



(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公開本

(11)公開編號：TW 201928351 A

(43)公開日：中華民國 108 (2019) 年 07 月 16 日

(21)申請案號：106145765

(22)申請日：中華民國 106 (2017) 年 12 月 26 日

(51)Int. Cl.：

*G01N33/574 (2006.01)**C12P21/08 (2006.01)**G01N33/53 (2006.01)**G01N33/531 (2006.01)**C12N15/00 (2006.01)**C12N5/16 (2006.01)**C07K16/00 (2006.01)*

(71)申請人：英商昂西免疫有限公司 (英國) ONCIMMUNE LIMITED (GB)

英國

(72)發明人：艾倫 傑瑞德 ALLEN, JARED (GB)；麥克唐納 伊莎貝爾 MACDONALD, ISABEL

(GB)；默里 安德莉亞 MURRAY, ANDREA (GB)；韋爾拜裡 克里斯多夫

WELBERRY, CHRISTOPHER (GB)

(74)代理人：黃仁宜

申請實體審查：無 申請專利範圍項數：11 項 圖式數：0 共 77 頁

(54)名稱

抗體測定

ANTIBODY ASSAY

(57)摘要

本發明涉及通過檢測包含來自哺乳動物物件之體液的受試樣品中的抗體來在所述哺乳動物物件中檢測肝癌的方法，其中所述抗體是對選自 MMP9、AIF1、EpCAM 和 CDKN1B 的腫瘤標誌物蛋白具有免疫特異性的自身抗體，所述方法包括：使所述受試樣品與選自 MMP9、AIF1、EpCAM 和 CDKN1B 的腫瘤標誌物抗原接觸；以及確定與所述受試樣品中存在的自身抗體結合的所述腫瘤標誌物抗原的複合物的存在或不存在，其中所述複合物的存在指示肝癌的存在。本發明中還包括在哺乳動物中診斷和治療肝癌的對應方法、預測對抗肝癌治療之響應的對應方法、檢測包含來自哺乳動物物件之體液的受試樣品中的抗體的對應方法以及適合用於進行本發明方法的試劑盒。

The present invention relates to a method of detecting liver cancer in a mammalian subject by detecting an antibody in a test sample comprising a bodily fluid from the mammalian subject, wherein the antibody is an autoantibody immunologically specific for a tumour marker protein selected from the group consisting of MMP9, AIF1, EpCAM and CDKN1B, which method comprises contacting the test sample with a tumour marker antigen selected from the group consisting of MMP9, AIF1, EpCAM and CDKN1B and determining the presence or absence of complexes of the tumour marker antigen bound to autoantibodies present in the test sample where the presence of said complexes is indicative of the presence of liver cancer. Also included within the invention are corresponding methods of diagnosing and treating liver cancer in a mammalian subject, corresponding methods of predicting response to an anti-liver cancer treatment, a corresponding method of detecting an antibody in a test sample comprising a bodily fluid from a mammalian subject and kits suitable for performing methods of the invention.

發明專利說明書

(本說明書格式、順序，請勿任意更動)

【發明名稱】 抗體測定

ANTIBODY ASSAY

【技術領域】

【0001】 本發明一般地涉及抗體檢測領域，並且特別地涉及用於檢測包含患者體液之樣品中與肝癌相關之自身抗體的測定。

【先前技術】

【0002】 很多診斷、預後和/或監測測定依賴於檢測特定疾病狀態或疾病易感性的生物標誌物。這樣的生物標誌物通常是特定疾病特徵性的或與疾病易感性相關的蛋白質或多肽，並且通常用於檢測癌症（包括肝癌）。

【0003】 肝癌並且尤其是肝細胞癌（hepatocellular carcinoma，HCC）是全世界第六常見的癌症，而且其還是癌症死亡的第二常見原因。高死亡率由晚期診斷（通常是在轉移之後）和已存在的肝疾病引起。晚期診斷是由於缺乏早期症狀和用於診斷的影像學技術不是最佳的。

【0004】 血液甲胎蛋白（alpha-fetoprotein，AFP）水準的超聲篩選和評估是目前最廣泛使用的肝癌篩查工具。然而，其差的表現突顯了用於肝癌的經改進早期檢測/篩選測試的重大缺口。

【0005】 明顯的是，有效篩查肝癌存在的臨床上可用的測試由於其可使肝癌得到早期診斷而受到歡迎。此外，對體液樣品（例如，血液樣品）進行的診斷測試相對於其他技術而言快速且相對不具有侵入性，從而提高篩查參與率。早期疾病檢測開闢了副作用較不嚴重的更廣泛範圍的治療選擇。中期肝癌的當前治療途徑涉及全肝移植，並且較早地鑒定患有早期疾病的患者將減輕器官捐獻者登記簿上的負擔。

【0006】 由於肝癌的比例在世界範圍內提高，用於肝癌的經改進篩查測試在全世界將是有用的。目前，中國占有所有 HCC 病例的約 50%，

而埃及也具有非常高的 HCC 比例。HCC 在這些國家的高患病率被認為部分地是因為乙型肝炎 (hepatitis B) 在中國的高發病率和丙型肝炎 (hepatitis C) 在埃及的高患病率。乙型肝炎和丙型肝炎以及肝硬化、非酒精性脂肪性肝病 (non-alcoholic fatty liver disease)、酒精性肝病、威爾遜病 (Wilson's disease)、遺傳性血色素沉著病 (hereditary hemochromatosis)、自身免疫性肝炎、證實的黃麴黴毒素暴露 (documented aflatoxin exposure)、血吸蟲病和糖尿病是肝癌的已知風險因數。這些病症在世界範圍內的患病率提高使得急需設計用於肝癌的快速且非侵入性的測試。

【0007】 近年來，越來越明顯的是，抗體（並且特別是自身抗體）可用作疾病或疾病易感性的生物標誌物。自身抗體是針對個體免疫系統識別為外來的抗原的天然抗體，即使該抗原實際上來源於個體。其可作為迴圈游離自身抗體或以由與其靶蛋白結合之自身抗體組成的迴圈免疫複合物的形式存在於迴圈中。由“正常”細胞表達的野生型蛋白與由患病細胞或在患病過程期間產生的經改變蛋白質形式之間的差異在一些情況下可導致經改變蛋白質被個體的免疫系統識別為“非自身的”並因此在該個體中引發免疫應答。這可以是導致產生對經改變蛋白質具有免疫特異性的自身抗體的體液（即 B 細胞介導的）免疫應答。

【0008】 就自身抗體產生而言測量個體針對腫瘤標誌物蛋白之存在的免疫應答的測定提供直接測量或檢測體液中的腫瘤標誌物蛋白的替代方案。這樣的測定實質上構成了腫瘤標誌物蛋白之存在的間接檢測。免疫應答的性質意味著，非常少量的迴圈腫瘤標誌物蛋白可能以可引發自身抗體，並且依賴於檢測針對腫瘤標誌物蛋白的免疫應答的間接方法將因此比用於直接測量體液中腫瘤標誌物蛋白水準的方法更靈敏。因此，基於自身抗體檢測的測定方法在患病過程早期可具有特別的價值。

【0009】 本發明人已出人意料地確定了先前未知與肝癌相關的四種腫瘤標誌物抗原。通過檢測針對這些腫瘤標誌物抗原中任一種的自身抗體，任選地與一種或更多種另外的腫瘤標誌物抗原組合，本發明人已設計了用於肝癌的有效且非侵入性的篩查方法，以及對應的

試劑盒。

【發明內容】

【0010】 本發明人已出人意料地確定，對以下腫瘤標誌物蛋白中任一種具有免疫特異性的自身抗體指示肝癌的存在：基質金屬肽酶 9（matrix metalloproteinase 9, MMP9）、異體移植炎性因數 1（allograft inflammatory factor 1, AIF1）、上皮細胞黏附分子（epithelial cell adhesion molecule, EpCAM）和週期蛋白依賴性激酶抑制劑 1B（cyclin-dependent kinase inhibitor 1B, CDKN1B）。因此，對這些腫瘤標誌物蛋白中任一種具有免疫特異性的自身抗體的檢測可用於肝癌的診斷。

【0011】 根據本發明的第一方面，提供了檢測包含來自哺乳動物物件之體液的受試樣品中的抗體的方法，其中所述抗體是對選自 MMP9、AIF1、EpCAM 和 CDKN1B 的腫瘤標誌物蛋白具有免疫特異性的自身抗體，所述方法包括以下步驟：

- (a) 使受試樣品與選自 MMP9、AIF1、EpCAM 和 CDKN1B 的腫瘤標誌物抗原接觸；以及
- (b) 確定與受試樣品中存在的自身抗體結合的腫瘤標誌物抗原的複合物的存在或不存在。

【0012】 在該方面，所述物件優選地被懷疑患有肝癌。

【0013】 根據本發明的第二方面，提供了通過檢測包含來自哺乳動物物件之體液的受試樣品中的抗體來在所述哺乳動物物件中檢測肝癌的方法，其中所述抗體是對選自 MMP9、AIF1、EpCAM 和 CDKN1B 的腫瘤標誌物蛋白具有免疫特異性的自身抗體，所述方法包括以下步驟：

- (a) 使受試樣品與選自 MMP9、AIF1、EpCAM 和 CDKN1B 的腫瘤標誌物抗原接觸；以及
- (b) 確定與受試樣品中存在的自身抗體結合的腫瘤標誌物抗原的複合物的存在或不存在；

其中所述複合物的存在指示肝癌的存在。

【0014】 根據本發明的協力廠商面，提供了通過檢測包含來自哺乳動

物物件之體液的受試樣品中的抗體來在所述哺乳動物物件中診斷和治療肝癌的方法，其中所述抗體是對選自 MMP9、AIF1、EpCAM 和 CDKN1B 的腫瘤標誌物蛋白具有免疫特異性的自身抗體，所述方法包括以下步驟：

- (a) 使受試樣品與選自 MMP9、AIF1、EpCAM 和 CDKN1B 的腫瘤標誌物抗原接觸；
- (b) 確定與受試樣品中存在的自身抗體結合的腫瘤標誌物抗原的複合物的存在或不存在；
- (c) 當檢測到與受試樣品中存在的自身抗體結合的腫瘤標誌物抗原的複合物時，診斷所述物件患有肝癌；以及
- (d) 向所診斷的物件施用肝癌治療。

【0015】 根據本發明的第四方面，提供了預測針對抗肝癌治療之回應的方法，所述方法包括檢測包含來自哺乳動物物件之體液的受試樣品中的抗體，其中所述抗體是對選自 MMP9、AIF1、EpCAM 和 CDKN1B 的腫瘤標誌物蛋白具有免疫特異性的自身抗體，所述方法包括以下步驟：

- (a) 使受試樣品與選自 MMP9、AIF1、EpCAM 和 CDKN1B 的腫瘤標誌物抗原接觸；
- (b) 確定與受試樣品中存在的自身抗體結合的腫瘤標誌物抗原的複合物的存在或不存在；
- (c) 檢測腫瘤標誌物抗原與受試樣品中存在的自身抗體之間特異性結合的量；以及
- (d) 將腫瘤標誌物抗原與自身抗體之間特異性結合的量與先前確立的結合量與可能的治療結果之間的關係進行比較；

其中當與對照相比時，特異性結合的量的改變預測患者將對抗肝癌治療作出或不作出回應。

【0016】 在本發明的這一方面，所述抗肝癌治療可選自化學治療、射頻消融術（radiofrequency ablation）、肝切除術（liver resection）、肝移植、疫苗接種、抗生長因數或信號轉導治療、內分泌治療、人抗體治療、經導管動脈化學栓塞術（transcatheter arterial chemoembolization）、經皮乙醇注射、微波消融術（microwave

ablation)、索拉非尼施用和放射性栓塞術 (radioembolisation)。

【0017】 根據本發明的第五方面，提供了選自 MMP9、AIF1、EpCAM 和 CDKN1B 的腫瘤標誌物抗原在通過檢測包含來自哺乳動物物件之體液的受試樣品中對 MMP9、AIF1、EpCAM 或 CDKN1B 具有免疫特異性的自身抗體來在所述哺乳動物物件中檢測肝癌的方法中的用途，所述方法包括以下步驟：

(a) 使受試樣品與選自 MMP9、AIF1、EpCAM 和 CDKN1B 的腫瘤標誌物抗原接觸；以及

(b) 確定與受試樣品中存在的自身抗體結合的腫瘤標誌物抗原的複合物的存在或不存在，

其中所述複合物的存在指示肝癌的存在。

【0018】 根據本發明的第六方面，提供了用於檢測包含來自哺乳動物物件之體液的受試樣品中的自身抗體的試劑盒，其包含：

(a) 選自 MMP9、AIF1、EpCAM 和 CDKN1B 的腫瘤標誌物抗原；和

(b) 能夠檢測與受試樣品中存在的自身抗體結合的腫瘤標誌物抗原的複合物的試劑。

【0019】 根據本發明的第七方面，提供了在包含來自哺乳動物物件之體液的受試樣品中確定患有肝癌之個體的抗體譜 (antibody profile) 的體外方法，其中所述抗體是對選自 MMP9、AIF1、EpCAM 和 CDKN1B 的腫瘤標誌物蛋白具有免疫特異性的自身抗體，所述方法包括以下步驟：

a) 使受試樣品與選自 MMP9、AIF1、EPCAM 和 CDKN1B 的腫瘤標誌物抗原接觸；以及

【0020】 b) 確定與受試樣品中存在的自身抗體結合的腫瘤標誌物抗原的複合物的存在或不存在，其中重複所述方法以建立抗體產生譜 (profile of antibody production)。在本發明的所有方面，所述哺乳動物物件優選地是人。在文本中，術語“哺乳動物物件”和“物件”將可互換使用，是指為哺乳動物 (優選人) 物件。

【0021】 在本發明的所有方面，所述方法優選地在體外對包含從哺乳動物物件獲得或製備的體液的受試樣品進行。

【0022】 對選自MMP9、AIF1、EpCAM和CDKN1B的腫瘤標誌物蛋白

具有免疫特異性的自身抗體可用作肝癌標誌物的出人意料的發現已允許本發明人設計可用於對肝癌進行檢測和診斷的用於檢測此類自身抗體的方法。這樣的檢測可使用試劑盒來進行，並且這些方法和試劑盒形成本发明的核心。

【圖式簡單說明】

【0023】 圖1. 用於演示推導以下二次曲線參數（secondary curve parameter）的示意圖：圖1A=斜率、截距、曲線下面積（Area under the Curve，AUC）和SlopeMax；圖1B=解離常數（Kd）。

【0024】 圖2. 自身抗體微量滴定板佈局：圖2A = 高通量測定（high-throughput assay，HTPA）佈局；圖2B = 滴定佈局。

【實施方式】

【0025】 本發明一般地提供了用於檢測對選自MMP9、AIF1、EpCAM和CDKN1B的腫瘤標誌物蛋白具有免疫特異性的自身抗體的免疫測定方法。該免疫測定方法可用於檢測或診斷肝癌。

檢測自身抗體的方法

【0026】 根據本发明的第一方面，提供了檢測包含來自哺乳動物物件之體液的受試樣品中的抗體的方法，其中所述抗體是對選自MMP9、AIF1、EpCAM和CDKN1B的腫瘤標誌物蛋白具有免疫特異性的自身抗體，所述方法包括以下步驟：

(a) 使受試樣品與選自MMP9、AIF1、EpCAM和CDKN1B的腫瘤標誌物抗原接觸；以及

(b) 確定與受試樣品中存在的自身抗體結合的腫瘤標誌物抗原的複合物的存在或不存在。

【0027】 本文中使用的術語“自身抗體”是指標對個體的免疫系統識別為外來物（即便該抗原實際上起源於該個體）的天然抗體。通常來說，自身抗體包括針對由患病細胞或疾病過程期間產生的天然蛋白質之經改變形式的抗體。蛋白質的經改變形式起源於個體，但可被個體的免疫系統視為“非自身（non-self）”，並因此以對該經改變蛋白質具有免疫特異性之自身抗體的形式在該個體中引起免疫應答。蛋白質的此類經改變形式可包括例如：具有經改變氨基酸序列的突變體，任選伴隨有二級、三級或四級結構，截短形式，拼接變體，經改變糖型等的改變。在另一些實施方案中，自身抗體可針對在疾病狀態中過表達的蛋白質，或作為基因擴增或異常轉錄調節的結果。顯著量的免疫系統細胞不常遇到的蛋白質的過表達可引發導致自身抗體產生的免疫應答。在另一些實施方案中，自身抗體可針對變成疾病狀態中表達的蛋白質的胎兒形式。如果通常只在發育早期階段（在免疫系統發揮功能之前）表達的胎兒蛋白質成為以疾病狀態表達，則在充分發育的人中以疾病狀態表達的胎兒形式可被免疫系統識別為“外來物”，從而引發導致自身抗體產生的免疫應答。在又一些實施方案中，自身抗體可針對在疾病狀態中於不同位置表達的蛋白質。例如，蛋白質可在健康個體的內部位置處表達，但是在疾病狀態下的表面暴露位置處表達，使得其暴露於迴圈，並因此暴露於疾病狀態的免疫系統，但不暴露于健康個體的免

疫系統。本文中，自身抗體所針對的蛋白質將被稱為“腫瘤標誌物蛋白”。

【0028】 在本發明的範圍內，考慮可檢測對MMP9、AIF1、EpCAM和CDKN1B中的任一種具有免疫特異性的自身抗體。本發明還考慮對這些腫瘤標誌物蛋白中的一種具有免疫特異性的自身抗體和對這些腫瘤標誌物蛋白中的第二種具有免疫特異性的自身抗體的檢測，任選地，與對這些腫瘤標誌物蛋白中的第三種具有免疫特異性的自身抗體的檢測，並且還任選地，對這些腫瘤標誌物蛋白中的第四種具有免疫特異性的自身抗體的檢測的組合。然而，本發明絕不限於該方面。當檢測到對經鑒定的腫瘤標誌物蛋白中的兩種或三種具有免疫特異性的自身抗體時，考慮兩種或三種腫瘤標誌物蛋白的所有組合。

【0029】 在本發明的上下文中，所使用的術語“抗原”是指與受試樣品中存在的自身抗體複合的免疫特異性試劑。抗原是包含能夠與期望檢測的靶自身抗體特異性相互作用的至少一種抗原決定簇或表位的物質，或與所述自身抗體的可變區或互補決定區特異性相互作用的任何捕獲劑。抗原通常將是天然或合成的生物大分子，例如蛋白質或肽、多糖或核酸，並且可包括抗體或其片段，例如抗獨特型抗體(anti-idiotypic antibody)。“腫瘤標誌物抗原”是患有癌症(在本上下文中特別地是肝癌)的對象中升高的抗原。本文中，術語“腫瘤標誌物抗原”與“抗原”將可互換使用。

【0030】 當提及待使用本發明的方法測試自身抗體之存在的材料

時，本文中使用的術語“體液”尤其包括血漿、血清、全血、尿、汗、淋巴、糞便、腦脊液、腹水、胸腔積液、精液、痰、乳頭抽吸液（nipple aspirate）、術後血清腫（post-operative seroma）、唾液、羊水、淚和傷口引流液（wound drainage fluid）。如前述的，本發明的方法優選在體外對包含從受試物件中取出的體液的受試樣品進行。所使用的體液類型可根據待測試的自身抗體的身份以及使用該測定的臨床情況而變化。通常來說，優選進行對血清或血漿樣品的測定。除了體液以外，受試樣品還可包含例如稀釋劑、防腐劑、穩定劑、緩衝劑等的組分。

【0031】 在某些實施方案中，本發明的方法還可包括以下步驟：

(c) 檢測腫瘤標誌物抗原與受試樣品中存在的自身抗體之間特異性結合的量，

其中自身抗體的存在或不存在是以所觀察到的特異性結合的量與預定取捨值之間的比較為基礎。

【0032】 在該實施方案中，腫瘤標誌物抗原與受試樣品中存在的自身抗體之間的特異性結合的量可以是結合的相對量或結合的絕對量。

【0033】 在此，如果腫瘤標誌物抗原與受試樣品中存在的自身抗體之間特異性結合的量高於或低於預定取捨值，則自身抗體可被認為是存在的。然而，通常地如果腫瘤標誌物抗原與受試樣品中存在的自身抗體之間特異性結合的量高於預定取捨值，則自身抗體被認為是存在的。預定取捨值可通過在病例對照研究中對已知陰性樣品

（例如正常個體）進行對照測定來確定。基於臨床、影像學和/或生物化學標準，“正常”個體將優選是不具有任何肝癌診斷的年齡匹配對照。在某些實施方案中，已知的陰性樣品可來源於良性肝病個體，即在肝癌高風險下但沒有顯示出任何肝癌證據的那些個體。優選地，正常個體不具有任何癌症的任何診斷。在此，可檢測到腫瘤標誌物抗原與來自正常患者的受試樣品中存在的自身抗體之間特異性結合的量並且進行平均以提供預定取捨值。在某些實施方案中，預定取捨值可通過選擇給出最大的約登值（Youden's value）的取捨值來確定（其保持大於90%的特異性）。

【0034】 本發明人出人意料地發現，對MMP9、AIF1、EpCAM和CDKN1B中的任一種具有免疫特異性的自身抗體與肝癌相關。因此，在某些實施方案中，所述物件可被懷疑患有肝癌。考慮懷疑對象可患有肝癌的任何原因。

【0035】 在本發明的所有方面中，肝癌可以是肝細胞癌（HCC）。

【0036】 在某些實施方案中，可懷疑哺乳動物物件患有肝癌，因為其先前在肝癌篩查中已被檢測呈陽性。在此考慮任何肝癌篩查。在某些實施方案中，所述物件先前可已被測試為對甲胎蛋白（AFP）呈陽性。通常來說，在從物件中採集的血液樣品中檢測到AFP水準，因此所述物件先前可在血液樣品中已被測試為對AFP呈陽性。然而，考慮任何AFP檢測技術。在一些作為替代的實施方案中，所述對象先前可已被檢測對脫- γ 羧基凝血酶原（DCP）或凝集素反應性甲胎蛋白（AFP-L3）呈陽性。通常來說，在從物件中採集的血液

樣品中檢測到DCP和AFP-L3水準並且所述物件可因此先前在血液樣品中已被測試為對DCP或AFP-L3呈陽性。然而，考慮任何DCP或AFP-L3檢測技術。

【0037】 在另一些實施方案中，可使用超聲監測或任何其他影像學方法測試所述物件對肝癌呈陽性。

【0038】 在本發明的範圍內，所述物件可在執行本發明的方法之前的任何點在肝癌篩查中已被測試為呈陽性。例如，肝癌篩查可在進行本發明的方法之前已經進行1小時、2小時、3小時、4小時、5小時、6小時、7小時、8小時、9小時、10小時、11小時、12小時、24小時、2天、3天、4天、5天、6天、1周、2周、3周、4周、1個月、2個月、3個月、4個月、5個月、6個月、1年、2年、3年、4年、5年、6年、7年、8年、9年、10年或更長。

【0039】 出於本發明的目的，正經歷肝癌治療或者先前經歷過肝癌治療的物件仍可被認為“懷疑患有肝癌”。本文中，肝癌的治療可在任何時間進行，並且所述物件可以或可以不隨後進行肝癌之存在的測試。

【0040】 所述物件由於肝癌已知風險因素的存在而被懷疑患有肝癌。在某些實施方案中，所述物件可患有肝硬化、非酒精性脂肪性肝病、酒精性肝病、威爾遜病、遺傳性血色素沉著病、自身免疫性肝炎、乙型肝炎、丙型肝炎、證實的黃麴黴毒素暴露、血吸蟲病或糖尿病。考慮確定這些風險因素的任何方法，並且所述物件可以或可以不正經歷或已經經歷與風險因素相關的治療。

【0041】 由於本發明人出人意料地確定對 MMP9、AIF1、EpCAM 和 CDKN1B 具有免疫特異性的自身抗體與肝癌相關，對這些腫瘤標誌物蛋白的任一種具有免疫特異性的自身抗體的受試樣品的檢測可用於檢測肝癌的方法。在一個方面中，本發明因此提供了通過檢測包含來自哺乳動物物件之體液的受試樣品中的抗體來在哺乳動物物件中檢測肝癌的方法，其中所述抗體是對選自 MMP9、AIF1、EpCAM 和 CDKN1B 的腫瘤標誌物蛋白具有免疫特異性的自身抗體，所述方法包括以下步驟：

(a) 使受試樣品與選自 MMP9、AIF1、EpCAM 和 CDKN1B 的腫瘤標誌物抗原接觸；以及

(b) 確定與受試樣品中存在的自身抗體結合的腫瘤標誌物抗原的複合物的存在或不存在；

其中所述複合物的存在指示肝癌的存在。

【0042】 在其最廣泛的一些方面中，本發明涉及用於檢測對 MMP9、AIF1、EpCAM 和 CDKN1B 中的任一種具有免疫特異性的自身抗體的方法，並且不限於肝癌的診斷或任何後續治療。然而，在一個方面中，本發明提供了通過檢測包含來自哺乳動物物件之體液的受試樣品中的抗體來在哺乳動物物件中診斷和治療肝癌的方法，其中所述抗體是對選自 MMP9、AIF1、EpCAM 和 CDKN1B 的腫瘤標誌物蛋白具有免疫特異性的自身抗體，所述方法包括以下步驟：

(a) 使受試樣品與選自 MMP9、AIF1、EpCAM 和 CDKN1B 的腫瘤標誌物抗原接觸；

(b) 確定與受試樣品中存在的自身抗體結合的腫瘤標誌物抗原的複合物的存在或不存在；

(c) 當檢測到與受試樣品中存在的自身抗體結合的腫瘤標誌物抗原的複合物時，診斷所述物件患有肝癌；以及

(d) 向所診斷的物件施用肝癌治療。

【0043】 在該方面中，如上所述的，如果腫瘤標誌物抗原與受試樣品中存在的自身抗體之間特異性結合的量高於或低於預定取捨值，則自身抗體可被認為是存在的。

【0044】 在本發明的範圍中，在肝癌診斷之後的任何時間可以施用肝癌治療。例如，在肝癌診斷之後1小時、2小時、3小時、4小時、5小時、6小時、7小時、8小時、9小時、10小時、11小時、12小時、24小時、2天、3天、4天、5天、6天、1周、2周、3周、4周、1個月、2個月、3個月、4個月、5個月、6個月、1年或更長，可施用肝癌治療。還考慮在治療輪次之間任何間隔內肝癌治療的多次施用。

【0045】 考慮不同於進行肝癌診斷之地理位置的地理位置處的肝癌治療的施用。此外，不論診斷和治療是在相同還是不同的地理位置處進行，肝癌治療都可由與進行診斷之人不同的人來施用。

【0046】 在一個方面中，本發明的自身抗體檢測方法可用於治療分層 (treatment stratification)，即確定特定患者或患者組是否或多或少地可能對特定抗肝癌治療作出回應。例如，本發明的自身抗體檢測方法可用於預測物件對抗肝癌治療作出的回應。

【0047】 因此，本發明提供了預測對抗肝癌治療作出回應的方法，所述方法包括檢測包含來自哺乳動物物件之體液的受試樣品中的抗體，其中所述抗體是對選自 MMP9、AIF1、EpCAM 和 CDKN1B 的腫瘤標誌物蛋白具有免疫特異性的自身抗體，所述方法包括以下步驟：

- (a) 使受試樣品與選自 MMP9、AIF1、EpCAM 和 CDKN1B 的腫瘤標誌物抗原接觸；
- (b) 確定與受試樣品中存在的自身抗體結合的腫瘤標誌物抗原的複合物的存在或不存在；
- (c) 檢測腫瘤標誌物抗原與受試樣品中存在的自身抗體之間特異性結合的量；以及
- (d) 將腫瘤標誌物抗原與自身抗體之間特異性結合的量與先前確立的結合量與可能的治療結果之間的關係進行比較；

其中當與對照相比時，特異性結合的量的改變預測患者將對所述抗肝癌治療作出或不作出回應。

【0048】 本文中，對照優選是來源於已知患有肝癌之物件的體液樣品，並且已知對所測試的抗肝癌治療不作出回應，即為非回應性對照。

【0049】 應注意，本發明絕不限於任何具體肝癌治療。在某些實施方案中，肝癌治療可選自化學治療、射頻消融術、肝切除術、肝移植、疫苗接種、抗生長因數或信號轉導治療、內分泌治療、人抗體治療、經導管動脈化學栓塞術、經皮乙醇注射、微波消融術、索拉非尼施用和放射性栓塞術。

【0050】 本發明的上述方面通常將進行一次。然而，體外免疫測定不具有侵入性並且可根據認為建立患者中自身抗體產生譜的需要而經常地進行，不管是在肝癌發生之前如在篩查“處於風險中的”個體中，還是在整個疾病過程中。

【0051】 因此，本發明提供了在包含來自哺乳動物物件之體液的受試樣品中確定患有肝癌之個體的抗體譜的體外方法，其中所述抗體是對選自 MMP9、AIF1、EpCAM 和 CDKN1B 的腫瘤標誌物蛋白具有免疫特異性的自身抗體，所述方法包括以下步驟：

- a) 使受試樣品與選自 MMP9、AIF1、EPCAM 和 CDKN1B 的腫瘤標誌物抗原接觸；以及
- b) 確定與受試樣品中存在的自身抗體結合的腫瘤標誌物抗原的複合物的存在或不存在，其中重複所述方法以建立抗體產生譜。

兩種或更多種腫瘤標誌物抗原的組

【0052】 在本發明的某些實施方案中，所述方法可檢測兩種或更多

種自身抗體。例如，所述方法可檢測兩種、三種、四種、五種、六種、七種、八種、九種、十種、十一種、十二種、十三種、十四種、十五種、十六種、十七種、十八種、十九種、二十種、二十一種、二十二種、二十三種、二十四種、二十五種、二十六種、二十七種、二十八種、二十九種、三十種、三十一種、三十二種、三十三種、三十四種、三十五種、三十六種、三十七種、三十八種或更多種自身抗體。根據本發明的核心，所述自身抗體中的一種對選自MMP9、AIF1、EpCAM和CDKN1B的腫瘤標誌物蛋白具有免疫特異性。

【0053】 在這些實施方案中，所述方法包括以下步驟：

(a) 使受試樣品與兩種或更多種腫瘤標誌物抗原的組(panel)接觸，所述組包含選自MMP9、AIF1、EpCAM和CDKN1B的腫瘤標誌物抗原以及對至少一種所述自身抗體具有免疫特異性的一種或更多種另外的腫瘤標誌物抗原。

【0054】 這些方法可以在下文中稱為“組測定”。這樣的測定通常比檢測單一腫瘤標誌物抗原的自身抗體更靈敏，並且給出頻率要低得多的假陰性結果（參見WO 99/58978、WO 2004/044590和WO2006/126008，其內容通過引用併入本文）。

【0055】 一般認為，將通過檢測多種自身抗體的存在來提高測定的靈敏度。因此，在一些實施方案中，本發明的方法考慮使用包含多種腫瘤標誌物抗原的組，例如兩種、三種、四種、五種、六種、七種、八種、九種、十種、十一種、十二種、十三種、十四種、十五

種、十六種、十七種、十八種、十九種、二十種、二十一種、二十二種、二十三種、二十四種、二十五種、二十六種、二十七種、二十八種、二十九種、三十種、三十一種、三十二種、三十三種、三十四種、三十五種、三十六種、三十七種、三十八種或更多種腫瘤標誌物抗原。

【0056】 應注意，這種組實施方案可與本發明的所有方法一起使用，包括檢測自身抗體的方法、檢測肝癌的方法、診斷和治療肝癌的方法、預測對抗肝癌治療作出回應的方法以及確定抗體譜的方法。

【0057】 在某些實施方案中，所述組可包含作為不同抗原的兩種或更多種腫瘤標誌物抗原。本文中，術語“不同抗原”涵蓋來源於不同蛋白質或多肽的抗原（例如，來源於由不同基因編碼的不相關蛋白質的抗原）。

【0058】 本發明還考慮使用包含一種或更多種不同抗原的兩種或更多種抗原變體的組的方法。本文中使用的術語“抗原變體”是指單一抗原（例如上文中所定義的單一蛋白質抗原）的等位基因或其他變體。抗原變體將一般地來源於單一基因，並且不同的抗原變體可在不同的群體成員或不同的疾病狀態中表達。抗原變體可在氨基酸序列或翻譯後修飾（例如糖基化、磷酸化或乙醯化）方面不同。此外，術語“抗原變體”涵蓋抗原突變，例如氨基酸替換、添加或缺失。通常來說，相對於野生型抗原，抗原變體將包含少於五種（例如，少於四種、少於三種、少於兩種或一種）突變。

【0059】 在這種組實施方案中，“一種或更多種另外的腫瘤標誌物抗原”優選除了對選自MMP9、AIF1、EpCAM和CDKN1B的腫瘤標誌物蛋白具有免疫特異性的自身抗體以外還對自身抗體具有免疫特異性，如下文進一步討論的。然而，雖然本發明絕不限於該方面，但是本發明考慮對這四種腫瘤標誌物蛋白中的一種具有免疫特異性的自身抗體和對這四種腫瘤標誌物蛋白中的第二種具有免疫特異性的自身抗體的檢測，任選地與對這四種腫瘤標誌物蛋白中的第三種具有免疫特異性的自身抗體的檢測組合且另外任選地與對這四種腫瘤標誌物蛋白的第四種具有免疫特異性的自身抗體的檢測組合。當檢測到對經鑒定的腫瘤標誌物蛋白的兩種或三種具有免疫特異性的自身抗體時，考慮兩種或三種腫瘤標誌物蛋白的所有組合。兩種或更多種腫瘤標誌物抗原的組可因此包含選自MMP9、AIF1、EpCAM和CDKN1B的兩種、三種或四種腫瘤標誌物抗原。在某個具體實施方案中，所述組可包含MMP9、AIF1、EpCAM和CDKN1B。在另一個具體實施方案中，所述組可由MMP9、AIF1、EpCAM和CDKN1B組成。

【0060】 在一個實施方案中，兩種或更多種腫瘤標誌物抗原的組可包含選自以下中的一種或更多種腫瘤標誌物抗原：NY-ESO-1、波形蛋白、HSPA4、轉鐵蛋白、HNRNP-L、HSPD1、HNRNP-A2、SALL4、NPM1、YWHAZ、DDX3X、p62、CAGE、MAGE A4、RaiA、GBU4-5、週期蛋白B1、AFP、SOX2、AKR1B10、ApoA1、BCL2、CD44、CK18、CPS1、FUCA1、GLUL、HSPA2、IL-8、MDM2、PEBP1、催乳素、

RGN、SPP1、SSX2和TGFB1。在這個實施方案中，所述組可包含所述腫瘤標誌物抗原中的一種、兩種、三種、四種、五種、六種、七種、八種、九種、十種、十一種、十二種、十三種、十四種、十五種、十六種、十七種、十八種、十九種、二十種、二十一種、二十二種、二十三種、二十四種、二十五種、二十六種、二十七種、二十八種、二十九種、三十種、三十一種、三十二種、三十三種或三十四種。根據本發明，所述組還將包含MMP9、AIF1、EpCAM或CDKN1B並且可包含這些腫瘤標誌物抗原中的一種、兩種、三種或四種。在其中這些腫瘤標誌物抗原中的兩種或三種被包含在所述組中的一些實施方案中，考慮這些抗原中的兩種或三種的所有組合。在具體實施方案中，所述組可包含MMP9、AIF1、EpCAM和CDKN1B。

【0061】 在一個實施方案中，兩種或更多種腫瘤標誌物抗原的組可包含MMP9、AIF1、EpCAM、NY-ESO-1、HSPA4、波形蛋白、HNRNP-L和轉鐵蛋白。在另一個實施方案中，兩種或更多種腫瘤標誌物抗原的組可由MMP9、AIF1、EpCAM、NY-ESO-1、HSPA4、波形蛋白、HNRNP-和轉鐵蛋白組成。

【0062】 在另一個實施方案中，兩種或更多種腫瘤標誌物抗原的組可包含AIF1、EpCAM、HSPA4和CPS1。在另一個實施方案中，兩種或更多種腫瘤標誌物抗原的組可由AIF1、EpCAM、HSPA4和CPS1組成。

