



# (12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102432683 A

(43) 申请公布日 2012. 05. 02

(21) 申请号 201110353972. 5

*C07K 16/02* (2006. 01)

(22) 申请日 2011. 10. 28

*C12N 9/12* (2006. 01)

(71) 申请人 周际

*G01N 33/53* (2006. 01)

地址 518057 广东省深圳市南山区滨海之窗  
花园 4 栋 606

*G01N 33/574* (2006. 01)

申请人 李劲

斯文·斯库格

艾伦·何

(72) 发明人 周际 李劲 斯文·斯库格

艾伦·何

(74) 专利代理机构 北京安博达知识产权代理有  
限公司 11271

代理人 徐国文

(51) Int. Cl.

*C07K 16/40* (2006. 01)

权利要求书 1 页 说明书 9 页

序列表 2 页 附图 5 页

## (54) 发明名称

一种多表位 TK1 抗体的制备及其在肿瘤患者  
早期复发风险及预后评估中的应用

## (57) 摘要

本发明提供了一种人宫颈癌细胞 TK1 单体 N 端 23 肽、C 端 20 肽和 C 端 28 肽组成的抗原决定簇制备的一种高特异性、高灵敏度的配位组合抗人 TK1 抗体及其在肿瘤诊断中的应用。抗原决定簇所包含的氨基酸序列为：N 端 23 肽 (3-25) : CINLPTVLPGPSKTRGQIQVIL、C 端 20 肽 (206-225) : CPVPGKPGGEAVAARKLFAPQ、C 端 28 肽 (198-225) : AGPDNKENCVPVPGKPGGEAVA ARKLFAPQ。本发明同时提供了应用该抗原制备抗体的方法,所提供的抗体试剂盒具有灵敏度高,特异性高,成本低廉等特点,通过增强化学发光点印迹检测法和免疫组化检测及检测试剂盒对对肿瘤康复人群进行定期监控,对其复发和转移风险及预后进行评估。

1. 一种高特异性、高灵敏度的抗人 TK1 抗体,其特征在于所述抗体选择的 TK1 蛋白包括:TK1 蛋白质,具有酶活性 / 非活性的单体、2 或 4 聚体 TK1 蛋白质,或 TK1 蛋白质与其他分子形成的蛋白复合物或抑制物。

2. 一种抗原决定簇,所述决定簇包括人宫颈癌细胞 TK1 单体 N 端 23 肽、C 端 20 肽和 C 端 28 肽,其氨基酸序列分别如下:N 端 23 肽 (3-25):CINLPTVLPGPSKTRGQIQVIL; C 端 20 肽 (206-225):CPVPGKPGGEAVAARKLFAPQ 和 C 端 28 肽 (198-225):AGPDKENCPVPGKPGGEAVAARKLFAPQ。

3. 一种利用权利要求 2 所述的抗原决定簇制备抗体的方法,其特征在于所述方法包括利用权利要求 2 所述的三个氨基酸免疫序列分别与 KLH 交联,分别免疫母鸡,提取卵黄液体,采用水萃取制备抗体溶液,分别用所述的抗原决定簇制备的亲合层析柱纯化抗体,初筛出高特异性、高灵敏度的抗体。

4. 一种利用权利要求 3 所述的方法所得的组合抗体制备的高特异性、高灵敏度的多表位抗人 TK1-IgY 抗体,其特征在于所述的抗体按质量百分数计:所述 23 肽免疫的单一抗体为 30%~45%,所述 20 肽免疫的单一抗体为 25%~40%,28 肽免疫的单一抗体为 20%~35%。

5. 一种利用权利要求 3 所述的方法所得的组合抗体制备的高特异性、高灵敏度的多表位抗人 TK1-IgY 抗体,其特征在于所述的抗体按质量百分数计:所述 23 肽免疫的单一抗体为 30%~35%,所述 20 肽免疫的单一抗体为 30%~35%,28 肽免疫的单一抗体为 30%~35%。

6. 一种用权利要求 3 至 5 中任一权利要求所述的抗体,其特征在与所述的抗体选择的 TK1 蛋白包括:TK1 蛋白质,具有酶活性 / 非活性的单体、2 或 4 聚体 TK1 蛋白质,或 TK1 蛋白质与其他分子形成的蛋白复合物或抑制物。

7. 一种对权利要求 4 中所述的配位组合的抗人 TK1-IgY 抗体的检测方法:所述检测方法包括硝酸纤维素膜点印染 / 免疫增强发光检测系统 (ECL) 的缩时检测方法、抗体直接标记生物素方法。

8. 一种利用权利要求 4 至 5 中任一权利要求所述的组合抗人 TK1-IgY 抗体与化学发光检测系统结合用于评估肿瘤患者早期复发风险及预后的试剂盒。

## 一种多表位 TK1 抗体的制备及其在肿瘤患者早期复发风险及预后评估中的应用

### 技术领域：

[0001] 本发明涉及一种抗体及其应用，具体讲设计一种一种高特异性、高灵敏度多表位 TK1 抗体的制备及其肿瘤患者早期复发风险及预后的评估中的应用。

### 背景技术：

[0002] 癌症是人类的死亡杀手，尽管有许多影像检测方法和治疗手段，例如化学治疗，内分泌治疗，放射治疗和手术等，虽然已经有了很大的进步，但远远不可能达到完美的程度，伴有复发和转移的可能，其中肿瘤患者的五年复发或转移比例高达 40%，复发患者死亡率高达 80%。

[0003] 癌症是一种细胞异常增殖的慢性疾病。癌细胞异常和失控的增殖是由于正常细胞中与增殖相关的基因发生了某种或多种突变所引起的。但到目前为止，很少有可信且早于影像的方法准确的评估肿瘤生长相关的标志物应用于肿瘤复发风险评估中。肿瘤复发是肿瘤再生的结果，其过程是肿瘤细胞再次失去控制地异常增殖的表达，目前尚未有一种方法能指导医生和患者通过评估细胞增殖指数来分析和判断肿瘤复发的风险，2008 美国信诺保健公司将现用肿瘤标志物 (Tumor Markers) 如何用于癌症的诊断和监督进行汇编，提出公认的准则和实践指南，对于肿瘤相关的血清标志物，进行了评估。对于现有许多肿瘤标志物进行回顾研究，例如 CEA, CA15-3, CA199 和 AFP 等一系列标志物可以进行治疗监视，由于这类标志物不与肿瘤细胞增殖直接相关，尚没有好的标志物进行早期复发风险及预后评估。

[0004] 二十世纪五十年代末，研究者发现胸苷激酶 (TK, ATP:thymidine 5'-phosphotransferase, EC. 2. 7. 1. 21, 简称 TK)，一种嘧啶补救途径的酶，催化胸苷磷酸化为胸苷酸。人细胞中 TK 以两种同功酶的形式出现：细胞质胸苷激酶（简称 TK1）和线粒体胸苷激酶（简称 TK2）。胸苷激酶 1（简称 TK1，也称为细胞质胸苷激酶）是与细胞周期调控密切相关的细胞周期类标志物，大量基础研究和实验肿瘤学证明了 TK1 表达是与细胞生长状态紧密联系的，因此 TK1 可以作为一种好的细胞增殖标志物来检测增殖细胞的增殖活性，因此将适用恶性肿瘤的增殖度检测，评估预后和复发风险。

