



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 110753845 B

(45) 授权公告日 2023.08.22

(21) 申请号 201880039041.8

(74) 专利代理机构 北京英赛嘉华知识产权代理

(22) 申请日 2018.06.28

有限责任公司 11204

(65) 同一申请的已公布的文献号

专利代理人 王达佐 洪欣

申请公布号 CN 110753845 A

(51) Int.CI.

(43) 申请公布日 2020.02.04

G01N 33/543 (2006.01)

(30) 优先权数据

G01N 33/574 (2006.01)

62/526,425 2017.06.29 US

(56) 对比文件

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

CN 1675550 A, 2005.09.28

2019.12.12

WO 2016172216 A1, 2016.10.27

(86) PCT国际申请的申请数据

CN 103562409 A, 2014.02.05

PCT/US2018/040075 2018.06.28

Julia D. Wulfkuhle¹ 等. Molecular

(87) PCT国际申请的公布数据

Analysis of HER2 Signaling in Human

W02019/006156 EN 2019.01.03

Breast Cancer by Functional Protein

(73) 专利权人 烟台载通生物技术有限公司

Pathway Activation Mapping.《CLINICAL

地址 264670 山东省烟台市高新区科技大
道39号CANCER RESEARCH》.2012, 第18卷(第23期), 第1-
21页.

(72) 发明人 张建棣

审查员 叶志东

权利要求书2页 说明书15页 附图11页

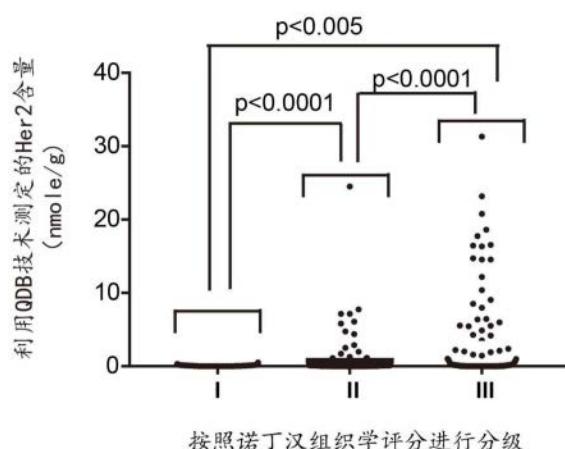
(54) 发明名称

用于实体瘤诊断的生物标志物绝对定量的方法和装置

(57) 摘要

CN 110753845 B

本发明提供了一种定量分析样品的方法。该方法包括下列步骤：(a) 提供代表所述样品的一个或多个特征的单个标志物，所述样品包含所述标志物的单个单位的群体；(b) 用斑点印迹分析检测标志物，其定量结果是样品中标志物的单个单位的群体的绝对量，通过样品体积或样品重量来进行标准化；(c) 基于标志物的定量结果获得样品的一个或多个特征的客观性测定。另外还公开了一种参考数据库以及用于诊断患者癌症的前述参考数据库的使用方法。



1. 一种定量分析样品的方法,所述方法用于非诊断目的,其包括下列步骤:

(a) 提供代表所述样品的一个或多个特征的单个标志物,所述样品是福尔马林固定石蜡包埋FFPE组织样品并且包含所述标志物的单个单位的群体;

(b) 用定量斑点印迹分析即QDB分析检测所述标志物,其定量结果是样品中所述标志物的单个单位的群体的绝对量,通过蛋白质重量来进行标准化,其中在检测过程中使QDB板的每个孔中的膜上的免疫复合物分别得到单独检测而不受相邻单元的干扰,从而使每个孔的信号分别得到定量检测;以及

(c) 基于所述标志物的绝对定量结果获得样品的一个或多个特征的测定。

2. 如权利要求1所述的方法,其中步骤(b)包括:

(b1) 将样品与包含结合因子的溶液一起孵育,其中所述结合因子能够特异性结合所述标志物的单个单位,并且所述结合因子能够通过所述斑点印迹分析进行定量;以及

(b2) 通过所述结合因子的QDB分析来检测所述标志物。

3. 如权利要求2所述的方法,其中,所述标志物是蛋白标志物,且所述结合因子是抗体。

4. 如权利要求3所述的方法,其中,所述抗体是分析物特异性试剂ASR级抗体或体外诊断IVD级抗体,或者所述抗体能够在免疫组织化学中进行检定。

5. 如权利要求1所述的方法,其中,所述样品是来自实验对象的活检组织。

6. 如权利要求5所述的方法,其中,所述实验对象是癌症患者。

7. 如权利要求6所述的方法,其中,所述标志物的绝对定量结果是为了根据标志物的定量结果来评估患者而被使用的定量结果。

8. 一种基于来自患者的活组织样品中的标志物的定量分析对患者进行癌症诊断的参考数据库的构建方法,所述方法用于非诊断目的,其中,

所述参考数据库包括多个参考个体信息,所述多个参考个体信息中的每个通过以下步骤来获得:

(a) 通过定量斑点印迹分析即QDB分析来检测所述标志物,其中定量结果是由已明确诊断的癌症患者提供的既存的福尔马林固定石蜡包埋活检组织样品中所述标志物的绝对量,且通过所述福尔马林固定石蜡包埋活组织样品中的蛋白质重量来进行标准化,其中在检测过程中使QDB板的每个孔中的膜上的免疫复合物分别得到单独检测而不受相邻单元的干扰,从而使每个孔的信号分别得到定量检测;以及

(b) 将所述定量结果与癌症患者的已知诊断相关联,从而获得参考个体信息。

9. 一种对患者进行癌症诊断的装置,其包含计算机可读存储介质,所述计算机可读存储介质中存储有权利要求8所述的方法构建的参考数据库,

所述装置通过计算机可读存储介质利用所述参考数据库并执行如下操作:

用QDB的方法检测所述参考数据库所用的所述标志物在患者的福尔马林固定石蜡包埋FFPE活检组织样品中的含量,其中检测的结果是所述标志物在所述活检组织样品中的绝对含量;

将所述活检组织中的所述标志物的定量结果同存储在所述参考数据库中的每个参考个体信息相比较;

在所述参考数据库中查找出同所述活检组织的所述标志物的定量结果最匹配的参考个体信息,并输出同该参考个体信息相关联的已知诊断结果。

10. 一种对患者进行癌症诊断的装置,其含有构成为通过网络对通过权利要求8所述的方法构建的参考数据库进行访问的单元,

其中利用所述参考数据库并执行如下操作:

用QDB的方法检测所述参考数据库所用的所述标志物在患者的福尔马林固定石蜡包埋FFPE活检组织样品中的含量,其中检测的结果是所述标志物在所述活检组织样品中的绝对含量;

将所述活检组织中的所述标志物的定量结果同存储在所述参考数据库中的每个参考个体信息相比较;

在所述参考数据库中查找出同所述活检组织的所述标志物的定量结果最匹配的参考个体信息,并输出同该参考个体信息相关联的已知诊断结果。

11. 一种对患者进行癌症诊断的试剂盒,其包含权利要求9或10所述的装置。

12. 一种权利要求8所述的方法构建的参考数据库在制造权利要求9或10中所述的装置中的用途。

13. 一种权利要求8所述的方法构建的参考数据库在制造权利要求11中所述的试剂盒中的用途。

用于实体瘤诊断的生物标志物绝对定量的方法和装置

[0001] 相关申请

[0002] 本申请的相关快速PCT要求基于2017年6月29日递交的美国临时专利申请62/526,425号的权益，并在此将该公开的内容通过参照而并入至本申请中。此外，2015年5月26号递交的美国专利申请14/721,205以及2017年2月15号递交的美国专利申请15/433,586公开的全部内容也通过参照而并入至本申请中。

技术领域

[0003] 本发明涉及利用免疫印迹分析方法以临床诊断为目的而对生物标志物(biomarker)在组织水平进行定量检测的方法和装置。具体而言，本发明涉及利用定量斑点印迹(QDB:quantitative dot blot)分析对生物标志物的表达水平进行检测并且结合参考数据库分析从而针对实体瘤提供诊断和预后的方法和装置。

背景技术

[0004] 蛋白质分析是现代生物学研究的重要基础。这项技术基于抗原-抗体相互作用的原理来测量目标抗原在各种医疗或实验条件下的表达水平。抗原被定义为当进入人体时能够触发免疫系统产生抗体的外来分子。抗体由于其针对特定抗原的高特异性，成为临床、制药和生物医学研究中一个有力的工具。

[0005] 抗原包括但不限于，化合物、多肽、蛋白质、RNA分子、DNA分子、细胞(在原位释放的蛋白质)或病毒颗粒(在原位释放的蛋白质)。完整或部分抗原分子，可被引入到包括驴、山羊、兔子等宿主动物体内，产生大量针对目标抗原的抗体。此外，导入的抗原或抗原的一部分，可能具有一个或几个抗原决定簇，因此，由于抗原决定簇数目的不同，宿主体内可能产生一个或多个针对目标抗原的特异性抗体。

[0006] 一个典型的免疫检测过程可以分为三个主要步骤。第一步是点样，将制备的含有目标抗原的样品首先转移到诸如硝酸纤维素膜、PVDF膜或像具有结合蛋白质能力的多孔板、免疫组化(IHC)中的载玻片和QDB板中的膜之类的固相载体的表面上。第二步是形成并标记目标抗原抗体复合物(例如，免疫复合物)；这一过程又包括阻塞、孵育和清洗子步骤。在阻塞子步骤，膜上的非特异性蛋白质结合位点经阻塞液(blocking buffer)处理来避免抗体非特异性结合到膜上。在免疫组化的有些情形中，在施加阻塞液前，需要进一步处理载玻片上的组织切片(脱蜡和抗原修复)。经过阻塞后，在孵育子步骤中，膜和针对目标抗原的抗体一起孵育，从而在膜上形成抗原抗体复合物；而未与目标抗原结合的抗体在这一过程中被洗掉。这里用的抗体一般是可购买的、预先标记的抗体。当然也可以通过一个标记子步骤在原位进行标记。在任一情形下使用的抗体应该被标记，通过标记物(reporter)例如标记酶(reporter enzyme)进行直接标记，或者通过由标记物标记的第二抗体进行间接标记。

