

[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 200680039458.1

[51] Int. Cl.

C12Q 1/68 (2006.01)
C12N 15/09 (2006.01)
G01N 33/53 (2006.01)
G01N 33/566 (2006.01)
G01N 33/574 (2006.01)
G01N 37/00 (2006.01)

[43] 公开日 2008年10月29日

[11] 公开号 CN 101297046A

[22] 申请日 2006.9.1
[21] 申请号 200680039458.1
[30] 优先权
 [32] 2005.9.2 [33] JP [31] 255370/2005
[86] 国际申请 PCT/JP2006/317379 2006.9.1
[87] 国际公布 WO2007/026895 日 2007.3.8
[85] 进入国家阶段日期 2008.4.23
[71] 申请人 东丽株式会社
 地址 日本东京都
 共同申请人 国立大学法人京都大学
[72] 发明人 秋山英雄 田中祥德 小园聪子
 信正均 小川修 高桥毅

[74] 专利代理机构 北京市金杜律师事务所
 代理人 杨宏军

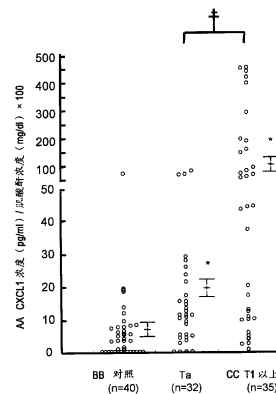
权利要求书 3 页 说明书 30 页 序列表 1 页
附图 5 页

[54] 发明名称

尿路上皮癌的检测用试剂盒及方法

[57] 摘要

本发明涉及一种检测尿路上皮癌的方法，所述方法包括体外测定来自受试者的生物试样中的 CX-CL1 蛋白质、或编码该蛋白质的基因的表达，本发明还涉及一种尿路上皮癌诊断用试剂盒，所述试剂盒包含能够与该蛋白质或基因特异性结合的抗体或核酸探针。



AA CXCL1 浓度 (pg/ml) / 肌酐浓度 (mg/dl) × 100
BB 对照
CC T1 以上

1、一种检测尿路上皮癌的方法，所述方法包括体外测定来自受试者的生物试样中的CXCL1蛋白质、或编码该蛋白质的基因的表达。

2、如权利要求1所述的方法，所述方法测定所述蛋白质的量或所述基因的表达量。

3、如权利要求2所述的方法，其中，以所述蛋白质的量或所述基因的表达量与对照试样的量相比显著增加为指标。

4、如权利要求3所述的方法，其中，所述增加为2倍以上。

5、如权利要求3所述的方法，其中，所述增加为3倍以上。

6、如权利要求1所述的方法，其中，所述测定是通过免疫学方法进行的测定。

7、如权利要求1所述的方法，其中，所述测定是通过杂交进行的测定。

8、如权利要求1所述的方法，其中，所述测定使用能够与所述蛋白质或所述基因结合的物质进行。

9、如权利要求8所述的方法，其中，能够与所述蛋白质结合的物质为抗体或其片段。

10、如权利要求8所述的方法，其中，能够与所述基因结合的物质为核酸探针。

11、如权利要求10所述的方法，其中，所述核酸探针由下述成分构成：由序列号1所示的碱基序列或其变体构成的核酸、由其互补序列构成的核酸、与所述核酸在严格条件下杂交的核酸、或含有所述核酸的15个以上连续碱基的片段。

12、如权利要求9或10所述的方法，其中，所述抗体或核酸探针被标记。

13、如权利要求1所述的方法，其中，使用与所述蛋白质或其片段特异性结合的抗体或其片段，采用免疫学方法测定试样中的该蛋白质，以与对照试样的量相比该蛋白质的量的增加为指标，检测尿路上