[0005] 对血清胸苷激酶 1 (STK1) 值进行分析，重要的是，体内正常细胞增殖不会导致血清胸苷激酶 1 水平的增加，因为正常的细胞分裂是按照细胞凋亡调控规律进行的，细胞内胸苷激酶 1 在细胞分裂之前已经被降解，但肿瘤细胞是逃逸了细胞凋亡调控规律的，导致细胞异常分裂增殖，肿瘤细胞（包括 S 和 G2 期的细胞）中的胸苷激酶 1 被释放至体液。因此，在细胞过度增生的情况下，STK1 水平与肿瘤细胞增殖速度相关，并与疾病的轻重程度有关。由于在总的血清 TK 中，STK1 高于 95%，TK2 低于 5%，因此 STK 的活性检测同样用于血清学，作为一优选的肿瘤细胞增殖标志物。

[0006] 采用人 TK1 抗体检测 STK1 浓度水平更能真实的代表体内是否存在异常增殖的细胞，因此，在近 10 多年里，按照抗体制备原理，一种 TK1 抗体已经试用于临床实践中。多个团队制备了不同的抗 TK1 抗体用于肿瘤疾病的检测和监控。TK 活性检测可用于预后主要是

血液癌类型,但现有的非同位素 TK 活性检测方法比较繁琐和耗时。

[0007] 在这基础上,我们于 2002 年进一步筛选研究,选择了暴露在 TK1 蛋白质的表面的抗原决定簇 C 端部分的这一关键免疫序列 31 肽 (195-225) 制备了抗人 TK1-IgY 抗体 (中国发明专利号 W O 204100760A1,国际专利号 W O 204100760A1.25/11-2004)。采用人 TK1 的 C 端 31 肽制备抗人 TK1-IgY 抗体及血清免疫学和组织免疫学的肿瘤检测试剂盒。这抗体将同时检测有活性的 TK1 蛋白和非活性的 TK1 蛋白,也能检测 TK1 蛋白质与其他的分子形成的复合物。尽管这血清试剂盒-增强发光免疫点印迹法检测系统试用与体检筛查中,检测范围在 0.3-2pM 之间,但检测范围在 0.1-1pM 时,误差有时会大于 30%。采用人群常规体检血清 TK1 和癌症患者血清 TK1 进行 ROC 值分析,ROC 值曲线下面积为 0.96,特异性为 0.991,最大似然法比例 (+) 为 56.04,证明抗体的特异性很好,可以用于人群体检筛查,但灵敏度在 0.51%,需进一步制备检测灵敏度高、特异性和稳定性好的抗体来完善检测系统,以便更好的提高在 0.1-1pM 范围内的检测精度,适用于肿瘤患者早期复发风险及预后评估中。

#### 发明内容:

[0008] 在采用人宫颈癌细胞的 TK1 上 C 端 31 肽 (195-225) 作为抗原的基础上,经多年实践,筛选出了暴露在 TK1 蛋白质的表面的多点位特别抗原决定簇,包括 N 端部分的关键性免疫多肽序列 23 肽, C 端 20 肽和 C 端部分的关键免疫序列 28 肽,应用上述关键免疫序列做特别抗原,采用母鸡免疫最终纯化并组合制备了抗 TK1-IgY 抗体。与现有的国际商用抗 TK1-IgG 抗体相比,所制备的抗体具有纯度高 (> 99%)、产量高、高灵敏度、高特异性且无非特异性免疫交叉反应,并可于 +4-8 度冰箱保存一年以上且活性稳定,便于商业运输、保存和操作等优点。本发明的抗 TK1 多表位抗体和 TK1 检测系统,能真实的反映细胞的增殖度,治疗以后,对肿瘤康复人群 (经影像手段无肿瘤检出,包括手术切除,放 / 化疗治疗,内分泌、免疫治疗或基因治疗的患者) 进行定期监控,对其复发和转移风险及预后进行评估。

[0009] 本发明提供的技术方案包括:

[0010] 1、设计和筛选抗原

[0011] 选择暴露的蛋白表面上 N、C 端的肽段。

[0012] 2、制备抗体

[0013] 利用上述关键免疫序列与 KLH 交联组成 23 肽-KLH, 20 肽-KLH, 28 肽-KLH 的抗原分别去免疫母鸡制得。而利用母鸡免疫的优点在于:(1) 鸡的 IgY 和人的 IgG 之间存在分子遗传差异性;(2) 鸡的 TK1 和人的 TK1 有种族差异性;(3) 与传统的兔免疫制备的多克隆抗体比较,IgY 具有内源分子均一性(只产生一种类型的抗体分子,即 IgY);(4) IgY 抗体不激活人补体系统,从而部分地阻断人血清中非特异抗原结合位点的激活;(5) 类风湿因子 (RF) 不与 IgY 抗体反应。这种 RF 是许多免疫测定中非特异反应的主要来源,因为 RF 与哺乳动物抗体 IgG 的 Fc 部分反应,可导致病人和健康人血清的假阳性;(6) 现在大多数乳腺癌患者,需要辅助治疗,许多患者接受化疗,例如:赫赛汀、靶向治疗药、单克隆抗体,以后也还需抗激素治疗,特别是抗体治疗情况下,TK1-IgY 抗体显示出比单抗体检测更具有优势。

[0014] 3、纯化抗体

[0015] 利用所述 N 端 23 肽,C 端 20 肽,C 端 28 肽序列分别与 KLH 交联,分别免疫母鸡,提

取卵黄液体,采用水萃取制备抗体溶液,分别用本发明中的抗原决定簇制备的亲亲和层析柱来纯化抗体。

[0016] 所述纯化包括下述步骤:

[0017] 第一步,初筛出免疫母鸡生产出的抗体是否具有高特异性和高灵敏度,即对每个免疫母鸡的卵黄液体进行分离,采用水萃取后得到抗体粗品,经亲和层析纯化得到初筛的高特异性和高灵敏度的抗人 TK1 抗体。根据免疫抗原的类型对亲和柱进行选择,混合后的粗品液是来源于 23 肽 -KLH, 20 肽 -KLH, 28 肽 -KLH 的抗原免疫的抗 TK1-IgY 抗体,亲和柱制备必须为 N 端 23 肽, C 端 20 肽和 C 端 28 肽的亲和柱。

[0018] 第二步,制备组合免疫抗原的亲和柱,对初筛出的 3 种抗体进行组合的配比测试,其特征在于组合抗原亲和柱配比选择。制备亲和柱要求按照所选择的 3 种抗体的混合比例,计算出相对应的抗原决定簇,即 23 肽, 20 肽和 28 肽量的百分比。经亲和柱层析纯化测试后,选择最佳的配比组合方案。

[0019] 4、多位点抗体组合制备抗人 TK1-IgY 抗体,除另有说明外,本申请中的百分比为质量百分比。

[0020] 配比范围:23 肽免疫的单一抗体占 30%~45%, 20 肽免疫的单一抗体占 25%~40%, 28 肽免疫的单一抗体占 20%~35%。

[0021] 5、5、鉴定抗人 TK1-IgY 抗体的灵敏度和特异性

[0022] 1) 确认制备抗体是否仅与人的 TK1 有特异性反应,第一步采用 TK1 阳性和阴性细胞株,西部印染法来鉴定抗体的特异性;利用淋巴瘤阳性株 CEM TK1<sup>+</sup> 和阴性株 CEM TK1<sup>-</sup> 来鉴定。经天然胶电泳后进行 TK1 抗体西部免疫印染,CEM TK1 阳性株有一条明显的 TK1 电泳带,CEM TK1 阴性株没有显现任何带。确认抗体的是仅与 TK1 酶有免疫反应,是特异性抗体。

