

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.
G01N 33/574 (2006.01)



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200880012580.9

[43] 公开日 2010年3月3日

[11] 公开号 CN 101663584A

[22] 申请日 2008.4.15

[21] 申请号 200880012580.9

[30] 优先权

[32] 2007.4.19 [33] US [31] 60/912,833

[86] 国际申请 PCT/US2008/060317 2008.4.15

[87] 国际公布 WO2008/130910 英 2008.10.30

[85] 进入国家阶段日期 2009.10.19

[71] 申请人 威尔斯达特生物制剂公司

地址 美国马里兰州

[72] 发明人 罗伯特·M·劳伦斯 鲁 明

[74] 专利代理机构 北京三友知识产权代理有限公司

代理人 丁香兰 庞东成

权利要求书3页 说明书21页 附图2页

[54] 发明名称

未分离的循环癌细胞的 Her-2/neu 蛋白的检测和治疗

[57] 摘要

通过进行灵敏的 Her-2/neu 免疫测试检测了在血液或外周血单核细胞(PBMC)样品中的循环癌细胞上的 Her-2/neu 蛋白表达。在进行所述免疫测试前无需分离癌细胞。阳性结果表明 Her-2/neu 在所述血样中的癌细胞上表达。该方法可以用于识别可能受益于采用如曲妥珠单抗(HERCEPTIN)、拉帕替尼、CP-724,714、HKI-272 和 BMS-599626 等靶向 Her-2/neu 的抗癌剂的治疗的癌症患者。

1. 一种检测全血血样中的循环癌细胞上的 Her-2/neu 蛋白表达的方法, 所述方法包括对所述血样进行能够检测癌细胞相关 Her-2/neu 的免疫测试, 其中阳性免疫测试结果表明在所述癌细胞上存在 Her-2/neu;

其中在进行所述免疫测试之前没有将所述循环癌细胞从所述全血中分离;

且其中所述免疫测试:

a) 能够在 SK-BR-3 乳腺癌细胞以小于或等于 100 个 SK-BR-3 细胞/ml 血液的浓度掺加入血液中时检测来自所述 SK-BR-3 乳腺癌细胞的 Her-2/neu; 和

b) 能够在至少 1×10^6 个人外周血单核细胞存在下进行测试时检测来自 10 个 SK-BR-3 乳腺癌细胞的 Her-2/neu。

2. 一种检测血样中的循环癌细胞上的 Her-2/neu 蛋白表达的方法, 所述方法包括对所述血样进行能够检测癌细胞相关 Her-2/neu 的免疫测试, 其中阳性免疫测试结果表明在所述癌细胞上存在 Her-2/neu;

其中在进行所述免疫测试之前没有将所述循环癌细胞从外周血单核细胞中分离;

且其中所述免疫测试:

a) 能够在 SK-BR-3 乳腺癌细胞以小于或等于 100 个 SK-BR-3 细胞/ml 血液的浓度掺加入血液中时检测来自所述 SK-BR-3 乳腺癌细胞的 Her-2/neu; 和

b) 能够在至少 1×10^6 个人外周血单核细胞存在下进行测试时检测来自 10 个 SK-BR-3 乳腺癌细胞的 Her-2/neu。

3. 如权利要求 1 或 2 所述的方法, 其中, 所述免疫测试是基于溶液的免疫测试。

4. 如权利要求 3 所述的方法, 其中, 所述免疫测试采用选自由电化学发光、化学发光、荧光化学发光、荧光偏振和时间分辨荧光组成的组的技术用于检测。

5. 如权利要求 1 或 2 所述的方法, 其中, 所述免疫测试是夹心免疫测试。

6. 如权利要求 5 所述的方法, 其中, 所述免疫测试采用选自由电化学发光、化学发光和荧光化学发光组成的组的技术用于检测。

7. 如权利要求 1 或 2 所述的方法, 其中, 所述免疫测试产生与所述血样中存在的癌细胞相关 Her-2/neu 分子数成比例的信号。

8. 如权利要求 1 或 2 所述的方法, 其中, 所述免疫测试使用与 Her-2/neu 的细胞质域选择性结合的一种或两种抗体。

9. 如权利要求 8 所述的方法, 其中, 所述免疫测试使用与 Her-2/neu 的细胞质域选择性结合的两种抗体。

10. 如权利要求 1 或 2 所述的方法, 其中, 所述免疫测试使用抗 Her-2/neu 的多克隆抗体。

11. 如权利要求 10 所述的方法, 其中, 所述免疫测试使用抗所述多克隆抗体的二抗。

12. 如权利要求 1 或 2 所述的方法, 其中, 所述免疫测试使用抗 Her-2/neu 的单克隆抗体。

13. 如权利要求 12 所述的方法, 其中, 所述免疫测试使用抗所述单克隆抗体的二抗。

14. 如权利要求 12 所述的方法, 其中, 所述单克隆抗体是人源化小鼠单克隆抗体。

15. 如权利要求 14 所述的方法, 其中, 所述单克隆抗体是曲妥珠单抗。

16. 一种识别可能受益于采用靶向 Her-2/neu 的抗癌剂的治疗的癌症患者的方法, 所述方法包括权利要求 1 的方法, 其中含癌细胞的所述血样取自所述患者。

17. 如权利要求 16 所述的方法, 其中, 通过 Her-2/neu 的组织测试已预先确定来自所述患者的肿瘤活检组织的 Her-2/neu 表达为阴性。

18. 如权利要求 17 所述的方法, 其中, 所述组织测试选自由免疫组织化学和荧光原位杂交分析组成的系列。

19. 一种治疗可能受益于采用靶向 Her-2/neu 的抗癌剂的治疗的癌症

患者的方法，所述方法包括对根据权利要求 16~18 中任一项所述的方法识别出的患者施用所述靶向 Her-2/neu 的抗癌剂。

20. 如权利要求 19 所述的方法，其中，所述抗癌剂选自由曲妥珠单抗、拉帕替尼、CP-724,714、HKI-272 和 BMS-599626 组成的系列。

21. 一种识别可能受益于采用靶向 Her-2/neu 的抗癌剂的治疗的癌症患者的方法，所述方法包括权利要求 2 的方法，其中，含癌细胞的所述血样抽取自所述患者。

22. 如权利要求 21 所述的方法，其中，通过 Her-2/neu 的组织测试已预先确定来自所述患者的肿瘤活检组织的 Her-2/neu 表达为阴性。

23. 如权利要求 22 所述的方法，其中，所述组织测试选自由免疫组织化学和荧光原位杂交分析组成的系列。

24. 一种治疗可能受益于采用靶向 Her-2/neu 的抗癌剂的治疗的癌症患者的方法，所述方法包括对根据权利要求 21~23 中任一项所述的方法识别出的患者施用所述靶向 Her-2/neu 的抗癌剂。

