[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl[7]
G01N 33/574

[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 02806510.7

[43] 公开日 2005 年 7 月 6 日

[11] 公开号 CN 1636139A

[22] 申请日 2002.1.11 [21] 申请号 02806510.7
[30] 优先权
[32] 2001. 1.12 [33] US [31] 60/260,898
[86] 国际申请 PCT/US2002/000574 2002.1.11
[87] 国际公布 WO2002/057787 英 2002.7.25
[85] 进入国家阶段日期 2003.9.12

[71] 申请人 耶鲁大学
地址 美国康涅狄格州
[72] 发明人 达里奥·C·阿尔蒂里
罗伯特·B·韦斯
香农·D·史密斯
马西娅·A·惠勒
珍妮特·普莱西亚

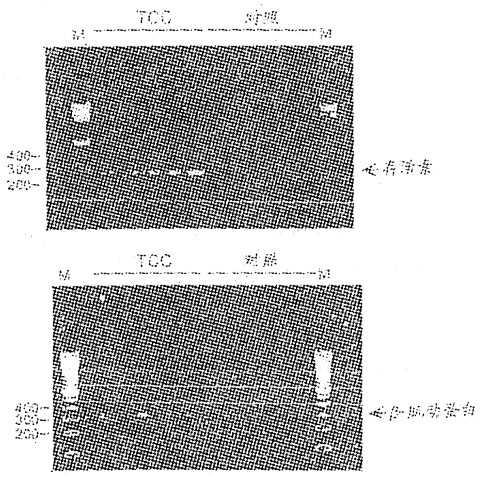
[74] 专利代理机构 北京市柳沈律师事务所
代理人 巫肖南 封新琴

权利要求书 2 页 说明书 23 页 附图 4 页

[54] 发明名称 癌症病人的生物液体中存活素的检测

[57] 摘要

本发明包括诊断癌症的一种方法，该方法包括检测病人的生物液体中存活素的存在。 本发明也提供试剂盒，其包括一种或更多的检测存活素多肽或存活素核酸的试剂和一个收集用于检测的生物液体的容器。



ISSN1008-4274

1.一种诊断病人的癌症的方法，包括分析来自病人的生物液体样本中的存活素存在或缺乏，其中样本中存活素的存在表明病人患有癌症。

2.根据权利要求 1 的方法，其中生物液体为尿或血清。

3.根据权利要求 1 的方法，其中癌症为任何侵袭泌尿生殖道的癌症。

4.根据权利要求 3 的方法，其中泌尿生殖道癌为膀胱癌或前列腺癌。

5.根据权利要求 4 的方法，其中膀胱癌或前列腺癌分级为 CIS。

6.根据权利要求 4 的方法，其中膀胱癌或前列腺癌为任何等级或阶段。

7.根据权利要求 1 的方法，其中存活素用选自下列的试剂检测：结合存活素的抗体，存活素结合伴侣，或与编码存活素的核酸杂交的核酸。

8.根据权利要求 7 的方法，其中试剂用标记物进行标记。

9.根据权利要求 8 的方法，其中标记物为放射活性标记物、荧光标记物、酶、或化学发光标记物。

10.根据权利要求 1 的方法，其中存活素用免疫分析进行检测。

11.根据权利要求 10 的方法，其中免疫分析为酶联免疫吸附分析或放射免疫分析。

12.根据权利要求 10 的方法，其中免疫分析包括免疫印迹、免疫扩散、免疫电泳、或免疫沉淀。

13. 根据权利要求 1 的方法，其中存活素用斑点印迹检测。

14. 根据权利要求 13 的方法，其中斑点印迹包括使用 Bio-Dot SF 模件。

15. 根据权利要求 1 的方法，其中存活素用核酸杂交方法检测。

16. 根据权利要求 15 的方法，其中核酸杂交为 RT-PCR 或 Northern 印迹分析。

17. 一种诊断，预后，或监测癌的试剂盒，包括用于收集来自病人的生物液体的容器以及检测生物液体中存活素存在的试剂。

18. 根据权利要求 17 的试剂盒，其中试剂选自结合存活素的抗体，存活素结合伴侣，以及与编码存活素的核酸杂交的核酸。

19. 根据权利要求 18 的试剂盒，其中试剂用标记物进行标记。

20. 根据权利要求 18 的试剂盒，其中标记物为放射性标记、荧光标记、酶、或化学发光标记。

21. 根据权利要求 17 的试剂盒，其中试剂包装在水性介质中或以冻干形式存在。

22. 根据权利要求 17 的试剂盒，进一步包括分析存活素存在的用具。

23. 根据权利要求 17 的试剂盒，其中癌为膀胱癌或前列腺癌。

24. 根据权利要求 17 的试剂盒，其中生物液体为尿或血清。

25. 一种确定病人的癌症等级的方法，包括对来自病人生物液体的样本中的存活素进行定量，并将该样本中存活素的量与对照样本中存活素的量进行比较以确定癌症的等级。

26. 一种确定病人的癌症阶段的方法，包括对来自病人生物液体的样本中的存活素进行定量，并将该样本中存活素的量与对照样本中存活素的量进行比较以确定癌症的阶段。

27. 一种监测病人癌症的方法，包括对来自病人生物液体的样本中的存活素进行定量以确定癌症的等级。

28. 根据权利要求 1 的方法，其中生物液体选自前列腺液、精液、全血、血清、尿、乳腺的活组织检查液体、胃肠液、或阴道液。

29. 根据权利要求 1 的方法，其中癌为任何表达存活素的癌。

30. 根据权利要求 1 的方法，其中癌选自成神经细胞瘤、乳腺癌、肺癌、膀胱癌、结肠直肠癌、胰腺癌、泌尿生殖道癌、前列腺癌、肾癌、或膀胱癌。

31. 根据权利要求的方法 1，其中癌为新发癌或复发癌。

癌症病人的生物液体中存活素的检测

发明领域

本发明涉及一种诊断癌症的方法，它包括检测病人生物液体中存活素(Survivn)的存在。特别地，本方法涉及膀胱癌的诊断方法，包括检测病人尿样中存活素的存在。另外，本发明涉及诊断癌症的试剂盒，包括检测病人生物体液的存活素的试剂和收集生物液体的容器。

发明背景

癌指易于侵袭周围组织并转移至新的身体部位的恶性肿瘤。除非接受足够的治疗，癌在被努力切除后很可能复发并且导致病人死亡。导致癌症的确切原因不知道，但是某些行为例如吸烟或暴露于致癌物质与某些类型癌症和肿瘤的发病率的相关性已经被很多研究者证明。

癌从原发部位向远端器官扩散，也就是，转移，仍然是大多数癌症病人的死亡的主要原因。尽管经过数年的研究，参与该过程的遗传机制在很大程度上还是不清楚。这样的信息在具有不确定的疾病进程的癌症的预后中显得特别重要。因为用目前肿瘤分级技术不能总是准确评估癌症预后，成功治疗癌症病人的最大的障碍之一还是缺乏可靠的预测性标记物。

膀胱癌

膀胱癌是恶性肿瘤，通常起源于连接膀胱的泌尿道上皮细胞(移行上皮细胞)。膀胱的泌尿道上皮癌，即膀胱癌，是美国男性第四位最常见癌症和女性第八位最常见癌症，每年有超过 54，000 的新病例和 11，200 的死亡病例。超过 80％的膀胱癌病人发生复发并且对长期缓解形成一个巨大的障碍，这种复发常常涉及肌肉侵袭和播散性疾病(Dawson 等，ABC of Urology: Urological Malignancies -II:Urothelial Tumors. BMJ，1996，312: 1090-94)。

许多因素可以促进膀胱癌的发展。吸烟和职业性暴露于某类称作芳香胺的有机化合物(β-萘胺，苯基苯胺，4-硝基联苯，对二氨基联苯)是已知的危险因素。一些研究表明大剂量人工合成的甜味糖精和移行上皮细胞膀胱癌有一定关系。其他研究已经表明妇女为治疗宫颈癌而接受放射性治疗可

以增加发生移行上皮细胞膀胱癌的危险性。另外，接受化疗药物，环磷酰胺(Cytoxan)的病人，已经证实发生膀胱癌的危险性更大。

最常见的膀胱癌的临床表现是血尿。通常，不管怎样，膀胱癌的诊断都是延迟的，因为血尿是间断性的或归于其他原因，例如泌尿道感染或应用抗凝剂。移行上皮细胞所排泄的尿的细胞学检查是常规用于诊断膀胱癌的方法。如果尿细胞学检查呈阳性，那么泌尿道上皮的移行上皮细胞癌几乎可以肯定是存在的。但是，高达一半的膀胱癌病人细胞学检查移行上皮细胞可为阴性。因此，阴性的细胞学检查结果不能除外膀胱癌的存在(Badalament 等，Cancer，1987，59(12):2078；Cohen 等，Urologic Clinics of North America，1992，19(3):421)。

作为一个额外的诊断并发症，由于移行上皮细胞排列于尿道起始于肾脏水平，包括肾盂，输尿管，膀胱，和大部分尿道，一旦最初诊断膀胱癌就要对整个尿道进行移行上皮细胞癌的评价。通过静脉肾盂造影(IVP)或逆行性肾盂造影，肾脏的肾盂和输尿管是最好评价的。IVP 方法包括静脉注射对照物，然后可以在肾脏从血液中滤出进入尿液。在这个过程中普通 X 线照片显示出尿道。典型的逆行性肾盂造影是用于对静脉造影剂过敏或 IVP 成相可见度差的病人。逆行性肾盂造影在膀胱镜检查时进行。

