



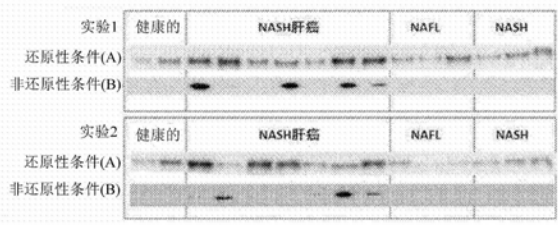
(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 108351358 A
(43)申请公布日 2018. 07. 31

(21)申请号 201680052566.6
(22)申请日 2016.09.09
(30)优先权数据
2015-178402 2015.09.10 JP
(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2018.03.09
(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/JP2016/076562 2016.09.09
(87)PCT国际申请的公布数据
W02017/043617 JA 2017.03.16
(71)申请人 积水医疗株式会社
地址 日本东京都
申请人 社会福祉法人恩赐财团济生会
宫崎彻
(72)发明人 宫崎彻 冈上武 小山则行
(74)专利代理机构 北京集佳知识产权代理有限公司 11227
代理人 郑斌 刘振佳
(51)Int.Cl.
G01N 33/574(2006.01)
C12Q 1/02(2006.01)
G01N 33/53(2006.01)
G01N 33/68(2006.01)
权利要求书1页 说明书14页 附图4页

(54)发明名称
肝癌测试方法

(57)摘要
为了提供:具有优异的灵敏度和特异性的用于测试肝癌的方法或用于辅助诊断肝癌的方法;以及可用于每种所述方法的试剂盒。提供了:用于测试肝癌的方法或用于辅助诊断肝癌的方法,其包括对从对象收集的生物样品中的游离AIM进行检测或定量的步骤;以及用于测试肝癌或用于辅助诊断肝癌的试剂盒,其包含能够与游离AIM结合的抗体。



1. 用于检查肝癌的方法,其包括对来自测试对象的生物样品中的游离AIM进行检测或定量的步骤。
2. 用于辅助诊断肝癌的方法,其包括对来自测试对象的生物样品中的游离AIM进行检测或定量的步骤。
3. 用于对来自测试对象的生物样品中的游离AIM进行检测或定量的方法,其用于检查肝癌。
4. 根据权利要求1至3中任一项所述的方法,其中所述生物样品是体液。
5. 根据权利要求4所述的方法,其中所述体液选自血清、血浆、全血和尿。
6. 根据权利要求1至5中任一项所述的方法,其中所述肝癌是由非酒精性脂肪性肝炎(NASH)引起的肝癌。
7. 根据权利要求1至6中任一项所述的方法,其中所述检测或定量是通过免疫测定进行的检测或定量。
8. 根据权利要求7所述的方法,其中所述检测或定量通过使生物样品与抗体接触来进行,所述抗体与游离AIM结合。
9. 根据权利要求8所述的方法,其中所述检测或定量通过与游离AIM特异性结合的抗体进行。
10. 根据权利要求8或权利要求9所述的方法,其中所述检测或定量是通过ELISA进行的测量。
11. 根据权利要求6至10中任一项所述的方法,其特征在于所述检测或定量在不将选自血清、血浆或全血的血液样品暴露于蛋白质变性条件和还原性条件的情况下进行。
12. 根据权利要求1或权利要求2所述的方法,其还包括对来自测试对象的生物样品中的总AIM进行定量的步骤。
13. 根据权利要求12所述的方法,其还包括计算游离AIM与总AIM比值的步骤。
14. 用于检查或辅助诊断肝癌的试剂盒,其包含与游离AIM结合的抗体。
15. 根据权利要求14所述的试剂盒,其中所述抗体是与游离AIM特异性结合的抗体。
16. 根据权利要求14或权利要求15所述的试剂盒,其中所述肝癌是由非酒精性脂肪性肝炎(NASH)引起的肝癌。

肝癌测试方法

技术领域

[0001] 本发明典型地涉及用于检查肝癌的方法或用于辅助诊断肝癌的方法。具体地,本发明涉及用于检查肝癌的方法或用于辅助诊断肝癌的方法,其包括对测试对象的生物样品中的游离AIM进行检测。本发明还涉及用于检查或辅助诊断肝癌的试剂盒。

背景技术

[0002] AIM (巨噬细胞的凋亡抑制剂 (apoptosis inhibitor of macrophage), 也称为 CD5L、api6 或 Spα) 是由组织巨噬细胞特异性产生的分子量为约 50kDa 的分泌蛋白质 (非专利文献 1)。AIM 具有串联连接的三个清道夫受体半胱氨酸富集 (scavenger receptor cysteine-rich, SRCR) 结构域的结构, 所述结构域是含有大量半胱氨酸残基的特异性序列, 并且由于每个结构域中每个半胱氨酸残基通过二硫键彼此结合, 所以认为其具有紧密的球形构象。

[0003] AIM 是一种黏附蛋白, 并且已经报道了多种分子为其结合配偶体 (結合パートナー)。例如, 已知其识别细菌和真菌的病原体相关分子模式 (pathogen-associated molecular pattern, PAMP), 例如脂磷壁酸 (lipoteichoic acid, LTA) 或脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS), 并具有聚集细菌的能力 (非专利文献 2)。体内还有许多细胞将 AIM 结合在它们的表面或将其并入到细胞中, 并且据报道 AIM 被并入到作为产生细胞的巨噬细胞自身中, 或者在脂肪细胞中通过清道夫受体 CD36 经胞吞作用并入以诱导脂肪降解 (非专利文献 3)。

[0004] 长久以来已知 AIM 与血液中的 IgM 结合 (非专利文献 4)。近年来, 据报道, 与 IgM 结合密切地参与使 AIM 不排泄到尿中并在血液中稳定存在, 并且几乎所有 AIM 都与血液中的 IgM 形成复合物, 且其很少以非结合形式存在 (非专利文献 5、6)。

[0005] 肝癌 (肝细胞癌 (hepatocellular carcinoma); HCC) 是一种缺乏有效治疗方法的疾病, 是癌中死亡的首要原因之一。此外, 目前非酒精性脂肪肝疾病 (non-alcoholic fatty liver disease, NAFLD) 以及生活方式相关疾病均有所提高。其中, 从仅表现脂肪肝 (非酒精性脂肪肝 (non-alcoholic fatty liver); NAFL) 的状态进展为伴随炎症和纤维化的非酒精性脂肪性肝炎 (non-alcoholic steatohepatitis; NASH) 的患者的数目显著提高, 因此认为当然的是, 未来发生来自 NASH 之 HCC 的患者的数目将提高 (非专利文献 7)。鉴于此背景, 关于 HCC 的诊断标志以及利用它们的有效治疗方法的开发存在显著的需求。

[0006] 迄今为止, 有数篇关于 AIM 与肝癌之间关系的报道。例如, 已报道了测量从测试对象收集的样品中的 AIM 浓度的方法, 作为用于诊断或检查包括肝癌的 AIM 相关疾病的方法 (专利文献 1)。

[0007] 此外, 在用于诊断包括肝癌在内的肝疾病的方法中, 报道了一种用于诊断肝疾病的方法, 其包括当来自测试对象的样品中的 AIM 浓度低于来自健康个体的样品中的 AIM 浓度时, 确定所述测试对象患有肝疾病或高度地可能患上肝疾病 (专利文献 2)。

[0008] 此外, 据报道, HCC 患者的血液 AIM 值显著高于健康成人 (非专利文献 8), 循环 AIM 水平可用作 HCC 的诊断和/或预后标志 (非专利文献 9), 在许多具有 HCC 的肝硬化个体中 CD5L 显

著提高(非专利文献10),与HCV感染患者的肝硬化相比,发现在HCC阶段中CD5L的表达提高(非专利文献11),等。

[0009] 然而,迄今尚未有关于未与其他结合配偶体(特别是IgM)形成复合物的非结合AIM与肝癌之间关系的报道。也没有可以以高精度区分HCC和包括NAFL或NASH在内其他肝病的方法的报道。

[0010] 引文列表

[0011] [专利文献]

[0012] [专利文献1]国际公布W02011/145725 A1

[0013] [专利文献2]国际公布W02013/162021 A1

[0014] [非专利文献]

[0015] [非专利文献1]Miyazaki T等.Increased Susceptibility of Thymocytes to Apoptosis in Mice Lacking AIM,a Novel Murine Macrophage-derived Soluble Factor Belonging to the Scavenger Receptor Cysteine-rich Domain Superfamily.J Exp Med 189:413-422,1999

