



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101952723 B

(45) 授权公告日 2016.05.11

(21) 申请号 200880122385.1

(22) 申请日 2008.12.23

(30) 优先权数据
0725239.8 2007.12.24 GB
61/016,689 2007.12.26 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日
2010.06.22

(86) PCT国际申请的申请数据
PCT/GB2008/004260 2008.12.23

(87) PCT国际申请的公布数据
W02009/081165 EN 2009.07.02

(73) 专利权人 昂西免疫有限公司
地址 英国诺丁汉

(72) 发明人 约翰·福赛思·鲁塞尔·罗伯特森
安德烈亚·默里 卡罗琳·查普曼
安东尼·巴恩斯

(74) 专利代理机构 北京集佳知识产权代理有限公司 11227
代理人 顾晋伟 韩宏星

(51) Int. Cl.
G01N 33/536(2006.01)
G01N 33/564(2006.01)

US 2006141547 A1, 2006.06.29,
WO 2006126008 A2, 2006.11.30,
CN 101203756 A, 2008.06.18,
Hirasawa 等. Natural Autoantibody to MUC1 Is a Prognostic Indicator for Non-Small Cell Lung Cancer. 《American journal of respiratory and critical care medicine》. 2000, 第161卷(第2期),
Angelopoulou 等. Detection of the TP53 tumour suppressor gene product and p53 auto-antibodies in the ascites of women with ovarian cancer. 《European Journal of Cancer》. 1997, 第33卷(第1期),
Coomber 等. Characterisation and clinicopathological correlates of serum anti-p53 antibodies in breast and colon cancer. 《Journal of cancer research and clinical oncology》. 1996, 第122卷(第12期),

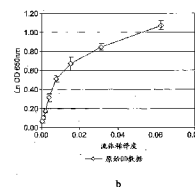
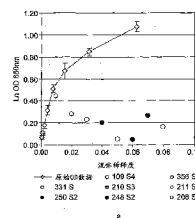
审查员 毕秀华

(56) 对比文件
WO 2004044590 A1, 2004.05.27,

权利要求书1页 说明书20页 附图43页

(54) 发明名称
免疫测定的校准品

(57) 摘要
包含哺乳动物体液的校准物质用于校准检测自身抗体之免疫测定的用途。



1. 校准用于检测自身抗体之免疫测定的方法,其包括:

(a) 使包含哺乳动物体液的多个不同稀释度的校准物质中每一个与自身抗体特异性的抗原接触,已知所述哺乳动物体液包含对肿瘤标志物蛋白具有免疫特异性的天然人自身抗体,其中所述抗原是重组肿瘤标志物抗原或者化学合成的肿瘤标志物抗原,并且其中所述校准物质不包含选自血清、全血和血浆的任何血液产品,并且所述校准物质中存在的自身抗体的量是未知的;

(b) 检测所述抗原与存在于所述校准物质中的自身抗体之间特异性结合的量;以及

(c) 针对步骤(a)中所用校准物质的每一个稀释度,绘制或计算所述特异性结合的量对所述校准物质之稀释度的曲线,从而校准使用所述抗原检测所述自身抗体的免疫测定。

2. 权利要求1的方法,其中所述校准物质包含人体液。

3. 权利要求1-2中任一项的方法,其中所述校准物质包含引流液、流出物或渗出物。

4. 权利要求1-2中任一项的方法,其中所述校准物质包含从一名或多名癌症对象收集的体液。

5. 权利要求1-2中任一项的方法,其中所述校准物质包含从其中存在肿瘤或曾经存在肿瘤或者与肿瘤相关或曾经与肿瘤相关的体腔或间隙收集的体液。

6. 权利要求5的方法,其中所述校准物质包含从一名或多名癌症对象收集的胸水。

7. 权利要求4的方法,其中所述校准物质包含从一名或多名癌症对象收集的腹水。

8. 权利要求1-2中任一项的方法,其中(a)部分中抗原的使用浓度大于20nM。

9. 权利要求8的方法,其中(a)部分中抗原的使用浓度范围为20nM至180nM。

10. 权利要求8的方法,其中(a)部分中抗原的使用浓度范围为50nM至160nM。

免疫测定的校准品

技术领域

[0001] 本发明一般地涉及免疫测定领域。更具体而言,本发明涉及校准物质用于校准自身抗体之免疫测定的用途。

背景技术

[0002] 日间差异是任何免疫测定中所固有的。此差异可由许多不同因素引起,包括环境条件、测量仪器或试剂的老化、试剂批次改变和生物变异。在长期研究中,当需要将一天的测试结果与不同天测量的另一结果相比较时,必需能根据此差异进行调整。对所述测定的校准使之成为可能并且还能够提醒操作者注意与仪器的输出或日间漂移有关的问题。

[0003] 一般地,校准被设计用于测量血清中抗原的免疫测定是相对直接的,因为重组或合成形式的抗原通常可制备并且容易定量。因此,可利用高度表征并明确定义的校准物质。

[0004] 就被设计用于测量患者试样中人自身抗体水平的测定而言,鉴别合适的校准物质受到所测量抗体之不同特异性和反应之多克隆性 (polyclonality) 的阻碍。本发明人已经研究了小鼠单克隆抗体用作自身抗体测定的校准品的用途。然而,这需要不同的报告系统用于检测人自身抗体,因此决不能保证所检测的差异是自身抗体测定中固有差异的真实代表。另外,所述单克隆抗体具有非常明确的特异性并且缺乏人多克隆反应所表现出的混杂性 (promiscuity)。这意味着可能不能检测出在捕获抗原结构中导致测定差异的微小改变。如果对人源化抗体进行改造以用作校准物质,这将采用与自身抗体测定相同的报告系统,但是将仍然表现出与其鼠单克隆抗体相同的单克隆性问题。

[0005] 因此,本发明人必须寻找能提供具有充足量并且还能被长期贮存的长期校准源的新校准物质源。

发明内容

[0006] 在第一个方面中,本发明涉及包含哺乳动物(尤其是人)体液的校准物质用于校准检测自身抗体之免疫测定的用途。

[0007] 在一个实施方案中,所述校准物质包含人体液。

[0008] 在一个实施方案中,所述校准物质不包含选自血清、全血和血浆的任何血液产品。

[0009] 在一个实施方案中,所述校准物质包含引流液、流出物 (exudate) 或渗出物 (transudate)。这种物质优选不包含选自血清、全血和血浆的任何血液产品。

[0010] 在一个实施方案中,所述校准物质包含从一名或多名癌症对象收集的体液。

[0011] 在另一个实施方案中,所述校准物质包含从其中存在肿瘤或曾经存在肿瘤或者与肿瘤相关或曾经与肿瘤相关的体腔或间隙收集的体液。

[0012] 在一个实施方案中,所述校准物质包含从其中存在肿瘤或曾经存在肿瘤或者与肿瘤相关或曾经与肿瘤相关的体腔或间隙收集的哺乳动物(尤其是人)体液。

[0013] 在某些非限定性实施方案中,所述校准物质可包含从一名或多名人癌症患者收集的胸水 (pleural fluid) 或腹水 (ascites fluid)。

[0014] 在一个实施方案中,所述校准物质包含对肿瘤标志物蛋白具有免疫特异性的天然人自身抗体,并且待校准的免疫测定是用于检测对肿瘤标志物蛋白具有免疫特异性的天然人自身抗体的免疫测定。

[0015] 在第二个方面中,本发明提供校准检测自身抗体之免疫测定的方法,其包括:

[0016] (a) 使包含哺乳动物体液的多个不同稀释度的校准物质中每一个与对免疫测定中待检测自身抗体具有特异性的抗原接触,其中已知所述体液包含对所述抗原具有免疫特异性的自身抗体;

[0017] (b) 检测所述抗原与存在于所述校准物质中的自身抗体之间特异性结合的量;以及

[0018] (c) 针对步骤(a)中所用校准物质的每一个稀释度,绘制或计算所述特异性结合的量对所述校准物质之稀释度的曲线,从而校准使用所述抗原检测所述自身抗体的免疫测定。

[0019] 在一个实施方案中,所述校准物质包含人体液。

[0020] 在一个实施方案中,所述校准物质不包含选自血清、全血和血浆的任何血液产品。

[0021] 在一个实施方案中,所述校准物质包含引流液、流出物或渗出物。这种物质优选不包含选自血清、全血和血浆的任何血液产品。

[0022] 在一个实施方案中,所述校准物质包含从一名或多名癌症对象收集的体液。

[0023] 在另一个实施方案中,所述校准物质包含从其中存在肿瘤或曾经存在肿瘤或者与肿瘤相关或曾经与肿瘤相关的体腔或间隙收集的体液。

[0024] 在一个实施方案中,所述校准物质包含从其中存在肿瘤或曾经存在肿瘤或者与肿瘤相关或曾经与肿瘤相关的体腔或间隙收集的哺乳动物(尤其是人)体液。

[0025] 在某些非限定性实施方案中,所述校准物质可包含从一名或多名人癌症患者收集的胸水或腹水。

[0026] 在一个实施方案中,所述校准物质包含肿瘤标志物蛋白免疫特异性的天然人自身抗体,并且待校准的免疫测定是用于检测肿瘤标志物蛋白免疫特异性的天然人自身抗体的免疫测定。

[0027] 因此,在一个具体的非限定性实施方案中,本发明提供校准检测抗肿瘤标志物自身抗体之免疫测定的方法,其包括:

[0028] (a) 使包含从一名或多名癌症患者分离的胸水或腹水的多个不同稀释度的校准物质中每一个与对抗肿瘤标志物自身抗体具有特异性的肿瘤标志物抗原接触,其中已知所述胸水或腹水包含对所述抗原具有免疫特异性的自身抗体;

[0029] (b) 检测所述抗原与存在于所述校准物质中的自身抗体之间特异性结合的量;以及

[0030] (c) 针对步骤(a)中所用校准物质的每一个稀释度,绘制或计算所述特异性结合的量对所述校准物质之稀释度的曲线,从而校准使用所述抗原检测所述自身抗体的免疫测定。

[0031] 在第三个方面中,本发明提供了用于校准检测自身抗体之免疫测定的校准标准品组合,其中所述组合中的各校准标准品包含不同稀释度的哺乳动物体液,已知所述哺乳动物体液包含天然人自身抗体。

- [0032] 如权利要求 22 中所要求保护的校准标准品组合,其中所述哺乳动物体液为人体液。
- [0033] 在一个实施方案中,所述哺乳动物体液不包含选自血清、全血和血浆的任何血液产品。
- [0034] 在一个实施方案中,所述哺乳动物体液是引流液、流出物或渗出物。
- [0035] 在一个实施方案中,所述哺乳动物体液是从一名或多名癌症患者收集的体液。
- [0036] 在另一个实施方案中,所述哺乳动物体液是从其中存在肿瘤或曾经存在肿瘤或者与肿瘤相关或曾经与肿瘤相关的体腔或间隙收集的体液。
- [0037] 在一个实施方案中,所述哺乳动物体液包含从一名或多名癌症对象(比如人癌症患者)收集的胸水。
- [0038] 在一个实施方案中,所述哺乳动物体液包含从一名或多名癌症对象(比如人癌症患者)收集的腹水。
- [0039] 本发明进一步提供用于检测自身抗体的免疫测定试剂盒,所述试剂盒包含根据本发明第三个方面的校准标准品组合以及含有对所述自身抗体具有免疫特异性的抗原的免疫测定试剂。

附图说明

- [0040] 图 1:来自晚期乳腺癌患者的胸水中人自身抗体的抗原特异性抑制作用。
- [0041] 图 2:通过 Western 印迹证明的胸水对重组癌症相关抗原的特异性。(a) p53 特异性的流体 B3280, (b) NY-ESO-1 特异性的流体 B1564, (c) 对 BGU4-5 和膜联蛋白 1 具有特异性的流体 PL-061, (d) 对 p53、CAGE 和 NY-ESO-1 具有特异性的流体 B3084。泳道 1 = 分子量标志物,泳道 2 = VOL,泳道 3 = p53,泳道 4 = c-myc,泳道 5 = CAGE,泳道 6 = NY-ESO-1,泳道 7 = BGU4-5,泳道 8 = IKBKE,泳道 9 = 膜联蛋白 1,泳道 10 = 膜联蛋白 2。
- [0042] 图 3:通过 Western 印迹证明的血清与重组蛋白中污染细菌蛋白的结合, (a)、(b)。泳道 1 = 分子量标志物,泳道 2 = 膜联蛋白 XIa,泳道 3 = BRCA2,泳道 4 = c-myc,泳道 5 = ECD6,泳道 6 = IKBKE,泳道 7 = NY-ESO-1,泳道 8 = p53,泳道 9 = PSA,泳道 10 = VOL。
- [0043] 图 4:该图描述患者流体稀释度对包被在板上的 NYESO 的滴定浓度 (nM) 的图。
- [0044] 图 5:利用引流液生成的校准曲线的重现性。所述曲线表示 10 次运行的平均值与以误差线表示的标准偏差所代表的测定间差异。显示了对 p53(a)、c-myc(b)、ECD6(c)、NYESO(d)、BRCA2(e)、PSA(f) 和膜联蛋白 XIa(g) 的反应性。
- [0045] 图 6:5 次运行中患者胸水合并液 C3/C4(a) 和患者胸水合并液 B3255/B3258(b) 对 160nM NYESO 的反应性,其中以流体稀释度的对数对 OD 对数进行绘图。通过减去与阴性对照抗原 VOL 之结合而获得的信号来校正非特异性结合的数据。
- [0046] 图 7:5 次运行中患者胸水合并液 B3255/B3258(a) 和患者胸水合并液 C3/C4(b) 对 160nM p53 的反应性,其中以流体稀释度的对数对光密度的对数进行绘图。通过减去与阴性对照抗原 VOL 之结合而获得的信号来校正非特异性结合的数据。
- [0047] 图 8:5 次运行中患者胸水合并液 B3255/B3258(a) 和患者胸水合并液 C3/C4(b) 对 160nM BRCA2 的反应性,其中以流体稀释度的对数对 OD 对数进行绘图。通过减去与阴性对照抗原 VOL 之结合而获得的信号来校正非特异性结合的数据。

[0048] 图 9 :5 次运行中患者胸水合并液 B3255/B3258(a) 和患者胸水合并液 C3/C4(b) 对 160nM c-myc 的反应性,其中以流体稀释度的对数对 OD 对数进行绘图。通过减去与阴性对照抗原 VOL 之结合而获得的信号来校正非特异性结合的数据。

[0049] 图 10 :5 次运行中患者胸水合并液 B3255/B3258(a) 和患者胸水合并液 C3/C4(b) 对 160nM PSA 的反应性,其中以流体稀释度的对数对 OD 对数进行绘图。通过减去与阴性对照抗原 VOL 之结合而获得的信号来校正非特异性结合的数据。

[0050] 图 11 :5 次运行中患者胸水合并液 B3258/B3255(a) 和患者胸水合并液 C3/C4(b) 对 160nM ECD6 的反应性,其中以流体稀释度的对数对 OD 对数进行绘图。通过减去与阴性对照抗原 VOL 之结合而获得的信号来校正非特异性结合的数据。

[0051] 图 12 :5 次运行中患者胸水合并液 B3255/B3258(a) 和患者胸水合并液 C3/C4(b) 对 160nM 膜联蛋白 XIa 的反应性,其中以流体稀释度的对数对 OD 对数进行绘图。通过减去与阴性对照抗原 VOL 之结合而获得的信号来校正非特异性结合的数据。

[0052] 图 13 :校准对对照样品之重现性的影响。在 5 次单独的运行中测量 8 个对照血清中针对 p53 的自身抗体。原始 OD 值显示在 (a) 中。同时运行校准曲线并将此用于外推对照样品的值 (b)。

[0053] 图 14 :校准对对照样品之重现性的影响。在 5 次单独的运行中测量 8 个对照血清中针对 c-myc 的自身抗体。原始 OD 值显示在 (a) 中。同时运行校准曲线并将此用于外推对照样品的值 (b)。

[0054] 图 15 :校准对对照样品之重现性的影响。在 5 次单独的运行中测量 8 个对照血清中针对 ECD6 的自身抗体。原始 OD 值显示在 (a) 中。同时运行校准曲线并将此用于外推对照样品的值 (b)。

[0055] 图 16 :校准对对照样品之重现性的影响。在 5 次单独的运行中测量 8 个对照血清中针对 NYESO 的自身抗体。原始 OD 值显示在 (a) 中。同时运行校准曲线并将此用于外推对照样品的值 (b)。

[0056] 图 17 :校准对对照样品之重现性的影响。在 5 次单独的运行中测量 8 个对照血清中针对 BRCA2 的自身抗体。原始 OD 值显示在 (a) 中。同时运行校准曲线并将此用于外推对照样品的值 (b)。

[0057] 图 18 :校准对对照样品之重现性的影响。在 5 次单独的运行中测量 8 个对照血清中针对 PSA 的自身抗体。原始 OD 值显示在 (a) 中。同时运行校准曲线并将此用于外推对照样品的值 (b)。

[0058] 图 19 :校准对对照样品之重现性的影响。在 5 次单独的运行中测量 8 个对照血清中针对膜联蛋白 XIa 的自身抗体。原始 OD 值显示在 (a) 中。同时运行校准曲线并将此用于外推对照样品的值 (b)。

[0059] 图 20 :血清和引流液用作自身抗体测定的潜在校准物质的比较。将胸水 C3(a) 与来自同一患者的血清样品 18176(b) 相比较。

[0060] 图 21 :血清和引流液用作自身抗体测定的潜在校准物质的比较。将胸水 C7(a) 与来自同一患者的血清样品 11828(b) 相比较。

[0061] 图 22 :具有最小化残差平方和的四参数对数校准品曲线。所述 4p1 图以光密度对校准品稀释度的对数构建。运行 1-12 的平均值以灰色实线表示,运行 13 和 14 的平均

值以黑色虚线表示。误差线代表平均值的标准偏差。针对 p53(a)、c-myc(b)、CAGE(c)、NY-ESO-1(d)、GBU4-5(e)、膜联蛋白 1(f) 和膜联蛋白 2(g) 的抗原特异性自身抗体测定。

[0062] 图 23 :校准对不同测定运行中进行的自身抗体测量值差异的影响。利用针对该运行的抗原特异性校准曲线来校正血清样品的结果。空心三角形=未校准的测量值,实心点=通过校准修正的测量值,虚线=校准值的平均值加上或减去 3 个标准偏差。

[0063] 图 24 :冷冻的校准品系列等份试样与新鲜稀释的校准品稀释系列的比较。使校准品胸水 C3 与 NYESO 抗原反应。每对新鲜和冷冻系列运行 10 次 (a)。平均值的对数 / 对数曲线示于 (b) 中,其中误差线表示标准偏差。

[0064] 图 25 :冷冻校准品系列等份试样与新鲜稀释的校准品稀释系列的比较。使校准品胸水 C7 与 c-myc 抗原反应。每对新鲜和冷冻系列运行 10 次 (a)。平均值的对数 / 对数曲线示于 (b) 中,其中误差线表示标准偏差。

[0065] 图 26 :冷冻的校准品系列等份试样与新鲜稀释的校准品稀释系列的比较。使校准品胸水 B3258 与 p53 抗原反应。每对新鲜和冷冻系列运行 10 次 (a)。平均值的对数 / 对数曲线示于 (b) 中,其中误差线表示标准偏差。

[0066] 图 27 :冷冻的校准品系列等份试样与新鲜稀释的校准品稀释系列的比较。使校准品胸水 B3258 与 PSA 抗原反应。每对新鲜和冷冻系列运行 10 次 (a)。平均值的对数 / 对数曲线示于 (b) 中,其中误差线表示标准偏差。

[0067] 图 28 :冷冻的校准品系列等份试样与新鲜稀释的校准品稀释系列的比较。使校准品胸水 B3258 与膜联蛋白抗原反应。每对新鲜和冷冻系列运行 10 次 (a)。平均值的对数 / 对数曲线示于 (b) 中,其中误差线表示标准偏差。

[0068] 图 29 :冷冻的校准品系列等份试样与新鲜稀释的校准品稀释系列的比较。使校准品胸水 B3255 与 BRCA2 抗原反应。每对新鲜和冷冻系列运行 10 次 (a)。平均值的对数 / 对数曲线示于 (b) 中,其中误差线表示标准偏差。

[0069] 图 30 :冷冻的校准品系列等份试样与新鲜稀释的校准品稀释系列的比较。使校准品胸水 C3 与 ECD6 抗原反应。每对新鲜和冷冻系列运行 10 次 (a)。平均值的对数 / 对数曲线示于 (b) 中,其中误差线表示标准偏差。

[0070] 图 31 :来自患有不同类型癌症之患者的流体中自身抗体与肿瘤相关抗原的反应性。

[0071] 图 32 :来自胰腺癌患者的胸水的系列稀释液与 160nM(a) 和 50nM(b) 阴性对照蛋白 VOL 的反应性。在不同的 5 天重复所述实验 5 次。

[0072] 图 33 :腹水 B2993 针对 160nM C-myc 的 4 次运行的结果,图 a 和 b 中均带有标准偏差误差线(图 a 描述该实验中所用对照血清的 OD 值)。

[0073] 图 34 :腹水 B3259 针对 160nM ECD6 的 4 次运行的结果,图 a 和 b 中均带有标准偏差误差线(图 a 描述该实验中所用对照血清的 OD 值)。

[0074] 图 35 :腹水 B2993 针对 160nM ECD6 的 4 次运行的结果,图 a 和 b 中均带有标准偏差误差线(图 a 描述该实验中所用对照血清的 OD 值)。

[0075] 发明详述

[0076] 本发明涉及包含哺乳动物(尤其是人)体液的校准物质用于校准检测自身抗体(尤其是人自身抗体)之免疫测定的用途。

[0077] 在一个实施方案中,本文所用的校准物质可包含人体液用作“天然人自身抗体”的来源,意指已经在人宿主中产生的自身抗体作为自然免疫过程的结果。为避免疑问,此校准物质不包含非人抗体或通过实验室技术外源性产生的任何人抗体或人源化抗体,例如来自培养的免疫细胞的单克隆抗体。

[0078] 所述校准物质可包含已知含有具有合适免疫特异性的自身抗体的任何人体液或其它哺乳动物体液,即所述校准品必须包含已知对免疫测定中待检测自身抗体呈阳性的哺乳动物(例如人)体液。在此方面,应当预先知道所述校准品流体含有这样的自身抗体,其表现出与期望利用免疫测定来检测的自身抗体可比较的免疫特异性。本发明的校准物质的优点在于其包含与在人血清中所发现的天然人自身抗体的免疫特异性基本上相同的天然人自身抗体,所述免疫特异性是针对在旨在校准的免疫测定中作为试剂使用的抗原的结合而言的。

[0079] 如所附实施例中举例说明的,可通过实施利用测试抗原的试验性测定预先确定给定的人体液样品中是否含有具有合适免疫特异性的自身抗体。在一个实施方案中,所述试验性测定可使用与旨在用在合适的免疫测定中使用的相同的抗原和检测方法。已表明含有对这种试验性测定中的测试抗原具有免疫特异性的自身抗体的体液适于用作所述随后的免疫测定使用相同测试抗原来检测自身抗体状态未知的患者测试样品中的相应自身抗体。在上下文中,“测试样品”可定义为来自待测试自身抗体存在的对象的样品,其中在测试样品之前,所述患者的所述自身抗体状态是未知的。

[0080] 通常不需要在使用之前测定校准物质中存在的自身抗体之量的准确滴度,尤其是当使用本发明的校准方法时,其利用多个稀释度的校准物质来提供校准标准品组合。不需要准确测定校准标准品组合中存在的自身抗体的绝对量,前提是所述校准标准品组涵盖了当在合适的免疫测定中测试抗体状态未知之患者测试样品时所预期会遇到的抗体滴度的正常范围。这可通过测试与典型的患者测试样品平行比较的稀释校准样品的范围来凭经验确定。

[0081] 所述校准物质可简单地由从人体分离得到之形式的人体液(例如“纯”胸水或腹水)组成,或者可在使用之前使所述体液与其它成分混合或用其它成分稀释来形成校准物质。典型地,在合适的缓冲液中配制一系列稀释度的流体来提供校准标准品组合。用于配制所述校准标准品的合适的稀释缓冲液包括例如PBS+0.5M NaCl+0.1%酪蛋白+0.1%吐温20的高盐缓冲液(在实施例中称为HSBT)或者含有1% BSA的PBS。因此,本发明涉及由本文所述类型的哺乳动物(例如人)体液与这些稀释缓冲液之一混合组成的校准物质的用途。特别有用的校准品由可从一名或多名人癌症患者获得的人胸水或人腹水与HSBT的混合物组成。或者,正常血清可用作校准品稀释液。还包括浓缩所述体液或(半)纯化所述抗体以及然后稀释此物质以提供校准标准品。可将其它成分加入到所述校准标准品中,例如以提高长期贮存的稳定性。

[0082] 在使用之前,可在合适稀释缓冲液中稀释的校准物质以等份试样分装并贮存。方便地,可将待稀释的校准物质等份试样冻存在 -20°C 或 -80°C 下并在使用前解冻。本发明人已表明胸水和腹水适于贮存在 -20°C 并可长期冻存而不损失自身抗体的反应性。在长期冻存之前预先稀释校准标准品并分成等份试样是方便的并且避免了重现性误差和多个冻融循环。

[0083] 在用于检测抗原的免疫测定领域中,将已知的阳性样品用作免疫测定的校准品是相当常规的做法。然而,当所述测定的靶标是抗体而不是抗原时,难于提供含有具有合适特异性之抗体的已知阳性样品的合适校准物质。本发明通过使用校准物质来解决此问题,所述校准物质含有预先已知包含具有合适特异性的抗体的体液。

[0084] 通常,优选不使用是“血液产品”(例如全血、血浆或血清)或含有“血液产品”的体液作为校准物质的基础。但是,所述校准物质可含有作为引流液、流出物或渗出物的体液,并且包括在疾病过程中产生的或者作为疾病结果的这些物质。在非限定性实施方案中,所述体液可选自胸水、腹水、水系腔液(hydrocoele)、伤口引流液、炎性或非炎性滑膜液、积液、乳头抽吸液、心包积液、胆汁、胰腺分泌物等。所述流体可从人对象或非人哺乳动物对象(包括例如狗和非人灵长类)获得。

[0085] 在某些实施方案中,所述校准物质可包含从其中存在肿瘤或曾经存在肿瘤或者与肿瘤相关或曾经与肿瘤相关的体腔或间隙分离出的体液。在此方面,术语“体腔或间隙”包括任何体腔或间隙,不论是天然腔或间隙或者作为疾病或医疗介入的结果而导致的间隙或腔(包括塌陷的(collapsed)或前腔(former cavity))。所述流体来源于其中存在肿瘤或曾经存在肿瘤或者与肿瘤相关或曾经与肿瘤相关的腔或间隙。优选地,所述“来源于体腔的体液”将是肿瘤诱导的体液,意指在疾病过程中例如响应于或作为肿瘤细胞存在的结果而产生的体液。在此方面,示例性“体腔”流体是腹水、胸水、积液、水系腔液和伤口引流液。

[0086] 为避免疑问,“来源于体腔或间隙的体液”不包括来源于体循环的血液产品,例如全血、血清或血浆。

[0087] 根据本发明,胸水和腹水是用于根据本发明用途的特别有用的校准物质来源,因为它们通常是大量获得的并且是作为治疗策略的一部分从患者中取出的。此流体(或者将会被丢弃)是有价值的校准物质来源。如上所述,本发明人已经证明了人“体腔”流体(例如胸水和腹水)是用于检测人血清中自身抗体的免疫测定的合适校准物质,因为这些流体含有可与人血清中存在的那些相比较的自身抗体,就与抗原结合的免疫特异性以及抗体同型两个方面而言。后者是重要的,因为其能将相同的检测系统用于所述校准物质中的自身抗体和患者血清测试样品中存在的具有相同抗原结合特异性的自身抗体。

[0088] 所述校准物质可包含从一名或多名癌症患者收集的体液,更具体是“体腔”流体,例如胸水或腹水。在上下文中,术语“癌症患者”包括之前诊断为患有癌症的个体,所述癌症包括但不限于结肠癌、卵巢癌、肺癌、肝癌、胰腺癌、食道癌、胃癌、肾癌、膀胱癌、子宫内膜癌、淋巴瘤和白血病或乳腺癌。所述流体可取自单个患者或者可将得自两名或更多名患者的流体合并在一起。可以是将两名或更多名患有相同类型或不同类型癌症、处于相同阶段或不同阶段的患者的流体样品合并一起。还包括将来自一名或更多名癌症患者的不同类型的体液合并在一起。

[0089] 由取自于患有特定类型癌症之癌症患者的体液所制得的校准物质可用于辅助诊断其它个体中相同类型癌症或不同类型癌症。如所附实施例中所举例说明的,肿瘤标志物蛋白特异性的天然人自身抗体存在于从结肠癌、卵巢癌、肺癌、肝癌、胰腺癌和乳腺癌患者取得的胸水中。一旦利用试验性测定确定存在具有所需免疫特异性的自身抗体,这些流体便可用于校准免疫测定以测试来自患有其它类型癌症之患者的测试样品中具有相同免疫学特异性的自身抗体,例如可用包含来自于患有结肠癌、卵巢癌、肺癌、肝癌或胰腺癌的患

者胸水（以及其它体腔液）的校准物质来校准乳腺癌血清中自身抗体的免疫测定。

[0090] 在一个实施方案中，从已诊断为癌症的患者制得的校准物质储备液可用于校准在晚些时候进行的免疫测定，以评价同一患者或不同患者的免疫状态，例如监测疾病进展和/或评价所述患者中抗癌治疗过程的功效。

[0091] 在使用中，本发明的校准物质可用于校准根据已知方法实施的检测自身抗体的免疫测定。典型地，所述免疫测定可采用直接、夹心或竞争性 ELISA 的形式，但是其它测定方法也在本发明的范围内。用于检测人抗肿瘤标志物自身抗体的免疫测定的一般特征描述于 WO 99/58978 和 WO2006/126008 中，其全部内容在此通过参考并入本文。本发明提供的校准物质可用于校准 WO 99/58978 和 WO 2006/126008 中所述的测定。

[0092] 本文所述的校准物质以及包含此校准物质的校准标准品组可用于校准任何类型的自身抗体的免疫测定，所述自身抗体起到疾病状态标志物或疾病易感性标志物的作用，其中所述疾病具有产生/诱导本文所述类型的体液（包括具有与作为疾病标志物的自身抗体可比较的免疫特异性的自身抗体）形成的可能。

[0093] 典型地与含有自身抗体的体液的产生相关的疾病的实例包括本文所列举的癌症类型。如上所述，从癌症患者获得的体液（尤其是“体腔液”例如胸水、腹水、水系腔水、积液、伤口引流液等）提供了含有肿瘤标志物特异性的自身抗体之阳性校准物质的有用来源。因此，所述校准物质可用于校准用于检测测试患者样品（例如自身抗体状态未知的患者血清样品）中癌症或早期肿瘤疾病的免疫测定。这样的测定（用于检测患者测试样品中抗肿瘤标志物自身抗体）可利用 WO 99/58978 和 WO 2006/126008 中所述的方法或其改进方法来实施。

