



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101358964 B

(45) 授权公告日 2012.06.20

(21) 申请号 200710075443.7

(22) 申请日 2007.07.31

(83) 生物保藏信息

CCTCC NO. C200722 2007.07.16

(73) 专利权人 叶尚勉

地址 611130 四川省成都市梓桐街 42 号

(72) 发明人 叶尚勉

(74) 专利代理机构 成都高远知识产权代理事务
所(普通合伙) 51222

代理人 李高峡

(51) Int. Cl.

G01N 33/52(2006.01)

G01N 33/577(2006.01)

(56) 对比文件

CN 1718588 A, 2006.01.11, 全文.

US 20030171280 A1, 2003.09.11, 全文.

Amiot L..HLA-G Class I Gene Expression

in Normal and Malignant Hematopoietic Cells. 《Human Immunology》.1998, 第 59 卷(第 8 期), 524-528.

审查员 杨冀川

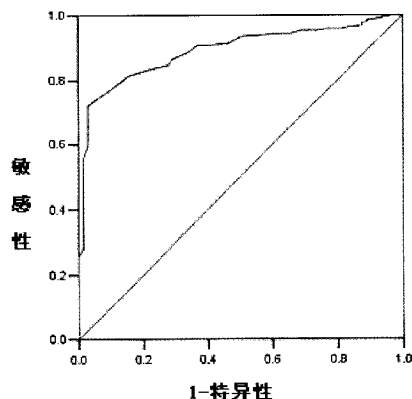
权利要求书 1 页 说明书 10 页 附图 12 页

(54) 发明名称

含抗 HLA-G 的单克隆抗体的癌症诊断试剂盒及其应用

(57) 摘要

本发明公开了一种含抗 HLA-G 的单克隆抗体的癌症诊断试剂盒及其应用。该试剂盒是由一种新的抗 HLA-G 的单克隆抗体 HGY-2 和抗 HLA-G 的单克隆抗体 HGY 制备的酶联免疫癌症诊断试剂盒,其中, HGY-2 是由含有由中国典型培养物保藏中心保藏的保藏编号为 CCTCC C200722 的杂交瘤细胞株产生的。本发明的试剂盒以血清或其他体液为被测样品,使用方便,准确率高,患者依从性好,为癌症诊断提供了一种新的方法和途径。



1. 一种单克隆抗体 HGY-2,其特征是:它是由中国典型培养物保藏中心保藏的保藏编号为 CCTCC NO. C200722 的杂交瘤细胞株产生的。
- 2、根据权利要求 1 所述的单克隆抗体,其特征是:其属于 IgG1 亚型。
- 3、一种试剂盒,其特征是:含有至少一种如权利要求 1、2 所述的单克隆抗体。
- 4、根据权利要求 3 所述的试剂盒,其特征是:还含有由中国典型培养物保藏中心保藏的保藏编号为 CCTCC NO. C200416 的杂交瘤细胞株产生的单克隆抗体 HGY。
- 5、根据权利要求 3 或 4 所述的试剂盒,其特征是:用于诊断恶性肿瘤。
- 6、根据权利要求 3 或 4 所述的试剂盒,其特征是:用于评价恶性肿瘤发展、转移及预后。
- 7、根据权利要求 3 或 4 所述的试剂盒,其特征是:用于指导癌症的治疗。
- 8、根据权利要求 3 或 4 所述的试剂盒,其特征是:所述试剂盒采用 ELISA 技术。
- 9、一种杂交瘤细胞株,其特征是:该杂交瘤是由中国典型培养物保藏中心保藏的保藏编号为 CCTCC NO. C200722 的杂交瘤细胞株。

含抗 HLA—G 的单克隆抗体的癌症诊断试剂盒及其应用

技术领域

[0001] 本发明涉及一种单克隆抗体,具体地说,涉及一种抗人类白细胞抗原 G(HLA-G) 的单克隆抗体及其分泌该抗体的杂交瘤细胞株。

[0002] 本发明还涉及利用该抗体制备的诊断恶性肿瘤的酶联免疫测定试剂盒,以及该试剂盒在癌症诊断,预后评价,治疗方案的选择以及治疗监测的临床应用。

背景技术

[0003] 人类白细胞抗原 G(HLA-G) 是一种非经典 I 类白细胞抗原(见 Geraghty et al. Proc Natl Acad Sci U S A. 1987 ;84 :9145-9)。该白细胞抗原的基因位于第 6 对染色体的短臂上;基因和表达的产物与经典 I 类白细胞抗原(HLA-A, B 和 C) 有 86% 雷同。HLA-G 与经典 I 类白细胞抗原相比有两个重要特点:一是、在正常生理情况下,HLA-G 仅在胎盘的绒毛膜细胞表达(见 Kovats et al. Science. 248 :220. 1990 ;McMaster et al. J Immunol. 154 :3771, 1995) 而 HLA-A, -B 和 -C 在几乎所有的有核体细胞均有表达。二是、HLA-G 不具有多态性:HLA-G 只有一种,仅有 6 个等位基因;而经典 I 类白细胞抗原有 96 种,536 个等位基因。不过,HLA-G 基因的转录产物可被剪切成为异构体。现已观察到四种表达膜蛋白的 HLA-G mRNA 的异构体:HLA-G1、HLA-G2、HLA-G3 和 HLA-G4 和三种表达可溶性蛋白的 HLA-G mRNA 的异构体:HLA-G5、HLA-G6 和 HLA-G7。(见 Ishitani et al. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 85 :3947. 1992 ;Kirszenbaum et al, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 91 :4029. 1994 ;Fujii et al J. Immunol. 153 :5516. 1995)。经十多年来研究已经证明:HLA-G 具有抑制自然杀伤细胞(NK) 和细胞毒性 T 淋巴细胞(CTL) 的功能,在胎儿的免疫耐受基理中起着重要的作用(有关综述见 LeMaoult et al. Tissue Antigens. 62 :273. 2003 ;)。

[0004] 肿瘤在发生和发展变化过程中,要表达一些不同于正常组织的肿瘤抗原。免疫系统对这些发生癌变的细胞有排斥消除的功能,称之为宿主的免疫监视。但在已经患上癌症病人,癌细胞明显地逃过了宿主的免疫监视,这种现象称之为肿瘤的免疫逃逸。在肿瘤生物学中,经典 I 类白细胞抗原族基因表达的下调是一个常见的现象(有关综述见 Garrido et al, Immunology Today 18 :89. 1997)。由于 HLA-I 族分子在细胞毒性的 T 淋巴细胞的活化中发挥中心作用,HLA-I 族基因表达的下调就成为肿瘤逃逸机制之一。

[0005] 因为 HLA-G 具有抑制自然杀伤细胞和细胞毒性 T 淋巴细胞的功能,在胎儿的免疫耐受基理中起着重要的作用。如果肿瘤细胞出现 HLA-G 的异常表达,就有可能像其在胎儿的免疫耐受基理起的作用一样,抑制宿主对肿瘤细胞的免疫排斥,而参与肿瘤免疫逃逸机制。从上世纪九十年代中(1996) 起,已有大量的研究结果发表证明:1) 癌细胞出现 HLA-G 的异常表达也是肿瘤生物学中的一个普遍现象;2) HLA-G 在肿瘤免疫逃逸机制中起重要作用;3) 测定 HLA-G 有较高的临床应用价值,使 HLA-G 能成为一个新的、较为理想的肿瘤标志物。

[0006] 如在本申请人较早的中国授权专利(专利号 ZL200410040919. X) 中公开了利用高特异性的抗 HLA-G 的单克隆抗体 HGY 检测常见恶性肿瘤病变中的 HLA-G 异常表达来诊断癌

症的方法,利用免疫印渍技术和免疫组化技术测定细胞样品或组织样品中 HLA-G 的异常表达,在癌症诊断中取得了良好的效果。

[0007] 酶联免疫吸附测定法 (ELISA) 是一种非常灵敏的测定血清或其它体液样品中抗原或抗体的方法。在这种测定方法中有 3 种必要的试剂:①固相的抗原或抗体,②酶标记的抗原或抗体,③酶作用的底物。一般说来,ELISA 方法测定结果的准确性,取决于固相抗原或抗体(一抗)以及酶标抗原或抗体(二抗)的特异性和敏感性,即,一抗和二抗特异性和敏感性越好,ELISA 测定结果的准确率越高。

[0008] 在临床诊断中,以血清或体液作为测定样品具有极大的好处,如:采集血液样品相对简便,无明显的创伤,可以反复检测,可方便地用于病程及治疗监测。

[0009] 虽然研究证明癌细胞出现 HLA-G 的异常表达是肿瘤生物学中的一个普遍现象,但测定血清可溶性 HLA-G 是否可应用于癌症的临床诊断则尚未得到证实。仅有两篇文献报道采用 HLA-G 酶联免疫测定法检测了黑色素瘤病人和某些血细胞恶性肿瘤的血清样品及一篇报道检测卵巢癌和乳腺癌患者的腹水样品。分述如下:Ugurel 等人用 HLA-G 酶联免疫测定法检测了 190 例不同临床分期的黑色素瘤病人的血清样品。并以 126 例正常健康人血清样品作为对照。结果发现:血清中 HLA-G 浓度在黑色素瘤病人显著地高于正常人。统计学上有极显著的意义 ($P < 0.0005$)。结果还发现:病人血清 HLA-G 浓度与病人临床分期和肿瘤的大小密切相关。 P 值分别 < 0.001 和 0.05 (见 Ugurel et al. Am J Pathol. 159 :817. 2001)。这个研究结果证明:测定血清中 HLA-G 浓度的变化不仅可以用于诊断病人是否患有恶性肿瘤,并且还可能显示肿瘤的大小。Sebti 等人也采用了 HLA-G 酶联免疫法检测了 17 例的慢性 B 淋巴细胞白血病,75 例非何杰金氏 B 淋巴瘤和 11 例非何杰金氏 T 细胞淋巴瘤的血清样品,并以 30 例正常人作为对照。还同时采用了 RT-PCR, REAL-TIME-RT-PCR, 免疫印迹和细胞免疫组化等技术。在这项研究中,发现有 70% 的慢性 B 淋巴细胞白血病病例,53% 的非何杰金氏 B 淋巴瘤病例和 45% 非何杰金氏 T 细胞淋巴瘤病例,血清 HLA-G 浓度比正常人显著地增高 (见 Sebti et al. Hum Immunol. 64 :1093. 2003)。因此,这个研究结果证明:测定血清 HLA-G 浓度的变化可以用于这些血液肿瘤疾病的诊断。Singer 等人用 HLA-G 酶联免疫测定法测定了 42 例卵巢癌和 108 例乳腺癌患者的腹水样品。同时还测定了 18 例相应良性肿瘤病人的腹水样品。他们发现:恶性肿瘤患者的可溶性 HLA-G 浓度显著地高于良性肿瘤病人 ($P < 0.001$)。更有意义的是:用 ROC 曲线分析方法分析测定的结果,发现 ROC 曲线下的面积为 0.95。在将特异性定为 100% 时,检测的灵敏度可高达 78% (68-88%)。表明:测定腹水样品中 HLA-G 浓度变化,78% 的卵巢癌和乳腺癌病人都有可能得到准确的诊断 (见 Singer et al., Cancer Res. 9 :4460. 2003)。

