



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104755935 A

(43) 申请公布日 2015. 07. 01

(21) 申请号 201380051263. 9

(51) Int. Cl.

(22) 申请日 2013. 08. 13

G01N 33/574(2006. 01)

(30) 优先权数据

G01N 33/53(2006. 01)

61/682462 2012. 08. 13 US

13/962494 2013. 08. 08 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2015. 03. 31

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/JP2013/072228 2013. 08. 13

(87) PCT国际申请的公布数据

W02014/027701 EN 2014. 02. 20

(71) 申请人 雅培日本有限公司

地址 日本千叶市

申请人 国立大学法人东京大学

(72) 发明人 N. 科施卡瓦 M. 纳卡加瓦

E. 尤施达 T. 尤施穆拉 M. 塞基

(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公

司 72001

代理人 杜艳玲 黄希贵

权利要求书5页 说明书33页 附图10页

(54) 发明名称

癌症的预后和诊断方法

(57) 摘要

提供了通过检测来自患者的样品中癌症的生物标志物的存在和 / 或量而诊断患者中的癌症的方法。所述方法和生物标志物可以用于开发对于具有癌症或怀疑具有癌症的患者的精确预后,或者精确地诊断具有癌症或怀疑具有癌症的患者。所述方法和生物标志物可以用于将患者鉴定和 / 或分类为用于癌症治疗的候选。

1. 用于为具有癌症或处于具有癌症的风险中的主体提供诊断、预后或风险分类的方法,所述方法包括以下步骤:

- a. 从所述主体获得包含血液的生物样品;
- b. 测定来自主体的生物样品中层粘连蛋白 γ -2 单体的浓度;
- c. 将来自所述样品的层粘连蛋白 γ -2 单体浓度与参考层粘连蛋白 γ -2 单体浓度值进行比较,其中样品中的层粘连蛋白 γ -2 单体浓度大于参考层粘连蛋白 γ -2 单体浓度值将所述主体鉴定为具有癌症或者具有发生癌症的增加风险。

2. 用于为主体提供癌症诊断、癌症预后或癌症风险分类的方法,所述方法包括以下步骤:

- a. 从所述主体获得包含血液的生物样品;
- b. 测定来自主体的生物样品中层粘连蛋白 γ -2 单体的浓度;
- c. 将来自样品的层粘连蛋白 γ -2 单体浓度与参考层粘连蛋白 γ -2 单体浓度值进行比较,其中样品中的层粘连蛋白 γ -2 单体浓度大于参考层粘连蛋白 γ -2 单体浓度值将所述主体鉴定为具有癌症或者具有发生癌症的增加风险。

3. 用于为具有癌症或处于具有癌症的风险中的主体提供诊断、预后或风险分类的方法,所述方法包括以下步骤:

- a. 从所述主体获得包含血液的生物样品;
- b. 测定来自主体的生物样品中层粘连蛋白 γ -2 单体的浓度;和
- c. 提供从 (b) 测定的浓度,以便当与参考层粘连蛋白 γ -2 单体浓度值相比时将所述主体鉴定为具有癌症或者具有发生癌症的增加风险。

4. 用于为具有癌症或处于具有癌症的风险中的主体提供诊断、预后或风险分类的方法,所述方法包括以下步骤:

- a. 从所述主体获得包含血液的生物样品;
- b. 测定来自主体的生物样品中层粘连蛋白 γ -2 单体的浓度;
- c. 将来自所述样品的层粘连蛋白 γ -2 单体浓度与参考层粘连蛋白 γ -2 单体浓度值进行比较;
- d. 提供来自 (c) 的比较,其中当所述比较包含大于参考层粘连蛋白 γ -2 单体浓度值的所述样品中的层粘连蛋白 γ -2 单体浓度时,所述比较将所述主体鉴定为具有癌症或者具有发生癌症的增加风险。

5. 用于为主体提供癌症诊断、癌症预后或癌症风险分类的方法,所述方法包括以下步骤:

- a. 从所述主体获得包含血液的生物样品;
- b. 测定来自主体的生物样品中层粘连蛋白 γ -2 单体的浓度;
- c. 将来自所述样品的层粘连蛋白 γ -2 单体浓度与参考层粘连蛋白 γ -2 单体浓度值进行比较;

d. 提供来自 (c) 的比较,其中当所述比较包含大于参考层粘连蛋白 γ -2 单体浓度值的所述样品中的层粘连蛋白 γ -2 单体浓度时,所述比较将所述主体鉴定为具有癌症或者具有发生癌症的增加风险。

6. 用于检测主体中的癌症的方法,其包括:

a. 测定来自所述主体的包含血液的样品中层粘连蛋白 γ -2 单体的浓度,其中所述层粘连蛋白 γ -2 单体的浓度通过使特异性结合层粘连蛋白 γ -2 单体的抗体与所述样品接触且检测抗体结合来测定;

其中,当来自所述主体的样品中层粘连蛋白 γ -2 单体的浓度相对于参考层粘连蛋白 γ -2 单体浓度更高时,检测到所述主体中的癌症。

7. 用于检测主体中的癌症的方法,其包括:

a. 测定来自所述主体的包含血液的样品中层粘连蛋白 γ -2 单体的浓度,其中所述层粘连蛋白 γ -2 单体的浓度通过使特异性结合层粘连蛋白 γ -2 单体的抗体与所述样品接触且检测抗体结合来测定;和

b. 将来自所述主体的样品中层粘连蛋白 γ -2 单体的浓度与参考层粘连蛋白 γ -2 单体浓度进行比较;

其中,当来自所述主体的样品中层粘连蛋白 γ -2 单体的浓度相对于参考层粘连蛋白 γ -2 单体浓度更高时,检测出所述主体中的癌症。

8. 用于诊断主体中的癌症的方法,其包括:

a. 测定来自所述主体的包含血液的样品中层粘连蛋白 γ -2 单体的浓度,其中所述层粘连蛋白 γ -2 单体的浓度通过使特异性结合层粘连蛋白 γ -2 单体的抗体与所述样品接触且检测抗体结合来测定;

其中,当来自所述主体的样品中层粘连蛋白 γ -2 单体的浓度相对于参考层粘连蛋白 γ -2 单体浓度更高时,诊断出所述主体中的癌症。

9. 用于诊断主体中的癌症的方法,其包括:

a. 测定来自所述主体的包含血液的样品中层粘连蛋白 γ -2 单体的浓度,其中所述层粘连蛋白 γ -2 单体的浓度通过使特异性结合层粘连蛋白 γ -2 单体的抗体与所述样品接触且检测抗体结合来测定;和

b. 将来自所述主体的样品中层粘连蛋白 γ -2 单体的浓度与参考层粘连蛋白 γ -2 单体浓度进行比较;

其中,当来自所述主体的样品中层粘连蛋白 γ -2 单体的浓度相对于参考层粘连蛋白 γ -2 单体浓度更高时,所述样品中层粘连蛋白 γ -2 单体的浓度表明癌症的诊断。

10. 用于预测主体中的癌症的方法,其包括:

a. 测定来自所述主体的包含血液的样品中层粘连蛋白 γ -2 单体的浓度,其中所述层粘连蛋白 γ -2 单体的浓度通过使特异性结合层粘连蛋白 γ -2 单体的抗体与所述样品接触且检测抗体结合来测定;

其中,当来自所述主体的样品中层粘连蛋白 γ -2 单体的浓度相对于参考层粘连蛋白 γ -2 单体浓度更高时,所述主体具有癌症的预测。

11. 用于预测主体中的癌症的方法,其包括:

a. 测定来自所述主体的包含血液的样品中层粘连蛋白 γ -2 单体的浓度,其中所述层粘连蛋白 γ -2 单体的浓度通过使特异性结合层粘连蛋白 γ -2 单体的抗体与所述样品接触且检测抗体结合来测定;和

b. 将来自所述主体的样品中层粘连蛋白 γ -2 单体的浓度与参考层粘连蛋白 γ -2 单体浓度进行比较;

其中,当来自所述主体的样品中层粘连蛋白 γ -2 单体的浓度相对于参考层粘连蛋白 γ -2 单体浓度更高时,所述样品中层粘连蛋白 γ -2 单体的浓度表明癌症的预测。

12. 权利要求 1-11 中任一项的方法,其进一步包括测定所述样品中癌症的至少一种额外生物标志物的浓度;和将所述至少一种额外生物标志物的浓度与所述至少一种生物标志物的参考浓度值进行比较。

13. 权利要求 12 的方法,其中所述癌症的额外生物标志物选自选自膀胱癌和结肠直肠癌的癌症的生物标志物。

14. 权利要求 13 的方法,其中所述额外生物标志物选自层粘连蛋白 γ -2 片段、癌胚抗原 (CEA) 和糖类抗原 19-9 (CA19-9)。

15. 权利要求 1-11 中任一项的方法,其中所述参考层粘连蛋白 γ -2 单体浓度值是对照样品的层粘连蛋白 γ -2 单体浓度值,或层粘连蛋白 γ -2 单体截止值。

16. 权利要求 15 的方法,其中所述参考层粘连蛋白 γ -2 单体浓度值是选自对照主体的生物样品和层粘连蛋白 γ -2 单体浓度标准品的对照样品的层粘连蛋白 γ -2 单体浓度。

17. 权利要求 15 的方法,其中所述参考层粘连蛋白 γ -2 单体浓度值选自对照样品的层粘连蛋白 γ -2 单体浓度值,和来自对照主体组的多个对照样品的中值或平均层粘连蛋白 γ -2 单体浓度。

18. 权利要求 15 的方法,其中所述样品中的层粘连蛋白 γ -2 单体浓度是参考层粘连蛋白 γ -2 单体浓度值的至少两倍。

19. 权利要求 15 的方法,其中所述参考层粘连蛋白 γ -2 单体浓度值是通过接受者操作曲线 (ROC) 分析从患者组的生物样品测定的层粘连蛋白 γ -2 单体截止值。

20. 权利要求 15 的方法,其中所述参考层粘连蛋白 γ -2 单体浓度值是通过患者组的生物样品的平均值加上 2 标准偏差分析测定的层粘连蛋白 γ -2 单体截止值。

21. 权利要求 15 的方法,其中所述参考层粘连蛋白 γ -2 单体浓度值是层粘连蛋白 γ -2 单体截止值,且为约 1000 pg/mL。

22. 权利要求 1-11 中任一项的方法,其中所述样品包含血清。

23. 权利要求 1-5 或 10-11 中任一项的方法,其中所述方法包括提供选自确定所述主体中癌症的严重性或阶段和所述主体将发生癌症的可能性的预测。

24. 权利要求 1-11 中任一项的方法,其中所述主体是人。

25. 权利要求 15 的方法,其中所述参考层粘连蛋白 γ -2 单体浓度值来自来自人对照主体的包含血液的生物样品。

26. 权利要求 1-11 中任一项的方法,其中所述来自主体的包含血液的生物样品选自全血、血浆和血清。

27. 权利要求 1-11 中任一项的方法,其中所述主体的生物样品是血浆或血清。

28. 权利要求 1-11 中任一项的方法,其中测定层粘连蛋白 γ -2 单体的浓度包括使用可以特异性结合层粘连蛋白 γ -2 单体的分子的免疫学方法。

29. 权利要求 28 的方法,其中可以结合层粘连蛋白 γ -2 单体的分子包含至少一种能够特异性结合层粘连蛋白 γ -2 单体的抗体。

30. 权利要求 29 的方法,其中可以结合层粘连蛋白 γ -2 单体的分子不结合层粘连蛋白 γ -2 的 N-末端片段。

31. 用于进行权利要求 1-11 中任一项的方法的试剂盒,所述试剂盒包含:

- a. 至少一种能够特异性结合层粘连蛋白 γ -2 单体的试剂,其允许定量生物样品中的层粘连蛋白 γ -2 单体浓度;和
- b. 指示参考层粘连蛋白 γ -2 单体浓度的参考标准品。

32. 权利要求 31 的试剂盒,其进一步包含至少一种能够结合生物样品中的癌症的至少一种额外生物标志物的额外试剂,所述额外试剂允许定量生物样品中的至少一种额外生物标志物的浓度,和指示生物样品中的癌症的至少一种额外生物标志物的参考浓度的参考标准品。

33. 权利要求 31 的试剂盒,其中所述至少一种试剂包含至少一种能够特异性结合层粘连蛋白 γ -2 单体的抗体。

34. 权利要求 1-30 中任一项的方法,其中所述癌症选自结肠直肠癌和膀胱癌。

35. 用于为主体提供癌症的诊断的方法,所述方法包括以下步骤:

- a. 从所述主体获得包含血液的生物样品;
- b. 提交血样样品用于测定来自主体的生物样品中层粘连蛋白 γ -2 单体的浓度;和
- c. 为主体提供所述主体是否具有癌症的诊断,其中所述诊断通过将步骤 b) 中测定的来自样品的层粘连蛋白 γ -2 单体浓度与参考层粘连蛋白 γ -2 单体浓度值进行比较而获得,其中如果样品中的层粘连蛋白 γ -2 单体浓度比参考层粘连蛋白 γ -2 单体浓度值更大,则为所述主体提供具有癌症的诊断,并且如果样品中的层粘连蛋白 γ -2 单体浓度比参考层粘连蛋白 γ -2 单体浓度更小,则为所述主体提供不具有癌症的诊断,并且如果为所述主体提供癌症的诊断,则指示主体寻求进一步的医学治疗。

36. 用于诊断主体中的癌症的方法,所述方法包括以下步骤:

- a. 从所述主体获得包含血液的生物样品;
- b. 提交血样样品用于测定来自主体的生物样品中层粘连蛋白 γ -2 单体的浓度;
- c. 通过将步骤 b) 中测定的来自样品的层粘连蛋白 γ -2 单体浓度与参考层粘连蛋白 γ -2 单体浓度值进行比较而将主体诊断为具有癌症或不具有癌症,其中如果样品中的层粘连蛋白 γ -2 单体浓度比参考层粘连蛋白 γ -2 单体浓度值更大,则主体被诊断为具有癌症,并且如果样品中的层粘连蛋白 γ -2 单体浓度比参考层粘连蛋白 γ -2 单体浓度更小,则主体被诊断为不具有癌症。

37. 用于为处于具有癌症的风险中的主体提供风险分类的方法,所述方法包括以下步骤:

- a. 从所述主体获得包含血液的生物样品;
- b. 提交血样样品用于测定来自主体的生物样品中层粘连蛋白 γ -2 单体的浓度;和
- c. 通过将步骤 b) 中测定的来自样品的层粘连蛋白 γ -2 单体浓度与参考层粘连蛋白 γ -2 单体浓度值进行比较而确定主体是否处于癌症的风险中,从而为主体提供风险分类,其中如果样品中的层粘连蛋白 γ -2 单体浓度比参考层粘连蛋白 γ -2 单体浓度值更大,则主体被确定为处于癌症的风险中,并且如果样品中的层粘连蛋白 γ -2 单体浓度比参考层粘连蛋白 γ -2 单体浓度更小,则主体被确定为不处于癌症的风险中。

38. 用于确定主体是否处于具有癌症的风险中的方法,所述方法包括以下步骤:

- a. 从所述主体获得包含血液的生物样品;

- b. 提交血样样品用于测定来自主体的生物样品中层粘连蛋白 γ -2 单体的浓度;和
- c. 通过将步骤 b) 中测定的来自样品的层粘连蛋白 γ -2 单体浓度与参考层粘连蛋白 γ -2 单体浓度值进行比较而确定主体是否处于癌症的风险中,其中如果样品中的层粘连蛋白 γ -2 单体浓度比参考层粘连蛋白 γ -2 单体浓度值更大,则主体被确定为处于癌症的风险中,并且如果样品中的层粘连蛋白 γ -2 单体浓度比参考层粘连蛋白 γ -2 单体浓度更小,则主体被确定为不处于癌症的风险中。

39. 权利要求 35-38 中任一项的方法,其中所述癌症选自消化系统癌症和泌尿系统癌症。

40. 权利要求 35-39 中任一项的方法,其中所述主体被诊断为具有结肠直肠癌或膀胱癌。

41. 权利要求 1-11 中任一项的方法,其中所述方法通过免疫测定进行。

42. 权利要求 41 的方法,其中所述免疫测定使用抗体,其中所述抗体是单克隆抗体 2H2。

43. 用于测定来自主体的血液样品中层粘连蛋白 γ -2 单体的浓度的方法,所述方法包括从主体获得血液样品和测定血液样品中层粘连蛋白 γ -2 单体的浓度的步骤。

44. 权利要求 43 的方法,其中所述方法通过免疫测定进行。

45. 权利要求 44 的方法,其中所述免疫测定采用抗体,并且所述抗体是单克隆抗体 2H2。

癌症的预后和诊断方法

[0001] 本申请要求 2012 年 8 月 13 日申请的美国临时申请号 61/682,462 的优先权,所述申请以其整体通过引用并入本文。

技术领域

[0002] 本公开涉及用于通过检测患者中的生物标志物以及测定其量来确定患者中癌症的预后、诊断或风险鉴定的方法和免疫测定平台。生物标志物可以用于鉴定具有癌症的患者,鉴定患者作为癌症治疗的候选,分类患者发生癌症的风险,或分类患者的癌症阶段或癌症进展的风险,以及确定诊断、预后或治疗方案。

[0003] 背景

癌症仍然是发达国家中成人的发病率和死亡率的一个显著原因。在一些情况下,癌症治疗的改善已经能够增加患者从诊断到死亡的存活时间。然而,癌症治疗的总体成功经常取决于疾病的早期检测,这允许治疗在原发性肿瘤扩展和 / 或转移性生长发生之前开始。因此,提供癌症的早期和 / 或更准确诊断的方法和测定是期望的,因为此类方法和测定可以允许早期治疗干预,并且可以改善患者后果(例如,生活质量,生存预期等)。

[0004] 层粘连蛋白是在基底层中发现的一组异源三聚体蛋白,并且形成基底膜的部分。这些蛋白基于三种不同的多肽分类,所述不同的多肽与彼此复合以形成层粘连蛋白结构。这三种多肽被鉴定为 α (α) 链、 β (β) 链和 γ (γ) 链,并且各自具有几个分子种类(例如, $\alpha 1-\alpha 5$ 、 $\beta 1-\beta 3$ 和 $\gamma 1-\gamma 2$)。层粘连蛋白 5(或 LN5) 已知存在于基底层,且在位于上皮细胞和支持上皮细胞的结缔组织之间的基底膜中是丰富的。LN5 的结构在已知层粘连蛋白中是独特的,因为它是具有包括 $\gamma 2$ ($\gamma 2$) 链的结构的唯一的层粘连蛋白,其当与 $\alpha 3$ 链和 $\beta 3$ 链复合时形成 LN5。在生理上, LN5 已知由上皮细胞产生,并且可以促进细胞粘附、增殖、分化和 / 或迁移。例如,当 LN5 从上皮细胞分泌时,它易受蛋白酶降解(例如,由膜 -1 型基质金属蛋白酶 -1 (MT1-MMP))。在一些情况下, LN5 朝着 $\gamma 2$ 链序列的 N 末端处理,以生成具有 EGF 样活性(包括促进细胞迁移和侵袭)的片段 [Koshikawa, 等人, *J. Cell Biol.*, (2000) 148:615-624]。

[0005] 用于检测 LN5(包括其加工形式)的现有方法主要聚焦于组织学方法(例如,组织的免疫染色)、尿分析或蛋白水解片段(例如, N 末端片段)的检测,并且没有提供用于检测层粘连蛋白 $\gamma 2$ 单体的便利和 / 或灵敏的方法。

[0006] 发明概述

在一个方面,本公开提供了用于为具有癌症或处于具有癌症的风险中的主体提供诊断、预后或风险分类的方法,所述方法包括以下步骤:从所述主体获得包含血液的生物样品;测定来自主体的生物样品中层粘连蛋白 $\gamma 2$ 单体的浓度;将来自样品的层粘连蛋白 $\gamma 2$ 单体浓度与参考层粘连蛋白 $\gamma 2$ 单体浓度值进行比较,其中样品中的层粘连蛋白 $\gamma 2$ 单体浓度大于参考层粘连蛋白 $\gamma 2$ 单体浓度值将所述主体鉴定为具有癌症或者具有发生癌症的增加风险。

[0007] 在一个方面,本公开涉及用于为具有癌症或处于具有癌症的风险中的主体提供诊

断、预后或风险分类的方法,所述方法包括以下步骤:从所述主体获得包含血液的生物样品;测定来自主体的生物样品中层粘连蛋白 γ -2 单体的浓度;和提供层粘连蛋白 γ -2 单体的浓度,以便当与参考层粘连蛋白 γ -2 单体浓度值相比时将所述主体鉴定为具有癌症或者具有发生癌症的增加风险。

[0008] 在一个进一步方面,本公开涉及用于为具有癌症或处于具有癌症的风险中的主体提供诊断、预后或风险分类的方法,所述方法包括以下步骤:从所述主体获得包含血液的生物样品;测定来自主体的生物样品中层粘连蛋白 γ -2 单体的浓度;将来自样品的层粘连蛋白 γ -2 单体浓度与参考层粘连蛋白 γ -2 单体浓度值进行比较;并且提供比较,其中当所述比较包括样品中的层粘连蛋白 γ -2 单体浓度大于参考层粘连蛋白 γ -2 单体浓度值时,所述比较将所述主体鉴定为具有癌症或者具有发生癌症的增加风险。

[0009] 在另一个方面,本公开提供了用于检测、诊断或预后主体中的癌症的方法,其包括测定来自主体的包含血液的样品中层粘连蛋白 γ -2 单体的浓度,其中层粘连蛋白 γ -2 单体的浓度通过使特异性结合层粘连蛋白 γ -2 单体的抗体与样品接触,并且检测抗体结合,并且其中,当来自主体的样品中层粘连蛋白 γ -2 单体的浓度相对于参考层粘连蛋白 γ -2 单体浓度更高时,癌症在主体中得到检测、诊断或预后。

[0010] 在又另一个方面,本公开提供了用于检测、诊断或预后主体中的癌症的方法,其包括测定来自主体的包含血液的样品中层粘连蛋白 γ -2 单体的浓度,其中层粘连蛋白 γ -2 单体的浓度通过使特异性结合层粘连蛋白 γ -2 单体的抗体与样品接触且检测抗体结合来测定;并且将来自主体的样品中层粘连蛋白 γ -2 单体的浓度与参考层粘连蛋白 γ -2 单体浓度进行比较,其中,当来自主体的样品中层粘连蛋白 γ -2 单体的浓度相对于参考层粘连蛋白 γ -2 单体浓度更高时,癌症在主体中得到检测、诊断或预后。

[0011] 在实施方案中,上述方面的方法可以进一步包括检测样品中的至少一种额外的癌症生物标志物。在所述方法的实施方案中,提供诊断可以是提供癌症(诸如,例如,膀胱癌或结肠直肠癌)的诊断。在所述方法的其他实施方案中,提供预后可以是确定癌症疾病阶段,或可以是确定主体将发生癌症诸如,例如,膀胱或结肠直肠癌的攻击性或侵袭性形式的可能性或风险。

[0012] 所述方法可以进一步包括评价选自以下的至少一种癌症的额外生物标志物:层粘连蛋白 γ -2 片段(例如,EGF 样片段)、癌胚抗原(CEA)、糖类抗原 19-9(也称为癌抗原 19-9,或 CA19-9)等。额外生物标志物的评估可包括,例如,测量来自主体的生物样品中生物标志物的浓度,或可包括主体的临床评估。对于通过测量来自主体的生物样品中的生物标志物的浓度而评估的额外生物标志物,此方法可进一步包括将至少一种额外生物标志物的测量浓度与所述生物标志物的参考值进行比较。本文公开的方法中使用的任何其他生物标志物的参考值可以涉及对照样品的所述生物标志物浓度、生物标志物截止值,或来自对照主体组的多个对照样品的中值浓度,等。

[0013] 在一个方面,本公开提供了用于将主体鉴定为膀胱癌或结肠直肠癌治疗方案的候选的方法,所述方法包括测定来自主体的包含血清的生物样品中层粘连蛋白 γ -2 单体的浓度,并且将样品中的层粘连蛋白 γ -2 单体浓度与参考层粘连蛋白 γ -2 单体浓度值进行比较,其中当样品中的层粘连蛋白 γ -2 单体浓度大于参考层粘连蛋白 γ -2 单体浓度值时,将所述主体鉴定为癌症治疗方案的候选。在实施方案中,所述方法可以进一步包括检测样