膀胱镜检查，是指应用光学设备观察膀胱内部，是一项感觉不舒适的操作方法，适用于膀胱癌的明确诊断。逆行性肾盂造影检查时，通过膀胱镜将小塑料导管插入输尿管，并且对照物注入输尿管和肾脏。膀胱镜检查可以鉴别小的细微的异常改变，可以对其他诊断形式例如超声，计算机 X 线断层扫描或核磁共振成像检查(MRI)的遗漏进行弥补。这样，膀胱镜检查是最初评价必要的部分，同时不能被其他检查所替代。现在，大多数膀胱镜检查都应用易变形柔软的检查镜。与刚性的膀胱镜对比，易变形柔软的内窥镜更舒适并且允许医生围绕增大的前列腺的曲线进行观察。

活组织检查也可以用来诊断膀胱癌。活组织检查是从器官，例如膀胱上采取一小块活组织样本，用显微镜检查以确定或建立诊断，评价预后，或跟踪疾病的进程。但是，活组织检查是侵入性操作，并不是很令人满意并且通常地是需要对病人实施麻醉。另外，与任何侵入性操作一样，进行活组织检查有导致感染的危险性。此外，完整的膀胱不能进行活检来判断是否存在膀胱癌。

膀胱癌分期

膀胱癌分级依据其浸润程度和与膀胱周围组织的不同(分化)。由医生诊断出膀胱癌后进行分期和分级。

有几种不同的方法进行癌分期。针对膀胱癌应用的两个最常用的分期系统为 ABCD 系统(Jewett-Strong-Marshall 系统)和 TNM 系统。ABCD 系统较老，应用 A-B-C-D 分期对膀胱癌的阶段或周期进行区分。本系统基本应用以下等级区分：0，原位癌(癌局限于膀胱黏膜内(内层))；A，癌扩散穿过黏膜但是不超过黏膜下层；B，癌侵入肌层；C，癌侵入脂肪；D，癌扩散到局部淋巴结或远端部位。每个字母都跟随一个数字，例如 Al，B2，等。TNM 系统，膀胱用 T 表示，淋巴结用 N 表示，远端扩散用 M 表示。每个字母跟随一个描述数字，T2aN0M0。例如，Ta 表示乳突状无浸润癌；Tis 表示原位癌；T1 表示癌侵入上皮下的结缔组织。

膀胱癌通过扩展入临近器官向体内其他部位扩散，包括前列腺、子宫、阴道、输尿管、和直肠。通过盆腔的淋巴结进行转移，下一步癌扩散至肝脏，肺和骨组织。

膀胱癌分级

膀胱癌分级是病理学家通过活组织检查进行。癌的分级可以提供癌可能的生长速度或恶性程度的信息。高分级癌比低分级癌生长更快并且更容易扩散。目前的分级系统通常只有三个不同等级：分化良好，中度分化，和分化不良(或 I，II 或 III 级)。一些病理学家用 4 段分级系统，I，II，III 和 IV。每个分级系统都可接受，病理学家将注明他们应用多少分段来进行癌症分级如 II/III 或 II/IV。分母或第二个数字表示他们应用的是哪个系统。分化良好的癌说明癌与正常膀胱组织更相近，所以通常生长和扩散不是很快。分化不良的癌说明癌与正常膀胱组织不相似，通常生长迅速并且更早地扩散至其他组织。中度分化癌处在中间水平。

分级，同样重要，但对于治疗决定的影响比分期小。在分期和分级明确后，在确定进一步治疗的决定之前也应该考虑其他因素。

前列腺癌

前列腺癌为生长在前列腺的恶性癌。它在所有年龄男性癌症的最常见死亡原因中排第三位，并为 75 岁以上老年男性癌症的最常见死亡原因。前列腺癌在小于 40 岁的男性中很少发现。

虽然病因不清楚，一些研究已经证实前列腺 癌与高脂肪饮食摄入和增加的睾丸激素水平的相关性。目前与良性前列腺增生(BPH)的关系还不清楚。

与膀胱癌一样，依据从前列腺周围组织分化的浸润情况和程度对前列腺癌进行分类或分期。大多数前列腺癌应用 A-B-C-D 分期系统或 TNM 系统进行分期。对前列腺癌，A-B-C-D 系统基本分类应用以下标准：A 癌不能触知(能够感觉到)，但是显微镜的活组织检查可以检测到；B 可以在前列腺可触知的癌；C 癌扩展超过前列腺但没有远距离转移；D 癌扩展到局部淋巴结。另一方面，TNM 系统，分别描述前列腺为(T)，淋巴结为(N)，和癌转移迹象(远距离扩散)为(M)。前列腺癌通过侵入精囊，膀胱和腹腔进行扩散。前列腺癌典型地转移为淋巴结、骨、肺脏、肝脏、和肾脏。

目前，前列腺癌通常应用由 Minnesota 大学的病理学家命名的 Gleason 系统进行分级。该系统包括在前列腺寻找侵袭的不同模式然后给以 1-5 的两个分值。所述两个分值相加得出整个 Gleason 评分值，范围为 2-10。分值越高，癌的侵入性越强。例如，一个典型的 Gleason 分级的癌可以记为 Gleason 4+3=7，或 Gleason 2+2=4。

存活素

细胞凋亡(程序性细胞死亡)抑制剂的下调表达异常延长细胞生存力，有利于突变累积，并促进对治疗的抗性，因此是癌变的因素(Reed，J. Clin. Oncol.，1999，17: 2941-53)。最近确定的癌症中细胞死亡/生存平衡中新的调节因子是存活素 (Ambrosini 等，Nat. Med.，1997，3: 917-21)，为细胞凋亡(IAP)基因家族的抑制剂的成员(Deveraux 等，Genes Dev.，1999，13: 239-52)。

存活素为 16.5 kDa 胞质蛋白，包含唯一部分保守的 BIR(杆状病毒 IAP 重复片段)结构域，以及一个高度荷电的羧基端卷曲螺旋区，而不是 RING 指状结构，其抑制当转化成 B 细胞前体时通过生长因子(IL-3)的撤消诱导的细胞凋亡(Ambrosini 等，Nat Med 1997，3: 917-921)。基于全部的序列保守性，羧基端 RING 指状结构的缺乏以及存在的唯一部分保守的 BIR 结构域，存活素为 IAP 家族差别最大的成员，与 NAIP 具有高度相似性(神经元细胞凋亡抑制蛋白；Roy 等，Cell，1995，80:167-178)。并且，与其他 IAP 蛋白不一样，存活素在正常成人组织中检测不到，但在通常的人类癌体中，却

成为第4高表达的转录本(Ambrosini等，Nat.Med.，1997，3: 917-21; Velculescu等，Nat.Genet.，1999，23: 387-88)，例如肺脏癌，结肠癌，乳腺癌，胰腺癌，以及前列腺癌，以及在约50%高分级非何杰金氏淋巴瘤。与在泌尿道上皮癌被提议的作用无调节细胞凋亡相一致的是(Gazzaniga 等，Int. J. 癌，1996，69: 100-04; Lara 等，Int. J.Radiat. Oncol. Biol. Phys.，1999，43: 1015-19)，存活素在78%的膀胱癌中被发现，但在正常的膀胱上皮中却没被发现，且其表达与加速复发相关(Swana 等，N. Engl. J. Med.，1999，341: 452-53)。由于其在癌中过量表达，但在正常组织却不过量表达(Ambrosini等，Nat. Med.，1997，3: 917-21; Velculescu 等，Nat.Genet.，1999，23: 387-88)，以及其在多种恶性疾病中不利的预测/预后作用(Adida 等，Lancet，1998，351: 882-83; Islam 等，Oncogene，2000，19: 617-23; Tanaka 等，Clin. 癌 Res.，2000，6: 127-34; Monzo 等，J. Clin. Oncol.，1999，17: 2100-04; Kawasaki 等，Cancer Res.，1998，58: 5071-74)，存活素可有用于作为癌症的分子标志物。对膀胱癌而言，尤其如此(Stein 等，J. Urol.，1998，160: 645-59; Ozen，Curr. Opin. Oncol.，1998，10: 273-78)，急需简单和非侵袭性诊断方法，以监测对治疗的反应和简单地跟踪方法。尽管被当作是"金标准" (Brown，Urol. Clin. North Am.，2000，27: 25-37)，尿细胞学在膀胱癌检测中具有低敏感度(30-40%)，且不能检测表面上的，低分级损害。相应地，本申请的发明者考察体液存活素作为癌检测的新分子标志物可能的适宜性，特别用来检测尿存活素进行膀胱癌的诊断。

发明概述

本发明提供一种诊断病人癌症的方法，包括分析来自病人生物液体的样本，判断存活素存在或缺乏，其中样本存活素的存在表明病人患有癌。在优选的技术方案中，生物液体选自前列腺液，精液，全血，血清，尿，乳腺活组织检查液体，胃肠液，以及阴道液，并且癌为新发或复发癌，选自肺癌，结肠癌，乳腺癌，胰腺癌，前列腺癌，膀胱癌，肾癌，泌尿生殖道癌，非何杰金氏淋巴瘤，以及成神经细胞瘤。更优选地，生物液体为尿或血清，并且癌为膀胱或前列腺癌。最优选地，生物液体为尿，并且癌为膀胱癌。

一方面，本发明包括判断癌症分级的方法，方法是对病人生物液体中的存活素量进行定量，其中高水平的存活素表明所述癌症为高分级的。此

外，本发明包括该方法在确定癌症分期中的应用，其中 CIS 期的癌症与非侵袭性乳突状癌期的癌症相比，具有较高水平的存活素。

另一方面，本发明涉及监测病人癌症的方法，包括对病人生物液体中的存活素的量进行定量。此外，本发明包括对病人预后的判断，方法是对病人生物液体中的存活素的量进行检测或定量。在某些情况下，存活素的存在表明预后很差。存活素的定量包括测量样本中存活素的相对水平。也包括对存活素存在或缺乏的检测。

