

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl<sup>7</sup>

C07K 4/02



# [12] 发明专利申请公开说明书

C12Q 1/70 G01N 33/53  
G01N 33/536 G01N 33/566

[21] 申请号 01810709.5

[43] 公开日 2003 年 7 月 30 日

[11] 公开号 CN 1433428A

[22] 申请日 2001.4.5 [21] 申请号 01810709.5

[30] 优先权

[32] 2000. 4. 5 [33] US [31] 60/194,796

[86] 国际申请 PCT/US01/11233 2001. 4. 5

[87] 国际公布 WO01/77142 英 2001. 10. 18

[85] 进入国家阶段日期 2002. 12. 5

[71] 申请人 冲击诊断公司

地址 美国犹他州

[72] 发明人 Y·X·胡

[74] 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

代理人 张广育 姜建成

权利要求书 3 页 说明书 12 页 序列表 4 页  
附图 5 页

[54] 发明名称 辨别人乳头瘤病毒的免疫学方法

[57] 摘要

本发明涉及肽，其与来自致癌 HPV 感染的病人的抗体具有高度反应性。此外还公开了，本发明的肽用于检测 HPV 感染和 HPV 相关的上皮细胞异常，尤其是与癌症前期和恶性上皮细胞损伤相关的上皮细胞异常，的免疫测定方法。所述的肽和方法在对子宫颈癌或其前期的诊断，或对其他具有癌症演变危险的诊断中特别有用。所述的检测可以在血液样品，或其它体液或组织上，通过检查是否存在抗 HPV16 和/或 18 的 IgA 或 IgG 抗体而进行。

I S S N 1 0 0 8 - 4 2 7 4

1.一种化学组合物,其包含来自人乳头瘤病毒 16 和 18 的 E2, E6,或 E7 早期编码区域的肽,其在水溶液中是可溶的,且进一步具有下述的一种或多种特性,即赖氨酸或半胱氨酸残基靠近氨基末端,色氨酸和甲硫氨酸和半胱氨酸残基占少数而甘氨酸和天冬酰胺残基相对丰富。

2.如权利要求 1 所述的化学组合物,其中,所述的肽选自:

Asp Ile Cys Asn Thr Met His Tyr Thr Asn Trp Thr His Ile Tyr Ile Cys Glu  
Glu (SEQ ID NO : 1);

His Lys Ser Ala Ile Val Thr Leu Thr Tyr Asp Ser Glu Trp Gln Arg Asp  
Gln Phe (SEQ ID NO : 2);

Pro Thr Leu His Glu Tyr Met Leu Asp Leu Gln Pro Glu Thr Thr Asp Leu  
Tyr Cys Tyr Glu Gln Leu Asn Asp Ser Ser Glu Glu Glu (SEQ ID NO : 3);

Cys Asp Ser Thr Leu Arg Leu Cys Val Gln Ser Thr His Val Asp Ile Arg  
Thr Leu Glu (SEQ ID NO : 4);

Glu Lys Thr Gly Ile Leu Tlu Val Thr Tyr His Ser Glu Thr Gln Arg Thr  
Lys Phe (SEQ ID NO : 5).

3.一种如权利要求 1 所述的化学组合物,其羧基末端具有至少 1 个但不多于 6 个附加的甘氨酸残基。

4.一种如权利要求 2 所述的化学组合物,其羧基端具有多达 6 个附加的氨基酸残基,这 6 个残基是甘氨酸和天冬酰胺的任意组合。

5.一种如权利要求 2 所述的化学组合物,其羧基端具有至少 1 个但不多于 6 个附加的天冬酰胺残基。

6.如权利要求 2 所述的化学组合物,其中的半胱氨酸被羧基甲基半

胱氨酸取代。

7. 一种诊断方法，其包括下述步骤：a)将可能含有抗体的体液或组织样品与一个或多个来自人乳头瘤病毒 16 和 18 的 E2, E6,或 E7 早期编码区域的肽反应；b) 所述的人乳头瘤病毒衍生的肽和样品中的抗体形成复合物；其中，抗体-肽复合物的形成证明存在抗人乳头瘤病毒抗体；c)检测所述的抗体-肽复合物。

8. 如权利要求 7 所述的诊断方法，其中的一个或多个肽序列选自：

Asp Ile Cys Asn Thr Met His Tyr Thr Asn Trp Thr His Ile Tyr Ile Cys Glu  
Glu (SEQ ID NO : 1);

His Lys Ser Ala Ile Val Thr Leu Thr Tyr Asp Ser Glu Trp Gln Arg Asp  
Gln Phe (SEQ ID NO : 2);

Pro Thr Leu His Glu Tyr Met Leu Asp Leu Gln Pro Glu Thr Thr Asp Leu  
Tyr Cys Tyr Glu Gln Leu Asn Asp Ser Ser Glu Glu Glu (SEQ ID NO : 3);

Cys Asp Ser Thr Leu Arg Leu Cys Val Gln Ser Thr His Val Asp Ile Arg  
Thr Leu Glu (SEQ ID NO : 4);

Glu Lys Thr Gly Ile Leu Thr Val Thr Tyr His Ser Glu Thr Gln Arg Thr  
Lys Phe (SEQ ID NO : 5)