[0023] 2) 确认制备抗体是否仅与人血清肿瘤患者中 TK1 有特异性反应,第二步采用选择已确认为健康无疾病者的血清和肿瘤患者阳性值的血清标本,用增强发光免疫点印迹方法检测,肿瘤患者阳性值的血清标本应显示不同程度的阳性值,健康者应该低于检测阈值 2pM 或不显示免疫反应。确认了抗体与健康无疾病人的血清无免疫交叉反应,是特异性抗体,并比较肿瘤患者血清中 TK1 的强度反应,对初筛的不同抗体进行鉴定,筛选出灵敏度高和特异性好的抗体。

[0024] 3) 确认制备抗体是否仅与人血清肿瘤患者中 TK1 有特异性反应,从 2) 步中筛选出灵敏度高和特异性好的抗体,采用初诊但未治疗肿瘤患者血清和健康无疾病人血清标本点样,进行天然胶电泳后,再用抗 TK1 抗体西部免疫印染,肿瘤患者血清标本显示一条明显的 TK1 电泳带,健康无疾病人血清标本没有显现任何带。确认抗体的是仅与人肿瘤血清的 TK1 酶有免疫反应,是特异性抗体。

[0025] 本发明是利用上述组合抗体在十万级的洁净环境下,将抗体进行分装,组装 TK1 免疫检测试剂盒,并与化学发光分析仪结合,对肿瘤康复人群(经影像手段无肿瘤检出,包括手术切除,放/化疗治疗,内分泌、免疫治疗或基因治疗的患者)进行定期监控,对其测复发和转移风险及预后进行评估。

[0026] 对临床肿瘤治疗患者,检测一患者个体治疗前后的 STK1 结合反应的水平,需要有许多次的定期检测,取治疗前的样品和定期治疗后的样品分析,取决于治疗方法。例如,取

手术治疗后患者一个月,3个月或6个月,到治疗一年的样品分析;例如化疗患者分次的样品也可能取治疗后2-3天,一星期,即几星期,一个疗程,和多个疗程,进行比较分析。

[0027] 癌患者的肿瘤复发风险进程度的预测是按照治疗前后的两者的 TK1 水平比较。例如,治疗前的 STK1 与 3 个月的 STK1 比较,如果 STK1 的水平没有降低或在升高,如果第 2 次的 STK1 水平与治疗前 STK1 水平比例,超过 2pM 或不下降,预示高复发或转移的可能性。预测高复发或转移的可能性,这检测癌症患者 STK 水平,需要与与同年龄和同性别范围的健康正常人的 TK1 水平比较。通过检测一患者第一次治疗和第 3 个月中的 STK1 的水平,评估是否患者在数年后出现高复发的风险。采用这方法对患者进行定期检测,可以监控在整个治疗的 1-5 年中,以至十年中,患者是否会有高复发的风险。因此,这发明给予医生治疗患者的早期信息,是否是低风险或高复发的风险。医生将有可能使用不同治疗方案,或改变治疗方案,增加治疗成功的机率,延长患者的生存和生活质量。采用这方法评估患者的 STK1 的水平,同样可能避免没有成效的治疗和不需要的治疗。

[0028] 根据 STK1 水平的变化,可帮助医生评估预测癌症的复发风险,即通过 TK1 水平对患者的肿瘤细胞的增殖情况做判定,还需要与患者的其他数据,例如患者的肿瘤类型,个人病史,家族遗传病史,年龄,性别等结合,进行评定。该检测系统的 TK1 水平的数据分析是通过配置在计算机上的特定软件程序,分析检测该患者 TK1 水平,按照肿瘤的增殖程度信息,来评估是否有复发的可能,分析系统可能还需要与补入的其它参数相结合进行更精确的分析。例如患者的肿瘤类型,个人病史,家族遗传史,年龄,性别,其他肿瘤标记的分析数据和生化分析参数。

[0029] 和现有技术比,本发明的优点如下:

[0030] (1) 本发明所制备的抗体具有纯度高 (> 99%)、产量高、高特异性无非特异性免疫交叉反应且检测精度在可达到 0.1pM。受试者工作曲线,ROC 曲线下面积值 = 0.96 ( $p < 0.0001$ ),最大似然法比例 (+) 明显升高为 236.49,特异性高达 0.997,灵敏度高达 0.737。

[0031] (2) TK1 多表位抗体和 TK1 检测系统,能真实的反映细胞的增殖度,治疗前后的 STK1 的高低变化与肿瘤细胞的增殖进度有关,因而能在早于影像学检测的情况下,对肿瘤康复人群(经影像手段无肿瘤检出,包括手术切除,放/化疗治疗,内分泌、免疫治疗或基因治疗的患者)进行定期监控,对其测复发和转移风险及预后进行评估。

[0032] (3) 稳定性好,可于 +4-8 度冰箱保存一年以上且活性稳定,更便于商业运输和保存并能降低试剂的潜在成本。

#### 附图说明:

[0033] 图 1: ABmart 抗体分析测试 TK1 蛋白图谱。

[0034] 图 2:(a) TK1 抗体试剂盒点样结果图

[0035] (b) STK1 点印迹实验分析软件测试 TK1 抗体试剂盒点样数据

[0036] (c) STK1 点印迹实验分析软件测试 TK1 抗体试剂盒点样数据曲线图

[0037] 图 3:(a) 为 CEM TK1<sup>-</sup> 和 CEM TK1<sup>+</sup> 的西部印染结果。

[0038] (b) 为鉴定治疗前淋巴瘤患者,治疗前/后的头颈癌患者,健康人血清的西部印染结果。

- [0039] 图 4 :CEM TK1<sup>+</sup>、CEM TK1<sup>-</sup>、宫颈内膜癌和结肠癌的 TK1 抗体染色结果
- [0040] 图 5 :生物素-TK1-IgY 抗体 (2 步法) 与三步法的比较图
- [0041] 图 6 :华瑞同康的抗 TK1-IgY 抗体与市售商用抗 TK1-M 抗体的实验比较图
- [0042] 图 7 :贲门癌症患者术前 STK1 浓度的比较及复发风险关系图
- [0043] 图 8 :STK1 评估非小细胞肺癌临床 I 和 II 期患者预后图
- [0044] 用以下实施例对本发明作详细描述 :

[0045] 实施例 1 :选择特异性多表位抗原

[0046] 如图 1 所示,用软件预测 TK1 无信号肽,无跨膜结构。图示单链 TK1 蛋白 234 氨基酸分布,指出氨基酸的亲疏水性氨基酸分布较均匀。图谱提供了可选方案:1) 从抗原性角度考虑,在蓝色曲线峰值高的地方选择的多肽较好;2) 按照亲水性氨基酸的分布,选择亲水区域;3) 选择负值所示疏水性较强的芳香族氨基酸。

[0047] 实例 2 :选择高灵敏度、高特异性多位点组合抗人 TK1-IgY 抗体的抗原

[0048] 选择制备高灵敏度、高特异性多位点组合抗人 TK1-IgY 抗体的抗原的选择:由于人宫颈癌 TK1 的部分序列有与其它蛋白具有相同的表位,得到的抗体可能与其它非特异性蛋白有交叉反应,纯化困难,按照已公布公知的 TK1 序列(蛋白质文库),选择暴露在蛋白质表面的特别肽,按照用软件预测得到的多肽的特异性程度大于 85% 的多肽片段列于下表,筛选的 TK1 特异性强的抗原片段,设计了 TK1N 端 23 肽,C 端 20 肽和 C 端 28 肽作为半抗原。

