

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200680019230.6

[51] Int. Cl.
G01N 33/569 (2006.01)
G01N 33/53 (2006.01)

[43] 公开日 2008 年 6 月 18 日

[11] 公开号 CN 101203759A

[22] 申请日 2006.3.30
[21] 申请号 200680019230.6
[30] 优先权
[32] 2005. 3.30 [33] US [31] 60/666,430
[86] 国际申请 PCT/US2006/011376 2006.3.30
[87] 国际公布 WO2006/105141 英 2006.10.5
[85] 进入国家阶段日期 2007.11.30
[71] 申请人 普渡研究基金会
地址 美国印第安纳州
共同申请人 恩多塞特公司
梅奥医学教育和研究基金会
[72] 发明人 P·S·罗 L·C·哈特曼
C·P·利蒙 P·R·埃利斯

[74] 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司
代理人 刘 健 梁 谋

权利要求书 3 页 说明书 31 页 附图 7 页

[54] 发明名称

使用细胞叶酸维生素受体定量法而用于癌症
预后的方法

[57] 摘要

本发明通过定量测定维生素受体在癌细胞上的表达, 涉及确定癌症预后的方法。该方法的步骤包括定量测定维生素受体在癌细胞中的表达, 和确定癌症预后。本发明还涉及用于测定癌细胞上的维生素受体存在的方法和试剂盒, 以筛选应当通过利用维生素受体靶向术的疗法进行治疗的病人, 和研制适于所述患者的治疗方案。本发明还涉及用于实施该方法的试剂盒。

1. 一种通过定量测定维生素受体在癌细胞上的表达而用于确定癌症预后的方法，该方法包括以下步骤：

体外定量测定维生素受体在癌细胞上的表达，和
确定癌症预后。

2. 权利要求1中所述的方法，其中维生素受体是叶酸受体。

3. 权利要求1中所述的方法，其中癌细胞是乳腺癌细胞。

4. 权利要求2中所述的方法，其中乳腺癌包括淋巴结阴性疾病。

5. 权利要求1中所述的方法，其中癌细胞选自卵巢癌细胞、子宫癌细胞、子宫内膜癌细胞、结肠直肠癌细胞、脑癌细胞、肾癌细胞、黑素瘤细胞、多发性骨髓瘤细胞、淋巴瘤细胞以及肺癌细胞。

6. 权利要求1中所述的方法，其中定量测定步骤包括使用抗体进行免疫组化染色。

7. 权利要求6中所述的方法，其中抗体是多克隆抗体。

8. 权利要求6中所述的方法，其中抗体是单克隆抗体。

9. 权利要求1中所述的方法，其中所述方法还包括确定癌症治疗方案的步骤。

10. 一种用于确定癌症预后的免疫组化方法，该方法包括以下步骤：

将癌细胞与靶向维生素受体的抗体进行体外接触，
定量测定维生素受体在癌细胞上的表达，和
确定癌症预后。

11. 权利要求10中所述的免疫组化分析方法，其中维生素受体是叶酸受体。

12. 权利要求10中所述的免疫组化分析方法，其中癌细胞是乳腺癌细胞。

13. 权利要求12中所述的免疫组化分析方法，其中乳腺癌包括淋巴结阴性疾病。

14. 权利要求10中所述的免疫组化分析方法，其中癌细胞选自卵巢癌细胞、子宫癌细胞、子宫内膜癌细胞、结肠直肠癌细胞、脑癌细胞、肾癌细胞、黑素瘤细胞、多发性骨髓瘤细胞、淋巴瘤细胞以及肺癌细胞。

15. 权利要求10中所述的免疫组化分析方法，其中抗体是多克隆抗

体。

16. 权利要求 10 中所述的免疫组化分析方法, 其中抗体是单克隆抗体。

17. 一种用于确定维生素受体在癌细胞上的存在, 以筛选应当通过利用维生素受体靶向术的疗法进行治疗的患者的方法, 该方法包括以下步骤:

将癌细胞与靶向维生素受体的抗体进行体外接触,
定量测定维生素受体在癌细胞上的表达, 和
筛选通过利用维生素受体靶向术的疗法进行治疗的患者。

18. 权利要求 17 中所述的方法, 其中维生素受体是叶酸受体。

19. 权利要求 17 中所述的方法, 其中癌细胞是乳腺癌细胞。

20. 权利要求 19 中所述的方法, 其中乳腺癌包括淋巴结阴性疾病。

21. 权利要求 17 中所述的方法, 其中癌细胞选自卵巢癌细胞、子宫癌细胞、子宫内膜癌细胞、结肠直肠癌细胞、脑癌细胞、肾癌细胞、黑色素瘤细胞、多发性骨髓瘤细胞、淋巴瘤细胞以及肺癌细胞。

22. 包含校准显微照片的试剂盒, 其中校准显微照片来自用维生素受体的抗体染色过的癌组织。

23. 权利要求 22 中所述的试剂盒, 其中所述试剂盒还包含维生素受体的抗体。

24. 权利要求 22 中所述的试剂盒, 其中所述试剂盒还包含用于免疫组化染色的试剂。

25. 权利要求 23 中所述的试剂盒, 其中所述试剂盒还包含用于免疫组化染色的试剂。

26. 权利要求 22 中所述的试剂盒, 其中所述试剂盒还包含有关使用校准显微照片的说明书。

27. 权利要求 23 中所述的试剂盒, 其中所述试剂盒还包含有关使用校准显微照片的说明书。

28. 权利要求 24 中所述的试剂盒, 其中所述试剂盒还包含有关使用校准显微照片的说明书。

29. 权利要求 25 中所述的试剂盒, 其中所述试剂盒还包含有关使用校准显微照片的说明书。

30. 权利要求 23 中所述的试剂盒, 其中抗体是多克隆抗体。

31. 权利要求 23 中所述的试剂盒，其中抗体是单克隆抗体。

32. 权利要求 22 中所述的试剂盒，其中校准显微照片具有与癌症预后相关的染色强度。

33. 权利要求 22 中所述的试剂盒，其中校准显微照片具有与患者对维生素靶向治疗的反应相关的染色强度。

34. 一种确定适于所筛选的癌症患者的治疗方案的方法，所述筛选是筛选通过利用维生素受体靶向术的疗法进行治疗的患者，其中该方法包括以下步骤：

将来自患者的癌细胞与靶向维生素受体的抗体进行体外接触，
定量测定维生素受体在癌细胞上的表达，和
确定适于癌症患者的治疗方案。

35. 权利要求 34 中所述的方法，其中维生素受体是叶酸受体。

36. 权利要求 34 中所述的方法，其中癌细胞是乳腺癌细胞。

37. 权利要求 36 中所述的方法，其中乳腺癌包括淋巴结阴性疾病。

38. 权利要求 34 所述的方法，其中癌症选自卵巢癌、子宫癌、子宫内膜癌、结肠直肠癌、脑癌、肾癌、黑素瘤、多发性骨髓瘤、淋巴瘤和肺癌。

使用细胞叶酸维生素受体定量法而用于癌症预后的方法

相关申请的参照

根据 35 U.S.C. § 119(e), 本申请要求 2005 年 3 月 30 日提交的美国临时申请序列号 60/666,430 的优先权, 并在此通过引用作为参考。

发明领域

本发明涉及通过定量确定维生素受体在癌细胞中表达的水平来用于获得癌症预后的方法和试剂盒, 并涉及指导控制或研制用于癌症的有效疗法。本发明还涉及用于测定癌细胞上维生素受体存在的方法和试剂盒, 以筛选应当通过利用维生素受体靶向术的疗法进行治疗的患者。

背景和概要

癌症的有效治疗方案常常取决于获得可靠预测癌症的能力, 因此可研制适于患者的最有效治疗方案。临床上重要的优先顺序在于提高预测癌症的能力和研制基于分子的治疗法, 以改进对患者的管理和治疗。在确定最适治疗方案中, 关键在于对确诊患有癌症的患者属于预测组进行确定, 因此这决定了患者的存活率。

例如在北美洲中, 乳腺癌是最常见的确诊危急生命的恶性肿瘤。在美国, 乳腺癌是 30-50 岁女性死亡的主要原因, 并且美国每年有出现超过 200,000 个新病例。尽管还在使用肿瘤分级(Tumor grade)、核分级(nuclear grade)、组织类型、DNA 倍数性以及激素受体状态, 但肿瘤大小和淋巴节状况(nodal status)仍然是预测结果的最可靠方法。仅仅已经鉴定了几种乳腺癌的肿瘤标记物, 并且那些标记中的多数不足以可靠来用于预测分析中。因此, 迫切需要适于乳腺癌和其它癌症的更好的预测分析法。

此外, 筛选应当通过特殊疗法进行治疗的患者, 可取决于检测肿瘤表面上的肿瘤标记物的存在的能力, 因此可测定靶向肿瘤标记物的疗法是否是保险的。例如, 在约 25%的乳腺癌症患者中发生人表皮生长因子受体 2(HER2)的过表达。已经研制了针对 HER2 蛋白的单克隆抗体 Herceptin®(Genentech, Inc., San Francisco, CA), 以作为乳腺癌疗法。然

而，并不将 Herceptin®施用于乳腺癌症患者，直到确定了乳腺癌患者的 HER2 状态为止。如果乳腺癌患者是 HER2 阳性，那么许可进行 Herceptin®治疗。

维生素受体在癌细胞中是过表达的。例如，高亲合性叶酸受体被鉴定为胎盘和滋养层细胞中的抗原所决定的单克隆抗体的膜相关糖蛋白。高亲合性叶酸受体在最普通细胞中是很少表达的，或是无法检测的。然而，它在上皮细胞源的癌中是过表达的或优先表达的，也许这提供了适于这些恶性细胞的生长优势。在>90%的卵巢癌中，可检测到叶酸受体的高水平表达，但在子宫内膜癌、乳腺癌、肾癌、肺癌、脑癌、子宫癌、胰腺癌、膀胱癌、睾丸癌和结肠直肠癌、淋巴瘤及其它头颈癌中，检测到叶酸受体表达的较低阳性度。

例如，根据所用的技术和所分析的组织，通过研究叶酸受体在乳腺癌中的表达，已经获得了不同的结果。Ross 等人测量了叶酸受体 mRNA，发现与正常乳房样本相比，5 种癌中的叶酸受体的 mRNA 水平提高。然而，提高程度比在卵巢癌中所观察到的水平低了约十倍(Ross 等, *Cancer* 73:2432-2443(1994))。Garin-Chesa 等人使用小鼠单克隆抗体 LK26，以评价叶酸受体在各种新冻癌中的表达。研究了其中 53 个乳腺癌，两个显示同质的 LK26 染色，另九个癌显示脂肪染色(Garin- Chesa 等, *Am. J. Pathol.* 142(2): 557-67 (1993))。

申请人已经研究了维生素受体在癌细胞中的过表达的用途，以分析用于获得癌症的预测法和用于指导控制或研制适于患者的有效疗法。该方法利用确定维生素受体在癌细胞中的过表达量。申请人还研究了确定癌细胞中维生素受体存在的方法的用途，以筛选应当通过利用维生素受体靶向术的疗法进行治疗的患者。

