



(12) **PATENT**

(19) **NO**

(11) **329725**

(13) **B1**

NORGE

(51) **Int Cl.**

G01N 33/574 (2006.01)

G01N 33/573 (2006.01)

Patentstyret

(21)	Søknadsnr	20014869	(86)	Int.inng.dag og søknadsnr	2000.04.10 PCT/DK2000/00170
(22)	Inng.dag	2001.10.05	(85)	Videreføringsdag	2001.10.05
(24)	Løpedag	2000.04.10	(30)	Prioritet	1999.04.09, DK, 476/99
(41)	Alm.tilgj	2001.12.04			
(45)	Meddelt	2010.12.06			
(73)	Innehaver	HS Rigshospitalet, Blegdamsvej 9, DK-2100 KØBENHAVN Ø, Danmark			
(72)	Oppfinner	Mads Holten-Andersen, København, Danmark Ross W Stephens, Braddon, ACT, Australia Hans Jørgen Nielsen, Lyngby, Danmark Jarle Christensen Ib, Hillerød, Danmark Nils Brünnner, Hellerup, Danmark			
(74)	Fullmektig	Plougmann & Vingtoft, Postboks 1003 Sentrum, 0104 OSLO, Norge			
(54)	Benevnelse	Fremgangsmåte for bestemmelse av kolorektalkreft eller metastatisk brystkreft basert på bestemmelse av konsentrasjonenTIMP-1 i plasmaprøver			
(56)	Anførte publikasjoner	S. Narou et al, "Serum levels of a tissue inhibitor of metalloproteinases-1 (TIMP-1) in bladder cancer patients.", Int. J. Urol., vol. 1, nr. 3, 1994, s. 228-231, US 5324634 A, WO 97/38314 A1, JP 08-136548 A			
(57)	Sammendrag				

Foreliggende oppfinnelse beskriver en fremgangsmåte for å bestemme hvorvidt et individ lider av kreft ved å bestemme en parameter som representerer TIMP-I-konsentrasjonen i kroppsvæskeprøver fra individet.

Foreliggende oppfinnelse omhandler en fremgangsmåte som kan benyttes for å screene store populasjoner for forekomsten av kolorektal kreft eller metastatisk brystkreft som angitt i henholdsvis krav 1 og krav 12. Fremgangsmåten er basert på målingen av vevsinhibitor av metallproteinaser 1 (TIMP-1) i plasmaprøver.

- 5 Oppfinnelsen tillater tidlig identifikasjon av pasienter som har kolorektal kreft. Fremgangsmåten er svært spesifikk, og pasienter med godartede tilstander, så som inflammatoriske tarmsykdommer, blir ikke detektert. Måling av en annen tilsvarende inhibitor, TIMP-2, viser ikke ekvivalent klinisk verdi, noe som indikerer et ytterligere nivå av spesifisitet for oppfinnelsen.
- 10 Testen er basert på målingen av vevsinhibitor av metallproteinaser type 1 (TIMP-1) i plasma. TIMP-1-konsentrasjoner kan bli bestemt enten som den totale TIMP-1-konsentrasjonen, den frie TIMP-1-konsentrasjonen, konsentrasjonen av komplekser mellom TIMP-1 og MMP'er og/eller forhold og fraksjoner derav,
- 15 heretter referert til som TIMP-1- nivåer. I henhold til oppfinnelsen kan individer med høy sannsynlighet for å ha kreft, for eksempel kolonkreft, bli identifisert ved forhøyede TIMP-1-nivåer i en plasmaprøve, mens individer med lave TIMP-1-nivåer sannsynligvis ikke lider av kreft, for eksempel kolonkreft. Således kan oppfinnelsen bli benyttet for å identifisere individer med en høy sannsynlighet for
- 20 å ha tidlig fase, ikke-symptomatisk kreft, for eksempel kolonkreft. De identifiserte individene bør bli ytterligere studert, og dersom kreft blir funnet, bør pasientene bli tilbudt kirurgi, stråling og/eller adjuvans anti-neoplastisk terapi, for derved å øke sjansen for å kurere kreft hos individet.
- 25 Kolorektal kreft er den fjerde mest vanlige kreftformen i den vestlige verden, med omkring 130000 nye tilfeller årlig i USA. 40-50 % av alle pasienter med kolorektal kreft vil bli diagnostisert med tidlig fase sykdom (Dukes' fase A eller B). De fleste av disse pasientene med tidlig fase kolorektal kreft kan bli kurert ved kirurgi alene. Således er risikoen for tilbakekomst nært relatert til fasen på sykdommen
- 30 ved tidspunktet for primær kirurgi, med omkring en 10 % tilbakefallsfrekvens i Dukes' fase A og 25-30 % i Dukes' fase B. Pasienter med Dukes' fase C kolorektal kreft har en fem års tilbakefallsfrekvens på 70 % etter kirurgi, og blir tilbudt adjuvanskjemoterapi. Etter tilbakefall er risikoen for å dø av sykdommen signifikant. Således er en måte å forbedre overlevelse på å øke antallet pasienter
- 35 som blir diagnostisert med tidlig fase sykdom. Screening for kolorektal kreft har

blitt vist å øke overlevelse, imidlertid lider nåværende tester av en mangel på overholdelse, av lav sensitivitet og av behovet for strenge diettrestriksjoner. Således er det et behov for utviklingen av nye og forbedrede tester for tidlig deteksjon av kolorektal kreft.

5

Fordi metastatisk sykdom er hovedårsaken til kreftpasientens sykelighet og dødelighet, er molekyler som er involvert i reguleringen av tumorinvasjon og metastaser attraktive som potensielle diagnostiske/prognostiske mål. Det er godt etablert at proteolytiske enzymer produsert av kreftceller eller av celler i

- 10 tumorstroma, er involvert i ekstracellulær vevsdegradering, som fører til kreftcelleinvasjon og metastase. Et antall med enzymer har blitt assosiert med denne prosessen, der de mest nøye studerte er metallproteinaser, så som collagenaser og stromelysiner, og serinproteaser så som plasmin. Nylig har det blitt publisert data som indikerer at disse molekylerne, frie eller bundet i
- 15 komplekser, blir frigitt fra tumorvev og finner sin vei inn i sirkulasjonen.

Matriks metallproteinaser (MMP'er) spiller en avgjørende rolle i kreftvekst og spredning, og bidrar til den enzymatiske degraderingen av den ekstracellulære matriksen (Liotta et al., 1991; Stetler-Stevenson et al, 1993; MacDougall &

- 20 Matrisian, 1995). De naturlig forekommende inhibitorene av MMP'er, vevsinhibitorer av MMP'er (TIMP'er), danner tette 1:1 støkiometriske komplekser med de aktiverte formene av MMP'ene (Velgus et al, 1985; Kleiner et al, 1993), og inhiberer derved den katalytiske aktiviteten til disse enzymene (Stetler-Stevenson et al, 1996; Goldberg et al, 1992; Birkedal-Hansen et al, 1993). Mens
- 25 balansen mellom matriksdegraderingsegenskapene til MMP'er og den inhibitoriske effekten av TIMP'er er nøye regulert under normale fysiologiske betingelser (Matrisian, 1992; Thorgeirsson et al, 1993; Birkedal-Hansen et al, 1993), kan denne balansen bli forstyrret i ondartet vev.

- 30 Et antall av enzymkoblede immunoassayer for deteksjon av TIMP-1 (Kodama et al, 1989; Cooksley et al, 1990; Clark et al, 1991) og TIMP-2 (Fujimoto et al, 1993) har blitt beskrevet. Disse assayene har blitt anvendt på kroppsvæsker, for eksempel serum, plasma, amnionvæske, cerebrospinalvæske, urin, men antallet med prøver som er testet har ikke vært tilstrekkelig til å etablere normalområder
- 35 for TIMP-nivåer i friske individer (Kodama et al, 1989; Clark et al, 1991). Videre

har ingen av disse assayene blitt tilstrekkelig validert for teknisk utførelse eller for klinisk anvendelse.

I en studie av Mimori et al (Mimori et al, 1997), der tumorvevsnivåer av TIMP-1 mRNA ble studert i pasienter med gastrisk karsinom, ble høye tumor/normalvevsforhold av TIMP-1 mRNA funnet å være assosiert med økt invasjon og dårlig prognose. Imidlertid viste TIMP-1 proteinnivåer i serum fra prostatakreftpasienter og friske donorer (Baker et al, 1994) en høy grad av overlapp. På samme måte viste en separat studie av plasma fra prostatakreftpasienter og friske donorer ingen forskjell i TIMP-1-nivåer mellom de to gruppene (Jung et al, 1997).

Narou et al. 1994 beskriver måling av TIMP-1 i serum hos pasienter med blærekreft. I artikkelen vises det at TIMP-1-nivået i serum er høyere i pasienter med blærekreft enn i friske individer og at TIMP-1-nivået i serum er signifikant høyere i pasienter med metastaser enn i pasienter uten metastaser.

WO 97/38314 beskriver diagnose, prediksjon av tilbakefall eller monitorering hos pasienter med bl.a. tumorer i nervesystemet ved å kvantifisere MMP-9 og/eller TIMP. TIMP kan i den forbindelse være TIMP-1, TIMP-2, TIMP-3 eller TIMP-4.

JP 8136548 beskriver måling av TIMP-1 i urin til bestemmelse av bl.a. blærekreft, leverkreft eller nyrekreft. Metoden benytter et immunoassay med monoklonale antistoffer til bestemmelsen av TIMP-1.

Studier av TIMP-1 i kompleks med MMP-9 i plasma hos pasienter med lang kommet gastrointestinal og gynekologisk kreft (Zucker et al, 1995) viste signifikant høyere nivåer i blodprøver fra kreftpasienter med metastatisk sykdom sammenlignet med friske kontrollindivider, og at pasienter med høye nivåer av TIMP-1:MMP-9-kompleks hadde en kortere overlevelse (Zucker et al, 1995 og US 5 324 634). Imidlertid inkluderte denne studien ikke målinger av total eller fri TIMP-1, kun komplekset mellom TIMP-1 og en av de opp til nå omkring 24 identifiserte MMP'ene. Videre ble det i denne studien ikke funnet forskjeller i kompleksnivåer mellom pasienter med brystkreft og friske donorer. Dette studiet inkluderte heller ikke pasienter med kreft i tidlig fase.

I et antall av krefttyper er det et kritisk og umøtt behov for svært sensitive og spesifikke markører for å screene store populasjoner for nærværet av ondartet sykdom. Slike markører bør være i stand til å identifisere individer med en høy sannsynlighet for tidlig fase kreft. Disse individene bør bli ytterligere undersøkt, og dersom kreft blir funnet, deretter bli tilbudt kirurgi, stråling eller adjuvans anti-neoplastisk terapi.

Siden proteinaser og deres reseptorer og inhibitorer synes å spille en avgjørende rolle i balansemekanismene som fører til kreftinvasjon, kan disse molekylerne bli uttrykt på et svært tidlig tidspunkt i den karsinogene prosessen. Ettersom mange av disse molekylerne utøver sin biologiske virkning ekstracellulært, kan de være tilstede i forhøyede nivåer i kroppsvæsker, selv i pasienter med tidlig fase invasiv ondartet sykdom. Videre, siden disse molekylerne er involvert i de mer grunnleggende trekkene ved ondartet progresjon, for eksempel invasjon og metastase, bør det undersøkes hvorvidt hvilke former for kreft det er som viser en økning i disse molekylerne.

Foreliggende oppfinnelse omhandler en fremgangsmåte for å hjelpe til i diagnostiseringen av kolorektal kreft i en pasient, nevnte fremgangsmåte omfatter å bestemme mengden av totale, kompleksbundede og/eller frie TIMP-1-nivåer og forhold og fraksjoner derav i plasmaprøver.

Et aspekt ved den foreliggende oppfinnelse omhandler en fremgangsmåte for å bestemme hvorvidt det er sannsynlig at et individ har kolorektal kreft eller metastatisk brystkreft, fremgangsmåten omfatter å bestemme en første parameter som representerer konsentrasjonen av TIMP-1 i plasmaprøver, og å indikere individet til å ha en høy sannsynlighet for å ha kreft dersom parameteren er ved eller over en diskriminerende verdi, og å indikere individet til lite sannsynlig å ha kreft dersom parameteren ikke er ved eller over den diskriminerende verdien.

30

Parameteren som representerer konsentrasjon av TIMP-1 kan være konsentrasjonen som er passende for TIMP-1. TIMP-1 eksisterer både i fri form og i form av komplekser med metallproteinaser, og det har blitt funnet at en viktig parameter er den totale konsentrasjonen av TIMP-1, det vil si summen av TIMP-1 i fri form og TIMP-1 i kompleksform. Det vil bli forstått at andre uttrykk enn den

35

passende konsentrasjonen kan representere konsentrasjonen, som for eksempel konsentrasjonen multiplisert med en faktor, osv. osv., og at slike andre representasjoner kan bli benyttet like godt for formålet med den foreliggende oppfinnelsen, gitt at de korresponderende justeringene blir gjort.

5

Den diskriminerende verdien er en verdi som er blitt bestemt ved å måle parameteren i både en frisk kontrollpopulasjon og en populasjon med kjent kreft, for derved å bestemme den diskriminerende verdien som identifiserer kreftpopulasjonen med enten en forutbestemt spesifisitet eller en forutbestemt sensitivitet, basert på en analyse av forholdet mellom parameterverdiene og de kjente kliniske dataene til den friske kontrollpopulasjonen og kreftpasientpopulasjonen, slik som det er åpenbart fra den detaljerte beskrivelsen i eksemplene heri. Den diskriminerende verdien bestemt på denne måten er gyldig for det samme eksperimentoppsettet i fremtidige individtester.

15

Spesifisitet er definert som andelen av positiver (det vil si individer som har en parameter som representerer konsentrasjonen av TIMP-1 i plasmaprøver høyere enn et predefinert diagnostisk nivå) som blir korrekt identifisert ved den beskrevne fremgangsmåten i henhold til oppfinnelsen. Sensitivitet er definert som andelen med negativer (det vil si individer som har en parameter som representerer konsentrasjonen av TIMP-1 i plasmaprøver som er lavere enn et predefinert diagnostisk nivå) som blir korrekt identifisert ved den beskrevne fremgangsmåten.

25 Således vedrører foreliggende oppfinnelse en fremgangsmåte for å bestemme hvorvidt et individ sannsynligvis har kolorektal kreft, kjennetegnet ved at fremgangsmåten omfatter å bestemme en første parameter som representerer enten

- a) den totale konsentrasjonen av TIMP-1 i plasmaprøver, eller
 - 30 b) kombinasjonen av konsentrasjonen av total TIMP-1 med konsentrasjonen av fri TIMP-1 i plasmaprøver,
- og som indikerer at det er stor sannsynlighet for at individet har kolorektal kreft dersom parameteren er ved eller over en diskriminerende verdi, og som indikerer at det er lite sannsynlig at individet har kolorektal kreft dersom parameteren ikke
- 35 er ved eller over den diskriminerende verdien, nevnte diskriminerende verdi blir

bestemt ved å måle nevnte i det minste ene første parameter i både en frisk kontrollpopulasjon og en populasjon med kjent kolorektal kreft, og derved bestemme den diskriminerende verdien som identifiserer kreftpopulasjonen med en forutbestemt spesifisitet eller en forutbestemt sensitivitet.

5

I et annet aspekt vedrører foreliggende oppfinnelse en fremgangsmåte for å bestemme hvorvidt det er sannsynlig at en pasient som har blitt behandlet for primær brystkreft har metastatisk brystkreft, kjennetegnet ved at den omfatter å bestemme en første parameter som representerer enten

- 10 a) den totale konsentrasjonen av TIMP-1 i plasmaprøver, eller
 b) kombinasjonen av total TIMP-1 med konsentrasjonen av fri TIMP-1 i plasmaprøver,

og som indikerer at det er stor sannsynlighet for at individet vil få metastatisk brystkreft dersom parameteren er ved eller over en diskriminerende verdi og som

- 15 indikerer at det er lite sannsynlig at individet har metastatisk brystkreft dersom parameteren ikke er ved eller over den diskriminerende verdien, nevnte diskriminerende verdi blir bestemt ved å måle nevnte i det minste en første parameter i både en frisk kontrollpopulasjon og en populasjon med kjent metastatisk brystkreft og derved bestemme den diskriminerende verdien som
 20 identifiserer kreftpopulasjonen med en forutbestemt spesifisitet eller en forutbestemt sensitivitet.

Oppfinnelsen kan benyttes både for et individ og for en hel populasjon.

- 25 I de spesifikke eksperimentelle oppsettene beskrevet heri, ble konsentrasjonsterskelen av total TIMP-1 nyttig som en diskriminerende verdi funnet å være i området fra 50-160 mikrogram/l av total TIMP-1 ved en spesifisitet på 90 %. Andre eksperimentelle oppsett og andre parametere vil resultere i andre verdier som kan bli bestemt i overensstemmelse med det som fremsettes heri.

30

Fremgangsmåten kan bli anvendt på en ikke-selektert populasjon, men mer passende på en populasjon som allerede er identifisert til å ha en økt risiko for å utvikle kreft, for eksempel individer med en genetisk disposisjon, individer som har vært eksponert for karsinogene substanser eller individer med kreft-

- 35 predisponerende ikke-ondartede sykdommer. I tilfellet med kolorektal kreft kan

populasjonen valgt for oppfinnelsen representere individer med en tidligere polypp, individer med Crohns sykdom eller ulcerøs kolitt, individer med en eller flere familiemedlemmer med kolorektal kreft eller individer med en tidligere reseksjon av tidlig kolorektal kreft.

5

Når et individ er blitt identifisert til å ha høye TIMP-1-nivåer i hans eller hennes plasma, bør individet bli foreskrevet for ytterligere undersøkelse. Dersom kreft blir funnet, kan pasienten bli tilbudt kirurgi, stråling eller adjuvans anti-neoplastisk terapi til hjelp for å kurere pasientens kreft.

10

Eksempel 1 beskriver fremstillingen og valideringen av et assay som måler total TIMP-1 med høy analytisk sensitivitet og spesifisitet. Det er beskrevet at friske bloddonorer har et svært smalt område med plasma total TIMP-1.

15 I eksempel 2 er dannelsen av et TIMP-1:MMP-9 ELISA beskrevet. Formatet, utførelsen og valideringen av dette assayet er lignende de for total TIMP-1, bortsett fra at et polyklonalt antistoff mot MMP-9 blir benyttet i fangingstrinnet. Ved å substituere MMP-9-antistoffet med et antistoff mot en annen MMP, kan komplekser mellom TIMP-1 og andre MMP'er bli kvantitert.

20

I eksempel 3 blir dannelsen av et TIMP-1-assay som kun måler fri TIMP-1 beskrevet. Dette assayet utnytter et monoklonalt anti-TIMP-1-antistoff (MAC 19) som bare gjenkjenner TIMP-1 i sin ikke-kompleksbundede form. Således vil dette assayet måle mengden av fri TIMP-1 i en prøve. Utføringen og valideringen av

25 dette assayet er lignende til assayet for total TIMP-1.

Ved å subtrahere den frie TIMP-1-konsentrasjonen fra den totale TIMP-1-konsentrasjonen i en biologisk prøve, kan konsentrasjonen av alle komplekse former av TIMP-1 bli bestemt. Det bør understrekes at TIMP-1 kan danne

30 komplekser med mange av MMP'ene, og derfor vil det å subtrahere en type av kompleks fra den totale mengden med TIMP-1 bare tilveiebringe informasjon om den fraksjonen av TIMP-1 som ikke er i kompleks med denne spesifikke MMP'en.

I eksempel 4 er det vist at pasienter som lider av kolorektal kreft har signifikant
35 forhøyede TIMP-1-nivåer i sine preoperative plasmaprøver. Et persentilplott av de

totale TIMP-1-nivåene i plasma fra alle pasienter med kolorektal kreft og fra de friske bloddonorene, viste at en total TIMP-1-konsentrasjon på 119,1 µg/l er 90-centilen til de friske donorene. Ved å benytte denne avkuttingen ble 68 % av pasientene med kolorektal kreft identifisert til å ha forhøyede plasma-TIMP-1-nivåer. Da kolonkreftpasientene ble analysert separat, ble det vist at de totale TIMP-1-målingene i plasma identifiserte 75 % av kolonkreftpasientene (diagnostisk sensitivitet) med en 90 % diagnostisk spesifisitet (10 % av de friske bloddonorene ble klassifisert til å være høye). På samme måte ble det vist for de rektale kreftpasientene alene at totale TIMP-1-målinger i plasma identifiserte 60 % av de rektale kreftpasientene med en 90 % diagnostisk spesifisitet. Dersom en høyere eller lavere sensitivitet eller spesifisitet er ønsket, kan avkuttingsverdien bli endret. Dette er illustrert i figur 13 som viser ROC-kurver for total TIMP-1 i plasma fra pasienter med kolorektal kreft. I tillegg er det inkludert ROC-kurver for de individuelle gruppene av pasienter med kolon- og rektalkreft. Enhver annen informasjon som kan bli avledet fra disse ROC-kurvene faller innenfor omfanget til den foreliggende oppfinnelsen.

En uavhengig prospektiv studie som inkluderer preoperative plasmaprøver fra 64 pasienter med kolonkreft (n = 43) eller rektalkreft (n = 21) bekreftet dataene som ble oppnådd i den ovennevnte beskrevne studien (figur 15). En ytterligere studie av 180 friske bloddonorer og 20 pasienter med kolorektal kreft, som benyttet forskjellige antistoffer (anti TIMP-1 11 E/C6, anti-TIMP-1 RRU-T6) i et automatisert immunoassay, understøttet ytterligere de tidligere kliniske resultatene. Videre viste de absolutte verdiene generert fra det automatiserte assayet en høy grad av korrelasjon til de som ble oppnådd ved assayet beskrevet i eksempel 1 ($r = 0,9$).

Den kliniske verdien av en markør for kreftscreening er relatert til dens evne til å detektere tidlige faser av sykdom, som muligens impliserer overlevelse. Det ble vist at total TIMP-1 var en like effektiv screeningsmarkør i tidlig fase kolorektal kreft (Dukes faser A og B) som den var i den totale populasjonen av pasienter med kolorektal kreft (figur 14). Således vil screening med total TIMP-1 resultere i at flere pasienter blir diagnostisert med tidlig fase kreft. På en lignende måte vil enhver informasjon som kan bli avledet fra figur 14 falle innenfor omfanget til den foreliggende oppfinnelsen.

