

WO 2012/031374 A1

(12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织
国 际 局



(43) 国际公布日
2012 年 3 月 15 日 (15.03.2012)

PCT

(10) 国际公布号

WO 2012/031374 A1

(51) 国际专利分类号:

A61K 39/395 (2006.01) G01N 33/577 (2006.01)
C12N 5/18 (2006.01)

(21) 国际申请号:

PCT/CN2010/001387

(22) 国际申请日:

2010 年 9 月 9 日 (09.09.2010)

(25) 申请语言:

中文

(26) 公布语言:

中文

(71) 申请人(对除美国外的所有指定国): **北京同为时代生物技术有限公司 (BEIJING COTIMES BIOTECH CO., LTD.)** [CN/CN]; 中国北京市经济技术开发区西环南路 26 号院 15 号楼, Beijing 100176 (CN)。

(72) 发明人; 及

(75) 发明人/申请人(仅对美国): **沈恩允 (SHEN, Enyun)** [CN/CN]; 中国北京市经济技术开发区西环南路 26 号院 15 号楼, Beijing 100176 (CN)。 **宋扬 (SONG, Yang)** [CN/CN]; 中国北京市大兴工业开发区科苑路 18 号厂房 3 层, Beijing 102600 (CN)。 **任世奇 (REN, Shiqi)** [CN/CN]; 中国北京市经济技术开发区西环南路 26 号院 15 号楼, Beijing 100176 (CN)。

(74) 代理人: **中国专利代理(香港)有限公司 (CHINA PATENT AGENT (H.K.) LTD.)**; 中国香港特别

行政区湾仔港湾道 23 号鹰君中心 22 号楼, Hong Kong (CN)。

(81) 指定国(除另有指明, 要求每一种可提供的国家保护): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW。

(84) 指定国(除另有指明, 要求每一种可提供的地区保护): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), 欧洲 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG)。

本国际公布:

- 包括国际检索报告(条约第 21 条(3))。
- 包括说明书序列表部分(细则 5.2(a))。

(54) Title: BLOOD MARKERS FOR DIAGNOSING EPITHELIUM DERIVED CANCERS AND MONOCLONAL ANTIBODIES THEREOF

(54) 发明名称: 用于诊断上皮源性癌症的血液标志物及其单克隆抗体

(57) Abstract: The present invention provides uses of cytokeratins as markers for diagnosing epithelium derived cancers. The present invention provides cancer-related epitopes of cytokeratins and monoclonal antibodies which specifically recognize the epitopes. The present invention also provides methods for the early screen, diagnosis or prognosis of epithelium derived cancers in subjects, methods for the evaluation of therapeutic effect of related medicaments or therapies, and kits for accomplishing the methods.

(57) 摘要:

本发明提供细胞角蛋白片段作为诊断上皮源性癌症的标志物的用途。本发明提供细胞角蛋白的癌症相关表位及特异识别该表位的单克隆抗体。本发明还提供对受试者中的上皮源性癌症进行早期筛查、诊断或预后评估的方法, 评估相关药物或疗法的治疗效果的方法, 以及用于实施该方法的试剂盒。

用于诊断上皮源性癌症的血液标志物及其单克隆抗体

技术领域

本发明涉及癌症的诊断，更具体地说，本发明涉及细胞角蛋白片
5 段作为诊断上皮源性癌症的标志物的用途。

背景技术

对于癌症患者的成功治疗而言最重要的因素之一是早期检测。随着基因分析及蛋白质组学的发展，在鉴定可用于诊断及预测特定癌症
10 的分子标记方面已取得了显著的进步。

上皮源性癌症是指起于上皮细胞的癌症，包括但不限于乳腺癌、胃癌、口腔癌、食管癌、结肠癌、肝癌、膀胱癌、胰腺癌、卵巢癌、宫颈癌、肺癌、乳腺癌和皮肤癌、前列腺癌、肾癌等。

例如，胃癌是世界上第二大癌症死因，是威胁人类健康最常见的
15 恶性肿瘤之一。胃癌患者预后的关键是作好二级预防，即早期发现和早期治疗。胃癌的早期及时准确检出和治疗，对于降低胃癌死亡率具有十分重要的意义。

肺癌是一种常见的肺部恶性肿瘤，近年来，随着吸烟和各种环境
20 因素的影响，世界各国特别是工业发达国家，肺癌的发病率和病死率均迅速上升。研发具有高度特异性和敏感性的血清肿瘤标记物对肺癌早期的发现及治疗具有很重要的意义。

分子诊断是诊断癌症最流行的方法。不同类型的分子如DNA、蛋白质和脂肪被用作诊断工具。肿瘤标记物（Tumor Markers, TM），是指在肿瘤发生和增殖过程中，由肿瘤细胞所产生或分泌并释放到血液、
25 细胞、体液中，反映肿瘤存在和生长的一类物质。肿瘤标记物通常是蛋白质，已经广泛应用于多种类型癌症的检测和诊断。肿瘤标记物浓度水平上升，可能表明了一种癌症在人体内的某种形式的存在。肿瘤标记物在临
30 床上主要用于对原发肿瘤的发现、肿瘤高危人群的筛选、良性和恶性肿瘤的鉴别诊断、肿瘤发展程度的判断、肿瘤治疗效果的观察和评价以及肿瘤复发和预后的预测等。肿瘤标记物常用免疫法测定，如间接法、双抗体夹心法、竞争法。检测手段有胶体金法、酶联免疫法、化学发光法、电化学发光法等。血清学检测的目的在于测定

病人血清中与癌症相关的肿瘤标记物的含量。此方法简单易行，适用于大量人群的普查。例如，目前国际上普遍应用的与胃癌相关的肿瘤标记物包括CEA，TPS以及CA72-4等。

细胞角蛋白(Cytokeratins)包括 20 多种不同蛋白，是细胞骨架的重要成分。尽管所有上皮源的细胞均表达一定水平的细胞角蛋白，但是某些角蛋白的组分例如角蛋白 8、18 以及 19 与恶性肿瘤的发生与进展密切相关 (M. Nap, Th. Van Wel, C. Andres, et al. Immunohistochemical Profiles of 30 Monoclonal Antibodies against Cytokeratins 8, 18 and 19[J]. Tumor Biology 2001;22:4-10) 。

细胞角蛋白 18 (Cytokeratin 18)是一分子量为 55kD 的酸性蛋白质，由 430 个氨基酸组成，具有高度保守的 α 螺旋结构中心区域，呈丝状结构。广泛分布于正常组织表面如复层上皮和鳞状上皮，以及单层上皮细胞如腺泡、气管、乳腺导管、汗腺、子宫内膜、结肠和肝细胞等。在正常上皮细胞中细胞角蛋白 18 表达相对稳定，细胞角蛋白 18 及其片段在外周血、骨髓、淋巴结中无表达或低表达，几乎没有片段产生释放入血。相反的是，当上皮细胞恶性转化时，细胞角蛋白 18 表达急剧增高。同时，细胞角蛋白 18 生长进程发生异常。在肿瘤细胞凋亡和坏死过程中激活的蛋白酶加速了细胞的降解，使得大量可溶性的细胞角蛋白 18 片段被释放，造成组织液、体液中可溶性的细胞角蛋白 18 片段的浓度升高，尤其在胃癌患者血液循环中含量丰富 (Stig L, Aleksandra M H ,Takayuki U, et al. Determining tumor apoptosis and necrosis in patient serum using cytokeratin 18 as a biomarker[J]. Cancer Letters 214(2004):1-9; T. Stigbrand. The Versatility of Cytokeratins as Tumor Markers[J]. Tumor Biology 2001;22:1-3) 。

细胞角蛋白 19 是一分子量为 40kD 的酸性蛋白质，是角蛋白家族中最小的成员，由 400 个氨基酸组成，具有高度保守的 α 融合结构中心区域，呈丝状结构。广泛分布于正常组织表面如复层上皮和鳞状上皮，以及单层上皮细胞如腺泡、气管、乳腺导管、汗腺、子宫内膜、结肠和肝细胞等。在正常上皮细胞中细胞角蛋白 19 表达相对稳定，细胞角蛋白 19 及其片段在外周血、骨髓、淋巴结中无表达或低表达，几乎没有片段产生释放入血循环系统。相反的是，当上皮细胞恶性转化时，细胞角蛋白 19 表达急剧增高。同时，细胞角蛋白 19 生长进程发生异常。

在肿瘤细胞凋亡和坏死过程中激活的蛋白酶加速了细胞的降解，使得大量可溶性的细胞角蛋白19片段被释放，造成组织液、体液中可溶性的细胞角蛋白19片段的浓度升高，尤其在肺癌患者血循环中含量丰富（J. Niklinski, T. Burzykowski, W. Niklinska, et al. Preoperative CYFRA 5 21-1 level as a prognostic indicator in resected nonsmall cell lung cancer [J]. Eur Respir J 1998; 12: 1424–1428）。

发明内容

本发明一方面提供了与上皮源性癌症有关的细胞角蛋白片段，其中该片段包含选自由SEQ ID NOs: 2、3、5和6构成的组的抗原表位。在一个具体实施方式中，该片段包含SEQ ID NO: 1的氨基酸残基200-400。在另一个具体实施方式中，该片段包含SEQ ID NO: 2的氨基酸残基325-400。

本发明另一方面提供了与所述抗原表位特异性结合的单克隆抗体。在一个具体实施方式中，该单克隆抗体由保藏号为CGMCC No. 1957、CGMCC No. 1956、CGMCC No. 1955或CGMCC No. 1952的杂交瘤产生。

本发明还提供了所述单克隆抗体的抗原结合部分，其中该抗原结合部分与所述单克隆抗体竞争结合所述抗原表位。在一个具体实施方式中，该抗原结合部分为人源化抗体。在另一个具体实施方式中，该抗原结合部分为嵌合抗体。

本发明一方面提供了用于对受试者中的上皮源性癌症进行早期筛查、诊断或预后评估的方法，该方法包括：获得来自受试者的生物样品，检测该生物样品中本发明的细胞角蛋白片段的含量，和将该含量与阈值水平进行比较。如果该含量超过阈值水平则说明该患者可能患有癌症。

在一个优选实施方式中，该方法还涉及与其他上皮源性肿瘤标记物联用。具体而言，该方法包括：获得来自受试者的生物样品，检测该生物样品中本发明的细胞角蛋白片段的含量，检测该生物样品中其他上皮源性肿瘤标记物的含量，和将所述细胞角蛋白片段以及所述其他上皮源性肿瘤标记物的含量与阈值水平进行比较。优选地，所述其他上皮源性肿瘤标记物选自由AFP、CEA、CA242、CA19-9、CA72-4、

CA125、CA15-3、NSE、SCCA、Cyfra21-1、PSA、free PSA构成的组。

本发明另一方面提供了评估用于治疗上皮源性癌症的药物或疗法的治疗效果的方法，包括：向患有上皮源性癌症的受试者施用所述药物或疗法，在施用所述药物或疗法之前和之后采集所述受试者的生物样品，和检测所述生物样品中本发明的细胞角蛋白片段的含量，其中在施用所述药物或疗法之前和之后该细胞角蛋白片段含量明显降低的，表明所述药物或疗法有明显疗效。

优选地，所述上皮源性癌症选自由胃癌、肝癌、肺癌、胆囊癌、乳腺癌、宫颈癌、卵巢癌、结肠癌、前列腺癌、肾癌、食道癌、肠癌、膀胱癌构成的组。

优选地，所述生物样品选自由血液、血清、组织液、尿液、大便、痰液、脑脊液、唾液、眼泪和乳头吸出液构成的组。

本发明另一方面提供了一种试剂盒，包含：固定于固相载体上的能够特异结合本发明的细胞角蛋白片段的包被抗体，以及被可检测地标记的能够特异结合该细胞角蛋白片段的检测抗体。该试剂盒可以用于实施本发明的方法，也可用于检测本发明的细胞角蛋白片段。

本发明还提供了所述细胞角蛋白片段的特异结合剂，例如本发明的单克隆抗体或者抗原结合片段，在制备用于诊断上皮源性癌症的试剂中的用途。

20

附图说明

图1是一幅流程图，简要描述了细胞角蛋白18片段制备和活性分析的步骤。

图2是一幅电泳图，显示了细胞角蛋白18片段cDNA的电泳结果。

25 图3显示了TOPO质粒的结构。其中，Ampicillin是指氨苄青霉素，Neomycin是指新霉素。

图4是一幅电泳图，显示了重组表达质粒TOPO-GY10、TOPO-GY11、TOPO-GY12的酶切鉴定结果。其中，marker是指标志物。

30 图5是一幅电泳图，显示了重组细胞角蛋白18片段GY10、GY11、GY12的SDS-PAGE结果。

图6显示了最佳抗体配对实验的结果。

图7是一幅示意图，显示了单克隆抗体3A9、2A6的结合表位的位

置。

图8显示了单克隆抗体3A9及2A6与其他人血清肿瘤标记物的免疫检测结果。

图9显示了胃癌与非胃癌诊断的ROC曲线。其中，specificity是指特5 异性，sensitivity是指灵敏度。

图10是一幅流程图，简要描述了细胞角蛋白19片段制备和活性分析的步骤。

图11是一幅电泳图，显示了细胞角蛋白19片段cDNA的电泳结果。

图12显示了TOPO质粒的结构。其中，Ampicillin是指氨苄青霉素，10 Neomycin是指新霉素。

图13是一幅电泳图，显示了重组表达质粒TOPO-GY20、TOPO-GY21、TOPO-GY22的酶切鉴定结果。其中，marker是指标志物。

图14是一幅电泳图，显示了重组细胞角蛋白19片段GY20、GY21、GY22的SDS-PAGE结果。

15 图15显示了最佳抗体配对实验的结果。

图16是一幅示意图，显示了单克隆抗体2G2、5H2的结合表位的位置。

图17显示了单克隆抗体2G2、5H2与其他人血清肿瘤标记物的免疫检测结果。

20 图18显示了肺癌与非肺癌鉴别诊断ROC曲线。其中，specificity是指特异性，sensitivity是指灵敏度。

相关序列的描述

SEQ ID NO:1显示了细胞角蛋白18(简称K18)的全长氨基酸序列，25 长度为430个氨基酸残基。

SEQ ID NO:2显示了单克隆抗体3A9识别的K18抗原表位的氨基酸序列，长度为51个氨基酸残基，对应于SEQ ID NO:1的氨基酸位置200~250。

30 SEQ ID NO:3显示了单克隆抗体2A6识别的K18抗原表位的氨基酸序列，长度为51个氨基酸残基，对应于SEQ ID NO:1的氨基酸位置350~400。

SEQ ID NO:4显示了细胞角蛋白19(简称K19)的全长氨基酸序列，

长度为400个氨基酸残基。

SEQ ID NO:5显示了单克隆抗体2G2识别的K19抗原表位的氨基酸序列，长度为26个氨基酸残基，对应于SEQ ID NO:4的氨基酸位置375～400。

5 SEQ ID NO:6显示了单克隆抗体5H2识别的K19抗原表位的氨基酸序列，长度为26个氨基酸残基，对应于SEQ ID NO:4的氨基酸位置325～350。

具体实施方式

10 本发明提供了细胞角蛋白18(K18)的两个上皮源性癌症相关表位。两个癌相关表位均位于细胞角蛋白18氨基酸序列的C端，其序列如SEQ ID NOs: 2、3所示。所述表位在恶性转化期间，特别是在胃，结肠，乳腺，卵巢，肾脏等组织的恶性转化期间变得暴露。所述癌相关表位的暴露，是通过肿瘤细胞的不断增殖、坏死、凋亡而将细胞角蛋白18片段释放于血液中而暴露的。而正常组织和健康人员血液中没有这两个癌相关表位的表达。本发明提供了分别识别这两个癌相关表位的两株单克隆抗体3A9和2A6，并应用这两株单抗发明了诊断癌症的方法。用于生产K18单抗3A9和2A6的杂交瘤于2007年3月8日保藏于中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心(CGMCC，北京市海淀区中关村北一条13号)，保藏编号分别为CGMCC NO. 1957和1956。保藏证明中的信息通过援引并入本文，作为本发明原始公开内容的一部分。