[0016] [非专利文献2]Sarrias MR等.A role for human Sp alpha as a pattern recognition receptor.J Biol Chem 280:35391-35398,2005

[0017] [非专利文献3]Kurokawa J等.Macrophage-derived AIM is endocytosed into adipocytes and decreases lipid Droplets via inhibition of fatty acid synthase activity.Cell Metab 11:479-492,2010

[0018] [非专利文献4]Tissot JD等.IgM are associated to Sp alpha(CD5antigen-like).Electrophoresis 23:1203-1206,2002。

[0019] [非专利文献5]Miyazaki T等.,“Latest Knowledge on Macrophage-derived Protein AIM-Their Diverse Functions and Association with Lifestyle-related Diseases-”,Nippon Rinsho,第71卷,第9期(2013-9),第1681-1689页

[0020] [非专利文献6]Miyazaki T等.Obesity-Associated Autoantibody Production Requires AIM to Retain the Immunoglobulin M Immune Complex on Follicular Dendritic Cells,Cell Reports 3,1187-1198,2013年4月25日

[0021] [非专利文献7]Ascha MS等.The incidence and risk factors of hepatocellular carcinoma in patients with nonalcoholic steatohepatitis.Hepatology 51:1972-1978,2010

[0022] [非专利文献8]Miyazaki T,Suppression of Fatty Liver Hepatocellular Carcinoma by Steatolysis protein AIM,Oxidative Stress,and Liver Disease<第10卷>99-106,2015年3月27日公开

[0023] [非专利文献9]Yamazaki T等.“Circulating AIM as an Indicator of Liver Damage and Hepatocellular Carcinoma in Humans”PLOS ONE,9(10);e109123,2014

[0024] [非专利文献10]Gray J等.“A proteomic strategy to identify novel serum biomarkers for liver cirrhosis and hepatocellular cancer in individuals with fatty liver disease”BMC Cancer 2009,9:271

[0025] [非专利文献11]Sarvari J等.“Differentially Expressed Proteins in

Chronic Active Hepatitis,Cirrhosis,and HCC Related to HCV Infection in Comparison With HBV Infection:A proteomics study”Hepatitis Monthly.2013年7月; 13(7):e8351

发明内容

[0026] 本发明要解决的问题

[0027] 本发明的目的在于提供在灵敏度和特异性方面优异的用于检查肝癌的方法或用于辅助诊断肝癌的方法,以及可用于所述方法的试剂盒。

[0028] 解决问题的手段

[0029] 由于本发明人为了解决上述问题进行了反复的广泛研究,发现在肝癌测试对象的生物样品中的游离AIM显著提高。由于认为游离AIM通常在血液中几乎不能确定,所以出乎意料的是尤其证实了在肝癌测试对象血清中的游离AIM显著提高。

[0030] 本发明基于上述知识。尽管现在将描述本发明的实施方案,但是这些方面不限制本发明的范围。

[0031] 换言之,在一个实施方案中,本发明涉及用于检查肝癌的方法,其包括对来自测试对象的生物样品中的游离AIM进行检测或定量的步骤。在另一方面,本发明可以是用于辅助诊断肝癌的方法,其包括对来自测试对象的生物样品中的游离AIM进行检测或定量的步骤。在另一方面,本发明可以是用于对来自测试对象的生物样品中的游离AIM进行检测或定量的方法,其用于检查肝癌。

[0032] 在本发明的方法中,所述生物样品可以是体液。此外,在本发明方法的一个实施方案中,所述体液可以是选自血清、血浆、全血和尿的体液。

[0033] 在一个实施方案中,本发明方法的特征在于所述检测或定量是通过免疫测定进行的检测或定量。例如,在本发明的方法中,所述检测或定量可以通过使生物样品与抗体接触来进行的检测或定量,所述抗体与游离AIM结合。在本发明方法的一个实施方案中,与游离AIM结合的所述抗体是与游离AIM特异性结合的抗体。而且,在本发明的一个实施方案中,所述检测或定量可以通过ELISA进行的测量。

[0034] 在一个实施方案中,本发明方法的特征在于所述检测或定量在不将选自血清、血浆或全血的血液样品暴露于蛋白质变性条件和还原性条件的情况下进行。

[0035] 在一个实施方案中,本发明的方法还可包括对来自测试对象的生物样品中的总AIM进行定量的步骤。在本发明的方法中,当还包括对游离AIM进行定量的步骤时,游离AIM的量可作为相对于总AIM的比值来计算。

[0036] 本发明还涉及用于检查或辅助诊断肝癌的试剂盒,其包含与游离AIM结合的抗体。在本发明试剂盒的一个实施方案中,与游离AIM结合的所述抗体是与游离AIM特异性结合的抗体。

[0037] 在本发明中,所述肝癌是由非酒精性脂肪性肝炎(NASH)引起的肝癌。

[0038] 本发明非限制性地涵盖以下特征。

[0039] (1) 用于检查肝癌的方法,其包括对来自测试对象的生物样品中的游离AIM进行检测或定量的步骤。

[0040] (2) 用于辅助诊断肝癌的方法,其包括对来自测试对象的生物样品中的游离AIM进

行检测或定量的步骤。

[0041] (3) 用于对来自测试对象的生物样品中的游离AIM进行检测或定量的方法,其用于检查肝癌。

[0042] (4) 根据(1)至(3)中任一项所述的方法,其中所述生物样品是体液。

[0043] (5) 根据(4)所述的方法,其中所述体液选自血清、血浆、全血和尿。

[0044] (6) 根据(1)至(5)中任一项所述的方法,其中所述肝癌是由非酒精性脂肪性肝炎(NASH)引起的肝癌。

[0045] (7) 根据(1)至(6)中任一项的方法,其中所述检测或定量是通过免疫测定进行的检测或定量。

[0046] (8) 根据(7)所述的方法,其中所述检测或定量通过使生物样品与抗体接触来进行,所述抗体与游离AIM结合。

[0047] (9) 根据(8)所述的方法,其中所述检测或定量通过与游离AIM特异性结合的抗体进行。

[0048] (10) 根据(8)或(9)所述的方法,其中所述检测或定量是通过ELISA进行的测量。

[0049] (11) 根据(6)至(10)中任一项所述的方法,其特征在於所述检测或定量在不将选自血清、血浆或全血的血液样品暴露于蛋白质变性条件和还原性条件的情况下进行。

[0050] (12) 根据(1)或(2)所述的方法,其还包括对来自测试对象的生物样品中的总AIM进行定量的步骤。

[0051] (13) 根据(12)所述的方法,其还包括计算游离AIM与总AIM比值的步骤。

[0052] (14) 用于检查或辅助诊断肝癌的试剂盒,其包含与游离AIM结合的抗体。

[0053] (15) 根据(14)所述的试剂盒,其中所述抗体是与游离AIM特异性结合的抗体。

[0054] (16) 根据(14)或(15)所述的试剂盒,其中所述肝癌是由非酒精性脂肪性肝炎(NASH)引起的肝癌。

[0055] 本发明的效果

[0056] 根据本发明,提供了在灵敏度和特异性方面优异的用于检测肝癌的方法或用于辅助诊断肝癌的方法,以及可用于所述方法的试剂盒。

附图说明

[0057] 图1示出了在健康个体、NAFL患者、NASH患者和NASH肝癌患者(HCC)的血清中用抗AIM抗体进行的Western印迹分析的结果。在图中,(A)示出了其中使血清暴露于还原性条件的结果,以及(B)示出了非还原性条件下的结果。

[0058] 图2示出了在健康个体、NAFL患者、NASH患者和NASH肝癌患者(HCC)的血清中用人AIM ELISA试剂盒(CY-8080;来自CireuLex)对游离AIM进行检测的结果。

