



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 102066931 B

(45)授权公告日 2017.03.15

(21)申请号 200980131077.X

(22)申请日 2009.06.12

(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 102066931 A

(43)申请公布日 2011.05.18

(30)优先权数据

61/131,991 2008.06.13 US

61/192,912 2008.09.22 US

12/456,053 2009.06.10 US

12/456,054 2009.06.10 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2011.02.10

(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/US2009/003537 2009.06.12

(87)PCT国际申请的公布数据
W02009/151632 EN 2009.12.17

(73)专利权人 武汉呵尔医疗科技发展有限公司
地址 430074 湖北省武汉市东湖新技术开
发区光谷大道111号光谷芯中心一期
第1-03栋501、502、601、602室

(72)发明人 郑淑玲

(74)专利代理机构 北京挺立专利事务所(普通
合伙) 11265

代理人 倪钜芳

(51)Int.Cl.
G01N 33/53(2006.01)

(56)对比文件

US 2008044809 A1,2008.02.21,

US 2008044809 A1,2008.02.21,

US 2006269967 A1,2006.11.30,

CN 1957256 A,2007.05.02,

张波等.免疫组化和核酸原位杂交在尖锐湿疣病理诊断中的意义.《华西医科大学学报》.2002,第33卷(第03期),

魏华等.免疫荧光检测人乳头状瘤病毒新技术.《医疗卫生装备》.2005,第26卷(第06期),

潘淑琴等.原位杂交及免疫组化法在诊断尖锐湿疣中的应用.《中国厂矿医学杂志》.1996,(第06期),

审查员 李煦颖

权利要求书2页 说明书46页 附图26页

(54)发明名称

人乳头状瘤病毒早期及晚期感染之免疫分析试验

(57)摘要

本专利发明实施案例,提供方法、单克隆抗体、多克隆抗体、试验和试剂盒,侦测人乳头状瘤病毒感染,包括各式人乳头状瘤病毒型之感染及早期或晚期人乳头状瘤病毒相关性或特异性之蛋白和抗体。在单一试验中,单克隆抗体可侦测高风险及低风险人乳头状瘤病毒型之原致癌基因,且不受限于试验之形式,提供一可专一性侦测侵袭性子宫颈癌之有利工具。本专利发明亦对子宫颈癌之生物标记进行确认,生物标记可配合试验方法,可用于侦测早期癌前病灶或癌症晚期之发展状况。

1. 一种或多种以上之单克隆抗体在制备用于侦测人类感染乳突状病毒状况的试剂中的应用,其中所述一种或多种以上之单克隆抗体选自由浓缩人乳头状瘤病毒E6单克隆抗体、抗人乳头状瘤病毒E7单克隆抗体、抗人乳头状瘤病毒L1单克隆抗体组成的组,并且其中所述侦测包括:

收集人类临床样本进行免疫学试验,以一种或多种以上之单克隆抗体,对临床样本中人类细胞进行染色,

其中当人类细胞核染色呈阳性反应时,表示疾病发展阶段处于疾病之早期阶段,其中当人类细胞质染色呈阳性反应时,表示人乳头状瘤病毒感染可能发展成晚期病变。

2. 根据权利要求1所述的应用,其一种或多种单克隆抗体是由一种或多种纯化后之乳头状瘤病毒重组蛋白所产生。

3. 根据权利要求1所述的应用,一种或多种单克隆抗体与至少一种人类乳头状瘤早期病毒蛋白具有键结能力。

4. 根据权利要求1所述的应用,一种或多种单克隆抗体与至少一种人类乳头状瘤晚期病毒蛋白具有键结能力。

5. 根据权利要求1所述的应用,一种或多种单克隆抗体与至少一种早期及至少一种晚期之人乳头状瘤病毒蛋白具有键结能力。

6. 根据权利要求1所述的应用,一种或多种单克隆抗体包含一抗体,其与人类乳头状瘤早期病毒蛋白具有键结能力,并包含另一抗体,其与人类乳头状瘤晚期蛋白具有键结能力。

7. 根据权利要求1所述的应用,进一步包含有:以一种或多种抗人乳头状瘤病毒重组蛋白之抗体,对临床样本之人体细胞进行免疫组织化学试验;并比较临床样本人体细胞之细胞核和细胞质染色。

8. 根据权利要求7所述的应用,临床样本人体细胞之细胞核染色呈阳性反应较细胞质多者,表示由族群中所筛选出之人乳头状瘤病毒感染病人处于疾病之早期阶段。

9. 根据权利要求7所述的应用,临床样本人体细胞之细胞质染色呈阳性反应较细胞核多者,表示由族群中所筛选出之人乳头状瘤病毒感染病人处于疾病之晚期阶段。

10. 根据权利要求1所述的应用,进一步包含:以两种或多种能与人乳头状瘤病毒蛋白产生键结之抗体,对临床样本之人体细胞进行免疫组织化学试验,由族群中所筛选出人乳头状瘤病毒E6,E7,L1蛋白,以及由上述组成的构成群组;以两种以上抗体比较人体细胞染色之结果,染色结果呈阳性反应者,表示该人体受人乳头状瘤病毒之感染。

11. 根据权利要求1所述的应用,免疫组织化学试验可用来侦测各种病程阶段之人乳头状瘤病毒感染,由群组中筛选出的疾病阶段包括早期人乳头状瘤病毒感染、晚期人乳头状瘤病毒感染、早期子宫颈细胞病灶、晚期子宫颈细胞病灶、低度鳞状上皮细胞病变、高度鳞状上皮细胞病变、意义不明的不典型鳞状细胞、子宫颈上皮内赘瘤、发展中子宫颈癌、腺癌多克隆、鳞状上皮细胞癌,及其上述组合群构成。

12. 根据权利要求1所述的应用,进一步包含有:提供一来自人体之临床样本,该临床样本含有型态正常与不正常之人体细胞;将该样本制备成一薄层细胞平铺于玻片表面;以一种或多种经由一种或多种纯化后之乳头状瘤病毒重组蛋白所产生之抗体,进行免疫细胞化学试验分析,其中至少有一种抗体与人类乳头状瘤早期病毒蛋白具有键结能力;并对玻片上临床样本中各式人乳头状瘤病毒蛋白型所产生的人乳头状瘤病毒蛋白进行染色。

13. 根据权利要求1所述的应用,进一步包含有:进行多项流细胞侦测,由型态正常与不正常之人体细胞之混和物中分离出每一细胞,以侦测每一个体细胞;分析临床样本液态溶液,其型态不正常和正常之细胞混和物中含有多种人乳头状瘤病毒型,侦测来自各种人乳头状瘤病毒型的人乳头状瘤病毒蛋白之表达。

14. 根据权利要求1所述的应用,进一步包括在固态表面上包被一抗体,以侦测细胞蛋白,并比较临床样本中,细胞蛋白和多种人乳头状瘤病毒蛋白之表达量,细胞蛋白是由下列族群中所筛选出:p16INK4a, E2F, Ki-67, MYC蛋白, CDK4, 周期素-A, 周期素-B, 周期素-E, 端粒酶-TERC, MCM2蛋白, TOP2A蛋白, 热休克蛋白40, 热休克蛋白60, 热休克蛋白70, CA9/MN蛋白, 层粘连蛋白5, 层粘连蛋, brn-3a, CDK N2蛋白, 拓朴异构酶2A, 微粒体维持蛋白-2, 微粒体维持蛋白-4, 微粒体维持蛋白-5, 生长素蛋白, VEGF蛋白, p53, RB, p27, 和p21, 以及其组合群。

15. 根据权利要求1所述的应用,其中所述疾病之早期阶段为早期结构不良增生阶段、低度鳞状上皮细胞病变、高度鳞状上皮细胞病变、第一级子宫颈上皮内赘瘤、第二级子宫颈上皮内赘瘤、第三级子宫颈上皮内赘瘤,以及其上述组合群构成。

16. 根据权利要求1所述的应用,其中所述晚期病变为晚期结构不良增生、高度鳞状上皮细胞病变、第二级或第三级子宫颈上皮内赘瘤、侵袭性子宫颈癌、鳞状上皮细胞癌、腺癌,以及其上述组合群构成。

17. 根据权利要求8所述的应用,其中所述疾病之早期阶段为早期结构不良增生、低度鳞状上皮细胞病变、高度鳞状上皮细胞病变、子宫颈上皮内赘瘤,以及其上述组合群构成。

18. 根据权利要求17所述的应用,其中所述子宫颈上皮内赘瘤为第一级子宫颈上皮内赘瘤、第二级子宫颈上皮内赘瘤、第三级子宫颈上皮内赘瘤。

19. 根据权利要求9所述的应用,其中所述疾病之晚期阶段为晚期结构不良增生、第三级子宫颈上皮内赘瘤、侵袭性癌症,以及其上述组合群构成。

20. 根据权利要求11所述的应用,其中所述子宫颈上皮内赘瘤为第一级子宫颈上皮内赘瘤、第二级子宫颈上皮内赘瘤、第三级子宫颈上皮内赘瘤。

人乳头状瘤病毒早期及晚期感染之免疫分析试验

[0001] 本项发明应用相关参照

[0002] 此专利应用范围受利于美国临时专利申请序号61/131,991,2008年6月13号提交,和美国临时专利申请序号61/192,912,2008年9月22日提交。每一上述相关之专利申请,在此以提及方式纳入。

[0003] 图示概述

[0004] 图1A说明以抗E7单克隆抗体经免疫组织化学(IHC)组织芯片染色,鳞状细胞癌(SCC)组织的代表性图。

[0005] 图1B说明图1A之鳞状细胞癌个案正常上皮细胞(与肿瘤组织相距15毫米)代表性图。

[0006] 图1C说明以相同抗E7单克隆抗体,经免疫组织化学组织芯片染色鳞状细胞癌样本的代表性图。

[0007] 图1D说明图1C肿瘤细胞之细胞质染色放大代表性图。

[0008] 图2A说明以抗E7单克隆抗体,经免疫组织化学染色腺癌(ADC)肿瘤细胞样本之代表性图。

[0009] 图2B说明图2A腺癌样本之相关正常上皮细胞(与肿瘤组织相距15毫米)代表性图。

[0010] 图2C说明图2A腺癌细胞之细胞质染色放大代表性图。

[0011] 图3A说明第三级子宫颈上皮内赘瘤结构不良细胞代表性染色图,依据另一发明实施案例,以老鼠单克隆抗人乳头状瘤病毒E7抗体进行免疫组织化学试验。

[0012] 图3B说明图2A结构不良上皮细胞之放大表表性图,指出第三级子宫颈上皮内赘瘤结构不良之细胞核染色。

[0013] 图4A说明第二级子宫颈上皮内赘瘤结构不良细胞代表性染色图,依据一发明实施案例,以老鼠之抗人乳头状瘤病毒E6单克隆抗体进行免疫组织化学试验。

[0014] 图4B说明图1A之第二级子宫颈上皮内赘瘤样本结构不良组织邻近之正常上皮细胞代表性染色图,以相同之老鼠之抗人乳头状瘤病毒E6单克隆抗体进行免疫组织化学试验。

[0015] 图4C说明第三级子宫颈上皮内赘瘤组织之结构不良性上皮细胞染色结果,依据另一发明实施案例,以与图1A相同之老鼠之抗人乳头状瘤病毒E6单克隆抗体进行免疫组织化学试验。

[0016] 图4D说明另一第三级子宫颈上皮内赘瘤组织之结构不良性上皮细胞染色结果,依据另一发明实施案例,以与图1C相同之老鼠之抗人乳头状瘤病毒E6单克隆抗体进行免疫组织化学试验。

[0017] 图5A说明临床检体诊断为意义不明的不典型鳞状细胞(ASCUS)之染色结果,依据一发明实施案例,在溶液中以老鼠之抗人乳头状瘤病毒E6单克隆抗体进行免疫细胞化学(ICC)试验。

[0018] 图5B说明与图5A相同之临床检体染色结果,依据一发明实施案例,以老鼠之抗人乳头状瘤病毒E7单克隆抗体进行免疫细胞化学试验。

[0019] 图6A说明临床检体诊断为第二级子宫颈上皮内赘瘤之染色结果,依据一发明实施案例,在溶液中以老鼠之抗人乳头状瘤病毒E7单克隆抗体进行免疫细胞化学试验。

[0020] 图6B说明另一诊断为第二级子宫颈上皮内赘瘤临床检体之染色结果,依据另一发明实施案例,在溶液中以老鼠之抗人乳头状瘤病毒E6单克隆抗体进行免疫细胞化学试验。

[0021] 图7A说明临床检体诊断为第三级子宫颈上皮内赘瘤之染色结果,依据另一发明实施案例,在溶液中以老鼠之抗人乳头状瘤病毒E6单克隆抗体进行免疫细胞化学试验。

[0022] 图7B说明另一也诊断为第三级子宫颈上皮内赘瘤临床检体之染色结果,以图7A相同之老鼠之抗人乳头状瘤病毒E6单克隆抗体进行染色。

[0023] 图7C说明与图7B相同之临床检体的另一免疫细胞化学染色图,以相同老鼠之抗人乳头状瘤病毒E6单克隆抗体进行染色。

[0024] 图7D说明与图7B相同之临床检体的另一免疫细胞化学染色图,以相同老鼠之抗人乳头状瘤病毒E6单克隆抗体进行染色。

[0025] 图7E说明与图7B相同之第三级子宫颈上皮内赘瘤样本的另一免疫细胞化学染色图,但依据另一发明实施案例,以老鼠之抗人乳头状瘤病毒E7单克隆抗体进行染色。

[0026] 图7F说明与图7E相同之第三级子宫颈上皮内赘瘤样本的另一免疫细胞化学染色图,以相同之老鼠之抗人乳头状瘤病毒E7单克隆抗体进行染色。

[0027] 图7G说明与图3B相同之第三级子宫颈上皮内赘瘤样本染色结果,但以老鼠之抗p16单克隆抗体进行免疫细胞化学试验。

[0028] 图8说明临床诊断为腺癌之染色结果,依据另一发明实施案例,以老鼠之抗人乳头状瘤病毒E6单克隆抗体进行免疫细胞化学试验。

[0029] 图9A说明临床诊断为鳞状细胞癌之染色结果,依据另一发明实施案例,以老鼠之抗人乳头状瘤病毒E6单克隆抗体进行免疫细胞化学试验。

[0030] 图9B说明与图9A相同之鳞状细胞癌样本染色结果,依据另一发明实施案例,以老鼠之抗人乳头状瘤病毒E7单克隆抗体进行免疫细胞化学试验。

[0031] 图9C说明与图9A相同之鳞状细胞癌样本染色结果,依据另一发明实施案例,以老鼠之抗p16单克隆抗体进行免疫细胞化学试验。

[0032] 图10A说明临床诊断为正常样本之染色结果,依据另一发明实施案例,以老鼠之抗人乳头状瘤病毒E6单克隆抗体进行免疫细胞化学试验。

[0033] 图10B说明与图6A相同之临床样本染色结果,依据另一发明实施案例,以老鼠之抗人乳头状瘤病毒E7单克隆抗体进行免疫细胞化学试验。

[0034] 图11A说明另一子宫颈抹片样本之细胞质染色结果,依据另一发明实施案例,以老鼠之抗人乳头状瘤病毒E6单克隆抗体进行免疫细胞化学试验。

[0035] 图11B说明与图11A相同样本之细胞核染色结果,以老鼠之抗人乳头状瘤病毒E7单克隆抗体进行试验。

[0036] 图11C说明另一子宫颈抹片样本之细胞质染色结果,以老鼠之抗人乳头状瘤病毒E6单克隆抗体进行试验。

[0037] 图12A说明临床诊断为第一级子宫颈上皮内赘瘤样本之染色结果,依据另一发明实施案例,以老鼠之抗人乳头状瘤病毒E6单克隆抗体进行免疫细胞化学试验。

[0038] 图12B说明与图12A相同第一级子宫颈上皮内赘瘤样本之另一免疫细胞化学染色

结果,以相同老鼠之抗人乳头状瘤病毒E6单克隆抗体进行试验。

[0039] 图12C说明与图12A相同第一级子宫颈上皮内赘瘤样本之另一免疫细胞化学染色结果,以相同老鼠之抗人乳头状瘤病毒E6单克隆抗体进行试验。

[0040] 图12D说明与图12A相同第一级子宫颈上皮内赘瘤样本之另一免疫细胞化学染色结果,但依据另一发明实施案例,以老鼠之抗人乳头状瘤病毒E7单克隆抗体进行免疫细胞化学试验。

[0041] 图12E说明与图12D相同第一级子宫颈上皮内赘瘤样本之另一免疫细胞化学染色结果,以相同老鼠之抗人乳头状瘤病毒E7单克隆抗体进行试验。

[0042] 图12F说明与图12A相同第一级子宫颈上皮内赘瘤样本之染色结果,依据另一发明实施案例,以老鼠之抗p16单克隆抗体进行免疫细胞化学试验。

[0043] 图13A说明侦测人乳头状瘤病毒L1蛋白之免疫印迹法结果,依据一发明实施案例,以老鼠之抗人乳头状瘤病毒L1单克隆抗体进行试验。

[0044] 图13B说明另一侦测人乳头状瘤病毒L1蛋白之免疫印迹法结果,以与图1相同之老鼠之抗人乳头状瘤病毒L1抗体进行试验。

[0045] 图14A说明与图13A相同侦测人乳头状瘤病毒E6蛋白免疫印迹法之结果,依据另一发明实施案例,以老鼠之抗人乳头状瘤病毒E6单克隆抗体进行试验。

[0046] 图14B说明与图13B相同侦测人乳头状瘤病毒E6蛋白免疫印迹法之结果,依据另一发明实施案例,使用与图14A相同之老鼠之抗人乳头状瘤病毒E6单克隆抗体进行试验。

[0047] 图15B说明与图13A及图14A相同免疫印迹法之结果,依据另一发明实施案例,以老鼠之抗人乳头状瘤病毒E7单克隆抗体侦测人乳头状瘤病毒E7蛋白。

[0048] 图16说明由10组子宫颈抹片样本之细胞裂解物,抗体基因芯片试验分析之平均荧光强度结果,依据另一发明实施案例,侦测各式人乳头状瘤病毒蛋白和细胞内生性蛋白质。

[0049] 图17为图16中10组细胞裂解物每一样本之荧光强度结果,依据发明另一实施案例,侦测人乳头状瘤病毒L1蛋白。

[0050] 图18为图16中10组细胞裂解物每一样本之抗体基因芯片分析荧光强度结果,依据发明另一实施案例,侦测人乳头状瘤病毒E7蛋白以及细胞p16 INK4a蛋白。

[0051] 图19为图16中10组细胞裂解物每一样本之抗体基因芯片分析荧光强度结果,依据发明另一实施案例,侦测人乳头状瘤病毒L1蛋白以及细胞p53蛋白。

[0052] 图20为图16中10组细胞裂解物每一样本之抗体基因芯片分析荧光强度结果,依据发明另一实施案例,侦测人乳头状瘤病毒E7蛋白以及来自Rb蛋白之细胞磷酸盐。

[0053] 图21为另一图片说明样本S2之抗体芯片分析荧光强度结果。

[0054] 图22图16中10组细胞裂解物每一样本之抗体芯片分析荧光强度结果,依据发明另一实施案例,侦测细胞p21 WAF1以及p53蛋白。

[0055] 图23说明酶联免疫吸附试验试验结果,针对临床诊断为鳞状细胞癌,或与人乳头状瘤病毒阴性血清样本比对后为人乳头状瘤病毒阳性(经聚合酶链反应测试)之人体血清样本,侦测其人乳头状瘤病毒E6,E7和L1蛋白,依据发明另一实施案例,以兔子之抗人乳头状瘤病毒多克隆抗体作为包被及侦测。

[0056] 图24说明以荧光流式细胞仪(FACS)进行夹心珠法侦测人乳头状瘤病毒16L1重组蛋白之结果,以老鼠之抗人乳头状瘤病毒16L1单克隆抗体作为包被抗体,以兔子之抗人乳

头状瘤病毒16L1多克隆抗体作为侦测抗体。

[0057] 图25说明以荧光流式细胞仪 (FACS) 进行夹心珠法侦测人乳头状瘤病毒16E6重组蛋白之结果,以老鼠之抗人乳头状瘤病毒16E6单克隆抗体作为包被抗体,以兔子之抗人乳头状瘤病毒16E6多克隆抗体作为侦测抗体。

[0058] 图26说明以荧光流式细胞仪 (FACS) 进行夹心珠法侦测人乳头状瘤病毒18E6重组蛋白之结果,以老鼠之抗人乳头状瘤病毒18E6单克隆抗体作为包被抗体,以兔子之抗人乳头状瘤病毒18E6多克隆抗体作为侦测抗体。

[0059] 图27说明以荧光流式细胞仪 (FACS) 进行夹心珠法侦测人乳头状瘤病毒16E7重组蛋白之结果,以老鼠之抗人乳头状瘤病毒16E7单克隆抗体作为包被抗体,以兔子之抗人乳头状瘤病毒16E7多克隆抗体作为侦测抗体。

[0060] 图28说明以荧光流式细胞仪 (FACS) 进行夹心珠法侦测人乳头状瘤病毒16E6重组蛋白之结果,以老鼠之抗人乳头状瘤病毒16E6单克隆抗体作为包被抗体,以兔子之抗人乳头状瘤病毒16E6多克隆抗体作为侦测抗体。

[0061] 图29说明以荧光流式细胞仪 (FACS) 进行夹心珠法侦测人乳头状瘤病毒18E6重组蛋白之结果,以老鼠之抗人乳头状瘤病毒18E6单克隆抗体作为包被抗体,以兔子之抗人乳头状瘤病毒18E6多克隆抗体作为侦测抗体。

[0062] 图30A说明利用与金颗粒共轭之兔子之抗人乳头状瘤病毒L1多克隆抗体进行之单步骤测流试验用以侦测人乳头状瘤病毒L1重组蛋白(由左至右:875,435,0微克/毫升)之结果,其与金颗粒共轭之兔子之抗人乳头状瘤病毒L1多克隆抗体在与人乳头状瘤病毒L1蛋白产生键结后会自薄膜上剥离,由此作为侦测试剂。

[0063] 图30B说明单步骤测流试验侦测鳞状细胞癌病患血清样本(左)之人乳头状瘤病毒L1重组蛋白之结果,与正常血清(人乳头状瘤病毒阴性)做比较,使用与图30B相同之方法。

[0064] 图30C说明利用与金颗粒共轭之老鼠之抗人乳头状瘤病毒E6单克隆抗体进行之单步骤测流试验用以侦测人乳头状瘤病毒E6重组蛋白(由左至右:10,2,0微克/毫升)之结果,其与金颗粒共轭之老鼠之抗人乳头状瘤病毒E6单克隆抗体在与人乳头状瘤病毒E6蛋白产生键结后会自薄膜上剥离,由此作为侦测试剂。

[0065] 图30D说明单步骤测流试验侦测鳞状细胞癌病患血清样本(由左至右为第一及第二)人乳头状瘤病毒L1蛋白之结果,与正常血清(人乳头状瘤病毒阴性)做比较,使用与图30C相同之方法。

[0066] 图30E说明利用与金颗粒共轭之老鼠之抗人乳头状瘤病毒E6单克隆抗体进行之单步骤测流试验用以侦测人乳头状瘤病毒E6重组蛋白(由左至右:875,435,0微克/毫升)之结果,其与金颗粒共轭之老鼠之抗人乳头状瘤病毒E6单克隆抗体在与人乳头状瘤病毒E6蛋白产生键结后会自薄膜上剥离,由此作为侦测试剂。

[0067] 图30F说明利用与金颗粒共轭之老鼠之抗人乳头状瘤病毒E7单克隆抗体进行之单步骤测流试验用以侦测人乳头状瘤病毒E7重组蛋白(由左至右:0,660,66,6.6,0.66微克/毫升)之结果,其与金颗粒共轭之老鼠之抗人乳头状瘤病毒E6单克隆抗体在与人乳头状瘤病毒E7蛋白产生键结后会自薄膜上剥离,由此作为侦测试剂。

[0068] 图30G说明单步骤测流试验侦测人乳头状瘤病毒阳性患血清样本(左)人乳头状瘤病毒E7蛋白之结果,与人乳头状瘤病毒阴性血清(右)做比较,使用与图30F相同之方法。

[0069] 本项发明摘要

[0070] 本项发明主体提供利用各式抗人乳头状瘤病毒重组蛋白之单克隆抗体进行各式免疫试验原位侦测人乳头状瘤病毒蛋白,此人乳头状瘤病毒蛋白包括感染高风险或低风险人乳头状瘤病毒型,其可被单一特异性单克隆抗体或一般泛抗体侦测到。在一实施案例中,一方法用来侦测人体人乳头状瘤病毒感染,利用一种或多种能与人乳头状瘤病毒早期蛋白产生键结之单克隆抗体,进行临床人类检体之免疫试验和人体细胞核染色。在另一实施案例中,一方法用来侦测人体人乳头状瘤病毒感染,利用一种或多种抗体,产生多种纯化后人乳头状瘤病毒重组蛋白,对临床检体之人体细胞进行免疫组织化学试验,并比较细胞核与细胞质之染色。另一方法亦用来侦测人体人乳头状瘤病毒感染,利用多种抗体与筛选自E6, E7, L1及其组合群蛋白之人乳头状瘤病毒蛋白产生键结,进行临床人类检体之免疫试验,并以两种以上抗体比较人体细胞染色情形,若至少一种以上抗体试验呈阳性染色结果,则表示人体受人乳头状瘤病毒感染。

[0071] 在一方面,本发明提供一抗人乳头状瘤病毒单克隆抗体,能应用于一免疫试验中,对人乳头状瘤病毒晚期感染之人类细胞进行细胞质染色。在另一面项中,本发明提供一抗人乳头状瘤病毒E7单克隆抗体和抗人乳头状瘤病毒E6单克隆抗体,能应用于一免疫试验中,对人类细胞进行细胞核染色,以表示在疾病发展阶段中之人乳头状瘤病毒感染状况。人乳头状瘤病毒感染之人体细胞的细胞核染色,显示人乳头状瘤病毒之早期感染,而细胞质之染色,则指出病变增生成为晚期疾病阶段。使用于免疫试验之抗人乳头状瘤病毒单克隆抗体包括,抗人乳头状瘤病毒E7、抗人乳头状瘤病毒E6和浓缩人乳头状瘤病毒L1单克隆抗体,以及其结合。在另一面项中,本发明提供一抗人乳头状瘤病毒E7单克隆抗体和人乳头状瘤病毒E7蛋白,作为生物标记,用以侦测子宫颈癌之增生。此外,本发明提供多种免疫试验之实施方法,包括免疫组织化学和免疫细胞化学分析。单克隆抗体对人乳头状瘤病毒蛋白具有高度专一性,亦可用于人乳头状瘤病毒侦测之免疫试验。在一实施案例中,以抗人乳头状瘤病毒单克隆抗体对上皮组织样本的细胞核染色,可显示一般人乳头状瘤病毒之感染。在另一实施案例中,以抗人乳头状瘤病毒单克隆抗体对上皮组织样本之细胞质染色,可显示人乳头状瘤病毒感染之病变增生。

[0072] 在另一方面,提供临床检体免疫试验之试剂盒,包含抗人乳头状瘤病毒单克隆抗体其能对人乳头状瘤病毒感染之人类细胞之细胞核进行染色,显示人乳头状瘤病毒之感染;对人乳头状瘤病毒感染之人类细胞之细胞质进行染色,则显示人乳头状瘤病毒晚期疾病阶段之感染。在另一方面,人体人乳头状瘤病毒感染之侦测试剂盒,包含一抗人乳头状瘤病毒单克隆抗体,其能用于人类临床检体中进行免疫试验,能对来自临床之人体细胞进行细胞核染色,并与人体细胞之细胞质染色做比较。

[0073] 本发明提供各式免疫试验,包括免疫组织化学,免疫细胞化学分析,及流细胞试验,利用各式抗人乳头状瘤病毒重组蛋白之单克隆抗体进行各式免疫试验原位侦测人乳头状瘤病毒蛋白,此人乳头状瘤病毒蛋白包括感染高风险或低风险人乳头状瘤病毒型,其可被单一特异性单克隆抗体或一般泛抗体侦测到。本发明亦提供人乳头状瘤病毒免疫细胞化学试验、人乳头状瘤病毒流细胞试验和人乳头状瘤病毒免疫组织化学试验,侦测子宫颈细胞或组织中乳头状瘤病毒蛋白之存在。此外,单克隆抗体对人乳头状瘤病毒蛋白具有高度专一性,可用于人乳头状瘤病毒免疫细胞化学或人乳头状瘤病毒流细胞试验。

[0074] 在一实施案例中,一免疫细胞试验方法用来原位侦测人体人乳头状瘤病毒感染,侦测玻片上含有人类细胞薄层之生物检体中,来自多种人乳头状瘤病毒型之人乳头状瘤病毒蛋白,利用多种抗体对人类细胞薄层进行染色。方法包含提供来自人体之临床检体,将检体制成不正常和正常形态之人类细胞均匀混合物溶液,将混合物于玻片上制成细胞薄层,以一种或多种抗多种纯化后人乳头状瘤病毒重组蛋白之抗体,进行免疫细胞化学试验,玻片上临床检体中的不正常和正常形态之细胞混合物中,来自一种或多种人乳头状瘤病毒型之一或多种人乳头状瘤病毒蛋白可被原位染色。

[0075] 在另一实施案例中,提供侦测人体人乳头状瘤病毒感染之方法,包括提供人类临床检体,该检体被制备成含有不正常和正常型态之人类细胞混合物之溶液,并以试剂标记一种或多种抗体,。利用一种或多种抗一种或多种纯化后人乳头状瘤病毒重组蛋白抗体,对含有不正常和正常型态之人类细胞混合物进行染色。该方法进一步包含进行一样或多样流细胞试验,将含有不正常和正常型态之人类细胞混合物之溶中单一细胞分离以进行侦测,侦测液态临床检体不正常和正常型态之人类细胞混合物中,一种或多种人乳头状瘤病毒型之人乳头状瘤病毒蛋白之存在。

[0076] 在一实施案例中,产生一种或多种抗一种或多种纯化后人乳头状瘤病毒重组蛋白之抗体,其中至少一种抗体可辨识人乳头状瘤病毒早期蛋白。在另一实施案例中,此一种或多种抗体以试剂进行标记,将人体生物样本中之多种人类细胞制备成溶液,各式抗体与来自各种人乳头状瘤病毒型之各种人乳头状瘤病毒蛋白产生键结,与被标记的抗体反应,藉由试剂的表达被侦测到。在另一实施案例中,试剂包括比色试剂、荧光染色试剂和其他试剂,作为流细胞试验中人类细胞分离和定性之试剂。

[0077] 此外,提供一进行免疫试验之试剂。该试剂包含抗体前封闭液、抗体后封闭液、抗人乳头状瘤病毒抗体作为一级抗体、与抗老鼠或抗兔子免疫球蛋白共轭之辣根过氧化物酶或生物素、或其他作为二级抗体之试剂,含有适当试剂之溶液作为二级抗体之基质被侦测。