[0094] 然而，应当理解的是，本发明不限于使用癌症来源的流体，实际上也不限于检测肿瘤标志物的自身抗体，尽管这是一个重要的实施方案。另一类与含有疾病特征性自身抗体的体液（除血清、全血或血浆之外）的产生相关的疾病为良性自身免疫疾病。因此，本发明涉及从患有良性自身免疫疾病的哺乳动物（例如人）对象获得的体液用作校准物质用于检测作为所述自身免疫疾病标志物的自身抗体的用途。这些自身免疫疾病的实例包括类风湿关节炎、系统红斑狼疮 (SLE)、原发性胆汁性肝硬化 (PBC)、自身免疫性甲状腺炎（如桥本甲状腺炎）、自身免疫性胃炎（如恶性贫血）、自身免疫性肾上腺炎（如阿狄森氏病）、自身免疫性甲状旁腺功能减低症、自身免疫性糖尿病（如 1 型糖尿病）或重症肌无力。

[0095] 在类风湿性关节炎的情形下，所述校准物质可包含与疾病进程相关的流出物或由与疾病进程相关的流出物组成，所述流出物典型地是关节积液，例如从 RA 患者的膝盖中分离出的炎性滑膜液。

[0096] 在系统红斑狼疮 (SLE) 的情形下，所述校准物质可包含从 SLE 患者获得的腹水或由从 SLE 患者获得的腹水组成（参见 Lacconi 等 . Internet Journal of Radiology, ISSN : 1528-8404）。在此方面，应当指出的是，不是所有的腹水（或实际上其它体腔液例如胸水）都与肿瘤存在相关。

[0097] 在胆汁性肝硬化的情形下，所述校准物质可包含从胆汁性肝硬化患者获得的腹水或由从胆汁性肝硬化患者获得的腹水组成。

[0098] 免疫测定（例如 ELISA、放射性免疫测定等）的一般特征是本领域中技术人员众所周知的（参见 Immunoassay, E. Diamandis 和 T. Christopoulos, Academic Press, Inc. ,

San Diego, CA, 1996, 其内容在此通过参考并入本文)。用于检测具有特定免疫特异性的自身抗体的免疫测定(例如与给定抗原具有免疫反应性的自身抗体, 比如肿瘤标志物蛋白)通常需要使用这样的试剂, 其含有在测试下表现出与所述抗体具有特异性免疫反应性的抗原。取决于所述测定的形式, 所述试剂可被固定在固体载体上。使待测试抗体之存在的测试样品与所述试剂接触, 并且如果具有所需的免疫特异性的抗体存在于所述测试样品中, 则它们将与所述试剂发生免疫反应以形成自身抗体-试剂复合物, 然后可检测或定量测量所述自身抗体-试剂复合物。典型地, 这些免疫测定通过使用用于检测所述测试样品中(自身)抗体的相同试剂进行平行测定来校准, 但是用一个或多个校准标准品替换所述测试样品, 所述校准标准品是已知含有具有合适免疫特异性的(自身)抗体的校准物质的样品。

[0099] 使用本发明校准物质的优选校准方法使用校准标准品组合, 通常是本发明校准物质的系列稀释液, 是针对一个或多个已知浓度的抗原进行测试的。在典型的“夹心”ELISA中, 对在测试下所述自身抗体具有特异性的抗原被固定到固体表面(例如标准微滴定测定板的孔或微珠表面)上, 并且使校准品样品(或待测试自身抗体之存在的测试样品)与所述固定抗原接触。存在于所述校准物质中具有所期望特异性的自身抗体将与所述固定抗原结合。然后可使用任何合适的方法来检测所结合的自身抗体/抗原复合物。

[0100] 因此, 本发明提供校准检测自身抗体之免疫测定的方法, 其包括:

[0101] (a) 使包含人或其它哺乳动物体液的多个不同稀释度的校准物质中每一个与对自身抗体具有(免疫)特异性的抗原接触, 其中已知所述人体液包含对所述抗原具有免疫特异性的自身抗体;

[0102] (b) 检测所述抗原与存在于所述校准物质中的自身抗体之间(免疫)特异性结合的量; 以及

[0103] (c) 针对步骤(a)中所用校准物质的每一个稀释度, 绘制或计算所述特异性结合的量对所述校准物质之稀释度的曲线, 从而校准使用所述抗原检测所述自身抗体的免疫测定。

[0104] 用于检测步骤(b)中的特异性结合的准确方法并不限于本发明。在一个实施方案中, 标记的抗人免疫球蛋白第二抗体特异性识别一类或多类人免疫球蛋白所共有的表位, 被用于检测自身抗体/抗原复合物。典型地, 所述第二抗体是抗IgG或抗IgM。所述第二抗体通常用可检测的标志物(典型地是酶标志物)例如过氧化物酶或碱性磷酸酶来标记, 通过添加所述酶的底物以产生可检测的产物来进行定量检测, 所述可检测的产物例如为有色产物、化学发光产物或荧光产物。可使用具有等同效果的本领域公知的其它类型的可检测标记物。

[0105] 就步骤(b)中获得的结合测量值而言, 对步骤(a)中所用的抗原浓度进行选择以得到宽的动态范围, 以提供用于宽范围的自身抗体测量的校准。这是一个尤其重要的关于用于检测抗肿瘤标志物自身抗体的免疫测定的考虑, 所述自身抗体定义为多克隆的, 并且在抗原/自身抗体结合强度以及所存在的自身抗体的绝对量方面表现出患者间的差异。所用抗原的浓度典型地大于20nM, 更尤其是在20nM-180nM之间, 或者在50nM-160nM之间。

[0106] 可能需要测试许多稀释度的校准物质来构建(c)部分中宽泛的校准曲线。典型地, 在所用的每个抗原浓度下, 将测试至少6个单一稀释度的校准物质, 但是此数字不旨在限于此。

[0107] 本文所述的校准物质的优选用途是用作检测对人肿瘤标志物具有免疫特异性的天然人自身抗体之免疫测定的校准品,这些自身抗体典型地与癌症相关。

[0108] 发现患者中癌症的形成和发展通常与患者体液中标志物的存在相关,这些“肿瘤标志物”反映了癌症生物学的不同方面(参见 Fateh-Maghadam, A. & Steilber, P. (1993) *Sensible use of tumour markers*. 由 Verlag GMBH 出版, ISBN 3-926725-07-9; Harris 等, *J Clin Oncol.*, 25 :5287-5312, 2007; Voorzanger-Rousselot 和 Garnerro, *Cancer Treatment Reviews*, 31 :230-283, 2007)。发现肿瘤标志物常常是由“正常”细胞表达的野生型蛋白质的改变形式,在此情形下,这种改变可以是原始氨基酸序列的改变,二级、三级或四级结构的改变或翻译后修饰的改变,例如异常糖基化。此外,在肿瘤细胞中被上调或过度表达(可能是基因扩增或异常转录调节的结果)的野生型蛋白也可以是肿瘤标志物。

[0109] 在一些情形下,由“正常”细胞表达的野生型蛋白和相应的肿瘤标志物蛋白之间的差异可导致所述肿瘤标志物蛋白被个体的免疫系统识别为“异己”并因此在所述个体中诱发免疫反应。这可以是体液(即 B 细胞介导的)免疫反应,导致产生对所述肿瘤标志物蛋白具有免疫特异性的自身抗体。自身抗体是针对被个体的免疫系统识别为外源物之抗原(甚至在抗原实际上来源于所述个体的情形下也是如此)的天然抗体。它们可作为循环的游离自身抗体或以循环的免疫复合物形式存在于循环中,所述免疫复合物由与其靶标肿瘤标志物蛋白结合的自身抗体组成。

[0110] 术语“癌症相关”抗肿瘤标志物自身抗体指这样的自身抗体,其是癌症疾病状态的特征并且针对存在于优先在癌症疾病状态下表达的肿瘤标志物蛋白形式上的表位。

[0111] 典型地,用于检测抗肿瘤标志物自身抗体的肿瘤标志物抗原包含重组肿瘤标志物蛋白(在细菌、昆虫、酵母或哺乳动物细胞中表达)或者化学合成的肿瘤标志物抗原,其可基本上包含全部的肿瘤标志物蛋白或其片段,例如短肽抗原。用作检测抗肿瘤自身抗体的免疫测定试剂的基础的肿瘤相关蛋白的其它可能来源包括培养的肿瘤细胞(以及供其生长所用的耗尽培养基(spent media))、肿瘤组织以及来自肿瘤个体的血清,或来自一名或多名癌症患者的其它体液(如 W/02004/044590 中所述)。

[0112] 本文所述的校准物质可用于校准用于检测针对不同肿瘤标志物的许多抗肿瘤标志物自身抗体的免疫测定,而不管这些测定中所用的抗原的性质如何。用于本发明中的校准物质(尤其是包含来自一名或多名癌症患者的胸水或腹水的校准物质)的一个关键特征在于它包含在抗原结合特异性方面非常类似于存在于癌症患者测试样品(例如癌症患者血清)中的自身抗体。所述校准物质可以与重组肿瘤标志物抗原、合成的肽肿瘤标志物抗原或纯化的肿瘤标志物天然抗原一起使用。

[0113] 本发明不旨在限于有关免疫测定的靶标方面,即不陷于旨在检测的靶标自身抗体的特异性方面。本文所述的校准物质可用于校准存在于所述校准物质本身中的任何自身抗体的免疫测定。单一的校准物质可含有大量的具有不同免疫特异性的不同自身抗体,因此相同的物质可用于校准大量的不同测定。例如,在现有的实施例中已经表明人胸水样品包含针对大量肿瘤标志物的自身抗体,包括 p53、c-myc、ECD-6(HER2/neu 胞外片段)、NY-ES01、BRCA2、PSA 以及膜联蛋白 X1-A。

[0114] 在最后一个方面,本发明提供这样的校准物质,其可用于将结合到固体表面(例如微滴定板的孔)上的标签蛋白的量进行定量,因为所述校准物质中存在对所述“标签”蛋

白的多肽标签成分（例如组氨酸标签或生物素标签）具有免疫特异性的天然自身抗体。本发明人观察到从癌症患者分离的某些胸水样品包含对连接到重组肿瘤标志物抗原上的组氨酸标签和 / 或生物素标签具有免疫特异性的抗体。因此, 这些胸水可用于提供用于具有组氨酸标签和 / 或生物素标签之重组蛋白的通用定量 ELISA, 其利用对所述标签具有特异性的天然人抗体以及标记的抗人第二抗体。该方法具有某些优点, 在抗肿瘤标志物自身抗体的免疫测定的情形下优于使用鼠单克隆抗体来定量与固体载体结合的标签抗原, 因为它使用与测量对所述肿瘤标志物抗原本身具有特异性的天然人自身抗体所用的报告系统相同的报告系统。因此, 可使用含有针对所述抗原的组氨酸标签或生物素标签部分的天然自身抗体的校准物质, 在一个测定板中运行测定以定量结合到所述板上的重组肿瘤标志物抗原, 并且平行运行用于相同标签重组抗原与天然抗肿瘤标志物自身抗体之结合的校准标准品组合, 并且就两个测定而言使用相同的报告系统。

[0115] 因此, 在又一个方面中, 本发明提供定量与固体表面结合的蛋白质之量的方法, 其中所述蛋白质包含标签, 所述方法包括: 使所述待检测所述蛋白质之存在的固体表面与含有人体液的试剂物质接触, 其中已知所述流体包含对所述标签具有免疫特异性的天然人抗体, 以及测量所述天然人抗体与所述标签之间的特异性结合的量, 从而对所述表面上存在的所述蛋白质进行定量。

[0116] 在上下文中, 术语“标签”指蛋白质上的化学部分, 其连接到不存在于任何天然表达形式的蛋白质中。所述标签可以是多肽, 在这种情况下, 所述标签由不与任何天然表达形式的蛋白质的氨基酸序列连接的氨基酸序列组成。

[0117] 固体表面上待定量的蛋白质典型地是重组表达蛋白。通常连接到重组表达蛋白上的标签的实例包括生物素标签和组氨酸标签。如所附实施例中举例说明的, 大约 10% 的人群含有对生物素具有免疫特异性的天然人抗体。也可在正常人群中鉴定出含有对组氨酸标签具有特异性的天然抗体的人个体。

[0118] 应当理解的是, 对根据本发明获得的校准曲线数据的统计分析和数学分析可包括但不限于四参数对数图。

[0119] 参照下述实验实施例进一步理解本发明。

[0120] 本文具体参考的所有科技出版物和专利公开物的全部内容在此通过引用并入本文。

[0121] 材料和方法

[0122] 校准物质的配制

[0123] 利用标准方法在知情同意情形下从癌症患者收集胸水和腹水。典型地, 在局部麻醉下向胸腔或腹腔插入引流管来收集流体。所述引流管可以插有或不插有影像引导控制 (image-guided control) (例如超声), 这取决于当地政策和临床治疗医师的实践。

[0124] i) 应当以标准的胸水 (pleural effusion) 引流方式将胸水收集到无菌胸腔引流容器中。

[0125] ii) 应当以标准的腹水 (ascite) 引流方式通过腹腔引流管将腹水收集到无菌引流袋中。

[0126] 不需要向所述袋 / 容器内添加化学品而将所述流体引流至所述袋 / 容器内。

[0127] 应当在所述袋 / 容器被装满时收集它们或以日为基础收集, 以较快者为准。

[0128] 在 II 级 Hood 中,使用 25ml 吸液管将 1 升流体转移至 20 支 50 毫升无菌管中并在 400g 离心 5 分钟。

[0129] 将上清倒入 2 支 500 毫升无菌组织培养瓶中并加入叠氮化钠至 0.01% (1 μ l 10% 储备液加至 1ml 上清中)。加入抑肽酶 (蛋白酶抑制剂) 至 1 μ g/ml (1 μ l 在 PBS 中的 10mg/ml 抑肽酶储备液加至 10ml 上清中)。然后将上清倒入非无菌的 50 毫升管中并贮存在 -20°C。

[0130] 试剂清单:

[0131] 叠氮化钠储备液,贮存在室温下,

[0132] 抑肽酶 = Calbiochem 616370

[0133] 抑肽酶储备液,以 50 μ l 等份试样贮存在 -20°C,

[0134] PBS = 磷酸盐缓冲液。

[0135] 自身抗体的标准免疫测定

[0136] 本文使用重组肿瘤标志物抗原举例说明一般的免疫测定法,但是,应当认识到相同的测定方案也可适用于其它 (自身) 抗原。

[0137] 以类似于 W099/58978 中所述的方法通过重组表达来制备肿瘤标志物抗原样品。

[0138] 简而言之,将编码目的标志物抗原的 cDNA 克隆到 pET21 载体 (Invitrogen) 中,所述载体已被修饰来编码生物素标签和 6x 组氨酸标签以有助于所表达蛋白的纯化。将所得克隆物在合适的细菌宿主细胞 (包涵体) 中培养,所述细菌裂解并变性,通过镍螯合物亲和柱 (Hi-trap, 可从 Amersham 商购,按照生产商方法) 重新获得所表达的抗原。通过在合适的缓冲液中透析使所表达的抗原复性,通过 SDS-PAGE、Western 印迹和 ELISA 来评价所表达蛋白的产率,并在贮存前定量。

[0139] 阴性对照 VOL 为空载体 (即未克隆的 cDNA),其仍然包含所述组氨酸标签序列和生物素标签序列。

[0140] 多种标志物 cDNA 的 GenBank 登记号如下:

[0141] P53 :B003596

[0142] c-myc :V00568

[0143] ECD6 (HER2) 细胞外结构域 :M11730

[0144] NY-ESO :NM_001327

[0145] BRCA2 :U43746

[0146] BRCA1 δ 9-10 :NM_007302

[0147] 膜联蛋白 X1-A :NM_145868

[0148] PSA :NM_001648

[0149] CAGE :NM_182699XM_291343

[0150] GBU4-5 :NM_001110822 XM_001713629 XM_001713630XM_001713631

[0151] 膜联蛋白 1 :NM_000700

[0152] 膜联蛋白 2 :NM_004039

[0153] 1. 将抗原和 VOL (阴性对照) 在 0.1M 碳酸盐缓冲液中稀释至合适浓度。利用多通道电子移液器根据板布置将抗原稀释液以 50 μ l/孔分散在 Falcon 微滴定板的数列中,覆盖板并在 4°C 下贮存 48 小时。

- [0154] 2. 利用板自动清洗机在 PBS+0.1% Tween 20 中清洗板 1 次,然后用纸巾吸干。
- [0155] 3. 用高盐孵育缓冲液 (HSBT, PBS+0.5M NaCl+0.1% 酪蛋白 +0.1% Tween™ 20) 以 200 μ l/ 孔封闭板 1 小时或直到使用 (在 4℃ 覆盖贮存)。
- [0156] 4. 适当时,在室温下于 HSBT 中稀释患者体液和校准物质的测试样品。
- [0157] 5. 将板倒空并在纸巾上吸干。利用多通道电子移液器将每个稀释的测试样品 (或校准物质) 以 50 μ l/ 孔分散在微滴定板的所有孔中。覆盖板并在室温下孵育 1.5 小时,同时摇动。
- [0158] 6. 清洗步骤:利用板自动清洗机在 PBS+0.1% Tween 20 中清洗板 3 次,然后用纸巾吸干。
- [0159] 7. 将缀合至兔抗人 IgG 和 IgM (Jackson, 1/10000, 在 HSBT 中) 或兔抗人 IgG (Dako, 1/5000, 在 HSBT 中) 上的辣根过氧化物酶以 50 μ l/ 孔分散在微滴定板的所有孔中。HRP- 缀合的兔抗小鼠 Ig (1/1000, 在 HSBT 中) 用于利用小鼠单克隆抗体的测定。然后在室温下孵育板 1 小时,同时摇动。
- [0160] 8. 如步骤 6 所示清洗板。
- [0161] 9. 以 50 μ l/ 孔添加预先配制的 TMB 底物,并在 bench 上孵育板 1 分钟。轻轻敲击板以进行混合。
- [0162] 10. 利用标准读板法于 650nm 处测定孔的光密度。

[0163] 实施例 1 (对比):单克隆抗体用作校准品

[0164] 研究了单克隆抗体用作自身抗体测定中的可能的校准物质 (数据未显示)。尽管可产生可重现的稀释反应,但是这些反应不可用作校准品曲线。认为这是无效的校准系统,因为所述单克隆抗体是鼠源的,因此需要使用不同的第二抗体报告系统来检测血清中的人自身抗体。因此,利用此方法,利用两种不同的测量系统才有效,并且不能通过所述小鼠单克隆系统来检测或校准由于所述第二抗系统引起的日间差异。此外,所述单克隆反应特异性如此之高以至于其不能有效模拟人自身抗体所表现出的多克隆反应。这可解释为什么单克隆抗体不能用作良性自身免疫疾病 (比如系统红斑狼疮和类风湿性关节炎) 中的校准物质。

[0165] 由于已经看低了单克隆抗体用作校准物质的可能性,出于上述原因,本发明人选择研究人胸水和腹水用作可能的校准物质来源。

[0166] 实施例 2:人流体中自身抗体的抗原特异性的证明

[0167] 在标准自身抗体测定中以 1 : 100 稀释度 (在 HSBT 中) 对患者流体进行筛选以确定含有针对所选抗原的自身抗体的那些流体 (表 1)。图 1a 和 1b 显示对两种不同胸水中自身抗体与两种不同抗原之结合的抑制作用的实施例,是通过将所述胸水与所述抗原在溶液中一起预孵育来实施的。因此,本发明人表明所选的抗原能测量对特定肿瘤相关抗原具有特异性的自身抗体。

[0168] 作为胸水中自身抗体的肿瘤相关抗原特异性的另一证实,对用作自身抗体测定中捕获剂的重组抗原进行 Western 印迹。这些 Western 印迹是根据文献中所述的标准方法进行的,并用被选择用作校准品的胸水进行检测。结果可见于图 2,其中每一流体的特定抗原特异性是通过对应于抗原抗体结合的校正大小 (correct size) 的强条带所表明的,所述抗原很少或不具有与污染物质条带结合的迹象。在图 3 中,使用血清来检测相似的 Western 印

迹,在此情形下,可观察到与存在于所有重组抗原中的细菌污染物的强结合。本发明人已经观察到所测试的 7/67(90%) 血清样品含有针对细菌蛋白质的抗体,然而,在通过 Western 印迹筛选的 54 个胸水中,仅 4 个(7%) 显示出这种结合的任何迹象。

[0169] 不管患者患有转移性癌症这一事实,因此,推测所述癌症已经存在了一段时间,一些流体样品已经显示具有针对少数抗原的自身抗体(表 1)。

[0170]

	每一校准品组中的流体数						
	P53	C-myc	ECD6	NYESO	BRCA2	PSA	膜联蛋白 XIa
低	61	53	62	59	61	21	26
中	1	9	1	1	2	5	3
高	3	3	2	5	2	5	2

[0171] 表 1:对胸水中针对 7 种不同肿瘤相关抗原的自身抗体的筛选。将所测量的自身抗体的水平任意指定为低、中或高。

[0172] 在良性自身免疫疾病中,就每种特定的疾病而言,自身抗原通常更有限得多。在此方面,本发明人所报道的有关癌症患者中体液的数据是不同的。不同癌症患者中不同自身抗体的存在使得开发针对多个自身抗体测试的全面校准系统远更具有挑战性并且复杂得多。对这些流体进行筛选之后,进一步研究了最可能用作测定之校准品的对抗原呈阳性的那些流体。

[0173] 实施例 3:抗原和 VOL 滴定以及流体滴定

[0174] 最初利用双滴定系统研究了患者流体用作校准系统的可能性,其中利用抗原滴定液和 VOL 滴定液包被测定板(参见表 2a)。使抗原和 VOL 吸附到板上最少 48 小时,此后,清洗所述板并用含有酪蛋白(0.1% w/v)、NaCl(0.5M) 和 Tween20(0.1% w/v) 的 PBS 将板封闭。在封闭孵育过程中,在管中配制一系列患者流体校准品滴定液(在 HSBT 中)。除去所述封闭缓冲液之后,将这些滴定液添加到空板中(如表 2b 所示)并孵育 90 分钟。如材料和方法中所述进行其余的测定。

[0175]

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0.5nM A	1.6nM A	5nM A	16nM A	50nM A	160nM A	0.5nM V	1.6nM A	5nM A	16nM A	50nM A	160nM A
B	0.5nM V	1.6nM V	5nM V	16nM V	50nM V	160nM V	0.5nM V	1.6nM V	5nM V	16nM V	50nM V	160nM V
C	0.5nM A	1.6nM A	5nM A	16nM A	50nM A	160nM A	0.5nM A	1.6nM A	5nM A	16nM A	50nM A	160nM A
D	0.5nM V	1.6nM V	5nM V	16nM V	50nM V	160nM V	0.5nM V	1.6nM V	5nM V	16nM V	50nM V	160nM V
E	0.5nM A	1.6nM A	5nM A	16nM A	50nM A	160nM A	0.5nM A	1.6nM A	5nM A	16nM A	50nM A	160nM A
F	0.5nM V	1.6nM V	5nM V	16nM V	50nM V	160nM V	0.5nM V	1.6nM V	5nM V	16nM V	50nM V	160nM V
G	0.5nM A	1.6nM A	5nM A	16nM A	50nM A	160nM A	0.5nM A	1.6nM A	5nM A	16nM A	50nM A	160nM A
H	0.5nM V	1.6nM V	5nM V	16nM V	50nM V	160nM V	0.5nM V	1.6nM V	5nM V	16nM V	50nM V	160nM V
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	流体校准品 1: 32 稀释液						流体校准品 1: 2 稀释液					
B	流体校准品 1: 64 稀释液						流体校准品 1: 4 稀释液					
C	流体校准品 1: 128 稀释液						流体校准品 1: 8 稀释液					
D	0 流体校准品						流体校准品 1: 16 稀释液					

[0176] 表 2:校准方法 2 中的板和测定排列,其中流体和抗原均滴定在板中。其中 A 是抗原, V 是 VOL(阴性对照蛋白)。

[0177] 通过分析此方法的数据,得出大量数据,不是所有的数据均适用于校准系统的功能。图 4 是利用胸水作为校准物质通过此测定模式生成的结果的实例。

[0178] 利用此方法,证明了患者的流体可在不同的流体和 / 或抗原稀释度下生成有效的

滴定曲线。此方法得到大量数据,但是似乎不能优化这种流体用作测定校准品的用途。如图 5 中明确证实的,流体与低浓度抗原的结合不能用于校准,因为信号弱并且动态范围窄。然而,在高的固定浓度的抗原(比如 160nM 和 50nM)下,由患者流体与抗原结合产生的 OD 值的动态范围宽,得到宽范围的自身抗体测量的校准范围。

[0179] 此结果得出校准品方法 3,其中本发明人利用了此观察结果,因此用固定浓度的抗原包被板并将患者流体用作校准品进行滴定。

[0180] 实施例 4:固定浓度的抗原和 VOL 以及流体滴定

[0181] 本发明人发现此方法产生与自身抗体测定有关的最有用的数据组,因为其将收集的数据量减少至可容易产生重现性并进行有效分析的水平。通过减少每次校准运行的测定孔的量,还可在用于校准品曲线的相同板上同时运行对照样品。还已经证明了 160nM 和 50nM 下的血清自身抗体测量值给出最有用的信息,并且针对这两个抗原浓度测量的校准曲线提供了最大的校准动态范围。因此决定在多种情形下研究此方法。

[0182] 进行最初的实验以确定针对 7 种不同抗原的患者流体的重现性。在用 160nM 和 50nM 抗原包被的板上进行这些测定。使抗原吸附到板上最少 48 小时,此后,清洗所述板并用 HSBT 封闭 90 分钟。在封闭孵育过程中,在管中配制多个患者腹水校准品滴定液的组合。除去所述封闭缓冲液之后,将这些滴定液添加到空板中并孵育 90 分钟。如材料和方法中所述进行其余的测定。

[0183] 从 1 : 2 开始,按照加倍得稀释范围向下稀释将校准品流体一式两份加至每个板中,进行此测定 10 次以确定信号的重现性。图 5 中的结果显示由所述 10 次运行生成的曲线的平均形状的代表性图。测定间的差异以误差线的形式表示,所述误差线以与所述 10 次运行的平均值相关的标准偏差形式显示。表 3 中显示与每种抗原反应的测定间变异系数(CV)。

原始 OD 数据的 CV							
	C-myc	P53	PSA	膜联蛋白	BRCA2	ECD6	NYESO
稀释液 1	11	9	8	6	13	13	7
稀释液 2	9	11	10	6	10	21	8
稀释液 3	11	14	12	8	9	20	14
稀释液 4	14	17	18	11	11	26	18
稀释液 5	15	13	17	17	13	26	21
稀释液 6	17	12	19	18	14	25	25
稀释液 7	16	10	17	21	17	20	20
稀释液 8	17	10	12	19	15	17	17

[0184] 表 3 :与多种肿瘤相关抗原反应的每种引流液稀释液的测定间 CV(%)。所述图是通过 10 次运行而计算得到的。

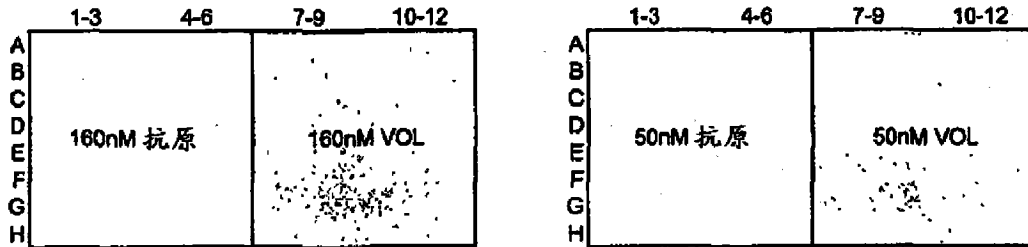
[0186] 上述实验的进一步进展得到下述校准品方法。然而,应当指出的是,此方法是作为实例给出的,但是不是唯一的方法,其中体液(比如胸水和腹水)可用于产生校准系统。所述方法能利用一名患者的流体作为校准品,所述校准品是按照用包被固定浓度抗原(例如 50nM 或 160nM 的抗原和 VOL)包被的板向下进行系列稀释的。还可将对照血清引入到所述测定模式中。然后,按照此方法以流体稀释度的对数对流体校准品 OD 的对数进行绘图,以生成四参数对数曲线。然后将此曲线用于由对照血清的光密度值的对数外推等量的校准品流体稀释度值。

[0187] 实施例 5:校准方法的优化

[0188] 下面是计划用于校准抗肿瘤标志物自身抗体测定的测定实施例。

[0189] 以 160nM 和 50nM 水平的抗原（膜联蛋白 XIa、PSA、p53、ECD6、BRCA2、NYESO 和 c-myc）和阴性对照蛋白 VOL 包被 96 孔微滴定板，如表 4 所示。在 4℃ 下使所述抗原吸附到板上至少 48 小时。此后，清洗所述板并用 HSBT 封闭 90 分钟。在封闭孵育过程中，配制校准品稀释液和对照血清（在 HSBT 中以 1 : 100 稀释）。

[0190]



[0191] 表 4 :流体校准品的板的包被方法。

[0192] 除去封闭缓冲液之后，将所述校准品流体和对照血清添加到空板中（如表 5 所示）并孵育 90 分钟。如材料和方法中所述进行其余的测定。利用每个校准品的一式三份样品的平均值创建抗原滴定曲线。以所述校准品流体稀释度的对数和光密度平均值的对数进行绘图，并用于绘制四参数对数曲线以拟合数据。然后将此曲线用于由对照血清光密度值的对数外推等量的校准品流体稀释度值。

[0193] 就运行自身抗体测定的每一天而言，也运行校准品组合的板。使用浓度为 50nM 和 160nM 的 7 种抗原，需要总共 14 个校准板。

[0194]

	B3255/ B3258 1-2	C3/C4 3-4	血清 5-6	B3255/ B3258 7-8	C3/C4 9-10	血清 11-12
A	1:2	1:2	血清 1	1:2	1:2	血清 1
B	1:4	1:4	血清 2	1:4	1:4	血清 2
C	1:8	1:8		1:8	1:8	
D	1:16	1:16	血清 3	1:16	1:16	血清 3
E	1:32	1:32	血清 5	1:32	1:32	血清 5
F	1:64	1:64	血清 6	1:64	1:64	血清 6
G	1:128	1:128	血清 7	1:128	1:128	血清 7
H	1:256	1:256	血清 8	1:256	1:256	血清 8

[0195] 表 5 :校准品和对照血清设置的实施例，凭经验确定稀释起始点以给出针对每一抗原的每一校准品流体的最合适值。

[0196] 最初利用两种不同的校准品流体进行这些实验，每种流体均由在不同时间点取自于同一患者的两种流体和 8 个血清对照合并组成。5 次测定运行的数据显示在图 6-12 中。

