



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110612447 A

(43)申请公布日 2019.12.24

(21)申请号 201880027192.1

(74)专利代理机构 北京品源专利代理有限公司
11332

(22)申请日 2018.02.23

代理人 刘明海 周瑞

(30)优先权数据

62/463,348 2017.02.24 US

(51)Int.Cl.

G01N 33/53(2006.01)

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2019.10.24

G01N 33/574(2006.01)

G01N 33/577(2006.01)

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/US2018/019548 2018.02.23

(87)PCT国际申请的公布数据

W02018/156973 EN 2018.08.30

(71)申请人 德克萨斯州立大学董事会

地址 美国德克萨斯州

(72)发明人 安·麦克尼尔·基尔拉里

史蒂文·T·洛特 陈楠月

西塔拉曼·巴拉森提尔

权利要求书4页 说明书43页 附图11页

(54)发明名称

用于检测早期胰腺癌的测定

(57)摘要

本文提供了检测胰腺癌,尤其是早期胰腺癌的方法,其包括测量生物标记物组TNC-FN III-C、TFPI和CA19-9的表达。所述表达可以通过ELISA(例如多重ELISA)测定。本文进一步提供了治疗被鉴定为患有胰腺癌的受试者的方法。

1. 一种用于测量抗原TNC-FN III-C、TFPI和CA19-9表达的测定,其包括:
 - (a) 使多种抗原与抗TNC-FN III-C抗体、抗TFPI抗体和抗CA19-9抗体接触以形成抗原-抗体复合物;和
 - (b) 使用与每种抗体明显结合的可检测部分检测所述抗原-抗体复合物,从而测量抗原TNC-FN III-C、TFPI和CA19-9的表达。
2. 根据权利要求1所述的测定,其中所述测定是体外测定。
3. 根据权利要求1所述的测定,其中所述测定是体内测定。
4. 根据权利要求1所述的方法,其中所述多种抗原是从生物学样本中获得的。
5. 根据权利要求4所述的方法,其中所述生物学样本是外科手术或活检标本、石蜡包埋的组织、冷冻的组织印记、外周血、尿液或细针抽吸物。
6. 根据权利要求4所述的方法,其中所述样本是血液样本。
7. 根据权利要求6所述的方法,其中所述血液样本是血浆样本。
8. 根据权利要求4所述的方法,其中所述生物学样本获自有癌症风险或具有遗传癌症家族史的受试者。
9. 根据权利要求4所述的方法,其中所述生物学样本取自50岁以上的受试者。
10. 根据权利要求8或9所述的方法,其中所述受试者先前没有被诊断出患有癌症。
11. 根据权利要求10所述的方法,其中所述受试者尚未接受糖尿病和/或慢性胰腺炎的测试。
12. 根据权利要求10所述的方法,其中已经确定所述受试者没有糖尿病和/或慢性胰腺炎。
13. 根据权利要求1所述的方法,其中检测被进一步定义为进行酶联免疫吸附测定(ELISA)。
14. 根据权利要求13所述的方法,其中进行一个、两个或三个ELISA。
15. 根据权利要求14所述的方法,其中所述ELISA是夹心ELISA。
16. 根据权利要求15所述的方法,其中所述夹心ELISA是多重ELISA,其中同时检测两种或三种抗原。
17. 根据权利要求1所述的方法,其中步骤(a)的所述抗体被缀合至表面。
18. 根据权利要求17所述的方法,其进一步包括在步骤(a)之后进行洗涤以除去不在抗原-抗体复合物中的抗原。
19. 根据权利要求18所述的方法,其进一步包括在洗涤步骤之后添加对三种抗原中的每一种具有特异性的检测抗体。
20. 根据权利要求19所述的方法,其中所述检测抗体是生物素化的。
21. 根据权利要求20所述的方法,其中检测包括加入链霉亲和素缀合的荧光团并测量所述荧光团。
22. 根据权利要求1-12中任一项所述的方法,其中所述样本是未稀释的。
23. 根据权利要求1-12中任一项所述的方法,其中所述样本至少稀释50倍。
24. 根据权利要求1所述的方法,其中所述可检测的部分在步骤(a)之前与抗体结合。
25. 根据权利要求24所述的方法,其中所述可检测的部分包括荧光探针、放射性探针或光敏剂。

26. 根据权利要求25所述的方法,其中所述荧光探针包括吖啶菁绿(ICG)、异硫氰酸荧光素(FITC)和/或IRDye800。

27. 根据权利要求24所述的方法,其中结合所述抗体的可检测部分通过光学成像、超声、磁共振成像(MRI)、正电子发射断层扫描(PET)、单光子发射计算机断层扫描(SPECT)或光线疗法来检测。

28. 根据权利要求24所述的方法,其中所述多种抗原被包含在组织中。

29. 根据权利要求28所述的方法,其中所述组织是肿瘤。

30. 根据权利要求28所述的方法,其中所述组织是人体组织。

31. 根据权利要求1所述的方法,其中测量包括将三种抗原中的每一种的表达与对照样本中的表达进行比较。

32. 根据权利要求31所述的方法,其中所述对照样本是从健康受试者中分离的。

33. 根据权利要求31所述的方法,其中所述对照样本是从患有良性疾病的受试者中分离的。

34. 根据权利要求31-33中任一项所述的方法,其中所述三种抗原与对照样本相比的表达增加表明存在癌症或癌前病变。

35. 根据权利要求34所述的方法,其中所述癌症是胰腺癌。

36. 根据权利要求35所述的方法,其中所述胰腺癌是早期胰腺癌。

37. 根据权利要求36所述的方法,其中所述早期胰腺癌是I期或II期胰腺癌。

38. 根据权利要求34所述的方法,其中所述癌前病变是胰腺癌癌前病变(PanIN)。

39. 根据权利要求37所述的方法,其中所述II期胰腺癌是IIA期或IIB期胰腺癌。

40. 根据权利要求34-39中任一项所述的方法,其中所述测定的特异性至少为0.8。

41. 根据权利要求34-39中任一项所述的方法,其中所述测定的准确性至少为0.7。

42. 根据权利要求34-39中任一项所述的方法,其进一步包括进行胰腺癌的成像研究。

43. 一种在受试者中治疗胰腺癌的方法,其包括对所述受试者施用一种或多种抗癌疗法,其中所述受试者被鉴定为抗原TNC-FN III-C、TFPI和CA19-9与对照中的所述抗原相比表达增加。

44. 根据权利要求43所述的方法,其中所述对照是健康的受试者。

45. 根据权利要求43所述的方法,其中所述抗原的表达增加通过对从受试者获得的样本进行ELISA来确定。

46. 根据权利要求43所述的方法,其中所述抗原的表达增加根据权利要求1所述的方法确定。

47. 根据权利要求45所述的方法,其中所述样本是血浆样本。

48. 根据权利要求43-47中任一项所述的方法,其中所述胰腺癌是早期胰腺癌。

49. 根据权利要求43-47中任一项所述的方法、其中所述一种或多种抗癌疗法是化学疗法、放射疗法、基因疗法、手术、激素疗法、抗血管生成疗法和/或免疫疗法。

50. 一种用于检测胰腺癌的试剂盒,其包含对抗原TNC-FN III-C、TFPI和CA19-9具有特异性的一组抗体。

51. 一种用于检测癌细胞的体外方法,其包括:

(a) 获得生物学样本;

(b) 使所述生物学样本与抗TNC-FN III-C抗体、抗TFPI抗体和抗CA19-9抗体接触;和
(c) 检测抗TNC-FN III-C抗体、抗TFPI抗体和抗CA19-9抗体与样本的结合,其中所述三种抗原与对照相比表达的增加表明存在癌细胞。

52. 根据权利要求51所述的方法,其中所述生物学样本是外科手术或活检标本、石蜡包埋的组织、冷冻的组织印记、外周血、尿液或细针抽吸物。

53. 根据权利要求4所述的方法,其中所述样本是血液样本。

54. 根据权利要求53所述的方法,其中所述血液样本是血浆样本。

55. 根据权利要求4所述的方法,其中所述生物学样本是从有癌症风险或有遗传性癌症家族史的受试者中获得的。

56. 根据权利要求4所述的方法,其中所述生物学样本是从50岁以上的受试者获得的。

57. 根据权利要求55或56所述的方法,其中所述受试者先前没有被诊断出患有癌症。

58. 根据权利要求57所述的方法,其中所述受试者尚未接受糖尿病和/或慢性胰腺炎的测试。

59. 根据权利要求57所述的方法,其中所述受试者已经确定没有糖尿病和/或慢性胰腺炎。

60. 根据权利要求1所述的方法,其中检测被进一步定义为进行ELISA。

61. 根据权利要求60所述的方法,其中进行一个、两个或三个ELISA。

62. 根据权利要求61所述的方法,其中所述ELISA是夹心ELISA。

63. 根据权利要求62所述的方法,其中所述夹心ELISA是多重ELISA,其中同时检测两种或三种抗原。

64. 根据权利要求1所述的方法,其中步骤(a)的所述抗体被缀合至表面。

65. 根据权利要求64所述的方法,其进一步包括在步骤(a)之后进行洗涤以除去不在抗原-抗体复合物中的抗原。

66. 根据权利要求65所述的方法,其进一步包括在洗涤步骤之后添加对三种抗原中的每一种具有特异性的检测抗体。

67. 根据权利要求66所述的方法,其中所述检测抗体是生物素化的。

68. 根据权利要求67所述的方法,其中检测包括加入链霉亲和素缀合的荧光团并测量所述荧光团。

69. 根据权利要求1-59中任一项所述的方法,其中所述样本是未稀释的。

70. 根据权利要求1-59中任一项所述的方法,其中所述样本至少稀释50倍。

71. 根据权利要求1所述的方法,其中测量包括将三种抗原中的每一种的表达与对照样本中的表达进行比较。

72. 根据权利要求71所述的方法,其中所述对照样本是从健康受试者中分离的。

73. 根据权利要求71所述的方法,其中所述对照样本是从患有良性疾病的受试者中分离的。

74. 根据权利要求34所述的方法,其中所述癌症是胰腺癌。

75. 根据权利要求74所述的方法,其中所述胰腺癌是早期胰腺癌。

76. 根据权利要求75所述的方法,其中所述早期胰腺癌是I期或II期胰腺癌。

77. 根据权利要求76所述的方法,其中所述II期胰腺癌是IIA期或IIB期胰腺癌。

78. 一种测量抗原TFPI表达的方法,其包括:

(a) 使多种抗原与抗TFPI抗体接触以形成抗原-抗体复合物;和

(b) 使用与所述抗TFPI抗体明显结合的可检测部分来检测抗原-抗体复合物,从而测量抗原TFPI的表达,其中TFPI与对照相比的表达的增加表明癌前病变的存在。

79. 根据权利要求78所述的方法,其中所述癌前病变是PanIN病变。

80. 根据权利要求78所述的方法,其中所述检测被进一步定义为进行ELISA。

81. 根据权利要求78所述的方法,其中所述多种抗原是从生物学样本中获得的。

82. 根据权利要求81所述的方法、其中所述生物学样本是手术或活检标本、组织、石蜡包埋的组织、冷冻的组织印记、外周血、尿液或细针抽吸物。

83. 根据权利要求78所述的方法,其中所述血液样本是血浆样本。

84. 根据权利要求78所述的方法,其中所述生物学样本获自有癌症风险或具有遗传癌症家族史的受试者。

85. 根据权利要求78所述的方法,其中所述可检测的部分在步骤(a)之前与抗体缀合。

86. 根据权利要求85所述的方法,其中所述可检测的部分包括荧光探针、放射性探针或光敏剂。

87. 根据权利要求85所述的方法,其中结合所述抗体的可检测部分通过光学成像、超声、磁共振成像(MRI)、正电子发射断层扫描(PET)、单光子发射计算机断层扫描(SPECT)或光线疗法来检测。

用于检测早期胰腺癌的测定

[0001] 本申请要求2017年2月24日提交的美国临时专利申请号62/463,348的权益,其全部内容通过引用并入本文。

[0002] 背景

[0003] 本发明是在美国国立卫生研究院授予的授权号为CA111302的政府支持下完成的。政府拥有本发明的某些权利。

1. 发明领域

[0004] 本发明总体上涉及分子生物学和医学领域。更具体地,其涉及用于胰腺癌的早期检测的生物标记物。

[0005] 2. 相关技术的描述

[0006] 在美国,胰腺导管腺癌(PDAC)是癌症死亡的第四大主要原因,当手术切除不再是有疗效的选项时,大多数患者表现为局部晚期疾病(~30%)或远处转移(~50%) (Conlon等人,1996;Rahib等人,2014)。在较早的、可切除的阶段诊断PDAC的影响估计可将5年生存率提高到30%或更高,这表明,如果可以及早诊断出该疾病,则PDAC患者的死亡率将显著降低(Chu等人,2010)。

[0007] 不幸的是,没有可检测早期PDAC的生物标记物。当前的金标准血液基生物标记物CA 19-9缺乏疾病早期检测所需的特异性(Chu等,2010)。鉴定PDAC生物标记物的尝试未能产生可经受多重盲法验证(multiple blinded validations)并改善CA19-9的单个标记物或多个标记物的组合。因此,迫切需要新的生物标记物组(biomarker panel)来改善当前的金标准生物标记物以用于PDAC的早期检测。

发明内容

[0008] 本公开的某些实施方案涉及用于检测癌症,特别是胰腺癌的早期检测的生物标记物组。在第一实施方案中,提供了一种用于测量抗原TNC-FN III-C、TFPI和CA19-9的表达的测定,其包括使多种抗原与抗TNC-FN III-C抗体、抗-TFPI抗体和抗CA19-9抗体接触形成抗原-抗体复合物;并使用与每种抗体明显结合的可检测部分检测抗原-抗体复合物,从而测量抗原TNC-FN III-C、TFPI和CA19-9的表达。在某些方面,所述测定是体外或体内测定。

[0009] 在一些方面,所述多种抗原从生物学样本获得。在某些方面,所述生物学样本是组织、手术或活检标本、石蜡包埋的组织、冷冻的组织印记、外周血、尿液或细针抽吸物。在具体的方面,所述样本是血液样本,例如血浆样本。在一些方面,所述生物学样本获自具有癌症风险的受试者,例如具有遗传癌症家族史的受试者。在具体的方面,所述生物学样本获自50岁以上的受试者,例如60、65、70、75岁或更高。在一些方面,所述受试者先前未被诊断出患有癌症。在某些方面,尚未对所述受试者进行糖尿病和/或慢性胰腺炎的测试。在其他方面,已经对所述受试者进行了测试并且确定其没有糖尿病和/或慢性胰腺炎。

[0010] 在某些方面,检测进一步定义为进行酶联免疫吸附测定(ELISA)、蛋白质印迹或免疫组织化学。在一些方面,进行一个、两个或三个ELISA。在具体的方面,所述ELISA是夹心

ELISA。在具体的方面,所述夹心ELISA是多重ELISA,其中同时检测两种或三种抗原。在一些方面,所述抗体缀合至表面。在某些方面,所述方法进一步包括在形成抗原-抗体复合物之后进行洗涤以除去不在抗原-抗体复合物中的抗原。在一些方面,所述方法进一步包括在洗涤步骤之后添加对三种抗原中的每一种特异的检测抗体。在具体的方面,所述检测抗体是生物素化的。因此,在一些方面,检测包括添加链霉亲和素缀合的荧光团并测量该荧光团。

[0011] 在一些方面,所述样本是未稀释的。在其他方面,将样本稀释至少50倍,例如至少75倍、100倍、150倍、200倍或更高。

[0012] 在一些方面,在使抗体与多种抗原接触之前,将所述可检测的部分与抗体结合。在一些方面,所述可检测的部分包括荧光探针、放射性探针或光敏剂。在具体的方面,所述荧光探针包含吖啶菁绿(ICG)、异硫氰酸荧光素(FITC)和/或IRDye800。在一些方面,通过光学成像、超声、磁共振成像(MRI)、正电子发射断层摄影(PET)、单光子发射计算机断层摄影(SPECT)或光线疗法来检测与抗体结合的可检测部分。在一些方面,所述多种抗原包含在组织中。在某些方面,所述组织是肿瘤。在具体的方面,所述组织是人体组织。

[0013] 在某些方面,测量包括将三种抗原中的每一种的表达与对照样本中的表达进行比较。在一些方面,所述对照样本是从健康受试者中分离的。在其他方面,所述对照样本是从患有良性疾病的受试者中分离的。在某些方面,与对照样本相比,三种抗原的表达增加表明存在癌症或癌前病变。

[0014] 在一些方面,所述方法进一步包括进行进一步的诊断测定,例如用于胰腺癌的成像研究。在一些方面,所述癌症是胰腺癌,例如早期胰腺癌。在具体的方面,所述早期胰腺癌是I期(例如,IA或IB期)或II期(例如,IIA或IIB期)胰腺癌。在一些方面,所述癌前病变是胰腺癌癌前病变(PanIN)。

[0015] 在一些方面,所述测定的特异性为至少0.8,例如0.81、0.82、0.83、0.84、0.85、0.86、0.87、0.88、0.89、0.90或更高。在某些方面,所述测定的准确性为至少0.7,例如0.71、0.72、0.73、0.74、0.75、0.76、0.77、0.78、0.79、0.80或更高。在具体的方面,所述测定的AUC为至少0.90,例如0.91、0.92、0.93、0.94、0.95、0.96、0.97、0.98、0.99或更高。

[0016] 在一些方面,所述方法进一步包括结合三种抗原的存在来分析受试者的协变量。在某些方面,所述协变量包括年龄、性别、中心(center)、吸烟和/或饮酒。在一些方面,逻辑回归模型可以用于开发生物标记物组加上年龄、性别、中心、吸烟和饮酒的组合,以将患者病例与健康或良性疾病分开。

[0017] 在另一个实施方案中,本公开进一步提供了一种在受试者中治疗胰腺癌的方法,其包括对该受试者施用一种或多种抗癌疗法,其中鉴定出所述受试者的抗原TNC-FN III-C、TFPI和CA19-9的表达比对照中抗原的表达增加。在一些方面,所述对照是健康受试者。

[0018] 在某些方面,通过对获自受试者的样本进行ELISA来确定抗原的表达增加。在具体的方面,根据所述实施方案的方法确定抗原的表达增加(例如,使多种抗原与抗TNC-FN III-C抗体、抗TFPI抗体和抗CA19-9抗体接触以形成抗原-抗体复合物;并使用与每种抗体明显结合的可检测部分检测所述抗原-抗体复合物,从而测量抗原TNC-FN III-C、TFPI和CA19-9的表达)。在一些方面,所述样本是血浆样本。在具体的方面,所述胰腺癌是早期胰腺癌。

[0019] 在一些方面,所述一种或多种抗癌疗法是化学疗法、放射疗法、基因疗法、手术、激

素疗法、抗血管生成疗法和/或免疫疗法。

[0020] 在又一个实施方案中,提供了用于检测胰腺癌的试剂盒,其包含对抗原TNC-FN III-C、TFPI和CA19-9特异的一组抗体。所述试剂盒可进一步包含试剂(例如板或阵列)、洗涤液和检测试剂,以进行ELISA或其他抗体检测测定。

[0021] 另一个实施方案提供了一种检测癌细胞的方法,其包括获得生物学样本;使所述生物学样本与抗TNC-FN III-C抗体、抗TFPI抗体和抗CA19-9抗体接触;以及检测抗TNC-FN III-C抗体、抗TFPI抗体和抗CA19-9抗体与样本的结合,其中与对照相比,三种抗原的表达增加表明癌细胞的存在。在一些方面,所述方法是体外或体内的。

[0022] 在某些方面,所述生物学样本是手术或活检标本、组织、石蜡包埋的组织、冷冻的组织印记、外周血、尿液或细针抽吸物。在具体的方面,所述样本是血液样本,例如血浆样本。在一些方面,所述生物学样本获自具有癌症风险的受试者,例如具有遗传癌症家族史的受试者。在具体的方面,所述生物学样本获自50岁以上的受试者。在一些方面,所述受试者先前未被诊断出患有癌症。在某些方面,尚未对所述受试者进行糖尿病和/或慢性胰腺炎的测试。在其他方面,已经对所述受试者进行了测试并且确定其没有糖尿病和/或慢性胰腺炎。

[0023] 在某些方面,检测进一步定义为进行ELISA。在一些方面,进行一个、两个或三个ELISA。在具体的方面,所述ELISA是夹心ELISA。在具体的方面,所述夹心ELISA是多重ELISA,其中同时检测两种或三种抗原。在一些方面,所述抗体被缀合至表面。在某些方面,所述方法进一步包括在形成抗体-抗原复合物之后进行洗涤,以除去不在抗原-抗体复合物中的抗原。在一些方面,所述方法进一步包括在洗涤步骤之后添加对三种抗原中的每一种特异的检测抗体。在具体的方面,所述检测抗体是生物素化的。因此,在一些方面,检测包括添加链霉亲和素缀合的荧光团并测量该荧光团。

[0024] 在一些方面,所述样本是未稀释的。在其他方面,将所述样本稀释至少50倍,例如至少75倍、100倍、150倍、200倍或更高。

[0025] 在某些方面,测量包括将三种抗原中的每一种的表达与对照样本中的表达进行比较。在一些方面,所述对照样本是从健康受试者中分离的。在其他方面,所述对照样本是从患有良性疾病的受试者中分离的。在一些方面,所述癌症是胰腺癌,例如早期胰腺癌。在具体的方面,所述早期胰腺癌是I期(例如,IA或IB期)或II期(例如,IIA或IIB期)胰腺癌。在一些方面,所述癌前病变是PanIN病变。

