

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200680018335. X

[51] Int. Cl.

G01N 33/53 (2006.01)

G01N 33/564 (2006.01)

G01N 33/574 (2006.01)

[43] 公开日 2008 年 6 月 18 日

[11] 公开号 CN 101203756A

[22] 申请日 2006.5.26

[21] 申请号 200680018335. X

[30] 优先权

[32] 2005. 5. 27 [33] US [31] 60/685,422

[32] 2005. 5. 27 [33] GB [31] 0510943.4

[86] 国际申请 PCT/GB2006/001944 2006.5.26

[87] 国际公布 WO2006/126008 英 2006.11.30

[85] 进入国家阶段日期 2007.11.26

[71] 申请人 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
托尼·巴尔内斯 安德烈亚·默里
卡罗琳·查普曼

[74] 专利代理机构 北京集佳知识产权代理有限公司
代理人 刘晓东 顾晋伟

权利要求书 5 页 说明书 36 页 附图 12 页

[54] 发明名称

改进的免疫测定方法

[57] 摘要

本发明涉及检测哺乳动物受试者中疾病状态或疾病易感性的方法，包括检测包含所述哺乳动物受试者体液的测试样品中的抗体，其中所述抗体是疾病状态或疾病易感性的生物标志物，该方法包括：
(a) 使所述测试样品接触多种不同量的所述抗体特异性抗原，(b) 检测所述抗体与所述抗原之间特异性结合的量，(c) 对步骤(a)中所用的每个抗原量，绘制或计算所述特异性结合量对抗原量的曲线，以及(d) 基于每个所用的不同抗原浓度下所述抗体与所述抗原之间的特异性结合量，确定该疾病状态或疾病易感性是否存在。

1. 检测哺乳动物受试者中疾病状态或疾病易感性的方法，包括检测包含所述哺乳动物受试者体液的测试样品中的抗体，其中所述抗体为疾病状态或疾病易感性的生物标志物，该方法包括：

(a)使所述测试样品接触与多种不同量的所述抗体特异性抗原，

(b)检测所述抗体与所述抗原之间特异性结合的量，

(c)对步骤(a)中所用的每个抗原量，绘制或计算该特异性结合量对该抗原量的曲线，以及

(d)基于所用的每个不同抗原浓度下该抗体与该抗原之间特异性结合的量，确定该疾病状态或疾病易感性的存在与否。

2. 权利要求1的方法，其中基于所有测试抗原浓度下特异性结合量的集合值确定该疾病状态或疾病易感性的存在与否。

3. 根据权利要求1或2的方法，其中通过筛选步骤(c)的图中总体为S形或反S型曲线的存在情况来确定所述疾病状态或疾病易感性的存在与否。

4. 根据前述权利要求中任一项的方法，其中所述抗体是对肿瘤标志物蛋白具有特异性的自身抗体。

5. 根据权利要求4的方法，其中所述抗原是肿瘤标志物蛋白或其抗原片段或表位。

6. 根据权利要求5的方法，其中所述肿瘤标志物蛋白为MUC1、MUC16、c-myc、EGFR、p53、ras、BRCA1、BRCA2、APC、HER2、PSA、CEA、CA19.9、NY-ESO-1、4-5、CAGE、PSMA、PSCA、EpCam、细胞角蛋白、恢复蛋白、激肽释放酶、膜联蛋白、AFP、GRP78、CA125、乳腺珠蛋白或raf。

7. 权利要求4-6中任一项的方法在癌症的诊断、预后或监测中的用途。

8. 权利要求4-6中任一项的方法在筛选无症状人受试者群体以鉴定发生癌症的风险提高的受试者中的用途，其中使用该方法测试的样品是取自该受试者的体液样品，并且其中将与正常对照个体相比自身抗体

水平升高的受试者鉴定为具有发生癌症的风险。

9. 权利要求 4-6 中任一项的方法在检测无症状人受试者的早期肿瘤性或早期致癌性改变中的用途，其中使用该方法测试的样品是取自该受试者的体液样品，并且其中将与正常对照个体相比自身抗体水平的升高作为该受试者中早期肿瘤性或早期致癌性改变的指示。

10. 权利要求 4-6 中任一项的方法在筛选无症状人受试者群体以鉴定已发生癌症的受试者中的用途，其中使用该方法测试的样品是取自该受试者的体液样品，并且其中将与正常对照个体相比自身抗体水平升高的受试者诊断为患有癌症。

11. 权利要求 4-6 中任一项的方法在测试无症状人受试者群体以鉴定已发生癌症的受试者中的用途，其中使用该方法测试的样品是取自该受试者的体液样品，并且其中将与正常对照个体相比自身抗体水平升高的受试者诊断为患有癌症。

12. 权利要求 4-6 中任一项的方法在监测患者癌症或其它肿瘤疾病的发展中的用途，其中使用该方法测试的样品是取自人患者的体液样品，并且其中将与正常对照相比自身抗体水平的升高作为该患者中存在癌症的指示。

13. 权利要求 4-6 中任一项的方法在检测先前诊断为患有癌症的人患者的复发疾病中的用途，所述人患者已经过抗癌治疗以降低癌症存在数量，其中使用该方法测试的样品是取自该患者的体液样品，并且其中将与正常对照相比患者中自身抗体水平的提高作为疾病已经复发的指示。

14. 权利要求 4-6 中任一项的方法在评估癌症预后中的用途，其中使用该方法测试的样品是取自人患者的体液样品，并且其中将与正常对照相比自身抗体水平的升高作为该患者癌症预后的指示。

15. 权利要求 4-6 中任一项的方法在预测对抗癌治疗的反应中的用途，其中使用该方法测试的样品是取自人类患者的体液样品，并且其中将所述患者的自身抗体水平与自身抗体水平和可能的治疗结果之间先前已建立的关系进行比较，以提供该患者是否将对这种抗癌治疗有反应的指示。

16. 根据权利要求 15 的用途，其中所述抗癌治疗为接种疫苗、抗生长

因子或信号转导治疗、放射治疗、内分泌治疗、人抗体治疗或化学治疗。

17. 权利要求 4-6 中任一项的方法在监测人癌症患者对抗癌治疗的应答中的用途，其中使用该方法测试的样品是取自该患者的体液样品，并且其中将治疗后自身抗体水平的变化作为该患者是否应答于该治疗的指示。

18. 根据权利要求 17 的用途，其中所述治疗为接种疫苗、抗生长因子或信号转导治疗、放射治疗、内分泌治疗、人抗体治疗或化学治疗，并且将治疗后自身抗体水平的变化作为该患者对该治疗具有阳性应答的指示。

19. 权利要求 4-6 中任一项的方法中的步骤 (a) 到 (c) 在选择用于特定人患者的抗癌治疗中的用途，其中该方法使用具有两种或更多抗原的板进行，每种抗原对应于不同的肿瘤标志物蛋白，以确定该患者对每一种不同肿瘤标志物蛋白的免疫应答的相对强度，其中选择鉴定为在该患者中引发最强免疫应答或强应答的一种或多种肿瘤标志物蛋白形成用于该患者的抗癌治疗的基础。

20. 根据权利要求 19 的用途，其中所述抗癌治疗为疫苗接种，其中选择鉴定为在该患者中引发最强免疫应答或强应答的一种或多种肿瘤标志物蛋白形成用于该患者的抗癌疫苗的基础。

21. 根据权利要求 1 的方法，其中所述抗体为自身抗体，其为自身免疫病的特征或与其相关。

22. 根据权利要求 21 的方法，其中所述自身免疫病为类风湿性关节炎、系统性红斑狼疮 (SLE)、原发性胆汁性肝硬化 (PBC)、自身免疫性甲状腺炎、桥本甲状腺炎、自身免疫性胃炎、恶性贫血、自身免疫性肾上腺炎、艾迪生病、自身免疫性甲状旁腺功能减退、自身免疫性糖尿病或重症肌无力。

23. 根据权利要求 1 的方法，其中所述抗体为自身抗体，其为导致器官功能不全或衰竭的肾病或肝病的特征或与其相关。

24. 根据权利要求 1 的方法，其中所述抗体针对移植进入该哺乳动物受试者的组织上存在的表位。

25. 在包含哺乳动物受试者体液的测试样品中检测抗体的方法，其中

所述抗体针对引入所述哺乳动物受试者的外源物质，该方法包括：

- (a) 使该测试样品接触多种不同量的该抗体特异性抗原，
- (b) 检测该抗体和该抗原之间特异性结合的量，以及
- (c) 对步骤(a)中所用的每个抗原量，绘制或计算所述特异性结合量对该抗原量的曲线。

26. 权利要求 25 所述的方法，其包括步骤(d)：基于在所用的每个不同抗原浓度下该抗体与该抗原之间特异性结合的量，检测所述抗体的存在情况。

27. 权利要求 25 或 26 的方法，其中基于所有测试抗原浓度下特异性结合量的集合值检测该抗体的存在情况。

28. 权利要求 25-27 中任一项所述的方法，其中通过总体为 S 形或反 S 型的曲线指示测试样品中存在与测定中所用抗原具有反应性的抗体。

29. 根据权利要求 25-28 中任一项的方法，其中所述哺乳动物受试者为人。

30. 根据权利要求 25-29 中任一项的方法，其中所述外源物质为治疗剂。

31. 根据权利要求 30 的方法，其中所述治疗剂为药物、前药或抗体疗法。

32. 根据权利要求 25-29 中任一项的方法，其中所述外源物质为疫苗。

33. 根据权利要求 31 或 32 的方法，其中所述外源物质为治疗剂或疫苗的非靶标部分。

34. 根据权利要求 33 的方法，其中所述非靶标部分为生物素。

35. 根据权利要求 25-29 中任一项的方法，其中所述外源物质为传染原如真菌、细菌、病毒或寄生虫。

36. 在包含哺乳动物受试者体液的测试样品中检测抗体的方法，其中所述抗体为疾病状态或疾病易感性的生物标志物，该方法包括：

- (a) 使该测试样品接触多个不同量的该抗体特异性抗原，

(b) 检测该抗体与该抗原之间特异性结合的量, 以及

(c) 对步骤(a)中所用的每一个抗原量, 绘制或计算该特异性结合量对该抗原量的曲线。

37. 根据权利要求36的方法, 其中通过总体为S形或反S型的曲线指示测试样品中存在与测定中所用抗原具有反应性的抗体。

38. 根据权利要求36或37的方法, 其中所述抗体是对肿瘤标志物蛋白具有特异性的自身抗体。

39. 根据权利要求36-38的方法, 其中所述抗原是肿瘤标志物蛋白或其抗原片段或表位。

40. 根据权利要求39的方法, 其中该肿瘤标志物蛋白是MUC1、MUC16、c-myc、EGFR、p53、ras、BRCA1、BRCA2、APC、HER2、PSA、CEA、CA19.9、NY-ESO-1、4-5、CAGE、PSMA、PSCA、EpCam、细胞角蛋白、恢复蛋白、激肽释放酶、膜联蛋白、AFP、GRP78、CA125、乳腺珠蛋白或raf。

41. 权利要求36-40中任一项的方法在癌症的诊断、预后或监测中的用途。

42. 权利要求36-40中任一项的方法用于权利要求8-20中任一项所确定应用的用途。

43. 根据权利要求36的方法, 其中所述抗体为自身抗体, 其为自身免疫病的特征或与其相关。

44. 根据权利要求36的方法, 其中所述自身抗体是导致器官功能不全或衰竭的疾病的特征或与其相关的自身抗体。

45. 根据权利要求44的方法, 其中该疾病为肾病或肝病。

46. 权利要求36的方法, 其中所述抗体针对移植进入哺乳动物受试者的组织上存在的表位。

47. 根据权利要求36-46中任一项的方法, 其中该抗原为天然存在的蛋白质或多肽、重组蛋白或多肽、合成蛋白质或多肽、合成肽、肽模拟物、多糖或核酸。

改进的免疫测定方法

技术领域

本发明一般涉及诊断或预后测定领域，特别涉及优化用于在包含患者体液的样品中检测抗体的测定，其中这样的抗体用作疾病状态或疾病易感性的生物标志物。

背景技术

许多诊断、预后和/或监测测定依赖于检测特定疾病状态或疾病易感性的生物标志物。这样的生物标志物一般是作为特定疾病特征的或与疾病易感性相关的蛋白质或多肽。

抗体特别是自身抗体也能作为疾病或疾病易感性的生物标志物，这一点在近年来开始愈发明显。自身抗体是天然存在的抗体，其针对被个体免疫系统识别为外源的抗原，尽管该抗原实际上源自该个体。它们可以作为循环的游离自身抗体存在于循环中，或者以由与其靶标志物蛋白结合的自身抗体组成的循环免疫复合物的形式存在。在一些情况下，正常细胞表达的野生型蛋白质与由疾病细胞产生或在疾病过程中产生的该蛋白质的改变形式之间的差异可能导致个体的免疫系统将所述改变的蛋白质识别为“非自身”，并因而在该个体中引发免疫应答。这可以是体液（即 B 细胞介导的）免疫应答，其引起产生对该改变的蛋白质具有免疫特异性的自身抗体。

WO99/58978 描述了用于检测/诊断癌症的方法，该方法基于评估个体对两种或更多不同肿瘤标志物的免疫应答。这些方法通常包括使来自个体的体液样品接触具有两种或更多不同肿瘤标志物抗原的板，每种抗原来自一种单独的肿瘤标志物蛋白，并且检测该肿瘤标志物抗原与对该肿瘤标志物蛋白具有免疫特异性的循环自身抗体结合的复合

物的形成。将存在这样的循环自身抗体作为存在癌症的指示。

测量个体在自身抗体产生方面对存在肿瘤标志物蛋白的免疫应答的测定提供了直接测量或检测体液中肿瘤标志物蛋白的替代方案。这样的测定实质上构成了对肿瘤标志物蛋白存在情况的间接检测。由于免疫应答的性质，很可能极少量的循环肿瘤标志物蛋白即可引发自身抗体，因此依赖于检测对肿瘤标志物的免疫应答的间接方法将比直接测量体液中肿瘤标志物的方法更灵敏。因此，基于检测自身抗体的测定可能在疾病过程的早期特别具有价值，并且可能在无症状患者的筛选方面也是如此，例如进行筛选以在无症状个体的群体中鉴定具有发生疾病“风险”的个体、在无症状个体的群体中鉴定已发生疾病的个体。另外，基于检测自身抗体的方法可能在疾病过程的早期特别具有价值，并且也可能被用于在无症状群体中鉴定已发生疾病的个体。此外，它们还可能用于复发性疾病的早期检测。该测定方法在选择或监测疾病的治疗方案方面也具有价值。

抗体和自身抗体也可作为其他疾病状态或疾病易感性的生物学标志物，例如类风湿性关节炎、系统性红斑狼疮（SLE）、原发性胆汁性肝硬化（PBC）、自身免疫性甲状腺炎（例如桥本甲状腺炎）、自身免疫性胃炎（例如恶性贫血）、自身免疫性肾上腺炎（例如艾迪生病）、自身免疫性甲状旁腺功能减退、自身免疫性糖尿病（例如I型糖尿病）、重症肌无力等。

本发明人认识到，当基于抗体检测的测定在诊断或预后上用于评价群体中个体的疾病状态、疾病进程或疾病易感性时，会在设计适用于整个待筛选群体的标准化测定法方面遇到困难，因为个体之间抗体的绝对量存在显著的变化。这会使假阴性结果的发生率很高，例如在抗体量低的个体中。类似地，对真阳性结果的评分也存在困难，因为个体间抗体绝对量的变化意味着难以为阳性测定结果设定适合于筛选群体中所有个体的阈值。

本发明人现在确定，可以通过包括抗原滴定步骤来显著改善基于检测作为疾病生物标志物的抗体特别是自身抗体的测定方法的性能、更具体地为临床效用以及可靠性。通过对怀疑含有抗体的样本针对一系列不同的抗原量进行测试并创建滴定曲线，有可能独立于样品中存在的抗体绝对量而可靠鉴定真阳性筛选结果。这样的方法与现有技术中的方法相反，在这些现有技术的方法中，滴定抗原仅用于创建校准曲线，以鉴定最适用于在实际患者样品中检测抗体的抗原浓度。在这些方法中，仅将单点测量用于实际诊断。因此，这些方法不容许个体间检测的抗体量的变化，导致发生所说的假阳性和假阴性。本发明人已经发现，本发明的抗原滴定法的特异性和灵敏度高于在单个抗原浓度下测定自身抗体的反应性以及滴定血清样品而不是抗原的方法。

发明概述

本发明的第一个方面提供在哺乳动物受试者中检测疾病状态或疾病易感性的方法，其包括在包含来自该哺乳动物受试者的体液的测试样品中检测抗体，其中所述抗体是疾病状态或疾病易感性的生物标志物，该方法包括：

