



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104995512 A

(43) 申请公布日 2015. 10. 21

(21) 申请号 201380073634. 3

(51) Int. Cl.

(22) 申请日 2013. 12. 17

G01N 33/53(2006. 01)

C07K 16/00(2006. 01)

(30) 优先权数据

61/740466 2012. 12. 21 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2015. 08. 21

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2013/075699 2013. 12. 17

(87) PCT国际申请的公布数据

W02014/099933 EN 2014. 06. 26

(71) 申请人 詹森生物科技公司

地址 美国宾夕法尼亚州

(72) 发明人 S. 查图维迪 S. 普拉特罗

D. 斯伊格

(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公

司 72001

代理人 初明明 彭昶

权利要求书2页 说明书11页 附图12页

(54) 发明名称

用于可溶性成纤维细胞生长因子受体的灵敏的多重免疫测定

(57) 摘要

本发明提供了使用多重微球技术来测量和检测生物样本中可溶性成纤维细胞生长因子受体(sFGFR) 2、3 和 4 的试剂盒和方法。

检测参数	FGFR2		FGFR3		FGFR4	
	血清	血浆	血清	血浆	血清	血浆
LLO	0.14 ng/mL	0.14 ng/mL	0.023 ng/mL	0.023 ng/mL	0.033 ng/mL	0.033 ng/mL
LLOQ	0.82 ng/mL	0.82 ng/mL	0.15 ng/mL	0.15 ng/mL	0.17 ng/mL	0.17 ng/mL
批内测定精度	低: 0-11% CV, 中: 1-7% CV, 高: 1-7% CV	N/A	低: 0-16% CV, 中: 2-10% CV, 高: 0-12% CV	N/A	低: 0-21% CV, 中: 1-11% CV, 高: 1-4% CV	N/A
批间测定精度 (n=3块板)	低: 8% CV, 中: 43% CV, 高: 10% CV	N/A	低: 13% CV, 中: 12% CV, 高: 8% CV	N/A	低: 33% CV, 中: 9% CV, 高: 3% CV	N/A
线性度	在1.5和1.40 之间为线性的	N/A	在1.5和1.40 之间为线性的	在1.5和1.40 之间为线性的	在1.5和1.40 之间为线性的	在1.5和1.40 之间为线性的
回收率	79%-126%	50%-114%	89%-143%	68%-142%	81%-165%	53%-152%
冻存稳定性 (n=3块板)	血清: 89% 血浆: 91% 冻存: 117%	N/A	血清: 88% 血浆: 90% 冻存: 107%	N/A	血清: 89% 血浆: 89% 冻存: 112%	N/A
冻存-解冻 稳定性	对于最多3个 冻存-解冻循环 为稳定的	对于最多3个 冻存-解冻循环 为稳定的	对于最多3个 冻存-解冻循环 为稳定的	对于最多3个 冻存-解冻循环 为稳定的	对于最多3个 冻存-解冻循环 为稳定的	对于最多3个 冻存-解冻循环 为稳定的
短期稳定性	室温下4℃下至 多24小时为 稳定的	室温下4℃下至 多4小时为 稳定的	4℃下至多2小时 为稳定的	室温下4℃下 至多24小时 为稳定的	室温下4℃下至 多24小时为 稳定的	室温下4℃下至 多24小时为 稳定的

1. 一种用于检测生物样本中可溶性成纤维细胞生长因子受体(sFGFR)的试剂盒,所述试剂盒包含:

缀合至微球的特异性结合 sFGFR 的捕获抗体组合物;和

缀合至检测标记的特异性结合 sFGFR 的检测抗体组合物;

其中在所述生物样本中检测到 0.14-494ng/mL 的 sFGFR2、0.023-74ng/mL 的 FGFR3 和 0.033-123ng/mL 的 FGFR4。

2. 根据权利要求 1 所述的试剂盒,其中所述生物样本选自由以下项组成的组:血液、血清、尿液、脑脊液(CSF)、血浆、淋巴液、唾液、汗液、胸膜液、滑液、泪液、胆汁和胰腺分泌物。

3. 根据权利要求 2 所述的试剂盒,其中所述 sFGFR 为 sFGFR2、sFGFR3 或 sFGFR4。

4. 根据权利要求 3 所述的试剂盒,其中所述捕获抗体组合物包含特异性结合 FGFR2 的捕获抗体、特异性结合 FGFR3 的捕获抗体和特异性结合 FGFR4 的捕获抗体。

5. 根据权利要求 4 所述的试剂盒,其中所述捕获抗体选自由以下项组成的组:

鼠抗人 FGFR2 单克隆抗体;

鼠抗人 FGFR3 单克隆抗体;和

鼠抗人磷酸化 FGFR4 多克隆抗体。

6. 根据权利要求 5 所述的试剂盒,其中所述检测抗体组合物包含特异性结合 FGFR2 的检测抗体、特异性结合 FGFR3 的检测抗体和特异性结合 FGFR4 的检测抗体。

7. 根据权利要求 6 所述的试剂盒,其中所述检测抗体选自由以下项组成的组:

鼠抗人 FGFR2 单克隆抗体;

鼠抗人 FGFR3 单克隆抗体;和

鼠抗人 FGFR4 多克隆抗体。

8. 根据权利要求 6 所述的试剂盒,其中所述微球缀合至两种荧光团。

9. 根据权利要求 8 所述的试剂盒,其中缀合至所述微球的两种荧光团为红色荧光团和红外荧光团。

10. 根据权利要求 9 所述的试剂盒,其中所述微球具有约 5 μ m 的直径。

11. 根据权利要求 10 所述的试剂盒,所述试剂盒还包含封闭缓冲液和孵育缓冲液。

12. 一种用于检测生物样本中 sFGFR2、sFGFR3 和 sFGFR4 的试剂盒,所述试剂盒包含:

缀合在微球上的鼠抗人 FGFR2 单克隆抗体;

缀合在微球上的鼠抗人 FGFR3 单克隆抗体;

缀合在微球上的鼠抗人磷酸化 FGFR4 多克隆抗体;

缀合至检测标记的鼠抗人 FGFR2 单克隆抗体;

缀合至检测标记的鼠抗人 FGFR3 单克隆抗体;

缀合至检测标记的鼠抗人 FGFR4 多克隆抗体;

其中在所述生物样本中检测到 0.14-494ng/mL 的 sFGFR2、0.023-74ng/mL 的 FGFR3 和 0.033-123ng/mL 的 FGFR4。

13. 根据权利要求 12 所述的试剂盒,所述试剂盒还包含封闭缓冲液和孵育缓冲液。

14. 一种测量样本中 sFGFR 的方法,所述方法包括:

a. 提供所述样本;

b. 使用权利要求 13 所述的试剂盒来测量所述样本中的 sFGFR。

15. 根据权利要求 14 所述的方法, 其中所述样本从活体受检者获得。

16. 一种用于测量生物样本中 sFGFR2、sFGFR3 和 / 或 sFGFR4 的量的方法, 所述方法包括:

a. 使所述生物样本与缀合在微球上的捕获抗体组合物接触, 所述捕获抗体组合物特异性结合 sFGFR2、sFGFR3 和 / 或 sFGFR4;

b. 使所述生物样本与偶联至检测标记的检测抗体组合物接触, 所述检测抗体组合物特异性结合 sFGFR2、sFGFR3 和 / 或 sFGFR4;

c. 测量由所述检测标记产生的信号;

d. 使 c 中产生的信号的量与所述生物样本中 sFGFR2、sFGFR3 或 sFGFR4 的量相关联。

17. 根据权利要求 16 所述的方法, 其中

对于 sFGFR2 的最小检测灵敏度为 0.14ng/mL;

对于 sFGFR 的最小检测灵敏度为 0.023ng/mL; 并且

对于 sFGFR 的最小检测灵敏度为 0.033ng/mL。

18. 根据权利要求 17 所述的方法, 其中所述生物样本选自由以下项组成的组: 血液、血清、尿液、脑脊液 (CSF)、血浆、淋巴液、唾液、汗液、胸膜液、滑液、泪液、胆汁和胰腺分泌物。

19. 根据权利要求 18 所述的方法, 其中每种微球具有约 5 μ m 的直径。

用于可溶性成纤维细胞生长因子受体的灵敏的多重免疫测定

[0001] 优先权申请

[0002] 本申请要求 2012 年 12 月 21 日提交的美国申请 61/740,466 的优先权,其全文以引用方式并入本文。

技术领域

[0003] 本文描述且受权利要求书保护的主题处于分析物检测领域,并且具体地,涉及用于测量和鉴定生物样本中可溶的或细胞外域的成纤维细胞生长因子受体的试剂盒和方法,所述受体包括 2 型受体、3 型受体和 4 型受体 (sFGFR2、sFGFR3 和 sFGFR4)。

背景技术

[0004] 癌变为多步过程,在此过程中,正常细胞通过积累多个基因突变并获得多个促进恶性表型的常见特征(常称为癌标志)而转化成癌细胞。六个经典的癌标志包括生长信号中的自给自足、对抗生长信号的不敏感、无限复制、细胞凋亡逃逸、持续的血管生成、以及侵入组织并形成癌细胞转移的能力(Hanahan, D., Weinber, R. A. Cell 2000, 100:57-70)。这些特征中的许多是由基因改变引起的,所述基因改变涉及关键癌基因的功能获得、扩增和/或过表达,以及瘤抑制因子的功能丧失、缺失和/或外基因沉默(Luo, J., Solimini, N. L., Elledge, S. J. Cell 2009, 136:823-837)。例如,已在多种人癌中鉴定出许多改变和突变处于成纤维细胞生长因子受体(FGFR)家族内。这些突变导致 FGFR 信号传导反常或癌中受体过表达,所述癌包括乳腺癌、膀胱癌、胃癌、前列腺癌、结肠癌、多发性骨髓瘤,以及尤其肺癌(Turner, N., Grose, R., Nat Rev Cancer. 2010, 10:116-129; Volm, M., Koomägi, R., Mattern, J., Stämmler, G. Eur J Cancer. 1997, 33:691-693; Bergsagel, P. L., Kuehl, W. M. J Clin Oncol. 2005, 23:6333-6338. Trudel, S., Stewart, A. K., Rom, E., Wei, E., Li, Z. H., Kotzer, S., Chumakov, I., Singer, Y., Chang, H., Liang, S. B., Yayan, A., Blood. 2006, 107:4039-4046)。

