(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 101036055 B
(45)授权公告日 2011.06.29

(21)申请号 200580033986.1

(22)申请日 2005.10.06

(30)优先权数据
60/616,332 2004.10.06 US

(85)PCT申请进入国家阶段日
2007.04.05

(86)PCT申请的申请数据
PCT/US2005/035894 2005.10.06

(87)PCT申请的公布数据
WO2006/041959 EN 2006.04.20

(73)专利权人 威尔斯达特生物制剂公司
地址 美国马里兰州

(72)发明人 罗伯特·M·洛朗斯 鲁明

(74)专利代理机构 北京三友知识产权代理有限公司 11127
代理人 丁香兰 赵晓梅

(51)Int.Cl.
G01N 33/53(2006.01)
A61K 38/00(2006.01)

(56)对比文件
WO 0052474 A1,2000.09.08, 全文.
WO 03065042 A1,2003.08.07, 全文.
WO 2004008099 A1,2004.01.22, 全文.

LIPTON ET AL.Elevated serum HER-2/neu level predicts decreased response to hormone therapy in metastatic breast cancer.《J. OF CLINICAL ONCOLOGY》.2002, 第20卷1467-1472.

STEARNS ET AL.Circulating tumor markers in breast cancer: accepted utilities and novel prospects.《BREAST CANCER RESEARCH AND TREATMENT》.1998, 第52卷239-259.

FORUS ET AL.Sensitive fluorescent in situ hybridisation method for the characterisation of breast cancer cells in bone marrow aspirates.《J. CLIN. PATHOL.: MOL. PATHOL.》.1999, 第52卷68-74.

COOK ET AL.Clinical Utility of Serum HER-2/neu testing on the Bayer Immunol (R) automated system in breast cancer.《ANTICANCER RESEARCH》.2001, 第21卷1465-1470.

BASELGA.Is circulating NER-2 more than just a tumor marker.《CLINICAL CANCER RESEARCH》.2001, 第7卷2605-2607.

审查员 王慧

权利要求书 1 页 说明书 14 页 附图 3 页

(54)发明名称

循环癌细胞上Her-2/neu蛋白的增加水平的检测以及治疗

(57)摘要

本发明涉及循环癌细胞上Her-2/neu蛋白的增加水平的检测以及治疗。具体地说,通过从血液样品中分离癌细胞,然后在所分离的癌细胞上进行灵敏的Her-2/neu免疫测定,来检测血液样品中循环癌细胞上Her-2/neu蛋白的表达。阳性结果表明Her-2/neu在血液样品中癌细胞上的表达。该方法可用于鉴定有望受益于用靶向Her-2/neu的抗癌剂如群司珠单抗(赫赛汀)所进行的治疗的癌症患者。

CN 101036055 B

1. 一种检测血液样品中循环癌细胞上 Her-2/neu 蛋白的表达的方法，该方法包括从所述血液样品中分离所述癌细胞，溶解所分离的癌细胞以获得细胞溶解物，然后在所述细胞溶解物上进行能检测癌细胞相关 Her-2/neu 的免疫测定，其中阳性免疫测定结果表明所述癌细胞上存在 Her-2/neu ；

其中通过将所述血液与能选择性结合于所述癌细胞的免疫磁珠接触而分离所述癌细胞 ；

其中所述免疫测定使用电化学发光检测技术 ；

其中所述免疫测定使用两种选择性结合于 Her-2/neu 的抗体 ；

且其中所述免疫测定具有下述限定的灵敏度 ：

a) 能以每毫升所述血液样品 0.1 皮克～ 20 皮克的 Her-2/neu 的水平检测癌细胞相关 Her-2/neu ；或

b) 能从以每毫升血液 1 ～ 100 个 SK-BR-3 细胞的浓度掺入血液中时的 SK-BR-3 乳癌细胞检测 Her-2/neu。

2. 如权利要求 1 所述的方法，其中 a) 中的所述灵敏度水平是每毫升所述血液样品 1 皮克～ 20 皮克的 Her-2/neu。

3. 如权利要求 2 所述的方法，其中 a) 中的所述灵敏度水平是每毫升所述血液样品 1 皮克～ 10 皮克的 Her-2/neu。

4. 如权利要求 3 所述的方法，其中 a) 中的所述灵敏度水平是每毫升所述血液样品 1 皮克～ 5 皮克的 Her-2/neu。

5. 如权利要求 1 所述的方法，其中 b) 中的所述灵敏度水平是每毫升血液少于或等于 10 个 SK-BR-3 细胞。

6. 如权利要求 5 所述的方法，其中 b) 中的所述灵敏度水平是每毫升血液少于或等于 3 个 SK-BR-3 细胞。

7. 如权利要求 6 所述的方法，其中 b) 中的所述灵敏度水平是每毫升血液 1 个 SK-BR-3 细胞。

8. 如权利要求 1 所述的方法，其中所述免疫测定利用选择性结合于 Her-2/neu 胞外结构域的抗体。

9. 如权利要求 1 所述的方法，其中所述免疫测定使用一种或两种选择性结合于 Her-2/neu 胞质结构域的抗体。

10. 如权利要求 9 所述的方法，其中所述免疫测定使用两种选择性结合于 Her-2/neu 胞质结构域的抗体。

11. 如权利要求 1 所述的方法，其中所述免疫测定使用针对 Her-2/neu 的多克隆抗体。

12. 如权利要求 1 所述的方法，其中所述免疫测定使用针对 Her-2/neu 的单克隆抗体。

13. 权利要求 12 所述的方法，其中所述单克隆抗体是人源化的小鼠单克隆抗体。

14. 如权利要求 13 所述的方法，其中所述单克隆抗体是群司珠单抗。

15. 如权利要求 1 所述的方法，其中所述免疫磁珠选择性结合于上皮癌细胞。

循环癌细胞上 Her-2/neu 蛋白的增加水平的检测以及治疗

背景技术

[0001] 目前只有 25％ -30％的乳癌患者基于在其原发性肿瘤的活组织检查中发现 Her-2/neu（也叫做 Her2/neu ;HER2 ;c-erbB-2 和 erbB2）蛋白或基因的增加水平而接受赫赛汀 (HERCEPTIN) 治疗。文献数据指出，在原发性肿瘤活组织检查中为 Her2/neu 阴性结果的相当多数量的妇女（测试的 26 个中的 11 个）继续发展为其循环癌细胞上的 Her2/neu 阳性 (Hayes DF 等，Int J Oncol21 :1111-7 ;Meng S 等，2004Proc Natl Acad Sci USA101 : 9393-98)。而且，相当多的患有乳癌的妇女不具有容易获得的活组织检查材料以用于测试 Her-2-neu 的状况。在 Hayes 等和 Meng 等的论文中使用的方法繁琐且耗时，需要一种快速的更加方便的检验，特别是可在医生诊所中实施的检验。Hayes 等的方法需要流式细胞计数分析，Meng 等的方法需要荧光原位杂交 (FISH)，其比本发明所提到的 Her-2/neu 蛋白的直接检测（例如通过 ECL）更加复杂和耗时。

[0002] Her2/neu 和赫赛汀治疗 :在来自患乳癌妇女的大约 25％的活组织检查样品中观察到了 Her2/neu 癌基因的过量表达并且 Her2/neu 癌基因的过量表达与不良预后有关。群司珠单抗 (Trastuzumab)（赫赛汀）是人源化的单克隆抗体，其抗 Her2/neu 受体的胞外结构域 (ECD) 和抑制过量表达该受体的人乳癌细胞的增殖（见 Esteve FJ2004, The Oncologist9（附刊 3）:第 4-9 页，最近综述）。乳癌细胞上 Her-2/neu 的蛋白质表达可容易地达到每个细胞 500,000 个分子或更多的水平，如 Her-2/neu 过量表达的称为 SK-BR-3 的人乳癌细胞系的情况。目前 Her2/neu 的检验依靠检验患者活组织检查的组织切片的蛋白质过量表达或基因扩增。在那些具有基因扩增或蛋白质的至少 2+ 免疫染色的妇女中，用单个试剂群司珠单抗或用与诸如紫杉醇等化学治疗剂组合的群司珠单抗已经证明有显著应答。能靶向 Her-2/neu 的其它试剂正在开发中且具有与本发明的赫赛汀相似的适用性。这些试剂包括但不限于 :正由 Genentech 开发的 OMNITARG(pertuzumab) ;正由 GlaxoSmithKline 开发的 GW-572016(Xia 等，2004, Oncogene23 :646-653) ;正由 Pfizer 开发的 CP-654577(Barbacci 等，2003, Cancer Res63 :4450-4459) ;正由 Wyeth 开发的 HKI-272(Rabindran 等，2004, Cancer Res2004,64 :3958-65)。在其特异性中包括 Her-2/neu 的其它抗癌剂描述在 Janmaat 和 Giaccone，2003(The Oncologist8 :576-86) 中。除了乳癌之外，Her-2/neu 在包括卵巢癌等其它癌细胞中也是过量表达的。