皮癌。

14、如权利要求1所述的方法，其中，使用下述探针测定试样中所述基因的表达量，以与对照试样的量相比该表达量的增加为指标，检测尿路上皮癌，所述探针由下述成分构成：由序列号1所示的碱基序列或其变异体构成的核酸、由其互补序列构成的核酸、与所述核酸在严格条件下杂交的核酸、或含有所述核酸的15个以上连续碱基的片段。

15、如权利要求1所述的方法，其中，所述尿路上皮癌选自膀胱癌、肾盂癌、尿管癌及尿道癌。

16、如权利要求1所述的方法，其中，所述试样为血液、血浆、血清或尿。

17、如权利要求1所述的方法，其中，所述试样为尿路上皮组织或细胞。

18、如权利要求1所述的方法，其中，所述蛋白质具有序列号2所示的氨基酸序列或其变异体序列。

19、如权利要求1所述的方法，其中，所述基因具有序列号1所示的碱基序列或其变异体序列。

20、一种尿路上皮癌诊断用试剂盒，其中含有与CXCL1蛋白质或其片段特异性结合的抗体或其片段或它们的化学修饰衍生物。

21、如权利要求20所述的试剂盒，其中，所述蛋白质具有序列号2所示的氨基酸序列或其变异体序列。

22、如权利要求20所述的试剂盒，其中，所述蛋白质的片段含有由至少8个氨基酸构成的表位。

23、如权利要求20所述的试剂盒，其中，所述尿路上皮癌选自膀胱癌、肾盂癌、尿管癌及尿道癌。

24、如权利要求20所述的试剂盒，其中，所述抗体或其片段与固相载体结合。

25、如权利要求20所述的试剂盒，其中，还含有能够与所述抗体或其片段结合的标记第二抗体。

26、如权利要求25所述的试剂盒，其中，所述第二抗体的标记为酶、荧光或放射性标记。

27、一种尿路上皮癌诊断用试剂盒，其中含有由序列号1所示的碱基序列或其变异体序列构成的核酸、由其互补序列构成的核酸、与所述核酸在严格条件下杂交的核酸、或含有所述核酸的15个以上连续碱基的片段、或它们的化学修饰衍生物。

28、如权利要求27所述的试剂盒，其中，所述核酸含有序列号1所示的碱基序列或其变异体序列。

29、如权利要求27所述的试剂盒，其中，所述尿路上皮癌选自膀胱癌、肾盂癌、尿管癌及尿道癌。

30、如权利要求27~29中任一项所述的试剂盒，其中，所述核酸与固相载体结合。

31、如权利要求30所述的试剂盒，其中，所述固相载体为DNA芯片或微阵列基板。

32、权利要求20或27所述的试剂盒的使用方法，用于体外检测受试者的尿路上皮癌。

尿路上皮癌的检测用试剂盒及方法

技术领域

本发明涉及一种通过测定对尿路上皮癌的检测或诊断有用的CXCL1蛋白质、或者编码该蛋白质的基因的表达来检测尿路上皮癌的方法。

本发明还涉及一种用于检测尿路上皮癌的尿路上皮癌诊断用试剂盒，其中含有能够与上述蛋白质或者基因结合的物质。

背景技术

所谓尿路上皮癌是指膀胱癌和肾盂癌、尿管癌等的总称，上述癌均由尿路的移行上皮细胞癌化产生，一般认为其性质是相同的。尿路上皮癌是在泌尿生殖器癌中继前列腺癌之后患病人数最多的癌症，在2001年的日本厚生劳动省大臣官房统计信息部“人口动态统计”中，仅膀胱癌在日本每年的患病人数就多达男9765人、女3243人，死亡人数多达男3459人、女1587人。肾盂癌、尿管癌相对较少，死亡人数男女总计分别为797人、713人。

