



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 108770366 A

(43)申请公布日 2018.11.06

(21)申请号 201680081824.3

(74)专利代理机构 北京汇思诚业知识产权代理有限公司 11444

(22)申请日 2016.12.15

代理人 王刚 龚敏

(30)优先权数据

62/267,618 2015.12.15 US

62/300,215 2016.02.26 US

(51)Int.Cl.

G01N 33/53(2006.01)

G01N 33/533(2006.01)

G01N 33/569(2006.01)

G01N 33/68(2006.01)

C12Q 1/68(2018.01)

(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2018.08.15

(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/US2016/066972 2016.12.15

(87)PCT国际申请的公布数据
W02017/106527 EN 2017.06.22

(71)申请人 凯斯西储大学
地址 美国俄亥俄州克利夫兰

(72)发明人 亚伦·温伯格 桑托什·高斯
乌姆特·A·古尔坎

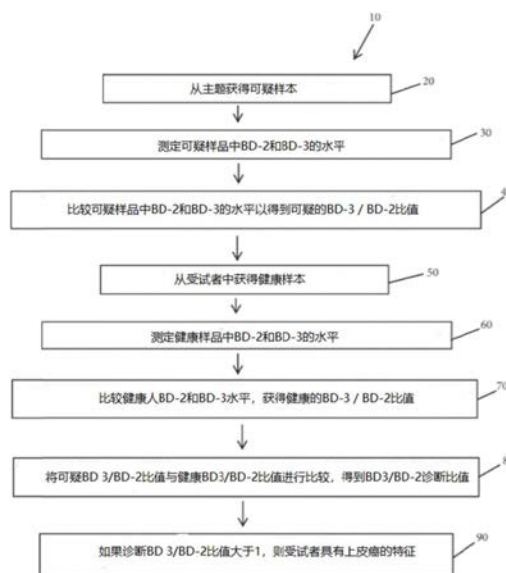
权利要求书2页 说明书13页 附图4页

(54)发明名称

β防御素在上皮性癌评估中的应用

(57)摘要

描述了一种检测上皮癌的方法,该方法包括步骤:(a)在受试者的可疑样本中测定β防御素3(BD-3)和β防御素2(BD-2)的水平;(b)比较可疑样本中确定的BD-3和BD-2的水平,以获得可疑BD-3/BD-2比值;(c)将可疑BD-3/BD-2比值与健康的BD-3/BD-2比值进行比较,以获得诊断BD-3/BD-2比值;和(D)如果诊断BD-3/BD-2比值大于1,则将受试者定性为上皮癌。还描述了使用诊断BD-3/BD-2比值检测上皮癌的微流控装置。



1. 一种检测上皮性癌的方法,包括以下步骤:
 - (a) 从受试者获得的可疑样本中测定 β 防御素3 (BD-3) 和 β 防御素2 (BD-2) 的水平;
 - (b) 比较可疑样本中确定的BD-3与BD-2的水平,以获得可疑的BD-3/BD-2比率;
 - (c) 将可疑的BD-3/BD-2比率与健康的BD-3/BD-2比值进行比较,以获得诊断BD 3/BD-2比率;
 - (d) 如果诊断BD 3/BD-2比率大于1,则将受试者定性为上皮癌。
2. 根据权利要求1所述的方法,其中,健康BD 3/BD-2比率是通过测定从受试者获得的健康样品中BD-3和BD-2的水平来确定的,将健康样品中BD-3与BD-2水平比较,获得健康的BD-3/BD-2比率。
3. 根据权利要求1所述的方法,进一步包括如果诊断BD 3/BD-2比率大于1,则向患者提供上皮癌的治疗。
4. 根据权利要求1所述的方法,其中,如果诊断BD 3/BD-2比率为1.5或更大,则受试者被定性为上皮癌。
5. 根据权利要求1所述的方法,其中在确定可疑样品中的BD-3和BD-2水平之前,将阴离子糖蛋白添加到可疑样品中。
6. 根据权利要求1所述的方法,其中可疑样本是从口腔病变获得的。
7. 根据权利要求1所述的方法,其中可疑样本是从皮肤损伤获得的。
8. 根据权利要求1所述的方法,其中可疑样本包括上皮细胞。
9. 根据权利要求1所述的方法,其中上皮癌是口腔上皮癌。
10. 根据权利要求1所述的方法,其中上皮癌是鳞状细胞癌。
11. 根据权利要求1所述的方法,其中使用免疫分析测定BD-2和BD-3的水平。
12. 根据权利要求11所述的方法,其中所述免疫分析是通过微流体装置进行的。
13. 根据权利要求11所述的方法,其中免疫测定使用荧光成像。
14. 根据权利要求13所述的方法,其中BD-3和BD-2的水平是使用移动设备来确定的,该移动设备被配置为访问通信网络并具有处理器,该处理器被配置为访问被配置为获取荧光图像的相机。
15. 一种用于检测上皮癌的微流控装置,包括一个包括健康通道和可疑通道的平面基底,其包括与上皮细胞特异性结合的固定结合配体,每个通道具有入口端和出口端以及试剂盒,与两个通道流体连接,试剂包括特异性结合BD-2的第一标记结合配体和与BD-3特异性结合的第二标记结合配体。
16. 根据权利要求15所述的微流体装置,其中与上皮细胞特异性结合的固定结合配体特异性结合上皮细胞粘附分子。
17. 根据权利要求15所述的微流体装置,其中结合配体用官能化的中和生物素固定到健康和可疑通道。
18. 根据权利要求15所述的微流体装置,其中该装置是护理点平台。
19. 根据权利要求15所述的微流体装置,其中固定化和标记的结合配体是抗体。
20. 根据权利要求18所述的微流体装置,其中标记的抗体是荧光标记的抗体。
21. 一种检测上皮癌的系统,包括权利要求15的微流体装置和配置为访问通信网络的移动设备,并且具有配置成访问配置成获取荧光图像的照相机的处理器,用于确定BD-3和

BD-2。

22. 根据权利要求21所述的系统,其中微流体装置是护理点平台。

β防御素在上皮性癌评估中的应用

[0001] 政府资助

[0002] 本发明是由国家牙科和颅颌面研究所在P01DE019759授权下资助的。政府对于这项发明有特定权利。

[0003] 相关申请的交叉引用

[0004] 本申请要求于2015年12月15日提交的序列号为No.62/267,618的美国临时申请以及于2016年2月26日提交的序列号为No.62/300,215的美国临时申请的优先权,二者均通过引用全文并入于此。

背景技术

[0005] 头颈部癌(HNC)是世界范围内最常见的第六种癌症,每年约有640000例头颈癌,约有350000人死亡。超过90%的HNC是口腔鳞状细胞癌(OSCC)。尽管早期发现OSCC是高度可治愈的,但由于其频繁的晚期表现,预期的5年相对生存率仅在过去的几十年中略微有所改善;所有OSCC的5年生存率为50%。Gasparotto,D,Mresto R,Int.J.Oncol.31(1).175-80(2007)。由于有一个明确的临床需要开发一种具有成本效益的、可靠的和非侵入性的生物标志物和检测系统,它可以帮助美国和其他高发病率地区的口腔鳞癌早期诊断,医学界正在努力寻找生物标志物。这有助于减少口腔鳞癌的发生。

[0006] 先前已证明,在口腔鳞癌早期的细胞转化导致上皮细胞源性抗菌和免疫调节肽的过度表达,称为人β防御素3(HBD-3)。KaSAR等人,Oral Oncol.45(8),696-702(2009);等,PLoS 1,5(6),E1099 3(2010)。在正常条件下,HBD-3在口腔粘膜高度增殖的非分化层基底中有选择性表达,而高分化的棘层和颗粒层表达HBD-2,几乎没有HBD-3。HBD-3的过度表达是一种可重复的表型,已在许多口腔癌活检中得到证实。Kestin等,Cancer Invest.27(5),55-51(2009)。此外,HBD-3已被确定为一种新的趋化因子,其选择性地招募肿瘤相关巨噬细胞(TAMs)和髓系来源的抑制细胞(MDSC),促进肿瘤的发展和进展。此外,HBD-3激活单核细胞以产生促肿瘤细胞因子和生长因子。Jin等人,PLoS One,5(6),e1093(2010)最近发现,肿瘤抑制基因P53,结合HBD-3基因的启动子区域,并反向调节其表征。此外,p53突变或靶向p53泛素导致HBD-3的过度表征。DasGupTa等人,OnCo target,7(19),27 430-2444(2016)。

发明内容

[0007] 发明人已确定HBD-3表达水平和HBD3/HBD-2表达的比值是检测口腔癌的有希望的候选生物标志物。数据提示HBD-3在原发性头颈部肿瘤发生中起重要作用。金等人,先天免疫和口腔癌变。口腔癌:病因、诊断和治疗新星科学出版社,第253-270页(2011)。特别地,数据表明:(1)HBD-3过表达是早期口腔原位癌(CIS)的一种常见的标记表型,(2)HBD-3具有促进肿瘤形成的生物学特性,(3)HBD-2在口腔顺式中不表达,(4)HBD-3与HBD-2的比值比A高。正常口腔粘膜部位,(5)此比例随病情的发展而变化。

