



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110139656 A

(43)申请公布日 2019.08.16

(21)申请号 201780061895.1

(22)申请日 2017.08.04

(30)优先权数据

62/371286 2016.08.05 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2019.04.04

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/US2017/045421 2017.08.04

(87)PCT国际申请的公布数据

W02018/027091 EN 2018.02.08

(71)申请人 纽约州州立大学研究基金会

地址 美国纽约州

申请人 科达斯诊断公司

(72)发明人 K.R.施罗耶

L.F.埃斯科巴-霍约斯 N.金

(74)专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司 72001

代理人 初明明 黄登高

(51)Int.Cl.

A61K 35/13(2015.01)

A61K 35/22(2015.01)

A61K 39/395(2006.01)

C07K 16/30(2006.01)

G01N 33/53(2006.01)

G01N 33/577(2006.01)

G01N 33/68(2006.01)

G01N 33/574(2006.01)

权利要求书2页 说明书17页

序列表4页 附图5页

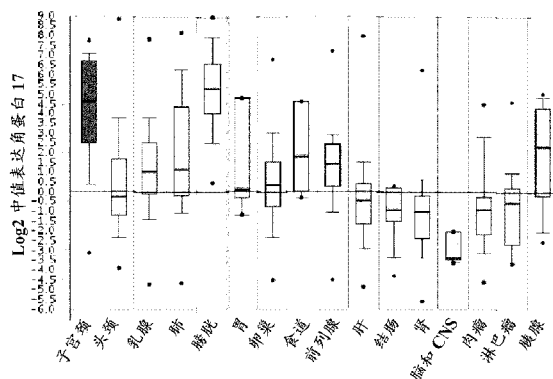
(54)发明名称

作为膀胱癌的生物标志物的角蛋白17

(57)摘要

本公开提供用于检测和分析从受试者获得的膀胱样品中K17表达的方法。本公开还涉及通过检测样品中的K17的表达来识别患有膀胱癌的哺乳动物受试者的方法和试剂盒。本发明的方法包括用于测定从受试者的膀胱获得的样品中的角蛋白17的水平的方法。基于细胞和无细胞的方法二者。

K17 基因表达: mRNA



1. 一种用于检测受试者中的角蛋白17表达的方法,包括:
从受试者获得样品,其中所述样品包含多个膀胱细胞;
检测所述样品中的角蛋白17 (K17) 表达,其中所述检测包括使所述细胞与抗K17抗体接触,和检测所述细胞中的K17和抗K17抗体之间的结合。
2. 权利要求1的方法,还包括处理所述样品,其中所述处理包括切碎所述样品以分离细胞,在包含尿素的裂解溶液中裂解所述分离的细胞,从所述裂解溶液中分离蛋白质,在包含胰蛋白酶的消化溶液中消化所述分离的蛋白质和将所得混合物离心成肽。
3. 权利要求1的方法,其中所述样品选自膀胱组织和尿。
4. 权利要求3的方法,其中所述膀胱组织是活检组织或福尔马林固定的石蜡包埋的组织样品。
5. 权利要求1的方法,其中所述多个膀胱细胞是移行性上皮细胞、结缔组织细胞、肌肉细胞、脂肪细胞或其组合。
6. 权利要求1的方法,其中所述样品中的K17表达通过选自免疫组织化学、组织微阵列、质谱、免疫细胞化学分析、蛋白质印迹、流式细胞术、微流体检测和ELISA的方法检测。
7. 权利要求6的方法,其中所述样品中的K17表达通过免疫组织化学或免疫细胞化学分析检测。
8. 一种诊断受试者中的膀胱癌的方法,包括:
从受试者获得样品,其中所述样品包含多个膀胱细胞;
检测所述样品中的K17表达,其中所述检测包括使所述细胞与抗K17抗体接触,和检测所述细胞中的K17和抗K17抗体之间的结合;和
当在所述样品中检测到增加量的K17时,诊断患有膀胱癌的受试者。
9. 权利要求8的方法,其中所述膀胱癌是尿道上皮癌。
10. 权利要求8的方法,其中所述尿道上皮癌是低恶性潜能的乳头状瘤形成、低级别乳头状尿道上皮癌、高级别乳头状尿道上皮癌或移行性尿道上皮癌。
11. 权利要求8的方法,其中所述抗K17抗体是小鼠单克隆-[E3]抗人K17抗体。
12. 权利要求8的方法,其中所述样品是尿样品。
13. 权利要求8的方法,其中所述样品是膀胱组织或福尔马林固定的石蜡包埋的膀胱组织。
14. 权利要求8的方法,其中所述样品中的K17表达通过选自免疫组织化学、组织微阵列、免疫细胞化学分析、蛋白质印迹、流式细胞术、微流体检测和ELISA的方法检测。
15. 权利要求14的方法,其中所述样品中的K17表达通过免疫组织化学或免疫细胞化学分析检测。
16. 权利要求8的方法,其中所述增加量的K17通过比较所述样品中的K17表达量与对照样品中的K17表达量检测。
17. 权利要求16的方法,其中所述对照样品是良性尿道上皮组织。
18. 权利要求17的方法,其中所述对照样品是膀胱粘膜。
19. 权利要求8的方法,其中所述增加的K17表达包括对照样品的至少1倍的K17表达水平。
20. 权利要求19的方法,其中所述增加的K17表达包括对照样品的5倍至10倍的K17表达

水平。

21. 权利要求8的方法,其中所述增加的K17表达包括对照样品的至少13倍的K17表达水平。

22. 权利要求21的方法,其中所述增加的K17表达包括对照样品的至少15倍的K17表达水平。

23. 权利要求22的方法,其中所述增加的K17表达包括对照样品的至少31倍的K17表达水平。

24. 权利要求8的方法,其中所述增加的K17表达包括对照样品的13倍至31倍的K17表达水平。

25. 一种用于识别患有膀胱癌的受试者的试剂盒,其包含描述根据权利要求8的方法的说明书。

26. 一种用于诊断患有膀胱癌的受试者的方法,包括:

从受试者获得尿样品,检测所述样品中的角蛋白17 (K17) 表达;和

当在所述样品中检测到增加量的K17时,诊断患有膀胱癌的受试者。

27. 权利要求26的方法,其中所述检测包括使尿样品与抗K17抗体接触,和检测所述样品中的K17和所述抗K17抗体之间的结合。

28. 权利要求8和26的方法,其中K17表达通过微流体测量检测。

29. 权利要求26的方法,其中所述K17表达通过ELISA检测。

30. 权利要求27的方法,其中所述抗K17抗体是小鼠单克隆-[E3] 抗人K17抗体。

31. 一种用于诊断患有膀胱癌的哺乳动物受试者的试剂盒,包括描述根据权利要求26的方法的说明书。

32. 一种诊断受试者中的膀胱癌的方法,包括:

从所述受试者获得尿样品;和

使用定性或定量检测方法检测所述样品中的K17蛋白或mRNA的量,其中所述样品中的K17蛋白或mRNA的检测指示所述受试者患有膀胱癌。

33. 权利要求32的方法,其中所述样品不含细胞。

34. 权利要求32的方法,其中对所述样品进行细胞收集步骤。

35. 权利要求33的方法,其中所述检测方法是定性测定。

36. 权利要求32的方法,其中所述检测方法是定量测定。

37. 权利要求36的方法,还包括检测对照样品中的K17蛋白或mRNA的量,其中当与所述对照样品比较时,检测所述尿样品中的K17蛋白或mRNA的量增加指示所述受试者患有膀胱癌。

38. 权利要求32的方法,其中超过所述量的K17蛋白或mRNA在多于一个尿样品中同时检测到。

39. 权利要求32的方法,其中所述检测包括使用自动化设备。

40. 权利要求39的方法,其中所述自动化设备能够运行除K17外的生物标志物的蛋白质或mRNA测定。

41. 权利要求32的方法,其中所述检测包括使用手持或便携式检测设备。

作为膀胱癌的生物标志物的角蛋白17

[0001] 相关申请的交叉引用

本申请要求2016年8月5日提交的美国临时申请号62/371,286的优先权的权益,其内容通过引用以其整体并入本文。

[0002] 本公开的领域

本公开涉及用于检测从受试者获得的样品中的角蛋白17的量的方法。本发明的方法可以用于诊断受试者中的膀胱癌。本公开的方法可以用组织活检和基于细胞以及无细胞的样品(如尿样品)实施。本公开还提供适用于确定可能包含或可能不包含完整细胞的尿中的K17的存在或不存在的方法,以及经由检测在受试者的尿的无细胞部分中的K17蛋白或mRNA来估计膀胱组织中的细胞角蛋白17的表达水平以确定该受试者中的膀胱癌的存在的方法。

[0003] 背景

膀胱癌是男性中第四大常见的恶性肿瘤且约占美国所有新诊断癌症的5%。参见American Cancer Society. Cancer Facts & Figures 2016. Atlanta, Ga: American Cancer Society (2016)。大约所有膀胱癌的一半首先在膀胱壁的衬里[即尿道上皮(也称为移行性上皮)]中被识别且被认为是非侵入性或原位癌症或尿道上皮癌(也称为移行性细胞癌)。参见Grossman, HB, 等人. JAMA. (2005) 293:810-816。大约1/3的膀胱癌患者表现出癌症侵入膀胱壁的下层肌层。治疗方式的进展导致早期诊断(即0期或I期膀胱癌)的受试者的存活率增加,其中早期诊断的受试者的平均五年存活率是85-98% [American Cancer Society. Cancer Facts & Figures 2016. Atlanta, Ga: American Cancer Society (2016)]。相反,晚期诊断导致更加黯淡的结果,其中诊断为II期或III期膀胱癌的受试者具有45%至65%的平均五年存活率。参见Kaufman DS, 等人. Lancet. (2009) 374: 239-249; American Cancer Society. Cancer Facts & Figures 2016. Atlanta, Ga: American Cancer Society (2016); 和Soloway MS. Urology. (2006) 67: 3-10。

[0004] 目前检测膀胱癌的方法包括尿分析(即检测尿中的血液),并使用各种商业测试: Immunocyt™, NMP22 BladderChek®, BTastat® Test和UroVysion® 膀胱癌试剂盒。Immunocyt™ 针对粘蛋白和癌胚抗原(CEA)的存在检测受试者的尿。NMP22 BladderChek® 筛选确定特定蛋白质NMP22是否存在于受试者的尿中。BTastat® Test经设计以检测人类补体因子H相关蛋白(hCFHrp)作为癌症生物标志物,其对于高级别尿道上皮癌的检测相对灵敏,但通常无法检测低级病变(即0-I期膀胱癌)(其提供最佳的治愈机会)。UroVysion® 膀胱癌试剂盒在来自怀疑患有膀胱癌的受试者的尿样本中经由荧光原位杂交(FISH)测试染色体3、7、17的非整倍性和9p21基因座的丢失。与BTastat® Test一样,UroVysion® 无法有效检测膀胱粘膜的低级别肿瘤,因为大多数低级别肿瘤是二倍体且因此用UroVysion® 膀胱癌试剂盒测试来测试为阴性。

[0005] 因此,对识别新的诊断生物标志物存在未满足的需求,其可以与现有治疗方法结合使用以确定受试者是否患有或继续患有膀胱癌,从而可以在早期识别需要治疗的患者。如果这种方法能够是非侵入性的,部署在能够一次运行多个测试和/或多个样品的现有技术诊断测试系统上,则这种方法将是特别有利的。本公开的方法解决了这些未满足的需求

且使得能够实现比现有测试更有效的治疗和更好的患者结果和存活时间。

[0006] 角蛋白17 (K17, KRT17或细胞角蛋白17), 一个中间丝细胞骨架家族的成员, 已被识别为某些特定癌症(即胰腺癌和宫颈癌)的预后和诊断生物标志物。参见Escobar-Hoyos, L. F., 等人. *Modern pathology* (2014) 27 (4) :621-630。然而, 本公开识别K17不是在所有癌症中过表达。例如, 图1清楚地显示, 虽然K17在某些癌症(例如宫颈癌和胰腺癌)中升高(高度表达), 但K17在许多其他癌症, 例如肝、结肠、肾、脑和淋巴结癌中不高度表达。癌症中的K17表达通常是器官和肿瘤类型特异性的。值得注意的是, 本公开第一次识别与从健康受试者的膀胱组织和尿样品确定的K17表达水平比较, 可以在患有膀胱癌的受试者的膀胱组织中检测到升高的K17表达水平, 以能够经由K17检测来进行膀胱癌的可靠诊断测试。