Ved å dele pasientene med kolorektal kreft i to grupper, pasienter med henholdsvis venstresidige og høyresidige tumorer, ble det åpenbart at måling av total TIMP-1 var spesielt nyttig for å identifisere de pasientene med tidlig fase, høyresidig kolonkreftskader (figur 14).

Spesifisiteten av en gitt kreftscreeningstest er basert på effektiviteten av testen til å identifisere kun de pasientene som lider av kreft, mens pasienter som lider av godartede sykdommer ikke bør bli identifisert som falske positive subjekter. I tilfellet med kolorektal kreft er det viktig at testen det er snakk om kan skille mellom ondartede og godartede sykdommer i kolon og rektalt. Dette er spesielt viktig for sykdommer som Crohns sykdom og ulcerøs kolitt, siden pasienter med disse sykdommene har høyere risiko for å utvikle kreft.

I eksempel 5 er det vist at totale TIMP-1-nivåer er signifikant høyere i pasienter med kolorektal kreft enn i pasienter med inflammatoriske tarmsykdommer (IBD), noe som viser at total TIMP-1 kan bli benyttet for å screene for kolorektal kreft i en populasjon av pasienter med IBD. At TIMP-1 ikke er økt i godartede sykdommer blir støttet av en nylig artikkel (Keyser et al, 1999), som viser at pasienter med revmatoid artritt ikke har økte plasma TIMP-1-nivåer. Videre, ved å sammenligne totale TIMP-1-nivåer blant pasienter med IBD (bortsett fra pasienter med klinisk vurdert akutt aktiv sykdom, $n = 4$) og friske bloddonorere, ble ingen signifikante forskjeller i totale plasma TIMP-1-nivåer funnet ($p = 0,56$), noe som viser at disse godartede sykdommene ikke gir falske positive testresultater.

25

I eksempel 6 blir den additive effekten av målingen av en ytterligere kolorektal kreftmarkør beskrevet. Carcino Embryonic Antigen (CEA) ble målt i alle kreftpasienter og friske bloddonorprøver. Ved å kombinere CEA og TIMP-1-nivåene målt ved assayet beskrevet i eksempel 1, ble det vist at mens CEA alene gir en 35 % sensitivitet ved en 98 % spesifisitet, økte sensitiviteten av kombinasjonen av CEA og total TIMP-1 bestemt ved logistikkregresjonsanalyse til 57 %, uten å ofre spesifisitet.

I eksempel 7 er det vist at pasienter som lider av kolorektal kreft har signifikant forhøyede frie TIMP-1-nivåer i sine preoperative plasmaprøver. Et persentilplott

som inkluderer de frie TIMP-1-nivåene fra pasientene med kolorektal kreft, så vel som frie TIMP-1-nivåer fra friske bloddonorer, viste at pasienter med kolorektal kreft hadde signifikant forhøyede frie TIMP-1-nivåer sammenlignet med blod-donorer $p = 0,02$. En ROC-kurve ble laget (figur 18) for disse pasientene og 5 donorer, og det ble sett at fri TIMP-1 ga et areal under kurven (AUC) på 0,61.

I eksempel 8 blir anvendelsen av TIMP-1:MMP-9-kompleksassayet som en hjelp for diagnostiseringen av kolorektal kreft beskrevet.

- 10 TIMP-1 er kjent for å eksistere enten som det frie molekylet, eller i kompleks med MMP'er, fortrinnsvis MMP-9. Å måle totalt TIMP-1, kompleksbundet TIMP-1 og fri TIMP-1 vil gjøre det mulig å validere hver av disse spesiene for sin potensielle diagnostiske verdi. I tillegg vil det være mulig å beregne forhold eller en hvilken som helst avledet algoritme mellom de ulike slagene som kan tilveiebringe 15 ytterligere diagnostisk verdi.

I eksempel 9 er den diagnostiske verdien av kombinasjonen av total og fri TIMP-1 beskrevet.

- 20 Dataene viser at ved å kombinere med logistikkregresjonsanalyse de frie TIMP-1-målingene med de totale TIMP-1-målingene, ble det demonstrert en signifikant økning i AUC. Enhver informasjon som kan bli avledet fra figur 18 faller innenfor omfanget til den foreliggende oppfinnelsen.
- 25 Spesifisiteten til en gitt kreftscreeningstest er basert på testens effektivitet til å identifisere kun de pasientene som lider av kreft, mens pasienter som lider av godartede sykdommer ikke bør identifiseres som falske positive. Imidlertid vil det være ønskelig at testen var spesifikk for en spesifikk krefttype, for eksempel kolonkreft, i stedet for å være en all-kreftmarkør.

30

- I eksempel 10 er de totale TIMP-1-verdiene i preoperative blodprøver fra en kohort gruppe på 322 pasienter med primær brystkreft (fase I og II) sammenlignet med de totale TIMP-1-nivåer i 108 friske bloddonorer, beskrevet. Det ble vist at brystpasientene hadde et midlere totalt TIMP-1-nivå på 88,3 $\mu\text{g/l}$, 35 mens de friske donorene hadde en midlere plasmakonsentrasjon av total TIMP-1

på 88,9 µg/l. Forskjellene mellom disse verdiene er ikke klinisk signifikant, noe som støtter spesifisiteten av TIMP-1-nivåer for diagnostiseringen av kolorektal kreft. Imidlertid bør det studeres hvorvidt forhøyede plasma TIMP-1-nivåer blir funnet i pasienter med tidlig fase ikke-kolorektal kreft.

5

I eksempel 11 er totale TIMP-1-nivåer i pasienter med metastatisk brystkreft beskrevet.

Det er verdt å merke seg at total TIMP-1 i plasma fra kvinner med metastatisk
10 brystkreft hadde en midlere verdi på 236 µg/l, signifikant høyere enn nivåer i friske bloddonorer. Dette viser potensialet for å benytte plasma TIMP-1-nivåer i behandlingen av brystkreftpasienter.

I eksempel 12 er konsentrasjonene av TIMP-2 i preoperative plasmaprøver fra
15 pasienter med kolorektal kreft beskrevet.

TIMP-2 er en annen vevsinhibitor av metallproteinase med en høy grad av homologi til TIMP-1. Ved å benytte et spesifikt immunoassay for TIMP-2 ble konsentrasjoner av denne inhibatoren bestemt i plasmaprøver fra pasienter med
20 kolorektal kreft og i friske bloddonorer. Ingen signifikante forskjeller i plasma TIMP-2-nivåer ble funnet mellom de to populasjonene, noe som støtter den unike verdien av TIMP-1 som en hjelp for den tidlige diagnostiseringen av kolorektal kreft.

25 FIGURTEKSTER

Figur 1: Kinetikkassay for TIMP-1. Utviklingskurver for endringen i absorbans ved 405 nm produsert ved hydrolyse av p-nitrofenylfosfat ved fast-fasebundet alkalinfosfatase immunkonjugat. Dataene som er vist er generert ved 4 individuelle
30 assaybrønner behandlet med 4 forskjellige konsentrasjoner av renset rekombinant TIMP-1; 10 µg/l (▽-▽), 2,5 µg/l (Δ-Δ), 0,63 µg/l (-) og 0,16 µg/l (O-O). Linjene som er vist har blitt tilpasset ved enkel lineær regresjon.

Figur 2: TIMP-1 standardkurve. Absorbansenheter for triplikat TIMP-1-standarder i
35 området fra 0 til 5 µg/l er samlet automatisk i løpet av 60 minutter, med

avlesninger gjort ved 405 nm hvert 10. minutt. Utviklingskurver er beregnet for hver brønn, og hastighetene oppnådd er tilpasset til en standardkurve ved å benytte en fireparameterlikning av formen $y = d + [(a-d)/(1+(x/c)^b)]$. I eksempelet som er vist hadde de fire avledede parametrene følgende verdier: a = 1,87, b = 1,11, c = 3,35, d = 73,5. Korrelasjonskoeffisienten for den tilpassede kurven er > 0,999.

Figur 3: Gjenvinning av signal fra standard TIMP-1 tilsatt i økende konsentrasjon til assayfortynningsbuffer (-), en 1:100 fortynning av EDTA plasmasammenslåing (Δ - Δ), en 1:100 fortynning av citrat plasmasammenslåing (∇ - ∇) og en 1:100 fortynning av heparin plasmasammenslåing (O-O). Verdiene som er vist er gjennomsnitt av triplikater. Korrelasjonskoeffisienten for hver tilpassede kurve er > 0,99.

Figur 4: Western blotting av immunabsorbert pasientplasma prøve. Rad 1: Standard TIMP-1; rad 2: Eluat av pasient citratplasma prøve fortynnet 1:100 og immunabsorbert med sau polyklont anti-TIMP-1. Bånd av ikke-reduerte standard TIMP-1 og TIMP-1 isolert fra plasma prøve åpenbares begge rett under 30 kDa.

20

Figur 5a: Persentilplott for nivået av TIMP-1 ($\mu\text{g/l}$) målt i citratplasma (O) og EDTA-plasma (Δ) fra det samme individet i et sett med 100 frivillige bloddonorere.

Figur 5b: Lineært regresjonsplott for nivået av TIMP-1 i citratplasma prøver sammenlignet med EDTA-plasma prøver fra de samme 100 individene. Likningen til den tilpassede linjen er $y = 0,93x$, med en regresjonskoeffisient på 0,99.

Figur 6: Persentilplott for nivåene av TIMP-1 ($\mu\text{g/l}$) målt i to sett med citratplasma prøver oppnådd ved den samme fremgangsmåten fra frivillige bloddonorere ved ulike tidspunkter. 100 prøver fra mai = 97 (Δ) og 94 prøver fra sept = 96 ().

Figur 7: Persentilplott for nivåene av TIMP-1 ($\mu\text{g/l}$) målt i 194 citratplasma prøver fra frivillige bloddonorere og lagdelt ved kjønn til 107 mannlige (Δ) og 87 kvinnelige (O).

Figur 8: Grafisk illustrasjon av TIMP-1:MMP-9-kompleks ELISA.

Figur 9: Grafisk illustrasjon av fri TIMP-1 ELISA.

5

Figur 10: En plate ble belagt med det polyklonale anti-MMP-9-antistoffet.

Forskjellige konsentrasjoner av TIMP-1:MMP-9-kompleks, fri MMP-9, fri TIMP-1 og en blank kontroll ble tilsatt. Bare TIMP-1:MMP-9-komplekser og fri MMP-9 ble bundet av det erobringpolyklonale (capture polyclonal) anti-MMP-9-antistoffet.

10 MAC19 ble deretter tilsatt for antigeneteksjon. Hverken TIMP-1:MMP-9-kompleks eller fri MMP-9 ble detektert ved MAC19, noe som definerer spesifisiteten til dette antistoffet for fri TIMP-1.

Figur 11: En plate ble belagt med det polyklonale anti-MMP-9-antistoffet.

15 Forskjellige konsentrasjoner av TIMP-1:MMP-9-kompleks, fri MMP-9, fri TIMP-1 og en blank kontroll ble tilsatt. Bare TIMP-1:MMP-9-komplekser og fri MMP-9 ble bundet av det erobringpolyklonale anti-MMP-9-antistoffet. MAC15 ble deretter tilsatt for antigeneteksjon. Bare TIMP-1:MMP-9-kompleks bundet av det erobringpolyklonale anti-MMP-9-antistoffet ble detektert ved MAC15. Fri MMP-9
20 ble ikke detektert ved MAC15.

Figur 12: Gjenvinning av signal i det frie TIMP-1-assayet fra standard TIMP-1

tilsatt i økende konsentrasjon til assayfortynningsbuffer (-), en fortynning av EDTA plasmasammenslåing (Δ - Δ), en fortynning av citratplasmasammenslåing (∇ - ∇) og en fortynning av heparinplasmasammenslåing (O-O). Verdiene som er vist er gjennomsnittene av triplikater. Korrelasjonskoeffisienten for hver tilpassede kurve er større enn 0,99.

Figur 13: ROC-kurver for total TIMP-1 i alle pasienter med kolorektal kreft, i
30 pasienter med rektal kreft separat og i pasienter med kolonkreft separat. Som friske kontrollsubjekter ble en gruppe på 108 friske bloddonorer benyttet. (Tall i parentes = Areal under kurven).

Figur 14: ROC-kurver for total TIMP-1 i alle kreftpasienter med kolorektal kreft
35 med Dukes A eller B-sykdom. I tillegg er kurver for Dukes A eller B-pasienter med

kolonkreft eller med høyresidig kolonkreft inkludert. (Tall i parentes = Areal under kurven).

Figur 15: ROC-kurve for total TIMP-1 fra et uavhengig sett av 64 pasienter med
5 kolorektal kreft sammenlignet med 108 friske bloddonorere er vist. (AUC = Areal under kurven).

Figur 16: Boksplott som viser totale TIMP-1-konsentrasjoner i plasma fra friske
bloddonorere, fra pasienter med Crohns sykdom, fra pasienter med ulkerativ kolitt
10 og fra pasienter med kolorektal kreft. Medianverdier, 10., 25., 75. og 90. centiller er vist.

Figur 17: ROC-kurver for total TIMP-1, CEA og for kombinasjonen av total TIMP-1
og CEA i pasienter med høyre kolonkreft og 108 friske bloddonorere. (Tall i
15 parentes = Areal under kurve).

Figur 18: ROC-kurver for plasmafri TIMP-1, for plasma total TIMP-1 og for
kombinasjonen herav i 64 CRC-pasienter og 108 donorer. (Tall i parentes = Areal
under kurve).

20

Figur 19: ROC-kurve for 322 primære brystkreftpasienter og 108 bloddonorere.
(AUC = Areal under kurve).

Figur 20: Persentilplott for nivået av total TIMP-1 ($\mu\text{g/l}$) målt ved ELISA i 19 EDTA
25 plasmaprøver fra kvinnelige pasienter med brystkreft (O) og 87 friske bloddonorere (Δ).

EKSEMPLER

30 Eksempel 1

Fremstilling av et ELISA for å kvantifisere totale TIMP-1-konsentrasjoner i human plasma.

Dette eksempelet beskriver fremstillingen og valideringen av et ELISA som måler totale TIMP-1-nivåer i plasma. I tillegg tilveiebringer dette eksempelet informasjon om TIMP-1-nivåer i ulike plasmaprepareringer, så vel som i friske bloddonorer av begge kjønn.

5

Blodprøver ble initielt oppnådd fra 94 tilsynelatende friske frivillige bloddonorer, og omfattet 51 menn i alderen 19 til 59 år (middelverdi: 41 år) og 43 kvinner i alderen 20 til 64 år (middelverdi: 36 år). I en påfølgende innsamling, ble 100 blodprøver oppnådd, som omfattet 56 menn i alderen 19 til 59 år (middelverdi: 10 42 år) og 44 kvinner i alderen 20 til 60 år (middelverdi: 46,5 år). Informert samtykke ble oppnådd fra alle donorer og tillatelse ble oppnådd fra de lokale etiske komiteer.

Perifert blod ble hentet med minimumsstaser (dersom nødvendig var et 15 maksimum på 2 min staser med en årepresse på maksimum +2 kPa akseptabelt) i forkjølt citrat-, EDTA- eller heparinsamlingsrør (Becton-Dickinson, Mountain View, CA), blandet 5 ganger ved inversjon og umiddelbart kjølt ned på is. Så snart som mulig (ikke senere enn 1,5 timer etter innsamling) ble plasma og blodceller separert ved sentrifugering ved 4 °C ved 1200 x g i 30 minutter, og lagret frosset 20 ved -80°C før assay. Plasmasammenslåinger ble gjort med nylig innsamlede prøver fra minst 10 donorer, porsjonert og lagret frosset ved -80 °C. For analyse ble prøvene raskt tint i et 37 °C vannbad og deretter plassert på is inntil behov.

Et sensitivt og spesifikt sandwich ELISA ble fremstilt ved å benytte TIMP-1- 25 antistoffer utviklet ved Strangeways Laboratories (Hembry et al, 1985). Et sau polyklonalt anti-TIMP-1-antiserum (Hembry et al, 1985; Murphy et al, 1991) ble benyttet for antigenetabling, og et murint monoklonalt anti-TIMP-1 IgG1 (MAC-15) (Cooksley et al, 1990) for antigeneteksjon. Et kanin anti-mus immunglobulin/alkalisk fosfatasekonjugat (katalog nummer D0314, Dako, 30 Glostrup, Danmark) var det sekundære deteksjonsreagenset. Dette sistnevnte konjugatet ble levert preabsorbert mot humant IgG, og eliminerte således kryssreaktivitet med IgG i plasmaprøvene. Ettersom det monoklonale deteksjonsantistoffet MAC-15 gjenkjenner både fri TIMP-1 og TIMP-1 i kompleks med MMP'er (Cooksley et al, 1990), ble det totale TIMP-1-innholdet erobret av 35 sau polyklonalt anti-TIMP-1-antiserum kvantifisert ved ELISA.

- 96 brønners mikrotiterplater (Maxisorp, Nunc, Roskilde, Danmark) ble belagt i 1 time ved 37 °C med 100 µl/brønn med polyklont anti-TIMP-1 (4 mg/l) i 0,1 mol/l karbonatbuffer, pH 9,5. Brønnene ble deretter renses to ganger med 200 µl/brønn med SuperBlockJ-løsning (Pierce Chemicals, Rockford, IL) fortynnet 1:1 med fosfatbufferet saltløsning (PBS). Mikrotiterplatene ble lagret i opp til 14 dager ved -20 °C. På analysedagen ble platene tint ved romtemperatur og vasket 5 ganger i PBS som inneholdt 1 g/l Tween.
- 10 En serie med rensede rekombinante humane TIMP-1-standarder ble benyttet for å kalibrere hver plate. Standarder ble fremstilt ved serielt å fortynne en stamløsning med renses TIMP-1. Standard konsentrasjoner var 10, 5, 2,5, 1,25, 0,625, 0,313 og 0,156 µg/l. Inkludert på hver plate var en blank som inneholdt kun prøvefortynningsbuffer, og to kontroller laget av en 1:100 fortynning av citratplasma-
- 15 sammenslåing. En kontroll ble tilsatt som den første prøven på platen og den andre kontrollen ble tilsatt som den siste. Alle plasmaprøvene ble fortynnet 1:100 i prøvebuffer som besto av 50 mol/l fosfat, pH 7,2, 0,1 mol/l NaCl, 10 g/l bovint serum albumin (Fraction V, Boehringer-Mannheim, Penzberg, Tyskland) og 1 g/l Tween 20. Et totalvolum på 100 µl/brønn av hver standard, blank, kontroll og
- 20 pasientprøve ble innkubert på platen i 1 time ved 30 °C. Alle standarder, blanker, kontroller og prøver ble kjørt i triplikat på hver plate for hvert assay. Etter primær innkubering ble brønnene vasket 5 ganger, deretter behandlet i 1 time ved 30°C med 100 µl/brønn med renses MAC-15 monoklont antistoff (0,5 mg/l) i prøvefortynningsbuffer. Etter ytterligere 5 vaskinger ble brønnene innkubert i 1 time
- 25 ved 30°C med 100 µl/brønn av kanin anti-muse immunglobuliner (Ig)/alkalisk fosfatasekonjugat fortynnet 1:2000 i prøvefortynningsbuffer. Etter 5 vaskinger med vaskeløsning og 3 vaskinger med destillert vann, ble 100 µl med frisk laget p-nitrofenylfosfat (Sigma, St. Louis, MO) substratløsning (1,7 g/l i 0,1 mol/l Tris.HCl, pH 9,5, 0,1 mol/l NaCl, 5 mmol/l MgCl₂) tilsatt til hver brønn. Platen ble
- 30 plassert i en Ceres 900J plateleser (Bio-Tek Instruments, Winnoski, VT) ved 23 °C med den gule fargeutviklingen automatisk monitorert. Avlesninger ble tatt ved 405 nm mot en luftblank hvert 10. minutt i 1 time. KinetiCalc II programvare ble benyttet for å analysere dataene ved å beregne hastigheten på fargedannelse for hver brønn (lineær regresjonsanalyse), som ga en 4-parameters tilpasset
- 35 standardkurve og å beregne TIMP-1-konsentrasjonen for hver plasmaprøve.