品中的至少一种额外的癌症生物标志物。

[0014] 在另一个实施方案中,本公开提供了用于诊断、预后和 / 或风险分类具有癌症诸如例如膀胱癌或结肠直肠癌或处于具有癌症诸如例如膀胱癌或结肠直肠癌的风险中的主体的方法,其中所述方法包括检测相对于不具有癌症的对照主体的主体中增加的层粘连蛋白 γ -2 单体浓度。

[0015] 在任何一种本文所述方法中,层粘连蛋白 γ -2 单体参考值可以是对照样品的层粘连蛋白 γ -2 单体浓度,或层粘连蛋白 γ -2 单体截止值。层粘连蛋白 γ -2 单体浓度可以是,例如,血液(例如,血浆或血清)中层粘连蛋白 γ -2 单体浓度的参考值。对样品可以是对照主体的生物样品,或层粘连蛋白 γ -2 单体标准品。对样品的层粘连蛋白 γ -2 单体浓度可以是,例如,来自对照主体组的多个对样品的中值层粘连蛋白 γ -2 单体浓度。或者,可以通过对患者组的生物样品的接受者操作曲线(ROC)分析而测定层粘连蛋白 γ -2 单体截止值。或者,可以通过患者组的生物样品的四分位数分析(quartile analysis)而测定层粘连蛋白 γ -2 单体截止值。又进一步或者,层粘连蛋白 γ -2 单体截止值可以通过患者组的生物样品的平均值加上两个标准偏差分析来确定。例如,层粘连蛋白 γ -2 单体截止值可以通过选择对应于由具有癌症(诸如,例如,膀胱癌或结肠直肠癌)的患者组成的患者组的中值的值来确定,所述值可为约 900- 至约 1000 pg/ml 血清。或者,层粘连蛋白 γ -2 单体截止值可以通过选择对应于由具有膀胱癌或结肠直肠癌的患者组成的患者组的第 75 百分位数的值来确定,所述值可为例如约 1,100 至约 1,400 pg/mL 血清。在其他实施方案中,适当的截止值可为约 70 pg/mL 至约 2,500 pg/mL 血清。例如,约 1,000 pg/mL 血清的截止值可以用于区分膀胱癌或结肠直肠癌样本和正常样本。类似截止值可用于血浆和全血样品。

[0016] 在任何方法中,所述方法可以经由免疫测定法进行。在此类免疫测定法中采用的抗体的实例为单克隆抗体 2H2。

[0017] 在任何所述方法中,主体可以是人主体,且主体的生物样品和 / 或对照样品可取自人主体。在任何所述方法中,生物样品可以是来自组织或体液,包括,例如,全血、血浆或血清,或其任何细胞培养悬液或级分中的任何一种。在本文所述方法的一些实施方案中,所述样品是全血、血浆或血清,合适地血浆或血清。可向任何外周血样品添加凝结抑制剂。在所述方法中,可通过免疫测定法进行层粘连蛋白 γ -2 单体和任选的所述至少一种额外生物标志物的浓度的测定,在所述免疫测定法中,使用能够特异性结合层粘连蛋白 γ -2 单体的试剂,和任选地,能够特异性结合所述额外生物标志物的试剂。

[0018] 在另一个方面,本公开提供了用于进行本文公开的任何方法和测定的试剂盒,其中,所述试剂盒包括能够特异性结合层粘连蛋白 γ -2 单体的至少一种试剂,允许定量来自主体的生物样品中的层粘连蛋白 γ -2 单体浓度;和指示层粘连蛋白 γ -2 单体参考浓度的参考标准品。在用于进行用于提供具有癌症(例如,膀胱癌或结肠直肠癌)或在具有癌症(例如,膀胱癌或结肠直肠癌)风险之中的主体的诊断、预后或风险分级的方法的试剂盒中,所述试剂盒可进一步包含能够特异性结合生物样品中的癌症的至少一种额外生物标志物的至少一种试剂,允许定量生物样品中的所述至少一种额外生物标志物的浓度;以及指示生物样品中的癌症的所述至少一种额外生物标志物的参考浓度的参考标准品。在任何所述试剂盒中,所述能够特异性结合层粘连蛋白 γ -2 单体的至少一种试剂可包含能够特

异性结合层粘连蛋白 γ -2 单体的至少一种抗体。在一些实施方案中,所述试剂盒适于与 ELISA 测定一起使用。

[0019] 附图简述

图 1 描绘了各种样本(膀胱癌、胰腺癌、卵巢癌、结肠癌、胃癌、食管癌;和对照样品)中层粘连蛋白 γ -2 单体的血清浓度(pg/mL)。图 1A 和 1B 描绘了相同数据,其中图 1B 放大了 0 pg/mL 至 2000 pg/mL 浓度范围的 y 轴。标明了平均浓度(实线)和一个标准偏差(虚线)。

[0020] 图 2 是生物标志物癌胚抗原(CEA)、糖类抗原 19-9(CA19-9)和层粘连蛋白 γ -2 单体(层粘连蛋白 γ -2)的接受者工作特征(ROC)图。图 2A 描绘了膀胱癌中的生物标志物。图 2B 描绘了结肠直肠癌中的生物标志物。

[0021] 图 3 描绘了单克隆抗体 D4B5 和 2H2(各自为 1 μ g/mL)的 Western 印迹分析的结果。所述数据显示,单克隆抗体 2H2 特异性结合层粘连蛋白 γ -2 单体,并且当其形成层粘连蛋白 5 复合物时不结合层粘连蛋白 γ -2 单体。

[0022] 图 4 是来自使用 2H2 单克隆抗体和层粘连蛋白 γ -2 单体(“g-2”)的各种稀释液和来自正常样本(ABS001)的测定基质的稀释测定实验的数据组的图形表示。

[0023] 图 5 说明了层粘连蛋白 γ -2 单体 ELISA。图 5A 描绘了本文所述的实施方案中使用的一般 ELISA 测定法的示意图。图 5B 描绘了 0 - 4,000 pg/mL 的浓度范围之间的层粘连蛋白 γ -2 单体 ELISA 标准曲线。分析灵敏度被测定为 3.7 pg/mL。

[0024] 图 6 说明了使用掺入重组层粘连蛋白 γ -2 单体的样品稀释液的 ARCHITECT 测定的分析灵敏度。

[0025] 图 7 说明了使用正常样本的稀释线性的进一步评估的结果。

[0026] 图 8 说明了正常样本中层粘连蛋白 γ -2 单体水平的测量。

[0027] 发明详述

本公开基于几个意料之外的开发和发现。在一个一般意义上,本公开涉及层粘连蛋白 γ -2 单体作为用于诊断、预后和风险分类某些癌症(诸如,例如,膀胱癌和结肠直肠癌)的生物标志物的用途。在另一个一般意义上,本公开涉及令人惊讶地开发提供包含血液(例如全血、血浆或血清)的生物样品中层粘连蛋白 γ -2 单体的检测的方法、测定和试剂盒。总之,这些意料之外的发现提供了相比于现有的方法和测定具有显著优势的方法和测定和用于一般测量和定量层粘连蛋白 γ -2 单体及其片段的测定。因此,本公开鉴定了具有某些癌症(包括膀胱癌和结肠直肠癌)的患者(例如,具有癌症的主体,具有发生癌症的增加风险的主体,将主体鉴定为用于癌症治疗的候选)中增加的(即,更高的)层粘连蛋白 γ -2 单体血清水平之间的新颖关联。如本文中总体通过几个非限制性实施方案的例举所公开,包含血液的生物样品中层粘连蛋白 γ -2 单体的增加浓度或水平的存在可以与癌症(例如,结肠直肠癌和/或膀胱癌)相关。层粘连蛋白 γ -2 单体的增加血液水平和癌症之间的关联是稳健的,预测癌症的疾病阶段、疾病发作、临床进展和/或疾病严重度。与现有的方法和测定(例如,其依赖于基于患者尿排出量和/或层粘连蛋白 γ -2 单体蛋白水解加工为其 EGF 样片段测量层粘连蛋白 γ -2 单体)相反,本文提供的方法和测定的实施方案包括可以从任何主体容易地获得的简单且方便的步骤。血液中层粘连蛋白 γ 2 的评价水平可以因此改善现有方法和测定,其用于诊断癌症,提供癌症治疗或癌症严重度的预后,和/或分级

(stratify) 或鉴定发生癌症的患者风险,由此显著使具有癌症或处于发生癌症的风险的患者受益。此外,层粘连蛋白 γ 2 单体和额外的生物标志物的联合使用可以提供额外的优点。

[0028] 因此,本公开提供了使用层粘连蛋白 γ -2 单体作为临床生物标志物诊断、预后或风险分类 / 鉴定具有癌症诸如膀胱癌或结肠直肠癌或处于具有癌症诸如膀胱癌或结肠直肠癌的风险的主体或主体组的方法。还提供了鉴定用于癌症治疗方案,诸如针对膀胱癌或结肠直肠癌的治疗的候选主体或候选主体组的方法,其中所述方法利用层粘连蛋白 γ 2 单体作为生物标志物。本公开还提供了用于实施所公开的方法的试剂盒。

[0029] 本段落和本文中整个公开中使用的段落标题仅仅用于组织的目的,并且不旨在进行限制。

[0030] A. 定义

除非上下文另有清楚地规定,否则,本文使用的单数形式“一个 / 种 (a)”、“一个 / 种 (an)”和“该 (the)”包括复数所指物。对于本文所述的数字范围,在所述范围之间具有相同精确度的每个中间数值均明确地考虑在内。例如,对于 6-9 的范围,除了 6 和 9 之外,数字 7 和 8 也考虑在内,且对于 6.0-7.0 的范围,数字 6.0、6.1、6.2、6.3、6.4、6.5、6.6、6.7、6.8、6.9 和 7.0 均明确地考虑在内。

[0031] 除非另有指明,否则,“或”的应用意指“和 / 或”。此外,术语“包括 (including)”和“具有 (having)”以及那些术语的其他形式(诸如“包括 (includes)”、“包括 (included)”、“具有 (has)”和“具有 (have)”)的应用没有限定性。

[0032] “组分”、“多种组分”或“至少一种组分”一般是指捕获抗体、检测或缀合校准物(calibrator)、对照、灵敏度实验对象组(sensitivity panel)、容器、缓冲液、稀释剂、盐、酶、酶的辅因子、检测试剂、预处理试剂 / 溶液、底物(例如作为溶液)、终止溶液等,根据本文所述方法和其他本领域已知方法,其可以包括于用于测试样品(诸如患者尿、血液、血清或血浆样品)测定的试剂盒中。一些组分可以在溶液中或者被冻干以重构用于测定中。

[0033] 当是指组合物时,如本文所使用的“对照”可以是指已知不含目标分析物(“阴性”),例如,层粘连蛋白 γ -2 单体(层粘连蛋白 γ -2 单体或层粘连蛋白的 γ -2 单体的变体或其组合)的组合物;或含有目标分析物(“阳性对照”),例如,层粘连蛋白 γ -2 单体(诸如人层粘连蛋白 γ 2 单体、层粘连蛋白 γ -2 单体的变体或其任何组合)的组合物。阳性对照可以包含已知浓度的层粘连蛋白 γ 2 单体。“对照”、“阳性对照”和“校准物”在本文可以互换使用,以指包含已知浓度层粘连蛋白 γ 2 单体的组合物。“阳性对照”可用于确立测定性能特征,并且是试剂(例如分析物)完整性的有用指示物。“正常对照”或“健康对照”可以是指取自不具有癌症或不处于发生癌症的风险的主体或实际主体的样品或样本。

[0034] 如本文所使用的术语“层粘连蛋白 gamma -2 单体”、“层粘连蛋白 -5 gamma -2 单体”、“LN-5 gamma -2 单体”、“gamma -2 单体”、“gamma -2”、“g-2 单体”或其中“ γ ”符号代替词语“gamma”或字母“g”的任何前述术语都是可互换的,并且是指构成层粘连蛋白 -5(也被称为“缠蛋白”和“nicein”等其他同义词)的多肽链之一,并且被标识为 γ -2 分子种类(与 γ -1 种类对比)的 gamma (γ) 链(与 alpha (α) 和 beta (β) 链相比)。在一些实施方案中,层粘连蛋白 γ -2 单体可以涉及任何层粘连蛋白 γ -2 单体序列,包括氨基酸序列(例如,蛋白、多肽、肽(前体或成熟)、融合体、衍生物、变体等,或编码此类氨基酸序列的核酸序列(例如,DNA 或 RNA 片段、截短物、融合体、衍生物、SNP、变体等)。层粘连蛋白 γ -2

单体可以来自任何生物体,并且在一些实施方案中,包含来自高等真核生物(包括哺乳动物)的氨基酸序列。在一些非限制性实施方案中,层粘连蛋白 γ -2 单体可以选自人(包括同种型 a 和 b, UniProtKB/Swiss-Prot:Q13753; RefSeq NP_005553.2)、小鼠(小家鼠 (*M. musculus*), UniProt:E9Q7G3; RefSeq NP_032511.3)、大鼠(褐家鼠 (*R. norvegicus*), GenBank:NP_001094110 (前体蛋白); UniProtKB/TrEMBL:F1LRH4)和鸡 (*G. gallus*, GenBank AAS92197; UniProtKB/TrEMBL Q6PVZ6 (部分序列))、以及蝇和蠕虫中任一种。

[0035] 在一些实施方案中,层粘连蛋白 γ -2 单体包含人层粘连蛋白 γ -2 单体(由 GenBank 登录号 NM_005562 (mRNA) 编码,或与 UniProtKB 登录号 Q13753 相关的氨基酸序列)。在人中,层粘连蛋白 γ -2 单体(或“LAMC2”)的基因位于染色体 1 的 q 臂 (1q25.3) 上。人层粘连蛋白 γ -2 单体序列可以包括前体蛋白序列,所述前体蛋白序列包括信号肽(通常为氨基酸 1-21),所述信号肽被切割下来以生成成熟分泌蛋白(氨基酸 22-1193)。层粘连蛋白 γ -2 单体还可以涵盖任何融合蛋白以及任何氨基酸序列变体。如上所示,层粘连蛋白 γ -2 单体对于层粘连蛋白 5 是独特的,其主要位于基底层和基底膜。

[0036] 如本文所使用的“标记”和“可检测的标记”是指结合至抗体或分析物以使得抗体和分析物之间的反应可检测的部分,并且如此标记的抗体或分析物被称为“可检测标记的”。标记可以产生可通过视觉或仪器装置检测的信号。各种标记包括产生信号的物质,诸如色原、荧光化合物、化学发光化合物、放射性化合物等。代表性标记实例包括产生光的部分,例如吖啶鎓 (acridinium) 化合物,以及产生荧光的部分,例如荧光素。其他标记如本文所述。在这方面,所述部分自身可不是可检测的,但是与另一个部分反应后,可变得可检测。术语“可检测标记的”的使用旨在涵盖此类标记。

[0037] 可以使用本领域已知的任何合适的可检测标记。例如,可检测标记可以是放射性标记(诸如 ^3H 、 ^{125}I 、 ^{35}S 、 ^{14}C 、 ^{32}P 、和 ^{33}P)、酶促标记(诸如辣根过氧化物酶、碱性磷酸酶、葡糖 6-磷酸脱氢酶等)、化学发光标记(诸如吖啶鎓酯 (acridinium esters)、硫酯、或磺胺;鲁米诺、异氨基苯二酰肼、菲啶鎓酯 (phenanthridinium esters) 等)、荧光标记(诸如荧光素(例如 5-荧光素、6-羧基荧光素、3'-6-羧基荧光素、5(6)-羧基荧光素、6-六氯-荧光素、6-四氯荧光素、异硫氰酸荧光素等))、罗丹明、藻胆蛋白、R-藻红蛋白、量子点(例如硫化锌加帽的 (capped) 硒化镉)、温度测量标记、或免疫-聚合酶链式反应标记。标记、标记程序和标记的检测的介绍见于 Polak 和 Van Noorden, *Introduction to Immunocytochemistry*, 第二版, Springer Verlag, N.Y. (1997), 以及 Haugland, *Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals*(1996), 其是由 Molecular Probes, Inc., Eugene, Oregon 出版的组合手册和目录。荧光标记可用于 FPIA (参见,例如美国专利号 5,593,896, 5,573,904, 5,496,925, 5,359,093, 和 5,352,803,其在此以其整体通过引用并入)。吖啶鎓化合物可以在均质化学发光测定中用作可检测标记(参见,例如 Adamczyk 等人, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 16: 1324-1328 (2006); Adamczyk 等人, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 4: 2313-2317 (2004); Adamczyk 等人, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 14: 3917-3921 (2004); 和 Adamczyk 等人, *Org. Lett.* 5: 3779-3782 (2003))。

[0038] 在一个方面,吖啶鎓化合物是吖啶鎓 -9-甲酰胺。制备吖啶鎓 -9-甲酰胺的方法描述于 Mattingly, *J. Biolumin. Chemilumin.* 6: 107-114 (1991); Adamczyk 等人, *J. Org. Chem.* 63: 5636-5639 (1998); Adamczyk 等人, *Tetrahedron* 55:

10899-10914 (1999); Adamczyk 等人, *Org. Lett.* 1: 779-781 (1999); Adamczyk 等人, *Bioconjugate Chem.* 11: 714-724 (2000); Mattingly 等人, In *Luminescence Biotechnology: Instruments and Applications*; Dyke, K. V. Ed.; CRC Press: Boca Raton, pp. 77 - 105 (2002); Adamczyk 等人, *Org. Lett.* 5: 3779-3782 (2003); 以及美国专利号 5,468,646、5,543,524 和 5,783,699 (其各自对于其关于其的教导以其整体并入本文)。

[0039] 吖啶鎓 (acridinium) 化合物的另一个实例是吖啶鎓-9-甲酸芳基酯。式 II 的吖啶鎓-9-甲酸芳基酯的一个实例是 10-甲基-9-(苯氧基羰基)吖啶鎓氟磺酸酯 (可获自 Cayman Chemical, Ann Arbor, MI)。制备吖啶鎓-9-甲酸芳基酯的方法描述于 McCapra 等人, *Photochem. Photobiol.* 4: 1111-21 (1965); Razavi 等人, *Luminescence* 15: 245-249 (2000); Razavi 等人, *Luminescence* 15: 239-244 (2000); 以及美国专利号 5,241,070 (其各自对于其关于其的教导以其整体并入本文)。此类吖啶鎓-9-甲酸芳基酯在信号的强度和 / 或信号的快速性方面是过氧化氢的有效化学发光指示剂,过氧化氢在由至少一种氧化酶对分析物的氧化中产生。吖啶鎓-9-甲酸芳基酯的化学发光发射的过程迅速完成,即,在小于 1 秒内,而吖啶鎓-9-甲酰胺的化学发光发射延长超过 2 秒。然而,吖啶鎓-9-甲酸芳基酯在蛋白存在的情况下失去了其化学发光特性。因此,其使用合适地包括信号生成和检测过程中不存在蛋白。用于分离或去除样品中的蛋白的方法对于本领域技术人员是众所周知的,并且包括,但不限于,超滤、提取、沉淀、透析、层析和 / 或消化 (参见,例如, Wells, *High Throughput Bioanalytical Sample Preparation. Methods and Automation Strategies*, Elsevier (2003))。从测试样品去除或分离的蛋白的量可以是约 40%、约 45%、约 50%、约 55%、约 60%、约 65%、约 70%、约 75%、约 80%、约 85%、约 90%、或约 95%、或至少约 40%、至少约 45%、至少约 50%、至少约 55%、至少约 60%、至少约 65%、至少约 70%、至少约 75%、至少约 80%、至少约 85%、至少约 90% 或至少约 95%。关于吖啶鎓-9-甲酸芳基酯及其用途的进一步细节描述于 2007 年 4 月 9 日提交的美国专利申请号 11/697,835。吖啶鎓-9-甲酸芳基酯可以溶解在任何合适的溶剂,诸如脱气无水 *N,N*-二甲基甲酰胺 (DMF) 或含水胆酸钠。

[0040] “预定截止 (cutoff)”和“预定水平”通常是指测定截止值,其用于通过将测定结果与预定截止 / 水平比较,来评估诊断、预后或治疗效力结果,其中预定截止 / 水平已经与各种临床参数 (例如疾病的存在、疾病阶段、疾病严重度、疾病进展、非进展或改进等) 联系或相关。本公开提供了示例性预定水平。然而,众所周知,截止值可能依赖于免疫测定的性质 (例如采用的抗体、反应条件、样品纯度等) 而变化。进一步完全在本领域技术人员的一般能力内的是,基于公开提供的描述将本文的公开针对其他免疫测定进行调整以获得关于那些其他免疫测定的免疫测定特异性截止值。尽管测定之间预定截止 / 水平的精确值可不同,但本文所述的相关性应当是普遍适用的。

[0041] 如在本文所述的诊断或预后测定中所使用的,“预处理试剂”,例如裂解、沉淀和 / 或增溶试剂,是将存在于测试样品中的任何细胞裂解和 / 或任何分析物增溶的试剂。如本文进一步所述,不是所有样品都需要预处理。此外,增溶分析物 (例如层粘连蛋白 γ -2 单体) 引起该分析物从存在于样品 (诸如,血液样品) 中的任何内源结合蛋白释放 (例如,解离或结合减少)。预处理试剂可以是均质的 (不要求分离步骤) 或异质的 (要求分离步

骤)。使用异质性预处理试剂时,在进行到测定的下一个步骤前,从测试样品将任何沉淀的分析物结合蛋白取出。预处理试剂任选地可以包含:(a)一种或多种溶剂和盐,(b)一种或多种溶剂、盐和去污剂,(c)去污剂,(d)去污剂和盐,或(e)适合于细胞裂解和/或分析物的增溶的任何试剂或试剂组合。

[0042] 在本文所述免疫测定和试剂盒上下文中,“质量控制试剂”包括但不限于校准物、对照、和灵敏度实验对象组。为了确立校准(标准)曲线以内推(interpolation)分析物(诸如抗体或分析物)的浓度,通常使用“校准物”或“标准品”(例如,一种或多种,诸如多种)。或者,可以使用接近预定阳性/阴性截止的单个校准物。可以共同使用多个校准物(即,多于一个校准物或不同量的校准物),从而构成“灵敏度实验对象组”。

[0043] “样品”、“测试样品”、“样本”、“来自主体的样品”和“患者样品”在本文中可以互换使用。样品,诸如血液、组织、尿、血清、血浆、羊水、脑脊髓液、胎盘细胞或组织、内皮细胞、白细胞或单核细胞的样品,可以如从患者获得直接使用,或者可以预处理,诸如通过过滤、蒸馏、提取、浓缩、离心、灭活干扰组分、添加试剂等,以便如本文讨论或另外以如本领域已知的一些方式修改样品的特征。

[0044] “校准组合物的系列”是指包含已知浓度的层粘连蛋白 γ -2单体的多种组合物,其中每种组合物与系列中的其他组合物的不同在于层粘连蛋白 γ -2单体的浓度。

[0045] “特异性结合伴侣”涉及特异性结合对的成员。特异性结合对包含两个不同的分子,它们通过化学或物理方式彼此特异性结合。因此,除了普通免疫测定的抗原和抗体特异性结合对以外,其他特异性结合对可以包括生物素和抗生物素蛋白(或链霉抗生物素蛋白)、碳水化合物和凝集素、互补核苷酸序列、效应物与受体分子、辅因子和酶、酶和酶抑制物等。此外,特异性结合对可以包括作为最初特异性结合成员类似物的成员,例如分析物-类似物。免疫反应性特异性结合成员包括抗原、抗原片段和抗体,包括单克隆抗体和多克隆抗体及其复合物和其片段,无论是分离的还是重组产生的。

[0046] 如本文所使用的“示踪剂”是指缀合至标记的分析物或分析物片段,诸如缀合至荧光素部分的层粘连蛋白 γ -2单体,其中缀合至标记的分析物可以有效地与分析物竞争对于分析物特异性的抗体上的位点。

[0047] 如本文所使用的术语“癌症”是指与失调的细胞增殖、生长、侵袭和转移或质量相关的任何恶性疾病(例如,血管生成、肿瘤、或致瘤性细胞生长)。在一些实施方案中,癌症可以包含膀胱癌或结肠直肠癌。

[0048] 通常,膀胱癌源于膀胱内衬细胞(称为移行细胞),并且基于它们肿瘤生长的方式进行分类。乳头状瘤外观是疣样的且附着于柄。非乳头状(无柄)肿瘤很少见,但更具侵袭性,并且通常与糟糕结果相关。许多风险因素与发生膀胱癌的增加可能性相关,包括吸烟、暴露于化学品、长期膀胱感染以及化疗药物环磷酰胺和放射治疗。