[0049]

No.	片段长度	起始位置	中止位置	多肽序列	多肽的特异性程度
1	23	3	25	CINLPTVLPGPSKTRGQIQVIL	88
2	10	8	17	TVLPGPSKTK	88
3	10	11	20	PGSPSKTRGQ	87.8
4	10	29	38	FSGKSTELMR	88.5
5	10	34	43	TELMRRVRRF	88.5
6	10	37	46	MRRVRRFQIA	89.1
7	10	48	57	YKCLVIKYAK	89.7
8	10	59	68	TRYSSSFCTH	87.8
9	10	76	85	LPACLLRDVA	88.7
10	10	84	93	VAQEALGVAV	88.2
11	10	113	122	ANAGKTIVVA	88.1
12	10	126	135	GTFQRKPFGA	89.2
13	10	128	137	FQRKPFGAIL	88.9
14	10	141	150	PLAESVVKLT	88.1
15	10	145	154	SVVKLTAVCM	88.9
16	10	156	165	CFREAAATKR	89.4
17	10	164	173	KRLGTEKEVE	88.6

[0050]

18	10	184	193	VCRLCYFKKA	90.3
19	28	198	225	AGPDNKENCPVPGKPGGEAVAARKLFAPQ	87.4
20	10	211	220	KPGGEAVAARK	87.4
21	20	206	225	CPVPGKPGGEAVAARKLFAPQ	89.2
22	10	224	233	PQQILQCSPA	89.6

[0051] 实施例 3 :筛选特异性多表位抗原

[0052] 特异性多表位抗原的选择 :按照公知的 TK1 空间结构,选择暴露在 TK1 蛋白质的表面的抗原决定簇,按照实例 2 筛选 TK1 免疫性强的抗原片段,筛选 TK1 的 N 端 23 肽,C 端 20 肽,和 C 端 28 肽是免疫性强的抗原片段,三段氨基酸序列分别如下(见序列表):1)N 端 23 肽(325):CINLPTVLPSPKTRGQIQVIL,2)C 端 20 肽(206-225):CPVPGKPGGEAVAARKLFAPQ,3)C 端 28 肽(198-225):AGPDNKENCPVPGKPGGEAVAARKLFAPQ。

[0053] 实施例 4 :用母鸡免疫制备特异性多表位配位组合抗人 TK1-IgY 抗体

[0054] 应用上述 N 端 23 肽,C 端 20 肽,C 端 28 肽序列做半抗原分别与 KLH 铰链,制备免疫抗原,利用该抗原制备灵敏度高、特异性好的抗人 TK-IgY 抗体新组合抗体。抗原用量 :选择免疫性好健康的罗曼母鸡 40 只,用量为 0.5 毫克,KLH-N23 肽,KLH-C20 肽,KLH-C28 肽,将上述免疫抗原用 PBS 缓冲液溶解再与福氏完全佐剂按 1 : 1 混合,注射到产蛋母鸡的胸肌。经两次给鸡用福氏不完全佐剂与抗原混合液加强免疫,四周后每天收集鸡蛋,在 4℃ 下储存。

[0055] 实施例 5 :提取和纯化多位点组合抗体

[0056] 抗体的粗品纯化过程如下 :采用带网眼的漏斗将蛋黄与蛋白分离,完整的蛋黄用无离子水洗净后用镊子去蛋黄表皮,收集蛋黄液。用 10 倍体积的蒸馏水稀释蛋黄液,搅拌均匀后调 pH 值为 5.0,在 4℃ 下放置过夜。次日取出后调 pH 值至 5.5,通过二次硫酸铵沉淀法,第一次按照 1000ml 溶液中加入硫酸铵固体 351g,第 2 次按每 1000ml 加 196g 硫酸铵的比例,在 10℃ 下冷冻离心,转速为 4000 转 / 分,时间为 24 分钟。弃去上清液,将沉淀蛋白用 1 : 4 的无离子水稀释并用 0.5mol/L 的 NaOH 调节 pH 至 8.0。采用 G25 柱脱除硫酸铵以后,混合的粗品溶液上制备好的亲和层析柱。

[0057] 1) 收集筛选出免疫效果好的母鸡生产的鸡蛋,将鸡蛋黄制备硫酸铵溶液,脱除硫酸铵以后,粗品 TK1 溶液混合上亲和层析柱。

[0058] 2) 制备亲和层析柱

[0059] 选择亲和柱抗原的类型 :混合后的粗品液来源于 23 肽-KLH+20 肽-KLH+28 肽-KLH 的抗原免疫的抗 TK1-IgY 抗体,亲和柱制备为 23 肽+20 肽+28 肽混合亲和柱,制备亲和柱要求按照所选择的 3 种抗体混合比例,计算出相对应抗原用量,即 23 肽,20 肽和 28 肽的量的百分比,将计算好的 N 端 23 肽,C 端 20 肽和 C 端 28 肽的量交链接到亲和层析柱。

[0060] 3) 纯化抗体 :于 2-8℃ 下将混合粗品液加入亲和柱,5 次循环,每 ml 亲和柱第 1 次过柱时的速度为 0.2ml/min-0.25ml/min。循环后用亲和柱平衡溶液冲洗杂蛋白,经过 3 次以上的重复测试,UV 均小于 0.010 时,停止冲洗;用 1.5 倍亲和柱体积的 Actisep 洗脱抗体,洗脱再用 G25 柱除去 Actisep,将收集好的抗体混合,测混合后的 UV 值;及时调 pH 至 8.0,加入保护试剂,保存抗体于 +4-8 度冰箱。

[0061] 实例 6 :检测和鉴定 TK1 检测组装试剂盒

[0062] 在十万级的洁净环境下,将抗体进行分装。如图 2(a), (b), (c) 所示,采用增强化学发光点印迹法对 STK1 进行标准化检测和鉴定,快速和简便,检验合格。

[0063] 实施例 7:筛选抗体的灵敏度和特异性

[0064] 鉴定抗体的灵敏度和特异性。1) 筛选灵敏度:选择初评合格的母鸡,用鸡蛋黄制备硫酸铵溶液,再用制备的亲合柱纯化抗体,得到纯度大于 99% 的 TK1 抗体,采用增强发光免疫点印迹方法,用 TK1 标准品 (20, 6. 6, 2. 2pM) 做标准曲线,选择已确认为健康者的血清和肿瘤患者阳性值的血清标本,用增强发光免疫点印迹方法检测,肿瘤患者阳性值的血清标本应显示阳性值,健康人应该低于检测阈值 2pM 或不显示免疫反应,对不与人 TK1 有反应,对健康人血清有非特异免疫交叉反应,或不与肿瘤患者血清 TK1 反应的抗体,为不合格抗体,删除。