在本发明的一个例证性实施方案中，通过定量测定维生素受体在癌细胞中的表达，提供了确定癌症预后的方法。该方法的步骤包括定量测定维生素受体在癌细胞中的表达，和确定癌症预后。在另一个例证性实施方案中，维生素受体是叶酸受体。在另一个实施方案中，癌细胞是乳腺癌细胞，或者癌细胞选自卵巢癌细胞、子宫癌细胞、子宫内膜癌细胞、结肠直肠癌细胞、脑癌细胞、肾癌细胞、淋巴瘤细胞以及肺癌细胞。在癌细胞是乳腺癌细胞的实施方案中，乳腺癌包括淋巴结(node)阴性疾病，但本发明不限于淋巴结阴性疾病。该方法的步骤还包括确定适于癌

的治疗方案。

在另一个例证性实施方案中，定量测定的步骤包括使用抗体，进行免疫组化染色。在该实施方案中，抗体是多克隆抗体或其混合物，或者是单克隆抗体或其混合物，或者是多克隆抗体和单克隆抗体的组合。可替代的或另外的，定量测定的步骤包括使用应用了放射性标记配体的放射受体分析，进行原位杂交或受体定量。

在本发明的另一个例证性实施方案中，提供了确定癌症预后的免疫组化方法。该方法的步骤包括将癌细胞接触靶向维生素受体的抗体、定量测定维生素受体在癌细胞中的表达，和确定癌症预后。在一个例证性实施方案中，维生素受体是叶酸受体。在另一个实施方案中，癌细胞是乳腺癌细胞。在该实施方案中，乳腺癌是淋巴结阴性疾病，但本发明不限于淋巴结阴性疾病。在另一个实施方案中，癌细胞选自卵巢癌细胞、子宫癌细胞、子宫内膜癌细胞、结肠直肠癌细胞、脑癌细胞、肾癌细胞、黑素瘤细胞、多发性骨髓瘤细胞、淋巴瘤细胞以及肺癌细胞。

在其它例证性实施方案中，抗体是多克隆抗体或其混合物，或者是单克隆抗体或其混合物，或者是多克隆抗体和单克隆抗体的组合。

在另一个实施方案中，提供了确定适于所筛选的癌症患者的治疗方案的方法，以通过利用维生素受体靶向的疗法而进行治疗。该方法的步骤包括将来自患者的癌细胞接触靶向维生素受体的抗体、定量测定维生素受体在癌细胞中的表达，和确定适于癌症患者的治疗方案。

在本发明的另一个例证性实施方案中，提供了用于确定癌的预测法的原位杂交法。该方法的步骤包括将癌细胞接触核酸探针、定量测定维生素受体在癌细胞中的表达、以及确定癌症预后，其中核酸探针杂交编码维生素受体的核酸或杂交与维生素受体的编码核酸互补的核酸。

在一个例证性实施方案中，维生素受体是叶酸受体。在另一个实施方案中，癌细胞是乳腺癌细胞。在该实施方案中，乳腺癌包括淋巴结阴性疾病，但本发明不限于淋巴结阴性疾病。在另一实施方案中，癌细胞选自卵巢癌细胞、子宫癌细胞、子宫内膜癌细胞、结肠直肠癌细胞、脑癌细胞、肾癌细胞、黑素瘤细胞、多发性骨髓瘤细胞、淋巴瘤细胞以及肺癌细胞。

在本发明的另一个例证性实施方案中，提供了确定癌症预后的方法。该方法的步骤包括将癌细胞接触结合配体的放射性标记维生素受体

或其类似物、定量测定维生素受体在癌细胞中的数量，和确定癌症预后。

在一个例证性实施方案中，维生素受体是叶酸受体。在另一个例证性实施方案中，癌细胞是乳腺癌细胞。在该实施方案中，乳腺癌包括淋巴结阴性疾病，但本发明不限于淋巴结阴性疾病。在另一实施方案中，癌细胞选自卵巢癌细胞、子宫癌细胞、子宫内膜癌细胞、结肠直肠癌细胞、脑癌细胞、肾癌细胞、黑素瘤细胞、多发性骨髓瘤细胞、淋巴瘤细胞以及肺癌细胞。在另一个例证性实施方案中，放射性标记配体是放射性标记叶酸或其类似物。

在本发明的另一个例证性实施方案中，提供用于实施免疫组化染色分析的试剂盒。试剂盒包括校准显微照片，其中校准显微照片来自用维生素受体抗体染色过的癌组织。在一个例证性实施方案中，试剂盒还包括维生素受体的抗体。在另一个实施方案中，试剂盒还包括用于免疫组化染色的试剂。在另一个实施方案中；试剂盒包括用于校准显微照片和用于实施免疫组化染色分析的说明书。

在本发明的另一实施方案中，提供用于实施原位杂交荧光分析的试剂盒。在该例证性实施方案中，试剂盒包含校准显微照片，其中校准显微照片来自癌组织，而癌组织的核酸已经与荧光标记的核酸探针进行原位杂交。核酸探针杂交编码维生素受体的核酸，或者探针杂交互补于维生素受体的编码核酸的核酸。在另一个实施方案中，试剂盒还包含荧光标记的核酸探针。在另一个实施方案中，试剂盒包含用于原位杂交的试剂。在另一个实施方案中，试剂盒包含用于校准显微照片和用于实施荧光原位杂交分析的说明书。

在另一个例证性实施方案中，提供用于实施维生素受体结合分析的试剂盒。在该例证性实施方案中，试剂盒包含可确定癌细胞上的维生素受体数量范围的校准表，其中该范围与癌的有效结果对比无效结果有关。在另一个例证性实施方案中，试剂盒还包含放射性标记的维生素受体结合配体，或其类似物。在另一个例证性实施方案中，试剂盒还包含用于实施维生素受体结合分析的试剂。在另一个例证性实施方案中，试剂盒还包含用于实施维生素受体结合分析的说明书。

附图简述

图 1 显示在包含细粒状弱斑点的乳腺癌细胞中,叶酸受体的强度 1+ 免疫组化斑点。

图 2 显示在包含粗粒状斑点的乳腺癌细胞中,叶酸受体的强度 2+ 免疫组化斑点。

图 3 显示在包含浓密度粗粒状的乳腺癌细胞中,叶酸受体的强度 3+ 免疫组化斑点。

图 4 显示疾病复发对比叶酸受体染色平均强度的实例。

图 5 显示用叶酸受体 α 的单克隆抗体 (mAb 343; 组 A 和组 B) 来免疫组化染色胰腺癌的实例。组 A 和组 B 显示柱细胞 (空箭头) 的顶端表面的膜染色,组 B 显示柱细胞 (实箭头) 的粒状细胞质染色。组 C 显示通过非免疫的 mIgG1 进行切片温育。

图 6 显示用叶酸受体 α 的单克隆抗体 (mAb 343; A 组和 B 组) 来免疫组化染色子宫内膜(endometriod)癌的实例。组 A 和组 B 显示在腺状上皮细胞中的明显的细胞质和顶膜染色 (空箭头)。未染色表示腺体 (组 B 中的实箭头) 之间的基质。组 C 显示通过非免疫的 mIgG1 进行切片温育。

图 7 显示用叶酸受体 α 的单克隆抗体 (mAb 343; 组 A 和组 B) 来免疫组化染色子宫颈鳞状细胞癌的实例。显示了鳞状细胞的集中细胞质染色 (组 B 中的空箭头)。组 C 显示通过非免疫的 mIgG₁ 进行切片温育。

详细说明

通过定量测定维生素受体在癌细胞中的表达和通过指导控制或研究用于癌症的有效疗法,提供用于预测癌症的方法和试剂盒。还提供用于确定维生素受体在癌细胞中存在 (即检测维生素受体) 的方法和试剂盒,以筛选应当通过利用维生素受体靶向术的疗法进行治疗的患者。在例证性实施方案中,维生素受体是叶酸受体,癌细胞选自卵巢癌细胞、子宫癌细胞、子宫内膜癌细胞、结肠直肠癌细胞、脑癌细胞、肾癌细胞、黑素瘤细胞、多发性骨髓瘤细胞、淋巴瘤细胞以及肺癌细胞。可通过外科手术从患者切除该方法中所用的癌组织。在癌细胞是乳腺癌细胞的实施方案中,乳腺癌包括淋巴结阴性疾病,但本发明不限于淋巴结阴性疾病。该方法可在原发性恶性物质上进行实施,并具有用于新陈代谢疾病的预测价值。

在其它例证性实施方案中，通过使用例如免疫组化染色法、荧光原位杂交法、Southern 印迹法、斑点印迹杂交、利用了放射性标记配体的放射受体分析法等等的方法，确定维生素受体的表达量。在使用了免疫组化染色法的实施方案中，所用的抗体是多克隆抗体或其混合物，或者是单克隆抗体或其混合物，或者是多克隆抗体和单克隆抗体的组合。

还在其它的例证性实施方案中，提供了使用任何上述特征的免疫组化染色法或原位杂交法或利用了放射性标记配体的放射受体分析。

在本发明的另一个例证性实施方案中，提供用于实施免疫组化染色分析的试剂盒。试剂盒包含校准显微照片，其中校准显微照片来自用维生素受体抗体染色过的癌组织。在一个例证性实施方案中，试剂盒还包含维生素受体的抗体。在另一个实施方案中，试剂盒还包含用于免疫组化染色的试剂。在另一个实施方案中；试剂盒包含用于校准显微照片和/或用于实施免疫组化染色分析的说明书。

还在本发明的另一个实施方案中，提供用于实施荧光原位杂交的试剂盒。在该例证性实施方案中，试剂盒包含校准显微照片，其中校准显微照片来自癌组织，而癌组织的核酸已经与荧光标记的核酸探针进行原位杂交。核酸探针杂交编码维生素受体的核酸，或者探针杂交互补于维生素受体的编码核酸的核酸。在另一个实施方案中，试剂盒还包含荧光标记的核酸探针。在另一个实施方案中，试剂盒包含用于原位杂交的试剂。在另一个实施方案中，试剂盒包含用于校准显微照片和/或用于实施荧光原位杂交分析的说明书。

在另一个例证性实施方案中，提供用于实施维生素受体结合分析的试剂盒。在该例证性实施方案中，试剂盒包含可确定癌细胞上的维生素受体数量范围的校准表，其中该范围与癌的有效结果对比无效结果有关。在另一个例证性实施方案中，试剂盒还包含放射性标记的维生素受体结合配体，或其类似物。在另一个例证性实施方案中，试剂盒还包含用于实施维生素受体结合分析的试剂。在另一个例证性实施方案中，试剂盒还包含用于校准表和/或用于实施维生素受体结合分析的说明书。

根据本发明，如本文中所用的“定量测定”或“定量”，意味着确定维生素受体在癌细胞上的数量，或意味着确定维生素受体在癌细胞中直接或间接表达的水平。在实施例 5、8、9 和 10 中描述了如本文中所用的“定量测定”或“定量”的含义实例，其中将免疫组化染色（实施

例 5、8 和 9) 定义为染色强度 1+、2+或 3+。例如, 对于荧光原位杂交 (FISH), 通过统计细胞核中的表示维生素受体基因存在的信号、并将维生素受体基因的信号量与未进行扩增的基因的信号量进行比较, 得到扩增基因的信号与未扩增基因的信号 (实施例 10) 的比值, 从而对维生素受体基因的扩增进行定量。对于扩增 HER-2/neu 基因的定量法, 所述的方法是本领域中已知的。例如, “定量测定” 或 “定量” 还意味着通过使用利用了放射性标记配体的维生素受体结合分析 (实施例 11), 确定癌细胞上维生素受体的绝对量。