20 本发明还提供了细胞角蛋白19的两个上皮源性癌症相关表位。其序列如SEQ ID NOs: 5、6所示。本发明提供了分别识别这两个癌相关表位的两株单克隆抗体2G2和5H2，并应用这两株单抗发明了诊断癌症的方法。用于生产K19单抗2G2和5H2的杂交瘤于2007年3月8日保藏于中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心(CGMCC，北京市海淀区中关村北一条13号)，保藏编号分别为CGMCC NO. 1955和1952。保藏证明中的信息通过援引并入本文，作为本发明原始公开内容的一部分。

30 本发明一方面提供了与上皮源性癌症有关的细胞角蛋白片段，其中该片段包含选自由SEQ ID NOs: 2、3、5和6构成的组的抗原表位。

本文所用的术语“上皮源性癌症”是指起于上皮细胞的癌症，包

括但不限于乳腺癌、基底细胞癌、腺癌、胃肠癌、唇癌、口腔癌、食管癌、小肠癌和胃癌、结肠癌、肝癌、膀胱癌、胰腺癌、卵巢癌、宫颈癌、肺癌、乳腺癌和皮肤癌例如鳞状细胞和基底细胞癌、前列腺癌、肾细胞癌及其它已知通过身体影响上皮细胞的癌症。

5 本文所用的术语“片段”是指与天然的全长蛋白相比，缺少一个或多个氨基酸残基的氨基酸序列。例如，蛋白片段可以通过从全长蛋白中删除部分残基而获得，例如N段截短片段可以通过将位于蛋白N段的部分氨基酸残基删除而获得。

10 蛋白片段中也可以含有外源序列，从而形成嵌合蛋白片段。例如，将蛋白A的N端结构域删除后，与蛋白B的N端结构域连接，可以形成蛋白A和蛋白B的嵌合片段。本领域技术人员可以理解，该嵌合片段的长度有可能超过蛋白A的长度。

15 为了便于纯化，可以在蛋白片段中添加常用的纯化标签，例如GST（谷胱甘肽巯基转移酶）、His-tag（六聚组氨酸）等。

20 本发明的细胞角蛋白片段可以含有抗原表位附近的一段连续的氨基酸序列。

25 例如，本发明的K18片段可以包含SEQ ID NO:1中涵盖SEQ ID NO:2或3所示抗原表位的至少60、70、80、90、100、120、150、180、200、210、220、250、280、300、320、350、380、400或420个连续的氨基酸残基。例如，在本发明一个实施方式中，K18片段包含SEQ ID NO:1的氨基酸残基1-250，涵盖单抗3A9识别的抗原表位；在另一个实施方式中，K18片段包含SEQ ID NO:1的氨基酸残基250-430，涵盖单抗2A6识别的抗原表位；在又一个实施方式中，K18片段包含SEQ ID NO:1的氨基酸残基150-430，同时涵盖两个抗原表位。可以将包含K18的一个或两个抗原表位的片段与K19的抗原表位融合在一起，形成嵌合片段。

30 本发明的K19片段可以包含SEQ ID NO:4中涵盖SEQ ID NO:5或6所示抗原表位的至少30、50、60、70、80、90、100、120、150、180、200、210、220、250、280、300、320、350或380个连续的氨基酸残基。例如，在本发明一个实施方式中，K19片段包含SEQ ID NO:4的氨基酸残基1-375，涵盖单抗5H2识别的抗原表位；在另一个实施方式中，K19片段包含SEQ ID NO:1的氨基酸残基150-400，同时涵盖单抗2G2和5H2识别的抗原表位。

通过本领域公知的分子克隆实验技术可以容易地制备包含特定氨基酸残基的蛋白片段。

本文所用的“生物样品”是指从患者(优选病人)获得的生物材料样品，包括组织样品、细胞样品(例如组织活检样品，例如吸出活检样品、
5 刷拭活检样品、表面活检样品、针吸活检样品、钻取活检样品、切除活检样品、开胸腹活检样品、切开式活检样品或内窥镜活检样品)和肿瘤样品。生物样品也可为生物流体样品。在一个优选实施方案中，生物样品为血清。然而，也可使用血液、尿液、唾液、脑脊液、乳头吸出液和细胞裂解物上清液等。

10 如本文所述，可通过本领域技术人员所知的任何手段来测量本发明细胞角蛋白片段的水平。在本发明中，一般优选使用抗体或抗体的抗原结合部分来检测生物样品中的细胞角蛋白片段的水平。然而，其它方法也可使用，例如通过分析 mRNA 转录物来测量细胞角蛋白片段的表达。

15 mRNA 水平的评价方法为本领域技术人员所熟知。举例而言，通过 RNA 印迹法可完成 RNA 转录物的检测，其中 RNA 制备物在变性琼脂糖凝胶上进行，并转移至合适支持物上，例如活性纤维素膜、硝酸纤维素膜或玻璃膜或尼龙膜。然后使标记(例如放射性标记)的 cDNA 或 RNA 与该制备物杂交，洗涤，并通过例如放射自显影等方法来分析。
20 或者，可在 DNA 阵列、芯片或微阵列上检测 mRNA 表达。举例而言，为监测 mRNA 水平，从待测生物样品中提取 mRNA，逆转录，产生荧光-标记的 cDNA 探针。然后用标记的 cDNA 探针探测能够与细胞角蛋白片段 cDNA 杂交的微阵列，扫描载玻片，测量荧光强度。该强度和杂交强度与表达水平相关。

25 也可测量细胞角蛋白片段水平，尤其是当该生物样品为流体样品例如血液或尿液时。在一个实施方案中，通过让生物样品与特异性结合细胞角蛋白片段的单克隆抗体接触，来测量细胞角蛋白片段水平。

30 术语“抗体的抗原结合部分”包括与细胞角蛋白的抗原表位特异性结合(起免疫反应)的免疫球蛋白分子和免疫球蛋白分子的免疫学活性决定簇，例如含有抗原结合位点的分子。术语“抗体的抗原结合部分”意指包括全抗体，例如任何同种型(IgG、IgA、IgM、IgE 等等)，也包括抗体片段。可使用常规技术使抗体片段化。因此，该术语包括

能够选择性地与某一蛋白反应的抗体分子的蛋白水解片段或重组制备的部分。此等蛋白水解和/或重组片段的非限制性实例包括 Fab、F(ab')2、Fab'、Fv、dAbs 及含有由多肽接头连接的 VL 区和 VH 区的单链抗体 (scFv)。所述 scFv 可共价或非共价连接形成含两个以上结合位点的抗体。
5 因此，“抗体的抗原结合部分”包括多克隆抗体、单克隆抗体或抗体的其它纯化制备物和重组抗体。术语“抗体的抗原结合部分”还指包括人源化抗体、双特异性抗体及含至少一个源自抗体分子的抗原结合决定簇的嵌合分子。术语“人源化抗体”指源自非人抗体（例如鼠）的保持或基本上保持亲本抗体抗原结合特性，但在人中具有较低
10 免疫原性的抗体。人源化抗体的优点是减少或消除了抗体在宿主中的免疫原性，从而增加生物利用度和减少可能的不利免疫反应。可使用 CDR 移植的方法制备人源化抗体。

本文所用的“标记抗体”包括以可检测的方式标记的抗体，包括但不限于酶标记抗体、放射性标记抗体、荧光标记抗体和化学发光标记抗体。
15 也可用可检测标签例如 HA、HSV、FLAG 或 HIS 标记抗体。

在本发明诊断及预后方法中使用抗体或抗体的抗原结合部分检测细胞角蛋白片段的水平，生物样品中存在的细胞角蛋白片段水平与可检测的标记抗体发射的信号强度相关。

在一个优选实施方案中，可通过将抗体与酶连接，来可检测地标记抗体或抗体的抗原结合部分。当该酶与其底物接触时，将与该底物反应，其反应方式能产生可检测化学部分，举例而言，通过分光光度法、荧光测定法或通过视觉手段来检测。可用于可检测地标记本发明抗体的酶包括但不限于苹果酸脱氢酶、辣根过氧化物酶、碱性磷酸酶、天冬酰胺酶、葡萄糖氧化酶、尿素酶、过氧化氢酶、葡萄糖淀粉酶和乙酰胆碱酯酶。化学发光是另一种可用于检测基于抗体或其抗原结合部分的方法。
25

使用多种其它免疫测定中的任一种也可完成检测。举例而言，通过放射性标记抗体，通过使用放射免疫测定可以检测该抗体。通过使用例如 γ 计数器或闪烁计数器或通过放射自显影等手段可检测放射性同位素。
30

用荧光化合物标记抗体也是可行的。当荧光标记的抗体暴露于合适波长的光时，由于荧光于是可检测其存在。在最常用荧光标记化合

物中有异硫氰酸荧光素、罗丹明、藻红蛋白和荧光胺。

本发明一方面提供了用于对受试者中的上皮源性癌症进行早期筛查、诊断或预后评估的方法，包括：获得来自受试者的生物样品，检测该生物样品中细胞角蛋白片段的含量，和将该含量与阈值水平进行比较。如果该含量超过阈值水平则说明该患者可能患有癌症或者预后不佳。

在一个优选实施方式中，采用本发明提供的单克隆抗体进行检测。例如，可以仅使用一种单抗来检测 K18 或 K19 片段；可以组合使用 3A9 和 2A6 来检测 K18 片段；可以组合使用 2G2 和 5H2 来检测 K19 片段；也可以组合使用 3A9 和 2G2 来同时检测 K18 片段和 K19 片段；或者同时组合使用上述四种单克隆抗体进行检测。可以理解，组合使用几种抗体可能提高诊断的准确性。

本文所用的术语“3A9”是指由保藏编号为 CGMCC NO. 1957 的杂交瘤生产的单克隆抗体，可以特异识别 K18 上的抗原表位。

本文所用的术语“2A6”是指由保藏编号为 CGMCC NO. 1956 的杂交瘤生产的单克隆抗体，可以特异识别 K18 上的抗原表位。

本文所用的术语“2G2”是指由保藏编号为 CGMCC NO. 1955 的杂交瘤生产的单克隆抗体，可以特异识别 K19 上的抗原表位。

本文所用的术语“5H2”是指由保藏编号为 CGMCC NO. 1952 的杂交瘤生产的单克隆抗体，可以特异识别 K19 上的抗原表位。

在一个优选实施方式中，该方法还涉及与其他上皮源性肿瘤标记物联用，例如 AFP、CEA、CA242、CA19-9、CA72-4、CA125、CA15-3、NSE、SCCA、Cyfra21-1、PSA、free PSA 等常用肿瘤标记物。对多个肿瘤标记物进行组合检测对于提高诊断的准确性有帮助。

本发明另一方面提供了评估用于治疗上皮源性癌症的药物或疗法的治疗效果的方法，包括：向患有上皮源性癌症的受试者施用所述药物或疗法，在施用所述药物或疗法之前和之后采集所述受试者的生物样品，和检测所述生物样品中本发明的细胞角蛋白片段的含量，其中在施用所述药物或疗法之前和之后该细胞角蛋白片段含量明显降低的，表明所述药物或疗法有明显疗效。

本发明也涉及对上皮源性癌症进行检测和预后评价的商用试剂盒。该试剂盒可以是本领域普通技术人员所熟知的任何配置，用于实

施一种或多种本文所述的方法。另外，优选用包括于试剂盒中的一种或多种标准品同时实施测试，以便该测试结果可定量或确证。例如，标准品可以是纯化的 K18 或 K19 蛋白。

试剂盒包括检测细胞角蛋白片段水平的手段，例如选择性结合细胞角蛋白片段的抗体或抗体片段。诊断检测试剂盒优选以标准双抗体结合形式配制，其中一种特异性抗体捕获患者样品中的细胞角蛋白片段，另一种特异性抗体用于检测捕获的细胞角蛋白片段。举例而言，将该捕获抗体（包被抗体）固定于例如测试板或硝酸纤维素膜等固相上。通常用可检测标记例如辣根过氧化物酶或放射性同位素来给第二抗体即检测抗体作标签。

在一个优选实施方式中，试剂盒中组合使用 3A9 和 2A6 来检测 K18 片段。在另一个优选实施方式中，试剂盒中组合使用 2G2 和 5H2 来检测 K19 片段。也可以组合使用 3A9 和 2G2 来同时检测 K18 片段和 K19 片段；或者同时组合使用上述四种单克隆抗体进行检测。可以理解，组合使用几种抗体可能提高诊断的准确性。

在其它的实施方案中，检测试剂盒可采用(但不限于)下列技术：竞争性和非竞争性测定、放射免疫测定(RIA)、生物发光和化学发光测定、荧光测定、夹层试验、免疫放射测定、斑点印迹、酶联测定(包括 ELISA)、微量滴定板和免疫细胞化学法。对每一试剂盒，测试的范围、灵敏度、准确度、可靠性、特异性和再现性均通过本领域技术人员所熟知的方法来确立。

上述检测试剂盒将还提供使用说明书。

本发明由下列实施例作进一步说明。提供这些实施例是为了帮助理解本发明，不得解释为对本发明的限制。

25

实施例 1

1. 抗角蛋白 18 及片段的单克隆抗体的制备

1.1 免疫原——重组细胞角蛋白 18 片段的制备

重组细胞角蛋白 18 片段 GY10 为 E.coli 系 BL21(DE3)大肠杆菌表达。

1.1.1 研制方案

见图 1。

1.1.2 细胞角蛋白 18 片段的 cDNA 合成

通过 RT-PCR 方法制备编码各种细胞角蛋白 18 片段的 cDNA:

a) 模板及引物

先从一种 HELA 人癌细胞系中分离得到总 RNA。然后根据说明书

- 5 用反转录试剂盒 (Promega) 合成 cDNA。所获得的 cDNA 即是 PCR 的模板。设计三种片段的引物，对各 cDNA 进行 PCR 扩增。片段编号及氨基酸序列见表 1-1。

表 1-1 重组细胞角蛋白 18 片段的编号及序列

片段编号	细胞角蛋白 18 片段序列
GY10	aa1 ~ 430
GY11	aa150 ~ 430
GY12	aa180 ~ 430

10

b) PCR 反应

PCR 反应溶液组分:

cDNA 模板: 5 μl;

引物: 5' 和 3' 引物各 10pmol

15 10 × PCR 缓冲液: 10 μl;

dNTP: 各 2.5mM, 共 4 μl;

Taq 聚合酶 (Promega): 5U;

加入无菌双蒸水至 100 μl.