目前尚无关于膀胱癌或其它尿路上皮癌的预防的研究，一般认为膀胱癌多于50岁以上发病，男性的发病频率是女性的2~3倍。另外，与不吸烟者相比，吸烟者的发病率高达其4倍左右。膀胱癌大致可分成2种类型，浅表性乳头状癌是恶性度较低的癌，向膀胱内腔（膀胱的内表面）突出，侵入较浅，表面呈乳头状（花椰菜样）具有细小的茎。可以采用内窥镜治疗，但半数以上患者在膀胱内复发。虽然癌的深度有时也达到粘膜下，但未达到膀胱的肌肉层。与此相对，浸润性癌是恶性度高的癌，侵入深，具有浸润至膀胱壁深部的倾向，有时发生转移。所以，必须采用切除膀胱、使用抗癌剂、放射疗法等对机体产生负担的相关治疗。

膀胱癌症状中最常见无痛血尿，有时也存在排尿次数多、排尿时疼痛、排尿后有余尿感等膀胱炎症状。诊断中可采用尿检（细胞学诊断）、X射线摄影、内窥镜等。但是，由于对早期诊断有用的可以在血液或尿中使用的特异性、高灵敏度肿瘤标记物尚不存在，所以癌症多在发展之后通过检查被发现。另外，在膀胱以外的部位发生的尿路上皮癌也具有相同的性质。因此，人们期待通过可用于尿路上皮癌、特别是膀胱癌的特异性、高灵敏度肿瘤标记物进行简便的检查的方法得以实用化。

已经公开了用于膀胱癌的检查 and 确定的多种标记物及方法。例如可以举出通过核磷蛋白（nucleophosmin）/ B23（专利文献1）、HURP（专利文献2）、CYP4B1或CYP4B2（专利文献3）等基因表达水平的变化来确定膀胱癌的方法，通过尿样中特定蛋白质的存在或量来确定膀胱癌的方法（专利文献4、专利文献5），以血液中可溶性Fas浓度为指标确定膀胱癌的方法（专利文献6）等。

专利文献1：特开2004 - 337120

专利文献2：特开2004 - 248508

专利文献3：特开2002 - 238599

专利文献4：特开2004 - 61288

专利文献5：特开平7 - 309895号公报

专利文献6：特开2000 - 131321

发明内容

本发明的课题在于发现一种新型尿路上皮癌肿瘤标记物，并且提供一种有效地检测尿路上皮癌、特别是膀胱癌的方法。

本发明人等为了解决上述课题，经潜心研究，结果发现，以CXCL1蛋白质作为肿瘤标记物，通过使用与其特异性结合的抗体、或者能够与编码该蛋白质的基因、其转录产物或其cDNA结合的核酸，能够有意义地检测出尿路上皮癌，从而完成本发明。

即，本发明包含以下发明。

(1) 一种检测尿路上皮癌的方法，所述方法包括体外测定来自受试者的生物试样中的CXCL1蛋白质、或编码该蛋白质的基因的表达。

(2) 如(1)所述的方法，其中，测定所述蛋白质的量或所述基因的表达量。

(3) 如(1)或(2)所述的方法，其中，以所述蛋白质的量或所述基因的表达量与对照试样的量相比显著增加为指标。

(4) 如(3)所述的方法，其中，所述增加为2倍以上。

(5) 如(3)所述的方法，其中，所述增加为3倍以上。

(6) 如(1)~(5)中任一项所述的方法，其中，所述测定是通过免疫学方法进行的测定。

(7) 如(1)~(5)中任一项所述的方法，其中，所述测定是通过杂交进行的测定。

(8) 如(1)~(7)中任一项所述的方法，其中，所述测定是使用能与所述蛋白质或所述基因结合的物质进行的。

(9) 如(8)所述的方法，其中，能够与所述蛋白质结合的物质为抗体或其片段。

(10) 如(8)所述的方法，其中，能够与所述基因结合的物质为核酸探针。

(11) 如(10)所述的方法，其中，所述核酸探针由下述成分构成：由序列号1所示的碱基序列或其变体构成的核酸、由其互补序列构成的核酸、与上述核酸在严格条件下杂交的核酸、或含有上述核酸的15个以上连续碱基的片段。