[0059] 图3示出了在NASH患者(NASH)和NASH肝癌患者(HCC)的血清中在每个纤维化阶段对游离AIM进行定量的结果。

[0060] 图4示出了在NASH患者(NASH)和NASH肝癌患者(HCC)的血清中在每个纤维化阶段对总AIM进行定量的结果。

[0061] 图5示出了基于NAFL患者、NASH患者(统称非HCC)和NASH肝癌患者(HCC)的血清中所定量的游离AIM和总AIM的量产生的散点图。

[0062] 图6示出了利用NAFL患者、NASH患者(统称非HCC)和NASH肝癌患者(HCC)进行的ROC分析的结果。

具体实施方式

[0063] 现在具体描述本发明的一些实施方案。

[0064] 根据本发明用于检查肝癌的方法包括对来自测试对象的生物样品中的游离AIM进行检测或定量的步骤。如上所述, AIM是由组织巨噬细胞特异性产生的分子量为约50kDa的分泌蛋白质, 且已知其在人和除人以外的许多哺乳动物以及鸟类中表达。还已知为了使AIM稳定地存在于血液中而不排泄到尿中, 几乎所有的AIM都与IgM形成复合物, 并且其很少作为非结合形式存在(非专利文献5和6)。还提出, 当来自测试对象的样品中的AIM浓度是较低值时, 具有或患有肝病的可能性就高(专利文献2)。尽管有这些知识, 但现在已经发现, 在肝癌测试对象中, 生物样品中的游离AIM显著提高。因此, 通过对来自测试对象的生物样品中的游离AIM进行检测或定量, 可在上述测试对象中以良好的检测灵敏度和特异性检测肝癌。本文中使用的“游离AIM”是指生物样品中未与AIM的其他结合配偶体(特别是IgM)形成复合物的非结合AIM。相比之下, “总AIM”是“游离AIM”和与其他结合配偶体(例如IgM)形成复合物的AIM(下文中也称为复合物AIM)的总称, 并且“检测或测量总AIM”是指检测或测量生物样品中的游离AIM和复合物AIM二者。

[0065] 在另一方面, 本发明涉及用于辅助诊断肝癌的方法, 其包括对来自测试对象的生物样品中的游离AIM进行检测或定量的步骤。

[0066] 本文中使用的“检查肝癌”或“辅助诊断肝癌”意指检查从测试对象收集的样品以获得诊断所必需的信息。因此, 本发明的方法不仅可在医疗机构进行, 而且可在例如检查公司进行。

[0067] 在另一方面, 本发明涉及用于对来自测试对象的生物样品中的游离AIM进行检测或定量的方法, 其用于检查肝癌。

[0068] 在本发明中, 测试对象没有特别的限制, 但包括例如具有发生肝癌的风险或怀疑已发生肝癌的测试对象。测试对象还包括已发生肝癌的测试对象, 在这种情况下, 可实施本发明, 目标是确定此类测试对象的预后或确定特定肝癌治疗的效果。测试对象通常是指人, 但也可包括其他动物, 包括例如其他灵长类、啮齿类、狗、猫、马、绵羊、猪等。

[0069] 在本发明中, 肝癌是指在肝中发生的恶性肿瘤, 并且意指在肝中经历原发的肝细胞癌。在一个实施方案中, 肝癌是由非酒精性脂肪性肝炎(NASH)引起的肝癌。

[0070] 在另一方面, 本发明可还包括向通过用于检查或辅助诊断肝癌的本发明方法确定的具有发生肝癌风险或怀疑已发生肝癌的测试对象施用肝癌疗法或治疗的步骤。

[0071] 在本发明中, 对来自测试对象的生物样品没有特别的限制, 只要其可以从测试对象收集即可, 并且可以是例如组织或体液。组织非限制性地包括卵巢、子宫、乳房、甲状腺、脑、食管、舌、肺、胰腺、胃、小肠、十二指肠、大肠、膀胱、肾、肝、前列腺、胆囊、咽、肌肉、骨和皮肤等, 但不限于此。体液包括但不限于血液(例如血清、血浆或全血)、淋巴、组织液、脊髓液、体腔液、消化液、鼻腔排出物、泪液、汗、尿等, 但不限于此。就易于获得和处理而言, 优选采用血液或尿作为所述生物样品, 更优选采用血液, 并且在血液中特别优选采用血清。此外, 所述体液可以是来自测试对象收集的体液本身, 或者其可以是经过对所收集体液常规地

进行例如稀释或浓缩处理的那些。注意,收集和制备本发明中使用的来自测试对象的生物样品的人可与执行本发明的步骤的人相同或不同。此外,本发明中使用的来自测试对象的生物样品可在实施本发明的时候收集或制备,或者提前收集或制备并储存。

[0072] 用于对游离AIM进行检测或定量的方法没有特别的限制,只要其为可检测和区分游离AIM和复合物AIM的方法即可,并且可应用通常使用的蛋白质检测方法。还优选的是,这样的蛋白质检测方法是可定量或半定量地测量游离AIM的方法。这样的方法可包括但不限于使用与游离AIM结合的抗体、分子筛色谱、离子交换色谱、质谱等的方法。

[0073] 在本发明中,用于检测游离AIM的装置没有特别的限制,并且可根据用于检测或测量游离AIM的方法适当地选择。这可具体地包括例如HPLC仪、质谱仪、电泳仪(例如毛细管电泳装置)、自动或半自动酶免疫测定仪、细胞清洗仪、自动或半自动化学发光免疫测定仪、发光测量装置、自动或半自动电化学发光免疫测定仪、光学测量装置、读板仪、CCD照相机、自动或半自动荧光免疫测定仪、荧光测量装置、自动或半自动放射免疫测定仪、液体闪烁计数器、库尔特计数器、表面等离子体测量装置、印迹装置、密度计等。

[0074] 在本发明中,就检测灵敏度、特异性和便利性而言,优选使用采用与游离AIM结合的抗体(在本文中也称为“抗游离AIM抗体”)的方法,例如,采用抗游离AIM抗体的免疫测定。抗游离AIM抗体没有特别的限制,只要其为可识别并结合AIM的抗体即可。

[0075] 对于抗游离AIM抗体,可按照公知的方法产生单克隆抗体和多克隆抗体二者。例如,可通过从用游离AIM或游离AIM片段免疫接种的非人哺乳动物分离抗体产生细胞,使其与骨髓瘤细胞等融合以产生杂交瘤,并纯化由该杂交瘤产生的抗体来获得单克隆抗体。此外,可从用游离AIM或游离AIM片段免疫接种的动物的血清中获得多克隆抗体。游离AIM片段是游离AIM的部分肽,并且抗游离AIM片段抗体识别游离AIM。此外,免疫原包括但不限于例如灵长类(例如人或猴)、啮齿类(例如大鼠或小鼠)、狗、猫、马、绵羊、猪等的游离AIM或游离AIM片段。

[0076] 本文中使用的“抗体”是指天然存在或通过基因重组技术产生的全长免疫球蛋白分子,或免疫球蛋白分子的免疫活性片段(例如抗体片段)。除非特别指出,否则本发明的抗体包括任何类型、类别或亚类,例如包括IgG、IgE、IgM、IgD、IgA、IgY、IgG₁、IgG₂、IgG₃、IgG₄、IgA₁、IgA₂等。这些抗体可用常规技术产生,并且可以是多克隆抗体或单克隆抗体。抗体片段包括F(ab')₂、F(ab)₂、Fab'、Fab、Fv、scFv等。抗体片段可通过例如使用编码核酸的基因重组技术来产生,或者其也可以通过用酶切割全长抗体来产生。在本发明中,优选地,所述抗游离AIM抗体是单克隆抗体。

[0077] 在本发明中,抗游离AIM抗体的实例可包括例如,保藏在国家技术和评价专利微生物保藏中心的AIM-CL-6(登录号:NITE BP-1092)和AIM-CL-7(登录号:NITE BP-1093)。

[0078] 优选地,本发明中使用的抗游离AIM抗体是与游离AIM特异性结合的抗体。“特异性结合”是指与非特异性相互作用在测量值上不同的结合,并且在本文中还指与已与IgM形成复合物的AIM相比,与游离AIM具有更高结合亲和力的抗体。在本发明的一个方面中,“特异性结合”可通过例如对于游离AIM具有至少约10⁻⁴M、或至少约10⁻⁵M、或至少约10⁻⁶M、或至少约10⁻⁷M、或至少约10⁻⁸M、或至少约10⁻⁹M、或至少约10⁻¹⁰M、或至少约10⁻¹¹M、或至少约10⁻¹²M或更高的K_d的抗体示出。在另一方面,“特异性结合”意指与游离AIM结合,而不与游离AIM以外的多肽(包括已与IgM形成复合物的AIM)显著结合。

[0079] 本领域技术人员通常使用的方法可用作本发明中的免疫测定,尽管应当选择辨别性地对游离AIM和复合物AIM进行检测或定量的方法或条件。例如,在本发明的方法中,当使用尿以外的生物样品,例如选自血清、血浆或全血的血液样品时,在用抗游离AIM抗体进行检测或定量时,优选地在必要时基于分子量对生物样品进行分级分离以使得辨别性地对游离AIM和复合物AIM进行检测。还优选的是在使游离AIM与复合物AIM分离之后用抗游离AIM抗体进行检测或定量。此外,在本发明的方法中,应该注意不要将所述生物样品暴露于其中与IgM形成复合物的AIM的结合状态被溶解的蛋白质变性条件或还原性条件。这样的蛋白质变性条件或还原性条件作为破坏或抑制蛋白质构象或蛋白质-蛋白质结合的方法或条件是本领域技术人员公知的。