[0007] 第三步是检测。对标记酶发出的信号进行检测并记录，从而提供与膜结合的免疫复合物的数量或者质量相关信息。

[0008] 不同的标记方法也相应地需要不同的检测方法。例如，第三步的检测反应可以是

通过目测的颜色变化或者是通过扫描仪、X射线胶片或酶标仪检测的化学发光信号。在检测过程中抗体也可以通过荧光进行标记，并利用扫描仪进行检测。

[0009] 蛋白质分析的多种技术都是这个典型的免疫检测法的变种。这些技术包括但不限于西式印迹分析技术、斑点免疫印迹分析技术、免疫组化(IHC)技术、酶联免疫分析(ELISA)技术、反向蛋白芯片(reverse phase protein microarray:RPPM)技术和新开发的定量斑点印迹分析(QDB)技术和载通(Zestern)技术。

[0010] 在免疫组化分析中，组织块首先以石蜡包埋块或冰冻块的形式进行处理，并进而以一定的厚度切割成切片，放置于载玻片上。然后，切片经过典型的免疫检测过程处理，使检测抗体和目标抗原在载玻片上形成免疫复合物。病理学家可利用该预先标记的抗体并借助显微镜对载玻片上的目标抗原进行检测。对于来自石蜡包埋的切片，为了促进抗原抗体反应，切片需要经过进一步处理。这些处理可包括对切片进行脱蜡和抗原修复，从而露出抗原以进行抗原抗体反应。

[0011] 在临床实践中，出于临床诊断和预后的目的，免疫组化分析被广泛用于在蛋白质水平上检测生物标志物表达的变化。典型的生物标志物的免疫组化报告表述为“+”或“-”，或者进而分类成“0、1+、2+、3+”。例如，通过免疫组化的方法分析常用于乳腺癌诊断的生物标志物——人表皮生长因子受体2(Her2)的表达水平，以确定是否在治疗过程中包括Her2针对性疗法(Her2-dependent therapy)。免疫组化的结果被分成四组：0和1+、2+和3+。0组和1+组的结果被认为是阴性，3+组被认为是阳性，而2+组被认为是两可。

[0012] 为了能有效反映染色强度与染色细胞百分比例，临床领域开发了包括H分数(H指数)的评分系统以提供关于免疫组化分析的更多详细信息。在另外的情形下，也可同时提供染色强度(例如强和弱)以及染色细胞的百分比。例如，结果可以报告为“(百分比，强度)”。然而，这些结果本质上都是半定量的结果。

[0013] 免疫组化提供了宝贵的形态学信息，并且人们已经投入了大量努力以实现分析程序的标准化，其结果仍然是定性的，受到包括处理过程、视野和观察者差异等因素的影响。这项技术也难以用于高通量分析。

[0014] 免疫组化分析相关联的不确定性导致诊断中的错误明显增加。事实上，在Her2的情况下，免疫组化分析的结果和荧光原位杂交(FISH)技术的结果相比较，不一致性(inconsistency)高达30%。

[0015] 免疫组化的分类结果也难以用于进一步数据分析。例如，虽然在阳性的个体患者中存在显著差异，它们在临床实践中被归结为同一类别。因而，来自免疫组化分析的结果难以用来进行充分的数据分析以提供我们所希望的更准确、更有预见性的诊断和预后。

[0016] 人们尝试过在组织水平定量检测生物标志物的含量并取得了成功。例如，基于亲近性分析(proximity assay)的Hermark测试，能够定量检测乳腺癌组织中的Her2表达水平。然而，这项技术检测的是乳腺癌患者中相对的Her2表达水平。

[0017] 同时，人们用SRM-MS质谱技术成功检测了Her2的绝对含量(绝对水平)。利用同位素标记的标准蛋白，人们检测了Her2的绝对含量，并利用受试者工作特性(Receiving Operative Characteristics:ROC)分析建议了740amole/g的临界值。

[0018] 然而，这些方法都非常复杂、操作繁琐，不适合于大量样品的高通量分析。复杂的分析过程也显著提高了操作成本和劳力。

[0019] 然而,最近开发的QDB方法,显示出适合通过高通量方式处理由细胞或组织制备的复合裂解液。当引入标准蛋白时,不管以重组蛋白形式还是以纯化蛋白形式,都可以将这种方法非常方便地转化为绝对定量的方法以对某特定蛋白的含量在细胞或组织水平上进行绝对定量测定。

[0020] 本发明中,我们力图利用QDB技术在组织水平上测定生物标志物表达水平以用于临床诊断。在本发明一实施方式中,目前临床诊断通用的免疫组化技术可以被转化为绝对定量测试方法,该方法在准确、量化、客观、高通量以及更全面地辅助临床诊断和预后方面具有显著的优点。来自QDB分析的绝对数据能够进一步以大规模方式进行数据分析,以提供更准确更有预见性的临床诊断和预后。

发明概要

[0021] 本发明提供了一种以组织水平检测生物标志物表达水平的方法。该生物标志物的评估是通过定量方式而不是如现行通用的分类的方式来进行。

[0022] 因此,本发明提供连续性结果以代替现行通用的不连续性结果。因此,同现行的免疫组化和荧光原位杂交技术相比较,本发明提供了更多的机会。

[0023] 本发明涉及一种检测样品的定量分析方法。所述方法包括:(a)提供代表所述样品的一个或多个特征的单个标志物(marker),所述样品包含所述标志物的单个单位的群体;(b)用斑点印迹分析检测所述标志物,其定量结果是样品中所述标志物的单个单位的群体的绝对量,通过样品种体积或样品重量来进行标准化;(c)基于所述标志物的定量结果获得样品的一个或多个特征的客观性测定。

[0024] 样品可以是来自研究对象的组织。在本发明一实施方式中,组织是指活检组织。在本发明另一实施方式中,组织是指冰冻组织。在本发明另一实施方式中,组织是指福尔马林液固定的样品;而在本发明另一实施方式中,组织是指经过福尔马林液固定、石蜡包埋的样品(FFPE样品)。

[0025] 研究对象可以是患者。更具体的说,研究对象可以是癌症患者。

[0026] 另外,上述方法的(b)步骤可以包括利用QDB方法检测所述标志物含量。更具体地说,(b)步骤可以包括:(b1)将样品与包含结合因子的溶液一起孵育,其中,所述结合因子能够特异性结合所述标志物的单个单位,并且所述结合因子能够通过斑点印迹分析进行定量;以及(b2)通过结合因子的QDB分析来检测所述标志物的含量。

[0027] 结合因子可用于基于包括免疫组化分析在内的抗原抗体相互作用的分析进行检测。此外,结合因子可用于流式细胞计数技术中进行检测。

[0028] 优选标志物是蛋白质标志物而结合因子是抗体。进而,抗体可以是分析物特异性试剂(ASR)级抗体或体外诊断(IVD)级抗体。

[0029] 此外,上述方法还包括(d)步骤:根据标志物的量化结果对患者进行评估。具体地说,(d)步骤包括对患者进行癌症的诊断和预后。对患者癌症的诊断和预后的例子包括无病生存率、总生存率、风险比或癌症治疗方案预测。

[0030] 本发明公开的定量检测的生物标志物水平也可以根据可利用信息的数理分析方法进行分类,以便于将本发明与现有的通用方法进行比较,并可以更好地探讨生物标志物的绝对含量的临床意义。

[0031] 本发明一实施方式可应用于免疫印迹分析。生物标志物的表达水平可以利用基于抗体的方法进行检测。

[0032] 通过确立基于抗体的方法的线性范围,生物标志物的绝对量可以在相同测量中利用标准蛋白(蛋白标准品)实现。

[0033] 在本发明一实施方式中,斑点免疫印迹分析的方法可用来实现组织水平上的生物标志物的绝对定量。

[0034] 利用重组蛋白或纯化蛋白,通过以图像为基础的斑点免疫印迹分析来确立蛋白标准曲线。通过图像收集和分析实现图像数字化。

[0035] 获得的信号被用来确立标准蛋白标准曲线。

[0036] 从FFPE块中提取的总蛋白可以被用于斑点免疫印迹分析,并且获得的信号可以利用上述参考标准曲线转化为生物标志物的绝对含量。

[0037] 在本发明一实施方式中,定量斑点印迹分析(QDB)可以被用来在组织水平检测生物标志物的绝对含量。

[0038] 在没有标准蛋白的情况下,生物标志物的蛋白表达量可以使用包括QDB方法在内的免疫印迹分析方法进行相对检测。只要充分控制分析过程(例如,使用阳性和阴性对照),这种方法可提供有价值的结果用于参考。

[0039] 在QDB分析中,生物标志物的绝对含量可以利用已经验证的检测抗体进行检测。对检测抗体的验证方法没有限制。抗体可以通过西式印迹分析方法进行验证,也可以根据以前的结果进行验证。在本发明一实施方式中,被广泛接受的用于免疫组化分析的抗体可以直接用于QDB分析。例如,ASR级抗体或IVD级抗体可用于QDB分析。这些抗体包括但不限于,用于Her2蛋白的EP3和4B5克隆抗体,用于ki67蛋白的MIB1抗体和用于雌激素受体蛋白(ER)的SP1抗体。同样,用于其他基于抗体检测方法(包括但不限于流式细胞术)的检测抗体,也可用于QDB分析。

[0040] 检测抗体(抗体A)可以通过与现有的检测抗体(抗体B)进行比较研究来验证。当两个以上的样品同时被抗体A和抗体B进行分析并得到类似的结果时,抗体A可以被认为得到验证。

[0041] 用于QDB分析的样品可用冰冻组织或福尔马林固定组织或福尔马林固定并经石蜡包埋的组织块(FFPE块)进行制备。这些样品也可以使用以其他方式保存的组织来制备,只要这些样品中能够实现抗原抗体反应即可。

[0042] 来自两个以上样品的生物标志物的绝对含量及其相关的临床信息可用来构建蛋白质数据库(即QDB数据库)。对QDB数据库的数理分析可提供医用信息。例如,可对生物标志物的绝对含量与无病生存率之间的可能的关联性进行分析以用来对患者提供预测性临床预后。