[0197] 下面的实验集中在选择针对每种抗原的一种流体校准品上。定义良好的校准品流体的原理特征是良好的动态范围。如果采用对数 / 对数图，那么其它有用的特征是：

[0198] 对数 / 对数图的线性

[0199] 对数 / 对数图的斜率的适用性

[0200] 对数 / 对数图的斜率的重现性

[0201] 实施例 6 :校准对对照样品中日间差异的影响

[0202] 在用于校准品曲线的同一板上运行对照样品以研究是否能利用所述胸水校准曲线外推回至稀释度值的对数，我们可对在所述对照样品中观察到的日间差异进行校正。图

13-19 显示了表明与由所述校准品曲线外推得到的值相比较的原始 OD 值中差异的数据。从这些图可以看出,对大多数抗原而言,由所述校准线的对数 / 对数图进行的外推提高了血清中自身抗体水平之测量的日间重现性。

[0203] 实施例 7 :血清与胸水用作校准物质的比较

[0204] 测量自身免疫疾病中的自身抗体的测定已经使用血清或血浆作为校准物质。引流液具有多个优于血液产品的优点。它们可以非常大的量获得、在低温下长期贮存时是稳定的并且因此可用于为许多测定提供可重现的校准物质。在一个时间点收集大量的样品是优于多次连续收集量小得多的血清的可能的优点。首先,转移性疾病是不可治愈的状态,并且患者将最终死于其疾病,这使得连续收集血液变得非常困难并最终不可能实施。第二,抗体的滴度可能随时间而变化,因此,连续收集的血液样品可能是不可相比的。第三,随着抗原漂移,体液免疫应答可能变成另一种免疫优势抗原。即使血液样品取自于原发性乳腺癌患者(即在早期),那么如果患者被其治疗治愈,则所述自身抗体反应可降低并且不能在连续样品中被检测到。所有上述内容意指本申请中所述流体的用途被认为是新颖的和有创造性的。为了评价利用流体的其它优点,进行了与匹配血清样品的直接对比。测试了取自于同一患者的血清和引流液的稀释系列与许多肿瘤相关抗原结合的能力。结果示于图 20 和 21 中。

[0205] 由图 20 可见,就许多抗原而言,所述流体和血清的反应性模式相似。然而,图 21 显示,就对自身抗体(即 ECD6、PSA 和膜联蛋白 XI-a)显示出阳性反应性的抗原而言,血清中信号通常低于胸水中信号。此外,反应性模式与血清抗体的不同,其与 PSA 的反应性水平比 ECD6 的低得多。这将提示,尽管样品 C7 和 11828 来自同一患者,但是胸引流液 C7 将提供针对 PSA 自身抗体的更好的校准品,因为其具有更大的动态范围。此特殊发现是极其出乎意料的。

[0206] 实施例 8 :胸水用于校准临床实验室情形中测定的用途

[0207] 为了验证胸水在进行自身抗体测定的高通量实验室中遇到的条件下的用途,进行了下述实验:

[0208] 校准:

[0209] 在首先鉴定对每一种抗原具有特异性的合适校准品流体(参见实施例 2)并优化稀释范围以跨越所述测定的动态范围(参见实施例 4)之后,利用抗原包被校准品的板,如表 6 所示:

[0210]

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	流体稀释系列的实施例
A													1 : 8
B													1 : 16
C		抗原			VOL		抗原			VOL			1 : 32
D		160 nM			160 nM		50 nM			50 nM			1 : 64
E													1 : 128
F													1 : 256
G													1 : 512
H													1 : 1024

[0211] 表 6 :待用于校准的抗原包被板的模式

[0212] 在合适的范围内系列稀释对图 3 中所示的板 (panel) 中每一种抗原具有特异性的

校准品流体,并添加到上述板中,如实施例中所示。根据标准方法测定这些板。

[0213] 血清样品:

[0214] 如表 7 所示利用抗原包被板并用于测定之前已经显示具有抗原特异性的自身抗体水平的许多不同血清样品。根据标准方法进行测定。

[0215]

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	0nM	1.6nM	5nM	16nM	50nM	160nM	0nM	1.6nM	5nM	16nM	50nM	160nM
A	GBU4-5							p53				
B	VOL							c-myc				
C	膜联蛋白 I							CAGE				
D	膜联蛋白 II							NY-ESO-1				
E	p53							GBU4-5				
F	c-myc							VOL				
G	CAGE							膜联蛋白 I				
H	NY-ESO-1							膜联蛋白 II				

[0216] 表 7 :用于测定血清样品以测试临床实验室条件下的校准系统之行为的板模式

[0217] 在 2 周的时间段内进行上述测定 6 天,每日两次(早晨和下午)(运行 1-12)。

[0218] 变异性运行:

[0219] 为了测试校准系统,必须将变异性引入到测定输出中。这是通过降低辣根过氧化物酶标记的第二抗体的浓度以在所有板上产生更弱信号来实现的。在第 7 个测定日进行此测定两次(运行 13 和 14)。

[0220] 血清样品的校准:

[0221] 创建针对每一校准品组合数据的四参数对数(4p1)图。就每一个图而言,将底部渐近线设定为 0,斜率设定为 1。将顶部渐近线限定为最大为 2。解析来自每一单独曲线的的数据以将残差平方和最小化。这提供了针对四个参数(顶部渐近线、底部渐近线、斜率和 EC₅₀)的值,然后将其用于公式中以阅读来自校准品曲线的血清样品。图 22 显示了运行 1-12 中光学密度对校准品流体稀释度之对数的 4p1 图(以灰色实线表示),其中误差线表示数据组的标准偏差。每个图上的第二条曲线(虚线)是变异性运行(运行 13 和 14)的平均 4p1 图和以误差线表示的标准偏差。

[0222] 描述图 22 中所述图的方程式用于根据其各自的校准品来校正每一个血清样品。这得到以对应于校准品流体稀释度的对数的任意单位表示的值(RU 值)。此对运行之间的差异的影响显示在图 23 中,就许多不同血清样品而言,其中未校准的值显示为空心三角形,根据此运行的校准曲线校正的值显示为实心圆。虚线代表校准值的平均值加上或减去 3 个标准偏差。注意如何通过校准来显著降低运行 13 和 14 中引入的变异性。

[0223] 实施例 9 :冷冻校准品系列的贮存

[0224] 因为系列滴定液的稀释耗时并且易于出现重现性误差,所以我们研究了“冷冻”校准品组合(其中配制校准品胸水稀释液的储备液,分成等份试样并冷冻在 -20℃)和当天新鲜配制的储备液之间的差异。此研究的结果可见于图 24-30。可以看出,每日新鲜配制的校准品系列和大批量配制并以等份试样冷冻的那些之间具有非常小的差异。这将提示,当用作校准物质时,所稀释的患者流体在低温(-20℃)下贮存时是稳定的,并且可长期贮存而不损失活性。因此,这是降低运行间差异的有效方法。

[0225] 实施例 10 :利用来自乳腺癌患者之外的癌症患者的流体进行校准

[0226] 一些肿瘤相关抗原和其诱发的自身抗体不是肿瘤类型特异性的。因此,可将来自肺癌患者的流体用于例如校准乳腺癌早期诊断的自身抗体测定,反之亦然。为了验证此理论,针对许多肿瘤相关抗原筛选了来自结肠癌患者、卵巢癌患者、肺癌患者、肝癌患者和胰腺癌患者的胸水。一旦确定是阳性,便制备校准稀释度曲线并针对所述抗原进行测试。每日重复实验 5 次以评价重现性。从图 31 中可以看出,可检测来自结肠癌患者 (a 和 e)、卵巢癌患者 (b)、肺癌患者 (c)、肝癌患者 (d 和 f) 以及胰腺癌患者 (g) 的流体中的与多种不同肿瘤相关抗原结合的自身抗体。这些反应似乎是可重现的并可进行滴定,因为所述流体是稀释的,这表明它们可在用于早期诊断乳腺癌和其它癌症的自身抗体测定中用作校准物质。

[0227] 实施例 11 :人流体用于定量固体表面上蛋白质之量的用途

[0228] 蛋白质被动吸附到塑料表面(例如微滴定板的孔)上是不能明确限定和控制的,并且可取决于多个因素,比如表面不平坦度以及蛋白质和塑料的电荷。因此,其可用于定量多少蛋白质被吸附并且可将其与其它蛋白质和其它表面相关联。对这种测量而言,蛋白质比色测定太不灵敏。Kelso 等人已经描述了吸附等温线法,但是这些依赖于标记示踪剂分子的可利用性。也可使用针对蛋白质标签(例如 His 标签)的抗体,但是它们通常是鼠源的,因此,其依赖于不同的报告系统来用于人自身抗体的测量。

[0229] 在针对许多肿瘤相关抗原对人流体进行筛选的过程中,观察到两种流体结合所有的蛋白质(包括阴性对照 VOL)(图 32)。VOL 是以与所述抗原完全相同的方式克隆和表达的重组肽,但是其仅由生物素标签序列和组氨酸标签组成。因此,这些流体内的人抗体必须与这些标签中一种或两种结合。因为所述标签也存在于所有重组肿瘤相关抗原上,所以所述流体可用于将吸附到所述板的孔上的蛋白质的量进行定量。表 6 显示在每个浓度下 50nM VOL 的信号与 160nM VOL 的信号比值。可以看出,在胸水的所有稀释液中,与 50nM 和 160nM VOL 结合的信号比是相对恒定的。这将提示所测量的信号与所述板上蛋白质的量相关联,因此该系统可用于定量蛋白质水平。

[0230]

流体稀释度	运行 1	运行 2	运行 3	运行 4	运行 5
1 : 8	0.65	0.58	0.53	0.76	0.62
1 : 16	0.54	0.52	0.42	0.87	0.92
1 : 32	0.51	0.5	0.41	0.82	0.71
1 : 64	0.54	0.58	0.51	0.84	0.72
1 : 128	0.69	0.64	0.53	1.03	0.76

[0231] 表 8 :引流液 16 的与 VOL 结合的自身抗体的测量。在每一流体稀释度下 50nM VOL 的信号与 160nM VOL 的信号比值。

[0232] 实施例 12 :非特异性结合的检测和校准

[0233] 非特异性结合是任何血清免疫测定所固有的问题,因为血清中存在的高浓度的免

疫球蛋白易于非特异性结合到所述板的塑料或包被抗原上。非特异性结合信号因血清样品而不同,但是可高至掩盖分析物的特异性反应。

[0234] 在前面的章节中鉴定了与 VOL 结合的流体。血清抗体反应是非特异性的,因为其不针对任何特定抗原。因此,这些胸水可用于检测和校正非特异性结合。

[0235] 实施例 13:腹水作为校准物质的用途

[0236] 除胸水之外,腹水是先前实施例中所用的有效的类似校准系统。这些测定是在利用 160nM 和 50nM 抗原包被的板上进行的。使抗原吸附到板上最少 48 小时,此后,清洗所述板并用 HSBT 封闭 90 分钟。在封闭孵育过程中,在管中配制多个患者腹水校准品滴定液的组合。除去所述封闭缓冲液之后,将这些滴定液添加到空板中并孵育 90 分钟。如材料和方法中所述进行其余的测定。

[0237] 从 1 : 2 开始,按照加倍的稀释范围向下稀释将腹水一式两份加至每个板中,进行此测定 4 次以检测信号的重现性。图 33-35 中的结果显示由所述 4 次运行生成的 VOL 校正曲线的平均形状的代表性图。测定间的差异以误差线的形式表示,所述误差线以与所述 4 次运行的平均值相关的标准偏差形式显示。

