(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 102449479 B
(45)授权公告日 2015.11.25

(21)申请号 201080020175.9
(22)申请日 2010.05.06
(30)优先权数据
61/215,589 2009.05.07 US
(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2011.11.07
(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/US2010/033944 2010.05.06
(87)PCT国际申请的公布数据
WO2010/129821 EN 2010.11.11
(73)专利权人 安科健康公司
地址 美国加利福尼亚州
(72)发明人 S-L·程
(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 33/48(2006.01)
G01N 33/53(2006.01)
(56)对比文件
US 5591574 A,1997.01.07,
US 6709832 B1,2004.03.23,
CN 1836166 A,2006.09.20,
CN 1675550 A,2005.09.28,
审查员 于园园

权利要求书2页 说明书30页 附图8页

(54)发明名称

鉴别高度或≥CIN2用于人乳头瘤病毒(HPV)与HPV相关癌症的早期及晚期检测、筛检和诊断

(57)摘要

公开了用于诊断人类个体中乳头瘤病毒感染的疾病阶段的方法和试剂盒。该方法包括从所述人类个体中获得样本,所述样本由包含蛋白质的组织样本或包含蛋白质的细胞样本组成;将所述样本和与一或多种HPV重组蛋白专一性结合的一或多种抗体接触;测定所述样本中与所述抗体专一性结合的至少一种蛋白的存在、不存在或量;并基于所述一或多种蛋白质的所述测定的存在、不存在或量,测定所述人类个体中乳头瘤病毒感染的所述疾病阶段。

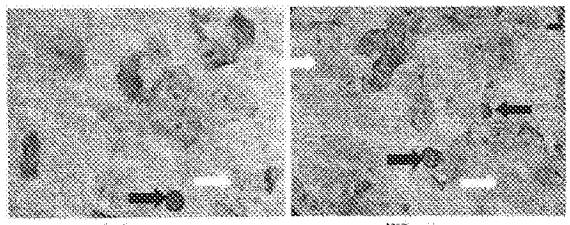

图1A 图1B

CN 102449479 B

1.专一性结合至一种或多种重组 HPV 蛋白的抗体在制备用以评价人类个体中乳头瘤病毒感染的疾病进展风险的试剂盒中的应用，测定包括：

由所述人类个体获得样本，所述样本包括含有蛋白质的组织样本，或含有蛋白质的细胞样本；

将所述样本与专一性结合至一种或多种重组 HPV 蛋白的第一一种或多种抗体进行接触，所述多种 HPV 重组蛋白选自重组乳头瘤病毒 E6 基因产物、重组乳头瘤病毒 E7 基因产物，所述接触在促进所述多种抗体的专一性结合的条件下进行；

测定所述样本中第一一种或多种蛋白质的存在、不存在或含量，所述第一一种或多种蛋白质与所述第一一种或多种抗体的一种或多种专一性结合，这至少部分地基于所述第一一种或多种抗体的一种或多种与所述接触样本的专一性结合的测量结果；以及

评价疾病进展的风险；

其中所述一种或多种蛋白质的所述不存在指示较小的疾病进展风险，并且所述一种或多种蛋白质的所述存在指示高的疾病进展风险。

2.权利要求 1 所述的应用，所述第一一种或多种蛋白质含有一种或多种蛋白质，其选自乳头瘤病毒 E6 基因产物、和乳头瘤病毒 E7 基因产物。

3.权利要求 1 所述的应用，所述测定进一步包括：

将所述样本与第二一种或多种抗体接触；

测定所述所述样本中第二一种或多种蛋白质的存在、不存在或含量，所述第二一种或多种蛋白质选自 p16INK4a、pRB、p53、E2F、E2F 活化的细胞周期蛋白、细胞周期蛋白依赖性激酶 CDK4、CDK6、Ki-67、MYC 蛋白、细胞周期蛋白 -A、细胞周期蛋白 -B、细胞周期蛋白 -E、端粒酶 -TERC、MCM2、TOP2A、热休克蛋白 40、热休克蛋白 60、热休克蛋白 70、CA9/MN、层黏蛋白 5、bm-3a、CDK N2、拓朴异构酶 2A、微体维持蛋白 -2、微体维持蛋白 -4、微体维持蛋白 -5、存活蛋白、VEGF、p27 和 p21，这基于所述第二多种抗体的一种或多种与所述接触样本的专一性结合的测量结果；以及

筛选乳头瘤病毒感染的所述人类个体进一步基于所述第二一种或多种蛋白质存在、不存在或含量的测定。

4.权利要求 1-3 任一项所述的应用，其中所述样本为原位样本、组织样本、或细胞样本，以及所述测定包括免疫组织化学试验、免疫细胞化学分析和流式细胞仪分析方法。

5.权利要求 1-3 任一项所述的应用，其中所述测定所述疾病阶段包括测定 HSIL 的存在与否、晚期 HPV 感染的存在与否、高度发育异常的存在与否。

6.权利要求 4 所述的应用，其中所述测定所述疾病阶段包括测定 HSIL 的存在与否、晚期 HPV 感染的存在与否、高度发育异常的存在与否。

7.权利要求 1-3 任一项所述的应用，其中所述测定所述疾病阶段包括测定疾病阶段 ≥ CIN2 的存在与否。

8.权利要求 4 所述的应用，其中所述测定所述疾病阶段包括测定疾病阶段 ≥ CIN2 的存在与否。

9.权利要求 1-3 任一项所述的应用，其中所述疾病阶段为 ≥ CIN2 或 < CIN2；或所述疾病阶段为 HSIL 或晚期 HPV 感染或高度发育异常。

10.权利要求 4 所述的应用，其中所述疾病阶段为 ≥ CIN2 或 < CIN2；或所述疾病阶段

为 HSIL 或晚期 HPV 感染或高度发育异常。

11. 权利要求 9 所述的应用，其中所述≥ CIN2 为 CIN2/3。

12. 权利要求 1 所述的应用，其中所述乳头瘤病毒包括一种或多种病毒，其选自 HPV-6、HPV-11、HPV-16、HPV-18、HPV-31、HPV-33、HPV-35、HPV-39、HPV-42、HPV-43、HPV-44、HPV-45、HPV-51、HPV-52、HPV-53、HPV-54、HPV-55、HPV-56、HPV-58、HPV-59 和 HPV-66。

13. 权利要求 1 所述的应用，其中所述重组乳头瘤病毒 E6 基因产物是重组 HPV-16E6 基因产物或重组 HPV-18E6 基因产物。

14. 权利要求 1 所述的应用，其中所述重组乳头瘤病毒 E7 基因产物是重组 HPV-16E7 基因产物或重组 HPV-18E7 基因产物。

15. 权利要求 1-3 任一项所述的应用，其中所述细胞样本包括正常细胞、ASC-US 细胞、ASC-H 细胞、LSIL 细胞、HSIL 细胞、ADC 细胞、AGC 细胞或 SCC 细胞。

16. 权利要求 4 所述的应用，其中所述细胞样本包括正常细胞、ASC-US 细胞、ASC-H 细胞、LSIL 细胞、HSIL 细胞、ADC 细胞、AGC 细胞或 SCC 细胞。

17. 权利要求 1-3 任一项所述的应用，其中所述组织样本为良性、CIN1、CIN2、CIN3、SCC、AGC 或 ADC。

18. 权利要求 4 所述的应用，其中所述组织样本为良性、CIN1、CIN2、CIN3、SCC、AGC 或 ADC。

19. 权利要求 1 所述的应用，所述测定进一步包括：

由所述人类个体获得第二样本，所述样本包含细胞样本；以及

对所述样本进行细胞学帕氏涂片试验；或

由所述人类个体获得第二样本，所述样本包含核酸；以及

对所述样本进行人乳突病毒的核酸杂交试验。

20. 一种包含专一性结合至一种或多种重组 HPV 蛋白的抗体的试剂盒，包含：

进行权利要求 1-14 任一项所述的应用的试剂；以及

执行所述应用的说明书。

鉴别高度或≥CIN2用于人乳头瘤病毒(HPV)与HPV相关癌症的早期及晚期检测、筛检和诊断

[0001] 对相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求2009年5月07号提交的名称为“有效用于人乳头状瘤病毒(HPV)与HPV相关癌症的早期及晚期检测、筛检及诊断的新型抗体及检测方法”的美国临时专利申请序号61/215,589的权益。

[0003] 本申请交叉引用美国专利申请序号11/559,366,提交于2006年11月13日,名称为“人乳突病毒(HPV)的检测方法及其应用于子宫颈癌”,美国专利申请序号12/082,740,200年4月14日提交,名称为“检测HPV的蛋白质芯片”,美国专利申请序号61/131,991,2008年6月13日提交,名称为“检测HPV的抗体及实验方法”,以及美国专利申请序号61/192,912,2008年9月22日提交,名称为“有效应用于早期及晚期乳头瘤病毒相关癌症的检测、筛检及诊断的新乳头瘤病毒单克隆抗体”,美国专利申请序号12/456,053,2009年6月10日提交,名称为“新HPV蛋白单克隆抗体”,美国专利申请序号12/456,054,2009年6月10日提交,名称为“原位检测早期及晚期乳头瘤病毒感染”,美国专利申请序号12/456,055,2009年6月10提交,名称为“原位检测早期及晚期乳头瘤病毒感染”,美国专利申请序号12/456,076,2009年6月10提交,名称为“检测早期及晚期乳头瘤病毒感染”,美国专利申请序号61/199,013,2008年11月12日提交,名称为“乳头瘤病毒相关癌症的检测、筛检及诊断”,和美国专利申请序号12/590,747,2009年11月12日提交,名称为“乳头瘤病毒相关癌症的检测、筛检及诊断”。每一上述相关专利申请的内容以它们的整体并入本文。

[0004] 发明背景

[0005] 子宫颈癌是在全世界妇女疾病中致死率高达第二位的常见癌症,每年累计约有50万新病例,并造成约25万死亡例。在美国,子宫颈癌的死亡率已大幅下降,这是因为现今成功采用的子宫颈癌筛选方法可检测癌前状态并在演变成癌症之前即被干预和处理。目前子宫颈癌筛选方法的范例系基于帕氏涂片试验(Pap test),此方法是一种以细胞学为基础的细胞检查,该细胞通过人或机器自子宫颈刮出并于显微镜下检测,以检测代表发育异常细胞生长的变化。此测试明显受限于主观上的判定标准的变异,并且受限于低灵敏度和高假阳性的结果。在子宫颈细胞学的假阴性报告率相差很大,从最低的1.6%至近28%。在美国每年检测出的子宫涂片异常,其中约400万为意义不明的不典型鳞状细胞(ASC-US),不典型性鳞状上皮细胞无法排除高度上皮发育异常(ASC-H),低度鳞状上皮内病变(LSIL),或非典型之腺细胞(AGC)。

[0006] 基于目前临床治疗的规范,以上所述病例,会以阴道镜组织切片作进一步检测,以测定有临床显著性的高度病变(第二或第三级子宫颈上皮内赘瘤)或在子宫颈切片检测出有子宫颈内组织增生的病例。根据一些报告显示,由细胞学检测出意义不明的不典型鳞状细胞之病例(美国每年高于200万例),在子宫颈切片检测中仅有5%-17%为第二或第三级子宫颈上皮内赘瘤,而在低度鳞状上皮内病变之病例中(美国每年约160万例),第二或第三级子宫颈上皮内赘瘤的比例则为25%。此数据显示约300万子宫涂片检测出为意义不

明的不典型鳞状细胞或低度鳞状上皮内病变的病例不需要阴道镜组织切片检测。虽然一直以来阴道镜切片检测被视为检测标准，但近来结果分析指出子宫颈切片检测可因取样或误诊而造成 33-50％的高度病变病例被遗漏。因而导致细胞学的假阳性结果及切片检测之假阴性结果极难被分辨。因此，目前极需一种检测方法以能分辨高度子宫颈发育异常，来鉴别及分类病患，这些病患可由此干预获得最大利益。

[0007] 虽然大多数低度子宫颈发育异常(low grade cervical dysplasias)会自行萎缩而不演变成子宫颈癌，但发育异常可作为一个迹象，即提高警觉是必要的。CIN1 是最常见和最温和形式的子宫颈上皮内瘤，通常在两年内会自行消退。正因如此，LSIL 的结果可用简单的“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，医生可能需要采取阴道镜组织切片以更积极地追踪结果。如果发育异常增进，则可能需要治疗。因此，需要一种方法来原位检测乳突病毒 (HPV) 癌蛋白。这特别有助于 ASC-US、LSIL 或 CIN1 患者来检测高度发育异常细胞，并鉴别出那些潜在 CIN2 或上述物质，其可立即受益于治疗，并避免“等待和观望”伴随的焦虑。

[0008] 特定上皮细胞感染以人乳突病毒 (HPV) 及由此诱导的上皮细胞增生，在子宫颈癌发生中扮演着重要角色。发现约 99％例确诊子宫颈癌伴随 HPV 感染，且活检证实为鳞状上皮内病变 (SIL) 或子宫颈上皮内赘瘤 (CIN)。HPV 感染主要经由性接触传播，尤其在年轻妇女为最高，目前全世界约有 2,000 万性活跃男女已被感染。约 1％的人口有生殖器疣，且 4％的妇女有子宫颈癌前病变，如低度鳞状细胞上皮病变 (LSIL)、高度鳞状细胞上皮病变 (HSIL) 或重要性不确定的非典型性鳞状细胞 (ASC-US)。

[0009] 这些病变，优先是在年龄介于 35-40 岁女性中观察到的，皆伴随发展成侵略性子宫颈癌的高风险。一般认为，持续 HPV 感染是演变成上皮癌前病变之必备条件。然而，在妇女感染高危险型 HPV 病毒中，LSIL 并非总是演变成 HSIL。事实上，多数 LSIL 人类病患会有缓解现象，尽管某些进展为 HSIL。虽然 99.7％的子宫颈癌为 HPV 阳性，但病毒基因组需整合入宿主基因组，以促进必要的基因表达从而发展为 HSIL 或癌。事实上，每 10 个有持续 HPV 感染的妇女中，只有一个发展为高度 CIN 病变，如子宫颈上皮内赘瘤 (CIN)2 级和 3 级（分为 CIN2 和 CIN3)，并且这些上皮病变案例的部分最终可发展为子宫颈癌。

[0010] 由 HPV 感染引起的疾病阶段包括早期 HPV 感染、晚期 HPV 感染、重要性不确定的非典型性鳞状细胞 (ASC-US)、非典型鳞状细胞、不能排除 HSIL(ASC-H)、非典型腺细胞 (AGC)、低度鳞状上皮细胞病变 (LSIL)、高度鳞状上皮细胞病变 (HSIL)、子宫颈上皮内赘生 CIN1、CIN2、CIN3（分别代表轻度、中度或重度细胞发育异常）、侵入性子宫颈癌、腺癌、或鳞状细胞癌 (SCC)。

[0011] 在过去，子宫颈癌筛检基于经子宫颈涂片而根据传统的细胞学检查，疑似的病例则接着进行阴道镜镜检和组织切片。使用细胞学筛检的方式确实使子宫颈癌的死亡率显著下降。但是，由于测试标准具有主观性，而子宫颈涂片检查的缺点包括获取样本困难、观察者自身和观察者彼此之间对于观察结果的一致性太差、高比率的假阴性（高达 20％）和假阳性、需要专业的实验室及高度训练有素的人员，以及对 HPV 感染者有很大比例无法确诊。目前需要更具再现性的实验方法以改善目前的检查方法，并避免不必要的医疗行为介入和造成受影响妇女的心理困扰。现行子宫颈细胞学筛检方式的灵敏性为 30％至 87％，而特异度介于 86％至 100％。

[0012] 通过核酸方法的 HPV 感染检测分析虽已被研发，但用以预测疾病风险并不理想，系因其成本高，检测作业程序，以及对场所、设备及高度设训练人员的要求，和对 CIN 的低阳性预测值。此外，当前的 DNA 分析方法并不能自 HSIL 中区分 LSIL 诊断，也不能自非转化潜在或缓解病毒感染来区分 CIN 病变。E6/E7mRNA 的检测分析显示与 HPV DNA 检测分析的灵敏度相当，且具有较高的阳性预测值。然而，目前仅有有限的显示原位 E6/E7 癌蛋白直接检测之的报告。目前需要的是一种低成本、简便、灵敏和特异性检测，其可在临床实验室或医师诊所依常规实践进行并能够检测早期上皮病变、自 HSIL 区分 LSIL、或预测进展至子宫颈癌的风险。

[0013] 用于生产 HPV 单克隆抗体的已知方案通常不适合于生产抗 -HPV 单克隆抗体，并且不能用于免疫组织化学诊断测试以进行普通人群的病理筛检。这是因为以此种方案产生的抗体并不需要与感染的人细胞中自然发生的 HPV 蛋白进行反应。此外，由先前技术抗体识别的表位并不必需是那些抵抗标准程序——包含取样、固定和储存临床样本——的表位。其他用 ELISA（酶联免疫吸附实验）检测人体中 HPV 相关抗体或病毒蛋白存在的尝试一般导致检测灵敏度极低，因此不能发展成市售可得的诊断试剂。大部分此类 ELISA 分析法针对单一病毒蛋白或短肽片段，因此不能与人体的抗体有良好反应或强烈并专一地结合。此类分析的特异性和灵敏度是如此之低，以至于即使使用患者确诊有 HPV 伴随的侵入性子宫颈癌的患者的样本，只有 53％患者样本发现对 HPV 感染呈阳性。由于测试人群来自一般筛检，有或没有低度或癌前病变，该分析法的灵敏度将会太低而无法于临床实践。因此，目前并无成功的 ELISA 分析法可作为临床样本的诊断工具。

[0014] 在 100 种以上的 HPV 感染中，只有约 15 种被认为具有发展为 CIN 或子宫颈癌的高风险。此外，约 70％子宫颈癌病例和 50％的 CIN2 和 CIN3 病例是由于感染高风险 HPV 类型 -16 和 HPV 类型 -18。然而，一些进行性子宫颈癌病例与低风险 HPV 类型感染有关，而感染某些 HPV 类型并不会进展为子宫颈癌。因此，确定出具有特定癌蛋白表达的 HPV 感染变得非常重要，而不是仅仅确定出高风险型的 HPV 感染。因此，极需检测作为子宫颈癌生物标记 (biomarker)HPV 癌蛋白，以更好地识别发展成 HSIL、癌前病变或子宫颈癌的风险。

[0015] 需要研发适当的分析方法，如 HPV 免疫分析法，用以检测此种 HPV 癌蛋白或子宫颈癌的生物标记。于 CIN2 和 CIN3 病变中 E6/E7 癌蛋白的存在可提供证据来显示高风险的进展。然而，可用于原位检测 E6/E7 致癌蛋白的抗体有限。因此，极需研发抗体及免疫分析法以检测作为子宫颈癌生物标记的 HPV 癌蛋白，以确定 HSIL 或≥ CIN2(CIN2 及以上)，或其癌前病变，以用于筛选侵入性子宫颈癌和 / 或恶性转形为子宫颈癌及其它 HPV 相关癌症的风险。

