



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103946241 A

(43) 申请公布日 2014. 07. 23

(21) 申请号 201280037235. 7

代理人 郑小粤

(22) 申请日 2012. 06. 01

(51) Int. Cl.

(30) 优先权数据

C07K 16/40 (2006. 01)

61/492, 210 2011. 06. 01 US

61/550, 895 2011. 10. 24 US

61/578, 813 2011. 12. 21 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2014. 01. 26

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2012/040585 2012. 06. 01

(87) PCT国际申请的公布数据

W02012/167181 EN 2012. 12. 06

(71) 申请人 吉利德生物制剂有限公司

地址 美国加利福尼亚州福斯特市

(72) 发明人 维多利亚·史密斯

乔安妮·I·阿达姆科维兹

苏珊·K·莱曼 詹森·钱 李晓明

邵立新 杰弗瑞·D·伯恩斯坦

(74) 专利代理机构 广州华进联合专利商标代理

有限公司 44224

权利要求书3页 说明书43页

序列表14页 附图26页

按照条约第19条修改的权利要求书4页

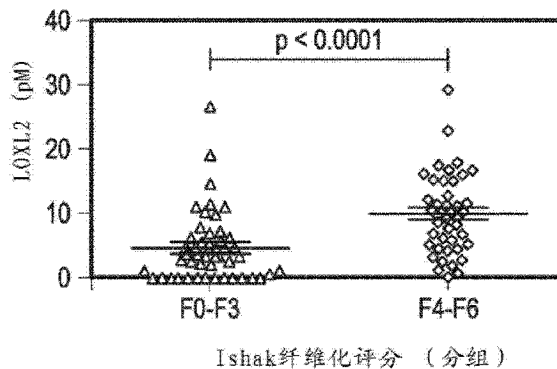
(54) 发明名称

赖氨酰氧化酶样 2 分析法及其使用方法

(57) 摘要

本发明提供了一种检测和 / 或定量个体中循环的赖氨酰氧化酶样 2 (LOXL2) 多肽的分析法。本发明还公开了该分析法能够用于诊断和预后应用。

LOXL2血清浓度vs. 纤维化评分



1. 一种检测、预测或监测疾病或病症的方法,所述方法包括:
 - a) 将从个体获得的液体样品与赖氨酰氧化酶样 2 (LOXL2) 特异性抗体接触 ;和
 - b) 检测所述抗体与液体样品中存在的 LOXL2 的结合,从而检测液体样品中 LOXL2 的水平,其中 LOXL2 的检出水平指示了所述个体中疾病或病症的存在与否或是所述个体对疾病或病症治疗产生反应的可能性。
2. 一种疾病或病症的预后方法,所述方法包括:
 - a) 将从患有所述疾病或病症的个体获得的液体样品与赖氨酰氧化酶样 2 (LOXL2) 特异性抗体接触 ;和
 - b) 检测所述抗体与液体样品中存在的 LOXL2 的结合,从而检测液体样品中的 LOXL2,其中检出的 LOXL2 水平指示了所述疾病或病症的结果、事件或终点的可能性。
3. 根据权利要求 1 或 2 所述的方法,其中:

所述个体正在进行所述疾病或病症治疗 ;和

步骤(b)中的 LOXL2 检出水平低于所述个体在较早时间点测定的水平表明了所述治疗的有效性。
4. 根据权利要求 3 所述的方法,其中在较早时间点测定的水平是治疗前水平。
5. 根据权利要求 1-4 中任一项所述的方法,其中所述液体样品是血液、血液组分、尿、唾液、痰或支气管肺泡灌洗液。
6. 根据权利要求 1-5 中任一项所述的方法,其中所述 LOXL2 特异性抗体包含可检测的标记物。
7. 根据权利要求 1-6 中任一项所述的方法,还包括将所述液体样品中存在的 LOXL2 固定在不溶性支架上,其中所述固定是通过将所述液体样品与 LOXL2 特异性第二抗体接触以形成第二抗体-LOXL2 复合物来进行的,其中所述第二抗体被固定在所述不溶性支架上。
8. 根据权利要求 7 所述的方法,其中所述固定在步骤(a)之前进行。
9. 根据权利要求 1-8 中任一项所述的方法,其中当 LOXL2 与抑制 LOXL2 酶活性的药剂结合时,步骤(a)中的抗体能够与 LOXL2 结合。
10. 根据权利要求 9 所述的方法,其中所述药剂是 LOXL2 酶活性的别构抑制剂。
11. 根据权利要求 10 所述的方法,其中所述别构抑制剂是抗 LOXL2 单克隆抗体。
12. 根据权利要求 11 所述的方法,其中所述抗 LOXL2 单克隆抗体与 LOXL2 的 SRCR3-4 结构域内的表位结合。
13. 根据权利要求 1-12 中任一项所述的方法,还包括:
 - c) 比较所述检出水平和正常对照值,其中高于正常对照值的检出水平是所述疾病或病症存在与否或是所述个体是否将对所述疾病或病症的治疗产生反应的可能性的指征。
14. 根据权利要求 1-13 中任一项所述的方法,其中所述疾病或病症是纤维化疾病或癌症。
15. 根据权利要求 14 所述的方法,其中所述疾病或病症是纤维化疾病且 LOXL2 循环水平高于正常对照值表明所述个体可能对所述纤维化疾病的治疗显示出有利的临床反应。
16. 根据权利要求 14 或 15 所述的方法,其中所述疾病或病症是肺纤维化、肝纤维化、肾纤维化、心肌纤维化或骨髓纤维化、肝硬化、慢性病毒性肝炎、丙型肝炎病毒(HCV)或乙型肝炎

炎病毒(HBV)。

17. 根据权利要求 16 所述的方法,其中所述疾病或病症是特发性肺纤维化(IPF)。

18. 根据权利要求 17 所述的方法,其中检出水平表明了所述个体中 IPF 疾病结果、终点或事件的可能性。

19. 根据权利要求 18 所述的方法,其中所述 IPF 疾病结果、终点或事件是 IPF 疾病发展、肺功能下降、呼吸系统住院治疗、移植后生存、死亡或对治疗的反应性。

20. 根据权利要求 17-19 中任一项所述的方法,还包括检测所述个体中 IPF 疾病严重程度或功能状态的指标,所述指标选自预测的用力肺活量(FVC)的百分比、预测的一氧化碳弥散量(DL_{CO})的百分比、6 分钟步行距离(6MWD)、平均肺动脉压(mPAP)、最低休息血氧饱和度(SpO₂)、复合生理指标(CPI)、圣乔治呼吸问卷评分(SGRQ)、过渡性呼吸困难指数(TDI)评分、对治疗的反应性以及 IPF 疾病的生物标志物组成的组中。

21. 根据权利要求 1-20 中任一项所述的方法,还包括使用预测模型分析 LOXL2 水平。

22. 根据权利要求 1-21 中任一项所述的方法,还包括开始、改变或中断对所述个体进行的所述疾病或病症的治疗。

23. 根据权利要求 1-22 中任一项所述的方法,还包括对所述个体进行一项或多项其他诊断试验。

24. 根据权利要求 23 所述的方法,其中所述一项或多项其他诊断试验是肺功能检查或肝功能检查。

25. 根据权利要求 1-24 中任一项所述的方法,其中所述检出水平表明了所述个体患有活动性纤维化疾病或晚期纤维化疾病。

26. 根据权利要求 25 所述的方法,其中所述活动性纤维化疾病是 METAVIR F1 或 F2 肝纤维化,或所述晚期纤维化疾病是 METAVIR F4 肝纤维化。

27. 一种用于检测从个体获得的液体生物样品中赖氨酰氧化酶样 2 (LOXL2) 多肽水平的分析装置,所述装置包括:界定了轴向流路的基质,所述基质包含:

i) 位于接收液体样品的流路上游末端的样品接收区;

ii) 位于所述流路内且在所述样品接收区下游的一个或多个检测区,每个所述一个或多个检测区中均包含 LOXL2 特异性抗体,其中每个所述 LOXL2 特异性抗体均能够与液体样品中存在的 LOXL2 多肽结合以形成抗 LOXL2/LOXL2 复合物;和

iii) 位于所述流路内部且在所述样品接收区下游的一个或多个对照区。

28. 根据权利要求 27 所述的分析装置,其中当所述一个或多个检测区包含至少两个检测区时,所述一个或多个对照区中至少一个位于两个检测区之间。

29. 根据权利要求 28 所述的分析装置,其中所述至少两个检测区和至少一个对照区以交替形式位于所述流路内,由位于任意对照区上游的检测区开始。

30. 根据权利要求 28 或 29 所述的分析装置,其中一个或多个所述抗 LOXL2 抗体被固定在所述检测区的基质上。

31. 根据权利要求 27-30 中任一项所述的分析装置,还包括标记物区,所述标记物区包含特异于 LOXL2 特异性抗体的标记抗体,其中:

所述标记抗体能够与抗 LOXL2 抗体 /LOXL2 复合物中存在的抗 LOXL2 抗体结合,以形成标记的抗 LOXL2 抗体 /LOXL2,且

所述标记抗体在存在液体样品时是可活动的。

32. 根据权利要求 31 所述的分析装置,其中所述标记抗体包含标记成分,所述标记成分选自化学发光试剂、微粒标记物、比色剂、能量转移试剂、酶、荧光试剂和放射性同位素组成的组。

33. 根据权利要求 27-32 中任一项所述的分析装置,其中所述基质位于外壳内,所述外壳包括支架和可选的封盖,其中所述外壳含有施用孔和一个或多个观察口。

34. 根据权利要求 28-33 中任一项所述的分析装置,其中所述装置是试纸条。

35. 根据权利要求 28-34 中任一项所述的分析装置,其中所述装置是浸渍片分析装置。

36. 一种测定从个体获得的生物样品中的赖氨酰氧化酶样 2 (LOXL2) 多肽水平的试剂盒,所述试剂盒包含:

a) LOXL2 特异性的第一抗体;和

b) LOXL2 特异性的第二抗体。

37. 根据权利要求 36 所述的试剂盒,还包含用于生成标准曲线的纯化 LOXL2。

38. 根据权利要求 36 或 37 所述的试剂盒,其中至少一个所述抗体包含可检测的标记物。

39. 根据权利要求 38 的所述试剂盒,其中所述可检测的标记物包含化学发光试剂、微粒标记物、比色剂、能量转移试剂、酶、荧光试剂和放射性同位素。

40. 根据权利要求 1-26 中任一项所述的方法,其中所述接触和检测是使用权利要求 27-35 中任一项所述的分析装置或权利要求 36-39 中任一项所述的试剂盒进行的。

赖氨酰氧化酶样 2 分析法及其使用方法

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求 2011 年 6 月 1 日提交的美国临时申请 No. 61/492, 210、2011 年 10 月 24 日提交的美国临时申请 No. 61/550, 895 和 2011 年 12 月 21 日提交的美国临时申请 No. 61/578, 813 的权益, 这些申请的全部内容出于所有目的通过引用合并入本申请中。

[0003] 通过 EFS-WEB 提交的序列列表的引用

[0004] 根据 MPEP § 1730II. B. 2(a) (C) 中所授权并规定, 通过 USPTO EFS-WEB 服务器电子提交的序列列表的全部内容, 在此出于所有目的通过引用合并入本申请中。在电子提交的文本文件中所鉴别的序列列表如下:

[0005]

文件名称	创建日期	容量(字节)
246102008340Seqlist.txt	2012 年 6 月 1 日	25, 654 字节

背景技术

[0006] 赖氨酰氧化酶样 2 (LOXL2) 是一种细胞外基质蛋白。在健康成人组织中很少见到细胞外 LOXL2, 但在多种纤维化疾病和肿瘤中可诱导其表达。LOXL2 由活化的成纤维细胞、疾病相关的平滑肌细胞、内皮细胞和上皮细胞分泌。

发明内容

[0007] 本发明涉及赖氨酰氧化酶样 2 (LOXL2) (例如 LOXL2 多肽) 的检测及其在诊断、预后和预测方法中的用途。例如, 本发明提供了检测和 / 或定量 LOXL2 的分析法, 例如检测和 / 或定量个体中循环的赖氨酰氧化酶样 2 (LOXL2) 多肽的分析法。本发明还提供了在诊断、预后和预测应用中这些分析法的方法和用途, 以及用于其中的分析装置和试剂盒。

[0008] 本发明提供了在个体中检测 LOXL2, 特别是循环的 LOXL2 的方法。提供的方法是检测、诊断、预测、监测和预后方法。在一些实施例中, 所述方法通过将个体获得的样品 (通常是液体样品) 与 LOXL2 特异性抗体接触, 并检测抗体与样品中存在的多肽例如 LOXL2 多肽的结合来进行。在一些实施例中, 此分析法可检测液体样品中的 LOXL2 至 300、250、200、175pg/mL 或更低, 或是检测样品中浓度低至 300、250、200、175pg/mL 的 LOXL2, 例如低至自大约 150pg/mL 至大约 175pg/mL, 自大约 125pg/mL 至大约 150pg/mL, 至大约 100pg/mL 至大约 125pg/mL, 自大约 75pg/mL 至大约 100pg/mL, 自大约 50pg/mL 至大约 75pg/mL, 或是自大约 40pg/mL 至大约 50pg/mL。

[0009] 在一些实施例中, 检测到的 LOXL2 水平显示了疾病或病症的存在与否。在一些实施例中, 它显示了个体对该疾病的特殊治疗产生反应的可能性, 或是显示了某种疗法的有效性。在一些实施例中, 例如其中所述方法是预后方法时, 所述检测到的 LOXL2 水平显示了该疾病或病症的结果、事件或终点的

[0010] 可能性。在一些方面, 循环 LOXL2 或升高的循环 LOXL2 是该疾病或病症的特征或

与其相关。在一些方面,个体患有该疾病或病症,在一些方面,个体疑似患有该疾病或病症。在一些方面,所述方法还包括确定个体是否具有该疾病或病症,是否可能对特殊疗法产生反应,或是是否可能具有特殊结果或事件,或是某种疗法是否有效。

[0011] 在一些实施例中,个体进行了对该疾病或病症的治疗,并且检测到的 LOXL2 水平低于较早时间点时测得的水平,例如治疗前水平,显示了该疗法的有效性。

[0012] 样品通常是液体样品,如血液、血液组分,例如血清或血浆、尿液、唾液、痰或是支气管肺泡灌洗液。

[0013] 在一些实施例中,抗体包括可检出的标记物;标记物范例包括化学发光试剂、微粒标记物、比色剂、能量转移试剂、酶、荧光试剂和放射性同位素。在一些实施例中,通过将液体样品与 LOXL2 特异性第二抗体接触以形成第二抗体-LOXL2 复合物来将存在于样品中的 LOXL2 固定在不可溶的支持物上。在一个实施例中,第二抗体是固定在不可溶的支持物上的。在另一个实施例中,样品与抗体接触之前形成第二抗体-LOXL2 复合物。所述固定的抗体可以是多克隆抗体或是单克隆抗体。在一些实施例中,当 LOXL2 结合在抑制 LOXL2 酶活性的试剂例如 LOXL2 酶活性的别构抑制剂上时,抗体例如抗 LOXL2 单克隆抗体与 LOXL2 结合,如与 SRCR3-4 结构域内的表位结合。

[0014] 在本文提供的方法和实施方案中使用的抗 LOXL2 抗体的范例包括,例如 AB0023、AB0024、具有 SEQ ID NO:6、8、10、11 或 12 中规定的氨基酸序列,或是与 SEQ ID NO:6、8、10、11 或 12 具有 75% 或更高、80% 或更高、90% 或更高、95% 或更高或是 99% 或更高同源性的氨基酸序列,或是具有 SEQ ID NO:6、8、10、11 或 12 中规定的可变区序列的 CDR1、CDR2 和 / 或 CDR3 的重链可变区,和 / 或具有 SEQ ID NO:7、9、13 或 14 中规定的氨基酸序列,或与 SEQ ID NO:7 具有 75% 或更高、80% 或更高、90% 或更高、95% 或更高或是 99% 或更高同源性的氨基酸序列,或是具有 SEQ ID NO:7、9、13 或 14 中规定的可变区序列的 CDR1、CDR2 和 / 或 CDR3 的可变轻链区,例如抗体具有 CDR1、CDR2 和 / 或 CDR3 或 SEQ ID NO:8 中规定的可变区序列的整个序列的重链和具有 CDR1、CDR2 和 / 或 CDR3 或 SEQ ID NO:9 中规定的可变区序列的整个序列的轻链可变区。

[0015] 在一些实施例中,此方法还包括对检测水平与正常对照值进行比较,其中检测水平高于正常对照值表明该疾病或病症的存在时,个体对该疾病或病症的治疗产生反应的可能性,或是病理结果的可能。例如,在一些实施例中,此方法检测到病理水平的循环 LOXL2。这些方法可包括对检测水平和正常对照值或其他参考值进行比较,其中检测水平高于正常对照值或参考值时表明存在病理状态。

[0016] 本发明还提供了测定个体是否患有以升高的循环赖氨酰氧化酶样 -2 (LOXL2) 为特征或与其有关的疾病或病症,诊断这些疾病或病症,或是对这些疾病或病症进行预测或预后判定的方法。在实例中,这些方法可通过检测来自个体的样品例如液体样品的 LOXL2 水平来进行,例如,根据本文提供的分析法和方法,如上述方法来进行。通常来说,高于正常对照水平、参考水平,或是在某些案例中超过基线的 LOXL2 水平表明该个体患有以升高的循环 LOXL2 为特征的疾病,或是表明此疾病或病症的预后或预测信息,例如预测了特殊结果的可能性或是该个体对特殊的疾病疗法产生反应的可能性。

[0017] 在所提供方法的一些方面,该疾病或病症是纤维化或癌症或是与其相关的疾病。实例包括肺纤维化(例如特发性肺纤维化(IPF))、肝纤维化、肾纤维化、心肌纤维化、骨髓纤

维化、肝硬化、慢性病毒性肝炎、丙型肝炎病毒(HCV)或乙型肝炎病毒(HBV)。在一些方面,该疾病或病症是特发性肺纤维化(IPF)。

[0018] 所述方法还可进一步包括对个体进行一种或多种诊断检查,这些检查可包括肺功能检查、心肌功能检查和肝功能检查。

[0019] 本发明还提供了用于确定患有纤维化疾病的个体是否对某种纤维化疾病疗法具有有益的临床反应的方法。这些方法可包括例如通过上述方法确定来自该个体获得的液体样品中赖氨酰氧化酶样-2(LOXL2)的循环水平。一方面,高于正常对照水平的LOXL2循环水平表明该个体对该纤维化疾病的某种疗法具有有益临床反应的可能性更大。在一些实施例中,基于测得的可能性生成报告。在一些实施例中,所述方法还包括对这些个体的纤维化疾病进行治疗。在一些实施例中,该个体患有活动期纤维化疾病,例如METAVIR F1或F2肝纤维化,和/或晚期纤维化疾病,例如METAVIR F4肝纤维化。

[0020] 本发明还提供了用于测定个体中以升高的赖氨酰氧化酶样-2(LOXL2)为特征的疾病的治疗有效性的方法。在一些实施例中,这些方法可通过在某个时间点以上述和此处所述检测方法测定正在进行该疾病治疗的个体中LOXL2的循环水平来进行。通常来说,从个体获得的样品中LOXL2循环水平低于较早时间点得到的水平例如治疗前水平,表明了该治疗的有效性。或者,样品中LOXL2的循环水平可在身体清除后最初出现增加。

[0021] 本发明提供的方法还包括特发性肺纤维化(IPF)的预测和预后方法。在一些实施例中,这些方法通过从个体得到样品,然后检测样品中的LOXL2水平来进行,例如使用此处描述的方法。一般来说,LOXL2水平显示了个体中IPF疾病结果或事件的可能性。

[0022] 本发明提供的这些方法和其他方法还可包括对LOXL2检测水平和正常对照水平进行比较的步骤,其中与正常对照水平比较LOXL2水平升高时表明个体中出现IPF疾病结果或事件的可能性增加。在一些所提供方法的实施方案中,高于基线水平阈值的LOXL2水平与患者中的阴性结果或死亡相关。在一个实施例中,样品中的LOXL2水平阈值是最低每毫升(mL)800皮克(pg)、最低600pg/mL、最低400pg/mL或最低200pg/mL。在另一个实施例中,样品中的LOXL2水平阈值是最低440pg/mL。在一个实施例中,该方法表明LOXL2水平与正常对照LOXL2水平或基线相当的受试者相比,个体中出现IPF疾病结果的可能性增加了至少2倍、3倍、4倍、5倍、6倍或7倍。

[0023] 其中IPF疾病结果和事件是IPF疾病进程(例如规定为任何原因引起的死亡、呼吸系统住院治疗或是肺功能降低)、肺功能下降、呼吸系统住院治疗、移植生存率、死亡和对治疗的反应。在一些实例中,这些方法预测了个体中与IPF相关的结果、事件、或终点、或是它们的可能性。在一些实例中,这些方法预测了个体中的结果、终点或是它们的可能性,其中个体通过另一种方法或分析法,例如根据个人临床和分子死亡指数(PCMI)或一种或多种其他生物标志物例如MMP7、ICAM1、IL8、VCAM1和S100A12的水平,被认为这些结果、终点或可能性为“阴性”(或这些其他方法或分析法无法检出这些标志物,或是无法检测结果、事件或它们的可能性)。

[0024] 预测或预后IPF方法还可包括在个体中检测IPF疾病严重程度或功能状态的指标,指标选自由预测的用力肺活量(FVC)的百分比、预测的一氧化碳弥散量(DL_{CO})的百分比、6分钟步行距离(6MWD)、平均肺动脉压(mPAP)、最低休息血氧饱和度(SpO₂)、复合生理指标(CPI)、圣乔治呼吸问卷评分(SGRQ)、过渡性呼吸困难指数(TDI)评分、对治疗的反应

性以及 IPF 疾病的生物标志物组成的组中。在一些实施例中,所述方法还包括使用预测模型分析 LOXL2 水平和 / 或疾病严重程度或功能状态的指标。

[0025] 本发明还提供了监测个体对 IPF 治疗的反应或测定个体对治疗产生反应的可能性的方法。在一个实施例中,所述方法通过从正进行 IPF 治疗的个体中得到样品,并且检测该样品中 LOXL2 的水平来进行。通常来说,LOXL2 水平显示了个体对治疗的反应性或个体对治疗产生反应的可能性。

[0026] 在一些实施例中,所述方法还包括在个体中开始、改变或中断 IPF 治疗。在一些实施例中,根据这些方法测得的信息例如 LOXL2 水平或相对水平或是预后或预测信息,开始、改变或中断治疗。在一些实施例中,自测得 LOXL2 水平之间即开始治疗。

[0027] 本发明还提供了在所提供方法中使用的分析装置和试剂盒,例如从个体获得的液体生物样品中测定赖氨酰氧化酶样 2(LOXL2)多肽水平中使用。在一个实施方案中,这种装置包括界定了轴向流路的基质,该基质包括 i) 在接收液体样品的流路上游末端的样品接收区,ii) 位于流路内部和样品接收区下游的一个或多个检测区,所述一个或多个检测区中均包含 LOXL-2 特异性抗体,其中每个 LOXL-2 特异性抗体均能够与液体样品中存在的 LOXL2 多肽结合以形成抗 LOXL2 抗体 /LOXL2 复合物;和 iii) 位于流路内部和样品接收区下游的一个或多个对照区。

[0028] 当存在两个检测区时,所述一个或多个对照区可位于检测区之间。检测区和对照区可以交替形式位于流路起点内,由位于任何对照区上游的检测区开始。在一个实施例中,一个或多个抗 LOXL2 抗体固定在检测区的基质上。

[0029] 在一些实施例中,该装置还包括标记物区,该标记物区包括一个特异于 LOXL2 特异性抗体的标记抗体。一般来说,这个标记抗体能够与抗 LOXL2 抗体 /LOXL2 复合物中存在的抗 LOXL2 抗体结合,以形成标记的抗 LOXL2 抗体 /LOXL2,并且这一标记的抗体在存在液体样品时是可活动的。这一标记抗体可包括选自化学发光试剂、微粒标记物、比色剂、能量转移试剂、酶、荧光试剂和放射性同位素的标记成分。

[0030] 在一些装置的实施例中,该基质位于包含支架且可选包含盖子的壳体内部,其中该壳体含有施用孔(application aperture)和一个或多个观察口。其中所提供的装置是试纸条和浸渍片(dipstick)分析装置。

[0031] 其中所提供的从个体获得的生物样品中测定赖氨酰氧化酶样 2(LOXL2)多肽水平的试剂盒包括特异于 LOXL2 的第一抗体和特异于 LOXL2 的第二抗体。该试剂盒还可包括用于生成标准曲线的纯化 LOXL2。在一个实施例中,试剂盒中至少有一种抗体包括可检测的标记物,例如化学发光试剂、微粒标记物、比色剂、能量转移试剂、酶、荧光试剂和放射性同位素。

[0032] 附图简述

[0033] 图 1 描述了 87 名慢性丙型肝炎病毒(HCV)感染患者的 LOXL2 血清浓度与 Ishak 纤维化评分。

[0034] 图 2 描述了确诊肝纤维化患者的血清样品中的 LOXL2 水平(pg/ml)。

[0035] 图 3 描述了特发性肺纤维化患者的血清样品中的 LOXL2 水平。

[0036] 图 4 提供了人 LOXL2 的氨基酸序列(SEQ ID NO:1)。

[0037] 图 5 显示了来源于人(H)(SEQ ID NO:2)、小鼠(M)(SEQ ID NO:3)、大鼠(R)(SEQ

ID NO:4) 和猕猴(C) (SEQ ID NO:5) 的 LOXL2 蛋白催化域的氨基酸序列的排列。小鼠、大鼠和猕猴蛋白质的残基,与人蛋白质的残基不同,由下划线指出。

[0038] 图 6 显示了通过对慢性 HCV 感染患者的肝组织进行免疫组织化学(IHC)染色而测得的人纤维化肝组织中 LOXL2 的表达。在左图中(5x 物镜放大倍数),黑色箭头指示了扩张至肝门区和门管区的纤维化区域。白色箭头指示了肝小叶周围的短纤维分隔的区域。右图(40x 物镜倍数)显示了在与肝细胞交界面(H)的纤维间隔(S)、窦周隙之内(箭头)和肝实质内的肌成纤维细胞之中(箭头)的 LOXL2 的免疫反应性。

[0039] 图 7 显示了 LOXL2 免疫分析的标准校正曲线,y-轴为原始 ECL (电化学发光)计数而 x-轴为 LOXL2 浓度(nM/L)。将纯化的重组全长 LOXL2 蛋白加入混合的正常人血清中,随后用血清连续稀释以绘制校正曲线。每个数据点代表三个重复孔的平均值;显示了四个独立平板的曲线。

[0040] 图 8 显示了基于分组基线 Ishak 纤维化评分和时间的 LOXL2 血清水平。每张图中的所示时间点显示了两组受试者的 LOXL2 浓度(pg/mL),其中分组依据是 Ishak 纤维化评分(分别是 1-3 和 5-6)。三个 LOXL2 浓度超出曲线范围的异常值(LOXL2 浓度 =5529,6621,8845pg/mL)均来源于同一名患者,其 Ishak 纤维化评分为 5。

[0041] 图 9 显示了受试者内 LOXL2 血清的中值水平,计算为第 4 周至第 30 周两组患者的 LOXL2 血清的中值浓度,其中分组依据是 Ishak 纤维化评分(分别是 1-3 和 5-6)。患者内平均变异系数是 22%。

[0042] 图 10 显示了 95% 置信区间内基于分组基线 Ishak 纤维化评分的随时间变化的 LOXL2 血清的中值浓度(pg/mL)。在第 25-28 周的活检研究中仅一名患者的 Ishak 纤维化评分变化大于或等于 2。

[0043] 图 11 显示了受试者内 LOXL2 的中值水平与透明质酸(HA)水平(左图)以及与金属蛋白酶-1 (TIMP1)组织抑制剂(右图)之间的关系,其中受试者具有所示 Ishak 评分(1-6)。表达的受试者内中值计算为第 4 周至第 30 周中表达的中值。此曲线使用局部加权平滑散点图进行绘制。

[0044] 图 12 显示了表明基线 LOXL2 水平(图(a)中是未转换的 LOXL2 水平而图(b)中是 $\log_{10}X$ 转换的 LOXL2 水平)与如实施例 9 中描述的特发性肺纤维化(IPF)严重程度和功能状态的基线指标之间相关性的散点图模型。在每张图中,第一行和第一列的 x-轴和 y-轴分别代表了基线 LOXL2 水平;第二行和第二列的 x-轴和 y-轴分别代表了预测的用力肺活量(FVC)基线;第三行和第三列的 x-轴和 y-轴分别代表了预测的一氧化碳弥散量(DL_{CO})百分比基线;第四行和第四列的 x-轴和 y-轴分别代表了 6 分钟步行距离(6MWD)的基线;第五行和第五列的 x-轴和 y-轴分别代表了复合生理功能(CPI)的基线;第六行和第六列的 x-轴和 y-轴分别代表了圣乔治呼吸问卷评分的基线;第七行和第七列的 x-轴和 y-轴分别代表了过渡性呼吸困难指数评分的基线。LOXL2 与 IPF 严重程度和表现状态的基线指标之间的相关性在图(a)和图(b)第一行的黑框中突出显示。

[0045] 图 13 显示了 Kaplan Meier 曲线,比较了疾病进程(PFS) (图(a))及其组成(肺功能下降(图(b))、呼吸系统住院治疗(图(c)) and 死亡(图(d)))的低(≤ 800 pg/mL)和高(>800 pg/mL) LOXL2 水平。在每张图中,顶部颜色较深的线代表了具有低(≤ 800 pg/mL)基线血清 LOXL2 水平的患者,颜色较浅的线代表具有高(>800 pg/mL)基线 LOXL2 水平的患者。

使用安贝生坦治疗所有患者。每个 y-轴显示了没有给定事件的患者百分比(轴上标记了 0、25、50、75 和 100),每个 x-轴显示了以日为单位的时间(轴上标记了 0、100、200、300、400、500、600、700 和 800 日)。

[0046] 图 14 显示了 ARTEMIS-IPF 患者(14A:合并的对照和安贝生坦治疗患者;14B:仅安贝生坦治疗患者)和 GAP 组患者中基线 LOXL2 分布的比较。

[0047] 图 15A 显示了全死因(all-cause mortality)的 Kaplan Meier 曲线,绘图依据是 GAP 组研究的基线之后 6 个月(左上图)、12 个月(右上图)、18 个月(左下图)和 24 个月(右下图)时的低(上线, $\leq 440\text{pg/mL}$)血清 LOXL2 水平比高(下线, $>440\text{pg/mL}$)血清 LOXL2 水平。图 15B 显示了所有原因致死的 Kaplan Meier 曲线,绘图依据是 ARTEMIS-IPF 研究的基线之后 6 个月(左上图)、12 个月(右上图)、18 个月(左下图)和 24 个月(右下图)时的低(上线, $\leq 800\text{pg/mL}$)血清 LOXL2 水平比高(下线, $>800\text{pg/mL}$)血清 LOXL2 水平。

[0048] 图 16 显示了不同患者组的平均血清 LOXL2 水平(pg/mL)。图 16A 显示了基线和第 240 周样品(总计 162 个样品,81 名患者每名一个基线样品和一个第 240 周样品)的平均血清 LOXL2 水平,分组依据是相应患者的 Ishak 纤维化评分(左至右为 0、1、2、3、4、5、6)。LOQ=定量水平。图 16B 显示了具有给定 Ishak 阶段患者(左至右为 0、1、2、3、4、5、6)的基线和第 240 周平均血清 LOXL2 水平。图 16C 显示了 Ishak 阶段在 1 至 3 之间和 4 至 6 之间相应患者的基线、第 240 周和总血清 LOXL2 水平。

[0049] 图 17 显示了研究中每个给定 Ishak 阶段患者的百分比(1、2、3、4、5、6(左至右为个体棒图)),这是根据具有的给定血清 LOXL2 水平(pg/mL)来确定的。LOD=检测限;LOQ=定量限。显示的每个类别自前一类上限延伸得到,例如,1500=1001-1500 pg/mL 。

[0050] 图 18 显示了个体 CHB 患者治疗后基线和第 240 周的血清 LOXL2 水平(pg/mL)。图 18A:肝硬化持续的患者($n=16$);图 18B:第 240 周时肝硬化逆转的患者($n=42$);图 18C:第 240 周时纤维化阶段(Ishak)没有出现变化的非肝硬化患者;图 18D:在研究过程中出现肝硬化发展的患者;和图 18E:纤维化(Ishak 评分)下降超过或等于 2 个阶段的非肝硬化患者。LOQ(定量限)=440 pg/mL , LOD(检测限)=180 pg/mL 。

[0051] 图 19 显示了第 240 周时具有基线血清 LOXL2 水平(<1500 、 >1500 、1500-3000、 <3000 和 $>3000\text{pg/mL}$)表现出组织学改善(“Y”)的肝硬化 CHB 患者的百分比以及第 240 周时具有相同给定基线血清 LOXL2 水平没有组织学改善(“N”)的肝硬化患者的百分比。

[0052] 定义

[0053] 如本文使用的术语“抗体”是指包含必需可变区序列以与抗原表位特异性结合的分离或重组结合试剂。因此,抗体是具有预期生理活性例如与特异靶抗原结合的任何形式的抗体或其片段。因此,使用其最广泛的意义,特别是包括单克隆抗体(包括全长单克隆抗体)、多克隆抗体、人抗体、人源化抗体、嵌合抗体、纳米抗体、双体、多特异性抗体(例如双特异性抗体)和包括但不限于 scFv、Fab 和 Fab_2 的抗体片段,只要其显示出预期的生物活性。因此术语“人抗体”是指含有除可能的非人类互补决定区(CDR)外的人源序列的抗体,并且不意味着存在 Ig 分子全长结构,仅需抗体具有最低人免疫原作用。

[0054] “抗体片段”包括完整抗体的一部分,例如完整抗体的抗原结合或可变区。抗体片段的实例包括 Fab、Fab'、 $\text{F(ab}')_2$ 和 Fv 片段;双体;线性抗体(Zapata 等人, Protein Eng. 8(10):1057-1062(1995));单链抗体分子;和由抗体片段形成的多特异性抗体。木瓜蛋

白酶消化抗体可生成两个相同的抗原结合片段,称为“Fab”片段,每个片段具有一个单独的抗原结合位点,和一个残余的“Fc”片段,其名称反映了它易于结晶的能力。木瓜蛋白酶处理得到一个具有两个抗原结合位点且仍能交联抗原的 $F(ab')_2$ 片段。

[0055] “Fv”是含有完整抗原识别和抗原结合位点的抗体片段,包括由一个重链可变区和一个轻链可变区非共价紧密结合形成的二聚体。在此构象中每个可变区的三个CDRs相互作用以在 V_H-V_L 二聚体的表面限定一个抗原结合位点。总体来说,六个CDRs赋予了对抗体的抗原结合特异性。但是,即使是单个可变区(或仅含有三个抗原特异性CDRs的半个Fv)也能够识别和结合抗原,尽管亲合力低于整个结合位点。

[0056] “Fab”片段还包含轻链的恒定区和重量的第一恒定区(CH_1)。Fab片段与Fab'片段不同,前者在重链 CH_1 区的羧基末端增加了几个残基,包括一个或多个来源于抗体铰链区的半胱氨酸。Fab'-SH在此是恒定区具有游离巯基的半胱氨酸的Fab'的命名。 $F(ab')_2$ 抗体片段最初是作为Fab'片段对生成的,它们之间具有铰链半胱氨酸。此外还已知抗体片段的其他化学偶联。

[0057] 如本文所用的术语“生物样品”是指从个体获得且可用于检测、诊断、预后或监测分析的多种样品类型。液体生物样品可包括例如血液、血液组分(例如血清或血浆)、尿液、唾液、支气管肺泡灌洗液、痰或脑脊髓液。此定义还包括上述样品获得后以任何方式处理的样品,例如通过试剂处理、溶解或某些成分例如蛋白质富集。

[0058] 如本文所用的“轴向流动”是指横向、纵向或贯向流动穿过包含一个或多个检测和/或对照区的特殊基质或材料。预期在特殊装置、分析或方法中流动的类型可根据装置结构而改变。不需受到理论的束缚,横向、纵向或贯向流动可涉及液体样品自液体与特殊基质的一端或一侧接触的点(上游或近侧末端)至此接触下游(或远侧)区域的流动。下游区域可以是自液体接触点起基质的相同侧或相反侧。例如,在本发明某个实施方案的垂直流动装置中,轴向流动可自第一个部分垂直穿过(顶部至底部)至第二个部分并从该处起至吸收介质。通过其他实施例以及本领域技术人员将理解的是,在一个配置的垂直流动装置例如浸渍片的装置中,液体样品可确实向装置上流动,但在这种情况下液体样品与装置的第一接触点仍是上游(即近侧)末端,而流动结束点仍是下游(即远侧)末端。