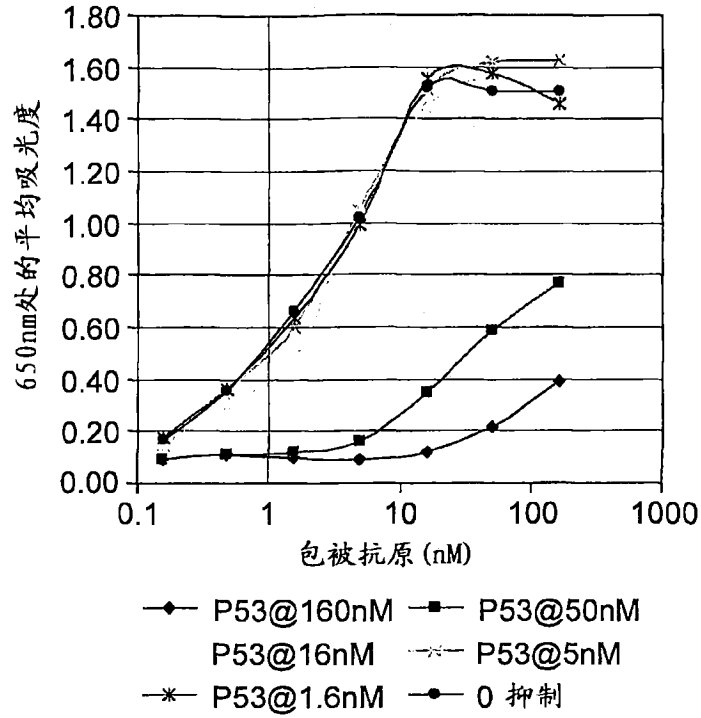


图 1a

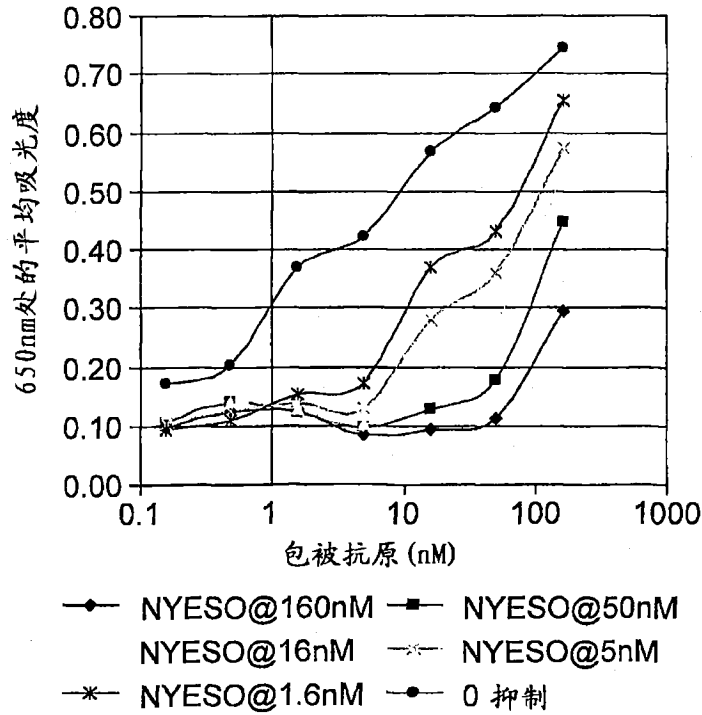


图 1b

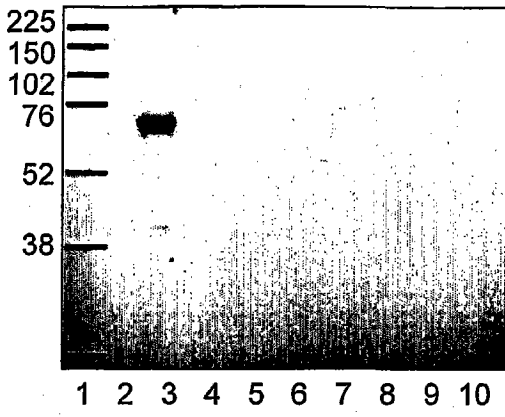


图 2a

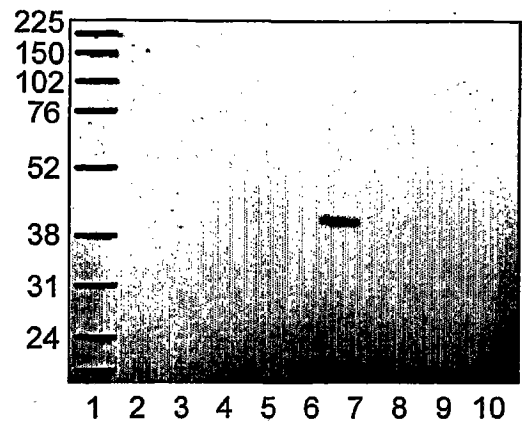


图 2b

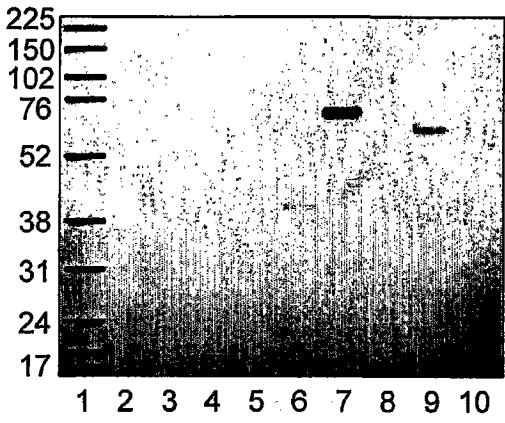


图 2c

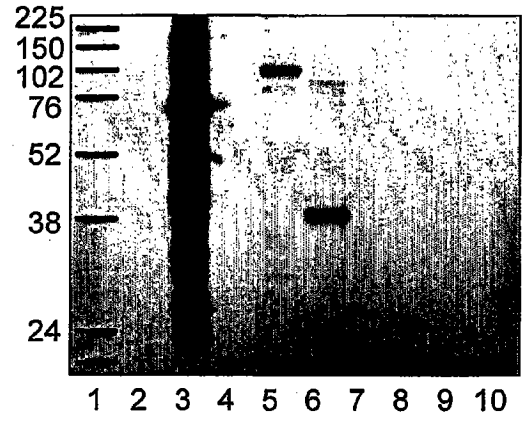


图 2d

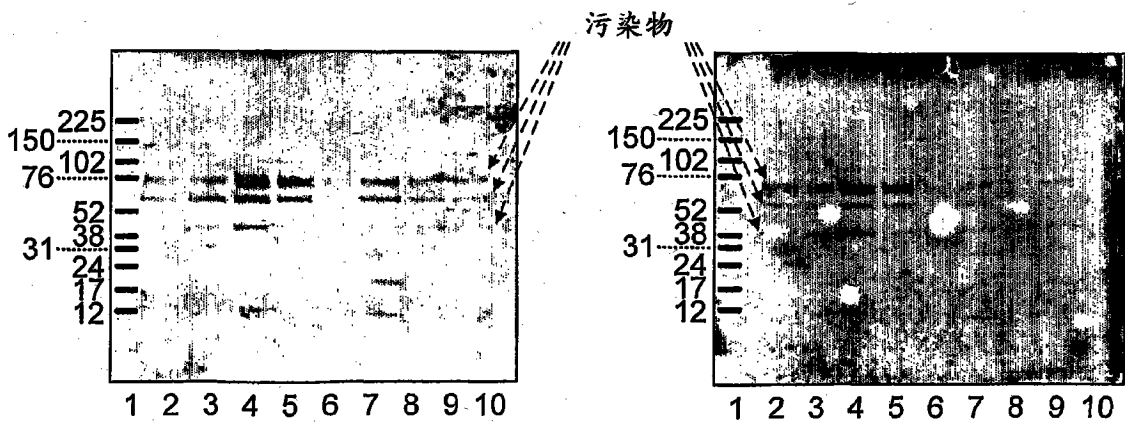


图 3

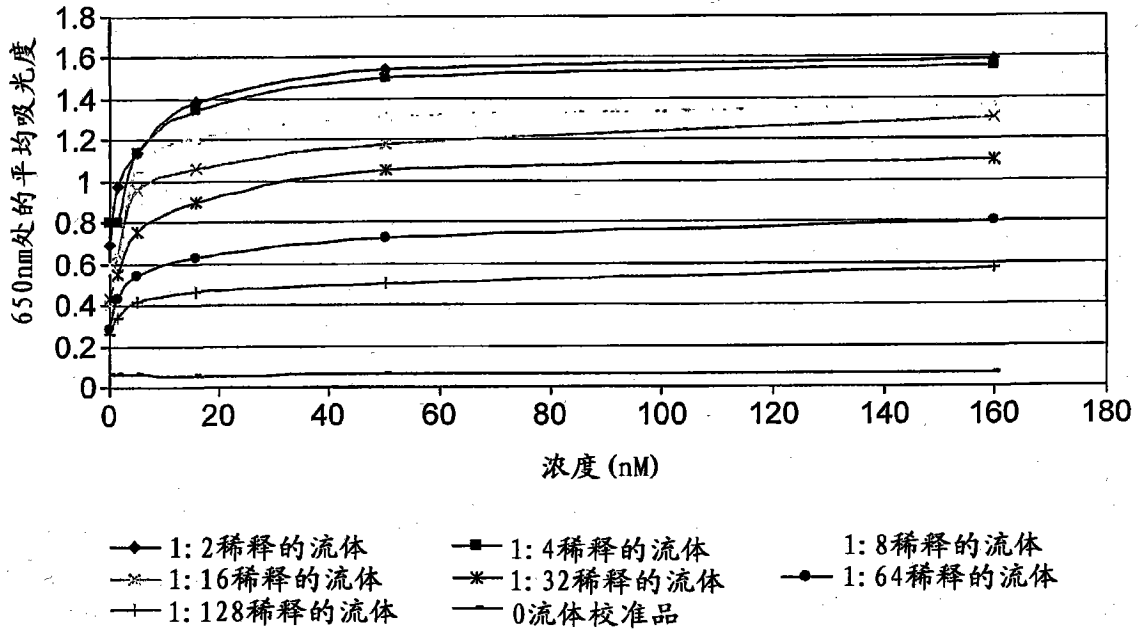


图 4

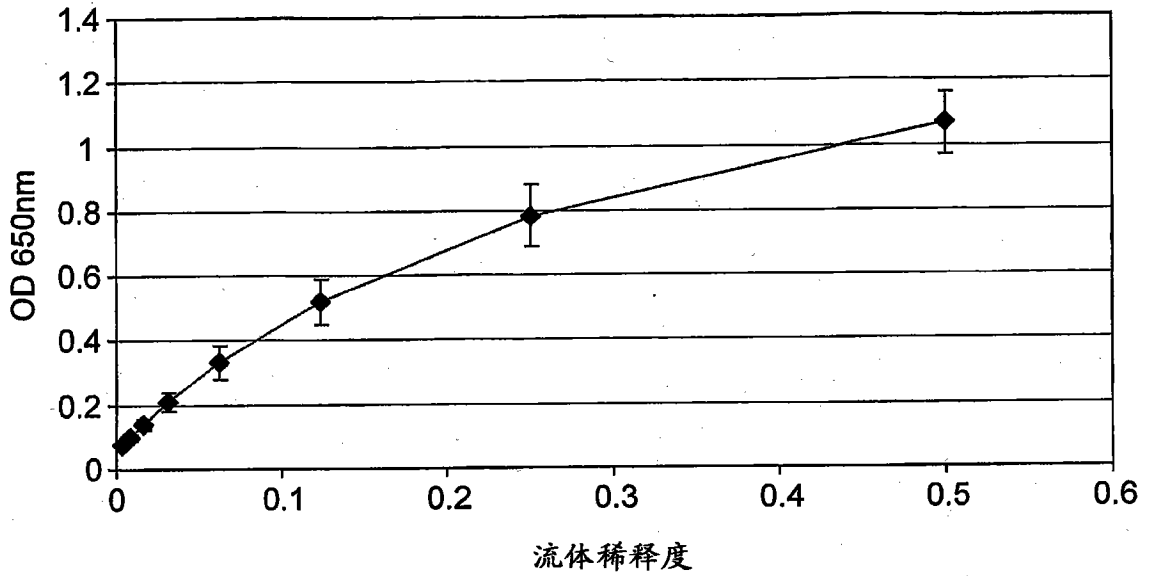


图 5a

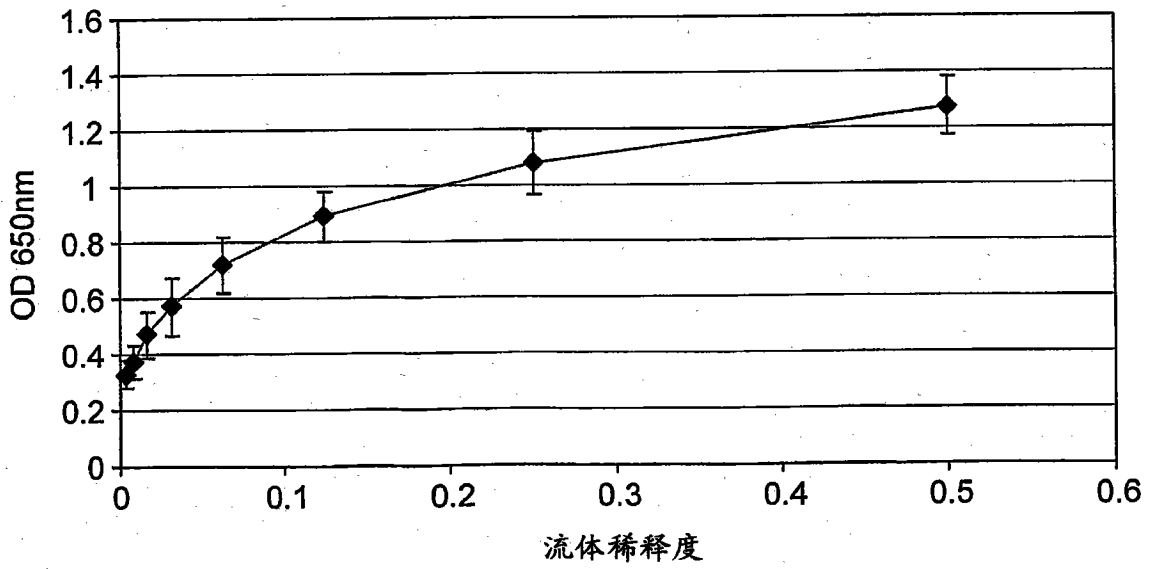


图 5b

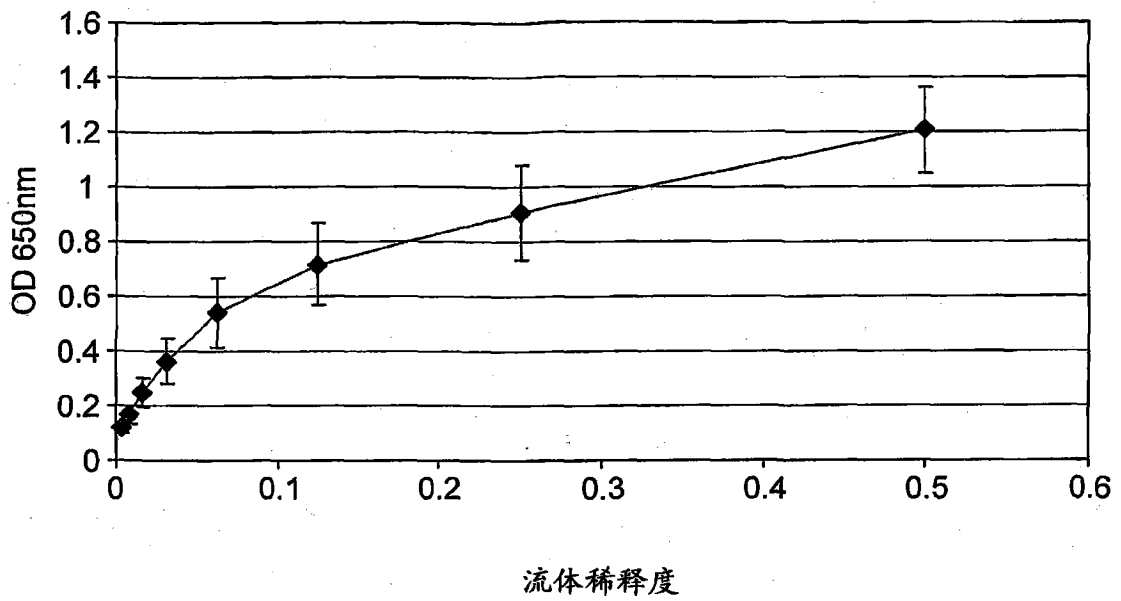


图 5c

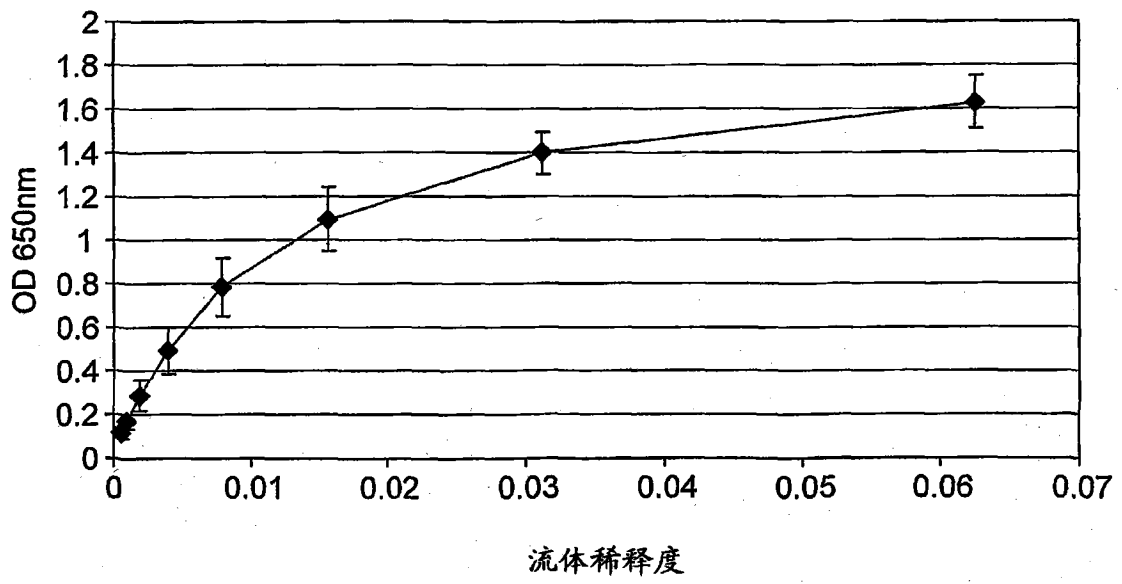


图 5d

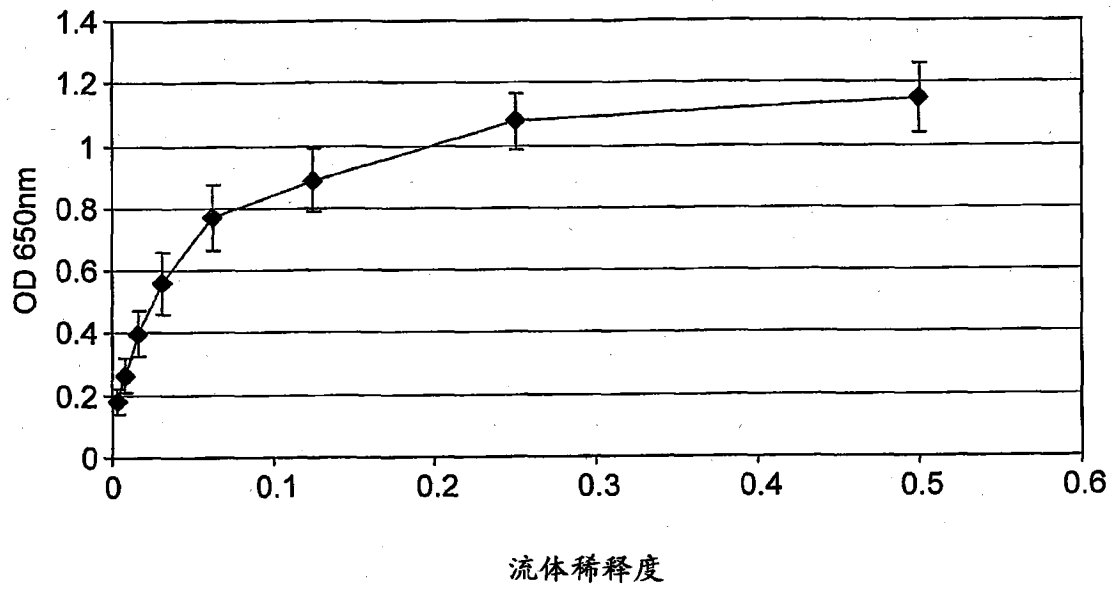


图 5e

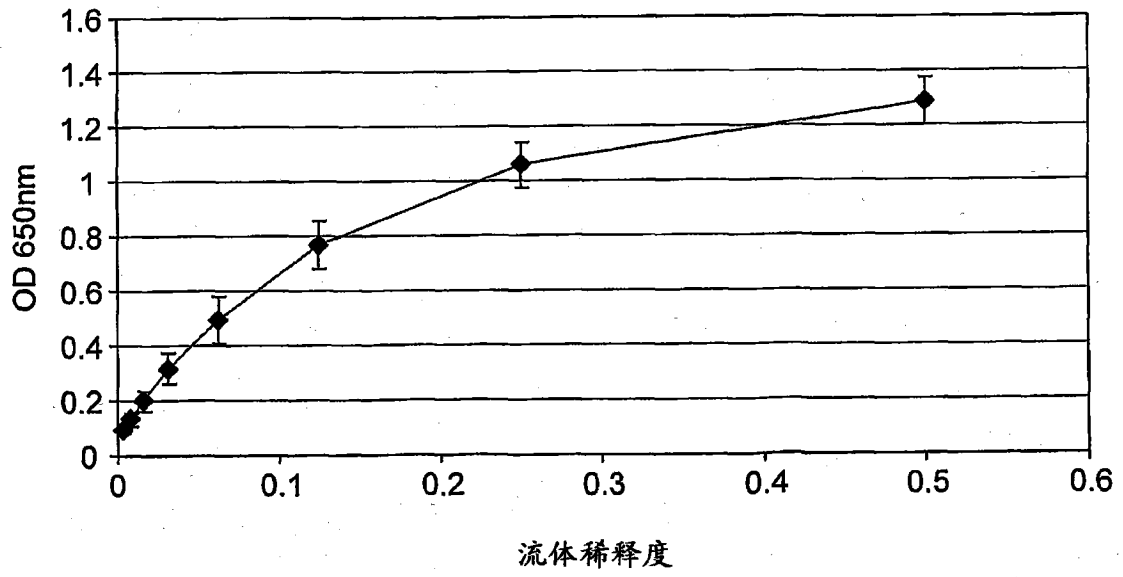


图 5f

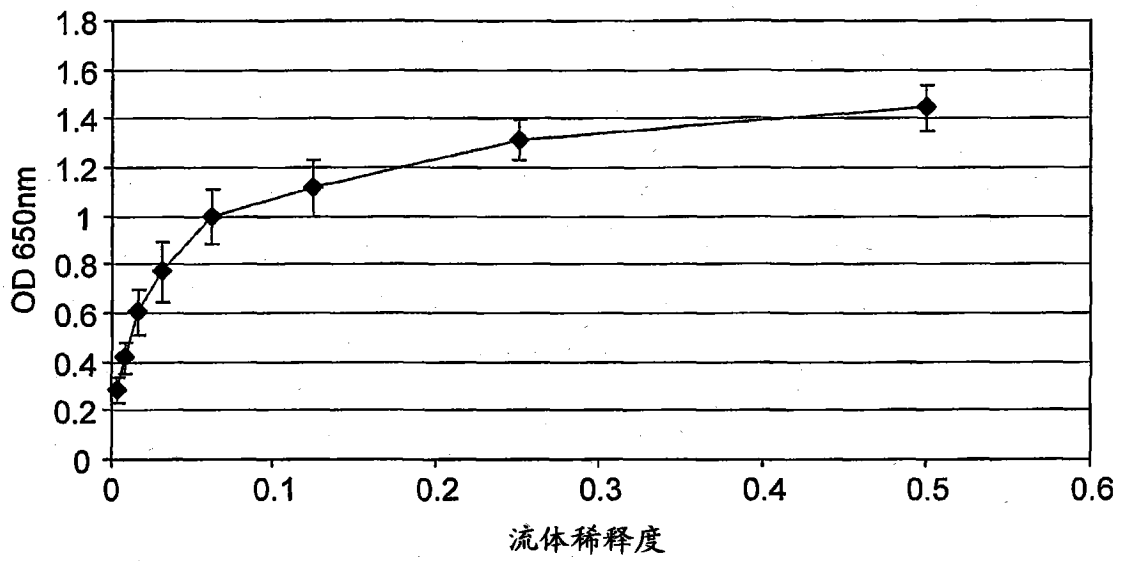


图 5g

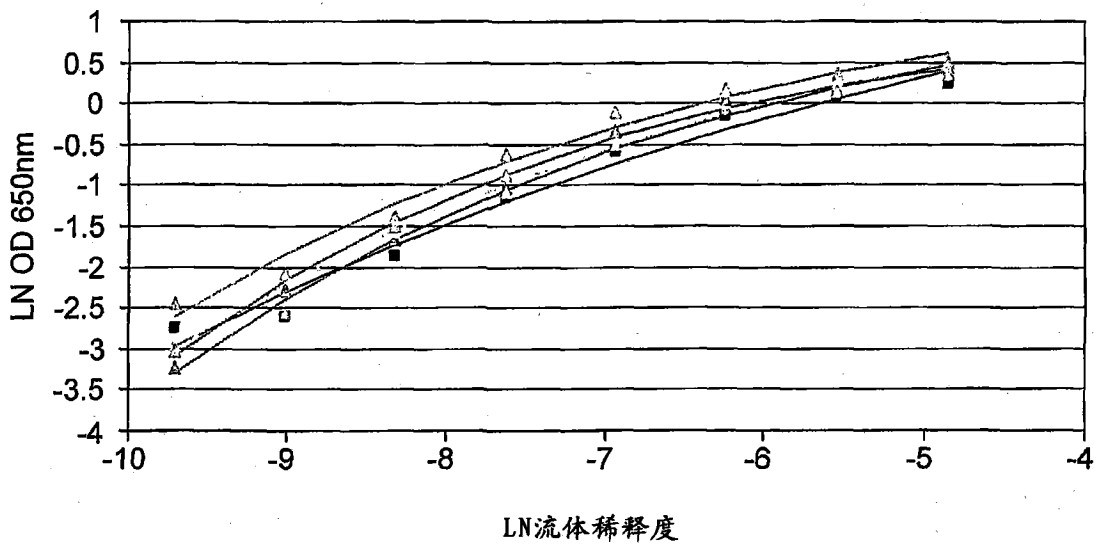


图 6a

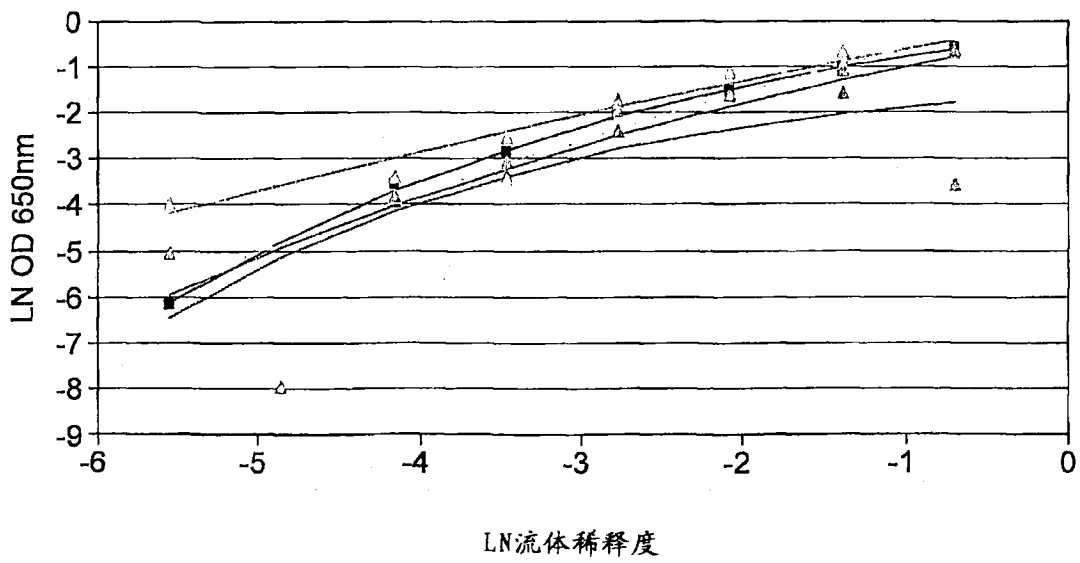


图 6b

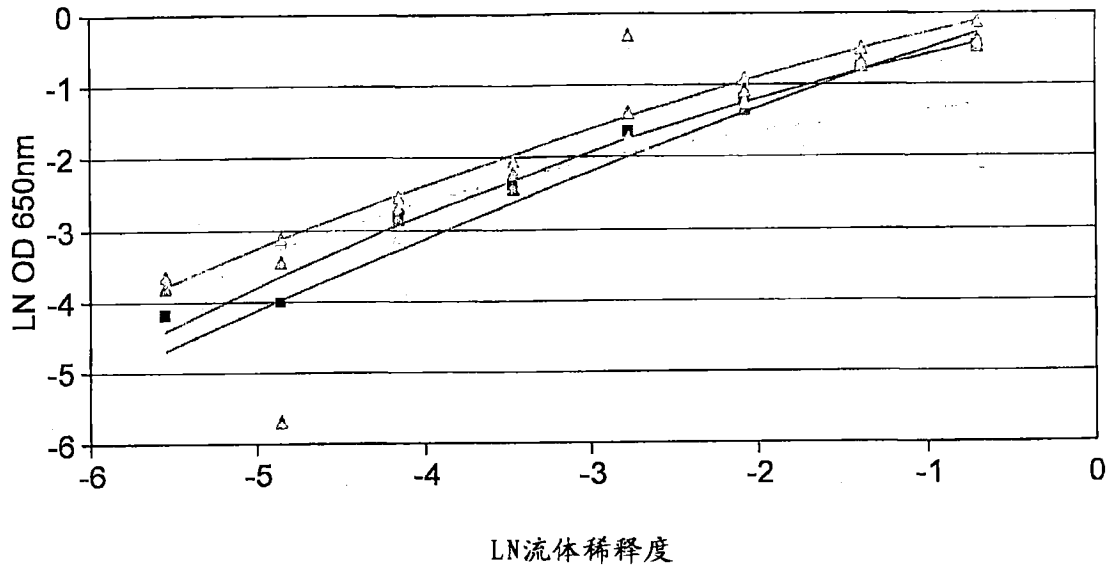


图 7a

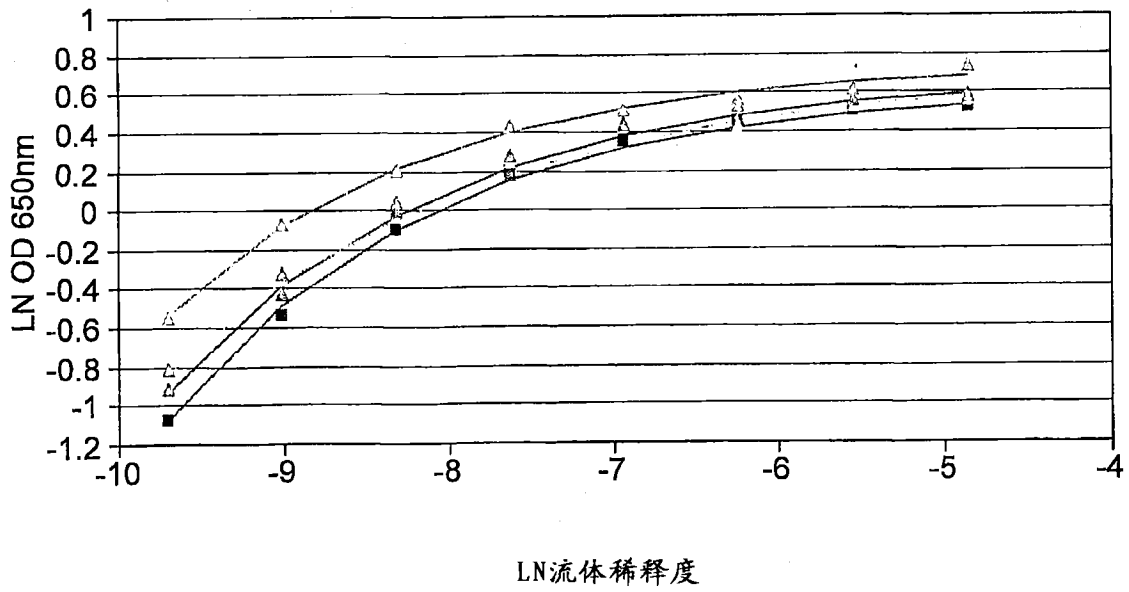


图 7b

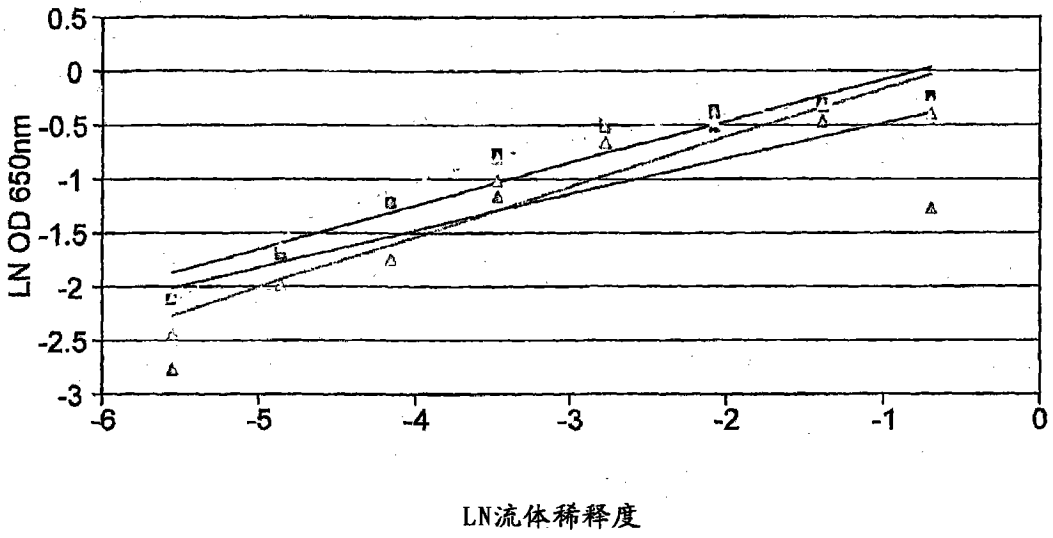


图 8a

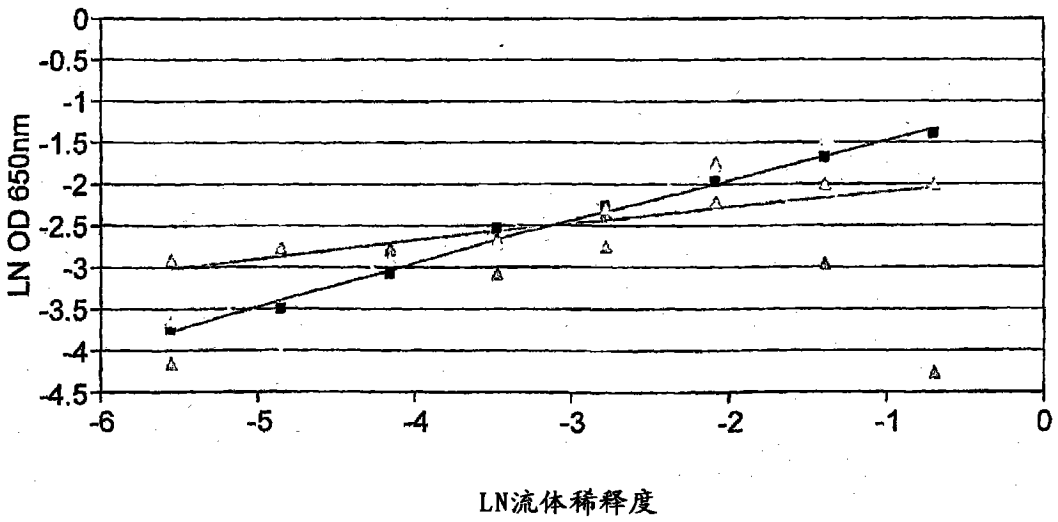


图 8b

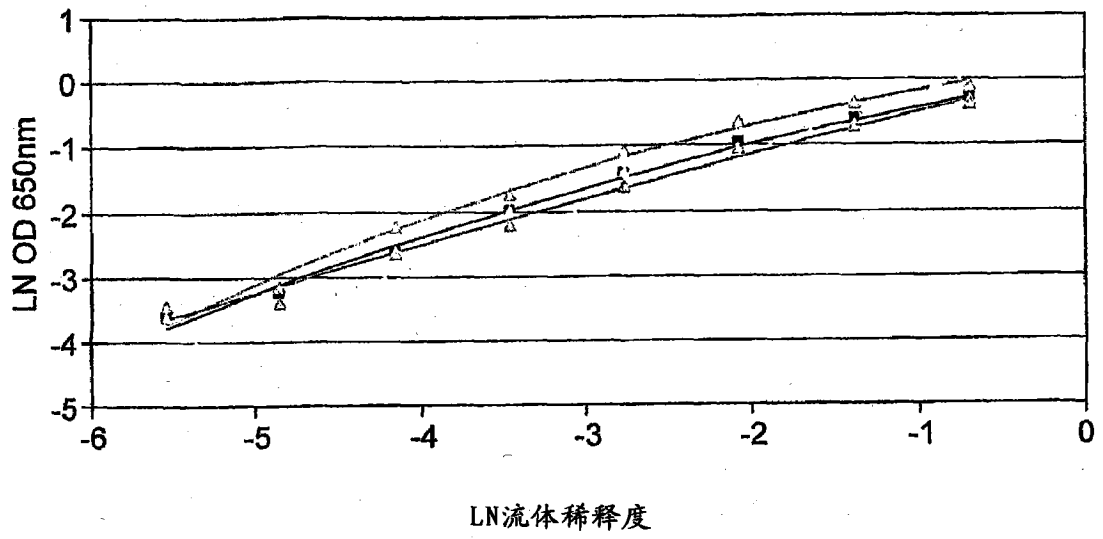


图 9a

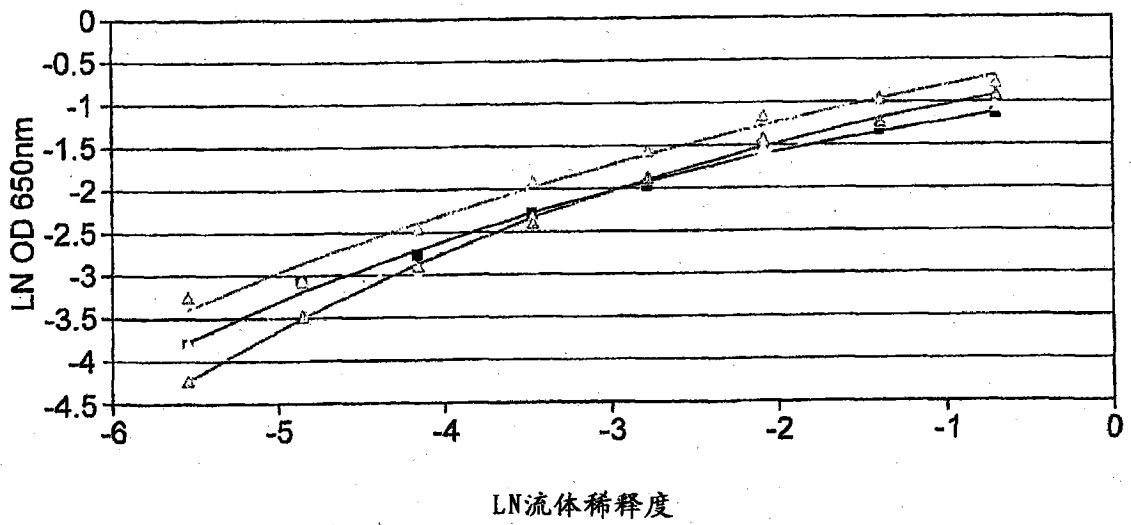


图 9b

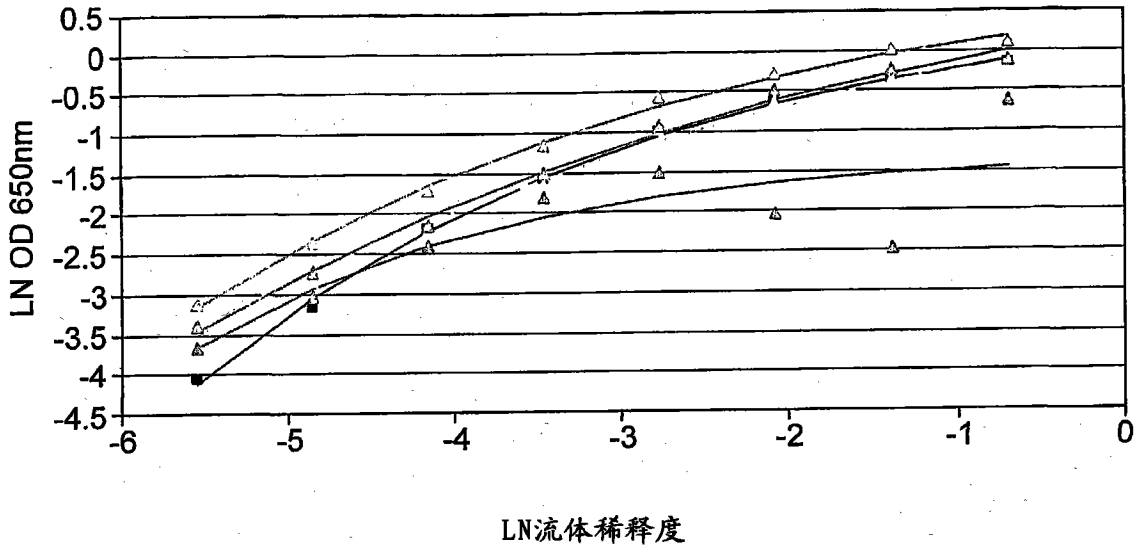


图 10a

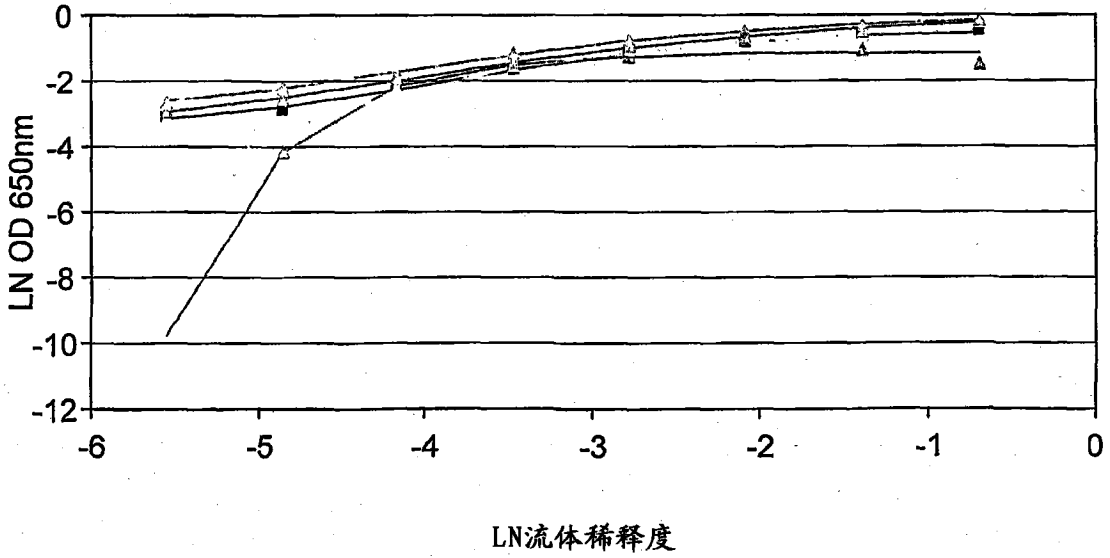


图 10b

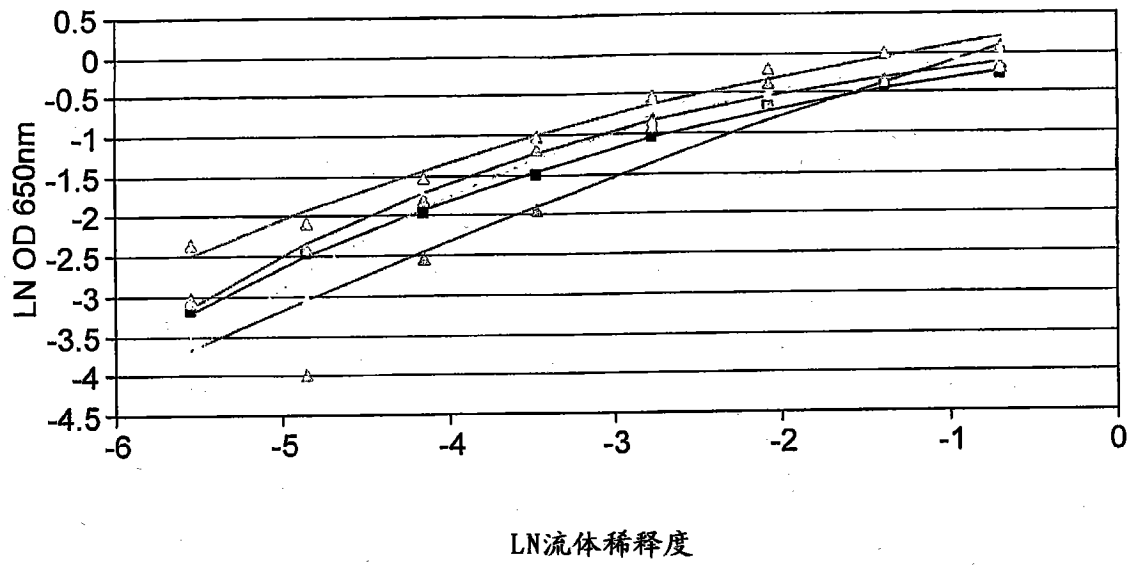


图 11a

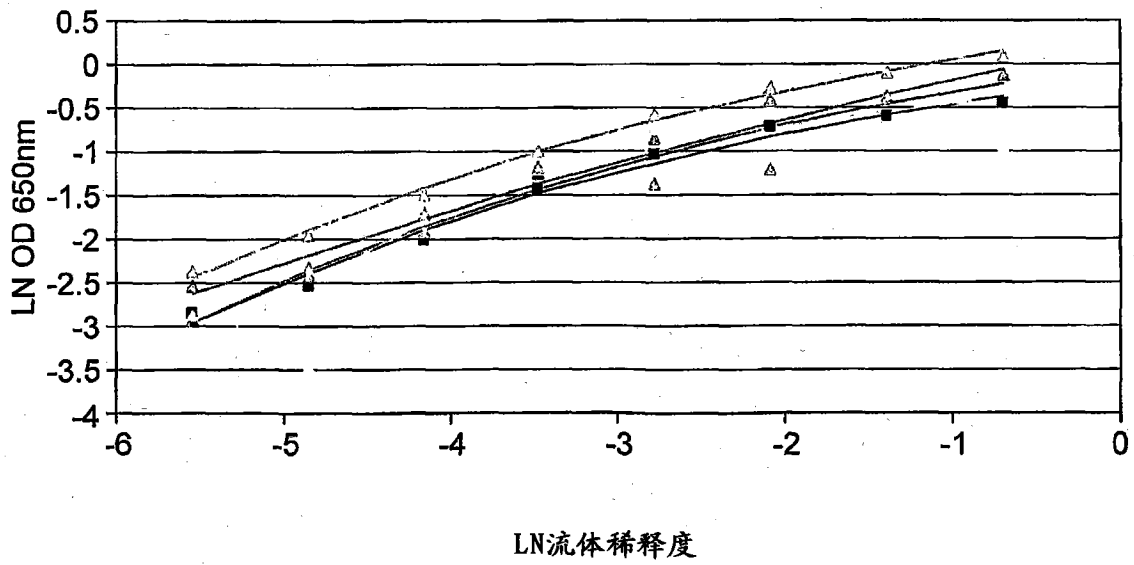
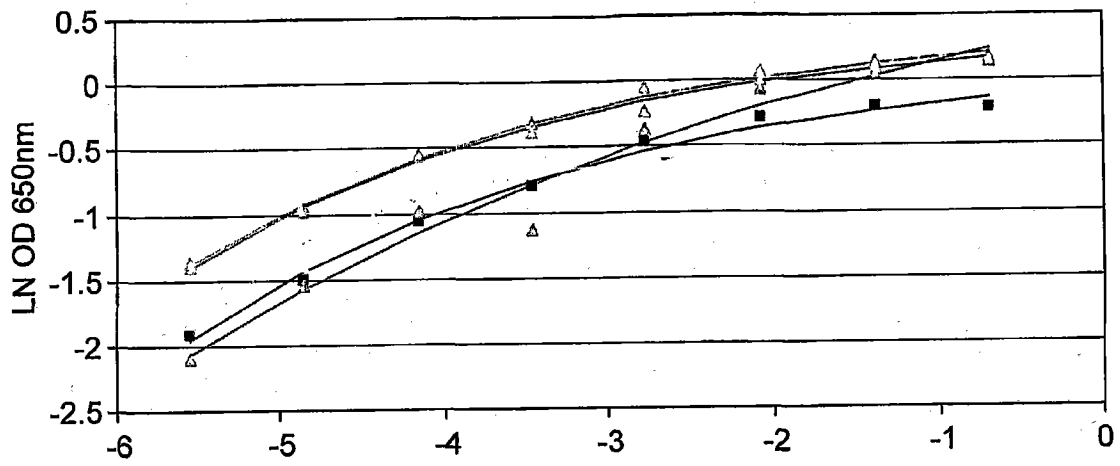
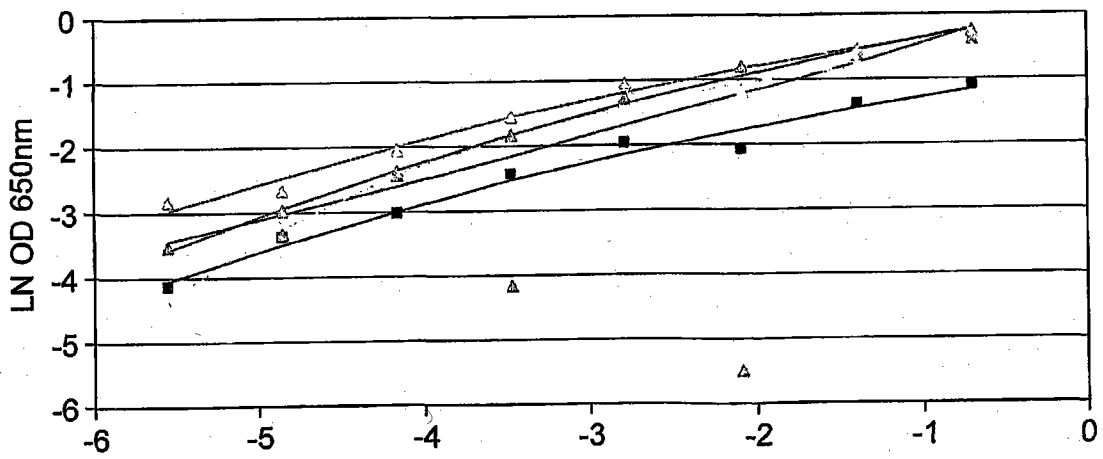