[0043] 本发明在上述以及其他应用中至少部分依赖如下发现:QDB分析的绝对性保证了来自不同来源的信息可以相互合并用来进行分析。来自QDB分析的新信息的持续增加保证了QDB数据库的不断成长。来自对QDB数据库的分析获得的信息为患者提供了诊断和预后的依据。

[0044] 蛋白质能够以非变性的方式进行提取,或者可以通过加热和/或变性剂进一步加以变性。非变性的形式应该被广义地理解。它可以是天然形式或者可以是指抗原没有与变

性剂(例如二硫苏糖醇(DTT)或β-巯基乙醇)接触或者没有接触到足以导致抗原彻底变性的变性剂的状态。

[0045] 在本发明一实施方式中,为了保证实验的一致性,可以包含预定量的抗原作为操作对照。该抗原的绝对含量需要在每次检测时进行测定,只有当检测结果中该抗原含量在预定量的一定范围内,该实验才被认为有效。

[0046] 在QDB分析中,对相同的裂解液而言对相同的生物标志物可用两种以上的抗体进行分析。这些抗体可以识别生物标志物的相同或不同的抗原决定簇。针对每种抗体可以分别得出临界值,根据这些临界值可确定样品为阳性或阴性。从两种以上的抗体分析得出的结论一致的样品,可以被接受为阴性或阳性,结论不一致的样品则指定为不明确(模糊)。

[0047] 在本发明一实施方式中,可以使用相同样品来检测两种以上的生物标志物的绝对含量,并且这些检测结果结合相关临床信息(包括但不限于无病生存率、总生存率、风险比、副作用、年龄、疾病的不同发展期)可以被用来建立一个模式,并且该模式可以被用于诊断和预后的目的。

[0048] 在本发明一实施方式中,生物标志物的绝对含量可以通过两种以上的抗体进行检测。利用不同抗体得出的生物标志物的不同绝对含量结合相关临床信息(包括但不限于无病生存率、总生存率、风险比、副作用、年龄、疾病的不同发展期)可以分别被用来建立一个模式,并且来自不同抗体的不同模式可以提供抗体特异信息用于诊断和预后的目的。

[0049] 本发明的另一方面,涉及一种基于对来自患者的活检组织样品中的标志物的定量分析而对患者进行癌症诊断的参考数据库。该参考数据库包括多个参考个体信息(reference profile),多个参考个体信息分别通过以下步骤获得:(a)提供一个已诊断的患者的活检组织样品;(b)对提供的活检组织样品通过斑点印迹分析来检测所述标志物,其中量化结果是活检组织样品中所述标志物的绝对量,且通过活检组织样品体积或活检组织样品重量来进行标准化;以及(c)将所述量化结果与癌症患者的已知诊断相关联,从而获得参考个体信息。

[0050] 上述(b)步骤中可以包括:(b1)将所述活检组织样品,同包含与所述标志物特异性结合的结合因子的溶液一起孵育;以及(b2)通过所述结合因子的QDB分析来检测所述标志物。

[0051] 在上述参考数据库中,优选生物标志物为蛋白质标志物而结合因子为抗体。参考数据库最好存储于计算性记忆芯片(computational memory chip)。

[0052] 本发明的另一方面在于提供对患者进行肿瘤诊断的方法。该方法包括:(i)提供上述参考数据库;(ii)获得患者的活检组织样品;(iii)用斑点免疫印迹分析的方法检测所述参考数据库所用的所述标志物在患者的活检组织中的含量,其中检测的结果是所述标志物在所述活检组织样品中的绝对含量;(iv)将所述活检组织中的所述标志物的定量结果同存储在所述参考数据库中的每个参考个体信息相比较;然后,(v)在所述参考数据库中查找出同所述活检组织的所述标志物的定量结果最匹配的参考个体信息,并输出同该参考个体信息相关联的已知诊断结果。

[0053] 在上述的方法中,待诊断的肿瘤是实体瘤。

[0054] 本发明另一方面是可用于对患者进行肿瘤诊断的装置。该装置包括上述参考数据库。

[0055] 本发明的另一种方面是可用于对患者进行肿瘤诊断的试剂盒。该试剂盒具有上述参考数据库。或者，该试剂盒也可以包括一个用于通过网络接入上述参考数据库的单元。

[0056] 该发明的详细情况反映在附图中以及下面的描述中。本发明的其它特征、目的和优势在专业人员阅读这些附图和描述以及附加的权利要求书时应显而易见。

[0057] 附图简述

[0058] 图1(图1A-图1D)示出通过斑点免疫印迹分析利用EP3抗体检测Her2的绝对含量。纯化的Her2蛋白被用来确立剂量曲线。获得的图像利用Li-Cor公司ImageQuant软件转为数字。利用标准蛋白确立的剂量曲线将从患者样品中获得的斑点免疫分析图像转化为这些患者Her2的绝对含量。

[0059] 图2(图2A-图2H)示出了利用三个对Her2、Ki67和ER已知的免疫组化分析抗体通过QDB分析分别确立它们在不同癌症组织中的线性区间。her2、Ki67和ER的重组蛋白被用作标准蛋白。这些抗体通过QDB分析分别确立了它们在这些癌症组织中的剂量曲线。

[0060] 图3(图3A-图3D)示出了运用QDB分析检测得到的从FFPE样品中提取的乳腺癌组织中的Her2、Ki67和ER的绝对含量、以及在冰冻胃组织中的Her2的绝对含量。前述结果基于各自的免疫组化结果进一步分组。

[0061] 图4(图4A-图4D)示出了如何通过利用QDB方法得出的Her2的绝对含量和根据当地医院提供的免疫组化信息来确定临界值并将连续性数据转化为分类结果。

[0062] 图5示出了如何利用生物标志物的绝对含量来分析临床数据。在该情况下调查了Her2的绝对含量与乳腺癌患者的组织学分级之间的潜在关系。

具体实施方式

[0063] 在描述本发明的方法之前，需要声明的是，本发明不仅仅限于在此所述的这些方法，具体应用中会存在变化。本说明书中所记载的术语仅仅是出于描述特定实施方式的目的，而并非限制这些实施方式，本发明的保护范围仅受附加的权利要求书的限制。

[0064] 除非另有说明，本说明书中使用的所有科技术语与本领域技术人员的理解相同。

[0065] 本发明涉及的方法主要出于临床诊断的目的。因而，在本说明书中，“决定(determining)”、“检测(measuring)”、“评价(assessing)”和“测试(assaying)”可混用，并且包括了定性和定量两种检测方式。这些术语既可以指定量也可以指半定量，因此，“决定(determining)”和“测试(assaying)”、“检测(measuring)”及其类似的描述可以混用。当需要声明定量检测时，需要用到针对测试物的“量进行检测/检测量”或者类似的描述语句。当需要描述定量或半定量时，则会用到针对测试物的“水平进行检测”或“检定(detecting)”分析对象(测试物)。

[0066] 同本说明书相关的“量化”测试提供了在样品中一种测试物同参考物(对照)的相对含量信息，一般以连续的数字出现，其中的“0”定义为测试物的量低于检测范围。“半定量”测试提供了物质的量或大致量，介于定性和定量之间。其中的“0”则定义为测试物的量低于检测范围。

[0067] 本说明书中的“诊断”是指对分子或病理状态、疾病及症状的鉴别，例如鉴别乳腺癌或其他癌症的分子亚型。

[0068] “预后”是指对可能由癌症导致的死亡或病情发展可能性的预测，包括对肿瘤疾病

(例如乳腺癌)的复发率、扩散可能性以及抗药性的预测。

[0069] “疗效预测”是指对治疗性干预结果的预测。

[0070] “实验对象 (subject)”、“宿主 (host)”、“患者”和“个体”在本说明书可以混用,指任何需要诊断或治疗的哺乳类(特别是人类)对象。

[0071] QDB定量检测

[0072] 在组织水平上对一个生物标志物的表达水平的定量检测可以通过免疫印迹分析方法实现。免疫印迹分析方法包含其最广泛的外延。只要在分析过程是基于抗体和涉及到固相,就可被认为是免疫印迹分析过程。该固相包括但不限于膜、ELISA板、QDB板(即,用于QDB分析的板)。

[0073] 对于抗体特异性的验证方法没有限制。当其抗原决定簇是线性时,抗体可通过西式印迹分析进行验证,也可以依赖于以前的经验进行验证。例如,许多抗体已被广泛应用于临床诊断和预后。这些抗体包括但不限于ASR抗体和IVD抗体以及其他可用于免疫组化和流式细胞术的临幊上容许的抗体。这些抗体都可以直接用于QDB分析而无需进一步验证。

[0074] 对于检测抗体,也可以通过参照已知抗体来进行验证。在本发明一实施方式中,检测抗体可用来分析两个以上的样品,其结果可以同来自已知抗体(例如来自Roche公司的用于Her2蛋白的4B5克隆)的结果进行比较。当这两个抗体的一致率超过一定程度时,可以认为该抗体是经过验证的抗体。

[0075] 在本发明一实施方式中,生物标志物的表达水平可以通过典型的免疫印迹分析方法进行检测。这种方法包括但不限于两个特征: (1) 经过验证的抗体; (2) 利用标准蛋白建立的剂量曲线。

[0076] 在本发明一实施方式中,生物标志物的表达水平可以通过典型的免疫印迹分析方法进行检测。这种方法包括但不限于三个特征: (1) 经过验证的抗体; (2) 利用标准蛋白建立的剂量曲线; (3) 在检测过程中膜上的免疫复合物得以单独检测而不受相邻单元的干扰。

[0077] 在本发明一实施方式中,在试验中可以包括参考样品。在同一免疫印迹分析中,参考样品同目标样品被一起处理。参考样品的量同目标样品的量进行比较。若目标样品中生物标志物的含量高于参考样品中生物标志物含量,则目标样品可定为阳性,反之为阴性。