[0049] 膀胱癌通常与许多症状相关,所述症状可以包括腹痛、尿血、骨痛、疲劳、排尿时疼痛、尿频和/或尿急、尿失禁和体重减轻。用于检测膀胱癌的现有测试包括腹部CT扫描、盆腔CT扫描、膀胱穿刺活检、膀胱镜、静脉肾盂造影、尿分析和尿细胞学。膀胱癌通常被分期为0至IV的标度,其中0期涉及仅在膀胱内衬的非侵袭性肿瘤;I期涉及渗透穿过膀胱内衬,但不到达膀胱的肌肉层;II期涉及肿瘤到达肌肉层;III期涉及肿瘤渗透穿过肌肉进入膀胱周围的组织;且IV期涉及转移性疾病(例如,至邻近淋巴结或远程部位)。当膀胱癌

扩散时,它经常首先在器官和组织(包括前列腺、直肠、尿管、子宫和阴道)中看到。转移性膀胱癌经常涉及骨、肝和/或肺。

[0050] 治疗通常基于疾病的不同阶段,其中 0 期和 I 期疾病的治疗包括手术切除肿瘤(例如,局部部分切除)与专门针对膀胱的化疗和/或免疫治疗。在 II 期和 III 期,治疗可以涉及膀胱的部分或完全切除,随后辐射和化疗,手术前化疗以试图在手术前缩小肿瘤,或对于不符合手术的患者放疗和化疗组合。在 IV 期,膀胱癌通常被认为是终末的,且治疗过程通常包括化疗。

[0051] 具有 0 期或 I 期膀胱癌的患者具有相当好的预后。尽管存在癌症将回复的高风险,但回复的大多数膀胱癌可以手术切除且治愈。具有 III 期肿瘤的人的治愈率小于 50%。具有 IV 期膀胱癌的患者很少治愈。

[0052] 在一些实施方案中,癌症可以包含结肠直肠(或结肠)癌,其通常是源于大肠(结肠)或直肠(结肠的末端)的癌。在美国,结肠直肠癌经常被引用为癌症相关死亡的主要原因之一。早期诊断经常与疾病的完全治愈相关。尽管不存在结肠癌的单一原因,但几乎所有结肠癌都作为息肉起源,所述息肉初始是良性的,并且缓慢发展为恶性癌症。与结肠直肠癌相关的风险因素包括年龄(大于 60 岁)、吸烟、饮酒、红色和/或加工肉类高的饮食、结肠直肠息肉、炎性肠病(例如,溃疡性结肠炎或克罗恩病)、结肠直肠癌的家族史、遗传易感性包括 Lynch 综合征和家族性腺瘤性息肉病(FAP)。

[0053] 在许多情况下,结肠直肠癌可以表现出没有任何症状。然而,一些病例还呈现腹痛和压痛、便血、腹泻,便秘、大便狭窄和不明原因的体重减轻。如上所示,结肠直肠癌的早期检测经常导致优异的预后(治愈)。结肠直肠癌的现有测试和筛选包括腹部体检、粪便隐血测试(FOBT)、结肠镜检查、乙状结肠镜检查 and 针对贫血和适当肝功能的血液测试。结肠癌的各个阶段(0-IV)通常如下表征:0 期,肠的最内层上的癌症;I 期,结肠的几个内层中的癌症;II 期,癌症已经扩散到结肠的肌肉壁;III 期,癌症已经扩散到淋巴结;IV 期,癌症已经扩散到其他器官。

[0054] 结肠直肠癌的治疗可以包括手术(例如,结肠切除术)、化疗和放疗中的任一种或组合,这通常取决于疾病的阶段。通常,检测且早期治疗(例如,0-III 期)结肠直肠癌的患者可以在诊断后存活 5 年,并且被视为治愈疾病。IV 期结肠直肠癌通常被认为是可治愈的。

[0055] 癌症的诊断通常通过如上所示的任何一种或多种临床或诊断测试进行,并且可以包括如本文中描述或如本领域已知的身体检查、成像测试、射线成像(X 射线)和实验室诊断中的任何一种或组合。几种生物标志物(包括癌胚抗原(CEA)和糖类抗原 19-9(CA19-9))用于在结肠直肠癌的诊断中。

[0056] CEA 是参与细胞粘附的糖蛋白,并且通常在胎儿发育过程中产生并且在出生前停止。CEA 首先在来自人结肠癌提取物的组织提取物中检测到,并且血清中增加的水平已经与结肠直肠癌以及胃器官、胰腺、肺、乳房和髓样甲状腺的癌相关。CEA 的正常水平为约 2.5 ng/mL。尽管如此,CEA 标志物对于诊断癌症或作为用于早期检测癌症的筛选测试不是完全可靠的。

[0057] CA19-9,尽管相关且鉴定为结肠癌和胰腺癌的标志物,但已经与假阴性结果以及假阳性结果两者的高发生相关。此外,在缺乏路易斯抗原的患者中,CA19-9 不表达,甚至当

患者患有肿瘤时也不表达。尽管如此,因为 CA19-9 可以在许多类型胃肠癌,诸如结肠直肠癌、食管癌和肝细胞癌中升高,所以它可用作癌症生物标志物(例如,结肠直肠癌)。

[0058] 因此,CEA 和 CA19-9 两者已经与某些类型的癌症相关,并且用作生物标志物来诊断疾病(例如,膀胱癌或结肠直肠癌)。然而,这些标志物缺乏准确和/或早期诊断患者中的癌症所需的期望灵敏度和特异性。

[0059] 如本文所使用的术语,主体(例如,患者)的“风险评估”、“风险分类”、“风险鉴定”或“风险分层”,是指对包括生物标志物在内的因素的评估,以预测包括疾病发作或病情进展的未来事件的发生风险,从而可以在更为知情的基础上做出对主体的治疗决定。

[0060] 如本文所使用的术语主体的“癌症风险”或“发生癌症的风险”是指评估因素,包括生物标志物,以预测癌症发生(包括癌症发作、癌症进展的可能性增加、与癌症相关的临床症状的发生/严重性)的风险。除了层粘连蛋白 γ -2 单体水平以外,可表明不良疾病预后的其他因素包括肿瘤尺寸、疾病阶段、CA19-9 和/或 CEA 的血清浓度、癌症的家族和/或个人历史和任何呈现症状的增加的临床严重度。因此,在一些实施方案中,所述方法涉及提供癌症发作或癌症进展的预后,包括检测/确定来自患者的样品中层粘连蛋白 γ -2 单体以及本文中描述或本领域已知的任何一种或多种预后因素的水平。

[0061] 如本文所使用的术语“特异性结合”或“特异性地结合”是指抗体、蛋白或肽与第二种化学物质种类的相互作用,其中,所述相互作用依赖于所述化学物质种类上具体结构(例如,抗原决定簇或表位)的存在;例如抗体识别并结合特异性蛋白结构而不是全部蛋白(protein generally)。如果抗体对于表位“A”是特异性的,则在包含标记的“A”和所述抗体的反应中含有表位 A(或游离、未标记的 A)的分子的存在将减少与所述抗体结合的标记的 A 的量。

[0062] 如本文所使用的术语“抗体”是指免疫球蛋白分子或其免疫活性部分,即抗原结合部分。免疫球蛋白分子的免疫活性部分的实例包括 F(ab) 和 F(ab')₂ 片段,其可通过使用酶(例如胃蛋白酶)处理抗体而产生。可用于本公开的抗体的实例包括,但不限于,抗血清、多克隆抗体、单克隆抗体、嵌合抗体、人抗体、人源化抗体、重组抗体、单链 Fvs (“scFv”)、亲和力成熟的抗体、单链抗体、单结构域抗体、F(ab) 片段、F(ab') 片段、二硫键连接的 Fvs (“sdFv”) 和抗-独特型(“抗-Id”)抗体,和以上任一种的有功能活性的表位结合片段。

[0063] 如本文所使用的术语“主体”和“患者”可互换地使用,无论所述主体具有还是目前正在经受任何形式的治疗。如本文所使用的术语“主体”(“subject”和“subjects”)可以指任何脊椎动物,包括但不限于,哺乳动物(例如,牛、猪、骆驼、美洲驼、马、山羊、兔、绵羊、仓鼠、豚鼠、猫、狗、大鼠和小鼠,非人的灵长类(例如,猴,诸如食蟹猴或猕猴、黑猩猩等)和人)。在一些实施方案中,主体可以是人或非人。在一些实施方案中,主体可以是处于发生癌症(诸如,例如,膀胱癌或结肠直肠癌)的风险中或已经具有癌症(诸如,例如,膀胱癌或结肠直肠癌)的人患者。

[0064] 如本文所使用的术语“样品”和“生物样品”通常是指针对含有目标分析物(诸如层粘连蛋白 γ -2 单体)所测试的和/或疑似包含目标分析物(诸如层粘连蛋白 γ -2 单体)的生物材料。所述样品可以是取自或源自主体的任何组织样品。在一些实施方案中,来自主体的样品可以包含蛋白。在一些实施方案中,来自主体的样品可以包含核酸(例如,多核苷酸, mRNA 等)。

[0065] 任何细胞类型、组织或体液可用于获得样品。此类细胞类型、组织和流体可以包括组织诸如活检和尸检样品的切片,出于组织学目的取用的冰冻切片,血液(诸如全血),血浆,血清,痰,粪便,眼泪,粘液,唾液,支气管肺泡灌洗(BAL)流体,毛发,皮肤,红细胞,血小板,间质液,眼晶状体液,脑脊髓液,汗液,鼻液,滑液,月经液,羊水,精液等。细胞类型和组织也可包括淋巴液,腹水液,妇科液,尿液,腹膜液,脑脊髓液,通过阴道清洗收集的流体,或通过阴道冲洗收集的流体。组织或细胞类型可以通过从动物取出细胞样品来提供,但也可以通过使用先前分离的细胞(例如,由另一人在另一时间和/或出于另一目的分离)来完成。也可以使用存档组织,诸如具有治疗或结果历史的那些。蛋白或核苷酸分离和/或纯化可以不是必要的。

[0066] 在本公开内容的实践中,使用本领域众所周知的用于采集、处理和加工尿、血液、血清和血浆以及其他体液的方法,例如,当本文提供的抗体作为免疫诊断试剂和/或用于层粘连蛋白 γ -2单体免疫测定试剂盒中时。测试样品可以除目的分析物之外包含其他部分,诸如抗体、抗原、半抗原、激素、药物、酶、受体、蛋白、肽、多肽、寡核苷酸或多核苷酸。例如,样品可以是主体获得的全血样品。将测试样品特别是全血在如本文所述的免疫测定之前进行处理(例如,用预处理试剂)可能是必需的或需要的。甚至在预处理不必要(例如,大多数尿样品,经预处理的存档样品等),样品的预处理是可以出于仅仅方便的目的进行的选项(例如,作为商业平台上的方案的部分)。样品可以如从主体获得直接使用或在预处理之后使用以修改样品的特征。预处理可以包括提取、浓缩、灭活干扰组分和/或添加试剂。

[0067] 预处理试剂可以是适合于与本文所述的测定(例如,免疫测定)和试剂盒使用的任何试剂。预处理任选包含:(a)一种或多种溶剂(例如甲醇和乙二醇),和盐,(b)一种或多种溶剂、盐和去污剂,(c)去污剂,或(d)去污剂和盐。预处理试剂是本领域已知的,且可以采用此类预处理,例如,用于在Abbott TDx、AxSYM®和ARCHITECT®分析仪(Abbott Laboratories, Abbott Park, IL)上测定的预处理,如文献所述(参见例如,Yatscoff等人,Abbott TDx Monoclonal Antibody Assay Evaluated for Measuring Cyclosporine in Whole Blood, Clin. Chem. 36: 1969-1973 (1990),和Wallemacq等人, Evaluation of the New AxSYM Cyclosporine Assay: Comparison with TDx Monoclonal Whole Blood and EMIT Cyclosporine Assays, Clin. Chem. 45: 432-435 (1999)),和/或可商业获得的。此外,可以如Abbott's美国专利号5,135,875、欧洲专利申请号0 471 293、和美国专利申请公开号2008/0020401(对于其关于预处理的教导以其整体通过引用并入)中所述完成预处理。预处理试剂可以是异质试剂或均质试剂。

[0068] 使用异质预处理试剂时,预处理试剂沉淀样品中存在的分析物结合蛋白(例如,可以结合层粘连蛋白 γ -2单体的蛋白)。此类预处理步骤包括通过向样品添加预处理试剂将形成的混合物上清液从沉淀的分析物结合蛋白分离,来取出任何分析物结合蛋白。在此类测定中,将不存在任何结合蛋白的混合物上清液用于测定中,直接进行到抗体捕获步骤。

[0069] 使用均质预处理试剂时,没有此类分离步骤。将测试样品和预处理试剂的整个混合物与标记的对于层粘连蛋白 γ -2单体、或层粘连蛋白 γ -2单体的变体特异性的结合伴侣诸如标记的抗层粘连蛋白 γ -2单体单克隆抗体(或其抗原反应性片段)接触。在由第一种特异性结合伴侣捕获之前或期间,此类测定中采用的预处理试剂通常在预处理的测试

样品混合物中得到稀释。尽管有此类稀释,但特定量的预处理试剂(例如,5 M 甲醇和 / 或 0.6 M 乙二醇)在捕获期间依然存在(或保留)于测试样品混合物中。

[0070] 除非本文另有限定,否则,与本公开相关使用的科学和技术术语应具有本领域普通技术人员通常所理解的含义。例如,与本文所述的细胞和组织培养、分子生物学、免疫学、微生物学、遗传学以及蛋白和核酸化学和杂交相关使用的任何术语和技术,都是本领域众所周知且常用的那些。术语的含义和范围应当是清楚的;然而,在任何潜在的歧义的情况下,本文提供的定义优于任何词典或外部的定义。此外,除非上下文另有需要,否则,单数术语应包括复数形式,且复数术语应包括单数形式。

[0071] B. 方法

所述方法涵盖提供主体的诊断或预后,其包括,关于癌症,以下中的任何一项或多项:确定所述主体具有癌症,确定癌症的严重度,确定主体发生癌症的风险(即,疾病发作的可能性),确定癌症治疗方案的功效,鉴定主体作为用于癌症治疗的候选,和关于具有疾病的主体中癌症进展的风险评估。所述方法部分基于以下意料之外的发现,即来自主体的生物样品(例如,血液、血清或血浆)中层粘连蛋白 γ -2 单体浓度预测或诊断主体中的癌症(例如,膀胱癌或结肠直肠癌),并且因此层粘连蛋白 γ -2 单体可以用作癌症的预后或诊断生物标志物。

[0072] 所述方法涉及提供或获取来自主体的生物样品,其可通过任何已知的手段获得,包括针刺、穿刺活检、拭子等。在所述方法的实施方案中,生物样品是血液样品,优选血浆或血清样品,其可通过标准技术(诸如,例如通过静脉穿刺)获得。所述方法中使用的生物样品可以在适合的组织贮存条件下贮存或保藏,或者可以从已经在合适条件下预先贮存或保藏的样品获取。在一些实施方案中,所述方法包括检验来自主体的生物样品的先前测定或分析的数据(例如,测量层粘连蛋白 γ -2 单体和 / 或另一种癌症生物标志物,诸如,例如,CEA 和 CA19-9 中的任何一种或多种)。

[0073] 所述方法涵盖通过测定主体中的层粘连蛋白 γ -2 单体浓度而用于具有癌症或疑似具有癌症的主体中癌症的诊断、预后和 / 或风险分层的方法。提供诊断可以是,例如,提供主体中的癌症的诊断,其中主体可以先前未诊断为具有癌症(或未鉴定为具有具有癌症风险的风险),怀疑具有癌症,或不是如此。或者,或另外,提供预后可以是,例如,确定癌症严重性或阶段,或者可以是风险评估,即确定主体将发生癌症的可能性。所述方法还包括鉴定具有提高的发生癌症的风险的一个或多个患者或患者的亚群。所有方法共有的特征是测定如本文所述的生物样品中的层粘连蛋白 γ -2 单体浓度,其中样品中层粘连蛋白 γ -2 单体浓度相对于层粘连蛋白 γ -2 单体浓度的参考值提高表明癌症,或发生癌症的增加风险。

[0074] 层粘连蛋白 γ -2 单体浓度被视为相比于参考值或预定水平,即,本文所述的参考层粘连蛋白 γ -2 单体浓度值增加。例如,可用作参考浓度值的层粘连蛋白 γ -2 单体血清浓度为约 500 pg/ml,但也可以更高或更低,例如血清中约 200 pg/ml 或约 1000 pg/ml(例如,约 200、250、300、350、400、450、500、550、600、650、700、750、800、850、900、950 或 1000 pg/ml 或更多)。与参考值相比,层粘连蛋白 γ -2 单体浓度,当其可检测更高(例如,高约 1% 至约 10%),或显著更高,例如高至少 20% (1.2 倍),高至少 30% (1.3 倍),高至少 40% (1.4 倍),高至少 50% (1.5 倍),高至少 60% (1.6 倍),高至少 70% (1.7 倍),高至少 80% (1.8 倍),高至少 100% (2.0 倍或两倍),高至少 150% (2.5 倍),或高至少 200% (3.0 倍

或三倍)时,可被视为增加。

[0075] 生物样品中层粘连蛋白 γ -2 单体的存在、浓度或量可以使用本领域已知的任何合适的测定法容易地确定。实例包括但不限于免疫测定,诸如夹心免疫测定(例如,单克隆-多克隆夹心免疫测定,包括放射性同位素检测(放射免疫测定(RIA))和酶检测(酶免疫测定(EIA)或酶联免疫吸附测定(ELISA)(例如 Quantikine ELISA 测定, R&D Systems, Minneapolis, MN))、竞争性抑制免疫测定(例如正向和反向)、荧光偏振免疫测定(FPIA)、酶多重免疫测定技术(EMIT)、生物发光共振能量转移(BRET)和均质化学发光测定等。在基于 SELDI 的免疫测定中,将特异性结合目的层粘连蛋白 γ -2 单体(或其部分)的捕获试剂附着于质谱分析法探针的表面,诸如预活化的蛋白芯片阵列。然后将层粘连蛋白 γ -2 单体(层粘连蛋白 γ -2 单体或其任何组合)特异性捕获在生物芯片上,并通过质谱分析法检测捕获的层粘连蛋白 γ -2 单体。或者,可以将层粘连蛋白 γ -2 单体从捕获试剂洗脱并通过传统 MALDI(基质辅助激光解吸/电离)或通过 SELDI 检测。化学发光微粒免疫测定,特别是采用 ARCHITECT® 自动化分析仪(Abbott Laboratories, Abbott Park, IL)的免疫测定,是优选免疫测定的实例。其他方法包括,例如,质谱和使用特异性结合层粘连蛋白 γ -2 单体的抗体(单克隆、多克隆、嵌合、人源化、人等)或其片段的免疫组织化学(例如,用来自组织活检的切片)。抗层粘连蛋白 γ -2 单体抗体和其片段可以根据如本文所述的本领域已知的方法来产生。或者,市售的抗层粘连蛋白 γ -2 单体抗体可以如本文所述使用。其他检测方法包括以下中描述的那些,例如,美国专利号 6,143,576 ;6,113,855 ;6,019,944 ;5,985,579 ;5,947,124 ;5,939,272 ;5,922,615 ;5,885,527 ;5,851,776 ;5,824,799 ;5,679,526 ;5,525,524 ;和 5,480,792,其中每个在此以其整体通过引用并入。

[0076] 层粘连蛋白 γ -2 单体或其变体或任何组合可以使用免疫测定法分析。层粘连蛋白 γ -2 单体的存在或量可以通过使用抗体和检测与层粘连蛋白 γ -2 单体的特异性结合来确定。如果需要,本文所述的一种或多种抗体可以与一种或多种市售的单克隆/多克隆抗体组合使用。此类抗体可购自公司,诸如 LifeSpan Biosciences, Inc. (Seattle, WA)、Acris Antibodies, Inc. (San Diego, CA)、Raybiotech, Inc. (Norcross, GA)、Atlas Antibodies (Stockholm, Sweden)、Sigma-Aldrich (St. Louis, MO)、IMGENEX (San Diego, CA)、GeneTex (Irvine, CA)、Abcam (Cambridge, MA)、Novus Biologicals (Littleton, CO)、Santa Cruz Biotechnology, Inc. (Santa Cruz, CA)、Cell Sciences (Canton, MA)、US Biological (Swampscott, MA)、AbD Serotec (Raleigh, NC)、R&D Systems, Inc. (Minneapolis, MN)、Thermo Scientific Pierce Products (Rockford, IL)、Abnova (Taiwan & Walnut, CA) 和 Enzo Life Sciences International, Inc. (Plymouth Meeting, PA)。

[0077] 可以利用任何免疫测定。免疫测定可以是酶联免疫测定(ELISA)、放射免疫测定(RIA)、竞争性抑制测定,诸如正向或反向竞争性抑制测定,荧光偏振测定或竞争性结合测定(例如)。ELISA 可以是夹心 ELISA。

[0078] 可以使用异质形式。例如,从主体获得样品后,制备第一种混合物。该混合物含有针对层粘连蛋白 γ -2 单体(包括层粘连蛋白 γ -2 单体的变体或其任何组合)进行评估的测试样品和第一种特异性结合伴侣,其中第一种特异性结合伴侣和测试样品中含有的任何层粘连蛋白 γ -2 单体形成第一种特异性结合伴侣-层粘连蛋白 γ -2 单体复合物。优选地,

第一种特异性结合伴侣是抗层粘连蛋白 γ -2 单体抗体或其片段。添加测试样品和第一种特异性结合伴侣以形成混合物的顺序并不关键。优选地,将第一种特异性结合伴侣固定化在固相上。在免疫测定中使用(用于第一种特异性结合伴侣,以及任选第二种特异性结合伴侣)的固相可以是本领域已知的任何固相,诸如但不限于磁性颗粒、珠粒、试管、微量滴定板、杯、膜、支架分子、薄膜、滤纸、盘(disk)和芯片。

[0079] 形成含有第一种特异性结合伴侣一层粘连蛋白 γ -2 单体复合物的混合物后,使用本领域已知的任何技术将任何未结合的层粘连蛋白 γ -2 单体从复合物去除。例如,可以通过洗涤将未结合的层粘连蛋白 γ -2 单体去除。然而,合适地,第一种特异性结合伴侣以多于测试样品中存在的任何层粘连蛋白 γ -2 单体的量存在,从而使得存在于测试样品中的所有层粘连蛋白 γ -2 单体由第一种特异性结合伴侣结合。

[0080] 去除任何未结合的层粘连蛋白 γ -2 单体后,将第二种特异性结合伴侣添加至混合物以形成第一种特异性结合伴侣一层粘连蛋白 γ -2 单体—第二种特异性结合伴侣复合物。第二种特异性结合伴侣优选是与层粘连蛋白 γ -2 单体上表位结合的抗层粘连蛋白 γ -2 单体抗体,所述表位不同于第一种特异性结合伴侣结合的层粘连蛋白 γ -2 单体上的表位。此外,也是优选地,第二种特异性结合伴侣用如上所述的可检测标记进行标记或含有如上所述的可检测标记。

[0081] 如上所示,固定化抗体或其片段的使用可以并入免疫测定。所述抗体可以固定在各种载体上,诸如磁性或色谱基质颗粒,测定板的表面(诸如微量滴定孔),固体基底材料的部件等。测定条可以通过在固体载体上的阵列中包被一种或多种抗体来制备。该条然后可以浸入测试生物样品,然后通过洗涤和检测步骤迅速处理,以生成可测量的信号,例如有色点。

[0082] 夹心 ELISA 测量两层抗体(即,捕获抗体(即,至少一种捕获抗体)和检测抗体(即,至少一种检测抗体)之间抗原的量。捕获和检测抗体结合抗原(例如,层粘连蛋白 γ -2 单体)上的不同表位。期望地,捕获抗体与表位的结合不干扰检测抗体与表位的结合。单克隆或多克隆抗体可以用作夹心 ELISA 中的捕获和检测抗体。