图 11b



LN流体稀释度

图 12a



LN流体稀释度

图 12b

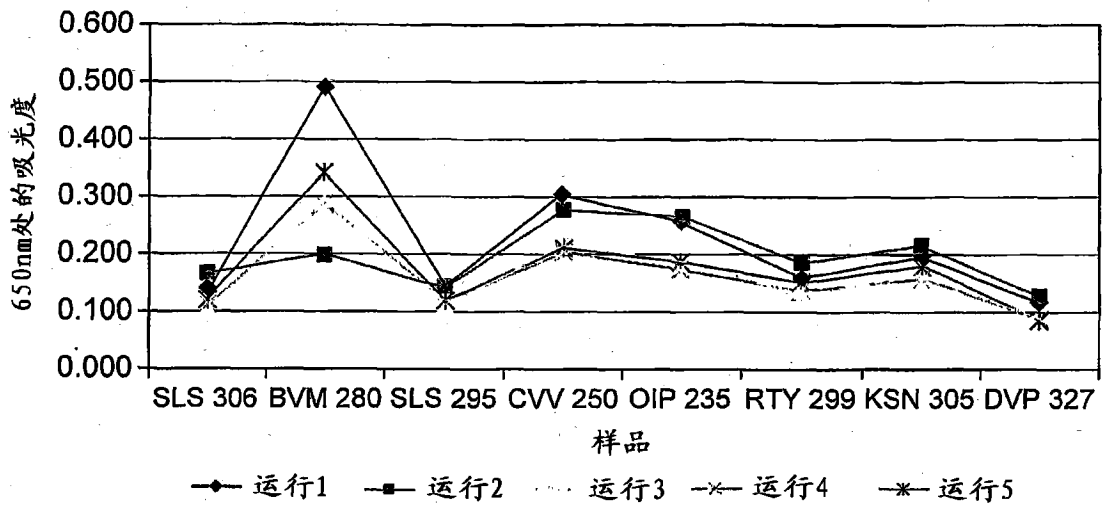


图 13a

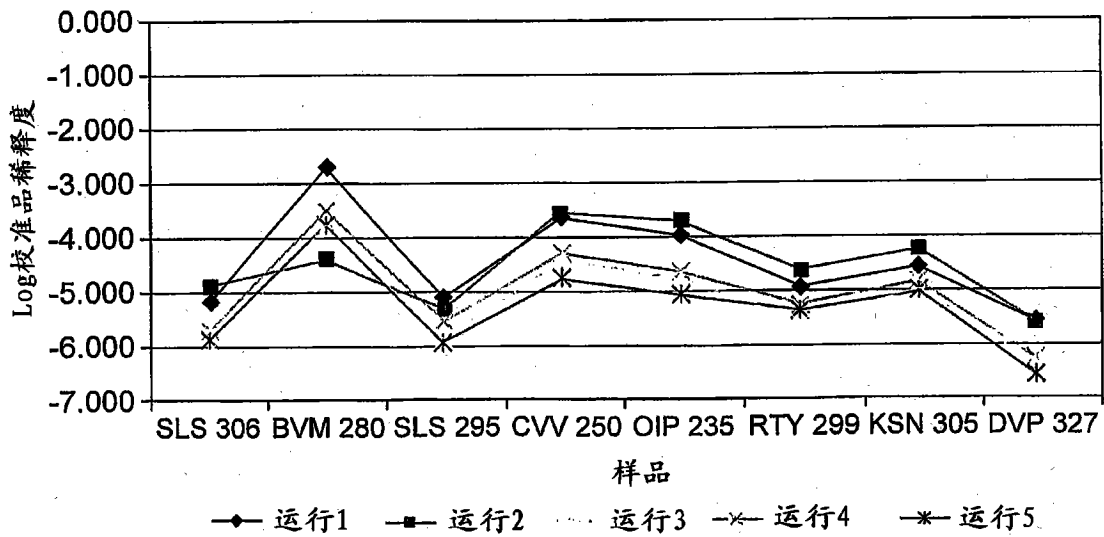


图 13b

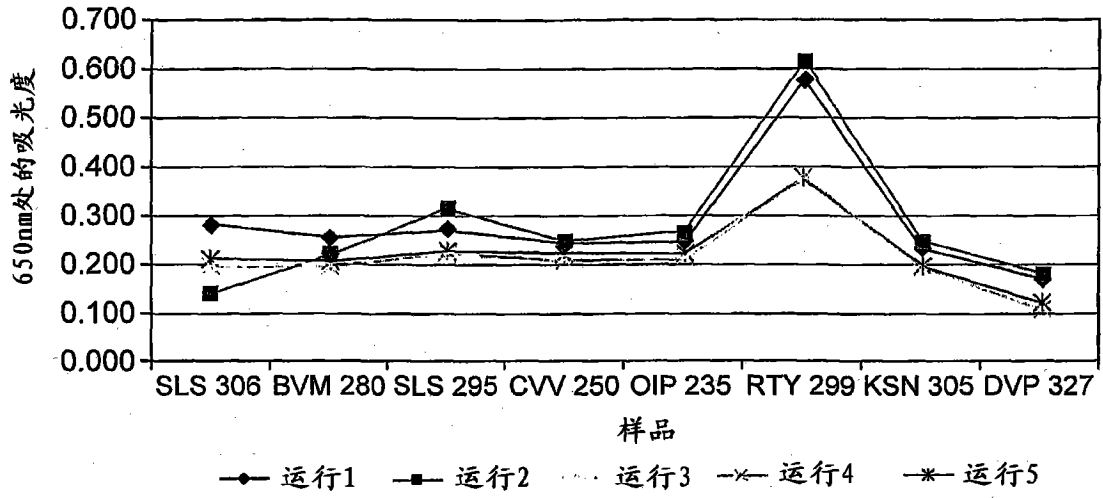


图 14a

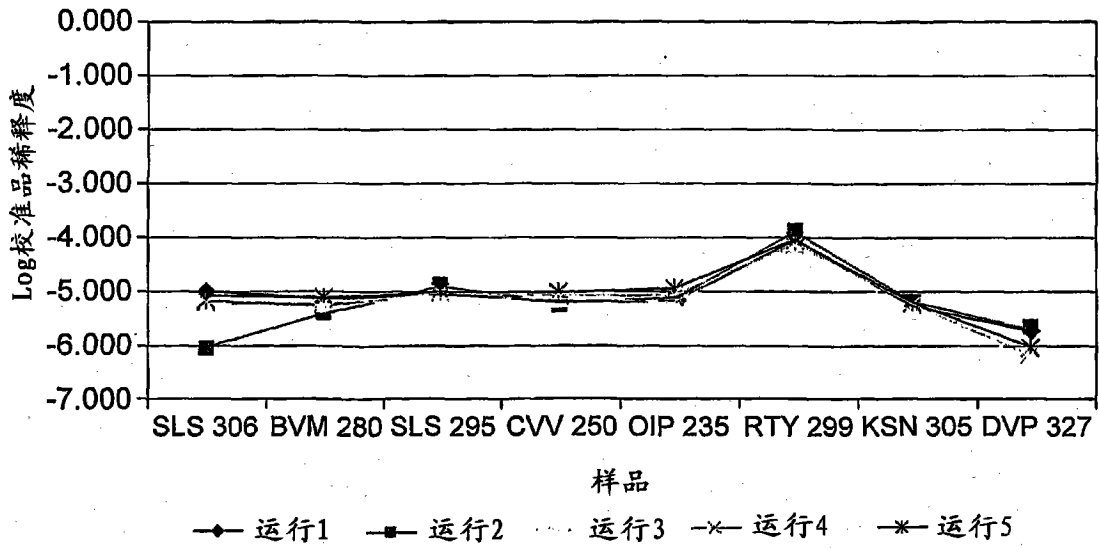


图 14b

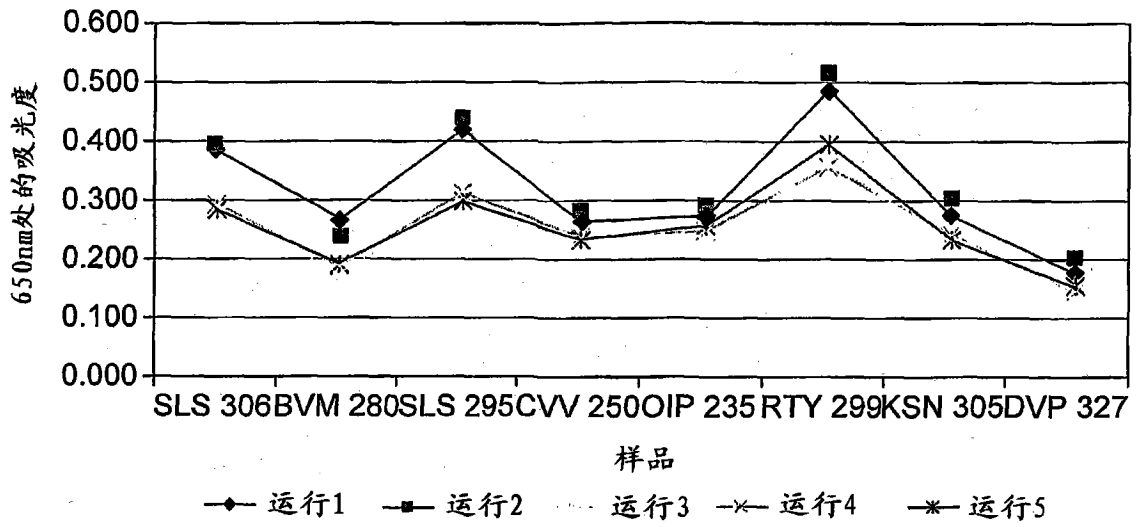


图 15a

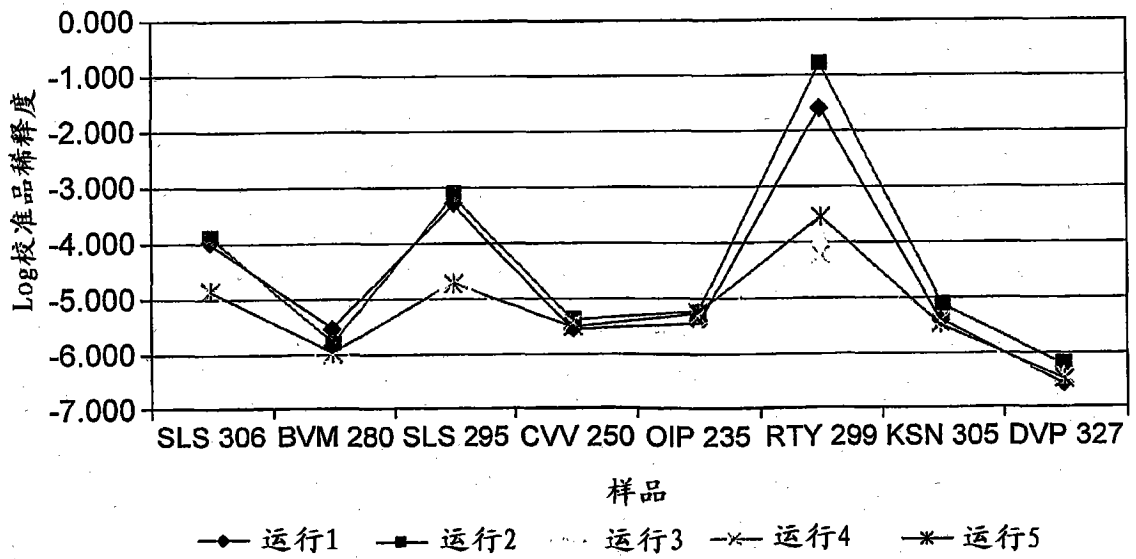


图 15b

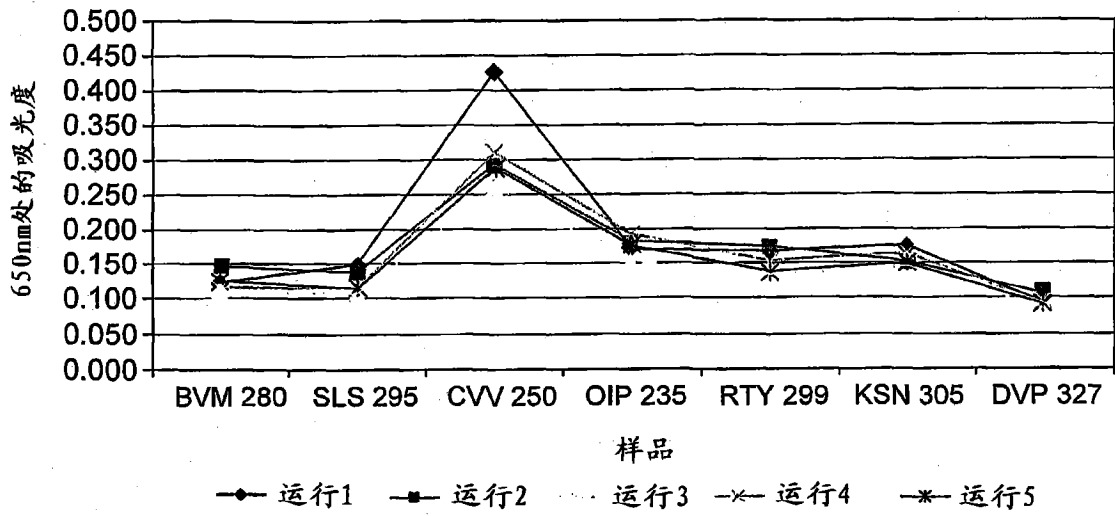


图 16a

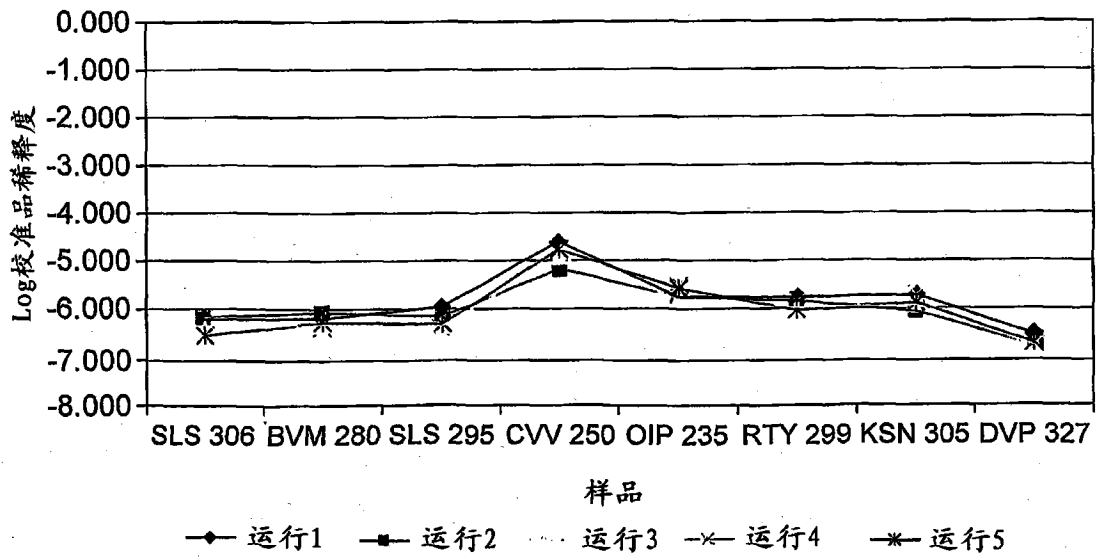


图 16b

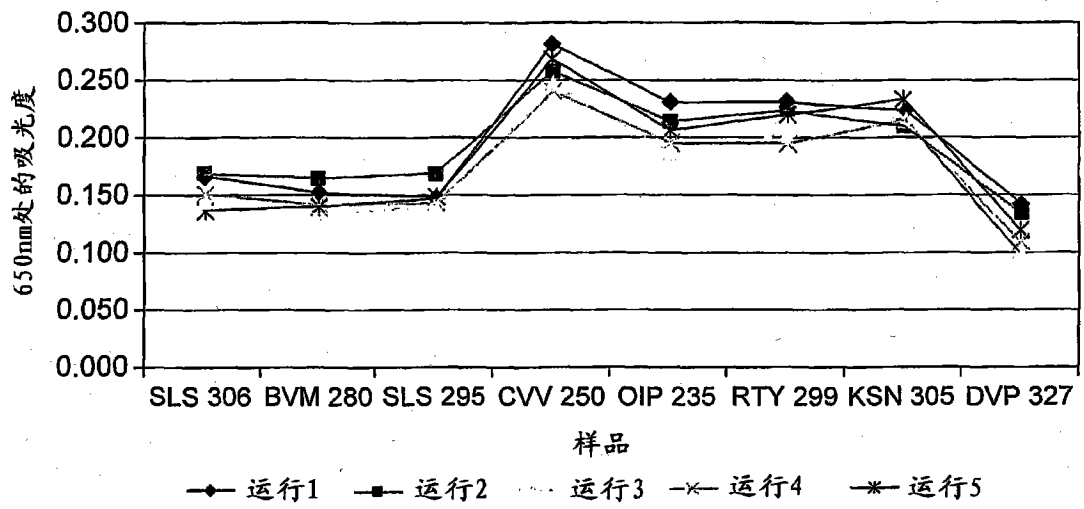


图 17a

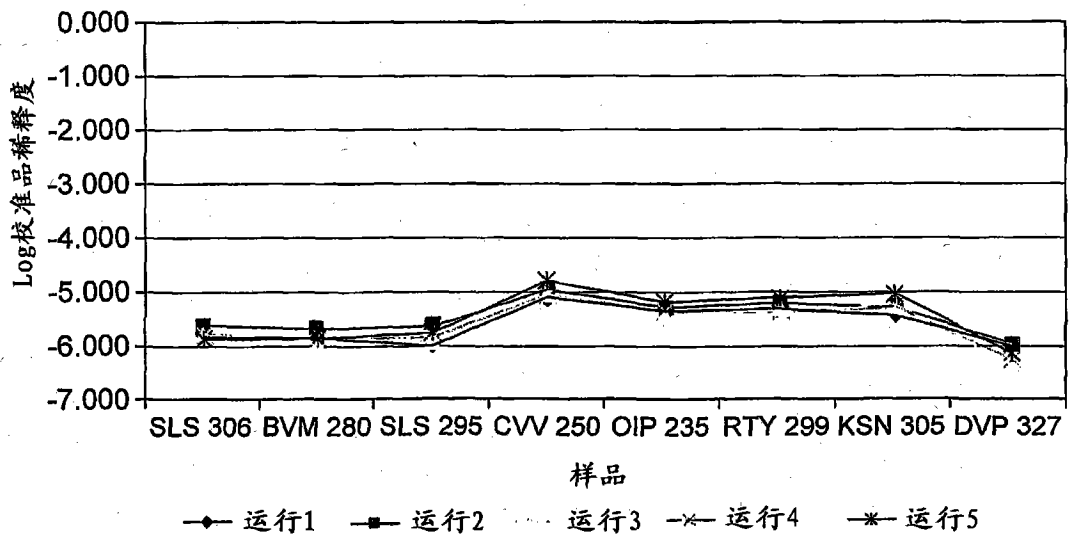


图 17b

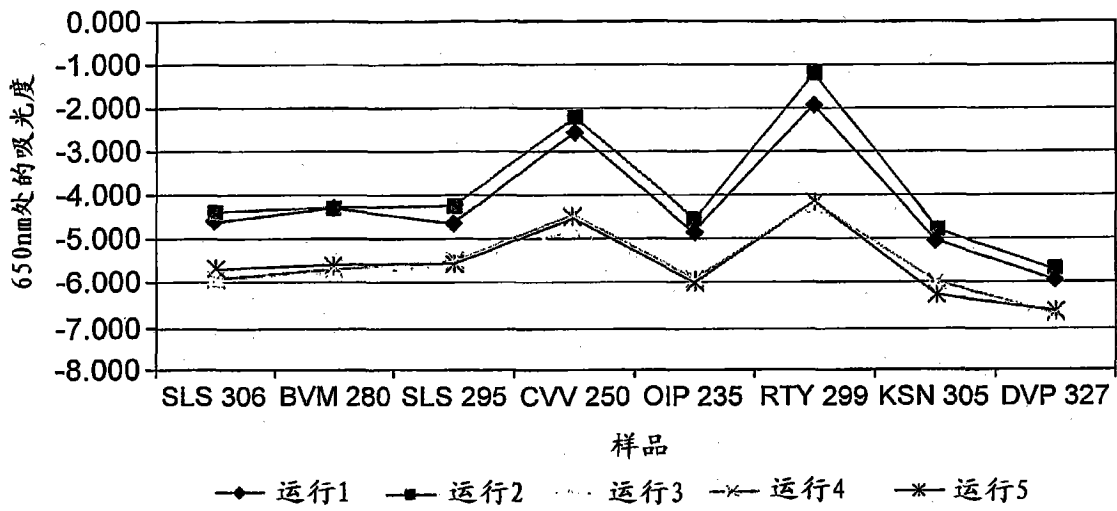


图 18a

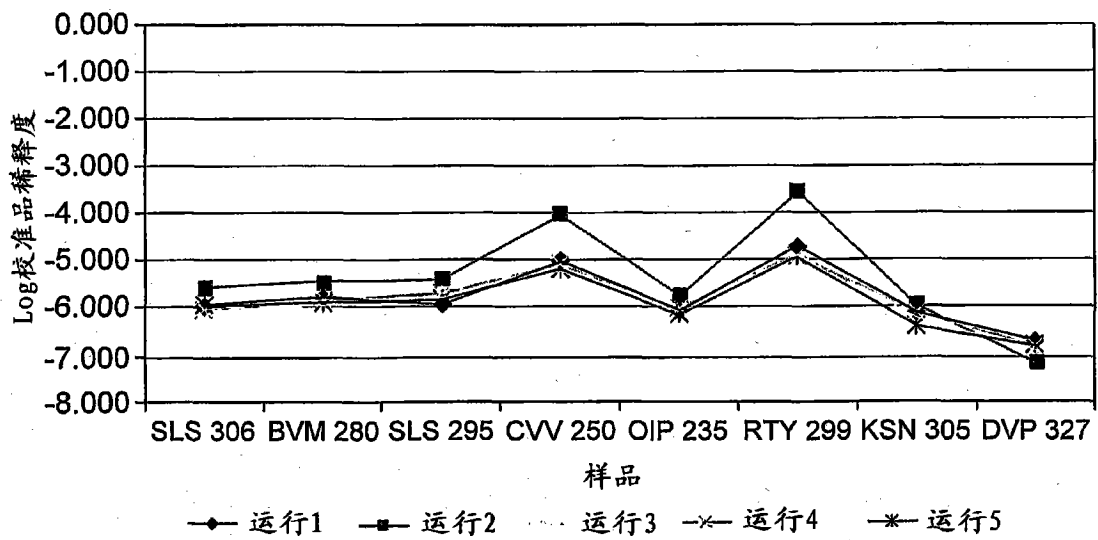


图 18b

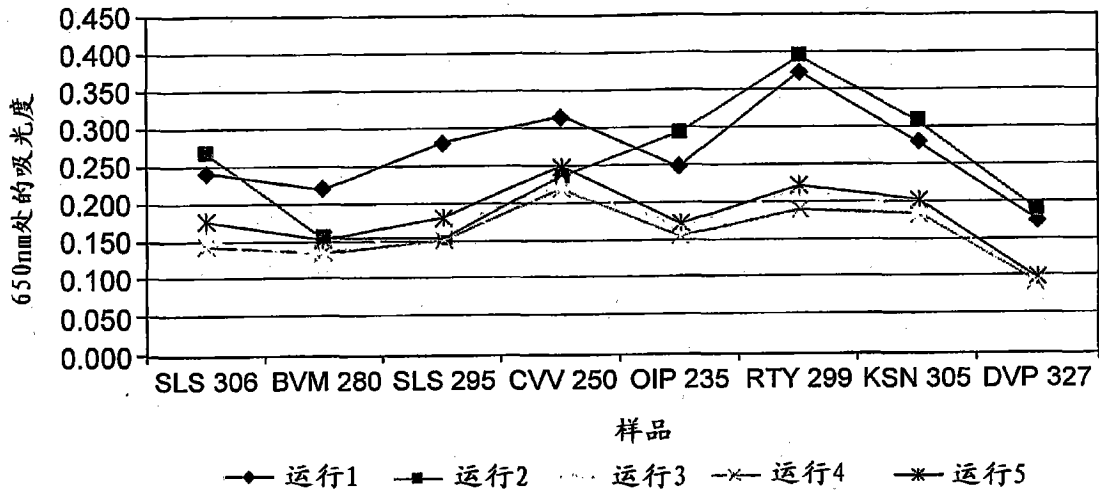


图 19a

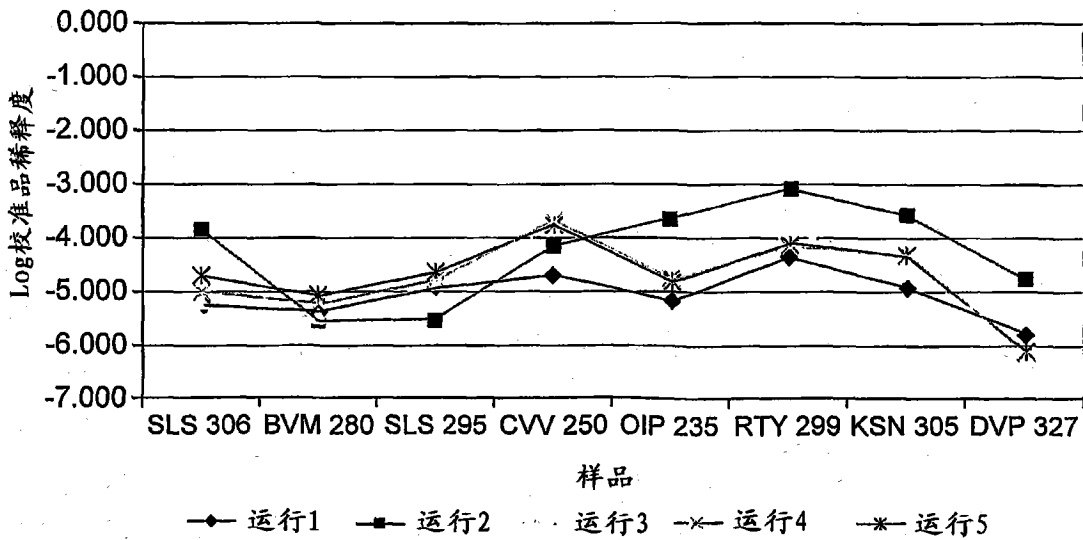


图 19b

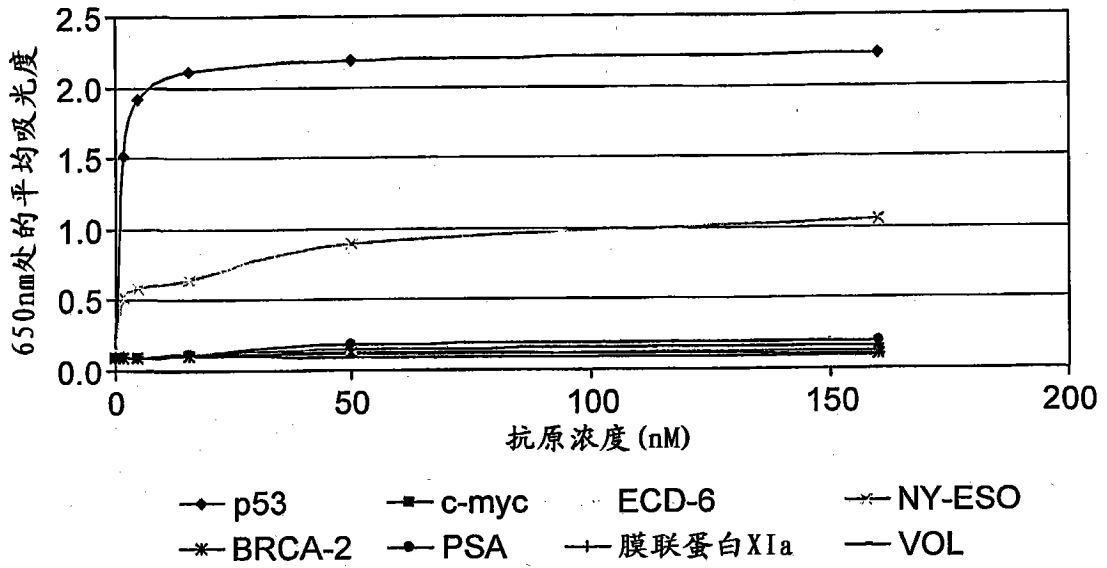


图 20a

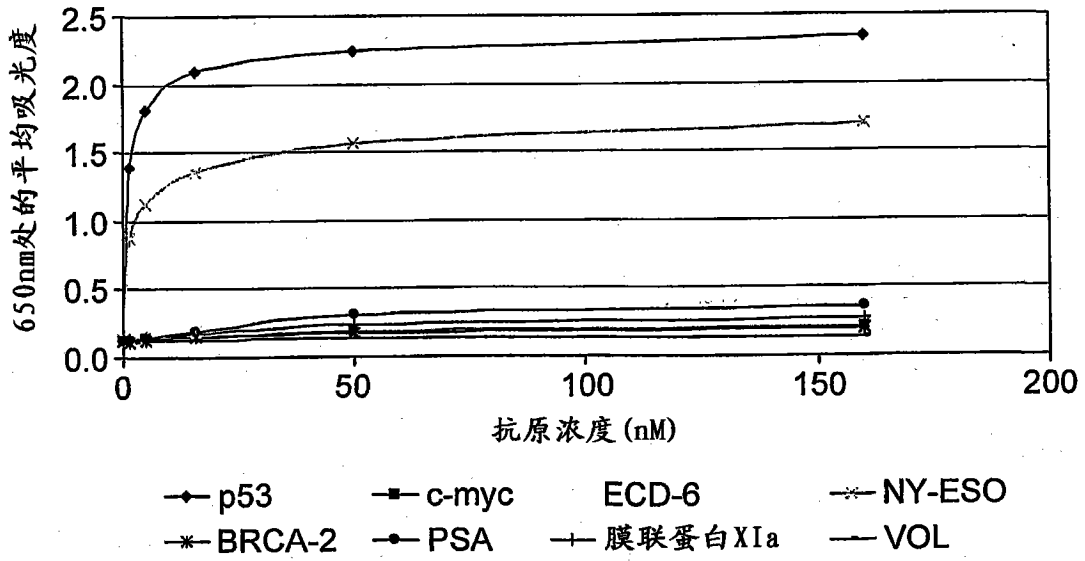


图 20b

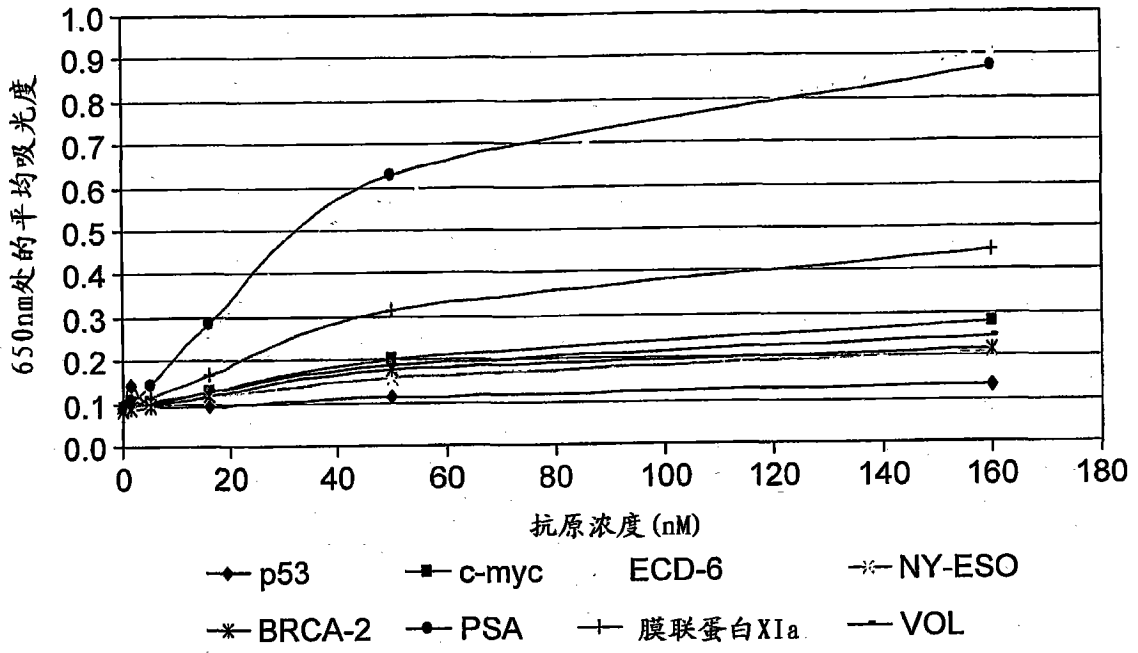


图 21a