[0026] 在一些方面,所述测定的特异性为至少0.8,例如0.81、0.82、0.83、0.84、0.85、0.86、0.87、0.88、0.89、0.90或更高。在某些方面,所述测定的准确性为至少0.7,例如0.71、0.72、0.73、0.74、0.75、0.76、0.77、0.78、0.79、0.80或更高。在具体的方面,所述测定的AUC为至少0.90,例如0.91、0.92、0.93、0.94、0.95、0.96、0.97、0.98、0.99或更高。

[0027] 在另一个实施方案中,提供了一种测量抗原TFPI表达的方法,其包括使多种抗原与抗TFPI抗体接触以形成抗原-抗体复合物;以及使用与抗TFPI抗体明显结合的可检测部分来检测抗原-抗体复合物,从而测量抗原TFPI的表达,其中与对照相比,TFPI的表达增加表明癌前病变的存在。在一些方面,所述癌前病变是PanIN病变。在某些方面,所述检测被进一步定义为进行ELISA。在某些方面,所述检测被进一步定义为进行免疫组织化学或蛋白质印迹,或本领域已知的用于检测抗体-抗原复合物的任意方法。

[0028] 在某些方面,所述多种抗原获自生物学样本。在一些方面,所述生物学样本是手术或活检标本、组织、石蜡包埋的组织、冷冻的组织印记、外周血、尿液或细针抽吸物。在某些方面,所述血液样本是血浆样本。在某些方面,所述生物学样本获自具有癌症风险或具有遗传癌症家族史的受试者。

[0029] 在某些方面,在使抗体与多种抗原接触之前,将所述可检测的部分与抗体缀合。在某些方面,所述可检测的部分包括荧光探针、放射性探针或光敏剂。在某些方面,通过光学成像、超声、磁共振成像(MRI)、正电子发射断层摄影(PET)、单光子发射计算机断层摄影(SPECT)或光线疗法来检测与抗体缀合的可检测部分。

[0030] 在某些方面,所述方法进一步包括结合三种抗原的存在来分析受试者的协变量。在某些方面,所述协变量包括年龄、性别、中心、吸烟和/或饮酒。

[0031] 通过下面的详细描述,本发明的其他目的、特征和优点将变得显而易见。然而,应当理解,详细说明和具体实施例虽然指示了本发明的优选实施例,但是仅以示例的方式给出,因为根据该详细描述,本发明的精神和范围内的各种改变和修改对本领域技术人员而言将变得显而易见。

附图说明

[0032] 以下附图构成了本说明书的一部分,并且被包括在内以进一步说明本发明的某些方面。通过参考这些附图中的一个或多个,结合在此呈现的具体实施方案的详细描述,可以更好地理解本发明。

[0033] 图1A-1D:TexGen队列1中的生物标记物组性能。TexGen队列中用于将I/IIA期[1A]、IIB期[1B]、所有II期[1C]和所有早期癌症[1D]与健康对照区分开的生物标记物组的接受者操作特征(ROC)曲线。计算了AUC,并使用自举法估算其95%置信区间(CI)。P值是双向的且是基于自举的。

[0034] 图2A-2D:EDRN参考集(reference set)队列3中的生物标记物组性能。[2A]将IA/IB/IIA期与健康对照区分开的生物标记物组的ROC曲线。[2B]在没有糖尿病和胰腺炎病史的队列中,将IA/IB/IIA期与健康对照区分开的生物标记物组的ROC曲线。[2C]将IIB期与健康对照区分开的生物标记物组的ROC曲线。[2D]在没有糖尿病和慢性胰腺炎病史的样本中,将IIB期与健康对照区分开的生物标记物组的ROC曲线。计算了AUC,并使用自举法估算其95%CI。P值是双向的且基于使用自举标准误差估计的Z检验。缩写:AUC,曲线下面积。

[0035] 图3A-3B:EDRN参考集队列3中的生物标记物组性能。[3A]在EDRN参考集中用于将所有早期癌症与健康对照区分开的生物标记物组的ROC曲线。[3B]在没有糖尿病和慢性胰腺炎病史的样本中,将所有癌症与健康对照区分开的生物标记物组的ROC曲线。计算了AUC,并使用自举法估算其95%CI。P值是双向的且基于使用自举标准误差估计的Z检验。

[0036] 图4:对照小鼠和呈现PanIN的KC小鼠的血清中的TFPI ELISA分析。

具体实施方式

[0037] 超过90%的胰腺腺癌(PDAC)患者死于其疾病,因此对早期疾病的检测至关重要。在可切除阶段检测到的,PDAC 5年生存率在主要中心估计高达30%,<2cm的淋巴结阴性肿瘤为30-60%,大约<10mm的极小肿瘤为60%(Ryan等人,2014;Mayo等人,2012;Ishikawa等

人,1999;Tsuchiyya等人,1986)。目前的金标准血液基生物标记物CA19-9缺乏早期检测所必需的预测价值。尽管一些研究已经确定了可以改善CA19-9性能的标记物,但这些研究仅限于晚期胰腺癌,或者生物标记物尚未在早期胰腺癌中使用多重盲法验证研究进行测试。此外,目前的生物标记物尚未显示出对一般人群筛查具有足够高的敏感性和特异性。通常,测定使用DNA、微小RNA或多重蛋白质组学方法,其使用大量标记物,对于转化成临床而言是困难、耗时且昂贵的。

[0038] 本公开的某些实施方案提供了用于检测胰腺癌,特别是早期胰腺癌以及癌前病变(例如PanIN病变)的生物标记物组。所提供的生物标记物组经过多重盲法验证,并且显著提高了CA19-9的性能和准确性,尤其是在本研究中使用的数量且批注充分的早期样本队列中。另外,本公开的生物标记物组可用于临床,例如用于一种或多种夹心ELISA测定(例如,用于筛选所有三种生物标记物的多重ELISA),其易于使用,提供快速结果,并且需要单一血样(single blood sample)。有趣的是,本发明的生物标记物组可用于筛查一般人群,因为它被证明与糖尿病和慢性胰腺炎的状况无关。

[0039] 具体地,本研究已确定优化的同工型(isoform)TNC-FN III-C作为胰腺癌的新型生物标记物。发现TNC-FN III-C和TFPI改善了CA19-9的性能。使用早期胰腺癌的大量样本队列,以两次盲法验证,验证了所述三种生物标记物的组,并显示出它们能够持续提高CA19-9的性能。因此,该组为CA 19-9的检测早期PDAC的预测能力增加了统计学意义,并且因此可作为用于早期检测可手术切除的PDAC的测定,从而具有临床实用性。

[0040] 因此,本文提供的一种方法包括通过检测与健康或良性疾病对照相比生物标记物组TNC-FN III-C、TFPI和CA19-9水平的改变来确定胰腺癌(包括早期胰腺癌)的存在。所述生物标记物可以通过ELISA、蛋白质印迹、免疫组织化学或其他基于抗体的检测方法来测量。所述方法可以包括结合至显像剂(如荧光团或放射性同位素)的抗体,所述显像剂可以通过光学成像或超声检测。被确定为具有生物标记物组表达水平改变的受试者可以进行胰腺癌的治疗,或者可以被转至影像学研究以及进一步的临床测试,以早期检测胰腺癌。

[0041] 此外,本研究发现TFPI可用作癌前病变(如PanIN病变)的生物标记物。因此,其他实施方案提供了测量样本或组织中的TFPI的方法,例如用于PanIN病变的检测。

[0042] I. 定义

[0043] 如本文所用,就指定的组分而言,“基本上不含”在本文中是指没有将指定的组分有目的地配制到组合物中和/或仅作为污染物或以痕量存在。因此,由组合物的任何意外污染引起的指定组分的总量远低于0.05%,优选低于0.01%。最优选的是其中用标准分析方法不能检测到指定组分的组合物。

[0044] 如本文的说明书中所用,“一(a)”或“一(an)”可以表示一个或多个。如在本文的权利要求中使用的,当与词“包含”结合使用时,词“一”或“一”可以表示一个或多个。

[0045] 除非明确指出仅指代替代方案或替代方案是互斥的,否则在权利要求中使用的术语“或”用于表示“和/或”,尽管本公开支持仅涉及替代方案和“和/或”的定义。如本文所使用的,“另一”可以表示至少第二个或更多个。

[0046] 在整个本申请中,术语“约”用于表示值包括设备误差的、用于确定该值的方法的固有变化,或研究的受试者之间存在的变化。

[0047] 如本文所用,术语“受试者”是指人类或非人类哺乳动物或动物。非人类哺乳动物

包括家畜、伴侣动物、实验动物和非人类灵长类动物。非人类受试者还具体包括但不限于鸡、马、牛、猪、山羊、狗、猫、豚鼠、仓鼠、貂和兔子。在一些实施方案中，受试者是患者。如本文所用，“患者”是指在医师或其他医护人员的照料下的受试者，其包括已经向医师或其他医护人员咨询，从医师或其他医护人员那里接受建议或从其接受处方或其他推荐的受试者。

[0048] 术语“治疗(treatment)”或“治疗(treating)”旨在包括预防(prophylaxis)、改善、防止(prevention)或治愈病况(例如胰腺癌)。病况(例如胰腺癌)已经开始后的治疗旨在减轻、改善或完全消除该病况和/或其相关症状，或防止其恶化。在病况开始之前对受试者的治疗旨在降低发生病况的风险和/或如果病况确实发生则降低其严重性。如本文所用，术语“防止”是指对有患病风险的受试者的预防性治疗，从而降低受试者患病的可能性，以及抑制已经存在的疾病的进一步发展。

[0049] “抗癌剂”能够例如通过促进杀死癌细胞、诱导癌细胞凋亡、降低癌细胞的生长速度、减少转移的发生率或数量、缩小肿瘤尺寸、抑制肿瘤生长、减少肿瘤或癌细胞的血液供应、促进针对癌细胞或肿瘤的免疫反应、防止或抑制癌症的进展或延长癌症患者的寿命来负面影响受试者的癌细胞/肿瘤。

[0050] 在本申请全文中使用的术语“治疗益处”或“治疗有效的”是指就该病况的医学治疗而言促进或增强受试者的健康的任何事物。这包括但不限于减少疾病迹象或症状的频率或严重程度。例如，癌症的治疗可涉及例如肿瘤尺寸的减小、肿瘤的侵袭性的减小、癌症的生长速率的减小或转移的预防。癌症的治疗还可以指延长患有癌症的受试者的存活期。

[0051] 本文中术语“抗体”以最广义使用，并且特别涵盖单克隆抗体(包括全长单克隆抗体)、多克隆抗体、多特异性抗体(例如，双特异性抗体)和抗体片段，只要它们表现出所需的生物学活性。

[0052] 本文所用的术语“确定表达水平”是指将基因特异性试剂如探针、引物或抗体和/或方法应用于样本，例如受试者的样本和/或对照样本，用于定量地、半定量地或定性确定或测量一种或多种基因的量，例如mRNA的量。例如，基因水平可以通过多种方法确定，包括例如免疫测定，所述免疫测定包括例如免疫组织化学、ELISA、蛋白质印迹、免疫沉淀等，其中生物标记物检测剂例如抗体(例如标记抗体)特异性结合生物标记物，并允许例如相对或绝对确定多肽生物标记物的量，杂交法和PCR方案，其中探针或引物或引物组用于确定核酸生物标记物的量，包括例如基于探针和基于扩增的方法，所述基于探针和基于扩增的方法包括例如微阵列分析、RT-PCR(例如定量RT-PCR)、基因表达系列分析(SAGE)、RNA印迹、数字分子条形码技术(例如Nanostring:nCounter™分析)和TaqMan定量PCR测定。可以应用其他mRNA检测和定量方法，例如在福尔马林固定、石蜡包埋(FFPE)的组织样本或细胞中进行mRNA原位杂交。该技术目前由QuantiGene® ViewRNA(Affymetrix)提供，该技术使用每种mRNA的探针组，所述探针组特异性结合扩增系统以扩增杂交信号；这些扩增的信号可以使用标准的荧光显微镜或成像系统可视化。此系统可以例如检测和测量异质样本中的转录水平；例如，如果样本在同一组织切片中存在正常细胞和肿瘤细胞。如上所述，基于TaqMan探针的基因表达分析(基于PCR)也可以用于测量组织样本中的基因表达水平，例如用于测量FFPE样本中的mRNA水平。简而言之，基于TaqMan探针的测定法利用与mRNA靶标特异性杂交的探针。此探针含有附着在每个末端的淬灭染料和报告染料(荧光分子)，并且仅在发生与

mRNA靶标的特异性杂交时发出荧光。在扩增步骤期间,聚合酶的核酸外切酶活性导致淬灭和报告染料从探针上脱离,并可能发生荧光发射。记录荧光发射并通过检测系统测量信号;这些信号强度用于计算样本中给定转录物(基因表达)的丰度。

[0053] 如本文所用,术语“样本”包括获自患者的任何生物标本。样本包括但不限于全血、血浆、血清、红细胞、白细胞(例如外周血单核细胞)、导管灌洗液、乳头抽吸物、淋巴(例如淋巴结的弥散性肿瘤细胞)、骨髓抽吸物、唾液、尿液、粪便(stool)(即粪便(feces))、痰、支气管灌洗液、眼泪、细针抽吸物(例如,通过细针吸出收集的针对靶标(例如肿瘤)的或随机取样正常细胞(例如乳晕周围组织)的)、任何其他体液、例如肿瘤活检(例如针头活检)或淋巴结(例如前哨淋巴结活检)的组织(例如肿瘤组织)和其细胞提取物。在一些实施方案中,所述样本是全血或其部分组分,例如血浆、血清或细胞沉淀。

[0054] 术语“增加”、“升高”、“过表达(overexpress)”、“过表达(overexpression)”、“过表达的”、“上调”或“上调的”可互换地指代与来自没有癌症的患者的生物学样本相比,在来自癌症患者的生物学样本(例如血浆)中以可检测到的更高水平存在的生物标记物。该术语包括与来自没有癌症的患者的样本相比,由于转录、转录后加工、翻译、翻译后加工、细胞定位(例如细胞器、细胞质、细胞核、细胞表面)以及RNA和蛋白质稳定性而在来自癌症患者的样本中的过表达。可以使用检测mRNA(即RT-PCR、PCR、杂交)或蛋白质的常规技术(即ELISA、免疫组织化学技术、质谱、Luminex® xMAP技术)检测过表达。过表达可以是与来自没有癌症的患者的样本相比,10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或更高的表达。在某些情况下,过表达是与来自没有癌症的患者样本相比,1倍、2倍、3倍、4倍、5、6、7、8、9、10或15倍或更高倍的转录或翻译水平。

[0055] “标记(label)”、“显像剂”或“可检测部分”是可通过光谱学、光化学、生物化学、免疫化学、化学或其他物理手段检测的组合物。例如,有用的标记包括³²P、荧光染料、电子致密试剂、酶(例如,如ELISA中常用的)、生物素、异羟基洋地黄毒苷或半抗原,以及例如通过在肽中掺入放射性标记可检测到的或用于检测与肽特异性反应的抗体的蛋白质。

[0056] 如本文所用,术语“生物标记物”是指来自待鉴定或待定量的组织样本或细胞的任何生物学特征。生物标记物可用于或潜在可用于测量一种或多种生物学过程、致病过程、疾病或对治疗干预的响应的起始、进展、严重程度、病理学、侵袭性、等级、活性、失能(disability)、死亡率、发病率、疾病亚分类或其他潜在特征。生物标记物实质上是存在于待分析的样本中的并且可以从样本中分离或在样本中测量的任意生物学化合物,例如蛋白质及其片段、肽、多肽、蛋白聚糖、糖蛋白、脂蛋白、碳水化合物、脂质、核酸、有机或无机化学物质、天然聚合物,以及小分子。

[0057] 如本文所用,术语“检测”是指观察来自标记部分的信号以指示样本中生物标记物的存在。可以使用本领域已知的用于检测特定可检测部分的任意方法进行检测。示例性的检测方法包括但不限于光谱学、光化学、生物化学、免疫化学、电、光学或化学方法。

[0058] II. 胰腺癌检测

[0059] A 生物学样本

[0060] 本公开的某些实施方案涉及样本中某些抗原或生物标记物(例如,TNC-FN IIIC、TFPI和/或CA19-9)的表达的检测和定量。如本文所用,术语“生物学样本”可以指整个生物体或其组织、细胞或组成部分的子集(subset)。“生物学样本”还可以指从整个生物体或其

组织、细胞或组成部分的子集,或其小部分 (fraction) 或部分 (portion) 制备的匀浆、裂解物或提取物。通常,在进行测定之前将所述生物学样本稀释。生物学样本的非限制性实例包括尿液、血液、脑脊液 (CSF)、胸膜液、痰和腹膜液、膀胱洗涤液、分泌物、口腔洗涤液、组织样本、印片 (touch preps) 或细针抽吸物。所述样本可包括体液和组织样本,所述组织样本包括但不限于血液、组织活检、脊髓液、脑膜液、尿液、肺泡液。在一些实施方案中,所述生物学样本可以是细胞系、细胞培养物或细胞悬液。优选地,所述生物学样本对应于衍生所述样本的亲本细胞中存在的DNA和/或表达产物的量和类型。所述生物学样本可以来自人类或非人类受试者。在具体的实施方案中,所述样本是血浆样本。所述测定也可以应用于体内组织,例如在手术期间。

[0061] B. 生物标记物

[0062] 本公开提供了用于检测胰腺癌的生物标记物组。该组包括生物标记物TNC-FN III-C、TFPI和CA19-9。作为双标记物组 (例如TNC-FN III-C/CA19-9或TFPI/CA19-9) 和三标记物组 (例如,TNC-FN III-C/TFPI/CA19-9), TNC-FN III-C和TFPI均可以提高CA19-9在胰腺癌检测中的性能。本发明的生物标记物组改善了用于检测胰腺癌的CA19-9金标准测定的AUC、特异性以及敏感性和准确性。通过添加TNC-FN III-C增加测定的特异性,所述组将假阳性病例的数量减少到可以将患者送往进一步的影像学检查 (例如CT扫描、MRI或超声检查) 的程度。

[0063] 1. CA19-9

[0064] CA19-9是一种肿瘤相关的粘蛋白型糖蛋白抗原,其与Lewis血型蛋白有关。虽然高CA 19-9最常与胰腺癌有关,但其他癌症 (例如结直肠癌、肺癌和胆囊癌) 也会引起高水平的CA 19-9。非癌性病况,例如胆结石、胆管阻塞 (黄疸)、胰腺炎、囊性纤维化和肝病,也可能导致高的CA 19-9水平。

[0065] 理想的肿瘤标记物应特异于给定的肿瘤类型且高度敏感,以免出现假阳性诊断。但是,由于敏感性不足,Lewis血型阴性 (Lea-b-) 人群的假阴性结果以及由阻塞性黄疸引起的假阳性结果高 (10-60%), CA 19-9似乎不符合这些标准 (Wu等人,2013)。

[0066] 2. TNC-FN III-C

[0067] 腱生蛋白-C (Tenascin-C) 是由四个结构域组成的细胞外基质糖蛋白。一个亚基具有在N末端的TA结构域,然后是表皮生长因子样序列结构域 (EGF样结构域),纤连蛋白III型 (FN III) 重复结构域和在C-末端的纤维蛋白原样结构域。FN III结构域中有可变剪接结构域,它会产生腱生蛋白-C的某些类型的变体。在组织中,这些亚基通过在N末端螺旋结构域处扭曲形成三聚体,并通过二硫键形成六聚体。尽管正常组织中存在腱生蛋白-C的低分子量变体,但是本公开鉴定了在胰腺癌中表达的腱生蛋白-C的高分子变体,TNC-FN III-C。因此,本研究是首次将该同工型鉴定为胰腺癌生物标记物的。

[0068] 3. TFPI

[0069] 组织因子途径抑制剂 (TFPI) 是一种抗凝蛋白,其可作为Kunitz型丝氨酸蛋白酶抑制剂。TFPI是一种可以可逆地抑制因子Xa的单链多肽。当Xa被抑制时,Xa-TFPI复合物随后也可以抑制FVIIa-组织因子复合物。FPI被认为在调节TF诱导的血栓形成中很重要,因为血管中不适当的血栓形成会引起心血管疾病,例如心肌梗塞、中风和肺栓塞等。TFPI可以单独或组合用作生物标记物,以检测癌前病变,例如PanINs。

[0070] C. 检测方法

[0071] 可以通过ELISA、蛋白质印迹、质谱、毛细管免疫检测方法、等电聚焦、免疫沉淀方法或免疫组织化学来测量生物标记物组的表达水平。其他检测方法包括基于抗体的光学成像、超声成像、MRI成像、PET成像和光线疗法。在具体的实施方案中，本发明的方法涉及进行一次或多次ELISA测定以检测一种或多种生物标记物（例如TNC-FN IIIC、TFPI和CA19-9）的表达。