- Gjenvinning av TIMP-1-signal ble målt etter tilsetning av 1:100 fortynninger av citrat-, EDTA- eller heparinplasmasammenslåinger. Renset TIMP-1 ble tilsatt til plasmasammenslåinger for å gi sluttkonsentrasjoner i området fra 0 til 10 µg/l.
- 5 Gjenvinningen i hvert tilfelle ble beregnet fra stigningen på linjen som representerer TIMP-1-signal som en funksjon av konsentrasjon, der 100 % gjenvinning ble definert som stigningen oppnådd når TIMP-1 ble fortynnet i prøvefortynningsbuffer.
 - 10 Citratplasma fra en pasient med et høyt nivå av TIMP-1 i blodet (634 µg/l, bestemt ved ELISA), ble fortynnet 1:10 og tilsatt en protein A-Sepharose-kolonne preinnkubert med polyklonalt sau anti-TIMP-1. Etter 5 sykluser ble bundet protein eluert fra kolonnen og 50 µl av det resulterende eluatet kjørt på 12 % SDS gel-elektroforese (Ready Gel, Bio-Rad). En blanding av lavmolekylvekt-(Pharmacia)
 - 15 og høymolekylvektmarkører (Bio-Rad) og 50 µl med TIMP-1-standard (100 µg/l) i Laemmli prøvebuffer ble også kjørt på gelen. Proteiner ble overført elektroforetisk fra gelen på en polyvinylidendifluorid (PVDF) membran (Millipore). Membranen ble innkubert i 1 time ved romtemperatur med 1 % skummet melkepulver i TBS. Etter vasking ble membranen innkubert i 1 time ved romtemperatur med 20 ml
 - 20 MAC-15 (5 mg/l). Membranen ble deretter vasket og innkubert for en ytterligere time ved romtemperatur med 20 ml kanin anti-mus Ig/alkalisk fosfatasekonjugat fortynnet 1:1000. Til slutt ble membranen vasket og farge utviklet ved tilsetning av en fosfatsubstratløsning (NBT/BCIP).
 - 25 Resultater:
- Utvikling av farge i hver brønn utviklet seg som en lineær funksjon av tid for alle konsentrasjoner av total TIMP-1 i disse eksperimentene (figur 1), med korrelasjonskoeffisienter for de tilpassede linjene typisk større enn 0,99.
- 30 Standardkurven for hastighetene plottet mot TIMP-1-konsentrasjonen besto av de lineære og øvre kurvede regionene (over området fra 0 til 5 µg/l) av en sigmoid kurve, og korrelasjonskoeffisienten for 4-parametertilpasningen var typisk bedre enn 0,999 (figur 2). Hastigheten uten TIMP-1 (lest mot en luftblank) var $1,21 \pm 0,15$ (gjennomsnitt $\pm$ SD) milliabsorbansenheter/min ($n = 29$), mens hastigheten
 - 35 med 10 µg/l standard TIMP-1 var $50,3 \pm 6,01$ milliabsorbansenheter/min ($n =$

29). Deteksjonsgrensen for assayet, definert som konsentrasjonen av TIMP-1 som korresponderer til et signal 3 SD over gjennomsnittet for TIMP-1-blanken, var 0,089 µg/l. Denne verdien var 13 % av gjennomsnittet av de målte konsentrasjonene av TIMP-1 i friske citratplasmaprøver. Intraassaykoeffisienten for

5 variasjon (CV) for 16 replikater av en kontroll citratplasma sammenslåing var 5,3 %, og interassay CV for 29 suksessive assay av plasma sammenslåingen (kjørt på forskjellige dager) var 6,2 %. Denne plasma sammenslåingen hadde en TIMP-1-konsentrasjon på 57,8 µg/l, som korresponderer til den 22. centilen til normale individer.

10

Gjenvinning av rekombinant TIMP-1 etter fortynning i plasma. Spesifikk gjenvinning ble bestemt ved tilsetning av økende konsentrasjoner av rensset TIMP-1 til et panel med plasma sammenslåingsreplikater, etterfulgt av påfølgende målinger av signal. Gjenvinning var 104 % i citratplasma, 101 % i fortynnet EDTA-plasma

15 og 87 % i fortynnet heparinplasma (figur 3). Således var gjenvinning av TIMP-1-signal fra en intern standard akseptabel for alle plasma prepareringene.

Serielle fortynninger av citrat-, EDTA- og heparinplasma sammenslåinger ble utført for å teste for lineær reduksjon i TIMP-1-signal. Citrat-, EDTA- og heparinplasma

20 ga alle god linearitet av signal som en funksjon av fortynning. Den 1 % plasma-fortynningen som var valgt for påfølgende bestemmelser lå godt innenfor området for denne lineære fortynningskurven.

Et Western blot av en immunabsorbert pasientplasma prøve viste et klart bånd på

25 28 kDa (figur 4, rad 2), som korresponderer til fri, ikke-kompleksbundet TIMP-1 (figur 4, rad 1). Ingen bånd ble funnet ved de antatte høyere molekylvektene som korresponderer til komplekser mellom MMP'er og TIMP-1, for eksempel MMP-2:TIMP-1, 100 kDa. Dette indikerer enten at hoveddelen av TIMP-1 var tilstede i plasmaet i den frie formen, eller at komplekser var dissosiert i løpet av SDS-

30 PAGE. Selv om prøvene ble etterlatt både uredusert og uoppvarmet for å bevare eventuelle komplekser som var tilstede i plasma prøven, har det vært rapportert at MMP:TIMP-komplekser kan være ustabile i SDS-PAGE (Wilhelm et al, 1989; Stetler-Stevensen et al, 1989; Moll et al, 1990), selv under ikke-reduserende betingelser (Moutsidakis et al, 1992).

35

En samling av citrat- og EDTA-plasmaprøver tatt samtidig fra 100 friske donorer var tilgjengelige for dette studiet. Disse prøvene var ikke spesifikt samlet som plasma med lite blodplater. Et lite, representativt antall med prøver, fremstilt som plasma med lite blodplater, skilte seg imidlertid ikke signifikant i totale TIMP-1-verdier. Persentilplottene for totale TIMP-1-nivåer i disse prøvene er vist i figur 5a. Verdiene i hvert sett var tilnærmet en normal distribusjon. Citratplasma TIMP-1-nivåer varierte mellom 55,0 og 90,3 $\mu\text{g/l}$ (10. til 90. persentil) med et gjennomsnitt på $69,2 \pm 13,1 \mu\text{g/l}$. På samme måte varierte EDTA-plasma TIMP-1-nivåer fra 58,0 til 91,8 $\mu\text{g/l}$, med et gjennomsnitt på $73,5 \pm 14,2 \mu\text{g/l}$. For både citrat- og EDTA-plasma var gjennomsnittlige TIMP-1-nivåer svært nær middelverdiene (tabell 1). En parret gjennomsnittssammenligning viste at nivået av TIMP-1 i citratplasma var signifikant lavere ved 4,34 $\mu\text{g/l}$ (95 % CI 2,34-6,33; ($p < 0,0001$)) enn EDTA-plasmanivået for det samme individet. Imidlertid er det sannsynlig at denne forskjellen kan skyldes variabiliteten i prøvesamlingsprosedyren i løpet av plasmainnsamling. EDTA-plasmarør inneholdt tørt anti-coagulerende materiale mens citratplasmarør inneholdt en liten mengde av flytende citratbuffer som ga en liten og variabel systematisk fortynningsfeil ($\times 9/10$). Nivået av TIMP-1 i citratplasma korrelerte med det i EDTA-plasma for de samme individene. Det lineære regresjonsplottet i figur 5b viser en regresjonskoeffisient på 0,99 med en stigning på den tilpassede linjen på 0,93, som muligens illustrerer denne lille fortynningsfeilen. En ikke-parametrisk Spearmans rank-test for datasettet ga en rho-verdi på 0,62 og $p < 0,0001$.

Totalt ble 194 citratplasmaprøver fra friske bloddonorer studert, som omfattet 94 prøver tatt i løpet av en innsamling og 100 prøver tatt 9 måneder senere fra et annet sett med donorer. Figur 6 viser persentilplottene for TIMP-1-nivåer målt i disse to uavhengige gruppene. Referanseområdet for TIMP-1-nivåer i citratplasma fra den første innsamlingen var 53,3 til 77,7 $\mu\text{g/l}$ (10. til 90. persentil) med et gjennomsnitt på $65,4 \pm 10,1 \mu\text{g/l}$, som ikke var mulig å skille fra gjennomsnittet (tabell 1), og som nærmet seg en normal distribusjon. Gjennomsnittlig TIMP-1-nivå for den andre innsamlingen var $69,2 \pm 13,1 \mu\text{g/l}$ (referanseområde 55,0 til 90,3 $\mu\text{g/l}$). En uparret gjennomsnittssammenligning viste at TIMP-1-nivåer i de to settene med prøver tatt i løpet av to forskjellige perioder var forskjellige kun med 3,82 $\mu\text{g/l}$ (95 % CI: 0,50-7,14 $\mu\text{g/l}$; $p = 0,024$). Videre var ingen signifikant forskjell åpenbar mellom kontrollene ($n = 8$) inkludert i hvert sett med assay

(gjennomsnittlig differanse 0,36 µg/l; 95 % CI: 1,71-2,44 µg/l; $p = 0,69$). Det gjennomsnittlige TIMP-1-nivået for alle de 194 citratplasmaprøvene var $67,3 \pm 11,8$ µg/l, nær middelerdien på 66,1 µg/l, med nivåer som igjen nærmet seg en normal distribusjon (referanseområde 54,0 til 82,7 µg/l).

5

TABELL 1:

SAMMENDRAG AV TOTALE TIMP-1-NIVÅER BESTEMT I BLOD FRA FRISKE
DONORER:

10

Blodfraksjon	Dato for prøve- innsamling	Antall prøver	Gjennomsnitt ± SD (µg/l)	Media (µg/l)	Referanseområde* (µg/l)
Citratplasma	September 96	94	$65,4 \pm 10,1$	65,6	53,3-77,7
Citratplasma	Mai 97	100**	$69,2 \pm 13,1$	67,0	55,0-90,3
Citratplasma	96+97	194	$67,3 \pm 11,8$	66,1	54,0-82,7
EDTA-plasma	Mai 97	100**	$73,5 \pm 14,2$	71,2	58,0-91,8

*Referanseområdet er definert som 10. til 90. persentil.

**Disse prøvene ble samlet fra de samme donorene.

I disse studiene (tester for korrelasjoner til kjønn og alder hos donor) hadde
15 kontrollverdiene som ble målt i hvert assay en CV på 2,7 %. Persentiler for TIMP-1-nivåer i 194 citratplasmaprøver beregnet i henhold til kjønn er vist i figur 7. Gjennomsnitts TIMP-1-verdien for 107 mannlige donorer var $70,4 \pm 12,0$ µg/l (middelerdi 69,4 µg/l) med et referanseområde fra 56,2 til 86,6 µg/l, mens den gjennomsnittlige TIMP-1-verdien for 87 kvinnelige donorer i dette settet var $65,5 \pm 10,5$ µg/l (middelerdi: 62,0 µg/l) med referanseområdet fra 51,8 til 77,0 µg/l.
20 Det var en signifikant forskjell ($p < 0,0001$) i TIMP-1-gjennomsnittsnivåer mellom de to gruppene, der menn hadde høyere TIMP-1-nivåer enn kvinner. Det var en trend mot en økning i plasma TIMP-1 ved økende alder (Spearman's rho = 0,33, $P = 0,0011$), men dette økte ikke med kjønn (kvinner: Spearman's rho = 0,20, $P = 0,0006$; menn: Spearman's rho = 0,35, $P = 0,0003$). I EDTA-plasma var den
25 gjennomsnittlige TIMP-1-verdien for 56 menn $76,9 \pm 15,0$ µg/l (middelerdi: 75,1

µg/l) med et område fra 58,8 til 96,9 µg/l, mens 44 kvinnelige donorer hadde et gjennomsnittlig TIMP-1-nivå på $69,3 \pm 11,8$ µg/l (middelverdi: 67,9 µg/l) med et referanseområde fra 56,1 til 85,5 µg/l. Igjen ble det åpenbart en signifikant forskjell mellom menn og kvinner ($p = 0,0076$, uparret gjennomsnitts-

5 sammenligning).

Assayet beskrevet over muliggjør nøyaktig bestemmelse av total TIMP-1 i humane plasmaprøver. Kinetiske hastighetsassay av det bundede antigenet ble enkelt oppnådd, og tillot automatiser tilpasning av hastighetskurver, som hadde vist seg
10 vesentlig mer pålitelige enn enkle endepunktsmålinger. Anvendelsen av et raskt blokkerende agens og en fortynningsbuffer med høy bufringskapasitet bidro også til reproducerbare assayer. Inkorporering av alle disse elementene i det endelige assayet fullbyrdet kravene til sensitivitet, spesifisitet, stabilitet og god gjenvinning av en intern standard.

15

De kvantitative studiene i blod fra friske donorer viste at både citrat- og EDTA-plasmaprøver er egnede for TIMP-1-bestemmelse. Sammenlignet med andre publiserte studier av TIMP-1 fra friske donorer Pung et al, 1996; Jung et al, 1996), falt nivåene i det foreliggende studiet innenfor et svært lite område. Noen
20 studier har rapportert resultater i serum, men plasma var valgt for det foreliggende studiet for å unngå det variable bidraget til blodplateaktivering og de målte TIMP-1-verdiene (Cooper et al, 1985). Mens plasmaprøvene som ble benyttet i dette studiet ikke var spesifikt fremstilt som blodplatefattig plasma, ble det vist, basert på tester utført i laboratoriet, at dette ikke endrer verdiene.
25 Donormaterialet var stort nok til å vise at TIMP-1-nivåer i friske individer (både EDTA og citrat) nærmet seg en normal distribusjon, for kvinner så vel som for menn. Gjennomsnittlige TIMP-1-nivåer var omkring 10 % høyere i menn enn i kvinner for både EDTA- og citratplasma. En forklaring for dette er en høyere frigivelseshastighet for TIMP-1 inn i blodet fra aktiverte blodplater, noe som
30 reflekterer en tendens mot høyere forekomst av trombo-embolisk sykdom i den mannlige populasjonen. Når menn og kvinner ble vurdert separat, var det en svak korrelasjon mellom TIMP-1 og alder sett for hele populasjonen (se over).

Eksempel 2

35

Fremstilling av et ELISA for å kvantitere TIMP-1:MMP-9-komplekser i plasma.

Det følgende eksempelet beskriver et assay for å bestemme konsentrasjonen av TIMP-1:MMP-9-komplekser i kroppsvæsker. Assayet blir benyttet med

- 5 plasmaprøver fra friske bloddonorer for å etablere normale områder for dette komplekset (Holten Andersen et al., 1999).

- Et sensitivt og spesifikt sandwich ELISA ble fremstilt ved å benytte det ovennevnte beskrevne TIMP-1-antistoffet, MAC-15, og et kanin MMP-9 polyklont antistoff utviklet i Hematologisk Avdeling, Rigshospitalet, Danmark (Kjeldsen et al, 10 1992). MMP-9-antistoffet ble benyttet for antigenetekt og MAC-15 ble benyttet for antigenetekt. Et kanin anti-mus-Ig/alkalisk fosfatasekonjugat (Dako, Glostrup, Danmark) muliggjorde et kinetisk hastighetsassay (figur 8). Det sistnevnte konjugatet ble levert preabsorbert mot human IgG, og eliminerte således 15 kryssreaktivitet med IgG i plasmaprøvene. MMP-9-antistoffet erobret både fri MMP-9 og MMP-9 i kompleks med TIMP-1, mens MAC-15 bare gjenkjente TIMP-1. Derfor ble bare TIMP-1:MMP-9-kompleksene kvantifisert ved dette reagensparet.

- For å hindre spontan, ex vivo TIMP-1:MMP-kompleksdannelse i løpet av prøve- 20 samlingen og assayprosedyrer, ble en proteaseinhibitor (det vil si galardin, batimastat, marimastat) tilsatt til plasmaprøven etter tining. Tilsetningen av proteaseinhibitoren blokkerte in vitro kompleksdannelse ved inhibisjon av den katalytiske aktiviteten til metallproteinaser.

- 25 TIMP-1:MMP-9-assayet ble fremstilt og validert ved en metode lignende til den som er beskrevet over for det totale TIMP-1-assayet. TIMP-1:MMP-9-standarder ble fremstilt ved å innkubere ekvimolare mengder med rensset rekombinant TIMP-1 og MMP-9 (aktivert ved å tilsette APMA) i PBS i 1 time ved 37 °C.
- 30 I korthet ble 96 brønners mikrotiterplater belagt over natt ved 4 °C ved 100 µl/brønn av kanin polyklont anti-MMP-9 antiserum i 0,1 mol/l karbonatbuffer, pH 9,5. Før anvendelse ble assaybrønnene godt rensset to ganger med 200 µl/brønn med SuperBlock-løsning fortynnet 1:1 med fosfatbufferet saltløsning (PBS), og deretter vasket 5 ganger i PBS som inneholdt 1 g/l Tween 20. Brønner ble 35 deretter innkubert i 1 time ved 30 °C med 100 µl/brønn med plasma fortynnet i

prøvebuffer A serier med rensset TIMP-1:MMP-9-standarder ble benyttet for å kalibrere hver plate. Standarder ble fremstilt ved serielt å fortynne en stamløsning med rensset TIMP-1:MMP-9-kompleks. Inkludert på hver plate var en blank som inneholdt kun prøvefortynningsbuffer og 2 kontroller laget av en citratplasma-sammenslåing. En kontrollplasma-sammenslåing ble tilsatt som den første på 5 platen og den andre kontrollen ble tilsatt som den siste. Alle standarder, blanker, kontroller og prøver ble kjørt i triplikat på hver plate for hvert assay. Etter prøveinnkubering og TIMP-1:MMP-9 kompleksbinding, ble brønnene vasket 5 ganger, etterfulgt av behandling i 1 time ved 30 °C med 100 µl/brønn med MAC-10 15 i prøvefortynningsbuffer. Etter ytterligere 5 vasker ble brønnene innkubert i 1 time ved 30 °C med 100 µl/brønn med kanin anti-mus Ig/alkalisk fosfatase-konjugat fortynnet i prøvefortynningsbuffer. Etter 5 vaskinger med vaskeløsning og 3 ytterligere vaskinger med destillert vann, ble 100 µl med nylig laget p-nitrofenylfosfat substratløsning tilsatt i hver brønn. Platene ble plassert i en Ceres 15 900J plateleser ved 23°C med den gule fargeutviklingen monitorert automatisk avlesninger ble utført ved 405 nm mot en luftblank hvert 10. minutt i 1 time. KinetiCalc II programvare ble benyttet for å analysere dataene ved å beregne hastigheten til fargedannelse for hver brønn (lineær regresjonsanalyse), å generere en 4-parameters tilpasset standardkurve, og å beregne TIMP-1:MMP-9-20 konsentrasjonen for hver plasmaprøve.

Spesifikk gjenvinning ble bestemt ved tilsetning av TIMP-1:MMP-9-kompleks til en serie av citrat-, EDTA- eller heparinplasma-sammenslåinger. Gjenvinningen i hvert tilfelle ble beregnet fra stigningen på linjen som representerer TIMP-1:MMP-9-25 komplekssignalet som en funksjon av konsentrasjon, der 100 % gjenvinning ble definert som stigningen oppnådd når TIMP-1:MMP-9-komplekset var fortynnet i prøvefortynningsbufferen.

Utviklingen av farge i hver brønn var en lineær funksjon av tid for alle 30 konsentrasjonene av TIMP-1:MMP-9-komplekser målt i disse eksperimentene, med korrelasjonskoeffisienter for de automatisk tilpassede linjene typisk større enn 0,9. Korrelasjonskoeffisienten for 4-parameter-tilpasningen var typisk større enn 0,999.

Spesifikk gjenvinning ble bestemt gjennom tilsetning av økende konsentrasjoner av TIMP-1:MMP-9 til en plasmasammenslåing, og påfølgende måling av det spesifikke signalet.

- 5 Seriefortynninger med citrat- og EDTA-plasmasammenslåinger ble utført og kompleksnivåer kvantifisert for å bestemme lineariteten til assayet. Citrat- og EDTA-plasmaer ga alle god linearitet av signaler som en funksjon av fortynning.

Eksempel 3

10

Fremstilling av et ELISA for å kvantifisere frie TIMP-1-nivåer i plasma.

Det følgende eksempelet beskriver et assay som bestemmer konsentrasjonen av frie TIMP-1-nivåer i kroppsvæsker. Assayet blir anvendt på plasmaprøver fra

- 15 friske bloddonorer for å etablere normale områder for fri TIMP-1.

Et sensitivt og spesifikt sandwich immunoassay ble bremstilt ved å benytte et TIMP-1 monoklonalt IgG1 antistoff (MAC-19) utviklet ved Strangeways Laboratories, England (Cooksley et al, 1990) og et sauepolyklonalt anti-TIMP-1-

- 20 antistoff. Det sauepolyklonale anti-TIMP-1-antistoffet ble benyttet for antigen-erobring, og det murine monoklonale MAC-19 ble benyttet for antigendeteksjon. Et kanin anti-mus-Ig/alkalisk fosfatasekonjugat var det sekundære deteksjonsreagenset (figur 9). Det siste konjugatet ble levert preabsorbert mot humant IgG, og eliminerte dermed kryssreaktivitet med IgG i plasmaprøvene. Det MAC-19
- 25 monoklonale antistoffet er fullstendig spesifikt for fri TIMP-1 som derfor er den eneste formen som blir kvantifisert i dette assayet.

For å teste at MAC19 ikke reagerer med komplekser mellom TIMP-1 og MMP-9, ble kaninpolyklonalt anti-MMP-9-antistoff beskrevet i eksempel 2 benyttet for

- 30 antigenerobring, og det musemonoklonale antistoffet MAC19 for antigendeteksjon. Et kanin anti-mus-Ig/alkalisk fosfatasekonjugat ble benyttet som det sekundære merkede reagenset. Standard TIMP-1:MMP-9-kompleks, fri MMP-9, fri TIMP-1 og en blank kontroll ble studert. Figur 10 viser at TIMP-1:MMP-9-komplekser bundet av det polyklonale anti-MMP-9-antistoffet ikke blir detektert av MAC19. Et
- 35 tilsvarende eksperiment ble utført der MAC19 ble substituert med MAC15. Figur

11 viser resultatene av dette eksperimentet. Det kan ses at MAC15 detekterer TIMP-1:MMP-9 kompleksbundet av det polyklonale anti-MMP-9-antistoffet.