[0016] 发明概述

[0017] 许多实施方式提供许多免疫分析方法用于利用各式不同的、抗重组 HPV 蛋白的单克隆抗体和抗细胞蛋白的抗体来原位 (in situ) 检测 HPV 蛋白及细胞蛋白。许多实施方式也提供 HPV 免疫细胞化学 (ICC) 检测法、HPV 免疫组织化学 (ICC) 检测法，用以检测受 HPV 感染引起的 HPV 蛋白及细胞蛋白在子宫颈细胞或子宫颈组织及其他 HPV 相关癌症——包括但不限于膀胱癌、头颈部癌、肺癌等等——中的存在。

[0018] 在某些实施方式中，一种筛检人类高度发育异常细胞的方法由各种免疫组织化学检测法进行，以从一种或多种乳头瘤病毒类型原位检测一种或多种乳头瘤病毒蛋白，和从

一种或多种乳头瘤病毒类型原位检测受 HPV 感染所影响的一种或多种细胞蛋白，这些蛋白存在于载玻片上的生物样本中，此生物样本含有组织，包括但不限于子宫颈癌、膀胱癌、肺癌、头颈部癌等等。

[0019] 在某些实施方式中，一种筛检人类高度发育异常细胞的方法由免疫细胞化学检测法进行，以从一种或多种乳头瘤病毒类型原位检测一种或多种乳头瘤病毒蛋白，和从一种或多种乳头瘤病毒类型原位检测受 HPV 感染所影响的一种或多种细胞蛋白，这些蛋白存在于载玻片上的生物样本中，此生物样本含有人类细胞薄层，利用一种或多种抗体对此人类细胞薄层进行染色。

[0020] 在某些实施方式中，提供了 HPV E6E7 检测法。

[0021] 在某些实施方式中，HPV E6E7 检测法与帕氏涂片试验 (Pap smear test) 同时使用。

[0022] 在某些实施方式中，可对抗一种或多种纯化的重组乳头状瘤病毒蛋白产生一种或多种抗体，其中至少有一种抗体能够辨识乳头状瘤病毒癌蛋白。在某些实施方式中，一种或多种抗体将被标上试剂 (agent)，而从人类受试者的生物样本中取得的一种或多种人类细胞会制备成液体基溶液，以便一种或多种抗体与存在于生物样品的一种或多种人类细胞中的一种或多种乳头状瘤病毒类型的一种或多种乳头状瘤病毒蛋白的结合，能够由与标记的一种或多种抗体反应的试剂的存在而被检测到。在一些实施方式中，这些试剂包括比色试剂、荧光发色团、以及其他在流式细胞仪分析方法中用于随后分离及鉴别一种或多种人类细胞的试剂。

[0023] 在某些实施方式中，提供了进行免疫组织化学检测法的试剂盒 (kit)。此试剂盒可包括前抗体 (pre-antibody) 阻断液、后抗体 (post-antibody) 阻断液、作为一抗的抗 HPV 抗体、与 HRP 或生物素共轭结合的抗小鼠或抗兔免疫球蛋白、或作为二抗的其他剂、以及含有用作待被检测的二抗底物的合适试剂的溶液。

[0024] 在某些实施方式中，提供了进行免疫组织化学检测法的试剂盒 (kit)。此试剂盒可包括前抗体阻断液、后抗体阻断液、作为一抗的抗 HPV 抗体、与 HRP 或生物素共轭结合的抗小鼠或抗兔免疫球蛋白、或作为二抗的其他试剂、以及含有用作待被检测的二抗底物的合适试剂的溶液。

[0025] 一个实施方式提供了在 HPV 感染的人类受试者当中测定乳头状瘤病毒感染的疾病阶段的方法，此方法包括：从本文所述的受试者取得样本，本文所述的样本由包括蛋白的组织样本及包括蛋白的细胞样本组成；将此样本与专一性结合一种或多种重组 HPV 蛋白的一种或多种抗体接触 (contacting)，此多种重组 HPV 蛋白选自重组乳头状瘤病毒 E6 基因产物、重组乳头状瘤病毒 E7 基因产物、重组乳头状瘤病毒 L1 基因产物、重组乳头状瘤病毒截短型 L1 基因产物以及重组乳头状瘤病毒 L2 基因产物，其中所述的接触发生在有助于多种抗体作专一性结合的条件之下；测定所述样本中第一种一或多种蛋白质的存在、不存在或含量，所述第一种一或多种蛋白质与所述第一种一或多种抗体的一或多种专一性结合，这至少部分地基于所述第一种一或多种抗体的一或多种与所述接触样本的专一性结合的测量；以及测定所述人类个体中所述乳头瘤病毒感染的疾病阶段，这基于所述样本中所述第一种一或多种蛋白质的所述存在、不存在或含量的测定。

[0026] 在一实施方式中，此第一种一或多种蛋白包括选自乳头瘤病毒 E6 基因产物、乳头

瘤病毒 E7 基因产物、乳头瘤病毒 L1 基因产物、乳头瘤病毒截短型 L1 基因产物和乳头瘤病毒 L2 基因产物的一种或多种蛋白。

[0027] 在一实施方式中，此第一种一或多种蛋白包括选自乳头瘤病毒 E6 基因产物和乳头瘤病毒 E7 基因产物的一种或多种蛋白。

[0028] 在一个实施方式中，该方法进一步地包括本文所述样本与第二一种或多种抗体接触；测定所述第二种一或多种蛋白质在所述样本中的存在、不存在或含量，所述第二种一或多种蛋白质选自 p16INK4a、pRB、p53、E2F、E2F 活化细胞周期蛋白、细胞周期蛋白依赖型激酶、CDK4、CDK6、Ki-67(MIB-1)、MYC 蛋白、细胞周期蛋白 -A、细胞周期蛋白 -B、细胞周期蛋白 -E、端粒酶 -TERC、MCM2、TOP2A、热休克蛋白 40(HSP_{40})、热休克蛋白 60(HSP_{60}) 热休克蛋白 70(HSP_{70})、CA9/MN、层黏蛋白 5、brn-3a、CDK N2、拓朴异构酶 2A、微体维持蛋白 -2、微体维持蛋白 -4、微体维持蛋白 -5、存活蛋白、VEGF、p27(kip1) 和 p21(waf)，这基于所述第二多种抗体的一或多种与所述接触样本的专一性结合的测量；以及筛选乳头瘤病毒感染的所述人类个体进一步基于所述第二种一或多种蛋白质存在、不存在或的含量测定。

[0029] 在一实施方式中，一种或多种蛋白包括 p16INK4a。

[0030] 在一实施方式中，样本是原位的。

[0031] 在实施方式中，样本包括组织样本，所述的测定包括免疫组织化学检测法。

[0032] 在一实施方式中，样本包括细胞样本，所述的测定包括免疫细胞化学检测法。

[0033] 在一实施方式中，所述的测定所述疾病阶段包括测定定 HSIL 的存在与否。

[0034] 在一实施方式中，所述的测定所述疾病阶段包括测定晚期 HPV 感染的存在或不存在。

[0035] 在一实施方式中，所述的测定所述疾病阶段包括测定高度发育异常的存在或不存在。

[0036] 在一实施方式中，疾病阶段是≥ CIN2 或＜ CIN2。

[0037] 在一实施方式中，疾病阶段是≥ CIN2 是 CIN2/3。

[0038] 在一实施方式中，疾病阶段是 HSIL。

[0039] 在一实施方式中，疾病阶段是晚期 HPV 感染。

[0040] 在一实施方式中，疾病阶段是高度发育异常。

[0041] 在一实施方式中，重组 HPV 蛋白通过包含以下步骤的程序而制备：提供编码融合蛋白的重组构建物，所述融合蛋白包含所述乳头瘤病毒基因产物和选自 HIS 标记、GST 标记和 MBP 标记的亲和性标记；在宿主细胞中表达所述重组构建物；在所述亲和性树脂与亲和性标记专一性结合条件下，用亲和性树脂温育由所述宿主细胞制备的提取物；以及自所述亲和性树脂中洗脱出所述的重组 HPV 蛋白，其中宿主细胞中所述重组构建物的表达导致某种水平的蛋白质表达，以便所述洗脱产生含有浓度从 1mg/L 至 10mg/L 的所述重组 HPV 蛋白的组合物，其中所述重组 HPV 蛋白在组合物中以经 SDS PAGE 测定纯度至少为 90％存在，其中所述重组 HPV 蛋白在组合物中以经尺寸排阻色谱法测定为基本可溶的单体形式而存在。

[0042] 在一实施方式中，乳头瘤病毒包括选自 HPV-6、HPV-11、HPV-16、HPV-18、HPV-31、HPV-33、HPV-35、HPV-39、HPV-42、HPV-43、HPV-44、HPV-45、HPV-51、HPV-52、HPV-53、HPV-54、HPV-55、HPV-56、HPV-58、HPV-59 和 HPV-66 所的一种或多种病毒。

[0043] 在一实施方式中，乳头瘤病毒包括选自 HPV-16 和 HPV-18 的一种或多种病毒。

[0044] 在一实施方式中，重组乳头瘤病毒 HPV E6 基因产物是重组 HPV-16E6 基因产物或重组 HPB-18E6 基因产物。

[0045] 在一实施方式中，重组乳头瘤病毒 HPV E7 基因产物是指重组 HPV-16E7 基因产物或是重组 HPB-18E7 基因产物。

[0046] 在一实施方式中，细胞样本包括正常细胞、ASC-US 细胞、ASC-H 细胞、LSIL 细胞、HSIL 细胞、ADC 细胞或 SCC 细胞。

[0047] 在一实施方式中，组织样本是良性的、CIN1、CIN2、CIN3、SCC 或 ADC。

[0048] 在一实施方式中，此方法进一步包括从人类受试者取得的第二样本，此样本包括细胞样本及；对所述样本进行细胞学帕氏涂片检查。

[0049] 在一实施方式中，此方法进一步由所述人类个体获得第二样本，所述样本包含核酸；以及对所述样本进行人乳突病毒的核酸杂交试验。

[0050] 附图的简要说明

[0051] 以这样的方式说明，可详细了解上述本发明的特点，对本发明的更具体的说明，简要总结于此，可以参照实施方式，其中的一些在附图中说明。必须注明的是，附图说明的一些实施方式只是典型实施方式，因此不被视为其范围的限制，可为有意承认其他等同有效的实施方式。

[0052] 图 1A 显示，以确诊为 CIN2 的临床样本，在液体基溶液中使用抗 HPV E7 小鼠单克隆抗体进行免疫细胞化学 (ICC) 染色的结果。图 1B 显示，以另一个确诊为 CIN2 的临床另一样本，在液体基溶液中使用抗 HPV E6 小鼠单克隆抗体进行免疫细胞化学 (ICC) 染色的结果。

[0053] 图 2 显示，以确诊为 CIN3 的临床样本，在液体基溶液中使用抗 HPV E6 小鼠单克隆抗体进行免疫细胞化学 (ICC) 染色的结果。

[0054] 图 3A-3D 为具代表性的图像，来自以另一个确诊为 CIN3 的临床样本，在另一个液体基溶液中，利用图 2 所示相同的抗 HPV E6 小鼠单克隆抗体进行免疫细胞化学 (ICC) 染色的结果。

[0055] 图 4A 显示，用图 3A-3D 中所示的相同 CIN3 样本使用抗 HPV E7 小鼠单克隆抗体进行免疫细胞化学 (ICC) 染色的结果。图 4B 显示另张图像，为使用相同的抗 HPV E7 小鼠单克隆抗体进行的图 4A 所示相同的免疫细胞化学 (ICC) 染色的结果。

[0056] 图 5 显示，以图 3A-3D 中所示的相同 CIN3 样本，使用抗 HPV p16 小鼠单克隆抗体进行免疫细胞化学 (ICC) 染色的结果。

[0057] 图 6A 显示于液体基溶液中被诊断为鳞状细胞癌 (SCC) 的临床样本 ICC 染色结果，使用抗 -HPV E6 小鼠单克隆抗体。图 6B 显示与图 6A 相同的 SCC 样本的 ICC 染色结果，使用抗 -HPV E7 小鼠单克隆抗体。图 6C 显示与图 6A 相同的 SCC 样本的 ICC 染色结果，使用抗 -p16 小鼠单克隆抗体。

[0058] 图 7A 显示于液体基溶液中被诊断为正常的临床样本 ICC 染色结果，使用抗 -HPV E6 小鼠单克隆抗体。图 7B 显示与图 7A 所示相同的临床样本的 ICC 染色结果，使用抗 -HPV E7 小鼠单克隆抗体。

[0059] 图 8A-8B：使用抗 -E6 抗体对子宫颈癌组织和其邻近正常组织的 IHC 图像。图 8C-8D：使用抗 -E7 抗体对子宫颈癌和其邻近正常组织之 IHC 图像。

[0060] 图9A-9C：子宫颈癌样本抗-E6抗体的IHC图像：阳性10×（左）、阳性20×（中）、阴性20×（右）。图9D-9F：子宫颈癌样本抗-E7抗体的IHC图像：阳性10×（左）、阳性20×（中）、阳性40×（右）。图9G-9I：子宫颈癌样本$p16^{INK4a}$抗体的IHC图像：阳性10×（左）、阳性20×（中）、阴性20×（右）。

[0061] 详述描述

[0062] 各种实施方式，提供各式免疫试验和抗作为生物标记的HPV致癌蛋白的单克隆抗体，以便高危险和低危险HPV病毒型感染引起的发育异常细胞的可被一或多种抗体检测到。各种实施方式提供HPV免疫组织化学（IHC）试验和HPV免疫细胞化学（ICC）试验，检测HPV致癌蛋白的存在，用以原位辨识组织或子宫颈细胞中来自高度或癌前病变的高度发育异常细胞。各种实施方式也提供方法，使用组合的HPV病毒标记和细胞标记进行IHC或ICC试验，以相对于使用单一HPV病毒标记或单一细胞标记进行的IHC或ICC试验，获得较高之灵敏性，原位检测高度发育异常细胞。

[0063] 在一些实施方式中，筛选人体中乳头瘤病毒感染的方法，在含有人类细胞薄层的玻片上进行免疫细胞化学试验，以原位检测玻片上的生物性样本中存在的来自一或多种乳头瘤病毒型的一或多种乳头瘤病毒蛋白。该薄层为子宫颈细胞的单层。

[0064] 为了对人类细胞薄层进行染色，使用一或多种针对一或多种纯化的重组乳头瘤病毒蛋白产生的抗体，，或针对一或多种受HPV感染影响的细胞蛋白产生的抗体，至少一种抗体能够辨识乳头瘤病毒致癌蛋白。乳头瘤病毒致癌蛋白包括但不限于HPV-16E6蛋白、HPV-16E7蛋白、HPV-18E6蛋白、HPV-18E7蛋白，以及其组合。细胞标记物包括但不限于$p16^{INK}$4a、pRB、p53、E2F、E2F活化细胞周期蛋白、细胞周期蛋白依赖型激酶、CDK4、CDK6、Ki-67(MIB-1)、MYC蛋白、细胞周期蛋白-A、细胞周期蛋白-B、细胞周期蛋白-E、端粒酶-TERC、MCM2、TOP2A、热休克蛋白40(HSP_{40})、热休克蛋白60(HSP_{60})、热休克蛋白70(HSP_{70})、CA9/MN、层黏蛋白5、brn-3a、CDK N2、拓朴异构酶2A、微体维持蛋白-2、微体维持蛋白-4、微体维持蛋白-5、存活蛋白、VEGF、p27(kip1)和p21(waf)。

[0065] 在某些实施方式中，一或多种免疫组织化学试验在一含有临床组织样本切片的玻片上进行以染色人类细胞，使用一或多种针对一或多种纯化的重组乳头瘤病毒蛋白产生的一或多种抗体，可，或针对一或多种受HPV感染所影响的细胞蛋白产生的一或多种抗体，至少一种抗体能够辨识乳头瘤病毒致癌蛋白，用以原位检测玻片上临床组织样本切片中存在的来自一或多种乳头瘤病毒型的一或多种蛋白质。乳头瘤病毒致癌蛋白包括但不限于HPV-16E6蛋白、HPV-16E7蛋白、HPV-18E6蛋白、HPV-18E7蛋白以及其结合。细胞标记物包括但不限于$p16^{INK}$4a、pRB、p53、E2F、E2F活化细胞周期蛋白、细胞周期蛋白依赖型激酶、CDK4、CDK6、Ki-67(MIB-1)、MYC蛋白、细胞周期蛋白-A、细胞周期蛋白-B、细胞周期蛋白-E、端粒酶-TERC、MCM2、TOP2A、热休克蛋白40(HSP_{40})、热休克蛋白60(HSP_{60})、热休克蛋白70(HSP_{70})、CA9/MN、层黏蛋白5、brn-3a、CDK N2、拓朴异构酶2A、微体维持蛋白-2、微体维持蛋白-4、微体维持蛋白-5、存活蛋白、VEGF、p27(kip1)和p21(waf)。

[0066] 在某些实施方式中，对临床样本也进行细胞学帕帕尼科拉乌氏（帕氏）涂片试验，将其细胞学帕帕尼科拉乌氏涂片试验结果与一或多种免疫组织化学试验进行比较。对临床样本也进行核酸杂交试验，以检测来自人体临床样本的乳头瘤病毒基因组的存在。

[0067] 各种实施方式一般涉及多种方法、检测试验、试剂盒、多克隆和单克隆抗体、多肽、

重组蛋白和核酸，有用于检测 HPV 感染，包含一般性 HPV 感染和不同 HPV 基因型的感染、高风险 HPVs 和低风险 HPVs。提供各种新颖的单克隆抗 HPV 蛋白抗体，可用作为生物标记，和作为用于检测 HPV 病毒蛋白、HPV 致癌蛋白、子宫颈癌早期筛选和诊断疾病等级≥ CIN2 的有用工具。本文描述的工具也可应用于 HPV 感染的早期临床筛检，以及子宫颈癌和其他 HPV 相关癌症的一般性诊断。

[0068] 在某些实施方式中，一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、乳头瘤病毒 E7 蛋白、乳头瘤病毒 L1 蛋白以及其组合。重组乳头瘤蛋白包括但不限于 HPV-16E6 重组蛋白、HPV-16E7 重组蛋白、HPV-18E6 重组蛋白、HPV-18E7 重组蛋白、HPV-16L1 重组蛋白、HPV-18L1 重组蛋白以及其组合。