25. 如权利要求 24 所述的方法，其中，所述抗癌剂选自由曲妥珠单抗、拉帕替尼、CP-724,714、HKI-272 和 BMS-599626 组成的系列。

未分离的循环癌细胞的 Her-2/neu 蛋白的检测和治疗

背景技术

市场上检测来自癌细胞的 Her-2/neu (也称为 Her2/neu、HER2、c-erbB-2 和 erbB2)蛋白或相关基因的现有测试繁琐且非常耗时。而且,仅有 25%~30%的乳腺癌患者基于在其原发肿瘤活检中发现 Her-2/neu (也称为 Her2/neu、HER2、c-erbB-2 和 erbB2)蛋白或基因的水平升高而接受 Her-2/neu 定向治疗。文献中的数据表明在原发肿瘤活检中具有 Her2/neu 阴性结果的大量女性(26名受测者中的11名)继续发展为对其循环癌细胞的 Her2/neu 阳性(Hayes DF 等, Int J Oncol 21:1111-1117; Meng S 等, 2004 Proc Natl Acad Sci USA 101:9393-9398)。此外,相当数量的患乳腺癌的女性没有易于测试 Her-2-neu 状态的活检材料。Hayes 等与 Meng 等的文章中所用的方法繁琐而耗时,需要快速的、更方便的测试,尤其是能在医师的诊室内进行的测试。Hayes 等的方法需要流式细胞术分析而 Meng 等的方法需要荧光原位杂交(FISH),这些都比本发明所述的 Her-2/neu 蛋白的直接检测(例如,通过 ECL)更加复杂和耗时。而且, Meng 等与 Hayes 等的方法需要免疫磁珠以便富集肿瘤细胞。相反,就通过避免可见于从全血或外周血单核细胞中分离癌细胞的步骤中的损失而改善灵敏度而言,无需这类分离步骤而进行的如本发明中的快速方法提供了额外的优点。

Her2/neu 和 Her-2/neu 靶向治疗:在来自患乳腺癌的女性的约 25%的活检样品中观察到 Her2/neu 癌基因的过表达,且所述过表达与较差的预后(prognosis)相关。曲妥珠单抗(HERCEPTIN)是抗 Her2/neu 受体的胞外域(ECD)的人源化单克隆抗体,并且抑制过表达该受体的人乳腺癌细胞的增殖(近期综述见 Esteve FJ 2004, The Oncologist 9 (增刊第3期):第4-9页)。乳腺癌细胞上的 Her-2/neu 蛋白表达可以容易地达到每个细胞 500,000 个分子以上的水平,与称为 SK-BR-3 的过表达 Her-2/neu 的人乳腺癌细胞系

的情形相同。目前的 Her2/neu 测试依赖于对患者的活检组织切片进行所述蛋白的过表达或基因扩增的测试。在带有基因扩增或所述蛋白的至少 2+ 的免疫染色的那些女性中，用单一药剂曲妥珠单抗或用曲妥珠单抗与如紫杉醇等化学治疗剂的组合显示出显著响应。近来，拉帕替尼(也称为 GW-572016)已由美国食品药品监督管理局(FDA)批准用于治疗患 Her-2/neu 阳性乳腺癌的女性。除乳腺癌以外，Her-2/neu 还在包括卵巢癌的其它癌细胞上过表达。

在医疗实践中迫切需要能从全血或 PBMC 样品快速且直接地进行的方便测试，该测试具有足够的灵敏度和特异性以便识别在循环乳腺癌细胞上有 Her-2/neu 蛋白过表达并因此可能受益于 Her-2/neu 靶向治疗(例如，曲妥珠单抗、拉帕替尼)或受益于其它抗 Her-2/neu 定向治疗的患乳腺癌的女性。由于文献中有证据表明目前不适于曲妥珠单抗或拉帕替尼治疗的数千名患乳腺癌的女性具有 Her-2/neu 过表达的循环肿瘤细胞并且具有被视作 Her-2/neu 阴性的原发肿瘤，因而所述测试越发重要。如果这类女性最初被识别出来，则她们可以受益于抗 Her-2/neu 靶向剂。

在 WO 2006/041959 (Wellstat Biologics Corp.)中描述了用于检测经分离的循环癌细胞上的 Her-2/neu 蛋白表达的方法。就测试容易性、测试的迅速性、最重要的是就通过减少对样品的大量操作来防止癌细胞损失而言，无需首先将循环癌细胞分离将是一个显著优点。但现有技术认为主要障碍在于获得具有足够的灵敏度和特异性以便从全血血样中或来自人外周血单核细胞样品的低水平循环乳腺癌细胞中检测 Her-2/neu 的免疫测试。

Hayes 等(2002, *Int J Oncol* 21:1111-1117)和 Meng 等(2004 *Proc Natl Acad Sci USA* 101:9393-9398)在他们的来自循环癌细胞的 Her-2/neu 的测试中都要求采用富集手段。利用流式细胞仪检测循环癌细胞上的 Her-2/neu, Hayes 等表明为了获取所需灵敏度这种富集是“必须”和“至关重要”的(见第 1112 页最后一句和第 1113 页第一句)。另外, Leone 等(2003; *J Leukocyte Biol* 74:593-601)表明在正常外周血单核细胞(PMBC)中 Her-2/neu 转录物和蛋白都以低水平表达。可以预期 Leone 等表明的这

种 Her-2/neu 表达会使得在大量 PBMC 存在时难以看到循环癌细胞中的 Her-2/neu 表达。

发明内容

本发明提供了一种检测全血血样中循环癌细胞上的 Her-2/neu 蛋白表达的方法，所述方法包括对所述血样进行能检测癌细胞相关 Her-2/neu 的免疫测试，其中阳性免疫测试结果表明在癌细胞上存在 Her-2/neu；其中在进行免疫测试前未将循环癌细胞从全血中分离；且其中所述免疫测试：a) 能在 SK-BR-3 乳腺癌细胞以小于或等于 100 个 SK-BR-3 细胞/ml 血液的浓度掺加(spike)入血液中时检测来自所述 SK-BR-3 乳腺癌细胞的 Her-2/neu；和 b) 能够在至少 1×10^6 个人外周血单核细胞存在下进行测试时检测来自 10 个 SK-BR-3 乳腺癌细胞的 Her-2/neu。

本发明提供了一种检测血样中循环癌细胞上的 Her-2/neu 蛋白表达的方法，所述方法包括对所述血样进行能够检测癌细胞相关 Her-2/neu 的免疫测试，其中阳性免疫测试结果表明在所述癌细胞上存在 Her-2/neu；其中在进行所述免疫测试之前没有将所述循环癌细胞从外周血单核细胞中分离；且其中所述免疫测试：a) 能够在 SK-BR-3 乳腺癌细胞以小于或等于 100 个 SK-BR-3 细胞/ml 血液的浓度掺加入血液中时检测来自所述 SK-BR-3 乳腺癌细胞的 Her-2/neu；和 b) 能够在至少 1×10^6 个人外周血单核细胞存在下进行测试时检测来自 10 个 SK-BR-3 乳腺癌细胞的 Her-2/neu。

本发明基于无需将循环癌细胞分离以检测这些细胞上的 Her-2/neu 蛋白表达的发现。就测试的容易性、测试的迅速性、最重要的是就通过减少对样品的大量操作来防止癌细胞损失而言，无需首先将循环癌细胞分离是一个显著优点。更少的步骤使本发明的方法进行起来更快和更廉价。此外，更少的步骤使所述方法更易于自动化。而且，本发明的改进测试通过消除分离步骤防止了癌细胞的损失，这种损失对检测来自血样中的循环癌细胞的 Her-2/neu 的灵敏度有显著的不利影响。

本发明提供了一种识别可能受益于采用靶向 Her-2/neu 的抗癌剂的

治疗的癌症患者的方法，所述方法包括上述检测方法。当用于识别这类患者时，从该患者抽取含癌细胞的血样。本发明提供了一种治疗如此识别出的癌症患者的方法，该方法包括对患者施用靶向 Her-2/neu 的抗癌剂。

附图说明

图 1. SK-BR-3 乳腺癌细胞(Her-2/neu 过表达的阳性对照)与 MDA-MB-468 (Her-2/neu 过表达的阴性对照)的裂解物中 Her-2/neu 的免疫测试检测的 ECL 信号的比较。所示为使用 1 个细胞/孔、2 个细胞/孔和 10 个细胞/孔的裂解物的数据。