9. 如权利要求 8 所述的诊断方法，其中，在所述的序列中半胱氨酸被羧基甲基半胱氨酸取代。

10. 如权利要求 8 所述的诊断方法，其中，所述的诊断是 HPV 感染的诊断。

11. 如权利要求 8 所述的诊断方法，其中，所述的诊断是对 HPV 相关的上皮细胞异常的诊断。

12. 如权利要求 8 所述的诊断方法，其中，其中所述的诊断是对子宫颈癌的诊断。

13. 如权利要求 8 所述的诊断方法，其中，所述的诊断是对子宫颈腺癌的诊断。

14. 如权利要求 7 所述的诊断方法，其中，所应用的肽来源于 E2 编码区，所述的诊断是对致癌 HPV 感染的诊断。

15. 如权利要求 7 所述的诊断方法，其中，所应用的肽来源于 E6 编码区，所述的诊断是对癌的诊断。

16. 如权利要求 7 所述的诊断方法，其中，所应用的肽来源于 E7 编码区，所述的诊断是对癌的诊断。

17. 如权利要求 7 所述的方法，其中的检测步骤是通过可见的颜色改变检测完成的。

18. 如权利要求 7 所述的方法，其中的检测步骤是通过分光光度计完成的。

## 辨别人乳头瘤病毒的免疫学方法

### 发明背景

技术领域: 总的来说, 本发明涉及与直接针对 HPV 的抗体反应的肽。有人将这种类型的肽称作抗原性或免疫原性的。更具体地说, 本发明涉及来源于人乳头瘤病毒[HPV] E2, E6, 和 E7 癌基因蛋白的早期编码区的肽, 和利用上述肽通过免疫测定诊断与 HPV 相关的上皮细胞异常的方法。

现有技术: 人乳头瘤病毒(HPV), 因某些类型的该种病毒诱导疣或乳头瘤, 进而引起全部子宫颈癌而得名(Nobbenhuis 等, "Relation of human papillomavirus status to cervical lesion and consequences for cervical-cancer screening: a prospective study", The Lancet, 354 : 20-25,1999; Cuzick 等, "A systematic review of the role of human papilloma virus (HPV) testing within a cervical screening programme: summary and conclusions", British Journal of Cancer, 83: 561-565,2000)。这不仅包括鳞状上皮细胞癌 (Nobbenhuis 等, 1999)还包括腺癌(Pirog 等, "Prevalence of human papillomavirus DNA in different histological subtypes of cervical adenocarcinoma," American Journal of Pathology, 157: 1055-1062, 2000)。这些病毒还与外阴和阴道癌(Frisch 等, "Human papillomavirus associated carcinomas in Hawaii and the mainland US", Cancer 88 : 1464-1469,2000; Sugase 等, "Distinct manifestations of human papillomaviruses in the vagina", International Journal of Cancer, 72: 412-415,1997), 以及肛门癌 (Frisch 等, 2000)和阴茎癌 (Gregoire 等, "Preferential association of human papillomavirus with high-grade histologic variants of penile-invasive squamous cell carcinoma", Journal of the National Cancer Institute, 87: 1705-1709,1995)极为相关。而且, HPV 还可能是引起脑和颈部特定癌症(Mellin 等, "Human papillomavirus (HPV) DNA in tonsillar cancer: clinical correlates, risk of relapse, and survival",

International Journal of Cancer, 89: 300-304,2000; Zumbach 等,"Antibodies against oncoproteins E6 and E7 of human papillomavirus types 16 and 18 in patients with head-and-neck squamous-cell carcinoma", International Journal of Cancer, 85: 815-818,2000)的原因, 似与致命性更强的黑素瘤相关 (Dreau 等, "Human papilloma virus in melanoma biopsy specimens and its relations to melanoma progression", Annals of Surgery, 231: 664-671,2000), 还可能在肺癌(Soini 等,"Presence of human papillomavirus DNA and abnormal p53 protein accumulation in lung carcinoma", Thorax 51: 887-893,1996)等癌症中起作用。HPV 存在以数字命名的不同的基因型, 其中只有某个亚型是致癌或引起癌症的。目前已经鉴定了 100 多个 HPV 基因型。癌主要分布在 HPV 16 和 18, 同时也出自 31,33,35,45,51,52,56 和 58。病毒感染可以支持病毒繁殖的子宫颈和其它细胞, 在其中病毒可以引起异常的细胞改变, 进而导致威胁生命的恶性肿瘤。世界上, 子宫颈癌是妇女中第二大普遍的癌症。每年, 约 450,000 名妇女被诊断为子宫颈癌, 并有约 300,000 名妇女死于这种疾病。由于 50 年前通过细胞学筛分子宫颈癌, 这种癌症在发达国家的死亡率已大大降低。事实上, 子宫颈癌被认为是可以预防的。预防的关键在于及时地通过易于操作和普及的筛分程序鉴别和处理癌症前期的损害。目前, 子宫颈 HPV 感染占全球妇女癌症发生率的 11.8%。与此一致的是致癌 HPV 检测是鉴别癌症患者或极有可能患该种疾病的人的一种有效的方法。明显地, 当癌症处于较易治愈的阶段时, HPV 检测有助于早期的检测。

HPV 感染需要细胞能够复制它们的 DNA, 特别是那些处于基础表皮层的细胞。侵入的出现是由于微小损伤, 这使基础增生细胞暴露于表面。病毒附着于细胞表面受体, 进而侵入到胞质液中。感染病毒颗粒包含由 7000 到 8000 个碱基对构成的闭合环状双链 DNA 基因组, 其包括在 HPV 基因型中不规则出现的 8 个早期转录的开放阅读框 E1 到 E8, 2 个晚期开放阅读框和非编码的长控制区域。

有关 HPV DNA 如何整合到宿主染色体中, 以及 E1 和 E2 癌基因蛋白如何在这一过程中起作用的情况已有很多发现。其与免疫学诊断的关联在

于，抗 E1 和 E2 基因产物的抗体构成了出现 HPV 感染的证据。

HPV 感染的方式导致癌症集中于 E6 和 E7 基因产物。在宿主细胞中，它们和细胞的 p53 和调节细胞分裂的成视网膜细胞瘤清除蛋白形成复合物。通过功能性地中和或灭活这些蛋白，细胞进入细胞周期中的 S 期。E7 癌基因蛋白通过其与依赖于细胞周期蛋白的蛋白激酶 p21 的相互作用进一步动摇细胞控制。这些相互作用调整了控制宿主细胞增殖和分化（也就是转化）的阶段，使正常细胞转化为肿瘤发生前的细胞并最终完全表达恶性肿瘤的第一步骤。