[0072] 酶联免疫吸附测定或ELISA可用于测量多种生物标记物的差异表达。ELISA测定有很多变体。可以对ELISA测试进行格式化，以用于分析物的直接、间接、竞争或夹心检测。所有这些都是基于将抗原或抗体固定在通常是微量滴定板的固体表面上。最初的ELISA方法包括制备含有目的生物标记物蛋白的样本，用样本涂覆微量滴定板的孔，将每个孔与识别特异性抗原的第一抗体孵育，洗去未结合的抗体，然后检测抗体-抗原复合物。抗体-抗体复合物可以直接检测。第一抗体缀合至检测系统，例如产生可检测产物的酶。抗体-抗体复合物可以间接检测。例如，如上所述，第一抗体通过与检测系统缀合的第二抗体进行检测。然后扫描微量滴定板，并且可以使用本领域已知的手段将原始强度数据转换成表达值。可从例如Meso Scale Discovery (MSD) 的商业供应商处获得单探针和多探针试剂盒。

[0073] 在一种ELISA方法中，第一或捕获结合剂，例如特异性结合目的生物标记物的抗体，被固定在合适的固相基底或载体上。然后将测试生物学样本与捕获抗体接触并孵育所需的时间。洗涤以除去未结合的物质后，与生物标记物上不同的、非重叠的表位结合的第二检测抗体随后用于检测多肽生物标记物与捕获抗体的结合。优选将检测抗体直接或间接缀合至可检测部分。可以在这样的方法中使用的可检测部分的实例包括但不限于化学发光剂和发光剂；荧光团，例如荧光素、若丹明和曙红；放射性同位素；比色剂；酶底物标记，例如生物素。

[0074] 在另一个实施方案中，ELISA是竞争性结合测定，其中使用标记的生物标记物代替标记的检测抗体，并且存在于测试样本中的标记的生物标记物和任何未标记的生物标记物竞争与捕获抗体结合。可以基于检测到的标记的生物标记物的比例来确定与捕获抗体结合的生物标记物的量。

[0075] 在某些实施方案中，与生物标记物结合的生物标记物或抗体直接或间接地用可检测部分标记。可检测试剂的作用是通过允许由结合剂与蛋白质标记物（或其片段）的结合而形成的复合物可视化，从而促进诊断方法的检测步骤。可以选择可检测试剂，使得其产生可以被测量并且其强度与被分析样本中存在的蛋白质标记物的量相关（优选成比例）的信号。标记生物学分子如多肽和抗体的方法是本领域众所周知的。多种可检测试剂中的任意一种均可用于本公开的实践中。合适的可检测试剂包括但不限于：抗血清和单克隆抗体可用的各种配体、放射性核素、荧光染料、化学发光剂、微粒（例如量子点、纳米晶体、荧光粉等）、光敏剂、酶（例如ELISA中使用的那些，即辣根过氧化物酶、 β -半乳糖苷酶、萤光素酶、碱性磷酸酶）、比色标记、磁性标记以及生物素、异羟基洋地黄毒苷或其他半抗原和蛋白质。

[0076] 抗体可以与用于对各种患病器官、组织或细胞类型进行成像和诊断的显像剂连接。可以将抗体用荧光团或放射性示踪剂标记或与其缀合，以用作显像剂。许多合适的显像剂以及将其与蛋白质或肽连接的方法在本领域中是已知的，所述连接使用可通过比色标记物（例如但不限于脲酶、碱性磷酸酶、（辣根）过氧化氢酶和葡萄糖氧化酶）检测到其存在的

金属螯合物、放射性同位素、荧光标记物或酶来实现。在一些实施方案中,显像缀合物还将用放射性同位素双重标记以通过核方法结合显像,并被制成独特的环状结构,并针对结合亲和力和药代动力学进行优化。此类药剂可以通过本领域普通技术人员已知的许多方法来施用,其包括但不限于口服、吸入、皮下(sub-q)、静脉内(I.V.)、腹膜内(I.P.)、肌肉内(I.M.)、或鞘内注射,或如以下更详细描述的方法。

[0077] 在一些方面,显像剂是例如荧光团的发色团。适用于本公开的示例性荧光团包括罗丹明、对甲氨基酚(rhodol)、荧光素、硫代荧光素(thiofluorescein)、氨基荧光素、羧基荧光素、氯代荧光素、甲基荧光素、磺基荧光素、氨基对甲氨基酚(aminorhodol)、羧基对甲氨基酚(carboxyrhodol)、氯代对甲氨基酚(chlororhodol)、甲基对甲氨基酚(methylrhodol)、磺基对甲氨基酚(sulforhodol);氨基罗丹明(aminorhodamine)、羧基罗丹明、氯代罗丹明(chlororhodamine)、甲基罗丹明(methylrhodamine)、磺基罗丹明(sulforhodamine)、和硫代罗丹明(thiorhodamine)、花菁(cyanine)、吡啶碳花菁(indocarbocyanine)、氧杂碳花菁(oxacarbocyanine)、噻碳花菁(thiacarbocyanine)、部花菁(merocyanine)、花菁2、花菁3、花菁3.5、花菁5、花菁5.5、花菁7、恶二唑衍生物(oxadiazole derivatives)、吡啶基恶唑(pyridyloxazole)、硝基苯并恶二唑(nitrobenzoxadiazole)、苯并恶二唑(benzoxadiazole)、芘衍生物(pyrenederivatives)、级联蓝(cascade blue)、恶嗪衍生物、尼罗红、尼罗蓝、甲酚紫(cresyl violet)、恶嗪170、吡啶衍生物、二氨基吡啶(proflavin)、吡啶橙、吡啶黄、芳基次甲基(arylmethine)衍生物、金胺、结晶紫、孔雀石绿、四吡咯衍生物、卟吩、酞花菁和胆红素;1-二甲氨基萘基-5-磺酸盐、1-苯胺基-8-萘磺酸盐、2-对甲苯基-6-萘磺酸盐、3-苯基-7-异氰酸根香豆素、N-(对-(2-苯并恶唑基)苯基)马来酰亚胺、芪类、芪、6-FAM(荧光素)、6-FAM(NHS酯)、荧光素dT、HEX、JOE(NHS酯),MAX、TET、ROX、TAMRA、TARMA™(NHS酯)、TEX 615、ATTO™488、ATTO™532、ATTO™550、ATTO™565、ATTO™Rh101、ATTO™590、ATTO™633、ATTO™647N、TYE™563、TYE™665、和TYE™705。在具体的方面,所述发色团是TAMRA。

[0078] 所述可检测部分可包括但不限于氟脱氧葡萄糖(FDG);2'-氟-2'脱氧-1β-D-阿拉伯呋喃糖基-5-乙基尿嘧啶(FEAU);5-[¹²³I]-2'-氟-5-碘-1β-D-阿拉伯呋喃糖基尿嘧啶;5-[¹²⁴I]-2'-氟-5-碘-1β-D-阿拉伯呋喃糖基尿嘧啶;5-[¹³¹I]-2'-氟-5-碘-1β-D-阿拉伯呋喃糖基尿嘧啶;5-[¹⁸F]-2'-氟-5-氟-1-β-D-阿拉伯呋喃糖基尿嘧啶;2-[¹¹C]-和5-([¹¹C]-甲基)-2'-氟-5-甲基-1-β-D-阿拉伯呋喃糖基尿嘧啶;2-[¹¹C]-2'-氟-5-乙基-1-β-D-阿拉伯呋喃糖基尿嘧啶;5-([¹¹C]-乙基)-2'-氟-5-乙基-1-β-D-阿拉伯呋喃糖基尿嘧啶;5-(2-[¹⁸F]-乙基)-2'-氟-5-(2-氟-乙基)-1-β-D-阿拉伯呋喃糖基尿嘧啶;5-[¹²³I]-2'-氟-5-碘-乙基-1-β-D-阿拉伯呋喃糖基尿嘧啶;5-[¹²⁴I]-2'-氟-5-碘-乙基-1-β-D-阿拉伯呋喃糖基尿嘧啶;5-[¹³¹I]-2'-氟-5-碘-乙基-1-β-D-阿拉伯呋喃糖基尿嘧啶;5-[¹²³I]-2'-氟-5-碘-1-β-D-呋喃核糖基尿嘧啶;5-[¹²⁴I]-2'-氟-5-碘-1-β-D-呋喃核糖基尿嘧啶;5-[¹³¹I]-2'-氟-5-碘-1-β-D-呋喃核糖基尿嘧啶;5-[¹²³I]-2'-氟-5-碘-乙基-1-β-D-呋喃核糖基尿嘧啶;5-[¹²⁴I]-2'-氟-5-碘-乙基-1-β-D-呋喃核糖基尿嘧啶;5-[¹³¹I]-2'-氟-5-碘-乙基-1-β-D-呋喃核糖基尿嘧啶;或9-4-[¹⁸F]氟-3-(羟甲基)丁基]鸟嘌呤

[0079] 在一些方面,所述显像剂是放射性核素。合适的放射性核素标记是Tc、In、Ga、Cu、F、Lu、Y、Bi、Ac和其他放射性核素同位素。具体地,所述放射性核素选自包括¹¹¹In、^{99m}Tc、

^{94m}Tc 、 ^{67}Ga 、 ^{66}Ga 、 ^{68}Ga 、 ^{52}Fe 、 ^{69}Er 、 ^{72}As 、 ^{97}Ru 、 ^{203}Pb 、 ^{62}Cu 、 ^{64}Cu 、 ^{67}Cu 、 ^{186}Re 、 ^{188}Re 、 ^{86}Y 、 ^{90}Y 、 ^{51}Cr 、 ^{52m}Mn 、 ^{157}Gd 、 ^{177}Lu 、 ^{161}Tb 、 ^{169}Yb 、 ^{175}Yb 、 ^{105}Rh 、 ^{166}Dy 、 ^{166}Ho 、 ^{153}Sm 、 ^{149}Pm 、 ^{151}Pm 、 ^{172}Tm 、 ^{121}Sn 、 ^{177m}Sn 、 ^{213}Bi 、 ^{142}Pr 、 ^{143}Pr 、 ^{198}Au 、 ^{199}Au 、 ^{18}F 、 ^{123}I 、 ^{124}I 、 ^{131}I 、 ^{75}Br 、 ^{76}Br 、 ^{77}Br 、和 ^{82}Br 等的组。这些放射性核素是阳离子的，并且可以通过缀合物的螯合基团与螯合剂复合，形成标记的组合物。

[0080] 检测和/或定量可检测标记或信号产生材料的方法取决于标记的性质。由适当的酶催化的反应产物可以是但不限于荧光，发光或放射性的，或者它们可以吸收可见光或紫外光。适用于检测此类可检测标记的检测器的示例包括但不限于X射线胶片、放射性计数器、闪烁计数器、分光光度计、色度计、荧光计、光度计和光密度计。可以允许对反应进行任何合适的制备，处理和分析的任何形式来进行任何检测方法。这可以例如在多孔测定板（例如96孔或386孔）中或使用任何合适的阵列或微阵列。各种试剂的储备溶液可以手动或自动制备，随后所有的移液、稀释、混合、分配、洗涤、孵育、样本读出、数据收集和分析都可以使用能够检测可检测标记的市售分析软件、机器人和检测仪器自动完成。显像可以通过光学显像、超声、PET、SPECT、MRI或光线疗法进行。

[0081] 在一些方面，所述一种或多种测定可以是夹心ELISA测定。可以通过三个单独的ELISA测定来检测这三种生物标记物，例如在三个单独用于每种生物标记物的平板或载玻片上或是在具有单独用于每种生物标记物的孔的一个平板或载玻片上。

[0082] 在某些实施方案中，抗原特异性抗体可以固定在载体或支持物上（例如珠子、磁性颗粒、乳胶颗粒、微量滴定板孔、比色皿或其他反应容器）。合适的载体或支持物材料的实例包括琼脂糖、纤维素、硝化纤维素、葡聚糖、**Sephadex®**、**Sepharose®**、脂质体、羧甲基纤维素、聚丙烯酰胺、聚苯乙烯、辉长岩、滤纸、磁铁石、离子交换树脂、塑料膜、塑料管、玻璃、聚胺-甲基乙烯基-醚-马来酸共聚物、氨基酸共聚物、乙烯-马来酸共聚物、尼龙、丝绸等。可以使用对第一结合剂特异的第二结合剂间接固定结合剂（例如，可以使用包被在载体或支持物上的绵羊抗小鼠IgG Fc片段特异性抗体固定对蛋白质标记物具有特异性的小鼠抗体）。

[0083] 在其他方面，可以通过多重ELISA检测三种生物标记物，以同时检测两种或三种生物标记物。例如，所述多重ELISA可以包括抗体阵列，其中捕获抗体以子阵列点样，所述样本在其上孵育，洗去非特异性蛋白质，并将所述阵列与生物素化检测抗体和链霉亲和素缀合的荧光团的混合物一起孵育，所述荧光团通过荧光激光扫描仪可视化（例如Quantibody Multiplex ELISA Array, RayBiotech）。

[0084] 可以使用多重测定法（例如多重ELISA）同时检测测试样本中几种不同生物标记物的存在。多重测定的优点是高通量，所需样本量小以及能够在宽动态浓度范围内检测不同蛋白质。在某些实施方案中，此类方法采用阵列，其中将对多种生物标记物具有特异性的多种结合剂（例如，捕获抗体）固定在基底（例如膜）上，其中每种捕获抗体均位于基底上的特定的、预先确定的位置。使用这种阵列进行测定的方法包括例如在美国专利公开号US2010/0093557A1和US2010/0190656A1中描述的方法，其公开内容通过引用特别地结合于此。

[0085] 基于利用例如流式细胞术、化学发光或电子化学发光技术的几种不同格式的多重阵列是本领域众所周知的。流式细胞多重阵列，也称为基于珠的多重阵列，其包括来自BD Biosciences (Bedford, Mass.) 的流式细胞小球微阵列术 (CBA) 系统和来自Luminex Corp.

(Austin, Tex)的多分析物分析 (multi-analyte profiling) (xMAP®) 技术, 两者均使用可通过流式细胞术区分的珠子组。每个珠子组都涂有特异性捕获抗体。荧光或链霉亲和素标记的检测抗体与在珠子组上形成的特异性捕获抗体-生物标记物复合物结合。可以通过珠子组的差异来识别和测量多种生物标记物, 其中使用流式细胞分析检测发色或发荧光的发射。

[0086] 在另一种形式中, 来自Quansys Biosciences (Logan, UT) 的多重ELISA将多个特异性捕获抗体涂覆在96孔微量滴定板上同一孔的多个点(一个点一个抗体)。然后使用化学发光技术检测平板上相应位点的多个生物标记物。

[0087] 抗体微阵列还可用于测量多种生物标记物的差异表达。为此, 将多种抗体排列并使其共价附于微阵列或生物芯片的表面。含有目的生物标记物蛋白质的蛋白质提取物通常用荧光染料或生物素标记。标记的生物标记物蛋白与抗体微阵列一起孵育。洗涤以去除未结合的蛋白质后, 扫描微阵列。可以使用本领域已知的手段将原始荧光强度数据转换成表达值。

[0088] D. 显像

[0089] 在某些实施方案中, 本发明涵盖了使用具有可检测部分的抗体对靶抗原成像的方法。所述抗体可以用可以通过本领域已知的各种方法检测的荧光和/或放射性标记。

[0090] 核磁共振 (NMR) 和磁共振成像 (MRI) 是通过将样本置于外部磁场中并检测原子核的共振频率来识别样本 (区域) 中同位素的技术。MRI扫描仪通常由1.5至7或更高特斯拉强度的磁体组成。磁场和无线电波用于激发体内质子。这些质子在激发后松弛, 并且计算机程序将该数据转换为人体组织的图片。在某些实施方案中, 本公开涵盖了拍摄强化前 (pre-contrast) 图像。注入组合物后, 将拍摄强化后的 (post-contrast) 图像。

[0091] NMR通常涉及以下步骤: 在施加的恒定磁场中磁核自旋的对准 (极化), 以及通过采用电磁辐射 (通常是射频 (RF) 脉冲) 来扰动核自旋的这种对准。给定载波频率的脉冲包含以载波频率为中心的一系列频率。近似方波的傅立叶变换包含来自主频率附近的频率的贡献。NMR频率范围允许人们使用毫秒到微秒的射频脉冲。

[0092] 单光子发射计算机断层扫描 (SPECT) 是一种使用伽马射线的成像技术。使用伽玛相机时, 检测信息通常以横截面切片的形式显示, 并可根据需要重新设置格式或进行操作。将发射伽马射线的放射性同位素 (放射性核素) 注入受试者体内。放射性同位素包含或被缀合至具有所需性质的分子, 例如标记物放射性同位素已连接至配体, 叶酸。这允许将例如叶酸的配体和放射性同位素 (放射性药物) 的组合运载并结合到体内的目标位置, 其然后 (由于同位素的伽马发射) 允许配体的浓度通过伽马相机看到。

[0093] 正电子发射断层扫描 (PET) 是一种可产生三维图像的成像技术。该系统检测由发射正电子的放射性核素 (示踪剂) 间接发射的伽马射线对。然后通过计算机分析构建区域内示踪剂浓度的三维图像。放射性示踪同位素被注入到受试者体内, 例如血液循环中。通常会有一个等待时间, 此时示踪剂会集中在目标组织中; 然后将受试者放置在成像扫描仪中。当放射性同位素经历正电子发射衰变时, 它会发射正电子 (这是具有相反电荷的电子的反粒子), 直到其减速到可以与电子相互作用的程度, 从而产生一对在大致相反方向上移动的 (γ) 光子。这些在扫描设备中被检测到。该技术取决于同时或同步检测沿大致相反方向移动的一对光子 (扫描仪具有内置的轻微方向误差容限)。未成对到达的光子 (即在时序窗口

内)将被忽略。将光子源沿着重合的直线(也称为响应线或LOR)定位。将该数据用于生成图像。

[0094] 与在约400nm至约500nm范围内的可见光相比,波长范围为600nm至850nm的光位于光谱的近红外范围内。因此,在本公开的诊断方法的实践中使用的激发光将包含至少一个波长的光,以在红外波长下照射组织以激发化合物,从而使从具有摄取本公开的化合物的区域获得的荧光清晰可见,并且使该荧光与周围组织的自发荧光不同。所述激发光可以是单色的或多色的。以这种方式,本公开的化合物是有利的,因为它们消除了对使用过滤机制的需要,如果荧光探针是在低于约600nm的波长下发荧光的探针,则将使用该过滤机制来获得期望的诊断图像。以这种方式,本公开的化合物避免了模糊的诊断图像,所述模糊的诊断图像是由从健康组织反射并导致荧光图像的分辨率下降的波长的激发光产生的。

[0095] 用于外科手术的诊断实验室、医师办公室和手术室可以配备头顶灯,其产生的光发射光谱中的光的波长可用于本公开诊断方法实践,例如产生适当波长的光的灯具。仅通过熄灭手术室中的其他光(以消除从所研究的身体部位的组织中可见地反射的多余光)并将近红外波长的激发光照射到体腔或手术产生的开口中,就可以将这种光用于本发明的诊断方法中,从而使直接被观察者(例如,外科医生)的眼睛接收到的荧光图像主要是从视野中的荧光团发出的荧光图像。

[0096] 在任何成像实施方案中,本文公开的方法可以进一步包括将来自受试者的区域的图像记录在计算机或计算机可读介质上的步骤。在某些实施方案中,所述方法可以进一步包括将记录的图像传递到代表正在评估的受试者的医学专业人员。

[0097] 在一些方面,本公开的化合物用于通过在允许化合物与靶细胞类型的至少一种细胞(例如,最近募集和分化的巨噬细胞)结合的时间和条件下施用此类化合物来鉴定肿瘤。然后对结合的化合物进行光学检测,以使得从本公开的结合的靶向化合物发出的近红外波长的荧光的存在指示在生物学样本中存在靶细胞类型。

[0098] 根据本公开的方法有效使用的缀合物的量取决于许多参数,包括缀合物的分子量、其施用途径及其组织分布。可以在导管插入或外部成像程序之前以一种或多种剂量(例如,约1至约3个剂量)施用抗原特异性抗体。剂量的数量取决于化合物的分子量、其施用途径及其组织分布以及其他因素。

[0099] 抗体可以与药学上可接受的载体组合地经肠胃外(例如静脉内、皮内、皮下、肌肉或腹膜内)施用于待评估肿瘤的患者。用于肠胃外施用的合适方式包括针头(包括微针头)注射器、无针头注射器和输注技术。

[0100] E. 使用方法

[0101] 本公开的方面包括用于诊断或监测受试者中癌症的发作、进展或消退的方法,其通过例如从受试者获得细胞或组织样本并分析此类样本中三种生物标记物TNF-FN III-C、TFPI和CA19-9的表达变化的存在来进行。如本文所用,术语“癌症”是指细胞的不受控制的生长,其可能干扰身体器官和系统的正常功能,并且包括原发性和转移性肿瘤。从其原始位置迁移并传播重要器官的原发性肿瘤或癌症最终会通过受影响器官的功能恶化而导致受试者死亡。转移是不同于原发性肿瘤的位置的癌细胞或癌细胞群,这是由于癌细胞从原发性肿瘤扩散到身体的其他部位而引起的。转移可能最终导致受试者死亡。

[0102] 癌症包括但不限于基底细胞癌、胆道癌;膀胱癌;骨癌;脑和CNS癌症;乳腺癌;宫颈

癌；绒毛膜癌；结肠和直肠癌；结缔组织癌；消化系统癌症；子宫内膜癌；食道癌；眼癌；头颈部癌症；胃癌；上皮内肿瘤；肾癌；喉癌；白血病；肝癌；肺癌（例如小细胞和非小细胞）；淋巴瘤（包括霍奇金氏和非霍奇金氏淋巴瘤）；黑色素瘤；骨髓瘤；神经母细胞瘤；口腔癌（例如嘴唇、舌头、口腔和咽部）；卵巢癌；胰腺癌；前列腺癌；视网膜母细胞瘤；横纹肌肉瘤；直肠癌；肾癌；呼吸系统癌症；肉瘤；皮肤癌；胃癌；睾丸癌；甲状腺癌；子宫癌；泌尿系统癌症，以及其他癌症和肉瘤。在具体的实施方案中，通过本发明方法诊断或治疗的受试者是患有胰腺癌（例如早期胰腺癌）的受试者。