[0078] 在本发明的另外一实施方式中,在实验中可以包括两个以上的参考样品。参考样品同目标样品在同一个免疫印迹分析中进行处理,参考样品的结果被用来确立样品等级次序,而参考这些参考样品来针对目标样品结果进行分类。例如,若参考样品1和参考样品2分别被用来定义1+和2+上限而目标样品的量介于参考样品1+和2+的量之间,则目标样品被定义为2+。

[0079] 在本发明一实施方式中,生物标志物的表达水平可以通过斑点免疫印迹分析进行定量检测。斑点免疫印迹分析包括但不限于下列特征: (a) 经过验证的抗体; (b) 当抗体用于分析一种类型的样品时所确立的线性范围 (linear range); (c) 膜上的免疫复合物以图像的形式被检测; (d) 将图像数字化。

[0080] 在本发明另一实施方式中,生物标志物的表达水平可以通过QDB方法进行定量检测。QDB方法包括但不限于下列特征: (a) 经过验证的抗体; (b) 当抗体用于分析一种类型的样品时所确立的线性范围; (c) 在检测过程中膜上的免疫复合物得到单独检测而不受相邻单元的干扰。

[0081] 来自现有通用的免疫组化分析的分类结果应包括其最广泛的外延。这些结果可以是二元的(阳性或阴性)、分级的(0、1+、2+、3+或强、中、弱)、基于百分比的或者上述几种类型的结合。在免疫组化分析中用到的几种评分方法(包括H评分)仍被认为是分类结果,因为这些结果在本质上是不连续的。

[0082] 来自本发明披露的方法的结果是一个连续的数据。该数据可以转化为如通用的免疫组化中一样的分类结果,以便于比较和理解来自本发明的结果的临床意义;然而这个转换过程是基于数理分析得出的临界参考值来实现的,并且这个分类结果可以根据临界值的不同而变化。在本发明一实施方式中,在乳腺癌组织中检测的her2水平可用于统计学分析,并利用免疫组化结果通过受试者工作特性(ROC)曲线分析得出临界值。在乳腺癌组织中的绝对含量可以根据ROC分析中得出的临界值而被定义为阳性或阴性。当her2的绝对含量高于临界值为阳性,反之为阴性。

[0083] 绝对检测

[0084] 来自本发明的分析结果可以是相对的,或者同标准蛋白相结合而成为绝对的。“相对”和“绝对”指两种检测的方法,应该包括其最广泛的外延。相对检测是利用与其他结果的比较来检测,而绝对检测则利用以已知量的标准单位来检测。也许,两种检测方法最明显的区别在于它们的应用范围不同。相对性结果只有在同样的实验条件下才有意义,而绝对性结果可以对包括不同地点和不同时间进行的分析结果进行比较。

[0085] 相应的,本发明的绝对性检测通过包含标准蛋白来实现。前述的标准蛋白应该包括其最广泛的外延。它是指已知量的抗原或者两个以上的已知量的一种抗原。它包括但不限于通过重量、质量、百分比、体积或分子数(例如摩尔数)或上述两种以上的组合来预定的量。它能够以纯化的形式或者以混合物的形式存在。它可以是天然的,也可以是非变性或变性的状态。在本发明中,天然和变性之间的任一种状态都可以被认为是非变性状态。

[0086] 生物标志物

[0087] 在本说明书中混用的“样品”、“患者样品”和“生物样品”一般是指可用于检测特定分子的样品,优选诸如下文中所述的生物标志物等的与生物特征相关联的特定的标志物分子。样品可以包括但不限于外周血细胞、CNS液、血清、血浆、口腔拭子(swab)、尿液、唾液、泪液、胸水及其类似物。在本发明中的样品一般指组织。

[0088] 术语“标志物”和“生物标志物”应定义为其最广泛的外延。在此可混用的“标志物”和“生物标志物”一般是指,在来自一种表型(例如患者)的样品中与来自另一种表型(例如没有患病或患有不同疾病)的相比是以不同形式存在的有机生物分子(例如多肽)。一种生物标志物,当其在第一种表型中的平均值或中间值与其在第二种表型中的平均值或中间值相比较而呈现出统计学显著差异时,就根据在不同表型中表达不同而得以确立。

[0089] 在本发明中,生物标志物是指与疾病状态或生物状态相关联的可检测的蛋白质分子。它可以是已充分确立的临床诊断用生物标志物(例如免疫组化分析用临床生物标志物)或者是新鉴定的体外诊断用生物标志物。

[0090] 在本发明一实施方式中,生物标志物被用来诊断实体瘤。

[0091] 已知的诊断用生物标志物包括但不限于ACTH、ACTIN、ADENOVIRUS、AFP、ALK-1、AMYLOID A、ANDROGEN RECEPTOR、ANNEXIN、ARGINASE-1、BAP1、B-AMYLOID、BCL-1, BCL-2、BCL-6、BEREP4、Beta-Catenin、BOB1、BRACHYURY、BRST-2、C3d、C4d、CALCITONIN、CALDESMON、

CALPONIN、CALRETININ、CD14、CD117、CD117、BM、CD123、CD138、CD15、CD163、CD1a、CD2、CD20、CD21、CD23、CD25、CD3、CD30、CD31、CD33、CD34、CD34、BM、CD38、CD4、CD43、CD45RA、CD45RB、CD45R0、CD5、CD56、CD57、CD61、CD68、CD7、CD79a、CD8、CD99、CDX2、CEAm、CEAp、Chromogranin、Chymotrypsin、Claudin 3、Claudin 4、CK MIX、CK20、CK34BE12、CK5/6、CK7、CK19、CKAE1/AE3、CKCAM5.2、CMV、c-Myc、CXCL13、CYCLIN D3、D2-40、DBA-44、Desmin、DOG-1、EBV、LMP、E-Cadherin、EGFR、EMA、EMA-Perineurioma、ER、ERG、Factor 13a、Factor 8、FOXP1、FSH、GALECTIN-3、Gastrin、GATA-3、GFAP、GH、Glucagon、Glut1、Glutamine synthetase、Glypican-3、GPC、GRANZYME、H. pylori、HBC、HBS、hCG、HepPar 1、Her2neu、HGAL、HHV-8、HMB-45、HPL、HSV、IDH1、IgA、IgD、IgG、IgG4、IgM、Inhibin、INI、Insulin、ISH EBV、ISH KAPPA、ISH LAMBDA、KAPPA、KBA62、KI67、Lambda、LANGERIN、LAT、LEF1、LH、LM02、LYSOZYME、MAP-2、MCT、MELAN A、MITF、MLH1、MNDA、MOC-31、MPO、MSH2、MSH6、MUC2、MUC5AC、MUM1、Myogenin、Napsin A、NB84、NEU N、Neurofilament、NKI/C3、NKX3.1、NPM、NSE、NUT、2-Oct、Oct-3/4、p16、p53、p57、p63、Parvovirus、PAX-2、PAX-5、PAX8、PCSK9、PD-1、Perforin、PHH3、PHLDA1、PIN4、PLAP、PMS2、PR、PRAP、Prolactin、Prox1、PSA、RNA、S100、S100P、SALL4、SF-1、SMA、SMMS、Somatostatin、SOX-10、SOX11、SCAP、S1P、SREBP、Spirochetes、STAT6、SV40、SYNAP、Tamm-Horsfall、T-bet、TCL-1、TCR、TCR、Gamma、TdT、THYRO、TIA-1、TOXO、Transthyretin、TRAP、TSH、TTF1、Tyrosinase、Vimentin、WT1、WT1(C-19)、ZAP70。

[0092] 本发明可用来分析新鲜组织中的抗原含量,也可用来分析FFPE块中抗原的含量。抗原可以从组织或FFPE块中以任何形式提取,只要来自提取过程的抗原能够进行抗原抗体反应即可。对于来自FFPE块的抗原,为了便于抗原抗体反应,需要对切片进行脱蜡并伴随或不伴随抗原修复步骤。

[0093] 参考数据库

[0094] 来自两个以上的目标样品的QDB结果,同其相匹配的临床信息相结合,能够用来建立用于数理分析的数据库(即AKA、QDB数据库)。因而,可以建立以临床诊断为目的参考数据库。

[0095] 在本说明书中“参考”或“参照”是可被互换性地来指可用来针对观察的数据相比较的已知数据或系列已知数据。已知数据代表两个参数之间的已知相互关系,例如生物标志物的表达水平与其相关的表型之间的相互关系。在此,已知数据构成了参考数据库中的参考个体信息。

[0096] 相应地,参考数据库可以通过存储多个参考个体信息以用于诊断目的,每个参考个体信息包括从已知诊断结果或治疗后已知临床疗效结果的对象个体获得的样品中生物标志物的表达水平。

[0097] 本发明一实施方式中还包括用于确认同参考数据库中的一个或几个参考个体信息最匹配的患者个体信息的方法。该方法包括:(a)在合适的程序计算机上,将来自患者样品中的生物标志物的表达水平(含量)同参考数据库中的参考个体信息相比较,以决定前述患者的个体信息同参考数据库中的每个参考个体信息的相似度;(b)在合适的程序计算机上,根据(a)步骤中决定的相似度中的最大相似度,从参考数据库中找出同患者个体信息最匹配的参考个体信息;(c)将同患者个体信息最匹配的、参考数据库中的参考个体信息的最大相似度或其相关表型,输出到用户界面设备、计算机可读存储介质或者区域性或可远程

接入的计算机系统,或者直接显示。

[0098] 基于绝对量的诊断方法

[0099] 利用数学方法对来自QDB数据库的信息进行分析来找出生物标志物的表达水平与临床特性之间的推定关系。作为例子包括但不限于,her2的相对表达水平与患者无病生存率之间的关系,以及Ki67表达水平对胃癌患者治疗的有效性的预测。这些信息可以为同类分析中的其他患者提供预后。

[0100] 如上所述,在临床诊断中的临床测试经常依赖于单个分析物,因而难以捕捉到该分析物与其他参数(包括一些临床数据)之间潜在的内在联系。此外,临床测试的结果经常不是定量的,依赖于免疫组化分析方法,而这种方法经常在不同的实验室里会得出不同的结果,部分原因是所用试剂难以统一,部分原因是解读带有主观因素而难以进行量化。