[0059] 在轴向流动背景下如本文所用的术语“上游”和“下游”是指液体样品流动随后液体样品接触本发明的典型装置的方向,其中,在正常操作条件下,液体样品流动方向是自上游位置至下游位置。例如,液体样品最初与样品接收区接触,然后液体样品向下游流动穿过标记物区等等。

[0060] 在本发明的实施方案进一步描述之前,需要理解的是本发明不限于所述的特殊实施方案,因为它们可能有所改变。还需理解的是本文所用的术语其目的仅在于描述特殊的实施方案,而不是对其进行限制。

[0061] 当提供数值范围时,应当理解包括该范围上限和下限之间的每个中间值(除非文中另有明确规定否则至下限单位的十分之一)以及该指定范围中任何其他指定值或中间值。这些较小范围的上限和下限可能独立地包括在较小范围中,也可均包括,取决于指定范围中的任何特定排除限度。当指定范围包括一个或两个限度时,排除了一个或两个这些列入限度的范围也包括在内。

[0062] 除非另有规定,否则本文所用的所有技术和科学术语具有与本发明所属领域普通

技术人员通常理解相同的意义。尽管与本文描述相似或相同的方法或材料也可在本发明实施方案的实践或检测中使用,但在此描述了优选的方法和材料。本文提及的所有出版物通过引用并入此处以公开和描述于引用出版物相关的方法和 / 或材料。

[0063] 应当注意的是在本文和所附权利要求中使用时,除非上下文中另有明确规定,否则单数形式的“一个(a和an)”和“这个(the)”包括复数的指代对象。因此,例如提及“一个 LOXL2 特异性抗体”时包括复数的该抗体,提及“该 LOXL2 多肽”包括涉及一个或多个 LOXL2 多肽以及本领域技术人员已知的多肽当量等等。还应注意的是权利要求可能撰写为排除了任何可选元素。同样地,这种说法预计是作为使用这些与权利要求元素详述相关的独家术语“仅(solely)”、“只(only)”等或是使用“否定”限制的前提基础。

[0064] 可以理解本发明的某些特征,为清楚起见在单独实施方案的上下文中描述,也可在单个实施方案中组合提供。相反,各个提供的特征,为简便起见在单个实施方案的上下文中描述,也可分别或以任何适合的子组合提供。本发明特别包括所提供实施方案的所有组合并在本文中公开,正如单独和明确公开的每一个组合。此外,不同实施方案及其元素的所有子组合也特别在本发明中包括和公开,正如本文单独和明确公开的每个子组合。

[0065] 本文所讨论的出版物仅提供了其在本申请提交日期之前公开的内容。本文中的内容不被解释为承认本发明由于先前的发明而并未先于这些出版物。另外,所提供的出版物的日期可能与需要单独确认的实际发表日期不同。

具体实施方式

[0066] 本发明提供了一种检测和 / 或定量 LOXL2 分析法,其中 LOXL2 通常为个体中循环的赖氨酰氧化酶样 2 (LOXL2) 多肽。本发明还提供了该分析法用于诊断和预后应用中。

[0067] 赖氨酰氧化酶样 2 (LOXL2) 在纤维化人肝组织中表达,其与胶原蛋白和其他基质成分进行交联,导致了硬度增加、病理性成纤维细胞的活化以及基质重塑和纤维增生的动态发展。Barry-Hamilton V, Spangler R, Marshall D 等人,“赖氨酰氧化酶样 2 的别构抑制剂阻碍病态微环境的形成 (Allosteric inhibition of lysyl oxidase-like-2 impedes the development of a pathologic microenvironment),” *Nat Med.* 2010. 16:1009 - 1017。LOXL2 在不同病因人类疾病的纤维化肝组织中表达,包括丙型肝炎感染 1、非酒精性脂肪性肝炎 (NASH) 1、酒精性脂肪性肝炎 (ASH)、Wilson 病 (Vadasz Z, Kessler O, Akiri G 等人,“在 Wilson 病中肝细胞周围的胶原蛋白的异常沉积与赖氨酰氧化酶和赖氨酰氧化酶样蛋白-2 的肝细胞特异性表达有关 (Abnormal deposition of collagen around hepatocytes in Wilson's disease is associated with hepatocyte specific expression of lysyl oxidase and lysyl oxidase like protein-2),” *J Hepatology.* 2005. 43:499 - 507) 和原发性胆汁性肝硬化 2, 还有硬化性胆管炎的小鼠模型。Nakken KE, Nygard S, Haaland T 等人,“复合炎症,组织重塑和纤维化的基因在患有慢性胆管炎的 Abcb4(-/-) 小鼠的肝中特异性转录 (Multiple inflammatory-, tissue remodelling- and fibrosis genes are differentially transcribed in the livers of Abcb4(-/-) mice harbouring chronic cholangitis),” *Scand J Gastroent.* 2007. 42:1245 - 1255。

[0068] 使用单克隆抗体进行的 LOXL2 别构抑制对于在不同疾病模型中抑制纤维化十分

有效,包括肝纤维化和肺纤维化的模型。LOXL2 的抑制引起了 TGF β 信号和多种关键促纤维化介质(例如 TGF- β 1、CTGF、内皮素、CXCL12) 1 的下调;LOXL2 是纤维化疾病中的关键通路靶点。Mehal WZ, Iredale J 和 Friedman SL, “纤维化核心的表达通路(Expressway to the core of fibrosis),” Nat Med. 2011. 17:552 - 553。

[0069] 肝软细胞组织中胶原蛋白的逐渐累积是慢性肝病的最终的常见途径。纤维化的逐渐累积可最终导致肝硬化和晚期肝病。LOXL2 可催化胶原蛋白小纤维的交联并且是纤维增生的关键调控蛋白。LOXL2 表达在患病肝组织中增加。

[0070] 在健康成人组中 LOXL2 表达很少;在正常(即无病)条件下,循环的 LOXL2 数量很低或无法检出。在某些疾病条件下,循环的 LOXL2 升高。例如,LOXL2 可在慢性肝病患者例如慢性丙型肝炎患者的血清中增加,较晚期纤维化患者中水平较高。因此循环 LOXL2 的检测对于确定个体是否患有导致循环的 LOXL2 水平升高的疾病十分有用。这类疾病包括纤维化和癌症。本发明提供了确定个体是否患有与 LOXL2 循环水平升高相关的疾病的诊断方法。循环 LOXL2 的检测之后可继续进行其他诊断方法,以确诊或是排除个体患有某种特殊疾病的可能性。

[0071] 已发现 LOXL2 循环水平与纤维化阶段相关。

[0072] 还发现 LOXL2 循环水平可提供患有纤维化的个体是否适合纤维化治疗的指示,并且提供了其他疾病相关的预后和预测信息,例如特殊终点、结果或事件的可能性,例如疾病结果或对治疗的反应性。本发明提供了确定个体对纤维化疾病的治疗产生反应的可能性和/或这些结果、终点或事件的可能性的方法。

[0073] HCV 感染患者的治疗决定越来越取决于非侵入性血清检查而不是肝的活组织检查。但是,血清检查还未能完全优化。参见 Castera, L., “用于在慢性肝病中纤维化和疾病进程的评估的侵入和非侵入性方法(Invasive and non-invasive methods for the assessment of fibrosis and disease progression in chronic liver disease),” Best Pract Res Clin Gastroent. 2011. 25:291 - 303。

[0074] 检测循环的 LOXL2 的方法

[0075] 本发明提供了一种对个体中循环的 LOXL2 多肽进行检测和/或定量的分析法。在实践中,可在受检从个体获得的液体样品中检测 LOXL2,其中液体样品可以是血液或血液组分,例如血浆或血清,或是其他液体样品。

[0076] 在一些实施方案中,所提供的方法和分析法可作为肝纤维化程度的非侵入性代替测量,例如在慢性 HCV 感染或 HBV 感染患者中。

[0077] LOXL2 多肽

[0078] “LOXL2 多肽”是指包含一个与图 4 中描述的氨基酸序列具有至少大约 90%、至少大约 95%、至少大约 97%、至少大约 98%、至少大约 99% 或 100% 氨基酸序列同一性,自大约 100 个氨基酸(aa)至大约 200aa、自大约 200aa 至大约 300aa、自大约 300aa 至大约 400aa、自大约 400aa 至大约 500aa、自大约 500aa 至大约 600aa、自大约 600aa 至大约 700aa 或是自大约 700aa 至大约 774aa 连续伸展的氨基酸序列的多肽。“LOXL2”还指图 4 中描述的人 LOXL2 氨基酸序列及其自然出现的变异型(多态性)。

[0079] 图 4 描述了人 LOXL2 的氨基酸序列,显示了四个清道夫受体半胱氨酸富集(SRCR)结构域。LOXL2 多肽可以是全长多肽或是成熟的(断裂形式;加工形式) LOXL2 多肽。预测

的信号断裂在 Ala25-Gln26 之间。前原肽上信号肽的断裂生成了 LOXL2 前肽。LOXL2 前肽在 SRCR2 和 SRCR3 之间(例如在图 4 中描述序列的第 301 和 306 氨基酸之间)断裂,得到包含 SRCR3、SRCR4 和赖氨酰氧化酶(催化)结构域的 LOXL2 多肽。

[0080] LOXL2 多肽可受到酶促激活。例如,LOXL2 多肽可催化赖氨酸和羟赖氨酸残基的 ϵ 氨基基团的氧化脱氨基作用,导致肽基赖氨酸至肽基 - α - 氨基脂肪 - δ - 半醛(醛赖氨酸)的转换并释放化学计算量的氨和过氧化氢。此反应通常在细胞外例如在胶原蛋白和弹性蛋白的赖氨酸残基上发生。

[0081] 在某些情况下,使用 LOXL2 分析法检测的 LOXL2 多肽是没有信号序列的全长 LOXL2 多肽,即包括 SRCR1-2、SRCR3-4 和催化结构域。在某些实例中,使用 LOXL2 分析法检测的 LOXL2 多肽是成熟的 LOXL2 多肽(即无信号序列且无 SRCR1-2),仅包括 SRCR3-4 结构域和催化结构域。或者,或是除了检测成熟的 LOXL2 多肽(SRCR3-4 和催化结构域;无信号序列和 SRCR1-2 结构域)之外,LOXL2 分析法还可检测 N-末端 LOXL2 片段,其中 N-末端 LOXL2 片段包括 SRCR1-2 结构域但不包括 SRCR3-4 或催化结构域。

[0082] 生物样品

[0083] 适合的液体生物样品包括但不限于全血;血液组分(又称为“血液制品”)、其中适合的血液组分包括但不限于血清和血浆;唾液;尿;支气管肺泡灌洗液;脑脊髓液;痰;等等。生物样品可以是新鲜血液或储存的血液(例如血液银行中的)或是血液组分。生物样品可以通过本发明的分析法明确得到的液体样品,或是以其他目的获得通过本发明的分析法二次取样得到的液体样品。

[0084] 作为一个实施例,生物样品可以是全血。可以通过标准临床程序得到患者的全血。在另一个实施方案中,生物样品是血浆。可通过离心抗凝血液自全血样品得到血浆。此方法可提供白细胞组分的血块黄层和血浆的上清液。在另一个实施方案中,生物样品是血清。

[0085] 如有必要可对样品进行预处理,根据需要在合适的缓冲溶液中稀释、肝素化、浓缩、或通过包括但不限于超速离心的任何编号方法进行分馏、通过快速蛋白液相色谱(FPLC)分馏或是沉淀。样品可通过例如免疫亲和方法进行样品,以去除样品中的一种或多种非 LOXL2 蛋白或其他非 LOXL2 组分;例如可使用抗白蛋白抗体去除样品中的白蛋白。可使用在生理 pH 下的采用各种缓冲剂中的一种的任意的多种标准缓冲水溶液,例如磷酸盐、Tris 等等。

[0086] 抗 LOXL2 抗体

[0087] 本发明方法使用特异于 LOXL2 的抗体来固定并检测液体样品中的 LOXL2。本发明分析方法中使用的抗体是特异性的 LOXL2,例如与 LOXL2 多肽特异性结合的抗体,其中特异性结合是指结合的亲合力至少为大约 10^{-7} M、至少为大约 10^{-8} M、至少为大约 10^{-9} M、至少为大约 10^{-10} M、至少为大约 10^{-11} M 或至少为大约 10^{-12} M,或是超过 10^{-12} M。非特异性结合是指结合的亲合力低于大约 10^{-7} M,也就是说结合的亲合力为 10^{-6} M、 10^{-5} M、 10^{-4} M 等等。

[0088] LOXL2 特异性抗体基本不与除 LOXL2 多肽之外的任何其他赖氨酰氧化酶样多肽结合,例如,LOXL2 特异性抗体基本不与 LOXL1、LOXL3 或 LOXL4 多肽或是赖氨酰氧化酶(LOX)多肽结合。

[0089] 在一些实施方案中,当 LOXL2 多肽在液体生物样品中时,LOXL2 特异性抗体与可接近的结合表位结合,例如,LOXL2 特异性抗体结合的表位是表面可接近的和 / 或未被液体生

物样品中可能存在的一个或多个非 LOXL2 蛋白遮盖的。

[0090] 本发明分析方法中适合使用的抗体包括多克隆抗体、单克隆抗体、人抗体、人源化抗体、嵌合抗体、纳米抗体、双体、多特异性抗体(即双特异性抗体)和抗原结合抗体片段。

[0091] 在一些情况下,本发明方法中使用的抗 LOXL2 抗体包含一个可检测的标记物。适合的可检测标记物包括但不限于磁珠(例如 Dynabeads™)、荧光染料(例如异硫氰酸荧光素、德克萨斯红、罗丹明、绿色荧光蛋白、红色荧光蛋白、黄色荧光蛋白等等)、放射性同位素标记(例如 ³H、¹²⁵I、³⁵S、¹⁴C 或 ³²P)、酶(例如辣根过氧化物酶、碱性磷酸酶、荧光素酶和其他酶联免疫吸附法(ELISA)中常用的酶)以及比色标记物例如胶体金或有色玻璃或塑料(例如聚苯乙烯、聚丙烯、乳胶等等)珠。

[0092] 抗 LOXL2 抗体包含可检测标记物时,可通过检测该标记物生成的信号(例如生色团、发色团等,作为抗 LOXL2 抗体连接的酶的产物生成;由该标记物直接生成的信号;等等)来检测该抗 LOXL2 抗体。在一些情况下,抗 LOXL2 抗体不包括可检测的标记物;而是使用含有可检测标记物的二抗来检测抗 LOXL2 抗体。适合的二抗包括特异性的抗 LOXL2 抗体的恒定区中表位的单克隆单体和多克隆抗体。二抗可包括任何可检测的标记物,包括但不限于磁珠(例如 Dynabeads™)、荧光染料(例如异硫氰酸荧光素、德克萨斯红、罗丹明、绿色荧光蛋白、红色荧光蛋白、黄色荧光蛋白等等)、放射性同位素标记(例如 ³H、¹²⁵I、³⁵S、¹⁴C 或 ³²P)、酶(例如辣根过氧化物酶、碱性磷酸酶、荧光素酶和其他酶联免疫吸附法(ELISA)中常用的酶)以及比色标记物例如胶体金或有色玻璃或塑料(例如聚苯乙烯、聚丙烯、乳胶等等)珠。还适合作为可检测标记物使用的是来源于 MesoScale Discovery 的 SULFO-TAG™ 标记物。SULFO-TAG™ 标记物是一个钌(II)三-联吡啶标签,其可与多肽(例如二抗)通过钌(II)三-(4-甲基砒)N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)-酯与伯胺(例如赖氨酸侧链)的反应进行连接。

[0093] 在一些实例中,本发明分析方法中使用的抗 LOXL2 抗体将固定在不溶性支架上。适合的不溶性支架可包括多种材料,包括但不限于聚二氟乙烯(PVDF)、纤维素、硝酸纤维素、尼龙、玻璃、聚苯乙烯、聚氯乙烯、聚丙烯、二氧化硅、聚乙烯、聚碳酸酯、葡聚糖、直链淀粉、天然和修饰纤维素、聚丙烯酰胺、嵌入聚丙烯酰胺凝胶中的二氧化硅、琼脂糖、辉长岩、磁铁等等。不溶性支架可以是以下任一形式(例如外形尺寸、形状),例如试纸条所用的板片;试纸检测形式;多孔板(例如 ELISA 中所用的多孔板);等等。

[0094] LOXL2 特异性抗体的非限制性实例包括美国专利公开申请 No. 2009/0104201 和美国专利公开申请 No. 2009/00053224 中公开的 LOXL2 特异性抗体。

[0095] 在一些实例中,适合的抗体特异性结合于 LOXL2SRCR1 结构域中的表位。在一些实例中,适合的抗体特异性结合于 LOXL2SRCR2 结构域中的表位。在一些实例中,适合的抗体特异性结合于 LOXL2SRCR3 结构域中的表位。在一些实例中,适合的抗体特异性结合于 LOXL2SRCR4 结构域中的表位。在一些实例中,适合的抗体特异性结合于 LOXL2 催化结构域中的表位。图 5 提供了 LOXL2 催化结构域的氨基酸序列。在一些实例中,适合的抗体(例如多克隆抗体)特异性结合于一个、两个、三个或更多 LOXL2 结构域中的多个表位。

[0096] 在一些实例中,抗体检测到无信号序列的全长 LOXL2 多肽,例如包括 SRCR1-2、SRCR3-4 和催化结构域。在一些实例中,抗体检测到成熟的 LOXL2 多肽(即无信号序列且无 SRCR1-2),仅包括 SRCR3-4 和催化结构域。在其他实例中,抗体检测到 N-末端 LOXL2 片段,其中 N-末端 LOXL2 片段包括 SRCR1-2 结构域但不包括 SRCR3-4 或催化结构域。

[0097] 例如,在一些实施方案中,适合的 LOXL2 抗体特异性结合于 SRCR3- 连接臂 -SRCR4 区域内的表位,其中此区域称为“SRCR3-4”。SRCR3-4 区可包括与 SEQ ID NO:1 的氨基酸 325-544、氨基酸 325-547、氨基酸 303-544 或氨基酸 303-547 具有至少大约 90%、至少大约 95%、至少大约 98%、至少大约 99% 或 100% 氨基酸序列同一性的氨基酸序列。因此,例如一些实施方案中,适合的抗 LOXL2 抗体特异性结合于氨基酸序列内部的表位,该氨基酸序列与 SEQ ID NO:1 的氨基酸 325-544、氨基酸 325-547、氨基酸 303-544 或氨基酸 303-547 具有至少大约 90%、至少大约 95%、至少大约 98%、至少大约 99% 或 100% 氨基酸序列同一性。

[0098] 在某些实施方案中,适合的抗 LOXL2 抗体特异性结合于连接臂 -SRCR3- 连接臂 -SRCR4- 连接臂区域内的表位,例如在一些情况下,适合的抗 LOXL2 抗体特异性结合于与 SEQ ID NO:1 的氨基酸 303-544、氨基酸 303-545、氨基酸 303-546 或氨基酸 303-547 具有至少大约 90%、至少大约 95%、至少大约 98%、至少大约 99% 或 100% 氨基酸序列同一性的氨基酸序列内的表位。在某些实施方案中,本发明抗 LOXL2 抗体特异性结合于 SRCR3- 连接臂 -SRCR4- 连接臂区域内的表位,例如在一些情况下,适合的抗 LOXL2 抗体特异性结合于与 SEQ ID NO:1 的氨基酸 325-544、氨基酸 325-545、氨基酸 325-546 或氨基酸 325-547 具有至少大约 90%、至少大约 95%、至少大约 98%、至少大约 99% 或 100% 氨基酸序列同一性的氨基酸序列内的表位。

[0099] 在某些实施方案中,适合的抗 LOXL2 抗体特异性结合于 SRCR3 区域内(且不在 SRCR4 内)的表位,其中 SRCR3 区域可包含与 SEQ ID NO:1 的氨基酸 325-425、氨基酸 303-425、氨基酸 303-434 或氨基酸 325-434 具有至少大约 90%、至少大约 95%、至少大约 98%、至少大约 99% 或 100% 氨基酸序列同一性的氨基酸序列。在某些实施方案中,适合的抗 LOXL2 抗体特异性结合于连接臂 -SRCR3 区域内的表位,例如在一些情况下,适合的抗 LOXL2 抗体特异性结合于与 SEQ ID NO:1 的氨基酸 303-425 具有至少大约 90%、至少大约 95%、至少大约 98%、至少大约 99% 或 100% 氨基酸序列同一性的氨基酸序列内的表位。在某些实施方案中,适合的抗 LOXL2 抗体特异性结合于 SRCR3- 连接臂区域内的表位,例如在一些情况下,适合的抗 LOXL2 抗体特异性结合于与 SEQ ID NO:1 的氨基酸 325-434 具有至少大约 90%、至少大约 95%、至少大约 98%、至少大约 99% 或 100% 氨基酸序列同一性的氨基酸序列内的表位。在某些实施方案中,适合的抗 LOXL2 抗体特异性结合于连接臂 -SRCR3- 连接臂区域内的表位,例如在一些情况下,适合的抗 LOXL2 抗体特异性结合于与 SEQ ID NO:1 的氨基酸 303-434 具有至少大约 90%、至少大约 95%、至少大约 98%、至少大约 99% 或 100% 氨基酸序列同一性的氨基酸序列内的表位。

[0100] 在某些实施方案中,适合的抗 LOXL2 抗体特异性结合于连接臂 -SRCR4- 连接臂区域内的表位,例如在一些情况下,适合的抗 LOXL2 抗体特异性结合于与 SEQ ID NO:1 的氨基酸 426-544、氨基酸 426-545、氨基酸 426-546 或氨基酸 426-547 具有至少大约 90%、至少大约 95%、至少大约 98%、至少大约 99% 或 100% 氨基酸序列同一性的氨基酸序列内的表位。在某些实施方案中,适合的抗 LOXL2 抗体特异性结合于 SRCR4 区域内(但不在 SRCR3 内)的表位,其中 SRCR4 区域可包含与 SEQ ID NO:1 的氨基酸 435-544、氨基酸 435-545、氨基酸 435-546 或氨基酸 435-547 具有至少大约 90%、至少大约 95%、至少大约 98%、至少大约 99% 或 100% 氨基酸序列同一性的氨基酸序列。

[0101] 在一些实施方案中,适合的抗 LOXL2 抗体特异性结合于 SRCR1- 连接臂 -SRCR2 区

域内的表位,其中此区域称为“SRCR1-2”。SRCR1-2 区域可包含与 SEQ ID NO:1 (图 4) 中描述氨基酸序列的氨基酸 58-302、氨基酸 58-324 具有至少大约 90%、至少大约 95%、至少大约 98%、至少大约 99% 或 100% 氨基酸序列同一性的氨基酸序列。在某些实施方案中,适合的抗 LXOL2 抗体特异性结合于与 SEQ ID NO:1 中描述氨基酸序列的氨基酸 58-324 具有至少大约 90%、至少大约 95%、至少大约 98%、至少大约 99% 或 100% 氨基酸序列同一性的氨基酸序列内的表位。在某些实施方案中,适合的抗 LXOL2 抗体特异性结合于 SRCR1 区域内(但在 SRCR2 内)的表位,其中 SRCR1 区域可包含与 SEQ ID NO:1 中描述氨基酸序列的氨基酸 58-159 具有至少大约 90%、至少大约 95%、至少大约 98%、至少大约 99% 或 100% 氨基酸序列同一性的氨基酸序列。在某些实施方案中,适合的抗 LXOL2 抗体特异性结合于 SRCR1-连接臂区域内的表位,其中 SRCR1-连接臂区域可包含与 SEQ ID NO:1 中描述氨基酸序列的氨基酸 58-187 具有至少大约 90%、至少大约 95%、至少大约 98%、至少大约 99% 或 100% 氨基酸序列同一性的氨基酸序列。在某些实施方案中,适合的抗 LXOL2 抗体特异性结合于 SRCR1 区域内(但在 SRCR2 内)的表位,其中 SRCR2 区域可包含与 SEQ ID NO:1 中描述氨基酸序列的氨基酸 188-302 具有至少大约 90%、至少大约 95%、至少大约 98%、至少大约 99% 或 100% 氨基酸序列同一性的氨基酸序列。

[0102] 作为一个非限制性实例,适合的抗体是单克隆抗体 AB0030,它特异性结合于 LOXL2 催化结构域中的表位。参见,例如美国 2009/0053224,其中抗体 AB0030 相当于 proBM20。

[0103] 在一些实施方案中,适合的抗体是当 LOXL2 与一个抑制 LOXL2 酶活性的试剂结合时与 LOXL2 特异性结合的抗体。抑制 LOXL2 酶活性的试剂包括 LOXL2 酶活性的别构抑制剂。在一些情况下,该别构抑制剂是抗 LOXL2 单克隆抗体,例如与 LOXL2 的“SRCR3-4”结构域内的表位结合的抗 LOXL2 单克隆抗体。抑制 LOXL2 酶活性和与 SRCR3-4 结构域内的表位结合的单克隆抗体的非限制性实例是 AB0023 和 AB0024;参见,例如美国 2009/0053224。因此,在一些实施方案中,适合的抗 LOXL2 抗体:a) 特异性结合于 SRCR3-4 内的表位;和 ii) 不与 AB0023 抗体和/或 AB0024 抗体竞争结合 SRCR3-4 内的表位。

[0104] 例如,在一些实施方案中,该抗体是具有含以下 CDRs 和中间框架区的可变重链区的抗体(对应 AB0023 的相应区,和下划线标出的 CDR1、CDR2 和 CDR3 序列):

[0105] MEWSRVFIFLLSVTAGVHSQVQLQQSGAELVRPGTSVKVSCKASGYAFTYYLIE WVKQRPQGLEWIG VINPGSGGTNYNEKFKGKATLTADKSSSTAYMQLSSLTSDSAV YFCARNWMNFDYWGQGTTLTVSS (SEQ ID NO:6)。在一些实施方案中,该抗体具有与 SEQ ID NO:6 具有 75% 或更高、80% 或更高、90% 或更高、95% 或更高或 99% 或更高同源性的氨基酸序列的重链可变区。在一些实施方案中,该抗体具有 SEQ ID NO:6 中定义的可变区序列的 CDR1、CDR2 和/或 CDR3 的重链可变区。

[0106] 在一些实施方案中,该抗体是其可变轻链区具有以下 CDRs 和中间框架区(对应 AB0023, CDR1、CDR2 和 CDR3 序列用下划线强调)的抗体:

[0107] MRCLAEFLLVWIPGAIGDIVMTQAAPSVSVTPGESVSI SCRSSKSLLSHNGNT YLYWFLQRPQ QSPQFLIYRMSNLASGVPDRFSGSGSGTAFTLRISRVEAEDVGVYYCM QHLEYPYTFGGGTKLEIK (SEQ ID NO:7)。在一些实施方案中,该抗体具有与 SEQ ID NO:7 具有 75% 或更高、80% 或更高、90% 或更高、95% 或更高或 99% 或更高同源性的氨基酸序列的轻链可变区。在一些实施方案中,该抗体具有 SEQ ID NO:7 中定义的可变区序列的 CDR1、CDR2 和/或 CDR3 的可变轻链区。在

一些实施方案中,该抗体具有 SEQ ID NO:6 中定义的可变区序列的 CDR1、CDR2 和 / 或 CDR3 的重链可变区并且具有 SEQ ID NO:7 中定义的可变区序列的 CDR1、CDR2 和 / 或 CDR3 的轻链可变区。

[0108] 在一些实施方案中,该抗体是此种抗体的人源化版本,例如美国专利申请公开 No. US2009/0053224 (2009 年 2 月 26 日)中描述的一个抗体,例如称为 AB0024 的抗体,和 / 或重链具有 AB0024 的 CDRs (CDR1、CDR2 和 CDR3) 和 / 或轻链具有 AB0024 的 CDRs (CDR1、CDR2 和 CDR3) 的一个抗体。

[0109] 例如,在一个实施方案中,该抗体是具有以下 CDRs 和中间框架区的可变重链区(对应 AB0024, CDR1、CDR2 和 CDR3 序列用下划线强调)的抗体:

[0110] QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYAFTYYLIEWVRQAPGQGLEWIGVINP GSGGTNYNEKFKGRA
TITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYFCARNWMNFDYWGQGT TTVVSS (SEQ ID NO:8)。

[0111] 在一些实施方案中,该抗体具有与 SEQ ID NO:8 具有 75% 或更高、80% 或更高、90% 或更高、95% 或更高或 99% 或更高同源性的氨基酸序列的重链可变区。在一些实施方案中,该抗体具有 SEQ ID NO:8 中定义的可变区序列的 CDR1、CDR2 和 / 或 CDR3 的重链可变区。

[0112] 在一些实施方案中,该抗体具有 SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:10 (QVQLVQSGAELKK P GASVKV SCKASGYAFTYYLIEWVKQAPGQGLEWIGVINPGSGGTNYNEKFKGRATLT ADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYFCARNWMNFDYWGQGT TTVVSS)、SEQ ID NO:11 (QVQLVQSGAEVKKPGASVKV SCKASGYAFTYYLIEW VRQAPGQGLEWIGVINPGSG GTNYNEKFKGRATLTADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYFCARNWMNFDYWGQGT T VSS)、或 SEQ ID NO:12 (QVQLVQSGAEVKKPGASVKV SCKASGYAFTYYLIEWVRQA PGQGLEWIGVINP GSGGTNYNEKFKGRVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARN WMNFDYWGQGT TTVVSS) 中定义的氨基酸序列的重链可变区,或是与 SEQ ID NO:8、10、11 或 12 具有 75% 或更高、80% 或更高、90% 或更高、95% 或更高或 99% 或更高同源性的氨基酸序列,和 / 或是其轻链可变区具有 SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:13 (DIVMT QTPLSLSVTPGQPASISCRSSKSLLSHNGNTYLYWFLQKPGQSPQFLIYRMS NLAGVDPDRFSGSGSGTFTLKISRVEAEDVGVYYCMQHLEYPYTFGGGTKVEIK)或 SEQ ID NO:14 (DIVM TQTPLSLSVTPGQPASISCRSSKSLLSHNGNTYLYWYLQKPGQSPQFLIYRMS NLAGVDPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCMQHLEYPYTFGGGTKVEIK)中定义的氨基酸序列,或是与 SEQ ID NO:9、13 或 14 具有 75% 或更高、80% 或更高、90% 或更高、95% 或更高或 99% 或更高同源性的氨基酸序列。

[0113] 在一个实施方案中,该抗体是具有以下 CDRs 和中间框架区(对应 AB0024, CDR1、CDR2 和 CDR3 序列用下划线强调)可变轻链区的抗体:

[0114] DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCRSSKSLLSHNGNTYLYWFLQKPGQSPQFLIYRM SNLAGVDPDRFS
GSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCMQHLEYPYTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:9)。在一些实施方案中,该抗体具有与 SEQ ID NO:9 具有 75% 或更高、80% 或更高、90% 或更高、95% 或更高或 99% 或更高同源性的氨基酸序列的轻链可变区。在一些实施方案中,该抗体具有 SEQ ID NO:9 中定义的可变区序列的 CDR1、CDR2 和 / 或 CDR3 的轻链可变区。在一些实施方案中,该抗体具有 SEQ ID NO:8 中定义的可变区序列的 CDR1、CDR2 和 / 或 CDR3 的重链可变区和具有 SEQ ID NO:9 中定义的可变区序列的 CDR1、CDR2 和 / 或 CDR3 的轻链可变区。

[0115] 可使用任何已知分析法来确定一个试剂是否抑制 LOXL2 的酶活性。例如,可使用二氨基戊烷(DAP)作为底物或使用胶原蛋白作为底物进行 LOXL2 酶活性的分析。在这两种分析法中,可使用将过氧化氢的生成(底物脱氨基时由 LOXL2 释放)与辣根过氧化物酶催化

的 Amplex[®] Red (Invitrogen, Carlsbad, CA) 转化为试卤灵(一种荧光产物)偶联的分析法来测定 LOXL2 的酶活性。

[0116] 在一些实施方案中,适合的抗 LOXL2 抗体可抑制 LOXL2 多肽的酶活性。在其他实施方案中,适合的抗 LOXL2 抗体并不抑制 LOXL2 多肽的酶活性。

[0117] 适合的抗 LOXL2 抗体包括,例如 RPDS-1M1、RPDS-1M3、RPDS-1M8、RPDS-1M9、RPDS-1M11、RPDS-1M15、RPDS-1M17、RPDS-1M19、RPDS-1M20 (AB0030)、RPDS-1M22、RPDS-1M24、RPDS-1M25、RPDS-1M27、RPDS-1M28、RPDS-1M29、RPDS-1M30、RPDS-1M31、RPDS-1M32、RPDS-2M1、RPDS-2M2、RPDS-2M3、RPDS-2M4、RPDS-2M5、RPDS-2M6、RPDS-2M7、RPDS-2M8、RPDS-2M9、RPDS-2M10、RPDS-2M11、RPDS-2M12、RPDS-2M13、RPDS-2M14、RPDS-2M15、RPDS-2M16、RPDS-2M17、RPDS-2M18 和 RPDS-2M19,其中这些抗体在美国专利申请 No. 13/021555 中描述。单克隆抗体 RPDS-1M1、RPDS-1M3、RPDS-1M8、RPDS-1M9、RPDS-1M11、RPDS-1M15、RPDS-1M17、RPDS-1M19、RPDS-1M20 (AB0030)、RPDS-1M22、RPDS-1M24、RPDS-1M25、RPDS-1M27、RPDS-1M28、RPDS-1M29、RPDS-1M30、RPDS-1M31、RPDS-1M32、RPDS-2M1、RPDS-2M2、RPDS-2M3、RPDS-2M4、RPDS-2M5、RPDS-2M6、RPDS-2M7、RPDS-2M8、RPDS-2M9、RPDS-2M10、RPDS-2M11、RPDS-2M12、RPDS-2M13、RPDS-2M14、RPDS-2M15、RPDS-2M16、RPDS-2M17、RPDS-2M18 和 RPDS-2M19 在 LOXL2 的催化结构域内结合。

[0118] 分析法的形式

[0119] 检测个体中循环 LOXL2 的本发明分析法通常包括:a) 将从个体获得的液体样品与 LOXL2 特异性抗体接触;和 b) 检测液体样品中存在的该抗体与 LOXL2 的结合。适合的分析方法包括酶联免疫吸附法(ELISA)、放射免疫分析法(RIA)、免疫沉淀分析法、侧向或轴向流动分析法、质谱等等。

[0120] 本发明的分析方法可在液体样品中检出 175pg/ml 或更低水平的 LOXL2,例如本发明的分析方法可在液体样品中检出自大约 150pg/ml 至大约 175pg/ml、自大约 125pg/ml 至大约 150pg/ml、自大约 100pg/ml 至大约 125pg/ml、自大约 75pg/ml 至大约 100pg/ml、自大约 50pg/ml 至大约 75pg/ml 或是自大约 40pg/ml 至大约 50pg/ml 的 LOXL2。例如,当液体样品中存在的 LOXL 的浓度为低于 10ng/ml,例如浓度为自大约 10ng/ml 至大约 5ng/ml、自大约 5ng/ml 至大约 1ng/ml、自大约 1ng/ml 至大约 500pg/ml、自大约 500pg/ml 至大约 400pg/ml、自大约 400pg/ml 至大约 300pg/ml、自大约 300pg/ml 至大约 200pg/ml、自大约 200pg/ml 至大约 150pg/ml、自大约 150pg/ml 至大约 100pg/ml、自大约 100pg/ml 至大约 75pg/ml、自大约 75pg/ml 至大约 50pg/ml 或自大约 50pg/ml 至大约 40pg/ml 时,本发明的分析方法可在液体样品中检出 LOXL2。在一些情况下,当液体样品中存在的 LOXL2 的浓度范围是大约 175pg/ml 至大约 5ng/ml (或超过 5ng/ml) 时,本发明的分析方法可检出液体样品中的 LOXL2。在一些情况下,当液体样品中存在的 LOXL2 的浓度范围是大约 40pg/ml 至大约 5ng/ml (或超过 5ng/ml) 时,本发明的分析方法可检出液体样品中的 LOXL2。在一些情况下,本发明的分析方法可以平均背景加 2.5x SD (背景的标准偏差) 的检测限检出液体样品中的 LOXL2。

[0121] 在一些情况下,本发明的分析方法包括两个 LOXL2 特异性抗体的使用。这两个 LOXL2 特异性抗体均可以是单克隆抗体;这两个 LOXL2 特异性抗体可以是一个多克隆抗体

和一个单克隆抗体 ;或是其他组合。

[0122] 例如,第一个 LOXL2 特异性抗体与液体样品接触,其中第一个 LOXL2 特异性抗体与液体样品中存在的 LOXL2 形成复合物。第一个 LOXL2 特异性抗体可固定在不溶性支架上,由此第一个 LOXL2 特异性抗体 /LOXL2 复合物固定在不溶性支架上。或者,第一个 LOXL2 特异性抗体可在溶液中,而第一个 LOXL2 特异性抗体 /LOXL2 复合物可以是不溶的,由此第一个 LOXL2 特异性抗体 /LOXL2 复合物免疫沉淀。可以使用第二个 LOXL2 特异性抗体检测第一个 LOXL2 特异性抗体 /LOXL2 复合物。在一些情况下,第一个 LOXL2 特异性抗体是多克隆抗体 ;第二个 LOXL2 特异性抗体是单克隆抗体。