[0005] 对于男性和女性而言,肺癌是癌症相关死亡的主要原因,并且 2010 年美国统计有 157,300 死亡例(Jemal, A., Siegel, J. Xu, J., Ward, E. CA Cancer J Clin. 2010, 60:277-300)。大多数肺癌病例(大约 85%)归类为非小细胞肺癌(NSCLC),在过去几十年中,肺癌幸存者的改善最小(American Cancer Society. Cancer Facts&Figures, 2010, Atlanta, GA)。近来,由于对 NSCLC 中生长因子信号传导了解的提高,而兴起了把表皮生长因子受体(EGFR)和血管内皮生长因子(VEGF)作为目标的新型治疗方法。尽管 EGFR 抑制剂在未选择患者中表现出一些优势,但在 EGFR 中激活突变鉴定瘤亚群异常灵敏于 EGFR 酪氨酸激酶抑制剂(Lynch, T. J., Bell, D. W., Sordella, R., Gurubhagavatula, S., Okimoto, R. A., Brannigan, B. W., Harris, P. L., Haserlat, S. M., Supko, J. G., Haluska, F. G., Louis, D. N., Christiani, D. C., Settleman, J., Haber, D. A. N Engl J Med. 2004, 350:2129-2139; Shepherd, F. A., Pereira, J. R., Ciuleanu, T., Eng, H. T., Hirsh, V., Thongprasert, S., Cam

pos, D., Maoleekoonpiroj, S., Smylie, M., Martins, R., Van Kooten, M., Dediu, M., Findlay, B., Tu, D., Johnston, D., Bezjak, A., Clark, G., Santabárbara, P., Seymour, L. *N Engl J Med.* 2005, 353:123-132)。类似地,对于患有 NSCLC 的某些患者,抗 VEGF 治疗方法产生了改善的结果 (Sandler, A., Gray, R., Perry, M. C., Brahmer, J., Schiller, J. H., Dowlati, A., Lilienbaum, R., Johnson, D. H. *N Engl J Med.* 2006, 355:2542-2550),尽管未达到定义抗 VEGF 疗效的预测生物标志 (Ramalingam, S. S., Belani, C. P. *Curr Opin Oncol.* 2010, 22:79-85)。NSCLC 中 EGFR 和 VEGF 抑制剂的经验强调需要定义其他信号传导途径,所述其他信号传导途径涉及瘤进展、血管生成和对当前可用治疗方法的抵抗 (Siegel, R., Naishadham, D., Jemal, A. *CA Cancer J Clin.* 2012, 62:10-29)。

[0006] 成纤维细胞生长因子受体 (FGFR) 为涉及多个生理过程的跨膜酪氨酸激酶受体,所述多个生理过程包括血管生成、器官生成、组织发育和内分泌信号传导。结构上,FGFR 由裂解的信号肽、三个免疫球蛋白 (Ig) 样域、酸性盒、跨膜域和分离的酪氨酸激酶域组成 (Turner, N., Grose, R. *Nat Rev Cancer.* 2010, 10:116-29; Beenken, A., Mohammadi, M. *Nat Rev Drug Discov.* 2009, 8:235-253)。迄今为止,已鉴定出 FGFR 编码的四种基因,命名为 FGFR1、FGFR2、FGFR3 和 FGFR4。每种类型的 FGFR 的灵敏度和特异性不同。该体系通过可在 FGFR1-3mRNA 中发生的延伸拼接而进一步复杂化,从而生成具有不同配体结合和信号转导活性的多种变体 (Turner, N., Grose, R. *Nat Rev Cancer.* 2010, 10:116-29; Beenken, A., Mohammadi, M. *Nat Rev Drug Discov.* 2009, 8:235-253)。成纤维细胞生长因子 (FGF) 为 FGFR 的配体并由根据细胞需要而释放的二十二种可溶性排泄肽组成。而且,FGF 和 FGFR 产生使生长信号精确微调的极高数量的配体 / 受体组合。FGF 信号传导的调节涉及多个机制,包括释放可溶形式的 FGFR (sFGFR),其由金属蛋白酶在细胞表面处的蛋白水解裂解而生成 (Müllberg J, Althoff K, Jostock T, Rose-John S. *Eur Cytokine Netw.* 2000, 11:27-38)。这些受体的脱落提供了关于 FGF 信号传导下调和生物活性蛋白释放到循环的关键机制 (Peschon J. J., Slack J. L., Reddy P., Stocking K. L., Sunnarborg, S. W., Lee, D. C., Russell, W. E., Castner, B. J., Johnson, R. S., Fitzner, J. N., Boyce, R. W., Nelson, N., Kozlosky, C. J., Wolfson, M. F., Rauch, C. T., Cerretti, D. P., Paxton, R. J., March, C. J., Black, R. A. *Science.* 1998;282:1281-2184)。

[0007] 在过去二十年中,有显示癌患者中血液内存在相当高水平的可溶性 FGFR 受体的确凿证据 (Hanneken, A., Ying, W., Ling, N., Baird, A. *Proc Natl Acad Sci.* 1994, 91:9170-9174; Hanneken A. *FEBS Lett.* 2001, 489:176-181),这表明在循环中监测这些受体的存在可能对于了解癌的进展和 / 或治疗方法至关重要。例如, C-末端截断的可溶形式的 FGFR4 由能在功能上调节 FGF 作用的人上皮乳腺癌细胞系表达 (Ezzat, S., Zheng, L., Yu, S., Asa, S. L. *Biochem Biophys Res Commun.* 2001, 287:60-65)。此外,已在人鳞状癌细胞系中鉴定出另选拼接形式的 FGFR3,其具有结合至 FGF1 和 FGF2 的潜力,如交联实验所示 (Terada, M., Shimizu, A., Sato, N., Miyakaze, S. I., Katayama, H., Kurokawa-Seo, M. *Mol Cell Biol Res Commun.* 2001, 4:365-373)。这些分泌的 sFGFR 的配体结合亲和力常类似于这些受体的膜结合形式,这表明它们的生物作用是通过与细胞表面受体竞争而调节配体的作用。

[0008] 尽管这些研究中的一些已在血液或细胞培养基中鉴定出 FGFR,而现有技术中使

用的唯一方法为免疫印迹法 (Hanneken, A., Ying, W., Ling, N., Baird, A. Proc Natl Acad Sci. 1994, 91 :9170-9174 ;Hanneken A. FEBS Lett. 2001, 489 :176-181), 这是一种非灵敏的、线性的或诊断的技术。因此, 对经得起检验自动化的 sFGFR 的标准化、快速、精确和经济筛选的研发需求仍未被满足。由于可商购获得的 DuoSet[®] 抗体可检测可溶形式的总 FGFR2、FGFR3 和 FGFR4, 故本申请人使用 ELISA 方法来研发类似于用于检测可溶性表皮生长因子受体的 sFGFR 的检测测定 (Muller, V., Witzel, I., Pantel, K., Krenkel, S., Luck, H. J., Neumann, R., Keller, T., Dittmer, J., Janicke, F., Thomssen, C. Anticancer Res. 2006, 26:1479-1487)。然而, 因为 DuoSetELISA 体系仅在所测定的生物样本中检测可溶性 FGFR3 (sFGFR3), 故其不令人满意。继而, 本申请人将该测定转到 Meso Scale Discovery 形式以提高对可溶性 FGFR2 (sFGFR2) 和 FGFR4 (sFGFR4) 的检测灵敏度。然而, 仍未检测到 sFGFR2 和 sFGFR4。因此, 成功研发出了检测生物样本中 sFGFR2、sFGFR3 和 sFGFR4 的完全不同的测定体系, 该体系利用多重的、基于微球的平台。本文所公开的主题提供了用于检测生物样本中 sFGFR2、sFGFR3 和 sFGFR4 的试剂盒和方法。

发明内容

[0009] 与无疾病的患者相比, 癌症患者在他们的生物流体和组织中通常具有较高的可溶性 FGF 受体含量。本文所述的试剂盒和方法可使本领域的技术人员鉴定和定量此类患者中可溶性 FGF 受体的多个同种型并为鉴定和定量肿瘤患者中 FGF 含量提供基础。本文所述的本发明的另一个实施例也属于同时筛选 sFGFR 的多重微球技术。

[0010] 实施例描述的方面中的第一方面为用于检测 sFGFR 的试剂盒。该试剂盒包含缀合至微球的特异性结合 sFGFR 的捕获抗体组合物。具有缀合的捕获抗体的微球具有约 5 μ m 的直径和两种荧光团。每种荧光团在光谱上不同于另一荧光团。该试剂盒还包含特异性结合 sFGFR 却不同于捕获抗体的检测抗体组合物, 并且该检测抗体缀合至本领域中已知的适用于所述指定用途的任何可检测的标记。此外, 该试剂盒可包含封闭缓冲液和孵育缓冲液。

[0011] 第二实施例包括用于检测 sFGFR2、sFGFR3 和 / 或 sFGFR4 的某个预定义的阈值水平的试剂盒。优选地, 此类水平在具有如下值的水平下检测: 生物样本中至少 0.14-494ng/mL 的 sFGFR2、0.23-74ng/mL 的 sFGFR3 和 0.33-123ng/mL 的 sFGFR4。该试剂盒包含缀合至微球的 sFGFR2、sFGFR3 和 sFGFR4 的捕获抗体和缀合至本领域中已知的检测标记的 sFGFR2、sFGFR3 和 sFGFR4 的检测抗体。该试剂盒还可包含封闭缓冲液和孵育缓冲液。

[0012] 本文描述且受权利要求书保护的主题的第三实施例包括用于测量生物样本中 sFGFR2、sFGFR3 和 / 或 sFGFR4 的量的方法。该方法包括使生物样本与缀合在微球上的特异性结合 sFGFR 的捕获抗体组合物接触, 使生物样本与偶联至本领域中已知的检测标记的特异性结合 sFGFR 的检测抗体组合物接触, 测量由检测标记产生的信号, 以及使所产生的信号的量与生物样本中 sFGFR2、sFGFR3 和 / 或 sFGFR4 的量相关联。