[0069] 一些实施方式提供各种抗 HPV 病毒蛋白的单克隆抗体，以便受高危险和低危险 HPV 病毒型的感染可通过单一单克隆抗体被检测到。一些实施方式还提供 HPV 非 - 病毒型专一性单克隆抗体，用以检测一或多种 HPV 病毒型。该一或多种乳头瘤病毒类型包括高危险 HPV 型、低危险 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 以及其组合。

[0070] 一些实施方式中所使用的各种术语的定义：

[0071] NILM：恶性上皮内病变阴性。当没有瘤形成的细胞证据时使用 NILM；这可能包括组织和 / 或其他非肿瘤性的发现，如反应性 / 修复性的改变。

[0072] ASC-US：重要性不明的非典型鳞状细胞。细胞通常为中间型大小或表面的鳞状细胞并具有核变化，这是一种征兆但不诊断为 LSIL 或 SIL，除非另指明。

[0073] ASC-H：无法排除 HSIL 的非典型鳞状细胞。细胞通常为化生细胞的大小，可能单独出现或形成团簇，它们是一种征兆但不诊断为 HSIL。

[0074] LSIL：低度鳞状内皮细胞病变，包含：HPV 细胞病变效应 / 中度发育异常 /CIN1。

[0075] HSIL：高度鳞状细胞上皮内病变，包含：中度发育异常 /CIN2 和严重发育异常 / CIS/CIN3，以及有可疑侵袭性特征的 HSIL。

[0076] 鳞状细胞癌 (SCC)：子宫颈的癌症，局部侵袭入邻近组织、血管、淋巴管和淋巴结。在其晚期阶段，可能难以治疗或可能是致命的。根据阶段或侵袭性程度，子宫颈侵袭性癌症可以利用局部切除术、子宫切除术、放射性子宫切除术、放射疗法和化学疗法加以治疗。

[0077] 腺癌：虽然多数的子宫颈癌来自组成外部皮肤的鳞状细胞，仍有一偶发性的癌症来自黏膜产生性细胞，其位于内子宫颈道延伸至子宫处。此腺质型被称之为“腺癌”，有别于“鳞状细胞癌”。腺癌难以被检测。不同于鳞状细胞癌，当腺癌前趋物存在时，难以在帕氏涂片中被辨认出。与腺癌不一致，鳞状细胞发育异常缓慢发展成子宫颈鳞状细胞癌。

[0078] 在美国，多数的帕氏涂片结果是正常的，然而，每年约有 4-5 百万的异常帕氏涂片检查结果被发现。多数异常的结果是轻微的异常 (ASC-US，典型地，帕氏检查结果的 2-5％) 或 LSIL(占结果的约 2％)，表示遭受 HPV 感染。虽然大多数的低级子宫颈发育异常会自动消退且从未导致子宫颈癌，但发育异常可作为需要提高警觉的征兆。CIN1 是最为普遍且最为良性的子宫颈上皮内赘瘤，且通常在两年内会自动消失。正因为如此，LSIL 结果可利用简单的“观察与等待”理念加以管理。然而，因为有 12-16％的机率会发展成更严重的发育异常，医师可能希望通过利用组织切片进行阴道镜检查来更积极的追踪结果。若发育异常恶

化，治疗可能是必要的。因此，提供 HPV E6E7 ICC 试验与帕氏涂片试验来原位检测 HPV 致癌蛋白是有效的，尤其有助于 ASC-US 或 LSIL 或 CIN1 病患检测高度发育异常细胞，以及识别潜在的 CIN2 或可受益于医疗介入的上述那些，并避免“等待和观察”所产生的焦虑感。

[0079] 高度鳞状上皮内细胞病变或 HSIL 或 HGSIL 表示中度或严重的子宫颈上皮内赘瘤或原位肿瘤。通常以帕氏涂片试验来进行诊断。在某些病例中，若无适当追踪，这些病变会导致侵袭性子宫颈癌。HGSIL 并不意味着癌症的存在。所有具 HGSIL 结果的妇女中，2％或更少在当时具有侵袭性子宫颈癌，然而，在未治疗下，约有 20％会发展成具有侵袭性的子宫颈癌。为了解决此问题，HGSIL 通常利用组织切片对样本进行立即的阴道镜检查，或移除发育异常的组织。该组织送至病理学测试以进行组织学分类，这比帕氏涂片结果更具有测定性。HGSIL 通常与 CIN2 或 CIN3 的组织学分类相关。因此，提供 HPV E6E7 IHC 试验配合 HE（苏木紫－伊红染色法），或 HPV E6E7 IHC 试验配合帕氏涂片试验以原位检测 HPV E6E7 致癌蛋白是有帮助的，尤其有助于识别 CIN2/CIN3 病患。

[0080] 在某些实施方式中，一或多种抗体与一或多种来自于生物性样本中的一或多种乳头瘤病毒型的蛋白质的结合以显微镜进行检测，检测与标记的一或多种抗体反应的试剂的存在，该试剂包含比色试剂、荧光显色试剂以及其组合。生物性样本包括子宫颈细胞、子宫颈组织、子宫颈刮拭、体液、血清、血液、肿瘤、细胞培养物、组织切片，以及其组合。生物性样本可获得自帕氏涂片试验结果异常的转诊人群，或子宫颈癌常规筛检的普通群体。

[0081] 说明性的实施例 1。

[0082] 某些实施方式针对免疫学试验，包含检测脱落的子宫颈细胞中的 HPV 蛋白和细胞蛋白。作为例子，ICC 试验的结果显示，使用小鼠单克隆抗 -HPV E6 或 HPV E7 抗体，可原位检测固定于玻片上单一细胞中的 HPV E6 和 HPV E7 蛋白。HPV E6 或 HPV E7 致癌蛋白的原位存在，可被检测自不同液体溶液中不同阶段的子宫颈刮拭样本。相同的子宫颈刮拭样本也进行标准子宫颈染色，用以比较 ICC 染色结果与帕氏涂片结果。

[0083] 例如，HPV E6 蛋白可分别在子宫颈刮拭正常、ASC-US、ASC-H、CIN1、CIN2/3 样本中被检测到，且具有增加的阳性率。样本依帕氏涂片被诊断为 HSIL(CIN2/3) 约有 92％的阳性率，仅有 15％的样本依帕氏涂片被诊断为正常者，使用相同的抗 -HPV E6 抗体通过 ICC 试验呈阳性染色。对于 ASC-US 或 ASC-H 样本，藉由使用于 LSIL、HSIL 样本中相同的抗 -HPV E6 抗体，约有 33％ -38％的这些样本呈阳性染色，表示这些 ASC-US 或 ASC-H 样本中，致癌基因蛋白的表达可能为潜在的≥ CIN2(CIN2 及其以上），且须要对进一步的癌症进展进行追踪。依帕氏涂片被诊断为 ASC-US，且 ICC 染色（使用抗 -HPV E6 抗体）阴性的样本，可能发展成恶病变之风险较低。如数据所示，ICC 染色方法使用某些实施方式描述的抗 -HPV E6 抗体，对≥ CIN2 提供了 ICC 试验灵敏性 93％、精确度 74％。对相同样本使用抗 -HPVE7 抗体，也发现相似的 ICC 结果。这些数据显示，某些实施方式所描述的 E6 或 E7 抗体和 E6E7ICC 试验，可作为有用的生物标记来检测 HPV 致癌蛋白，用于 1) 作为已分类的子宫颈异常病患的辅助试验，以及 2) 自普通群体常规子宫颈测试筛选子宫颈癌的联合试验。

[0084] 在某些实施方式中，提供用来进行免疫细胞学试验的试剂盒。该试剂盒可包含前－抗体阻断溶液、后－抗体阻断溶液、抗 -HPV 抗体作为一级抗体、结合有 HRP 或生物素的抗－小鼠或抗－兔免疫球蛋白、作为二级抗体的其他试剂，以及含有作为待检测二级抗体的底物的适当试剂的溶液。

[0085] 在某些实施方式中，临床样本的核酸杂交试验可检测来自人体的临床样本中乳头瘤病毒基因组的存在。该核酸杂交试验包括聚合酶连锁反应、核酸杂交试验、DNA 芯片试验、放射性核酸杂交试验和检测试验，以及非 - 放射性核酸杂交和检测试验。

[0086] 此外，帕氏涂片正常样本也使用抗 -HPV 抗体进行 HPV E6 或 E7 ICC 测试，并发现染色呈阴性（44 个样本中有 44 个）。这些数据表示，某些实施方式描述的 ICC 染色试验非常专一。与相同样本的 HPV DNA 测试结果进行比较，16％（37 个样本中有 7 个）的帕氏涂片正常样本在 HPV DNA 测试中呈阳性。本研究使用的高度 HPV DNA 测试为 HC2，是 FDA 认可的 HPV DNA 测试。对于那些 HPV DNA 阳性但为帕氏涂片正常且 HPV ICC 阴性之样本，可能为 HPV DNA 试验的假阳性，或为 HPV DNA 阳性但无可检测到的 HPV 致癌基因蛋白表达。因此，相较于 HPV DNA 测试，本专利描述的 HPV ICC 试验对于子宫颈癌的筛选提供了较好的临床相关性。

[0087] 说明性的实施例 2。

[0088] 某些实施方式涉及免疫试验，包含检测子宫颈癌中的 HPV 致癌蛋白和细胞蛋白。HPV E6 和 E7 致癌基因蛋白表达于子宫颈癌的肿瘤细胞中，藉由使用专一性抗 -E6 和抗 -E7 抗体进行 IHC 试验，在大多数的样本中可被检测到。这些结果巩固了病原学和 HPV 致癌蛋白分子机制在多数的子宫颈癌病例中的角色。研究结果进一步显示，丧失调节的病毒 E6 和 E7 致癌蛋白，各别使得 p53 和 pRB 蛋白产生功能性的失活，导致 $p16^{INK}4a$ 过度表达。

[0089] 如数据所示，使用抗 -E6 抗体进行 HPV IHC 试验，灵敏性约为 92.1％（203 个子宫颈癌组织中有 187 个），精确度为 100％（3 个正常子宫颈组织中 0 个阳性）。在 16 个 IHC 阴性样本中，15 个样本使用抗 -p16 抗体 IHC 呈阳性。结合 E6 和 p16IHC 试验，提供了 99.5％的试验灵敏性（203 个 E6 或 p16 IHC 阳性样本中有 202 个）。

[0090] 使用抗 -p16 抗体的 HPV IHC 试验灵敏性约为 91.3％（208 个样本中有 190 个）。在 18 个 IHC p16 阴性样本中，17 个样本使用抗 -E6 抗体进行 IHC 呈阳性。结合 p16 和 E6 IHC 试验，提供了 99.5％的试验灵敏性（203 个 p16 或 E6 IHC 阳性样本中有 202 个）。

[0091] 使用抗 -E7 抗体的 HPV IHC 试验灵敏性为约 76.2％（202 个样本中有 154 个）。在 48 个 IHC E7 阴性样本中，28 个样本使用 E6 和 p16 皆呈阳性，5 个样本为 E6 阳性和 p16 阴性，14 个样本为 E6 阴性和 p16 阳性，仅有一个样本在 E6 和 E7 和 p16 中都呈阴性。结合 E6、E7 和 p16 IHC 试验，提供了 99.5％的试验灵敏性（202 个 E6、E7 或 p16 IHC 阳性样本中有 201 个）。

[0092] 子宫颈癌样本中所显示的 HPV E6/E7 致癌蛋白和 p16 细胞蛋白表达量之差异，可能是个体病例的癌症发展涉及了多种不同路径。数据显示，为了可检测到 99.5％（接近 100％）的子宫颈癌，多重生物标记（也即，结合 E6 和 p16 IHC 试验）是必要的。

[0093] HPV 致癌蛋白和细胞蛋白在癌症形成上都扮演了重要角色，作为生物标记用以诊断 HPV 相关性癌症。更多的不同 HPV 相关性癌症生物标记的研究，将有助于提供个人化的医疗。

[0094] 因此，某些实施方式提供单克隆抗体，其能够辨识来自两种不同 HPV 病毒型——HPV16 和 HPV18——的 E6 蛋白上的表位，都可通过用纯化的 HPV16E6 重组蛋白和纯化的 HPV18E6 重组蛋白筛选抗体产生性杂交合瘤细胞。某些实施方式提供单克隆抗体，其能够辨识 HPV16 E7 和 HPV18 E7 蛋白上的一般性表位。作为一例子，该单克隆抗体被用来测试各

种等级上皮细胞病变（CIN2，CIN3，LSIL，HSIL，ASC-U）和不同子宫颈癌、鳞状细胞癌（SCC，一种常见的癌症）以及腺癌（ADC，一种腺体癌症）的各种生物性样本、细胞系和／或临床样本。

[0095] 在某些实施方式中，用以筛选人体中乳头瘤病毒的感染方法包括：获得来自人体的临床样本；和利用多种HPV重组蛋白以及对HPV致癌蛋白具有专一性的实验室生产抗体，对获自人体的临床样本执行一或多项免疫学试验，以检测和筛选人类对象HPV蛋白和HPV抗体存在中的HPV感染的存在。在某些实施方式中，人类对象中的HPV蛋白使用针对HPV重组蛋白产生的抗体进行检测，包括但不限于各种抗各种HPV早期和晚期蛋白的多克隆和单克隆抗体。

[0096] 示范性E6或E7早期致癌基因的克隆在本申请中被描述。包含HPV-16 E6、E7或L1基因的氨基酸密码区的DNA片段通过聚合酶链式反应（PCR）而获得。将该DNA片段亚克隆到组氨酸标记物表达载体上，以产生用来表达E6和E7重组蛋白的质粒DNA。含有组氨酸标记物（例如His_6、His_8等）、谷胱甘肽-S-转移酶（GST）融合、麦芽糖结合蛋白（MBP）以及其他的其他种类的表达载体也可被使用。此外，该DNA片段可被亚克隆到其他表达系统，例如杆状病毒（bacilobirus）、酵母菌等，以表达来自不同HPV病毒型和病毒株的E6或E7重组蛋白。例如，由杆状病毒中表达的HPV 16所获得的L1重组蛋白被获得并命名为HPV-16-L1-baculo。

[0097] 以IPTG诱导E6或E7重组蛋白在大肠杆菌BL21(DE3)中表达。在37℃下诱导蛋白质表达两小时后，以供货商（分别为Amersham和New England Biolabs）所建议的标准步骤来获得E6或E7重组蛋白，并将其纯化使最后浓度为约1mg/L。发现较长的诱导时间和再次流过蛋白质纯化柱产生较高的蛋白质产量，产生高浓度纯化的重组蛋白，产量为约2-10mg/L。以PAGE分析估计GST-E6或His E6蛋白质的纯度＞90％。重组E6或E7融合蛋白被用来检测临床样本中E6或E7抗体的表达，也被用作为多克隆抗血清和单克隆抗体产生的免疫原。

[0098] 克隆和进行免疫试验的基本技术可于“Antibodies：A Laboratory Manual”，Harlow and Lane，Cold Spring Harbor Laboratory，Cold Spring Harbor，N.Y.1989；“Molecular Cloning”，A Laboratory Manual，eds.Sambrook，Fritsch and Maniatis，Cold Spring Harbor Laboratory Press，1989，以及本领域已知的其他书本和手册文章中找到。相关的免疫试验、组织和／或子宫颈细胞之免疫组织化学、以及／或免疫细胞学试验与流式细胞技术与下列专利有交互相关性：美国专利申请序号11/559,366，2006年11月13日提交，名称为“乳头瘤病毒检测方法与其在子宫颈癌之应用”；美国专利申请序号12/082,740，2008年4月14日提交，名称为“HPV检测之蛋白质芯片”；美国专利申请序号61/131,991，2008年9月22日提交，名称为“新型抗HPV单克隆抗体，有效用于HPV相关性子宫颈癌之早期晚期检测、筛选和诊断”；美国专利申请序号12/456,053，2009年6月10日提交，名称为“新型抗HPV蛋白单克隆抗体”；美国专利申请序号12/456,054，2009年6月10日提交，名称为“HPV感染之早期和晚期活体内检测”；美国专利申请序号12/456,055，2009年6月10日提交，名称为“HPV感染之早期和晚期活体内检测”；美国专利申请序号12/456,076，2009年6月10日提交，名称为“HPV感染之早期和晚期检测”；美国专利申请序号61/199,013，2008年11月12日提交，名称为“HPV相关癌症之检测、筛选和诊断”；以及美国专利申请序

号 12/590,747,2009 年 11 月 12 日提交,名称为“HPV 相关癌症之检测、筛选和诊断”。以上交互相关之专利申请内容在此以参照方式将其全体加以合并整合。

[0099] 各项实施方式也提供了各种方法、检测试验、试剂盒、单克隆和多克隆抗体、多肽、重组蛋白和核酸,可用于检测一般 HPV 感染以及不同 HPV 基因型、高危险 HPVs 和低危险 HPVs 的感染。此外,检测 HPV 蛋白表达之试验方法或样本之形式不受限制,并可用于子宫颈组织、子宫颈细胞、子宫颈刮拭、血清、体液等。有用的筛检或诊断试验可为 IHC、ICC、流式细胞技术、结合到珠的抗体、快筛、蛋白质芯片、点墨法、沟槽,以及传统 ELISA 试验。HPV 蛋白可藉由某些实施方式描述之抗体进行检测,该蛋白存在于上皮组织,这在病理学家分级后以 IHC 染色被证实。

[0100] 检测 HPV DNAs、基因组、早期病毒蛋白、晚期病毒蛋白、原致癌蛋白和 / 或来自 HPV 基因型的衣壳蛋白,依据“Antibodies :A Laboratory Manual”, Harlow and Lane, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y. 1989 ;“Molecular Cloning”, A Laboratory Manual, eds. Sambrook, Fritsch and Maniatis, Cold Spring Harbor Laboratory Press,1989 以及其他书本和手册,可藉由各种体外和体内方法以及检测试验被进行,对于 HPV 感染的一般性临床筛选非常有效。

[0101] 以免疫学试验检测 HPV 抗体和 / 或原致癌蛋白,可用于 HPV 感染的早期临床筛检和子宫颈癌的一般诊断。对于变化阶段的 HPV 蛋白和宿主蛋白的比较性检测可以在相同或不同的试验方法中来加以执行。也可应用于检测子宫颈的 HPV 相关性癌症,HPV 感染、癌变前和癌变 HPV 相关上皮细胞病灶诱发上皮发育异常相关之病例,以及具发展中 HPV 相关性子宫颈癌和腺癌风险之病例。本申请所述方法可独立使用,或作为传统细胞学帕氏涂片测试或组织学测式的附属筛选工具,且所得的结果可与后续患者管理相比较。