[0123] 在一些实施方案中,本发明分析方法包括将从个体获得的液体样品与固定的 LOXL2 特异性抗体接触,其中固定的 LOXL2 特异性抗体是固定在不溶性支架上的。样品中存在的任何 LOXL2 将与固定的 LOXL2 特异性抗体结合,形成固定的抗 LOXL2/LOXL2 复合物。可使用第二个(非固定的)LOXL2 特异性抗体检测固定的抗 LOXL2/LOXL2 复合物。可使用可检测的标记的二抗可检测地标记,或者检测第二个 LOXL2 特异性抗体。

[0124] 因此,在一些实施方案中,本发明中检测个体中循环 LOXL2 的方法包括 :a) 从将个体获得的液体样品与 LOXL2 特异性一抗接触,一抗和 LOXL2 形成复合物 ;b) 将 LOXL2- 一抗复合物与 LOXL2 特异性二抗接触 ;和 c) 检测二抗与 LOXL2- 一抗复合物的结合。

[0125] 不溶性支架可以是多孔板的一个或多个孔、试纸、浸渍片等等。在任何上述分析法形式中,可进行一个或多个洗涤步骤以去除未结合的成分。

[0126] 本发明的一个分析方法可检测个体中病理水平的循环 LOXL2。例如,本发明分析方法可包括 :a) 将从个体获得的液体样品和 LOXL2 特异性抗体接触 ;b) 检测该抗体与液体样品中存在的 LOXL2 的结合 ;和 c) 比较检测水平和正常对照值。高于正常对照值的检出水平是病理指征(例如癌症或纤维化)。

[0127] 对照值

[0128] 从受试者获得的液体样品中 LOXL2 的水平可与正常对照值或正常对照值范围进行比较。对照值可依据来源于对照人群例如普通人群或人类受试者的选拔人群的比较样品(例如,血液、血浆或血清样品,或其他液体生物样品)中 LOXL2 的水平。例如,选拔人群可以由明确健康的受试者组成,例如此前没有任何纤维化或癌症的体征或症状的个体。明确健康的个体通常也不会以其他方式表现疾病的症状。换句话说,如果由专业医生进行检查这些个体将被认为是健康且没有疾病症状的。

[0129] 对照值可以采取多种形式。对照值可以是单一界限值(cut-off value),例如中值或平均值。正常对照值可以是正常对照范围。

[0130] 在一些情况下,对照的正常值低于本发明检测方法的检测限,例如正常值可以是低于大约 175pg/ml、低于大约 150pg/ml、低于大约 100pg/ml、低于大约 75pg/ml、低于大约 50pg/ml 或低于大约 40pg/ml。

[0131] 受试者

[0132] 如上文所指出的,使用本发明的 LOXL2 分析法检测从个体获得的液体样品。适合使用本发明分析法检测的个体包括但不限于,未诊断出患有疾病但表现出症状和 / 或向医生就诊的个体(例如患有未确诊病症或疾病的个体);已确诊癌症的个体 ;怀疑患有癌症但未确诊患有癌症的个体 ;明确健康且正在进行常规筛查的个体 ;已确诊患有纤维化的个

体;怀疑患有纤维化但未确诊患有纤维化的个体;已确诊患有丙型肝炎病毒(HCV)感染例如慢性 HCV 或乙型肝炎病毒(HBV)感染例如慢性 HBV (CHB) 的个体;和正在进行癌症或纤维化疾病治疗的个体。

[0133] 癌症患者

[0134] 适合使用本发明 LOXL2 分析法检测的个体包括已确诊患有癌症的个体,包括患有良性肿瘤的个体、患有原发瘤的个体、患有肿瘤转移的个体、以及患有非实体瘤型癌症的个体。适合使用本发明 LOXL2 分析法检测的个体包括患有癌症但还确诊患有癌症的个体。因此,适合使用本发明 LOXL2 分析法检测的个体包括患有各种癌症包括癌、肉瘤、白血病和淋巴瘤的个体。

[0135] 癌包括但不限于食道癌、肝细胞癌、基底细胞癌(皮肤癌的一种形式)、鳞状上皮细胞癌(不同组织)、膀胱癌包括移行细胞癌(一种膀胱的恶性赘生物)、支气管癌、结肠癌、结肠直肠癌、胃癌、肺癌包括肺的小细胞癌和非小细胞癌、肾上腺皮质癌、甲状腺癌、胰腺癌、卵巢癌、前列腺癌、腺癌、汗腺癌、皮脂腺癌、乳头状癌、乳头腺癌、囊腺癌、髓样癌、肾细胞癌、原位管癌或胆管癌、绒毛膜癌、精原细胞瘤、胚胎性癌、Wilm 肿瘤、子宫颈癌、子宫癌、睾丸癌、骨癌、上皮癌和鼻咽癌等等。

[0136] 肉瘤包括但不限于纤维肉瘤、粘液肉瘤、脂肪肉瘤、软骨肉瘤、脊索瘤、成骨肉瘤、骨肉瘤、血管肉瘤、内皮肉瘤、淋巴管肉瘤、淋巴管内皮肉瘤、滑膜瘤、间皮瘤、Ewing 肉瘤、平滑肌肉瘤、横纹肌肉瘤和其他软组织肉瘤

[0137] 实体瘤包括但不限于神经胶质瘤、星形细胞瘤、成神经管细胞瘤、颅咽管瘤、室管膜细胞瘤、松果体瘤、成血管细胞瘤、听神经瘤、少突神经胶质瘤、脑膜瘤、黑素瘤、成神经细胞瘤和成视网膜细胞瘤。

[0138] 白血病包括但不限于 a) 慢性骨髓增生综合征(多能造血干细胞的肿瘤性疾病);b) 急性髓性白血病(多能造血干细胞或限制谱系潜能造血细胞的瘤性转化);c) 慢性淋巴细胞性白血病(CLL;免疫不成熟和功能不完全的小淋巴细胞的克隆样增生),包括 B- 细胞 CLL、T 细胞 CLL 前淋巴细胞性白血病和毛细胞性白血病;和 d) 急性成淋巴细胞性白血病(特征为成淋巴细胞的蓄积)。淋巴瘤包括但不限于 B 细胞淋巴瘤(例如 Burkitt 淋巴瘤);霍奇金(Hodgkin)淋巴瘤等等。

[0139] 良性肿瘤包括但不限于血管瘤、肝细胞腺瘤、海绵状血管瘤、灶性结节性增生、听神经瘤、神经纤维瘤、胆管瘤、胆管囊腺瘤、纤维瘤、脂肪瘤、平滑肌瘤、间皮瘤、畸胎瘤、粘液瘤、结节再生性增生、颗粒性结膜炎和脓性肉芽肿。

[0140] 原发瘤和转移性肿瘤包括例如肺癌(包括但不限于肺腺癌、鳞状上皮细胞癌、大细胞癌、细支气管肺泡癌、非小细胞癌、小细胞癌、间皮瘤);乳腺癌(包括但不限于导管癌、小叶癌、炎性乳腺癌、透明细胞癌、粘液癌);结肠直肠癌(包括但不限于结肠癌、直肠癌);肛门癌;胰腺癌(包括但不限于胰腺癌、胰岛细胞癌、神经内分泌肿瘤);前列腺癌、卵巢癌(包括但不限于卵巢上皮癌或表面上皮间质肿瘤包括浆液性肿瘤、内膜样瘤和粘液性囊腺癌、性索间质细胞瘤);肝和胆管癌(包括但不限于肝细胞癌、胆管细胞型肝癌、血管瘤);食道癌(包括但不限于食道腺癌和鳞状上皮细胞癌);非霍奇金淋巴瘤;膀胱癌;子宫癌(包括但不限于子宫内膜腺癌、子宫乳头状浆液性腺癌、子宫透明细胞癌、子宫肉瘤和平滑肌肉瘤、中胚叶混合瘤);神经胶质瘤、成胶质细胞瘤、成神经管细胞瘤和其他脑瘤;肾癌(包括但不限于

肾细胞癌、透明细胞癌、Wilms 肿瘤)；头颈癌(包括但不限于鳞状上皮细胞癌)；胃癌(包括但不限于胃腺癌、胃肠道间质瘤)；多发性骨髓瘤；睾丸癌；生殖细胞瘤；神经内分泌肿瘤；子宫颈癌；胃肠道、乳腺和其他器官的良性肿瘤；和印戒细胞癌。

[0141] 在一些情况下，癌症患者是当前正在进行癌症治疗的个体。在一些实例中，治疗包括给药抑制 LOXL2 多肽酶活性的药剂。抑制 LOXL2 酶活性的药剂包括 LOXL2 酶活性的别构抑制剂。在一些情况下，该别构抑制剂是抗 LOXL2 单克隆抗体，例如与 LOXL2 的“SRCR3-4”结构域内的表位结合的抗 LOXL2 单克隆抗体。抑制 LOXL2 酶活性且与 SRCR3-4 结构域内的表位结合的单克隆抗体的非限制性实例是 AB0023 和 AB0024；参见例如美国专利 2009/0053224。

[0142] 上皮-间质的转化

[0143] 适合使用本发明分析方法检测的个体包括已发生上皮细胞的上皮-间质转化(EMT)的个体。适合使用本发明分析方法检测的个体包括已发生结缔组织生成和成纤维细胞活化(其被认为是生成肿瘤和纤维化疾病的病理微环境的因素)的个体。这类个体可能具有癌症前期细胞和/或处于癌症发展的早期。

[0144] 纤维化

[0145] 适合使用本发明 LOXL2 分析方法检测的个体包括已确诊患有纤维化(一种纤维变性疾病)例如肝纤维化、肾纤维化、肺纤维化、骨髓纤维化、心肌纤维化或其他类型纤维化的个体。适合使用本发明 LOXL2 分析方法检测的个体包括患有纤维化疾病(例如肝纤维化、肾纤维化、肺纤维化、骨髓纤维化、心肌纤维化或其他类型纤维化)但还未确诊为患有纤维化疾病的个体。

[0146] 在一些情况下，适合的检查受试者患有晚期纤维化，但仍可能适合进行纤维化治疗方案的治疗。例如，适合的分析受试者包括患有活动性(不是晚期)纤维化的受试者。在一些情况下，适合的分析受试者是患有纤维化且可能预计经历疾病快速发展的个体。

[0147] 在一些情况下，使用本发明 LOXL2 分析方法检测的个体是当前正在进行纤维化疾病治疗的个体。在一些实例中，治疗包括给药抑制 LOXL2 多肽酶活性的药剂。抑制 LOXL2 酶活性的药剂包括 LOXL2 酶活性的别构抑制剂。在一些实例中，该别构抑制剂是抗 LOXL2 单克隆抗体，例如与 LOXL2 的“SRCR3-4”结构域内的表位结合的抗 LOXL2 单克隆抗体。抑制 LOXL2 酶活性且与 SRCR3-4 结构域内的表位结合的单克隆抗体的非限制性实例是 AB0023 和 AB0024；参见例如美国专利 2009/0053224。

[0148] 肝纤维化

[0149] 肝的纤维化与很多肝病的病理学相关。纤维化可作为血色病、Wilson 疾病、酒精中毒、血吸虫病、病毒性肝炎、胆管梗阻、接触毒素和代谢性疾病的并发症出现。肝纤维化任其发展会进展为肝硬化(由包膜的结节(encapsulated nodules)的存在确定)、肝衰竭和死亡。

[0150] 肝纤维化包括但不限于肝硬化和相关疾病例如慢性病毒性肝炎、非酒精性脂肪性肝病(NAFLD)、酒精性脂肪性肝炎(ASH)、非酒精性脂肪性肝炎(NASH)、原发性胆汁性肝硬化(PBC)、胆汁性肝硬化、原发性硬化性胆管炎和自身免疫性肝炎。

[0151] 来自寄生虫和病毒感染(例如乙型肝炎病毒(HBV)、HCV、人免疫缺陷病毒(HIV)、血吸虫病)或酗酒的长期压力的对肝的慢性损伤通常会引起肝的重塑，推测将

包膜的损伤区域并保护其余的肝组织不受伤害(Li and Friedman, Gastroenterol. Hepatol. 14:618-633, 1999)。肝纤维化导致细胞外基质改变,包括总胶原蛋白的含量增加 3-10 倍以及低密度基底膜被高密度基质替代,这削弱了肝细胞、肝星形细胞和上皮细胞的代谢和合成功能。(Girogescu, M., (肝纤维化的非侵入性的生化标记) Non-invasive Biochemical Markers of Liver Fibrosis, J. Gastrointest. Liver Dis., 15(2):149-159(2006))。

[0152] 现有许多标准评分系统为肝纤维化的程度和严重性提供了定量评估。包括 METAVIR、Knodel1、Scheuer、Ludwig 和 Ishak 评分系统。基于 METAVIR、Knodel1、Scheuer、Ludwig 和 Ishak 评分系统,患有肝纤维化的个体包括具有任何程度或严重性肝纤维化的个体。

[0153] METAVIR 评分系统是基于肝活检不同特征的分析,包括纤维化(肝门纤维化、小叶中心纤维化和肝硬化);坏死(零碎和小叶坏死、嗜酸性回缩和气球样变性);炎症(肝门束炎症、肝门淋巴结聚集和肝门炎症的分布);胆管变化;和 Knodel1 指数(门静脉周围坏死、小叶坏死、肝门炎症、纤维化和疾病总体活动性的评分)。METAVIR 系统中每个阶段的定义如下:得分:0,无纤维化;得分:1,肝门束星状扩大但无隔膜形成;得分:2,肝门束扩大伴有很少的隔膜形成;得分:3,大量隔膜但无肝硬化;和得分:4,肝硬化。

[0154] Knodel1 评分系统又称为组织学活动性指数,基于组织学特征的四类评分对本标进行分级:I. 门静脉周围和/或桥接坏死;II. 小叶内变性和局灶性坏死;III. 肝门炎症;和 IV. 纤维化。在 Knodel1 疾病分期系统中,评分如下:得分:0,无纤维化;得分:1,轻度坏死(纤维性肝门扩大);得分:2,中度坏死;得分:3,严重坏死(桥接纤维化);和得分:4,肝硬化。评分越高,肝组织损伤越严重。Knodel1(1981)Hepatol. 1:431。

[0155] 在 Scheuer 评分系统中,评分如下:得分:0,无纤维化;得分:1,增大,纤维化的肝门束;得分:2,门静脉周围或门-门隔膜,但结构完整;得分:3,纤维化伴有结构扭曲,但无明显肝硬化;得分:4,可能或确定肝硬化。Scheuer(1991)J. Hepatol. 13:372。

[0156] Ishak 评分系统在 Ishak(1995)J. Hepatol. 22:696-699 中描述。阶段 0,无纤维化;阶段 1,一些门管区纤维性扩张,伴有或没有短的纤维性隔膜;阶段 2,大部分门管区纤维性扩张,伴有或没有短的纤维性隔膜;阶段 3,大部分门管区纤维性扩张,伴有偶见的门-门(P-P)桥接;阶段 4,门管区纤维性扩张,伴有明显的桥接(P-P)以及门-中心(P-C);阶段 5,标记的桥接(P-P 和/或 P-C),伴有偶发的结节(不完全的肝硬化);阶段 6,肝硬化,可能的或确定的。

[0157] 肾纤维化

[0158] 与肝纤维化类似,肾纤维化可由多种疾病和对肾的损伤引起。这些疾病和损伤的实例包括慢性肾病、代谢综合征、膀胱输尿管反流、小管间质性肾纤维化、糖尿病(包括糖尿病性肾病)和作为结果的肾小球肾炎(GN),包括但是不限于局灶性节段性肾小球硬化和膜性肾小球肾炎、肾小球膜毛细血管 GN。

[0159] 现在人们已公认代谢综合征是异常的集群,包括糖尿病的标志例如抗胰岛素性、以及中心或内脏肥胖和高血压。在几乎所有情况下,葡萄糖失调可导致刺激细胞因子释放和细胞外基质沉积的上调。其他参与慢性肾病、糖尿病、代谢综合征和肾小球肾炎的因素包括高血脂、高血压和蛋白尿,它们均会导致肾脏的进一步损伤,并刺激细胞外基质沉积。因

此,无论原发性原因是什么,对肾的损伤可导致肾纤维化并伴随肾功能下降。(Skena, F. and Gesualdo, L., Pathogenic Mechanisms of Diabetic Nephropathy, J. Am. Soc. Nephrol., 16:S30-33(2005); Whaley-Connell, A., and Sower, J. R., (慢性肾病和心血管代谢综合征) Chronic Kidney Disease and the Cardiometabolic Syndrome, J. Clin. Hypert., 8(8):546-48(2006))。

[0160] 肺纤维化

[0161] 肺的纤维化包括许多综合征和疾病。范例疾病包括特发性肺纤维化(IPF)、特发性间质性肺炎和急性呼吸窘迫综合征(ARDS)。肺纤维化还包括但不限于隐源性纤维化肺肺炎、慢性纤维化间质性肺炎、间质性肺病(ILD)和弥散性实质性肺病(DPLD)。

[0162] 大多数肺纤维化包括上述疾病的发病机理还未得到充分的了解,但是它们均具有流入炎性细胞以及随后富含胶原蛋白的细胞外基质的合成和沉积增加的特征。(Chua et al., Am J. Respir. Cell. Mol. Biol., 33:9-13(2005); Tzortzaki et al., J. Histochem. & Cytochem., 54(6):693-700(2006); Armstrong et al., Am. J. Respir. Crit. Care Med., 160:1910-1915(1999))。

[0163] IPF 是为肺组织的炎症和最终纤维化所表征;尽管这两个症状可以是分离的。IPF 的原因还不清楚;它既可以由自身免疫性疾病引起,也可由感染导致。IPF 的症状包括呼吸困难(即呼吸短促,随着疾病的发展呼吸困难成为了主要症状)和干咳。血氧不足、右心衰竭、心脏病发作、肺栓塞、中风或肺部感染可导致死亡,而这些疾病均可由 IPF 引发。

[0164] 在一些情况下,使用本发明 LOXL2 分析法检测的个体是当前正在进行 IPF 治疗的个体。在一些实例中,该治疗包括给药抑制 LOXL2 多肽酶活性的药剂。抑制 LOXL2 多肽酶活性的药剂包括 LOXL2 酶活性的别构抑制剂。在一些情况下,该别构抑制剂是抗 LOXL2 单克隆抗体,例如与 LOXL2 的“SRCR3-4”结构域内的表位结合的抗 LOXL2 单克隆抗体。抑制 LOXL2 酶活性且与 SRCR3-4 结构域内的表位结合的单克隆抗体的非限制性实例是 AB0023 和 AB0024;参见例如美国专利 2009/0053224。

[0165] 骨髓纤维化

[0166] 原发性骨髓纤维化的发病过程包括初级巨核细胞加权的无性系骨髓增生和癌旁间质反应,包括骨髓纤维化、骨硬化、血管生成和髓外造血。骨髓反应包括细胞外基质蛋白例如纤维状胶原蛋白的过度沉积、细胞过少、骨髓成纤维细胞的活化和招募、过量的细胞因子和生长因子生成和其他导致造血能力下降的变化。继发性骨髓纤维化可由真性红细胞增多症或原发性血小板增多症引发。

[0167] 正在进行治疗的个体

[0168] 在一些情况下,使用本发明 LOXL2 分析法检测的个体是当前正在进行纤维化疾病或癌症治疗的个体。在一些实例中,该治疗包括给药抑制 LOXL2 多肽酶活性的药剂。抑制 LOXL2 多肽酶活性的药剂包括 LOXL2 酶活性的别构抑制剂。在一些情况下,该别构抑制剂是抗 LOXL2 单克隆抗体,例如与 LOXL2 的 SRCR3-4 结构域内的表位结合的抗 LOXL2 单克隆抗体。抑制 LOXL2 酶活性且与 SRCR3-4 结构域内的表位结合的单克隆抗体的非限制性实例是 AB0023 和 AB0024;参见例如美国专利 2009/0053224。

[0169] 诊断方法

[0170] 本发明为与 LOXL2 相关的疾病或病症提供了多种诊断方法,包括与 LOXL2 水平升

高例如循环的 LOXL2 升高相关或以其为特征的疾病或病症。例如,本发明提供了可确定个体是否患有以循环的 LOXL2 升高为特征的疾病的方法。本发明还提供了评估这类疾病或病症的活动程度或严重程度方法。诊断方法通常涉及使用如上述的本发明 LOXL2 分析方法检测个体中的循环 LOXL2 水平。以循环的 LOXL2 升高为特征的疾病包括癌症和纤维化。

[0171] 在一个给定样本中的 LOXL2 水平可表达为浓度、重量或本文所述的检测分析法的其他读出值。一方面,高于正常对照水平或其他参考水平的循环 LOXL2 水平表明了该个体患有以循环的 LOXL2 升高为特征的疾病。例如,高于正常对照或其他参考水平至少 10%、至少 15%、至少 20%、至少 25%、至少 30%、至少 40%、至少 50% 或超过 50% 的循环 LOXL2 水平可表明该个体患有以循环 LOXL2 升高为特征的疾病。在另一个实例中,超过大约 40pg/ml、超过大约 50pg/ml、超过大约 75pg/ml、超过大约 100pg/ml、超过大约 150pg/ml、超过大约 175pg/ml、超过大约 200pg/ml、超过大约 250pg/ml、超过大约 300pg/ml、超过大约 350pg/ml、超过大约 400pg/ml、超过大约 450pg/ml、超过大约 500pg/ml、超过大约 550pg/ml、超过大约 600pg/ml、超过大约 650pg/ml、超过大约 700pg/ml、超过大约 750pg/ml 或超过大约 800pg/ml 的循环 LOXL2 水平可表明该个体患有以循环 LOXL2 升高为特征的疾病,和 / 或给出该疾病或病症相关的预后或预测信息,例如通过指明活动性疾病或特殊的活跃水平。在一些情况下,该水平表明了患者的活动性纤维增生。如本文所用的术语“正常对照水平”和“参考水平”在 LOXL2 背景下是指与样品例如一个供试样品中 LOXL2 水平相比较的 LOXL2 水平。在一个实施例中,正常对照或参考水平是通常在健康个体例如没有本发明疾病或病症如 LOXL2 相关疾病或病症的从个体获得的样品中观察到的水平。在另一个实施例中,正常对照或参考水平是在患有 LOXL2 相关疾病或病症的个体中观察到的水平,例如疾病的活动性较低、预后相对较好或更有机会得到特殊结果、终点或事件如存活或对治疗的反应性的个体。例如,参考或正常对照水平可以是在特殊时间点观察到的在最终表现出有益结果、终点或事件的个体中得到的样品的水平,例如基线水平。在另一个实施例中,正常对照或参考水平是获得自相同个体但与待分析样品相比不同时间点的样品中观察到水平,例如治疗前的基线,或疾病进程较早或检出疾病前的水平,。在另一个实施例中,正常或参考水平是标准水平,例如在制备为具有 LOXL2 预定浓度的样品中的水平或就是预定水平。如本文所用的“基线”是指在特殊事件或时期前的时间点时特殊变量的数量、水平或测量结果,例如在治疗前或监测疾病进程的研究开始前。因此,一方面,LOXL2 的参考或正常对照水平是基线水平,例如来自于相同个体或其他个体的基线水平。

[0172] 对照值

[0173] 从受试者获得的液体样品中的 LOXL2 水平可以与正常对照值或正常对照值的范围进行比较。对照值可以基于来源于对照人群例如普通人群或人类受试者的选拔人群的比较样品(例如血液、血浆或血清样品,或其他液体生物样品)中的 LOXL2 水平。例如,该选拔人群可以由明确健康的受试者组成,例如此前没有任何纤维化或癌症的体征或症状的个体。明确健康的个体通常也不会以其他方式表现疾病的症状。换句话说,如果由专业医生进行检查这些个体将被认为是健康且没有疾病症状的。或者,该评估值可以与其他参考值进行比较,例如平均数、平均值或中值或患有特殊疾病或并在的受试者人群的观察值。例如,这种参考值可用于与特殊个体的评估水平进行比较,其中特殊个体例如随后被确定患有比获得参考值的总患者组活动性更强的疾病。

[0174] 对照值可以采取多种形式。对照值可以是单一界限值,例如中值或平均值。正常对照值可以是正常对照范围。

[0175] 受检个体

[0176] 受检者包括以上列出的个体。适合使用本发明分析法检测的个体包括但不限于还未确诊为患有疾病但表现出症状和 / 或就医的个体(例如患有未确诊病症或疾病的个体);已确诊癌症的个体;怀疑患有癌症但还未确诊患有癌症的个体;明确健康且正在进行常规筛查的个体;已确诊患有纤维化的个体;怀疑患有纤维化但还未确诊患有纤维化的个体;已确诊患有丙型肝炎病毒(HCV)或乙型肝炎病毒(HBV)感染(和可选还确诊患有 HCV 感染或 HBV 感染相关的肝损伤)的个体;和正在进行癌症或纤维化疾病治疗的个体。

[0177] 在一些情况下,受检个体是患有未确诊病症或疾病的个体,例如表现出症状和 / 或主诉的个体;本发明诊断方法可用来确定这类个体是否可能患有纤维化疾病或癌症。本发明诊断方法可以是鉴别诊断的一部分;且在一些情况下可以与一个或多个诊断试验结合使用,例如以确认或排除诊断。

[0178] 生成报告

[0179] 本发明的诊断方法可包括报告的生成,该报告提供了个体是否可能患有纤维化疾病或癌症的指征。此报告可包括例如进一步评估的建议;治疗药物治疗的建议;等等信息。

[0180] 本发明的报告还可包括一个或多个以下内容:1) 服务供应商的信息;2) 患者数据;3) LOXL2 水平相关的数据;4) 后续评估建议;5) 治疗药物治疗;和 6) 其他特点。

[0181] 进一步评估

[0182] 根据 LOXL2 水平的检测,和 / 或根据(上述)报告,医生或其他有资格的医学人员可确定是否需要受试者(患者)进行进一步评估。进一步评估可包括例如肺功能检查(例如,当怀疑肺纤维化时);肝功能检查(例如当怀疑肝纤维化时);和多种癌症检查,根据怀疑癌症的类型可能进行不同检查。

[0183] 在一个实施例中,当怀疑个体患有癌症时,可进行各种癌症检查,其中这些检查包括,例如组织活检的组织化学分析以确定是否存在癌性细胞;确定是否存在肿瘤相关抗原的检查;等等。

[0184] 在另一个实施例中,当怀疑个体患有肺纤维化疾病时,可对个体进行肺纤维化疾病症状的评估。肺纤维化疾病的症状可包括但不限于体重下降、肺重量增加、肺纤维化、病理性肺结构(例如“蜂巢”肺)、Ashcroft 评分升高、肺胶原蛋白水平增加、CD45⁺/ 胶原蛋白⁺ 细胞数增加、肺细胞增殖和扩张以及细支气管肺泡(BAL)液体中白细胞数增加。症状还可包括,例如一种或多种以下分子的肺水平增加:LOXL2、 α -平滑肌肌动蛋白(α -SMA)、转化生长因子 β -1 (TGF β -1)、基质细胞衍生因子(SDF-1)(例如 SDF-1 α)、内皮素-1 (ET-1) 和磷酸化 SMAD2。

[0185] 在另一个实施例中,当怀疑个体患有肝纤维化疾病时,可对个体进行肝功能的标志物评估。肝功能包括但不限于蛋白质例如血清蛋白(例如白蛋白、凝血因子、碱性磷酸酶、氨基转移酶(如丙氨酸氨基转移酶、天冬氨酸氨基转移酶)、5'-核苷酶、 γ -谷氨酰转肽酶等等)的合成、胆红素的合成、胆固醇的合成和胆酸的合成;肝代谢功能,包括但不限于碳水化合物代谢、氨基酸和氮代谢、激素代谢和脂质代谢;外源性药物的解毒作用;血流动力学功能,包括内脏和门脉血流动力学;等等。例如,使用标准分析法测定血清丙氨酸氨基转移

酶(ALT)水平。一般来说,低于大约 45 国际单位的 ALT 水平是正常的。ALT 水平升高可表明肝功能受损。肝功能储备的定量测试还可用于评估肝功能,其中这些测试包括,例如吲哚菁绿清除率(ICG)、半乳糖消除能力(GEC)、氨基比林呼气试验(ABT)、安替比林清除率、单乙基甘氨酸二甲苯胺(MEG-X)清除率和咖啡因清除率。

[0186] 治疗

[0187] 根据 LOXL2 水平的检测,和 / 或根据(上述)报告,医生或其他有资格的医学人员可确定是否建议进行适合的治疗药物治疗,例如以治疗纤维化疾病、以治疗癌症等等。

[0188] 例如,根据 LOXL2 循环水平和可选的进一步评估(例如组织活检的组织化学分析),已确定患有早期癌症的个体可开始癌症化疗药物治疗方案和 / 或可使用放射疗法治疗和 / 或可进行手术去除癌症。

[0189] 癌症化疗药物(“化疗药物”)包括细胞毒和细胞抑制药物。化疗药物可包括对细胞具有其他作用例如将转化状态逆转至分化状态的作用或可抑制细胞复制的药物。在例如 Goodman et al., “疗法的药理学基础 (The Pharmacological Basis of Therapeutics),” Sixth Edition, A. B. Gilman et al., eds. / Macmillan Publishing Co. New York, 1980 中列出了已知细胞毒药剂的实例。这些药剂包括紫杉烷,例如紫杉醇和多烯紫杉醇;氮例如氮芥、美法仑、尿嘧啶氮芥和苯丁酸氮芥;乙烯亚胺衍生物,例如噻替哌;烷基磺酸盐,例如白消安;亚硝基脲,例如环己亚硝脲、甲基环己亚硝脲和链脲霉素;三氮烯,例如氮烯唑胺;叶酸类似物,例如甲氨蝶呤;嘧啶类似物,例如氟二氧嘧啶、阿糖胞苷和阿扎立平;嘌呤类似物,例如巯基嘌呤和硫鸟嘌呤;长春花生物碱类,例如长春花碱和长春新碱;抗生素,例如放线菌素 D、柔红霉素、阿霉素和丝裂霉素;金属配合物,例如配位铂配合物,例如顺铂;取代尿素,例如羟基脲;甲基胍衍生物,例如甲基胍;肾上腺皮质抑制剂,例如米托坦;激素和拮抗剂,例如肾上腺皮质激素(强的松)、孕酮(羟孕酮己酸酯、乙酸酯和甲地孕酮乙酸酯)、雌激素(己烯雌酚和乙炔雌二醇)、和雄激素(睾酮丙酸酯和氟甲睾酮)。

[0190] 在另一个实施例中,根据例如 LOXL2 循环水平和可选根据进一步评估(例如肺功能检查)确定患有 IPF 的个体可使用 IPF 的药物疗法和 / 或其他 IPF 疗法进行治疗。IPF 的首要治疗是药物治疗,IPF 治疗中最常用的药物是皮质类固醇(例如强的松)、青霉胺和多种抗肿瘤药(例如环磷酰胺、硫唑嘌呤、苯丁酸氮芥、长春新碱和秋水仙碱)。其他治疗包括吸氧,以及在极端情况下肺移植。

[0191] 在另一个实施例中,根据 LOXL2 循环水平和可选根据进一步评估(例如肝功能检查;HCV、HBV 感染检查等等)确定患有肝纤维化的个体可使用例如抗病毒药剂如适合治疗 HCV 和 HBV 感染或其他肝炎病毒感染的药剂进行治疗。例如, HCV 感染可使用干扰素 α (IFN- α)、塔利伟林、利巴韦林、左旋伟林(levovirin)、HCV NS3 抑制剂、HCV NS5B 抑制剂或一种或多种前述药物的组合进行治疗。

[0192] 检测治疗疗效的方法

[0193] 本发明提供了监测 LOXL2 相关疾病或病症例如以循环的 LOXL2 升高为特征的疾病的治疗疗效的方法,此方法通常涉及在某个时间点使用本发明的 LOXL2 分析法测定个体中循环的 LOXL2 水平。一方面,样品中 LOXL2 水平低于该个体较早时间点时的水平表明了治疗具有疗效。另一方面,与对照或参考样品相比较低的水平表明了治疗的疗效。另一方面,

LOXL2 水平,例如高 LOXL2 水平表明个体将对治疗例如 LOXL2 靶向治疗产生有益的反应。

[0194] 例如,在个体中于第一个时间点和第二个时间点时测定循环 LOXL2 水平,其中第二个时间点迟于第一个时间点。第一个时间点可以在治疗开始前;而第二个时间点可以在治疗期间(例如治疗方案开始后)。第一个时间点可以在治疗期间;而第二个时间点可以在较靠后的治疗期间。第二个时间点可以在第一个时间点之后大约 1 小时至大约 1 年,例如,第二个时间点可以在第一个时间点之后大约 1 小时至大约 2 小时、大约 2 小时至大约 4 小时、大约 4 小时至大约 8 小时、大约 8 小时至大约 16 小时、大约 16 小时至大约 24 小时、大约 24 小时至大约 36 小时、大约 36 小时至大约 72 小时、大约 72 小时至大约 4 天、大约 4 天至大约 1 周、大约 1 周至大约 2 周、大约 2 周至大约 1 个月、大约 1 个月至大约 3 个月、大约 3 个月至大约 6 个月、或大约 6 个月至大约 1 年、或是超过 1 年。

[0195] 因此,例如在一些实施方案中,本发明测定以循环 LOXL2 升高为特征的疾病的疗效的方法包含:a) 在第一个时间点测定个体中循环的 LOXL2 水平(通过在第一个时间点测定自个体获得的液体样品中的 LOXL2 水平);b) 在第二个时间点测定个体中循环的 LOXL2 水平(通过在第二个时间点测定自个体获得的液体样品中的 LOXL2 水平);并对第一个时间点和第二个时间点的 LOXL 水平进行比较。

[0196] 如果第二个时间点的循环 LOXL2 水平低于第一个时间点的循环 LOXL2 水平,可以总结为对以循环的 LOXL2 升高为特征的疾病进行的治疗是有效的;在这种情况下,可以建议继续此治疗方案。如果第二个时间点的循环 LOXL2 水平高于第一个时间点的循环 LOXL2 水平,可以总结为对以循环的 LOXL2 升高为特征的疾病进行的治疗无效;在这种情况下,可以建议中断此治疗方案,增加此治疗方案中使用药物的剂量,增加给药次数,或是使用替代治疗方案。如果第二个时间点的循环 LOXL2 水平与第一个时间点的循环 LOXL2 水平没有明显变化,可以总结为对以循环的 LOXL2 升高为特征的疾病进行的治疗无效,或是该治疗方案应进行变更;在这种情况下,可以建议中断此治疗方案,增加此治疗方案中使用药物的剂量,增加给药次数,或是使用替代治疗方案。

[0197] 受检者

[0198] 用于监测治疗效果的本发明方法可用于检测多类型个体,包括,例如,已确诊患有癌症且正在进行治疗的个体;已确诊患有纤维化且正在进行治疗的个体;已确诊患有 HCV 或 HBV 感染且正在治疗 HCV 或 HBV 感染的个体;已确诊患有 HCV 或 HBV 感染相关肝损伤且正在治疗 HCV 或 HBV 感染和 / 或肝损伤的个体;等等。

[0199] 在一些情况下,使用本发明 LOXL2 分析法进行检测的个体是当前正在进行癌症治疗的个体。癌症化疗可以是多种细胞毒性药剂。这些细胞毒性药剂包括紫杉烷,例如紫杉醇和多烯紫杉醇;氮例如氮芥、美法仑、尿嘧啶氮芥和苯丁酸氮芥;乙烯亚胺衍生物,例如噻替哌;烷基磺酸盐,例如白消安;亚硝基脲,例如环己亚硝脲、甲基环己亚硝脲和链脲霉素;三氮烯,例如氮烯唑胺;叶酸类似物,例如甲氨蝶呤;嘧啶类似物,例如氟二氧嘧啶、阿糖胞苷和阿扎立平;嘌呤类似物,例如巯基嘌呤和硫鸟嘌呤;长春花生物碱类,例如长春花碱和长春新碱;抗生素,例如放线菌素 D、柔红霉素、阿霉素和丝裂霉素;金属配合物,例如配位铂配合物,例如顺铂;取代尿素,例如羟基脲;甲基胍衍生物,例如甲基胍;肾上腺皮质抑制剂,例如米托坦;激素和拮抗剂,例如肾上腺皮质激素(强的松)、孕酮(羟孕酮己酸酯、乙酸酯和甲地孕酮乙酸酯)、雌激素(己烯雌酚和乙炔雌二醇)、和雄激素(睾酮丙酸酯和氟甲