[0080] 免疫测定使用可检测地标记的抗游离AIM抗体或可检测地标记的抗游离AIM抗体的抗体(二抗)。根据标记抗体的方法,将其分为酶免疫测定(EIA或ELISA)、放射免疫测定(RIA)、荧光免疫测定(FIA)、荧光偏振免疫测定(FPIA)、化学发光免疫测定法(CLIA)、电化学发光免疫测定(ECLIA)等,其中的任何一种均可用于本发明的方法中。

[0081] 在ELISA方法中使用用酶(例如过氧化物酶和碱性磷酸酶)标记的抗体,在RIA方法中使用用放射性物质(例如¹²⁵I、¹³¹I、³⁵S和³H)标记的抗体,在FPIA方法中使用用荧光物质(例如异硫氰酸荧光素、罗丹明、丹酰氯、藻红蛋白、四甲基罗丹明异硫氰酸酯)以及近红外荧光物质标记的抗体,以及在CLIA方法中使用用发光物质(例如萤光素酶、萤光素和水母蛋白)标记的抗体。另外,还可检测用纳米粒子(例如金胶体和量子点)标记的抗体。

[0082] 在免疫测定中,抗游离AIM抗体也可用生物素标记,并与用例如酶标记的亲合素或链霉亲和素结合以检测和测量游离AIM。

[0083] 在免疫测定中,使用酶标记的ELISA方法是优选的,因为其可方便且迅速地测量靶标。

[0084] 在ELISA方法中,可例如使用夹心法。将抗游离AIM抗体固定在固相载体上,添加适当处理的生物样品并使其反应,并随后再添加用酶标记的识别其他表位的抗游离AIM抗体并使其反应。洗涤后,使混合物与酶底物反应以显色,并可测量吸光度以确定游离AIM的浓度。此外,在使固定在固相载体上的抗游离AIM抗体与生物学样品中的游离AIM反应后,添加未标记的游离AIM抗体(一抗),并且可用酶标记该未标记抗体的抗体(二抗)并进一步添加。

[0085] 当酶是过氧化物酶时,可使用3,3'-二氨基联苯胺(DAB)、3,3',5,5'-四甲基联苯胺(TMB)、邻苯二胺(OPD)等作为酶底物,并且当其碱性磷酸酶时,可使用磷酸对硝基苯酯(NPP)等。

[0086] 在上述免疫测定中,作为用于以高灵敏度测量蛋白质的方法,ECLIA也是优选的。在ECLIA方法中,将抗游离AIM抗体固定于微珠,添加适当处理的生物样品并使其反应,并随后添加用电化学发光物质标记的识别其他表位的抗游离AIM抗体并使其反应。在洗涤微珠之后,将微珠捕获到电极上,施加电能以允许发光,并且可测量发光量以确定游离AIM的浓度。

[0087] 在上述免疫测定中,作为可简便地检测痕量蛋白质的方法,聚集法也是优选的。聚集法包括例如具有结合于胶乳颗粒之抗体的胶乳聚集法。

[0088] 当胶乳颗粒与抗游离AIM抗体结合并与生物样品混合时,如果存在游离AIM,则抗体结合的胶乳颗粒聚集。然后通过样品上照射近红外光并测量吸光度(比浊法)或散射光

(浊度法)来对聚集块进行定量,以确定抗原浓度。

[0089] 在本发明中,可使用可特异性检测游离AIM的试剂盒来对游离AIM进行检测或定量。上述试剂盒可包括例如市售试剂盒,并且根据上述试剂盒的说明,这可用于对游离AIM进行检测或定量。这样的试剂盒可包括但不限于人AIM ELISA试剂盒(CY-8080;来自CircuLex)等。

[0090] 除了对游离AIM进行检测或定量之外,本发明的方法还可包括对来自测试对象的生物样品中的总AIM进行定量的步骤。例如,在NASH肝癌患者中,取决于肝纤维化阶段,未观察到生物样品中总AIM的显著提高,而观察到游离AIM显著提高。因此,例如通过进一步评价总AIM的量,可以以更高的精确度和特异性检查肝癌。在本发明的一个实施方案中,游离AIM的量作为相对于总AIM的比值来计算。

[0091] 总AIM的检测或定量可通过对于本领域技术人员常规的任何蛋白质检测方法进行,并且这样的方法可包括但不限于使用与AIM结合的抗体、分子筛色谱、离子交换色谱、质谱等的方法。在本发明的一个实施方案中,就特异性和便利性而言,优选通过使用与AIM结合的任何抗体的免疫测定(例如ELISA)来测量。此外,在本发明中,用于检测总AIM的装置没有特别的限制,并且可根据用于检测或测量总AIM的方法适当地选择。

[0092] 在本发明中,可使用可特异性检测总AIM的试剂盒来对总AIM进行检测或定量。上述试剂盒可包括例如市售试剂盒,并且根据上述试剂盒的说明,这可用于对总AIM进行检测或定量。这样的试剂盒可包括但不限于人AIM ELISA试剂盒(KK901;来自Trans Genic)等。

[0093] 在本发明的一个实施方案中,可如下进行总AIM的检测或定量:通过使来自测试对象的检测或定量了游离AIM的生物样品暴露于蛋白质变性条件或还原性条件来将生物样品中的复合物AIM转变成游离AIM,并随后对游离AIM的总量进行定量。

[0094] 在本发明的一个实施方案中,游离AIM的检测或定量和总AIM的检测或定量也可在一次测量中同时进行。这样的实施方案可包括将上述使用与AIM结合的抗体的方法与分子筛色谱相结合的方法。与AIM结合的抗体是可识别游离AIM和与其他结合配偶体形成复合物的AIM二者的抗体,并且在本文中也称为“抗AIM抗体”。因此,抗AIM抗体可以是抗游离AIM抗体和/或可识别与其他结合配偶体形成复合物之AIM的抗体。在一个实施方案中,抗AIM抗体是抗游离AIM抗体,其识别游离AIM上与其他结合配偶体形成复合物的区域不同的区域。当抗AIM抗体与生物样品混合时,在所述样品中存在复合物AIM和游离AIM的情况下,抗AIM抗体与复合物AIM或游离AIM中的每一种结合。当对所述混合样品进行分子筛色谱时,由于具有与其结合的抗AIM抗体的游离AIM和具有与其结合的抗AIM抗体的复合物AIM根据其各自的分子量在保留时间分离和洗脱,所以可通过测量来自游离AIM的峰和来自复合物AIM的峰在一次测量中同时测量游离AIM、复合物AIM、总AIM以及游离AIM相对于总AIM的比值。例如上述的通过色谱分离和测量抗体和抗原的结合物质的方法是公知的,例如日本公开的未审查专利申请公开No.H 2-028557等。对抗AIM抗体的标记或分子筛以外的色谱法的应用也没有限制,并且根据本文中对游离AIM的检测或定量以及总AIM的检测或定量的描述,其可适当地选择和组合使用。

[0095] 本发明的方法还可包括基于来自所述测试对象的生物样品中游离AIM的量来确定肝癌的步骤。本发明中游离AIM的量没有特别的限制,只要其是来自所述测试对象的生物样品中包含的所述游离AIM的浓度、或者与其对应的定量值或半定量值即可。本发明中游离

AIM的量的实例可包括直接测量所检测的所述游离AIM的量的测量值,通过检测标记间接测量所检测的所述游离AIM的量的测量值等。

[0096] 在通过将来自测试对象的生物样品中游离AIM的量与例如作为参照值(截断值)的对照健康个体的生物样品中的游离AIM的量进行比较的本发明方法的确定步骤中,如果来自所述测试对象的生物样品中游离AIM的量更大,则可确定肝癌。

[0097] 对照健康个体意指提前证明没有发生肝癌的个体。此外,游离AIM的量更大是指来自测试对象的游离AIM的量大于设定为区分健康个体与肝癌患者的参照值(截断值)。

[0098] 所述参照值可例如通过对肝癌患者的生物样品中的游离AIM的量和健康个体的对照组的生物样品中的游离AIM的量进行ROC分析(接受者操作特征分析(Receiver Operating Characteristic analysis))等来设定。ROC分析是例如可评价疾病检查方法的检测和诊断能力的分析方法,例如以下中描述的分析方法:The Japan Society for Clinical Laboratory Automation Journal"Evaluation Manual for Diagnostic Utility of Clinical Examination",Ver.1.3(2004.9.1),第29卷增刊1(全号154)(2004年9月1日发布)。