[0008] 本发明提供一种检测上皮性癌的方法,该方法包括以下步骤:(a)在受试者的可疑样本中测定β防御素3(BD-3)和β防御素2(BD-2)的水平;(b)将可疑的BD-3与BD-2的水平进

行比较;PLE以获得可疑的BD 3/BD-2比值,(c)将可疑BD-3/BD-2比值与健康的BD-3/BD-2比值进行比较,以获得诊断BD 3/BD-2比值;和(D)如果诊断BD3/BD-2比值大于1,则将受试者定性为上皮癌。

[0009] 本发明的另一个方面提供了一种用于检测上皮癌的微流控装置,其包括平面基板,其包括第一和第二通道,所述第一通道和第二通道包括与上皮细胞特异性结合的固定结合配体,每个通道具有入口端和输出端。让末端和试剂室流体连接到第一和第二通道,并包括与BD-2特异性结合的第一标记结合配体,以及与BD-3特异结合的第二标记结合配体。结合配体可以是抗体或适体。在一些实施例中,微流体装置被配置为用于护理点使用。

[0010] 本发明的另一个方面提供了一种用于上皮癌的护理点检测系统,包括微流体护理点平台和被配置为访问通信网络的移动设备,并且具有被配置为访问被配置为获取的照相机的处理器。E荧光图像用于确定BD-3和BD-2的水平。

[0011] 本发明比上皮癌的现有检测提供了许多优点。在一些实施方案中,该测定是非侵入性或微创的。与传统的生物标记物测定不同,该测定的结果依赖于两种分析物(HBD-3和HBD-2),使得其比基于使用单一分析物的检测更健壮和特异。每个病人都是他们自己的控制,所以敏感性和特异性通常都很高。可以同时分析正常部位和病损部位的样品,从而最小化化验间变异。与常规生物标记测定不同,需要测定分析物的浓度(体液或单位/单位的量/单位),该测定系统不需要确定绝对浓度,从而消除了包含“标准肛门”的必要性。在每次测定中已知浓度。样品可以在采集的当天进行分析,也可以储存几个月而不会丢失分析值。该测定不需要任何吞吐量仪器。该测定可以很容易地小型化并在短时间内提供结果;例如,在半小时内与标准过夜时间帧。最后,HBD3/HBD-2比值也可预测其他实体肿瘤并具有预后价值。

附图说明

[0012] 并入并构成本说明书的一部分的附图说明了本发明的一些实施例,并与描述一起用来解释发明的原理。

[0013] 图1提供了检测受试者上皮癌的方法的示意图。

[0014] 图2A~2C提供了从30例患者的口腔病变部位(L)与相应的对侧正常部位(N)的细胞刷细胞裂解物的HBD-3ELISA/HBD-2ELISA的(a)吸光度(OD 450)比值的曲线图。绿线表示中值。 $[P < 0.0001$;癌与非癌患者]。十九例被诊断为癌,十一例为非癌。(b)提供了一个图表,显示在诊断为癌症的患者中发现的不同诊断,以及对应于诊断BD 3/BD-2比值的相关R值。(c)提供包括50例患者的扩展研究的结果。

[0015] 图3A~3E提供了一种示意图和图像,示出了在微流控装置中从口腔病变部位和对应的对侧部位的细胞刷样品中上皮细胞中HBD-3/2比值的POC测定。(a)微流体装置由50 μm 高的两个微流体通道组成。(b)微流体通道中的表面化学,用于捕获上皮细胞和HBD-2和HBD-3的荧光标记。(c)相位对比的初步结果,(d)上皮细胞中HBD-3的荧光和(E)在微流体装置中捕获并标记HBD-3的上皮细胞的覆盖成像。HBD-2标记未显示。刻度杆为20 μm 。

[0016] 图4A~4E提供了与配备计算荧光分析能力的定制附件集成的原型护理点移动成像系统的图像。(A—C)移动成像系统允许通过LED和两个激光二极管光源的微流道中的上皮细胞的亮场和荧光成像。(d)智能手机相机与球透镜耦合以收集频道图像。发射滤光器用

于HBD3/HBD-2水平的荧光成像。(e)示出具有通过移动成像系统获得的细胞的微通道的典型图像。虚线圆表示微通道中的细胞。

具体实施方式

[0017] 本发明将通过参考一些更详细的实施例来描述,偶尔参考附图。然而,这些发明可以以不同的形式体现,不应被解释为限于本文所阐述的实施例。相反,这些实施例被提供,使得本公开将是彻底和完整的,并且将充分地将发明的范围传达给本领域的技术人员。

[0018] 除另有规定外,此处所用的所有技术术语和科学术语具有与这些发明所属的本领域普通技术人员通常所理解的含义相同的含义。在本发明的描述中使用的术语仅用于描述特定的实施例,并不意在限制发明。在描述发明和附加权利要求时,单数形式“a”、“a”和“the”都包括复数形式,除非上下文清楚地表明。

[0019] 阐述了本发明的广泛范围的数值范围和参数在某些情况下的近似。然而,在具体实例中阐述的数值尽可能精确地被报告。然而,任何数值固有地包含一定的误差,这些误差必然是由它们各自的测试测量中发现的标准偏差引起的。在本说明书中给出的每个数值范围将包括落在这样更广泛的数值范围内的每一个较窄的数值范围,就好像这类较窄的数值范围都在这里被明确地写成。

[0020] 如本文所用,术语“诊断”可包括确定受试者的疾病性质,以及确定疾病或疾病发作的严重程度和可能的结果和/或恢复的可能性(预后)。诊断也可以包括在合理治疗的情况下诊断,其中诊断指导治疗,包括初始选择治疗,修改治疗(例如,调整剂量和/或给药方案)等。

[0021] 术语“主体”和“病人”可在此互换使用,一般指哺乳动物,包括但不限于灵长类动物,包括猿猴和人、马(如马)、犬齿(如狗)、猫科动物、各种家畜(如蹄类动物,例如猪)。动物园里的IGS、山羊、绵羊等,以及家养的宠物和动物。对人类的诊断是特别令人感兴趣的。

[0022] 上皮癌的检测方法

[0023] 在一个方面,本发明提供了一种检测上皮性癌10的方法。该方法的步骤如图1所示。该方法包括确定从受试者30获得的可疑样品中 β 防御素3(BD-3)和 β 防御素2(BD-2)的水平。本文描述了多种测定BD-2和BD-3水平的方法。在一些实施例中,该步骤之前是从受试者20获得可疑样本的步骤。然后根据可疑样本中确定的水平,将BD-3的水平与BD-2进行比较,以获得可疑的BD-3/BD-2比率40。在一些实施例中,该方法还包括获得健康的BD-3/BD-2比率的步骤,虽然在其他实施例中使用了预先存在的BD-3/BD-2比率。获得健康的BD-3/BD-2比值包括从受试者50获得健康样品的步骤,测定健康样品60中的BD-2和BD-3的水平,并比较健康样品中的BD-2和BD-3的水平,以获得健康的BD-3/BD-2比率70。然后,该方法包括将可疑BD-3/BD-2比值与健康的BD-3/BD-2比值进行比较,以获得诊断BD 3/BD-2比值80;并且如果诊断BD 3/BD-2比值大于1 90,则将受试者定性为上皮癌。

[0024] 癌症患者已在可疑部位有癌组织。在一些实施例中,该方法可以确定受试者患癌症的风险增加。如本文所定义的,患癌症的风险增加,与健康受试者相比,受试者具有更高的患癌症的机会。例如,在一些实施例中,诊断BD 3/BD-2比值大于1表明受试者比不具有诊断BD 3/BD-2比值大于1的受试者的代表性样本更容易患癌症50%。在进一步的实施例中,该方法可以确定受试者在短期内具有发展癌症的风险增加。

[0025] β防御素

[0026] 本文所述的方法、系统和装置包括确定生物样品中β防御素2 (BD-2) 和β防御素3 (BD-3) 的水平。防御素是一类阳离子抗菌肽,在先天免疫和适应性免疫以及其他非免疫过程中发挥重要作用。Machado LR, Ottolini B, 前面的免疫学, 6:115 (2015)。防御素是一种古老多样的蛋白质家族,存在于大多数多细胞生物中。在一些实施例中,本方法旨在诊断人类受试者中的上皮癌,并相应地检测人β防御素2 (BD-2) 和人β防御素3 (BD-3)。人类BD-2和BD-3的氨基酸序列是已知的(见Schr OrdJM, Harder J., INT J BieCurm细胞Bio..., 31 (6): 65-51 (1999) 和Hig等人, J Bio-CeCm. 276 (8): 5707~13 (2001), 并测定了它们的三维结构。J. Biol等, Chemistry. 277, 827~899 (2002) 和鲍尔等, 蛋白质SCI. 10, 247-9 (2001)。此外, β防御素已被广泛地应用于其他种类,如鸟类、鱼类和猪。因此,本领域的技术人员可以在各种物种中使用相应的β防御素和β防御素同源物进行癌症诊断。发明人已经表明, BD-3与BD-2比值的增加表明受试者具有或具有增加上皮癌的风险。