程序如下:

- 20 溶液加热至 94 °C 恒温 2min, 然后循环 40 次, 每个循环设置为: 加热 94 °C 30s, 52 °C 1min, 72 °C 3min。程序完成后, 反应溶液加热 72 °C 10min。然后获取扩增的 DNA 片段, 用含 0.25 μg/ml 溴化乙锭的 1% 琼脂糖凝胶分离, 见图 2。结果显示条带中包含所需的细胞角蛋白 18 片段 cDNA 片段, 然后用 Gene Clean kit (BIO101, Irvine, CA) 回收 DNA 片段。

1.1.3 构建质粒并筛选

用 TOPO100 expression Cloning Kit (Invitrogen, Carlsbad, CA) 克隆 cDNA 片段。

- (1) 将从 PCR 反应溶液回收的细胞角蛋白 18 的 cDNA 与克隆试剂盒提供的 TOPO 质粒（图 3）50ng 混合；
 - (2) 溶液中加入 10× 连接酶反应缓冲液 (6mM Tris-HCl(pH7.5), 6mM MgCl₂, 5mM NaCl, 7mM β -巯基乙醇, 0.1 mM ATP, 2mM DTT, 5 1mM 亚精胺, 0.1mg/ml BSA) ；
 - (3) 再加入 4U T4 DNA 连接酶(1 μ l);
 - (4) 用灭菌去离子水调整溶液体积至 10 μ l;
 - (5) 将其在 14℃温育 15h;
 - (6) 取 2 μ l 加入到 50 μ l 感受态 E.coli 细菌株 TOP10F (由 TA 克 10 隆试剂盒提供, 并按照说明书制成感受态, 混合物冰浴 30min, 然后孵育 42℃30s, 再冰浴 5min)
 - (7) 配制 500 μ l 培养基, 含 2%(v/v)蛋白胨, 0.5%(w/v)酵母膏, 0.05%(w/v)NaCl, 2.5mM KCl, 1mM MgCl₂ 和 20mM 葡萄糖, 将(6)加入其中, 37℃温育 1h, 并振摇。
 - 15 (8) 在 L-肉汤琼脂平板 (1%(v/v)蛋白胨, 0.5%(w/v)酵母膏, 0.5%(w/v)NaCl, 0.1%葡萄糖, 0.6%(w/v)bacto-agar(Difo, Detroit, MI)) 涂铺(7), 100μg/ml.
 - (9) 培养基表面可筛选出抗氨苄的克隆子, 用铂丝涂布圈挑出单菌落放入 L-肉汤培养基 (含氨苄 100μg/ml) 中 37℃培养, 过夜, 振摇 20 (200rpm)。
 - (10) 温育过后, 离心收集细菌, 用碱法提取 DNA 质粒。
经酶切鉴定, 已经得到重组的表达质粒 TOPO-GY10、TOPO-GY11、TOPO-GY12, 如图 4。
- #### 1.1.4 重组蛋白的诱导表达和鉴定
- 25 编码各种细胞角蛋白 18 的 cDNA 已经插入 TOPO 质粒中,
- (1) 所获质粒转化至 E.coli 系 BL21(DE3), 然后在 LB 培养基中培养至指数生长期, 用异丙醇 β-硫代半乳糖苷(IPTG)诱导表达 3h。
 - (2) 沉淀细胞, 用裂解液(8M urea, 20mM Tris-HCl)重悬, 并用超声破碎。
 - 30 (3) 后 14,000 × g 离心 15min, 在 Ni 柱纯化上清。用 PBS 溶液透析纯化蛋白, 4℃过夜。
 - (4) 用 BCA 试剂(Pierce, Woburn, MA)检测蛋白浓度。

1.1.5 重组细胞角蛋白 18 的纯化

活化 Sephadex G-50，利用分子筛层析纯化重组细胞角蛋白 18 片段。将 Sephadex G-50 溶于 100 mM Tris-HCl 缓冲液 (pH 7.4)，在 100 °C 煮沸 10 分钟，然后用 100 mM Tris-HCl 缓冲液 (pH 7.4) 封闭，并在 5 4°C 保存。将细菌破碎浓缩液流经 2ml 凝胶珠，流速为 2 ml/min。样品通过后，50 毫升 PBS 冲洗，洗脱缓冲液 0.1 M 甘氨酸 (pH 2.4), 0.15 M NaCl。洗脱液于紫外 OD280nm 测值判断洗脱是否完毕。收集有效洗脱液 (OD>0.01) 置于透析袋用 1L 的磷酸盐缓冲液 (pH7.5) 4°C 透析，期间更换 2 次透析缓冲液。将纯化的蛋白质浓缩到约 1mg/ml，加入 10% NaN₃，4°C 保存。用 10 % 的 SDS - PAGE 检测，并用 GDS8000 10 凝胶成像系统扫描分析蛋白纯度。

结果如图 5，结果显示获得了高纯度的重组细胞角蛋白 18 片段 GY10、GY11、GY12，电泳测定纯度大于 95 %。

用于制备单克隆抗体的免疫原为基因重组全长人细胞角蛋白 18，15 此蛋白由美国 UAB 大学周铜教授馈赠。

1.2 免疫流程

动物：6 ~ 8 周龄雌性 Balb/c 小鼠。

初次免疫（第 1 天）：采用 1ml 抗原蛋白溶液与相同体积的弗氏完全佐剂混匀形成乳化颗粒，每只足底注射 100 μl。

二次免疫（第 7 天）：采用 1ml 抗原蛋白溶液与相同体积的弗氏不完全佐剂混匀形成乳化颗粒，每只足底注射 100 μl。

强化免疫（第 14、21、28 天）：采用不含佐剂的抗原 (1mg/ml)，每只足底注射 100 μl。

融合（第 31 天）。

25 1.3 杂交瘤的建立

取免疫小鼠的腘窝及腹股沟分离淋巴细胞，将其与 NS1 骨髓瘤细胞按 2:1 比例混合，用无血清 RPMI 1640 洗涤 2 次，加入 1ml 37°C 预热的 PEG1500，在 37°C 轻微混合细胞 1 分钟，然后在 3 分钟内缓慢滴加 20ml 预热至 37°C 的无血清 RPMI 1640 培养基。离心，将融合细胞悬浮于 12% FBS RPMI 1640 HAT 选择培养基。将细胞加入 5 块 96 孔细胞培养板中，100 μl/孔。

30 1.4 ELISA 检测筛选阳性克隆

在细胞融合后 7 天，用间接 ELISA 法进行初次筛选，所有杂交瘤均用三种重组人细胞角蛋白 18 抗原筛选：（1）全长细胞角蛋白 18；（2）N 端细胞角蛋白 18 片段；（3）C 端细胞角蛋白 18 片段。

用上述角蛋白 18 抗原（1 μ g/ml）包被 ELISA 板 4℃过夜；用 PBS 5 洗涤 3 次，用含 3% (w/v) BSA 的 PBS 室温封闭 1h。检测时每孔加入 100 μ l 细胞培养液上清；37℃温浴 30 分钟，用 PBST 洗涤液洗 5 遍，拍干后加入过氧化物酶结合的羊抗鼠免疫球蛋白（HRP-GAM Ig, DAKO 公司），37℃温浴 30 分钟，取出后用 PBST 洗涤液洗 5 遍，拍干后先后加入底物液 A、B 各 50 μ l（底物液 A 成分为：13.42g 10 Na₂HPO₄·12H₂O、4.2g 柠檬酸·H₂O 和 0.3g 过氧化氢，用去离子水中调节体积为 700ml；显色液 B 成分为：0.2g 四甲基联苯胺、20ml 二甲基甲酰胺用去离子水中调节体积为 700ml），37℃显色 10 分钟，加入 50 μ l 终止液（2M H₂SO₄）终止反应，并于酶标仪上检测各孔的 OD₄₅₀ 值，以 OD₄₅₀ 值高于 2.0 以上者视为阳性。

单克隆抗体的初筛结果概括为表 1-2。所有 480 孔杂交瘤培养上清经四种抗原检测后，我们鉴定出 48 个克隆与全长细胞角蛋白 18 抗原反应很强。其中 5 个克隆与角蛋白 18 的 N 端、C 端片段以及无关对照抗原呈阳性反应，这些克隆被视为非特异性克隆；其中 18 个克隆与 N 端细胞角蛋白 18 片段呈阳性反应，定义为 N 端特异性克隆；其中 24 20 个与 C 端细胞角蛋白 18 片段呈阳性反应，定义为 C 端特异性克隆。另外，还有 1 株克隆与 N 端及 C 端抗原反应，其反应特异性未知。这些 N 端和 C 端特异性克隆作为候选克隆进行进一步研究。

这些克隆通过有限稀释法进行三次亚克隆。

25 表 1-2 初次筛选鼠抗人角蛋白 18 单抗结果

反应结果				总共 480 个克隆	备注
全长角蛋白 18	N-端片段 (aa1 ~ 250)	C-端片段 (aa200 ~ 430)	阴性对照 抗原	阳性克隆数	
+	+	+	+	5	非特异性
+	+	-	-	18	N-端特异
+	-	+	-	24	C-端特异
+	+	+	-	1	未知

1.5 单克隆抗体的产生及纯化

取 16 周龄的健康 Balb/c 小鼠，腹腔注射 0.5ml pristane。5~7 天后，收集克隆化的杂交瘤细胞，离心去上清，加入不含血清的培养基，调节细胞密度至 2×10^5 ~ 2×10^6 个/ml，每只小鼠注射 0.5ml。7~10 天后小鼠腹部增大，开始收集腹水。3000rpm 离心 15 分钟，吸取中间澄清部分的液体，0.45μm 的微孔滤膜过滤除菌，分装后-20℃保存。

将处理好的腹水用 0.02mol/L、pH7.4 的 PBS (81ml 0.2mol/L Na₂HPO₄, 19ml 0.2mol/L NaH₂PO₄, 加生理盐水至 100ml) 5 倍稀释，取 50 ml 上样至 2 ml protein-A/G 层析柱，流速为 1 ml/min. 然后用 PBS 洗涤亲和层析柱至流出液 OD₂₈₀ 测值小于 0.01。然后使用 0.1M Glycine-HCL pH2.4 缓冲液洗脱结合在层析柱上的抗体，收集洗脱组分 2ml/管，最后将所有 OD₂₈₀ 大于 0.1 的洗脱组分混合，再用 1/10 体积的 1M Tris-HCL pH 8.5 溶液中和。最后在 PBS 溶液中透析过夜，期间更换 2 次透析液。

1.6 酶标抗体的制备

辣根过氧化物酶 (HRP) 标记单抗和多克隆抗体的常用方法是过碘酸钠法。其原理是 HRP 的糖基用过碘酸钠氧化成醛基，加入抗体 IgG 后该醛基与 IgG 氨基结合，形成 Schiff 氏碱。为了防止 HRP 中糖的醛基与其自身蛋白氨基发生偶合，在用过碘酸钠氧化前先用二硝基氟苯阻断氨基。氧化反应末了，用硼氢化钠稳定 Schiff 氏碱。

- (1) 将 5mg HRP 溶于 0.5ml 0.1mol/L NaHCO₃ 溶液中；加 0.5ml 10mmol/L NaIO₄ 溶液，混匀，盖紧瓶塞，室温避光作用 2 小时。
- (2) 加 0.75ml 0.1mol/L Na₂CO₃ 混匀。
- (3) 加入 0.75ml 纯化单抗 (15mg/ml)，混匀。
- (4) 称取 Sephadex G25 干粉 0.3g，加入一支下口垫玻璃棉的 5ml 注射器外筒内；随后将上述交联物移入注射器外套；盖紧，室温作用 (避光) 3 小时或 4℃过夜。
- (5) 用少许 PBS 将交联物全部洗出，收集洗出液，加 1/20V 体积 新鲜配制的 5mg/ml NaBH₄ 溶液，混匀，室温作用 30 分钟；再加入 3/20V NaBH₄ 溶液，混匀，室温作用 1 小时 (或 4℃过夜)。
- (6) 将交联物过 Sephadex G200 或 Sepharose 6B (2.6×50cm) 层析纯

化，分管收集第一峰。

(7) 酶结合物质量鉴定：

克分子比值测定

$$\text{酶量 (mg/ml)} = \text{OD}_{403} \times 0.4$$

5 $\text{IgG 量 (mg/ml)} = (\text{OD}_{280} - \text{OD}_{403} \times 0.3) \times 0.62$

克分子比值 (E/P) = 酶量 \times 4 / IgG 量，一般在 1-2 之间。酶结合率 = 酶量 \times 体积 / 抗体，标记率一般为 0.3-0.6，即 1-2 个 HRP 分子结合在一个抗体分子上，标记率可大于 0.6, 0.8, 0.9；OD₄₀₃/OD₂₈₀ 等于 0.4 时，E/P 约为 1。

10 标记率 = OD₄₀₃ / OD₂₈₀

酶活性和抗体活性的测定 可应用 ELISA 法、免疫扩散、DAB-H₂O₂ 显色反应测定酶结合物的酶活性，抗体活性及效价、特异性。

15 (8) HRP 抗体结合物的保存：加入等量甘油后，小量分装-20℃存放，防止反复冻融；或加入等量 60% 甘油 4℃保存；不宜加 NaN₃ 或酚防腐，否则会影响酶活性。必要时冻干保存，以 BSA 或脱脂牛奶作保护剂。

1.7 肿瘤相关角蛋白 18 片段单克隆抗体配对筛选和临床初步验证

20 纯化及酶标抗体经 ELISA 法确认其抗原反应性后，选取 10 株具有高度亲和力的进行配对实验，以筛选出与胃癌高度相关的角蛋白 18 抗体配对。

1.7.1 交叉配对试验

25 为了获取与胃癌血清角蛋白 18 具有选择性的单克隆抗体配对，我们选取 10 份胃癌血清样本及 10 份正常人血清样本作为测试样本。将 10 份胃癌血清等量体积混合作为阳性样本，将 10 份正常人血清等量体积混合作为阴性样本。用 1μg/ml 的纯化抗体包被 96 孔板，4℃过夜，然后以含 3% BSA 的 PBS 封闭，室温下 1h。然后在一套 ELISA 板中各孔加入 50μl 的胃癌阳性血清，在另外一套 ELISA 板中加入正常人阴性对照血清，再各加入 50μl 的 1:1000 酶标抗体。37℃温育后洗涤，加入显色底物，避光 10 分钟，加入终止液，在 450nm 测量 OD 值。

30 表 1-3 概括了 5 对单克隆抗体的交叉配对实验结果。其中以 3A9/2A6-HRP, 2A6/3A9-HRP, 3H7/3A9-HRP 的抗体配对显示出对胃

瘤血清的强阳性反应，而对正常人血清呈阴性反应。因此，我们确定这些抗体配对所检测的血清角蛋白 18 与胃癌高度相关。

表 1-3 筛选胃癌相关角蛋白 18 抗体的交叉实验

正常人 胃癌		包被抗体				
		2A6	2E6	2H6	3A9	3H7
酶 标 抗 体	2A6	0.05 0.11	0.12 0.98	0.09 1.22	0.05 1.88	0.14 0.78
	2E6	0.09 1.12	0.05 0.06	0.14 0.87	0.12 1.12	0.16 0.92
	2H6	0.12 0.98	0.09 0.56	0.06 0.12	0.09 0.92	0.09 0.66
	3A9	0.08 1.54	0.09 1.24	0.12 0.88	0.05 0.12	0.08 0.98
	3H7	0.11 0.68	0.15 0.88	0.13 0.98	0.06 1.22	0.08 0.12

5

1.7.2 最佳抗体配对临床验证实验

从上述交叉抗体配对实验中初选出 3 对与胃癌角蛋白 18 高度相关的抗体配对 3A9/2A6-HRP, 2A6/3A9-HRP, 3H7/3A9-HRP, 使用 ELISA 法进行临床验证。用 1 μ g/ml 的纯化抗体包被 96 孔板，4℃过夜，然后以含 3%BSA 的 PBS 室温下封闭 1h。分别入 10 份胃癌血清和 10 份正常人血清各 50 μ l 作为检测样本进行检测，然后加入 50 μ l 的 1:1000 酶标抗体。37℃温育后洗涤，加入显色底物，避光 10 分钟，加入终止液，在 450nm 测量 OD 值。将检测数据作散点分布图，初步观察比较诊断灵敏度及特异性，见图 6。