需要本文所述的 “定量” 类型, 使得医生根据通过维生素受体结合分析所测定的免疫组化染色强度或荧光强度或受体数量, 可对患者分组, 例如 “有效结果” 组或 “无效结果” 组, 这以便医生确定适于患者的最有效的治疗方案。高染色强度是与无效结果相关 (例如 2+或 3+免疫组化染色强度或荧光强度), 并且所述的患者应当接收主动治疗方案。

本发明的方法和试剂盒可用于人临床医学和兽医学用途。可单独使用本文所述的方法和试剂盒, 或者联合其它的预测方法、或预测指示物 (例如本文所述的指示物)、或预测试剂盒、或用于研制适于癌的有效疗法的试剂盒进行使用本文所述的方法和试剂盒, 或者联合用于确定癌细胞上维生素受体的存在的方法或试剂盒进行使用本文所述的方法和试剂盒, 以筛选应当通过利用了维生素受体靶向术的疗法进行治疗的患者。当单独使用维生素受体表达而不使用另一种预测指示物以确定预测法时, 维生素受体表达被认为是独立的预测因子。

癌细胞是致癌的癌细胞群体, 包括良性肿瘤和恶性肿瘤 (如, 转移性), 或癌细胞是非致癌的。癌细胞群体可自发出现的, 或通过宿主动物生殖系中存在的突变或体细胞突变的所述过程而出现, 或者癌细胞群体是化学性、病毒性、或放射性诱导的。本发明可用于获得适于或检测癌上的维生素受体的预测法, 癌例如是癌瘤、肉瘤、淋巴瘤、霍奇金病 (Hodgkin's disease, HD)、黑素瘤、间皮细胞瘤、Burkitt 淋巴瘤、鼻咽癌、白血病以及骨髓癌 (如, 多发性骨髓瘤)。癌细胞群体包括但不限于, 脑癌、口腔癌、甲状腺癌、内分泌癌、皮肤癌、胃癌、食道癌、子宫内膜癌、喉癌、其它头颈癌、胰腺癌、结肠癌、结肠直肠癌、膀胱癌、骨癌、卵巢癌 (如血清、子宫内膜样以及粘蛋白样的)、子宫颈癌、子

宫癌、乳腺癌、睾丸癌、前列腺癌、直肠癌、肾癌、肝癌、以及肺癌(如,恶性腺瘤和间皮细胞瘤),或任何过表达维生素受体的其它癌。

例如,已知在前述段落中的多数癌种类是维生素受体阳性的(参见 Ross 等, *Cancer* 73: 2432-2443 (1994); Garin-Chesa 等, *Am. J. Pathol.* 142(2): 557-67 (1993); Franklin 等, *Int. J. Cancer Suppl.* 8: 89-95 (1994); Li 等, *J. Nuc. Med.* 37:665-672 (1996); Toffoli, *Int. J. Cancer* 74: 193-198 (1997); Veggian, *Tumor* 75:510-513 (1989); Weitman 等, *Cancer Research* 52: 3396-3401; 以及 Bueno 等, *J. Thor. Card. Sur. Feb.* 121: 225-233 (2001))。

作为获得癌症预后的结果所研制的治疗性方案包括,例如,在下列出版物中所述的维生素受体靶向疗法或这些疗法的组合:美国专利申请公开号 US-2001-0031252-A1、US2003-0086900-A1、US-2003-0198643-A1、US-2005-0002942-A1、或 PCT 国际公开号 WO03/097647,其中这些出版物在此引用以作为参考。如果患者归入无效结果组中,所研制的治疗性方案还可包括放射治疗、化学治疗、免疫治疗或主动监测、或这些疗法的组合。

或者,很少的主动方法用于被归入有效结果组中的患者。例如,当使用本文所述的方法而观测到明显的染色或荧光(如,2+或3+)时,或当分别使用 FISH 分析或维生素受体结合分析而确定癌细胞之中或之上的受体或扩增基因的极限数量时,则需要更积极的疗法。

在一个例证性实施方案中,癌细胞选自卵巢癌细胞、子宫癌细胞、子宫内膜癌细胞、结肠直肠癌细胞、脑癌细胞、肾癌细胞、黑素瘤细胞、多发性骨髓瘤细胞、淋巴瘤细胞以及肺癌细胞,或任何过表达维生素受体的其它癌。在癌细胞是乳腺癌细胞的实施方案中,乳腺癌包括淋巴结阴性疾病,但本发明不限于淋巴结阴性疾病。

用于该方法的抗体和用于本文所述的免疫组化染色分析的试剂盒是多克隆抗体或单克隆抗体(如,PU17 或 mAb 343)。在例证性实施方案中,可使用多克隆抗体混合物、或单克隆抗体混合物、或多克隆抗体和单克隆抗体的混合物。在其它例证性实施方案中,抗体是抗体的 Fab 片段或 scFv 片段(即定向标记的抗体的 Fab 片段或单链可变区)或其混合物,它们由于定向这些抗体的受体的过表达而能优先结合癌细胞。可组合使用本文所述的任何类型的抗体。可使用本领域中已知的任何抗维

生素受体的抗体，例如在下列中描述的抗体：Ross 等, *Cancer* 73: 2432-2443 (1994); Garin-Chesa 等, *Am. J. Pathol.* 142(2): 557-67 (1993); Franklin 等, *Int. J. Cancer Suppl.* 8: 89-95 (1994) (即单克隆抗体 146、343、458 以及 741); Li 等, *J. Nuc. Med.* 37:665-672 (1996); Toffoli, *Int. J. Cancer* 74: 193-198 (1997); Veggian, *Tumor* 75:510-513 (1989); Weitman 等, *Cancer Research* 52: 3396-3401; Bueno 等, *J. Thor. Card. Sur. Feb.* 121: 225- 233 (2001); 和 Coney 等, *Cancer Research* 51: 6125-6132 (1991) (即 M0v18 和 M0v19), 每件文献在此通过引用作为参考。

通过用于免疫组化染色法中直接检测抗体的技术人员已知的试剂 (如, 辣根过氧化物酶、碱性磷酸酶、化学荧光化合物等等), 可直接标记用于本文所述的免疫组化法和试剂盒的任何抗体。或者, 将结合抗维生素受体的抗体的第二标记抗体用于免疫组化染色法。

根据本发明的一个实施方案, 具有高亲合力的抗体可结合癌细胞或其它细胞类型上的受体。高亲合力结合是抗体固着的, 或者通过使用化学修饰的抗体可提高结合亲合力。

通过用于纯化蛋白质的标准方法, 可纯化用于本文所述的免疫组化法和试剂盒的这些抗体群体中的任何一种。用于抗体纯化的各种方法是本领域技术人员众所周知的。通常, 从注射了抗原的动物的血清中收集多克隆抗体, 和从分泌单克隆抗体的杂交瘤细胞培养基中或从注射了杂交瘤细胞的动物腹水流体中收集单克隆抗体。为了从血清或培养基中进行纯化, 将抗体进行本领域技术人员已知的纯化法或分级分离技术 (fractionation technique)。常规的纯化法或分级分离技术, 包括凝胶过滤、离子交换层析、DEAE-Sepharose 柱层析、亲和层析、溶剂-溶剂萃取、超滤、FPLC 以及 HPLC。通过所述的技术, 例如超滤和切向流过滤, 浓缩纯化的抗体。应当理解不限于用于从血清、培养基或腹水流体中纯化抗体的上述纯化法, 并且如果需要所述的方法以获得纯化抗体, 则本领域技术人员已知的任何纯化法可用于纯化抗体。

在一个实施方案中, 使用本文所述的免疫组化染色分析中所用的抗体, 以制备包含有效量抗体的预测组合物。所用组合物的实例, 包括抗体水溶液, 例如, 在磷酸盐缓冲液盐水溶液中的、或在本领域中已知的其它缓冲溶液中的、具有 5%葡萄糖或其它熟知的组合物 (例如乙醇、乙二醇、酯和酰胺) 的盐溶液中的抗体水溶液。通过加入其它蛋白质

(如,牛血清蛋白、明胶等等)或化学试剂(如,甘油、聚乙二醇、EDTA、山梨酸钾、苯甲酸钠、蛋白酶抑制剂、还原剂、乙醛等等),可稳定抗体。试剂盒中的抗体组合物还可以是包含抗体的可复水冻干物的形式。

抗体的结合部位包括在癌细胞表面之上或之中优先表达/呈递的任何受体。还可在活性巨噬细胞或其它活化免疫细胞的表面上呈递抗体的结合部位。由这些细胞优先表达的表面呈递蛋白是在普通细胞上不存在的或以微量浓度存在的受体,这使得抗体优先结合于这些细胞。因此,在与普通细胞相比的这些细胞上调的任何受体、或在普通细胞表面上未表达/呈递的任何受体,或在普通细胞表面上未大量表达/呈递的任何受体,都可用于定量。在一个实施方案中,结合抗体的部位是维生素受体,例如叶酸受体。

在本发明的例证性实施方案中,维生素受体组成整体,其可进行直接(如,免疫组化)或间接(如,使用荧光原位杂交分析)定量,或根据本文所述的方法和试剂盒进行检测。根据本文所述的方法和试剂盒而定量或检测的可接受的维生素受体,包括适于烟酸、泛酸、叶酸、核黄素、硫胺盐酸素、生物素、维生素 B12 以及脂质可溶性维生素 A、D、E 和 K 的受体。

在一个例证性实施方案中,可确定叶酸受体的数量。需要将叶酸及其还原型同系系(congener)进行一个碳转移反应,以用于生物合成核苷酸碱基、氨基酸及其它甲基化合物,因此,通过增殖细胞而大量提供它们。通过低亲合性还原的叶酸载体($K_m=10^{-5}M$)或高亲合性叶酸受体($K_d=10^{-10}M$),将叶酸转运到细胞中。遍在表达还原的叶酸载体,并构成适于最普通细胞的唯一的叶酸摄入通道。除了肾和胎盘之外,普通组织表达很低的或不能检测的水平的高亲合性叶酸受体。然而,包括恶性组织的许多肿瘤组织,例如卵巢癌、乳腺癌、子宫癌、肾癌、子宫内膜癌、支气管癌、结肠直肠癌、肺癌和脑癌,以及黑素瘤、淋巴瘤以及骨髓癌,表达极高水平的高亲合性叶酸受体。事实上,据估计所有卵巢癌瘤中的 90%过表达该受体。并且,最近报道在活化但非休眠的滑膜巨噬细胞(synovial macrophage)上可表达叶酸受体 β (叶酸受体的非上皮性同工型)。因此,申请人发现了可获得确定维生素受体的过表达量的、适于各种癌的检测法。

通过本领域中已知的任何免疫组化染色分析法(例如在美国专利号

5,846,739 和 5,989,838 中描述的方法,在此通过引用以作为参考),可实施本文所述的免疫组化染色分析。通常,在一个例证性实施方案中,将石蜡包埋的组织切片进行脱蜡、复水和封蔽。在免疫组化分析之前,用本领域中已知的任何固定剂例如甲醛,将组织切片固定,和/或在染色之前于加热烘箱中干燥。还可实施抗原复原步骤(retrieval step)。然后,将切片与一级抗体一起温育,洗涤除去未结合的抗体,并与二级抗体(例如酶联抗体)一起温育。将抗体复合物与不溶性色蛋白一起温育,得到不溶性显色沉淀。然后,复染切片,以用于光学显微检查。

在另一个例证性实施方案中,可使用冰冻组织切片,并可将冻结切片固定在乙醇中。例如,使用甲醇中的过氧化物酶和 Powerblock™ 试剂(Biogenics, San Ramon, CA),封蔽组织切片。然后,通过 DAKO LSAB™-HRP 系统(DAKO, Carpinteria, CA),进行抗体染色。