[0010] 根据我们和其他研究小组采用免疫组化技术研究的结果,HLA-G 在 62-84% 的肺癌,食道癌,胃癌,直肠癌和乳腺癌均有不同程度的表达,并且 HLA-G 的表达与各种临床和病理指标密切相关;表达 HLA-G 阳性的患者的生存率和时间明显低于和短于 HLA-G 表达阴性的病人,是一种具有临床应用价值的,独立的,涉及肿瘤免疫学的肿瘤预后指标 (见专利,叶尚勉:《抗 HLA-G 的单克隆抗体及分泌它的杂交瘤细胞株、癌症诊断方法、诊断试剂盒及其应用》专利号:ZL200410040919. X, 2007 年 4 月 25 日;Ye et al. Modern Pathology, 20 :357. 2007;Yie et al, Annal Surgical Oncology, 2007;Yie et al, American Journal of Clinic Patlogy, 2007;Yie et al, Lung Cancer, 2007)。因为 HLA-G 仅在恶性肿瘤表达

的特性及在上述常见恶性肿瘤有较高的阳性表达率,采用 HLA-G 酶联免疫法检测血清或血浆中 HLA-G 浓度的变化有可能成为癌症诊断的特异性的临床指标。

[0011] 但现今采用抗 HLA-G 单克隆抗体 (87G, 01G, 223G, MEMG/9 和 4H84) 灵敏度较差,用于肿瘤 HLA-G 组化研究仅得到 21% -51% 的阳性率 (见 Amiot 等, *Human Immunol.* 59 :524, 1998 ;Real 等, *Int. J. Cancer*81 :512, 1999 ;Frumento 等, *Tissue Antigens*56 :30, 2000 ;Hurks 等, *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 42 :3081, 2001。Mizuno 等, *Br. J. Haematol.* 111 :280, 2000 ;Urosevic 等, *Am. J. Pathol.* 159 :817, 2001 ;Urosevic 等, *Blood*99 :609, 2002 ;Lefebvre 等, *J. Pathol.* 196 :266, 2002 ;Yang 等, *Chinese J. Histochem. Cytochem.* 10 :70, 2001)。由这些抗 HLA-G 抗体建立的 HLA-G 酶联免疫测定法的敏感性可能相对较低。根据文献和调查,迄今为止,仅有极少数 HLA-G 酶联免疫测定法应用的报道,而且其中多数 HLA-G 酶联免疫测定法都采用一种抗经典 I 类白细胞抗原族的单克隆抗体 (W6/32) 作为酶联免疫测定夹心法的“二抗”。W6/32 单克隆抗体即能和 HLA-G 蛋白结合也能与 HLA-A, B 和 C 抗原结合。因为血清中存在大量的可溶性 HLA-A, B, C 蛋白 (见 Turowski & Kedzierska. *Med Sci Monit.* 6 :123. 2000), 这种 HLA-G 酶联免疫测定法有可能特异也相对较低,从而影响其在临床诊断上的应用。

[0012] 如上所述,对于检测癌症病人血清中 HLA-G 蛋白来说,检测试剂如 :抗体,必须能够有足够高的特异性和敏感性才能得到好的结果。

[0013] 我们在中国专利 ZL 2004 10040919. X 中业已证明我们所发明的抗 HLA-G 的单克隆抗体 [HGY] 比现有的抗 HLA-G 的单克隆抗体有较高的特异性和敏感性,使得由该抗体为基础建立具有更高的检测特异性和灵敏度的 HLA-G 酶联免疫测定法成为可能。适宜用测定血清或血浆中 HLA-G 浓度的变化作癌症临床诊断,预后和治疗方案的选择,其应用前景十分乐观。

[0014] 正是由于缺乏特异性和敏感性均较好的“二抗”,目前尚未见报道利用酶联免疫测定试剂盒,测定血液或体液样品中可溶性 HLA-G 的浓度,在肺癌,胃癌,直 - 结肠癌,食道癌等常见恶性肿瘤的癌症诊断中取得良好结果的应用。

[0015] 发明内容

[0016] 针对现有 HLA-G 单克隆抗体作为癌症检测标志物和 HLA-G 酶联免疫测定法的缺陷,本发明的目的是提供一种新的单克隆抗体,即抗 HLA-G 单克隆抗体,命名为 HGY-2,它是由中国典型培养物保藏中心保藏的保藏编号为 CCTCC NO. C200722 的杂交瘤细胞株产生的,属 IgG1 亚型。

[0017] 本发明的单克隆抗体可以通过本发明的杂交瘤细胞株产生,因此可以从培养本发明的杂交瘤细胞株的培养液中获得,或用杂交瘤细胞株细胞种植到实验动物腹腔产生腹水而获得。

[0018] 本发明的另一目的是提供一种杂交瘤细胞株,它能够产生属 IgG1 亚型的抗 HLA-G 单克隆抗体。本发明的杂交瘤细胞株可以用本领域技术人员所熟知的细胞融合技术产生。因此,用天然的 HLA-G 蛋白作为抗原免疫小鼠等动物,将该动物的脾细胞或淋巴细胞与骨髓瘤细胞融合,产生杂交瘤细胞株,并从中筛选出产生 IgG1 亚型的单克隆抗体的杂交瘤细胞株,从而获得本发明的杂交瘤细胞株。

[0019] 所述的杂交瘤细胞株,是由中国典型培养物保藏中心保藏的保藏编号为 CCTCC

NO. C200722 的杂交瘤细胞株,保藏日期 2007 年 7 月 16 日。

[0020] 本发明的杂交瘤细胞株产生的单克隆抗体构成了本发明的一个方面。

[0021] 本发明的另一方面是,含有至少一种上述的单克隆抗体的试剂盒,优选的试剂盒是含有上述的任意一种单克隆抗体,更优选的试剂盒还含有由中国典型培养物保藏中心保藏的保藏编号为 CCTCC NO. C200416 的杂交瘤细胞株产生的单克隆抗体 [HGY] (制备方法见专利号 ZL200410040919. X 的中国专利)。

[0022] 由于本发明的单克隆抗体 HGY—2 与其他类型的 HLA—I 族抗原不存在交叉反应,因此本发明的单克隆抗体对于 HLA—G 具有高度的特异性。并且本发明的单克隆抗体与多数 HLA—G 异构体相结合,虽然不同类型的癌症可能表达出不同的 HLA—G 异构体,但是对不同类型癌症的各种表达产物,本发明单克隆抗体都能够加以检测,因此具有很高的灵敏性。

[0023] 本发明提供一种检测恶性肿瘤病人血清或其它体液 HLA—G 浓度的一种夹心式酶联免疫测定法,采用高特异性和灵敏性的 HLA—G 单克隆抗体 HGY 包被酶标板或酶标条作为本发明中 HLA—G 酶联免疫测定法中的“一抗”,该单克隆抗体能够特异性地结合血清或血浆中可溶性 HLA—G,而不与血清或血浆中可溶性 HLA—A, B, C 抗原结合。本发明的单克隆抗体 HGY—2 是一种不同于 HGY,能够结合 HLA—G 不同抗原表位的单克隆抗体,因此,本发明采用 HGY—2 作为本 HLA—G 酶联免疫测定法中的“二抗”,HGY—2 采用蛋白 G 免疫亲和层析纯化后用生物素标记。

[0024] 本发明的酶联免疫测定试剂盒是一种夹心式酶联免疫测定试剂盒,是根据 Micallef and Ahsan 所描述的原理而研发成功的 (Micallef J, Ahsan R. Immunoassay development. In ;Gosling JP, Basso LV, editors. Immunoassay :laboratory analysis and clinical applications. London ;Butterworth-Heinemann ;1994. p. 51-68)。由于本发明的这两种单克隆抗体与其他类型的 HLA I 族抗原不存在交叉反应,因此本发明的单克隆抗体和多克隆抗体对于 HLA—G 具有高度的特异性。并且本发明的这两种单克隆抗体均具有很高的灵敏性。使该检测试剂盒具有很高的特异性,敏感性,准确性和可重复性。同时,本发明的酶联免疫检测试剂盒,可以通过本领域技术人员所公知的方法,能够方便临床的大规模使用,为癌症的诊断,发展转移的评价以及治疗指导提供了一种可靠的有价值的途径。本发明的试剂盒优选采用 ELISA 技术进行检测。

[0025] 本发明还研发出一种分离纯化和制备 HLA—G 蛋白标准的方法。

[0026] 本发明与抗人白细胞抗原 G(HLA—G) 单克隆抗体在临床肿瘤学的应用有关。具体地讲,本发明涉及对于发生在常见类型的肿瘤恶变的过程中血液及体液中 HLA—G 的含量变化 ;HLA—G 酶联免疫测定法是测定血清或其他体液中可溶性的 HLA—G 蛋白。测定的原理是采用两种具有抗 HLA—G 蛋白特异性的单克隆抗体 (该两种单抗结合 HLA—G 蛋白不同的抗原表位),用夹心式酶联免疫方法,根据纯化的 HLA—G 蛋白标准,定量地确定血清或其他体液中 HLA—G 的含量。

[0027] 附图的简要说明

[0028] 图 1. 标记生物素的抗 HLA—G 单克隆抗体 HGY 与未标记 HGY 抗体或抗 HLA—G 单克隆抗体 HGY—2 用竞争性抗体捕获酶联免疫检测法测定。因为 HGY—2 抗体结合不同于 HGY 单克隆抗体的 HLA—G 蛋白分子上的抗原表位,加入不同剂量的 HGY—2 抗体对标记 HGY 对 HLA—G 蛋白分子的结合无显著的影响 ;而未标价的 HGY 则竞争标记 HGY 对 HLA—G 蛋白分子的结合。