[0078] 在另一实施案例中,提供试剂盒侦测人体人乳头状瘤病毒感染,包含抗人乳头状瘤病毒单克隆抗体,其能与人乳头状瘤病毒早期蛋白产生键结,以用来进行临床检体之免疫细胞化学试验,该检体被制备成含有不正常和正常型态之人类细胞混合物之溶液,,并置于玻片上形成细胞薄层,将一种或多种来自一种或多种人乳头状瘤病毒型之人乳头状瘤病毒蛋白加以原位染色。

[0079] 本发明提供多种固态表面免疫试验,利用各式抗人乳头状瘤病毒重组蛋白之单克隆抗体进行各式免疫试验原位侦测人乳头状瘤病毒蛋白,此人乳头状瘤病毒蛋白包括感染高风险或低风险人乳头状瘤病毒型,其可被单一特异性单克隆抗体或一般泛抗体侦测到。本发明亦提供人乳头状瘤病毒膜免疫印迹分析法、蛋白质晶片基因芯片试验、人乳头状瘤病毒微粒试验、人乳头状瘤病毒测流快速试验、人乳头状瘤病毒垂直通透快速试验、人乳头状瘤病毒微流体快速试验、酶免疫分析方法(EIA)和酶联免疫吸附试验(ELISA),侦测生物检体如子宫颈细胞或组织中人乳头状瘤病毒蛋白之存在。此外,亦提供进行这些试验的试剂和设备。

[0080] 在一实施案例中,提供一方法侦测多种人乳头状瘤病毒蛋白,提供一抗人乳头状瘤病毒抗体,能与临床检体中来自各种人乳头状瘤病毒型之多种人乳头状瘤病毒蛋白产生键结,提供一固体表面,包被抗人乳头状瘤病毒抗体或表达于细胞裂解物溶液中的病毒蛋

白;将临床检体制程细胞裂解溶液,其中含有多种人乳头状瘤病毒蛋白。方法进一步包含抗人乳头状瘤病毒抗体与细胞裂解物溶液进行反应,形成一含有多种人乳头状瘤病毒蛋白与抗人乳头状瘤病毒抗体复合物之固态玻片,侦测玻片上的复合物,确认临床检体中人乳头状瘤病毒蛋白之表达。

[0081] 在另一实施案例中,提供一方法侦测生物样本中,来自不同人乳头状瘤病毒型的一种或多种人乳头状瘤病毒蛋白之存在,并将生物样本制成细胞裂解溶液,将抗人乳头状瘤病毒第一抗体包被于固态表面,与细胞裂解溶液中的抗人乳头状瘤病毒第二抗体进行反应。两者抗体皆能与来自多种人乳头状瘤病毒型之人乳头状瘤病毒蛋白产生键结。方法进一步包括在固态表面形成多种人乳头状瘤病毒蛋白与抗人乳头状瘤病毒一级、二级抗体之复合物,藉侦测固态表面上复合物的形成,可侦测生物样本中一种或多种人乳头状瘤病毒蛋白之表达。

[0082] 此外,依据本发明一实施案例,提供一测流系统,可侦测制备成细胞裂解物溶液的临床样本中,来自一种或各种人乳头状瘤病毒型的一种或多种人乳头状瘤病毒蛋白,此测流系统包括:在玻片一端之固态表面包被上抗人乳头状瘤病毒抗体,该第一抗人乳头状瘤病毒抗体可与来自各式人乳头状瘤病毒型之一或多种人乳头状瘤病毒蛋白产生键结,因此能将细胞裂解物溶液中的人乳头状瘤病毒蛋白捕捉至固态表面;在玻片之另一端包被上第二抗人乳头状瘤病毒抗体,流经玻片之细胞裂解物溶液测流进入后,与第二抗体反应形成复合体,该第二抗体能与一种或多种人乳头状瘤病毒蛋白产生键结,因此能侦测临床样本中人乳头状瘤病毒蛋白之表达。

[0083] 在一方面,抗人乳头状瘤病毒第一抗体由抗一种或多种带有各式人乳头状瘤病毒基因之重组蛋白产生,该抗人乳头状瘤病毒第一抗体可捕捉固态表面上,细胞裂解溶液中的多种人乳头状瘤病毒蛋白。在另一方面,抗人乳头状瘤病毒第二抗体由带有相同人乳头状瘤病毒基因之相同第一重组蛋白产生,该抗人乳头状瘤病毒第二抗体能与固态表面上,细胞裂解溶液中的多种人乳头状瘤病毒蛋白产生键结并进行侦测。

[0084] 范例。

[0085] 范例一:表达、纯化并制备人乳头状瘤病毒重组蛋白,作为抗原,产生抗血清及抗人乳头状瘤病毒抗体,以融合瘤细胞株进行筛选形成单克隆抗体。

[0086] 人乳头状瘤病毒重组蛋白可为任何人乳头状瘤病毒蛋白及早期或晚期基因之人乳头状瘤病毒蛋白,包括但不限于E2,E6,E7,L1及L2,且可形成多种人乳头状瘤病毒型。E6,E7及L1之全段多肽序列,不仅难以被获得,且蛋白纯化时产生非预期之聚集现象,造成蛋白质不稳定和低度表达,且纯化后之蛋白抗原表达量低。例如,许多早期E6原致癌蛋白包含许多半胱氨酸,因而正确的E6原致癌蛋白拓图需要许多适切的双硫键之形成。此外,某些免疫学试验使用早期E6和E7蛋白之小分子胜肽,其侦测特异性和敏感度极低,且不适合作为临床活体诊断之工具。因此,本专利发明提供之重组蛋白,重组人乳头状瘤病毒原致癌蛋白之部分序列或全段续列,形成重组杂交蛋白。

[0087] 1).各式带有人乳头状瘤病毒16E6和人乳头状瘤病毒18E6基因的重组蛋白之克隆和产生。一来自人乳头状瘤病毒范例病毒型人乳头状瘤病毒16之E6早期原致癌范例基因被克隆,此克隆基因具有474个硷基对(b.p.)之脱氧核糖核酸片段,包含全部人乳头状瘤病毒16E6基因之157种胺基酸编码区,经聚合酶链反应(PCR)获得并加以扩增。分离出的脱氧核

醣核酸片段之脱氧核糖核酸序列经由与基因银行资料库的比对进行确认。重组蛋白人乳头状瘤病毒18E6亦可被获得。所有克隆步骤依据“分子克隆”，实验室手册，Sambrook, Fritsch and Maniatis, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. 一书所描述之方法。此外，人乳头状瘤病毒18E6基因亦被克隆及确认脱氧核糖核酸序列。

[0088] 2). 各式带有人乳头状瘤病毒16E7和人乳头状瘤病毒18E7基因的重组蛋白之克隆和产生。一来自人乳头状瘤病毒范例病毒型人乳头状瘤病毒16之早期原致癌范例基因E7被克隆，此克隆基因具有294个硷基对 (b.p.) 之脱氧核糖核酸片段，包含全部人乳头状瘤病毒16E7基因之99种胺基酸编码区，经聚合酶链反应获得并加以扩增。分离出的脱氧核糖核酸片段之脱氧核糖核酸序列经由与基因银行资料库的比对进行确认。人乳头状瘤病毒18E7重组蛋白亦被获得。此外，来自不同人乳头状瘤病毒型的E7脱氧核糖核酸片段，可由不同临床检体或来源被克隆。

[0089] 3). 带有人乳头状瘤病毒16L1和人乳头状瘤病毒18L1基因的重组蛋白之克隆和产生。一来自人乳头状瘤病毒范例病毒型人乳头状瘤病毒16之早期范例基因被克隆，1596个硷基对 (b.p.) 之脱氧核糖核酸片段，包含全部人乳头状瘤病毒16L1基因之531种胺基酸编码区，经聚合酶链反应获得并加以扩增。分离出的脱氧核糖核酸片段之脱氧核糖核酸序列经由与基因银行资料库的比对进行确认。此外，来自不同人乳头状瘤病毒型的L1脱氧核糖核酸片段，可由不同临床检体或来源被克隆。

[0090] 由His-标记表达系统获得人乳头状瘤病毒16L1蛋白之N端重组片段。人乳头状瘤病毒16L1N端重组蛋白之分子量约为34KD。L1C端片段亦可被获得。人乳头状瘤病毒18L1重组蛋白也能被获得，做为抗原产生抗血清、多克隆抗体和单克隆抗体。

[0091] 此专利描述之多种重组蛋白可表达于各种合适之系统中，诸如细菌、病毒、酵母菌和哺乳类表达系统，如大肠杆菌、酵母菌、杆状病毒和哺乳类之细胞培养等。虽多胜肽可由其他方式获得，专利提供之实施案例中，多种重组蛋白大部分(或几乎)为其原始型式，此构型在免疫分析试验中，更有可能与来自人乳头状瘤病毒感染人体组织之抗体产生键结。例如，GST, MBP或His标志-人乳头状瘤病毒16-E6, 人乳头状瘤病毒18E6, 人乳头状瘤病毒16E7, 人乳头状瘤病毒18E7, 人乳头状瘤病毒16L1, 和人乳头状瘤病毒18L1重组蛋白，利用IPTG驱动诱导，在大肠杆菌BL21 (DE3) 中被表达。诱导蛋白质表达后，标志-人乳头状瘤病毒重组蛋白经由培养细胞裂解后溶解部分被获得，并纯化至浓度约为0.1到1毫克/毫升或更高。人乳头状瘤病毒重组蛋白之纯度，经电泳PAGE分析，预估大于90%。人乳头状瘤病毒重组蛋白可用以侦测临床检体中人乳头状瘤病毒抗体之存在与否，也可做为抗原制造多克隆抗血清和单克隆抗体。

[0092] 此专利描述之各式表达载体的细胞培养包含多种人乳头状瘤病毒重组蛋白，放大至1公升，10公升或100公升甚至更高，以获得大量可溶的重组蛋白进行纯化。细胞裂解后可溶解部分，通过各式层析管柱，在适当的表达系统中与人乳头状瘤病毒重组蛋白之标记位置键结；标志-人乳头状瘤病毒重组蛋白在由管柱中被冲提出来，浓缩至100毫升，10毫升或1毫升。纯化后的水溶性人乳头状瘤病毒重组蛋白进一步以中性酸硷值缓冲液或磷酸盐缓冲液浓缩和透析，作为抗原产生抗人乳头状瘤病毒蛋白之抗血清。由溶解部份纯化出的水溶性人乳头状瘤病毒重组蛋白，摺叠方式与其在活体状态下原始摺叠方式相似。

[0093] 生产各种不同造型之单克隆抗体，获得高质量的纯化后人乳头状瘤病毒重组蛋白

是很重要的,抗体能辨识一般或特殊的抗原表位,用以侦测人乳头状瘤病毒感染。纯化后人乳头状瘤病毒重组蛋白,经由测试确认与来自临床人乳头状瘤病毒感染检体之人乳头状瘤病毒抗体的键结能力。该纯化后之人乳头状瘤病毒重组蛋白可作为抗原产生抗血清和抗体,在活体中辨识人乳头状瘤病毒自然病毒蛋白。范例二:生产抗人乳头状瘤病毒多克隆抗体。

[0094] 纯化大肠杆菌中表达之人乳头状瘤病毒E6,E7或L1重组蛋白,以磷酸盐浓缩透析后作为抗原。免疫反应按照标准程序进行,以酶联免疫吸附试验分析每一获得之血清,接着程序性增加及出血。收集滴定度最佳之血液,产生之血清经由蛋白质A管柱或亲合性管柱进行免疫球蛋白(Ig)之纯化;纯化后之免疫球蛋白G(IgG)作为人乳头状瘤病毒免疫针测分析之抗人乳头状瘤病毒抗体。

[0095] 此专利发明描述的单克隆抗体、多克隆抗体和血清之获得、纯化和试验,无论致病原因、细胞病灶、发炎反应或癌症之发展情况,可用以侦测人乳头状瘤病毒感染。其他研究者尝试发展抗人乳头状瘤病毒单克隆抗体却未得成果,因未能得到足够之人乳头状瘤病毒蛋白来产生单克隆抗体;无法产生高度专一性之单克隆抗体,因抗原不具免疫抗原性;或产生之抗体无法辨识临床检体早期人乳头状瘤病毒感染之人乳头状瘤病毒原始病毒造型。一些抗体产生抗突变之胜肽,仅能辨识晚期宫颈癌,但不确定其抗体辨识人乳头状瘤病毒野型之自然蛋白或任何早期人乳头状瘤病毒感染。此外,晚期人乳头状瘤病毒之侦测对疾病介入和治疗已太迟。

[0096] 此专利发明所描述之临床抗体应用,可藉适当之临床检体经人乳头状瘤病毒免疫侦测分析被证实,如酶联免疫吸附试验、免疫细胞化学试验、免疫组织化学试验。本发明之新型单克隆抗体和抗血清获得方法,可与具有早期细胞病灶,如子宫颈上皮内赘瘤和晚期人乳头状瘤病毒相关之宫颈癌,之临床检体的人乳头状瘤病毒蛋白反应并产生键结。此单克隆抗体和抗血清,为人乳头状瘤病毒相关致病原和早期晚期宫颈癌发展之侦测和筛选,提供了强而有利的侦测工具,因此提供疾病发展之介入和早期治疗之渠道。

[0097] 范例三:发展抗人乳头状瘤病毒单克隆抗体

[0098] 纯化在大肠杆菌表达之人乳头状瘤病毒E6,E7或L1重组蛋白,以磷酸盐浓缩和透析后作为抗原。小鼠之免疫反应测试按照标准程序进行,以酶联免疫吸附试验分析滴定每一获得之血清,接着程序性增加及出血。当小鼠之血清达最佳化时,以标准步骤融合小鼠之脾细胞和肿瘤细胞。克隆融合细胞,如融合瘤细胞,并进一步进行培养。

[0099] 1).融合瘤细胞筛选:为获得本专利所描述对各种人乳头状瘤病毒蛋白具有专一性键结能力之人乳头状瘤病毒产生抗体之融合瘤细胞,藉由筛选各种原始抗原和其他人乳头状瘤病毒蛋白作为正向筛选,非相关性的蛋白则作为负向筛选,以进行融合瘤细胞克隆。例如,两种以上纯化后人乳头状瘤病毒重组蛋白被筛选出,用以抗每一融合瘤细胞之克隆,并用以测试和了解所获得的每一产生抗体之融合瘤细胞株之专一性。

[0100] 2).融合瘤细胞株库:以免疫分析方法(如酶联免疫吸附试验,酶免疫分析方法和其他试验)克隆所希望之阳性反应及阴性反应之融合瘤细胞,并克隆至单一细胞。每一单一细胞经细胞培养而生长,当细胞数达每毫升含一百万个细胞时,将细胞冷冻保纯在摄氏零下80度或液态氮中,作为细胞库之存贮。

[0101] 3).腹水之产生:每一融合瘤细胞株在组织培养中生长,并注射至小鼠体中以产生

腹水。产生并收集之腹水做为以G蛋白管柱纯化之免疫球蛋白，每一融合瘤细胞株纯化出之免疫球蛋白是同型的，可应用于人乳头状瘤病毒免疫分析

[0102] 范例四：人乳头状瘤病毒免疫组织化学试验。

[0103] 1). 人乳头状瘤病毒免疫组织化学试剂和试验：在一实施案例中，提供进行人乳头状瘤病毒免疫组织化学试验的试剂。试剂包括抗原摄取试剂、抗体前封闭液、抗体后封闭液、抗人乳头状瘤病毒第一抗体、与抗老鼠或抗兔子免疫球蛋白共轭之辣根过氧化物酶或生物素或其他试剂作为之第二抗体、以及一溶液其中含有适当之试剂作为第二抗体被侦测之基质。

[0104] 抗原摄取试剂包含低酸硷值、中性酸硷值或高酸硷值之缓冲溶液。前抗体封闭液包含一些蛋白质、牛血清蛋白 (BSA)、血清或其他试剂，用以终止由抗体所产生非之特异性键结。后抗体封闭液与前抗体封闭液相似，含有少量蛋白质或血清，与第一抗体进行培养。含有人乳头状瘤病毒抗体之溶液可以为浓缩形式，或被稀释作为试剂之使用。抗人乳头状瘤病毒抗体可以辣根过氧化物酶、生物素或其它可被做为侦测基质之适当试剂直接标记。含有第二抗体之溶液可以为浓缩形式，或被稀释作为试剂之使用。基质溶液由可做为侦测基质之当试剂组成，包括DAB (3,3'-diaminobenzidine) 作为一组成成分或两种成分，或AEC (3-Amino-9-Ethylcarbazole) 基质作为一组成成分或两种成分，或其他基质。

[0105] 一旦子宫颈组织被制成和固定后，便进行免疫组织化学试验，玻片上的组织与抗原摄取试剂一起加热沸腾一段时间，然后将玻片冷却至室温，以前抗体封闭液进行封闭一段时间后，与人乳头状瘤病毒抗体进行培养。以磷酸盐、水或其他缓冲液清洗玻片，除去任何未键结之人乳头状瘤病毒抗体；将玻片与第二抗体进行培养，如抗老鼠IgG辣根过氧化物酶，以适当之基质进行侦测。试举一例，当过氧化物酶和过氧化氢存在时，DAB被氧化产生棕色沉淀，和酵素活性部位上之酒精不溶性沉淀；沉淀颜色依酵素含量呈淡金棕色至深金棕色，显微镜下金棕色沉淀，表示人乳头状瘤病毒抗体与玻片上组织细胞中表达的人乳头状瘤病毒蛋白产生专一性键结。此试验可在室温或高温下加速键结反应进行，该人乳头状瘤病毒免疫组织化学试验可徒手操作或以免疫组织化学自动仪进行，提供了人乳头状瘤病毒感染和人乳头状瘤病毒原致癌蛋白原位侦测之有力工具。因此，人乳头状瘤病毒免疫组织化学染色试验是非常有用的确认检查，对于结构不良细胞之确认，人乳头状瘤病毒免疫组织化学染色提供人乳头状瘤病毒感染或人乳头状瘤病毒原致癌蛋白表达情形之进一步信息。此外，不同阶段之子宫颈细胞结构不良，人乳头状瘤病毒E6和E7原致癌蛋白之过度表达，可能表示子宫颈上皮内赘瘤之增生或子宫颈癌之发展。

[0106] 2). 样本选择与制备：为了分析本发明所提供之抗人乳头状瘤病毒抗体是否能原位侦测不同子宫颈上皮内赘瘤病程或癌症之人乳头状瘤病毒蛋白，以免疫组织化学试验分析子宫颈组织，包括含有第二级子宫颈上皮内赘瘤 (子宫颈上皮内赘瘤第二级伴随中度病灶表达) 之高度鳞状上皮内病变 (HSIL)、第三级子宫颈上皮内赘瘤 (子宫颈上皮内赘瘤第三级伴随重度病灶表达)、含有鳞状细胞癌 (SCC, 子宫颈癌最常见之癌症) 之侵袭性癌症和腺癌 (ADC, 腺型肿瘤)。将蜡质组织块切割成4微米，至于玻片上培养在60℃隔夜；去蜡质/脱水部分则不遮蔽，进行标准免疫组织化学染色程序。将纯化后的抗人乳头状瘤病毒蛋白单克隆抗体稀释作为第一抗体，染色步骤依序为第二抗体溶液、清洗和适当之基质试剂。当片段形成时，立即以去离子水将玻片悬浮，以四溴萤光素进行复染，脱水后盖上盖玻片。

[0107] 3). 组织芯片:为了在一次均质试验反应中同时分析多个样本,以组织基因芯片将许多样本同时点在玻片上。将来自第二级子宫颈上皮内赘瘤,第三级子宫颈上皮内赘瘤或非侵袭性癌症共84组样本制备成三个组织基因芯片:一阵列包含30个第二级子宫颈上皮内赘瘤个体及其周围正常上皮细胞;另一阵列包含30个第三级子宫颈上皮内赘瘤个体及其周围正常上皮细胞;最后一阵列包含12%子宫颈鳞状上皮细胞癌以及其周围正常上皮细胞,12个腺癌样本及其正常上皮相关细胞,距离肿瘤边缘至少15毫米的阴道或子宫颈黏膜。在每一子宫颈上皮内赘瘤病例中,选择一肿瘤形成之代表性组织阵列点,和另一代表其正常相关组织之基因芯片点;在非侵袭性癌症病例中,选择两个组织为阵列点,和一个正常相关组织基因芯片点。取得人乳头状瘤病毒脱氧核糖核酸比对之组织玻片后,回收来自相关蜡嵌入组织块之2毫米的阴道或子宫颈黏膜。在每一子宫颈上皮内赘瘤病例中,选择一肿瘤形成之代表性组织阵列点圆形组织阵列点。

[0108] 4). 人乳头状瘤病毒脱氧核糖核酸测试:每一病例之人乳头状瘤病毒脱氧核糖核酸比对,使用EasyChip®人乳头状瘤病毒点墨法或HR-人乳头状瘤病毒晶片,藉由修饰有MY11/GP6+聚合酶链反应-基准之反-免疫印迹分析法进行确认,其在尼龙滤膜上含有13种特异性之寡核苷酸,以全部细胞脱氧核糖核酸作为核苷酸的来源,放大后藉杂交进行侦测。

[0109] 5). 免疫组织化学程度和数据分析:组织芯片上每一阵列点之染色结果,由专业之解剖病理学家以显微镜进行分析,肿瘤细胞或结构不良性细胞之面积,经细胞染色后计算其百分比,染色深浅分为0-3个等级。正常邻近上皮细胞,或与其相关之结构不良细胞和肿瘤相距15毫米的阴道或子宫颈黏膜。在每一子宫颈上皮内赘瘤病例中,选择一肿瘤形成之代表性组织阵列点的正常组织皆纳入等级分类;所有数据结果皆由专业病理学家进行分级,将10%的染色部分切下以进行阳性或阴性试验,所有数据在表1-17中显示。

[0110] 为证明能够侦测非侵袭性子宫颈癌之人乳头状瘤病毒蛋白,鳞状上皮细胞癌是最常见的子宫颈癌,将鳞状细胞癌组织进行人乳头状瘤病毒免疫组织化学试验。图1A-1D说明以老鼠人乳头状瘤病毒E7单克隆抗体进行鳞状上皮细胞癌组织免疫组织化学染色之结果。图1A说明以浓缩人乳头状瘤病毒E7老鼠单克隆抗体,对组织基因芯片中的鳞状细胞癌组织进行免疫组织化学染色之代表性影像图。图1B说明图1A中,鳞状细胞癌个案之正常上皮细胞(与肿瘤组织相距15毫米)代表性影像图。图1C说明使用相同浓缩人乳头状瘤病毒E7老鼠单克隆抗体,对组织基因芯片另一鳞状细胞癌样本进行免疫组织化学染色之代表性影像图。图1D说明图1C中肿瘤细胞细胞质以相同浓缩人乳头状瘤病毒E7抗体染色后之放大影像图。研究结果显示,E7原致蛋白癌的表达可在鳞状细胞癌组织中的肿瘤细胞被侦测到,黑色实心箭头标示出肿瘤细胞中E7蛋白之特异性染色,而空心箭头则标示出未被染色的正常细胞。这些结果显示,鳞状细胞癌子宫颈组织中的人乳头状瘤病毒E7蛋白,可藉由浓缩人乳头状瘤病毒E7抗体进行免疫组织化学试验被原位侦测。

[0111] 在另一类型非侵袭性子宫颈癌的人乳头状瘤病毒蛋白侦测中,图2A-2C说明以相同老鼠人乳头状瘤病毒E7单克隆抗体,对子宫颈腺癌进行免疫组织化学染色。结果显示,腺癌组织中的肿瘤细胞,可侦测到E7原致癌蛋白的表达,黑色实心箭头标示出肿瘤细胞中E7蛋白之专一性染色,而空心箭头则标示出未被染色之正常细胞。图2A说明以图1中相同之浓缩人乳头状瘤病毒E7抗体,对腺癌多克隆样本之肿瘤细胞进行免疫组织化学染色的代表性影像图。图2B图2A中,腺癌样本之相关性正常上皮细胞(与肿瘤组织相距15毫米)代表性影

像图。图2C说明图2A中腺癌肿瘤细胞的细胞质染色放大影像图,由放大的影像图可标示出在肿瘤细胞细胞质中E7蛋白表达的位置。这些结果显示,以E7单克隆抗体进行免疫组织化学染色,可侦测腺癌的肿瘤细胞,且与鳞状细胞癌染色型态相似。

[0112] 分析每一侵袭性癌症之人乳头状瘤病毒 免疫组织化学结果,表1说明24个免疫组织化学侵袭性癌症样本细胞质(C)、细胞核(N)染色之结果,在图1A-1D和图2A-2C中,以C或N表示浓缩人乳头状瘤病毒E7抗体染色之百分比。附加的抗人乳头状瘤病毒抗体包含其他抗E7抗体、抗人乳头状瘤病毒E6抗体,如MAb1和MAb 7,以及抗人乳头状瘤病毒L1抗体,皆以相同的组织基因芯片进行测试。为了进行各种抗人乳头状瘤病毒抗体之免疫组织化学染色,使用另一浓缩人乳头状瘤病毒抗体对肿瘤细胞的细胞质染色,免疫组织化学分级结果说明于表1,人乳头状瘤病毒脱氧核糖核酸比对之结果亦说明于表中,作为相关性样本。

[0113] 表1结果说明,以抗E7抗体对鳞状细胞癌和腺癌的肿瘤细胞进行染色,可发现细胞核和细胞质皆被染色;然而,与肿瘤细胞的细胞核染色做比较,细胞质的染色程度较大。在其邻近正常上皮细胞中,仅在细胞核侦测到人乳头状瘤病毒E7蛋白的表达,而未在细胞质中测得人乳头状瘤病毒E7蛋白表达,与正常邻近细胞做比较,肿瘤细胞的细胞质明显的被染色。这些结果说明,鳞状细胞癌和腺癌组织中的肿瘤细胞,在其细胞质和细胞核中可侦测到人乳头状瘤病毒E7蛋白的表达。E7蛋白的表达位置在肿瘤细胞的细胞质中,而非正常上皮细胞或基质细胞,显示出其对肿瘤存在特异性。藉由抗E7抗体,侦测表达在正常邻近上皮细胞和肿瘤细胞的人乳头状瘤病毒E7蛋白,可显示原致癌蛋白表达的人乳头状瘤病毒感染。使用其他抗人乳头状瘤病毒抗体的类似染色型态说明于表1,结果显示此处所描述之人乳头状瘤病毒免疫组织化学试验,可侦测到表达于子宫颈组织肿瘤细胞中的人乳头状瘤病毒早期基因,如E6和E7,以及晚期基因L1蛋白。

[0114] 比较人乳头状瘤病毒 免疫组织化学及人乳头状瘤病毒脱氧核糖核酸比对之结果,抗E7抗体对所有测试样本中的人乳头状瘤病毒型呈阳性反应。此处所描述之浓缩E7单克隆抗体可侦测单一人乳头状瘤病毒型感染,诸如人乳头状瘤病毒16,人乳头状瘤病毒18,人乳头状瘤病毒33和人乳头状瘤病毒45此类与癌症相关之人乳头状瘤病毒型(高风险人乳头状瘤病毒型)。单一抗E7单克隆抗体也可侦测多种病毒型感染的人乳头状瘤病毒,如人乳头状瘤病毒11,人乳头状瘤病毒16,人乳头状瘤病毒18,人乳头状瘤病毒52,人乳头状瘤病毒58,人乳头状瘤病毒51和人乳头状瘤病毒59这些病毒型之结合,包含高风险、低风险和非原致癌基因 α -人乳头状瘤病毒;然而,多重人乳头状瘤病毒型之感染,其中至少含有一种高风险型人乳头状瘤病毒。这些结果显示,本发明中描述之浓缩E7抗体是非专一性的,因此可作为有利之工具,侦测子宫颈癌常见之一般高风险病毒型的人乳头状瘤病毒E7蛋白。

[0115] 表1:12个鳞状细胞癌生物检体和12个腺癌生物检体之免疫组织化学染色结果(% stained染色百分比)以及人乳头状瘤病毒脱氧核糖核酸比对结果(C:细胞质;N:细胞核;Dys:结构不良性或肿瘤细胞)

[0116]

样本 #	HPV 型	抗-E7				另一抗-E7	抗-E6	另一抗-E6	抗-L1
		Dys (%stained)		Normal epith. (% stained)		Dys (%)	Dys (%)	Dys. (%)	Dys. (%)
		C	N	C	N	C	C	C	C
SCC-1	18	85	8 5	0	2 0	12.5	10	70	55
SCC-2	16, 52	90	8 5	0	2 5	15	15	10	55
SCC-3	16	60	6 5	0	4 0	5	0	10	20
SCC-4	16	92	5 0	0	4 0	5	0	10	85
SCC-5	16, 52, 58	92	5 5	0	5 0	20	5	15	88
SCC-6	18, 52, 58	90	6 0			25	18	10	70
SCC-7	16, 52	92	7 5	0	3 0	30	5	10	20
SCC-8	16, 58	10	1 0	0	5	0	0	10	50
SCC-9	no DNA	95	6 0	0	4 0	25	8	15	8
SCC-10	18	92	6 5	0	6 0	45	25	20	65
SCC-11	16, 58			0	8 0	5		0	0
SCC-12	33	95	9 0	0	0	30	1	20	55
腺癌-1	16, 18	30	2	0	5	15	25	20	82

[0117]

			0	0					
腺癌-2	no DNA	62	4 0	0	3 0	35	70	35	78
腺癌-3	16	20	3 0	0	2 0	35	55		60
腺癌-4	16, 18	80	8 0	0	0	10	5	0	90
腺癌-5	51, 52	95	8 0	0	5 0	10	70	15	92
腺癌-6	11, 16, 52			0	4 0	5	0	0	15
腺癌-7	18	50	4 0	0	6 0	25	20	20	75
腺癌-8	18	85	6 0	0	4 0	15	50	15	82
腺癌-9	45	82	5 5	0	3 0	30	2	20	40
腺癌-10	18	15	1 0	0	4 0	15	15	5	70
腺癌-11	18, 59	70	0	0	5 0	15	8	5	65
腺癌-12	18								30

[0118] 侦测非侵袭性严重结构性不良子宫颈组织(高度鳞状上皮内病变;高度鳞状上皮病变,第3期)的人乳头状瘤病毒蛋白,图3说明以相同老鼠人乳头状瘤病毒E7单克隆抗体,对第三级子宫颈上皮内赘瘤组织进行免疫组织化学染色之结果,结果显示在第三级子宫颈上皮内赘瘤组织中,可侦测到E7原致癌蛋白的表达;黑色实心箭头指出在结构不良性细胞中对E7蛋白的专一性染色,空白箭头则表示未被染色的正常细胞。图3A说明以图1和图2侦测侵袭性癌组织的相同抗人乳头状瘤病毒E7抗体,结构不良性细胞的第三级子宫颈上皮内赘瘤组织进行免疫组织化学染色之代表性影像图。图3B说明图3A中第三级子宫颈上皮内赘瘤组织的邻近正常上皮细胞代表性影像图。这些结果显示,藉由老鼠之抗人乳头状瘤病毒E7抗体,进行此处所描述之免疫组织化学试验,可原位侦测第三级子宫颈上皮内赘瘤子宫颈组织的人乳头状瘤病毒E7蛋白表达。