[0103] 本文所述的方法可用于筛查患者的癌症，或可用于监测诊断为癌症的患者。例如，在筛查模式下，以早期发现膀胱癌为目标，筛查有胰腺癌风险的患者。本文描述的方法可以单独使用，也可以与其他测试结合使用。通常，对血浆样本进行ELISA，并确定生物标记物组的表达变化。进一步检查了三种生物标记物表达发生变化的患者，必要时所述患者可以接受适当治疗。治疗后，使用本文所述的方法监测患者的癌症复发。

[0104] 在一些实施方案中，测试样本可以是来自患有胰腺癌或癌前病况的受试者的样本，而对照样本可以是来自无癌和/或没有癌前病况的受试者的样本。

[0105] F. 抗癌药

[0106] 在一些实施方案中，本发明的方法通过检测三种生物标记物TNC-FN III-C、TFPI和CA19-9的表达改变来鉴定受试者患有例如胰腺癌的癌症。在进一步的实施方案中，本公开提供了通过施用一种或多种抗癌疗法来治疗被鉴定为患有癌症的受试者的方法。

[0107] 一种或多种抗癌疗法可以是放射疗法、外科手术（例如乳房肿瘤切除术和乳房切除术）、化学疗法、基因疗法、DNA疗法、病毒疗法、RNA疗法、免疫疗法、骨髓移植、纳米疗法、单克隆抗体疗法或以上的组合。所述抗癌疗法可以是辅助疗法或新辅助疗法的形式。

[0108] 在一些实施方案中，所述抗癌疗法是施用小分子酶抑制剂或抗转移剂。在一些实施方案中，所述抗癌疗法是施用副作用限制剂（例如，旨在减轻治疗副作用的发生和/或严重性的试剂，例如止吐剂等）。在一些实施方案中，所述抗癌疗法是放射疗法。在一些实施方案中，所述抗癌疗法是手术。在一些实施方案中，所述抗癌疗法是放射疗法和手术的组合。在一些实施方案中，所述抗癌疗法是伽马辐射。在一些实施方案中，所述抗癌疗法是靶向PBK/AKT/mTOR途径的疗法、HSP90抑制剂、微管蛋白抑制剂、凋亡抑制剂和/或化学预防剂（chemopreventative agent）。所述抗癌疗法可以是本领域已知的一种或多种化学治疗剂。

[0109] 相对于另外的癌症疗法（例如免疫检查点疗法），可以在之前、之中、之后或以各种组合施用第一抗癌疗法。施用间隔可以从同步至数分钟至数天至数周。在其中向患者分开提供第一抗癌疗法与另外的治疗剂的实施方案中，通常会确保在每个递送的时间之间显著的时间段没有到期，使得两种化合物仍然能够对患者发挥有利的综合效应。在这种情况下，可以预期的是，可以在彼此相隔约12至24或72小时内，更具体地在约6-12小时内为患者提供第一抗癌疗法和第二抗癌疗法。在某些情况下，可能希望将治疗时间显著延长，其中各次施用之间的间隔从几天（2、3、4、5、6或7天）延长到几周（1、2、3、4、5、6、7、或8周）。

[0110] 1. 化学疗法

[0111] 根据本发明的实施方案，可以使用多种化学治疗剂。术语“化学疗法”是指使用药物来治疗癌症。“化学治疗剂”用于表示在癌症的治疗中施用的化合物或组合物。这些药剂或药物根据它们在细胞内的活动方式进行分类，例如，它们是否以及在什么阶段影响细胞

周期。或者,可以基于其直接交联DNA、嵌入DNA或通过影响核酸合成而诱导染色体和有丝分裂畸变的能力来表征药剂。

[0112] 化学治疗剂的实例包括烷化剂,例如噻替派(thiotepa)和环磷酰胺(cyclophosphamide);烷基磺酸盐,例如白消安(busulfan)、英丙舒凡(improsulfan)和哌泊舒凡(piposulfan);氮杂环丙烷,例如苯佐替派(benzodopa)、卡波醌(carboquone)、美妥替派(meturedopa)和乌瑞替派(uredopa);乙烯亚胺和甲基三聚氰胺(methylmelamine),包括六甲蜜胺、三乙烯三聚氰胺、三乙烯磷酰胺、三乙烯硫代磷酰胺和三甲基三聚氰胺;乙酰精宁(acetogenins)(特别是布拉它辛(bullatacin)和不拉它辛酮(bullatacinone));喜树碱(camptothecin)(包括合成的类似物托泊替康(topotecan));苔藓抑素(bryostatins);海洋抑素(callystatin);CC-1065(包括其阿多来新(adozelesin)、卡折来新(carzelesin)和比折来新(bizelesin)合成类似物);念珠藻素(cryptophycins)(尤其是念珠藻素1和念珠藻素8);多拉司他汀(dolastatin);倍癌霉素(duocarmycin)(包括合成类似物KW-2189和CB1-TM1);艾榴塞洛素(eleutherobin);水鬼蕉碱(pancratistatin);匍枝珊瑚醇(sarcodictyin);海绵抑素(spongistatin);氮芥,例如苯丁酸氮芥(chlorambucil)、萘氮芥(chlornaphazine)、胆磷酰胺(cholophosphamide)、雌莫司汀(estramustine)异环磷酰胺(ifosfamide)、双氯乙基甲胺(mechlorethamine)、盐酸甲氧氮芥(mechlorethamine hydrochloride)、美法仑(melphalan)、新氮芥(novembichin)、苯芥胆甾醇(phenesterine)、泼尼莫司汀(prednimustine)、曲磷胺(trofosfamide)和尿嘧啶氮芥;亚硝基脲,例如卡莫司汀(Carmustine)、氯脲菌素(chlorozotocin)、福莫司汀(fotemustine)、洛莫斯汀(Iomustine)、尼莫斯汀(nimustine)和雷莫斯汀(ranimustine);抗生素,例如烯二炔抗生素(例如卡奇霉素(calicheamicin),特别是卡奇霉素 γ 和卡奇霉素 ω);达内霉素(dynemicin),包括达内霉素A;二膦酸盐,例如氯膦酸盐(clodronate);埃斯培拉霉素(esperamicin);以及新制癌菌素(neocarzinostatin)生色团和相关的色蛋白烯二炔类抗生素生色团、阿克拉霉素(aclacinomycin)、放线菌素,安曲霉素(authrarnycin)、重氮丝氨酸、博来霉素(bleomycin),放线菌素C、卡拉比星(carabycin)、洋红霉素(carminomycin)、嗜癌霉素(carzinophilin)、色霉素(chromomycinis)、放线菌素D、柔红霉素(daunorubicin)、地托比星(detorubicin)、6-重氮-5-氧代-L-正亮氨酸、阿霉素(doxorubicin)(包括吗啉代阿霉素(morpholino-doxorubicin)、氰基吗啉代阿霉素(cyanomorpholino-doxorubicin)、2-吡咯啉代阿霉素(2-pyrrolino-doxorubicin)和脱氧阿霉素(deoxydoxorubicin)、表柔比星(epirubicin)、依索比星(esorubicin)、伊达比星(idarubicin)、麻西罗霉素(marcellomycin)、丝裂霉素(mitomycins)(例如丝裂霉素C)、霉酚酸(mycophenolic acid)、诺拉霉素(nogalamycin)、橄榄霉素(olivomycin)、培洛霉素(peplomycin)、泊非霉素(porfiromycin)、嘌呤霉素(Puromycin)、三铁阿霉素(quelamycin)、罗多比星(rodorubicin)、链黑霉素(streptonigrin)、链脲霉素(streptozocin)、杀结核菌素(tubercidin)、乌苯美司(ubenimex)、净司他丁(zinostatin)、佐柔比星(zorubicin);抗代谢物、例如甲氨蝶呤和5-氟尿嘧啶(5-FU);叶酸类似物,例如二甲叶酸(denopterin)、蝶罗呤(pteropterin)、三甲曲沙(trimetrexate);嘌呤类似物、例如氟达拉滨(fludarabine)、6-巯嘌呤(6-mercaptopurine)、硫咪嘌呤(thiamiprine)和硫鸟嘌呤;嘧啶类似物,例如安西他滨

(ancitabine)、阿扎胞苷(azacitidine)、6-氮尿苷、卡莫氟(carmofur)、阿糖胞苷(cytarabine)、二脱氧尿苷、去氧氟尿苷(doxifluridine)、依诺他滨(enocitabine)和氟尿苷(floxuridine);雄激素,例如卡普睾酮(calusterone)、屈他雄酮丙酸酯(dromostanolone propionate)、环硫雄醇(epitiostanol)、美雄烷(mepitiostane)和睾内酯(testolactone);抗肾上腺素,例如米托坦(mitotane)和曲洛斯坦(trilostane);叶酸补充剂,例如亚叶酸(frolic acid);醋葡醛内酯(aceglatone);醛磷酸胺糖苷(aldophosphamide glycoside);氨基乙酰丙酸(aminolevulinic acid);恩尿嘧啶(eniluracil);安吡啶(amsacrine);bestrabucil;比生群(bisantrene);依达曲沙(edatraxate);地磷酰胺(defofamine);秋水仙胺(demecolcine);地吡醌(diaziquone);依氟鸟氨酸(elfornithine);依利醋铵(elliptinium acetate);埃博霉素(epothilone);依托格鲁(etoglucid);硝酸镓;羟基脲;香菇多糖(Lentinan);氯尼达明(Ionidainine);美登醇(maytansinoid),如美登素(maytansine)和安丝菌素(ansamitocin);米托胍脲(mitoguazone);米托蒽醌(mitoxantrone);莫哌达醇(mopidanmol);二胺硝吡啶(nitraerine);喷司他丁(pentostatin);蛋氨酸芥(phenamet);吡柔比星(pirarubicin);洛索蒽醌(Isoxantrone);鬼臼酸(podophyllinic acid);2-乙基胍;丙卡巴肼(procarbazine);PSK多糖复合物;雷佐生(razoxane);根霉素(rhizoxin);西佐喃(sizofiran);螺方定锗(spirogermanium);细交链孢菌酮酸(tenuazonic acid);三亚胺醌(triaziquone);2,2',2''-三氯三乙胺;单端孢霉烯族毒素类(trichothecenes)(特别是T-2毒素、疣孢菌素A(verracurin A)、杆孢菌素(roridin)A和蛇行菌素(anguidine));尿烷;长春地辛(vindesine);达卡巴嗪(dacarbazine);甘露司汀(mannomustine);;二溴甘露醇(mitobronitol);二溴卫矛醇(mitolactol);哌泊溴烷(pipobroman);gacytosine;阿糖胞苷(arabinoside) (“Ara_C”);环磷酰胺(cyclophosphamide);噻替哌(thiotepa);紫杉烷类(taxoids),例如紫杉醇(paclitaxel)和多西他赛吉西他滨(docetaxel gemcitabine);6-硫鸟嘌呤;巯基嘌呤;铂配位络合物,例如顺铂(cisplatin)、奥沙利铂(oxaliplatin)和卡铂(carboplatin);长春碱(vinblastine);铂;依托泊苷(etoposide)(VP-16);异环磷酰胺;米托蒽醌;长春新碱;长春瑞滨(vinorelbine);能灭瘤(novantrone);替尼泊苷(teniposide);依达曲沙(edatrexate);道诺霉素(daunomycin);氨基蝶呤(aminopterin);希罗达(xeloda);伊班膦酸盐(ib和ronate);伊立替康(irinotecan)(例如CPT-11);拓扑异构酶抑制剂RFS 2000;二氟间甲基鸟氨酸(DMF0);视黄醇类(retinoids),如视黄酸(retinoic acid);卡培他滨(capecitabine);卡铂、考布他汀(combretastatin)、丙卡巴肼(procarbazine)、林可霉素(plicomycin)、吉西他滨(gemcitabien)、那韦尔滨(navelbine)、法呢基蛋白转移酶抑制剂、反铂(transplatinum)和上述任何一种的药学上可接受的盐,酸或衍生物。

[0113] 2. 放射疗法

[0114] 引起DNA损伤并已被广泛使用的其他因素包括众所周知的 γ 射线、X射线和/或放射性同位素向肿瘤细胞的直接递送。还可以考虑其他形式的DNA损伤因素,例如微波、质子束辐照(美国专利5,760,395和4,870,287)和UV辐照。所有这些因素最有可能影响对DNA、DNA前体、DNA复制和修复以及染色体装配和维持的广泛损害。X射线的剂量范围是从持续很长时间(3到4wk)的每天50到200伦琴到单次剂量2000到6000伦琴。放射性同位素的剂量范

围差异很大,并且取决于同位素的半衰期、所发射辐射的强度和类型以及肿瘤细胞的摄取。

[0115] 3. 免疫疗法

[0116] 在癌症治疗的背景下,免疫疗法通常依赖于免疫效应细胞和分子的使用来靶向和破坏癌细胞。利妥昔单抗(RITUXAN®)就是这样的例子。免疫效应物可以是例如对肿瘤细胞表面上的某些标记物具有特异性的抗体。单独的抗体可以充当疗法的效应物,或者它可以募集其他细胞来实际影响细胞杀伤。抗体也可以与药物或毒素(化学疗法、放射性核素、蓖麻毒蛋白A链、霍乱毒素、百日咳毒素等)缀合并用作靶向剂。或者,效应物可以是携带表面分子的淋巴细胞,该表面分子与肿瘤细胞靶标直接或间接相互作用。各种效应细胞包括细胞毒性T细胞和NK细胞。

[0117] 抗体-药物缀合物已成为癌症治疗剂开发的突破性方法。癌症是世界上主要的死亡原因之一。抗体-药物缀合物(ADC)包含与杀细胞药物共价连接的单克隆抗体(MAb)。这种方法将单克隆抗体针对其抗原靶标的高特异性与高效的细胞毒性药物结合在一起,从而产生了“武装”的单克隆抗体,可将有效载荷(药物)递送至具有丰富抗原水平的肿瘤细胞。药物的靶向递送还将其在正常组织中的暴露降至最低,从而降低了毒性并提高了治疗指数。FDA批准了两种ADC药物:2011年批准ADCETRIS®(维汀-布伦妥昔单抗(brentuximab vedotin))和2013年批准KADCYLA®(曲妥珠单抗美坦新(trastuzumab emtansine)或T-DM1)验证了该方法。当前,在癌症治疗的临床试验的各个阶段中,有30多种ADC药物候选物(Leal等人,2014)。随着抗体工程化和连接子-有效载荷(linker-payload)优化的日益成熟,新型ADC的发现和开发越来越依赖于对适用于该方法的新靶标的鉴定和验证以及靶向MAb的产生。ADC标靶的两个标准是肿瘤细胞内上调的/高水平的表达和强大的内在化。

[0118] 在免疫疗法的一方面,肿瘤细胞必须带有一些适合于靶向(即在大多数其他细胞上不存在的)标记物。存在许多肿瘤标记物,并且在本发明实施方案的背景下,这些肿瘤标记物中的任意一种都可能适于靶向。常见的肿瘤标记物包括CD20、癌胚抗原、酪氨酸酶(p97)、gp68、TAG-72、HMFG、唾液酸化路易斯抗原、MucA、MucB、PLAP、层粘连蛋白受体、erb B和p155。免疫疗法的另一个方面是将抗癌效应与免疫刺激效应结合起来。还存在免疫刺激分子,其包括:细胞因子(例如IL-2、IL-4、IL-12、GM-CSF、 γ -IFN)、趋化因子(例如MIP-1、MCP-1、IL-8)和生长因子(例如FLT3配体)。

[0119] 当前正在研究或使用的免疫疗法的例子是免疫佐剂,例如牛分枝杆菌(*Mycobacterium bovis*)、恶性疟原虫(*Plasmodium falciparum*)、二硝基氯苯和芳香族化合物(美国专利5,801,005和5,739,169;Hui和Hashimoto,1998;Christodoulides等人,1998);细胞因子疗法,例如干扰素 α 、 β 和 γ 、IL-1、GM-CSF和TNF(Bukowski等人,1998;Davidson等人,1998;Hellstrand等人,1998);基因治疗,例如TNF、IL-1、IL-2和p53(Qin等人,1998;Austin-Ward和Villaseca,1998;美国专利5,830,880和5,846,945);和单克隆抗体,例如抗CD20、抗神经节苷脂GM2和抗p185(Hollander,2012;Hanibuchi等人,1998;美国专利5,824,311)。预期可将一种或多种抗癌疗法与本文所述的抗体疗法一起使用。

[0120] 在一些实施方案中,免疫疗法可以是免疫检查点抑制剂。免疫检查点或调高信号(例如共刺激分子)或调低信号。可被免疫检查点阻断靶向的抑制性免疫检查点包括腺苷A2A受体(A2AR)、B7-H3(也称为CD276)、B和T淋巴细胞衰减因子(BTLA)、细胞毒性T淋巴细胞相关蛋白4(CTLA-4也称为CD152)、吡啶胺2,3-双加氧酶(IDO)、杀伤细胞免疫球蛋白(KIR)、

淋巴细胞激活基因3 (LAG3)、程序性死亡1 (PD-1)、T细胞免疫球蛋白结构域和粘蛋白结构域3 (TIM-3) 和T细胞活化的V结构域Ig抑制剂 (VISTA)。具体地,免疫检查点抑制剂靶向PD-1轴和/或CTLA-4。

[0121] 免疫检查点抑制剂可以是药物,例如小分子、配体或受体的重组形式,或者特别是抗体,例如人抗体(例如,国际专利公开W02015016718;Pardoll, Nat Rev Cancer, 12(4): 252-64, 2012;两者均通过引用并入本文)。可以使用免疫检查点蛋白或其类似物的已知抑制剂,特别是可以使用嵌合的、人源化或人类形式的抗体。如技术人员将知道的,替代和/或等效名称可以用于本公开中提及的某些抗体。在本公开的上下文中,这样的替代和/或等效名称是可互换的。例如,已知兰洛利珠单抗 (lambrolizumab) 也被称为替代名称和等效名称MK-3475和派姆单抗 (pembrolizumab)。

[0122] 在一些实施方案中,PD-1结合拮抗剂是抑制PD-1与其配体结合伴侣结合的分子。在一个具体方面,PD-1配体结合伴侣是PDL1和/或PDL2。在另一个实施方案中,PDL1结合拮抗剂是抑制PDL1与其结合伴侣结合的分子。在一个具体方面,PDL1结合伴侣是PD-1和/或B7-1。在另一个实施方案中,PDL2结合拮抗剂是抑制PDL2与其结合伴侣结合的分子。在一个具体方面,PDL2结合伴侣是PD-1。拮抗剂可以是抗体、其抗原结合片段、免疫粘附素、融合蛋白或寡肽。示例性抗体描述于美国专利号8,735,553、8,354,509和8,008,449,其全部通过引用并入本文。用于本文提供的方法中的其他PD-1轴拮抗剂在本领域是已知的,如在美国专利公开号US20140294898、US2014022021和US20110008369中所述,其均通过引用并入本文。

[0123] 在一些实施方案中,PD-1结合拮抗剂是抗PD-1抗体(例如,人类抗体、人源化抗体或嵌合抗体)。在一些实施方案中,抗PD-1抗体选自纳武单抗 (nivolumab)、派姆单抗和CT-011。在一些实施方案中,PD-1结合拮抗剂是免疫粘附素(例如,包含与恒定区(例如,免疫球蛋白序列的Fc区)融合的PDL1或PDL2的细胞外或PD-1结合部分的免疫粘附素)。在一些实施方案中,PD-1结合拮抗剂是AMP-224。纳武单抗,也称为MDX-1106-04、MDX-1106、ONO-4538、BMS-936558和 **OPDIVO**[®],是在W02006/121168中描述的抗PD-1抗体。派姆单抗,也称为MK-3475、Merck 3475、lambrolizumab、**KEYTRUDA**[®]和SCH-900475,是W02009/114335中所述的抗PD-1抗体。CT-011,也称为hBAT或hBAT-1,是W02009/101611中所述的抗PD-1抗体。AMP-224,也称为B7-DCIg,是W02010/027827和W02011/066342中所述的PDL2-Fc融合可溶性受体。

[0124] 在本文提供的方法中可以被靶向的另一个免疫检查点是细胞毒性T淋巴细胞相关蛋白4 (CTLA-4),也称为CD 152。人类CTLA-4的完整cDNA序列的Genbank登录号为L15006。CTLA-4存在于T细胞的表面上,并且当与抗原呈递细胞表面的CD80或CD86结合时,其充当“关闭开关”。CTLA4是免疫球蛋白超家族的成员,该家族在辅助T细胞的表面表达并向T细胞传递抑制信号。CTLA4与T细胞共刺激蛋白CD28相似,并且两个分子均与抗原呈递细胞上的CD80和CD86(分别也称为B7-1和B7-2)结合。CTLA4向T细胞传递抑制信号,而CD28则传递刺激信号。细胞内CTLA4也存在于调节性T细胞中,可能对其功能很重要。通过T细胞受体和CD28的T细胞活化导致CTLA-4 (B7分子的抑制性受体)表达增加。