[0027] 上皮癌

[0028] 本发明可用于诊断各种不同类型的上皮癌。癌症是一种异常和过度增殖的疾病。癌症通常是由环境侮辱或复制错误引起的,这使得少量的细胞能够逃脱正常的增殖控制并增加它们的数量。具有生长优势但尚未完全癌变的细胞被称为癌前细胞。癌症导致受试者的癌细胞数量增加。这些细胞可以形成一种称为肿瘤的异常质量的细胞,其细胞被称为肿瘤细胞。肿瘤可以是良性肿瘤,也可以是恶性肿瘤。良性肿瘤包含增殖的细胞,但仍停留在特定的部位。另一方面,恶性肿瘤细胞可以侵入和破坏邻近组织,并通过一种称为转移的过程扩散到身体的其他部位。

[0029] 上皮癌也被称为癌症,并代表来源于上皮细胞的癌症。该组包括许多最常见的癌症类型,包括几乎所有在皮肤、头颈部、乳腺、前列腺、肺、胰腺和结肠中发育的肿瘤。上皮癌的一种常见类型是鳞状细胞癌。在一些实施例中,本发明的方法旨在检测起源部位的上皮癌,而在其他实施例中,该方法旨在检测由于转移而迁移的上皮癌。在一些实施例中,本发明的方法旨在检测从头颈癌、口腔癌、食道癌和皮肤癌组成的组中的上皮癌。头颈部癌是从唇、口(口)、鼻腔(鼻内)、鼻窦、咽、喉或腮腺开始的癌症。大多数头颈癌生物学上相似。头颈部癌的90%是鳞状细胞癌,因此被称为头颈部鳞状细胞癌(HNSCC)。这些癌症通常起源于这些区域的粘膜衬里(上皮)。口腔癌或口腔癌是头颈部癌症的一种,包括口腔中的任何癌组织生长。典型的口腔癌是口腔上皮癌。最后,本发明还可用于检测上皮性皮肤癌,它是由皮肤引起的上皮癌,包括基底细胞癌和鳞状细胞癌。

[0030] 生物样品

[0031] 本方法包括测定生物样品中的BD-2和BD-3的水平。生物样本包括但不限于限于体液,例如唾液、尿液和血液相关样本(例如全血、血清、血浆和其他血液衍生样本)、脑脊液、支气管肺泡灌洗等。在一些实施例中,生物样品是皮肤样品。由于本发明旨在诊断上皮癌,在一些实施例中,可疑样本和健康样本均包括上皮细胞。生物样品可以通过任何已知的方法获得,包括针棒、针活检、拭子等。在示例性方法中,生物样品是粘膜样品,例如可以通过使用细胞刷获得。在一些实施例中,细胞刷的头部大小对应于可疑组织或病变的大小。

[0032] 生物样品可以是新鲜的或储存的(例如血液或血液部分储存在血库中)。样品可以储存不同的时间,例如储存一小时,一天,一周,一个月,或一个多月。生物样品可以是为本

发明的检测而明确获得的体液或为另一目的获得的体液,其可用于本发明的化验。

[0033] 本发明的生物样品可以根据它们在该方法中所起的作用加以区分。在本发明中,生物样品可以是可疑样品或健康样品。在实施该方法时,使用可疑样本和健康样本。本文所用的“可疑样本”指的是从肿瘤所在的组织部位获得的生物样本,如粘膜病变。该网站可能是可疑的,由于可见的不规则性,疼痛,或作为其他诊断测试的结果,或者它可能仅仅是现场进行测试。例如,在一些实施例中,可疑样本是从口腔病变获得的,而在其他实施例中,可疑样本是从皮肤损伤获得的。如果该方法表明受试者有或患癌症的风险增加,癌症将出现在可疑部位。

[0034] 本发明的方法还涉及获得健康样本,该健康样本是从没有怀疑癌症存在的组织部位获得的生物样本,或者优选地是基于其他可用信息的组织显然是健康的和非癌症的。在一些实施例中,可疑样品和健康样品从同一个主题获得,这可以在作为更可靠诊断的内部标准方面提供优势,但是在一些实施例中,可疑样品和健康样品可以从不同的样品获得。学科。可疑样本和健康样本从不同的组织部位获得。因此,在一个实施例中,例如,在诊断口腔癌时,从口腔病变获得可疑样本,而健康样本是来自健康区域的口腔区域的全血、血清、血浆或唾液。

[0035] 在一些实施方案中,试剂被添加到身体样品中,减少了身体样品中 γ -防御素和负电荷部分之间的静电相互作用,而不影响检测抗体和/或其片段与 γ -防御素的结合。参见美国专利出版物第2010号/第0022025号,其公开内容通过引用合并于此。身体样本中的负电荷部分可包括阴离子糖蛋白,如粘蛋白、一大家族、大量糖基化蛋白和钙保护蛋白,钙结合蛋白主要由嗜中性粒细胞分泌。

[0036] 该试剂可包括正负电荷部分和/或离子,其能够减少体样品中 β -防御素和负电荷部分之间的静电相互作用。正电荷带电部分和/或离子可以通过向身体样本施用盐,在身体样本中提供,当加入时可以容易地离解并形成阳离子或正电荷的电解质,这些电解质能够与负电荷部分缔合。在一个实例中,解离后的盐可以形成能够与负电荷部分相关联的二价阳离子。能够形成二价阳离子的盐的例子是 $MgCl_2$ 和 $CaCl_2$ 。 $MgCl_2$ 和 $CaCl_2$ 在加入身体样品后可以解离并形成 Mg^{2+} 和 Ca^{2+} 阳离子。

[0037] 试剂可以有效地减少身体样品中的 β -防御素和负电荷部分之间的静电相互作用,而不影响检测抗体和/或其片段与 γ -防御素的结合。举例来说,可以通过将 $CaCl_2$ 添加到身体样品中,在约50mmol/L至约250mmol/L的浓度下,减少身体样品中的 β -防御素和负电荷部分之间的静电相互作用。E抗体与身体样本接触,和/或同时与捕获抗体接触。

[0038] 结合配体

[0039] 在某些方面,本发明包括与生物分析物特异性结合的结合配体。生物分析物的例子包括上皮细胞、BD-2和BD-3。本领域技术人员已知多种结合配体,如抗体、抗体片段和适体。

[0040] 在一些实施方案中,结合配体是抗体。抗体包括多克隆和单克隆抗体,以及包含抗体的相关抗原结合域的抗体片段。本文所用的术语“抗体”是指包含至少一个抗原结合域的免疫球蛋白分子或其他分子。本文所用的“抗体”一词旨在包括完整抗体、单克隆抗体、多克隆抗体、嵌合抗体、人源化抗体、初步化抗体、多特异性抗体、单链抗体、表位结合片段,例如Fab、Fab'和 $F(ab')_2$ 、FD、Fvs,单链FVS(scFv),二硫键连接的FVS(SDFV),包含VL或VH结构域

的片段,以及完全合成和重组抗体。抗体可以是任何类型(例如IgG、IgE、IgM、IgD、IgA和IgY),类(例如IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1和IgA2)或免疫球蛋白分子的亚类。

[0041] 单克隆抗体可以通过免疫接种在小鼠和大鼠等动物中产生。B细胞可以从免疫动物中分离出来,例如从脾脏中分离出来。分离的B细胞可以与例如骨髓瘤细胞系融合,以产生可以在体外培养中无限期地维持的杂交瘤。这些杂交瘤可以通过稀释(单细胞克隆)分离并生长成菌落。单个菌落可以筛选出具有—致亲和性和特异性的抗体。杂交瘤细胞可以在组织培养中生长,并且可以从培养基中分离抗体。杂交瘤细胞也可注射到动物(如小鼠)中,以形成体内肿瘤(如腹膜肿瘤),产生可作为腹腔液(腹水)收获的抗体。血清的溶解补体活性可任选地被灭活,例如通过加热。

[0042] 生物分析物(例如,BD-2或BD-3)可用于产生抗体。本领域的技术人员将认识到,用于免疫的多肽的量将基于多种因素而变化,包括被免疫的动物、所选择的多肽的抗原性和注射部位。作为免疫原的多肽可以适当地修饰或在佐剂中施用以增加肽抗原性。在一些实施方案中,多肽、肽、半抗原和小化合物可以与载体蛋白结合以引起免疫反应,或者可以施用和佐剂,例如不完全的弗罗因德佐剂。