[0119] 分析每一第三级子宫颈上皮内赘瘤个案的人乳头状瘤病毒 免疫组织化学结果,表2说明30个子宫颈上皮内赘瘤3样本之免疫组织化学等级,进行细胞膜(M)、细胞质(C)和细胞核(N)染色,以M,C或N表示抗E7抗体之染色程度(%)。附加的抗人乳头状瘤病毒抗体包括抗人乳头状瘤病毒E6抗体,如MAb1和MAb7,以及抗人乳头状瘤病毒L1抗体,皆在相同组织基因芯片中被测试。不同抗人乳头状瘤病毒抗体之免疫组织化学染色结果,以另一抗人乳头状瘤病毒抗体对肿瘤细胞的细胞质进行染色,免疫组织化学等级如表1所示。人乳头状瘤

病毒脱氧核糖核酸比对结果亦说明于表中,作为相关性样本。

[0120] 如表2所示,利用抗E7抗体进行试验,在所有第三级子宫颈上皮内赘瘤样本中,发现结构不良性细胞的细胞核被染色,仅部分样本发现细胞质被染色。结果显示结构性不良细胞的细胞质被染色部分较细胞核多,亦如前述之侵袭性癌组织中,邻近正常上皮细胞中的人乳头状瘤病毒E7蛋白仅在细胞核中被发现,而非在细胞质中被发现;与结构不良性邻近的正常细胞做比较,细胞质的染色在结构不良性细胞中最为清楚。E7蛋白的表达位置在结构不良性细胞的细胞质,而非正常的上皮细胞或基质细胞,显示其对高度鳞状上皮内病变的专一性。这些结果显示,在第三级子宫颈上皮内赘瘤组织中的细胞质和结构不良性细胞的细胞核中,可侦测到人乳头状瘤病毒E7蛋白的表达;以浓缩人乳头状瘤病毒E7抗体可侦测人乳头状瘤病毒E7蛋白在正常邻近上皮细胞的细胞核和结构良性细胞中表达,显示受人乳头状瘤病毒感染且伴随原致癌蛋白表达。蛋白高度表达的案例中,侦测其结构不良性细胞之细胞质,可专一性指出结构不良性细胞的增生。表2说明使用另一浓缩人乳头状瘤病毒抗体,可得到相似的染色型态,结果显示此处所描述之人乳头状瘤病毒免疫组织化学试验,可侦测人乳头状瘤病毒早期基因如E6和E7,以及晚期基因L1蛋白,在第三级子宫颈上皮内赘瘤结构不良性细胞中的表达。

[0121] 比较人乳头状瘤病毒 免疫组织化学和脱氧核糖核酸比对之结果,抗E7抗体对测试样本中所有表达的人乳头状瘤病毒型呈阳性反应。例如,此处所描述之抗人乳头状瘤病毒E7单克隆抗体可侦测单一人乳头状瘤病毒感染,至少为人乳头状瘤病毒16,人乳头状瘤病毒18,人乳头状瘤病毒31,人乳头状瘤病毒33,人乳头状瘤病毒39和人乳头状瘤病毒58与癌症相关(高风险人乳头状瘤病毒型)之其中一种病毒型。单一抗人乳头状瘤病毒E7单克隆抗体亦可侦测两种以上人乳头状瘤病毒型的感染,例如常见之高风险人乳头状瘤病毒型人乳头状瘤病毒16,人乳头状瘤病毒18,人乳头状瘤病毒33,人乳头状瘤病毒39,人乳头状瘤病毒52和人乳头状瘤病毒58。这些结果显示,本专利发明所描述之抗人乳头状瘤病毒E7抗体是非专一性的,可作为侦测C13组织中,常见高风险人乳头状瘤病毒型的人乳头状瘤病毒E7蛋白之有利侦测工具。

[0122] 表2:30组子宫颈上皮内赘瘤3样本之免疫组织化学染色(染色%和等级0-3)结果和人乳头状瘤病毒脱氧核糖核酸比对结果(M:细胞膜;C:细胞质;N:细胞核;Dys:结构不良性细胞)

样本 #	HPV 型	抗-E7						抗-E6	另一抗-E7	抗-L1
		Dysplasia (%stained)			Normal epithelium (%stained)			Dys. (%)	Dys. (%)	Dys. (%)
		M	C	N	M	C	N	Cyto	Cyto	Cyto
31	33	0	80	80	0	0	50	70	40	80
32	16	0	80	80			60	0	0	5
33	16, 58				0	0	60			
34	31	0	50	70	0	0	50	0	0	10
35	16, 39	0	70	90	0	0	40	0	10	30
36	31	0	70	60	0	0	50	0	20	20
37	39	0	0	40	0	0	0	0	0	0
38	16				0	0	40			
39	16	0	60	70	0	0	40	0		0
40	58	0	90	90	0	0	50	50	0	30
41	16	0	0	50	0	0	50	0	20	20
42	16	0	70	70	0	0	30	0	0	
43	33	0	0	90	0	0	50	0	0	5
44	52	0	70	80	0	0	50	70	10	50
45	51, 52	0	90	90	0	0	30	80	50	10
46	16	0	0	80	0	0	50	0	0	5
47	16	0	60	80	0	0	50	30	10	20
48	16, 58	0	0	80	0	0	50	0	0	10
49	31	0	80	60			50	70	40	40
50	16	0	0	60	0	0	30	0	20	20
51	6				0	0	20		0	
52	16, 18, 33, 39	0	0	20	0	0	30	0	0	0
53	51, 52, 58	0	70	60	0	0		60	60	40
54	16, 45	0	0	70	0	0	50	0	20	20
55	16	0	0	75	0	0	50	0	0	0
56	33, 52	0	0	80	0	0	50	0	0	10
57	16	0	0	50	0	0	40	0	0	0
58	33	0	0	80	0	0		0	20	10
59	16	0	0	60	0	0	20	0	10	5
60	16, 52, 58	0	70	80	0	0	50	70	0	20

[0123]

[0124] 侦测高度鳞状上皮内病变伴随中度不典型增生(第二级子宫颈上皮内赘瘤)中的人乳头状瘤病毒蛋白,图4说明以老鼠之抗人乳头状瘤病毒E6单克隆抗体对第二级子宫颈

上皮内赘瘤组织进行免疫组织化学染色之结果,结果显示可侦测第二级子宫颈上皮内赘瘤早期E6原致癌蛋白之表达。图4A说明第二级子宫颈上皮内赘瘤组织以抗人乳头状瘤病毒E6单克隆抗体进行免疫组织学染色之代表性影像图。图4B说明图4A中第二级子宫颈上皮内赘瘤样本结构不良性组织的邻近正常上皮细胞之代表性影像图。图4C说明以相同抗人乳头状瘤病毒E6单克隆抗体,对另一第二级子宫颈上皮内赘瘤样本结构不良性组织上皮细胞进行免疫组织化学染色之代表性影像图。图4D为图4C之放大代表性影像图,黑色实心箭头指出结构不良性细胞中E6蛋白的专一性染色,空心箭头则指出未被染色之正常细胞。在第三级子宫颈上皮内赘瘤中可发现与第二级子宫颈上皮内赘瘤相似的染色型态,显示出E6蛋白的表达位置是在结构不良性细胞之细胞质中,而非其他细胞和基质细胞。这些结果显示,第二级子宫颈上皮内赘瘤子宫颈组织的人乳头状瘤病毒E6蛋白之原位表达,可藉由老鼠之抗人乳头状瘤病毒E6单克隆抗体进行免疫组织化学染色而被侦测到。

[0125] 分析每一第二级子宫颈上皮内赘瘤个案的人乳头状瘤病毒 免疫组织化学结果,表3说明30个子宫颈上皮内赘瘤2样本之免疫组织化学等级,进行细胞膜(M)、细胞质(C)和细胞核(N)染色,以M,C或N表示抗E7抗体之染色程度(%)。附加的抗人乳头状瘤病毒抗体包括抗人乳头状瘤病毒E6抗体,如MAb1和MAb7,以及抗人乳头状瘤病毒L1抗体,皆在相同组织基因芯片中被测试。不同抗人乳头状瘤病毒抗体之免疫组织化学染色结果,以另一抗人乳头状瘤病毒抗体对肿瘤细胞的细胞质进行染色,免疫组织化学等级如表3所示。人乳头状瘤病毒脱氧核糖核酸比对结果亦说明于表中,作为相关性样本。

[0126] 如表3所示,利用抗E6或抗E7抗体进行试验,在所有第二级子宫颈上皮内赘瘤样本中,发现结构不良性细胞的细胞核被染色,仅部分样本发现细胞质被染色。结果显示,在第二级子宫颈上皮内赘瘤样本中,结构性不良细胞的细胞核被染色部分较细胞质多,亦如前述之鳞状细胞癌,腺癌和第三级子宫颈上皮内赘瘤样本中,邻近正常上皮细胞的人乳头状瘤病毒E7蛋白仅在细胞核中被发现,而非在细胞质中被发现;与邻近的正常细胞做比较,以抗E6抗体对第二级子宫颈上皮内赘瘤细胞质的染色,在结构不良性细胞中最为清楚。E6蛋白的表达位置在结构不良性细胞的细胞质,而非正常的上皮细胞或基质细胞,显示其对高度鳞状上皮内病变的专一性。这些结果显示,在第二级子宫颈上皮内赘瘤组织中的细胞质和结构不良性细胞的细胞核中,可侦测到人乳头状瘤病毒E6蛋白的表达;在结构不良性细胞之细胞质中侦测到人乳头状瘤病毒E6蛋白高度表达的案例,可说明结构不良性细胞的增生。表3说明使用另一浓缩人乳头状瘤病毒抗体,可得到相似的染色型态,结果显示此处所描述之人乳头状瘤病毒免疫组织化学试验,可侦测人乳头状瘤病毒早期基因如E6和E7,以及晚期基因L1蛋白,在第二级子宫颈上皮内赘瘤结构不良性细胞中的表达。

[0127] 比较人乳头状瘤病毒 免疫组织化学和脱氧核糖核酸比对之结果,抗E7抗体对测试样本中所有表达的人乳头状瘤病毒型呈阳性反应。例如,此处所描述之抗E7单克隆抗体可侦测单一人乳头状瘤病毒感染,至少为人乳头状瘤病毒16,人乳头状瘤病毒18,人乳头状瘤病毒31,人乳头状瘤病毒52和人乳头状瘤病毒58与癌症相关(高风险人乳头状瘤病毒型)之其中一种病毒型,以及人乳头状瘤病毒6和人乳头状瘤病毒53非高风险之人乳头状瘤病毒型。单一抗人乳头状瘤病毒E7单克隆抗体亦可侦测两种以上人乳头状瘤病毒型的感染,例如常见之高风险或低风险人乳头状瘤病毒型人乳头状瘤病毒6,人乳头状瘤病毒16,人乳头状瘤病毒18,人乳头状瘤病毒31,人乳头状瘤病毒39,人乳头状瘤病毒44,人乳头状瘤病

毒52,人乳头状瘤病毒58,人乳头状瘤病毒66,人乳头状瘤病毒68,以及其结合型。这些结果显示,本专利发明所描述之抗人乳头状瘤病毒E7抗体是非病毒型专一性的,可侦测第二级子宫颈上皮内赘瘤组织中,来自常见高风险和低风险人乳头状瘤病毒型的人乳头状瘤病毒E7蛋白。结构不良性细胞的形成原因,可能来自原致癌蛋白的表达,而非人乳头状瘤病毒型的基因型;这解释了感染高风险人乳头状瘤病毒型,且未在细胞质中侦测到原致癌蛋白时,可能产生复原。因此,本专利描述之人乳头状瘤病毒免疫组织化学试验,不仅提供临床侦测人乳头状瘤病毒感染之额外信息,亦可侦测结构不良性细胞增生的迹象。

[0128] 表3:30组子宫颈上皮内赘瘤2样本之免疫组织化学染色(染色%和等级0-3)结果和人乳头状瘤病毒脱氧核糖核酸比对结果(M:细胞膜;C:细胞质;N:细胞核;Dys:结构不良性细胞)

[0129]

样本 #	HPV 型	抗-E7						抗-E6	另一抗-E7	抗-L1			
		Dysplasia (% stained)			Normal epithelium (%stained)						Dys. (%)	Dys. (%)	Dys. (%)
		M	C	N	M	C	N				Cyto	Cyto	Cyto
1	6	0	80	80	0	0	30	70	40	80			
2	31	0	0	90				0	40	0			
3	52	0	25	50	0	0	70	0	20	20			
4	16	0	0	40	0	0	30	0	5	0			

[0130]

5	58	0	0	50	0	0	10	0	0	0
6	52	0	80	70	0	0	50	0	5	0
7	53	0	0	80	0	0	30	0	10	10
8	52	0	50	90	0	0	20	60	10	20
9	31	0	80	80	0	0	50	70	20	40
10	16	0	50	80	0	0	50	60	20	10
11	no DNA	0	0	50	0	0	70	0	0	10
12	33	0	60	60	0	0	50	0	10	30
13	no DNA	0	70	80	0	0	70	0	20	10
14	52	0	0	70	0	0	70	0	30	20
15	no DNA	0	0	70	0	0	50	0	20	5
16	52	0	0	10	0	0	30	0	0	5
17	52	0	0	60	0	0	80	0	0	5
18	16	0	50	60	0	0	30	50	10	20
19	16	0	50	70				0	10	20
20	52, 44	0	50	80	0	0	40	0	30	30
21	16	0	0	50	0	0	50	0	20	20
22	16, 18, 6	0	0	40	0	0	0	0	10	0
23	16, 31	0	0	30	0	0	60	0	0	
24	6	0	0	80	0	0	50	0	10	5
25	16	0	0	10	0	0	60	0	0	0
26	58	0	0	40	0	0	40	0	10	5
27	16, 39, 52				0	0	70		0	
28	6	0	0	50	0	0	70	0	10	5
29	16	0	0	70	0	0	5	0	10	20
30	66, 68,	0	0	30	0	0	60	0	10	0

[0131] 与正常细胞相较,细胞质染色仅在结构不良性细胞中被发现且明显可辨,因此可作为结构不良性细胞增生之试验依据。为了进一步比较不同子宫颈上皮内赘瘤程度或癌组织结构不良性细胞的专一性细胞质染色,分析表1-3中之数据以获得试验结果。每一案例中,染色程度大于10%即判定为阳性,小于10%者则为阴性。如表4数据所示,试验的阳性比率随子宫颈上皮内赘瘤严重程度增加,从38%,52%至100%,在第二级子宫颈上皮内赘瘤(CIN2),第三级子宫颈上皮内赘瘤(CIN3),鳞状细胞癌(SCC)或腺癌(ADC)病例中亦如此。阳性预测值(PPV)和阴性预测值(NPV)亦表示于表中,显示以细胞质染色百分比作为试验之专

一性。

[0132] 表4:各种不同发展中子宫颈癌及组织病灶之组织切片样本,以抗E7抗体进行免疫组织化学染色之结果

[0133]

	抗-E7	结构不良 或癌 细胞质 染色	正常 细胞 细胞质 染色	免疫组 织化学 阳性百 分比	专一性		
CIN2	阳性	11	0	38%	100%	100%	PPV
	阴性	18	28			61%	NPV
CIN3	阳性	14	0	52%	100%	100%	PPV
	阴性	13	28			68%	NPV
SCC	阳性	11	0	100%	100%	100%	PPV
	阴性	0	11			100%	NPV
ADC	阳性	10	0	100%	100%	100%	PPV
	阴性	0	10			100%	NPV

[0134] 人乳头状瘤病毒E7原致癌蛋白之表达可藉由另一抗E7单克隆抗体被侦测到,以相同组织基因芯片进行测试,结果呈现于表5,说明以另一E7抗体进行之试验分析,对第二级宫颈上皮内赘瘤,第三级宫颈上皮内赘瘤,鳞状细胞癌和腺癌之侦测,分别具有72%,48%,67%,83%之阳性比率。阳性预测值(PPV)和阴性预测值(NPV)亦表示于表中,显示以该抗体进行试验之专一性不佳。

[0135] 表5:各种不同发展中子宫颈癌及组织病灶之组织切片样本,以另一抗E7抗体进行免疫组织化学染色之结果

[0136]

	抗-E7	结构不良 或癌 细胞质 染色	正常 细胞 细胞质 染色	免疫组 织化学 阳性百 分比	专一性		
CIN2	阳性	21	16	72%		57%	PPV
	阴性	8	9		36%	53%	NPV
CIN3	阳性	13	4	48%		76%	PPV
	阴性	14	25		86%	64%	NPV

[0137]

SCC	阳性	8	5	67%		62%	PPV
	阴性	4	6		55%	60%	NPV
ADC	阳性	10	6	83%		63%	PPV
	阴性	2	6		50%	75%	NPV

[0138] 为了证实人乳头状瘤病毒E6蛋白可利用抗E6单克隆抗体进行侦测,以相同组织基因芯片进行测试,结果呈现于表6-7,说明以另一两种抗E6抗体进行之试验分析。如数据所示,来自第二级子宫颈上皮内赘瘤,第三级子宫颈上皮内赘瘤和非侵袭性癌症之肿瘤细胞的结构不良性细胞,其细胞质中E6蛋白之表达,可被本专利描述之抗E6抗体侦测到。在抗E7抗体免疫组织化学试验中,随子宫颈上皮内赘瘤严重程度而增加的阳性比率,在抗E6抗体试验中呈相同增加趋势。两种抗E6抗体在试验中,随子宫颈上皮内赘瘤严重程度呈现相同的阳性比率增加趋势,而其中一抗E6抗体在试验中的表达优于另一抗E6抗体;MAb1可能辨识与MAb7不同之抗原表位,因此造成不同的试验结果。然而,如表中所示,这两种单克隆抗体皆具有高度之阳性预测值(PPV)和阴性预测值(NPV)。以抗E7抗体进行的所有免疫组织化学试验,其阳性比率高于使用抗E6抗体之试验,可能是因E7蛋白比E6蛋白的表达时间较早,因此可作为子宫颈癌之早期侦测的生物标记。

[0139] 表6:各种不同发展中子宫颈癌及组织病灶之组织切片样本,以抗E6抗体进行免疫组织化学染色之结果

[0140]

	抗-E6	结构不良 或癌 细胞质 染色	正常细胞 细胞质染色	免疫组织 化学阳性 百分比	专一性		
CIN2	阳性	5	1	17%		83%	PPV
	阴性	25	29		97%	54%	NPV
CIN3	阳性	17	7	57%		71%	PPV
	阴性	13	23		77%	64%	NPV
SCC	阳性	7	1	64%		88%	PPV
	阴性	4	10		91%	71%	NPV
ADC	阳性	9	0	75%		100%	PPV
	阴性	3	12		100%	80%	NPV
合计	阳性	38	9	46%	0	81%	PPV
	阴性	45	74	0	89%	62%	NPV

[0141] 表7:各种不同发展中子宫颈癌及组织病灶之组织切片样本,以另一抗E6抗体进行免疫组织化学染色之结果

[0142]

	另一 抗-E6	结构不良或癌 细胞质 染色	正常细 胞 细胞质 染色	免疫组织 化学阳性 百分比	专一性		
CIN2	阳性	5	0	17%		100%	PPV
	阴性	24	28		100%	54%	NPV
CIN3	阳性	8	0	30%		100%	PPV
	阴性	19	29		100%	60%	NPV
SCC	阳性	11	0	92%		100%	PPV
	阴性	1	11		100%	92%	NPV
ADC	阳性	9	0	75%		100%	PPV
	阴性	3	12		100%	80%	NPV
合计	阳性	33	0	41%	0	100%	PPV
	阴性	47	80	0	100%	63%	NPV

[0143] 以相同组织基因芯片,利用抗L1抗体进行免疫组织化学试验,侦测不同子宫颈上皮内赘瘤阶段,L1病毒蛋白之表达。由L1抗体对细胞质进行染色,获得不同免疫组织化学等级结果,分析所有样本之阳性比率。研究不同子宫颈上皮内赘瘤阶段之人乳头状瘤病毒早期和晚期蛋白原位表达间之相关性,表8说明免疫组织化学试验,第二级子宫颈上皮内赘瘤,第三级子宫颈上皮内赘瘤和侵袭性癌症的细胞质中,E7和L1蛋白表达之阳性比率。以本发明所述之人乳头状瘤病毒免疫组织化学试验,比较不同子宫颈上皮内赘瘤阶段和非侵袭性癌症组织中E7和L1表达之相关性,结果显示E7似乎是子宫颈癌早期侦测之良好生物标记。表8说明子宫颈上皮内赘瘤样本经免疫组织化学试验呈L1阳性结果者,其中第二级子宫颈上皮内赘瘤约有60% (15个样本中有9个),第三级子宫颈上皮内赘瘤约有58% (19个样本中有11个) 在E7免疫组织化学试验中呈阳性。非侵袭性癌症样本呈L1细胞质阳性之比率,鳞状细胞癌(11个样本中有11个)和腺癌(10个样本中有10个)皆为100%,呈E7细胞质阳性,显示癌症的发展与E7的表达具有100%相关性。研究结果显示,第二级子宫颈上皮内赘瘤/3样本L1和E7细胞质皆呈阳性反应者,与L1阳性但E7阴性者相较下,具有较高的结构不良性细胞发展之风险。

[0144] 表8同时说明样本细胞质中E7和E6阳性表达之关连性,如数据所示,E7细胞质呈阳性表达之样本,其对E6细胞质表达之阳性比率,第二级子宫颈上皮内赘瘤约为45% (11个样本中有5个),第三级子宫颈上皮内赘瘤为57% (14个样本中有8个),鳞状细胞癌为100% (11个样本中有11个),腺癌则为90% (10个样本中有9个)。这些结果显示,在结构不良性细胞早期发展中,E6在E7之后才表达,但在子宫颈癌晚期则共同表达。

[0145] 表8:各种不同发展中子宫颈癌及组织病灶之组织切片样本,以抗E7抗体进行免疫组织化学染色,并与抗L1及抗E6比较之结果

[0146]

总样本数	CIN2		CIN3		SCC		ADC	
	L1 (+)	L1 (-)	L1 (+)	L1 (-)	L1 (+)	L1 (-)	L1 (+)	L1 (-)
E7 阳性	9	2	11	3	11	0	10	0
E7 阴性	6	8	8	5	0	0	0	0
总样本数	E6 (+)	E6 (-)	E6 (+)	E6 (-)	E6 (+)	E6 (-)	E6 (+)	E6 (-)
E7 阳性	5	6	8	6	11	0	9	1
E7 阴性	0	17	0	13	0	0	0	0

[0147] 为了在单一反应中,使各种不同疾病程度之样本,能在均质条件下进行试验,利用组织基因芯片将第二级子宫颈上皮内赘瘤,第三级子宫颈上皮内赘瘤和非侵袭性癌症之各式样本收集于同一玻片上。制备两组组织基因芯片:一阵列为各包含10组样本之第二级子宫颈上皮内赘瘤,第三级子宫颈上皮内赘瘤,鳞状细胞癌以及其邻近正常上皮细胞;另一阵列为第二级子宫颈上皮内赘瘤,第三级子宫颈上皮内赘瘤,腺癌以及其邻近正常上皮细胞各10组样本。为了进一步确认人乳头状瘤病毒 免疫组织化学试验对人乳头状瘤病毒相关之结构不良性细胞或子宫颈癌具有专一性,另外制备一组织基因芯片,含有来自各式正常人类组织的90种以上样本,在人乳头状瘤病毒免疫组织化学试验中作为负控制组。以抗E6和抗E7抗体进行相同的人乳头状瘤病毒 免疫组织化学试验,可应用于这些组织基因芯片中,以获得前述之免疫组织化学染色百分比;细胞核或细胞质染色率达10%以上者即归类为阳性反应。

[0148] 所有组织基因芯片试验之免疫组织化学数据,呈现于表9-14。表9说明各式子宫颈癌发展中及组织病灶切片检体样本,以老鼠之抗人乳头状瘤病毒E7抗体进行免疫组织化学染色之结果。研究数据显示,不同病程阶段之子宫颈组织,由第二级子宫颈上皮内赘瘤,第三级子宫颈上皮内赘瘤和侵袭性癌组织如鳞状上皮细胞癌或腺癌(ADC)样本中,可藉增加的阳性比率侦测人乳头状瘤病毒E7蛋白的原位表达。样本中第二级子宫颈上皮内赘瘤和第三级子宫颈上皮内赘瘤的阳性比率分别为72%和90%。在癌组织中(鳞状上皮细胞癌和腺癌)以抗人乳头状瘤病毒E7抗体进行免疫组织化学染色,100%的样本呈阳性结果,表示100%的癌症皆表达人乳头状瘤病毒原致癌基因蛋白。这些结果显示,本专利发明描述之人乳头状瘤病毒E7抗体进行免疫组织化学试验,可作为由不同病程之组织中诊断出子宫颈癌之有利工具。

[0149] 表9:各种不同发展中子宫颈癌及组织病灶之组织切片样本,以抗人乳头状瘤病毒E7单克隆抗体进行免疫组织化学染色之结果

免疫组织化学	CIN2	CIN3	SCC	ADC	total
抗人乳头状瘤病毒 E7 染色阴性	34	43	22	23	122
抗人乳头状瘤病毒 E7 染色阳性	13	5	0	0	18
阳性率	72%	90%	100%	100%	87%

[0151] 将表9的数据进一步分析,以获得试验之结果。表10说明表9中免疫组织化学染色之结果,以正常人类组织作为第二级子宫颈上皮内赘瘤阴性反应之样本。实验数据显示,以抗人乳头状瘤病毒E7抗体进行免疫组织化学染色,对第二级子宫颈上皮内赘瘤+之敏感度达87%,专一性达92%。这些结果显示,该试验可有效应用于侦测人乳头状瘤病毒蛋白,以进行子宫颈病灶第二级子宫颈上皮内赘瘤之确认。

[0152] 表10:以老鼠之抗人乳头状瘤病毒E7单克隆抗体,对第二级子宫颈上皮内赘瘤+病灶进行免疫组织化学染色,并与子宫颈上皮内赘瘤阴性样本做比较之结果

	CIN2+	CIN 阴性	
抗人乳头状瘤病毒 E7 染色阳性	122	7	95% PPV
抗人乳头状瘤病毒 E7 染色阴性	18	85	83% NPV
敏感度	87%		
专一性		92%	

[0154] 为了进一步分析数据,表11说明表9和表10中免疫组织化学阴性之结果,显示以本发明描述之抗人乳头状瘤病毒E7抗体,对第三级子宫颈上皮内赘瘤+(包括第三级子宫颈上皮内赘瘤和侵袭性癌症)进行免疫组织化学试验,敏感度达95%,专一性达92%,阳性预测值(PPV)达93%,阴性预测值(NPV)为95%。这些结果显示,该试验可于临床应用中侦测人乳头状瘤病毒蛋白,以进行子宫颈病灶不同病程之确认。

[0155] 表11:以老鼠之抗人乳头状瘤病毒E7单克隆抗体,对第三级子宫颈上皮内赘瘤+病灶进行免疫组织化学染色,并与子宫颈上皮内赘瘤阴性样本做比较之结果

		CIN3+	CIN negative	
[0156]	抗人乳头状瘤病毒 E7 染色阳性	88	7	93% PPV
	抗人乳头状瘤病毒 E7 染色阴性	5	85	94% NPV
	敏感度	95%		
	专一性		92%	

[0157] 为了确认利用本发明所描述之抗E6抗体进行免疫组织化学试验,是否可侦测E6蛋白之表达,使用相同的组织基因芯片,以抗E6抗体进行免疫组织化学试验。表12-14说明以抗人乳头状瘤病毒E6抗体进行另一人乳头状瘤病毒免疫组织化学试验之结果,如数据所示,比较抗E6和抗E7抗体之免疫组织化学结果。

[0158] 表12:各种不同发展中子宫颈癌及组织病灶之组织切片样本,以抗人乳头状瘤病毒E6单克隆抗体进行免疫组织化学染色之结果

[0159]

免疫组织化学	CIN2	CIN3	SCC	ADC	total
抗人乳头状瘤病毒 E6 染色阳性	32	35	23	17	107
抗人乳头状瘤病毒 E6 染色阴性	17	15	1	7	40
阳性率	65%	70%	96%	71%	73%

[0160] 表12说明各种不同发展中子宫颈癌及组织病灶之组织切片样本,以抗人乳头状瘤病毒E6抗体进行免疫组织化学染色之结果。研究数据显示,以本发明描述之老鼠之抗人乳头状瘤病毒E6单克隆抗体进行免疫组织化学试验,可侦测人乳头状瘤病毒E6蛋白。来自不同病程阶段之子宫组织的人乳头状瘤病毒E6蛋白,可原位侦测其表达。如数据所示,由第二级子宫上皮内赘瘤,第三级子宫上皮内赘瘤和侵袭性癌组织如鳞状上皮细胞癌或腺癌(ADC)样本中,可藉增加的阳性比率侦测人乳头状瘤病毒E6蛋白的原位表达。如数据所示,在第二级子宫上皮内赘瘤,第三级子宫上皮内赘瘤和癌组织鳞状上皮细胞癌样本中,人乳头状瘤病毒E6蛋白的表达呈阳性且随比例增加;样本中第二级子宫上皮内赘瘤和第三级子宫上皮内赘瘤的阳性比率分别为65%和70%。在癌组织中,96%的鳞状细胞癌样本以抗人乳头状瘤病毒E6抗体进行免疫组织化学染色呈阳性,而ADC样本仅71%呈阳性,表示人乳头状瘤病毒E6原致癌基因在鳞状细胞癌的表达高于AD。这些结果显示,以本发明所描述之人乳头状瘤病毒E6抗体进行免疫组织化学试验,提供作为确认不同病程子宫颈癌组织之诊断工具。

[0161] 表13:以老鼠之抗人乳头状瘤病毒E6单克隆抗体,对第二级子宫上皮内赘瘤+病灶进行免疫组织化学染色,并与子宫上皮内赘瘤阴性样本做比较之结果

[0162]

	CIN2+	CIN阴性	
抗人乳头状瘤病毒E6染色阳性	107	12	90%PPV
抗人乳头状瘤病毒E6染色阴性	40	80	67%NPV
敏感度	73%		
专一性		87%	

[0163] 为了进一步分析数据,表13说明表11和表12中免疫组织化学染色之结果,显示以本发明描述之抗人乳头状瘤病毒E6抗体,对第二级子宫颈上皮内赘瘤+进行HIC试验,敏感度达73%,专一性达87%。这些结果显示,该试验可于临床应用中侦测人乳头状瘤病毒蛋白,以进行子宫颈病灶不同病程之确认。

[0164] 表14:以老鼠之抗人乳头状瘤病毒E7单克隆抗体,对第三级子宫颈上皮内赘瘤+病灶进行免疫组织化学染色,并与子宫颈上皮内赘瘤阴性样本做比较之结果

[0165]

	CIN3+	CIN 阴性	
抗人乳头状瘤病毒 E6 染色阳性	75	7	91% PPV
抗人乳头状瘤病毒 E6 染色阴性	23	85	79% NPV
敏感度	77%		
专一性		92%	