- For å hindre ex vivo-dannelse av TIMP-1:MMP-komplekser i løpet av prøve-
 5 samlingen og assayprosedyrene, ble en proteaseinhibitor (det vil si galardin, baltimastat, marimastat) tilsatt til plasmaprøven etter tining. Tilsetningen av proteaseinhibitoren hindret in vitro kompleksdannelse ved inhibisjon av den katalytiske aktiviteten av metallproteinase.
- 10 96 brønners mikrotiterplater ble belagt i 1 time ved 37 °C med 100 µl/brønn av polyklonalt sau anti-TIMP-1 (5 mg/l) i 0,1 mol/l karbonatbuffer, pH 9,5. Assaybrønnene ble deretter renses to ganger med 200 µl/brønn med SuperBlock-løsning fortynnet 1:1 med fosfatbufret saltløsning (PBS). Mikrotiterplatene ble lagret i opp til 14 dager ved -20 °C. På dagen de skulle brukes ble platene tint ved
 15 romtemperatur og vasket 5 ganger i PBS som inneholdt 1 g/l Tween 20. Brønnene ble deretter innkubert i 1 time ved 30 °C med 100 µl/brønn med triplikat 1:25 fortynninger av plasma laget i en prøvebuffer som besto av 50 mol/l fosfat, pH 7,2, 0,1 mol/l NaCl, 10 g/l bovint serum albumin (Fraction V, Boehringer-Mannheim, Penzberg, Tyskland) og 1 g/l Tween 20. Standarder ble fremstilt ved
 20 seriefortynning av en stamløsning med renses fri TIMP-1 for å gi konsentrasjoner på 10, 5, 2,5, 1,25, 0,625, 0,313 og 0,156 µg/l. Inkludert på hver plate var en blank som inneholdt kun prøvefortynningsbuffer og 2 kontroller laget av en citratplasmasammenslåing fortynnet 1:25. En kontrollplasmasammenslåing ble tilsatt som den første prøven på platen, og den andre kontrollen ble tilsatt som
 25 den siste. Alle standarder, blanker, kontroller og prøver ble kjørt i triplikat på hver plate for hvert assay. Etter TIMP-1-binding ble brønnene vasket 5 ganger, deretter behandlet i 1 time ved 30 °C med 100 µl/brønn med det rensede murine monoklonale anti-TIMP MAC-19 (0,5 mg/l) i prøvefortynningsbuffer. Etter ytterligere 5 vaskinger ble brønnene innkubert i 1 time ved 30 °C med 100
 30 µl/brønn med kanin anti-mus immunoglobulin/alkalisk fosfatasekonjugat fortynnet 1:2000 i prøvefortynningsbuffer. Etter 5 vaskinger med vaskeløsning og 3 vaskinger med destillert vann, ble 100 µl med nylig laget p-nitrofenylfosfat (Sigma, St. Louis, MO) substratløsning (1,7 g/l i 0,1 mol/l Tris.HCl, pH 9,5, 0,1 mol/l NaCl, 5 mmol/l MgCl₂) tilsatt til hver brønn, og platen ble plassert i en Ceres
 35 900J plateleser (Bio-Tek Instruments, Winooski, VT) ved 23 °C. Den gule farge-

utviklingen ble monitorert automatisk og avlesninger ble utført ved 405 nm mot en luftblank hvert 10. minutt i 1 time. KinetiCalc II programvare ble benyttet for å analysere dataene, for å beregne hastigheten på fargeforandringene for hver brønn (lineær regresjonsanalyse) og for å beregne en 4-parameters tilpasset standardkurve, som den frie TIMP-1-konsentrasjonen for hver plasmaprøve ble beregnet fra.

Disse eksperimentene ble utført i det vesentlige som beskrevet i eksempel 1, men ved å benytte MAC19 i stedet for MAC15 for deteksjon av fri TIMP-1 (som beskrevet over).

108 donorplasmaprøver ble oppnådd. Donorer ga blod på frivillig basis og var alle tilsynelatende friske. Informert samtykke ble oppnådd fra alle bloddonorene og tillatelse ble oppnådd fra den lokale etiske komiteen. Blodprøvetakingen og håndteringen ble utført som beskrevet i eksempel 1.

Utvikling av farge i hver brønn var en lineær funksjon av tid for alle konsentrasjonene av fri TIMP-1 målt i disse eksperimentene, med korrelasjonskoeffisienter for de automatisk tilpassede linjene typisk bedre enn 0,9.

20

Korrelasjonskoeffisienten for 4-parametertilpasningen var typisk bedre enn 0,999. Intra-assay-variasjonen for 24 triplikatmålinger av kontrollplasmasammenslåing var 9,6 %.

25 Spesifikk signalgjenvinning ble bestemt ved tilsetning av økende konsentrasjoner med rensset TIMP-1-standard til en plasmasammenslåing, og deretter måling av ELISA-signalet. I den fortynnede citratplasmasammenslåingen ble det oppnådd 105 % gjenvinning, mens 96 % gjenvinning ble oppnådd i den fortynnede EDTA-plasmasammenslåingen (figur 12).

30

Seriefortynninger av citrat- og EDTA-plasmasammenslåinger ble utført og frie TIMP-1-nivåer målt for å teste for lineær reduksjon i ELISA-signaler. Citrat- og EDTA-plasma ga alle god linearitet av signal som en funksjon av fortynning.

Fri TIMP-1 var målbar i alle plasmaprøvene. Midlere fri TIMP-1-konsentrasjon var 70,9 µg/l (område: 32,3-169,7 µg/l).

- 5 Dette assayet måler direkte plasmafrie TIMP-1-nivåer i plasma. Når man sammenligner frie TIMP-1-nivåer med totale TIMP-1-nivåer (sistnevnte målt med assay beskrevet i eksempel 1) i de 108 friske bloddonorene, ble det oppnådd en korrelasjonskoeffisient på 0,46 (Rho, Spearman Rank, $p < 0,0001$).

Eksempel 4

10

Diagnostisk verdi av total TIMP-1 i pasienter med kolorektal kreft.

- 15 Totale TIMP-1-nivåer i plasma fra 591 pasienter med kolorektal kreft (338 kolon og 253 rektal) og i plasma fra 108 alders- og kjønnsmessig tilpassede friske individer ble målt med TIMP-1-assayet beskrevet i eksempel 1. TIMP-1-verdiene ble analysert og sammenlignet ved å benytte standard biostatistiske parametere.

- 591 pasienter som undergikk valgfri kirurgi for patologisk bekreftet kolorektal kreft ble inkludert i studiet. Blodprøver ble oppnådd preoperativt med informert
- 20 samtykke fra alle pasienter i overensstemmelse med Helsinkideklarasjonen, og tillatelse ble gitt av den lokale etiske komite ved Hvidovre Hospital, Danmark. Alle pasienter hadde patologisk verifisert adenokarsinom i kolon og rektum. Det ble funnet at 59 (10 %) pasienter kunne bli klassifisert til å ha Dukes fase A-sykdom, 219 (37 %) pasienter med Dukes fase B, 170 (29 %) pasienter med Dukes fase C
- 25 og 143 (24 %) pasienter med Dukes fase D. 338 tumorer var kolonkreft og 253 var rektalkreft. Kliniske data så som alder, kjønn og overlevelse etter kirurgi ble samlet. Den midlere alderen til pasientene var 69 år (varierte fra 33 til 90 år) med 237 kvinner og 354 menn representert i pasientgruppen.
- 30 En annen pasientgruppe ble samlet prospektivt. Denne gruppen besto av 21 pasienter med rektalkreft og 43 pasienter med kolonkreft. Der var 11 pasienter med Dukes fase A, 27 med Dukes fase B, 14 med Dukes fase C og 13 med Dukes fase D-sykdom.
- 35 Den samme donorpopulasjonen som beskrevet i eksempel 3.

Blodprøver (5 ml) ble samlet preoperativt fra alle pasienter på dagen for kirurgi. For å sikre gyldige TIMP-1-målinger ble perifert blod tatt med minimumsstase og samlet i EDTA antikoaguleringsrør (Becton-Dickinson, Mountain View, CA) i

5 overensstemmelse med en tidligere beskrevet protokoll (eksempel 1).

TIMP-1-nivåer ble målt i EDTA-plasmaprøver ved å benytte assayet beskrevet i eksempel 1.

10 Ved å benytte et kinetisk hastighetsassay ble TIMP-1-nivåer bestemt i alle pasienter og friske donorplasmaprøver. Hver plasmaprøve hadde målbare nivåer av TIMP-1, med en midlere total TIMP-1-verdi for de 591 pasientene med kolorektal kreft på 141,1 µg/l (område 53,7-788,7 µg/l). Når gruppert i kolon- og rektalkreft, var middelerverdiene 158,6 µg/l (område: 53,7-788,7 µg/l) for kolon og

15 126,3 (område: 64,1-640,1 µg/l) for rektalkreft. Det var en statistisk signifikant forskjell i TIMP-1-nivåer når pasientmaterialet ble gruppert i henhold til Dukes fase, der Dukes A var den laveste og Dukes D den høyeste (Kruskal-Wallis-test, $P < 0,0001$). Imidlertid var de høyeste TIMP-1-nivåene ikke begrenset til langt-kommet sykdom, og ingen signifikant forskjell i totale plasma TIMP-1-nivåer ble

20 sett blant pasienter med Dukes A-C-sykdom. En relativt svak korrelasjon mellom plasma TIMP-1 og alder ble funnet ($r = 0,35$; $p < 0,0001$). Det var ingen signifikant forskjell i TIMP-1-nivåer mellom menn og kvinner ($p = 0,97$).

Det midlere TIMP-1-nivået i plasma fra friske donorer var 88,6 µg/l med et

25 område fra 51,0-156,2 µg/l. Det var en høy statistisk forskjell i de totale plasma TIMP-1-verdiene mellom pasientene med kolorektal kreft og de friske bloddonorene.

Den midlere TIMP-1-verdien for de 64 pasientene med kolorektal kreft var 138,2

30 µg/l (område: 80,7-790,6 µg/l). Gruppering av pasientene i kolon- og rektal kreft, de midlere totale TIMP-1-verdier var 152,2 µg/l (område: 80,7-626,2 µg/l) for kolon og 133,6 (område: 84,3-790,6 µg/l) for rektalkreft. Det var en høy statistisk forskjell i de totale plasma TIMP-1-verdiene mellom pasientene med kolon- og rektalkreft hver sammenlignet med friske bloddonorer.

- Ved å benytte de målte totale TIMP-1-nivåene i plasma fra friske donorer og de 591 pasientene med kolorektal kreft, ble det oppnådd Receiver Operation Characteristics (ROC) kurver for å evaluere den diagnostiske verdien av total TIMP-1. Som det kan ses i figur 13 var ROC-kurven bratt, noe som indikerer en
- 5 høy sensitivitet og spesifisitet for total TIMP-1 som en markør for kolorektal kreft. Det synes som om AUC er større for kolonkreft enn for rektalkreft. Figur 14 viser en lignende ROC-kurve som nå kun inkluderer pasienter med tidlig fase kolorektal kreft, det vil si Dukes fase A- eller B-sykdom. Også vist er ROC-kurven for tidlig fase (Dukes fase A og B) høyresidig kolonkreft.
- 10
- Ved å benytte de totale TIMP-1-nivåene i plasma fra friske donorer og i den andre gruppen av 64 pasienter med kolorektal kreft, ble ROC-kurver igjen konstruert for å bekrefte den diagnostiske verdien av TIMP-1. Som det kan ses i figur 15 var kurven initielt bratt, noe som indikerer en høy sensitivitet og spesifisitet for total
- 15 TIMP-1 som en markør for kolorektal kreft.
- En ytterligere studie på 180 friske bloddonorer og 20 pasienter med kolorektal kreft, ved å benytte forskjellige antistoffer (anti TIMP-1 11E/C6, anti-TIMP-1 RRU-T6) (disse to klonene som produserer antistoffer var deponert 10. april 2000 ved
- 20 ATTC) i et automatisert immunoassay, understøttet ytterligere de tidligere kliniske resultatene. Videre viste de absolutte verdiene generert fra det automatiserte assayet en høy grad av korrelasjon med de som ble oppnådd ved assayet beskrevet i eksempel i ($r = 0,9$).
- 25 Disse dataene tyder på at totale TIMP-1-målinger i plasma kan bli benyttet som en screeningsprosedyre som hjelp i å identifisere pasienter med en høy risiko for å ha kolorektal kreft. Spesielt var total TIMP-1 like effektiv i å identifisere pasienter med tidlig kreft (Dukes fase A+B) som til å identifisere pasienter med mer frem-
- skreden sykdom. Videre var total TIMP-1 til og med mer effektiv til å identifisere
- 30 pasienter med tidlig fase, høyresidig kolonkreft, en diagnose som er vanskelig med tradisjonelle diagnostiske prosedyrer. Høyresidig kolonkreft kan ikke bli visualisert ved fleksibel sigmoidoskopi, en standard kolonkreftscreenings-
- metodologi. Den har en mer lunefull start enn venstresidige skader, og kliniske symptomer utvikler seg kun i senfasesykdom. Tidlig diagnose av høyresidig
- 35 kolonkreft har potensiale til å redusere dødeligheten ved denne sykdommen.

Videre underbygger de mindre, prospektive forsøkende resultatene til det større retrospektive studiet, noe som ytterligere bekrefter den diagnostiske verdien av total TIMP-1 i pasienter som lider av kolorektal kreft.

5

Eksempel 5

Kvantifisering av total TIMP-1 i plasma fra pasienter med inflammatorisk tarmsykdom.

10

46 pasienter med IBD (inflammatorisk tarmsykdom) ble inkludert i studiet. 22 pasienter hadde ulcerøs kolitt og 24 pasienter hadde Crohns sykdom. De totale TIMP-1-nivåene i EDTA-plasma fra friske bloddonorere og pasienter med kolorektal kreft (eksemplene 3 og 4) ble inkludert for sammenligning.

15

Totalt TIMP-1-nivåer ble målt i EDTA-plasmaprøvene ved å benytte sandwich-assayet beskrevet i eksempel 1.

De målte totale TIMP-1-verdiene er vist i tabell 2.

20

Tabell 2.

	Ulcerøs kolitt	Crohns sykdom	IBD total
	n=22	n=24	n=46
Median total TIMP-1 (µg/l)	79,5	78,3	84,8
Område total TIMP-1 (µg/l)	54,9-189,9	49,0-156,2	38,7-154,5
	Friske bloddonorere	Kolorektal kreft	
	n=108	n=591	
Median total TIMP-1 (µg/l)	89,1	141	
Område total TIMP-1 (µg/l)	51,0-156,2	53,7-789	

Det var ingen signifikant forskjell når totale TIMP-1-verdier fra pasienter med IBD og friske bloddonorer ble sammenlignet (Mann-Whitney; $p = 0,45$). Det var en høy signifikant forskjell mellom totale plasma TIMP-1-nivåer mellom pasienter med IBD og de 591 pasientene med kolorektal kreft (Mann-Whitney; $p < 0,0001$).

5 En grafisk representasjon av disse resultatene er avtegnet i figur 16.

Disse resultatene viser at pasienter med kolorektal kreft har signifikant høyere totale TIMP-1-plasmanivåer enn pasienter med IBD. Videre hadde pasienter med IBD totale TIMP-1-nivåer ekvivalente til de som er funnet i friske bloddonorer, noe
10 som viser at plasma total TIMP-1 kan bli benyttet som en svært sensitiv og spesifikk markør for å skille mellom godartede og ondartede sykdommer i gastrointestinal traktus.

Eksempel 6

15

Diagnostisk verdi av total TIMP-1 i kombinasjon med CEA i pasienter med kolorektal kreft.

Total TIMP-1 i plasma fra 591 pasienter med kolorektal kreft (338 kolon og 253
20 rektal) og i plasma fra 108 alders- og kjønnsstilpassede friske individer ble målt ved å benytte TIMP-1-assayet beskrevet i eksempel 1. I tillegg ble CEA målt i de korresponderende pasientene og donorserumprøver ved å benytte et kommersielt tilgjengelig kjemiluminescerende CEA EIA-sett (Immulin CEA, DPC®, Los Angeles, California, USA). TIMP-1- og CEA-verdiene fra friske donorer og
25 kreftpasienter ble kombinert ved logistikkregresjonsanalyse og ROC-kurver ble generert.

Å beregne sensitiviteten og spesifisiteten til CEA i 591 pasienter med kolorektal kreft når man inkluderte de 108 friske donorene førte til en cut-off som tilveie-
30 brakte 98 % spesifisitet til en sensitivitet på 35 %. Når pasientene ble gruppert i kolon- eller rektalkreft, var sensitiviteten henholdsvis 37 % og 33 % med det samme nivået av spesifisitet. Ved kun å inkludere pasienter med høyresidig kolonkreft, er det vist i figur 17 at sensitiviteten økte til 45 %.

Når de totale TIMP-1-verdiene fra eksempel 4 blir inkludert sammen med CEA, ble sensitiviteten av markørkombinasjonen funnet ved logistikkregresjonsanalyse å være 52 %. Den ytterligere diagnostiske sensitiviteten oppnådd ved addisjonen av CEA-målinger i serum er svært signifikant ($p < 0,0001$). Når pasientene ble delt i 5 grupper på kolon- og rektalkreft, var sensitiviteten henholdsvis 61 % og 39 %, ved 98 % spesifisitetsnivå. Inkludert kun pasienter med høyresidig kolonkreft var sensitiviteten 74 %. En grafisk illustrasjon av disse resultatene fremgår av figur 17.

- 10 Disse dataene viser at ved å addere en ytterligere markør, kan det oppnås en forbedring i den diagnostiske sensitiviteten av total TIMP-1, mens man opprettholder en høy spesifisitet på 98 %. Således kan kombinasjonen av CEA og TIMP-1 være nyttig som en screeningsprosedyre for å identifisere pasienter med en høy risiko for å ha kolorektal kreft. Spesielt var denne kombinasjonen effektiv for å
- 15 identifisere pasienter med tidlig fase kreft (Dukes fase A+B). Denne kombinasjonen var også svært effektiv for å identifisere pasienter med tidlig fase, høyresidig kolonkreft.

Eksempel 7

20

Mangel på diagnostisk verdi av plasmafrie TIMP-1-verdier i pasienter med kolorektal kreft.

- Frie TIMP-1-nivåer i plasma fra 64 pasienter med kolorektal kreft (43 kolon og 21 rektal) og i plasma fra 108 alderstilpassede, friske individer ble målt ved å benytte TIMP-1-assayet beskrevet i eksempel 3. De frie TIMP-1-verdiene ble analysert og sammenlignet ved å benytte standard biostatistiske parametere.
- 25

- Ved å benytte kinetisk hastighets-ELISA som beskrevet i eksempel 3, ble frie TIMP-1-nivåer målt i alle pasienter og friske donorplasmaprøver. Alle prøver hadde målbare nivåer av TIMP-1, med en midlere fri TIMP-1-verdi på 82,0 µg/l (område: 44,7-424,0 µg/l) for pasientene med kolorektal kreft. Midlere fri TIMP-1-nivå i plasma fra friske donorer var 70,9 µg/l, med et område på 32,3-169,7 µg/l. Mens ingen signifikant forskjell i frie TIMP-1-nivåer ble funnet blant pasienter med
- 30
- 35 Dukes fase A-C-sykdom, hadde pasienter med Dukes fase D signifikant forhøyede

frie TIMP-1-nivåer sammenlignet med pasienter med Dukes fase A- og B-sykdom. Når man sammenlignet totale TIMP-1-verdier med frie TIMP-1-verdier i plasma fra disse 64 pasientene med kolorektal kreft, ble det funnet en korrelasjonskoeffisient på 0,91 (Rho, Spearman Rank, $p < 0,001$).

5

Figur 18 viser ROC-kurvene generert fra plasmamålingene av fri TIMP-1. AUC er 0,61 når man bestemmer den diagnostiske utførelsen av fri TIMP-1.

Disse dataene viser at fri TIMP-1 alene sannsynligvis ikke er nyttig som

- 10 screeningsmarkør for å identifiser pasienter med høy risiko for å ha kolorektal kreft.

Eksempel 8

- 15 Diagnostisk verdi av TIMP-1:MMP-9-kompleksmålinger i pasienter med kolorektal kreft.

TIMP-1:MMP-9-kompleksnivåer i plasma fra pasienter med kolorektal kreft og i plasma fra alders- og kjønntilpassede friske individer kan bli målt ved å benytte

- 20 TIMP-1:MMP-9-assayet beskrevet i eksempel 2. TIMP-1:MMP-9-kompleksverdier fra friske donorer og kreftpasienter kan bli sammenlignet og de diagnostiske verdiene bestemt.

Ved å benytte de målte verdiene for fri, total og TIMP-1:MMP-9-kompleksnivåer,

- 25 kan den diagnostiske verdien av forhold eller fraksjoner bli beregnet. I tillegg kan andre molekyler, for eksempel serum CEA bli addert til disse beregningene for å generere matematiske algoritmer for å øke den totale diagnostiske verdien.

Eksempel 9

30

Diagnostisk verdi av kombinasjonen av plasma total TIMP-1 og plasma fri TIMP-1 i pasienter med kolorektal kreft.

Totale TIMP-1-nivåer i plasma fra 64 pasienter med kolorektal kreft og i plasma

- 35 fra 108 alders- og kjønntilpassede friske individer ble målt med TIMP-1-assayet

beskrevet i eksempel 1. Ved å benytte assayet beskrevet i eksempel 3, ble plasmafrie TIMP-1-nivåer målt i de samme individene som beskrevet over. De totale og de frie TIMP-1-verdiene ble analysert og sammenlignet ved å benytte logistikkregresjonsanalyse.

5

64 pasienter som undergikk frivillig kirurgi for patologisk bekreftet kolorektal kreft var inkludert i studiet. Denne gruppen besto av 21 pasienter med rektal kreft og 43 pasienter med kolonkreft. Det var 11 pasienter med Dukes fase A, 27 med Dukes fase B, 14 med Dukes fase C og 13 med Dukes fase D-sykdom. Blodprøver ble oppnådd preoperativt med informert samtykke fra alle pasienter i overensstemmelse med Helsinkideklarasjonen, og tillatelse ble gitt av den lokale etiske komiteen ved Hvidovre Hospital, Danmark. Alle pasienter hadde patologisk verifiserte adenocarcinoma i kolon eller rektum. Kliniske data så som alder, kjønn og overlevelse etter kirurgi ble samlet.

15

Friske donorer: Den samme donorpopulasjonen som beskrevet i eksempel 3.

Blodprøver (5 ml) ble samlet preoperativt fra alle pasienter på dagen for kirurgi. For å sikre korrekte TIMP-1-målinger ble perifert blod tatt med minimale staser og samlet i EDTA antikoaguleringsrør (Becton-Dickinson, Mountain View, CA) i overensstemmelse med en tidligere beskrevet protokoll (eksempel 1).

TIMP-1-nivåer ble målt i EDTA plasmaprøver ved å benytte assayene beskrevet i eksempel 1 og i eksempel 3.

25

De totale TIMP-1-nivåer i disse 64 pasientene med kolorektal kreft er beskrevet i eksempel 4, og de frie TIMP-1-nivåene i disse pasientene er beskrevet i eksempel 7.