睾酮)。

[0200] 在一些实施例中,癌症治疗包括给药抑制 LOXL2 多肽酶活性的药剂。抑制 LOXL2 多肽酶活性的药剂包括 LOXL2 酶活性的别构抑制剂。在一些情况下,该别构抑制剂是抗 LOXL2 单克隆抗体,例如与 LOXL2 的“SRCR3-4”结构域内的表位结合的抗 LOXL2 单克隆抗体。抑制 LOXL2 酶活性且与 SRCR3-4 结构域内的表位结合的单克隆抗体的非限制性实例是 AB0023 和 AB0024;参见例如美国专利 2009/0053224。

[0201] 在另一个实施例中,正在进行肝纤维化治疗或正在对可导致肝纤维化的疾病进行治疗的个体适合使用本发明的方法进行检测。在一个实施例中,正在进行 HCV 感染治疗的个体适合使用本发明的方法进行检测。例如,可以用 IFN- α 、塔利伟林、利巴韦林、左旋伟林、HCV NS3 抑制剂、HCV NS5B 抑制剂或一种或多种前述药物的组合治疗 HCV 感染。

[0202] 在另一个实施例中,正在进行 IPF 治疗的个体适合使用本发明的方法进行检测。常用于 IPF 治疗的药物包括,例如皮质类固醇(例如强的松)、青霉胺和多种抗肿瘤药(例如环磷酰胺、硫唑嘌呤、苯丁酸氮芥、长春新碱和秋水仙碱)。

[0203] 对照值

[0204] 从受检者获得的液体样品中的 LOXL2 水平可以与本文所述的正常对照值或正常对照值的范围或其他参考值进行比较。对照值的依据可以是来源于对照人群的比较样品(例如血液、血浆或血清样品,或其他液体生物样品)中的 LOXL2 水平,例如普通人群或人类受试者的选拔人群。例如,该选拔人群可以由明确健康的受试者组成,例如此前没有任何纤维化或癌症的体征或症状的个体。明确健康的个体通常也不会以其他方式表现疾病的症状。换句话说,如果由专业医生进行检查这些个体将被认为是健康且没有疾病症状的。

[0205] 对照值可以采取多种形式。对照值可以是单一界限值,例如中值或平均值。正常对照值可以是正常对照范围。在某些情况下,对照的正常值低于本发明检测方法的检测限,例如低于大约 175pg/ml、低于大约 150pg/ml、低于大约 125pg/ml、低于大约 100pg/ml、低于大约 75pg/ml、低于大约 50pg/ml 或低于大约 40pg/ml。

[0206] 预后方法

[0207] 本发明还提供了多个预后和预测方法。例如,本发明提供了确定患有纤维化疾病的个体对纤维化疾病治疗表现出有利临床反应的可能性的方法。在另一个实施例中,此方法确定了特殊疾病结果或终点或治疗反应性的可能性或风险。此方法通常涉及使用本发明的 LOXL2 分析法检测例如从个体获得的液体样品中循环的 LOXL2 水平。一方面,高于正常对照或其他参考水平的 LOXL2 水平表明该个体对纤维化疾病的治疗表现出有利临床反应的可能性增加。另一方面,相对较低的水平表明出现特殊疾病结果或终点的相对可能性或风险较低,或是其他预后信息。同样,相对较高的 LOXL2 水平可表明较差的预后,例如出现特殊疾病或病症的结果或达到特殊终点的风险或可能性提高。如上文所述,纤维化疾病包括肺纤维化、肝纤维化、心肌纤维化和骨髓纤维化。在一些情况下,例如,当循环的 LOXL2 水平表明该受试者可能对纤维化疾病的治疗具有有利的临床反应时,本发明的方法还涉及治疗纤维化疾病的个体。

[0208] 适合使用本发明的分析方法进行检测的个体包括已确诊患有纤维化的个体,例如肝纤维化、肾纤维化、肺纤维化、骨髓纤维化、心肌纤维化或其他类型纤维化。肝纤维化包括但不限于肝硬化和相关病症,例如慢性病毒性肝炎(由例如 HCV 或 HBV 感染引起)、NAFLD、

ASH、NASH、PBC、胆汁性肝硬化、原发性硬化性胆管炎(PSC)和自身免疫性肝炎。肾纤维化可由多种疾病和损伤引起,其中这些疾病和损伤的实例包括慢性肾病、代谢综合征、膀胱输尿管反流、小管间质性纤维化、糖尿病(包括糖尿病性肾病变)和作为结果的肾小球肾炎(GN),包括但是不限于局灶性节段性肾小球硬化和膜性肾小球肾炎、肾小球膜毛细血管 GN。肺的纤维化包括许多综合征和疾病,其中范例疾病包括 IPF、特发性间质性肺炎和 ARDS。肺纤维化还包括但不限于隐源性纤维化肺泡炎、慢性纤维化间质性肺炎、ILD 和 DPLD。

[0209] 在一些情况下,适合的受检者具有晚期纤维化,但仍可能适合使用纤维化治疗方案进行治疗。例如,适合的受试者包括患有活动性(非末期)纤维化的受试者。在一些情况下,适合的受检者是患有纤维化且可能预计将经历疾病快速发展的个体。在一个实施例中,个体可能患有晚期例如 METAVIR F4 肝纤维化;患有 METAVIR F4 纤维化和阳性 LOXL2(例如,使用本发明 LOXL2 分析法测定时,高于液体样品中 LOXL2 的正常水平)的个体可能仍然是纤维化治疗的候选人。携带阴性 LOXL2(用本发明 LOXL2 分析法测定时,为液体样品中 LOXL2 的正常水平)的 METAVIR F4 肝纤维化患者可能不认为是纤维化治疗的候选人。在另一个实施例中,患有早期肝纤维化(例如 METAVIR F1 或 F2)、LOXL2 升高(例如,使用本发明 LOXL2 分析法测定时,高于液体样品中 LOXL2 的正常水平)的个体可被认为是纤维化治疗的候选人。

[0210] 对照值

[0211] 从受检者获得的液体样品中的 LOXL2 水平可以与正常对照值或正常对照值的范围进行比较。对照值的依据可以是来源于对照人群的比较样品(例如血液、血浆或血清样品,或其他液体生物样品)中的 LOXL2 水平,例如普通人群或人类受试者的选拔人群。例如,该选拔人群可以由明确健康的受试者组成,例如此前没有任何纤维化体征或症状的个体。明确健康的个体通常也不会以其他方式表现疾病的症状。换句话说,如果由专业医生进行检查这些个体将被认为是健康且没有疾病症状的。

[0212] 对照值可以采取多种形式。对照值可以是单一界限值,例如中值或平均值。正常对照值可以是正常对照范围。在某些情况下,对照的正常值低于本发明检测方法的检测限,例如低于大约 175pg/ml、低于大约 150pg/ml、低于大约 125pg/ml、低于大约 100pg/ml、低于大约 75pg/ml、低于大约 50pg/ml 或低于大约 40pg/ml。

[0213] 生成报告

[0214] 通过测定循环的 LOXL2 水平来评估患者对纤维化疾病的治疗表现出有利临床反应的可能性。患者对纤维化疾病的治疗表现出有利临床反应的可能性将提供在报告中。此报告还可包括与患者产生反应的可能性相关的信息。例如,本发明的方法还可包括生成或输出报告的步骤,该报告提供了受试者反应可能性评估的结果,可以以电子媒体(例如在计算机显示器的电子显示屏)或有形介质(例如打印在纸上或其他有形介质上)的形式提供。

[0215] 如本文所用的“报告”是电子或有形文件,包括提供了与本发明可能性评估及其结果相关的目标信息的报告元素。本发明报告至少包括可能性评估,例如纤维化疾病患者对纤维化疾病治疗表现出有利临床反应的可能性的指征。本发明报告可完全或部分以电子形式生成。本发明报告还可包括一个或多个以下内容:1) 检测机构相关信息;2) 服务供应商的信息;3) 患者数据;4) 样品数据;5) 解释性报告,可包括多方面信息包括:a) 指征;b) 检测数据,例如循环的 LOXL2 水平;和 6) 其他特点。

[0216] 预后和预测 IPF 的方法

[0217] 在一些实施方案中,本文提供了特发性肺纤维化(IPF)的诊断、预后和预测方法。如本文的实例所示,在 IPF 患者的血清中检测到与正常对照样品相比 LOXL2 表达升高;另外,循环 LOXL2 水平升高表明了活动性 IPF 表型和不同疾病结果的风险增加。在 IPF 患者的肺组织中也检测到较高的 LOXL2 表达。因此,本文提供了使用 LOXL2 作为 IPF 疾病标志物例如 IPF 疾病活动性标志物或活动性 IPF 表型标志物的方法。因此,在本发明提供方法的一些实施方案中,LOXL2 可用作 IPF 的诊断、预后和 / 或预测标志物。一方面,LOXL2 水平用于评估纤维形成和 / 或不同 IPF 阶段、严重程度或结果,例如特殊疾病结果或治疗反应性的可能性。

[0218] 另一方面,LOXL2 水平是活动性疾病或疾病活动性水平的指标。另一方面,通常与对照或其他参考样品相比较高的血清水平表明了出现特殊疾病结果或在特殊时期出现特殊疾病结果的风险。在其他方面,LOXL2 水平表明了患者对特殊治疗产生反应的可能性或给出了对正在进行的治疗的反应性的信息,例如使用 LOXL2 抑制剂进行的治疗或其他治疗。因此,在一些实施方案中,这些方法还包括根据预测或检测的 LOXL2 水平开始、中断或改变疾病治疗方法。

[0219] 使用这些方法评估或预测的范例疾病结果包括 IPF 疾病进程(定义为以下之一的复合终点:任何原因导致的死亡)、较差的无进展生存期(PFS)、呼吸系统住院治疗、肺功能下降,例如肺功能绝对下降(可定义为用力肺活量(FVC)下降 10% 且一氧化碳弥散量(DL_{CO})下降 5% 或 DL_{CO} 下降 15% 且 FVC 下降 5%) 和死亡。

[0220] 这些方法通常涉及获得患者样品和 / 或确定样品中的 LOXL2 水平(例如使用本文描述的方法)以及根据这些和其他信息进行多种统计分析。在一个实施例中,确定了患者或样品是否具有高或低水平的 LOXL2,例如,低或高的循环或血清 LOXL2 水平。确认此信息,例如可通过根据给定人群中测定的 LOXL2 水平分布二分 LOXL2 水平确认此信息,例如在样本集合中,制定 LOXL2 “低”和“高”水平的界限点。例如,LOXL2 高水平可认为是给定样品中不低于或高于特殊浓度的水平,例如每毫升(mL)血清中 LOXL2 高于或大约 800 皮克(pg)。或者,可以根据人群中样品的水平分布或是根据与对照或参考样品相比的特定倍数变化来定义 LOXL2 高血清水平。

[0221] 在一些方面,这些方法通过测定 LOXL2 水平与其他相关测量结果来进行,例如疾病严重程度或功能状态的标志物,例如 IPF 的基线测量结果,例如反应 IPF 严重程度的标志物,例如预测用力肺活量(FVC)的百分比、预测一氧化碳弥散量(DL_{CO})的百分比、6 分钟步行距离(6MWD)、平均肺动脉压(mPAP)、最低休息血氧饱和度(SpO₂)、复合生理指标(CPI)、圣乔治呼吸问卷评分(SGRQ)、过渡性呼吸困难指数(TDI)评分、对治疗的反应和 / 或疾病或疾病严重程度的其他生物标志物。因此,在预测模型和方法的一些方面,LOXL2 是整合了疾病严重程度或功能状态的 IPF 疾病结果的生物标志物和 / 或其他生物标志物。

[0222] 诊断、预后和预测方法的统计分析

[0223] 在一些实施例中,根据 LOXL2 水平和其他结果进行统计分析。在一个实例中,对 LOXL2 水平进行了评估,例如使用标准直方图评估未转换或 log₁₀x 转换的 LOXL2 水平。统计分析可包括测定个体样品和 / 或患者的不同数值,例如平均值,例如几何平均值,或 LOXL2 表达水平和 / 或基线变量的中值,以及计算不同样品或病症之间的标准偏差和倍数变化,

和使用大量众所周知的检验比较表达水平和 / 或其他变量,例如学生 t 检验可用于例如比较基线变量和 LOXL2 表达水平的分布。

[0224] 在一些方面,使用皮尔逊相关性(PC)来评估成对值之间的线性关系(相关性)(例如通过计算 PC 系数),例如 LOXL2 表达水平和其他变量例如本文所述的基线 IPF 变量之间。通过计算个体成对变量的 PC 系数,这些分析可用于线性分离表达模式的分布(如实施例 9 所示,绘制 x 轴和 y 轴的个体矩阵)。

[0225] 预测模型

[0226] 在一些实施方案中,预测方法还包含统计分析的更多使用以及预测模型和系统的使用。在一些方面,根据 LOXL2 水平和其他信息例如疾病严重程度的变量指征和其他生物标志物,使用这些模型和系统预测疾病结果、终点、反应性和 / 或事件。例如,生存模型可用于检查 LOXL2 水平和其他协变量和一个或多个事件、终点或结果之间的相互关系,例如疾病结果,如 IPF 结果和对一个或多个疗法的反应性;此模型可用于预测一名特定患者是否出现事件、终点或结果,或是该结果是否在特定时间段内出现的可能性。

[0227] 在一个此种实施例中,进行 Cox 比例风险模型,例如 Cox 逐步比例风险模型以检查 LOXL2 水平(和可选的其他协变量,例如本文描述的基线 IPF 变量和其他可能与疾病结果相关的变量,例如其他疾病生物标志物)和结果例如 IPF 结果之间的相互关系。使用众所周知的统计方法,计算风险比(HRs),代表了协变量例如 LOXL2 水平和患者结果、终点或事件之间的相互关系。因此,在一些方面,本文提供的方法包括使用这些模型根据 LOXL2 水平和其他协变量的值预测各个患者的结果、终点和 / 或事件,例如 IPF 疾病结果。在一个实例中,此模型包括 LOXL2 水平(例如,“高”LOXL2 水平的存在与否)、6MWD 和 / 或 CPI。

[0228] 此模型中使用的 IPF 结果、事件和终点包括疾病进程或严重程度的终点或事件指标,例如任何通常在 IPF 临床试验或治疗方案中规定的终点,例如 IPF 疾病进程、肺功能下降、呼吸系统住院治疗和死亡。在一些方面,疾病进程代表了规定为以下内容之一的复合终点:任何原因导致的死亡、呼吸系统住院治疗或肺功能绝对下降,定义为用力肺活量(FVC)下降 10% 且一氧化碳弥散量(DL_{CO})下降 5% 或 DL_{CO} 下降 15% 且 FVC 下降 5%。肺功能终点可使用肺功能检查来确定。在一些实例中,至少使用了两个检查,分别进行了至少 4 周。其他范例终点是所有原因导致的死亡、移植后生存和死亡。此结果可定义为达到终点前经过的时间。

[0229] 可以使用受试者工作特征(ROC)曲线来评估系统的敏感性与特异性。使用众所周知的方法计算曲线下面积(AUC)。

[0230] 在预测模型的一些实例中,例如在一个特定的置信区间(CI)和置信水平,例如 95% 置信区间,例如根据低于特定阈值的 P 值如 0.05,LOXL2 明显与一个或多个结果或事件例如疾病进程有关。对于一个给定的协变量,例如高 LOXL2 水平,可以使用风险比来检测特定结果的风险的倍数变化。在一些方面,给定的 LOXL2 水平与至少 2 倍、3 倍、4 倍、5 倍、6 倍或 7 倍风险形成特殊结果或本文所述的其他结果有关,例如具有在统计学上显著的相关性,其中特殊结果例如疾病进程、住院治疗、肺功能下降。例如,风险的倍数变化可表达为与正常受试者如 LOXL2 水平未升高的受试者或具有“低”LOXL2 水平的受试者相比较的形式。在一个实例中,当模型中包括其他协变量例如 6MWD 和 CPI 时,LXOL2 水平例如“高”LOXL2 水平与结果例如疾病进程具有统计学显著的相关性。

[0231] 试剂盒和分析装置

[0232] 本发明提供了进行用于循环 LOXL2 的本发明分析法的试剂盒和分析装置。

[0233] 在一些实施方案中,本发明试剂盒包括:a)LOXL2 特异性第一抗体;和 b)LOXL2 特异性第二抗体。在一些情况下,第一抗体是多克隆 LOXL2 特异性抗体;第二抗体是单克隆 LOXL2 特异性抗体。在其他情况下,第一抗体是单克隆 LOXL2 特异性抗体;第二抗体是多克隆 LOXL2 特异性抗体。在一些情况下,第一抗体和/或第二抗体包含可检测的标记物。在一些情况下,无论是第一抗体还是第二抗体均不包含可检测的标记物。

[0234] 在一些实施方案中,第一抗体被固定在不溶性支架上。或者,试剂盒中提供不溶性支架,使用者将第一抗体固定至该不溶性支架上。因此,在一些情况下,本发明的试剂盒包括:a)LOXL2 特异性第一抗体;b)LOXL2 特异性第二抗体;和 c) 不溶性支架。如上所述,该不溶性支架可以多种材料和形式提供。例如,在一些实例中,该不溶性支架是塑料多孔板、试纸条或浸渍片。

[0235] 如上文所述,在一些实例中,无论是第一抗体还是第二抗体均不包含可检测的标记物。在这种情况下,可提供包含可检测标记物且与第二抗体结合的第三抗体;这种抗体通常是指二抗。可检测的标记物可以是例如化学发光试剂、微粒标记物、比色剂、能量转移试剂、酶、荧光试剂或放射性同位素。因此,在一些实施方案中,本发明的试剂盒包含:a)LOXL2 特异性第一抗体;b)LOXL2 特异性第二抗体;和 c) 第三抗体,其中第三抗体包含一个可检测的标记物,且与第二抗体结合。在一些情况下,本发明试剂盒包含:a)LOXL2 特异性第一抗体;b)LOXL2 特异性第二抗体;c) 第三抗体,其中第三抗体包含一个可检测的标记物,且与第二抗体结合;和 d) 不溶性支架。该不溶性支架可以以如上文所述的任何材料或形式提供。例如,在一些实例中,该不溶性支架是塑料多孔板、试纸条或浸渍片。

[0236] 本发明试剂盒还可包括纯化的 LOXL2,用于生成标准曲线。

[0237] 本发明试剂盒还可包括一个或多个其他成分,例如缓冲液;蛋白酶抑制剂;可检测的标记物;洗涤剂;封闭剂;等等。该试剂盒的多种成分可存放于单独容器中,或是如有需要某些相容成分可以预先合并至一个容器中。

[0238] 除了上述成分之外,本发明试剂盒可包括使用试剂盒内成分以实践本发明方法的说明书。实践本发明方法的说明书通常记录在适合的记录介质上。例如,说明书可打印在基质如纸或塑料等等之上。就此而言,说明书可作为包装说明书放在试剂盒内,印在试剂盒或其成分的容器标签上(例如与包装或分包装相连)等等。在另一个实施方案中,说明书以电子保存的数据文件形式放在合适的计算机可读取存储介质中,例如只读型光盘(CD-ROM)、数字多功能光盘(DVD)、软盘等等。在其他实施方案中,实际说明书未放在试剂盒中,而是提供了从远程来源例如通过互联网获得说明书的方法。此实施方案的实施例是包括网址的试剂盒,在该网址上可查看和/或下载说明书。通过此方法得到的说明书被记录在合适的基质上。

[0239] 分析装置

[0240] 本发明还提供了在检测从个体获得的液体生物样品中 LOXL2 的分析装置。该仪器可包括界定了轴向流路的基质。

[0241] 基质可包含:i) 位于接收液体样品的流路上游末端样品接收区;ii) 位于流路内且在样品接收区下游的一个或多个检测区,所述一个或多个检测区中均包含固定于其中的

LOXL2 特异性抗体,以形成固定的抗 LOXL2/LOXL2 复合物;和 iii) 位于流路内部且在样品接收区下游的一个或多个对照区,其中该一个或多个对照区可包括阳性和 / 或阴性对照。检测区和对照区可以交替形式位于流路内,由位于所有对照区上游的检测区开始。

[0242] 基质可包含:i) 位于接收液体样品的流路上游末端的样品接收区, ii) 位于流路内部且在样品接收区下游的一个或多个检测区,所述一个或多个检测区中均含有 LOXL-2 特异性抗体,以形成抗 LOXL2 抗体 /LOXL2 复合物;和 iii) 位于流路内部且从样品接收区下游的一个或多个对照区,其中该一个或多个对照区可包括阳性和 / 或阴性对照。检测区和对照区可以交替形式位于流路内,由位于所有对照区上游的检测区开始。在一些实施方案中,LOXL2 特异性抗体不固定;并且,当抗 LOXL2 抗体与样品中存在的任何 LOXL2 结合时,抗 LOXL2 抗体 /LOXL2 复合物是可活动的。例如,在第一个检测区形成的抗 LOXL2 抗体 /LOXL2 复合物可以活动,所以它进入包含一个固定的抗 LOXL2 抗体的第二个检测区,其中抗 LOXL2 抗体 /LOXL2 复合物与固定的抗 LOXL2 抗体结合,形成固定的抗 LOXL2 抗体 /LOXL2 复合物。

[0243] 在一些实施方案中,当使用这种分析装置时,在将液体样品加入至该装置的样本接收区之前,可先混合标记的 LOXL2 特异性抗体与液体样品,此混合可生成标记的抗体 /LOXL2 复合物。在这些实施方案中,将包含标记的抗体 /LOXL2 复合物的液体样品加入至该分析装置的样品接收区。液体样品沿着装置流动,直至达到检测区。存在于检测区的抗体与标记的抗体 /LOXL2 复合物中存在的 LOXL2 结合;然后可以被检测。

[0244] 该分析装置还可包括含有标记的 LOXL2 特异性抗体的标记区,其中标记抗体能够结合固定的 LOXL2/ 抗 LOXL2 抗体复合物中存在的 LOXL2,以形成标记的 LOXL2/ 抗 LOXL2 抗体复合物,其中标记抗体在液体样品存在时可以移动。当使用这种分析装置时,将可能含有 LOXL2 的液体样品加入至该装置的样品接收区;存在于标记区中的抗 LOXL2 抗体与 LOXL2 结合,形成标记的抗体 /LOXL2 复合物,与标记抗体类似,也是可活动的;标记抗体 /LOXL2 复合物沿着装置流动,直至液体样品到达检测区。存在于检测区的抗 LOXL2 抗体与标记抗体 /LOXL2 复合物中的 LOXL2 结合;然后可以被检测。

[0245] 或者,该分析装置可包括一个含有特异于抗 LOXL2 抗体的标记抗体,其中该标记抗体与检测区中形成的任何抗 LOXL2 抗体 /LOXL2 复合物结合。在一些情况中,该标记抗体是可活动的。

[0246] 标记抗体可包含一个标记物例如化学发光试剂、微粒标记物、比色剂、能量转移试剂、酶、荧光试剂或放射性同位素。

[0247] 对照区包括阳性对照区和阴性对照区。

[0248] 基质通常是不溶性支架,其中合适的不可溶性支架包括但不限于聚二氟乙烯(PVDF)、纤维素、硝酸纤维素、尼龙等等。基质可以是柔性的,也可以是相对不易弯曲的。该机制可位于包含支架和可选的封盖的外壳(housing)内,其中所述外壳含有施用孔和一个或多个观察口。分析装置可以是多种形式,例如试纸条、浸渍片等等。

[0249] 实施例

[0250] 以下实施例不用来限制发明人所认为的发明的范围;也不表示以下试验是进行的全部或仅有的试验。努力确保所用数字(例如数量,温度等等)的准确性,但一些实验错误和偏差应考虑在内。除非另有说明,否则份数是重量份数,分子量是平均分子量,温度是摄氏度,压力是大气压或接近大气压。可能使用标准缩写,例如 bp, 碱基对;kb, 千碱基对;p1,

皮升 ;s 或 sec,秒 ;min,分钟 ;h 或 hr,小时 ;aa,氨基酸 ;kb,千碱基对 ;bp,碱基对 ;nt,核苷酸 ;i. m.,肌肉注射 ;i. p.,腹腔注射 ;s. c.,皮下注射 ;等等。

[0251] **实施例 1:**检测人血清或血浆样品中 LOXL2 的免疫分析

[0252] 材料和方法

[0253] 抗体

[0254] 针对重组纯化全长 LOXL2 蛋白生成兔多克隆抗体(“兔 A”);此抗体识别 LOXL2 所有结构域中的多个表位。鼠单克隆抗体 AB0030 与 LOXL2 催化结构域结合,并识别全长 LOXL2 蛋白和成熟的 LOXL2 蛋白(其在 SRCR2 和 SRCR3 结构域之间断裂)。

[0255] 在 MSD 平台上进行的 LOXL2 免疫分析

[0256] 过夜在 4°C 下用 30 μ l 体积的 3 μ g/ml 在磷酸缓冲生理盐水(PBS)中按配方配制的兔抗人 LOXL2 多克隆抗体的溶液包被来自于 MesoScale Discovery (MSD) (产品编号 L15XA-3) 的标准单点未包被电极平板。包被后,通过加入 PBS 中的 5% (w/v) Blocker A (MSD 产品号 R93AA-1) 的溶液封闭平板孔。封闭步骤后,使用自动洗板机用含有 0.05% 吐温 20 非离子型去垢剂的 PBS 洗涤平板 3 次。通过在 PBS 中 1:4 稀释(1 份血清,3 份 PBS) 单独制备待测人样品(血清或血浆)。然后将样品加入至平板每个孔中。室温下在旋转摇床(300-600rpm)上孵育样品 2-3 小时。样品结合后,再次使用自动洗板机用含有 0.05% 吐温 20 去垢剂的 PBS 洗涤平板 3 次。

[0257] 一抗 AB0030 是与 LOXL2 催化结构域结合的鼠抗人 LOXL2 单克隆抗体。将 PBS 中的 2% (w/v) Blocker A 的 1 μ g/ml AB0030 的溶液加入至每个孔中,然后于室温下在旋转摇床(300-600rpm)上孵育样品 1 小时。AB0030 结合后,再次使用自动洗板机用含有 0.05% 吐温 20 去垢剂的 PBS 洗涤平板 3 次。

[0258] 二抗是缀合至 SulfoTag 染料的羊抗鼠 IgG 分子(MSD 产品编号 R32AC-5)。将 PBS 中的 2% (w/v) Blocker A 的 1 μ g/ml 二抗的溶液加入至每个孔中,于室温下在旋转摇床(300-600rpm)上孵育平板 1 小时。二抗结合后,使用自动洗板机用含有 0.05% 吐温 20 去垢剂的 PBS 洗涤平板 3 次。

[0259] 将含表面活性剂的 1x Read Buffer T (MSC 产品编号 R92TC-2)加至每个孔中,随后立即在 MSD 成像 (Sector Imager) 2400 仪上测量平板。

[0260] 通过与同一分析板上的校准曲线进行比较来获得人类试样的相对定量值,校准曲线由在来自正常健康供体混合的人血清或血浆的已知浓度中添加的纯化重组人 LOXL2 蛋白(R&D Systems)组成。使用标准技术进行校准曲线拟合和未知样品插入。

[0261] 使用标准形式进行的 LOXL2 免疫分析

[0262] 使用 Costar3922 高结合多孔板。兔多克隆抗体(Ab) (兔“A”) 在 CB2 包被缓冲液(免疫学化学的技术 (Immunochemical Technologies) CB2(6248)) 中稀释为 0.625 μ g/ml。将稀释的多克隆 Ab 以 50 μ l/ 孔的体积加入至平板孔中,并将平板在 4°C 下放置过夜。使用多克隆抗体包被各孔后,用 200 μ l/ 孔 BB1 封闭溶液(免疫学化学的技术产品 #640 (Immunochemical Technologies product#640))在室温(RT)下封闭 1-3 小时。封闭后,使用 200 μ l/ 孔 PBS-T (含有 0.05% 吐温 20 的 PBS) 洗涤平板 3 次。

[0263] 每孔加入 25 μ l HiSpec 稀释液(AbD Serotec BUF049B)。然后在各孔中加入相同体积的检测血清;平板在室温下放置 2 小时。使血清样品结合后,洗涤平板 3 次。

[0264] 在 PBS-T+0.5% 牛血清白蛋白 (BSA) 中将一抗 (AB0030) 稀释为 $5 \mu\text{g/ml}$; 每孔中加入 $50 \mu\text{l}$ 稀释的一抗。在室温下放置平板一小时, 然后用 PBS-T 洗涤三次。二抗 (辣根过氧化物酶 (HRP) - 缀合羊抗鼠抗体, Jackson Immunoresearch, 0.8mg/ml) 在 PBS-T+0.5%BSA 中稀释 1:10000。每孔中加入 $50 \mu\text{l}$ 稀释的二抗。在室温下放置平板一小时, 然后用 PBS-T 洗涤三次。

[0265] **实施例 2**: 用于评估慢性丙型肝炎病毒 (HCV) 感染患者的肝纤维化的血清 LOXL2 检测

[0266] 通过免疫组织化学 (IHC) 的纤维化肝组织的分析显示了成纤维细胞、新生血管、炎症细胞和肝细胞构成的纤维生成界面处的局部 LOXL2 表达, 表明 LOXL2 与活动性纤维发生的疾病有关。为了进一步探索血清 LOXL2 与纤维化肝病的关系, 使用实施例 1 中描述的 LOXL2 特异性 ELISA。采集了 87 名慢性 HCV 感染患者的血清样品与肝活检。通过免疫分析测定 LOXL2 和已确定生物标志物即透明质酸 (HA) 的血清水平以及金属蛋白酶 -1 (TIMP1) 的组织抑制剂, 使用 Ishak 评分系统评估每个活组织切片的肝纤维的组织学阶段。单独地, 还采集了 30 名健康献血者的血清样品, 并评估了血清 LOXL2 水平。使用 ANOVA 检验以及 Mann-Whitney U 检验研究了按照纤维化评分分组的样品中血清生物标志物和纤维化评分之间的相关性。

[0267] 结果

[0268] 结果参见图 1 和图 2。在 83% 慢性 HCV 感染患者的血清中检测到 LOXL2 蛋白, 但在任何正常健康供体的血清中没有检测到 LOXL2 蛋白。在 HA、TIMP1 和 LOXL2 的血清水平和纤维化阶段之间存在正相关性。血清结果与 IHC 分析一致, 这表明相比在无感染或健康个体的样品中 LOXL 蛋白水平很低或无法检出, 在活动性纤维化区域存在高水平的 LOXL 蛋白。

[0269] **实施例 3**: IPF 患者中的血清 LOXL2

[0270] 对从 15 名特发性肺纤维化 (IPF) 确诊患者获得的血清样品进行 LOXL2 检测。结果参见图 3。列出了每个患者的识别编号。15 名患者中有 10 名检测为阳性; 其他 5 名低于检测限, 报告为“未检出”。还对年龄匹配的正常受试者进行了检测; 所有受试者的血清 LOXL2 均为阴性结果 (“未检出”; 低于检测限)。

[0271] **实施例 4**: 癌症患者中的血清 LOXL2

[0272] 对使用抗 LOXL2 (AB0024) 抗体治疗癌症的八名癌症患者进行了研究。下表 1 中列出了患者识别号 (“Pt ID”); 癌症诊断; 抗 LOXL2 抗体的剂量水平; 发展时间; 和 LOXL2 表达, 对由最初的原发肿瘤或相关样品分离的固定组织样品 ($\sim 5 \mu\text{m}$ 切片) 进行免疫组织化学检查得到。

[0273] 表 1

Pt ID	诊断	剂量水平 (mpk)	发展时间	LOXL2 表达
001	肾细胞	1	44天	血管
002	结肠直肠	1	稳定 (~7)	促结缔组织增生阳性

[0274]

Pt ID	诊断	剂量水平 (mpk)	发展时间 (个月)	LOXL2表达
003	子宫中胚叶 混合瘤 (mullerian)	1	57天	最小值; 不促结缔组织 增生
004	乳腺	3	38天	最小值; 不一致
005	结肠直肠	3	56天	促结缔组织增生阳性
006	黑色素瘤	3	42天	阳性
007	结肠 SC	10	57天	
008	前列腺	10	30天	促结缔组织增生阳性
009	卵巢/乳腺	10	51天	弱; 不促结缔组织增生

[0276] 血样采集自抗 LOXL2 治疗开始第 1 天(样品在抗 LOXL2 治疗前采集);和抗 LOXL2 治疗开始后第 29 天和 57 天。

[0277] 结果

[0278] 在所有时间点,8 名患者的血浆中均检出了 LOXL2,8 名患者的 5 名的血清样品中检出了 LOXL2。AB0024 给药并未清除或遮盖 LOXL2 信号。

[0279] 实施例 5:慢性 HCV 感染、非酒精性脂肪性肝炎(NASH) 1 和酒精性脂肪性肝炎(ASH) 患者肝组织中 LOXL2 的表达

[0280] 免疫组织化学的(IHC)染色显示了慢性 HCV 感染患者的肝组织中 LOXL2 的表达。速冻人组织样品获得自 Cureline (Burlingame, CA) 和 Asterand (Detroit, MI), 而且用抗 LOXL2 对连续切片进行染色。

[0281] 结果

[0282] 慢性 HCV 感染患者切片的结果参见表 6, 显示了此患者肝组织中 LOXL2 的蛋白表达。在图 6 的左图中(5x 物镜倍数), 黑色箭头指示了扩张至肝门区和门管区的纤维化区域。白色箭头指示了肝小叶周围的短纤维分隔。图 6 的右图(40x 物镜倍数)显示了在与肝细胞交界面(H)的纤维间隔(S)、窦周隙之内(箭头)和肝实质内的肌成纤维细胞之中(箭头)观察到的 LOXL2 免疫反应性。此结果表明在本研究中, LOXL2 在慢性 HCV 感染患者的肝组织中表达, 并且此表达通过本发明提供的分析法的实施方案进行了测定。在另一个 IHC 研究中, 在 NASH、HCV 相关纤维化和 ASH 的活动性疾病界面的肝组织上 LOXL2 表达有强定位, 但在健康肝上则没有(数据未显示)。

[0283] 实施例 6:用于人血清基质中 LOXL2 免疫分析法的校准标准品

[0284] 使用实施例 1 中描述的 LOXL2 免疫分析法(形成于 MesoScale Discovery 平台上的三明治免疫分析法), 在从健康个体获得的血清中未检测到 LOXL2。为了创建一条校准曲线, 将纯化的重组全长 LOXL2 蛋白加至混合的正常人血清中, 随后用血清连续稀释。

[0285] 结果

[0286] 结果参见表 7。每个数据点代表 3 个重复孔的平均值; 显示了 4 个独立板的曲线。

[0287] 表 2 显示了校准标准品在人血清基质中的特征。在表 2 中, 检测下限(LLOD)是空白孔的平均值+2.5*stdev(原始值, 外推); 定量下限(LLOQ)是浓度最低的校准标准品并且原始测量结果的相对误差 <30% 且变异系数 <30%。使用重复检测的样品测定批内和批间精

密度。

[0288] 表 2 :LOXL2 免疫分析法 :校准标准品在人血清基质中的特征

分析方法的特征	结果
准确度 (相对误差)	<15%
批内精密度	3.5%
批间精密度	15.5%
[0289] 冻/融循环后的恢复	70% 一次重复, >70% 2或多次重复
检测下限 (LLOD)	150-200 pg/ml
定量下限 (LLOQ)	180-550 pg/ml
定量上限 (ULOQ)	未确定

[0290] 实施例 7 :与轻度至中度肝纤维化患者相比肝硬化受试者中升高的 LOXL2 血清水平

[0291] 患者血清样品采集自二十六名患有慢性丙型肝炎感染的成人,他们加入了临床试验的空白对照组。受试者根据 Ishak 纤维化评分(1-3 :轻度至中度纤维化 ;5-6 :肝硬化)进行分组。受试者的人口统计特征参见表 3。

[0292] 表 3 :HCV 受试者的人口统计特征

特征	Ishak评分 1-3 (n=14)	Ishak评分 5-6 (n=12)	全部 (n=26)		
年龄*	53 (50.5, 56.0)	55 (47.8, 55.0)	53.5 (49.3, 55.8)		
性别					
男性	9 (64.3%)	9 (75.0%)	18 (69.2%)		
女性	5 (35.7%)	3 (25.0%)	8 (30.8%)		
种族					
白人	11 (78.6%) 3 (21.4%)	10 (83.3%) 2 (16.7%)	21 (80.8%) 5 (19.2%)		
特征	Ishak评分 1-3 (n=14)	Ishak评分 5-6 (n=12)	全部 (n=26)		
黑人					
基线Ishak纤维化评分 (n)					
F1	F2	F3	F4	F5	F6
3	6	5	0	7	5

[0294]

[0295] * 报告的中值和四分间距(25%, 75%)

[0296] 在六个时间点采集血清样品,为与研究基线相比 :第 4、8、16、24、26 和 30 周。由主要病理学家以盲法(blinded fashion)对成对肝活组织切片(筛选和第 24 周)进行评估。参见 Manns M, Palmer R, Flisiak E, et al., J Hepatology. 2011, 54Supplement1:S55 - S56。使用实施例 1 中描述的 LOXL2 免疫分析法(形成于 MesoScale Discovery 平台上的三明治免疫分析法)测定血清 LOXL2。