图 2. SK-BR-3 乳腺癌细胞(Her-2/neu 过表达的阳性对照)与 MDA-MB-468 (Her-2/neu 过表达的阴性对照)的裂解物中 Her-2/neu 的免疫测试检测的 ECL 信号的进一步比较。在该图中使用来自如图 1 所示的相同实验的数据，不同之处在于在该图中还包括从 50 个细胞/孔和 250 个细胞/孔的裂解材料获得的数据以便显示增加的 X 轴范围。

具体实施方式

此处所用的连接词“包含”是开放式的。采用该词语的权利要求除该权利要求中叙述的那些要素以外还可以包含其它要素。因而，例如，所述权利要求可以解读为还包含没有在其中具体叙述的其它步骤的方法，只要所叙述的要素或其等价物存在即可。

术语“未分离癌细胞”或“未经分离的癌细胞”：如此处使用，与带有测试用抗原的癌细胞有关的术语“未分离癌细胞”或“未经分离的癌细胞”是指在至少 100,000 个非癌细胞/ml 样品、更优选为至少 500,000 个非癌细胞/ml 样品、更优选为至少 1,000,000 个非癌细胞/ml 样品且最优选为至少 2,000,000 个非癌细胞/ml 样品存在下可检测抗原的癌细胞。例如，如果测试针对于发现于循环人癌细胞上的抗原，且如果循环人癌细胞处在 500,000 个人外周血单核细胞/ml 测试样品的存在下，则所述样品中的循环人癌细胞是未经分离的癌细胞和未分离癌细胞。

在本发明的一个实施方式中，免疫测试是基于溶液的免疫测试。基

于溶液的免疫测试：如此处所用，术语“基于溶液的免疫测试”是指使用抵抗抗原的至少一种抗体的在溶液中的所述抗原的免疫测试。适合基于溶液的免疫测试的检测技术包括电化学发光、化学发光、荧光化学发光、荧光偏振和时间分辨荧光。

在本发明的另一个实施方式中，免疫测试是夹心免疫测试。如本文所用，术语“夹心免疫测试”是指使用各自均抵抗抗原或抗原的一部分的抗体对(例如，抗体‘A’和抗体‘B’)来检测所述抗原的测试。对于所述抗体对，将抗体‘A’共价或非共价地标记至报道分子(例如，可电化学发光的分子或可发荧光的分子)。抗体‘A’的非共价标记的实例是使抗抗体‘A’的经标记的二抗与抗体‘A’结合。抗体‘B’与如测试板、磁体或电极等固体支持相直接连接(或使其间接连接)。适于夹心免疫测试的检测技术包括电化学发光、化学发光和荧光化学发光。

本发明提供了对血样中循环乳腺癌细胞上的 Her-2/neu 蛋白水平进行定量的足够灵敏的方法，还提供了用于识别可能受益于使用曲妥珠单抗、拉帕替尼或其它靶向 Her-2/neu 的药剂的治疗的患乳腺癌女性的方法。可以靶向 Her-2/neu 的其它药剂正在开发中并且具有与本发明用的曲妥珠单抗或拉帕替尼相似的适用性。这些药剂包括但不限于：Genentech 开发的 OMNITARG (帕妥珠单抗)；Pfizer 开发的 CP-724,714 和 CP-654577 (Munster 等, 2007, Clin Cancer Res 13:1238-1245; Barbacci 等, 2003, Cancer Res 63:4450-4459); Wyeth 开发的 HKI-272 (Wong 等, 2006, J Clin Oncol 24 (6月20日增刊):3018; Rabindran 等, 2004, Cancer Res 2004, 64:3958-3965); 和 Bristol-Myers-Squibb 开发的 BMS-599626。在 Spector 等, 2007 (Breast Cancer Res 9, 从第 205 页开始)和 Janmaat 与 Giaccone, 2003 (The Oncologist 8:576-586)中描述了在其特异性中包括 Her-2/neu 的其它抗癌剂。靶向 Her-2/neu 的额外的抗癌剂还包括靶向 Her2 的纳米颗粒生物缀合物(见 Alexis F 等, 2007; 第 4181 号摘要, 2007 美国癌症研究协会年会)和含化学治疗剂的抗 Her2 免疫脂质体(见 Noble CO 等, 2004, Expert Opin Ther Targets 8:335-353)。

本发明采用的免疫测试具有足以检测来自每毫升血液中掺加的至少

100 个 SK-BR-3 乳腺癌细胞的 Her-2/neu 的灵敏度, 优选具有足以检测来自每毫升血液中掺加的至少 30 个 SK-BR-3 乳腺癌细胞的 Her-2/neu 的灵敏度, 更优选具有足以检测来自每毫升血液中掺加的至少 10 个 SK-BR-3 乳腺癌细胞的 Her-2/neu 的灵敏度, 更优选具有足以检测来自每毫升血液中掺加的至少 3 个 SK-BR-3 乳腺癌细胞的 Her-2/neu 的灵敏度, 且最优选具有足以检测来自每毫升血液中掺加的至少 1 个 SK-BR-3 乳腺癌细胞的 Her-2/neu 的灵敏度。本发明采用的免疫测试耐干扰, 从而能在至少 1,000,000 个人外周血单核细胞存在下进行检测时检测 10 个 SK-BR-3 乳腺癌细胞的 Her-2/neu。

在优选实施方式中, 所述免疫测试产生与血样中的癌细胞相关 Her-2/neu 分子数成比例的信号。

从患有癌症、尤其是乳腺癌的患者取得血样(通常在约 8 ml~20 ml 范围内)。所包括的步骤详细描述如下:

1. 必要时将红细胞和中性粒细胞耗竭。优选实施方式包括该步骤。
2. 对来自循环癌细胞的 Her-2/neu 蛋白进行检测和定量。

1. 必要时将红细胞和中性粒细胞耗竭。优选方法采用带抗凝剂(EDTA 或柠檬酸盐)的 BD Vacutainer CPT 管。这些管含有经正确离心时(1,100×g, 10 分钟, 甩平转子)能将红血球和中性粒细胞除去的材料。离心后, 管的底部含有红细胞(红血球)和中性粒细胞的细胞沉淀。在细胞沉淀上方是凝胶屏障(gel barrier), 而在凝胶屏障上方是作为血浆底部带的单核的细胞(肿瘤细胞、淋巴细胞和单核细胞)。然后可以容易地从凝胶屏障上方的顶部收集肿瘤细胞、淋巴细胞和单核细胞。由于该方法不仅除去红血球还除去中性粒细胞, 因而优选该方法。

2. 对来自循环癌细胞的 Her-2/neu 蛋白进行检测和定量。

然后通过使用与检测分子直接或间接相连的抗 Her-2/neu 的单克隆抗体(mAb)(如 HERCEPTIN)或多克隆抗体(例如, 来自 R&D Systems 的目录号为 AF1129 的山羊多克隆抗体)来完成 Her-2/neu 的检测。在电化学发光(ECL)的情形中, 检测分子是钨。在公共领域中有大量文献详细地

提供了用于在含三丙胺的溶液中将钉与抗体相连(例如, Lee 等, *Am J Trop Med Hyg* 2001, 65:1-9)然后通过 ECL 检测磁珠上的抗原的有用方法。施加电位使钉标记激发并发光并且用 ECL 检测仪器(如 ORIGEN 分析仪或如来自 BIOVERIS Corporation, 盖瑟斯堡, 美国马里兰州的 M-Series® 384 等商购仪器)进行检测。

本发明采用的免疫测试由至少一个抗体且优选为两组抗体组成。这些抗体可以为抗 Her-2/neu 的多克隆抗体或单克隆抗体。单克隆抗体优选为人源化小鼠单克隆抗体, 例如曲妥珠单抗。曲妥珠单抗是本发明的免疫测试和治疗方法的优选实施方式。