【0063】 在另一個實施方案中，兩種或更多種腫瘤標誌物抗原的組可包含EpCAM、NY-ESO-1、波形蛋白、HSPA2、HSPA4和HNRNP-L。

在另一個實施方案中，兩種或更多種腫瘤標誌物抗原的組可由

EpCAM、NY-ESO-1、波形蛋白、HSPA2、HSPA4和HNRNP-L組成。

【0064】 在另一個實施方案中，兩種或更多種腫瘤標誌物抗原的組可包含 MMP9、AIF1、EpCAM、DDX3X、SALL4、MAGE A4、NY-ESO-1、CAGE、RalA 和 SOX2。在另一個實施方案中，兩種或更多種腫瘤標誌物抗原的組可由 MMP9、AIF1、EpCAM、DDX3X、SALL4、MAGE A4、NY-ESO-1、CAGE、RalA 和 SOX2 組成。

【0065】 在另一個實施方案中，兩種或更多種腫瘤標誌物抗原的組可包含 EpCAM、CAGE、SOX2、RalA、MAGE A4、DDX3X 和 NY-ESO-1。在另一個實施方案中，兩種或更多種腫瘤標誌物抗原的組可由 EpCAM、CAGE、SOX2、RalA、MAGE A4、DDX3X 和 NY-ESO-1 組成。

【0066】 在另一個實施方案中，兩種或更多種腫瘤標誌物抗原的組

可包含AIF1、CAGE、HSPD1、SOX2、SALL4、HSPA4和轉鐵蛋白。

在另一個實施方案中，兩種或更多種腫瘤標誌物抗原的組可由

AIF1、CAGE、HSPD1、SOX2、SALL4、HSPA4和轉鐵蛋白組成。

【0067】 在某些具體實施方案中，兩種或更多種腫瘤標誌物抗原的組可根據物件的性別（即物件為雄性還是雌性）而不同。在這個實施方案中，當物件為雌性時，兩種或更多種腫瘤標誌物抗原的組可包含或由以下組成：AIF1、EpCAM、HSPA4 和 CPS1，或者 AIF1、CAGE、HSPD1、SOX2、SALL4、HSPA4 和轉鐵蛋白。此外，在這個實施方案中，當所述物件為雄性時，兩種或更多種腫瘤標誌物抗原的組可包含或由以下組成：EpCAM、NY-ESO-1、波形蛋白、HSPA2、HSPA4 和 HNRNP-L，或者 EpCAM、CAGE、SOX2、RalA、MAGE A4、DDX3X 和 NY-ESO-1。

【0068】 在一個具體實施方案中，兩種或更多種腫瘤標誌物抗原的組可包含 NY-ESO-1、波形蛋白、HSPA4、轉鐵蛋白、HNRNP-L、HSPD1、HNRNP-A2、SALL4、週期蛋白 B1、AFP、NPM1、YWHAZ、DDX3X、p62、CAGE、MAGE A4、RalA、GBU4-5、SOX2、AKR1B10、ApoA1、BCL2、CD44、CK18、CPS1、FUCA1、GLUL、HSPA2、IL-8、

MDM2、PEBP1、催乳素、RGN、SPP1、SSX2 和 TGFB1。根據本發明，所述組還將包含 MMP9、AIF1、EpCAM 或 CDKN1B，並且可包含這些腫瘤標誌物抗原中的一種、兩種、三種或四種。在其中這些腫瘤標誌物抗原中的兩種或三種被包含在所述組中的一些實施方案中，考慮這些抗原中的兩種或三種的所有組合。

【0069】 在一些具體實施方案中，所述組可包含 MMP9、AIF1、EpCAM 和 CDKN1B。例如，兩種或更多種腫瘤標誌物抗原的組可包含 MMP9、AIF1、EpCAM、CDKN1B、NY-ESO-1、波形蛋白、HSPA4、轉鐵蛋白、HNRNP-L、HSPD1、HNRNP-A2、SALL4、週期蛋白 B1、AFP、NPM1、YWHAZ、DDX3X、p62、CAGE、MAGE A4、RalA、GBU4-5、SOX2、AKR1B10、ApoA1、BCL2、CD44、CK18、CPS1、FUCA1、GLUL、HSPA2、IL-8、MDM2、PEBP1、催乳素、RGN、SPP1、SSX2 和 TGFB1。

【0070】 在一個具體實施方案中，兩種或更多種腫瘤標誌物抗原的組由以下組成：MMP9、AIF1、EpCAM、CDKN1B、NY-ESO-1、波形蛋白、HSPA4、轉鐵蛋白、HNRNP-L、HSPD1、HNRNP-A2、SALL4、週期蛋白 B1、AFP、NPM1、YWHAZ、DDX3X、p62、CAGE、MAGE A4、RalA、GBU4-5、SOX2、AKR1B10、ApoA1、BCL2、CD44、CK18、CPS1、FUCA1、GLUL、HSPA2、IL-8、MDM2、PEBP1、催乳素、RGN、SPP1、SSX2 和 TGFB1。

【0071】 在一個具體實施方案中，兩種或更多種腫瘤標誌物抗原的組可包含 CAGE、NY-ESO-1、MMP9、轉鐵蛋白、MAGE A4、RalA、HSPA4、SALL4、週期蛋白 B1、EpCAM、DDX3X 和 AIF1。在另一個實施方案中，兩種或更多種腫瘤標誌物抗原的組可由 CAGE、NY-ESO-1、MMP9、轉鐵蛋白、MAGE A4、RalA、HSPA4、SALL4、週期蛋白 B1、EpCAM、DDX3X 和 AIF1 組成。

【0072】 在一個具體實施方案中，兩種或更多種腫瘤標誌物抗原的組可包含 CAGE、NY-ESO-1、MMP9、轉鐵蛋白、MAGE A4、RalA、HSPA4、SALL4、週期蛋白 B1、EpCAM、DDX3X、AIF1、SOX2 和 AFP。在另一個實施方案中，兩種或更多種腫瘤標誌物抗原的組可由 CAGE、NY-ESO-1、MMP9、轉鐵蛋白、MAGE A4、RalA、HSPA4、

SALL4、週期蛋白B1、EpCAM、DDX3X、AIF1 SOX2和AFP組成。

另外的篩選步驟

【0073】 在本發明的某些實施方案中，本發明的方法還可包括篩選與肝癌相關的另外標誌物。在這個實施方案中，考慮篩查已知與肝癌相關的任何標誌物的任何方法。

【0074】 例如，所述方法還可包括檢測包含來自哺乳動物物件之體液的受試樣品中的甲胎蛋白（AFP）、脫- γ 羧基凝血酶原（DCP）或凝集素反應性甲胎蛋白（AFP-L3）。優選地，體液為血液。在其中所述方法還包括檢測包含來自哺乳動物物件之體液的受試樣品中的甲胎蛋白（AFP）的一些實施方案中，體液優選為血液並且優選將200 ng/ml的取捨值用於評估陽性。

抗原滴定

【0075】 在WO2006/126008（其內容通過引用併入本文）中，可以確定，通過包括抗原滴定步驟，可以顯著改善基於檢測作為疾病生物標誌物的自身抗體的測定的性能（並且更具體地臨床效用和可靠性）。通過測試懷疑包含抵抗一系列不同量的抗原的自身抗體的樣品並構建滴定曲線，可以可靠地鑒定真陽性篩選結果，而與樣品中存在的自身抗體的絕對量無關。WO2006/126008的抗原滴定方法提供比在單個抗原濃度下測量自身抗體反應性更大的特異性和靈敏度，或者血清樣品而不是抗原被滴定的方法。

【0076】 在某些實施方案中，本發明因此考慮其中腫瘤標誌物抗原以多個不同的量提供的方法，並且其中所述方法包括以下步驟：

- (a) 使受試樣品與多種不同量的腫瘤標誌物抗原接觸；
- (b) 確定與受試樣品中存在的自身抗體結合的腫瘤標誌物抗原的複合物

的存在或不存在；

(c) 檢測腫瘤標誌物抗原與自身抗體之間特異性結合的量；

(d) 對於步驟(a)中使用的腫瘤標誌物抗原的每種量，繪製或計算特異性結合的量相對於腫瘤標誌物抗原的量的曲線；以及

(e) 基於在使用的腫瘤標誌物抗原的每種不同量下腫瘤標誌物抗原與自身抗體之間特異性結合的量來確定自身抗體的存在或不存在。

【0077】 在實踐中，不同量的腫瘤標誌物抗原一般將通過改變所使用的腫瘤標誌物抗原的濃度來提供。因此，術語“不同量”和“不同濃度”可互換使用。然而，在本發明的範圍中，考慮改變腫瘤標誌物抗原的量的任何方法。熟練的讀者將理解，在本發明的方法中，可用於與靶自身抗體結合的抗原決定簇或表位的量對於建立滴定系列（即，一組以不同量提供的抗原）是重要的。在許多測定形式中，可用於結合的抗原決定簇或表位的量與存在的抗原分子的量直接相關。然而，在另一些實施方案中，例如某些固相測定系統，暴露的抗原決定簇或表位的量可與抗原的量不直接相關，但是可取決於其他因素，例如與固體表面的附著和構象呈現。在這些實施方案中，本文中提及的滴定系列中的“不同量的抗原”可被認為是指不同量的抗原決定簇或表位。在一些特定實施方案中，抗原量的變化可通過改變所測試樣品所針對的抗原或表位元密度，或通過維持抗原或表位元密度但是抗原被固定的表面積增大，或者通過這二者來實現。

【0078】 在這個實施方案中，“一組抗原”是指在本發明的方法中以不同量測試的單一抗原。

【0079】 在其中考慮多種抗原的一些實施方案中，如上所述，“一組不同的抗原”是指在本發明的方法中以不同量測試的單一抗原，其中每種抗原是來源於不同蛋白質或多肽的“不同抗原”（例如，來源於由不同基因編碼的不相關蛋白質的抗原）。給定的微陣列可僅包含來源於不同蛋白質或多肽的不同抗原組，或者僅包含來源於單一蛋白質或多肽的不同肽表位的不同抗原的組，或者二者以任意比例的混合物。應注意，在本發明的任何實施方案中，不同量的單個組的抗原各自通常將包含僅一種抗原而不包含其混合物。

【0080】 一組抗原變體是指在本發明的方法中以不同量測試的單一抗原變體。

【0081】 在某些實施方案中，可以基於針對使用的所有腫瘤標誌物抗原量的特異性結合量的集體值（collective value）來確定自身抗體的存在或不存在。在本發明的方法期間，對於每個不同測試的抗原（抗原決定簇或表位）量，測定自身抗體與抗原之間特異性結合的相對量或絕對量，並將其用於繪製或計算特異性結合的量（相對量或絕對量）相對於每種測試的抗原量的曲線。與測定中使用的抗原反應的自身抗體的受試樣品中的存在基於在每種抗原量下所觀察到的特異性結合的量並且通常由典型地為 S-形形狀（S-shaped）或 S-形（sigmoidal）的劑量-回應曲線表示。因此，在某些實施方案中，自身抗體的存在或不存在通過篩選針對劑量回應曲線的存在的圖（例如大致 S 形或 sigmoidal 曲線）來確定。如果對於測試的不同抗原量可檢測到的結合中沒有變化，那麼可將其記為不存在可檢測到的自身抗體量。

【0082】 在一個實施方案中，自身抗體的存在或不存在通過將自身抗體與抗原之間特異性結合的量與預定取捨值進行比較來確定。在此，對於滴定系列中使用的每種抗原量，繪製特異性結合的量相對於抗原量的曲線，並且在病例對照研究中，將已知陽性樣品（例如，患有疾病的患者群體）中的結合水準與已知陰性樣品（例如，正常個體）中觀察到的結合水準進行比較。選擇滴定曲線上一個或更多個點處自身抗體結合的取捨值，以使靈敏度（沒有假陰性）最大化同時保持高特異性（沒有假陽性）。只要對於滴定系列中使用的每個抗原量，特異性結合的量相對於抗原量的曲線是劑量響應曲線，如果對於滴定曲線上一個或更多個點確定的特異性結合的量高於預定取捨點值，則認為測量為陽性。在某些實施方案中，預定取捨值可通過選擇給出最大約登值同時保持特異性大於 90% 的取捨值來確定。

【0083】 應注意，該抗原滴定實施方案可與本發明的所有方法一起使用，包括檢測自身抗體的方法、檢測肝癌的方法、診斷和治療肝癌的方法、預測對抗肝癌治療作出回應的方法以及確定抗體譜的方

法。此外，抗原滴定可用於其中僅檢測到單一自身抗體的一些實施方案中以及其中抗原的組用於檢測多種自身抗體的一些實施方案中。

雙取捨

【0084】 通常認為，將通過測量針對多種抗原的自身抗體來提高測定的靈敏度。然而，這種提高的靈敏度通常與特異性的成比例下降相關，因此測定方法可限於其可使用的抗原數。在某些實施方案中，本方法可通過使用確定自身抗體與抗原之間特異性結合水準的抗原滴定方法和二次曲線參數的評估來解釋特異性的降低，其中只有測試結果當與被分類為陽性的這些度量中的這兩個的取捨點相比時被認為是陽性的。該方法在本文中將被稱為“雙取捨”方法並且在 WO2015/193678（其內容通過引用併入本文）中完全地描述。

【0085】 在某些實施方案中，本發明的方法還包括以下步驟：

- (d1) 由步驟(c)中繪製或計算的曲線計算二次曲線參數；以及
- (e) 基於以下的組合來確定自身抗體的存在或不存在：
 - (i) 步驟(b)中確定的自身抗體與腫瘤標誌物抗原之間特異性結合的量；和
 - (ii) 步驟(d1)中確定的二次曲線參數。

【0086】 雙取捨方法使用上述抗原滴定方法。在檢測在滴定系列中使用的每種抗原量下的抗原/自身抗體結合的量並且對於滴定系列中使用的每種抗原量之後，繪製特異性結合的量相對於抗原的量的曲線，計算二次曲線參數。二次曲線參數由線性或對數回歸曲線計算。本文中，二次曲線參數是提供曲線性質指示的任何計算值。例如，二次曲線參數可以是斜率、截距、AUC、SlopeMax 或解離常數（Kd）。這些二次曲線參數示於圖 1 中。

【0087】 斜率使用以下方程式計算：

$$b = \frac{\sum (x - \bar{x})(y - \bar{y})}{\sum (x - \bar{x})^2}$$

其中b是斜率，x是指抗原濃度（nM），並且y是指OD值（吸光度單位（AU））。

【0088】 對於每種樣品，斜率可由線性或對數回歸曲線計算，或者由線性和對數回歸曲線二者計算。

【0089】 回歸線的截距是當 $x=0$ 時 y 軸線的值。

【0090】 對於每種樣品，截距可由線性或對數回歸曲線計算，或者由線性和對數回歸曲線二者計算。

【0091】 AUC可使用總和梯形法則來計算，其可通過評估每組抗原濃度之間的定積分遵循以下公式來完成：

$$\int_a^b f(x) dx \approx (b - a) \left[\frac{f(a) + f(b)}{2} \right].$$

【0092】 對於每對連續的抗原濃度，重複該計算，並將得到的值相加以得到 AUC 的總值。

【0093】 對於每種樣品，曲線下面積（AUC）可由線性或對數回歸曲線計算，或者由線性和對數回歸曲線二者計算。

【0094】 SlopeMax 可使用與上面討論的斜率相同的公式來計算。然而，為了確定每種樣品的斜率的最大可能值，獲得每對連續抗原濃度的斜率值，最大幅度的斜率值表示 SlopeMax。

【0095】 對於每種樣品，SlopeMax 可由線性或對數回歸曲線計算，或者由線性和對數回歸曲線二者計算。

【0096】 解離常數（Kd）可通過將四參數邏輯斯諦曲線擬合至每組滴定點來計算並且使用公式 $F(x)=((A-D)/(1+((x/C)^B)))+D$ 用反覆運算求解方法給出最小漸近線（A）、斜率因數（B）、拐點（C）和最大漸近線（D）參數的值，由此使平方殘差（squared residual）的總和最小化。該求解資料的拐點對應於抗原/自身抗體結合的 Kd。

【0097】 在某些實施方案中，對於滴定系列中使用的每種抗原量，二次曲線參數可通過將邏輯斯諦曲線（例如4參數邏輯斯諦曲線）

擬合至特異性結合的量相對於抗原量的曲線來確定。在這個實施方案中，二次曲線參數可以是最大漸近線、最小漸近線、Hill斜率（或斜率因數）或者拐點。

【0098】 4-參數邏輯斯諦（4PL）曲線是由以下公式定義的曲線：

$$F(x) = ((A-D)/(1+((x/C)^B))) + D,$$

其中A = 最小漸近線，B = Hill斜率（或斜率因數），C = 拐點並且
D = 最大漸近線。

【0099】 為了確定該實施例中的二次曲線參數，使用反覆運算求解函數計算每種樣品和抗原的 4PL 曲線。在此，4 個參數設置為接近每個預期值的值，具有以下限制：最小漸近線的值固定為 0，Hill 斜率的值限制為正值，並且拐點限制為最大值 1000。

【00100】 然後可計算滴定曲線的每個點與 4PL 曲線上的相應點之差值（由公式 $F(x) = ((A-D)/(1+((x/C)^B))) + D$ 返回），對差值進行平方並且對所有平方後的差值進行求和。

【00101】 然後調整用於 4 二次曲線參數的值，並且以反覆運算的方式重複計算平方平均值的總和，直到平方平均值的總和盡可能地接近零。反覆運算求解可使用 Microsoft Excel 的 SOLVER 函數來進行。

【00102】 一旦獲得了二次曲線參數，就將其與抗原/自身抗體結合資料組合以確定自身抗體的存在或不存在。在此，將自身抗體與抗原之間特異性結合的量與如上所述的預定取捨值進行比較。

【00103】 二次曲線參數的取捨值使用已知的陽性樣品（例如，由患有疾病的患者群組組成的病例-對照樣品組中的組）和已知的陰性樣品（例如，病例-對照研究中的正常個體群組）來確定。對於每個樣品，對滴定系列中使用的每種抗原量繪製特異性結合的量相對於抗原量的曲線，並且將在已知的陽性樣品（例如，患有疾病的患者）中觀察到的二次曲線參數與在已知的陰性樣品（例如，正常個體）中觀察到的二次曲線參數比較。當與以上討論的抗原/自身抗體結合的取捨值組合使用時，選擇使特異性最大化的二次曲線參數的取捨值（沒有假陽性）。

- 【00104】 在計算二次曲線參數的取捨值時，還確定正讀數所要求的方向性，即是高於還是低於取捨值的值被認為是正的。正讀數所要求的方向性將取決於抗原和二次曲線參數。
- 【00105】 如果測量結果既高於抗原/自身抗體結合的取捨值並且與二次曲線參數的取捨值相比又顯示正讀數所要求的方向性，則其被認為是最終陽性，即表示受試樣品中自身抗體的存在。
- 【00106】 如在 WO2015/193678（其內容通過引用併入本文）中進一步描述的，與僅基於受試樣品中自身抗體之間特異性結合的量的作為替代的方法相比，在測定方法中包括二次曲線參數提高了免疫測定的特異性，提高了陽性預測值（Positive Predictive Value，PPV）。
- 【00107】 應理解，雖然本文中包括的雙取捨法的描述集中在使用與抗原/自身抗體結合的量的測量結果組合的單個二次曲線參數組合，但是考慮使用多個二次曲線參數。因此，在某些實施方案中，本發明的方法使用二、三、四個、五個、六個、七個、八個或更多個二次曲線參數。
- 【00108】 雙取捨法在用於臨床診斷、預後、預測和/或監測測定上是有利的，其中靶自身抗體存在的絕對量和在靶自身抗體不存在下觀察到的結合水準可在患者之間變化巨大。如果這樣的測定基於使用單一的受試抗原量/濃度的自身抗體結合檢測，則由於測定方法的限制，包含一定量的自身抗體（其處於在整個群體中自身抗體量的正常生理範圍的極低或極高端）的患者樣品可被略去；自身抗體量低的樣品可被評分為假陰性結果，而具有極高水準的那些可離開所選測定方法內的準確檢測的範圍。使用與二次曲線參數的計算組合的滴定法可解釋這些自身抗體水準的差異和所觀察到的結合水準的差異。
- 【00109】 應注意，該雙取捨實施方案可與本發明的所有方法一起使用，包括檢測自身抗體的方法、檢測肝癌的方法、診斷和治療肝癌的方法、預測對抗肝癌治療的作出回應的方法以及確定抗體譜的方法。此外，雙取捨法可用於其中只檢測單一自身抗體的一些實施方案以及其中使用抗原組來檢測多種自身抗體的一些實施方案。在這種組實施方案中，應注意，針對組內的每種抗原計算的二次曲線參數不一定相同。然而，在一些實施方案中，針對組內的每種抗原計算的二次曲線參數可相

同。

測定形式

【00110】 免疫測定（例如 ELISA、放射免疫測定等）的一般特點是本領域技術人員公知的（參見 Immunoassay, E. Diamandis and T. Christopoulos, Academic Press, Inc., San Diego, CA, 1996，其內容通過引用併入本文）。

【00111】 用於檢測具有特定免疫特異性的自身抗體的免疫測定通常需要使用對相關自身抗體表現出特異性免疫反應性的試劑（抗原）。根據測定的形式，可將該抗原固定在固體支持物上。使受試樣品與抗原接觸，且如果樣品中存在所需要的免疫特異性的自身抗體，則它們將與抗原發生免疫反應以形成抗原/自身抗體複合物，其可隨後被檢測或定量測量。

【00112】 本發明的方法可以以能夠使被懷疑包含自身抗體的受試樣品與抗原接觸的任何合適的形式進行。

【00113】 方便地，如果需要的話，受試樣品與抗原之間的接觸可發生在允許平行測定不同抗原或不同抗原量的單獨反應室（例如，微量滴定板的孔）中。在其中需要不同量抗原的一些實施方案中，可在整個微量滴定板的孔上通過從抗原原液製備系列稀釋液將這些包被到微量滴定板的孔上。抗原原液可具有已知或未知的濃度。然後可將受試樣品的等分試樣添加至板的孔，使受試樣品的體積和稀釋度在每個孔中保持恒定。添加至微量滴定板的孔的抗原的絕對量可根據例如這樣的因素而改變：靶自身抗體的性質、受試樣品的性質、受試樣品的稀釋度等，如本領域技術人員會理解的。通常來說，將選擇抗原的量和受試樣品的稀釋度以產生一定範圍的信號強度，這些信號強度落入方法中的抗原/自身抗體結合檢測所選擇的讀出的可接受的檢測範圍內。方便地，測試的抗原量可在 1.6 nM 至 160 mM 的範圍內變化。

【00114】 在本發明的另一個實施方案中，可將抗原固定在固體支持物上的離散位置或反應位點處。在其中需要不同量的抗原的一些實施方案中，可將這些各自固定在固體支持物上的離散位置或反應位點處。然後可使整個支持物與受試樣品接觸，並且在每個離散位置

或反應位點處分別地檢測或測量自身抗體與抗原的結合。合適的固體支持物包括微陣列。當需要不同量的抗原時，可通過將不同量的特定抗原固定在陣列上的離散的可分辨的反應位元點處來製備微陣列。在另一些實施方案中，固定化抗原分子的實際量可保持基本上恒定，但陣列上的位點或點的尺寸變化以改變可用結合表位的量，提供滴定系列的具有不同量的可用結合表位的位點或點。在這樣的一些實施方案中，在製備滴定系列中，抗原上結合表位的二維表面濃度是重要的，而不是抗原的絕對量。用於製備和詢問蛋白質/肽微陣列的技術通常是本領域中已知的。

【00115】 微陣列可用于平行地對單個樣品進行不同特異性的自身抗體的多個測定。這可使用包含多種抗原或抗原組的陣列來完成。

【00116】 某些抗原可包含或來源於分離自天然來源的蛋白質或多肽，包括但不限於分離自患者組織或體液（例如，血漿、血清、全血、尿、汗、淋巴、糞便、腦脊液、腹水、胸腔積液、精液、痰、乳頭抽吸液、術後血清腫和傷口引流液）的蛋白質或多肽。在這樣的一些實施方案中，抗原可包含基本上所有的天然蛋白，即基本上以其分離自天然來源的形式的蛋白質或其可包含天然蛋白的片段。為了在本發明的方法中作為抗原是有效的，任何這樣的片段必須保留對使用其來測試的自身抗體的免疫反應性。合適的片段可例如通過經分離的蛋白質的化學或酶促切割來製備。

【00117】 在某些實施方案中，並且根據使用抗原的測定的確切性質，抗原可包括與一種或更多種另外的分子（其賦予蛋白質中天然不存在的一些期望特性）連接的天然蛋白或其片段。例如，蛋白質或片段可與顯示標記物（revealing label）（例如螢光標記物、有色標記物、發光標記物、放射標記物或重金屬（例如，膠體金））綴合。在另一些實施方案中，蛋白質或片段可表達為重組產生的融合蛋白。舉例來說，融合蛋白可在 N 端或 C 端處包含有助於純化經重組表達的抗原的標籤肽。

- 【00118】 根據要使用抗原的測定的形式，可將抗原固定在固體支援物（例如晶片、載玻片、微量滴定板的孔、珠、膜或納米粒）上。固定化可通過非共價吸附、共價連接或通過標籤來實現。
- 【00119】 可使用任何合適的連接方式，只要這在顯著程度上不有害地影響抗原與靶自身抗體發生免疫反應的能力。
- 【00120】 本發明不限於固相測定，但還涵蓋全部或部分地在液相中進行的測定，例如溶液相珠測定或競爭測定。
- 【00121】 在一個實施方案中，抗原可用有利於固定化的配體（例如生物素）標記。然後可以將抗原稀釋至合適的滴定範圍，並使其與溶液中患者樣品中的自身抗體反應。然後可通過配體-受體相互作用（例如，生物素-鏈黴親和素）將所得的免疫複合物固定在固體支持物上，並如下所述進行測定的剩餘部分。
- 【00122】 為了便於生產用於本發明測定方法的生物素化抗原，編碼全長抗原、其截短形式或其抗原片段的 cDNA 可表達為用蛋白質或多肽標籤標記的融合蛋白，其可例如通過酶促反應與生物素輔助因數連接。
- 【00123】 用於生產重組生物素化抗原的載體可商購自許多來源。或者，生物素化抗原可通過生物素與表達和純化後的抗原分子共價連接來生產。
- 【00124】 如上所述，根據本發明的用於檢測自身抗體的免疫測定可基於本領域中已知的標準技術。在一個最優選實施方案中，免疫測定可以是ELISA。ELISA在本領域中通常是公知的。在典型的間接ELISA中，將對測試下的自身抗體具有特異性的抗原固定在固體表面（例如，標準微量滴定測定板的孔、或者微珠或微陣列的表面）上並且使包含待測試自身抗體之存在的體液的樣品與固定化抗原接觸。樣品中存在的具有期望特異性的任何自身抗體會與固定化抗原結合。然後可使用任何合適的方法檢測結合的抗原/自身抗體複合物。在一個優選實施方案中，使用經標記的抗人免疫球蛋白抗體

二抗（其特異性識別一種或更多種類的人免疫球蛋白共有的表位）來檢測抗原/自身抗體複合物。通常來說，二抗將是抗IgG或抗IgM。二抗通常用可檢測標誌物（通常是酶標記物，例如過氧化物酶或鹼性磷酸酶）標記，允許通過添加產生可檢測產物（例如有色產物、化學發光產物或螢光產物）的酶的底物的定量檢測。可以以等同效果使用本領域中已知的其他類型的可檢測標籤。

本發明方法的應用

【00125】 本發明提供了選自 MMP9、AIF1、EpCAM 和 CDKN1B 的腫瘤標誌物抗原在通過檢測包含來自哺乳動物物件之體液的受試樣品中對 MMP9、AIF1、EpCAM 或 CDKN1B 具有免疫特異性的自身抗體來在所述哺乳動物物件中檢測肝癌的方法中的用途，所述方法包括以下步驟：

(a) 使受試樣品與選自 MMP9、AIF1、EpCAM 和 CDKN1B 的腫瘤標誌物抗原接觸；以及

(b) 確定與受試樣品中存在的自身抗體結合的腫瘤標誌物抗原的複合物的存在或不存在；

其中所述複合物的存在指示肝癌的存在。

【00126】 在本發明的該實施方案中，以上所討論的與本發明的多種方法相關的所有限制被考慮與該用途有關。

【00127】 根據本發明的測定方法可用於多種不同的臨床情況。特別地，所述方法可用於檢測或診斷肝癌、評估診斷患有肝癌之患者的預後、預測對治療的響應、監測患者中肝癌的進展、為了診斷肝癌之存在而篩查無症狀人物件群、預測肝癌患者對抗肝癌治療（例如，化學治療、射頻消融術、肝切除術、肝移植、疫苗接種、抗生

長因數或信號轉導治療、內分泌治療、人抗體治療、經導管動脈化學栓塞術、經皮乙醇注射、微波消融術、索拉非尼施用和放射性栓塞術)的響應、監測肝癌患者對抗肝癌治療(例如,化學治療、射頻消融術、肝切除術、肝移植、疫苗接種、抗生長因數或信號轉導治療、內分泌治療、人抗體治療、經導管動脈化學栓塞術、經皮乙醇注射、微波消融術、索拉非尼施用和放射性栓塞術)的響應、檢測先前診斷患有肝癌的患者(其已經進行了抗肝癌治療以降低肝癌存在的量)中的復發疾病、選擇用於特定患者的抗肝癌治療(例如,化學治療、射頻消融術、肝切除術、肝移植、疫苗接種、抗生長因數或信號轉導治療、內分泌治療、人抗體治療、經導管動脈化學栓塞術、經皮乙醇注射、微波消融術、索拉非尼施用和放射性栓塞術)、或在患有或懷疑患有肝癌的患者中確定抗體譜。

試劑盒

【00128】 本發明涵蓋適用於進行本發明方法中的任一種的試劑盒,其中試劑盒包含:

- (a) 一種或更多種腫瘤標誌物抗原;和
- (b) 能夠檢測與受試樣品中存在的自身抗體結合的腫瘤標誌物抗原的複合物的試劑。

【00129】 本發明還包括用於檢測包含來自哺乳動物物件之體液的受試樣品中的自身抗體的試劑盒,其包含:

- (a) 選自 MMP9、AIF1 EpCAM 和 CDKN1B 的腫瘤標誌物抗原;
- (b) 能夠檢測與受試樣品中存在的自身抗體結合的腫瘤標誌物抗原的複合物的試劑。

【00130】 在某些實施方案中，試劑盒還可包含：

(c) 用於使腫瘤標誌物抗原與包含來自哺乳動物物件之體液的受試樣品接觸的裝置。

【00131】 用於使腫瘤標誌物抗原與包含來自哺乳動物物件之體液的受試樣品接觸的裝置的實例包括腫瘤標誌物抗原在晶片、載玻片、微量滴定板的孔、珠、膜或納米粒上的固定化。

【00132】 在一些實施方案中，試劑盒內的腫瘤標誌物抗原可存在於兩種或更多種腫瘤標誌物抗原的組中。在該實施方案中，試劑盒可包含二種、三種、四種、五種、六種、七種、八種、九種、十種、十一種、十二種、十三種、十四種、十五種、十六種、十七種、十八種、十九種、二十種、二十一種、二十二種、二十三種、二十四種、二十五種、二十六種、二十七種、二十八種、二十九種、三十種、三十一種、三十二種、三十三種、三十四種、三十五種、三十六種、三十七種、三十八種或更多種的抗原。這些抗原可以是不同的抗原，其中不同的抗原是來源於不同蛋白質或多肽的抗原（例如，來源於由不同基因編碼的不相關蛋白質的抗原）或來源於如上所限定的單一蛋白質或多肽的不同肽表位的抗原。

【00133】 在一個實施方案中，兩種或更多種腫瘤標誌物抗原的組可包含 MMP9、AIF1、EpCAM 和 CDKN1B。在某個具體實施方案中，組可由 MMP9、AIF1、EpCAM 和 CDKN1B 組成。

【00134】 在一個實施方案中，兩種或更多種腫瘤標誌物抗原的組可包含選自以下的一種或更多種腫瘤標誌物抗原：NY-ESO-1、波形蛋白、HSPA4、轉鐵蛋白、HNRNP-L、HSPD1、HNRNP-A2、SALL4、週期蛋白 B1、AFP、NPM1、YWHAZ、DDX3X、p62、CAGE、MAGE A4、RalA、GBU4-5、SOX2、AKR1B10、ApoA1、BCL2、CD44、CK18、CPS1、FUCA1、GLUL、HSPA2、IL-8、MDM2、PEBP1、催乳素、RGN、SPP1、SSX2 和 TGFBI。在該實施方案中，組可包含所記載的腫瘤標誌物抗原中的一種、二種、三種、四種、五種、六種、七種、八種、九種、十種、十一種、十二種、十三種、十四種、十五種、十六種、十七種、十八種、十九種、二十種、二十一種、二十二種、二十三種、二十四種、二十五種、二十六種、二十七種、二十八種、二十九種、三十種、三十一種、三十二種、三十三種或

三十四種。根據本發明，組將還包含 MMP9、AIF1、EpCAM 或 CDKN1B，並且可包含這些腫瘤標誌物抗原中的一種、兩種、三種或四種。在其中組中包含這些腫瘤標誌物抗原中的兩種或三種的一些實施方案中，考慮這些抗原中的兩種或三種的所有組合。在一些具體實施方案中，組可包含 MMP9、AIF1、EpCAM 和 CDKN1B。

【00135】 在一個實施方案中，兩種或更多種腫瘤標誌物抗原的組可包含 MMP9、AIF1、EpCAM、NY-ESO-1、HSPA4、波形蛋白、HNRNP-L 和轉鐵蛋白。在另一個實施方案中，兩種或更多種腫瘤標誌物抗原的組可由 MMP9、AIF1、EpCAM、NY-ESO-1、HSPA4、波形蛋白、HNRNP-L 和轉鐵蛋白組成。

【00136】 在另一個實施方案中，兩種或更多種腫瘤標誌物抗原的組可包含 AIF1、EpCAM、HSPA4 和 CPS1。在另一個實施方案中，兩種或更多種腫瘤標誌物抗原的組可由 AIF1、EpCAM、HSPA4 和 CPS1 組成。

【00137】 在另一個實施方案中，兩種或更多種腫瘤標誌物抗原的組可包含 EpCAM、NY-ESO-1、波形蛋白、HSPA2、HSPA4 和 HNRNP-L。在另一個實施方案中，兩種或更多種腫瘤標誌物抗原的組可由 EpCAM、NY-ESO-1、波形蛋白、HSPA2、HSPA4 和 HNRNP-L 組成。

【00138】 在又一個實施方案中，兩種或更多種腫瘤標誌物抗原的組可包含 MMP9、AIF1、EpCAM、DDX3X、SALL4、MAGE A4、NY-ESO-1、CAGE、RalA 和 SOX2。在另一個實施方案中，兩種或更多種腫瘤標誌物抗原的組可由 MMP9、AIF1、EpCAM、DDX3X、SALL4、MAGE A4、NY-ESO-1、CAGE、RalA 和 SOX2 組成。

【00139】 在又一個實施方案中，兩種或更多種腫瘤標誌物抗原的組可包含 EpCAM、CAGE、SOX2、RalA、MAGE A4、DDX3X 和 NY-ESO-1。在另一個實施方案中，兩種或更多種腫瘤標誌物抗原的組可由 EpCAM、CAGE、SOX2、RalA、MAGE A4、DDX3X 和 NY-ESO-1 組成。

【00140】 在又一個實施方案中，兩種或更多種腫瘤標誌物抗原的組可包含 AIF1、CAGE、HSPD1、SOX2、SALL4、HSPA4 和轉鐵蛋白。在另一個實施方案中，兩種或更多種腫瘤標誌物抗原的組可由 AIF1、CAGE、HSPD1、SOX2、SALL4、HSPA4 和轉鐵蛋白組成。