[0083] 通常,至少两种抗体用来分离和定量测试样品中的层粘连蛋白 γ -2 单体(包括层粘连蛋白 γ -2 单体的变体或其任何组合)。更具体地,至少两种抗体结合形成被称为“三明治”的免疫复合物的层粘连蛋白 γ -2 单体的某些表位或层粘连蛋白 γ -2 单体的部分。一种或多种抗体可以用于捕获测试样品中的层粘连蛋白 γ -2 单体(例如,层粘连蛋白 γ -2 单体或层粘连蛋白 γ -2 单体的变体,或其任何组合)(这些抗体经常被称为一种或多种“捕获”抗体),并且一种或多种抗体用于将可检测的(即,定量的)标记结合至夹心(这些抗体经常被称为一种或多种“检测”抗体)。在夹心测定中,抗体与其表位的结合期望不被测定中的任何其他抗体与其各自表位的结合所减弱。换言之,选择抗体,使得与含有或怀疑含有层粘连蛋白 γ -2 单体(例如,层粘连蛋白 γ -2 单体或层粘连蛋白 γ -2 单体的变体,或其任何组合)的测试样品接触的一种或多种第一抗体不结合所有或部分第二或随后抗体识别的表位,从而不干扰一种或多种第二检测抗体结合层粘连蛋白 γ -2 单体(例如,层粘连蛋白 γ -2 单体、层粘连蛋白 γ -2 单体的变体,或其任何组合)的能力。

[0084] 所述抗体可以用作所述免疫测定中的第一抗体。优选地,所述抗体以 4.2×10^{-11} M 至 7.4×10^{-13} M 的 K_D 免疫特异性结合包含层粘连蛋白 γ -2 单体的至少三个连续(3)氨基酸

的表位。免疫测定可以包含免疫特异性结合包含层粘连蛋白 γ -2 单体的至少三个连续 (3) 氨基酸的表位的第二抗体,其中第二抗体结合的连续 (3) 氨基酸不同于第一抗体结合的三 (3) 个连续氨基酸。在一些实施方案中,所述抗体可以相比于层粘连蛋白 -5 或相比于层粘连蛋白 γ -2 单体的片段(例如,层粘连蛋白 γ -2 单体的 EGF 样片段)优先结合层粘连蛋白 γ -2 单体。

[0085] 在一个实施方案中,怀疑含有层粘连蛋白 γ -2 单体(例如,层粘连蛋白 γ -2 单体、层粘连蛋白 γ -2 单体的变体或其任何组合)的测试样品可以同时或相继与至少一种或多种捕获抗体和至少一种检测抗体接触。在夹心测定形式中,怀疑含有层粘连蛋白 γ -2 单体(例如,层粘连蛋白 γ -2 单体、层粘连蛋白 γ -2 单体的变体或其任何组合)的测试样品首先与特异性结合特定表位的至少一种捕获抗体在允许形成抗体-层粘连蛋白 γ -2 单体复合物的条件下接触。如果使用多于一种捕获抗体,则形成多重捕获抗体-层粘连蛋白 γ -2 单体复合物。在夹心测定中,抗体,优选地,至少一种捕获抗体,以测试样品中预期的层粘连蛋白 γ -2 单体或层粘连蛋白 γ -2 单体变体的最大量的摩尔过量的量使用。例如,可以使用约 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 至约 1 mg/mL 抗体 / mL 微粒包被缓冲液。

[0086] 任选地,使测试样品与至少一种第一捕获抗体接触之前,所述至少一种捕获抗体可以结合至便于从测试样品分离抗体-层粘连蛋白 γ -2 单体复合物的固相支持物。可以使用本领域已知的任何固体支持物,包括但不限于,孔、试管或珠粒的形式的由聚合材料制成的固体支持物。一种或多种抗体可以通过吸附、通过使用化学偶联剂共价键合或通过本领域已知的其他方式结合至固体支持物,条件是此类结合不干扰抗体结合层粘连蛋白 γ -2 单体或层粘连蛋白 γ -2 单体变体的能力。此外,如果需要,固体支持物可以衍生化,以允许与抗体上的各种官能团的反应性。此类衍生化需要使用某些偶联剂,诸如,但不限于,马来酸酐、N-羟基琥珀酰亚胺和 1-乙基-3-(3-二甲基氨基丙基)碳二亚胺。

[0087] 使怀疑含有层粘连蛋白 γ -2 单体(例如,层粘连蛋白 γ -2 单体、层粘连蛋白 γ -2 单体的变体或其任何组合)的测试样品与至少一种捕获抗体接触后,孵育测试样品,以允许形成一种或多种捕获抗体-层粘连蛋白 γ -2 单体复合物。孵育可以在约 4.5 至约 10.0 的 pH、约 2 $^{\circ}\text{C}$ 至约 45 $^{\circ}\text{C}$ 温度下实施至少约一 (1) 分钟至约十八 (18) 小时,约 2-6 分钟或约 3-4 分钟的时间段。

[0088] 形成一种或多种捕获抗体-层粘连蛋白 γ -2 单体复合物后,然后使复合物与至少一种检测抗体接触(在允许形成一种或多种捕获抗体-层粘连蛋白 γ -2 单体-一种或多种检测抗体复合物的条件下)。如果使捕获抗体-层粘连蛋白 γ -2 单体复合物与至少一种检测抗体接触,则形成一种或多种捕获抗体-层粘连蛋白 γ -2 单体-一种或多种检测抗体复合物。正如捕获抗体,当使至少一种检测(和随后)抗体与捕获抗体-层粘连蛋白 γ -2 单体复合物接触时,需要与上述条件类似的条件孵育一段时间以形成一种或多种捕获抗体-层粘连蛋白 γ -2 单体-一种或多种检测抗体复合物。优选地,至少一种检测抗体含有可检测标记。在形成一种或多种捕获抗体-层粘连蛋白 γ -2 单体-一种或多种检测抗体复合物之前、同时或之后,可检测标记可以结合至少一种检测抗体。可以如本文讨论和本领域已知使用本领域已知的任何可检测标记。

[0089] 可以根据 Adamezyk 等人, Anal. Chim. Acta 579(1): 61-67 (2006) 中所述的方法进行化学发光测定。尽管可以使用任何合适的测定形式,但微量板化学发光分析

仪 (Mithras LB-940, Berthold Technologies U.S.A., LLC, Oak Ridge, TN) 使小体积的多样品的快速测定成为可能。化学发光分析仪可以配备使用 96 孔黑色聚苯乙烯微量板 (Costar #3792) 的多个试剂注射器。可以将每个样品添加至单独孔, 随后如通过采用测定的类型确定, 同时 / 顺序添加其他试剂。期望地, 避免 (诸如通过酸化) 采用吖啶鎓芳基酯 (acridinium aryl ester) 的中性或碱性溶液中形成假碱基。然后逐孔记录化学发光响应。在这方面, 用于记录化学发光响应的的时间将部分取决于添加试剂和采用的具体吖啶鎓之间的延迟。

[0090] 添加测试样品和一种或多种特异性结合伴侣以形成化学发光测定的混合物的顺序并不关键。如果第一种特异性结合伴侣用吖啶鎓化合物进行可检测地标记, 则形成可检测地标记的第一种特异性结合伴侣 - 层粘连蛋白 γ -2 单体复合物。或者, 如果使用第二种特异性结合伴侣, 而且第二种特异性结合伴侣用吖啶鎓化合物进行可检测地标记, 则形成可检测地标记的第一种特异性结合伴侣 - 层粘连蛋白 γ -2 单体 - 第二种特异性结合伴侣复合物。无论是否标记, 任何未结合特异性结合伴侣都可以使用本领域已知的任何技术诸如洗涤从混合物去除。

[0091] 可以在添加上述吖啶鎓化合物之前、同时或之后, 在混合物中原位生成过氧化氢、或为混合物提供或补充过氧化氢。可以以许多方法原位生成过氧化氢, 诸如对于本领域技术人员显而易见的方法。

[0092] 或者, 过氧化氢源可以简单添加至混合物。例如, 过氧化氢源可以是已知含有过氧化氢的一种或多种缓冲剂或其他溶液。在这方面, 可以简单地添加过氧化氢溶液。

[0093] 在同时或随后将至少一种碱性溶液添加到样品之后, 生成了指示层粘连蛋白 γ -2 单体或其变体存在的可检测信号, 即化学发光信号。碱性溶液含有至少一种碱, 并且具有大于或等于 10、优选大于或等于 12 的 pH。碱性溶液的实例包括但不限于氢氧化钠、氢氧化钾、氢氧化钙、氢氧化铵、氢氧化镁、碳酸钠、碳酸氢钠、氢氧化钙、碳酸钙、和碳酸氢钙。添加至样品的碱性溶液的量取决于碱性溶液的浓度。基于使用的碱性溶液的浓度, 本领域技术人员可以容易地确定添加至样品的碱性溶液的量。

[0094] 可以使用本领域技术人员已知的常规技术检测生成的化学发光信号。基于生成的信号强度, 可以定量样品中层粘连蛋白 γ -2 单体 (例如, 层粘连蛋白 γ -2 单体、层粘连蛋白 γ -2 单体的变体或其任何组合) 的量。具体地, 样品中层粘连蛋白 γ -2 单体的量与生成的信号强度成正比。可以通过将生成的光的量与关于层粘连蛋白 γ -2 单体的标准曲线进行比较或通过参考标准品进行比较而定量存在的层粘连蛋白 γ -2 单体的量。可以使用层粘连蛋白 γ -2 单体的系列稀释液或已知浓度的溶液, 通过质谱分析法、重量分析方法和其他本领域已知技术生成标准曲线。

[0095] 在采用 ARCHITECT® (或其后继者) 分析仪的化学发光微粒测定中, 缀合物稀释剂 pH 应为约 5.8 +/- 0.2, 微粒包被缓冲液应维持于室温 (即, 约 17 至约 27°C), 微粒包被缓冲液 pH 应为约 5.5 +/- 0.2, 且微粒稀释剂 pH 应为约 6.0 +/- 0.2。固体优选为少于约 0.2%, 诸如少于约 0.15%、少于约 0.14%、少于约 0.13%、少于约 0.12%、少于约 0.11%、少于约 0.10%、少于约 0.09%、少于约 0.08%、少于约 0.07%、少于约 0.06%、少于约 0.05%、少于约 0.04%、或少于约 0.03%, 诸如约 0.025%。

[0096] 在正向竞争形式中, 已知浓度的标记的层粘连蛋白 γ -2 单体 (例如, 层粘连蛋白

γ -2 单体、层粘连蛋白 γ -2 单体的变体或其任何组合) 的等分试样用于与测试样品中的层粘连蛋白 γ -2 单体竞争结合层粘连蛋白 γ -2 单体抗体 (诸如固定化层粘连蛋白 γ -2 单体抗体)。

[0097] 在正向竞争测定中,固定化抗体 (诸如层粘连蛋白 γ -2 单体抗体) 可以相继或同时与测试样品和标记的层粘连蛋白 γ -2 单体或层粘连蛋白 γ -2 单体变体接触。层粘连蛋白 γ -2 单体蛋白或层粘连蛋白 γ -2 单体变体可以用任何可检测的标记 (包括上述讨论的那些可检测标记以及抗层粘连蛋白 γ -2 单体抗体) 标记。在该测定中,抗体可以固定至固体支持物上。或者,抗体可以偶联至抗体,诸如抗种类抗体,所述抗体已固定在固体支持物诸如微粒上。

[0098] 标记的层粘连蛋白 γ -2 单体 (例如,层粘连蛋白 γ -2 单体、层粘连蛋白 γ -2 单体的变体或其任何组合)、测试样品和抗体在与上述关于夹心测定形式描述的条件类似的条件下进行孵育。然后可生成两种不同种类的抗体-层粘连蛋白 γ -2 单体复合物。具体地,生成的抗体-层粘连蛋白 γ -2 单体复合物之一含有可检测标记,而另一抗体-层粘连蛋白 γ -2 单体复合物不含可检测标记。在定量可检测标记之前,抗体-层粘连蛋白 γ -2 单体复合物可以,但不是必须,与测试样品的剩余部分分离。无论抗体-层粘连蛋白 γ -2 单体复合物是否与测试样品的剩余部分分离,然后定量抗体-层粘连蛋白 γ -2 单体复合物的可检测标记的量。测试样品中层粘连蛋白 γ -2 单体 (例如,层粘连蛋白 γ -2 单体,层粘连蛋白 γ -2 单体的变体或其任何组合) 的浓度然后通过将抗体-层粘连蛋白 γ -2 单体中可检测标记的量与标准曲线比较来确定。标准曲线可以使用已知浓度的层粘连蛋白 γ -2 单体 (例如,层粘连蛋白 γ -2 单体、层粘连蛋白 γ -2 单体的变体或其任何组合) 的系列稀释液,通过质谱,重量分析和通过本领域已知的其他技术来生成。

[0099] 抗体-层粘连蛋白 γ -2 单体复合物可以通过以下与测试样品分离:将抗体结合至固体支持物,诸如上述关于夹心测定形式讨论的固体支持物,然后去除测试样品的剩余部分与固体支持物的接触。

[0100] 在反向竞争测定中,固定化的层粘连蛋白 γ -2 单体 (例如,层粘连蛋白 γ -2 单体、层粘连蛋白 γ -2 单体的变体或其任何组合) 可以相继或同时与测试样品和至少一种标记的抗体接触。优选地,抗体特异性结合表位,所述表位包含层粘连蛋白 γ -2 单体的至少 3、至少 4、至少 5、至少 6、至少 7、至少 8、至少 9、或至少 10、至少 15、至少 20、至少 25 或至少 30 个氨基酸。

[0101] 层粘连蛋白 γ -2 单体 (例如,层粘连蛋白 γ -2 单体、层粘连蛋白 γ -2 单体的变体或其任何组合) 可以结合至固体支持物,诸如上述关于夹心测定形式讨论的固体支持物。

[0102] 固定化的层粘连蛋白 γ -2 单体 (例如,层粘连蛋白 γ -2 单体、层粘连蛋白 γ -2 单体的变体或其任何组合)、测试样品和至少一种标记的抗体在与上述关于夹心测定形式描述的条件类似的条件下进行孵育。然后生成两种不同种类的层粘连蛋白 γ -2 单体-抗体复合物。具体地,生成的层粘连蛋白 γ -2 单体-抗体复合物之一进行固定化且含有可检测标记,而另一层粘连蛋白 γ -2 单体-抗体复合物不进行固定化且含有可检测标记。将未固定化的层粘连蛋白 γ -2 单体-抗体复合物和测试样品的剩余部分通过本领域已知的技术 (诸如洗涤) 从存在的固定化的层粘连蛋白 γ -2 单体-抗体复合物中去除。一旦去除未固定化的层粘连蛋白 γ -2 单体抗体复合物,然后定量固定化的层粘连蛋白 γ -2 单体-抗体

复合物中可检测标记的量。测试样品中层粘连蛋白 γ -2 单体（例如，层粘连蛋白 γ -2 单体，层粘连蛋白 γ -2 单体的变体或其任何组合）的浓度然后通过将层粘连蛋白 γ -2 单体 - 复合物中可检测标记的量与标准曲线比较来确定。标准曲线可以使用已知浓度的层粘连蛋白 γ -2 单体或层粘连蛋白 γ -2 单体变体的系列稀释液，通过质谱，重量分析和通过本领域已知的其他技术来生成。

[0103] 在荧光偏振测定中，抗体或其功能活性片段可以首先与怀疑含有层粘连蛋白 γ -2 单体（例如，层粘连蛋白 γ -2 单体、层粘连蛋白 γ -2 单体的变体或其任何组合）接触以形成未标记的层粘连蛋白 γ -2 单体 - 抗体复合物。未标记的层粘连蛋白 γ -2 单体 - 抗体复合物然后与荧光标记的层粘连蛋白 γ -2 单体（例如，层粘连蛋白 γ -2 单体、层粘连蛋白 γ -2 单体的变体或其任何组合）接触。标记的层粘连蛋白 γ -2 单体与测试样品中的任何未标记的层粘连蛋白 γ -2 单体竞争结合抗体或其功能活性片段。测定形成的标记的层粘连蛋白 γ -2 单体 - 抗体复合物的量，且经由使用标准曲线来测定测试样品中层粘连蛋白 γ -2 单体（例如，层粘连蛋白 γ -2 单体、层粘连蛋白 γ -2 单体的变体或其任何组合）的量。

[0104] 荧光偏振测定中使用的抗体特异性结合表位，所述表位包含层粘连蛋白 γ -2 单体的至少 3、至少 4、至少 5、至少 6、至少 7、至少 8、至少 9、至少 10、至少 15、至少 20、至少 25 或至少 30 个氨基酸。

[0105] 抗体、标记的层粘连蛋白 γ -2 单体（例如，层粘连蛋白 γ -2 单体、层粘连蛋白 γ -2 单体的变体或其任何组合）、测试样品和至少一种标记的抗体可以在与上述关于夹心免疫测定描述的条件类似的条件下进行孵育。

[0106] 或者，抗体或其功能活性片段可以同时与荧光标记的层粘连蛋白 γ -2 单体（例如，层粘连蛋白 γ -2 单体、层粘连蛋白 γ -2 单体的变体或其任何组合）和怀疑含有层粘连蛋白 γ -2 单体（例如，层粘连蛋白 γ -2 单体、层粘连蛋白 γ -2 单体的变体或其任何组合）的未标记的测试样品接触以形成标记的层粘连蛋白 γ -2 单体 - 抗体复合物和未标记的层粘连蛋白 γ -2 单体 - 抗体复合物两者。测定形成的标记的层粘连蛋白 γ -2 单体 - 抗体复合物的量，且经由使用标准曲线来测定测试样品中层粘连蛋白 γ -2 单体的量。该免疫测定中使用的抗体可以特异性结合表位，所述表位包含层粘连蛋白 γ -2 单体的至少 3、至少 4、至少 5、至少 6、至少 7、至少 8、至少 9、至少 10、至少 15、至少 20、至少 25 或至少 30 个氨基酸。

[0107] 或者，抗体或其功能活性片段首先与荧光标记的层粘连蛋白 γ -2 单体（例如，层粘连蛋白 γ -2 单体、层粘连蛋白 γ -2 单体的变体或其任何组合）接触以形成标记的层粘连蛋白 γ -2 单体 - 抗体复合物。标记的层粘连蛋白 γ -2 单体 - 抗体复合物然后与怀疑含有层粘连蛋白 γ -2 单体（例如，层粘连蛋白 γ -2 单体、层粘连蛋白 γ -2 单体的变体或其任何组合）的未标记的测试样品接触。测试样品中的任何未标记的层粘连蛋白 γ -2 单体与层粘连蛋白 γ -2 单体（例如，层粘连蛋白 γ -2 单体、层粘连蛋白 γ -2 单体的变体或其任何组合）竞争结合抗体或其功能活性片段。使用形成的标记的层粘连蛋白 γ -2 单体 - 抗体复合物的量以经由使用标准曲线来测定测试样品中层粘连蛋白 γ -2 单体的量。该免疫测定中使用的抗体特异性结合表位，所述表位包含层粘连蛋白 γ -2 单体的至少三 3、至少 4、至少 5、至少 6、至少 7、至少 8、至少 9、至少 10、至少 15、至少 20、至少 25 或至少 30

个氨基酸。

[0108] 质谱 (MS) 分析可以单独使用或与其他方法组合使用。其他方法包括免疫测定和上述检测特定多核苷酸的那些。质谱方法可用于测定一种或多种生物标志物的存在和 / 或量。MS 分析可以包含基质辅助激光解吸 / 电离 (MALDI) 飞行时间 (TOF) MS 分析, 诸如, 例如, 引导 - 点 MALDI-TOF 或液相色谱 MALDI-TOF 分析。在一些实施方案中, MS 分析包含电喷雾电离 (ESI) MS, 诸如液相色谱 (LC) ESI-MS。质谱分析可以使用市售光谱仪来完成。可以使用用于利用 MS 分析的方法, 包括 MALDI-TOF MS 和 ESI-MS, 以检测生物样品中生物标志物肽的存在和量。参见, 例如, 美国专利号 6, 925, 389 ; 6, 989, 100 ; 和 6, 890, 763 用于指导, 其各自通过引用并入本文。

[0109] 可能期望包括对照样品或校准物, 诸如一系列校准物。可以同时分析对照样品与来自上述主体的样品。从主体样品获得的结果可以与从对照样品获得的结果进行比较。可以提供标准曲线, 生物样品的测定结果可以与其进行比较。此类标准曲线将水平呈现为测定单位的函数, 即, 如果使用荧光标记, 则为荧光信号强度。使用从多个供体采集的样品, 对于正常组织中层粘连蛋白 γ -2 单体的对照水平以及从可具有上述特征中的一个或多个的供体采集的组织中层粘连蛋白 γ -2 单体的“处于风险中”水平, 可以提供标准曲线。

[0110] 因此, 考虑到上述情况, 提供了确定测试样品中层粘连蛋白 γ -2 单体 (例如, 层粘连蛋白 γ -2 单体、层粘连蛋白 γ -2 单体的变体或其任何组合) 的存在、量或浓度的方法。所述方法包括通过免疫测定测定测试样品的层粘连蛋白 γ -2 单体 (例如, 层粘连蛋白 γ -2 单体、层粘连蛋白 γ -2 单体的变体, 或其任何组合), 例如, 采用至少一种抗体和至少一种可检测标记, 并且包括将作为测试样品中层粘连蛋白 γ -2 单体的存在、量或浓度的直接或间接指示的由可检测标记生成的信号与作为校准物中层粘连蛋白 γ -2 单体的存在、量或浓度的直接或间接指示生成的信号进行比较。校准物任选且优选是一系列校准物的部分, 其中每种校准物与系列中的其他校准物的不同在于层粘连蛋白 γ -2 单体浓度。所述至少一种抗体之一是分离的抗体, 其特异性结合层粘连蛋白 γ -2 单体 (例如, 层粘连蛋白 γ -2 单体、层粘连蛋白 γ -2 单体的变体或其任何组合), 其中所述抗体具有选自 (i) 可变重链结构域区域, 或 (ii) 可变重链结构域区域和可变轻结构域区域的结构域或区域。或者, 所述至少一种抗体之一是分离的抗体, 其特异性结合层粘连蛋白 γ -2 单体 (例如, 层粘连蛋白 γ -2 单体、层粘连蛋白 γ -2 单体的变体或其任何组合), 其中所述抗体具有 (i) 包含互补决定区 (CDR) 1、CDR2 和 CDR3 的可变重链和包含 CDR1、CDR2 和 CDR3 的可变轻链。可以使用的至少一种抗体的实例是特异性结合层粘连蛋白 γ -2 单体的抗体, 诸如由以下公司市售的抗体, 诸如 LifeSpan Biosciences, Inc. (Seattle, WA)、Acris Antibodies, Inc. (San Diego, CA)、Raybiotech, Inc. (Norcross, GA)、Atlas Antibodies (Stockholm, Sweden)、Sigma-Aldrich (St. Louis, MO)、IMGENEX (San Diego, CA)、GeneTex (Irvine, CA)、Abcam (Cambridge, MA)、Novus Biologicals (Littleton, CO)、Santa Cruz Biotechnology, Inc. (Santa Cruz, CA)、Cell Sciences (Canton, MA)、US Biological (Swampscott, MA)、AbD Serotec (Raleigh, NC)、R&D Systems, Inc. (Minneapolis, MN)、Thermo Scientific Pierce Products (Rockford, IL)、Abnova (Taiwan & Walnut, CA) 和 Enzo Life Sciences International, Inc. (Plymouth Meeting, PA)。

[0111] 所述方法可以包括: (i) 使测试样品与至少一种捕获抗体接触, 所述捕获抗体结

合层粘连蛋白 γ -2 单体（例如，层粘连蛋白 γ -2 单体，层粘连蛋白 γ -2 单体的变体，或其任何组合）上的表位，以便形成捕获抗体 / 层粘连蛋白 γ -2 单体复合物，(ii) 使捕获抗体 / 层粘连蛋白 γ -2 单体复合物与至少一种检测抗体接触，检测抗体包含可检测标记且结合不被捕获抗体结合的层粘连蛋白 γ -2 单体（例如，层粘连蛋白 γ -2 单体，层粘连蛋白 γ -2 单体的变体，或其任何组合）上的表位，以形成捕获抗体 / 层粘连蛋白 γ -2 单体 / 检测抗体复合物，和 (iii) 基于 (ii) 中形成的捕获抗体 / 层粘连蛋白 γ -2 单体 / 检测抗体复合物中的可检测标记生成的信号测定测试样品中层粘连蛋白 γ -2 单体的量。