[0297] 将受试者根据 Ishak 纤维化评分(1-3 :轻度至中度纤维化 ;5-6 :肝硬化)分组,以

进行统计分析。本研究未观察到有受试者的基线 Ishak 纤维化评分为 4。将含有低于分析方法定量下限 (LLOQ) 的可检出 LOXL2 的血清样品设为 LLOQ。生物标志物水平的差异通过描述和图示进行了总结。使用每组观察样品规模代替取样通过 10000 个中值引导程序建立 95% 置信区间 (CI)。当在一个时间点比较各组时使用 Wilcoxon 秩和检验计算 P 值, 当在所有时间点比较各组时通过重复测量线性模型和受试者间随机效应计算。

[0298] 结果

[0299] 图 8 显示了基于分组基线 Ishak 纤维化评分和时间的 LOXL2 血清水平。各图显示了在所示时间点时 (第 4、8、16、24、26、30 周) 两组患者的 LOXL2 浓度 (pg/mL), 分组依据是 Ishak 纤维化评分 (分别为 1-3 和 5-6)。三个 LOXL2 浓度超出曲线范围的异常值 (LOXL2 浓度 = 5529、6621、8845pg/ml) 均来自于同一名受试者, 其 Ishak 纤维化评分为 5。

[0300] 图 9 显示了两组患者的 LOXL2 血清水平的受试者内中值, 计算为第 4-30 周的 LOXL2 血清的中值浓度, 分组依据是 Ishak 纤维化评分 (分别为 1-3 和 5-6)。受试者内平均变异系数是 22%。

[0301] 图 10 显示了 95% 置信区间内基于分组基线 Ishak 纤维化评分的随时间 (周) 变化的 LOXL2 血清的中值浓度 (pg/mL)。在第 25-28 周的活检研究中仅一名患者的 Ishak 纤维化评分变化大于或等于 2。

[0302] 表 4 显示了每个时间点 LOXL2 的中值浓度 (pg/mL), p 值显示了与患有轻度至中度肝纤维化的受试者相比, 患有肝硬化的受试者中 LOXL2 的中值浓度升高的统计学显著性。

[0303] 表 4 : LOXL2 血清水平基于分组纤维化评分的统计学显著性

[0304]

时间点	LOXL2的中值浓度(pg/ml)		P值
	Ishak F1-F3	Ishak F5-F6	
第4周	641	1684	0.0149
第8周	786	1700	0.0091
第16周	814	1457	0.0407
第24周	881	1616	0.0596
第26周	865	1763	0.0716
第30周	711	1118	0.5890
全部	810	1591	0.0275

[0305] 这些结果确认了本文提供的免疫分析法的实施方案测量 LOXL2 蛋白血清浓度的能力。此结果还证明了在本研究中, 与患有轻度至中度肝纤维化的患者相比, 患有肝硬化的受试者中血清 LOXL2 蛋白水平显著升高, 并且使用本文提供的分析法实施方案可在血清中检测到该升高。

[0306] 实施例 8 : 患有慢性 HCV 感染相关的受试者中与血清透明质酸 TIMP1 水平相关的血清 LOXL2 水平

[0307] 按照实施例 7 进行免疫分析和统计分析。此外, 使用商业化的免疫分析试剂盒测定透明质酸 (HA) 和 TIMP1。使用 Spearman 秩相关评估生物标志物 (LOXL2 和 HA 或 TIMP1) 之间的关系。

[0308] 结果

[0309] 图 11 显示了受试者内 LOXL2 的中值水平与透明质酸 (HA) 水平 (左图) 以及与金属蛋白酶 -1 (TIMP1) 组织抑制剂 (右图) 之间的关系, 其中受试者具有所示 Ishak 评分 (1-6)。

表达的受试者内中值计算为第 4 周至第 30 周中表达的中值。此曲线使用局部加权平滑散点图进行绘制。

[0310] 这些结果表明在本研究中,根据本文提供的免疫分析法进行测量,血清 LOXL2 水平与血清 HA 和 TIMP1 水平有关。

[0311] **实施例 9**:IPF 患者的 LOXL2 基线水平

[0312] A. ARTEMIS-IPF 患者

[0313] 血清样品采集自参加了 ARTEMIS-IPF 试验的受试者。这是一项随机、双盲、安慰剂对照的事件驱动试验。受试者以 2:1 的比例随机给予安贝生坦或安慰剂,其中安贝生坦是一种 ET_A 受体的选择性拮抗剂。此研究提前终止;有 660 名受试者参加。

[0314] 收集反映了 IPF 严重程度和功能状态的基线变量。基线变量包括预测用力肺活量(FVC)的百分比、预测一氧化碳弥散量(DL_{CO})的百分比、6 分钟步行距离(6MWD)、平均肺动脉压(mPAP)、最低休息血氧饱和度(SpO_2)、复合生理指标(CPI)、圣乔治呼吸问卷评分(SGRQ)和过渡性呼吸困难指数(TDI)评分。通过右心导管插入术得到 mPAP,所有研究受试者均需要 mPAP。CPI 是一个经过验证的整合了 FVC 的多维模型,一秒钟用力呼气容积(FEV_1)和 DL_{CO} 以评价在患者胸部的计算机断层扫描上看到的纤维化程度。主要终点是 IPF 疾病进展的时间,复合终点定义为以下内容之一:任何原因导致的死亡、呼吸系统住院治疗或肺功能绝对下降,其中肺功能绝对下降定义为用力肺活量(FVC)下降 10% 且一氧化碳弥散量(DL_{CO})下降 5% 或 DL_{CO} 下降 15% 且 FVC 下降 5%。通过两个肺功能检查证实了肺功能终点,这两个检查至少间隔四周进行。

[0315] 使用形成于 MesoScale Discovery 平台上建立的免疫分析法和实施例 1 中描述的抗 LOXL2 抗体在三重复样品中定量测定 LOXL2 的基线水平。

[0316] 使用标准直方图评估未转化和 $\log_{10}X$ 转化的 LOXL2 基线水平。使用学生 T 检验比较基线变量的分布。使用皮尔逊相关系数检查 LOXL2 基线水平和基线变量之间的关系。使用 Cox 逐步比例风险模型检查 LOXL2 基线水平和 IPF 结果之间的关系。使用受试者工作特征曲线估算曲线下面积。

[0317] 结果

[0318] 从意向性治疗人群中 69 名受试者获得的血清样品可用于分析。与未得到血清样品的 423 名来源于 ARTEMIS-IPF 的受试者相比,IPF 严重程度或功能状态的基线指标没有统计学显著的差别(表 5)。但是,在这 69 名受试者中,当比较安贝生坦和安慰剂治疗组时,IPF 严重程度和功能状态的基线指标具有统计学显著的差别(表 6)。安贝生坦组的受试者具有较低的基线 DL_{CO} ($p=0.035$),较低的基线 6MWD ($p=0.004$),较高的基线 mPAP ($p=0.016$),较高的基线 CPI ($p=0.05$)和较高的基线 SGRQ ($p=0.011$)。安贝生坦受试者的平均基线 LOXL2 水平较高。

[0319] LOXL2 基线水平分布的分析显示 8 名受试者具有低于大约 88pg/mL 的 LOXL2 水平,34 名受试者具有大约 88 至大约 440pg/mL 的 LOXL2 水平,28 名受试者具有超过大约 440pg/mL 的 LOXL2 水平。平均 LOXL2 水平大约是 325pg/mL,四分间距为大约 147pg/mL 至大约 770pg/mL,最小值为大约 18pg/mL,最大值为大约 5400pg/mL。

[0320] 根据皮尔逊相关系数,在 LOXL2 基线水平与 IPF 严重程度和功能状态的这些基线指标之间相关性很弱。图 12 显示了表明基线 LOXL2 水平与 FVC、 DL_{CO} 、6MWD、CPI、SGRQ 和 TDI

之间相关性的散点图模型。在图(a)和图(b)的第一行的黑框中突出显示了 LOXL2 与严重程度基线指标之间的相关性。LOXL2 与各个基线严重程度的指标之间的相关系数如下：-0.21 (FCV)，-0.11 (DLCO)，0.03 (6MWD)，0.10 (mPAP)，-0.07 (SpO₂)，0.14 (CPI)，0.06 (SGRQ) 和 -0.05 (TDI)。但 LOXL2 基线水平的 $\text{Log}_{10}X$ 转化使分布标准化后，LOXL2 与 IPF 严重程度和功能状态的基线指标之间的相关性仍然很弱(图 12b)。

[0321] 考虑到大多数基线 LOXL2 水平低于大约 800pg/mL，将 LOXL2 基线水平二分为 $\leq 800\text{pg/mL}$ (“低”)和 $>800\text{pg/mL}$ (“高”)以进行其余分析。在 LOXL2 基线水平高于大约 440pg/mL 的 28 名受试者中，12 名受试者的 LOXL 基线水平很低，为大约 440-800pg/mL，将其归为低组；16 名受试者的 LOXL 基线水平高于 800pg/mL，将其归为高组。

[0322] 图 13 显示了“高”和“低”LOXL2 基线水平组之间的疾病进程比较。由于在安慰剂组中仅有两名患者具有“高”LOXL2 基线水平(他们均没有任何事件)，图 13 仅比较了安贝生坦组的“低”和“高”LOXL2 基线水平。结果显示高 LOXL2 基线水平与更多疾病进程事件相关(图 13a)，且高 LOXL2 基线水平与更多肺功能下降事件(图 13b)、更多呼吸系统住院治疗(图 13c)和更多死亡(图 13d)相关。

[0323] 此外，如图 7 所示，Cox 比例风险模型表明高 LOXL2 基线水平的存在与疾病进程风险的 5 倍增加(风险比例 [HR] 4.95, 95% 置信区间 [CI] 1.52-16.18, $p=0.008$)、肺功能下降风险的 7 倍增加(HR 7.36, 95% CI 1.16-46.74, $p=0.034$)和呼吸系统住院治疗风险的 5 倍增加(HR 4.85, 95% CI 1.09-21.68, $p=0.039$)有关。对所有这些统计模型进行了调整以适应指定治疗和基线 6MWD 和 CPI 评分。高基线 LOXL2 水平与死亡风险的明显增加没有显著相关性(HR 1.59, 95% CI 0.24-10.53, $p=0.633$)。

[0324] 还对样品进行了 MMP7、ICAM1、IL8、VCAM1 和 S100A12 水平的分析。这些蛋白与治疗结果均没有显著相关性。结果表明高基线 LOXL2 水平与 IPF 疾病进程风险的 5-7 倍增加相关，但与死亡无关。

[0325] 表 5. 基于 ARTEMIS-IPF 中血清可得性的基线 IPF 严重程度和功能状态比较

IPF 严重程度的基线指标	无血清 N=423	血清 N=69	P 值
平均% FVC (SD)	69 (14)	70 (12)	0.649
平均% DLCO (SD)	43 (14)	42 (11)	0.487
平均 6MWD m (SD)	416 (120)	399 (116)	0.256
[0326] 平均 PAP mmHg (SD)	20 (7)	20 (6)	0.920
平均最低 SpO ₂ % (SD)	88 (6)	88 (6)	0.825
平均 CPI (SD)	52 (11)	53 (9)	0.784
平均 SGRQ (SD)	39 (20)	38 (18)	0.605
平均 TDI (SD)	7 (2)	8 (2)	0.588

[0327] 表 6. 在可获得基线血清的受试者中基于 ARTEMIS-IPF 中指定治疗的基线 IPF 严重程度和功能状态比较

IPF 严重程度的基线指标	安贝生坦 N=49	安慰剂 N=20	P 值
平均% FVC (SD)	68 (12)	73 (12)	0.128
平均% DLCO (SD)	40 (11)	47 (9)	0.035
平均 6MWD m (SD)	373 (109)	461 (110)	0.004
平均 PAP mmHg (SD)	22 (6)	18 (5)	0.016
平均最低 SpO2 % (SD)	87 (6)	87 (5)	0.166
平均 CPI (SD)	54 (9)	49 (8)	0.050
平均 SGRQ (SD)	42 (19)	29 (15)	0.011
平均 TDI (SD)	7 (2)	8 (2)	0.083
平均 LOXL2 (SD)	903 (1172)	295 (288)	0.026

[0329] 表 7. IPF 患者的基线 LOXL2 水平及其与研究终点的关系

终点	事件数		高LOXL2的风险比例 (95% CI)	P值
	低LOXL2	高LOXL2		
疾病进程	10	8	4.95 (1.52-16.18)	0.008
肺功能下降	5	4	7.36 (1.16-46.74)	0.034
呼吸系统住院 治疗	6	6	4.85 (1.09-21.68)	0.039
死亡	5	4	1.59 (0.24-10.53)	0.633

[0331] B. GAP 人群 IPF 患者

[0332] 在第二临床 IPF 前瞻性随访研究的患者中评估了血清 LOXL2 水平, 此项研究在没有其他肺病史的 111 名 IPF 受试者(认为是 GAP 人群)中评估了疾病进程。所有 GAP 人群受试者根据 ATS/ERS 指导原则均诊断患有 IPF, 并在超过 55 岁和未确定病因的患者中通过外科肺活检或胸膜下蜂窝状改变、牵拉性支气管扩张和最小肺泡充盈的放射照相结果进行了证实。肺功能检查显示了预测的 40-70% 用力肺活量。受试者能够在一个临床机构接受所有进行中的护理和随访。

[0333] 在第一次访视时, 对每名参与者进行抽血、肺功能检查、6 分钟步行试验(6MWT)、心电图和 CT 扫描, 以及数个设计用来测量患者感受的问卷调查。在 3-8 个月间隔的后续访视中, 采集血样, 重复进行 PFTs、问卷调查和 6MWTs。平均 FVC、FEV1 和 DLCO 分别为预测值的 $65.7 \pm 17.5\%$ 、 $76.8 \pm 18.7\%$ 和 $47.3 \pm 17.9\%$ 。

[0334] LOXL2 基线血清水平按照上述 ARTEMIS-IPF 受试者所用方法进行定量。使用标准直方图以自然对数形式评估 LOXL2 基线血清水平。试验测得 LLOD 为 180pg/mL 而 LLOQ 为 440pg/mL。

[0335] 自然对照转换后使用回归方法将 GAP 人群的 LOXL2 水平标准化至 ARTEMIS-IPF 数据。结果参见图 14。

[0336] 将肺移植视为死亡事件(大多数肺移植患者死亡)时, 估计全死因的时间。使用分类与回归树(CART)方法作为公正的方法来选择基线血清 LOXL2 水平二分的最佳阈值或界限点。在 GAP 人群中, 当 Log(LOXL2) 是唯一变量时, CART 分析选择了 440pg/mL (自然对数

刻度值为 6.08) 作为界限点。

[0337] 表 8A 显示了 GAP 人群受试者的基线和人口统计特征,表 8B 显示了此人群中多个基线值的相关性。

[0338] 表 8A :GAP 人群基线和人口统计特征

变量	数量	平均值 (标准偏差)	中值 (最小值, 最大值)
性别	男: 74 (67%) 女: 37 (33%)		
[0339] 年龄 (岁)	111	67 (9.3)	67 (3, 84)
预测的 FVC %	73	66 (18)	64 (34, 113)
预测的 FEV1 %	73	77 (19)	74 (37, 129)
预测的 DLCO %	73	48 (18)	46 (14, 109)
CPI	73	52 (13)	52 (12, 78)
6 分钟步行距离	17	912 (420)	890 (100, 1555)
LOXL2	111	1495 (2307)	717 (90, 15708)
LOG (LOXL2)	111	7 (1)	7 (5, 10)
LOG (LOXL2) *	111	6 (1)	6 (5, 9)

[0340]

[0341] * 通过回归方法标准化 LOXL2

[0342] 表 8B :基线变量之间的相关性

[0343]

	年龄	预测的 FVC %	预测的 FEV1 %	预测的 DLCO %	CPI
Log LOXL2	-0.7	-0.03	-0.06	-0.28	-0.24
年龄		0.07	0.23	0.02	0.05
预测的 FVC %			0.93	0.38	-0.61
预测的 FEV1 %				0.47	-0.60
预测的 DLCO %					-0.95

[0344] 使用 Cox 比例风险模型和 Kaplan-Meier 生存曲线评估了基线后六(6)个月、十二(12)个月、十八(18)个月和二十四(24)个月时二分的 LOXL2 水平和全死因之间的相关性。没有评估基线 LOXL2 水平与住院治疗和肺功能下降之间的相关性,因为没有获得数据。‘

[0345] 基线 LOXL2 水平的分布分析呈现了朝向较低范围的偏态分布,与在 ARTEMIS-IPF 人群中的观察结果相似。基线 LOXL2 的中值水平是 716.5pg/mL (四分间距是 358.3pg/mL, 1446.6pg/mL)。LOXL2 与 IPF 严重程度的基线人口统计特征和基线临床指标之间的相关性很弱(年龄的相关系数为 -0.07, FVC 为 -0.03, DLCO 为 -0.28)。没有对疾病严重程度的其他临床指征可用于进一步分析。

[0346] 这结果表明阈值 440pg/ml 的基线血清 LOXL2 水平与全死因的风险相关。血清中基线 LOXL2 水平高于 440pg/ml 与基线后 12-、18- 和 24- 月时的更高死亡有关(图 15A 和 B)。

[0347] 多变量 Cox 比例风险模型(协变量包括年龄和性别)暗示基线 LOXL2 水平高于 440pg/ml 的存在与基线后 12-、18- 和 24- 月时死亡风险的 2.3 倍增加有关(参见表 9A 和 B)。

[0348] 表 9A :GAP 人群中基线后 6-、12-、18- 和 24- 月时低($\leq 440\text{pg/mL}$)与高($>440\text{pg/mL}$)基线 LOXL2 水平受试者的事件比例和风险比例

[0349]

基线后时间	事件比例		风险比例* (95% CI)	P 值
	低 LOXL2	高 LOXL2		
6 个月	5/52 (10%)	10/59 (17%)	1.76 (0.60, 5.22)	0.3051
12 个月	10/52 (19%)	23/59 (39%)	2.27 (1.05, 6.98)	0.0319
18 个月	12/52 (23%)	26/59 (44%)	2.22 (1.12, 4.43)	0.0231
24 个月	14/52 (27%)	30/59 (51%)	2.31(1.22, 4.37)	0.0105

[0350]

[0351] * 模型包括年龄和性别作为协变量。

[0352] 表 9B :基线后 6-、12-、18- 和 24- 月时低($\leq 440\text{pg/mL}$)与高($>440\text{pg/mL}$)基线水平 LOXL2 水平受试者的事件比例和风险比例

[0353]

基线后时间	事件比例		风险比例 (95% CI)	P 值
	低 LOXL2	高 LOXL2		
6 个月	2/36 (6%)	3/13 (23%)	5.08 (0.85, 30.47)	0.0756
12 个月	5/36 (14%)	3/13 (23%)	1.90 (0.45, 7.99)	0.3796
18 个月	5/36 (14%)	3/13 (23%)	1.90 (0.45, 7.99)	0.3796
24 个月	5/36 (14%)	4/13 (31%)	2.11(0.54, 8.24)	0.2846

[0354] 对于一个受试者子集,前瞻性采集额外的血清样品。在研究的持续时间内,从 60 名受试者采集了两(2)个样品,从 42 名受试者采集了三(3)个样品,从 31 名受试者采集了四(4)个样品,从 17 名受试者采集了五(5)个样品,从 12 名受试者采集了六(6)个样品,从七(7)名受试者采集了七(7)个样品,从两(2)名受试者采集了八(8)个样品。没有采集与急性发作相关的样品。

[0355] 使用多变量 Cox 比例风险模型(和包括年龄和性别的协变量),合并各个样品中的 LOXL2 水平作为时间依赖的持续变量,以评估血清 LOXL2 水平和全死因之间的关系。随时间测定的血清 LOXL2 水平与死亡风险相关($p=0.003$)。在 GAP 人群中,研究期间任何时间采集的血清 LOXL2 水平每增加 2.7 倍,死亡风险升高 1.63 倍(95% 置信区间 1.19-2.25)。

[0356] 表 10 显示了基线后不同时间血清 LOXL2 水平多变量分析的结果。

[0357] 表 10 :基于基线后 6-、12-、18- 和 24- 月时低($\leq 440\text{pg/mL}$)与高($>440\text{pg/mL}$)血清 LOXL2 水平的多变量分析

[0358]

反应变量	模型项	风险比例(95 % CI)	P值
死亡时间6个月	Log LOXL2 (<或> 6.08)	1.8 (0.6, 5.2)	0.305
	性别	*0.5 (0.1, 1.8)	0.299
	年龄 (连续)	1.0 (1.0, 1.1)	0.931
死亡时间12个月	Log LOXL2 (<或> 6.08)	2.3 (1.1, 7.0)	0.032
	性别	*0.4 (0.2, 0.9)	0.037
	年龄 (连续)	1.0 (1.0, 1.0)	0.647
死亡时间18个月	Log LOXL2 (<或> 6.08)	2.2 (1.1, 4.4)	0.023
	性别	*0.5 (0.2, 1.0)	0.052
	年龄 (连续)	1.0 (1.0, 1.0)	0.848
死亡时间24个月	Log LOXL2 (<或> 6.08)	2.3 (1.2, 4.4)	0.011
	性别	*0.4 (0.2, 1.0)	0.026
	年龄 (连续)	1.0 (1.0, 1.0)	0.808

[0359]

[0360] * 风险比例有利于女性患者

[0361] GAP 人群的结果与上述 ARTEMIS-IPF 研究类似。两个研究均表明高于阈值水平的基线血清 LOXL2 水平与 IPF 患者阴性结果的风险增加有关。

[0362] 实施例 10 :慢性乙型肝炎(CHB)患者的基线血清 LOXL2 水平

[0363] 在治疗前和用 300mg 富马酸替诺福韦(TDF)治疗 240 周后评估慢性乙型肝炎(CHB)和肝纤维化患者的血清 LOXL2 水平。在治疗前和 TDF 治疗 240 周后,自 348 名患有 CHB 的人类受试者中采集肝活组织切片。有病理学家使用 Ishak 量表对活组织进行评分以评估纤维化。在本研究中,96.3%的受试者显示了肝纤维化的改善或无进展。在 96 名开始研究时患有活检证实的肝硬化受试者中,治疗 240 周有 74% 出现肝硬化恢复。

[0364] 通过 ELISA 在基线和 240 周时对 348 名受试者中的 81 例进行血清 LOXL2 水平的回顾性评估,包括多名纤维化评分改善的受试者。在治疗后第 240 周时,这 81 名受试者中有 42 例出现了肝硬化恢复,16 例为持续性肝硬化,2 例在治疗过程中发展为肝硬化,18 例为纤维化没有改变的非肝硬化受试者,3 例为 Ishak 测量的纤维化至少降低 2 分的非肝硬化受试者。

[0365] 在这 81 名 CHB 受试者中有 91% 和肝硬化受试者中有 97% 出现了基线血清 LOXL2 水平升高。如下所示,相比肝硬化程度较低的患者,肝硬化患者在基线时(Ishak 得分 5 或 6)具有提高的 LOXL2 血清的中值水平。这一观察结果与在慢性丙型肝炎感染患者中观察到的 LOXL 血清水平相似。此外,组织学研究表明 LOXL2 蛋白集中在活动性纤维增生的部位(数据未显示)。这些结果暗示肝硬化患者的肝中仍具有活动性纤维增生。此外,在治疗的 240 周期间,具有基线肝硬化的 60 名患者中有 72% 显示了 Ishak 纤维化评分的恢复或改善。此外,相比基线,这些患者在第 240 周时的血清 LOXL2 的中值水平更低。这些结果暗示总体纤维化和纤维增生均通过抗病毒治疗减少。

[0366] 图 16A 显示了与纤维化评分相关的血清 LOXL2 水平(pg/mL),图 16B 和 16C 显示了

与基线 Ishak 纤维化评分相关的血清基线 LOXL2 水平 (pg/mL)。治疗后 240 周时, 平均血清 LOXL2 水平已有所下降并且不再与 Ishak 纤维化评分相关。还可参见表 11。

[0367] 表 11 : 基线和治疗开始后 240 周时与 Ishak 阶段相比的平均血清 LOXL2 水平
[0368]

	数量	基线	数量	240 周
全部受试者(平均 LOXL2 (pg/mL))	81	2678.6	81	748.9
Ishak 阶段 0-3 (平均 LOXL2 (pg/mL))	18	510.2	56	746.8
Ishak 阶段 4-6 (平均 LOXL2 (pg/mL))	63	3298.2	25	753.5

[0369] 如图 17 所示, 所有具有基线 Ishak 阶段在 1 和 3 之间的受试者具有低于 1500pg/mL 的血清 LOXL2 水平, 基线 Ishak 阶段在 4 和 6 之间的受试者有 49% 具有高于 1500pg/mL 的血清 LOXL2 水平。

[0370] 81 名受试者中有 79% 出现血清 LOXL2 水平下降。11% 的受试者(基线水平均低于定量限)的 LOXL2 水平没有变化。

[0371] 图 18 显示了以下组中每名受试者在基线和 240 周时的血清 LOXL2 水平 (pg/mL): 第 240 周时患有持续性肝硬化的受试者 (n=16, 图 18A); 240 周时肝硬化恢复的受试者 (n=42, 图 18B); 240 周时纤维化阶段 (Ishak) 没有改变的无肝硬化受试者 (n=18, 图 18C); 随着本研究的进行发展为肝硬化的受试者 (图 18D); 和 240 周时纤维化下降超过或等于 2 个阶段的无肝硬化受试者 (图 18E)。

[0372] 表 12 比较了在 240 周时患有持续性肝硬化的受试者、240 周时肝硬化恢复的受试者和随着本研究的进行纤维化阶段没有改变的无肝硬化受试者(“无肝硬化无 Δ”)的基线和 240 周时的血清 LOXL2 水平 (pg/mL)。

[0373] 表 12 : 不同 CHB 受试者组中血清 LOXL2 水平的变化

	持续性肝硬化(n=16)		肝硬化恢复(n=42)		无肝硬化无 Δ (n=18)	
	基线	240 周	基线	240 周	基线	240 周
平均值	9124.1	603.8	1355.0	922.6	798.4	436.8
中值	1863	LOQ	1073	<LOQ	<LOQ	<LOQ
< LoQ	2 (13%)	8 (50%)	4 (10%)	29 (69%)	10 (56%)	14 (78%)
< LoD	1 (6%)	2 (13%)	1 (2%)	13 (31%)	4 (22%)	8 (44%)
< 1000	5 (31%)	14 (88%)	20 (48%)	35 (83%)	13 (72%)	15 (83%)
> 3000	5 (31%)	0 (0%)	2 (5%)	3 (7%)	1 (6%)	0 (0%)
减少		14 (88%)		37 (88%)		9 (50%)
增加		0 (0%)		5 (12%)		2 (11%)

[0374]

[0375]

[0376] 如表 12 所示,88% 的肝硬化受试者中 LOXL2 水平下降。此外,经测定在 240 周时患有持续性肝硬化的患者具有最高的基线血清 LOXL2 水平。

[0377] 图 19 显示了具有给定基线血清 LOXL2 水平(<1500、>1500、1500-3000、<3000 和 >3000pg/mL)经测定在 240 周时具有组织学改善的肝硬化受试者的百分比,和具有相同给定基线血清 LOXL2 水平经测定在 240 周时没有组织学改善的肝硬化受试者的百分比。如图所示,基线血清 LOXL2 水平低于 1500pg/mL 的肝硬化受试者有 88% 的恢复可能。基线血清 LOXL2 水平在 1500 和 3000pg/mL 之间的肝硬化受试者有 70% 的恢复可能,而基线血清水平高于 3000pg/mL 的肝硬化受试者仅有 29% 的恢复可能。因此,在肝硬化患者中,基线血清 LOXL2 水平低于 1500pg/mL 与 88% 的恢复可能相关,而基线血清水平高于 3000pg/mL 与 29% 的恢复可能相关。

[0378] 相较于基线纤维化阶段,基线血清 LOXL2 水平与 240 周时的 Ishak 纤维化阶段更为相关。这暗示高血清 LOXL2 水平反映了活动性纤维增生。

[0379] 本研究的结果证实了 CHB 患者中血清 LOXL2 水平有所升高,在纤维化程度最高的患者中升高最多,这表明血清 LOXL2 和纤维化评分之间存在着一般相关性。血清 LOXL2 水平反映了活动性疾病和活动性纤维增生(例如,考虑到较高的基线水平与 240 周时较高的纤维化阶段有关)。治疗潜伏 CHB 在大多数患者中可引起 LOXL2 的下降,暗示了纤维增生的下调。甚至在纤维化评分没有改变但临床表现良好的患者中 5 年后血清 LOXL2 下降。这些结果表明血清 LOXL2 水平可作为活动性疾病的标志物,高 LOXL2 是可预测没有恢复。

[0380] 虽然本发明已对其具体实施方案进行了描述,但本领域技术人员应理解可在不偏离本发明实际精神和范围下可以进行多种改变且可进行同等代替。此外,可进行多种变更以适应符合本发明目的、精神和范围的特殊情况、材料、物质组成、工艺、工艺步骤。所有这种变更预计处于本文所附权利要求的范围之内。

[0001]

序列表

<110> 吉利德生物制药有限公司
 维多利亚·史密斯
 乔安妮·I·阿达姆科维兹
 苏珊·K·莱曼
 詹森·钱
 李晓明
 邵立新
 杰弗瑞·D·伯恩斯坦

<120> 赖氨酰氧化酶样 2 分析法及其使用方法

<130> 246102008340

<140> 还未指定

<141> 同时用此方法

<150> US 61/492, 210

<151> 2011-06-01

<150> US 61/550, 895

<151> 2011-10-24

<150> US 61/578, 813

<151> 2011-12-21

<160> 14

<170> FastSEQ for Windows Version 4.0

<210> 1

<211> 774

<212> PRT

<213> 人

<220>

<221> 混杂的_特征

<222> (1)... (774)

<223> LOXL2

<400> I

Met Glu Arg Pro Leu Cys Ser His Leu Cys Ser Cys Leu Ala Met Leu

1

5

10

15

[0002]

Ala Leu Leu Ser Pro Leu Ser Leu Ala Gln Tyr Asp Ser Trp Pro His
 20 25 30
 Tyr Pro Glu Tyr Phe Gln Gln Pro Ala Pro Glu Tyr His Gln Pro Gln
 35 40 45
 Ala Pro Ala Asn Val Ala Lys Ile Gln Leu Arg Leu Ala Gly Gln Lys
 50 55 60
 Arg Lys His Ser Glu Gly Arg Val Glu Val Tyr Tyr Asp Gly Gln Trp
 65 70 75 80
 Gly Thr Val Cys Asp Asp Asp Phe Ser Ile His Ala Ala His Val Val
 85 90 95
 Cys Arg Glu Leu Gly Tyr Val Glu Ala Lys Ser Trp Thr Ala Ser Ser
 100 105 110
 Ser Tyr Gly Lys Gly Glu Gly Pro Ile Trp Leu Asp Asn Leu His Cys
 115 120 125
 Thr Gly Asn Glu Ala Thr Leu Ala Ala Cys Thr Ser Asn Gly Trp Gly
 130 135 140
 Val Thr Asp Cys Lys His Thr Glu Asp Val Gly Val Val Cys Ser Asp
 145 150 155 160
 Lys Arg Ile Pro Gly Phe Lys Phe Asp Asn Ser Leu Ile Asn Gln Ile
 165 170 175
 Glu Asn Leu Asn Ile Gln Val Glu Asp Ile Arg Ile Arg Ala Ile Leu
 180 185 190
 Ser Thr Tyr Arg Lys Arg Thr Pro Val Met Glu Gly Tyr Val Glu Val
 195 200 205
 Lys Glu Gly Lys Thr Trp Lys Gln Ile Cys Asp Lys His Trp Thr Ala
 210 215 220
 Lys Asn Ser Arg Val Val Cys Gly Met Phe Gly Phe Pro Gly Glu Arg
 225 230 235 240
 Thr Tyr Asn Thr Lys Val Tyr Lys Met Phe Ala Ser Arg Arg Lys Gln
 245 250 255
 Arg Tyr Trp Pro Phe Ser Met Asp Cys Thr Gly Thr Glu Ala His Ile
 260 265 270
 Ser Ser Cys Lys Leu Gly Pro Gln Val Ser Leu Asp Pro Met Lys Asn
 275 280 285
 Val Thr Cys Glu Asn Gly Leu Pro Ala Val Val Ser Cys Val Pro Gly
 290 295 300
 Gln Val Phe Ser Pro Asp Gly Pro Ser Arg Phe Arg Lys Ala Tyr Lys
 305 310 315 320
 Pro Glu Gln Pro Leu Val Arg Leu Arg Gly Gly Ala Tyr Ile Gly Glu
 325 330 335
 Gly Arg Val Glu Val Leu Lys Asn Gly Glu Trp Gly Thr Val Cys Asp
 340 345 350
 Asp Lys Trp Asp Leu Val Ser Ala Ser Val Val Cys Arg Glu Leu Gly
 355 360 365

[0003]

Phe Gly Ser Ala Lys Glu Ala Val Thr Gly Ser Arg Leu Gly Gln Gly
 370 375 380
 Ile Gly Pro Ile His Leu Asn Glu Ile Gln Cys Thr Gly Asn Glu Lys
 385 390 395 400
 Ser Ile Ile Asp Cys Lys Phe Asn Ala Glu Ser Gln Gly Cys Asn His
 405 410 415
 Glu Glu Asp Ala Gly Val Arg Cys Asn Thr Pro Ala Met Gly Leu Gln
 420 425 430
 Lys Lys Leu Arg Leu Asn Gly Gly Arg Asn Pro Tyr Glu Gly Arg Val
 435 440 445
 Glu Val Leu Val Glu Arg Asn Gly Ser Leu Val Trp Gly Met Val Cys
 450 455 460
 Gly Gln Asn Trp Gly Ile Val Glu Ala Met Val Val Cys Arg Gln Leu
 465 470 475 480
 Gly Leu Gly Phe Ala Ser Asn Ala Phe Gln Glu Thr Trp Tyr Trp His
 485 490 495
 Gly Asp Val Asn Ser Asn Lys Val Val Met Ser Gly Val Lys Cys Ser
 500 505 510
 Gly Thr Glu Leu Ser Leu Ala His Cys Arg His Asp Gly Glu Asp Val
 515 520 525
 Ala Cys Pro Gln Gly Gly Val Gln Tyr Gly Ala Gly Val Ala Cys Ser
 530 535 540
 Glu Thr Ala Pro Asp Leu Val Leu Asn Ala Glu Met Val Gln Gln Thr
 545 550 555 560
 Thr Tyr Leu Glu Asp Arg Pro Met Phe Met Leu Gln Cys Ala Met Glu
 565 570 575
 Glu Asn Cys Leu Ser Ala Ser Ala Ala Gln Thr Asp Pro Thr Thr Gly
 580 585 590
 Tyr Arg Arg Leu Leu Arg Phe Ser Ser Gln Ile His Asn Asn Gly Gln
 595 600 605
 Ser Asp Phe Arg Pro Lys Asn Gly Arg His Ala Trp Ile Trp His Asp
 610 615 620
 Cys His Arg His Tyr His Ser Met Glu Val Phe Thr His Tyr Asp Leu
 625 630 635 640
 Leu Asn Leu Asn Gly Thr Lys Val Ala Glu Gly His Lys Ala Ser Phe
 645 650 655
 Cys Leu Glu Asp Thr Glu Cys Glu Gly Asp Ile Gln Lys Asn Tyr Glu
 660 665 670
 Cys Ala Asn Phe Gly Asp Gln Gly Ile Thr Met Gly Cys Trp Asp Met
 675 680 685
 Tyr Arg His Asp Ile Asp Cys Gln Trp Val Asp Ile Thr Asp Val Pro
 690 695 700
 Pro Gly Asp Tyr Leu Phe Gln Val Val Ile Asn Pro Asn Phe Glu Val
 705 710 715 720

[0004]

Ala Glu Ser Asp Tyr Ser Asn Asn Ile Met Lys Cys Arg Ser Arg Tyr
725 730 735
Asp Gly His Arg Ile Trp Met Tyr Asn Cys His Ile Gly Gly Ser Phe
740 745 750
Ser Glu Glu Thr Glu Lys Lys Phe Glu His Phe Ser Gly Leu Leu Asn
755 760 765
Asn Gln Leu Ser Pro Gln
770

<210> 2

<211> 227

<212> PRT

<213> 人

<220>

<221> 结构域

<222> (1)... (227)