[0013] 缩写

[0014] FGF 成纤维细胞生长因子

[0015] FGFR 成纤维细胞生长因子受体

[0016] FGFRs (多种) 成纤维细胞生长因子受体

[0017] sFGFR 可溶性成纤维细胞生长因子受体

- [0018] sFGFR2 可溶性成纤维细胞生长因子受体 2
[0019] sFGFR3 可溶性成纤维细胞生长因子受体 3
[0020] sFGFR4 可溶性成纤维细胞生长因子受体 4
[0021] sFGFRs (多种) 可溶性成纤维细胞生长因子受体
[0022] NSCLC 非小细胞肺癌
[0023] ADAM 去整合素
[0024] ELISA 酶联免疫吸附测定
[0025] MSD Meso Scale Discovery
[0026] EDTA 乙二胺四乙酸
[0027] BSA 牛血清白蛋白
[0028] LDD 最小可检测剂量
[0029] CV 变异系数
[0030] LLOQ 定量下限
[0031] RTKI 受体酪氨酸激酶抑制剂
[0032] VEGF 血管内皮生长因子
[0033] PDGFR 血小板衍生长因子受体

[0034] 定义

[0035] 如本文所用,术语“试剂盒”是指试剂和其他材料的组合。试剂盒预期可包含试剂,诸如缓冲剂、蛋白稳定试剂、信号产生体系(例如,荧光信号生成体系)、抗体、对照蛋白、以及测试容器(例如,微量滴定板等)。术语“试剂盒”不旨在限于试剂和/或其他材料的特定组合。在一个实施例中,试剂盒还包含使用试剂的说明。测试试剂盒可以任何合适的方式包装,通常,其具有处于单个容器或(必要时)处于多个容器的成分以及用于进行测试的一张说明书。在一些实施例中,试剂盒还优选地包括阳性对照样本。可以本领域中已知的多种方法来制备试剂盒。

[0036] 术语“生物样本”涵盖从生物体获得的多种样本类型,并且其可用于诊断或监测测定。该术语涵盖血液和其他生物源液体样本、固体组织样本,诸如活检标本或来源于其的组织培养物或细胞和其子代。该术语涵盖已在取得它们后以任何方式(诸如用试剂处理、溶解、或富集某些组分)操作的样本。该术语涵盖临床样本,并且还包括细胞培养物中的细胞、细胞上清液、细胞裂解物、血清、血浆、生物流体和组织样本。术语“生物样本”意在区分临床环境中的样本与可为重组样本或来源于重组样本的样本。

[0037] 就本申请的意义而言,术语“捕获抗体”和“检测抗体”旨在涵盖以高亲和力与特异性 sFGFR 结合的那些抗体。

[0038] 术语“抗体”在广义上使用,并且具体地,涵盖完整的单克隆抗体,多克隆抗体,由至少两种完整的抗体形成的多特异性抗体(例如,双特异性抗体),以及抗体片段(只要其表现出所需生物特性)。抗体可来源于任何物种且可为例如 IgM、IgG(例如, IgG1、IgG2、IgG3 或 IgG4)、IgD、IgA 或 IgE。所需生物活性为与 sFGFR 的结合。

[0039] 如本文所用,术语“单克隆抗体”是指制备的单分子组合物的抗体。单克隆抗体组合物显示出单一结合特异性以及对 sFGFR 特定表位的亲和力。

[0040] 如本文所用,术语“多克隆抗体”是指不同的抗体分子的组合物,其能够与同一或

不同抗原上的多个不同特异性抗原决定簇结合或反应。多克隆抗体的抗原特异性的变异度位于构成多克隆抗体的单个抗体的可变区中,具体地,位于互补决定区(CDR)1、CDR2 和 CDR3 区。优选地,多克隆抗体通过用靶 sFGFR 或其部分免疫动物来制备。另选地,多克隆抗体可通过将具有所需靶 sFGFR 特异性的多个单克隆抗体混合来制备。

[0041] 术语“特异性结合”是指两种分子间的结合,例如,抗原和抗体,其特征不在于即使存在许多其他不同分子情况下某一分子(抗原)与另一特异性分子(抗体)结合的能力,即,显示出在非均相分子混合物中优先将一种分子与另一种分子结合。

[0042] 术语“微球”是指小的离散的固体载体。这些离散的固体载体可用于连接探针组,使得所述组中的每个单独探针彼此不同。微球组合物可依据例如形式、化学过程和/或连接方法和/或核酸合成方法而变化。示例性微球组合物包含固体载体,并且赋予其化学功能,用于多核苷酸、多肽和/或有机部分的合成中。此类组合物包含例如塑料,陶瓷,玻璃,聚苯乙烯,甲基苯乙烯,丙烯酸类聚合物,顺磁性材料,氧化钪溶胶,碳石墨,二氧化钛,胶乳或交联的右旋糖酐诸如琼脂糖,纤维素,尼龙,交联的胶束和 Teflon™,以及任何其他材料。

[0043] 如本文所用,术语“荧光团”是指可用于定量和检测 sFGFR 抗原的任何荧光化合物或荧光蛋白。

[0044] 术语“灵敏度”本质上为本发明所述的多重测定正确鉴定最小浓度的特异性 sFGFR 的程度的量度。如本文所述,灵敏度定义为可准确回收 80-120% 的特异性 sFGFR 的最小可检测剂量 (ng/mL)。

[0045] 术语“缓冲液”是指缓冲溶液或水。缓冲液维持感兴趣分析物(例如,sFGFR)和分析物结合剂(例如,sFGFR 抗体)之间的反应且不妨碍抗体/抗原相互作用。

[0046] 如本文所用,术语“活体受检者”是指任何活生物体,包括人。

[0047] 如本文所用,说明书中术语“一个”或“一种”可指一个(种)或多个(种)。如本文权利要求中所用,当与词语“包含(包括)”一起使用时,词语“一个”或“一种”可指一个(种)或多于一个(种)。如本文所用,“另一个”可指至少第二个或更多。

[0048] 如本文所用,术语“包含(包括)”或变型诸如“含有”或“具有”可用于暗示包含所述元素或整体,或者元素或整体的组,但不排除任何其他元素或整体,或者元素或整体的组。

[0049] 除非另有定义,否则本文中使用的所有技术和科学术语具有与本发明相关领域的普通技术人员一般理解相同的含义。

附图说明

[0050] 图 1:使用针对可溶性 FGFR2、FGFR3 和 FGFR4 研发的测定而建立的用于血清和血浆的校验参数。

[0051] 图 2:血清和血浆中浓度为 7.8ng/mL、2.9ng/mL、1.7ng/mL 和 0.82ng/mL 的 FGFR2 的加标-回收 (N = 3)。

[0052] 图 3:血清和血浆中浓度为 1.4ng/mL、0.57ng/mL、0.30ng/mL 和 0.15ng/mL 的 FGFR3 的加标-回收 (N = 3)。

[0053] 图 4:血清和血浆中浓度为 2.2ng/mL、0.94ng/mL、0.54ng/mL 和 0.29ng/mL 的 FGFR4 的加标-回收 (N = 3)。

[0054] 图 5 : 下列物质的交叉反应性 : 捕获时 FGFR3 和 FGFR4 与抗 FGFR2, 捕获时 FGFR2 和 FGFR4 与抗 FGFR3, 以及捕获时 FGFR2 和 FGFR3 与抗 FGFR4。

[0055] 图 6 : 标示浓度 (ng/mL) 对反算浓度 (ng/mL) 的 FGFR2 的标准曲线 (N = 5)。

[0056] 图 7 : 标示浓度 (ng/mL) 对反算浓度 (ng/mL) 的 FGFR3 的标准曲线 (N = 5)。

[0057] 图 8 : 标示浓度 (ng/mL) 对反算浓度 (ng/mL) 的 FGFR4 的标准曲线 (N = 5)。

[0058] 图 9 : 在掺加低浓度、中浓度和高浓度分析物的运行之间的对照样本中 FGFR2 血清浓度的实验评定 (N = 5)。

[0059] 图 10 : 在掺加低浓度、中等浓度和高浓度分析物的运行之间的对照样本中 FGFR3 血清浓度的实验评定 (N = 5)。

[0060] 图 11 : 在掺加低浓度、中等浓度和高浓度分析物的运行之间的对照样本中 FGFR4 血清浓度的实验评定 (N = 5)。

[0061] 图 12 : 血清 (N = 3) 和血浆 (N = 3) 中浓度为 7.8ng/mL、2.9ng/mL、1.7ng/mL 和 0.82ng/mL 的 FGFR2, 浓度为 1.4ng/mL、0.57ng/mL、0.30ng/mL 和 0.15ng/mL 的 FGFR3, 以及浓度为 2.2ng/mL、0.94ng/mL、0.54ng/mL 和 0.29ng/mL 的 FGFR4 的加标 - 回收数据。

[0062] 图 13 : 血浆、血清和高加标对照中 FGFR2 的稀释线性度数据。

[0063] 图 14 : 血浆、血清和高加标对照中 FGFR3 的稀释线性度数据。

[0064] 图 15 : 血浆、血清和高加标对照中 FGFR4 的稀释线性度数据。

[0065] 图 16 : 顶栏 : 用于在前列腺癌血清和肺癌血清建立较好范围的样本缓冲液。底栏 : 为了获得转移癌血清的较高信号而尝试的不同封闭缓冲液。

[0066] 图 17 : 前列腺癌 (N = 5) 和肺癌 (N = 10) 中 FGFR2、FGFR3 和 FGFR4 的参考范围。

具体实施方式

[0067] 可溶性 FGFR 浓度的早期分析有利于了解癌的状态 (治疗前和治疗后) 并将有助于选择靶向 FGFR 的特定候选药物。此类分析也提出关于 FGFR 药物的作用模式的线索。因此, 迫切需要对于 FGFR 灵敏和特异的合适的诊断测定。