30 Ved å benytte de totale og de frie TIMP-1-nivåene i plasma fra friske donorer og fra de 64 pasientene med kolorektal kreft, ble ROC-kurver konstruert for hver av disse TIMP-1-formene. De totale TIMP-1-verdiene oppnådd bekrefter den diagnostiske verdien av totale TIMP-1-målinger i pasienter med kolorektal kreft. Som det kan ses i figur 15, var kurven igjen initielt bratt, noe som indikerer en

høy sensitivitet og spesifisitet av total TIMP-1 som en markør for kolorektal kreft. ROC-kurven for fri TIMP-1 var diskutert i eksempel 7.

De korresponderende dataene for total TIMP-1 i denne pasientpopulasjonen ga en
 5 AUC på 0,88. Imidlertid ble en økning i diagnostisk verdi oppnådd når man kombinerte fri og total TIMP-1 (AUC = 0,94). Denne økningen er statistisk svært signifikant, $p < 0,0001$, og viser verdien av den viktige utformingen ved å benytte både fri og total TIMP-1 i den samme analysen.

10 Disse dataene tyder på at kombinasjonen av totale TIMP-1- og frie TIMP-1-målinger i plasma kan bli benyttet som en screeningsprosedyre for å hjelpe til med identifiseringen av pasienter med en høy risiko for å ha kolorektal kreft.

På tilsvarende måte som beskrevet i det foreliggende eksempelet kan andre
 15 forhold og/eller kombinasjoner eller matematiske permutasjoner mellom frie og totale TIMP-1-verdier bli beregnet og benyttet for diagnostiske hensikter.

Beregninger av forhold mellom de ulike formene av TIMP-1, inkludert total og fri TIMP-1, total konsentrasjon av komplekser (total TIMP-1-fri TIMP-1), og/eller
 20 konsentrasjonen av TIMP-1:MMP-9, kan være ekstremt nyttige i håndteringen og spesielt i de forskjellige diagnosene av pasienter med godartede sykdommer og pasienter med kreft.

Eksempel 10

25

Mangel på diagnostisk verdi av totale TIMP-1-målinger i pasienter med primær (fase I og II) brystkreft.

Ved å benytte det totale TIMP-1-assayet beskrevet i eksempel 1, ble preoperative
 30 plasmaprøver fra 322 pasienter med primær brystkreft analysert for totalt TIMP-1-innhold. I tillegg ble 108 plasmaprøver fra friske bloddonorer evaluert. Den totale midlere TIMP-1 for brystkreftpasienter var 88,3 $\mu\text{g/l}$ (område: 45,5-289,3 $\mu\text{g/l}$) med midlere totalt TIMP-1-nivå for friske bloddonorer var 88,9 $\mu\text{g/l}$ (område: 51,0-156,2 $\mu\text{g/l}$). Det var ingen statistisk signifikant forskjell i totale

TIMP-1 plasmanivåer mellom de to gruppene (Mann-Whitney, $p = 0,87$). Figur 19 viser en ROC-kurve som inkluderer de ovennevnte dataene.

Disse dataene viser at pasienter med primær brystkreft har totale TIMP-1-verdier som ikke er signifikant forskjellige fra de til friske bloddonorere. Således støtter disse dataene spesifisiteten av TIMP-1-målinger i diagnostiseringen av pasienter med kolorektal kreft.

Eksempel 11

10

Diagnostisk verdi av plasma total TIMP-1 i pasienter med metastatisk (fase IV) brystkreft.

Dette eksempelet beskriver totale TIMP-1-bestemmelser fra pasienter med brystkreft i fase IV.

20

Blod ble samlet fra 19 pasienter med brystkreft i fase IV (alder 45 til 70 år) ved Onkologiavdelingen, Herlev Universitetshospital, København, Danmark, og fra 87 friske kvinnelige bloddonorere (eksempel 1).

Totale TIMP-1-nivåer ble målt i alle EDTA-plasmaprøvene ved å benytte assayet beskrevet i eksempel 1.

Total TIMP-1 ble målt i EDTA-plasmaprøver fra 19 brystkreftpasienter med sykdom i fase IV. Disse nivåene ble sammenlignet med totale TIMP-1-nivåer i 87 friske kvinnelige donorer. Gjennomsnittet, totalt TIMP-1-nivå målt i de 19 brystkreftpasientene var $292 \pm 331 \mu\text{g/l}$ (middelverdi: $236 \mu\text{g/l}$), sammenlignet med et gjennomsnitt, totalt TIMP-1-nivå på $63,5 \pm 10,5 \mu\text{g/l}$ (middelverdi: $62,0 \mu\text{g/l}$) i 87 friske kvinnelige donorer. En Wald-Wolfowitz-kjøringstest indikerte en svært signifikant forskjell ($p < 0,0001$) mellom pasient totale TIMP-1-nivåer og de til friske donorer. Figur 20 viser et persentilplott av totale TIMP-1-nivåer fra de 19 brystkreftpasientene og TIMP-1-nivåene funnet i plasma fra de 87 friske kvinnelige donorene.

Disse dataene viser at plasma TIMP-1-målinger kan bli benyttet for å monitorere brystkreftpasienter for tilbakekomst av sykdom.

Eksempel 12

5

Diagnostisk verdi av TIMP-2-målinger i pasienter med kolorektal kreft.

TIMP-2-nivåer ble målt med et innomhus TIMP-2-assay i plasma fra 64 pasienter med kolorektal kreft (43 kolon og 21 rektal) og i plasma fra 108 alderstilpassede friske individer. De målte TIMP-2-verdiene fra friske donorer og kreftpasienter ble sammenlignet.

TIMP-2 var målbar i alle prøver. Ingen signifikante forskjeller i TIMP-2-nivåer ble funnet mellom friske donorer og pasienter med kolorektal kreft.

15

Disse dataene støtter spesifisiteten til TIMP-1-målinger i diagnostiseringen av pasienter med kolorektal kreft, noe som støtter den unike verdien av TIMP-1 som en hjelp i tidlig diagnostisering av kolorektal kreft.

REFERANSER

- Baker T, Tickle S, Wasan H, Docherty A, Isenberg D & Waxman J (1994) Serum metalloproteinases and their inhibitors: markers for malignant potential. *Br. J. Cancer* 70, 506-512.
- Birkedal-Hansen H, Moore WG, Bodden MK, Windsor LJ, Birkedal-Hansen B, DeCarlo A & Engler JA (1993) Matrix metalloproteinases: a review. *Crit. Rev. Oral Biol. Med.* 4, 197-250.
- Clark IM, Powell LK, Wright JK & Cawston TE (1991) Polyclonal and monoclonal anti-bodies against human tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMP) and the design of an enzyme-linked immunosorbent assay to measure TIMP. *Matrix* 11, 76-85.
- Cooksley S, Hipkiss JB, Tickle SP, Holmes IE, Docherty AJ, Murphy G & Lawson AD (1990) Immunoassays for the detection of human collagenase, stromelysin, tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMP) and enzyme-inhibitor complexes. *Matrix* 10, 285-291.
- Cooper TW, Eisen AZ, Stricklin GP & Welgus HG (1985) Platelet-derived collagenase inhibitor: characterization and subcellular localization. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 82, 2779-2783.
- DeClerk YA, Perez N, Shimada H, Boone TC, Langley KE & Taylor SM (1992) Inhibition of invasion and metastasis in cells transfected with an inhibitor of metalloproteinases. *Cancer Res.* 701-708.
- Fujimoto N, Zhang J, Iwata K, Shinya T, Okada Y & Hayakawa T (1993) A one-step sandwich enzyme immunoassay for tissue inhibitor of metalloproteinases-2 using monoclonal antibodies. *Clin. Chim. Acta* 220, 31-45.
- Goldberg GI, Strongin A, Collier IE, Genrich LT & Marmer BL (1992) Interaction of 92-kDa type IV collagenase with the tissue inhibitor of metalloproteinases

prevents dimerization, complex formation with interstitial collagenase, and activation of the proenzyme with stromelysin. *J. Biol. Chem.* 267, 4583-4591

Hembry RM, Murphy G & Reynolds JJ (1985) Immunolocalization of tissue inhibitor
5 of metalloproteinases (TIMP) in human cells. Characterization and use of a specific
antiserum. *J. Cell Sci.* 73, 105-119.

Holten-Andersen M, Murphy G, Nielsen HJ, Pedersen AN, Christensen IJ, Høyer-
Hansen G, Briinner N and Stephens RW (1999) Quantitation of TIMP-1 in plasma
10 of healthy blood donors and patients with advanced cancer. *Br J Cancer* 80, 495-
503.

Jung K, Nowak L, Lein M, Priem F, Schnorr D, Loening SA (1997) Matrix
metalloproteinases 1 and 3, tissue inhibitor of metalloproteinase-1 and the
15 complex of metalloproteinase-1/tissue inhibitor in plasma of patients with prostate
cancer. *Int. J. Cancer* 74, 220-223.

Jung K, Nowak L, Lein M, Henke W, Schnorr D & Loening SA (1996) What kind of
specimen should be selected for determining tissue inhibitor of metalloproteinase-
20 1 (TIMP-1) in blood? [letter]. *Clin. Chim. Acta* 254, 97-100.

Jung K, Nowak L, Lein M, Henke W, Schnorr D & Loening SA (1996) Role of
specimen collection in preanalytical variation of metalloproteinases and their
inhibitors in blood. *Clin. Chem.* 42, 2043-2045.

25

Keyszer G, Lambiri I, Nagel R, Keysser C, Keysser M, Gromnica-Ihle E, Franz J,
Burmester GR, Jung K (1999) Circulating levels of matrix metalloproteinases MMP-
3 and MMP-1, tissue inhibitor of metalloproteinases 1 (TIMP-1) and MMP-1/TIMP-1
complex in rheumatic disease. Correlation with clinical activity of rheumatoid
30 arthritis versus other surrogate markers. *J. Rheum.* 26, 251-258.

Kjeldsen L, Bjerrum OW, Askaa J, Borregaard N (1992) Subcellular localization
and release of human neutrophil gelatinase, confirming the existence of separate
gelatinase-containing granules. *Biochem. J.* 287, 603-610.

35

- Khokha R & Waterhouse P (1993) The role of tissue inhibitor of metalloproteinase-1 in specific aspects of cancer progression and reproduction. *J. Neurooncol.* 18, 123-127.
- 5 Khokha R, Zimmer MJ, Graham CH, Lala PK & Waterhouse P (1992a) Suppression of invasion by inducible expression of tissue inhibitor of metalloproteinase-1 (TIMP-1) in B16-F10 melanoma cells. *J. Natl. Cancer Inst.* 84, 1017-1022.
- Khoka R, Zimmer MJ, Wilson SM & Chambers AF (1992b) Up-regulation of TIMP-1
 10 expression in B16-F10 melanoma cells suppresses their metastatic ability in chick embryo. *Clin. Exp. Metastasis* 10, 365-370.
- Kleiner Jr DE, Tuuttila A, Tryggvason K & Stetler-Stevenson WG (1993) Stability
 15 analysis of latent and active 72-kDa type IV collagenase: the role of tissue inhibitor of metalloproteinases-2 (TIMP-2). *Biochemistry* 32, 1583-1592.
- Kodama S, Yamashita K, Kishi J, Iwata K & Hayakawa T (1989) A sandwich
 enzyme immunoassay for collagenase inhibitor using monoclonal antibodies.
 Matrix 9, 1-6.
- 20 Liotta LA, Steeg PS & Stetler-Stevenson WG (1991) Cancer metastasis and angiogenesis: an imbalance of positive and negative regulation. *Cell* 64, 327-336.
- MacDougall JR & Matrisian LM (1995) Contributions of tumor and stromal matrix
 25 metalloproteinases to tumor progression, invasion and metastasis. *Cancer Metastasis Rev.* 14, 351-362.
- Matrisian LM (1992) The matrix-degrading metalloproteinases. *Bioessays* 14, 455-463.
- 30 Mimori K, Mori M, Shiraishi T, Fujie T, Baba K, Haraguchi M, Abe R, Ueo H & Akiyoshi T (1997) Clinical significance of tissue inhibitor of metalloproteinase expression in gastric carcinoma. *Br. J. Cancer* 76, 531-536.

- Moll UM, Youngleib GL, Rosinski KB & Quigley JP (1990) Tumor promoter-stimulated Mr 92,000 gelatinase secreted by normal and malignant human cells: isolation and characterization of the enzyme from HT1080 tumor cells. *Cancer Res.* 50, 6162-6170.
- 5
- Moutsiaakis D, Mancuso P, Kruttsch H, Stetler-Stevenson WG & Zucker S (1992) Characterization of metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in human plasma. *Connect. Tissue Res.* 28, 213-230.
- 10 Murphy G, Houbrechts A, Cockett MI, Williamson RA, O'Shea M & Docherty AJ (1991) The N-terminal domain of tissue inhibitor of metalloproteinases retains metalloproteinase inhibitory activity [published erratum appears in *Biochemistry* 1991 Oct 22; 30(42): 10362]. *Biochemistry* 30, 8097-8102.
- 15 Stetler-Stevenson WG, Hewitt R & Corcoran M (1996) Matrix metalloproteinases and tumor invasion: from correlation and causality to the clinic. *Semin. Cancer Biol.* 7, 147-154.
- Stetler-Stevenson WG, Kruttsch HC & Liotta LA (1989) Tissue inhibitor of
- 20 metalloproteinase (TIMP-2). A new member of the metalloproteinase inhibitor family. *J. Biol. Chem.* 264, 17274-17378.
- Stetler-Stevenson WG, Liotta LA & Kleiner Jr DE (1993) Extracellular matrix 6: role of matrix metalloproteinases in tumor invasion and metastasis. *FASEB J.* 7,
- 25 1434-1441.
- Thorgeirsson UP, Lindsay CK, Cottam DW & Gomez DE (1993) Tumor invasion, proteolysis, and angiogenesis. *J. Neurooncol.* 18, 89-103.
- 30 Welgus HG, Jeffrey JJ, Eisen AZ, Roswit WT & Stricklin GP (1985) Human skin fibroblast collagenase: interaction with substrate and inhibitor. *Coll. Relat. Res.* 5, 167-179.
- Wilhelm SM, Collier IE, Marmer BL, Eisen AZ, Grant GA & Goldberg GI (1989)
- 35 SV40-transformed human lung fibroblasts secrete a 92-kDa type IV collagenase

which is identical to that secreted by normal human macrophages [published erratum appears in J Biol Chem 1990 Dec 25; 265(36): 22570]. J. Biol. Chem. 264, 17213-17221.

- 5 Zucker S, Lysik RM, DiMassimo BI, Zarrabi HM, Moll UM, Grimson R, Tickle SP & Docherty AJ (1995) Plasma assay of gelatinase B: tissue inhibitor of metalloproteinase complexes in cancer. Cancer 76, 700-708.

PATENTKRAV

1. Fremgangsmåte for å bestemme hvorvidt et individ sannsynligvis har kolorektal kreft,
- 5 k a r a k t e r i s e r t v e d at fremgangsmåten omfatter å bestemme en første parameter som representerer enten
 - a) den totale konsentrasjonen av TIMP-1 i plasmaprøver, eller
 - b) kombinasjonen av konsentrasjonen av total TIMP-1 med konsentrasjonen av fri TIMP-1 i plasmaprøver,
- 10 og som indikerer at det er stor sannsynlighet for at individet har kolorektal kreft dersom parameteren er ved eller over en diskriminerende verdi, og som indikerer at det er lite sannsynlig at individet har kolorektal kreft dersom parameteren ikke er ved eller over den diskriminerende verdien, nevnte diskriminerende verdi blir bestemt ved å måle nevnte i det minste ene første parameter i både en frisk
- 15 kontrollpopulasjon og en populasjon med kjent kolorektal kreft, og derved bestemme den diskriminerende verdien som identifiserer kreftpopulasjonen med en forutbestemt spesifisitet eller en forutbestemt sensitivitet.
2. Fremgangsmåte som angitt i krav 1,
- 20 k a r a k t e r i s e r t v e d at kombinasjonen blir utført ved logistikkregresjonsanalyse.
3. Fremgangsmåte som angitt i et hvilket som helst av de foregående kravene,
- 25 k a r a k t e r i s e r t v e d at den ytterligere omfatter å bestemme minst en andre parameter, der den andre parameteren representerer konsentrasjonen av en ytterligere markør forskjellig fra en hvilken som helst form av TIMP-1, i en kroppsvæskeprøve fra individet.
- 30 4. Fremgangsmåte som angitt i krav 3,
- k a r a k t e r i s e r t v e d at den første parameteren som representerer konsentrasjonen av TIMP-1 i plasmaprøver og den i det minste ene andre parameteren som er forskjellig fra en hvilken som helst form av TIMP-1, blir kombinert for å resultere i en kombinert parameter, og indikerer at det er stor
- 35 sannsynlighet for at individet har kolorektal kreft dersom den kombinerte

parameteren er ved eller over en diskriminerende verdi, og indikerer at det er lite sannsynlig at individet har kolorektal kreft dersom den kombinerte parameteren ikke er ved eller over den diskriminerende verdien.

- 5 5. Fremgangsmåte som angitt i krav 4,
k a r a k t e r i s e r t v e d at kombinerings blir utført ved
logistikkregresjonsanalyse.
6. Fremgangsmåte som angitt i krav 4 eller 5,
10 k a r a k t e r i s e r t v e d at den diskriminerende verdien til den
kombinerte parameteren er en verdi som er blitt bestemt ved å bestemme nevnte
kombinerte parameter i både en frisk kontrollpopulasjon og en populasjon med
kjent kolorektal kreft, for derved å bestemme den diskriminerende verdien som
identifiserer kreftpopulasjonen med en forutbestemt spesifisitet eller en
15 forutbestemt sensitivitet.
7. Fremgangsmåte som angitt i et hvilket som helst av kravene 3-6,
k a r a k t e r i s e r t v e d at den i det minste ene andre parameteren
som blir bestemt er en parameter som representerer konsentrasjonen av en
20 tumormarkør.
8. Fremgangsmåte som angitt i krav 7,
k a r a k t e r i s e r t v e d at tumormarkøren er valgt fra gruppen som
består av CEA, løselig u-PAR, katepsin B, HER2-neu, CA15-3 og YKL-40.
25
9. Fremgangsmåte som angitt i krav 8,
k a r a k t e r i s e r t v e d at den i det minste ene andre parameteren
som blir bestemt er konsentrasjonen av CEA.
- 30 10. Fremgangsmåte som angitt i et hvilket som helst av de foregående
kravene, k a r a k t e r i s e r t v e d at individet er et medlem av en
ikke-selektert populasjon.
11. Fremgangsmåte som angitt i et hvilket som helst av de foregående
35 kravene, k a r a k t e r i s e r t v e d at individet er et medlem av en

populasjon som allerede er identifisert til å ha en økt risiko for å utvikle kolorektal kreft.

12. Fremgangsmåte for å bestemme hvorvidt det er sannsynlig at en pasient
5 som har blitt behandlet for primær brystkreft har metastatisk brystkreft,
k a r a k t e r i s e r t v e d at den omfatter å bestemme en første
parameter som representerer enten
 - a) den totale konsentrasjonen av TIMP-1 i plasmaprøver, eller
 - b) kombinasjonen av total TIMP-1 med konsentrasjonen av fri TIMP-1 i
10 plasmaprøver,
 og som indikerer at det er stor sannsynlighet for at individet vil få metastatisk
brystkreft dersom parameteren er ved eller over en diskriminerende verdi og som
indikerer at det er lite sannsynlig at individet har metastatisk brystkreft dersom
parameteren ikke er ved eller over den diskriminerende verdien, nevnte
15 diskriminerende verdi blir bestemt ved å måle nevnte i det minste en første
parameter i både en frisk kontrollpopulasjon og en populasjon med kjent
metastatisk brystkreft og derved bestemme den diskriminerende verdien som
identifiserer kreftpopulasjonen med en forutbestemt spesifisitet eller en
forutbestemt sensitivitet.
20
13. Fremgangsmåte som angitt i krav 12,
k a r a k t e r i s e r t v e d at kombinasjonen blir utført ved
logistikkregresjonsanalyse.
- 25 14. Fremgangsmåte som angitt i krav 12 eller 13,
k a r a k t e r i s e r t v e d at den ytterligere omfatter å bestemme i det
minste en andre parameter, der den andre parameteren representerer
konsentrasjonen av en ytterligere markør forskjellig fra en hvilken som helst form
av TIMP-1, i en kroppsvæskeprøve fra individet.
30
15. Fremgangsmåte som angitt i krav 14,
k a r a k t e r i s e r t v e d at den første parameteren som representerer
konsentrasjonen av TIMP-1 i plasmaprøver og den i det minste ene andre
parameteren forskjellig fra en hvilken som helst form av TIMP-1, blir kombinert
35 for å resultere i en kombinert parameter, og som indikerer en stor sannsynlighet

for at individet har metastatisk kreft dersom den kombinerte parameteren er ved eller over en diskriminerende verdi, og som indikerer det som lite sannsynlig at individet har metastatisk kreft dersom den kombinerte parameteren ikke er ved eller over den diskriminerende verdien.

5

16. Fremgangsmåte som angitt i krav 15,
k a r a k t e r i s e r t v e d at kombinerings blir utført ved
logistikkregresjonsanalyse.

- 10 17. Fremgangsmåte som angitt i krav 15 eller 16,
k a r a k t e r i s e r t v e d at den diskriminerende verdien til den
kombinerte parameteren er en verdi som er blitt bestemt ved å bestemme nevnte
kombinerte parameter i både en frisk kontrollpopulasjon og en populasjon med
kjent metastatisk kreft, og derved bestemme den diskriminerende verdien som
15 identifiserer den metastatiske kreftpopulasjonen med en forutbestemt spesifisitet
eller en forutbestemt sensitivitet.

18. Fremgangsmåte som angitt i et hvilket som helst av kravene 14-17,
k a r a k t e r i s e r t v e d at den i det minste ene andre parameteren
20 som er bestemt er en parameter som representerer konsentrasjonen av en
tumormarkør.

19. Fremgangsmåte som angitt i krav 18,
k a r a k t e r i s e r t v e d at tumormarkøren er valgt fra gruppen som
25 består av CEA, løselig u-PAR, katepsin B, HER2-neu, CA15-3 og YKL-40.

20. Fremgangsmåte som angitt i krav 19,
k a r a k t e r i s e r t v e d at den i det minste ene andre parameteren
som er bestemt er konsentrasjonen av CEA.