[0065] 鉴定抗体的特异性

[0066] 细胞培养:采用常规细胞培养方法,将实验所用的 CEM TK<sup>+</sup>, CEM TK<sup>-</sup> 细胞进行用含 10% 小牛血清的 1640 培养液 (含 10% 小牛血清) 培养,当培养瓶中细胞数长到  $20 \times 10^6$  时,将收获的细胞用裂解缓冲液萃取细胞液 (裂解缓冲液:10mM Tris-HCl, 250mM 蔗糖, 160mM KCl, 5. 6mM NaF, 3. 8mM MgCl<sub>2</sub>, 5. 0mM ATP, 0. 2% NP 40, pH = 7. 5)。20 微克 /10 微升的 CEM TK1 阳性株和 CEM TK1 阴性株细胞提取液与等量的电泳缓冲液混合,天然胶电泳 (4-10% 梯度),试剂盒和操作由供应商 Invitrogen 公司提供。进行 TK1 抗体西部免疫印迹 (半干电泳转移操作方法由 Bio-Rad 提供)。IgYTK1Ab (100, 000X 1mg/ml) 采用人血清标本, IgYTK1Ab 浓度 (100, 000X 1mg/ml)。如图 3(a) 为 TK 抗体西部印迹结果,CEM TK1 阳性株有 TK1 一条明显的电泳带,CEM TK1 阴性株没有显现任何带。验证了抗体仅仅与人 TK1 有特异性反应。

[0067] 图 3(b) 为西部印迹法鉴定:其中的样品来源于 1 例治疗前淋巴瘤患者,1 例治疗前 / 后的头颈癌患者,1 例健康人 (无疾病),经点印迹 / 免疫增强发光检测系统 (ECL) 鉴定,分别为 44, 20, 0. 5 和 0. 1pM。2 微升血清稀释为 10 微升与等量的电泳缓冲液混合,过天然胶电泳 (4-10% 梯度) 后进行 TK1 抗体西部免疫印迹。结果显示,治疗前淋巴瘤患者与治疗前的头颈癌患者有一明显的电泳带,治疗后的头颈癌患者和健康人的血清 TK1 几乎不可以观察。验证抗体与人血清无非特异性免疫交叉反应。

[0068] 实施例 8:鉴定 TK1 抗体的特异性和灵敏度

[0069] 石蜡包埋的厚为 4  $\mu$ m 切片标本,经脱蜡水化,将切片浸入标靶修复液。按照供应商 (DakoEnVision® System 试剂盒) 提供的操作步骤,进行组织化学染色。切片浸入 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 溶液,10 分钟以后灭活内源性酶,用封闭试剂处理 30 分钟,加入 TK1 抗体,并在室温下孵育 2 小时;用 PBS 溶液清洗切片;加 EnVisionG 复合物,并在室温下孵育 40 分钟;二氨基联苯胺显色并用苏木精对载玻片进行复染色。TK1 阳性和阴性的人淋巴瘤 CEM 细胞采用丙酮固定法,其后的染色和操作步骤同前所述。评估各个切片的 TK1 表达,通过 > 10 的显微视野以 200-400 放大倍数观察每一组织切片,以 > 1000 个细胞中含 TK1 阳性细胞的数量计算,最后按阳性染色细胞的百分比计算。

[0070] 如图 4,采用一种淋巴瘤细胞株:CEMTK1 阳性株和 CEMTK1 阴性株为标准进行鉴定。图谱显示在 CEMTK1 阳性株细胞中的细胞质中呈不同程度的阳性染色 (A),但在 CEMTK1 阴性株染色不染色,呈阴性反应 (B)。恶性肿瘤患者组织标本 - 宫颈内膜癌 (C) 和结肠癌 (D)。图谱显示染色特点:在恶性肿瘤宫颈内膜癌和结肠癌细胞中的细胞质中呈不同程度的

阳性染色,部分细胞也显示细胞核中染色。结论:TK1 抗体是具有特异性和灵敏度。

[0071] 实施例 9:应用 TK1-IgY 抗体

[0072] (1) 硝酸纤维素膜点印染 / 免疫增强发光检测系统 (ECL) 的缩时检测方法 (称为 3 步法)

[0073] 基于 2002 年专利的增强发光 - 免疫点印染法 (ECL dot blot Assay)。建立了快速检测方法。其程序是:取早饭前供试者的生物体液,例如:1) 取清晨空腹血样品,离心 4000 转 /8-10 分钟,分离血清。将 3 微升的血清样品精确点样到硝酸纤维素膜 (HybandTMC, GE, UK) 上,同时,用不同浓度 TK1 (20, 6.6, 2.2pM) 做标准品点样 (132)。风干 30 分钟,用 pH 为 7.5 的 TBS (20mmol/L Tris, 0.15mol/L NaCl) 漂洗 (2 分钟 /2 次);2) 加入用 TBS 缓冲液配置的 6% 的脱脂奶粉,室温下封闭 1 小时,除去封闭试剂;3) 加入用 TBS 配置的最佳稀释浓度的 TK1 抗体,免疫反应 1.5 小时。反应完成以后,用 TBST (TBST 加入 0.1% 吐温 20) 迅速漂洗 2 次,震荡洗涤 3 次 (5 分钟 /1 次);4) 加生物素化第 2 抗体 (按最佳浓度稀释),室温下震荡反应 40 分钟。反应完成以后,同上方法洗涤;5) 加入亲和素辣根过氧化物酶 (streptavidin-Horse Radish Peroxidase)。同上方法洗涤以后,用 ECL 发光试剂精确反应 1 分钟,甩干后,该膜密封于薄膜袋,放入 CCD 检测仪器,这发光信号的强弱将通过 CCD (Charged Coupled Device) 成像系统分析仪捕获信号和扫描定量分析。按照标准比较,TK1 的浓度大于正常健康人标准阈值 (2.0pM) 为风险值。采用这标准曲线,计算被检者 TK1 的变化水平,对应于被检者的肿瘤细胞的增殖速度。采用抗体免疫结合的检测方法其检测精度可达 0.1pM 以下。

[0074] 实施例 10:应用生物素直接标记的 TK1-IgY 抗体

[0075] 如图 5,磺酸基琥珀酰亚胺 -LC- 生物素直接标记 TK1-IgY 抗体 (2143 试剂盒 EZ-Link® Sulfo-NHS-LC-Biotinylation, Pierce, USA)。从 -20 度冰箱取出的磺酸基琥珀酰亚胺 - 的 LC 生物素瓶,按照说明书指出的方法计算,20 倍摩尔比的生物素试剂与 1 倍摩尔的 IgG 抗体,称重 2.2 毫克生物素溶解到 400 微升的超纯无任何胺离子的水中,取 24.1 微升的生物素试剂加入到用 975.9 微升 PBS 中,配置 2 毫克纯化 TK1 IgY 抗体。冰浴孵育两小时或在室温下反应 30-60 分钟。采用 HABA Assay 检测标记的生物素的分子数,立即采用脱盐柱清除多余的生物素。采用实验例 5 方法,加生物素化 TK1 抗体 (按最佳浓度稀释),室温下震荡反应 1.5 小时,反应完成以后,再按照实验例 8 操作,方法洗涤以后,进入第 5 步。结果与 3 步法相同,操作更为简单方便。

[0076] 实施例 11:鉴定抗体的灵敏度

[0077] 对多表位抗原制备组合抗人 TK1-IgY 抗体的特异性和灵敏度进行分析,多表位抗原制备组合抗人 TK1-IgY 抗体 (23 肽 +28 肽 +20 肽多表位抗原制备组合抗人 TK1-IgY 抗体按照 1 : 1 : 1 比例) 与 28 肽免疫的单一抗体,23 肽免疫的单一抗体和 20 肽免疫的单一抗体进行比较。对 11 个已经确诊为恶性肿瘤患者阳性的血清,采用增强发光免疫点印迹方法进行分析,结果指出多表位抗原制备组合抗体与 28 肽免疫的单一的抗体比较,在 50% 的血清标本中,血清 TK1 值升高 20% -50%。多表位抗原制备组合抗体与 23 或 20 肽免疫的单一抗体比较,在 95% 的血清标本中,血清 TK1 值升高 20% -50%。利用 10 个健康人的血清进行分析,多表位抗原制备组合抗体与 28 肽免疫的单一抗体,23 肽免疫的单一抗体和 20 肽免疫的单一抗体进行比较,没有明显的变化。说明多表位抗原制备组合抗体提高了灵敏