[0003] ECL :电化学发光是一种使用设计成电化学刺激时发光的标记的过程（关于 ECL 的综述见 Yang 等，1994, Biotechnology12 :193-194 ;也可见 Blackburn 等，1991, Clin Chem37 :1534-1539)。这些标记与合适的装置（如由 BioVeris 开发的）一起供检测诸如蛋白质、mRNA 和 DNA 等各种生物分子的具有高度灵敏度的方法之用。Martin 等 (2003，美国专利号 6,524,865) 描述了基于 ECL 的酶免疫测定 ;然而没有描述检测血液中循环癌细胞上的蛋白质如 Her-2/neu 的应用。

[0004] ECL 和整个真核细胞

[0005] 使用整个真核细胞的 ECL 方法已由 Chinn 等公开（美国专利 6,300,143B1)。然而 Chinn 等的方法是用于测量细胞表面抗体的结合亲和力而不是测定细胞表面上受体分子的

相对数量。且 Chinn 的方法起始于大量细胞 (167,000 细胞每 ml) 的纯化细胞群，与首先从全血中发现的不纯混合物中分离数量可以是很少 (典型地为 1 至 200 细胞每 ml ;Hayes 等，2002) 的所选细胞群相反。

[0006] Her-2/neu 或相关分子的测定 :

[0007] 目前美国食品和药品管理局 (FDA) 批准的筛选用赫赛汀 (群司珠单抗) 治疗的患者的测定是 :(1)Her-2/neu 蛋白过量表达的免疫组织化学法 (DAKO 的 HERCEPTEST) 和 (2) 用于 Her-2/neu 基因扩增的 FISH(荧光原位杂交) 测定 (VYSIS 的 PATHVISION 试剂盒)。这些检验已显示了患者对于赫赛汀的应答和受益的预见性 (Fornier M等，2002.HER2testing and correlation with efficacy of trastuzumab therapy.Oncology16 :1340-58)。然而，这两种测定都具有以下四个限制 :

[0008] 1) 这些测定需要活组织检查样品组织。不是所有的患者都有这样存档的容易获得的用于检测的材料。在这种情况下，唯一的选择是获得肿瘤活组织检查样品。血液样品的测定会更加方便、容易实施，且具有更快提供答案的潜力。

[0009] 2) 非常普遍的是，首次诊断乳癌时采集的活组织检查样品在数年后当患者疾病复发时才使用。因此，使用测试旧组织材料的测定，能在作出关于是否用赫赛汀治疗患者的临床决定之前在可能为许多年的时间点上确定患者关于 Her-2/neu 的肿瘤状况。文献数据提出在原发性肿瘤活组织检查中具有 Her2/neu 阴性结果的相当多数量的妇女 (26 个测试中的 11 个) 继续发展为其循环癌细胞上的 Her2/neu 阳性 (Hayes DF 等，Int JOncol21 : 1111-7 ;Meng S等，2004Proc Natl Acad Sci USA101 :9393-98)，因此是用赫赛汀治疗的候选者。关于来自血液样品的循环乳癌细胞的 Her-2/neu 状况的测定，会提供其目前 Her-2/neu 状况的更加实用且快速的测定。

[0010] 3) 由于这些测定中评分的主观性，地方实验室与中央实验室对于两种类型的测定最近已显示出显著量的相异，在一些地方实验室发现可产生高达 25％的假阳性率 (Fomier 等，2002)。使用更加常见的免疫组织化学测定，相对于 FISH 估计有 14％～ 17％的假阴性率 (Seidman 等，2001，J Clin Oncol19 :2587-95 ;Fornier 等，2002)。使用免疫组织化学产生的 14％～ 17％的假阴性率显示了在美国每年有数千名这样的妇女将补充为赫赛汀治疗的候选者。

[0011] 4) 最后，这些方法是缓慢的，需要 (a) 待从采集位置的存储处重新获得的组织块，(b) 待切割的切片，(c) 大量的处理和其次很经常性的，(d) 耗时和受训人员的主观性评分。这些手工分析是不方便的，其一般用于通过免疫组织化学法显示细胞染色的程度或用于显示对样品进行评分所需的阳性 FISH 位置的数量。对于治疗医生来说，希望提供更迅速反馈的更快测定。此外，FISH 是很昂贵的且不能普遍地获得 (Fornier 等，2002)。

[0012] Koski，1998(美国专利 5,783,404) 描述了乳癌细胞和乳癌组织中 Her-2/neu 蛋白的免疫组织化学测定，其使用能识别 Her-2/neu 蛋白特定部分的变性表位的单克隆抗体。然而这些测定是在纯的乳癌细胞群或如在乳癌组织中很高百分比的乳癌细胞的环境中进行的。Koski 没有解决在复杂基质中如血液中检测少量的表达 Her-2/neu 的乳癌细胞的问题。

[0013] Slamon 等，1990(美国专利 4,968,603) 描述了扩增 Her-2/neu 基因的测定和在筛选患者中的用途。没有提供检测 Her-2/neu 蛋白的测定的实施例。而且，该专利没有解决

在复杂基质中如血液中检测少量的表达 Her-2/neu 的乳癌细胞的问题。用针对 Her-2/neu 蛋白的单克隆抗体如赫赛汀治疗乳癌患者的鉴定患者的应用没有指示。

[0014] Carney 等,1995(美国专利 5,401,638) 描述了人血清或血浆的免疫测定,以检测由人 neu 基因产物胞外结构域 (ECD) 组成的全长 Her-2/neu 蛋白的截短形式构成的 neu 相关蛋白 p100。Carney 的该项专利没有解决特别是在复杂混合物如全血中的细胞相关的或全长的 Her-2/neu 蛋白的检测。基于 Carney 的商业上的测定 (来自 ONCOGENE) 具有的灵敏度 (1.5ng 截短的 Her-2/neu 每 ml 血清) 太低,以至于不能用于检测潜在少量的 Her-2/neu 蛋白 (pg 含量),该潜在少量的 Her-2/neu 蛋白能根据本发明得以检测且是检测所要求的。正如本发明中的测定对于细胞相关 Her-2/neu 是非常有利的,因为患者活组织检查组织的免疫组织化学已经证明了细胞相关表达对响应赫赛汀治疗的预见力。Burstein 等 (2003,J ClinOncol21 :2889-2895) 的最近报告显示了针对截短的 p100 蛋白 (HER2ECD) 的血清测定的有限有效性。Burstein 等报道“HER2ECD 的基线水平或治疗引起的 HER2ECD 减少均未预测出一个周期后针对群司珠单抗的临床应答”。在用赫赛汀治疗的乳癌患者的研究中,Cobleigh 等 (1999,J Clin Oncol9 :2639) 达成了一个相似的结论,即在血清 ECD 水平和赫赛汀应答状况之间没有可证明的显著关联。

[0015] Carney 等,1997(美国专利 5,604,107) 描述了在细胞溶解物中检测全长 p185Her-2/neu 蛋白的免疫测定 ;然而基于 Carney 的商业上的 ELISA 测定具有的灵敏度的数量级太低,以至于不能用于检测此处描述的申请所要求的少量 Her-2/neu 蛋白 (pg 含量)。如上所述,用于定量 Her-2/neu 蛋白的该测定的灵敏度被报道为每 ml 血清为 1.5ng 截短的 Her-2/neu ;推测在更加复杂的混合物如全血中将更差。而且,Carney 等没有解决使用全血的 Her-2/neu 测定。代替的是在血液的血浆成分而不是细胞相关成分中检测称为 p100 的截短的 Her-2/neu 的水平。上面讨论了优选如该发明中测量细胞相关全长蛋白质的测定而不是测量截短的蛋白质的血浆水平的测定的基本原理。Carney 等也没有指出使用整个细胞而是使用细胞溶解物。