结果显示，3A9/2A6-HRP 检测中，胃癌血清检测值均高于正常人血清检测值，灵敏度及特异性均为 100%；2A6/3A9-HRP 检测中，1 例胃癌血清检测值在正常人血清检测值范围内，灵敏度及特异性较前者低；3H7/3A9-HRP 检测中，4 例胃癌血清检测值在正常人血清检测值范围内，灵敏度及特异性较前两者低；所以，3A9/2A6-HRP 配对对血清的诊断性能最佳。

1.8 肿瘤相关角蛋白 18 单克隆抗体的特征性研究

1.8.1 抗体识别肿瘤相关角蛋白 18 片段抗原决定簇的确定

为了进一步确定 3A9 及 2A6 的抗原结合表位，我们制备了一组重组角蛋白 18 片段，这些片段带有每 50 个氨基酸片段的缺失，如表 1-4 所示。采用间接 ELISA 法测定抗体与这些抗原的结合活性。

- (1) ELISA 微孔板包被 1 μ g/ml 各种细胞角蛋白 18 片段, 4°C 过夜;
- (2) 用 PBS 洗涤 3 次, 用含 3% (w/v) BSA 的 PBS 封闭, 室温, 1h;
- (3) 微孔中加入检测抗体 (终浓度 1 μ g/ml), 温育 1h, 37°C;
- (4) 用 PBS 洗涤 3 次, 未结合抗体即被洗去。然后加入连接 HRP 的抗 mouse IgG 抗体(μ g/ml), 温育 30min, 37°C;
- (5) 用 PBS 洗涤 3 次, 加入 TMB 底物, 静置 10min, 然后加入终止液 2N H₂SO₄; 在 ELISA 酶标仪上检测样本孔 450 nm/650 nm 光密度。

15

表 1-4 抗原识别表位的确定

序号	抗原	3A9	2A6
C1	aa1 ~ 430	+	+
C2	aa50 ~ 430	+	+
C3	aa100 ~ 430	+	+
C4	aa150 ~ 430	+	+
C5	aa200 ~ 430	+	+
C6	aa250 ~ 430	-	+
N7	aa1 ~ 400	+	+
N8	aa1 ~ 350	+	-
N9	aa1 ~ 300	+	-
N10	aa1 ~ 250	+	-
		aa 200 ~ 250	aa350 ~ 400

结果显示, 单抗 3A9 结合抗原 1~5, 但是不能结合抗原 6(aa250~430), 同时与所有 C 端缺失片段呈阳性反应。因此, 单抗 3A9 的抗原结合表位位于细胞角蛋白 18 aa 200~250 的片段内。单抗 2A6 与所有

的 N 端缺失片段均呈阳性反应，并且与 1 个 N 端片段 (aa1~400) 呈阳性反应，其它 3 个 N 端片段均呈阴性反应。因此，单抗 2A6 结合表位为细胞角蛋白 18 aa 350~400 的片段内。单抗 3A9 和单抗 2A6 的结合表位如图 7 所示。

5 1.8.2 杂交瘤分泌抗体的类型及亚类鉴定

以纯化角蛋白 18 抗原包被 ELISA 板。每孔加入各单克隆抗体的细胞上清 100 μ L, 37℃温育 30min; 在 TECAN 全自动洗板机上用 PBST 洗涤 5 次，每次间隔 20 秒，扣干，加入合适稀释度的 HRP-山羊抗小鼠 IgM、IgG1、IgG2a、IgG2b、IgG3 抗体 (Serotec 公司) 酶标二抗，于 37℃温育 30min; 在 TECAN 全自动洗板机上用 PBST 洗涤 5 次，每次间隔 20sec，扣干，加入显色液 A (H_2O_2) 和 B (TMB) 各 1 滴，于 37℃显色 10min，加入 1 滴终止液 (2M H_2SO_4)；在 TECAN 酶标仪上测量 OD_{450nm} (参比波长为 620nm)，cutoff 值为 2 倍的阴性均值，OD 值大于 cutoff 值为阳性，OD 值小于 cutoff 值为阴性。结果表明，3A9 10 为 IgG2a, 2A6 为 IgG1。

15 1.8.3 特异性

为了检测单抗 3A9 及 2A6 的反应特异性，我们检测其与其它人血清肿瘤标记物的免疫结合强度。首先将 K18、K8、K19、CEA、CA724 其他人血清肿瘤标记物按 1 μ g/ml 包被 96 孔板，4℃过夜，然后以含 20 3%BSA 的 PBS 室温下封闭 1h。检测时每孔加入 50 μ l 1:1000 稀释的单抗 3A9 或 2A6；37℃温浴 30 分钟，用 PBST 洗涤液洗 5 遍，拍干后加入过氧化物酶结合的羊抗鼠免疫球蛋白 (HRP-GAM Ig, DAKO 公司)，37℃温浴 30 分钟，取出后用 PBST 洗涤液洗 5 遍，拍干后先后加入底物液 A、B 各 50 μ l (底物液 A 成分为：13.42g $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$ 、25 4.2g 柠檬酸· H_2O 和 0.3g 过氧化氢，用去离子水中调节体积为 700ml；显色液 B 成分为：0.2g 四甲基联苯胺、20ml 二甲基甲酰胺用去离子水中调节体积为 700ml)，37℃显色 10 分钟，加入 50 μ l 终止液 (2M H_2SO_4) 终止反应，并于酶标仪上检测各孔的 OD₄₅₀ 值。结果见图 8。

结果显示，单克隆抗体 3A9、2A6 与 K18 呈强阳性反应，与其它肿瘤标记物均呈阴性反应。表明单克隆抗体 3A9、2A6 为角蛋白 18 高度特异的单克隆抗体。

2 角蛋白 18-3A9 试剂盒的制备

细胞角蛋白18-3A9测定试剂盒（化学法发光法）采用固相96孔发光板作为反应载体，通过与胃癌相关的抗角蛋白18的一对单克隆抗体构成双抗体夹心法，使用高敏感的化学发光检测技术对胃癌病人血清中角蛋白18片段进行定量检测。

5 以 K18 单抗 3A9 作为包被抗体，以 K18 单抗 2A6 作为标记抗体，制备 K18 试剂盒。

试剂盒主要组分为：校准品、包被板、酶结合物、发光液、浓缩洗涤液。

10 标准品为纯化的角蛋白 18。包被抗体为 K18 单抗 3A9。标记抗体为 K18 单抗 2A6，以 HRP 辣根过氧化物酶进行标记，形成抗体-HRP 复合物（酶结合物）。

15 包被板是包被单抗 3A9 经洗涤、封闭、干燥，真空封装而成。K18 单抗 3A9 以柠檬酸缓冲液 PH4.8 为包被缓冲液，以 5 μ g/mL 的包被浓度进行包被。封闭液为 0.02M PBS+0.4% 酪蛋白 +1%BSA+0.5M NaCl+0.2%明胶+10%牛血清+0.05%Tween-20+1‰防腐剂+2.5%蔗糖。

标记抗体为 2A6-HRP。稀释液为 0.02M PBS+1%酪蛋白+1%BSA+1‰氨基比啉 +0.05%Tween-20。

发光液由将 KPL 生产的发光液 A 和发光液 B 分装而成。浓缩洗涤液为 20 \times PBS 洗涤液。

20 3 临床验证和应用

在临床实验的统计分析过程中，考虑到对治疗（化疗和手术）后处于恢复期的患者血清中 K18 的含量较治疗前会明显减少，为了排除治疗对试验结果的干扰，在临床 1000 例样本中选取 24 例胃癌初诊患者（未经治疗）血清标本检测结果进行分析，结果表明 K18 试剂盒的灵敏度为 62.5%，CA72-4 试剂盒的灵敏度为 37.50%，详见表 1-5。

表 1-5 K18 试剂盒与 CA72-4 试剂盒对初诊胃癌患者诊断评价指标比较

诊断试剂	灵敏度%	特异度%	符合率%	阳性预测值	阴性预测值
				%	%
K18	62.50	96.00	92.41	65.22	95.52
CA72-4	37.50	95.00	88.84	47.37	84.82

在临床实验的统计分析过程中，考虑到试剂盒对炎症等患者诊断的假阳性率是影响诊断结果的重要因素，本试验对150例胃炎患者血清样本进行对比试验，以比较K18试剂盒和CA72-4试剂盒鉴别诊断能力。结果显示，K18试剂盒对炎症患者血清样本诊断假阳性率为5.3%，CA72-4试剂盒对炎症患者血清样本诊断假阳性率为16.7%，K18试剂盒假阳性率低于CA72-4。见表1-6。检测结果表明本试剂盒能将炎症患者血清与胃癌患者血清很好的区分，具有很好的特异性。

10 表 1-6 炎症患者血清检测结果统计

试剂盒	检测结果	
	阳性	阴性
K18试剂盒	8	142
CA72-4试剂盒	25	125

如图9所示，由ROC曲线分析结果可知，角蛋白18-3A9试剂盒对应的ROC曲线下面积(0.743)大于罗氏公司的CA72-4试剂盒对应ROC曲线下所围面积(0.612)，角蛋白18-3A9试剂盒诊断胃癌的效果较CA72-4试剂盒好。

在中国医学科学院肿瘤医院进行的预实验中，选择癌症患者血清241例，其中肺癌84例，胃癌76例，肠癌81例，阴性对照61例，正常人体检血清61例进行临床验证预实验。结果如表1-7，表明角蛋白18-3A9测定试剂盒（化学发光法）对其它上皮源肿瘤也具有较高的检出率。

20

表 1-7 K18 对各种癌症鉴别诊断结果

	灵敏度(%)	特异度(%)
肺癌	43	90
胃癌	45	90
肠癌	53	90

实施例 2

1 抗角蛋白 19 及片段的单克隆抗体的制备

1.1 免疫原

重组细胞角蛋白 19 片段 GY20 为 E.coli 系 BL21(DE3)大肠杆菌表达。

5 通过以下方法研制得到:

1.1.1 研发方案

见图 10

1.1.2 细胞角蛋白 19 片段的 cDNA 合成

通过 RT-PCR 方法制备编码各种细胞角蛋白 19 片段的 cDNA:

10 a) 模板及引物

先从一种 HELA 人癌细胞系中分离得到总 RNA。然后根据说明书用反转录试剂盒 (Promega) 合成 cDNA。所获得的 cDNA 即是 PCR 的模板。设计三种片段的引物，对各 cDNA 进行 PCR 扩增。片段编号及氨基酸序列见表 2-1。

15

表 2-1 重组细胞角蛋白 19 片段的编号及序列

片段编号	细胞角蛋白 19 片段序列
GY20	aa1 ~ 400
GY21	aa150 ~ 400
GY22	aa200 ~ 400

b) PCR 反应

PCR 反应溶液组分:

20 cDNA 模板: 5 μl;

引物: 5' 和 3' 引物各 10pmol

10 × PCR 缓冲液: 10 μl;

dNTP: 各 2.5mM, 共 4 μl;

Taq 聚合酶 (Promega): 5U;

25 加入无菌双蒸水至 100 μl。

程序如下:

溶液加热至 94 °C 恒温 2min, 然后循环 40 次, 每个循环设置为: 加热 94 °C 30s, 52 °C 1min, 72 °C 3min。程序完成后, 反应溶液加热 72 °C

10min。然后获取扩增的DNA片段，用含0.25μg/ml溴化乙锭的1%琼脂糖凝胶分离，见图11。结果显示条带中包含所需的细胞角蛋白19片段cDNA片段，然后用Gene Clean kit (BIO101, Irvine, CA) 回收DNA片段。

5 1.1.3 构建质粒并筛选

用 TOPO100 expression Cloning Kit(Invitrogen, Carlsbad, CA)克隆cDNA 片段。

(11) 将从 PCR 反应溶液回收的细胞角蛋白 19 的 cDNA 与克隆试剂盒提供的 TOPO 质粒 (图 12) 50ng 混合；

10 (12) 溶液中加入 10 × 连接酶反应缓冲液 (6mM Tris-HCl(pH7.5), 6mM MgCl₂, 5mM NaCl, 7mM β -巯基乙醇, 0.1 mM ATP, 2mM DTT, 1mM 亚精胺, 0.1mg/ml BSA) ；

(13) 再加入 4U T4 DNA 连接酶 (1 μ l);

(14) 用灭菌去离子水调整溶液体积至 10 μ l;

15 (15) 将其在 14℃ 温育 15h;

(16) 取 2 μ l 加入到 50 μ l 感受态 E.coli 细菌株 TOP10F (由 TA 克隆试剂盒提供，并按照说明书制成感受态，混合物冰浴 30min，然后孵育 42℃ 30s，再冰浴 5min)

20 (17) 配制 500 μ l 培养基，含 2%(v/v)蛋白胨， 0.5%(w/v)酵母膏， 0.05%(w/v)NaCl, 2.5mM KCl, 1mM MgCl₂ 和 20mM 葡萄糖，将(6)加入其中， 37℃ 温育 1h， 并振摇。

(18) 在 L-肉汤琼脂平板 (1%(v/v)蛋白胨， 0.5%(w/v)酵母膏， 0.5%(w/v)NaCl, 0.1%葡萄糖， 0.6%(w/v)bacto-agar(Difo, Detroit, MI)) 涂铺(7)， 100 μ g/ml。

25 (19) 培养基表面可筛选出抗氨苄的克隆子，用铂丝涂布圈挑出单菌落放入 L-肉汤培养基 (含氨苄 100 μ g/ml) 中 37℃ 培养，过夜，振摇(200rpm)。

(20) 温育过后，离心收集细菌，用碱法提取 DNA 质粒。

经酶切鉴定，已经得到重组的表达质粒 TOPO-GY20、TOPO-GY21、30 TOPO-GY22，如图 13。

1.1.4 重组蛋白的诱导表达和鉴定

编码各种细胞角蛋白 19 的 cDNA 已经插入 TOPO 质粒中，

(5) 所获质粒转化至 E.coli 系 BL21(DE3)，然后在 LB 培养基中培养至指数增长期，用异丙醇 β -硫代半乳糖苷(IPTG)诱导表达 3h。

(6) 沉淀细胞，用裂解液(8M urea, 20mM Tris-HCl)重悬，并用超声破碎。

5 (7) 后 $14,000 \times g$ 离心 15min，在 Ni 柱纯化上清。用 PBS 溶液透析纯化蛋白，4℃过夜。

(8) 用 BCA 试剂(Pierce, Woburn, MA)检测蛋白浓度。

1.1.5 重组细胞角蛋白 19 的纯化

活化 Sephadex G-50，利用分子筛层析纯化重组细胞角蛋白 19 片段。将 Sephadex G-50 溶于 100 mM Tris-HCl 缓冲液 (pH 7.4)，在 100 ℃煮沸 10 分钟，然后用 100 mM Tris-HCl 缓冲液 (pH 7.4)封闭，并在 4℃保存。将细菌破碎浓缩液流经 2ml 凝胶珠，流速为 2 ml /min。样品通过后，50 毫升 PBS 冲洗，洗脱缓冲液 0.1 M 甘氨酸 (pH 2.4), 0.15 M NaCl。洗脱液于紫外 OD280nm 测值判断洗脱是否完毕。收集有效洗脱液 (OD>0.01) 置于透析袋用 1L 的磷酸盐缓冲液 (pH7.5) 4℃透析，期间更换 2 次透析缓冲液。将纯化的蛋白质浓缩到约 1mg/ml，加入 1% NaN₃，4℃保存。用 10 % 的 SDS – PAGE 检测，并用 GDS8000 凝胶成像系统扫描分析蛋白纯度。