【00141】 在一個具體實施方案中，兩種或更多種腫瘤標誌物抗原的組可包含 NY-ESO-1、波形蛋白、HSPA4、轉鐵蛋白、HNRNP-L、HSPD1、HNRNP-A2、SALL4、週期蛋白 B1、AFP、NPM1、YWHAZ、DDX3X、p62、CAGE、MAGE A4、RalA、GBU4-5、SOX2、AKR1B10、ApoA1、BCL2、CD44、CK18、CPS1、FUCA1、GLUL、HSPA2、IL-8、MDM2、PEBP1、催乳素、RGN、SPP1、SSX2 和 TGFB1。根據本發明，組還將包含 MMP9、AIF1、EpCAM 或 CDKN1B，並且可包含這些腫瘤標誌物抗原中的一種、兩種、三種或四種。在其中組中包含這些腫瘤標誌物抗原中的兩種或三種的一些實施方案中，考慮這些抗原中的兩種或三種的所有組合。在一些具體實施方案中，組可包含 MMP9、AIF1、EpCAM 和 CDKN1B。例如，兩種或更多種腫瘤標誌物抗原的組可包含 MMP9、AIF1、EpCAM、CDKN1B、NY-ESO-1、波形蛋白、HSPA4、轉鐵蛋白、HNRNP-L、HSPD1、HNRNP-A2、SALL4、週期蛋白 B1、AFP、NPM1、YWHAZ、DDX3X、p62、CAGE、MAGE A4、RalA、GBU4-5、SOX2、AKR1B10、ApoA1、BCL2、CD44、CK18、CPS1、FUCA1、GLUL、HSPA2、IL-8、MDM2、PEBP1、催乳素、RGN、SPP1、SSX2 和 TGFB1。或者，兩種或更多種腫瘤標誌物抗原的組可由 MMP9、AIF1、EpCAM、CDKN1B、NY-ESO-1、波形蛋白、HSPA4、轉鐵蛋白、HNRNP-L、HSPD1、HNRNP-A2、SALL4、週期蛋白 B1、AFP、NPM1、YWHAZ、DDX3X、p62、CAGE、MAGE A4、RalA、GBU4-5、SOX2、AKR1B10、ApoA1、BCL2、CD44、CK18、CPS1、FUCA1、GLUL、HSPA2、IL-8、MDM2、PEBP1、催乳素、RGN、SPP1、SSX2 和 TGFB1 組成。

【00142】 在一個具體實施方案中，兩種或更多種腫瘤標誌物抗原的組可包含 CAGE、NY-ESO-1、MMP9、轉鐵蛋白、MAGE A4、RalA、HSPA4、SALL4、週期蛋白 B1、EpCAM、DDX3X 和 AIF1。在另一個實施方案中，兩種或更多種腫瘤標誌物抗原的組可由 CAGE、NY-ESO-1、MMP9、轉鐵蛋白、MAGE A4、RalA、HSPA4、SALL4、週期蛋白 B1、EpCAM、DDX3X 和 AIF1 組成。

【00143】 在一個具體實施方案中，兩種或更多種腫瘤標誌物抗原的組可包含 CAGE、NY-ESO-1、MMP9、轉鐵蛋白、MAGE A4、RalA、HSPA4、SALL4、週期蛋白 B1、EpCAM、DDX3X、AIF1、SOX2 和 AFP。另一個實施方案中，兩種或更多種腫瘤標誌物抗原的組可由 CAGE、NY-ESO-1、MMP9、轉鐵蛋白、MAGE A4、RalA、HSPA4、

SALL4、週期蛋白 B1、EpCAM、DDX3X、AIF1 SOX2 和 AFP 組成。

【00144】 本發明的試劑盒可適用於檢測肝癌。

【00145】 在某些實施方案中，試劑盒可用於檢測肝癌。

【00146】 在本發明的試劑盒中，體液可選自血漿、血清、全血、尿、汗、淋巴、糞便、腦脊液、腹水、胸腔積液、精液、痰、乳頭抽吸液、術後血清腫、唾液、羊水、淚和傷口引流液。

【00147】 將參考以下非限制性實驗實施例進一步理解本發明。

實施例

實施例1-用於測量腫瘤相關蛋白的自身抗體的一般方案

【00148】 按照與 WO 99/58978（其內容通過引用併入本文）中所述的那些類似的方法，可通過重組表達製備腫瘤標誌物抗原的樣品。簡而言之，將編碼目標標誌物抗原的 cDNA 克隆到經修飾以編碼生物素標籤和 6x 組氨酸標籤的 pET21 載體（Invitrogen）中以有助於純化所表達的蛋白質。使所得的克隆在 BL21(DE3)大腸桿菌（*E. coli*）中生長，隨後將細菌裂解。按照製造商的方案，通過鎳螯合親和柱（HiTrap，可商購自 GE Healthcare）回收所表達的抗原。儲存前，通過 SDS-PAGE、Western 印跡和蛋白質測定評估所表達的蛋白質的純度、特異性和收率。

【00149】 通過用空 pET21 載體（即沒有編碼腫瘤相關抗原的 cDNA）轉化 BL21(DE3)大腸桿菌產生陰性對照蛋白 VOL。所表達並經純化的蛋白質包含在重組腫瘤相關抗原上發現的相同的 His 和生物素標籤序列，並且允許校正與殘餘細菌污染物結合的非特異性自身抗體。

【00150】 許多標誌物 cDNA 的 GenBank 登錄號如下：

AFP: NM_001134.1

AIF1: NM_001623.3

AKR1B10: NM_020299.4.
 APOA1: NM_000039.1.
 BCL2: NM_000633.2
 CAGE: NM_182699
 CALR: NM_004343.3
 CD44: NM_001001389
 CDKN1B: NM_004064.4
 CK18: NM_000224
 CPS1: NM_001875.4
 CCNB1: NM_031966.2
 CYCLIN B1: NM_031966.2
 DDX3X: NM_001356.3
 EpCAM: NM_002354
 FUCA1: NM_000147.4
 GLUL: NM_001033044.2
 HNRNP-A2: NM_002137.3
 HNRNP-L: NM_001533.2
 HSPA2: NM_021979.3.
 HSPA4: NM_002154.3
 HSPD1: NM_002156.4
 IL8: NM_000584.3
 MAGE A4: NM_001011548.1
 MDM2: NM_002392.5
 MMP9: NM_004994.2.
 NPM1: NM_002520.6
 NY-ESO-1: NM 001327
 PEBP1: NM_002567.2

P62: NM_001007225.1

催乳素: NM_000948.5

RalA: NM_005402.2

RGN: NM_004683.5

SALL4: NM_020436.3.

SOX2: NM_003106

SPP1: NM_001040058.1

SSX2: NM_175698.1

TGFB1: NM_000660.5

轉鐵蛋白: NM_001063.3

波形蛋白: NM_003380.3

YWHAZ: NM_001135699.1

【00151】 將抗原和 VOL（陰性對照）在高磷酸鹽結合緩衝液中稀釋至適當濃度，然後稀釋以提供任兩種單獨的蛋白質濃度，如在高通量測定（high throughput assay，HTPA）形式中（圖 2A）；或半對數滴定範圍，如在滴定測定形式中（圖 2B）。使用自動液體處理系統根據板佈局將抗原稀釋液以 50 μ l/孔分配到Falcon微量滴定板的排中（圖 2A 和圖 2B）。覆蓋板並在 18 至 22°C 下保存 18 至 24 小時。

【00152】 用豬皮明膠結合緩衝液（PSGBB，PBS + 0.1%豬皮明膠+ 0.05%疊氮化鈉）以 200 μ l/孔封閉板 1 小時。將血清樣品解凍，渦旋並在 18 至 22°C 下在 PSGBB 中以 1/110 稀釋。將對板進行抽出並在衛生紙上拍幹。使用自動液體處理儀器將每個經稀釋的血清樣品以 50 μ l/孔分配到微量滴定板的所有孔中。覆蓋板並在室溫下搖動孵育 1.5 小時。

【00153】 洗滌步驟：使用自動洗板機將板在 PBS + 0.1%吐溫 20 中洗滌三次，然後在衛生紙上拍幹。

【00154】 將辣根過氧化物酶綴合的兔抗人免疫球蛋白（Dako，在 PSGBB 中 1/5,000）以 50 μ l/孔分配到微量滴定板的所有孔中。然後將板在室溫下搖動孵育 1 小時。如上所述，洗滌板。

【00155】 將預製備的TMB底物以50 μ l/孔添加至各板，並在實驗臺上
孵育15分鐘。輕拍板以混合。使用標準分光光度計讀板機在650 nm
處測定每個孔的光密度。

實施例2-通過HTPA在肝細胞癌（HCC）中檢測自身抗體

【00156】 以下資料從評估在使用HTPA形式的HCC檢測中自身抗體測
定的組的靈敏度和特異性的預備研究中獲得。研究中包括的受試者
的臨床和人口統計狀況在表1至4中給出。

表1-實施例2中所述的研究中包括的患者的人口統計狀況

人口因素	HCC 患者	良性肝病患者	沒有惡性證據的個體
數量	99	99	99
平均年齡	62.3	58.1	62.2
年齡範圍	30-91	30-89	30-87
男性%	69	69	69

表 2-HCC 患者中存在的原發性腫瘤的尺寸

	可用患者的數量	平均值	最小值-最大值
原發性腫瘤尺寸（cm）	88	5.9	0.4-19

表 3-使用 TNM 分期的 HCC 患者的腫瘤分期

TNM 分期	數目
1	35
2	21

3	21
4	2
N/A	20

TNM = 惡性腫瘤分期系統的 TNM 分類；N/A =不可得

表 4- 良性肝病中存在的肝疾病。

良性背景	數目
丙型肝炎病毒感染	67
乙型肝炎病毒感染	22
酒精性肝病	6
自身免疫性肝炎	2
血色素沉著病	1
原發性膽汁性肝硬化	1
總計	99

【00157】 根據實施例 1 中給出的方案使用表 5 中列出的抗原進行測定。通過選擇給出最大約登值同時保持個體標誌物特異性大於 90% 的取捨值確定測定取捨值。結果示於表 5 中，顯然，大量的這些自身抗體標誌物在患有 HCC 的患者中顯示出比患有良性肝病的患者或健康對照更高的陽性水準，因此它們可具有區分 HCC 患者與沒有惡性證據之患者的能力。

【00158】 此外，顯然，與任何僅單一AAb相比，AAb組的測量提高了區分HCC患者與患有非癌性肝疾病之患者的能力。組1和組2（表6和表10）示出了如何可組合不同組的AAb以實現相似的性能同時優

化某些特性以適應不同的臨床需求。組1（表6）包含對所有患者可
用的標誌物。與組1相比，如組2中（表10），通過性別優化組中包
含的標誌物提高了特異性，而靈敏度略有降低。這證明了建立適應
不同臨床需求的不同組的能力。表7和表11示出了每個組可檢測患
有1期和2期癌症的患者，這是導致HCC有效治療的至關重要的早期
診斷。

表 5-在每個組中個體 AAb 標誌物的陽性

	HCC		良性		正常	
	陽性	%	陽性	%	陽性	%
AIF1	2	2.0	0	0	0	0
AKR1B10	1	1.0	0	0	0	0
ApoA1	1	1.0	0	0	0	0
BCL2	3	3.0	1	1.0	1	1.0
CD44	1	1.0	0	0	0	0
CDKN1B	2	2.0	0	0	1	1.0
CK18	1	1.0	0	0	0	0
CPS1	2	2.0	1	1.0	0	0
DDX3X	3	3.0	1	1.0	2	2.0
EpCAM	5	5.1	1	1.0	6	6.1
FUCA1	1	1.0	0	0	0	0
GLUL	1	1.0	0	0	0	0

HNRNP-A2	1	1.0	0	0	0	0
HNRNP-L	3	3.0	2	2.0	0	0
HSPA2	1	1.0	0	0	0	0
HSPA4	5	5.1	1	1.0	0	0
HSPD1	2	2.0	2	2.0	0	0
IL-8	5	5.1	4	4.0	4	4.0
MDM2	2	2.0	1	1.0	0	0
MMP9	3	3.0	1	1.0	1	1.0
NPM1	2	2.0	1	1.0	0	0
NY-ESO-1	7	7.1	0	0	1	1.0
PEBP1	1	1.0	0	0	0	0
催乳素	2	2.0	1	1.0	1	1.0
RGN	1	1.0	0	0	0	0
SALL4	1	1.0	0	0	0	0
SPP1	1	1.0	1	1.0	0	0
SSX2	3	3.0	1	1.0	1	1.0
TF	2	2.0	0	0	0	0
TGFB1	1	1.0	0	0	0	0
波形蛋白	7	7.1	3	3.0	6	6.1
YWHAZ	2	2.0	1	1.0	2	2.0

組1 - 一般組

【00159】 組1是使用NRI（淨重分類改進，Net Reclassification Improvement）形成的並且包含腫瘤標誌物抗原EpCAM、AIF1和MMP9以及NY-ESO-1、HSPA4、波形蛋白、HNRNP-L和轉鐵蛋白，其中如果任一給出的AAb水準高於如實施例2中所述產生的其取捨值，則結果是陽性。表6和表7示出了在實施例2中所述的樣品組中該組的性能。

表6-組1的性能和組成

組 1	靈敏度 (%)	特異性 (良性) (%)	特異性 (正常) (%)
NY-ESO-1、 EpCAM、 HSPA4、波形蛋 白、HNRNP-L、 轉鐵蛋白、 AIF1、MMP9	28.3	94	87.9

表 7-組 1 的按 TNM 分期的性能

分期	陽性	陰性	靈敏度
1	8	27	23
2	4	17	19
3	8	13	38
4	0	2	0

組2-男性和女性的個體組

【00160】 組2是通過將實施例2中所述的樣品組分成單獨的性別組並對每個組進行單獨的NRI而形成的。組2包含腫瘤標誌物抗原EpCAM、AIF1和MMP9以及HSPA4、CPS1、NY-ESO-1、波形蛋白、HSPA2和HNRNP-L。如果患者是女性並且HSPA4、AIF1、EpCAM或CPS1中的任一種高於如實施例2中所述產生的取捨值，或者如果患者是男性並且NY-ESO-1、波形蛋白、EpCAM、HSPA2、HSPA4或HNRNP-L中的任一種高於如實施例2中所述產生的取捨值，則結果是陽性。表10和表11示出了在實施例2中所述的樣品組中組2的性能。

表 8 - 組 2a 的性能和組成 - 女性

組 2a	靈敏度 (%)	特異性 (良性) (%)	特異性 (正常) (%)
HSPA4、 AIF1、 EpCAM、 CPS1	22.6	100	100

表 9 - 組 2b 的性能和組成 - 男性

組 2b	靈敏度 (%)	特異性 (良性) (%)	特異性 (正常) (%)
NY-ESO-1、 波形蛋白、 EpCAM、	25	97.1	92.6

HSPA2、 HSPA4、 HNRNP-L			
-----------------------------	--	--	--

表 10- 組 2 的性能和組成 - 組合的

組 2	靈敏度 (%)	特異性 (良性) (%)	特異性 (正常) (%)
2a + 2b	24.2	98	94.9

表 11 - 組 2 的按 TNM 分期的性能

分期	陽性	陰性	靈敏度 (%)
1	6	29	17.1
2	4	17	19
3	6	15	28.6
4	0	2	0

實施例3-通過HTPA測量的與自身抗體組合的AFP的另外測量

【00161】 使用可商購的ELISA（Aviva Systems Biology）針對實施例2 中所述的樣品組在血清樣品中測量迴圈甲胎蛋白（alpha-fetoprotein，AFP）。使用200 ng/ml的常用取捨值以評估陽性。表12示出了將AFP添加至實施例2中所示組1和組2的結果。從這些結果，清楚的是，與AAb組組合的AFP的性能大於僅AFP或AAb組的性能。

表 12 - 僅 AFP 和當被添加至實施例 2 中所述的組時的性能

標誌物組合	靈敏度	特異性（良性）	特異性（正常）
AFP	35.4	100	100
組 1 + AFP	52.5	93.9	87.9
組 2（組合的） + AFP	49.5	97.9	94.9

實施例4-通過滴定測定在肝細胞癌（HCC）中檢測自身抗體

【00162】 以下資料從在使用滴定板形式評估HCC檢測中自身抗體測定組的靈敏度和特異性的研究中獲得（圖2B）。研究中包括的受試者的臨床和人口統計狀況在表13至表16中給出。

表 13 - 實施例 2 中所述的研究包括的患者的入口統計狀況

入口統計因素	HCC 患者	良性肝病患者	沒有惡性證據的個體
數量	98	99	95
平均年齡	62.6	50.7	62.7
年齡範圍	30-91	30-82	30-84
男性%	69	69	68

表 14 - HCC 患者中存在的原發性腫瘤的尺寸

	可用患者數量	平均值	最小值-最大值
原發性腫瘤尺寸（cm）	86	6.02	0.4-19

表 15 - 使用 TNM 分期的 HCC 患者的腫瘤分期

TNM 分期	數目
1	35
2	20
3	21
4	2
N/A	20

N/A = 不可得

表 16 - 良性肝病患者中存在的肝疾病

良性背景	數目
丙型肝炎病毒感染	58
乙型肝炎病毒感染	31
酒精性肝病	6
自身免疫性肝炎	2
血色素沉著病	1
原發性膽汁性肝硬化	1
總計	99

【00163】 根據實施例 1 中給出的方案使用表 17 中列出的抗原進行測定。通過選擇給出最大約登值同時保持個體標誌物特異性大於 90% 的取捨值確定測定取捨值。結果示於表 17 中，顯然，這些自身抗體標誌物中的一些在患有 HCC 的患者中顯示比患有良性肝病的患者或健康對照更高的陽性水準，因此它們可具有區分 HCC 與沒有惡性疾病證據之患者的能力。在實施例 2 中所示的研究中發現顯示出癌症/正常差異的 AAb 繼續顯示出區分 HCC 患者與患有非癌性肝

疾病之患者（良性）和健康對照（正常）的能力。此外，顯然，與任何僅單一標誌物相比，組的測量再次提高了區分 HCC 患者的能力。

【00164】 組3（表18）和組4（表22）示出了如何可組合不同組的標誌物以實現相似的性能同時優化某些特性以適應不同的臨床需求。組3包含可用于所有患者的標誌物，而組4按照性別指定了不同標誌物，這提高了特異性同時保持靈敏度（表20和表21）。這證明了建立適應不同臨床需求的不同組的能力。每個實施例組都可檢測患有1期和2期癌症的患者，這對於早期診斷並因此有效治療HCC是至關重要的（表19和表23）。

表 17 - 在每組中個體 AAb 標誌物的陽性

	HCC		良性		正常	
	陽性	%	陽性	%	陽性	%
AIF1	1	1.0	0	0	0	0
CAGE	12	12.2	3	3.0	9	9.5
CDKN1B	14	14.3	13	13.0	21	22.1
DDX3X	5	5.1	2	2.0	2	2.1
EpCAM	3	3.1	0	0	3	3.2
HNRNP-A2	6	6.1	4	4.0	6	6.3
HSPA4	4	4.1	1	1.0	0	0
HSPD1	7	7.1	5	5.0	3	3.2
MAGE A4	3	3.1	0	0	0	0

MMP9	2	2.0	1	1.0	0	0
NY-ESO-1	8	8.2	0	0	4	4.2
p62	9	9.2	5	5.0	2	2.1
RalA	4	4.1	1	1.0	4	4.2
SALL4	6	6.1	3	3.0	1	1.1
SOX2	3	3.1	0	0	1	1.1
轉鐵蛋白	7	7.1	5	5.0	1	1.1
YWHAZ	6	(6.1)	4	(4.0)	5	(5.3)

組3

【00165】 組3是使用NRI形成的並且包含腫瘤標誌物抗原EpCAM、AIF1和MMP9以及DDX3X、SALL4、MAGE A4、NY-ESO-1、CAGE、RalA和SOX2，其中如果給出的AAb水準中的任一種高於如實施例4中所述產生的其取捨值，則結果是陽性。表18和表19示出了在實施例4中所述的樣品組中該組的性能。

表 18 - 組 3 的性能和組成

	靈敏度 (%)	特異性 (良性) (%)	特異性 (正常) (%)
DDX3X、 SALL4、 MAGE A4、 MMP9、	36.7	89.9	84.2

AIF1、 NY-ESO-1、 CAGE、 RalA、 EpCAM、 SOX2			
--	--	--	--

表 19 - 組 3 的按 TNM 分期的性能

分期	陽性	陰性	靈敏度 (%)
1	10	25	28.6
2	8	12	40
3	8	13	38
4	1	1	100

組4 - 男性和女性的個體組

【00166】 組4是通過將實施例2中所述的樣品組分成單獨的性別組並對每個組進行單獨的NRI形成的。組4包含腫瘤標誌物抗原EpCAM和AIF1以及CAGE、SOX2、RalA、MAGE A4、DDX3X、NY-ESO-1、HSPD1、SALL4、HSPA4和轉鐵蛋白。如果患者是女性並且CAGE、HSPD1、SOX2、SALL4、AIF1、HSPA4或轉鐵蛋白中的任一種高於如實施例4中所述產生的取捨值，或者如果患者是男性並且CAGE、SOX2、RalA、MAGE A4、DDX3X、NY-ESO-1或EpCAM中的任一種

高於如實施例4中所述產生的取捨值，則結果是陽性。表10和表11示出了在實施例4中所述的樣品組中組4的性能。

表 20 - 組 4a 的性能和組成 - 男性

	靈敏度 (%)	特異性 (良性) (%)	特異性 (正常) (%)
CAGE、SOX2、 RalA、MAGE A4、DDX3X、 NY-ESO-1、 EpCAM	32.4	95.6	86.2

表 21 - 組 4b 的性能和組成 - 女性

	靈敏度 (%)	特異性 (良性) (%)	特異性 (正常) (%)
CAGE、HSPD1、 SOX2、SALL4、 AIF1、HSPA4、轉 鐵蛋白	50	90.3	90

表 22 - 組 4 的性能和組成 - 組合的

	靈敏度 (%)	特異性 (良性) (%)	特異性 (正常) (%)
4a + 4b	37	93.8	87.4

表 23 - 組 4 的按 TNM 分期的性能

分期	陽性	陰性	靈敏度 (%)
1	12	23	34.3
2	7	13	35
3	7	14	30
4	1	1	50

實施例5-通過滴定測定測量的與自身抗體組合的AFP的另外測量

【00167】 使用可商購的ELISA（Aviva Systems Biology）針對實施例4中所述的樣品組在血清樣品中測量迴圈甲胎蛋白（AFP）。使用200 ng/ml的常用取捨值以評估陽性。表24示出了將AFP添加到實施例4中所示的組3和組4中的結果。從這些結果，清楚的是，與AAb組組合的AFP的性能大於僅AFP或AAb組的性能。

表 24 - 僅 AFP 和當被添加至實施例 4 中所述組時的性能

標誌物組合	靈敏度 (%)	特異性（良性） (%)	特異性（正常） (%)
AFP	31.6	100	100
組 3 + AFP	55.1	89.9	84.2
組 4（組合的） + AFP	55.1	93.8	87.4

實施例6 - EarlyCDT-Liver LDT的設計和開發的訓練研究

【00168】 以下資料從評估在使用滴定板形式的HCC檢測中自身抗體測定的組的靈敏度和特異性的研究中獲得（圖2B）。受試者的人口統計狀況和良性群組的硬化狀態在表25至表26中給出，與先前實施例中使用不同的群組。

表 25 - 實施例 6 中使用的患者群組的人口統計學狀況

人口統計因素	HCC 患者 (HCC)	良性肝病患者 (良性)	沒有惡性證據的個體 (正常)
數量	169	184	191
平均年齡 (年齡 範圍)	59.8 (32-81)	54.7 (20-76)	59.9 (31-81)
男性 %	85.2	70.1	84.3

表 26 - 良性群組患者的硬化狀態

硬化狀態	數目
硬化	87
非硬化性肝病	81
未知	16
總計	184

【00169】 根據實施例1中給出的方案使用表27中列出的抗原進行測定。通過使用將特異性限制為>85%的蒙特卡洛直接搜索法（Monte Carlo direct search method）確定每個標誌物的取捨值。結果示於表

27中，顯然，這些自身抗體標誌物中的一些在患有HCC的患者中顯示出比良性或正常群組中更高的陽性水準，因此它們具有區分HCC與沒有惡性疾病證據之患者的能力。在實施例2中所示的研究中發現顯示出癌症/正常差異的AAb繼續顯示出區分HCC患者與患有非癌性肝疾病之患者（良性）和健康對照（正常）的能力。此外，顯然，與任何僅單一標誌物相比，組的測量再次提高了區分HCC患者的能力。組可檢測患有1期和2期癌症的患者（靈敏度為40-45%），這對於早期診斷並因此有效治療HCC的至關重要的（表28）。

表 27 - 在每組中個體 AAb 標誌物的陽性

自身抗體	HCC		良性		正常	
	陽性	(%)	陽性	(%)	陽性	(%)
AIF1	2	1.2	0	0.0	0	0.0
CAGE	33	19.5	7	3.8	5	2.6
CYCLIN B1	8	4.7	8	4.3	2	1.0
DDX3X	3	1.8	0	0.0	0	0.0
EpCAM	5	3.0	2	1.1	1	0.5
HSPA4	12	7.1	6	3.3	2	1.0
MAGE A4	14	8.3	6	3.3	3	1.6
MMP9	17	10.1	5	2.7	6	3.1
NY-ESO-1	21	12.4	11	6.0	4	2.1
Ra1A	12	7.1	7	3.8	6	3.1

SALL4	11	6.5	7	3.8	4	2.1
轉鐵蛋白	15	8.9	5	2.7	10	5.2
組	78	46.2	24	87	26	86.4

表 28 - 按 HCC 群組分期的 AAb 組的性能：按分期和所得靈敏度的患者數目 (n)

分期	n	陽性	靈敏度 (%)
BCLC 0	1	0	0.0
BCLC A	30	12	40.0
BCLC B	71	32	45.1
BCLC C	28	19	67.9
BCLC D	8	5	62.5
未知	31	10	32.3

BCLC = 巴賽隆納臨床肝癌 (Barcelona Clinic Liver Cancer, BCLC)

分期系統

【00170】 使用可商購的ELISA (Monobind) 對實施例6中所述的樣品組在血清樣品中測量迴圈甲胎蛋白 (AFP)。在表29中使用200 ng/ml 的常用取捨值評估按分期分開的陽性。AFP抗原靈敏度隨著該群組的分期而提高，早期疾病的靈敏度遠低於晚期疾病。還值得注意的是，與該實施例的AAb組相比，AFP抗原對早期疾病的靈敏度低得多，然而晚期性能相似。

表 29- 按 HCC 群組分期的 AFP 抗原的性能：按分期和所得靈敏度的患者數目 (n)

分期	n	陽性	靈敏度 (%)
----	---	----	---------

BCLC 0	1	0	0.0
BCLC A	30	3	10.0
BCLC B	71	25	35.2
BCLC C	28	16	57.1
BCLC D	8	5	62.5
未知	31	3	9.7

【00171】 通過將AFP抗原與AAb組結果組合（表30）可提高實施例6中的HCC群組的陽性和靈敏度，提高了早期和晚期疾病的靈敏度。從這些結果，清楚的是與AAb組組合的AFP的性能比僅AFP或AAb組的性能更大（表31），將AAb組與AFP組合對特異性具有最小的影響。

表 30 - 按 HCC 群組分期的 AAb 組+AFP 抗原的性能：按分期和所得靈敏度的患者數目（n）

分期	n	陽性	靈敏度（%）
BCLC 0	1	0	0.0
BCLC A	30	13	43.0
BCLC B	71	42	59.2
BCLC C	28	25	89.3
BCLC D	8	6	75.0
未知	31	11	35.5

表 31 - 僅 AFP 和當添加至實施例 6 中所述的 AAb 組時的性能

標記物組合	靈敏度	特異性（良性）	特異性（正常）
AAb 組	46.2	87.0	86.4

AFP 抗原	30.8	99.5	100.0
AAb 組 + AFP 抗原	57.4	86.4	86.4

本發明順序編號的實施方案：

1. 通過檢測包含來自哺乳動物物件之體液的受試樣品中的抗體來在所述哺乳動物物件中檢測肝癌的方法，其中所述抗體是對選自 MMP9、AIF1、EpCAM 和 CDKN1B 的腫瘤標誌物蛋白具有免疫特異性的自身抗體，所述方法包括以下步驟：

(a) 使所述受試樣品與選自 MMP9、AIF1、EpCAM 和 CDKN1B 的腫瘤標誌物抗原接觸；以及

(b) 確定與所述受試樣品中存在的自身抗體結合的所述腫瘤標誌物抗原的複合物的存在或不存在；

其中所述複合物的存在指示肝癌的存在。

2. 檢測包含來自哺乳動物物件之體液的受試樣品中的抗體的方法，其中所述抗體是對選自 MMP9、AIF1、EpCAM 和 CDKN1B 的腫瘤標誌物蛋白具有免疫特異性的自身抗體，所述方法包括以下步驟：

(a) 使所述受試樣品與選自 MMP9、AIF1、EpCAM 和 CDKN1B 的腫瘤標誌物抗原接觸；以及

(b) 確定與所述受試樣品中存在的自身抗體結合的所述腫瘤標誌物抗原的複合物的存在或不存在。

3. 實施方案 2 所述的方法，其中所述哺乳動物物件被懷疑患有肝癌。

4. 實施方案 1 或實施方案 3 所述的方法，其中所述哺乳動物物件已被測試為對甲胎蛋白（AFP）、脫- γ 羧基凝血酶原（DCP）或凝集素反應性甲胎蛋白（AFP-L3）呈陽性。

5. 實施方案 1 或實施方案 3 所述的方法，其中所述哺乳動物物件已使用超聲監測測試為對肝癌呈陽性。

6. 實施方案 1 或實施方案 3 所述的方法，其中所述哺乳動物物件患有肝硬化、非酒精性脂肪性肝病、酒精性肝病、威爾遜病、遺傳性血色素沉着病、自身免疫性肝炎、乙型肝炎、丙型肝炎、證實的黃麴黴毒素暴露、血吸蟲病或糖尿病。

7. 根據實施方案 1 至 6 中任一項所述的方法，其中檢測兩種或更多種



自身抗體，並且其中所述方法包括以下步驟：

(a) 使所述受試樣品與兩種或更多種腫瘤標誌物抗原的組接觸，所述組包含選自 MMP9、AIF1、EpCAM 和 CDKN1B 的腫瘤標誌物抗原以及對至少一種所述自身抗體具有免疫特異性的一種或更多種另外的腫瘤標誌物抗原。

8. 實施方案 7 所述的方法，其中所述組包含作為不同抗原的兩種或更多種腫瘤標誌物抗原。

9. 實施方案 8 所述的方法，其中所述組包含一種或更多種所述不同抗原的兩種或更多種抗原變體。

10. 實施方案 7 或實施方案 8 所述的方法，其中所述兩種或更多種腫瘤標誌物抗原的組包含 MMP9、AIF1、EpCAM 和 CDKN1B。

11. 實施方案 7 至 9 中任一項所述的方法，其中所述兩種或更多種腫瘤標誌物抗原的組包含選自以下的一種或更多種腫瘤標誌物抗原：

NY-ESO-1、波形蛋白、HSPA4、轉鐵蛋白、HNRNP-L、HSPD1、HNRNP-A2、SALL4、週期蛋白 B1、AFP、NPM1、YWHAZ、DDX3X、p62、CAGE、MAGE A4、RalA、GBU4-5、SOX2、AKR1B10、ApoA1、BCL2、CD44、CK18、CPS1、FUCA1、GLUL、HSPA2、IL-8、MDM2、PEBP1、催乳素、RGN、SPP1、SSX2 和 TGFB1。

12. 實施方案 11 所述的方法，其中所述兩種或更多種腫瘤標誌物抗原的組包含 CAGE、NY-ESO-1、MMP9、轉鐵蛋白、MAGE A4、RalA、HSPA4、SALL4、週期蛋白 B1、EpCAM、DDX3X 和 AIF1。

13. 實施方案 12 所述的方法，其中所述兩種或更多種腫瘤標誌物抗原的組由 CAGE、NY-ESO-1、MMP9、轉鐵蛋白、MAGE A4、RalA、HSPA4、SALL4、週期蛋白 B1、EpCAM、DDX3X 和 AIF1 組成。

14. 實施方案 11 所述的方法，其中所述兩種或更多種腫瘤標誌物抗原的組包含 CAGE、NY-ESO-1、MMP9、轉鐵蛋白、MAGE A4、RalA、HSPA4、SALL4、週期蛋白 B1、EpCAM、DDX3X、AIF1、SOX2 和 AFP。

15. 實施方案 14 所述的方法，其中所述兩種或更多種腫瘤標誌物抗原的組由 CAGE、NY-ESO-1、MMP9、轉鐵蛋白、MAGE A4、RalA、HSPA4、SALL4、週期蛋白 B1、EpCAM、DDX3X、AIF1、SOX2 和 AFP 組成。

16. 實施方案 11 所述的方法，其中所述兩種或更多種腫瘤標誌物抗原

的組包含 MMP9、AIF1、EpCAM、NY-ESO-1、HSPA4、波形蛋白、HNRNP-L 和轉鐵蛋白。

17. 實施方案 16 所述的方法，其中所述兩種或更多種腫瘤標誌物抗原的組由 MMP9、AIF1、EpCAM、NY-ESO-1、HSPA4、波形蛋白、HNRNP-L 和轉鐵蛋白組成。

18. 實施方案 11 所述的方法，其中所述兩種或更多種腫瘤標誌物抗原的組包含 AIF1、EpCAM、HSPA4 和 CPS1。

19. 實施方案 18 所述的方法，其中所述兩種或更多種腫瘤標誌物抗原的組由 AIF1、EpCAM、HSPA4 和 CPS1 組成。

20. 實施方案 18 或實施方案 19 所述的方法，其中所述物件為雌性。

21. 實施方案 11 所述的方法，其中所述兩種或更多種腫瘤標誌物抗原的組包含 EpCAM、NY-ESO-1、波形蛋白、HSPA2、HSPA4 和 HNRNP-L。

22. 實施方案 21 所述的方法，其中所述兩種或更多種腫瘤標誌物抗原的組由 EpCAM、NY-ESO-1、波形蛋白、HSPA2、HSPA4 和 HNRNP-L 組成。

23. 實施方案 21 或實施方案 22 所述的方法，其中所述物件為雄性。

24. 實施方案 11 所述的方法，其中所述兩種或更多種腫瘤標誌物抗原的組包含 MMP9、AIF1、EpCAM、DDX3X、SALL4、MAGE A4、NY-ESO-1、CAGE、RaiA 和 SOX2。

25. 實施方案 24 所述的方法，其中所述兩種或更多種腫瘤標誌物抗原的組由 MMP9、AIF1、EpCAM、DDX3X、SALL4、MAGE A4、NY-ESO-1、CAGE、RaiA 和 SOX2 組成。

26. 實施方案 11 所述的方法，其中所述兩種或更多種腫瘤標誌物抗原的組包含 EpCAM、CAGE、SOX2、RaiA、MAGE A4、DDX3X 和 NY-ESO-1。

27. 實施方案 26 所述的方法，其中所述兩種或更多種腫瘤標誌物抗原的組由 EpCAM、CAGE、SOX2、RaiA、MAGE A4、DDX3X 和 NY-ESO-1 組成。

28. 實施方案 26 或實施方案 27 所述的方法，其中所述物件為雄性。

29. 實施方案 11 所述的方法，其中所述兩種或更多種腫瘤標誌物抗原的組包含 AIF1、CAGE、HSPD1、SOX2、SALL4、HSPA4 和轉鐵蛋白。

30. 實施方案 29 所述的方法，其中所述兩種或更多種腫瘤標誌物抗原

的組由 AIF1、CAGE、HSPD1、SOX2、SALL4、HSPA4 和轉鐵蛋白組成。

31. 實施方案 29 或實施方案 30 所述的方法，其中所述物件為雌性。

32. 實施方案 11 所述的方法，其中所述兩種或更多種腫瘤標誌物抗原的組包含 NY-ESO-1、波形蛋白、HSPA4、轉鐵蛋白、HNRNP-L、HSPD1、HNRNP-A2、SALL4、週期蛋白 B1、AFP、NPM1、YWHAZ、DDX3X、p62、CAGE、MAGE A4、RalA、GBU4-5、SOX2、AKR1B10、ApoA1、BCL2、CD44、CK18、CPS1、FUCA1、GLUL、HSPA2、IL-8、MDM2、PEBP1、催乳素、RGN、SPP1、SSX2 和 TGFB1。

33. 實施方案 32 所述的方法，其中所述兩種或更多種腫瘤標誌物抗原的組包含 MMP9、AIF1、EpCAM、CDKN1B、NY-ESO-1、波形蛋白、HSPA4、轉鐵蛋白、HNRNP-L、HSPD1、HNRNP-A2、SALL4、週期蛋白 B1、AFP、NPM1、YWHAZ、DDX3X、p62、CAGE、MAGE A4、RalA、GBU4-5、SOX2、AKR1B10、ApoA1、BCL2、CD44、CK18、CPS1、FUCA1、GLUL、HSPA2、IL-8、MDM2、PEBP1、催乳素、RGN、SPP1、SSX2 和 TGFB1。