[0043] 产生抗体的方案,包括制备免疫原、动物免疫和抗血清收集,可在抗体中找到:实验手册,E.哈洛和D.Lane,ED,冷泉港实验室(冷泉港,N.Y.,1988)pp.55-120和A.M.Campbell,单克隆抗体技术:生物化学和分子生物学中的实验室技术,爱思唯尔科学出版社,阿姆斯特丹,荷兰(1984)。

[0044] 本发明所用的“抗体片段”—词旨在包括任何合适的抗体片段,其包括抗原结合功能域,该抗原结合域显示抗原结合功能。抗体可以使用常规技术破碎。例如,可以通过用胃蛋白酶处理抗体来产生F(ab')₂片段。所得到的F(ab')₂片段可以被处理以减少二硫键以产生Fab1片段。木瓜蛋白酶消化可导致Fab片段的形成。Fab、Fab'和F(ab')₂、scFv、Fv、DSFV、FD、DABS、T和ABS、DS-scFv、二聚体、微小体、糖尿病、双特异性抗体片段和其他片段也可以通过重组技术合成或可以化学合成。用于产生抗体片段的技术是众所周知的,并且在本领域中被描述。抗体片段,包括单链抗体,可以单独或与以下部分或全部结合:可变区(铰链区)、CH1、CH2和CH3结构域。

[0045] 抗体被设计用于特异性结合,这是由于抗体对生物分析物的表位的互补决定区的亲和力。当抗体优先结合目标结构或其亚基时,抗体“特异性结合”,但结合到基本上较小的程度,或不与不是目标结构的生物分子结合。在一些实施方案中,抗体特异性结合目标分析物(例如,BD-2或BD-3),其特异亲和力介于10⁻⁸M和10⁻¹¹M之间。在一些实施方案中,抗体或抗体片段结合BD-2或BD-3,其特异亲和力大于10⁻⁷M,10⁻⁸M,10⁻⁹M,10⁻¹⁰M,或10⁻¹¹M,在10⁻⁸M-10⁻¹¹M之间,10⁻⁹M-10⁻¹⁰M,10⁻¹⁰M-10⁻¹¹M。在优选的方面,使用竞争性结合测定来测量比活性,如AuxuelFM(1994)中所阐述的。分子生物学中的现行协议。奇切斯特:John Wiley和Sons(“奥苏贝尔”),这里被引用。

[0046] 在一些实施方案中,结合配体是适体。适体可以用作免疫测定的抗体的替代物。见陈A1,杨S2,Biases生物电子.71,230~42(2015)。适体是通过与Watsson CR1K碱基配对以外的相互作用结合到特定靶分子或细胞结构的高特异性和亲和力的核酸。适体功能与核苷酸序列本身无关,而是基于形成的二级/三级结构,因此最好被认为是非编码序列。本发明的适体可以是单链RNA、DNA、修饰的核酸或它们的混合物。适体也可以是线性或圆形的。因

此,在一些实施方案中,适体是单链DNA,而在其他实施例中,它们是单链RNA。

[0047] 本发明适体的长度没有特别限制,通常可以是约10至约200个核苷酸,并且可以是,例如,约100个核苷酸或更少,约50个碱基或更少,约40个核苷酸或更少,或约35个碱基或更少。当适配子中的核苷酸总数较少时,化学合成和批量生产将更容易且成本更低。此外,在几乎所有已知的情况下,可以在包含30个核苷酸或LES的核酸序列中形成参与适体结合的非沃森-克里克类型的相互作用的各种结构基序,如发夹环、对称和不对称凸起和假结S。

[0048] 适体能够与BD-2和BD-3等生物分析物特异性结合。特定绑定指的是对所选目标和其他潜在目标进行区分的绑定,并与所选择的目标具有实质上的亲和力。实质亲和力表示具有至少约 10^{-8} M的结合离解常数的适体,但在其他实施例中,适体可具有至少约 10^{-9} M、约 10^{-10} M、约 10^{-11} M、或至少约 10^{-12} M的结合离解常数。

[0049] 适体可包括原适体的结构类似物。结构类似物的实例包括在2' -位置的嘧啶或嘌呤核苷酸的氢原子、卤素或-O-烷基上修饰的适体。野生型RNA和DNA适体不像它们优选的那样稳定,因为它们易受核酸酶降解。通过在2' 位上加入修饰基团,可以大大提高核酸酶降解的抗性。适配体核苷酸的其他修饰的例子包括5位嘧啶修饰、8位嘌呤修饰、环外胺修饰、4-硫脲基取代、5-溴或5-碘尿嘧啶代换;骨架修饰和硫代磷酸酯或烷基膦。PHAT修饰。

[0050] 测定BD-2和BD-3水平的方法

[0051] BD-2和BD-3的水平可由本领域已知的多种标准蛋白质分析方法中的任何一种确定。这些方法包括吸光度、蛋白质测定(例如,DC蛋白测定、非干扰蛋白质测定、BCA蛋白测定和Louv测定)、凝胶电泳(例如SDS-PAGE凝胶纯化)、蛋白质免疫印迹(例如Western blot)、色谱(例如,大小排阻色谱法)。N交换色谱法和亲和色谱法,沉淀法,超速离心法,免疫分析法,如酶联免疫吸附试验(ELISA),以及本领域普通技术人员已知的其他常用技术。在一些实施方案中,所用的测定允许一个同时测定生物样品中的BD-2和BD-3的水平。例如,可以使用荧光成像的免疫测定,其中用于检测BD-2和BD-3的抗体以不同的荧光波长发射,从而可以容易地分辨出它们的荧光信号。

[0052] 免疫测定是使用结合配体(例如抗体)特异性结合抗原(例如生物标记物)的分析。免疫测定的特征在于使用特定结合配体的特异结合特性来分离、靶向和/或量化抗原。虽然使用适配体作为结合配体不是免疫系统的组成部分的使用,但使用适体的检测仍然被称为“免疫测定”。在这样的条件下与结合配体(例如抗体)的特异性结合可能需要用于I的抗体。TS对特定蛋白质的特异性。例如,可以选择从特定物种如大鼠、小鼠或人获得的多克隆抗体,以获得仅与该生物标志物特异性反应的多克隆抗体,而不与其他蛋白质反应,除了B的多态性变异体和等位基因以外。伊奥马克这种选择可以通过减去与其他物种的生物标记分子交叉反应的抗体来实现。可以使用多种不同的形式进行免疫测定,包括竞争性均质免疫测定、异质性免疫测定、一个位点非竞争性免疫测定和两个位点非竞争性免疫测定。

[0053] 在一些实施方案中,确定BD-2和BD-3水平的方法利用双位点非竞争性免疫分析格式。在这种格式中,可疑或健康样品中的分析物被结合到结合配体(例如抗体)位点,然后标记的结合配体(例如抗体)与分析物结合。然后测量标记的结合配体在该位点上的量。它将与分析物的浓度成正比,因为如果未知样品中不存在分析物,则标记结合配体将不结合。这种类型也被称为夹心法,因为分析物被夹在两个结合配体之间。更具体地,本实施例包括获

得可疑和/或健康样品的步骤,将样品与固定化结合配体接触,从样品中除去未结合的物质,将结合的材料(例如上皮细胞)与标记的结合配体特异性地接触。BD-2和BD-3,然后检测BD-2和BD-3的量。固定结合配体优选特异性结合上皮细胞,该上皮细胞可以同时承载BD-2和/或BD-3。在一些实施方案中,用洗涤剂处理上皮细胞,然后在与BD-2和BD-3特异的标记结合配体接触之前使上皮细胞通透,因为这允许结合配体穿透上皮细胞并在EP内接触BD-2和BD-3。上皮细胞使用渗透步骤可以增加该方法相对于其他类型的免疫测定的灵敏度,这通常要求上皮细胞在BD-2和BD-3检测之前被破坏。该方法可利用具有BD-2或BD-3特异性的标记结合配体,其具有可相互区分的标签,以便于同时检测BD-2和BD-3。

[0054] 免疫测定可用于测定样品中生物标志物(例如,BD-2或BD-3)的存在或不存在,以及样品中生物标志物的数量。结合配体标记复合物的量可以通过与标准进行比较来确定。标准可以是已知的化合物或已知存在于样品中的另一种蛋白质。可以理解,只要测量单位可以与控制单元比较,BD-2和BD-3的量就不需要以绝对单位来测量。