[0007] 本公开识别并验证K17作为诊断性膀胱癌生物标志物的效用且提供用于检测受试者中的膀胱癌的高度灵敏的方法。该方法还有利地在之前未知患有膀胱癌的患者中使用, 对于所述患者, 非侵入性、廉价的测试将提供超过现有诊断的意外进展, 现有诊断需要昂贵且侵入性的程序来验证患者患有膀胱癌。

[0008] 本公开的概述

本公开揭示角蛋白17是用于诊断膀胱癌的生物标志物, 所述膀胱癌包括早期膀胱癌, 其具有积极治疗结果的最佳潜力。本公开还揭示使用排泄尿可以进行可靠的、非侵入性膀胱癌诊断。例如, 本文的数据显示可以单独基于尿测试, 通过简单地减少困扰目前的非侵入性测试方法的“假阴性”读数的量来进行改进诊断。本文提供的数据还显示, 在患有早期和高级别膀胱癌的受试者中K17水平增加(当与对照样品比较时), 但在正常良性膀胱粘膜(即, 非癌性对照组织)中缺乏或检测到低水平。总之, 本公开首次显示, 增加的K17表达是膀胱癌的发生和进展中的关键事件且可以测量K17表达作为受试者中的膀胱癌的诊断指标。

[0009] 因此, 在本公开的一个方面, 提供用于确定受试者中的K17的量的方法。在某些实施方案中, 受试者患有膀胱癌或可能患有膀胱癌。在本发明的方法的一个示例性实施方案中, 从受试者获得膀胱细胞的样品; 且然后标记样品以检测样品中K17的表达。在某些实施方案中, 通过抗体与样品中的K17蛋白的结合来检测K17的存在。在另一个实施方案中, 通过测量样品中的K17 mRNA的水平, 例如通过RT-PCR, 检测K17的存在。在其他实施方案中, 在样品中检测K17表达并与对照样品(例如参考样品或标准品)的K17表达比较, 且当K17水平增加至高于对照样品的水平时, 受试者患有膀胱癌。在某些实施方案中, 样品是膀胱组织活检、福尔马林固定的石蜡包埋的组织样品或尿样品。在一些实施方案中, 对照样品是来自健康受试者的良性膀胱粘膜、尿道上皮细胞或移行性上皮细胞。在其他实施方案中, 对照样品是标准品, 其可以是包含已知量的K17蛋白或核酸的参考样品或可以简单地是基于样品中检测到的特定量的K17蛋白或核酸提供阳性、阴性或无结果的读数或指令。在其他实施方案中, 样品是尿, 且尿将含有一种或多种膀胱癌或膀胱癌细胞。在一些实施方案中, 已知样品将不含细胞。在具体的实施方案中, 检测到的膀胱癌是尿道上皮癌。在某些实施方案中, 尿道上皮癌是乳头状癌, 例如低恶性潜能的乳头状尿道上皮肿瘤(PUNLMP)、低级别乳头状尿道上皮癌(LG)、高级别乳头状尿道上皮癌(HG)或移行性尿道上皮癌。在其他实施方案中, 检测到的膀胱癌是扁平癌, 例如膀胱的原位扁平尿道上皮癌(非侵入性扁平尿道上皮癌)。在又其他实施方案中, 检测到的膀胱癌是侵入性癌症, 例如侵入性尿道上皮细胞癌。在某些实施方案中, 检测到的膀胱癌是鳞状细胞癌、腺癌、小细胞癌或肉瘤。在本发明的方法的一些

实施方案中,通过免疫组织化学染色或免疫细胞化学分析或通过mRNA检测测定样品中K17表达的存在或不存在或水平。

[0010] 在本公开的另一方面,提供用于检测无细胞样品中的K17表达的方法。在某些实施方案中,受试者患有膀胱癌或可能患有膀胱癌。在本发明的方法的一个示例性实施方案中,样品是从受试者获得的排泄尿。在其他实施方案中,排泄尿样品不含细胞或已经过处理,使得所有细胞都已从所述样品中除去。在具体的实施方案中,无细胞尿样品从受试者获得;且然后使样品与抗K17抗体接触以检测样品中K17的量。此处,样品中K17的量将反映受试者的膀胱中K17的量。在某些实施方案中,通过抗体与样品中的K17蛋白的结合或通过质谱法检测K17的存在。在某些实施方案中,通过检测样品中的K17 mRNA确定K17的量。在一些实施方案中,所述方法可以是定性的(即,样品中检测到的K17的任何量指示膀胱癌)或定量的(仅高于预定水平的量指示患有膀胱癌的受试者)。在定量实施方案中,基于与对照样品比较在样品中检测的K17蛋白或K17 mRNA的量确定K17表达,且当K17水平增加至高于对照样品的水平时,受试者患有膀胱癌。在一些实施方案中,对照样品是来自一个或多个健康受试者的尿或包含已知量的K17蛋白或mRNA的溶液,或简单地已知量或设定为特定量的标准品。在具体的实施方案中,检测到膀胱癌是尿道上皮癌。在某些实施方案中,检测到的尿道上皮癌是乳头状癌,例如低恶性潜能的乳头状尿道上皮肿瘤(PUNLMP)、低级别乳头状尿道上皮癌(LG)或高级别乳头状尿道上皮癌(HG)。在其他实施方案中,检测到的膀胱癌是扁平癌,例如膀胱的扁平原位癌或非侵入性扁平尿道上皮癌。在又其他实施方案中,检测到的膀胱癌是侵入性癌症,例如侵入性尿道上皮细胞癌或移行性细胞癌。在某些实施方案中,检测到的膀胱癌是鳞状细胞癌、腺癌、小细胞癌或肉瘤。在本发明的方法的一些实施方案中,样品中K17表达的水平由ELISA确定。在本发明的方法的其他实施方案中,通过检测膀胱细胞或尿中K17 mRNA的量来确定K17表达水平。

[0011] 附图和表格的简述

图1:角蛋白17表达在不同类型的癌症中变化。RNA表达数据,通过数据挖掘来自国家癌症研究所的TCGA数据入口进行评估。直方图显示具有升高的K17表达的某些类型的癌症(例如宫颈癌、膀胱癌和胰腺癌)的K17表达的对数标度表示。该图表进一步显示许多类型的癌症,例如结肠癌、肝癌、脑癌和淋巴瘤,表达相对低水平的K17。

[0012] 图2:尿细胞学样品中K17的免疫细胞化学定位。角蛋白17表达可以通过检测标记的细胞质K17(较暗的细胞)显示,而其他非癌细胞缺乏K17标记(正常的、未标记的细胞)。

[0013] 图3A-D:角蛋白17尿免疫细胞化学。(a),罕见良性细胞中的K17染色,4倍放大率;(b),罕见良性细胞中的K17染色,40倍放大率;(c),增加的(2+)K17染色,4倍放大率;(d),增加的(2+)K17染色,20倍放大率。在罕见情况下,K17在来自正常尿细胞学样本的良性细胞中稀疏检测到(a,b),但K17染色在来自患有尿道上皮癌的受试者的尿道上皮细胞中是强阳性的(c,d)。

[0014] 图4A-D:角蛋白17免疫细胞化学。(a,b)大多数正常鳞状和尿道上皮细胞(c,d)对K17是阴性的,即没有表现出角蛋白17染色。

[0015] 图5A-D:膀胱组织学。(a,b,d) K17的仅微弱局灶性染色在良性膀胱粘膜(c)中检测到。

[0016] 图6A-D:在所有等级的尿道上皮肿瘤中检测到增加的K17。(a)低恶性潜能的乳头

状尿道上皮肿瘤；(b)低级别乳头状尿道上皮癌，其从邻近的对照尿道上皮粘膜转换；(c-d)高级别乳头状尿道上皮癌。免疫组织化学分析显示在所有异常尿道上皮细胞（即肿瘤组织）中弥漫和稳健的角蛋白17表达(a,b)，高级别尿道上皮癌表现出更加局灶性K17表达(c,d)。

[0017] 图7A-D:侵入性尿道上皮癌中的增加的角蛋白17免疫组织化学。(a)在非肿瘤性尿道上皮粘膜下方发现的侵入性癌；(b)在精囊周软膀胱组织中的侵入性癌；(c)在癌的侵入性前沿的K17表达；(d)通过肿瘤细胞的固有层侵入。测试的所有组织样品显示，当与来自健康患者的组织比较时，从患有侵入性尿道上皮癌的受试者获得的肿瘤细胞中的角蛋白17表达增加。

[0018] 图8A-B:使用微流体检测方法的角蛋白17检测。分析(a)HeLa和(b)C33细胞的样品。数据显示，当与C33(35.1% K17阳性)细胞比较时，在HeLa(90.4% K17阳性)中检测到显著更多的K17标记的细胞。这些数据显示，使用与K17免疫染色方法结合的微流体设备可以有效地实现K17的检测，且因此，微流体设备以及K17 mRNA检测和定量方法是实施本发明的方法的合适手段。

[0019] 表1:对照尿道上皮粘膜和尿道上皮膀胱癌的角蛋白17染色。对照样品(良性)和早期尿道上皮膀胱癌(PUNLMP, LG, HG)的平均PathSQ评分指示对照膀胱组织样品和尿道上皮癌组织样品中K17表达的显著差异($p < 0.001$)。

[0020] 表2:尿细胞学样品中K17表达的免疫细胞化学分析。该数据比较来自患有膀胱癌的患者(对恶性肿瘤阳性)和无膀胱癌患者(对恶性肿瘤阴性或对恶性肿瘤可疑)的尿样品中的临床诊断。这些数据从患有膀胱癌的受试者(T3-T7)获得的所有样品中K17的阳性染色。相反，从非癌症患者获得的尿样品未表现出K17标记，即使存在可检测水平的膀胱细胞(N1, N7, N8)。

[0021] 表3:通过从尿中分离的细胞的免疫细胞化学染色检测K17表达。表3显示来自四个独立研究的结果，共分析了104个患者样品。使用本发明的方法分析来自患有膀胱癌的受试者的39个样品和来自良性组织的65个样品。显示每个研究的K17检测方法的灵敏度和特异性。结果显示，目前基于K17的诊断方法具有93%的平均灵敏度和91%的特异性。

[0022] 表4:用于检测尿的无细胞组分中角蛋白17蛋白的ELISA的检测限。表4显示通过ELISA测试的具有平均值、标准偏差和变化系数百分比(%CV)的来自K17标准品(重组17蛋白)的K17测试结果。从阴性对照(零标准/无K17蛋白)确定阳性信号的截止值，使得阳性K17测定为阴性对照的平均值的标准偏差的3倍(零标准的平均值+[3x零标准的标准偏差])。

[0023] 表5:来自膀胱癌受试者的无细胞尿样品中K17蛋白的检测。表5显示测试21个尿样品(6个癌性, 15个良性/对照)的数据。K17阳性样品具有至少0.081的平均光密度(OD)和低于20%的%CV。数据显示，6个癌症中有4个检测出K17阳性，而且没有一个良性样品检测出K17阳性。

[0024] 表6:通过定量RT-PCR检测K17 mRNA的引物组。表6显示用于通过RT-PCR检测和/或定量K17 mRNA的示例性引物对。设计本发明的合适引物，例如表6中所示的那些，以产生跨越K17内含子的产物，使得只有当样品中存在由K17 mRNA产生的cDNA时才发生预测大小的产物的PCR扩增。

