



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102822672 B

(45) 授权公告日 2015. 12. 09

(21) 申请号 201080060962. 6

(22) 申请日 2010. 12. 16

(30) 优先权数据

61/335, 540 2010. 01. 08 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2012. 07. 09

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2010/060765 2010. 12. 16

(87) PCT国际申请的公布数据

W02011/084598 EN 2011. 07. 14

(73) 专利权人 安科健康公司

地址 美国加利福尼亚

(72) 发明人 S·成

(74) 专利代理机构 北京纪凯知识产权代理有限公司

11245

代理人 赵蓉民 陆惠中

(51) Int. Cl.

G01N 33/53(2006. 01)

C12Q 1/70(2006. 01)

(56) 对比文件

US 2010/0003704 A1, 2010. 01. 07,

WO 2009/079192 A1, 2009. 06. 25,

US 2008/0200344 A1, 2008. 08. 21,

US 2008/0044809 A1, 2008. 02. 21,

US 2004/0018487 A1, 2004. 01. 29,

US 2008/0267982 A1, 2008. 10. 30,

US 2005/0042600 A1, 2005. 02. 24,

李蓉芬. 影响细胞 ELISA 结果的主要因素. 《第三军医大学学报》. 2001, 第 23 卷 (第 7 期), 第 871-872 页.

刘在新. 固定细胞免疫过氧化物酶技术. 《甘肃畜牧兽医》. 1993, (第 2 期),

周仲芳. 用固定细胞阻断酶联免疫吸附试验鉴别诊断猪传染性胃肠炎病毒和猪呼吸道冠状病毒的感染. 《中国兽医杂志》. 1997, (第 12 期), 第 5-7 页.

审查员 刘迎鸣

权利要求书2页 说明书37页 附图12页

(54) 发明名称

用于诊断和筛选与 HPV 有关的癌症的高通量细胞基 HPV 免疫测定

(57) 摘要

公开了量化临床样品中 HPV 蛋白质表达的方法。该量化方法包括获得临床样品的过程。这种临床样品由易受 HPV 感染的细胞群体组成。该量化方法还包括将临床样品沉积到容器中的过程。使临床样品与特异性结合由 HPV 感染细胞表达的 HPV 蛋白质的初次抗体接触,所述接触的条件是促进初次抗体与由细胞群体表达的 HPV 蛋白质特异性结合。该方法还包括量化初次抗体的特异性结合的过程,从而量化临床样品中的 HPV 蛋白质表达。该分析提供客观的测试,以在活组织检查前,从细胞学样品中识别具有高级前体的患者。

CN 102822672 B

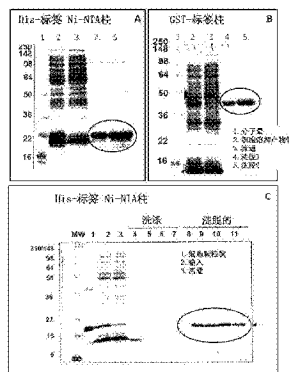


图1A-1C

1. 量化临床样品中 HPV 蛋白质表达的方法,包括如下步骤:

获得临床样品,所述临床样品包括易受 HPV 感染细胞群体;

将所述临床样品沉积到基质上,而不裂解所述细胞群体;

使所述临床样品与包含特异性原位结合 HPV 蛋白质的单克隆全抗体的溶液接触,其中所述单克隆全抗体特异性结合来自不同 HPV 类型的两种或更多种天然 HPV 蛋白,其中所述两种或更多种天然 HPV 蛋白是来自不同 HPV 类型的天然 E7 蛋白或来自不同 HPV 类型的天然 E6 蛋白,其中所述天然 E7 蛋白或天然 E6 蛋白为核蛋白,并且所述单克隆全抗体能够原位结合临床样品中的所述蛋白质;所述接触的条件是促进所述单克隆抗体与由包括来自所述获得的临床样品的所述细胞群体的一种或多种细胞表达的 HPV 蛋白质特异性结合;和

量化所述单克隆全抗体的所述特异性结合,从而量化所述临床样品中的 HPV 蛋白质表达,其中所述量化所述特异性结合包括量化与所述特异性结合的量成比例产生的溶液相分析物,并且其中所述细胞群体是全细胞群体。

2. 权利要求 1 所述的方法,

其中所述临床样品包括分散在收集液体中的细胞;

其中所述基质选自膜、珠和微量孔表面;

其中所述 HPV 蛋白质包括选自 HPV E6 蛋白质、HPV E7 蛋白质的 HPV 蛋白质;

其中所述单克隆全抗体包括标记;和

其中所述量化步骤包括量化由酶标记或荧光信号产生的生色基质。

3. 权利要求 1 所述的方法,还包括测量所述临床样品的细胞密度。

4. 权利要求 3 所述的方法,还包括标准化所述临床样品的所述细胞密度。

5. 用于量化临床样品中 HPV 蛋白质表达的试剂盒,包括

基质,其用于沉积包括易受 HPV 感染细胞群体的临床样品;

抗 HPV 单克隆全抗体,其用于与所述临床样品进行温育,所述单克隆全抗体特异性原位结合 HPV 蛋白质,并用于与所述临床样品在促进所述抗体与包括来自所述获得的临床样品的所述细胞群体的一种或多种细胞表达的 HPV 蛋白质特异性结合的条件下接触,其中所述单克隆全抗体特异性结合来自不同 HPV 类型的两种或更多种天然 HPV 蛋白,其中所述两种或更多种天然 HPV 蛋白是来自不同 HPV 类型的天然 E7 蛋白或来自不同 HPV 类型的天然 E6 蛋白,其中所述天然 E7 蛋白或天然 E6 蛋白为核蛋白,并且所述单克隆全抗体能够原位结合临床样品中的所述蛋白质;

检测剂或标记有检测剂的二次抗体,其用于量化所述抗体的所述特异性结合,从而量化所述临床样品中的 HPV 蛋白质表达;和

预定的 HPV 蛋白质表达水平阈值,其用于与所述量化的 HPV 蛋白质表达进行比较,其中所述细胞群体是全细胞群体。

6. 权利要求 5 所述的试剂盒,还包括染色剂,其用于测量所述临床样品中存在的细胞数目,从而根据所述临床样品中存在的细胞数目来标准化所述量化的 HPV 蛋白质表达。

7. 权利要求 5 所述的试剂盒,还包括 HPV 蛋白质标准曲线,其用于与所述量化的 HPV 蛋白质表达比较。

8. 权利要求 5 所述的试剂盒,其中所述预定的 HPV 蛋白质表达水平阈值与所述临床样品中的癌症或所述临床样品中的疾病等级有关,其中

所述预定的 HPV 蛋白质表达水平阈值通过测量包含诊断的疾病等级的临床样品中的所述 HPV 蛋白质表达水平而被确定。

9. 权利要求 2 所述的方法,其中  
所述临床样品包括固定的细胞;和  
所述收集液体包括固定剂。

10. 权利要求 2 所述的方法,其中所述细胞获自宫颈拭子、宫颈刮片、口腔拭子、口腔刮片、肛门拭子或肛门刮片。

11. 权利要求 1 所述的方法,其中所述单克隆全抗体特异地结合由一种或多种 HPV 型编码的一种或多种 HPV 蛋白质,所述一种或多种 HPV 型选自高风险 HPV 型、低风险 HPV 型。

12. 权利要求 11 所述的方法,其中所述高风险 HPV 型选自 HPV-16、HPV-18、HPV-31、HPV-33、HPV-35、HPV-39、HPV-45、HPV-51、HPV-52、HPV-56、HPV-58、HPV-59、HPV-68。

13. 权利要求 11 所述的方法,其中所述低风险 HPV 型选自 HPV-6、HPV-11、HPV-42、HPV-43、HPV-44、HPV-53、HPV-54。

14. 权利要求 1 所述的方法,其中所述单克隆全抗体特异地结合 HPV 蛋白质,所述 HPV 蛋白质选自 HPV E6 蛋白质、HPV E7 蛋白质。

15. 权利要求 1 所述的方法,还包括使所述临床样品与标记的二次抗体接触,所述标记的二次抗体特异地结合所述单克隆全抗体。

16. 权利要求 2、9、10 和 15 任一项所述的方法,其中所述标记选自直接标记和间接标记。

17. 权利要求 5 所述的试剂盒,用于根据所述量化的 HPV 蛋白质表达评估所述临床样品中的 HPV 相关前癌或癌症疾病等级的风险。

## 用于诊断和筛选与 HPV 有关的癌症的高通量细胞基 HPV 免疫测定

[0001] 相关申请的交叉参考

[0002] 本申请要求 2010 年 1 月 8 日提交的、名称为“用于诊断和筛选与 HPV 有关的癌症的高通量细胞基 HPV 免疫测定”的美国临时申请序列号 61/335,540 的权益,其内容通过引用被并入本文,为了各种目的。

[0003] 发明背景

[0004] 宫颈癌是全球女性癌症死亡的第二最常见的原因,每年产生约 50 万新病例,累计造成约 25 万死亡例。在美国,宫颈癌死亡率由于宫颈癌筛查项目已大幅下降,宫颈癌筛查项目检测癌前状态,以便它们可以在发展成癌症之前被治疗。当前,宫颈癌筛查的典范基于帕氏试验 (Pap test),其是一种基于细胞学的试验,从子宫颈刮下细胞并在显微镜下检查以检测表明发育异常细胞生长的变化。该试验由于明显的观察者间变化性而具有主观性,并且其受低灵敏性和高假阳性结果的限制。关于宫颈细胞学假阴性率的报道差异很大,从低至 1.6% 到大约 28%。在美国,每年约有 400 万异常帕氏试验被诊断为意义不明确的非典型鳞状细胞 (ASC-US),非典型鳞状细胞不能排除高级鳞状上皮内病变 (ASC-H)、低度鳞状上皮内病变 (LSIL) 或非典型腺细胞 (AGC)。

[0005] 在当前的实践指导方针下,对这些病例进行阴道镜检查,以进一步识别将具有临床上明显的高级病变 (CIN2/3) 或在宫颈活检时具有子宫颈内瘤形成的患者亚组。根据一些报道,患有细胞学诊断的 ASC-US (在美国每年超过 200 万例) 的患者在宫颈活检时仅有 5% 到 17% 的可能性成为潜在的 CIN2/3,而在 LSIL (在美国每年约 160 万例) 中,发现 CIN2/3 高达 25%。这些数据表明,在阴道涂片时患有 ASC-US 或 LSIL 的约 300 万病例不需要阴道镜检查。尽管阴道镜活组织检查一直以来被视为黄金标准,但最近的报道表明,由于取样或诊断错误,宫颈活检可能遗漏 33% 到 50% 的高等级疾病。因此,可能难以区分假阳性宫颈细胞学结果和假阴性活组织检查结果。因而,极需一种检测来鉴定高级发育异常,以将可以最大受益于本干预的患者分类。

[0006] 虽然大部分低度宫颈发育异常自动退化而不导致宫颈癌,但发育异常可用作需要提高警惕的征兆。CIN1 是最常见和最良性形式的宫颈上皮内瘤形成,其通常会在两年内自然分解。正因如此,LSIL 结果可用简单的“观望和等待”的理念来处理。然而,因有 12-16% 的机会发展成更严重的发育异常,医生可能希望通过阴道镜检查用活组织检查来更侵袭性地追踪结果。如果发育异常发展,则治疗可能是必要的。因此,需要一种方法来原位检测人乳头瘤病毒 HPV 癌蛋白。它会特别有助于在 ASC-US 或 LSIL 或 CIN1 患者中检测高度发育异常细胞以及鉴定潜在的 CIN2 或以上的那些患者,其可受益于立即干预并避免与“等待和观望”方法伴随的焦虑。

[0007] 人乳头瘤病毒 (HPV) 对特定上皮细胞的感染以及产生的上皮增生对宫颈癌发生发挥重要的作用。发现约 99% 例确诊宫颈癌病例与以活组织检查确认的鳞状上皮内病变 (SIL) 或宫颈上皮内瘤形成 (CIN) 的 HPV 感染有关。HPV 感染——主要通过性接触传播——的发生率在年轻女性中最高,并且,世界上目前约有 2,000 万性活跃男女被感染。约 1% 的

群体具有生殖器疣突,而4%的女性具有宫颈癌前病变,如低度鳞状上皮内病变(LSIL)或高级鳞状上皮内病变(HSIL)或意义不明确的非典型鳞状细胞(ASC-US)。

[0008] 这些病变,优选在年龄介于35-40岁的女性中观察到的病变均伴随发展成浸润性宫颈癌的高风险。一般认为,持续HPV感染对于发展成上皮癌前病变是必要的。然而,在感染有高风险HPV菌株的女性中,LSIL并不总是发展成HSIL。大部分被诊断有LSIL的人类对象病情都会缓解。虽然99.7%的宫颈癌为HPV阳性,但病毒基因组需整合到宿主基因组,以促进触发HSIL或癌发展的基因的表达。事实上,每10个患有持续HPV感染的妇女中,只有一个发展为高级CIN病变,如宫颈上皮内瘤形成(CIN)2级和3级(分别为CIN2和CIN3),在某些情况下,其最终发展为子宫颈癌。

[0009] 由HPV感染引起的疾病分期包括早期HPV感染、晚期HPV感染、意义不明确的非典型鳞状细胞(ASC-US)、非典型鳞状细胞,不能排除HSIL(ASC-H)、非典型腺细胞(AGC)、低级鳞状上皮内病变(LSIL)、高级鳞状上皮内病变(HSIL)、分别代表轻度、中度或严重细胞发育异常的宫颈内赘生物CIN1、CIN2、CIN3、浸润性宫颈癌、腺癌或鳞状细胞癌(SCC)。

[0010] 已经开发了基于核酸的HPV检测分析,但考虑到高成本、分析操作程序、对实验室(facility)、设备和训练有素的人员的要求以及对CIN的低阳性预测值,其对于预测疾病风险并不是理想的。当前基于DNA的分析不能区分LSIL与HSIL,也不区分CIN病变与非转化潜伏或退化的病毒感染。目前对于E6/E7 mRNA的基于mRNA的分析与具有更高阳性预测值的HPV DNA检测的敏感度大致相当。对于原位检测E6/E7癌蛋白的分析的报告有限。Longworth, M. S. 和 Laimins, L. A. (2004) Pathogenesis of Human Papillomaviruses in Differentiating Epithelia (人乳头瘤病毒在分化的上皮细胞中的发病机理), *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 68, pp362-372; 和 Tungteakkhun, S. S. 和 Duerksen-Hughes, P. J. (2008) Cellular Binding Partners of the Human Papillomavirus E6 Protein (人乳头瘤病毒E6蛋白质的细胞结合配体), *Arch. Virol.* 153, pp397-408。目前需要的是一种低成本、简便、灵敏、特异性的分析,其可在临床实验室或医生办公室的常规工作中进行并能检测早期上皮病变、区分HSIL与LSIL或预测发展成宫颈癌的风险。

[0011] 产生针对HPV的单克隆抗体的已知方案通常不适于生产抗-HPV单克隆抗体并且不能用于筛选一般人类群体的免疫组织化学诊断测试。Veress, G., Konya, J., Csiky-Meszaros, T., Czegledy, J. 和 Gergely, L. (1994) Human Papillomavirus DNA and Anti-HPV Secretory IgA Antibodies in Cytologically Normal Cervical Specimens (细胞学上正常的宫颈样本中的人乳头瘤病毒DNA和抗HPV分泌性IgA抗体), *Journal of Medical Virology* 43, pp201-207; Sun, Y., Shan, K. V., Muller, M., Munoz, N., Bosch, X. F. 和 Viscidi, P. P. (1994) Comparison of Peptide Enzyme-Linked Immunosorbent Assay and Radioimmuno-precipitation Assay with In Vitro-Translated Proteins for Detection of Serum Antibodies to Human Papillomavirus Type 16 E6 and E7 Proteins (用体外翻译的蛋白质进行肽酶联免疫吸附试验和放射免疫沉淀分析的比较,以检测针对人乳头瘤病毒16 E6和E7型蛋白质的血清抗体), *Journal of Clinical Microbiology* 1994, pp2216-2220; Meschede, W., Zumbach, K., Braspenning, J., Scheffner, M., Benitez-Bribiesca, L., Luande, J., Gissmann, L. 和 Pawlita, M. (1998) Antibodies

against Early Protein of Human Papillomaviruses as Diagnostic Markers for Invasive Cervical Cancer (抗人乳头瘤病毒早期蛋白的抗体作为浸润性宫颈癌的诊断标记), *Journal of Clinical Microbiology*, 475-480 ; Sehr, P., Zymbach, K. 和 Pawlita, M. (2001) A Generic Capture ELISA for Recombinant Proteins Fused to Glutathione S-Transferase: Validation for HPV Serology (与谷胱甘肽 S-转移酶融合的重组蛋白质的通用捕获 ELISA: HPV 血清学的确认), *Journal of Immunological Methods* 253, 153-162 ; Matlashewski, G., Banks, L., Wu-Liao, J., Spence, P., Pim, D. 和 Crawford, L. (1986) The Expression of Human Papillomavirus Type 18 E6 Protein in Bacteria and the Production of Anti-E6 Antibodies (人乳头瘤病毒 18 E6 型蛋白质在细菌中的表达和抗 E6 抗体的生产), *J. Gen. Virol.* 67, 1909-1916。这可能反映在用变性剂处理后使用再折叠的重组蛋白作为免疫原, 以生产抗体。这种抗体与感染的人细胞产生的天然构象 HPV 蛋白质呈现的表位反应较差。另外, 现有技术抗体识别的表位可以通过涉及临床样本的取样、固定和储存的标准程序来改变。通过 ELISA (酶联免疫吸附实验) 检测 HPV 有关抗体或病毒蛋白质在人对象中的存在的其它尝试也通常导致极其低的分析灵敏性, 因而不能发展成商业适用的诊断测试。大部分此类 ELISA 分析靶向单一病毒蛋白质或短肽片段, 其不能与人对象的抗体有良好的相互作用或牢固并特异性地与之结合。此类分析的特异性和灵敏性非常低, 以至于即使使用来自确诊患有 HPV 有关的浸润性宫颈癌的患者的样品, 也只发现 53% 的患者样品对 HPV 感染呈阳性。Nindl, I., Benitez-Bribiesca, L., Berumen, J., N, F., Fisher, S., Gross, G., Lopez-Carillo, L., Muller, M., Tommasino, M., Vazquez-Curiel, A. 和 Gissmann, L. (1994) Antibodies against Linear and Conformational Epitopes of the Human Papillomavirus (HPV) Type 16 E6 and E7 Oncoproteins in Sera of Cervical Cancer Patients (抵抗人乳头瘤病毒 (HPV) 16 E6 和 E7 型癌蛋白在宫颈癌患者血清中的线性和构象表位的抗体), *Arch. Virol.* 137, 341-353。考虑到测试群体来自一般筛查, 具有或没有低级或癌前病变, 分析的灵敏性将太低而不能用于临床实践。因此, 目前并无成功的 ELISA 分析可作为临床样品的诊断工具。

[0012] 在 100 种以上的 HPV 突变体或菌株中, 只有约 15 种与高风险的 CIN 或宫颈癌风险有关。同样地, 约 70% 的宫颈癌病例和 50% 的 CIN2 和 CIN3 病例归于高风险 HPV 16 型和 HPV 18 型感染。然而, 一些进行性宫颈癌病例与低风险 HPV 型感染有关, 而感染某些 HPV 型并不会发展为宫颈癌。鉴定那些 HPV 感染并监测其特定癌基因蛋白质的表达而不是仅仅鉴定高风险型 (一种或多种) 的 HPV 感染是重要的。因此, 需要检测作为宫颈癌的生物标记的 HPV 癌蛋白, 以更好地鉴定发展成 HSIL、其他癌前病变或确定的宫颈癌的风险。

[0013] 需要发展适当的分析, 如 HPV 免疫测定, 来检测这种 HPV 癌蛋白或宫颈癌的生物标记。E6/E7 癌蛋白在 CIN2 和 CIN3 病变中的存在可以提供证据, 表明发展的高风险。然而, 现有技术抗体仅具有用于原位检测 E6/E7 癌蛋白的有限效用。M. S. 和 Laimins, L. A. (2004) Pathogenesis of Human Papillomaviruses in Differentiating Epithelia (人乳头瘤病毒在分化的上皮细胞中的发病机理), *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 68, pp362-372 ; 和 Tungteakkhun, S. S. 和 Duerksen-Hughes, P. J. (2008) Cellular Binding Partners of the Human Papillomavirus E6 Protein (人乳头瘤病毒 E6 蛋白质的细胞结合配体), *Arch. Virol.* 153, pp397-408。因此, 需要开发抗体及免疫分析, 用于检测作为宫颈

癌的生物标记的 HPV 癌蛋白,以确定 HSIL 或  $\geq$  CIN2 (CIN2 及以上),或其他癌前病变,以用于筛选侵入性子宫颈癌和 / 或评估恶性肿瘤转化为宫颈癌和与 HPV 有关的癌症的风险。

### 发明内容

[0014] 本发明的实施方式提供方法、单克隆抗体、多克隆抗体、分析和试剂盒,来检测 HPV 感染和 HPV 相关的癌症诊断、筛查,包括各种 HPV 基因型的感染、早期和 / 或晚期 HPV 有关的或 HPV 特异的癌症。抗 -HPV 抗体被用于对临床样品进行 HPV 高通量分析。也提供用于检测 HPV 感染、宫颈癌、其它 HPV 相关的癌症、早期癌前病变以及晚期癌发展的各种免疫分析和试剂盒。

[0015] 公开了量化临床样品中 HPV 蛋白质表达的方法。该方法包括获得临床样品的过程,所述临床样品包括易被 HPV 感染的细胞群体。该方法还可以包括将临床样品沉积到容器中的过程以及使临床样品与特异性结合由 HPV 感染细胞表达的 HPV 蛋白质的初次抗体接触的过程,接触的条件是促进初次抗体与由细胞群体表达的 HPV 蛋白质特异性结合。该方法还可以包括量化初次抗体的特异性结合的过程,从而量化临床样品中的 HPV 蛋白质表达。

[0016] 在一些实施方式中,临床样品可以任选地包括分散在收集液体中的细胞。在这些实施方式中的这种临床样品还可以任选地包括固定的细胞。

[0017] 在一些实施方式中,方法可以任选地包括测量临床样品的细胞密度的过程,并且,临床样品的细胞密度可任选地被标准化。在一些实施方式中,方法可以任选地包括使临床样品与基质接触的过程,所述基质选择膜、珠和微量孔表面。

[0018] 在一些实施方式中,方法可以任选地包括将 HPV 蛋白质表达化到预定的 HPV 蛋白质表达水平阈值的过程。这种量化 HPV 蛋白质表达的过程可以任选地包括根据临床样品中存在的细胞数目使量化的 HPV 蛋白质表达标准化。这种量化 HPV 蛋白质表达的过程还可以任选地包括比较量化的 HPV 蛋白质表达与 HPV 蛋白质标准曲线。这种量化 HPV 蛋白质表达的过程还可以任选地使预定的 HPV 蛋白质表达水平阈值与临床样品中的癌症相关联,和任选地使预定的 HPV 蛋白质表达水平阈值与临床样品中的转化病理期相关联。

[0019] 在一些实施方式中,通过测量包括诊断的肿瘤的临床样品中的 HPV 蛋白质表达水平来确定预定的 HPV 蛋白质表达水平阈值。

[0020] 在一些实施方式中,临床样品可以任选地包括获自宫颈拭子 (swab) 或宫颈刮片 (scrape) 的细胞。临床样品还可以任选地包括获自口腔拭子、口腔刮片、肛门拭子或肛门刮片的细胞。

[0021] 在一些实施方式中,HPV 可以选自 16、HPV 18、HPV 31、HPV 33、HPV 39、HPV 45、HPV 52 和 HPV 5。在一些实施方式中,特异地结合由一种以上 HPV 编码的一种以上 HPV 蛋白质的初次抗体可以选自 HPV 16、HPV 18、HPV 31、HPV 33、HPV 39、HPV45、HPV 52 和 HPV 58。在一些实施方式中,HPV 蛋白质可以选自 HPV E6 蛋白质和 HPV E7 蛋白质。在一些实施方式中,初次抗体可以特异地结合 HPV E6 蛋白质和 HPV E7 蛋白质。

[0022] 在一些实施方式中,临床样品可以沉积到容器中,所述容器是微量滴定板的样品孔。

[0023] 在一些实施方式中,量化临床样品中 HPV 蛋白质表达的方法可以任选地进一步包

括使临床样品与标记的二次抗体接触的过程,所述标记的二次抗体特异地结合初次抗体。

[0024] 在一些实施方式中,标记的二次抗体可以选自直接标记或间接标记。

[0025] 在一些实施方式中,初次抗体可以任选地包含标记。这种标记可以选自直接标记或间接标记。

[0026] 在一些实施方式中,量化 HPV 蛋白质表达的过程可以包括量化由酶标记产生的生色基质。在一些实施方式中,量化 HPV 蛋白质表达的过程还可以包括量化荧光信号。

[0027] 在一些实施方式中,量化 HPV 蛋白质表达的过程可以包括根据量化的 HPV 蛋白质表达评估临床样品中 HPV 相关癌症疾病等级的过程。这种 HPV 相关癌症可以任选地是宫颈癌。

[0028] 附图简述

[0029] 为使本发明上述特征的方式可以被详细地理解,可以通过参考实施方式对上面简述的本发明进行更具体的描述,所述实施方式中的一些图解在附图中。然而,注意到附图仅说明一些实施方式中的典型实施方式,因此不应该被认为限制其范围,因为本发明可以允许其它等效的实施方式。