在本发明的另一个实施方式中, 使用了抵抗靶向 Her-2/neu 的抗体之一的二抗。在本发明的优选实施方式中, 将所述二抗共价或非共价地标记于报道分子(例如, 可电化学发光的分子或可发荧光的分子)。在本发明的另一个优选实施方式中, 使用 ECL 并将所述二抗生物素化从而使得所述二抗能与链霉亲和素包被的磁珠连接。

为了检测 Her-2/neu, 可以从如 R&D Systems (明尼阿波利斯, 美国明尼苏达州)、Biosource (卡马里奥, 美国加利福尼亚州)和 BD Biosciences (圣地亚哥, 美国加利福尼亚州)等来源商购各种抗 Her-2/neu 的单克隆抗体和多克隆抗体, 其中包括抗胞外域和抗细胞质域的抗体。兔多克隆抗体也可获自 LABVISION Corp (弗里蒙特, 美国加利福尼亚州; 如 neu Ab-21)和 UPSTATE CELL SIGNALING SOLUTIONS (普莱西德湖, 美国纽约州; 如目录号 06-562)。抗 Her-2/neu 的胞外域的山羊多克隆抗体可获自 R&D Systems (目录号 AF1129)。抗全长重组 Her-2/neu 的山羊多克隆抗体可获自 EXALPHA BIOLOGICS (罗斯代尔, 美国马里兰州; 目录号 M100P)。预计这种抗全长 Her-2/neu 的多克隆抗体能与 Her-2/neu 的胞外域和细胞质域结合而对胞外域不具特异性; 这种抗体仍然有用但优选应将其与对 Her-2/neu 更具特异性的抗体组合使用。可利用的单克隆抗体同时抗胞外域(例如, R&D Systems 目录号 MAB1129)和细胞质域(例如, LABVISION neuAB-8), 包括抗 C 末端肽(例如, LABVISION neuAB-15)。在 Hudziak 等(1997, 美国专利第 5,677,171 号)中也公开了抗 Her-2/neu 的

单克隆抗体。一个改良实施方式使用 HERCEPTIN, 这是因为与该抗体的结合最能预测作为对患者的治疗的 HERCEPTIN 的结合。虑及更高的灵敏度, 另一个有利的实施方式使用多克隆抗体或与 Her-2/neu 蛋白上的许多抗原表位结合的抗体混合物(cocktail)。

在本发明的一个实施方式中, 通过在样品进行细胞裂解前使一种抗 Her-2/neu 的抗体与癌细胞结合而对完整无损的癌细胞进行免疫测试中的一步。用于与完整无损的癌细胞结合的这种抗体必须抗 Her-2/neu 的胞外域。作为另一种选择, 可以在基于溶液的免疫测试的所有步骤之前将癌细胞裂解并对细胞裂解物进行免疫测试。在这种情况下, 免疫测试可以利用与 Her-2/neu 的胞外域或细胞质域选择性结合的抗体。在本发明的更具体的实施方式中, 免疫测试使用与 Her-2/neu 的细胞质域选择性结合的一种或两种抗体。

在本发明的基于溶液的免疫测试的优选实施方式中, 采用抵抗抗原的抗体来将溶液中的抗原与如磁体、电极或测试板等固体支持物间接相连。基于溶液的免疫测试的实例是采用电化学发光(ECL)从而用抵抗抗原的两种抗体来检测所述抗原的实例, 其中所述抗体之一由钉标记而另一个与能连接至电极的磁珠相连。除电化学发光以外, 可以产生本应用所需的高灵敏度的其它基于溶液的免疫测试包括但不限于:

- a) 化学发光, 如 Liu Y 等, 2003 (J Food Protection 66:512-517)所述。
- b) 荧光化学发光(FCL), 如 Yu H 等, 2000 (Biosens Bioelectron 14:829-840)所述。
- c) 荧光偏振免疫测试(见 Howanitz JH, 1988 Arch Pathol Lab Med 112:775-779)。
- d) 时间分辨荧光免疫测试(Butcher H 等, 2003, J Immunol Methods 272:247-256; Soukka 等, 2001, Clin Chem 47:1269-1278; Howanitz JH, 1988 Arch Pathol Lab Med 112:775-779)。

在本发明的夹心免疫测试的优选实施方式中, 采用了其中一个抗体由钉标记而另一个抗体与能连接至电极的磁珠相连的电化学发光(ECL)。

由于其灵敏度, 可以将用于识别可能受益于采用靶向 Her-2/neu 的抗

癌剂的治疗的患者的本发明的方法有效地应用于这样的患者：取自所述患者的肿瘤活检组织此前通过 Her-2/neu 用组织测试被确定为（例如，通过免疫组织化学或 FISH 分析）对 Her-2/neu 表达为阴性。

参考下列实施例可以更好地理解本发明，所述实施例仅为说明性而不限制本文所述的发明。

实施例

实施例 1

患有转移性乳腺癌的患者进入诊室并直接抽取血样(8mL~40mL)至含有如柠檬酸盐等抗凝剂的 BD Vacutainer CPT 管内。将所述材料在 1500RCF (相对离心力)~1800 RCF 离心 20 分钟。将凝胶屏障上方的细胞层除去并置于已含有如多克隆抗体或 HERCEPTIN (曲妥珠单抗)等抗 Her-2/neu 抗体的另一个容器(例如, 管)内。所述抗体已预先由钉标记。用钉标记抗体的常规方法描述于现有技术中, 如 Lee 等, Am J Trop Med Hyg 2001, 65:1-9。然后将样品中的细胞裂解。裂解可以通过现有技术中描述的许多细胞裂解剂实现, 所述细胞裂解剂例如但不限于裂解缓冲液 A [1% NP-40, 20 mM Tris (pH 8.0), 137 mM NaCl, 10%甘油, 2 mM EDTA, 1 mM 原钒酸钠, 10 µg/mL 抑肽酶, 10 µg/mL 亮肽素]。将经生物素化且抗 Her-2/neu 的二抗加入裂解物中。例如, 该二抗是抗 Her-2/neu 的生物素化多克隆抗体, 如来自 R&D Systems 的多克隆抗体(目录号 BAF1129)。接着将三丙胺溶液与链霉亲和素包被的磁珠一同加入细胞裂解物中, 所述磁珠将两个抗体和所结合的抗原带至电极附近。施加电流并用如商购 ECL 检测装置(BIOVERIS Corporation)等 ECL 检测装置检测电化学发光(ECL)。在这些仪器内, 紧靠工作电极上方安置有光电倍增管(PMT)用于有效光俘获。在工作电极下方, 安置有磁体用于俘获涂布有靶标抗原的珠体。信号与所发现的结合于循环肿瘤细胞表面上的 Her-2/neu 的量成比例。

实施例 2

提供了与实施例 1 中所用的方法相同的方法, 不同之处在于将两个

抗 Her-2/Neu 多克隆抗体用于检测。

实施例 3

方法与实施例 1 和 2 中所用的方法相同，不同之处在于在添加抗体对中的每一个之前将 PBMC 样品裂解。

实施例 4

方法与实施例 1 和 3 中所用的方法相同，不同之处在于直接使用全血血样而非 PBMC 样品。

实施例 5

提供了与实施例 1~4 中所用的方法相同的方法，不同之处在于患者之前具有基于其原发肿瘤分析的 Her2/neu 阴性结果或没有易于获得的肿瘤组织用于分析。

实施例 6

具有高于如实施例 1~5 中所示的对照样品的 Her-2/neu 水平的患者被视为具有 Her-2/neu 阳性的肿瘤细胞，因而以包含如曲妥珠单抗等抗 Her-2/neu 的单克隆抗体的方案进行治疗。优选治疗由以 90 分钟输注施用的 4 mg/kg 的初始负荷剂量与以 30 分钟输注施用的 2 mg/kg 的周维持剂量组成。