<223> LOXL2 蛋白的催化结构域

<400> 2

Pro Asp Leu Val Leu Asn Ala Glu Met Val Gln Gln Thr Thr Tyr Leu
1 5 10 15
Glu Asp Arg Pro Met Phe Met Leu Gln Cys Ala Met Glu Glu Asn Cys
20 25 30
Leu Ser Ala Ser Ala Ala Gln Thr Asp Pro Thr Thr Gly Tyr Arg Arg
35 40 45
Leu Leu Arg Phe Ser Ser Gln Ile His Asn Asn Gly Gln Ser Asp Phe
50 55 60
Arg Pro Lys Asn Gly Arg His Ala Trp Ile Trp His Asp Cys His Arg
65 70 75 80
His Tyr His Ser Met Glu Val Phe Thr His Tyr Asp Leu Leu Asn Leu
85 90 95
Asn Gly Thr Lys Val Ala Glu Gly His Lys Ala Ser Phe Cys Leu Glu
100 105 110
Asp Thr Glu Cys Glu Gly Asp Ile Gln Lys Asn Tyr Glu Cys Ala Asn
115 120 125
Phe Gly Asp Gln Gly Ile Thr Met Gly Cys Trp Asp Met Tyr Arg His
130 135 140
Asp Ile Asp Cys Gln Trp Val Asp Ile Thr Asp Val Pro Pro Gly Asp
145 150 155 160
Tyr Leu Phe Gln Val Val Ile Asn Pro Asn Phe Glu Val Ala Glu Ser
165 170 175
Asp Tyr Ser Asn Asn Ile Met Lys Cys Arg Ser Arg Tyr Asp Gly His

[0005]

```

                180                185                190
Arg Ile Trp Met Tyr Asn Cys His Ile Gly Gly Ser Phe Ser Glu Glu
                195                200                205
Thr Glu Lys Lys Phe Glu His Phe Ser Gly Leu Leu Asn Asn Gln Leu
                210                215                220
Ser Pro Gln
225

```

```

<210> 3
<211> 227
<212> PRT
<213> 家鼠

```

```

<220>
<221> 结构域
<222> (1)...(227)
<223> LOXL2 蛋白的催化结构域

```

```

<400> 3
Pro Asp Leu Val Leu Asn Ala Glu Ile Val Gln Gln Thr Ala Tyr Leu
 1                5                10                15
Glu Asp Arg Pro Met Ser Leu Leu Gln Cys Ala Met Glu Glu Asn Cys
                20                25                30
Leu Ser Ala Ser Ala Val His Thr Asp Pro Thr Arg Gly His Arg Arg
                35                40                45
Leu Leu Arg Phe Ser Ser Gln Ile His Asn Asn Gly Gln Ser Asp Phe
                50                55                60
Arg Pro Lys Asn Gly Arg His Ala Trp Ile Trp His Asp Cys His Arg
65                70                75                80
His Tyr His Ser Met Glu Val Phe Thr Tyr Tyr Asp Leu Leu Ser Leu
                85                90                95
Asn Gly Thr Lys Val Ala Glu Gly His Lys Ala Ser Phe Cys Leu Glu
                100               105               110
Asp Thr Glu Cys Glu Gly Asp Ile Gln Lys Ser Tyr Glu Cys Ala Asn
                115               120               125
Phe Gly Glu Gln Gly Ile Thr Met Gly Cys Trp Asp Met Tyr Arg His
                130               135               140
Asp Ile Asp Cys Gln Trp Ile Asp Ile Thr Asp Val Pro Pro Gly Asp
145                150                155                160
Tyr Leu Phe Gln Val Val Ile Asn Pro Asn Tyr Glu Val Pro Glu Ser
                165                170                175
Asp Phe Ser Asn Asn Ile Met Lys Cys Arg Ser Arg Tyr Asp Gly Tyr
                180                185                190

```

[0006]

Arg Ile Trp Met Tyr Asn Cys His Val Gly Gly Ala Phe Ser Glu Glu
 195 200 205
 Thr Glu Gln Lys Phe Glu His Phe Ser Gly Leu Leu Asn Asn Gln Leu
 210 215 220
 Ser Val Gln
 225

<210> 4
 <211> 227
 <212> PRT
 <213> 黑鼠

<220>
 <221> 结构域
 <222> (1)...(227)
 <223> LOXL2 蛋白的催化结构域

<400> 4
 Pro Asp Leu Val Leu Asn Ala Glu Ile Val Gln Gln Thr Ala Tyr Leu
 1 5 10 15
 Glu Asp Arg Pro Met Ala Leu Leu Gln Cys Ala Met Glu Glu Asn Cys
 20 25 30
 Leu Ser Ala Ser Ala Val His Thr Asp Pro Thr Arg Gly His Arg Arg
 35 40 45
 Leu Leu Arg Phe Ser Ser Gln Ile His Asn Asn Gly Gln Ser Asp Phe
 50 55 60
 Arg Pro Lys Asn Gly Arg His Ala Trp Ile Trp His Asp Cys His Arg
 65 70 75 80
 His Tyr His Ser Met Glu Val Phe Thr Tyr Tyr Asp Leu Leu Ser Leu
 85 90 95
 Asn Gly Thr Lys Val Ala Glu Gly His Lys Ala Ser Phe Cys Leu Glu
 100 105 110
 Asp Thr Glu Cys Glu Gly Asp Ile Gln Lys Ser Tyr Glu Cys Ala Asn
 115 120 125
 Phe Gly Glu Gln Gly Ile Thr Met Gly Cys Trp Asp Met Tyr Arg His
 130 135 140
 Asp Ile Asp Cys Gln Trp Ile Asp Ile Thr Asp Val Pro Pro Gly Asp
 145 150 155 160
 Tyr Leu Phe Gln Val Val Ile Asn Pro Asn Tyr Glu Val Pro Glu Ser
 165 170 175
 Asp Phe Ser Asn Asn Ile Met Lys Cys Arg Ser Arg Tyr Asp Gly Tyr
 180 185 190
 Arg Ile Trp Met Tyr Asn Cys His Val Gly Gly Ala Phe Ser Glu Glu

[0007]

195 200 205
 Thr Glu Gln Lys Phe Glu His Phe Ser Gly Leu Leu Asn Asn Gln Leu
 210 215 220
 Ser Val Gln
 225

<210> 5
 <211> 227
 <212> PRT
 <213> 食蟹猴

<220>
 <221> 结构域
 <222> (1)... (227)
 <223> LOXL2 蛋白的催化结构域

<400> 5
 Pro Asp Leu Val Leu Asn Ala Glu Met Val Gln Gln Thr Thr Tyr Leu
 1 5 10 15
 Glu Asp Arg Pro Met Phe Met Leu Gln Cys Ala Met Glu Glu Asn Cys
 20 25 30
 Leu Ser Ala Ser Ala Ala Gln Thr Asn Pro Thr Thr Gly Tyr Arg Arg
 35 40 45
 Leu Leu Arg Phe Ser Ser Gln Ile His Asn Asn Gly Gln Ser Asp Phe
 50 55 60
 Arg Pro Lys Asn Gly Arg His Ala Trp Ile Trp His Asp Cys His Arg
 65 70 75 80
 His Tyr His Ser Met Glu Val Phe Thr His Tyr Asp Leu Leu Asn Leu
 85 90 95
 Asn Gly Thr Lys Val Ala Glu Gly His Lys Ala Ser Phe Cys Leu Glu
 100 105 110
 Asp Thr Glu Cys Glu Gly Asp Ile Gln Lys Asn Tyr Glu Cys Ala Asn
 115 120 125
 Phe Gly Asp Gln Gly Ile Thr Met Gly Cys Trp Asp Met Tyr Arg His
 130 135 140
 Asp Ile Asp Cys Gln Trp Ile Asp Ile Thr Asp Val Pro Pro Gly Asp
 145 150 155 160
 Tyr Leu Phe Gln Val Val Ile Asn Pro Asn Phe Glu Val Ala Glu Ser
 165 170 175
 Asp Tyr Ser Asn Asn Ile Met Lys Cys Arg Ser Arg Tyr Asp Gly His
 180 185 190
 Arg Ile Trp Met Tyr Asn Cys His Ile Gly Gly Ser Phe Ser Glu Glu

[0008]

<220>

<223> 合成结构

<220>

<221> 链

<222> (1)... (132)

<223> 轻链可变区

<400> 7

```

Met Arg Cys Leu Ala Glu Phe Leu Gly Leu Leu Val Leu Trp Ile Pro
 1           5           10           15
Gly Ala Ile Gly Asp Ile Val Met Thr Gln Ala Ala Pro Ser Val Ser
          20           25           30
Val Thr Pro Gly Glu Ser Val Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Lys Ser
          35           40           45
Leu Leu His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Tyr Trp Phe Leu Gln Arg
 50           55           60
Pro Gly Gln Ser Pro Gln Phe Leu Ile Tyr Arg Met Ser Asn Leu Ala
65           70           75           80
Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ala Phe
          85           90           95
Thr Leu Arg Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr
          100          105          110
Cys Met Gln His Leu Glu Tyr Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys
          115          120          125
Leu Glu Ile Lys
          130

```

<210> 8

<211> I16

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成结构

<220>

<221> 链

<222> (1)... (116)

<223> 重链可变区

<400> 8

```

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala

```

[0010]

```

1           5           10           15
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ala Phe Thr Tyr Tyr
           20           25           30
Leu Ile Glu Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
           35           40           45
Gly Val Ile Asn Pro Gly Ser Gly Gly Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe
           50           55           60
Lys Gly Arg Ala Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65           70           75           80
Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys
           85           90           95
Ala Arg Asn Trp Met Asn Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val
           100          105          110
Thr Val Ser Ser
           115

```

<210> 9
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成结构

<220>
 <221> 链
 <222> (1)... (112)
 <223> 轻链可变区

```

<400> 9
Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Ser Val Thr Pro Gly
1           5           10           15
Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Lys Ser Leu Leu His Ser
           20           25           30
Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Tyr Trp Phe Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
           35           40           45
Pro Gln Phe Leu Ile Tyr Arg Met Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro
           50           55           60
Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
65           70           75           80
Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln His
           85           90           95
Leu Glu Tyr Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

```

[0011]

100

105

110

<210> 10

<211> 116

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成结构

<220>

<221> 链

<222> (1)... (116)

<223> 重链可变区

<400> 10

Gln	Val	Gln	Leu	Val	Gln	Ser	Gly	Ala	Glu	Leu	Lys	Lys	Pro	Gly	Ala
1			5						10					15	
Ser	Val	Lys	Val	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Tyr	Ala	Phe	Thr	Tyr	Tyr
			20					25						30	
Leu	Ile	Glu	Trp	Val	Lys	Gln	Ala	Pro	Gly	Gln	Gly	Leu	Glu	Trp	Ile
			35				40							45	
Gly	Val	Ile	Asn	Pro	Gly	Ser	Gly	Gly	Thr	Asn	Tyr	Asn	Glu	Lys	Phe
			50				55						60		
Lys	Gly	Arg	Ala	Thr	Leu	Thr	Ala	Asp	Lys	Ser	Thr	Ser	Thr	Ala	Tyr
			65			70				75				80	
Met	Glu	Leu	Ser	Ser	Leu	Arg	Ser	Glu	Asp	Ser	Ala	Val	Tyr	Phe	Cys
						85				90				95	
Ala	Arg	Asn	Trp	Met	Asn	Phe	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Thr	Val
						100			105					110	
Thr	Val	Ser	Ser												
															115

<210> 11

<211> 116

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成结构

<220>

[0012]

<221> 链

<222> (1)... (116)

<223> 重链可变区

<400> 11

Gln	Val	Gln	Leu	Val	Gln	Ser	Gly	Ala	Glu	Val	Lys	Lys	Pro	Gly	Ala
1			5						10					15	
Ser	Val	Lys	Val	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Tyr	Ala	Phe	Thr	Tyr	Tyr
			20					25						30	
Leu	Ile	Glu	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Gln	Gly	Leu	Glu	Trp	Ile
			35					40						45	
Gly	Val	Ile	Asn	Pro	Gly	Ser	Gly	Gly	Thr	Asn	Tyr	Asn	Glu	Lys	Phe
			50				55						60		
Lys	Gly	Arg	Ala	Thr	Leu	Thr	Ala	Asp	Lys	Ser	Thr	Ser	Thr	Ala	Tyr
65					70					75				80	
Met	Glu	Leu	Ser	Ser	Leu	Arg	Ser	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Phe	Cys
					85					90				95	
Ala	Arg	Asn	Trp	Met	Asn	Phe	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Thr	Val
					100				105					110	
Thr	Val	Ser	Ser												
															115

<210> 12

<211> 116

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成结构

<220>

<221> 链

<222> (1)... (116)

<223> 重链可变区

<400> 12

Gln	Val	Gln	Leu	Val	Gln	Ser	Gly	Ala	Glu	Val	Lys	Lys	Pro	Gly	Ala
1			5						10					15	
Ser	Val	Lys	Val	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Tyr	Ala	Phe	Thr	Tyr	Tyr
			20					25						30	
Leu	Ile	Glu	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Gln	Gly	Leu	Glu	Trp	Ile
			35					40						45	
Gly	Val	Ile	Asn	Pro	Gly	Ser	Gly	Gly	Thr	Asn	Tyr	Asn	Glu	Lys	Phe

[0013]

	50		55		60												
Lys	Gly	Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Ala	Asp	Lys	Ser	Thr	Ser	Thr	Ala	Tyr		
65					70					75				80			
Met	Glu	Leu	Ser	Ser	Leu	Arg	Ser	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys		
				85					90					95			
Ala	Arg	Asn	Trp	Met	Asn	Phe	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Thr	Val		
				100				105					110				
Thr	Val	Ser	Ser														
				115													

<210> 13

<211> 112

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成结构

<220>

<221> 链

<222> (1)... (112)

<223> 轻链可变区

<400> 13

Asp	Ile	Val	Met	Thr	Gln	Thr	Pro	Leu	Ser	Leu	Ser	Val	Thr	Pro	Gly		
1				5				10						15			
Gln	Pro	Ala	Ser	Ile	Ser	Cys	Arg	Ser	Ser	Lys	Ser	Leu	Leu	His	Ser		
			20					25					30				
Asn	Gly	Asn	Thr	Tyr	Leu	Tyr	Trp	Phe	Leu	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	Ser		
			35				40					45					
Pro	Gln	Phe	Leu	Ile	Tyr	Arg	Met	Ser	Asn	Leu	Ala	Ser	Gly	Val	Pro		
50						55					60						
Asp	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Ala	Phe	Thr	Leu	Lys	Ile		
65					70					75				80			
Ser	Arg	Val	Glu	Ala	Glu	Asp	Val	Gly	Val	Tyr	Tyr	Cys	Met	Gln	His		
			85						90					95			
Leu	Glu	Tyr	Pro	Tyr	Thr	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Ile	Lys		
			100					105					110				

<210> 14

<211> 112

<212> PRT

<213> 人工序列

[0014]

<220>

<223> 合成结构

<220>

<221> 链

<222> (1)... (112)

<223> 轻链可变区

<400> 14

Asp	Ile	Val	Met	Thr	Gln	Thr	Pro	Leu	Ser	Leu	Ser	Val	Thr	Pro	Gly
1				5				10						15	
Gln	Pro	Ala	Ser	Ile	Ser	Cys	Arg	Ser	Ser	Lys	Ser	Leu	Leu	His	Ser
			20					25						30	
Asn	Gly	Asn	Thr	Tyr	Leu	Tyr	Trp	Tyr	Leu	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	Ser
			35				40						45		
Pro	Gln	Phe	Leu	Ile	Tyr	Arg	Met	Ser	Asn	Leu	Ala	Ser	Gly	Val	Pro
			50				55					60			
Asp	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Lys	Ile
65					70					75				80	
Ser	Arg	Val	Glu	Ala	Glu	Asp	Val	Gly	Val	Tyr	Tyr	Cys	Met	Gln	His
					85					90				95	
Leu	Glu	Tyr	Pro	Tyr	Thr	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Ile	Lys
					100					105				110	

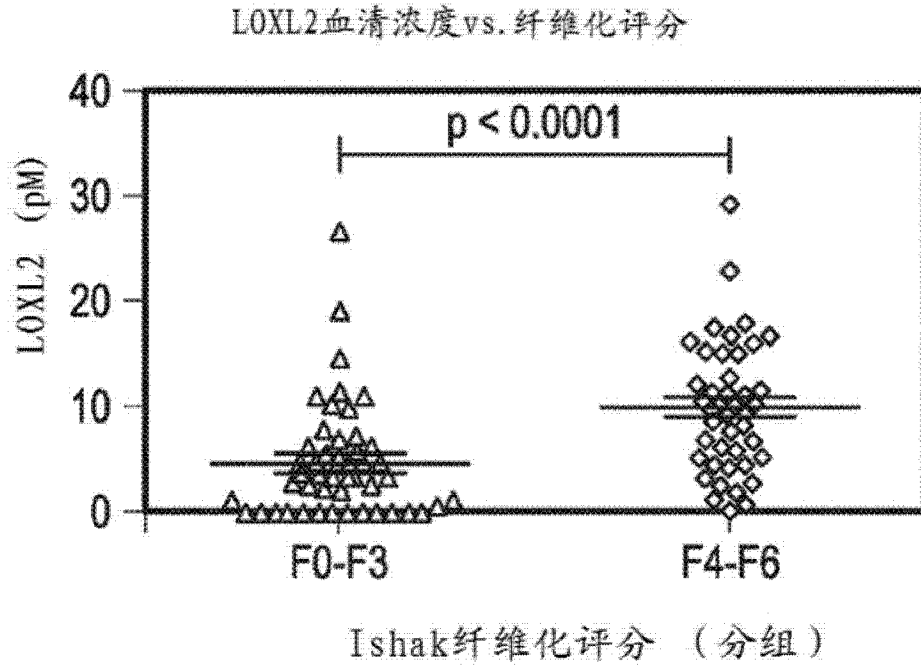


图 1

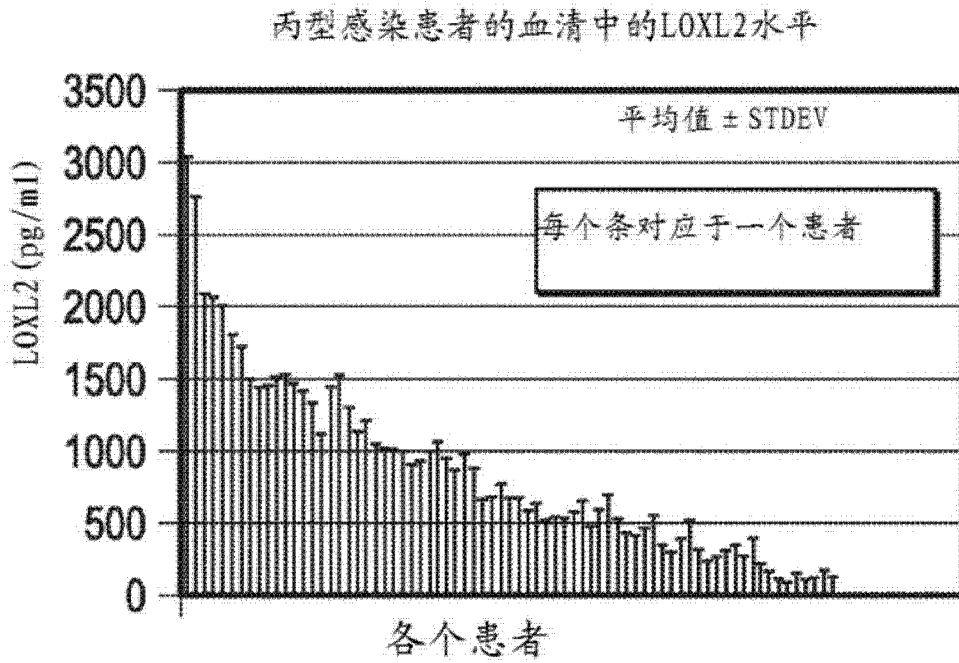


图 2

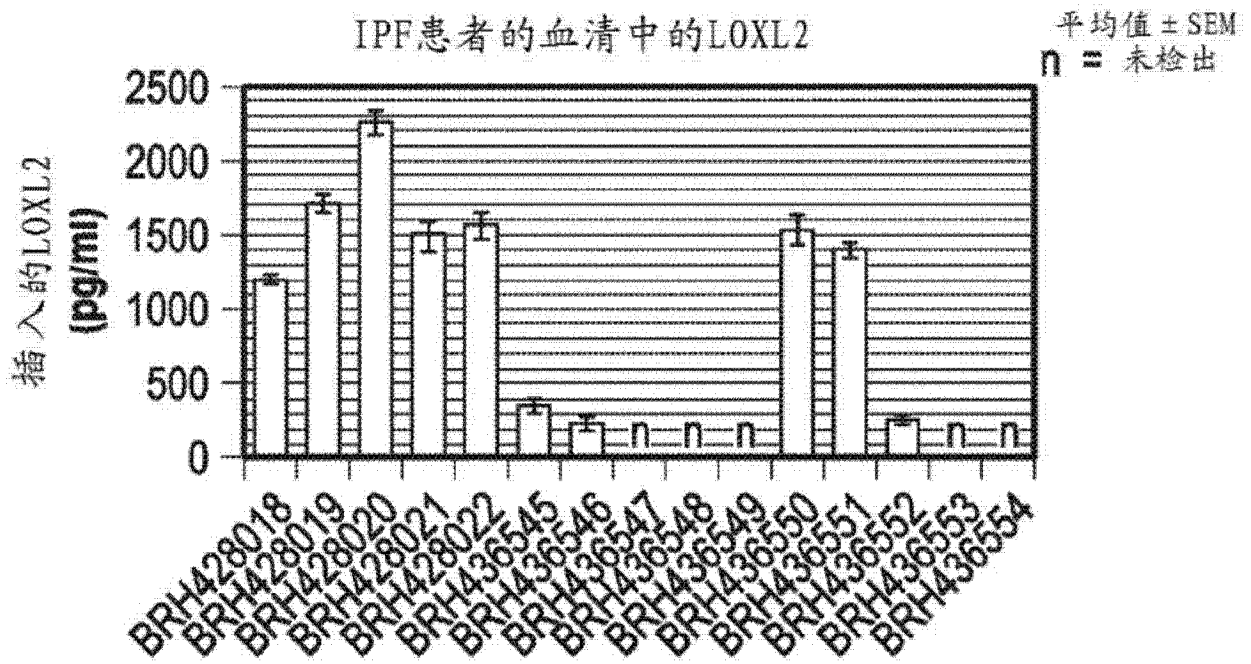


图 3

MERPLCSHLC SCLAMLALLS PLSLAQYDSW PHYEYFQOP APEYHQPOAP ANVAKIQLRL 60
信 号 肽
AGQKRKHSEG RVEVYYDGOW GTVCDDDESI HAAHVVCREL GYVEAKSWTA SSSYGKGEGR 120
IWLDNLHCTG NEATLAACTS NGWGVTDCKH TEDVGVVCS D KRIPIGKFDN SLINQIENLN 180
IQVEDIRIRA ILSYRKRTF VMEGYVEVKE GKTWKOICDK HWTAKNSRVV CGMFGFPGER 240
TYNTKVYKMF ASRRKORYWP FSMDCITGTEA HISSCKLGPQ VSLDPMKNVT CENGLPAVVS 300
CVPGQVFPD GPSRFRKAYK PEQPLVRLRG GAYIGEGRVE VLKNGEWGTV CDDKNDLVSA 360
SVVCRELGEG SAKEAVTGR LGQIGIGPIHL NEIOCTGNEK SIIDCKFNAE SQGCNHEEDA 420
GVRCNTPAMG LQKKLRNGG RNPYEGRVEV IVERNGSLW GMVCGQNWGI VEAMVVCROL 480
GLGEASNAFO ETWYWHGDVN SNKVVMGVK CSGTELSLAH CRHDGEDVAC POGGVOYGAG 540
VACSETAPDL VLNAEMVOOT TYLEDRPFMF LQCAMEENCL SASAAQTDPT TGYRLLRES 600
SQIHNGQSD FRPKNGRHAW IWHDCRRHYH SMEVFTHYDL LNLNGTKVAE GHKASFCLED 660
TECEGDIKN YECANEGDOG IIMGWDMYR HDIDCOMVDI TDVPEGDYLE OVVINPFEV 720
AESDYSNNIM KCRSRYDGRH IWMYNCHIGG SESETEKKE EHESGLLNNO LSPQ 774

SRCR1

SRCR2

SRCR3

SRCR4

催 化 结 构 域

SEQ ID NO:1

图 4

*

H:	PDLVLNAEMV	QTTYLED RP	MFMLQCAMEE	NCLSASAAQT	DPTTGYRRL L	RESSQIHNN G
M:	PDLVLNAEIV	QTYALED RP	MSLLQCAMEE	NCLSASAVHT	DPTRGHRRLL	RESSQIHNN G
R:	PDLVLNAEIV	QTYALED RP	MALLQCAMEE	NCLSASAVHT	DPTRGHRRLL	RESSQIHNN G
C:	PDLVLNAEMV	QTTYLED RP	MFMLQCAMEE	NCLSASAAQT	NPTTGYRRL L	RESSQIHNN G
H:	QSDFRPKNGR	HAWIWHDC HR	HYHSMEVFTH	YDLLNLNGTK	VAEGHKASFC	LEDTECEGDI
M:	QSDFRPKNGR	HAWIWHDC HR	HYHSMEVFY	YDLLSLNGTK	VAEGHKASFC	LEDTECEGDI
R:	QSDFRPKNGR	HAWIWHDC HR	HYHSMEVFY	YDLLSLNGTK	VAEGHKASFC	LEDTECEGDI
C:	QSDFRPKNGR	HAWIWHDC HR	HYHSMEVFTH	YDLLNLNGTK	VAEGHKASFC	LEDTECEGDI
H:	QKNYECANFG	DQGITMGCWD	MYRHDIDCQW	VDITDVPPGD	YLFQVVINPN	FEVAESDYSN
M:	QKSYECANFG	EQGITMGCWD	MYRHDIDCQW	IDITDVPPGD	YLFQVVINPN	YEVPESD ESN
R:	QKSYECANFG	EQGITMGCWD	MYRHDIDCQW	IDITDVPPGD	YLFQVVINPN	YEVPESD ESN
C:	QKNYECANFG	DQGITMGCWD	MYRHDIDCQW	IDITDVPPGD	YLFQVVINPN	FEVAESDYSN

*

H:	NIMKCRSRYD	GHRIMWYNCH	IGGSFSEETE	KKFEHFSGLL	NNQLSPQ	(SEQ ID NO:2)
M:	NIMKCRSRYD	G Y RIWYNCH	VGC A FSEETE	QKFEHFSGLL	NNQLSVQ	(SEQ ID NO:3)
R:	NIMKCRSRYD	G Y RIWYNCH	VGC A FSEETE	QKFEHFSGLL	NNQLSVQ	(SEQ ID NO:4)
C:	NIMKCRSRYD	GHRIMWYNCH	IGGSFSEETE	KKFEHFSGLL	NNQLSPQ	(SEQ ID NO:5)