- (a) 使所述测试样品与多个不同量的所述抗体特异性的抗原接触，
- (b) 检测所述抗体与所述抗原之间特异性结合的量，
- (c) 对步骤(a)中所用的每个抗原量，绘制或计算该特异性结合量对该抗原量的曲线，以及
- (d) 基于每个所用的不同抗原浓度下该抗体与该抗原之间特异性结合的量，确定该疾病状态或疾病易感性的存在与否。

本发明的第二个方面提供在包含来自哺乳动物受试者的体液的测试样品中检测抗体的方法，其中所述抗体针对引入该哺乳动物受试者的外源物质，该方法包括：

- (a) 使所述测试样品与多个不同量的所述抗体特异性的抗原接触，

(b) 检测所述抗体与所述抗原之间特异性结合的量, 以及

(c) 对步骤(a)中所用的每个抗原量, 绘制或计算该特异性结合量对该抗原量的曲线。

本发明的第三个方面提供在包含来自哺乳动物受试者的体液的测试样品中检测抗体的方法, 其中该抗体是疾病状态或疾病易感性的生物标志物, 该方法包括:

(a) 使所述测试样品与多个不同量的所述抗体特异性的抗原接触,

(b) 检测所述抗体与所述抗原之间特异性结合的量, 以及

(c) 对步骤(a)中所用的每个抗原量, 绘制或计算该特异性结合量对该抗原量的曲线。

在本发明的所有方面中, 所述哺乳动物受试者优选为人。

在本发明的所有方面中, 该方法优选在体外在包含从该哺乳动物受试者获得或制备的体液的测试样品上进行。

在所有方面中, 本发明的一个特别特征是, 对测试样品中是否存在相关抗体的判断是基于每个不同测试抗原浓度下观察到的特异性结合的量(换言之, 集合值), 而不是仅仅在单个浓度下的读数。因此, 可以直接基于这些集合值确定患者样品中是否存在疾病状态或疾病易感性或针对外源物质的抗体。优选地, 基于以特异性结合量对抗原量作图时呈现的总体为S形或反S型的曲线作出该判断。从本文实施例中显而易见地, 本发明人观察到本发明的抗原滴定法与基于单个读数的诊断或检测方法相比具有更高的特异性和灵敏度, 并且减少了假阳性和假阴性鉴定的发生率。

附图说明

图 1: 使用抗原滴定曲线测量血清中的自身抗体。癌症患者血清 17766 (C) 与测试抗原强烈结合, 具有特征性反 S 型曲线 (—◆—),

但是不与阴性对照结合，VOL (—■—)。作为对比，来自正常个体的血清 18052 (N) 不与测试抗原 (—▲—) 或阴性对照 (—◀—) 结合。

图 2: 使用抗原滴定测定衡量的正常个体与原发性乳腺癌 (PBC) 患者中 p53 自身抗体水平的比较。自身抗体水平表示为由于结合测试抗原 (p53) 产生的 OD_{650} 减去由于结合阴性对照产生的 OD_{650} 。正常截止值 (-----) 计算为正常群体的平均值加 2 倍标准差。

图 3 显示使用抗原滴定测定衡量的正常个体与肺癌患者中 p53 和 NY-ESO 自身抗体水平的比较。自身抗体水平表示为由于结合测试抗原 (p53 或 NY-ESO) 产生的 OD_{650} 减去由于结合阴性对照产生的 OD_{650} 。正常截止值 (-----) 计算为正常群体的平均值加 2 倍标准差。

图 4 显示用于在来自乳腺癌患者的腹水样品中检测针对 p53 和 NY-ESO 的自身抗体的滴定曲线。测试了该患者，但发现没有产生抗 c-myc 的自身抗体。

图 5 显示用于在来自乳腺癌患者 (原位导管癌) 的血清样品中检测针对 BRCA1、BRCA2 和 HER2 的自身抗体的滴定曲线。

图 6 显示用于在来自肺癌患者的血清样品中检测针对 NY-ESO 的自身抗体的滴定曲线。测试了该患者，但发现没有产生抗 p53 或 c-myc 的自身抗体。

图 7 显示用于在来自肺癌患者的血清样品中检测针对 NY-ESO 和 p53 的自身抗体的滴定曲线。测试了该患者，但发现没有产生抗 c-myc 的自身抗体。

图 8 (a) 和图 8 (b) 展示了在来自“正常”受试者 (即无癌症证据的个体) 的血清样品中用于针对抗 p53、c-myc 和 NY-ESO-1 的自身抗体的两次独立滴定测定的结果。

图 9 (a) 和图 9 (b) 显示了使用一系列不同抗原对来自单个侵袭性乳腺癌患者的血清样品进行的两次独立滴定测定的结果。

图 10 (a) 和图 10 (b) 展示了滴定测定的结果, 其中用生物素化的抗原 BRCA2、HER2、c-myc 和 NY-ESO-1、非生物素化的 BRCA1 和“空”载体 VOL 的对照表达产物测试了来自临床正常人受试者的血清样品中自身抗体的存在情况, 其中 VOL 编码生物素标记但没有额外的抗原。

图 11 展示了关于抗原 p53、c-myc 和 NY-ESO-1、以及“空”载体 VOL 的对照表达产物, 用本发明的抗原滴定测定对原发性乳腺癌患者的自身抗体分析的结果。

图 12 展示了使用来自正常个体的血清重复图 11 所示测定的结果。

图 13 展示了对患原发性乳腺癌但还显示针对生物素的抗体应答的患者使用本发明的抗原滴定测定得到的结果。

图 14 展示了在正常样品上进行的根据本发明滴定抗原的自身抗体检测测定与抗原量保持恒定而滴定血清的自身抗体检测测定之间实验性比较的结果。

图 15 展示了在来自原发性乳腺癌患者的样品上进行的根据本发明滴定抗原的自身抗体检测测定与抗原量保持恒定而滴定血清的自身抗体检测测定之间实验性比较的结果。

发明详述

本发明一般提供检测作为疾病状态或疾病易感性生物标志物的抗体的免疫测定方法, 其特征在于针对不同量的该抗体特异性抗原对待测试抗体存在的样品进行测试, 并由抗体/抗原结合对测试抗原量产生滴定曲线。

本领域普通技术人员已经公知诸如 ELISA、放射免疫测定等免疫测定的一般特征 (参阅 Immunoassay, E. Diamandis and T. Christopoulos, Academic Press, Inc., San Diego, CA, 1996)。用于检测具有特定免疫特异性的抗体的免疫测定通常需要使用在测试中显示对

抗体具有特定免疫反应性的试剂（抗原）。取决于测定的形式，这种抗原可以固定在固体支持物上。使待测试抗体存在的样品与该抗原接触，如果该样品中存在具有所需免疫特异性的抗体，则这些抗体将与该抗原发生免疫反应，以形成可以随后检测或定量测量的抗体-抗原复合物。

本发明的方法的特征在于针对多种不同的抗原量（本文中也称为滴定系列）对待测试抗体存在的标准化样品进行测试。针对至少两种、优选至少三个、四个、五个、六个或七个不同的抗原量测试样品。典型的测定可以包括一个不含任何抗原的阴性对照。

在本上下文中，术语“抗原”指包含至少一个能与想要检测的靶抗体特异性相互作用的抗原决定簇或表位的物质，或者任何与该抗体可变区或互补性决定区特异性相互作用的俘获剂。该抗原一般是天然存在的或合成的生物大分子，例如蛋白或肽、多糖或核酸，并且可以包括抗体或其片段，例如抗独特型抗体。

本领域技术人员将认识到，在本发明的方法中，可用于结合目标抗体的抗原决定簇或表位的量在建立滴定系列时是非常重要的。在许多测定形式中，可用于结合的抗原决定簇或表位的量与存在的抗原分子的量直接相关。然而，在其他实施方案如某些固相测定系统中，暴露的抗原决定簇或表位的量可以不与抗原量直接相关，而是可能取决于其他因素，如对固体表面的附着等。在这些实施方案中，本文中提到的滴定系列中的“不同抗原量”可以指不同量的抗原决定簇或表位。

对使用的每个不同抗原（抗原决定簇或表位）量确定抗体和抗原之间特异性结合的相对或绝对量，并用于对每个测试抗原量绘制或计算特异性结合的（相对或绝对）量对抗原量的曲线。例如，在附图中展示了检测多种不同抗体的典型结果。基于在每个抗原量下观察到的特异性结合量确定测试样品中与用于测定的抗原具有反应性的抗体的存在，一般表示为总体为S形或反S型的曲线。抗体与抗原之间特异

性结合的绝对量一般并不重要，除非需要进行定量测量。对于简单的关于抗体存在与否的“是/否”确定，只要产生形状正确的曲线就够了。如果可检测的结合在不同的测试抗原量中没有变化，那么可将其评为不存在可检测量的抗体。在本发明优选的实施方案中，该方法是非定量的。因此使用独立于信号强度的无量纲的比例关系可以给出关于抗体是否存在的“是/否”确定。

需要时，可以从抗原滴定测定的结果中得出对于存在于特定样品中的抗体量的测量。

本发明的方法可有利地用于临床诊断、预后、预测和/或监测测定，其中存在的靶抗体的绝对量可以在患者和患者之间有巨大的变化。本发明人观察到，如果这样的测定是基于使用测试抗体的单个量/浓度来检测抗体结合，则含有处于群体中抗体量正常生理范围的极低端和极高端的抗体量的患者样品可能就会由于测定方法的局限性而被错过；抗体量低的样品可能评为假阴性结果，而抗体水平极高的样品可能超出选定的测定方法的准确检测范围。

本发明的滴定测定方法还特别适于检测作为疾病状态或易感性生物标志物的抗体/自身抗体，其中抗体/自身抗体对靶抗原的特异性和亲和力在患者和患者之间有相当可观的变化。自身抗体应答因其本性可在患者和患者之间存在非常显著的差异，存在的自身抗体绝对量和自身抗体的特异性/亲和力都会存在差异。本发明的方法可以考虑这样的患者与患者之间的差异，因此使得可以开发用于任何给定抗体/自身抗体的标准测定形式。

自身抗体与其靶抗原之间的相互作用一般是低亲和力的，但如上所述，结合的强度在患者和患者之间可能不同。本发明的方法特别适于检测低亲和力结合，因为从滴定曲线的形状可以推断出阳性结果。

本发明的方法还提供在进行用于诊断、预后和/或监测（疾病状态或治疗）目的的自身抗体/抗体检测时针对每日变化的安全措施。当进

行在包含患者体液的样品中检测抗体的免疫测定时，经常可以观察到可观的信号强度每日变化。例如，这样的变化可能是由于测试前样品的获得和储存方式差异而产生。这样的因素使得难于确定地对临床测定结果进行评价，例如基于简单的抗体/抗原结合阈值来评价。本发明使这样的每日变化的影响尽可能小，因为从独立于信号强度的滴定曲线形状得到的阳性结果是十分明显的。

本发明方法其他优点在于它允许稀释患者样品而仍然产生一致的结果，以及它能利用一个个体中不同来源的体液（例如血液或血清与腹水或胸腔积液相比）产生相同的定性筛选结果（阳性/阴性），尽管在不同流体中抗体的绝对浓度可能不同。

本发明的方法可以用能使怀疑含有抗体的样品与多种不同量的抗原接触的任何适当形式进行。方便地，该样品与不同抗原量的接触可以在分开但平行的反应室如微孔板的孔中进行。通过在微孔板的孔中制备来自抗原原液的连续稀释将不同的抗原量包被在微孔板的孔上。该抗原原液的浓度可以已知或未知。然后可将测试样品的等分试样加入该板的孔中，使测试样品的体积和稀释度在每个孔中保持一致。本领域技术人员会理解，加入微孔板孔中的抗原绝对量可以取决于诸如靶抗体的性质、测试样品的性质、测试样品的稀释度等因素而变化。通常选择抗原量和样品稀释度以便产生信号强度范围，所述强度范围落入选择用于在该方法中检测抗体/抗原结合的可接受的读出检测范围内。测试怀疑含有抗肿瘤标志物自身抗体的人血清样品的典型量和稀释度在随后的实施例中给出。方便地，测试的抗原量可以在0.01 μ g/ml到10 μ g/ml的范围内变化。

如上所述，甚至当原液中抗原的绝对浓度未知时，也有可能从单个抗原原液开始构造滴定曲线。倘若使用同样的单个原液溶液并以同样的方式进行连续稀释，就可能在不同的起始测试样品上对这一抗原分别进行的滴定测定结果进行比较。

在其他实施方案中，可将不同的抗原（抗原决定簇或表位）量固定在固体支持物上离散的位置或反应位点上。然后可以使整个支持物与测试样品接触，并在每个离散的位置或反应位点上分别检测或测量抗体与抗原的结合。合适的固体支持物也包括微阵列，例如阵列上的离散位点或点上含有不同抗原量的阵列。微阵列可以通过将不同量的特定抗原固定在阵列上离散的、可分辨的反应位点处来制备。在其他的实施方案中，固定的抗原分子实际量可以保持基本恒定，但阵列上位点或点的大小是可变的，以便改变可利用的结合表位的量，由此提供可利用的结合表位量不同的位点或点的滴定系列。在这样的实施方案中，在制备滴定系列时，重要的是抗原上结合表位的二维表面浓度，而非抗原的绝对量。制备和探询蛋白质/肽微阵列的技术是本领域普遍已知的。

从以上讨论中将会理解，在本发明所有的实施方案中，抗原量的变化可以通过改变测试样品所用的抗原或表位的密度、通过维持抗原或表位密度但增加固定抗原的表面面积或者通过二者同时来实现。

微阵列可以用于在单个样品上平行进行不同特异性的抗体的多重测定。这可以通过使用包括多组不同抗原的阵列来实现，每组包括多种不同量或浓度的抗原。术语“不同抗原”包括来自不同蛋白质或多肽（例如来自不同基因编码的无关蛋白质）的抗原以及来自单个蛋白质或多肽中不同肽表位的抗原。给定的微阵列可以仅包含来自不同蛋白质或多肽的不同抗原组，或者仅包含来自单个蛋白质或多肽中不同肽表位的抗原组，或者两者以任何比例混合。应当注意，本发明任何实施方案中不同量或不同浓度的每组单独的抗原一般仅包括一种抗原而不是其混合物。

涉及用本发明方法测试抗体存在的材料时，本文使用的术语“体液”包括血浆、血清、全血、尿、汗、淋巴、粪便、脑脊髓液、腹水、胸腔积液、精液、痰、乳头抽吸液、手术后血清肿或伤口排出液。如

上所述，本发明的方法优选在包含取自测试受试者的体液的测试样品上体外进行。所用体液的类型可以根据待测抗体的身份和应用测定的临床状况而变化。通常该测定优选在血清和血浆样品上进行。测试样品还可包括体液以外的组分，例如稀释剂、防腐剂、稳定剂、缓冲剂等。

术语“抗原”在本文中以广义使用，指显示出对待检测抗体有特异性免疫反应性的任何物质。合适的抗原可以包括但不限于天然存在的蛋白质、重组或合成蛋白质或多肽、合成肽、肽模拟物等，还包括多糖和核酸。特别地，本文使用“抗原”时，其旨在包括能与待检测抗体的可变区或互补性决定区特异性免疫相互作用的任何俘获剂，无论是人来源、哺乳动物来源还是其它来源。例如，抗独特型抗体可以认为是用于这种目的的抗原，如噬菌体展示产生的抗原。

某些抗原可以包含或来自于从自然来源分离的蛋白质或多肽，包括但不限于从患者组织或体液分离的蛋白质或多肽。在这样的实施方案中，抗原可以基本上包括所有天然存在的蛋白质，即基本上处于从自然来源分离时的形态的蛋白质，或者可以包括天然存在蛋白质的片段。为了在本发明方法中像抗原那样有效，任何这样的“片段”都必须保留对测试所用抗体的免疫反应性。例如，可以通过该分离的蛋白质的化学或酶促切割来制备合适的片段。

取决于准备使用的测定的精确性质，该抗原可包含与一种或多种其它分子连接的天然存在蛋白质或其片段，所述分子传递该蛋白质中非天然存在的一些理想特征。例如，蛋白质或片段可以与显示标记（revealing label）缀合，例如荧光标记、有色标记、发光标记、放射性示踪剂或重金属如胶体金。在其它的实施方案中，蛋白质或片段可以表达为融合蛋白。例如，融合蛋白可以在 N-或 C-端包含标记肽，以帮助纯化重组表达的抗原。

取决于要使用的测定形式，抗原可以固定在固体支持物上，例如

微孔板的孔、微阵列珠或芯片或磁珠上。可以通过非共价吸附或共价附着来实现固定。

任何适当的附着方法都可以使用，只要其不对抗原与靶抗体发生免疫反应的能力产生不利影响。

本发明并不局限于固相测定，还可以包括部分或全部在液相中进行的测定，例如溶液相珠测定。

在一个实施方案中，抗原可以用方便固定的配体如生物素进行标记。然后将抗原稀释到合适的滴定范围，接着与溶液中患者样品里的自身抗体反应。接着可将得到的复合物通过配体-受体相互作用（例如生物素-链霉抗生物素蛋白）固定在固体支持物上，剩余的测定根据以下描述实施。