实施例 7

具有高于如实施例 1~5 中所示的对照样品的 Her-2/neu 水平的患者被视为具有 Her-2/neu 阳性的肿瘤细胞，因而以包含拉帕替尼的方案进行治疗。采用拉帕替尼的给药方案的实例是在重复的 21 天循环中与 2000mg/m²/日的卡培他滨组合(在第 1~14 天以相隔约 12 小时的两剂口服施用)将该药剂在第 1~21 天以 1,2500 mg 每日一次口服给药(5 片 250 mg/片的片剂)。

实施例 8

具有高于如实施例 1~5 中所示的对照样品的 Her-2/neu 水平的患者被视为具有 Her-2/neu 阳性的肿瘤细胞，因而以包含 CP-724,714 的方案进行治疗。采用 CP-724,714 的给药方案的实例是将该药剂每日两次以 250mg 的口服剂量给药。

实施例 9

具有高于如实施例 1~5 中所示的对照样品的 Her-2/neu 水平的患者被视为具有 Her-2/neu 阳性的肿瘤细胞,因而以包含 HKI-272 的方案进行治疗。采用 HKI-272 的给药方案的实例是将该药剂以 240 mg~320 mg 的口服剂量在第 1 天给药一次然后从第 8 天开始每日一次。

实施例 10

在该实施例中,将纯化的重组 Her-2/neu (胞外域)用作检测采用电化学发光的基于溶液的免疫测试的灵敏度的标准品。将该标准品稀释于含 1%牛血清白蛋白(BSA)的 PBS 中(磷酸盐缓冲盐水; pH=7.2)。

配制测试缓冲液:

- 测试缓冲液 1: PBS (磷酸盐缓冲盐水)中的 0.5% Tween-20 和 0.5% 牛血清白蛋白(BSA)

Her-2/neu 标准品(重组 Her-2/neu 胞外域)获自 Oncogene Science (产品号 EL541)。生物素化和非生物素化形式的山羊抗人 Her-2/neu 多克隆抗体(目录号分别为 BAF1129 和 AF1129)均获自 R&D Systems, Inc. (明尼阿波利斯,明尼苏达州 55413,美国)。用 Lorence & Lu (PCT WO 2006/041959 A2)中指示的方法对多克隆抗体 AF1129 进行钉标记(“TAG 标记”)。

下面在本实施例和后续实施例中,将钉标记的多克隆抗体 AF1129 和生物素化的多克隆抗体 BAF1129 称作“TAG-pAb”和“生物素-pAb”。

电化学发光测试如下进行:

- 依次将稀释于 4 个 PBS 测试缓冲液中的 25 μ l/孔 Her-2/neu 标准品和 50 μ l/孔 TAG-pAb 与生物素-pAb 的混合物[以下两组浓度之一: (A) 50 μ l 中各 1 μ g/ml(在每孔 250 μ l 的最终测试体积中最终浓度为 0.2 μ g/ml); 和(B) 50 μ l 中 0.7 μ g/ml 的生物素-pAb (在每孔 250 μ l 的最终测试体积中最终浓度为 0.14 μ g/ml), 和 50 μ l 中 1.2 μ g/ml 的 TAG-pAb (在每孔 250 μ l 的最终测试体积中最终浓度为 0.24 μ g/ml)]加入 96 孔 U 形底聚丙烯板的孔内并在室温持续振荡下温育(例如, 2 小时)。
- 在各孔内加入 25 μ l 中的 10 μ g 链霉亲和素磁珠(例如, Dynabeads

M-280 Streptavidin, BioVeris, Corporation, 盖瑟斯堡, 美国马里兰州)并在持续振荡下温育(例如, 30 分钟)。

- 在各孔内加入测试缓冲液 1 以使最终体积为每孔 250 μl 。本测试中被分析物(重组 Her-2/neu 胞外域)的量从 16 pg/孔至 160 pg/孔至 1600 pg/孔变化。还包括不带分析物的对照孔。对所有条件以至少一式两孔进行测试。然后用 M-Series® 384 分析仪(BioVeris, Corporation, 盖瑟斯堡, 美国马里兰州)对 96 孔板的电化学发光进行分析。

结果显示, 在两组所用条件下使用 TAG-pAb 和生物素-pAb 以基于溶液的免疫分析能够检测到所有受测的重组 Her-2/neu 胞外域水平(16 pg/孔、160 pg/孔和 1600 pg/孔), 并且所述水平均高于基线(表 1)。

表 1. 通过采用钨标记的多克隆抗体(TAG-pAb)和生物素化的多克隆抗体(生物素-pAb)的免疫测试对重组 Her-2/neu 的电化学发光(ECL)检测

Her-2/neu (pg/孔)	平均 ECL 信号(高于背景)*	
	采用 0.2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的 TAG-pAb 和 0.2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的生物素-pAb 的最终 浓度	采用 0.24 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的 TAG-pAb 和 0.14 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的生物素-pAb 的最 终浓度
16	85	54
160	473	510
1600	4404	6041

* 高于来自不带抗原的对照孔的平均信号的平均 ECL 信号。

实施例 11

• 方法与实施例 10 中所用的方法相同, 不同之处在于: 分析 SK-BR-3 乳腺癌细胞(Her-2/neu 过表达的阳性对照细胞)的和 MDA-MB-468 乳腺癌细胞(对 Her-2/neu 过表达呈阴性)的细胞提取物。

根据 ATCC 推荐条件使 SK-BR-3 和 MDA-MB-468 细胞(来自 ATCC, 马纳萨斯, 美国弗吉尼亚州)生长于 6 孔组织培养板中, 用 PBS 将其洗涤 2 次, 并用血细胞计数器对等分试样进行计数。用 Pierce 裂解缓冲液(如 Lorence & Lu [PCT WO 2006/041959 A2]中所述)进行 SK-BR-3 细胞的裂解并获得上清液。每孔中裂解上清液的量有所不同, 为提取自 1~250 个 SK-BR-3 或 MDA-MB-468 细胞的裂解上清液, 并使用实验 10 中所述的免疫测试采用最终测试浓度为 0.2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的 TAG-pAb 和 0.2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的生物

素-pAb 对 Her-2/neu 进行分析。

本实验的结果如图 1 和图 2 所示。图 1 通过图表展示了数据组的较低端以便最佳地观察该测试检测来自低细胞数的 Her-2/neu 的能力。图 1 仅包括最多达 10 细胞/孔的细胞范围的数据。图 2 通过图表展示了整个数据组(多达 250 细胞/孔)。

可以由本实验中的 SK-BR-3 细胞的裂解物检测 Her-2/neu 并且检测到的 Her-2/neu 高于基线, 所述裂解物包括本实验中使用最低量的 SK-BR-3 裂解物的那些孔中的裂解物(每孔添加有 1 个细胞的孔中的裂解物; 图 1)。而且, 在 Her-2/neu 免疫测试中, SK-BR-3 细胞(Her-2/neu 过表达的阳性对照)的裂解物在从 1 个细胞/孔~250 个细胞/孔的整个受测范围内均给出比 MDA-MB-468 细胞(对 Her-2/neu 过表达呈阴性)的裂解物高得多的信号, 表明 Her-2/neu 检测结果的高特异性(图 1 和图 2)。

实施例 12

在本实验中, 免疫测试方法与实施例 10 中所用的方法相同, 不同之处在于人外周血单核细胞(PBMC)获自商业来源(Cellular Technology Ltd.; 克利夫兰, 美国俄亥俄州; 产品号 CTL-UP1), 并且以与实施例 11 的乳腺癌细胞相同的方式制备裂解物。

通过在各孔中添加下列物质来制备测试用样品:

- 10 个 SK-BR-3 细胞或对照 PBS 测试缓冲液(PBS, pH = 7.2, 含 0.5% BSA 和 0.5% Tween 20)的细胞裂解物。
- 625,000 个人 PBMC 或对照 PBS 测试缓冲液(PBS, pH = 7.2, 含 0.5% BSA 和 0.5% Tween 20)的细胞裂解物。

在这些合并的裂解物中, 添加下列物质:

- 在各孔内添加 Tag-pAb 和生物素-pAb (每种抗体的最终测试浓度为 0.2 $\mu\text{g/ml}$), 并将 96 孔板在室温持续振荡下温育 2 小时。
- 在各孔内添加 25 μl 中的 10 μg 链霉亲和素磁珠(例如, Dynabeads M-280 Streptavidin, 目录号 110028, BioVeris, Corporation, 盖瑟斯堡, 美国马里兰州)并在持续振荡下温育 30 分钟。
- 在各孔内添加 PBS 测试缓冲液(PBS, pH = 7.2, 含 0.5% BSA 和

0.5% Tween 20)以使最终体积为 250 μ l/孔。然后如实施例 10 所述对 96 孔板进行电化学发光分析。

本实验的结果如表 2 所示。无法从 625,000 个人 PBMC 中检测到 Her-2/neu (表 2)。相反,即使从所用的最小量的 SK-BR-3 乳腺癌细胞裂解物(10 个 SK-BR-3 细胞的裂解物/孔;见表 6)中也可以检测到 Her-2/neu。另外,添加 625,000 个人 PBMC 的细胞裂解物不干扰对乳腺癌细胞中 Her-2/neu 的检测(表 2)。

表 2. 在存在或不存在人 PBMC 裂解物时对 SK-BR-3 乳腺癌细胞裂解物中 Her-2/neu 的 ECL 免疫测试检测

SK-BR-3 细胞的裂解物 (SK-BR-3 细胞/孔)	平均 ECL 信号(高于背景)*	
	不含 PBMC 的裂解物	每孔含 625,000 个 PBMC 的裂解物
0	0	负**
10	608	388

* 这些值的背景是仅来自测试缓冲液的信号。

** 负: ECL 信号低于背景水平。

实施例 13

在这两个实验中,如实施例 10 中使用 Her-2/neu 蛋白标准品和实施例 11 中使用 SK-BR-3 裂解物那样进行免疫测试,不同之处在于使用人源化单克隆抗体曲妥珠单抗(Herceptin)代替生物素-pAb 并且测试了下列四种 ECL 免疫测试条件之一:

- 条件 1: 将曲妥珠单抗用钉直接标记。使用如实施例 10 中指定的最终测试浓度为 0.2 μ g/ml 的生物素化多克隆抗体。
- 条件 2: 将曲妥珠单抗用生物素直接标记。使用如实施例 10 中指定的最终测试浓度为 0.2 μ g/ml 的钉标记多克隆抗体。
- 条件 3 和 4: 在这两种条件中,没有将曲妥珠单抗直接标记;而是使用二抗(生物素标记的抗人 IgG)。
 - 条件 3: 首先将曲妥珠单抗(当以 250 μ l/孔进行 ECL 时最终浓度为 0.2 μ g/ml)直接与细胞裂解物温育 50 分钟。在该步骤后添加生物素标记的抗人 IgG (最终浓度 0.2 μ g/ml; eBioscience, 圣地亚哥, 美国加利福尼亚州; 目录号 13-4998,

生物素标记的山羊抗人 IgG 抗体)和 TAG-pAb (最终浓度 0.2 μ g/ml), 然后将这些测试组分在室温温育 1 小时, 接着添加链霉亲和素珠(如此前在实施例 10 中所用)。

。条件 4: 浓度与条件 3 相同, 不同之处在于改变了试剂的添加顺序。在条件 4 中, 首先将曲妥珠单抗和钉标记的 pAb (TAG-pAb)与细胞裂解物温育 50 分钟。在该步骤后添加生物素标记的抗人 IgG, 然后将这些测试组分在室温温育 1 小时, 接着添加链霉亲和素珠(如此前在实施例 10 中所用)。

在使用曲妥珠单抗的第一个实验中, 在测试 Her-2/neu 阳性对照样品时测试了条件 1 和 2。在该实验中, 使用 1600 pg/孔的 Her-2/neu 时, 条件 1 产生了远远高于背景的信号, 并且比条件 2 更灵敏。

表 3A 根据条件 1 和 2 (这两种条件详见实施例 13 的正文)使用标记的曲妥珠单抗对 SK-BR-3 乳腺癌细胞裂解物中 Her-2/neu 标准品的 ECL 免疫测试检测

Her-2/neu (pg/孔)	平均 ECL 信号(高于背景)	
	条件 1	条件 2
1	负*	负*
4	14	2
16	11	1
160	21	负*
1600	81	14

* 负: ECL 信号低于背景水平。

在使用曲妥珠单抗的下一个实验中, 设计了条件 3 和 4 来改善相对于条件 1 和 2 的灵敏度, 并将条件 3 和 4 用于测试 SK-BR-3 细胞裂解物的 Her-2/neu。结果显示在条件 3 和 4 下, 在基于溶液的测试中可以将曲妥珠单抗与多克隆抗体共同使用以检测至少 1 个 SK-BR-3 细胞/孔的裂解物的 Her-2/neu (表 3B)。条件 4 在检测少量的 SK-BR-3 细胞时比条件 3 更灵敏。

表 3B. 使用未标记的曲妥珠单抗、生物素标记的抗人 IgG 和 TAG-pAb 对 SK-BR-3 乳腺癌细胞裂解物中 Her-2/neu 的 ECL 免疫测试检测。测试了如实施例 13 的正文中限定的两种不同免疫测试条件(条件 3 和 4)。

SK-BR-3 细胞的裂解物 (SK-BR-3 细胞/孔)	平均 ECL 信号(高于背景)	
	条件 3	条件 4
0	0	0
1	156	290
2	213	311
10	841	758
50	3455	3481
250	15065	15147

基于该实施例的结果，在使用曲妥珠单抗的 4 种测试条件中，使用抗曲妥珠单抗的二抗的条件 3 和 4 相对于将曲妥珠单抗直接标记且未使用二抗的条件 1 和 2 提供了有利结果。

实施例 14

在本实验中，使用 TAG-pAb 和生物素-pAb 的免疫测试方法与实施例 12 中所用的方法相同，且使用曲妥珠单抗的免疫测试方法与实施例 13 的条件 4 相同。来自 6 个额外供体的人外周血单核细胞(PBMC)获自 Cellular Technology Ltd. (克利夫兰，美国俄亥俄州；产品号 CTL-UP1)，且如实施例 12 那样制备裂解物。在本实施例中，在有或没有 SK-BR-3 细胞的裂解物(以 10 细胞/孔进行测试)掺加入这些 PBMC 裂解物的条件下以 500,000 细胞/孔~1,000,000 细胞/孔测试 PBMC 的裂解物。

对于单独的 PBMC 供体，使用 TAG-pAb 和生物素-pAb 的结果如表 4~9 所示，对于所有供体的平均值的结果如表 10 所示。如表 4~9 所示且如表 10 中所总结，在所有供体 PBMC 中获得了非常一致的结果。即使高达 1,000,000 个 PBMC 的裂解物也给出了比仅 10 个 SK-BR-3 细胞的裂解物明显更低的 Her-2/neu 信号。即使在高达 1,000,000 个 PBMC 的裂解物的存在下也能由 10 个 SK-BR-3 细胞的裂解物获得高信号。这些结果表明人 PBMC 不会干扰本免疫测试从少量的过表达 Her-2/neu 的乳腺癌细胞中检测 Her-2/neu 的能力。