[0125] 在一些实施方案中,免疫检查点抑制剂是抗CTLA-4抗体(例如,人类抗体、人源化

抗体或嵌合抗体)、其抗原结合片段、免疫粘附素、融合蛋白或寡肽。

[0126] 适用于本发明方法的抗人类CTLA-4抗体(或由其衍生的VH和/或VL结构域)可以使用本领域众所周知的方法产生。或者,可以使用本领域公认的抗CTLA-4抗体。例如,公开于:美国专利号8,119,129;国际专利公开号W001/14424、W0 98/42752和W0 00/37504(CP675, 206,也称为曲美木单抗(tremelimumab);以前称为替西木单抗(ticilimumab));美国专利号6,207,156;Hurwitz等人,1998;Camacho等人,2004;和Mokyr等人,1998的抗CTLA-4抗体可用于本文公开的方法。每个前述出版物的教导通过引用并入本文。也可以使用与这些本领域公认的任一种抗体竞争与CTLA-4结合的抗体。例如,人源化CTLA-4抗体描述于国际专利申请号W02001014424、W02000037504和美国专利号8,017,114;其全部通过引用并入本文。

[0127] 示例性的抗CTLA-4抗体是伊匹单抗(ipilimumab)(也称为10D1、MDX-010、MDX-101和Yervoy®)或其抗原结合片段及变体(参见,例如,W0 01/14424)。在其他实施方案中,抗体包含伊匹单抗的重链和轻链CDR或VR。因此,在一个实施方案中,该抗体包含伊匹单抗的VH区的CDR1、CDR2和CDR3结构域,以及伊匹单抗的VL区的CDR1、CDR2和CDR3结构域。在另一个实施方案中,该抗体竞争与CTLA-4上的与上述抗体相同的表位结合和/或与之结合。在另一个实施方案中,该抗体与上述抗体具有至少约90%的可变区氨基酸序列同一性(例如,与伊匹单抗具有至少约90%、95%或99%的可变区同一性)。

[0128] 用于调节CTLA-4的其他分子包括CTLA-4配体和受体,如在美国专利号5,844,905、5,885,796和国际专利申请号W01995001994和W01998042752中所述的,其全部通过引用并入本文;和免疫粘附素,如美国专利号8,329,867中所述的,其通过引用并入本文。

[0129] 4. 手术

[0130] 大约60%的癌症患者将接受某种类型的手术,其包括预防性、诊断性或分期(staging)、根治性和姑息性手术。根治性手术包括切除,其中全部或部分癌组织被物理去除、切除和/或破坏,并且其可以与其他疗法结合使用,例如本发明实施方案的治疗、化学疗法、放射疗法、激素疗法、基因疗法、免疫疗法和/或替代疗法。肿瘤切除是指物理去除至少部分肿瘤。除肿瘤切除外,手术治疗还包括激光手术、冷冻手术、电外科手术和显微控制手术(莫氏手术)。

[0131] 切除部分或全部癌细胞、组织或肿瘤后,体内可能会形成空腔。可以通过对该区域进行灌注、直接注射或局部应用其他抗癌疗法来完成治疗。可以例如每1、2、3、4、5、6或7天,或者每1、2、3、4和5周或每1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11或12个月重复这种治疗。这些治疗也可以具有不同的剂量。

[0132] 5. 其他药剂

[0133] 预期其他药剂可以单独使用或与其他抗癌疗法组合使用以改善治疗的疗效。这些另外的药剂包括影响细胞表面受体和GAP连接的上调的药剂、细胞抑制剂和分化剂、细胞粘附抑制剂、增加过度增殖细胞对凋亡诱导剂敏感性的药剂或其他生物剂。通过增加GAP连接数增加细胞间信号传导,将增加对邻近的过度增殖细胞群的抗过度增殖作用。在其他实施方案中,细胞抑制剂或分化剂可以与本发明实施方案的某些方面组合使用以改善治疗的抗过度增殖功效。预期细胞粘附抑制剂可改善本发明实施方案的功效。细胞粘附抑制剂的实例是粘着斑激酶(FAK)抑制剂和洛伐他汀(Lovastatin)。进一步考虑到可以将增加过度增

殖细胞对凋亡的敏感性的其他药剂(例如抗体c225)与本发明实施方案的某些方面组合使用以改善治疗功效。

[0134] III. 试剂盒

[0135] 用于对血浆样本进行ELISA测定以检测癌症(例如胰腺癌)的试剂盒也在本发明范围内。这种试剂盒的例子可以包括对所述三种生物标记物具有特异性的一组抗体。试剂盒可进一步包含使用抗体进行ELISA测定以鉴定血浆样本中所述生物标记物表达改变的说明书。试剂盒可进一步包含用于诊断目的的说明书,其指示:来自癌症患者的生物标记物组的表达升高表明胰腺癌的风险增加。试剂盒可进一步包含指示以下的说明书:血浆中生物标记物组的表达改变指示应将患者送去进一步诊断测试和/或用胰腺癌的抗癌药进行治疗。

[0136] 在一些实施方案中,试剂盒可进一步包含检测试剂,例如链霉亲和素缀合的抗体。在一些实施方案中,试剂盒可进一步包含试剂和缓冲液,其包括但不限于洗涤缓冲液。在一些实施方案中,试剂盒可进一步包括安装介质和/或一种或多种对照ELISA板。

[0137] IV 实施例

[0138] 包括以下实施例以说明本发明的优选实施方案。本领域技术人员应该理解,以下实施例中公开的技术代表发明人发现的在本发明的实践中发挥良好作用的技术,因此可以认为构成其实施的优选方式。然而,本领域技术人员应当理解,根据本公开,可以在所公开的特定实施例中进行许多改变,并且在不脱离本发明的精神和范围的情况下仍可获得相似或相似的结果。

[0139] 实施例1-胰腺癌迁移特征的分析 and 验证

[0140] 经CLIA认证的盲法临床实验室研究中的迁移特征组验证:使用针对TFPI的夹心ELISA(Balasantil等人,2011)和针对TNC的优化的夹心ELISA,使用目前的研究已将其鉴定为新型的胰腺癌生物标记物的TNC、TNC-FN III-C的剪接形式,对迁移特征的临床实验室重现性进行了测试。在盲法CLIA实验室中,使用相同的样本重复进行先前进行的迁移特征分析。针对CA19-9、TNC-FN III-C和TFPI筛选了20个PDAC IV期血浆样本和20个健康对照。患者特征在表5中给出。结果表明,CLIA实验室中的标记物测定均可靠且可重复,在两个实验室中,TFPI、TNC-FN III-C和CA19-9的组合组的AUC达到0.92(95%CI=0.82至1.00),而基于单独的CA19-9的性能较差(AUC 0.71,95%CI=0.52至0.90MDACC)和AUC-0.72(95%CI=0.54至0.90CLIA实验室)。表6给出了最佳临界值(cutoff)时的AUC值和敏感性/特异性。这些CA 19-9测定之前也已与FDA批准的试剂盒进行了比较,发现结果几乎相同(Haab等人,2015)。

[0141] 早期PDAC中的预验证研究:接下来使用早期血浆队列1(表1)进行ELISA测定。在与健康对照(n=30)相比的I/IIA期PDAC队列(n=30)中,迁移特征标记将CA 19-9的性能从0.72的AUC提高到0.84的AUC(图1A和表2)。但是,在IIB期(n=22)与健康对照相比时,TFPI和TNC-FN III-C与金标准的组合产生了0.98的非常高的AUC值(95%CI=0.95至1.00),这与基于单独的CA19-9的情况相比,统计学上显著更好(图1B和表2)。在将所有II期癌症归为一组(IIA/IIB期)(n=57)时,添加TNC-FN III-C和TFPI分别可改善CA19-9的性能,对于TNC-FN III-C+CA 19-9和TFPI+CA 19-9,AUC分别为0.92(95%CI=0.86 to 0.97)和0.97(95%CI=0.94 to 0.99),对于组合组,整体AUC为0.97(95%CI=0.93至0.99),这显著改善了CA19-9(P=0.03)(图1C和表2)。在最终分析中,检查了三种生物标记物的组合组。对于所

有早期癌症 (I和II期) (n=85) 与健康对照 (n=30), 结果具有统计学意义, 其中迁移特征组将CA19-9的性能从0.83的AUC提高到0.92的AUC (P=0.04) (图1D和表2)。

[0142] 为了为验证研究设定最佳的临界值, 并进一步完善用于早期PDAC检测的诊断标记物组, 将队列1作为训练队列以建立统计学模型和风险评估。通过在所有癌症和对照之间进行比较的前向选择, 选择了具有CA19-9、TFPI和TNC-FN III-C的组合生物标记物组。基于逻辑回归模型, 使用 $RS=0.0816*CA19-9+0.0783*TFPI+0.0229*TNC-FN\ III-C$ 确定风险评估 (RS)。最佳临界值定为5.79。对于仅使用CA19-9的组, $RS=0.0855*CA19-9$, 最佳临界值为1.12。在两个盲法独立验证队列中测试了生物标记物组的性能及其最佳临界值。

[0143] 表1. TexGen早期队列和匹兹堡大学早期盲法队列*中的研究受试者的特征。

[0144]

特征	训练组-TEXGEN		验证组- 1 匹兹堡大学队列		
	PDAC (n = 85)	健康对照 (n =30)	PDAC (n = 23)	健康对照 (n =17)	慢性胰腺炎 (n= 24)
性别					
男性	46	19	14	6	13
女性	39	11	9	11	11
年龄, 岁数					
<50	4	5	3	3	14
50-60	25	12	6	2	3
61-70	28	10	10	6	6
71-80	22	3	2	2	1
>80	6	--	2	4	--
组织学					
腺癌	60	--	15	--	--
浸润性导管癌	24	--	8	--	--
腺癌梭形细胞	1	--	0	--	--
期					

[0145]

I	25	--		--	--
IA	1	--		--	--
IB	2	--		--	--
II	33	--		--	--
IIA	2	--		--	--
IIB	22	--	23	--	--
饮酒史					
当前	28	13	9	4	8
过去	18	4	7	5	12
从不	39	13	6	7	4
未知	--	--	1	1	0
吸烟史					
当前	7	0	8	4	12
过去	44	11	10	6	6
从不	34	19	5	7	6
糖尿病史					
是	21	5	5	4	6
否	64	25	18	13	18
部位					
身体	6	--	0	--	--
头部	68	--	19	--	--
胰腺重叠病变	6	--	3	--	--
尾部	2	--	0	--	--
其他指定部分	3	--	1	--	--
期					
直接延伸	32	--	--	--	--
直接延伸+淋巴结	16	--	--	--	--

[0146]	远端	3	--	--	--	--
	局部	25	--	--	--	--
	局部淋巴结受累	3	--	--	--	--
	未分期	6	--	--	--	--
	<u>TNM 期</u>					
	T1N1Mx	--	--	2	--	--
	T2N1Mx	--	--	1	--	--
	T3N0Mx	--	--	1	--	--
	T3N1Mx	--	--	14	--	--
	T3N1BMx	--	--	5	--	--

[0147] *PDAC-胰腺导管腺癌,破折号=不适用

[0148] 使用风险评分和临界值的早期队列2盲法验证:在队列2的早期PDAC与慢性胰腺炎病例或健康对照中,验证了队列1的迁移特征组的性能和相应的临界值(表1)。对于盲法验证分析,在IIB期(n=23)与慢性胰腺炎(n=24)的比较中,CA19-9组的AUC为0.84(95%CI=0.72至0.96),而三标记物组提供的AUC略高,为0.86(95%CI=0.74至0.96)。表7提供了验证结果的详细总结。

[0149] EDNR参考集的盲法验证:然后,在由NCI从多个机构建立的252个样本的EDNR参考集中,使用相似SOP分析了迁移特征标记物的性能。为了区分IA/IB/IIA期病例(n=55)与健康对照(n=61),与单独的CA 19-9(AUC为0.74(95%CI=0.64至0.84))相比,组合的生物标记物组使用风险评分和确定的临界值将AUC提高至0.79(95%CI=0.70至0.87)(图2A和表3)。基于临界值的相应平均敏感性和特异性(准确性)在统计学上显著提高,从CA19-9的0.66提高到组合生物标记物组的0.77(P<0.001)。此外,与慢性胰腺炎(n=62)相比,组合生物标记物组在IA/IB/IIA期病例(n=55)中统计学上显著地改善了CA 19-9的性能,其中AUC从0.69(95%CI=0.58至0.79)提高至0.75(95%CI=0.65至0.84)(P=0.045);相应的准确性从0.57提高到0.72(P<0.001)。此外,通过对队列进行分层以仅包括无糖尿病和胰腺炎病史的亚群,可以观察到CA 19-9的性能有了明显改善。在与健康对照(n=50)相比的IA/IB/IIA期患者亚群(n=30)中,组合模型将CA 19-9AUC从0.78(95%CI=0.66至0.89)提高到0.87(95%CI=0.77至0.95)(图2B和表3)。基于队列1所确定的临界值的相应准确性统计学上显著提高,从CA19-9的0.65提高到组合生物标记物组的0.82(P<0.001)。

[0150] IIB期PDAC(n=42)与健康对照组(n=61)的验证结果表明,组合生物标记物组的AUC为0.87(95%CI=0.80至0.94),而单独的CA 19-9的AUC为0.83(95%CI=0.74至0.91)(图2C和表3),其中准确性从0.71统计学显著地提高到0.79(P=0.03)。对于IIB期病例(n=42)与慢性胰腺炎(n=62)相比,组合生物标记物模型将CA 19-9的AUC从0.77(95%CI=0.67至0.86)提高到0.83(95%CI=0.74至0.91)(P=0.05),相应的准确性从0.62统计学显著地提高到0.74(P=0.009)。在无糖尿病和胰腺炎病史的子队列中,基于22例IIB期病例和50名健康对照,组合模型组的AUC为0.93(95%CI=0.87至0.98),而CA19-9的AUC为0.88

(95%CI=0.77至0.96) (图2D和表3);相应的准确性从0.76提高到0.83。因此,组合的生物标记物模型改善了金标准的性能,尤其是对于那些没有糖尿病或胰腺炎的病例,这表明队列的分层可以鉴定AUC值可能接近临床效用的个体。

[0151] 接下来,基于对所有早期癌症 (n=98) 和所有健康对照 (n=61) 的综合分析,验证了生物标记物组的性能。结果表明,相对于CA19-9,生物标记物组的分类性能在统计学上有显著提高。具体地,CA 19-9的AUC为0.78 (95%CI=0.71至0.85),而使用生物标记物组的AUC在统计学上显著提高至0.83 (95%CI=0.76至0.89) (图3A和表3, P=0.045);相应的准确性也从0.68统计学上大幅显著提高到0.78 (P=0.001)。对所有早期癌症 (n=98) 和慢性胰腺炎 (n=62) 的验证也表明,CA 19-9在统计学上有显著改善 (AUC值P=0.01, 准确性P<0.001) (表3)。急性良性胆道阻塞队列与早期PDAC的分析也显示,尽管无统计学意义,对于所有早期癌症与良性疾病血浆,组合模型的性能均优于CA19-9 (表8)。此外,在没有糖尿病和胰腺炎病史的亚群中 (n=52早期PDAC病例和n=50健康对照),与单独CA19-9的0.82 (95%CI=0.73至0.90) 的AUC相比,组合迁移特征模型导致统计学上显著增加的AUC,其为0.89 (95%CI=0.82至0.95) (P=0.03) (图3B和表3);相应的准确性从0.69统计学上显著提高到0.82 (P<0.001)。

[0152] EDRN参考集中的验证结果清楚地表明向CA 19-9添加迁移特征对于PDAC的早期检测的价值,以及通过将队列分层为没有糖尿病和慢性胰腺炎的子队列所观察到的整体组的性能的提升。

[0153] 表2. TexGen队列中的生物标记物组性能

测定	I/IIA 期 (n=30) vs 对照 (n=30)		IIB 期 (n=22) vs 对照 (n=30)		II 期 (n=57) vs 对照(n=30)		所有早期 (n=85) vs 对 照(n=30)	
	AUC (95%CI)	P 值*	AUC (95%CI)	P 值*	AUC (95%CI)	P 值*	AUC (95%CI)	P 值*
[0154] CA 19-9	0.72 (0.57, 0.86)	1.00	0.87 (0.76, 0.96)	1.00	0.90 (0.82, 0.95)	1.00	0.83 (0.75, 0.90)	1.00
[0154] TFPI	0.71 (0.57, 0.84)	0.91	0.91 (0.81, 0.98)	0.58	0.86 (0.77, 0.93)	0.57	0.80 (0.71, 0.88)	0.64
TNC-FNIII-C	0.54 (0.39, 0.69)	0.08	0.87 (0.77, 0.95)	0.97	0.75 (0.63, 0.85)	0.04	0.68 (0.57, 0.79)	0.03
TNC-FNIII-C, CA 19-9	0.82 (0.71, 0.92)	0.27	0.95 (0.89, 0.99)	0.14	0.92 (0.86, 0.97)	0.43	0.89 (0.83, 0.94)	0.22
[0155] TFPI, CA 19-9	0.82 (0.70, 0.91)	0.29	0.98 (0.93, 1.00)	0.06	0.97(0.94, 0.99)	0.04	0.91 (0.86, 0.96)	0.06
[0155] TNC FNIII-C, TFPI, CA19-9	0.84 (0.74, 0.93)	0.17	0.98 (0.95, 1.00)	0.04	0.97 (0.93, 0.99)	0.03	0.92 (0.86, 0.96)	0.04

[0156] *P值是双向的,并基于自举计算。AUC=曲线下面积;CI=置信区间。

[0157] 表3.EDRN参考集中的生物标记物组性能。

[0158]

测定	CA 19-9			迁移特征+ CA 19-9					准确性	AUC
	AUC (95% CI)	敏感性 (95% CI)	特异性 (95% CI)	准确性 (95% CI)	AUC (95% CI)	敏感 性 (95% CI)	特异 性 (95% CI)	准确性 (95% CI)	P-值*	P-值†
IA/IB/IIA 期 (n=55) vs. 健康(n=61)	0.74 (0.64, 0.84)	0.71 (0.58, 0.82)	0.61 (0.48, 0.74)	0.66 (0.57, 0.74)	0.79 (0.70, 0.87)	0.73 (0.6, 0.84)	0.82 (0.72, 0.90)	0.77 (0.70, 0.85)	<0.001	0.095
IA/IB/IIA 期 (n=55) vs. CP (n=62)	0.69 (0.58, 0.79)	0.71 (0.58, 0.82)	0.44 (0.31, 0.57)	0.57 (0.48, 0.66)	0.75 (0.65, 0.84)	0.73 (0.62, 0.84)	0.71 (0.60, 0.81)	0.72 (0.64, 0.80)	<0.001	0.045
没有糖尿病和胰腺炎病史										
IA/IB/IIA 期 (n=30) vs. 健康 (n=50)	0.78 (0.66, 0.89)	0.7 (0.53, 0.87)	0.6 (0.46, 0.72)	0.65 (0.55, 0.75)	0.87 (0.77, 0.95)	0.8 (0.63, 0.93)	0.84 (0.74, 0.94)	0.82 (0.73, 0.91)	<0.001	0.07
IIB 期 (n=42) vs. 健康(n=61)	0.83 (0.74, 0.91)	0.81 (0.69, 0.93)	0.61 (0.48, 0.72)	0.71 (0.62, 0.79)	0.87 (0.80, 0.94)	0.76 (0.64, 0.88)	0.82 (0.72, 0.90)	0.79 (0.71, 0.87)	0.03	0.18
IIB 期 (n=42) vs.	0.77 (0.67, 0.87)	0.81 (0.69, 0.93)	0.44 (0.32, 0.57)	0.62 (0.54, 0.71)	0.83 (0.74, 0.91)	0.76 (0.62, 0.88)	0.71 (0.60, 0.81)	0.74 (0.65, 0.83)	0.009	0.05

[0159]

CP (n=62)	0.86)	0.93)	0.57)	0.71)	0.91)	0.88)	0.82)	0.82)		
没有糖尿病和胰腺炎病史										
IIB 期 (n=22) vs. 健康(n=50)	0.88 (0.77, 0.96)	0.91 (0.77, 1)	0.6 (0.46, 0.74)	0.76 (0.66, 0.83)	0.93 (0.87, 0.98)	0.82 (0.64, 0.96)	0.84 (0.74, 0.94)	0.83 (0.73, 0.92)	0.08	0.22
所有 癌症 (n=98) vs. 健康(n=61)	0.78 (0.71, 0.85)	0.76 (0.66, 0.84)	0.61 (0.48, 0.72)	0.68 (0.60, 0.75)	0.83 (0.76, 0.89)	0.75 (0.65, 0.83)	0.82 (0.71, 0.90)	0.78 (0.72, 0.84)	0.001	0.045
所有 癌症 (n=98) vs. CP (n=62)	0.73 (0.64, 0.80)	0.76 (0.66, 0.84)	0.44 (0.32, 0.55)	0.60 (0.52, 0.67)	0.78 (0.71, 0.85)	0.75 (0.65, 0.83)	0.71 (0.60, 0.82)	0.73 (0.65, 0.79)	<0.001	0.01
没有糖尿病和胰腺炎病史										
所有 癌症 (n=52) vs. 健康(n=50)	0.82 (0.73, 0.90)	0.79 (0.67, 0.89)	0.6 (0.46, 0.74)	0.69 (0.61, 0.77)	0.89 (0.82, 0.95)	0.81 (0.69, 0.90)	0.84 (0.72, 0.94)	0.82 (0.75, 0.89)	<0.001	0.03