[0102] 更多详细的实施例。

[0103] 人乳头瘤病毒 (HPV) 感染被认为在子宫颈发育异常和癌症中扮演重要的病理角色。FDA 许可的 HPV DAN 试验有两种,都无法检测诸如病毒基因组转录或翻译的下游事件。虽这些试验可检测 HPV DNA 的存在,它们却无法分辨可自愈 HPV 感染的真正癌前阶段。因此,在临床上,有必要从临床显著疾病中区分出自愈型感染的 HPV 感染个体。此外,临床上也迫切需要对分子诊断辅助物加以辨认,以证实子宫颈细胞学试验的专一性,用于检测高度发育异常和癌症,并且降低子宫颈细胞学试验假阴性结果的风险。HPV E6 和 E7 致癌基因的作用,在了解何种 HPV 的机制有助于癌症的发展上,有很大程度的影响力。这些致癌基因使得在关键细胞周期检查点调控的肿瘤阻抑基因失活。HPV E6 和 E7 分别与 p53 和视网膜母细胞瘤 (RB) 交互作用并将其降解,释放转录因子 E2F 以诱发细胞凋亡的肿瘤阻抑基因。E7 具有多重作用,也刺激细胞周期基因,阻断细胞周期蛋白依赖性激酶抑制剂,并且诱发非整倍体的产生,导致肿瘤发生。在癌前病变中,E6 和 E7 蛋白的表达远高于其在良性组织中,且 HPV E6 和 E7 致癌蛋白表达量的增加显示由 HPV 感染发展成癌前病变。治疗剂被发现可有效阻断 E7 的功能。因此,作为高度 CIN 2/3 的专一性生物标记,检测 E7 致癌蛋白的能力是关键的发展,使从业人员能够 1) 从癌前病变的病灶中鉴别 HPV 感染,2) 在子宫颈组织中辨别高度结构不良细胞和肿瘤细胞,3) 避免良性 HPV 感染的妇女不必要的阴道镜检查和生物检体采样。E6 和 E7 致癌蛋白向来难以进行分离。我们发展出高度专一性抗 HPV E6 或 E7 致癌蛋白的专用抗体。除了子宫颈癌之外,由下生殖道 (肛门、外阴、阴道和阴茎) 以及

某些口腔、头部、颈部和皮肤癌的肿瘤组织中，已可检测出 HPV DNA 的存在。我们已发展出的 E6 和 E7 生物标记预期在多重族群和器官部位中可有效检测与 HPV 感染相关的癌症 / 癌前病变。技术上的挑战即为，在子宫颈细胞学样本中，由于型态上正常与微量不正常的细胞相互混和，使得 HPV 相关致癌蛋白在一般情况下的存在量很低。

[0104] HPV E6 E7 致癌基因是子宫颈癌发病的关键因子，在发育异常细胞和恶性细胞中过度表达。E6 和 E7 基因都具有刺激增生的活性。这些基因和其各自的蛋白质在恶性变形中扮演了重要角色。尽管其联合的功能导致转化活性的增加，它们各自携有自身的致癌基因路径，可独立使人类细胞无限增殖（永生）。因此每一个 E6 和 E7 致癌蛋白在子宫颈癌中都应被视为关键标记物。E6 或 E7 致癌蛋白作为多功能蛋白质，对肿瘤发生必需的多种重要的细胞路径进行去调节作用。致癌的 HPV 类型中 E6 和 E7 致癌蛋白的过度表达，在子宫颈癌中已被认为是非常特异的标记物。因此，组织中 E6 和 E7 致癌蛋白的检测，比检测高危险 HPVs 或其他内源性细胞周期标记物，成为辨识真正癌前病变更直接和具有专一性的测试。然而，目前没人成功发展出抗 -E6 或抗 -E7 抗体，以作为临床诊断上合适的生物标记。

[0105] 目前的 HPV DNA 测试可检测高危险型 HPV 的感染，旦无法辨别良性 HPV 感染与高度癌前病变。其他发展中的生物标记试验，诸如 p16 和 proExC，可检测对 HPV 感染无专一性的内源性细胞标记物。检测致癌基因转录体的 HPV E6E7 mRNA 测试显示出比 Pap 和 HC2 试验增加的专一性，但该试验程序需要昂贵和复杂精密的仪器。此外，mRNA 试验由于其丰度极低，以及 RNA 与生俱来的降解倾向，在例行的临床诊断上可能不适用。原位杂交 (ISH) 可检测组织中的 HPV DNA 或 E7mRNA，但在临床实验室中不被广泛接受。由于 IHC 较 ISH 健全，且致癌蛋白是致癌基因实质上的终产物——其直接作用并加以阻断参与细胞凋亡和不正常细胞增生的 RB 肿瘤阻抑蛋白，HPV E6 E7 致癌蛋白较 E6 E7 mRNA 测试为更好的生物标记。然而，HPV E6 E7 的 IHC 试验在体外诊断尚不可用。迄今，可用的抗 -HPV E6 或 E7 抗体有限。我们所生产的抗 -HPV E6 或 E7 抗体可抗非变性的 HPV E6 或 E7 重组蛋白。利用我们已研发出的专一性抗 -E7 抗体，目标在于发展健全的 IHC 诊断试验平台，用于直接检测 HPV E6 或 E7 蛋白质，作为辨识高度 CIN2/3 的关键因子。我们希冀此平台可扩展成为一健全的 HPV E7 免疫试验方法，便可在细胞学样本上由良性 HPV 感染中辨识癌前病变，藉此判定在筛选进行时，何种医疗介入较为有效。

[0106] 详细实施例 1。

[0107] 某些实施方式涉及抗 HPV 蛋白质的单克隆抗体。在临床样本中，产生对 HPV 蛋白检测具有专一性的抗体，其第一重要的步骤便是获得大量原始构型的纯化 HPV 重组蛋白以作为免疫原。蛋白质纯化过程中不期望的聚集、蛋白质不稳定性、表达程度低，以及纯化蛋白免疫应答低，使得 E6 和 E7 被认为非常难以分离和纯化。我们已经克服了技术上的障碍，制造出非变性且可溶性的 HPV E6 和 E7 重组蛋白。为证实我们所发展出的纯化方法可纯化出与原始形态非常近似的构型并与抗 -HPV 抗体结合，我们使用含有人类 HPV 抗体的 HPV 感染子宫颈样本 (PCR 结果为高危险型 HPV 阳性) 以对纯化的 HPV 重组蛋白进行测试。使用该纯化 E6 和 E7 重组蛋白来检测 HPV 感染的研究确认这些蛋白质会与受 HPV 感染经人体免疫反应而产生的抗 -HPV 抗体结合。这些结果显示，该纯化 HPV 重组蛋白适合作为免疫原以增加抗血清，并在活体中产生可辨识天然 HPV 病毒蛋白的抗体。我们已使用非变性的、可溶性的 E6 和 E7 重组蛋白进行抗原刺激，因此已经产生高专一性的抗 HPV E6 和 E7 致癌蛋白

的专用抗体。

[0108] 初步研究结果支持，可藉由不同的应用：ELISA、蛋白质印迹和子宫颈癌组织的免疫组织化学技术（IHC），使用我们的新型抗 -E6 和抗 -E7 抗体。临床样本的确认结果显示，我们的抗 -E7 单克隆抗体可作为辨认子宫颈组织中高度发育异常的生物标记，且在临床诊断上有进一步开发研究的潜能。

[0109] HPV 重组蛋白可以是任何一种 HPV 病毒蛋白、早期基因和 / 或晚期基因的 HPV 蛋白，包含但不限于 E2、E6、E7、L1、L2，且可来自各种不同 HPV 病毒型。一些实施方式提供了重组蛋白，例如含有 HPV 致癌蛋白的部份序列或全长序列的重组杂合蛋白。例如，由于蛋白质纯化过程中不期望的聚集、蛋白质不稳定、表达水平低以及纯化蛋白免疫应答度低，使得 E6、E7 和 / 或 L1 的全长多肽序列被认为非常难以获得和纯化。例如，许多早期 E6 致癌蛋白含有许多半胱氨酸，因此使得正确的 E6 致癌蛋白拓扑学需要适当的形成许多双硫键。此外，某些免疫学试验使用早期 E6 和 E7 蛋白的小肽，导致试验的专一性和敏感性极低，也因此不适合作为商品化的诊断工具。

[0110] 产生 HPV 重组蛋白作为免疫原以产生抗血清，并筛选来自杂交瘤细胞系的单克隆抗体。克隆和产生各种不同重组蛋白包括由HPV16 E6和HPV18 E6g基因、HPV16 E7和HPV18 E7 基因、HPV16 L1 和 HPV18 L1 基因编码的基因。为了产生具有许多期望构型的最（或相似）原始形式的重组蛋白，由可溶性部分中纯化大肠杆菌所表达的 HPV E6、E7 或 L1 重组蛋白，然后加以浓缩，以 PBS 透析，作为免疫原。经由标准步骤进行小鼠的免疫以及融合，以筛选出与我们 ELISA 筛选标准相符的克隆。每一杂交瘤细胞系在组织培养中成长，且注射至小鼠体内以生产腹水。收集腹水，同型化，由蛋白质 G 柱进行纯化，以进行 HPV 免疫试验。

[0111] 生殖道感染已辨识出超过 40 种的 HPV 病毒型，15 种是来自子宫颈癌的高危险型，其中 HPV 16 型占约 50％，HPV 18 型则占了子宫颈癌病例的 20-25％。然而，由于许多 HPV 感染——包括 HPV 16 和 HPV 18——是可自愈的，检测组织中的 HPV E6 和 E7 致癌蛋白可作为辨识任何 HPV 病毒型的高度发育异常细胞的最直接且健全的试验。我们的目标是获得 HPV E7 专一性单克隆抗体，该抗体具有与癌症发展相关的最高危险 HPV 病毒型反应的能力。我们由 HPV 16 和 18 型（占子宫颈癌病例约 75％）中筛选出具有 HPV 重组蛋白的杂交瘤克隆，以测定出能够由大部分或所有的高危险 HPV 病毒型中检测出相关蛋白质的克隆。此外，我们筛选具有不相关 HPV 蛋白的杂交瘤克隆，以消除与 HPV 结构蛋白非特异性结合的那些克隆。用于杂交瘤筛选的纯化人乳头瘤病毒重组蛋白包含旦不限于 HPV 16 E6 蛋白、HPV 16 E7 蛋白、HPV 16 L1 蛋白、HPV 18 E6 蛋白和 HPV 18 E7 蛋白。将我们的 IHC 结果与来自试验组织的 HPV 基因定型分析进行比较，我们的抗 -E7 抗体可辨认大部分的一般高危险型，包含但不限于HPV 16和HPV 18，且同时也可辨认其他分别与HPV 16（即，31、33、35、52、58 型）和 18（即，45 型）病毒型密切关联的高危险型。

[0112] 某些实施方式涉及解决了发展CIN2/3的E7抗体所面临的三项挑战。第一，临床样本中的 HPV 蛋白质含量极低，使得难以加以分离。第二，许多 HPV 病毒型各自具有其独特的 E7 密码序列。第三，目前仍无法成功的由 HPV 感染的培养细胞系中大量产生和纯化出 HPV 蛋白质作为免疫原以产生抗体。针对合成小肽或变性的重组蛋白所产生的已知抗 -HPV 抗体在受感染的人类细胞中，并不必然会与天然产生的 HPV 病毒蛋白产生反应，故一般不适用于临床诊断。另一项技术挑战是经福尔马林固定和石蜡膜包埋处理后在自然感染的人类

组织中发生的蛋白质构型改变，使得难以用来检测临床相关样本。这些因素解释了一项事实，由变性的重组蛋白或和合成肽所产生的现有抗体对于 IHC 无法作用。此外，已知某些使用 E7 蛋白质小肽的免疫学试验方法产生极低的试验专一性和灵敏性。因此，目前尚无可用的天然形式的 E6 或 E7 蛋白质可纯化作为免疫原，以产生能够在体外诊断中检测临床样本中存在的病毒蛋白的抗 -HPV 抗体。

[0113] 详细的实施例 2- 免疫细胞化学分析 (ICC)

[0114] 某些实施方式涉及免疫试验，包含检测脱落的子宫颈细胞的 HPV 蛋白和细胞蛋白。样本制备 ：将收集自液体溶液中的子宫颈刮拭细胞分成两部分，一部分进行细胞学帕氏染色，另一部分则使用某些实施方式中所描述的 HPV 抗体进行免疫细胞化学染色。在帕氏涂片的结果中，将帕氏染色样本分为 0-17 等级。等级 (1) 到 (3) 视为正常，等级 (4) 及以上则为异常。帕氏涂片检查报告的解读有时会引发争议。基于 Bethesda 2001 系统，帕氏涂片阴性可能包括了阴性上皮内病变或恶性肿瘤，而帕氏涂片异常可能包含发育异常和病变发展的不同阶段的鳞状细胞。例如，LSIL ：低度鳞状细胞上皮内病变、HSIL ：高度鳞状细胞上皮病变、CIN 1 ：子宫颈上皮内赘瘤第一级，轻度细胞异常、CIN 2 ：子宫颈上皮内赘瘤第二级，病灶更具侵略性、CIN 3 ：子宫颈上皮内赘瘤第三级，具侵略性的发育异常。侵袭性癌症可包含鳞状上皮细胞癌 (SCC)、腺癌，以及其他癌症。非典型的异常细胞包括非典型鳞状上皮细胞 (ASC-US) 和非典型腺细胞 (AGUS)，在帕氏涂片中，不寻常或非典型的细胞可能微不足道并使其重要性被忽略。针对鉴定出的异常细胞，HPV 免疫细胞化学染色可提供额外的 HPV 感染状况和 / 或 HPV 致癌蛋白表达的信息。因此，相较于帕氏染色，HPV 免疫细胞化学染色试验用于辨认帕氏 LSIL 或 HSIL 样本中的高度发育异常，和 / 或非典型异常细胞如 ASC-US 或 AGUS 非常有效。

[0115] 使用 ICC 方法作为免疫学试验例子，收集来自子宫颈刮拭的细胞，离心、清洗后，依此处所描述之 ICC 步骤进行免疫染色。依据标准生产流程以液体溶液收集子宫颈刮拭。然后以细胞离心机或 Thin Prep 技术将子宫颈细胞处理成单层薄膜。将玻片上的单层细胞固定，依 HPV 免疫细胞化学试验步骤通过抗 -HPV 抗体染色。于显微镜下可看见被染色的细胞。

[0116] 在某些实施方式中，提供进行 ICC 试验的试剂盒。该试剂盒包含前 - 抗体阻断溶液、后 - 抗体阻断溶液、抗 -HPV 抗体作为初级抗体、结合有 HRP 或生物素的抗 - 小鼠或抗 - 兔子免疫球蛋白、其他作为次级抗体的试剂，和含有作为待被检测次级抗体的底物的适当试的溶液。

[0117] 抗 -HPV 抗体也可直接标记上 HRP 或生物素，或使用适当的试剂作为底物可被检测的其他试剂。前 - 抗体阻断溶液可包含某些蛋白质、BSA、血清或其他试剂，用来阻断初级抗体与细胞产生非特异性结合。后 - 抗体阻断溶液可包含与前 - 抗体阻断溶液相似的溶液，其以较少量的阻断蛋白质或血清与初级抗体一起进行温育。含有 HPV 抗体的溶液可以是浓缩或稀释的形式，作为预备使用的试剂。含有次级抗体的溶液可以是浓缩或稀释的形式，作为预备使用的试剂。含有作为底物的适当试剂的溶液可以包括 DAB(3,3'- 二氨基联苯胺) 作为一种或两种成分，或 AEC(3- 氨基 -9- 乙基咔唑) 底物作为一种或两种成分，或其他底物。

[0118] 来自子宫颈刮拭的人类细胞经过处理和固定在玻片形成单层或薄膜后，进行免疫

细胞化学 (ICC) 试验，用前 - 抗体阻断溶液阻断玻片一段时间，再与 HPV 抗体一起温育。该玻片然后以 PBS 或 H_2O 或其他溶液清洗 3 到 5 次，除去任何未结合的 HPV 抗体。然后将玻片与二级抗体如抗 - 小鼠 IgG HRP 进行温育，接着清洗和结合适当的底物进行检测。作为底物的例子，在过氧化酶和过氧化氢存在下将 DAB 氧化，导致棕色、酒精不溶性沉淀物在酶活性位置沉淀。沉淀物的颜可色由浅金黄棕色到深金黄棕色，这取决于酶的存在量。在显微镜下可见的金黄棕色沉淀，表示 HPV 抗体与细胞内存在的 HPV 蛋白质产生专一性结合。该试验分析可于室温或较高温下进性，以加快结合反应。该 HPV ICC 试验可以手动进行或通过 ICC 自动仪进行操作，因此对于 HPV 感染与子宫颈刮拭中位于原位上皮细胞的 HPV 致癌蛋白，提供了强而有力的筛选与检测工具。

[0119] 为了证实 HPV ICC 试验能够识别不同疾病阶段的发育异常，来自轻度、中度、严重或侵袭性的肿瘤形成的样本都进行测试。这些样本包含但不限于，例如 CIN1、CIN2、CIN3、LSIL、HSIL 或 ASC-US。为了证明本申请所描述的 ICC 试验能够用于对于不同阶段各式液体溶液中的各种样本来源进行染色，也制备溶于不同液体溶液中的不同阶段的样本，以在某些实施方式中进行 ICC 试验。

[0120] 中度发育异常表示子宫颈的皮肤适度的成长，比其应有速度还快，且已发展超过了轻微阶段。子宫颈组织切片显示，不成熟的基底细胞生长途中通过皮肤表面，无明显的成熟。中度发育异常是相当重要的，因为存在更大的风险且挑战将会提升，若不经治疗，将发展成为非侵袭性的子宫颈癌。基于此原因，中度发育异常被称为“高度”病变或 HGSIL。另一针对此状况的同义字为“CIN2”（子宫颈上皮内赘瘤，第二级）。帕氏涂片中度发育异常通常显示进一步的子宫颈阴道镜研究是必要的。若证实为中度发育异常，通常便进行治疗。治疗可包括冷冻治疗、LEEP 或激光。治疗之后，常常获得频繁的帕氏涂片检查作为后续追踪，以确保是否复发（约 10％机率），复发则被及时诊断并作进一步的治疗。

[0121] 为证实 HPV ICC 试验能够检测 HSIL，图 1A 显示子宫颈刮拭细胞经帕氏染色被诊断为 CIN2，将其制备于另一液体溶液中，使用抗 -E7 单克隆抗体进行阳性 ICC 染色。如图 1A 所示，该 CIN2、HSIL 异常细胞处于相互连接的形式，经细胞核与细胞质的阳性染色，具有高 N/C（核 / 质）比值（以黑色箭头显示）。这些结果显示，在 ICC 试验中，通过使用小鼠单克隆抗 -HPV E7 抗体，可原位检测不同来源的液体溶液中的中间肿瘤阶段的异常细胞之 HPV E7 蛋白存在。