对于单独的 PBMC 供体，使用曲妥珠单抗、生物素标记的抗人 IgG 和 TAG-pAb 的结果如表 11~16 所示，对于所有供体的平均值的结果如表 17 所示。使用采用这些抗体的基于溶液的免疫测试获得的结果与使用 TAG 标记的多克隆抗体和生物素标记的多克隆抗体时获得的结果非常相似。在所有

使用的供体 PBMC 中, 结果再一次一致。与由仅 10 个 SK-BR-3 细胞的裂解物所获得的高信号相反, 来自各个供体的 1,000,000 个 PMBC 的裂解物都没有给出高于基线的 Her-2/neu 信号。这些结果再次表明人 PBMC 不会干扰本方法从少量的过表达 Her-2/neu 的乳腺癌细胞中检测 Her-2/neu 的能力。

表 4. 在存在或不存在来自供体 0706 号的人 PBMC 的裂解物时对 SK-BR-3 乳腺癌细胞裂解物中的 Her-2/neu 的 ECL 免疫测试检测(使用生物素-pAb 和 Tag-pAb)

SK-BR-3 细胞的裂解物 (SK-BR-3 细胞/孔)	平均 ECL 信号(高于背景)*	
	不含 PBMC 的裂解物	每孔含 1,000,000 个 PBMC 的裂解物
0	0	177
10	789	1174

* 这些值的背景是仅来自测试缓冲液的信号。

表 5. 在存在或不存在来自供体 0920 号的人 PBMC 的裂解物时对 SK-BR-3 乳腺癌细胞裂解物中的 Her-2/neu 的 ECL 免疫测试检测(使用生物素-pAb 和 Tag-pAb)

SK-BR-3 细胞的裂解物(SK-BR-3 细胞/孔)	平均 ECL 信号(高于背景)*		
	不含 PBMC 的裂解物	每孔含 500,000 个 PBMC 的裂解物	每孔含 1,000,000 个 PBMC 的裂解物
0	0	77	87
10	789	1008	800

* 这些值的背景是仅来自测试缓冲液的信号。

表 6. 在存在或不存在来自供体 1026 号的人 PBMC 的裂解物时对 SK-BR-3 乳腺癌细胞裂解物中的 Her-2/neu 的 ECL 免疫测试检测(使用生物素-pAb 和 Tag-pAb)

SK-BR-3 细胞的裂解物(SK-BR-3 细胞/孔)	平均 ECL 信号(高于背景)*		
	不含 PBMC 的裂解物	每孔含 500,000 个 PBMC 的裂解物	每孔含 1,000,000 个 PBMC 的裂解物
0	0	162	137
10	789	895	865

* 这些值的背景是仅来自测试缓冲液的信号。

表 7. 在存在或不存在来自供体 0711 号的人 PBMC 的裂解物时对 SK-BR-3 乳腺癌细胞裂解物中的 Her-2/neu 的 ECL 免疫测试检测(使用生

物素-pAb 和 Tag-pAb)

SK-BR-3 细胞的裂解物(SK-BR-3 细胞/孔)	平均 ECL 信号(高于背景)*		
	不含 PBMC 的裂解物	每孔含 500,000 个 PBMC 的裂解物	每孔含 1,000,000 个 PBMC 的裂解物
0	0	167	75
10	789	805	1052

* 这些值的背景是仅来自测试缓冲液的信号。

表 8. 在存在或不存在来自供体 0524 号的人 PBMC 的裂解物时对 SK-BR-3 乳腺癌细胞裂解物中的 Her-2/neu 的 ECL 免疫测试检测(使用生物素-pAb 和 Tag-pAb)

SK-BR-3 细胞的裂解物(SK-BR-3 细胞/孔)	平均 ECL 信号(高于背景)*		
	不含 PBMC 的裂解物	每孔含 500,000 个 PBMC 的裂解物	每孔含 1,000,000 个 PBMC 的裂解物
0	0	210	340
10	789	683	1180

* 这些值的背景是仅来自测试缓冲液的信号。

表 9. 在存在或不存在来自供体 0116G 号的人 PBMC 的裂解物时对 SK-BR-3 乳腺癌细胞裂解物中的 Her-2/neu 的 ECL 免疫测试检测(使用生物素-pAb 和 Tag-pAb)

SK-BR-3 细胞的裂解物(SK-BR-3 细胞/孔)	平均 ECL 信号(高于背景)*		
	不含 PBMC 的裂解物	每孔含 500,000 个 PBMC 的裂解物	每孔含 1,000,000 个 PBMC 的裂解物
0	0	121	86
10	789	618	1137

* 这些值的背景是仅来自测试缓冲液的信号。

表 10. 表 4~9 的数据的平均值: 在存在或不存在人 PBMC 的裂解物时对 SK-BR-3 乳腺癌细胞裂解物中的 Her-2/neu 的 ECL 免疫测试检测(使用生物素-pAb 和 Tag-pAb)。所示为所有供体 PBMC 的数据的平均值。

SK-BR-3 细胞的裂解物(SK-BR-3 细胞/孔)	平均 ECL 信号(高于背景)*		
	不含 PBMC 的裂解物	每孔含 500,000 个 PBMC 的裂解物	每孔含 1,000,000 个 PBMC 的裂解物
0	0	147	150
10	789	678	1035

* 这些值的背景是仅来自测试缓冲液的信号。

表 11. 在存在或不存在来自供体 0706 号的人 PBMC 的裂解物时对 SK-BR-3 乳腺癌细胞裂解物中的 Her-2/neu 的 ECL 免疫测试检测(使用曲妥珠单抗、生物素标记的抗人 IgG 和 Tag-pAb)

SK-BR-3 细胞的裂解物 (SK-BR-3 细胞/孔)	平均 ECL 信号(高于背景)*	
	不含 PBMC 的裂解物	每孔含 1,000,000 个 PBMC 的裂解物
0	0	负**
10	428	314

* 这些值的背景是仅来自测试缓冲液的信号。

** 负: ECL 信号略低于背景水平。

表 12. 在存在或不存在来自供体 0920 号的人 PBMC 的裂解物时对 SK-BR-3 乳腺癌细胞裂解物中的 Her-2/neu 的 ECL 免疫测试检测(使用曲妥珠单抗、生物素标记的抗人 IgG 和 Tag-pAb)

SK-BR-3 细胞的裂解物(SK-BR-3 细胞/孔)	平均 ECL 信号(高于背景)*		
	不含 PBMC 的裂解物	每孔含 500,000 个 PBMC 的裂解物	每孔含 1,000,000 个 PBMC 的裂解物
0	0	负**	负**
10	428	492	269

* 这些值的背景是仅来自测试缓冲液的信号。

** 负: ECL 信号略低于背景水平。

表 13. 在存在或不存在来自供体 1026 号的人 PBMC 的裂解物时对 SK-BR-3 乳腺癌细胞裂解物中的 Her-2/neu 的 ECL 免疫测试检测(使用曲妥珠单抗、生物素标记的抗人 IgG 和 Tag-pAb)

SK-BR-3 细胞的裂解物(SK-BR-3 细胞/孔)	平均 ECL 信号(高于背景)*		
	不含 PBMC 的裂解物	每孔含 500,000 个 PBMC 的裂解物	每孔含 1,000,000 个 PBMC 的裂解物
0	0	负**	负**
10	428	452	311

* 这些值的背景是仅来自测试缓冲液的信号。

** 负: ECL 信号略低于背景水平。

表 14. 在存在或不存在来自供体 0711 号的人 PBMC 的裂解物时对 SK-BR-3 乳腺癌细胞裂解物中的 Her-2/neu 的 ECL 免疫测试检测(使用曲

妥珠单抗、生物素标记的抗人 IgG 和 Tag-pAb)