[0099] 参照值也可设定为例如健康个体的检测水平的平均值和标准偏差值的2倍或3倍的总和,并且可进一步适当地设定为以平衡方式满足灵敏度(检出率)和特异性(假阳性率低的程度)的值。

[0100] 例如,这包括通过如下文实施例3所述对健康个体血清的游离AIM测量值($1.12 \pm 0.187 \mu\text{g/mL}$)和NASH肝癌患者血清的游离AIM测量值($2.90 \pm 1.375 \mu\text{g/mL}$)应用上述方案,并进一步将其调节为以平衡方式满足灵敏度和特异性的值,将 $1.681 (1.12 + 0.187 * 3) \mu\text{g/mL}$ 设定为健康个体的平均值与标准偏差的3倍的总和值,或者 $1.494 (1.12 + 0.187 * 2) \mu\text{g/mL}$ 设定为健康个体的平均值与标准偏差的2倍的总和值(基于人AIM ELISA试剂盒(CY-8080;来自CircuLex)的测量值)。

[0101] 作为上述确定步骤的另一个方面,例如,还可根据病理学等将患者分组,并且可比较每个患者组之间的游离AIM的测量结果。其实例可包括如下文实施例中所述将NAFL和NASH患者组(非HCC患者组)与NASH肝癌(HCC患者组)进行比较。此外,如下文实施例中所述,这种情况的截断值可包括 $1.6 \mu\text{g/mL}$ 或更高(基于人AIM ELISA试剂盒(CY-8080,来自CircuLex)的测量值)。

[0102] 在另一方面,本发明涉及用于检查或辅助诊断肝癌的试剂盒。在本发明的一个方面中,根据本发明的试剂盒是用于进行根据本发明的上述用于检查肝癌的方法的试剂盒,并且包含抗游离AIM抗体。在本发明试剂盒的一个实施方案中,抗游离AIM抗体是与游离AIM特异性结合的抗体。

[0103] 用于检查和辅助诊断的上述试剂盒包含通过免疫测定来测量生物样品中游离AIM的浓度所必需的试剂和装置,所述免疫测定利用游离AIM和抗游离AIM抗体之间的抗原抗体反应。

[0104] 在一个方面,本发明的试剂盒用于通过夹心ELISA方法测量游离AIM的浓度,并且包含微量滴定板;用于捕获的抗游离AIM抗体;用碱性磷酸酶或过氧化物酶标记的抗游离AIM抗体;以及碱性磷酸酶底物(例如NPP)或过氧化物酶底物(例如DAB、TMB和微量滴定板OPD)。捕获抗体和标记的抗体识别不同的表位。在这样的试剂盒中,首先将捕获抗体固定在

微量滴定板上,向其中添加适当处理和稀释的生物样品并随后孵育,并将样品移出并洗涤。随后,添加标记的抗体并随后孵育,并添加底物用于显色。通过用例如微量滴定板读取器测量显色,可确定游离AIM的浓度。

[0105] 在另一方面,本发明的试剂盒用于通过使用二抗的夹心ELISA方法测量游离AIM的浓度,并包含微量滴定板;用于捕获的抗游离AIM抗体;作为一抗的抗游离AIM抗体;作为二抗的用碱性磷酸酶或过氧化物酶标记的抗游离AIM抗体的抗体;以及碱性磷酸酶底物(例如NPP)或过氧化物酶底物(例如DAB、TMB和OPD)。捕获抗体和一抗识别不同的表位。在这样的试剂盒中,首先将捕获抗体固定在微量滴定板上,向其中添加适当处理和稀释的生物样品并随后孵育,并将样品移出并洗涤。随后,添加一抗,随后孵育和洗涤,进一步添加酶标记的二抗并孵育,并随后添加底物用于显色。通过用例如微量滴定板读取器测量显色,可确定游离AIM的浓度。通过使用二抗,放大了反应并且可提高检测灵敏度。

[0106] 还优选的是,本发明的试剂盒还包含必要的缓冲液、酶反应淬灭溶液、微板读取器、说明书等。

[0107] 标记的抗体不限于酶标记的抗体,并且可以用以下标记的抗体:放射性物质(例如 ^{25}I 、 ^{131}I 、 ^{35}S 和 ^3H)、荧光物质(例如异硫氰酸荧光素、罗丹明、丹酰氯、藻红蛋白、四甲基罗丹明异硫氰酸酯和近红外荧光物质)、发光物质(例如萤光素酶、萤光素和水母蛋白)、纳米颗粒(金胶体和量子点)等。也可使用生物素化抗体作为标记的抗体,并将标记的亲合素或链霉亲和素添加至试剂盒。

[0108] 本发明的诊断试剂盒的另一方面还包括通过ECLIA方法以高灵敏度测量游离AIM浓度的那些。该试剂盒包含在其上固相化有抗游离AIM抗体的微珠,电化学发光物质(例如钌)标记的抗游离AIM抗体等。在这样的试剂盒中,将经过适当处理的生物样品添加至在其上固相化有抗游离AIM抗体的微珠并使其反应,并随后将样品移出并洗涤。随后,添加用电化学发光物质标记的识别其他表位的抗游离AIM抗体并使其反应。在洗涤微珠之后,将微珠捕获到电极上,施加电能以允许发光,并且可测量发光量以确定游离AIM的浓度。

[0109] 本发明的诊断试剂盒的另一方面还包括用于通过胶乳聚集法测量游离AIM浓度的那些。该试剂盒包含抗游离AIM抗体敏化胶乳,其中使生物样品与抗游离AIM抗体混合,并通过光学方法对团块进行定量。还优选的是,试剂盒包含用于使聚集反应可视化的聚集反应板。

[0110] 现在将用实施例更具体地描述本发明。本发明不以任何方式受以下所示实施例的限制。

[0111] 实施例

[0112] 实施例1:小鼠抗人AIM单克隆抗体的制备

[0113] <动物致敏>

[0114] 作为抗原,将全长人rAIM(2mg/ml)与等量的TiterMax Gold(G-1, Funakoshi)混合以制备乳液。使用两只8周龄雌性Balb/c小鼠(来自Charles River)作为免疫动物,并将50 μL 抗原溶液施用于足底后部区域。2周后进行类似施用,并且在另外2周或更久之后将50 μL 抗原溶液施用于足底后部区域,以为3天后的细胞融合做准备。

[0115] <骨髓瘤细胞>

[0116] 使用小鼠P3U1作为骨髓瘤细胞,并且使用补充谷氨酰胺和丙酮酸并添加10%FBS

(来自BWT的S1560)的RPMI1640 (11875-119GIBCO) 培养基作为扩增培养物。作为抗生素,添加适量的青霉素和链霉素。

[0117] <细胞融合>

[0118] 从在麻醉下采集心脏血液的小鼠中,无菌切除腭淋巴结,放在具有#200网孔的烧杯上,并且通过用硅棒刺入来制备细胞悬液。将细胞在RPMI1640中离心洗涤2次后,并随后对细胞数计数。通过离心收集处于对数生长期状态的骨髓瘤细胞并洗涤,然后将淋巴细胞与骨髓瘤细胞的比例调整为5比1,并进行混合离心。用PEG1500 (783641, Roche) 进行细胞融合。换言之,使细胞沉淀与1mL PEG溶液反应3分钟,将其连续稀释并通过离心洗涤,添加培养基并将每种200 μ L放入15个96孔板中,并进行1周的培养。作为培养基,使用补充有HAT补充物 (21060-017, GIBCO) 和FBS浓度调节至15%的骨髓瘤细胞培养基。

[0119] <小鼠腹腔液的收集>

[0120] 将以冷冻状态保存的细胞解冻,进行增殖培养,然后将 1×10^7 个细胞施用于预先1周或更久腹膜内施用0.5ml姥蛟烷 (のプリスタン) (42-002, Cosmo Bio) 的裸小鼠 (BALB/cAJcl-nu/nu, CLEA Japan) 的腹膜腔,并且在约2周后获得4-12ml腹腔液。通过离心处理移出固体,并随后将其以冷冻状态储存。

[0121] 实施例2:NASH肝癌 (HCC) 特异性血清中游离AIM的检测

[0122] 在还原性或非还原性条件下对4例健康个体病例、6例NAFL患者病例、6例NASH患者病例和14例NASH肝癌患者病例 (HCC) 的血清进行琼脂糖凝胶电泳,并用抗AIM抗体进行Western印迹。