结果如图 14，结果显示获得了高纯度的重组细胞角蛋白 19 片段 GY20、GY21、GY22，电泳测定纯度大于 95 %。

用于制备单克隆抗体的免疫原为基因重组全长人细胞角蛋白 19，此蛋白由美国 UAB 大学周铜教授馈赠。

1.2 免疫程序

动物：6 ~ 8 周龄雌性 Balb/c 小鼠。

25 初次免疫（第 1 天）：采用 1ml 抗原蛋白溶液与相同体积的弗氏完全佐剂混匀形成乳化颗粒，每只足底注射 100 μl 。

二次免疫（第 7 天）：采用 1ml 抗原蛋白溶液与相同体积的弗氏不完全佐剂混匀形成乳化颗粒，每只足底注射 100 μl 。

30 强化免疫（第 14、21、28 天）：采用不含佐剂的抗原 (1mg/ml)，每只足底注射 100 μl 。

融合（第 31 天）。

杂交瘤的建立

取免疫小鼠的腘窝及腹股沟分离淋巴细胞，将其与 NS1 骨髓瘤细胞按 2:1 比例混合，用无血清 RPMI 1640 洗涤 2 次，加入 1ml 37℃ 预热的 PEG1500，在 37℃ 轻微混合细胞 1 分钟，然后在 3 分钟内缓慢滴加 20ml 预热至 37℃ 的无血清 RPMI 1640 培养基。离心，将融合细胞悬浮于 12% FBS RPMI 1640 HAT 选择培养基。将细胞加入 5 块 96 孔细胞培养板中，100 μ l/孔。

1.4 ELISA 检测筛选阳性克隆

在细胞融合后 7 天，用间接 ELISA 法进行初次筛选，所有杂交瘤均用三种重组人细胞角蛋白 19 抗原筛选：（1）全长细胞角蛋白 19；
10 （2）N 端细胞角蛋白 19 片段；（3）C 端细胞角蛋白 19 片段。

用上述角蛋白 19 抗原（1 μ g/ml）包被 ELISA 板 4℃ 过夜；用 PBS 洗涤 3 次，用含 3% (w/v) BSA 的 PBS 室温封闭 1h。检测时每孔中加入 100 μ l 细胞培养液上清；37℃ 温浴 30 分钟，用 PBST 洗涤液洗 5 遍，拍干后加入过氧化物酶结合的羊抗鼠免疫球蛋白（HRP-GAM Ig，
15 DAKO 公司），37℃ 温浴 30 分钟，取出后用 PBST 洗涤液洗 5 遍，拍干后先后加入底物液 A、B 各 50 μ l（底物液 A 成分为：13.42g Na₂HPO₄·12H₂O、4.2g 柠檬酸·H₂O 和 0.3g 过氧化氢，用去离子水中调节体积为 700ml；显色液 B 成分为：0.2g 四甲基联苯胺、20ml 二甲基
20 甲酰胺用去离子水中调节体积为 700ml），37℃ 显色 10 分钟，加入 50 μ l 终止液（2M H₂SO₄）终止反应，并于酶标仪上检测各孔的 OD₄₅₀ 值，以 OD₄₅₀ 值高于 2.0 以上者视为阳性。

单克隆抗体的初筛结果概括与表 2-2。所有 480 孔杂交瘤培养上清经四种抗原检测后，我们鉴定出 39 个克隆与全长细胞角蛋白 19 抗原反应很强。其中，3 个克隆与角蛋白 19 的 N 端、C 端片段以及无关对照抗原呈阳性反应，这些克隆被视为非特异性克隆；其中 15 个克隆与 N 端细胞角蛋白 19 片段呈阳性反应，定义为 N 端特异性克隆；其中 18 个与 C 端细胞角蛋白 19 片段呈阳性反应，定义为 C 端特异性克隆。另外，还有 3 株克隆与 N 端及 C 端抗原反应，其反应特异性未知。这些 N 端和 C 端特异性克隆作为候选克隆进行进一步研究。

30 这些克隆通过有限稀释法进行三次亚克隆。

表 2-2 初次筛选角蛋白 19 鼠抗人单抗结果

反应结果				总共480个克隆	备注
全长角蛋白 19	N-端片段 (aa1 ~ 250)	C-端片段 (aa150 ~ 400)	对照抗原	阳性克隆数	
+	+	+	+	3	非特异性
+	+	-	-	15	N-端特异
+	-	+	-	18	C-端特异
+	+	+	-	3	未知

1.5 单克隆抗体的产生及纯化

取 16 周龄的健康 Balb/c 小鼠，腹腔注射 0.5ml pristane。5~7 天后，
5 收集克隆化的杂交瘤细胞，离心去上清，加入不含血清的培养基，调节细胞密度至 $2 \times 10^5 \sim 2 \times 10^6$ 个/ml，每只小鼠注射 0.5ml。7~10 天后
小鼠腹部增大，开始收集腹水。3000rpm 离心 15 分钟，吸取中间澄清部分的液体， $0.45\mu\text{m}$ 的微孔滤膜过滤除菌，分装后-20℃保存。

将处理好的腹水用 0.02mol/L、pH7.4 的 PBS (81ml 0.2mol/L
10 Na_2HPO_4 , 19ml 0.2mol/L NaH_2PO_4 , 加生理盐水至 100ml) 5 倍稀释，
取 50 ml 上样至 2 ml protein-A/G 层析柱，流速为 1 ml/min. 然后用 PBS 洗涤亲和层析柱至流出液 OD_{280} 测值小于 0.01。使用 0.1M Glycine-HCL pH2.4 缓冲液洗脱结合在层析柱上的抗体，收集洗脱组分 2ml/管，最后将所有 OD_{280} 大于 0.1 的洗脱组分混合，然后用 1/10 体积的 1M Tris-HCL pH 8.5 溶液中和。然后在 PBS 溶液中透析过夜，期间
15 更换 2 次透析液。

1.6 酶标抗体的制备

辣根过氧化物酶 (HRP) 标记单抗和多克隆抗体的常用方法是过碘酸钠法。其原理是 HRP 的糖基用过碘酸钠氧化成醛基，加入抗体 IgG
20 后该醛基与 IgG 氨基结合，形成 Schiff 氏碱。为了防止 HRP 中糖的醛基与其自身蛋白氨基发生偶合，在用过碘酸钠氧化前先用二硝基氟苯阻断氨基。氧化反应末了，用硼氢化钠稳定 Schiff 氏碱。

- (1) 将 5mg HRP 溶于 0.5ml 0.1mol/L NaHCO_3 溶液中；加 0.5ml
10mmol/L NaIO_4 溶液，混匀，盖紧瓶塞，室温避光作用 2 小时。
25 (2) 加 0.75ml 0.1mol/L Na_2CO_3 混匀。

(3) 加入 0.75ml 纯化单抗 (15mg/ml)，混匀。

(4) 称取 Sephadex G25 干粉 0.3g，加入一支下口垫玻璃棉的 5ml 注射器外筒内；随后将上述交联物移入注射器外套；盖紧，室温作用（避光）3 小时或 4℃过夜。

5 (5) 用少许 PBS 将交联物全部洗出，收集洗出液，加 1/20V 体积 新鲜配制的 5mg/ml NaBH₄ 溶液，混匀，室温作用 30 分钟；再加入 3/20V NaBH₄ 溶液，混匀，室温作用 1 小时（或 4℃过夜）。

(6) 将交联物过 Sephadex G200 或 Sepharose 6B (2.6×50cm) 层析纯化，分管收集第一峰。

10 (7) 酶结合物质量鉴定：

克分子比值测定

$$\text{酶量 (mg/ml)} = \text{OD}_{403} \times 0.4$$

$$\text{IgG 量 (mg/ml)} = (\text{OD}_{280} - \text{OD}_{403} \times 0.3) \times 0.62$$

15 克分子比值 (E/P) = 酶量 × 4 / IgG 量，一般在 1-2 之间。酶结合率 = 酶量 × 体积 / 抗体，标记率一般为 0.3-0.6，即 1-2 个 HRP 分子结合在一个抗体分子上，标记率可大于 0.6, 0.8, 0.9；OD₄₀₃/OD₂₈₀ 等于 0.4 时，E/P 约为 1。

$$\text{标记率} = \text{OD}_{403} / \text{OD}_{280}$$

20 酶活性和抗体活性的测定 可应用 ELISA 法、免疫扩散、DAB-H₂O₂ 显色反应测定酶结合物的酶活性，抗体活性及效价、特异性。

(8) HRP 抗体结合物的保存：加入等量甘油后，小量分装-20℃存放，防止反复冻融；或加入等量 60% 甘油 4℃保存；不宜加 NaN₃ 或酚防腐，否则会影响酶活性。必要时冻干保存，以 BSA 或脱脂牛奶作保护剂。

25 1.7 肿瘤相关角蛋白 19 片段单克隆抗体配对的筛选

纯化及酶标抗体经 ELISA 法确认其抗原反应性后，选取 10 株具有高度亲和力的进行配对实验，以筛选出与肺癌高度相关的角蛋白 19 抗体配对。

1.7.1 交叉配对试验选择

30 为了获取与肺癌血清角蛋白 19 具有选择性的单克隆抗体配对，我们选取 10 份肺癌血清样本及 10 份正常人血清样本作为测试样本。将 10 份肺癌血清等量体积混合作为阳性样本，将 10 份正常人血清等量体

积混合作为阴性样本。用 $1\mu\text{g/ml}$ 的纯化抗体包被 96 孔板， 4°C 过夜，然后以含 3%BSA 的 PBS 室温下封闭 1h。然后一套 ELISA 板中各孔加入 $50\mu\text{l}$ 的肺癌阳性血清，在另外一套 ELISA 板中加入正常人阴性对照血清，再各加入 $50\mu\text{l}$ 的 1:1000 酶标抗体。 37°C 温育后洗涤，加入显色底物，避光 10 分钟，加入终止液，在 450nm 测量 OD 值。

表 2-3 概括了 5 对单克隆抗体的交叉配对实验结果。其中以 2G2/5H2-HRP, 5H2/2G2-HRP, 5H2/1D11-HRP 的抗体配对显示出对肺癌血清的强阳性反应，而对正常人血清呈阴性反应。因此，我们确定这些抗体配对所检测的血清角蛋白 19 与肺癌高度相关。

10

表 2-3 筛选肺癌相关角蛋白 19 抗体的交叉实验

		包被抗体				
		1D11	1H5	2G2	4C9	5H2
酶 标 抗 体	1D11	0.09 0.08	0.06 0.31	0.07 1.28	0.08 0.44	0.08 1.44
	1H5	0.05 0.23	0.11 0.09	0.06 1.42	0.1 0.22	0.07 1.25
	2G2	0.06 0.44	0.08 0.32	0.08 0.12	0.08 1.32	0.06 1.98
	4C9	0.08 0.54	0.1 0.22	0.11 1.26	0.07 0.09	0.08 0.54
	5H2	0.09 1.12	0.08 0.98	0.08 2.48	0.08 0.66	0.08 0.12

1.7.2 初步确认最佳抗体配对实验

从上述交叉抗体配对实验中初选出 3 对与肺癌角蛋白 19 高度相关的抗体配对 2G2/5H2-HRP, 5H2/2G2-HRP, 5H2/1D11-HRP, 使用 ELISA 法进行临床验证。用 $1\mu\text{g/ml}$ 的纯化抗体包被 96 孔板， 4°C 过夜，然后以含 3%BSA 的 PBS 室温下封闭 1h。分别入 10 份肺癌血清和 10 份正常人血清各 $50\mu\text{l}$ 作为检测样本进行检测，然后加入 $50\mu\text{l}$ 的 1:1000 酶标抗体。 37°C 温育后洗涤，加入显色底物，避光 10 分钟，加入终止液，在 450nm 测量 OD 值。将检测数据作散点分布图，初步观察比较诊断

灵敏度及特异性，见图 15。

结果显示，2G2/5H2-HRP 检测中，1 例肺癌血清检测值在正常人血清检测值范围内，且其它肺癌血清检测值均较高，以特异性 100% 计，灵敏度为 90%；5H2/2G2-HRP 检测中，2 例肺癌血清检测值在正常人血清检测值范围内，4 例肺癌血清检测值偏低，以特异性 100% 计，灵敏度为 80%；5H2/1D11-HRP 检测中，4 例肺癌血清检测值在正常人血清检测值范围内，且所有肺癌血清检测值较前两种检测均偏低，以特异性 100% 计，灵敏度为 60%；所以，2G2/5H2-HRP 配对对血清的诊断性能最佳。

10 1.8 肿瘤相关角蛋白 19 单克隆抗体的特征性研究

1.8.1 肿瘤相关角蛋白 19 片段抗原决定簇的确定

为了进一步确定 2G2、5H2 的抗原结合表位，我们制备了一组重组角蛋白 19 片段，这些片段带有每 50 个氨基酸片段的缺失，如表 2.4 所示。采用间接 ELISA 法测定抗体与这些抗原的结合活性。

- 15 (1) ELISA 微孔板包被 $1 \mu\text{g/ml}$ 各种细胞角蛋白 19 片段， 4°C 过夜；
(2) 用 PBS 洗涤 3 次，用含 3% (w/v) BSA 的 PBS 封闭，室温，
1h；
(3) 微孔中加入检测抗体（终浓度 $1 \mu\text{g/ml}$ ），温育 1h， 37°C ；
20 (4) 用 PBS 洗涤 3 次，未结合抗体即被洗去。然后加入连接 HRP
的抗 mouse IgG 抗体 ($\mu\text{g/ml}$)，温育 30min， 37°C ；
(5) 用 PBS 洗涤 3 次，加入 TMB 底物，静置 10min，然后加入
终止液 $2\text{N H}_2\text{SO}_4$ ；在 ELISA 酶标仪上检测样本孔 $450\text{ nm}/650\text{ nm}$ 光密度。

表 2-4 抗原识别表位的确定

序号	抗原	2G2	5H2
C1	aa1 ~ 400	+	+
C2	aa50 ~ 400	+	+
C3	aa100 ~ 400	+	+
C4	aa150 ~ 400	+	+
N5	aa1 ~ 375	-	+
N6	aa1 ~ 350	-	-
N7	aa1 ~ 300	-	-
N8	aa1 ~ 250	-	-
		aa 375 ~ 400	aa325 ~ 350

结果显示，单抗 2G2 结合抗原 1~4，同时与所有 C 端缺失片段呈阳性反应。因此，单抗 2G2 的抗原结合表位位于细胞角蛋白 19 aa 375~400 的片段内。单抗 5H2 与所有的 N 端缺失片段均呈阳性反应，并且与 1 个 N 端片段 (aa1~375) 呈阳性反应，与其它 3 个 N 端片段均呈阴性反应。单抗 5H2 结合表位为细胞角蛋白 19 aa 325~350 的片段内。单抗 2G2 和单抗 5H2 的结合表位如图 16 所示：

1.8.2 杂交瘤分泌抗体的类型及亚类鉴定

以纯化角蛋白 19 抗原包被 ELISA 板。每孔加入各单克隆抗体的细胞上清 100 μ L，37℃温育 30min；在 TECAN 全自动洗板机上用 PBST 洗涤 5 次，每次间隔 20 秒，扣干，加入合适稀释度的 HRP-山羊抗小鼠 IgM、IgG1、IgG2a、IgG2b、IgG3 抗体（Serotec 公司）酶标二抗，于 37℃温育 30min；在 TECAN 全自动洗板机上用 PBST 洗涤 5 次，每次间隔 20sec，扣干，加入显色液 A (H_2O_2) 和 B (TMB) 各 1 滴，于 37℃显色 10min，加入 1 滴终止液 (2M H_2SO_4)；在 TECAN 酶标仪上测量 OD_{450nm} (参比波长为 620nm)，cutoff 值为 2 倍的阴性均值， OD 值大于 cutoff 值为阳性， OD 值小于 cutoff 值为阴性。结果表明 2G2 为 IgG2a，5H2 为 IgG1。