(12) 如(9)~(11)中任一项所述的方法，其中，所述抗体或核酸探针是被标记的。

(13) 如(1)~(6)、(8)、(9)及(12)中任一项所述的方法，其中，使用与所述蛋白质或其片段特异性结合的抗体或其片段，采用免疫学方法测定试样中的该蛋白质，以该蛋白质的量与对照试样的量相比增加为指标，检测尿路上皮癌。

(14) 如(1)~(5)、(7)、(8)、(10)~(12)中任一项所述的方法,其中,使用下述探针测定试样中上述基因的表达量,以与对照试样的量相比该表达量的增加为指标,检测尿路上皮癌,所述探针由下述成分构成:由序列号1所示的碱基序列或其变异体构成的核酸、由其互补序列构成的核酸、与上述核酸在严格条件下杂交的核酸、或含有上述核酸的15个以上连续碱基的片段。

(15) 如(1)~(14)中任一项所述的方法,其中,所述尿路上皮癌选自膀胱癌、肾盂癌、尿管癌及尿道癌。

(16) 如(1)~(15)中任一项所述的方法,其中,所述试样为血液、血浆、血清或尿。

(17) 如(1)~(15)中任一项所述的方法,其中,所述试样为尿路上皮组织或细胞。

(18) 如(1)~(6)、(8)、(9)、(12)、(13)、(15)~(17)中任一项所述的方法,其中,所述蛋白质具有序列号2所示的氨基酸序列或其变异体序列。

(19) 如(1)~(5)、(7)、(8)、(10)~(12)、(14)~(17)中任一项所述的方法,其中,所述基因具有序列号1所示的碱基序列或其变异体序列。

(20) 一种尿路上皮癌诊断用试剂盒,含有与CXCL1蛋白质或其片段特异性结合的抗体或其片段或它们的化学修饰衍生物。

(21) 如(20)所述的试剂盒,其中,所述蛋白质具有序列号2所示的氨基酸序列或其变异体序列。

(22) 如(20)或(21)所述的试剂盒,其中,所述蛋白质的片段含有由至少8个氨基酸构成的表位。

(23) 如(20)~(22)中任一项所述的试剂盒,其中,所述尿路上皮癌选自膀胱癌、肾盂癌、尿管癌及尿道癌。

(24) 如(20)~(23)中任一项所述的试剂盒,其中,所述抗体或其片段与固相载体结合。

(25) 如(20)~(24)中任一项所述的试剂盒,其中,还含有

能够与所述抗体或其片段结合的标记第二抗体。

(26) 如(25)所述的试剂盒, 其中, 所述第二抗体的标记为酶、荧光或放射性标记。

(27) 一种尿路上皮癌诊断用试剂盒, 含有由序列号1所示的碱基序列或其变异体序列构成的核酸、由其互补序列构成的核酸、与上述核酸在严格条件下杂交的核酸、或含有上述核酸的15个以上连续碱基的片段、或它们的化学修饰衍生物。

(28) 如(27)所述的试剂盒, 其中, 所述核酸具有序列号1所示的碱基序列或其变异体序列。

(29) 如(27)或(28)所述的试剂盒, 其中, 所述尿路上皮癌选自膀胱癌、肾盂癌、尿管癌及尿道癌。

(30) 如(27)~(29)中任一项所述的试剂盒, 其中, 所述核酸与固相载体结合。

(31) 如(30)所述的试剂盒, 其中, 所述固相载体为DNA芯片或微阵列基板。

(32) 上述(20)~(31)中任一项所述的试剂盒的使用方法, 用于体外检测受试者的尿路上皮癌。

<用语定义>

本说明书中使用的用语具有以下定义。

核酸、核苷酸、多核苷酸、氨基酸、肽、多肽、蛋白质等用简写符号的表示, 符合“用于制作含有碱基序列或氨基酸序列的说明书等的指南”(日本专利局编)及本技术领域的惯例。