[0123] 在还原性条件下,将患者血清与包含SDS和巯基乙醇的样品缓冲液混合,使其在99℃下还原5分钟,并随后添加至e-PAGEL (来自ATTO) 凝胶并通过SDS-PAGE方法分离。在非还原性条件下,将患者血清与不包含SDS和巯基乙醇的样品缓冲液混合,并通过Native-PAGE方法分离。电泳后,将蛋白质转移到PVDF膜 (Immobilon, 来自Millipore) 上,并用实施例1中制备的小鼠抗人AIM单克隆抗体在4℃下进行一抗反应过夜。使用HRP结合的抗小鼠IgG抗体作为二抗,使用Luminata Forte Western HRP Substrate (来自Millipore) 作为检测试剂,并且用Image Quant LAS 4000 (GE Healthcare) 进行信号检测。

[0124] 在还原性条件 (A) 下,由于所有AIM分子与IgM解离,所以看到游离AIM的单一一条带。在非还原状态 (B) 下,由于AIM未与IgM解离,所以在健康个体、NAFL患者和NASH患者中未检测到游离AIM条带,但在NASH肝癌患者 (HCC) 中检测到游离AIM条带。在使用不同患者血清的实验1和2中证实了类似的结果 (图1)。该实验也证实了实施例1中制备的小鼠抗人AIM单克隆抗体与AIM结合。

[0125] 实施例3:血清中游离AIM的定量

[0126] 使用对游离AIM进行定量的人AIM ELISA试剂盒 (CY-8080, 来自CircuLex) 测量10例健康个体病例、42例NAFL患者病例、135例NASH患者病例和26例NASH肝癌患者病例 (HCC) 的血清中游离AIM的浓度。根据试剂盒的说明书进行测量。使用Man-Whitney U检验进行统计分析, $p < 0.05$ 被认为有显著差异。

[0127] 结果,NAFL和NASH患者中游离AIM的浓度分别为 $1.07 \pm 0.568 \mu\text{g/mL}$ 和 $1.12 \pm 0.632 \mu\text{g/mL}$,并且未表现出与健康个体 ($1.12 \pm 0.187 \mu\text{g/mL}$) 的差异,但NASH肝癌患者 (HCC) 表现出为 $2.90 \pm 1.375 \mu\text{g/mL}$ 的显著高的游离AIM (图2)。

[0128] 实施例4:肝的每个纤维化阶段中游离AIM和总AIM的定量

[0129] 使用对游离AIM进行定量的上述人AIM ELISA试剂盒 (CY-8080, 来自CircuLex) 测量135例NASH患者病例和26例NASH肝癌患者病例 (HCC) 的血清中游离AIM的浓度。

[0130] 此外,使用对总AIM进行定量的ELISA测量患者血清中总AIM的浓度。在测量时,使用具有通过BCA方法评估的浓度的标准材料。在上述ELISA中,按照常规方法将小鼠抗人AIM单克隆抗体在平板上固相化,并添加患者血清。洗涤后,使其与HRP标记的小鼠抗人AIM单克隆抗体反应,并用HRP底物进行显色。使用的所有抗AIM抗体为根据实施例1中所述的方法制备的抗体,其为识别游离AIM和复合物AIM二者并且各自具有不同表位的抗体。

[0131] 由于随着肝纤维化的进展报告了总AIM的提高,所以根据Brunt分类 (Am J Gastroenterol. 1999年9月;94 (9):2467-2674) 将患者分为以下三组用于分析:纤维化阶段1和2 (F1-F2)、阶段3 (F3) 和阶段4 (F4)。在NASH患者中,除了未见纤维化的27例以外,分析的NASH患者和NASH肝癌患者 (HCC) 的病例数各自为F1-F2的71例和4例,F3的30例和10例,以及F4的7例和12例。

[0132] 在所有阶段,与NASH患者相比,NASH肝癌患者 (HCC) 中游离AIM显著提高 (图3)。在所有阶段,未在NASH患者和NASH肝癌患者之间发现总AIM的显著差异 (图4)。

[0133] 实施例5:随着癌变游离AIM的提高与总AIM的提高了的比较

[0134] 使用如实施例4中使用的对游离AIM进行定量的上述人AIM ELISA试剂盒 (CY-8080, 来自CircuLex) 和对总AIM进行定量的相同ELISA来测量42例NAFL患者病例、135例NASH患者病例和26例NASH肝癌患者病例 (HCC) 的血清中游离AIM和总AIM的浓度。尽管随着总AIM的提高,游离AIM也提高,但是与NAFL和NASH患者 (统称非HCC) (白色圆圈) 相比,NASH肝癌患者 (HCC) (黑色圆圈) 中游离AIM的提高是显著的 (图5)。

[0135] 实施例6:NASH患者和NASH肝癌患者、进展的纤维化病例、肝硬化病例的ROC分析

[0136] 对NASH患者 (135例) 和NASH肝癌患者 (HCC) (26例) 的血清中游离AIM和总AIM的浓度进行ROC分析 (见表1)。

[0137] 游离AIM的AUC为0.927,且总AIM的AUC为0.801 (表1 (A))。游离AIM可以以更高精确度区分肝癌。

[0138] 已知随着肝纤维化进展,肝癌的发病更可能发生。对纤维化阶段3 (F3) 和阶段4 (F4) 的进展的纤维化病例的血清中游离AIM和总AIM的浓度进行ROC分析。在进展的纤维化病例中,游离AIM的AUC为0.918,且总AIM的AUC为0.709 (表1 (B))。在进展的纤维化病例中游离AIM可以以高精确度区分肝癌,但利用总AIM的精确度较低。

[0139] 具有进展的纤维化的肝硬化病例具有最高的肝癌发病风险。对阶段4 (F4) 肝硬化病例的血清中的游离AIM和总AIM的浓度进行ROC分析。在肝硬化病例中,游离AIM的AUC为0.869,且总AIM的AUC为0.506 (表1 (C))。在肝硬化病例中游离AIM也可以以高精确度区分肝癌,但利用总AIM的精确度较低。

[0140] [表1]

[0141]

		(A) 全部病例	(B) 进展的纤维化病例	(C) 肝硬化病例
病例数	NASH	135	37	7
	NASH肝癌	26	22	12

ROC-AUC	游离AIM	0.927	0.981	0.869
	总AIM	0.801	0.709	0.506

[0142] 实施例7:非HCC患者和HCC患者中的ROC分析

[0143] 在NAFL和NASH患者(统称非HCC患者)(177例)和NASH肝癌患者(HCC)(26例)中,对血清中游离AIM的浓度和总AIM的浓度以及游离AIM与总AIM浓度比值进行ROC分析。游离AIM的AUC为0.929,总AIM的AUC为0.806,且游离AIM/总AIM比值的AUC为0.842,并且游离AIM可以以更高诊断效率区分肝癌患者(见图6)

[0144] 实施例8:诊断灵敏度和特异性的分析

[0145] 对于NAFL和NASH患者(统称非HCC)(177例)和NASH肝癌患者(HCC)(26例),测量血液游离AIM的浓度,用1.6 μ g/mL的截断值研究游离AIM对肝癌的诊断价值。因此,在NASH肝癌患者(HCC)中表现1.6 μ g/mL或更高的患者为23例,且诊断灵敏度为0.885(23/26)。此外,在没有肝癌的患者中表现小于1.6 μ g/mL的患者为152例,且诊断特异性为0.859(152/177)(表2)。

[0146] [表2]

[0147]

	非 HCC	HCC	总计
小于 1.6 μ g/mL 的游离 AIM	152	3	155
1.6 μ g/mL 或更高的游离 AIM	25	23	48
总计	177	26	203

[0148] 实施例9:与肿瘤标志物的关联

[0149] 在25例NASH肝癌患者中,研究了肿瘤标志物(PIVKA-II和AFP)与血液游离AIM浓度、总AIM浓度以及游离AIM与总AIM浓度比值的关联。将患者用分别为40mAU/mL和20ng/mL的PIVKA-II和AFP的截断值分开,并分析每位患者的游离AIM浓度、总AIM浓度以及游离AIM与总AIM浓度比值。结果,对于游离AIM浓度、总AIM浓度以及游离AIM与总AIM浓度比值中的任一种,在对于每种肿瘤标志物表现出截断值或更高的患者组与表现为小于截断值的患者组之间没有发现显著差异(表3)。

[0150] [表3]

[0151]

	PIVKA-II			AFP		
	小于 40 mAU	40 mAU 或 更高	<i>P</i>	小于 20 ng	20 ng 或 更高	<i>P</i>
	平均值(SD)	平均值(SD)		平均值(SD)	平均值 (SD)	
游离 AIM (mg/mL)	2.83 (1.60)	2.99 (1.20)	0.406	2.73 (1.44)	3.51 (1.05)	0.121
总 AIM (mg/mL)	7.42 (3.19)	7.70 (2.50)	0.574	7.40 (2.90)	8.11 (2.60)	0.475
游离/总比值	0.39 (0.13)	0.38 (0.10)	0.728	0.37 (0.12)	0.44 (0.08)	0.198