[0068] 尽管证明能成功检测其他可溶性生长因子受体, 但先前尝试获得可靠检测 sFGFR 的多个同种型的合适的测定未能成功。令人惊奇的是, 使用基于微球的多重免疫测定技术 (具体地, 本文和美国专利 6,599,331、6,592,822 和 6,268,222 中所述的 “Luminex 100/200™” 平台, 研发出准确测量生物样本中 sFGFR2、sFGFR3 和 sFGFR4 的测定。基于微球的多重免疫测定技术为夹心测定。术语 “夹心测定” 是指其中抗原夹在两种结合试剂 (通常为抗体) 之间的免疫测定。第一结合试剂 (捕获抗体) 连接至微球, 并且第二结合试剂 (检测抗体) 包含可检测基团。可检测基团的例子非限制地包括例如 : 荧光物、酶、结合第二结合试剂的表位 (例如, 当第二结合试剂 / 抗体为鼠抗体时, 其通过荧光标记的抗鼠抗体而检测), 例如抗原或结合对中的成员诸如生物素。

[0069] 聚苯乙烯微球为该测定重要组分。这些微球小珠用两种光谱上不同的荧光团内部染色。使用精确比率的这些荧光团, 创建由具有特定光谱位置的 100 种不同微球组组成的阵列。每种微球组可在其表面上具有不同的反应物。本申请中, 反应物称为 “捕获抗体”。因为微球组可通过它们的光谱位置来区分, 故可将它们混合, 从而使至多 100 种不同分析物在单个反应容器中同时测量。偶联至报道分子 (本申请中称为 “检测抗体”) 的第三荧光

团定量发生在微球表面处的生物分子相互作用。当微球被 Luminex 分析仪中两种独立激光穿过时,在快速流动的流体流中单独询问它们。根据样本反应,高速数字信号处理基于微球的光谱位置将微球归类并在表面上将反应定量在几秒内。

[0070] 对于本文所述的测定,基于微球的多重免疫测定提供若干优势:

[0071] • 由于不需要针对每种单个 sFGFR 的独立试剂盒,故测定成本廉价。

[0072] • 由于一个试剂盒可测试多个 sFGFR,故大大降低了运行测定所需生物样本的量。

[0073] • 由于不需要预先处理或滴定生物样本,故测定的定量测量提供高的再现性。

[0074] 鉴于这些原因,尽管能够在本发明背景下使用其他免疫测定诸如放射性免疫测定,仍优选基于微球的多重免疫测定。

[0075] 实例

[0076] 提供了以下非限制性实例来进一步说明本发明。本领域的技术人员将认识到以下实例中公开的技术符合发明人已发现在受权利要求书保护的发明实践中作用良好的代表方法,从而应被认为构成其实践模式的实例。然而,按照本公开,本领域的技术人员应认识到在不脱离本发明的实质和范围下,可对所公开的具体实施例进行多种改变而仍获得相似或类似的结果。

[0077] 实例 1:生物样本的采集和储存

[0078] 由于 sFGFR 经蛋白水解裂解之后多数释放到循环中,故使用血液、血清和血浆样本 [Bioreclamation, LLC (Westbury, NY)] 来研发和校验多重免疫测定。由已在国家注册的采血师从自愿的健康志愿者的肘前区域采集血液样本并将该血液样本在 450-500mL 干燥采集袋中于冷藏库内过夜以凝结。在 5℃ 下以 2800xg 离心二十分钟来分离血清。使用血浆提取装置将所分离的血清转移到转移袋中以确保无红血细胞污染。将人血浆采集在包含乙二胺四乙酸钾的采集袋中,缓慢混合五分钟并于室温下静置三十分钟。将该袋在 5℃ 下以 2800xg 离心二十分钟。使用血浆提取装置将所分离的血浆转移到转移袋中以确保无红血细胞污染。在分离成冻存管中的等分试样之前,将人血清和人血浆二者在 4℃ 下储存至多一周并将它们于 -80℃ 冷冻直至使用。

[0079] 实例 2:多重免疫测定的研发

[0080] 成功实施基于微球的多重免疫测定用于生物样本中 sFGFR 检测需要研发和优化规程。第一,必须鉴定出引起最高灵敏测定的试剂。评价的第一组试剂为用于 sFGFR2、sFGFR3 和 sFGFR4 的捕获和检测抗体对。探究了几种不同来源的的抗体;然而,由于列于表 1 中的抗体对使 sFGFR2、sFGFR3 和 sFGFR4 检测的范围最大化,故将该抗体对用于多重体系中。

[0081] 表 1:用于建立 FGFR2、FGFR3 和 FGFR4 测定的捕获和检测抗体的组合。

[0082]

	抗体概述		
	FGF R2	FGF R3	FGF R4
捕获:	Abcam (Cambridge, MA) ab89476	R&D Systems (Minneapolis, MN) MAB7661	R&D Systems Duoset 842983
检测(总):	R&D Systems MAB6841	R&D Systems MAB766	R&D Systems Duoset 842741
标准物:	所有标准物均获自相应的 R&D Systems Duoset 试剂盒		

[0083] 所制备的该测定的下一组分为偶联捕获抗体的微球。将捕获抗体特异性羧化(《-COOH》)至 5.6 微米聚苯乙烯微球,如下所述:抗 FGFR2 羧化至小珠 # (88), 抗 FGFR3 羧化至小珠 # (16), 并且抗 FGFR4 羧化至小珠 # (79)。这些区对应于使用 Luminex 100/200™ 体系的 100 个潜在唯一染色区中的 3 个。使用专有缀合体系进行靶捕获抗体至聚苯乙烯微球的偶联,该体系使用与得自 Bio-Rad Life Sciences (目录号 171-406001) 的 Bio- Plex® 胺偶联试剂盒类似的程序。简而言之,经由涉及蛋白伯氨基基团和聚苯乙烯微球表面上结合的羧基官能团的碳二亚胺反应,得到了靶捕获抗体至羧化的聚苯乙烯微球的共价偶联。清洗之后除掉未结合的蛋白,共价连接即使在长期储存后仍为稳定的。根据制造商规程使用 Sulfo-NHS-LC-Biotin (Pierce, 目录号 21327) 使 sFGFR2 和 sFGFR3 的检测抗体生物素酰化,而购买已连接生物素标记的 sFGFR4 的检测抗体。

[0084] 评价的另一组试剂为用于样本稀释、封闭步骤和孵育的缓冲液。用于多重测定的典型缓冲液是基于 PBS 的或基于 Tris 的。孵育和稀释效果最好的缓冲液为含 1% BSA 的 PBS, 并且非特异性蛋白封闭效果最好的缓冲液为含 1% 牛 γ 球蛋白和免疫球蛋白 G 的 PBS。

[0085] 一旦制备出用于免疫测定的试剂,便使用之后的规程以定量生物样本中的 FGFR2、sFGFR3 和 sFGFR4:

[0086] • 对于所有三种 sFGFR (每种分析物每孔 1800 个小珠),在添加免疫球蛋白 G 的 PBS 中将 5 μ L 稀释的带标记的捕获抗体的微球与 5 μ L 由 1% 牛 γ 球蛋白组成的封闭剂 (MP Biomedicals, Santa Ana, CA, 目录号 82041) 混合。

[0087] • 将该混合物添加到 96 孔平底微量滴定板。

[0088] • 测试之前,使即将使用的样本在室温下即时解冻。

[0089] • 将 10 μ L 以 1:5 稀释于包含防腐剂 (叠氮化钠) 的 4% BSA 缓冲液中的标准物、定量对照、或血清添加到所述板,用移液管混合样本,并且在孵育所述板一小时而无需震动。

[0090] • 将 10 μ L 生物素酰化的检测抗体 (对于所有三种分析物,稀释于含防腐剂的 1% BSA 缓冲液以得到 3 μ g/mL 的终浓度) 添加到每个孔,完全混合,并且在室温下孵育一小时。

[0091] • 将 10 μ L 稀释至 100 μ g/mL 的链霉亲和素 - 藻红素添加到每个孔,完全混合,并且于室温下孵育三十分钟。

[0092] • 将过滤膜微量滴定板用 100 μ L 含叠氮化钠的基于 BSA 的洗涤缓冲液预先润湿,之后经由真空歧管装置抽吸。

[0093] • 将平底微量滴定板中的反应内容物转移到过滤板的相应孔。真空抽吸所有孔,并且用 100 μ L 洗涤缓冲液洗涤内容物两次。

[0094] • 最终洗涤之后,向每个孔添加 100 μ L 洗涤缓冲液,并且通过充分混合来重悬所

述微球。

[0095] • 然后,在使用专有分析软件的 Luminex 100/200™阅读器上分析所述板。对于每块板,使用专有软件针对每种 sFGFR 创建标准曲线。sFGFR2 和 sFGFR3 的标准曲线使用 5 参数逻辑回归,并且 sFGFR4 的标准曲线使用 4 参数逻辑回归。

[0096] 实例 3:多重免疫测定的统计校验

[0097] 基于美国食品和药物管理局的指导方针(美国卫生和人类服务部,药物评价与研究中心(CDER),以及兽药中心(CVM),行业指南,生物分析方法校验,2001年5月, <http://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/UCM070107.pdf>),研发了需要全部校验 sFGFR2、sFGFR3 和 sFGFR4 多重免疫测定的校验程序。该程序包括最佳样本基质、测定选择性、通过标准曲线确定的线性范围、最小可检测剂量(LDD)、定量下限(LLOQ)、精度、绝对回收率、稀释线性度、基质干扰、冷冻/解冻稳定性、室温下稳定性和参考范围的评定(图1)。

[0098] 血浆和血清样本的比较:由于在测定中使用血液来测量 sFGFR2、sFGFR3 和 sFGFR4 的含量,故比较血浆或血清以鉴定最佳生物基质。如图2、图3和图4所示,当测定血清时,sFGFR 回收一致地为最佳的。因此,血清为用于进一步校验分析的最终选择的基质。尽管适于目的的校验也将需要建立鉴定基质的最佳选择,本发明所述的多重免疫测定方法也可用于其他生物样本(脑脊液、尿液、淋巴液、唾液、汗液、胸膜液、滑液、房水、泪液、胆汁、胰腺分泌物)。

[0099] 测定选择性:由于在同一样本孔中测试 FGFR2、sFGFR3 和 sFGFR4,故探知三种分析物之间无显著交叉反应性至关重要。为了研究交叉反应性,对最高浓度的 sFGFR3 和 sFGFR4 信号进行 FGFR2 捕获抗体测试。类似地,对所有其他组合进行评价,并且仅在 FGFR4 捕获抗体和最高浓度 sFGFR2 之间发现 1.6%交叉反应性(图5)。