[0055] 用于检测的结合配体(例如抗体)可以用任何可检测的功能或模块标记,而不干扰检测抗体与结合的防御素表位上的自由结合表位的结合。标签的例子是已知的用于免疫测定的标签,包括可直接检测的部分,如荧光色素、化学发光和放射性标记,以及必须被反应或衍生的待检测的部分,如酶。这种标签的例子包括放射性同位素 ^{32}P 、 ^{14}C 、 ^{125}I 、 ^3H 、 ^{131}I 、荧光基团,如稀土螯合物或荧光素及其衍生物、罗丹明及其衍生物、丹酰、伞形酮、荧光素酶,例如萤火虫荧光素酶和细菌荧光素酶(美国Pat)。4737456) 荧光素、2,3-二氢氮杂二酮、horseradish peroxidase (HRP)、碱性磷酸酶、 β -半乳糖苷酶、糖化酶、溶菌酶、糖类氧化酶、葡萄糖氧化酶、半乳糖氧化酶、葡萄糖-6-磷酸脱氢酶、杂环氧化酶如尿酸酶和XAN。Th氧化酶,与过氧化氢一起氧化一种染料前体的酶,如HPP、乳过氧化物酶或微过氧化物酶、生物素/抗生物素蛋白、生物素/链霉亲和素、生物素/链霉亲和素- β -半乳糖苷酶(MUG)、自旋标记物、噬菌体标签、稳定自由基等。常规方法可将这些标记共价结合到蛋白质或多肽上。例如,偶联剂,如二醛、碳二亚胺、二酰亚胺、双酰亚胺、双重氮化联苯胺等可用于标记上述荧光、化学发光和酶标记物的抗体(例如,美国Pat)。第3940475号(荧光测定)和3645090(酶);猎人等人自然144:945(1962);戴维等人。生物化学13:1014-1021(1974);疼痛等。J. Immunol. 方法40:219-230(1981);Nygren J. Histochem和CyCeCm30:407~412(1982)。

[0056] 这样的标记,包括酶,与抗体的结合,是一种普通的免疫测定技术中的标准操作程序。例如,奥沙利文等。酶免疫分析中酶-抗体结合物的制备方法:Enzymology方法,E. J. J. Langone和H. Van Vunakis,第73卷(学术出版社,纽约,N. Y., 1981), pp. 147—166页。制备基于荧光适体的生物传感器的方法也是已知的。见王等人,Curr Me Chan., 18(27), 4175-84/4(2011)。

[0057] 测量抗体标记复合体的量或存在的方法包括,例如,检测荧光、发光、化学发光、吸光度、反射率、透射率、双折射或折射率(例如表面等离子体共振、椭偏仪、共振MI)。RROR方法,门控耦合器波导法或干涉测量法。光学方法包括显微镜(共聚焦和非共焦)、成像方法和非成像方法。电化学方法包括伏安法和安培法。射频方法包括多极共振光谱学。有用的检测在本领域中是众所周知的,包括例如酶免疫测定(EIA),例如酶联免疫吸附试验(ELISA)、放射免疫测定(RIA)、Western印迹试验或狭缝印迹试验。

[0058] 诊断BD 3/BD-2比值的确定

[0059] BD-2和BD-3在受试者身体样本中的水平可以进行比较,以提供BD-3/BD-2比值。在一个步骤中,将可疑样品中的BD-3水平与可疑样品中的BD-2水平进行比较,以获得可疑的BD-3/BD-2比率,其代表可疑样品中这两个β防御素的比率。最后,在另一步骤中,将可疑BD 3/BD-2比值与健康的BD-3/BD-2比值进行比较,以获得诊断BD 3/BD-2比值。将可疑BD 3/BD-2比值与预先存在的健康BD 3/BD-2比值进行比较,或更优选地从受试者的健康组织获得的样品中测定BD-3和BD-2的水平,并将健康样品中的BD-3与健康样品中的BD-2水平进行比较。确定健康的BD-3/BD-2比值。预先存在的BD3/BD-2比值可以表示通过评价多个受试者健康组织中的BD-3/BD-2比值所确定的平均比率,或者它可以是使用受试者的健康组织早期确定的比率。

[0060] 发明人已确定诊断BD 3/BD-2比值大于1,表明受试者具有或具有增加的上皮癌风险。诊断BD 3/BD-2比值的大小也有助于表征癌症的风险或严重程度,从而确定哪些试验对象将极大地受益于某些积极治疗。在一些实施例中,使用不同的诊断BD 3/BD-2比值作为切断以确定受试者是否患有或具有增加的上皮癌风险。在一些实施例中,如果诊断BD 3/BD-2比值是1.1或更多、1.2或更多、1.3或更多、1.4或更多、1.5或更多、1.6或更多、1.7或更多、1.8或更多、1.9或更多、2或更多、3或更多、或5或更多,或任何其他比率大于1。HBD-3和HBD-2的人口学数据和口腔肿瘤特征如表1所示,显示在上皮癌患者中HBD-3与HBD-2的比率增加。BD-2和BD-3在使用免疫化学然后用密度测定分析产生表1的实验中被确定。

[0061] 表1

HBD-3和HBD-2的人口学数据和口腔肿瘤特征					
临床特点					
	n	%	年龄	hBD-3 ^a	hBD-2 ^a
总计	54	100	median range		
通常	24	44	45.5 17-77	1.69 (0.27)*	1.34 (0.16)
女性	15	27			
男性	9	17			
CIS	27	50	59.5 41-85	5.78 (1.94)*	0.76 (0.23)
女性	13	24			
男性	14	26			
HNSCC	3	6	76.5 74-85	7.23 (2.1)*	0.84 (.11)
Female	0	0			
Male	3	6			

a, 免疫荧光强度 (SD); *, p<0.02

[0062] [0063] β防御素水平或比值之间的比较可通过本领域技术人员已知的任何合适的方法进行。例如,比较可以由操作分析装置的个体或可访问分析装置提供的数据的另一个人进行数学或定性。交替地,确定和比较BD-2和BD-3的水平的步骤可以电子地进行(例如,通过电子数据处理器)。

[0064] 该方法还可包括提供BD3/BD-2比值大于1时指示受试者需要癌症治疗的报告的步骤。例如,用于执行该方法的装置可以包括耦合到蛋白质检测器的处理器,并且适于量化表

示来自检测器的信号的数据,并且适于执行多元统计分析,将输出值与第一参考V进行比较。ALUE和第二参考值,并计算风险评分;以及输出显示器,耦合到处理器并被配置为报告风险评分。

[0065] 本方法也可用于确定是否和何时可用于治疗上皮性癌的治疗应给予受试者。在一些实施例中,该方法包括如果诊断BD3/BD-2比值大于1,则向受试者提供癌症治疗。本领域技术人员已知多种治疗上皮性癌的方法。上皮癌治疗的例子包括手术切除癌症、冷冻癌细胞、局部热破坏癌细胞、化疗、放射治疗和靶向药物治疗。

[0066] 检测上皮性癌的微流控装置

[0067] 在一些实施方案中,使用微流控装置进行上皮癌的测定。单个微流体装置能够处理样品预处理、浓缩、运输和检测。这导致简化的操作 workflow,允许由外人操作。微流控装置还需要较少的样品和试剂体积,具有更好的可移植性和复用能力。因此微流控器件已被广泛用于生物标志物检测。YETSEN等人,实验室芯片,13:2210-2251(2013)。在微流体装置中,微流体通道中的流动由泵的主动流或毛细管力的被动控制驱动。在另一个实施例中,移动设备可与微流体装置一起使用,以捕获和评估来自设备的色度反馈以促进护理点诊断。

[0068] 微流体装置100典型地包括平面基板110,其包括健康通道120和可疑通道130。这两个通道包括与上皮细胞特异性结合的固定结合配体。此外,每个通道具有入口端和出口端,以及试剂室,其流体地连接到两个通道。在图3A所示的实施例中,入口管线140将通道连接到样品和试剂室,而轮廓线150将样品连接到废物室。在一些实施例中,通道具有从大约25微米到100微米的深度。试剂室提供用于实施测定的试剂,其包括与BD-2特异性结合的第一标记结合配体,和与BD-3特异结合的第二标记结合配体。在一些实施方案中,结合配体是抗体,而在其他实施方案中,结合配体是适体。制造微流体器件的方法是本领域技术人员已知的,并且包括光刻和非光刻制造方法。

[0069] 微流控装置包括固定化结合配体和标记结合配体。固定化结合配体(例如,固定结合抗体)固定在平面基片的通道内,而标记结合配体在溶液中提供。固定可通过吸附到水不溶性基质或表面而发生(美国专利No.3720760,这里通过引用整体并入)或非共价或共价偶联,例如,使用戊二醛或碳二亚胺交联,具有或不具有先前激活的载体,例如硝酸和还原剂,如美国PAT中所描述的。3645852号或在罗曼斯等,J. Immunol. 方法57:87-98(1983),或以后,如免疫沉淀法。

[0070] 平面衬底内的通道包括固定化的结合配体,其可以根据需要以非共价或共价相互作用或物理键连接。附件技术包括美国PAT中描述的技术。第4376110号和其中引用的参考文献。如果使用共价结合,则在本领域已知的条件下,可以将板或其它固相与交联剂一起与结合配体一起孵育。

[0071] 用于将捕获抗体与固相底物连接的常用交联剂,例如,1,1-双(重氮乙酰基)-2-苯基乙二醇、戊二醛、N-羧基琥珀酰亚胺酯、4-叠氮水杨酸酯、双官能团亚胺酯,包括二琥珀酰亚胺酯。如3,3'-二硫代丁酯(琥珀酰亚胺丙酸酯)和双官能马来酰亚胺,如双-N-马来酰亚胺-1,8-辛烷。衍生试剂,如甲基-3-(对-叠氮苯基)二硫代丙酸酯产生光活化中间体,能够在光的存在下形成交联。