本说明书中, 所谓“CXCL1”(趋化因子(C-X-C基序)配体1、GRO- α 、GRO-1、黑素瘤生长刺激活性, α)蛋白质, 是指属于C-X-C趋化因子家族的由107个氨基酸残基构成的分子量约1.1kDa的蛋白质。此蛋白质用作作为7-跨膜型受体的CXCR1及CXCR2的配体, 引起表达上述受体的嗜中性细胞、嗜碱细胞、肥大细胞等的迁移(Richmond, A等、1988、EMBO journal、第7卷、p.2025-712033等)。另外, 有报道指出此蛋白质在人恶性黑素瘤中具有作为促细胞

分裂因子的活性 (Anisowicz, A等、1987、Proceedings of the national Academy of Sciences, USA、第84卷、p.7188 - 7192)。

本说明书中,所谓“核酸”是指包括RNA及DNA中的任一种的核酸。需要说明的是,上述DNA包括cDNA、基因组DNA及合成DNA中的任一种。上述RNA包括总RNA、mRNA、rRNA、及合成RNA中的任一种。另外,本说明书中核酸可以与多核苷酸互换使用。

在本说明书中,“cDNA”包括与基因表达生成的RNA互补的序列的全长DNA链、及由其部分序列组成的DNA片段。cDNA可以通过以RNA为模板,利用使用聚T引物的RT-PCR(逆转录酶-聚合酶链反应)进行合成。

在本说明书中,“基因”不仅包括双链DNA,还包括构成双链DNA的正链(或有义链)或互补链(或反义链)等各单链DNA。另外,对其长度无特别限定。所以,在本说明书中,在没有特别说明的情况下,“基因”是指包括人类基因组DNA在内的双链DNA、包括cDNA在内的单链DNA(正链)、具有与该正链互补的序列的单链DNA(互补链)、及上述DNA的片段中的任一种。另外,该“基因”不仅包括以特定的碱基序列(或序列号)表示的“基因”,还包括编码与由上述基因编码的蛋白质的生物学功能相同的蛋白质的“基因”,所述蛋白质例如可以举出同源物(homolog)、剪接变体等变异体、及衍生物。作为编码同源物、变异体或衍生物的“基因”,具体可以举出具有在后述的严格条件下与序列号1所示碱基序列的互补序列杂交的碱基序列的“基因”。

例如,作为来自人的蛋白质的同源物(homolog)或编码该同源物的基因,可以举出与该蛋白质或编码该蛋白质的人基因对应的来自其它生物种的蛋白质或基因,上述蛋白质或基因同源物可以通过HomoloGene(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/homoloGene/>)鉴定。具体而言,可以将特定的人类氨基酸或碱基序列代入BLAST程序(BLAST program)(Karlin, S.等, Proceedings of the National Academic Sciences U.S.A., 1993年,第90卷, p.5873 - 5877, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>),得到一致(得分最高、E值为0且

同一性显示为100%)序列的登录号(accession number)。作为BLAST程序,已知有BLASTN(基因)、BLASTX(蛋白质)等。例如,进行基因检索时,将从上述BLAST检索得到的登录号输入UniGene(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/UniGene/>),得到UniGeneClusterID(以Hs.表示的编号),将得到的UniGeneClusterID输入HomoloGene。从作为结果得到的表示其它生物种基因与人类基因的基因同源物的相关性的列表中选择其它生物种的基因作为与由特定碱基序列表示的人类基因对应的基因同源物。在该方法中,可以使用FASTA程序(<http://www.ddbj.nig.ac.jp/search/fasta-e.html>)代替BLAST程序。