[0100] 标准曲线:使用可从 R&D Systems Duosets 获得的总 FGFR2 α 标准物(部件号 841650),总 FGFR3 标准物(部件号 841879)和总 FGFR4 标准物(部件号 842742)(分别为目录号 DYC665、DYC766 和 DYC685)来生成标准曲线。每种 sFGFR 的标准曲线通过首先在鱼血清/BSA 缓冲液中创建三种标准物的高标准混合物而制得:对于 FGFR2 为 100ng/mL,对于 FGFR3 为 15ng/mL,并且对于 FGFR4 为 25ng/mL。通过对 37 μ L 每种标准物添加 88 μ L 标准稀释剂来对该高标准物进行一连串七次的稀释。FGFR2、FGFR3 和 FGFR4 的标准曲线范围分别为 100ng/mL-0.020ng/mL,15ng/mL-0.003ng/mL 和 25ng/mL-0.005ng/mL。在每块板上运行每种分析物的标准曲线,并且将所述值平均,计算出运行之间的 CV%(图6、图7和图8)。FGFR2、sFGFR3 和 sFGFR4 的平均 CV 分别为 8.38%、6.38%、5.13%,表明该曲线在板与板之间的变异很小。

[0101] 最小可检测剂量:可区分 99%置信度的空白的最低分析物浓度被认为是最小可检测剂量(LDD)。LDD 通过对来自标准曲线空白的 20 个平行测定的信号进行平均并向平均空白信号添加三个标准偏差来计算。

[0102] 定量下限(LLOQ):定量下限(LLOQ)为可准确检测的最低标准。为了适于 LLOQ 定义,标准必须为线性的,落在 30% CV 的测定范围内,并且当掺入基质中时必须回收 75-125%。LLOQ 通过在三次运行中运行一式三份的两倍稀释的低标准物来确定。将标准物 5-8 稀释两倍并一式三份在三次不同运行中测定。计算 CV 并将 CV 对浓度作图。经计算从

该曲线图内推并乘以稀释因子的 LLOQ 对于 sFGFR2、sFGFR3 和 sFGFR4 分别为 0.53ng/mL、0.084ng/mL 和 0.15ng/mL。如所提及的, LLOQ 浓度下回收 75-125% 的分析物至关重要。然而, 对于 sFGFR2, 浓度低于 0.82ng/mL 的样本未能成功回收。经确定 0.82ng/mL 的血清 (N = 3) 的平均回收率为 85.67%。未能成功回收浓度低于 0.15ng/mL 的 FGFR3 样本, 并且掺加 sFGFR3 的血清样本 (N = 3) 的平均回收率为 103.3%。未能成功回收浓度低于 0.17ng/mL 的 FGFR4 样本, 并且掺加 sFGFR3 的血清样本 (N = 3) 的平均回收率为 101.3%。最后, 确定 sFGFR2、sFGFR3 和 sFGFR4 的 LLOQ 分别为 0.82ng/mL、0.15ng/mL、0.17ng/mL (表 2)。

[0103] 表 2 :FGFR2、FGFR3 和 FGFR4 的 LLOQ 和动态范围。

[0104]

分析物	单位	LLOQ	动态范围
FGF-R2	ng/ml	0.82	0.10-494
FGF-R3	ng/ml	0.15	0.015-74
FGF-R4	ng/ml	0.17	0.025-123

[0105] **精度**:测定的精度通过在最少五次运行中测量两份中三种水平的对照来在一个运行内 (批内测定 CV) 和一系列运行中 (批间测定 CV) 确定。sFGFR2 对照的平均值为 1.3、9.3 和 35ng/mL, 批间测定 CV 在 8-13% 范围内, 并且批内测定 CV 在 1-11% 范围内 (图 9)。sFGFR3 对照的平均值为 0.117、2.8 和 14ng/mL, 批间测定 CV 在 8-13% 范围内, 并且批内测定 CV 在 0-16% 范围内 (图 10)。sFGFR4 对照的平均值为 0.095、4.1 和 23ng/mL, 批间测定 CV 在 3-33% 范围内, 并且批内测定 CV 在 1-21% 范围内 (图 11)。sFGFR4 的上限稍高于 30%, 这是 21% 高 CV 的一个不良运行的结果。高 CV 的原因在于样本的平均浓度为 0.095ng/mL, 其比 sFGFR4 的 LLOQ 低得多。

[0106] **绝对回收率**:为了确定每种 sFGFR 的回收%, 将血清掺加四种浓度的标准物 sFGFR2、sFGFR3 和 sFGFR4 并以一式三份进行分析。通过从加标浓度减去基准值并将所得结果除以加标浓度再乘以 100 来计算回收%。观测到 sFGFR2 的平均回收率在 76-126% (N = 3) 范围内, sFGFR3 的平均回收率在 89-143% (N = 3) 范围内, 并且 sFGFR4 的平均回收率在 81-145% (N = 3) 范围内 (图 2、图 3、图 4 和图 12)。

[0107] **稀释线性度**:可读取的样本偶尔高于每种分析物的测定上限。为了获得正确值, 探知样本在测定缓冲液中线性稀释且具有 70-130% 内的回收% 至关重要。将样本在测定缓冲液中稀释两倍, 以 1:5 从初始样本开始, 并随后稀释至 1:10、1:20 和 1:40 的终浓度。稀释线性度测试在纯正常血清和血浆样本中进行, 但所计算的这些样本的 sFGFR 浓度低于该测定的 LLOQ。最初将混合正常人血清掺加重组 sFGFR, 随后稀释至 1:10、1:20 和 1:40 的终浓度。可用对于 sFGFR2 为 109%, 对于 sFGFR3 为 109% 且对于 sFGFR4 为 96% 的平均回收% 将掺加的血清样本成功稀释至 1:40 (图 13, 图 14 和图 15)。

[0108] **基质干扰**:不论存在于样本中的常见组分诸如血红素、胆红素或三甘油酯是否会在多重测定中引入误差, 均应进行基质干扰测量。通过向对照样本中掺加血红素 (至多 500mg/dL)、胆红素 (至多 20mg/dL) 和三甘油酯 (至多 500mg/dL) 并确定加标样本对未加标样本中观测到的回收% 来评价基质干扰。掺加血红素 (至多 500mg/dL)、胆红素 (至

多 20mg/dL) 和三甘油酯 (至多 500mg/dL) 之后的回收%分别对于 sFGFR2 为 89%、91% 和 117%, 对于 sFGFR3 为 88%、90% 和 107%, 并且对于 sFGFR4 为 85%、89% 和 117%。

[0109] 稳定性: 分析期间, 样本会经历多个冷冻-解冻循环; 因此, 在多个冷冻-解冻循环之后评定分析物稳定性至关重要, 并且确定 4°C 下的稳定性同样至关重要。通过对至多三个循环的冷冻-解冻而测定血清样本来确定冷冻-解冻稳定性, 并且确定每个样本的回收%。此外, 通过对每个样本的室温和 4°C 孵育 24 小时测试, 血清样本也是稳定的。连同未孵育的样本测试孵育的样本, 并且确定回收%。

[0110] 简而言之, 血清 (N = 3) 掺加重组标准物, 并且测量每个样本的基线浓度。使样本经历三个冷冻-解冻循环, 并且通过比较基线样本来计算回收%。血清 (N = 3) 三个冷冻-解冻循环的平均回收%对于 sFGFR2 为 90.11%, 对于 FGFR3 为 84.11%, 并且对于 FGFR4 为 89.00%。样本 (N = 3) 也在 4°C 下 2 小时、4 小时和 24 小时时间点处以及在室温下 4 小时和 24 小时时间点处评定它们的抗原稳定性。血清 (N = 3) 在室温下以及 4°C 下 24 小时内的平均回收%对于 sFGFR2、sFGFR3 和 sFGFR4 为 83.93%、83.33% 和 89.87%。

[0111] 实例 4: 测定应用

[0112] 评定了测定检测癌样本中 sFGFR 的能力。图 16 示出了当用于分析癌血清的样本缓冲液包含 4% BSA 且封闭缓冲液包含去污剂 NP-40 时获得的测定中最佳 sFGFR 信号。选择最佳缓冲液之后, 检测了十五种不同的癌样本: 五种前列腺癌样本和十种肺癌样本 (图 17)。从这十五种样本中, 仅可在四种样本中检测到在 0.007-0.41ng/mL 范围内可测量量的 sFGFR2。有趣的是, sFGFR3 可以 0.015-1.2ng/mL 的测量范围对所有十五种样本测得。此外, sFGFR4 以在 0.07-4.4ng/mL 范围内的最高浓度存在于所有样本中。

校验参数	FGF R2		FGF R3		FGF R4	
	血清	血浆	血清	血浆	血清	血浆
LDD	0.14 ng/mL	0.14 ng/mL	0.023 ng/mL	0.023 ng/mL	0.033 ng/mL	0.033 ng/mL
LLOQ	0.82 ng/mL	0.82 ng/mL	0.15 ng/mL	0.15 ng/mL	0.17 ng/mL	0.17 ng/mL
批内测定精度	低: 0-11% CV, 中: 1-7% CV, 高: 1-7% CV	N/A	低: 0-16% CV, 中: 2-10% CV, 高: 0-12% CV	N/A	低: 0-21% CV, 中: 1-11% CV, 高: 1-4% CV	N/A
批间测定精度 (n=5块板)	低: 8% CV, 中: 13% CV, 高: 10% CV	N/A	低: 13% CV, 中: 12% CV, 高: 8% CV	N/A	低: 33% CV, 中: 9% CV, 高: 3% CV	N/A
线性度	在1:5和1:40之间为线性的	N/A	在1:5和1:40之间为线性的	在1:5和1:40之间为线性的	在1:5和1:40之间为线性的	超过1:5为非线性的
加标回收	76%-126%	50%-114%	89%-143%	68%-142%	81%-145%	63%-152%
基质干扰 (回收%)	血红蛋白: 89% 胆红素: 91% 三甘油酯: 117%	N/A	血红蛋白: 88% 胆红素: 90% 三甘油酯: 107%	N/A	血红蛋白: 85% 胆红素: 89% 三甘油酯: 117%	N/A
冷冻-解冻稳定性	对于至多3个冷冻-解冻循环为稳定的	对于至多3个冷冻-解冻循环为稳定的	对于至多3个冷冻-解冻循环为稳定的	对于至多3个冷冻-解冻循环为稳定的	对于至多3个冷冻-解冻循环为稳定的	对于至多3个冷冻-解冻循环为稳定的
短期抗原稳定性	室温和4℃下至多24小时为稳定的	室温和4℃下至多4小时为稳定的	4℃下至多2小时且室温下4小时为稳定的	室温和4℃下至多24小时为稳定的	4℃下至多4小时且室温下24小时为稳定的	室温和4℃下至多24小时为稳定的