在本文所述的方法中,可使用本领域中已知适于免疫组化染色分析的任何试剂。在例证性实施方案中,染色之前使用本领域中已知的任何固定剂例如乙醇、丙酮或甲醛,可固定组织。在其它例证性实施方案中,使用生物素-亲和素-辣根过氧化物酶方法和作为抗体染色的底物的二氨基联苯胺,用于实施免疫组化染色分析的试剂包括,用于脱蜡的二甲苯、梯度乙醇洗液(如,100%、95%和70%乙醇溶液)和用于水合的水、磷酸盐缓冲盐水或其它缓冲溶液、过氧化物酶、CAS Block™(DAKO, Carpinteria, CA)、或用于封闭的 Powerblock™ 试剂(Biogenics, San Ramon, CA)、用于抗原复原的 Borg Decloaker Buffer™(Biocare Medical, Walnut Creek, CA)、用于复染的苏木精(Sigma, St. Louis, MO)、直接靶向维生素受体的多克隆抗体、直接靶向维生素受体的单克隆抗体以及 EnVision⁺™ HRP/DAB⁺检测试剂盒(DAKO Cytomation, Carpinteria, CA)或 DAKO LSAB™-HRP 检测试剂盒(DAKO, Carpinteria, CA)。在本文所述的方法中,可使用本领域中已知用于免疫组化染色分析的任何试剂,包括本领域中已知的任何其它抗体染色试剂盒。

该方法中所用的试剂盒,含有下列详细描述的校准显微照片,还含有上述用于实施免疫组化染色分析的任何一种或多种试剂。该试剂盒还可含有本领域中已知的用于实施免疫组化染色分析的任何其它试剂。试剂盒还包含适于使用试剂盒试剂和/或校准显微照片以确定癌症预后的

说明书。

从通过用于染色试样的相同免疫组化染色分析法而染色的对照组组织切片中，和从癌组织中，制备校准显微照片（即，对照玻片）。可使用任何癌组织，例如，包括具有细粒状弱染色(1+染色)的玻片、具有粗粒状染色(2+染色)的玻片以及具有高强度粗粒状染色(3+染色)的玻片。

为了 1)确定癌细胞中维生素受体的表达量（即，为了如下所述的荧光原位杂交分析，“确定维生素受体的表达量”意味着通过确定维生素受体基因的扩增量而进行间接定量），以获得癌症预后并研制适于患者的有效治疗方案，或为了 2)确定癌细胞中维生素受体的存在，以筛选应当通过利用了维生素受体靶向术的疗法进行治疗的患者，所用的另一种方法是荧光原位杂交(FISH)。可使用 FISH 技术，以检测过表达维生素受体的癌细胞中的基因扩增，例如适于烟酸、泛酸、叶酸、核黄素、硫胺盐酸素、生物素、维生素 B12 以及脂质可溶性维生素 A、D、E 和 K 的受体，其中扩增了编码受体的基因。FISH 是很有利的，因为可检测出样品中只有少数细胞是癌的定位扩增。

在美国专利号 6,358,682 和 6,218,529 中详细描述了 FISH 检验法，各自在此通过引用以作为参考。通常，FISH 检验法利用甲醛固定、石蜡包埋的癌组织，例如选自下列的癌组织：卵巢癌细胞、子宫癌细胞、子宫内膜癌细胞、乳腺癌细胞、结肠直肠癌细胞、脑癌细胞、肾癌细胞、黑素瘤细胞、多发性骨髓瘤细胞、淋巴瘤细胞以及肺癌细胞。将甲醛固定、石蜡包埋的癌组织进行化学和/或酶促处理，以消化蛋白质，并将 DNA 从双链 DNA 转换成单链 DNA 进行处理，例如通过加热和/或通过高盐浓度进行处理。然后，通过固定剂例如甲酰胺，将 DNA 固定成单链形式。

然后，将固定的单链 DNA 与接触含有荧光标记的 DNA 探针。探针互补于编码维生素受体的核酸，或者探针互补于与编码维生素受体的核酸互补的核酸。然后，在本领域中已知的任何条件（即有利于杂交）下，温育切片并在杂交洗液中洗涤。在“Molecular Cloning”（第 3 版，Sambrook 和 Russell 编著，2001 年）中，描述了用于杂交的这些杂交液和洗液，在此通过引用以作为参考。

使用与连接于 DNA 探针的生物素结合的荧光标记配体（如，荧光素标记的亲合素），进行荧光标记探针，或将探针进行直接荧光标记，

例如用荧光素或罗丹明(rhodamine)。例如使用嵌入型(intercalating)荧光染料(如, Antifade 溶液中的 4',6-二脒基-2-苯基吡啶(DAPI)), 进行复染核 DNA。将落射荧光显微镜用于检测荧光。例如, 通过荧光素标记的探针, 可放射绿光, 而通过 DAPI 标记的核 DNA, 放射蓝光。在该实例中, 对组织切片中的胞核, 计算蓝色本底中的绿色信号量。在美国专利号 6,358,682 中, 更详细地描述了该方法, 并在此通过引用以作为参考。

用于实施 FISH 分析的试剂盒, 包含荧光标记的核酸探针、用于原位杂交的试剂、校准显微照片(即, 对照玻片)、用于校准显微照片或试剂盒的说明书, 或其任意组合。例如, 用于分析的靶群体, 可以是卵巢癌细胞、子宫癌细胞、子宫内膜癌细胞、结肠直肠癌细胞、脑癌细胞、肾癌细胞、黑素瘤细胞、多发性骨髓瘤细胞、淋巴瘤细胞以及肺癌细胞, 或任何过表达维生素受体的其它癌细胞。

使用本领域中已知的用于 FISH 的任何荧光化合物, 例如荧光素、罗丹明等等, 可直接标记试剂盒中的荧光标记探针。或者, 可间接标记试剂盒中的探针, 例如将生物素偶联于探针, 并将荧光探针与亲和素-荧光标记偶联物一起温育以进行间接荧光标记。可将用于原位杂交的试剂盒试剂中的一种试剂, 复染到染料本底核 DNA(如, DAPI)。

通过来自肿瘤或细胞系的组织切片, 制备校准显微照片(即, 对照玻片)。将细胞系均匀分布在玻片上。由于细胞的匀质性的缘故, 细胞系是很有利的。可使用具有正常拷贝数的维生素受体基因的玻片、具有高拷贝数的维生素受体基因的玻片以及具有低拷贝数的维生素受体基因的玻片。

在一个例证性实施方案中, 使用衍生于相同癌组织的细胞系。在另一个例证性实施方案中, 细胞系并不是肿瘤细胞系, 例如, 通过将细胞固定在固体物质(例如琼胶糖、明胶、果胶、藻酸盐、角叉藻聚糖、单体、聚合物等等)上, 制备对照玻片。通过冷却、加入离子、加入聚合剂、加入交联剂等等, 制备固体物质。在另一个例证性实施方案中, 将细胞在血浆中凝固、用甲醛固定并包埋在石蜡中。然后, 进行石蜡切片, 并将石蜡块切片固定在玻片上。可使用本领域中已知的其它固定剂。在“Molecular Pathology”(第 1 卷, IRL 出版社, 纽约)中描述了所述的方法, 并在此通过引用以作为参考。

可使用类似于市场上可买到的但可用于检测维生素受体基因扩增

的 Oncor INFORM HER-2/*neu* 基因检测系统 (Ventana Medical Systems, Gaithersburg, Md., 美国; Cat.No:S8000-试剂盒) 或 Abbott Path Vysion™ HER-2/*neu* 试剂盒的试剂盒。Oncor INFORM 试剂盒和 Abbott Path Vysion™ 试剂盒中的说明书, 可明确地通过引用以作为参考。

在本发明的另一个例证性实施方案中, 提供了用于确定癌症预后的维生素受体结合分析法。该方法的步骤包括将癌细胞接触结合配体的放射性标记维生素受体或其类似物、定量测定维生素受体在癌细胞中的数量, 和确定癌症预后。

在例证性实施方案中, 维生素受体是叶酸受体。在另一个实施方案中, 癌细胞是乳腺癌细胞。在该实施方案中, 乳腺癌包括淋巴结阴性疾病, 但本发明不限于节点阴性疾病。在另一例证性实施方案中, 癌细胞选自卵巢癌细胞、子宫癌细胞、子宫内膜癌细胞、结肠直肠癌细胞、脑癌细胞、肾癌细胞、黑素瘤细胞、多发性骨髓瘤细胞、淋巴瘤细胞以及肺癌细胞, 或任何过表达维生素受体的其它癌。在另一个例证性实施方案中, 放射性标记配体是放射性标记叶酸或其类似物。

叶酸类似物包括亚叶酸、蝶酰谷氨酸 (pteropolyglutamic acid) 和叶酸受体结合蝶啶, 例如四氢蝶呤(tetrahydropterin)、二氢叶酸、四氢叶酸以及它们的脱氮(deaza)和二脱氮(dideaza)类似物。术语“脱氮”和“二脱氮”类似物, 指本领域中可识别的、具有天然存在于叶酸结构中的碳原子被一或两个氮原子取代的类似物。例如, 脱氮类似物包括 1-脱氮、3-脱氮、5-脱氮、8-脱氮以及 10-脱氮类似物。例如, 二脱氮类似物包括 1,5 二脱氮、5,10-二脱氮、8,10-二脱氮以及 5,8-二脱氮类似物。上述的叶酸类似物通常被定义为“叶酸盐”, 反映了它们结合叶酸受体的能力。其它叶酸受体结合的类似物, 包括氨基蝶呤(aminopterin)、氨甲蝶呤(甲氨蝶呤)、N¹⁰-甲基叶酸盐(methylfolate)、2-去氨基-羟基叶酸、脱氮类似物例如 1-脱氮甲蝶呤(deazamethopterin)或 3-脱氮甲蝶呤、以及 3',5'-二氯-4-氨基-4-脱氧-N¹⁰-甲基蝶酰谷氨酸(二氯氨甲蝶呤)。

可使用本领域中已知的任何维生素受体结合分析法(即, 放射受体分析法), 例如 Parker 等人(*Anal.Biochem.*(2005)), 在此通过引用以作为参考)描述的用于定量可溶性维生素受体(参见实施例 11)的分析法。可使用本领域中用于实施维生素受体结合分析的任何已知试剂, 例如放射性标记的维生素受体-结合配体、或其类似物。

将这些试剂中的任何试剂,例如放射性标记的维生素受体-结合配体或其类似物,加入用于确定癌症预后的试剂盒中。试剂盒还包含可确定癌细胞上的维生素受体数量范围的校准表,其中该范围与癌的有效结果对比无效结果有关。试剂盒还包含用于试剂盒试剂和用于校准表的说明书,以确定癌症预后。

还提供用于确定维生素受体在癌细胞中存在的方法和试剂盒,以筛选应当通过利用维生素受体靶向术的疗法进行治疗的患者。在例证性实施方案中,维生素受体是叶酸受体,癌细胞选自卵巢癌细胞、子宫癌细胞、子宫内膜癌细胞、结肠直肠癌细胞、脑癌细胞、肾癌细胞、黑素瘤细胞、多发性骨髓瘤细胞、淋巴瘤细胞以及肺癌细胞,或任何过表达维生素受体的其它癌。可通过外科手术从患者切除该方法中所用的癌组织。在癌细胞是乳腺癌细胞的实施方案中,乳腺癌包括淋巴结阴性疾病,但本发明不限于淋巴结阴性疾病。通过本文所述的任何方法,可检测维生素受体,包括免疫组化染色分析、FISH 分析,以及利用了放射性标记配体的维生素受体结合分析法。