[0166] 为了进一步分析数据,表14说明表13中免疫组织化学染色之结果,显示以本发明描述之抗人乳头状瘤病毒E6抗体,对第三级子宫颈上皮内赘瘤进行HIC试验,敏感度达77%,专一性达92%,阳性预测值为91%,阴性预测值为79%。这些结果显示,该试验可于临床应用中侦测人乳头状瘤病毒蛋白,以进行子宫颈病灶不同病程之确认。

[0167] 范例五:人乳头状瘤病毒 免疫细胞化学试验

[0168] 样本制备:传统子宫颈抹片样本和液态细胞学样本,这两种形式之样本可应用于免疫细胞化学试验。子宫颈细胞直接由玻片上之抹片或液体溶液中分为两部分,一作为细胞学抹片染色,另一部份以本发明描述之人乳头状瘤病毒抗体进行免疫组织化学染色。依据抹片染色之结果,将样本分为0-17个等级,等级1-3为正常,等级4以上则属于不正常。不正常细胞包括不同病程阶段之鳞状上皮细胞,可能发展成就不良性细胞或病灶;例如,LSIL:低度鳞状上皮内病变、HSIL:高度鳞状上皮病变、CIN1:子宫颈上皮内赘瘤,轻度细胞变异、CIN2:子宫颈上皮内赘瘤伴随增生性病灶、CIN3:子宫颈上皮内赘瘤伴随结构不良性增生,侵袭性癌症则包括鳞状细胞癌(SCC)、腺癌(ADC)以及其他。未被定义之变异性细胞,如ASCUS:意义不明的不典型鳞状细胞和抹片中不正常或非典型细胞,仍无清楚之结论,其差异性亦未被确定。已被定义之变异性细胞,人乳头状瘤病毒免疫细胞化学染色可提供人乳头状瘤病毒感染或原致癌蛋白表达之附加信息,因此,与子宫颈抹片染色相较,人乳头状瘤病毒免疫细胞化学染色可更有效应用于侦测低度鳞状上皮内病变或高度鳞状上皮内病变非正常细胞,或侦测其他未被定义之不正常细胞,如ASCUS或AGUS。

[0169] 以免疫细胞化学方法作为一免疫试验范例,将子宫颈抹片之细胞直接涂抹在玻片上,或收集于液体溶液中,经离心和纯化及免疫染色后,进行免疫细胞化学步骤。收集于液体溶液中的子宫颈抹片依操作程序,将子宫颈细胞进行细胞离心或薄层技术制成单层细胞,将玻片上的薄层细胞固定,以抗人乳头状瘤病毒抗体染色,进行人乳头状瘤病毒 免疫细胞化学步骤,被染色的细胞以显微镜进行观察。

[0170] 在一实施案例中,提供进行免疫细胞化学试验之试剂。该试剂包含前抗体封闭液、后-抗体封闭液、抗人乳头状瘤病毒抗体作为第一抗体、抗老鼠或抗兔子免疫球蛋白共轭辣根过氧化物酶或生物素、或其他作为第二抗体之试剂,含有适当试剂之溶液作为第二抗体之基质被侦测。

[0171] 抗人乳头状瘤病毒抗体可直接标记上辣根过氧化物酶、生物素或其他试剂,以利下一步适当试剂作为基质时被侦测。前抗体封闭液则包含部分蛋白质、BSA、血清或其他试剂,用以终止细胞对抗体之非特异性键结。后-抗体封闭液与前抗体封闭液成分相似,含有少量蛋白质或血清,与第一抗体进行培养。含有人乳头状瘤病毒抗体之溶液可以为浓缩形式,或被稀释作为试剂之使用。抗人乳头状瘤病毒抗体亦直接标记有辣根过氧化物酶、生物素或其它试剂,可被做为基质之适当试剂侦测。含有第二抗体之溶液可以为浓缩形式,或被稀释作为试剂之使用。溶液中含有适当之试剂作为基质,包括DAB (3,3'-diaminobenzidine) 作为一组成成分或两种成分,或AEC (3-Amino-9-Ethylcarbazole) 基质作为一组成成分或两种成分,或其他基质。

[0172] 当分离出子宫颈抹片中的人类细胞,并在玻片上固定成薄层或薄片后,封闭液先与人乳头状瘤病毒抗体共同培养,以前抗体封闭液终止玻片一段时间,进行免疫细胞化学试验。之后将玻片以磷酸盐、水或其他溶液清洗3到5次,移除未键结的人乳头状瘤病毒抗体;将玻片与第二抗体如抗老鼠IgG辣根过氧化物酶进行培养,以适当之基质进行侦测。试举一例,当过氧化物酶和过氧化氢存在时,DAB被氧化产生棕色沉淀,和酵素活性部位上之酒精不溶性沉淀;沉淀颜色依酵素含量呈淡金棕色至深金棕色,显微镜下金棕色沉淀,表示人乳头状瘤病毒抗体与玻片上组织细胞中表达的人乳头状瘤病毒蛋白产生专一性键结。此试验可在室温或高温下加速键结反应进行,该人乳头状瘤病毒免疫细胞化学试验可徒手操作或以免疫细胞化学自动仪进行,提供了子宫颈抹片上皮细胞中人乳头状瘤病毒感染和人乳头状瘤病毒原致癌蛋白原位侦测之有力工具。

[0173] 为进一步证实人乳头状瘤病毒 免疫细胞化学试验可应用于不同阶段之结构不良性细胞,测试不同早期、中期或晚期阶段之病灶。测试样本包括但不限于早期病灶低度鳞状上皮内病变,第一级子宫颈上皮内赘瘤或意义不明的不典型鳞状细胞,中期病灶第二级子宫颈上皮内赘瘤,第三级子宫颈上皮内赘瘤或高度鳞状上皮内病变,以及晚期病灶鳞状细胞癌和腺癌。使用不同溶态溶液制备不同病程阶段的样本,进行本专利所述之免疫细胞化学试验,以证实该试验可应用于各式不同来源、不同病程阶段和不同液态溶液之样本。

[0174] 人乳头状瘤病毒 免疫细胞化学试验可用于确认标准细胞学抹片染色所无法确认之不正常细胞,例如ASCUS(意义不明的不典型鳞状细胞,在抹片中之不正常或不典型细胞,无定论且不确定其差异性),或AGUS(不确定性非典型腺体),人乳头状瘤病毒 免疫细胞化学试验即用于测试意义不明的不典型鳞状细胞样本。如图5A所示,免疫细胞化学试验结果说明,某些经抹片染色被诊断为意义不明的不典型鳞状细胞之子宫颈抹片细胞,以抗E6单

克隆抗体进行免疫细胞化学染色呈阳性反应。图5B显示与图5A同样本之免疫细胞化学试验结果,说明某些子宫颈抹片细胞(经抹片染色被诊断为意义不明的不典型鳞状细胞),以抗E7单克隆抗体进行免疫细胞化学染色呈阳性反应。如图5A和5B所示,高N/C(细胞核/细胞质)值的不正常细胞(以黑色箭头标示)呈阳性染色,正常细胞(大且型态不规则,细胞核小)染色则呈阴性,以白色箭头标示。图5A和5B皆说明子宫颈抹片意义不明的不典型鳞状细胞样本,可侦测其不正常细胞中的人乳头状瘤病毒E6和人乳头状瘤病毒E7蛋白,此结果显示意义不明的不典型鳞状细胞样本中含有受人乳头状瘤病毒感染之细胞,且伴随E6和E7原致癌蛋白之表达,因此可以老鼠之抗人乳头状瘤病毒E6及抗人乳头状瘤病毒E7单克隆抗体进行免疫细胞化学试验原位侦测。

[0175] 人乳头状瘤病毒 免疫细胞化学试验可侦测高度鳞状上皮内病变细胞,图6A说明以抹片染色诊断为第二级子宫颈上皮内赘瘤之子宫颈细胞,以另一液态溶液进行制备,利用抗E7单克隆抗体进行免疫细胞化学试验呈阳性染色。如图6A所示,第二级子宫颈上皮内赘瘤,高度鳞状上皮内病变不正常细胞具有高N/C(细胞核/细胞质)值(以黑色箭头表示),其细胞核和细胞质染色呈阳性。这些结果显示,以老鼠-人乳头状瘤病毒E7对不同来源的液态溶液进行免疫细胞化学试验,可侦测到在不同阶段肿瘤的不正常细胞中原位表达的人乳头状瘤病毒E7蛋白。

[0176] 另一范例中,图6B说明另一子宫颈细胞之第二级子宫颈上皮内赘瘤样本,以另一液态溶液进行制备后,经抗E6单克隆抗体进行免疫细胞化学染色试验呈阳性反应。如果图6B所示,第二级子宫颈上皮内赘瘤,高度鳞状上皮内病变不正常细胞具有高N/C(细胞核/细胞质)值(以黑色箭头表示),其细胞核和细胞质染色呈阳性。这些结果显示,以老鼠-人乳头状瘤病毒E6对不同来源的液态溶液进行免疫细胞化学试验,可侦测到在不同阶段肿瘤的不正常细胞中原位表达的人乳头状瘤病毒E6蛋白。

[0177] 本发明描述之免疫细胞化学试验,可确认中期到晚期子宫颈上皮内赘瘤细胞,以不同溶液配制的第三级子宫颈上皮内赘瘤子宫颈抹片样本,亦能进行该免疫细胞化学试验。图7A说明子宫颈抹片细胞(抹片染色诊断为第三级子宫颈上皮内赘瘤),以浓缩E6单克隆抗体进行免疫细胞化学染色呈阳性反应。图7B-7E说明以相同浓缩E6老鼠单克隆抗体,分析另一第三级子宫颈上皮内赘瘤样本;如图所示,高度鳞状上皮内病变不正常细胞N/C(细胞核/细胞质)值高(以黑色箭头表示),故与其他细胞连结在一起,染色结果呈阳性反应。这些结果显示,中期/晚期肿瘤不正常细胞中,人乳头状瘤病毒E6蛋白的原位表达,在不同来源的液态溶液中,可利用老鼠之抗人乳头状瘤病毒单克隆抗体经免疫细胞化学试验进行侦测;来自第三级子宫颈上皮内赘瘤液态溶液中的不正常细胞之人乳头状瘤病毒E6蛋白的原位表达,可藉老鼠之抗人乳头状瘤病毒单克隆抗体经免疫细胞化学试验进行侦测。

[0178] 图7E说明与图7B相同之第三级子宫颈上皮内赘瘤样本,以抗人乳头状瘤病毒E7老鼠单克隆抗体进行免疫细胞化学染色之结果。图3F说明另一免疫细胞化学染色结果,与图3E使用相同抗人乳头状瘤病毒E7老鼠单克隆抗体;如图所示,第三级子宫颈上皮内赘瘤中高度鳞状上皮内病变不正常细胞N/C(细胞核/细胞质)值高(以黑色箭头表示),故与其他细胞连结在一起,染色结果呈阳性反应。这些结果显示,中期肿瘤不正常细胞中,人乳头状瘤病毒E7蛋白的原位表达,在不同来源的液态溶液中,可利用老鼠之抗人乳头状瘤病毒单克隆抗体经免疫细胞化学试验进行侦测;来自第三级子宫颈上皮内赘瘤液态溶液中的不正常

细胞之人乳头状瘤病毒E7蛋白的原位表达,可藉老鼠之抗人乳头状瘤病毒单克隆抗体经免疫细胞化学试验进行侦测。

[0179] 为了确认晚期肿瘤中p16也成过渡表达状态,以抗p16老鼠单克隆抗体对相同的第三级子宫颈上皮内赘瘤样本进行免疫细胞化学染色。图7G说明与图7B-7F相同之第三级子宫颈上皮内赘瘤样本,以抗p16老鼠单克隆抗体进行免疫细胞化学染色之结果,如图所示,第三级子宫颈上皮内赘瘤中高度鳞状上皮内病变不正常细胞N/C(细胞核/细胞质)值高(以黑色箭头表示),故与其他细胞连结在一起,染色结果呈阳性反应。这些结果显示,中期到晚期肿瘤不正常细胞中,p16蛋白的原位表达,在不同来源的液态溶液中,可利用老鼠之抗人乳头状瘤病毒单克隆抗体经免疫细胞化学试验进行侦测;来自第三级子宫颈上皮内赘瘤液态溶液中的不正常细胞之人乳头状瘤病毒E6,人乳头状瘤病毒E7和p16的原位表达,可藉老鼠单克隆抗体经免疫细胞化学试验进行侦测。

[0180] 本处所描述之免疫细胞化学试验可作为另一范例,应用于侦测液态溶液中之子宫颈癌细胞,子宫颈抹片样本中不同的癌肿瘤以不同溶液进行制备,进行免疫细胞化学试验分析。图8说明子宫颈癌细胞(经抹片染色诊断为腺癌以抗)-E6单克隆抗体进行免疫细胞化学染色呈阳性反应;其中,具有高N/C(细胞核/细胞质)值(以黑色箭头表示)的不正常细胞,染色呈阳性,与其他细胞连结之高度鳞状上皮内病变不正常细胞亦呈阳性染色反应。这些结果显示,液态溶液中的腺癌子宫颈细胞,其人乳头状瘤病毒E6蛋白之表达,可藉抗人乳头状瘤病毒E6老鼠单克隆抗体进行免疫细胞化学试验加以侦测。

[0181] 本处所描述之免疫细胞化学试验也可应用于侦测另一液态溶液中的子宫颈癌另一种病毒型,图9A说明另一型子宫颈癌细胞鳞状细胞癌(经抹片染色诊断为鳞状细胞癌),以抗E6单克隆抗体进行免疫细胞化学染色呈阳性反应。图9B说明相同鳞状细胞癌样本以抗人乳头状瘤病毒E7老鼠单克隆抗体进行免疫细胞化学染色之结果。图9C说明同鳞状细胞癌样本以抗p16老鼠单克隆抗体进行免疫细胞化学染色之结果。如图所示,高度鳞状上皮内病变鳞状细胞癌细胞之细胞核和细胞质染色呈阳性反应,表示不同病毒型子宫颈癌细胞于液态溶液中,其人乳头状瘤病毒E6和人乳头状瘤病毒E7蛋白之原位表达,可利用抗人乳头状瘤病毒E6或E7老鼠单克隆抗体,进行免疫细胞化学试验加以侦测。为了确认晚期肿瘤中p16也成过渡表达状态,以抗p16老鼠单克隆抗体对相同的鳞状细胞癌样本进行免疫细胞化学染色。图9C说明与图9A-9B相同鳞状细胞癌样本,以抗p16老鼠单克隆抗体进行免疫细胞化学染色之结果,显示晚期肿瘤中的p16蛋白表达可被侦测到;说明来自不同病毒型子宫颈癌液态溶液中的不正常细胞,其人乳头状瘤病毒E6,人乳头状瘤病毒E7和p16蛋白的原位表达,可藉老鼠单克隆抗体经免疫细胞化学试验进行侦测。

[0182] 为了确认本处所描述之免疫细胞化学染色结果,说明子宫颈抹片细胞中原位表达的人乳头状瘤病毒蛋白与人乳头状瘤病毒抗体为专一性键结,亦将液态溶液中所获得正常的子宫颈细胞进行免疫细胞化学试验分析。图10A说明以液态溶液制备的子宫颈抹片细胞(抹片染色诊断为正常者),以抗E6单克隆抗体进行免疫细胞化学试验呈阴性染色反应;相同的样本以抗E7单克隆抗体进行免疫细胞化学试验结果说明于图10B。研究结果显示,正常细胞中所表达的人乳头状瘤病毒E6或E7蛋白,以抗人乳头状瘤病毒E6或E7单克隆抗体进行免疫细胞化学试验,皆呈阴性染色结果;表示本发明所描述之免疫细胞化学试验,是一专一性染色方法,以人乳头状瘤病毒特异性抗体侦测人乳头状瘤病毒蛋白。

[0183] 细胞层级中之免疫细胞化学染色结果,图11A说明以抗人乳头状瘤病毒E6老鼠单克隆抗体,对液态溶液制备的子宫颈抹片细胞之细胞质进行染色。图7B说明与图11A同一样本,以抗人乳头状瘤病毒E7老鼠单克隆抗体进行细胞核染色之结果。图11C说明以抗人乳头状瘤病毒E7老鼠单克隆抗体,对另一样本进行细胞质染色之代表性影像图。如图所示,不正常细胞具有高N/C(细胞核/细胞质)值(以黑色箭头表示),染色结果呈阳性;而正常细胞(大,细胞型态不规则,且细胞核小)染色结果则呈阴性反应,以白色箭头表示。这些结果说明,本发明描述之抗人乳头状瘤病毒E6和E7老鼠单克隆抗体,可侦测细胞或细胞核中人乳头状瘤病毒E6和E7蛋白之表达。

[0184] 人乳头状瘤病毒E6和E7原致癌蛋白可在某些低度鳞状上皮内病变或子宫颈上皮内赘瘤中度细胞病变中表达,图12A-12C说明以抗人乳头状瘤病毒E6老鼠单克隆抗体,对临床诊断为第一级子宫颈上皮内赘瘤样本之液态溶液,进行免疫细胞化学染色之结果。图12B-12C说明使用与图12A相同抗人乳头状瘤病毒E6老鼠单克隆抗体,进行免疫细胞化学染色之结果。图12D说明与图12A相同之第一级子宫颈上皮内赘瘤样本,以抗人乳头状瘤病毒E7老鼠单克隆抗体进行免疫细胞化学染色之结果。图12E使用与图12D相同抗人乳头状瘤病毒E7老鼠单克隆抗体,进行免疫细胞化学染色之结果。如图所示,不正常的低度鳞状上皮内病变和第一级子宫颈上皮内赘瘤细胞彼此间相互连结,或具有高的N/C(细胞核/细胞质)值(以黑色箭头表示),其细胞核和细胞质染色结果呈阳性反应。这些结果说明,利用抗人乳头状瘤病毒E6或E7抗体进行免疫细胞化学试验,人乳头状瘤病毒E6和E7蛋白的原位表达,可在液态溶液制备的早期肿瘤样本中被侦测到。为了确认早期肿瘤中p16蛋白是否表达,以抗p16老鼠单克隆抗体对第一级子宫颈上皮内赘瘤样本进行免疫细胞化学染色。图12F说明与图12A-12E相同之第一级子宫颈上皮内赘瘤样本,以抗p16老鼠单克隆抗体进行免疫细胞化学试验之结果,显示该样本早期肿瘤中无法侦测到p16蛋白。所有结果说明,人乳头状瘤病毒E6和人乳头状瘤病毒E7蛋白之原位表达,可利本发明描述之用抗人乳头状瘤病毒E6或E7老鼠单克隆抗体,对早期肿瘤之不正常细胞进行侦测,而抗p16老鼠单克隆抗体进行免疫细胞化学试验,则无法侦测到p16蛋白之表达。

[0185] 免疫细胞化学试验不仅可侦测人乳头状瘤病毒感染,亦能原位侦测人乳头状瘤病毒原致癌蛋白。因此,相对于标准人乳头状瘤病毒脱氧核糖核酸试验或抹片试验,单独的免疫细胞化学试验,或与其他各式专一性或一般抗人乳头状瘤病毒抗体结合后,可成为原位侦测人乳头状瘤病毒之有利工具。

[0186] 表15:以抗人乳头状瘤病毒E6老鼠单克隆抗体对各式子宫颈抹片液态溶液样本进行免疫细胞化学试验之结果

[0187]

子宫颈抹片	normal	ASCUS	ASC-H	CIN1	CIN2/3	SCC
ICC 免疫细胞化学 抗人乳头状瘤病毒 E7 染色阳性	4	3	4	11	17	4
ICC 免疫细胞化学 抗人乳头状瘤病毒 E7 染色阴性	25	6	4	6	0	1
合计	29	9	8	17	17	5
阳性率	14%	33%	38%	65%	100%	80%

[0188] 表15说明以抗人乳头状瘤病毒E6老鼠单克隆抗体对各式子宫颈抹片液态溶液样本进行免疫细胞化学试验之结果。结果说明,使用抗人乳头状瘤病毒E6老鼠单克隆抗体,对固定于玻片上之单一细胞进行免疫细胞化学试验,可原位侦测人乳头状瘤病毒E6蛋白之表达,且样本可为各种病程阶段之子宫颈抹片液态溶液样本。将相同的样本进行抹片染色与免疫细胞化学染色结果作比较,图表15所示,人乳头状瘤病毒E6蛋白的表达,随子宫颈抹片正常,意义不明的不典型鳞状细胞,ASC-H,第一级子宫颈上皮内赘瘤和第二级子宫颈上皮内赘瘤/3样本,呈正向增加之趋势。

[0189] 经抹片诊断为第二级子宫颈上皮内赘瘤/3之样本,100%呈阳性反应,而被诊断为正常染色之样本,以相同之抗人乳头状瘤病毒E6抗体进行免疫细胞化学染色试验,有14%呈阳性反应。意义不明的不典型鳞状细胞或ASC-H样本中,使用与表15中第一级子宫颈上皮内赘瘤和第二级子宫颈上皮内赘瘤/3样本相同之抗人乳头状瘤病毒E6抗体,约有33%至50%呈阳性染色结果,表示这些意义不明的不典型鳞状细胞或ASC-H样本中原致癌蛋白的表达,将更进一步形成癌症的增生。抹片染色诊断为意义不明的不典型鳞状细胞但免疫细胞化学染色(抗人乳头状瘤病毒E6抗体)呈阴性的样本,发展成增生病灶的风险可能较低。

[0190] 表16:以抗人乳头状瘤病毒E6老鼠单克隆抗体对第二级子宫颈上皮内赘瘤+子宫颈抹片液态溶液样本进行免疫细胞化学染色之结果

[0191]

子宫颈抹片	normal	CIN2+		
ICC 免疫细胞化学 抗人乳头状瘤病毒 E7 染色阳性	4	21	84%	PPV
ICC 免疫细胞化学 抗人乳头状瘤病毒 E7 染色阴性	25	1	96%	NPV
敏感度		95%		
专一性	86%			

[0192] 表16说明来自表15之免疫细胞化学染色结果。如数据所示,以本发明所描述之抗人乳头状瘤病毒E6抗体进行免疫细胞化学染色试验,对第二级子宫颈上皮内赘瘤+敏感度

达95%，专一性达83%。研究结果显示，该试验有利于侦测人乳头状瘤病毒蛋白，可对一般大众例行性之抹片染色进行宫颈癌筛选

[0193] 表17:以抗人乳头状瘤病毒E7老鼠单克隆抗体对各式子宫颈抹片液态溶液样本进行免疫细胞化学染色之结果

[0194]

子宫颈抹片	normal	ASCUS	ASC-H	CIN1	CIN2/3	SCC
ICC 免疫细胞化学 抗人乳头状瘤病毒 E7 染色阳性	3	4	3	11	16	4
ICC 免疫细胞化学 抗人乳头状瘤病毒	25	6	5	6	1	1

[0195]

E7 染色阴性						
合计	28	10	8	17	17	5
阳性率	11%	40%	38%	65%	94%	80%

[0196] 另一免疫细胞化学试验侦测人乳头状瘤病毒之范例，表17和表18说明以抗人乳头状瘤病毒E7抗体进行免疫细胞化学染色之结果。如数据所示，抗人乳头状瘤病毒E7抗体免疫细胞化学试验结果与抗人乳头状瘤病毒E6之结果不同，表17说明人乳头状瘤病毒E7蛋白的表达，随子宫颈抹片正常，意义不明的不典型鳞状细胞，ASC-H，第一级子宫颈上皮内赘瘤和第二级子宫颈上皮内赘瘤/3样本，呈正向增加之趋势。诊断为抹片第二级子宫颈上皮内赘瘤/3之样本94%呈阳性反应，仅11%抹片正常之样本，以相同抗人乳头状瘤病毒E7抗体进行免疫细胞化学试验呈阳性反应。意义不明的不典型鳞状细胞或ASC-H样本中，以与表17的第一级子宫颈上皮内赘瘤，第二级子宫颈上皮内赘瘤/3样本使用相同之抗人乳头状瘤病毒E7抗体，40%呈阳性染色反应，表示这些样本的原致癌基因蛋白之表达，可能造成进一步癌症增生；抹片诊断为意义不明的不典型鳞状细胞且免疫细胞化学染色(抗人乳头状瘤病毒E7抗体)呈阴性之样本，发展成病灶增生之风险则较低。

[0197] 表18说明来自表17之免疫细胞化学染色结果。如数据所示，以本发明所描述之抗人乳头状瘤病毒E7抗体进行免疫细胞化学染色试验，对第二级子宫颈上皮内赘瘤+敏感度达91%，专一性达89%。研究结果显示，该试验有利于侦测人乳头状瘤病毒蛋白，可对一般大众例行性之抹片染色进行宫颈癌筛选。

[0198] 表18:以抗人乳头状瘤病毒E7老鼠单克隆抗体对第二级子宫颈上皮内赘瘤+子宫颈抹片液态溶液样本进行免疫细胞化学染色之结果

[0199]

子宫颈抹片	Normal	CIN2+		
免疫细胞化学 抗人乳头状瘤病毒 E7 染色阳性	3	20	87%	PPV
免疫细胞化学 抗人乳头状瘤病毒 E7 染色阴性	25	2	93%	NPV
敏感度		91%		
专一性	89%			

[0200] 表19:以各式抗人乳头状瘤病毒抗体对抹片正常样本进行免疫细胞化学染色之结果,并与人乳头状瘤病毒脱氧核糖核酸测试作比较

[0201]

	子宫颈抹片正常	
	免疫细胞化学 抗人乳头状瘤病毒 E7 染色阳性	免疫细胞化学 抗人乳头状瘤病毒 E7 染色阴性
高危人乳头状瘤病毒脱氧核糖核酸 阳性	0	6
高危人乳头状瘤病毒脱氧核糖核酸 阴性	0	26

[0202] 为了测试本发明描述之人乳头状瘤病毒 免疫细胞化学试验是否能作为子宫颈癌早期筛选之工具,将抹片正常样本进行人乳头状瘤病毒免疫细胞化学试验与人乳头状瘤病毒脱氧核糖核酸测试之比较。如表19数据所示,以抗人乳头状瘤病毒抗体进行试验,所有抹片正常样本呈阴性反应(32个样本中有32个),32个样本中,16个样本以抗人乳头状瘤病毒E7抗体进行染色,4个样本以抗人乳头状瘤病毒L1抗体进行染色。结果显示,本发明描述之免疫细胞化学染色试验具有很好之专一性,与人乳头状瘤病毒脱氧核糖核酸测试作比较,仅19%(32个样本中有6个)的抹片正常样本在人乳头状瘤病毒脱氧核糖核酸测试中呈阳性反应。本实验中,以唯一美国食品和药物管理局许可之hc2进行人乳头状瘤病毒脱氧核糖核酸测试。人乳头状瘤病毒脱氧核糖核酸呈阳性反应,抹片染色却正常,且人乳头状瘤病毒免疫细胞化学试验呈阴性之样本,可能是伪阴性,或并未表达人乳头状瘤病毒原致癌基因蛋白。实验结果显示,人乳头状瘤病毒免疫细胞化学试验与人乳头状瘤病毒脱氧核糖核酸试验相较下,提供较高之阳性预测值,因此,对于临床筛选子宫颈癌,免疫细胞化学提供了较好之依据。

[0203] 范例六:6.人乳头状瘤病毒流式细胞试验

[0204] 另一人乳头状瘤病毒蛋白免疫学试验侦测范例,为人乳头状瘤病毒流式细胞试验。将子宫颈抹片细胞收集至液态溶液中,依标准程序进行离心与纯化,接着进行与免疫细

胞化学染色相似步骤之免疫染色。将细胞保持在溶液中而不固定于玻片上,以利流式细胞仪进行分析,以抗人乳头状瘤病毒抗体对溶液中的细胞进行固定、终止和培养,接着以适当之第二抗体和基质试剂进行流式细胞仪侦测。人乳头状瘤病毒流式细胞仪试验之优点为,一次可测试高度流率之样本数,而不需要专业的细胞学家对玻片进行分析。

[0205] 在一实施案例中,提供免疫细胞化学流式细胞仪试验之试剂盒。该试剂盒可包含前抗体封闭液、后-抗体封闭液、抗人乳头状瘤病毒抗体作为第一抗体、抗老鼠或抗兔子免疫球蛋白共轭荧光物或生物素、或其他作为第二抗体之试剂,含有适当试剂之溶液作为第二抗体之基质,以利流式细胞仪进行侦测。

[0206] 非直接标定需要两阶段之培养步骤,先使用第一抗体,接着使用相容之第二抗体,第二抗体可带有荧光染料(FITC,PE,Cy5等)。抗人乳头状瘤病毒抗体亦可直接标记上荧光物质、生物素或其他试剂,以适当之试剂作为基质进行侦测。前抗体封闭液则包含某些蛋白质、BSA、血清或其他试剂,用以终止与抗体非特异性键结之细胞。后-抗体封闭液与前抗体封闭液相似,含有少量蛋白质或血清,与第一抗体进行培养。含有人乳头状瘤病毒抗体之溶液可以为浓缩形式,或被稀释作为试剂之使用。含有第二抗体之溶液可以为浓缩形式,或被稀释作为试剂之使用。

[0207] 人乳头状瘤病毒E6,E7或L1蛋白可以专一性抗体和标记有荧光染料(共轭上FITC,PE,Cy5等)之第二抗体进行侦测。以流式细胞仪分析细胞,可依其大小或其他参数将细胞进行分类,且可进行染色或不需染色。将较小细胞之细胞群的染色程度与较大细之细胞群做比较,并作为试验中正常细胞的对照组。该试验提供每一细胞专一性染色,使否被染色的细胞数可经由计算而得知,且染色程度可藉由分析而量化。此试验可大量分析、不需显微镜的使用,亦不需要细胞学家进行染色结果的程度分级。流式细胞仪之电脑软件可准确无误地对资料进行分析,且不需进行细胞学之专人训练,故可有效应用于临床,作为侦测人乳头状瘤病毒相关蛋白之筛选或辅助工具。

[0208] 在另一范例中,细胞被染色后,悬浮保存在4℃黑暗环境下,且尽快以细胞仪进行分析,若等待分析时间超过一个小时,则需将细胞进行固定,可使细胞保存数天,可稳定光散色且将多数生物危害因子去活化,不同试验则需要不同的试剂加以固定并找出最佳化之参数。固定方法一:0.01%至1%三聚甲醛10-15分钟,每样本为100微升,固定方法二:丙酮或甲醇:每一样本中加入1毫升冰丙酮,混和均匀后,于-20℃静置5-10分钟,离心后以磷酸盐1%BSA清洗两次。

[0209] 将细胞先进行固定,以确认短半衰期抗原或抗体之稳定性,进行细胞内染色,可维持标记蛋白在原始细胞中的位置。侦测细胞内抗原,在进行染色前需进行细胞通透步骤,将抗体在通透缓冲液中进行制备,以确保细胞能维持通透,当细胞群开始通透时,流式细胞仪上的细胞光散色数据在通透后产生改变。细胞质胞器和颗粒中的抗原,依抗原种类不同而有不同的固定和通透方法,以维持抗原决定为之可用性。