[0016] Hudziak 等,1998(美国专利 5,720,937) 要求保护通过将哺乳动物体内的细胞暴露于单克隆抗体以确定 Her-2/neu 蛋白的过量表达的体内测定。然而,没有描述体外测定肿瘤细胞的方法。

[0017] 血液中循环癌细胞的分离 :

[0018] Terstappen 等,2002(美国专利 6,365,362) 描述了使用具有针对上皮细胞粘附分子 (EpCAM) 的抗体的免疫磁珠从患者血液样品中分离乳癌细胞。Terstappen 的测定结合了免疫磁性富集与流式细胞计数分析和免疫细胞计数分析。然而,流式细胞计数和免疫细胞计数是不方便且耗时的技术。

[0019] 因此,在医学实践中需要一种快速且方便的测定,其灵敏度足以使用全血样品来鉴定以下患有乳癌的妇女,她们具有在循环乳癌细胞上的 Her-2/neu 蛋白的过量表达,且因此有望受益于诸如群司珠单抗等 Her-2/neu 靶向治疗。

发明内容

[0020] 本发明提供一种检测血液样品中循环癌细胞上的 Her-2/neu 蛋白的表达的方法,该方法包括从所述血液样品中分离所述癌细胞,然后对分离的所述癌细胞实施能检测癌细

胞相关 Her-2/neu 的免疫测定，其中阳性免疫测定结果表明所述癌细胞上 Her-2/neu 的存在。本发明的测定具有以下限定的灵敏度 :a) 每毫升血液样品中能以 0.1 皮克～ 20 皮克的 Her-2/neu 水平检测癌细胞相关 Her-2/neu ;或 b) 能从以每毫升血液少于或等于 100 个 SK-BR-3 细胞的浓度掺入血液中时的 SK-BR-3 乳癌细胞检测 Her-2/neu。

[0021] 本发明提供一种鉴定有望受益于用靶向 Her-2/neu 的抗癌剂所进行的治疗的癌症患者的方法，该方法包括上述的检测方法。当用于鉴定这样的患者时，从患者中抽取含有癌细胞的血液样品。本发明提供一种治疗如此鉴定的癌症患者的方法，该方法包括给患者施用 Her-2/neu 靶向抗癌剂。

附图说明

[0022] 图 1 :通过 ECL 免疫测定检测重组 Her-2/neu(4pg/ 孔、16pg/ 孔和 64pg/ 孔)。

[0023] 图 2 :从 SK-BR-3 人乳癌细胞提取物 (每孔 10、30 和 100 个细胞溶解物材料) 中检测 Her-2/neu。所用的细胞溶解试剂是 Sigma Lysis Buffer。

[0024] 图 3 :从 SK-BR-3 人乳癌细胞提取物 (每孔 10、30 和 100 个细胞溶解物材料) 中检测 Her-2/neu。所用的细胞溶解试剂是 Pierce Lysis Buffer。

[0025] 图 4 :比较 SK-BR-3 乳癌细胞 (Her-2/neu 过量表达的阳性对照) 中与 MDA-MB-468 乳癌细胞 (Her-2/neu 过量表达呈阴性) 的溶解物中 Her-2/neu 免疫测定检测的 ECL 信号。对于每一个细胞系，使用来自 10、30 和 100 个细胞 / 孔的溶解物材料。

[0026] 图 5 :比较以 0.9、3 和 10 个细胞 / 孔的溶解物材料使用的来自 SK-BR-3 乳癌细胞 (Her-2/neu 过量表达的阳性对照) 与以 0.9、3、10 和 100 个细胞 / 孔的溶解物材料使用的来自 MDA-MB-468 乳癌细胞 (Her-2/neu 过量表达呈阴性) 的溶解物中 Her-2/neu 免疫测定检测的 ECL 信号。

[0027] 图 6 :对于以 1、3 和 10 个 SK-BR-3 细胞 / 孔的溶解物材料使用的来自 SK-BR-3 乳癌细胞 (Her-2/neu 过量表达的阳性对照) 的溶解物中 Her-2/neu 免疫测定检测，未受到 PBMC 溶解物 (100 至 10,000 个细胞 / 孔) 的干扰。

具体实施方式

[0028] 如这里使用的过渡性术语“包括”是开放式的。使用该术语的权利要求可以含有该权利要求中那些列举要素之外的额外要素。因此，例如，该权利要求可理解为也包括没有在此明确列举的其它步骤的方法，只要列举的要素或其等价要素是存在的。

[0029] 本发明提供灵敏的足以定量血液样品中循环乳癌细胞上的 Her-2/neu 蛋白的水平的方法，并提供鉴定那些有望受益于使用赫赛汀或别的靶向 Her-2/neu 的试剂进行的治疗的患乳癌妇女的方法。一种方便、高灵敏性且快速的通过检验血液样品来鉴定将受益于赫赛汀治疗的额外患者的方法，在乳癌治疗领域中是一个重要的进步。如下所述，一种用于检测循环乳癌细胞表面上 Her-2/neu 蛋白的快速且高度灵敏的免疫学测定如使用电化学发光 (ECL) 检测是实施上述方法的优选方法。

[0030] 本发明是基于用于从血液中分离循环癌细胞过程的高度特异性和某些基于免疫学的测定如 ECL 的高度灵敏性的组合。优选的且有利的是，将免疫磁珠用于本发明的两个方面，因而起到新的双重功能的作用 :将免疫磁珠用于从血液中分离和纯化循环癌细胞，然

后将不同的珠或这些相同的珠用作实施 ECL 的支持相，从而允许磁体捕获它们且将目标抗原与标记的抗体（例如钌标签标记的抗体）集中在一起。

[0031] 在本发明的检测方法的实施方案中，上述 a) 中的灵敏度水平为 1 皮克～ 20 皮克、1 皮克～ 10 皮克或者 1 皮克～ 5 皮克的 Her-2/neu 每毫升血液样品。在本发明的检测方法的另一个实施方案中，上述 b) 中的灵敏度水平为能从以每毫升血液少于或等于 10 个 SK-BR-3 细胞的浓度掺入血液中时的 SK-BR-3 乳癌细胞检测 Her-2/neu。在更进一步的实施方案中，上述 b) 中的灵敏度水平为能从以每毫升血液少于或等于 3 个 SK-BR-3 细胞，甚至每毫升血液少于或等于 1 个 SK-BR-3 细胞的浓度掺入血液中时的 SK-BR-3 乳癌细胞检测 Her-2/neu。

[0032] 从患有癌症特别是乳癌的患者中获取血液样品（通常为约 8ml ～ 20ml）。详细步骤包括以下：

[0033] 1. 除去红细胞

[0034] 2. 可选的阴性选择以进一步去除正常白细胞。优选的实施方案包括该步骤。

[0035] 3. 阳性选择循环癌细胞

[0036] 4. 由循环癌细胞检测和定量 Her-2/neu 蛋白

[0037] 1. 除去红细胞。

[0038] 可获得多种除去红细胞的方法，包括但不限于基于密度的分离（如将血液直接收集到 BECTON DICKINSON BD Vacutainer CPT 管中，随后离心）和商业上的溶解缓冲液如 PURESCRIPT RBC 溶解缓冲液 (GENTRA，Minneapolis)、FACS 溶解溶液 (BDIS)、IMMUNOLYSE(COULTER)、OPTILYSE B(IMMUNOTECH) 和 ACK 溶解缓冲液 (BIOSOURCE，Rockville，MD)。

[0039] 一个优选的方法使用具有抗凝剂 (EDTA 或柠檬酸盐）的 BDVacutainer CPT 管。这些管含有恰当离心 (1,100×g10 分钟，甩平桶型转子 (swing-out bucket rotor)) 后使得可除去红细胞和嗜中性粒细胞的物质。离心后，管底含有红细胞（红血球）和嗜中性粒细胞的细胞沉淀。在该细胞沉淀上面是凝胶层，在该凝胶层上面是肿瘤细胞、淋巴细胞和单核细胞（作为血浆底部的一个条带）。然后可将肿瘤细胞、淋巴细胞和单核细胞容易地从凝胶层上面的顶部收集。该方法是优选的，因为其不仅可以除去红细胞而且还可以除去嗜中性粒细胞。