例如,利用维生素受体靶向术的疗法是在下列文件中描述的疗法、或这些疗法的组合: 专利申请公开号 US-2001-0031252-A1、US-2003-0086900-A1、US-2003-0198643-A1、US2005-0002942-A1、或 PCT 国际公开号 WO03/097647, 分别在此通过引用以作为参考。

实施例 1

组织样品

制备从具有趋异临床结果的女性中所选出的侵袭性乳腺癌的组织微阵列。具体地说,从自诊断起至少七年未复发的女性中获得 67 个样品中所包含的 34 个样品。其它的 33 个样品来自在诊断后不足 3.5 年内复发疾病的女性。为了寻找与淋巴结阴性疾病相关的标记,富集淋巴结阴性样品的组。所有样品都是在 1984-1985 年所诊断的,以确保充分随访(follow-up)有效结果组。

在表 1 中,显示了患者和肿瘤特征。建立样品组,以提供大致相同量的早期女性患者对比未(或延迟)复发的女性患者。如所提到的,淋巴结阴性样品起主要作用,以寻找淋巴结阴性疾病中的判别标记。52 名女性患有淋巴结阴性疾病。15 名女性患有淋巴结阳性疾病。曾有 34 例

T1 肿瘤和 33 例 T2 肿瘤 (T1=2cm 或更小; T2=2.1 至 5cm)。70%癌是雌激素受体阳性, 而 24%癌是雌激素受体阴性。6%癌不清楚是雌激素受体阳性或阴性的。仅仅 10 名女性接受辅助化学疗法, 3 例接受三苯氧胺治疗。81%癌是高级别的。

在无效结果组中, 有 33 名女性在确诊 3.5 年内复发。她们的平均复发时间是 1.9 年。确诊后至少 7 年中, 34 例未复发。在所述的有效结果组中, 32 例在随访的平均 13.7 年内没有复发。另外的 2 例在她们确诊后的第 14 年复发。对于无效结果组, 存活患者对比死亡患者的百分比是 15%对 85%。对于有效结果组, 存活率是 76%, 死亡率是 24%。

表 1.患者和肿瘤特征

患者和肿瘤特征(n=67)	
百分率	
肿瘤大小	
T1	34(51%)
T2	33(49%)
淋巴结状况	
N-	52(78%)
N+	15(22%)
ER 状况	
+	47(70%)
-	16(24%)
未知	4(6%)
组织学	
导管	57(85%)
小叶	6(9%)
腺癌, NOS	4(6%)
级别	
2	2(3%)
3	11(16%)
4	54(81%)
辅助疗法	
三苯氧胺	
是	3(4%)
否	64(96%)
化学疗法	
是	10(15%)
否	57(85%)
叶酸受体染色	
1	11(17%)
2	17(25%)
3	39(58%)

实施例 2

抗血清制备

叶酸受体的多克隆抗血清(PU-17)来自于 Endocyte, Inc. 简单地说, 从 Sigma Chemical Co. 购买牛乳叶酸结合蛋白, 并在叶酸固定柱上进行亲和纯化, 并根据规定程序在用于接种新西兰白兔之前, 用弗氏佐剂 (Freund adjuvant) 进行乳化。将抗原与不完全弗氏佐剂一起进行第二次强化后的两周, 取血并收集抗血清。

实施例 3

抗体纯化

试剂制备

1. 收集缓冲液: 1 M 磷酸盐, pH 8

将 67.2g Na_2HPO_4 和 0.367g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 加入约 450ml 去离子水中。搅拌混合液直至溶解, 并用 1N HCl 或 NaOH 调节 pH 至 8.0。用去离子水将终体积补充至 500ml, 并用 Nalgene 500mL 0.22 μm 过滤器进行过滤。

2. 洗涤缓冲液: 10 mM 磷酸盐, pH 6.8

将 5ml 的 1M 磷酸盐缓冲液(pH8)稀释到约 450ml 去离子水中。用 HCl 将 pH 调节至 6.8, 并用去离子水将终体积补充至 500ml。用 Nalgene 500ml 的 0.22 μm 过滤器, 过滤溶液。

3. 洗脱缓冲液: 0.1 M 甘氨酸, pH 2.5

将 3.75g 甘氨酸加入约 450ml 去离子水中。将搅拌溶解, 并用 HCl 调节 pH 至 2.5。用去离子水将终体积补充至 500ml, 并用 Nalgene 500mL 0.22 μm 过滤器进行过滤。

4. 磷酸盐缓冲盐水(PBS), pH 7.4

将 100ml 的 Gibco 10X PBS 加入约 850ml 去离子水中, 并进行搅拌。用 HCl 将 pH 调节至 7.4, 并用去离子水将终体积补充至 1L。用 Nalgene 1L 的 0.22 μm 过滤器, 过滤溶液。

5. 100X BSA/叠氮化物溶液:

将 100mg/mL 的 BSA 和 10%叠氮化钠(w/v)溶解于 PBS(pH7.4)中。将 1 克 BSA 和 1g 叠氮化钠加入 10ml 的 1XPBS (pH7.4)中。将溶液充分混合, 直至溶解所有的 BSA。用 0.22 μm 针头式(syringe-driven)过滤器,

过滤溶液。

FPLC 纯化

将偶联 FBP 的 HiTrap[®] 亲和柱加热至室温，并用 20ml 洗涤缓冲液 (pH6.8)、以 5ml/分钟的流速进行洗涤柱，直至平衡。FPLC 系统用于纯化过程的洗涤和洗脱步骤。用洗涤缓冲液 (pH6.8)，以 1:1 的比例混合将 15ml 的 PU-17 样品。使用 25mm 的 MCE 针头式过滤器 (0.45 μ m) 和 10ml 结核菌素注射器，过滤稀释的抗血清。通过 5ml 结核菌素注射器，注射抗血清。

在室温下，使抗血清结合柱约 10 分钟。该温育期后，将另一 5ml 抗血清上柱。抗血清上样之后，使用 10ml 结核菌素注射器，将 10ml 洗涤缓冲液 (pH6.8) 加到柱上。

在将两次 5ml 抗血清注射样加到柱之后，将柱钩挂在 FPLC 系统上。用约 10ml 洗涤缓冲液 (缓冲液 A)，以 5mL/分钟洗涤柱。在洗液中检测不出物质之后，则开始洗脱。使用 5ml/分钟的流速，并将梯度逐渐提高到 100% 洗脱缓冲液 (缓冲液 B)。收集该点处的 1ml 级份。监控 A₂₈₀，集中含有洗脱抗体的级份并保存 (通常是级份 5-10)。

在集中级份之后，通过加入约 400 μ l 的收集缓冲液 (pH8)，中和洗脱抗体。将收集缓冲液缓慢加入样品中，并用 pHHydrion 6-8 pH 试纸监控 pH。当 pH 达到 pH6.4-7.0 时，充分中和抗体样品。

在从柱上洗脱所有抗体之后，将梯度转回缓冲液 A (0% 缓冲液 B)。用约 20ml 洗涤缓冲液 (缓冲液 A)，将柱重平衡。在平衡柱之后，将其从 FPLC 系统上拆下，并注入 2ml 或更多的抗血清溶液，使其结合柱上并进行洗脱。重复上述步骤，直至所有抗血清流过该柱。

第一抗体浓缩步骤

在纯化所有的血清并中和以及集中洗脱抗体之后，将纯化抗体转入 Millipore Ultrafree[®]-4 Biomax 10K NMWL 离心浓缩机中。在 4℃ 中，以 3200 $\times$ g 离心浓缩物，直至达到约 2ml 的终体积。

缓冲液更换和第二抗体浓缩步骤

使用经过 PBS (pH7.4) 平衡的 PD-10 平衡柱 (Bio-Rad Econo-Pac[®])

10DG 一次性层析柱), 进行更换缓冲液。将约 2ml 样品置于该柱容器中。将所有样品转入柱基质。收集该点处的 1ml 柱级份。将 PBS 倒入柱容器顶部, 以洗脱抗体。在分光光度仪 (PBS 用于零分光光度仪) 上, 使用石英紫外比色杯和 280nm 吸光度, 检查级份的蛋白含量。集中所有具有蛋白的级份。

将集中的抗体溶液转入 Millipore Ultrafree[®]-4 Biomax 10K NMWL 离心浓缩器中, 并如上所述进行浓缩抗体, 直至纯化抗体达到约 1-2ml 的终体积。

实施例 4

制备组织微阵列

使用定制的制造装置, 制出排列在 216 芯容量的受体石蜡块(recipient block)中的 0.6mm 组织芯(tissue core), 以制备组织微阵列。除了作为免疫组织化学反应的置信标记和对照的肝中心部分之外, 将来自每个患者肿瘤石蜡块的多个中心部分加入受体石蜡块中。在固定于带电玻片上的组织微阵列切片上, 实施免疫组织化学。

实施例 5

免疫组织化学

通过下列分析法, 实施免疫组织化学(IHC)。在来自 Fisher 的 SuperFrost 带电玻片上, 通过 5 微米切片, 对甲醛固定的石蜡包埋切片进行 IHC。在染色之前, 将玻片在 65℃烘箱中烘烤 30-40 分钟。使用变动 3 次的二甲苯, 对甲醛固定的石蜡包埋样品进行脱蜡, 并在一系列乙醇洗涤 (100%、95%, 然后 70%乙醇) 直至流动蒸馏水中进行再水合。脱蜡之后, 将玻片置于 Biocare Decloaker Unit(Biocare Medical, Walnut Creek, CA)中的 BORG Decloaker 缓冲液中。切片冷却之后, 在流动的蒸馏水中充分洗涤切片。对于该过程 (室温下), 在 DAKO Autostainer 上完成观测。将切片在 3% H_2O_2 的乙醇溶液中温育 5 分钟, 以灭活内源过氧化物。然后, 将切片在 1:200 PU-17 兔一级抗体(购自 Endocyte, Inc, Inc.) 中温育 30 分钟。使用 TBST 洗涤缓冲液, 洗涤切片。使用标记的 Polymer Rabbit EnVision+、HRP/DAB+检测系统(DAKO Cytomation, Carpinteria, CA), 并使其温育 15 分钟。使用 TBST 洗涤缓冲液, 洗涤玻片。然后,

将切片在二氨基联苯胺(DAB+)溶液(DAKO Cytomation, Carpinteria, CA)中温育 5 分钟、用改良的 Schmidt 苏木精复染 5 分钟、在流动的自来水中染蓝 3 分钟, 并进行固定和盖片。

实施例 6

数字成像

使用苏木精, 复染玻片。使用 Bliss “Virtual Microscopy” 显微镜和计算机系统(Bacus Laboratories,Lombard,IL)进行数字成像, 其中计算机系统由具有计算机接入的电子级调控的 Zeiss Axioplan 显微镜和高分辨率 3CCD 摄像机的组成, 可产生具有核心图像的真实幻灯片, 其中核心图像连接于含有相关的组织核心信息的微软 AccessTM 数据库。图像和数据文件存储在共享服务器空间中, 以提供统计远程访问免疫组化结果得分的数字图像。