1.8.3 特异性

为了检测单抗 2G2 及 5H2 的反应特异性，我们检测其与其它人血清肿瘤标记物的免疫结合强度。首先将 K18、K8、K19、CEA、CA724

其他人血清肿瘤标记物按 $1\mu\text{g}/\text{ml}$ 包被 96 孔板， 4°C 过夜，然后以含 3% BSA 的 PBS 室温下封闭 1h。检测时每孔加入 $50\mu\text{l}$ 1:1000 稀释的单抗 2G2 或 5H2； 37°C 温浴 30 分钟，用 PBST 洗涤液洗 5 遍，拍干后加入过氧化物酶结合的羊抗鼠免疫球蛋白 (HRP-GAM Ig, DAKO 公司)，
5 37°C 温浴 30 分钟，取出后用 PBST 洗涤液洗 5 遍，拍干后先后加入底物液 A、B 各 $50\mu\text{l}$ (底物液 A 成分为： $13.42\text{g Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 、 $4.2\text{g 柠檬酸} \cdot \text{H}_2\text{O}$ 和 0.3g 过氧化氢 ，用去离子水中调节体积为 700ml ；显色液 B 成分为： 0.2g 四甲基联苯胺 、 20ml 二甲基甲酰胺 用去离子水中调节体积为 700ml)， 37°C 显色 10 分钟，加入 $50\mu\text{l}$ 终止液 ($2\text{M H}_2\text{SO}_4$)
10 终止反应，并于酶标仪上检测各孔的 OD_{450} 值。结果见图 17。

结果显示，单克隆抗体 2G2、5H2 与 K19 呈强阳性反应，与其它肿瘤标记物均呈阴性反应。表明单克隆抗体 2G2、5H2 为角蛋白 19 高度特异的单克隆抗体。

2 角蛋白 19-2G2 试剂盒的制备

15 角蛋白 19-2G2 测定试剂盒 (化学法发光法) 采用固相 96 孔发光板作为反应载体，通过与肺癌相关的抗角蛋白 19 的一对单克隆抗体构成双抗体夹心法，使用高敏感的化学发光检测技术对肺癌病人血清中角蛋白 19 片段进行定量检测。

20 以 K19 单抗 2G2 作为包被抗体，以 K19 单抗 5H2 作为标记抗体，制备 K19 试剂盒。

试剂盒主要组分为：校准品、包被板、酶结合物、发光液、浓缩洗涤液。

25 标准品为纯化的角蛋白 19。包被抗体为 K19 单抗 2G2。标记抗体为 K19 单抗 5H2，以 HRP 辣根过氧化物酶进行标记，形成抗体-HRP 复合物 (酶结合物)。

包被板是包被单抗 2G2，经洗涤、封闭、干燥，真空封装而成。
K19 单抗 2G2 以柠檬酸缓冲液 PH4.8 为包被缓冲液，以 $5\mu\text{g}/\text{mL}$ 的包被浓度进行包被。封闭液为 $0.02\text{M PBS} + 0.4\% \text{ 酪蛋白} + 1\% \text{ BSA} + 0.5\text{M NaCl} + 0.2\% \text{ 明胶} + 10\% \text{ 牛血清} + 0.05\% \text{ Tween-20} + 1\% \text{ 防腐剂} + 2.5\% \text{ 蔗糖}$ 。

30 标记抗体为 5H2-HRP。稀释液为 $0.02\text{M PBS} + 0.4\% \text{ 酪蛋白} + 1\% \text{ BSA} + 0.5\text{M NaCl} + 1\% \text{ 氨基比啉} + 0.2\% \text{ 明胶} + 10\% \text{ 牛血清} + 0.05\% \text{ Tween-20}$ 。

发光液由将KPL生产的发光液A和发光液B分装而成。浓缩洗涤液为20×PBS洗涤液。

3 临床验证和应用

在临床实验的统计分析过程中，考虑到对治疗（化疗和手术）后处于恢复期的患者，血清中 K19 的含量较治疗前会明显减少。为了排除治疗对试验结果的干扰，在临床 1000 例样本中选取 69 例肺癌初诊患者（未经治疗）血清标本检测结果进行分析，结果表明 K19 试剂盒的灵敏度为 88.4%，CYFRA21-1 试剂盒的灵敏度为 52.17%，见表 2-5。

10 表 2-5 K19 试剂盒与 CYFRA21-1 试剂盒对初诊肺癌患者诊断评价指标比较

诊断试剂	灵敏度%	特异度%	符合率%	阳性预测值%	阴性预测值%
K19	88.41	97.50	95.17	92.42	96.06
CYFRA21-1	52.17	95.50	84.39	80.00	85.27

15 在临床实验的统计分析过程中，考虑到试剂盒对炎症等患者诊断的假阳性率是影响诊断结果的重要因素。本试验对 150 例肺炎患者血清样本进行对比试验，以比较 K19 试剂盒和 CYFRA21-1 试剂盒鉴别诊断能力。结果显示 K19 试剂盒对炎症患者血清样本诊断假阳性率为 5.3%，CYFRA21-1 试剂盒对炎症患者血清样本诊断假阳性率为 12.0%。K19 试剂盒假阳性率低于 CYFRA21-1 试剂盒，见表 2-6。检测结果表明本试剂盒能将炎症患者血清与肺癌患者血清很好的区分，具有很好的特异性。

20 表 2-6 炎症患者血清检测结果统计

试剂盒	检测结果	
	阳性	阴性
K19试剂盒	8	142
CYFRA21-1试剂盒	18	132

由图 18 的 ROC 曲线分析结果可知，角蛋白 19-2G2 试剂盒对应的 ROC 曲线下面积(0.817)大于罗氏公司的 CYFRA21-1 试剂盒对应 ROC 曲线下所围面积 (0.766)，角蛋白 19-2G2 试剂盒诊断肺癌效果优于 CYFRA21-1 试剂盒。

5 在中国医学科学院肿瘤医院进行的预实验中，选择癌症患者血清 241 例，其中肺癌 84 例，胃癌 76 例，肠癌 81 例，阴性对照 61 例，正常人体检血清 61 例进行临床验证预实验。结果如表 2-7,表明角蛋白 19-2G2 测定试剂盒（化学发光法）对其它上皮源肿瘤也具有较高的检出率。

10

表 2-7 K19 对各种癌症鉴别诊断结果

癌种	灵敏度(%)	特异度(%)
肺癌	75	90
胃癌	63	90
肠癌	62	90

权 利 要 求

1. 与上皮源性癌症有关的细胞角蛋白片段，其中该片段包含选自由SEQ ID NOs: 2、3、5和6构成的组的抗原表位。
- 5 2. 权利要求1的细胞角蛋白片段，其中该片段包含SEQ ID NO: 1的氨基酸残基200-400。
3. 权利要求1的细胞角蛋白片段，其中该片段包含SEQ ID NO: 2的氨基酸残基325-400。
4. 与权利要求1中定义的抗原表位特异性结合的单克隆抗体。
- 10 5. 权利要求4的单克隆抗体，其中该单克隆抗体由保藏号为CGMCC No. 1957、CGMCC No. 1956、CGMCC No. 1955或CGMCC No. 1952的杂交瘤产生。
6. 权利要求4或5的单克隆抗体的抗原结合部分，其中该抗原结合部分与权利要求4或5的单克隆抗体竞争结合权利要求1中定义的抗原表位。
- 15 7. 权利要求6的抗原结合部分，其中该抗原结合部分为人源化抗体。
8. 权利要求6的抗原结合部分，其中该抗原结合部分为嵌合抗体。
9. 杂交瘤细胞系，其保藏编号选自由CGMCC No. 1957、CGMCC
- 20 No. 1956、CGMCC No. 1955和CGMCC No. 1952构成的组。
10. 用于对受试者中的上皮源性癌症进行早期筛查、诊断或预后评估的方法，该方法包括：
 - 获得来自受试者的生物样品，
检测该生物样品中权利要求1-3之任一项的细胞角蛋白片段的含
量，和
 - 将该含量与阈值水平进行比较。
- 25 11. 用于对受试者中的上皮源性癌症进行早期筛查、诊断或预后评估的方法，该方法包括：
 - 获得来自受试者的生物样品，
检测该生物样品中权利要求1-3之任一项的细胞角蛋白片段的含
量，
 - 检测该生物样品中其他上皮源性肿瘤标记物的含量，和

将所述细胞角蛋白片段以及所述其他上皮源性肿瘤标记物的含量与阈值水平进行比较。

12. 评估用于治疗上皮源性癌症的药物或疗法的治疗效果的方法，包括：

5 向患有上皮源性癌症的受试者施用所述药物或疗法，在施用所述药物或疗法之前和之后采集所述受试者的生物样品，
和

检测所述生物样品中权利要求1-3之任一项的细胞角蛋白片段的含
量，

10 其中在施用所述药物或疗法之前和之后该细胞角蛋白片段含量明
显降低的，表明所述药物或疗法有明显疗效。

13. 权利要求10-12之任一项的方法，其中所述上皮源性癌症选自
由胃癌、肝癌、肺癌、胆囊癌、乳腺癌、宫颈癌、卵巢癌、结肠癌、
前列腺癌、肾癌、食道癌、肠癌、膀胱癌构成的组。

15 14. 权利要求10-13之任一项的方法，其中所述检测采用了权利要
求4-5之任一项的单克隆抗体或权利要求6-8之任一项的抗原结合部分。

15. 权利要求10-14之任一项的方法，其中所述生物样品选自由血
液、血清、组织液、尿液、大便、痰液、脑脊液、唾液、眼泪和乳头
吸出液构成的组。

20 16. 权利要求11-15之任一项的方法，其中所述其他上皮源性肿瘤
标记物选自由AFP、CEA、CA242、CA19-9、CA72-4、CA125、CA15-3、
NSE、SCCA、Cyfra21-1、PSA、free PSA构成的组。

17. 试剂盒，其包含：

25 固定于固相载体上的能够特异结合权利要求1-3之任一项的细胞角
蛋白片段的包被抗体，以及

被可检测地标记的能够特异结合该细胞角蛋白片段的检测抗体。

18. 权利要求17的试剂盒，其中所述包被抗体和检测抗体各自独立
地为权利要求4-5之任一项的单克隆抗体或权利要求6-8之任一项的抗
原结合部分。

30 19. 权利要求1-3之任一项的细胞角蛋白片段的特异结合剂在制备
用于诊断上皮源性癌症的试剂中的用途。

20. 权利要求19的用途，其中所述特异结合剂为权利要求4-5之任

一项的单克隆抗体或权利要求6-8之任一项的抗原结合部分。

21. 权利要求19-20之任一项的用途，其中所述上皮源性癌症选自由胃癌、肝癌、肺癌、胆囊癌、乳腺癌、宫颈癌、卵巢癌、结肠癌、前列腺癌、肾癌、食道癌、肠癌、膀胱癌构成的组。