[0030] 图 1A 提供根据本发明的实施方式纯化自 His- 标签 Ni-NTA 柱的重组 E7 蛋白质的示例性凝胶图像。

[0031] 图 1B 提供纯化自 GST- 标签柱的重组 E7 蛋白质的示例性凝胶图像。

[0032] 图 1C 提供纯化自 His- 标签 Ni-NTA 柱的重组 E6 蛋白质的示例性凝胶图像。

[0033] 图 2A 提供示例性蛋白质印迹图像,其图解利用多克隆抗 -HPV 16 E7 抗体和多克隆抗 HPV 18 E7 抗体在来自宫颈癌细胞系的细胞溶解产物中检测 HPV 16 E7 重组蛋白质、HPV 18 E7 重组蛋白质和 HPV E7 癌蛋白。

[0034] 图 2B 提供示例性蛋白质印迹图像,其图解利用多克隆抗 -HPV 16 E6 抗体在来自宫颈组织的细胞溶解产物中检测 HPV 16 E6 和 HPV 18 E6 重组蛋白质以及 HPV E6 癌蛋白。

[0035] 图 3 图解来自各种杂交瘤克隆(细胞系 1 到 14)的抗 -HPV E6、抗 -HPV E7 和抗 -HPV L1 抗体与根据本发明的一个实施方式的图例中标记的各种杂 HPV 蛋白质的交叉反应。6xHis 被用作阴性对照。

[0036] 图 4A 提供示例性 ELISA 结果,其利用小鼠单克隆抗 -HPV E6 抗体来检测各种 HPV 型的各种 HPV 蛋白质。

[0037] 图 4B 提供示例性蛋白质印迹结果,其利用涉及各种细胞系的小鼠单克隆抗 -HPV18E6 抗体。

[0038] 图 4C 提供示例性 ELISA 结果,其利用小鼠单克隆抗 -HPV E7 抗体来检测各种 HPV 型的各种 HPV 蛋白质。

[0039] 图 4D 提供示例性蛋白质印迹结果,其利用涉及各种细胞系的小鼠单克隆抗 -HPVE7 抗体。

[0040] 图 5A 提供 HPV18 E6 重组蛋白质和 HPV16 E6 重组蛋白质的示例性标准曲线,其通过比色法利用小鼠单克隆抗 -E6 抗体。

[0041] 图 5B 提供 HPV18 E6 蛋白质与各种稀释度的单克隆抗 -E6 抗体的示例性标准曲线,其利用发光方法。

[0042] 图 5C 提供 HPV16 E6 蛋白质的示例性标准曲线,该 HPV16 E6 蛋白质通过小鼠单克

隆抗 -E6 抗体利用发光方法进行检测。

[0043] 图 5D 提供 HPV18 E7 和 HPV16 E7 重组蛋白质的示例性标准曲线,其通过比色法利用单克隆抗 -E7 抗体。

[0044] 图 5E 提供 HPV18 E7 重组蛋白质与各种稀释度的单克隆抗 -E7 抗体的示例性标准曲线,其利用发光方法。

[0045] 图 5F 提供 HPV16 E7 重组蛋白质的示例性标准曲线,该 HPV16 E7 重组蛋白质通过抗 -E7 抗体利用发光方法进行检测。

[0046] 图 6A 提供在抗 -HPV E7 抗体存在和不存在的情况下示例性全细胞 ELISA 结果,其显示 HPV 全细胞 ELISA 对宫颈癌细胞系的平均吸光度。

[0047] 图 6B 提供在抗 -HPV E7 抗体存在和不存在的情况下示例性宫颈癌细胞系的全细胞 ELISA 结果,其显示图 6A 的平均吸光度,并被标准化成 HPV 阳性海拉细胞和 HPV 阴性 C33a 细胞的每细胞的密度。

[0048] 图 6C 提供利用抗 -HPV E7 抗体和比色吸光度检测方法进行全细胞 ELISA 时 HPV 阳性海拉细胞和 HPV 阴性 C33a 细胞的示例性滴定曲线。

[0049] 图 6D 图解根据图 6C HPV 阳性海拉细胞和 HPV 阴性 C33a 细胞的滴定曲线的标准化的每细胞密度。

[0050] 图 6E 提供示例性全细胞 ELISA 结果,其显示基于细胞的 ELISA 试验的吸光度,所述 ELISA 试验利用小鼠单克隆抗 -HPV E6 抗体检测临床癌症样品、HPV 阳性海拉细胞和 SiHa 细胞中而不是 HPV 阴性 C33a 细胞中存在的 HPV E6 癌蛋白。

[0051] 图 7A 提供通过比色法利用单克隆抗 -E6 抗体的 HPV18 E6 重组蛋白质示例性标准曲线。

[0052] 图 7B 提供 HPV 全细胞 ELISA 结果的示例性柱形图,其利用图 7A 中使用的相同单克隆抗 -E6 抗体来检测总计 355 个临床细胞学样品的临床样品中存在的 HPV E6 癌蛋白。

[0053] 图 7C 显示盲法试验 (blind study) 的结果,该盲法试验以利用图 7A 和 7B 中使用的相同单克隆抗 -HPV E6 单克隆抗体在 HPV 全细胞 ELISA 上测试的 38 例临床样品进行。

[0054] 图 8A 提供示例性直方图,其显示图 7B 中所示总计 355 例临床样品中每一个的单独吸收强度。

[0055] 图 8B 提供从图 8A 和 7B 所示的相同的 355 个细胞学样品分析的 ROC 曲线的示例性概要。

[0056] 图 9A 提供显示为细胞系的吸收强度的示例性全细胞 ELISA 结果,其利用抗 - $\beta$  肌动蛋白抗体检测  $\beta$  - 肌动蛋白在 HPV 阳性细胞系 HeLa 和 HPV 阴性细胞系 C33a 中的表达水平。

[0057] 图 9B 提供显示为 7500 个海拉细胞和 7500 个 HT3 细胞的吸收强度的示例性全细胞 ELISA 结果,其利用抗 -HPV E6 抗体和抗 - $\beta$  肌动蛋白。

[0058] 图 9C 提供显示为 7500 个海拉细胞和 7500 个 HT3 细胞的吸收强度的比的示例性全细胞 ELISA 结果,其利用抗 -HPV E6 抗体和抗 - $\beta$  肌动蛋白抗体。 $\beta$  - 肌动蛋白被用作参考,用于标准化常常含有不同细胞数目的临床样品的信号强度。

[0059] 图 10A 提供显示为吸收强度的示例性全细胞 ELISA 结果,其利用抗 -HPV E6 抗体筛查 16 个临床样品。

[0060] 图 10B 提供显示为吸收强度比的示例性全细胞 ELISA 结果,其利用相同的小鼠抗-HPV E6 和抗- $\beta$ -肌动蛋白单克隆抗体来筛查图 10A 中测试的相同的 16 个临床样品。与具有不同细胞量的样品相关的信号强度根据利用抗- $\beta$ -肌动蛋白抗体获得的信号强度进行标准化。

[0061] 图 11 是流程图,图解根据本发明实施方式的方法的实例。

[0062] 发明详述

[0063] 乳头瘤病毒是 DNA 病毒,其具有 DNA 基因组、无包被病毒体和二十面体外壳。该双链环状 HPV DNA 基因组包含一个晚期基因编码区、一个早期基因编码区和非编码上游调控区,其具有控制早期和晚期基因表达的各种转录因子的结合位点。晚期基因编码区中的两个单独的开放阅读框编码病毒壳体蛋白 L1 和 L2。这两个病毒壳体蛋白属于同一类,其中壳体蛋白 L1 为主要的壳体蛋白,其在不同的 HPV 型中高度保守。早期基因编码区中的 8 个开放阅读框编码 8 个早期病毒蛋白质,其被命名为 E1、E2、E3、E4、E5、E6、E7 和 E8。早期蛋白 E6 和 E7 是癌蛋白,其对于宿主细胞无限增殖化和转化以及对于长期的病毒复制和存活至关重要。

[0064] 被高风险 HPV 感染需要两个早期病毒蛋白质——E6 和 E7,它们是癌蛋白,因为它们在外转化细胞,并且需要它们的存在来维持恶性。在癌前或癌症宫颈组织中抑制 E6 和 E7 表达阻断浸润性癌发展。在宿主组织中,E6 和 E7 癌蛋白通过分别消极阻断内源性宿主细胞调控蛋白 p53 和成视网膜细胞瘤 (Rb) 肿瘤抑制蛋白的活性来发挥作用,以引起导致宫颈癌发展的凋亡和细胞周期失调的抑制。E6 癌蛋白结合 p53——保护细胞免于 DNA 损伤和调控凋亡的细胞因子,以诱导 p53 降解。通过降低 p53 蛋白质的水平,E6 癌蛋白防止肿瘤细胞死亡。E7 癌蛋白结合 Rb,以诱导 Rb 降解、破坏正常的细胞周期,并引起细胞增殖。E7 癌蛋白通过其与细胞周期蛋白依赖性激酶抑制蛋白 p21 的相互作用进一步破坏细胞控制。发现 HPV E6 和 E7 癌蛋白在转化的生殖组织中被持续地产生。这些相互作用设置控制宿主细胞增殖和分化(即,转化)的阶段,正常细胞转变成前癌生物细胞和最终转变成癌症恶性肿瘤的完全表达的第一步骤。

[0065] 似乎在肿瘤发展中发挥作用的一个另外的事件(event)是将 HPV DNA 整合至宿主基因组中,这常常破坏 E2 的开放阅读框,造成 E6 和 E7 癌蛋白过度表达,并可能导致宿主基因组不稳定。额外的辅因子和突变事件在浸润性宫颈癌的发病机理中可能是重要的,其可以包括染色体重排、组成型杂合性缺失和原癌基因失活。

[0066] HPV-16 和 HPV-18 均显示使培养中的人角质形成细胞永生,并且,目前为止,它们是诱导浸润性宫颈癌的最常见的高风险 HPV 型。HPV-16 型单独感染伴随超过 50% 的宫颈癌病例,大部分导致鳞状细胞癌。HPV-18 感染更可能诱发腺癌。一些研究已经指出,宫颈组织中的腺癌产生更侵袭形式的癌症,其结果比鳞状细胞癌导致的癌症更不利。这表明,被 HPV-18 感染的个体的预后可能比任何其它形式的 HPV 感染差得多。

[0067] 在美国,大部分帕氏试验结果是正常的,然而,每年发现约 400-500 万例异常帕氏试验结果。大部分异常结果是轻度异常(ASC-US,典型地,帕氏试验结果的 2-5%)或 LSIL(结果的约 2%),表明 HPV 感染。虽然大部分低级宫颈发育异常自动退化而不导致宫颈癌,但发育异常可用作需要提高警惕的征兆。CIN1 是最常见和最良性形式的宫颈上皮内瘤形成,其通常会在两年内自动分解。正因如此,LSIL 结果可用简单的“观望和等待”的理念来处理。

然而,因有 12-16%的机会发展成更严重发育异常,医生可能希望通过阴道镜检查用活组织检查来更侵袭性地追踪结果。如果发育异常发展,则治疗可能是必要的。因此,提供 HPV E6E7 ICC 分析和帕氏涂片试验以原位检测 HPV 癌蛋白是有用的,特别有助于在 ASC-US 或 LSIL 或 CIN1 患者中检测高级发育异常细胞以及鉴定潜在的 CIN2 或以上的那些患者,其可受益于立即干预并避免“等待和观望”伴随的焦虑。

[0068] 高级鳞状上皮内病变或 HSIL 或 HGSIL 表明中度或重度原位子宫颈上皮内瘤形成或原位癌。其通常在帕氏试验后确诊。在一些情况下,若不适当追踪,这些病变会导致浸润性宫颈癌。HGSIL 并不意味着存在癌症。在所有具有 HGSIL 结果的女性中,2%或更少在当时患有浸润性宫颈癌,然而,约 20%在不治疗的情况下会发展成患上浸润性宫颈癌。为了抗击这种发展,HGSIL 通常伴随立即用活组织检查进行阴道镜检查来取样或去除发育异常的组织。将该组织发送病理学测试,以指定比帕氏涂片试验更确定的组织学分类。HGSIL 通常与 CIN2 或 CIN3 的组织学分类相对应。因此,提供 HPV E6E7 IHC 分析与 HE(苏木精和伊红染色)或 HPV E6E7 ICC 分析与帕氏试验对于原位检测 HPV E6E7 癌蛋白是有帮助的,尤其有助于鉴定 CIN2/CIN3 患者。

[0069] 本发明的实施方式提供各种免疫测定和抵抗作为生物标记的 HPV 癌蛋白的单克隆抗体,以便,例如来自被高风险和低风险 HPV 型感染的高级发育异常细胞的 E6、E7 癌蛋白的过度表达可以通过一种或多种抗体进行检测。各个实施方式提供 HPV 全细胞免疫测定,其检测 HPV 癌蛋白在宫颈细胞中的存在或存在的量,以在不使用侵袭性手术的情况下鉴定患有高级或癌前病变的患者。

[0070] 在一些实施方式中,一种或多种抗体与生物样品中存在的一种或多种乳头瘤病毒类型的一种或多种蛋白质的结合可以在显微镜下检查,检测与标记的一种或多种抗体反应的剂的存在,其中剂包括显色剂、荧光色原及其组合。生物样品可以包括宫颈细胞、宫颈组织、宫颈拭子、体液、血清、血液、肿瘤、细胞培养物、活体解剖物 (biopsies) 及其组合。生物样品可来自于由于异常帕氏试验结果而介绍的一组人或来自作为进行宫颈癌常规筛查的普通群体的一组人。

[0071] 根据本发明的某些实施方式,筛查人对象乳头瘤病毒感染的方法可以通过对包含人细胞薄层的微量滴定板的固相进行全细胞免疫分析而执行,以从细胞内检测微量滴定板上的生物样品中存在的一种或多种乳头瘤病毒类型的一种或多种乳头瘤病毒蛋白。薄层是单层宫颈细胞。

[0072] 根据本发明的某些实施方式,可以对包含临床细胞学样品薄层的微量滴定板进行一种或多种全细胞免疫测定,以使人细胞与一种或多种抗体结合,所述抗体针对一种或多种纯化的重组乳头瘤病毒蛋白而产生或针对一种或多种被 HPV 感染侵袭的细胞蛋白质而产生,至少一种抗体能够识别乳头瘤病毒癌蛋白,以检测微量滴定板表面上的临床细胞学样品薄层中存在的一种或多种乳头瘤病毒类型的一种或多种蛋白质。乳头瘤病毒癌蛋白包括但不限于:HPV-16 E6 蛋白质、HPV-16E7 蛋白质、HPV-18 E6 蛋白质、HPV-18 E7 蛋白质及其组合。细胞蛋白质包括但不限于:p16<sup>INK4a</sup>、pRB、p53、E2F、E2F 活化的细胞周期蛋白质、细胞周期蛋白依赖性激酶、CDK4、CDK6、Ki-67 (MIB-1)、MYC 蛋白质、细胞周期蛋白 -A、细胞周期蛋白 -B、细胞周期蛋白 -E、端粒 -TERC、MCM2、TOP2A、热休克蛋白 40 (HSP<sub>40</sub>)、热休克蛋白 60 (HSP<sub>60</sub>)、热休克蛋白 70 (HSP<sub>70</sub>)、CA9/MN、层粘连蛋白 5、brn-3a、CDK N2、拓扑异构酶 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、存活蛋白、VEGF、p27(kipl) 和 p21(waf)。

[0073] 本发明的实施方式提供各种免疫测定和针对 HPV 病毒蛋白质的单克隆抗体, 以便由最高风险 HPV 型的感染可以被单一单克隆抗体和 / 或通用全抗体检测到。本发明提供 HPV 细胞基 ELISA 分析, 以高通量形式检测 HPV 蛋白质的存在。检测人对象中乳头瘤病毒的方法包括进行一种或多种免疫分析, 如对被加工成形态上异常和正常的人细胞混合物的人对象临床样品进行的基于细胞的 ELISA。生物样品可以包含获自一种或多种如下材料的细胞: 宫颈组织、宫颈拭子、体液、血清、血液、肿瘤、细胞培养物、活体解剖物及其组合。生物样品可以获自作为进行宫颈癌常规筛查的普通群体的一群人。

[0074] 在一个确定的实施方式中, 本发明的自动化高通量 HPV 细胞基 ELISA 可用于一般筛查 HPV 感染和早期诊断宫颈癌和其它癌症、精确检测浸润性宫颈癌、检测其它 HPV 相关的癌症、早期癌前病变以及晚期癌发展。提供针对 HPV 蛋白质的各种新单克隆抗体, 其作为生物标记是有用的, 并且, 其对于检测 HPV 病毒蛋白质、HPV 癌蛋白、早期筛查宫颈癌和诊断 CIN 和 / 或浸润性宫颈癌和其它癌症是有用的工具。

[0075] 临床样品中存在的一种或多种乳头瘤病毒类型的一种或多种乳头瘤病毒蛋白可以通过针对一种或多种纯化的重组乳头瘤病毒蛋白而产生的一种或多种标记的抗体被检测。一种或多种抗体可以用在本领域中适于检测的不同剂进行标记, 其中所述剂可以包括显色剂、化学发光剂、荧光色原及其组合。在一个实施方式中, 一种或多种抗体中的至少一种抗体能够识别乳头瘤病毒早期蛋白。乳头瘤病毒早期蛋白可以是, 例如 HPV-16 E6 蛋白质、HPV-16 E7 蛋白质、HPV-18 E6 蛋白质、HPV-18 E7 蛋白质及其组合。

[0076] 根据某些实施方式, 人细胞的混合物可以自液基溶液施加到微量滴定板。在微量培养板之前, 细胞混合物可以通过不同的孔尺寸进行过滤, 以分开混合物中的宫颈细胞和其它细胞。细胞也可以通过梯度溶液被离心, 以从收集的混合物中获得宫颈细胞。微量滴定板的表面可以是玻璃或塑料表面, 其用剂进行处理, 以保持细胞粘附在表面上。微量滴定板的表面还可以包括膜基滤器, 以允许将宫颈细胞与不必要的血细胞、黏液、碎片等分开。膜的孔尺寸范围可以为 5 微米到 10 微米。可以用剂预处理膜, 以允许宫颈细胞粘附在表面上。人细胞的薄层可以是, 例如单层宫颈细胞。

[0077] 根据某些实施方式, 进行标准化步骤以标准化微量滴定板每个孔中测试的细胞数目。例如, 可以获得细胞含量 (cellularity) (= 细胞颗粒物 (pellet), ul/ 样品溶液, mL), 以标准化样品中的细胞差异。作为另一实例, 在全细胞 ELISA 分析之后, 微量滴定板上的细胞可以被剂复染, 使核显色或荧光染色, 以量化每个孔中测试的细胞数目。作为另一实例, 全细胞 ELISA 可以包括使用两种或更多种抗体, 至少一种用于检测 HPV 癌蛋白和一种用于检测一般的细胞蛋白质, 例如  $\beta$ -肌动蛋白, 作为内部对照。这使得能够标准化患者之间的细胞数目, 并通过 HPV 特异抗体计算一个检测中表达 HPV 特定蛋白质的细胞和另一检测中复染的细胞的比例。两个检测获得的比例代表 HPV E6E7 癌蛋白在异常和正常细胞混合物中存在的程度。

[0078] 在一个实施方式中, 基于细胞的 ELISA 的检测系统可以包括平板读取器 (plate reader), 其能够吸收可见光、UV 光、照度计、各种波长以激发和发射荧光色素及其组合。在使用具有显色基质的膜基滤器微量滴定板的实施方式中, 沉淀的显色可以被目测而不需要

使用仪器。这种膜基 ELISA 也可以与溶液基质一起用于显色或化学发光检测。在另一实施方式中,检测系统可以是 CCD 相机或其他成像仪以捕获测量结果,其可以利用激光器作为入射辐射源任选地获得。

[0079] 在某些实施方式中,也可以对临床样品进行细胞学帕帕尼科拉乌涂片分析,以比较细胞学帕帕尼科拉乌涂片测试的结果与一种或多种免疫组织学分析的结果。也可以对临床样品进行核酸杂交分析,以检测乳头瘤病毒基因组的存在。

[0080] 各个实施方式一般涉及各种方法、检测分析、试剂盒、多克隆和单克隆抗体、多肽、重组蛋白质和对检测 HPV 感染有用的核酸,所述 HPV 感染包括普通的 HPV 感染以及通过各种 HPV 基因型的感染,包括高风险 HPV 和低风险 HPV。提供针对 PVH 蛋白质的各种新单克隆抗体,其作为生物标记是有用的,并且对于检测 HPV 病毒蛋白质、HPV 癌蛋白、早期筛查宫颈癌和诊断疾病阶段 >CIN2 或 >CIN3 是有用的工具。本文描述的工具也可以用于早期临床筛查 HPV 感染以及宫颈癌和其它 HPV 相关癌症的一般诊断。

[0081] 在一个实施方式中,一种或多种纯化的重组乳头瘤病毒蛋白包括乳头瘤病毒 E6 蛋白质、乳头瘤病毒 E7 蛋白质、乳头瘤病毒 L1 蛋白质及其组合。重组乳头瘤病毒蛋白包括但不限于重组 HPV-16 E6 蛋白质、重组 HPV-16 E7 蛋白质、重组 HPV-18 E6 蛋白质、重组 HPV-18 E7 蛋白质和 HPV-16 L1 蛋白质、重组 HPV-18L1 蛋白质及其组合。

[0082] 一些实施方式提供针对 HPV 病毒蛋白质的各种单克隆抗体,以便通过高风险和低风险 HPV 型的感染可以被单一单克隆抗体检测到。一些实施方式也提供 HPV 非类型特异性单克隆抗体,以检测一种或多种 HPV 类型。即,单一抗体可以从一种以上的病毒类型中识别 HPV 蛋白质。我们将这些称为全特异性抗体。一种或多种乳头瘤病毒类型包括高风险 HPV 型、低风险 HPV 型、HPV-16、HPV-18、HPV-31、HPV-33、HPV-35、HPV-39、HPV-45、HPV-51、HPV-52、HPV-56、HPV-58、HPV-59 和 HPV-68、HPV-6、HPV-11、HPV-42、HPV-43、HPV-44、HPV-53、HPV-54、HPV-55 和 HPV-56 及其组合。

[0083] 对下面的术语和缩写的定义阐述如下:

[0084] NILM:恶性肿瘤上皮内病变阴性。当没有瘤形成的细胞证据时,使用 NILM;这可以包括生物体和/或其它非赘生物发现结果,如反应性/修复性变化。

[0085] ASC-US:无确定意义的非典型鳞状细胞。细胞通常为中等大小或表面鳞状细胞,其具有对于没有另外说明的 LSIL 或 SIL 暗示性而非诊断性的核变化。

[0086] ASC-H:非典型鳞状细胞,不能排除 HSIL。细胞通常是化生细胞的大小,其可以单独或成簇出现,它们对于 HSIL 是暗示性而非诊断性的。

[0087] LSIL:低级鳞状上皮内病变,包括:HPV 细胞病理效应/轻度发育异常/CIN 1。

[0088] HSIL:高级鳞状上皮内病变,包括:中度发育异常/CIN 2 和严重发育异常/CIS/CIN 3 和具有怀疑是浸润性的特征的 HSIL。

[0089] 鳞状细胞癌(SCC):子宫颈癌,局部浸润到邻近组织、血管、淋巴管和淋巴结。在其晚期,它难以治疗,并且可以证明是致命的。根据浸润的阶段或程度,浸润性子宫颈癌可以通过局部切除、子宫切除术、根治性子宫切除术、放射线疗法和化疗来进行治疗。

[0090] 腺癌:虽然大多数子宫颈癌来自构成外部皮肤的鳞状细胞,但偶尔也有源自黏液生成细胞的癌症,所述黏液生成细胞排列于子宫颈内管,其引导进入子宫。该腺型被称为“腺癌”而不是“鳞状细胞癌”。腺癌难以检测。与鳞状细胞癌不同,当存在时,腺癌前体难以

根据帕氏涂片被鉴定。鳞状细胞发育异常缓慢发展成子宫颈鳞状细胞癌,这与腺癌不一样。

[0091] 本发明的竞争性优势。

[0092] 通过 ELISA(酶联免疫吸附试验)检测 HPV 相关抗体在人对象中的存在的尝试通常导致极其低的分析灵敏性,因而不能发展成商业上适用的诊断测试。Nindl, I., Benitez-Bribiesca, L., Berumen, J., N, F., Fisher, S., Gross, G., Lopez-Carillo, L., Muller, M., Tommasino, M., Vazquez-Curiel, A. 和 Gissmann, L. (1994) Antibodies against Linear and Conformational Epitopes of the Human Papillomavirus (HPV) Type 16 E6 and E7 Oncoproteins in Sera of Cervical Cancer Patients(抵抗人乳头瘤病毒 (HPV) 16E6 和 E7 型癌蛋白在宫颈癌患者血清中的线性和构象表位的抗体), Arch. Virol. 137, 341-353。大部分这些 ELISA 分析靶向单一病毒蛋白质或短肽片段,其不能与来自人对象的抗体良好地相互作用或与之稳固和特异性地结合。这种分析的特异性和灵敏性如此低,以至于即使使用来自确认患有 HPV 伴随的浸润性宫颈癌的患者的样品,也只发现 53% 的患者样品对 HPV 感染呈阳性。因此,没有成功的 ELISA 分析可用作临床样品的诊断工具。