[0210] 细胞固定对是影响染色试验之结果品质之重要因素,固定的方法如下:(1)使用甲醛及接口活性剂:在0.01%甲醛中进行固定10-15分钟(稳定蛋白质),以接口活性剂打破细胞膜。接口活性剂:Triton或NP-40(0.1-1%溶于磷酸盐中),可部分溶解细胞核膜,且适合用于细胞核抗原染色。值得注意的是,细胞膜和细胞质的损失可导致光散色减少,亦减低非特异性之荧光值。Tween 20,Saponin,Digitonin和Leucoperm是温和的细胞膜溶解剂,以

PBC配置成0.5%，提供够大的孔径使抗体能够穿透，而不须溶解细胞质膜，适合于细胞质或细胞表面之抗原，也可用于溶解性细胞核抗原。(2) 使用甲醛(0.01%)及甲醇，和接口活性剂：在每一样本中加入1毫升冰甲醇，混和均匀后，于-20℃静置5-10分钟，离心后以磷酸盐1%BSA清洗两次。以丙酮进行固定和通透：在每一样本中加入1毫升冰丙酮，混和均匀后，于-20℃静置5-10分钟，离心后以磷酸盐1%BSA清洗两次。

[0211] 范例七：以一抗人乳头状瘤病毒抗体侦测固态表面之人乳头状瘤病毒蛋白

[0212] 1). 直接酶免疫分析方法试验：将多种人乳头状瘤病毒蛋白包被于微孔盘上，以多种抗人乳头状瘤病毒抗体进行侦测

[0213] 临床之子宫颈抹片样本以直接酶免疫分析方法试验侦测人乳头状瘤病毒E6, E7或L1蛋白。不同样本之子宫颈细胞，可来自液态细胞溶液中、运送液中(进行人乳头状瘤病毒脱氧核糖核酸测试)或细胞裂解液中。为进行酶免疫分析方法试验，样品进行制备、离心、纯化和裂解，产生细胞裂解物作为分析。定量分析细胞裂解物中的蛋白质，并等量将其包被在微孔盘每一微孔中，以人乳头状瘤病毒单克隆抗体键结微孔盘中的蛋白质并进行侦测，接着以共轭有辣根过氧化物酶之第二抗体(以老鼠或兔子之浓缩IgG为例)进行键结，加入TMB基质做为呈色试剂，以酶联免疫吸附试验酵素免疫仪侦测可见光谱吸收值(450nm)。

[0214] 将来自不同肿瘤病程阶段之子宫颈细胞收集在液态溶液中，获得其细胞裂解物，用以侦测人乳头状瘤病毒脱氧核糖核酸和蛋白质。人乳头状瘤病毒脱氧核糖核酸侦测中，采递减式聚合酶链反应步骤；以直接酶免疫分析方法试验，进行人乳头状瘤病毒蛋白质的侦测，将细胞裂解物直接包被在微孔盘上进行键结，接着以共轭上辣根过氧化物酶之特异性第二抗体进行反应。以微孔分析仪读取加入或未加入一级人乳头状瘤病毒抗体之可见光谱吸收值(450nm)。微孔盘上包被有细胞裂解物中各式不同的蛋白质，没有添加一级人乳头状瘤病毒抗体之样本所测得的可见光谱吸收值，表示细胞裂解物和第二抗体为非专一性键结。人乳头状瘤病毒蛋白与抗人乳头状瘤病毒抗体产生专一性键结之可见光谱吸收值，将每一样本可见光谱吸收值与第二抗体非专一性键结之可见光谱吸收值相减，得到净可见光谱吸收值，即为人乳头状瘤病毒蛋白与一级抗人乳头状瘤病毒抗体专一性键结之可见光谱吸收值。聚合酶链反应呈阴性反应之样本，自侦测其净可见光谱吸收值，以其平均值作为试验的基准。酶免疫分析方法试验中，样本之净可见光谱吸收值为聚合酶链反应阴性样本平均可见光谱吸收值两倍以上时，表示为阳性，反之则为阴。

[0215] 表20：液态子宫颈抹片样本之人乳头状瘤病毒脱氧核糖核酸和蛋白质侦测

[0216]

液态子宫颈抹片样本		人乳头状瘤病毒 脱氧核糖核酸	直接酶免 疫分析
样本 No.	临床诊断或抹片结果	聚合酶链反应	(抗 E7 抗体)
1	意义不明的不典型鳞状细胞	阳性	阳性
2	不典型鳞状细胞	阳性	阳性
3	意义不明的不典型鳞状细胞	阳性	阳性
4	意义不明的不典型鳞状细胞	阴性	阳性
5	意义不明的不典型鳞状细胞	阴性	阴性
6	第一级子宫颈上皮内赘瘤	阳性	阳性
7	第一级子宫颈上皮内赘瘤	阳性	阳性
8	第一级子宫颈上皮内赘瘤	阳性	阳性
9	第一级子宫颈上皮内赘瘤	阳性	阴性
10	第一级子宫颈上皮内赘瘤/ 意义不明的不典型鳞状细胞	阴性	阳性
11	第一级子宫颈上皮内赘瘤	阴性	阴性
12	第二级子宫颈上皮内赘瘤	阳性	阴性
13	第二级子宫颈上皮内赘瘤	阳性	阴性
14	第二级子宫颈上皮内赘瘤	阴性	阴性
15	第二级子宫颈上皮内赘瘤	阴性	阴性
16	第三级子宫颈上皮内赘瘤	阳性	阳性
17	第三级子宫颈上皮内赘瘤	阳性	阳性
18	第三级子宫颈上皮内赘瘤	阳性	阳性
19	第三级子宫颈上皮内赘瘤	阴性	阴性
20	第三级子宫颈上皮内赘瘤	阴性	阴性
21	第三级子宫颈上皮内赘瘤	阴性	阴性
22	鳞状细胞癌	阳性	阳性
23	鳞状细胞癌	阳性	阳性
24	腺癌	阴性	阴性

[0217] 临床样本以组织学或抹片染色诊断为正常细胞,意义不明的不典型鳞状细胞,第一级子宫颈上皮内赘瘤,第二级子宫颈上皮内赘瘤,第三级子宫颈上皮内赘瘤,鳞状细胞癌或腺癌者,进行细胞裂解后,直接包被于微孔盘上。比较临床诊断或抹片结果,以聚合酶链反应侦测人乳头状瘤病毒脱氧核糖核酸,以酶免疫分析方法侦测人乳头状瘤病毒蛋白,结果显示于表20。数据显示,以抗E7多克隆抗体侦测人乳头状瘤病毒脱氧核糖核酸与人乳头状瘤病毒蛋白之一致性为79% (24个样本中有19个),两者结果不符合率达21% (24个样本

中有5个),其中3个样本为聚合酶链反应阳性,酶免疫分析方法阴性(样本No.9/第一级子宫颈上皮内赘瘤,No.12/第二级子宫颈上皮内赘瘤和No.13/第二级子宫颈上皮内赘瘤),表示受人乳头状瘤病毒感染但,无E7原致癌蛋白之表达,或未侦测到其表达。聚合酶链反应呈阳性,酶免疫分析方法呈阴性之样本中,样本No.4和No.10(第一级子宫颈上皮内赘瘤/意义不明的不典型鳞状细胞),可能为聚合酶链反应伪阴性,或E7原致癌蛋白表达伴随人乳头状瘤病毒脱氧核糖核酸之缺失。

[0218] 聚合酶链反应呈阳性,酶免疫分析方法却呈阴性之样本,可能是人乳头状瘤病毒脱氧核糖核酸试验的伪阳性,或确实为阳性,但人乳头状瘤病毒原致癌基因蛋白没有表达,这些结果显示,人乳头状瘤病毒 酶免疫分析方法试验可作为临床筛选子宫颈癌之另一项依据。侦测人乳头状瘤病毒原致癌蛋白对追踪结构不良性高度鳞状上皮内病变是否发生是很重要的,人乳头状瘤病毒原致癌蛋白可作为早期侦测或筛选子宫颈癌及其他人乳头状瘤病毒相关癌症之良好生物标记。聚合酶链反应和酶免疫分析方法试验皆呈阴性,但却被诊断为意义不明的不典型鳞状细胞或子宫颈上皮内赘瘤的病例,人乳头状瘤病毒脱氧核糖核酸和原致癌蛋白的无法侦测,可能与病患子宫颈抹片样本之制备有关,或其抹片染色结果呈伪阳性,尽管如此,仍有许多样本需进行测试。

[0219] 2).免疫印迹分析法:将细胞裂解物转渍在膜上,以一种或多种抗人乳头状瘤病毒抗体,侦测生物性样本中之人乳头状瘤病毒蛋白。

[0220] 发展一快速且不需仪器判读结果之试验,点墨法是一可行的方式,以比色剂提供一可视之结果,侦测膜上细胞裂解物中的人乳头状瘤病毒蛋白。将来自不同肿瘤病程阶段子宫颈细胞收集至液态溶液中,制备成细胞裂解物并转渍在膜上,先将膜风乾以封闭液终止转渍点,加入抗人乳头状瘤病毒抗体与转渍点进行反应,接着加入能与抗人乳头状瘤病毒抗体产生键结之第二抗体。每一步骤间清洗转渍点,以避免非特异性键结之抗体附着于膜上,最后加入TMB呈色试剂,细胞裂解物与抗人乳头状瘤病毒抗体产生键结者,在试验中即呈蓝色阳性反应。人乳头状瘤病毒重组蛋白亦转渍在膜上,作为正控制组或负控制组。

[0221] 图13A说明以抗人乳头状瘤病毒L1老鼠单克隆抗体,进行点墨法侦测人乳头状瘤病毒L1蛋白之结果。第一行为不同鳞状细胞癌子宫颈抹片之液态细胞裂解物,第二行为人乳头状瘤病毒16L1重组蛋白,由左至右浓度分别为20,2,0.2和0微克/毫升,以A,B,C,D做标示。由第二行点墨的结果显示,0.2微克/毫升浓度以上之人乳头状瘤病毒16L1重组蛋白,或纯化后之低浓度重组蛋白,以图13A使用之抗人乳头状瘤病毒L1老鼠单克隆抗体反应呈高度阳性。实验数据显示,使用与图13A相同之抗人乳头状瘤病毒L1老鼠单克隆抗体进行免疫印迹分析法,可侦测来自人乳头状瘤病毒16L1重组蛋白和细胞裂解物中的人乳头状瘤病毒L1蛋白。

[0222] 图13B说明使用与图13A相同之抗人乳头状瘤病毒L1老鼠单克隆抗体进行另一免疫印迹分析法之结果。第一行和第二行之转渍点为来自不同鳞状细胞癌子宫颈抹片之液态细胞裂解物,第三行转渍点则为人乳头状瘤病毒16E6,人乳头状瘤病毒18E6,人乳头状瘤病毒16E7,人乳头状瘤病毒18E7,人乳头状瘤病毒16L1重组蛋白,由左至右标记为A,B,C,D,E。如结果所示,人乳头状瘤病毒重组蛋白点3E,以抗人乳头状瘤病毒L1抗体进行试验呈阳性反应,与第三行人乳头状瘤病毒16E7和人乳头状瘤病毒16E6无反应进行的转渍点,或人乳头状瘤病毒18E7和人乳头状瘤病毒18E6反应性弱的转渍点进行比较。以反应性弱的转渍点

或非特异性键结者作为背景值,临床样本2C和2E与人乳头状瘤病毒16L1重组蛋白具有很强的反应性,结果说明,使用与图13A相同之抗人乳头状瘤病毒L1老鼠单克隆抗体进行免疫印迹分析法,可侦测来自人乳头状瘤病毒16L1重组蛋白和细胞裂解物中的人乳头状瘤病毒L1蛋白。

[0223] 以点墨法侦测人乳头状瘤病毒E6蛋白,图14A说明以抗人乳头状瘤病毒E6抗体进行点墨分析之结果。如图所示,第一行为来自不同鳞状细胞癌子宫颈抹片之细胞裂解物溶液(与图1的第一行相同),第二行为人乳头状瘤病毒16E6重组蛋白,由左至右浓度分别为20,2,0.2和0微克/毫升,以A,B,C,D做标示。第二行转渍点结果显示,以图3所使用之抗人乳头状瘤病毒E6老鼠单克隆抗体进行免疫印迹分析法,浓度为20和2微克/毫升之人乳头状瘤病毒E6重组蛋白呈阳性反应,0.2微克/毫升和纯化后之重组蛋白反应性弱。显示使用与图14A相同之浓缩人乳头状瘤病毒E6老鼠单克隆抗体进行免疫印迹分析法,可侦测来自人乳头状瘤病毒16E6重组蛋白和细胞裂解物中的人乳头状瘤病毒E6蛋白。

[0224] 图13B相同的点墨法亦应用于人乳头状瘤病毒E6蛋白之侦测。图14B说明以图14A相同抗人乳头状瘤病毒E6抗体进行免疫印迹分析法侦测人乳头状瘤病毒E6之结果。如结果所示,第三行人乳头状瘤病毒16E6重组蛋白点3A,以抗人乳头状瘤病毒16E6抗体进行试验呈阳性反应,与图13B第三行人乳头状瘤病毒18E6反应性弱的转渍点,或其他无反应进行的转渍点进行比较。结果说明,抗人乳头状瘤病毒16E6老鼠单克隆抗体与人乳头状瘤病毒E6为专一性反应,而不与人乳头状瘤病毒L1或人乳头状瘤病毒E7蛋白产生反应。以反应性弱的转渍点作为背景值或试验中人乳头状瘤病毒18E6之交叉性键结,相对于其他反应性适中的转渍点,样本2C和2E为反应性很强之转渍点,样本2D则无侦测到转渍点。这些实验数据显示,70%(10样本中有7个样本)的临床样本含有人乳头状瘤病毒E6蛋白,可利用抗人乳头状瘤病毒16E6老鼠单克隆抗体进行点墨法试验加以侦测。

[0225] 为说明以点墨法侦测人乳头状瘤病毒E7蛋白,将图13B和图14B中相同的转渍点,以抗人乳头状瘤病毒E7老鼠单克隆抗体侦测人乳头状瘤病毒E7蛋白,如图15所示。结果显示,图15第三行转渍点中,人乳头状瘤病毒18E7重组蛋白转渍点3D与抗人乳头状瘤病毒E7老鼠单克隆抗体呈阳性反应,其他人乳头状瘤病毒重组蛋白则未侦测到转渍点,或与人乳头状瘤病毒16L1有反应性极弱的转渍点3E,如图15第三行所示。这些结果说明,抗人乳头状瘤病毒E7老鼠单克隆抗体与人乳头状瘤病毒E7为专一性反应,而不与人乳头状瘤病毒L1或人乳头状瘤病毒E7蛋白产生交叉反应。以反应性弱的转渍点作为背景值或试验中人乳头状瘤病毒18E7之交叉性键结,相对于其他无反应性的转渍点,样本2C和2E为反应性很强之转渍点。这些实验数据显示,样本2C和2E含有人乳头状瘤病毒18E7蛋白,可利用抗人乳头状瘤病毒18E7老鼠单克隆抗体进行点墨法试验加以侦测。

[0226] 3). 抗体芯片:将抗体转渍在蛋白芯片上,以侦测生物性检体标记的细胞裂解物中之人乳头状瘤病毒蛋白和细胞内生性蛋白。

[0227] 试举一例,在蛋白芯片中,作为蛋白质包被/键结的表面,可为经表面化学处理后之玻璃或膜,可与捕捉试剂或蛋白,产生共价性或非共价性键结。转渍机器上适当的针孔中嵌有捕捉试剂,如重组蛋白、抗原、抗体或其他蛋白质,将其置于适当之缓冲液中,以便于与表面包被之蛋白或抗体产生键结。亦如微孔盘的表面所述,捕捉蛋白或抗体与蛋白芯片表面化学处理后之表面产生很强的键结,保留此表面使捕捉蛋白能与标的蛋白、抗体或抗原

产生作用且专一性键结,经过多次清洗除去非特异性之键结,以共轭上Cy3或Cy5之侦测系统进行侦测。以基因芯片扫描器量测转渍点影像之荧光强度,判定是否产生专一性反应。

[0228] 在一范例中,抗体基因芯片可以蛋白芯片试验形式,用来侦测人乳头状瘤病毒蛋白或其他细胞性蛋白。将欲进行测试的细胞、样本或培养细胞,收集、离心、清洗后,加以裂解产生细胞裂解物作为分析物。定量细胞裂解物中的蛋白质含量,并标定上生物素、Cy3、Cy-5或其他呈色示剂,以利侦测转渍点上抗体表面所标记到的蛋白质之键结。蛋白芯片的表面,依不同的分析和定量技术,可为膜或玻璃表面。

[0229] 表21说明蛋白芯片试验侦测不同人乳头状瘤病毒蛋白和宿主细胞蛋白表达之结果。抗体芯片先转渍上抗体,其可抗人乳头状瘤病毒和各种细胞蛋白,用来侦测临床子宫颈抹片样本中,人乳头状瘤病毒蛋白和宿主细胞蛋白之表达。10组子宫颈抹片样本(在表2标记为S1-S10)被诊断为角蛋白鳞状上皮细胞癌(等级2或3),保存在液态溶液中被裂解产生蛋白质裂解物,并标记上适当之标记物(如生物素)以利侦测之进行(如卵白素-Cy3)。荧光强度表示样本中的蛋白质与抗体产生键结,抗体包括但不限于人乳头状瘤病毒16E7,人乳头状瘤病毒16L1,p63,p53,p21WAF1,p16INK4a,磷酸化Rb和未磷酸化Rb,如表21所示。荧光强度表示特异之蛋白与芯片上抗体产生专一性键结,显示不同程度之人乳头状瘤病毒感染,比较并分析于图6-12。

[0230] 表21:抗体基因芯片每一阵列点之荧光强度(扣除背景值后)值,说明宫颈癌病人细胞裂解物中所表达的蛋白质,与特异性抗体产生专一性键结

[0231]

抗体列点	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10
HPV16E7	849	1407	422	355	443	403	316	337	383	267
HPV 16	1309	236	1477	418	620	1206	251	205	700	3407
p63	398	128	205	51	167	146	215	230	427	174
p53	325	102	86	161	119	83	226	242	465	335
p21WAF1	594	100	130	92	167	54	177	178	493	250
p16INK4a	164	549	97	107	116	87	72	128	87	174
Retinoblastoma	753	170	140	185	109	70	219	247	448	317
Rb (phosph)	491	236	269	143	238	245	156	224	310	171

[0232] 比较10组受测之鳞状细胞癌样本蛋白质之表达,测量样本特异性之蛋白质荧光强度平均值及标准差,可显示其蛋白质表达量,如图16所示。结果显示,10组子宫颈抹片样本之细胞裂解物中,各种人乳头状瘤病毒蛋白和细胞内生性蛋白可藉抗体基因芯片试验进行侦测,如图16所示,人乳头状瘤病毒16和人乳头状瘤病毒16E7这两种蛋白,与其他细胞性蛋白相较呈过度表达状态。

[0233] 比较不同样本中人乳头状瘤病毒16的不同,图17说明来自图16中子宫颈抹片样本细胞裂解物,侦测人乳头状瘤病毒L1蛋白之荧光强度值。结果说明,人乳头状瘤病毒16抗体(抗人乳头状瘤病毒L1抗体)与人乳头状瘤病毒蛋白产生键结,特别是抗体基因芯片上来自子宫颈癌病人之细胞裂解物中所表达的L1病毒蛋白。人乳头状瘤病毒16L1蛋白主要表达在样本S1,S3,S6和S10中,中度表达在样本S4,S5和S9,在样本S2,S7和S8中则表达力较差,该样本可能为另一H酸硷V病毒型感染,在此试验中无法被人乳头状瘤病毒16抗体辨识。

[0234] 人乳头状瘤病毒E6和E7蛋白在子宫颈癌人乳头状瘤病毒原致癌基因中扮演重要

角色,为研究人乳头状瘤病毒E6E7原致癌蛋白和细胞性蛋白间的交互作用,抗体基因芯片试验可做为一工具,同时侦测人乳头状瘤病毒蛋白和细胞性蛋白如p53或Rb,该蛋白与受人乳头状瘤病毒感染影响之人乳头状瘤病毒原致癌蛋白或细胞性蛋白p16,p21等产生交互作用。P16INK4a常被用来侦测子宫颈癌,为侦测人乳头状瘤病毒蛋白,如E6或E7原致癌蛋白可做为较好的生物标记,抗体基因芯片(蛋白芯片试验)分析可同时侦测多种人乳头状瘤病毒蛋白和细胞性蛋白。图18说明10组鳞状细胞癌样本中,人乳头状瘤病毒E7和p16蛋白表达之侦测和比较,每一样本之荧光强度值(由1到10)表示抗体基因芯片上子宫颈癌患者细胞裂解物中所表达之蛋白,与人乳头状瘤病毒16E7和p16INK4a抗体产生专一性键结。每一组样本对人乳头状瘤病毒E7抗体之荧光强度皆高于p16抗体,显示人乳头状瘤病毒E7蛋白表达量较p16蛋白多,结果说明人乳头状瘤病毒E7是较好的侦测子宫颈癌之标记物。

[0235] 子宫颈癌人乳头状瘤病毒感染影响p53,图19说明人乳头状瘤病毒16和p53抗体之荧光强度,显示人乳头状瘤病毒感染之临床样本中,人乳头状瘤病毒16的过度表达会抑制p53。比较人乳头状瘤病毒16和p53的表达,结果显示,在多数样本中(S7和S8样本除外),p53表达量远低于人乳头状瘤病毒16的高度表达,S7和S8可能为其他人乳头状瘤病毒16以外之病毒型感染。临床样本中p53的低度表达显示,多数的p53蛋白在子宫颈癌发展中被人乳头状瘤病毒E6原致癌蛋白降解。

[0236] 说明子宫颈癌人乳头状瘤病毒感染影响之E7、视网膜母细胞肿瘤(Rb)蛋白和磷酸化Rb,图20说明人乳头状瘤病毒16E7和pRb抗体之荧光强度,以抗Rb-磷酸特异性抗体将Rb去活化时,人乳头状瘤病毒16E7即过度表达。比较人乳头状瘤病毒16E7和Rb-磷酸化之表达,样本S2中明显可见人乳头状瘤病毒16E7之过度表达抑制磷酸化Rb结果说明以E7将Rb去活化(与抗Rb-磷酸抗体反应性降低),将导致发展中子宫颈癌之肿瘤恶性转变。

[0237] 子宫颈癌之蛋白芯片试验表达分析,图21说明样本S2中被选择的人乳头状瘤病毒蛋白和细胞性蛋白之表达分析。研究结果显示,当其他细胞性蛋白受抑制时,人乳头状瘤病毒E7和p16皆过度表达,由图8、图20和图21所有结果指出,样本2中人乳头状瘤病毒E7蛋白的过度表达,会使Rb去活化并诱导p16INK4a表达,导致肿瘤恶性转变且使子宫颈癌发展。样本S1中人乳头状瘤病毒E7的高度表达可能与Rb无关,因此p16INK4a亦不高度表达。

[0238] 子宫颈癌中另一细胞蛋白p21WAF1之表达与p53有关,图12说明子宫颈抹片细胞之细胞裂解物,侦测其细胞性p21WAF1及p53蛋白表达之荧光强度值。如图22所示,10个样本中有9个样本(样本S1除外)的p21WAF1与p53之表达有显著相关,研究结果显示,经由人乳头状瘤病毒E6路径抑制p21WAF1,可使肿瘤压制基因p53被降解,因而导致肿瘤恶性转变成子宫颈癌之发展。

[0239] 蛋白芯片试验可作为侦测人乳头状瘤病毒蛋白之工具,亦可侦测恶性癌症发展中受人乳头状瘤病毒感染所诱导或抑制之细胞性蛋白。本发明所使用之蛋白芯片试验研究结果说明,本研究中之子宫颈癌病人其患病路径不同,因此癌症发展状况亦不同。本技术应用于其他人乳头状瘤病毒相关性癌症,用以预测恶性肿瘤之发展路径,亦可发展相关之数据分析,在癌症发展路径过程中辨识各个相关性之蛋白,因此,可发展出针对个人用药之特异性治疗。

[0240] 范例八:将抗人乳头状瘤病毒蛋白第一抗体捕捉于一表面,经抗人乳头状瘤病毒第二抗体进行辨识,侦测生物检体中之人乳头状瘤病毒蛋白

[0241] 抗原夹心试验法是以蛋白芯片、一层膜或微孔盘为底,在其表面包被一层第一抗体,如捕捉抗体或点样抗体,该抗体对感兴趣之抗原具有亲和力,并能产生键结。感兴趣之抗原可能为人乳头状瘤病毒蛋白、原致癌蛋白、外鞘蛋白,其带有人乳头状瘤病毒基因,如早期基因或晚期基因。阻断芯片表面未键结部分后,受分析的临床样本可与捕捉抗体产生键结形成一免疫复合体,经第二抗体或侦测性抗体键结至感兴趣之抗原加以侦测。因此,第一抗体、第二抗体、捕捉抗体对和侦测性抗体与感兴趣之抗原交互作用,状似夹心,故有夹心试验法之称。捕捉性抗体或点样抗体可以是相同的或不同的抗体,其与侦测性抗体可对感兴趣之抗原如人乳头状瘤病毒蛋白、人乳头状瘤病毒原致癌蛋白和外鞘蛋白等产生专一性键结。

[0242] 其次,夹心键结之抗原-抗体复合体可以第二抗体进行侦测,该抗体对侦测抗体具有亲和力,且可以标准免疫复合体侦测系统简单被测量,如比色剂、化学冷光、萤光和其他不同种类之基质。最后的数据读取和呈现,藉由仪器设定进行适当之吸收光读取,或直接以目视与控制组进行比较。阳性反应结果表示临床样本中所表达的感兴趣之抗原,与第一抗体、捕捉抗体和侦测性抗体产生键结;反之,阴性反应则表示第一抗体未与感兴趣之抗原产生键结,代表临床样本中不存在感兴趣之抗原。

[0243] 1). 酶联免疫吸附试验:上微孔盘上包被抗人乳头状瘤病毒第一抗体,藉由抗人乳头状瘤病毒第二抗体侦测人乳头状瘤病毒蛋白

[0244] 说明在微孔盘上进行夹心酶联免疫吸附试验,将诊断出含有鳞状细胞癌、人乳头状瘤病毒聚合酶链反应阳性或人乳头状瘤病毒聚合酶链反应阴性之血清加以稀释,制备成细胞裂解物,以进行人乳头状瘤病毒E6,E7或L1蛋白之存在。试验步骤为,包被一层兔子之抗E6,E7或L1之单克隆抗体作为第一抗体,加上细胞裂解物(血清),以及其相关之抗人乳头状瘤病毒第二抗体,再以另一共轭有辣根过氧化物酶之抗体进行侦测,与基质和终止试剂培养后,以微孔盘分析仪测量可见光谱吸收值(450nm)。如图8所示,实验结果说明酶联免疫吸附试验以兔子之抗人乳头状瘤病毒多克隆抗体,可侦测被诊断为鳞状细胞癌、人乳头状瘤病毒阳性或人乳头状瘤病毒阴性之人类血清样本中,人乳头状瘤病毒E6,E7和L1蛋白之表达。

[0245] 图23说明从被诊断为鳞状细胞癌、人乳头状瘤病毒阳性之病患血清中,以人乳头状瘤病毒阴性作为控制组,可侦测E6,E7原致癌蛋白和L1病毒蛋白。实验数据显示,相较于E6和L1蛋白,E7蛋白是血清中的主要蛋白;相对于人乳头状瘤病毒阴性样本,E6及E7蛋白是鳞状细胞癌和人乳头状瘤病毒阳性样本中的主要蛋白,而人乳头状瘤病毒阳性样本并无L1病毒蛋白之表达,在其他案例中,L1蛋白的表达皆不及E6和E7蛋白。这些结果说明,依病毒感染的程度或周期不同,血清中的L1蛋白可能表达或不表达;而鳞状细胞癌和人乳头状瘤病毒阳性样本皆在血清侦测到E6或E7原致癌蛋白,标示E6或E7是人乳头状瘤病毒血清侦测较好的生物标记。此为从血清中侦测到E6,E7原致癌蛋白的第一份报告,需要更多的血清样本进行分析。

[0246] 2). 流式磁珠试验:在一磁珠上包被抗人乳头状瘤病毒第一抗体,藉由抗人乳头状瘤病毒第二抗体侦测人乳头状瘤病毒蛋白

[0247] 将抗人乳头状瘤病毒第一抗体包被在磁珠表面,与生物性检体细胞裂解物中之人乳头状瘤病毒蛋白进行反应,在磁珠表面形成一复合体,以捕捉抗人乳头状瘤病毒第二抗

体。当抗人乳头状瘤病毒第二抗体事先被标记时,该复合体可直接被侦测到,或加入能与第二抗体产生键结之预标记抗体,即可侦测到该复合体。预标记抗体可用侦测性抗原加以标记,包含但不仅限于辣根过氧化酶、生物素、奈米金颗粒、荧光染料或其加以结合。试举一例,在磁珠固态表面上之复合体,利用抗老鼠或兔子PE作为第二抗体,便可由流式细胞仪(FACS)进行侦测。当多种人乳头状瘤病毒蛋白被捕捉至磁珠表面时,标记有不同荧光染料之多种抗人乳头状瘤病毒第二抗体,可同时被流式细胞仪侦测。因此以流式细胞仪进行磁珠试验是一有利的多重试验工具,用来侦测生物性检体中一种或多种以上之人乳头状瘤病毒蛋白。

[0248] 此磁珠试验可应用于侦测各式人乳头状瘤病毒蛋白,利用各式浓缩人乳头状瘤病毒E6,人乳头状瘤病毒E7或人乳头状瘤病毒L1抗体作为包被和侦测性抗体,侦测人乳头状瘤病毒E6,人乳头状瘤病毒E7和人乳头状瘤病毒L1蛋白。图24-27说明以流式细胞仪进行磁珠试验,侦测人乳头状瘤病毒16L1,人乳头状瘤病毒16E6,人乳头状瘤病毒18E6和人乳头状瘤病毒16E7蛋白之结果。图24说明以流式细胞仪进行夹心磁珠试验,以兔子之抗人乳头状瘤病毒16L1多克隆抗体作为包被抗体,以及老鼠之抗人乳头状瘤病毒16L1单克隆抗体作为侦测性抗体,再以共轭上PE试剂之老鼠抗体作为二级抗体,侦测人乳头状瘤病毒16L1重组蛋白。如数据所示,含有纯化后人乳头状瘤病毒16L1重组蛋白之样本被捕捉在磁珠表面,以流式细胞仪进行侦测,可显示出不连续的波峰,表示有很强的荧光PE(波峰位于图24右边)来自含有样本之缓冲溶液,作为试验的负控制组(波峰位于图24左边)。实验结果显示,未侦测到蛋白质表达之控制组样本(平均值约为12)和含有特异性侦测蛋白之样本(平均值约为2958)荧光强度差异达250倍,表示该磁珠试验分析方法,可动态分析不同程度临床样本中人乳头状瘤病毒L1蛋白之表达。