[0040] 2. 阴性选择以进一步去除正常白细胞。

[0041] 本发明的一个优选实施方案使用阴性选择步骤以分离肿瘤细胞。阴性选择使得可进一步去除白细胞特别是淋巴细胞和单核细胞。该步骤包括使用对两种白细胞抗原特别是共同的白细胞抗原 CD45 和对红细胞抗原如血型糖蛋白 A 具有双特异性的抗体。一种商业上可获得的具有这样双特异性抗体的混合物可获自 STEMCELL TECHNOLOGIES(Rosettesep 目录第 15127 号和第 15167 号）。该混合物包括针对血型糖蛋白 A 和人的造血细胞上多种细胞表面抗原 (CD2、CD16、CD19、CD36、CD38、CD45、CD66b) 的双重特异性抗体。在血液采集之前，将一种或多种这些双特异性抗体加入到 BD Vacutainer CPT 管中。在优选的实施方案中，使用针对多于一个的白细胞相关 CD 分子的双特异性抗体的混合物。当将血液导入 CPT vacutainer 管时，双特异性抗体则形成免疫玫瑰花结，每一个免疫玫瑰花结由白细胞加许多红细胞组成。这些免疫玫瑰花结具有近似红细胞的密度，且当离心后，发现在红细胞

沉淀中，因此进而从细胞沉淀和凝胶层上面发现的肿瘤细胞级分中除去白细胞。收集血浆中具有肿瘤细胞的级分以进一步处理。

[0042] 3. 阳性选择循环癌细胞。

[0043] 分离循环癌细胞的优选方法使用免疫磁珠。分离循环癌细胞的其它方法包括过滤(Vona G 等，2000，Am J Pathol. 2000 156 :57-63)。在一个优选的实施方案中，免疫磁珠具有针对癌细胞表面上选择性发现的抗原（如上皮细胞粘附分子 (EpCAM)、细胞角蛋白如细胞角蛋白 -19) 的抗体，特别是针对细胞角蛋白和其它表面标记的抗体混合物。也可使用具有针对 Her2/neu 的抗体的免疫磁珠。免疫磁珠可以具有各种大小 (50 微米～小于 200nm)，包括具有针对 EpCAM（其为商业上可获得的）或针对 Her2/neu 的抗体的 DYNAL 珠 (>1.5 微米～约 50 微米)。在一个优选的实施方案中，使用纳米颗粒珠，因为其使得可更快且更有效地将肿瘤细胞和珠结合。在本发明的一个实施方案中，将 EasySep™ 人 EpCAM 阳性选择混合物和 EasySep™ 磁性纳米颗粒 (STEMCELL TECHNOLOGIES) 加入到来自先前步骤的血浆中具有肿瘤细胞的级分中。然后用磁体从剩余物质中分离肿瘤细胞，并用水溶液清洗肿瘤细胞。然后纯化的肿瘤细胞可备下个步骤中检测抗原之用。

[0044] 4. 由循环癌细胞检测和定量 Her-2/neu 蛋白。

[0045] 然后可以通过使用与检测分子连接的针对 Her-2/neu 的单克隆抗体 (mAb) 如赫赛汀或 mAb191924(R&D systems 目录号为 MAB1129) 或多克隆抗体（例如山羊多克隆抗体 R&D systems 目录号为 AF1129) 来完成 Her-2/neu 的检测。在电化学发光 (ECL) 的情况下，检测分子是钌。在公共领域中有丰富的文献提供了用于将钌连接于抗体（例如 Lee 等，AmJ Trop Med Hyg2001，65 :1-9)，随后在含有三丙胺的溶液中进行磁珠上抗原的 ECL 检测的非常有用的方法。通过电势的应用，激发钌标记而发光，使用 ECL 检测仪器（如 ORIGEN 分析仪或可商购的仪器像来自 BIOVERIS 公司 (Gaithersburg，MD) 的 M-Series ® 384) 检测所述光。

[0046] 根据本发明使用的免疫测定可以是针对 Her-2/neu 的多克隆或单克隆抗体。优选单克隆抗体是人源化的小鼠单克隆抗体，例如群司珠单抗。群司珠单抗对于本发明的免疫测定和治疗方法是优选的。

[0047] 为了检测 Her-2/neu，各种针对 Her-2/neu 的单克隆和多克隆抗体和包括针对胞外结构域和胞质结构域的抗体可商购自如 R&D Systems(Minneapolis，MN Biosource(Camarillo，CA) 和 BD Biosciences，SanDiego，CA) 等来源。兔多克隆抗体也可获自 LABVISION 公司 (Fremont. CA ；如 neu Ab-21) 和获自 UPSTATE CELL SIGNALING SOLUTIONS(Lake Placid，NY ；如目录号 06-562)。针对 Her-2/neu 胞外结构域的山羊多克隆抗体可获自 R&D systems（目录号 AF1129)。针对全长重组 Her-2/neu 的山羊多克隆抗体可获自 EXALPHA BIOLOGICS(Rosedale，MA ；目录号 M100P)。预计这些针对全长 Her-2/neu 的多克隆抗体将能与 Her-2/neu 的胞外和胞质结构域结合而不是胞外结构域特异性的。可获得的单克隆抗体针对胞外结构域（例如 R&D Systems 目录号 MAB1129) 和胞质结构域（例如 LABVISION neuAB-8)，包括针对 C- 末端肽（例如 LABVISION neuAB-15)。在 Hudziak 等 (1997，美国专利 5,677,171) 中也公开了针对 Her-2/neu 的单克隆抗体。一个改进的实施方案使用赫赛汀，因与该抗体结合是最能够预测作为患者的治疗手段的赫赛汀的结合。另一个有利的实施方案使用兔多克隆抗体或结合于 Her-2/neu 蛋白上的许多表位的抗体混

合物而使得具有更高的灵敏度。

[0048] 在本发明的一个实施方案中，免疫测定在完整的癌细胞上进行，并使用选择性结合于 Her-2/neu 胞外结构域的抗体。作为一种选择，在免疫测定前可将分离的癌细胞溶解，并在细胞溶解物上进行免疫测定。在这种情况下，免疫测定可使用选择性结合于 Her-2/neu 的胞外结构域或胞质结构域的抗体。在本发明的一个更具体的实施方案中，免疫测定使用一种或两种选择性结合于 Her-2/neu 胞质结构域的抗体。

[0049] 本发明的免疫测定比任何先前开发的针对 Her-2/neu 的免疫测定更为迅速且具有明显更高的灵敏度。本发明的免疫测定能检测非癌症人类志愿者中每 ml 血液加入的 100 个或更少 SK-BR-3 乳癌细胞的 Her-2/neu 表达。本发明的免疫测定能以每毫升血液样品中 20 皮克或更少 Her-2/neu 的水平检测癌细胞相关 Her-2/neu。

[0050] 除了电化学发光之外，能产生本发明所需的高灵敏度的其它免疫测定包括，但不限于：

[0051] a) 如 Liu Y 等，2003(J Food Protection66 :512-7) 描述的化学发光。

[0052] b) 如 YuH 等，2000(Biosens Bioelectron14 :829-40) 描述的荧光发生化学发光 (FCL)。

[0053] c) 荧光偏振免疫测定（见 Howanitz JH，1988Arch Pathol Lab Med112 :775-9)。

[0054] d) 时间分辨荧光免疫测定 (Butcher H 等，2003，J Immunol Methods272 :247-56 ; Soukka 等，2001，Clin Chem47 :1269-78 ;Howanitz JH，1988Arch Pathol Lab Med112 : 775-9)。

[0055] 在一个优选的实施方案中，估计了测定中使用的乳癌细胞的相对量。这使得可获得每个细胞的总 Her-2/neu 蛋白的比率，并能与具有每个细胞高、中和低水平 Her-2/neu 蛋白的乳癌细胞的对照标准进行比较。这是优选的实施方案，因其排除了其中有许多具有低水平 Her-2/neu 蛋白表达的循环乳癌细胞的假阳性情况，其可能给出模拟从少量具有高水平表达的乳癌细胞获得的信号。在该实施方案中，可使用各种方法来估计相对细胞数量，所述方法包括流式细胞计数分析、总 DNA 或 DNA 相关抗原如溶解细胞的组蛋白（每个二倍体细胞有 6pg DNA) 的定量和浊度或吸光度测定。