为方便产生用于本发明测定方法的生物素化抗原，编码全长抗原、其截短形式或其抗原片段的 cDNA 可以表达为用蛋白质或多肽标签标记的融合蛋白，其中生物素辅因子可以通过酶反应附着在该标签上。可从多个来源购得用于生产重组生物素化抗原的载体。

如所附实施例所示，使用生物素化抗原滴定曲线方法的其他好处是该测定方法能够区分生物素组分与抗生物素抗体的结合以及真正的抗原与其同族抗体的结合。本发明人已经观察到，显著数量的人群体天然产生抗生物素抗体，其可能在基于使用生物素化抗原的测定中导致假阳性结果的产生。

如上所述，用于检测本发明抗体的“免疫测定”可以基于本领域已知的标准技术，只是使用多种抗原量创建滴定曲线。在非常优选的实施方案中，免疫测定可以是酶联免疫吸附测定（ELISA）。ELISA 是本领域普遍公知的。在典型的“间接”ELISA 中，将在测试中对抗体具有特异性的抗原固定在固体表面（例如标准微孔测定板的孔，或者微珠或微阵列的表面），并且使用于测试抗体存在的包含体液的样品

与固定的抗原接触。存在于样品中的具有所需亲和力的任何抗体将与固定的抗原结合。接着可使用任何适当的方法检测结合的抗体/抗原复合物。在一个优选的实施方案中，使用标记的第二抗人免疫球蛋白抗体检测抗体/抗原复合物，所述抗体其可特异性识别一种或多种人免疫球蛋白类别共有的表位。第二抗体一般为抗 IgG 或抗 IgM。第二抗体通常用检测标记进行标记，一般为酶标记如过氧化物酶或碱性磷酸酶，其允许通过加入该酶的底物而进行定量检测，该酶产生可检测产物，例如有色的、化学发光的或荧光的产物。本领域已知的其它类型检测标记可以等效地使用。

本发明涉及作为疾病状态或疾病易感性生物标志物的抗体的检测方法。本发明的这一特定方面优选地排除设计用于测试由于除了接种癌症标志物以外的疫苗攻击或免疫操作而产生的抗体的测定方法。所以，本发明此方面的测定优选地不包括被设计用于测试接种/免疫后抗病毒或抗菌抗体存在情况的测定方法。

在本发明的某些实施方案中，抗体可以是自身抗体。如上所述，术语“自身抗体”指针对个体的免疫系统识别为外源的抗原的天然存在抗体，即使该抗原实际上源自该个体。自身抗体包括针对由患病细胞产生的或在疾病过程中产生的天然存在蛋白质改变形式的抗体。蛋白质的改变形式源自该个体，但可被该个体的免疫系统视为“非自身”，并由此在此个体中以对该改变蛋白质具有免疫特异性的自身抗体的形式引发免疫应答。这样的蛋白质改变形式可以包括，例如任选地伴有二级、三级或四级结构变化的氨基酸序列改变的突变体、截短形式、剪接变体、改变的糖型（glycoform）等。在其它实施方案中，自身抗体可以针对在疾病状态中由于基因扩增或异常转录调节而过表达的蛋白质。免疫系统细胞在正常情况下不会遇到的显著量的过表达蛋白质可触发导致自身抗体产生的免疫应答。在其他实施方案中，该自身抗体可以针对在疾病状态中开始表达的蛋白质的胎儿形式。如果仅在免

疫系统起作用前的发育早期正常表达的胎儿蛋白质开始在疾病状态中表达,则该胎儿形式可能被免疫系统识别为“外源”,由此触发导致自身抗体产生的免疫应答。

在一个实施方案中,该抗体可以是对肿瘤标志物蛋白具有特异性的自身抗体,更具体地是“癌症相关的”抗肿瘤自身抗体。

术语“癌症相关”的抗肿瘤自身抗体指针对肿瘤标志物蛋白形式上存在的表位的自身抗体,所述肿瘤标志物蛋白在癌疾病状态下优先表达。这样的自身抗体的存在是癌症疾病状态的特征,或是无症状患者中易患癌症体质的特征。

在优选的应用中,本发明的方法将用于检测人类受试者或患者中癌症相关抗肿瘤自身抗体的存在,最优选采取体外免疫测定的形式,在包含取自该受试者/患者的体液样品的测试样品上进行。在测试前,该体液样品可以在合适的缓冲液中稀释或经处理以便长期保存。

体外免疫测定是非侵袭性的,并且可以根据需要重复以便在疾病发作前筛选“具有风险”的个体时或者在整个疾病过程中(以下将结合该方法优选的应用进一步讨论)建立患者自身抗体产生谱。

在具体但非限制性的实施方案中,本发明的方法可以(同时)包括针对两种或更多类型自身抗体的免疫测定,每种自身抗体对相同或相关肿瘤标志物蛋白(例如由单个基因编码的不同的同种型或变体)上的不同表位具有特异性,或者对不同肿瘤标志物蛋白质(指由不同基因编码的蛋白质)上的表位具有特异性。这些方法一般包括使用具有两组或更多组抗原的板,每组抗原通常源自不同的肿瘤标志物蛋白(在此上下文中不同意味着蛋白质是不同基因的产物),尽管上文已经指出一组抗原也可能包括在同一肿瘤标志物蛋白上的不同表位。一组抗原指在本发明的方法中在不同量/浓度下测试的单个抗原。这些方法(在下文中可称为“板测定”)利用一个具有两组或更多组抗原的板来监测个体对肿瘤或其它致癌性/肿瘤性变化的总体免疫应答。由此,这

些方法检测给定个体中免疫应答的“谱”，指示哪种肿瘤标志物引发导致自身抗体产生的免疫应答。使用具有两组或更多组抗原的板来监测针对两种或更多不同肿瘤标志物的自身抗体的产生通常比检测针对单个标志物的自身抗体更灵敏，并且给出低得多的假阴性结果频率（参阅 WO99/58978 和 WO2004/044590，其内容以其整体以参考方式并入本文）。

因此，在非限制性的实施方案中，本发明提供在包含来自哺乳动物的体液的测试样品中检测两种或更多抗体的方法，其中至少一种所述抗体是疾病状态或疾病易感性的生物标志物，该方法包括：

(a) 使该测试样品接触两组或更多组抗原，其中每一组所述抗原对测试样品中的一种待检测抗体具有特异性，并且其中每一组抗原包括该抗原的多个不同的量，

(b) 检测该抗体和该抗原之间特异性结合的量，以及

(c) 对步骤 (a) 中所用的每一组抗原，绘制或计算特异性结合量对抗原量的曲线。

在一个实施方案中，所述两种或更多种抗体的每一种是疾病状态或疾病易感性的生物标志物，然而，将疾病标志物抗原的滴定测定与同一测试样品中其它类型抗体（是或不是疾病标志物均可）的滴定测定组合也在本发明的范围内。

无论如何，对相关抗体在测试样品中是否存在的判断是基于测试中每种不同抗原在每个不同抗原浓度下观察到的特异性结合的量，换言之，是基于每个抗原的集合值而不是每种抗原的单个浓度下的读数。因此，基于存在两种或更多种类型抗体来确定患者样品中是否存在疾病状态或疾病易感性或者外源物质的抗体可以是基于每种抗原的这些集合值。优选地，基于测试中存在的任何或所有抗原呈现为总体呈 S 形或反 S 型的曲线作出判断。

为消除疑问，基于使用单个抗原类型以检测抗体的测定在本文中可称为“单标志物测定”，而基于使用具有两种或更多种抗原的板的测定称为“板测定”。

本发明的方法作为单标志物测定或板测定的一部分适用于检测基本上任何肿瘤标志物蛋白的自身抗体，对于该肿瘤标志物蛋白可以制备合适的抗原。具体地，该方法适用于检测/测量以下蛋白质的自身抗体：表皮生长因子受体蛋白 EGFR(Downward 等 (1984) *Nature*. 307: 521-527; Robertson 等 (2001) *Archives of Pathology and Laboratory Medicine* 126;177-81)、糖蛋白 MUC1 (Batra, S. K.等 (1992) *Int. J. Pancreatology*, 12: 271-283) 和信号转导/细胞周期调节蛋白 Myc (Blackwood, E. M.等 (1994) *Molecular Biology of the Cell* 5: 597-609)、p53 (Matlashewski, G.等 (1984) *EMBO J.* 3: 3257-3262; Wolf, D.等 . (1985) *Mol. Cell. Biol.* 5: 1887-1893) 和 ras (或 Ras) (Capella, G.等 . (1991) *Environ Health Perspectives*. 93: 125-131) 以及 BRCA1 (Scully, R.等 (1997) *PNAS* 94: 5605-10)、BRCA2 (Sharan, S. K.等 (.1997) *Nature*. 386: 804-810)、APC (Su, L. K.等 (1993) *Cancer Res.* 53: 2728-2731; Munemitsu, S.等 (1995) *PNAS* 92: 3046-50)、CA125 (Nouwen, E. J.等 (1990) *Differentiation*. 45: 192-8)、PSA (Rosenberg, R. S.等 (1998) *Biochem Biophys Res Commun.* 248: 935-939)、癌胚抗原 CEA (Duffy, M.J. (2001) *Clin Chem*, Apr 47(4): 624-30)、CA19.9 (Haga, Y.等 (1989) *Clin, Biochem* (1989) Oct 22(5): 363-8)、NY-ESO-1 (cancer/testis., antigen; Chen, Y. -T.等, *Proc. Nat. Acad. Sci.* 94: 1914- 1918, 1997)、PSMA(前列腺特异性膜抗原; Israeli, R. S.等, *Cancer Res.* 53: 227-230, 1993)、PSCA (前列腺干细胞抗原; Reiter, R. E.等, *Proc. Nat. Acad. Sci.* 95: 1735-1740, 1998) 和 EpCam (上皮细胞粘附分子; Szala, S.等, *Proc. Nat. Acad. Sci.* 87: 3542-3546, 1990)、HER2(也称为 c-erbB2 Coussens, L.等, *Science* 230: 1132-1139, 1985)、CAGE (Jager D,等, *Cancer Res.* 1999 Dec 15;59 (24) :6197-204;

Mashino K,等 , Br J Cancer. 2001 Sep 1; 85 (5) : 713-20)、细胞角蛋白 (Moll R,等 , Cell. 1982 Nov,- 31 (1) : 11-24 ; Braun S,等, N Engl J Med. 2000; 342: 525-533)、恢复蛋白 (Maeda A,等 , Cancer Res. 2000 Apr 1;60 (7) :1914-20)、激肽释放酶 (Kim H,等 , Br J Cancer 2001;84:643-650; Yousef GM 等, Tumor Biol 2002;23:185- 192); 膜联蛋白 (Hudelist G,等 , Breast Cancer Res Treat. 2004 Aug;86 (3) :281-91)、 α -胎蛋白 (Stiller D,等, Acta Histochem Suppl. 1986;33 :225-31)、GRP78 (Block TM,等, Proc Natl Acad Sci USA. 2005 Jan 18;102 (3) : 779-84; Hsu WM,等, Int J Cancer. 2005 Mar 1;113 (6) : 920-7)、CA125 (Norum LF,等, Tumour Biol. 2001 Jul-Aug;22 (4) :223-8; Perey L,等, Br J Cancer. 1990 Oct;62 (4) :668-70; Devine PL,等, Anticancer Res. 1992 May-Jun;12 (3) :709-17); 乳腺珠蛋白 (mammoglobin) (Zehentner BK,等 , Clin Chem. 2004 Nov;50(II) :2069-76; Zehentner BK, Carter D. Clin Biochem. 2004 Apr; 37 (4) : 249-57)、raf (Callans LS.等 ,. Ann Surg Oncol. 1995 Jan,-2 (1) : 38-42; Pratt MA,等 , Mol Cell Biochem. 1998 Dec; 189 (1-2) : 119-25)、 β -人绒毛促性腺激素 b-HCG (Ayala AR,等, Am J Reprod Immunol. 1983 Apr-May;3 (3) : 149-51; Gregory JJ Jr, 等, Drugs. 1999 Apr;57 (4) :463-7) 或 4-5 抗原 (Krause P,等, J Immunol Methods. 2003 Dec; 283 (1-2) : 261-7)。然而, 本发明并不旨在仅限于检测这些特定肿瘤标志物的抗体。

基于检测抗肿瘤标志物自身抗体的本发明测定法 (单标志物或板测定形式) 可以用于多种不同的临床情况。具体地, 该方法可以用于检测或诊断癌症, 评估已诊断为癌症患者的预后, 预测对治疗的应答, 监测患者中癌症或其它肿瘤疾病的发展, 检测在无症状人受试者中早期肿瘤性或早期致癌性变化, 筛选无症状人受试者群体以鉴别发生癌症的风险提高的受试者或诊断癌症的存在, 预测癌症患者对抗癌治疗 (例如接种疫苗、抗生长因子或信号转导治疗、放射治疗、内分泌治

疗、人抗体治疗、化学治疗)的应答,监测癌症患者对抗癌治疗(例如接种疫苗、抗生长因子或信号转导治疗、放射治疗、内分泌治疗、人抗体治疗、化学治疗)的应答,检测以前诊断为患有癌症并经历抗癌治疗以降低存在的癌量的患者中的复发性疾病,或者选择用于特定患者的抗癌治疗(例如疫苗、抗生长因子或信号转导治疗、放射治疗、内分泌治疗、人抗体治疗、化学治疗)。

本发明人已经一般地观察到,癌症相关自身抗体的水平显示与疾病状态正相关(参阅 WO99/58979,其内容以参考方式并入本文)。因此,当本发明的方法在临床应用中使用时,一般将与合适的对照相比抗肿瘤标志物自身抗体水平的提高作为癌症疾病状态的指示。

例如,当该免疫测定方法用于癌症诊断时,将与“正常”对照个体相比自身抗体水平的提高作为个体患有癌症的指示。“正常”对照个体优选为基于临床、影像和/或生化标准未诊断为癌症的年龄匹配的对照。

当该免疫测定方法用于预测癌症患者对抗癌治疗(例如疫苗接种、抗生长因子或信号转导治疗、放射治疗、内分泌治疗、人抗体治疗、化学治疗)的应答时,可将与“正常”对照个体相比自身抗体水平的提高作为个体是否可能应答于该抗癌治疗的指示。“正常”对照个体优选为基于临床、影像和/或生化标准未诊断为癌症的年龄匹配的对照。对于每一种上文列出的治疗,自身抗体与对照相比的水平与成功治疗可能性之间的关系可以通过观察这些治疗在患者中的结果而建立,所述患者的自身抗体状态在整个治疗过程中被监测。基于对自身抗体状态的评估,可以使用先前建立的关系预测每种治疗在给定患者中成功的可能性。

当免疫测定方法用于监测癌症或其它肿瘤疾病在患者中的发展时,将与“正常对照”相比自身抗体水平的提高作为患者中癌症存在的指示。“正常对照”可以是对照个体中存在的自身抗体的水平,优选基

于临床、影像和/或生化标准未诊断为癌症的年龄匹配的对照个体中的水平。或者，该“正常对照”可以是对测试中特定患者建立的“基线”水平。例如，“基线”水平可以是在作出第一次癌症诊断或复发癌症诊断时存在的自身抗体水平。基线水平以上的任何提高可以作为患者中癌症数量增加的指示，反之，基线以下的任何降低可以作为患者中癌症数量减少的指示。例如，“基线”值也可以是新治疗开始前的水平。自身抗体水平的变化可以作为治疗有效性的指示。指示对治疗阳性应答的“变化”方向（即提高与降低）将取决于该治疗确切的性质。对于任何给定的治疗，可以容易地确定指示阳性结果的自身抗体水平“变化”方向，例如通过监测与应答于该治疗的群体临床或生化指示相比较的自身抗体水平。

当该免疫测定方法用于筛选无症状人受试者群体时，这可以是鉴定发生癌症的风险提高的受试者，与“正常”对照个体相比自身抗体水平提高的个体鉴定为具有发生癌症的“风险”。“正常”对照个体优选为未被鉴定为具有任何发生癌症的趋势的或任何显著提高的发生癌症风险的年龄匹配对照。一个例外可能是年龄本身就是主要的风险因素。

当该免疫测定方法用于筛选无症状人受试者群体时，这可以是在已发生癌症的受试者中诊断癌症，与“正常”对照个体相比自身抗体水平提高的个体被评为具有癌症或一些肿瘤性变化形式。“正常”对照个体优选为未被鉴定为具有任何发生癌症的趋势的或任何显著提高的发生癌症风险的年龄匹配对照。一个例外可能是年龄本身就是主要的风险因素。或者，“正常对照”可以是对测试中特定患者建立的“基线”水平。例如，“基线”水平可以是在患者第一次接受测试并发现水平不超过“正常对照”群体水平时存在的自身抗体水平。其后在此基线测量值上的任何提高均可作为该个体存在癌症的指示。这样，个体可以通过这样的基线测试称为用于将来自身抗体测量的其自身对照。