30

21. Fremgangsmåte som angitt i et hvilket som helst av kravene 12-20,
k a r a k t e r i s e r t v e d at bestemmelsen blir utført ved flere
tidspunkter ved intervaller, som del av en monitorering av en kreftpasient etter
behandlingen for primærkreft.

35

22. Fremgangsmåte som angitt i et hvilket som helst av kravene 1-11,
k a r a k t e r i s e r t v e d at den blir benyttet for å detektere tidlig fase
kolorektal kreft.
- 5 23. Fremgangsmåte som angitt i krav 22,
k a r a k t e r i s e r t v e d at den tidlige fase kolorektale kreften er valgt
fra gruppen som består av kolonkreft Dukes fase A, kolonkreft Dukes fase B,
kolonkreft Dukes fase C, rektalkreft Dukes fase A, rektalkreft Dukes fase B og
rektalkreft Dukes fase C.
- 10 24. Fremgangsmåte som angitt i et hvilket som helst av de foregående
kravene,
k a r a k t e r i s e r t v e d at konsentrasjonsbestemmelsen blir utført
ved hjelp av et immunoassay eller et aktivitetsassay.
- 15 25. Fremgangsmåte som angitt i krav 24,
k a r a k t e r i s e r t v e d at immunassayet er et ELISA.
26. Fremgangsmåte som angitt i krav 24,
- 20 k a r a k t e r i s e r t v e d at aktivitetsassayet er zymografi.

1/20

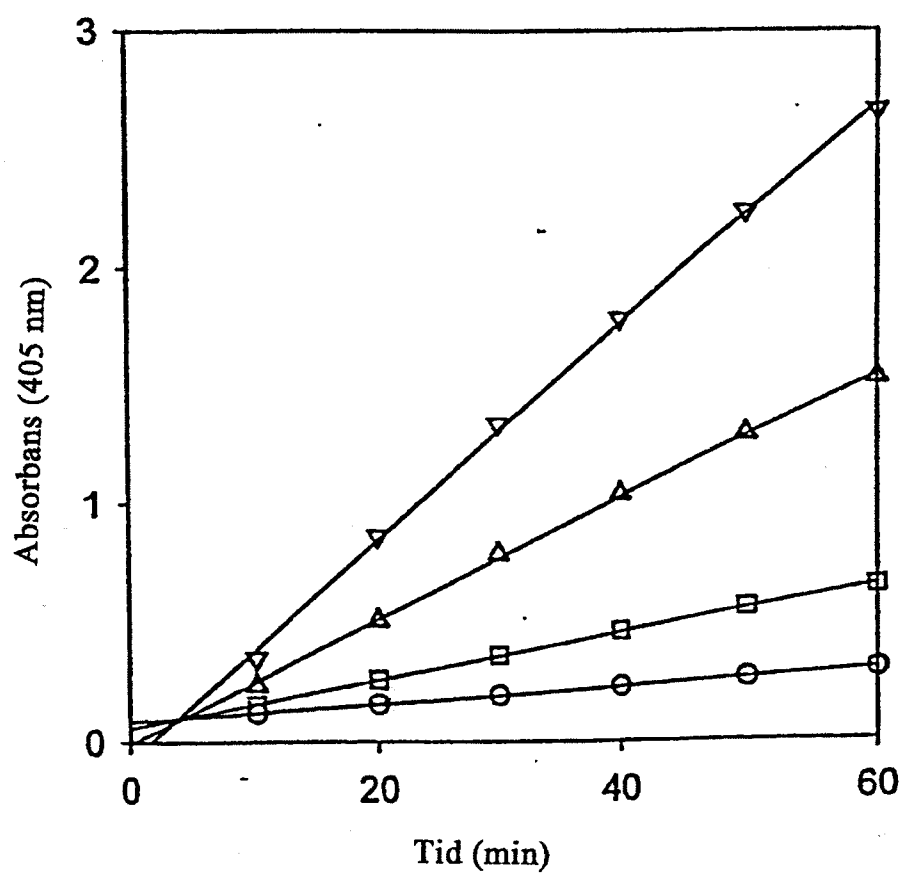


Fig. 1

2/20

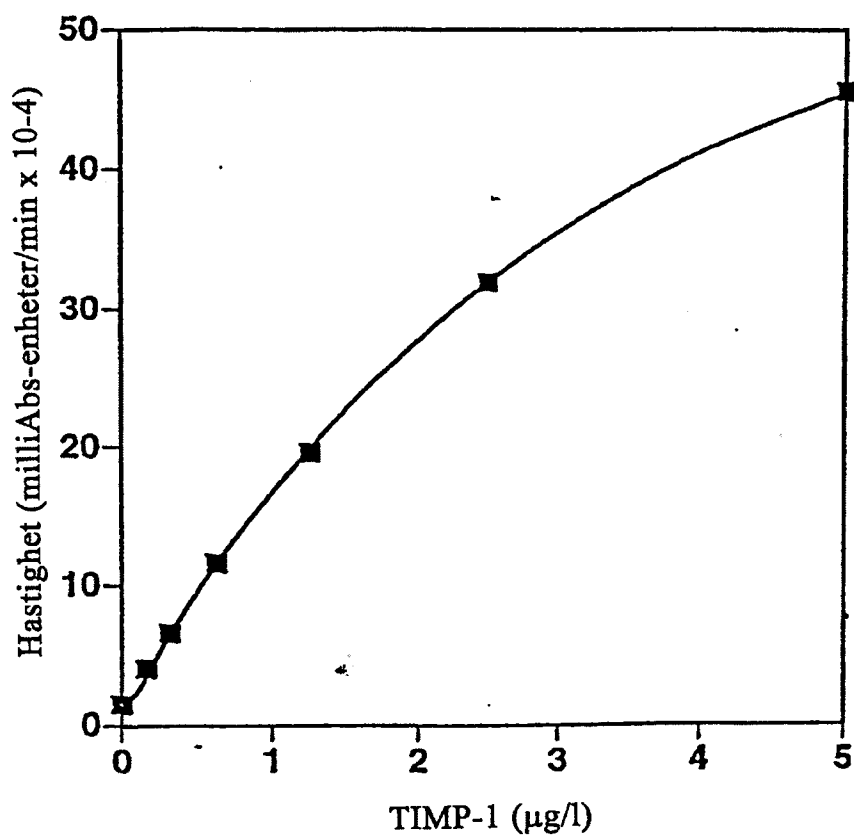


Fig. 2

3/20

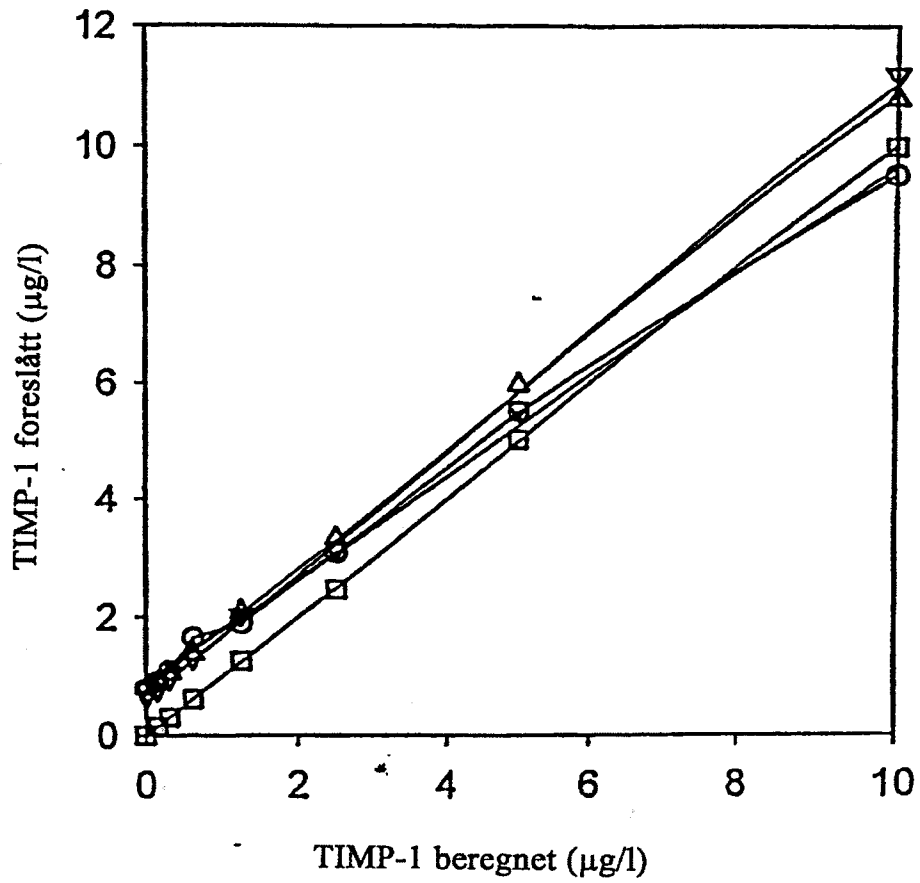


Fig. 3

4/20

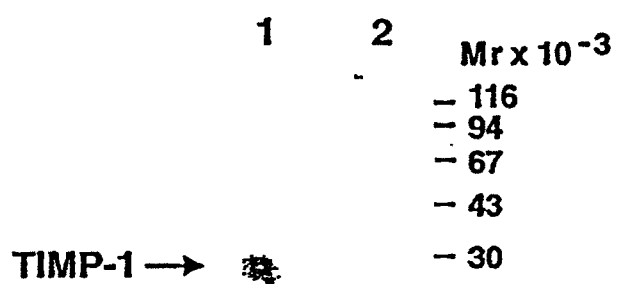
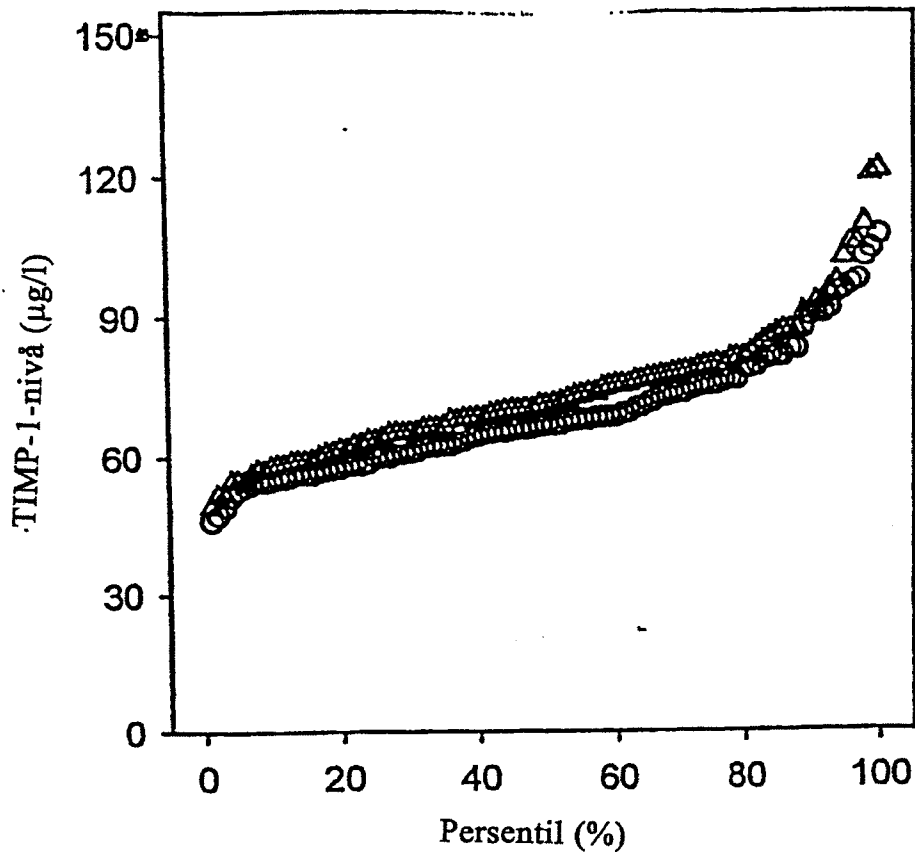
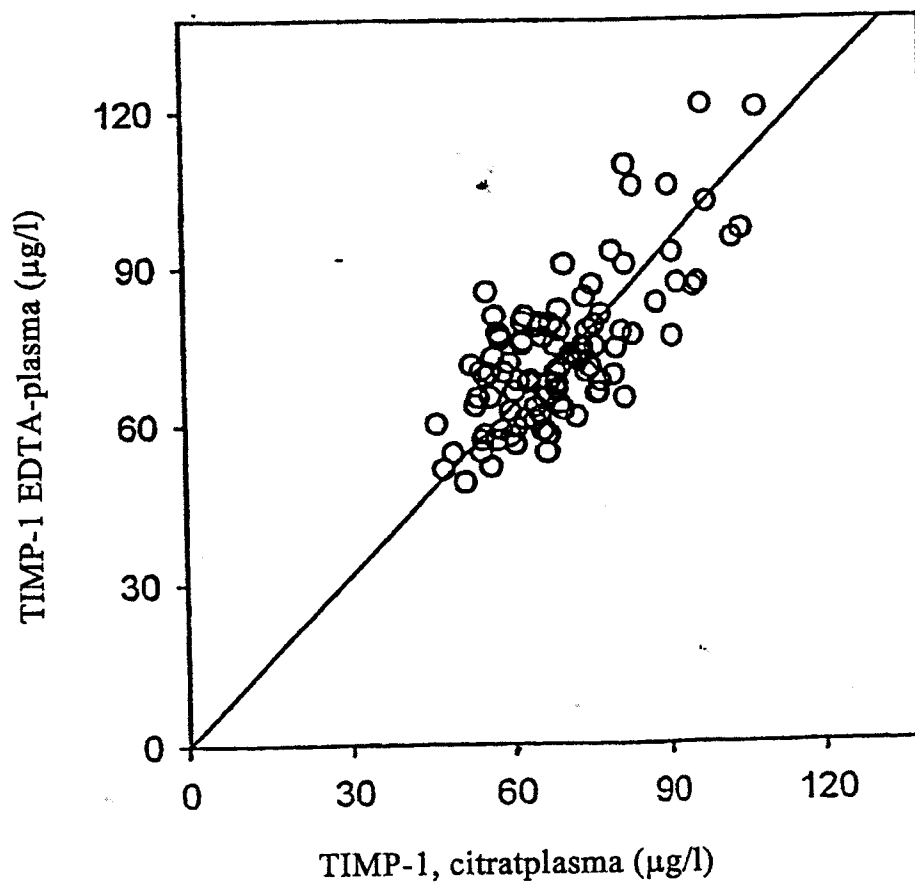