[0093] 一些实施方式致力于解决发展针对 CIN2/3 的 E6 或 E7 抗体过程中的三个挑战。首先, HPV 蛋白质为细胞内蛋白质,其少量地存在于临床样品中。其次, HPV 蛋白质的构象对样品收集过程敏感。第三,有许多 HPV 类型,每一个均具有不同的 E6 编码序列。因此, HPV 蛋白质没有从 HPV 感染的培养细胞系被成功地大量生产和纯化以用作抗体生产的免疫原。针对少量合成肽或变性的重组蛋白质产生的已知抗-HPV 抗体通常不适合用于临床诊断,因为它们并不必然与天然产生的 HPV 病毒蛋白质在感染的人细胞中进行反应。Veress, G., Konya, J., Csiky-Meszaros, T., Czegledy, J. 和 Gergely, L. (1994) Human Papillomavirus DNA and Anti-HPV Secretory IgA Antibodies in Cytologically Normal Cervical Specimens(细胞学上正常的宫颈样本中的人乳头瘤病毒 DNA 和抗 HPV 分泌性 IgA 抗体), Journal of Medical Virology 43, pp201-207; Sun, Y., Shan, K. V., Muller, M., Munoz, N., Bosch, X. F. 和 Viscidi, P. P. (1994) Comparison of Peptide Enzyme-Linked Immunosorbent Assay and Radioimmunoassay with In Vitro-Translated Proteins for Detection of Serum Antibodies to Human Papillomavirus Type 16 E6 and E7 Proteins(用体外翻译的蛋白质进行肽酶联免疫吸附试验和放射免疫沉淀分析的比较,以检测针对人乳头瘤病毒 16 E6 和 E7 型蛋白质的血清抗体), Journal of Clinical Microbiology 1994, pp2216-2220; Meschede, W., Zumbach, K., Braspenning, J., Scheffner, M., Benitez-Bribiesca, L., Luande, J., Gissmann, L. 和 Pawlita, M. (1998) Antibodies against Early Protein of Human Papillomaviruses as Diagnostic Markers for Invasive Cervical Cancer(抗人乳头瘤病毒早期蛋白的抗体作为浸润性宫颈癌的诊断标记), Journal of Clinical Microbiology, 475-480; Sehr, P., Zymbach, K. 和 Pawlita, M. (2001) A Generic Capture ELISA for Recombinant Proteins Fused to Glutathione S-Transferase: Validation for HPV Serology(与谷胱甘肽 S-转移酶融合的重组蛋白质的通用捕获 ELISA: HPV 血清学的确认), Journal of Immunological Methods 253, 153-162; Matlashewski, G., Banks, L., Wu-Liao, J., Spence, P., Pirn, D. 和 Crawford, L. (1986) The Expression of Human Papillomavirus Type 18 E6 Protein in Bacteria and the Production of Anti-E6 Antibodies (人乳头瘤病毒 18 E6

型蛋白质在细菌中的表达和抗 E6 抗体的生产), J. Gen. Virol. 67, 1909-1916。另一技术挑战涉及蛋白质构象变化,其在自然感染有 HPV 的人组织中进行福尔马林固定和石蜡包埋时发生。这归于在临床相关样品中检测 HPV 蛋白质的难度。E6 癌蛋白包含众多半胱氨酸氨基酸以及 E6 癌蛋白的正确拓扑图要求形成许多二硫键的事实使得生产和原位检测这种癌蛋白非常困难。这些因素解释了这样一个事实,即从变性的重组蛋白质或合成肽产生的可得抗体并不足够有效,以至于不能可靠地用于体外诊断。此外,还已知利用 E6 蛋白质的小肽的某些免疫分析导致极其低的分析特异性和灵敏性。Nindl, I., Benitez-Bribiesca, L., Berumen, J., N. F., Fisher, S., Gross, G., Lopez-Carillo, L., Muller, M., Tommasino, M., Vazquez-Curiel, A. 和 Gissmann, L. (1994) Antibodies against Linear and Conformational Epitopes of the Human Papillomavirus (HPV) Type 16 E6 and E7 Oncoproteins in Sera of Cervical Cancer Patients (抵抗人乳头瘤病毒 (HPV) 16 E6 和 E7 型癌蛋白在宫颈癌患者血清中的线性和构象表位的抗体), Arch. Virol. 137, 341-353。因此,没有天然形式的可用 E6 蛋白质,其被纯化为免疫原以用于产生能够检测存在于临床样品中的病毒癌蛋白的抗-HPV 抗体,进行体外诊断。

[0094] 本发明提供新的病毒癌蛋白测试方法,其利用新的工具组合,所述工具组合包括新抗体、重组表达的 HPV 蛋白质——包括但不限于:E6、E7、L1、L2 和全细胞分析。本发明首先使得全细胞 ELISA 能够检测临床样品中的细胞内 HPV 癌蛋白。该全细胞 ELISA 能够在诊断中检测作为真正前癌的生物标记的 HPV 癌蛋白以及筛查宫颈癌和其它与 HPV 有关的癌症。

[0095] 重组 HPV E6 和抗体发展。E6 抗体的发展难以获得 E6 癌蛋白而受到阻碍,该 E6 癌蛋白易于聚集。此外,由于产生蛋白质构象变化的样品收集条件,在临床样品中难以检测 E6 蛋白质。我们已克服了技术障碍,以产生非变性且可溶形式的 HPV E6 重组蛋白,并开发出针对 HPV E6 癌蛋白的高度特异性抗体。本发明提供全抗-HPV E6 抗体,即能在固定的细胞中检测大部分盛行的高风险 HPV 型的单一抗体。相同的方法被用于开发重组 HPV E7 蛋白质和抗体,以获得全抗-HPV E7 抗体。相同的方法也被用于开发重组 HPV L1 蛋白质和重组 HPV L2 蛋白质以及抗体,以获得全抗-HPV L1 和全抗-HPV L2 抗体。

[0096] 全细胞分析方法。我们同时开发了 IHC 和 ICC 分析,以利用这些抗体类型在固定的临床样品中检测 E6、E7 和 L1 蛋白质。我们对宫颈组织和脱落的宫颈细胞学样品进行的 IHC 和 ICC 研究显示这些抗体类型的有用性,即能够检测临床样品中的 E6、E7 和 L1 蛋白质。为了避免活组织检查的侵袭性程序,以及避免根据染色和 IHC/HCC 结果对形态进行解释的主观性和可变性,我们开发了基于全细胞 ELISA 的客观平台,为宫颈癌筛查提供有力的工具。HPV E6、E7 和 L1 全细胞 ELISA 以高通量分析分别客观地测量细胞内 E6、E7 和 L1 蛋白质,并能够在诊断中检测作为真正前癌的生物标记的 HPV 癌蛋白以及筛查宫颈癌和其它与 HPV 有关的癌症。这些分析不需要细胞裂解,避免在蛋白质的萃取过程中使用可能导致蛋白质构象改变的洗涤剂,并能直接检测宫颈细胞中的天然 E6、E7 和 L1 蛋白质。这些分析提供客观的测试,以鉴定具有高度前体的患者,从而避免阴道镜检查 and 活组织检查不必要的侵入程序。这种 ELISA 形式使用更特异性和临床相关的生物标记,以提供客观的、更加灵敏的、有力的和高通量的测试,其可以自动化以适于常规宫颈癌筛查,并将提供针对 E6、E7 和 L1 蛋白质的二元(存在或不存在)或半定量测量。

[0097] 目前,没有商业可得的、临床测量 HPV 有关蛋白质或抗体的存在的免疫分析。本发明的实施方式因此提供诊断工具,其可用于诊断 HPV 感染、发育异常和 HPV 相关宫颈癌。此外,本文所描述的免疫分析的结果可用于与针对 p53 和 RB 特别设计的、其他商业可得的免疫分析进行比较。已知感染高风险型 HPV,如 HPV-16 和 HPV-18 会引起宫颈癌,这是由于 E6 和 E7——诱导宫颈细胞变为恶性肿瘤和改变 / 减少宿主细胞的 p53 和 RB 内源性蛋白质表达的病毒癌蛋白——的表达,导致细胞机能障碍并最终导致癌症。因此,考虑针对来自相同人对象的临床样品,例如宫颈组织、体液、血清等进行的、通过 HPV 感染而改变的所有这些蛋白质水平的分析结果进行比较。

[0098] 图 11 图解根据本发明一种或多种实施方式的方法的实例。

[0099] 在步骤 110 中,获得临床样品,其包括易受 HPV 感染的细胞群体。临床样品是包括来自活的人对象的宫颈细胞、宫颈组织、宫颈拭子、体液、血清、血液、肿瘤、细胞培养物、活体解剖物及其组合的样品。临床样品可以获自由异常帕氏试验结果而参照的一组人或作为进行宫颈癌常规筛查的普通群体的一组人。

[0100] 在步骤 120 中,临床样品被分散在收集液体中。作为对 ELISA 板的全细胞免疫测定的实例,来自宫颈刮片的细胞直接涂抹在微量滴定板的孔表面上,以进行物镜测量。作为另一实例,宫颈细胞被收集到液基溶液中并根据生产商的指示进行处理。

[0101] 在步骤 130 中,临床样品被沉积到容器中,以将细胞固定化到固体表面上。通过液基溶液收集的临床样品根据生产商的指示进行处理。细胞薄层被铺在微量滴定板的孔或被涂覆或处理以适于结合的其它类型表面诸如玻璃或塑料表面上,例如被处理以使细胞结合的塑料表面或被处理以使蛋白质结合的塑料表面;附着薄膜层的玻璃或塑料表面。表面也可以是珠的形式,以最小化接触面积。将每个样品载入到单独容器中。组合多个容器以形成如微量滴定板的形式,以用于高通量方法。细胞经固化后固定,接着进行抗原修复、阻断,用本发明的不同抗 -HPV 抗体进行温育。

[0102] 在步骤 140 中,获得初次抗体(抗 -HPV 抗体),其特异地结合由 HPV 感染细胞表达的 HPV 蛋白质。抗 -HPV 抗体可以直接标记有检测剂或可以通过标记有检测剂的二次抗体被间接检测到。含有 HPV 蛋白质的、微量滴定板上的细胞将在溶液中与抗 -HPV 抗体结合。未结合的抗 -HPV 抗体将通过洗涤被去除,并且,具有标记结合物的二次抗体和合适的基质将相继被加入,以通过平板读取器进行分析。

[0103] 在步骤 150 中,利用特异性结合 HPV 蛋白质的初次抗体针对临床样品进行一种或多种免疫分析,所述 HPV 蛋白质由 HPV 感染细胞表达。未结合的抗 -HPV 抗体将通过洗涤被去除,并且,具有标记结合物的二次抗体和合适的基质将相继被加入,以通过平板读取器进行分析。作为实例,抗 -HPV 抗体可直接用生物素标记,或可以被标记有 HRP 或生物素或随着用作基质的适当的剂被检测到的其它剂的二次抗体检测到,或者可以标记荧光原(fluorochromogen),以被适当的读取器直接检测到。前 - 抗体封闭溶液可以包含某些蛋白质或 BSA 或血清或其它剂,以阻断细胞与抗体非特异性结合。后封闭溶液可以包含与前 - 抗体封闭溶液相似的溶液,其具有较少的蛋白质或血清,与初级抗体一起进行温育。含有 HPV 抗体的溶液,可为浓缩的形式或稀释的形式,作为即用型试剂。含有次级抗体的溶液,可为浓缩的形式或稀释的形式,作为即用型试剂。

[0104] 在步骤 160 中,检测到与临床样品中表达的初次抗体特异性结合的 HPV 蛋白,测量

并量化所述 HPV 蛋白的量。适于读取代表抗体与样品中的目标蛋白质结合的信号强度的基质被加入到样品中,以量化样品中表达的蛋白质。作为实例,对于显色技术,TMB ELISA 基质或其等同物被用于检测源于抗体与蛋白质的结合的辣根过氧化物酶活性。将 TMB 加入到样品后,它产生蓝色,蓝色在加入酸性终止液(最大吸光度在 450nm)后变成黄色。利用显色平板读取器读取信号强度。作为另一实例,对于化学发光技术,商业上可得的化学发光基质被用于检测源于抗体与蛋白质的结合的辣根过氧化物酶活性。将基质加入到样品后,利用化学发光平板读取器读取化学发光强度。作为再一个实例,对于荧光技术,商业上可得的荧光基质被用于检测源于抗体与蛋白质的结合的辣根过氧化物酶活性。将基质加入到样品后,利用荧光平板读取器读取荧光强度。

[0105] 在步骤 170 中,根据 HPV 蛋白质在临床样品中的表达量测定临床样品的疾病等级。作为实例,通过利用已知量的 HPV 重组蛋白作为标准曲线,可以量化 HPV 癌蛋白的表达水平。在信号读取中选择截止阈值(cutoff threshold),以量化 HPV 蛋白质的表达水平,并被用于测定分析的阳性率以及确定样品的疾病等级。

[0106] 本文所述的一种或多种重组蛋白质可以在各种合适的系统中被表达,所述系统如细菌表达系统、病毒表达系统、酵母表达系统、哺乳动物表达系统,例如在本领域中通常已知的大肠杆菌、酵母、杆状病毒和/或哺乳动物细胞培养物。虽然可以通过其它手段获得多肽,但本发明的实施方式提供一种或多种重组蛋白质——大部分处于(或接近于)其天然形式,其在免疫分析中对于与患有 HPV 感染的人对象组织的抗体结合可能是非常期望的构象。获得的重组蛋白质被用于分析的阳性对照,也被用作免疫原以产生抗体。

[0107] HPV 重组蛋白质可以是任意种类的 HPV 病毒蛋白质、早期基因和/或晚期基因——包括但不限于:E2、E6、E7、L1、L2 的 HPV 蛋白质,并且可以来自各种 HPV 型。一些实施方式提供重组蛋白质,如重组杂合蛋白质,其含有 HPV 癌基因蛋白质的部分序列或全长序列。例如,全长 E6、E7 和/或 L1 多肽序列——由于在蛋白质纯化过程中不期望的聚集、蛋白质不稳定性、低水平表达、纯化蛋白质的低免疫原应答而被发现非常难以获得和纯化。例如,许多早期 E6 癌蛋白包含许多半胱氨酸氨基酸,因而,E6 癌蛋白的正确拓扑图要求适当地形成许多二硫键。另外,已知利用早期 E6 和 E7 蛋白质的小肽的某些免疫分析导致极其低的特异性和灵敏性,因而不适合作为商业化的诊断工具。

[0108] 生产 HPV 重组蛋白质,作为免疫原用于产生抗血清和从杂交瘤细胞系筛选单克隆抗体:各种重组蛋白质的克隆和生产包括由 HP V16 E6 编码的基因和 HPV18E6 基因、HP V16 E7 和 HPV18 E7 基因、HP V16 L1 和 HPV18 L1 基因。为了提供具有期望构象的重组蛋白质——大部分处于(或接近于)其天然形式,从可溶部分中纯化出在大肠杆菌中表达的重组 HPV E6、E7 或 L1 蛋白质,然后浓缩并用 PBS 透析,以用作免疫原。通过标准程序进行小鼠免疫接种和融合,以选出符合我们对 ELISA 的筛选标准的克隆。每个杂交瘤细胞系在组织培养物中生长并注入到小鼠中,以产生腹水。收集腹水、分出同种型(isotyped)并通过蛋白质 G 柱纯化,以用于 HPV 免疫测定。

[0109] 一些实施方式致力于针对 HPV 蛋白质的单克隆抗体。获得大量天然构象的、纯化的重组 HPV 蛋白质作为免疫原成为生产对于检测临床样品中的 HPV 蛋白质特异的抗体中的首要关键步骤。已知 E6 和 E7 由于在蛋白质纯化过程中不期望的聚集、蛋白质不稳定性、低水平表达和纯化蛋白质的低免疫原应答而非常难以分离和纯化。我们已克服技术障碍,生

产了非变性、可溶形式的 HPV E6 和 E7 重组蛋白质。为了证明我们开发的纯化方法产生与抗 -HPV 抗体结合的、接近于天然形式的构象,我们使用包含人 HPV 抗体的 HPV 感染的宫颈样品(通过 PCR 为高风险 -HPV 阳性)来测试纯化的重组 HPV 蛋白质。利用这种纯化的 E6 和 E7 重组蛋白质检测 HPV 感染的研究证明这些蛋白质与抗 -HPV 抗体结合,该抗 -HPV 抗体由响应于 HPV 感染的人免疫应答产生的。这些结果表明,这种纯化的重组 HPV 蛋白质适合用作免疫原来产生抗血清和产生能在体内识别天然 HPV 病毒蛋白质的抗体。我们已经使用非变性、可溶的 E6 和 E7 重组蛋白质来进行抗原刺激,并从而开发了针对 HPV E6 和 E7 癌蛋白的高度特异性抗体。

[0110] 获得的多克隆和单克隆抗体有助于在宫颈活检、血清或生殖拭子样本中诊断 HPV 感染以及评估人或其它对象中的疾病等级。尤其地,利用本发明抗体进行诊断允许鉴定处于恶性转化高风险的患者以及鉴定与样品有关的 CIN 特别阶段。抗体也可用于血清分析,以检测 HPV 病毒或检测转移的感染组织中的病毒以及监测 HPV 免疫疗法、抗 -HPV 疫苗或涉及控制 HPV 感染和 / 或宫颈癌的其它治疗剂的进展。

[0111] 因此,通过用纯化的 HPV16 E6 重组蛋白质和纯化的 HPV18 E6 重组蛋白质筛选产生抗体的杂交瘤细胞,一些实施方式提供单克隆抗体,其能够识别两种不同的 HPV 型——HPV16 和 HPV18 的 E6 蛋白质上的共同表位。一些实施方式提供单克隆抗体,其识别 HPV16 E7 和 HPV18 E7 蛋白质上的共同表位。举例来说,单克隆抗体用于测试生物样品、细胞系和 / 或临床样品的各种等级的上皮病变 (CIN2、CIN3、LSIL、HSIL、ASC-US) 以及不同的宫颈癌、鳞状细胞癌 (SCC, 一种常见的癌症类型) 和腺癌 (ADC, 一种腺癌类型)。

[0112] 获得的示例性单克隆抗体包括能够与 HPV16 E6 和 HPV16 E7 病毒蛋白质结合的单克隆抗体类型;能与所有 HPV16 E6、HPV16 E7 和 HPV16 L1 病毒蛋白质结合的另一单克隆抗体类型;和能与 HPV18 E6 和 HPV18 E7 病毒蛋白质结合的另一单克隆抗体类型。因此,利用本发明方法产生的单克隆抗体能够结合来自相同 HPV 型的两种或更多种 HPV 病毒蛋白质,所述 HPV 型选自高风险 HPV 型、低风险 HPV 型、HPV-16、HPV-18、HPV-31、HPV-33、HPV-35、HPV-39、HPV-45、HPV-51、HPV-52、HPV-56、HPV-58、HPV-59 和 HPV-68、HPV-6、HPV-11、HPV-42、HPV-43、HPV-44、HPV-53、HPV-54、HPV-55 和 HPV-56 及其组合。

[0113] 这些单克隆抗体可用于进行一种或多种免疫分析来检测 HPV 感染和 HPV 相关的宫颈癌和其它疾病。合适的免疫分析可以包括 ELISA(酶联免疫吸附试验)、乳头瘤病毒蛋白的抗原分析、针对乳头瘤病毒蛋白的抗体的抗体分析、乳头瘤病毒免疫复合体分析、蛋白质芯片分析、放射免疫沉淀测定分析、快速膜免疫层析分析、快速棒 (rapid stick) 免疫层析分析、组织和 / 或宫颈细胞的免疫组织化学分析和免疫细胞化学分析、其后的流式细胞测定。

[0114] 我们使用非变性、可溶的 E6 和 E7 重组蛋白进行抗原刺激,并从而开发了针对 HPV E6 和 E7 癌蛋白的高度特异性抗体。

[0115] 初始研究支持通过不同的应用:宫颈癌组织中的 ELISA、蛋白质印迹和免疫组织化学法 (IHC) 来使用我们的新抗 -E6 和抗 -E7 抗体。来自临床样品的确认结果表明我们的抗 -E7 单克隆抗体可用作生物标记,来鉴定宫颈组织中的高级发育异常,并可用于可靠的临床诊断分析中。

[0116] 在生殖道感染中鉴定了 40 种以上的 HPV 型,其中鉴别的 15 种类型为宫颈癌高风

险型,其中,HPV 16 型占约 50% 而 18 型占宫颈癌病例的另外 20-25%。然而,由于许多 HPV 感染——包括 HPV 16 和 HPV 18 感染——是自限性的,所以鉴定组织中的 HPV E6 和 E7 癌蛋白可以是鉴别高度发育异常细胞的最直接和有利的测试,无论 HPV 型如何。我们的目标是获得 HPV E7 特异性单克隆抗体,其能够同与癌症发展相关的最高风险 HPV 型反应。我们用来自 HPV 16 型和 18 型(占宫颈癌病例的约 75%) 的 HPV 重组蛋白质筛选了杂交瘤克隆,以鉴定能够从大部分或所有高风险 HPV 型中检测相关蛋白质的克隆。另外,我们用不相关的 HPV 蛋白质筛选了杂交瘤克隆,以排除与 HPV 结构蛋白质非特异性结合的那些。用于杂交瘤筛选的纯化的重组人乳头瘤病毒蛋白质包括但不限于 HPV 16 E6 蛋白质、HPV 16E7 蛋白质、HPV 16 L1 蛋白质、HPV 18 E6 蛋白质和 HPV 18 E7 蛋白质。比较我们的 IHC 结果与来自测试组织的 HPV 基因型数据,我们的抗 E7 抗体鉴定大部分普通高风险型——不但包括 HPV 16 和 HPV 18,而且还包括另外的高风险型,其与 16 型(即,31、33、35、52、58 型)和 18 型(即,45 型)密切相关。

[0117] 本发明的一个方面提供生产单克隆抗体的方法。该方法包括获得各种纯化的重组乳头瘤病毒蛋白和用两种或更多种纯化的重组乳头瘤病毒蛋白筛选产生抗体的杂交瘤细胞,以获得这样的单克隆抗体,其能够识别两种或更多种纯化的重组人乳头瘤病毒蛋白质上的共同表位并结合生物和临床样品中两种或更多种纯化的重组乳头瘤病毒蛋白和相应的乳头瘤病毒蛋白。

[0118] 另外,通过使用方法——包括用两种或更多种纯化的重组乳头瘤病毒蛋白阳性选择产生抗体的杂交瘤细胞和用非 HPV 蛋白质阴性选择产生抗体的杂交瘤细胞,产生与两种或更多种人乳头瘤病毒蛋白质具有结合特异性的单克隆抗体。例如,该方法可以包括通过用对两种或更多种纯化的重组乳头瘤病毒蛋白的阳性反应性和对非 HPV 蛋白质的阴性反应性选择产生抗体的杂交瘤细胞,而利用两种或更多种纯化的重组乳头瘤病毒蛋白筛选产生抗体的杂交瘤细胞,以便产生抗体的杂交瘤细胞产生对两种或更多种人乳头瘤病毒蛋白质具有结合特异性的单克隆抗体。两种或更多种纯化的重组乳头瘤病毒蛋白可以包括,例如 HPV 16 E6 蛋白质、HPV 16 E7 蛋白质、HPV 16 L1 蛋白质、HPV 18 E6 蛋白质、HPV 18 E7 蛋白质、HPV 18 L1 蛋白质和其组合。

[0119] 本发明的另一方法包括用第一 HPV 型的第一纯化的重组人乳头瘤病毒蛋白质和第二 HPV 型的第二纯化的重组人乳头瘤病毒蛋白质筛选产生抗体的杂交瘤细胞,以获得这样的单克隆抗体,其能够识别两种或更多种不同 HPV 型的人乳头瘤病毒蛋白质上的共同表位。本发明的再一种方法提供用第一 HPV 型的第一纯化的重组人乳头瘤病毒蛋白质和第二 HPV 型的第二纯化的重组人乳头瘤病毒蛋白质筛选产生抗体的杂交瘤细胞,以获得这样的单克隆抗体,其仅能够识别第一和第二纯化的重组人乳头瘤病毒蛋白质之一而不是其它纯化的重组人乳头瘤病毒蛋白质上的特异性表位。

[0120] 本发明的另一方面提供方法和能够结合来自不同 HPV 型的两种或更多种 HPV 病毒蛋白质的单克隆抗体。通过用对来自不同 HPV 型的两种或更多种纯化的重组乳头瘤病毒蛋白的阳性反应性和对非 HPV 蛋白质的阴性反应性选择产生抗体的杂交瘤细胞,借助于用两种或更多种纯化的重组乳头瘤病毒蛋白筛选产生抗体的杂交瘤细胞而获得单克隆抗体,以便产生抗体的杂交瘤细胞产生与两种或更多种 HPV 病毒蛋白质具有结合特异性的单克隆抗体。示范性单克隆抗体包括能够结合 HPV16 E7 和 HPV18 E7 蛋白质的一类单克隆抗体;

能够结合 HPV16 E6 和 HPV18E6 蛋白质的另一类单克隆抗体 ;和能够结合 HPV16 L1 和 HPV18 L1 蛋白质的另一类单克隆抗体,以用于各种免疫分析。

[0121] 本文所述的单克隆抗体是全抗体,其识别不同病毒类型中的共同表位。HPV 16 和 HPV 18 是引起宫颈癌的最常见的两种类型。在 13 种 HPV 高风险型中,两个主要的组包括 HPV 16 及其相关类型,如 31、33、35、52、58 型,以及 HPV 18 及其相关类型,如 45 型。尽管在生殖道感染的 40 种以上的 HPV 型中,HPV 16 和 HPV 18 属于不同的组,但基因组序列分析显示 HPV 16 和 HPV 18 之间以及其它类型之间的同源性,如表 1 所示。我们用 HPV 16E6 和 HPV 18 重组蛋白质筛选抗体,以获得能够结合 HPV 16、31、33、52、58 和 HPV 18、45 的全抗体。该全抗体对于检测在最高风险型 HPV 感染中存在的 HPV E6 蛋白质是新型的。

[0122] 表 1 :不同 HPV 型的 L1、E6 和 E7 的氨基酸序列同源性。

[0123]

	L1	E6	E7
HPV 16 对 HPV 18	63%	53%	42%
HPV 16 对 HPV 31	81%	65%	73%
HPV 16 对 HPV 33	79%	62%	60%
HPV 18 对 HPV 31	64%	51%	38%
HPV 18 对 HPV 33	65%	46%	44%
HPV 31 对 HPV 33	78%	57%	59%
HPV 16 对 HPV 6A	68%	35%	56%
HPV 16 对 HPV 11	68%	34%	55%
HPV 6A 对 HPV 11	92%	81%	83%