优选地，存活素用与存活素结合或与编码存活素的核酸杂交的试剂进行检测。最优选地，试剂选自结合存活素的抗体，存活素结合片段，以及与编码存活素的核酸杂交的核酸，并且试剂用标记物标记。标记物为可为放射活性标记物，荧光标记物，酶，化学发光标记物，或比色标记物。

本发明一方面，用免疫分析检测存活素。优选地，免疫分析为酶联免疫吸附分析或放射免疫分析，并且免疫分析包括免疫印迹，免疫扩散，免疫电泳，或免疫沉淀。更优选地，存活素用斑点印迹检测，最优选地，用 Bio-Dot 方法以及 Bio-Dot SF 摸件。

本发明另一方面，存活素用核酸杂交检测。在优选的技术方案中，核酸杂交为 RT-PCR 或 Northern 印迹分析。核酸杂交中使用的试剂用放射活性标记物，荧光标记物，酶，化学发光标记物，或比色的标记物标记。

本发明也提供用于诊断，预后，或监测病人癌的试剂盒，包括用于收集病人的生物液体的容器以及一种或多种检测生物液体中存活素的存在的试剂。试剂盒中的试剂可用标记物进行标记。或者，试剂盒可包括其他的组分用来标记试剂。本发明也包括含有其他组分的试剂盒，所述其他组分用来诊断和监测病人的癌症，并对癌症的预后进行判断。在一种技术方案中，试剂盒的组分包装在水性介质中或为冻干的形式。

附图说明

图 1 显示用 Bio-Dot SF 摸件进行存活素的尿检测。

来自指示病人组的重组存活素(左列)，或尿样以 μg/ml 渐增的浓度应用到狭缝印迹仪器上。膜与抗存活素抗体孵育，接着用 HRP-偶联的山羊抗兔 IgG 孵育。通过化学发光显出条带，用密度测定法进行定量。TCC，膀胱癌(组 4)；TCC/R，消退(组 5)；TCC/T，接受治疗(组 5)；RCC，肾细胞癌，PC，

前列腺癌(组 3)；PSA，有 PSA 升高但无前列腺癌诊断的病人(组 2)；BPH，良性前列腺增生(组 2)；Ctrl，健康志愿者(组 1)。

图 2 显示尿存活素的 Western 印迹。对来自正常健康志愿者(正常)和患膀胱癌(TCC)的组 4 病人尿细胞进行电泳，转移到尼龙膜上并用抗存活素抗体进行免疫印迹，然后进行化学发光处理。相对分子量标准显示在左边。

图 3 显示尿中存活素 mRNA 的 RT-PCR 扩增结果。从尿细胞中提取总 RNA 并用随机引物进行反转录。扩增反应用存活素-特异巢式引物(279bp)或 β-肌动蛋白-特异引物(309bp)进行。以(M)标出分子量标准(bp)。TCC，5 例代表性的新发或复发膀胱癌病人(组 4)的分析。

图 4 显示用 Bio-Dot SF 摸件进行存活素的血清检测。

渐增浓度的重组存活素(μg/ml)(左和右列)，尿或血清样品应用到狭缝印迹仪器上。膜与抗存活素抗体孵育，然后与 HRP-偶联的山羊抗兔 IgG 孵育。条带通过化学发光显色。"serum Bl CA"之前的数字指示血清来自患 TCC 的病人的血清。大多数这类样本进行双份印迹。8 例膀胱癌病人的血清样本中 7 例呈阳性。2 份测试样本中 1 份样本(8-serum Bl CA) 为阴性。来自病人 2 Bl CA 的尿和血清为阳性。"Urine Hx TCC"指示来自先前诊断患有 TCC 的 1 例病人的尿。该病人已经接受了切除术并正接受 BCG 治疗。"3-serum P CA"表明来自前列腺癌病人的存活素阳性血清。"6-serum BPH"是来自良性前列腺增生病人的血清。该样本的存活素阳性为测试的 1/2 倍。没有其他方面关于该病人的信息。"Urine TCC"指来自膀胱癌病人的尿。"Neg con"为蛋白对照。"Blank"为只有 TBS 缓冲液。

发明详述

I.一般描述

本发明基于开发安全、可靠、非侵袭性癌症检测特别是膀胱癌检测的筛选方法的需要。所述疾病的单个预防/预后标志物的鉴定仍很困难(Stein 等，J. Urol.，1998，160:645-59)。用于诊断和筛选癌症，特别是移行上皮细胞膀胱癌以及用于癌症活性的监测并对膀胱癌患者个体进行预后判断的标志物的鉴定以及方法的开发，将对癌症的治疗有用。

本发明公开了一种简单的，基于抗体或其他探针的检测，其用于确定患癌病人的尿或其他体液中的细胞凋亡抑制剂存活素。

本发明部分基于下列发现：在所有新诊断的或复发的膀胱癌病人(46/46)中发现尿存活素，但在正常志愿者中(0/17)，或在患其他泌尿道癌(0/30)的病人中却没有发现，只有 4/30 非肿瘤性泌尿生殖道疾病的病人发现有尿存活素。本发明也基于下列发现：3 例尿存活素检测为阳性的血尿病人中，1 例膀胱癌细胞学呈阳性，另 1 例在存活素检测的 6 个月内诊断出患膀胱癌。此外，本发明基于已经进行膀胱癌治疗并通过膀胱镜检查发现病情缓解的病人尿存活素检测为阴性(32/35)。

本发明也部分基于膀胱癌和前列腺癌病人的血清中检测到存活素的发现。

II.具体技术方案

1. 生物液体

文中术语"病人生物液体"指来自活生物体的液体。该术语包含活生物体机体中可发现的"体液"。

本发明包括试剂在筛选生物液体以判断存活素的存在中的用途。体外血清学评价取自病人的生物液体，从而可以进行癌症的非侵袭性诊断。例如，人体液例如前列腺液、精液、全血、血清、尿、乳腺活组织检查液、胃肠液、以及阴道液可从病人身上取样，利用可以检测存活素的试剂通过放射免疫分析或酶-联免疫分析、竞争性结合酶-联免疫分析、斑点印迹、Western 印迹、Northern 印迹、PCR、或本领域公知其他的分析方法分析存活素的存在。

在优选的技术方案中，收集病人血清用来检测存活素的存在以进行膀胱或前列腺癌的诊断。

更优选地，收集病人尿样本用来检测存活素的存在以进行膀胱癌的诊断。待检的尿样本可在分析前尽早先收集好，并冻存以备处理。如果尿样在分析前冻存，优选地收集样本并置于冰上。优选在约 2 小时内，离心冰冻的样本使成团状细胞碎片，然后过滤，滤液迅速在-20℃冻存，更优选在-80℃冻存。在即将分析之前，冻存样本应在 37℃水浴中快速解冻。鲜尿样本也应在收集后立即使用，最好离心，并过滤。更优选地，将全尿放置在冰上直至其在-80℃冻存。在 4℃解冻后，尿样在 4℃ 离心并分析其中的存活素。

2.检测 存活素的试剂

能用来检测病人生物液体中的存活素的试剂是那些能与存活素或编码存活素的核酸相互作用的试剂。所述试剂的实例包括，但不限于存活素抗体或其结合存活素的片段；存活素结合伴侣，例如 $p34^{cdc2}$-细胞周期蛋白 B1 激酶；以及与编码存活素的核酸杂交的核酸。

存活素抗体

本领域普通的技术人员已经制备并使用了存活素抗体。 Lu 等(Cancer Res.，1998，58(9):1808-12)报道了从重组产生的存活素/谷胱甘肽 S-转移酶融合蛋白制备小鼠单克隆存活素抗体，用于胃癌的免疫组织化学分析。Grossman 等(J. Invest.Dermatol.，1999，113: 1076-81)公开了利用兔多克隆抗体来检测人转移性恶性黑色素瘤细胞株中的存活素。

使用本领域公知并描述的标准免疫学方法，利用存活素或存活素肽来产生抗体(Practical Immunology，Butt，编辑，Marchel Dekker，New York，1984)。简言之，用分离的存活素或存活素 肽(例如，利用重组 DNA 在宿主细胞进行中表达)在异种宿主中产生抗体。优选的抗体为与存活素蛋白上的表位特异结合的抗体，优选对所述表位结合亲和力大于约 10^5M^{-1}，最优选亲和力大于约 10^7M^{-1}。例如，当需要抗人存活素蛋白的抗体时，合适的抗体产生宿主为小鼠，山羊，兔，豚鼠，或其他的用来产生抗体的哺乳动物。存活素蛋白或肽与能增加宿主体内抗体产生的合适的佐剂组合，并注射到宿主体内，例如，经腹膜内注射。可以使用任何合适刺激宿主的免疫应答的佐剂。目前优选的佐剂为 Freund 氏完全佐剂(一种乳剂，包括灭活及干燥的微生物细胞，例如，购自 Calbiochem Corp.，San Diego，或 Gibco，Grand Island，N. Y.)。当需要多次注射抗原时，后续的注射包括所述抗原与不完全佐剂(例如无细胞的乳剂)联合使用。

在优选的技术方案中，检测生物液体中存活素的存在的公开的方法是用特异结合存活素的抗体进行的。用本领域公知的方法制备特异结合存活素的多克隆和单克隆抗体。抗体包括按照 Huse 等方法制备的重组的多克隆或单克隆 Fab 片段。(Science，1989，246: 1275-1281；也参见 Campbell，"Monoclonal Antibody Technology，The Production and Characterization of Rodent and Human Hybridomas"in Burdon 等，编辑，Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology，1985 Volume 13，Elsevier Science Publishers，Amsterdam)。