[0152] 工业适用性

[0153] 通过使用本发明的方法和/或检查或诊断辅助试剂盒,可以以优异的灵敏度和特异性检查肝癌。

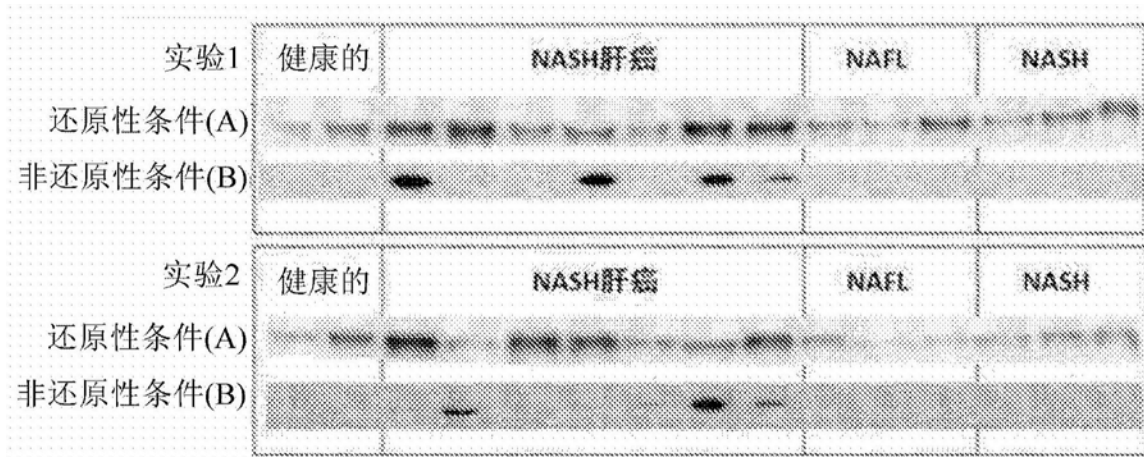


图1

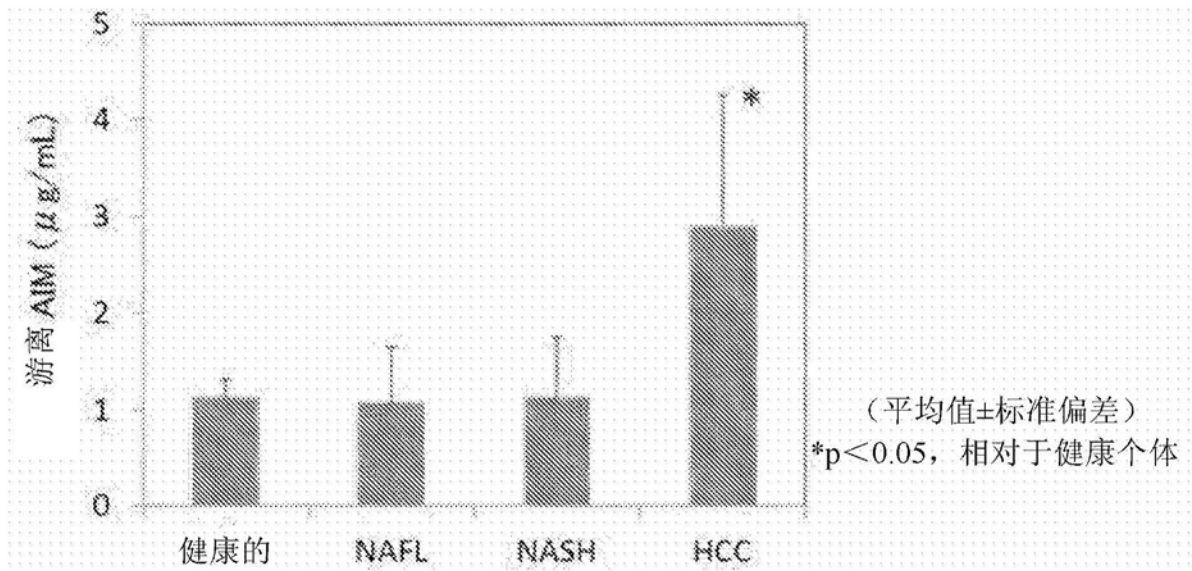


图2

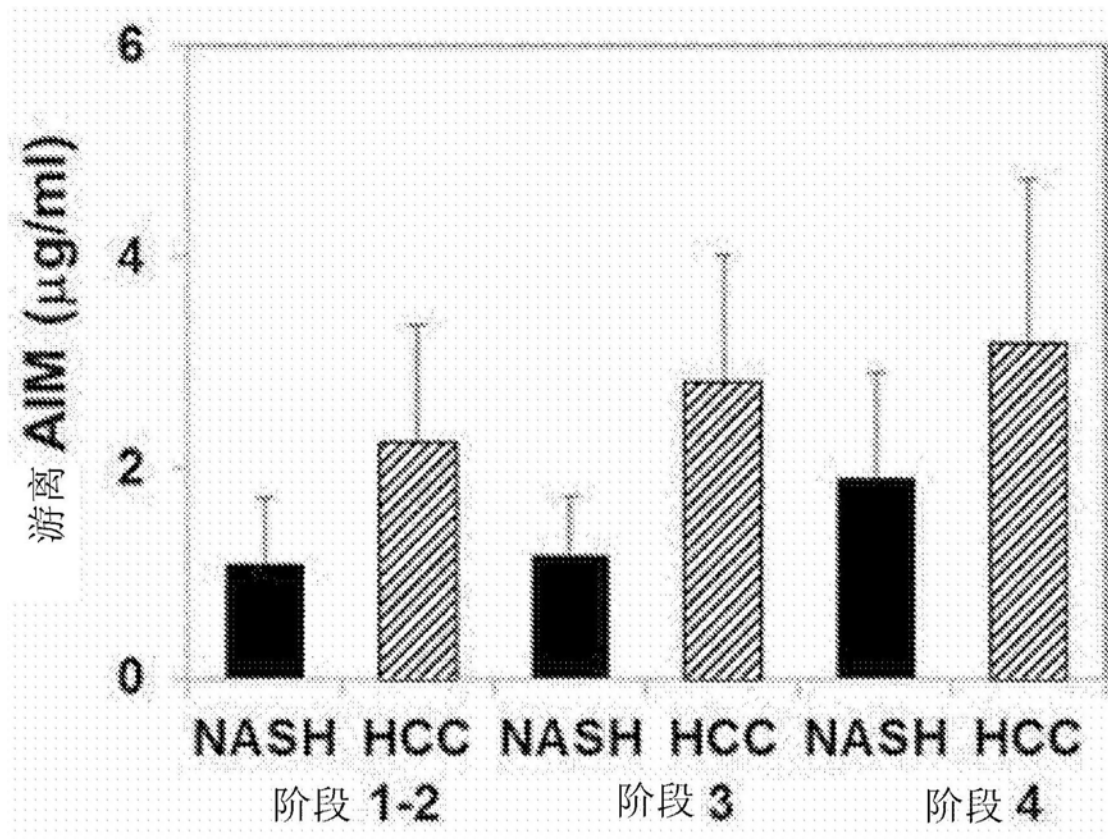


图3

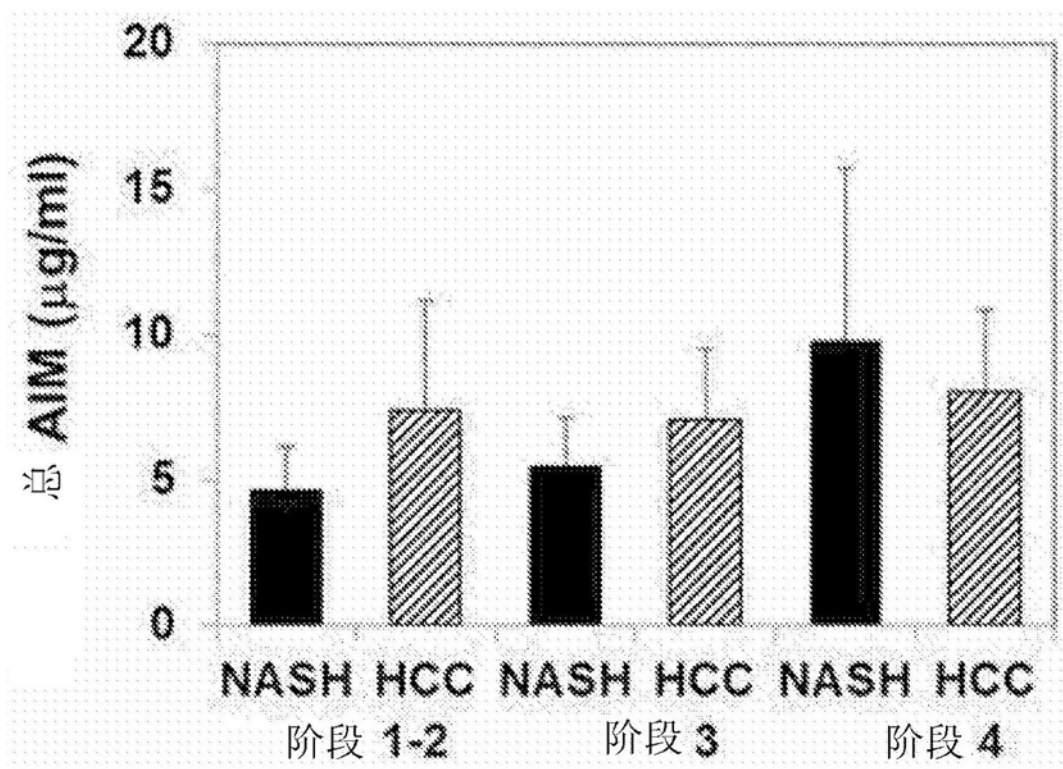


图4

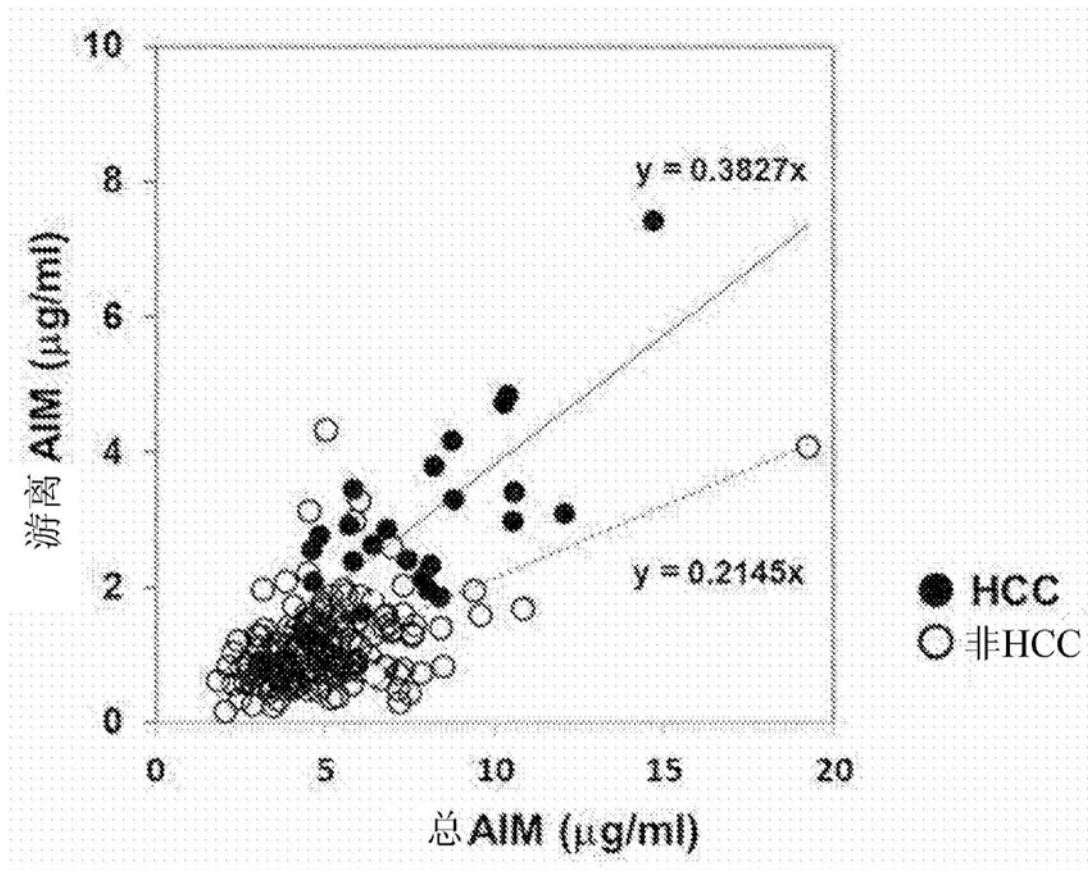


图5

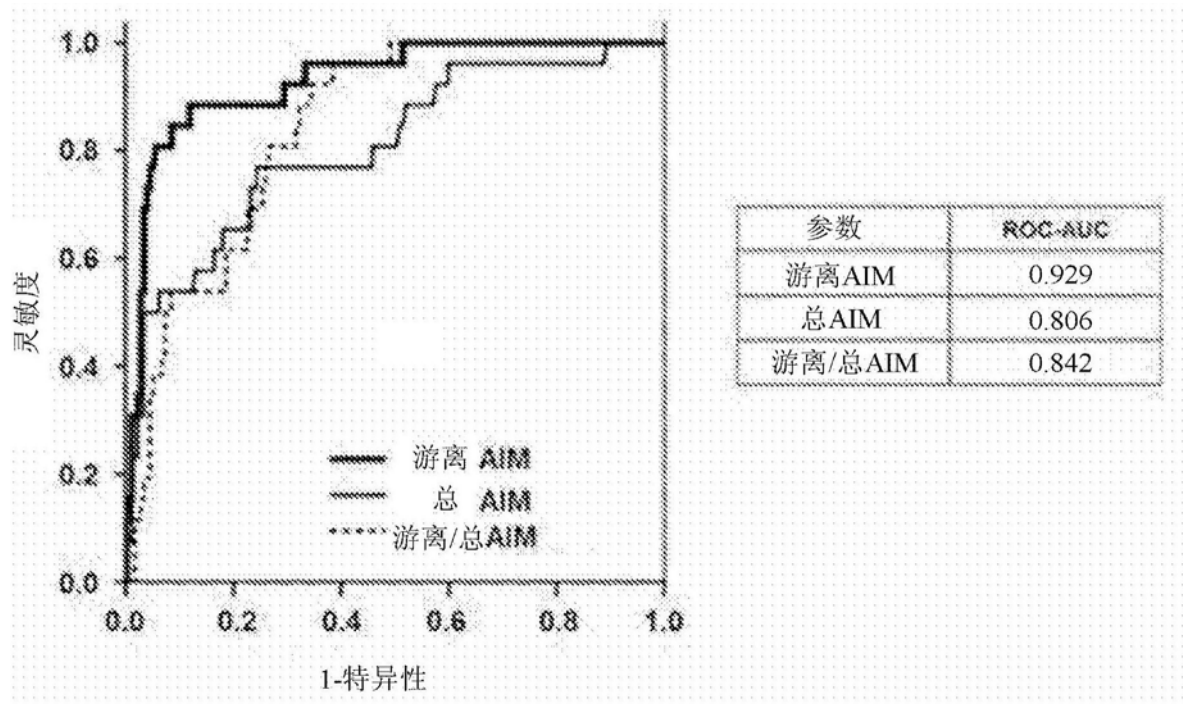


图6

专利名称(译)	肝癌测试方法		
公开(公告)号	CN108351358A	公开(公告)日	2018-07-31
申请号	CN201680052566.6	申请日	2016-09-09
[标]申请(专利权)人(译)	积水医疗株式会社		
申请(专利权)人(译)	积水医疗株式会社 宫崎彻		
当前申请(专利权)人(译)	积水医疗株式会社 宫崎彻		
[标]发明人	宫崎彻 冈上武 小山则行		
发明人	宫崎彻 冈上武 小山则行		
IPC分类号	G01N33/574 C12Q1/02 G01N33/53 G01N33/68		
CPC分类号	C12Q1/02 G01N33/57438		
代理人(译)	郑斌		
优先权	2015178402 2015-09-10 JP		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

为了提供：具有优异的灵敏度和特异性的用于测试肝癌的方法或用于辅助诊断肝癌的方法；以及可用于每种所述方法的试剂盒。提供了：用于测试肝癌的方法或用于辅助诊断肝癌的方法，其包括对从对象收集的生物样品中的游离AIM进行检测或定量的步骤；以及用于测试肝癌或用于辅助诊断肝癌的试剂盒，其包含能够与游离AIM结合的抗体。