E6 和 E7 癌基因蛋白在肿瘤细胞中是组成型表达的，使这些基因沉默可使恶性表型回复。因而，所述的 E6 和 E7 基因产物似乎是肿瘤特异性的抗原，可能靶定或探测免疫学癌试验中的抗体和控制 HPV 诱导的肿瘤的疫苗中的抗原。

事实上，由于所述的 E6 和 E7 癌基因蛋白一贯在子宫颈癌细胞中表达，它们似乎是抗体产生的天然靶位。在早期的研究中，针对 E7 癌基因蛋白的应答仅有中等程度的疾病特异性，但现在已经证明 E7 IgG 和 IgA 表现强烈的疾病相关性。与非癌对照相比，在子宫颈癌病人的血清中表现出高水平的抗 E6 和 E7 癌基因蛋白抗体。而且，即使这些抗体以较少量存在时，似乎也可以通过免疫学的方法检测。鉴定 HPV 感染和可能的癌症的灵敏度可因结合多病毒蛋白的血清学试验而提高。因此，用来自子宫颈癌患者的样品由两种癌基因蛋白可获得阳性的结果。

到目前巴氏涂片 (Papanicolaou smear) 是用于子宫颈癌的公众健康筛分的主要方法。由于多种原因，巴氏涂片 (Papanicolaou smear) 远非理想的筛分试验。缺点包括获得样品困难，假阴性率高 (达 20%)，需要配备了经过严格训练的人员的专业实验室。已经发展了核酸方法，但是也不理想，这主要是由于其花费高并同样需要受过严格训练的人员。另一种试验即，所谓“DNA 杂交捕获”。这一方法受限于高花费和取样困难。所需要的是低花费，简单，灵敏并特异的试验，其可在易于获得的身体样品中进行。

本发明的一个目的在于研制一种来自 HPV E2 蛋白和 HPV 16 和 18、

E6 和 E7 癌基因蛋白的抗体反应肽。进一步的目的在于以化学纯的形式提供上述肽。再进一步的目的在于提供简单、快速、花费低且更灵敏的试验，以诊断不仅仅是 HPV 感染，还包括大多数的，即使不是全部，HPV 相关的肿瘤。另一目的是提供在 HPV 接种物中使用的抗原，该抗原可诱导抗体产生和杀伤性 T 细胞的活性。

### 发明简述

本发明的上述目的和其他目的是通过新肽来实现的，所述肽的序列是由发明人通过仔细分析 HPV 16 和 18 的 E2, E6, 和 E7 癌基因蛋白的早期编码区而得到的。这些肽本身形成了一种高度灵敏和特异性的诊断免疫测定。经 HPV 感染后发现了针对 E2 致癌蛋白的抗体。在与 HPV 相关的肿瘤中发现了针对 E6 和 E7 癌基因蛋白的抗体。本发明的肽的大小在约 19 个氨基酸残基到约 30 个氨基酸残基之间，其易于通过化学方法合成，所获得的产物纯度可高于 99%。尽管所述的肽也可以通过其他方式获得，但以纯化的形式，其与随机抗体发生非期望的交叉反应的可能性大大降低。因此，本发明的纯化的肽使其自身成为一种高特异性的诊断的免疫学测定。所述的诊断的免疫学测定方法包括：采集可能含有抗体的体液或组织样品，若存在即与本发明的一种或多种肽反应，然后测定抗体-肽反应的存在。免疫测定所采用的来自 E2 区域的肽作为 HPV 感染与否的可靠指标。

免疫测定所采用的来自 E6 和 E7 癌基因蛋白的肽作为 HPV 相关的恶性或恶变前细胞发生的可靠指标。本发明最有用的方面之一是在对子宫颈癌，鳞状上皮细胞和腺癌及与致癌 HPV 感染相关的任何上皮细胞异常的诊断中的应用，所述的致癌 HPV 感染包括中空细胞病；角化过度症；包括上皮内瘤形成或上皮内病变的癌前期病症；高度发育不良；和侵袭性或恶性癌症。除子宫颈癌外，对针对来自 HPV E6 和 E7 癌基因蛋白的肽的抗体的检测对检测头和颈癌，小细胞肺癌和阴茎及肛门鳞状上皮细胞癌，和黑色素瘤也是有用的。

### 附图简述

结合下述的附图对本发明进行更为详细地描述，其中：

图 1 是相应于在图 2-4 中使用的氨基酸的单字母密码子；

图 2 是 E2 癌基因蛋白的早期编码区的编码描述，其中本发明的 SEQ NO 1 和 SEQ NO 2 加了下划线；

图 3 是 E6 癌基因蛋白的早期编码区的编码描述，其中本发明的 SEQ NO 3 加了下划线；

图 4 HPV 18 的 E7 癌基因蛋白的早期编码区的编码描述，其中本发明的 SEQ NO 5 加了下划线；

图 5 和 6 是表示对对照和经 HPV 感染及患 HPV 相关肿瘤的病人所做的诊断免疫测定的结果。

### 优选实施方案详述

本发明的肽来自 HPV 16 和 18 的 E2，E6 和 E7 癌基因蛋白的早期编码区。本发明的肽的推导是基于其预测的与在经致癌 HPV 感染的宿主中形成的抗体发生相互作用的能力。在所用的特异因子中用于筛选的是在水溶液中可溶的或具有亲水性能的。据估计，致癌基因产物蛋白的亲水区域更有可能是朝向在天然状态下完全蛋白表面的方向，由此形成抗原区域，最可能出现针对该区域的抗体反应性。