如上所述，制备多克隆和单克隆抗体的方法对本领域普通的技术人员而言是公知的。简言之，多克隆抗体通过对宿主哺乳动物，例如兔，小鼠，大鼠，或山羊，注射存活素蛋白或存活素肽或片段而制备得到。从哺乳动物抽取血清并筛选以得到对所述肽或肽片段特异的多克隆抗体。

用来产生抗体的存活素蛋白，肽，或片段可从其天然来源分离、用重组方法、或用合成方法得到。

为了产生单克隆抗体，哺乳动物宿主用存活素 蛋白或肽接种然后加强免疫。最后一次强化免疫几天后，收集被接种的哺乳动物的脾。将从脾得到的细胞悬浮液与肿瘤细胞融合，所用方法按照 Kohler 和 Milstein 描述的方法(Nature，1975，256:495-497)。为使其有用，肽片段必须包含足够的氨基酸残基以限定被检的存活素分子的表位。

如果片段太短而不具有免疫原性，其可偶联到载体分子上。一些合适的载体分子包括钥孔血蓝蛋白(keyhole limpet hemocyanin)以及牛血清白蛋白。偶联可用本领域公知的方法进行。一种这样的方法是将所述片段的半胱氨酸残基与载体分子的半胱氨酸结合。 肽片段可用本领域公知的方法合成。一些合适的方法描述在 Stuart 和 Young 的"Solid Phase Peptide Synthesis，"Second Edition，Pierce Chemical Company (1984)中。

抗体或片段的纯化可用多种本领域技术人员熟悉的方法来完成，包括，用硫酸铵或硫酸钠沉淀，然后对盐水透析，离子交换色谱，亲和力或免疫亲和力色谱 以及凝胶过滤，区带电泳，等。(Goding in，Monoclonal Antibodies: Principles and Practice，2d ed.，pp. 104-126，Orlando，Fla.，Academic Press)。优选使用纯化的抗体或纯化的具有至少一个存活素结合区部分的抗体片段，包括例如Fv，$F(ab')_2$，Fab片段(Harlow和Lane，1988，Antibody Cold Spring Harbor)来检测癌症病人液体中的存活素，优选膀胱癌病人的尿液。

用于癌症检测和/或监测的时候，纯化的抗体可直接或通过连接臂共价连接到充当报告基团的化合物上，以检测存活素的存在。多种不同类型的物质可作为报告基团，包括但不限于酶，染料，放射活性金属和非金属同位素，发荧光(fluorogenic)化合物，荧光化合物，等。本发明用于检测，监测的抗体(或其片段)的抗体偶联物的制备方法描述在美国专利 4,671,958; 4,741,900 以及 4,867,973 中。

本发明一方面中，优选的结合表位可从已知的存活素基因序列及其编码的核酸序列鉴定出来，并用来产生高亲和力的存活素抗体。而且，存活素上结合表位的确定可用来设计和构建优选的抗体。例如，编码存活素上优选的表位的DNA可以重组的方式表达并可用来选择与所述表位选择性结合的抗体。选择的抗体然后在足以容许抗体与存活素上特异结合表位进行特异结合的条件下，曝露于所述样本，然后检测所形成的复合物的量。人们已经充分了解特定的抗体方法学并在文献中进行了充分的描述。它们的制备的更详细描述可参见，例如，Practical Immunology，Butt，W. R.，编辑，Marcel Dekker，New York，1984。

本发明也包括存活素抗体的检测。存活素为癌症特异性标志物。因此，病人生物液体中存活素抗体的检测也能导致癌症诊断。

存活素结合伴侣

结合存活素的其他分子也可用来检测生物液体中存活素的存在。存活素结合伴侣的实例，除了存活素抗体外，包括但不限于 $p34^{cdc2}$-细胞周期蛋白 B1 激酶和 caspase-9。

核酸

与编码存活素的核酸杂交的核酸，包括天然存在的核酸，寡核苷酸，反义寡核苷酸，以及合成的寡核苷酸，可用来作为检测癌症病人生物液体中存活素存在的试剂，所述生物液体优选为膀胱癌病人的尿液。Ambrosini等(Nat Med，1997，3: 917-921)公开了存活素基因的克隆。用作本发明试剂的核酸和寡核苷酸包括但不限于相应于 Ambrosini 等分离的存活素基因的那些核酸(Nat Med，1997，3:917-921)。本发明包括利用相应于存活素编码序列以及其互补序列的核酸序列，以及编码序列进一步上游或下游方向的存活素转录序列(例如，包含在，或延伸到，5'和 3'非翻译区的序列)的互补序列，来作为癌症病人生物液体中存活素表达的检测试剂，优选生物液体为膀胱癌症病人的尿液。

检测生物液体中存活素存在的优选寡核苷酸是与至少部分编码存活素的 cDNA 序列互补的那些寡核苷酸。所述互补序列为本领域也公知"反义"序列。所述寡核苷酸可为寡核糖核苷酸或寡脱氧核糖核苷酸。此外，寡核苷酸可为天然寡聚物，由生物学上重要的核苷酸组成，即，A(腺嘌呤)，dA(脱氧腺嘌呤)，G(鸟嘌呤)，dG(脱氧鸟嘌呤)，C(胞嘧啶)，dC(脱氧胞嘧啶)，T(胸

腺嘧啶)和 U(尿嘧啶)，或修饰的寡核苷酸，例如，甲基或硫原子取代核苷酸间的磷酸二酯键中磷酸酯氧原子。此外，所述核苷酸自身，和/或其核糖部分可被修饰。

寡核苷酸可用文献上充分描述的任何已知的化学的寡核苷酸合成方法进行化学合成。例如，寡核苷酸可用任何商品化的，自动核酸合成仪制备得到。或者，寡核苷酸可用标准重组 DNA 技术制备，例如，诱导非编码链的转录。编码存活素的 DNA 序列可倒转在重组 DNA 体系中，例如，按照反方向插入合适的启动子的下游，这样可转录出非编码链。

尽管任何长度的寡核苷酸可用来与编码存活素的核酸杂交，通常优选在 8-100 个核苷酸范围内的寡核苷酸。用于尿样本中存活素的检测的最优选寡核苷酸为 15-50 个核苷酸范围内的寡核苷酸。

选来与存活素核酸杂交的寡核苷酸，无论是化学合成的或通过重组 DNA 技术得到的，都随后用标准技术分离和纯化，并优选地用标准标记方法进行标记物(例如，用 ^{35}S 或 ^{32}p)。

本发明也包括利用聚合酶(PCR)中的寡核苷酸对来检测生物液体存活素的表达。寡核苷酸对由存活素引物和反向存活素引物组成。优选的寡核苷酸对为 SEQ ID NO: 1 和 SEQ ID NO:2。更优选地，寡核苷酸对为 SEQ ID NO:3 和 SEQ ID NO:4。

3.检测方法

蛋白结合分析

本领域普通技术人员应该认识到，本发明包括特异地确定和定量癌症病人生物液体中存活素蛋白的任何方法。目前优选的对样本中存活素蛋白进行检测的方法是通过能与标志物蛋白特异性地相互作用的结合蛋白进行的。优选地，可使用标记的抗体，其结合部分，或其他存活素结合伴侣。抗体可为单克隆或多克隆来源，或可为生物合成方法制备的。存活素结合伴侣也可为天然存在的分子或合成产生的分子。复合的存活素蛋白的量，例如，与结合蛋白结合了的存活素蛋白的量，用本领域描述的标准蛋白检测方法测定。免疫分析设计，理论以及方案的详细综述可在本领域的众多文本中见到，包括 Practical Immunology，Butt，编辑，Marcel Dekker，NEW York，1984。

存在多种用标记抗体检测蛋白的分析方法。在 1 步分析法中，存活素分子，如果存在，被固定并与标记抗体孵育。标记抗体结合到固定的靶分子上。洗涤除去未结合的分子后，分析样本判断标记物的存在。

在 2 步分析法中，固定的存活素分子与未标记的抗体孵育。存活素-未标记抗体复合物，如果存在，然后结合到对未标记抗体特异的第二种标记抗体上。洗涤样本并分析标记物的存在。

用来标记抗体的标志物的选择随应用而变。但是，本领域普通的技术人员很易作出标志物的选择。所述标记抗体可用于免疫分析以及组织学应用以检测癌症的存在。标记抗体可为多克隆或单克隆的。在优选的技术方案中，抗体为多克隆兔抗体。

抗体可用放射活性原子，酶，发色或荧光成分，或比色的标记物进行标记。对用来标记的标记物的选择也取决于期望的检测限的要求。酶分析(ELISA)通常允许检测酶-标记的复合物与酶底物相互作用而形成的有色产物。放射活性原子的一些实例包括 ^{32}P，^{125}I，^{3}H，以及 ^{14}P。 酶的一些实例包括辣根过氧化物酶，碱性磷酸酶，β-半乳糖苷酶，以及葡萄糖-6-磷酸酯脱氢酶。发色成分的一些实例包括荧光素和罗丹明。可用本领域公知的方法将所述抗体偶联到所述标记物上。例如，酶和发色分子可用偶联试剂，例如二醛类，碳二亚胺类，二马来酰亚胺类等偶联到抗体上。或者，偶联可通过配体-受体对发生。一些合适的配体-受体对包括，例如，生物素-亲和素或-链亲和素，以及抗体-抗原。