[0025] 本公开的详述

迄今为止，膀胱癌，特别是早期膀胱癌(例如，尿道上皮癌)的诊断标志物(例如，免疫组

组织化学标志物) 相对于原位可视化和/或活检, 例如侵入性程序的金标准, 仅略微改善诊断准确性。相反, 本公开识别, 表征和验证新型生物标志物K17, 并提供相对于现有技术改善诊断准确性的新方法, 且有利地用于使用膀胱组织的免疫组织化学染色和用于筛选尿细胞学样品的免疫细胞学技术或用于检测K17 mRNA的基于核酸的测试来检测早期膀胱癌。本公开还提供通过检测膀胱组织和尿样品 (包括无细胞尿样品) 中的K17蛋白或mRNA水平来诊断患有膀胱癌的受试者的无细胞方法。

[0026] 术语

如本公开中使用的术语“肽”或“蛋白质”是指通过相邻氨基酸残基的 α -氨基和羧基之间的肽键彼此连接的一系列线性氨基酸残基。在一个实施方案中, 蛋白质是角蛋白17 (K17)。

[0027] 如本文所用的术语“核酸”是指任何种类的一种或多种核苷酸碱基, 包括单链或双链形式。在本公开的一个方面, 核酸是DNA且在另一方面, 核酸是例如mRNA。在实施本公开的方法中, 通过本发明的方法分析的核酸 (例如, K17 RNA) 来源于一个或多个样品。

[0028] 如本文所用的术语“细胞角蛋白17”, “角蛋白17”, “KRT17”和“K17”是指位于第17号染色体上的人角蛋白, 角蛋白, II型细胞骨架4基因 (如以登录号NG_008625阐述) 或其产物, 其编码I型中间丝链角蛋白17。包括在K17的预期含义内的是如以登录号NM_000422阐述的角蛋白17 cDNA序列的mRNA转录物, 和由其翻译的蛋白质, 包括例如角蛋白, I型细胞骨架蛋白, 17 (如以登录号NP_000413阐述) 或其同系物。

[0029] 如本文所用的短语“受试者”, “测试受试者”或“患者”是指任何哺乳动物。在一个实施方案中, 受试者是膀胱癌诊断 (例如, 尿道上皮癌) 的候选者或具有癌前病变, 例如尿道上皮癌形成的个体。在某些实施方案中, 所述受试者已被诊断患有膀胱癌且所述受试者是其治疗的候选者。本公开的方法可以在任何具有患癌症风险或已被诊断患有癌症的哺乳动物受试者上实施。特别地, 当在人体上实施时, 本文描述的方法是最有用的。

[0030] 如本公开中使用的“生物样品”、“测试样品”或“样品”可以以技术人员已知的任何方式获得。样品可以源自受试者的任何部分, 包括膀胱组织、尿或其组合。在某些实施方案中, 样品是从受试者的膀胱中提取的组织活检、新鲜组织或活组织。在具体的实施方案中, 样品是来自膀胱壁的细胞收集, 例如膀胱的移行性上皮、结缔组织、肌肉组织或脂肪组织。在其他实施方案中, 在用于所公开的方法之前处理样品。例如, 从受试者中分离的福尔马林固定的石蜡包埋的组织样品可用于本公开的方法, 因为福尔马林固定和石蜡包埋有利于临床组织样本的组织学保存和诊断, 且福尔马林固定的石蜡包埋的组织比新鲜或冷冻组织更容易大量获得。在一些实施方案中, 通过离心或通过过滤从尿中收集细胞, 并将收集的细胞用于测试。技术人员将注意确保样品以防止K17蛋白或mRNA的可避免降解的方式收集, 处理和测试, 这可以根据待采用的测试而变化。在具体的实施方案中, 样品是从受试者获得的一定体积的尿, 由此尿可以具有或不具有可检测量的细胞 (即, 样品可以是或可以不是无细胞的)。在某些实施方案中, 样品是含有K17蛋白或mRNA的无细胞尿样品。

[0031] 如本文所用的“对样品”、“非癌性样品”或“正常样品”是不表现出升高的K17和/或表现出没有K17或降低的K17水平 (其中“降低”是相对于标准品或指示癌症的其他已知值) 的样品。在某些实施方案中, 对样品不含癌细胞 (例如, 良性组织组分, 包括但不限于正常膀胱粘膜、良性膀胱粘膜细胞和来自膀胱的尿道上皮或移行性上皮的其他非癌细胞)。

在一个具体的实施方案中,对照或正常样品是来自良性组织的样品,其不表现出K17染色或表达。用于本公开的对照样品的非限制性实例包括非癌组织提取物,从受试者提取的手术切缘,已知具有正常或降低的K17水平的分离细胞,或从其他健康个体获得的良性样品或尿。在一个实施方案中,对照样品是来自健康个体的人尿或配制的尿替代品(没有或具有预定量的K17蛋白或核酸)。在一个实施方案中,本公开的对照样品是从涉及的受试者获得的良性膀胱组织。在某些其他实施方案中,对照样品是从健康受试者(即,无癌症患者)获得的尿细胞学样品。在具体的实施方案中,对照样品是从受试者获得的无细胞体积的尿,由此尿不具有可检测量的K17蛋白或核酸。在其他实施方案中,对照样品是从受试者获得的无细胞体积的尿,其中无细胞尿样品具有已知量的可检测的K17蛋白或核酸。

[0032] 术语“增加”或“更大”或“升高”意指至少大于在对照样品中识别(例如K17表达或量)、测量或分析的实体的相对量。非限制性实例包括但不限于相对于对照样品增加50%,或相对于阴性对照样品增加至少30%,40%,50%,60%,70%,80%,90%,100%,200%,300%,400%,500%,1000%或更大。在具体的实施方案中,指示患有膀胱癌的受试者的K17表达包括相对于由对照样品表现出的K17表达量增加至少1倍,1.5倍,2倍,3倍,4倍,5倍,10倍,13倍,15倍,20倍,25倍,30倍或更大。如本公开中使用的“增加的K17表达水平”应表示与K17表达的对照或正常水平或如在参考样品中测量或通过标准设定的比较,细胞、生物体或样品中存在的K17蛋白或其肽片段或RNA的量增加。在某些实施方案中,样品中任何量的K17的检测为相对于对照的增加。在某些具体的实施方案中,与膀胱癌相对应的角蛋白17表达水平的增加通过相对于由对照样品表现出或作为标准设定的K17表达量,至少1倍、2倍、3倍、4倍、5倍、10倍、13倍、15倍、20倍、25倍、30倍或更大增加的K17表达的存在来示例。

[0033] 术语“降低”或“减少”意指至少小于在对照样品中识别、测量或分析或由标准设定的实体的相对量。

[0034] 如本文所用的短语“膀胱癌”包括膀胱的细胞或组织中的恶性肿瘤。膀胱癌包括例如称为尿道上皮或移行性上皮的细胞层中的恶性肿瘤,所述细胞层排列在输尿管、膀胱、尿道和肾脏的部分的内侧。在特定情况下,膀胱癌包括膀胱壁的结缔组织、肌肉或脂肪层中存在癌细胞。本公开的膀胱癌可以是膀胱的侵入性或非侵入性,乳头状或扁平癌。“乳头状癌”通过从膀胱内表面向膀胱的中空中心生长的细长的手指状突起示例。向膀胱中心生长而不会生长到膀胱壁的更深组织层的乳头状肿瘤是非侵入性乳头状膀胱癌。在某些实施方案中,膀胱癌是具有低恶性潜能的乳头状尿道上皮肿瘤(PUNLMP)。在其他情况下,膀胱癌是低级别(缓慢生长)乳头状尿道上皮癌(LG)或高级别乳头状尿道上皮癌(HG)。在其他实施方案中,膀胱癌是移行性尿道上皮癌。“扁平癌”是不会向膀胱的中空部分生长且主要取代膀胱壁的移行性上皮的膀胱癌。在某些实施方案中,膀胱癌是非侵入性扁平癌或扁平原位癌(CIS)。在其他实施方案中,膀胱癌是膀胱壁的鳞状细胞癌,腺癌,小细胞癌或肉瘤。使用本公开的方法可检测的膀胱癌可被指定“级别”,例如低级别或高级别癌症。“低级别膀胱癌”由尿道上皮细胞组成,其具有正常或对照膀胱尿道上皮细胞的外观且通常对治疗反应具有良好或积极的预后。“高级别膀胱癌”是从正常或对照组织中可辨别的分化差或未分化的膀胱细胞子集。与低级别癌症比较,高级别膀胱癌通常更具有侵入性且具有差的预后。

[0035] 方法

本公开描述使用角蛋白17作为膀胱癌的生物标志物的方法。在此,在从福尔马林固定

的石蜡包埋样品获得的显微切割组织切片或尿细胞学样品中,通过免疫组织化学、免疫细胞化学、液相或固相蛋白质测定(例如ELISA、微流体、流式细胞术、质谱法),或检测K17 mRNA或测量K17 mRNA水平(例如,通过RT-PCR方法,如Q-RT-PCR),检测K17 RNA或蛋白质表达,用于各种诊断类别(即,非癌性膀胱粘膜,低恶性潜能的乳头状尿道上皮肿瘤(PUNLMP),低级别乳头状尿道上皮癌(LG),和高级别乳头状尿道上皮癌(HG)或移行性尿道上皮癌)。数据显示K17表现出在对照(良性)和PUNLMP样品之间约30倍表达差异;对照和LG膀胱癌样品之间15倍表达差异;和对照和HG膀胱癌样品之间13倍K17表达差异。因此,本公开显示K17表达可以被测量并用作诊断膀胱癌的诊断生物标志物。

[0036] 本公开的一个方面提供用于诊断患有膀胱癌的受试者的方法,其包括从受试者获得测试样品,并检测样品中K17表达的水平,由此当与对照样品比较时,样品中K17表达水平增加将受试者识别为患有膀胱癌。在另一个实施方案中,通过以定性或定量方式检测K17 mRNA的存在来确定K17表达水平。在一个具体的实施方案中,K17表达水平通过免疫测定测定,所述免疫测定以定性或定量方式检测K17蛋白的存在。

[0037] 在某些实施方案中,通过检测样品中K17和抗K17抗体之间的结合来确定K17表达。在本公开的一个实施方案中,从涉及的受试者获得生物样品(即,测试样品或对照样品)。可以根据本发明的方法使用的生物样品可以通过本领域普通技术人员已知的各种方法收集。用于当前方法的样品收集技术的非限制性实例包括:细针穿刺活检,手术切除活检,内窥镜活检和切除活检。在其他实施方案中,可以在从怀疑患有癌症的受试者获得的尿样品中检测K17水平,且对尿样品进行测试以确定样品中K17蛋白或K17 mRNA的量。在某些实施方案中,可以针对细胞的存在分析尿样品或经处理以便在测试期间从尿中收集细胞。然而在各种其他实施方案中,样品以不依赖于细胞是否存在的方式处理。在具体的实施方案中,可以在来自膀胱癌患者的尿样品中检测K17表达,所述尿样品是无细胞的或甚至来自排泄尿的无细胞部分。在其他实施方案中,样品是排泄尿样品,其含有可检测量(数量)的细胞。通过使医生能够在低成本下以高灵敏度(很少假阴性)和高准确度(很少假阳性)在排泄尿样品中检测膀胱癌,本发明的方法提供优于当前诊断的益处。

[0038] 在一些实施方案中,该方法包括对照样品,其可以从没有癌症的受试者的尿或非癌组织中获得。如图3A-B和4C-D所示,对照样品可包括含有可检测量的良性尿道上皮细胞的排泄尿。在其他实施方案中,对照样品是含有可检测量的正常鳞状细胞的排泄尿,如图4A-B所示。在其他实施方案中,对照样品(非癌性)可包括膀胱粘膜组织(图5A-B和D)或良性膀胱粘膜组织(图5C),其不表现出角蛋白17染色。在其他实施方案中,对照样品可以是阳性对照,例如从已知患有膀胱癌的受试者获得的样品,其表现出增加的(强)水平的K17染色。例如,阳性对照样品是含有可检测量的尿道上皮癌细胞的排泄尿,如图3C-D所示,其表现出强(增加)量的角蛋白17表达。在又其他实施方案中,阳性对照样品(癌性)包括从具有低恶性潜能的乳头状尿道上皮肿瘤(图6A)、低级别尿道上皮癌(图6B)、高级别乳头状尿道上皮癌(图6C-D)或侵入性尿道上皮癌(图7A-D)的受试者获得的组织。无论用作阳性对照样品的细胞或组织类型如何,这些细胞必须表现出增加的K17表达水平。此外,且特别是在本公开的高通量实施方案中,将用自动化设备和计算机控制的分析学来部署本发明的方法,使得将不存在对照,或对照将是配制的液体或材料或甚至是用户或仪器制造商设定的预先确定的值。