图 1

FGF R2的加标-回收 (n=3)

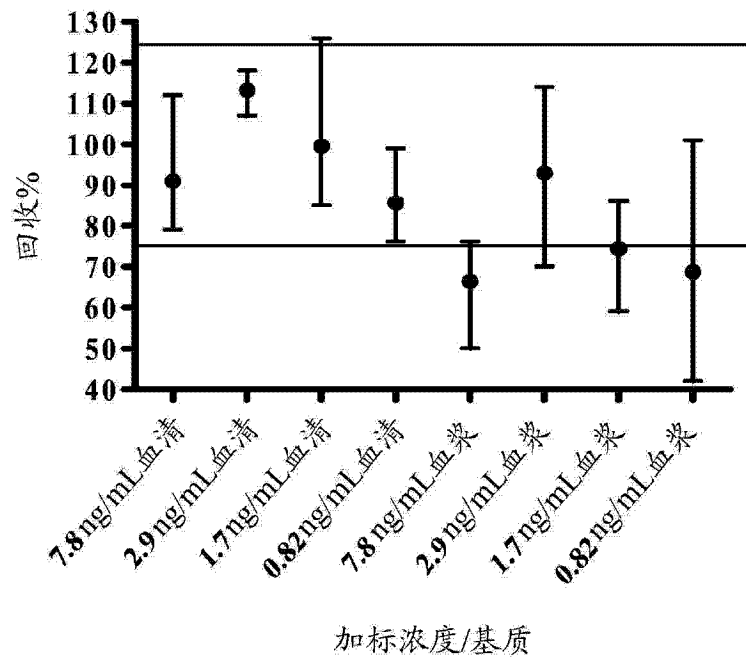


图 2

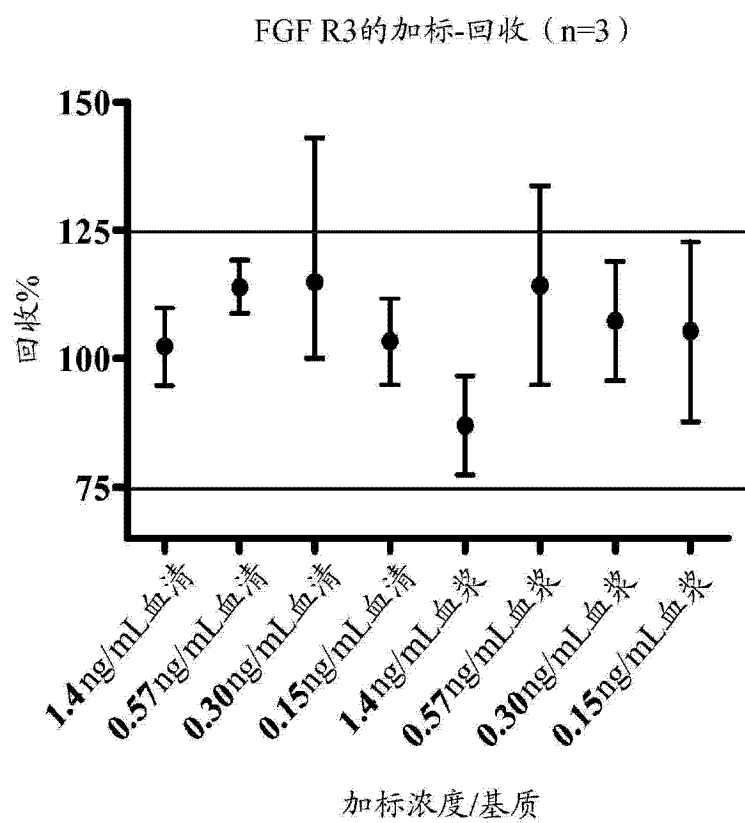


图 3

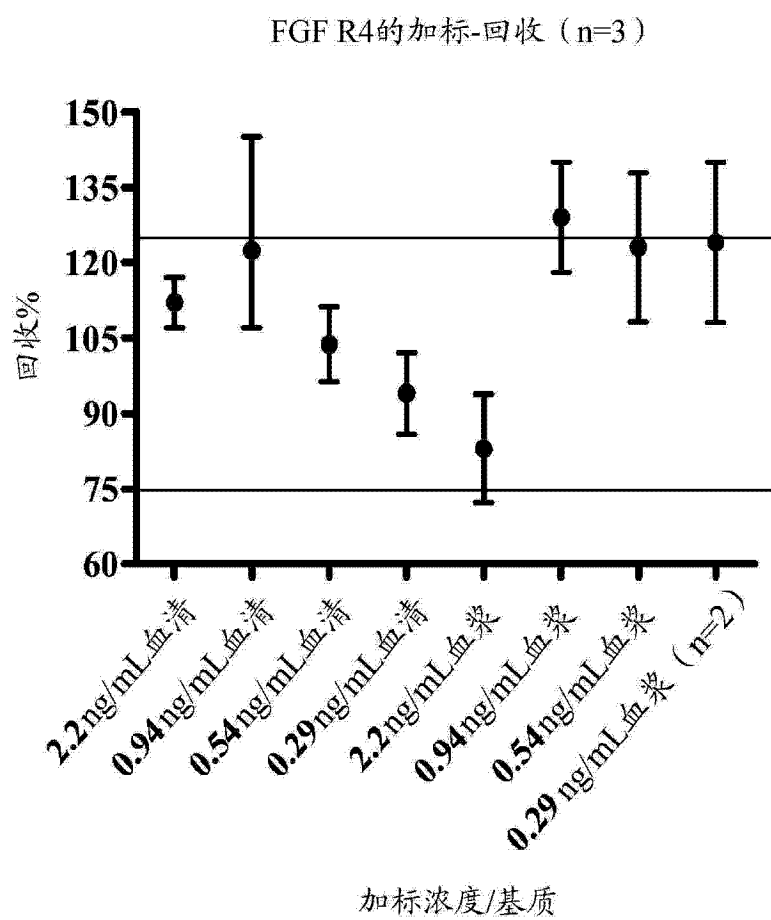


图 4

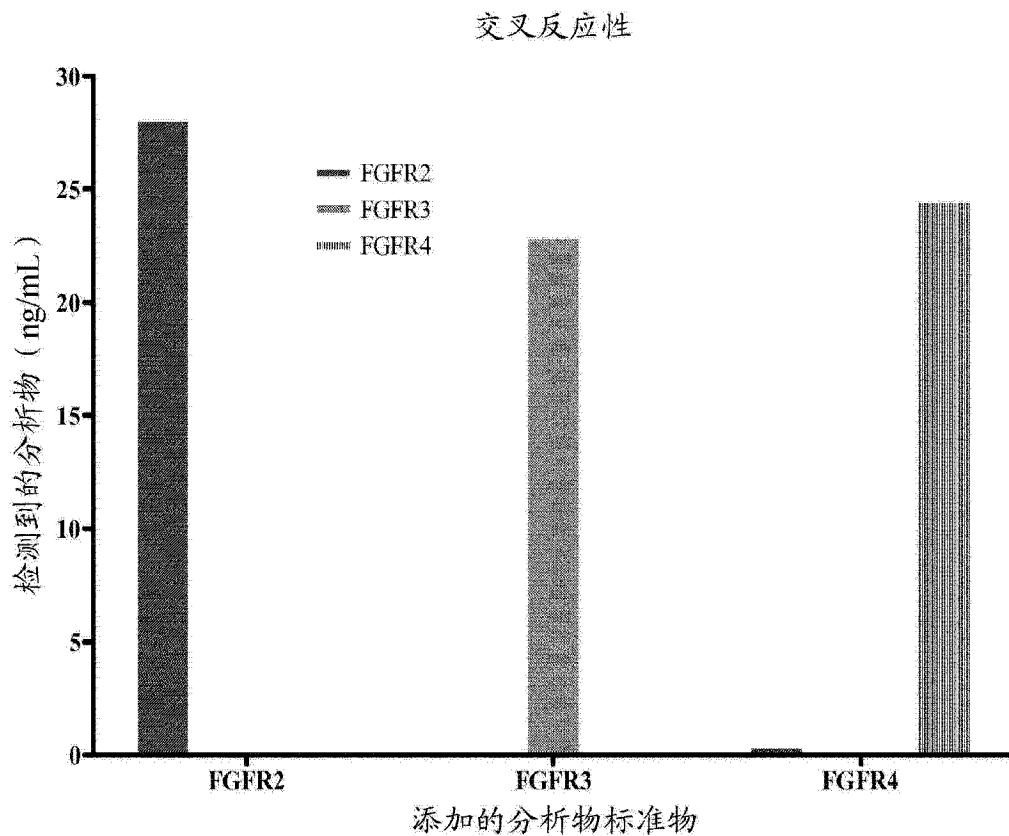


图 5

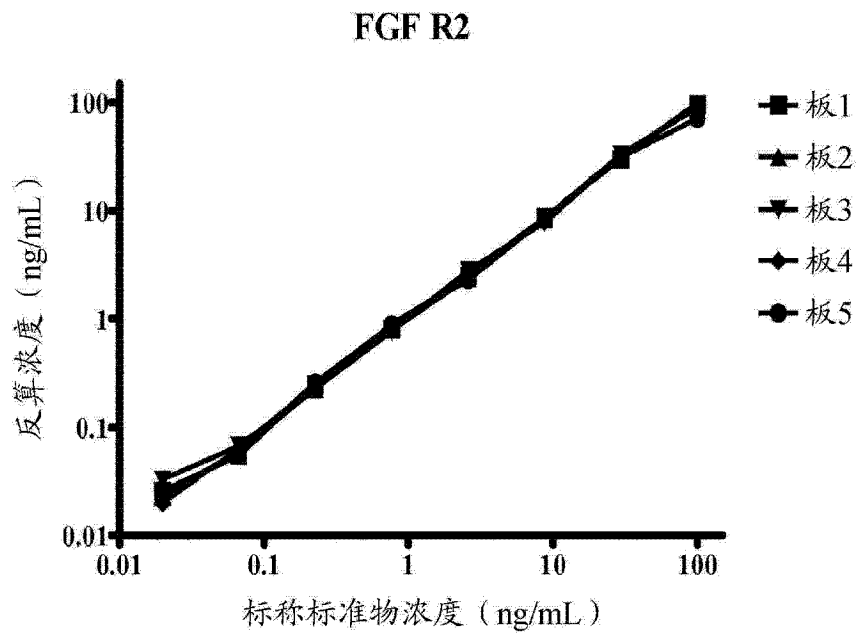


图 6

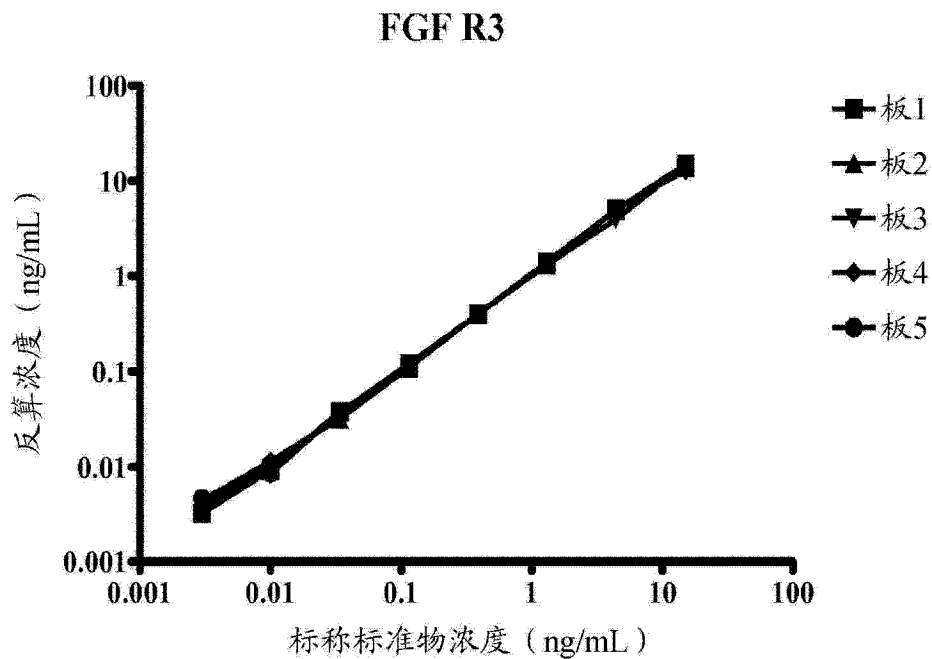


图 7

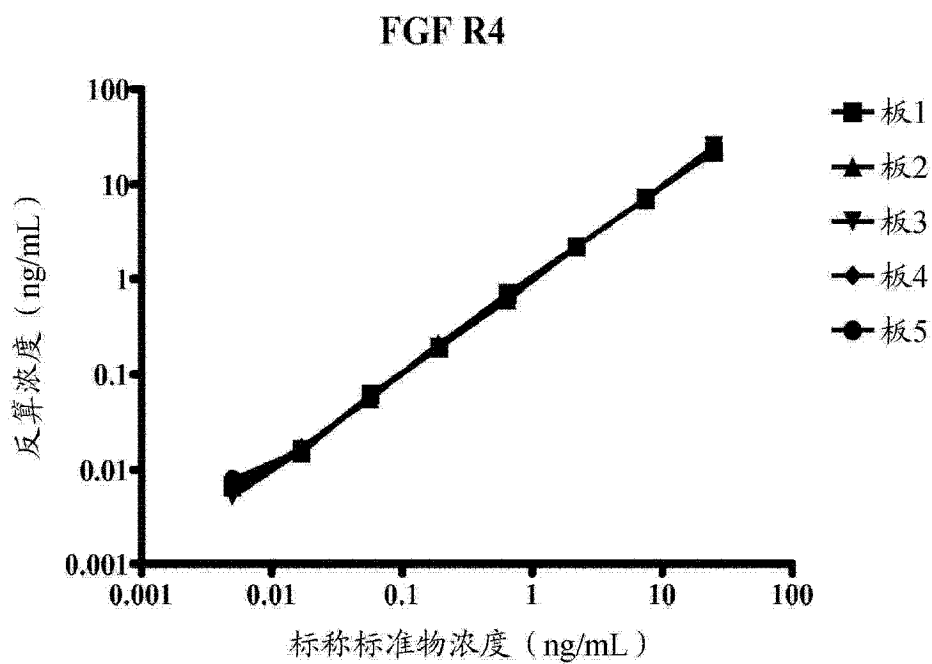


图 8