当该免疫测定方法用于监测癌症患者对抗癌治疗（例如疫苗接种、

抗生长因子或信号转导治疗、放射治疗、内分泌治疗、人抗体治疗、化学治疗)的应答时,将治疗后自身抗体水平的改变作为该患者对该治疗有阳性应答的指示。可将治疗开始前自身抗体的基线水平用于比较目的,以确定治疗是否引起自身抗体水平的“提高或降低”。自身抗体水平的变化可作为治疗有效性的指示。指示对治疗有阳性应答的“改变”方向(即提高与降低)将取决于该治疗的确切性质。对于任何给定的治疗,可以容易地确定指示阳性结果的自身抗体水平“变化”方向,例如通过监测应答于该治疗的其他临床或生化指示相比的自身抗体水平。

本发明的方法可以用于预测和/或监测个体对基本上任何已知抗癌治疗的应答。这包括如人抗体治疗,其中将单克隆或多克隆抗体输注到患者中,非限制性的具体实例为使用抗生长因子抗体 HerceptinTM进行治疗(Baselga, J., D. Tripathy 等, J Clin Oncol., 14(3), 737-744, 1996)。天然自身抗体应答的存在可增强或抑制人工输注治疗性抗体进行治疗的有效性。使用本发明的方法,有可能将任何患者或患者组中疗程前后的自身抗体的天然水平与对任何抗癌治疗(包括抗体治疗)相关联。其后这一认识可以继而用于预测其它患者(或者在重复治疗情况下的同一患者)将如何应答于同样的治疗。

当该免疫测定用于检测复发性疾病时,将与“正常对照”相比患者中自身抗体水平的提高作为疾病已经复发的指示。“正常对照”可以是对照个体中存在的自身抗体水平,优选基于临床、影像和/或生化标准未诊断为癌症的年龄匹配的对照。或者,“正常对照”可以是对测试中特定患者建立的“基线”水平。例如,该“基线”水平可以是基于临床、影响和/或生化标准处于疾病缓和期时存在的自身抗体水平。

本发明的测定方法可用于检测许多不同类型的癌症,其实例为乳腺、膀胱、结肠直肠、前列腺、肺、胰腺和卵巢的癌症。该测定方法可以作为现有筛选和监控方法的补充。例如,在原发性乳腺癌的情况

下，自身抗体的免疫测定可以提醒临床医生比计划更早地对乳房 X 线照片上从放射照相角度来看并不可疑的小损伤进行活检，或者进行乳房成像，或者进行重复成像。在临床上，预计本发明的测定方法比目前其成功取决于操作者的成像技术（如乳房 X 线照相术和超声）更客观和具有更好的重现性。

“板测定”可以根据特定的临床应用定制。至少测定 p53 和 c-erbB2 的自身抗体的抗原板对许多癌症类型特别有用，并且可以任选地补充其它已知与待检测的特定癌症或该特定癌症的一个阶段相关的标志物。例如，对于乳腺癌，该板可以包括 MUC1 和/或 c-myc 和/或 BRCA1 和/或 BRCA2 和/或 PSA；而对于膀胱癌，该板可以任选地包括 MUC1 和/或 c-myc；对于结肠直肠癌为 ras 和/或 APC；对于前列腺癌为 PSA 和/或 BRCA1 和/或 BRCA2；或者对于卵巢癌为 BRCA1 和/或 BRCA2 和/或 CA125。在其它优选的实施方案中，p53 或 c-erbB2 并非必须是必须的。

在乳腺癌的情况下，合适的板可选自：

p53 和 MUC1，任选地具有 c-erbB2 和/或 c-myc 和/或 BRCA1 和/或 BRCA2 和/或 PSA 和/或 NY-ESO-1 和/或 BRC1；

p53 和 c-myc，任选地具有 c-erbB2 和/或 MUC1 和/或 BRCA1 和/或 BRCA2 和/或 PSA 和/或 NY-ESO-1 和/或 BRC1；

p53 和 BRCA1，任选地具有 c-erbB2 和/或 MUC1 和/或 c-myc 和/或 BRCA2 和/或 PSA 和/或 NY-ESO-1 和/或 BRC1；

p53 和 BRCA2，任选地具有 c-erbB2 和/或 MUC1 和/或 c-myc 和/或 BRCA1 和/或 PSA 和/或 NY-ESO-1 和/或 BRC1；

c-erbB2 和 MUC1，任选地具有 p53 和/或 c-myc，和/或 BRCA1 和/或 BRCA2 和/或 PSA 和/或 NY-ESO-1 和/或 BRC1；

c-erbB2 和 c-myc，任选地具有 p53 和/或 MUC1 和/或 BRCA1 和/或

BRCA2 和/或 PSA 和/或 NY-ESO-1 和/或 BRC1;

c-erbB2 和 BRCA1, 任选地具有 p53 和/或 MUC1 和/或 c-myc 和/或 BRCA2 和/或 PSA 和/或 NY-ESO-1 和/或 BRC1;

c-erbB2 和 BRCA2, 任选地具有 p53 和/或 MUC1 和/或 c-myc 和/或 BRCA1 和/或 PSA;

p53、c-myc、NY-ESO-1 和 BRCA2。

在结肠直肠癌的情况下, 合适的板可选自例如:

p53 和 ras, 任选地具有 c-erbB2 和/或 APC;

p53 和 APC, 任选地具有 c-erbB2 和/或 Ras;

Ras 和 APC, 任选地具有 p53 和/或 c-erbB2, 这样的板也可包括 CEA 或 CA19-9。

在前列腺癌的情况下, 合适的板可选自例如:

p53 和 PSA, 任选地具有 BRCA1 和/或 BRCA2 和/或 c-erbB2;

c-erbB2 和 PSA, 任选地具有 p53 和/或 BRCA1 和/或 BRCA2;

PSMA, PSCA 和激肽释放酶。

在卵巢癌的情况下, 合适的板可选自例如:

p53 和 CA125, 任选地具有 c-erbB2 和/或 BRCA1 和/或 BRCA2;

c-erbB2 和 CA125, 任选地具有 p53 和/或 BRCA1 和/或 BRCA2 ;

HER2、膜联蛋白、CAGE 和 4-5。

在肺癌的情况下, 合适的板可选自:

p53 和 NY-ESO-1, 任选地具有其他标志物;

HER2、膜联蛋白、CAGE 和 4-5。

当本发明的方法用于进行基于来自不同蛋白质的两种或更多肿瘤

标志物抗原的“板测定”时，板上的至少一种抗原必须在本发明基于多个不同量形成滴定曲线的测定中进行测试。优选地，每种形成该板的抗原均根据本发明测定进行测试，并对板上每种单独的抗原绘制/计算滴定曲线。

本发明还设想，用于测定至少一种抗肿瘤标志物抗体的滴定测定可以与设计用于检测同一患者样品中至少一种肿瘤标志物蛋白（其可以与或不与滴定测定方法中所用抗原有关）的测定方法组合。这样，对抗肿瘤标志物自身抗体的测定与对肿瘤标志物蛋白的测定可以在单个患者样品上平行进行。

在另一实施方案中，本发明的免疫测定法可用于选择用于特定患者的抗癌疫苗。在这一实施方案中，用具有两种或更多抗原的板测试取自该患者的体液样品，每种抗原对应于不同的肿瘤标志物蛋白，以确定该患者对每种不同的肿瘤标志物蛋白免疫应答的相对强度。对一种或多种给定肿瘤标志物蛋白的“免疫应答强度”由该免疫测定检测到的此肿瘤标志物蛋白特异性癌症相关自身抗体的存在和/或量来指示；其中定量自身抗体，癌症相关自身抗体的水平越高，免疫应答就越强。接着选择鉴定为在患者中引起最强免疫应答或强应答（即自身抗体水平最高）的一种或多种肿瘤标志物蛋白质形成用于该患者的抗癌疫苗的基础。

本发明方法的效用不仅限于检测抗肿瘤自身抗体，尽管该测定对此目的特别有用。癌症仅是检测自身抗体可用作疾病状态/疾病易感性生物标志物的疾病的一个实例。本发明已经显示了其显著优点在于使用滴定法在患者样品中检测自身抗体。因此，有理由得出这样的结论，可以通过使用滴定法检测作为除癌症以外其它疾病的生物标志物的自身抗体来得到类似的优点。因此，该方法可用于检测作为疾病状态或疾病易感性生物标志物的任何自身抗体，其中所述该疾病已经（或能够）显示出与自身抗体的产生相关。

本发明方法的其它应用包括但不限于检测作为自身免疫病如类风湿性关节炎、系统性红斑狼疮 (SLE)、原发性胆汁性肝硬化 (PBC)、自身免疫性甲状腺炎 (例如桥本甲状腺炎)、自身免疫性胃炎 (例如恶性贫血)、自身免疫性肾上腺炎 (例如艾迪生病)、自身免疫性甲状旁腺功能减退、自身免疫性糖尿病 (例如 I 型糖尿病) 或重症肌无力的生物标志物的自身抗体, 在患者样品中筛选导致器官功能不全或衰竭的肾病或肝病以及筛选移植后的患者样品以检测针对患病组织 (其在移植后留在原位) 或移植组织的抗体的存在情况。

本发明的另一个方面涉及在包含来自哺乳动物受试者的体液的测试样品中检测抗体的方法, 其中所述抗体针对引入所述哺乳动物受试者的外源物质, 该方法包括:

- (a) 使该测试样品接触不同量的该抗体特异性抗原,
- (b) 检测该抗体和该抗原之间特异性结合的量, 以及
- (c) 对步骤 (a) 中所用的每个抗原量, 绘制或计算该特异性结合量对该抗原量的曲线。

优选地, 在本发明的这个实施方案中, 该方法还包括步骤 (d) 基于在每个所用的不同抗原浓度下该抗体和该抗原之间特异性结合的量 (换言之, 观察到的每个特定抗原的集合值) 检测该抗体的存在情况。优选地, 通过总体为 S 形或反 S 型的曲线指示该测试样品中存在与测定中所用抗原具有反应性的抗体。

在本发明的这一方面中, 所述滴定方法可以用于评估哺乳动物受试者 (优选人受试者) 对引入该受试者的任何外源物质的免疫应答。

在一个实施方案中, 该外源物质可以是治疗剂例如药物或前药、人类抗体治疗或疫苗。本发明的方法可用于评估对患者施用治疗剂是否触发了引起抗体产生的免疫应答, 所述抗体对该治疗剂上的表位或与该治疗剂一起施用的递送载体、赋形剂、运载体 (carrier) 等的组

分具有特异性。

治疗剂的确切性质并不对本发明产生限制。在非限制性的实施方案中，本发明的方法可以用于评估对任选地与赋形剂、运载体或递送载体组合的合成小分子、天然存在的物质、天然存在的或合成产生的生物制剂或上述两种或多种的任意组合的免疫应答。

在一个有用的实施方案中，本发明的方法可用于评估对治疗剂或疫苗的非靶标部分的免疫应答。“非靶标”部分指施用的治疗剂或疫苗的组分部分，在治疗剂的情况下，该部分对治疗活性无直接贡献，或者在疫苗的情况下，该部分并不旨在引发宿主中的抗体产生。例如，存在的非靶标部分可有利于治疗剂或疫苗的纯化，或者可以设计用于协助治疗剂/疫苗的递送、摄入或靶向。这样的“非靶标”部分包括但不限于通常附加在重组表达多肽上的接头或标记，如生物素标记、组氨酸标签等。

在本发明此方面的另一个实施方案中，该外源物质可以是传染原，如真菌、细菌、病毒或寄生虫。

参考以下非限制性实验实施例可以进一步理解本发明。

实施例 1-用于在自身抗体测定中滴定抗原的一般方案

(生物素化的)肿瘤标志物抗原的样品可以通过重组表达来制备，遵循 WO99/58978 所述的类似方法。

简言之，将编码目的标志物抗原的 cDNA 克隆进 pET21 载体 (Invitrogen)，该载体已经修饰以编码生物素标签和 6x 组氨酸标签，用于辅助表达蛋白的纯化。得到的克隆在合适的细菌宿主细胞中培养 (在包含体内)，裂解细菌并变性，通过镍螯合亲和柱 (Hi-trap，可购自 Amersham，遵循制造商的操作) 回收表达的抗原。表达的抗原通过在适合的缓冲液中透析而复性，并通过 SDS-PAGE、western 印

迹和 ELISA 评估表达的抗原的产率，并在保存前定量。

阴性对照 VOL 为空载体（即未克隆的 cDNA），其仍然包括组氨酸和生物素标签序列）。

多种标志物 cDNA 的 GenBank 登记号如下：

P53: B003596

c-myc: V00568

ECD6 (HER2) 胞外结构域: M11730

NY-ESO: NM_001327

BRCA2: U43746

BRCA1 89-10: NM_007302.

1、抗原和 VOL（阴性对照）在 0.1M 碳酸缓冲液中稀释至适当浓度，然后连续稀释以形成半对数（semi-log）滴定范围(见表 1)。使用电子多通道移液器将抗原稀释液以 50 μ l/孔按照板的设计分配至 Falcon 微孔板的行中。盖上板并在 4℃ 下保存 48 小时。

2、使用自动洗板器将板在 PBS + 0.1% tween 20 中洗一次，然后在纸巾上拍干。

3、用高盐孵育缓冲液（HSB, PBS + 0.5M NaCl + 0.1%酪蛋白）以 200 μ l/孔将板封闭 1 小时或封闭至临用时（在 4℃ 下加盖保存）。

4、室温下将血清样品解冻、振荡并以 1/100 在 HSB 中稀释。

5、倒空板并在纸巾上拍干。使用电子多通道移液器以 50 μ l/孔将每种稀释的血清样品分配至微孔板的所有孔中。对照抗体以 1/1000 在 HSB 中稀释并分配至最终板的适当孔中。盖上板并在室温下摇动孵育 1.5 小时。

6、洗涤步骤：用自动洗板器将板在 PBS + 0.1% tween 20 中洗

涤三次，然后在纸巾上拍干。

7、以 50μl/孔将缀合辣根过氧化物酶的兔抗人 Ig（Jackson，1/10,000 在 HSB 中）分配至微孔板的所有孔中。将缀合 HRP 的兔抗小鼠 Ig（Jackson，1/1000 在 HSB 中）分配至微孔板中含有抗抗原抗体的对照孔中。然后将板在室温下摇动培养 1 小时。

8、将板像步骤 6 中那样洗涤。

9、以 50 μl/孔加入预先制备的 TMB 底物，并且将板在实验台上孵育 10 分钟。将板轻轻拍打以便混合。

10、使用标准读板器操作在 650 nm 处测定各孔的光密度。

表 1: 标准板的设计

P53 板

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	p53 10 μg/ml			c-myc 10 μg/ml			NY-ESO 10 μg/ml			VOL 10 μg/ml		
B	p53 3 μg/ml			c-myc 3 μg/ml			NY-ESO 3 μg/ml			VOL 3 μg/ml		
C	p53 1 μg/ml			c-myc 1 μg/ml			NY-ESO 1 μg/ml			VOL 1 μg/ml		
D	p53 0.3 μg/ml			c-myc 0.3 μg/ml			NY-ESO 0.3 μg/ml			VOL 0.3 μg/ml		
E	p53 0.1 μg/ml			c-myc 0.1 μg/ml			NY-ESO 0.1 μg/ml			VOL 0.1 μg/ml		
F	p53 0.03 μg/ml			c-myc 0.03 μg/ml			NY-ESO 0.03 μg/ml			VOL 0.03 μg/ml		
G	p53 0.01 μg/ml			c-myc 0.01 μg/ml			NY-ESO 0.01 μg/ml			VOL 0.01 μg/ml		
H	碳酸缓冲液			碳酸缓冲液			碳酸缓冲液			碳酸缓冲液		

BRCA 板

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	BRCA1 10 µg/ml			BRCA2 10 µg/ml			ECD-6 10 µg/ml			VOL 10 µg/ml		
B	BRCA1 3 µg/ml			BRCA2 3 µg/ml			ECD-6 3 µg/ml			VOL 3 µg/ml		
C	BRCA1 1 µg/ml			BRCA2 1 µg/ml			ECD-6 1 µg/ml			VOL 1 µg/ml		
D	BRCA1 0.3 µg/ml			BRCA2 0.3 µg/ml			ECD-6 0.3 µg/ml			VOL 0.3 µg/ml		
E	BRCA1 0.1 µg/ml			BRCA2 0.1 µg/ml			ECD-6 0.1 µg/ml			VOL 0.1 µg/ml		
F	BRCA1 0.03 µg/ml			BRCA2 0.03 µg/ml			ECD-6 0.03 µg/ml			VOL 0.03 µg/ml		
G	BRCA1 0.01 µg/ml			BRCA2 0.01 µg/ml			ECD-6 0.01 µg/ml			VOL 0.01 µg/ml		
H	碳酸缓冲液			碳酸缓冲液			碳酸缓冲液			碳酸缓冲液		