迄今为止公知的最灵敏的标记物为化学发光标记物，其中标记物与反应物相互作用而发光。有用的标记物包括化学发光分子，例如吖啶鎓(acridium)酯类或化学发光酶，其中反应物为酶底物。当，例如，吖啶鎓酯类与碱性过氧化物溶液反应的时候，就发出强光，检测限比其他标记物的检测限增加 100-10,000 倍。并且，反应很迅速。化学发光和免疫分析的详细综述可在 Weeks 等(Methods in Enzymology，1983，133: 366-387)，Kawaguichi 等(Stabilized Phenyl Acridinium Esters For Chemiluminescent Immunoassay --Bioluminescence and Chemiluminescence，Proceedings of 9th International Symposium 1996，Edited by Hastings，Kricka and Stanley，John Wiley & Sons，1997，pp. 480-484)，以及美国专利 5，468，646 中找到。流体分析的其他考虑包括使用微量滴定孔或柱免疫分析。柱分析特别有利，

其中使用快速反应标记物，例如化学发光标记物。标记的复合物可洗脱到柱后检测器中，后者也包含反应物或酶底物，从而使后续形成的产物可以立即得到检测。

一方面，本发明包括使用夹心技术检测检测血清和其他生物液体中的存活素蛋白。如 PCT 公开文本 W093/09437(1993 年 5 月 13 日发表)中所述，该技术需要 2 中能与感兴趣的蛋白结合的抗体：例如，1 种被固定到固相载体上；另一种游离在溶液中，但是用一些容易检测的化合物标记。可用于第二种抗体的化学标记物实例包括但不限于放射同位素，荧光化合物，以及酶或当暴露于反应物或酶底物的时候，产生有色的或电化学活性的产物的其他分子。当包含存活素 蛋白的样本置于这种体系中的时候，存活素蛋白与被固定的抗体和标记抗体都发生结合。结果是在支持物表面上形成"夹心"免疫复合物。洗去未结合的样本成分和过量的标记抗体，并测量复合到在支持物表面上的蛋白上的标记抗体量，从而进行复合蛋白的检测。夹心免疫分析是高度特异的并且非常敏感，条件是使用具有优良检测限的标记物。

本发明也包括同时筛选许多生物液体样本。可用广泛使用并易自动化的常规 96-孔微量滴定方式实现这一目的。也存在数种进行 96 孔板颜色分析的商品化分光仪("读板器")。

优选地，体液样本中存活素的存在用放射免疫分析或酶-联免疫分析，竞争性结合酶-联免疫分析，斑点印迹，Western 印迹，色谱，优选高效液相色谱(HPLC)，或本领域公知的其他分析方法进行检测。

斑点印迹是本领域普通的技术人员用抗体作为探针检测期望的蛋白的常规操作(Promega Protocols and Applications Guide，Second Edition，1991，Page 263，Promega Corporation)。利用斑点印迹仪器将样本转移到膜上。标记探针与膜温育，并检测蛋白的存在。

Western 印迹分析是本领域普通的技术人员公知的方法(Sambrook 等，Molecular Cloning，A Laboratory Manual，1989，Vol. 3，Chapter 18，Cold Spring Harbor Laboratory)。在 Western 印迹中，样本用 SDS-PAGE 分离。凝胶转移到膜上。膜与标记抗体进行孵育以检测期望的蛋白。

上述分析涉及例如但不限于下列步骤：免疫印迹，免疫扩散，免疫电泳，或免疫沉淀。

优选地，存活素用斑点印迹或 Western 印迹检测。更优选地，利用 Bio-Dot 方法和 Bio-Dot SF 摸件进行癌症病人生物液体中的存活素斑点印迹检测。

核酸检测

病人生物液体样本中存活素的存在也可用核酸杂交确定，例如但不限于 Northern 印迹分析，斑点印迹，Southern 印迹分析，荧光原位杂交(FISH)，以及 PCR。色谱，优选 HPLC，以及其他的已知的分析也可用来确定样本中存活素信使 RNA 水平。

存活素 DNA 令人信服地可在研究的生物液体的脱落或释放的存活素-阳性癌细胞中发现。

一方面，本发明包括利用核酸作为试剂，来检测病人生物液体中的存活素，其中核酸进行了标记。核酸试剂可用放射活性标记物，荧光标记物，酶，化学发光标记物，比色的标记物或其他标记物或上述讨论的标记物或本领域公知的标记物进行标记。

另一方面，本发明包括利用 Northern 印迹分析来检测体液样本中存活素 mRNA 的存在。分析的第一步涉及用凝胶电泳分离包含存活素核酸的样品。被分离的核酸然后转移到硝酸纤维素滤膜或其他滤膜上。随后，标记的寡核苷酸在合适的杂交条件下暴露于滤膜，例如在 42℃的 50％甲酰胺，5XSSPE，2XDenhardt 溶液，0.1％SDS 中，如 Molecular Cloning: A Laboratory Manual，Maniatis 等 (1982，CSH Laboratory)中所述。本领域公知的其他方法包括溶液杂交，斑点和狭缝 RNA 杂交，以及基于探针的微阵列。用本领域公知的标准方法测量杂交片段的放射活性可对病人生物液体中存在的存活素核酸量进行定量。

斑点印迹涉及将包含研究的核酸的样本转移到膜上。核酸可在转移到膜之前或之后进行变性。膜与标记探针孵育。斑点印迹对本领域普通的技术人员而言是公知的方法，并在 U.S.4,582,789 和 4,617,261 中进行了更充分的公开，其公开这里引入作为参考。

聚合酶链式反应(PCR)利用聚合引物和试剂来扩增核酸样本中一种或多种特异核酸序列，然后检测扩增的序列。其中一种引物的延伸产物当与另一种杂交时，就成为用于产生所需特异性核酸序列的摸板，反之亦然，

重复该方法，直到产生需要量的序列。本领域普通的技术人员检测期望的序列的存在 (U. S. 4，683，195)，通常使用聚合酶链式反应。

本领域普通的技术人员通常进行用来检测期望序列的 PCR 的一种具体实例是反转录 PCR(RT-PCR; Saiki 等，Science，1985，230: 1350; Scharf 等，Science，1986，233: 1076)。RT-PCR 涉及从生物液体中分离总 RNA，在能识别需要的核酸序列的引物存在的条件下，使该 RNA 变性，利用引物通过反转录产生 RNA 的 cDNA 拷贝，利用特异性的引物通过 PCR 扩增 cDNA，并通过电泳或本领域普通的技术人员知道的其他方法检测扩增的 cDNA。

在优选的技术方案中，检测癌症病人生物液体，优选膀胱癌病人的尿中存活素核酸的方法包括，Northern 印迹分析，斑点印迹，Southern 印迹分析，FISH，以及 PCR。更优选地，检测方法为 RT-PCR 时，使用下列两对引物 ： SEQ ID NO: 1 和 2 以及 SEQ ID NO: 3 和 4。

4.诊断癌症的试剂盒

一方面，本发明包括试剂盒，其包括诊断癌症的必需元件。优选地，试剂盒包括用来收集来自病人的生物液体的容器以及用来检测液体中存活素的存在或其编码核酸的试剂。试剂盒的组成可包装在水性介质中或以冻干形式存在。

可以制备用于诊断或监测癌症的试剂盒，所述试剂盒包含一种或多种检测存活素蛋白的试剂，例如但不限于存活素抗体，其片段，或存活素结合伴侣。试剂可以与用以收集来自病人生物液体的容器包装在一起。当试剂盒中使用以偶联物的形式存在的抗体或结合伴侣的时候，所述偶联物连接有标记物，例如放射活性金属离子或半分子，所述偶联物的成分可以为充分偶联形式，或以中间体形式或以分开的半分子存在，由试剂盒使用者进行偶联。

也可以制备包含一种或多种检测存活素核酸的试剂的试剂盒，存活素核酸例如但不限于全长存活素核酸，存活素寡核苷酸，以及存活素引物对。试剂可与收集来自病人生物液体的容器包装在一起。核酸可以标记形式或待标记形式存在。

试剂盒的其他组成可包括但不限于，收集生物液体的用具(means)，对试剂进行标记的用具，固定生物液体中存活素或存活素核酸的膜，将生物液体转移到膜上的用具，使试剂与病人生物液体中的存活素结合的用具，

第二种抗体，从病人生物液体分离总 RNA 的用具，进行凝胶电泳的用具，从分离的总 RNA 产生 cDNA 的方法，进行杂交分析的用具，以及进行 PCR 的用具，等。

5.本发明分析以及试剂盒的应用

本发明所述的分析或方法以及试剂盒有用于诊断，预后，以及监测病人的癌症。本发明一方面，病人生物液体存活素的存在表明病人患有癌症。所述癌症可为新发癌或复发癌。文中术语"复发癌"指治疗后复发的癌症(复发的)。文中术语"新发癌"指新发展的癌症。

存活素可在表达以及分泌，释放，或于体液中发现存活素的任何癌症的生物液体中检测到。存活素在肺脏，结肠，胰腺，乳腺，前列腺癌(Ambrosini 等，Nat. Med.，1997，3: 917-21)，膀胱(Swana 等，N. Engl. J. Med.，1999，341: 452-53)，以及非何杰金氏淋巴瘤中表达。存活素在成神经细胞瘤，乳腺癌，肺癌膀胱癌以及结肠直肠癌中的表达与不利的疾病状况相关并缩短生存期(Adida 等，Lancet，1998，351:882-83；Islam 等，Oncogene，2000，19: 617-23；Tanaka 等，Clin. Cancer Res.，2000，6: 127-34；Monzo 等，J. Clin. Oncol.，1999，17: 2100-04; Kawasaki 等，Cancer Res.，1998，58: 5071-74; Swana 等，N. Engl. J. Med.，1999，341: 452-53)。