需要说明的是,对“基因”的功能区域没有限定,例如可以包括表达控制区域、编码区域、外显子或内含子。

在本说明书中,“转录产物”是指以基因的DNA序列为模板合成的信使RNA(mRNA)。RNA聚合酶与位于基因上游的被称为启动子的部位结合,使核糖核苷酸与3'末端结合,使其与DNA的碱基序列互补,合成mRNA。该mRNA中不仅含有基因自身,还含有包括表达控制区域、编码区域、外显子或内含子在内的从转录起点至聚A序列末端的全长序列。

在本说明书中,“翻译产物”表示无论转录合成的mRNA接受/不接受剪接等修饰,都基于其信息而合成的蛋白质。在mRNA的翻译过程中,首先,核糖体与信使RNA结合,然后,根据mRNA的碱基序列结合氨基酸,从而合成蛋白质。

本说明书中所谓“探针”包含为了特异性地检测由基因表达生成的RNA或来自该RNA的核酸而使用的核酸及/或与其互补的核酸。

在本说明书中,“引物”包括能特异性识别、扩增基因表达产生的RNA或来自该RNA的核酸的连续核酸及/或与其互补的核酸。

此处,互补的核酸(互补链、反链)是指基于A:T(U)、G:C的碱基配对,与由序列号定义的碱基序列组成的核酸的全长序列、或其部分序列(此处,为了便于说明,将上述序列称为正链)具有碱基互补关系的核酸。其中,所述互补链不只限于与作为对象的正链的碱

基序列完全互补的序列，也可以是具有能与作为对象的正链在严格条件下杂交的互补性的序列。

在本说明书中，“严格条件”是指相对于探针与其它序列的杂交，探针以可检测性更大的程度（例如，比背景至少大2倍）与其靶序列杂交的条件。严格条件具有序列依赖性，因进行杂交的环境的不同而不同。通过控制杂交及/或清洗条件为严格条件，可以鉴定与探针100%互补的靶序列。

在本说明书中，“变异体”为核酸时，是指起因于多态性、突变、转录时的选择剪接等的天然变异体、同源物、或以遗传密码的简并为基础的变异体、或在序列号1表示的碱基序列或其部分序列中缺失、置换、添加或插入1个以上、优选1个或几个碱基的变异体、或与该碱基序列或其部分序列具有约80%以上、约85%以上、优选约90%以上、更优选约95%以上、约97%以上、约98%以上、或约99%以上的同源性百分比的变异体、或在上述定义的严格条件下与含有该碱基序列或其部分序列的多核苷酸或寡核苷酸杂交的核酸，另一方面，变异体为蛋白质或肽时，是指在序列号2表示的氨基酸序列或其部分序列中缺失、置换、添加或插入1个以上、优选1个或几个氨基酸的变异体、或与该氨基酸序列或其部分序列具有约80%以上、约85%以上、优选约90%以上、更优选约95%以上、约97%以上、约98%以上、或约99%以上的同源性百分比的变异体。

在本说明书中，“数个”是指约10、9、8、7、6、5、4、3或2个以下的整数。

在本说明书中，“同源性百分比”可以使用诸如上述BLAST或FASTA的蛋白质或基因检索系统，通过导入空位（gap）而进行确定（Karlin, S.等，1993年，Proceedings of the National Academic Sciences U.S.A., 第90卷, p.5873 - 5877; Altschul, S.F.等，1990年，Journal of Molecular Biology, 第215卷, p.403 - 410; Pearson, W.R.等，1988年，Proceedings of the National Academic Sciences U.S.A., 第85卷, p.2444 - 2448）。

在本说明书中，“衍生物”为核酸时，是指通过荧光团、放射性同位素等进行标记的衍生物、含有修饰核苷酸（例如，含有卤素、甲基等烷基、甲氧基等烷氧基、硫代、羧甲基等基团的核苷酸，生物素化核苷酸，及进行了碱基的再构建、双键的饱和、脱氨基化、硫分子对氧分子的取代等的核苷酸等）的衍生物等，另一方面，“衍生物”为蛋白质时，是指乙酰化、酰化、烷基化、磷酸化、硫酸化、糖基化、生物素化/亲和素化、标记化（例如酶、荧光团、发光物质等标记的）衍生物等化学修饰衍生物。