[0072] 用于固定化的固相可以是任何惰性载体或载体,其基本上不溶于水,用于免疫测定,包括表面、颗粒、多孔基质等形式的载体。常用的载体的例子包括小片。SPS、Sephadex、

聚氯乙烯塑料珠、以及由聚乙烯、聚丙烯、聚苯乙烯等制成的化验板或试管,以及粒状材料,如滤纸、琼脂糖、交联葡聚糖和其他多糖。

[0073] 微流体平台包括与上皮细胞特异性结合的固定化结合配体(例如抗体)。固定化抗体可以针对上皮细胞上发现的任何抗原特异性。例如,在一些实施方案中,抗体特异性结合上皮细胞粘附分子。由抗体捕获的上皮细胞通常在用Beta 2和BD-3进行分析时,释放它们的内容,然后使用针对这些 β 防御素的标记抗体进行分析。微流体平台包括与BD-2特异性结合的第一标记结合配体和与BD-3特异结合的第二标记结合配体抗体。优选使用可单独检测的化合物标记抗体,例如在不同波长下荧光的标记物,从而可以容易地区分和/或确定BD-2和BD-3的水平。

[0074] 在本发明的一个实施例中涉及BD-2和BD-3检测的组件的详细视图如图3B所示。在该图中,N-(4-马来酰丁基氧基)琥珀酰亚胺(GMBS)连接体通过(3-氨基丙基)三乙氧基硅烷(AP)附着在平面基片的表面上。TES),用于硅基底表面的硅烷化。GMBS连接物用于固定上皮细胞特异性的结合配体(例如,上皮细胞粘附分子特异的结合配体)到平面基板内的健康和可疑通道。在这个实施方案中,结合配体用GMBS固定化,所述GMBS已与中和生物素标记的抗体结合的中和素功能化。

[0075] 检测上皮性癌的护理系统

[0076] 本发明的另一个方面提供了一种上皮癌的护理点检测系统。该系统包括本文所描述微流体护理点平台,以及被配置为访问通信网络的移动设备,并且具有配置为访问配置成获取荧光图像的照相机的处理器,用于确定BD-3和BD-2的级别。将移动设备集成到检测系统中能够立即处理结果,而不需要使用传统的、笨重的和昂贵的分光光度计。用于将移动设备集成到微流体分析系统的方法在本领域中是已知的。参见美国专利出版物US 2014/0242612,其公开内容以引用方式并入本文。移动设备可以包括存储在移动设备的处理器上并由其执行的应用程序,以分析从微流控装置中标记的结合配体检测到的信号。

[0077] 微流体护理点平台的使用允许使用容易携带的快速检测上皮癌,并且在某些情况下使用一次性装置。各种各样的护理点微流控装置是市售的(HANKN1, Li-CA, Seong GH, ANU Rev肛门化学(Palo Alto Calif), 6:119-41 (2013)), 并且特别用于在低资源环境下诊断疾病。夏尔马等,生物传感器(巴塞尔). 5 (3):57~601 (2015)。还描述了用于口腔癌诊断的一次性护理点微流控装置。参见美国专利公开第2013/0295580号。

[0078] 图4示出了上皮癌200的护理点检测系统的实施例。该系统包括一个外壳210,该外壳可以使用移动移动电话220的相对侧的滑动坞230可释放地连接到移动电话220。第一激光器240和第二激光器250被配置为安装在外壳210中的插座内。在外壳内存在激光路径,以允许来自激光器的光照射到微流体装置100上。发光二极管(LED) 260,放置在与微流体装置100垂直的外壳210中的插座中。

[0079] 使用该系统进行护理点检测的方法可包括以下步骤:用户可以检索患者的健康和可疑样本,将样本加载到微流体装置上,在微芯片上进行免疫测定,以分离和检测健康和可疑样本中的BD-2和BD-3,将具有完整免疫分析的微流体装置插入到滑动DO中。外壳的CKS,使用移动设备照相机产生彩色图像的微流体装置,分析彩色图像以确定完成的免疫测定所产生的颜色强度,将健康强度和可疑的BD-2和BD-3的浓度与颜色强度相关。AMPLE,并报告样品中的BD-2和BD-3浓度。包括在移动设备中的应用可用于计算健康和可疑比率,以及最

终的BD-3/BD-3诊断比率,并将这些报告给用户。

[0080] 为了说明的目的,包括下面的例子,并不打算限制本发明的范围。

[0081] 实例

[0082] 实例1:口腔鳞癌生物标志物

[0083] 发明人已报道,在口腔早期肿瘤病变中HBD-3过度表达,而HBD-2则减少。发明人还报道了表皮生长因子(EGF)通过MAPK p38、JNK、Akt/PI3K和PKC在口腔癌细胞中诱导HBD-3表达。KaSAR等人,Oral Oncol.45(8),696-702(2009)。另一方面,HBD-2已被证明与炎症和微生物感染有关;即,通过NF- β B.TSUTSUMI ISHII Y,Nagaoka I.,J-LyoC Biol 71(1),154-62(2002)激活。此外,HBD-3的肿瘤细胞表达与 β -catenin在体内的过度表达和核易位有关。EGF/EGFR轴和 β -连环蛋白的过度表达和激活参与了口腔鳞癌的发生。Ca1IFAN0等,癌症研究56(11),248892(1996)。发明人的数据表明口腔的癌变导致HBD-3在肿瘤细胞中的过度表达。此外,发明人已报道HBD-3可通过选择性募集和激活肿瘤微环境中的肿瘤相关巨噬细胞(TAMs)来促进OSCC进展。KaSAR等人,Oral Oncol.45(8),696-702(2009)。

[0084] 患者资料:与耳鼻咽喉科,CWRU/UH合作,发明人已开始试验研究以产生数据,以检验HBD3/HBD-2比值是否可预测口腔鳞癌。三十名可疑的口腔病变患者和被安排进行活组织检查的受试者同意接受该项研究。Cytobrush样本取自各自的病变部位和对侧正常部位。进行程序的人被校准,以便对所有受试者均匀地进行该过程。刷洗一个位点后,将刷子插入含有运输液的无菌DANA PAP(Diges,盖瑟斯堡,MD,美国)管中。所有细胞刷样品保存在-80 $^{\circ}$ C,直到使用。

[0085] 50mM NaCl,1mM Na₂EDTA;1毫米EGTA;1%NP40;1%脱氧胆酸钠;2.5.毫米焦磷酸钠;1毫米甘油磷酸盐;1mM Na₃Vo₄;1毫克/毫升亮肽素。离心后(10分钟,4 $^{\circ}$ C,10000rpm)将细胞碎片丢弃,然后用透明细胞裂解液进行ELISA。天啊,克林.53(4),75-65(2007);MeSCH等人,Inflamm Bowel Dis.19(5),942-53(2013)。

[0086] 结果:ELISA操作员对各病变的病理学检查均盲,即仅在获得ELISA检测的定量结果后才见到病理报告。结果表明,只有30名患者,发明人已经看到HBV-3/HBD-2在癌性与非癌性病变中的比例有统计学上的显著差异,这表明该检测可以区分OSCC与非OSCC病变。参见图2A和2C。图2B中显示了基于50个主题的扩展池的同一研究的附加数据。

[0087] 实例2:微流控法检测口腔癌的研究

[0088] 发明人提出了一种微流控装置(图3A),它比常规的OSCC筛选具有几个优点。首先,测定系统的结果依赖于两种分析物HBD-3和HBD-2,使其比基于单一分析物的检测更具鲁棒性和特异性。第二,每个主题是他或她自己的控制,促进更稳健的敏感性和特异性。第三,分别从正常和病灶部位取样,可以同时分析,从而最小化分析间变异性。使用发明人精心建立的技术,微流控通道将通过中子活化蛋白通过GMBS表面化学功能化,用于固定生物素化的EpCAM抗体(图3B)。然后,从细胞刷收集的上皮细胞(图3C)将被注射到微通道中而不进行任何处理。在微流体通道中捕获的上皮细胞将经历0.5%个Triton X-100的继代步骤,随后标记HBD-3(Alexa For 488)和HBD-2(Alexa For 647)。捕获的细胞将被成像(图3D和3E)。HBD 3/2比将使用与配备有荧光成像能力的定制附件集成的移动设备(例如,iPhone)来量化。

[0089] 实例3:口腔癌检测仪

[0090] 发明人将建立和测试原型护理点(POC)系统,该系统将分析从细胞刷收集的样本,

以确定口腔癌生物标志物HBD-3和HBD-2的比率。图4A~4C示出了用于点位系统的移动成像系统的外部视图,而在图4D中示出了系统的切割版本。原型将验证由我们的POC技术获得的比率镜像结果来自夹心ELISA法,U。对15名受试者口腔标本进行采样。Cytobrush样本将从同一患者的病灶部位和正常部位收集。ELISA和POC对这些样品将并行进行,以确定两者之间的结果的相似性。