[0056] 由于其灵敏度，用于鉴定有望受益于用靶向 Her-2/neu 的抗癌剂所进行的治疗的患者的本发明方法，可有效地应用于先前通过 Her-2/neu 组织测试已测定（例如通过免疫组织化学或 FISH 分析）肿瘤活组织检查组织为 Her-2/neu 表达阴性的患者。

[0057] 通过参考以下实施例将更好地理解本发明，该实施例举例说明但不限制这里描述的本发明。

[0058] 实施例

[0059] 实施例 1

[0060] 患有转移性乳癌的患者来到诊所，将血液样品 (8mL 至 40mL) 直接抽取到 BD Vacutainer CPT 管中，所述 BD Vacutainer CPT 管含有诸如柠檬酸盐等抗凝剂以及所加入的阴性选择产物：含有针对红细胞抗原及针对白细胞表面抗原的双特异性抗体的 ROSETTESEP（来自 STEMCELLTECHNOLOGIES)。将所述物质在 1500RCF（相对离心力）至 1800RCF 离心 20 分钟。除去凝胶层上面的细胞层。加入 EasySep™ 人 EpCAM 阳性选择混合物和 EasySep™ 磁性纳米颗粒 (StemCell Technologies)，用磁场分离和清洗肿瘤细胞。将

针对 Her-2/neu 的钌标记的多克隆抗体随同三丙胺溶液一起加入到粘附于已结合到电极的磁珠的肿瘤细胞中。在本领域中描述了钌标记抗体的常规方法，如在 Lee 等，Am J Trop Med Hyg2001,65 :1-9 中。施加电流并使用如商购的 (BIOVERIS Corporation)ECL 检测装置来检测电化学发光 (ECL)。在这些仪器中将光电倍增管 (PMT) 恰好置于工作电极之上以有效地捕获光。在工作电极下面，将磁体放在捕获用目标抗原包被的珠的适当位置。信号与发现的结合在循环肿瘤细胞表面上的 Her-2/neu 的量成比例。

[0061] 实施例 2

[0062] 提供与实施例 1 中使用的相同的方法，不同之处在于使用针对 Her-2/Neu 的单克隆抗体而不是多克隆抗体进行检测。

[0063] 实施例 3

[0064] 提供与实施例 1 ～ 2 中使用的相同的方法，不同之处在于在加入连接于磁珠的针对 Her-2/neu 的抗体之前溶解所分离的乳癌细胞。溶解可用本领域中描述的许多细胞溶解试剂实现，所述细胞溶解试剂例如但不限于 Lysis Buffer A[1％ NP-40、20mM Tris(pH8.0)、137mM NaCl、10％甘油、2mM EDTA、1mM 原钒酸钠、10μg/mL 抑肽酶、10Ug/mL 亮肽素] 和 RIPA 缓冲液 (Papetti 和 Herman，2001，Am J Pathology159 :165-178)。在该夹心式 ECL(见 Yang 等，1994，for an illustration of a ‘sandwich’ immunoassay using ECL) 中，使用两套针对 Her-2/neu 的抗体 :一种抗体是生物素酰化的且粘附于链抗生物素蛋白包被的磁珠，而第二种抗体是钌标记的。

[0065] 实施例 4

[0066] 提供与实施例 1 ～ 3 使用的相同的方法，不同之处在于患者具有先前基于原发性肿瘤分析为 Her-2/neu 阴性的结果或者不具有容易获得用于分析的肿瘤组织。

[0067] 实施例 5

[0068] 提供实施例 1 ～ 4 中使用的方法，在分析中使用额外的定量乳癌细胞的相对数量的步骤。根据 DNA 含量 (每二倍体核有 6pg DNA) 定量细胞的 ELISA(www.gentra.com/calcularing.asp) 已由 Friis 等描述了 (2003 ;APMIS111 :658-68)，但缺少本发明所需的灵敏度。使用高度灵敏的免疫测定例如通过使用 ECL 和用于定量 Her-2/neu 的类似仪器，实现了检测本发明所要求的少量细胞所需的更高灵敏度测定。

[0069] 为了通过 ECL 定量细胞，首先溶解细胞 (例如用溶解缓冲液，例如但不限于上面详述的 Lysis Buffer A)，然后加入两种不同的针对双链 DNA 的抗体 (例如可获自 STATENS SERUM INSTITUT(哥本哈根，丹麦) 的小鼠单克隆抗体 HYB33-01 ; 可获自 CHEMICON(Temecula，CA，USA) 的小鼠单克隆抗体 MAB3032 ; 来自 ALPHA DIAGNOSTICSINTERNATIONAL(San Antonio，TX，USA) 的小鼠单克隆抗体 (目录号 DNA11-M)) ;一种已用钌进行标记 (本领域描述了钌标记抗体的常规方法，如 Lee 等，Am J Trop Med Hyg2001,65 :1-9)，另一种用生物素进行标记以粘附于链抗生物素蛋白包被的磁珠。用三丙胺溶液和借助使用磁场结合于电极的磁珠通过 ECL 实现抗原 [该情况下 dsDNA(双链 DNA)] 的定量。施加电流并使用如商购的 (BIOVERIS 公司) 的 ECL 检测装置检测电化学发光 (ECL)。在这些仪器中将光电倍增管 (PMT) 恰好置于工作电极之上以有效地捕获光。信号与 dsDNA 的量成比例，因此与细胞数量成比例。然后这使得可获得每细胞数量中 Her-2/neu 的比率。该比率而不是每 ml 血液中肿瘤细胞相关 Her-2/neu 的绝对数量，

在本发明中对于测定患者针对赫赛汀治疗的灵敏度是有利的。

[0070] 实施例 6

[0071] 实施例 1 ～ 5 中显示为 Her-2/neu 水平高于对照样品的患者，被认为是具有对 Her-2/neu 呈阳性的肿瘤细胞，然后用包括针对 Her2/neu 的单克隆抗体如赫赛汀的疗法治疗。优选的治疗包括以 90 分钟输注施用 4mg/kg 的初始负荷剂量，每周以 30 分钟输注 2mg/kg 的维持剂量。

[0072] 实施例 7

[0073] 在该实施例中，纯化的重组 Her-2/neu（胞外结构域）用作一种标准以使用电化学发光检测夹心式免疫测定的灵敏度。

[0074] 制备四种不同的 PBS 测定缓冲液：

[0075] • 测定缓冲液 1：PBS（磷酸缓冲盐水）中含 0.5％吐温 -20 和 0.5％牛血清白蛋白 (BSA)

[0076] • 测定缓冲液 2：PBS 中含 1.0％吐温 -20 和 0.5％ BSA

[0077] • 测定缓冲液 3：PBS 中含 0.5％吐温 -20 和 1.0％ BSA

[0078] • 测定缓冲液 4：PBS 中含 1.0％吐温 -20 和 1.0％ BSA

[0079] Her-2/neu 标准（重组 Her-2/neu 胞外结构域）获自 DakoCytomation(Carpinteria，CA93013USA；Product EL541)。山羊抗人 Her-2/neu 多克隆抗体以生物素酰化和非生物素酰化两种形式（目录号分别为 BAF1129 和 AF1129）获自 R&D Systems，Inc.(Minneapolis，MN55413USA)，单克隆抗体 MAB1129(R&D Systems 目录号为 191924) 也是一样。多克隆抗体 AF1129 和单克隆抗体 MAB1129 按如下进行钌标记（“TAG 标记”）：

[0080] • 在 DMSO 中制备 1.5μg/μl 钌标记 (BV-TAG-NHS Ester，目录号为 110034；BioVeris 公司，Gaithersburg，MD，USA)。

[0081] • 对于 500μl 单克隆抗体（蛋白质浓度为 1mg/ml)，加入 18.8μlBV-TAG-NHS，对于 200μl 多克隆抗体（蛋白质浓度为 0.5mg/ml)，加入 3.8μl BV-TAG-NHS。在每一种情况下，将溶液孵育一小时，并通过加入 20μl2M 甘氨酸停止反应。