[0029] 图 2. 抗 HLA-G 单克隆抗体 HGY-2 的抗体稀释曲线。

[0030] 图 3. 显示 10 批 HLA-G ELISA 的标准曲线。采用抗 HLA-G 单克隆抗体 [HGY]4℃ 过夜包被 96 孔酶标板或 12x8/8x12 酶标条, 10 μg/ml, 每孔 50 μl。洗板, 封闭后加入用不同剂量的 HLA-G 蛋白标准品 (0-1 μg/ml, 每孔 50 μl)。HLA-G 蛋白标准品是用单克隆抗体 HGY 抗体制备的特异性免疫亲和层析技术从早期妊娠胎盘组织裂解物中分离纯化获得。在室温保温 1 小时, 洗板 4 次, 然后加入 1:500 的生物素标记的抗 HLA-G 多克隆抗体, 每孔 50 μl。室温保温 1 小时, 再加入 1:1000 的 Streptavidin-HRP 复合物, 每孔 50 μl, 室温保温 1 小时。以 TMB 为底物显色, 1M HCl 终止显色反应。在酶标仪上读 450/630nm 波长的光密度。最后用直线回归方法进行分析, 得出标准曲线的切距, 斜率和直线回归方程, 用于样品的血浆 / 血清中 HLA-G 浓度的确定。

[0031] 图 4. 显示 HLA-G 蛋白标准曲线和待测血浆样品稀释曲线的平行性。HLA-G 蛋白标准曲线和待测血浆 / 血清样品稀释曲线的直线回归方程分别为 $Y = 0.067 + 0.553X$ 和 $Y = -0.013 + 0.501X$ 。这两条的直线回归方程的斜率 (0.553VS0.501) 统计学上无显著差异。

[0032] 图 5A 和 B 分别为 65 例正常对照组和 215 例癌症病人组的血浆 HLA-G 蛋白浓度的分布曲线。两者均呈现正态分布。

[0033] 图 6A. 正常对照血浆 HLA-G 蛋白浓度与癌症病人血清 HLA-G 蛋白浓度的比较。癌症病人血清中的 HLA-G 蛋白浓度显著性地高于正常人血浆 HLA-G 蛋白浓度 (T 检验, $t = 9.35, P = 0.0001$)。图 6B. 检测血浆 HLA-G 蛋白对癌症诊断的 ROC 曲线分析。曲线下面积 (AUC) = 0.890, $P = 0.0001$ 。

[0034] 图 7A. 43 例肺癌病人的血浆 HLA-G 蛋白浓度的分布曲线。图 7B. 65 例正常对照血浆 HLA-G 蛋白浓度与 43 例肺癌病人血浆 HLA-G 蛋白浓度的比较。肺癌病人血浆中的 HLA-G 蛋白浓度显著性地高于正常人血浆 HLA-G 蛋白浓度 (T 检验, $t = 4.35, P = 0.0001$)。图 7C. 检测血浆 HLA-G 蛋白对肺癌诊断的 ROC 曲线分析。AUC = 0.714, $P = 0.0001$ 。

[0035] 图 8A. 58 例食道癌病人的血浆 HLA-G 蛋白浓度的分布曲线。图 8B. 65 例正常对照血浆 HLA-G 蛋白浓度与 58 例食道癌病人血浆 HLA-G 蛋白浓度的比较。食道癌病人血浆中的 HLA-G 蛋白浓度显著性地高于正常人血浆 HLA-G 蛋白浓度 (T 检验, $t = 10.83, P = 0.0001$)。图 8C. 检测血浆 HLA-G 蛋白对肺癌诊断的 ROC 曲线分析。AUC = 0.943, $P = 0.0001$ 。

[0036] 图 9A. 28 例胃癌病人的血浆 HLA-G 蛋白浓度的分布曲线。图 9B. 65 例正常对照血浆 HLA-G 蛋白浓度与 28 例胃癌病人血浆 HLA-G 蛋白浓度的比较。胃癌病人血浆中的 HLA-G 蛋白浓度显著性地高于正常人血浆 HLA-G 蛋白浓度 (T 检验, $t = 6.80, P = 0.0001$)。图 9C. 检测血浆 HLA-G 蛋白对胃癌诊断的 ROC 曲线分析。AUC = 0.867, $P = 0.0001$ 。

[0037] 图 10A. 37 例直 - 结肠癌病人的血浆 HLA-G 蛋白浓度的分布曲线。图 10B. 65 例正常对照血浆 HLA-G 蛋白浓度与 37 例直 - 结肠癌病人血浆 HLA-G 蛋白浓度的比较。直 - 结肠癌病人血浆中的 HLA-G 蛋白浓度显著性地高于正常人血浆 HLA-G 蛋白浓度 (T 检验, $t = 10.78, P = 0.0001$)。图 10C. 检测血浆 HLA-G 蛋白对直 - 结肠癌诊断的 ROC 曲线分析。AUC = 0.952, $P = 0.0001$ 。

[0038] 图 11A. 42 例乳腺癌病人的血浆 HLA-G 蛋白浓度的分布曲线。图 11B. 16 例女性正常对照血浆 HLA-G 蛋白浓度与 42 例乳腺癌病人血浆 HLA-G 蛋白浓度的比较。乳腺癌病人

血浆中的 HLA-G 蛋白浓度显著性地高于正常人血浆 HLA-G 蛋白浓度 (T 检验, $t = 5.85$, $P = 0.0001$)。图 11C. 检测血浆 HLA-G 蛋白对乳腺癌诊断的 ROC 曲线分析。AUC = 0.952, $P = 0.0001$ 。

[0039] 发明的具体实施方式

[0040] 以下通过具体实施例对本发明作进一步说明, 所列举的本发明抗体在癌症检测和诊断中的特殊应用范例有助于更好地了解本发明的特点, 并非对本发明的限制。

[0041] 实施例 1 本发明 HGY 单克隆抗体的制备

[0042] 按照叶尚勉专利: ZL200410040919. X 公开的方法, 用中国典型培养物保藏中心保藏的保藏编号为 CCTCC NO. C200416 的杂交瘤细胞株制备抗 HLA-G 的单克隆抗体 HGY。天然 HLA-G 蛋白质的纯化, 单克隆抗体的制备及单克隆抗体的特性, 均与上述专利公开的内容一致。

[0043] 本发明 HGY-2 单克隆抗体的制备

[0044] 按照叶尚勉专利: ZL200410040919. X 公开的方法, 本发明的基础亦采用 HGY 单克隆抗体的制备方法, 用从妊娠三个月内流产的胎盘组织中纯化的天然 HLA-G 蛋白质, 其中含有全部 HLA-G 转录异构体和糖蛋白异构体, 通过免疫小鼠, 将小鼠脾细胞与 SP2 骨髓瘤细胞株融合杂交, 得到一株由中国典型培养物保藏中心保藏的保藏编号为 CCTCC NO. C200722 的杂交瘤细胞株, 来制备抗 HLA-G 的单克隆抗体 HGY-2。天然 HLA-G 蛋白质的纯化, 单克隆抗体的制备与上述专利公开的内容一致。

[0045] 单克隆抗体 HGY-2 的特性

[0046] 用 HGY-2 单克隆抗体进行以下实验, 证明:

[0047] ●小鼠抗体分型试剂药盒 (Amersh) 测定, 该细胞株产生的单抗亚型为 IgG1。

[0048] ●用抗体捕获酶联免疫检测法测定表明, 本发明的 HGY-2 抗体与其他类型的 HLA-I 族抗原不存在交叉反应。与 HGY 单克隆抗体一样, HGY-2 对 HLA-G 具有高度的特异性 (表 1)。

[0049] 表 1. HGY-2 单克隆抗体的特异性 (交叉反应实验)

[0050]

化合物	交叉反应%
HLA-GHLA-A2HLA-B4HLA-C 混合白细胞裂解液	1000. 010. 020. 0020. 005

[0051] 将抗 HLA-G 多克隆抗体 ($10 \mu\text{g/ml}$, $50 \mu\text{l/孔}$) 包被在酶标板上, 然后加入等量的 HLA-G, HLA-A2, HLA-B4, HLA-C 或混合白细胞裂解液。用生物素标记的抗 HLA-G 的单克隆抗体检测抗 HLA-G 多克隆抗体结合这些样品的程度。以结合 HLA-G 的为 100%, 然后比较结合 HLA-A2, HLA-B4, HLA-C 或混合白细胞裂解液的相对于结合 HLA-G 的百分率。

[0052] ●用竞争性抗体捕获酶联免疫检测法测定表明, 本发明的 HGY-2 抗体结合不同于 HGY 单克隆抗体的 HLA-G 蛋白分子上的抗原表位 (图 1)。

[0053] ●用抗体捕获酶联免疫检测法测定的 HGY-2 单抗的抗体滴度实验证明本发明该抗体的对 HLA-G 蛋白分子, 与 HGY 一样具有较高的敏感性 (图 2)。

[0054] 实施例 2 本发明 HLA-G 酶联免疫检测试剂盒的研制

[0055] 1. 单抗:

[0056] 该试剂盒采用了两种抗 HLA-G 蛋白分子特异性单克隆抗体 (HGY 和 HGY-2)。这两种单抗能够结合 HLA-G 蛋白分子不同的抗原表位。抗体均储藏在 -80°C 。

[0057] 2. HLA-G 蛋白标准品的制备：

[0058] 该试剂盒采用的 HLA-G 蛋白标准品是用抗 HLA-G 单克隆抗体（已经商业化的 4H84 或叶尚勉专利：ZL 2004 10040919 中的 HGY）免疫亲和层析方法从收集的人工流产的一期胎盘组织的提取液中分离纯化获得，其纯度大于 95%。也可用基因重组的方法克隆和建立表达 HLA-G 蛋白的细胞株，然后用抗 HLA-G 抗体免疫亲和层析方法分离纯化基因重组的 HLA-G 蛋白标准品。蛋白标准品储藏在 -80℃。

[0059] 3. 制备试剂盒

[0060] ● 本发明采用特异很高的抗 HLA-G 单克隆抗体 HGY 作为“一抗”，包被在结合率高而背景低的酶标板（或酶标条）上。采用标准的抗体包被浓度和制备方法（10 μg/ml；见 Harlow 和 Lane, *Antibodies, a Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor, NY, pp139, 1988）。