Fig. 4

5/20

**Fig. 5a****Fig. 5b**

6/20

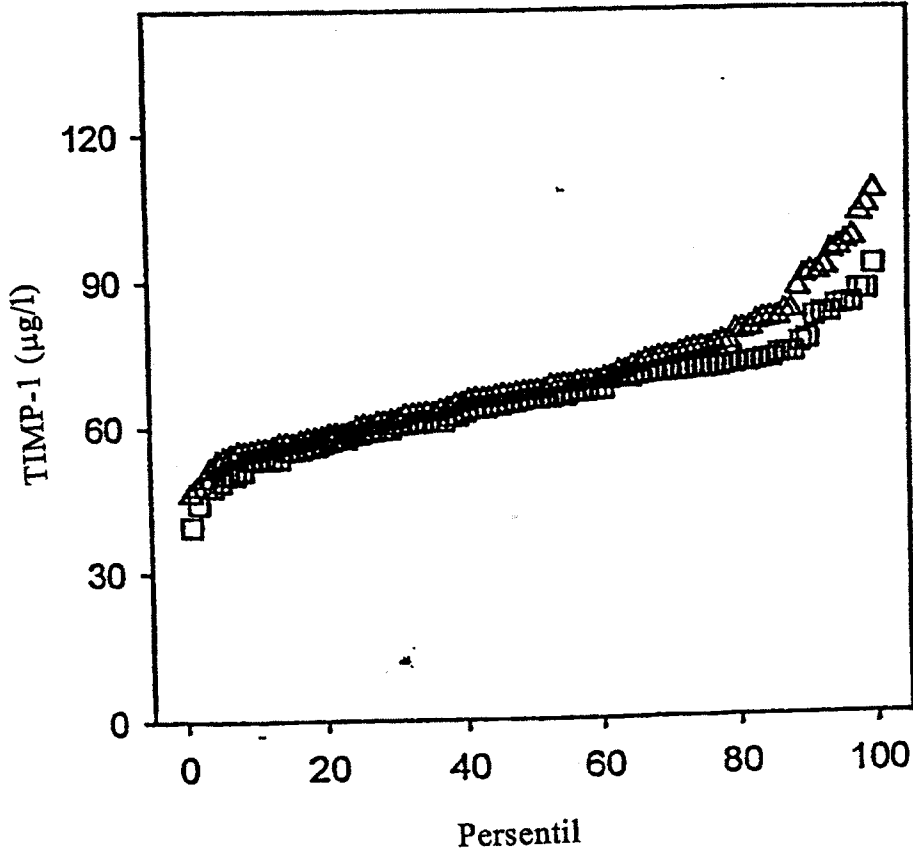


Fig. 6

7/20

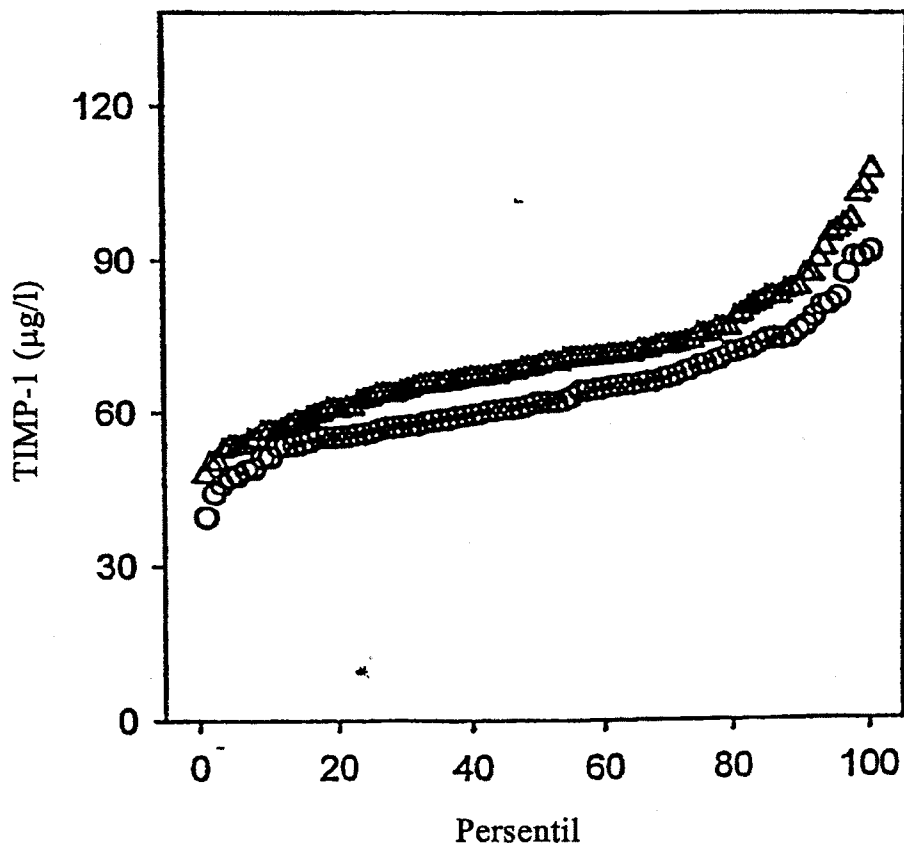


Fig. 7

8/20

ELISA AV HUMAN MMP-9:TIMP-1 I PLASMA

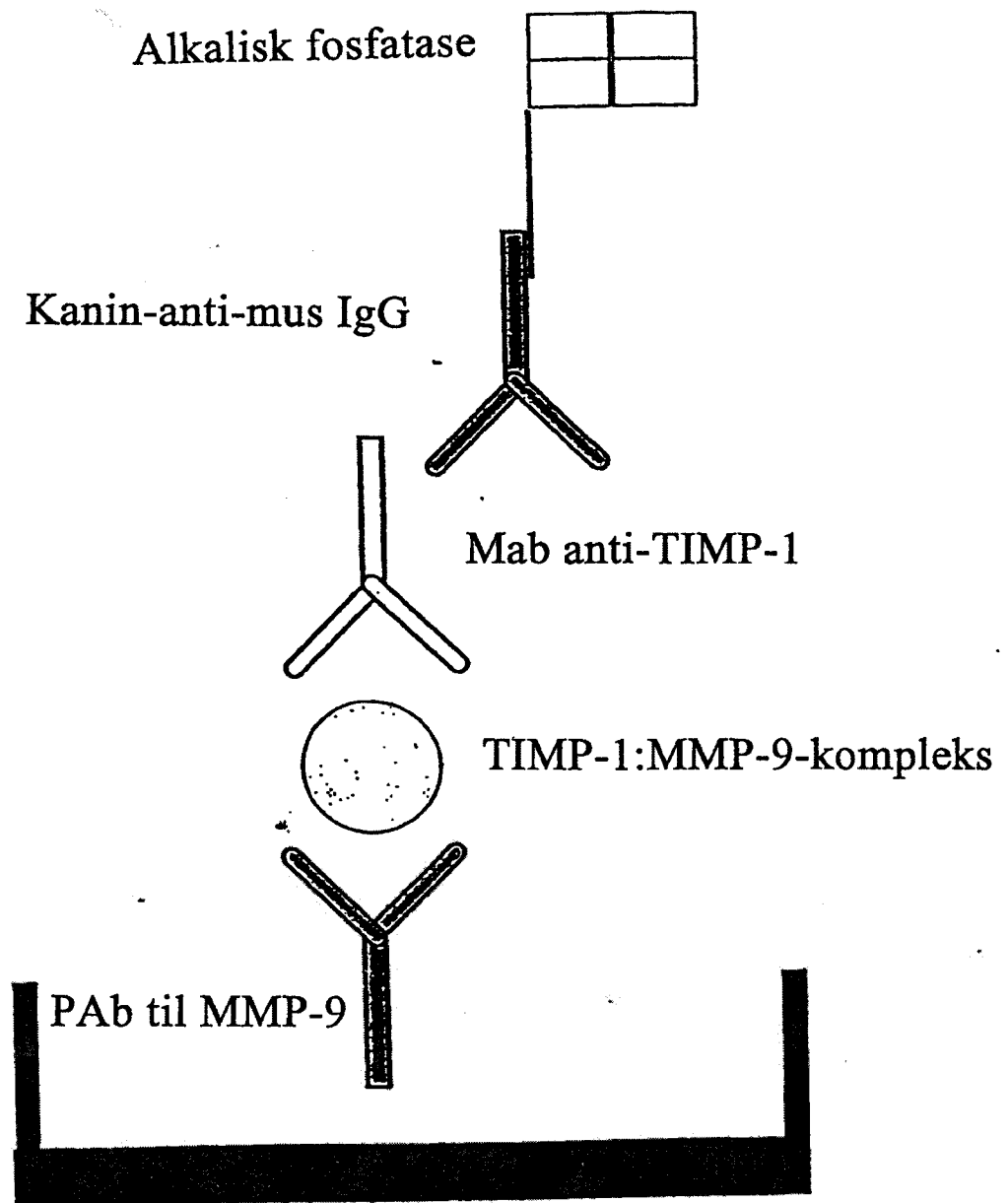


Fig. 8

9/20

ELISA AV FRI (IKKE-KOMPLEKSBUNDET)
HUMAN TIMP-1 I PLASMA

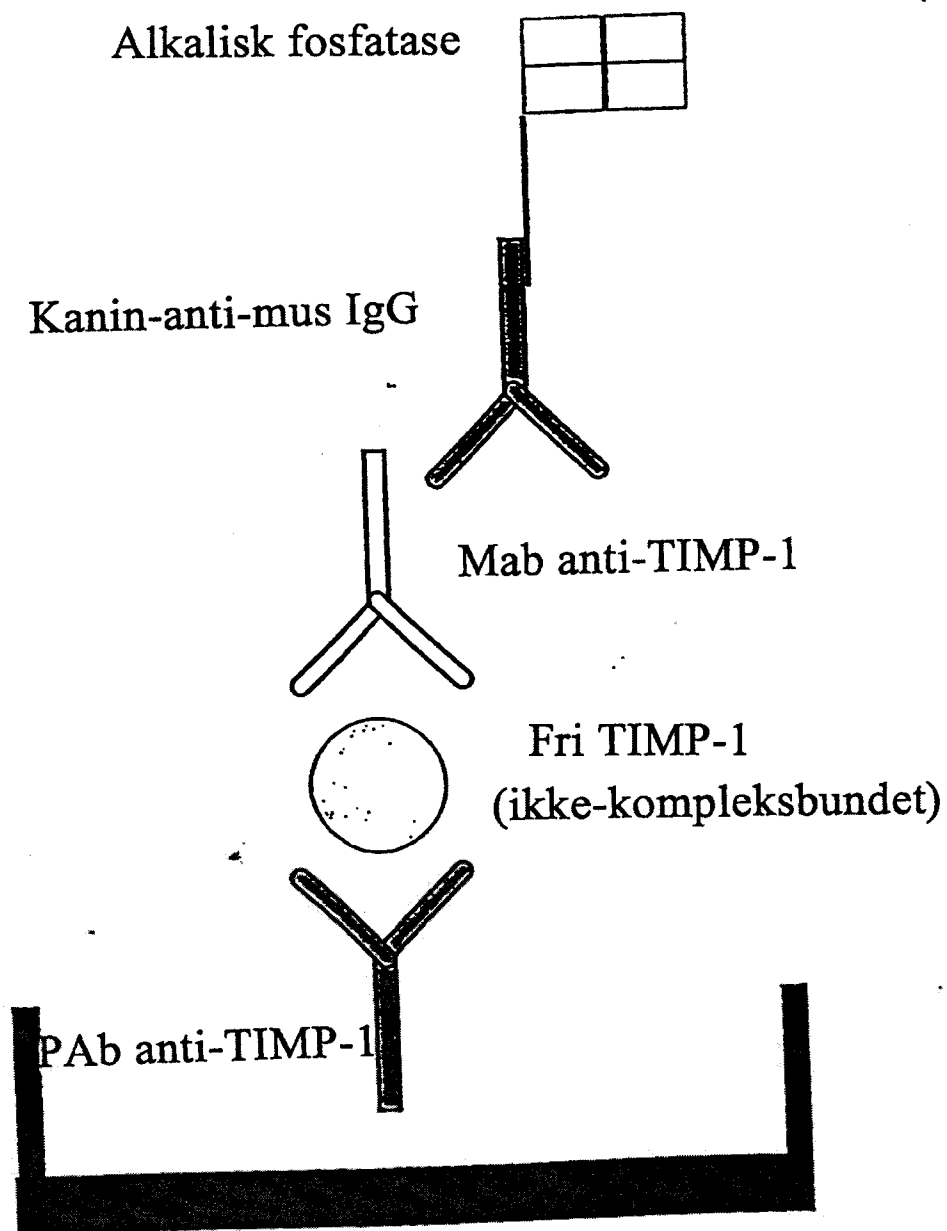


Fig. 9

10/20

Antistofftester:

Polyklonalt antiMMP9 som erobrer

MAC19 som deteksjon

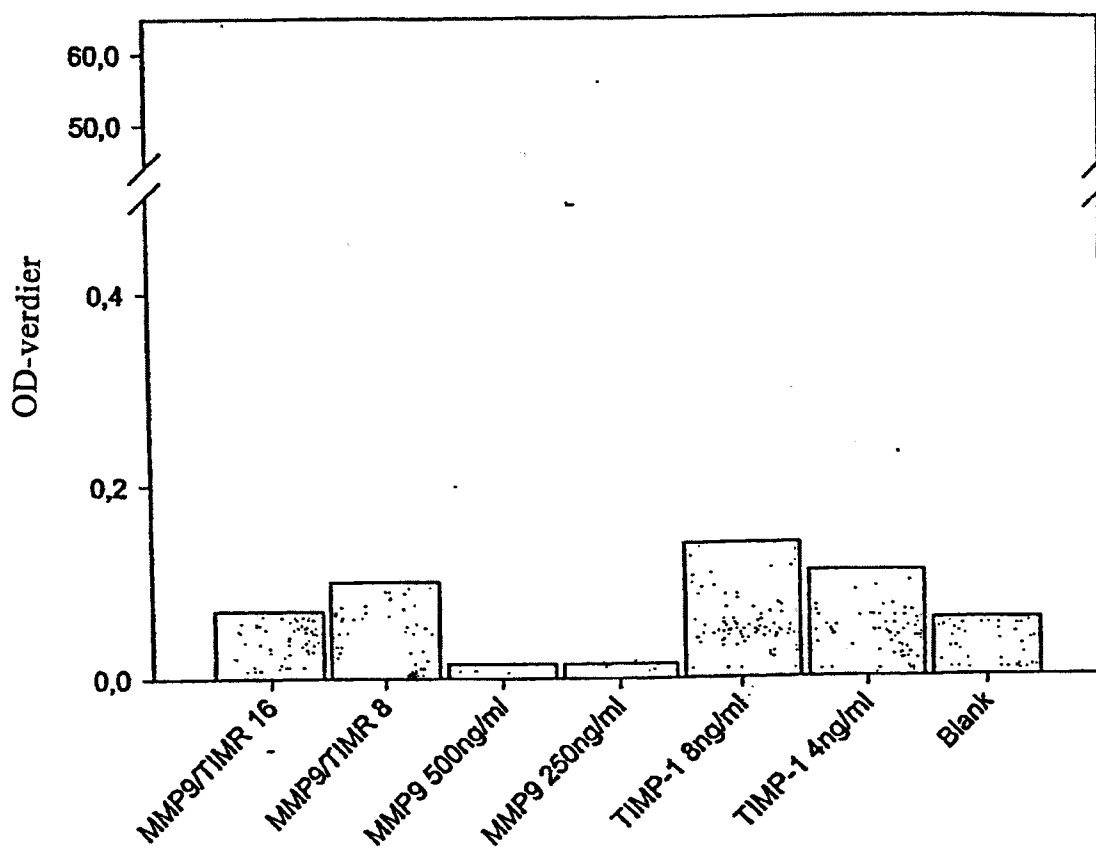


Fig. 10

11/20

Antistofftester:
Polyklonalt antiMMP9 som erobrer
MAC15 som deteksjon

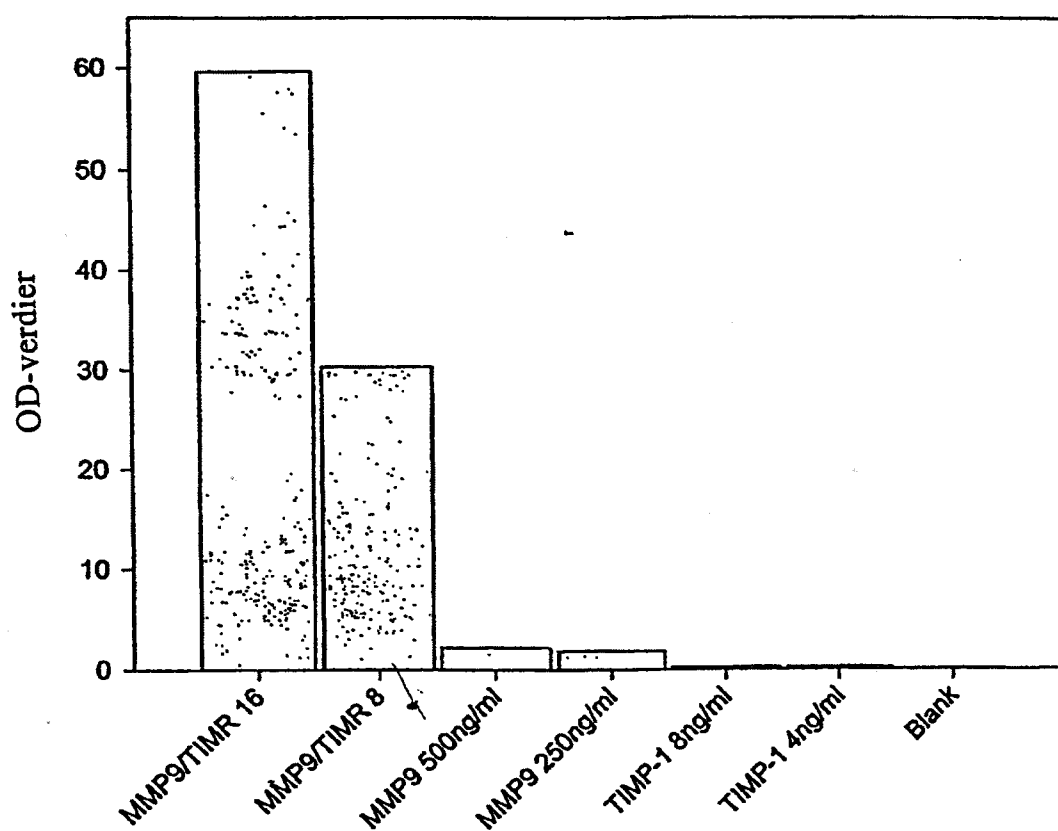
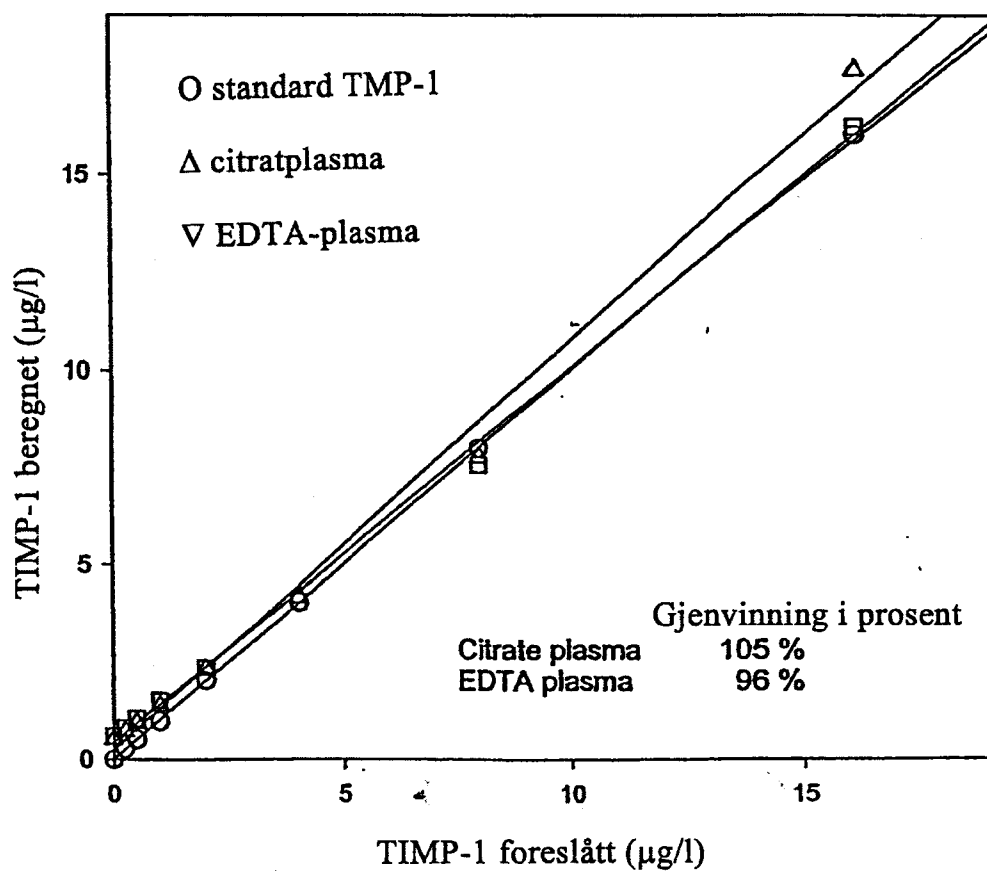


Fig. 11

12/20

Poly/MAC19-assay - gjenvinning i citrat- og EDTA-plasma



Intra-assay-variasjon: 9,6% for 24 triplikatmålinger av kontrollplasma sammenslåing.