实施例 2、检测原发性乳腺癌中的自身抗体

以下数据得自评估滴定自身抗体测定在原发性乳腺癌 (PBC) 中板的灵敏度和再现性的试验性研究。该研究包括来自 17 个无癌症证据妇女的血清以及来自 20 个原发性乳腺癌妇女手术前的血清样品。正常与癌症样品的年龄匹配。一个正常样品和三个癌症样品只能除去，因为它们显示了抗生物素抗体应答的证据，因此不能使用目前的测定形式进行评估。群体中的约 10% 被认为会发生针对生物素的免疫应答。

根据实施例 1 给出的操作使用抗原 p53、c-myc、NY-ESO-1 和 BRCA2 进行测定。

图 1 给出了该抗原滴定测定用于测量血清中 p53 自身抗体时所得曲线的实例。可以看出，癌症患者的血清 17766 (C) 以特征性反 S 型曲线的方式与测试抗原 (p53) 强烈结合，但不与阴性对照 VOL 结合。相比之下，来自正常个体的血清 18052 (N) 没有给出与测试抗原或阴性对照结合的滴定曲线。

自身抗体水平表达为由于结合测试抗原产生的光密度 (650nm) 减去由于结合阴性对照 (VOL) 而产生的光密度。正常的截止值计算作为正常组的 95% (平均值 + 2 倍标准差)。在图 2 中该点以点划线显

示，其中将正常个体中抗 p53 自身抗体水平与癌症患者进行比较。可见癌症组显示出通常较高的自身抗体水平，并且水平在截止值以上的个体的比例也较高。

板由四种抗原组成：p53、c-myc、NY-ESO-1 和 BRCA2。单个测定的灵敏度在表 2 中与这种具有四种抗原的板在原发性乳腺癌检测中的组合灵敏度（63 %）一起给出。

P53	c-myc	NY-ESO-1	BRCA2	板
6/17(35%)	5/17(29%)	4/17(24%)	4/17(24%)	63%

表 2：抗原滴定自身抗体测定的灵敏度。测量了针对四种不同抗原的自身抗体，并且计算了该板的组合灵敏度。截止值水平计算为正常样品集的平均值 + 2 倍标准差。具有抗生物素抗体应答的个体由于不能进行评估而被排除。

为了评估使用滴定自身抗体测定得到的测量是否可以重现，在分开的三天中进行测定，结果示于表 3。如果所有三次结果一致则认为该测定是可重现的。以正常血清进行测量的重现性为 94 %（15/16），而在乳腺癌样品中则为 88 %（14/16）。

正常	执行			原发性乳腺癌	执行		
	A	B	C		A	B	C
18017	-	+	+	17733	+	-	-
18018	-	-	-	17734 AB	+	-	-
18019	-	-	-	17735	-	-	-
18020	-	-	-	17742	+	+	+
18021	-	-	-	17743	+	+	+
18047	-	-	-	17744	+	+	+
18048 AB	+	-	+	17755	-	+	-
18049	-	-	-	17756	-	-	-
18050	ND	-	-	17757	-	-	-
18051	-	-	-	17758	ND	-	-
18052	-	-	-	17759	+	+	+
18053	-	-	-	17766	+	+	+
18054	-	-	-	17774	-	-	-
18055	-	-	-	17775 AB	+	+	-
18056	-	-	-	17776	-	-	-
18057	-	-	-	17777	-	-	ND
18058	-	-	-	17796	-	-	-
				17797 AB	+	-	-
				17832	+	+	+
				17450	-	-	-

表 3: 对 p53 自身抗体进行抗原滴定测定的重现性。在分开的三天中, 在来自原发性乳腺癌患者 (PBC) 或正常对照的血清样品上进行测定 (执行 A、B 和 C)。在每日基础上, 截止水平计算为正常样品集的平均值 + 2 倍标准差。AB 表示显示抗生物素抗体应答证据的个体, 不能通过此测定形式进行评估。如果所有三次结果一致则认为测定是可重现的。正常个体的重现性为 94% (15/16), 而在 PBC 患者中则为 88% (14/16)。

实施例 3、肺癌中自身抗体的测定

在试验性肺癌研究（10 个正常和 9 个肺癌血浆）中的对 2 种抗原（p53 和 NY-ESO）的自身抗体应答进行分析，显示检出率为 78 %（图 3）。

根据实施例 1 中的一般方案进行该测定，只是使用血浆样品代替血清。

阳性患者样品表现为与图 1 所示类似的反 S 型滴定曲线。图 3 显示了使用抗原滴定测定测量的正常个体与肺癌患者中 p53 和 NY-ESO 自身抗体水平的比较。正常截止值计算正常群体的平均值加 2 倍标准差。

实施例 4、其他滴定曲线

以下其他滴定曲线均在基于实施例 1 中所述一般方法的测定中产生。结果显示该滴定曲线方法可用于在不同类型的体液和不同的疾病（以不同类型的癌症示例）中检测许多不同的抗原，并且还展示了本发明在区分“真”或“假”阳性结果上的优点。

图 4 显示用于在来自乳腺癌患者的腹水样品中检测针对 p53 和 NY-ESO 的自身抗体的滴定曲线。测试了该患者，但发现没有产生抗 c-myc 的自身抗体。

图 5 显示用于在来自乳腺癌患者（导管原位癌）的血清样品中检测针对 BRCA1、BRCA2 和 HER2 的自身抗体的滴定曲线。

图 6 显示用于在来自肺癌患者的血清样品中检测针对 NY-ESO 的自身抗体的滴定曲线。测试了该患者，但发现没有产生抗 p53 或 c-myc 的自身抗体。

图 7 显示用于在来自肺癌患者的血清样品中检测针对 NY-ESO 和 p53 的自身抗体的滴定曲线。测试了该患者，但发现没有产生抗 c-myc 的自身抗体。

图 8 (a) 和图 8 (b) 展示了用于在来自“正常”受试者（即无癌症证据的个体）的血清样品中针对抗 p53、c-myc 和 NY-ESO-1 的自身抗体的两次独立滴定测定的结果。在图 8 (a) 显示的测定中，随着抗原量的增加观察到了平坦的线，表明血清样品中不包含针对任何测试抗原的自身抗体。当同一患者血清样品的第二个等分试样用同样的测定方法再次测试时，测定失败并产生示于图 8 (b) 的反常结果。抗原量增加时的特征滴定曲线的消失表明这是反常结果，而不是真阳性。如果使用单个固定抗原量在单点测定中测试这一样品，就得到看起来像“假阳性”的结果。因而，这些结果说明该滴定曲线方法的优点在于区分真阳性和假阳性结果。

图 9 (a) 和图 9 (b) 显示使用一系列不同抗原对来自单个侵袭性乳腺癌患者的血清样品进行两次独立滴定测定的结果。该特定患者显示了针对 NY-ESO-1、HER2 和 BRCA2 的自身抗体。对于每个阳性抗原，当抗原浓度提高时信号强度（即滴定信号）的提高表示阳性测定结果。

图 10 (a) 和图 10 (b) 展示了本发明在区分抗生物素应答和对特定抗原（即肿瘤标志物）的“真”自身抗体中的效用。在这些测定中，使用生物素化的抗原 BRCA2、HER2、c-myc 和 NY-ESO-1、非生物素化的 BRCA1 和“空”载体 VOL 的对照表达产物（其编码生物素标记但没有其他抗原）对来自临床正常人受试者的血清样品测试自身抗体的存在情况。测试个体对生物素化抗原和空载体 VOL（其仅为有效的生物素）均显示滴定应答，但不应答于非生物素化抗原 BRCA1，表明对生物素化标志物的“阳性”结果事实上是由于在该个体中存在抗生物素抗体造成的。

实施例 5、与单点测量相比较对抗原滴定测定的灵敏度和特异性进行分析

使用滴定法和在单个抗原浓度 (10 µg/ml) 下测量对 100 个患有原发性乳腺癌 (PBC) 的妇女和 80 个无恶性疾病证据的妇女进行自身抗体 (AAb) 测量。以下各表显示了两种方法的直接比较。

表 4: 在 PBC 中对滴定 AAb 测定与在单个抗原浓度下测量的灵敏度进行比较

抗原	单点	滴定测定
p53	17.5%	18.9%
c-myc	6.2%	22.9%
NY-ESO-1	24.7%	25.0%
BRCA2	20.6%	31.3%
HER2	23.7%	25.0%
MUC1	18.5%	19.8%
板 (6Ags)	54.6%	62.2%

表 5: 在正常妇女中对滴定 AAb 测定与在单个抗原浓度下测量的灵敏度进行比较

抗原	单点	滴定测定
p53	93.8%	97.3%
c-myc	93.8%	94.6%
NY-ESO-1	90.0%	93.3%
BRCA2	90.0%	94.6%
HER2	91.3%	95.9%
MUC1	92.5%	95.9%
板 (6Ags)	71.3%	78.4%

可以看出, 通过使用抗原滴定曲线上的多个点得到了与单点测量相比更高的灵敏度和特异性。

实施例 6、抗原滴定测定灵敏度和特异性较高的可能原因

不限于理论地, 申请人认为在滴定抗原的测定中观察到的较高的特异性和灵敏度有多个原因。

(i) 图 11 显示了使用抗原 p53、c-myc 和 NY-ESO-1 在不同浓度下对来自原发性乳腺癌 (PCB) 患者的血清进行 AAb 分析的结果。这些结果表明在一些情况下, 滴定曲线在高抗原水平时下降 (NY-ESO-1 曲线)。这在免疫化学中是经常观察到的现象。如果使用在 10 $\mu\text{g/ml}$ 的单点测量, 该患者将被归类为 NY-ESO-1 自身抗体阴性, 而事实上明显为阳性应答。

(ii) 图 12 显示了同样使用滴定抗原 p53、c-myc 和 NY-ESO-1 对来自正常个体的血清进行的分析。该图展示了申请人在约 10 % 的测定中观察到的一种效应, 其中抗原测量 (在此为 p53) 的基线偏移至阴性对照 (VOL) 的水平以上。这就产生了不真实的高读数。这种类型的结果很容易用被滴定测定鉴别, 但在一组单点测定中是无法查觉的。这些假阳性将导致特异性降低 (见表 5)。

(iii) 正如实施例 4 中的讨论, 用于滴定 AAb 测定的抗原具有用于蛋白质纯化的生物素标签。然而, 已知群体中的约 10 % 对生物素 (一种维生素) 产生抗体应答。图 13 展示了原发性乳腺癌 (PBC) 患者中的抗生物素应答。这种应答可以使用滴定曲线明确鉴别, 因为对阴性对照 VOL (其也是生物素化的) 产生强烈抗体应答。这样的个体必须认为是不能用这种测定形式来评估的。然而, 如果使用单点测定, 抗生物素应答则不能从真实应答中区分出来。

实施例 7、与血清滴定相比, 抗原滴定显示灵敏度的提高

在两个完全无关的实验中以两种方式进行 AAb 测量。第一种使用标准形式, 其中用从 10 $\mu\text{g/ml}$ 降至 0.01 $\mu\text{g/ml}$ 半对数滴定的抗原包被板。封闭后, 加入 1/100 稀释的血清。在第二种方式中, 用浓度为 3 $\mu\text{g/ml}$ 的抗原包被板, 封闭后加入从 1/10 稀释度降至 1/10,000 稀释度的半对数滴定范围内的血清。测定中其余的方法相同。将两种已知为 p53 和 c-myc 阳性的血清混合物与 8 种来自原发性乳腺癌妇女的血

清以及 10 种来自正常个体的血清一起测定。结果显示于以下文表 6 中。

表 6: 涉及抗原滴定的 AAb 测定与涉及血清滴定的 AAb 测定相比的灵敏度

PBC	抗原 p53	血清 p53	抗原 c-myc	血清 c-myc	抗原 BRCA2	血清 BRCA2
p53 +ve	++	+++	++	++	-	-
c-myc +ve	-	-	+	+	-	-
17179	+++	+++	+++	+++	++	+
19451	+	++	-	-	-	-
18237	++	++	++	+	+	-
18489	-	-	-	-	+	-
19510	-	-	-	-	-	-
19190	+	-	-	-	+	++
18610	+	-	+	+	-	-
18458	+	-	+	-	-	-
阳性	70%	40%	60%	50%	40%	20%

可见涉及抗原滴定的测定形式比涉及血清滴定的测定形式更为灵敏。强阳性样品可以用两种形式检测，但是抗原滴定测定中的弱阳性一般在血清滴定测定中无法检测。

血清滴定中显示的较低灵敏度是由于血清在高浓度下固有的非特异性结合造成的。这引起甚至在正常样品中也对蛋白质有一定水平的结合（见图 14），提高了正常截止值，因而降低了灵敏度。与抗原滴定形式（BRCA2 = 100 %）相比，在血清滴定形式中特异性也降低了（BRCA2 = 90 %）。

图 15 反映了图 4 所示的实验，但是使用来自原发性乳腺癌患者的血清进行。使用本发明的抗原滴定法时，发现该患者针对 p53 和 c-myc 的自身抗体为阳性，但针对 BRCA2 的自身抗体为阴性。然而，当在血清滴定范围内测量自身抗体时，没有检测到自身抗体（见表 6）。这是由于在高浓度下血清表现出的非特异性结合（由与阴性对照蛋白（VOL）高水平的结合证实），其掩盖了特异性自身抗体结合的信号。

其结果是使用血清稀释液时，该测定可能会将患有原发性乳腺癌的患者划分为阴性。由于 $\text{灵敏度} = \text{真阳性} / (\text{真阳性} + \text{假阴性})$ ，这就会使分母增大，因此降低了灵敏度。

总之，申请人已经显示，抗原滴定自身抗体测定比在单个抗原浓度下测量自身抗体反应性更为灵敏和特异。这是因为抗原滴定提供了在高抗原浓度下检测低丰度、低亲和力抗体而同时检测高丰度抗体的机会，否则高丰度抗体将在高抗原浓度下结合而最大限度的结合将进一步降低滴定曲线。这也允许从真实结果中区分不可评估的测定，这在单点测量中是不可能的。相信抗原滴定 AAb 测定比仅滴定血清更为灵敏，因为在高浓度下观察到的与血清的高水平非特异性结合提高了正常的截止值水平，因此降低了灵敏度。