[0082] • 每一反应混合物中未偶联的 BV-TAG-NHS Ester 用 PD-10 凝胶过滤柱除去，所述凝胶过滤柱用 PBS（包含 0.08％叠氮化钠）预先平衡，所述包含 0.08％叠氮化钠的 PBS 也用于洗脱。对于每一抗体，通过蛋白质测定法测定每一级分中的蛋白质浓度，具有高蛋白质含量的级分用于随后的实施例中。

[0083] 在本实施例和随后的实施例中，钌标记的多克隆抗体 AF1129 和生物素酰化的多克隆抗体 BAF1129 此后称为“TAG-pAb”和“Biotin-pAb”。本实施例中钌标记的单克隆抗体 MAB1129 此后称为“TAG-mAb”。

[0084] 电化学发光测定按如下进行：

[0085] • 按顺序将 25μl/ 孔的 Her-2/neu 标准，然后 50μl/ 孔的 TAG-Ab 和 Biotin-Ab 混合物（例如各浓度为 1μg/ml；稀释到 4 种 PBS 测定缓冲液中）加入到 96 孔 U 型底聚丙烯板的孔中，并在室温持续摇动孵育（例如 2 小时）。

[0086] • 将 25μl 中的 10μg 磁性链抗生物素蛋白珠（例如 Dynabeads M-280Streptavidin，目录号为 110028，BioVeris，Corporation，Gaithersburg，MD) 加入到

每个孔中，并持续摇动孵育（例如 30 分钟）。

[0087] 将 •PBS 测定缓冲液加入到每个孔中以使最终体积为每孔 250μl。本测定中分析物（重组 Her-2/neu 胞外结构域）的含量为每孔 16pg 至 1600pg 不等。也包括没有分析物的对照孔。所有条件以至少双份重复孔进行测试。然后使用 M8M-Series® Analyzer（目录号为 310800，BioVeris，Corporation，Gaithersburg，MD）分析 96 孔板的电化学发光。

[0088] 结果显示，使用具有 TAG-pAb 和 Biotin-pAb 的夹心式免疫测定，使用所有四种不同的测定缓冲液可检测到所有测试的重组 Her-2/neu 胞外结构域的水平（16Pg/ 孔、160Pg/ 孔和 1600Pg/ 孔），且高于基线（表 1）。使用具有 TAG-mAb 和 Biotin-pAb 的夹心式免疫测定也可检测到重组 Her-2/neu 胞外结构域（表 2）。

[0089] 表 1. 通过使用钌标记的多克隆 (TAG-pAb) 和生物素酰化的多克隆抗体 (Biotin-pAb) 的免疫测定进行重组 Her-2/neu 的电化学发光 (ECL) 检测。

[0090]

	平均 ECL 信号 (高于背景)*			
Her-2/neu (pg/孔)	使用测定缓冲液-1	使用测定缓冲液-2	使用测定缓冲液-3	使用测定缓冲液-4
16	146	88	89	93
160	998	884	888	850
1600	9690	9466	8553	8750

[0091] * 平均 ECL 信号高于来自没有抗原的对照孔的平均信号。

[0092] 表 2. 通过使用钌标记的单克隆 (TAG-mAb) 和生物素酰化的多克隆抗体 (Biotin-pAb) 的免疫测定进行重组 Her-2/neu 的电化学发光 (ECL) 检测。

[0093]

	平均 ECL 信号 (高于背景)*			
Her-2/neu (pg/孔)	使用测定缓冲液-1	使用测定缓冲液-2	使用测定缓冲液-3	使用测定缓冲液-4
16	**	**	*	8
160	**	**	12	39
1600	38	34	57	96

[0094] * 平均 ECL 信号高于来自没有抗原的对照孔的平均信号。

[0095] ** 信号不高于来自没有抗原的对照孔的平均信号。

[0096] 实施例 8

[0097] 使用如实施例 7 中所使用的方法，不同之处在于：

[0098] • 在本实施例整个过程中使用的 PBS 测定缓冲液是 PBS 测定缓冲液 1。

[0099] • 仅使用的钌标记的抗体是 Tag-pAb。加入的 Tag-pAb 的浓度是在 50μl 中的

2μg/ml 而不是 1μg/ml。

[0100] • 重组 Her-2/neu(胞外结构域)的量为 4pg/ml 至 64pg/ml 不等。

[0101] 结果显示,清楚地检测到所有测试的重组 Her-2/neu 胞外结构域的水平 (4Pg/ 孔、16Pg/ 孔和 64Pg/ 孔)且高于基线(见图 1)。

[0102] 实施例 9

[0103] 方法为实施例 8 中使用的方法,不同之处在于:

[0104] • 重组 Her-2/neu(胞外结构域)的量为 16Pg/ 孔至 4096Pg/ 孔不等。

[0105] 检测 Her-2/neu 的能力是在存在或缺少 0.02μl/ 孔的细胞溶解缓冲液中测试的。在分离的孔中测试 Pierce Lysis Buffer[M-PER® ExtractionReagent(产品号为 78501,获自 Pierce Biotechnology, Inc., Rockford, IL)] 和 Sigma Lysis Buffer[Sigma CelLytic™-M(Sigma 产品号为 C2978, Sigma-Aldrich, Inc., St. Louis, MO63103)]。

[0106] 结果提供在表 3 中。可检测到该实验中所有含量(包括最低含量 16Pg/ 孔)的 Her-2/neu 且高于基线(表 3)。该结果是在存在或缺少各细胞溶解缓冲液 (Pierce Lysis Buffer 或 Sigma Lysis Buffer) 中观察到的。

[0107] 表 3. ECL 免疫测定检测重组 Her-2/neu

[0108]

	平均 ECL 信号(高于背景)		
Her-2/neu (pg/孔)	使用测定缓冲液-1	使用具有 Pierce Lysis Buffer 的测定缓冲液-1	使用具有 Sigma Lysis Buffer 的测定缓冲液-1
0	0	0	0
16	298	226	274
64	480	436	482
256	1203	1043	1174
1024	4341	3998	4055
4096	13976	15046	14097

[0109] 实施例 10

[0110] 免疫测定方法如同实施例 8 使用的免疫测定方法一样,不同之处在于:

[0111] • 分析了来自 SK-BR-3 乳癌细胞的细胞提取物。

[0112] 按照 ATCC 推荐的条件使 SK-BR-3 细胞(来自 ATCC, Manassas, VA) 在 6 孔组织培养板中生长,用 PBS 清洗两次,使用血细胞计数器对等分试样进行计数。使用 Pierce Lysis Buffer 或 Sigma Lysis Buffer 进行 SK-BR-3 细胞的溶解。这两种溶解缓冲液描述于上面的实施例 9 中。为了溶解 SK-BR-3 细胞,每 1 百万个细胞加入 200μl 溶解缓冲液。按照各制造商的推荐进行细胞溶解,在除去细胞碎片之前附加 5 分钟的剧烈涡旋。通过在 Eppendorf 离心机(型号为 5415C) 中以 14,000rpm 离心 30 分钟从细胞溶解物中除去细胞碎片。每孔溶解物上清液的量因从 10 至 1000 个 SK-BR-3 细胞中提取的量而异,使用实施例 7 中描述的采用 PBS 测定缓冲液 1 的免疫测定分析 Her-2/neu。

[0113] 该实验的结果提供在表 4 中。从本实验的 SK-BR-3 细胞的溶解物中包括使用本实验中最低量 SK-BR-3 溶解物的那些孔（每孔加入 10 个细胞的溶解物；表 4）中可检测到 Her-2/neu 且高于基线。无论使用何种细胞溶解缓冲液 (Pierce Lysis Buffer 或 Sigma Lysis Buffer)，均观察到该结果。图 2 和 3 为对于每孔测试的 SK-BR-3 细胞的三个最低量的溶解物（每孔 10、30 和 100 个 SK-BR-3 细胞），分别使用 Sigma Lysis Buffer 和 PierceLysis Buffer 的图示结果，表明了使用该免疫测定利用细胞进行的 Her-2/neu 检测呈线性。

[0114] 表 4. 在 SK-BR-3 乳癌细胞溶解物中 ECL 免疫测定检测 Her-2/neu

[0115]

	平均 ECL 信号(高于背景)	
来自 SK-BR-3 细胞的溶解物(细胞/孔)	使用 Pierce Lysis Buffer	使用 Sigma Lysis Buffer
0	0	0
10	831	1079
30	2076	2574
100	6587	7225
300	19402	19436
1000	56866	54339