[0112] 或者，所述方法可以包括：(i) 使测试样品与至少一种捕获抗体接触，所述捕获抗体结合层粘连蛋白 γ -2 单体（例如，层粘连蛋白 γ -2 单体，层粘连蛋白 γ -2 单体的变体，或其任何组合）的表位，以便形成捕获抗体 / 层粘连蛋白 γ -2 单体复合物，并且同时或相继，以任何顺序，使测试样品与可检测标记的层粘连蛋白 γ -2 单体接触，其可以与测试样品中的任何层粘连蛋白 γ -2 单体（例如，层粘连蛋白 γ -2 单体，层粘连蛋白 γ -2 单体的变体，或其任何组合）竞争结合至少一种捕获抗体。测试样品中存在的任何层粘连蛋白 γ -2 单体（例如，层粘连蛋白 γ -2 单体，层粘连蛋白 γ -2 单体的变体，或其任何组合）和可检测标记的层粘连蛋白 γ -2 单体与彼此竞争以分别形成捕获抗体 / 层粘连蛋白 γ -2 单体复合物和捕获抗体 / 可检测标记的层粘连蛋白 γ -2 单体复合物。所述方法进一步包括 (ii) 基于 (ii) 中形成的捕获抗体 / 可检测标记的层粘连蛋白 γ -2 单体复合物中的可检测标记生成的信号测定测试样品中层粘连蛋白 γ -2 单体的存在、量或浓度。捕获抗体 / 可检测标记的层粘连蛋白 γ -2 单体复合物中的可检测标记生成的信号与测试样品中层粘连蛋白 γ -2 单体复合物的量或浓度成反比。

[0113] 在一些实施方案中，所述方法可以包括本领域中用于测量样品中的层粘连蛋白 γ -2 单体的量的任何技术和测定法。例如，多克隆、单克隆、嵌合、人源化或人抗层粘连蛋白 γ -2 单体抗体 (Ab) 可以直接或间接地连接，例如经由绵羊（或其他物种）抗人 Ab，连接至固相支持物。存在于样品中且与固体支持物接触的任何层粘连蛋白 γ -2 单体由多克隆、单克隆、嵌合的人源化或人抗层粘连蛋白 γ -2 单体 Ab 结合。生物素标记的小鼠抗层粘连蛋白 γ -2 单体 Ab 也结合层粘连蛋白 γ -2 单体。连接至辣根过氧化物酶 (HRPO) 的链霉抗生物素蛋白结合小鼠抗层粘连蛋白 γ -2 单体 Ab 上的生物素。与邻苯二胺接触后，HRPO 将邻苯二胺转化为 2,3-二氨基酚嗪，其颜色为橙褐色，并且可以在 492 nm 进行分光光度测量。

[0114] 所述方法可以进一步包括对从其获得测试样品的患者诊断、确定预后、或评估处理（治疗性或预防性）的效力。如果所述方法进一步包括对从其获得测试样品的患者评估治疗性 / 预防性处理的效力，则所述方法任选进一步包括根据需要调整患者的治疗性 / 预防性处理以改善效力。可以调整所述方法以用于自动化系统或半自动化系统中。

[0115] 通常，可以采用预定水平作为基准，针对所述基准对测定测试样品的层粘连蛋白 γ -2 单体（例如，层粘连蛋白 γ -2 单体，层粘连蛋白 γ -2 单体的变体或其任何组合）后所获结果进行评估。通常，在进行此类比较中，通过在适当的条件下将具体测定运行足够次数而获得预定水平，从而使得可以获得分析物的存在、量或浓度与疾病、病症或状况（例如，癌症）的特定阶段或终点、或与具体临床标记之间的联系或关联。通常，使用参考主体（或主体群体）的测定获得预定水平。测量的层粘连蛋白 γ -2 单体可以包括其片段、其降解产物、和 / 或其酶切产物。

[0116] 具体而言,就用于监测疾病进展和 / 或治疗的预定水平而言,层粘连蛋白 γ -2 单体 (例如,层粘连蛋白 γ -2 单体,层粘连蛋白 γ -2 单体的变体或其任何组合) 的量或浓度可以是“无变化的”、“有利的”(或“有利改变的”)、或“不利的”(或“不利改变的”)。“升高的”或“增加的”是指测试样品中的量或浓度高于通常或正常水平或范围 (例如预定水平)、或高于另一个参考水平或范围 (例如较早或基线样品)。术语“降低的”或“减少的”是指测试样品中的量或浓度低于通常或正常水平或范围 (例如预定水平)、或低于另一个参考水平或范围 (例如较早或基线样品)。术语“改变的”指样品中的量或浓度相比于通常或正常水平或范围 (例如预定水平)、或相比于另一个参考水平或范围 (例如较早或基线样品) 发生改变 (增加或减少)。

[0117] 根据标准实践定义关于层粘连蛋白 γ -2 单体的通常或正常水平或范围。当与通常或正常水平或范围、或参考水平或范围相比,存在不能由实验误差或样品差异解释的任何净变化时,可以考虑已经出现了所谓的变化水平或变化。因此,在特定样品中测量的水平将与来自所谓的正常主体的类似样品中确定的水平或水平范围进行比较。在此背景下,例如,分别地,“正常主体”是没有可检测的疾病或病症的个体,而“正常”(有时称为“对照”)患者或群体是没有表现可检测疾病或病症的那些患者或群体。“表观正常主体”是其中层粘连蛋白 γ -2 单体尚未进行评估或正在进行评估的主体。当分析物正常不可检测 (例如,正常水平是零,或在正常群体的约 25 至约 75 百分位范围内),但是在测试样品中可检测时,以及当分析物以高于正常水平存在于测试样品中时,称该分析物水平被称为“升高的”。因此,本公开尤其提供了筛选具有癌症或处于具有癌症的风险中的主体的方法。

[0118] 测定方法也涉及其他标记的测定等,如本文讨论和本领域已知的。例如,测定方法还可以涉及测定 (检测) 层粘连蛋白 γ -2 单体和 / 或层粘连蛋白 γ -2 单体片段、CEA 和 CA19-9 (例如)。

[0119] 因此,本文所述方法也可用于确定主体是否患有癌症 (例如,膀胱癌或结肠癌),诸如本文讨论和本领域已知的癌症或处于发生癌症 (例如,膀胱癌或结肠癌),诸如本文讨论和本领域已知的癌症的风险中。具体地,此类方法可以包括步骤:

(a) 确定来自主体的测试样品中层粘连蛋白 γ -2 单体 (例如,层粘连蛋白 γ -2 单体,层粘连蛋白 γ -2 单体的变体或其任何组合) 的浓度或量 (使用本文所述方法或本领域已知方法); 并且

(b) 将步骤 (a) 中确定的层粘连蛋白 γ -2 单体 (例如,层粘连蛋白 γ -2 单体,层粘连蛋白 γ -2 单体的变体或其任何组合) 的浓度或量与预定水平比较,其中,如果步骤 (a) 中确定的层粘连蛋白 γ -2 单体的浓度或量相对于预定水平是有利的,则将该主体确定为未患有本文讨论和本领域已知的癌症或没有处于本文讨论和本领域已知的癌症的风险中。然而,如果步骤 (a) 中确定的层粘连蛋白 γ -2 单体的浓度或量相对于预定水平是不利的 (诸如例如,增加的),则将该主体确定为患有本文讨论和本领域已知的癌症或处于本文讨论和本领域已知的癌症的风险中。

[0120] 此外,本文提供了监测主体中疾病进展的方法。在一些实施方案中,该方法包括步骤

(a) 确定来自主体的测试样品中层粘连蛋白 γ -2 单体 (例如,层粘连蛋白 γ -2 单体,层粘连蛋白 γ -2 单体的变体或其任何组合) 的浓度或量;

(b) 确定来自主体的较晚测试样品中层粘连蛋白 γ -2 单体的浓度或量；并且

(c) 将步骤 (b) 中确定的层粘连蛋白 γ -2 单体的浓度或量与步骤 (a) 中确定的层粘连蛋白 γ -2 单体的浓度或量比较,其中,如果当与步骤 (a) 中确定的层粘连蛋白 γ -2 单体的浓度或量比较时,步骤 (b) 中确定的浓度或量是无变化的或是不利的(诸如例如,增加的),则确定主体中的疾病已经继续、进展或恶化。比较而言,如果当与步骤 (a) 中确定的层粘连蛋白 γ -2 单体的浓度或量比较时,步骤 (b) 中确定的层粘连蛋白 γ -2 单体的浓度或量是有利的,则确定主体中的疾病已经停止、消退或改善。

[0121] 如本文所述,在一些实施方案中,本文公开的各种方法包括提供如各个方法步骤中测定的层粘连蛋白 γ -2 单体的浓度、量或比较中的任何。一旦提供,样品中层粘连蛋白 γ -2 单体的浓度、量或比较可用于提供疾病的诊断、预后或风险评估(例如,疾病进展的评估或发生疾病的可能性的评估),或监测主体中的疾病过程(例如,在经历治疗的主体或已经治疗且针对疾病复发监测的主体)。任选地,所述方法进一步包括将步骤 (b) 中确定的层粘连蛋白 γ -2 单体的浓度或量例如与预定水平进行比较。此外,任选地,如果比较显示,步骤 (b) 中确定的层粘连蛋白 γ -2 单体的浓度或量例如相对于预定水平不利地改变(诸如例如,增加的),则所述方法包括用一种或多种药物组合物对主体治疗一段时间。

[0122] 此外,所述方法可用于在接受用一种或多种药物组合物治疗的主体中监测治疗。具体而言,此类方法涉及对主体施用一种或多种药物组合物(诸如一种或多种化疗或生物药物)之前提供来自主体的第一份测试样品。接下来,确定来自主体的第一份测试样品中层粘连蛋白 γ -2 单体的浓度或量(例如,使用本文所述或本领域已知的方法)。确定层粘连蛋白 γ -2 单体的浓度或量后,任选然后将层粘连蛋白 γ -2 单体的浓度或量与预定水平进行比较。如果在第一份测试样品中确定的层粘连蛋白 γ -2 单体的浓度或量低于预定水平,则不对该主体用一种或多种药物组合物治疗。然而,如果在第一份测试样品中确定的层粘连蛋白 γ -2 单体的浓度或量高于预定水平,则用一种或多种药物组合物对该主体治疗一段时间。本领域技术人员可以确定用一种或多种药物组合物对该主体治疗的时间段(例如该时间段可以从约以 (1) 天到约三十 (30) 天,此时可以评估治疗的成功(例如,使用临床指标或确定治疗已开始之后层粘连蛋白 γ -2 单体的浓度或量)。

[0123] 在用一种或多种药物组合物治疗过程期间,然后从主体获得第二份和后续的测试样品。从主体获得所述测试样品的测试样品数目和时间并不关键。例如,第二份测试样品可以在首次对主体施用一种或多种药物组合物后七 (7) 天获得,第三份测试样品可以在首次对主体施用一种或多种药物组合物后两 (2) 周获得,第四份测试样品可以在首次对主体施用一种或多种药物组合物后三 (3) 周获得,第五份测试样品可以在首次对主体施用一种或多种药物组合物后四 (4) 周获得,等。

[0124] 从主体获得每个第二份或后续测试样品后,确定第二份或后续测试样品中层粘连蛋白 γ -2 单体(例如,层粘连蛋白 γ -2 单体,层粘连蛋白 γ -2 单体的变体或其任何组合)的浓度或量(例如,使用本文所述或本领域已知的方法)。然后将第二份和后续测试样品每一份中确定的层粘连蛋白 γ -2 单体的浓度或量与第一份测试样品(例如,最初任选与预定水平进行比较的测试样品)中确定的层粘连蛋白 γ -2 单体的浓度或量进行比较。如果当与步骤 (a) 中确定的层粘连蛋白 γ -2 单体的浓度或量比较时,步骤 (c) 中确定的层粘连蛋白 γ -2 单体的浓度或量是有利的,则确定主体中的疾病或感染已经停止、消退或改善,且应当

对主体继续施用步骤 (b) 的一种或多种药物组合物。然而,如果当与步骤 (a) 中确定的层粘连蛋白 γ -2 单体的浓度或量比较时,步骤 (c) 中确定的浓度或量无变化或是不利的(诸如例如,增加的),则确定疾病已经继续、进展或恶化,且应当用更高浓度的步骤 (b) 中对主体施用的一种或多种药物组合物治疗主体,或者应当用不同于步骤 (b) 中对主体施用的一种或多种药物组合物的一种或多种药物组合物治疗主体。具体而言,可以用不同于主体以前已经接受的一种或多种药物组合物的一种或多种药物组合物治疗主体,并且评估不同组合物减少或降低主体层粘连蛋白 γ -2 单体水平和 / 或改善疾病的症状的效力。

[0125] 通常,对于可进行重复测试的测定(例如,监测疾病进展和 / 或对治疗的应答),在已从主体获得第一份测试样品后在一段时间及时获得第二份或后续的测试样品。具体而言,可以在已从主体获得第一份测试样品后的数分钟、数小时、数天、数周或数年获得来自主体的第二份测试样品。例如,可以在从主体获得第一份测试样品后的如下时间段从主体获得第二份测试样品:约 1 分钟、约 5 分钟、约 10 分钟、约 15 分钟、约 30 分钟、约 45 分钟、约 60 分钟、约 2 小时、约 3 小时、约 4 小时、约 5 小时、约 6 小时、约 7 小时、约 8 小时、约 9 小时、约 10 小时、约 11 小时、约 12 小时、约 13 小时、约 14 小时、约 15 小时、约 16 小时、约 17 小时、约 18 小时、约 19 小时、约 20 小时、约 21 小时、约 22 小时、约 23 小时、约 24 小时、约 2 天、约 3 天、约 4 天、约 5 天、约 6 天、约 7 天、约 2 周、约 3 周、约 4 周、约 5 周、约 6 周、约 7 周、约 8 周、约 9 周、约 10 周、约 11 周、约 12 周、约 13 周、约 14 周、约 15 周、约 16 周、约 17 周、约 18 周、约 19 周、约 20 周、约 21 周、约 22 周、约 23 周、约 24 周、约 25 周、约 26 周、约 27 周、约 28 周、约 29 周、约 30 周、约 31 周、约 32 周、约 33 周、约 34 周、约 35 周、约 36 周、约 37 周、约 38 周、约 39 周、约 40 周、约 41 周、约 42 周、约 43 周、约 44 周、约 45 周、约 46 周、约 47 周、约 48 周、约 49 周、约 50 周、约 51 周、约 52 周、约 1.5 年、约 2 年、约 2.5 年、约 3.0 年、约 3.5 年、约 4.0 年、约 4.5 年、约 5.0 年、约 5.5 年、约 6.0 年、约 6.5 年、约 7.0 年、约 7.5 年、约 8.0 年、约 8.5 年、约 9.0 年、约 9.5 年或约 10.0 年或更多,或至少约上述时间段之一之后。当用于监测疾病进展时,上述测定可用于在患有癌症和 / 或与癌症相关的任何状况的主体中监测疾病进展。当癌症未治愈时,此类状况通常可以是慢性的,或者此类状况可以是急性的(也称为病危护理状况)。急性状况,常常是,涉及例如心血管、神经或排泄系统的威胁生命的疾病或其他危急医学状况。通常,病危护理状况是指需要在基于医院的机构(hospital-based setting)(包括但不限于急诊室、重症监护病房、创伤中心、或其他急救护理机构)中的急性医学干预或通过随行医务人员或其他现场医学人员(field-based medical personnel)管理的那些状况。对于病危护理状况,通常在较短的时间范围内进行重复监测,所述较短的时间范围即数分钟、数小时或数天(例如,每约 1 分钟、约 5 分钟、约 10 分钟、约 15 分钟、约 30 分钟、约 45 分钟、约 60 分钟、约 2 小时、约 3 小时、约 4 小时、约 5 小时、约 6 小时、约 7 小时、约 8 小时、约 9 小时、约 10 小时、约 11 小时、约 12 小时、约 13 小时、约 14 小时、约 15 小时、约 16 小时、约 17 小时、约 18 小时、约 19 小时、约 20 小时、约 21 小时、约 22 小时、约 23 小时、约 24 小时、约 2 天、约 3 天、约 4 天、约 5 天、约 6 天或约 7 天,或至少约每上述时间范围之一重复),且最初的测定同样一般在较短的时间范围内完成,例如疾病或状况开始约数分钟、数小时或数天。

[0126] 合适地,测定也可用于在患有慢性或非急性状况的主体中监测疾病进展。非病危护理或非急性状况是指除了急性、威胁生命的疾病或其他危急医学状况之外的状况。通常,

非急性状况包括具有长期或慢性持续时间的那些状况。对于非急性状况,通常在较长的时间范围内进行重复监测,例如数小时、数天、数周、数月或数年(例如,约 1 小时、约 2 小时、约 3 小时、约 4 小时、约 5 小时、约 6 小时、约 7 小时、约 8 小时、约 9 小时、约 10 小时、约 11 小时、约 12 小时、约 13 小时、约 14 小时、约 15 小时、约 16 小时、约 17 小时、约 18 小时、约 19 小时、约 20 小时、约 21 小时、约 22 小时、约 23 小时、约 24 小时、约 2 天、约 3 天、约 4 天、约 5 天、约 6 天、约 7 天、约 2 周、约 3 周、约 4 周、约 5 周、约 6 周、约 7 周、约 8 周、约 9 周、约 10 周、约 11 周、约 12 周、约 13 周、约 14 周、约 15 周、约 16 周、约 17 周、约 18 周、约 19 周、约 20 周、约 21 周、约 22 周、约 23 周、约 24 周、约 25 周、约 26 周、约 27 周、约 28 周、约 29 周、约 30 周、约 31 周、约 32 周、约 33 周、约 34 周、约 35 周、约 36 周、约 37 周、约 38 周、约 39 周、约 40 周、约 41 周、约 42 周、约 43 周、约 44 周、约 45 周、约 46 周、约 47 周、约 48 周、约 49 周、约 50 周、约 51 周、约 52 周、约 1.5 年、约 2 年、约 2.5 年、约 3.0 年、约 3.5 年、约 4.0 年、约 4.5 年、约 5.0 年、约 5.5 年、约 6.0 年、约 6.5 年、约 7.0 年、约 7.5 年、约 8.0 年、约 8.5 年、约 9.0 年、约 9.5 年或约 10.0 年、或更长(例如,持续主体的生命期限)之后),且初始测定同样通常在较长时间范围内完成,例如疾病或状况发作的约数小时、数天、数月或数年。

[0127] 此外,可以使用从主体获得的第一份测试样品进行上述测定,其中第一份测试样品获得自一种来源,诸如血液、尿、血清或血浆。任选地,然后可以使用从主体获得的第二份测试样品重复上述测定,其中所述第二份测试样品获得自相同或另一种来源。例如,如果从尿获得第一份测试样品,则可以从血清或血浆获得第二份测试样品。可以比较从使用第一份测试样品和第二份测试样品的测定获得的结果。可以将该比较用于评估主体中的疾病或状况状态。

[0128] 此外,本公开也涉及确定倾向于或患有癌症的主体是否会从治疗受益的方法。具体而言,本公开涉及层粘连蛋白 γ -2 单体配对物诊断方法和产品。因此,如本文所述的“监测主体中疾病治疗”的方法进一步也可以最佳地涵盖选择或鉴定用于治疗的首选,诸如用化疗药物、生物制剂、放射、姑息治疗、激素治疗和 / 或手术的治疗。

[0129] 因此,在一些实施方案中,本公开还提供了确定具有癌症或者处于具有癌症(如本文讨论和本领域已知)的风险中的主体是否是用于具体癌症治疗的首选的方法。通常,主体是已经经历一些疾病症状或已经实际上被诊断为具有癌症或者处于癌症的风险中和 / 或表明如本文所述的层粘连蛋白 γ -2 单体或其变体的不利浓度或量(诸如,例如,当与预定水平相比时层粘连蛋白 γ -2 单体的增加浓度)的主体。

[0130] 所述方法任选包括如本文所述的测定,其中在用一种或多种药物组合物对主体进行治疗之前和之后评估分析物,或其中在此类治疗后评估分析物,并将分析物的浓度或量与预定水平进行比较。治疗后观察到的不利的分析物浓度(诸如,例如,当与预定水平相比时的增加浓度)或量,证实主体将不会受益于接受进一步或继续治疗,而治疗后观察到的有利的分析物浓度或量,证实主体将会受益于接受进一步或继续治疗。这种证实帮助管理临床研究和提供改进的患者护理。

[0131] 尽管本文的某些实施方案在用于评估癌症或癌症发作风险时是有益的,但测定和试剂盒适当时也任选可用于评估其他疾病、病症和状况中的层粘连蛋白 γ -2 单体。

[0132] 通常,可以检测或定量样品中的生物标志物的任何方法可用于本文所述的方法

中。这些方法除了免疫学方法之外,还包括物理和分子生物学方法。例如,适合的物理方法包括质谱方法、荧光共振能量转移 (FRET) 测定法、色谱分析和染料 - 检测方法。可使用的合适的分子生物学方法包括但不限于,Northern 或 Southern 印迹杂交、核酸点杂交或条形印迹杂交、原位杂交、核酸芯片测定法、PCR、逆转录酶 PCR (RT-PCR) 或实时 PCR (taq-man PCR)。检测生物标志物的其他方法包括,例如,核磁共振 (NMR)、荧光测定法、比色法、放射性测量法、发光法 (luminometry) 或其他光谱法、等离子共振 (例如 BIACORE),和一维或二维凝胶电泳。

[0133] 一旦测量,将层粘连蛋白 γ -2 单体浓度和所评估的任何其他额外生物标志物的浓度与具体生物标志物的预定参考值进行比较。超过层粘连蛋白 γ -2 单体参考值的测量 (即测定) 的层粘连蛋白 γ -2 单体浓度表明主体具有癌症,或癌症的风险提高。参考值可通过多种方式中的一种测定。例如,层粘连蛋白 γ -2 单体参考值可以是在取自对照主体的样品中测量的层粘连蛋白 γ -2 单体浓度,或者可以是由在取自对照主体组的多个对照样品中测量的浓度计算的层粘连蛋白 γ -2 单体浓度中值。层粘连蛋白 γ -2 单体浓度中值优选获得自至少 20 个对照主体、至少 30 个对照主体、或至少 40 个对照主体的组。生物标志物的预定参考值可以是预定截止值。

[0134] “对照主体”是健康主体,即没有癌症的临床体征或症状的主体。优选地,在临床上评估对照主体的癌症的其他未检测体征或症状,所述评估可包括常规体检和 / 或实验室测试。

[0135] 或者,可通过接受者操作曲线 (ROC) 分析,从患者组的生物样品测定层粘连蛋白 γ -2 单体截止值 (或预定截止值)。如生物领域中通常众所周知的,ROC 分析是确定测试将一种情形与另一种情形 (例如患病的情况与正常情况) 相区分的能力,或者是比较两种或更多种实验室测试或诊断测试的诊断性能。根据本公开应用的 ROC 分析的描述由 P. J. Heagerty 等人, *Time-dependent ROC curves for censored survival data and a diagnostic marker*, Biometrics 56:337-44 (2000) 提供,其公开整体通过引用并入本文。或者,可以通过对患者组的生物样品的四分位数分析测定层粘连蛋白 γ -2 单体截止值。例如,可通过选择对应于第 25 至第 75 百分位数范围中的任何值的值 (优选对应于第 25 百分位数、第 50 百分位数或第 75 百分位数,且最优选第 75 百分位数的值) 而测定层粘连蛋白 γ -2 单体截止值。又进一步或者,层粘连蛋白 γ -2 单体截止值可以通过患者组的生物样品的平均值加上两个标准偏差分析来确定。由相关患者组的中值获得的示例层粘连蛋白 γ -2 单体参考值为血清中约 950 pg/ml。由在第 75 百分位数的四分位数分析获得的示例层粘连蛋白 γ -2 单体参考值为血清中约 1200 pg/ml。此类统计分析可以使用本领域已知的任何方法来进行,并且可以通过任何数目的市售软件包 (例如,来自 Analyse-it Software Ltd., Leeds, UK; StataCorp LP, College Station, TX; SAS Institute Inc., Cary, NC.) 来实施。从平均值加上两个标准偏差分析获得的示例性层粘连蛋白 γ -2 单体参考值在血清中为约 1050 pg/ml。