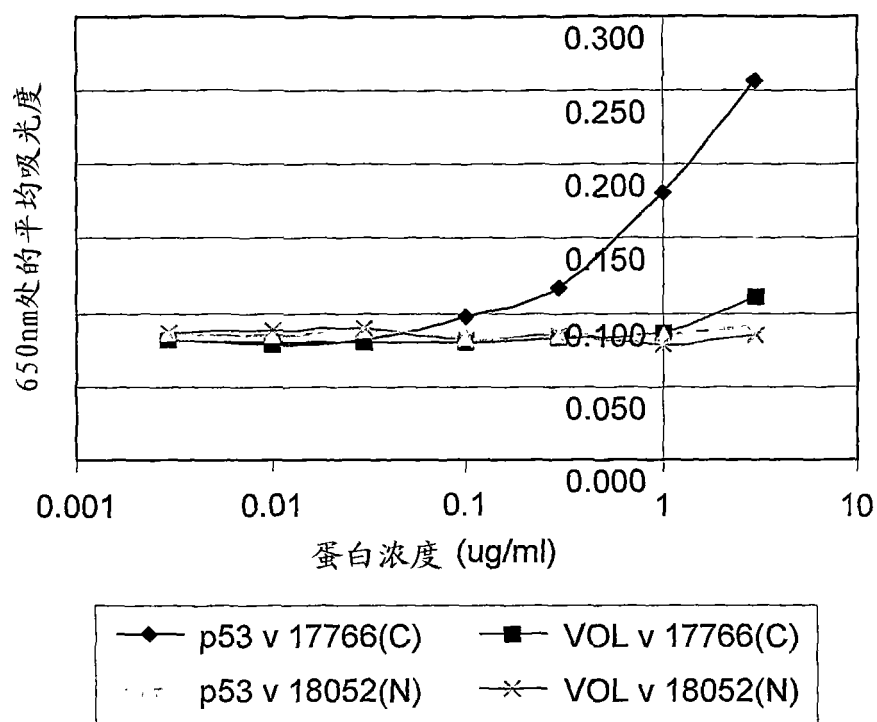


图1

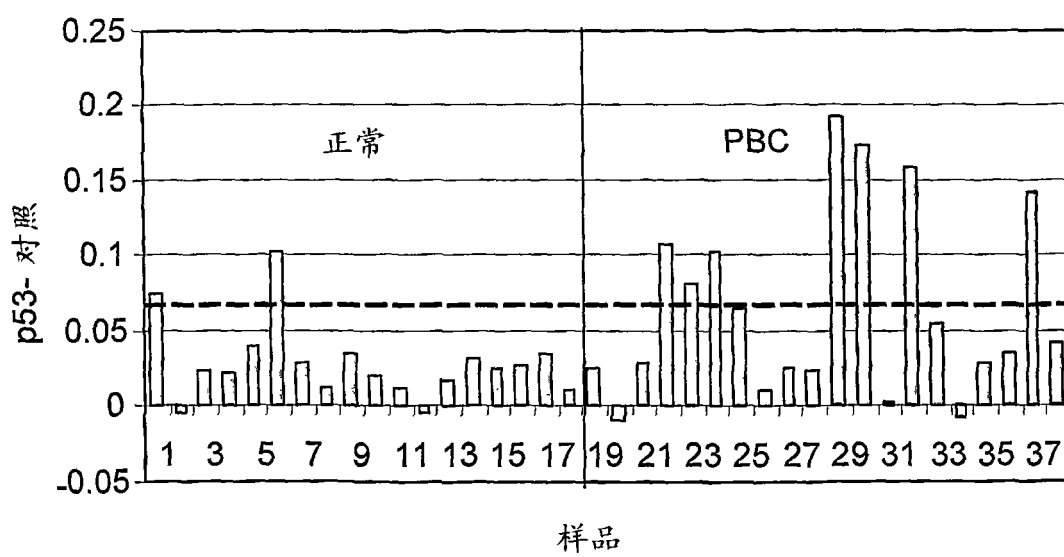


图2

正常和肺癌血浆针对p53和NY-ESO抗原的反应性

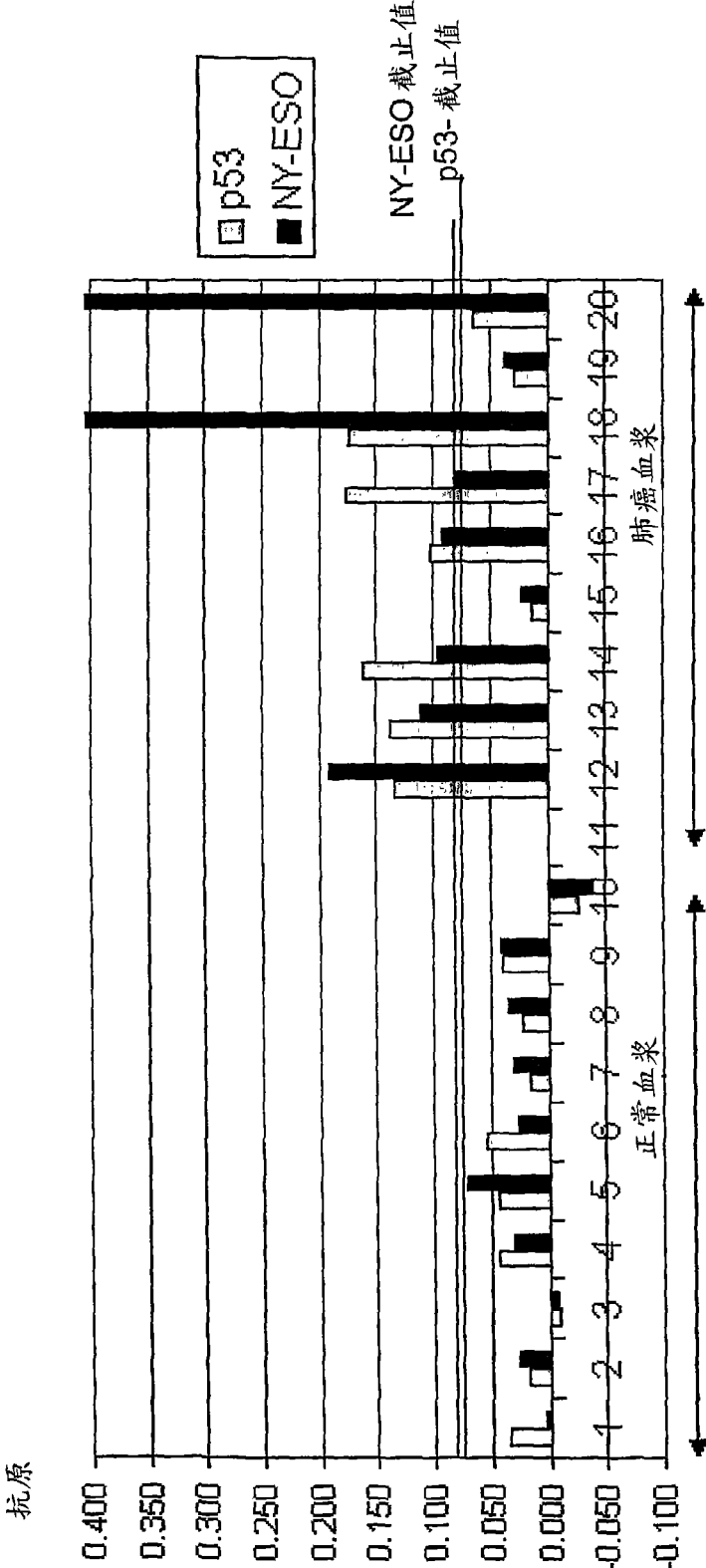


图3

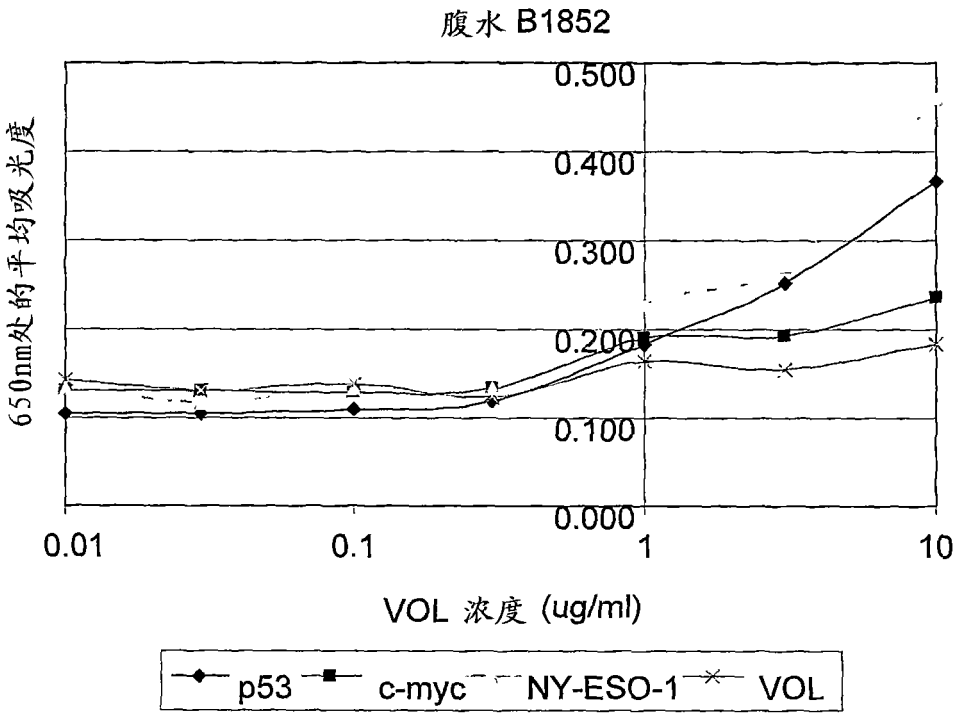


图 4

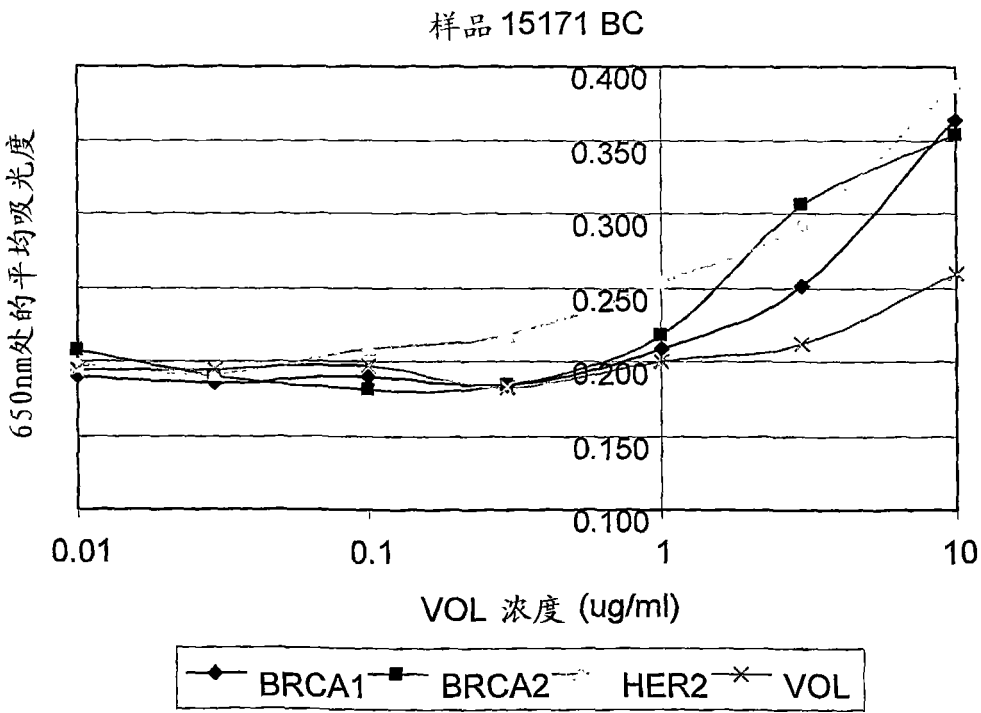


图 5

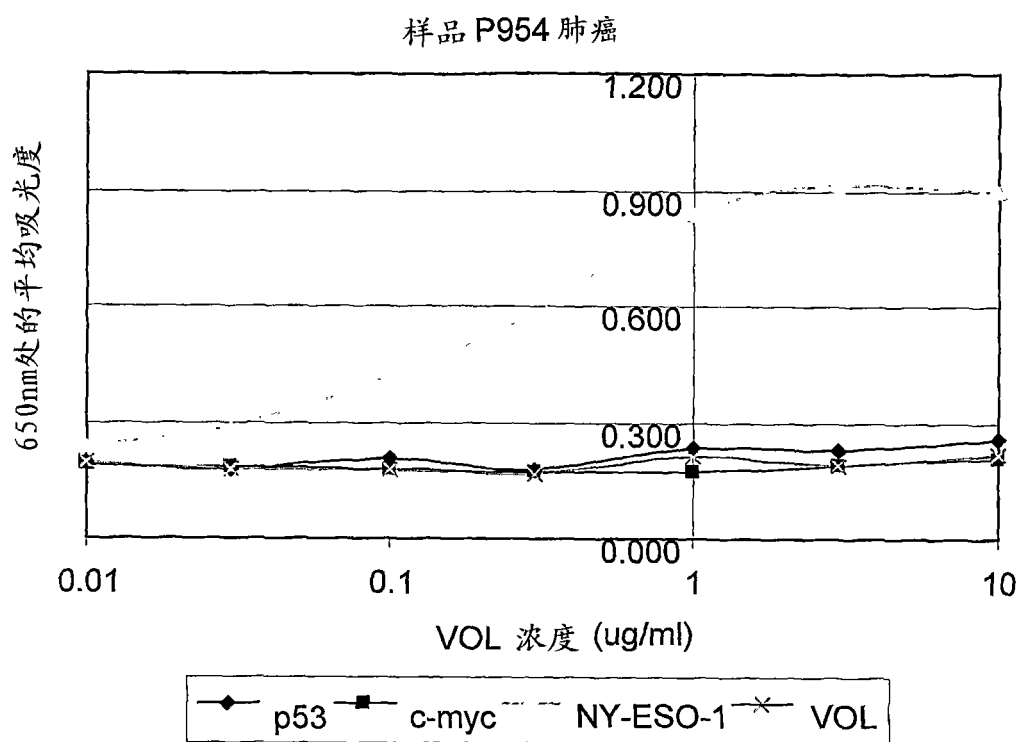


图6

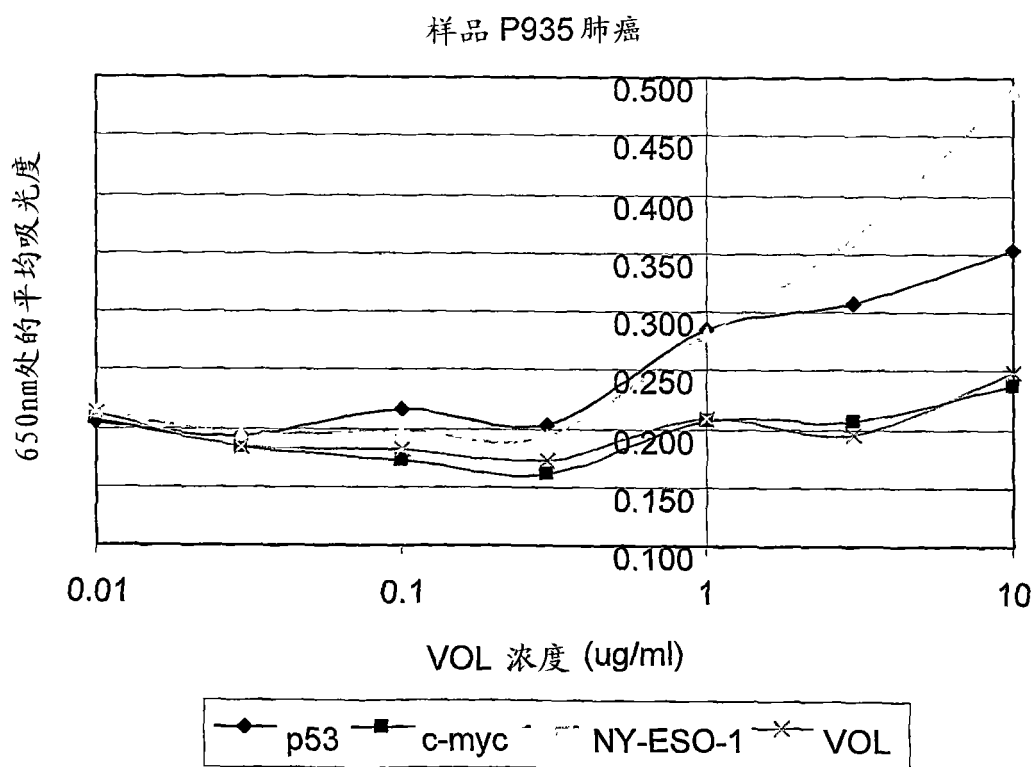


图7

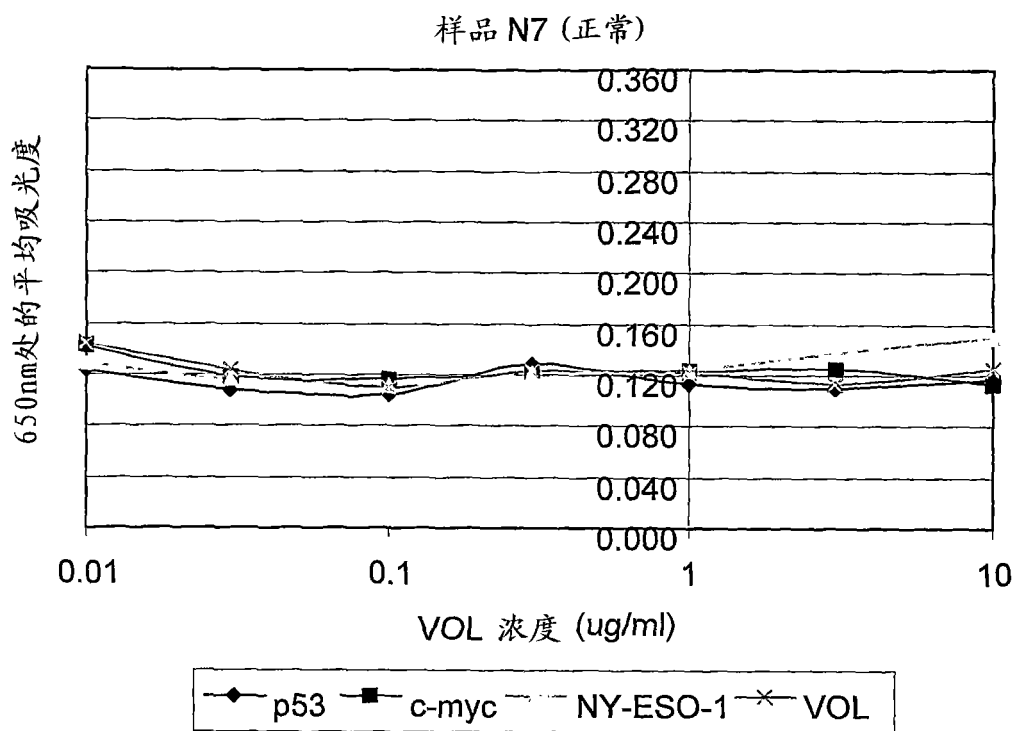


图 8a

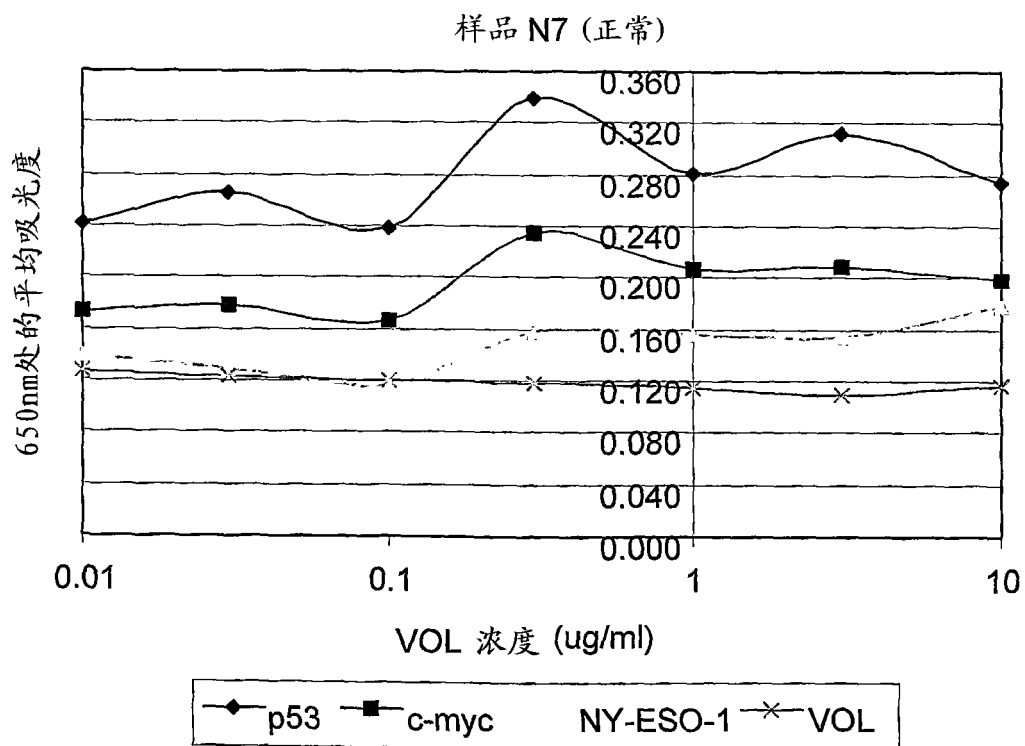


图 8b

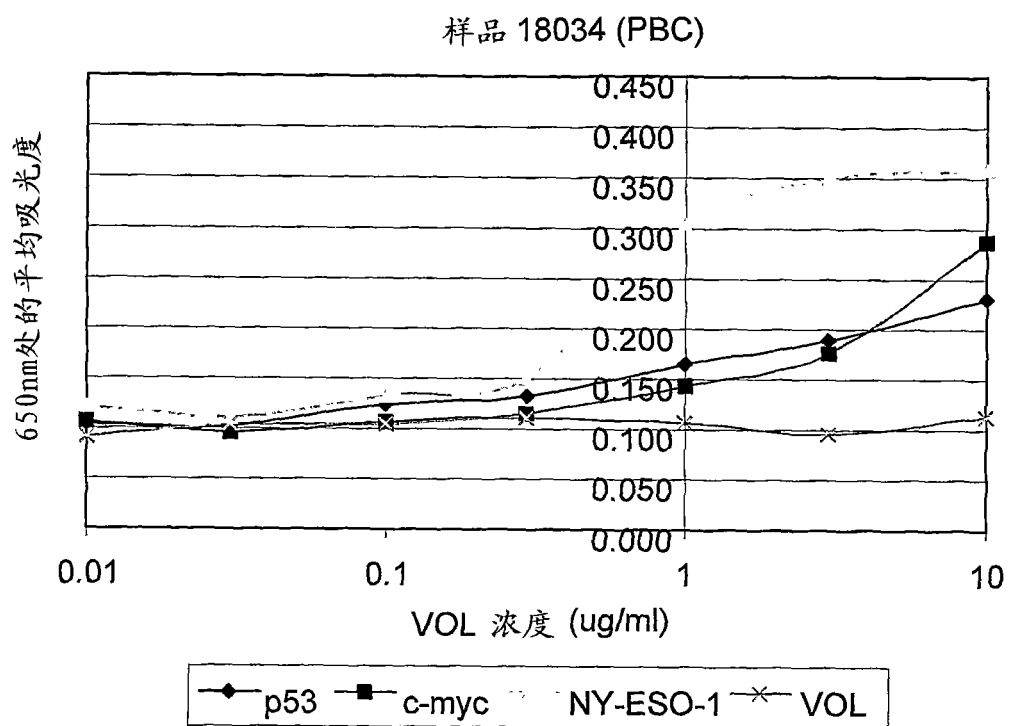


图 9a

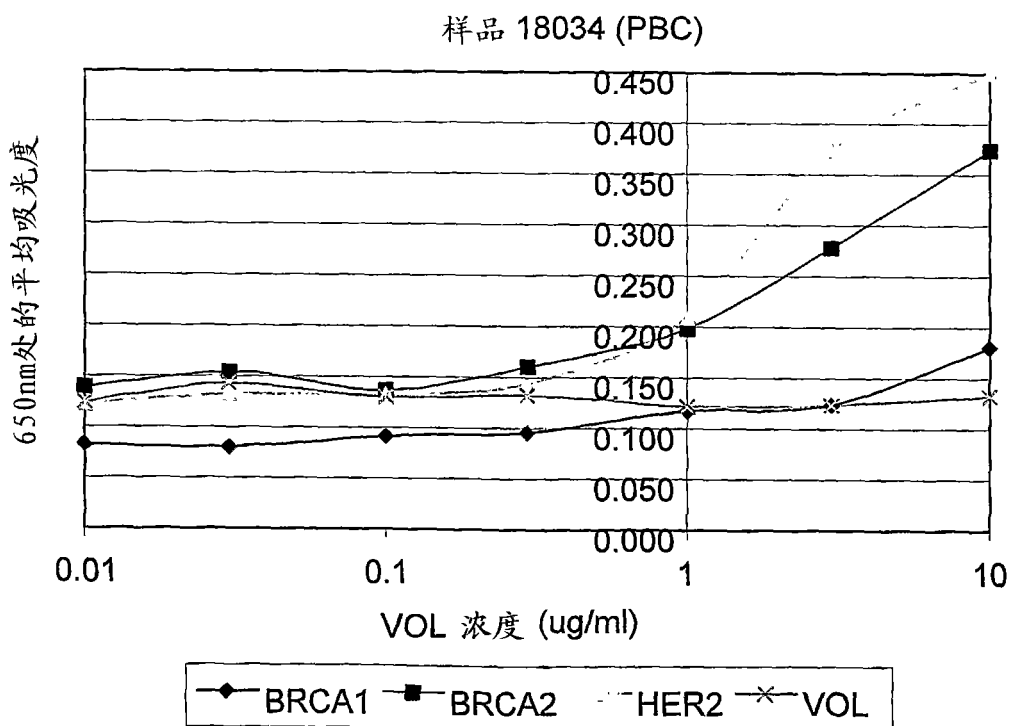


图 9b

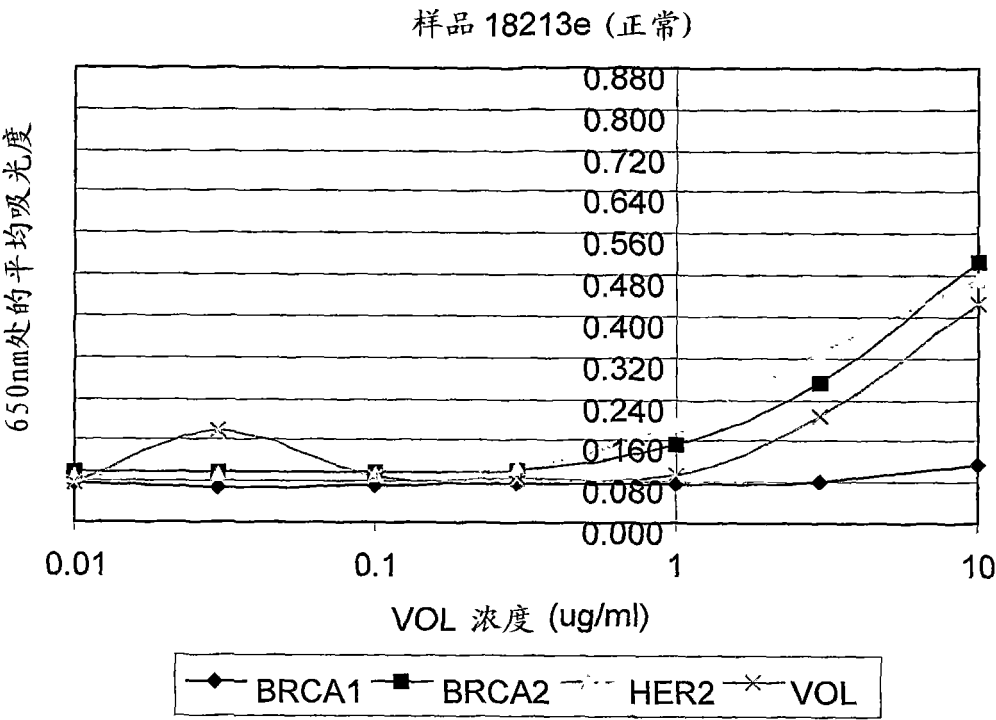


图 10a