实施例 7

分级和染色强度以及统计的定义

所用的分级系统, 可评价结构模式、核异型程度以及有丝分裂速率 (Broders, A.C., *JAMA* 74: 656-664 (1920)和 Broders, A.C., *Surg. CHn. North America* 21: 947-62 (1941))。分级 1 肿瘤主要具有腺状的或乳突状的生长模式, 并略微具有核多型。分级 4 肿瘤主要具有固体生长模式和明显的核多型。分级 2 肿瘤主要具有腺状的或乳突状的生长, 并具有中等的核多型。分级 3 肿瘤具有腺状和固体的混合生长, 并具有中等的核多型。

将叶酸受体表达的染色计算为 0 至 3。将没有可辨别的染色计为 0。得分 1 表示弱细粒状染色。得分 2 表示粗粒状染色, 得分 3 表示明显稠密的粗粒状染色。当呈现阳性染色时, 阳性染色通常扩散到肿瘤全部。图 1-3 中显示了 1+、2+3+染色的代表样品。

从大部分患者样品中收集多个核心部分 (4%具有六个核心部分、74%具有三个核心部分、16%具有两个核心部分以及 6%具有一个核心部分)。将所有核心部分染色, 并进行读数。然后, 我们将强度值进行平均, 得出概要分值。没有样品具有所有的核心部分阴性。将染色强度的三个概要分值定义为: 1=0.3-1.3; 2=1.5-2.3; 3=2.5-3。

将包括中值和频率的描述统计学用于患者和肿瘤特性。使用 Cox 比例危险(proportional hazard)单变量和多变量的模型，评价未复发的存活率。

实施例 8

受体染色强度

叶酸受体的平均染色强度是: 11 个样品(17%)为 1+、17 个样品(25%)为 2+以及 39 个样品(58%)为 3+。没有样品具有所有的核心部分阴性。在具有 1+染色的 11 名女性中，没有一个出现复发。在具有 2+染色样品的 17 名女性中，5 名(29.4%)出现复发。在具有 3+染色的组中，39 名中的 28 名(71.8%)出现复发，其平均时间为 2.5 年。如图 4 所示，1+和 2+染色组的复发平均时间大于 4 年。图 1-3 显示 1+、2+和 3+染色的实施例。在普通组织对照中，叶酸受体的染色是阴性。

通过肿瘤大小、淋巴节状况、分级和雌激素受体状况，表 2 显示了叶酸受体的染色模式。在叶酸受体过表达和肿瘤大小、淋巴节状况或雌激素受体状况之间，不存在联系。在高分级和明显的叶酸受体表达($p=0.036$)之间，存在着联系。

通过将作为二分变量的各种病理学特征与复发率进行比较（即，有效结果对比无效结果），明显的 3+叶酸受体阳性是与早期复发相关（风险比 6.0; (95% CI 2.3-15.7), $p<0.001$ ，参见表 3）。在该样本集中，有效结果组和无效结果组中存在近似相等数量的淋巴结阳性和淋巴结阴性样品。相似的，T1 肿瘤对比 T2 肿瘤的比例和雌激素受体阳性样品对比雌激素受体阴性样品的比例，相对均匀地分布在两个结果组之间。

总之，在对肿瘤大小、淋巴节状况、雌激素受体状况、辅助疗法、肿瘤分级以及组织结构进行校准之后，3+叶酸受体染色仍然是与无效结果显著相关， $p<0.001$ 。明显的叶酸受体阳性是患有乳腺癌的患者组中最显著的预测因子。因此，在叶酸受体的过表达和乳腺癌的早期复发之间存在强相关。本文所述的分析法可用于确定适于患有癌的患者预测法，并用于确定基于所述预测法的治疗方案。

表 2

	叶酸受体（平均强度）			
	1(n=11)	2(n=17)	3(n=19)	P 值*
肿瘤大小				
T1	8	7	19	0.272
T2	3	10	20	
淋巴结状况				
阴性	10	10	32	0.087
阳性	1	7	7	
雌激素受体				
ER+	6	13	28	0.711
ER-	3	3	10	
未知	2	1	1	
分级				
2	2	0	0	0.036
3	3	3	5	
4	6	14	34	

*所有 p 值进行了 Fisher 精确检验(Fisher's Exact Test)。

表 3.病理学特征和结果

	复发		P 值*
	早期	延迟/无	
肿瘤大小			
T1	15	19	0.18
T2	19	14	
淋巴结状况			
N-	27	25	0.82
N+	7	8	
雌激素受体			
无作用	1	3	0.51
+	26	21	
-	7	9	
分级			
2	0	2	0.07**
3	3	8	
4	31	23	
叶酸受体（平均强度）			
1	0	11	<0.001
2	5	12	
3	28	11	

* 除非另外指出，所有 p 值是卡方。

** Fisher 精确检验

实施例 9

免疫组化

通过本领域中已知的任何免疫组化染色法，实施免疫组化染色分析。以下描述另一种例证性方法。

组织切片的脱蜡和再水化

将玻片置于 3 次连续的二甲苯水浴中，每次水浴 3 分钟。抽出过量液体，并将玻片置于 3 次连续的 100%乙醇水浴，每次水浴浸渍 15 下。

抽出过量液体，并将玻片置于 3 次连续的 95%乙醇水浴，每次水浴浸渍 15 下。抽出过量液体，并将玻片置于 3 次改变的去离子水中，每次 30 秒。

预处理与热诱导的表位复原(HIER)

将玻片置于装满 250mL 的 BORG Decloaker 试剂的染色皿中。在约 17-25psi 的压力和约 120℃的温度下，将染色皿在 Decloaking 槽(BioCare Medical, Walnut Creek, CA)中放置 3 分钟。将玻片冷却 10 分钟。

过氧化物酶封闭

将玻片在 DI 水中进行简单地洗涤。用吸收布(absorbent wipe)抽去多余水量。在 DI 水中，将玻片再次洗涤 1 分钟，并将多余水量抽到吸收布上。室温下，使用来自 DAKO EnvisionPlus 试剂盒的、用于封闭样品的充足备用的过氧化物酶封闭液。将玻片在室温下温育 5+/-1 分钟。排干玻片上的溶液。将玻片在 PBS 水浴中洗涤三次，每次 3 分钟+/-30 秒。

CAS 封闭

在吸收布上抽去过量的缓冲液。加入充足的备用 CAS 封闭液，以封闭样品。将玻片在室温下温育 10+/-1 分钟。排干玻片上的溶液，并在吸收布上抽去过量的溶液。

一级抗体或阴性对照试剂

加入足够的稀释(5µg/ml)的一级抗体(PU-17)或阴性对照试剂（兔 IgG），以封闭样品。室温下，将样品在湿槽中温育 30+/-1 分钟。用以同种型对照的方向流动的 PBS 轻柔洗涤玻片，以测试制品。将玻片在 PBS 水浴中洗涤三次，每次 3 分钟+/-30 秒。

过氧化物酶标记的聚合物

用吸收布吸去过量的缓冲液。加入来自 DAKO EnvisionPlus 试剂盒的足够备用的 HRP 标记聚合物二级抗体,以封闭样品。室温下，将样品在湿槽中温育 30+/-1 分钟。排干玻片上的溶液。将玻片在 PBS 水浴中洗涤三次，每次洗涤 3 分钟+/-30 秒。

底物-显色

用吸收布吸去过量的缓冲液。加入足够的准备的液体 DAB 底物-色蛋白溶液（根据包装说明书进行准备），以封闭样品。将样品在室温下温育 5 ± 1 分钟。排干玻片上的溶液。用去离子水将玻片洗涤三次，每次洗涤 30 秒。

复染和脱水

吸去过量的水分 将玻片在 Harris 苏木精水浴中放置一分钟。用流动的去离子水，将玻片洗涤 15 秒，或直至洗涤水变得澄清。将玻片在 0.5% 酸醇中快速浸渍一下，并用流动的 DI 水洗涤 30 秒。然后，将玻片在 0.2% 氨水中放置 40 秒，并用流动的 DI 水洗涤 15 秒。将玻片置于 3 次连续的 95% 乙醇水浴中，每次浸渍 15 下。将玻片置于 3 次连续的 100% 乙醇水浴中，每次浸渍 15 下。然后，将玻片置于 3 次连续的二甲苯（等价的澄清剂）水浴中，每次水浴 1 分钟。用封固剂固定玻片。

玻片的判读

阳性对照

首先应当检查阳性对照组织，以确定所有试剂的功能是适当的。靶抗原部位的褐色终产物的存在，表示阳性反应。如果阳性对照组织无法显示阳性染色，应当认为该测试样品的结果是无效果的。

阴性对照

阳性对照组织之后，应当检查阴性对照组织，以证实一级抗体对靶抗原的定位标记。在阴性对照组织中未出现特异染色，这证明未出现抗体对细胞/细胞级份的交叉反应。如果在阴性对照组织中出现特异染色，应当认为该测试样品的结果是无效果的。

如果出现了，则非特异性染色将发生扩散。在来自甲醛过度固定组织的切片中，可观测到结缔组织的散在荧光染色。坏死细胞或衰老细胞常常非特异染色。

测试组织

应当最后检查通过一级抗体所染色的测试样品。应当在阴性对照试剂的非特异性背景染色的环境中，评价阳性染色强度。未出现特异阳性染色反应，判读为未有抗原检出。

应当在玻片上进行组织的形态检阅，以确定是否存在足够数量的组织，和是否恰当地表示所定义的组织。将不符合上述标准的样品，剔除该分析。

染色强度

相对于含有通过阴性对照抗体所染色的相邻切片的对照玻片的强度，判定测试制品的染色强度。将通过阴性试剂对照所标记的切片的染色，定义为“背景”。

“0”表示没有同种型背景染色的斑点。

“1+”表示所观察的暗淡或浅棕色染色的弱反应。在显微镜检中，1+染色在低放大倍数下通常是不可见的。

“2+”表示所观察的中间暗度（强度）的褐色染色阴影的中等反应。在显微镜检中，2+染色在低放大倍数下是可见的，但不显著。

“3”表示所观察的黑色染色的黑褐色的强反应。在显微镜检中，作为明显阳性染色的3+染色在低放大倍数下是很易识别的。在高放大倍数下，在亚细胞位置（膜、细胞质和核）可看到强度加重。

染色强度的判读

得分	FR 评价	染色模式
0	阴性	背景中的肿瘤细胞未染色
1+	阳性	背景中的肿瘤细胞出现染色
2+	阳性	在 $\geq 10\%$ 的肿瘤细胞中，出现“2+”中度染色
3+	阳性	在 $\geq 10\%$ 的肿瘤细胞中，出现“3+”强染色

实施例 10

FISH 分析

制备甲醛固定、石蜡包埋的癌组织切片，并进行化学和酶促处理，以消化蛋白质。然后，在 $20\times$ SSC 和甲酰胺的存在下，将切片在 75°C 下加热，以将 DNA 从双链 DNA 转变为单链 DNA。然后，将切片接触含

有荧光标记的 DNA 探针的杂交液,其中所述的 DNA 探针互补于编码维生素受体的核酸,或互补于与编码维生素受体的核酸互补的核酸。然后,在有利于杂交的条件下,温育切片。在 20×SSC 和甲酰胺的混合液中,洗涤切片。

使用结合于连接 DNA 探针的生物素的荧光标记配体(如,荧光素标记的亲素),检测杂交探针。然后,使用嵌入型荧光染料(如, Antifade 溶液中的 DAPI),复染核 DNA。落射荧光显微镜用于检测荧光,并产生绿光(荧光素)和蓝光(DAPI)的发射。对组织切片中的胞核,计算蓝色背景中的绿色信号量。在美国专利号 6,358,682 中,更详细地描述了该方法,并在此通过引用以作为参考。