[0136] 在一些实施方案中,所述方法包含以下的层粘连蛋白 γ -2 单体截止值:约 70、约 80、约 90、约 100、约 110、约 120、约 130、约 140、约 150、约 160、约 170、约 180、约 190、约 200、约 210、约 220、约 230、约 240、约 250、约 260、约 270、约 280、约 290、约 300、约 310、约 320、约 330、约 340、约 350、约 360、约 370、约 380、约 390、约 400、约 410、约 420、约 430、约

440、约 450、约 460、约 470、约 480、约 490、约 500、约 510、约 520、约 530、约 540、约 550、约 560、约 570、约 580、约 590、约 600、约 610、约 620、约 630、约 640、约 650、约 660、约 670、约 680、约 690、约 700、约 710、约 720、约 730、约 740、约 750、约 760、约 770、约 780、约 790、约 800、约 810、约 820、约 830、约 840、约 850、约 860、约 870、约 880、约 890、约 900、约 910、约 920、约 930、约 940、约 950、约 960、约 970、约 980、约 990 或约 1,000 pg/mL。

[0137] 所述方法可进一步包括评估癌症的至少一种其他生物标志物,例如,通过测量生物样品中至少一种其他生物标志物的浓度,并将所测量的浓度与所评估的每种其他生物标志物的参考值进行比较。可评估一种、两种、三种、四种或更多的其他生物标志物。癌症的额外的此类生物标志物包括,但不限于,CEA、CA19-9 和层粘连蛋白 γ -2 单体的片段(例如,由 MT1-MMP 生成的 EGF 样片段)。如本文对于测定层粘连蛋白 γ -2 单体参考值所述,可类似地测定癌症的任何其他生物标志物的参考值(或预定水平)。通常,生物样品中任何其他生物标志物的测量(即,测定)的浓度超过该生物标志物的参考值也表明主体具有癌症或癌症发作的风险提高。尽管如此,真实情况相反的生物标志物的实例也是可能的,即生物样品中的浓度与癌症或癌症发作的风险提高的情况之间成反比关系的生物标志物,从而使得,测定的生物标志物浓度低于该生物标志物的参考值表明主体具有癌症或癌症发作的风险提高。

[0138] 例如,血液中升高水平的 CEA 已用作癌症(诸如结肠直肠癌)的诊断生物标志物。CEA 经常在疑似具有一些形式的癌症的患者中评估,即使阳性结果可能是由于其他原因,而阴性结果不排除疾病。尽管如此,与体征和症状组合,CEA 可以在诊断和疾病预后两者中发挥作用,并且是一些癌症类型的通常疾病诊断标准的部分。CEA 的水平增加可以在癌症中发生。通常,样品中更高水平的 CEA 与癌症的存在或发作的较大概率相关。因此,本文所述的方法的实施方案包括测定样品中 CEA(和/或 CA19-9、层粘连蛋白 γ -2 单体的片段等)和层粘连蛋白 γ -2 单体的浓度。

[0139] 因此,在一些实施方案中,所述方法包括检测层粘连蛋白 γ -2 单体和选自 CEA、CA19-9 和层粘连蛋白 γ -2 单体的片段的至少一种标志物。在一些实施方案中,所述方法涵盖检测层粘连蛋白 γ -2 单体和 CEA,和任选地,选自 CA19-9 和层粘连蛋白 γ -2 单体的片段的至少一种标志物。在一些实施方案中,所述方法涵盖检测层粘连蛋白 γ -2 单体和 CA19-9,和任选地,选自 CEA 和层粘连蛋白 γ -2 单体的片段的至少一种标志物。在一些实施方案中,所述方法涵盖检测层粘连蛋白 γ -2 单体和层粘连蛋白 γ -2 单体的片段,和任选地,选自 CEA 和 CA19-9 的至少一种标志物。在一些实施方案中,所述方法涵盖检测层粘连蛋白 γ -2 单体、CEA、CA19-9 和层粘连蛋白 γ -2 单体的片段。

[0140] C. 试剂盒

本文提供了试剂盒,其可用于治疗患有癌症、或处于癌症的增加风险中的主体,或诊断主体具有如本文先前所述的癌症。

[0141] 待用于治疗患者的试剂盒将含有对于层粘连蛋白 γ -2 单体特异性的抗体。所述试剂盒优选包括用于使用本文所述的抗体治疗主体的说明书。包括在所述试剂盒中的说明书可以粘贴到包装材料,或者,可以作为包装插页而包括在内。尽管说明书通常是书面或印刷材料,但它们也不限于此。能够存储此类说明书并将其传达给最终用户的任何介质都是本公开所考虑的。此类介质包括但不限于电子存储介质(例如,磁盘、磁带、卡带、芯片)、光

介质（例如，CD ROM）等。如本文所使用的术语“说明书”可包括提供该说明书的因特网地址。

[0142] 还提供了用于测定测试样品的层粘连蛋白 γ -2 单体（例如，层粘连蛋白 γ -2 单体、层粘连蛋白 γ -2 单体的变体或其任何组合）的试剂盒。所述试剂盒包含用于测定测试样品的层粘连蛋白 γ -2 单体的至少一种组分和用于测定测试样品的（例如，层粘连蛋白 γ -2 单体、层粘连蛋白 γ -2 单体的变体或其任何组合）的说明书。所述至少一种组分包括至少一种组合物，所述组合物包含特异性结合（例如，层粘连蛋白 γ -2 单体、层粘连蛋白 γ -2 单体的变体或其任何组合）的分离抗体。所述抗体具有可变重结构域区域和可变轻结构域区域。抗体任选被可检测标记。

[0143] 例如，所述试剂盒可以包含用于通过免疫测定，例如化学发光微粒免疫测定测定测试样品的（例如，层粘连蛋白 γ -2 单体、层粘连蛋白 γ -2 单体的变体或其任何组合）的说明书。说明书可以是纸形式或计算机可读形式，诸如光盘、CD、DVD 等。所述抗体可以是层粘连蛋白 γ -2 单体捕获抗体和 / 或层粘连蛋白 γ -2 单体检测抗体。或者或额外地，试剂盒可以包含校准物或对照，例如纯化的，且任选冻干的，（例如，层粘连蛋白 γ -2 单体，层粘连蛋白 γ -2 单体的变体或其任何组合），和 / 或至少一个用于实施测定的容器（例如已经用抗层粘连蛋白 γ -2 单体单克隆抗体包被的管、微量滴定板或条），和 / 或缓冲液，诸如测定缓冲液或洗涤缓冲液，其中任一个可作为浓缩溶液、可检测标记（例如酶促标记）的底物溶液、或终止液提供。优选地，试剂盒包含进行该测定所必需的所有组分，即，试剂、标准品、缓冲液、稀释剂等。说明书还可以包括用于出于定量层粘连蛋白 γ -2 单体的目的生成标准曲线或参考标准的说明书。

[0144] 试剂盒中提供的任何抗体，诸如对于层粘连蛋白 γ -2 单体特异性的重组抗体，可以并入可检测标记，诸如荧光团、放射性部分、酶、生物素 / 抗生物素蛋白标记、发色团、化学发光标记等，或者试剂盒可以包括用于标记抗体的试剂或用于检测抗体的试剂（例如，检测抗体）和 / 或用于标记分析物的试剂或用于检测分析物的试剂。可以将抗体、校准物和 / 或对照在分开的容器中提供，或预先分配到合适的测定形式中，例如到微量滴定板中。

[0145] 任选地，试剂盒包括质量控制组分（例如，灵敏度实验对象组 (sensitivity panels)、校准物和阳性对照)。质量控制试剂的制备为本领域众所周知，并在关于多种免疫诊断产品的插页中得到描述。灵敏度实验对象组成员任选用于确立测定性能特征，并进一步任选地是免疫测定试剂盒试剂完整性以及测定标准化的有用指示物。

[0146] 试剂盒也可以任选包括进行诊断性测定或促进质量控制评价所需的其他试剂，诸如缓冲液、盐、酶、酶辅因子、底物、检测试剂等。其他组分，诸如用于分离和 / 或处理测试样品的缓冲液和溶液（例如预处理试剂）也可包括在试剂盒中。试剂盒可以额外包括一种或多种其他对照。可以将试剂盒的一种或多种组分冻干，在该情况下，试剂盒可以进一步包含适于重构冻干的组分的试剂。

[0147] 任选将试剂盒的各种组分根据需要提供在合适的容器（例如微量滴定板）中。试剂盒可以进一步包括容纳或贮存样品的容器（例如血液样品的容器或药液筒）。适当时，试剂盒任选也可以含有反应容器、混合容器和促进制备试剂或测试样品的其他组分。试剂盒也可以包括帮助获得测试样品的一种或多种仪器，诸如注射器、移液管、镊子、量勺 (measured spoon) 等。

[0148] 如果可检测标记是至少一种吡啶鎓化合物,则试剂盒可以包含至少一种吡啶鎓-9-甲酰胺、至少一种吡啶鎓-9-甲酸芳基酯或其任何组合。如果可检测标记是至少一种吡啶鎓化合物,则试剂盒也可以包含过氧化氢的来源,诸如缓冲液、溶液、和/或至少一种碱性溶液。

[0149] 如果需要,所述试剂盒可以含有固相,诸如磁性颗粒、珠粒、试管、微量滴定板、比色皿、膜、支架分子、薄膜、滤纸、石英晶体、盘或芯片。所述试剂盒还可包括可检测的标记,其可以是抗体或缀合于抗体,诸如发挥检测抗体作用的抗体。所述可检测的标记可以例如是直接标记,其可以是酶、寡核苷酸、纳米颗粒化学发光体、荧光团、荧光猝灭剂、化学发光猝灭剂或生物素。所述试剂盒可任选地包括检测所述标记所需的任何其他试剂。

[0150] 如果需要,所述试剂盒可以进一步包含一种或多种组分,单独或进一步与说明组合,用于测定测试样品的另一种分析物,其可以是生物标志物,诸如癌症的生物标志物。分析物的实例包括,但不限于层粘连蛋白 γ -2 单体、CEA、CA19-9、和层粘连蛋白 γ -2 单体的片段以及其他分析物和本文讨论或者另外本领域已知的生物标志物。在一些实施方案中,用于测定测试样品的层粘连蛋白 γ -2 单体的一种或多种组分使得能够测定层粘连蛋白 γ -2 单体的存在、量或浓度。样品,诸如血清样品,也可以使用 TOF-MS 和内部标准品针对层粘连蛋白 γ -2 单体进行测定。

[0151] 通过如本文所述的免疫测定确定测试样品中层粘连蛋白 γ -2 单体的浓度的试剂盒(或其组分)及方法,可以进行调整以用于多种自动化和半自动化系统中(包括其中固相包含微粒的那些),如例如美国专利号 5,089,424 和 5,006,309 中所述、以及例如由 Abbott Laboratories (Abbott Park, IL) 作为 ARCHITECT® 商业销售的。

[0152] 自动化或半自动化系统与非自动化系统(例如 ELISA) 相比之间的一些差异包括结合第一特异性结合伴侣(例如,分析物抗体或捕获抗体)的基底(这可以影响夹心形成和分析物反应性)和捕获、检测和/或任何任选洗涤步骤的长度和时机。尽管非自动化形式(诸如 ELISA) 可要求与样品和捕获试剂相对较长的孵育时间(例如,约 2 小时),但自动化或半自动化形式(例如 ARCHITECT® 和任何后继平台, Abbott Laboratories) 可具有相对较短的孵育时间(例如对 ARCHITECT® 约 18 分钟)。类似地,尽管非自动化形式(诸如 ELISA) 可以孵育检测抗体(诸如缀合试剂)相对较长的孵育时间(例如,约 2 小时),但自动化或半自动化形式(例如 ARCHITECT® 和任何后继平台)可具有相对较短的孵育时间(例如对 ARCHITECT® 和任何后继平台约 4 分钟)。

[0153] 可从 Abbott Laboratories 获得的其他平台包括但不限于 AxSYM®、IMx® (参见例如,美国专利号 5,294,404,其在此以其整体通过引用并入)、PRISM®、EIA(珠粒)、和 Quantum™ II,以及其他平台。此外,可以用其他形式例如在电化学或其他手提式或现场即时(point-of-care)测定系统中采用该测定、试剂盒和试剂盒组分。本公开例如可适用于进行夹心免疫测定的商业 Abbott Point of Care (i-STAT®, Abbott Laboratories) 电化学免疫测定系统。在一次性使用测试设备中的免疫传感器及其制造和操作方法描述于例如美国专利号 5,063,081、美国专利申请公开号 2003/0170881、美国专利申请公开号 2004/0018577、美国专利申请公开号 2005/0054078、和美国专利申请公开号 2006/0160164,其通过参考它们关于其的教导以其整体并入。

[0154] 具体而言,关于测定对 I-STAT® 系统的调整,优选下述配置。用一对金电流分析工

作电极和一个银-氯化银参考电极制造微制作硅芯片。在工作电极之一上,具有固定化的捕获抗体的聚苯乙烯珠粒(0.2 mm 直径)附着于电极上模式化的聚乙烯醇的聚合物涂层。将该芯片以适于免疫测定的流体学形式装配到 I-STAT® 药液筒中。药液筒的样品保持室的壁的部分上存在包含用碱性磷酸酶(或其他标记)标记的检测抗体的层。在药液筒流体袋内是包括对氨基苯酚磷酸酯的含水试剂。

[0155] 在操作中,将怀疑含有层粘连蛋白 γ -2 单体的样品添加到测试药液筒的保持室,并将药液筒插入 I-STAT® 阅读器。在二抗(检测抗体)溶解到样品中后,药液筒中的泵元件迫使样品进入含有芯片的管道。在此将其振荡以促进在第一捕获抗体、层粘连蛋白 γ -2 单体和标记的第二检测抗体之间形成夹心。在测定的倒数第二个步骤,将流体挤出袋并进入管道,以将样品从芯片洗掉且进入废物室中。在测定的最终步骤,碱性磷酸酶标记与对氨基苯酚磷酸酯反应,以切割磷酸基团并允许释放的对氨基苯酚在工作电极被电化学氧化。基于测量的电流,阅读器能够通过嵌入式算法和工厂确定的校准曲线计算样品中层粘连蛋白 γ -2 单体的量。

[0156] 将理解的是,本文所述方法和试剂盒必需包括实施免疫测定的其他试剂和方法。例如,本公开涵盖各种缓冲液,诸如本领域已知的和/或易于制备或被优化以应用的,例如用于洗涤,作为缀合物稀释剂、和/或作为校准物稀释剂。示例性缀合物稀释剂是用于某些试剂盒(Abbott Laboratories, Abbott Park, IL)中并含有 2-(N-吗啉代)乙磺酸(MES)、盐、蛋白封闭剂、抗微生物剂、和去污剂的 ARCHITECT® 缀合物稀释剂。示例性校准物稀释剂是用于某些试剂盒(Abbott Laboratories, Abbott Park, IL)中并包含含有 MES、其他盐、蛋白封闭剂、和抗微生物剂的缓冲液的 ARCHITECT® 校准物稀释剂。此外,如 2008 年 12 月 31 日提交的美国专利申请号 61/142,048 中所述,例如在 I-STAT® 药液筒形式中,使用与信号抗体连接的核酸序列作为信号放大器,可以获得改善的信号生成。

[0157] 如果需要,可在试剂盒中包括多种浓度的各种抗体,以便于标准曲线的生成,可将测试样品中检测到的信号与标准曲线进行比较。或者,可通过制备试剂盒中提供的单一抗体溶液的稀释液而生成标准曲线。

[0158] 本领域技术人员将显而易见的是,本文所述的本公开方法的其他适合的改变和调整是容易可适用且可感知的,并可使用合适的等同方案实施而不脱离本公开或本文公开的方面和实施方案的范围。现在已经详细描述了本公开,其将通过参考以下实施例被更清楚地理解,所述实施例仅仅意欲说明本公开的一些方面和实施方案,并且不应被视为限制本公开的范围。本文引用的所有期刊参考文献、美国专利和出版物的公开均以其整体通过引用并入本文。

实施例

[0159] 材料与方法

实施例中使用的兔多克隆抗体通过用纯化的人层粘连蛋白 γ -2 链的结构域 III 免疫兔而建立,所述人层粘连蛋白 γ -2 链的结构域 III 在大肠杆菌中重组表达(结构域 III (383-608 aa) 表达为使用 Gateway 技术(Invitrogen, Grand Island, NY)的 GST 融合蛋白)。小鼠单克隆抗体 2H2 由东京大学的 Koshikawa 博士和 Seiki 博士提供(单克隆抗体 2H2 描述于 Koshikawa N, 等人. *Cancer Res.* 2008; 68: (2). 2008 年 1 月 15 日)。单

克隆抗体 D4B5 和 1H3 (D4B5 由 Millipore, Billerica, Massachusetts 市售。1H3 描述于 Koshikawa N, 等人. *Cancer Res.* 2008; 68: (2). 2008 年 1 月 15 日)。膀胱癌患者的样本购自 ProMedDx (Norton, MA)。结肠直肠癌患者的样本购自 ProMedDx (Norton, MA) 和 KAC Co., Ltd. (Kyoto, Japan)。胰腺癌患者的样本购自 ProMedDx (Norton, MA) Bioreclamation LLC (Long Island, NY) 和 KAC Co., Ltd. (Kyoto, Japan)。卵巢癌患者的样本购自 Bioreclamation LLC (Long Island, NY) 和 KAC Co., Ltd. (Kyoto, Japan)。胃癌患者的样本购自 ProMedDx (Norton, MA) 和 KAC Co., Ltd. (Kyoto, Japan)。食管癌患者的样本购自 Bioreclamation LLC (Long Island, NY)。总共 109 个正常样本购自几个供应商,包括 KAC Co., Ltd. (Kyoto, Japan)、Bioreclamation LLC (Long Island, NY)、SeraCare life Sciences Inc. (Milford, MA) 和 Complex Antibodies, Inc (Fort Lauderdale, FL)。

[0160] 实施例 1: 抗体和原型 ELISA 的验证

进行一系列实验,以便表征用于在建立层粘连蛋白 γ -2 单体的示例性 ELISA 中使用的各种抗体的结合特性。

[0161] 单克隆抗体 2H2 与 γ -2 单体的结合特异性

进行 Western 印迹测定以便评估单克隆抗体 2H2 与 γ -2 单体的特异性和其与层粘连蛋白 5 的交叉反应性程度。如图 3 中说明,抗体单克隆 D4B5 (购自 Millipore, Billerica, Massachusetts) 表现出与层粘连蛋白 5 复合物 (以 20 ng;图 3 的泳道 1) 和 γ -2 单体 (以 4 ng;图 3 的泳道 2) 两者的结合活性。相比之下,单克隆抗体 2H2 显示与 γ -2 单体的结合特异性,而没有与层粘连蛋白 5 复合物的任何结合活性。每种单克隆抗体以 1 μ g/mL 的浓度使用。

[0162] 掺料回收率和稀释线性

为了评价稀释线性中的抗体性能,将单克隆抗体 D4B5 (5 μ g/mL)、1H3 (10 μ g/mL) 和 2H2 (10 μ g/mL) (来源 D4B5 购自 D4B5 由 Millipore, Billerica, Massachusetts 市售。2H2 和 1H3 由 Koshikawa 博士和 Seiki 博士 (东京大学) 提供且描述于 Koshikawa N, 等人. *Cancer Res.* 2008; 68: (2). 2008 年 1 月 15 日) 使用标准程序包被在 96 孔微量滴定板 (Costar) 的孔中。简而言之,将各孔用磷酸盐缓冲盐水 (PBS) 中的各种浓度的抗体在 4 $^{\circ}$ C 包被过夜。将各孔用 3% 牛血清白蛋白 (BSA) 在 37 $^{\circ}$ C 封闭 1 小时。将各种稀释度 (400x、2000x、10000x 和无添加 / 掺料) 的重组层粘连蛋白 γ -2 单体添加至稀释液 (PBS), 并且添加至正常血清样本样品 (Complex Antibodies, Inc.) 的两种不同的稀释液 (3x 和 10x)。每种抗体显示与层粘连蛋白 γ -2 单体的稀释度以及基质 (即正常血清样品) 的稀释度的良好响应线性。来自本实验中的数据的说明性实例显示于图 4 中的 2H2 单克隆抗体。

[0163] 单克隆抗体 2H2 在 96 孔微量滴定板中以 10 μ g/mL 包被,并且使用掺料回收率测定进一步评估。将重组层粘连蛋白 γ -2 单体掺入稀释液 (PBS) 和正常血清样本样品 (ProMedDx)。本实验的层粘连蛋白 γ -2 单体的目标浓度范围跨越 0-20 ng/mL (0.00、0.31、0.63、1.25、2.50、5.00、10.00 和 20.00 ng/mL)。一旦将正常样本样品中的浓度针对内源信号 (即无掺料) 进行调整,则层粘连蛋白 γ -2 单体的平均掺料回收率计算为 86.3%。

[0164] 使用 2H2 作为捕获抗体建立 ELISA 的灵敏度

使用 2H2 单克隆抗体作为捕获抗体、针对人层粘连蛋白 γ -2 的结构域 III 的兔多克隆

抗体作为检测抗体和缀合至辣根过氧化物酶的二级抗兔抗体进行 ELISA 测定,以便评价层粘连蛋白 γ -2 单体 ELISA 的分析灵敏度和可靠浓度范围。简而言之,96 孔板中的各孔用 50 μ L 2H2 抗体 (10 μ g/mL) 在 4 $^{\circ}$ C 包被过夜。将各孔用 200 μ L/ 孔的 PBS 洗涤三次。将各孔用 200 μ L 含有 PBS 中的 BSA(3%) 的溶液在 37 $^{\circ}$ C 封闭 1 小时。用 200 μ L PBS 中的 0.1% Tween-20 洗涤三次之后,将板储存在 -20 $^{\circ}$ C 直至使用。

[0165] 对于 ELISA,制备以下溶液:

将样品溶液制备为含有 1% BSA、10 mM EDTA、2% Tween 20、0.2 mg/mL HBR 的 PBS 中的 10x 样本稀释液。

[0166] 洗涤溶液是含有 0.1% Tween-20 的 PBS。

[0167] 检测抗体溶液(或“第一”抗体溶液)含有含 1% BSA、10mM EDTA、2% Tween-20、0.2mg/mL HBR 的 PBS 中的多克隆兔抗体。将该溶液在室温添加至各孔(50 μ L),并且孵育 1 小时。

[0168] 二抗溶液(或“第二”抗体溶液)含有含 1% BSA、10mM EDTA、2% Tween-20、0.2mg/mL HBR 的 PBS 中 5000x 过量的缀合至辣根过氧化物酶(HRP)的驴抗兔 IgG 抗体或山羊抗兔 IgG 的 F(ab')₂ 片段。

[0169] ELISA 方案:向各孔添加 50 μ L 样品溶液,并且允许在 37 $^{\circ}$ C 孵育 2 小时。将各孔用洗涤溶液洗涤三次,200 μ L/ 洗涤。洗涤后,将检测抗体溶液在室温添加至各孔(50 μ L/ 孔),并且孵育 1 小时。将各孔再次洗涤三次,200 μ L 洗涤溶液 / 洗涤。将二抗溶液(50 μ L/ 孔)在室温添加至各孔,并且孵育 1 小时。四轮洗涤(200 μ L/ 洗涤)之后,将 100 μ L 四甲基联苯胺(TMB)添加至每个孔。通过添加 100 μ l/ 孔的 0.6% 硫酸溶液终止反应,孵育 20 min。OD 读数在 450 和 630 nm (Bio-Rad) 进行。

[0170] 如图 5B 中显示,建立的标准曲线表明测定的分析灵敏度为约 3.7 pg/mL,使得该 ELISA 的可靠检测限值为约 4 pg/mL,并且线性检测范围为至少 0-4,000 pg/mL。

[0171] 使用层粘连蛋白 γ -2 单体掺料 (spiked) 的癌症样本和正常样本的稀释线性分析

使用两个癌症样本(一个膀胱癌样本,一个胰腺癌样品)和两个正常样本进行稀释线性的进一步评估。用重组层粘连蛋白 γ -2 单体掺料正常样本。对于范围为 1:8 至 1:1 (即,8x 至 1x 稀释度)的稀释因子,结果表明了癌症样本中 95-116% (相比于未掺料)和正常样本中 93-113% 的回收率。

[0172] 实施例 2:层粘连蛋白 γ -2 单体的测量

制备十个膀胱癌患者的血清样本和二十五个结肠直肠癌患者的血清样本连同正常样本(109),用于测定各种生物标志物浓度。对于 CEA 和 CA19-9 使用 ARCHITECT 系统进行样品的测量,而层粘连蛋白 γ -2 单体浓度使用上文详述的 ELISA 测定法来测定。所有商业试剂盒根据制造商的说明书使用。