本说明书中，所谓“诊断（或检测或确定）用试剂盒”，是指为了诊断是否患有尿路上皮癌、患病程度或有无改善或改善程度，及为了筛选对尿路上皮癌的预防、改善或治疗有用的候选物质，而直接或间接使用的试剂盒。其中包含能够特异性地识别、并结合下述基因的核苷酸、寡核苷酸及多核苷酸，所述基因与尿路上皮癌的患病相关，在生物体内、特别是在尿路上皮组织内的表达发生变化。上述寡核苷酸及多核苷酸，基于上述性质，可以有效地用作探针或引物，所述探针用于检测在生物体内、组织或细胞内等表达的上述基因，所述引物用于扩增在生物体内表达的上述基因。另外，其中还包含能够检测为该基因翻译产物的蛋白质的抗体。

本说明书中，所谓为检测/诊断对象的“生物试样”，是本发明的蛋白质及/或基因的表达随尿路上皮癌的发展而发生变化的试样（或标本），是从受试者采集的试样。具体而言，该试样包括尿路上皮组织及其周边淋巴结、还有怀疑发生转移的其它脏器、血液、血清、血浆、淋巴细胞培养上清液、尿、脊髓液、唾液、汗、腹水等体液、还有细胞或脏器的提取物等。

本说明书中所谓“尿路上皮癌”，是指在肾盂、肾盂、尿管、膀胱、尿道的移行上皮部发生的癌。作为尿路上皮癌的例子，例如可以举出膀胱癌、肾盂癌、尿管癌、尿道癌，本发明特别适用于膀胱癌的检测。

本说明书中所谓“受试者”，是指患有尿路上皮癌的动物，优选

哺乳动物，较优选人。

本说明书中所谓“特异性”，是指只识别特定的蛋白质或核酸、或者仅与其结合或反应。

根据本发明，能够容易地且以较高可靠度地检测尿路上皮癌。例如，只需测定患者尿中的CXCL1浓度/肌酸酐浓度的比例，即可容易地确定是否患有尿路上皮癌。本发明对浸润性肿瘤的检测特别有效。

本说明书包括为本申请优先权基础的日本专利申请2005-255370号说明书及/或附图记载的内容。

附图说明

[图1]膀胱癌株化细胞及正常尿路上皮细胞中CXCL1的通过RT-PCR测定的mRNA表达量比较。

[图2]膀胱癌株化细胞及正常尿路上皮细胞的培养上清液中CXCL1蛋白质表达量。

[图3]膀胱癌患者的尿中的CXCL1蛋白质表达。

[图4]膀胱癌患者的尿中的CXCL1蛋白质表达量的测定。白圆圈表示各数据的数值，平均值和标准差以+字表示。*表示危险率 $P < 0.001$ ，健康人（对照）和早期癌症患者（Ta）之间有显著差异。+表示危险率 $P < 0.01$ ，早期癌症患者和进行性癌症患者（T1以上）之间有显著差异。

[图5]膀胱癌患者的组织中的CXCL1蛋白质表达的免疫染色图。进行性癌（pT2G3）及淋巴结转移灶中可见较强染色。与其相对，正常尿路上皮组织（pTaG1）中未见染色。

具体实施方式

本次，本发明人等通过细胞培养上清液的蛋白组分析（proteome analysis）筛选与正常尿路上皮细胞相比在来自膀胱癌患者的癌细胞中表达增强的蛋白质。结果发现，与正常尿路上皮细胞的培养上清液相比在癌细胞的培养上清液中能够较多地检测出全长CXCL1蛋白质。此