Fig. 12

13/20

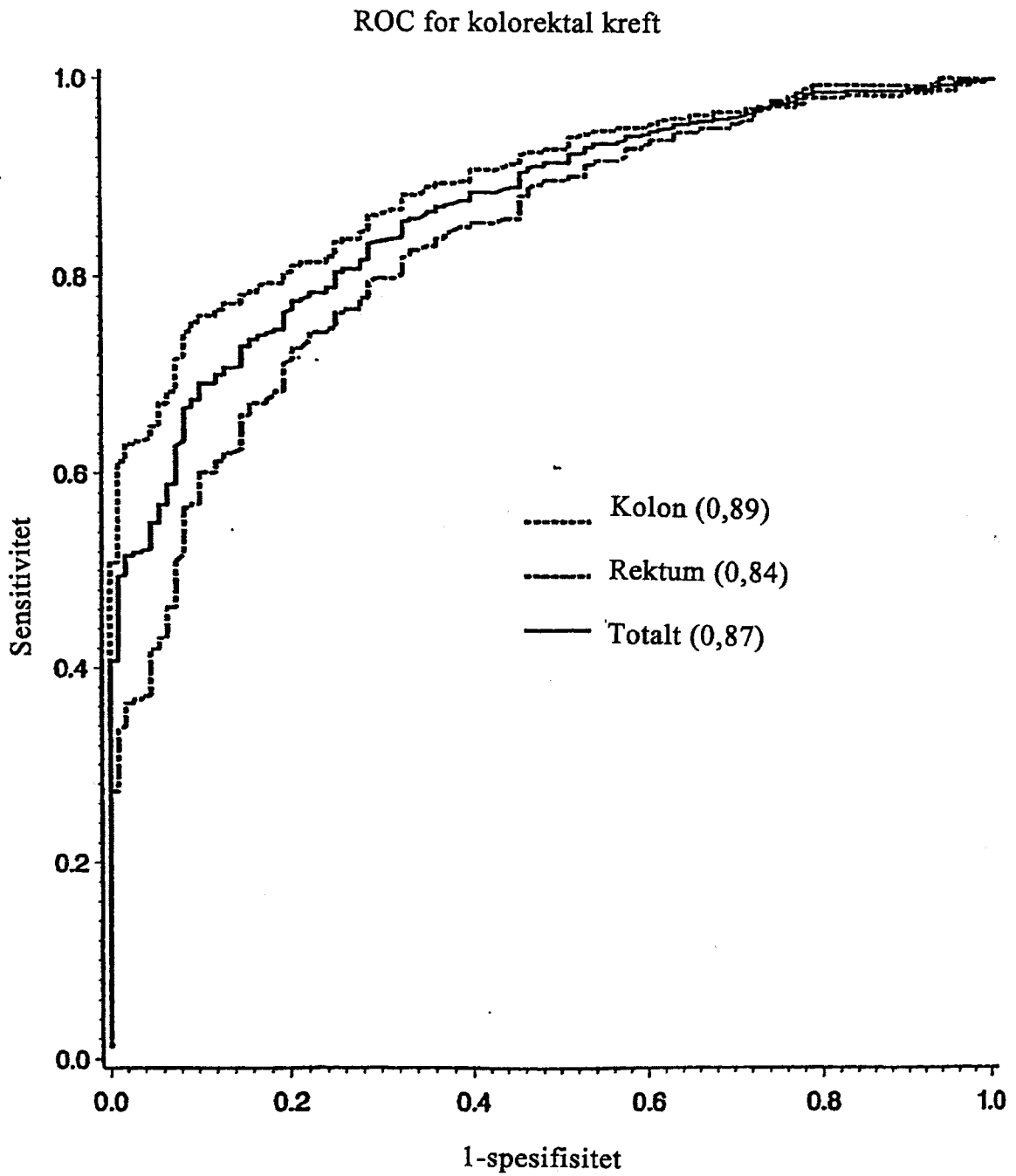


Fig. 13

14/20

ROC for kolorektal kreft/Dukes A+B

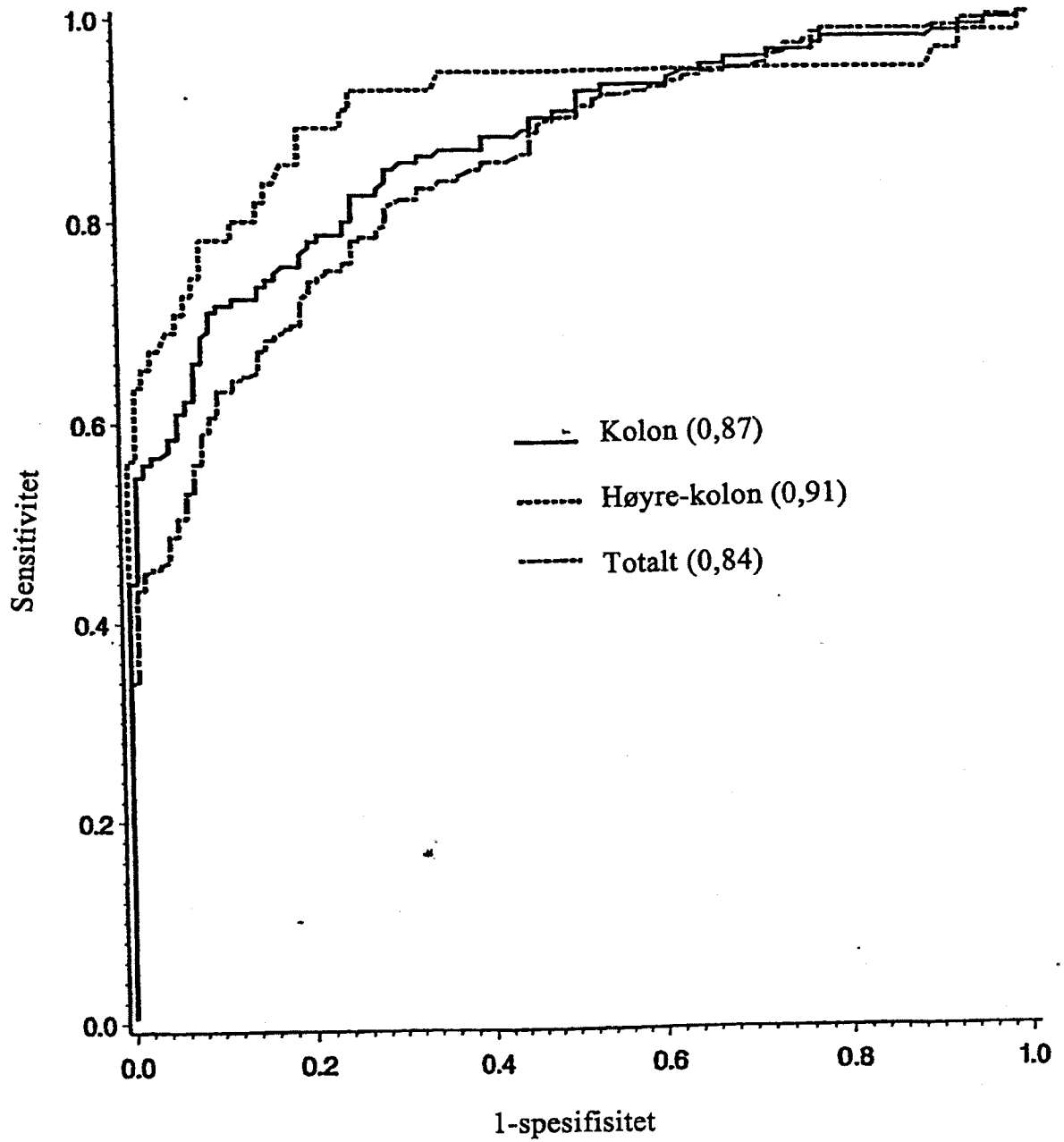


Fig. 14

15/20

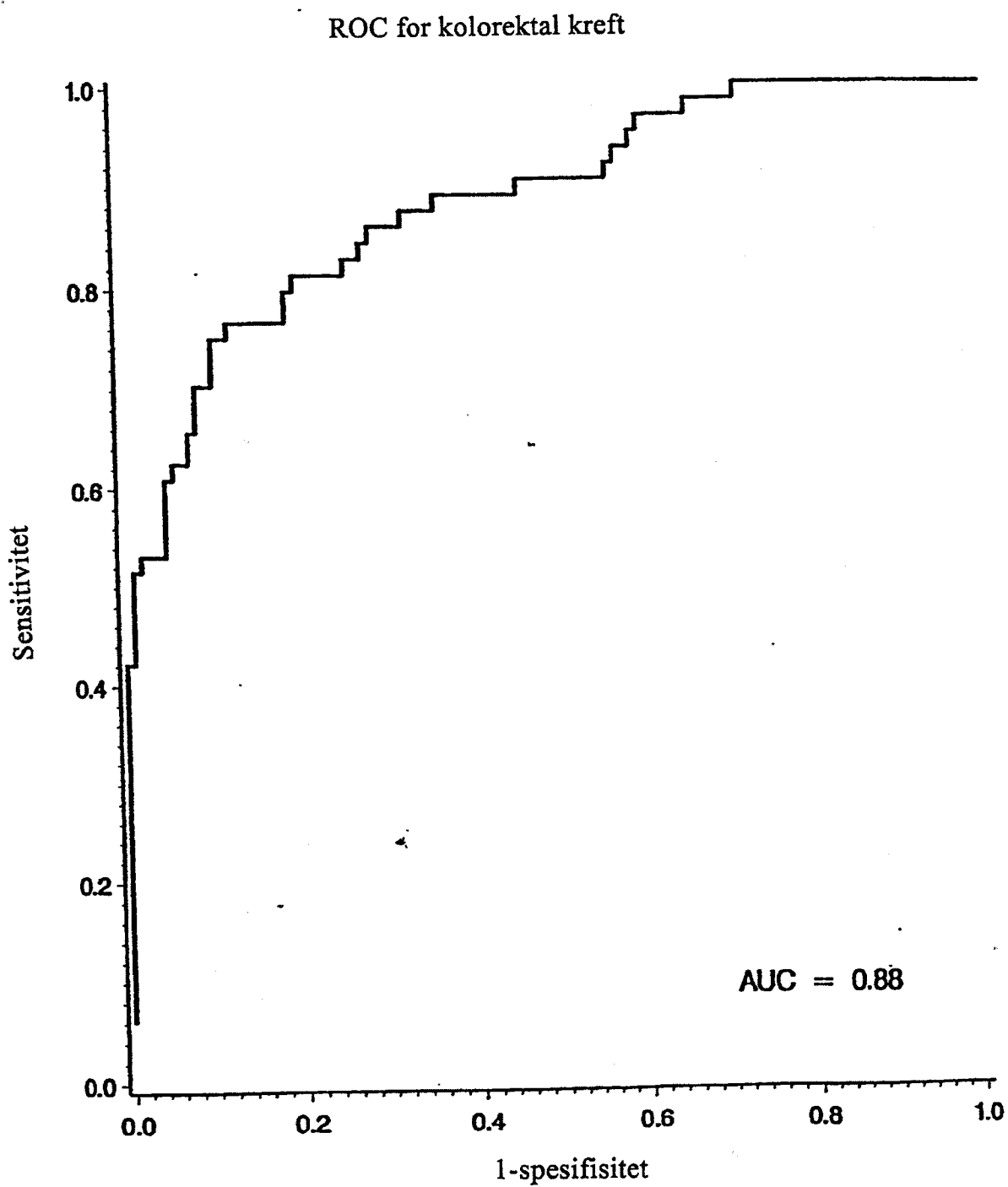
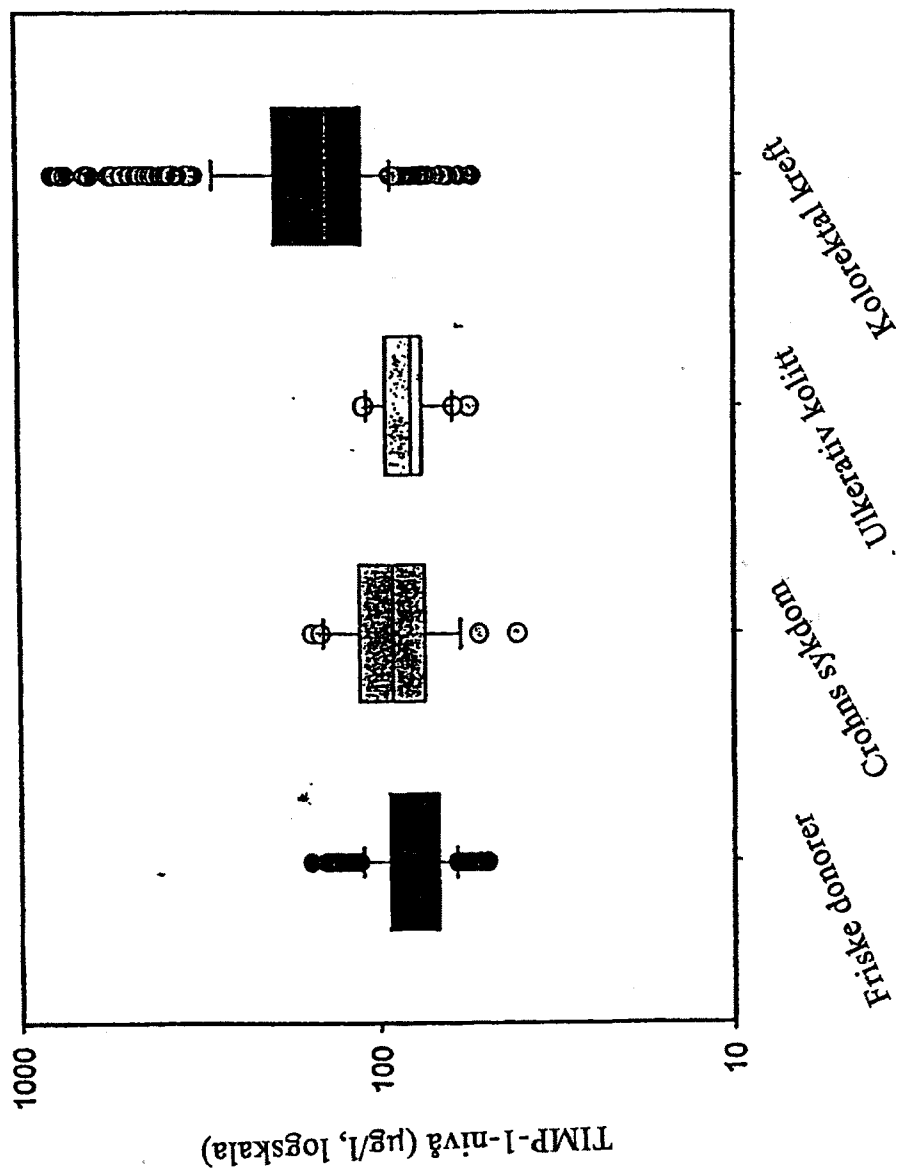


Fig. 15

16/20

TIMP-1-nivåer ($\mu\text{g/l}$, logskala) i EDTA-plasma fra forskjellige pasientgrupper sammenlignet med friske donorprøver.

**Fig. 16**

17/20

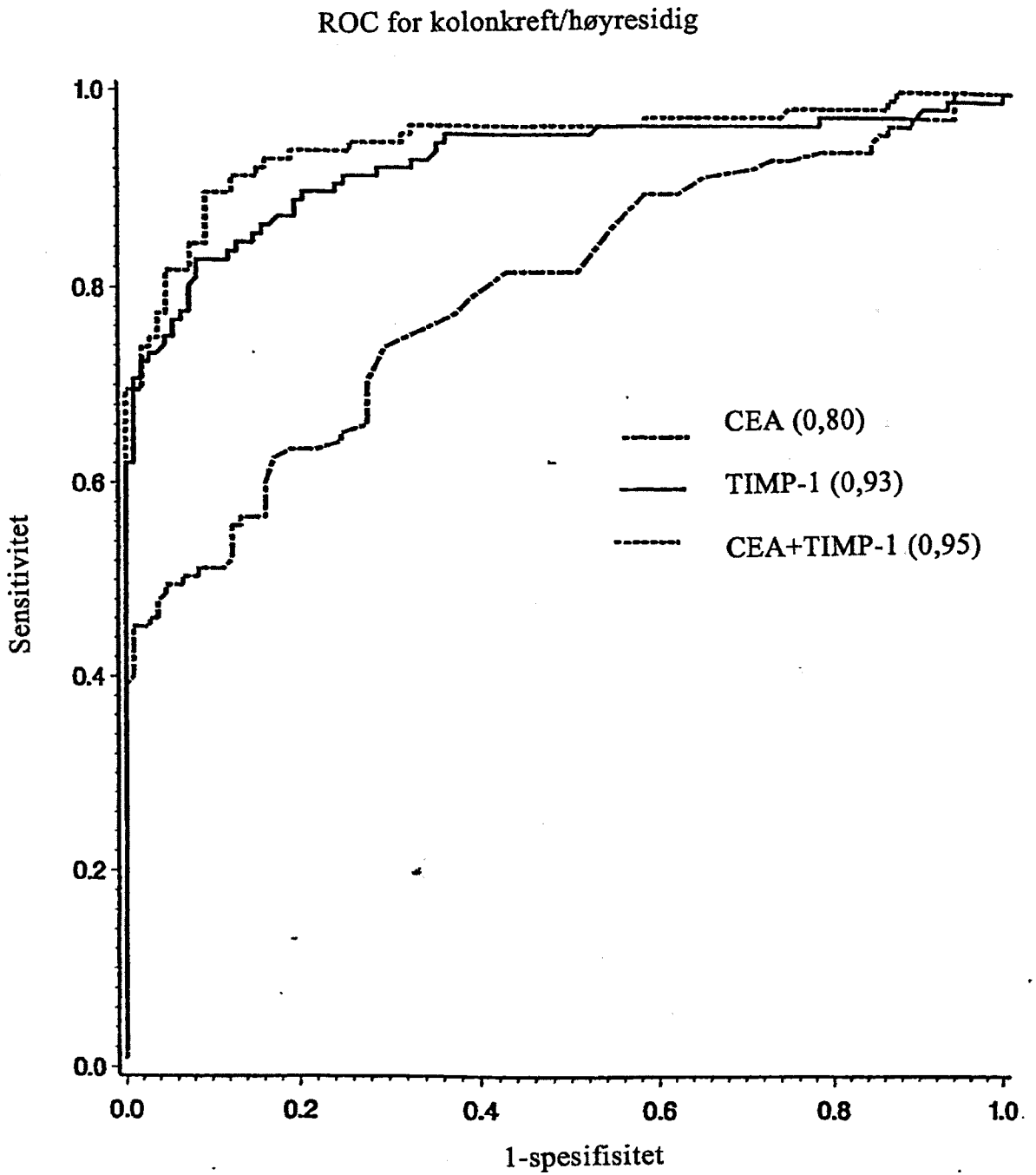


Fig. 17

18/20

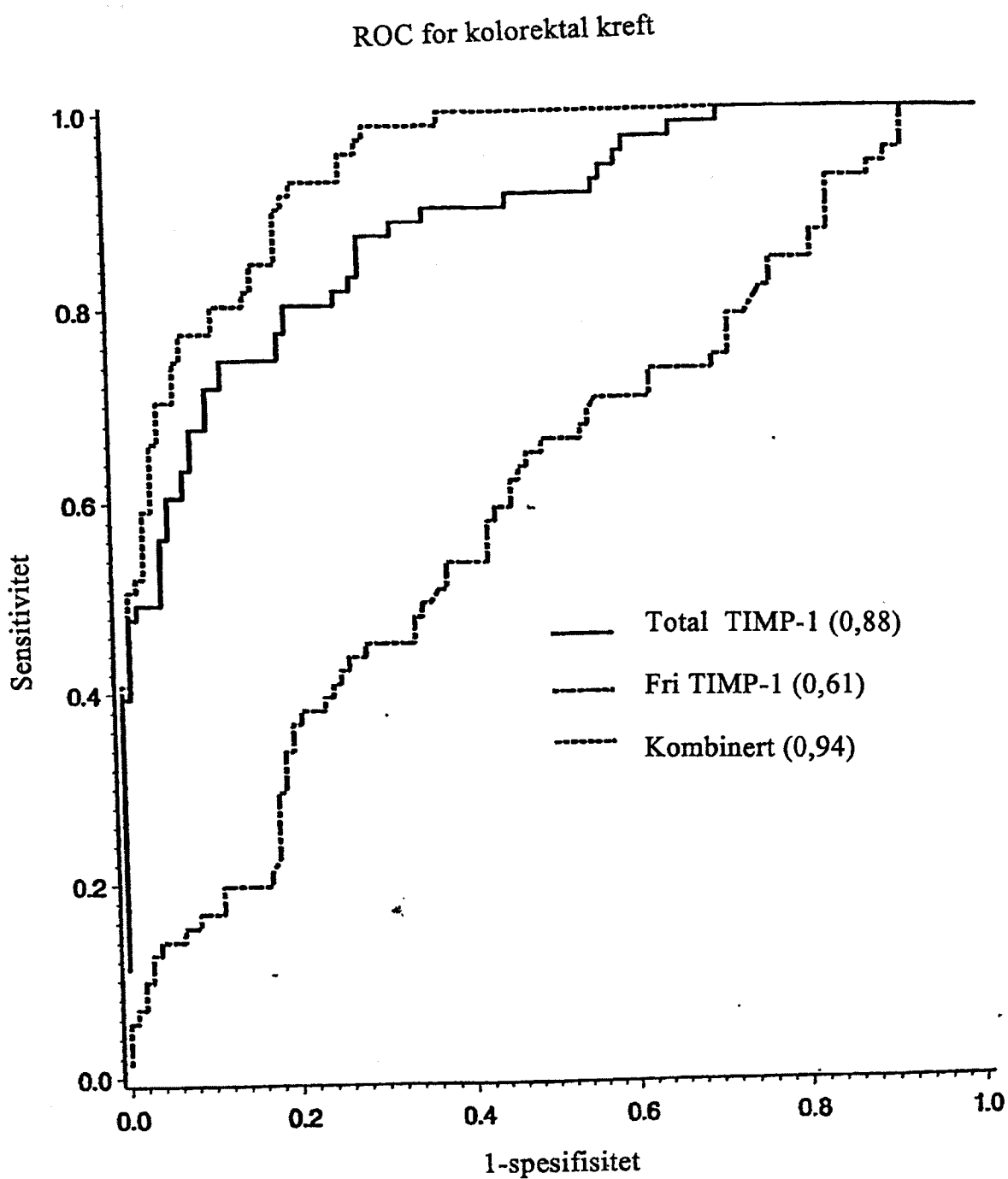


Fig. 18

19/20

ROC for primær brystkreft

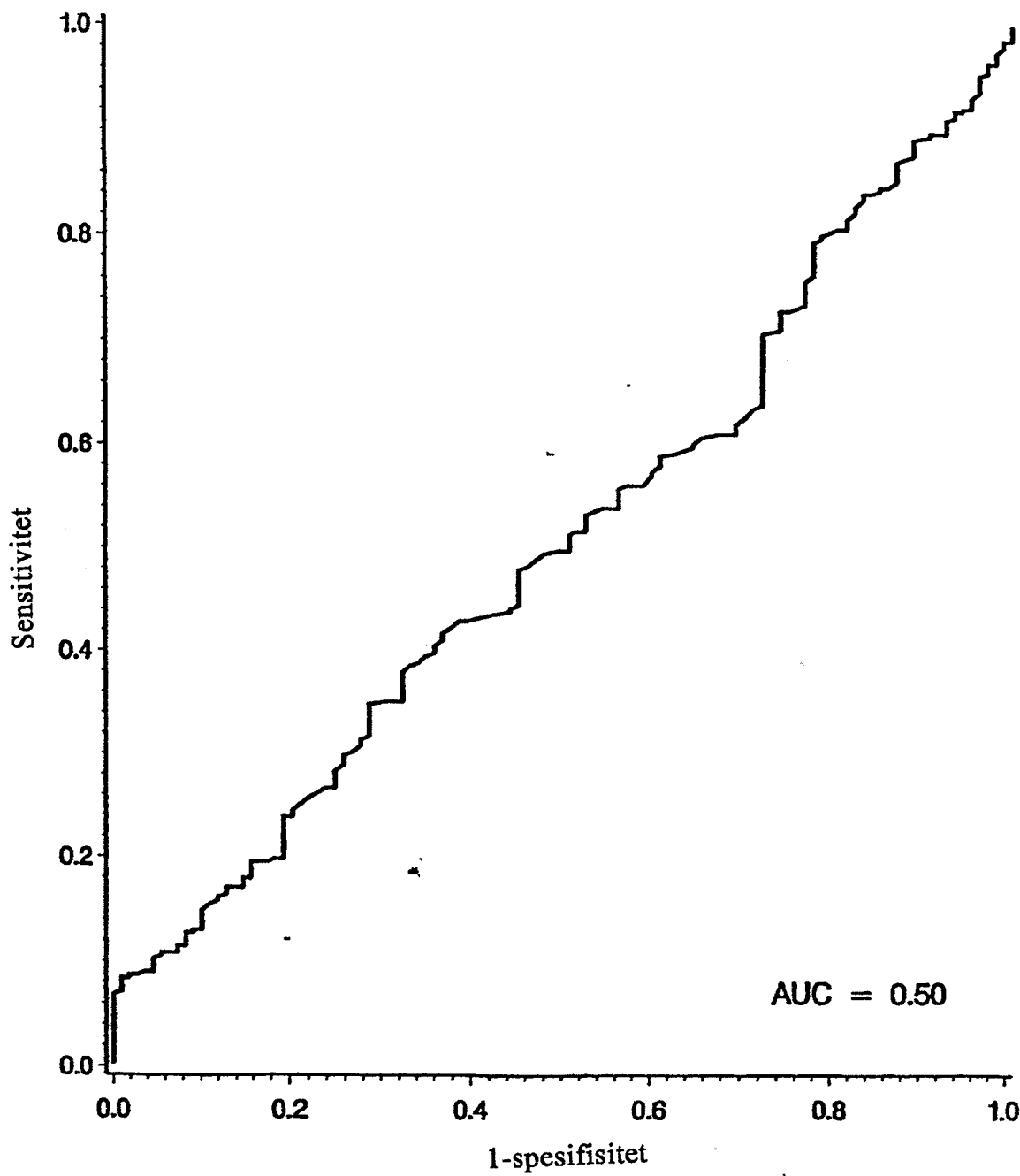
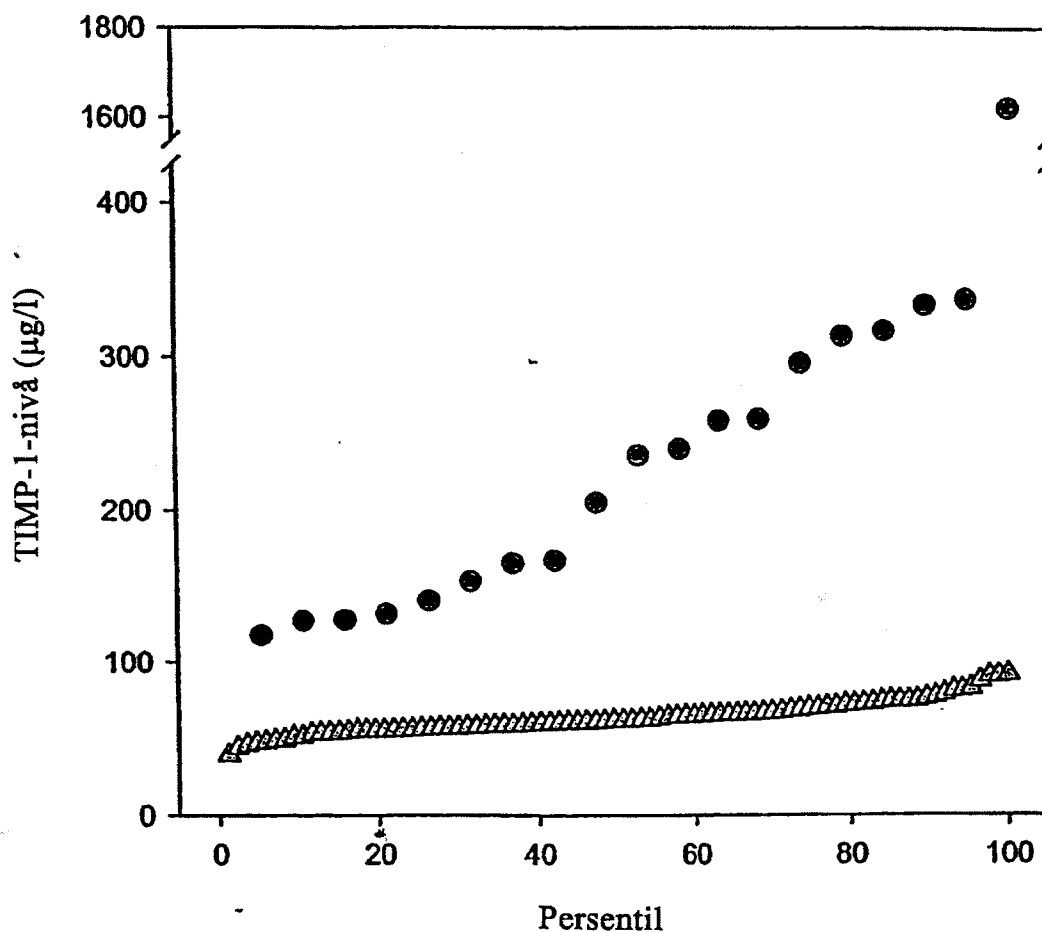


Fig. 19

20/20

TIMP-1 i citratplasma fra friske kvinner (n=87) og pasienter med langt fremskreden brystkreft (n=19)



	Midlere TIMP-1	Gjennomsnitt ± sd
Brystkreftpasienter	236 µg/L	292 ± 331 µg/L
Friske bloddonoror	62.0 µg/L	63.5 ± 10.5 µg/L

Fig. 20