34. 實施方案 33 所述的方法，其中所述兩種或更多種腫瘤標誌物抗原的組由以下組成：MMP9、AIF1、EpCAM、CDKN1B、NY-ESO-1、波形蛋白、HSPA4、轉鐵蛋白、HNRNP-L、HSPD1、HNRNP-A2、SALL4、週期蛋白 B1、AFP、NPM1、YWHAZ、DDX3X、p62、CAGE、MAGE A4、RalA、GBU4-5、SOX2、AKR1B10、ApoA1、BCL2、CD44、CK18、CPS1、FUCA1、GLUL、HSPA2、IL-8、MDM2、PEBP1、催乳素、RGN、SPP1、SSX2 和 TGFB1。

35. 前述實施方案中任一項所述的方法，其還包括以下步驟：

(c) 檢測所述腫瘤標誌物抗原與所述受試樣品中存在的自身抗體之間特異性結合的量，

其中所述自身抗體的存在或不存在是以所觀察到的特異性結合的量與預定取捨值之間的比較為基礎。

36. 前述實施方案中任一項所述的方法，其中所述腫瘤標誌物抗原以多個不同的量提供，並且其中所述方法包括以下步驟：

(a) 使所述受試樣品與多種不同量的所述腫瘤標誌物抗原接觸；

(b) 確定與所述受試樣品中存在的自身抗體結合的所述腫瘤標誌物抗原的複合物的存在或不存在；

(c) 檢測所述腫瘤標誌物抗原與所述自身抗體之間特異性結合的量；

(d) 對於步驟(a)中使用的腫瘤標誌物抗原的每種量，繪製或計算所述特異性結合的量相對於所述腫瘤標誌物抗原量的曲線；以及

(e) 基於在使用的腫瘤標誌物抗原的每種不同量下所述腫瘤標誌物抗原與所述自身抗體之間特異性結合的量來確定所述自身抗體的存在或不存在。

37. 實施方案 36 所述的方法，其中基於對於使用的腫瘤標誌物抗原的所有量的特異性結合量的集體值來確定所述自身抗體的存在或不存在。

38. 實施方案 36 所述的方法，其中通過針對劑量回應曲線的存在對步驟(d)的圖進行篩選來確定所述自身抗體的存在或不存在。

39. 實施方案 38 所述的方法，其中所述劑量回應曲線為大致 S 形或 sigmoidal 曲線。

40. 實施方案 36 至 39 中任一項所述的方法，其中所述方法還包括以下步驟：

(d1) 由步驟(c)中繪製或計算的所述曲線計算二次曲線參數；以及

(e) 基於以下的組合來確定所述自身抗體的存在或不存在：

(i) 步驟(b)中確定的所述自身抗體與所述腫瘤標誌物抗原之間特異性結合的量；和

(ii) 步驟(d1)中確定的所述二次曲線參數。

41. 實施方案 40 所述的方法，其中所述二次曲線參數選自斜率、截距、AUC、SlopeMax 和解離常數 (Kd)。

42. 實施方案 41 所述的方法，其中所述二次曲線參數由線性或對數回歸曲線計算。

43. 實施方案 40 至 42 中任一項所述的方法，其中所述二次曲線參數為最大漸近線、最小漸近線、Hill 斜率（或斜率因數）、或者針對步驟(c)中繪製或計算的每個曲線擬合的邏輯斯諦曲線的拐點。

44. 在包含來自哺乳動物物件之體液的受試樣品中確定患有肝癌之個體的抗體譜的體外方法，其中所述抗體是對選自 MMP9、AIF1、EpCAM 和 CDKN1B 的腫瘤標誌物蛋白具有免疫特異性的自身抗體，所述方法包括以下步驟：

a) 使所述受試樣品與選自 MMP9、AIF1、EpCAM 和 CDKN1B 的腫瘤標

誌物抗原接觸；以及

b) 確定與所述受試樣品中存在的自身抗體結合的所述腫瘤標誌物抗原的複合物的存在或不存在，其中重複所述方法以建立抗體產生譜。

45. 通過檢測包含來自哺乳動物物件之體液的受試樣品中的抗體來在所述哺乳動物物件中診斷和治療肝癌的方法，其中所述抗體是對選自 MMP9、AIF1、EpCAM 和 CDKN1B 的腫瘤標誌物蛋白具有免疫特異性的自身抗體，所述方法包括以下步驟：

(a) 使所述受試樣品與選自 MMP9、AIF1、EpCAM 和 CDKN1B 的腫瘤標誌物抗原接觸；

(b) 確定與所述受試樣品中存在的自身抗體結合的所述腫瘤標誌物抗原的複合物的存在或不存在；

(c) 當檢測到與所述受試樣品中存在的自身抗體結合的所述腫瘤標誌物抗原的複合物時，診斷所述物件患有肝癌；以及

(d) 向所診斷的物件施用肝癌治療。

46. 預測針對抗肝癌治療之回應的方法，所述方法包括檢測包含來自哺乳動物物件之體液的受試樣品中的抗體，其中所述抗體是對選自 MMP9、AIF1、EpCAM 和 CDKN1B 的腫瘤標誌物蛋白具有免疫特異性的自身抗體，所述方法包括以下步驟：

(a) 使所述受試樣品與選自 MMP9、AIF1、EpCAM 和 CDKN1B 的腫瘤標誌物抗原接觸；

(b) 確定與所述受試樣品中存在的自身抗體結合的所述腫瘤標誌物抗原的複合物的存在或不存在；

(c) 檢測所述腫瘤標誌物抗原與所述受試樣品中存在的自身抗體之間特異性結合的量；以及

(d) 將所述腫瘤標誌物抗原與所述自身抗體之間特異性結合的量與先前確立的結合量與可能的治療結果之間的關係進行比較；

其中當與對照相比時，特異性結合的量的改變預測患者將對所述抗肝癌治療作出或不作出回應。

47. 實施方案 45 或實施方案 46 所述的方法，其中所述肝癌治療選自化學治療、射頻消融術、肝切除術、肝移植、疫苗接種、抗生長因數或信號

轉導治療、內分泌治療、人抗體治療、經導管動脈化學栓塞術、經皮乙醇注射、微波消融術、索拉非尼施用和放射性栓塞術。

48. 實施方案 44 至 47 中任一項所述的方法，其中檢測兩種或更多種自身抗體，並且其中所述方法包括以下步驟：

(a) 使所述受試樣品與兩種或更多種腫瘤標誌物抗原的組接觸，所述組包含選自 MMP9、AIF1、EpCAM 和 CDKN1B 的腫瘤標誌物抗原以及對至少一種所述自身抗體具有免疫特異性的一種或更多種另外的腫瘤標誌物抗原。

49. 實施方案 48 所述的方法，其中所述組包含作為不同抗原的兩種或更多種腫瘤標誌物抗原。

50. 實施方案 49 所述的方法，其中所述組包含一種或更多種所述不同抗原的兩種或更多種抗原變體。

51. 實施方案 49 所述的方法，其中所述兩種或更多種腫瘤標誌物抗原的組包含 MMP9、AIF1、EpCAM 和 CDKN1B。

52. 實施方案 48 至 50 中任一項所述的方法，其中所述兩種或更多種腫瘤標誌物抗原的組包含選自以下的一種或更多種腫瘤標誌物抗原：
NY-ESO-1、波形蛋白、HSPA4、轉鐵蛋白、HNRNP-L、HSPD1、HNRNP-A2、SALL4、週期蛋白 B1、AFP、NPM1、YWHAZ、DDX3X、p62、CAGE、MAGE A4、RalA、GBU4-5、SOX2、AKR1B10、ApoA1、BCL2、CD44、CK18、CPS1、FUCA1、GLUL、HSPA2、IL-8、MDM2、PEBP1、催乳素、RGN、SPP1、SSX2 和 TGFB1。

53. 實施方案 52 所述的方法，其中所述兩種或更多種腫瘤標誌物抗原的組包含 CAGE、NY-ESO-1、MMP9、轉鐵蛋白、MAGE A4、RalA、HSPA4、SALL4、週期蛋白 B1、EpCAM、DDX3X 和 AIF1。

54. 實施方案 53 所述的方法，其中所述兩種或更多種腫瘤標誌物抗原的組由 CAGE、NY-ESO-1、MMP9、轉鐵蛋白、MAGE A4、RalA、HSPA4、SALL4、週期蛋白 B1、EpCAM、DDX3X 和 AIF1 組成。

55. 實施方案 52 所述的方法，其中所述兩種或更多種腫瘤標誌物抗原的組包含 CAGE、NY-ESO-1、MMP9、轉鐵蛋白、MAGE A4、RalA、HSPA4、SALL4、週期蛋白 B1、EpCAM、DDX3X、AIF1、SOX2 和 AFP。

56. 實施方案 55 所述的方法，其中所述兩種或更多種腫瘤標誌物抗原

的組由 CAGE、NY-ESO-1、MMP9、轉鐵蛋白、MAGE A4、RaiA、HSPA4、SALL4、週期蛋白 B1、EpCAM、DDX3X、AIF1、SOX2 和 AFP 組成。

57. 實施方案 52 所述的方法，其中所述兩種或更多種腫瘤標誌物抗原的組包含 MMP9、AIF1、EpCAM、NY-ESO-1、HSPA4、波形蛋白、HNRNP-L 和轉鐵蛋白。

58. 實施方案 57 所述的方法，其中所述兩種或更多種腫瘤標誌物抗原的組由 MMP9、AIF1、EpCAM、NY-ESO-1、HSPA4、波形蛋白、HNRNP-L 和轉鐵蛋白組成。

59. 實施方案 52 所述的方法，其中所述兩種或更多種腫瘤標誌物抗原的組包含 AIF1、EpCAM、HSPA4 和 CPS1。

60. 實施方案 59 所述的方法，其中所述兩種或更多種腫瘤標誌物抗原的組由 AIF1、EpCAM、HSPA4 和 CPS1 組成。

61. 實施方案 59 或實施方案 60 所述的方法，其中所述物件為雌性。

62. 實施方案 52 所述的方法，其中所述兩種或更多種腫瘤標誌物抗原的組包含 EpCAM、NY-ESO-1、波形蛋白、HSPA2、HSPA4 和 HNRNP-L。

63. 實施方案 62 所述的方法，其中所述兩種或更多種腫瘤標誌物抗原的組由 EpCAM、NY-ESO-1、波形蛋白、HSPA2、HSPA4 和 HNRNP-L 組成。

64. 實施方案 62 或實施方案 63 所述的方法，其中所述物件為雄性。

65. 實施方案 52 所述的方法，其中所述兩種或更多種腫瘤標誌物抗原的組包含 MMP9、AIF1、EpCAM、DDX3X、SALL4、MAGE A4、NY-ESO-1、CAGE、RaiA 和 SOX2。

66. 實施方案 65 所述的方法，其中所述兩種或更多種腫瘤標誌物抗原的組由 MMP9、AIF1、EpCAM、DDX3X、SALL4、MAGE A4、NY-ESO-1、CAGE、RaiA 和 SOX2 組成。

67. 實施方案 52 所述的方法，其中所述兩種或更多種腫瘤標誌物抗原的組包含 EpCAM、CAGE、SOX2、RaiA、MAGE A4、DDX3X 和 NY-ESO-1。

68. 實施方案 67 所述的方法，其中所述兩種或更多種腫瘤標誌物抗原的組由 EpCAM、CAGE、SOX2、RaiA、MAGE A4、DDX3X 和 NY-ESO-1 組成。

69. 實施方案 67 或實施方案 68 所述的方法，其中所述物件為雄性。

70. 實施方案 52 所述的方法，其中所述兩種或更多種腫瘤標誌物抗原包含 AIF1、CAGE、HSPD1、SOX2、SALL4、HSPA4 和轉鐵蛋白。

71. 實施方案 70 所述的方法，其中所述兩種或更多種腫瘤標誌物抗原的組由 AIF1、CAGE、HSPD1、SOX2、SALL4、HSPA4 和轉鐵蛋白組成。

72. 實施方案 70 或實施方案 71 所述的方法，其中所述物件為雌性。

73. 實施方案 52 所述的方法，其中所述兩種或更多種腫瘤標誌物抗原的組包含 NY-ESO-1、波形蛋白、HSPA4、轉鐵蛋白、HNRNP-L、HSPD1、HNRNP-A2、SALL4、週期蛋白 B1、AFP、NPM1、YWHAZ、DDX3X、p62、CAGE、MAGE A4、RalA、GBU4-5、SOX2、AKR1B10、ApoA1、BCL2、CD44、CK18、CPS1、FUCA1、GLUL、HSPA2、IL-8、MDM2、PEBP1、催乳素、RGN、SPP1、SSX2 和 TGFB1。

74. 實施方案 73 所述的方法，其中所述兩種或更多種腫瘤標誌物抗原的組包含 MMP9、AIF1、EpCAM、CDKN1B、NY-ESO-1、波形蛋白、HSPA4、轉鐵蛋白、HNRNP-L、HSPD1、HNRNP-A2、SALL4、週期蛋白 B1、AFP、NPM1、YWHAZ、DDX3X、p62、CAGE、MAGE A4、RalA、GBU4-5、SOX2、AKR1B10、ApoA1、BCL2、CD44、CK18、CPS1、FUCA1、GLUL、HSPA2、IL-8、MDM2、PEBP1、催乳素、RGN、SPP1、SSX2 和 TGFB1。

75. 實施方案 74 所述的方法，其中所述兩種或更多種腫瘤標誌物抗原的組由以下組成：MMP9、AIF1、EpCAM、CDKN1B、NY-ESO-1、波形蛋白、HSPA4、轉鐵蛋白、HNRNP-L、HSPD1、HNRNP-A2、SALL4、週期蛋白 B1、AFP、NPM1、YWHAZ、DDX3X、p62、CAGE、MAGE A4、RalA、GBU4-5、SOX2、AKR1B10、ApoA1、BCL2、CD44、CK18、CPS1、FUCA1、GLUL、HSPA2、IL-8、MDM2、PEBP1、催乳素、RGN、SPP1、SSX2 和 TGFB1。

76. 實施方案 48 至 75 中任一項所述的方法，其中所述腫瘤標誌物抗原以多個不同的量提供，並且其中所述方法包括以下步驟：

(a) 使所述受試樣品與多種不同量的所述腫瘤標誌物抗原接觸；

(b) 確定與所述受試樣品中存在的自身抗體結合的所述腫瘤標誌物抗原的複合物的存在或不存在；

(c) 檢測所述腫瘤標誌物抗原與所述自身抗體之間特異性結合的量；

(d) 對於步驟(a)中使用的腫瘤標誌物抗原的每種量，繪製或計算所述特異性結合的量相對於所述腫瘤標誌物抗原量的曲線；

(e) 基於在使用的腫瘤標誌物抗原的每種不同量下所述腫瘤標誌物抗原與所述自身抗體之間特異性結合的量來建立抗體產生譜或診斷所述物件患有肝癌；以及任選地

(f) 向所診斷的物件施用肝癌治療。

77. 實施方案 76 所述的方法，其中基於對於使用的腫瘤標誌物抗原的所有量的特異性結合量的集體值來確定肝癌的存在或不存在。

78. 實施方案 77 所述的方法，其中通過針對劑量回應曲線的存在對步驟(d)的圖進行篩選來診斷所述對象患有肝癌。

79. 實施方案 78 所述的方法，其中所述劑量回應曲線是大致 S 形或 sigmoidal 曲線。

80. 實施方案 76 至 79 中任一項所述的方法，其中所述方法還包括：

(d1) 由步驟(d)中繪製或計算的所述曲線計算二次曲線參數；以及

(e) 基於以下的組合來對肝癌進行診斷：

(i) 步驟(c)中確定的所述自身抗體與所述腫瘤標誌物抗原之間特異性結合的量；和

(ii) 步驟(d1)中確定的所述二次曲線參數。

81. 實施方案 80 所述的方法，其中所述二次曲線參數選自斜率、截距、AUC、SlopeMax 和解離常數 (Kd)。

82. 實施方案 81 所述的方法，其中所述二次曲線參數由線性或對數回歸曲線計算。

83. 實施方案 80 至 82 中任一項所述的方法，其中所述二次曲線參數是最大漸近線、最小漸近線、Hill 斜率 (或斜率因數)、或者針對步驟(d)中繪製或計算的每個曲線擬合的邏輯斯諦曲線的拐點。

84. 前述實施方案中任一項所述的方法，其中所述腫瘤標誌物抗原是天然蛋白質或多肽、重組蛋白或多肽、合成蛋白或多肽、合成肽、肽模擬物、多糖或核酸。

85. 實施方案 1 和 3 至 75 中任一項所述的方法，其中所述肝癌是肝細胞癌 (HCC)。

86. 前述實施方案中任一項所述的方法，其中所述體液選自血漿、血清、全血、尿、汗、淋巴、糞便、腦脊液、腹水、胸腔積液、精液、痰、

乳頭抽吸液、術後血清腫、唾液、羊水、淚和傷口引流液。

87. 前述實施方案中任一項所述的方法，其中所述方法還包括檢測包含來自所述哺乳動物物件之體液的受試樣品中的甲胎蛋白（AFP）、脫- γ 羧基凝血酶原（DCP）或凝集素反應性甲胎蛋白（AFP-L3）。

88. 實施方案 87 所述的方法，其中所述方法包括檢測包含來自所述哺乳動物物件之體液的受試樣品中的甲胎蛋白（AFP）。

89. 實施方案 88 所述的方法，其中在包含來自所述哺乳動物物件之體液的受試樣品中檢測對所述腫瘤標誌物蛋白 CAGE、NY-ESO-1、MMP9、轉鐵蛋白、MAGE A4、RalA、HSPA4、SALL4、週期蛋白 B1、EpCAM、DDX3X 和 AIF1 具有免疫特異性的自身抗體。

90. 實施方案 88 所述的方法，其中在包含來自所述哺乳動物物件之體液的受試樣品中檢測對所述腫瘤標誌物蛋白 CAGE、NY-ESO-1、MMP9、轉鐵蛋白、MAGE A4、RalA、HSPA4、SALL4、週期蛋白 B1、EpCAM、DDX3X、AIF1、SOX2 和 AFP 具有免疫特異性的自身抗體。

91. 實施方案 87 至 90 所述的方法，其中所述體液是血液。

92. 選自 MMP9、AIF1、EpCAM 和 CDKN1B 的腫瘤標誌物抗原在通過檢測包含來自哺乳動物物件之體液的受試樣品中對 MMP9、AIF1、EpCAM 或 CDKN1B 具有免疫特異性的自身抗體來在所述哺乳動物物件中檢測肝癌的方法中的用途，所述方法包括以下步驟：

(a) 使所述受試樣品與選自 MMP9、AIF1、EpCAM 和 CDKN1B 的腫瘤標誌物抗原接觸；以及

(b) 確定與所述受試樣品中存在的自身抗體結合的所述腫瘤標誌物抗原的複合物的存在或不存在，

其中所述複合物的存在指示肝癌的存在。

93. 適用於進行前述實施方案中任一項所述方法的試劑盒，其中所述試劑盒包含：

(a) 一種或更多種腫瘤標誌物抗原；和

(b) 能夠檢測與所述受試樣品中存在的自身抗體結合的所述腫瘤標誌物抗原的複合物的試劑。

94. 用於檢測包含來自哺乳動物物件之體液的受試樣品中的自身抗體

的試劑盒，其包含：

- (a) 選自 MMP9、AIF1、EpCAM 和 CDKN1B 的腫瘤標誌物抗原；和
- (b) 能夠檢測與所述受試樣品中存在的自身抗體結合的所述腫瘤標誌物抗原的複合物的試劑。

95. 實施方案 93 或實施方案 94 所述的試劑盒，其還包含：

- (c) 用於使所述腫瘤標誌物抗原與包含來自哺乳動物物件之體液的受試樣品接觸的裝置。

96. 實施方案 95 所述的試劑盒，其中所述用於使所述腫瘤標誌物抗原與包含來自哺乳動物物件之體液的受試樣品接觸的裝置包含固定在晶片、載玻片、板、微量滴定板的孔、珠、膜或納米粒上的所述腫瘤標誌物抗原。

97. 實施方案 93 至 96 中任一項所述的試劑盒，其中所述腫瘤標誌物抗原存在於兩種或更多種腫瘤標誌物抗原的組中。

98. 實施方案 97 所述的試劑盒，其中所述組包含作為不同抗原的兩種或更多種腫瘤標誌物抗原。

99. 實施方案 97 或實施方案 98 所述的試劑盒，其中所述兩種或更多種腫瘤標誌物抗原的組包含 MMP9、AIF1、EpCAM 和 CDKN1B。

100. 實施方案 97 至 99 中任一項所述的試劑盒，其中所述兩種或更多種腫瘤標誌物抗原的組包含選自以下的一種或更多種腫瘤標誌物抗原：NY-ESO-1、波形蛋白、HSPA4、轉鐵蛋白、HNRNP-L、HSPD1、HNRNP-A2、SALL4、週期蛋白 B1、AFP、NPM1、YWHAZ、DDX3X、p62、CAGE、MAGE A4、RalA、GBU4-5、SOX2、AKR1B10、ApoA1、BCL2、CD44、CK18、CPS1、FUCA1、GLUL、HSPA2、IL-8、MDM2、PEBP1、催乳素、RGN、SPP1、SSX2 和 TGFBI。

101. 實施方案 100 所述的試劑盒，其中所述兩種或更多種腫瘤標誌物抗原的組包含 CAGE、NY-ESO-1、MMP9、轉鐵蛋白、MAGE A4、RalA、HSPA4、SALL4、週期蛋白 B1、EpCAM、DDX3X 和 AIF1。

102. 實施方案 101 所述的試劑盒，其中所述兩種或更多種腫瘤標誌物抗原的組由 CAGE、NY-ESO-1、MMP9、轉鐵蛋白、MAGE A4、RalA、HSPA4、SALL4、週期蛋白 B1、EpCAM、DDX3X 和 AIF1 組成。

103. 實施方案 100 所述的試劑盒，其中所述兩種或更多種腫瘤標誌物抗原的組包含 CAGE、NY-ESO-1、MMP9、轉鐵蛋白、MAGE A4、RalA、

HSPA4、SALL4、週期蛋白 B1、EpCAM、DDX3X、AIF1、SOX2 和 AFP。

104. 實施方案 103 所述的試劑盒，其中所述兩種或更多種腫瘤標誌物抗原的組由 CAGE、NY-ESO-1、MMP9、轉鐵蛋白、MAGE A4、RalA、HSPA4、SALL4、週期蛋白 B1、EpCAM、DDX3X、AIF1、SOX2 和 AFP 組成。

105. 實施方案 100 所述的試劑盒，其中所述兩種或更多種腫瘤標誌物抗原的組包含 MMP9、AIF1、EpCAM、NY-ESO-1、HSPA4、波形蛋白、HNRNP-L 和轉鐵蛋白。

106. 實施方案 105 所述的試劑盒，其中所述兩種或更多種腫瘤標誌物抗原的組由 MMP9、AIF1、EpCAM、NY-ESO-1、HSPA4、波形蛋白、HNRNP-L 和轉鐵蛋白組成。

107. 實施方案 100 所述的試劑盒，其中所述兩種或更多種腫瘤標誌物抗原的組包含 AIF1、EpCAM、HSPA4 和 CPS1。

108. 實施方案 107 所述的試劑盒，其中所述兩種或更多種腫瘤標誌物抗原的組由 AIF1、EpCAM、HSPA4 和 CPS1 組成。

109. 實施方案 107 或實施方案 108 所述的試劑盒，其中所述對象為雌性。

110. 實施方案 100 所述的試劑盒，其中所述兩種或更多種腫瘤標誌物抗原的組包含 EpCAM、NY-ESO-1、波形蛋白、HSPA2、HSPA4 和 HNRNP-L。

111. 實施方案 110 所述的試劑盒，其中所述兩種或更多種腫瘤標誌物抗原的組由 EpCAM、NY-ESO-1、波形蛋白、HSPA2、HSPA4 和 HNRNP-L 組成。

112. 實施方案 110 或實施方案 111 所述的試劑盒，其中所述對象為雄性。

113. 實施方案 110 所述的試劑盒，其中所述兩種或更多種腫瘤標誌物抗原的組包含 MMP9、AIF1、EpCAM、DDX3X、SALL4、MAGE A4、NY-ESO-1、CAGE、RalA 和 SOX2。

114. 實施方案 113 所述的試劑盒，其中所述兩種或更多種腫瘤標誌物抗原的組由 MMP9、AIF1、EpCAM、DDX3X、SALL4、MAGE A4、NY-ESO-1、CAGE、RalA 和 SOX2 組成。

115. 實施方案 100 所述的試劑盒，其中所述兩種或更多種腫瘤標誌物抗原的組包含 EpCAM、CAGE、SOX2、RalA、MAGE A4、DDX3X 和

NY-ESO-1。

116. 實施方案 115 所述的試劑盒，其中所述兩種或更多種腫瘤標誌物抗原的組由 EpCAM、CAGE、SOX2、RalA、MAGE A4、DDX3X 和 NY-ESO-1 組成。

117. 實施方案 115 或實施方案 116 所述的試劑盒，其中所述對象為雄性。

118. 實施方案 100 所述的試劑盒，其中所述兩種或更多種腫瘤標誌物抗原的組包含 AIF1、CAGE、HSPD1、SOX2、SALL4、HSPA4 和轉鐵蛋白。

119. 實施方案 118 所述的試劑盒，其中所述兩種或更多種腫瘤標誌物抗原的組由 AIF1、CAGE、HSPD1、SOX2、SALL4、HSPA4 和轉鐵蛋白組成。

120. 實施方案 118 或實施方案 119 所述的試劑盒，其中所述對象為雌性。

121. 實施方案 100 所述的試劑盒，其中所述兩種或更多種腫瘤標誌物抗原的組包含 NY-ESO-1、波形蛋白、HSPA4、轉鐵蛋白、HNRNP-L、HSPD1、HNRNP-A2、SALL4、週期蛋白 B1、AFP、NPM1、YWHAZ、DDX3X、p62、CAGE、MAGE A4、RalA、GBU4-5、SOX2、AKR1B10、ApoA1、BCL2、CD44、CK18、CPS1、FUCA1、GLUL、HSPA2、IL-8、MDM2、PEBP1、催乳素、RGN、SPP1、SSX2 和 TGFB1。

122. 實施方案 121 所述的試劑盒，其中所述兩種或更多種腫瘤標誌物抗原的組包含 MMP9、AIF1、EpCAM、CDKN1B、NY-ESO-1、波形蛋白、HSPA4、轉鐵蛋白、HNRNP-L、HSPD1、HNRNP-A2、SALL4、週期蛋白 B1、AFP、NPM1、YWHAZ、DDX3X、p62、CAGE、MAGE A4、RalA、GBU4-5、SOX2、AKR1B10、ApoA1、BCL2、CD44、CK18、CPS1、FUCA1、GLUL、HSPA2、IL-8、MDM2、PEBP1、催乳素、RGN、SPP1、SSX2 和 TGFB1。

123. 實施方案 122 所述的試劑盒，其中所述兩種或更多種腫瘤標誌物抗原的組由以下組成：MMP9、AIF1、EpCAM、CDKN1B、NY-ESO-1、波形蛋白、HSPA4、轉鐵蛋白、HNRNP-L、HSPD1、HNRNP-A2、SALL4、週期蛋白 B1、AFP、NPM1、YWHAZ、DDX3X、p62、CAGE、MAGE A4、RalA、GBU4-5、SOX2、AKR1B10、ApoA1、BCL2、CD44、CK18、CPS1、FUCA1、GLUL、HSPA2、IL-8、MDM2、PEBP1、催乳素、RGN、SPP1、SSX2 和 TGFB1。

124. 實施方案 93 至 123 中任一項所述的試劑盒，其用於檢測肝癌。

125. 實施方案93至124中任一項所述的試劑盒，其中所述體液選自血漿、血清、全血、尿、汗、淋巴、糞便、腦脊液、腹水、胸腔積液、精液、痰、乳頭抽吸液、術後血清腫、唾液、羊水、淚和傷口引流液。

【符號說明】

申請專利範圍

1. 通過檢測包含來自哺乳動物物件之體液的受試樣品中的抗體來在所述哺乳動物物件中檢測肝癌的方法，其中所述抗體是對選自 MMP9、AIF1、EpCAM 和 CDKN1B 的腫瘤標誌物蛋白具有免疫特異性的自身抗體，所述方法包括以下步驟：

(a) 使所述受試樣品與選自 MMP9、AIF1、EpCAM 和 CDKN1B 的腫瘤標誌物抗原接觸；以及

(b) 確定與所述受試樣品中存在的自身抗體結合的所述腫瘤標誌物抗原的複合物的存在或不存在；

其中所述複合物的存在指示肝癌的存在。

2. 檢測包含來自哺乳動物物件之體液的受試樣品中的抗體的方法，其中所述抗體是對選自 MMP9、AIF1、EpCAM 和 CDKN1B 的腫瘤標誌物蛋白具有免疫特異性的自身抗體，所述方法包括以下步驟：

(a) 使所述受試樣品與選自 MMP9、AIF1、EpCAM 和 CDKN1B 的腫瘤標誌物抗原接觸；以及

發明摘要

【發明名稱】 抗體測定

ANTIBODY ASSAY

【中文】

本發明涉及通過檢測包含來自哺乳動物物件之體液的受試樣品中的抗體來在所述哺乳動物物件中檢測肝癌的方法，其中所述抗體是對選自MMP9、AIF1、EpCAM和CDKN1B的腫瘤標誌物蛋白具有免疫特異性的自身抗體，所述方法包括：使所述受試樣品與選自MMP9、AIF1、EpCAM和CDKN1B的腫瘤標誌物抗原接觸；以及確定與所述受試樣品中存在的自身抗體結合的所述腫瘤標誌物抗原的複合物的存在或不存在，其中所述複合物的存在指示肝癌的存在。本發明中還包括在哺乳動物中診斷和治療肝癌的對應方法、預測對抗肝癌治療之響應的對應方法、檢測包含來自哺乳動物物件之體液的受試樣品中的抗體的對應方法以及適合用於進行本發明方法的試劑盒。

【英文】

The present invention relates to a method of detecting liver cancer in a mammalian subject by detecting an antibody in a test sample comprising a bodily fluid from the mammalian subject, wherein the antibody is an autoantibody immunologically specific for a tumour marker protein selected from the group consisting of MMP9, AIF1, EpCAM and CDKN1B, which method comprises contacting the test sample with a

tumour marker antigen selected from the group consisting of MMP9, AIF1, EpCAM and CDKN1B and determining the presence or absence of complexes of the tumour marker antigen bound to autoantibodies present in the test sample where the presence of said complexes is indicative of the presence of liver cancer. Also included within the invention are corresponding methods of diagnosing and treating liver cancer in a mammalian subject, corresponding methods of predicting response to an anti-liver cancer treatment, a corresponding method of detecting an antibody in a test sample comprising a bodily fluid from a mammalian subject and kits suitable for performing methods of the invention.

【代表圖】

125. 實施方案93至124中任一項所述的試劑盒，其中所述體液選自血漿、血清、全血、尿、汗、淋巴、糞便、腦脊液、腹水、胸腔積液、精液、痰、乳頭抽吸液、術後血清腫、唾液、羊水、淚和傷口引流液。

【符號說明】

申請專利範圍

1. 通過檢測包含來自哺乳動物物件之體液的受試樣品中的抗體來在所述哺乳動物物件中檢測肝癌的方法，其中所述抗體是對選自 MMP9、AIF1、EpCAM 和 CDKN1B 的腫瘤標誌物蛋白具有免疫特異性的自身抗體，所述方法包括以下步驟：

(a) 使所述受試樣品與選自 MMP9、AIF1、EpCAM 和 CDKN1B 的腫瘤標誌物抗原接觸；以及

(b) 確定與所述受試樣品中存在的自身抗體結合的所述腫瘤標誌物抗原的複合物的存在或不存在；

其中所述複合物的存在指示肝癌的存在。

2. 檢測包含來自哺乳動物物件之體液的受試樣品中的抗體的方法，其中所述抗體是對選自 MMP9、AIF1、EpCAM 和 CDKN1B 的腫瘤標誌物蛋白具有免疫特異性的自身抗體，所述方法包括以下步驟：

(a) 使所述受試樣品與選自 MMP9、AIF1、EpCAM 和 CDKN1B 的腫瘤標誌物抗原接觸；以及

(b) 確定與所述受試樣品中存在的自身抗體結合的所述腫瘤標誌物抗原的複合物的存在或不存在。

3. 權利要求 2 所述的方法，其中所述哺乳動物物件被懷疑患有肝癌。

4. 在包含來自哺乳動物物件之體液的受試樣品中確定患有肝癌之個體的抗體譜的體外方法，其中所述抗體是對選自 MMP9、AIF1、EpCAM 和 CDKN1B 的腫瘤標誌物蛋白具有免疫特異性的自身抗體，所述方法包括以下步驟：

a) 使所述受試樣品與選自 MMP9、AIF1、EpCAM 和 CDKN1B 的腫瘤標誌物抗原接觸；以及

b) 確定與所述受試樣品中存在的自身抗體結合的所述腫瘤標誌物抗原的複合物的存在或不存在，其中重複所述方法以建立抗體產生譜。

5. 通過檢測包含來自哺乳動物物件之體液的受試樣品中的抗體來在所述哺乳動物物件中診斷和治療肝癌的方法，其中所述抗體是對選自 MMP9、AIF1、EpCAM 和 CDKN1B 的腫瘤標誌物蛋白具有免疫特異性的自身抗體，所述方法包括以下步驟：

(a) 使所述受試樣品與選自 MMP9、AIF1、EpCAM 和 CDKN1B 的腫瘤標誌物抗原接觸；

(b) 確定與所述受試樣品中存在的自身抗體結合的所述腫瘤標誌物抗原的複合物的存在或不存在；

(c) 當檢測到與所述受試樣品中存在的自身抗體結合的所述腫瘤標誌物抗原的複合物時，診斷所述物件患有肝癌；以及

(d) 向所診斷的物件施用肝癌治療。

6. 預測針對抗肝癌治療之回應的方法，所述方法包括檢測包含來自哺乳動物物件之體液的受試樣品中的抗體，其中所述抗體是對選自 MMP9、AIF1、EpCAM 和 CDKN1B 的腫瘤標誌物蛋白具有免疫特異性的自身抗體，所述方法包括以下步驟：

(a) 使所述受試樣品與選自 MMP9、AIF1、EpCAM 和 CDKN1B 的腫瘤標誌物抗原接觸；

(b) 確定與所述受試樣品中存在的自身抗體結合的所述腫瘤標誌物抗原的複合物的存在或不存在；

(c) 檢測所述腫瘤標誌物抗原與所述受試樣品中存在的自身抗體之間特異性結合的量；以及

(d) 將所述腫瘤標誌物抗原與所述自身抗體之間特異性結合的量與先前確立的結合量與可能的治療結果之間的關係進行比較；

其中當與對照相比時，特異性結合的量的改變預測患者將對所述抗肝癌治療作出或不作出回應。

7. 權利要求 1 至 6 中任一項所述的方法，其中檢測兩種或更多種自身抗體，並且其中所述方法包括以下步驟：

(a) 使所述受試樣品與兩種或更多種腫瘤標誌物抗原的組接觸，所述組包含：

(i) CAGE、NY-ESO-1、MMP9、轉鐵蛋白、MAGE A4、RaiA、HSPA4、SALL4、週期蛋白 B1、EpCAM、DDX3X 和 AIF1；或者

(ii) CAGE、NY-ESO-1、MMP9、轉鐵蛋白、MAGE A4、RaiA、HSPA4、SALL4、週期蛋白 B1、EpCAM、DDX3X、AIF1、SOX2 和 AFP。

8. 前述權利要求中任一項所述的方法，其中所述腫瘤標誌物抗原以多個不同的量提供，並且其中所述方法包括以下步驟：

(a) 使所述受試樣品與多種不同量的所述腫瘤標誌物抗原接觸；

(b) 確定與所述受試樣品中存在的自身抗體結合的所述腫瘤標誌物抗原的複合物的存在或不存在；

(c) 檢測所述腫瘤標誌物抗原與所述自身抗體之間特異性結合的量；

(d) 對於步驟(a)中使用的腫瘤標誌物抗原的每種量，繪製或計算所述特異性結合的量相對於所述腫瘤標誌物抗原量的曲線；

(e) 基於在使用的腫瘤標誌物抗原的每種不同量下所述腫瘤標誌物抗原與所述自身抗體之間特異性結合的量來確定所述自身抗體的存在或不存在、建立抗體產生譜、診斷所述物件患有肝癌或預測針對抗肝癌治療之回應；以及任選地