[0249] 在另一范例中,图25说明以兔子之抗人乳头状瘤病毒16E6多克隆抗体作为包被抗体,以及老鼠之抗人乳头状瘤病毒16E6单克隆抗体作为侦测性抗体,再以共轭上PE试剂之老鼠抗体作为二级抗体,以流式细胞仪进行夹心磁珠试验,侦测人乳头状瘤病毒16E6重组蛋白。如数据所示,含有纯化后人乳头状瘤病毒16E6重组蛋白之样本被捕捉在磁珠表面,以流式细胞仪进行侦测,可显示出不连续的波峰,表示有很强的荧光PE(波峰位于图25右边)来自含有样本之缓冲溶液,作为试验的负控制组(波峰位于图25左边)。实验结果显示,未侦测到蛋白质表达之控制组样本(平均值约为17)和含有特异性侦测蛋白之样本(平均值约为114)荧光强度差异达7倍,表示该磁珠试验分析方法,可动态分析不同程度临床样本中人乳头状瘤病毒E6L1蛋白之表达。

[0250] 图26说明以兔子之抗人乳头状瘤病毒18E6多克隆抗体作为包被抗体,以及老鼠之抗人乳头状瘤病毒18E6单克隆抗体作为侦测性抗体,再以共轭上PE试剂之老鼠抗体作为二级抗体,以流式细胞仪进行夹心磁珠试验,侦测人乳头状瘤病毒16E6重组蛋白。如数据所示,含有纯化后人乳头状瘤病毒18E6重组蛋白之样本被捕捉在磁珠表面,以流式细胞仪进行侦测,可显示出不连续的波峰,表示有很强的荧光PE(波峰位于图26右边)来自含有样本之缓冲溶液,作为试验的负控制组(波峰位于图26左边)。实验结果显示,未侦测到蛋白质表达之控制组样本(平均值约为148)和含有特异性侦测蛋白之样本(平均值约为2294)荧光强度差异达15倍,表示该磁珠试验分析方法,可动态分析不同程度临床样本中人乳头状瘤病毒18E6蛋白之表达。

[0251] 图27说明以兔子之抗人乳头状瘤病毒16E7多克隆抗体作为包被抗体,以及老鼠之抗人乳头状瘤病毒16E7单克隆抗体作为侦测性抗体,再以共轭上PE试剂之老鼠抗体作为二级抗体,以流式细胞仪进行夹心磁珠试验,侦测人乳头状瘤病毒16E7重组蛋白。如数据所示,含有纯化后人乳头状瘤病毒16E7重组蛋白之样本被捕捉在磁珠表面,以流式细胞仪进行侦测,可显示出连续的波峰,表示有很强的荧光PE (波峰位于图27右边) 来自含有样本之缓冲溶液,作为试验的负控制组 (波峰位于图27左边)。实验结果显示,未侦测到蛋白质表达之控制组样本 (平均值约为5.5) 和含有特异性侦测蛋白之样本 (平均值约为673) 荧光强度差异达122倍,表示该磁珠试验分析方法,可动态分析不同程度临床样本中人乳头状瘤病毒16E7蛋白之表达。

[0252] 磁珠试验之表达方式随包被抗体的改变而异图28-29说明不同的试验方法侦测人乳头状瘤病毒16E6和人乳头状瘤病毒18E6,并与图25和图26做比较。图28说明以兔子之抗人乳头状瘤病毒16E6多克隆抗体作为包被抗体,以及老鼠之抗人乳头状瘤病毒16L1单克隆抗体作为侦测性抗体,再以以PE试剂共轭上之老鼠抗体作为二级抗体,以流式细胞仪进行夹心磁珠试验,侦测人乳头状瘤病毒16E6重组蛋白。如数据所示,含有纯化后人乳头状瘤病毒16E6重组蛋白之样本被捕捉在磁珠表面,以流式细胞仪进行侦测,可显示出连续的波峰,表示有很强的荧光PE (波峰位于图28右边) 来自含有样本之缓冲溶液,作为试验的负控制组 (波峰位于图28左边)。实验结果显示,未侦测到蛋白质表达之控制组样本 (平均值约为1223) 和含有特异性侦测蛋白之样本 (平均值约为2755) 荧光强度差异达2倍;比较图28和图25磁珠试验侦测人乳头状瘤病毒16E6蛋白之结果,显示图25提供较大之动态侦测范围,可侦测临床样本中各种不同含量之人乳头状瘤病毒E6蛋白表达。

[0253] 在另一范例中,图29说明以兔子之抗人乳头状瘤病毒18E6多克隆抗体作为包被抗体,以及老鼠之抗人乳头状瘤病毒18E6单克隆抗体作为侦测性抗体,再以共轭上PE试剂之老鼠抗体作为二级抗体,以流式细胞仪进行夹心磁珠试验,侦测人乳头状瘤病毒18E6重组蛋白。如数据所示,含有纯化后人乳头状瘤病毒18E6重组蛋白之样本被捕捉在磁珠表面,以流式细胞仪进行侦测,可显示出连续的波峰,表示有很强的荧光PE (波峰位于图29右边) 来自含有样本之缓冲溶液,作为试验的负控制组 (波峰位于图29左边)。实验结果显示,未侦测到蛋白质表达之控制组样本 (平均值约为787) 和含有特异性侦测蛋白之样本 (平均值约为3803) 荧光强度差异达5倍。比较图29和图26磁珠试验侦测人乳头状瘤病毒18E6蛋白之结果,显示图26提供较大之动态侦测范围,可侦测临床样本中各种不同含量之人乳头状瘤病毒E6蛋白表达。

[0254] 3). 快速流体试验侦测人乳头状瘤病毒感染:快速免疫学试验可在膜上垂直进行或在玻片上平行进行。测流或扩散单步骤快速免疫试验亦可指免疫层析试验,简易之始用方式花费约5-15分钟便可得到结果,且不需经过训练或仪器分析。该试验基本原理为固态硝化纤维或含有捕捉试剂之玻片,与抹片样本进行反应,若病人样本含有标的试剂,硝化纤维上的捕捉试剂便与其产生反应形成复合体,并藉由扩散或毛细反应转移到硝化纤维上。

[0255] 试膜或试棒亦可用于样本收集或与棉质纱布共同或单独使用,以便所设计的免疫反应开始进行,能即时获得测试之结果,亦如在人体中插入探视镜后,便可立即观测内子宫颈。因此,单步骤快速免疫试验可作为一级初步筛选方法,使用于人乳头状瘤病毒确认试验,如抹片细胞学测试、免疫学试验和核酸杂交试验或其组合试验之前。

[0256] 重直快速免疫试验,在一有膜作为捕捉/键结表面,用以包被或转渍捕捉试剂的设备中进行;。该设备在膜下方含有一衬垫,以利样本和试验试剂流过试膜。样本中所包含的任何标的蛋白、抗体或抗原,可以捕捉试剂产生特异性反应并键结,因此不过流过试膜,即使经过多次清洗步骤除去非特异性之键结,被捕捉到的样本仍可维持在膜表面上。共轭有辣根过氧化物酶或其他物质的第二抗体可应用于膜表面,侦测维持在膜上的任何蛋白-抗体复合物,且可藉由呈色试剂达可视之观察。

[0257] 本发明所提供之单步骤快速免疫试验,是一种非侵入式且简单进行的试验方法,如同一般临柜购得之怀孕检测方法,不需任何特殊之仪器。单步骤快速免疫试验可作为活体之免疫层析试验,可直接定性分析一般人乳头状瘤病毒抗原、高风险人乳头状瘤病毒型之特殊抗原或人乳头状瘤病毒相关之抗体。单步骤快速免疫试验可作为护理站诊断、小诊所或实验室中抹片检查之辅助。单步骤快速免疫试验适于在室温下,简单加入不需经过稀释的样本,稍待一段反应时间后,便可产生可视之结果。

[0258] 测流快速免疫试验是一单步骤试验方法,预先将捕捉蛋白或抗体包被在膜玻片表面,带有标的蛋白或抗体之样本共轭上侦测性抗体,并与奈米金颗粒结合,直接将结合物应用于膜玻片,使样本测向流过膜玻片,直至到达玻片表面所设计之位置。捕捉-标的-侦测性蛋白-免疫复合体,在所设计的位置捕捉蛋白或抗体包被处成形且维持在膜表面,在设计位置处不需经过清洗或分离,即可视阳性反应之结果,因此称为单步骤反应。整个试验步骤仅耗时低于15分钟,因此称为单步骤快速测试。

[0259] 单步骤快速免疫层析试验是一个简单、快速且操作简易之试验方法,可方便使用于照护站。本发明提供受试之样本与侦测抗体之混合物,该混合物可贴附或先固定于膜表面或玻璃上,在适当之培养温度下(如室温)反应数分钟。反应时间可依试验之反应条件和侦测抗体之品质而缩短,因此快速免疫试验之等待时间短,试验不需经由仪器侦测便可得可视之结果。

[0260] A.) 单步骤人乳头状瘤病毒测流试验:将抗人乳头状瘤病毒第一抗体固定于试膜上,以有奈米金颗粒共轭之抗人乳头状瘤病毒第二抗体进行侦测

[0261] 单步骤快速免疫试验可以是膜或固定有捕捉试剂之测试棒,捕捉试剂如纯化后之人乳头状瘤病毒抗体、重组蛋白或人乳头状瘤病毒相关之抗体和蛋白质等,其所捕捉之标的试剂,如临床样本中之人乳头状瘤病毒相关之抗体和蛋白等,接着以免疫试验系统进行侦测。

[0262] 图30A-30G说明以本发明描述之抗体,进行单步骤测流试验,侦测人乳头状瘤病毒蛋白。图30A说明以兔子之抗L1多克隆抗体固定于膜上,并共轭奈米金颗粒,进行单步骤测流试验侦测人乳头状瘤病毒L1重组蛋白。试验控制组(TC)显示于第一条联机,第二条线(箭号)为阳性反应,右边箭号无可见之带纹者为阴性反应。L1重组蛋白浓度由左至右为6,3,1.5,0.75,0.375,0微克/毫升。实验数据显示,单步骤人乳头状瘤病毒测流试验可侦测浓度低于375纳克/毫升之人乳头状瘤病毒L1重组蛋白。

[0263] 快速测流试验可侦测临床样本中之人乳头状瘤病毒L1蛋白,图30B说明以图30A相同兔子之抗L1多克隆抗体固定于膜上侦测血清样本中人乳头状瘤病毒L1蛋白之结果。试验控制组(TC)显示于第一条线上,第二条线(箭号)为阳性反应说明鳞状细胞癌病患之血清样本中侦测到L1蛋白(左边),经聚合酶链反应因为人乳头状瘤病毒阴性之血清无可见之带

纹,作为试验中之阴性控制组(右边)。实验数据显示,单步骤人乳头状瘤病毒测流试验可经由比较人乳头状瘤病毒阴性血清,侦测鳞状细胞癌血清样本中之人乳头状瘤病毒L1蛋白。

[0264] 快速测流试验可侦测人乳头状瘤病毒E6蛋白,图30C说明以老鼠之浓缩人乳头状瘤病毒E6单克隆抗体固定于膜上,并共轭奈米金颗粒,进行单步骤测流试验侦测人乳头状瘤病毒E6蛋白。试验控制组(TC)显示于第一条联机,第二条线(箭号)为阳性反应,右边箭号无可见之带纹者为阴性反应。E6重组蛋白浓度由左至右为10,2,0微克/毫升。实验数据显示,单步骤人乳头状瘤病毒测流试验可侦测浓度低于2微克/毫升之人乳头状瘤病毒E6重组蛋白。

[0265] 测流试验系统可进一步用来侦测临床样本中之人乳头状瘤病毒E6蛋白图30D说明以图30C相同老鼠之抗E6单克隆抗体固定于膜上,侦测血清样本中人乳头状瘤病毒E6蛋白之结果。试验控制组(TC)显示于第一条线上,第二条线(箭号)为阳性反应说明鳞状细胞癌血清样本(由左边开始第一及第二)中E6蛋白呈侦测阳性,经聚合酶链反应反应为人乳头状瘤病毒阴性之血清无可见之带纹,作为试验中之阴性控制组(右边)。实验数据显示,单步骤人乳头状瘤病毒测流试验可经由比较人乳头状瘤病毒阴性血清,侦测鳞状细胞癌血清样本中之人乳头状瘤病毒E6蛋白。

[0266] 图30E说明以另一老鼠之抗E6单克隆抗体固定于膜上,并共轭奈米金颗粒,进行单步骤测流试验侦测人乳头状瘤病毒E6重组蛋白。试验控制组(TC)显示于第一条联机,第二条线(箭号)为阳性反应,右边箭号无可见之带纹者为阴性反应。E6重组蛋白浓度由左至右为875,438,0微克/毫升。实验数据显示,单步骤人乳头状瘤病毒测流试验可侦测浓度低于435纳克/毫升之人乳头状瘤病毒E6重组蛋白。

[0267] 快速测流试验可侦测人乳头状瘤病毒E7蛋白,图30F说明以老鼠之浓缩人乳头状瘤病毒E7单克隆抗体固定于膜上,并共轭奈米金颗粒,进行单步骤测流试验侦测人乳头状瘤病毒E7蛋白。试验控制组(TC)显示于第一条联机,第二条线(箭号)为阳性反应,右边箭号无可见之带纹者为阴性反应。E7重组蛋白浓度由左至右为0,660,66,6.6,0.66微克/毫升。实验数据显示,单步骤人乳头状瘤病毒测流试验可侦测浓度低于660微克/毫升之人乳头状瘤病毒E7重组蛋白。

[0268] 测流试验系统可进一步用来侦测临床样本中之人乳头状瘤病毒E7蛋白,图30G说明以图30F相同老鼠之抗人乳头状瘤病毒E7单克隆抗体固定于膜上,侦测血清样本中人乳头状瘤病毒E7蛋白之结果。试验控制组(TC)显示于第一条线上,说明聚合酶链反应反应呈人乳头状瘤病毒阳性(左边)之血清样本E7蛋白呈阳性侦测,经聚合酶链反应反应为人乳头状瘤病毒阴性之血清无可见之带纹,作为试验中之阴性控制组(右边)。实验数据显示,单步骤人乳头状瘤病毒测流试验可经由比较人乳头状瘤病毒阴性血清,侦测已知人乳头状瘤病毒阳性血清样本中之人乳头状瘤病毒E7蛋白。

[0269] 一种或多种以上之免疫学试验,使用抗体和由早期或晚期基因所纯化后之重组蛋白,针对人乳头状瘤病毒感染发生时,做为可信之指标物质。此外,人乳头状瘤病毒相关恶性肿瘤或肿瘤前之细胞转换皆可以试验分析,其中本发明最有用之面项为诊断子宫颈癌、鳞状上皮细胞和腺癌等,任何与人乳头状瘤病毒感染原致癌基因相关之不正常上皮细胞,如细胞空洞、过度角质化,癌前病灶包括上皮细胞变性或内皮细胞病灶、高度结构不良增生,以及非侵袭性或恶性癌症。

[0270] 人乳头状瘤病毒感染之早期诊断在成功预防和治疗宫颈癌中扮演重要角色。宫颈癌之预防阶段,需要促进普遍人口之大范围的人乳头状瘤病毒试验/筛选方式,并对过去和现在有人乳头状瘤病毒感染病史和癌前病灶之病人进行追踪。最重要的是,12-15岁的女性感染人乳头状瘤病毒将可能导致非侵袭型性癌症的发展,因此本发明所述女性早期筛选人乳头状瘤病毒感染之生物标记试验便相当重要,该试验可早期治疗人乳头状瘤病毒感染病预防宫颈癌的发展,而不需依赖化学治疗或放射性治疗癌症恶性肿瘤。