[0124] 本发明的再一方面提供 HPV 型 - 特异性单克隆抗体,其仅能结合第一 HPV 病毒蛋白质而不是不同于第一 HPV 病毒蛋白质的第二 HPV 病毒蛋白质。通过用对第一 HPV 型的第一纯化的重组乳头瘤病毒蛋白的阳性反应性和对第二 HPV 型第二纯化的重组乳头瘤病毒蛋白的阴性反应性筛选产生抗体的杂交瘤细胞,获得这种单克隆抗体,其中第一和第二病毒蛋白质与第一和第二 HPV 型的第一和第二纯化的重组乳头瘤病毒蛋白相应。HPV 型 - 特异性单克隆抗体可以仅与一种病毒蛋白质——第一病毒蛋白质结合。第一病毒蛋白质可以包括来自选自以下的 HPV 型的病毒蛋白质 :高风险 HPV 型、低风险 HPV 型、HPV-16、HPV-18、HPV-31、HPV-33、HPV-35、HPV-39、HPV-45、HPV-51、HPV-52、HPV-56、HPV-58、HPV-59 和 HPV-68、HPV-6、HPV-11、HPV-42、HPV-43、HPV-44、HPV-53、HPV-54、HPV-55 和 HPV-56 及其组合。示例性单克隆抗体包括这样的单克隆抗体,其仅识别选自以下的一种病毒蛋白质 :HPV 16 E6 蛋白质、HPV 16 E7 蛋白质、HPV 16 L1 蛋白质、HPV 18E6 蛋白质、HPV18 E7 蛋白质和 HPV 18 L1 蛋白质。通过本发明方法产生的这种类型的单克隆抗体可用于在一种或多种免

疫分析中检测特异性病毒蛋白质的存在。

[0125] 本文开发的抗体有助于 HPV 早期和晚期基因编码的高质量 and 适当纯化的重组蛋白质,在免疫分析中有助于产生非常高的灵敏性和特异性,以筛查 HPV 感染和进行宫颈癌检测。单克隆抗体可用于一种或多种免疫分析,其选自 ELISA(酶联免疫吸附试验)、乳头瘤病毒蛋白的抗原分析、针对乳头瘤病毒蛋白的抗体的抗体分析、乳头瘤病毒免疫复合体分析、蛋白质芯片分析、放射免疫沉淀测定分析、快速膜免疫层析分析、快速棒免疫层析分析、组织和 / 或宫颈细胞的免疫组织化学分析和免疫细胞化学分析、其后的流式细胞测定等。在一个实施方式中,一种或多种免疫分析可以是非侵袭性的,其中需要最少或不需要额外的仪器。

[0126] 用于产生 HPV 的单克隆抗体的已知方案通常不适合用于产生抗 -HPV 单克隆抗体,并不能用于免疫细胞化学诊断测试来筛选一般的人群体。这是因为通过这些方案产生的抗体将不一定与在感染的人细胞中发现的天然产生的 HPV 蛋白质进行反应。另外,现有技术抗体识别的表位不一定是抵抗临床样本的取样、固定和储存过程中涉及的标准程序的那些表位。

[0127] 纯化的重组蛋白质被用于通过注入到动物物种和用重组蛋白质筛选特异性结合来产生抗 - 血清、多克隆和单克隆抗体。许多方便的动物物种可用于制备合适的抗血清,并且,这些抗血清可直接使用。合适的动物物种包括小鼠、大鼠、兔子、豚鼠或甚至更大的哺乳动物,如绵羊。为了施用给这些动物,重组蛋白质通常在有佐剂的存在下施用,所述佐剂通常为弗氏完全佐剂,并且通过标准技术定期收获多克隆血清。

[0128] 利用 Kohler 和 Milstein 的方法或其更近的修改通过永生化的被注射动物的脾脏或其它产生抗体的细胞以获得产生单克隆抗体的克隆,可以产生单克隆抗体。HPV 阳性和阴性人血清样品有助于筛选产生单克隆抗体的杂交瘤,以确保单克隆抗体克隆的特异性。可以获得与纯化的 E6、E7 和 L1 反应的一种以上的阳性克隆,并且,可将获得的细胞培养物进一步注射到小鼠或其它动物源以产生腹水来纯化单克隆抗体,如通过蛋白质 A 亲和柱层析。纯化的抗体可用作我们的 ELISA 中的捕获或检测探针,或者与检测酶,如 (HRP、AP 等) 结合,以在吸光、荧光或化学发光检测系统中进行 ELISA 基质检测。

[0129] 进行克隆和免疫分析的基本技术可以从下列参考资料中找到:“Antibodies:A Laboratory Manual(抗体:技术实验指南)”,Harlow 和 Lane,Cold Spring Harbor Laboratory,Cold Spring Harbor,N.Y.1989;“Molecular Cloning(分子克隆)”,A Laboratory Manual(技术实验手册),Sambrook,Fritsch 和 Maniatis 编,Cold Spring Harbor Laboratory Press,1989 和本领域中已知的其他书籍和技术手册。

[0130] 例如,一种或多种基于免疫学的分析可以包括基于抗体的分析,其使纯化的乳头瘤病毒蛋白涂覆在表面上,如微量滴定板的底部表面、膜和 / 或芯片。未被涂覆的表面可以用非结合蛋白质封闭。然后,待测试的样品,如可能与抗体抵抗 HPV 病毒或 HPV 相关蛋白质的样品(来自人对象的样品)可通过结合涂覆的纯化的乳头瘤病毒蛋白而结合到表面。结合的抗体 - 纯化的乳头瘤病毒蛋白复合物可通过二次抗体和一些商业上可得的检测系统利用显色、化学发光或荧光基质进行检测。二次抗体的一个实例是辣根过氧化物酶结合的二次抗体,如针对人免疫球蛋白(对于 IgG、IgA 等是特异性的)的抗体。最终结果可以通过微量培养板读取器读取或通过眼睛观察——如果使用了显色基质。

[0131] 作为另一实例,抗原分析包括将初级抗体,如对与感兴趣的抗原结合具有亲和性的捕获抗体,涂覆在表面上,如微量滴定板的底部表面、膜、芯片等。感兴趣的抗原可以是,例如乳头瘤病毒蛋白、癌蛋白、壳体蛋白质,其可以由 HPV 病毒基因,例如早期基因或晚期基因等编码。将表面上未结合的部分封闭之后,待分析的临床样品可被施加,以与捕获抗体结合,形成免疫复合体,其通过与感兴趣的抗原结合可以被另一初级抗体或检测抗体检测。因此,两个初级抗体或成对的捕获抗体和检测抗体与感兴趣的抗原相互作用,很像三明治。捕获抗体可以是与检测抗体相同或不同的抗体,只要两个抗体可以特异地结合感兴趣的抗原,例如 HPV 病毒蛋白质、HPV 癌蛋白、壳体蛋白质等等。

[0132] 接下来,夹在中间的结合的抗体-抗原复合体可以通过二次抗体被检测,所述二次抗体对检测抗体具有亲和性并有助于通过标准免疫学复合检测系统利用显色、化学发光、荧光和许多不同种类的基质进行测量。最终的读取或目测可以通过具有适当的光吸收读取器的仪器进行或通过眼睛直接目测,并与对照样品的结果进行比较。阳性结果表明感兴趣的抗原与初级抗体、捕获抗体和检测抗体的结合,因而表明感兴趣的抗原在临床样品中的存在。相反的,阴性结果表明感兴趣的抗原不与初级抗体结合,因而感兴趣的抗原在临床样品中不存在。

[0133] 一种或多种免疫分析可用于检测至少三种类型的感兴趣的目标蛋白质,包括但不限于:抗原、抗体和抗原/抗体免疫复合体(在下文中也分别称为抗原测试、抗体测试和抗原/抗体免疫复合体测试)等。

[0134] 一种或多种免疫分析的形式可以是微量培养板形式(例如,32孔、48孔、96孔或384孔)、垂直或水平膜基快速测试、多点或多重蛋白质芯片。分析的原理与以上所述相同,除了检测系统根据基质而变化,所述基质被选择,以通过针对分析特别设计的仪器分析不同读取结果或形式的结果。另外,在一种类型的免疫分析中以一种形式开发的程序、条件、结合特异性可适于相同或不同免疫分析的不同形式,和/或相同或不同形式的不同免疫分析。

[0135] 也可以以各种形式进行 ELISA 程序。利用若干层抗-抗体、链霉抗生物素-生物素复合体和酶-抗-酶抗体复合体增强 ELISA 灵敏性的方法在本领域中是悉知的。用于固定抗原的固体支持物或表面通常是如本文所述的塑料,但各种其它固体支持物诸如乳胶或琼脂糖也被描述。抗原也没有必要被直接固定在固体支持物/固相上。例如,存在常用的 ELISA 形式,其通过抗原的固-相-固定的抗体将特异性抗原固定到固体支持物,所谓的捕捉抗体 ELISA 或三明治式 ELISA。涉及将抗原印记(转移)到片形式的固体支持物的免疫测定的特殊例子被称为免疫印记。典型地,固体支持物是硝化纤维或尼龙膜/片,但其它支持物也被描述。各种结合、混合、温育、涂覆或印记相互作用均包含在 ELISA 分析中。在 ELISA 分析之前,可以根据其大小通过凝胶电泳或类似方法分开抗原或抗体。结合到片上的特定抗原的抗体的检测可以与其它免疫测定类似的方式进行。

[0136] 96孔形式是高通量筛选形式,其有助于优化分析程序和条件。也可以使用具有不同孔数目的其它形式。也对,例如来自对 HPV 感染呈阳性的供体对象和未被 HPV 感染的未感染(virgin)对象的血清样品进行阳性对照和阴性对照。发现免疫分析导致,例如在检测 E6、E7 和 L1 抗体中的高灵敏性。做出初始滴定曲线并优化 ELISA 分析条件。

[0137] 适于结合的分析条件是这样的条件(就盐浓度、pH、洗涤剂、蛋白质浓度、温度等

而言),其允许在固体支持物或在溶液中结合发生在,例如捕获剂和目标剂之间、初级抗体和二次抗体之间、重组蛋白质和可以与重组蛋白质结合的蛋白质或抗体之间等等。这种条件,尤其关于抗体及其抗原,在本领域中是悉知的(见,例如 Harlow 和 Lane(Antibodies:A Laboratory Manual(抗体:技术实验指南)Cold Spring Harbor Laboratory,Cold Spring Harbor, N. Y. (1989))。适于特异性结合的条件通常允许解离常数(KD)小于约  $10^{-6}$ M 的结合配体或结合对选择性地彼此结合。

[0138] 抗-E6、抗-E7 和抗-L1 捕获抗体附着到微量滴定板的底部,以在加入纯化的重组蛋白质之前进行涂覆。然后,使用检测抗体来检测与捕获抗体结合的捕获的重组蛋白质。确定优化的捕获和检测抗体浓度。测定重组蛋白质在反应中的浓度——导致 ELISA 分析中抗原检测的直线性。这些三明治式的 ELISA 分析在同一天重复多次,以及在不同天重复多次,以测定分析的再现性和可靠性。测定每一分析的特异性和灵敏性。此外,显示 ELISA 分析在检测宫颈癌过程中与其它癌症相比具有选择性,例如以证明与来自卵巢或子宫内膜癌的样品的非交叉反应。因为已知在大部分——如果不是所有——宫颈癌细胞中发现 HPV,但其通常与其它癌症无关,所以本文所述的抗原测试不应该检测与其它癌症有关的抗原。为了测试这种选择性,例如可以测试来自卵巢组织和子宫内膜癌细胞系的提取物,其也可以用作抗原测试中的阴性对照。

[0139] 作为 HPV 全细胞 ELISA 的实例,基本测试程序如下:

通量步骤			
	1	液基溶液中收集的临床样品	管形瓶(10-20 ml) -
[0140]	2	移转至 96-微孔板	微孔板 96
	3	固定	微孔板 96
	4	透化	微孔板 96
	5	添加封闭液	微孔板 96
	6	添加初级抗-E6 或抗-E7 抗体	微孔板 96
	7	洗涤	微孔板 96
[0141]	8	添加结合的二次抗体	微孔板 96
	9	添加基质	微孔板 96
	10	分析	平板读取器 96

[0142] 当来自宫颈刮片的人细胞被处理并在微量滴定板上固定成单层细胞或细胞薄层后,通过用前-抗体封闭溶液封闭微量滴定板的孔达一段时间接下来用 HPV 抗体温育,来进行全细胞 ELISA 分析。然后用 PBS 或 H<sub>2</sub>O 或其它溶液洗涤板 3 到 5 次,以去除任何未结合的 HPV 抗体。然后,用二次抗体,例如抗-小鼠 IgG HRP 温育载玻片,接下来,洗涤并结合适当的基质以进行检测。作为基质的实例,TMA 在过氧化物酶和过氧化氢存在的情况下,根据存在的酶的量在酶活性部位被氧化,导致蓝色溶液沉积。蓝色溶液表明 HPV 抗体与细胞中存在的 HPV 蛋白质的特异性结合。分析可以在室温或更高温度下进行,以加速结合反应。该 HPV 全细胞 ELISA 分析可以手工进行或自动操作,从而提供在来自宫颈刮片的上皮细胞中筛选 HPV 感染和检测 HPV 癌蛋白的强有力的工具。

[0143] 为了证明 HPV ELISA 分析可以鉴别不同疾病等级的发育异常细胞,轻度、中度、重度或浸润性癌形成的样品均被测试。这些样品包括但不限于:例如,CIN1、CIN2、CIN3、LSIL、HSIL 或 ASC-US。在一些实施方式中,为了证明本文所述的全细胞 ELISA 分析可用于测试各种液基溶液中各个等级的各种样品源,不同液基溶液中的不同等级的样品也被测试。

[0144] 子宫颈癌属于影响生殖器官的最常见形式的癌。它局部浸润到邻近组织、血管、淋巴管和淋巴结。在其晚期,它难以治疗,并且可以证明是致命的。在发展成子宫颈癌之前,通常存在可逆的癌前变化期,被称为发育异常。虽然大多数子宫颈癌来自构成外部皮肤的鳞状细胞,但偶尔也有源自黏液生成细胞的癌症,所述黏液生成细胞排列于子宫颈内管,其引导进入子宫。该腺型被称为“腺癌(ADC)”而不是“鳞状细胞癌(SCC)”。与鳞状细胞癌不一样,腺癌前体——当存在时——可能难以根据帕氏涂片进行鉴定,因而使得腺癌难以检测。鳞状细胞发育异常缓慢发展成子宫颈鳞状细胞癌,这与腺癌不一致。因此,子宫颈腺癌常常在比鳞状细胞癌更晚的阶段被检测到。治疗与更常见的鳞状细胞癌的治疗类似。然而,因为它更经常在更晚的阶段被发现,常常需要更侵袭性的治疗。因此,关键是利用在一些实施方式中描述的 HPV 全细胞 ELISA 分析在液基溶液中通过早期筛查腺癌细胞检测 HPV 癌蛋白的存在。

[0145] HPV 相关癌形成的病例特征。

[0146] 中度发育异常意味着子宫颈皮肤以比正常速度中等快的速度生长,并已经发展超出轻度阶段。子宫颈的活组织检查显示不成熟基底细胞在通向皮肤表面中生长到一半,而没有明显的成熟。中度发育异常很重要,因为这些变化将前进到大得多的风险,而且,如果不治疗,它将发展成浸润性宫颈癌。为此理由,中度发育异常被称为“高度”病变或 HGSIL。这种状况的另一个同义词是“CIN2”(宫颈上皮内瘤形成,II 级)。帕氏涂片上的中度发育异常通常表明需要通过阴道镜检查进一步研究子宫颈。如果确定中度发育异常,那么通常对其治疗。治疗可能包括冷冻手术、LEEP 或激光。在治疗之后,通常获得频繁的帕氏涂片作为随访(follow-up),以确定是否复发(约 10%的机会),复发被快速诊断并进行进一步治疗。

[0147] 如果异常细胞通过基膜侵入到下面的组织中,则它们被认为是癌症。对于重度发育异常,它不被认为是癌症而是癌前问题,因为发育异常中的异常细胞并不通过基膜侵入。因此,根据定义,它们不是癌症。原位癌意味着存在延伸到皮肤全层的异常细胞。这些细胞单独看起来就像是癌细胞。原位癌被许多专家认为在临床上等同于重度发育异常或 CIN3,并且,应对其进行快速谨慎的评估。治疗可以包括通过冷冻它们(冷冻手术)、汽化它们(激光)来消除异常细胞或用充电的线圈剃除它们(LEEP)。在一些情况下,需要宫颈锥形活组织检查形式的更大面积外科手术来解决该问题。

[0148] 实施例 1. HPV 重组蛋白质表达、纯化和制备,以用作免疫原来产生抗血清和从杂交瘤细胞系筛选单克隆抗体

[0149] HPV 重组蛋白质可以是任意种类的 HPV 蛋白质,早期基因和/或晚期基因的 HPV 蛋白质,包括但不限于:E2、E6、E7、L1、L2,并且可以来自各种 HPV 型。本发明的一个方面提供重组蛋白质,如重组杂合蛋白质,其包含 HPV 癌基因蛋白质的部分序列或全长序列。例如,全长 E6、E7 和/或 L1 多肽序列,发现其难以获得和纯化,这是由于在蛋白质纯化过程中不期望的聚集、蛋白质不稳定性、低水平表达,纯化蛋白质的低免疫原应答。例如,许多早期 E6

癌蛋白包含许多半胱氨酸氨基酸,因而 E6 癌蛋白的正确拓扑图要求适当形成许多二硫键。另外,已知利用早期 E6 和 E7 蛋白质的小肽的某些免疫分析导致极其低的分析特异性和灵敏性,因而不适于作为体外临床诊断的工具。

[0150] 本文描述示例性癌基因 E6 或 E7 早期基因的克隆。包含 HPV-16 E6、E7 或 L1 基因的氨基酸编码区的 DNA 片段通过聚合酶链式反应 (PCR) 扩增获得。将 DNA 片段亚克隆到组氨酸标签表达载体,以产生质粒 DNA,用于表达 E6 或 E7 重组蛋白质。也使用具有组氨酸标签(例如,His<sub>6</sub>、His<sub>8</sub>等)、谷胱甘肽 S- 转移酶 (GST) 融合、麦芽糖-结合-蛋白质 (MBP) 等的其它类型的表达载体。另外,可将 DNA 片段亚克隆到其它表达体系,即杆状病毒、酵母等,以表达各种 HPV 型和菌株的 E6 或 E7 重组蛋白质。例如,获得在杆状病毒中表达的 HPV 16 的 L1 重组蛋白质,并将其命名为 HPV-16-L1-baculo。

[0151] 利用 IPTG 驱使的诱导在大肠杆菌 BL21 (DE3) 中表达 E6 或 E7 重组蛋白质。在 37°C 下诱导蛋白质表达两小时后,利用提供者(分别为 Amersham 和 New England Biolabs) 推荐的方案获得 E6 或 E7 重组蛋白质,并将其纯化成浓度为约 1mg/L。发现更长的诱导时间和在蛋白质纯化柱上回流经过而产生更高的蛋白质产量,导致高浓度的纯化的重组蛋白质,产量约为 2-10mg/L。根据 PAGE 分析,重组 GST-E6 或 His E6 蛋白质的纯度估计为 >90%。重组 E6 或 E7 融合蛋白质被用于检测 E6 或 E7 抗体在临床样品的存在,并且,也被用作免疫原来产生多克隆抗血清和单克隆抗体。

[0152] 用于克隆和进行免疫分析的基本技术可以在“Antibodies:A Laboratory Manual(抗体:实验室手册),Harlow 和 Lane,Cold Spring Harbor Laboratory,Cold Spring Harbor, N. Y. 1989”;“Molecular Cloning(分子克隆)”A Laboratory Manual(实验室技术手册),eds. Sambrook,Fritsch 和 Maniatis,Cold Spring Harbor Laboratory Press,1989 和本领域中已知的其它书籍和手册中发现。我们对 HPV 重组蛋白质进行纯化和表征过程的细节描述在我们共同拥有的美国专利号 7,732,166 中,其标题为“Detection Method for Human Papillomavirus(HPV)and Its Application in Cervical Cancer(人乳头瘤病毒 (HPV) 的检测方法及其在宫颈癌中的应用)”,其全部内容通过引用其整体被并入本文。

[0153] 图 1C。利用 His- 标签 Ni-NTA 柱的重组 E6 蛋白质的凝胶纯化图像。收集与泳道 8-11(椭圆形和箭头所示)对应的洗脱液,以获得非聚集单体形式的纯化的重组 HPV E6 蛋白质。图 1C 显示通过 SDS-PAGE 分析的、由 IPTG 诱导的全长 HPV-18E6 重组蛋白质的表达。所得 His- 标记的 -HPV18-E6 重组蛋白质的分子量约为 20.5KD。根据 PAGE 分析,重组 E6 蛋白质的纯度估计为约 90% 或更高。图 1C 所示的纯化的重组 E6 蛋白质被用于一种或多种免疫分析,例如,在抗体分析中被用作检测抗体等。纯化的重组 E6 蛋白质也被用作免疫原,以产生针对 HPV-16 E6 蛋白质特异的抗血清、多克隆抗体和单克隆抗体。

[0154] 作为另一实例,图 1D 显示纯化的重组 E6 蛋白质的凝胶过滤柱层析的结果,表明纯化的重组蛋白质 HPV-16-E6 是单体可溶蛋白质,分子大小约 20.5kDa。在 BSA 之后洗脱纯化的重组 E6 蛋白质。图 1A- 图 1B,分别利用 His- 标签 Ni-NTA 和 GST- 标签柱的重组 E7 蛋白质的凝胶纯化图像。收集与泳道 4-5(椭圆形所述)对应的洗脱液,以获得非聚集单体形式的纯化的重组 HPV E7 蛋白质。图 1A 和图 1B 是 SDS-PAGE 凝胶图,显示一个示例性的、纯化的重组 His 标记的(图 1A)和 GST 标记的(图 B)HPV-18-E7 蛋白质。如图 1B 中所示的实

例, GST 标记的 HPV-18-E7 重组蛋白质被纯化成与如圈所示分子量为 37.2KDa 的主要单带的同质性。所得重组 HPV-18 E7GST 蛋白质的分子量约为 37.2KD。获得重组 HPV-18 E7GST 蛋白质,并纯化成终浓度约为 1mg/L。也获得重组 HPV-18 E7HIS 蛋白质,并纯化成终浓度约为 1mg/L。其他表达体系也被用于表达来自各种 HPV 基因型和菌株的 E7 重组蛋白质。例如,获得来自 HPV-18 的 E7 重组蛋白质并命名为 HPV-18-E7- 组氨酸。重组 E7 融合蛋白质或重组 E7 杆状病毒蛋白质被用于检测临床样品上 E7 抗体的存在,而且,也被用作免疫原来产生多克隆抗血清和单克隆抗体。

[0155] 通常,利用如在本文和各种重组蛋白质表达体系中所述的程序,应用正向和反向引物对,借助于聚合酶链式反应 (PCR) 扩增,通过克隆早期和晚期基因获得来自各种高风险 HPV 型和低风险 HPV 型或菌株的重组蛋白质。例如,通过在 His- 标记的表达体系中进行表达,也获得 HPV-16 L1 蛋白质的重组 N- 末端片段。例如,从 his- 标记的表达体系和杆状病毒表达体系获得 HPV-16 的部分和全长 L1 重组蛋白质,并命名为 HPV-16L1N-his 和 PV-16L1-his(baculo-SF9)。重组 L1 蛋白质和 / 或重组 L1 部分蛋白质被用于检测临床样品上 L1 抗体的存在,而且也被用作免疫原来产生多克隆抗血清和单克隆抗体。

[0156] 通过在 His- 标记的表达体系中进行表达也获得 HPV 16 L1 蛋白质的重组 N- 末端片段。HPV-16 L1 N- 末端重组蛋白质的分子量约为 34KD。也可以获得 C- 末端片段。相同技术被用于产生重组 HPV-18 L1 蛋白质,其被用作免疫原来产生抗血清、多克隆和单克隆抗体。

[0157] 实施例 2. 抗 -HPV 抗体制备。利用实施例 1 所述技术产生的重组 HPV 蛋白质被用作免疫原来产生抗血清、多克隆抗体和单克隆抗体。

[0158] 用于进行克隆和进行免疫分析的基本技术可以在下列资料中找到: “Antibodies:A Laboratory Manual(抗体:实验室手册)”, Harlow 和 Lane, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N. Y. 1989; “Molecular Cloning(分子克隆)”, A Laboratory Manual(实验室手册), eds. Sambrook, Fritsch 和 Maniatis, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989 和本领域中已知的其他书籍和技术手册。我们的抗体生产表征产生的抗体的过程的细节以及某些分析描述在我们共同拥有的美国申请序列号 12/456, 053——2009 年 6 月 10 日提交, 标题为 “Novel Monoclonal Antibodies against HPV Proteins (针对 HPV 蛋白质的新型单克隆抗体)”、美国申请序列号 12/456, 054——2009 年 6 月 10 日提交, 标题为 “In situ Detection of Early Stages and Late Stages HPV Infection (原位检测早期和晚期 HPV 感染)”、美国申请序列号 12/456, 055——2009 年 6 月 10 日提交, 标题为 “In situ Detection of Early Stages and Late Stages HPV Infection (原位检测早期和晚期 HPV 感染)” 和美国申请序列号 12/456, 076——2009 年 6 月 10 日提交, 标题为 “Detection of Early Stages and Late Stages HPV Infection(早期和晚期 HPV 感染的检测)”。每一专利文献均通过引用其整体被并入本文, 用于所有目的。