[0116] 实施例 11

[0117] 在本实验中，免疫测定方法如同实施例 10 中使用的免疫测定方法一样，不同之处在于检测使用 Sigma Lysis Buffer 从以下细胞获得的溶解物：

[0118] •SK-BR-3 人乳癌细胞 (Her-2/neu 的高表达；Goebel SU 等，2002，Cancer Res62：3702-10)；制备见实施例 10。该 SK-BR-3 细胞系是对于乳癌表达 Her-2/neu 蛋白的合适的阳性对照。

[0119] •MDA-MB-468 人乳癌是对于 Her-2/neu 的过量表达的合适的阴性对照乳癌细胞系 (Goebel SU 等，2002，Cancer Res62：3702-10)。对于 MDA-MB-468 细胞如同实施例 10 中对于 SK-BR-3 细胞一样进行细胞培养和使用 Sigma Cell Lysis Buffer 的细胞溶解。

[0120] 本实验的结果提供在图 4 中。来自 SK-BR-3 细胞的溶解物 (Her-2/neu 过量表达的阳性对照）在 Her-2/neu 免疫测定中比来自 MDA-MB-468 细胞的溶解物（对于 Her-2/neu 过量表达呈阴性）给出高得多的信号，显示了 Her-2/neu 检测结果的特异性（图 4)。

[0121] 实施例 12

[0122] 在该实验中，免疫测定方法如同实施例 11 中使用的免疫测定方法一样，不同之处在于：50μl 中加入的 Tag-pAb 和 Biotin-pAb 的浓度各自都为 0.5μg/ml 而不是 1μg/ml。同样，就 Her-2/neu 的表达来说，将来自 SK-BR-3 细胞的细胞溶解物与来自 MDA-MB-468 细胞的细胞溶解物进行比较。本实验的结果提供在图 5 中。来自 SK-BR-3 细胞的溶解物 (Her-2/neu 过量表达的阳性对照）在 Her-2/neu 免疫测定中比来自 MDA-MB-468 细胞的溶解物（对于 Her-2/neu 过量表达呈阴性）给出高得多的信号，显示了 Her-2/neu 检测结果

的特异性（图5）。同样，从每孔少至0.9个SK-BR-3细胞的溶解物材料中可检测到Her-2/neu；这给出了高于背景的ECL信号，也高于来自100个MDA-MB-468细胞的溶解物材料的信号（图5）。

[0123] 实施例13

[0124] 在本实验中，免疫测定方法如同实施例12中使用的免疫测定方法一样，不同之处在于使用Sigma Lysis Buffer获得另外的细胞溶解物（小鼠外周血单核细胞，PBMC）。PBMC由淋巴细胞和单核细胞组成，且可以在导致循环乳癌细胞从血液中分离乳癌的起始步骤中共同纯化。

[0125] 将4ml小鼠血液采集到4ml的BECTON DICKINSON BD VacutainerCPT管中，在Jouan CR412离心机中以3000rpm离心30分钟。在凝胶之上的细胞级分中收集PBMC并用PBS清洗4次。从4ml血液中总共收集到1百万个PBMC。如同对于SK-BR-3细胞一样进行细胞溶解。通过在Eppendorf离心机（型号为5415C）中以14,000rpm离心30分钟从细胞溶解物中除去细胞碎片。然后将上清液用于本实验的分析。

[0126] 通过将以下物质加入到每个孔中来制备用于测试的样品：

[0127] •12.5μl中来自1～10个SK-BR-3细胞的细胞溶解物。

[0128] •同样，在12.5μl中来自100～10,000个PBMC或对照PBS测定缓冲液1的细胞溶解物。

[0129] •每孔加入含有Tag-pAb和Biotin-pAb（各抗体为50μl中0.5μg/ml）的50μl溶液，并将96孔板在室温持续摇动孵育2小时。

[0130] •将25μl中10μg磁性链抗生物素蛋白珠（例如Dynabeads M-280Streptavidin，目录号为110028，BioVeris，Corporation，Gaithersburg，MD）加入到每个孔中并持续摇动孵育30分钟。

[0131] •将PBS测定缓冲液-1加入到每个孔中使最终体积为250μl每孔。所有条件在至少三个重复孔中测试。然后使用M8M-Series®分析仪（目录号为310800，BioVeris，Corporation，Gaithersburg，MD）分析96孔板的电化学发光。

[0132] 本实验的结果提供在表5和表6及图6中。从100、1000和10,000个PBMC中无法检测到Her-2/neu（表5）。相反，从使用的甚至最小量的SK-BR-3乳癌细胞溶解物（每孔来自1个SK-BR-3细胞的溶解物；见表6）中可检测到Her-2/neu。而且，来自100、1000和甚至10,000个PBMC的细胞溶解物的添加不会干扰乳癌细胞中Her-2/neu的检测（表6和图6）。在导致循环乳癌细胞从血液中分离乳癌的起始步骤中可共同纯化的PBMC，具有无法检测到的Her-2/neu表达，而且也不会干扰SK-BR-3细胞上Her-2/neu的检测。

[0133] 表5. 在大量（例如10,000）PBMC上用ECL免疫测定进行检测时未检测到Her-2/neu。

[0134]

PBMC溶解物的量（细胞／孔）	平均ECL信号（高于背景）
0	0
100	阴性*
1000	阴性
10,000	阴性

[0135] *阴性：ECL信号略低于背景水平。

[0136] 表 6. 在存在或缺少 PBMC 溶解物的情况下在 SK-BR-3 乳癌细胞溶解物中进行 Her-2/neu 的 ECL 免疫测定检测。

[0137]

	平均 ECL 信号(高于背景)				
来自 SK-BR-3 细胞的溶解物 (SK-BR-3 细胞/孔)	没有来自 PBMC 的溶解物	具有每孔来自 100 个 PBMC 的溶解物	具有每孔来自 1000 个 PBMC 的溶解物	具有每孔来自 3000 个 PBMC 的溶解物	具有每孔来自 10,000 个 PBMC 的溶解物
0	0	0	0	0	0
1	57	68	47	61	NT
3	206	218	194	192	201
10	710	733	695	NT	686

[0138] NT :未测试。

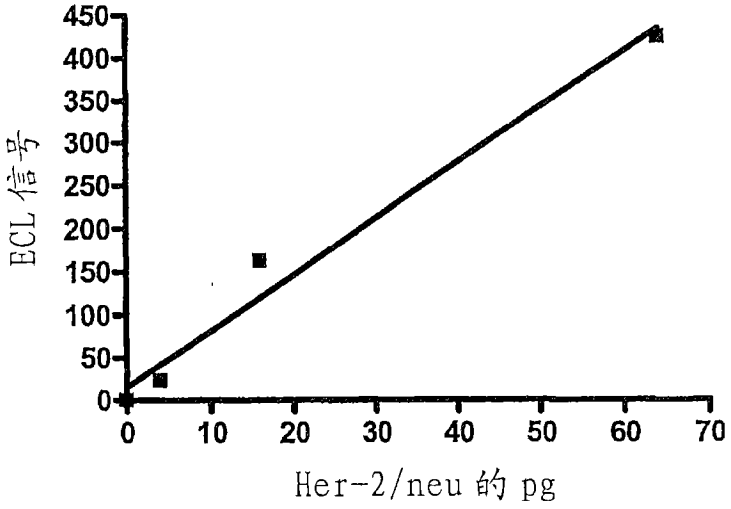
ECL 信号
450
400
350
300
250
200
150
100
50
0
0 10 20 30 40 50 60 70
Her-2/neu 的 pg