度,更好的区分出个体细胞是否处在异常增殖及其增值度的高或低。

[0078] 实施例 12 :各肽配比范围为 23 肽 30-35%,20 肽 30-35%,28 肽 30-35%,目的是提高灵敏度和抗干扰性能用于复发风险的评估

补充实施例	实施说明	新组合抗体 TK1 效果	华瑞同康 TK1 试剂盒
[0079] 1	30 例混合肿瘤,治疗后两年内的复发患者在治疗后三个月内血清 TK1 水平分析,TK1 评估复发风险的准确率	75%	60%

[0080] 实施例 13 :比较商用型单克隆 TK1 抗体与华瑞同康生物技术有限公司制备的抗 TK1-IgY 抗体

[0081] 采用硝酸纤维素膜点印染 / 增强化学发光检测系统 (ECL) 的快速检测方法。

[0082] 其程序是 :取早饭前供试者生物体液进行检测。按照标准比较,TK1 的浓度大于正常健康人标准阈值 (2.0pM) 为风险值。采用这标准曲线,将方便计算治疗中被检者的 TK1 的水平变化,与对应于被检者的肿瘤细胞的增殖速度的关系。采用抗体免疫结合的检测方法可达到足够低的检测精度,特别是可检测不同健康个体 TK1 的水平差异。最低检测量可达到 0.1pM。如图 7 检测结果 :采用华瑞同康制备的抗 TK1-IgY 抗体检测健康无疾病人的血清,其血清 TK1 基本不可检测,但商用型单克隆 TK1 抗体 (QED Bioscience Inc, San Diego, USA) 与健康人的血清有明显的非特异性免疫交叉反应,重复检测结果相似。结论 :商用型单克隆 TK1 抗体 (QED Bioscience Inc, San Diego, USA) 不可以用于健康人群体检筛查。

[0083] 实施例 14 :鉴定抗体灵敏度的及用试剂盒评估肿瘤患者复发风险及预后

[0084] 检测 146 例头颈部恶性肿瘤患者检测的阳性率为 76.7%,特异性为 93.3%。恶性肿瘤组 STK1 浓度比健康对照组、良性肿瘤组的 STK1 浓度明显升高,其差别有统计学意义 ( $p < 0.01$ )。恶性肿瘤组患者手术后 STK1 水平比术前明显降低 ;治疗有效的病例可以观察到 STK1 检测浓度的明显下降,肿瘤复发的病例可以观察到 STK1 浓度的升高 ( $p < 0.01$ )。

[0085] 结论 :STK1 对头颈部恶性肿瘤的检测有较好的灵敏度 (76.7%) 和特异性 (93.3%),对复发和预后判断有是一有的效监测的可靠手段。但采用消化道肿瘤相关标志物检测和 MTMPC 检测两系统 -- 在头颈部恶性肿瘤的检测中灵敏度低于 27%。

[0086] 实施例 15 :STK1 浓度与复发风险的关系。

[0087] 如图 7,对非小肺癌 - 贲门癌患者对 57 例进行分析,显示术前 STK1 浓度升高与复发风险的关系。术前 7 例 STK1 高水平 (阈值高于 2.0pM 以上) 预示了较高的复发风险。

[0088] 实施例 16 :评估患者的预后的因子之一的 STK1

[0089] 如图 8,非小细胞肺癌临床 I 和 II 期患者 21 例,手术前检测 STK1,低于 1.0pM 有 3 例,1.0-2.0pM 有 10 例,STK1 高于 2.0pM 有 18 例。30 个月跟踪比较,STK1 低于 1pM 有 3 例,全部生存,STK1 水平 1.0-2.0pM 有 10 例 (无复发,死亡率 20%),STK1 高于 2.0pM 有 18 例 (复发率 28%,死亡率 28%),说明 STK1 升高患者,复发和死亡率有升高的趋势。

[0001]

## 序 列 表

<110>周际、李劲、斯文·斯库格 (Sven Skog)、艾伦·何 (Ellen He)

<120>一种多表位 TK1 抗体的制备及其在人群体检筛查中早期肿瘤检测和  
风险预警中的应用

<160>3

<210>1

<211>23

<212>PRT

<213>Human

<220>

<221>PRT

<222>(3)..(25)

<400>1

Cys Ile Asn Leu Pro Thr Val Leu Pro Gly Ser Pro Ser Lys Thr Arg Gly Gln

1

5

10

15

Ile Gln Val Ile Leu

20

<210>2

<211>20

<212> PRT

<213>Human

<220>

<221>PRT

[0002]

<222>(206)..(225)

<400>2

Cys Pro Val Pro Gly Lys Pro Gly Glu Ala Val Ala Ala Arg Lys Leu Phe Ala

1

5

10

15

Pro Gln

20

<210>3

<211>28

<212> PRT

<213>Human

<220>

<221>PRT

<222>(198)..(225)