[0159] 图 2. 利用多克隆抗 -HPV E6 和抗 -HPV E7, 在宫颈癌细胞系和宫颈组织的细胞溶解产物中检测 HPV 重组蛋白质和 HPV 蛋白质的蛋白质印迹图像。图 2A, 兔子抗 -HPV 16 E7 抗体 (RAb4) 和兔子抗 -HPV 18 E7 抗体 (RAb2) 被用于检测 HPV 18 感染的海拉细胞、HPV 16 感染的 CaSki 细胞和 HPV 阴性 C33a 细胞中的 HPV E7 蛋白质表达水平。纯化的重组蛋白质被用作阳性对照, 其被深染色 (dark stain)。抗 - $\beta$  肌动蛋白抗体被用作内部对照,

其对于所有的细胞系也显示深染色。这些结果表明 RAb4 检测来自细胞溶解产物的 HPV E7 蛋白质,所述细胞溶解产物是 HPV18 感染的 (HeLa) 和 HPV16 感染的 (CaSki)。这些数据表明,多克隆抗 -HPV 16E7 抗体与 HPV 18 E7 蛋白质交叉反应。RAb2 检测来自细胞溶解产物的 HPV E7 蛋白质,所述细胞溶解产物是 HPV18 感染的。图 2B,兔抗 -HPV16 E6 抗体被用于检测从宫颈癌组织中提取的细胞溶解产物中的 HPV E6 蛋白质。HPV16E6 和 HPV18E6 重组蛋白质被用作阳性对照,并且获得深染色(泳道 1 和 2)。HPV18 感染的 HeLa 细胞溶解产物也产生深染色(带 3)。来自人子宫颈的正常细胞提取物产生阴性结果(泳道 4 和 6)。来自人子宫颈的癌细胞提取物产生阳性结果(泳道 5 和 7)。这些数据表明,多克隆抗 -HPV16E6 抗体可以同时检测 HPV16 和 HPV 18 E6 重组蛋白质以及来自宫颈癌组织的蛋白质。

[0160] 实施例 2.6。抗 -HPV 抗体的特异性。

[0161] 一种或多种免疫分析可用于测试通过用两种或更多种 HPV 重组蛋白质筛选杂交瘤细胞系产生的单克隆抗体的特异性。EIA(酶免疫分析)和/或蛋白质印迹被用作测试本文所述 HPV 抗体特异性的分析形式。各种纯化的重组 HPV 蛋白质——包括用于获得抗 -HPV 抗体的初始筛选蛋白质和不用于筛选的其他蛋白质——被用于涂覆微量滴定板,以测试针对 EIA 获得的抗 -HPV 抗体的特异性。宫颈癌细胞系的细胞溶解产物中的蛋白质(具有或不具有 HPV 感染)被用于通过蛋白质印迹测试抗 -HPV 抗体的特异性。为了确定 HPV 抗体与来自 HPV 感染细胞系的蛋白质的结合和反应性,蛋白质印迹非常有助于显示与 HPV 感染细胞系中存在的蛋白质相应的特定蛋白质带。这些蛋白质印迹蛋白质带可以与重组 HPV 蛋白质比较在 SDS-PAGE 凝胶上其预期的分子量位置。宫颈癌细胞系的细胞溶解产物——包括 HeLa 细胞系 (HPV18 阳性)、SiHa 细胞系 (HPV16 阳性) 和 C33A 细胞系 (非 HPV 感染的) 被用于显示在蛋白质印迹上通过 HPV 单克隆抗体对 HPV E6、E7 或 L1 的检测。

[0162] 图 3 显示来自各种杂交瘤克隆的抗 -HPV E6、抗 -HPV E7 和抗 -L1 抗体与各种 HPV 蛋白质的交叉反应。6×His 被用作阴性对照。这些数据表明,本发明描述的单克隆抗体包括 HPV 型 - 特异性和非类型特异性的克隆,其能够与 HPV 重组蛋白质结合。

[0163] 图 4A 显示利用小鼠抗 -HPV E6 抗体检测各种 HPV 蛋白质的 ELISA 结果。获得与 HPV16E6 和 HPV 18E6 蛋白质的特异性结合。图 4B。利用小鼠抗 -HPV18E6 抗体针对各种细胞系的蛋白质印迹结果。针对 HPV18 感染的 HeLa 细胞系获得阳性菌株。重组 HPV18E6 蛋白质被用作阳性对照。抗 - $\beta$  肌动蛋白抗体被用作内部阳性对照。图 4C。利用小鼠抗 -HPV E7 抗体检测各种 HPV 蛋白质的 ELISA 结果。用 HPV16E7 和 HPV18E7 蛋白质获得特异性结合。图 4D。利用小鼠抗 -HPV E7 抗体针对各种细胞系的蛋白质印迹结果。针对 HPV18 感染的 HeLa 细胞系获得阳性菌株。重组 HPV18E7 蛋白质被用作阳性对照。抗 - $\beta$  肌动蛋白抗体被用作内部阳性对照。

[0164] 为了显示能够与来自本发明所述不同 HPV 型的两种或更多种 HPV 病毒蛋白质结合的单克隆抗体,获得能够与 HPV 16 和 HPV18 的重组 E6 蛋白质反应的单克隆抗体。图 4A 显示针对 EIA 单克隆抗体与能够与重组 HPV16 E6 和 HPV18E6 蛋白质反应的共同表位的特异性。在待被本文所述的抗体检测的微量滴定板上涂覆的重组蛋白质为天然形式。这些数据表明,单克隆抗体与天然形式的重组 HPV16E6 和 HPV18E6 蛋白质强烈地起反应,但与天然形式的重组 HPV E7 没有反应性,与 HPV L1 蛋白质也没有反应性。这些数据表明,该抗体含有 HPV E6 共同表位,其能够与天然形式的重组 HPV16 E6 和 HPV18 E6 蛋白质反应。图 4B 显示

蛋白质印记结果,其利用来自各种宫颈癌细胞系的细胞溶解产物与图 4A 中测试的、与 HPV 16 和 HPV18 的重组 E6 蛋白质结合的同单克隆抗体进行反应。细胞溶解产物和重组蛋白质均显示如由单克隆抗体在 17kDa 的标准分子量标记周围检测到的单一条带,表明检测到 HeLa(HPV18) 中的来自宫颈癌细胞系的 HPV E6 蛋白质(约 18kDa),而不是 C33A(非 HPV 感染)细胞系。显示具有预期分子量的重组蛋白质泳道上的条带表明单克隆抗体与变性的 HPV18E6 重组蛋白质强烈地起反应。

[0165] 作为显示能够与来自本发明所述不同 HPV 型的两种或更多种 HPV 病毒蛋白质结合的单克隆抗体的另外实例,图 4C(圈所示)显示针对 EIA 能够与重组 HPV16E7 和 HPV18E7 蛋白质同时起反应的单克隆抗体的特异性。在待被本文所述的抗体检测的微量滴定板上涂覆的重组蛋白质为天然形式。这些数据表明,本文所述的单克隆抗体与天然形式的重组 HPV16 E7 和 HPV18 E7 蛋白质强烈地起反应,但与天然形式的重组 HPV E6 没有反应性,与 HPV L1 蛋白质也没有反应性。这些数据表明,该抗体含有 HPV E7 共同表位,其能够与天然形式的 HPV16 E7 和 HPV18E7 蛋白质反应。

[0166] 为了显示单克隆抗体仅能与第一 HPV 病毒蛋白质而不是不同于第一 HPV 病毒蛋白质的第二 HPV 病毒蛋白质结合,图 4C(第一图)显示针对 EIA 能够与重组 HPV16 E7 而不是与其他重组 HPV 蛋白质起反应的单克隆抗体的特异性。针对 EIA 的数据表明,含有特异性表位的该单克隆抗体的特异性仅能与 HPV VI 6 E7 反应,而并不与 HPV18 E7 或其他重组 HPV 蛋白质交叉反应。在待被本文所述的抗体检测的微量滴定板上涂覆的重组蛋白质为天然形式。这些数据表明,本文所述的单克隆抗体与天然形式的重组 HPV16 E7 蛋白质强烈地起反应,但不与天然形式的重组 HPV E6 或 L1 蛋白质交叉反应。这些数据也表明,该抗体含有 HPV16 E6 特异性表位,其仅能够与 HPV16 E7 蛋白质反应。图 4C(第二图)显示针对 EIA 能与重组 HPV18 E7 反应、但不与其他重组 HPV 蛋白质反应的单克隆抗体的特异性。

[0167] 实施例 2 中描述的程序提供技术,以生产和表征针对至少纯化的重组 HPV 16E6 蛋白质、HPV 16 E7 蛋白质、HPV 16 L1 蛋白质、HPV 18 E6 蛋白质、HPV18 E7 蛋白质、HPV 18 L1 蛋白质和其组合产生的至少单克隆和多克隆抗体。实施例 2 描述的结果表明这些抗体与至少 HPV 16 E6 蛋白质、HPV 16 E7 蛋白质、HPV 16 L1 蛋白质、HPV 18 E6 蛋白质、HP VI 8 E7 蛋白质、HPV 18 L1 蛋白质和其组合的特异性结合。数据表明全抗体的产生,其每一个均能检测至少两种或 HPV 型的 HPV 蛋白质。

[0168] 实施例 3。样品收集和制备的详细程序。用于样品收集和制备以用于本申请所述的全细胞 ELISA 分析的详细程序描述在该实施例中。

[0169] 用于本发明的各个实施例中所述的全细胞 ELISA 的样品包括但不限于:重组蛋白质、培养的细胞系和临床样品。

[0170] 使用的重组蛋白质根据实施例 1 中提供的程序获得和表征。使用的培养的细胞系获自体外细胞培养物组分。

[0171] 使用的临床样品获自活的人对象。从其获得样品的人对象属于以下种类:1. 健康的人对象,在常规身体检查中从其获得样品,并用作常规筛选的一部分。2. 易感染 HPV 的人对象(例如,通过家族史所确定的;暴露于某些环境因素等)。3. 具有异常症状(例如,宫颈疣突或类似物)的人对象。4. 被暂时诊断患有宫颈疾病(例如,通过根据,例如帕氏涂片、杂交捕获、PCR 测试等的其他测试确定的)的人对象。

[0172] 用于本发明各个实施例所述的全细胞 ELISA 的临床样品衍生自从人对象获得的宫颈刮片。本文所使用的样品因此包括典型地——尽管不是必要的——流体形式,即,水形式的材料或材料混合物。所有样品均在女性患者进行预定的妇科检查时取自女性患者。将翼镜插入人对象之后,将刷子或棉拭子插入子宫颈内并旋转,以获得子宫颈内细胞,即,宫颈刮片。然后,取出刷子或拭子并迅速存放在保存溶液中。使用各种保存溶液——包括但不限于:商业上可得的和临床使用的ThinPrep<sup>®</sup> (Hologic, Inc.) 保存溶液和SurePath<sup>®</sup> (BD Biosciences Inc.) 保存溶液。

[0173] 实施例 4。全细胞 ELISA 分析的详细程序。与本申请中描述的全细胞 ELISA 分析中使用的各种分析条件有关的详细程序被描述在本实施例中。

[0174] 作为实例,蛋白质、细胞或临床样品(以下称为样品)被用于全细胞 ELISA 分析。样品可以直接沉积到微量滴定板的孔或在溶液中含有固定剂和防腐剂的收集瓶中。在分析之前,在没有任何预处理或有各种预处理的情况下使用样品,所述预处理包括但不限于:抗原修复程序、细胞凝集程序或其组合。

[0175] 通过在各种温度下处理各种缓冲溶液中的样品达各种时间段,进行抗原修复程序。使用的温度范围为室温到 100℃或更高,即,120℃。使用的缓冲溶液包括高 pH Tris 缓冲液 (pH=9-10) 和低 pH 柠檬酸盐缓冲液 (pH=~6)。使用的处理时间范围在 5 分钟到 45 分钟。

[0176] 利用以下程序进行细胞凝集。将收集液体中的细胞离心或是它们静置不被干扰达 30min 到 2 小时,以使细胞沉到收集瓶的底部。然后去除部分上清液,以浓缩样品。

[0177] 在单次处理、联合处理或不处理之后,将样品分配到容器表面以进行分析。使用的各种表面包括但不限于:玻璃或塑料表面,其被涂覆或处理,以具有合适的结合特异性,例如,处理的塑料表面用于进行细胞结合或处理的塑料表面用于进行蛋白质结合;附着薄膜层的玻璃或塑料表面。表面也可以是珠的形式,以最大化接触面积。每一样品均被载入到单独的容器中。多个容器被组合,以形成像用于高通量方法的微量滴定板一样的形式。

[0178] 将样品分配到容器表面之后,将样品固定化到表面上。使用用于固定化的各种条件。进行固定化,以允许样品静置在表面上而不受干扰。固定化时间的范围在 10 分钟到 24 小时。固定化温度范围为 4℃到 37℃。

[0179] 在固定化之后将样品固定住。使用用于固定的各种条件。使用的固定溶液包括 100% 甲醇、100% 乙醇和 100% 丙酮。使用的固定时间范围在立即进行鼓风干燥到 24 小时或直到固定溶液在没有帮助的情况下完全蒸发。使用的固定温度范围为 4℃至室温。

[0180] 固定之后,使样品透化,以破坏抗体进入细胞的细胞膜,使在细胞内与抗原结合的抗体容易接近。使用各种透化剂,包括但不限于乙醇基溶液,如冷冻的(-20℃)去离子 H<sub>2</sub>O 中的 90% 甲醇和洗涤剂基溶液,如皂苷、氟核、NP-40、吐温-20 和毛地黄皂苷。使用每种洗涤剂基透化剂的各种浓度(均用去离子 H<sub>2</sub>O 稀释):NP40, 0.1% 到 5%;吐温-20, 0.1% 到 2.5%;皂苷, 0.001% 到 0.5%;毛地黄皂苷, 0.1% 到 2.5%;和氟核, 0.01% 到 1%。使用用于透化的各种温度,从室温到 0℃。使用各种透化时间,从 5 分钟到 30 分钟。在温和摇动下进行温育。

[0181] 按照分析程序使用洗涤溶液;一般在为了消除前面步骤的残留溶液而加入新溶液之前。使用各种洗涤溶液,包括去离子水、磷酸盐缓冲盐水和包含吐温-20 的磷酸盐缓冲盐水。使用各种浓度的吐温-20,其范围从 0.1% 到 1%。使用各种洗涤时间,范围从立即处理

到 5 分钟。进行洗涤程序,允许样品在不受干扰或在温和摇动下温育。洗涤程序被重复使用 2 到 4 次。

[0182] 在透化之后,处理容器中的溶液。用洗涤溶液洗涤样品。然后,用 3% $H_2O_2$ 温育样品,以阻断可以以另外方式引起背景信号增强的内源性过氧化氢酶。用去离子  $H_2O$ 、100% 甲醇或磷酸盐缓冲盐水制备 3% $H_2O_2$ 溶液。使用的温育时间范围为 10 分钟到 30 分钟。温育之后,处理容器中的溶液并洗涤样品。

[0183] 然后,在封闭溶液中温育样品,以封闭样品和表面上的非特异性结合位点,以消除非特异性结合。使用各种封闭条件。使用的封闭溶液包括正常的山羊血清、酪蛋白缓冲液和商业上可得的分析稀释剂以及分析缓冲液。使用的温育时间范围为 1 小时到 24 小时。使用的封闭温度包括室温和 4°C。在温和摇动下进行温育。在温育之后处理封闭溶液。

[0184] 将与重组蛋白质或在相同样品中表达的感兴趣的蛋白质结合的初级抗体加入到样品中。执行各种条件。使用各种多克隆或单克隆抗-HPV E6 或抗-HPV E7 抗体。使用抗体的各种稀释物,范围从 1:50 稀释到 1:1000 稀释。使用各种稀释剂,范围为 10% 正常山羊血清、酪蛋白缓冲液和分析稀释剂。进行各种温育时间长度,范围为 1 小时到 24 小时。执行各种温育温度,包括室温和 4°C。在温和摇动下进行温育。在温育之后处理初级抗体溶液。用洗涤溶液洗涤样品。

[0185] 将与初级抗体结合的二次抗体加入到样品中。执行各种条件。使用各种次级抗体,包括与生物素或辣根过氧化物酶 (HRP) 结合的抗体。使用次级抗体的各种稀释物,范围为生物素标记的抗体,1:125 到 1:1000 稀释物;和 HRP- 结合的抗体,1:125 to 1:250。使用各种稀释剂,包括磷酸盐缓冲盐水、正常山羊血清、酪蛋白缓冲液和商业上可得的分析稀释剂。执行各种温育时间,范围从 30 分钟到 1 小时。在温和摇动下进行温育。在温育之后处理二次抗体溶液。用洗涤溶液洗涤样品。

[0186] 如果使用生物素化的二次抗体,样品然后用链霉抗生物素结合的 HRP 溶液温育。执行各种温育条件。执行 HRP 溶液的各种稀释,范围从 1:250 到 1:600 稀释。执行各种温育时间,范围从 45 分钟到 1 小时。使用各种稀释剂,包括磷酸盐缓冲盐水、正常山羊血清、酪蛋白缓冲液和商业上可得的分析稀释剂。在温和摇动下进行温育。温育之后,处理溶液。用洗涤溶液洗涤样品。

[0187] 将适于读取代表抗体与样品中的目标蛋白质结合的信号强度的基质加入到样品,以获得蛋白质或在样品中表达的蛋白质的量的测量结果。使用各种基质。所有基质均为商业上可得的,并且,根据提供的指示进行基质的制备。在温和摇动下进行温育。

[0188] 对于显色技术, TMB ELISA 基质或其等同物被用于检测由于抗体与蛋白质的结合而引起的辣根过氧化物酶活性。将 TMB 加入到样品之后,它产生蓝色,该蓝色在加入酸性终止液(最大吸光度在 450nm 处)后变成黄色。利用显色平板读取器读取信号强度。

[0189] 对于化学发光技术,商业上可得的化学发光基质被用于检测由于抗体与蛋白质的结合而引起的辣根过氧化物酶活性。将基质加入样品之后,利用化学发光平板读取器读取化学发光强度。

[0190] 对于荧光技术,商业上可得的荧光基质被用于检测由于抗体与蛋白质的结合而引起的辣根过氧化物酶活性。将基质加入样品之后,利用荧光平板读取器读取荧光强度。

[0191] 实施例 5。针对培养的细胞进行的全细胞 ELISA 分析

[0192] 为了证明本申请所述全细胞 ELISA 分析的可行性,将实施例 4 中所述的分析程序应用于培养的细胞,通过该分析程序,细胞群体和细胞数目更加一致。

[0193] 作为实例,利用抗-HPV E7 抗体进行全细胞 ELISA,以检测 HPV E7 癌蛋白在 HPV 阳性细胞系 HeLa 和 HPV 阴性细胞系 C33a 中的表达水平。海拉细胞和 C33a 细胞获自细胞培养物组分。制备了各种浓度的细胞培养物溶液:每 50  $\mu$ L 约 9000 个海拉细胞、4500 个海拉细胞、40000 个 C33a 细胞和 20000 个 C33a 细胞。两份 50  $\mu$ L 每种浓度的每种细胞系均被分配到干净的、聚苯乙烯涂覆的、底部平坦且高度结合的 96 孔微量滴定板中。在室温下固定化细胞 30 分钟。固定化之后,处理溶液,并且利用 25  $\mu$ L 100% 乙醇固定细胞同时在室温下立即进行鼓风干燥。在固定之后,在室温下利用冷冻的(-20 $^{\circ}$ C)去离子水中的 90% 甲醇 100  $\mu$ L 透化细胞 5 分钟,同时温和摇动。透化之后,处理容器中的溶液,并在温和摇动下用磷酸盐缓冲盐水洗涤细胞 2 次,每次 5 分钟。将 100  $\mu$ L 3%  $H_2O_2$  加入到样品中,并在室温下温育 20 分钟,同时进行温和摇动,以阻断内源性过氧化氢酶。完成温育之后,处理溶液,并洗涤细胞 3 次,每次 5 分钟,同时进行温和摇动。然后,在室温下,在 100  $\mu$ L 10% 正常山羊血清中温育细胞 1 小时,同时进行温和摇动,以封闭样品和微量滴定板的表面上的非特异性结合位点,消除非特异性结合。在 10% 正常山羊血清中以 1:200 稀释使用 50  $\mu$ L 的抗-HPV E7 抗体,在室温下温育样品 1 小时,同时进行温和摇动。在温育完成之后,处理溶液,并且,在温和摇动下用 PBS 洗涤溶液洗涤样品 3 次,每次 5 分钟。然后,然后以 1:500 稀释将 50  $\mu$ L 生物素标记的二次抗体加入到 5% 正常山羊血清中,并在室温下温育样品 30 分钟,同时进行温和摇动。在温育完成之后,处理溶液,并且,在温和摇动下用 PBS 洗涤溶液洗涤样品 3 次,每次 5 分钟。然后,以 1:600 稀释将 50  $\mu$ L 链霉抗生物素结合物的 HRP 溶液加入到 PBS 中,并在室温下温育样品 45 分钟,同时进行温和摇动。在温育完成之后,处理溶液,并且,在温和摇动下用 PBS 洗涤溶液洗涤样品 3 次,每次 5 分钟。然后,加入 50  $\mu$ L TMB 基质,在室温下温育样品 10 分钟而不受干扰。然后,加入 25  $\mu$ L 酸性终止液以终止酶促反应,并且,利用显色平板读取器读取信号强度。重复分析至少 2 次,以确定再现性。全细胞 ELISA 结果显示在图 6A 中。

[0194] 图 6A 显示细胞系的平均吸光度,没有用和不用抗-HPV E7 抗体进行标准化。每一个读取结果对应于 ELISA 孔中的总细胞,并且,细胞数目显示在图例中。HPV 阳性海拉细胞的信号强度明显高于 HPV 阴性 C33a 细胞的信号强度,尽管事实上载入了明显高数目的 HPV 阴性 C33a 细胞。在没有初级抗体被用作阴性对照的情况下进行分析。产生可以忽略的信号强度。

[0195] 进行标准化,数据显示在图 6B 中。在具有和没有抗-HPV E7 抗体的情况下,HPV 阳性海拉细胞和 HPV 阴性 C33a 细胞的吸光度进行平均。读取结果被标准化,其对应于每一细胞的吸光度。与图 6A 中显示的没有标准化的数据相比,HPV 阳性海拉细胞和 HPV 阴性 C33a 细胞之间的信号强度差异进一步被增加。

[0196] 作为另一实例,利用各种浓度的 HPV 阳性海拉细胞和 HPV 阴性 C33a 细胞进行全细胞 ELISA 分析。使用的海拉细胞的浓度为每 50  $\mu$ L 1250 个细胞、2500 个细胞、3750 个细胞和 5000 个细胞。使用的 C33a 细胞的浓度为每 50  $\mu$ L 2500 个细胞、5000 个细胞、10000 个细胞和 20000 个细胞。使用在之前第三段中描述的不同分析程序。以 1:200 稀释使用抗-HPV E7 抗体,于 10% 正常山羊血清中。重复分析至少 2 次,以确定再现性。将产生的数据绘图,

以生成 HeLa 和 C33a 细胞的滴定曲线。

[0197] 图 6C 显示针对抗 -HPV E7 抗体的 HPV 阳性海拉细胞（菱形点）和 HPV 阴性 C33a 细胞（方形点）的滴定曲线，其利用比色法测量吸光度而不进行细胞数目标准化。呈现的读取结果对应于每一 ELISA 孔的平均读取结果。HPV 阳性和 HPV 阴性细胞系之间吸光度的差异发生在将 5000 个细胞用于分析时。C33a 的信号强度在利用更高细胞数目——每孔超过 10000 个细胞——时饱和，表明载入到容器表面的细胞可能过饱和。

[0198] 进行细胞数目标准化，结果显示在图 6D 中。HPV 阳性海拉细胞（菱形点）和 HPV 阴性 C33a 细胞（方形点）的滴定曲线，其利用比色法测量吸光度。图 6C 的读取结果根据细胞数目进行标准化，因而对应于每一孔的平均读取结果。HPV 阳性海拉细胞的数据显示，信号强度在用于分析的细胞量不太高时最佳。HPV 阴性 C33A 细胞的数据显示，无论用于分析的细胞量如何，信号强度保持最小化，确定该特定的细胞系是 HPV 阴性的。

[0199] 作为另一实例，利用抗 -HPV E6 抗体进行全细胞 ELISA 分析，以利用之前第六段中描述的类似程序检测 HPV E6 癌蛋白在临床癌症样品、培养的 HPV 阳性 HeLa 和 SiHa 细胞和 HPV 阴性 C33a 细胞中的表达水平。直接使用临床癌症样品，即，在收集溶液中收集的而未进行细胞数目标准化，并且收集液体是 SurePath® 保存溶液。使用的所有三种培养的细胞系的浓度为每 50  $\mu$ L 36000 个细胞、27000 个细胞、1800 个细胞和 9000 个细胞。以 1:200 稀释使用抗 -HPV E6 抗体，于 10% 正常山羊血清中。重复分析至少 2 次，以确定再现性。将产生的数据绘图，以显示图 6E 中所示的相对吸收强度。

[0200] 图 6E 显示获自全细胞 ELISA 分析的吸光度，所述全细胞 ELISA 分析利用抗 -HPV E6 抗体，以进行临床癌症样品、HPV 阳性海拉细胞和 SiHa 细胞和 HPV 阴性 C33a 细胞的 HPV E6 抗原捕获。临床癌症样品显示高吸收信号。HPV 阳性 HeLa 和 SiHa 细胞的吸光度强度与细胞数目成比例。36000 个 HeLa 或 SiHa 细胞产生可与临床癌症样品获得的信号强度相比拟的信号强度。HPV 阴性 C33a 细胞的强度低。

[0201] 总之，如图 6 所示，实施例提供的数据表明，利用抗 -HPV E6 或抗 -HPV E7 抗体的全细胞 ELISA 分析允许检测 HPV E6 或 HPV E7 癌蛋白在培养的细胞和临床癌症样品中的表达水平。产生的针对纯化的重组 HPV 蛋白质的一种或多种抗 -HPV 抗体与由 HPV 感染细胞表达的 HPV 蛋白质的特异性结合被检测到。检测 HPV 感染细胞的 HPV 蛋白质表达水平，并根据吸收信号强度进行量化。由 HPV 感染细胞表达的 HPV 蛋白质的量化的表达水平根据用于全细胞 ELISA 分析的培养的细胞样品中的测量的细胞数目进行标准化。