[0039] 虽然膀胱癌可能导致尿中存在癌细胞,本公开的意外方面是来自癌症患者的无细胞尿样品中的K17的量足以能够使这些样品与正常(非癌性)样品区分。此外,由于基于细胞的测定的质量控制和细胞收集步骤是昂贵的,本公开的该实施方案的实施将显著降低与当前侵入性测试相关的成本。因此,在一些实施方案中,样品是流体尿,其不包括可检测量的细胞,即无细胞样品。对于这些具体的实施方案,对照样品可以是含有先前测定的(已知)量的K17蛋白或RNA的无细胞尿样品,该量可以是无或低于检测限的量。在一些实施方案中,无细胞尿样品含有可检测量的K17蛋白或RNA(例如来自膀胱癌患者的样品或对照样品)。在其他实施方案中,无细胞尿样品不含可检测量的K17蛋白或RNA(阴性对照样品或来自未患有膀胱癌的受试者的样品)。在所部署的方法分析角蛋白17在排泄尿的无细胞部分中的表达的实施方案中,对照样品可以是包括已知量的K17蛋白(对于阴性对照,其可以为零)的流体样品(例如,尿)或来自健康患者的正常膀胱细胞的样品。在其他实施方案中,对照样品可以是阳性对照,例如包括来自已知患有膀胱癌的受试者的已知量或高于所预期的量(如果受试者不患有膀胱癌)的K17蛋白的流体样品(例如,尿)。

[0040] 在某些实施方案中,从受试者获得的样品直接使用而无需任何预处理或处理,例如福尔马林固定、快速冷冻或石蜡包埋。在一个具体的实施方案中,生物样品可以从受试者获得并通过福尔马林处理并将福尔马林固定的样品包埋在石蜡中处理。在某些实施方案中,可以在使用前储存样品。因此,本发明的诊断方法可以使用多种制备方法应用,包括用于免疫组织化学染色仪器(例如自动染色仪),例如Autostainer Link (Dako),Discovery XT和BenchMark XT (Ventana Medical Systems, Inc.), Leica[®] ST5010 Autostainer XL, Leica[®] Multistainer ST5020 (Leica Biosystems Nussloch GmbH), Autostainer Link 48 (Agilent), 和Lab Vision[™] Autostainer 360-2D, Lab Vision[™] Autostainer 480s (Thermo Fisher Scientific[™])的制备。

[0041] 在一些实施方案中,本发明的方法中使用的样品是从受试者获得的尿。在某些实施方案中,尿样品包括可检测量的细胞,其可测试并分析K17表达。在一些实施方案中,细胞来自受试者的膀胱壁。在具体的实施方案中,样品含有可检测量的表达K17的细胞。

[0042] 在获得合适的样品后,可以使用本领域普通技术人员已知的各种技术测定样品中K17表达的水平。在本公开的某些实施方案中,K17表达水平可以通过以下方法测量:免疫组织化学(IHC), qRT-PCR, RNA印迹, 蛋白质印迹, 酶联免疫吸附测定(ELISA), 微阵列分析或质谱。在具体的实施方案中,通过液相蛋白质测定(例如,ELISA, 微流体, 流式细胞术)检测K17。在一个具体的实施方案中,K17表达通过尿样品的免疫组织化学染色来确定,所述尿样品包括可检测量的膀胱细胞。在其他实施方案中,通过流式细胞术或基于微流体的检测方法检测荧光标记的细胞来确定K17表达。在具体的实施方案中,荧光标记的细胞表达角蛋白17。在一些实施方案中,通过检测样品中K17 mRNA或蛋白质的存在来确定K17表达水平。在一些实施方案中,样品中检测到的任何量的K17 mRNA或蛋白质与膀胱癌的诊断相关。在其他实施方案中,样品中K17蛋白质或mRNA的量必须超过对照样品中存在的量。

[0043] 任何类型的抗体均可用于针对K17抗原,包括但不限于小鼠单克隆-[E3]抗人K17抗体、针对人K17的多克隆抗体、针对哺乳动物K17蛋白结构域或其表位的单克隆抗体或多克隆抗体。还可适用的是免疫球蛋白分子的嵌合、单链、Fc、Fab、Fab'和Fab2片段,以及针对K17蛋白的Fab表达文库。所提及的抗体包括所有类别、亚类和类型和免疫球蛋白,且还包括

与K17蛋白结合的半抗原分子(例如核酸,聚合物)。

[0044] 在某些实施方案中,在与第一抗体温育后,样品使用生物素化的第二抗体通过间接的基于抗生物素蛋白-生物素的免疫过氧化物酶方法处理,显色并用苏木精复染。然后可以对于K17表达来分析载玻片。

[0045] 在某些实施方案中,角蛋白表达通过PathSQ方法,一种手动半定量评分系统定量,PathSQ方法定量强染色细胞的百分比,对相应的临床数据不知情。在又一个实施方案中,载玻片可以通过National Institutes of Health ImageJ 1.46,基于Java的图像处理器软件,使用DAB-苏木精(DAB-H)颜色反卷积插件评分。参见Schneider CA, 等人., Nat methods. (2012) 9:671-5,其全部内容通过引用明确地并入本文。

[0046] 如本申请的表1所示,K17的免疫组织化学分析在福尔马林固定的石蜡包埋的样品上进行。在此,通过激光捕获显微镜切碎来自苏木精和伊红染色的组织切片的正常膀胱粘膜(对照样品)、PUNLMP、LG乳头状尿道上皮癌和HG乳头状尿道上皮癌测试样品,并从每个诊断类别收集膀胱壁细胞。然后使用间接免疫过氧化物酶方法处理福尔马林固定的石蜡包埋的组织样品。具体而言,然后将样品与蛋白酶混合物一起温育以促进蛋白质交联的逆转。在温育后,在升高的温度(大于50℃)下,将组织样品脱石蜡并再水合。然后在decloaking室中在柠檬酸盐缓冲液中进行抗原修复。阻断内源性过氧化物酶,并通过与K17特异性抗体一起温育来标记样品。在第一抗体温育后,加入第二抗体,且样品显色并用苏木精复染。使用等效方法处理来自对照组织样品的阴性对照。

[0047] 在一个具体的实施方案中,阴性对照样品(良性)和膀胱癌样品(PUNLMP, LG, HG, 移行性尿道上皮癌)中K17的免疫组织化学染色通过PathSQ,一种手动半定量评分系统评分,PathSQ定量强染色的[癌]细胞的百分比,对相应的临床数据不知情,并计算相对于对照样品中的K17表达水平的倍数增加。参见图3C-D。对于组织活检,PathSQ评分必须为至少5%。在其他实施方案中,PathSQ评分为5%至99%,10%至90%,20%至80%,30%至70%,或40%至60%。在其他实施方案中,本领域普通技术人员将能够确定对应于癌症存在的样品的PathSQ评分。

[0048] 在一个具体的实施方案中,经由组织微阵列进行K17蛋白检测。例如,可以从石蜡块获得含有正常膀胱粘膜、PUNLMP、LG、HG或移行性尿道上皮膀胱癌细胞的组织,并将其置于组织微阵列块中。在某些实施方案中,膀胱癌细胞的其他来源可用作测试样品。特别地,含有膀胱壁细胞的尿样品或不含细胞但含有源自膀胱壁细胞的蛋白质和/或mRNA的尿样品是理想的测试样品。用于确定样品中K17相对于对照样品的倍数增加的对照样品可以从例如商业组织微阵列样品,例如从HISTO-Array™获得的那些获得。然后可以处理用于当前方法的组织微阵列载玻片,即在二甲苯中脱石蜡并使用醇再水合。在某些实施方案中,可以通过以下方式进一步处理样品:用柠檬酸盐缓冲液温育,应用过氧化氢以阻断内源性过氧化物酶,或通过用血清处理样品以阻断非特异性结合(例如,牛、人、驴或马血清)。通过与针对K17的第一抗体温育来进一步标记样品。

[0049] 在一些实施方案中且如本公开的图2、3A-D至5A-D和表2和3所示,K17表达可以通过对可检测量的细胞的免疫细胞化学分析从尿细胞学样品确定。在此,从涉及的受试者收集排泄尿样品并使用本领域普通技术人员已知的技术,例如离心或过滤从样品中分离膀胱细胞。然后将分离的膀胱细胞固定到载玻片上,使用常规免疫细胞化学方法标记K17,对苏木精复染,并使用显微镜对测试和对照尿样品二者中的K17表达进行评分。

[0050] 例如,图2和3A和B显示从获自健康(非癌性)受试者的排泄尿中分离的细胞获得的对照样品的角蛋白17染色。这些细胞显示K17染色的稀疏(“对照水平”)。相比之下,图3C-D显示在从患有膀胱癌(尿道上皮癌)的受试者的排泄尿获得的尿道上皮细胞中强烈的角蛋白17染色。角蛋白17表达的阴性对照水平的其他实例在图4A-D和5A-D中,其描绘健康的鳞状细胞(图4A-B)和健康的非癌性尿道上皮细胞(图4C-D),以及非癌性膀胱粘膜(图5A、B和D)和良性膀胱粘膜组织(图5C)。

[0051] 在又一个实施方案中,可以使用定性方式的逆转录酶PCR(RT-PCR)和通过定量RT-PCR测定K17 mRNA表达。更具体地,可以使用Trizol试剂从样品中提取总RNA。逆转录酶-PCR然后可以使用本领域普通技术人员已知的方法进行。例如,1 μ g RNA可以用作cDNA合成的模板,且然后可以将cDNA模板与对于K17 mRNA的基因特异性引物(即正向5'-3'引物序列和反向3'-5'序列)混合。K17引物的实例显示在表6中。还可以添加用于检测的探针序列(例如,来自Applied Biosystems的TaqMan™和来自Thermo Fisher Scientific系统的SYBR® Green是本领域已知的且可用于此目的)。然后可以对每个样品进行实时定量PCR且可以将获得的数据标准化至对照水平,如对照或正常样品(即,良性膀胱粘膜)中所述的K17 mRNA表达水平。参见,例如,Schmittgen和Livak, *Nature protocols* (2008) 3: 1101-1108。其他核酸检测技术,包括但不限于基于核酸序列的扩增(NASBA)、环介导等温扩增(LAMP)、链置换扩增(SDA)、多重置换扩增(MDA)、滚环扩增、连接酶链反应(LCR)、解旋酶依赖性扩增、分支扩增,或分支DNA也可用于检测K17 mRNA或以其他方式定量K17 mRNA表达。

[0052] 在其中检测K17蛋白的其他实施方案中,可以使用酶联免疫吸附测定(ELISA)来部署本公开的方法以确定样品中的K17表达。另外,质谱和侧向流动蛋白质检测测定可用于检测和定量样品中的K17表达水平。例如,如表4和5所示,可以通过离心制备样品例如排泄尿以分离样品中存在的膀胱细胞。在某些实施方案中,例如基于无细胞的诊断方法,可以分离测试样品的无细胞部分并使用ELISA系统检查K17蛋白表达。对于基于无细胞ELISA的检测方法,用包含抗角蛋白17抗体如K17 E3单克隆抗体的包被溶液包被微量滴定板并温育。然后可以封闭微量滴定板以防止K17蛋白的非特异性结合。接下来,将预定量的测试样品添加到微量滴定板的每个孔中并温育。然后向每个孔中加入含有可检测标志物如过氧化物酶标记的K17抗体(例如,用过氧化物酶标记的2D10单克隆抗体)的检测溶液并温育。在某些实施方案中,可以在加入能够与可检测的标志物反应以发射信号的检测底物之前洗涤孔。在温育后,通过发射可检测波长的光(例如450nm)读取每个板,且测定样品中角蛋白17蛋白的量。在某些实施方案中,对照样品,例如校准物是连续运行的且然后可以将测试样品中K17蛋白的量与对照物的量进行比较以通过从检测到的K17蛋白的量推断确定受试者是否患有膀胱癌,其中癌症诊断与超过对照量或标准的检测量相关。