[0173] 结果

图 1 描述了具有各种癌症(包括膀胱癌 (n = 10) 和结肠直肠癌 (n = 25)) 的患者的血清样品以及来自健康对照患者的血清样品中层粘连蛋白 γ -2 单体的水平的点状图。[来自膀胱癌患者的中的层粘连蛋白 γ -2 单体的中值水平为 992 pg/mL,对于结肠直肠癌患者为 929 pg/mL,而对于健康对照为 485 pg/mL。使用 Student's t- 检验:膀胱癌相比于健康对照为 p=0.000041,结肠直肠癌相比于健康对照为 p=0.00031]。当与正常样本或其他癌

症样本（例如，胰腺、卵巢、胃和食管）中层粘连蛋白 γ -2 单体的浓度比较时，来自膀胱样本和结肠直肠癌样本的血清样品中层粘连蛋白 γ -2 单体的浓度显著更高。

[0174] LN γ -2 单体 - 膀胱癌和结肠直肠癌的灵敏且特异的血清标志物

接受者工作特征 (ROC) 图从膀胱癌和结肠直肠癌样本中三种测量的生物标志物（层粘连蛋白 γ -2 单体、CEA、CA19-9）的水平观察真阳性率针对正常样本中三种生物标志物水平的观察假阳性率来生成（图 2）。从左下轴线穿过图到右上角（例如，(1, 1) 的坐标）的对角线将表明图具有最坏可能的预测方法，其中标志物水平将完全无法区分癌症样本和正常样本。预期最好可能的预测方法在 ROC 空间的左上角或坐标 (0, 1) 产生点，代表 100% 灵敏度（无假阴性）和 100% 特异性（无假阳性）。因此，从接近 1.0 的值的实际数据图推导的曲线下面积 (AUC) 代表最佳可能的预测方法。如图 2 中显示，ROC 图曲线表明当与膀胱和结肠直肠癌诊断相关的其他生物标志物 (CEA 和 CA19-9) 相比时，层粘连蛋白 γ -2 单体标志物对于膀胱癌和结肠直肠癌两者的灵敏度和特异性。从该数据来看，层粘连蛋白 γ -2 单体表明作为膀胱癌和结肠直肠癌的生物标志物相对于那些疾病的现有生物标志物的优异的灵敏度和特异性。

[0175] 表 1. ROC 概述（膀胱癌相对于 (v.) 正常）。

标志物	面积	95% CI	SE
层粘连蛋白 γ 2 单体	0.91	0.83-0.99	0.039
CEA	0.55	0.29-0.61	0.083
CA19-9	0.66	0.48-0.84	0.091

[0176] 表 2. ROC 概述（结肠直肠癌相对于 (v.) 正常）。

标志物	面积	95% CI	SE
层粘连蛋白 γ 2 单体	0.90	0.85-0.96	0.028
CEA	0.55	0.37-0.73	0.092
CA19-9	0.58	0.43-0.74	0.077

[0177] 该数据首次确立，a) 检测血清中层粘连蛋白 γ -2 单体的能力，和 b) 血清中层粘连蛋白 γ -2 单体的浓度增加（相比于正常（健康）对照以及其他癌症类型的样品中的浓度）与患者样品中膀胱癌和结肠直肠癌的发生的意外关联。此外，该数据还确立，层粘连蛋白 γ -2 单体显示当与其他现有和临床相关的生物标志物相比时对于膀胱癌和结肠直肠癌两者的优异的诊断准确性。本公开还首次确立了这样的诊断测试，所述诊断测试可用于以增加灵敏度和特异性（即，它不检测层粘连蛋白 5）检测血清中的层粘连蛋白 γ -2 单体，并且不需要蛋白水解处理层粘连蛋白 γ -2 单体用于检测（即，该测定对于 MT1-MMP 生成的层粘连蛋白 γ -2 N- 末端片段不是特异性的）。

[0178] 因此，层粘连蛋白 γ -2 单体可以用于诊断患者样品中的癌症，诸如，膀胱癌和结肠直肠癌，或提供主体或患者中癌症诸如膀胱癌和结肠直肠癌的风险或进展的预后。类似地，层粘连蛋白 γ -2 单体的升高水平可以用于将患者鉴定为包含一种或多种癌症治疗的治疗的候选。

[0179] 实施例 3：确立用于自动免疫测定仪器 ARCHITECT™ 的原型试剂

进行一系列实验，以便将 ELISA 试剂转移为用于检测层粘连蛋白 γ -2 单体的自动免疫测定试剂。

[0180] 将单克隆抗体 2H2 包被在顺磁微球 (Varian Medical Systems, Palo Alto, CA) 上。羧基修饰的微粒然后用 MES 缓冲液 (pH5.5) 洗涤，然后将含有 N-(3- 二甲基氨基丙

基)-N'-乙基-碳二亚胺盐酸盐 (SIGMA-ALDRICH, St Louis, MO) 和 N-羟基琥珀酰亚胺 (SIGMA-ALDRICH, St Louis, MO) 的 MES 缓冲液添加至微粒。在室温孵育 30 min 后,将试剂被洗出,并且将用 MES 缓冲液稀释的抗体添加至微粒。该反应中抗体的最终浓度为 0.3 mg/mL。在室温孵育 2 小时后,微粒用具有 1% Tween-20 的 TBS 洗涤,并储存在 2-8 摄氏度。

[0181] 将针对人层粘连蛋白 γ -2 的结构域 III 的兔多克隆抗体 (用作 ELISA 中的检测抗体) 与吡啶鎓在含有 0.5% CHAPS 的 PBS 缓冲液中缀合。过量吡啶鎓由 Zeba Micro 微脱盐离心柱 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) 去除。测定样品稀释液是基于具有 1% BSA 和 0.1% Tween-20 的磷酸盐缓冲液制备。

[0182] ARCHITECT™测定在 i2000 ARCHITECT™分析仪上进行。将重组层粘连蛋白 γ -2 单体掺入样品稀释液 (具有 1% BSA 和 0.1% Tween-20 的 PBS)。用于本实验的层粘连蛋白 γ -2 单体的校准物范围跨越 0-20 ng/mL (0.00、0.01、0.02、0.10、1.00、10.00 和 20.00 ng/mL)。

[0183] 如图 6 中显示,初步标准曲线表明测定的分析灵敏度为约或接近 10 pg/mL。因此,该测定是相当灵敏的。

[0184] 使用层粘连蛋白 γ -2 单体掺料的癌症样本和正常样本的稀释线性分析

稀释线性的进一步评估使用五个正常样本进行。用重组层粘连蛋白 γ -2 单体掺料正常样本。掺料样品用样品稀释液稀释,以产生三倍稀释系列。如图 7 上显示,稀释因子范围为 1:81 至 1:3 (即,81x 至 3x 稀释度)。结果表明了 5 个正常样本中 100-113% 的平均回收率 (相比于未掺料)。ARCHITECT™上的初步测定显示在稀释线性测试方面的良好表现。

[0185] 市售正常样本的评估

总共 66 个正常样本购自几个供应商,包括 ProMedDx (Norton, MA)、KAC Co., Ltd. (Kyoto, Japan)、SeraCare life Sciences Inc. (Milford, MA) 和 Complex Antibodies, Inc (Fort Lauderdale, FL)。正常样本中的层粘连蛋白 γ -2 单体水平由 ARCHITECT™测量。结果显示在图 8 中。正常样本的中位值为 46.0 pg/mL,且 95 百分位数为 95.0 pg/mL。平均值 (64 个正常样本:排除 2 个样本,2496 pg/mL 和 302 pg/mL) 为 50.2 pg/mL。从标准偏差分析 (排除 2 个样本,2496 pg/mL 和 302 pg/mL) 来看,标准偏差值为 17.8 pg/mL,平均值加上两个标准偏差 (适当的截止值) 为 85.8 pg/mL。

参考文献

Koshikawa, N. 等人, Overexpression of Laminin γ 2 Chain Monomer in Invading Gastric Carcinoma Cells; *Cancer Res* (1999) 59:5596-5601.

Koshikawa, N. 等人, Development of a New Tracking Tool for the Human Monomeric Laminin- γ 2 Chain In vitro and In vivo; *Cancer Res* (2008) 68:530-536.

Koshikawa, 等人, Role of Cell Surface Metalloprotease MT1-MMP in Epithelial Cell Migration over Laminin-5; *J. Cell Biol.*, (2000) 148:615-624.

WO03016907 (EISAI CO. LTD) Reagent For Assaying Laminin 5 Antigen In Biological Sample And Assay Method.

JP2011-209281 (University of Tokyo; University Kochi) Examination Method and Examination Kit for Urological Cancer

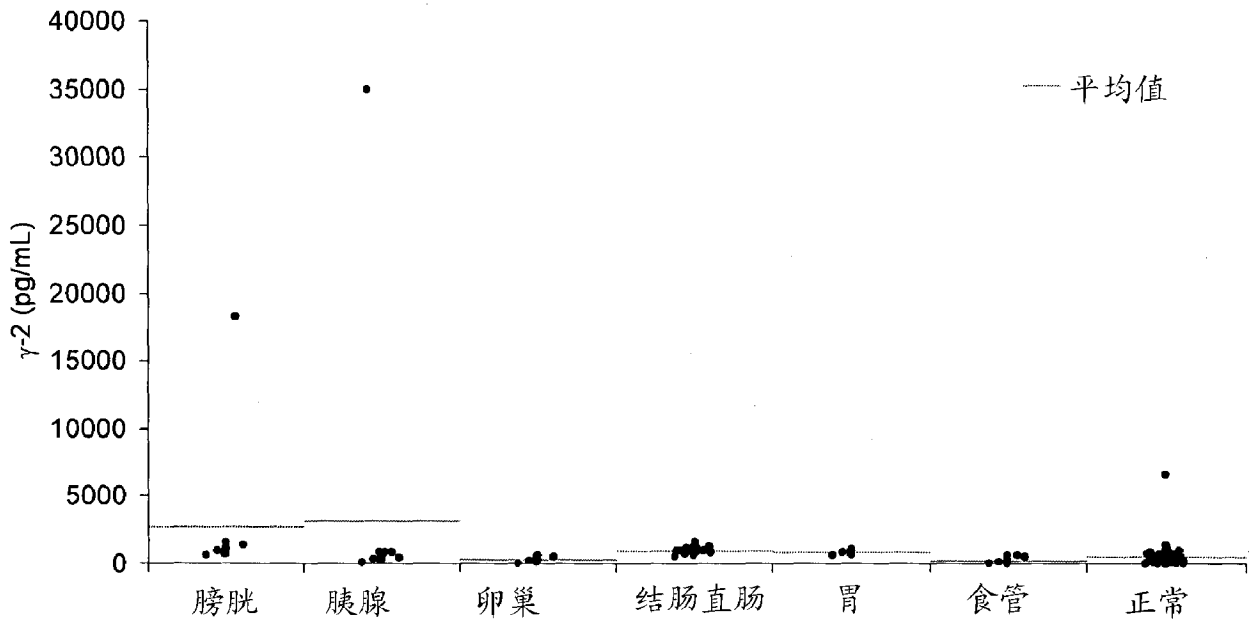


图 1A

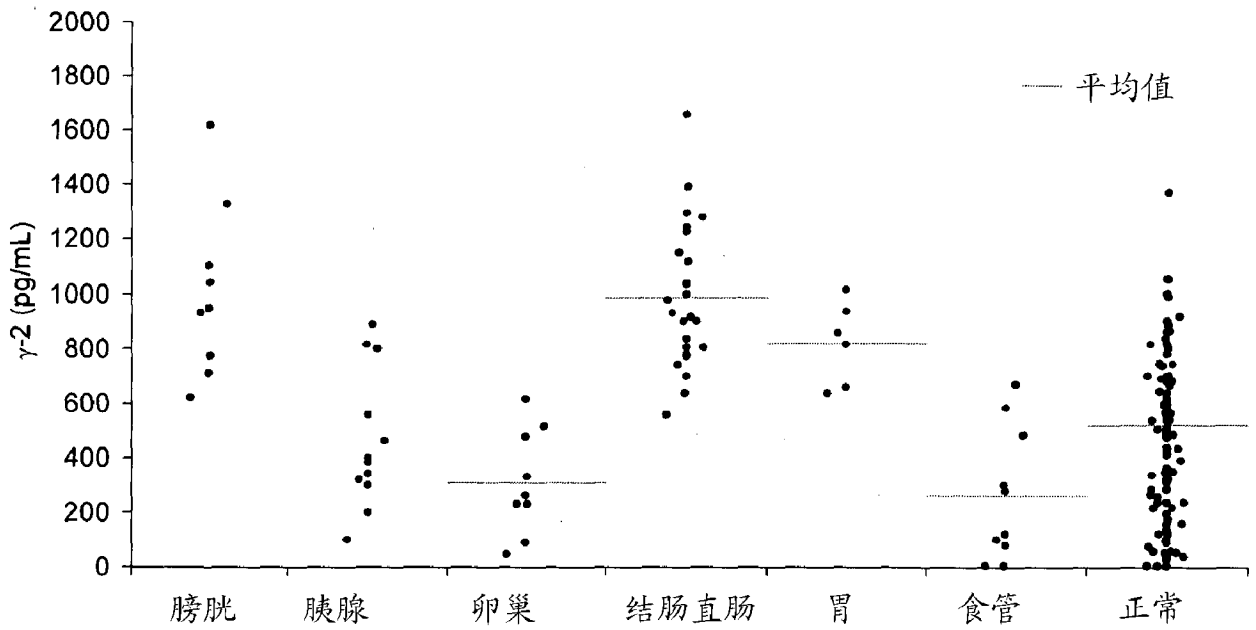


图 1B

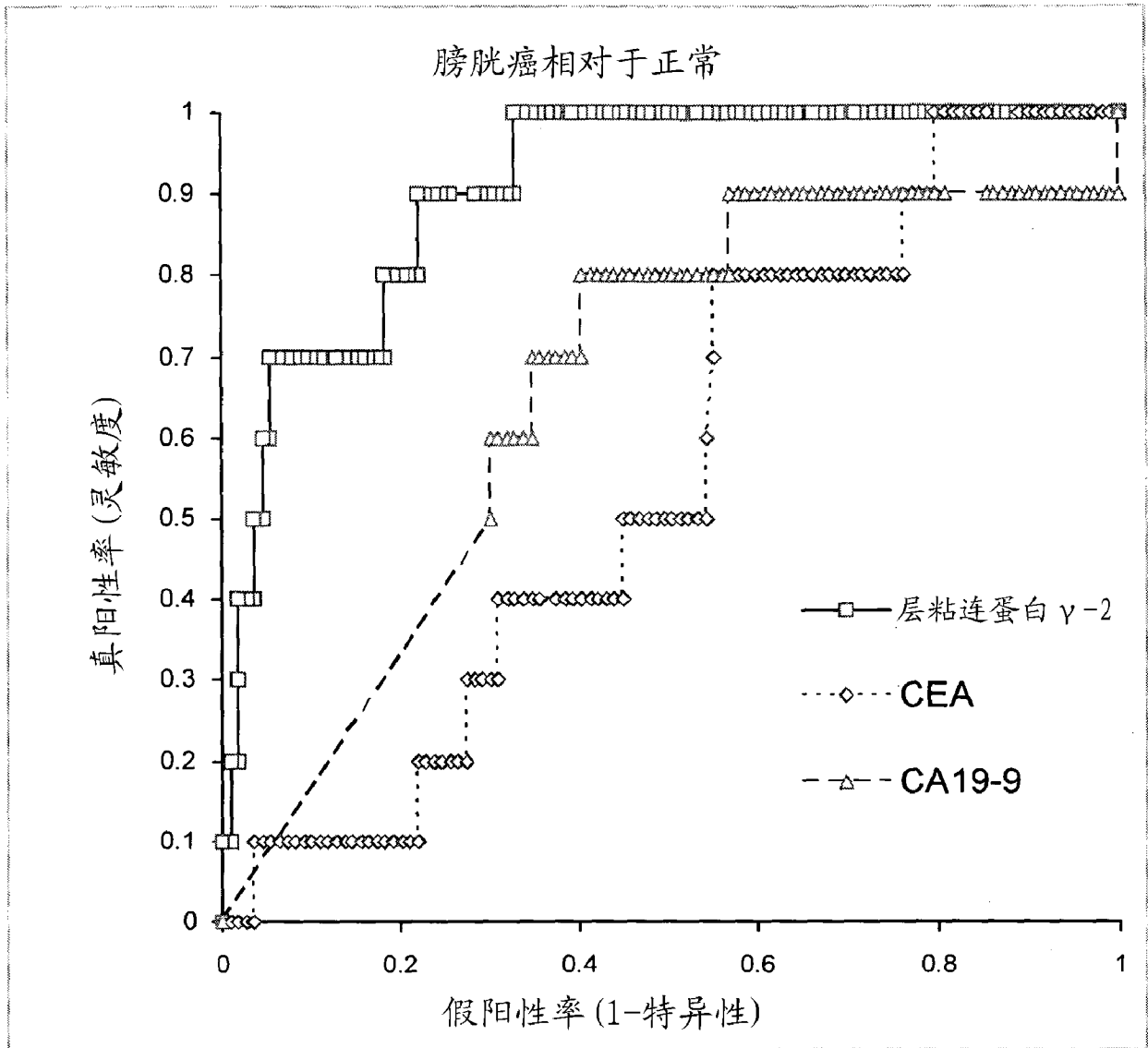


图 2A

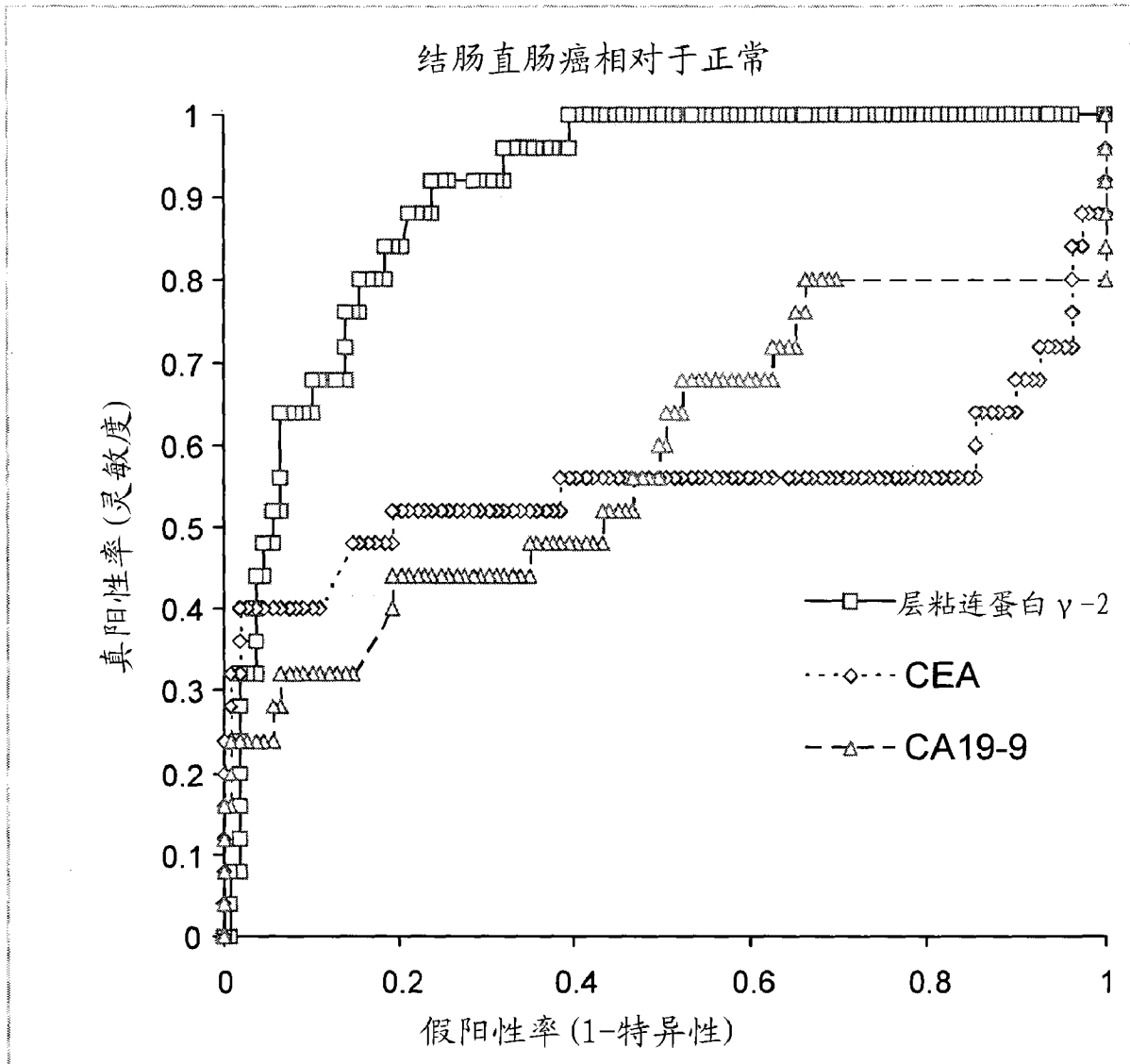
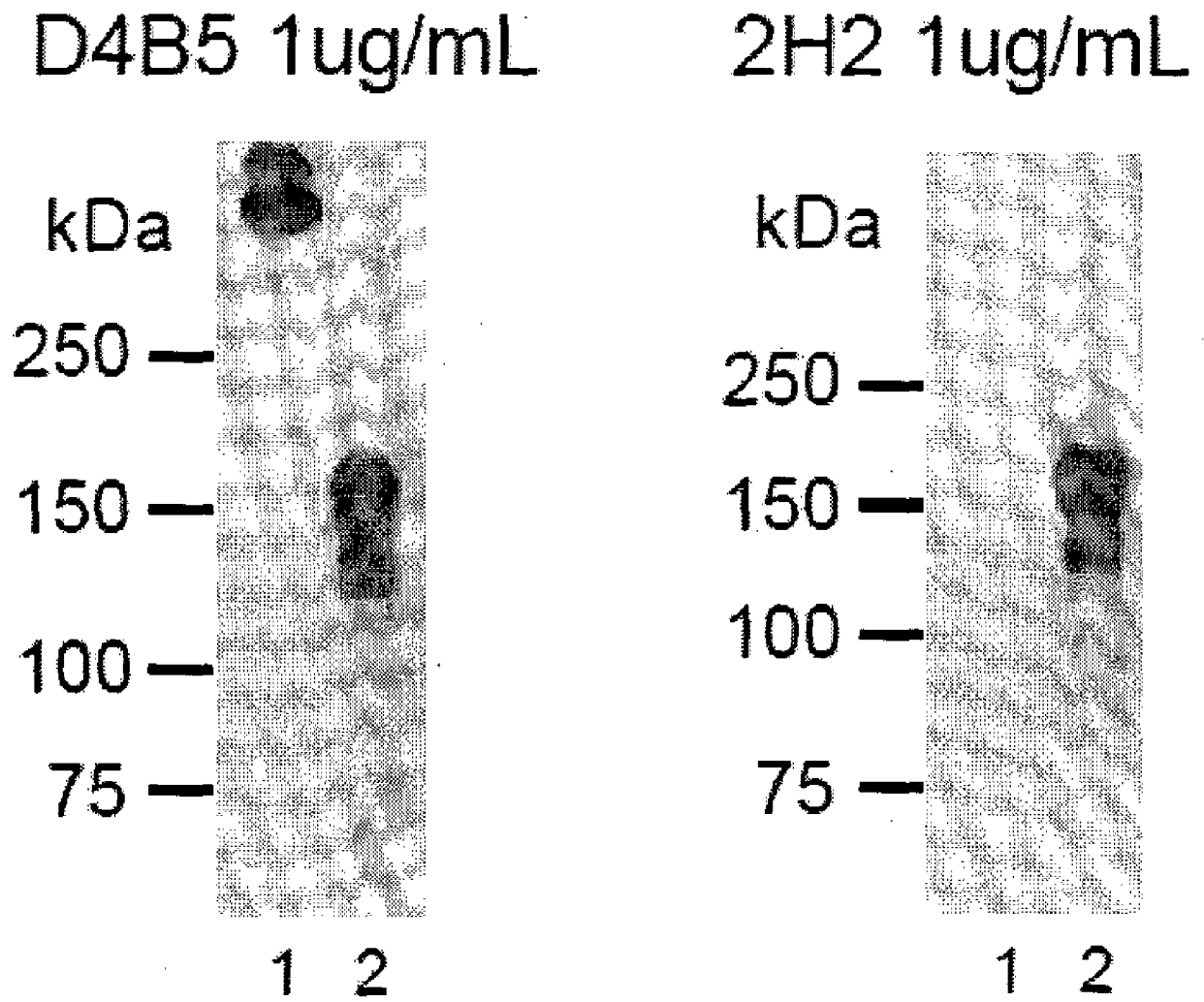