[0202] 实施例 6。利用全细胞 ELISA 分析检测 HPV 癌蛋白在临床样品中的表达水平

[0203] 为了证明全细胞 ELISA 分析可用于筛查和诊断 HPV 有关感染，针对各组临床细胞学样品进行全细胞 ELISA 分析，所述临床细胞学样品包括经组织学诊断的临床细胞学样品、未进行组织学诊断的盲临床细胞学样品、宫颈癌样品和正常宫颈细胞学样品。这些临床细胞学样品储存在 ThinPrep® 保存溶液或 SurePath® 保存溶液中。

[0204] 作为实例，利用抗 -HPV E6 抗体进行全细胞 ELISA，以检测 HPV E6 癌蛋白在临床样品中的表达水平。使用总计 355 个临床细胞学样品。两份 50  $\mu$ L 的每种样品被分配到干净的、聚苯乙烯涂覆的、底部平坦且高度结合的 96 孔微量滴定板。在室温下固定化细胞 30 分钟。固定化之后，处理溶液，并在室温下用 25  $\mu$ L 100% 乙醇固定细胞，同时立即进行鼓风干燥。固定之后，在室温下，用 100  $\mu$ L 冷冻的 (-20°C) 去离子水中的 90% 甲醇透化细胞 5 分

钟,同时进行温和摇动。透化之后,处理容器中的溶液,并且,在温和摇动下用磷酸盐缓冲盐水洗涤细胞 2 次,每次 5 分钟。将 100  $\mu$ L 3%  $H_2O_2$  加入到样品中,并在室温下温育 20 分钟同时进行温和摇动,以阻断内源性过氧化氢酶。在温育完成之后,处理溶液,并且,洗涤细胞 3 次,每次 5 分钟,同时进行温和摇动。然后,在室温下,在 100  $\mu$ L 10% 正常山羊血清中温育细胞 1 小时,同时进行温和摇动,以封闭样品和微量滴定板表面上的非特异性结合位点,消除非特异性结合。50  $\mu$ L 以 1:200 稀释的抗-HPV E6 抗体被用于 10% 正常山羊血清中,在室温下温育样品 1 小时,同时进行温和摇动。在温育完成之后,处理溶液,并且,在温和摇动下用 PBS 洗涤溶液洗涤样品 3 次,每次 5 分钟。然后,将 50  $\mu$ L 以 1:500 稀释的生物素标记的二次抗体加入到 5% 正常山羊血清中,并在室温下温育样品 30 分钟,同时进行温和摇动。在温育完成之后,处理溶液,并且,在温和摇动下用 PBS 洗涤溶液洗涤样品 3 次,每次 5 分钟。然后,将 50  $\mu$ L 以 1:600 稀释的链霉抗生物素结合物的 HRP 溶液加入到 PBS 中,并在室温下温育样品 45 分钟,同时进行温和摇动。在温育完成之后,处理溶液,并且,在温和摇动下用 PBS 洗涤溶液洗涤样品 3 次,每次 5 分钟。然后,加入 50  $\mu$ L TMB 基质,以在室温下温育样品 10 分钟而不受干扰。然后,加入 25  $\mu$ L 酸性终止液以终止酶促反应,并且,利用显色平板读取器读取信号强度。重复分析至少 2 次,以确保数据质量和再现性。全细胞 ELISA 结果显示在图 7 中。

[0205] 图 7A。获自全细胞吸光度 ELISA 的平均吸收强度的标准曲线,所述全细胞吸光度 ELISA 利用抗-HPV E6 单克隆抗体测量重组 HPV E6 蛋白质的表达水平。图 7B。获自 355 个临床样品的平均吸收强度。柱显示有标准差,其为临床细胞学样品的误差柱,所述临床细胞学样品(样品数目=355)按组织学阶段进行分组:279 个正常样品、48 个 CIN1 样品、5 个 CIN3 样品和 23 个宫颈癌样品。HPV E6 蛋白质的表达水平可以通过与图 5(再次显示为图 7A)中所述 HPV E6 蛋白质标准曲线对应进行评估。在 355 个临床细胞学样品中,38 个样品为盲细胞学样品,没有关于其组织学阶段的结果。这 38 个样品的数据显示在图 7C 中。在图 7C 中,一个盲法试验(右边图)和组合的整体研究(combined total study)(右边图)的柱状图显示获自全细胞吸光度 ELISA 的平均吸收强度,所述全细胞吸光度 ELISA 利用抗-HPV E6 单克隆抗体来测量 HPV E6 蛋白质的表达水平。柱显示有标准差,其为临床细胞学样品的误差柱。左边的图显示一个代表性的盲法研究,使用 17 正常的(WNL)、14 个 CIN1、5 个 CIN3 和 2 个癌症(SCC)样品。截止阈值设置为 0.341,来评估 HPV E6 的表达水平,以确定分析的阳性率和确定样品的感染阶段。两个图的结果是可以比较的,显示利用本申请所述全细胞吸光度 ELISA 产生可再现的数据。通过与滴定曲线(图 7A,左上图)进行比较,这些数据可用于筛查和用于确定临床样品的感染阶段。

[0206] 用 355 个临床样品获得的全细胞 ELISA 数据可被绘制为直方图,以显示这些信号强度的单独吸收强度和分布。图 8A 为直方图,显示获自全细胞吸光度 ELISA 的每个临床样品单独的吸收强度,所述全细胞吸光度 ELISA 利用抗-HPV E6 单克隆抗体测量 HPV E6 蛋白质的表达水平。在研究中总计有 279 个正常的、48 个 CIN1、5 个 CIN3 和 23 个宫颈癌(CxCa)样品。数据表明,本申请所述全细胞吸光度 ELISA 根据其代表 HPV E6 蛋白质表达水平的吸光度强度,能够区分具有不同宫颈疾病等级的临床病例。对利用临床样品获得的数据进行统计学分析,如图 8B 中所示。图 8B 显示通过分析总计 355 个细胞学样品获得的 ROC 曲线(接受者操作特性(receiver operating characteristic))的概要。ROC 分析

是真阳性率或灵敏性和假阳性率或 1- 特异性的相关性图。该分析独立于种类分布 (class distribution) 来提供工具,以选择可能的最佳模型并放弃次优的模型。该图以 1- 灵敏度作为 y 轴和特异性作为 x 轴产生。右边底部角上的大空间表明,在该研究选择的模型提供高度灵敏性和高度特异性。表中的 RA (ROC 区域) 值表明,测试性能,即,  $RA > 0.9$  为优良,  $0.9 > RA > 0.8$  为良好等。我们的 ROC 分析结果在右边底部上产生大空间,表明本研究的该实施例具有非常高的灵敏性和高的特异性。

[0207] 作为另一实例,利用抗 -HPV L1 抗体进行全细胞 ELISA,以检测 HPV E6 癌蛋白在临床样品中的表达水平。利用在之前第三段中描述的相同程序,测试总计 82 个临床样品。代表性数据总结在表 3 中。

[0208] 表 3。利用抗 -HPV L1 抗体对代表性临床样品进行 ELISA 测试结果的实例。

样品号	Pap 诊断	HPV L1 ELISA OD	HPV E6 ELISA OD	HPV E7 ELISA OD
OH001	HSIL	0.392	0.157	0.191
OH002	HSIL	0.389	0.164	0.392
OH003	HSIL	0.398	1.333	0.069
OH004	HSIL	0.806	1.718	0.397
OH005	HSIL	0.484	1.633	0.167
OH006	HSIL	0.730	0.792	0.196
OH007	HSIL	0.702	1.939	0.438
OH008	HSIL	0.327	0.017	0.149
OH009	HSIL	0.381	0.033	0.206
OH010	HSIL	0.385	0.953	0.000
OH011	HSIL	0.432	1.607	0.082
OH012	HSIL	0.583	1.547	0.201
OH013	阴性	0.019	0.144	0.000
OH014	阴性	0.081	0.086	0.044
OH015	阴性	0.005	0.005	0.068
OH016	阴性	0.023	0.000	0.004
OH017	阴性	0.008	0.011	0.027

[0209]

[0210] 该实施例中描述的程序表明,本申请描述的对临床样品的全细胞 ELISA 分析的可行性,所述临床样品包括容易受 HPV 感染的固定的细胞群。该实施例中提供的结果表明,针对纯化的重组 HPV 蛋白质产生的一种或多种抗 -HPV 抗体与由 HPV 感染细胞表达的 HPV 蛋白质在促进抗体与由来自临床样品的细胞群体表达的 HPV 蛋白质特异性结合的条件下的特异性结合被检测到。通过 HPV 感染细胞进行的 HPV 蛋白质表达水平被检测,并根据吸收信号强度被量化。将由 HPV 感染细胞表达的 HPV 蛋白质的量化表达水平与预定的 HPV 蛋白质表达水平阈值以及与 HPV 蛋白质标准曲线进行比较。预定的 HPV 蛋白质表达水平阈值与癌或临床样品中转化的病例阶段有关。在总计 355 例中检测到的 HPV 型包括 8、16、18、33、35 和 69 型,如表 4 所总结的。这些数据表明,本文所述全细胞 ELISA 中使用的全抗体能够

从具有最高风险型 HPV 感染的临床样品中检测 HPV 癌蛋白。

[0211] 表 4。与 HPV 基因型相关的代表性临床样品的 ELISA 测试结果的实例。

	样品号	HPV 测试	HPV 分型	Pap 诊断	HPV E6 ELISA OD
[0212]	OH021	阳性	18,58	WNL	1.029
	OH022	阳性	16	CIN 1	0.391
	OH023	阳性	53	CIN 1	0.900
	OH024	阳性	58	CIN 3	0.467
	OH025	阳性	16	Ca-SCC	1.028
	OH026	阳性	16	Ca-SCC	0.654
[0213]	OH027	阳性	18	Ca-SCC	1.472
	OH028	阳性	33	Ca-SCC	1.240
	OH029	阳性	16	Ca-SCC	1.703
	OH030	阴性	阴性	WNL	0.086
	OH031	阴性	阴性	WNL	0.093

[0214] 实施例 7。全细胞 ELISA 数据的标准化

[0215] 标准化用于本申请所述全细胞 ELISA 分析的临床样品中的细胞密度的各种方法。

[0216] 实施例 7.1。分析之前的细胞含量标准化：在分析之前标准化临床样品中的细胞密度，以允许载入到用于 ELISA 分析的微量滴定板的每个孔上的样品包含大约相同水平的细胞密度。这根据以下程序进行。使在收集液体中的单个样品静置至少 30 分钟到 2 小时而不受干扰，以使细胞沉在收集瓶的底部上。测量细胞颗粒物 (pallet) 的体积，并且，通过计算颗粒物体积 ( $\mu\text{L}$ ) 与溶液总体积 (ml) 的比获得细胞密度，即，样品的细胞含量。通过浓缩或稀释样品使它们的细胞含量相同来进行标准化。作为实例，进行标准化后的样品具有相同的细胞含量。作为另一实例，细胞含量为 25 或以上的样品被直接使用。细胞含量低于 25 的样品被标准化到使细胞含量达到 25。

[0217] 表 5。细胞密度测量的实例和标准化临床样品中的细胞密度。

[0218]

样品号	细胞颗粒物, 体积( $\mu\text{L}$ )	样品溶液, 体积(ml)	细胞密度 (细胞含量)	标准化因子	去除的溶液 (ml)	标准化的细胞密度
OH041	50	12.5	4.0	6.3	10.5	25
OH042	50	12	4.2	6.0	10.0	25
OH043	100	13	7.7	3.3	9.0	25
OH044	50	12.5	4.0	6.3	10.5	25
OH045	100	7	14.3	1.8	3.0	25
OH046	25	12	2.1	12.0	11.0	25
OH047	25	11	2.3	11.0	10.0	25
OH048	25	13.5	1.9	13.5	12.5	25
OH049	250	12.5	20.0	1.3	2.5	25
OH050	600	14.5	41.4	1	0	41.4

[0219] 实施例 7.2。利用看家基因作为内部阳性对照的细胞数目标标准化:作为实例,抗- $\beta$ -肌动蛋白被用作内部阳性对照,以为沉积在容器表面中的细胞数目作参考。肌动蛋白是高度保守的蛋白质,其参与细胞运动、结构和完整性。 $\beta$ -肌动蛋白抗体已被广泛用作免疫测定中的装载对照 (loading control),因为它被确定保持相同比例的总细胞蛋白质。根据以下程序利用抗- $\beta$ -肌动蛋白进行标准化。将两份样品载入到容器中的表面上,并且,利用实施例 4 中所述的相同分析程序进行分析。完成封闭程序之后,用抗-HPV 初级抗体温育一组复样 (duplicate sample),而其它组的复样用抗- $\beta$ -肌动蛋白抗体温育。在温育完成之后,对两个复样进行剩下的分析程序。执行抗- $\beta$ -肌动蛋白抗体温育的各种条件。使用抗- $\beta$ -肌动蛋白抗体的各种稀释度,范围从 1:50 到 1:400 稀释。使用各种温育时间,范围为 1 小时到 24 小时。使用各种温育温度,范围从室温到 4 $^{\circ}\text{C}$ 。

[0220] 作为实例,利用抗- $\beta$ 肌动蛋白抗体进行全细胞 ELISA,以检测  $\beta$ -肌动蛋白在 HPV 阳性细胞系 HeLa 和 HPV 阴性细胞系 C33a 中的表达水平。海拉细胞和 C33a 细胞获自细胞培养物组分。将各种浓度的细胞培养物溶液制备为每 50  $\mu\text{L}$  大约 1250 个细胞、2500 个细胞、5000 个细胞和 10000 个细胞。将两份 50  $\mu\text{L}$  的每一细胞系的每一浓度分配到干净的、聚苯乙烯涂覆的、底部平坦且高度结合的 96 孔微量滴定板中。在室温下固定化细胞 30 分钟。固定化之后,处理溶液,并在室温下用 25  $\mu\text{L}$  100% 乙醇固定细胞,同时立即进行鼓风干燥。固定之后,在室温下,用 100  $\mu\text{L}$  冷冻的 (-20 $^{\circ}\text{C}$ ) 在去离子水中的 90% 甲醇透化细胞 5 分钟,同时进行温和摇动。透化之后,处理容器中的溶液,并且,在温和摇动下用磷酸盐缓冲盐水洗涤细胞 2 次,每次 5 分钟。将 100  $\mu\text{L}$  3%  $\text{H}_2\text{O}_2$  加入到样品中,并在室温下温育 20 分钟,同时进行温和摇动,以阻断内源性过氧化氢酶。在温育完成之后,处理溶液,并且,洗涤细胞 3 次,每次 5 分钟,同时进行温和摇动。然后,在室温下,在 100  $\mu\text{L}$  10% 正常山羊血清中温育细胞 1 小时,同时进行温和摇动,以封闭样品和微量滴定板表面上的非特异性结合位点,消除非特异性结合。50  $\mu\text{L}$  以 1:200 和 1:400 稀释的抗- $\beta$ 肌动蛋白抗体被用于 10% 正常山羊血清中,在室温下温育样品 1 小时,同时进行温和摇动。在温育完成之后,处理溶液,并且,在温和摇动下用 PBS 洗涤溶液洗涤样品 3 次,每次 5 分钟。然后,将 50  $\mu\text{L}$  以 1:500 稀释的生物素标记的二次抗体加入到 5% 正常山羊血清中,并在室温下温育样品 30 分钟,同时

进行温和摇动。在温育完成之后,处理溶液,并且,在温和摇动下用 PBS 洗涤溶液洗涤样品 3 次,每次 5 分钟。然后,将 50  $\mu$ L 以 1:600 稀释的链霉抗生物素结合的 HRP 溶液加入到 PBS 中,并在室温下温育样品 45 分钟,同时进行温和摇动。在温育完成之后,处理溶液,并且,在温和摇动下用 PBS 洗涤溶液洗涤样品 3 次,每次 5 分钟。然后,加入 50  $\mu$ L TMB 基质,以在室温下温育样品 10 分钟而不受干扰。然后,加入 25  $\mu$ L 酸性终止液以终止酶促反应,并且,利用显色平板读取器读取信号强度。重复分析至少 2 次,以确保数据质量和再现性。全细胞 ELISA 结果显示在图 9A 中。

[0221] 图 9A 显示获自全细胞 ELISA 的细胞系的吸收强度 (OD),所述全细胞 ELISA 利用抗- $\beta$  肌动蛋白抗体检测  $\beta$ -肌动蛋白在 HPV 阳性细胞系 HeLa (菱形和方形点) 和 HPV 阴性细胞系 C33a (三角形和圆点) 中的表达水平。结果显示,吸收强度随着载入到微量滴定板孔中的细胞数目而增加,不管其是 HPV 阳性还是 HPV 阴性细胞系。也测试不同浓度的  $\beta$ -肌动蛋白抗体。200 和 400 倍稀释物提供载入到孔中的固定量细胞的吸收强度的最小差异。结果表明, $\beta$ -肌动蛋白可用作标准来量化在本申请所述全细胞 ELISA 中的微量测试孔中固定化的细胞量。

[0222] 作为另一实例,并行利用抗-HPV E6 抗体和抗- $\beta$  肌动蛋白抗体进行全细胞 ELISA,以检测 HPV E6 癌蛋白和  $\beta$ -肌动蛋白在 HPV 阳性细胞系 HeLa 和 HPV 阴性细胞系 C33a 中的表达水平,用于横向比较。海拉细胞和 C33a 细胞获自细胞培养物组分。培养的细胞系的细胞被计数并制备成每 50  $\mu$ L 大约 7500 个细胞。两份 50  $\mu$ L 每种细胞系的每种浓度,两组,被分配到干净的、聚苯乙烯涂覆的、底部平坦且高度结合的 96 孔微量滴定板中。在室温下固定化细胞 30 分钟。固定化之后,处理溶液,并在室温下利用 25  $\mu$ L 100% 乙醇固定细胞,同时立即进行鼓风干燥。固定之后,用 100  $\mu$ L 冷冻的 (-20 $^{\circ}$ C) 在去离子水中的 90% 甲醇在室温下透化细胞 5 分钟,同时进行温和摇动。透化之后,处理容器中的溶液,并且,在温和摇动下用磷酸盐缓冲盐水洗涤细胞 2 次,每次 5 分钟。将 100  $\mu$ L 3% $H_2O_2$  加入到样品中,并在室温下温育 20 分钟同时进行温和摇动,以阻断内源性过氧化氢酶。在温育完成之后,处理溶液,并且,洗涤细胞 3 次,每次 5 分钟,同时进行温和摇动。然后,在室温下,在 100  $\mu$ L 10% 正常山羊血清中温育细胞 1 小时,同时进行温和摇动,以封闭样品和微量滴定板表面上的非特异性结合位点,消除非特异性结合。50  $\mu$ L 以 1:200 稀释的抗- $\beta$  肌动蛋白抗体被用于 10% 正常山羊血清中,用于一组复样。50  $\mu$ L 以 1:200 稀释的抗-HPV E6 抗体被用于 10% 正常山羊血清中,用于另一组复样。所有样品均在室温下温育 1 小时,同时进行温和摇动。在温育完成之后,处理溶液,并且,在温和摇动下用 PBS 洗涤溶液洗涤样品 3 次,每次 5 分钟。然后,将 50  $\mu$ L 以 1:500 稀释的生物素标记的二次抗体加入到 5% 正常山羊血清中,并在室温下温育样品 30 分钟,同时进行温和摇动。在温育完成之后,处理溶液,并且,在温和摇动下用 PBS 洗涤溶液洗涤样品 3 次,每次 5 分钟。然后,将 50  $\mu$ L 以 1:600 稀释的链霉抗生物素结合的 HRP 溶液加入到 PBS 中,并在室温下温育样品 45 分钟,同时进行温和摇动。在温育完成之后,处理溶液,并且,在温和摇动下用 PBS 洗涤溶液洗涤样品 3 次,每次 5 分钟。然后,加入 50  $\mu$ L TMB 基质,以在室温下温育样品 10 分钟而不受干扰。然后,加入 25  $\mu$ L 酸性终止液以终止酶促反应,并且,利用显色平板读取器读取信号强度。重复分析至少 2 次,以确定再现性。利用抗- $\beta$ -肌动蛋白抗体针对宫颈癌细胞系的全细胞 ELISA 结果显示在图 9A 中。

[0223] 图 9B 显示获自全细胞 ELISA 的 7500 个海拉细胞的吸收强度（条纹柱，HPV 阳性细胞系）和 7500 个 HT3 细胞的吸收强度（实心柱，HPV 阴性细胞系），所述全细胞 ELISA 利用抗-HPV E6 抗体和抗-β 肌动蛋白抗体检测 HPV E6 和 β-肌动蛋白在细胞中的表达水平。没有加入初级抗体的细胞样品被用作对照，其显示最小信号强度。结果显示，当使用抗-HPV E6 抗体时，HeLa 和 HT3 细胞之间的吸收强度存在显著差异，表明在这两个细胞系中的 HPV E6 蛋白质的差异表达水平。相反地，当使用 β-肌动蛋白抗体时，两个细胞系之间吸收强度的差异可以忽略，表明 β-肌动蛋白保持相同水平的总体细胞蛋白质，并且可用作标准来标准化固定化在容器表面中的细胞的量，用于全细胞 ELISA 分析，因而量化本申请所述 HPV 蛋白质的量。因为产生自抗-β-肌动蛋白的信号强度与总体细胞蛋白质成比例，所以产生自具有各种细胞数目的样品的抗-HPV E6 的信号强度可以根据产生自抗-β-肌动蛋白抗体的信号强度进行标准化。图 9C 显示获自全细胞 ELISA 的 7500 个海拉细胞（条纹柱，HPV 阳性细胞系）和 7500 个 HT3 细胞（实心柱，HPV 阴性细胞系）的抗-HPVE6 与抗-β-肌动蛋白的吸收强度之比，所述全细胞 ELISA 利用抗-HPV E6 抗体和抗-β-肌动蛋白抗体来检测 HPV E6 和 β-肌动蛋白在细胞中的表达水平。抗-β-肌动蛋白抗体被用于标准化与固定化在本申请所述全细胞 ELISA 中微量测试孔中的各种细胞数目的 HPV 蛋白质表达有关的信号强度。然后，根据每个孔细胞中的抗-β-肌动蛋白抗体检测的 β-肌动蛋白的量，我们标准化 HPV 蛋白质在细胞中的表达水平。这些数据表明，β-肌动蛋白可被用作参考，用于标准化通常含有各种细胞数目的临床样品的信号强度。

[0224] 利用 β-肌动蛋白作为参考进行的信号强度标准化然后针对临床样品进行测试，其中每一样品可能由各种细胞数目的量组成。根据之前第二段中所述的相同方案，利用抗-HPV E6 抗体和抗-β 肌动蛋白抗体进行全细胞 ELISA，以并行检测 HPV E6 癌蛋白和 β-肌动蛋白在 16 个临床样品中的表达水平。在不进行实施例 5.1 所述预分析标准化的情况下，两组复样，每一样品 50 μL，被分配到干净的、底部平坦且高度结合的 96 孔微量滴定板中。在室温下固定化样品 30 分钟。固定化之后，处理溶液，并在室温下利用 25 μL 100% 乙醇固定样品，同时立即进行鼓风干燥。固定之后，在室温下用 100 μL 冷冻的（-20℃）在去离子水中的 90% 甲醇透化样品 5 分钟，同时进行温和摇动。透化之后，处理容器中的溶液，并且，在温和摇动下用磷酸盐缓冲盐水洗涤细胞 2 次，每次 5 分钟。将 100 μL 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 加入到样品中，并在室温下温育 20 分钟同时进行温和摇动，以阻断内源性过氧化氢酶。在温育完成之后，处理溶液，并且，洗涤细胞 3 次，每次 5 分钟，同时进行温和摇动。然后，在室温下，在 100 μL 10% 正常山羊血清中温育样品 1 小时，同时进行温和摇动，以封闭样品和微量滴定板表面上的非特异性结合位点，消除非特异性结合。50 μL 以 1:200 稀释的抗-β 肌动蛋白抗体被用于 10% 正常山羊血清中，用于一组复样。50 μL 以 1:200 稀释的抗-HPV E6 抗体被用于 10% 正常山羊血清，用于另一组复样。所有样品均在室温下温育 1 小时，同时进行温和摇动。在温育完成之后，处理溶液，并且，在温和摇动下用 PBS 洗涤溶液洗涤样品 3 次，每次 5 分钟。然后，将 50 μL 以 1:500 稀释的生物素标记的二次抗体加入到 5% 正常山羊血清中，并在室温下温育样品 30 分钟，同时进行温和摇动。在温育完成之后，处理溶液，并且，在温和摇动下用 PBS 洗涤溶液洗涤样品 3 次，每次 5 分钟。然后，将 50 μL 以 1:600 稀释的链霉抗生物素结合物的 HRP 溶液加入到 PBS 中，并在室温下温育样品 45 分钟，同时进行温和摇动。在温育完成之后，处理溶液，并且，在温和摇动下用 PBS 洗涤溶液洗涤样品 3 次，每

次 5 分钟。然后,加入 50  $\mu$  L TMB 基质,以在室温下温育样品 10 分钟而不受干扰。然后,加入 25  $\mu$  L 酸性终止液以终止酶促反应,并且,利用显色平板读取器读取信号强度。重复分析至少 2 次,以确定再现性。全细胞 ELISA 结果显示在图 10 中。