[0160] *基于Z检验的双向P值,使用自举标准误差估计,以确保CA 19-9与迁移特征+CA 19-9之间的准确性相等。AUC=曲线下面积;CP=慢性胰腺炎;CI=置信区间。

[0161] 表4. 基于使用EDRN参考集样本开发的模型,在将年龄和糖尿病状况(不包括在无糖尿病和慢性胰腺炎的子队列中)纳入风险模型后的EDRN参考集中的生物标记物组性能。

[0162]

测定	CA-19-9			迁移特征+ CA19-9		
	AUC (95%CI)	最佳 敏感 性	最佳 特异 性	AUC (95%CI)	最佳 敏感 性	最佳 特异 性
调整年龄和糖尿病状况后的完整队列						

[0163]

IA/IB/IIA 期(n=54) vs. 健康 (n=56)	0.85 (0.77-0.92)	0.82	0.79	0.86 (0.79-0.93)	0.76	0.84
IA/IB/IIA 期(n=54) vs. 良性 (n=31)	0.69 (0.60-0.82)	0.39	0.90	0.71 (0.64-0.84)	0.48	0.87
调整年龄后没有糖尿病和胰腺炎病史的子队列						
IA/IB/IIA 期(n=30) vs. 健康 (n=50)	0.89 (0.81-0.96)	0.80	0.90	0.90 (0.83-0.98)	0.80	0.94
IA/IB/IIA 期(n=30) vs. 良性 (n=21)	0.65 (0.53-0.82)	0.77	0.52	0.71 (0.60-0.88)	0.93	0.43
调整年龄和糖尿病状况后的完整队列						
Stage IIB (n=38) vs. 健康 (n=56)	0.86 (0.75-0.95)	0.71	0.91	0.88 (0.81-0.97)	0.84	0.79
Stage IIB (n=38) vs 良性 (n=31)	0.64 (0.54-0.79)	0.32	0.97	0.74 (0.67-0.87)	0.82	0.55
调整年龄后没有糖尿病和胰腺炎病史的子队列						
Stage IIB (n=22) vs. 健康 (n=50)	0.89 (0.79-0.97)	0.86	0.80	0.93 (0.87-1.00)	0.91	0.86
Stage IIB (n=22) vs 良性 (n=21)	0.59 (0.49-0.81)	0.82	0.48	0.80 (0.67-0.94)	0.77	0.71
调整年龄和糖尿病状况后的完整队列						
All Cancer (n=93) vs. 健康(n=56)	0.85 (0.78-0.91)	0.73	0.88	0.86 (0.79-0.93)	0.81	0.8
All Cancer (n=93) vs. 良性 (n=31)	0.66 (0.58-0.77)	0.58	0.68	0.71 (0.61-0.82)	0.59	0.74

	调整年龄后没有糖尿病和胰腺炎病史的子队列						
[0164]	All Cancer (n=52) vs. 健康(n=50)	0.88 (0.80-0.93)	0.69	0.98	0.90 (0.85-0.97)	0.75	0.96
	All Cancer (n=52) vs. 良性 (n=21)	0.62 (0.53-0.80)	0.79	0.52	0.74 (0.64-0.87)	0.73	0.67

[0165] *良性是指急性良性胆道阻塞。AUC=曲线下面积;CI=置信区间。

[0166] 表5.用于CLIA验证的研究人群的特征。

特征	PDAC 病例号 (n = 20)	健康对照号 (n =20)
性别		
男性	12	10
女性	8	10
年龄, 岁数*		
<50	5	9
50-60	7	5
61-70	6	4
71-80	2	1
组织学		
腺癌, IV期	20	N/A
饮酒史		
目前	9	n/a
过去	3	n/a
从不	8	n/a
吸烟史		
目前	2	n/a
过去	8	n/a

[0168]

从不	10	n/a
糖尿病史		
是	5	n/a
否	15	n/a
部位		
身体	4	N/A
头部	11	N/A
胰腺重叠病变	1	N/A
尾部	3	N/A
其他指定部分	1	N/A
期		
直接延伸	2	N/A
远端	18	N/A

[0169]

表6. 在生物标记物发现实验室和CLIA实验室*中分析的标记物的生物标记物性能。

[0170]

标记物	MDACC 结果			CLIA 结果		
	AUC (95%CI)	最佳敏感性	最佳 特 异 性	AUC (95%CI)	最佳敏 感 性	最佳特 异 性
TFPI	0.80 (0.65-0.94)	0.70	0.80	0.78 (0.64-0.93)	0.75	0.75
CA 19-9	0.71 (0.52-0.90)	0.65	1.00	0.72 (0.54-0.90)	0.65	1.00
TNC-FN III-C	0.59 (0.40-0.78)	0.60	0.70	0.68 (0.51-0.85)	0.55	0.80
TNC-FN III-C+ TFPI	0.80 (0.66-0.94)	0.70	0.85	0.83 (0.69-0.97)	0.85	0.80

[0171]

TNC-FN CA19-9	III-C+	0.74 (0.56-0.92)	0.65	1.00	0.82 (0.65-0.98)	0.80	0.90
TFPI+CA 19-9		0.92 (0.82-1.00)	0.85	0.85	0.92 (0.82-1.00)	0.85	0.85
TNC-FN TFPI+CA19-9	III-C+	0.92 (0.82-1.00)	0.85	0.85	0.92 (0.82-1.00)	0.95	0.85

[0172]

表7.匹兹堡大学队列中生物标记物模型的验证。

测定	CA-19-9				迁移特征 + CA-19-9					
	AUC (95%CI)	敏感 性 (95% CI)	特异性 (95% CI)	准确 性 (95% CI)	AUC (95% CI)	敏感 性 (95% CI)	特异性 (95%CI)	准确性 (95%CI)	准确 性 P value *	AU C P val ue†
IIB 期 (n=23) vs 对 照 s (n=17)	0.86 (0.72-0.96)	0.83 (0.65-0.96)	0.76 (0.53-0.94)	0.80 (0.68-0.90)	0.85 (0.73-0.96)	0.83 (0.70-0.96)	0.76 (0.59-0.94)	0.80 (0.70-0.90)	1.00	0.95
IIB 期 (n=23) vs CP (n=24)	0.84 (0.72-0.96)	0.83 (0.65-0.96)	0.75 (0.56-0.88)	0.79 (0.66-0.89)	0.86 (0.74-0.96)	0.83 (0.67-0.96)	0.88 (0.73-1.00)	0.85 (0.74-0.94)	0.23	0.87
IIB 期 (n=23) vs 对 照 s +	0.85 (0.72-0.96)	0.83 (0.65-0.96)	0.74 (0.61-0.86)	0.77 (0.67-0.86)	0.86 (0.75-0.95)	0.83 (0.65-0.96)	0.82 (0.72-0.92)	0.82 (0.73-0.90)	0.31	0.93

[0174]

CP (n=41)										
--------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--

[0175]

表8.在区分急性良性胆道阻塞样本与IA/IB/IIA期、IIB期以及所有癌症样本时，EDRN参考集队列中的生物标记物组模型性能。

[0176]

	CA 19-9				迁移特征+ CA 19-9					
测定	AUC (95% CI)	敏感性 (95% CI)	特异性 (95% CI)	准确性 (95% CI)	AUC (95% CI)	敏感性 (95% CI)	特异性 (95% CI)	准确性 (95% CI)	准确性P-值 *	AUC P-值†
IA/IB /IIA 期 (n=55)) vs. 良性 (n=31))	0.54 (0.41- 0.66)	0.71 (0.58- 0.84)	0.26 (0.13- 0.42)	0.48 (0.38- 0.59)	0.57 (0.45- 0.69)	0.73 (0.62- 0.84)	0.36 (0.19- 0.55)	0.54 (0.45- 0.65)	0.27	0.32
IIB期 (n=42)) vs. 良性 (n=31))	0.58 (0.44- 0.70)	0.81 (0.69- 0.93)	0.26 (0.12- 0.42)	0.53 (0.44- 0.63)	0.61 (0.48- 0.74)	0.76 (0.64- 0.88)	0.36 (0.19- 0.52)	0.56 (0.45- 0.67)	0.65	0.25
所有 癌症 (n=98)) vs.	0.56 (0.44- 0.67)	0.76 (0.66- 0.84)	0.26 (0.13- 0.42)	0.51 (0.42- 0.60)	0.58 (0.47- 0.69)	0.75 (0.65- 0.83)	0.36 (0.19- 0.52)	0.55 (0.46- 0.64)	0.38	0.22

良性 (n=31))										
没有糖尿病和胰腺炎病史										
IA/IB /IIA 期 (n=30)) vs. 良性 (n=21))	0.61 (0.45- 0.75)	0.7 (0.54- 0.87)	0.33 (0.14- 0.53)	0.52 (0.38- 0.64)	0.62 (0.46- 0.77)	0.8 (0.63- 0.93)	0.38 (0.19- 0.62)	0.59 (0.46- 0.72)	0.28	0.75
[0177] IIB期 (n=22)) vs. 良性 (n=21))	0.65 (0.47- 0.81)	0.91 (0.77- 1.00)	0.33 (0.14- 0.53)	0.62 (0.50- 0.74)	0.65 (0.49- 0.81)	0.82 (0.64- 0.96)	0.38 (0.19- 0.57)	0.6 (0.48- 0.72)	0.75	0.96
所有 癌症 (n=52)) vs. 良性 (n=21))	0.62 (0.49- 0.76)	0.79 (0.67- 0.89)	0.33 (0.14- 0.52)	0.56 (0.45- 0.67)	0.63 (0.49- 0.78)	0.81 (0.69- 0.90)	0.38 (0.19- 0.62)	0.59 (0.48- 0.72)	0.62	0.79

[0178] 表9. 在全队列和没有糖尿病和胰腺炎病史的子队列的EDRN参考集中的逻辑回归分析。

样本和系数	全队列			没有糖尿病和胰腺炎病史		
	估计	95% CI	P-值*	估计	95% CI	P-值*
所有癌症 vs 健康						
截距	-4.889	(-8.026, -1.751)	0.002	-9.278	(-14.175, -4.381)	<0.001
CA19-9	0.022	(0.005, 0.039)	0.01	0.065	(0.025, 0.105)	0.001
TFPI	0.050	(0.009, 0.091)	0.02	0.079	(0.016, 0.142)	0.01
TNC-FNIII-C	0.007	(-0.004, 0.018)	0.22	0.006	(-0.006, 0.019)	0.33
年龄	0.034	(-0.008, 0.075)	0.11	0.068	(0.008, 0.128)	0.03
糖尿病	1.165	(0.084, 2.247)	0.03	--	--	--
IA/IB/IIA期 vs 健康						
截距	-5.784	(-9.537, -2.031)	0.003	-10.972	(-17.100, -4.844)	<0.001
CA19-9	0.015	(0.002, 0.029)	0.02	0.067	(0.021, 0.114)	0.004
TFPI	0.039	(-0.012, 0.090)	0.14	0.051	(-0.034, 0.136)	0.24
TNC-FNIII-C	0.008	(-0.004, 0.019)	0.20	0.007	(-0.006, 0.020)	0.29
年龄	0.046	(-0.002, 0.094)	0.06	0.097	(0.023, 0.171)	0.01
糖尿病	1.299	(0.144, 2.454)	0.03	--	--	--
IIB 期 vs 健康						
截距	-6.603	(-11.092, -2.113)	0.004	-9.533	(-17.170, -1.895)	0.01

[0181] 表10. 区分所有癌症、IA/IB/IIA期和IIB期样本与健康对照、慢性胰腺炎和急性良

性胆道阻塞样本时,EDRN参考集中不同组合下的个体生物标记物性能。

[0182]

测定	AUC (95%CI)					
	CA 19-9	TFPI	TNC-C	CA19-9+TFPI	CA19-9+TNC	全部
所有癌症 (n=98) vs. 健康 (n=61)	0.78 (0.71-0.85)	0.66 (0.57-0.74)	0.62 (0.47-0.71)	0.81 (0.74-0.88)	0.81 (0.74-0.87)	0.82 (0.75-0.89)
所有癌症 (n=98) vs. CP (n=62)	0.73 (0.65-0.80)	0.65 (0.56-0.74)	0.60 (0.50-0.68)	0.77 (0.69-0.85)	0.77 (0.69-0.83)	0.79 (0.72-0.86)
所有癌症 (n=98) vs. 良性 (n=31)	0.56 (0.45-0.67)	0.54 (0.45-0.64)	0.49 (0.40-0.64)	0.55 (0.48-0.68)	0.57 (0.49-0.71)	0.61 (0.53-0.73)
IA/IB/IIA 期 (n=55) vs. 健康 (n=61)	0.74 (0.63-0.84)	0.62 (0.52-0.71)	0.63 (0.48-0.74)	0.77 (0.67-0.85)	0.80 (0.69-0.88)	0.79 (0.70-0.88)
IA/IB/IIA 期 (n=55) vs. CP	0.69 (0.58,0.79)	0.61 (0.52-0.71)	0.60 (0.51-0.70)	0.72 (0.63-0.82)	0.75 (0.66-0.84)	0.75 (0.68-0.85)

[0183]

(n=62)						
IA/IB/IIA 期 (n=55) vs. 良性 (n=31)	0.54 (0.43-0.65)	0.49 (0.43-0.64)	0.48 (0.39-0.66)	0.54 (0.46-0.69)	0.57 (0.46-0.73)	0.58 (0.50-0.74)
IIB 期 (n=42) vs. 健康 (n=61)	0.83 (0.74-0.91)	0.72 (0.62-0.83)	0.61 (0.46-0.72)	0.85 (0.75-0.94)	0.84 (0.75-0.92)	0.85 (0.75-0.94)
IIB 期 (n=42) vs. CP (n=62)	0.77 (0.67-0.85)	0.71 (0.61-0.80)	0.59 (0.49-0.70)	0.82 (0.73-0.91)	0.79 (0.69-0.88)	0.83 (0.75-0.91)
IIB 期 (n=42) vs 良性 (n=31)	0.58 (0.38-0.70)	0.61 (0.49-0.73)	0.50 (0.39-0.66)	0.62 (0.49-0.75)	0.57 (0.46-0.74)	0.64 (0.54-0.78)
调整年龄和糖尿病状况后						
所有癌症 (n=93) vs. 健康 (n=56)	0.85 (0.78-0.91)	0.77 (0.7-0.85)	0.70 (0.63-0.8)	0.87 (0.79-0.93)	0.86 (0.78-0.92)	0.86 (0.79-0.93)
所有癌症 (n=93) vs. CP (n=60)	0.86 (0.80-0.92)	0.77 (0.71-0.86)	0.76 (0.69-0.85)	0.86 (0.8-0.92)	0.85 (0.81-0.92)	0.86 (0.81-0.93)
所有癌症 (n=93) vs. 良性 (n=31)	0.66 (0.58-0.77)	0.66 (0.58,0.77)	0.65 (0.55-0.76)	0.67 (0.59-0.79)	0.7 (0.59-0.80)	0.71 (0.61-0.82)

[0184]

IA/IB/IIA 期 (n=54) vs. 健康 (n=56)	0.85 (0.77-0.92)	0.75 (0.65-0.84)	0.72 (0.64-0.82)	0.85 (0.78-0.93)	0.85 (0.79-0.93)	0.86 (0.79-0.93)
IA/IB/IIA 期 (n=54) vs. CP (n=60)	0.86 (0.79-0.93)	0.76 (0.68-0.86)	0.76 (0.69-0.86)	0.85 (0.79-0.93)	0.86 (0.79-0.93)	0.86 (0.79-0.94)
IA/IB/IIA 期 (n=54) vs. 良性 (n=31)	0.69 (0.60-0.82)	0.66 (0.57-0.78)	0.66 (0.57-0.79)	0.69 (0.61-0.82)	0.72 (0.62-0.83)	0.71 (0.64-0.84)
IIB 期 (n=38) vs. 健康 (n=56)	0.86 (0.75-0.95)	0.83 (0.75-0.92)	0.7 (0.60-0.81)	0.88 (0.8-0.97)	0.86 (0.76-0.95)	0.88 (0.81-0.97)
IIB 期 (n=38) vs. CP (n=60)	0.88 (0.82-0.94)	0.82 (0.75-0.91)	0.78 (0.69-0.87)	0.88 (0.82-0.96)	0.88 (0.82-0.94)	0.88 (0.83-0.96)
IIB 期 (n=38) vs. 良性 (n=31)	0.64 (0.54-0.79)	0.71 (0.62-0.83)	0.67 (0.56-0.8)	0.72 (0.62-0.84)	0.70 (0.60-0.83)	0.74 (0.67-0.87)

[0185] AUC,曲线下面积。CP,慢性胰腺炎。良性-急性良性胆道梗阻。迁移特征是指TFPI和TNC-FNIIIC的组合。模型在添加或不添加年龄和糖尿病状况作为预测指标的情况下开发。

[0186] 表11.区分IA/IB/IIA期和IIB期样本与健康对照、慢性胰腺炎和没有糖尿病或慢性胰腺炎病史的急性良性胆道阻塞样本时,EDRN参考集中不同组合下的个体生物标记物性能。

测定	AUC (95%CI)					
	CA 19-9	TFPI	TNC-C	CA19-9+TFPI	CA 19-9+TNC	全部
所有癌症 (n=52) vs. 健康(n=50)	0.82 (0.73-0.91)	0.77 (0.68-0.85)	0.65 (0.40-0.76)	0.89 (0.82-0.95)	0.85 (0.78-0.93)	0.89 (0.83-0.96)
所有癌症 (n=52) vs. 良性(n=21)	0.62 (0.40-0.76)	0.58 (0.46-0.72)	0.57 (0.44-0.72)	0.58 (0.49-0.78)	0.68 (0.55-0.81)	0.70 (0.58-0.84)
IA/IB/IIA 期 (n= 30) vs. 健康 (n=50)	0.78 (0.63-0.90)	0.71 (0.58-0.83)	0.67 (0.46-0.798)	0.86 (0.74-0.94)	0.82 (0.71-0.94)	0.86 (0.77-0.95)
IA/IB/IIA 期 (n=30) vs. 良性(n=21)	0.61 (0.45-0.75)	0.52 (0.42-0.69)	0.54 (0.41,0.70)	0.58 (0.47-0.78)	0.66 (0.53-0.81)	0.66 (0.57-0.82)
IIB 期(n=22) vs. 健康 (n=50)	0.88 (0.76-0.97)	0.85 (0.71-0.94)	0.62 (0.37-0.76)	0.93 (0.85-1.0)	0.88 (0.78-0.97)	0.93 (0.86-1.0)
IIB 期 (n=22) vs 良性 (n=21)	0.65 (0.28-0.81)	0.65 (0.49-0.81)	0.62 (0.49-0.79)	0.66 (0.52-0.83)	0.71 (0.57-0.86)	0.76 (0.64-0.92)
调整年龄后						
所有癌症 (n=52) vs. 健康(n=50)	0.88 (0.80-0.93)	0.79 (0.71-0.88)	0.73 (0.64-0.83)	0.90 (0.84-0.96)	0.88 (0.82-0.94)	0.90 (0.85-0.97)
所有癌症 (n=52) vs. 良性(n=21)	0.62 (0.53-0.80)	0.63 (0.52-0.77)	0.65 (0.53-0.79)	0.63 (0.55-0.82)	0.72 (0.62-0.86)	0.74 (0.64-0.87)
IA/IB/IIA 期 (n=30) vs. 健康(n=50)	0.89 (0.81-0.96)	0.74 (0.64-0.86)	0.74 (0.63-0.85)	0.90 (0.81-0.97)	0.89 (0.82-0.97)	0.90 (0.83-0.98)
IA/IB/IIA 期 (n=30) vs. 良性(n=21)	0.65 (0.53-0.82)	0.61 (0.49-0.78)	0.64 (0.51-0.82)	0.64 (0.54-0.84)	0.71 (0.59-0.87)	0.71 (0.60-0.88)
IIB 期(n=22) vs. 健康 (n=50)	0.89 (0.79-0.97)	0.87 (0.77-0.96)	0.72 (0.50-0.84)	0.93 (0.85-1.0)	0.88 (0.79-0.97)	0.93 (0.87-1.0)
IIB 期(n=22) vs 良性 (n=21)	0.59 (0.49-0.81)	0.70 (0.56-0.85)	0.67 (0.54-0.84)	0.71 (0.57-0.87)	0.75 (0.61-0.9)	0.80 (0.67-0.94)

[0187]

[0188]

[0189] AUC,曲线下面积。CP,慢性胰腺炎。良性-急性良性胆道阻塞。迁移特征是指TFPI和TNC-FNIIIC的组合。模型在添加或不添加年龄作为预测指标的情况下开发。

[0190] 评估包括年龄和糖尿病状况在内的其他风险因素:基于EDRN参考集数据,进一步基于EDRN参考集的结果探索了结合年龄和糖尿病状况的三种标记物的性能。为了进行此分

析,将逻辑回归模型重新拟合到每个病例/对照组,其在全队列中包括所有三个标记物,以及年龄和糖尿病状况,或在没有糖尿病和慢性胰腺炎的子队列中仅包括年龄。表4给出了模型性能的结果。具体地,在没有糖尿病和慢性胰腺炎的子队列中,用于将IA/IB/IIA期、IIB期或所有早期癌症与健康对照区分开来的风险评分分别达到了0.90、0.93和0.90的AUC。表3列出了早期癌症和健康对照的逻辑回归模型的结果。