图 2B



ECL-Plus: 1min

非还原条件

1. Ln5 20ng
2. γ 2单体 4ng

图 3

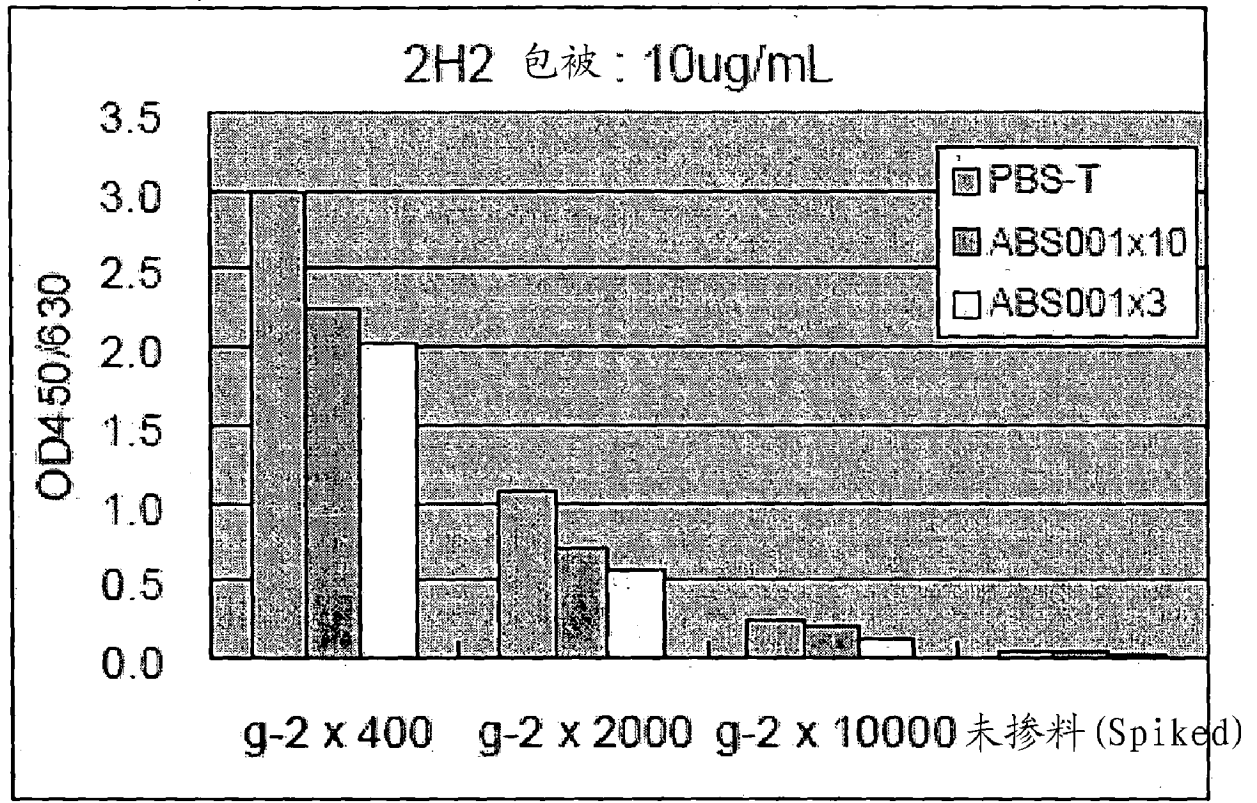


图 4

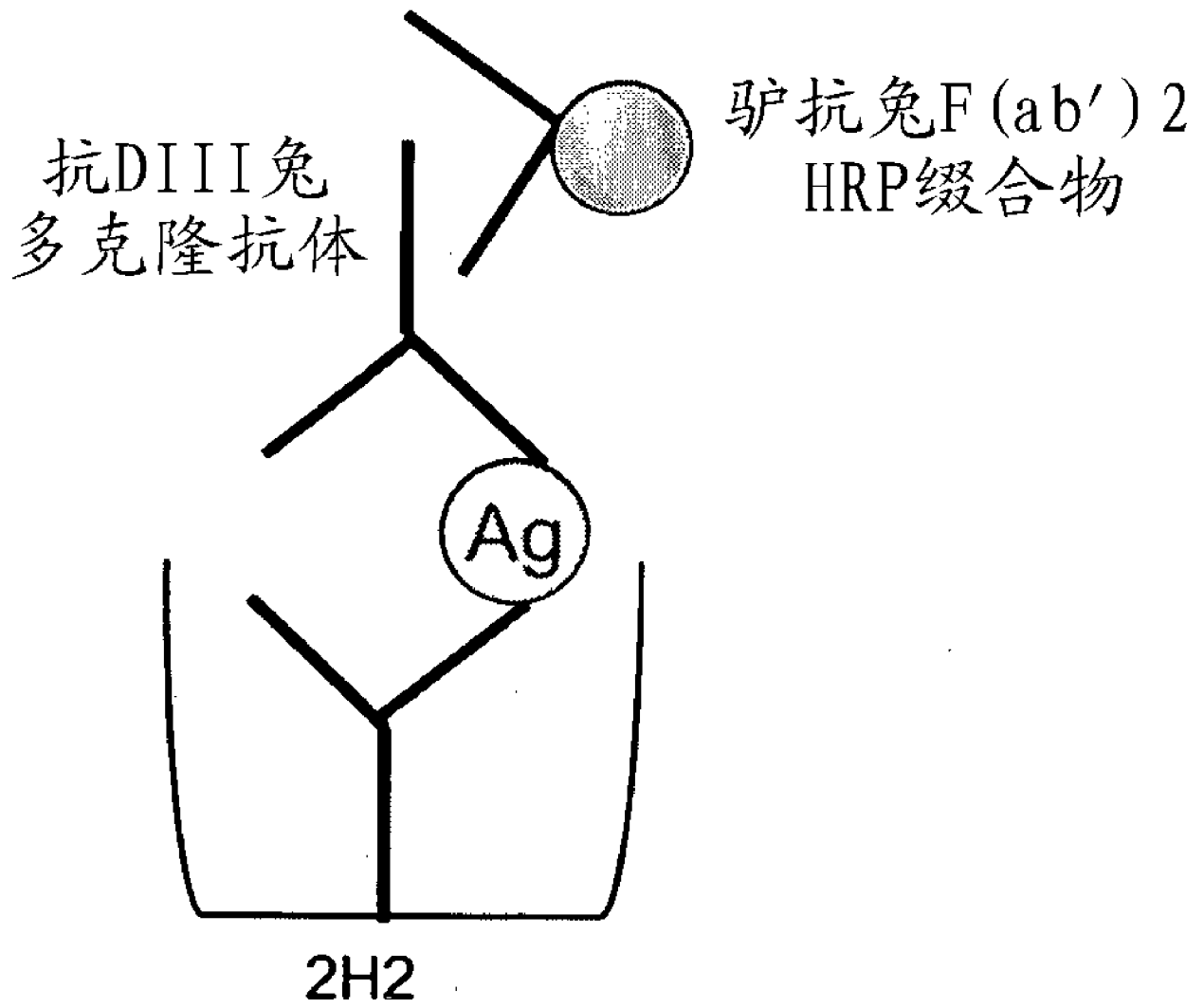


图 5A

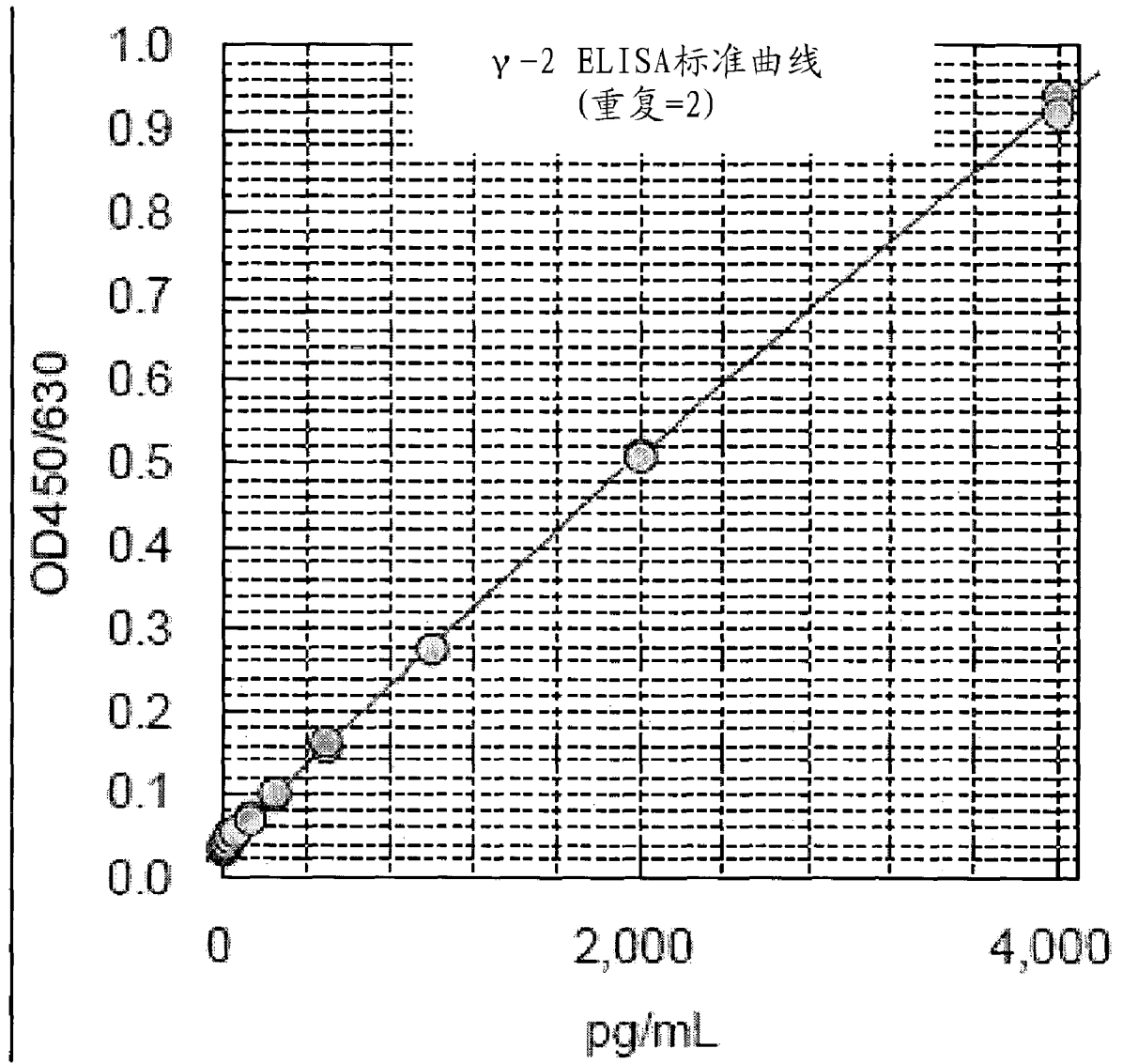
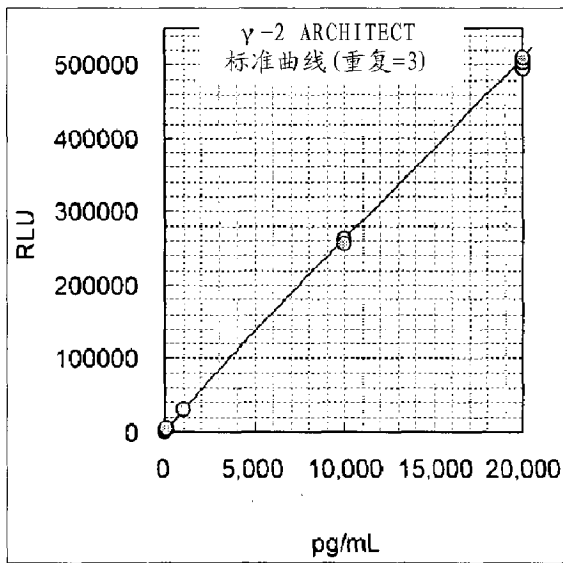
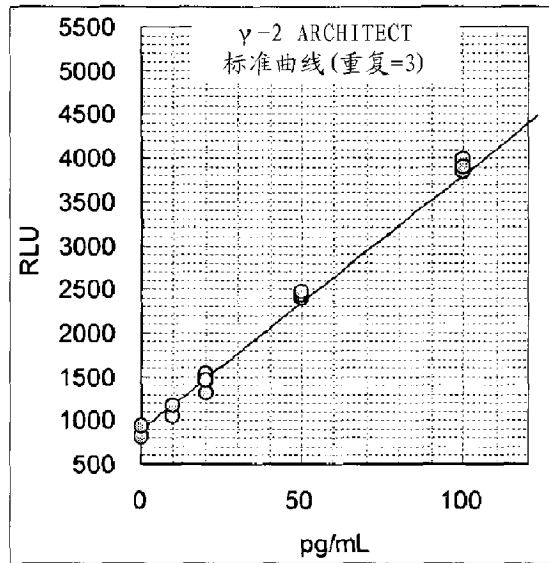


图 5B

样品ID	目标	RLU				计算的浓度			
		个体	平均值	SD	CV	个体	平均值	SD	CV
Cal-A	0.0 pg/mL	816	850.0	66.8	7.9%	-3 pg/mL	-2 pg/mL	2.3	-148.4%
		807				-3 pg/mL			
		927				1 pg/mL			
Cal-B	10.0 pg/mL	1048	1129.7	70.9	6.3%	5 pg/mL	8 pg/mL	2.4	30.2%
		1175				10 pg/mL			
		1166				9 pg/mL			
Cal-C	20.0 pg/mL	1530	1434.0	114.0	7.9%	22 pg/mL	22 pg/mL	3.9	18.0%
		1308				14 pg/mL			
		1464				19 pg/mL			
Cal-D	50.0 pg/mL	2388	2432.3	41.8	1.7%	51 pg/mL	53 pg/mL	1.4	2.7%
		2438				53 pg/mL			
		2471				54 pg/mL			
Cal-E	100.0 pg/mL	3833	3905.0	78.7	2.0%	101 pg/mL	103 pg/mL	2.7	2.6%
		3989				106 pg/mL			
		3893				103 pg/mL			
Cal-F	1000.0 pg/mL	29924	29584.0	372.4	1.3%	1010 pg/mL	998 pg/mL	13.2	1.3%
		29642				1000 pg/mL			
		29186				984 pg/mL			
Cal-G	10000.0 pg/mL	261499	259762.3	3331.8	1.3%	9923 pg/mL	9852 pg/mL	135.0	1.4%
		261867				9938 pg/mL			
		255921				9697 pg/mL			
Cal-H	20000.0 pg/mL	493285	501689.7	8261.9	1.6%	19306 pg/mL	19635 pg/mL	323.6	1.6%
		501983				19647 pg/mL			
		509801				19953 pg/mL			



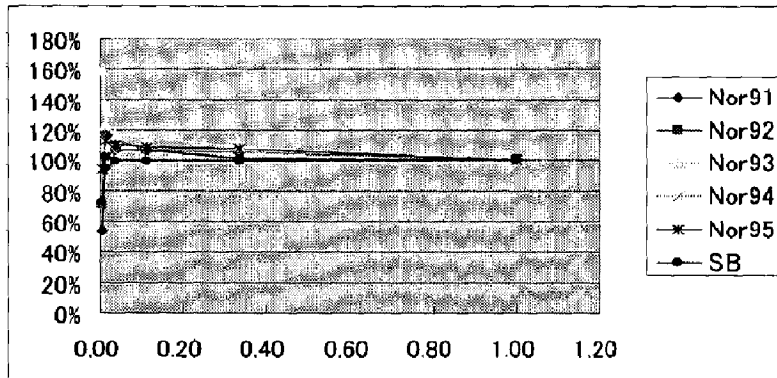
范围：0 - 500,000 RLU



范围：0 - 5,500 RLU

图 6

样品ID	样品	值 (pg/mL)	值x稀释倍数 (pg/mL)	稀释样品相对于 10000 pg/mL 掺料 (%)
正常-91	正常-91 + 10000pg/mL	1019.7	1019.7	100.0%
	正常-91 + 10000pg/mL x 3	344.7	1034.0	101.4%
	正常-91 + 10000pg/mL x 9	121.2	1090.6	107.0%
	正常-91 + 10000pg/mL x 27	40.1	1082.8	106.2%
	正常-91 + 10000pg/mL x 81	12.9	1041.0	102.1%
	正常-91 + 10000pg/mL x 243	2.2	543.3	53.3%
正常-92	正常-92 + 10000pg/mL	964.2	964.2	100.0%
	正常-92 + 10000pg/mL x 3	338.8	1016.5	105.4%
	正常-92 + 10000pg/mL x 9	114.1	1026.9	106.5%
	正常-92 + 10000pg/mL x 27	40.8	1100.7	114.2%
	正常-92 + 10000pg/mL x 81	13.8	1115.0	115.6%
	正常-92 + 10000pg/mL x 243	2.8	679.2	70.4%
正常-93	正常-93 + 10000pg/mL	913.1	913.1	100.0%
	正常-93 + 10000pg/mL x 3	331.6	994.9	109.0%
	正常-93 + 10000pg/mL x 9	117.6	1058.5	115.9%
	正常-93 + 10000pg/mL x 27	39.5	1066.8	116.8%
	正常-93 + 10000pg/mL x 81	13.9	1127.9	123.5%
	正常-93 + 10000pg/mL x 243	6.0	1453.0	159.1%
正常-94	正常-94 + 10000pg/mL	998.6	998.6	100.0%
	正常-94 + 10000pg/mL x 3	359.0	1076.9	107.8%
	正常-94 + 10000pg/mL x 9	126.9	1142.1	114.4%
	正常-94 + 10000pg/mL x 27	38.9	1049.2	105.1%
	正常-94 + 10000pg/mL x 81	13.7	1112.2	111.4%
	正常-94 + 10000pg/mL x 243	4.4	1070.3	107.2%
正常-95	正常-95 + 10000pg/mL	947.3	947.3	100.0%
	正常-95 + 10000pg/mL x 3	339.1	1017.4	107.4%
	正常-95 + 10000pg/mL x 9	114.5	1030.4	108.8%
	正常-95 + 10000pg/mL x 27	39.0	1052.3	111.1%
	正常-95 + 10000pg/mL x 81	13.1	1064.1	112.3%
	正常-95 + 10000pg/mL x 243	3.7	892.8	94.2%
SB	SB + 10000pg/mL	1084.9	1084.9	100.0%
	SB + 10000pg/mL x 3	360.6	1081.8	99.7%
	SB + 10000pg/mL x 9	120.0	1079.8	99.5%
	SB + 10000pg/mL x 27	39.7	1072.0	98.8%
	SB + 10000pg/mL x 81	12.6	1016.9	93.7%
	SB + 10000pg/mL x 243	3.3	790.2	72.8%



稀释 稀释因子	x1	x3	x9	x27	x81	x243
	1.0000	0.3333	0.1111	0.0370	0.0123	0.0041
Nor91	100%	101%	107%	106%	102%	53%
Nor92	100%	105%	107%	114%	116%	70%
Nor93	100%	109%	116%	117%	124%	159%
Nor94	100%	108%	114%	105%	111%	107%
Nor95	100%	107%	109%	111%	112%	94%
SB	100%	100%	100%	99%	94%	73%
平均值(Nor91-95)	100%	106%	111%	111%	113%	97%

图 7

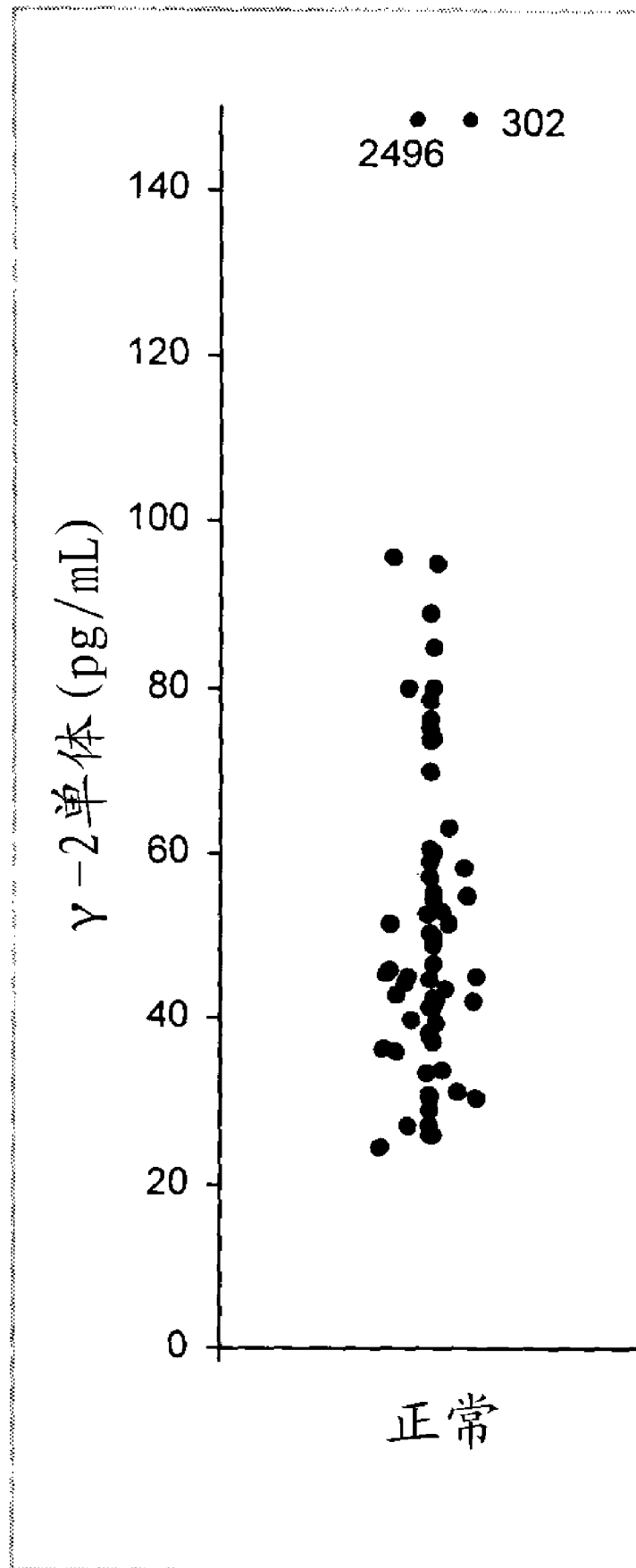


图 8

专利名称(译)	癌症的预后和诊断方法		
公开(公告)号	CN104755935A	公开(公告)日	2015-07-01
申请号	CN201380051263.9	申请日	2013-08-13
[标]申请(专利权)人(译)	阿波特日本有限公司 国立大学法人 东京大学		
申请(专利权)人(译)	雅培日本有限公司 国立大学法人东京大学		
当前申请(专利权)人(译)	雅培日本有限公司 国立大学法人东京大学		
[标]发明人	N 科施卡瓦 M 纳卡加瓦 E 尤施达 T 尤施穆拉 M 塞基		
发明人	N.科施卡瓦 M.纳卡加瓦 E.尤施达 T.尤施穆拉 M.塞基		
IPC分类号	G01N33/574 G01N33/53		
CPC分类号	G01N2800/52 G01N2333/78 G01N2800/50 G01N33/57488		
代理人(译)	杜艳玲		
优先权	61/682462 2012-08-13 US 13/962494 2013-08-08 US		
其他公开文献	CN104755935B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

提供了通过检测来自患者的样品中癌症的生物标志物的存在和/或量而诊断患者中的癌症的方法。所述方法和生物标志物可以用于开发对于具有癌症或怀疑具有癌症的患者的精确预后，或者精确地诊断具有癌症或怀疑具有癌症的患者。所述方法和生物标志物可以用于将患者鉴定和/或分类为用于癌症治疗的候选。