[0061] ● 本发明采用 HGY-2 单克隆抗体作为“二抗”。为进一步提高检测的灵敏度，将抗 HLA-G 多克隆抗体用蛋白 G 亲和层析纯化后标记上生物素。再采用商业化的多链 Streptoavidin-HRP 复合物放大检测信号。

[0062] ● 本发明采用从早期胎盘组织纯化的 HLA-G 蛋白作为标准。

[0063] 4. 测定步骤

[0064] ● 测定时，将血清或其它体液加到 HGY 单抗包被的酶标板（条），每孔 0.05mL。同时加入用样品稀液稀释配制成 0 到 1 μg/ml 的 HLA-G 的蛋白标准，共六个标准点以及质控样品。室温下震荡孵化 1 小时。

[0065] ● 用洗液将酶标板（条）洗涤 4 次。

[0066] ● 加入用样品稀液稀释配制的 1:1000 的 HGY-2-生物素复合物，每孔 0.05mL。

[0067] ● 室温下震荡孵化 1 小时。

[0068] ● 用洗液将酶标板（条）洗涤 4 次。

[0069] ● 加入用样品稀液稀释配制的 1:2000 的 Streptoavidin-HRP 复合物，每孔 0.05mL。

在室温下震荡孵化 1 小时。

[0070] ● 用洗液将酶标板（条）洗涤 4 次。

[0071] ● 加入 TMB 工作液，每孔 0.1mL。在室温下孵化 10 到 15 分钟。

[0072] ● 用 1M 的 HCL 停止颜色反应，每孔 0.1mL。

[0073] ● 用酶标仪在 450/630 的波长读取样品和标准的光密度，然后从标准曲线计算样品中 HLA-G 的含量。

[0074] 实施例 3 本发明 HLA-G 酶联免疫检测试剂盒的特性

[0075] 本发明首先是建立检测血浆 / 血清可溶性 HLA-G 的夹心式酶联免疫检测试剂盒，并对试剂盒的特异性，灵敏度，准确性和可重复性进行验证。

[0076] ● 图 3 显示 10 次 HLA-G ELISA 测定的标准曲线。结果表明用本发明建立的夹心式酶联免疫检测试剂盒，灵敏度为 10ng/ml，重复性较高（平均各标准点的批内和批间误差均小于 10%；表 2）。在每批检测时，该 HLA-GELISA 设立三个剂量的阳性对照样品。从表 2 还可以看到阳性对照样品的批内和批间误差均小于 10%；进一步证实该试剂盒的可重复性。

[0077] 表 2. HLA-G 酶联免疫组化检测法的可重复性（检测的批内和批间误差 CV%）

[0078]

	批内误差 (CV%) 均数+SD	批间误差 (CV%) 均数+SD
标准曲线 (N = 10)	6.27+4.16	8.6+4.35
质控样品 (N = 10)	5.67+2.15	9.4+2.53

[0079] 按酶联免疫检测法公知的标准,批内误差低于 10%,批间误差低于 15%,即可认定该试剂盒具有可靠的可重复性 (Micallef J, Ahsan R. Immunoassay development. In: Gosling JP, Basso LV, editors. Immunoassay: laboratory analysis and clinical applications. London: Butterworth-Heinemann; 1994. p. 51-68)。

[0080] ●从标准曲线和血浆稀释曲线平行实验的结果证明检测血浆中可溶性 HLA-G 蛋白与试剂盒的标准一致 (图 4)。

[0081] ●从表 3 的回收实验的结果证明该 HLA-G ELISA 试剂盒具有高度的准确性。

[0082] 表 3. HLA-G 酶联免疫组化检测法的准确性 (回收实验)

[0083]

加入的 HLA-G 蛋白量	实际测定值 ($\mu\text{g/ml}$)	理论测定值 ($\mu\text{g/ml}$)	回收率%
00. 20. 40. 8	0. 450. 570. 901. 15	0. 450. 650. 851. 25	87. 7105. 892. 0
平均			95. 2

[0084] 既在同一血浆混合样品中加入不同剂量的 HLA-G 蛋白标准品,然后用 HLA-G 酶联免疫进行检测,得到实际测定值。因为已知未加 HLA-G 蛋白标准的混合样品中 HLA-G 蛋白含量,对加入不同剂量的 HLA-G 蛋白标准品的同一血浆混合样品就有理论测定值。实际测定值与理论测定值的比率即为该酶联免疫检测的回收率。也就是该检测方法的准确性。

[0085] 综上所述,该发明建立的 HLA-G ELISA 技术具有高度可靠性和可重复性。

[0086] 实施 4 癌症常见类型的 HLA-G ELISA 测定

[0087] 虽然已有文献报道发现血清中 HLA-G 蛋白浓度在黑色素瘤病人和某些血液细胞肿瘤的病人正常人显著地增高,但用酶联免疫测定法检测血清中 HLA-G 蛋白浓度是否能用于各种常见的恶性肿瘤,如肺癌,食道癌,胃癌,直肠癌和乳腺癌尚未见报道。本实施的目的是验证用本发明中建立的特异,敏感,准确,重复性高的 HLA-G 酶联免疫测定法检测试剂盒是否能用于上述常见恶性肿瘤的临床诊断。

[0088] 1. 材料和方法

[0089] 收集 215 例上述五种常见恶性肿瘤血浆样品和 65 例健康人作为对照。在 215 例上述五种常见恶性肿瘤病人中肺癌 43 例,食道癌 58 例,胃癌 28 例,直肠癌 37 例和乳腺癌 42 例。在 65 例健康人中男性 49 例,女性 16 例。女性对照及病人均无怀孕。癌症病人的样品均在手术前收集。手术前病人均未经化疗或放射治疗。所有的样品储藏于 -80°C 待测。

[0090] 该 280 样品中 HLA-G 浓度分 8 批复管用上述本发明中建立的 HLA-G 酶联免疫测定法检测试剂盒测定。每批均含一标准曲线,3 个不同剂量的质控样品。每批均包括正常标准,测待样品和质控样品在室温保温 1 小时,洗板 4 次,然后加入 1:500 的生物素标记的 HGY-2 单克隆抗体复合物,每孔 $50\mu\text{l}$ 。室温保温 1 小时,再加入 1:1000 的 Streptavidin-HRP 复合物,每孔 $50\mu\text{l}$,室温保温 1 小时。以 TMB 为底物显色,1M HCl 终止显色反应。在酶标仪上读 450/630nm 波长的光密度。最后用直线回归方法进行分析,得出标准曲线的切距,斜率和直线回归方程,血浆样品中 HLA-G 浓度则从标准曲线确定。

[0091] 用 SSPC 统计软件对测定的结果进行统计学分析。对样品中 HLA-G 浓度的分布情

况用 Histogram 分析。用 T 检验比较正常对照和癌症病人。用 ROC 曲线分析方法确定测定血浆中 HLA-G 浓度对这五种常见癌症临床诊断特异性,敏感性和临界值。

[0092] 2. 结果

[0093] 正常对照和各种癌症病人血浆中 HLA-G 的浓度均呈正态分布 (图 5)。血清中 HLA-G 浓度在癌症病人显著地高于正常人。统计学上有极显著的意义 ($P = 0.0001$) (图 6A)。ROC 曲线分析结果表明检测血浆 HLA-G 蛋白对癌症诊断具有相当高的临床意义的 ($AUC = 0.890, P = 0.0001$) (图 6B)。

[0094] 图 7—图 11 分别显示对肺癌,食道癌,胃癌,直肠癌和乳腺癌血浆中 HLA-G 浓度的分布,与正常对照的比较和 ROC 曲线分析结果。检测血浆 HLA-G 蛋白对食道癌,直肠癌和乳腺癌癌症诊断具有很高临床应用价值 (AUC 在 0.94-0.95 之间);胃癌其次 ($AUC = 0.867$),肺癌较差 ($AUC = 0.714$)。

[0095] 表 4 总结采用该 HLA-G 酶联免疫检测试剂盒对肺癌,食道癌,胃癌,直-结肠癌和乳腺癌临床诊断的效率。

[0096] 表 4. HLA-G 酶连免疫检测试剂盒对肺癌,食道癌,胃癌,直-结肠癌和乳腺癌临床诊断的效率

[0097]

癌症	病例	判断值 (cut-off)*	阳性率	特异性
肺癌	37	0.47 ($\mu\text{g/ml}$)	58.1%	71.8%
食道癌	58	0.52	87.9%	90.0%
胃癌	28	0.49	85.7%	80.0%
直-结肠癌	37	0.53	89.2%	90.0%
乳腺癌	42	0.54	88.1%	100%
平均 (mean+SE)		0.51+0.013	81.8+13.3%	86.3+10.0%

[0098] * 根据 ROC 曲线确定

[0099] 3. 讨论

[0100] 一种肿瘤标志物能否用于癌症的诊断主要取决于该肿瘤标志物的特异性和敏感性。也就是说,无论用什么方法检测出该肿瘤标志物高于正常人的水平,便可以判断该病人是否可能患有癌症 (特异性)。另一方面,则要求在癌症患者中检测出该肿瘤标志物水平增高的病例相对较高 (敏感性)。ROC 曲线指受试者工作特征曲线 (receive operating characteristic curve),是反映敏感性和特异性连续变量的综合指标,是用构图法揭示敏感性和特异性的相互关系,它通过将连续变量设定出多个不同的临界值,从而计算出一系列敏感性和特异性,再以敏感性为纵坐标、(1-特异性)为横坐标绘制成曲线,曲线下面积越大,诊断准确性越高。结果中患者和正常人分布的重叠程度决定了曲线下面积。重叠越小曲线下面积越大,反之亦然。两个分布完全分开时,曲线下面积为 1,两个分布完全重叠时,曲线下面积为 0.5。ROC 曲线下面积在 ROC 曲线上,最靠近坐标图左上方的点为敏感性和特异性均较高的临界值。本研究已经证实:HLA-G 在肿瘤的表达具有较高的恶性肿瘤的特异性;同时还证实:HLA-G 在上述五种恶性肿瘤浓度增高的病例也相对较高。因而,检测血清其或其它体液以及组织中 HLA-G 浓度的变化,是能够用于癌症的临床诊断的。再从上述国外已发表的临床应用的研究结果,在实际上应用上,也完全支持这个论断。