<400>3

Ala Gly Pro Asp Asn Lys Glu Asn Cys Pro Val Pro Gly Lys Pro Gly Glu

1

5

10

15

Ala Val Ala Ala Arg Lys Leu Phe Ala Pro Gln

20

25

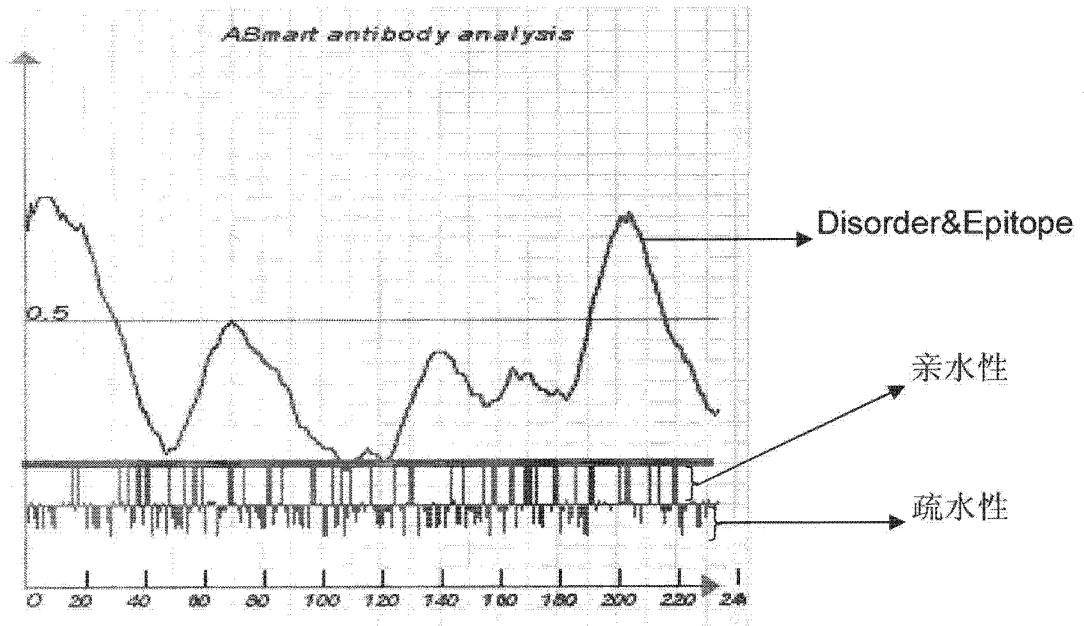


图 1

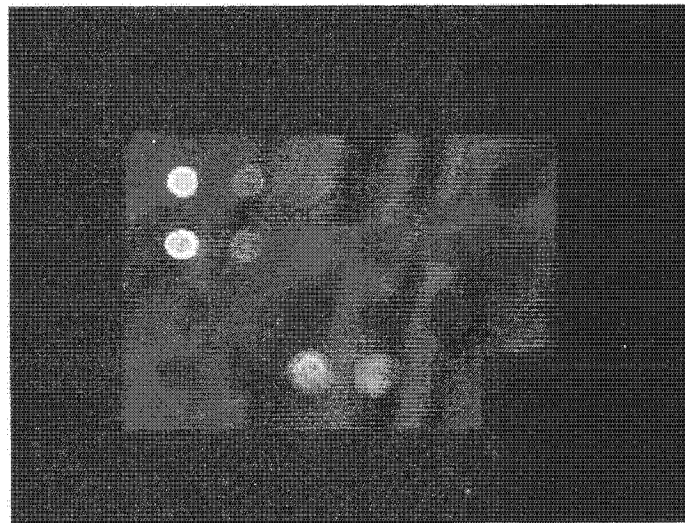


图 2(a)

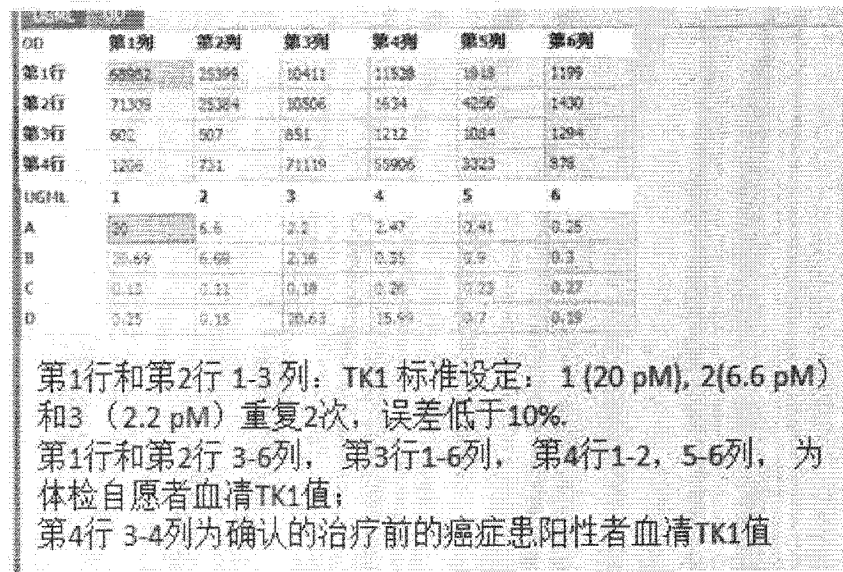


图 2(b)

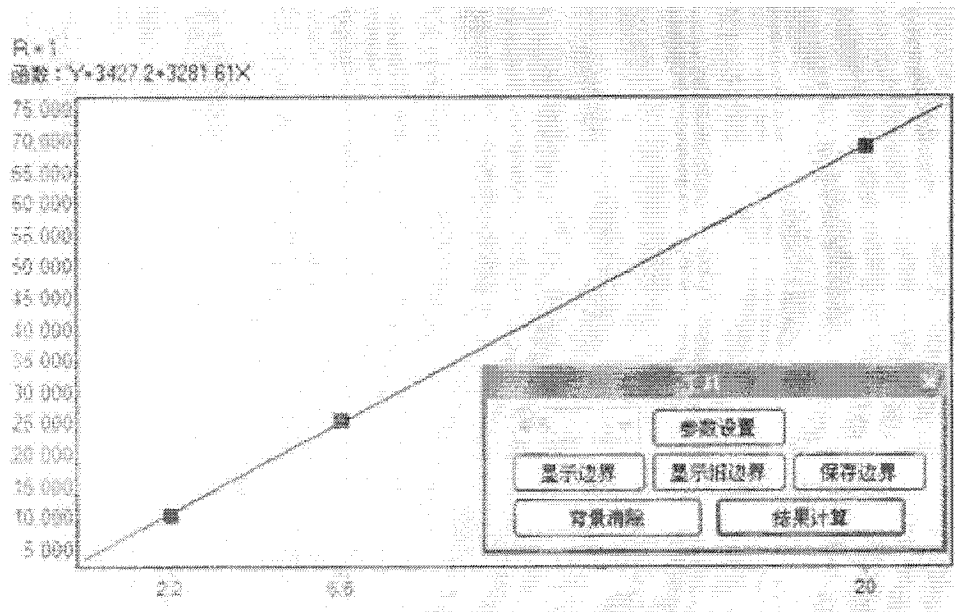


图 2(c)

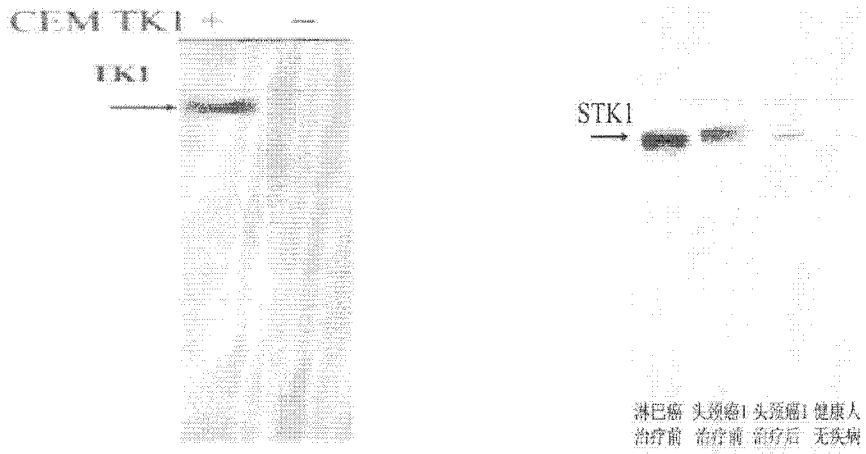


图 3(a)

图 3(b)