图 1

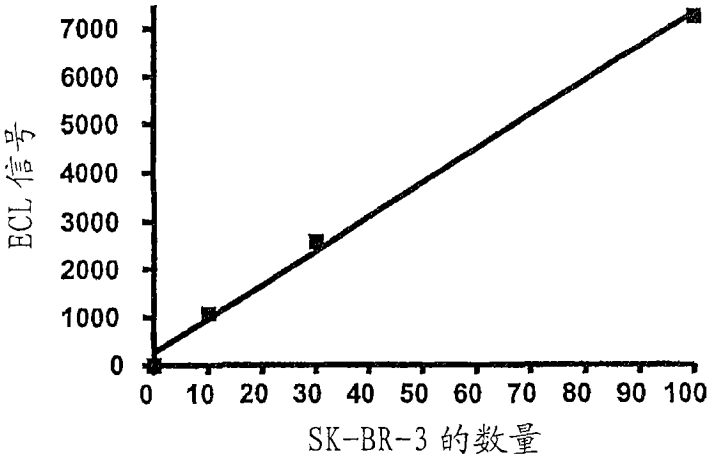
ECL 信号
7000
6000
5000
4000
3000
2000
1000
0
0 10 20 30 40 50 60 70 80 90 100
SK-BR-3 的数量

图 2

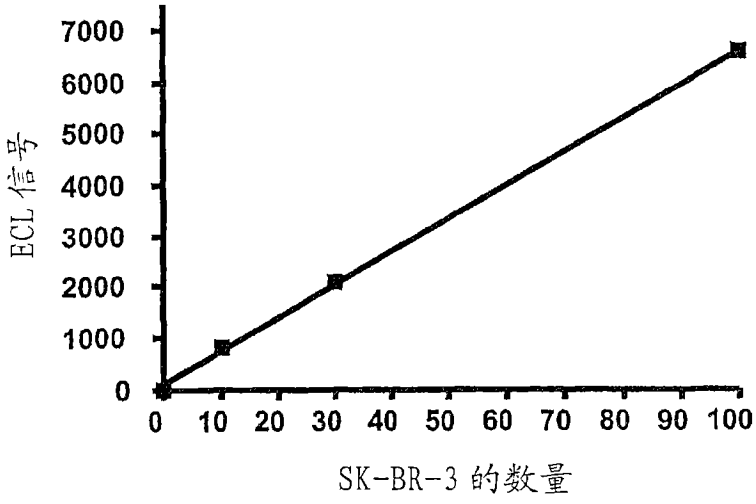
ECL 信号
7000
6000
5000
4000
3000
2000
1000
0
0 10 20 30 40 50 60 70 80 90 100
SK-BR-3 的数量

图 3

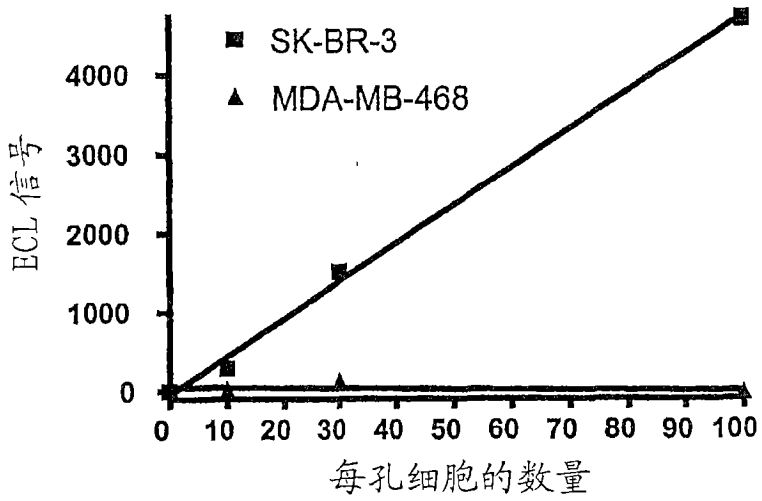
SK-BR-3
MDA-MB-468
ECL 信号
4000
3000
2000
1000
0
0 10 20 30 40 50 60 70 80 90 100
每孔细胞的数量

图 4

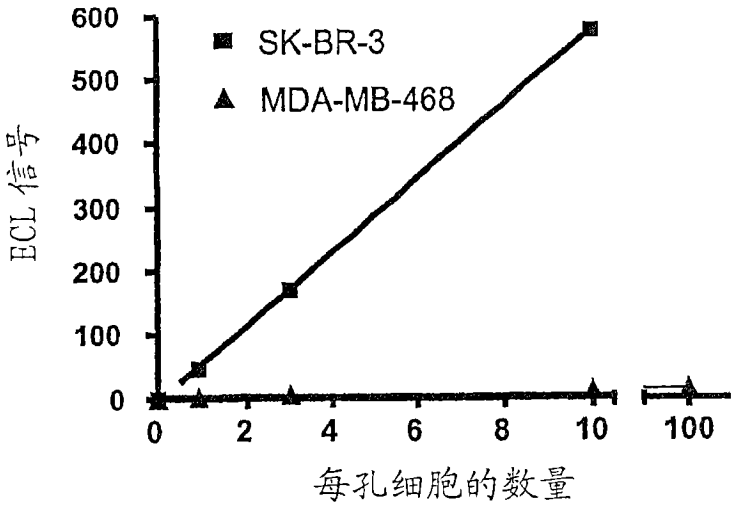
SK-BR-3
MDA-MB-468
ECL 信号
600
500
400
300
200
100
0
0 2 4 6 8 10 100
每孔细胞的数量

图 5

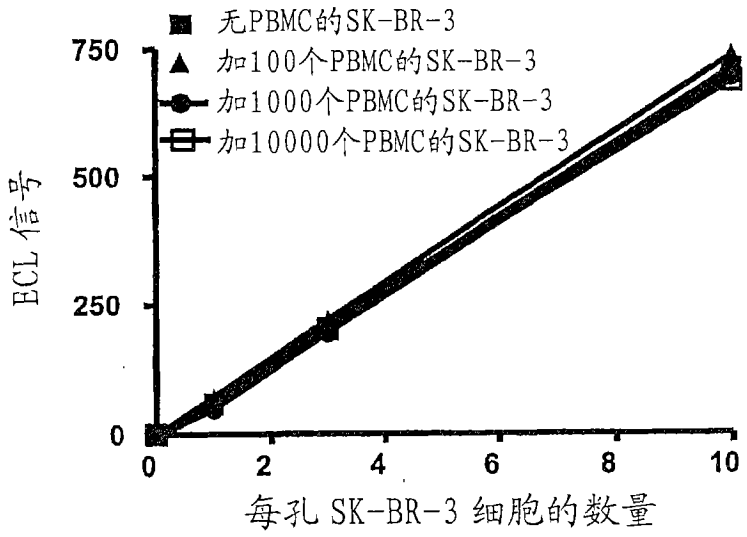
无PBMC的SK-BR-3
加100个PBMC的SK-BR-3
加1000个PBMC的SK-BR-3
加10000个PBMC的SK-BR-3
ECL信号
750
500
250
0
0
2
4
6
8
10
每孔 SK-BR-3 细胞的数量

图 6

专利名称(译)	循环癌细胞上Her-2/neu蛋白的增加水平的检测以及治疗		
公开(公告)号	CN101036055B	公开(公告)日	2011-06-29
申请号	CN200580033986.1	申请日	2005-10-06
[标]申请(专利权)人(译)	病毒防御公司		
申请(专利权)人(译)	威尔斯达特生物制剂公司		
当前申请(专利权)人(译)	威尔斯达特生物制剂公司		
[标]发明人	罗伯特M洛朗斯 鲁明		
发明人	罗伯特·M·洛朗斯 鲁明		
IPC分类号	G01N33/53 A61K38/00		
CPC分类号	G01N33/57415 G01N2333/4706 G01N33/57488 G01N33/6854 C07K16/32 A61P35/00 A61P43/00		
代理人(译)	赵晓梅		
审查员(译)	王慧		
优先权	60/616332 2004-10-06 US		
其他公开文献	CN101036055A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及循环癌细胞上Her-2/neu蛋白的增加水平的检测以及治疗。具体地说，通过从血液样品中分离癌细胞，然后在所分离的癌细胞上进行灵敏的Her-2/neu免疫测定，来检测血液样品中循环癌细胞上Her-2/neu蛋白的表达。阳性结果表明Her-2/neu在血液样品中癌细胞上的表达。该方法可用于鉴定有望受益于用靶向Her-2/neu的抗癌剂如群司珠单抗(赫赛汀)所进行的治疗的癌症患者。

-1470.

BASELGA. Is circulating NER-2 more than a tumor marker. 《 CLINICAL CANCER ARCH》. 2001, 第 7 卷 2605-2607.

审查员 王慧

权利要求书 1 页 说明书 14 页 附图 3 页