[0101] 发明总结

[0102] 本发明与使用纯化的天然 HLA-G 蛋白免疫小鼠制取抗-HLA-G 两种结合 HLA-G 蛋白不同抗原表位的单克隆抗体有关。并采用这些抗体建立的 HLA-G 酶联免疫检测法有关。按本发明方法,采用本发明的 HLA-G 酶联免疫检测法能够对肺癌,食道癌,胃癌,直肠癌和乳腺癌血浆中 HLA-G 浓度的增高进行检测,在采用 ROC 曲线分析后得到临床应用的临界值。采用临界值,对肺癌,食道癌,胃癌,直肠癌和乳腺癌诊断的特异性分别为 71.8%, 90.0%, 80.0%, 90.0% 和 100%;敏感性分别为 58.1%, 87.9%, 85.7%, 89.2% 和 88.1%。对这些常见类型的癌症,采用本发明的酶联免疫检测法,其测定结果具有临床癌症诊断的应用价值。

[0103] 实施例 5 癌症诊断试剂盒的制备

[0104] 由以上的研究结果,我们研制了 HLA-G 免疫组化试剂盒,由于本发明的抗 HLA-G 单克隆抗体具有高度特异性和灵敏性,并且理化性质稳定,可以按照标准方法方便地制备成为癌症诊断试剂盒。

[0105] 以下是用本发明抗 HLA-G 单克隆抗体制备的一种诊断试剂盒的具体组成:

[0106] ● 抗 HLA-G 抗体 (HGY) 包被的 96 孔酶标板 (或 12X8 或 8X12 酶标条)

[0107] ● 生物素标记的 HGY-2 单克隆抗体

[0108] ● STREPTOVIDIN-HRP 复合物

[0109] ● HLA-G 蛋白标准品

[0110] ● 样品缓冲液

[0111] ● 洗涤缓冲液

[0112] ● 色原底物溶液 (TMB)

[0113] ● 色原终止液 (1M HCL)

[0114] ● 质量控制样品

[0115] 检定原理

[0116] 该试剂盒是应用一种特异性很高的抗 HLA-G 单克隆抗体 (HGY) 包被在 96 孔酶标板或 12X8 或 8X12 酶标条上。血浆或血清中的可溶性 HLA-G 蛋白和 HGY 抗体结合;再采用生物素标记的 HGY-2 单克隆抗体对被 HGY 抗体结合的 HLA-G 蛋白进行夹心式结合。然后用 Streptoavidin-HRP 复合物结合抗 HLA-G 多克隆抗体。辣根过氧化酶催化色原底物 (TMB) 显色,根据标准曲线确定检测样品中 HLA-G 的浓度。