图 5

人纤维化肝组织中LOXL2的表达

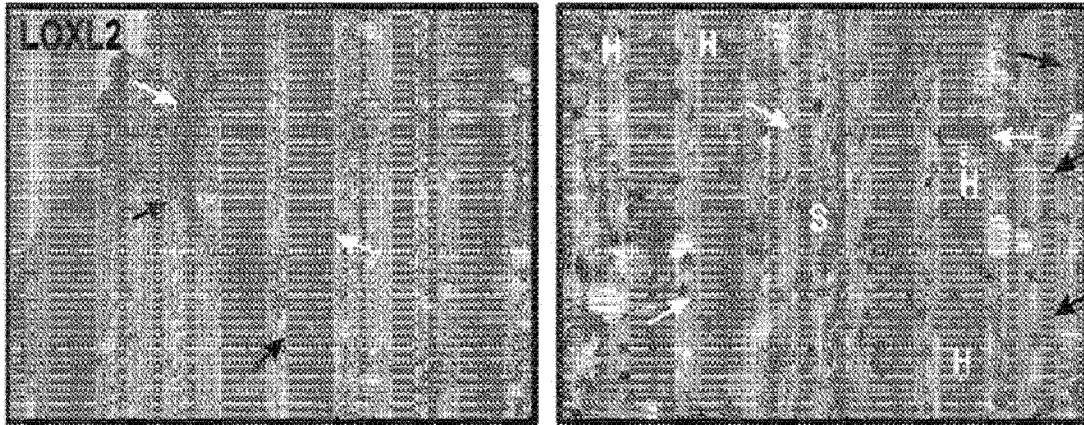


图 6

LOXL2免疫分析的标准校正曲线

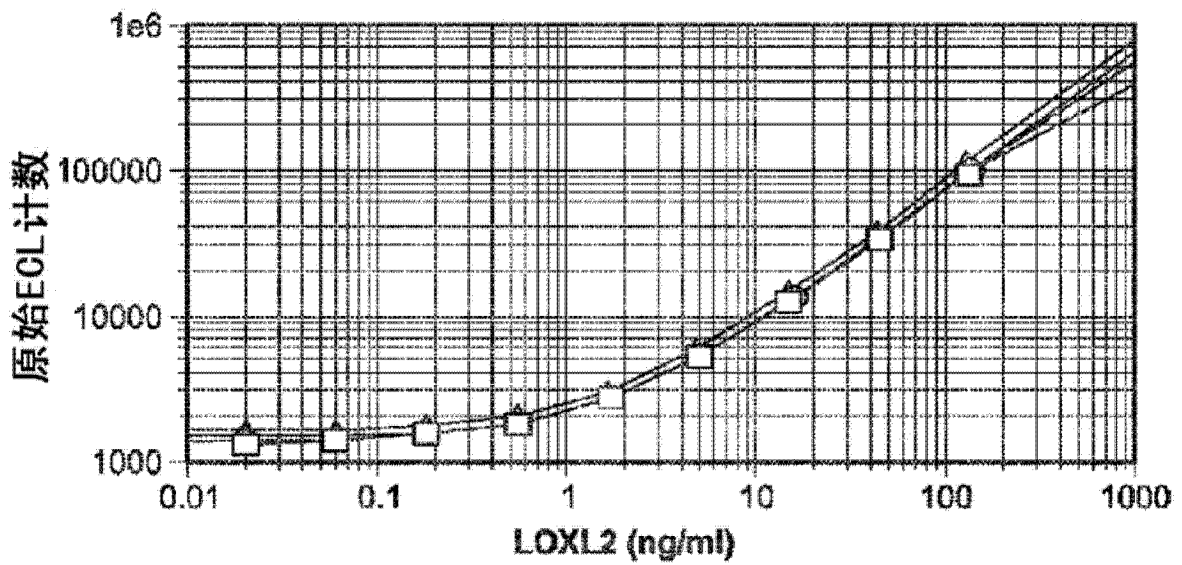


图 7

基于分组基线Ishak纤维化评分和时间的血清水平

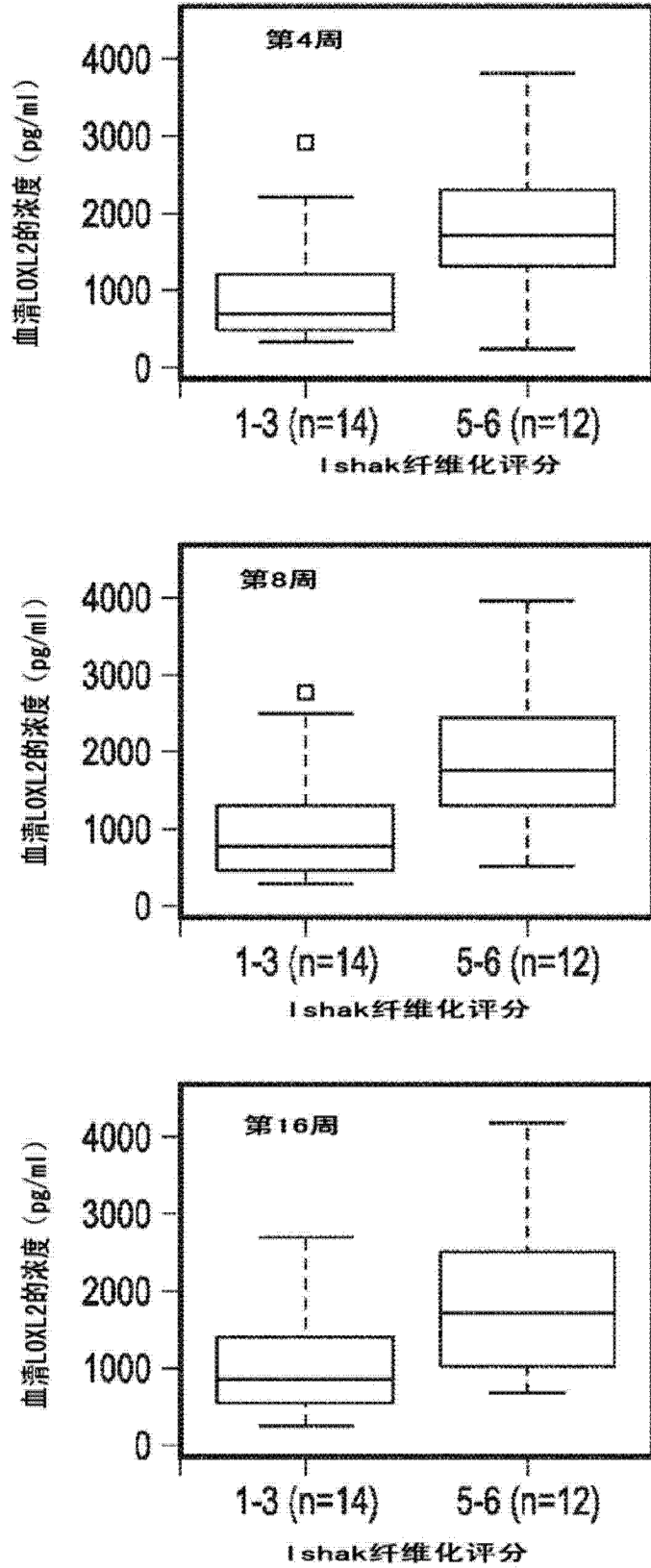


图 8

基于分组基线Ishak纤维化评分和时间的血清水平

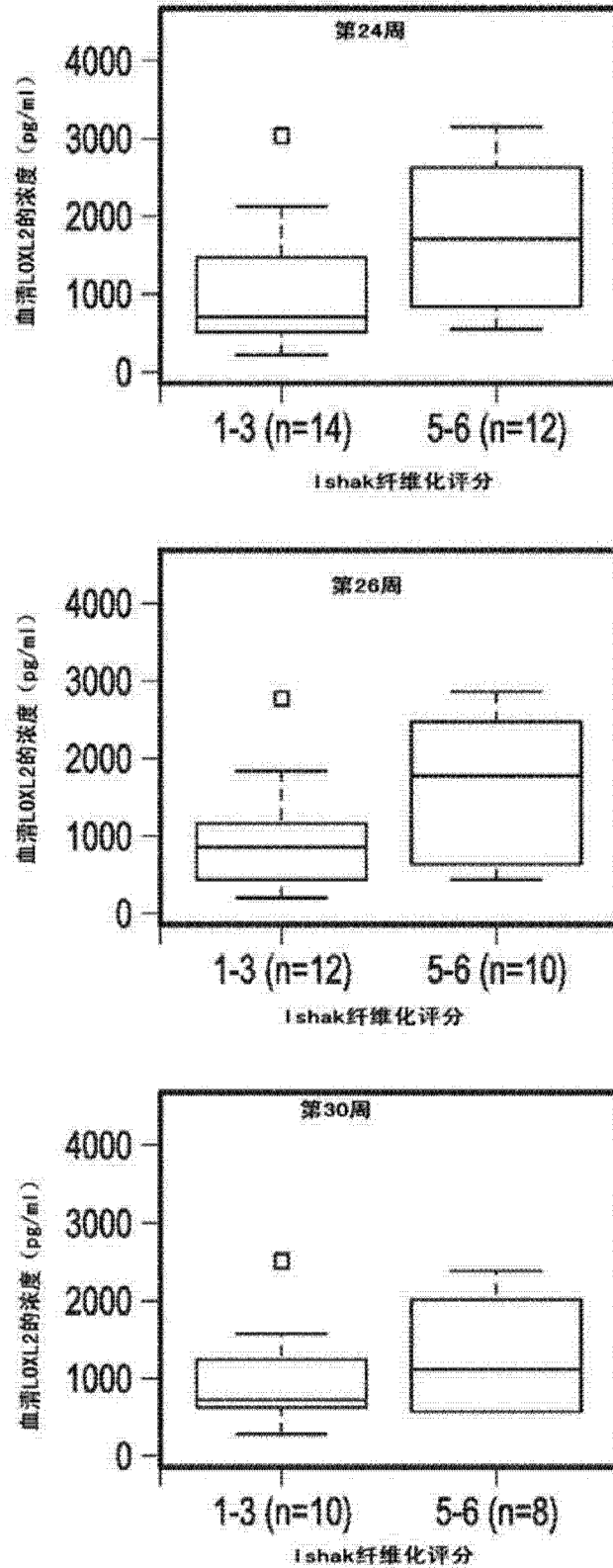


图 8 续

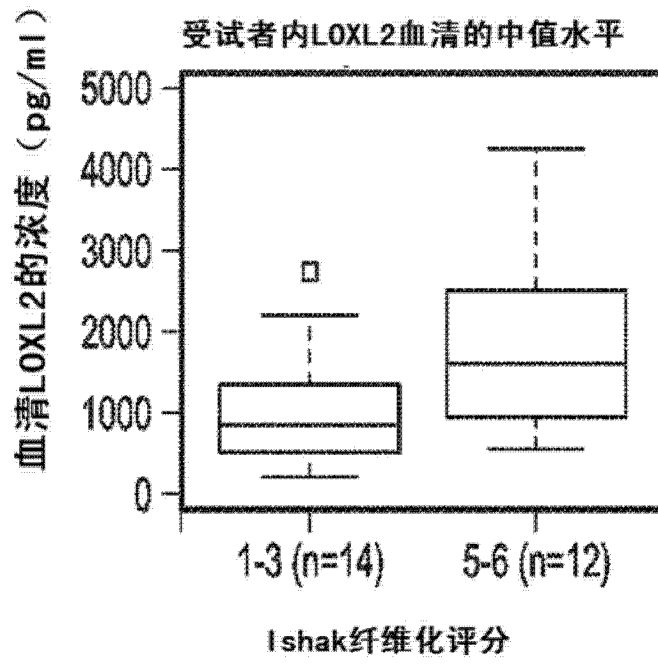


图 9

95%置信区间内基于分组基线Ishak纤维化评分的随着时间变化的LOXL2的中值浓度

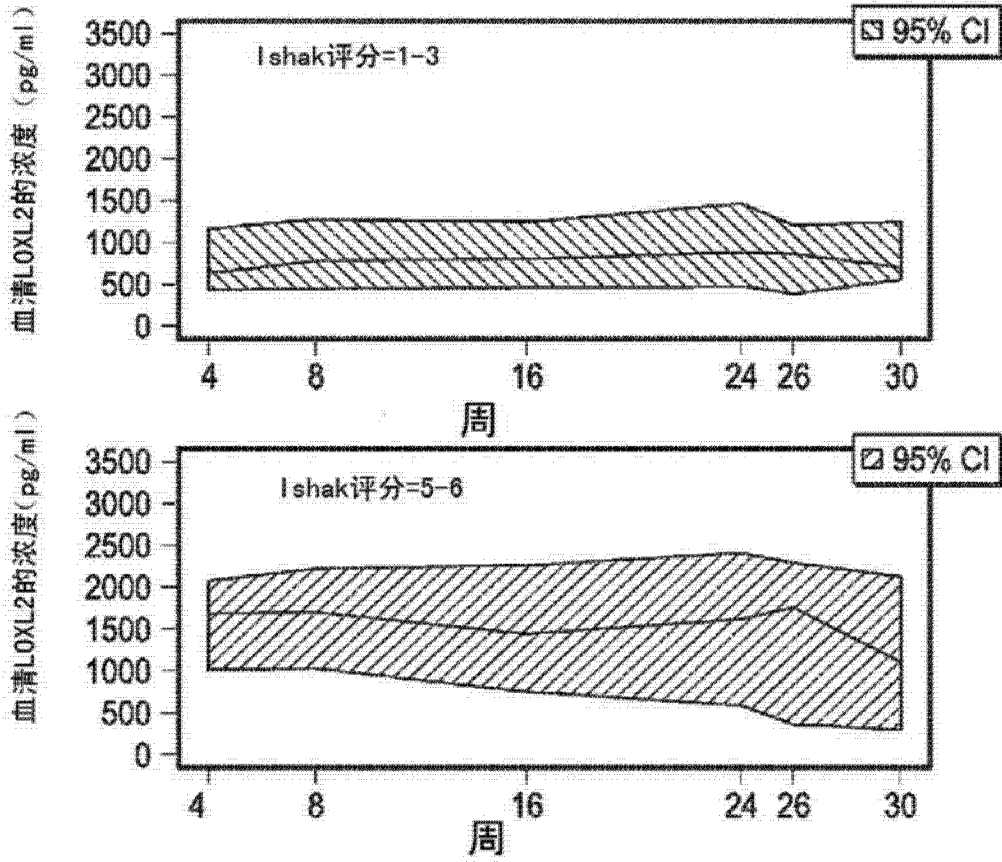


图 10

受试者内LOXL2的中值水平vs. HA和TIMP1

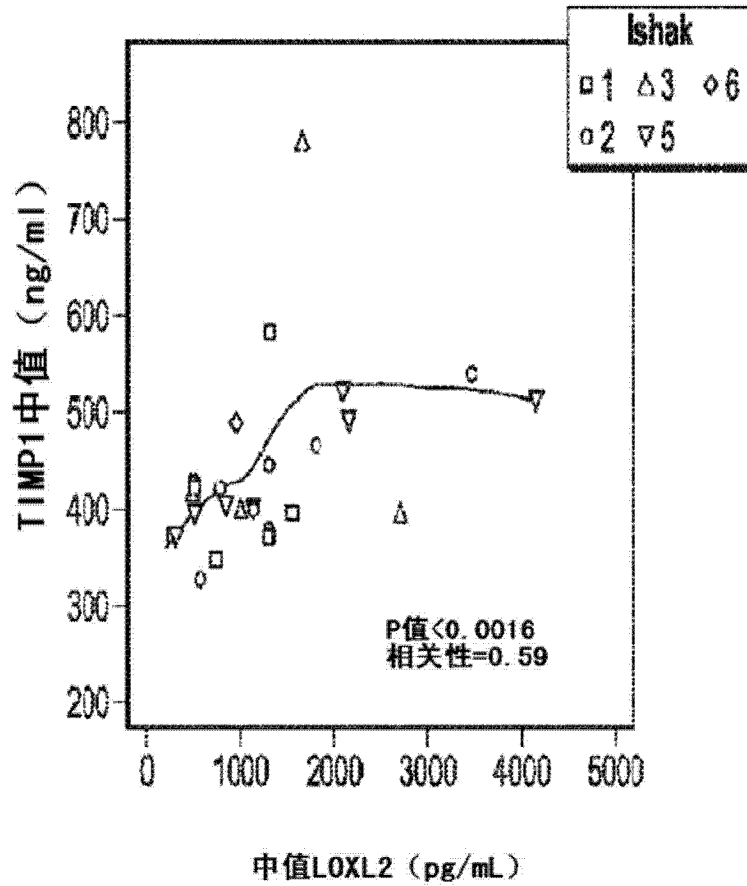
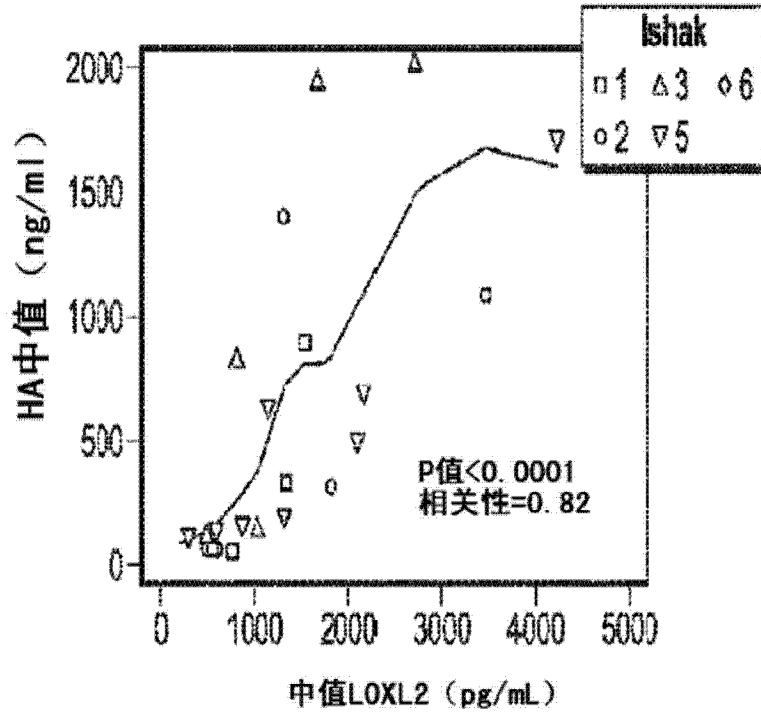