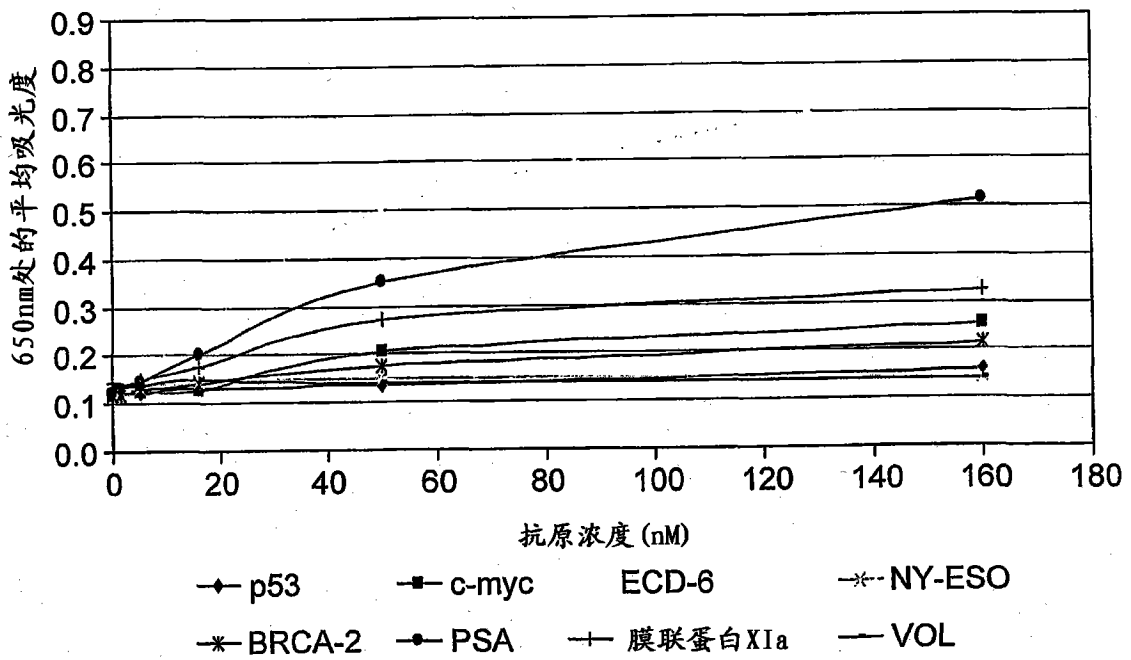


图 21b

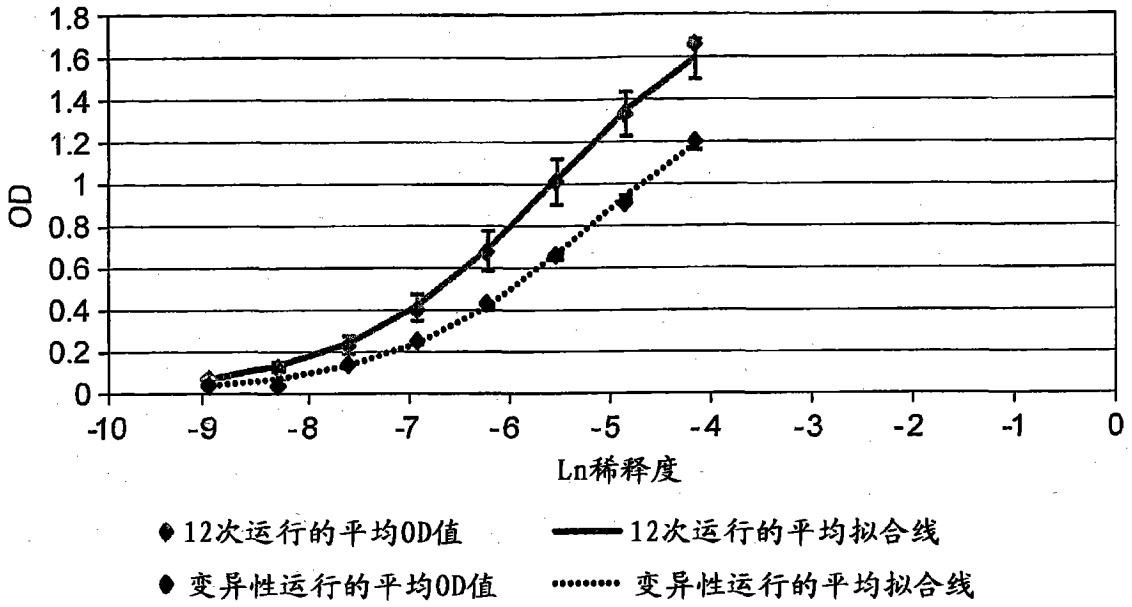


图 22a

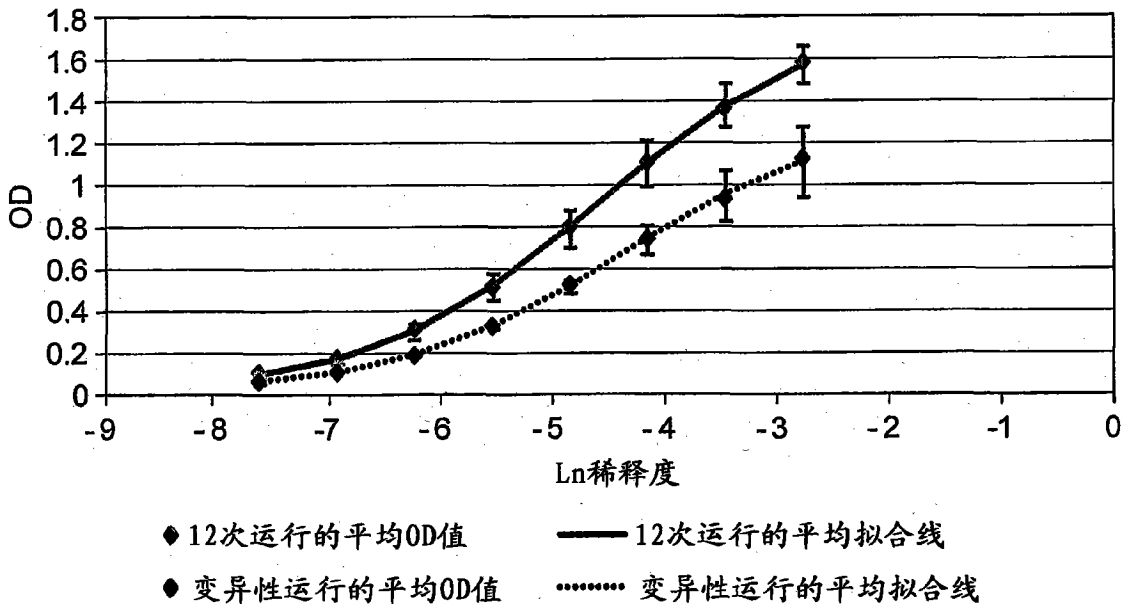


图 22b

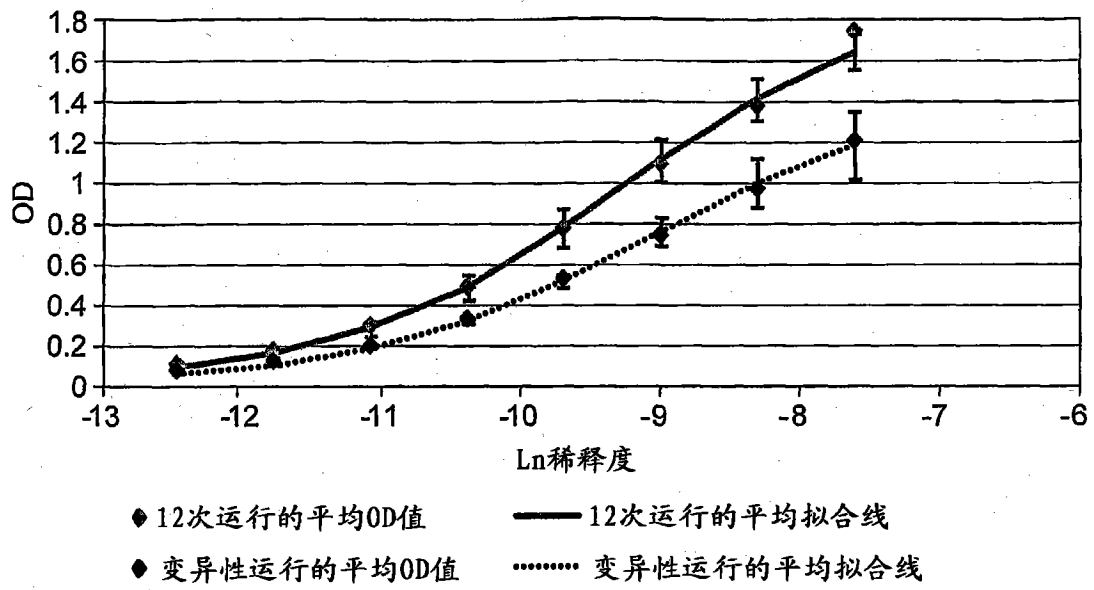


图 22c

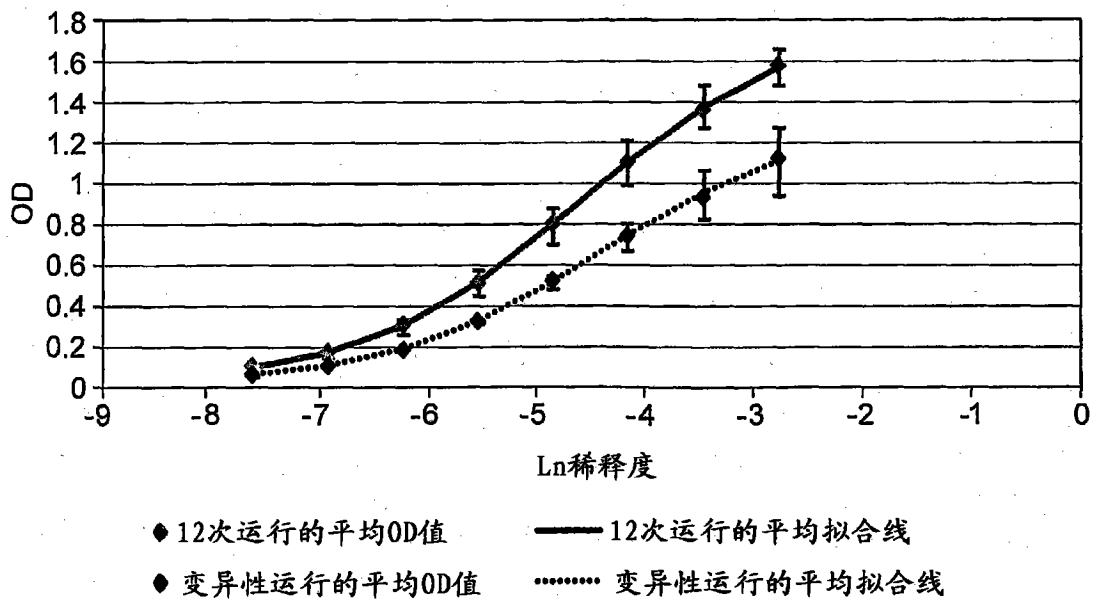


图 22d

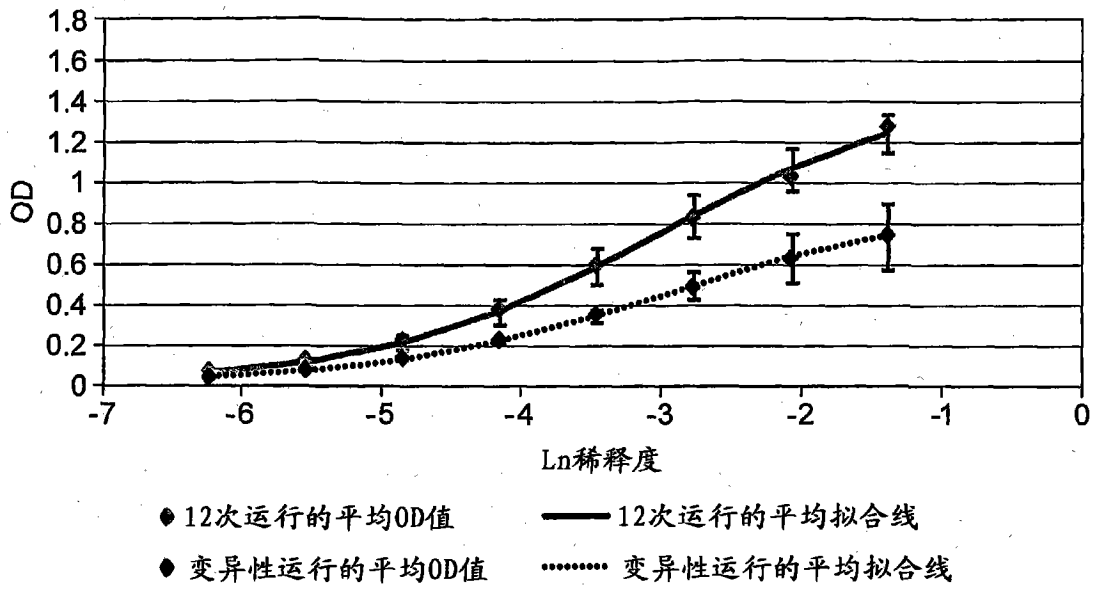


图 22e

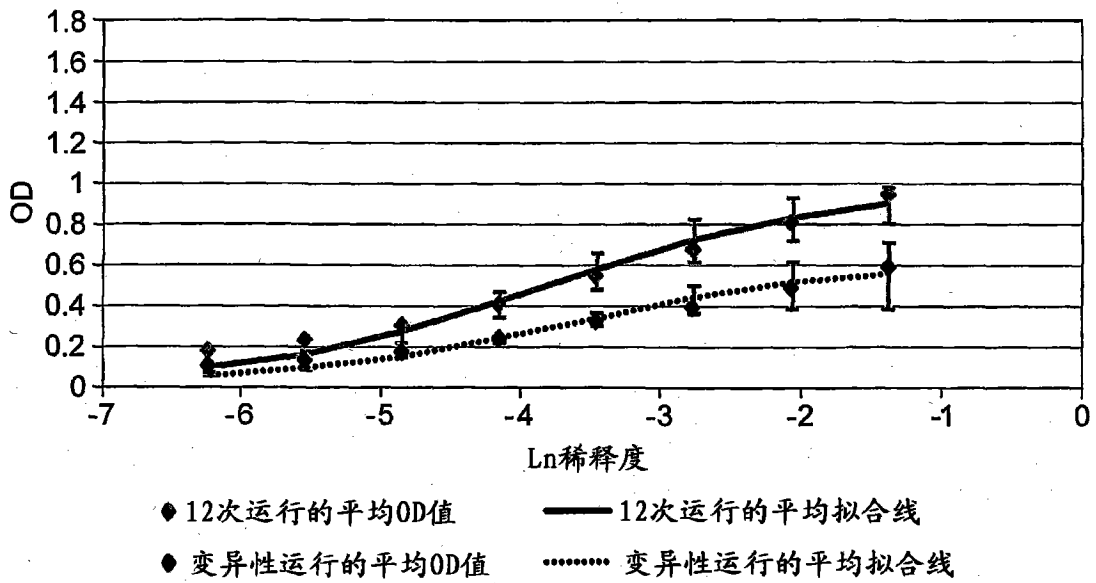


图 22f

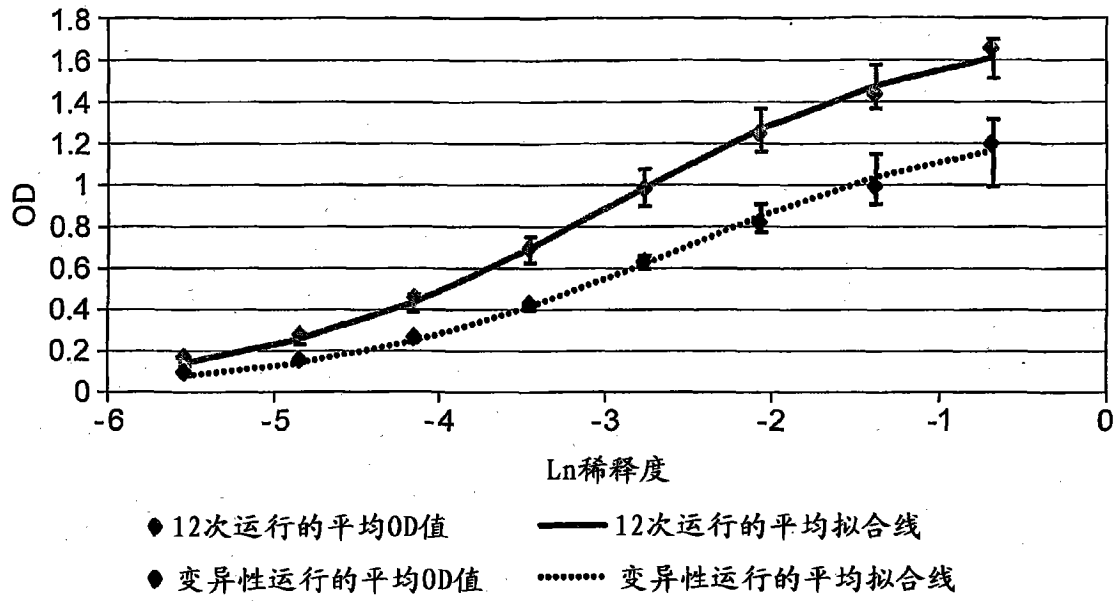


图 22g

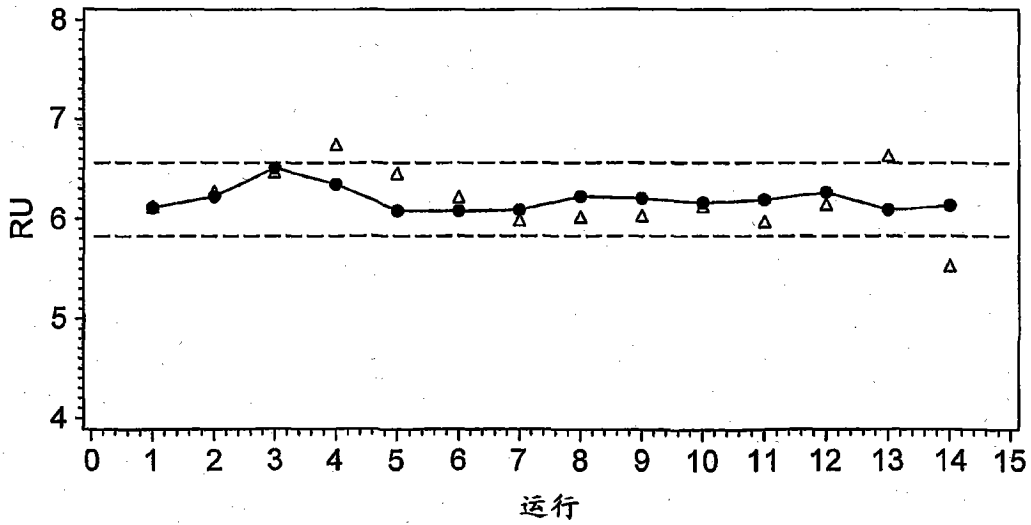


图 23a

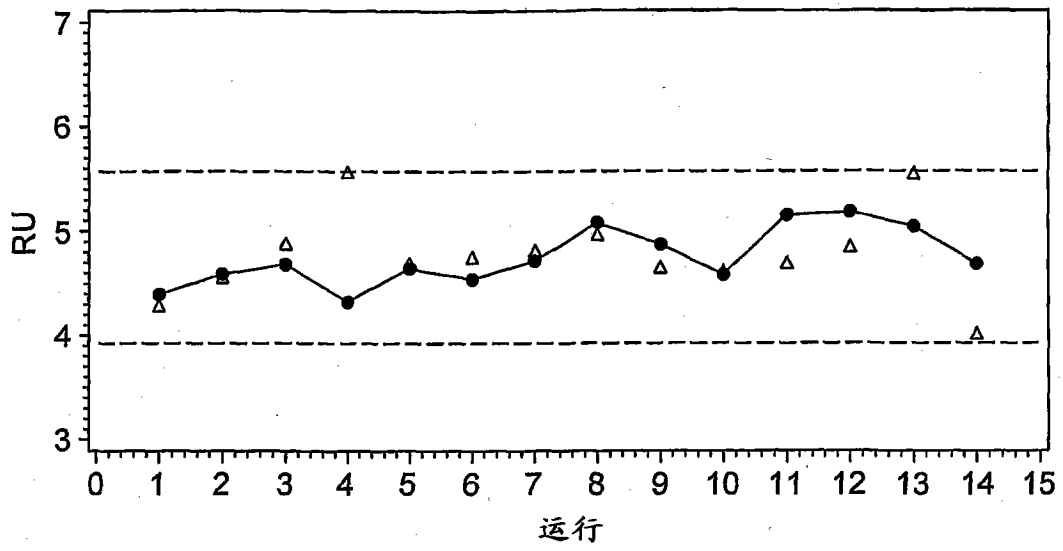


图 23b

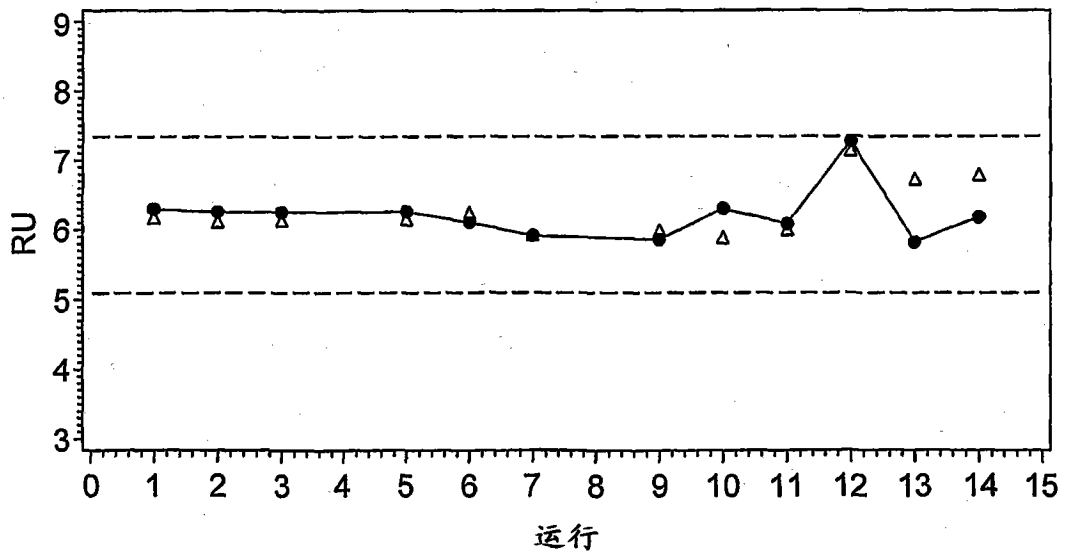


图 23c

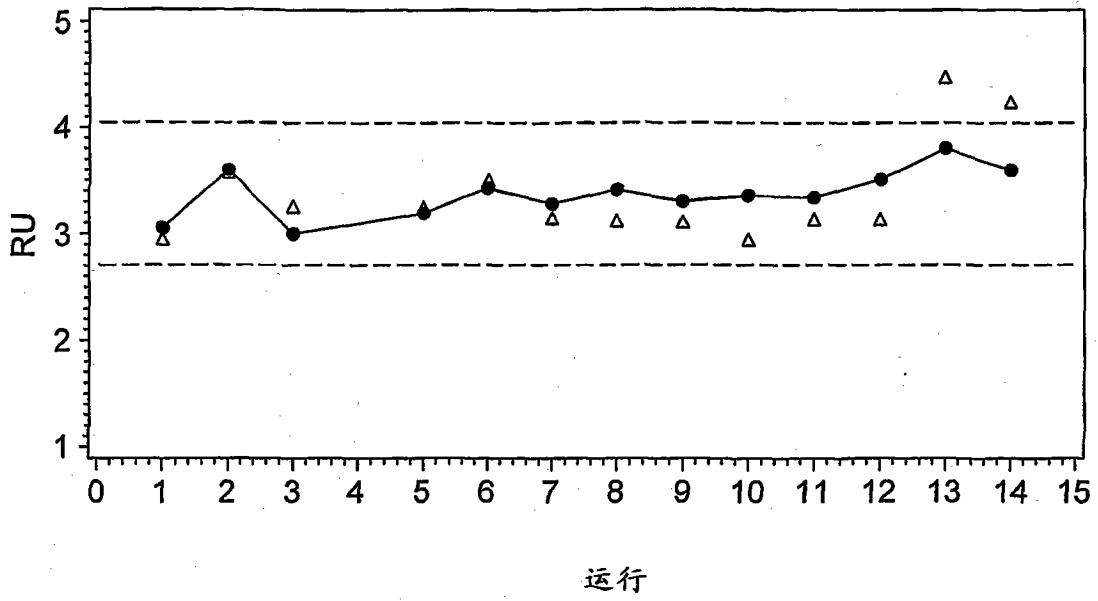


图 23d

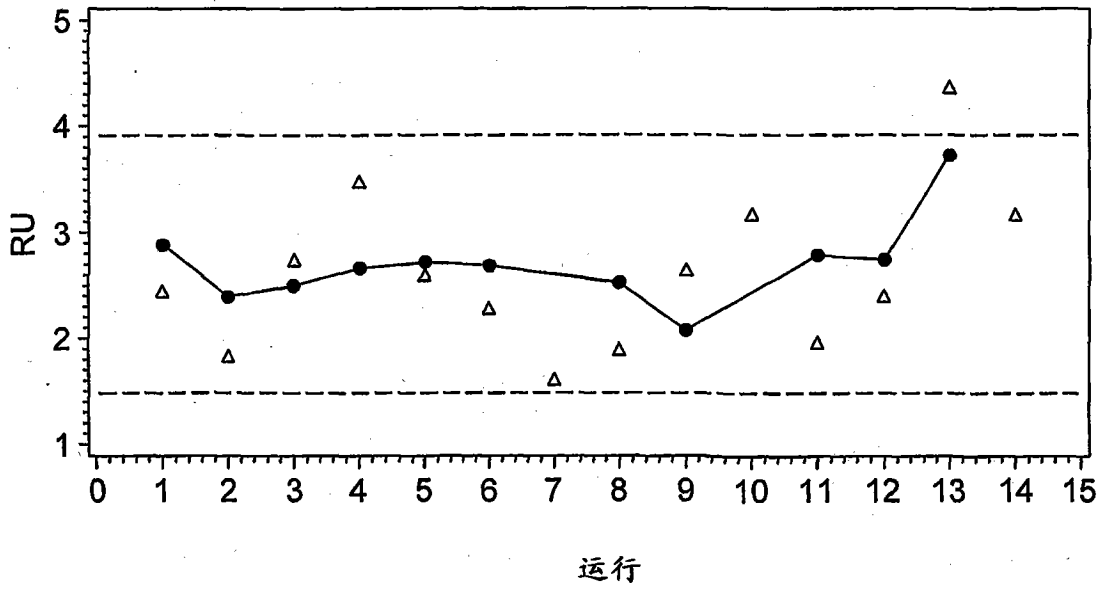


图 23e

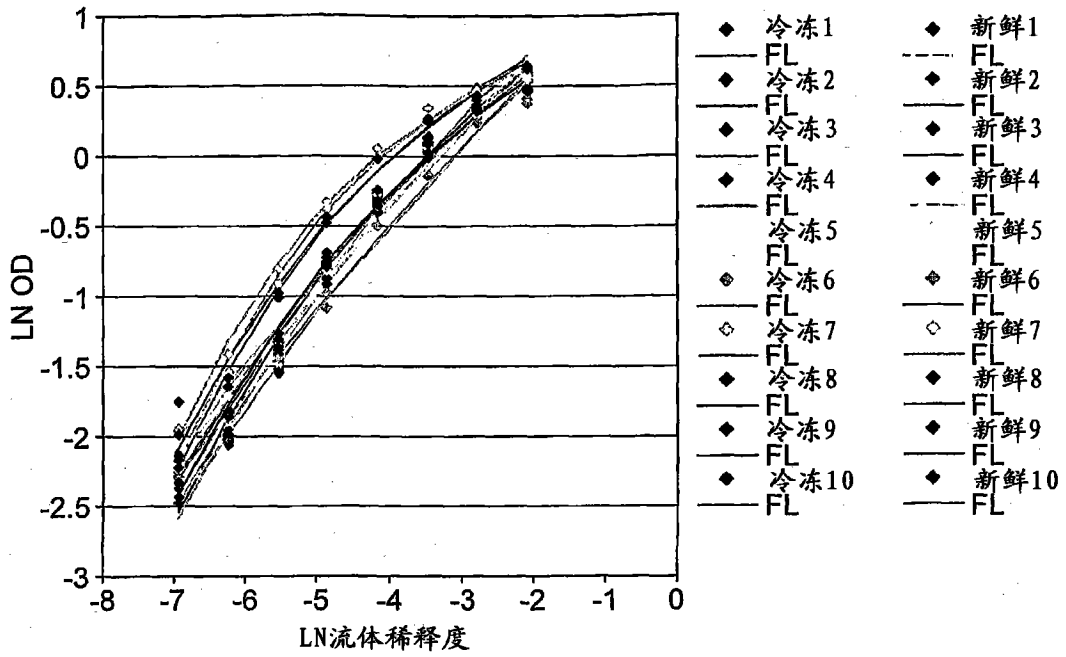


图 24a

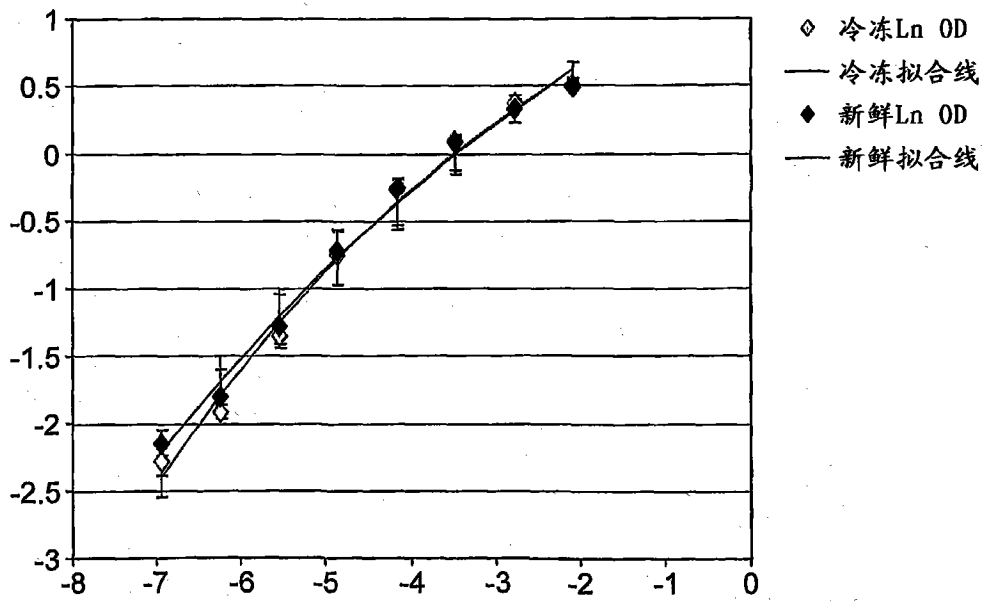


图 24b

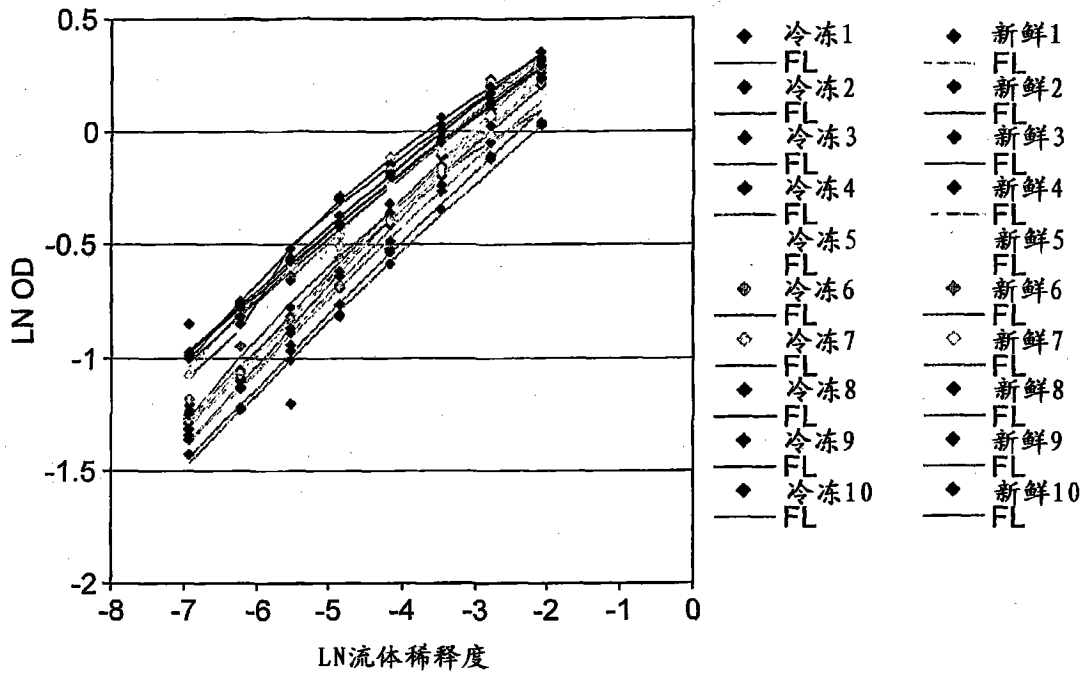


图 25a

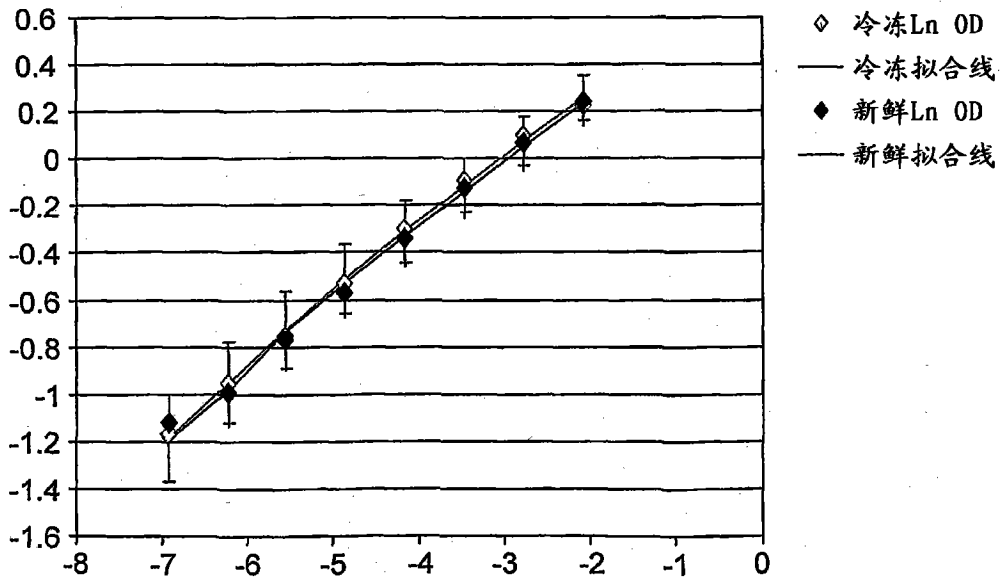


图 25b

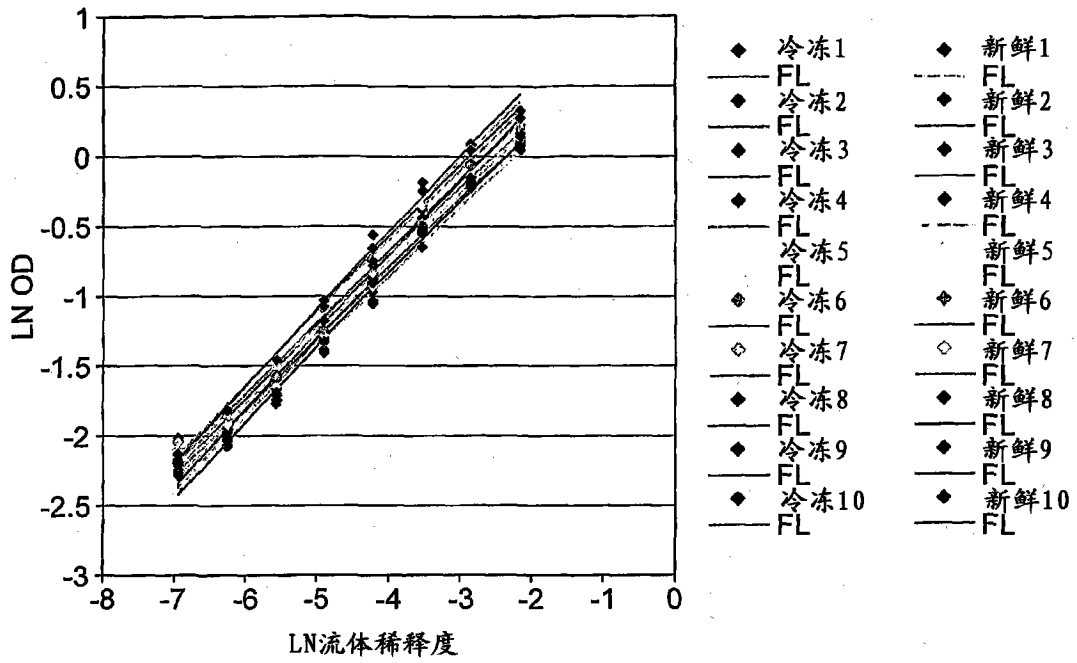