[0122] 图 1B 显示另一制备于另一液体溶液中的子宫颈刮拭细胞的 CIN2 样本，使用抗 -E6 单克隆抗体进行 ICC 阳性染色。如图 1B 所示，该 CIN2、HSIL 异常细胞处于相互连接的形式，经细胞核与细胞质的阳性染色，具有高 N/C（核 / 质）比值（以黑色箭头显示）。这些结果显示，使用本发明描述的 ICC 试验方法中的小鼠单克隆抗 -HPV E6 抗体，可原位检测不同来源液体溶液中的异常细胞中间肿瘤阶段存在的 HPV E6 蛋白。

[0123] 若异常细胞通过基底膜而侵入至下层组织，则被认为是癌症。对于严重的发育异常，虽不被认为是癌症但将之视为癌前问题，因为发育异常中的异常细胞没有通过基底膜而侵入。因此，顾名思义，它们并非癌症。原位癌指的是异常细胞扩增至全层的皮肤。这些细胞单独看起来就像癌细胞。原位癌被许多有关当局认为在临床上等同于严重的发育异常或 CIN3，且应加以及时和仔细评估。治疗可包括藉由冷冻消除异常细胞（冷冻治疗）、蒸发（激光），或以通电的金属线圈 (LEEP) 将其刮除。在某些情况下，针对子宫颈锥组织切片的

形式，须要更多广泛的手术方法来解决问题。

[0124] 为证实本发明描述的 ICC 试验方法可用于液体溶液中的严重子宫颈内皮瘤细胞，制备溶于不同液体溶液中的 CIN3 子宫颈刮拭样本，以进行某些实施方式所描述的 ICC 试验。图 2 显示子宫颈刮拭细胞（经帕氏染色诊断为 CIN3）可使用抗 -E6 单克隆抗体进行 ICC 阳性染色。图 3A-3D 显示，使用相同的抗 -E6 小鼠单克隆抗体对另一 CIN3 样本 ICC 染色的结果。如图 3A-3D 所示，该 CIN3、HSIL 异常细胞处于相互连接的形式，经细胞核与细胞质的阳性染色，具有高 N/C（核 / 质）比值（以黑色箭头显示）。这些结果显示，藉由本发明描述的 ICC 试验方法，使用小鼠单克隆抗 -HPV E6 抗体，可原位检测不同来源液体溶液中的异常细胞癌变中间阶段的 HPV E6 蛋白存在。这些结果也显示，在 ICC 试验中，使用小鼠单克隆抗 -E6 抗体，可原位检测液体溶液 CIN3 异常细胞中 HPV E6 蛋白的存在。

[0125] 图 4A 和 4B 显示两幅代表性 ICC 染色图像，将与，使用图 3A-3D 所示相同 CIN3 样本的抗 -HPV E7 小鼠单克隆抗体。图像显示，该 CIN3、HSIL 异常细胞处于相互连接的形式，经细胞核与细胞质的阳性染色，具有高 N/C（核 / 质）比值（以黑色箭头显示）。这些结果显示，在 ICC 试验中，利用小鼠单克隆抗 -HPV E7 抗体，可原位检测不同来源液体溶液中的异常细胞中间肿瘤阶段的 HPV E7 蛋白存在。这些结果显示，藉由本发明描述的 ICC 试验方法，使用小鼠单克隆抗 -HPV E7 抗体，可原位检测液体溶液 CIN3 异常细胞中 HPV E7 蛋白之存在。

[0126] 为了确认 p16 在晚期肿瘤中也过度表达，将与图 3 和图 4 相同的 CIN3 样本，使用抗 -p16 小鼠单克隆抗体进行 ICC 染色。图 5 显示来自相同的 ICN3 样本利用抗 -p16 小鼠单克隆抗体进行 ICC 染色的结果。如图所示，该 CIN3、HSIL 异常细胞处于相互连接的形式，经细胞核与细胞质的阳性染色，具有高 N/C（核 / 质）比值（以黑色箭头显示）。这些结果显示，在中期至晚期肿瘤阶段的异常细胞中，可原位检测到 p16 蛋白的存在。图 2-5 表示的所有这些结果显示，藉由 ICC 试验，使用本发明所描述的小鼠单克隆抗体，可原位检测到来自液体溶液中 CIN3 异常细胞的 HPV E6、HPV E7 和 p16 蛋白的存在。

[0127] 子宫颈癌是最常见的影响生殖器官的癌症形式。它局部侵袭至邻近组织、血管、淋巴管和淋巴结。在其晚期阶段，则难以治疗甚至可能是致命的。在发展成为子宫颈癌之前，通常有一段可逆的癌前变化，称为发育异常。虽然大多数子宫颈癌源自构成外部皮肤的鳞状细胞，仍有偶发的癌症是由生成黏液的细胞所产生，其位于进入子宫的内子宫颈腔道上。此种腺型被称为“腺癌 (ADC)”而非“鳞状细胞癌 (SCC)”。不同于鳞状细胞癌，当腺癌的前体存在时，难以经由帕氏涂片被辨认出来，因此使得腺癌难以被检测出来。子宫颈鳞状细胞异常增生成为鳞状细胞癌的发展缓慢，且不像在腺癌中一致。因此，子宫颈腺癌比鳞状细胞癌经常在更晚期的阶段被检测到。治疗方式则与更常见的鳞状细胞癌相似。然而，由于其通常在较晚期的阶段才被发现，往往需要更积极的治疗。因此，使用某些实施方式描述的 HPV ICC 试验，对液体溶液中的腺癌细胞进行早期筛选，以检测 HPV 致癌蛋白的存在变得极为重要。

[0128] 作为另一例子说明本发明所描述的 ICC 试验可应用于检测液体溶液中的子宫颈癌细胞，将子宫颈刮拭样本的不同肿瘤制备于不同的液体溶液中，以进行某些实施方式所描述的 ICC 试验。作为例子，图 6A 显示，最常见的子宫颈癌类型之一，SCC（经帕氏染色诊断为鳞状细胞癌），可使用抗 -E6 单克隆抗体被 ICC 阳性染色。图 6B 显示使用抗 -HPV E7

小鼠单克隆抗体，对图 6A 所示的相同 SCC 样本进行 ICC 染色的结果。为了确认在晚期肿瘤中 p26 也过量表达，使用抗 -p16 小鼠单克隆抗体，对图 6A 和 6B 中相同的 SCC 样本进行 ICC 染色。图 6C 显示使用抗 -p16 小鼠单克隆抗体，对图 6A 和 6B 所示的相同 SCC 样本进行 ICC 染色的结果。如图 6A-C 所示，HSIL SCC 细胞处于相互连接的形式，经细胞核与细胞质的阳性染色，具有高 N/C（核 / 质）比值（以黑色箭头显示）。这些结果显示，藉由本发明描述的 ICC 试验方法，使用小鼠单克隆抗体，可原位检测液体溶液中不同类型子宫颈癌细胞的异常细胞中 HPV E6、HPV E7 和 p16 蛋白的存在。

[0129] 为表示本发明所描述的 ICC 染色的结果来自于 HPV 抗体和子宫颈刮拭细胞原位存在的 HPV 蛋白的专一性结合，同时还获得来自液体溶液中的正常子宫颈细胞进行 ICC 试验测试。图 7A 显示，经帕氏染色诊断为正常子宫颈刮拭细胞，将其制备于液体溶液中，使用抗 -E6 单克隆抗体以 ICC 阴性染色。相同的样本也使用如图 7B 所示的抗 -HPV E7 单克隆抗体进行 ICC 染色。使用小鼠单克隆抗 -HPV E6 或抗 -HPV E7 抗体的 ICC 试验显示阴性染色结果，因此表示 HPV E6 蛋白和 HPV E7 蛋白都未在正常的子宫颈刮拭细胞中原位存在。因此，该结果显示，某些实施方式所描述的 ICC 试验，是使用本发明所描述的 HPV 专一性抗体来检测 HPV 蛋白质的专一性染色方法。

[0130] 虽然有许多因素，包括免疫系统受损，会导致中度发育异常的发展，但 HPV 感染可能为其中最重要的因素。中度发育异常的发生，并非永久性的特征。它会消退或发展，使其在妇女子宫颈（和帕氏涂片）上一度存在又消失。这结果来自于这一事实，即 HPV 病毒是这些潜伏在子宫颈皮肤细胞内的改变的先决条件。一般针对女性施行的免疫系统检查，在免疫系统失调的时候，HPV 能够再活化细胞机械装置导致更快速的生长。针对发展出显示为中度发育异常的的单一帕氏涂片检查的妇女，大致有三项如下方法可采用 :1) 六个月内重复帕氏涂片检查。帕氏涂片不正常者大部分会转变成自愈性的 HPV 感染，由其是青春期的女性。重复的帕氏涂片检查而无其他治疗，使得许多子宫颈感染得以有时间痊愈，避免了其他更多广泛的介入治疗。另一方面，重复的帕氏涂片检查方法主要缺点在于，大多数的妇女无论如何最终需要进行阴道镜检查，他们已遭受了超乎意料的不同程度的焦虑，但仍无法解决其健康问题。2) 立即阴道镜检查。许多妇女在历经简单的检查发现异常后，往往感到焦虑且未立即加以进行调查。这种方法的主要缺点是，即使妇女帕氏涂片呈假阳性，将会经历适度昂贵的评估过程。3) 观察并治疗（确诊性切除术治疗）。代替阴道镜评估和直接的组织切片，继之以某些形式的治疗数天或数周后，某些医师更喜欢以阴道镜来评估子宫颈，且对于那些适合进行 LEEP 手术者，同时立即进行 LEEP 治疗。然而，对多数的患者而言，这是过度的治疗。

[0131] 关于 ASC（非典型鳞状细胞）的报道，是一种细胞学家用来描述不完全正常的帕氏涂片的方法。然而，他们无法肯定是何种异常或其重要性为何。ASC 帕氏涂片可分为两型 : ASC-US（非典型）和 ASC-H（不能排除高度 SIL）。诊断为 ASC 的妇女中，少数拥有子宫颈高度病变。ASC-US 的妇女中，介于 5％和 17％会存在高度 SIL(CIN2 或 CIN3)。ASC-H 的妇女中，介于 24％和 94％有高度 SIL。因此，ASC 帕氏涂片发展成 HSIL 的可能性不容忽视。任何 ASC 帕氏涂片妇女中，非侵袭性子宫颈癌症的风险约为 0.1％至 0.2％。

[0132] HPV E6 或 E7 免疫细胞化学 (ICC) 试验不仅检测 HPV 感染，也可原位检测 HPV 致癌蛋白。因此，与标准 HPV DNA 测试或帕氏涂片试验相比较，ICC 试验结合各式专一的和一般

的抗 -HPV 抗体，可作为原位检测 HPV 强而有力的工具。

[0133] 表 1 显示使用小鼠抗 -HPV E6 单克隆抗体，对液体溶液中不同的子宫颈刮拭样本 HPV E6 ICC 试验的结果。共有 85 个取自临床转诊病患的样本收集至 ThinPrep。表 1 的结果显示，使用小鼠单克隆抗 -HPV E6 抗体，可藉由免疫细胞化学 (ICC) 试验，对固定于玻片上的单一细胞原位检测到 HPV E6 蛋白。HPV E6 蛋白质的原位存在，可从各种液体溶液中不同阶段的子宫颈刮拭样本中检测出。相同的子宫颈刮拭样本也进行标准帕氏染色，以将 ICC 染色结果结果与帕氏涂片结果进行比较。如表 1 所示，HPV E6 蛋白分别存在于子宫颈刮拭正常、ASC-US、ASC-H、LSIL 和 HSIL 样本中，且阳性率增加。

[0134] 帕氏涂片 HSIL 或 CIN2/3 样本有约 100％的阳性率，而仅 14％的样本被诊断为帕氏染色正常者，使用相同的抗 -HPV E6 抗体经 ICC 试验呈阳性染色结果。对于 ASC 样本，约 33％的 ASC-US 和约 50％的 ASC-H，使用表 1 所示用于 LSIL、HSIL 样本相同的抗 -HPV E6 抗体，得阳性染色结果，这表示这些 ASC-US 或 ASC-H 样本中致癌蛋白的表达接着产生进一步的病情恶化。对于帕氏涂片 ASC-US 和 HPVE6ICC 染色阴性的样本，其发展成为恶化病变的风险较低。这些结果显示，本发明描述的 HPV E6ICC 试验，对于提供 HPV 感染的额外信息用于做出疾病管理决策非常有效。

[0135] 表 1. 使用小鼠抗 -HPV E6 单克隆抗体对液体溶液中的各种子宫颈刮拭样本进行的 ICC 染色。

[0136]

	帕氏试验					
	正常	ASC-US	ASC-H	LSIL	HSIL	SCC
E6 ICC 阳性	4	3	4	11	17	4
E6 ICC 阴性	25	6	4	6	0	1
总和	29	9	8	17	17	5
阳性率	14%	33%	38%	65%	100%	80%

[0137] 表 2 显示表 1 中 ICC 染色结果的概述。如数据显示，该 ICC 染色方法使用某些实施方式描述的抗 -HPV E6 抗体，得到 ICC 试验≥ CIN2 灵敏性为 95％，精确度为 66％。这些数据显示，此试验含有 50％的 PPV（阳性预测值）和 98％的 NPV（阴性预测值），可有效用于帕氏涂片异常的分类病患或普通群体常规性帕氏染色的宫颈癌筛选，检测 HPV 蛋白质。

[0138] 表 2. 使用小鼠单克隆抗 -HPV E6 抗体，对液体溶液中 CIN2 子宫颈刮拭样本 ICC 染色结果的概述。

[0139]

	帕氏 HSIL 阳性	帕氏 HSIL 阴性		
E6 ICC 阳性	21	21	50%	PPV
E6 ICC 阴性	1	41	98%	NPV
灵敏性	95%			
专一性		66%		

[0140] 作为另一 HPV ICC 试验例子，表 3 和表 4 显示使用抗 -HPV E7 抗体的 ICC 染色结果。如数据所示，HPV 抗 -E7 给出与 HPV 抗 -E6 所示相当的 ICC 结果。表 3 显示，HPV E7 蛋白分别存在于子宫颈刮拭正常、ASC-US、ASC-H、LSIL 和 HSIL 样本中，且阳性率增加。帕氏涂片样本确诊为 HSIL 者，有约 94％的阳性率，仅 11％的样本被诊断为帕氏涂片正常者，使用相同的抗 -HPV E7 抗体经 ICC 试验呈阳性染色结果。对于 ASC-US 或 ASC-H 样本，使用与如表 3 所示用于 CIN1、CIN2/3 样本相同的抗 -HPV E7 抗体，有约 40％的这些样本得阳性染色结果，这表示这些 ASC-US 或 ASC-H 样本中的致癌蛋白的表达接着产生进一步的癌症恶化。对于帕氏涂片确诊为 ASC-US 和 ICC 染色（抗 -HPV E7）呈阴性的样本，其发展成为恶化病变的风险较低。

[0141] 表 3. 使用小鼠单克隆抗 -HPV E7 抗体，对液体溶液中各式子宫颈刮拭样本的 ICC 染色结果。

[0142]

	帕氏正常	ASC-US	ASC-H	LSIL	HSIL	SCC
E7 ICC 阳性	3	4	3	11	16	4
E7 ICC 阴性	25	6	5	6	1	1
总和	28	10	8	17	17	5
阳性率	11%	40%	38%	65%	94%	80%

[0143] 表 4 显示表 3 中 ICC 染色结果的概述。如数据显示，使用某些实施方式描述的抗 -HPV E7 抗体的该 ICC 染色方法，对 HSIL+ 得到 ICC 试验灵敏性为 91％，专一性为 67％。这些数据显示，此试验含有 51％的 PPV 阳性预测值和 95％的 NPV 阴性预测值，可有效用于帕氏涂片异常的分类病患或普通群体常规帕氏染色的子宫颈癌筛选，以检测 HPV 蛋白质。

[0144] 表 4. 使用小鼠单克隆抗 -HPV E7 抗体，对液体溶液中子宫颈刮拭≥ CIN2 样本的 ICC 染色结果。

[0145]

	帕氏 HSIL 阳性	帕氏 HSIL 阴性		
E7 ICC 阳性	20	21	51％	PPV
E7 ICC 阴性	2	42	95％	NPV

灵敏性	91%			
专一性		67%		

[0146] 作为另一例子，帕氏细胞学样本的所有 200+ 病例由临床转诊患者获得，并收集至液态 Prep 溶液中。结合帕氏测试和 HPV DNA 测试及相关组织学结果，用于分析 HPV E6E7 致癌蛋白和细胞蛋白的表达。共 177 个 ICC 结果的病例用帕氏试验、HPV DNA 试验和组织学的结果进行分析，对液体溶液中不同阶段的子宫颈刮拭样本，ICC 使用抗 -E6、抗 -E7 和抗 -p16 抗体。作为例子，表 5 显示帕氏试验、HPV DNA 试验和使用 E6、E7 或 p16 抗体进行 ICC 试验的结果的相关性。

[0147] 表 5. ICC 染色结果概述，显示具有不同异常阶段的帕氏涂片样本的 48 个病例与 HPV DNA 试验和使用抗 -HPV 抗体、抗 -p16 抗体的 ICC 试验进行比较。

[0148]

			免疫细胞化学					
帕氏涂片		No cases	E6 +	E6 -	E7 +	E7 -	p16+	p16-
NML	HPV +	16	11	5	4	12	2	14
	HPV -	12	6	6	2	10	1	11
ASC-US	HPV +	5	5	0	3	2	1	4
	HPV -	1	0	1	0	1	0	1
CIN1/2/3	HPV +	13	11	2	6	7	4	9
	HPV -	1	1	0	1	0	0	1

[0149] 由表 5 的数据显示，使用抗 -HPV 抗体进行 ICC 染色，相较于单独使用抗 -p16 进行 ICC，对 HPV DNA 试验阳性率有更佳的相关性。结果显示，HPV ICC 可用于早期检测原位 HPV 蛋白质。针对假阳性样本，例如，帕氏检测正常的 HPV 阳性样本，ICC 可进一步确认 HPV 致癌蛋白的表达。针对假阴性样本，例如，帕氏检测正常的 HPV 阴性样本，ICC 试验却为阳性样本，其需要作进一步确认是否有任何的病变进展。然而，大部分为 HPV DNA 阳性样本的 ASC-US 或 CIN 病例，使用抗 -E6 抗体进行 HPV ICC 试验呈现阳性。与 p16ICC 相较，HPV ICC 与帕氏涂片异常有更好的相关性。

[0150] 表 6，利用帕氏试验作为黄金标准，HPV DNA 试验和 E7 ICC 试验比较。

[0151]