存活素在肿瘤的进程中由脱落的癌细胞释放到细胞外环境中。相应地，来自病人的任何生物液体可用来分析存活素的存在。优选地，可以收集来自病人的体液例如前列腺液、精液、全血、血清、尿、乳腺活组织检查液、胃肠液、以及阴道液并筛选存活素的存在。

在优选的技术方案中，本发明的方法和试剂盒通过检测病人生物液体中的存活素，可用来诊断泌尿生殖道癌，包括膀胱癌，前列腺癌，以及肾癌。更优选地，本发明的方法和试剂盒通过检测病人尿样本中存活素的存在，可用来诊断膀胱癌。病人尿样本中的存活素的存在表明病人患有膀胱癌。

另一方面，本发明的方法和试剂盒可用来定量病人生物液体中的存活素的量。病人生物液体中的存活素量可用于癌症分级。病人生物液体中的高水平的存活素可能表明所述癌有高的分级。或者，本发明的方法和试剂盒可用来确定病人癌症分期。CIS 期的癌与非侵袭性乳突状癌时期的癌症相比，具有较高水平的存活素。

文中术语"乳突状癌"指恶性肿瘤，特征在于形成了许多，不规则的，纤维性基质指状突起，并且表层为肿瘤上皮细胞所覆盖。

文中术语"癌原位(CIS)"与上皮内癌同义。当该术语用来表示膀胱癌时，指膀胱内层(移行上皮细胞)内的扁平癌。

此外，对病人生物液体中存活素的定量可用来监测病人体内癌症进程并判断癌症病人的预后。例如，测量一段时间的存活素量可以提供有关癌症生长速度的信息。

尿中存活素可用来作为监测病人的快速及便宜方法。尿中存活素的检测结合一整套尿标志物，可以提高早期复发检测的敏感度和特异性。

可以预期，当病人的生物液体检测出存活素阳性后，需要利用更具侵入性及更昂贵的方法，例如膀胱镜进行检测。

按照前述一般性的讨论，下面提供的特定实施例只是说明性的，并不用来限制本发明的发明范围。其他一般性的和具体的情况对本领域普通的技术人员而言是显而易见的。

实施例

材料与方法

尿样：在 Yale-New Haven Hospital 的泌尿门诊以及 New England Health Care Systems，West Haven，康涅狄格分部退役军人管理局收集到 158 份尿样。从分类成 5 个不同组的个体中获得随机的干净尿样或直接通过导管得到的尿样。组 1，正常健康志愿者，平均年龄 47.6±20.8 岁，未用药(n=17)。组 2，病人，平均年龄 60.0±18.1 岁，诊断患有非恶性尿道疾病或血尿(n=30)。组 3，病人，平均年龄 71.5±9.9 岁，诊断患有泌尿生殖癌，膀胱癌除外(n=30)。组 4，病人，平均年龄 69.7±8.7 岁，诊断患有新发或复发膀胱癌(n=46)。组 5，平均年龄 76.1±8.9 岁的正在接受治疗或已经接受治疗的膀胱癌的病人，并且在收集尿的当天细胞学镜检为阴性(n=35)。

组 5 中的治疗措施包括膀胱内卡介内(BCG)，噻替哌，经尿道切除术，部分膀胱切除术以及辐照。组 4 包括那些收集尿后接受类似的治疗措施和/或抢救性膀胱切除术或完全膀胱切除术的病人。

统计分析：尿存活素和病人诊断之间的关系用 Chi 平方检验进行分析。用 Yale-New Haven Hospital 的分级分类系统，通过非参数统计分析来进行加权尿存活素评分值的比较。

实施例 1

用 Bio-Dot SF 模件检测尿中存活素

用提供 48-孔狭槽形式的模件中的微孔过滤装置将尿样过滤到硝酸纤维素膜上。使用多克隆抗体分析该印迹中存活素的存在。方案如下:收集尿并保存-80℃直至分析。在分析的当天，尿样在 20，000 x g 离心 20 分钟。同时 Bio-Dot 微孔过滤装置装配上 0.2 μm 硝酸纤维素膜 (BioRad Laboratories，Hercules，CA)，并用 20 mM Tris-缓冲盐 (pH 7.5)润湿。然后，尿样上清液(300 μl)与作为标准的渐增浓度的大肠(杆)菌表达型重组存活素(Li 等，Nature，1998，396:580-84)(0.001-1.0llg/ml)溶解在 300μl 的 TBS 中，并过滤到膜上。过滤后，干燥膜，在 5％Blotto 和 0.01％叠氮钠的 PBS(pH7.4)中 4℃封闭 12 小时。用 PBS-Tween20 (0.25％)清洗后，膜与 2μg/ml 的兔抗存活素抗体 22℃孵育(Grossman 等，J. Invest. Dermatol.，1999，113: 1076-81.)3 小时，用 PBS-Tween 清洗，与 1:1000 稀释的辣根过氧化物酶-偶联驴抗兔 IgG(Amersham Biotech，Piscataway NJ) 22℃孵育 1 小时。PBS x 2 清洗 10 分钟，PBS-Tween x 2 清洗 5 分钟，再 PBS x 2 清洗 5 分钟，第一抗体的结合可以用增强化学发光(Amersham)和放射自显影检测。条带用密度测定法进行定量，根据抗体随重组存活素的浓度递增的反应性计算存活素加权评分，如下：0=未检测到；1=0.001-0.25μg/ml；2=0.25-1μg/ml；3=>1μg/ml。每份尿样在两种不同的场合下至少分析两次，得到可以比较的结果。

实施例 2

Western 印迹

尿样(100ml)在 1，200 x g 22℃离心 10 分钟，细胞沉淀用 TBS 洗两次，在蛋白酶抑制剂存在的条件下 4℃在 0.5％TritonX-100 中溶解 30 分钟。样本用 SDS 凝胶电泳分离，转移到尼龙膜(Millipore，Corp.)上，并进一步用 1μg/l 抗存活素的抗体(Grossman 等，J. Invest. Dermatol.，1999，113:1076-81)孵育，然后用辣根过氧化物酶(HRP)-偶联的山羊抗兔 IgG 孵育，然后检测化学发光。

实施例 3

RT-PCR

从 15 例新发或复发泌尿道上皮癌病人，2 例已经治疗的膀胱癌病人，1 例前列腺癌病人，1 例非肿恶性尿道疾病病人和 1 例健康志愿者中获取 50ml

干净尿样。用 Trizol 试剂 (Life Technologies，Inc.，Gaithersburg，MD，USA)从尿沉淀中分离出总 RNA。1-5μg 总 RNA 用 1μl 的 Superscript 反转录酶(Gibco BRL，LifeTechnologies，Inc.，Gaithersburg，MD，USA)以随机引发的方式在 43℃温育 1h 合成单链 cDNA。70 ℃加热 15 分钟后，用存活素 引物进行第一次扩增：5'- CTGCCTGGCAGCCCTTTCTCAA-3' (正向；SEQ ID NO: 1)以及 5'AATAAACCCTGGAAGTGGTGCA-3' (反向；SEQ ID NO: 2)，94℃变性 15 秒，53℃退火 15 秒，72℃延伸 1 分钟，进行 20 个循环，然后 72℃温育 5 分钟。 463 个碱基对(bp)的存活素 cDNA 片段然后用嵌套存活素引物进行第二轮扩增：5'-CCGCATCTCTACATTCAAGAAC-3'(正向；SEQ ID NO: 3)和 5'CTTGGCTCTTTCTCTGTCC-3'(反向；SEQ ID NO: 4)，94℃变性 30 秒，60℃退火 30 秒，72℃延伸 45 秒，进行 30 个循环，然后 72℃温育 5 分钟。扩增的 279bp 的存活素 cDNA 用 2.0％琼脂糖凝胶进行分离并用溴乙锭染色而显现。对照反应用 β-肌动蛋白特异性引物进行扩增：5'-AGCGGGAAATCGTGCGTG-3' (正向；SEQ ID NO: 5)以及 5'CAGGGTACATGGTGGTGCC-3' (反向；SEQ ID NO: 6)，得到 309bp 的片段。

结果

用 Bio-Dot 检测法检测尿中存活素的代表性实验见图 1。用 Bio-Dot 方法对本研究中收集的 158 份样本中的 138 份进行了尿 存活素的测定(表 1)。另外对 20 份尿样用 RT-PCR 分析存活素表达，以独立地评价 Bio-Dot 方法的特异性。在下列研究对象中未检测出存活素：正常志愿者的尿(0/16)，或良性前列腺增生病人(0/6)，间质性膀胱炎病人(0/2)，肾结石病人(0/3)，尿道感染病人(0/6)，或患其他的非恶性尿道疾病的病人(0/6)(表 1)。在 5 例隐发性血尿病人(加权存活素评分，2)中 3 例检测出尿存活素，他们都有尿潴留和经尿道前列腺切除术后排尿困难的病史，膀胱镜检查发现有小梁的不规则的增厚膀胱。1 例有升高的 PSA 水平但无前列腺癌诊断的病人，尿存活素为阳性(表 1)。该病人膀胱镜检查也发现有小梁的不规则的增厚膀胱。在患下列疾病的病人的尿样中未检测出存活素：前列腺癌(0/19)，肾癌(0/8)，阴道癌(0/1)，或宫颈癌(0/1)(表 1)。与此形成鲜明对照的是，在所有的新发或复发膀胱癌病人中检测到尿存活素(31/31)(表 1)。用 Bio-Dot SF 分析了尿存活素的组 4 中 31 例病人进行了组织病理学分级(I 级-IV 级)，包括 13 例病

人为 II 级，7 例病人为 III 级，5 例病人为 IV 级的肿瘤。在 5 例病人中发现原位癌(CIS)合并乳突状和侵入性癌，在 1 例病人中发现原位癌合并高分级的输尿管的泌尿道上皮癌。