[0101] 标准蛋白在QDB分析中的引入实现了对生物标志物的绝对含量测定,因而极大地方便了不同临床实验室之间结果的比较。来自两个以上的目标样品的QDB结果,同其相匹配的临床信息相结合,能够用来建立用于数理分析的QDB数据库。采用数学方法探究生物标志物的绝对含量与临床参数之间的推定关联性。例如但不限于Her2的绝对表达量与患者无病生存率之间的关系。当患者的生物标志物的绝对含量被测定后,这些信息可在将来为患者提供诊断和预后。

[0102] 来自QDB分析的两次以上的绝对定量结果可以合并,以增加用于数理分析的数据库的规模。生物标志物的绝对含量与临床参数的推定关系可以通过数理分析方法进行探究。作为例子包括但不限于,Her2的绝对含量与患者无病生存率之间的关系,或者Ki67表达水平与胃癌患者治疗的有效性的预测。这些信息为已知生物标志物绝对含量的患者提供诊断或预后。

[0103] 采用目标样品可以检测两种以上的生物标志物的绝对含量。这些结果同患者的相关临床信息相结合,可以被用来构建用于数理分析的QDB参考数据库,为已经检测过这些生物标志物的绝对含量的患者提供诊断和预后。参考个体信息可以通过收集已知的诊断或临床治疗结果的患者的两种以上的生物标志物分子绝对含量来获得。然后,对于新患者,这些生物标志物的绝对含量可以被测定并同参考数据库中的信息进行比较。基于存储的参考个体信息中与这些绝对含量相匹配的信息,可为新患者在治疗上提供诊断和预后。

[0104] 临床特性应包含其最广泛的外延。该特征可以包括但不限于年龄、性别、血压、血糖水平、癌症分期、风险比、无病存活期或者任何与患者的诊断、预防和治疗相关的信息。

[0105] 本发明的另一个显著的优势来自诊断方法。具体地说,该方法可用于对加入临床试验的患者进行筛选。以实现患者个性化治疗为目的的癌症治疗的临床试验的主要障碍是,缺乏可用于对患者进行阶层化的生物标志物。针对癌患者的基于绝对含量的筛选工具的诊断确认,可通过使用单一标准和改进实验的起始过程来显著降低此类试验的成本。由于鉴定和筛选患者的成本降低,本发明用于筛选的新方法将有助于从更广泛的人群和/或临床环境中招募、筛选和/或选择患者,从而为服务不足的患者群体提供参与临床试验的机会,而这是以往施行的大多数肿瘤试验的主要限制条件。

[0106] 此外,当前的肿瘤学家经常具有许多可供他们选择的治疗手段,包括标记为“标准治疗”的那些治疗方案以及其他没有这样的标签但在某些类型的癌症患者中表现出功效的药物。若在诊断后可尽快让患者得到相应的最佳癌症治疗选项,将极大提高患者取得良好

治疗结果的可能性。本发明的方法提供了一种可行性方法以满足这些需求。

[0107] 生物标志物的绝对水平可用QDB分析来检测,还可用其他方法和QDB分析共同检测。在本发明一实施方式中,目标样品的绝对含量经由QDB分析得以验证。

[0108] 用于建立QDB数据库的生物标志物的绝对含量可用QDB分析来检测,或者可用QDB分析来验证。QDB数据库应作最广义的理解。QDB数据库包括至少一个目标样品且其具有经QDB方法予以检测或验证的一个生物标志物的绝对含量。

[0109] 生物标志物的绝对含量可采用两种以上的抗体来检测。这些抗体可针对前述生物标志物的相同的抗原决定簇或者针对不同的抗原决定簇。由这些抗体测定的生物标志物的绝对含量可能相同,也可能彼此不同。当上述绝对含量因使用不同抗体而彼此不同时,应该将它们与所用抗体一起标明,并且分别处理以满足诊断和预后的目的。

[0110] 在本发明一实施方式中,当使用两种以上的检测抗体来检测样品中生物标志物的绝对含量时,若这些抗体给出的诊断或预后相同,则诊断或预后被认为是有效的。若它们的诊断或预后不一致,则诊断或预后被认为是“模糊”的,需要进行进一步验证。

[0111] 只要经过验证对目标抗原是特异性的,用于抗原-抗体相互作用的任何抗体都可用于QDB分析。在本发明一实施方式中抗体是单克隆的,而在本发明另一实施方式中抗体是多克隆的。

[0112] 在本发明一实施方式中,用于免疫组织化学分析的抗体可用于对人或动物的组织或细胞进行QDB分析。

[0113] 在本发明一实施方式中,用于流式细胞术的抗体可用于对人或动物的组织或细胞进行QDB分析。

[0114] 在本发明另一实施方式中,基于抗原-抗体分析的抗体可用于对人或动物的组织或细胞进行QDB分析。

[0115] 在本发明一实施方式中,用于样品的生物标志物的QDB分析的抗体可用在某波长处可检测的荧光染料进行标记,而用于相同样品的另一种生物标志物的QDB分析的另一种抗体可用在其他波长处可检测的荧光染料进行标记。由此可同时对相同样品中的两种生物标志物进行分析。

[0116] 在本发明另一实施方式中,用于样品的生物标志物的QDB分析的抗体可用同位素进行标记,而用于相同样品的另一种生物标志物的QDB分析的另一种抗体可用其他同位素进行标记,由此可同时对相同样品中的两种生物标志物进行分析。在本发明另一实施方式中,用于样品的生物标志物的QDB分析的抗体可用一种方法、例如用辣根过氧化物酶(HRP)进行标记;而针对相同样品的另一种生物标志物的QDB分析的另一种抗体可用荧光染料进行标记,由此能够同时对相同样品中的两种生物标志物进行检测。

[0117] 这里所用的“标记酶”应作最广义的理解。标记酶可以是免疫检测测定中任何对抗体的修饰,以有助于抗体检测。例如,标记酶可以是但不限于,抗体用放射性同位素如碘化物125直接标记、或者诸如碱性磷酸酶或辣根过氧化物酶等标记酶标记、或者直接以荧光染料进行标记。对被标记的抗体的标记酶数量的检测是通过形成可检测的产物得以完成。该产物可以具有放射性或化学发光或产生荧光;或者可以是产生在可见光内或可见光之外具有特征的吸收或反射光谱的产物。当补体被用于检测结合的抗原-抗体复合物时,它可被上述方式中的任一种加以标记,或者通过特定的抗补体的抗体来加以检测。

[0118] 标记酶可以是,但不限于抗体间接被放射性同位素(如碘离子125)、或者被标记酶(如碱性磷酸酶或者辣根过氧化物酶)来标记。抗体可以但不限于,被间接地通过第二抗体进行标记,而第二抗体可以直接或间接地被放射性同位素(如碘离子125)或者标记酶(如碱性磷酸酶或辣根过氧化物酶)进行标记。在一种实施方式中,第二抗体被生物素标记,并间接地通过被辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase)标记的链霉亲和素分子进行标记。

[0119] 本文所用的“抗原”和“抗体”的定义也涵盖最广泛的范围。“抗原”可以是分子、细胞、病毒或颗粒。“抗原”可以指化合物、肽、蛋白质、RNA分子、DNA分子、细胞(在原位释放的蛋白质)或病毒颗粒(在原位释放的蛋白)、或者任何可导致宿主动物(包括人类)产生一种或多种抗体的分子。抗原也可以指由上述分子或分子某部分(moiety)中的任何两种或多种交联在一起的产物。抗原能够以纯合物的形式或者以混合物的形式存在。抗原能够以未修饰的形式或者以经修饰后的形式(例如,被化学物质修饰)存在。

[0120] 本文所用的“抗体”的定义也涵盖最广泛的范围。抗体是可同“抗原”结合的多肽。抗体包括但不限于传统的抗体、含有抗原结合位点的传统抗体的片段、含有抗原结合位点的重组抗体、同抗原结合的蛋白质、或者含有任何上述两种或多种交联在一起的产物。抗体可以纯化物或者以混合物的形式存在。抗体能够以未修饰的形式或者以经修饰后的形式(例如,被化学物质修饰)存在。

[0121] “实体瘤”应作最广泛的理解。实体瘤是指任何在细胞水平上相连而不作为单个细胞存在的肿瘤或非肿瘤的组织。它包括但不限于乳腺癌、前列腺癌、膀胱癌、胃癌、肾癌、皮肤黑素瘤、子宫颈癌、卵巢癌、头颈癌、脑癌、甲状腺癌、肺癌、肝癌、胰腺癌和结直肠癌。

[0122] 需要说明的是,在这里描述的示例性实例是当前优选的实施例,因此应该仅作为描述而不仅限于此。在每个实施例中的特征或侧重面通常应该被认为也包括了其他实施例中的其它类似特征或侧重面。

[0123] 更进一步说,所提及的实施例并不旨在表示以下实验包括了全部或仅可进行的实验。尽管我们力图确保所用数字(例如含量、温度等)的准确性,但依然难免一些实验误差和偏差。

[0124] 材料和方法

[0125] 受试者和人源细胞系

[0126] 冷冻组织和福尔马林固定石蜡包埋(formalin fixed paraffin-embedded:FFPE)切片连同其临床信息、包括免疫组化所属分类(0、1+、2+或3+)均从当地医院获得。部分样品也提供了FISH结果。MCF-7和BT-474细胞系购自中国科学院细胞库(中国上海)。利用这两株细胞系制备的裂解物被用做HER2阴性和阳性对照。

[0127] 一般试剂

[0128] 用于细胞培养的所有通用试剂均购自Thermo Fisher Scientifics(Waltham, MA, USA),包括细胞培养基和培养皿。蛋白酶抑制剂购自Sigma Aldrich公司(美国密苏里州圣路易斯市)。所有其他化学物质购自国药集团化学试剂有限公司(中国北京)。重组人HER2/ErbB2/CD340(676-1255)蛋白购自北京义翘神州科技有限公司(Sino Biological Inc.) (中国北京)。QDB板由中国烟台载通生物技术有限公司生产。

[0129] Ventana抗HER2/neu(4B5)兔单克隆一抗和抗人雌激素受体(克隆Sp1)购自Roche Diagnostics GmbH公司。兔抗HER2抗体(克隆EP3)和小鼠抗人Ki67(克隆MIB1)购自ZSGB-