(f) 向所診斷的物件施用肝癌治療。

9. 選自 MMP9、AIF1、EpCAM 和 CDKN1B 的腫瘤標誌物抗原在通過檢測包含來自哺乳動物物件之體液的受試樣品中對 MMP9、AIF1、EpCAM 或 CDKN1B 具有免疫特異性的自身抗體來在所述哺乳動物物件中檢測肝癌的

方法中的用途，所述方法包括以下步驟：

(a) 使所述受試樣品與選自 MMP9、AIF1、EpCAM 和 CDKN1B 的腫瘤標誌物抗原接觸；以及

(b) 確定與所述受試樣品中存在的自身抗體結合的所述腫瘤標誌物抗原的複合物的存在或不存在，

其中所述複合物的存在指示肝癌的存在。

10. 用於檢測包含來自哺乳動物物件之體液的受試樣品中的自身抗體的試劑盒，其包含：

(a) 選自 MMP9、AIF1、EpCAM 和 CDKN1B 的腫瘤標誌物抗原；和

(b) 能夠檢測與所述受試樣品中存在的自身抗體結合的所述腫瘤標誌物抗原的複合物的試劑。

11. 權利要求 10 所述的試劑盒，其中所述腫瘤標誌物抗原存在於兩種或更多種腫瘤標誌物抗原的組中，並且其中所述兩種或更多種腫瘤標誌物抗原的組包含：

(i) CAGE、NY-ESO-1、MMP9、轉鐵蛋白、MAGE A4、RalA、HSPA4、SALL4、週期蛋白 B1、EpCAM、DDX3X 和 AIF1；或

(ii) CAGE、NY-ESO-1、MMP9、轉鐵蛋白、MAGE A4、RalA、HSPA4、SALL4、週期蛋白 B1、EpCAM、DDX3X、AIF1、SOX2 和 AFP。

發明專利說明書

(本說明書格式、順序，請勿任意更動)

【發明名稱】(中文/英文)

抗體測定 / ANTIBODY ASSAY

【技術領域】

【0001】本發明一般地涉及抗體檢測領域，並且特別地涉及用於檢測包含患者體液之樣品中與肝癌相關之自身抗體的測定。

【先前技術】

【0002】很多診斷、預後和/或監測測定依賴於檢測特定疾病狀態或疾病易感性的生物標誌物。這樣的生物標誌物通常是特定疾病特徵性的或與疾病易感性相關的蛋白質或多肽，並且通常用於檢測癌症（包括肝癌）。

【0003】肝癌並且尤其是肝細胞癌（hepatocellular carcinoma，HCC）是全世界第六常見的癌症，而且其還是癌症死亡的第二常見原因。高死亡率由晚期診斷（通常是在轉移之後）和已存在的肝疾病引起。晚期診斷是由於缺乏早期症狀和用於診斷的影像學技術不是最佳的。

【0004】血液甲胎蛋白（alpha-fetoprotein，AFP）水準的超聲篩選和評估是目前最廣泛使用的肝癌篩查工具。然而，其差的表現突顯了用於肝癌的經改進早期檢測/篩選測試的重大缺口。

【0005】明顯的是，有效篩查肝癌存在的臨床上可用的測試由於其可使肝癌得到早期診斷而受到歡迎。此外，對體液樣品（例如，血液樣品）進行的診斷測試相對於其他技術而言快速且相對不具有侵入性，從而提高篩查參與率。早期疾病檢測開闢了副作用較不嚴重的更廣泛範圍的治療選擇。中期肝癌的當前治療途徑涉及全肝移植，並且較早地鑒定患有早期疾病的患者將減輕器官捐獻者登記簿上的負擔。

【0006】由於肝癌的比例在世界範圍內提高，用於肝癌的經改進篩查測試在全世界將是有用的。目前，中國占有所有HCC病例的約50%，而埃及也具有非常高的HCC比例。HCC在這些國家的高患病率被認為部分地是因為乙型肝炎（hepatitis B）在中國的高發病率和丙型肝炎（hepatitis C）在埃及的高患病率。乙型肝炎和丙型肝炎以及肝硬化、非酒精性脂肪性肝病

(non-alcoholic fatty liver disease)、酒精性肝病、威爾遜病 (Wilson's disease)、遺傳性血色素沉著病 (hereditary hemochromatosis)、自身免疫性肝炎、證實的黃麴黴毒素暴露 (documented aflatoxin exposure)、血吸蟲病和糖尿病是肝癌的已知風險因數。這些病症在世界範圍內的患病率提高使得急需設計用於肝癌的快速且非侵入性的測試。

【0007】近年來，越來越明顯的是，抗體（並且特別是自身抗體）可用作疾病或疾病易感性的生物標誌物。自身抗體是針對個體免疫系統識別為外來的抗原的天然抗體，即使該抗原實際上來源於個體。其可作為迴圈游離自身抗體或以由與其靶蛋白結合之自身抗體組成的迴圈免疫複合物的形式存在於迴圈中。由“正常”細胞表達的野生型蛋白與由患病細胞或在患病過程期間產生的經改變蛋白質形式之間的差異在一些情況下可導致經改變蛋白質被個體的免疫系統識別為“非自身的”並因此在該個體中引發免疫反應。這可以是導致產生對經改變蛋白質具有免疫特異性的自身抗體的體液（即B細胞介導的）免疫反應。

【0008】就自身抗體產生而言測量個體針對腫瘤標誌物蛋白之存在的免疫反應的測定提供直接測量或檢測體液中的腫瘤標誌物蛋白的替代方案。這樣的測定實質上構成了腫瘤標誌物蛋白之存在的間接檢測。免疫反應的性質意味著，非常少量的迴圈腫瘤標誌物蛋白可能以可引發自身抗體，並且依賴於檢測針對腫瘤標誌物蛋白的免疫反應的間接方法將因此比用於直接測量體液中腫瘤標誌物蛋白水準的方法更靈敏。因此，基於自身抗體檢測的測定方法在患病過程早期可具有特別的價值。

【0009】本發明人已出人意料地確定了先前未知與肝癌相關的四種腫瘤標誌物抗原。藉由檢測針對這些腫瘤標誌物抗原中任一種的自身抗體，任選地與一種或更多種另外的腫瘤標誌物抗原組合，本發明人已設計了用於肝癌的有效且非侵入性的篩查方法，以及對應的試劑盒。

【發明內容】

【0010】本發明人已出人意料地確定，對以下腫瘤標誌物蛋白中任一種具有免疫特異性的自身抗體指示肝癌的存在：基質金屬肽酶9 (matrix metalloproteinase 9, MMP9)、異體移植物炎症因數1 (allograft inflammatory

factor 1, AIF1)、上皮細胞黏附分子 (epithelial cell adhesion molecule, EpCAM) 和週期蛋白依賴性激酶抑制劑1B (cyclin-dependent kinase inhibitor 1B, CDKN1B)。因此，對這些腫瘤標誌物蛋白中任一種具有免疫特異性的自身抗體的檢測可用於肝癌的診斷。

【0011】根據本發明的第一方面，提供了檢測包含來自哺乳動物物件之體液的受試樣品中的抗體的方法，其中所述抗體是對選自MMP9、AIF1、EpCAM和CDKN1B的腫瘤標誌物蛋白具有免疫特異性的自身抗體，所述方法包括以下步驟：

(a) 使受試樣品與選自MMP9、AIF1、EpCAM和CDKN1B的腫瘤標誌物抗原接觸；以及

(b) 確定與受試樣品中存在的自身抗體結合的腫瘤標誌物抗原的複合物的存在或不存在。

【0012】在該方面，所述物件優選地被懷疑患有肝癌。

【0013】根據本發明的第二方面，提供了藉由檢測包含來自哺乳動物物件之體液的受試樣品中的抗體來在所述哺乳動物物件中檢測肝癌的方法，其中所述抗體是對選自MMP9、AIF1、EpCAM和CDKN1B的腫瘤標誌物蛋白具有免疫特異性的自身抗體，所述方法包括以下步驟：

(a) 使受試樣品與選自MMP9、AIF1、EpCAM和CDKN1B的腫瘤標誌物抗原接觸；以及

(b) 確定與受試樣品中存在的自身抗體結合的腫瘤標誌物抗原的複合物的存在或不存在；

其中所述複合物的存在指示肝癌的存在。

【0014】根據本發明的協力廠商面，提供了藉由檢測包含來自哺乳動物物件之體液的受試樣品中的抗體來在所述哺乳動物物件中診斷和治療肝癌的方法，其中所述抗體是對選自MMP9、AIF1、EpCAM和CDKN1B的腫瘤標誌物蛋白具有免疫特異性的自身抗體，所述方法包括以下步驟：

(a) 使受試樣品與選自MMP9、AIF1、EpCAM和CDKN1B的腫瘤標誌物抗原接觸；

(b) 確定與受試樣品中存在的自身抗體結合的腫瘤標誌物抗原的複合物的存在或不存在；

(c) 當檢測到與受試樣品中存在的自身抗體結合的腫瘤標誌物抗原的複合物時，診斷所述物件患有肝癌；以及

(d) 向所診斷的物件施用肝癌治療。

【0015】根據本發明的第四方面，提供了預測針對抗肝癌治療之回應的方法，所述方法包括檢測包含來自哺乳動物物件之體液的受試樣品中的抗體，其中所述抗體是對選自MMP9、AIF1、EpCAM和CDKN1B的腫瘤標誌物蛋白具有免疫特異性的自身抗體，所述方法包括以下步驟：

(a) 使受試樣品與選自MMP9、AIF1、EpCAM和CDKN1B的腫瘤標誌物抗原接觸；

(b) 確定與受試樣品中存在的自身抗體結合的腫瘤標誌物抗原的複合物的存在或不存在；

(c) 檢測腫瘤標誌物抗原與受試樣品中存在的自身抗體之間特異性結合的量；以及

(d) 將腫瘤標誌物抗原與自身抗體之間特異性結合的量與先前確立的結合量與可能的治療結果之間的關係進行比較；

其中當與對照相比時，特異性結合的量的改變預測患者將對抗肝癌治療作出或不作出回應。

【0016】在本發明的這一方面，所述抗肝癌治療可選自化學治療、射頻消融術（radiofrequency ablation）、肝切除術（liver resection）、肝移植、疫苗接種、抗生長因數或信號轉導治療、內分泌治療、人抗體治療、經導管動脈化學栓塞術（transcatheter arterial chemoembolization）、經皮乙醇注射、微波消融術（microwave ablation）、索拉非尼施用和放射性栓塞術（radioembolisation）。

【0017】根據本發明的第五方面，提供了選自MMP9、AIF1、EpCAM和CDKN1B的腫瘤標誌物抗原在藉由檢測包含來自哺乳動物物件之體液的受試樣品中對MMP9、AIF1、EpCAM或CDKN1B具有免疫特異性的自身抗體來在所述哺乳動物物件中檢測肝癌的方法中的用途，所述方法包括以下步驟：

(a) 使受試樣品與選自MMP9、AIF1、EpCAM和CDKN1B的腫瘤標誌物抗原接觸；以及

(b) 確定與受試樣品中存在的自身抗體結合的腫瘤標誌物抗原的複合物的存在或不存在，

其中所述複合物的存在指示肝癌的存在。

【0018】根據本發明的第六方面，提供了用於檢測包含來自哺乳動物物件之體液的受試樣品中的自身抗體的試劑盒，其包含：

(a) 選自MMP9、AIF1、EpCAM和CDKN1B的腫瘤標誌物抗原；和

(b) 能夠檢測與受試樣品中存在的自身抗體結合的腫瘤標誌物抗原的複合物的試劑。

【0019】根據本發明的第七方面，提供了在包含來自哺乳動物物件之體液的受試樣品中確定患有肝癌之個體的抗體譜（antibody profile）的體外方法，其中所述抗體是對選自MMP9、AIF1、EpCAM和CDKN1B的腫瘤標誌物蛋白具有免疫特異性的自身抗體，所述方法包括以下步驟：

a) 使受試樣品與選自MMP9、AIF1、EPCAM和CDKN1B的腫瘤標誌物抗原接觸；以及

【0020】b) 確定與受試樣品中存在的自身抗體結合的腫瘤標誌物抗原的複合物的存在或不存在，其中重複所述方法以建立抗體產生譜（profile of antibody production）。在本發明的所有方面，所述哺乳動物物件優選地是人。在文本中，術語“哺乳動物物件”和“物件”將可互換使用，是指為哺乳動物（優選為人）物件。

【0021】在本發明的所有方面，所述方法優選地在體外對包含從哺乳動物物件獲得或製備的體液的受試樣品進行。

【0022】對選自MMP9、AIF1、EpCAM和CDKN1B的腫瘤標誌物蛋白具有免疫特異性的自身抗體可用作肝癌標誌物的出人意料的發現已允許本發明人設計可用於對肝癌進行檢測和診斷的用於檢測此類自身抗體的方法。這樣的檢測可使用試劑盒來進行，並且這些方法和試劑盒形成本发明的核心。

【圖式簡單說明】

【0023】圖1. 用於演示推導以下二次曲線參數（secondary curve parameter）的示意圖：圖1A=斜率、截距、曲線下面積（Area under the Curve，

AUC) 和 SlopeMax; 圖 1B=解離常數 (K_d)。

【0024】圖 2. 自身抗體微量滴定板佈局: 圖 2A = 高通量測定 (high-throughput assay, HTPA) 佈局; 圖 2B = 滴定佈局。

【實施方式】

【0025】本發明一般地提供了用於檢測對選自 MMP9、AIF1、EpCAM 和 CDKN1B 的腫瘤標誌物蛋白具有免疫特異性的自身抗體的免疫測定方法。該免疫測定方法可用於檢測或診斷肝癌。

檢測自身抗體的方法

【0026】根據本發明的第一方面, 提供了檢測包含來自哺乳動物物件之體液的受試樣品中的抗體的方法, 其中所述抗體是對選自 MMP9、AIF1、EpCAM 和 CDKN1B 的腫瘤標誌物蛋白具有免疫特異性的自身抗體, 所述方法包括以下步驟:

(a) 使受試樣品與選自 MMP9、AIF1、EpCAM 和 CDKN1B 的腫瘤標誌物抗原接觸; 以及

(b) 確定與受試樣品中存在的自身抗體結合的腫瘤標誌物抗原的複合物的存在或不存在。

【0027】本文中使用的術語“自身抗體”是指標對個體的免疫系統識別為外來物 (即便該抗原實際上起源於該個體) 的天然抗體。通常來說, 自身抗體包括針對由患病細胞或疾病過程期間產生的天然蛋白質之經改變形式的抗體。蛋白質的經改變形式起源於個體, 但可被個體的免疫系統視為“非自身 (non-self)”, 並因此以對該經改變蛋白質具有免疫特異性之自身抗體的形式在該個體中引起免疫反應。蛋白質的此類經改變形式可包括例如: 具有經改變氨基酸序列的突變體, 任選伴隨有二級、三級或四級結構, 截短形式, 拼接變體, 經改變糖型等的改變。在另一些實施方案中, 自身抗體可針對在疾病狀態中過表達的蛋白質, 或作為基因擴增或異常轉錄調節的結果。顯著量的免疫系統細胞不常遇到的蛋白質的過表達可引發導致自身抗體產生的免疫反應。在另一些實施方案中, 自身抗體可針對變

成疾病狀態中表達的蛋白質的胎兒形式。如果通常只在發育早期階段（在免疫系統發揮功能之前）表達的胎兒蛋白質成為以疾病狀態表達，則在充分發育的人中以疾病狀態表達的胎兒形式可被免疫系統識別為“外來物”，從而引發導致自身抗體產生的免疫反應。在又一些實施方案中，自身抗體可針對在疾病狀態中於不同位置表達的蛋白質。例如，蛋白質可在健康個體的內部位置處表達，但是在疾病狀態下的表面暴露位置處表達，使得其暴露於迴圈，並因此暴露於疾病狀態的免疫系統，但不暴露于健康個體的免疫系統。本文中，自身抗體所針對的蛋白質將被稱為“腫瘤標誌物蛋白”。

【0028】在本發明的範圍內，考慮可檢測對 MMP9、AIF1、EpCAM 和 CDKN1B 中的任一種具有免疫特異性的自身抗體。本發明還考慮對這些腫瘤標誌物蛋白中的一種具有免疫特異性的自身抗體和對這些腫瘤標誌物蛋白中的第二種具有免疫特異性的自身抗體的檢測，任選地，與對這些腫瘤標誌物蛋白中的第三種具有免疫特異性的自身抗體的檢測，並且還任選地，對這些腫瘤標誌物蛋白中的第四種具有免疫特異性的自身抗體的檢測的組合。然而，本發明絕不限於該方面。當檢測到對經鑒定的腫瘤標誌物蛋白中的兩種或三種具有免疫特異性的自身抗體時，考慮兩種或三種腫瘤標誌物蛋白的所有組合。

【0029】在本發明的上下文中，所使用的術語“抗原”是指與受試樣品中存在的自身抗體複合的免疫特異性試劑。抗原是包含能夠與期望檢測的靶自身抗體特異性相互作用的至少一種抗原決定簇或表位的物質，或與所述自身抗體的可變區或互補決定區特異性相互作用的任何捕獲劑。抗原通常將是天然或合成的生物大分子，例如蛋白質或肽、多糖或核酸，並且可包括抗體或其片段，例如抗獨特型抗體（anti-idiotypic antibody）。“腫瘤標誌物抗原”是患有癌症（在本上下文中特別地是肝癌）的對象中升高的抗原。本文中，術語“腫瘤標誌物抗原”與“抗原”將可互換使用。

【0030】當提及待使用本發明的方法測試自身抗體之存在的材料時，本文中使用的術語“體液”尤其包括血漿、血清、全血、尿、汗、淋巴、糞便、腦脊液、腹水、胸腔積液、精液、痰、乳頭抽吸液（nipple aspirate）、

術後血清腫 (post-operative seroma)、唾液、羊水、淚和傷口引流液 (wound drainage fluid)。如前述的，本發明的方法優選在體外對包含從受試物件中取出的體液的受試樣品進行。所使用的體液類型可根據待測試的自身抗體的身份以及使用該測定的臨床情況而變化。通常來說，優選進行對血清或血漿樣品的測定。除了體液以外，受試樣品還可包含例如稀釋劑、防腐劑、穩定劑、緩衝劑等的組分。

【0031】在某些實施方案中，本發明的方法還可包括以下步驟：

(c) 檢測腫瘤標誌物抗原與受試樣品中存在的自身抗體之間特異性結合的量，

其中自身抗體的存在或不存在是以所觀察到的特異性結合的量與預定取捨值之間的比較為基礎。

【0032】在該實施方案中，腫瘤標誌物抗原與受試樣品中存在的自身抗體之間的特異性結合的量可以是結合的相對量或結合的絕對量。

【0033】在此，如果腫瘤標誌物抗原與受試樣品中存在的自身抗體之間特異性結合的量高於或低於預定取捨值，則自身抗體可被認為是存在的。然而，通常地如果腫瘤標誌物抗原與受試樣品中存在的自身抗體之間特異性結合的量高於預定取捨值，則自身抗體被認為是存在的。預定取捨值可藉由在病例對照研究中對已知陰性樣品（例如正常個體）進行對照測定來確定。基於臨床、影像學和/或生物化學標準，“正常”個體將優選是不具有任何肝癌診斷的年齡匹配對照。在某些實施方案中，已知的陰性樣品可來源於良性肝病個體，即在肝癌高風險下但沒有顯示出任何肝癌證據的那些個體。優選地，正常個體不具有任何癌症的任何診斷。在此，可檢測到腫瘤標誌物抗原與來自正常患者的受試樣品中存在的自身抗體之間特異性結合的量並且進行平均以提供預定取捨值。在某些實施方案中，預定取捨值可藉由選擇給出最大的約登值 (Youden's value) 的取捨值來確定（其保持大於 90% 的特異性）。

【0034】本發明人出人意料地發現，對 MMP9、AIF1、EpCAM 和 CDKN1B 中的任一種具有免疫特異性的自身抗體與肝癌相關。因此，在某些實施方

案中，所述物件可被懷疑患有肝癌。考慮懷疑對象可患有肝癌的任何原因。

【0035】在本發明的所有方面中，肝癌可以是肝細胞癌（HCC）。

【0036】在某些實施方案中，可懷疑哺乳動物物件患有肝癌，因為其先前在肝癌篩查中已被檢測呈陽性。在此考慮任何肝癌篩查。在某些實施方案中，所述物件先前可已被測試為對甲胎蛋白（AFP）呈陽性。通常來說，在從物件中採集的血液樣品中檢測到 AFP 水準，因此所述物件先前可在血液樣品中已被測試為對 AFP 呈陽性。然而，考慮任何 AFP 檢測技術。在一些作為替代的實施方案中，所述對象先前可已被檢測對脫- γ 羧基凝血酶原（DCP）或凝集素反應性甲胎蛋白（AFP-L3）呈陽性。通常來說，在從物件中採集的血液樣品中檢測到 DCP 和 AFP-L3 水準並且所述物件可因此先前在血液樣品中已被測試為對 DCP 或 AFP-L3 呈陽性。然而，考慮任何 DCP 或 AFP-L3 檢測技術。

【0037】在另一些實施方案中，可使用超聲監測或任何其他影像學方法測試所述物件對肝癌呈陽性。

【0038】在本發明的範圍內，所述物件可在執行本發明的方法之前的任何點在肝癌篩查中已被測試為呈陽性。例如，肝癌篩查可在進行本發明的方法之前已經進行 1 小時、2 小時、3 小時、4 小時、5 小時、6 小時、7 小時、8 小時、9 小時、10 小時、11 小時、12 小時、24 小時、2 天、3 天、4 天、5 天、6 天、1 週、2 週、3 週、4 週、1 個月、2 個月、3 個月、4 個月、5 個月、6 個月、1 年、2 年、3 年、4 年、5 年、6 年、7 年、8 年、9 年、10 年或更長。

【0039】出於本發明的目的，正經歷肝癌治療或者先前經歷過肝癌治療的物件仍可被認為“懷疑患有肝癌”。本文中，肝癌的治療可在任何時間進行，並且所述物件可以或可以不隨後進行肝癌之存在的測試。

【0040】所述物件由於肝癌已知風險因素的存在而被懷疑患有肝癌。在某些實施方案中，所述物件可患有肝硬化、非酒精性脂肪性肝病、酒精性肝病、威爾遜病、遺傳性血色素沉著病、自身免疫性肝炎、乙型肝炎、丙型肝炎、證實的黃麴黴毒素暴露、血吸蟲病或糖尿病。考慮確定這些風險

因素的任何方法，並且所述物件可以或可以不正經歷或已經經歷與風險因素相關的治療。

【0041】由於本發明人出人意料地確定對 MMP9、AIF1、EpCAM 和 CDKN1B 具有免疫特異性的自身抗體與肝癌相關，對這些腫瘤標誌物蛋白的任一種具有免疫特異性的自身抗體的受試樣品的檢測可用於檢測肝癌的方法。在一個方面中，本發明因此提供了藉由檢測包含來自哺乳動物物件之體液的受試樣品中的抗體來在哺乳動物物件中檢測肝癌的方法，其中所述抗體是對選自 MMP9、AIF1、EpCAM 和 CDKN1B 的腫瘤標誌物蛋白具有免疫特異性的自身抗體，所述方法包括以下步驟：

(a) 使受試樣品與選自 MMP9、AIF1、EpCAM 和 CDKN1B 的腫瘤標誌物抗原接觸；以及

(b) 確定與受試樣品中存在的自身抗體結合的腫瘤標誌物抗原的複合物的存在或不存在；

其中所述複合物的存在指示肝癌的存在。

【0042】在其最廣泛的一些方面中，本發明涉及用於檢測對 MMP9、AIF1、EpCAM 和 CDKN1B 中的任一種具有免疫特異性的自身抗體的方法，並且不限於肝癌的診斷或任何後續治療。然而，在一個方面中，本發明提供了藉由檢測包含來自哺乳動物物件之體液的受試樣品中的抗體來在哺乳動物物件中診斷和治療肝癌的方法，其中所述抗體是對選自 MMP9、AIF1、EpCAM 和 CDKN1B 的腫瘤標誌物蛋白具有免疫特異性的自身抗體，所述方法包括以下步驟：

(a) 使受試樣品與選自 MMP9、AIF1、EpCAM 和 CDKN1B 的腫瘤標誌物抗原接觸；

(b) 確定與受試樣品中存在的自身抗體結合的腫瘤標誌物抗原的複合物的存在或不存在；

(c) 當檢測到與受試樣品中存在的自身抗體結合的腫瘤標誌物抗原的複合物時，診斷所述物件患有肝癌；以及

(d) 向所診斷的物件施用肝癌治療。

【0043】在該方面中，如上所述的，如果腫瘤標誌物抗原與受試樣品中存在的自身抗體之間特異性結合的量高於或低於預定取捨值，則自身抗體可被認為是存在的。

【0044】在本發明的範圍中，在肝癌診斷之後的任何時間可以施用肝癌治療。例如，在肝癌診斷之後 1 小時、2 小時、3 小時、4 小時、5 小時、6 小時、7 小時、8 小時、9 小時、10 小時、11 小時、12 小時、24 小時、2 天、3 天、4 天、5 天、6 天、1 週、2 週、3 週、4 週、1 個月、2 個月、3 個月、4 個月、5 個月、6 個月、1 年或更長，可施用肝癌治療。還考慮在治療輪次之間任何間隔內肝癌治療的多次施用。

【0045】考慮不同於進行肝癌診斷之地理位置的地理位置處的肝癌治療的施用。此外，不論診斷和治療是在相同還是不同的地理位置處進行，肝癌治療都可由與進行診斷之人不同的人來施用。

【0046】在一個方面中，本發明的自身抗體檢測方法可用於治療分層（treatment stratification），即確定特定患者或患者組是否或多或少地可能對特定抗肝癌治療作出回應。例如，本發明的自身抗體檢測方法可用於預測物件對抗肝癌治療作出的回應。

【0047】因此，本發明提供了預測對抗肝癌治療作出回應的方法，所述方法包括檢測包含來自哺乳動物物件之體液的受試樣品中的抗體，其中所述抗體是對選自 MMP9、AIF1、EpCAM 和 CDKN1B 的腫瘤標誌物蛋白具有免疫特異性的自身抗體，所述方法包括以下步驟：

(a) 使受試樣品與選自 MMP9、AIF1、EpCAM 和 CDKN1B 的腫瘤標誌物抗原接觸；

(b) 確定與受試樣品中存在的自身抗體結合的腫瘤標誌物抗原的複合物的存在或不存在；

(c) 檢測腫瘤標誌物抗原與受試樣品中存在的自身抗體之間特異性結合的量；以及

(d) 將腫瘤標誌物抗原與自身抗體之間特異性結合的量與先前確立的結含量與可能的治療結果之間的關係進行比較；

其中當與對照相比時，特異性結合的量的改變預測患者將對所述抗肝癌治療作出或不作出回應。

【0048】本文中，對照優選是來源於已知患有肝癌之物件的體液樣品，並且已知對所測試的抗肝癌治療不作出回應，即為非回應性對照。

【0049】應注意，本發明絕不限於任何具體肝癌治療。在某些實施方案中，肝癌治療可選自化學治療、射頻消融術、肝切除術、肝移植、疫苗接種、抗生長因數或信號轉導治療、內分泌治療、人抗體治療、經導管動脈化學栓塞術、經皮乙醇注射、微波消融術、索拉非尼施用和放射性栓塞術。

【0050】本發明的上述方面通常將進行一次。然而，體外免疫測定不具有侵入性並且可根據認為建立患者中自身抗體產生譜的需要而經常地進行，不管是在肝癌發生之前如在篩查“處於風險中的”個體中，還是在整個疾病過程中。

【0051】因此，本發明提供了在包含來自哺乳動物物件之體液的受試樣品中確定患有肝癌之個體的抗體譜的體外方法，其中所述抗體是對選自 MMP9、AIF1、EpCAM 和 CDKN1B 的腫瘤標誌物蛋白具有免疫特異性的自身抗體，所述方法包括以下步驟：

- a) 使受試樣品與選自 MMP9、AIF1、EPCAM 和 CDKN1B 的腫瘤標誌物抗原接觸；以及
- b) 確定與受試樣品中存在的自身抗體結合的腫瘤標誌物抗原的複合物的存在或不存在，其中重複所述方法以建立抗體產生譜。

兩種或更多種腫瘤標誌物抗原的組

【0052】在本發明的某些實施方案中，所述方法可檢測兩種或更多種自身抗體。例如，所述方法可檢測兩種、三種、四種、五種、六種、七種、八種、九種、十種、十一種、十二種、十三種、十四種、十五種、十六種、十七種、十八種、十九種、二十種、二十一種、二十二種、二十三種、二十四種、二十五種、二十六種、二十七種、二十八種、二十九種、三十種、三十一種、三十二種、三十三種、三十四種、三十五種、三十六種、三十

七種、三十八種或更多種自身抗體。根據本發明的核心，所述自身抗體中的一種對選自 MMP9、AIF1、EpCAM 和 CDKN1B 的腫瘤標誌物蛋白具有免疫特異性。

【0053】 在這些實施方案中，所述方法包括以下步驟：

(a) 使受試樣品與兩種或更多種腫瘤標誌物抗原的組（panel）接觸，所述組包含選自 MMP9、AIF1、EpCAM 和 CDKN1B 的腫瘤標誌物抗原以及對至少一種所述自身抗體具有免疫特異性的一種或更多種另外的腫瘤標誌物抗原。

【0054】 這些方法可以在下文中稱為“組測定”。這樣的測定通常比檢測單一腫瘤標誌物抗原的自身抗體更靈敏，並且給出頻率要低得多的假陰性結果（參見 WO 99/58978、WO 2004/044590 和 WO2006/126008，其內容藉由引用併入本文）。

【0055】 一般認為，將藉由檢測多種自身抗體的存在來提高測定的靈敏度。因此，在一些實施方案中，本發明的方法考慮使用包含多種腫瘤標誌物抗原的組，例如兩種、三種、四種、五種、六種、七種、八種、九種、十種、十一種、十二種、十三種、十四種、十五種、十六種、十七種、十八種、十九種、二十種、二十一種、二十二種、二十三種、二十四種、二十五種、二十六種、二十七種、二十八種、二十九種、三十種、三十一種、三十二種、三十三種、三十四種、三十五種、三十六種、三十七種、三十八種或更多種腫瘤標誌物抗原。

【0056】 應注意，這種組實施方案可與本發明的所有方法一起使用，包括檢測自身抗體的方法、檢測肝癌的方法、診斷和治療肝癌的方法、預測對抗肝癌治療作出回應的方法以及確定抗體譜的方法。

【0057】 在某些實施方案中，所述組可包含作為不同抗原的兩種或更多種腫瘤標誌物抗原。本文中，術語“不同抗原”涵蓋來源於不同蛋白質或多肽的抗原（例如，來源於由不同基因編碼的不相關蛋白質的抗原）。

【0058】 本發明還考慮使用包含一種或更多種不同抗原的兩種或更多種抗原變體的組的方法。本文中使用的術語“抗原變體”是指單一抗原（例

如上文中所定義的單一蛋白質抗原)的等位基因或其他變體。抗原變體將一般地來源於單一基因，並且不同的抗原變體可在不同的群體成員或不同的疾病狀態中表達。抗原變體可在氨基酸序列或翻譯後修飾(例如糖基化、磷酸化或乙醯化)方面不同。此外，術語“抗原變體”涵蓋抗原突變，例如氨基酸替換、添加或缺失。通常來說，相對於野生型抗原，抗原變體將包含少於五種(例如，少於四種、少於三種、少於兩種或一種)突變。

【0059】在這種組實施方案中，“一種或更多種另外的腫瘤標誌物抗原”優選除了對選自 MMP9、AIF1、EpCAM 和 CDKN1B 的腫瘤標誌物蛋白具有免疫特異性的自身抗體以外還對自身抗體具有免疫特異性，如下文進一步討論的。然而，雖然本發明絕不限於該方面，但是本發明考慮對這四種腫瘤標誌物蛋白中的一種具有免疫特異性的自身抗體和對這四種腫瘤標誌物蛋白中的第二種具有免疫特異性的自身抗體的檢測，任選地與對這四種腫瘤標誌物蛋白中的第三種具有免疫特異性的自身抗體的檢測組合且另外任選地與對這四種腫瘤標誌物蛋白的第四種具有免疫特異性的自身抗體的檢測組合。當檢測到對經鑒定的腫瘤標誌物蛋白的兩種或三種具有免疫特異性的自身抗體時，考慮兩種或三種腫瘤標誌物蛋白的所有組合。兩種或更多種腫瘤標誌物抗原的組可因此包含選自 MMP9、AIF1、EpCAM 和 CDKN1B 的兩種、三種或四種腫瘤標誌物抗原。在某個具體實施方案中，所述組可包含 MMP9、AIF1、EpCAM 和 CDKN1B。在另一個具體實施方案中，所述組可由 MMP9、AIF1、EpCAM 和 CDKN1B 組成。

【0060】在一個實施方案中，兩種或更多種腫瘤標誌物抗原的組可包含選自以下中的一種或更多種腫瘤標誌物抗原：NY-ESO-1、波形蛋白、HSPA4、轉鐵蛋白、HNRNP-L、HSPD1、HNRNP-A2、SALL4、NPM1、YWHAZ、DDX3X、p62、CAGE、MAGE A4、RalA、GBU4-5、週期蛋白 B1、AFP、SOX2、AKR1B10、ApoA1、BCL2、CD44、CK18、CPS1、FUCA1、GLUL、HSPA2、IL-8、MDM2、PEBP1、催乳素、RGN、SPP1、SSX2 和 TGFB1。在這個實施方案中，所述組可包含所述腫瘤標誌物抗原中的一種、兩種、三種、四種、五種、六種、七種、八種、九種、十種、十一種、十二種、十三種、十四種、十五種、十六種、十七種、十八種、十九種、二

十種、二十一種、二十二種、二十三種、二十四種、二十五種、二十六種、二十七種、二十八種、二十九種、三十種、三十一種、三十二種、三十三種或三十四種。根據本發明，所述組還將包含 MMP9、AIF1、EpCAM 或 CDKN1B 並且可包含這些腫瘤標誌物抗原中的一種、兩種、三種或四種。在其中這些腫瘤標誌物抗原中的兩種或三種被包含在所述組中的一些實施方案中，考慮這些抗原中的兩種或三種的所有組合。在具體實施方案中，所述組可包含 MMP9、AIF1、EpCAM 和 CDKN1B。

【0061】在一個實施方案中，兩種或更多種腫瘤標誌物抗原的組可包含 MMP9、AIF1、EpCAM、NY-ESO-1、HSPA4、波形蛋白、HNRNP-L 和轉鐵蛋白。在另一個實施方案中，兩種或更多種腫瘤標誌物抗原的組可由 MMP9、AIF1、EpCAM、NY-ESO-1、HSPA4、波形蛋白、HNRNP-和轉鐵蛋白組成。

【0062】在另一個實施方案中，兩種或更多種腫瘤標誌物抗原的組可包含 AIF1、EpCAM、HSPA4 和 CPS1。在另一個實施方案中，兩種或更多種腫瘤標誌物抗原的組可由 AIF1、EpCAM、HSPA4 和 CPS1 組成。

【0063】在另一個實施方案中，兩種或更多種腫瘤標誌物抗原的組可包含 EpCAM、NY-ESO-1、波形蛋白、HSPA2、HSPA4 和 HNRNP-L。在另一個實施方案中，兩種或更多種腫瘤標誌物抗原的組可由 EpCAM、NY-ESO-1、波形蛋白、HSPA2、HSPA4 和 HNRNP-L 組成。

【0064】在又一個實施方案中，兩種或更多種腫瘤標誌物抗原的組可包含 MMP9、AIF1、EpCAM、DDX3X、SALL4、MAGE A4、NY-ESO-1、CAGE、RalA 和 SOX2。在另一個實施方案中，兩種或更多種腫瘤標誌物抗原的組可由 MMP9、AIF1、EpCAM、DDX3X、SALL4、MAGE A4、NY-ESO-1、CAGE、RalA 和 SOX2 組成。

【0065】在另一個實施方案中，兩種或更多種腫瘤標誌物抗原的組可包含 EpCAM、CAGE、SOX2、RalA、MAGE A4、DDX3X 和 NY-ESO-1。在另一個實施方案中，兩種或更多種腫瘤標誌物抗原的組可由 EpCAM、CAGE、SOX2、RalA、MAGE A4、DDX3X 和 NY-ESO-1 組成。