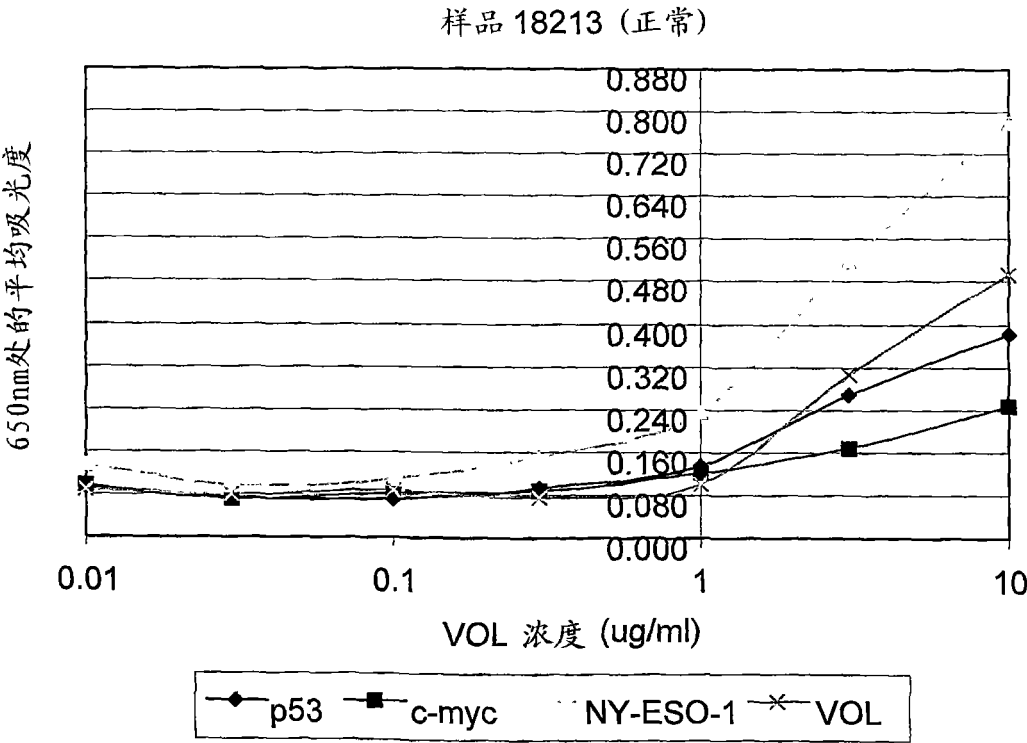


图 10b

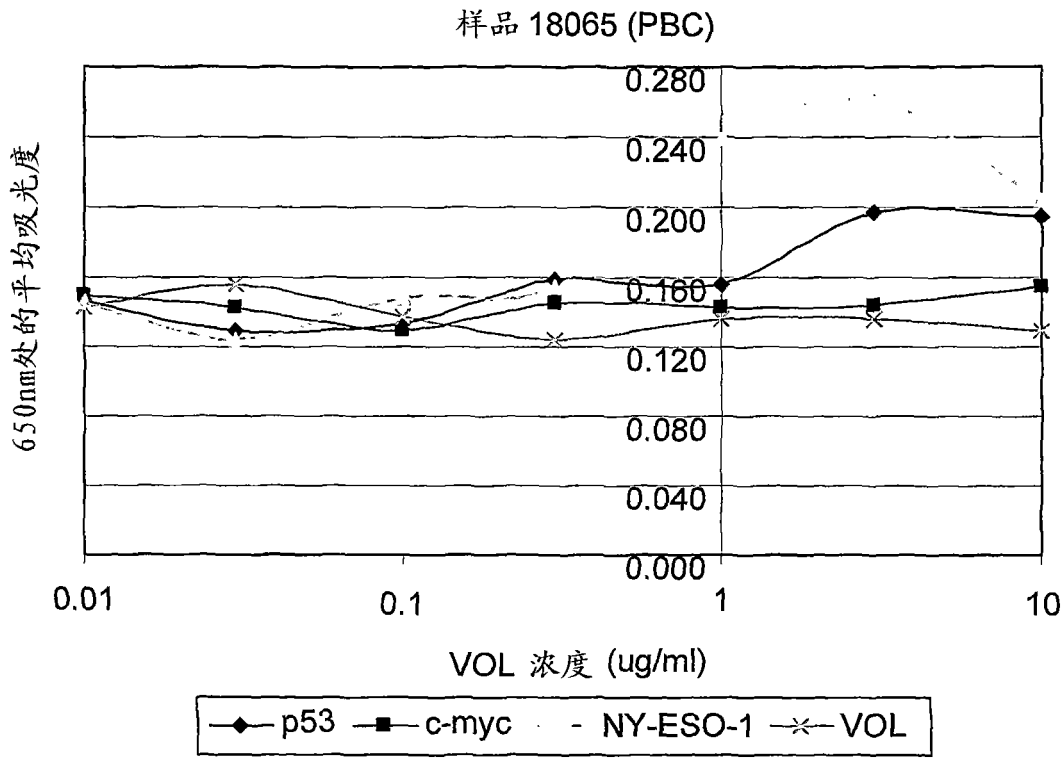


图 11

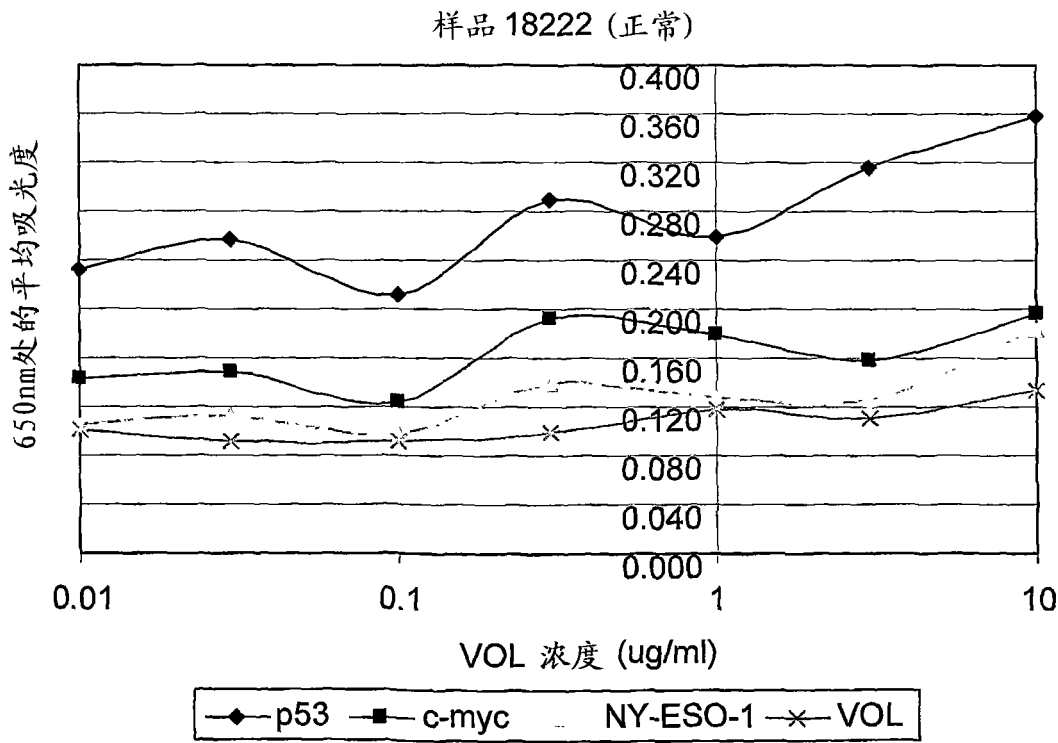


图 12

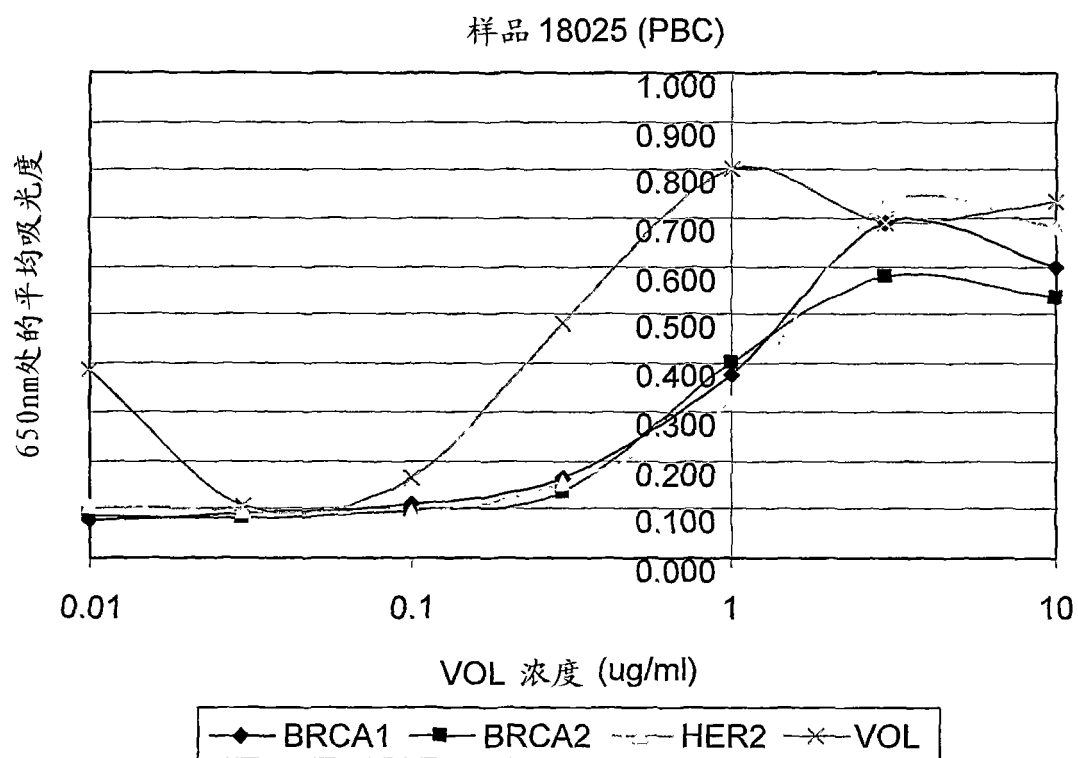


图13

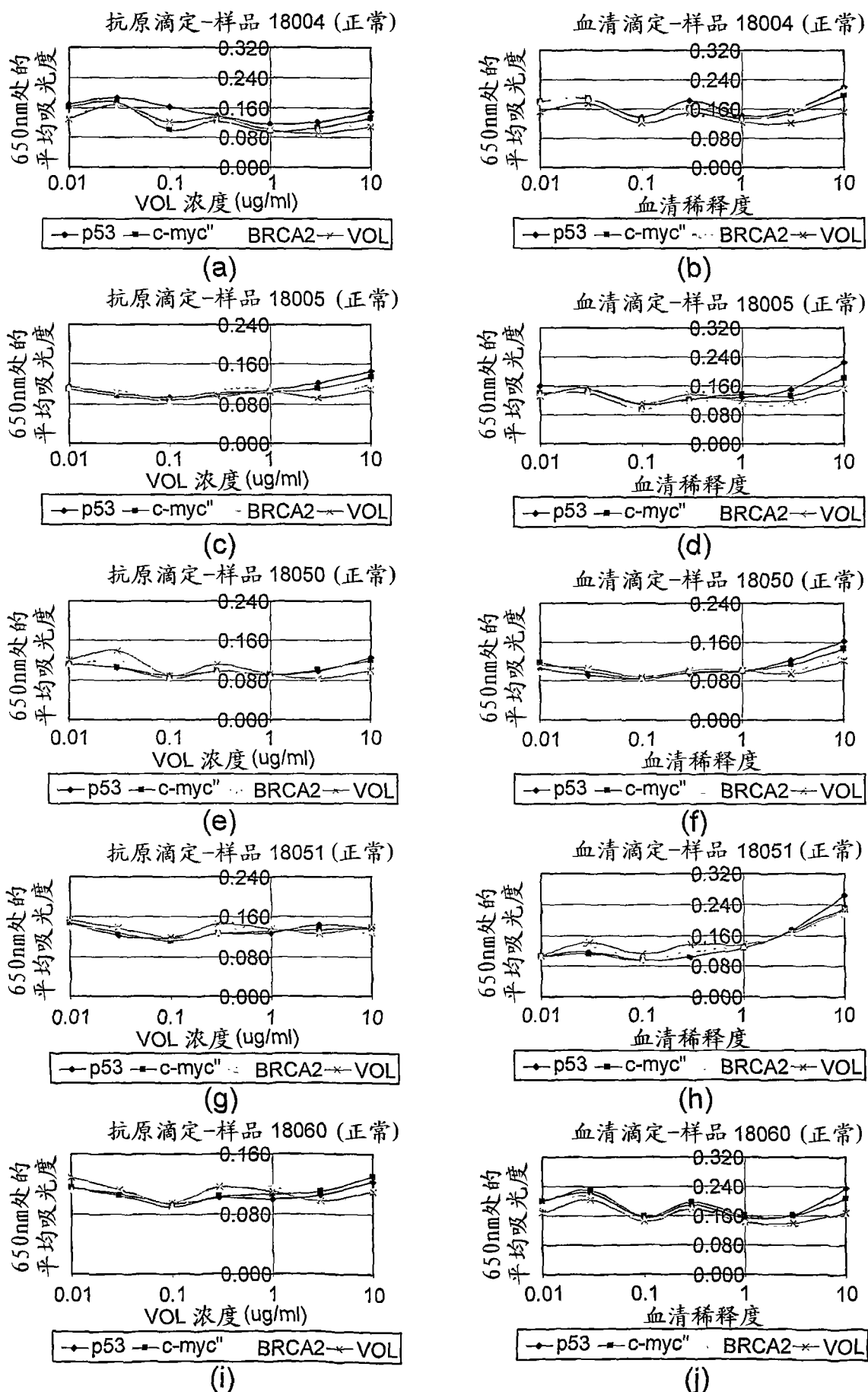


图14

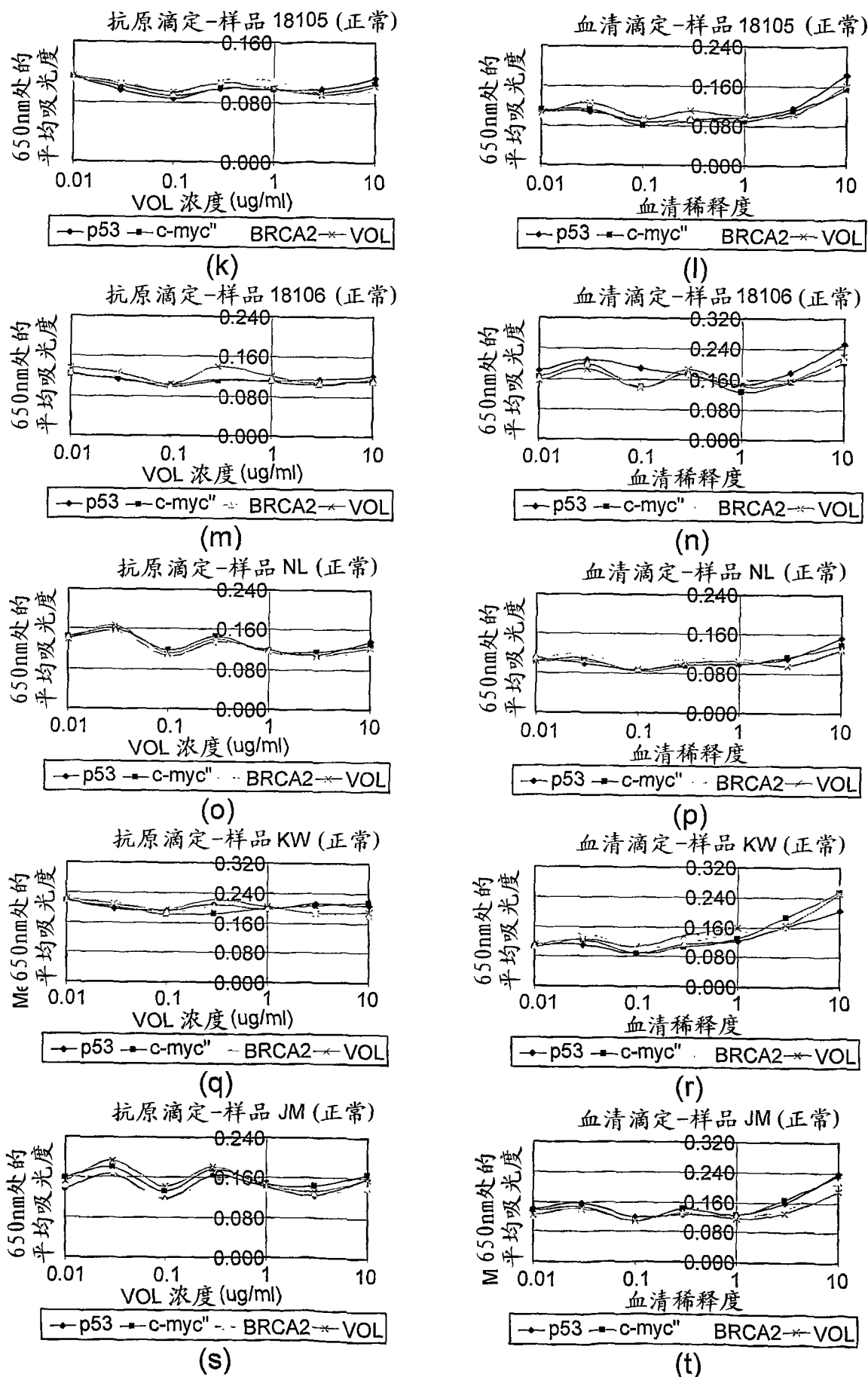


图 14 (续)

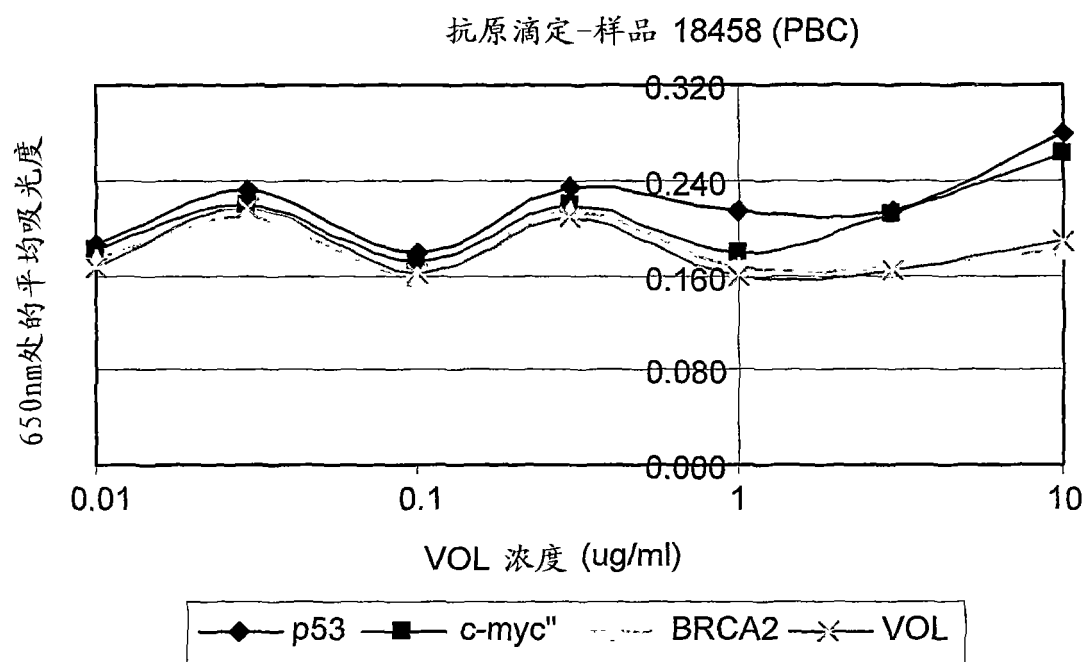


图 15a

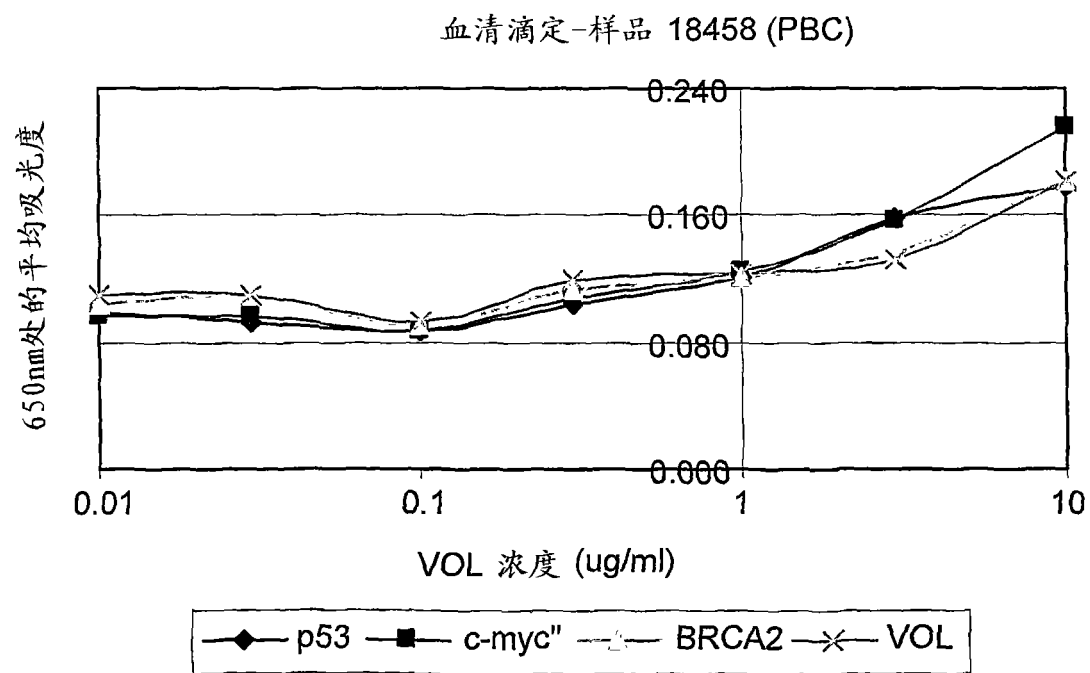


图 15b

专利名称(译)	改进的免疫测定方法		
公开(公告)号	CN101203756A	公开(公告)日	2008-06-18
申请号	CN200680018335.X	申请日	2006-05-26
[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 托尼·巴尔内斯 安德烈亚·默里 卡罗琳·查普曼		