图 26a

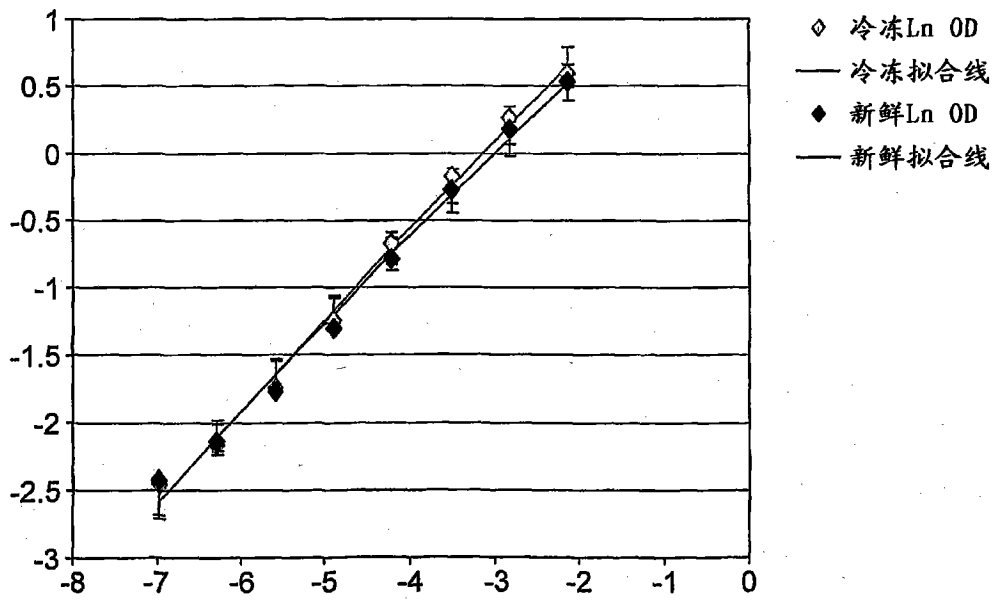


图 26b

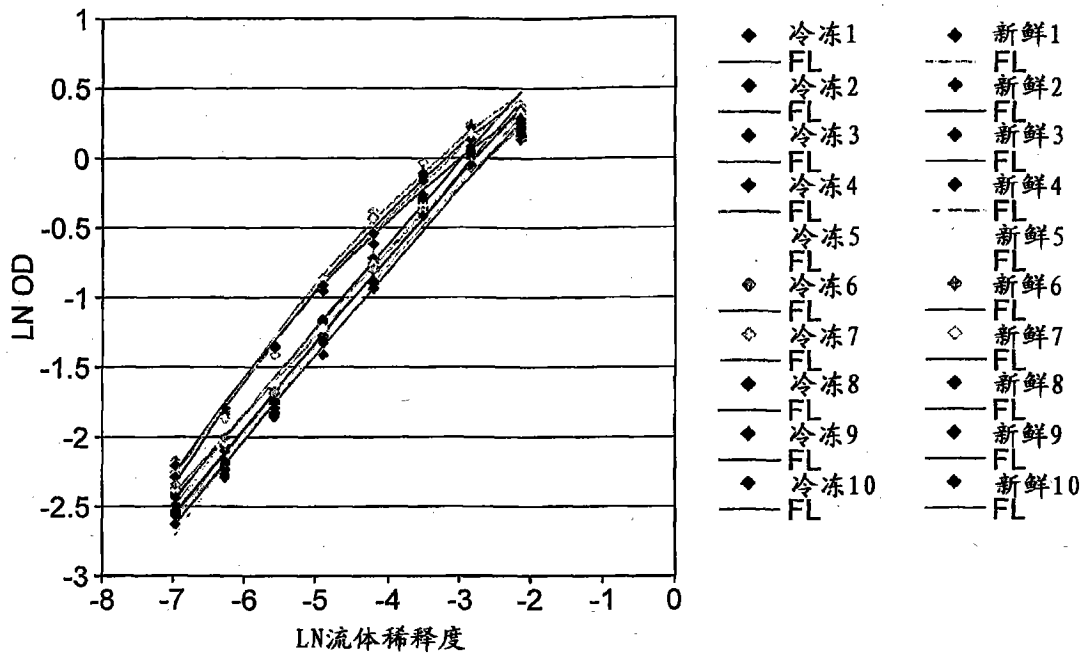


图 27a

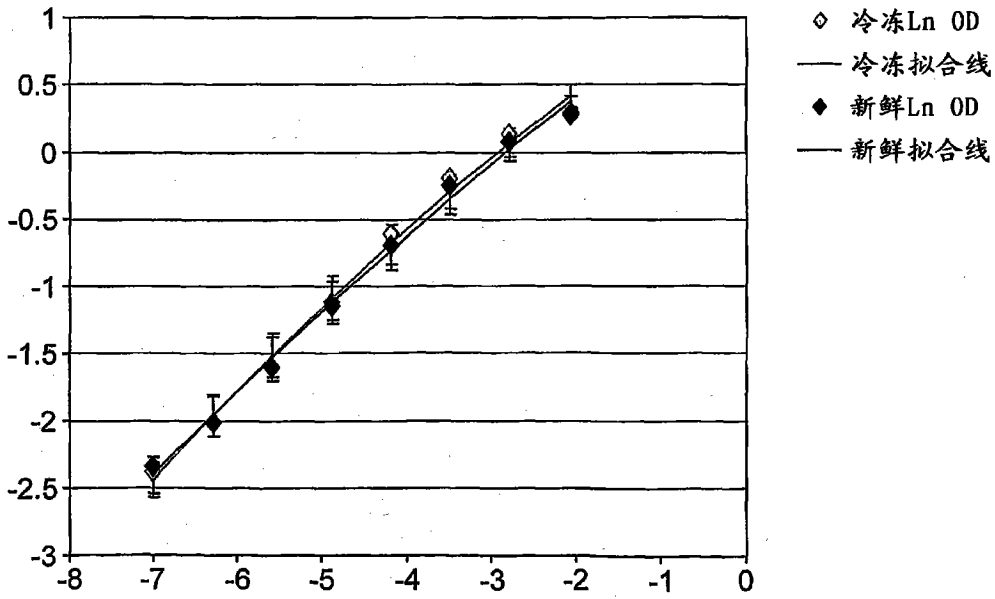


图 27b

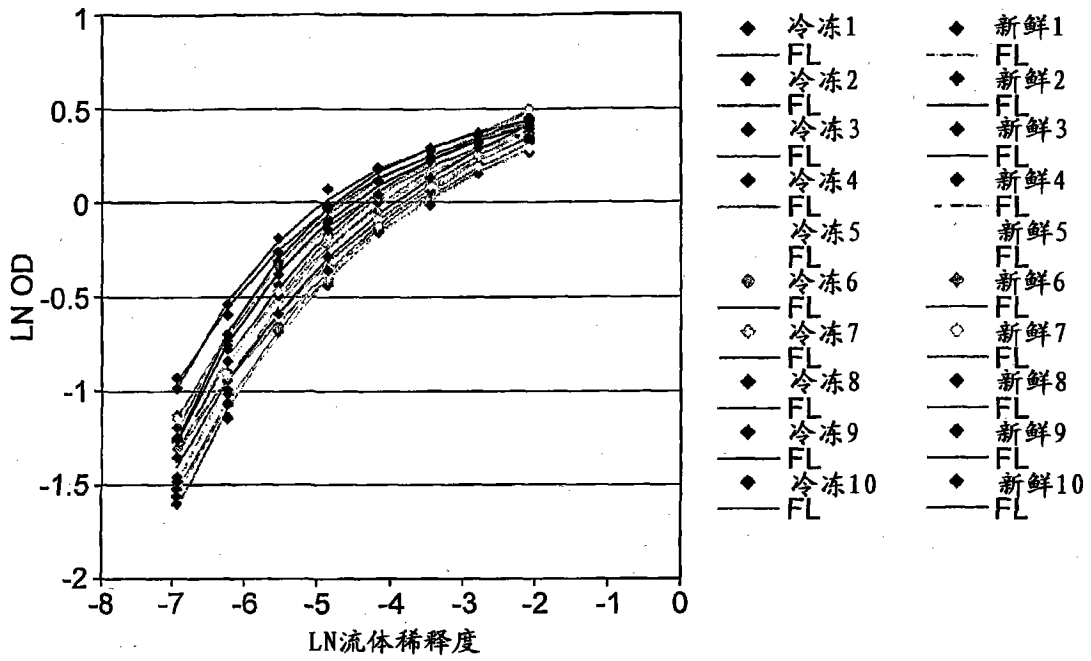


图 28a

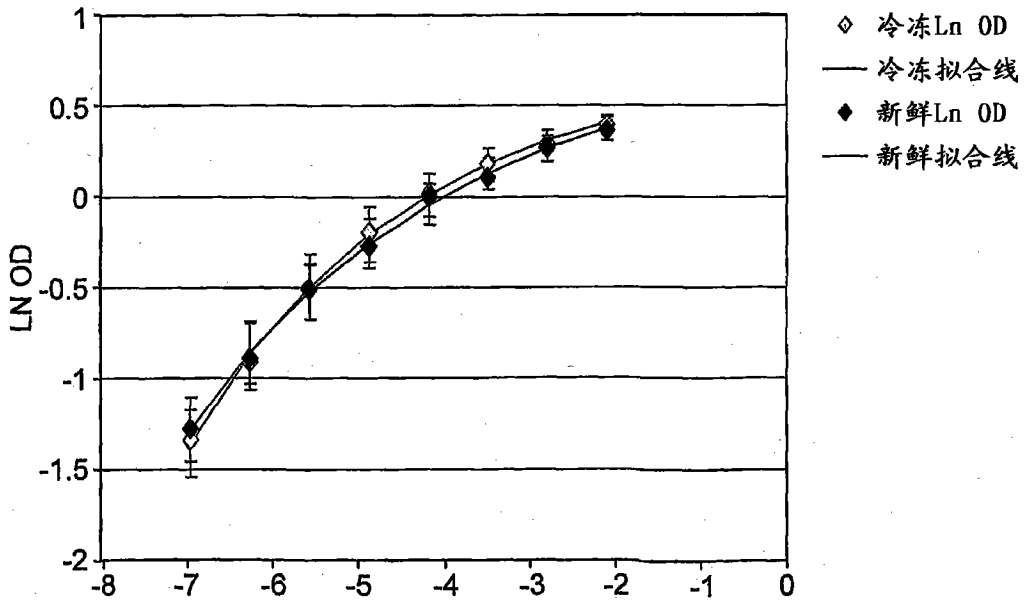


图 28b

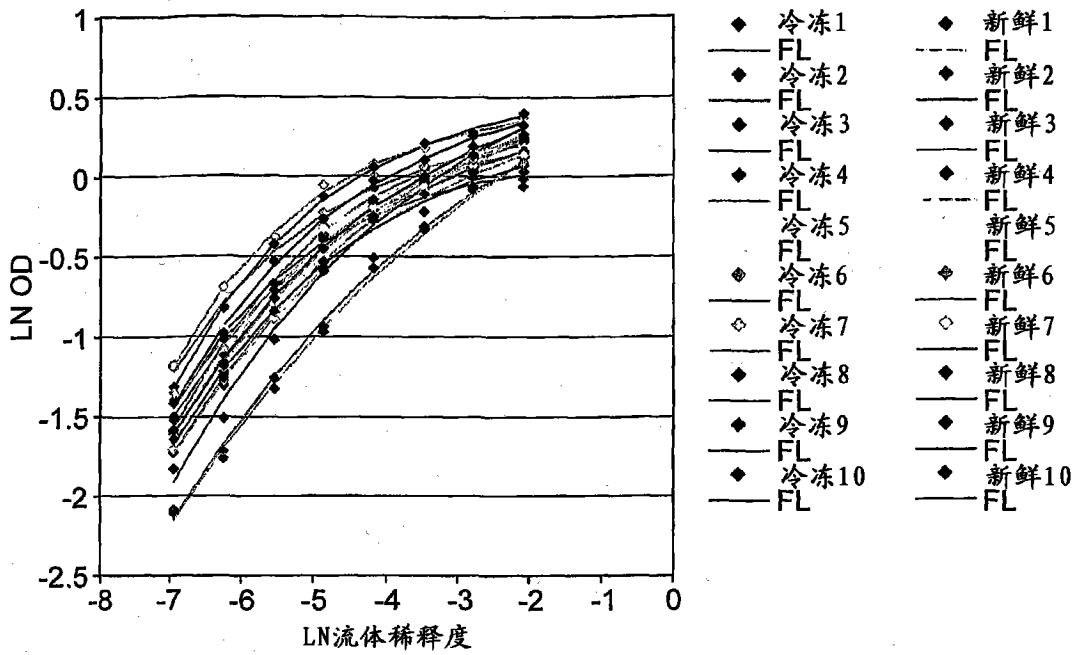


图 29a

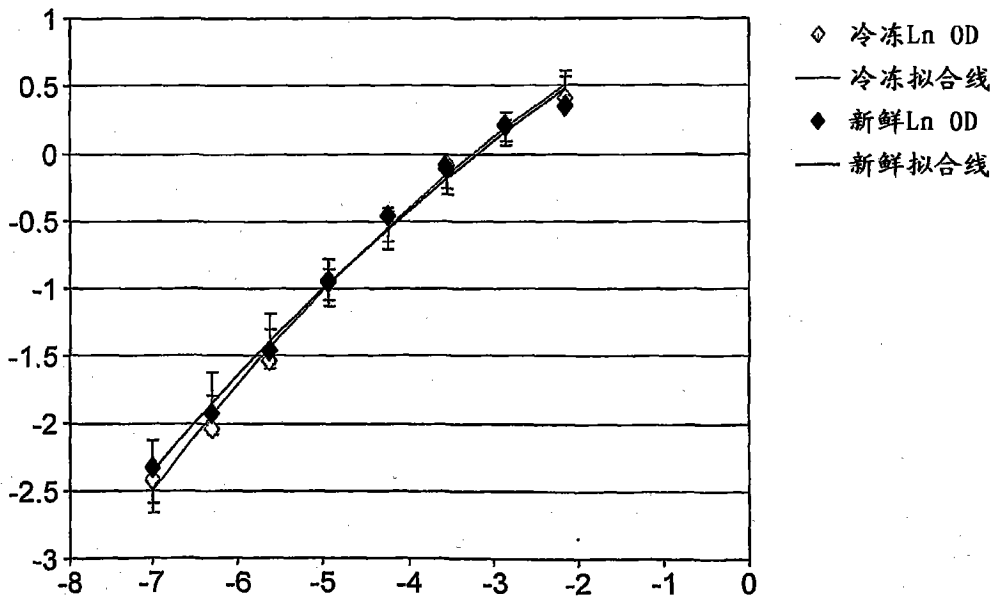


图 29b

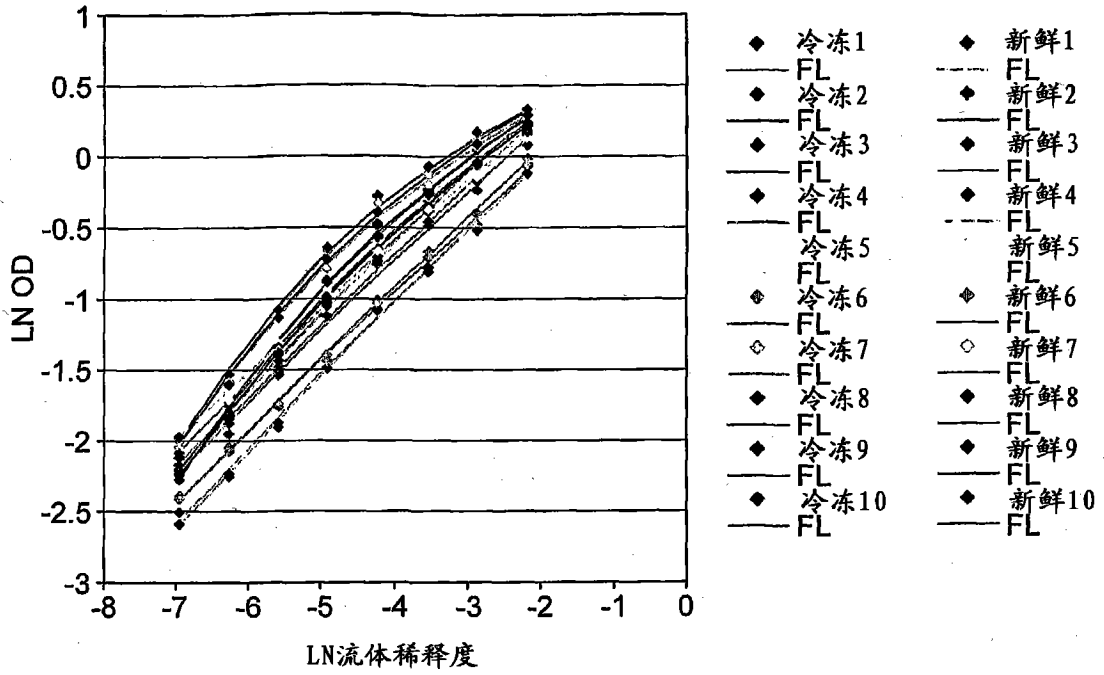


图 30a

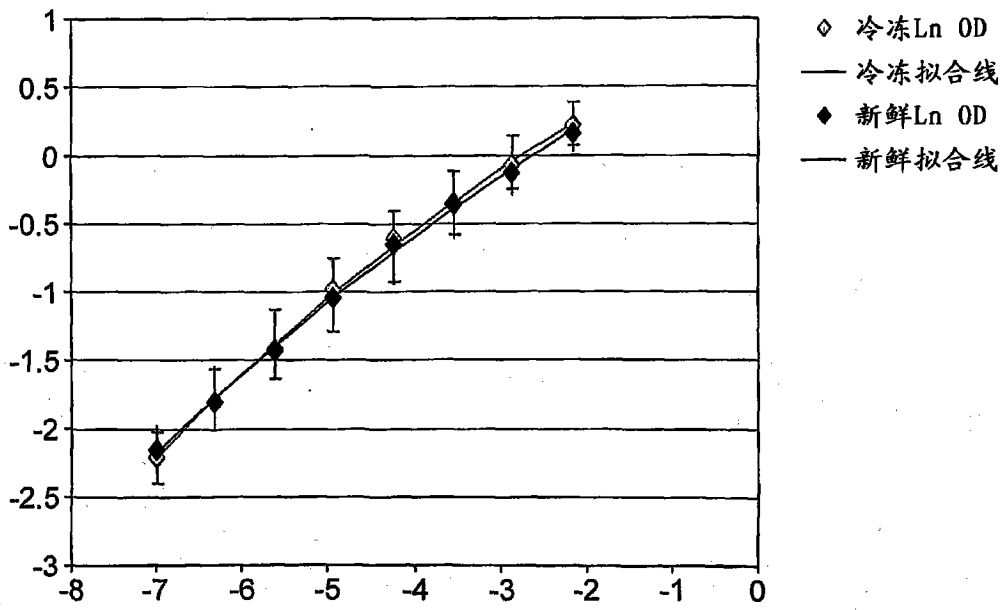


图 30b

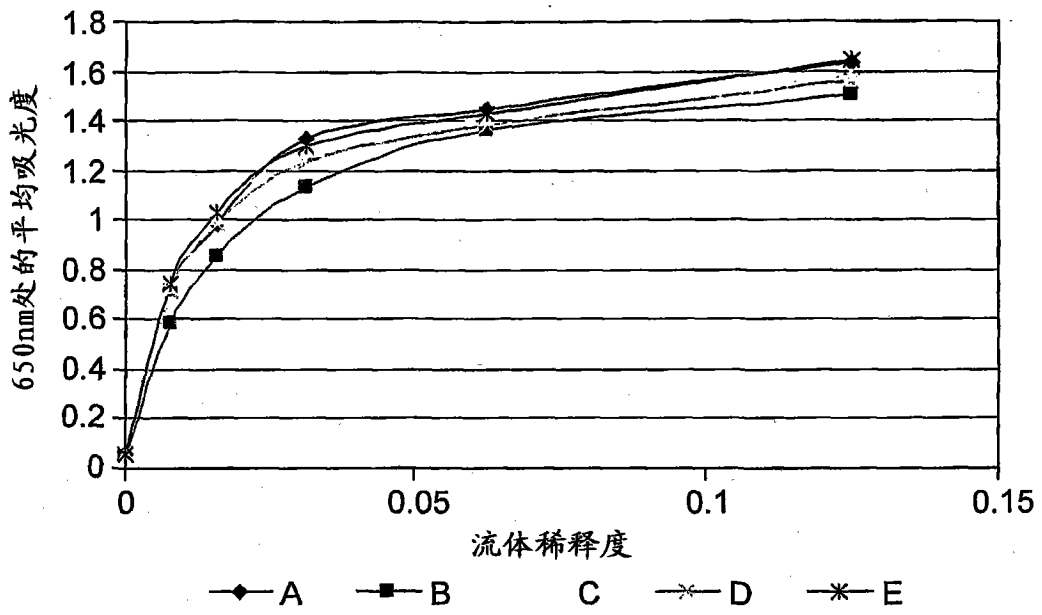


图 31a

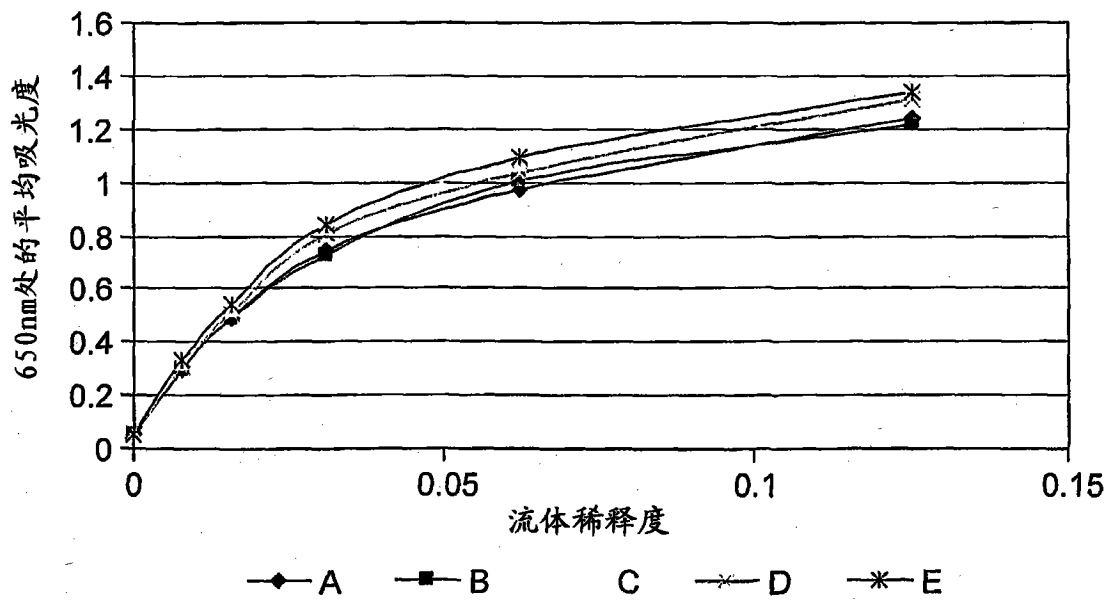


图 31b

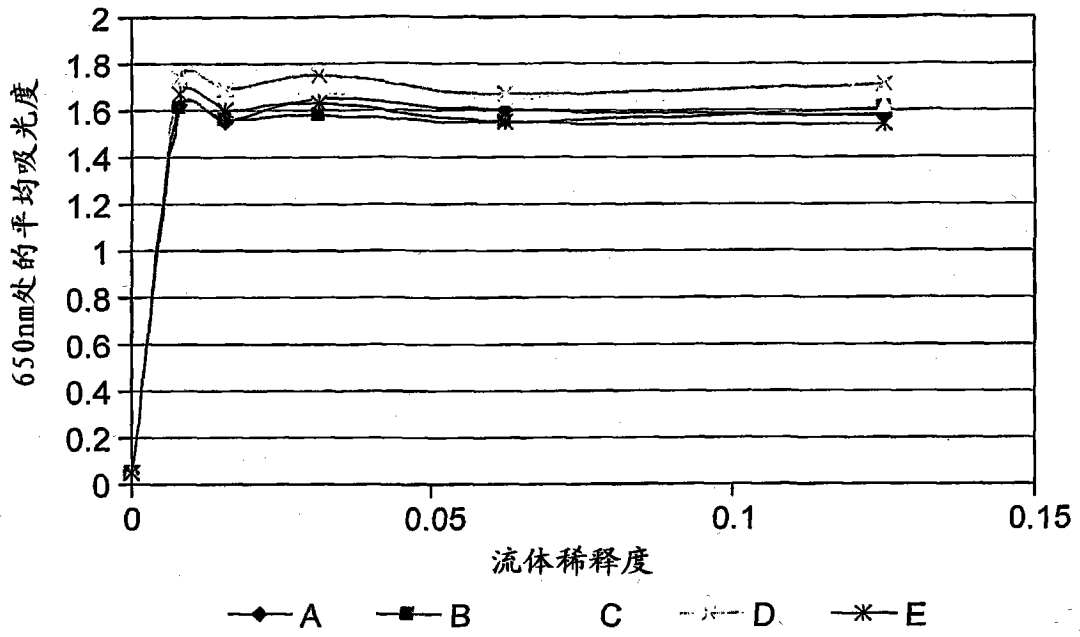


图 31c

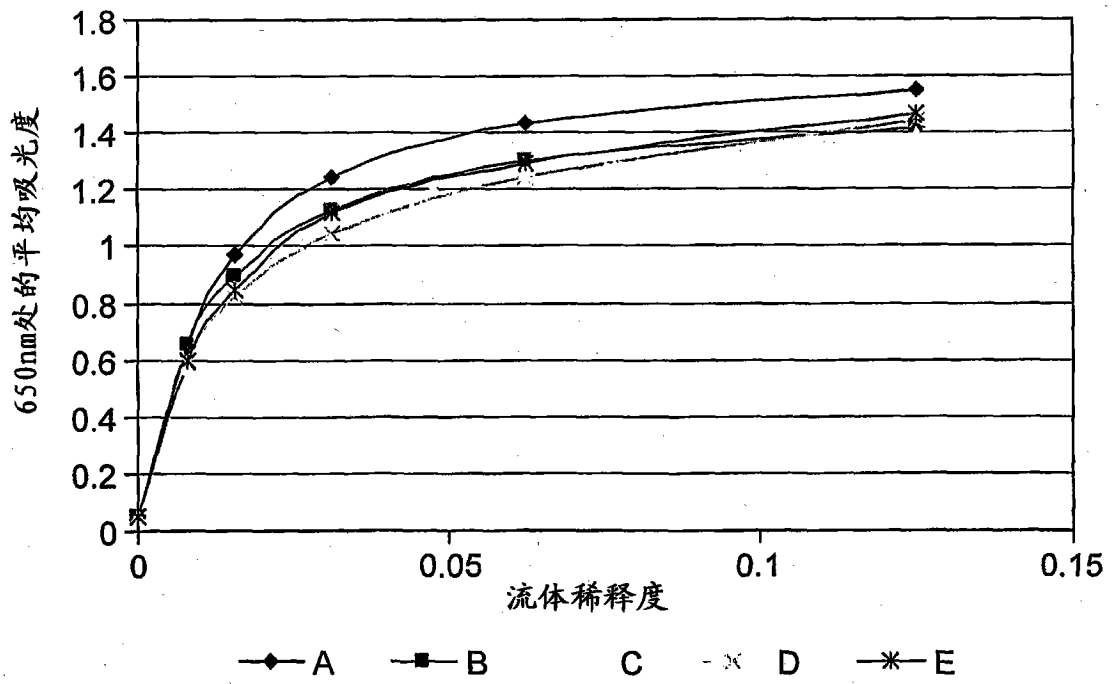


图 31d

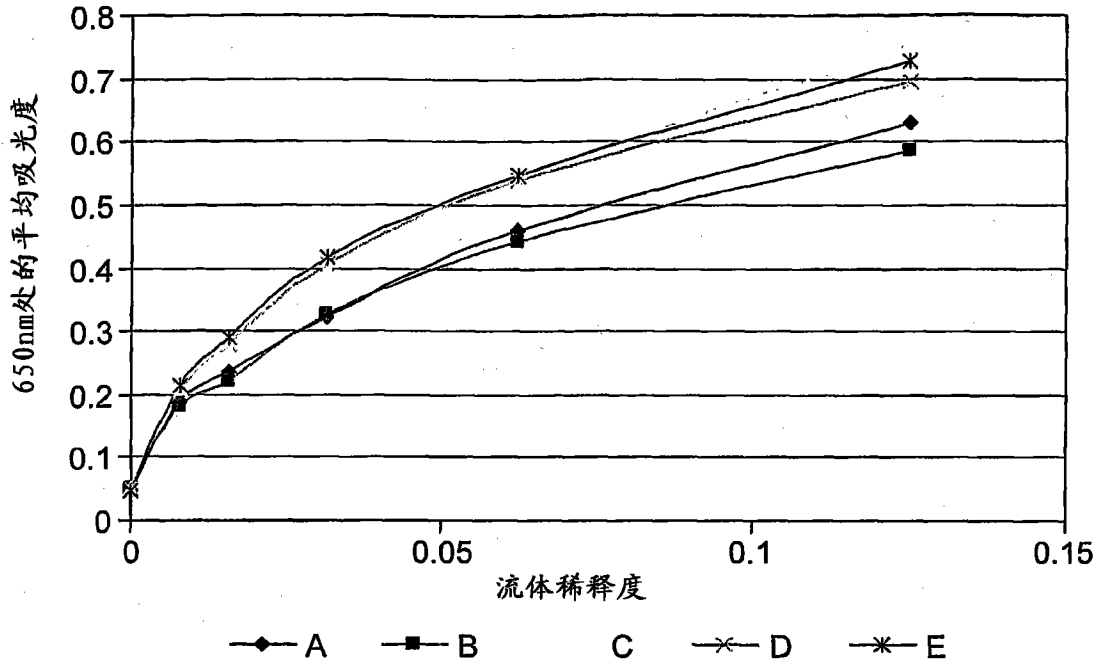


图 31e

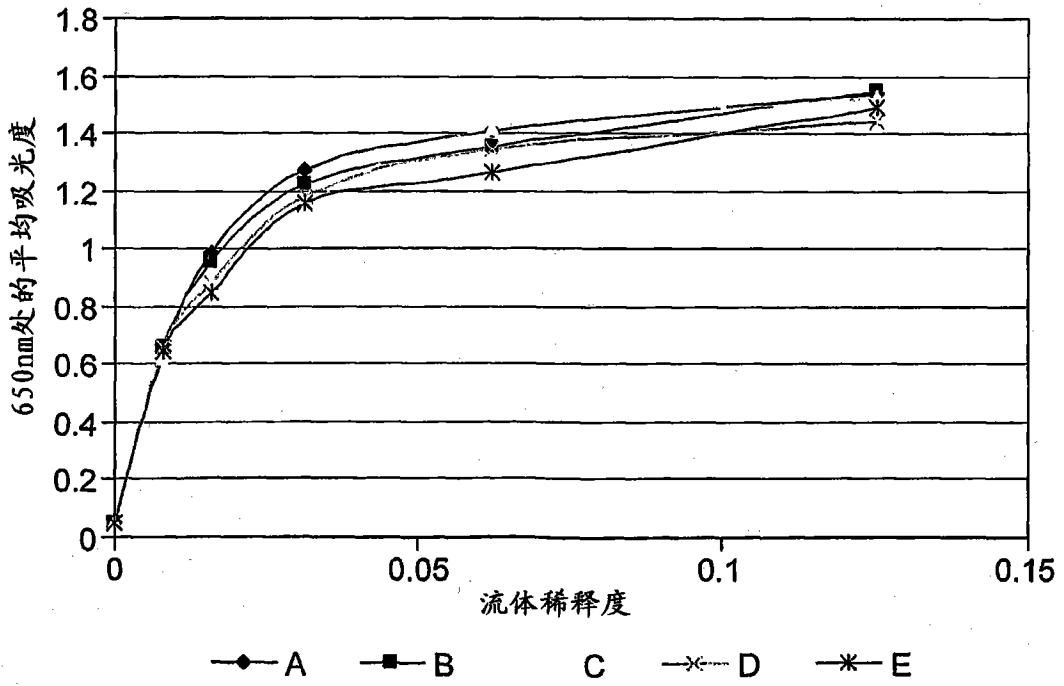


图 31f

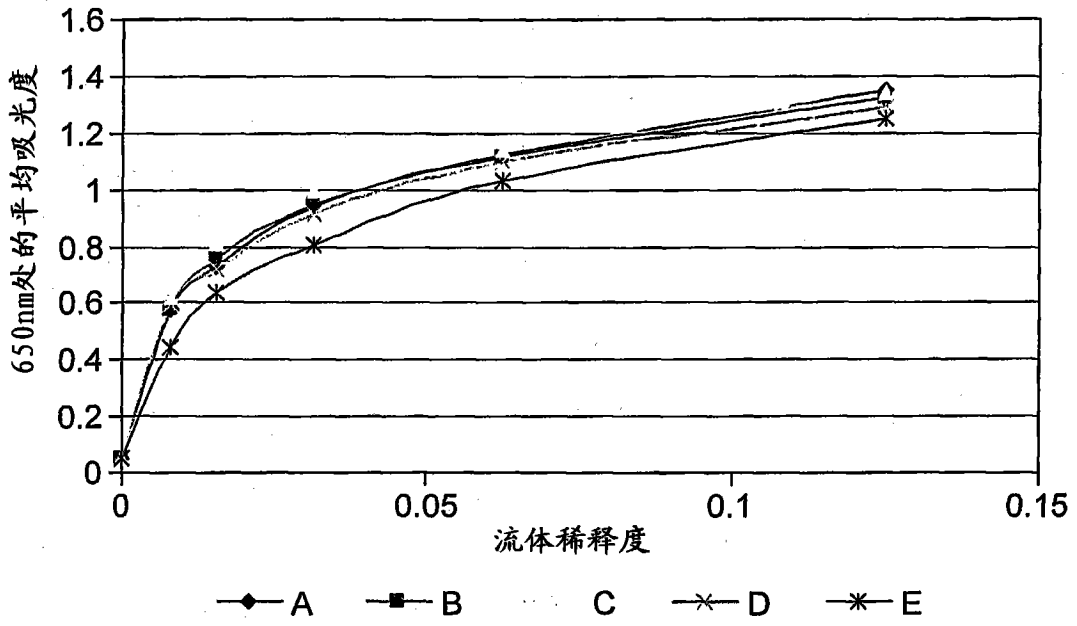


图 31g

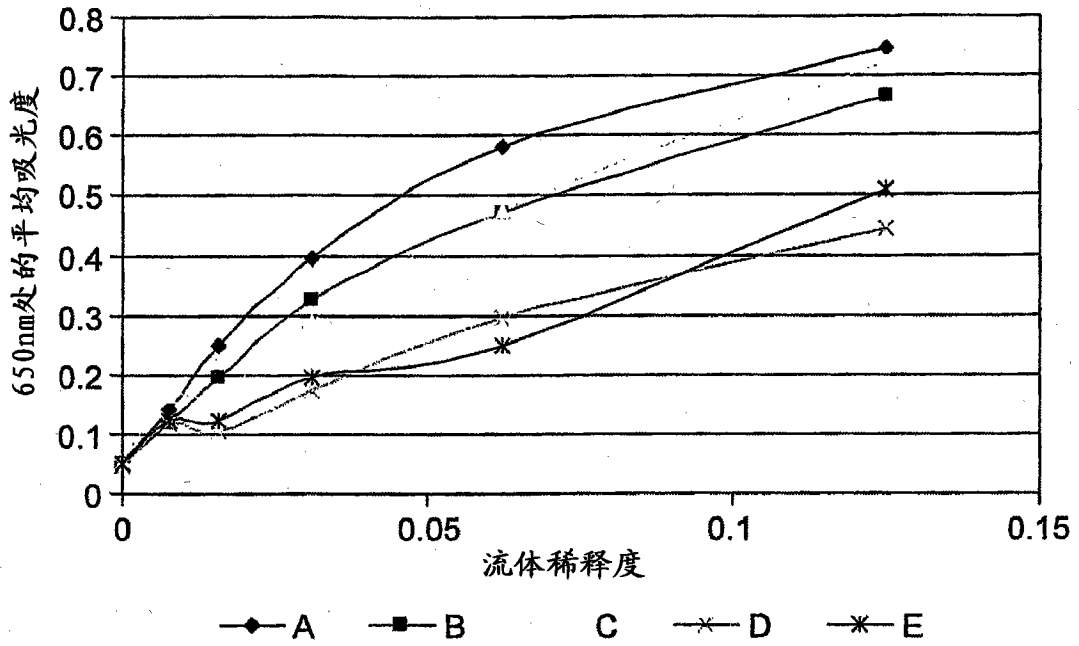


图 32a

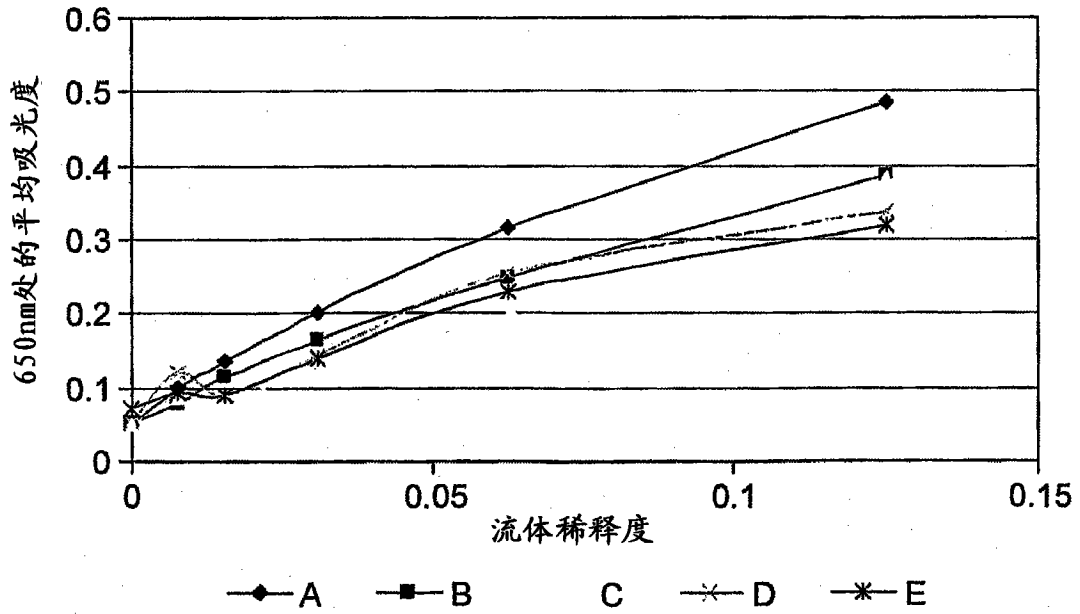