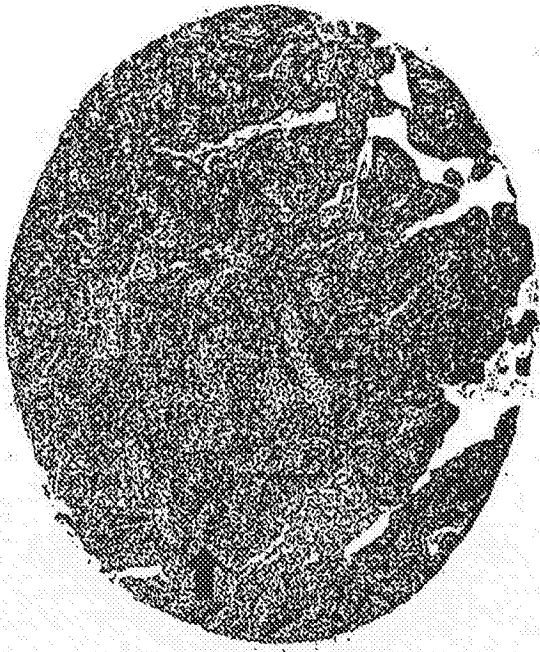


图1A

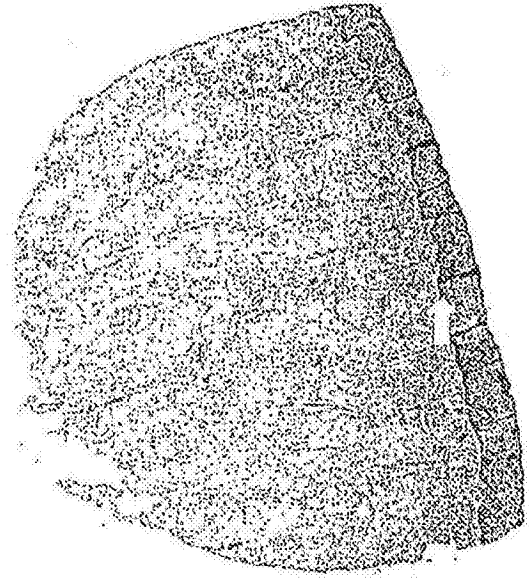


图1B

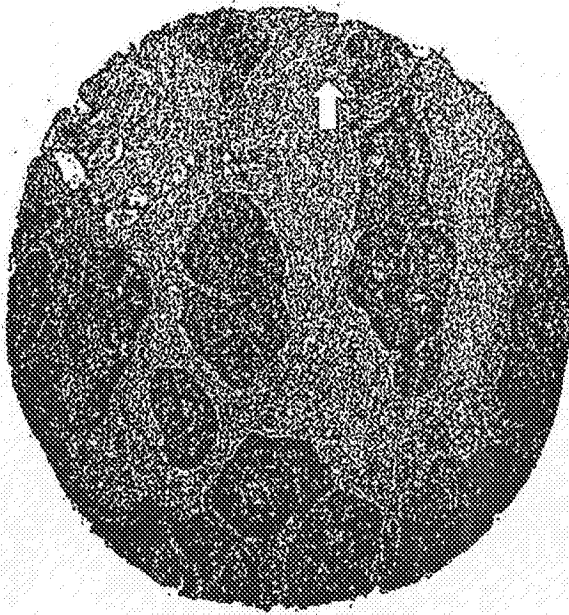


图1C

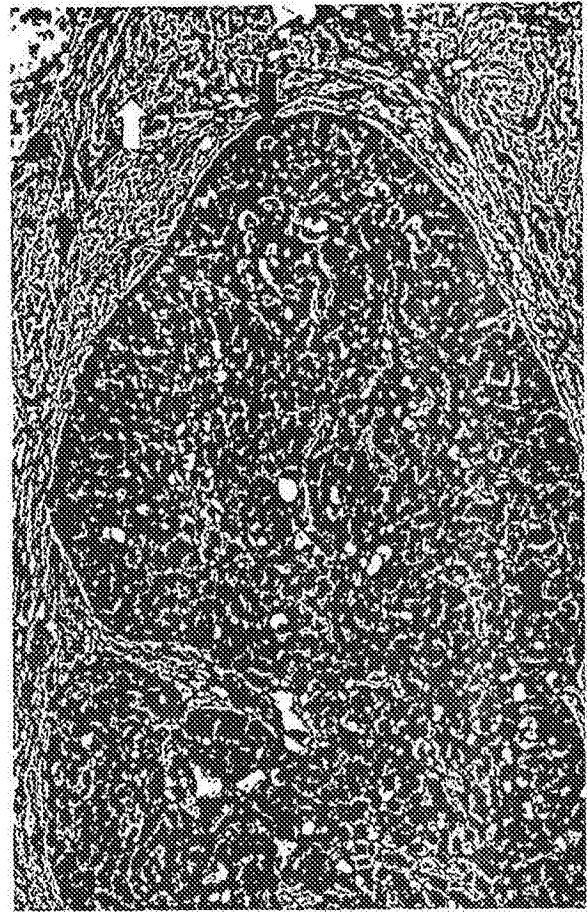


图1D

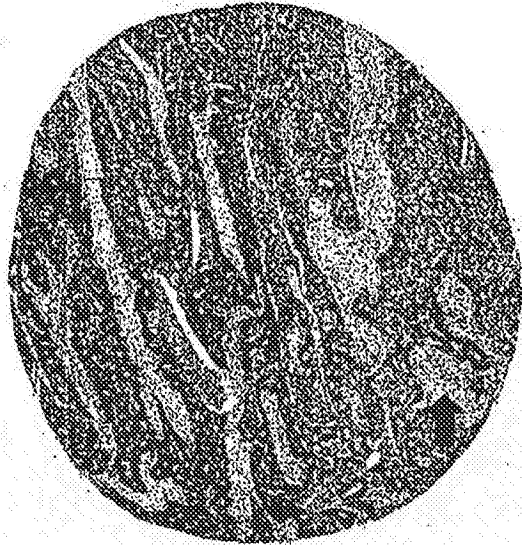


图2A

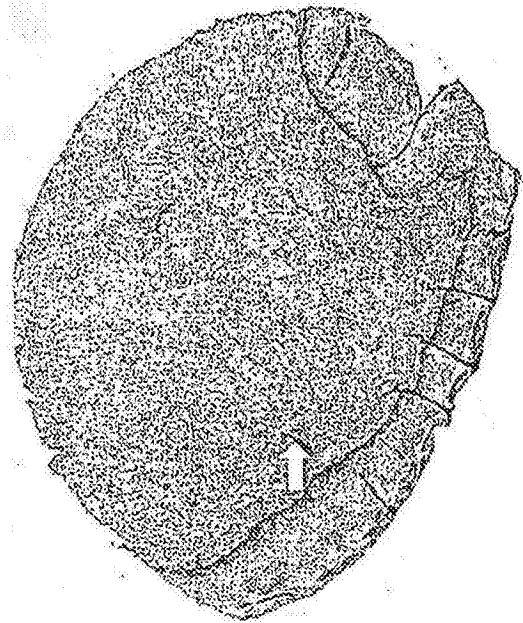


图2B

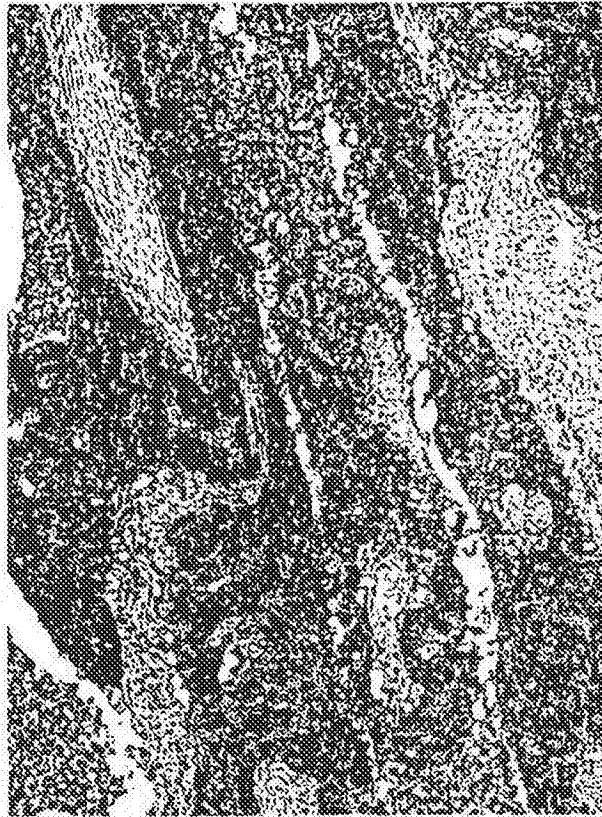


图2C

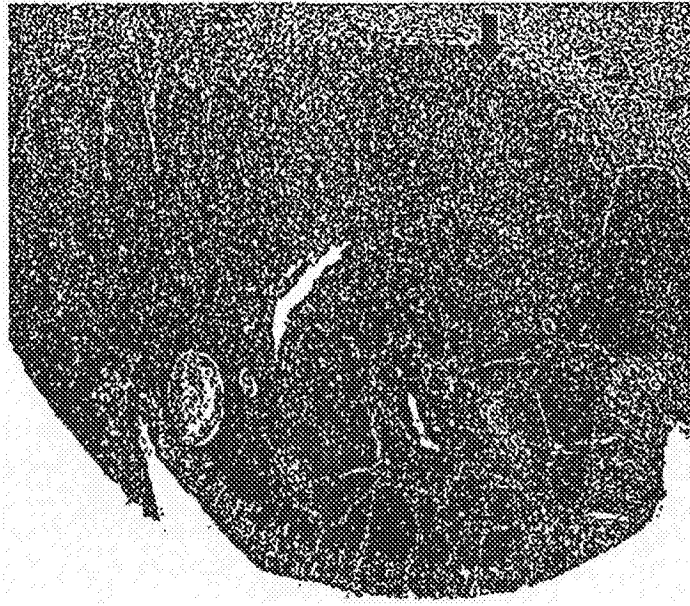


图3A

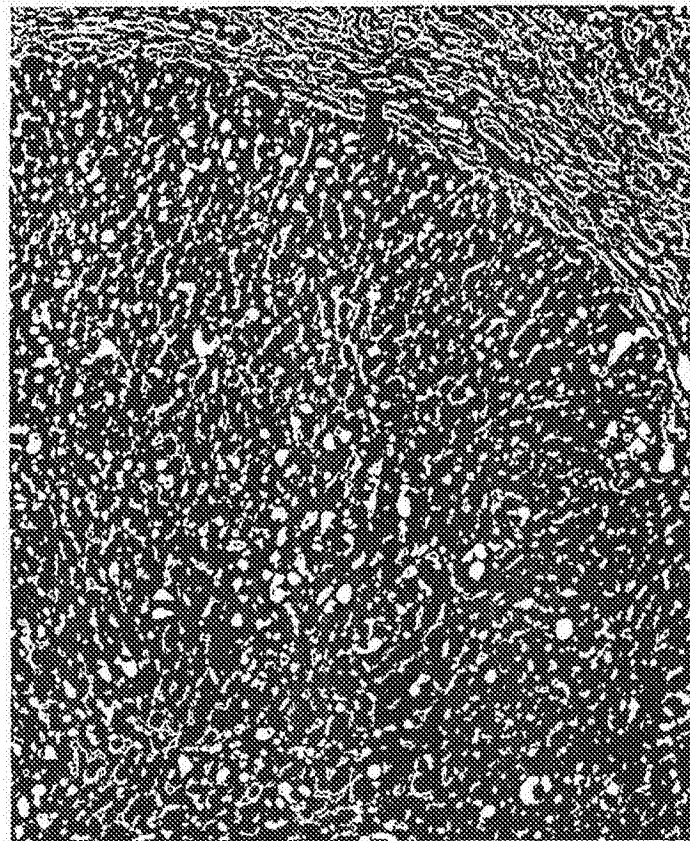


图3B

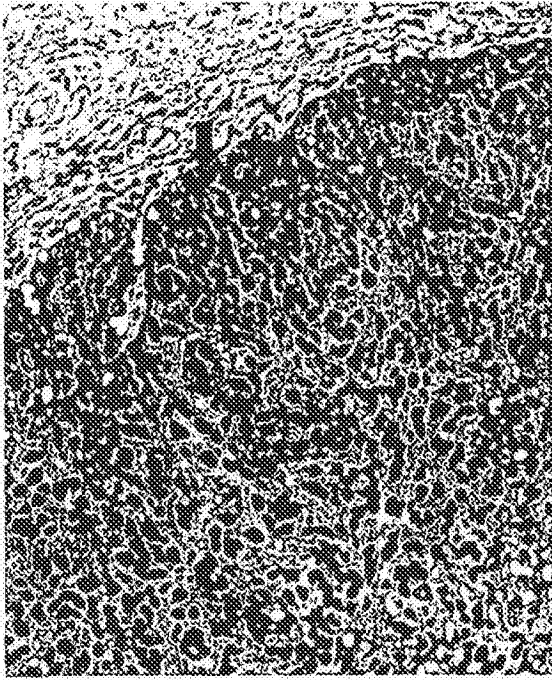


图4A

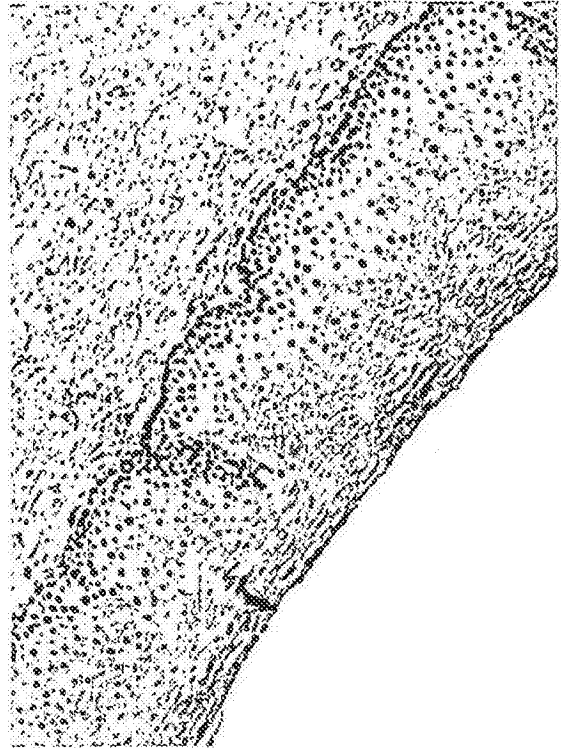


图4B

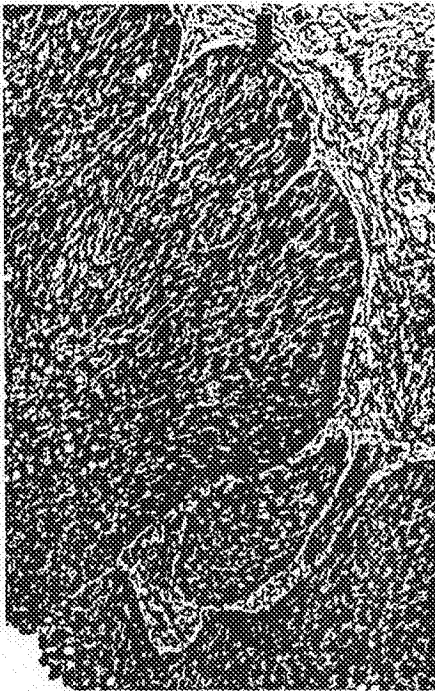


图4C

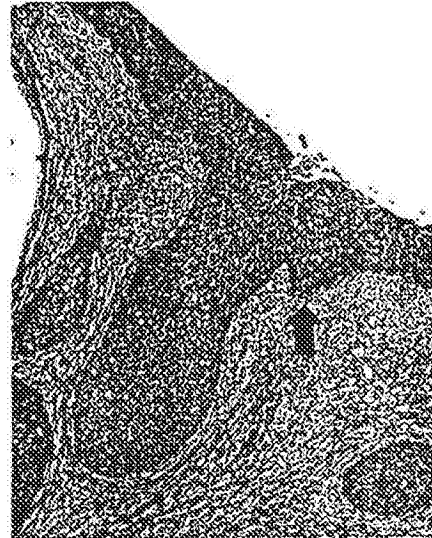


图4D

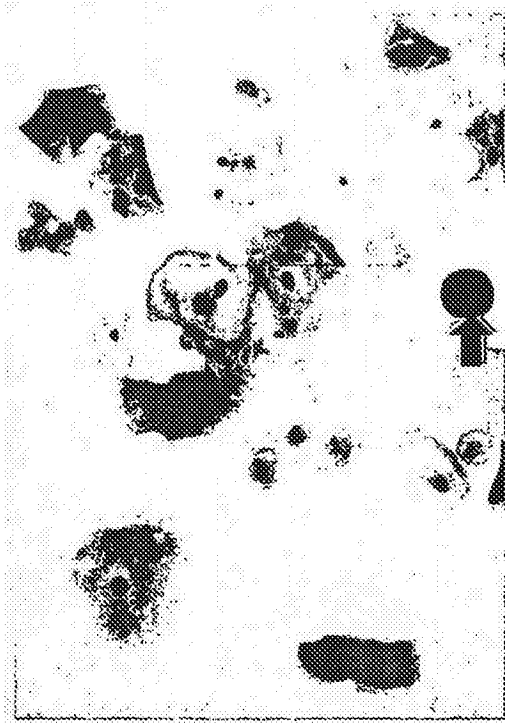


图5A

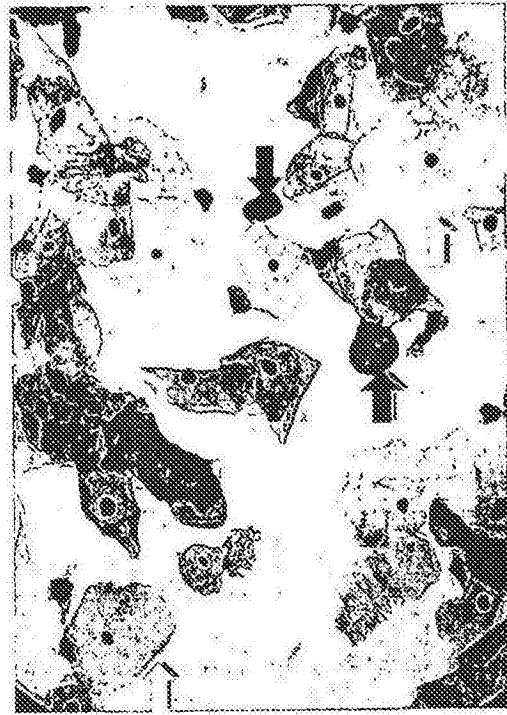


图5B

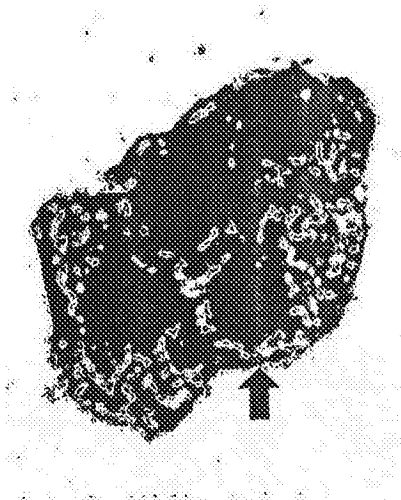


图6A

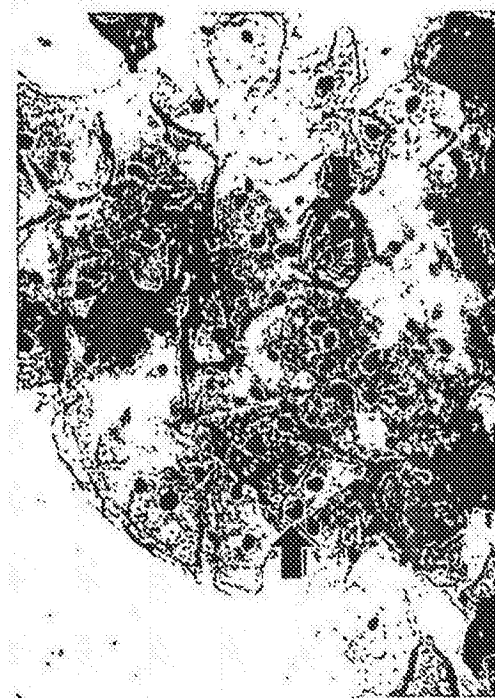


图6B



图7A

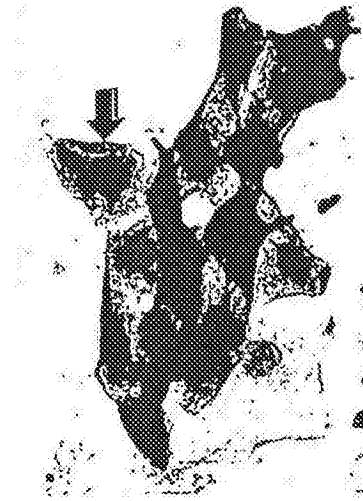


图7B

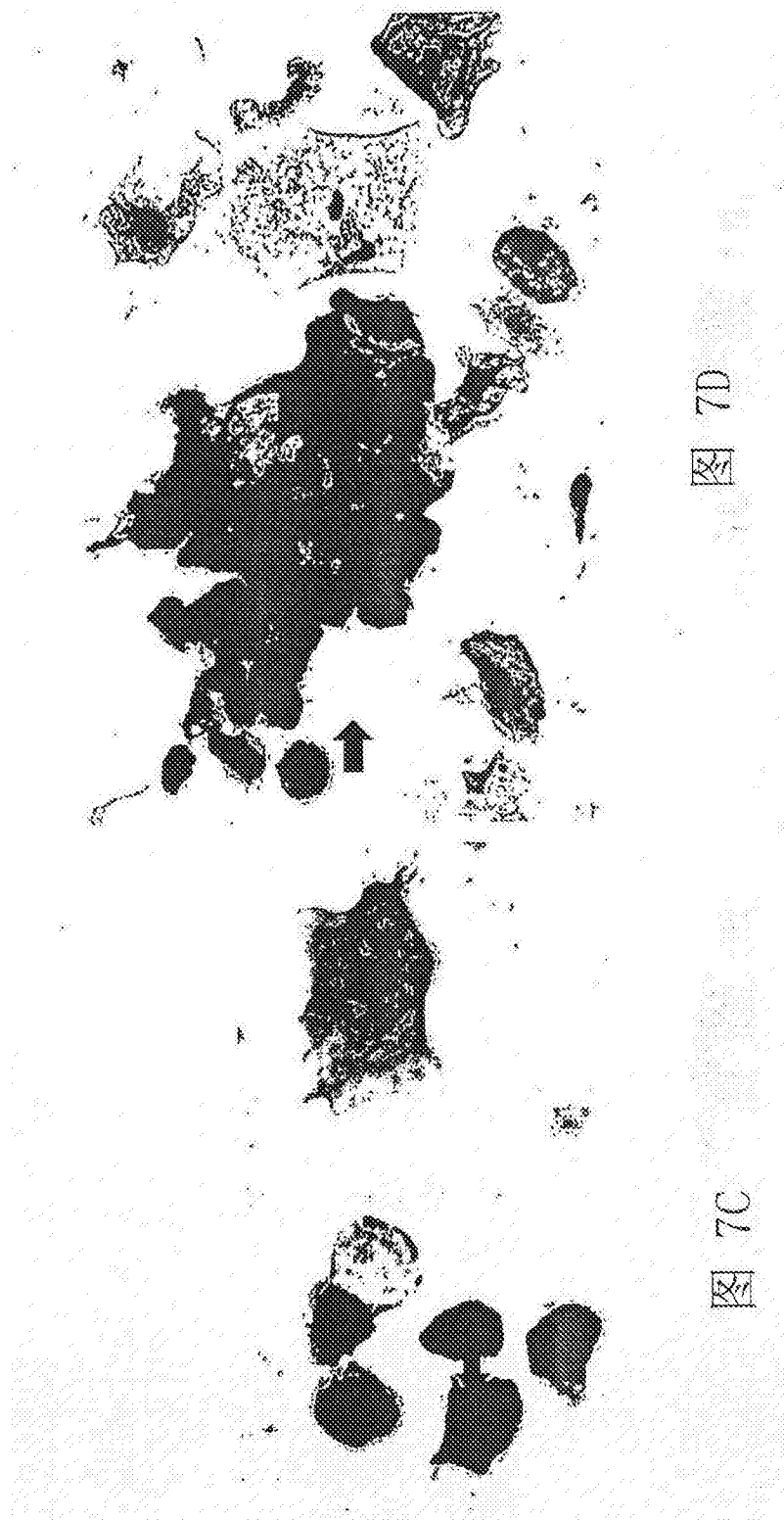




图7F



图7G



图7H

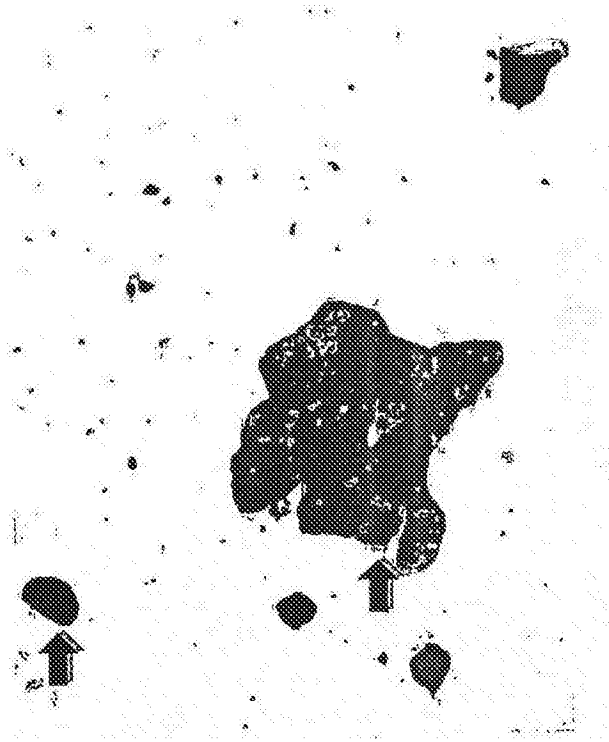


图8

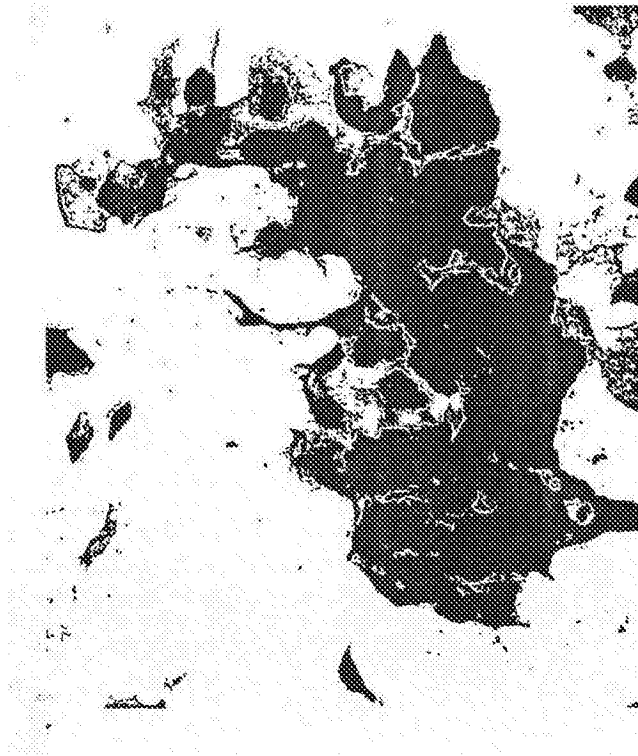


图9A



图9B

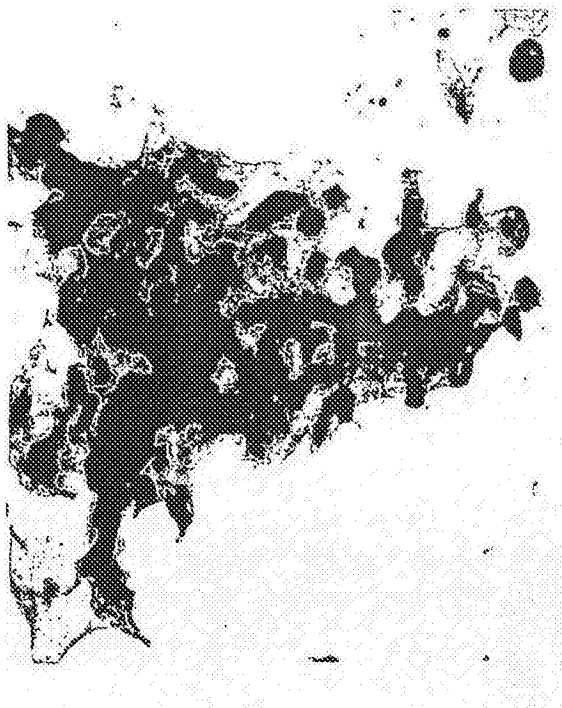


图9C

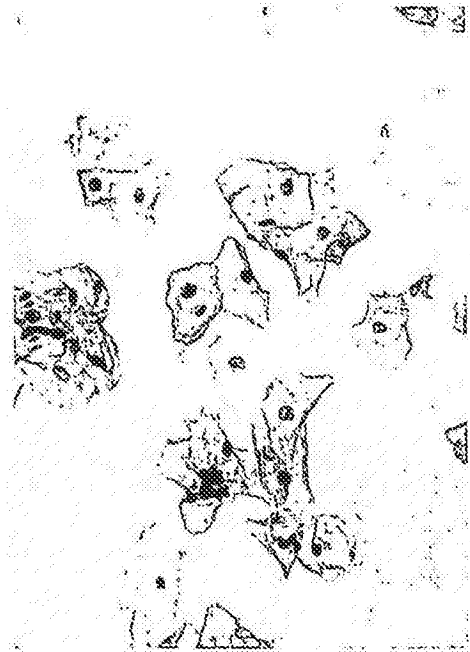


图10A



图10B



图11A

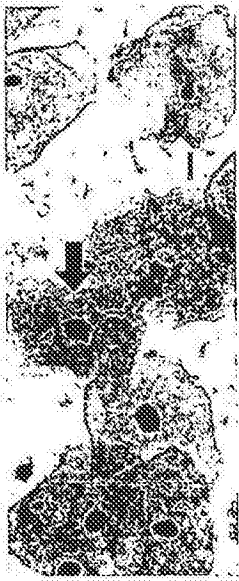


图11B

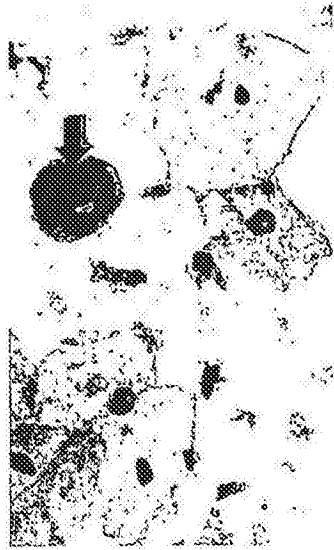


图11C



图12A

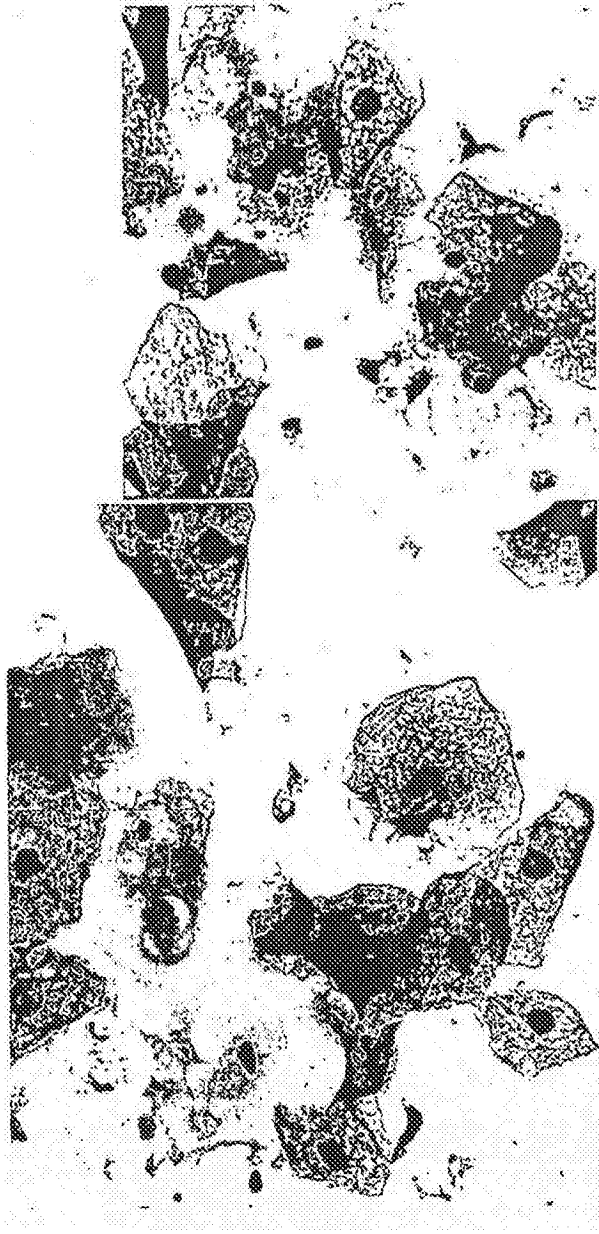


图 12C

图 12B



图12D

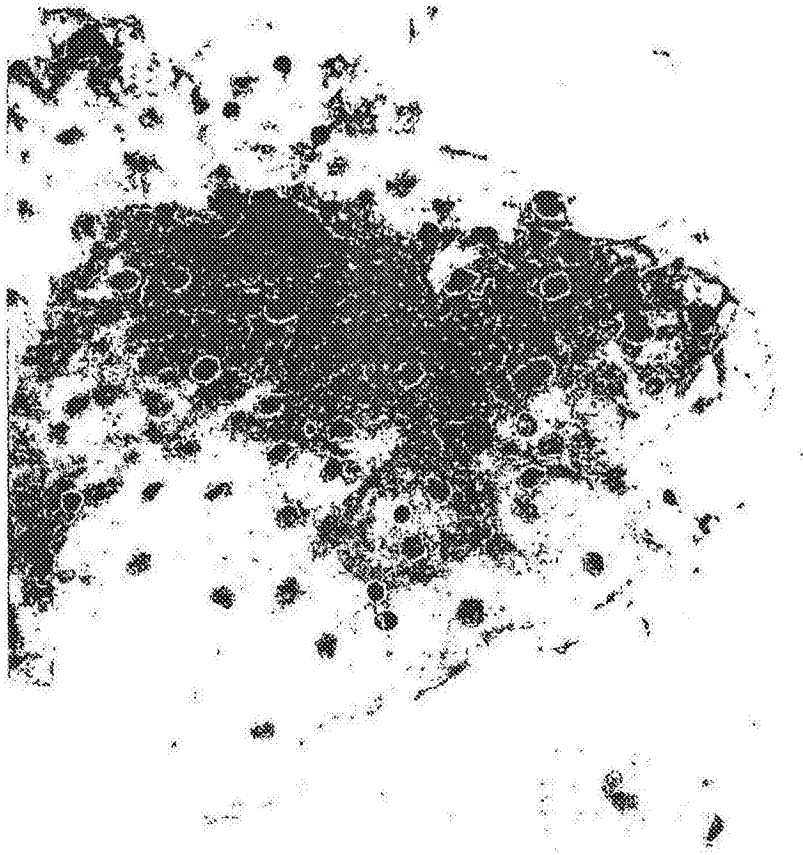


图12E

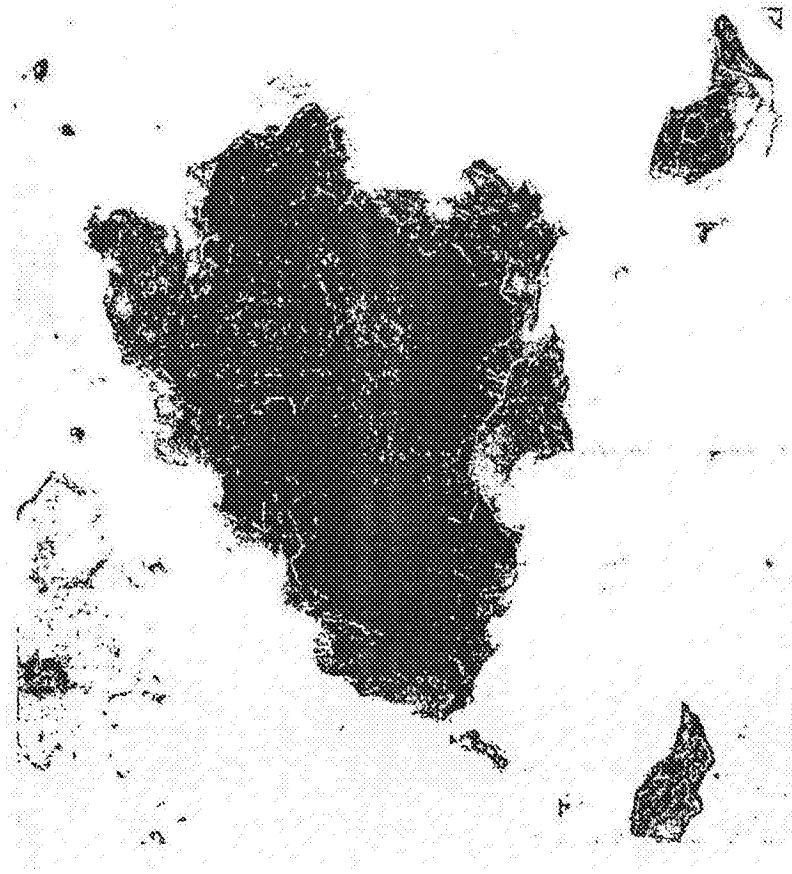


图12F

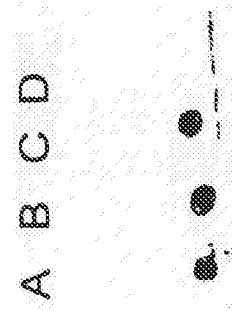


图13A

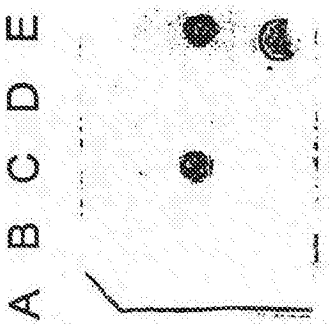


图13B

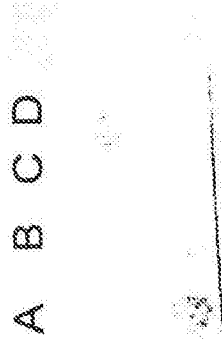


图14A

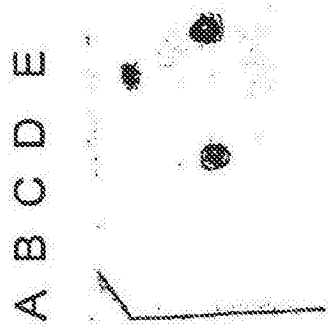


图14B

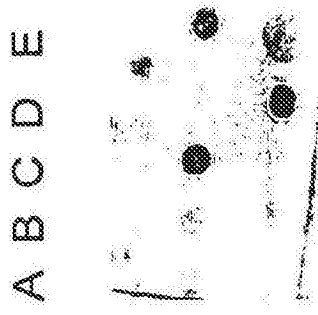


图15

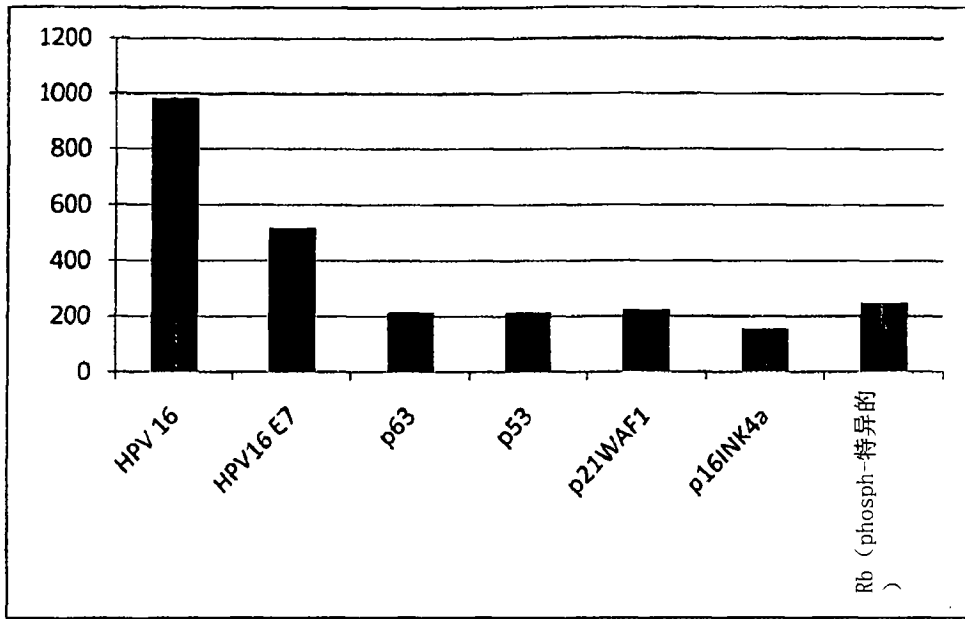


图16

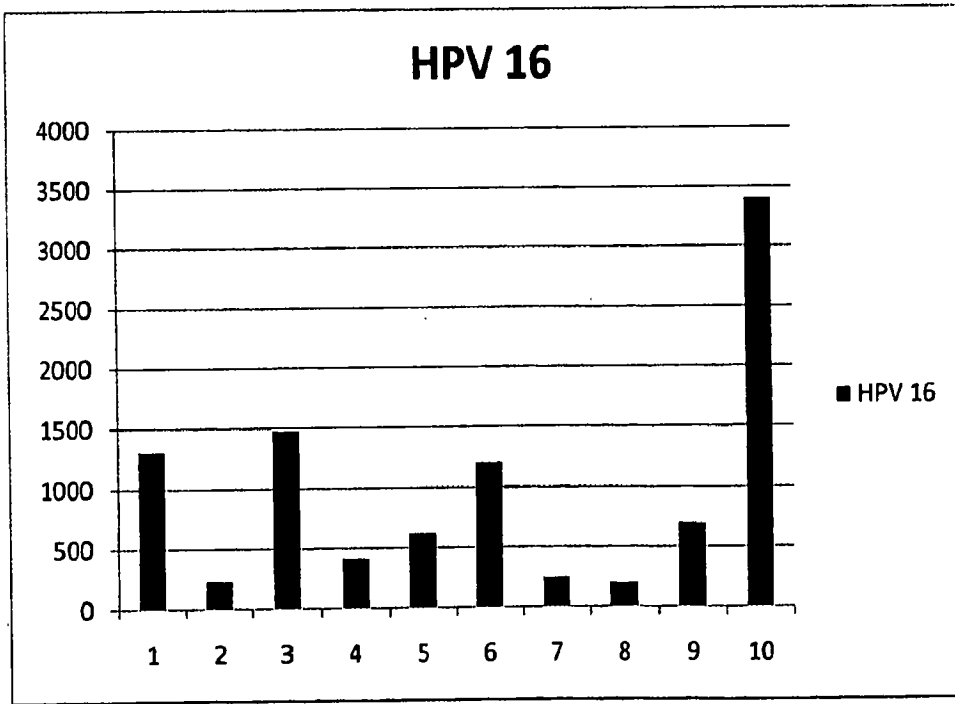


图17

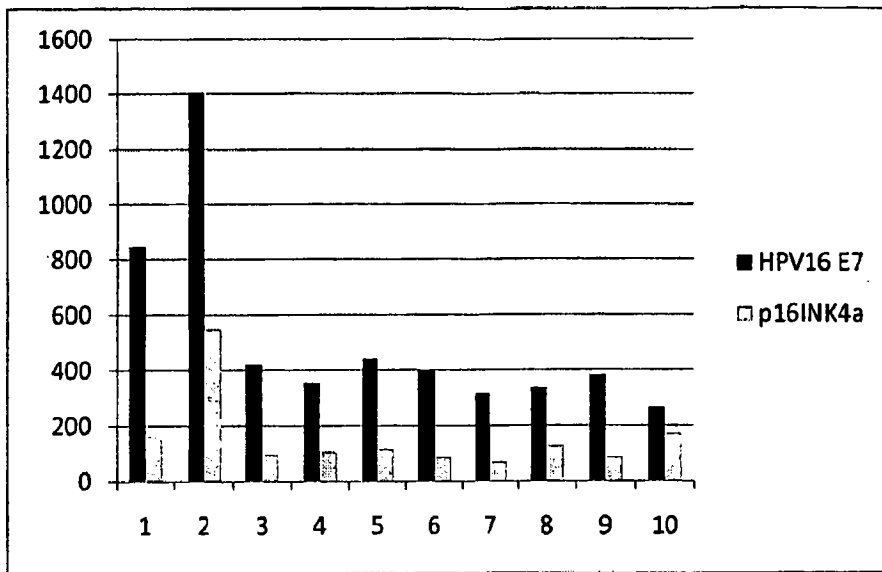


图18

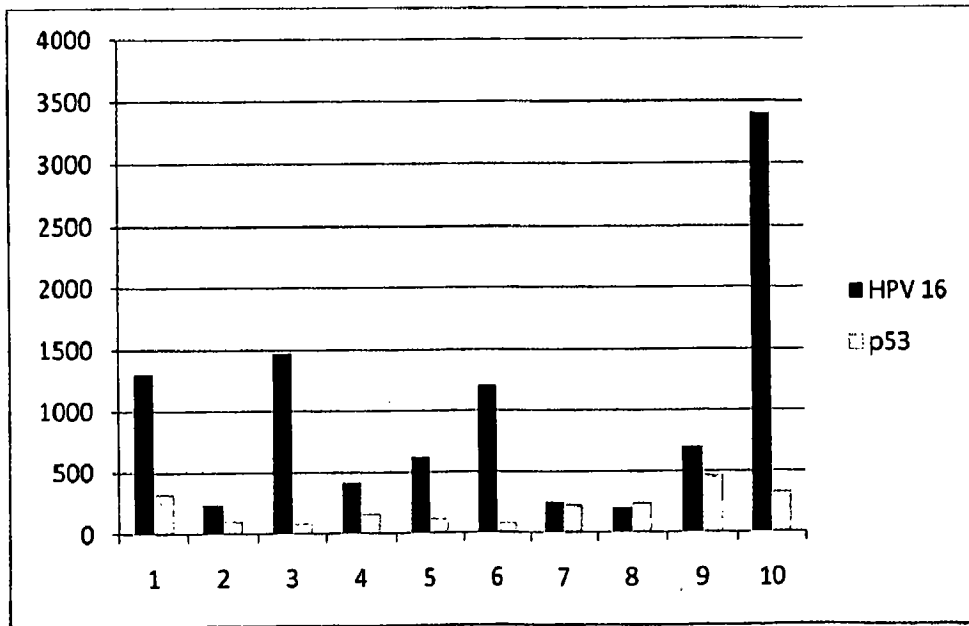


图19

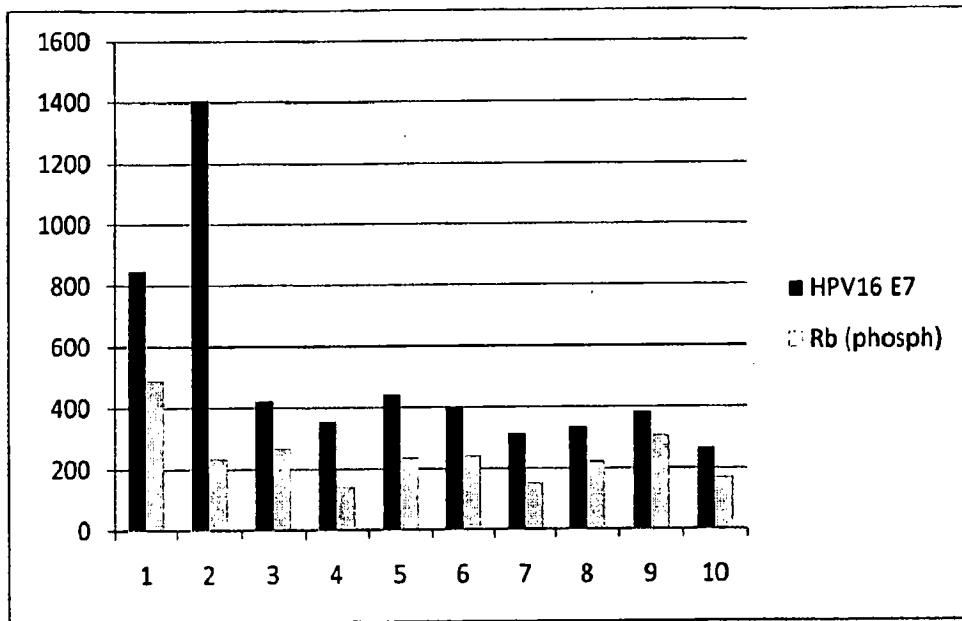


图20

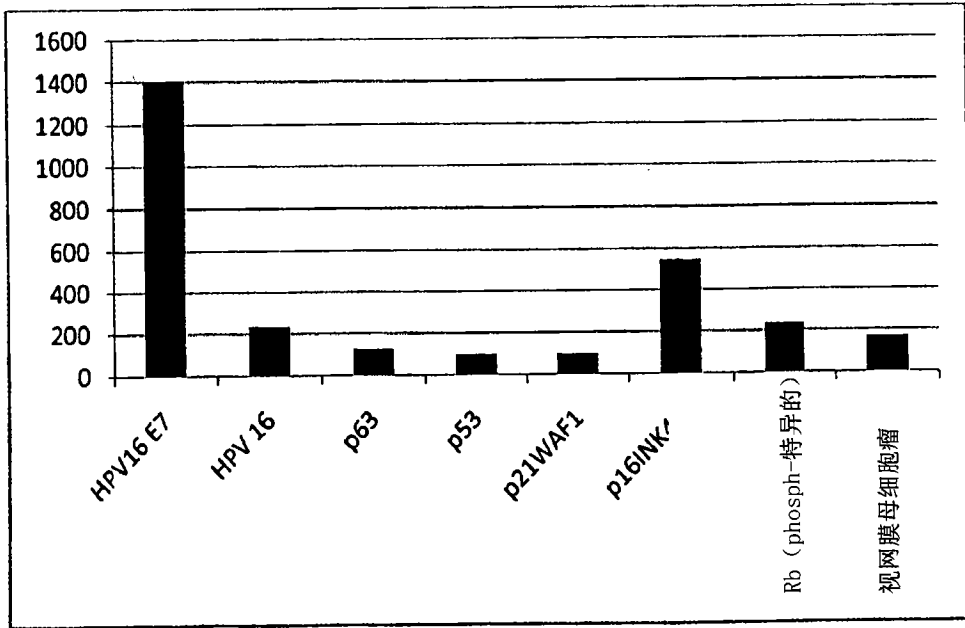


图21