SK-BR-3 细胞的裂解物(SK-BR-3 细胞/孔)	平均 ECL 信号(高于背景)*		
	不含 PBMC 的裂解物	每孔含 500,000 个 PBMC 的裂解物	每孔含 1,000,000 个 PBMC 的裂解物
0	0	负**	负**
10	428	397	525

* 这些值的背景是仅来自测试缓冲液的信号。

** 负: ECL 信号略低于背景水平。

表 15. 在存在或不存在来自供体 0524 号的人 PBMC 的裂解物时对 SK-BR-3 乳腺癌细胞裂解物中的 Her-2/neu 的 ECL 免疫测试检测(使用曲妥珠单抗、生物素标记的抗人 IgG 和 Tag-pAb)

SK-BR-3 细胞的裂解物(SK-BR-3 细胞/孔)	平均 ECL 信号(高于背景)*		
	不含 PBMC 的裂解物	每孔含 500,000 个 PBMC 的裂解物	每孔含 1,000,000 个 PBMC 的裂解物
0	0	79	负**
10	428	468	496

* 这些值的背景是仅来自测试缓冲液的信号。

** 负: ECL 信号略低于背景水平。

表 16. 在存在或不存在来自供体 0116G 号的人 PBMC 的裂解物时对 SK-BR-3 乳腺癌细胞裂解物中的 Her-2/neu 的 ECL 免疫测试检测(使用曲妥珠单抗、生物素标记的抗人 IgG 和 Tag-pAb)

SK-BR-3 细胞的裂解物(SK-BR-3 细胞/孔)	平均 ECL 信号(高于背景)*		
	不含 PBMC 的裂解物	每孔含 500,000 个 PBMC 的裂解物	每孔含 1,000,000 个 PBMC 的裂解物
0	0	负**	负**
10	428	217	545

* 这些值的背景是仅来自测试缓冲液的信号。

** 负: ECL 信号略低于背景水平。

表 17. 表 11~16 的数据的平均值: 在存在或不存在人 PBMC 的裂解物时对 SK-BR-3 乳腺癌细胞裂解物中的 Her-2/neu 的 ECL 免疫测试检测(使用曲妥珠单抗、生物素标记的抗人 IgG 和 Tag-pAb)。所示为所有供体 PBMC 的数据的平均值。

SK-BR-3 细胞的裂解物(SK-BR-3 细胞/孔)	平均 ECL 信号(高于背景)*		
	不含 PBMC 的裂解物	每孔含 500,000 个 PBMC 的裂解物	每孔含 1,000,000 个 PBMC 的裂解物
0	0	负**	负**
10	428	362	410

* 这些值的背景是仅来自测试缓冲液的信号。

** 负: ECL 信号略低于背景水平。

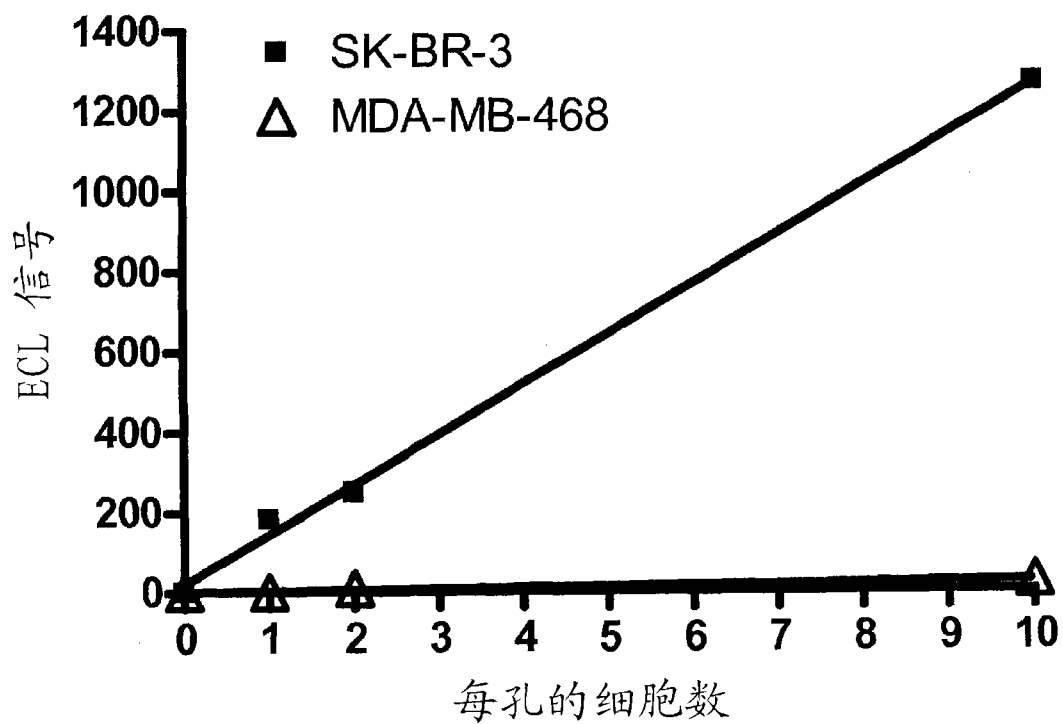


图1

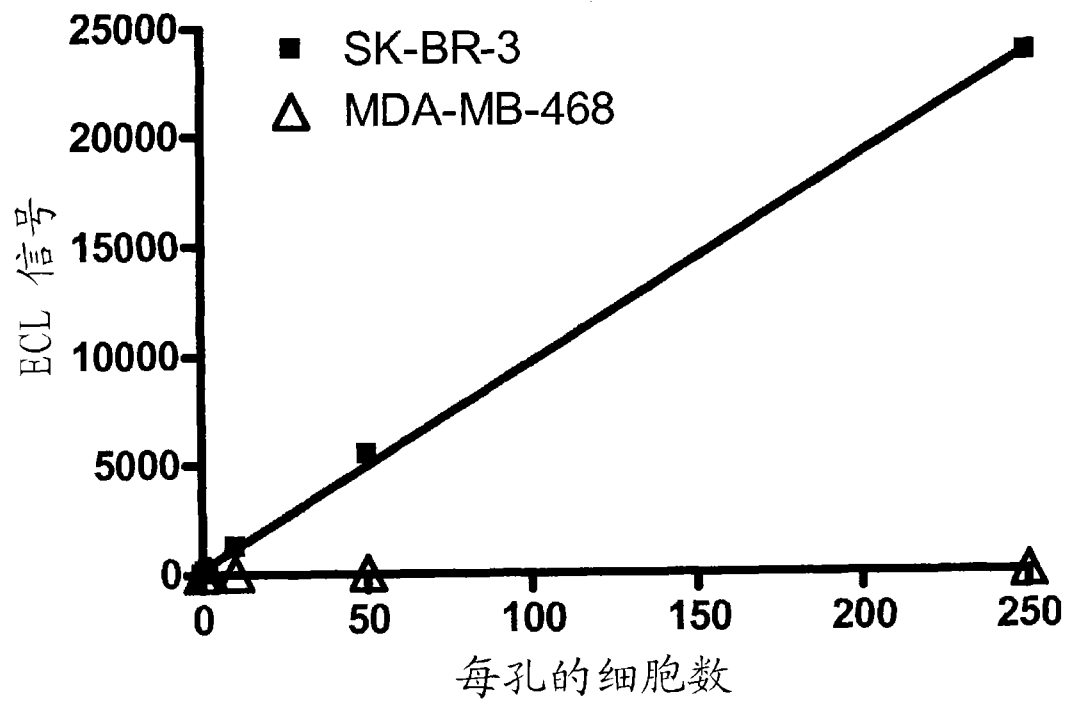


图2