[0053] 在一个实施方案中,可以使用流式细胞术来部署本公开的方法。在本公开的一个实施方案中,提供微流体流式细胞术系统,其可以使用可检测标签检测标记细胞以检测和/或定量样品中的K17蛋白或mRNA,例如确定K17表达或表达水平。如图8A-B中示例,获得并制备含有细胞的样品,例如排泄尿或膀胱组织样品。在某些实施方案中,通过将细胞固定在甲醇中并通过离心分离固定的细胞来处理或制备尿样品。在一些实施方案中,将细胞悬浮在磷酸盐缓冲溶液(PBS)中并与抗角蛋白17抗体(例如K17 E3单克隆抗体(Abcam)接触并温育以允许与样品中存在的K17结合。然后可以洗涤样品以限制非特异性结合。然后使样品与包

括可检测的标志物,例如藻红蛋白的第二抗体接触并温育以允许特异性结合到样品中标记的K17。然后将样品悬浮在流体中并等分到盒中。然后可以在微流体检测系统例如Moxi Go系统(Orflo Technologies Inc.)中读取盒以确定样品中存在的K17的量。在某些实施方案中,对照样品,例如参考样品,以相同的方式运行,并将测试样品中K17蛋白的量与对照的量进行比较以确定受试者是否患有膀胱癌。在其他实施方案中,在测试样品中检测到高于预设标准量的任何量的K17与增加的K17表达水平相关并因此与膀胱癌的诊断相关。

[0054] 在本公开的当前方法的一个实施方案中,将样品中K17(蛋白质或mRNA)的量与正常膀胱细胞或非癌细胞(或组织或尿样品或衍生自任一个的细胞样品)中存在的K17的对照量,或与对照样品中K17(蛋白质或mRNA)的量进行比较。可以通过技术人员已知的用于检测和定量蛋白质或mRNA的任何方法进行比较。在一个具体的实施方案中,指示患有膀胱癌的受试者的K17表达的量包括但不限于相对于对照样品增加30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%、200%、300%、500%、1000%或更多。

[0055] 在其他实施方案中,指示患有膀胱癌的受试者的K17表达包括相对于由对照样品表现出的K17表达量增加至少1倍、1.5倍、2倍、3倍、4倍、5倍、10倍、13倍、15倍、20倍、25倍、30倍或更大。在某些具体的实施方案中,如通过PathSQ测量的对应于受试者中的早期膀胱癌的K17表达通过样品中的K17染色来示例,其表现出相对于对照(良性)样品,K17表达增加10倍至60倍。在其他实施方案中,受试者中的早期膀胱癌通过测试样品中的K17染色示例,其表现出相对于对照样品,K17表达增加13倍至30倍。在一个具体的实施方案中,受试者中的早期膀胱癌通过测试样品中的K17染色示例,其表现出相对于对照样品,K17表达增加约13倍、约15倍或约30倍。在本公开的优选实施方案中,表现出具有大于30的PathSQ评分的K17表达的测试样品指示受试者的病变等于或大于低恶性潜能的乳头状尿道上皮肿瘤(PUNLMP)。在其中测试样品表现出具有30至35的PathSQ评分的K17表达的实施方案中,受试者患有低级别乳头状尿道上皮癌(LG)。在其中测试样品表现出具有29或更低的PathSQ评分的K17表达的实施方案中,受试者患有高级别乳头状尿道上皮癌(HG)。在其中测试样品表现出具有12至46的PathSQ评分的K17表达的具体的实施方案中,受试者患有膀胱癌。

[0056] 在又其他实施方案中,指示患有膀胱癌的受试者的K17表达包括至少0.065、至少0.070、至少0.075、至少0.080、至少0.081、至少0.085、至少0.090或更高的测试样品的光密度读数。在某些实施方案中,指示患有膀胱癌的受试者的K17表达包括0.065至0.2、0.065至0.1、0.075至0.2、0.075至0.1、0.08至0.2、0.08至0.15、0.08至0.1、0.08至0.09(包括端值)的测试样品的光密度读数。在具体的实施方案中,指示患有膀胱癌的受试者的K17表达包括0.065、0.066、0.067、0.068、0.069、0.070、0.071、0.072、0.073、0.074、0.075、0.076、0.077、0.078、0.079、0.080、0.081、0.082、0.083、0.084、0.085、0.086、0.087、0.088、0.089、0.090、0.091、0.092、0.093、0.094、0.095、0.096、0.097、0.098、0.099、0.10、0.11、0.12、0.13、0.14、0.15、0.16、0.17、0.18、0.19、0.20、0.21、0.22、0.23、0.24、0.25、0.26、0.27、0.28、0.29、0.30或更大的测试样品的光密度读数。

[0057] 本发明的方法还可用于诊断其他K17介导的疾病的存在。因此,本公开的方法不旨在受前文的描述或以下实施例的限制。

实施例

[0058] 实施例1. 材料和方法

所进行的研究包括84个福尔马林固定的石蜡包埋的手术组织块的分析(表1)。所有手术组织块从可疑患有膀胱癌的受试者(患者)获得。这些研究病例包括以下诊断类别:良性尿道上皮(n=12),低恶性潜能的乳头状尿道上皮肿瘤(PUNLMP)(n=9),低级别乳头状尿道上皮癌(n=23),高级别乳头状尿道上皮癌(n=14),移行性/尿道上皮癌(n=26)。在某些情况下,在通过病理学家(DCM)对来自经尿道切除术(TURBT)、膀胱活检或膀胱切除术样本的苏木精-伊红染色的切片进行组织学检查以确认如最初报道的诊断组织在剩余的组织块中充分表示后选择组织块。具有不足的残留组织或无法保存诊断组织用于将来临床使用的病例不包括在研究中。膀胱癌通过以下分类:(i)根据Edge SB和Compton CC. *Annals of surgical oncology*. (2010) 17:1471-4 (其全部内容通过引用并入本文)的临床阶段;和(ii)肿瘤级别(表1)。

[0059] 免疫组织化学。通过间接免疫过氧化物酶方法进行免疫组织化学分析,如先前在L. Escobar-Hoyos等人., *Cancer Res*. 2015 Sep 1;75(17):3650-62.)中描述,其明确地通过引用以其整体并入本文。简而言之,在60°C下温育后,组织切片在二甲苯中脱蜡并在醇中再水合。在decloaking室中在柠檬酸盐缓冲液中在120°C下进行抗原修复10分钟。内源性过氧化物酶被3%过氧化氢阻断,且切片在4°C下用小鼠单克隆-[E3]抗人K17抗体(Abcam®)或/和Ki-67(克隆MIB-1, 1:100稀释, DAKO, Carpinteria, CA, USA)对于膀胱癌标记过夜。结合并标记K17的用于本发明的方法的其他抗体,包括抗细胞角蛋白17抗体[EP1623]-细胞骨架标志物ab109725(Abcam®),角蛋白17(D73C7)兔mAb(Cell Signaling Technology®),对人K17的豚鼠多克隆(IgG) LS-C22650 (LifeSpan BioSciences, Inc.),对角蛋白17的兔多克隆抗体orb22505 (Biorbyt)。在第一抗体施加后,将生物素化的马第二抗体(R.T.U. Vectastain ABC试剂盒; Vector Laboratories)加入到样品中。用3,3'-二氨基联苯胺(DAB;Dako)显色,且用苏木精复染。使用等效浓度的亚类匹配的免疫球蛋白对所有运行进行阴性对照。膀胱癌中的K17的免疫组织化学染色通过PathSQ,一种手动半定量评分系统评分,PathSQ定量强染色的肿瘤细胞的百分比,对相应的临床数据不知情。PathSQ基于具有强(即2+)染色的肿瘤细胞的比例。将Ki-67染色评分为具有阳性核染色的肿瘤细胞的百分比。

[0060] 通过微流体检测K17。除了尿细胞学样品的免疫染色外,尿中的K17阳性细胞可以通过应用流式细胞术或微流体系统(可以使用荧光标签检测标记细胞)来检测。这种系统的一个实例是Moxi Go系统(Orflo Technologies Inc.),其利用一次性微流体盒和可以基于尺寸(Coulter方法)和荧光信号(藻红蛋白)计算细胞数的读取器。使用Moxi Go微流体设备(Orflo Technologies Inc.)的K17阳性细胞检测使用K17-阳性(Hela)和K17-阴性(C33)细胞作为对照进行测试。将细胞(约 1×10^5 个细胞)在70%甲醇中固定1小时,通过在1000g下离心5分钟沉淀,然后用1mL 1X PBS洗涤。然后将细胞沉淀并重悬于100 μ L磷酸盐缓冲溶液(PBS)中。接下来,将50 μ L细胞与50 μ L角蛋白17抗体(E3,Abcam)混合,并在室温下温育2小时。然后将细胞沉淀并用1mL PBS洗涤一次,并再次沉淀。然后将沉淀的细胞重悬于50 μ L用藻红蛋白(PE)标记的抗小鼠抗体(在PBS中1:100稀释,Abcam),并在室温下温育30min。用1mL PBS洗涤细胞两次,且最后重悬于500 μ L PBS中。通过将75 μ L每种样品加到微流体盒上

并在仪器上读取,在Moxi Go微流体仪器上读取标记的细胞。

[0061] 使用ELISA检测K17。通过ELISA对排泄尿样品测试尿的无细胞组分中的角蛋白17蛋白。将排泄尿以1000g离心5min以沉淀细胞。在离心后,倾析出尿的液体无细胞部分并用于K17 ELISA中的测试。对于ELISA,使用在1X PBS中浓度为2 μ g/mL的K17 E3单克隆抗体(Nordic MUBio, Sysyteren, Netherlands),每孔用100 μ L K17包被溶液包被高结合微量滴定板,并在4 $^{\circ}$ C下温育过夜。然后每孔用200 μ L封闭缓冲液(SuperBlock PBS Blocking Solution, ThermoFisher Scientific)封闭每个板,并在室温(RT)下温育1小时。

[0062] 通过将100 μ L尿样品与100 μ L测定缓冲液(1X PBS中的10%小牛血清)一式两份加入每个孔中测试样品,并在室温下温育1小时。样品用K17校准物(角蛋白17重组蛋白,Abcam)在相同板上以3倍连续稀释从1 μ g/mL开始运行。然后用400 μ L洗涤缓冲液(1XPBS中的0.05% Tween-20)洗涤每个板4次,且将在测定缓冲液中的1 μ g/mL的终浓度下100 μ L含有用过氧化物酶标记的K17 2D10单克隆抗体(K17 2D10单克隆抗体-HRP,US Biologicals)的检测抗体溶液和样品在室温下温育1小时。然后洗涤细胞并向每个孔中加入100 μ L TMB底物(Pierce),并将样品在室温下在黑暗中温育20分钟。然后使用100 μ L终止溶液(VWR)终止反应并在450nm下读板。

[0063] 角蛋白蛋白表达的评分。通过National Institutes of Health ImageJ 1.46(参见Schneider CA, 等人., *Nat methods*. (2012) 9:671-5,其内容通过引用并入本文)基于Java的图像处理器软件,使用DAB-苏木精(DAB-H)颜色反卷积插件(参见Ruifrok AC, Johnston DA. *Anal Quant Cytol Histol*. (2001) 23:291-9,其全部内容通过引用并入本文)和通过对相应临床数据不知情的定量强阳性染色细胞的百分比的手动半定量评分系统(PathSQ),对载玻片评分。在某些实施方案中,免疫组织化学分析的测量单位为核心PathSQ评分和所有核心评分的平均PathSQ评分。诊断类别之间的评分差异通过Kruskal-Wallis或Wilcoxon秩和检验(未显示)确定。计算接收者操作曲线和曲线下面积以评估可能基于逻辑回归模型区分不同的诊断类别的生物标志物。使用Youden指数确定来自接收者操作曲线的最佳截止值。参见Youden WJ. *Cancer*. (1950) 3:32-5,其内容通过引用并入本文。