【0066】在另一個實施方案中，兩種或更多種腫瘤標誌物抗原的組可包含 AIF1、CAGE、HSPD1、SOX2、SALL4、HSPA4 和轉鐵蛋白。在另一個實施方案中，兩種或更多種腫瘤標誌物抗原的組可由 AIF1、CAGE、HSPD1、SOX2、SALL4、HSPA4 和轉鐵蛋白組成。

【0067】在某些具體實施方案中，兩種或更多種腫瘤標誌物抗原的組可根據物件的性別（即物件為雄性還是雌性）而不同。在這個實施方案中，當物件為雌性時，兩種或更多種腫瘤標誌物抗原的組可包含或由以下組成：AIF1、EpCAM、HSPA4 和 CPS1，或者 AIF1、CAGE、HSPD1、SOX2、SALL4、HSPA4 和轉鐵蛋白。此外，在這個實施方案中，當所述物件為雄性時，兩種或更多種腫瘤標誌物抗原的組可包含或由以下組成：EpCAM、NY-ESO-1、波形蛋白、HSPA2、HSPA4 和 HNRNP-L，或者 EpCAM、CAGE、SOX2、RalA、MAGE A4、DDX3X 和 NY-ESO-1。

【0068】在一個具體實施方案中，兩種或更多種腫瘤標誌物抗原的組可包含 NY-ESO-1、波形蛋白、HSPA4、轉鐵蛋白、HNRNP-L、HSPD1、HNRNP-A2、SALL4、週期蛋白 B1、AFP、NPM1、YWHAZ、DDX3X、p62、CAGE、MAGE A4、RalA、GBU4-5、SOX2、AKR1B10、ApoA1、BCL2、CD44、CK18、CPS1、FUCA1、GLUL、HSPA2、IL-8、MDM2、PEBP1、催乳素、RGN、SPP1、SSX2 和 TGFB1。根據本發明，所述組還將包含 MMP9、AIF1、EpCAM 或 CDKN1B，並且可包含這些腫瘤標誌物抗原中的一種、兩種、三種或四種。在其中這些腫瘤標誌物抗原中的兩種或三種被包含在所述組中的一些實施方案中，考慮這些抗原中的兩種或三種的所有組合。

【0069】在一些具體實施方案中，所述組可包含 MMP9、AIF1、EpCAM 和 CDKN1B。例如，兩種或更多種腫瘤標誌物抗原的組可包含 MMP9、AIF1、EpCAM、CDKN1B、NY-ESO-1、波形蛋白、HSPA4、轉鐵蛋白、HNRNP-L、HSPD1、HNRNP-A2、SALL4、週期蛋白 B1、AFP、NPM1、YWHAZ、DDX3X、p62、CAGE、MAGE A4、RalA、GBU4-5、SOX2、AKR1B10、ApoA1、BCL2、CD44、CK18、CPS1、FUCA1、GLUL、HSPA2、IL-8、MDM2、PEBP1、催乳素、RGN、SPP1、SSX2 和 TGFB1。

【0070】在一個具體實施方案中，兩種或更多種腫瘤標誌物抗原的組由以下組成：MMP9、AIF1、EpCAM、CDKN1B、NY-ESO-1、波形蛋白、HSPA4、轉鐵蛋白、HNRNP-L、HSPD1、HNRNP-A2、SALL4、週期蛋白 B1、AFP、NPM1、YWHAZ、DDX3X、p62、CAGE、MAGE A4、RalA、GBU4-5、SOX2、AKR1B10、ApoA1、BCL2、CD44、CK18、CPS1、FUCA1、GLUL、HSPA2、IL-8、MDM2、PEBP1、催乳素、RGN、SPP1、SSX2 和 TGFB1。

【0071】在一個具體實施方案中，兩種或更多種腫瘤標誌物抗原的組可包含 CAGE、NY-ESO-1、MMP9、轉鐵蛋白、MAGE A4、RalA、HSPA4、SALL4、週期蛋白 B1、EpCAM、DDX3X 和 AIF1。在另一個實施方案中，兩種或更多種腫瘤標誌物抗原的組可由 CAGE、NY-ESO-1、MMP9、轉鐵蛋白、MAGE A4、RalA、HSPA4、SALL4、週期蛋白 B1、EpCAM、DDX3X 和 AIF1 組成。

【0072】在一個具體實施方案中，兩種或更多種腫瘤標誌物抗原的組可包含 CAGE、NY-ESO-1、MMP9、轉鐵蛋白、MAGE A4、RalA、HSPA4、SALL4、週期蛋白 B1、EpCAM、DDX3X、AIF1、SOX2 和 AFP。在另一個實施方案中，兩種或更多種腫瘤標誌物抗原的組可由 CAGE、NY-ESO-1、MMP9、轉鐵蛋白、MAGE A4、RalA、HSPA4、SALL4、週期蛋白 B1、EpCAM、DDX3X、AIF1 SOX2 和 AFP 組成。

另外的篩選步驟

【0073】在本發明的某些實施方案中，本發明的方法還可包括篩選與肝癌相關的另外標誌物。在這個實施方案中，考慮篩查已知與肝癌相關的任何標誌物的任何方法。

【0074】例如，所述方法還可包括檢測包含來自哺乳動物物件之體液的受試樣品中的甲胎蛋白（AFP）、脫- γ 羧基凝血酶原（DCP）或凝集素反應性甲胎蛋白（AFP-L3）。優選地，體液為血液。在其中所述方法還包括檢測包含來自哺乳動物物件之體液的受試樣品中的甲胎蛋白（AFP）的一些實施

方案中，體液優選為血液並且優選將 200 ng/ml 的取捨值用於評估陽性。

抗原滴定

【0075】在 WO2006/126008（其內容藉由引用併入本文）中，可以確定，藉由包括抗原滴定步驟，可以顯著改善基於檢測作為疾病生物標誌物的自身抗體的測定的性能（並且更具體地臨床效用和可靠性）。藉由測試懷疑包含抵抗一系列不同量的抗原的自身抗體的樣品並構建滴定曲線，可以可靠地鑒定真陽性篩選結果，而與樣品中存在的自身抗體的絕對量無關。WO2006/126008 的抗原滴定方法提供比在單個抗原濃度下測量自身抗體反應性更大的特異性和靈敏度，或者血清樣品而不是抗原被滴定的方法。

【0076】在某些實施方案中，本發明因此考慮其中腫瘤標誌物抗原以多個不同的量提供的方法，並且其中所述方法包括以下步驟：

- (a) 使受試樣品與多種不同量的腫瘤標誌物抗原接觸；
- (b) 確定與受試樣品中存在的自身抗體結合的腫瘤標誌物抗原的複合物的存在或不存在；
- (c) 檢測腫瘤標誌物抗原與自身抗體之間特異性結合的量；
- (d) 對於步驟(a)中使用的腫瘤標誌物抗原的每種量，繪製或計算特異性結合的量相對於腫瘤標誌物抗原的量的曲線；以及
- (e) 基於在使用的腫瘤標誌物抗原的每種不同量下腫瘤標誌物抗原與自身抗體之間特異性結合的量來確定自身抗體的存在或不存在。

【0077】在實踐中，不同量的腫瘤標誌物抗原一般將藉由改變所使用的腫瘤標誌物抗原的濃度來提供。因此，術語“不同量”和“不同濃度”可互換使用。然而，在本發明的範圍中，考慮改變腫瘤標誌物抗原的量的任何方法。熟練的讀者將理解，在本發明的方法中，可用於與靶自身抗體結合的抗原決定簇或表位的量對於建立滴定系列（即，一組以不同量提供的抗原）是重要的。在許多測定形式中，可用於結合的抗原決定簇或表位的量與存在的抗原分子的量直接相關。然而，在另一些實施方案中，例如某

些固相測定系統，暴露的抗原決定簇或表位的量可與抗原的量不直接相關，但是可取決於其他因素，例如與固體表面的附著和構象呈現。在這些實施方案中，本文中提及的滴定系列中的“不同量的抗原”可被認為是指不同量的抗原決定簇或表位。在一些特定實施方案中，抗原量的變化可藉由改變所測試樣品所針對的抗原或表位元密度，或藉由維持抗原或表位元密度但是抗原被固定的表面積增大，或者藉由這二者來實現。

【0078】在這個實施方案中，“一組抗原”是指在本發明的方法中以不同量測試的單一抗原。

【0079】在其中考慮多種抗原的一些實施方案中，如上所述，“一組不同的抗原”是指在本發明的方法中以不同量測試的單一抗原，其中每種抗原是來源於不同蛋白質或多肽的“不同抗原”（例如，來源於由不同基因編碼的不相關蛋白質的抗原）。給定的微陣列可僅包含來源於不同蛋白質或多肽的不同抗原組，或者僅包含來源於單一蛋白質或多肽的不同肽表位的不同抗原的組，或者二者以任意比例的混合物。應注意，在本發明的任何實施方案中，不同量的單個組的抗原各自通常將包含僅一種抗原而不包含其混合物。

【0080】一組抗原變體是指在本發明的方法中以不同量測試的單一抗原變體。

【0081】在某些實施方案中，可以基於針對使用的所有腫瘤標誌物抗原量的特異性結合量的集體值（collective value）來確定自身抗體的存在或不存在。在本發明的方法期間，對於每個不同測試的抗原（抗原決定簇或表位）量，測定自身抗體與抗原之間特異性結合的相對量或絕對量，並將其用於繪製或計算特異性結合的量（相對量或絕對量）相對於每種測試的抗原量的曲線。與測定中使用的抗原反應的自身抗體的受試樣品中的存在基於在每種抗原量下所觀察到的特異性結合的量並且通常由典型地為 S-形形狀（S-shaped）或 S-形（sigmoidal）的劑量-回應曲線表示。因此，在某些實施方案中，自身抗體的存在或不存在藉由篩選針對劑量回應曲線的存在圖（例如大致 S 形或 sigmoidal 曲線）來確定。如果對於測試的不同抗原量可檢測到的結合中沒有變化，那麼可將其記為不存在可檢測到的自身抗

體量。

【0082】在一個實施方案中，自身抗體的存在或不存在藉由將自身抗體與抗原之間特異性結合的量與預定取捨值進行比較來確定。在此，對於滴定系列中使用的每種抗原量，繪製特異性結合的量相對於抗原量的曲線，並且在病例對照研究中，將已知陽性樣品（例如，患有疾病的患者群體）中的結合水準與已知陰性樣品（例如，正常個體）中觀察到的結合水準進行比較。選擇滴定曲線上一個或更多個點處自身抗體結合的取捨值，以使靈敏度（沒有假陰性）最大化同時保持高特異性（沒有假陽性）。只要對於滴定系列中使用的每個抗原量，特異性結合的量相對於抗原量的曲線是劑量響應曲線，如果對於滴定曲線上一個或更多個點確定的特異性結合的量高於預定取捨點值，則認為測量為陽性。在某些實施方案中，預定取捨值可藉由選擇給出最大約登值同時保持特異性大於 90% 的取捨值來確定。

【0083】應注意，該抗原滴定實施方案可與本發明的所有方法一起使用，包括檢測自身抗體的方法、檢測肝癌的方法、診斷和治療肝癌的方法、預測對抗肝癌治療作出回應的方法以及確定抗體譜的方法。此外，抗原滴定可用於其中僅檢測到單一自身抗體的一些實施方案中以及其中抗原的組用於檢測多種自身抗體的一些實施方案中。

雙取捨

【0084】通常認為，將藉由測量針對多種抗原的自身抗體來提高測定的靈敏度。然而，這種提高的靈敏度通常與特異性的成比例下降相關，因此測定方法可限於其可使用的抗原數。在某些實施方案中，本方法可藉由使用確定自身抗體與抗原之間特異性結合水準的抗原滴定方法和二次曲線參數的評估來解釋特異性的降低，其中只有測試結果當與被分類為陽性的這些度量中的這兩個的取捨點相比時被認為是陽性的。該方法在本文中將被稱為“雙取捨”方法並且在 WO2015/193678（其內容藉由引用併入本文）中完全地描述。

【0085】在某些實施方案中，本發明的方法還包括以下步驟：

(d1) 由步驟(c)中繪製或計算的曲線計算二次曲線參數；以及

(e) 基於以下的組合來確定自身抗體的存在或不存在：

(i) 步驟(b)中確定的自身抗體與腫瘤標誌物抗原之間特異性結合的量；和

(ii) 步驟(d1)中確定的二次曲線參數。

【0086】雙取捨方法使用上述抗原滴定方法。在檢測在滴定系列中使用的每種抗原量下的抗原/自身抗體結合的量並且對於滴定系列中使用的每種抗原量之後，繪製特異性結合的量相對於抗原的量的曲線，計算二次曲線參數。二次曲線參數由線性或對數回歸曲線計算。本文中，二次曲線參數是提供曲線性質指示的任何計算值。例如，二次曲線參數可以是斜率、截距、AUC、SlopeMax 或解離常數（Kd）。這些二次曲線參數示於圖 1 中。

【0087】斜率使用以下方程式計算：

$$b = \frac{\sum (x - \bar{x})(y - \bar{y})}{\sum (x - \bar{x})^2}$$

其中 b 是斜率，x 是指抗原濃度（nM），並且 y 是指 OD 值（吸光度單位（AU））。

【0088】對於每種樣品，斜率可由線性或對數回歸曲線計算，或者由線性和對數回歸曲線二者計算。

【0089】回歸線的截距是當 x=0 時 y 軸線的值。

【0090】對於每種樣品，截距可由線性或對數回歸曲線計算，或者由線性和對數回歸曲線二者計算。

【0091】AUC 可使用總和梯形法則來計算，其可藉由評估每組抗原濃度之間的定積分遵循以下公式來完成：

$$\int_a^b f(x) dx \approx (b - a) \left[\frac{f(a) + f(b)}{2} \right]$$

【0092】對於每對連續的抗原濃度，重複該計算，並將得到的值相加

得到 AUC 的總值。

【0093】對於每種樣品，曲線下面積（AUC）可由線性或對數回歸曲線計算，或者由線性和對數回歸曲線二者計算。

【0094】SlopeMax 可使用與上面討論的斜率相同的公式來計算。然而，為了確定每種樣品的斜率的最大可能值，獲得每對連續抗原濃度的斜率值，最大幅度的斜率值表示 SlopeMax。

【0095】對於每種樣品，SlopeMax 可由線性或對數回歸曲線計算，或者由線性和對數回歸曲線二者計算。

【0096】解離常數（Kd）可藉由將四參數邏輯斯諦曲線擬合至每組滴定點來計算並且使用公式 $F(x) = ((A-D)/(1+((x/C)^B))) + D$ 用反覆運算求解方法給出最小漸近線（A）、斜率因數（B）、拐點（C）和最大漸近線（D）參數的值，由此使平方殘差（squared residual）的總和最小化。該求解資料的拐點對應於抗原/自身抗體結合的 Kd。

【0097】在某些實施方案中，對於滴定系列中使用的每種抗原量，二次曲線參數可藉由將邏輯斯諦曲線（例如 4 參數邏輯斯諦曲線）擬合至特異性結合的量相對於抗原量的曲線來確定。在這個實施方案中，二次曲線參數可以是最大漸近線、最小漸近線、Hill 斜率（或斜率因數）或者拐點。

【0098】4-參數邏輯斯諦（4PL）曲線是由以下公式定義的曲線：

$$F(x) = ((A-D)/(1+((x/C)^B))) + D,$$

其中 A = 最小漸近線，B = Hill 斜率（或斜率因數），C = 拐點並且 D = 最大漸近線。

【0099】為了確定該實施例中的二次曲線參數，使用反覆運算求解函數計算每種樣品和抗原的 4PL 曲線。在此，4 個參數設置為接近每個預期值的值，具有以下限制：最小漸近線的值固定為 0，Hill 斜率的值限制為正值，並且拐點限制為最大值 1000。

【0100】然後可計算滴定曲線的每個點與 4PL 曲線上的相應點之差值（由公式 $F(x) = ((A-D)/(1+((x/C)^B))) + D$ 返回），對差值進行平方並且對所有平

方後的差值進行求和。

【0101】然後調整用於 4 二次曲線參數的值，並且以反覆運算的方式重複計算平方平均值的總和，直到平方平均值的總和盡可能地接近零。反覆運算求解可使用 Microsoft Excel 的 SOLVER 函數來進行。

【0102】一旦獲得了二次曲線參數，就將其與抗原/自身抗體結合資料組合以確定自身抗體的存在或不存在。在此，將自身抗體與抗原之間特異性結合的量與如上所述的預定取捨值進行比較。

【0103】二次曲線參數的取捨值使用已知的陽性樣品（例如，由患有疾病的患者群組組成的病例-對照樣品組中的組）和已知的陰性樣品（例如，病例-對照研究中的正常個體群組）來確定。對於每個樣品，對滴定系列中使用的每種抗原量繪製特異性結合的量相對於抗原量的曲線，並且將在已知的陽性樣品（例如，患有疾病的患者）中觀察到的二次曲線參數與在已知的陰性樣品（例如，正常個體）中觀察到的二次曲線參數比較。當與以上討論的抗原/自身抗體結合的取捨值組合使用時，選擇使特異性最大化的二次曲線參數的取捨值（沒有假陽性）。

【0104】在計算二次曲線參數的取捨值時，還確定正讀數所要求的方向性，即是高於還是低於取捨值的值被認為是正的。正讀數所要求的方向性將取決於抗原和二次曲線參數。

【0105】如果測量結果既高於抗原/自身抗體結合的取捨值並且與二次曲線參數的取捨值相比又顯示正讀數所要求的方向性，則其被認為是最終陽性，即表示受試樣品中自身抗體的存在。

【0106】如在 WO2015/193678（其內容藉由引用併入本文）中進一步描述的，與僅基於受試樣品中自身抗體之間特異性結合的量的作為替代的方法相比，在測定方法中包括二次曲線參數提高了免疫測定的特異性，提高了陽性預測值（Positive Predictive Value，PPV）。

【0107】應理解，雖然本文中包括的雙取捨法的描述集中在使用與抗原/自身抗體結合的量的測量結果組合的單個二次曲線參數組合，但是考慮使用多個二次曲線參數。因此，在某些實施方案中，本發明的方法使用二、

三個、四個、五個、六個、七個、八個或更多個二次曲線參數。

【0108】雙取捨法在用於臨床診斷、預後、預測和/或監測測定上是有利的，其中靶自身抗體存在的絕對量和在靶自身抗體不存在下觀察到的結合水準可在患者之間變化巨大。如果這樣的測定基於使用單一的受試抗原量/濃度的自身抗體結合檢測，則由於測定方法的限制，包含一定量的自身抗體（其處於在整個群體中自身抗體量的正常生理範圍的極低或極高端）的患者樣品可被略去；自身抗體量低的樣品可被評分為假陰性結果，而具有極高水準的那些可離開所選測定方法內的準確檢測的範圍。使用與二次曲線參數的計算組合的滴定法可解釋這些自身抗體水準的差異和所觀察到的結合水準的差異。

【0109】應注意，該雙取捨實施方案可與本發明的所有方法一起使用，包括檢測自身抗體的方法、檢測肝癌的方法、診斷和治療肝癌的方法、預測對抗肝癌治療的作出回應的方法以及確定抗體譜的方法。此外，雙取捨法可用於其中只檢測單一自身抗體的一些實施方案以及其中使用抗原組來檢測多種自身抗體的一些實施方案。在這種組實施方案中，應注意，針對組內的每種抗原計算的二次曲線參數不一定相同。然而，在一些實施方案中，針對組內的每種抗原計算的二次曲線參數可相同。

測定形式

【0110】免疫測定（例如 ELISA、放射免疫測定等）的一般特點是本領域技術人員習知的（參見 Immunoassay, E. Diamandis and T. Christopoulos, Academic Press, Inc., San Diego, CA, 1996，其內容藉由引用併入本文）。

【0111】用於檢測具有特定免疫特異性的自身抗體的免疫測定通常需要使用對相關自身抗體表現出特異性免疫反應性的試劑（抗原）。根據測定的形式，可將該抗原固定在固體支持物上。使受試樣品與抗原接觸，且如果樣品中存在所需要的免疫特異性的自身抗體，則它們將與抗原發生免疫反應以形成抗原/自身抗體複合物，其可隨後被檢測或定量測量。

【0112】本發明的方法可以以能夠使被懷疑包含自身抗體的受試樣品與抗原接觸的任何合適的形式進行。

【0113】方便地，如果需要的話，受試樣品與抗原之間的接觸可發生在允許平行測定不同抗原或不同抗原量的單獨反應室（例如，微量滴定板的孔）中。在其中需要不同量抗原的一些實施方案中，可在整個微量滴定板的孔上藉由從抗原原液製備系列稀釋液將這些包被到微量滴定板的孔上。抗原原液可具有已知或未知的濃度。然後可將受試樣品的等分試樣添加至板的孔，使受試樣品的體積和稀釋度在每個孔中保持恆定。添加至微量滴定板的孔的抗原的絕對量可根據例如這樣的因素而改變：靶自身抗體的性質、受試樣品的性質、受試樣品的稀釋度等，如本領域技術人員會理解的。通常來說，將選擇抗原的量和受試樣品的稀釋度以產生一定範圍的信號強度，這些信號強度落入方法中的抗原/自身抗體結合檢測所選擇的讀出的可接受的檢測範圍內。方便地，測試的抗原量可在 1.6 nM 至 160 mM 的範圍內變化。

【0114】在本發明的另一個實施方案中，可將抗原固定在固體支持物上的離散位置或反應位點處。在其中需要不同量的抗原的一些實施方案中，可將這些各自固定在固體支持物上的離散位置或反應位點處。然後可使整個支持物與受試樣品接觸，並且在每個離散位置或反應位點處分別地檢測或測量自身抗體與抗原的結合。合適的固體支持物包括微陣列。當需要不同量的抗原時，可藉由將不同量的特定抗原固定在陣列上的離散的可分辨的反應位元點處來製備微陣列。在另一些實施方案中，固定化抗原分子的實際量可保持基本上恆定，但陣列上的位點或點的尺寸變化以改變可用結合表位的量，提供滴定系列的具有不同量的可用結合表位的位點或點。在這樣的一些實施方案中，在製備滴定系列中，抗原上結合表位的二維表面濃度是重要的，而不是抗原的絕對量。用於製備和詢問蛋白質/肽微陣列的技術通常是本領域中已知的。

【0115】微陣列可用于平行地對單個樣品進行不同特異性的自身抗體的多個測定。這可使用包含多種抗原或抗原組的陣列來完成。

【0116】某些抗原可包含或來源於分離自天然來源的蛋白質或多肽，包括但不限於分離自患者組織或體液（例如，血漿、血清、全血、尿、汗、淋巴、糞便、腦脊液、腹水、胸腔積液、精液、痰、乳頭抽吸液、術後血

清腫和傷口引流液)的蛋白質或多肽。在這樣的一些實施方案中，抗原可包含基本上所有的天然蛋白，即基本上以其分離自天然來源的形式的蛋白質或其可包含天然蛋白的片段。為了在本發明的方法中作為抗原是有效的，任何這樣的片段必須保留對使用其來測試的自身抗體的免疫反應性。合適的片段可例如藉由經分離的蛋白質的化學或酶促切割來製備。

【0117】在某些實施方案中，並且根據使用抗原的測定的確切性質，抗原可包括與一種或更多種另外的分子（其賦予蛋白質中天然不存在的一些期望特性）連接的天然蛋白或其片段。例如，蛋白質或片段可與顯示標記物（revealing label）（例如螢光標記物、有色標記物、發光標記物、放射標記物或重金屬（例如，膠體金））綴合。在另一些實施方案中，蛋白質或片段可表達為重組產生的融合蛋白。舉例來說，融合蛋白可在 N 端或 C 端處包含有助於純化經重組表達的抗原的標籤肽。

【0118】根據要使用抗原的測定的形式，可將抗原固定在固體支援物（例如晶片、載玻片、微量滴定板的孔、珠、膜或納米粒）上。固定化可藉由非共價吸附、共價連接或藉由標籤來實現。

【0119】可使用任何合適的連接方式，只要這在顯著程度上不有害地影響抗原與靶自身抗體發生免疫反應的能力。

【0120】本發明不限於固相測定，但還涵蓋全部或部分地在液相中進行的測定，例如溶液相珠測定或競爭測定。

【0121】在一個實施方案中，抗原可用有利於固定化的配體（例如生物素）標記。然後可以將抗原稀釋至合適的滴定範圍，並使其與溶液中患者樣品中的自身抗體反應。然後可藉由配體-受體相互作用（例如，生物素-鏈黴親和素）將所得的免疫複合物固定在固體支持物上，並如下所述進行測定的剩餘部分。

【0122】為了便於生產用於本發明測定方法的生物素化抗原，編碼全長抗原、其截短形式或其抗原片段的 cDNA 可表達為用蛋白質或多肽標籤標記的融合蛋白，其可例如藉由酶促反應與生物素輔助因數連接。

【0123】用於生產重組生物素化抗原的載體可商購自許多來源。或者，

生物素化抗原可藉由生物素與表達和純化後的抗原分子共價連接來生產。

【0124】如上所述，根據本發明的用於檢測自身抗體的免疫測定可基於本領域中已知的標準技術。在一個最優選實施方案中，免疫測定可以是 ELISA。ELISA 在本領域中通常是習知的。在典型的間接 ELISA 中，將對測試下的自身抗體具有特異性的抗原固定在固體表面（例如，標準微量滴定測定板的孔、或者微珠或微陣列的表面）上並且使包含待測試自身抗體之存在的體液的樣品與固定化抗原接觸。樣品中存在的具有期望特異性的任何自身抗體會與固定化抗原結合。然後可使用任何合適的方法檢測結合的抗原/自身抗體複合物。在一個優選實施方案中，使用經標記的抗人免疫球蛋白抗體二抗（其特異性識別一種或更多種類的人免疫球蛋白共有的表位）來檢測抗原/自身抗體複合物。通常來說，二抗將是抗 IgG 或抗 IgM。二抗通常用可檢測標誌物（通常是酶標記物，例如過氧化物酶或鹼性磷酸酶）標記，允許藉由添加產生可檢測產物（例如有色產物、化學發光產物或螢光產物）的酶的底物的定量檢測。可以以等同效果使用本領域中已知的其他類型的可檢測標籤。

本發明方法的應用

【0125】本發明提供了選自 MMP9、AIF1、EpCAM 和 CDKN1B 的腫瘤標誌物抗原在藉由檢測包含來自哺乳動物物件之體液的受試樣品中對 MMP9、AIF1、EpCAM 或 CDKN1B 具有免疫特異性的自身抗體來在所述哺乳動物物件中檢測肝癌的方法中的用途，所述方法包括以下步驟：

(a) 使受試樣品與選自 MMP9、AIF1、EpCAM 和 CDKN1B 的腫瘤標誌物抗原接觸；以及

(b) 確定與受試樣品中存在的自身抗體結合的腫瘤標誌物抗原的複合物的存在或不存在；

其中所述複合物的存在指示肝癌的存在。

【0126】在本發明的該實施方案中，以上所討論的與本發明的多種方法相關的所有限制被考慮與該用途有關。

【0127】根據本發明的測定方法可用於多種不同的臨床情況。特別地，

所述方法可用於檢測或診斷肝癌、評估診斷患有肝癌之患者的預後、預測對治療的響應、監測患者中肝癌的進展、為了診斷肝癌之存在而篩查無症狀人物件群、預測肝癌患者對抗肝癌治療（例如，化學治療、射頻消融術、肝切除術、肝移植、疫苗接種、抗生長因數或信號轉導治療、內分泌治療、人抗體治療、經導管動脈化學栓塞術、經皮乙醇注射、微波消融術、索拉非尼施用和放射性栓塞術）的響應、監測肝癌患者對抗肝癌治療（例如，化學治療、射頻消融術、肝切除術、肝移植、疫苗接種、抗生長因數或信號轉導治療、內分泌治療、人抗體治療、經導管動脈化學栓塞術、經皮乙醇注射、微波消融術、索拉非尼施用和放射性栓塞術）的響應、檢測先前診斷患有肝癌的患者（其已經進行了抗肝癌治療以降低肝癌存在的量）中的復發疾病、選擇用於特定患者的抗肝癌治療（例如，化學治療、射頻消融術、肝切除術、肝移植、疫苗接種、抗生長因數或信號轉導治療、內分泌治療、人抗體治療、經導管動脈化學栓塞術、經皮乙醇注射、微波消融術、索拉非尼施用和放射性栓塞術）、或在患有或懷疑患有肝癌的患者中確定抗體譜。

試劑盒

【0128】本發明涵蓋適用於進行本發明方法中的任一種的試劑盒，其中試劑盒包含：

- (a) 一種或更多種腫瘤標誌物抗原；和
- (b) 能夠檢測與受試樣品中存在的自身抗體結合的腫瘤標誌物抗原的複合物的試劑。

【0129】本發明還包括用於檢測包含來自哺乳動物物件之體液的受試樣品中的自身抗體的試劑盒，其包含：

- (a) 選自 MMP9、AIF1 EpCAM 和 CDKN1B 的腫瘤標誌物抗原；
- (b) 能夠檢測與受試樣品中存在的自身抗體結合的腫瘤標誌物抗原的複合物的試劑。

【0130】在某些實施方案中，試劑盒還可包含：

- (c) 用於使腫瘤標誌物抗原與包含來自哺乳動物物件之體液的受試樣品

接觸的裝置。

【0131】用於使腫瘤標誌物抗原與包含來自哺乳動物物件之體液的受試樣品接觸的裝置的實例包括腫瘤標誌物抗原在晶片、載玻片、微量滴定板的孔、珠、膜或納米粒上的固定化。

【0132】在一些實施方案中，試劑盒內的腫瘤標誌物抗原可存在於兩種或更多種腫瘤標誌物抗原的組中。在該實施方案中，試劑盒可包含二種、三種、四種、五種、六種、七種、八種、九種、十種、十一種、十二種、十三種、十四種、十五種、十六種、十七種、十八種、十九種、二十種、二十一種、二十二種、二十三種、二十四種、二十五種、二十六種、二十七種、二十八種、二十九種、三十種、三十一種、三十二種、三十三種、三十四種、三十五種、三十六種、三十七種、三十八種或更多種的抗原。這些抗原可以是不同的抗原，其中不同的抗原是來源於不同蛋白質或多肽的抗原（例如，來源於由不同基因編碼的不相關蛋白質的抗原）或來源於如上所限定的單一蛋白質或多肽的不同肽表位的抗原。

【0133】在一個實施方案中，兩種或更多種腫瘤標誌物抗原的組可包含 MMP9、AIF1、EpCAM 和 CDKN1B。在某個具體實施方案中，組可由 MMP9、AIF1、EpCAM 和 CDKN1B 組成。

【0134】在一個實施方案中，兩種或更多種腫瘤標誌物抗原的組可包含選自以下的一種或更多種腫瘤標誌物抗原：NY-ESO-1、波形蛋白、HSPA4、轉鐵蛋白、HNRNP-L、HSPD1、HNRNP-A2、SALL4、週期蛋白 B1、AFP、NPM1、YWHAZ、DDX3X、p62、CAGE、MAGE A4、RalA、GBU4-5、SOX2、AKR1B10、ApoA1、BCL2、CD44、CK18、CPS1、FUCA1、GLUL、HSPA2、IL-8、MDM2、PEBP1、催乳素、RGN、SPP1、SSX2 和 TGFB1。在該實施方案中，組可包含所記載的腫瘤標誌物抗原中的一種、二種、三種、四種、五種、六種、七種、八種、九種、十種、十一種、十二種、十三種、十四種、十五種、十六種、十七種、十八種、十九種、二十種、二十一種、二十二種、二十三種、二十四種、二十五種、二十六種、二十七種、二十八種、二十九種、三十種、三十一種、三十二種、三十三種或三十四種。根據本發明，組將還包含 MMP9、AIF1、EpCAM 或 CDKN1B，

並且可包含這些腫瘤標誌物抗原中的一種、兩種、三種或四種。在其中組中包含這些腫瘤標誌物抗原中的兩種或三種的一些實施方案中，考慮這些抗原中的兩種或三種的所有組合。在一些具體實施方案中，組可包含 MMP9、AIF1、EpCAM 和 CDKN1B。

【0135】在一個實施方案中，兩種或更多種腫瘤標誌物抗原的組可包含 MMP9、AIF1、EpCAM、NY-ESO-1、HSPA4、波形蛋白、HNRNP-L 和轉鐵蛋白。在另一個實施方案中，兩種或更多種腫瘤標誌物抗原的組可由 MMP9、AIF1、EpCAM、NY-ESO-1、HSPA4、波形蛋白、HNRNP-L 和轉鐵蛋白組成。

【0136】在另一個實施方案中，兩種或更多種腫瘤標誌物抗原的組可包含 AIF1、EpCAM、HSPA4 和 CPS1。在另一個實施方案中，兩種或更多種腫瘤標誌物抗原的組可由 AIF1、EpCAM、HSPA4 和 CPS1 組成。

【0137】在另一個實施方案中，兩種或更多種腫瘤標誌物抗原的組可包含 EpCAM、NY-ESO-1、波形蛋白、HSPA2、HSPA4 和 HNRNP-L。在另一個實施方案中，兩種或更多種腫瘤標誌物抗原的組可由 EpCAM、NY-ESO-1、波形蛋白、HSPA2、HSPA4 和 HNRNP-L 組成。

【0138】在又一個實施方案中，兩種或更多種腫瘤標誌物抗原的組可包含 MMP9、AIF1、EpCAM、DDX3X、SALL4、MAGE A4、NY-ESO-1、CAGE、RalA 和 SOX2。在另一個實施方案中，兩種或更多種腫瘤標誌物抗原的組可由 MMP9、AIF1、EpCAM、DDX3X、SALL4、MAGE A4、NY-ESO-1、CAGE、RalA 和 SOX2 組成。

【0139】在又一個實施方案中，兩種或更多種腫瘤標誌物抗原的組可包含 EpCAM、CAGE、SOX2、RalA、MAGE A4、DDX3X 和 NY-ESO-1。在另一個實施方案中，兩種或更多種腫瘤標誌物抗原的組可由 EpCAM、CAGE、SOX2、RalA、MAGE A4、DDX3X 和 NY-ESO-1 組成。

【0140】在又一個實施方案中，兩種或更多種腫瘤標誌物抗原的組可包含 AIF1、CAGE、HSPD1、SOX2、SALL4、HSPA4 和轉鐵蛋白。在另一個實施方案中，兩種或更多種腫瘤標誌物抗原的組可由 AIF1、CAGE、

HSPD1、SOX2、SALL4、HSPA4 和轉鐵蛋白組成。

【0141】在一個具體實施方案中，兩種或更多種腫瘤標誌物抗原的組可包含 NY-ESO-1、波形蛋白、HSPA4、轉鐵蛋白、HNRNP-L、HSPD1、HNRNP-A2、SALL4、週期蛋白 B1、AFP、NPM1、YWHAZ、DDX3X、p62、CAGE、MAGE A4、RalA、GBU4-5、SOX2、AKR1B10、ApoA1、BCL2、CD44、CK18、CPS1、FUCA1、GLUL、HSPA2、IL-8、MDM2、PEBP1、催乳素、RGN、SPP1、SSX2 和 TGFB1。根據本發明，組還將包含 MMP9、AIF1、EpCAM 或 CDKN1B，並且可包含這些腫瘤標誌物抗原中的一種、兩種、三種或四種。在其中組中包含這些腫瘤標誌物抗原中的兩種或三種的一些實施方案中，考慮這些抗原中的兩種或三種的所有組合。在一些具體實施方案中，組可包含 MMP9、AIF1、EpCAM 和 CDKN1B。例如，兩種或更多種腫瘤標誌物抗原的組可包含 MMP9、AIF1、EpCAM、CDKN1B、NY-ESO-1、波形蛋白、HSPA4、轉鐵蛋白、HNRNP-L、HSPD1、HNRNP-A2、SALL4、週期蛋白 B1、AFP、NPM1、YWHAZ、DDX3X、p62、CAGE、MAGE A4、RalA、GBU4-5、SOX2、AKR1B10、ApoA1、BCL2、CD44、CK18、CPS1、FUCA1、GLUL、HSPA2、IL-8、MDM2、PEBP1、催乳素、RGN、SPP1、SSX2 和 TGFB1。或者，兩種或更多種腫瘤標誌物抗原的組可由 MMP9、AIF1、EpCAM、CDKN1B、NY-ESO-1、波形蛋白、HSPA4、轉鐵蛋白、HNRNP-L、HSPD1、HNRNP-A2、SALL4、週期蛋白 B1、AFP、NPM1、YWHAZ、DDX3X、p62、CAGE、MAGE A4、RalA、GBU4-5、SOX2、AKR1B10、ApoA1、BCL2、CD44、CK18、CPS1、FUCA1、GLUL、HSPA2、IL-8、MDM2、PEBP1、催乳素、RGN、SPP1、SSX2 和 TGFB1 組成。