表 1.用 Bio-Dot SF 模件检测 138 例尿样本中的存活素的结果

尿样本	(n)	存活素-阴性	存活素-阳性
组 1(对照健康志愿者)	16	16	0
组 2(非肿瘤性尿道疾病)	29		
血尿	5	2	3
UTI	6	6	0
BPH	6	6	0
上升 PSA	1	0	1
间质性膀胱炎	2	2	0
肾结石	3	3	0
其他†	6	6	0
组 3(除膀胱癌外的泌尿生殖癌)	29		
前列腺癌			
肾癌	19	19	0
阴道癌	8	8	0
宫颈癌	1	1	0
组 4(新发或复发膀胱癌)	1	1	0
组 5(经治疗的膀胱癌¶)	31 §	0	31
	33	30	3‡

UTI，尿道感染；BPH，良性前列腺增生；PSA，前列腺特异抗原。† 包括乳突状坏死病人(n=1)，前列腺炎病人(n=2)，膀胱输尿管反流病人(n=1)，以及肌酐水平不断升高的肾移植病人(n=2)。§ 包括 1 例患输尿管泌尿道上皮癌的病人。¶膀胱镜检查正常。‡ 所述病人中的 2 人接受了膀胱癌的经尿道切除术治疗，1 人接受电灼疗法。1 例病人尿细胞学检查为膀胱癌阳性。

用 Bio-Dot SF 分析，组 5 中 33 个病人中的 30 个没有检测出尿存活素(表 1)。所述 30 个病人中的 5 人接受了 BCG 并且已经完成了 3-5 疗程，其他的 25 人为治疗后膀胱镜检查阴性的状态。组 5 中最初诊断有 GII 非侵袭性膀胱癌的 3 个病人，进行被动膀胱镜检查后，尿存活素检测呈阳性。3 例病人

中 1 人尿细胞学检查为膀胱癌阳性。3 个病人中的 2 人接受了经尿道切除膀胱癌的治疗，并且 1 人接受电灼疗法治疗。

对加权存活素评分标准化后，患 CIS 的病人的存活素评分(2.5....0.5，n=6)比 II 级膀胱癌病人(1.3....0.6，n=13)高得多。加权存活素评分与多个膀胱癌病例的组织病理学或分级之间的关联度分别见表 2 和 3。

表 2.加权尿存活素评分和膀胱癌组织病理学之间的相关性

组织病理学	所测病例	平均存活素评分
ND	3	1.7±1.2
非侵袭性乳突状癌	4	1±0
未侵入逼尿肌	12	1.6±0.8
侵入肌肉	6	1.7±0.8
CIS	6	2.5±0.5†

表 3.加权尿存活素评分与膀胱癌分级之间的相关性

分级	检测病例	平均存活素评分
分级 II	13	1.3±0.6
分级 III	7	1.5±0.8
分级 IV	5	2±1
分级 IV	1	3*

加权存活素评分用重组存活素浓度递增的标准曲线计算出来如下:0，未检测出；1，0.001-0.25μg/ml；2，0.25-1μg/ml；以及 3，>1μg/ml。*6 个 CIS 病人中的 1 人患输尿管泌尿道上皮癌(分级 IV；存活素评分，3)。组织病理学分析用对乳突状移行上皮细胞肿瘤进行分类的 Broader 氏细胞学分级体系(分级 I-IV)进行。ND，未测定。CIS，原位癌。† 与分级 II 或非侵袭性乳突状癌相比，差异显著($p<0.02$)。

通过 Western 印迹，16.5kDa 的存活素单带在膀胱癌病人的尿细胞团中检测出，在来自健康志愿者的尿细胞团中却未检测出(图 2)。

为了独立地评价用 Bio-Dot 方法得到的结果，另外 15 个新发或复发膀胱癌病人用 RT-PCR 分析尿存活素 。从所有 15 例新发膀胱癌病人 (15/15) 的尿细胞团中扩增出 279 bp 的存活素 cDNA (图 3，数据未显示)。与此相反，从另外 5 例个体的尿细胞团中没有检测出存活素 cDNA，这 5 例中 1 例患尿道感染，2 例为已经治疗的膀胱癌并且膀胱镜检查为阴性，1 例患前

列腺癌，1 例来自正常志愿者(图 3)。在对照实验中，从对照和膀胱癌病人尿中都扩增出 309 bp 的β-肌动蛋白 cDNA 片段(图 3)。用 RT-PCR 分析的膀胱癌的组织病理学病例包括 5 个 II 级癌症病人，1 个 III 级癌症病人，6 个 IV 级癌症病人和 3 个 CIS 病人。所述实验表明：在肿瘤进程中，脱落的癌细胞被动地将存活素释放到细胞外环境，即尿中。

在这里检查的病人中，尿存活素检测对新发或复发膀胱癌病人的敏感度为 100％，并且其对其他肿瘤性和非肿瘤性泌尿生殖疾病的特异性为 95％($p<0.02$)。由于其高特异性，尿存活素检测可用来作为细胞学和/或其他诊断性标志物的补充(Ramakumar 等，J. Urol.，1999，161:388-94 ；Lokeshwar 等，J. Urol.，2000，163: 348-56)，以更好监测膀胱癌症病人并识别出早期复发或再发(de novo)癌症。利用目前商业供应的抗存活素单个抗体的 1 步检测法进行尿存活素检测的其他可能优势包括其简单性，适于作为对点服务(point-of-service)，以及其廉价。

实施例 4

病人血清中存活素的检测

从膀胱癌和前列腺癌的病人中收集血样。分离血清并通过实施例 1 中描述的斑点印迹方法检测存活素的存在。检测膀胱癌和前列腺癌病人血清中的存活素。将递增浓度的重组存活素 g(μg/ml)(左和右列)，尿或血清样本加载到狭槽-印迹装置中。膜与抗存活素抗体、随后与 HRP-偶联山羊抗兔 IgG 孵育。条带用化学发光显色。

癌症病人血清中存活素的检测表明，存活素可用作其他癌症检测的标志物。血清中存活素的存在的检测可用于 癌症复发的筛选和检测。

应该理解前述讨论和实施例只是为了提供某种优选的技术方案的详细描述。下列事实对本领域的普通技术人员而言是显而易见的：可以进行多种不偏离本发明精神和范围的修改。在本专利申请中出现的所有的期刊文章，其他参考文献，专利，以及专利申请全部引入作为参考。

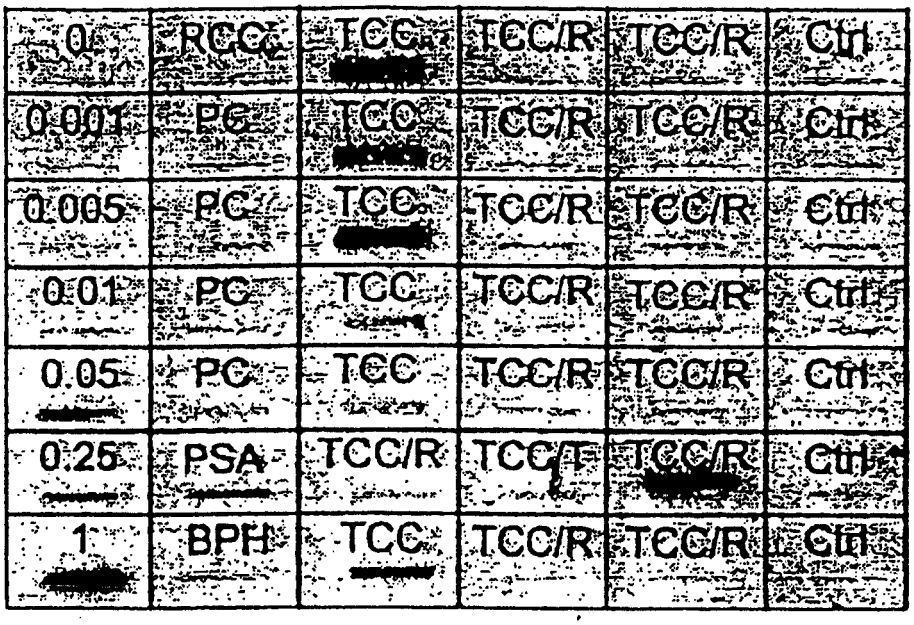

0
RCC
TCC
TCC/R
TCC/R
Ctrl
0.001
PC
TCC
TCC/R
TCC/R
Ctrl
0.005
PC
TCC
TCC/R
TCC/R
Ctrl
0.01
PC
TCC
TCC/R
TCC/R
Ctrl
0.05
PC
TCC
TCC/R
TCC/R
Ctrl
0.25
PSA
TCC/R
TCC/T
TCC/R
Ctrl
1
BPH
TCC
TCC/R
TCC/R
Ctrl