[0064] 实施例2:免疫组织化学染色细胞中的角蛋白17检测作为膀胱癌的诊断方法。

[0065] 为了确定K17在早期膀胱癌的一个或多个诊断类别中的诊断值,对来自四个诊断类别的存档膀胱癌患者组织样品的组织上的K17进行免疫组织化学染色(表1):良性膀胱粘膜(良性),低恶性潜能的乳头状尿道上皮瘤形成(PUNLMP),低级别乳头状尿道上皮癌(LG),高级别乳头状尿道上皮癌(HG)和尿道上皮癌。

[0066] 在良性膀胱粘膜中K17染色仅微弱可检测(2.08的平均PathSQ评分),但在所检查的所有诊断类别的膀胱癌中高度表达。例如,表1显示分别对于HG和PUNLMP样品,范围为12.3831954至45.1781993的平均PathSQ评分(表1),而对照(非癌性)样品的平均PathSQ评分为约2。此外,图3A-D以及图4A-D和图5A-D中所示的对照样品与图6A-D至7A-D中染色的癌性样品的比较显示,仅在从患有膀胱癌的受试者获得的样品中存在强(增加的)角蛋白17染色。总之,这些结果显示K17是膀胱癌,例如膀胱的尿道上皮癌的强诊断标志物($p < 0.001$)。

[0067] 在测试的含有膀胱壁细胞的尿样品中,在被诊断为膀胱癌可疑或阳性的5/5个样品中检测到K17染色。见表2。如表2所示,在恶性肿瘤阴性的病例中不存在K17表达。这些数

据清楚地显示从患有膀胱癌的受试者 (T3-T7) 获得的所有样品中K17的阳性染色。相反, 从非癌性患者获得的尿样品没有表现出K17标记, 其中存在可检测水平的膀胱细胞 (N1, N7, N8)。这些结果提供K17检测是膀胱癌的诊断标志物的实验支持。

[0068] 使用膀胱组织样品获得的免疫组织化学结果提供以下假设的支持: K17检测可能是一种灵敏和特异性标志物, 以改善尿细胞学样本中膀胱癌诊断的准确性。如本公开的表3 中所示, K17检测提供作为膀胱癌的诊断标志物的灵敏度和特异性。例如, 作为对含有膀胱细胞的排泄尿样品进行的多个研究的结果 (图2), K17显示93%的灵敏度 (真实K17阳性样品数/检测到的K17阳性样品数) 和91%的特异性 (真实K17阴性样品数/检测到的K17阴性样品数)。对于研究2, 大多数假阳性样品用直接点样样品进行, 而研究3使用ThinPrep样品制备方法进行。总之, 所提供的数据显示通过尿样品中膀胱细胞的免疫染色检测K17可以以高灵敏度和特异性检测受试者中的膀胱癌的存在。

[0069] 实施例3: 通过基于自动设备的检测方法检测细胞中的角蛋白17

除了尿细胞学样品的免疫染色外, 尿细胞学样品中的K17阳性细胞可通过流式细胞术和微流体设备系统 (能够检测荧光标记的蛋白质) 检测到。在此, 分离已知对K17阳性的标记的癌细胞 (HeLa, 图8A) 和K17阴性的对照细胞 (C33, 图8B), 用K17抗体进行荧光标记, 并在微流体检测设备上分析K17表达, 如上所述。如图8A-8B所示, 与对照的C33细胞 (35.1%K17阳性) 比较, 在HeLa中存在显著更多的K17标记的细胞 (90.4%K17阳性)。总之, 这些数据显示使用与K17免疫染色结合的微流体设备可以有效地实现K17阳性细胞的检测。

[0070] 实施例4: 基于无细胞K17的诊断方法

如表4和5所示, 可以分析由缺乏膀胱细胞的排泄尿组成的测试样品的K17蛋白表达, 以确定受试者是否患有膀胱癌。例如, 表4显示使用基于ELISA的K17检测方法获得的结果。在此, 分析具有已知量的K17蛋白的对照样品 (即校准物), 以确定在无细胞样品中ELISA系统测试的灵敏度。从阴性对照 (零校准物) 确定增加的K17蛋白表达的截止值, 其中可检测信号是空白与阴性对照的平均值的标准偏差的3倍。例如, 使用以下公式: 阴性对照ELISA读数的平均值+ [阴性对照的标准偏差的3倍]。基于该数据, ELISA的灵敏度极限为约1ng/mL的K17蛋白。

[0071] 表5显示从受试者获得的21个无细胞尿样品 (6个癌性, 15个良性, 粗体是阳性样品) 的数据。在此, 21个测试样品中的每一个在ELISA系统上运行且在每个样品中检测排泄尿的无细胞部分中的K17表达, 并与表4中的对照水平比较。显示0.081或更高的平均光密度 (OD) 读数与小于20%的%CV的测试样品与受试者中的膀胱癌的存在良好相关。例如, 67%的癌症样品 (6个样品中的4个) 表现出0.081或更高的OD读数, 而非癌性对照样品中没有一个显示超过0.078 OD的可检测到的K17水平。由于这是模型实验而不是实际的患者测试, 两个癌症样品中缺乏可检测的K17信号被认为是归因于不受控制的测试因素, 例如样品收集的时间, 由于首次早晨排泄物将具有比在一天的其他时间的排泄物更高水平的累积K17蛋白, 或归因于样品处理。总之, 这些数据表明本公开提供一种方法, 通过该方法, 无细胞尿样品中可检测水平的K17蛋白的测量可以用于使用ELISA或其他基于蛋白质的检测平台, 如质谱或侧向流动仪器来检测受试者中的膀胱癌的存在 (例如, 诊断膀胱癌)。

[0072] 表1: 对照尿道上皮粘膜和尿道上皮膀胱癌中的角蛋白17染色

样品	数量 (N)	K17表达 (平均)	相对于良性, 在K17表达中的倍数增加
----	--------	------------	---------------------

良性	12	2.08	
PUNLMP	9	65.56	31.5倍
LG	23	34.57	16.6倍
HG	14	29.36	14.1倍
移行性/尿道上皮癌	26	49.23	23.7倍

表2:尿样品中K17表达的免疫细胞化学分析

解码的受试者ID号	细胞学诊断	K17表达
T1	对于恶性肿瘤可疑	无细胞
T2	对于恶性肿瘤可疑	无细胞
T3	对于恶性肿瘤阳性	适度细胞,退行性改变,强阳性
T4	对于恶性肿瘤阳性	适度细胞,弱阳性
T5	对于恶性肿瘤阳性	高度细胞,强阳性
T6	对于恶性肿瘤阳性	适度细胞,弱阳性
T7	对于恶性肿瘤阳性	高度细胞,强阳性
T8	对于恶性肿瘤可疑	无细胞
N1	对于恶性肿瘤阴性	稀疏细胞性,蛋白质性碎片,阴性
N2	对于恶性肿瘤阴性	无细胞
N3	存在罕见反应和退化的尿道上皮细胞	无细胞
N4	对于恶性肿瘤阴性	无细胞
N5	对于恶性肿瘤阴性	无细胞
N6	对于恶性肿瘤阴性	无细胞
N7	对于恶性肿瘤阴性	稀疏细胞性,阴性
N8	对于恶性肿瘤阴性	适度细胞,阴性

表3:通过免疫染色从尿分离的细胞检测K17表达

	研究1	研究2	研究3	研究4	总计1
恶性	3	10	5	21	39
良性	5	20	18	22	65
总计	8	30	23	43	104
真阳性	5	9	5	17	
假阴性	0	1	0	4	
真阴性	3	14	18	21	
假阳性	0	6	0	1	平均
灵敏度	100%	90%	100%	81%	93%
特异性	100%	70%	100%	95%	91%

表4:用于检测尿的无细胞组分中角蛋白17蛋白的ELISA的检测限

校准物(ng/mL)	OD-1	OD-2	平均	STDEV	%CV
1000	3.555	3.624	3.590	0.049	1%
333.3	3.578	3.604	3.591	0.018	1%
111.1	2.469	2.289	2.379	0.127	5%
37.0	0.844	0.832	0.838	0.008	1%
12.3	0.323	0.318	0.321	0.004	1%
4.1	0.142	0.14	0.141	0.001	1%
1.4	0.087	0.081	0.084	0.004	5%
0	0.067	0.058	0.063	0.006	10%
截止= 0.082					

表5:检测尿样品的无细胞部分中的K17蛋白以检测受试者中的膀胱癌的存在

样品	诊断	OD-1	OD-2	平均	STDEV	%CV
N281-1	良性	0.069	0.070	0.070	0.001	1%
N281-2	良性	0.056	0.053	0.055	0.002	4%
CT7699	良性	0.055	0.054	0.055	0.001	1%
CT7304	良性	0.056	0.054	0.055	0.001	3%
GC 19-1	癌症	0.064	0.066	0.065	0.001	2%
GN19-1	良性	0.059	0.059	0.059	0.000	0%
GN19-2	良性	0.063	0.06	0.062	0.002	3%
GN19-3	良性	0.111	0.078	0.095	0.020	25%
GC24-1	癌症	0.090	0.093	0.092	0.002	2%
GN24-1	良性	0.056	0.055	0.056	0.001	1%
GN24-2	良性	0.062	0.061	0.062	0.001	1%
GN24-3	良性	0.078	0.078	0.078	0.000	0%
GN24-4	良性	0.056	0.056	0.056	0.000	0%
G6117-1	良性	0.051	0.055	0.053	0.003	5%
G6117-2	癌症	0.072	0.09	0.081	0.013	16%
G6717-1	癌症	0.092	0.09	0.091	0.001	2%
G6717-2	良性	0.075	0.078	0.077	0.002	3%
G6817-1	癌症	0.050	0.059	0.055	0.006	12%
G6817-2	良性	0.058	0.062	0.060	0.003	5%
G629-1	癌症	0.088	0.095	0.092	0.005	5%
G629-2	良性	0.067	0.06	0.064	0.005	8%

表6:通过定量RT-PCR检测K17 mRNA的引物组

对	正向引物(5'-3')	反向引物(5'-3')	产物长度 (bp)
1	SEQ ID NO: 1 CAGTCCCAGCTCAGCAT GAA	SEQ ID NO: 2 CCACAATGGTACGCACCT GA	295
2	SEQ ID NO: 3 AGAACCTCAATGACCGC CTG	SEQ ID NO: 4 TCCACAATGGTACGCACC TG	973
3	SEQ ID NO: 5 CAAGGATGCCGAGGATT GGT	SEQ ID NO: 6 ACAATGGTACGCACCTGA CG	432
4	SEQ ID NO: 7 TCCTCAACGAGATGCGT GAC	SEQ ID NO: 8 CACAATGGTACGCACCTG AC	482
5	SEQ ID NO: 9 GGATGCCGAGGATTGGT TCT	SEQ ID NO: 10 AATGGTACGCACCTGACG G	427
6	SEQ ID NO: 11 GCAGAGAAGAACCGCA AGGA	SEQ ID NO: 12 ACCTCTTCCACAATGGTAC GC	455
7	SEQ ID NO: 13 GCTCAGCATGAAAGCAT CCC	SEQ ID NO: 14 CCTCTTCCACAATGGTACG C	293
8	SEQ ID NO: 15 CCATGCAGGCCTTGGAG ATA	SEQ ID NO: 16 GTGGTCACCGGTTCTTTCT TG	298
9	SEQ ID NO: 17 CCGTCAGGTGCGTACCA TT	SEQ ID NO: 18 TTGTCATCAGGCAAGGAA GCA	216
10	SEQ ID NO: 19 GGTGAAGATCCGTGACT GGT	SEQ ID NO: 20 TTCCACAATGGTACGCAC CTG	901