【0142】在一個具體實施方案中，兩種或更多種腫瘤標誌物抗原的組可包含 CAGE、NY-ESO-1、MMP9、轉鐵蛋白、MAGE A4、RalA、HSPA4、SALL4、週期蛋白 B1、EpCAM、DDX3X 和 AIF1。在另一個實施方案中，兩種或更多種腫瘤標誌物抗原的組可由 CAGE、NY-ESO-1、MMP9、轉鐵蛋白、MAGE A4、RalA、HSPA4、SALL4、週期蛋白 B1、EpCAM、DDX3X 和 AIF1 組成。

【0143】在一個具體實施方案中，兩種或更多種腫瘤標誌物抗原的組可包含 CAGE、NY-ESO-1、MMP9、轉鐵蛋白、MAGE A4、RalA、HSPA4、SALL4、週期蛋白 B1、EpCAM、DDX3X、AIF1、SOX2 和 AFP。另一個實施方案中，兩種或更多種腫瘤標誌物抗原的組可由 CAGE、NY-ESO-1、MMP9、轉鐵蛋白、MAGE A4、RalA、HSPA4、SALL4、週期蛋白 B1、EpCAM、DDX3X、AIF1 SOX2 和 AFP 組成。

【0144】本發明的試劑盒可適用於檢測肝癌。

【0145】在某些實施方案中，試劑盒可用於檢測肝癌。

【0146】在本發明的試劑盒中，體液可選自血漿、血清、全血、尿、汗、淋巴、糞便、腦脊液、腹水、胸腔積液、精液、痰、乳頭抽吸液、術後血清腫、唾液、羊水、淚和傷口引流液。

【0147】將參考以下非限制性實驗實施例進一步理解本發明。

實施例

實施例 1-用於測量腫瘤相關蛋白的自身抗體的一般方案

【0148】按照與 WO 99/58978（其內容藉由引用併入本文）中所述的那些類似的方法，可藉由重組表達製備腫瘤標誌物抗原的樣品。簡而言之，將編碼目標標誌物抗原的 cDNA 克隆到經修飾以編碼生物素標籤和 6x 組氨酸標籤的 pET21 載體（Invitrogen）中以有助於純化所表達的蛋白質。使所得的克隆在 BL21(DE3)大腸桿菌（*E. coli*）中生長，隨後將細菌裂解。按照製造商的方案，藉由鎳螯合親和柱（HiTrap，可商購自 GE Healthcare）回收所表達的抗原。儲存前，藉由 SDS-PAGE、Western 印跡和蛋白質測定評估所表達的蛋白質的純度、特異性和收率。

【0149】藉由用空 pET21 載體（即沒有編碼腫瘤相關抗原的 cDNA）轉化 BL21(DE3)大腸桿菌產生陰性對照蛋白 VOL。所表達並經純化的蛋白質包含在重組腫瘤相關抗原上發現的相同的 His 和生物素標籤序列，並且允許校正與殘餘細菌污染物結合的非特異性自身抗體。

【0150】許多標誌物 cDNA 的 GenBank 登錄號如下：

AFP: NM_001134.1
AIF1: NM_001623.3
AKR1B10: NM_020299.4.
APOA1: NM_000039.1.
BCL2: NM_000633.2
CAGE: NM_182699
CALR: NM_004343.3
CD44: NM_001001389
CDKN1B: NM_004064.4
CK18: NM_000224
CPS1: NM_001875.4
CCNB1: NM_031966.2
CYCLIN B1: NM_031966.2
DDX3X: NM_001356.3
EpCAM: NM_002354
FUCA1: NM_000147.4
GLUL: NM_001033044.2
HNRNP-A2: NM_002137.3
HNRNP-L: NM_001533.2
HSPA2: NM_021979.3.
HSPA4: NM_002154.3
HSPD1: NM_002156.4
IL8: NM_000584.3
MAGE A4: NM_001011548.1

MDM2: NM_002392.5
MMP9: NM_004994.2.
NPM1: NM_002520.6
NY-ESO-1: NM_001327
PEBP1: NM_002567.2
P62: NM_001007225.1
催乳素: NM_000948.5
RalA: NM_005402.2
RGN: NM_004683.5
SALL4: NM_020436.3.
SOX2: NM_003106
SPP1: NM_001040058.1
SSX2: NM_175698.1
TGFB1: NM_000660.5
轉鐵蛋白: NM_001063.3
波形蛋白: NM_003380.3
YWHAZ: NM_001135699.1

【0151】將抗原和 VOL（陰性對照）在高磷酸鹽結合緩衝液中稀釋至適當濃度，然後稀釋以提供任兩種單獨的蛋白質濃度，如在高通量測定（high throughput assay，HTPA）形式中（圖 2A）；或半對數滴定範圍，如在滴定測定形式中（圖 2B）。使用自動液體處理系統根據板佈局將抗原稀釋液以 50 µl/孔分配到 Falcon 微量滴定板的排中（圖 2A 和圖 2B）。覆蓋板並在 18 至 22°C 下保存 18 至 24 小時。

【0152】用豬皮明膠結合緩衝液（PSGBB，PBS + 0.1%豬皮明膠+ 0.05%疊氮化鈉）以 200 µl/孔封閉板 1 小時。將血清樣品解凍，渦旋並在 18 至 22

℃下在 PSGBB 中以 1/110 稀釋。將對板進行抽出並在衛生紙上拍幹。使用自動液體處理儀器將每個經稀釋的血清樣品以 50 μl/孔分配到微量滴定板的所有孔中。覆蓋板並在室溫下搖動孵育 1.5 小時。

【0153】洗滌步驟：使用自動洗板機將板在 PBS + 0.1%吐溫 20 中洗滌三次，然後在衛生紙上拍幹。

【0154】將辣根過氧化物酶綴合的兔抗人免疫球蛋白（Dako，在 PSGBB 中 1/5,000）以 50 μl/孔分配到微量滴定板的所有孔中。然後將板在室溫下搖動孵育 1 小時。如上所述，洗滌板。

【0155】將預製備的 TMB 底物以 50 μl/孔添加至各板，並在實驗臺上孵育 15 分鐘。輕拍板以混合。使用標準分光光度計讀板機在 650 nm 處測定每個孔的光密度。

實施例 2-藉由 HTPA 在肝細胞癌（HCC）中檢測自身抗體

【0156】以下資料從評估在使用 HTPA 形式的 HCC 檢測中自身抗體測定的組的靈敏度和特異性的預備研究中獲得。研究中包括的受試者的臨床和人口統計狀況在表 1 至 4 中給出。

表 1-實施例 2 中所述的研究中包括的患者的人口統計狀況

人口因素	HCC 患者	良性肝病患者	沒有惡性證據的個體
數量	99	99	99
平均年齡	62.3	58.1	62.2
年齡範圍	30-91	30-89	30-87
男性%	69	69	69

表 2-HCC 患者中存在的原發性腫瘤的尺寸

	可用患者的數量	平均值	最小值-最大值
原發性腫瘤尺寸（cm）	88	5.9	0.4-19

表 3-使用 TNM 分期的 HCC 患者的腫瘤分期

TNM 分期	數目
1	35
2	21
3	21
4	2
N/A	20

TNM = 惡性腫瘤分期系統的 TNM 分類；N/A =不可得

表 4- 良性肝病患者中存在的肝疾病。

良性背景	數目
丙型肝炎病毒感染	67
乙型肝炎病毒感染	22
酒精性肝病	6
自身免疫性肝炎	2
血色素沉著病	1
原發性膽汁性肝硬化	1
總計	99

【0157】根據實施例 1 中給出的方案使用表 5 中列出的抗原進行測定。藉由選擇給出最大約登值同時保持個體標誌物特異性大於 90%的取捨值確定測定取捨值。結果示於表 5 中，顯然，大量的這些自身抗體標誌物在患有 HCC 的患者中顯示出比患有良性肝病的患者或健康對照更高的陽性水準，因此它們可具有區分 HCC 患者與沒有惡性證據之患者的能力。

【0158】此外，顯然，與任何僅單一 AAb 相比，AAb 組的測量提高了區分 HCC 患者與患有非癌性肝疾病之患者的能力。組 1 和組 2（表 6 和表 10）示出了如何可組合不同組的 AAb 以實現相似的性能同時優化某些特性以適應不同的臨床需求。組 1（表 6）包含對所有患者可用的標誌物。與組 1 相比，如組 2 中（表 10），藉由性別優化組中包含的標誌物提高了特異性，而靈敏度略有降低。這證明了建立適應不同臨床需求的不同組的能力。表 7

和表 11 示出了每個組可檢測患有 1 期和 2 期癌症的患者，這是導致 HCC 有效治療的至關重要的早期診斷。

表 5-在每個組中個體 AAb 標誌物的陽性

	HCC		良性		正常	
	陽性	%	陽性	%	陽性	%
AIF1	2	2.0	0	0	0	0
AKR1B10	1	1.0	0	0	0	0
ApoA1	1	1.0	0	0	0	0
BCL2	3	3.0	1	1.0	1	1.0
CD44	1	1.0	0	0	0	0
CDKN1B	2	2.0	0	0	1	1.0
CK18	1	1.0	0	0	0	0
CPS1	2	2.0	1	1.0	0	0
DDX3X	3	3.0	1	1.0	2	2.0
EpCAM	5	5.1	1	1.0	6	6.1
FUCA1	1	1.0	0	0	0	0
GLUL	1	1.0	0	0	0	0
HNRNP-A2	1	1.0	0	0	0	0
HNRNP-L	3	3.0	2	2.0	0	0
HSPA2	1	1.0	0	0	0	0
HSPA4	5	5.1	1	1.0	0	0
HSPD1	2	2.0	2	2.0	0	0
IL-8	5	5.1	4	4.0	4	4.0
MDM2	2	2.0	1	1.0	0	0
MMP9	3	3.0	1	1.0	1	1.0
NPM1	2	2.0	1	1.0	0	0
NY-ESO-1	7	7.1	0	0	1	1.0
PEBP1	1	1.0	0	0	0	0
催乳素	2	2.0	1	1.0	1	1.0

RGN	1	1.0	0	0	0	0
SALL4	1	1.0	0	0	0	0
SPP1	1	1.0	1	1.0	0	0
SSX2	3	3.0	1	1.0	1	1.0
TF	2	2.0	0	0	0	0
TGFB1	1	1.0	0	0	0	0
波形蛋白	7	7.1	3	3.0	6	6.1
YWHAZ	2	2.0	1	1.0	2	2.0

組 1 - 一般組

【0159】組 1 是使用 NRI（淨重分類改進，Net Reclassification Improvement）形成的並且包含腫瘤標誌物抗原 EpCAM、AIF1 和 MMP9 以及 NY-ESO-1、HSPA4、波形蛋白、HNRNP-L 和轉鐵蛋白，其中如果任一給出的 AAb 水準高於如實施例 2 中所述產生的其取捨值，則結果是陽性。表 6 和表 7 示出了在實施例 2 中所述的樣品組中該組的性能。

表 6-組 1 的性能和組成

組 1	靈敏度 (%)	特異性（良性）(%)	特異性（正常）(%)
NY-ESO-1、 EpCAM、 HSPA4、波形蛋白、 HNRNP-L、 轉鐵蛋白、 AIF1、MMP9	28.3	94	87.9

表 7-組 1 的按 TNM 分期的性能

分期	陽性	陰性	靈敏度
1	8	27	23

2	4	17	19
3	8	13	38
4	0	2	0

組 2-男性和女性的個體組

【0160】組 2 是藉由將實施例 2 中所述的樣品組分成單獨的性別組並對每個組進行單獨的 NRI 而形成的。組 2 包含腫瘤標誌物抗原 EpCAM、AIF1 和 MMP9 以及 HSPA4、CPS1、NY-ESO-1、波形蛋白、HSPA2 和 HNRNP-L。如果患者是女性並且 HSPA4、AIF1、EpCAM 或 CPS1 中的任一種高於如實施例 2 中所述產生的取捨值，或者如果患者是男性並且 NY-ESO-1、波形蛋白、EpCAM、HSPA2、HSPA4 或 HNRNP-L 中的任一種高於如實施例 2 中所述產生的取捨值，則結果是陽性。表 10 和表 11 示出了在實施例 2 中所述的樣品組中組 2 的性能。

表 8 - 組 2a 的性能和組成 - 女性

組 2a	靈敏度 (%)	特異性 (良性) (%)	特異性 (正常) (%)
HSPA4、 AIF1、 EpCAM、 CPS1	22.6	100	100

表 9 - 組 2b 的性能和組成 - 男性

組 2b	靈敏度 (%)	特異性 (良性) (%)	特異性 (正常) (%)
NY-ESO-1、 波形蛋白、 EpCAM、 HSPA2、 HSPA4、 HNRNP-L	25	97.1	92.6

表 10 - 組 2 的性能和組成 - 組合的

組 2	靈敏度 (%)	特異性 (良性) (%)	特異性 (正常) (%)
2a + 2b	24.2	98	94.9

表 11 - 組 2 的按 TNM 分期的性能

分期	陽性	陰性	靈敏度 (%)
1	6	29	17.1
2	4	17	19
3	6	15	28.6
4	0	2	0

實施例 3-藉由 HTPA 測量的與自身抗體組合的 AFP 的另外測量

【0161】使用可商購的 ELISA (Aviva Systems Biology) 針對實施例 2 中所述的樣品組在血清樣品中測量迴圈甲胎蛋白 (alpha-fetoprotein, AFP)。使用 200 ng/ml 的常用取捨值以評估陽性。表 12 示出了將 AFP 添加至實施例 2 中所示組 1 和組 2 的結果。從這些結果，清楚的是，與 AAb 組組合的 AFP 的性能大於僅 AFP 或 AAb 組的性能。

表 12 - 僅 AFP 和當被添加至實施例 2 中所述的組時的性能

標誌物組合	靈敏度	特異性 (良性)	特異性 (正常)
AFP	35.4	100	100
組 1 + AFP	52.5	93.9	87.9
組 2 (組合的) + AFP	49.5	97.9	94.9

實施例 4-藉由滴定測定在肝細胞癌 (HCC) 中檢測自身抗體

【0162】以下資料從在使用滴定板形式評估 HCC 檢測中自身抗體測定

組的靈敏度和特異性的研究中獲得（圖 2B）。研究中包括的受試者的臨床和人口統計狀況在表 13 至表 16 中給出。

表 13 - 實施例 2 中所述的研究包括的患者的入口統計狀況

人口統計因素	HCC 患者	良性肝病患者	沒有惡性證據的個體
數量	98	99	95
平均年齡	62.6	50.7	62.7
年齡範圍	30-91	30-82	30-84
男性%	69	69	68

表 14 - HCC 患者中存在的原發性腫瘤的尺寸

	可用患者數量	平均值	最小值-最大值
原發性腫瘤尺寸 (cm)	86	6.02	0.4-19

表 15 - 使用 TNM 分期的 HCC 患者的腫瘤分期

TNM 分期	數目
1	35
2	20
3	21
4	2
N/A	20

N/A = 不可得

表 16 - 良性肝病患者中存在的肝疾病

良性背景	數目
丙型肝炎病毒感染	58
乙型肝炎病毒感染	31
酒精性肝病	6
自身免疫性肝炎	2
血色素沉著病	1

原發性膽汁性肝硬化	1
總計	99

【0163】根據實施例 1 中給出的方案使用表 17 中列出的抗原進行測定。藉由選擇給出最大約登值同時保持個體標誌物特異性大於 90%的取捨值確定測定取捨值。結果示於表 17 中，顯然，這些自身抗體標誌物中的一些在患有 HCC 的患者中顯示比患有良性肝病的患者或健康對照更高的陽性水準，因此它們可具有區分 HCC 與沒有惡性疾病證據之患者的能力。在實施例 2 中所示的研究中發現顯示出癌症/正常差異的 AAb 繼續顯示出區分 HCC 患者與患有非癌性肝疾病之患者（良性）和健康對照（正常）的能力。此外，顯然，與任何僅單一標誌物相比，組的測量再次提高了區分 HCC 患者的能力。

【0164】組 3（表 18）和組 4（表 22）示出了如何可組合不同組的標誌物以實現相似的性能同時優化某些特性以適應不同的臨床需求。組 3 包含可用于所有患者的標誌物，而組 4 按照性別指定了不同標誌物，這提高了特異性同時保持靈敏度（表 20 和表 21）。這證明了建立適應不同臨床需求的不同組的能力。每個實施例組都可檢測患有 1 期和 2 期癌症的患者，這對於早期診斷並因此有效治療 HCC 是至關重要的（表 19 和表 23）。

表 17－ 在每組中個體 AAb 標誌物的陽性

	HCC		良性		正常	
	陽性	%	陽性	%	陽性	%
AIF1	1	1.0	0	0	0	0
CAGE	12	12.2	3	3.0	9	9.5
CDKN1B	14	14.3	13	13.0	21	22.1
DDX3X	5	5.1	2	2.0	2	2.1
EpCAM	3	3.1	0	0	3	3.2
HNRNP-A2	6	6.1	4	4.0	6	6.3
HSPA4	4	4.1	1	1.0	0	0
HSPD1	7	7.1	5	5.0	3	3.2

MAGE A4	3	3.1	0	0	0	0
MMP9	2	2.0	1	1.0	0	0
NY-ESO-1	8	8.2	0	0	4	4.2
p62	9	9.2	5	5.0	2	2.1
RalA	4	4.1	1	1.0	4	4.2
SALL4	6	6.1	3	3.0	1	1.1
SOX2	3	3.1	0	0	1	1.1
轉鐵蛋白	7	7.1	5	5.0	1	1.1
YWHAZ	6	(6.1)	4	(4.0)	5	(5.3)

組 3

【0165】組 3 是使用 NRI 形成的並且包含腫瘤標誌物抗原 EpCAM、AIF1 和 MMP9 以及 DDX3X、SALL4、MAGE A4、NY-ESO-1、CAGE、RalA 和 SOX2，其中如果給出的 AAb 水準中的任一種高於如實施例 4 中所述產生的其取捨值，則結果是陽性。表 18 和表 19 示出了在實施例 4 中所述的樣品組中該組的性能。

表 18 - 組 3 的性能和組成

	靈敏度 (%)	特異性 (良性) (%)	特異性 (正常) (%)
DDX3X、 SALL4、 MAGE A4、 MMP9、 AIF1、 NY-ESO-1、 CAGE、 RalA、 EpCAM、 SOX2	36.7	89.9	84.2

表 19 - 組 3 的按 TNM 分期的性能

分期	陽性	陰性	靈敏度 (%)
1	10	25	28.6
2	8	12	40
3	8	13	38
4	1	1	100

組 4 - 男性和女性的個體組

【0166】組 4 是藉由將實施例 2 中所述的樣品組分成單獨的性別組並對每個組進行單獨的 NRI 形成的。組 4 包含腫瘤標誌物抗原 EpCAM 和 AIF1 以及 CAGE、SOX2、RalA、MAGE A4、DDX3X、NY-ESO-1、HSPD1、SALL4、HSPA4 和轉鐵蛋白。如果患者是女性並且 CAGE、HSPD1、SOX2、SALL4、AIF1、HSPA4 或轉鐵蛋白中的任一種高於如實施例 4 中所述產生的取捨值，或者如果患者是男性並且 CAGE、SOX2、RalA、MAGE A4、DDX3X、NY-ESO-1 或 EpCAM 中的任一種高於如實施例 4 中所述產生的取捨值，則結果是陽性。表 10 和表 11 示出了在實施例 4 中所述的樣品組中組 4 的性能。

表 20 - 組 4a 的性能和組成 - 男性

	靈敏度 (%)	特異性 (良性) (%)	特異性 (正常) (%)
CAGE、SOX2、 RalA、MAGE A4、DDX3X、 NY-ESO-1、 EpCAM	32.4	95.6	86.2

表 21 - 組 4b 的性能和組成 - 女性

	靈敏度 (%)	特異性 (良性) (%)	特異性 (正常) (%)
CAGE、HSPD1、 SOX2、SALL4、 AIF1、HSPA4、 轉鐵蛋白	50	90.3	90

表 22 - 組 4 的性能和組成 – 組合的

	靈敏度 (%)	特異性 (良性) (%)	特異性 (正常) (%)
4a + 4b	37	93.8	87.4

表 23 - 組 4 的按 TNM 分期的性能

分期	陽性	陰性	靈敏度 (%)
1	12	23	34.3
2	7	13	35
3	7	14	30
4	1	1	50

實施例 5-藉由滴定測定測量的與自身抗體組合的 AFP 的另外測量

【0167】使用可商購的 ELISA (Aviva Systems Biology) 針對實施例 4 中所述的樣品組在血清樣品中測量迴圈甲胎蛋白 (AFP)。使用 200 ng/ml 的常用取捨值以評估陽性。表 24 示出了將 AFP 添加到實施例 4 中所示的組 3 和組 4 中的結果。從這些結果，清楚的是，與 AAb 組組合的 AFP 的性能大於僅 AFP 或 AAb 組的性能。

表 24 – 僅 AFP 和當被添加至實施例 4 中所述組時的性能

標誌物組合	靈敏度 (%)	特異性 (良性) (%)	特異性 (正常) (%)
-------	---------	-----------------	-----------------

AFP	31.6	100	100
組 3 + AFP	55.1	89.9	84.2
組 4（組合的） + AFP	55.1	93.8	87.4

實施例 6 – *EarlyCDT-Liver LDT* 的設計和開發的訓練研究

【0168】以下資料從評估在使用滴定板形式的 HCC 檢測中自身抗體測定的組的靈敏度和特異性的研究中獲得（圖 2B）。受試者的人口統計狀況和良性群組的硬化狀態在表 25 至表 26 中給出，與先前實施例中使用不同的群組。

表 25 - 實施例 6 中使用的患者群組的人口統計學狀況

人口統計因素	HCC 患者(HCC)	良性肝病患者 (良性)	沒有惡性證據的個體 (正常)
數量	169	184	191
平均年齡（年齡 範圍）	59.8（32-81）	54.7（20-76）	59.9（31-81）
男性%	85.2	70.1	84.3

表 26 – 良性群組患者的硬化狀態

硬化狀態	數目
硬化	87
非硬化性肝病	81
未知	16
總計	184

【0169】根據實施例 1 中給出的方案使用表 27 中列出的抗原進行測定。藉由使用將特異性限制為>85%的蒙特卡洛直接搜索法（Monte Carlo direct search method）確定每個標誌物的取捨值。結果示於表 27 中，顯然，這些自身抗體標誌物中的一些在患有 HCC 的患者中顯示出比良性或正常群組中

更高的陽性水準，因此它們具有區分 HCC 與沒有惡性疾病證據之患者的能力。在實施例 2 中所示的研究中發現顯示出癌症/正常差異的 AAb 繼續顯示出區分 HCC 患者與患有非癌性肝疾病之患者（良性）和健康對照（正常）的能力。此外，顯然，與任何僅單一標誌物相比，組的測量再次提高了區分 HCC 患者的能力。組可檢測患有 1 期和 2 期癌症的患者（靈敏度為 40-45%），這對於早期診斷並因此有效治療 HCC 的至關重要的（表 28）。

表 27 – 在每組中個體 AAb 標誌物的陽性

自身抗體	HCC		良性		正常	
	陽性	(%)	陽性	(%)	陽性	(%)
AIF1	2	1.2	0	0.0	0	0.0
CAGE	33	19.5	7	3.8	5	2.6
CYCLIN B1	8	4.7	8	4.3	2	1.0
DDX3X	3	1.8	0	0.0	0	0.0
EpCAM	5	3.0	2	1.1	1	0.5
HSPA4	12	7.1	6	3.3	2	1.0
MAGE A4	14	8.3	6	3.3	3	1.6
MMP9	17	10.1	5	2.7	6	3.1
NY-ESO-1	21	12.4	11	6.0	4	2.1
RalA	12	7.1	7	3.8	6	3.1
SALL4	11	6.5	7	3.8	4	2.1
轉鐵蛋白	15	8.9	5	2.7	10	5.2
組	78	46.2	24	87	26	86.4

表 28 – 按 HCC 群組分期的 AAb 組的性能：按分期和所得靈敏度的患者數目（n）

分期	n	陽性	靈敏度（%）
BCLC 0	1	0	0.0
BCLC A	30	12	40.0

BCLC B	71	32	45.1
BCLC C	28	19	67.9
BCLC D	8	5	62.5
未知	31	10	32.3

BCLC = 巴賽隆納臨床肝癌（Barcelona Clinic Liver Cancer，BCLC）分期系統

【0170】使用可商購的 ELISA（Monobind）對實施例 6 中所述的樣品組在血清樣品中測量迴圈甲胎蛋白（AFP）。在表 29 中使用 200 ng/ml 的常用取捨值評估按分期分開的陽性。AFP 抗原靈敏度隨著該群組的分期而提高，早期疾病的靈敏度遠低於晚期疾病。還值得注意的是，與該實施例的 AAb 組相比，AFP 抗原對早期疾病的靈敏度低得多，然而晚期性能相似。

表 29- 按 HCC 群組分期的 AFP 抗原的性能：按分期和所得靈敏度的患者數目（n）

分期	n	陽性	靈敏度 (%)
BCLC 0	1	0	0.0
BCLC A	30	3	10.0
BCLC B	71	25	35.2
BCLC C	28	16	57.1
BCLC D	8	5	62.5
未知	31	3	9.7

【0171】藉由將 AFP 抗原與 AAb 組結果組合（表 30）可提高實施例 6 中的 HCC 群組的陽性和靈敏度，提高了早期和晚期疾病的靈敏度。從這些結果，清楚的是與 AAb 組組合的 AFP 的性能比僅 AFP 或 AAb 組的性能更大（表 31），將 AAb 組與 AFP 組合對特異性具有最小的影響。

表 30 – 按 HCC 群組分期的 AAb 組+AFP 抗原的性能：按分期和所得靈敏

度的患者數目 (n)

分期	n	陽性	靈敏度 (%)
BCLC 0	1	0	0.0
BCLC A	30	13	43.0
BCLC B	71	42	59.2
BCLC C	28	25	89.3
BCLC D	8	6	75.0
未知	31	11	35.5

表 31 – 僅 AFP 和當添加至實施例 6 中所述的 AAb 組時的性能

標記物組合	靈敏度	特異性 (良性)	特異性 (正常)
AAb 組	46.2	87.0	86.4
AFP 抗原	30.8	99.5	100.0
AAb 組 + AFP 抗原	57.4	86.4	86.4

本發明順序編號的實施方案：

1. 藉由檢測包含來自哺乳動物物件之體液的受試樣品中的抗體來在所述哺乳動物物件中檢測肝癌的方法，其中所述抗體是對選自 MMP9、AIF1、EpCAM 和 CDKN1B 的腫瘤標誌物蛋白具有免疫特異性的自身抗體，所述方法包括以下步驟：

(a) 使所述受試樣品與選自 MMP9、AIF1、EpCAM 和 CDKN1B 的腫瘤標誌物抗原接觸；以及

(b) 確定與所述受試樣品中存在的自身抗體結合的所述腫瘤標誌物抗原的複合物的存在或不存在；

其中所述複合物的存在指示肝癌的存在。

2. 檢測包含來自哺乳動物物件之體液的受試樣品中的抗體的方法，其中所述抗體是對選自 MMP9、AIF1、EpCAM 和 CDKN1B 的腫瘤標誌物蛋白具有免疫特異性的自身抗體，所述方法包括以下步驟：

(a) 使所述受試樣品與選自 MMP9、AIF1、EpCAM 和 CDKN1B 的腫瘤標誌物抗原接觸；以及

(b) 確定與所述受試樣品中存在的自身抗體結合的所述腫瘤標誌物抗原的複合物的存在或不存在。

3. 實施方案 2 所述的方法，其中所述哺乳動物物件被懷疑患有肝癌。

4. 實施方案 1 或實施方案 3 所述的方法，其中所述哺乳動物物件已被測試為對甲胎蛋白（AFP）、脫- γ 羧基凝血酶原（DCP）或凝集素反應性甲胎蛋白（AFP-L3）呈陽性。

5. 實施方案 1 或實施方案 3 所述的方法，其中所述哺乳動物物件已使用超聲監測測試為對肝癌呈陽性。

6. 實施方案 1 或實施方案 3 所述的方法，其中所述哺乳動物物件患有肝硬化、非酒精性脂肪性肝病、酒精性肝病、威爾遜病、遺傳性血色素沉着病、自身免疫性肝炎、乙型肝炎、丙型肝炎、證實的黃麴黴毒素暴露、血吸蟲病或糖尿病。

7. 根據實施方案 1 至 6 中任一項所述的方法，其中檢測兩種或更多種自身抗體，並且其中所述方法包括以下步驟：

(a) 使所述受試樣品與兩種或更多種腫瘤標誌物抗原的組接觸，所述組包含選自 MMP9、AIF1、EpCAM 和 CDKN1B 的腫瘤標誌物抗原以及對至少一種所述自身抗體具有免疫特異性的一種或更多種另外的腫瘤標誌物抗原。

8. 實施方案 7 所述的方法，其中所述組包含作為不同抗原的兩種或更多種腫瘤標誌物抗原。

9. 實施方案 8 所述的方法，其中所述組包含一種或更多種所述不同抗原的兩種或更多種抗原變體。

10. 實施方案 7 或實施方案 8 所述的方法，其中所述兩種或更多種腫瘤標誌物抗原的組包含 MMP9、AIF1、EpCAM 和 CDKN1B。

11. 實施方案 7 至 9 中任一項所述的方法，其中所述兩種或更多種腫瘤標誌物抗原的組包含選自以下的一種或更多種腫瘤標誌物抗原：

NY-ESO-1、波形蛋白、HSPA4、轉鐵蛋白、HNRNP-L、HSPD1、HNRNP-A2、SALL4、週期蛋白 B1、AFP、NPM1、YWHAZ、DDX3X、p62、CAGE、MAGE A4、RalA、GBU4-5、SOX2、AKR1B10、ApoA1、BCL2、CD44、CK18、CPS1、FUCA1、GLUL、HSPA2、IL-8、MDM2、PEBP1、催乳素、RGN、SPP1、SSX2 和 TGFB1。

12. 實施方案 11 所述的方法，其中所述兩種或更多種腫瘤標誌物抗原的組包含 CAGE、NY-ESO-1、MMP9、轉鐵蛋白、MAGE A4、RalA、HSPA4、SALL4、週期蛋白 B1、EpCAM、DDX3X 和 AIF1。

13. 實施方案 12 所述的方法，其中所述兩種或更多種腫瘤標誌物抗原的組由 CAGE、NY-ESO-1、MMP9、轉鐵蛋白、MAGE A4、RalA、HSPA4、SALL4、週期蛋白 B1、EpCAM、DDX3X 和 AIF1 組成。

14. 實施方案 11 所述的方法，其中所述兩種或更多種腫瘤標誌物抗原的組包含 CAGE、NY-ESO-1、MMP9、轉鐵蛋白、MAGE A4、RalA、HSPA4、SALL4、週期蛋白 B1、EpCAM、DDX3X、AIF1、SOX2 和 AFP。

15. 實施方案 14 所述的方法，其中所述兩種或更多種腫瘤標誌物抗原的組由 CAGE、NY-ESO-1、MMP9、轉鐵蛋白、MAGE A4、RalA、HSPA4、SALL4、週期蛋白 B1、EpCAM、DDX3X、AIF1、SOX2 和 AFP 組成。

16. 實施方案 11 所述的方法，其中所述兩種或更多種腫瘤標誌物抗原的組包含 MMP9、AIF1、EpCAM、NY-ESO-1、HSPA4、波形蛋白、HNRNP-L 和轉鐵蛋白。

17. 實施方案 16 所述的方法，其中所述兩種或更多種腫瘤標誌物抗原的組由 MMP9、AIF1、EpCAM、NY-ESO-1、HSPA4、波形蛋白、HNRNP-L 和轉鐵蛋白組成。

18. 實施方案 11 所述的方法，其中所述兩種或更多種腫瘤標誌物抗原

的組包含 AIF1、EpCAM、HSPA4 和 CPS1。

19. 實施方案 18 所述的方法，其中所述兩種或更多種腫瘤標誌物抗原的組由 AIF1、EpCAM、HSPA4 和 CPS1 組成。

20. 實施方案 18 或實施方案 19 所述的方法，其中所述物件為雌性。

21. 實施方案 11 所述的方法，其中所述兩種或更多種腫瘤標誌物抗原的組包含 EpCAM、NY-ESO-1、波形蛋白、HSPA2、HSPA4 和 HNRNP-L。

22. 實施方案 21 所述的方法，其中所述兩種或更多種腫瘤標誌物抗原的組由 EpCAM、NY-ESO-1、波形蛋白、HSPA2、HSPA4 和 HNRNP-L 組成。

23. 實施方案 21 或實施方案 22 所述的方法，其中所述物件為雄性。

24. 實施方案 11 所述的方法，其中所述兩種或更多種腫瘤標誌物抗原的組包含 MMP9、AIF1、EpCAM、DDX3X、SALL4、MAGE A4、NY-ESO-1、CAGE、RalA 和 SOX2。

25. 實施方案 24 所述的方法，其中所述兩種或更多種腫瘤標誌物抗原的組由 MMP9、AIF1、EpCAM、DDX3X、SALL4、MAGE A4、NY-ESO-1、CAGE、RalA 和 SOX2 組成。

26. 實施方案 11 所述的方法，其中所述兩種或更多種腫瘤標誌物抗原的組包含 EpCAM、CAGE、SOX2、RalA、MAGE A4、DDX3X 和 NY-ESO-1。

27. 實施方案 26 所述的方法，其中所述兩種或更多種腫瘤標誌物抗原的組由 EpCAM、CAGE、SOX2、RalA、MAGE A4、DDX3X 和 NY-ESO-1 組成。

28. 實施方案 26 或實施方案 27 所述的方法，其中所述物件為雄性。

29. 實施方案 11 所述的方法，其中所述兩種或更多種腫瘤標誌物抗原的組包含 AIF1、CAGE、HSPD1、SOX2、SALL4、HSPA4 和轉鐵蛋白。

30. 實施方案 29 所述的方法，其中所述兩種或更多種腫瘤標誌物抗原的組由 AIF1、CAGE、HSPD1、SOX2、SALL4、HSPA4 和轉鐵蛋白組成。

31. 實施方案 29 或實施方案 30 所述的方法，其中所述物件為雌性。

32. 實施方案 11 所述的方法，其中所述兩種或更多種腫瘤標誌物抗原的組包含 NY-ESO-1、波形蛋白、HSPA4、轉鐵蛋白、HNRNP-L、HSPD1、HNRNP-A2、SALL4、週期蛋白 B1、AFP、NPM1、YWHAZ、DDX3X、p62、CAGE、MAGE A4、RalA、GBU4-5、SOX2、AKR1B10、ApoA1、BCL2、CD44、CK18、CPS1、FUCA1、GLUL、HSPA2、IL-8、MDM2、PEBP1、催乳素、RGN、SPP1、SSX2 和 TGFB1。

33. 實施方案 32 所述的方法，其中所述兩種或更多種腫瘤標誌物抗原的組包含 MMP9、AIF1、EpCAM、CDKN1B、NY-ESO-1、波形蛋白、HSPA4、轉鐵蛋白、HNRNP-L、HSPD1、HNRNP-A2、SALL4、週期蛋白 B1、AFP、NPM1、YWHAZ、DDX3X、p62、CAGE、MAGE A4、RalA、GBU4-5、SOX2、AKR1B10、ApoA1、BCL2、CD44、CK18、CPS1、FUCA1、GLUL、HSPA2、IL-8、MDM2、PEBP1、催乳素、RGN、SPP1、SSX2 和 TGFB1。

34. 實施方案 33 所述的方法，其中所述兩種或更多種腫瘤標誌物抗原的組由以下組成：MMP9、AIF1、EpCAM、CDKN1B、NY-ESO-1、波形蛋白、HSPA4、轉鐵蛋白、HNRNP-L、HSPD1、HNRNP-A2、SALL4、週期蛋白 B1、AFP、NPM1、YWHAZ、DDX3X、p62、CAGE、MAGE A4、RalA、GBU4-5、SOX2、AKR1B10、ApoA1、BCL2、CD44、CK18、CPS1、FUCA1、GLUL、HSPA2、IL-8、MDM2、PEBP1、催乳素、RGN、SPP1、SSX2 和 TGFB1。