[0225] 为了证明  $\beta$ -肌动蛋白可用作参考来标准化临床样品之间存在的细胞数目的差异,16 个代表性临床样品以重复的两组针对全细胞 ELISA 分析进行测试。第一组样品利用抗-HPV E6 抗体进行测试。第二组样品利用抗- $\beta$ -肌动蛋白抗体进行测试。从第一和第二组分别分析的数据组被定义为单标记试验(single marker experiment)(图 10A)。按照两个标记的比例从两组分析的数据被定义为双标记试验(图 10B)。图 10 显示利用(A)单标记——抗-HPV E6 抗体和(B)双标记——抗-HPV E6 和抗- $\beta$ -肌动蛋白抗体进行的筛选方法的比较。在图 10A 中,使用单标记筛选。吸收强度(OD)数据获自全细胞 ELISA,其利用抗-HPV E6 抗体筛选 16 个临床样品。当 OD 高于 0.400 时定义为 HPV 阳性。8 个样品被检测为 HPV 阳性,而 8 个为 HPV 阴性。在图 10B 中,使用双标记筛选。吸收强度(OD)数据获自全细胞 ELISA,其利用抗-HPV E6 和抗- $\beta$ -肌动蛋白抗体来筛选在(A)中测试的相同的 16 个临床样品。当抗-E6 与抗  $\beta$ -肌动蛋白的 OD 之比大于 2.0 时,定义为 HPV 阳性。在单标记筛选中测试为阳性的同样的 8 个样品在利用双标记筛选方法时仍然为阳性,而其它 8 个样品仍为阴性。这些结果表明,抗- $\beta$ -肌动蛋白抗体可用于标准化固定化在本申请所述全细胞 ELISA 分析中微量测试孔中的细胞的量。通过使用抗- $\beta$ -肌动蛋白抗体,允许与具有各种细胞量的样品有关的信号强度根据利用抗- $\beta$ -肌动蛋白抗体获得的信号强度进行标准化。

[0226] 实施例 7.3。利用细胞菌株的标准化,举例来说,台盼蓝染色:在分析完成和从平板读取器获得 ELISA 数据之后,处理容器中的溶液。洗涤样品。将 50  $\mu$  L 台盼蓝溶液分配到容器中。在台盼蓝溶液中温育样品 5 分钟,然后处理溶液。观察细胞染色的暗度,其代表沉积在容器中表面上的细胞的量。因此可以估计样品中细胞的量,并可以根据细胞数目标标准化 ELISA 数据。

[0227] 该实施例中描述的程序显示用于临床样品中细胞数目标标准化的各种方法以允许测量或量化临床样品中的 HPV 蛋白质表达水平。根据抗-HPV 抗体与 HPV 蛋白质在从临床样品固定化在微量滴定板上的标准化的细胞中的特异性结合的检测,该方法能够对临床样品中存在的 HPV 蛋白质进行精确的定量分析。

[0228] 实施例 8。HPV 蛋白质在样品中的表达水平的量化

[0229] 本发明描述的全细胞 ELISA 分析根据这些癌蛋白与针对纯化的重组 HPV 蛋白质产生的抗体的特异性结合,以信号读取的形式检测 HPV 癌蛋白在感兴趣样品中的表达。因此,HPV 癌蛋白表达水平的量化可以通过比较获自样品的信号强度与获自具有已知浓度的 HPV 重组蛋白质的信号强度来实现。

[0230] 对具有各种浓度的纯化的重组 HPV 蛋白质进行 ELISA 分析。获得纯化的重组 HPV 蛋白质,并利用实施例 1 所述的程序进行表征。在磷酸盐缓冲盐水中连续稀释蛋白质,从每 50  $\mu$  L 200ng 到每 50  $\mu$  L 0.02pg。每一稀释倍数的样品均有三重,将其 50  $\mu$  L 分配到干净的、聚苯乙烯涂覆的、底部平坦且高度结合的 96 孔微量滴定板中。在 4 $^{\circ}$ C 下固定化蛋白质样品 24 小时。固定化后,处理溶液。在室温下,在 100  $\mu$  L 10% 正常山羊血清中温育样品 2 小时,以封闭样品和微量滴定板表面上的非特异性结合位点,从而消除非特异性结合。50  $\mu$  L

以 1:200 稀释的初级抗体——抗-HPV E6 或抗-HPV E7 抗体——被用于 10% 正常山羊血清中,在室温下温育样品 1 小时,同时进行温和摇动。在温育完成之后,处理溶液,并且,在温和摇动下用 PBS 洗涤溶液洗涤样品 3 次,每次 5 分钟。然后,将 50  $\mu$ L 以 1:500 稀释的生物素标记的二次抗体加入到 5% 正常山羊血清中,并在室温下温育样品 30 分钟,同时进行温和摇动。在温育完成之后,处理溶液,并且,在温和摇动下用 PBS 洗涤溶液洗涤样品 3 次,每次 5 分钟。将 50  $\mu$ L 以 1:600 稀释的链霉抗生物素结合的 HRP 溶液加入到 PBS 中,并在室温下温育样品 45 分钟,同时进行温和摇动。在温育完成之后,处理溶液,并且,在温和摇动下用 PBS 洗涤溶液洗涤样品 3 次,每次 5 分钟。然后,加入 50  $\mu$ L TMB 基质,以在室温下温育样品 10 分钟而不受干扰。然后,加入 25  $\mu$ L 酸性终止液以终止酶促反应,并且,利用显色平板读取器读取信号强度。重复分析至少 2 次,以确保数据质量和再现性。针对蛋白质的相应浓度将信号强度数据绘图,并且产生吸光度蛋白质标准曲线。

[0231] 也通过上述相同程序利用白色的、聚苯乙烯涂覆的、底部平坦且高度结合的 96 孔微量滴定板来完成分析。50  $\mu$ L 化学发光的基质被用于化学发光信号读取。针对蛋白质的相应浓度将信号强度数据绘图,并且产生化学发光蛋白质标准曲线。

[0232] 图 5 显示 HPV E6 和 HPV E7 蛋白质的蛋白质标准曲线的结果。抗-HPV E6 单克隆抗体被用于检测 HPV E6 蛋白质的存在。抗-HPV E7 单克隆抗体被用于检测 HPV E7 蛋白质的存在。图 5A:利用比色法的 HPV18 E6 蛋白质(菱形点)和 HPV16E6 蛋白质(方形点)的标准曲线;图 5B:利用发光方法的各种稀释倍数的 HPV18 E6 蛋白质(菱形点:200 $\times$  稀释倍数,方形点:1000 $\times$  释倍数和三角形点:5000 $\times$  释倍数)的标准曲线;和图 5C:利用发光方法的 HPV VI 6 E6 蛋白质的标准曲线。图 5D:利用比色法的 HPV18 E7 蛋白质(菱形点)和 HPV16 E7 蛋白质(方形点)的标准曲线;图 5E:利用发光方法的各种稀释倍数的 HPV18 E7 蛋白质(菱形点:200 $\times$  稀释倍数,方形点:1000 $\times$  释倍数和三角形点:5000 $\times$  释倍数)的标准曲线;和图 5F:利用发光方法的 HPV16 E7 蛋白质的标准曲线。这些标准曲线被用于评估在临床样品中表达的 HPV E6 或 HPV E7 蛋白质的量。根据表达的 HPV E6 或 HPV E7 蛋白质的量,将临床样品分成宫颈癌发展的不同阶段。本发明中描述的方法能够量化与疾病等级相关的临床样品中的 HPV 蛋白质。

[0233] 该实施例描述的程序和结果显示利用吸收信号强度和发光信号强度产生至少 HPV18 E6、HPV18 E7、HPV16 E6 和 HPV16 E7 的 HPV 蛋白质标准曲线的方法,所述吸收信号强度和发光信号强度代表获自抗-HPV 抗体与纯化的重组 HPV 蛋白质的特异性结合的 HPV 蛋白质表达水平的量。这些 HPV 蛋白质标准曲线被用于比较临床样品获得的信号强度,以评估用于本申请所述全细胞 ELISA 分析的临床样品中的 HPV 感染细胞中的 HPV 蛋白质表达水平。