所包含的另一因子具有靠近 N-末端的单个赖氨酸或半胱氨酸。所述的靠近是指在末端或距末端不超过两个残基。所述的单个，应理解为另外的赖氨酸或半胱氨酸残基距 N-末端至少 8 个残基。当所述残基不位于 N-末端或靠近 N-末端时，优选地将赖氨酸或半胱氨酸添加到反应肽的 N-末端。还优选总的看来，色氨酸和甲硫氨酸残基占少数而甘氨酸和天冬酰胺残基相对丰富。所述的占少数是指尽可能少地出现，而所述的丰富是指在序列中对出现的此类氨基酸数量没有限定。所述肽组合物的更优选实施例中包括在羧基端添加多达 6 个附加的氨基酸残基，这些残基是甘氨酸和天冬酰胺的任意组合。附加的甘氨酸和天冬酰胺以促进抗体结合的方式在含水的反应培养基中确定所述肽的方向。

图 2-4 公开了含 16 到 30 个残基的 5 个特异的肽序列。在图 2-4 中编码序列的说明在图 1 中给出。如图 2 中所描述的 SEQ NO.1 和 NO.2 是由 HPV16 的 E2 区域衍生的,解码并按标准的三字符缩写的序列 1 和 2 如下:

Asp Ile Cys Asn Thr Met His Tyr Thr Asn Trp Thr His Ile Tyr Ile

1                    5                    10                    15

Cys Glu Glu (SEQ NO. 1);

His Lys Ser Ala Ile Val Thr Leu Thr Tyr Asp Ser Glu Trp Gln Arg

1                    5                    10                    15 (SEQ. NO. 2)

如图 3 所描述的序列 3 和 4 是由 HPV16 的 E7 的早期编码区域衍生的。解码并按标准的三字符缩写的序列 3 如下:

Pro Thr Leu His Glu Tyr Met Leu Asp Leu Gln Pro Glu Thr Thr Asp

1                    5                    10                    15

Leu Tyr Cys Tyr Glu Gln Leu Asn Asp Ser Ser Glu Glu Glu (SEQ. NO. 3)

20                    25                    30

Cys Asp Ser Thr Leu Arg Leu Cys Val Gln Ser Thr His Val Asp Ile

1                    5                    10                    15

Arg Thr Leu Glu (SEQ. NO. 4)

20

如图 3 所描述的序列 3 和 4 是由 HPV18 的 E2 的早期编码区域衍生的。解码并按标准的三字符缩写的序列 5 如下:

Glu Lys Thr Gly Ile Leu Thr Val Thr Tyr His Ser Glu Thr Gln Arg

1                    5                    10                    15

Thr Lys Phe (SEQ. NO. 5)

在诊断方法中应用所述的肽是基于下述的事实,即多个与 HPV 相关的上皮细胞异常的对象中发现了针对 HPV16 和 18 的 E2, E6 和 E7 癌基因蛋白的天然表位的抗体,上述的异常范围从单纯的感染到恶性肿瘤。更具体地说,这种 HPV 相关的细胞异常可以包括但不限于中空细胞病;角

化过度症；包括上皮内瘤形成或上皮内病变的癌前期病症；高度发育不良；和侵染性或恶性癌症。上文已经讨论了与 HPV 相关的恶性肿瘤。所述的方法包括采集可能包含抗体的体液或组织的样品。这种样品优选易于获取的来自静脉血样品的血清或血浆。但是，可能本领域技术人员已知的可能含有抗体的子宫颈分泌物，子宫组织，或来源于身体其他部分的组织，其他体液也可以作为采集病人样品的来源。当使肽抗原和样品抗体在合适的培养基中反应时，则可进行分析确定是否存在抗体-肽反应。

### 肽序列的合成

虽然本发明的肽可以由多种现有技术中的方法获得，但其中重组方式和化学合成是优选的方法，这是由于它们便于积累大量的以基本纯化的形式存在的肽，在本实施例中可占重量的 99%。所述的肽以 0.25 的比例合成，使用 9-芴甲氧羰基(FMOC)-保护的 L-氨基酸，超级酸不稳定的 2-氯三苯甲基树脂 (Novabiochem, Nottingham, UK) 作为固相支持物。预加到反应容器中的树脂用二甲基甲酰胺洗，然后完全排空。向上述树脂中加入 10ml 含 20% 哌啶的二甲基甲酰胺。将所述混合物振荡 5 分钟后排空。加入另外 10ml 含 20% 哌啶的二甲基甲酰胺，将所述混合物振荡 30 分钟。排空后所述的树脂用二甲基甲酰胺洗 4 次，用二氯甲烷洗一次。用标准的水合茚三酮检测，若上述树脂珠变蓝则认为其已制备好了。

对于每个氨基酸，偶联溶液的配置如下：1 mmol 选择的 Fmoc 氨基酸；2.1 ml 0.45 M 2-(1H-苯并三唑-1-基)-1, 1, 3, 3-四甲基脒-六氟磷酸/水合苯并三唑 [1 mmol]；348  $\mu$ l 的 N, N-二异丙基乙胺 [2 mmol]。将混合物振荡至少 30 分钟。将反应容器排空。将所述的树脂用二甲基甲酰胺洗 4 次，最后用二氯甲烷洗。用标准的茚三酮试验确定偶联的氨基酸。对于每个氨基酸，以合适的顺序将偶联溶液加入到所述的树脂中，重复上述偶联反应直到每个氨基酸均处于所述肽的适当位置。

通过在下述溶液中进行 2 小时的反应将完成的肽从树脂上切割下来，所述的溶液包括 5% H<sub>2</sub>O, 5% 苯酚，3% 苯硫基甲烷，3% 乙烷二硫醇，3% 三异丙基硅烷，81% 三氟乙酸。切割后，所述的树脂混合物滤过到冷的甲基-叔丁基-醚中。将沉淀的肽用冷的甲基-叔丁基-醚洗 2 次，在氮气条

件下干燥。肽的分子量用 Matrix-Assisted laser Desorption Time-Flight 质谱核对，用 18300A 5 $\mu$ m 柱的高压液相色谱确定纯度。合成的肽的纯度达 99% 的水平，但是需强调的是为达到分析的目的较低的纯度水平也可能是合适的。