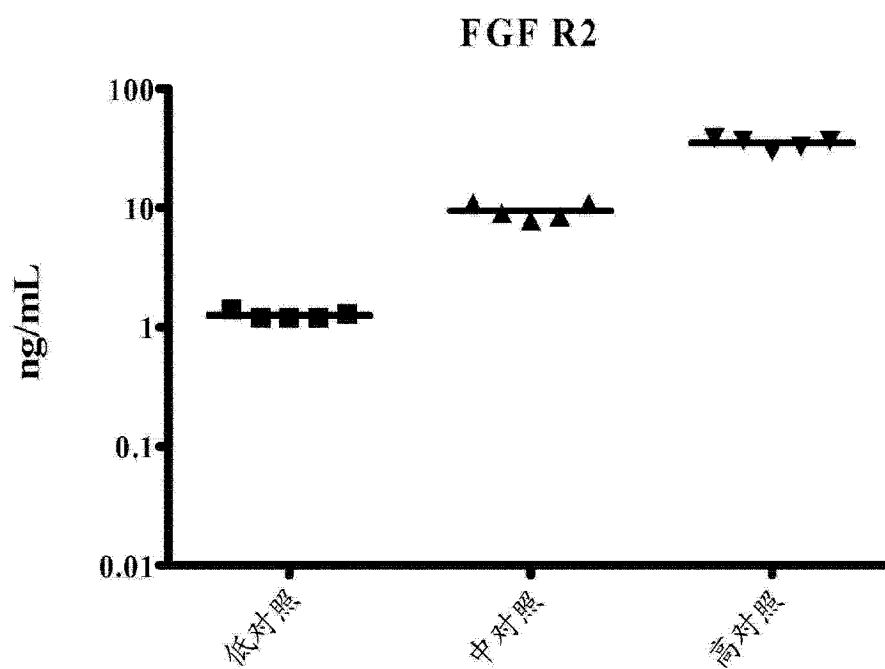


图 9

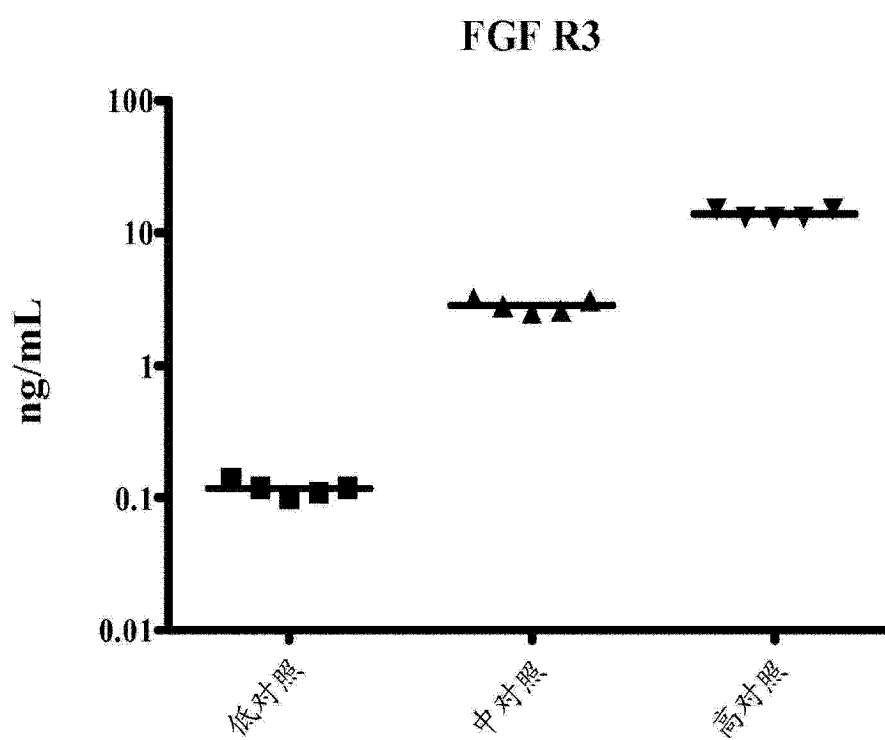


图 10

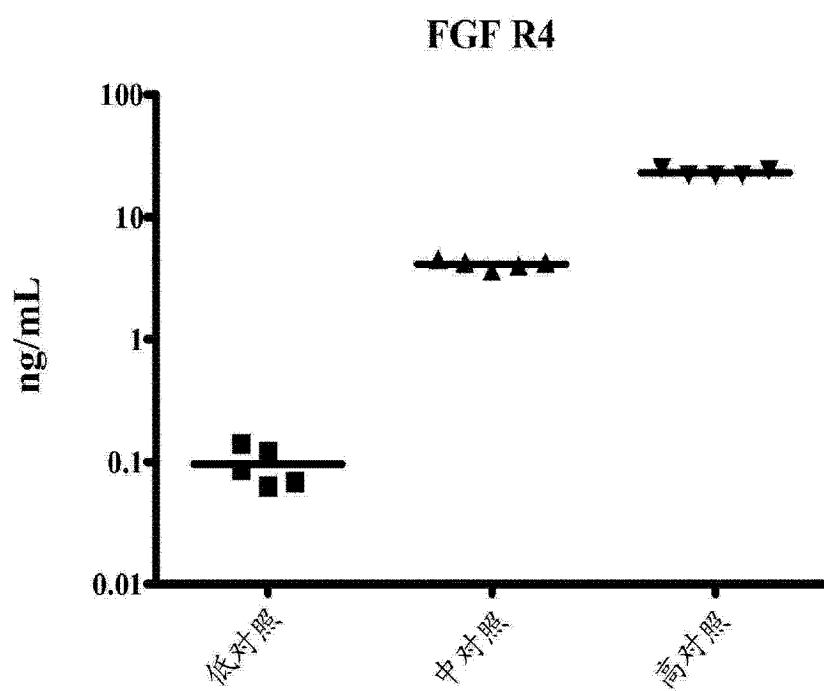


图 11

FGF-R2	加标量ng/mL	血清1 回收%	血清2 回收%	血清3 回收%	血浆1 回收%	血浆2 回收%	血浆3 回收%
加标#4	7.8	112%	79%	82%	76%	50%	73%
加标#3	2.9	118%	115%	107%	95%	70%	114%
加标#2	1.7	126%	85%	88%	86%	59%	78%
加标#1	0.82	99%	82%	76%	101%	42%	63%
平均值		114%	90%	88%	89%	55%	82%