图 32b

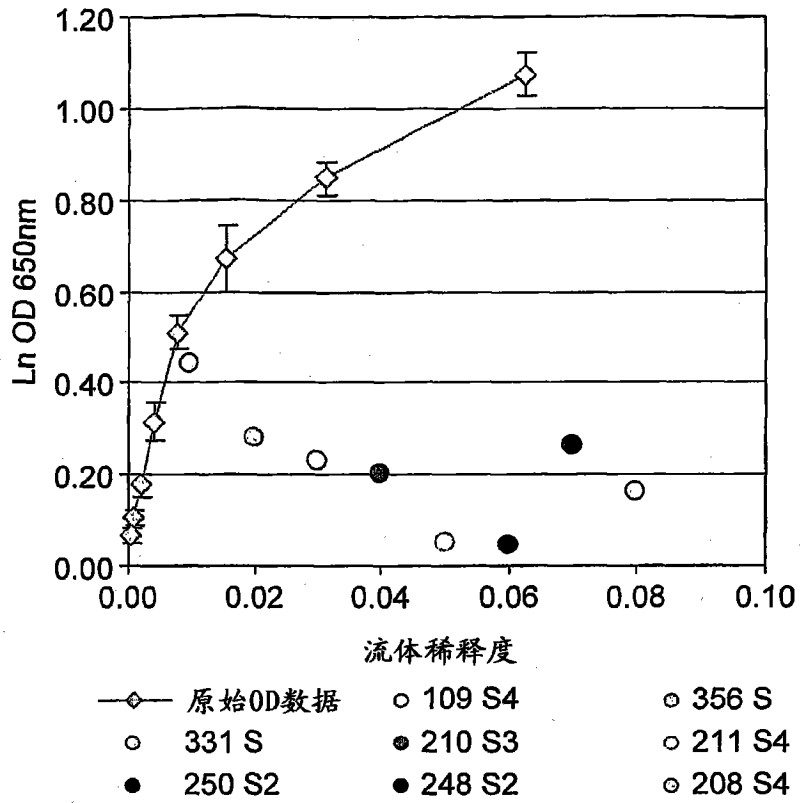


图 33a

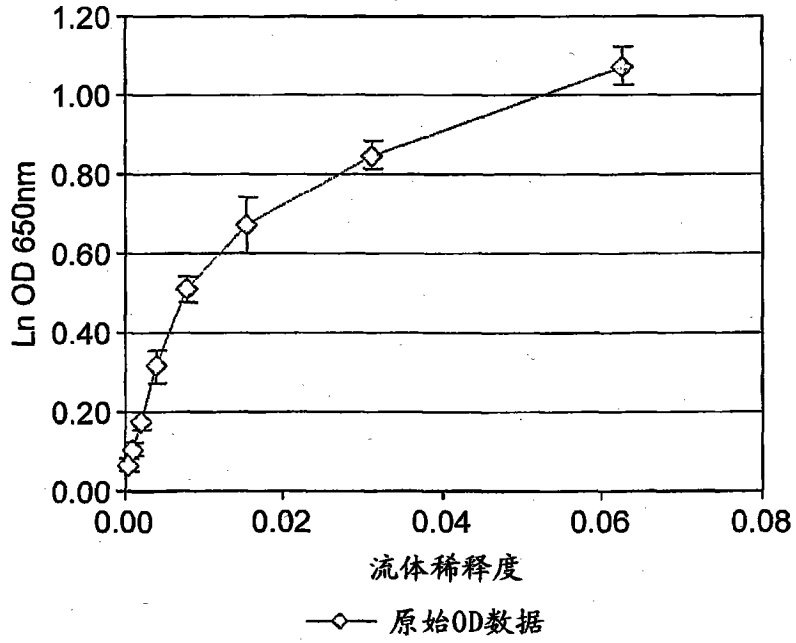


图 33b

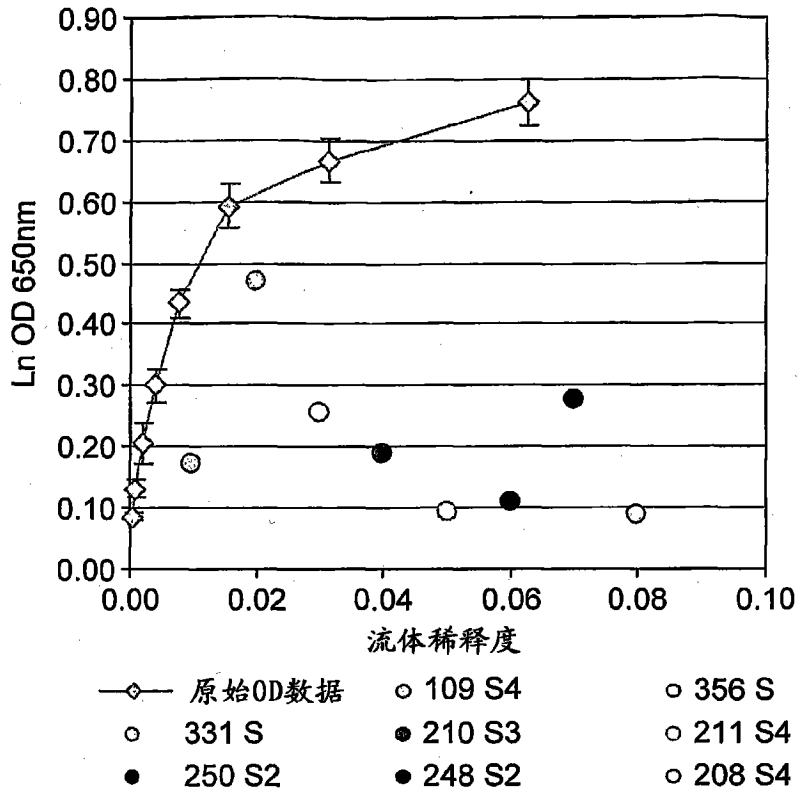


图 34a

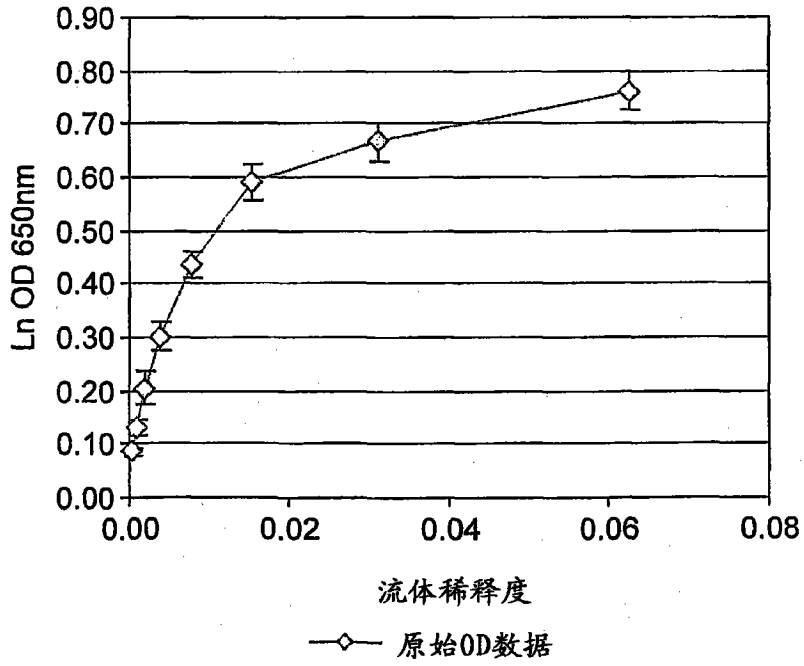


图 34b

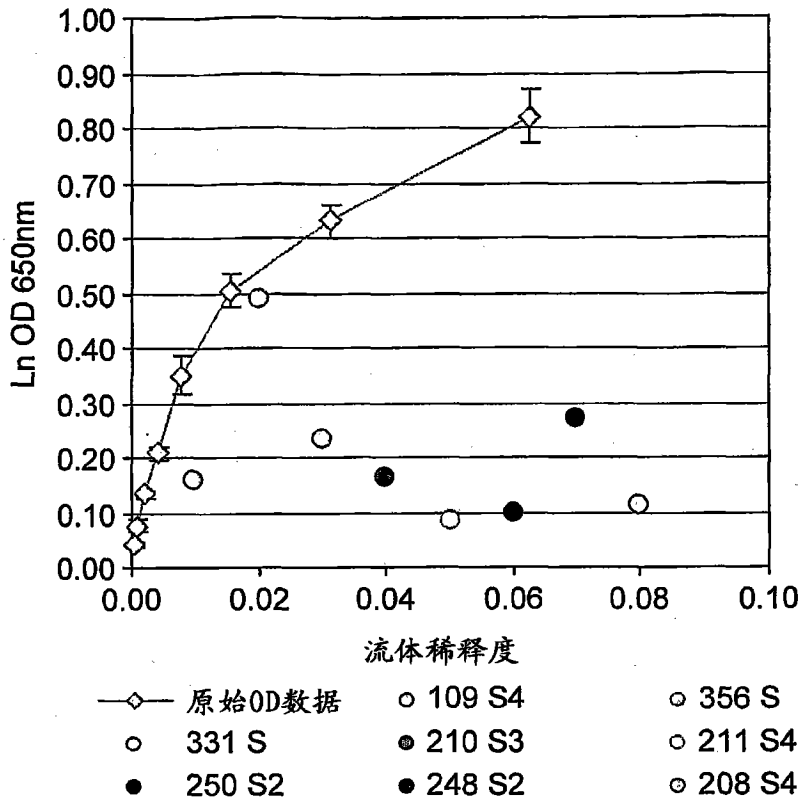


图 35a

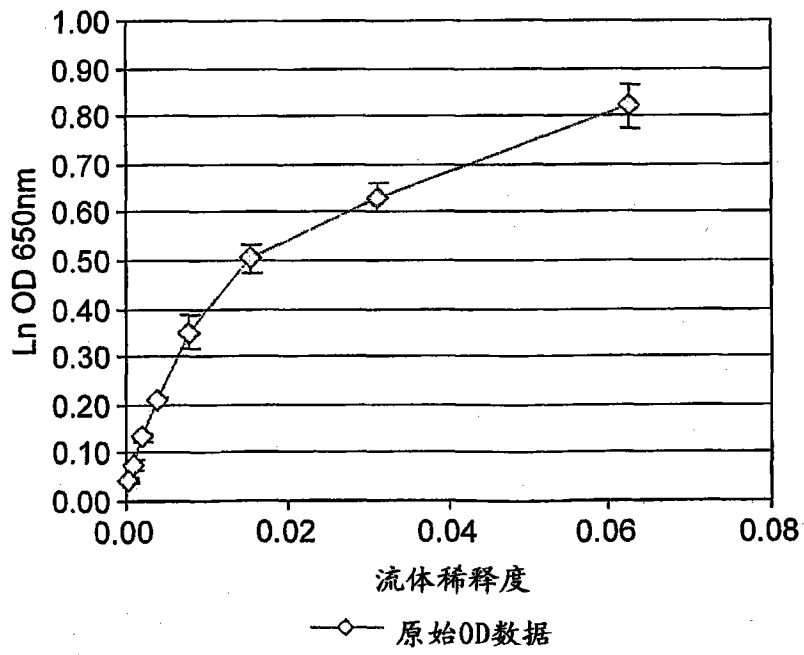


图 35b

专利名称(译)	免疫测定的校准品		
公开(公告)号	CN101952723B	公开(公告)日	2016-05-11
申请号	CN200880122385.1	申请日	2008-12-23
[标]申请(专利权)人(译)	昂西免疫有限公司		
申请(专利权)人(译)	昂西免疫有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	昂西免疫有限公司		
[标]发明人	约翰福赛思鲁塞尔罗伯特森 安德烈亚默里 卡罗琳查普曼 安东尼巴恩斯		
发明人	约翰·福赛思·鲁塞尔·罗伯特森 安德烈亚·默里 卡罗琳·查普曼 安东尼·巴恩斯		
IPC分类号	G01N33/536 G01N33/564		
CPC分类号	G01N33/57488 G01N33/531 G01N33/564 G01N33/574 G01N33/58 G01N33/96 G01N2496/00 G01N2496/05		
优先权	2007025239 2007-12-24 GB 61/016689 2007-12-26 US		
其他公开文献	CN101952723A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

包含哺乳动物体液的校准物质用于校准检测自身抗体之免疫测定的用途。