### 氨基酸序列的保存

人造的氨基酸序列以 1 mg/ml 的浓度悬浮于 pH 7.0 的 PBS 中。所述的序列溶液分装成 500 $\mu$ l 肽/管保存在 -20 $^{\circ}$ C。

### 马来酸酐结合所述的氨基酸序列至滴定板中

用 REACTI-BIND™ 马来酸酐激活的聚苯乙烯板 (Pierce, Rockford, IL)。用包被缓冲液 (100 mM 碳酸氢钠缓冲液 pH 9.4) 将每一氨基酸稀释至 12.5 $\mu$ g/ml。每一滴定孔中添加 100 $\mu$ l (1.25 $\mu$ g) 经稀释的序列溶液。将上述滴定板在室温下摇动温育 1 小时。将上述的板倒空，然后将剩余的液体轻敲到干净的纸巾上。每孔用 100 $\mu$ l 洗涤缓冲液 (含 0.1% 牛血清白蛋白 0.05% 吐温-20 的磷酸盐缓冲液, pH 7.0) 洗涤。总共重复 3 遍。每一遍均需将板倒空并将剩余的液体轻敲到干净的纸巾上。向每孔中加入 200 $\mu$ l 封闭缓冲液 (含 3% 牛血清白蛋白和 0.05% 吐温-20 的磷酸盐缓冲液, pH 7.0)。封闭溶液在每孔中停留 1 分钟。将上述滴定板倒置排空。加填封闭溶液再排空反复三次。处理完的滴定板在室温下干燥，可在 4 $^{\circ}$ C 下保存 4 个月。

### 样品采集

所有的样品均由女性病人在其预定的妇科检查过程中采集。用棉签采集子宫颈内细胞。用于 ThinPrep Pap 涂片 (Cytoc Corporation, Stamford, CT) 的细胞分散于 ThinPrep 防腐溶液中。HPV DNA 杂合体捕获试验 (Digene Corporation, Silver Spring, MD) 的细胞悬浮于相同的介质中。ThinPrep Pap 涂片和 HPV DNA 杂合体捕获试验将在下面进一步阐述。

用普通的静脉切开术方法获得静脉血，用 21-或 22-号的两头针至琼脂阻隔的管中。从每个受试者总共取 7-9 ml 血。在室温下 15 分钟以形成凝结，将所述的血浆离心 15 分钟，用一次性移液管从细胞中抽吸出血清，以 0.25-ml 每小份分装到 Eppendorf 管中，于 -80 $^{\circ}$ C 下贮存。

### 免疫测定

得自 14 到 15 岁的处女的血清作为阴性对照，用洗涤缓冲液(含 0.1% 牛血清白蛋白和 0.5%吐温-20 的磷酸盐缓冲液 pH 7.0)将受试和对照血清以 1: 25 倍稀释。每孔添加 100 $\mu$ l 稀释血清，试验用板在室温下摇动温育 1 小时。每孔每次用 200 $\mu$ l 洗涤缓冲液漂洗，共三次。每次漂洗 5 分钟。将板倒空并将剩余的液体轻敲到干净的纸巾上。

每孔添加 100 $\mu$ l 用洗涤缓冲液 1: 8000 倍稀释的辣根过氧化物酶偶联的小鼠抗人 IgG，将所述的测试板在室温下温育 1 小时。每孔以多功能移液管每次用 200 $\mu$ l 洗涤缓冲液漂洗，共 4 次。每次漂洗 5 分钟。每次漂洗前，将板倒空并将剩余的液体轻敲到干净的纸巾上。

向每孔添加 100 $\mu$ l 3, 3',5, 5'-四甲基联苯胺，辣根过氧化物酶的底物。在室温下温育直到可以见到变为明显的蓝绿色，5-30 分钟，然后向每孔中加入 5 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>150 $\mu$ l 以终止反应。

### **ThinPrep Pap 试验和 HPV DNA 杂合体捕获的比较试验**

ThinPrep Pap 试验—清楚地替代常规的 Pap 涂片，ThinPrep Pap 试验克服了常规方法的限制。通过改进样品玻片的制备方式，ThinPrep Pap 实际上改进了样品的质量。在临床试验中，所述的 ThinPrep Pap 试验低级和更严重损害的检测对总体人群的筛选改进了 65%，对高危人群的筛选改进了 6%。其也将亚适当样品的数量降低了 50%多。因此，此处所用的 ThinPrep Pap 用于优化子宫颈细胞学的结果。

试验中将子宫颈拭子在管形瓶的防腐液中漂洗，而并非象常规的 Pap 涂片那样将子宫颈的样品涂在玻片上。所述的样品送往经检测合格的临床实验室，在那里用 ThinPrep 2000 处理机分散、过滤样品中的内容物以压缩血液，粘液，和炎症。薄的甚至层状的子宫颈细胞机械地沉淀到玻片上，结果形成易于进行精确显微检测的制备得很好的均匀制品。所述的玻片经妇科细胞学家委员会检测并作出结论。

杂合捕获 II HPV DNA 试验—杂合捕获 II HPV DNA 试验(HC II, Digene Corporation, Silver Springs, MD)是用作与应用本发明的肽的 ELISA 试验的对照。其经美国食品和药品管理局批准用于检测致癌 HPV DNA，作为

ASCUS (意义未定的非典型鳞状细胞)或其它异常 Pap 结果的反馈。所述的杂合捕获包括用非放射性探针的分子杂交,以及用于化学放射的杂合体检测的扩增。用于分析的材料是经变性且与特异的基因探针反应形成可被覆盖于管壁的抗体捕获的杂合 RNA/DNA。杂交固定后,它们与针对 RNA/DNA 且与碱性磷酸酶偶联的特异抗体反应。形成稳定的基层,所述的杂合体通过分光光度法由化学放射检测。