[0091] 利用发明人实验室中的一项技术,从皮损和控制部位渗透和荧光标记的细胞将被注入到PIC微器件的微通道中并成像。R值将使用配备有计算双激光荧光成像能力的定制附件与移动设备(例如,三星Galaxy S4)进行量化。请参阅图4。该技术已成功地实现了白光和单激光二极管。在这个试点项目中,将建立两个激光二极管系统,将定制用于确定细胞刷样品中HBD3/HBD-2比值。

[0092] 重要的是要注意,夹心ELISA法需要从细胞刷样品中提取裂解细胞,使它们除了基于实验室ELISA中固有的几个额外步骤外进行离心。因此,使用夹心ELISA法可以获得从开始到结束的结果的最佳时间是大约八小时(即,过夜)。POC方法通过绕过细胞裂解步骤以及常规ELISA所需的各种其它步骤,将在更短的时间范围内提供可比较的结果;可能在15分钟内。

[0093] 正在进行IRB批准的试验研究,以评估两种分析物生物标志物(HBD3/HBD-2)在鉴别ENT诊所的癌症患者和非癌性病变中的有效性,以诊断可疑的口腔病变。在活检之前,取病灶和对侧健康粘膜部位的细胞刷样品(按每个位点精确地敲10次;按照协议),并进行ELISA。

[0094] 发明人将使用POC设备进行相同的先导研究,使用IRB目前批准的相同协议。十五名受试者将被纳入耳鼻喉科诊所,并有可疑的口腔病变。在手术刀活检过程中,发明人将对每个受试者的病灶和对侧正常部位进行细胞刷检,并对每个样品分别进行ELISA和POC分析。

[0095] 计算无透镜显微镜是一种新兴的技术,用于数字图像和计数微观粒子。它提供了一种紧凑、高通量、成本效益高、可现场部署的替代传统显微镜的方法。这种方式不需要任何透镜、激光器或其它笨重的光学/机械部件,这可以在成本和方便方面提供优势。

[0096] 通过引用将所有专利、专利申请和出版物以及电子引用材料的完整披露纳入其中。前面给出了详细的描述和例子,以便于理解。从中不需要理解任何不必要的限制。本发明不限于所示和描述的确切细节,对于本领域技术人员显而易见的变化将包含在由权利要求限定的发明内。