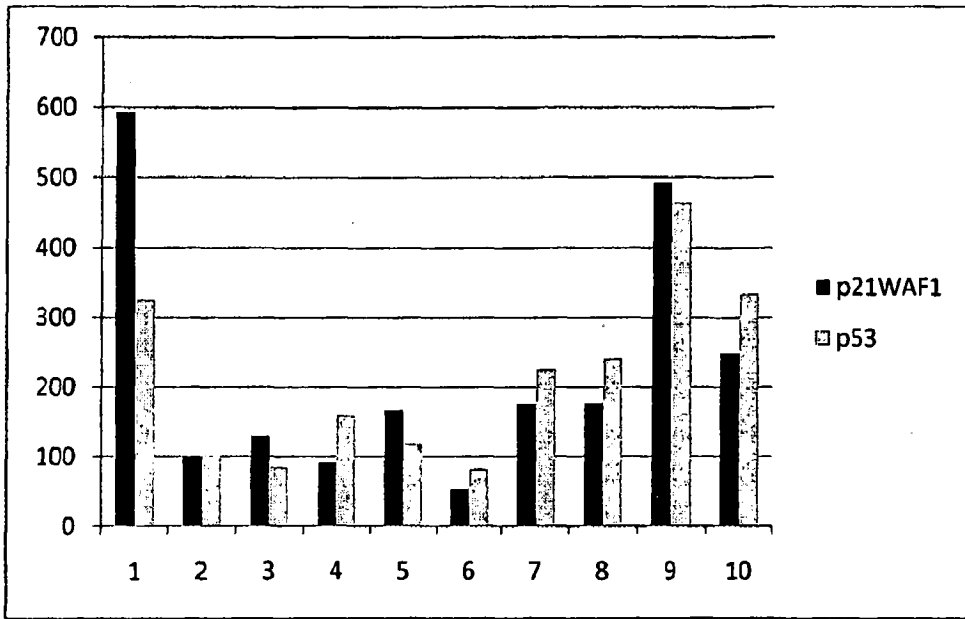


图22



图23

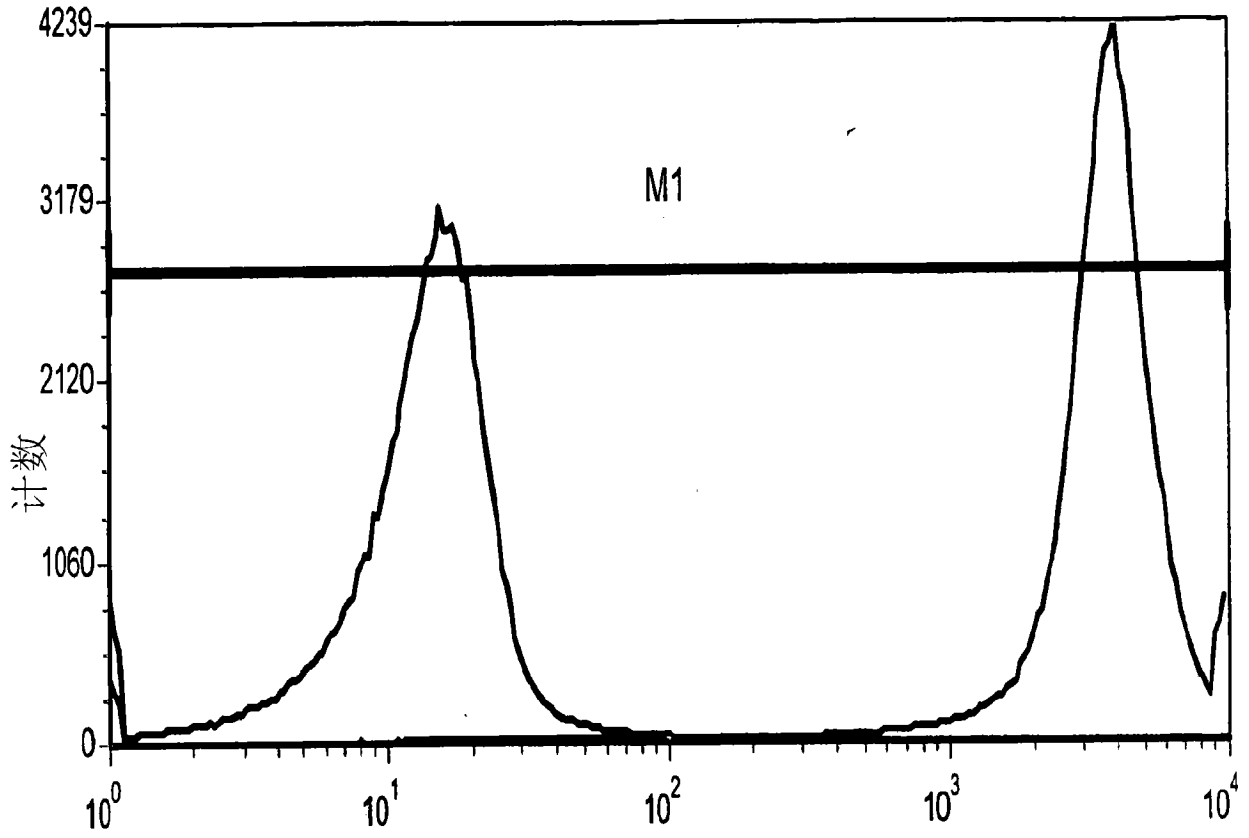


图24

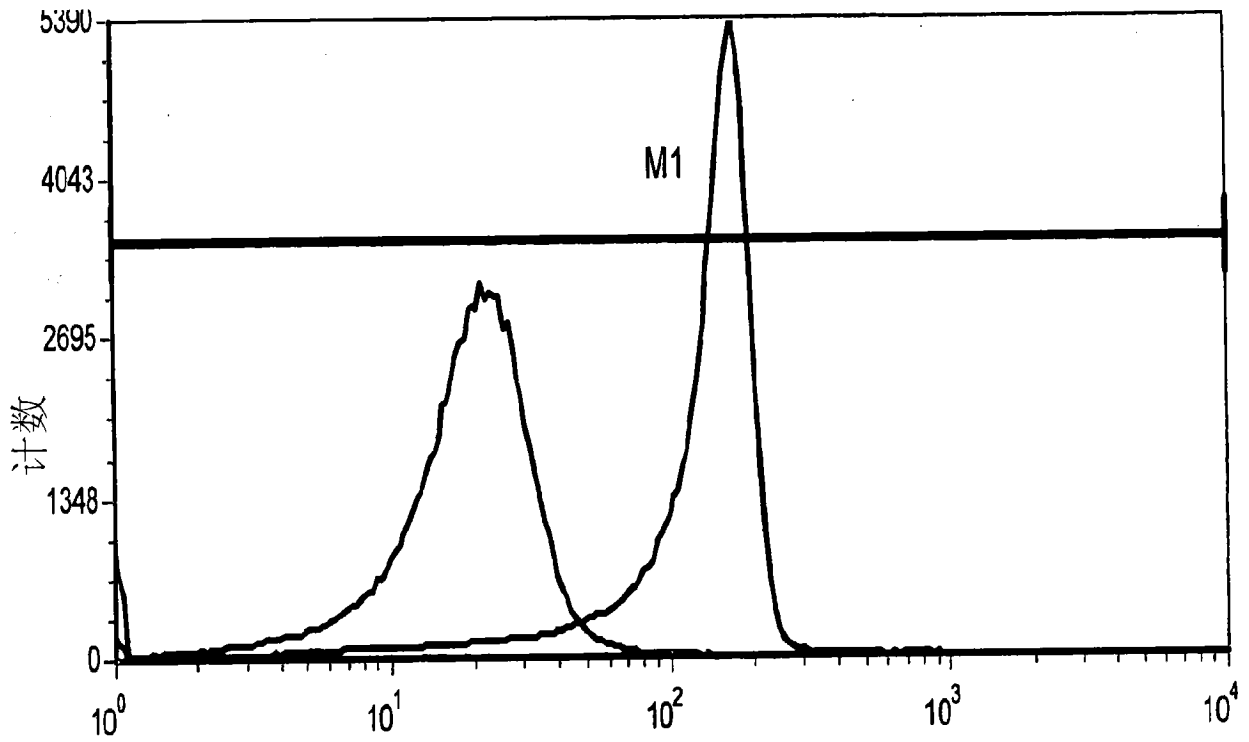


图25

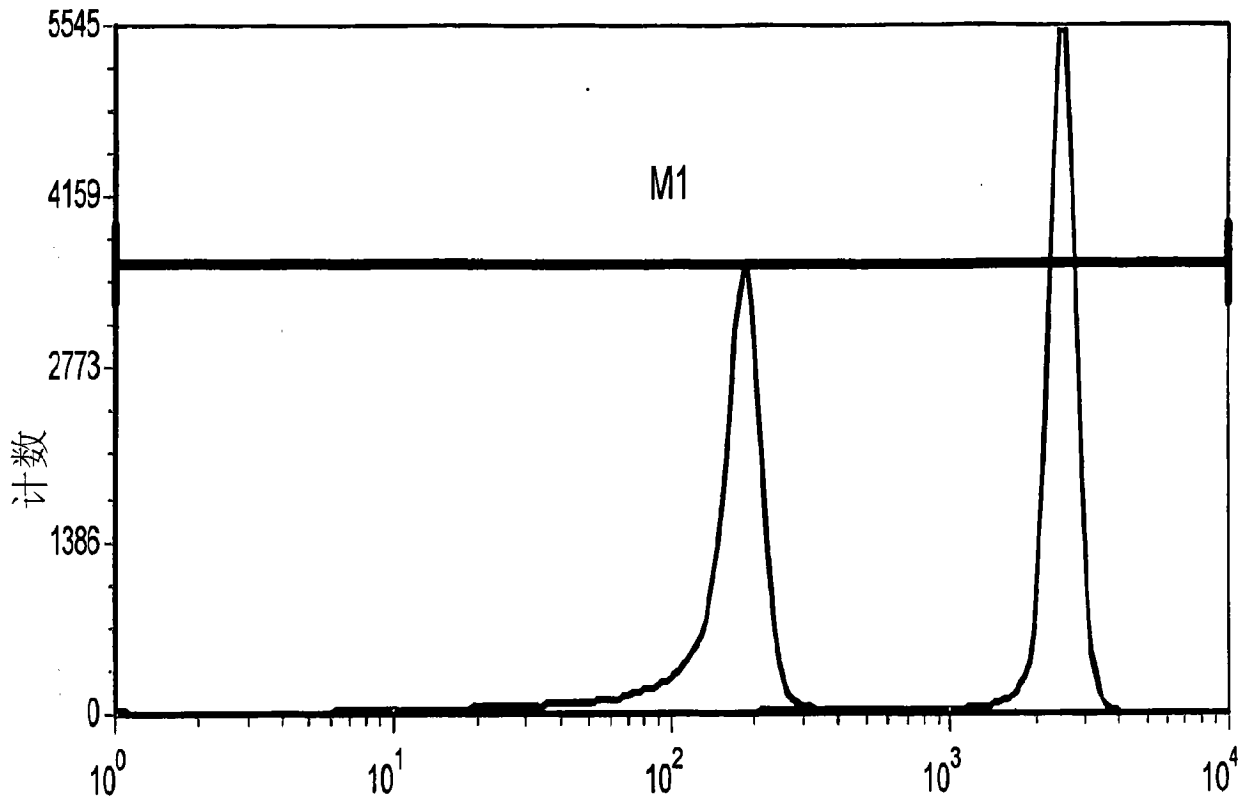


图26

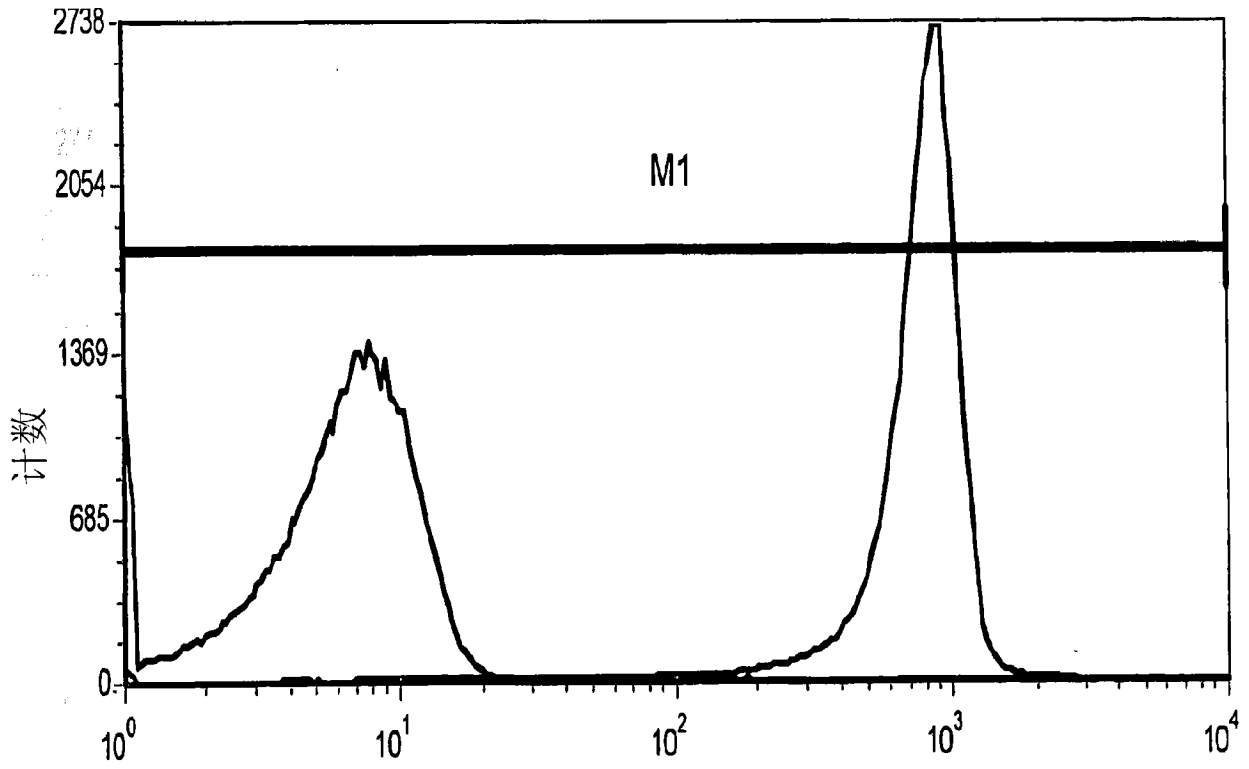


图27

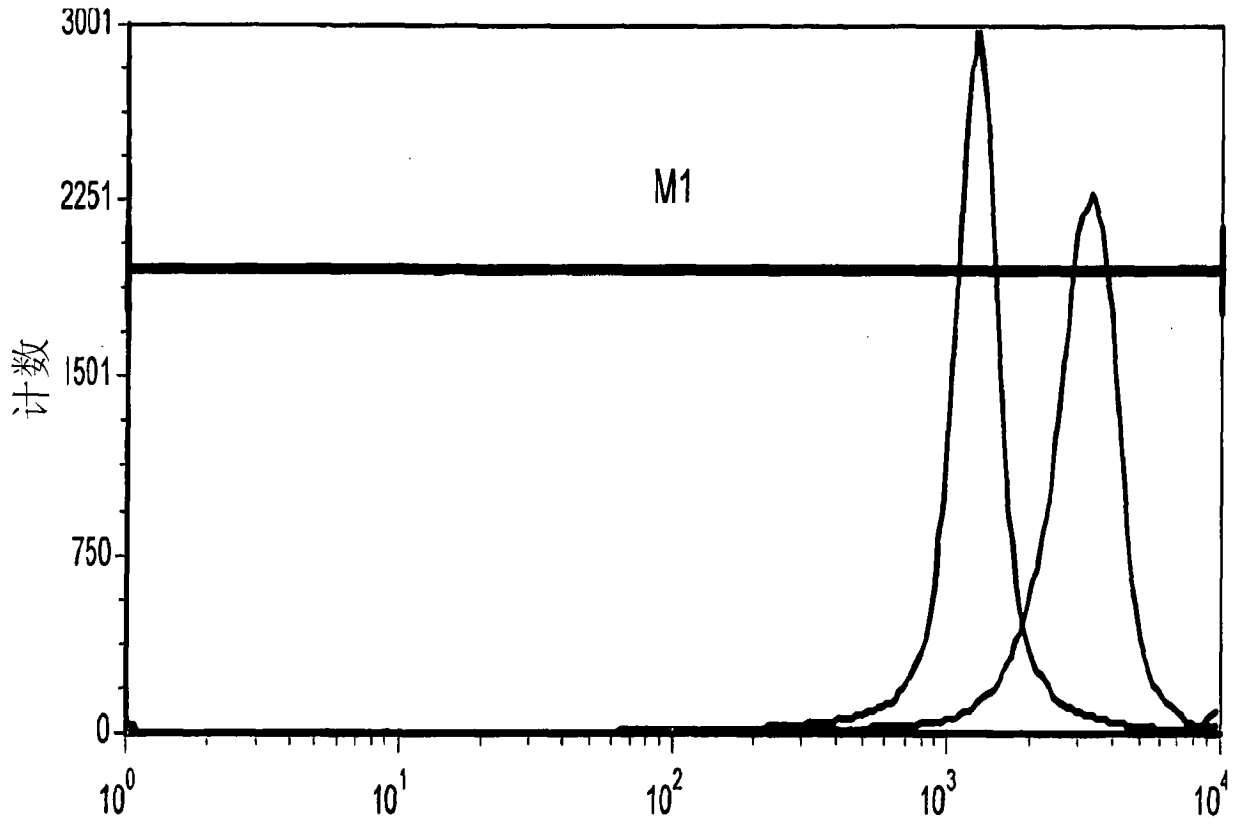


图28

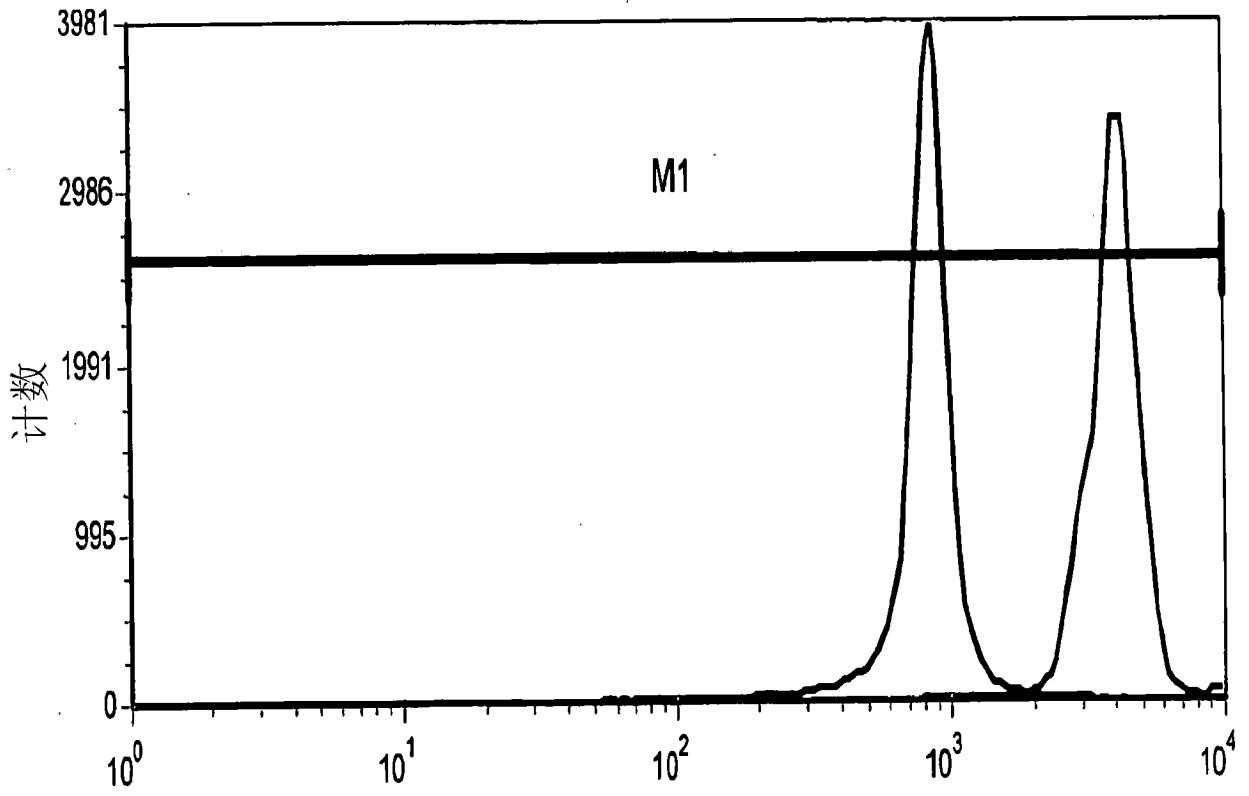


图29

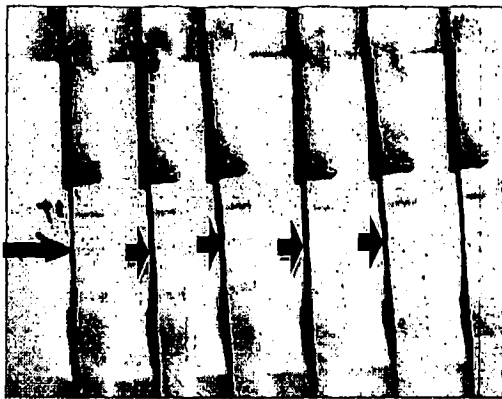


图30A

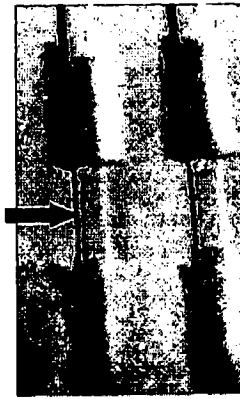


图30B

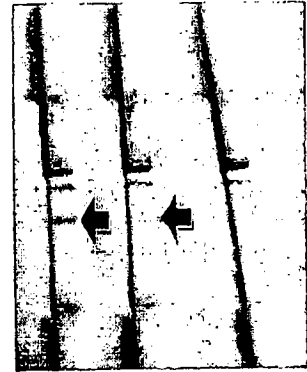


图30C

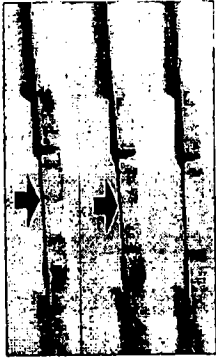


图30D

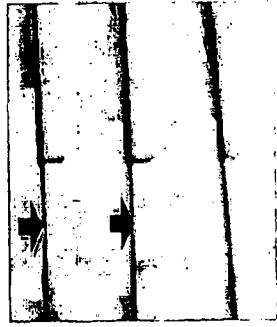


图30E

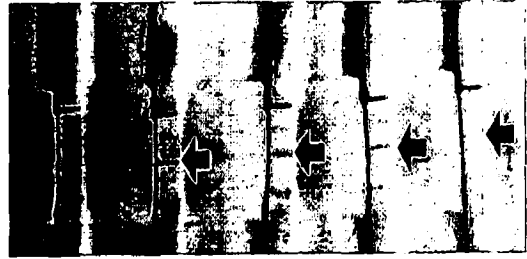


图30F

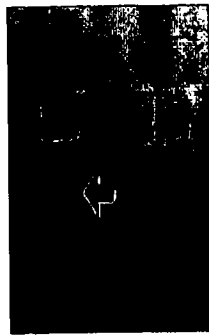


图30G

专利名称(译)	人乳头状瘤病毒早期及晚期感染之免疫分析试验		
公开(公告)号	CN102066931B	公开(公告)日	2017-03-15
申请号	CN200980131077.X	申请日	2009-06-12
申请(专利权)人(译)	郑淑玲		
当前申请(专利权)人(译)	武汉呵尔医疗科技发展有限公司		
[标]发明人	郑淑玲		
发明人	郑淑玲		
IPC分类号	G01N33/53		
CPC分类号	G01N33/56983 C07K16/084 C12Q1/708 G01N33/571 G01N2333/025 G01N2469/10		
优先权	61/131991 2008-06-13 US 12/456054 2009-06-10 US 12/456053 2009-06-10 US 61/192912 2008-09-22 US		
其他公开文献	CN102066931A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本专利发明实施案例，提供方法、单克隆抗体、多克隆抗体、试验和试剂盒，侦测人乳头状瘤病毒感染，包括各式人乳头状瘤病毒型之感染及早期或晚期人乳头状瘤病毒相关性或特异性之蛋白和抗体。在单一试验中，单克隆抗体可侦测高风险及低风险人乳头状瘤病毒型之原致癌基因，且不受限于试验之形式，提供一可专一性侦测侵袭性子宫颈癌之有利工具。本专利发明亦对子宫颈癌之生物标记进行确认，生物标记可配合试验方法，可用于侦测早期癌前病灶或癌症晚期之发展状况。

样本 #	HPV 型	抗-E7				另一抗-E7		另一抗-E6		另一抗-L1	
		Dys (%stained)		Normal epith. (%stained)		Dys (%)	Dys (%)	Dys. (%)	Dys. (%)	Dys. (%)	Dys. (%)
		C	N	C	N	C	C	C	C	C	C
SCC-1	18	85	8	5	0	2	0	12.5	10	70	55
SCC-2	16, 52	90	8	5	0	2	5	15	15	10	55
SCC-3	16	60	6	5	0	4	0	5	0	10	20
SCC-4	16	92	5	0	0	4	0	5	0	10	85
SCC-5	16, 52, 58	92	5	0	5	0	0	20	5	15	88
SCC-6	18, 52, 58	90	6	0	0	0	0	25	18	10	70
SCC-7	16, 52	92	7	5	0	3	0	30	5	10	20
SCC-8	16, 58	10	1	0	0	5	0	0	0	10	50
SCC-9	no DNA	95	6	0	0	4	0	25	8	15	8
SCC-10	18	92	6	5	0	6	0	45	25	20	65
SCC-11	16, 58			0	8	0	0	5		0	0
SCC-12	33	95	9	0	0	0	0	30	1	20	55
腺癌-1	16, 18	30	2	0	5	0	0	15	25	20	82