FGF-R3	加标量ng/mL	血清1 回收%	血清2 回收%	血清3 回收%	血浆1 回收%	血浆2 回收%	血浆3 回收%
加标#4	1.4	115%	89%	103%	99%	68%	94%
加标#3	0.57	124%	112%	106%	124%	77%	142%
加标#2	0.3	143%	102%	100%	119%	84%	119%
加标#1	0.15	120%	97%	93%	129%	71%	116%
平均值		125%	100%	100%	118%	75%	118%

FGF-R4	加标量ng/mL	血清1 回收%	血清2 回收%	血清3 回收%	血浆1 回收%	血浆2 回收%	血浆3 回收%
加标#4	2.2	116%	118%	102%	100%	86%	63%
加标#3	0.94	115%	145%	107%	120%	116%	151%
加标#2	0.54	103%	117%	91%	114%	103%	152%
加标#1	0.29	92%	109%	81%	140%	108%	<低>
平均值		106%	122%	95%	118%	103%	91%

图 12

<u>FGF-R2</u>	稀释	所需的浓度 ng/mL	观测的浓度 ng/mL	回收%
血浆	1:10	<低>	<低>	N/A
	1:20	<低>	<低>	N/A
	1:40	<低>	<低>	N/A
	平均回收%			N/A
血清	1:10	<低>	<低>	N/A
	1:20	<低>	<低>	N/A
	1:40	<低>	<低>	N/A
	平均回收%			N/A
对照水平3	1:10	19	20	109%
	1:20	9.3	9.6	103%
	1:40	4.7	5.3	113%
	平均回收%			109%

图 13

FGF-R3	稀释	所需的浓度 ng/mL	观测的浓度 ng/mL	回收%
血浆	1:10	0.033	0.023	71%
	1:20	0.017	0.015	88%
	1:40	0.0083	0.0087	105%
	平均回收%			88%
血清	1:10	0.031	0.022	70%
	1:20	0.015	0.012	78%
	1:40	<低>	<低>	N/A
	平均回收%			74%
对照水平3	1:10	5	5.6	112%
	1:20	2.5	2.6	103%
	1:40	1.3	1.4	113%
	平均回收%			109%

图 14

<u>FGF-R4</u>	稀释	所需的浓度 ng/mL	观测的浓度 ng/mL	回收%
血浆	1:10	0.1	0.051	50%
	1:20	0.051	0.019	36%
	1:40	0.026	0.011	43%
	平均回收%			43%
血清	1:10	0.064	0.036	56%
	1:20	0.032	0.017	54%
	1:40	0.016	0.008	50%
	平均回收%			53%
对照水平3	1:10	7	6.9	99%
	1:20	3.5	3.2	91%
	1:40	1.7	1.7	97%
	平均回收%			96%

图 15

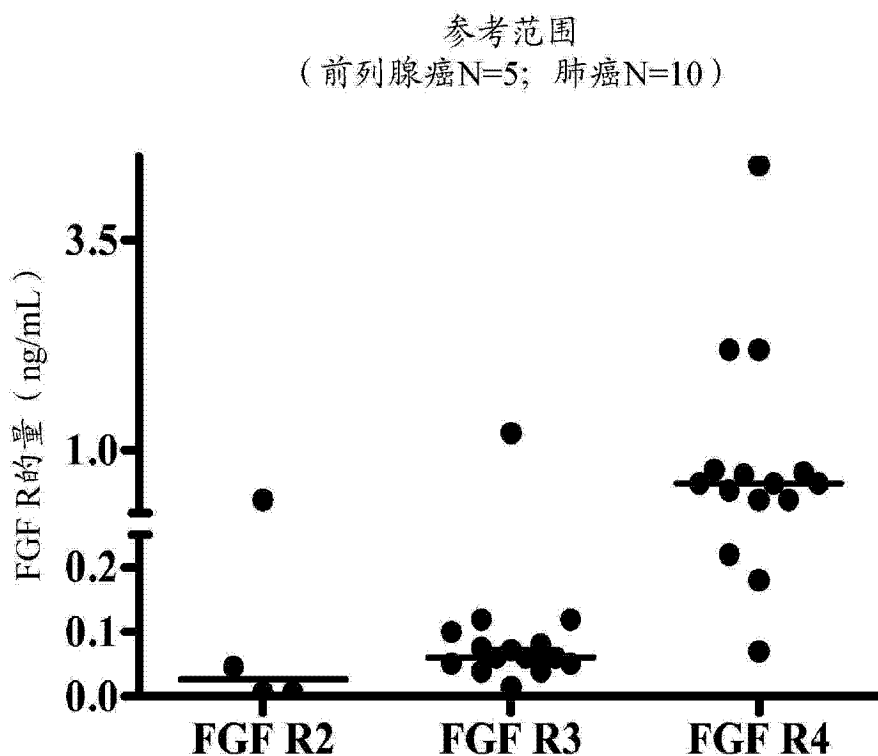


图 16

	MFI单元						
样本缓冲液	NP-40缓冲液			4% BSA			结论
分析物	FGF-R2	FGF-R3	FGF-R4	FGF-R2	FGF-R3	FGF-R4	对于所有分析物，4% BSA样本缓冲液提高样本信号
前列腺癌血清（n=10）	3-45	10-78	13.5-332	2-58	11-216.5	103-749	
肺癌血清（n=20）	1-15	5-18	9-102	2-16.5	5-24	19-385	

	MFI单元						
缓冲液	NP-40裂解缓冲封闭剂			异染性封闭缓冲液			结论
样本	FGF R2	FGF R3	FGF R4	FGF R2	FGF R3	FGF R4	对于所有分析物， NP-40裂解封闭剂 使信号的增强降低
转移癌血清 (n=1)	787	790	437	8	57	53	

图 17

专利名称(译)	用于可溶性成纤维细胞生长因子受体的灵敏的多重免疫测定		
公开(公告)号	CN104995512A	公开(公告)日	2015-10-21
申请号	CN201380073634.3	申请日	2013-12-17
[标]申请(专利权)人(译)	詹森生物科技公司		
申请(专利权)人(译)	詹森生物科技公司		
当前申请(专利权)人(译)	詹森生物科技公司		
[标]发明人	S 查图维迪 S 普拉特罗 D 斯伊格		
发明人	S.查图维迪 S.普拉特罗 D.斯伊格		
IPC分类号	G01N33/53 C07K16/00		
CPC分类号	G01N33/74 G01N2333/71 G01N2333/50		
代理人(译)	彭昶		
优先权	61/740466 2012-12-21 US		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供了使用多重微球技术来测量和检测生物样本中可溶性成纤维细胞生长因子受体(sFGFR)2、3和4的试剂盒和方法。

校验参数	FGFR2		FGFR3		FGFR4	
	血清	血浆	血清	血浆	血清	血浆
LDD	0.14 ng/mL	0.14 ng/mL	0.023 ng/mL	0.023 ng/mL	0.033 ng/mL	0.033 ng/mL
LLOQ	0.82 ng/mL	0.82 ng/mL	0.15 ng/mL	0.15 ng/mL	0.17 ng/mL	0.17 ng/mL
批内测定精度	低: 0-11% CV, 中: 1-7% CV, 高: 1-7% CV	N/A	低: 0-16% CV, 中: 2-10% CV, 高: 0-12% CV	N/A	低: 0-21% CV, 中: 1-11% CV, 高: 1-4% CV	N/A
批间测定精度 (n=5块板)	低: 8% CV, 中: 13% CV, 高: 10% CV	N/A	低: 13% CV, 中: 12% CV, 高: 8% CV	N/A	低: 33% CV, 中: 9% CV, 高: 3% CV	N/A
线性度	在1.5和1.40 之间为线性的	N/A	在1.5和1.40 之间为线性的	在1.5和1.40 之间为线性的	在1.5和1.40 之间为线性的	超过1.5为 非线性
加标回收	76%-126%	50%-114%	89%-143%	68%-142%	81%-145%	63%-152%
基质干扰 (回收%)	血红素: 89% 胆红素: 91% 三甘油酯: 117%	N/A	血红素: 88% 胆红素: 90% 三甘油酯: 107%	N/A	血红素: 85% 胆红素: 89% 三甘油酯: 117%	N/A
冷冻-解冻 稳定性	对于至多3个 冷冻-解冻循环 为稳定的	对于至多3个 冷冻-解冻循环 为稳定的	对于至多3个 冷冻-解冻循环 为稳定的	对于至多3个 冷冻-解冻循环 为稳定的	对于至多3个 冷冻-解冻循环 为稳定的	对于至多3个 冷冻-解冻循环 为稳定的
短期抗原 稳定性	室温和4℃下至 多24小时为 稳定的	室温和4℃下至 多4小时为 稳定的	4℃下至多2小时 且室温下4小时 为稳定的	室温和4℃下 至多24小时 为稳定的	4℃下至多4小时 且室温下24小时 为稳定的	室温和4℃下至 多24小时为 稳定的