图 11

基线LOXL2水平与IPF严重程度和功能状态的基线指标之间的相关性
LOXL2数据的散点图模型

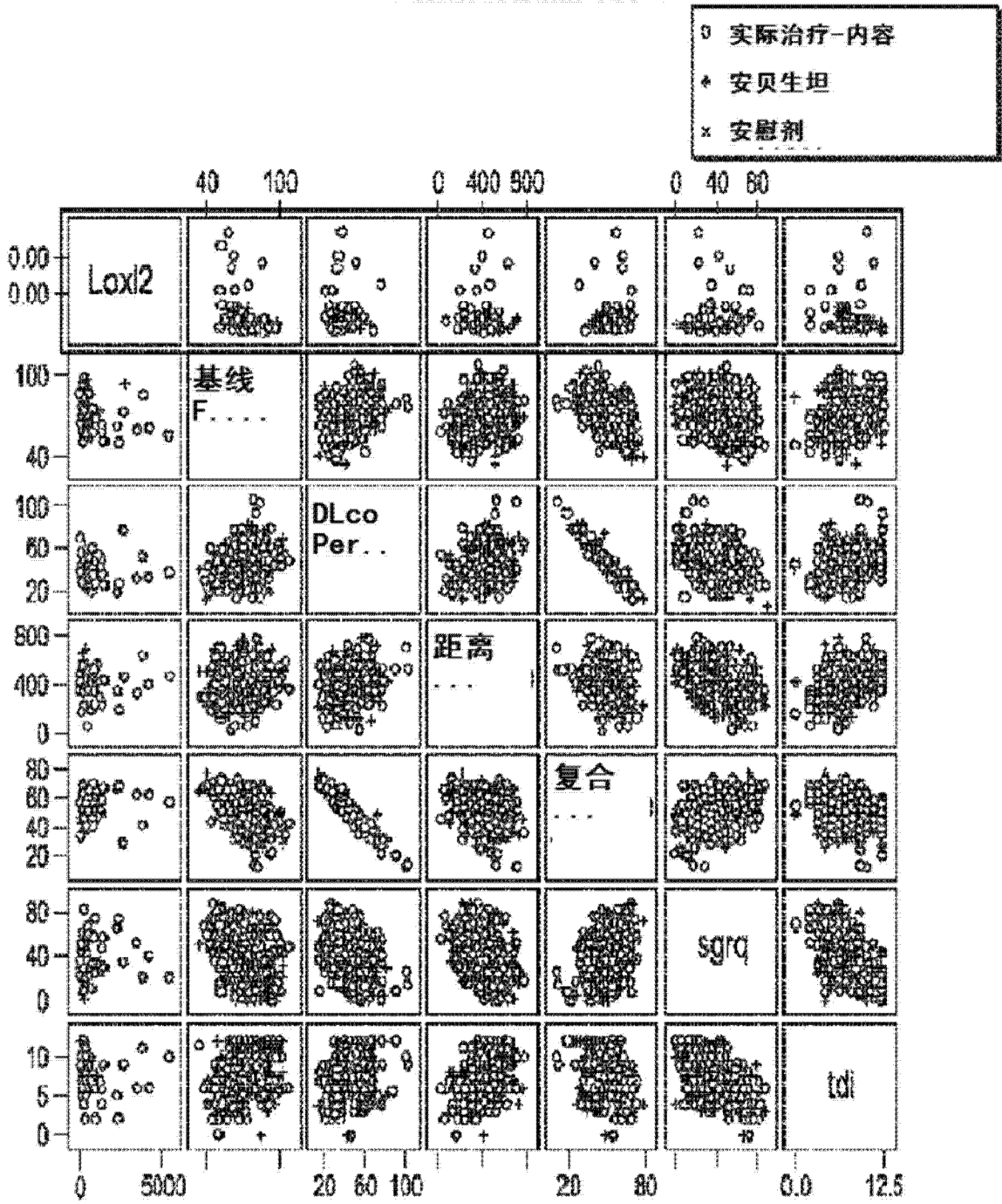


图 12A

基线LOXL2水平与IPF严重程度和功能状态的基线指标之间的相关性
LOXL2数据的散点图模型

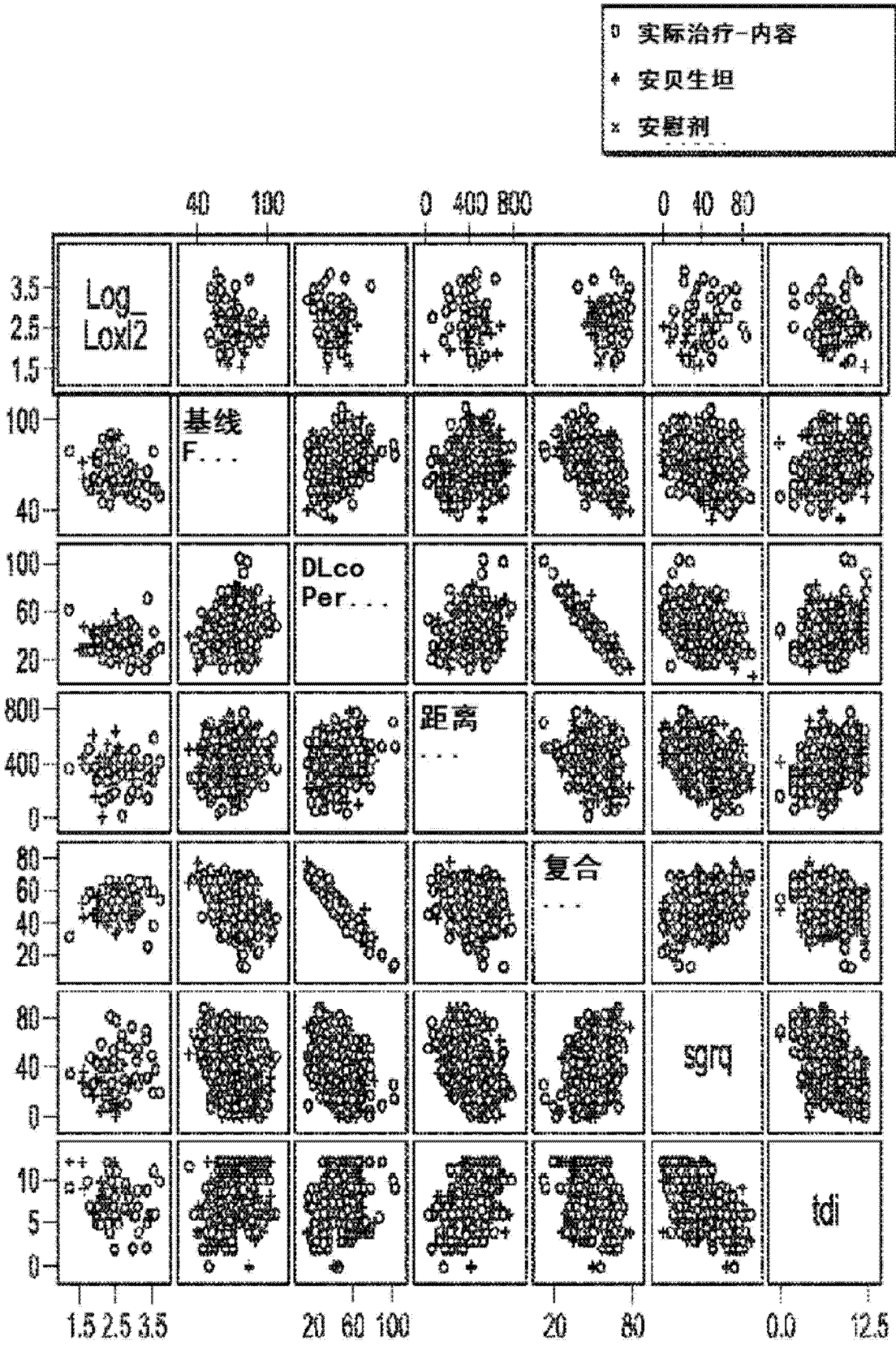


图 12B

Kaplan Meier曲线比较了疾病进程及其组成（肺功能下降、呼吸系统住院治疗 and 死亡）的低和高 LOXL2水平

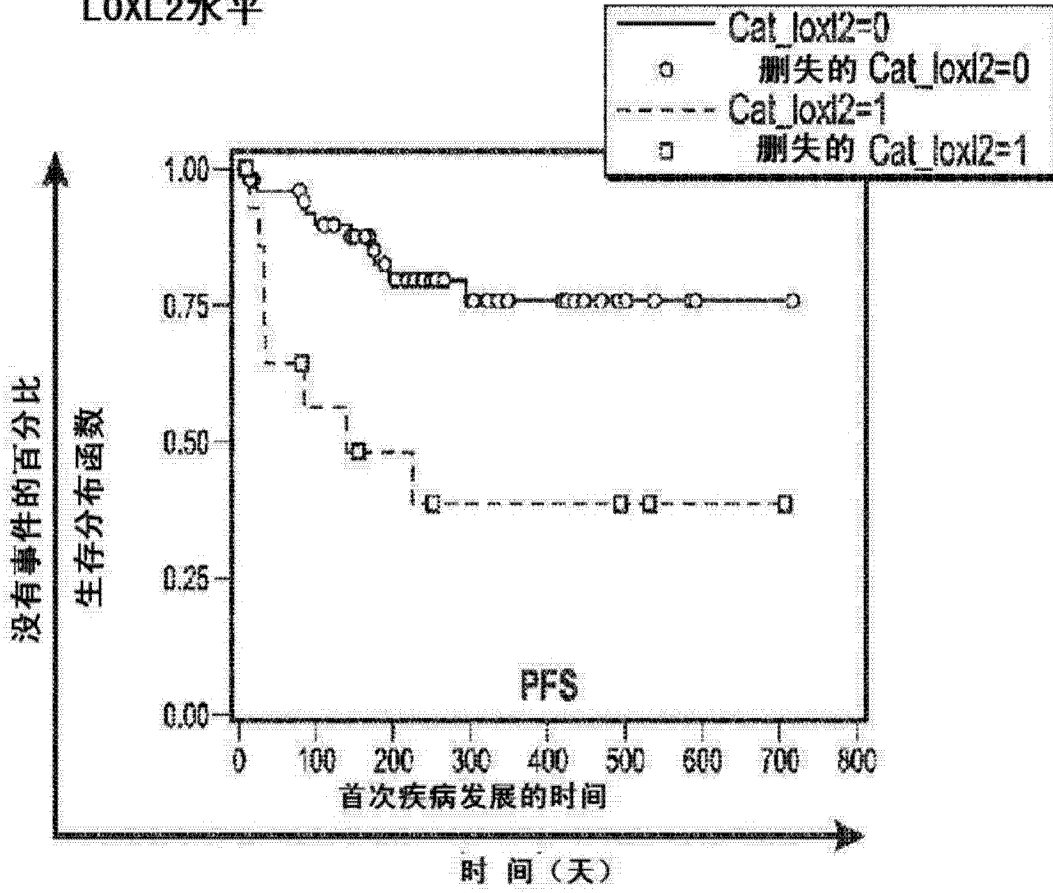


图 13A

Kaplan Meier曲线比较了疾病进程及其组成（肺功能下降、呼吸系统住院治疗 and 死亡）的低和高 LOXL2水平

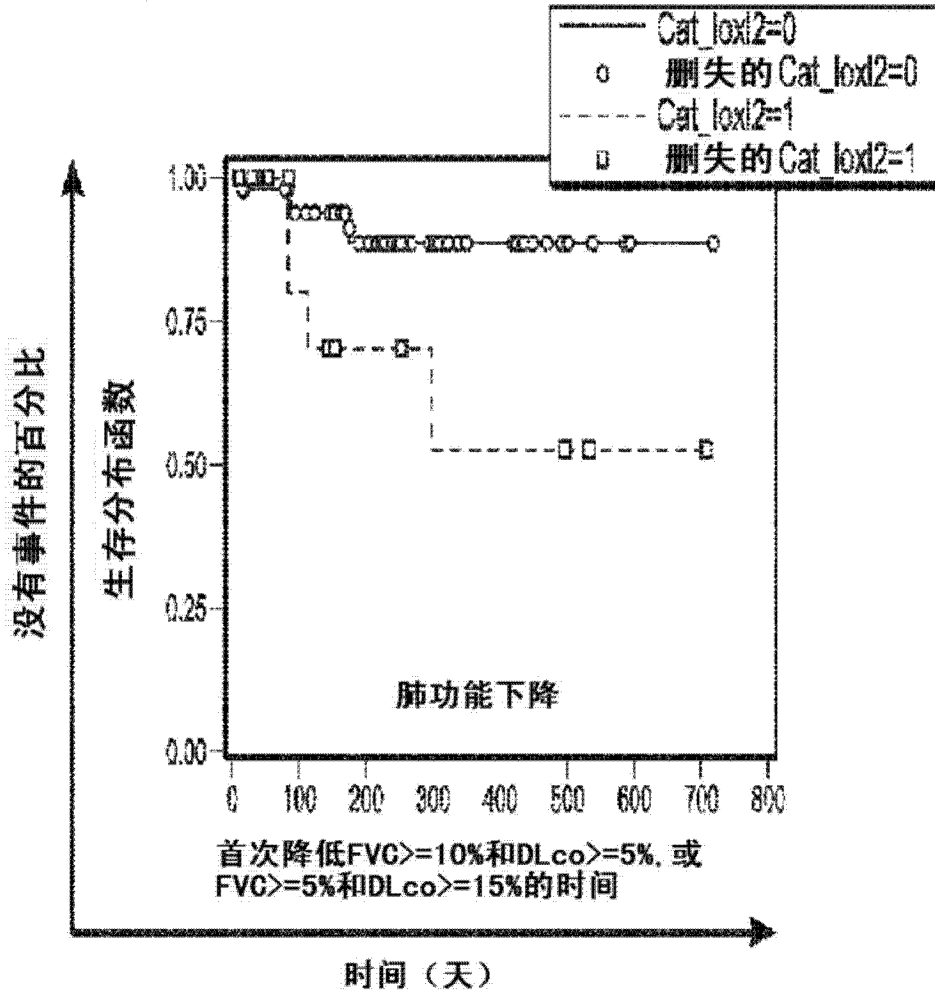


图 13B

Kaplan Meier 曲线比较了疾病进程及其组成（肺功能下降、呼吸系统住院治疗 and 死亡）的低和高 LOXL2 水平

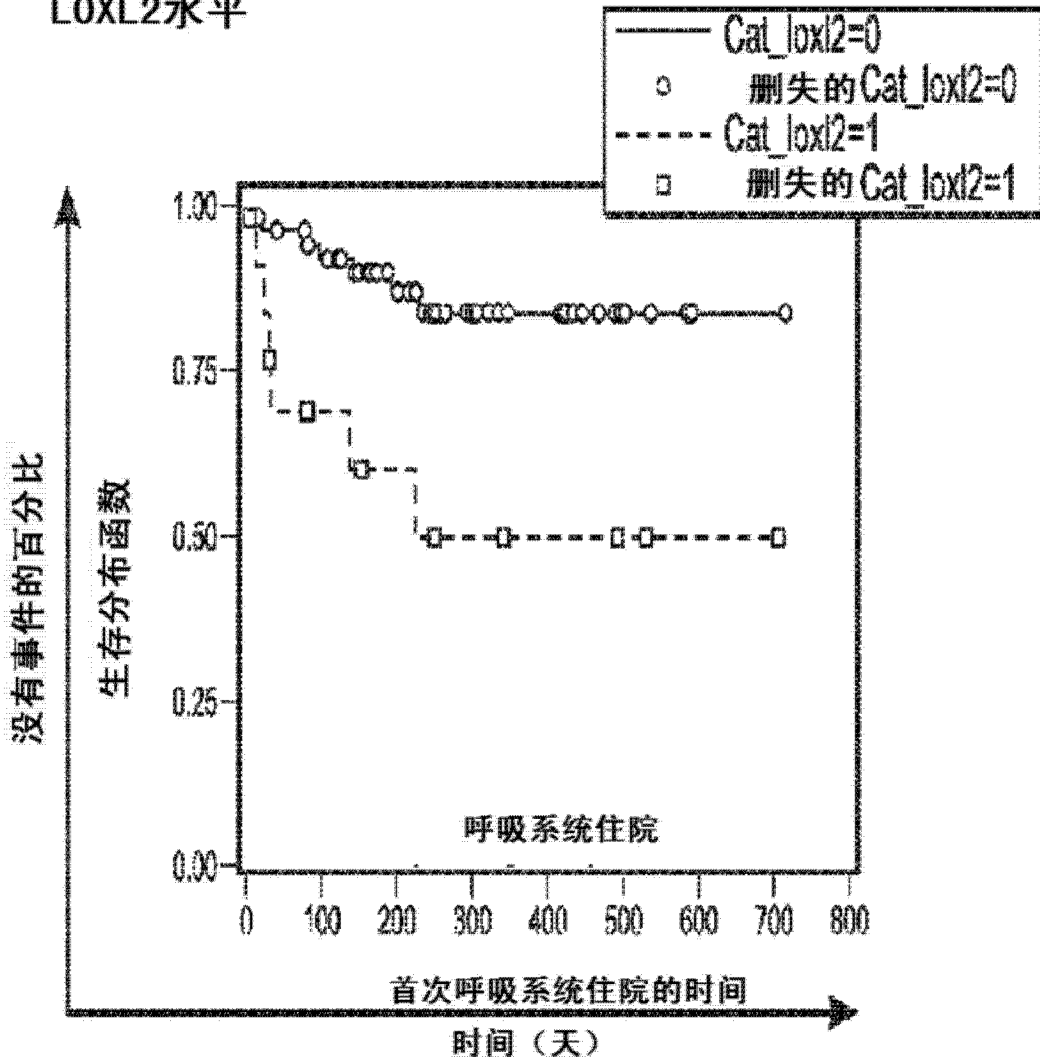


图 13C

Kaplan Meier曲线比较了疾病进程及其组成（肺功能下降、呼吸系统住院治疗 and 死亡）的低和高 LOXL2水平

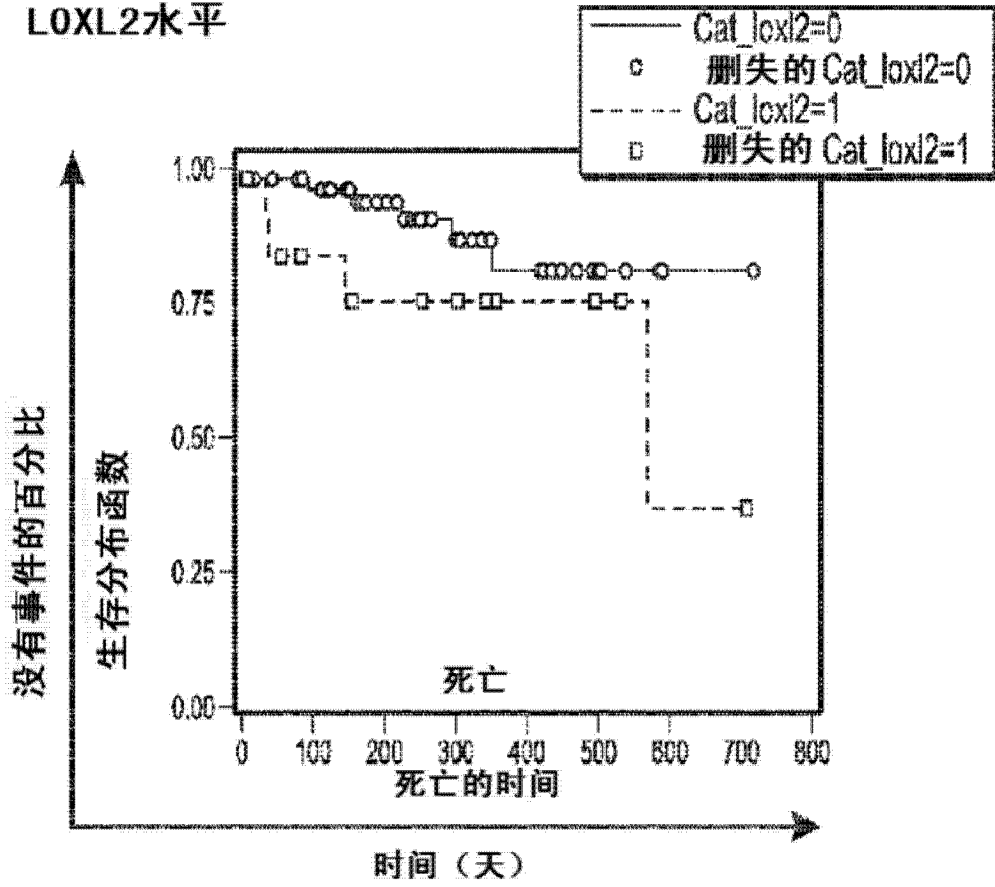


图 13D

ARTEMIS-IPF患者（合并的对照和安贝生坦治疗患者）和GAP组患者中基线LOXL2分布的比较

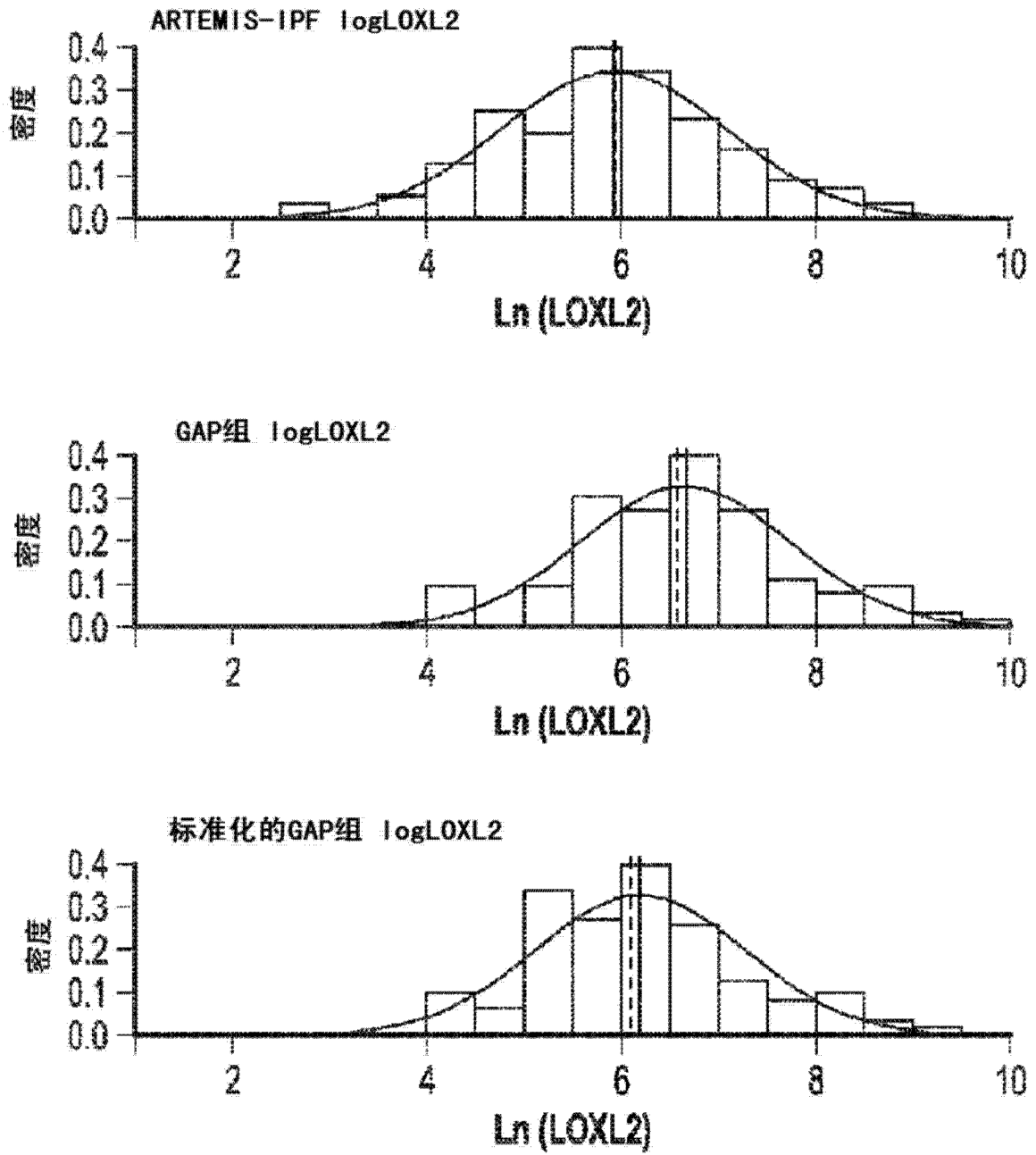


图 14A

ARTEMIS-IPF患者（贝生坦治疗患者）和GAP组患者中基线LOXL2分布的比较

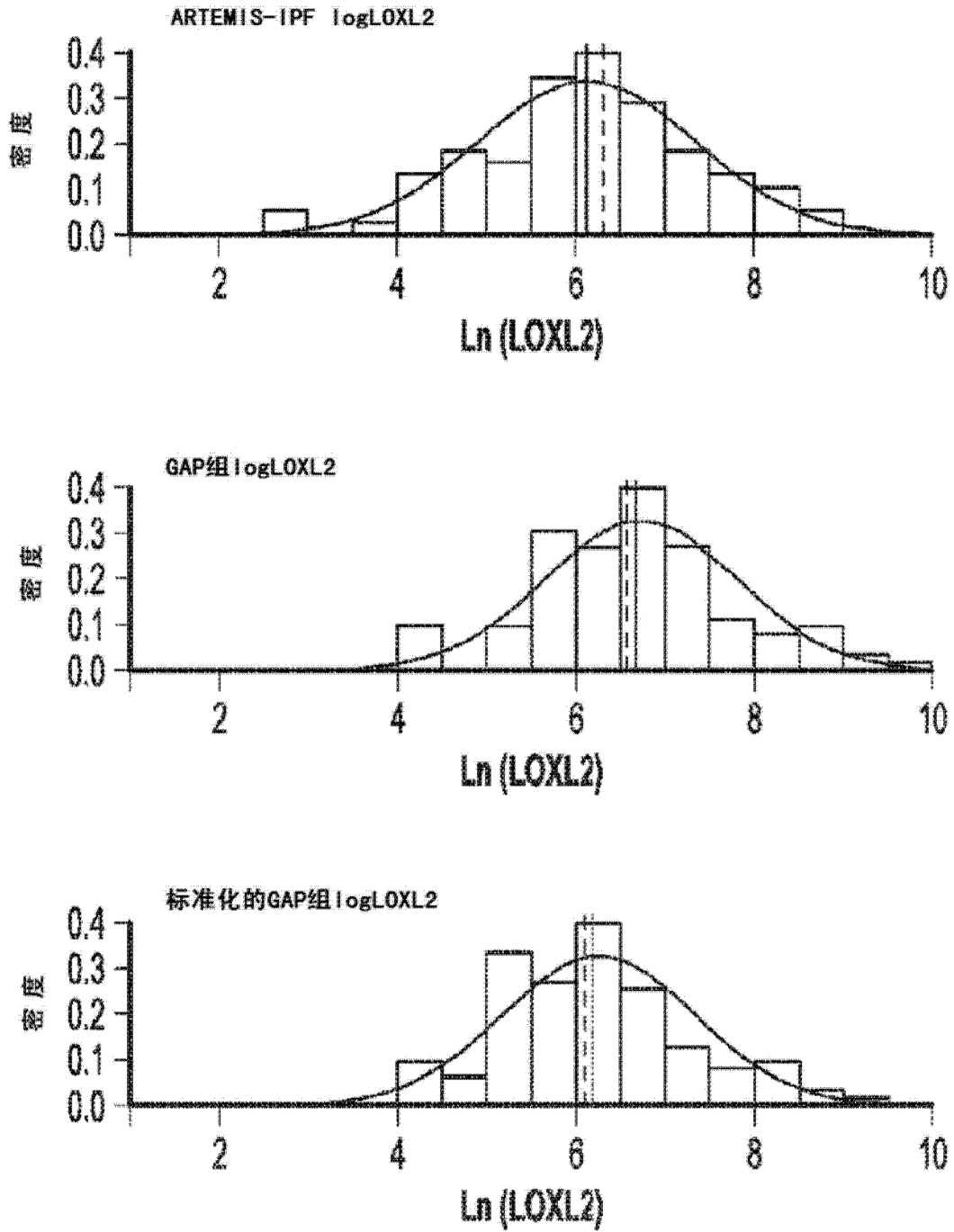


图 14B

低血清基线的LOXL2水平相比血清基线的高LOXL2水平的GAP组患者中的全死因

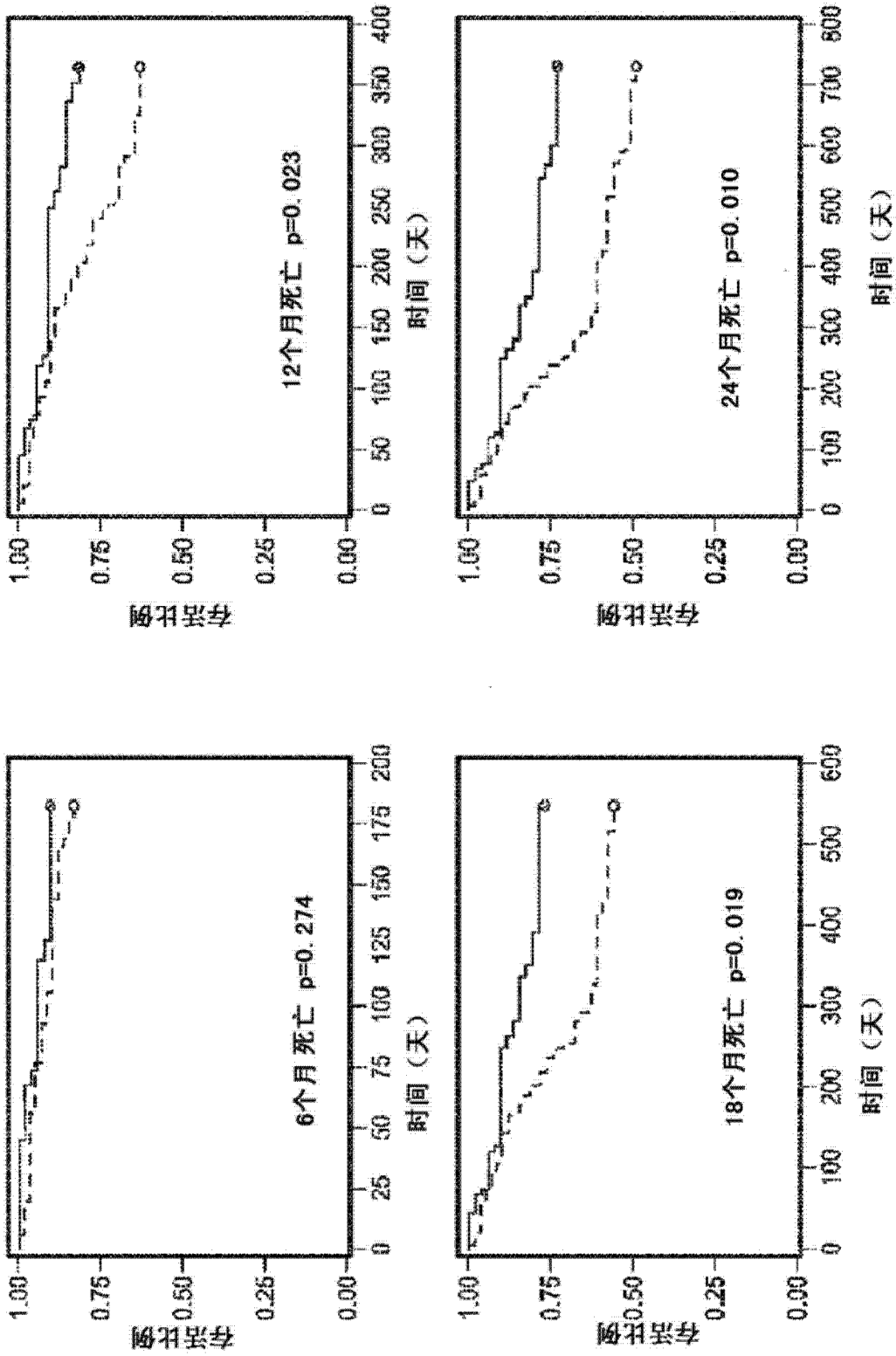


图 15A

低血清基线的LOXL2水平相比高血清基线的LOXL2水平的ARTEMIS-IPF患者的全死因

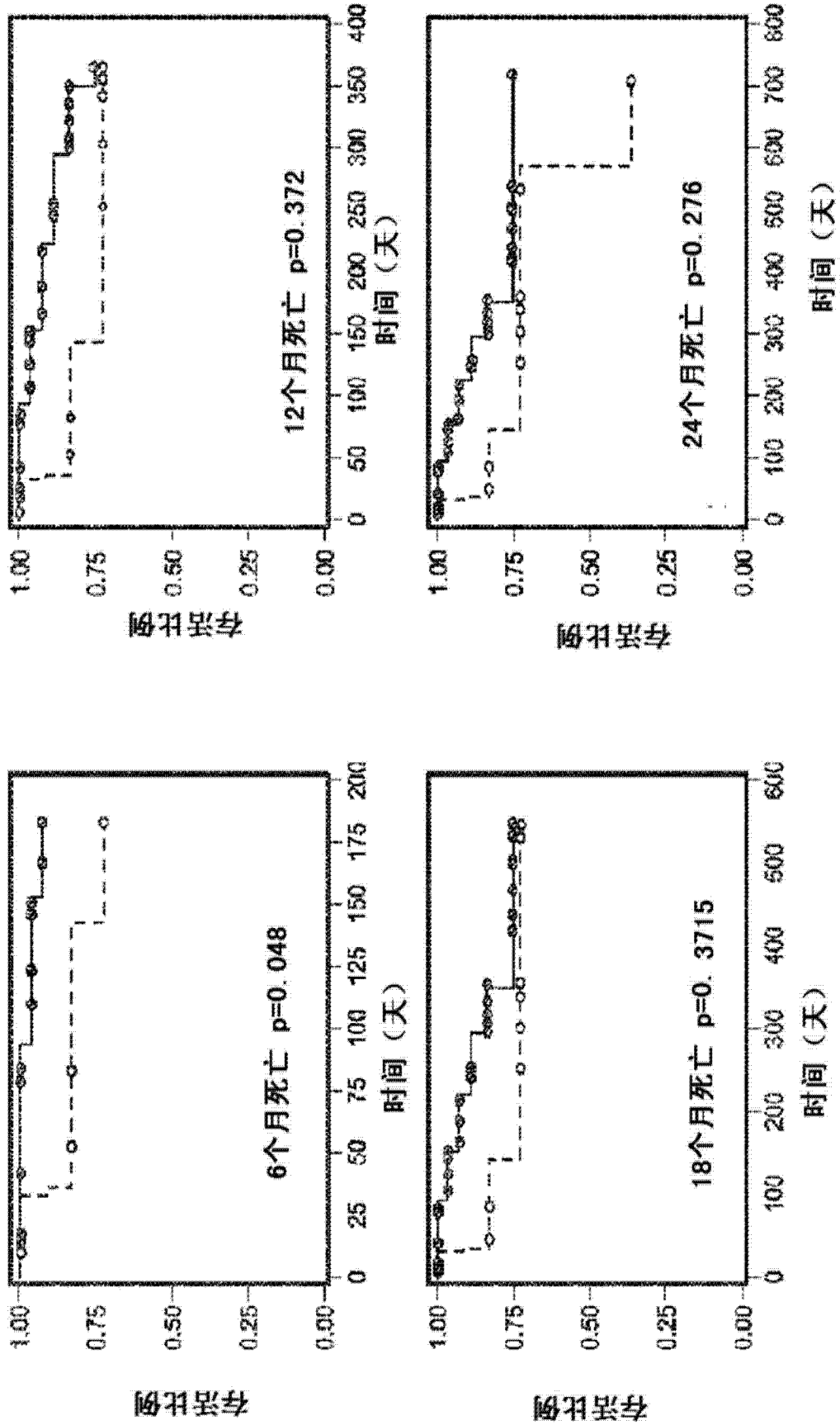


图 15B

基于Ishak纤维化阶段分组的CHB患者中的血清LOXL2水平

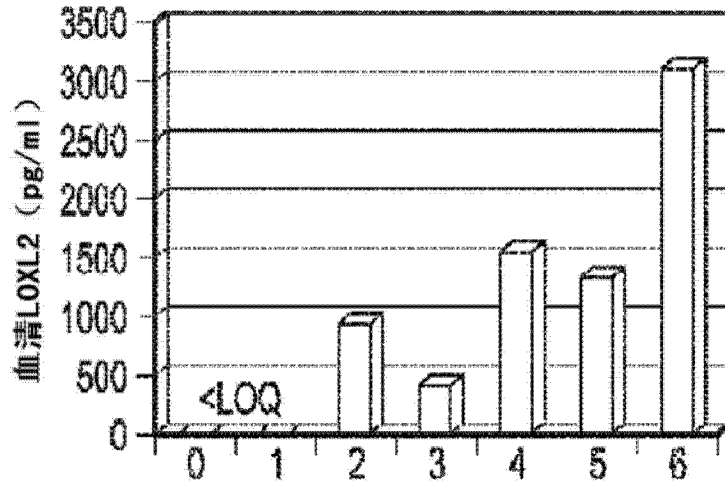


图 16A

基于Ishak纤维化阶段分组的CHB患者中的血清LOXL2水平

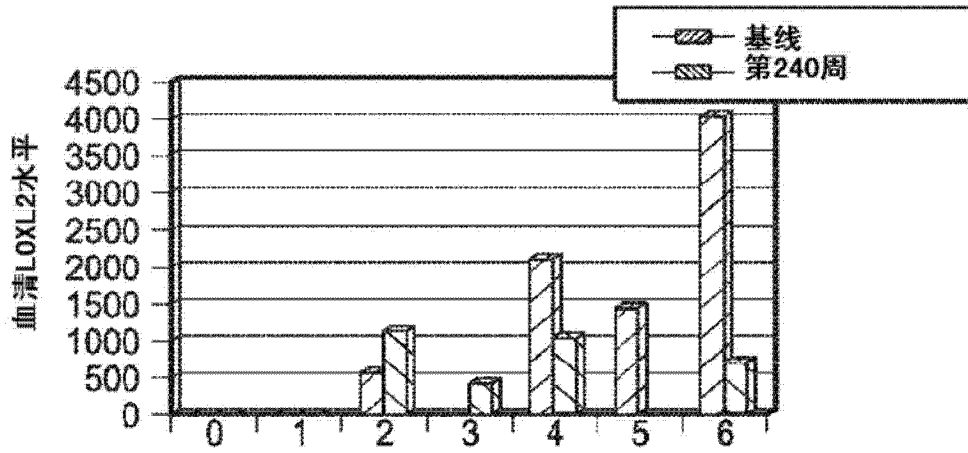


图 16B

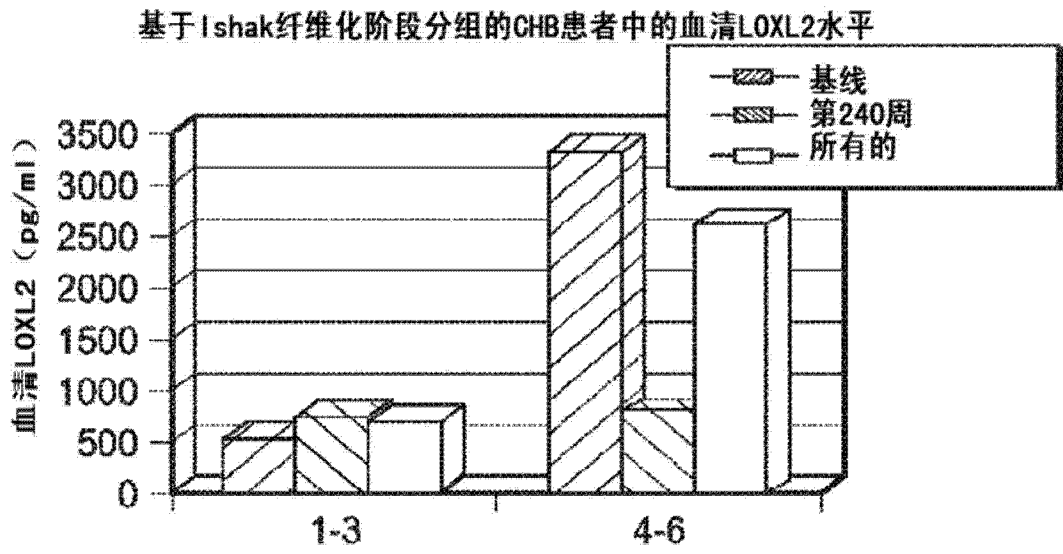


图 16C

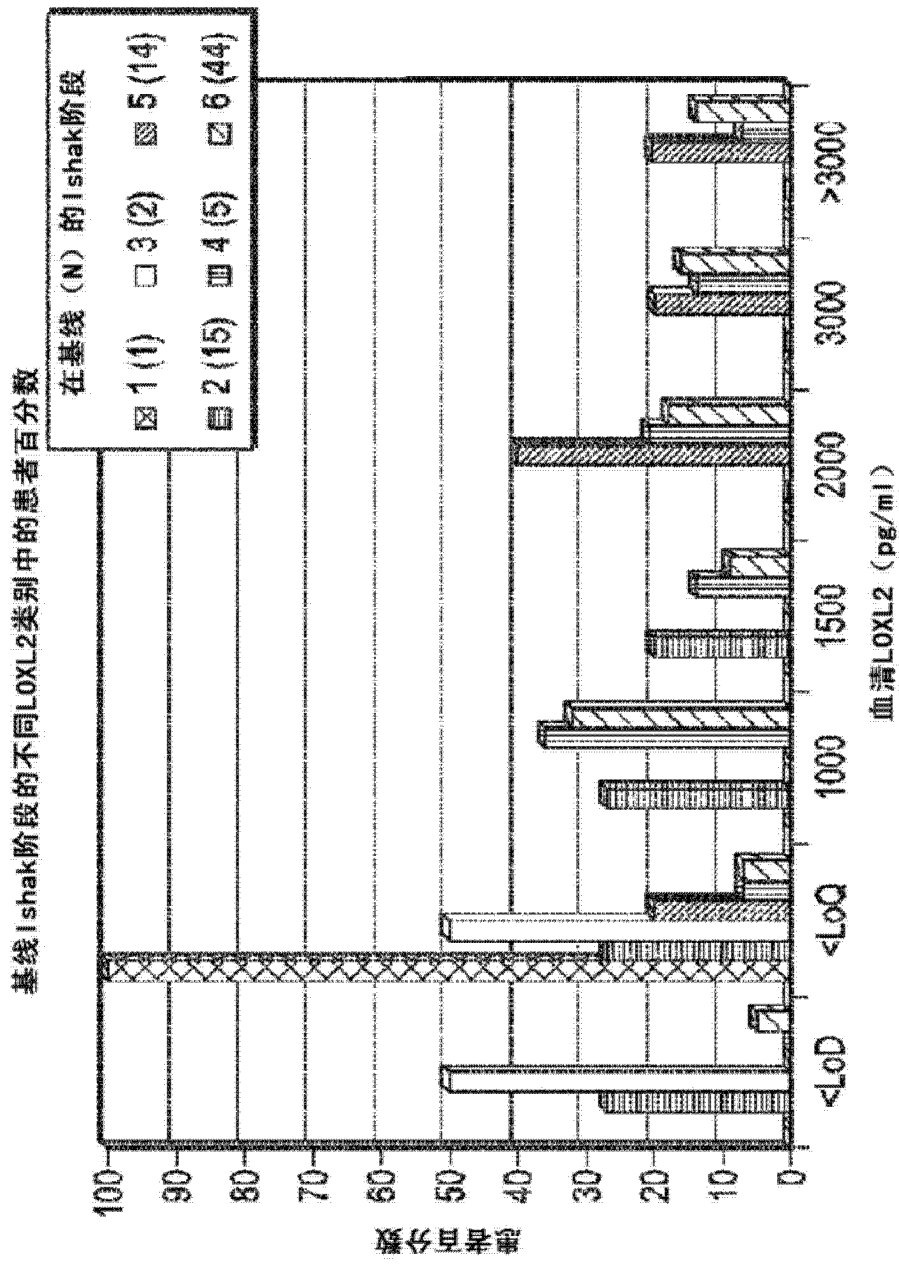


图 17

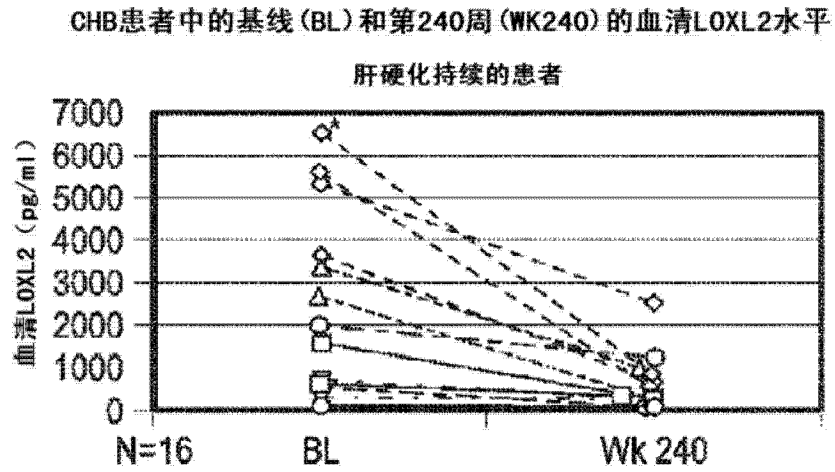


图 18A

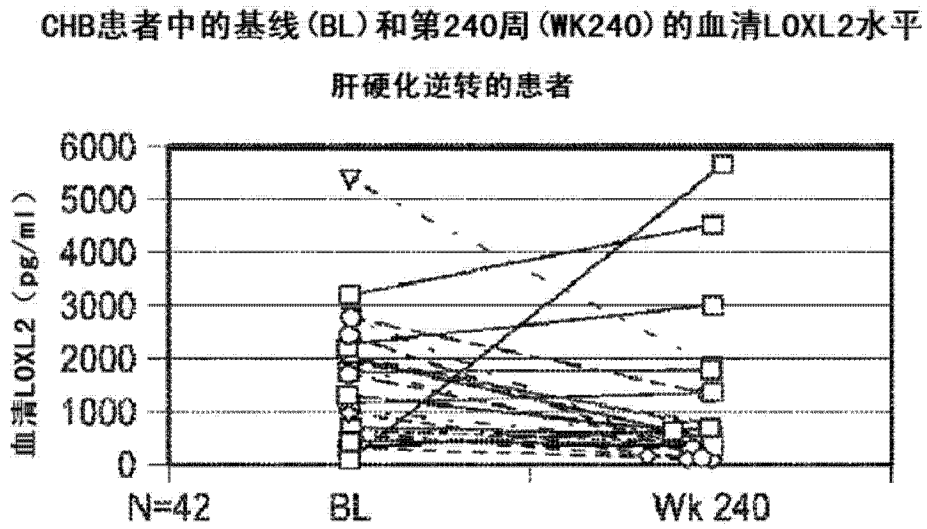


图 18B

CHB患者中的基线(BL)和第240周(WK240)的血清LOXL2水平
纤维化阶段没有变化的非肝硬化患者

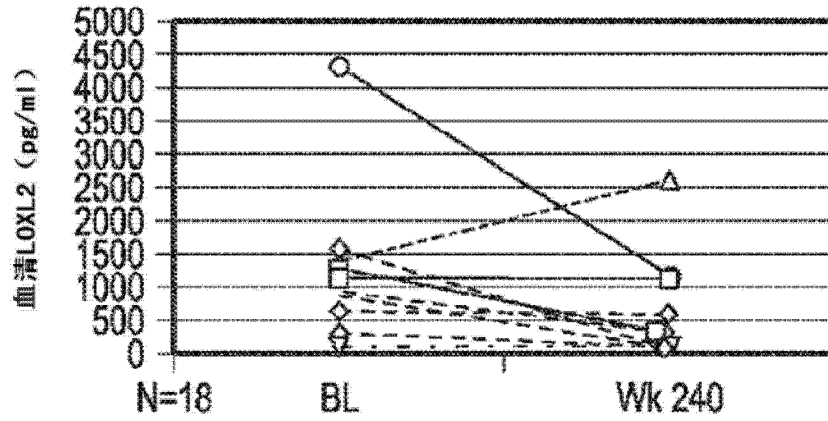


图 18C

CHB患者中的基线(BL)和第240周(WK240)的血清LOXL2水平

肝硬化发展的患者

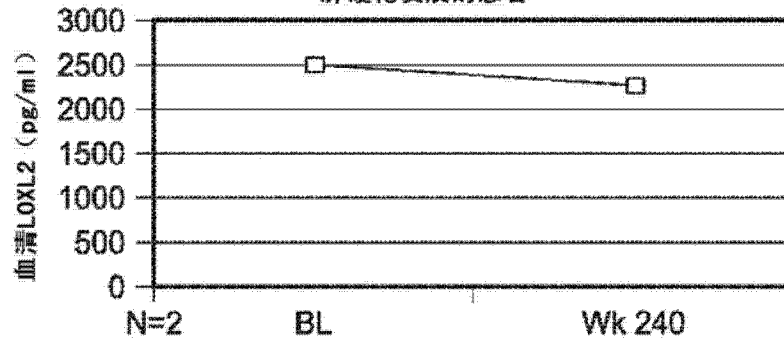


图 18D

CHB患者中的基线(BL)和第240周(WK240)的血清LOXL2水平

纤维化下降≥2个阶段的非肝硬化患者

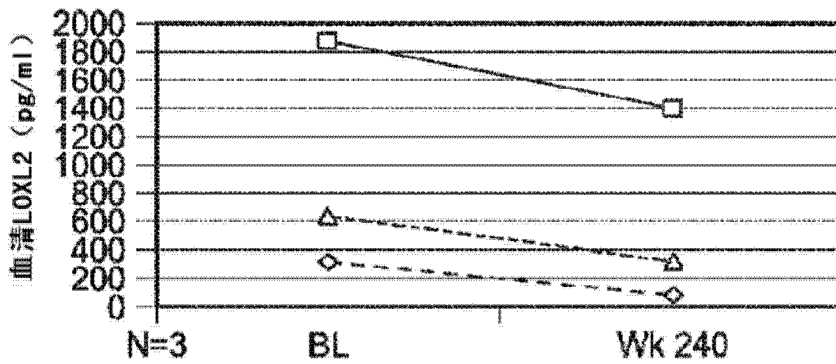


图 18E

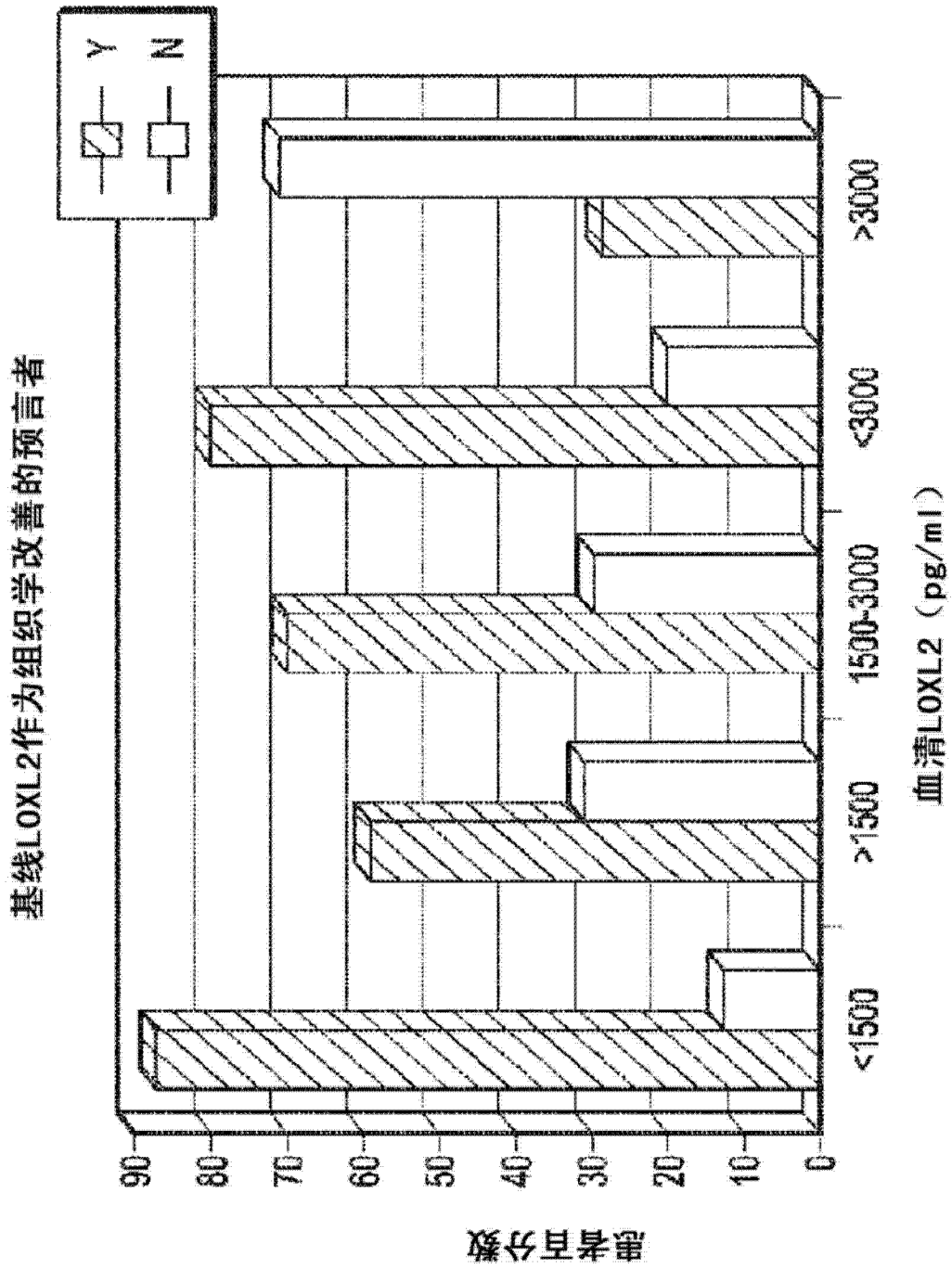


图 19

1. 一种方法,包括:

a) 将从个体获得的液体样品与赖氨酰氧化酶样 2 (LOXL2) 特异性抗体接触,所述个体正在进行疾病或病症治疗;和

b) 检测所述抗体与液体样品中存在的 LOXL2 的结合,从而检测液体样品中 LOXL2 的水平;

其中 LOXL2 的检出水平指示了所述个体中疾病或病症的存在与否或是所述个体对疾病或病症治疗产生反应的可能性。

2. 一种方法,包括:

a) 将从个体获得的液体样品与赖氨酰氧化酶样 2 (LOXL2) 特异性抗体接触,所述个人患有并且正进行疾病或病症的治疗;和

b) 检测所述抗体与液体样品中存在的 LOXL2 的结合,从而检测液体样品中的 LOXL2;其中检出的 LOXL2 水平指示了所述疾病或病症的结果、事件或终点的可能性。

3. 根据权利要求 1 或 2 所述的方法,其中:

步骤 (b) 中的 LOXL2 检出水平低于所述个体在较早时间点测定的水平表明了所述治疗的有效性。

4. 根据权利要求 3 所述的方法,其中在较早时间点测定的水平是治疗前水平。

5. 根据权利要求 1-4 和 6-26 中任一项所述的方法,其中所述液体样品是血液、血液组分、尿、唾液、痰或支气管肺泡灌洗液。

6. 根据权利要求 1-5 和 7-26 中任一项所述的方法,其中所述 LOXL2 特异性抗体包含可检测的标记物。

7. 根据权利要求 1-6 和 8-26 中任一项所述的方法,还包括将所述液体样品中存在的 LOXL2 固定在不溶性支架上,其中所述固定是通过将所述液体样品与 LOXL2 特异性第二抗体接触以形成第二抗体-LOXL2 复合物来进行的,其中所述第二抗体被固定在所述不溶性支架上。

8. 根据权利要求 7 所述的方法,其中所述固定在步骤 (a) 之前进行。

9. 一种方法,包括:

a) 将从个体获得的液体样品与赖氨酰氧化酶样 2 (LOXL2) 特异性抗体接触,其中当 LOXL2 与抑制 LOXL2 酶活性的药剂结合时,所述抗体能够与 LOXL2 结合;和

b) 检测所述抗体与液体样品中存在的 LOXL2 的结合,从而检测液体样品中 LOXL2 的水平;

其中 LOXL2 的检出水平指示了所述个体中疾病或病症的存在与否,或所述疾病或病症的结果、事件或终点的可能性。

10. 根据权利要求 9 所述的方法,其中所述药剂是 LOXL2 酶活性的别构抑制剂。

11. 根据权利要求 10 所述的方法,其中所述别构抑制剂是抗 LOXL2 单克隆抗体。

12. 根据权利要求 11 所述的方法,其中所述抗 LOXL2 单克隆抗体与 LOXL2 的 SRCR3-4 结构域内的表位结合。

13. 一种方法,包括:

a) 将从个体获得的液体样品与赖氨酰氧化酶样 2 (LOXL2) 特异性抗体接触;

b) 检测所述抗体与液体样品中存在的 LOXL2 的结合,从而检测液体样品中 LOXL2 的水

平；

c) 比较所述检出水平和正常对照值,其中高于正常对照值的检出水平是所述个体将对疾病或病症的治疗产生反应的可能性的指征;和

d) 确定所述个人将对所述疾病或病症的治疗产生反应的可能性。

14. 根据权利要求 1-13 和 15-26 中任一项所述的方法,其中所述疾病或病症是纤维化疾病或癌症。

15. 根据权利要求 14 所述的方法,其中所述疾病或病症是纤维化疾病且 LOXL2 循环水平高于正常对照值表明所述个体可能对所述纤维化疾病的治疗显示出有利的临床反应。

16. 根据权利要求 14 或 15 所述的方法,其中所述疾病或病症是肺纤维化、肝纤维化、肾纤维化、心肌纤维化或骨髓纤维化、肝硬化、慢性病毒性肝炎、丙型肝炎病毒 (HCV) 或乙型肝炎病毒 (HBV)。

17. 根据权利要求 16 所述的方法,其中所述疾病或病症是特发性肺纤维化 (IPF)。

18. 根据权利要求 17 所述的方法,其中检出水平表明了所述个体中 IPF 疾病结果、终点或事件的可能性。

19. 根据权利要求 18 所述的方法,其中所述 IPF 疾病结果、终点或事件是 IPF 疾病发展、肺功能下降、呼吸系统住院治疗、移植后生存、死亡或对治疗的反应性。

20. 一种方法,包括:

a) 将从患有 IPF 的个体获得的液体样品与赖氨酰氧化酶样 2 (LOXL2) 特异性抗体接触;和

b) 检测所述抗体与液体样品中存在的 LOXL2 的结合,从而检测液体样品中 LOXL2 的水平,其中检出水平指示了 IPF 疾病发展、肺功能下降、呼吸系统住院治疗、移植后生存、死亡或对治疗的反应性的可能性。

21. 根据权利要求 17-20 中任一项所述的方法,还包括检测所述个体中 IPF 疾病严重程度或功能状态的指标,所述指标选自预测的用力肺活量 (FVC) 的百分比、预测的一氧化碳弥散量 (DLCO) 的百分比、6 分钟步行距离 (6MWD)、平均肺动脉压 (mPAP)、最低休息血氧饱和度 (SpO₂)、复合生理指标 (CPI)、圣乔治呼吸问卷评分 (SGRQ)、过渡性呼吸困难指数 (TDI) 评分、对治疗的反应性以及 IPF 疾病的生物标志物组成的组中。

22. 根据权利要求 1-21 和 23-27 中任一项所述的方法,还包括使用预测模型分析 LOXL2 水平。

23. 一种方法,包括:

a) 将从患有疾病或者病症的个体获得的液体样品与赖氨酰氧化酶样 2 (LOXL2) 特异性抗体接触;和

b) 检测所述抗体与液体样品中存在的 LOXL2 的结合,从而检测液体样品中 LOXL2 的水平,其中检出水平指示了所述个人的所述疾病或病症存在与否或所述个体对所述疾病或病症的治疗产生反应的可能性;

c) 根据液体样品中 LOXL2 的检出水平,开始、改变或中断对所述个体进行的所述疾病或病症的治疗。

24. 一种方法,包括:

a) 将从患有疾病或者病症的个体获得的液体样品与赖氨酰氧化酶样 2 (LOXL2) 特异性

抗体接触 ;和

b) 检测所述抗体与液体样品中存在的 LOXL2 的结合,从而检测液体样品中 LOXL2 的水平 ;

c) 对所述个体进行一项或多项其他诊断试验。

25. 根据权利要求 24 所述的方法,其中所述一项或多项其他诊断试验是肺功能检查或肝功能检查。

26. 一种方法,包括 :

a) 将从个体获得的液体样品与赖氨酰氧化酶样 2 (LOXL2) 特异性抗体接触 ;和

b) 检测所述抗体与液体样品中存在的 LOXL2 的结合,从而检测液体样品中 LOXL2 的水平,其中所述检出水平表明了所述个体患有活动性纤维化疾病或晚期纤维化疾病。

27. 根据权利要求 26 所述的方法,其中所述活动性纤维化疾病是 METAVIR F1 或 F2 肝纤维化,或所述晚期纤维化疾病是 METAVIR F4 肝纤维化。

28. 一种用于检测从个体获得的液体生物样品中赖氨酰氧化酶样 2 (LOXL2) 多肽水平的分析装置,所述装置包括 :界定了轴向流路的基质,所述基质包含 :

i) 位于接收液体样品的流路上游末端的样品接收区 ;

ii) 位于所述流路内且在所述样品接收区下游的一个或多个检测区,每个所述一个或多个检测区中均包含 LOXL2 特异性抗体,其中每个所述 LOXL2 特异性抗体均能够与液体样品中存在的 LOXL2 多肽结合以形成抗 LOXL2/LOXL2 复合物 ;和

iii) 位于所述流路内部且在所述样品接收区下游的一个或多个对照区。

29. 根据权利要求 28 所述的分析装置,其中当所述一个或多个检测区包含至少两个检测区时,所述一个或多个对照区中至少一个位于两个检测区之间。

30. 根据权利要求 29 所述的分析装置,其中所述至少两个检测区和至少一个对照区以交替形式位于所述流路内,由位于任意对照区上游的检测区开始。

31. 根据权利要求 29 或 30 所述的分析装置,其中一个或多个检测区的所述抗 LOXL2 抗体被固定在所述检测区的基质上。

32. 根据权利要求 28-31 中任一项所述的分析装置,还包括标记物区,所述标记物区包含特异于 LOXL2 特异性抗体的标记抗体,其中 :

所述标记抗体能够与抗 LOXL2 抗体 /LOXL2 复合物中存在的抗 LOXL2 抗体结合,以形成标记的抗 LOXL2 抗体 /LOXL2,且

所述标记抗体在存在液体样品时是可活动的。

33. 根据权利要求 32 所述的分析装置,其中所述标记抗体包含标记成分,所述标记成分选自自由化学发光试剂、微粒标记物、比色剂、能量转移试剂、酶、荧光试剂和放射性同位素组成的组。

34. 根据权利要求 28-33 中任一项所述的分析装置,其中所述基质位于外壳内,所述外壳包括支架和可选的封盖,其中所述外壳含有施用孔和一个或多个观察口。

35. 根据权利要求 29-34 中任一项所述的分析装置,其中所述装置是试纸条。

36. 根据权利要求 29-35 中任一项所述的分析装置,其中所述装置是浸渍片分析装置。

37. 一种测定从个体获得的生物样品中的赖氨酰氧化酶样 2 (LOXL2) 多肽水平的试剂盒,所述试剂盒包含 :

- a) LOXL2 特异性的第一抗体 ;和
 - b) LOXL2 特异性的第二抗体。
38. 根据权利要求 37 所述的试剂盒, 还包含用于生成标准曲线的纯化 LOXL2。
39. 根据权利要求 37 或 38 所述的试剂盒, 其中至少一个所述抗体包含可检测的标记物。
40. 根据权利要求 39 所述的试剂盒, 其中所述可检测的标记物包括化学发光试剂、微粒标记物、比色剂、能量转移试剂、酶、荧光试剂和放射性同位素。
41. 根据权利要求 1-27 中任一项所述的方法, 其中所述接触和检测是使用权利要求 28-36 中任一项所述的分析装置或权利要求 37-40 中任一项所述的试剂盒进行的。
42. 根据权利要求 1-27 和 41 中任一项所述的方法, 其中 LOXL2 的检出水平高于约 700pg/mL。
43. 根据权利要求 42 所述的方法, 其中 LOXL2 的检出水平高于约 800pg/mL。
44. 根据权利要求 1-27 和 41 中任一项所述的方法, 其中 LOXL2 的检出水平高于约 750pg/mL。
45. 根据权利要求 1-27 和 41 中任一项所述的方法, 还包括确定 LOXL2 的检出水平高于 LOXL2 的阈值水平, 从而确定所述个人中疾病的结果、终点或事件的可能性。
46. 根据权利要求 45 所述的方法, 其中所述阈值浓度为约 700pg/mL、750pg/mL 或 800pg/mL。
47. 根据权利要求 1-16 或 22-25 中任一项所述的方法, 其中所述疾病或者病症是原发性胆汁性肝硬化 (PBC) 或原发性硬化性胆管炎 (PSC)。