所述的试验依制造商的建议用微量滴定板形式和针对“高致癌危险性”的 HPV 探针。这是在与进行 ThinPrep Pap 涂片的同一个经检测合格的临床实验室中进行的。人乳头瘤病毒检测是定量的,所述样品进行一次或多次读数,所认定的阳性对照含有病毒 DNA (每次试验 1 pg/mL HPV DNA 或 5000 HPV 基因组拷贝)。

### 完全 ELISA 试验的可见性/解释

滴定板的底部用 70%的乙醇清洗,将滴定板置于读数器。

在 450nm 下读取吸光度,以添加了 100ml 2N HCl 的 100ml TMB 溶液作空白对照。标记了 A1 & A2 的孔用于估计背景(A1, A2)。

### 结果

将所述的结果与 Pap 涂片, Digene HPV DNA 试验的比较,以及本发明的免疫分析结果列于表 1, 并如图 5 和 6 所示。检测了 31 个样品。样品 19 到 31 来自由于性史和/或在先的 Pap 涂片而具有低先期测验概率的妇女,其结果在用于全部试验的所有样品中都是阴性。这表明了低假阳性率和高阴性预测率。

样品 1 到 18 来自由于已证明的临床/病理史或多伙伴性史而具有高先期测验概率的妇女。在所有这些样品中至少一个依照本发明的免疫学实验显示阳性。这表明了高的阳性预测率。由于在一些情况下三种免疫分析中只有一种是阳性,即显示出肽结合体的价值。低的假阳性率和高真阳性率体现了试验的高灵敏性和高特异性。

另外值得注意的是,病人 1 具有经病理证实的子宫腺癌。病人 2 具有子宫鳞状细胞癌。

本发明参考目前认为是实践中的最佳方式的实施例进行介绍和描述，但应当理解的是在不脱离本发明目前所公开的内容的前提下，可以通过多种变换以不同的实施方案改写本发明，而这均包含在本发明下述权利要求的范围内。

更具体地说，可能作出的多种变换总结于授予 Dillner 等人的美国专利 5,629,146 中：

通过表明某种肽是免疫原性的，发明人已定义了其包含与人血清反应的表位。包含在所述肽序列中的该表位不仅仅依赖于所述的确定的肽序列，也可以包含于对起始肽进行了多种微小修饰的序列中。所述的修饰包括延伸、截短、环化以及氨基酸的取代。当经上述修饰的肽应看作是含有新表位的新肽时将会出现一些问题。通过原始肽与经修饰肽的竞争免疫试验可以作出直接地判断即，如果经修饰的肽与针对原始肽的抗体有基本相同的免疫反应性则说明其包含相同的表位。需要强调的是肽可以由多种方式产生。本文中的肽采用有机化学方法合成，但相同的肽也可以通过其他方式如重组 DNA 表达系统产生。

应当理解此处对本发明的方法所进行的描述仅是示例性，而不是对本发明的限制。可以通过多种不同的方式进行免疫学试验。对与特异抗原结合的抗体的检测可以通过多种针对抗体的抗体（抗-抗体），或其它与抗体有亲和性的化合物，如蛋白 A 或蛋白 G 实现。这些试剂可用多种不同的方式进行标记，例如放射性（放射免疫分析），荧光（荧光免疫分析）酶促地（酶联免疫分析，ELISA 或 EIA）。一种特定的酶促免疫分析的情况是在组织切片上检测抗原抗体复合物。这种过程是指免疫染色或免疫组织化学，虽然其原理与 ELISA 相似。

ELISA 也可以多种形式进行。用几层抗-抗体，抗生物素蛋白复合物和酶-抗-酶抗体复合物来增强 ELISA 的灵敏性的方法是本领域技术人员所公知的。如本文所述固定抗原的固体支持物通常是塑料，但也可以是其它的固体支持物如乳胶或琼脂糖。并不需要将抗原直接固定到固相支持物上。通常使用的 ELISA 形式是将特异抗原通过针对该抗原的固相固定的抗体固定到固体支持物上，所谓的捕获抗体 ELISA 或夹心 ELISA。免疫

分析的一种特定的形式包括将抗原印迹（转移）到薄片状的固体支持物上，此称之为免疫印迹。典型的，这种固体支持物是硝酸纤维素膜或尼龙膜，但也可以使用其他的支持物。该方法的一个显著的特点，在印迹前根据抗原的大小将其通过凝胶电泳或类似的方法分离。可以用与其他免疫学试验中类似的方法检测在薄层上与特异抗原结合的抗体。此处所述的用抗-抗体，抗生物素蛋白复合物增强步骤和酶促标记所进行的检测只是这种检测的一个实例。

对于一般的诊断方法，已知由几种诊断方法结合可以产生一种比包含在所述结合中的各个单独的试验更灵敏和/或特异性更强的试验方法。显然，此处所述的任何抗体试验均可以彼此结合或与其他实验相结合，以产生具有优化的灵敏性和特异性的结合诊断方法。



His Lys Ser Ala Ile Val Thr Leu Thr Tyr Asp Ser Glu Trp Gln Arg  
 1 5 10 15

<210> 3  
 <211> 30  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 来自HPV-16 E2早期区域

<400> 3

Pro Thr Leu His Glu Tyr Met Leu Asp Leu Gln Pro Glu Thr Thr Asp  
 1 5 10 15

Leu Tyr Cys Tyr Glu Gln Leu Asn Asp Ser Ser Glu Glu Glu  
 20 25 30

<210> 4  
 <211> 20  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 来自HPV-16 E2早期区域

<400> 4

Cys Asp Ser Thr Leu Arg Leu Cys Val Gln Ser Thr His Val Asp Ile  
 1 5 10 15

Arg Thr Leu Glu  
 20

<210> 5  
 <211> 19  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 来自HPV-16 E2早期区域



<220>

<221> misc\_feature

<222> (19)..(19)