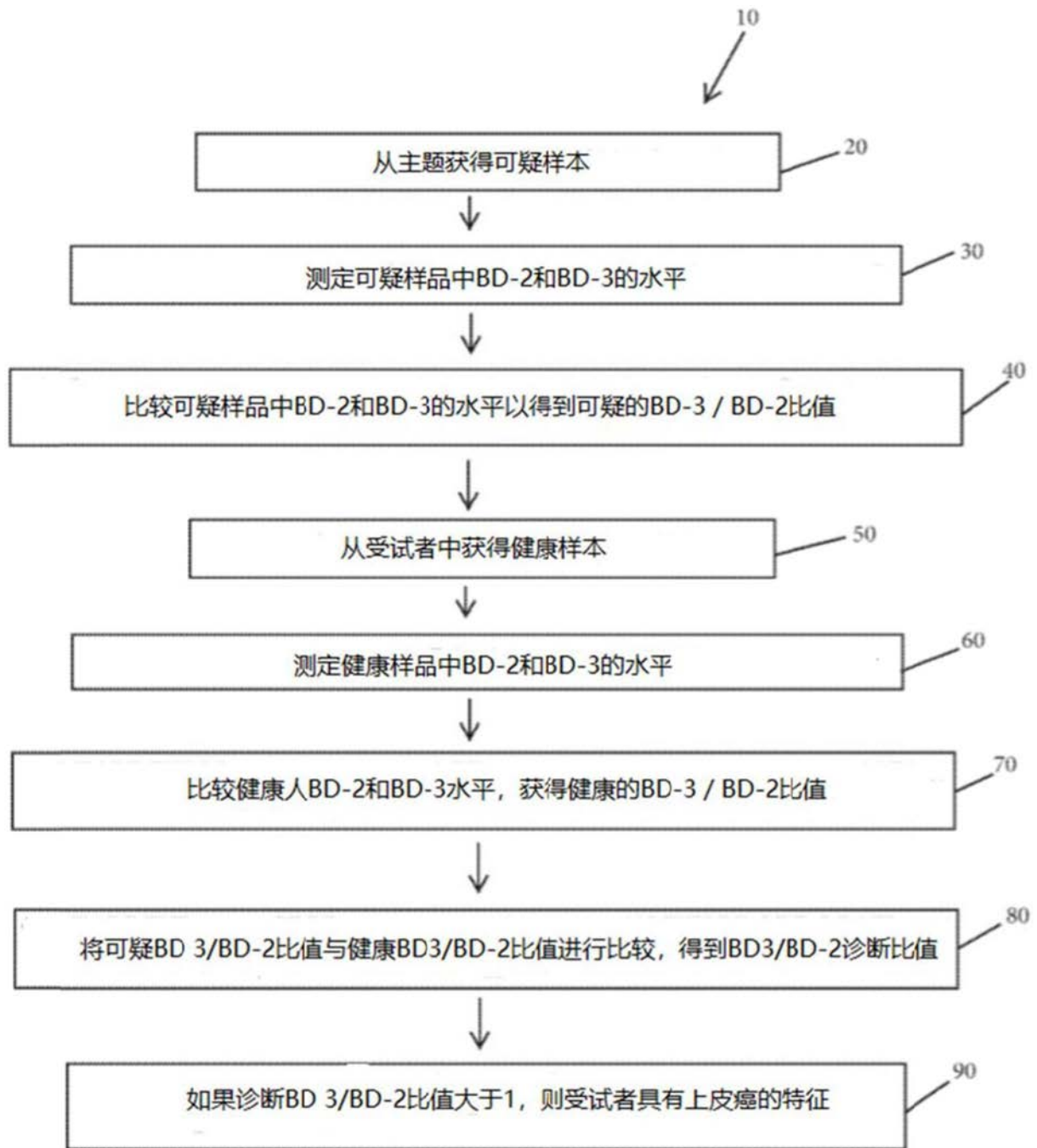


图1

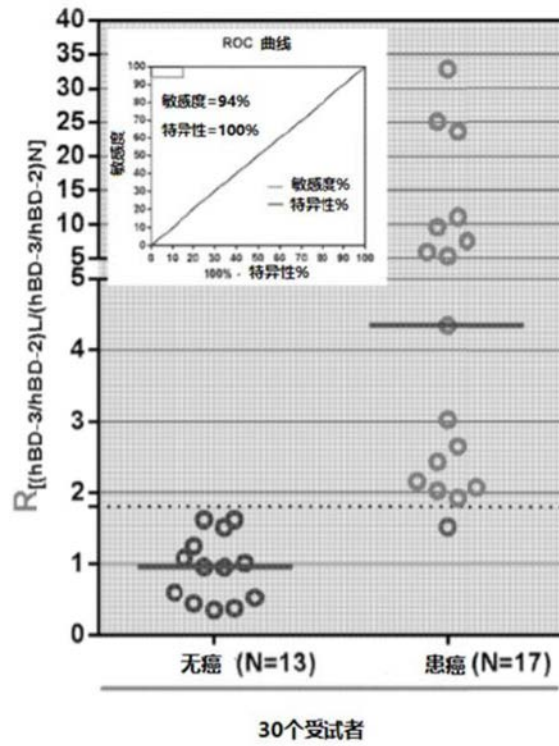


图2A

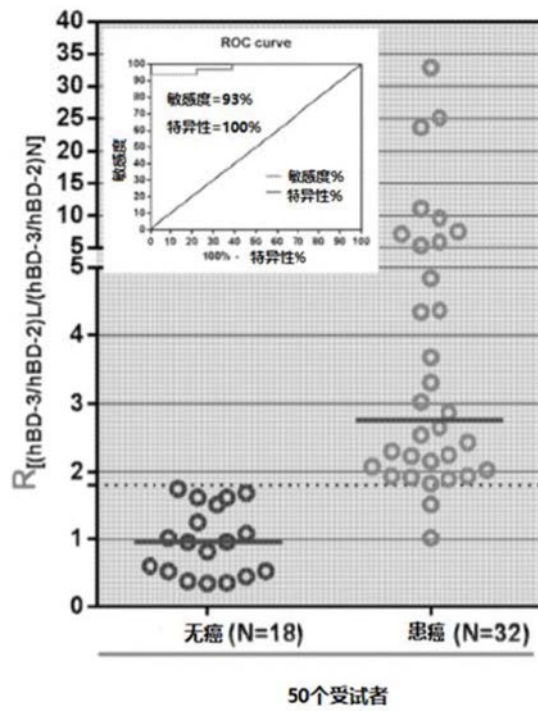


图2B

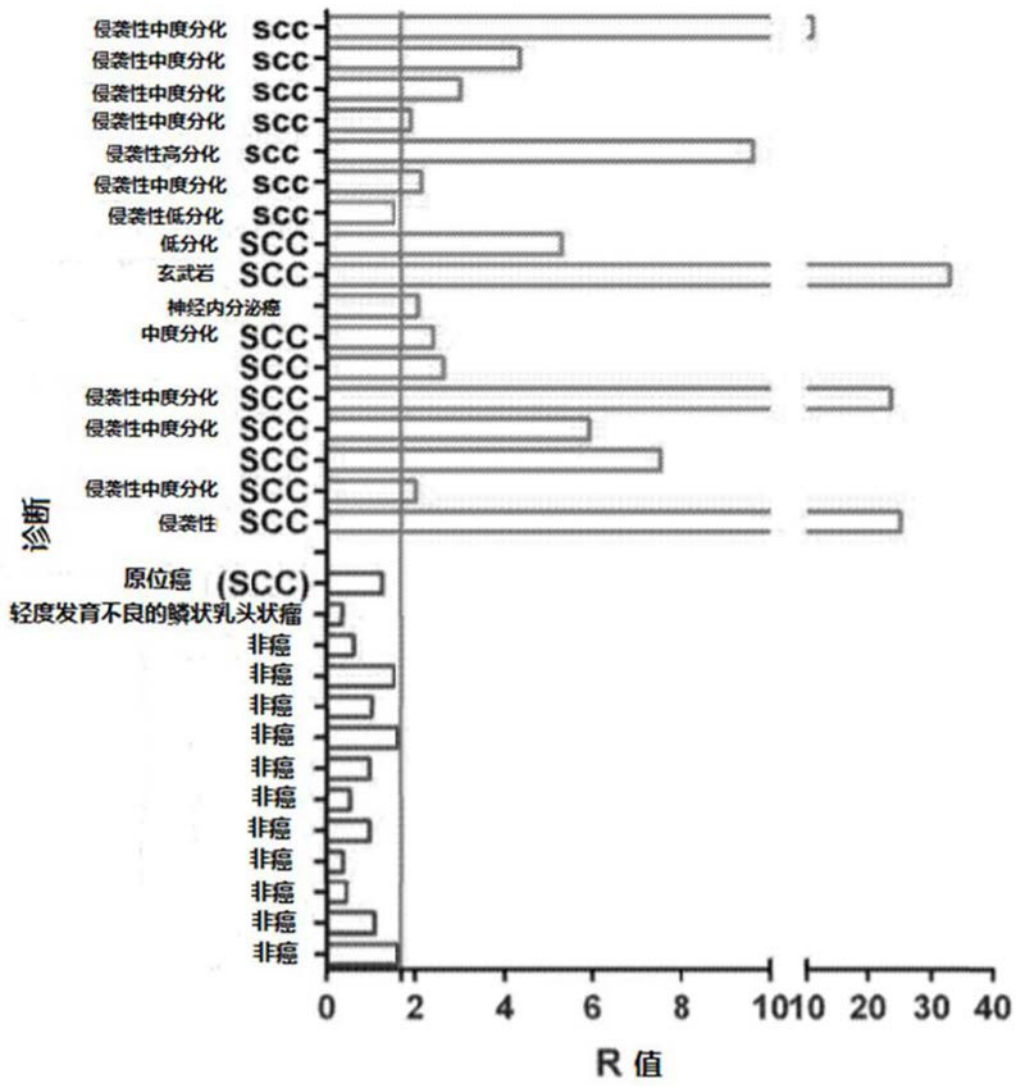


图2C

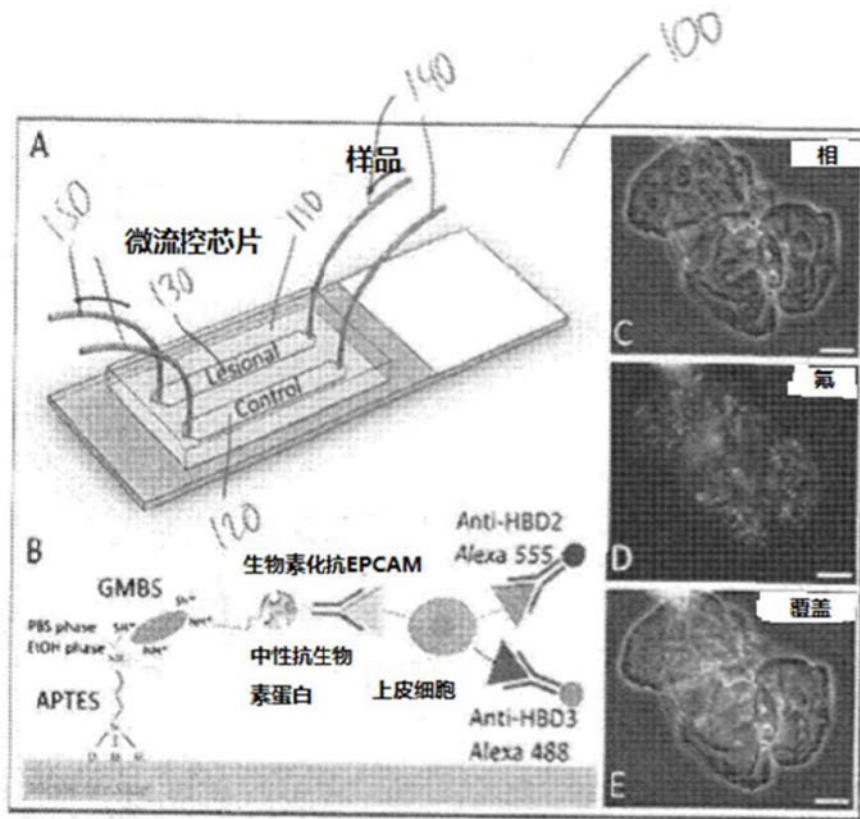


图3

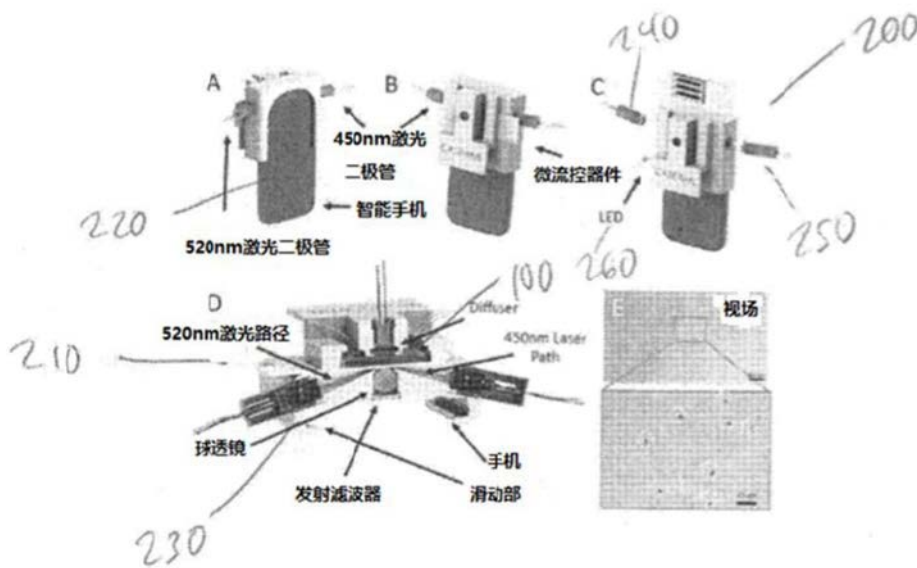


图4

专利名称(译)	β防御素在上皮性癌评估中的应用		
公开(公告)号	CN108770366A	公开(公告)日	2018-11-06
申请号	CN201680081824.3	申请日	2016-12-15
[标]申请(专利权)人(译)	凯斯西储大学		
申请(专利权)人(译)	凯斯西储大学		
当前申请(专利权)人(译)	凯斯西储大学		
[标]发明人	亚伦温伯格 桑托什高斯 乌姆特 A 古尔坎		
发明人	亚伦·温伯格 桑托什·高斯 乌姆特·A·古尔坎		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/533 G01N33/569 G01N33/68 C12Q1/68		
代理人(译)	王刚 龚敏		
优先权	62/267618 2015-12-15 US 62/300215 2016-02-26 US		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

描述了一种检测上皮癌的方法，该方法包括步骤：(a)在受试者的可疑样本中测定β防御素3(BD-3)和β防御素2(BD-2)的水平；(b)比较可疑样本中确定的BD-3和BD-2的水平，以获得可疑B. D-3/BD-2比值，(c)将可疑BD-3/BD-2比值与健康的BD-3/BD-2比值进行比较，以获得诊断BD 3 /BD-2比值；和(D)如果诊断BD 3/BD-2比值大于1，则将受试者定性为上皮癌。还描述了使用诊断BD 3/BD-2比值检测上皮癌的微流控装置。