[0191] 总之,本研究记载了TFPI和TNC-FN III-C用以将早期PDAC病例与健康对照区分开来的作用,以及其作为生物标记物来改善CA 19-9在PDAC早期检测中的性能的潜能。使用在代表EDRN参考集的队列3中开发的迁移特征和CA19-9标记物组,观察到将所有早期癌症与健康对照和慢性胰腺炎区分开来的AUC的统计学显著的改善。此外,基于队列1中建立的最佳临界值,在队列3中观察到了与CA 19-9相比准确性显著提高,从而可以将所有早期癌症与健康对照和慢性胰腺炎区分开。结果表明,与CA 19-9结合使用时,组合的标记物组模型可以为PDAC的早期检测提供具有高敏感性和特异性的更准确的测试,并且该组与糖尿病和慢性胰腺炎的风险无关。此外,当将所有早期PDAC病例合并到EDRN队列中时,结果将得到加强,表明对病例和对照的多种组合具有统计学意义。

[0192] 实施例2-材料和方法

[0193] 临床队列:将20个晚期IV PDAC和20个正常对照的血浆队列用于CLIA实验室验证研究。早期预验证队列1包含115个样本,其包括85个早期PDAC病例:I期(n=28)、II期(n=57)和30个从TexGen信息库(德克萨斯医学中心联盟)获得的GI筛查对照。匹兹堡大学的早期盲法验证队列2包括64个样本:IIB期(n=23)、慢性胰腺炎(n=24)和GI对照(n=17)。早期盲法验证队列3是NCI早期检测研究网络(EDRN)胰腺癌参考集的252个血浆样本,其包括98个早期PDAC病例:IA期(n=7)、IB期(n=8)、II期(n=1)、IIA期(n=40)、IIB期(n=42)、62例慢性胰腺炎对照、31例急性胆道阻塞对照和61例健康对照(Haab等人,2015)。研究方案已获得机构审查委员会的批准,并且所有患者均签署了知情同意书。

[0194] ELISA测定:TFPI的ELISA测定如先前所述进行(Balasenthil等人,2011)。使用人腱生蛋白C(FN III-C)ELISA试剂盒(ABL-America,Minneapolis,MN)确定了腱生蛋白C[FN III-C]的血浆水平,该试剂盒通过夹心ELISA检测FN III-C结构域。将样本稀释50倍,然后在预先涂有对FN III-C结构域特异的抗人腱生蛋白C(19C4MS)小鼠IgG MAb的ELISA板中在37°C孵育60分钟。用洗涤缓冲液短暂地洗涤孔7次后,加入辣根-过氧化物酶缀合的抗人腱生蛋白C(4F10TT)Ab,并在4°C下孵育30分钟。用缓冲液洗涤孔(9次),加入色原溶液,并在黑暗中于室温孵育30分钟。终止反应,并在30分钟内使用ELISA板读取器(Spectramax Plus³⁸⁴,Spectramax Plus¹⁹⁰分子设备和iMark微孔板读取器,BioRad)读取数据。结果是重复孔的平均吸光度。如先前所述进行CA 19-9的ELISA,并报告其中该CA 19-9ELISA测定与其他两个CA 19-9测定表现出相似的性能((Balasenthil等人,2011;Haab等人,2015)。

[0195] 统计学方法:所有统计学检验均为双侧检验,并且P值小于0.05被认为具有统计学意义。

[0196] CLIA分析:使用逻辑回归模型来区分PDAC与健康对照。为了确定最佳敏感性和特异性的风险评分阈值,计算出与点(0,1)[(1-敏感性)²+(1-特异性)²]距离值最短的点(DeLong等人,1998)。使用Stata 13.1软件(Stata Corporation)进行所有统计学分析。

[0197] 早期队列1(TexGen队列)的分析:使用逻辑回归模型分析标记物的性能并确定标

记物组相对于CA 19-9的总体性能。计算ROC曲线和AUC,并基于500个自举样本估算其95%的自举置信区间(CI)。队列1被用作训练组,以评估与单独使用CA 19-9相比,添加TFPI和TNC-FNIII-C的性能改进。使用前向选择方法并考虑到AUC的值,开发出最佳标记物组合组。使用与CLIA分析相同的方法确定相应风险评分的最佳临界值。

[0198] 早期队列2(U匹兹堡队列)和3(EDRN参考集)的盲法验证:在两个独立的患者队列(队列2和3)中验证了从队列1开发的最终选择的组及其最佳临界值。由于队列3中的大部分参考集病例没有糖尿病和胰腺炎病史,因此在该子队列中也进行了验证。基于从队列1开发的组构建经验ROC曲线,并计算出相应的AUC。基于从队列1开发的临界值,还计算出敏感性、特异性以及平均敏感性和特异性(此后称为“准确性”)。为了评估AUC、敏感性、特异性和准确性,基于500个自举样本获得了95%的自举置信区间。基于Z检验,使用自举标准误差估计值,计算了生物标记物组与仅使用CA19-9的组之间的性能差异的P值。所有分析均使用R统计软件(cran.r-project)进行。

[0199] 纳入临床风险因素的队列3的进一步探索性分析:在队列3中验证了生物标记物组(队列1中开发的)后,在队列3中进一步探讨了所测量的临床风险因素的纳入,包括年龄和糖尿病状况。使用逻辑回归模型来开发候选标记物(TFPI和/或TNC-FN III-C)与CA 19-9,以及年龄和糖尿病状况(不包括在无糖尿病和慢性胰腺炎的子队列中)的组合,以分离每种病例和对照组。基于预测的风险评分构建了经验ROC曲线并计算出相应的AUC。为了评估AUC、敏感性和特异性,基于500个自举样本获得了95%的自举置信区间,其中为每个自举样本重新拟合了逻辑回归模型。

[0200] 实施例3-迁移特征生物标记物组的进一步验证

[0201] 作为迁移特征生物标记物组的附加的验证,使用目前的迁移特征生物标记物组进行ELISA测定,并在来自国际研究机构(IARC)的独立盲血浆样本集中分析了它们的性能,该样本集由39个早期PDAC和89个健康对照组成。对所述测定进行统计学分析。对于使用IARC集的所有早期PDAC与所有健康队列(表12),两种生物标记物与CA19-9的组合均可将CA19-9的AUC值从0.81(95%CI=0.72降至0.90)显著提高至0.86(95%CI=0.78至0.93)。当在分析中包括其他协变量(*年龄+性别+中心+吸烟+饮酒)时,合并后的组将AUC进一步提高至0.90(95%CI=0.84至0.96)。结果是有意义的,因为所利用的算法不同于实施例1中建立的算法,并且再次表明本发明生物标记物组改善了多个盲样本集中的CA19-9性能,并突出了生物标记物组的临床价值。

[0202] 表12:IARC队列中的迁移特征生物标记物性能。

模型	AUC	P 值
CA 19-9	0.81 (0.72-0.90)	<0.0001
TFPI	0.57 (0.45-0.70)	0.2468
TNC-FNIII-C	0.71 (0.62-0.81)	<0.0001
CA 19-9+TFPI	0.81 (0.72-0.90)	<0.0001
[0203] CA 19-9+TNC	0.86 (0.78-0.93)	<0.0001
CA 19-9+TNC+TFPI	0.86 (0.78-0.93)	<0.0001
协变量* +CA 19-9 +TFPI +TNC	0.90 (0.84-0.96)	<0.0001

[0204] *年龄+性别+中心+吸烟+饮酒

[0205] 与野生型对照相比,在含有胰腺癌癌前病变 (PanIN) 的KC胰腺基因工程小鼠模型 (GEMM) 中,血浆中TFPI水平升高:从KC GEMM模型的血清中筛选出迁移特征标记物之一:TFPI。该GEMM模型忠实地再现了胰腺癌的发展,其中存在称为PanINs的癌前病变,可以在PDAC发展之前的特定时间点进行检查。GEMM方法基于以下假设:a) 人类胰腺导管腺癌 (PDAC) 的基因工程小鼠模型 (GEMM) 忠实地概括了人类疾病的临床和分子特征,并且b) 在适当的GEMM中的血样的系列分析提供了开发专门用于检测胰腺癌癌前病变PanINs的敏感和特异的整合生物标记物组的难得的机会。对于人类样本,这是不可能的,因为在人类患者中,PanIN主要与腺癌同步检测。还需要强调的是,GEMM模型除了忠实地概括表征人类胰腺肿瘤的组织学病变外,还显示出与人类患者中观察到的非常相似的增生性基质和炎症反应。因此,目的是当病灶切除被认为是可治愈时,确定本发明生物标记物组可以检测出胰腺癌或注定要成为胰腺癌的癌前病变的最早阶段。

[0206] TFPI水平通过商业化ELISA测定在混合血浆中进行了检测,该混合血浆从含有阶段性PanIN病变 (1-3期) 的小鼠与对照组的野生型小鼠中分离出来。在包含PanIN病变的8只KC小鼠与3只野生型对照的血浆中观察到,TFPI水平存在显著差异 (图)。结果表明,TFPI可用于胰腺癌发展之前的癌前病变的早期检测。

[0207] ***

[0208] 根据本公开,本文公开的和要求保护的所有方法可以在不进行过度实验的情况下进行和执行。尽管已经根据优选实施方案描述了本发明的组合和方法,但是对于本领域技术人员而言显而易见的是,可以对所述方法以及所描述的方法的步骤或步骤顺序进行改变。在不背离本发明的概念、精神和范围的情况下,本发明不限于此。更具体地,显而易见的是,化学和生理相关的某些试剂可以代替本文所述的试剂,同时将获得相同或相似的结果。对于本领域技术人员显而易见的所有这些类似的替代和修改都被认为落入所附权利要求

所限定的本发明的精神、范围和概念之内。

[0209] 参考文献

[0210] 以下参考文献通过引用具体地并入本文,这些参考文献在一定程度上对本文所述的内容提供了示例性的过程或其他细节的补充。

[0211] Austin-Ward和Villaseca,Revista Medica de Chile,126 (7) :838-845,1998.

[0212] Balasenthil等人,Cancer Prev Res.2011;4 (1) :137-149.

[0213] Bukowski等人,Clinical Cancer Res.,4 (10) :2337-2347,1998.

[0214] Camacho等人J Clin Oncology 22 (145) :Abstract No.2505 (antibody CP-675206) ,2004.

[0215] Christodoulides等人,Microbiology,144 (Pt 11) :3027-3037,1998.

[0216] Chu等人,JOP.2010;11:203-212.

[0217] Conlon等人,Ann Surg.1996;223 (3) :273-279.

[0218] Davidson等人,J.Immunother.,21 (5) :389-398,1998.

[0219] DeLong等人,Biometrics.1988;44 (3) :837-845.

[0220] Haab等人,PLoS One.2015;10 (10) :e0139049.

[0221] Hanibuchi等人,Int.J.Cancer,78 (4) :480-485,1998.

[0222] Hellstrand等人,Acta Oncologica,37 (4) :347-353,1998.

[0223] Hollander,Front.Immun.,3:3,2012.

[0224] Hui和Hashimoto,Infection Immun.,66 (11) :5329-5336,1998.

[0225] Hurwitz等人,Proc Natl Acad Sci USA 95 (17) :10067-10071,1998.

[0226] 国际专利公开号WO 00/37504

[0227] 国际专利公开号WO 01/14424

[0228] 国际专利公开号WO 98/42752

[0229] 国际专利公开号WO2000037504

[0230] 国际专利公开号WO2001014424

[0231] 国际专利公开号WO2006/121168

[0232] 国际专利公开号WO2009/101611

[0233] 国际专利公开号WO2009/114335

[0234] 国际专利公开号WO2010/027827

[0235] 国际专利公开号WO2011/066342

[0236] 国际专利公开号WO2015016718

[0237] Ishikawa等人,Hepatogastroenterology.1999;46 (25) :8-15.

[0238] Leal,M.,Ann N Y Acad Sci 1321,41-54,2014.

[0239] Mayo等人,Cancer.2012;118 (10) :2674-2681.

[0240] Mokyr等人,Cancer Res 58:5301-5304,1998.

[0241] Pardoll,Nat Rev Cancer,12 (4) :252-64,2012

[0242] Qin等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA,95 (24) :14411-14416,1998.

[0243] Rahib等人,Cancer Res.2014;74:2913-2921.

[0244] Ryan等人,N Engl J Med.2014;371 (22) :2140-2141.

- [0245] Tsuchiya等人,Ann Surg.1986;203(1):77-81.
- [0246] 美国专利号4,870,287
- [0247] 美国专利号5,739,169
- [0248] 美国专利号5,760,395
- [0249] 美国专利号5,801,005
- [0250] 美国专利号5,824,311
- [0251] 美国专利号5,830,880
- [0252] 美国专利号5,846,945
- [0253] 美国专利号6,207,156
- [0254] 美国专利号8,008,449
- [0255] 美国专利号8,017,114
- [0256] 美国专利号8,119,129
- [0257] 美国专利号8,354,509
- [0258] 美国专利号8,735,553
- [0259] 美国专利公开号US2010/0093557
- [0260] 美国专利公开号US2010/0190656A1
- [0261] 美国专利公开号US20110008369
- [0262] 美国专利公开号US2014022021
- [0263] 美国专利公开号US20140294898
- [0264] Wu等人,Clin Adv Hemat Oncol.,11(1):53-55,2013