帕氏试验	HPV	No cases	E7 ICC 阳性	E7 ICC 阴性
NML	HPV +	16 (57%)	4 (14%)	12 (43%)
	HPV -	12(43%)	2 (7%)	10 (36%)
ASC-US	HPV +	5(83%)	3 (50%)	2 (33%)
	HPV -	1(17%)	0 (0%)	1 (17%)
LSIL	HPV +	8(100%)	2 (25%)	6 (75%)
	HPV -	0(0%)	0 (0%)	0 (0%)
HSIL	HPV +	5(83%)	4 (67%)	1 (17%)
	HPV -	1(17%)	1 (17%)	0 (0%)

[0152] 为了分析 HPV DNA 和 HPV E6E7 致癌蛋白表达的相关性，作为例子，表 6 进一步表示了 HPV E7 ICC 的阳性率，与表 5 所示 48 个病例的帕氏测试结果中不同分类的 HPV DNA 结果进行比较。如表 6 所示，HPV DNA 测试显示阳性率对帕氏 NML、ASC-US、LSIL 和 HSIL 分别为 57％、83％、100％和 83％，相对于 E7ICC 试验，阳性率则为 21％、51％、25％和 84％。这些数据显示，临床转诊病患的 HPVDNA 试验具有高的阳性率，表示在分类的帕氏异常病患中，HPV DNA 试验并不有效。如数据所示，83％的 ASC-US 为 HPV DNA 阳性，因此仅有 17％的 ASC-US/HPV 阴性病患可免于不必要的阴道镜检查。然而，100％的 LSIL 为 HPV DNA 阳性，表示对于分类的 LSIL 病患，并不建议使用 HPV DNA 检测。然而，仅 50％的 ASC-US 和 25％的 LSIL 呈 E7 阳性。这表示 E7ICC 试验对分类的帕氏异常 ASC-US 和 LSIL 病患是较好的检测方法，可大大避免不必要的阴道镜检查或过度检测。对于 HSIL 族群，HPV DNA 试验和 E7 ICC 试验都有 83％的阳性率。对于 HSIL/HPV DNA 阴性，由于在 E7 ICC 试验中呈阳性，HPV DNA 试验则可能呈假阴性。对于 HSIL/HPV DNA 阳性，但 E7 ICC 阴性，需要更进一步确认是否为真的 HSIL 及组织学 CIN2 等级以上。

[0153] 进一步分析表 6、表 7 和表 8 的 HPV DNA 试验与 E7 ICC 试验的灵敏性与专一性，以帕氏 HSIL 作为切点 (cut off)，分别显示 E7 ICC 试验和 HPV DNA 试验的结果。

[0154] 表 7. 利用帕氏试验作为黄金标准，比较 E7 ICC 和 HPV DNA 试验（来自表 6 中的总共 48 个病例）

[0155]

	帕氏 HSIL 阳性	帕氏 HSIL 阴性		
E7 ICC 阳性	5	11	31％	PPV
E7 ICC 阴性	1	31	97％	NPV
灵敏性	83％			
专一性		74％		

[0156] 表 8. 以 HSIL 作为切点，比较 HPV DNA 试验与帕氏试验的概述（来自表 6 中的总共 48 个病例）

[0157]

	帕氏 HSIL 阳性	帕氏 HSIL 阴性		
HPV 阳性	5	29	15%	PPV
HPV 阴性	1	13	93%	NPV
灵敏性	83%			
专一性		31%		

[0158] 如表 8 数据所示，HPV DNA 方法提供了对≥ CIN2 灵敏性为 83%，专一性为 31%，PPV 为 15%，NPV 为 93%。与表 7 相比较，对相同的病患使用抗 -HPV E7 单克隆抗体进行相同的 ICC 研究，这两种方法有相同的试验灵敏性 (83%)。然而，使用抗 -E7 抗体进行的 ICC 试验表现了较高的精确度 (74%对 31%)，较好的 PPV(31%对 15%)，以及较好的 NPV(97%对 93%)。因此，这些结果显示，相较于 HPV DNA 方法，HPV E7 ICC 试验可作为较好的方法来检测 HPV 蛋白，用于从普通群体常规帕氏涂片染色来筛选子宫颈癌。因此，HPV E6 E7 作为较好的生物标记用于辨认高度发育异常，并对可从医疗介入获利的病患提供有效的疾病管理。

[0159] 为了进一步分析 HPV E7 ICC 数据与组织学结果，作为另一例子，表 9 和表 10 显示了以组织学作为黄金标准的 HPV E7 ICC 染色结果。表 9 显示，HPV E7 蛋白在子宫颈刮拭正常、CIN1、CIN2/3 样本中存在，且阳性率随之增加。帕氏涂片诊断为 CIN2/3 的样本具有约 94%的阳性率，而 23%的样本经诊断组织学结果为 NIL(正常) 者，使用相同抗 -HPV E7 抗体 ICC 染色结果呈阳性。对于 CIN1 样本，有约 40%的这些样本以相同的抗 -HPV E7 呈阳性染色，表示致癌蛋白在这些 CIN1 样本中的表达，且接着发展成进一步的癌症进展。组织学 NIL/CIN1 和 ICC 染色 (抗 -HPV E7) 阴性样本，可能发展成为进行性病变的风险性较低。

[0160] 表 9. 使用小鼠抗 -HPV E7 单克隆抗体的 ICC 染色结果与组织学的比较。由收集至 LiquidPrep 中的临床转诊病患样本获得共 105 个病例。

[0161]

组织学	NIL	CIN1	CIN2	CIN3
HPV E7 ICC 阳性	14	6	11	15
HPV E7 ICC 阴性	48	9	1	1
总病例数	62	15	12	16
阳性率	23%	40%	92%	94%

[0162] 表 10 表是来自表 9 的 ICC 染色结果的概述。如数据所示，ICC 染色方法使用某些实施方式所描述的抗 -HPV E7 抗体，提供了对于≥ CIN2 样本 ICC 试验 93%的灵敏性和 74%的专一性。这些数据显示，此试验 PPV 为 57%，NPV 为 97%，可有效用于检测 HPV 蛋白质，用于从普通群体常规帕氏涂片染色来筛选子宫颈癌。

[0163] 表 10。使用小鼠单克隆抗 -HPV E7 抗体，对液体溶液中子宫颈刮拭样本进行 ICC

染色的结果概述。

[0164]

	CIN ≥ 2	CIN ≤ 1		
HPV E7 ICC 阳性	26	20	57%	PPV
HPV E7 ICC 阴性	2	57	97%	NPV
灵敏性	93%			
专一性		74%		

[0165] 为了测试某些实施方式所描述的 ICC 试验是否适于检测早期的子宫颈癌筛选，使用帕氏涂片正常样本将 HPV ICC 试验与 HPV DNA 试验进行比较。如表 11 所示，所有受测试的帕氏涂片正常样本（44 个样本中的 44 个），使用抗 -HPV 抗体呈阴性染色。这些数据显示，某些实施方式所描述的 ICC 染色试验是非常专一的。对相同的样本进行 HPV DNA 试验的结果比较，16%（44 个样本中有 7 个）的帕氏涂片正常样本在 HPV DNA 试验呈阳性。本研究使用的高度 HPV DNA 试验为 HC2，是 FDA 批准的唯一 HPV DNA 试验。对于其中 7 个 HPV DNA 阳性但帕氏涂片正常以及 HPV ICC 阴性的样本，可能为 HPV DNA 试验的假阳性，或事实上 HPV 感染可检测到 DNA，但却无 HPV 致癌蛋白质的表达。这些数据显示，本发明描述的 HPV ICC 试验相较于 HPV DNA 试验，提供较好的阳性预测值。因此，该 HPV ICC 试验对于子宫颈癌的诊断提供较好的临床相关性。

[0166] 表 11. 帕氏正常样本中利用各种抗 -HPV 抗体的 ICC 染色与 HPV DNA 测试（HC2）的比较，以帕氏试验作为黄金标准。来自一般群体筛选的共 44 个正常帕氏涂片的病例。样本收集于 Liquid Prep 溶液中。

[0167]

帕氏涂片正常	HPV ICC 阳性	HPV ICC 阴性
高度 HPV DNA 阳性	0	7
高度 HPV DNA 阴性	0	37

[0168] 详细实施例 3- 免疫组织化学试验（IHC）

[0169] 某些实施方式涉及筛选人类个体乳头瘤病毒感染的方法，包括提供含有一种或多种来自人类个体临床组织样本的组织细胞的薄片，将该薄片铺于玻片上，对含有临床组织样本薄片的玻片进行一或多项免疫组织化学试验，使用针对一种或多种纯化的重组乳头瘤病毒蛋白产生的一种或多种抗体，对人类细胞薄层进行染色，其中所述至少有一种抗体能够辨识乳头瘤病毒的早期蛋白，并原位检测来自玻片上临床组织样本薄片中存在的一种或多种乳头瘤病毒型的一种或多种蛋白质。

[0170] 样本制备：将石蜡组织块切分为 4 微米，放置于玻片上于 60℃烘烤过夜。脱蜡 / 水合切片在除膜后进行 IHC 染色标准步骤。纯化的单克隆抗 HPV 蛋白抗体经稀释后作为一级抗体。以二级抗体溶液进行染色步骤，以适当的底物试剂对每一切片进行清洗。一旦该

切片形成后，将玻片浸于 dH_2O 中，以苏木紫复染，脱水并覆上盖玻片。子宫颈组织含有，例如，LSIL：低度鳞状上皮内细胞病变、HSIL：高度鳞状上皮内细胞病变、CIN 1：子宫颈上皮内赘瘤，中度细胞异常、CIN2：子宫颈上皮内赘瘤，病变更具侵略性、CIN3：子宫颈上皮内赘瘤，含有侵略形态的发育异常。侵袭性癌症如鳞状细胞癌（SCC）和腺癌（ADC）。对于发育异常细胞的辨识，HPV IHC 染色可对 HPV 感染状态和／或 HPV 致癌蛋白的表达提供额外的信息。因此，HPV IHC 染色试验可作非常有效的确认性测试。此外，不同子宫颈发育异常阶段的 HPV E6 和 E7 致癌蛋白的过度表达可能表示 CIN 和／或子宫颈癌发展的进展。

[0171] 组织一旦经处理和固定后，通过用抗原修复缓冲液煮沸玻片上的组织一段时间来进行免疫组织化学（IHC）试验。然后将玻片冷却至室温，用前－抗体阻断溶液阻断一段时间，再与 HPV 抗体进行温育。将玻片以 PBS 或 H_2O 或其他溶液清洗 3 到 5 次，以除去任何未结合的 HPV 抗体。将玻片与二级抗体一起温育，例如，抗－小鼠 IgG HRP，继以适当的底物以进行检测。作为例子，在过氧化酶和过氧化氢存在下将 DAB 氧化，在酶活性位置产生棕色、酒精不溶性沉淀物的沉淀。沉淀物的颜色由浅金黄到深金黄棕色，这取决于酶的存在量。在显微镜下可见的金黄棕色沉淀物，表示 HPV 抗体与细胞内存在的 HPV 蛋白质产生专一性结合。该试验分析可于室温或较高温下进性，以加快结合反应。该 HPV IHC 试验可以手动进行或通过 ICC 自动仪进行操作，因此提供了在子宫颈组织上皮细胞中检测 HPV 感染与 HPV 致癌蛋白原位定位的强有力工具。

[0172] 一些实施例子涉及 IHC 试验，包含检测子宫颈组织中的 HPV E6、E7 和 p16 蛋白。一例子步骤用来说明免疫组织化学（IHC）染色试验：A）组织阵列制备：由石蜡包埋的组织块切割成组织切片。每一组织微阵列含有 22 个子宫颈鳞状细胞癌或腺癌样本，以及 3 个正常上皮细胞作为负控制。收集 87 个石蜡包埋块核心并切分为 4 微米的组织切片。每一组织微阵列含有 3 重复的芯片，总共 26 个子宫颈鳞状细胞癌或腺癌样本，以及 3 重复的芯片，总共 3 个正常样本作为负控制。总共 220 个病例排列于共 9 个玻片上。B）免疫组织化学方法：9 个组织微阵列共 220 个子宫颈癌组织的病例，以 E6、E7 和 p16 IHC 进行测试。产生具有全长 HPV 病毒型 16 E6、E7 和 HPV 病毒型 18E6、E7 的重组蛋白，并纯化以免疫兔子和小鼠，用于某些实施方式所描述的多克隆抗体和单克隆抗体产生。使这类抗体和克隆 E6H4 至 $p16^{INK4a}$ 人类蛋白，发展 IHC 方案以染色组织微阵列。研究包含来自每一肿瘤个体的 3 个样本。为解释结果，对于 E6 和 E7 蛋白，若所给定的样本中至少有 10％肿瘤细胞被染色，且强度分为 1、2 或 3 等级；则指定为样本具有阳性 E6/E7 表达。对于 $p16^{INK4a}$，若样本呈现连续细胞染色（也即，扩散染色形态），指定为“阳性”类别，若样本呈阴性染色反应或呈分隔的细胞或小细胞团块染色（也即，局部染色形态），则为指定“阴性”类别。C）DNA 分型：每一病例的 HPV DNA 分型通过 PCR SPF10-LiPA 25 进行辨别（ver.1：Labo Biomedical Pdts.，Rijswijk，The Netherlands 制造），一种检测 25 种高和低风险 HPV 病毒型的反杂交技术。该试验在 HPV 实验室中进行（Catalan Institute of Oncology，Barcelona，Spain）。

[0173] 作为一例子，图 8A-8B 显示 IHC 图像，使用抗 -E6 抗体于子宫颈癌组织和其相邻的正常组织。图 8C-8D 显示 IHC 图像，使用抗 -E7 抗体于子宫颈癌组织和其相邻的正常组织。结果显示子宫颈癌样本呈阳性染色，邻近正常组织则呈阴性染色。作为另一例子，图 9 显示不同放大程度的子宫颈癌样本的 IHC 图像。图 9A-C，以抗 -E6 抗体进行 IHC：阳性 10x（A）、阳性 20x（B）、阴性 20x（C）。图 9D-F，以抗 -E7 抗体进行 IHC：阳性 10x（D）、阳性 20x（E）、阳

性 40x(F)。图 9G-I，以 $p16^{INK4a}$抗体进行 IHC：阳性 10x(G)、阳性 20x(H)、阴性 20x(I)。

[0174] IHC 染色的结果由执业病理医师评分以给予 0-3 等级的强度和肿瘤细胞被染色的百分比。为解释结果，阳性结果被指定为样本中存在 E6/E7，至少 10％的肿瘤细胞被染色且强度等级为 1、2 或 3。对于 $p16^{INK4a}$，若样本呈现连续细胞染色（也即，扩散染色形态），指定为“阳性”等级，若样本呈阴性染色反应或呈分隔的细胞或小细胞团块染色（也即，局部染色形态），则指定为“阴性”等级。分析数据以获得试验的灵敏性和专一性，与 PCR 和 p16 IHC 染色进行比较。同时分析统计上的显著性。

[0175] 表 12 显示使用抗 -E6、E7 和 p16 抗体进行 IHC 试验的灵敏性。结果显示，使用抗 -E6 抗体 HPV IHC 试验灵敏性为约 92.1％（203 个样本中有 187 个）。使用抗 -E7 抗体 HPV IHC 试验灵敏性为约 76.2％（202 个样本中有 154 个）。使用抗 -p16 抗体 HPV IHC 试验灵敏性为约 91.3％（208 个样本中有 190 个）。

[0176] 表 12. 使用单一标记的 IHC 试验结果的概述。

[0177]

	抗-E6(Nº 病例)	抗- E7 (Nº 病例)	$p16^{INK4a}$(Nº 病例)
阳性	187	154	190
阴性	16	48	18
总和 1	203	202	208
灵敏性	92.1% (187/203)	76.2% (154/202)	91.3% (190/208)
专一性	100%	100%	100%

[0178] E6、E7 和 p16 蛋白表达的相关性显示于表 13-15。在表 13 中，共 203 个样本以 E6 或 p16 通过 IHC 试验进行分析。187 个 IHC E6 阳性样本中，170 个样本在 p16 IHC 试验呈阳性。16 个 IHC E6 阴性样本中，15 个样本在 p16 IHC 试验呈阳性。185 个 IHC p16 阳性样本中，170 个样本在 E6 IHC 试验呈阳性。18 个 IHC p16 阴性样本中，17 个样本在 E6 IHC 试验呈阳性。仅有一个样本在 E6IHC 和 p16 IHC 都呈阴性。因此，结合 p16 和 E6 IHC 试验，可得 99.5％试验灵敏性（203 个样本中 202 个呈 p16 或 E6 IHC 阳性，表 5）

[0179] 表 13. E6 和 p16 蛋白表达的 IHC 试验结果的相关性。

[0180]

	E6 阳性	E6 阴性	总和
p16 阳性	170	15	185
p16 阴性	17	1	18
	187	16	203

[0181] 在表 14 中，共 202 个样本以 E6 或 E7 通过 IHC 试验进行分析。186 个 IHC E6 阳性样本中，153 个样本在 E7 IHC 试验呈阳性。16 个 IHC E6 阴性样本中，1 个样本在 E7 IHC 试验呈阳性。154 个 IHC E7 阳性样本中，153 个样本在 E6 IHC 试验呈阳性。48 个 IHC E7 阴性样本中，33 个样本在 E6 IHC 试验呈阳性。共有 15 个样本在 E6 IHC 和 E7 IHC 都呈阴性。因此，结合 E6 和 E7 IHC 试验，可得 92.5％试验灵敏性（202 个样本中 187 个呈 E6 或 E7 阳

性，表 5)

[0182] 表 14. E6 和 E7 蛋白表达的 IHC 试验结果相关性。

[0183]

	E6 阳性	E6 阴性	总和
E7 阳性	153	1	154
E7 阴性	33	15	48
	186	16	202

[0184] 在表 15 中，共 202 个样本以 E7 或 p16 通过 IHC 试验进行分析。154 个 IHC E7 阳性样本中，142 个样本在 p16 IHC 试验呈阳性。48 个 IHC E7 阴性样本中，42 个样本在 p16 IHC 试验呈阳性。184 个 IHC p16 阳性样本中，142 个样本在 E7 IHC 试验呈阳性。18 个 IHC p16 阴性样本中，12 个样本在 E7 IHC 试验呈阳性。共有 6 个样本在 E7 IHC 和 p16 IHC 都呈阴性。结合 E7 和 p16 IHC 试验，可得 97.0％试验灵敏性 (202 个样本中 196 个呈 p16 或 E7 IHC 阳性，表 5)

[0185] 表 15. E7 和 p16 蛋白表达的 IHC 试验结果的相关性。

[0186]