[0117] 本发明的癌症诊断试剂盒以血清或其他体液为被测样品,使用方便,准确率高,患者依从性好,为癌症诊断提供了一种新的方法和途径。

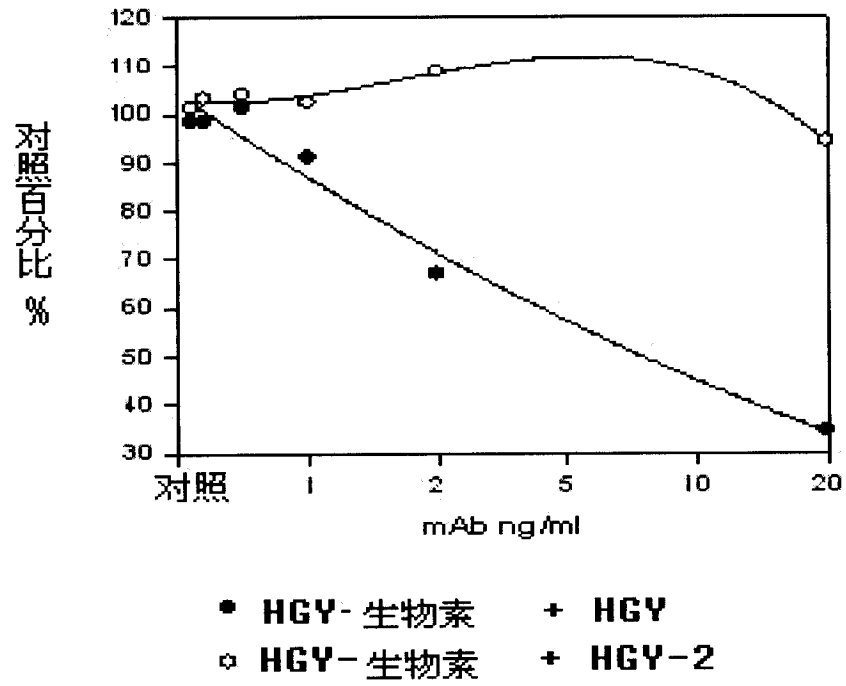


图 1

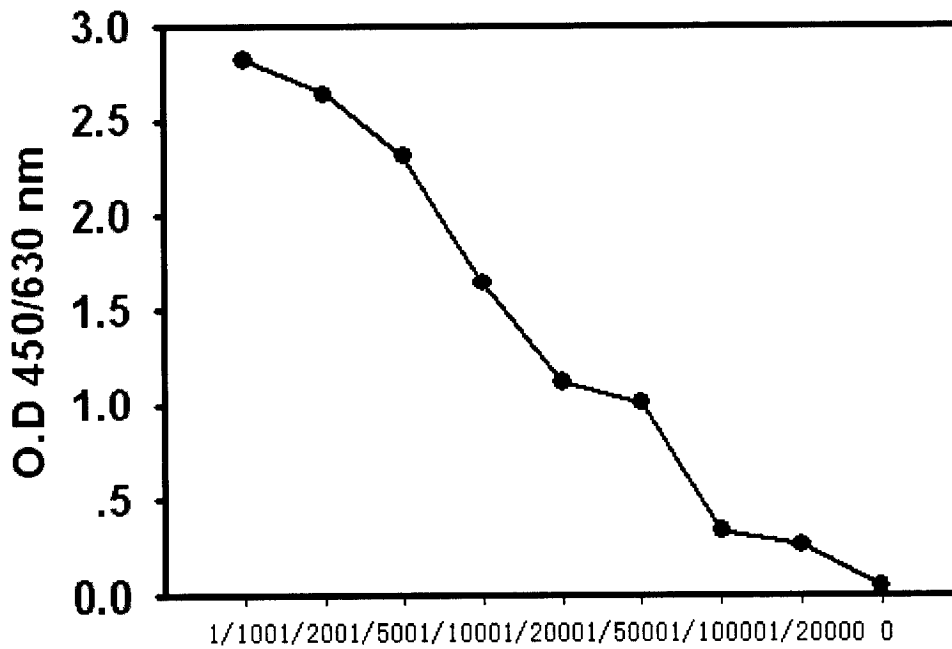


图 2

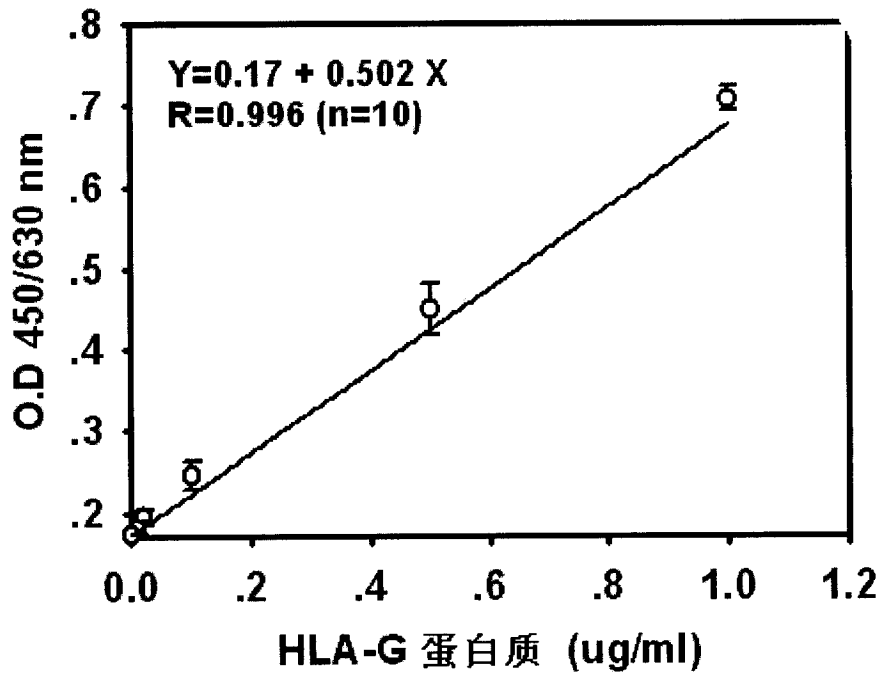


图 3

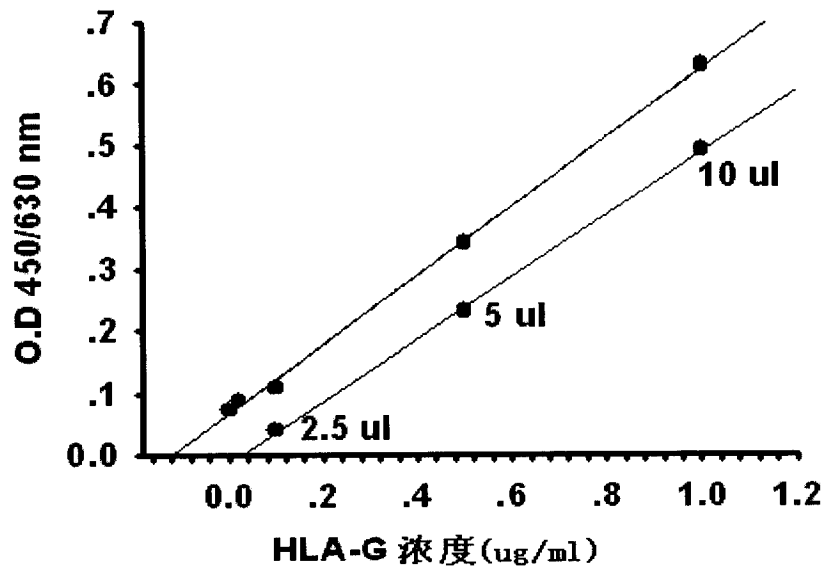


图 4

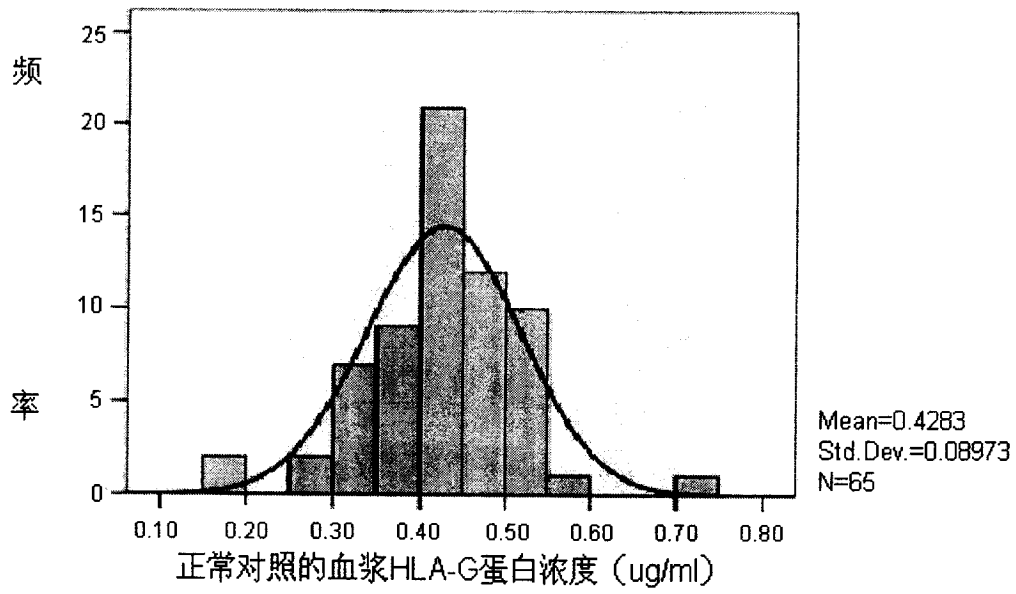


图 5A

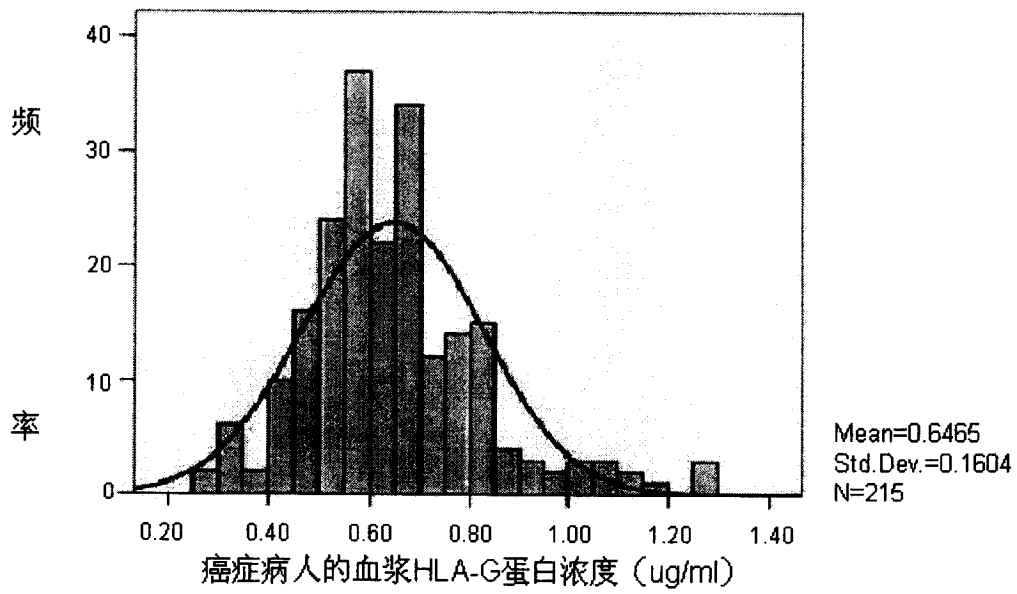


图 5B

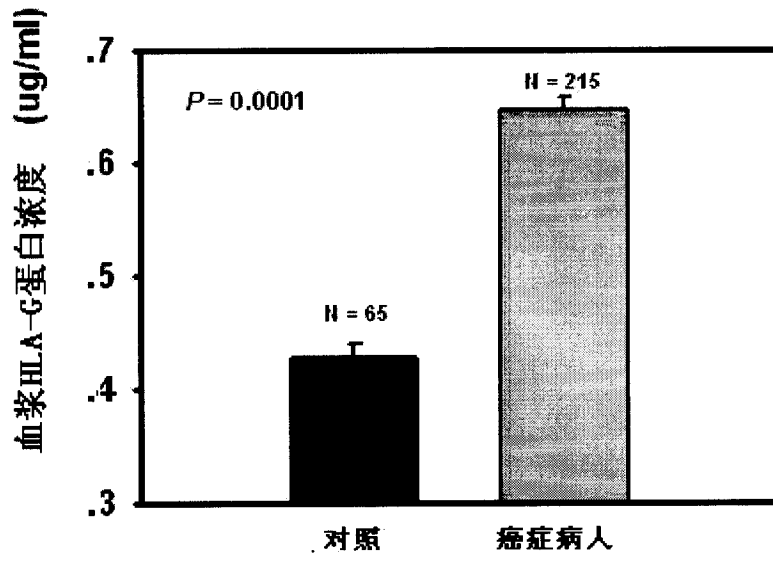