BIO公司(中国北京)。HRP标记的驴抗兔IgG二抗购自Jackson Immunoresearch实验室(美国宾夕法尼亚州西格罗夫)。

[0130] 细胞和组织裂解液的制备

[0131] 冷冻组织:从组织活检切取约150mg组织,在加有蛋白酶抑制剂(2 μ g/ml亮抑酶肽,2 μ g/ml抑肽酶,1 μ g/ml胃酶抑素,2mM PMSF,2mM NaF)的300 μ l的裂解缓冲液(50mM HEPES,137mM NaCl,5mM EDTA,1mM MgCl₂,10mM Na₂P₂O₇,1% TritonX-100,10%甘油)中用手持式组织匀浆器处理30秒,然后以12000 \times g离心5分钟。收集上清液进行免疫印迹分析。总蛋白质浓度根据制造商的说明使用Pierce BCA蛋白质测定试剂盒进行检测。当准备MCF-7和BT-474细胞裂解液时,细胞在加有蛋白酶抑制剂的裂解缓冲液(lysis buffer)中用移液枪上下吹打50次。离心后收集上清液,并用BCA蛋白质测定试剂盒检测总蛋白含量。

[0132] 处理福尔马林固定石蜡包埋块

[0133] 收集两个15 μ m切片,脱石蜡后,在加有蛋白酶抑制剂(2 μ g/ml亮抑酶肽,2 μ g/ml抑肽酶,1 μ g/ml胃酶抑素,2mM PMSF,2mM NaF)的300 μ l的裂解缓冲液(50mM HEPES,137mM NaCl,5mM EDTA,1mM MgCl₂,10mM Na₂P₂O₇,1% TritonX-100,10% glycerol)中进行处理,然后在12000 \times g离心5分钟。收集上清液进行免疫印迹分析。总蛋白质浓度根据制造商的说明使用Pierce BCA蛋白质测定试剂盒进行检测。

[0134] 斑点印迹分析

[0135] 将纯化的her2蛋白按图示进行梯度稀释,并与从FFPE切片提取的总蛋白一起点在膜上。这些样品通过典型的斑点免疫印迹分析过程进行处理,直到使用Li-Cor公司的C-Digit Western印迹扫描仪捕获图像。用Li-Cor公司的ImageQuant软件将图像转换为数字,从而建立蛋白标准曲线以将来自患者的样品的图像转换为其绝对生物标志物含量。

[0136] QDB分析

[0137] 特异性抗体(针对Her2的EP3或4B5克隆,针对Ki67的MIB1克隆,针对雌激素受体(ER)的SP1)各自的线性范围是用来自几个分别对这些生物标志物呈阳性反应的患者的裂解物加以混合的混合液来确定的。首先混合等量的3到4个来自乳腺癌或胃癌组织的组织裂解液,将混合的裂解液从0~2 μ g进行梯度稀释以确定QDB分析的线性范围。对于作为商品购入的或者由公司内部自行表达并纯化的标准蛋白也按0~500pg的梯度稀释以用于确定QDB分析的线性范围。

[0138] 将样品按一式三份以2 μ l/单元加到QDB板上,并如现有技术中所述进行处理。在每孔中加入100 μ l第一抗体,在4°C下孵育过夜。再在室温下将驴抗兔或驴抗小鼠第二抗体与QDB板孵育4小时。先用TBST简单冲洗QDB板两次,再清洗5次,每次10分钟,然后将它们放入白色96孔板中3分钟,该白色96孔板预先加有100 μ l/孔根据制造商的说明书制备的ECL溶液。然后使用Tecan Infiniti 200 pro酶标仪,通过在用户界面上选择“带盖的板”来定量检测来自组合板的每个孔的化学发光信号。

[0139] 分别用梯度稀释的标准蛋白来建立线性回归公式。该公式被用于计算每个乳腺癌组织样品中的总HER2水平,并且通过BCA蛋白测定试剂盒检测的总蛋白量来校正结果。为了确保实验的一致性,制备于BT474和MCF7两种细胞的细胞裂解液分别在实验中被用作阳性对照。两种细胞裂解液被分装成小份。其绝对生物标志物水平先经QDB分析检测记录后作为常规样品而被包含在所有QDB实验中使用。化学发光读数少于2倍空白值的样品被

认为其含量低于检测范围,在数据分析中记为0。最终结果通过重组HER2蛋白的纯度百分比进行校正。

[0140] 统计分析

[0141] 对于统计显著性的常见测试包括了t检验、ANOVA、Kruskal-Wallis、Wilcoxon、Mann-Whitney和优势比等。单独或组合生物标志物提供了检测对象属于目的表型的相对可能性程度。因此,生物标志物含量可用作例如疾病、药物治疗效果等的标志物。因此生物标志物可以作为测试用分析物以便于提高诊断水平或类似用途。

[0142] 所有数据均以平均值±标准差(SD)表示。各组之间的差异通过Microsoft Excel的未配对双尾学生t检验来计算。取用P值<0.05作为统计学显著的标准。如图例中所示,使用GraphPad Prism软件版本7.0(美国GraphPad Software Inc.)进行受试者工作特性(ROC)曲线分析。

[0143] 实施例

[0144] 实施例1示出如何使用斑点印迹分析来检测FFPE样品中的Her2的绝对含量。

[0145] 在图1A中,将重组Her2蛋白进行梯度稀释并与从FFPE块提取的四位患者样品一起点在膜上。

[0146] 对膜上点样的标准蛋白和患者样品,在斑点印迹分析中使用抗Her2蛋白质的EP3克隆进行处理;并且,如图1A和1B所示,使用Li-Cor公司的C-Digit Western印迹扫描仪捕获图像。

[0147] 如图1C所示,用Li-Cor公司的ImageQuant软件将图1A中的图像转换为数字,并且利用这些数字建立蛋白标准曲线。

[0148] 来自四位患者样品的图像也使用相同的计算机软件转换成数字,这些数字利用基于在图1C中建立的蛋白标准曲线,被转换成Her2绝对含量。

[0149] 图2A~图2H示出如何使用特异性抗体来确立QDB分析的线性范围。图2A示出利用Her2-EP3抗体对冷冻乳腺癌组织进行QDB分析的线性范围;图2B示出使用Her2-EP3抗体对FFPE切片进行QDB分析的线性范围;图2C示出对重组Her2蛋白的进行QDB分析的线性范围;图2D示出使用MIB1抗体分析冷冻胃癌组织的QDB分析的线性范围;图2E示出使用抗Ki67的MIB1抗体对FFPE切片进行QDB分析的线性范围;图2F示出使用MIB1抗体对Ki67蛋白重组片段进行QDB分析的线性范围;图2G显示使用SP1抗体对雌激素受体(ER)蛋白重组片段进行QDB分析的线性范围;图2H示出使用SP1抗体对FFPE切片中ER的含量进行QDB分析的线性范围。

[0150] 图3A~图3D分别示出使用Her2-4B5、MIB1和SP2抗体检测的乳腺癌组织中Her2(A)、Ki67(B)和ER(C)的绝对含量。在图3D中,使用Her2-EP3抗体检测了冷冻胃癌组织中Her2的绝对含量。实验结果是三次独立实验且每个实验包括三个重复的结果的平均值,并根据IHC评分进行分组。

[0151] 图4A~图4D示出如何使用受试者工作特性(ROC)曲线分析将QDB结果转换为分类结果。来自QDB分析的结果根据其IHC结果被分为阴性组和阳性组,并用这两组数据来计算优化的特异性和敏感性的临界值。图4A和4B分别显示基于HER2-EP3和HER2-4B5抗体的QDB分析结果得到的ROC曲线。图4C和4D示出如何根据ROC分析计算的临界值将QDB结果分为阴性组和阳性组。

[0152] 在图5中,在完成对263个FFPE样品的Her2绝对含量的检测后,将这些数据基于组织学分级(histologic grade)来进行分组,其中该组织学分级是由当地医院根据诺丁汉组织学评分提供。其中,I级组有34例样品,II级组有125例样品,III级组有104例样品。三个级别的平均值分别为0.08、0.73和3.15nmole/g。III级组Her2水平明显高于I级组和II级组;II级组Her2绝对含量明显高于I级组。目前主流的IHC和FISH分类系统无法达到这一目的。

[0153] 本说明书中引用的所有出版物和专利都通过引用并入本说明书,如同每个单独的出版物或专利被明确且单独地标明为通过引用并入。并且这里通过引用并入揭示和描述本说明书中的方法和/或材料与所引用的出版物的联系。任何出版物的引用都是因为它们公开在提交日期之前,并且不应该被解释为承认本发明由于先前的发明而无权先于这种出版物。此外,所提供的出版日期可能与需要独立确认的实际出版日期不同。在通过引用结合于此的文件中阐述的术语的定义与本说明书中明确定义的术语的定义冲突的情况下,以本说明书所述的定义为准。

[0154] 以下声明特别指出了与公开的发明之一直接相关某些实施例或其组合是新的且非显而易见的。以特征、功能、元素和/或特性的其他组合或亚组合来具体表现的发明可以通过本申请权利要求书的修改或者在本申请或相关申请中提出的新权利要求来主张。无论这些修改或新的权利要求是针对不同的发明还是针对相同的发明,或者是与原始权利要求的范围不同、更宽、更窄或相等,也均被认为已包括在发明的主题内公开。