实施例 11

维生素受体-结合分析

获得来自癌症患者的组织样品(如,卵巢癌症患者或乳腺癌患者)。在 4℃ 下实施所有样品的制备过程,并通过已知的方法进行实施(Parker 等, *Anal. Biochem.* (2005),在此通过引用以作为参考)。

叶酸受体分析

根据下列叶酸受体定量法,实施该出版物中所述的例证性方法。使用 PowerGen125 均质化器(Fisher Scientific),在匀浆缓冲液(10mM Tris, pH8.0, 亮抑酶肽和抑蛋白酶肽各 0.02mg/ml; 1ml 缓冲液/50mg 的组织)中搅匀组织样品。通过轻度离心(3000×g, 15 分钟),除去大碎片。通过以 40,000×g、离心 60 分钟,收集膜沉淀,并重悬浮在增溶缓冲液(50mM Tris, pH 7.4; 150mM NaCl; 2mM *n*-辛基-β-D-葡萄糖苷, 5mM EDTA 以及 0.02%叠氮化钠)中。通过再次以 40,000×g 离心 60 分钟,除去不可溶物质,并通过二喹啉甲酸(bicinchoninic acid,BCA)法(Pierce Chemical)测定上清的蛋白浓缩总量。然后,在增溶缓冲液中将每份样品稀释至 0.25mg/ml,并将 100μl 放入两台 Microcon-30 微量浓缩器(30,000-MW 截止功率, Millipore)中的每一台。然后在室温下,以 14,000×g 将样品离心 10 分钟,使得所有液体穿过膜并将溶解受体保持在微量浓缩器膜的表面。所有随后的离心步骤都使用相同的参数。

将乙酸盐缓冲液(55μl 的 30mM 乙酸, pH3.0, 150mM NaCl)加入

每台微量浓缩器，随后实施离心步骤。其次，将 55 μ l 磷酸盐缓冲液盐水 (PBS) 分发到微量浓缩器中，随后实施另一次离心。然后，将 50 μ l 的 [3 H]-叶酸结合试剂 (120nM [3 H]-叶酸 (Amersham)、10mM Na₂PO₄、1.8mM KH₂PO₄、pH7.4，含有 500mM NaCl、2.7mM KCl 以及 25mM *n*-辛基- β -D-葡萄糖苷) 或 50 μ l 竞争剂 (添加 120 μ M 未标记叶酸的结合试剂) 加入适当的浓缩器中。在室温下温育 20 分钟后，用 75 μ l 的 50mM *n*-辛基- β -D-葡萄糖苷 (0.7M NaCl 的 PBS 溶液，pH7.4)，将浓缩器洗涤/离心 3 次。最后洗涤后，通过用 100 μ l 的含 4% Triton-X100[®] 的 PBS 洗涤 2 次，从微量浓缩器的膜表面回收含溶解叶酸受体滞留物。然后，在液体闪烁计数器 (Packard Bioscience Co.) 中计算样品。根据已知标准的 CPM，将 CPM 值转变成叶酸受体皮摩尔，并根据样品蛋白含量对最终结果进行标准化处理。

浓度依赖性和线性分析

将以上列出的叶酸受体分析法进行几次修正。对于浓度依赖性分析，选择表达高叶酸受体水平的已知的人 B-细胞淋巴瘤组织以用于分析，并且每台微量浓缩器分析 50 μ g 膜衍生总蛋白。对 5 种 [3 H] 叶酸结合试剂浓度 (5、15、30、60 和 120nM)，测试 1000 倍过量的未标记叶酸的存在和不存在。达到所用的该分析饱和度。为了说明叶酸受体结合部位的饱和度，将 25 μ g 转移性卵巢恶性腺瘤作为组织样品，并分析 10、100、120、130 和 140nM 的 [3 H] 叶酸结合试剂浓度 (+/-1000 倍过量的未标记叶酸)。

还显示了展现线性的分析法。使用 120nM [3 H] 叶酸结合试剂溶液，对来自人卵巢乳突状浆液性囊腺癌组织样品的 14、24、34、和 45 μ g 的膜衍生总蛋白，进行线性分析。通过 BCA 蛋白分析法 (Pierce)，测定蛋白浓度。

实施例 12

维生素受体在癌细胞上的表达

将甲醛固定的结肠、肺、卵巢和子宫内膜肿瘤的石蜡包埋切片 (每种肿瘤组织检查 30-50 张组织切片)，在来自 Fisher 的 SuperFrost 带电玻片上进行 5 微米切片，以实施免疫组化。在染色之前，将玻片在 65 $^{\circ}$ C 烘

箱中烘烤 30-40 分钟。使用变动 3 次的二甲苯，对甲醛固定的石蜡包埋样品进行脱蜡，并在一系列乙醇洗涤（100%、95%，然后 70%乙醇）直至流动蒸馏水中进行再水合。脱蜡之后，将玻片置于预热的 DAKO Target Retrieval 缓冲液的 99℃水浴中。切片冷却分钟之后，在流动的蒸馏水中充分洗涤切片。对于该过程（室温下），在 DAKO Autostainer 上完成观测。将切片在 3% H₂O₂ 的乙醇溶液中温育 5 分钟，以灭活内源过氧化物。然后，将切片在 1:100 稀释的单克隆抗体 343 一级抗体的 DAKO 背景消除稀释液中进行温育。单克隆抗体 343 由科罗拉多大学的 Wilbur Franklin 博士惠赠，并定向靶向叶酸受体 α (Franklin 等, *Int.J.Cancer Suppl*, vol.8:89-95(1994))。使用 TBST 洗涤缓冲液，洗涤切片。使用 CSAII 无生物素的 Tyramide 信号放大系统 (DAKO Cytomation, Carpinteria, CA)，并使其温育 15 分钟。使用 TBST 洗涤缓冲液，洗涤玻片。然后，将切片在二氨基联苯胺(DAB+)溶液(DAKO Cytomation, Carpinteria, CA)中温育 5 分钟、用改良的 Schmidt 苏木精复染 5 分钟、在流动的自来水中染蓝 3 分钟，并进行固定和盖片。当用靶向叶酸受体 α 的单克隆抗体 343 进行免疫标记时，大多数的侵袭性结肠肿瘤、肺肿瘤、卵巢肿瘤和子宫内膜肿瘤是中等阳性(2+)至强阳性(3+)。

实施例 13

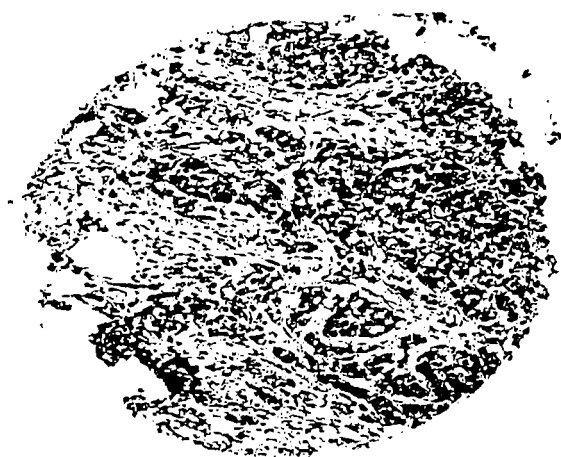
维生素受体在癌细胞上的表达

对甲醛固定的石蜡包埋切片，进行免疫组化。用 3 次变化的二甲苯脱蜡样品，并在递减的乙醇梯度（99×2，90%×2）中进行再水合，以及在流动的蒸馏水进行洗涤。在标准实验室水浴槽中，将玻片置于 DAKO Target Retrieval 缓冲液(DAKO Cytomation, Cat#S1699)中于 99℃温育 40 分钟，然后在 50mM Tris HCl、300mM NaCl、0.1%Tween-20 pH7.6(TBST)中室温冷却 20 分钟，并在 TBST 中进一步洗涤 2 次，每次 5 分钟。

然后，将切片与过氧化物酶封闭剂一起温育 5 分钟，随即与蛋白封闭剂一起温育 5 分钟，其中两种试剂都已包括在 CSAII 试剂盒(DAKO Cytomation, Cat#K1497)中。将切片与鼠 343 单克隆抗体(10 μ l/ml)在背景消除稀释液(DAKO Cytomation, Cat#S3022)一起温育 30 分钟。将阴性对照切片与 10 μ g/ml 的非免疫鼠 IgG₁(DAKO Cytomation, Cat #X0931)或与背景消除稀释液（无原始对照）一起温育。

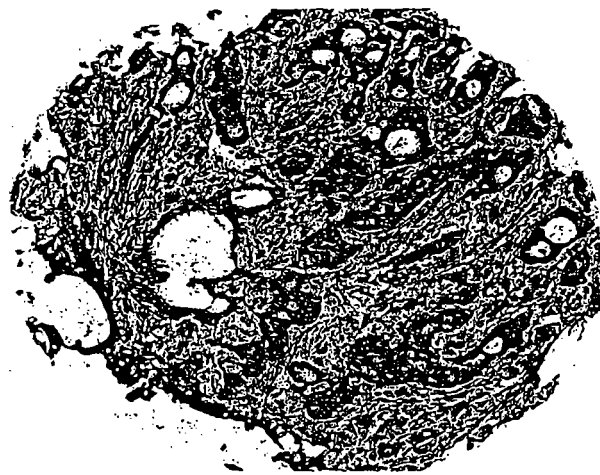
在切片与一级抗体一起温育后，然后在 TBST 中洗涤切片（3×5 分钟）、与抗鼠免疫球蛋白-HRP 一起温育 15 分钟、在 TBST 中洗涤（3×5 分钟），然后在黑暗中，与扩增试剂(荧光基团-酪胺/HRP)一起室温温育。扩增步骤之后，在 TBST(3×5 分钟)中洗涤切片，然后与抗荧光素-HRP 一起室温下温育 15 分钟。在最后一系列 TBST 冲洗（3×5 分钟）之后，将切片与二氨基联苯胺一起温育 3 分钟。CSA II 型试剂盒提供了在抗体扩增和观测步骤中所用的所有试剂的一部分。

在色素形成后，用苏木精复染切片、在乙醇递增梯度（90-99-100%）中进行脱水、在变化两次的二甲苯中进行纯化，并在 DePeX 下盖片。使用配置了 Olympus DP12 数字照相机的 Olympus BX51 显微镜，拍摄显微照片。如图 5-7（组 A、B 和 C）所示，使用叶酸受体 α 的单克隆抗体 mAb 343，将胰腺癌、子宫内膜癌和子宫颈癌组织染成阳性。