图 6A

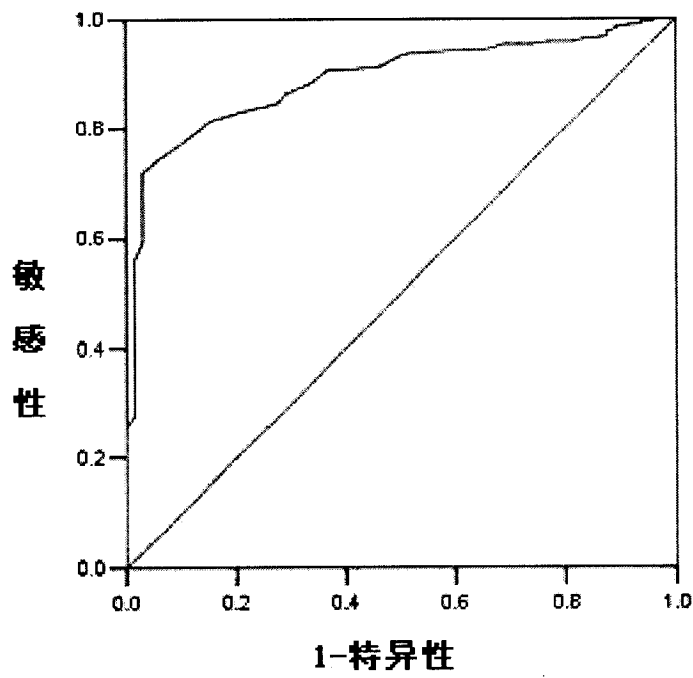


图 6B

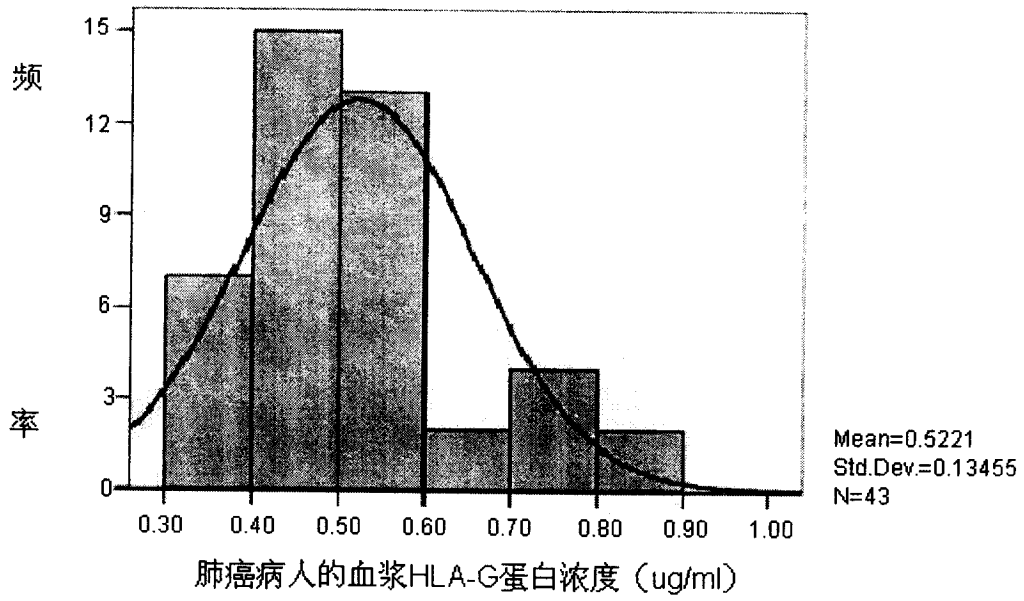


图 7A

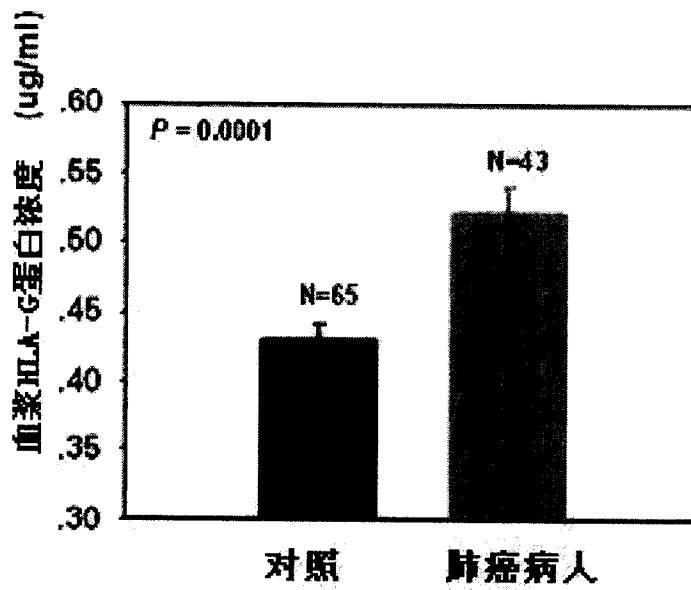


图 7B

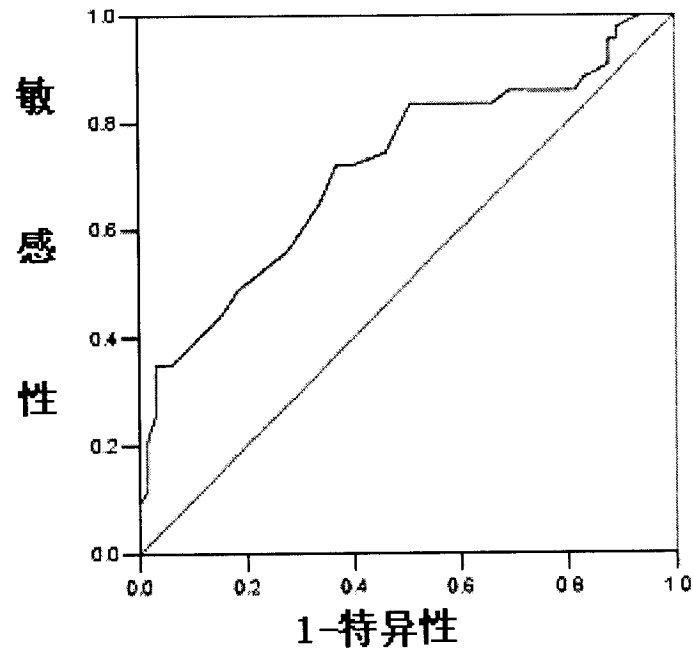


图 7C

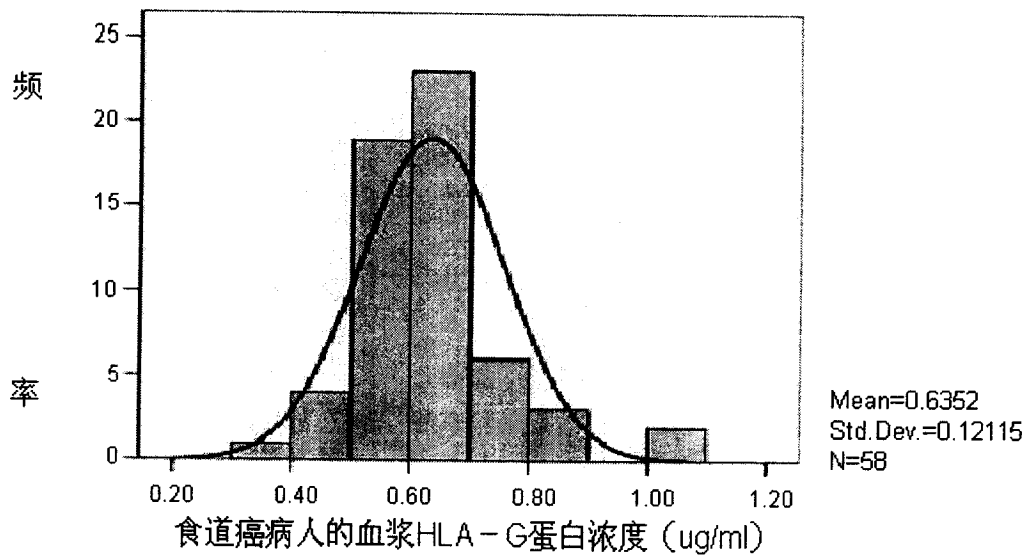


图 8A

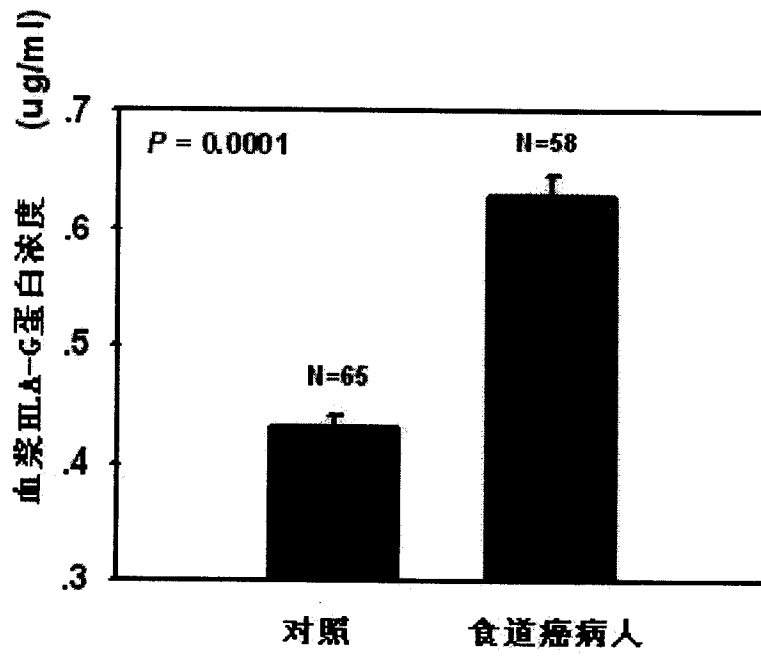


图 8B

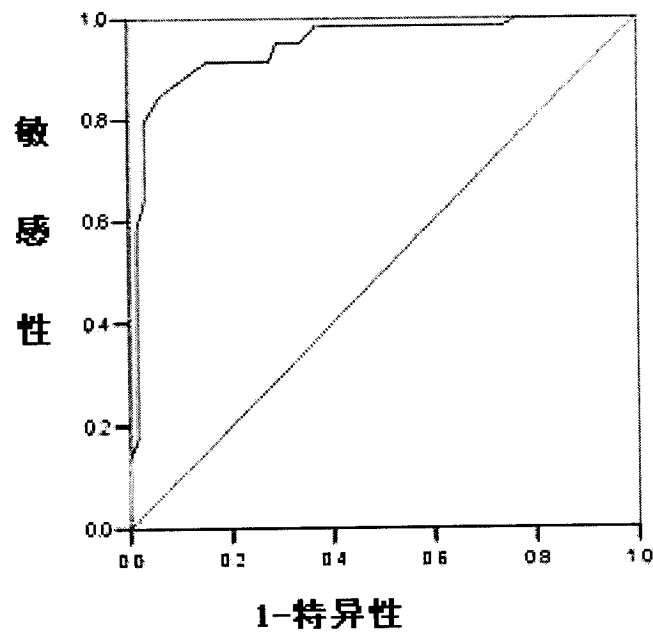


图 8C

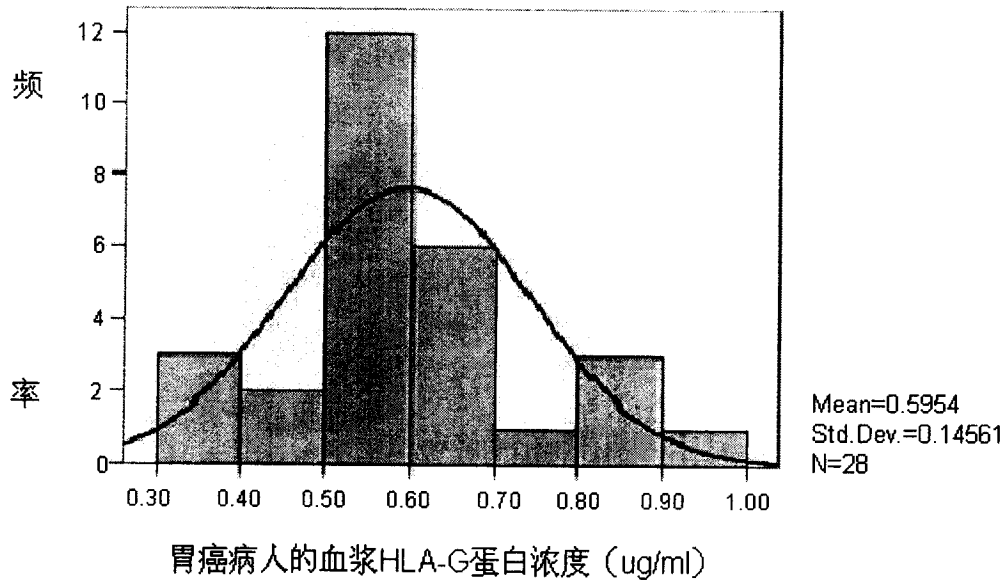


图 9A