序列表

[0001]	<110>	纽约州立大学研究基金会 KDx Diagnostics, Inc.	
	<120>	作为膀胱癌的生物标志物的角蛋白 17	
	<130>	33851PCT	
	<150>	62/371,286	
	<151>	2016-08-05	
	<160>	20	
	<170>	PatentIn 版本 3.5	
	<210>	1	
	<211>	20	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	K17 mRNA 的第一正向引物	
	<400>	1	
		cagtcaccagc tcagcatgaa	20
	<210>	2	
	<211>	20	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	K17 mRNA 的第一反向引物	
	<400>	2	
		ccacaatggt acgcacctga	20
	<210>	3	
	<211>	20	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	K17 mRNA 的第二正向引物	
	<400>	3	
		agaacctcaa tgaccgcctg	20
	<210>	4	
	<211>	20	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	K17 mRNA 的第二反向引物	
	<400>	4	
		tccacaatgg tacgcacctg	20
	<210>	5	
	<211>	20	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	

[0002]	<220>		
	<223>	K17 mRNA 的第三正向引物	
	<400>	5	
		caaggatgcc gagattggt	20
	<210>	6	
	<211>	20	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	K17 mRNA 的第三反向引物	
	<400>	6	
		acaatggtac gcacctgacg	20
	<210>	7	
	<211>	20	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	K17 mRNA 的第四正向引物	
	<400>	7	
		tcctcaacga gatgcgtgac	20
	<210>	8	
	<211>	20	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	K17 mRNA 的第四反向引物	
	<400>	8	
		cacaatggtgta cgcacctgac	20
	<210>	9	
	<211>	20	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	K17 mRNA 的第五正向引物	
	<400>	9	
		ggatgccgag gattggttct	20
	<210>	10	
	<211>	19	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	K17 mRNA 的第五反向引物	
	<400>	10	
		aatggtacgc acctgacgg	19
	<210>	11	
	<211>	20	

[0003]	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> K17 mRNA 的第六正向引物	
	<400> 11	
	gcagagaaga accgcaagga	20
	<210> 12	
	<211> 21	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> K17 mRNA 的第六反向引物	
	<400> 12	
	acctcttcca caatggtacg c	21
	<210> 13	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> K17 mRNA 的第七正向引物	
	<400> 13	
	gctcagcatg aaagcatccc	20
	<210> 14	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> K17 mRNA 的第七反向引物	
	<400> 14	
	cctcttccac aatggtacgc	20
	<210> 15	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> K17 mRNA 的第八正向引物	
	<400> 15	
	ccatgcaggc cttggagata	20
	<210> 16	
	<211> 21	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> K17 mRNA 的第八反向引物	
	<400> 16	
	gtggtcaccg gttctttctt g	21

	<210> 17	
	<211> 19	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> K17 mRNA 的第九正向引物	
	<400> 17	
	ccgtcaggtg cgtaccatt	19
	<210> 18	
	<211> 21	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> K17 mRNA 的第九反向引物	
	<400> 18	
[0004]	ttgtcatcag gcaaggaagc a	21
	<210> 19	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> K17 mRNA 的第十正向引物	
	<400> 19	
	ggtgaagatc cgtgactggt	20
	<210> 20	
	<211> 21	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> K17 mRNA 的第十反向引物	
	<400> 20	
	ttccacaatg gtacgcacct g	21