<223> Xaa =L-羧甲基半胱氨酸

<400> 7

Pro Thr Leu His Glu Tyr Met Leu Asp Leu Gln Pro Glu Thr Thr Asp  
1 5 10 15

Leu Tyr Xaa Tyr Glu Gln Leu Asn Asp Ser Ser Glu Glu Glu  
20 25 30

<210> 8

<211> 20

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 来自HPV-16 E2早期区域

<220>

<221> misc\_feature

<222> (1)..(1)

<223> Xaa =L-羧甲基半胱氨酸

<220>

<221> misc\_feature

<222> (8)..(8)

<223> Xaa =L-羧甲基半胱氨酸

<400> 8

Xaa Asp Ser Thr Leu Arg Leu Xaa Val Gln Ser Thr His Val Asp Ile  
1 5 10 15

Arg Thr Leu Glu  
20

---

符号	氨基酸
Y	L-酪氨酸
G	甘氨酸
F	L-苯丙氨酸
M	L-甲硫氨酸
A	L-丙氨酸
S	L-丝氨酸
I	L-异亮氨酸
L	L-亮氨酸
T	L-苏氨酸
V	L-缬氨酸
P	L-脯氨酸
K	L-赖氨酸
H	L-组氨酸
Q	L-谷氨酰胺
E	L-谷氨酸
W	L-色氨酸
R	L-精氨酸
D	L-天冬氨酸
N	L-天冬酰胺
C	L-半胱氨酸

---

图 1

SEQ ID. NO. 1 =

N-末端 DICNTMHYTNWTHIYICEE C-末端

SEQ ID. NO. 2 =

N-末端 HKSAIVTLTYDSEWQR C-末端

SEQ. ID. NOs.1和2,用下划线标出,表示HPV-16的E2编码区,如下:

	5	10	15	20	25	30
1	M E T L C Q R L N V C Q D K I L T H Y E N D S T D L R D H I					
31	D Y W K H M R L E C A I Y Y K A R E M G F K H I N H Q V V P					
61	T L A V S K N K A L Q A I E L Q L T L E T I Y N S Q Y S N E					
91	K W T L Q D V S L E V Y L T A P T G C I K K H G Y T V E V Q					
121	<u>F D G D I C N T M H Y T N W T H I Y I C E E</u> A S V T V V E G					
151	Q V D Y Y G L Y Y V H E G I R T Y F V Q F K D D A E K Y S K					
181	N K V W E V H A G G Q V I L C P T S V F S S N E V S S P E I					
211	I R Q H L A N H P A A T H T K A V A L G T E E T Q T T I Q R					
241	P R S E P D T G N P C H T T K L L H R D S V D S A P I L T A					
271	F N S S H K G R I N C N S N T T P I V H L K G D A N T L K C					
301	L R Y R F K K H C T L Y T A V S S T W H W T G H N V K <u>H K S</u>					
331	<u>A I V T L T Y D S E W Q R</u> D Q F L S Q V K I P K T I T V S T					
361	G F M S I					

图 2

SEQ ID. NO. 3 =

N- 末端 PTLHEYMLDLQPETTDLYCYEQLNDSSEE C- 末端

SEQ ID. NO. 4 =

N- 末端 CDSTLRRCVQSTHVDIRTLE C- 末端

Sequence ID. NOs. 3和5, 用下划线标出, 表示HPV-16 E7的编码区, 如下:

	5	10	15	20	25	30
1	M H G D T	<u>P T L H E Y M L D L O P E T T D L Y C Y E Q L N D</u>				
31	<u>S S E E E</u>	D E I D G P A G Q A E P D R A H Y N I V T F C C K				
61	<u>C D S T L R L C V Q S T H V D I R T L E</u>	D L L M G T L G I V				
91	C P I C S Q K P					

图 3

SEQ ID. NO. 5 =

N- 末端 EKTGILTVTYHSETQRTKFC- 末端

SEQ ID. NO. 5, 用下划线标出, 表示HPV-18 E2的编码区, 如下:

	5	10	15	20	25	30
1	M Q T P K E T L S E R L S C V Q D K I I D H Y E N D S K D I					
31	D S Q I Q Y W Q L I R W E N A I F F A A R E H G I Q T L N H					
61	Q V V P A Y N I S K S K A H K A I E L Q M A L Q G L A Q S R					
91	Y K T E D W T L Q D T C E E L W N T E P T H C F K K G G Q T					
121	V Q V Y F D G N K D N C M T Y V A W D S V Y Y M T D A G T W					
151	D K T A T C V S H R G L Y Y V K E G Y N T F Y I E F K S E C					
181	E K Y G N T G T W E V H F G N N V I D C N D S M C S T S D D					
211	T V S A T Q L V K Q L Q H T P S P Y S S T V S V G T A K T Y					
241	G Q T S A A T R P G H C G L A E K Q H C G P V N P L L G A A					
271	T P T G N N K R R K L C S G N T T P I I H L K G D R N S L K					
301	C L R Y R L R K H S D H Y R D I S S T W H W T G A G N <u>E K T</u>					
331	<u>G I L T V T Y H S E T Q R T K F</u> L N T V A I P D S V Q I L V					
361	G Y M T M					

图 4

表1 用本发明的肽进行的免疫学试验。这些分析与对来自相同病人的子宫颈细胞的Pap细胞学和HPV DNA杂合捕获分析相比较。由妇科医生从供试者采血清和子宫颈细胞。在经证明合格的临床实验室进行Pap涂片和所述的Digene HPV DNA试验。在完成这一试验前，进行所述的Impact Diagnostics HPV免疫试验的人员不知道其它试验的结果或受试者的历史。除非特别说明，受试者均在35岁以上。图例：pos=阳性；neg=阴性；n/a=不适合或未做；insufficient=用于分析的细胞数不足。