发明人	约翰·福赛思·鲁塞尔·罗伯特森 托尼·巴尔内斯 安德烈亚·默里 卡罗琳·查普曼		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/564 G01N33/574		
CPC分类号	G01N2800/102 G01N33/564 G01N2800/52 G01N33/574 G01N33/57484		
代理人(译)	刘晓东		
优先权	60/685422 2005-05-27 US 2005010943 2005-05-27 GB		
其他公开文献	CN101203756B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及检测哺乳动物受试者中疾病状态或疾病易感性的方法，包括检测包含所述哺乳动物受试者体液的测试样品中的抗体，其中所述抗体是疾病状态或疾病易感性的生物标志物，该方法包括：(a)使所述测试样品接触多种不同量的所述抗体特异性抗原，(b)检测所述抗体与所述抗原之间特异性结合的量，(c)对步骤(a)中所用的每个抗原量，绘制或计算所述特异性结合量对抗原量的曲线，以及(d)基于每个所用的不同抗原浓度下所述抗体与所述抗原之间的特异性结合量，确定该疾病状态或疾病易感性是否存在。

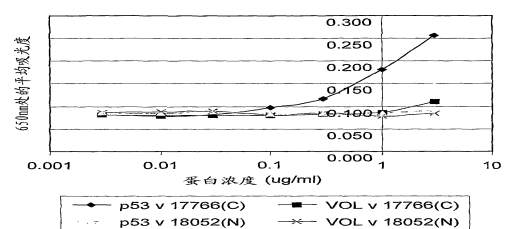


图 1

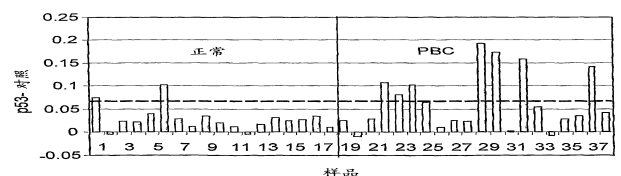


图 2