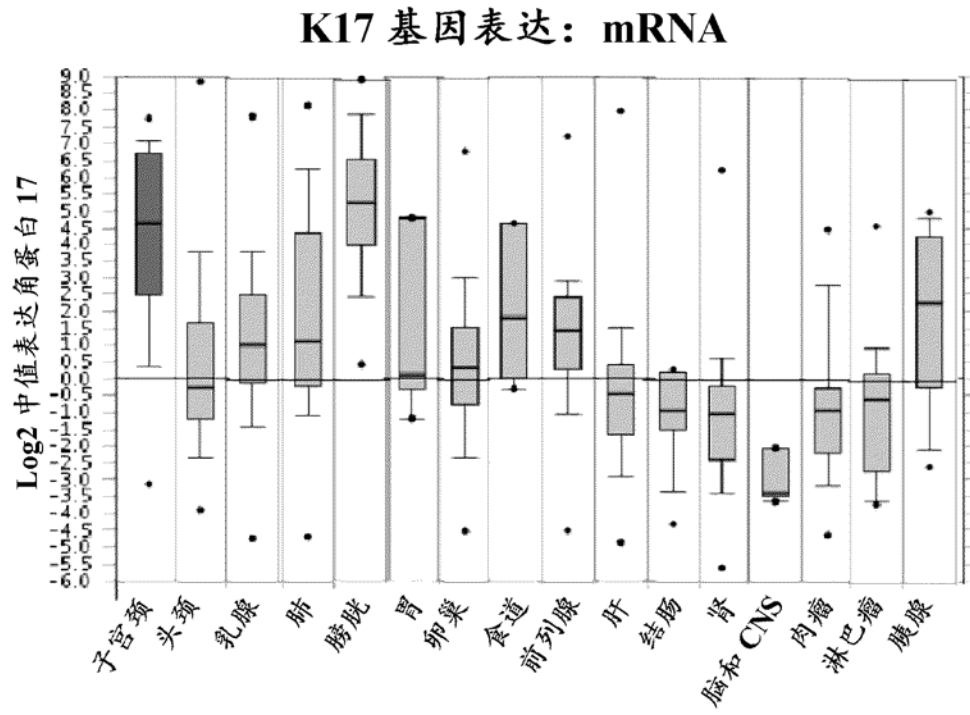


图 1

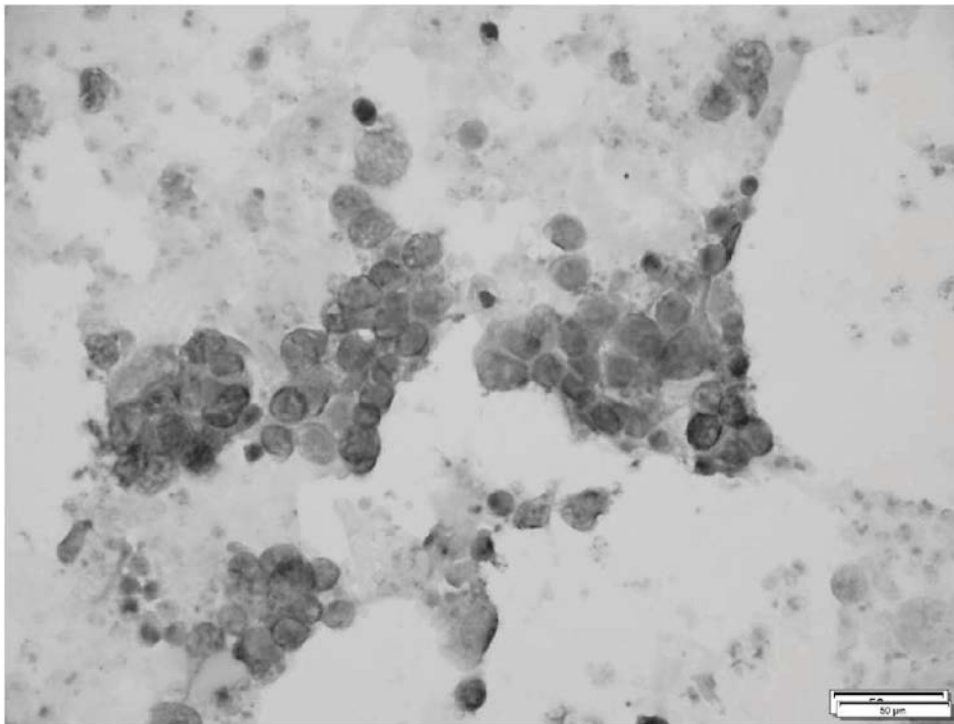


图 2

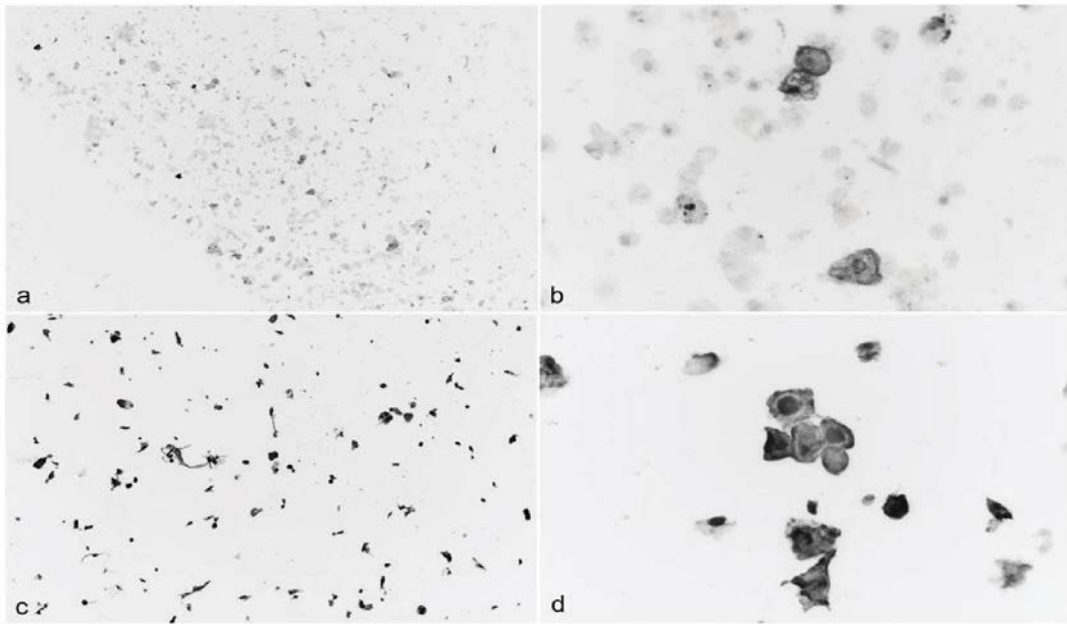


图 3A-D

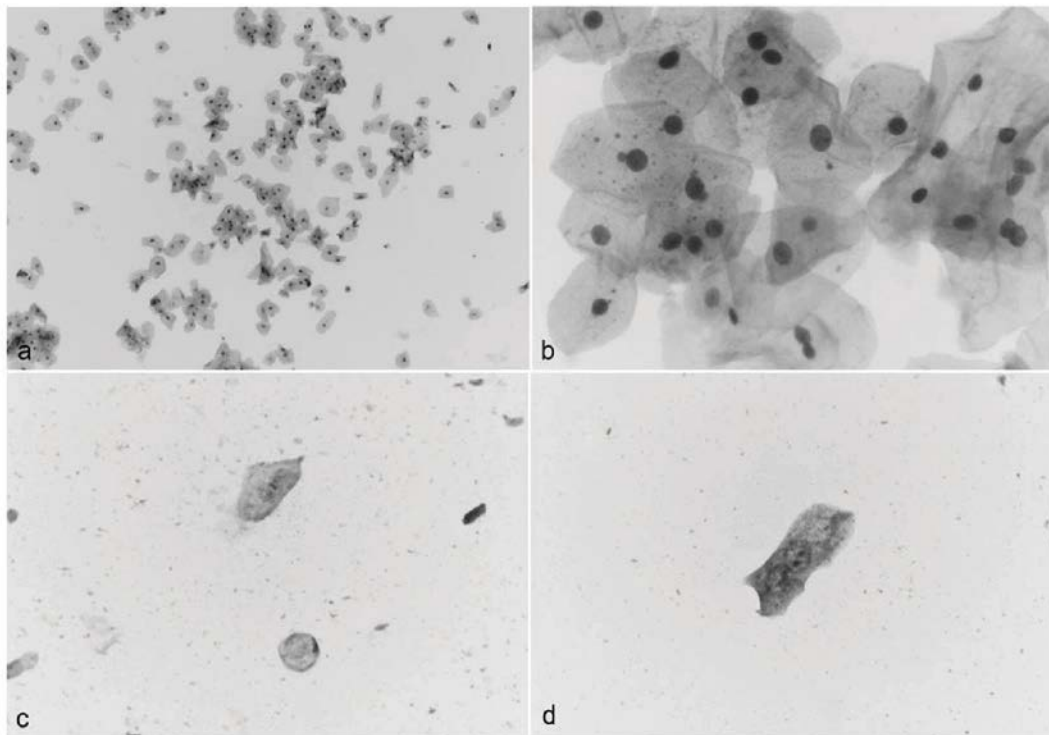


图 4A-D

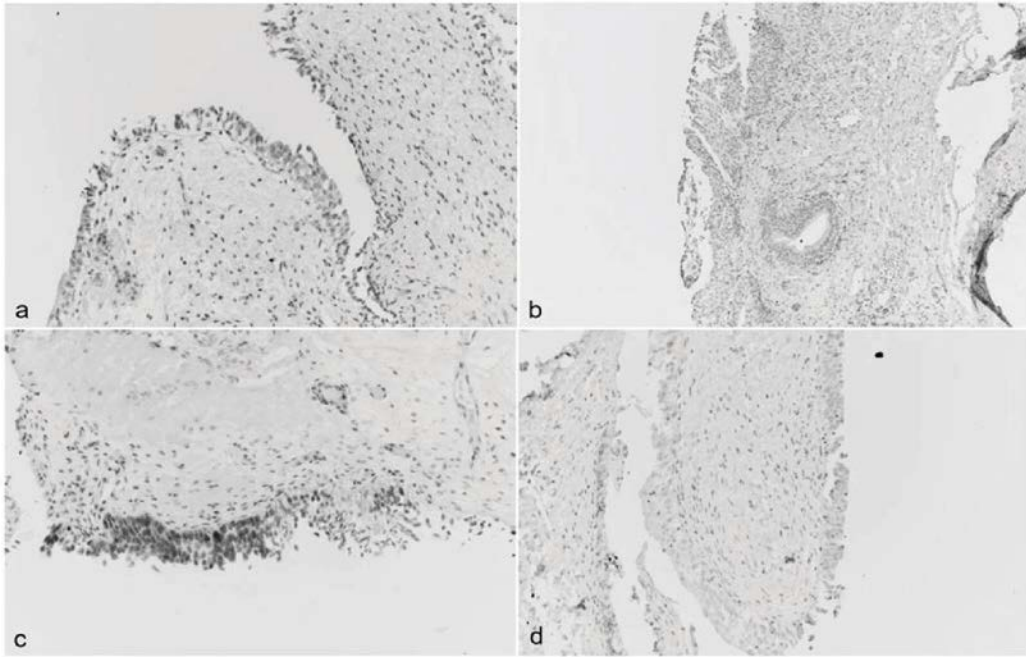


图 5A-D

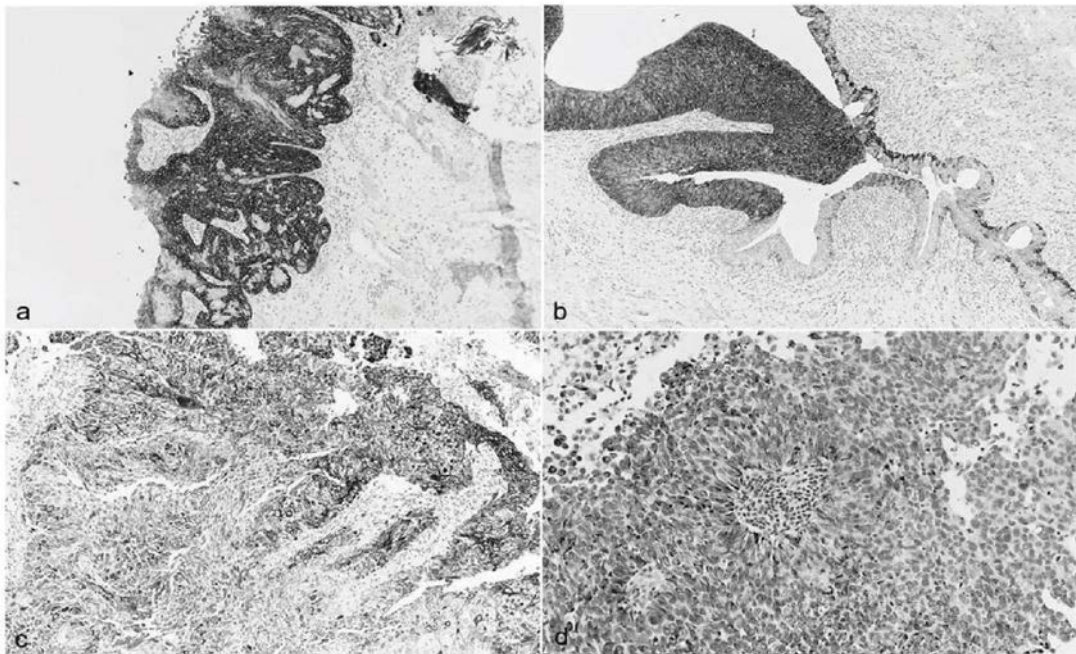


图 6A-D

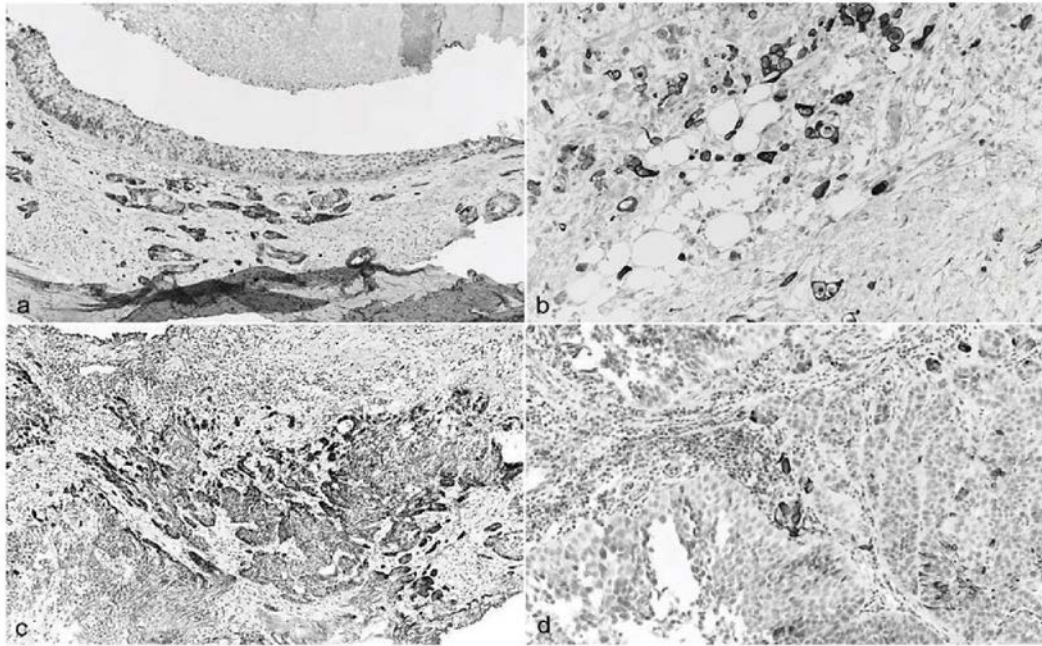


图 7A-D

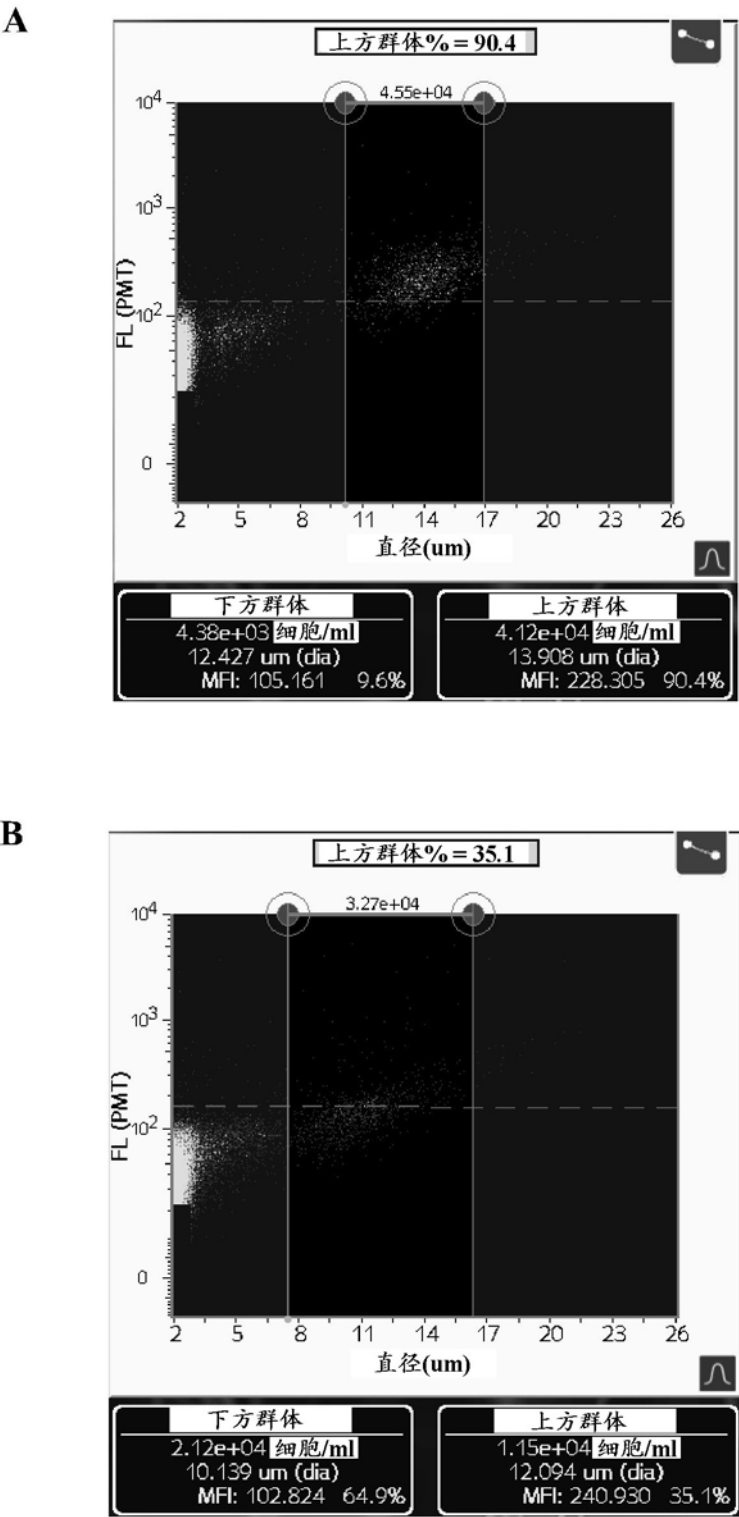


图 8A-B

专利名称(译)	作为膀胱癌的生物标志物的角蛋白17		
公开(公告)号	CN110139656A	公开(公告)日	2019-08-16
申请号	CN201780061895.1	申请日	2017-08-04
申请(专利权)人(译)	纽约州州立大学研究基金会		
当前申请(专利权)人(译)	纽约州州立大学研究基金会		
[标]发明人	N 金		
发明人	K.R.施罗耶 L.F.埃斯科巴-霍约斯 N.金		
IPC分类号	A61K35/13 A61K35/22 A61K39/395 C07K16/30 G01N33/53 G01N33/577 G01N33/68 G01N33/574		
CPC分类号	A61K35/22 A61K38/00 C12Q1/6886 C12Q2600/158 G01N33/57407 G01N2333/4742 G01N2800/34		
代理人(译)	黄登高		
优先权	62/371286 2016-08-05 US		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本公开提供用于检测和分析从受试者获得的膀胱样品中K17表达的方法。本公开还涉及通过检测样品中的K17的表达来识别患有膀胱癌的哺乳动物受试者的方法和试剂盒。本发明的方法包括用于测定从受试者的膀胱获得的样品中的角蛋白17的水平的方法二者。

K17 基因表达: mRNA