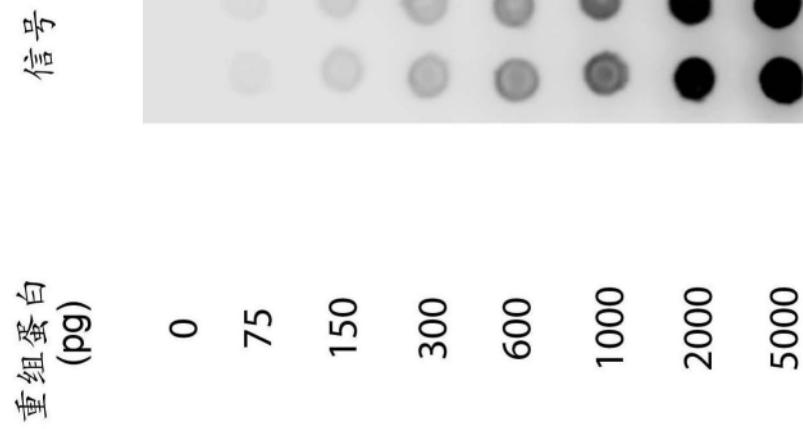


图1A

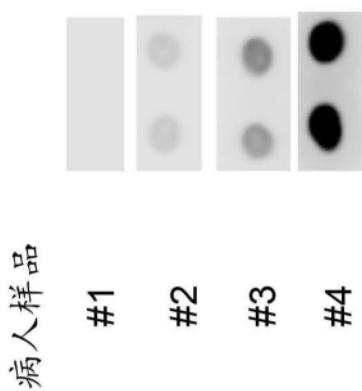


图1B

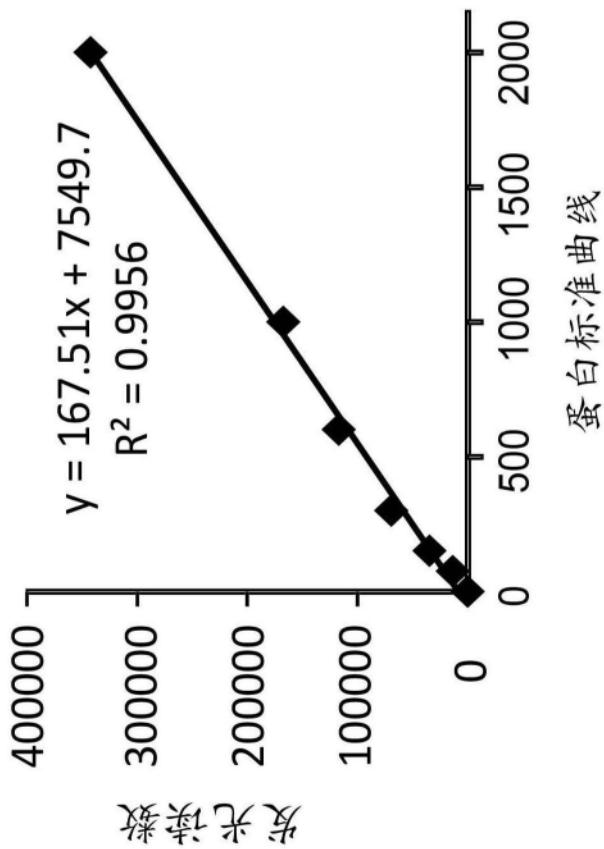
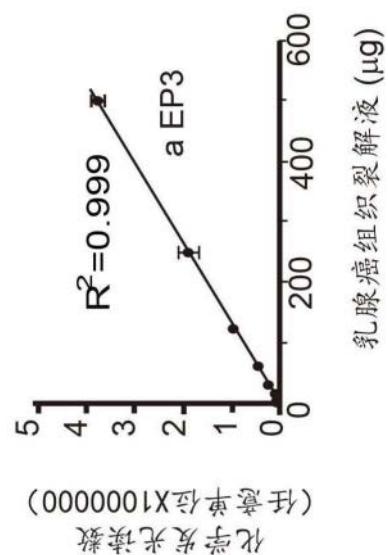
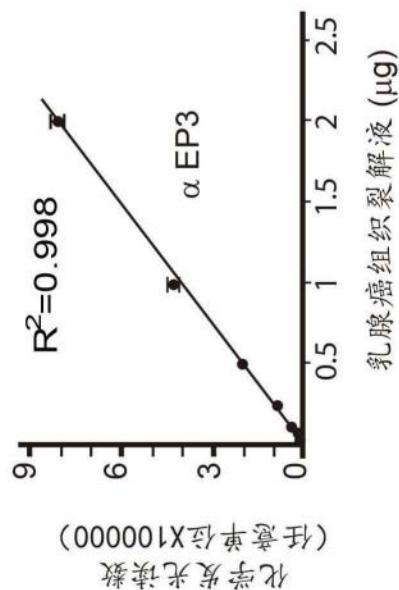


图1C

样品	蛋白含量
#1	0
#2	7.08 nmole/g
#3	0.92 nmole/g
#4	36.04 nmole/g

图1D



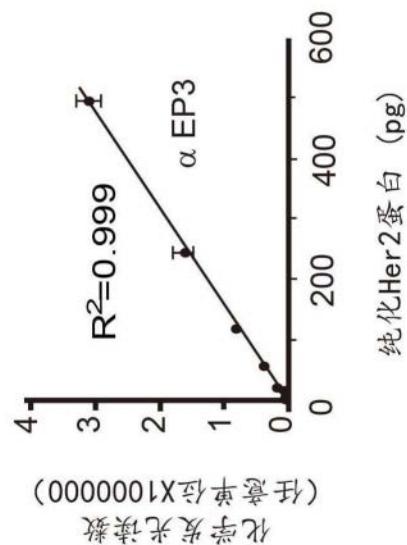


图2C

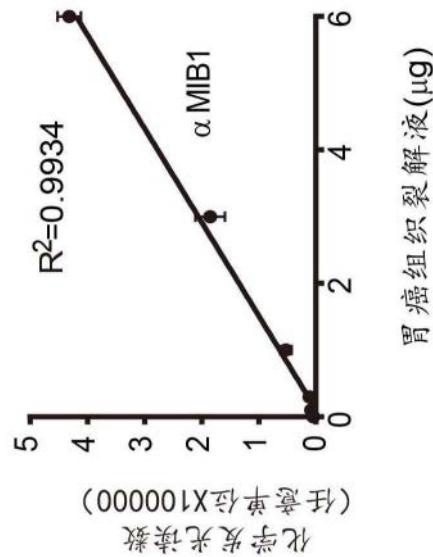
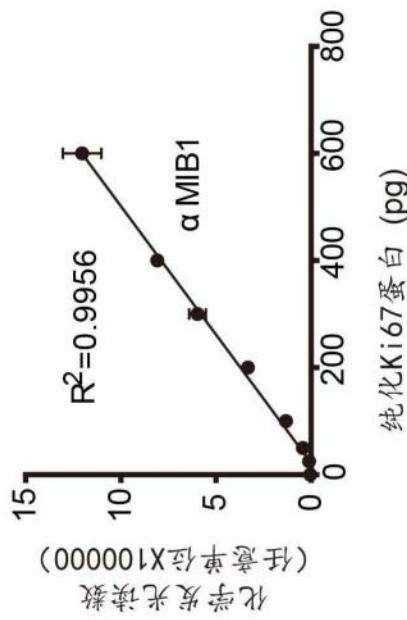
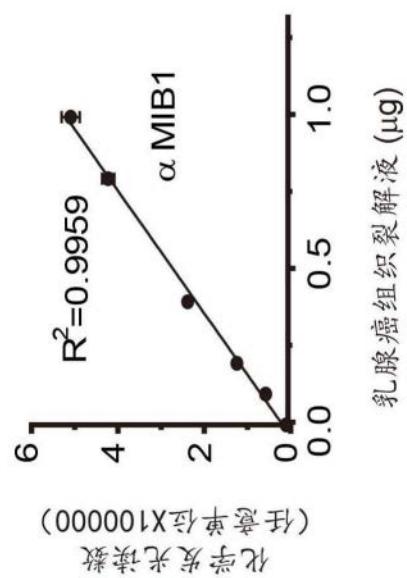
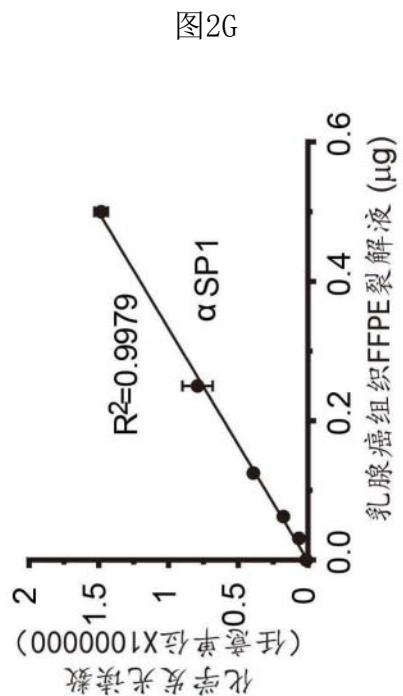
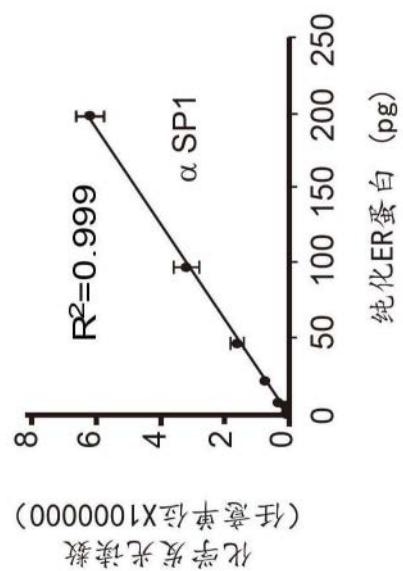