1/9

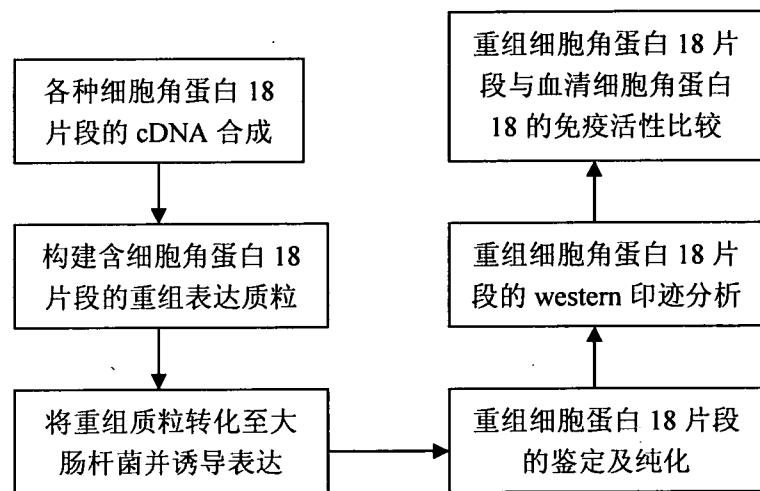


图 1

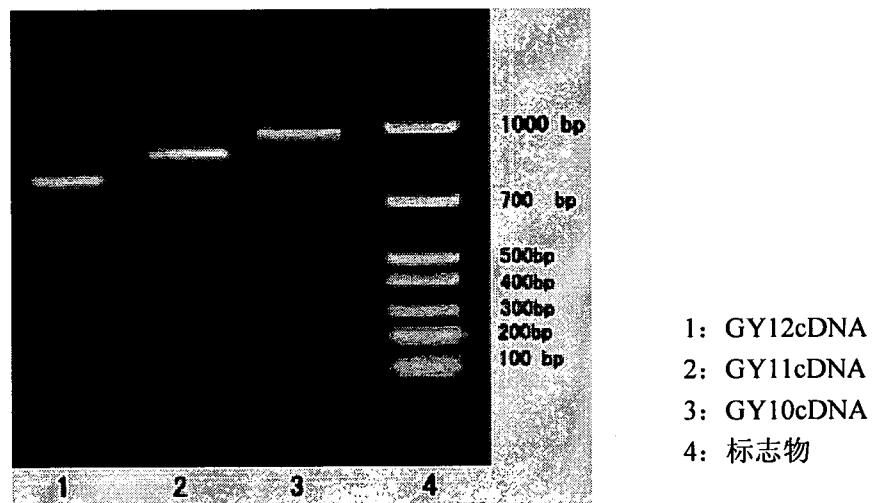


图 2

2/9

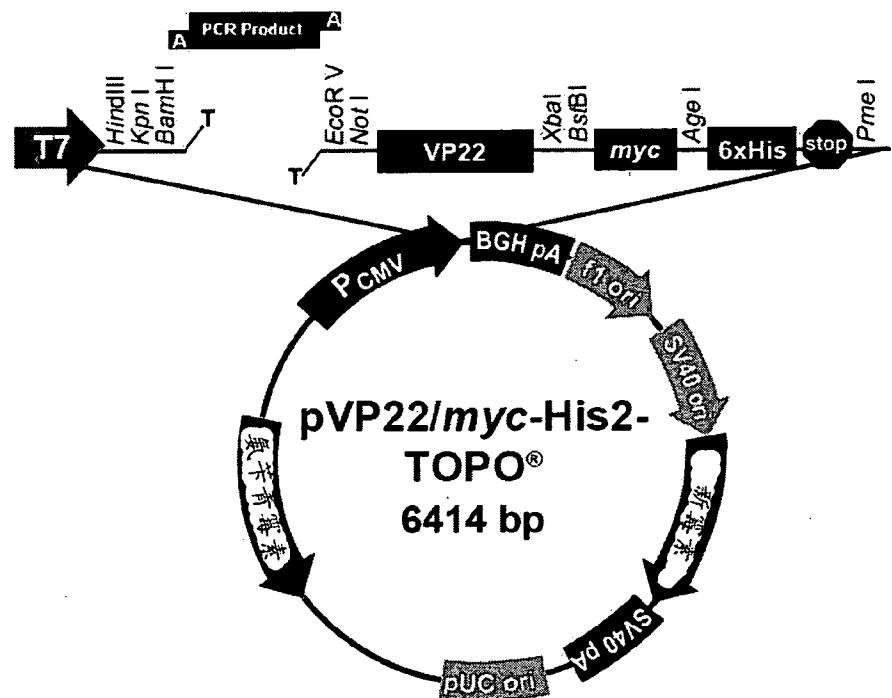


图 3

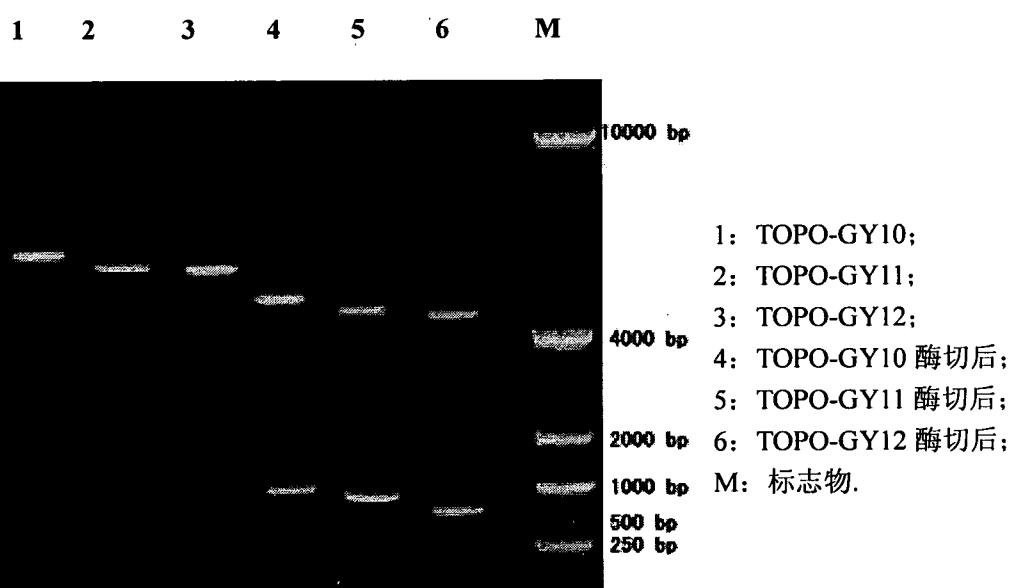


图 4

3/9

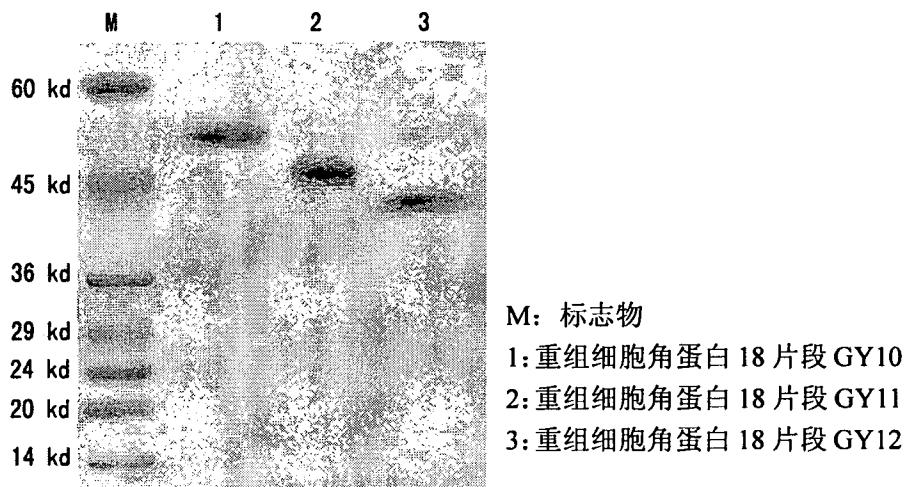


图 5

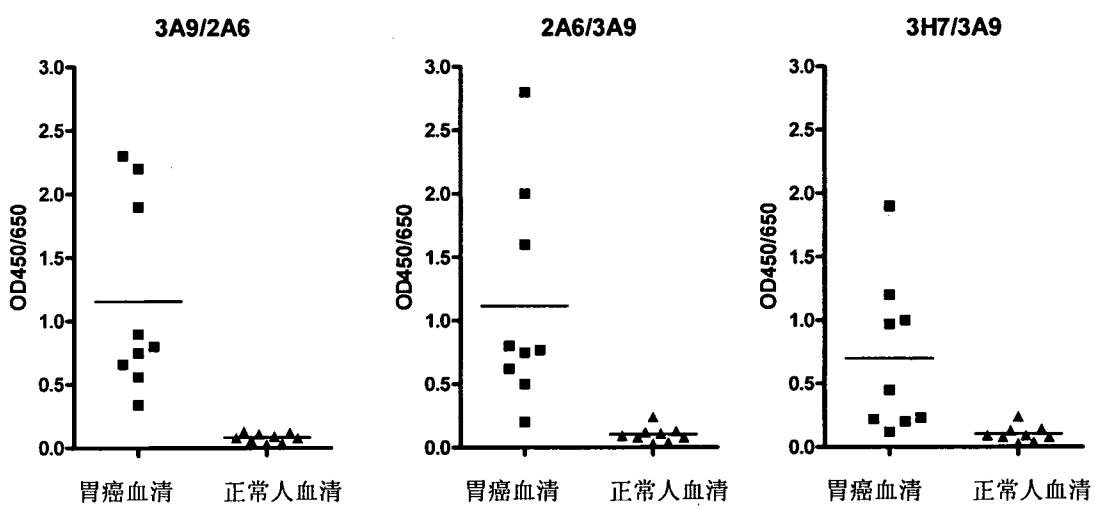


图 6

4/9

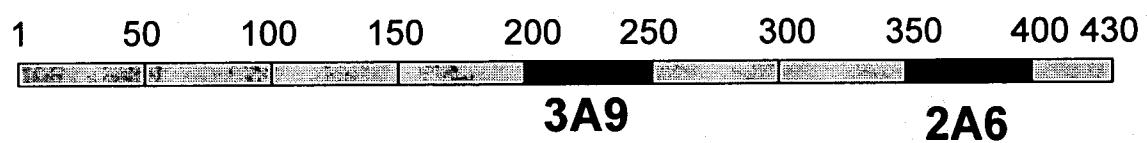


图 7

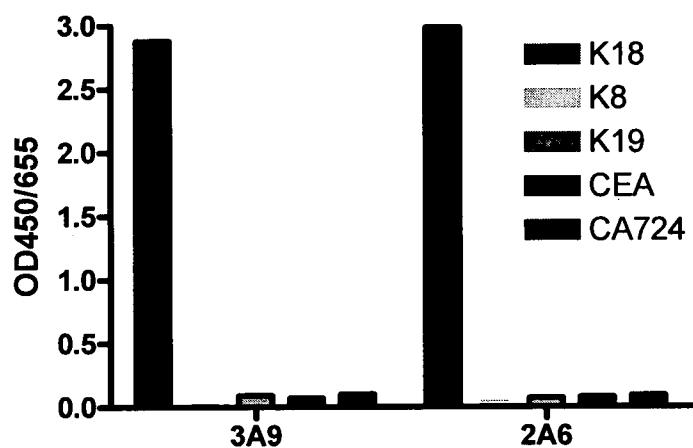


图 8

5/9

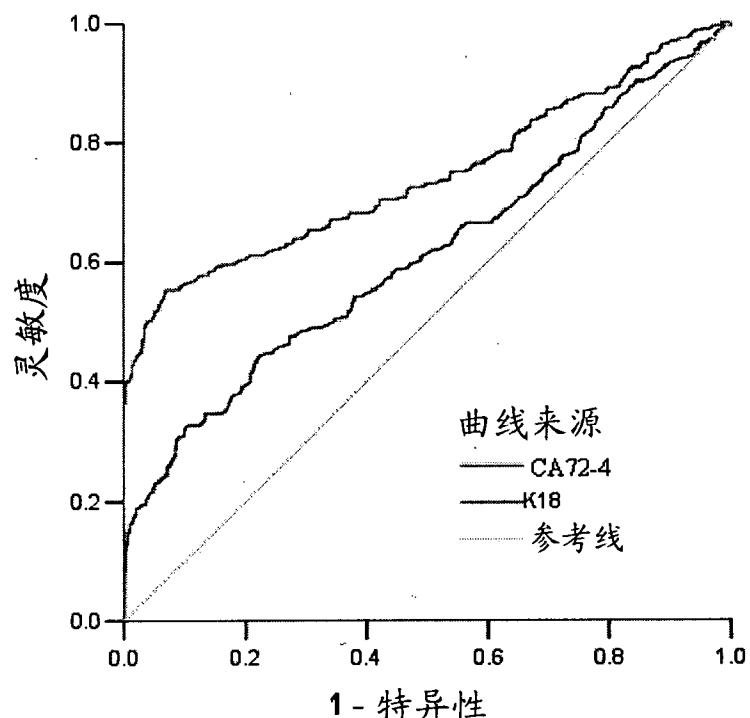


图 9

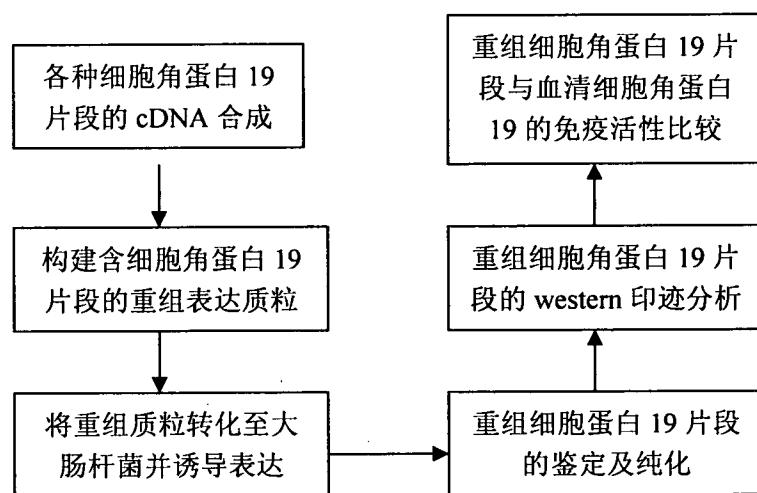


图 10

6/9

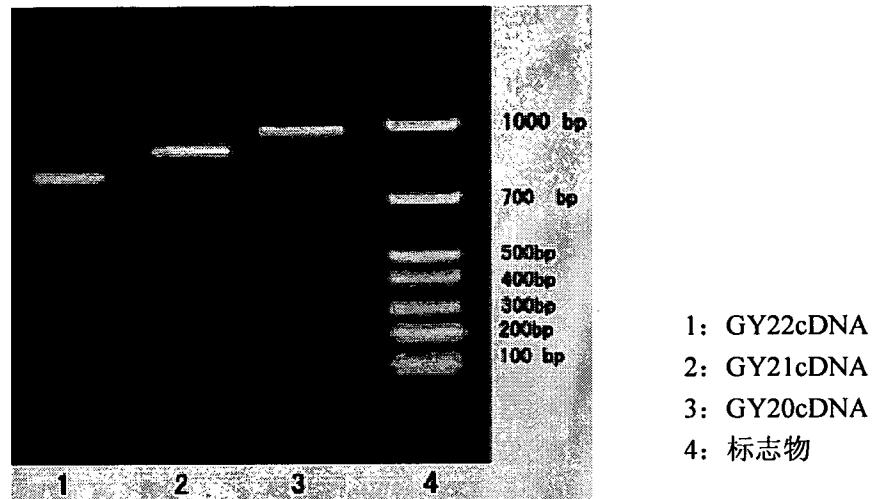


图 11

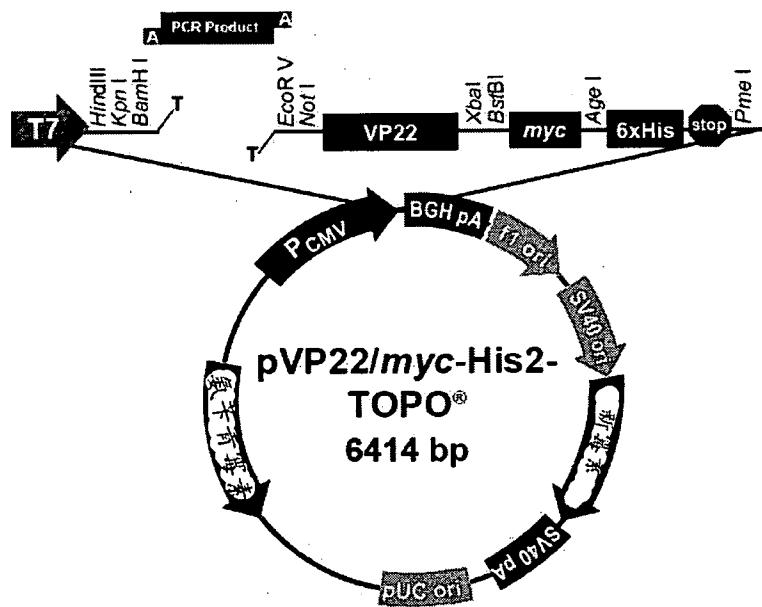


图 12

7/9

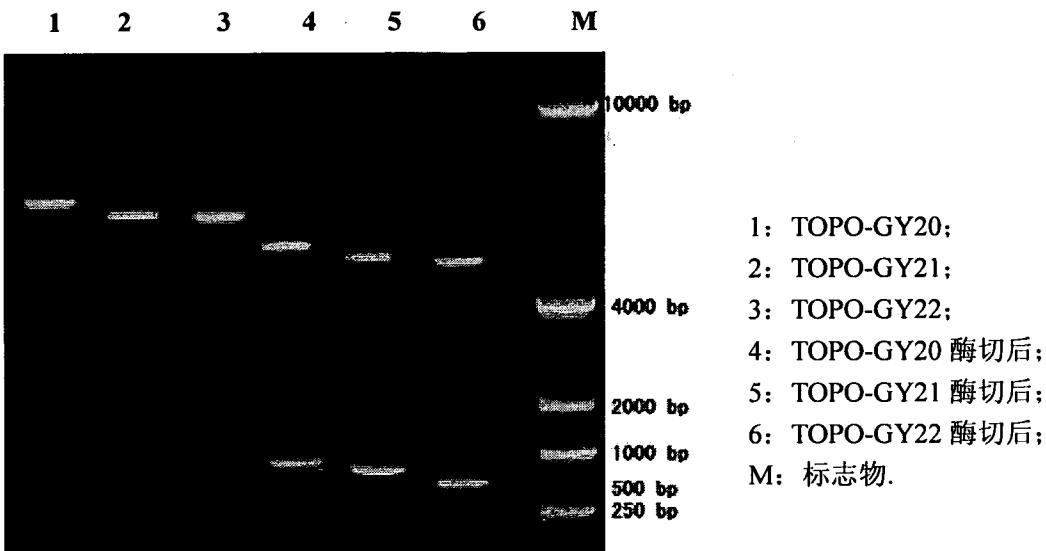


图 13

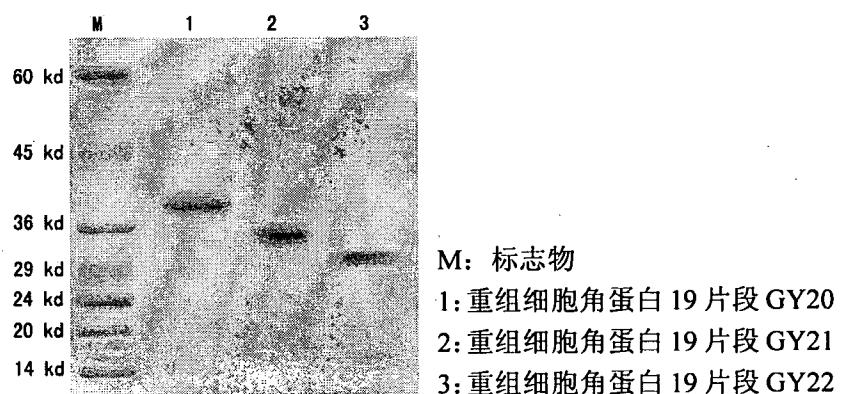


图 14

8/9

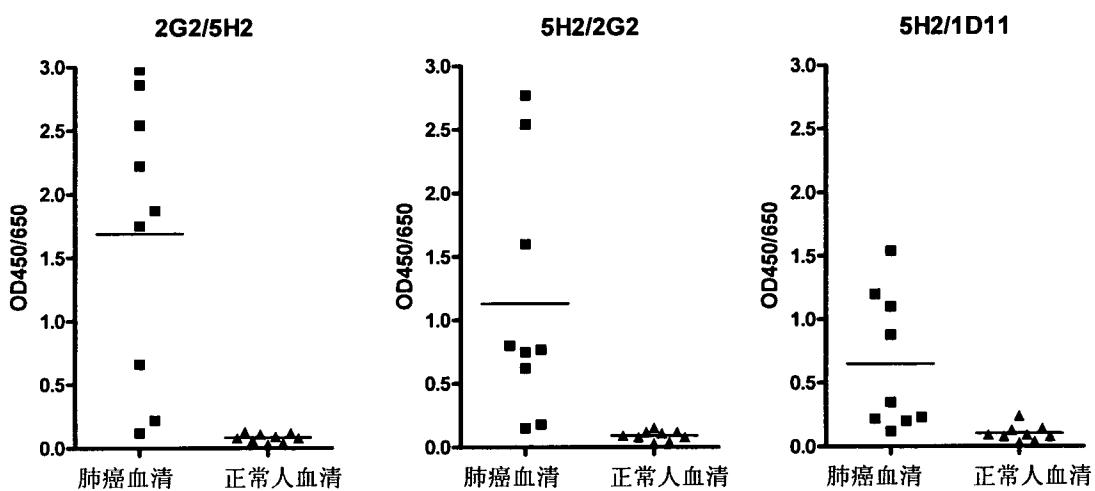


图 15

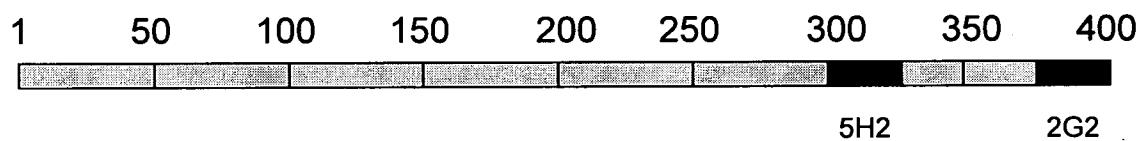


图 16

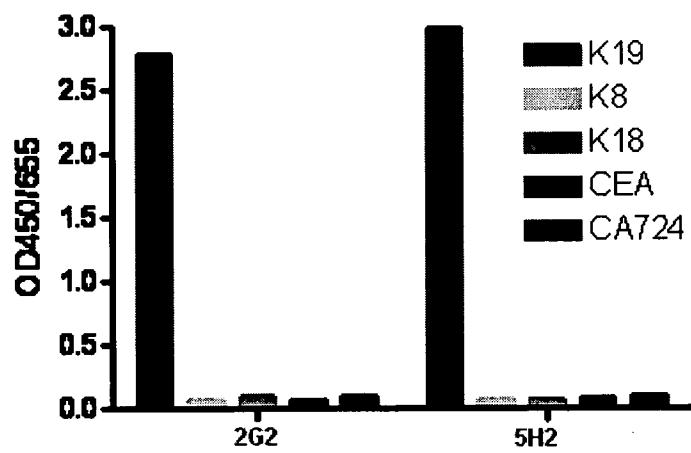


图 17

9/9

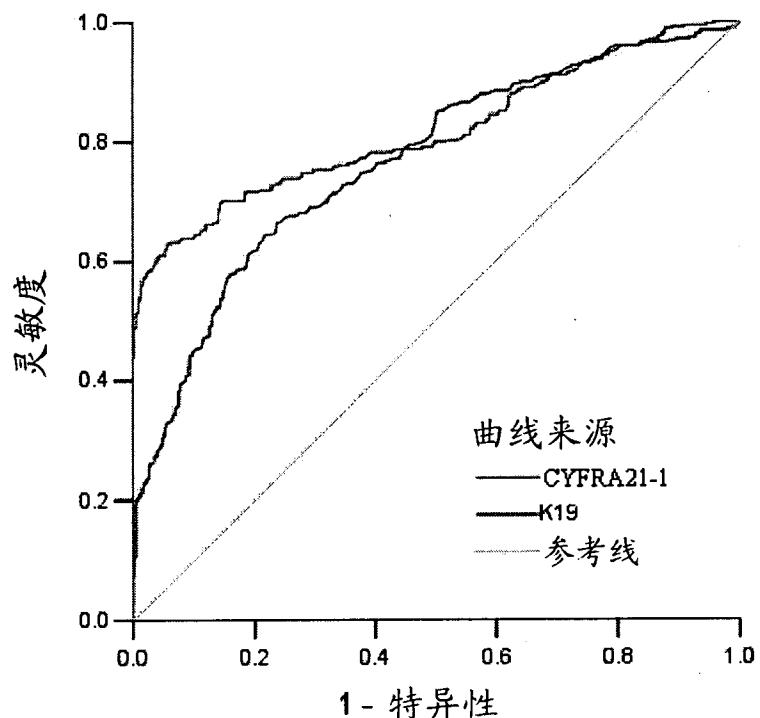


图 18

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2010/001387

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

See extra sheet

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC: A61K, C12N, G01N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

WPI, EPODOC, CPRS, CNKI, BIOSIS, GenBank

cytokeratin, keratin, keratin 18, K18, keratin 19, K19, cancer, tumor, antigen, epitope

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	CN1639185A (SCRIPPS RES INST) 13 Jul. 2005 (13.07.2005) see claim 1, pages 3 and 52 in description, sequence list	1-2, 10-13, 15
X	CN1544463A (SHANGHAI INST BIOLOGICAL SCI) 10 Nov. 2004 (10.11.2004) see claim 1	1, 3
X	CN1471587A (HITACHI CHEM CO LTD, et al.) 28 Jan. 2004 (28.01.2004) see claims 1-4, pages 1-20 in description	1-3, 10-11, 13, 15-16
A	ZF Fan, et al. Research and Clinical Evaluation of tumor markers. Labeled Immunoassays & Clin Med, June 2002, 9(2): 108-111.	1-21

Further documents are listed in the continuation of Box C.

See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim (S) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search 12 May 2011 (12.05.2011)	Date of mailing of the international search report 16 Jun. 2011 (16.06.2011)
Name and mailing address of the ISA/CN The State Intellectual Property Office, the P.R.China 6 Xitucheng Rd., Jimen Bridge, Haidian District, Beijing, China 100088 Facsimile No. 86-10-62019451	Authorized officer SU,Lin Telephone No. (86-10)62411030

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2010/001387

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

This Authority considers that there are 4 inventions covered by the claims indicated as follows:

I: Claims 1-2 and 4-21 (all partially), referring to a cytokeratin fragment comprising antigenic epitope of SEQ ID NO: 2, a hybridoma cell (Deposit number: CGMCC No. 1957), an antibody produced by said hybridoma cell, and the related method and kit.

See extra sheet

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fees, this Authority did not invite payment of additional fee.

3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on protest

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2010/001387

Patent Documents referred in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
CN 1639185 A	13.07.2005	WO 03057168 A2 AU 2003207459 A1 EP 1461001 A2 US 2005048070 A1 JP 2005523888 T AU 2003207459 A8 IN KOLNP200802449 E IN 226798 B	17.07.2003 24.07.2003 29.09.2004 03.03.2005 11.08.2005 20.10.2005 23.01.2009 26.12.2008
CN 1544463 A	10.11.2004	NONE	
CN 1471587 A	28.01.2004	WO 0198539 A2 AU 7008201 A US 2003215828 A1 EP 1356093 A2 JP 2004500895 T AU 2001270082 A8 US 2006275783 A1 US 7214781 B2 JP 4392163 B2	27.12.2001 02.01.2002 20.11.2003 29.10.2003 15.01.2004 13.10.2005 07.12.2006 08.05.2007 24.12.2009

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2010/001387

CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61K 39/395 (2006.01) i

C12N 5/18 (2006.01) i

G01N 33/577 (2006.01) i

Box No. III Observations where unity of invention is lacking

II: Claims 1-2 and 4-21 (all partially), referring to a cytokeratin fragment comprising antigenic epitope of SEQ ID NO: 3, a hybridoma cell (Deposit number: CGMCC No. 1956), an antibody produced by said hybridoma cell, and the related method and kit.

III: Claims 1 and 3-21 (all partially), referring to a cytokeratin fragment comprising antigenic epitope of SEQ ID NO: 5, a hybridoma cell (Deposit number: CGMCC No. 1955), an antibody produced by said hybridoma cell, and the related method and kit.