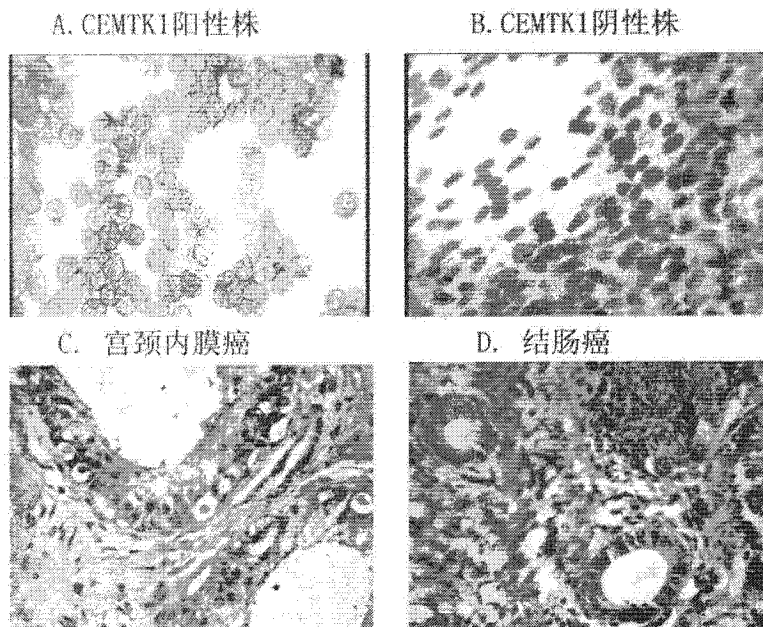
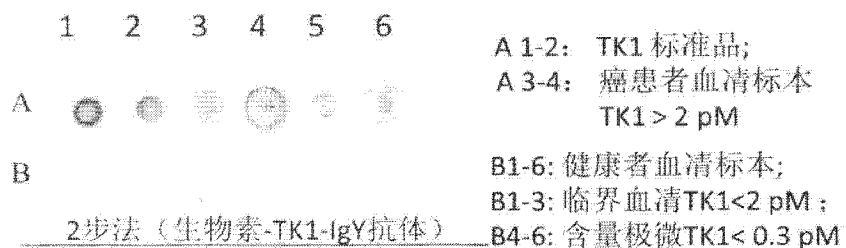


图 4



2步法 (生物素-TK1-IgY抗体) 与3步检测法比较

图 5

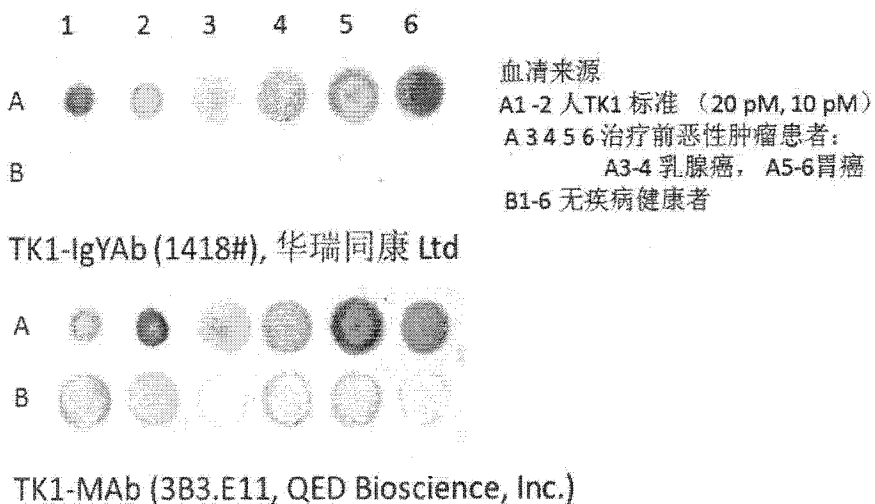
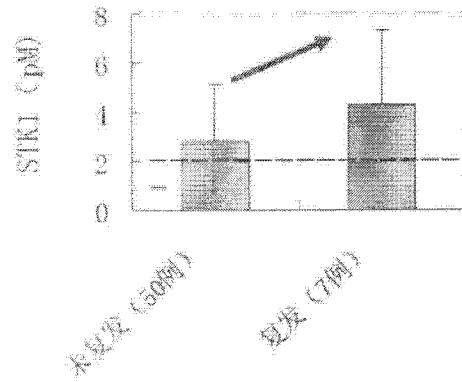


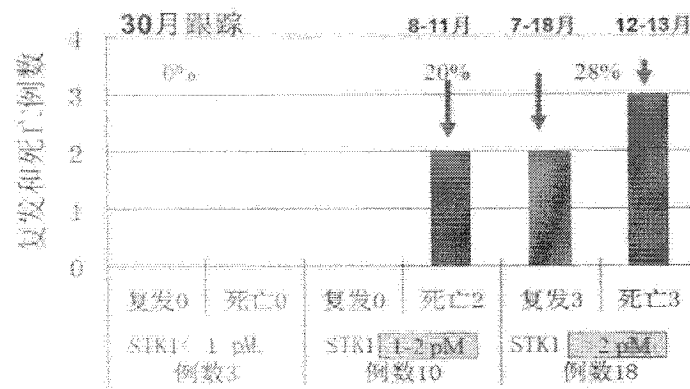
图 6

非小肺癌，贲门癌患者术前STK1浓度升高与复发风险的关系。跟踪2.5年



术前高水平STK1预示了较高的复发风险

图 7



非小细胞肺癌临床I和II期患者，STK1高于2pM,1-2 pM, 低于1 pM 的患者比较，复发和死亡率有升高的趋势。TK1是评估患者的 预后的因子之一

图 8

专利名称(译)	一种多表位TK1抗体的制备及其在肿瘤患者早期复发风险及预后评估中的应用		
公开(公告)号	<a href="#">CN102432683A</a>	公开(公告)日	2012-05-02
申请号	CN201110353972.5	申请日	2011-10-28
[标]申请(专利权)人(译)	周际 斯文·斯库格 艾伦·何		
申请(专利权)人(译)	周际 李劲 斯文·斯库格 艾伦·何		
当前申请(专利权)人(译)	周际 李劲 斯文·斯库格 艾伦·何		
[标]发明人	周际 李劲 斯文·斯库格 艾伦·何		
发明人	周际 李劲 斯文·斯库格 艾伦·何		
IPC分类号	C07K16/40 C07K16/02 C12N9/12 G01N33/53 G01N33/574		
代理人(译)	徐国文		
其他公开文献	CN102432683B		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

#### 摘要(译)

本发明提供了一种人宫颈癌细胞TK1单体N端23肽、C端20肽和C端28肽组成的抗原决定簇制备的一种高特异性、高灵敏度的配位组合抗人TK1抗体及其在肿瘤诊断中的应用。抗原决定簇所包含的氨基酸序列为：N端23肽(3-25)：CINLPTVLPGPSKTRGQIQVIL、C端20肽(206-225)：CPVPGKPGEAVAARKLFAPQ、C端28肽(198-225)：AGPDNKENCVPVPGKPGEAVAARKLFAPQ。本发明同时提供了应用该抗原制备抗体的方法，所提供的抗体试剂盒具有灵敏度高，特异性高，成本低廉等特点，通过增强化学发光点印迹检测法和免疫组化检测及检测试剂盒对对肿瘤康复人群进行定期监控，对其复发和转移风险及预后进行评估。

No.	片段长度	起始位置	中止位置	多肽序列	多肽的特异性程度
1	23	3	25	CINLPTVLPGPSKTRGQIQVIL	88
2	10	8	17	TVLPGPSKT	88
3	10	11	20	PGSPKTRGQ	87.8
4	10	29	38	FSGKSTELMR	88.5
5	10	34	43	TELMRRVRRF	88.5
6	10	37	46	MRRVRRFQIA	89.1
7	10	48	57	YKCLVIKYAK	89.7
8	10	59	68	TRYSSSFCTH	87.8
9	10	76	85	LPACLLRDVA	88.7
10	10	84	93	VAQEALGVAV	88.2
11	10	113	122	ANAGKTIVIVA	88.1
12	10	126	135	GTFQRKPFGA	89.2
13	10	128	137	FQRKPFGAIL	88.9
14	10	141	150	PLAESVVKLT	88.1
15	10	145	154	SVVKLTAVCM	88.9
16	10	156	165	CFREAAAYTKR	89.4
17	10	164	173	KRLGTEKEVE	88.6