图2D





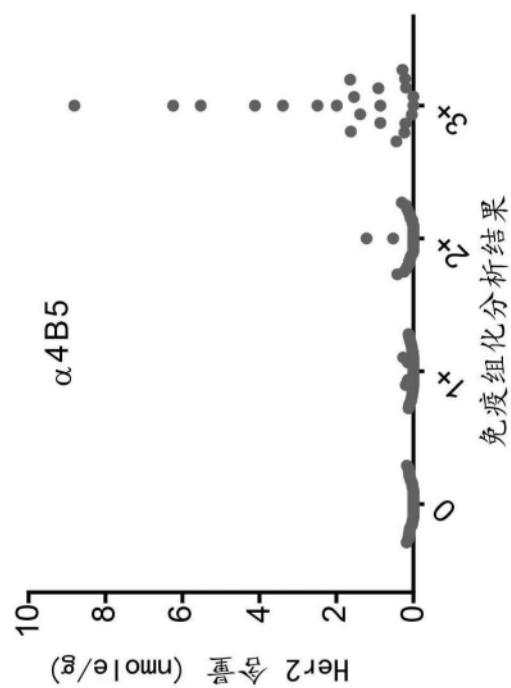


图3A

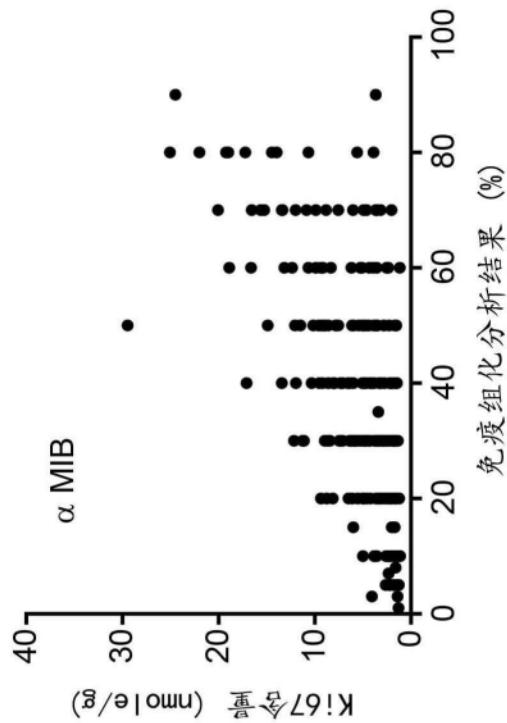


图3B

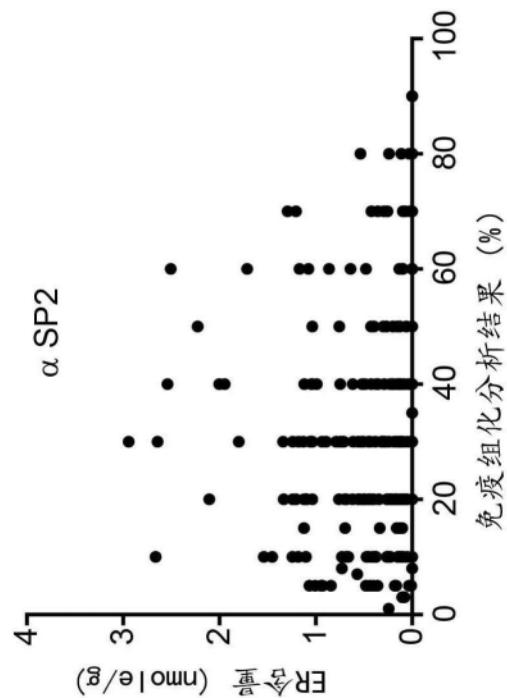


图3C

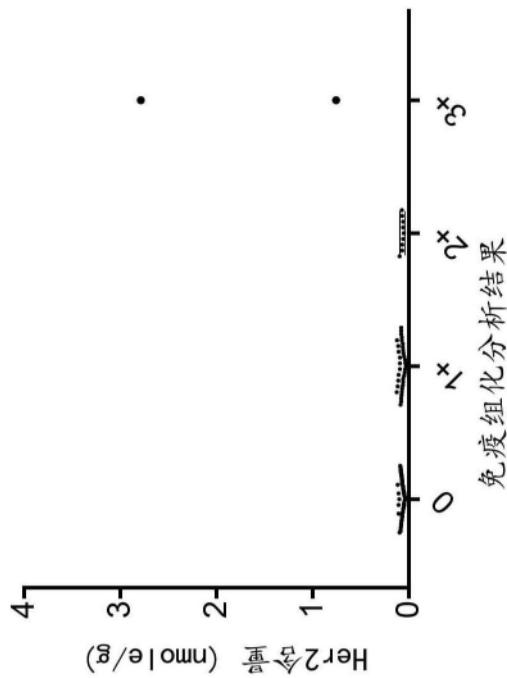


图3D

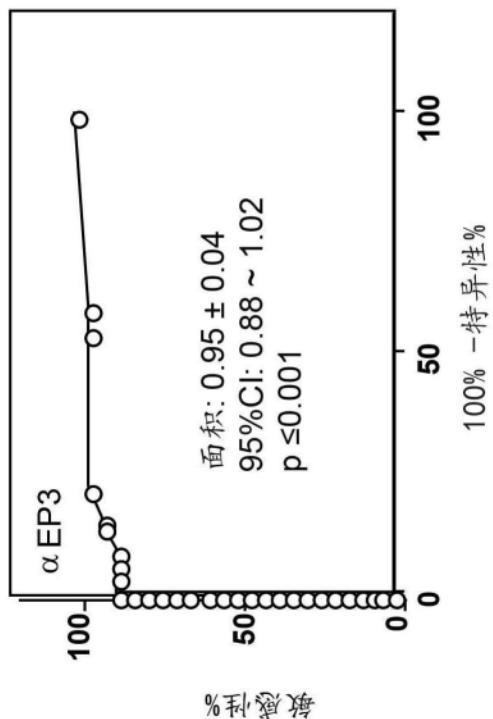


图4A

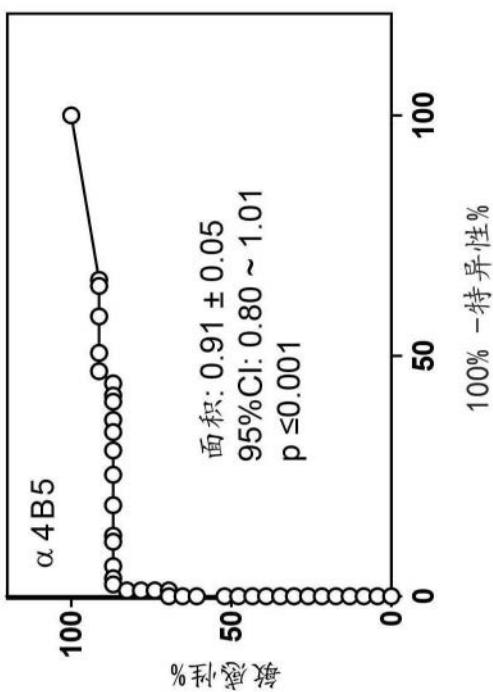


图4B

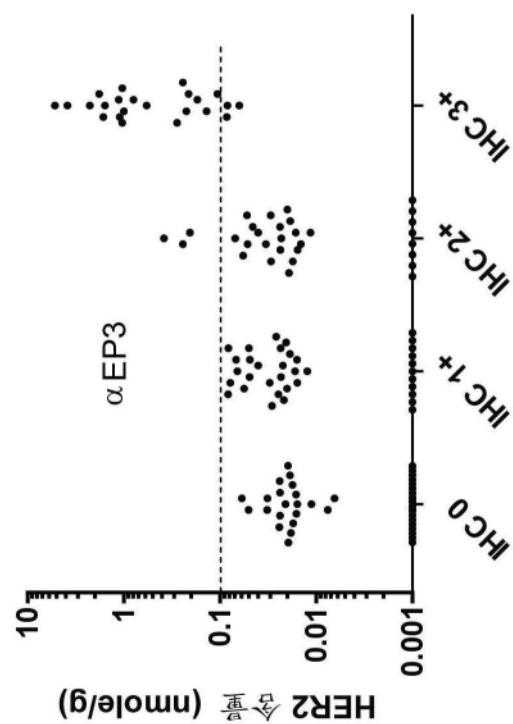


图4C

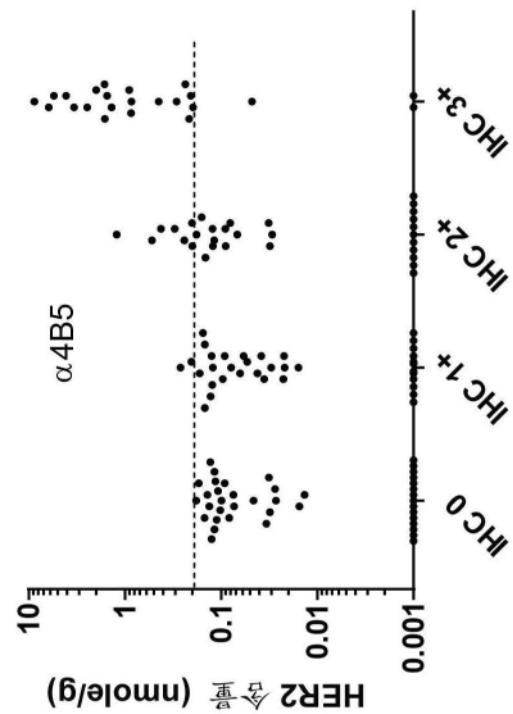


图4D

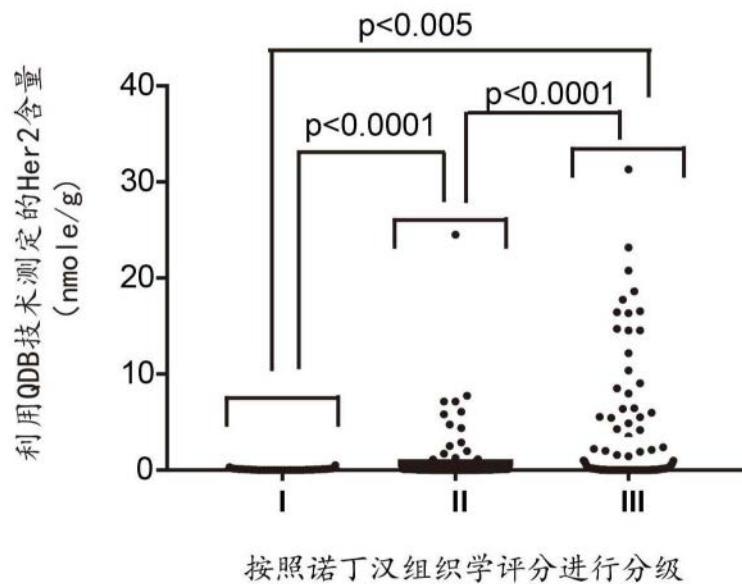


图5