	E7 阳性	E7 阴性	总和
p16 阳性	142	42	184
p16 阴性	12	6	18
	154	48	202

[0187] 在子宫颈癌肿瘤细胞中表达的 HPV E6 和 E7 致癌蛋白，以专一的抗 -E6 和抗 -E7 抗体进行 IHC 试验，可在大部份的样本中被检测到。这些结果强化了病原学，以及 HPV 致癌蛋白的分子机转在多数子宫颈癌病例中起作用。研究结果进一步显示，藉由丧失调节性的病毒 E6 和 E7 致癌蛋白的表达，可分别使 p53 和 pRb 蛋白的功能失活，造成 $p16^{INK4a}$的过度表达。在此研究中，如表 12 所示，E6 抗体的灵敏性 (92％) 与 $p16^{INK4a}$抗体的灵敏性 (91％) 相当。虽然 E7 抗体的灵敏性相对较低 (76％)，试验可再进一步地优化。样本 IHC 试验的结果显示，于子宫颈癌中 HPV E6/E7 致癌蛋白和 p16 细胞蛋白的表达并不一致，这可能在病例个体中，有许多不同路径涉及癌症的发展。因此，HPV 致癌蛋白和细胞蛋白在癌症形成上都扮演重要角色，可作为诊断 HPV 相关性癌症的生物标记。研究不同 HPV 相关性癌症中的更多的生物标记将有助于提供个人化的医疗介入。

[0188] 虽 p16 在现今实验中是被采纳的标记，但不是对于所有的病例试验都是完美的。表 13 显示，在 18 个 p16 IHC 阴性样本中，17 个样本以抗 -E6 抗体进行 IHC 呈阳性。表 15 显示，在 18 个 p16 IHC 阴性样本中，12 个样本以抗 -E7 抗体进行 IHC 呈阳性。因此，如表 16 所示，使用结合标记 p16+E6 的 IHC 试验提供 99.5％的试验灵敏性，相较于单独使用 p16，灵敏性为 91.3％。使用结合标记 p16+E7 的 IHC 试验提供 97.0％的试验灵敏性，相较于单

独使用 p16，灵敏性为 91.3%。在两案例中，使用组合的标记和细胞蛋白诸如 p16 以及致癌蛋白诸如 E6 或 E7 进行 IHC 试验，增加了检测子宫颈癌的试验灵敏性。

[0189] 表 16. 使用单一或组合标记 I 的 HC 试验的灵敏性概述。

[0190]

IHC 试验种类	样本数	阳性样本数	灵敏性
E6	203	187	92.1%
E7	202	154	76.2%
p16	208	190	91.3%
E6+p16	203	202	99.5%
E6+E7	202	187	92.5%
E7+p16	202	196	97.0%
E6+E7+p16	202	201	99.5%

[0191] 与使用 E6 或 p16 相比较，使用单一标记 E7 的 IHC 试验提供了相对较低的灵敏性 76.2%，如表 5 所示。使用组合标记的试验可增加灵敏性。由表 15 和表 16 综合结果显示，48 个 E7 IHC 阴性样本中，有 33 个样本为 E6 IHC 阳性（表 15）；48 个 E7 IHC 阴性样本中，有 42 个样本为 p16 IHC 阳性（表 16）。此外，这些样本中有 28 个都为 E6 和 p16 阳性（数据未显示）。剩下的 47 个 E7 IHC 阴性病例为 E6IHC 阳性或 p16 IHC 阳性，仅有一个样本是 E6、E7 或 p16 IHC 阴性。因此，如表 16 所示，虽然 E7 IHC 的灵敏性相对较低仅为 76.2%，当使用组合标记 E6+E7 时，灵敏性可提升至 92.5%；使用 E7+p16 组合标记时，则可提升至 97.0%；此外，若所有三种标记都使用，IHC 试验的灵敏性可更进一步提升至 99.5%。任一案例中的 IHC 试验，使用含细胞蛋白如 p16 或其他致癌蛋白如 E6 或 E7 的组合标记，都使试验灵敏性增加。

[0192] IHC 试验使用单一 E6 标记，灵敏性为 92.1%，如表 16 所示。使用组合标记的试验显示灵敏性增加。表 13 显示，在 E6IHC 阴性的 16 个样本中，有 15 个样本使用抗 -p16 抗体进行 IHC 试验呈阳性。表 3 显示，在 16 个 E6 IHC 阴性样本中，有一个样本使用抗 -E7 抗体进行 IHC 试验呈阳性。因此，如表 16 所示，使用 E6+p16 组合标记进行 IHC 试验得到 99.5% 的试验灵敏性，相较于单独使用 E6，灵敏性为 92.1%；使用 E6+E7 组合标记进行 IHC 试验得到 92.5%的试验灵敏性，相较于单独使用 E6，灵敏性为 92.1%。任一案例中的 IHC 试验，使用含细胞蛋白如 p16 或某些其他致癌蛋白如 E6 或 E7 的组合标记，都使试验灵敏性增加。

[0193] 这些数据表明，为了检测 99.5%（接近 100%）的子宫颈癌，须使用一种以上的生物标记。

[0194] 表 17 显示 HPV DNA 分型方法和 E6 IHC 方法结果的比较。共测试 202 个样本。在 163 个样本中，有 162 个阳性，1 个阴性，显示 E6 IHC 和 HPV DNA 试验方法结果一致 (81%，163/202)。92% (162/177) 的 HPV DNA 阳性为 E6 IHC 阳性。87% (162/186) 的 E6 IHC 阳

性为 HPV DNA 阳性。186 个病例为 E6 IHC 阳性，仅 177 个病例为 HPV DNA 分型阳性。在子宫颈组织检查切片中，相较于 HPV DNA 分型方法灵敏性（87.6%，202 个样本中有 177 个），E6 IHC 方法因此提供了较好的试验灵敏性 92%（202 个样本中有 186 个）。于 16 个 E6 IHC 阴性样本中，有 15 个样本为 HPV DNA 分型阳性。HPV DNA 分型阴性的 25 个样本中，有 24 个样本为 E6 IHC 阳性。202 个测试样本中，仅剩下 1 个样本都为 E6 IHC 和 HPVDNA 分型阴性。因此，当同时结合 E6 IHC 和 HPV DNA 方法时，试验灵敏性可提升至 99.5%（201/202）。该结果显示，对于单一标记，E6 IHC 是优异的，提供简单、有效和较高的灵敏性（E6 IHC 92% 对 HPV DNA 87.6%）。结合此两种方法则可进一步增加试验灵敏性至 99.5%。

[0195] 表 17. HPV DNA 分型和 E6 IHC 方法的比较。

[0196]

E6，IHC	HPV DNA 分型		N° 总和
	阳性	阴性	
阳性	162	24	186
阴性	15	1	16
N° 总和	177	25	202

[0197] 本研究中的所有病例都是经组织学鉴定为子宫颈癌的病例。表 18 显示 177 个 HPV DNA 子宫颈癌病例中的癌症类型分布。84%（149/177）的病例为鳞状细胞癌、11%（20/177）为腺癌、3.4%（6/177）为腺鳞状癌，和 1.1%（2/177）为其他癌症类型。E6 过度表达（E6+）的样本中，92.6%（138/149）鳞状细胞癌、80%（16/20）腺癌，和 100%（6/6）的腺鳞状癌是 E6 IHC 阳性。

[0198] 表 18. E6 IHC 和 HPV DNA 受试样本的癌症表征（组织学诊断）。

[0199]

	鳞状细胞癌		腺癌		腺鳞状癌		其他		总和
E6+/HPV DNA+	138	92.6%	16	80%	6	100%	2	100%	162
E6-/HPV DNA+	11	7.4%	4	20%	0	0	0	0	15
总和	149	100%	20	100%	6	100%	2	100%	177

[0200] 概述：子宫颈癌肿瘤细胞中表达的 HPV E6 和 E7 致癌蛋白可在大部份样本中利用专一性抗 -E6 和抗 -E7 抗体藉由 IHC 试验检测到。这些结果强化了病原学以及 HPV 致癌蛋白的分子机制在多数子宫颈癌病例中起作用。研究结果进一步显示，藉由丧失调节性的病毒 E6 和 E7 致癌蛋白表达可分别使 p53 和 pRb 蛋白的功能失活，造成 $p16^{INK4a}$的过度表达。在本研究中，E6 抗体的灵敏性（92%）近似于 $p16^{INK4a}$抗体的灵敏性（91%）。然而，结合的 E6 和 p16 IHC 试验则可进一步提升灵敏性至 99.5%。

[0201] 与子宫颈癌组织的 HPV DNA 分型方法相比较，E6 IHC 试验更好，提供较高的灵敏性和简单而广泛的试验。结合的 IHC 和 HPV DNA 分型方法，可进一步将试验灵敏性提升至 99.5%。对于子宫颈癌样本中 HPV E6/E7 致癌蛋白和 p16 细胞蛋白的表达并不一致，可能

在病例个体中，有许多不同路径涉及癌症的发展。数据显示，相较于使用单一标记物 E6 或 p16，多重标记物（也即，结合的 E6 和 p16IHC 试验）有助于获得较高的子宫颈癌灵敏性。

[0202] 在高度 CIN 病变中，E6 和 E7 强烈表达于宿主的基底上皮细胞中，且大大地干扰这些宿主细胞复制能力的细胞周期控制。HPV 致癌蛋白的表达干扰了宿主细胞 G1-S 期的调控。HPV E6 和 E7 蛋白攻击许多细胞交互作用，例如 E7 使 pRB 失活，E6 则使 p53 降解。高水平的 HPV E7 蛋白使 pRB 失活，并导致 E2F-Rb 结合受到中断。通常，pRB 结合至 E2F 阻断 E2F 驱动的细胞周期活化。在复制的细胞中，E2F 受 RB 磷酸化的调节。RB 的磷酸化通常由细胞周期蛋白依赖性激酶 (CDK4、CDK6) 所介导，其由数种激酶抑制剂 (INKs) 所控制。

[0203] 作为 Rb/E2F 阻抑作用的丧失以及游离 E2F 的强烈活化的结果，宿主细胞蛋白质 $p16^{INK4a}$被强烈地过度表达。此外，由于 $p16^{INK4a}$介导的 Cdk4/6 的阻抑作用对 pRB 宿主蛋白并无下游效应产生，S 期的基因便持续地被活化。由于 E7 依赖的 E2F 的释放并不由 pRB 磷酸化所介导，$p16^{INK4a}$表达的反调节作用对活化的细胞周期的并无影响。在生理学条件下，当细胞遭受基因组压力形势，例如老化组织中端粒长度的大幅缩短，$p16^{INK4a}$便会表达。同时，HPV E6 介导 p53 的降解，使得细胞凋亡终止。细胞周期蛋白依赖性激酶 (CDK) 抑制剂 $p16^{INK4a}$的过度表达是丧失调节的 HPV 致癌基因表达的直接结果。

[0204] 此外，宿主细胞蛋白对增生是重要的，且宿主细胞基因组的复制可能因 HPV 感染而过度表达。这些宿主细胞蛋白包含旦不限于 ki67(MIB-1)、MYC 细胞致癌基因、细胞周期蛋白（例如细胞周期蛋白 A、B、E 等）、CDKN2A/p16INK4a、端粒酶（例如 TERC)、复制复合蛋白（例如 MCM5、CDC6、拓朴异构酶 IIα (TOP2A)、MCM2、微染色体维持蛋白 2、4 和 5 等）。

[0205] 因此，检测 HPV 蛋白，例如 E6、E7、L1 等或其 HPV 感染的免疫反应的免疫试验，可藉由高通量 ELISA 筛选试验、快速免疫学筛选试验和其他多重蛋白质芯片试验方法等及其组合等加以进行。本发明实施方式提供各种 HPV 蛋白的单克隆和多克隆抗体，可使用于一种或多种试验中，包括发展出的抗体、抗原或免疫复合试验，以检测早期基因（例如 E6 和 E7) 和晚期基因（例如 L1) 编码的 HPV 病毒蛋白。此外，发展出的抗体、抗原或 E6、E7、L1 蛋白的免疫复合试验及其抗体为一种形式，例如，微孔板形式，可适用于单步骤的免疫层析试验，用于直接测量 HPV 感染所诱发的 E6、E7、L1 蛋白或抗体。本发明所提供的一项或多项免疫试验目标在于提供用户友好型程序以简单仪器或无需额外仪器在短时间内执行。将多种免疫学试验的结果与伴随细胞学和组织学人类对象数据的核酸杂交试验以及人口学信息相互比较，用于验证 HPV 感染和 / 或子宫颈癌诊断的相关性和正确性。

[0206] 发育异常细胞的早期诊断对子宫颈癌的成功预防和治疗是重要的。预防子宫颈癌的策略需要改善 HPV 试验 / 筛选以涵盖大范围的全球族群，并密切追踪这些具有过去或现在 HPV 感染和 / 或癌前病变的对象。重要的是，目前已知妇女在发展成侵袭性癌症的前，须遭受 12-15 年的 HPV 感染。因此，重要的是能够测定本文所述的高度发育异常或癌前细胞的 HPV 相关性生物标记以在早期阶段的癌前筛选妇女，并找出潜在的高度 CIN，这将有益于医疗介入和预防子宫颈癌发展，而非在诊断为晚期时依赖化学治疗或放射来治疗癌症的恶性肿瘤。