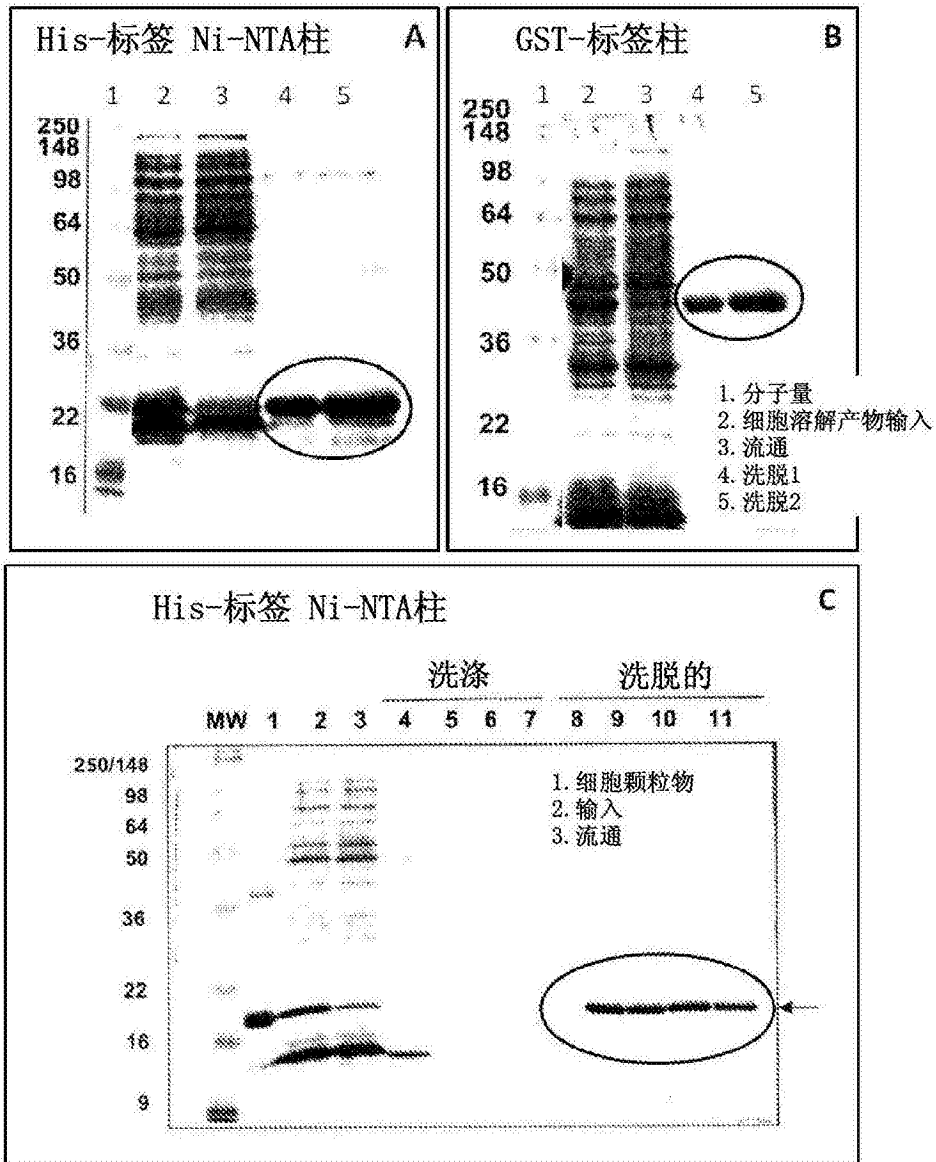


图 1A-1C

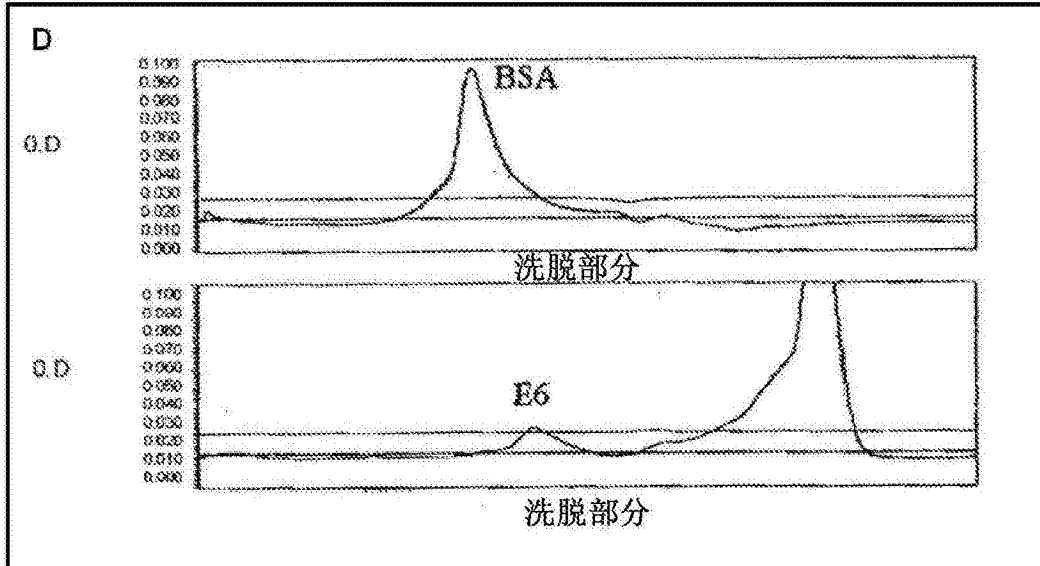


图 1D

A. 兔抗-HPV E7

B. 兔抗-HPV E6

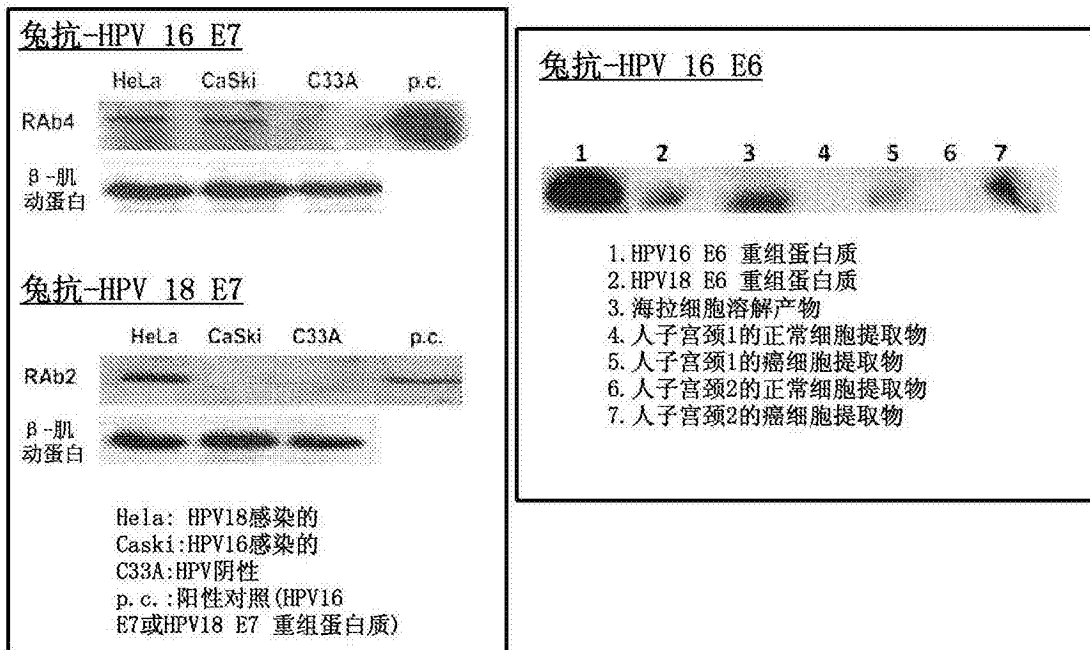


图 2

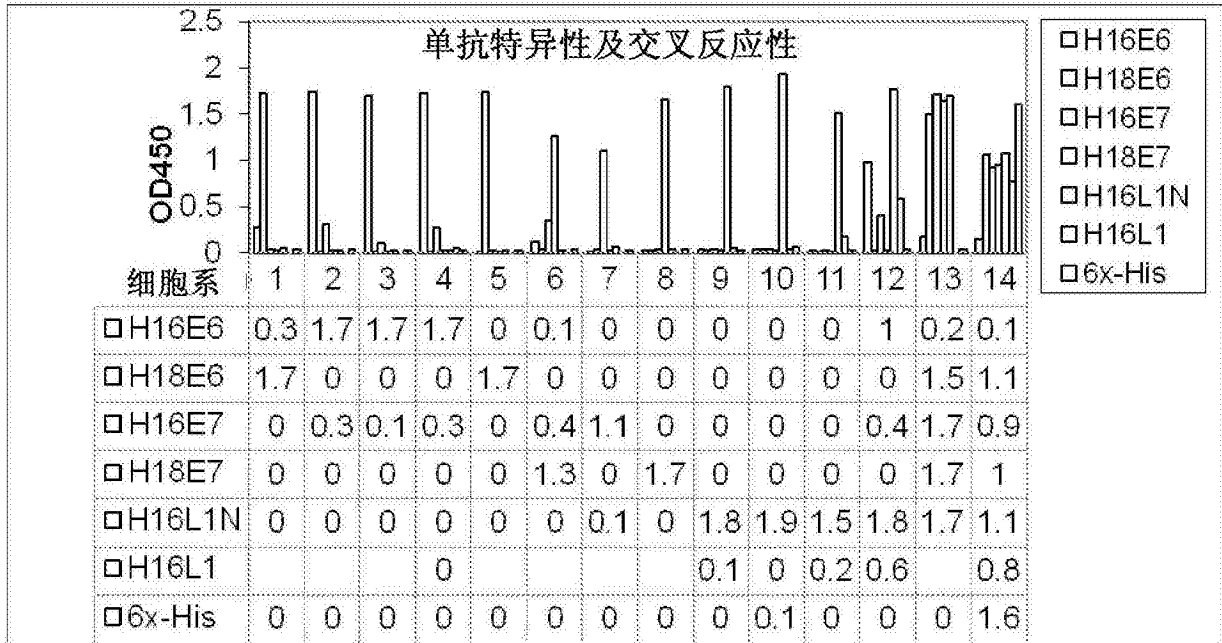


图 3

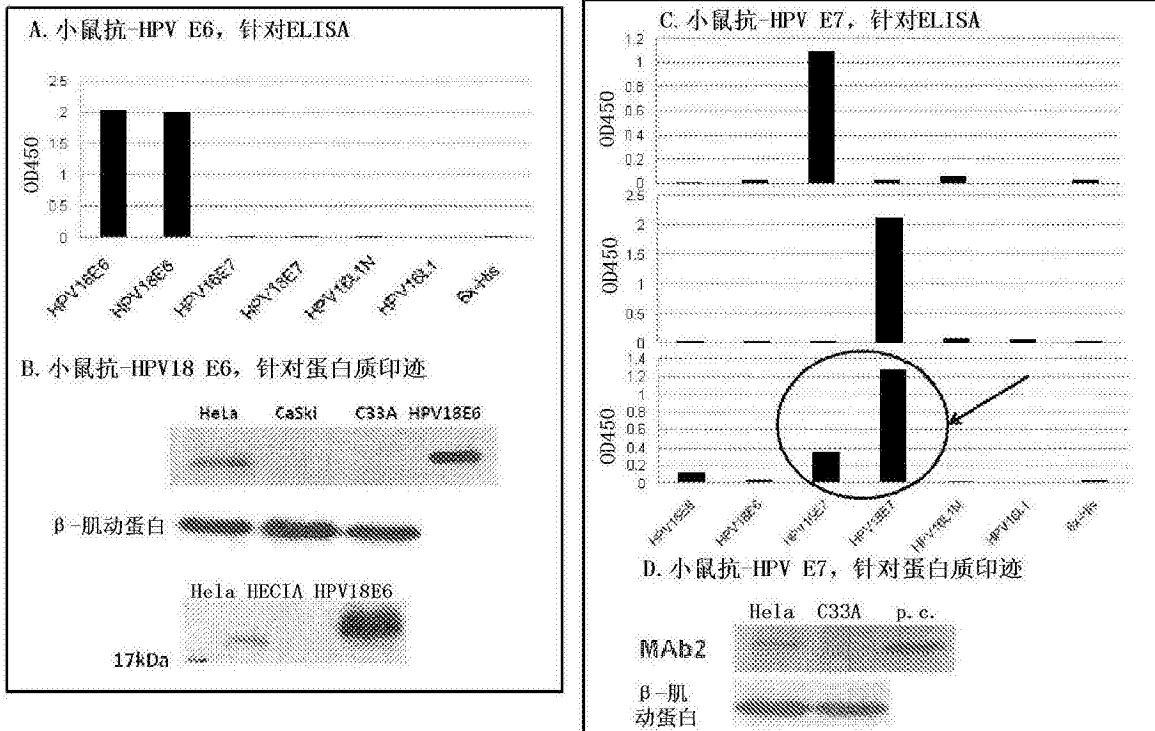


图 4

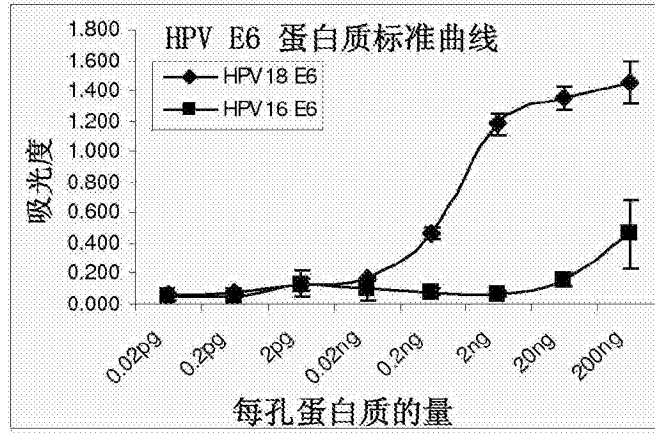


图 5A

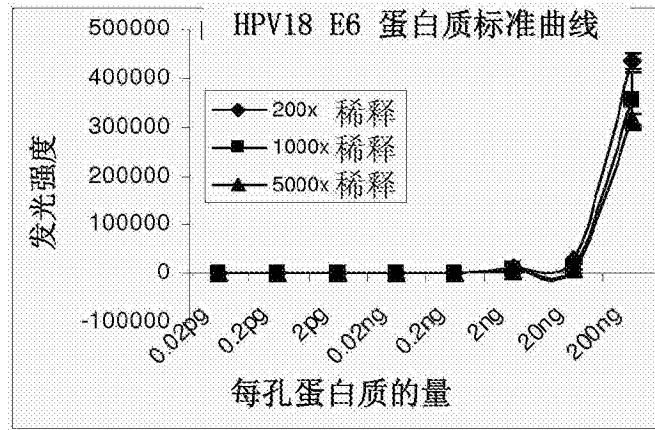


图 5B

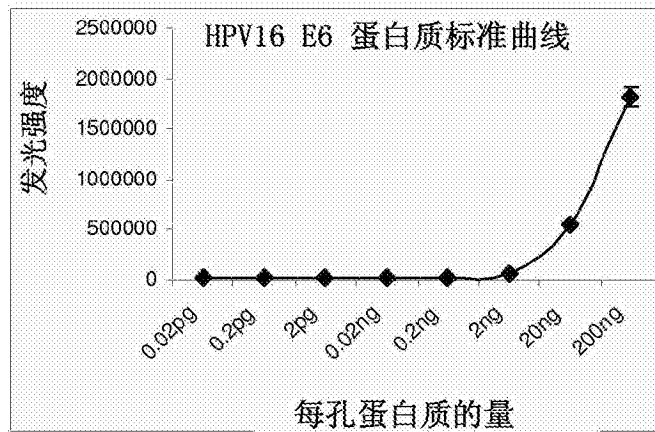


图 5C

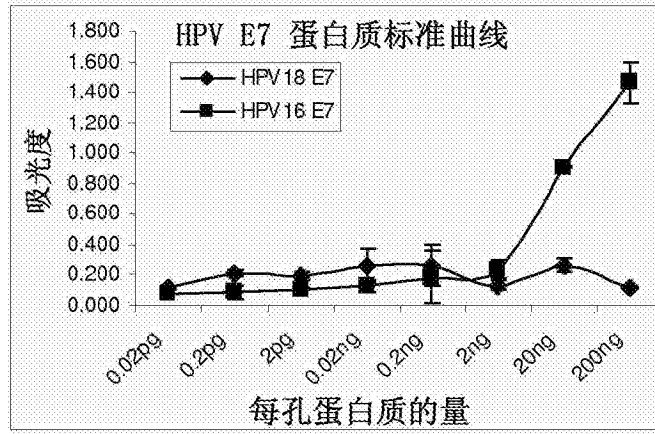


图 5D

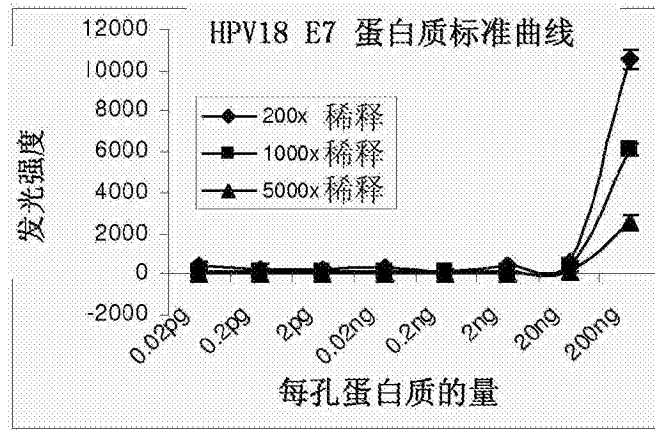


图 5E

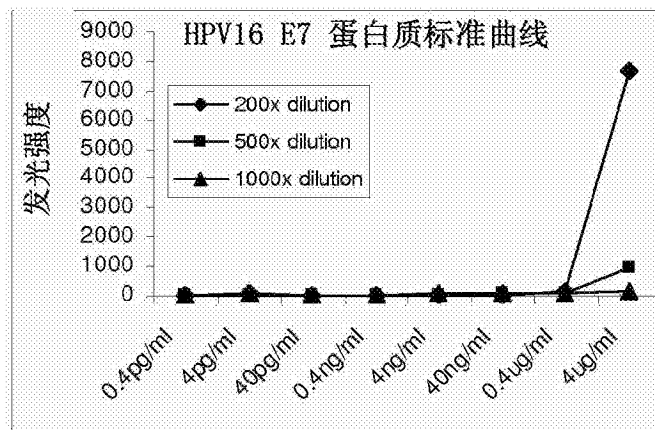


图 5F

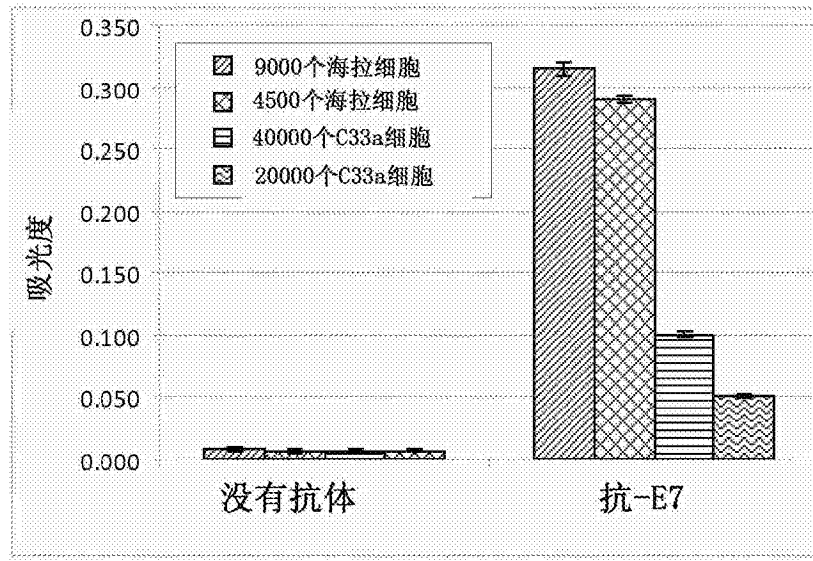


图 6A

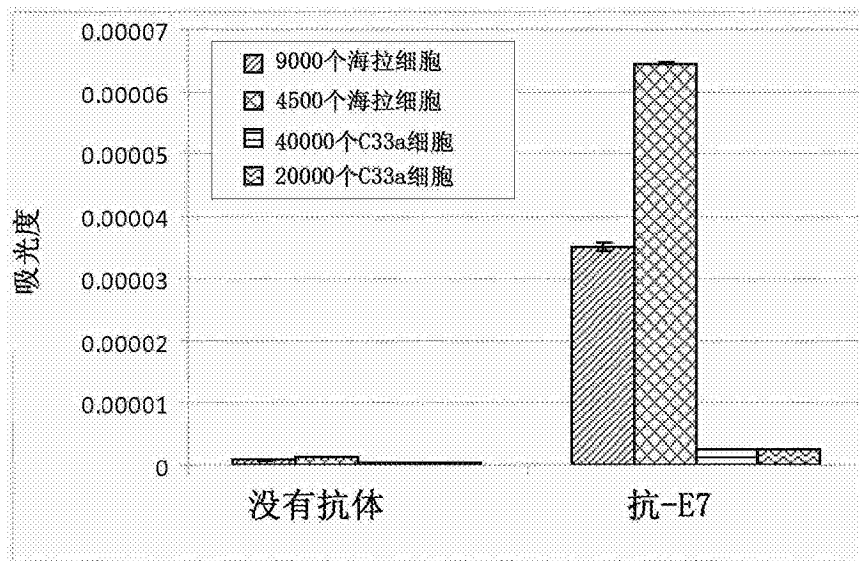


图 6B

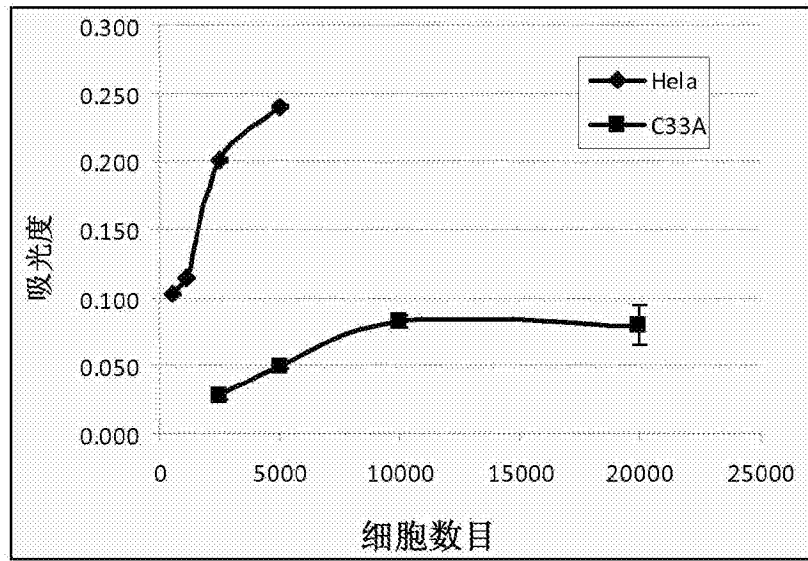


图 6C

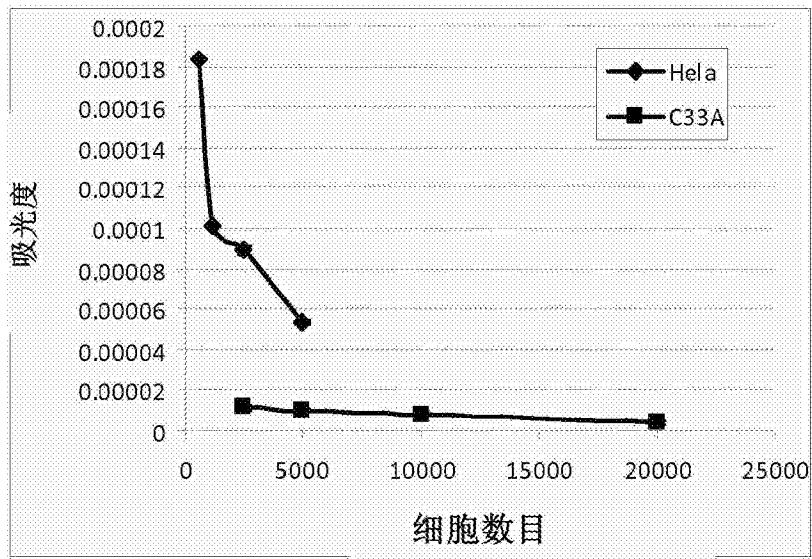


图 6D

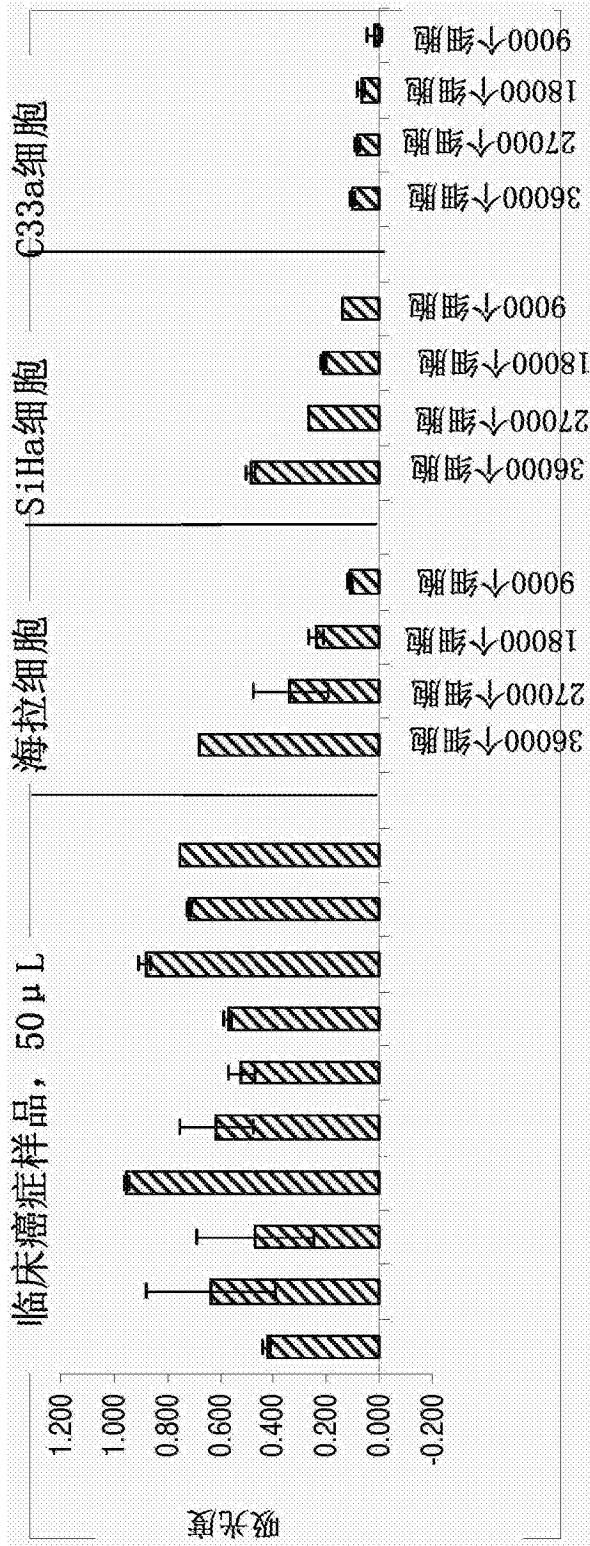


图 6E

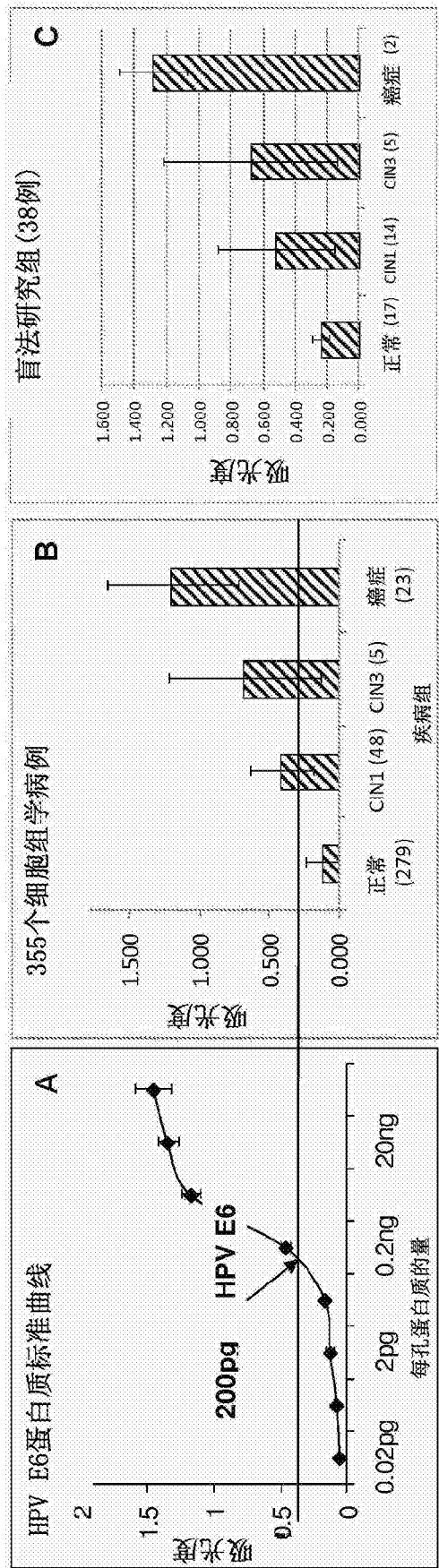


图 7

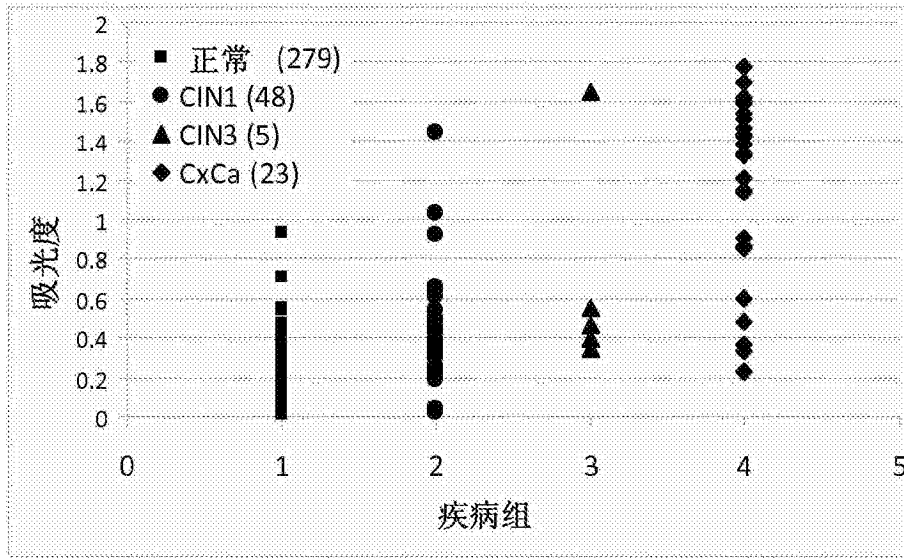


图 8A

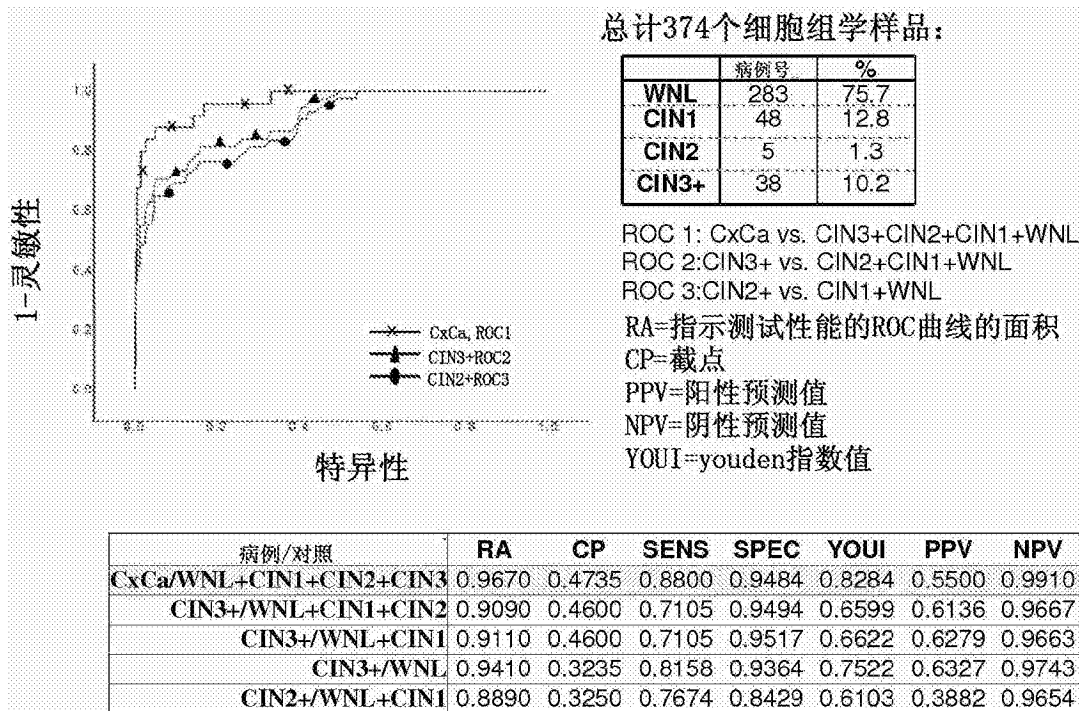


图 8B

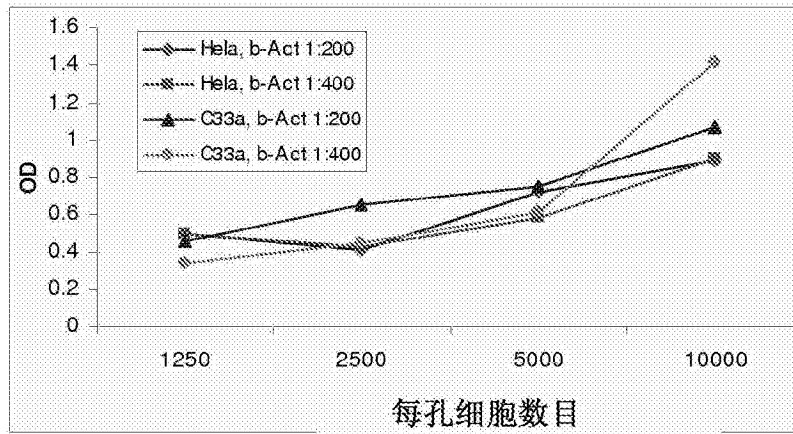


图 9A

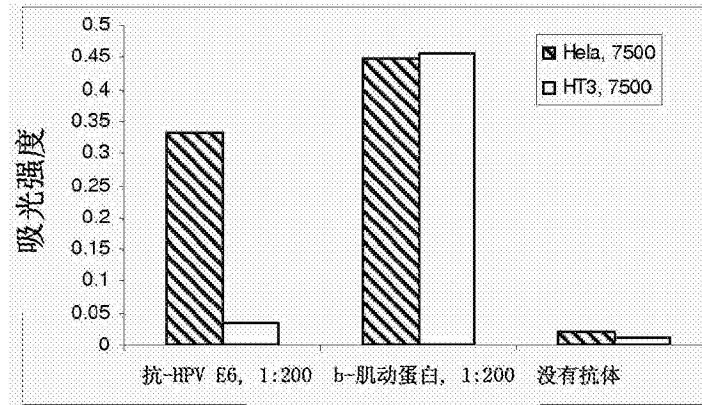


图 9B

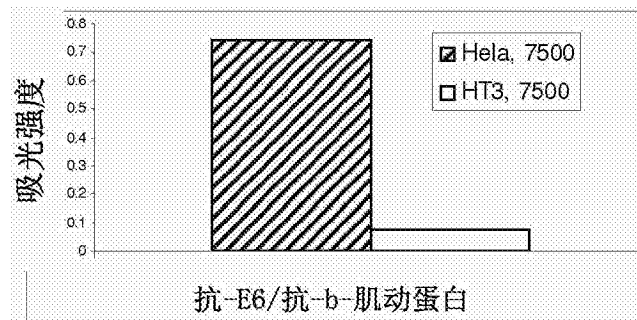


图 9C

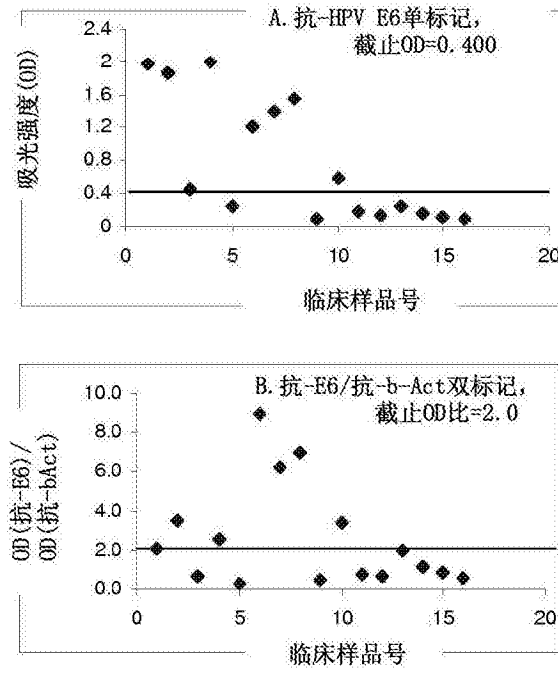


图 10

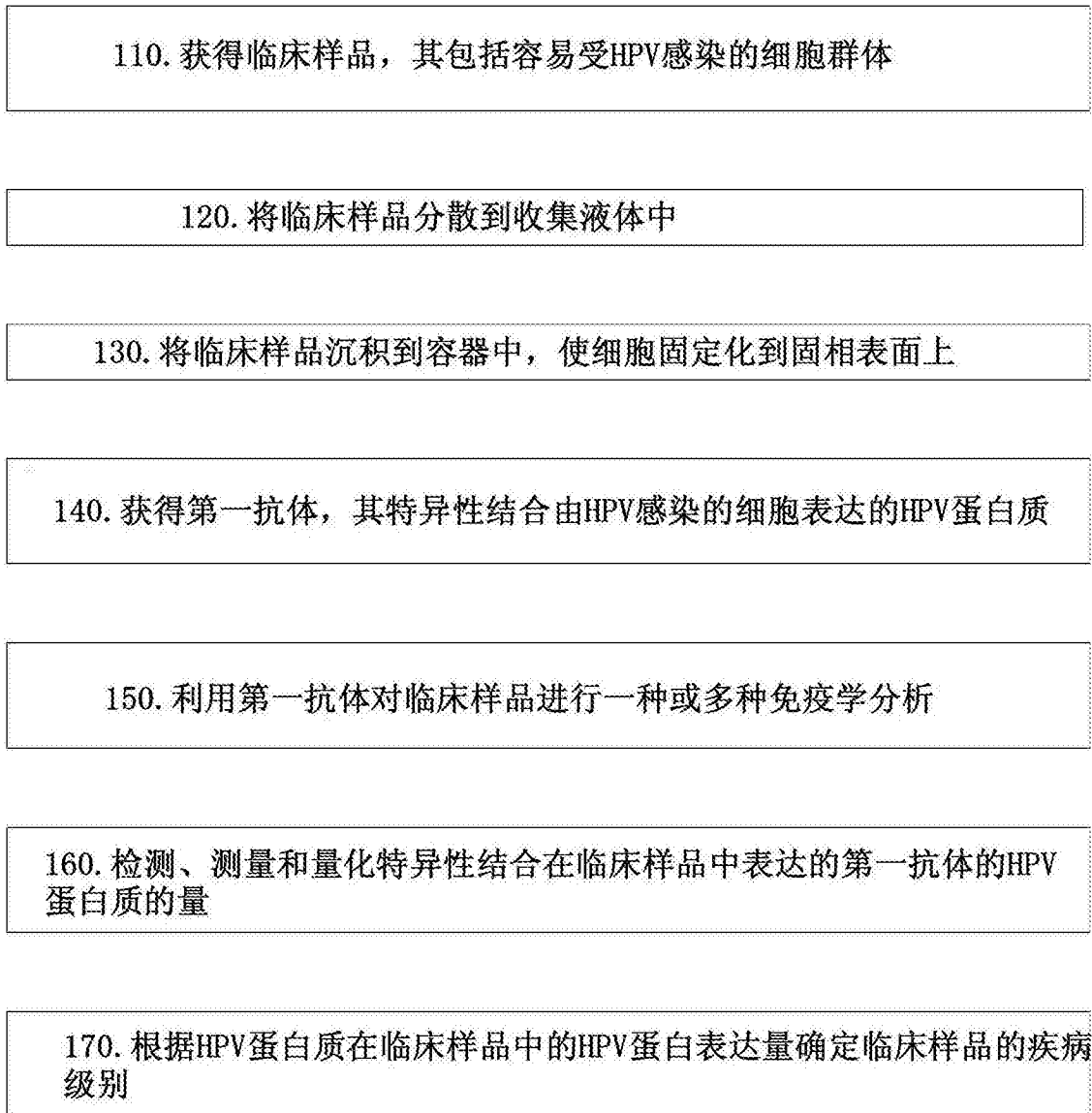


图 11

专利名称(译)	用于诊断和筛选与HPV有关的癌症的高通量细胞基HPV免疫测定		
公开(公告)号	<a href="#">CN102822672B</a>	公开(公告)日	2015-12-09
申请号	CN201080060962.6	申请日	2010-12-16
[标]申请(专利权)人(译)	安科健康公司		
申请(专利权)人(译)	安科健康公司		
当前申请(专利权)人(译)	安科健康公司		
[标]发明人	S成		
发明人	S·成		
IPC分类号	G01N33/53 C12Q1/70		
CPC分类号	G01N33/57411 G01N33/56983 G01N2333/025		
代理人(译)	陆惠中		
优先权	61/335540 2010-01-08 US		
其他公开文献	CN102822672A		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

公开了量化临床样品中HPV蛋白质表达的方法。该量化方法包括获得临床样品的过程。这种临床样品由易受HPV感染的细胞群体组成。该量化方法还包括将临床样品沉积到容器中的过程。使临床样品与特异性结合由HPV感染细胞表达的HPV蛋白质的初次抗体接触，所述接触的条件是促进初次抗体与由细胞群体表达的HPV蛋白质特异性结合。该方法还包括量化初次抗体的特异性结合的过程，从而量化临床样品中的HPV蛋白质表达。该分析提供客观的测试，以在活组织检查前，从细胞学样品中识别具有高级前体的患者。

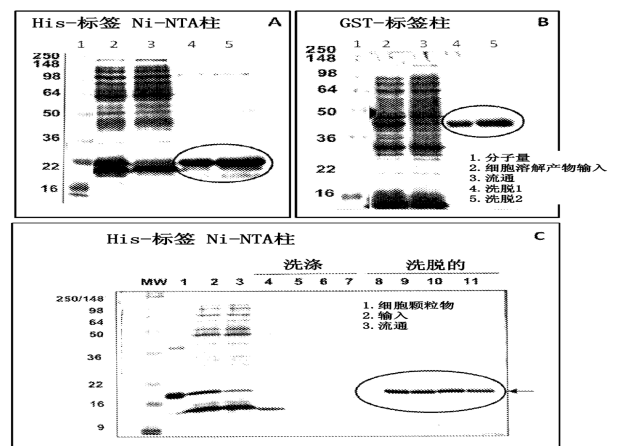


图1A-1C