图 1

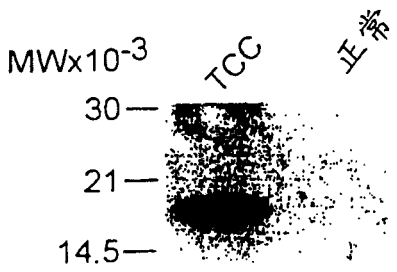


图 2

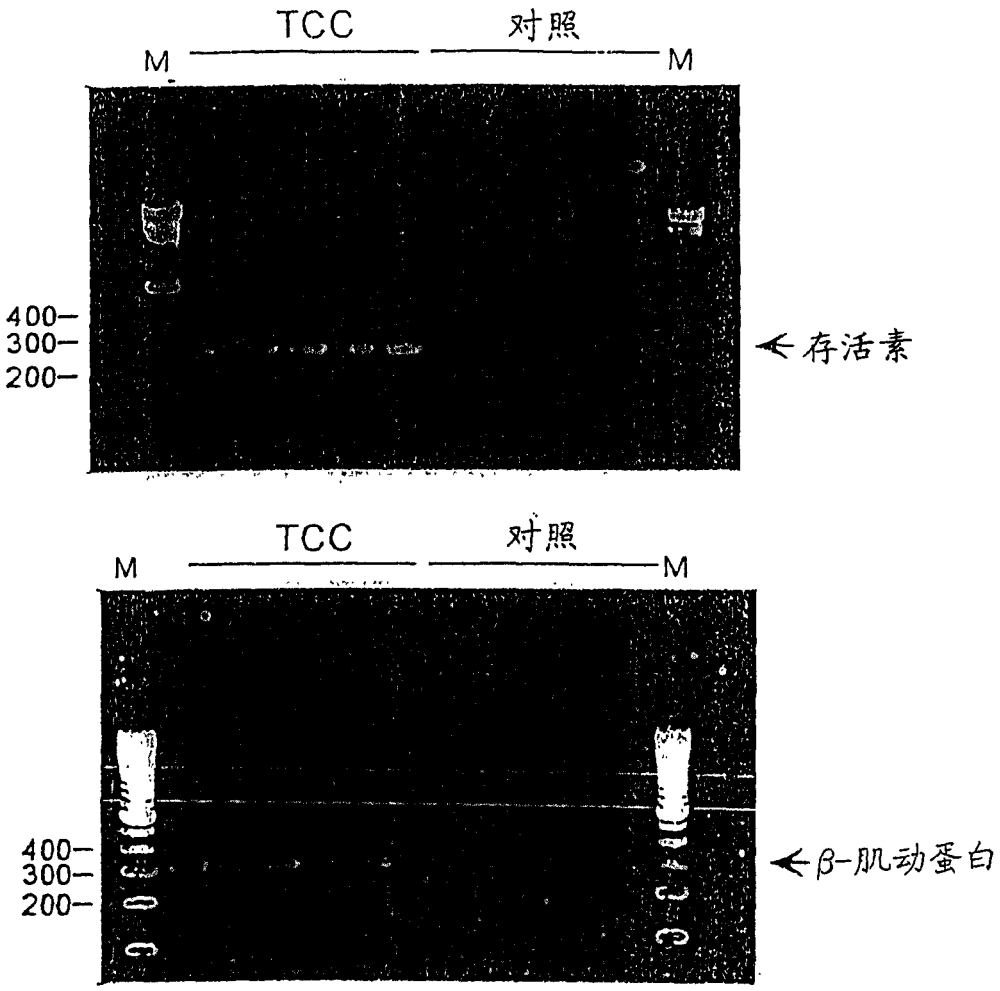
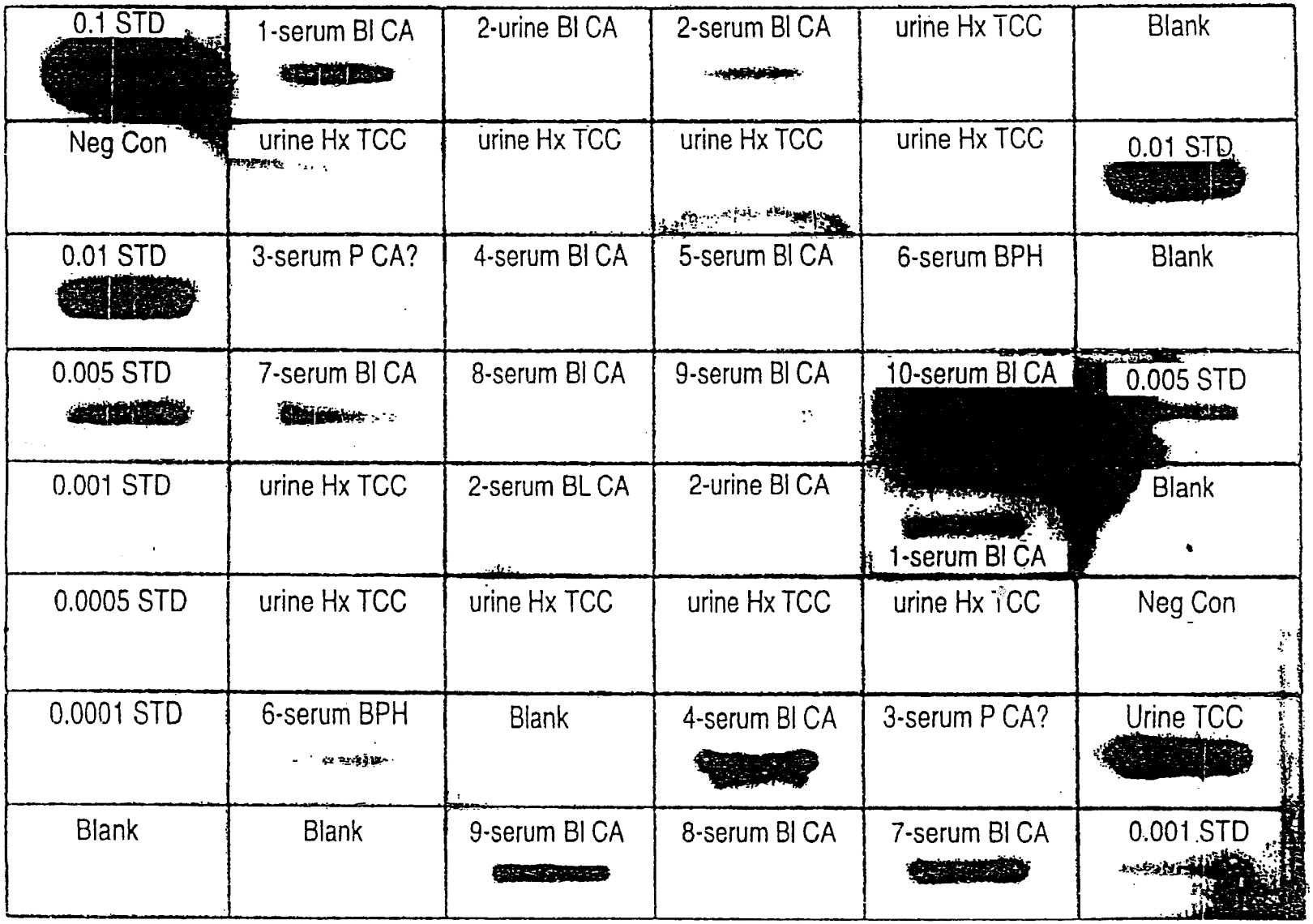
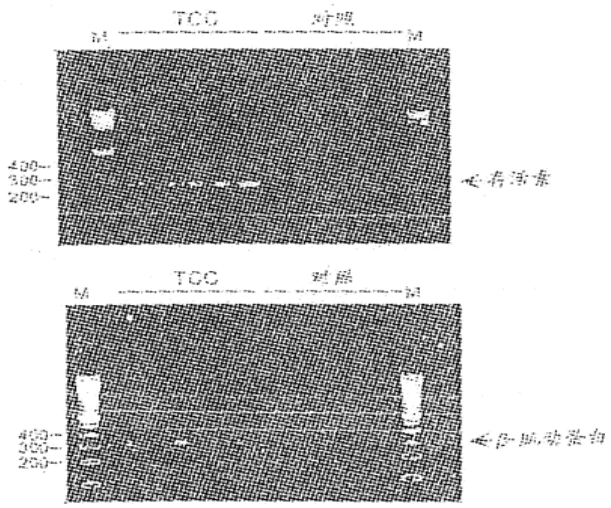


图 3

图 4


0.1 STD
1-serum Bl CA
2-urine Bl CA
2-serum Bl CA
urine Hx TCC
Blank
Neg Con
urine Hx TCC
urine Hx TCC
urine Hx TCC
urine Hx TCC
0.01 STD
0.01 STD
3-serum P CA?
4-serum Bl CA
5-serum Bl CA
6-serum BPH
Blank
0.005 STD
7-serum Bl CA
8-serum Bl CA
9-serum Bl CA
10-serum Bl CA
0.005 STD
0.001 STD
urine Hx TCC
2-serum BL CA
2-urine Bl CA
Blank
1-serum Bl CA
0.0005 STD
urine Hx TCC
urine Hx TCC
urine Hx TCC
urine Hx TCC
Neg Con
0.0001 STD
6-serum BPH
Blank
4-serum Bl CA
3-serum P CA?
Urine TCC
Blank
Blank
9-serum Bl CA
8-serum Bl CA
7-serum Bl CA
0.001 STD

专利名称(译)	癌症病人的生物液体中存活素的检测		
公开(公告)号	CN1636139A	公开(公告)日	2005-07-06
申请号	CN02806510.7	申请日	2002-01-11
[标]申请(专利权)人(译)	耶鲁大学		
申请(专利权)人(译)	耶鲁大学		
[标]发明人	达里奥C阿尔蒂里 罗伯特 B 韦斯 香农 D 史密斯 马西娅 A 惠勒 珍妮特普莱西亚		
发明人	达里奥·C·阿尔蒂里 罗伯特·B·韦斯 香农·D·史密斯 马西娅·A·惠勒 珍妮特·普莱西亚		
IPC分类号	C07K14/47 C12Q1/68 G01N21/78 G01N33/53 G01N33/574		
CPC分类号	G01N33/57488 C07K14/4747 G01N33/57407 G01N33/57434 G01N2333/47 Y10S435/81		
优先权	60/260898 2001-01-12 US		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明包括诊断癌症的一种方法，该方法包括检测病人的生物液体中存活素的存在。本发明也提供试剂盒，其包括一种或更多的检测存活素多肽或存活素核酸的试剂和一个收集用于检测的生物液体的容器。