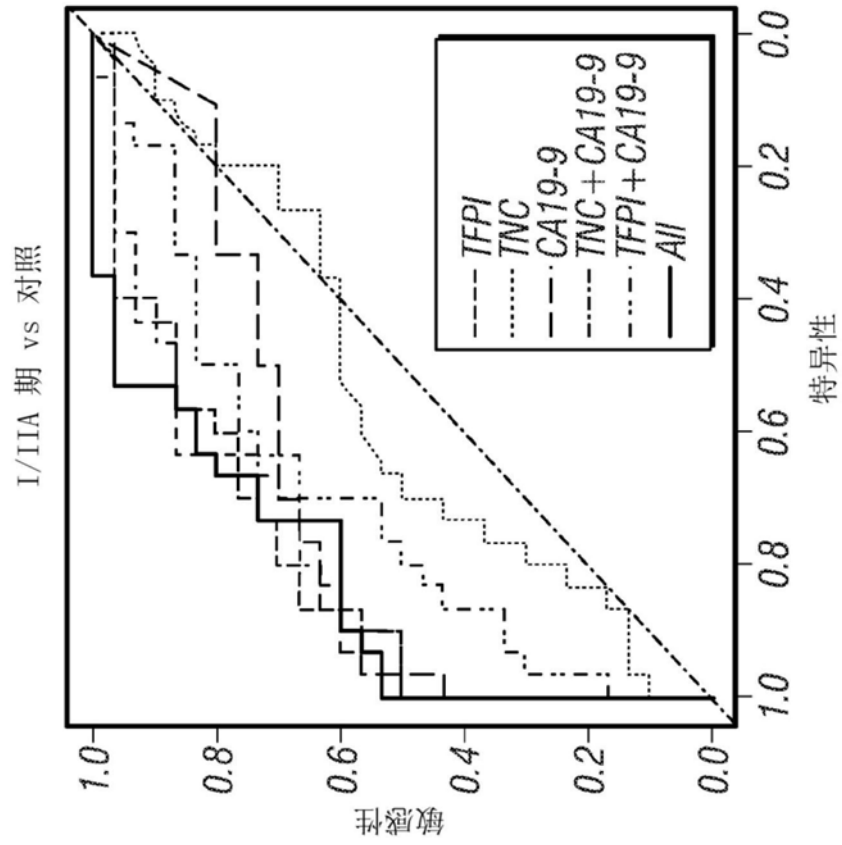


图1A

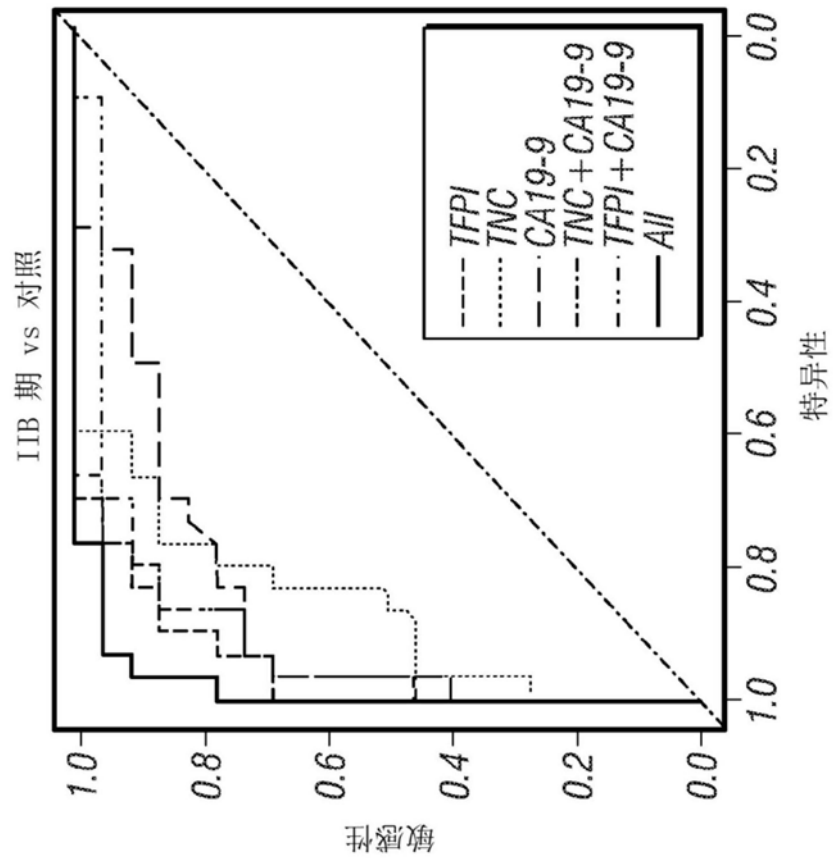


图1B

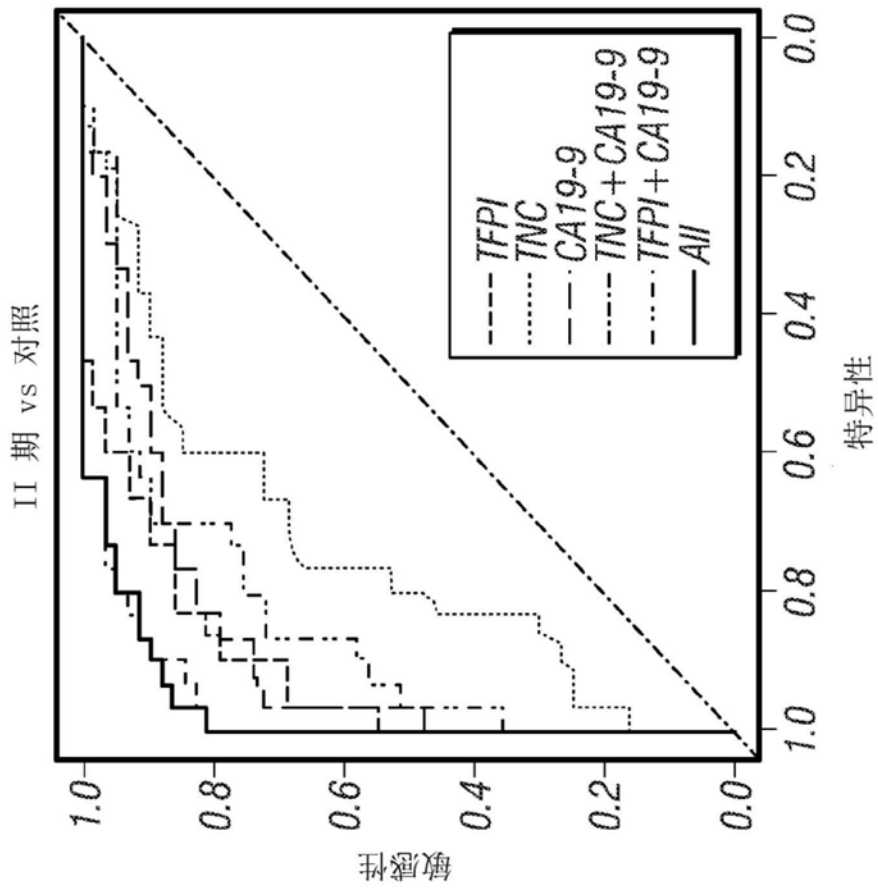


图1C

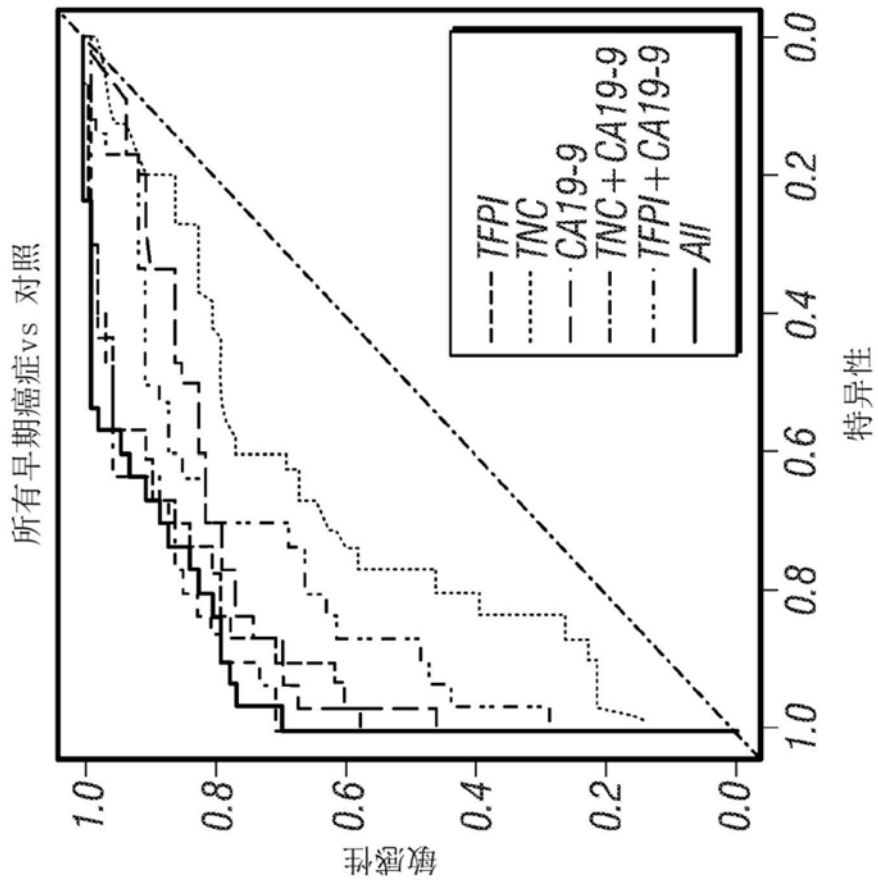


图1D

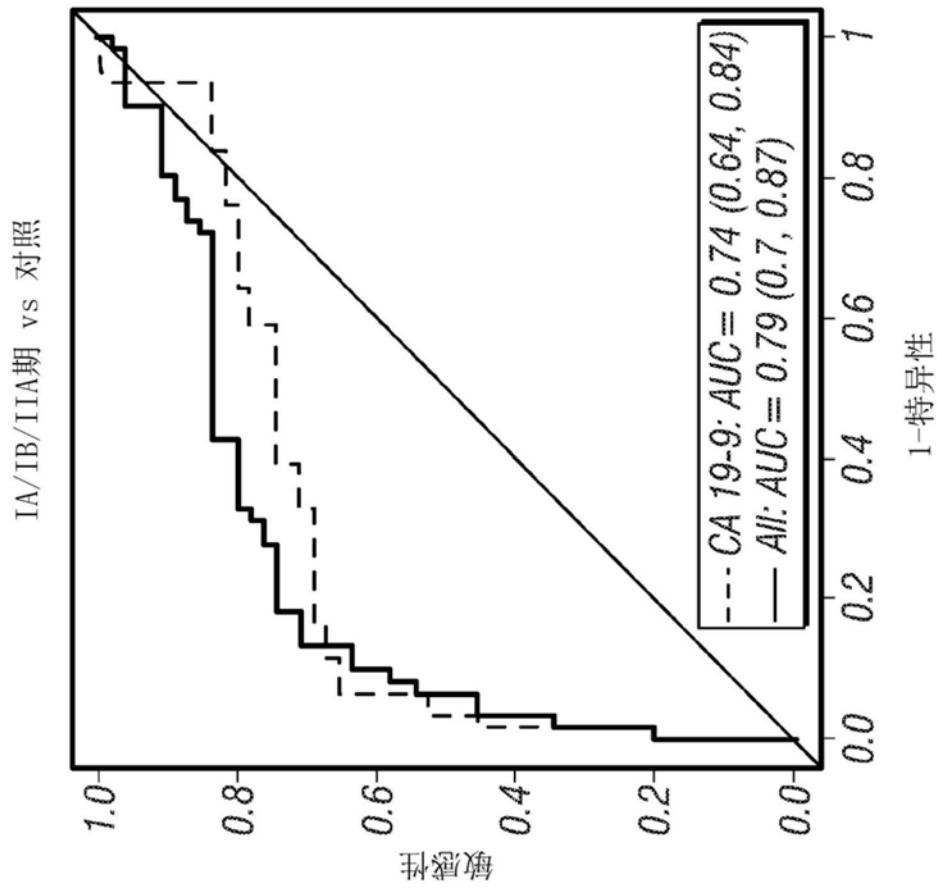


图2A

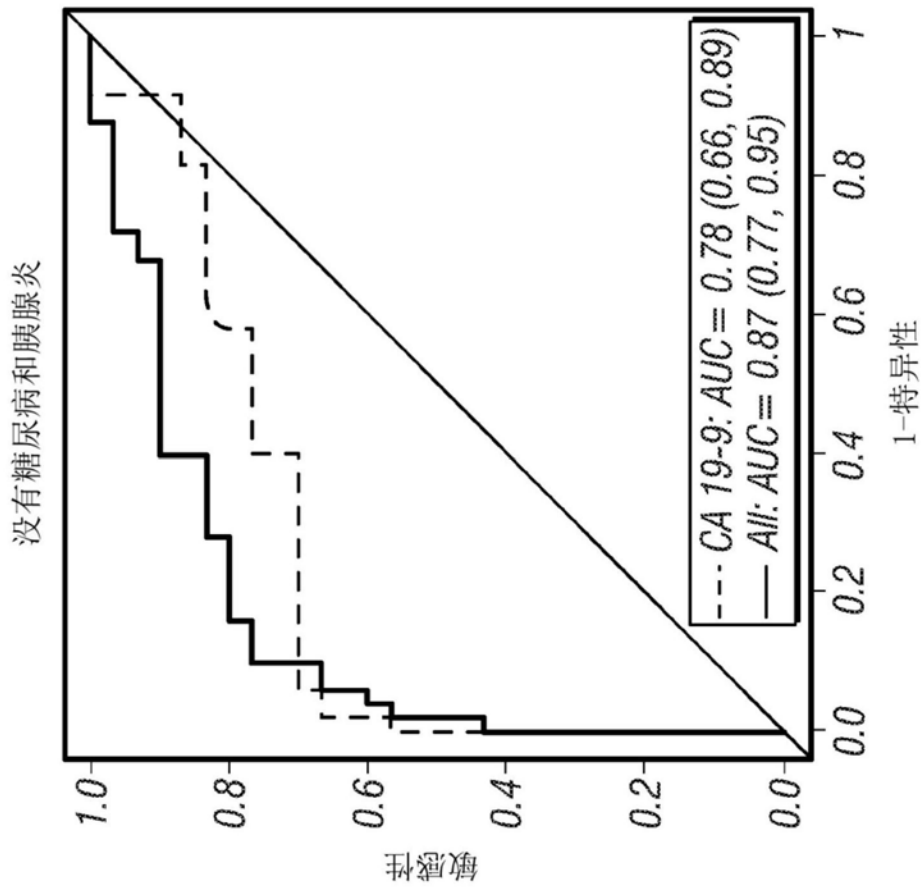


图2B

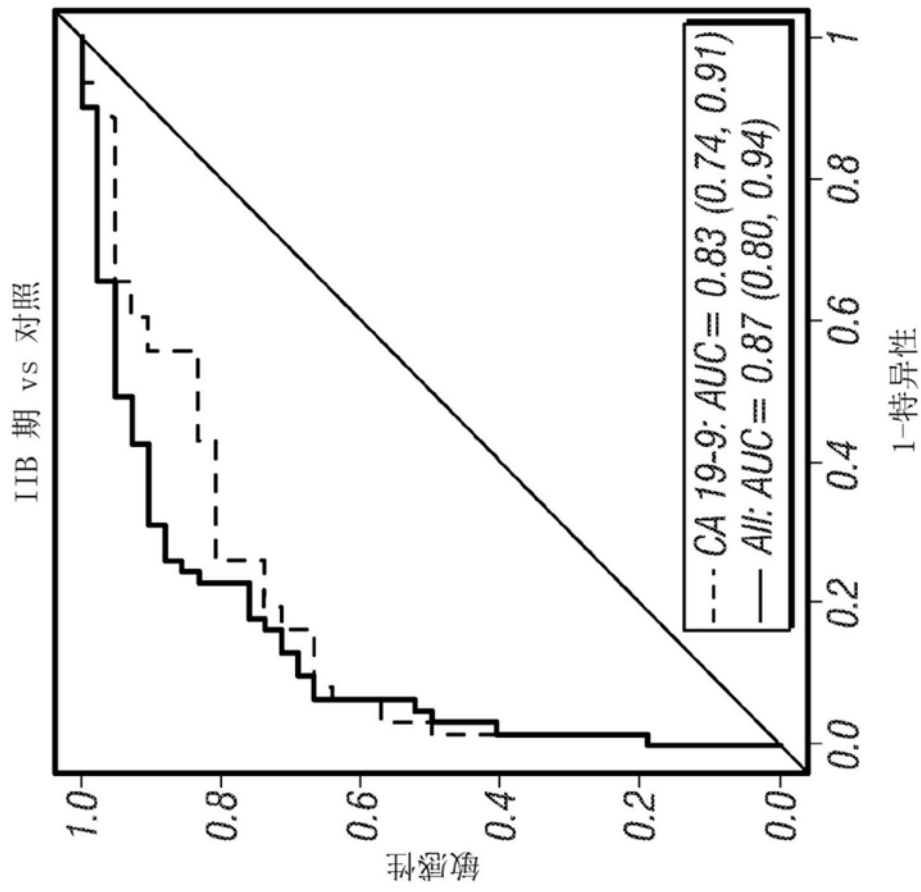


图2C

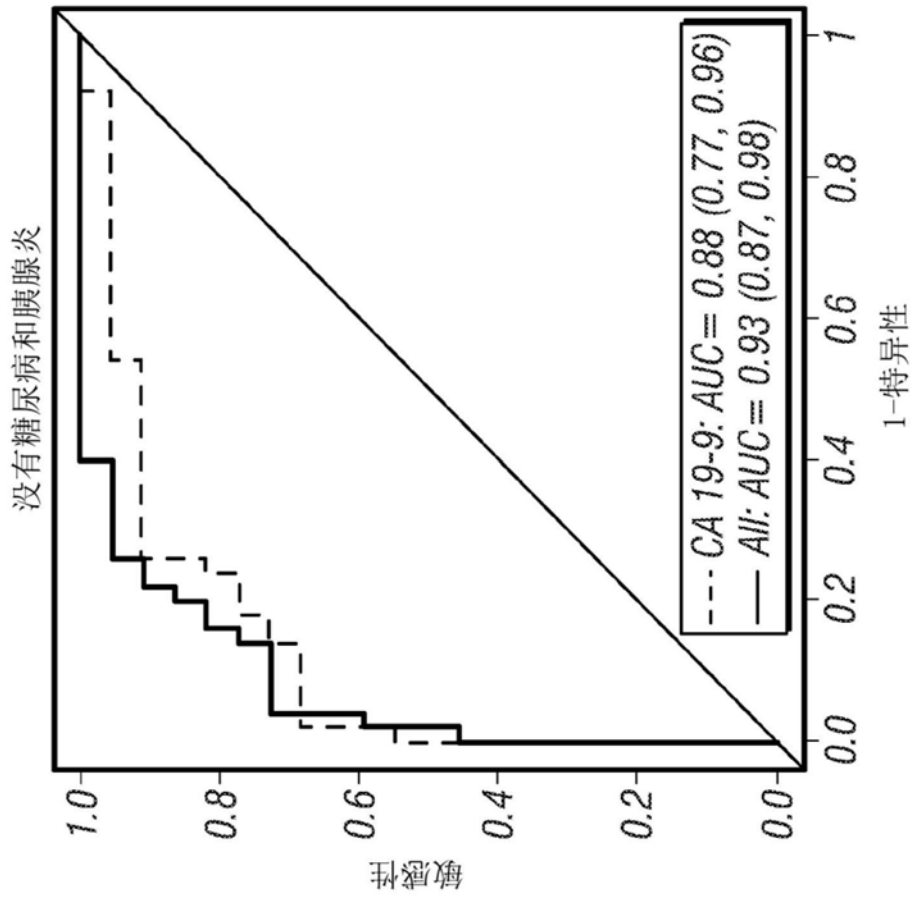


图2D

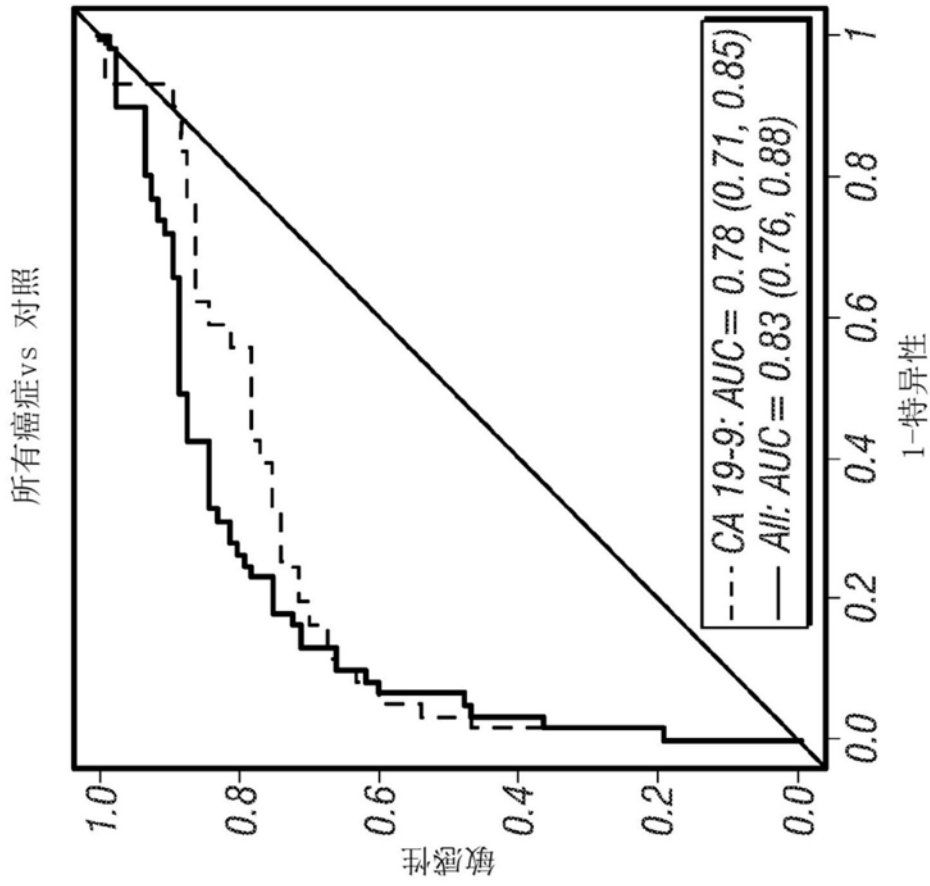


图3A

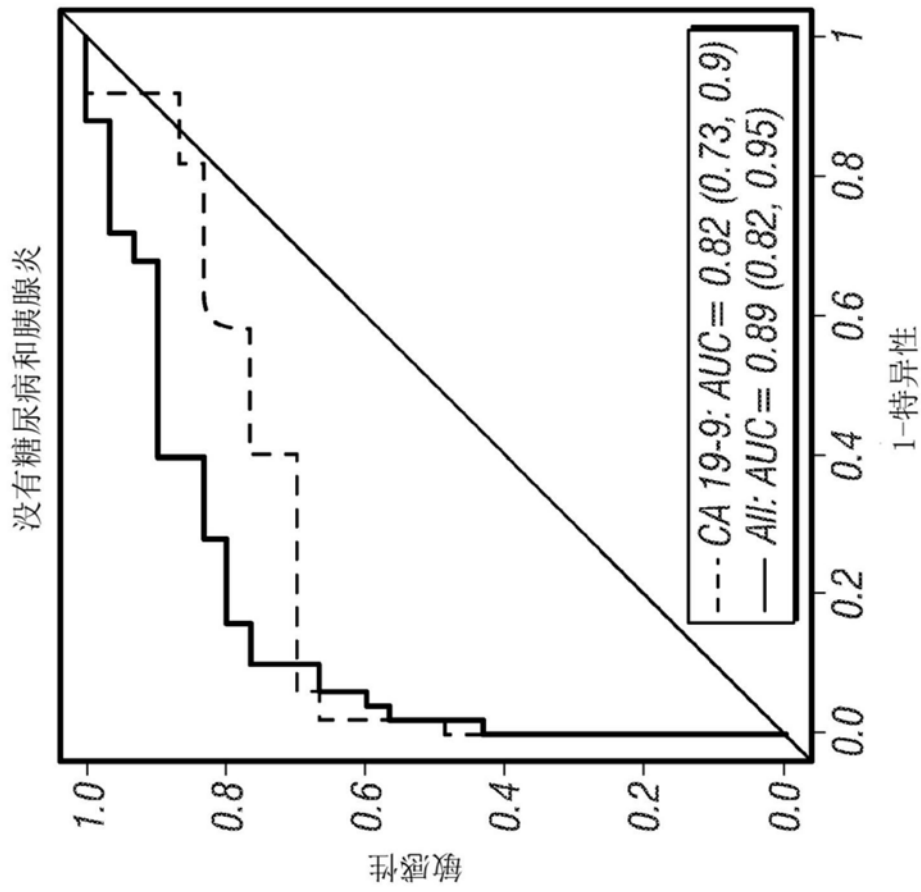


图3B

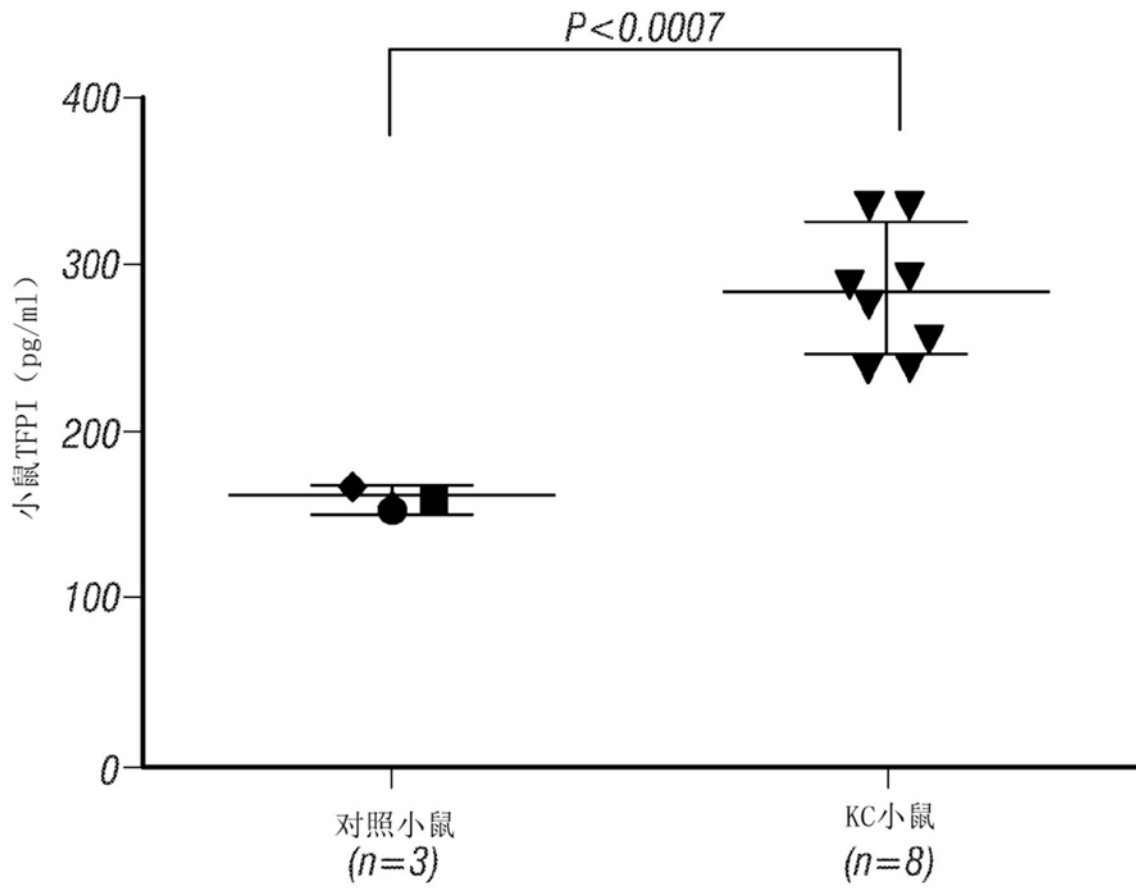


图4

专利名称(译)	用于检测早期胰腺癌的测定		
公开(公告)号	CN110612447A	公开(公告)日	2019-12-24
申请号	CN201880027192.1	申请日	2018-02-23
[标]申请(专利权)人(译)	德克萨斯州立大学董事会		
申请(专利权)人(译)	德克萨斯州立大学董事会		
当前申请(专利权)人(译)	德克萨斯州立大学董事会		
发明人	安·麦克尼尔·基尔拉里 史蒂文·T·洛特 陈楠月 西塔拉曼·巴拉森提尔		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/574 G01N33/577		
CPC分类号	G01N33/57438		
代理人(译)	刘明海 周瑞		
优先权	62/463348 2017-02-24 US		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本文提供了检测胰腺癌，尤其是早期胰腺癌的方法，其包括测量生物标记物组TNC-FN III-C、TFPI和CA19-9的表达。所述表达可以通过ELISA(例如多重ELISA)测定。本文进一步提供了治疗被鉴定为患有胰腺癌的受试者的方法。