IV: Claims 1 and 3-21 (all partially), referring to a cytokeratin fragment comprising antigenic epitope of SEQ ID NO: 6, a hybridoma cell (Deposit number: CGMCC No. 1952), an antibody produced by said hybridoma cell, and the related method and kit.

D1 (CN1544463A (SHANGHAI INST BIOLOGICAL SCI), 10 Nov. 2004, see abstract) discloses that a fragment of cytokeratin 19 is related with hepatoma, and sequences of SEQ ID NOS: 2, 3, 5 and 6 according to the present invention are different from each other, therefore, there is no same or corresponding special technical feature among the above mentioned 4 inventions. The above mentioned 4 inventions do not belong to a single general inventive concept and do not meet the requirements of unity of invention as defined in Rule 13.1 PCT.

A. 主题的分类

参见附加页

按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和 IPC 两种分类

B. 检索领域

检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)

IPC: A61K, C12N, G01N

包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献

在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称, 和使用的检索词 (如使用))

WPI, EPODOC, CPRS, CNKI, BIOSIS, GenBank

细胞角蛋白, 角蛋白, 角蛋白 18, 角蛋白 19, 癌, 癌症, 瘤, 肿瘤, 抗原, 表位, cytokeratin, keratin, keratin 18, K18, keratin 19, K19, cancer, tumor, antigen, epitope

C. 相关文件

类 型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求
X	CN1639185A (斯克里普斯研究学院) 13.7 月 2005 (13.07.2005) 参见权利要求 1, 说明书第 3 和 52 页, 序列表	1-2, 10-13, 15
X	CN1544463A (中国科学院上海生命科学研究院) 10.11 月 2004 (10.11.2004) 参见权利要求 1	1, 3
X	CN1471587A (日立化成工业株式会社等) 28.1 月 2004 (28.01.2004) 参见权利要求 1-4, 说明书第 1-20 页	1-3, 10-11, 13, 15-16
A	范振符等. 肿瘤标志物的研究与临床应用评价. 标记免疫分析与临床, 2002 年 6 月, 9(2): 108-111.	1-21

 其余文件在 C 栏的续页中列出。 见同族专利附件。

* 引用文件的具体类型:

“A” 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件

“E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利

“L” 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件 (如具体说明的)

“O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件

“P” 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件

“T” 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了理解发明之理论或原理的在后文件

“X” 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性

“Y” 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性

“&” 同族专利的文件

国际检索实际完成的日期 12.5 月 2011 (12.05.2011)	国际检索报告邮寄日期 16.6 月 2011 (16.06.2011)
ISA/CN 的名称和邮寄地址: 中华人民共和国国家知识产权局 中国北京市海淀区蓟门桥西土城路 6 号 100088 传真号: (86-10)62019451	受权官员 苏林 电话号码: (86-10) 62411030

第II栏 某些权利要求被认为是不能检索的意见(续第1页第2项)

根据条约第17条(2)(a)，对某些权利要求未做国际检索报告的理由如下：

1. 权利要求：

因为它们涉及不要求本单位进行检索的主题，即：

2. 权利要求：

因为它们涉及国际申请中不符合规定的要求的部分，以致不能进行任何有意义的国际检索，
具体地说：

3. 权利要求：

因为它们是从属权利要求，并且没有按照细则6.4(a)第2句和第3句的要求撰写。

第III栏 缺乏发明单一性的意见(续第1页第3项)

本国际检索单位在该国际申请中发现4项发明，即：

- 1、权利要求1-2（部分的）和4-21（部分的），涉及包含SEQ ID NO: 2的抗原表位的细胞角蛋白片段，保藏号为CGMCC No. 1957的杂交瘤细胞及其产生的抗体以及相关方法和试剂盒。
- 2、权利要求1-2（部分的）和4-21（部分的），涉及包含SEQ ID NO: 3的抗原表位的细胞角蛋白片段，保藏号为CGMCC No. 1956的杂交瘤细胞及其产生的抗体以及相关方法和试剂盒。

参见附加页

1. 由于申请人按时缴纳了被要求缴纳的全部附加检索费，本国际检索报告涉及全部可作检索的权利要求。
2. 由于无需付出有理由要求附加费的劳动即能对全部可检索的权利要求进行检索，本单位未通知缴纳任何附加费。
3. 由于申请人仅按时缴纳了部分被要求缴纳的附加检索费，本国际检索报告仅涉及已缴费的那些权利要求。
具体地说，是权利要求：
4. 申请人未按时缴纳被要求缴纳的附加检索费。因此，本国际检索报告仅涉及权利要求书中首先提及的发明；包含该发明的权利要求是：

关于异议的说明： 申请人缴纳了附加检索费，同时提交了异议书，适用时，缴纳了异议费。

申请人缴纳了附加检索费，同时提交了异议书，但未在通知书规定的时间期限内缴纳异议费。

缴纳附加检索费时未提交异议书。

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号
PCT/CN2010/001387

检索报告中引用的专利文件	公布日期	同族专利	公布日期
CN 1639185 A	13.07.2005	WO 03057168 A2 AU 2003207459 A1 EP 1461001 A2 US 2005048070 A1 JP 2005523888 T AU 2003207459 A8 IN KOLNP200802449 E IN 226798 B	17.07.2003 24.07.2003 29.09.2004 03.03.2005 11.08.2005 20.10.2005 23.01.2009 26.12.2008
CN 1544463 A	10.11.2004	无	
CN 1471587 A	28.01.2004	WO 0198539 A2 AU 7008201 A US 2003215828 A1 EP 1356093 A2 JP 2004500895 T AU 2001270082 A8 US 2006275783 A1 US 7214781 B2 JP 4392163 B2	27.12.2001 02.01.2002 20.11.2003 29.10.2003 15.01.2004 13.10.2005 07.12.2006 08.05.2007 24.12.2009

主题的分类

A61K 39/395 (2006.01) i

C12N 5/18 (2006.01) i

G01N 33/577 (2006.01) i

第III栏 缺乏发明单一性的意见

3、权利要求 1 (部分的) 和 3-21 (部分的)，涉及包含 SEQ ID NO: 5 的抗原表位的细胞角蛋白片段，保藏号为 CGMCC No. 1955 的杂交瘤细胞及其产生的抗体以及相关方法和试剂盒。

4、权利要求 1 (部分的) 和 3-21 (部分的)，涉及包含 SEQ ID NO: 6 的抗原表位的细胞角蛋白片段，保藏号为 CGMCC No. 1952 的杂交瘤细胞及其产生的抗体以及相关方法和试剂盒。

因为 D1 (CN1544463A (中国科学院上海生命科学研究院), 10.11 月 2004, 参见摘要) 公开了细胞角蛋白 19 的片段与肝癌有关，而本发明 SEQ ID NOS: 2、3、5 和 6 的序列各不相同，因此上述 4 组发明之间没有相同或者相应的特定技术特征，没有满足发明单一性的要求，不符合 PCT 细则 13.1 的规定。