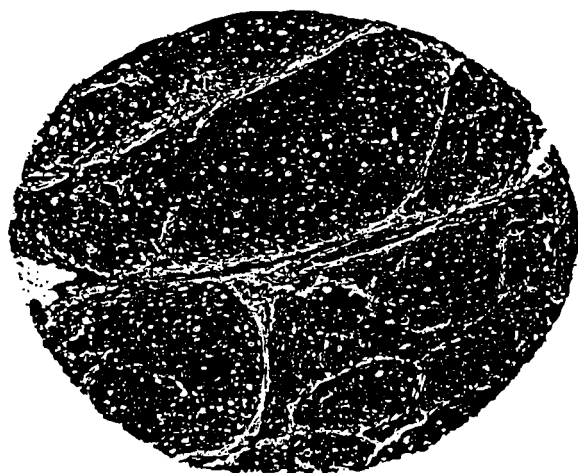
强度1

图 1



强度2

图 2



强度3

图 3

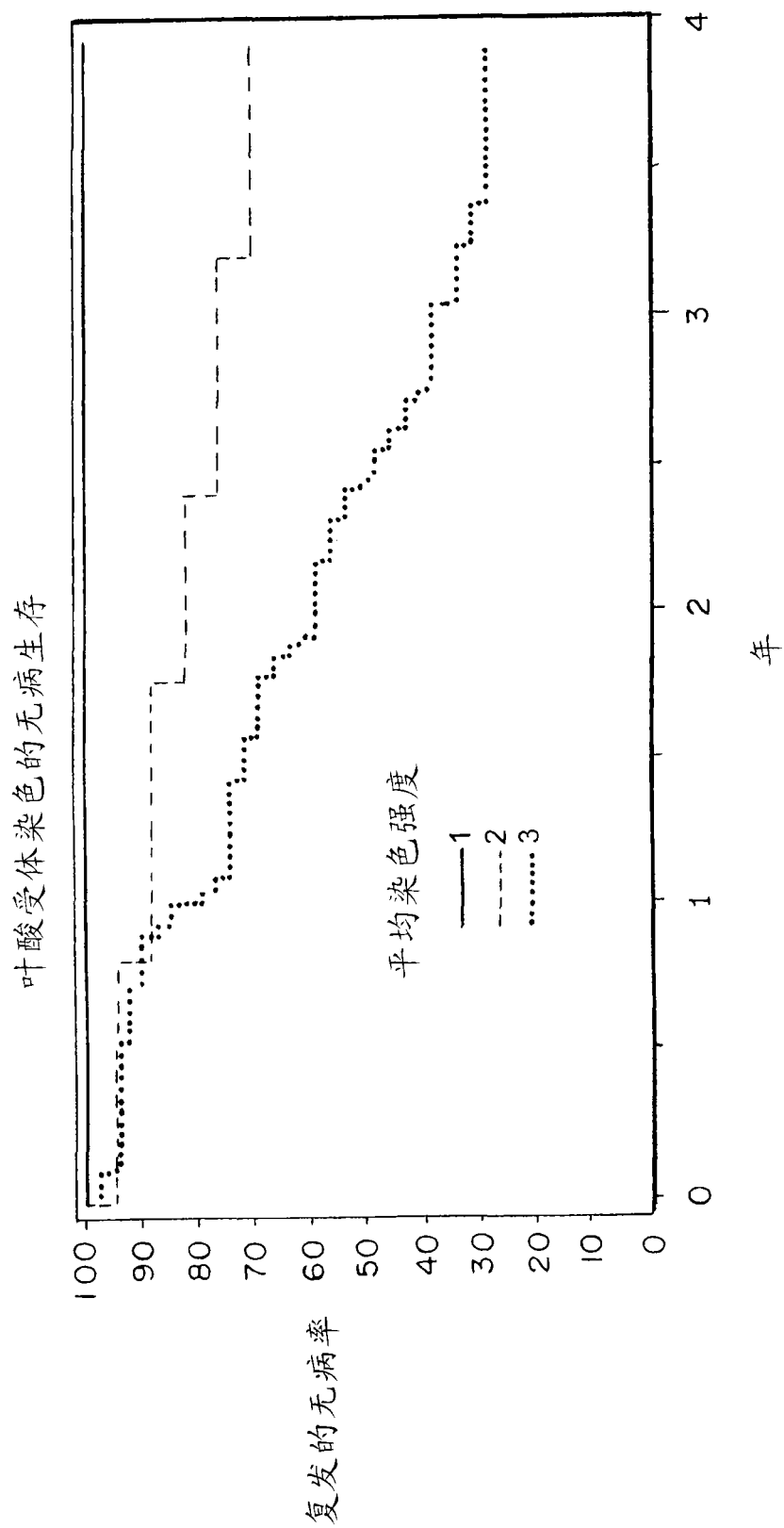


图 4

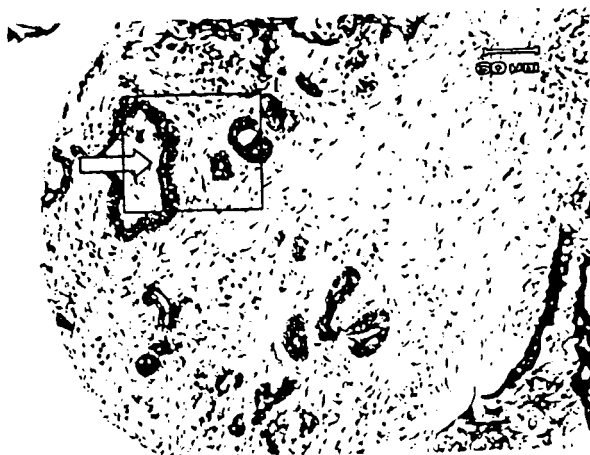


图 5A

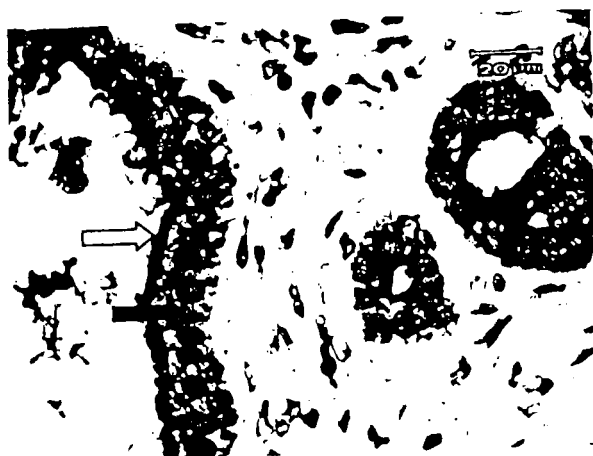


图 5B



图 5C



图 6A

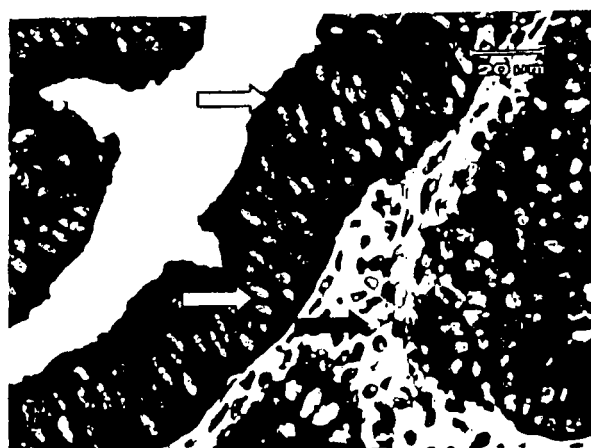


图 6B



图 6C

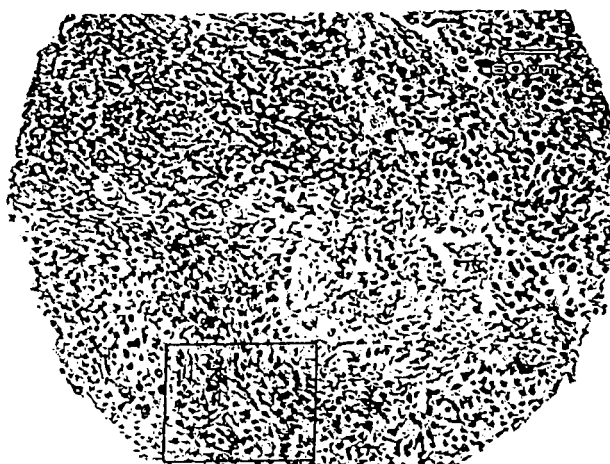


图 7A

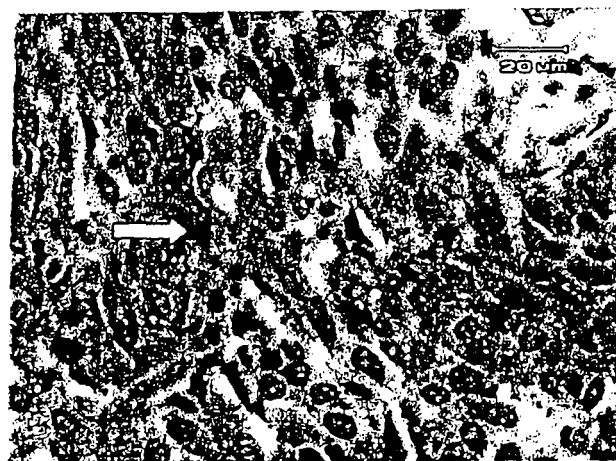


图 7B

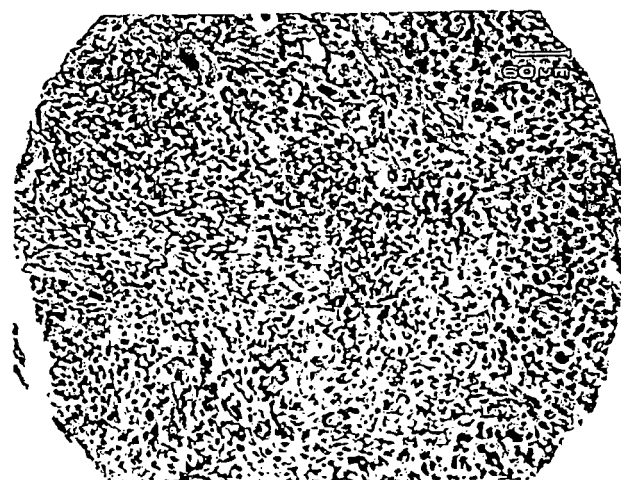
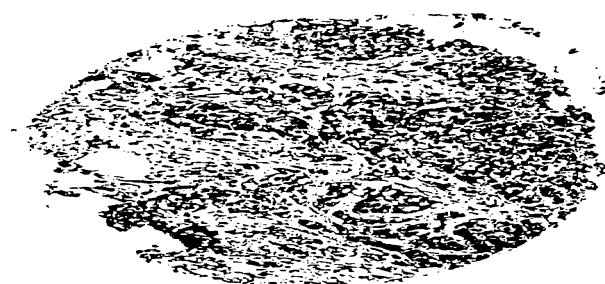


图 7C

专利名称(译)	使用细胞叶酸维生素受体定量法而用于癌症预后的方法		
公开(公告)号	CN101203759A	公开(公告)日	2008-06-18
申请号	CN200680019230.6	申请日	2006-03-30
[标]申请(专利权)人(译)	普渡研究基金会 恩多塞特公司 梅奥医学教育和研究基金会		
申请(专利权)人(译)	普渡研究基金会 恩多塞特公司 梅奥医学教育和研究基金会		
当前申请(专利权)人(译)	普渡研究基金会 恩多塞特公司 梅奥医学教育和研究基金会		
[标]发明人	PS罗 LC哈特曼 CP利蒙 PR埃利斯		
发明人	P·S·罗 L·C·哈特曼 C·P·利蒙 P·R·埃利斯		
IPC分类号	G01N33/569 G01N33/53		
CPC分类号	G01N33/57492		
代理人(译)	刘健 梁谋		
优先权	60/666430 2005-03-30 US		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明通过定量测定维生素受体在癌细胞上的表达，涉及确定癌症预后的方法。该方法的步骤包括定量测定维生素受体在癌细胞中的表达，和确定癌症预后。本发明还涉及用于测定癌细胞上的维生素受体存在的方法和试剂盒，以筛选应当通过利用维生素受体靶向术的疗法进行治疗的病人，和研制适于所述患者的治疗方案。本发明还涉及用于实施该方法的试剂盒。



强度 1

图 1