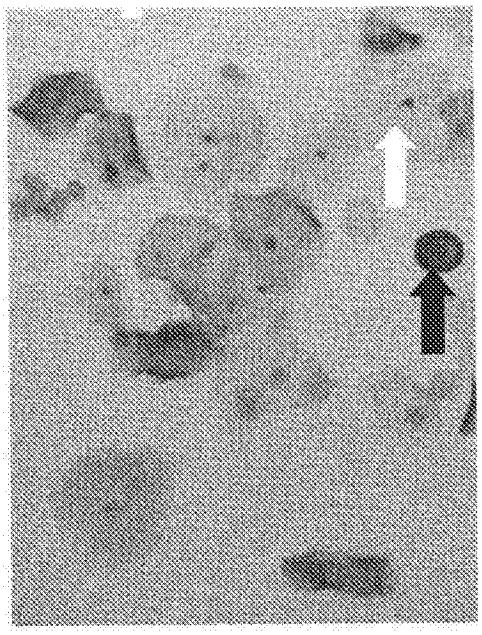

图 1A

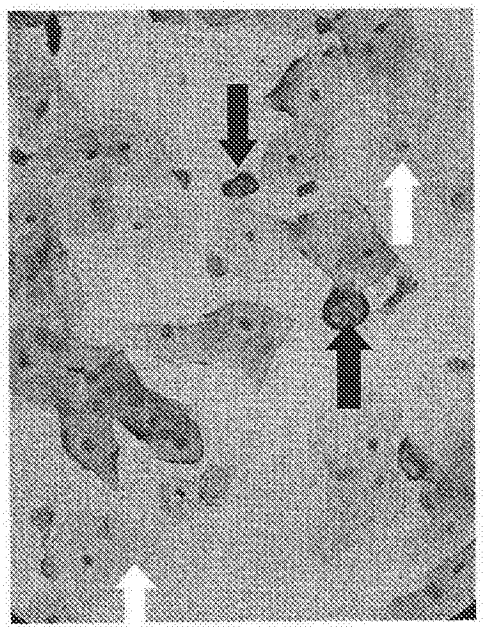

图 1B

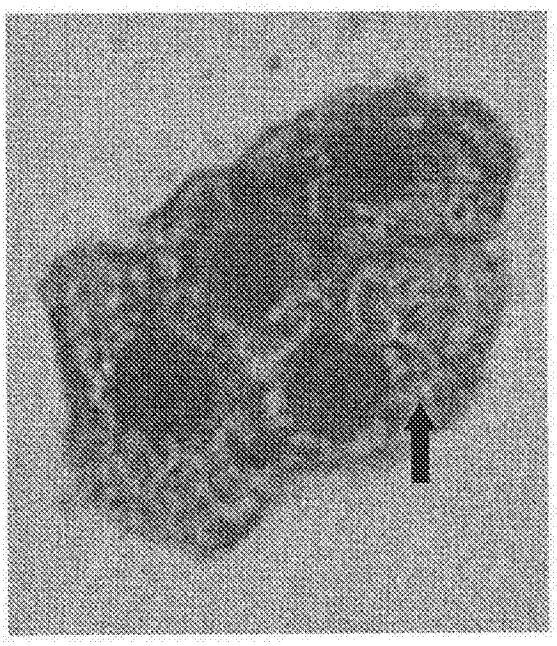

图 2

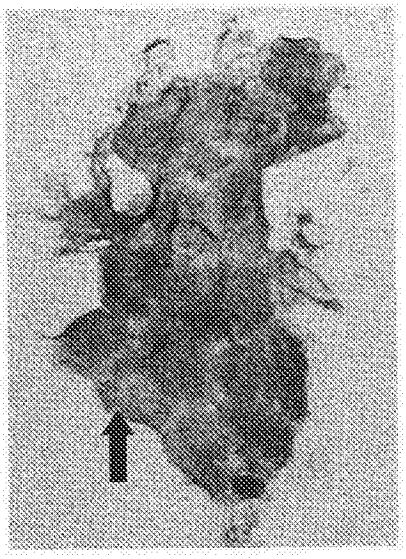

图 3A

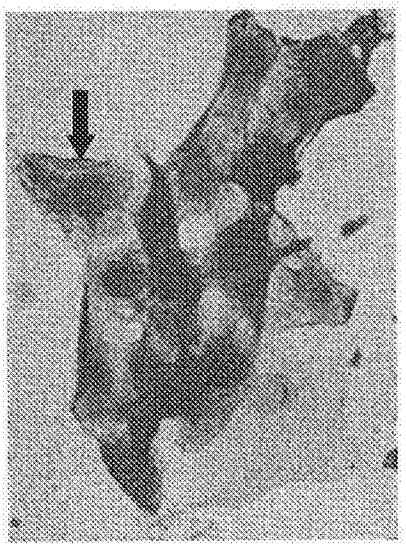

图 3B

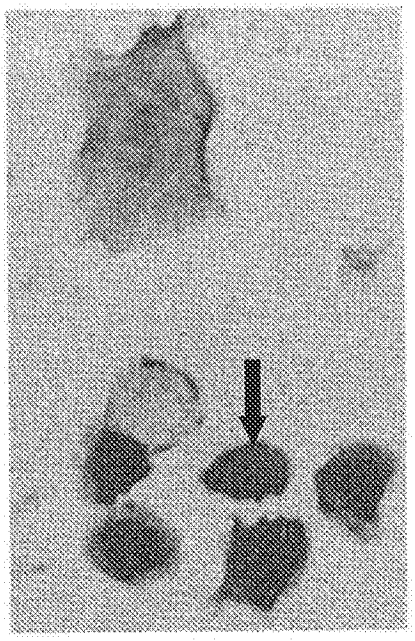

图 3C

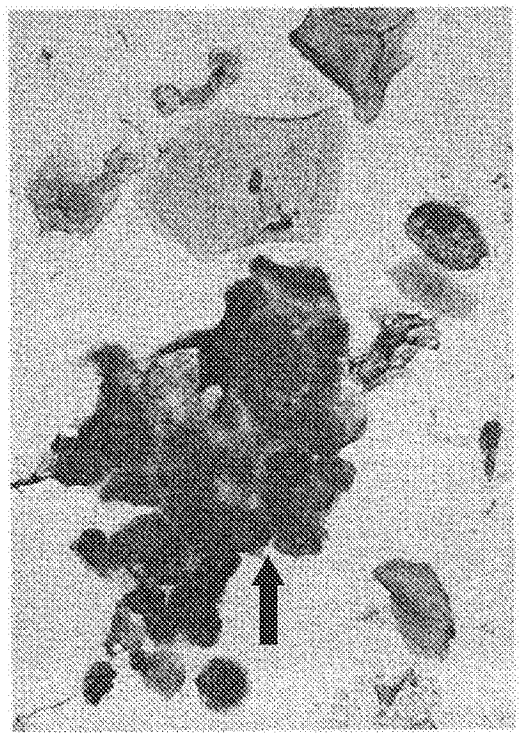

图 3D

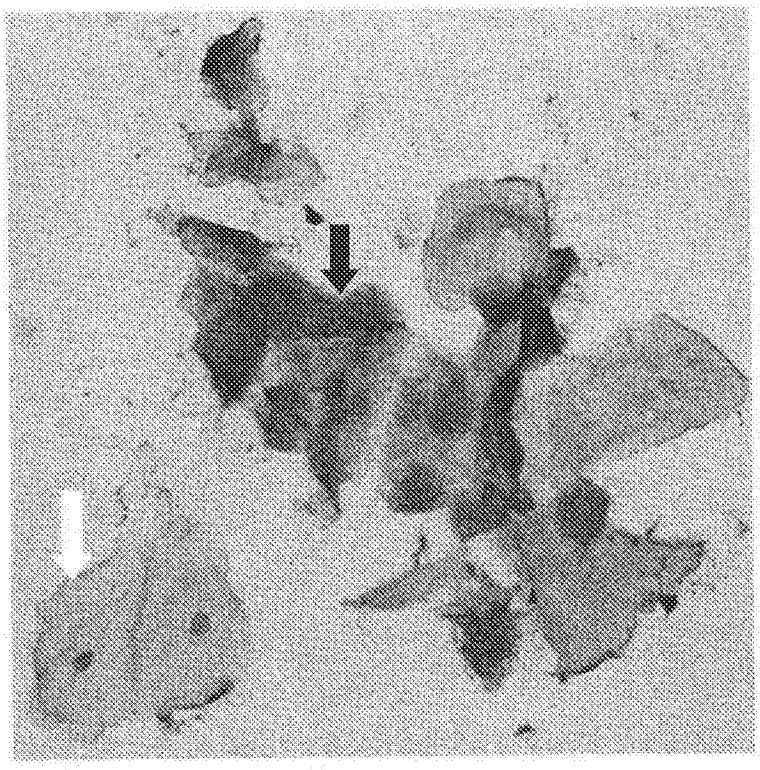

图 4A

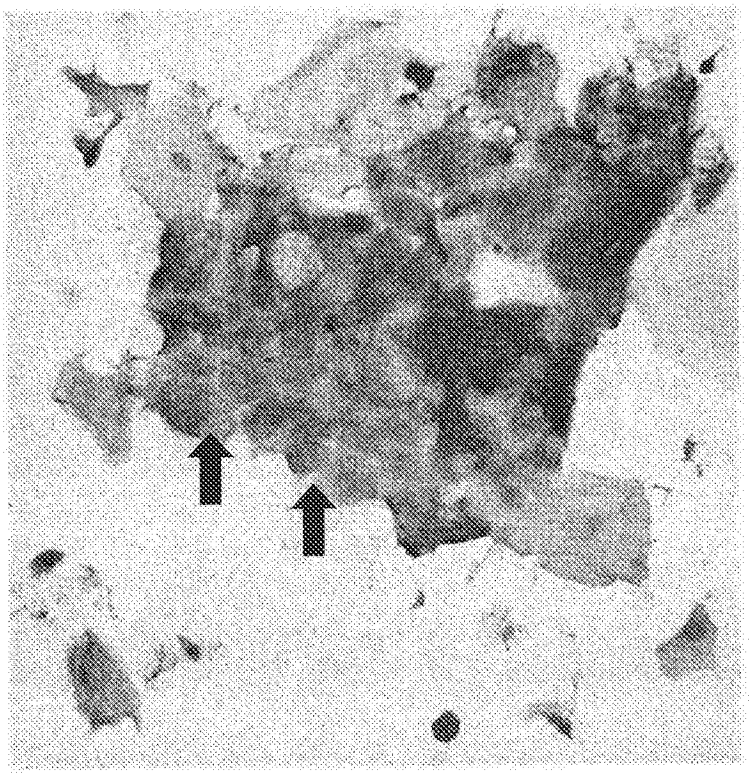

图 4B

图 5

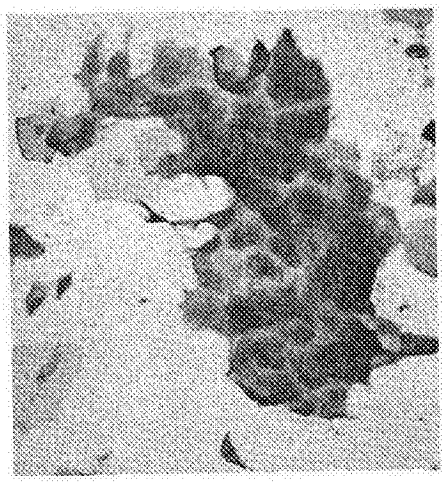

图 6A

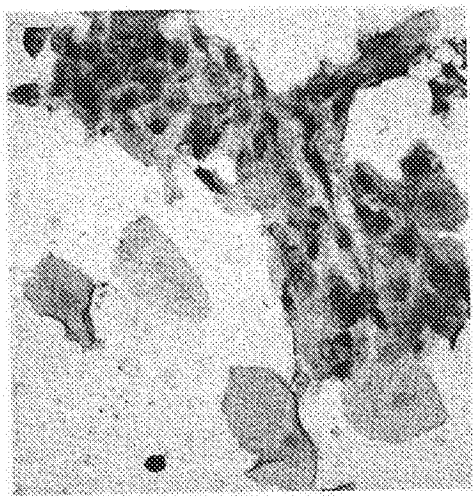

图 6B

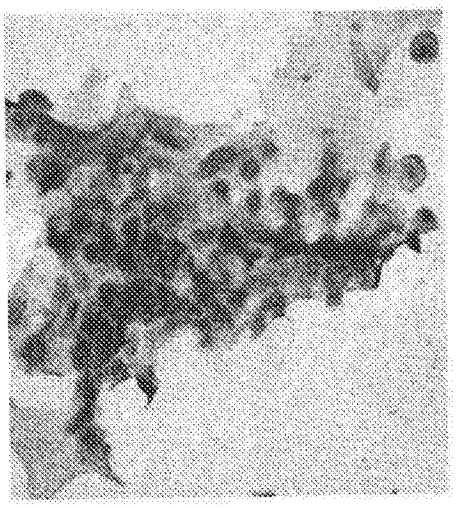

图 6C

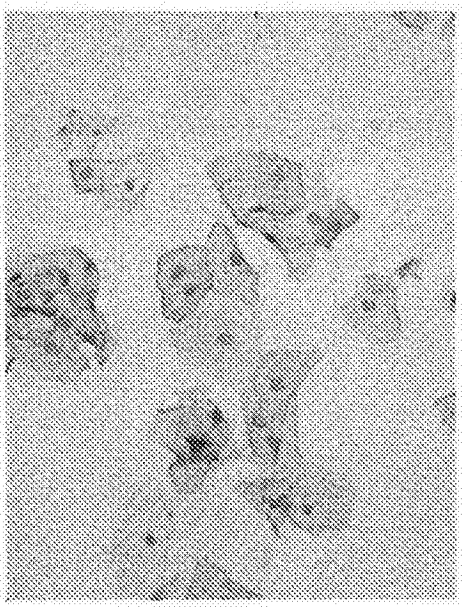

图 7A

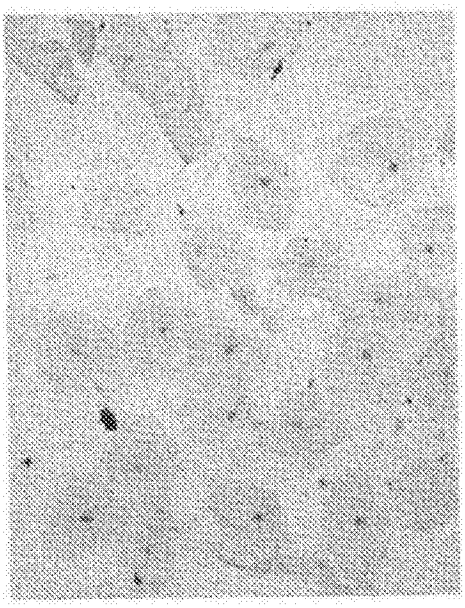

图 7B

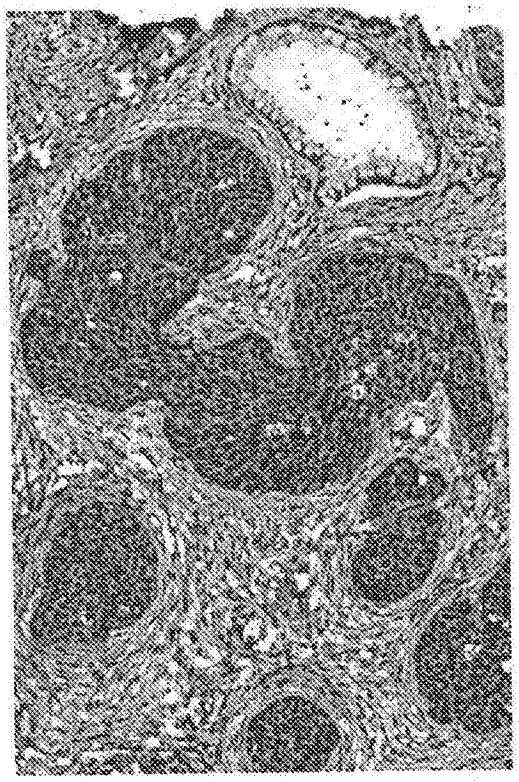

图 8A

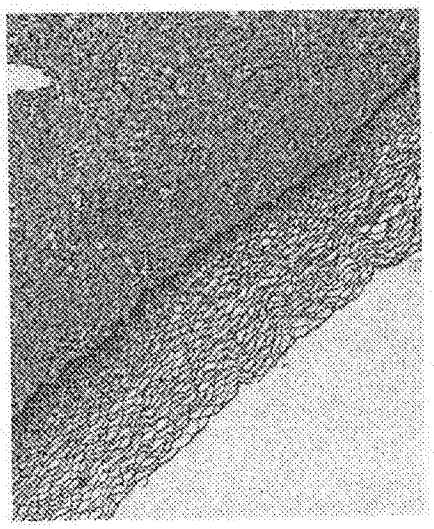

图 8B

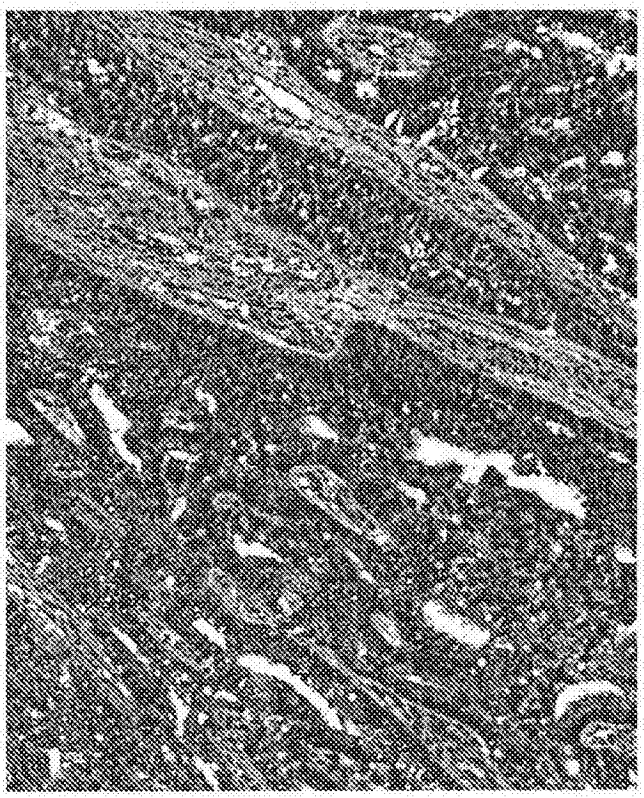

图 8C

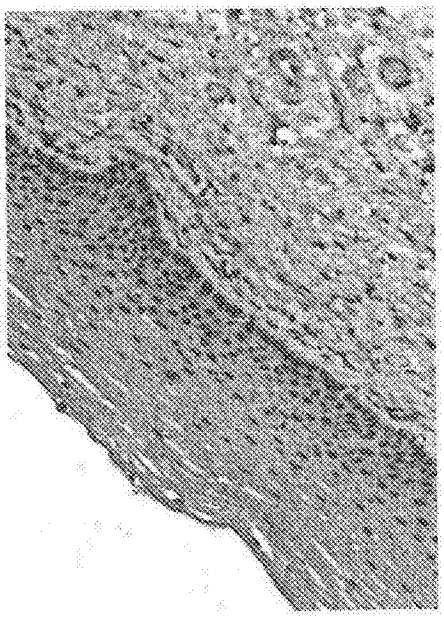

图 8D

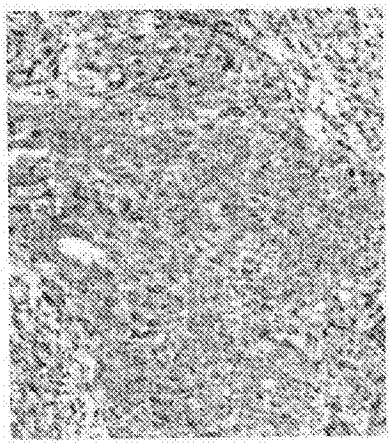

图 9A

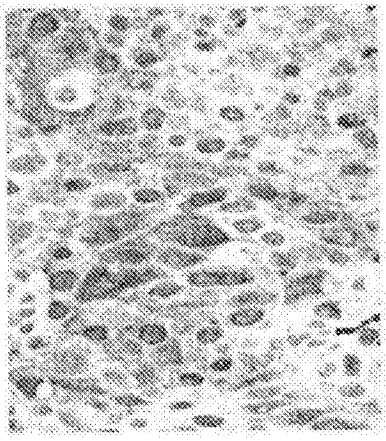

图 9B

图 9C

图 9D

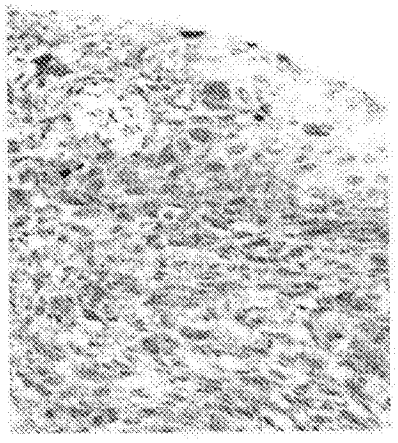

图 9E

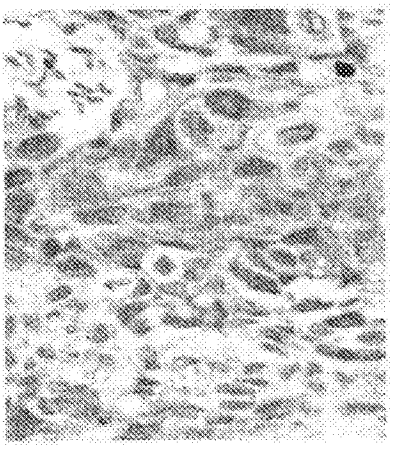

图 9F

图 9G

图 9H

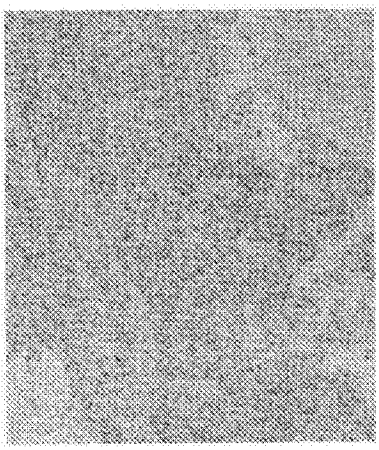

图 9I

专利名称(译)	鉴别高度或≥CIN2用于人乳头瘤病毒(HPV)与HPV相关癌症的早期及晚期检测、筛检和诊断		
公开(公告)号	CN102449479B	公开(公告)日	2015-11-25
申请号	CN201080020175.9	申请日	2010-05-06
[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 L程		
发明人	S-L·程		
IPC分类号	G01N33/48 G01N33/53		
CPC分类号	G01N33/56983 G01N33/57411 G01N2333/025 G01N2800/56		
代理人(译)	陆惠中		
审查员(译)	于园园		
优先权	61/215589 2009-05-07 US		
其他公开文献	CN102449479A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

公开了用于诊断人类个体中乳头瘤病毒感染的疾病阶段的方法和试剂盒。该方法包括从所述人类个体中获得样本，所述样本由包含蛋白质的组织样本或包含蛋白质的细胞样本组成；将所述样本和与一或多种HPV重组蛋白专一性结合的一或多种抗体接触；测定所述样本中与所述抗体专一性结合的至少一种蛋白的存在、不存在或量；并基于所述一或多种蛋白质的所述测定的存在、不存在或量，测定所述人类个体中乳头瘤病毒感染的所述疾病阶段。

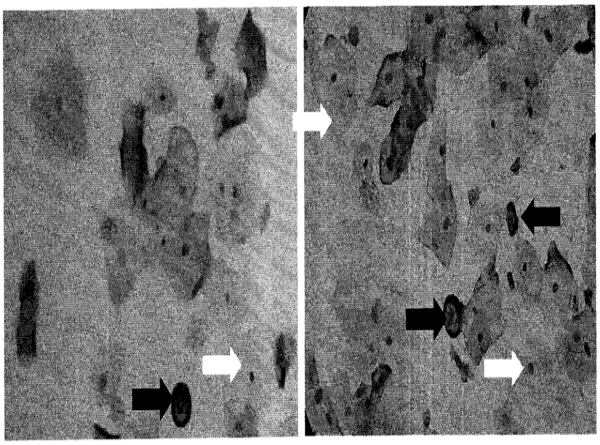

图1A 图1B