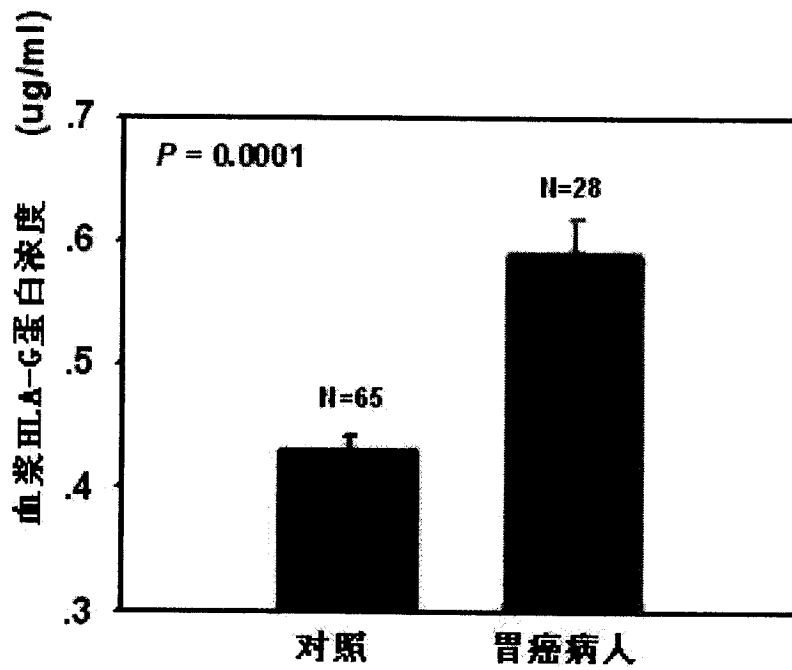


图 9B

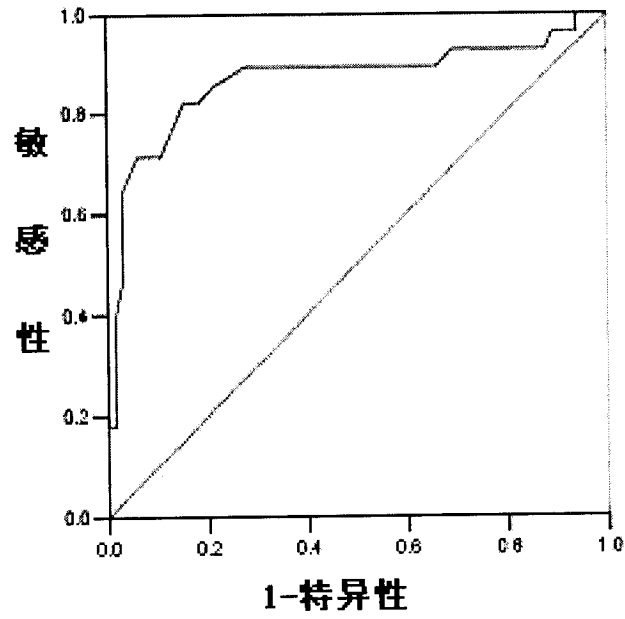


图 9C

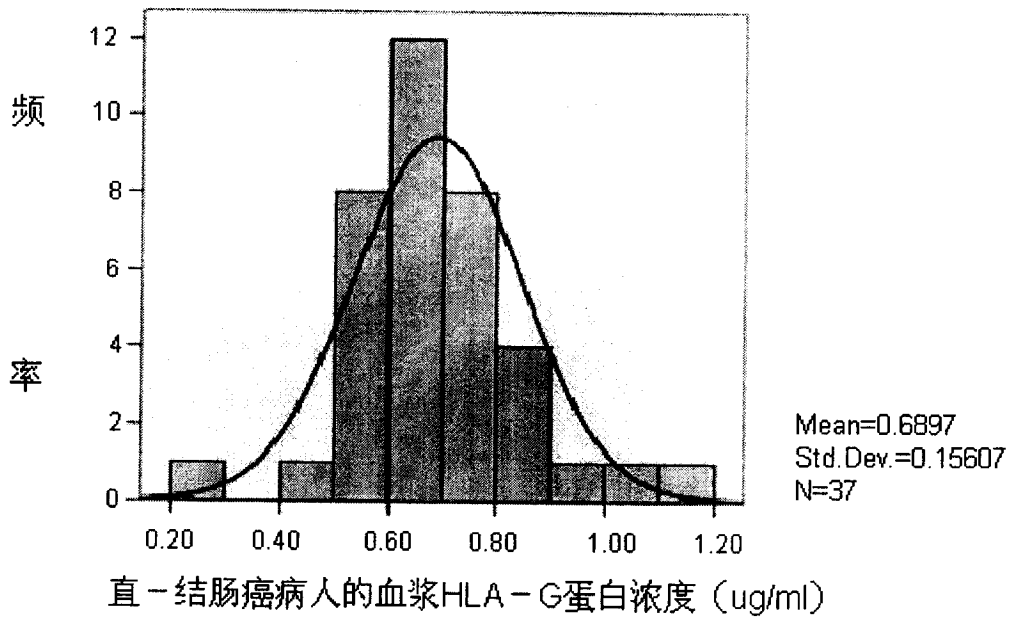


图 10A

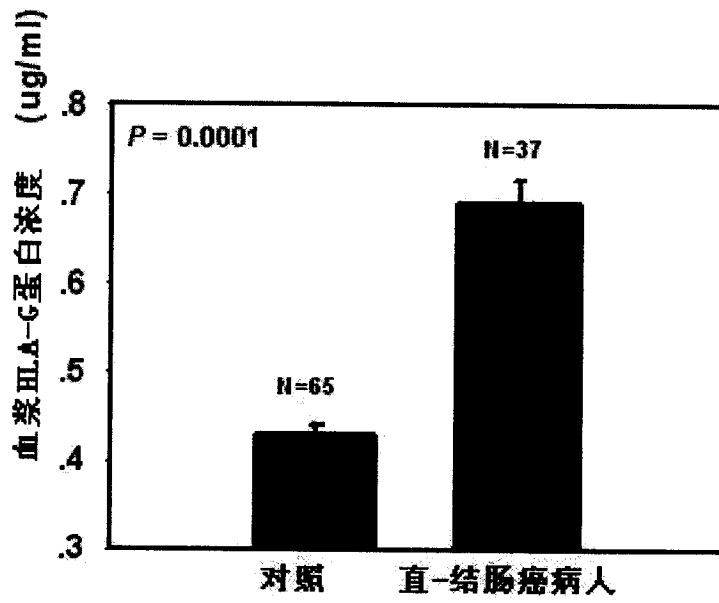


图 10B

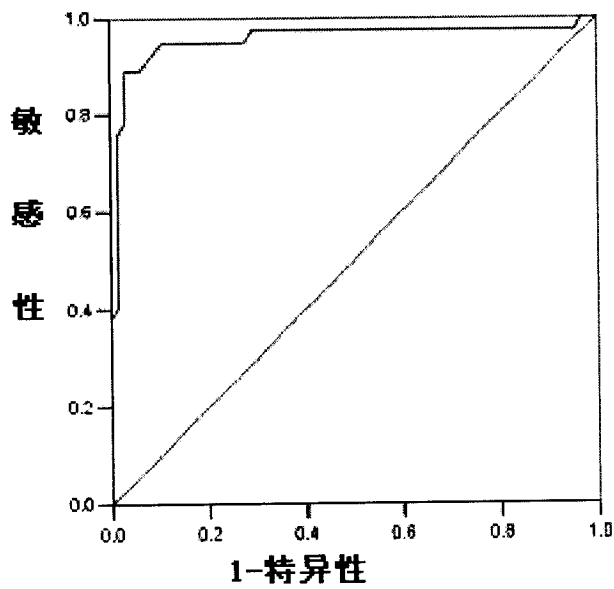


图 10C

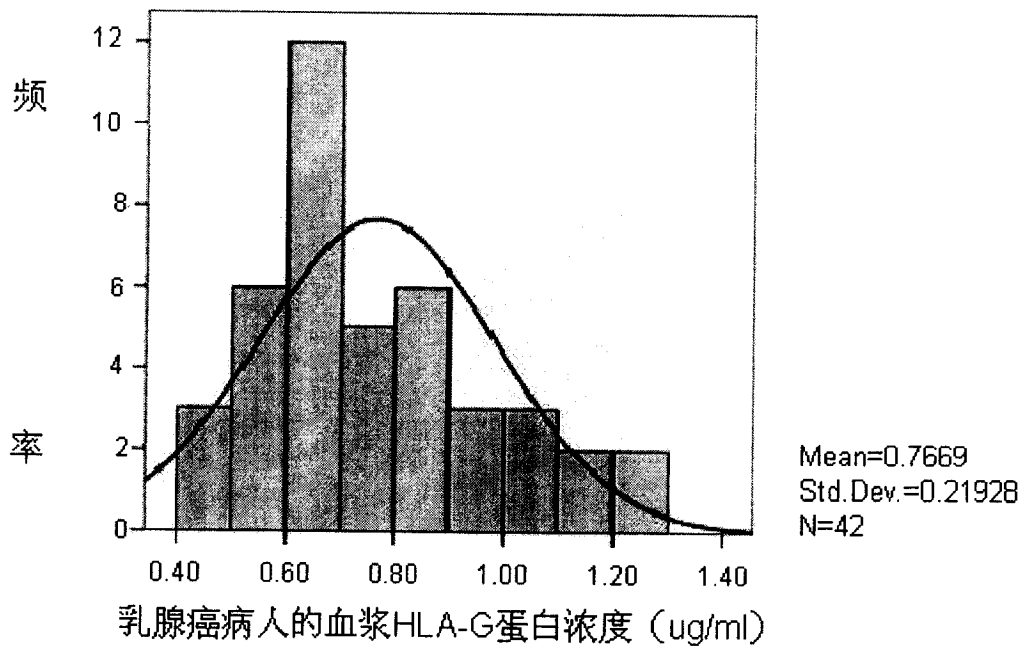


图 11A

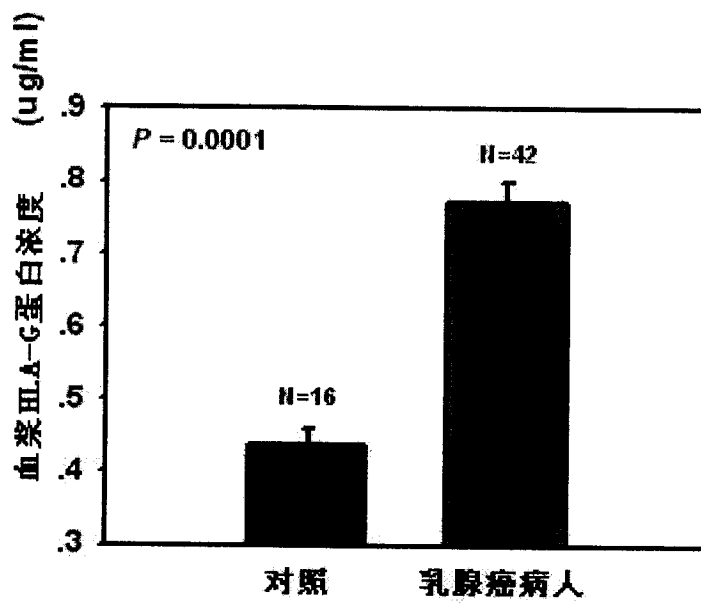


图 11B

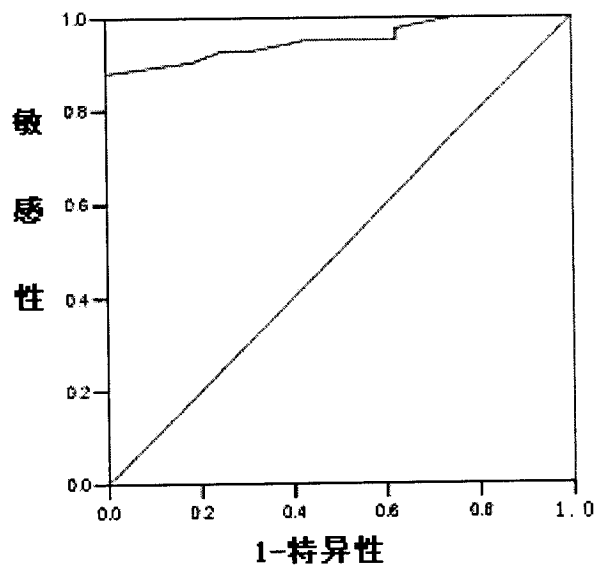


图 11C