样品	Pap 涂片	Digene HPV DNA 试验	Impact HPV 免疫试验 <sup>2</sup>			注:
			HPV-16a	HPV-16b	HPV-18	
1	neg	n/a	pos	pos	neg	在1987年诊断的子宫颈癌
2	n/a	n/a	pos	pos	pos	损伤手术去除 在1991年诊断的子宫颈癌
3	neg	neg	pos	neg	pos	全部子宫切除
4	neg	neg	pos	neg	pos	以前Pap涂片 -- CIN III <sup>3</sup>
5	neg	量不足	neg	neg	pos	以前Pap涂片 -- CIN III <sup>3</sup>
6	neg	neg	neg	pos	pos	以前Pap涂片 -- CIN I <sup>3</sup>
7	neg	neg	pos	pos	pos	以前Pap涂片 -- CIN I <sup>3</sup>
8	neg	neg	pos	neg	pos	以前Pap涂片 -- CIN I <sup>3</sup>
9	neg	neg	neg	neg	pos	以前Pap涂片 -- CIN I-II <sup>3</sup>
10	neg	neg	pos	pos	neg	无异常Pap涂片史；
11	neg	neg	pos	pos	pos	认可多性伙伴
12	neg	neg	pos	pos	pos	无异常Pap涂片史；
13	neg	neg	pos	neg	neg	无异常Pap涂片史；
14	neg	neg	neg	neg	pos	认可多性伙伴
15	ASCUS <sup>3</sup>	pos	neg	pos	pos	无异常Pap涂片史；
16	neg	neg	pos	pos	neg	无异常Pap涂片史；
17	n/a	n/a	pos	neg	neg	无异常Pap涂片史；
18	n/a	n/a	pos	neg	neg	无异常Pap涂片史；
19	neg	neg	neg	neg	neg	无异常Pap涂片史；
20	neg	neg	neg	neg	neg	无异常Pap涂片史；
21	neg	n/a	neg	neg	neg	有性行为的女性
22	neg	neg	neg	neg	neg	有性行为的女性
23	neg	neg	neg	neg	neg	处女--14岁
24	neg	neg	neg	neg	neg	处女--15岁
						无异常Pap涂片史；
						认可多性伙伴
						无异常Pap涂片史
						无异常Pap涂片史
						无异常Pap涂片史

图 5

表1续表:用本发明的肽进行的血清免疫学试验

样品	Pap 涂片	Digene HPV DNA 试验	Impact HPV 免疫试验 <sup>2</sup>		HPV-18	注释
			HPV-16a	HPV-16b		
25	neg	neg	neg	neg	neg	无异常Pap涂片
26	neg	neg	neg	neg	neg	无异常Pap涂片
27	neg	neg	neg	neg	neg	无异常Pap涂片
28	neg	neg	neg	neg	neg	无异常Pap涂片
29	neg	neg	neg	neg	neg	无异常Pap涂片
30	neg	neg	neg	neg	neg	无异常Pap涂片
31	neg	neg	neg	neg	neg	无异常Pap涂片

<sup>1</sup> 所述的Digene HPV DNA试验需要足够的细胞以获得成功的HPV DNA检测。同样只有当病毒DNA充分复制时才能检测到HPV DNA (当感染处于休眠状态不行)。

<sup>2</sup> HPV-16a=HPV-16的E2区的表位; HPV-16b= HPV-16的E7区的表位; HPV-18= HPV-18的E2区的表位; 对于HPV免疫试验, 阳性结果为可见的显著蓝色而阴性结果保持无色。

<sup>3</sup> ASCUS 指Pap涂片中异常的或非典型的细胞。这些细胞的重要性通常未确定, 而且在大多数情况下证明其并不重要。在低度的发育不良(CIN I)中只有一些细胞是异常的, 而中度发育不良(CIN II)异常细胞包括子宫内层表面近一半厚度的细胞。在严重发育不良或原位癌中(CIN III)中全部内层的细胞是异常的, 但异常的细胞并未扩散到表面以下。原位癌指"原地癌症"。如不进行常演变为侵袭性癌症。在发育不良和原位癌中所有的异常均局限于子宫的表层("皮")。而对于侵袭性癌, 不仅是全部的内层细胞异常, 它们还侵入到表层以下的组织。

图 6

专利名称(译)	辨别人乳头瘤病毒的免疫学方法		
公开(公告)号	<a href="#">CN1433428A</a>	公开(公告)日	2003-07-30
申请号	CN01810709.5	申请日	2001-04-05
发明人	Y·X·胡		
IPC分类号	C07K14/025 G01N33/569 G01N33/68 C07K4/02 C12Q1/70 G01N33/53 G01N33/536 G01N33/566		
CPC分类号	G01N2469/20 G01N33/6854 C12N2710/20022 G01N33/56983 G01N2333/025 C07K14/005		
代理人(译)	姜建成		
优先权	60/194796 2000-04-05 US		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明涉及肽，其与来自致癌HPV感染的病人的抗体具有高度反应性。此外还公开了，本发明的肽用于检测HPV感染和HPV相关的上皮细胞异常，尤其是与癌症前期和恶性上皮细胞损伤相关的上皮细胞异常，的免疫测定方法。所述的肽和方法在对宫颈癌或其前期的诊断，或对其他具有癌症演变危险的诊断中特别有用。所述的检测可以在血液样品，或其它体液或组织上，通过检查是否存在抗HPV16和/或18的IgA或IgG抗体而进行。

符号	氨基酸
Y	L-酪氨酸
G	甘氨酸
F	L-苯丙氨酸
M	L-甲硫氨酸
A	L-丙氨酸
S	L-丝氨酸
I	L-异亮氨酸
L	L-亮氨酸
T	L-苏氨酸
V	L-缬氨酸
P	L-脯氨酸
K	L-赖氨酸
H	L-组氨酸
Q	L-谷氨酰胺
E	L-谷氨酸
W	L-色氨酸
R	L-精氨酸
D	L-天冬氨酸
N	L-天冬酰胺
C	L-半胱氨酸

图 1