35. 前述實施方案中任一項所述的方法，其還包括以下步驟：

(c) 檢測所述腫瘤標誌物抗原與所述受試樣品中存在的自身抗體之間特異性結合的量，

其中所述自身抗體的存在或不存在是以所觀察到的特異性結合的量與預定取捨值之間的比較為基礎。

36. 前述實施方案中任一項所述的方法，其中所述腫瘤標誌物抗原以多個不同的量提供，並且其中所述方法包括以下步驟：

(a) 使所述受試樣品與多種不同量的所述腫瘤標誌物抗原接觸；

(b) 確定與所述受試樣品中存在的自身抗體結合的所述腫瘤標誌物抗

原的複合物的存在或不存在；

(c) 檢測所述腫瘤標誌物抗原與所述自身抗體之間特異性結合的量；

(d) 對於步驟(a)中使用的腫瘤標誌物抗原的每種量，繪製或計算所述特異性結合的量相對於所述腫瘤標誌物抗原量的曲線；以及

(e) 基於在使用的腫瘤標誌物抗原的每種不同量下所述腫瘤標誌物抗原與所述自身抗體之間特異性結合的量來確定所述自身抗體的存在或不存在。

37. 實施方案 36 所述的方法，其中基於對於使用的腫瘤標誌物抗原的所有量的特異性結合量的集體值來確定所述自身抗體的存在或不存在。

38. 實施方案 36 所述的方法，其中藉由針對劑量回應曲線的存在對步驟(d)的圖進行篩選來確定所述自身抗體的存在或不存在。

39. 實施方案 38 所述的方法，其中所述劑量回應曲線為大致 S 形或 sigmoidal 曲線。

40. 實施方案 36 至 39 中任一項所述的方法，其中所述方法還包括以下步驟：

(d1) 由步驟(c)中繪製或計算的所述曲線計算二次曲線參數；以及

(e) 基於以下的組合來確定所述自身抗體的存在或不存在：

(i) 步驟(b)中確定的所述自身抗體與所述腫瘤標誌物抗原之間特異性結合的量；和

(ii) 步驟(d1)中確定的所述二次曲線參數。

41. 實施方案 40 所述的方法，其中所述二次曲線參數選自斜率、截距、AUC、SlopeMax 和解離常數 (Kd)。

42. 實施方案 41 所述的方法，其中所述二次曲線參數由線性或對數回歸曲線計算。

43. 實施方案 40 至 42 中任一項所述的方法，其中所述二次曲線參數為最大漸近線、最小漸近線、Hill 斜率 (或斜率因數)、或者針對步驟(c)中繪

製或計算的每個曲線擬合的邏輯斯諦曲線的拐點。

44. 在包含來自哺乳動物物件之體液的受試樣品中確定患有肝癌之個體的抗體譜的體外方法，其中所述抗體是對選自 MMP9、AIF1、EpCAM 和 CDKN1B 的腫瘤標誌物蛋白具有免疫特異性的自身抗體，所述方法包括以下步驟：

a) 使所述受試樣品與選自 MMP9、AIF1、EpCAM 和 CDKN1B 的腫瘤標誌物抗原接觸；以及

b) 確定與所述受試樣品中存在的自身抗體結合的所述腫瘤標誌物抗原的複合物的存在或不存在，其中重複所述方法以建立抗體產生譜。

45. 藉由檢測包含來自哺乳動物物件之體液的受試樣品中的抗體來在所述哺乳動物物件中診斷和治療肝癌的方法，其中所述抗體是對選自 MMP9、AIF1、EpCAM 和 CDKN1B 的腫瘤標誌物蛋白具有免疫特異性的自身抗體，所述方法包括以下步驟：

(a) 使所述受試樣品與選自 MMP9、AIF1、EpCAM 和 CDKN1B 的腫瘤標誌物抗原接觸；

(b) 確定與所述受試樣品中存在的自身抗體結合的所述腫瘤標誌物抗原的複合物的存在或不存在；

(c) 當檢測到與所述受試樣品中存在的自身抗體結合的所述腫瘤標誌物抗原的複合物時，診斷所述物件患有肝癌；以及

(d) 向所診斷的物件施用肝癌治療。

46. 預測針對抗肝癌治療之回應的方法，所述方法包括檢測包含來自哺乳動物物件之體液的受試樣品中的抗體，其中所述抗體是對選自 MMP9、AIF1、EpCAM 和 CDKN1B 的腫瘤標誌物蛋白具有免疫特異性的自身抗體，所述方法包括以下步驟：

(a) 使所述受試樣品與選自 MMP9、AIF1、EpCAM 和 CDKN1B 的腫瘤標誌物抗原接觸；

(b) 確定與所述受試樣品中存在的自身抗體結合的所述腫瘤標誌物抗

原的複合物的存在或不存在；

(c) 檢測所述腫瘤標誌物抗原與所述受試樣品中存在的自身抗體之間特異性結合的量；以及

(d) 將所述腫瘤標誌物抗原與所述自身抗體之間特異性結合的量與先前確立的結合量與可能的治療結果之間的關係進行比較；

其中當與對照相比時，特異性結合的量的改變預測患者將對所述抗肝癌治療作出或不作出回應。

47. 實施方案 45 或實施方案 46 所述的方法，其中所述肝癌治療選自化學治療、射頻消融術、肝切除術、肝移植、疫苗接種、抗生長因數或信號轉導治療、內分泌治療、人抗體治療、經導管動脈化學栓塞術、經皮乙醇注射、微波消融術、索拉非尼施用和放射性栓塞術。

48. 實施方案 44 至 47 中任一項所述的方法，其中檢測兩種或更多種自身抗體，並且其中所述方法包括以下步驟：

(a) 使所述受試樣品與兩種或更多種腫瘤標誌物抗原的組接觸，所述組包含選自 MMP9、AIF1、EpCAM 和 CDKN1B 的腫瘤標誌物抗原以及對至少一種所述自身抗體具有免疫特異性的一種或更多種另外的腫瘤標誌物抗原。

49. 實施方案 48 所述的方法，其中所述組包含作為不同抗原的兩種或更多種腫瘤標誌物抗原。

50. 實施方案 49 所述的方法，其中所述組包含一種或更多種所述不同抗原的兩種或更多種抗原變體。

51. 實施方案 49 所述的方法，其中所述兩種或更多種腫瘤標誌物抗原的組包含 MMP9、AIF1、EpCAM 和 CDKN1B。

52. 實施方案 48 至 50 中任一項所述的方法，其中所述兩種或更多種腫瘤標誌物抗原的組包含選自以下的一種或更多種腫瘤標誌物抗原：
NY-ESO-1、波形蛋白、HSPA4、轉鐵蛋白、HNRNP-L、HSPD1、HNRNP-A2、SALL4、週期蛋白 B1、AFP、NPM1、YWHAZ、DDX3X、p62、CAGE、

MAGE A4、RalA、GBU4-5、SOX2、AKR1B10、ApoA1、BCL2、CD44、CK18、CPS1、FUCA1、GLUL、HSPA2、IL-8、MDM2、PEBP1、催乳素、RGN、SPP1、SSX2 和 TGFB1。

53. 實施方案 52 所述的方法，其中所述兩種或更多種腫瘤標誌物抗原的組包含 CAGE、NY-ESO-1、MMP9、轉鐵蛋白、MAGE A4、RalA、HSPA4、SALL4、週期蛋白 B1、EpCAM、DDX3X 和 AIF1。

54. 實施方案 53 所述的方法，其中所述兩種或更多種腫瘤標誌物抗原的組由 CAGE、NY-ESO-1、MMP9、轉鐵蛋白、MAGE A4、RalA、HSPA4、SALL4、週期蛋白 B1、EpCAM、DDX3X 和 AIF1 組成。

55. 實施方案 52 所述的方法，其中所述兩種或更多種腫瘤標誌物抗原的組包含 CAGE、NY-ESO-1、MMP9、轉鐵蛋白、MAGE A4、RalA、HSPA4、SALL4、週期蛋白 B1、EpCAM、DDX3X、AIF1、SOX2 和 AFP。

56. 實施方案 55 所述的方法，其中所述兩種或更多種腫瘤標誌物抗原的組由 CAGE、NY-ESO-1、MMP9、轉鐵蛋白、MAGE A4、RalA、HSPA4、SALL4、週期蛋白 B1、EpCAM、DDX3X、AIF1、SOX2 和 AFP 組成。

57. 實施方案 52 所述的方法，其中所述兩種或更多種腫瘤標誌物抗原的組包含 MMP9、AIF1、EpCAM、NY-ESO-1、HSPA4、波形蛋白、HNRNP-L 和轉鐵蛋白。

58. 實施方案 57 所述的方法，其中所述兩種或更多種腫瘤標誌物抗原的組由 MMP9、AIF1、EpCAM、NY-ESO-1、HSPA4、波形蛋白、HNRNP-L 和轉鐵蛋白組成。

59. 實施方案 52 所述的方法，其中所述兩種或更多種腫瘤標誌物抗原的組包含 AIF1、EpCAM、HSPA4 和 CPS1。

60. 實施方案 59 所述的方法，其中所述兩種或更多種腫瘤標誌物抗原的組由 AIF1、EpCAM、HSPA4 和 CPS1 組成。

61. 實施方案 59 或實施方案 60 所述的方法，其中所述物件為雌性。

62. 實施方案 52 所述的方法，其中所述兩種或更多種腫瘤標誌物抗原

的組包含 EpCAM、NY-ESO-1、波形蛋白、HSPA2、HSPA4 和 HNRNP-L。

63. 實施方案 62 所述的方法，其中所述兩種或更多種腫瘤標誌物抗原的組由 EpCAM、NY-ESO-1、波形蛋白、HSPA2、HSPA4 和 HNRNP-L 組成。

64. 實施方案 62 或實施方案 63 所述的方法，其中所述物件為雄性。

65. 實施方案 52 所述的方法，其中所述兩種或更多種腫瘤標誌物抗原的組包含 MMP9、AIF1、EpCAM、DDX3X、SALL4、MAGE A4、NY-ESO-1、CAGE、RalA 和 SOX2。

66. 實施方案 65 所述的方法，其中所述兩種或更多種腫瘤標誌物抗原的組由 MMP9、AIF1、EpCAM、DDX3X、SALL4、MAGE A4、NY-ESO-1、CAGE、RalA 和 SOX2 組成。

67. 實施方案 52 所述的方法，其中所述兩種或更多種腫瘤標誌物抗原的組包含 EpCAM、CAGE、SOX2、RalA、MAGE A4、DDX3X 和 NY-ESO-1。

68. 實施方案 67 所述的方法，其中所述兩種或更多種腫瘤標誌物抗原的組由 EpCAM、CAGE、SOX2、RalA、MAGE A4、DDX3X 和 NY-ESO-1 組成。

69. 實施方案 67 或實施方案 68 所述的方法，其中所述物件為雄性。

70. 實施方案 52 所述的方法，其中所述兩種或更多種腫瘤標誌物抗原包含 AIF1、CAGE、HSPD1、SOX2、SALL4、HSPA4 和轉鐵蛋白。

71. 實施方案 70 所述的方法，其中所述兩種或更多種腫瘤標誌物抗原的組由 AIF1、CAGE、HSPD1、SOX2、SALL4、HSPA4 和轉鐵蛋白組成。

72. 實施方案 70 或實施方案 71 所述的方法，其中所述物件為雌性。

73. 實施方案 52 所述的方法，其中所述兩種或更多種腫瘤標誌物抗原的組包含 NY-ESO-1、波形蛋白、HSPA4、轉鐵蛋白、HNRNP-L、HSPD1、HNRNP-A2、SALL4、週期蛋白 B1、AFP、NPM1、YWHAZ、DDX3X、p62、CAGE、MAGE A4、RalA、GBU4-5、SOX2、AKR1B10、ApoA1、BCL2、CD44、CK18、CPS1、FUCA1、GLUL、HSPA2、IL-8、MDM2、

PEBP1、催乳素、RGN、SPP1、SSX2 和 TGFB1。

74. 實施方案 73 所述的方法，其中所述兩種或更多種腫瘤標誌物抗原的組包含 MMP9、AIF1、EpCAM、CDKN1B、NY-ESO-1、波形蛋白、HSPA4、轉鐵蛋白、HNRNP-L、HSPD1、HNRNP-A2、SALL4、週期蛋白 B1、AFP、NPM1、YWHAZ、DDX3X、p62、CAGE、MAGE A4、RalA、GBU4-5、SOX2、AKR1B10、ApoA1、BCL2、CD44、CK18、CPS1、FUCA1、GLUL、HSPA2、IL-8、MDM2、PEBP1、催乳素、RGN、SPP1、SSX2 和 TGFB1。

75. 實施方案 74 所述的方法，其中所述兩種或更多種腫瘤標誌物抗原的組由以下組成：MMP9、AIF1、EpCAM、CDKN1B、NY-ESO-1、波形蛋白、HSPA4、轉鐵蛋白、HNRNP-L、HSPD1、HNRNP-A2、SALL4、週期蛋白 B1、AFP、NPM1、YWHAZ、DDX3X、p62、CAGE、MAGE A4、RalA、GBU4-5、SOX2、AKR1B10、ApoA1、BCL2、CD44、CK18、CPS1、FUCA1、GLUL、HSPA2、IL-8、MDM2、PEBP1、催乳素、RGN、SPP1、SSX2 和 TGFB1。

76. 實施方案 48 至 75 中任一項所述的方法，其中所述腫瘤標誌物抗原以多個不同的量提供，並且其中所述方法包括以下步驟：

- (a) 使所述受試樣品與多種不同量的所述腫瘤標誌物抗原接觸；
- (b) 確定與所述受試樣品中存在的自身抗體結合的所述腫瘤標誌物抗原的複合物的存在或不存在；
- (c) 檢測所述腫瘤標誌物抗原與所述自身抗體之間特異性結合的量；
- (d) 對於步驟(a)中使用的腫瘤標誌物抗原的每種量，繪製或計算所述特異性結合的量相對於所述腫瘤標誌物抗原量的曲線；
- (e) 基於在使用的腫瘤標誌物抗原的每種不同量下所述腫瘤標誌物抗原與所述自身抗體之間特異性結合的量來建立抗體產生譜或診斷所述物件患有肝癌；以及任選地
- (f) 向所診斷的物件施用肝癌治療。

77. 實施方案 76 所述的方法，其中基於對於使用的腫瘤標誌物抗原的

所有量的特異性結合量的集體值來確定肝癌的存在或不存在。

78. 實施方案 77 所述的方法，其中藉由針對劑量回應曲線的存在對步驟(d)的圖進行篩選來診斷所述對象患有肝癌。

79. 實施方案 78 所述的方法，其中所述劑量回應曲線是大致 S 形或 sigmoidal 曲線。

80. 實施方案 76 至 79 中任一項所述的方法，其中所述方法還包括：

(d1) 由步驟(d)中繪製或計算的所述曲線計算二次曲線參數；以及

(e) 基於以下的組合來對肝癌進行診斷：

(i) 步驟(c)中確定的所述自身抗體與所述腫瘤標誌物抗原之間特異性結合的量；和

(ii) 步驟(d1)中確定的所述二次曲線參數。

81. 實施方案 80 所述的方法，其中所述二次曲線參數選自斜率、截距、AUC、SlopeMax 和解離常數 (Kd)。

82. 實施方案 81 所述的方法，其中所述二次曲線參數由線性或對數回歸曲線計算。

83. 實施方案 80 至 82 中任一項所述的方法，其中所述二次曲線參數是最大漸近線、最小漸近線、Hill 斜率（或斜率因數）、或者針對步驟(d)中繪製或計算的每個曲線擬合的邏輯斯諦曲線的拐點。

84. 前述實施方案中任一項所述的方法，其中所述腫瘤標誌物抗原是天然蛋白質或多肽、重組蛋白或多肽、合成蛋白或多肽、合成肽、肽模擬物、多糖或核酸。

85. 實施方案 1 和 3 至 75 中任一項所述的方法，其中所述肝癌是肝細胞癌 (HCC)。

86. 前述實施方案中任一項所述的方法，其中所述體液選自血漿、血清、全血、尿、汗、淋巴、糞便、腦脊液、腹水、胸腔積液、精液、痰、乳頭抽吸液、術後血清腫、唾液、羊水、淚和傷口引流液。

87. 前述實施方案中任一項所述的方法，其中所述方法還包括檢測包含來自所述哺乳動物物件之體液的受試樣品中的甲胎蛋白（AFP）、脫- γ 羧基凝血酶原（DCP）或凝集素反應性甲胎蛋白（AFP-L3）。

88. 實施方案 87 所述的方法，其中所述方法包括檢測包含來自所述哺乳動物物件之體液的受試樣品中的甲胎蛋白（AFP）。

89. 實施方案 88 所述的方法，其中在包含來自所述哺乳動物物件之體液的受試樣品中檢測對所述腫瘤標誌物蛋白 CAGE、NY-ESO-1、MMP9、轉鐵蛋白、MAGE A4、RalA、HSPA4、SALL4、週期蛋白 B1、EpCAM、DDX3X 和 AIF1 具有免疫特異性的自身抗體。

90. 實施方案 88 所述的方法，其中在包含來自所述哺乳動物物件之體液的受試樣品中檢測對所述腫瘤標誌物蛋白 CAGE、NY-ESO-1、MMP9、轉鐵蛋白、MAGE A4、RalA、HSPA4、SALL4、週期蛋白 B1、EpCAM、DDX3X、AIF1、SOX2 和 AFP 具有免疫特異性的自身抗體。

91. 實施方案 87 至 90 所述的方法，其中所述體液是血液。

92. 選自 MMP9、AIF1、EpCAM 和 CDKN1B 的腫瘤標誌物抗原在藉由檢測包含來自哺乳動物物件之體液的受試樣品中對 MMP9、AIF1、EpCAM 或 CDKN1B 具有免疫特異性的自身抗體來在所述哺乳動物物件中檢測肝癌的方法中的用途，所述方法包括以下步驟：

(a) 使所述受試樣品與選自 MMP9、AIF1、EpCAM 和 CDKN1B 的腫瘤標誌物抗原接觸；以及

(b) 確定與所述受試樣品中存在的自身抗體結合的所述腫瘤標誌物抗原的複合物的存在或不存在，

其中所述複合物的存在指示肝癌的存在。

93. 適用於進行前述實施方案中任一項所述方法的試劑盒，其中所述試劑盒包含：

(a) 一種或更多種腫瘤標誌物抗原；和

(b) 能夠檢測與所述受試樣品中存在的自身抗體結合的所述腫瘤標誌

物抗原的複合物的試劑。

94. 用於檢測包含來自哺乳動物物件之體液的受試樣品中的自身抗體的試劑盒，其包含：

(a) 選自 MMP9、AIF1、EpCAM 和 CDKN1B 的腫瘤標誌物抗原；和

(b) 能夠檢測與所述受試樣品中存在的自身抗體結合的所述腫瘤標誌物抗原的複合物的試劑。

95. 實施方案 93 或實施方案 94 所述的試劑盒，其還包含：

(c) 用於使所述腫瘤標誌物抗原與包含來自哺乳動物物件之體液的受試樣品接觸的裝置。

96. 實施方案 95 所述的試劑盒，其中所述用於使所述腫瘤標誌物抗原與包含來自哺乳動物物件之體液的受試樣品接觸的裝置包含固定在晶片、載玻片、板、微量滴定板的孔、珠、膜或納米粒上的所述腫瘤標誌物抗原。

97. 實施方案 93 至 96 中任一項所述的試劑盒，其中所述腫瘤標誌物抗原存在於兩種或更多種腫瘤標誌物抗原的組中。

98. 實施方案 97 所述的試劑盒，其中所述組包含作為不同抗原的兩種或更多種腫瘤標誌物抗原。

99. 實施方案 97 或實施方案 98 所述的試劑盒，其中所述兩種或更多種腫瘤標誌物抗原的組包含 MMP9、AIF1、EpCAM 和 CDKN1B。

100. 實施方案 97 至 99 中任一項所述的試劑盒，其中所述兩種或更多種腫瘤標誌物抗原的組包含選自以下的一種或更多種腫瘤標誌物抗原：

NY-ESO-1、波形蛋白、HSPA4、轉鐵蛋白、HNRNP-L、HSPD1、HNRNP-A2、SALL4、週期蛋白 B1、AFP、NPM1、YWHAZ、DDX3X、p62、CAGE、MAGE A4、RalA、GBU4-5、SOX2、AKR1B10、ApoA1、BCL2、CD44、CK18、CPS1、FUCA1、GLUL、HSPA2、IL-8、MDM2、PEBP1、催乳素、RGN、SPP1、SSX2 和 TGFB1。

101. 實施方案 100 所述的試劑盒，其中所述兩種或更多種腫瘤標誌物抗原的組包含 CAGE、NY-ESO-1、MMP9、轉鐵蛋白、MAGE A4、RalA、

HSPA4、SALL4、週期蛋白 B1、EpCAM、DDX3X 和 AIF1。

102. 實施方案 101 所述的試劑盒，其中所述兩種或更多種腫瘤標誌物抗原的組由 CAGE、NY-ESO-1、MMP9、轉鐵蛋白、MAGE A4、RalA、HSPA4、SALL4、週期蛋白 B1、EpCAM、DDX3X 和 AIF1 組成。

103. 實施方案 100 所述的試劑盒，其中所述兩種或更多種腫瘤標誌物抗原的組包含 CAGE、NY-ESO-1、MMP9、轉鐵蛋白、MAGE A4、RalA、HSPA4、SALL4、週期蛋白 B1、EpCAM、DDX3X、AIF1、SOX2 和 AFP。

104. 實施方案 103 所述的試劑盒，其中所述兩種或更多種腫瘤標誌物抗原的組由 CAGE、NY-ESO-1、MMP9、轉鐵蛋白、MAGE A4、RalA、HSPA4、SALL4、週期蛋白 B1、EpCAM、DDX3X、AIF1、SOX2 和 AFP 組成。

105. 實施方案 100 所述的試劑盒，其中所述兩種或更多種腫瘤標誌物抗原的組包含 MMP9、AIF1、EpCAM、NY-ESO-1、HSPA4、波形蛋白、HNRNP-L 和轉鐵蛋白。

106. 實施方案 105 所述的試劑盒，其中所述兩種或更多種腫瘤標誌物抗原的組由 MMP9、AIF1、EpCAM、NY-ESO-1、HSPA4、波形蛋白、HNRNP-L 和轉鐵蛋白組成。

107. 實施方案 100 所述的試劑盒，其中所述兩種或更多種腫瘤標誌物抗原的組包含 AIF1、EpCAM、HSPA4 和 CPS1。

108. 實施方案 107 所述的試劑盒，其中所述兩種或更多種腫瘤標誌物抗原的組由 AIF1、EpCAM、HSPA4 和 CPS1 組成。

109. 實施方案 107 或實施方案 108 所述的試劑盒，其中所述對象為雌性。

110. 實施方案 100 所述的試劑盒，其中所述兩種或更多種腫瘤標誌物抗原的組包含 EpCAM、NY-ESO-1、波形蛋白、HSPA2、HSPA4 和 HNRNP-L。

111. 實施方案 110 所述的試劑盒，其中所述兩種或更多種腫瘤標誌物抗原的組由 EpCAM、NY-ESO-1、波形蛋白、HSPA2、HSPA4 和 HNRNP-L

組成。

112. 實施方案 110 或實施方案 111 所述的試劑盒，其中所述對象為雄性。

113. 實施方案 110 所述的試劑盒，其中所述兩種或更多種腫瘤標誌物抗原的組包含 MMP9、AIF1、EpCAM、DDX3X、SALL4、MAGE A4、NY-ESO-1、CAGE、RalA 和 SOX2。

114. 實施方案 113 所述的試劑盒，其中所述兩種或更多種腫瘤標誌物抗原的組由 MMP9、AIF1、EpCAM、DDX3X、SALL4、MAGE A4、NY-ESO-1、CAGE、RalA 和 SOX2 組成。

115. 實施方案 100 所述的試劑盒，其中所述兩種或更多種腫瘤標誌物抗原的組包含 EpCAM、CAGE、SOX2、RalA、MAGE A4、DDX3X 和 NY-ESO-1。

116. 實施方案 115 所述的試劑盒，其中所述兩種或更多種腫瘤標誌物抗原的組由 EpCAM、CAGE、SOX2、RalA、MAGE A4、DDX3X 和 NY-ESO-1 組成。

117. 實施方案 115 或實施方案 116 所述的試劑盒，其中所述對象為雄性。

118. 實施方案 100 所述的試劑盒，其中所述兩種或更多種腫瘤標誌物抗原的組包含 AIF1、CAGE、HSPD1、SOX2、SALL4、HSPA4 和轉鐵蛋白。

119. 實施方案 118 所述的試劑盒，其中所述兩種或更多種腫瘤標誌物抗原的組由 AIF1、CAGE、HSPD1、SOX2、SALL4、HSPA4 和轉鐵蛋白組成。

120. 實施方案 118 或實施方案 119 所述的試劑盒，其中所述對象為雌性。

121. 實施方案 100 所述的試劑盒，其中所述兩種或更多種腫瘤標誌物抗原的組包含 NY-ESO-1、波形蛋白、HSPA4、轉鐵蛋白、HNRNP-L、HSPD1、HNRNP-A2、SALL4、週期蛋白 B1、AFP、NPM1、YWHAZ、DDX3X、

p62、CAGE、MAGE A4、RalA、GBU4-5、SOX2、AKR1B10、ApoA1、BCL2、CD44、CK18、CPS1、FUCA1、GLUL、HSPA2、IL-8、MDM2、PEBP1、催乳素、RGN、SPP1、SSX2 和 TGFB1。

122. 實施方案 121 所述的試劑盒，其中所述兩種或更多種腫瘤標誌物抗原的組包含 MMP9、AIF1、EpCAM、CDKN1B、NY-ESO-1、波形蛋白、HSPA4、轉鐵蛋白、HNRNP-L、HSPD1、HNRNP-A2、SALL4、週期蛋白 B1、AFP、NPM1、YWHAZ、DDX3X、p62、CAGE、MAGE A4、RalA、GBU4-5、SOX2、AKR1B10、ApoA1、BCL2、CD44、CK18、CPS1、FUCA1、GLUL、HSPA2、IL-8、MDM2、PEBP1、催乳素、RGN、SPP1、SSX2 和 TGFB1。

123. 實施方案 122 所述的試劑盒，其中所述兩種或更多種腫瘤標誌物抗原的組由以下組成：MMP9、AIF1、EpCAM、CDKN1B、NY-ESO-1、波形蛋白、HSPA4、轉鐵蛋白、HNRNP-L、HSPD1、HNRNP-A2、SALL4、週期蛋白 B1、AFP、NPM1、YWHAZ、DDX3X、p62、CAGE、MAGE A4、RalA、GBU4-5、SOX2、AKR1B10、ApoA1、BCL2、CD44、CK18、CPS1、FUCA1、GLUL、HSPA2、IL-8、MDM2、PEBP1、催乳素、RGN、SPP1、SSX2 和 TGFB1。

124. 實施方案 93 至 123 中任一項所述的試劑盒，其用於檢測肝癌。

125. 實施方案 93 至 124 中任一項所述的試劑盒，其中所述體液選自血漿、血清、全血、尿、汗、淋巴、糞便、腦脊液、腹水、胸腔積液、精液、痰、乳頭抽吸液、術後血清腫、唾液、羊水、淚和傷口引流液。

【符號說明】

無。

發明摘要

※ 申請案號：

※ 申請日：

※IPC 分類：

【發明名稱】(中文/英文)

抗體測定 / ANTIBODY ASSAY

【中文】

本發明涉及藉由檢測包含來自哺乳動物物件之體液的受試樣品中的抗體來在所述哺乳動物物件中檢測肝癌的方法，其中所述抗體是對選自MMP9、AIF1、EpCAM和CDKN1B的腫瘤標誌物蛋白具有免疫特異性的自身抗體，所述方法包括：使所述受試樣品與選自MMP9、AIF1、EpCAM和CDKN1B的腫瘤標誌物抗原接觸；以及確定與所述受試樣品中存在的自身抗體結合的所述腫瘤標誌物抗原的複合物的存在或不存在，其中所述複合物的存在指示肝癌的存在。本發明中還包括在哺乳動物中診斷和治療肝癌的對應方法、預測對抗肝癌治療之響應的對應方法、檢測包含來自哺乳動物物件之體液的受試樣品中的抗體的對應方法以及適合用於進行本發明方法的試劑盒。

【英文】

The present invention relates to a method of detecting liver cancer in a mammalian subject by detecting an antibody in a test sample comprising a bodily fluid from the mammalian subject, wherein the antibody is an autoantibody immunologically specific for a tumour marker protein selected from the group consisting of MMP9, AIF1, EpCAM and CDKN1B, which method comprises contacting the test sample with a tumour marker antigen selected from the group consisting of MMP9, AIF1, EpCAM and CDKN1B and

determining the presence or absence of complexes of the tumour marker antigen bound to autoantibodies present in the test sample where the presence of said complexes is indicative of the presence of liver cancer. Also included within the invention are corresponding methods of diagnosing and treating liver cancer in a mammalian subject, corresponding methods of predicting response to an anti-liver cancer treatment, a corresponding method of detecting an antibody in a test sample comprising a bodily fluid from a mammalian subject and kits suitable for performing methods of the invention.

【代表圖】

【本案指定代表圖】：圖1A。

【本代表圖之符號簡單說明】：無。

【本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式】：

無

申請專利範圍

1. 一種藉由檢測包含來自哺乳動物物件之體液的受試樣品中的抗體來在所述哺乳動物物件中檢測肝癌的方法，其中所述抗體是對選自 MMP9、AIF1、EpCAM 和 CDKN1B 的腫瘤標誌物蛋白具有免疫特異性的自身抗體，所述方法包括以下步驟：

(a) 使所述受試樣品與選自 MMP9、AIF1、EpCAM 和 CDKN1B 的腫瘤標誌物抗原接觸；以及

(b) 確定與所述受試樣品中存在的自身抗體結合的所述腫瘤標誌物抗原的複合物的存在或不存在；

其中所述複合物的存在指示肝癌的存在。

2. 一種檢測包含來自哺乳動物物件之體液的受試樣品中的抗體的方法，其中所述抗體是對選自 MMP9、AIF1、EpCAM 和 CDKN1B 的腫瘤標誌物蛋白具有免疫特異性的自身抗體，所述方法包括以下步驟：

(a) 使所述受試樣品與選自 MMP9、AIF1、EpCAM 和 CDKN1B 的腫瘤標誌物抗原接觸；以及

(b) 確定與所述受試樣品中存在的自身抗體結合的所述腫瘤標誌物抗原的複合物的存在或不存在。

3. 如請求項 2 所述的方法，其中所述哺乳動物物件被懷疑患有肝癌。

4. 一種在包含來自哺乳動物物件之體液的受試樣品中確定患有肝癌之個體的抗體譜的體外方法，其中所述抗體是對選自 MMP9、AIF1、EpCAM 和 CDKN1B 的腫瘤標誌物蛋白具有免疫特異性的自身抗體，所述方法包括以下步驟：

a) 使所述受試樣品與選自 MMP9、AIF1、EpCAM 和 CDKN1B 的腫瘤標誌物抗原接觸；以及

b) 確定與所述受試樣品中存在的自身抗體結合的所述腫瘤標誌物抗原的複合物的存在或不存在，其中重複所述方法以建立抗體產生譜。

5. 一種藉由檢測包含來自哺乳動物物件之體液的受試樣品中的抗體來

在所述哺乳動物物件中診斷和治療肝癌的方法，其中所述抗體是對選自 MMP9、AIF1、EpCAM 和 CDKN1B 的腫瘤標誌物蛋白具有免疫特異性的自身抗體，所述方法包括以下步驟：

(a) 使所述受試樣品與選自 MMP9、AIF1、EpCAM 和 CDKN1B 的腫瘤標誌物抗原接觸；

(b) 確定與所述受試樣品中存在的自身抗體結合的所述腫瘤標誌物抗原的複合物的存在或不存在；

(c) 當檢測到與所述受試樣品中存在的自身抗體結合的所述腫瘤標誌物抗原的複合物時，診斷所述物件患有肝癌；以及

(d) 向所診斷的物件施用肝癌治療。

6. 一種預測針對抗肝癌治療之回應的方法，所述方法包括檢測包含來自哺乳動物物件之體液的受試樣品中的抗體，其中所述抗體是對選自 MMP9、AIF1、EpCAM 和 CDKN1B 的腫瘤標誌物蛋白具有免疫特異性的自身抗體，所述方法包括以下步驟：

(a) 使所述受試樣品與選自 MMP9、AIF1、EpCAM 和 CDKN1B 的腫瘤標誌物抗原接觸；

(b) 確定與所述受試樣品中存在的自身抗體結合的所述腫瘤標誌物抗原的複合物的存在或不存在；

(c) 檢測所述腫瘤標誌物抗原與所述受試樣品中存在的自身抗體之間特異性結合的量；以及

(d) 將所述腫瘤標誌物抗原與所述自身抗體之間特異性結合的量與先前確立的結合量與可能的治療結果之間的關係進行比較；

其中當與對照相比時，特異性結合的量的改變預測患者將對所述抗肝癌治療作出或不作出回應。

7. 如請求項 1 至 6 中任一項所述的方法，其中檢測兩種或更多種自身抗體，並且其中所述方法包括以下步驟：

(a) 使所述受試樣品與兩種或更多種腫瘤標誌物抗原的組接觸，所述組

包含:

(i) CAGE、NY-ESO-1、MMP9、轉鐵蛋白、MAGE A4、RalA、HSPA4、SALL4、週期蛋白 B1、EpCAM、DDX3X 和 AIF1；或者

(ii) CAGE、NY-ESO-1、MMP9、轉鐵蛋白、MAGE A4、RalA、HSPA4、SALL4、週期蛋白 B1、EpCAM、DDX3X、AIF1、SOX2 和 AFP。

8. 如前述請求項中任一項所述的方法，其中所述腫瘤標誌物抗原以多個不同的量提供，並且其中所述方法包括以下步驟：

(a) 使所述受試樣品與多種不同量的所述腫瘤標誌物抗原接觸；

(b) 確定與所述受試樣品中存在的自身抗體結合的所述腫瘤標誌物抗原的複合物的存在或不存在；

(c) 檢測所述腫瘤標誌物抗原與所述自身抗體之間特異性結合的量；

(d) 對於步驟(a)中使用的腫瘤標誌物抗原的每種量，繪製或計算所述特異性結合的量相對於所述腫瘤標誌物抗原量的曲線；

(e) 基於在使用的腫瘤標誌物抗原的每種不同量下所述腫瘤標誌物抗原與所述自身抗體之間特異性結合的量來確定所述自身抗體的存在或不存在、建立抗體產生譜、診斷所述物件患有肝癌或預測針對抗肝癌治療之回應；以及任選地

(f) 向所診斷的物件施用肝癌治療。

9. 一種選自 MMP9、AIF1、EpCAM 和 CDKN1B 的腫瘤標誌物抗原在藉由檢測包含來自哺乳動物物件之體液的受試樣品中對 MMP9、AIF1、EpCAM 或 CDKN1B 具有免疫特異性的自身抗體來在所述哺乳動物物件中檢測肝癌的方法中的用途，所述方法包括以下步驟：

(a) 使所述受試樣品與選自 MMP9、AIF1、EpCAM 和 CDKN1B 的腫瘤標誌物抗原接觸；以及

(b) 確定與所述受試樣品中存在的自身抗體結合的所述腫瘤標誌物抗原的複合物的存在或不存在，

其中所述複合物的存在指示肝癌的存在。

10. 一種用於檢測包含來自哺乳動物物件之體液的受試樣品中的自身抗體的試劑盒，其包含：

- (a) 選自 MMP9、AIF1、EpCAM 和 CDKN1B 的腫瘤標誌物抗原；和
- (b) 能夠檢測與所述受試樣品中存在的自身抗體結合的所述腫瘤標誌物抗原的複合物的試劑。

11. 如請求項 10 所述的試劑盒，其中所述腫瘤標誌物抗原存在於兩種或更多種腫瘤標誌物抗原的組中，並且其中所述兩種或更多種腫瘤標誌物抗原的組包含：

- (i) CAGE、NY-ESO-1、MMP9、轉鐵蛋白、MAGE A4、RalA、HSPA4、SALL4、週期蛋白 B1、EpCAM、DDX3X 和 AIF1；或
- (ii) CAGE、NY-ESO-1、MMP9、轉鐵蛋白、MAGE A4、RalA、HSPA4、SALL4、週期蛋白B1、EpCAM、DDX3X、AIF1、SOX2和AFP。