处，所谓正常尿路上皮细胞，是指从未患有尿路上皮癌的肾切除患者的正常尿管中获得的上皮细胞。

另外，本发明人等采用免疫学方法测定膀胱癌患者在癌切除手术前和手术后的血液及尿中CXCL1蛋白质的量时，发现与膀胱癌切除后相比在膀胱癌切除前的患者的血液及尿中能够高度地检测到CXCL1蛋白质。

进而，本发明人等发现，回收在来自膀胱癌患者的细胞和正常尿路上皮细胞中表达的总RNA，采用DNA阵列法及定量PCR法测定编码该总RNA中的CXCL1基因的表达量，与正常细胞相比，在来自膀胱癌患者的细胞中编码CXCL1的mRNA量增加。

因此，本发明的方案之一，提供一种检测尿路上皮癌的方法，所述方法包括体外测定来自受试者的生物试样中的CXCL1蛋白质、或编码该蛋白质的基因的表达。

一般情况下，本发明的方法中测定生物试样中上述蛋白质的存在或存在量、或者上述基因的表达或表达量。此处，本发明的靶蛋白质或基因也包含由依赖受试者的种类（例如人种）或个体的多态性、剪接变异等引起的变异体。上述蛋白质的存在或量、或者基因的表达或表达量可以使用能够与该蛋白质或基因特异性结合的物质进行测定。上述物质包括如下所述的抗体、核酸探针等。

本发明中可以使用的抗体是识别CXCL1蛋白质（优选具有序列号2的氨基酸序列的蛋白质）并与其特异性结合的抗体或其片段或者化学修饰衍生物（定义如上）。抗体包括多克隆抗体、单克隆抗体、或抗体片段、例如Fab、Fab'、F(ab')₂、Fv、ScFv等。本发明的抗体是针对由上述蛋白质的至少5个、优选至少8个氨基酸构成的1或多个表位的抗体。特异性的多克隆抗体可以通过如下方法制备，例如，使CXCL1蛋白质免疫的兔等的抗血清通过CXCL1蛋白质与琼脂糖等载体结合的柱，回收与柱载体结合的IgG抗体。单克隆抗体可以通过下述方法获得。

本发明中可以使用的核酸探针包括：由序列号1表示的碱基序列

或其变异体序列构成的核酸、由其互补序列构成的核酸、与上述核酸在严格条件下杂交的核酸、或含有上述核酸的15个以上连续碱基的片段、或它们的化学修饰衍生物（定义如上）。

本发明的方法中，通过其实施方案，测定来自受试者的生物试样中的上述蛋白质的存在量或上述基因的表达量。该蛋白质的量或基因的表达量与对照试样中的量相比显著增加时，可确定受试者患有尿路上皮癌。此处，对照试样是来自例如正常或健康的个体、或者无尿路上皮癌的个体的对应的试样，例如血液、尿等体液，尿路上皮组织或细胞等。特别是对于组织或细胞，利用常用方法从上述试样中回收mRNA，确定通过定量RT-PCR法生成、扩增的cDNA量（其与靶基因的表达量对应。），或者培养该细胞，测定其培养上清液中的CXCL1蛋白质的浓度。

相对于对照试样的增加率通常为2倍以上、优选3倍以上、较优选4倍以上、最优选5倍以上。增加率为3倍以上时可靠度升高。增加的程度不仅可以通过与测定的实测值进行对比而确定，也可以通过例如以某种校正物质（例如肌酸酐等）的量为基准，根据与该基准的相对值进行比较而确定。

作为尿路上皮癌，如上述定义所述，包括例如膀胱癌、肾盂癌、尿管癌、尿道癌等。特别是在膀胱癌的检测中，与浅表性肿瘤相比，浸润性肿瘤的癌检测可靠性显著升高。因此，可推测本发明对于尿路上皮癌中易于发生转移的浸润性肿瘤的检测也是有效的。

如上所述，本发明的尿路上皮癌的检测方法包括：使用引物或探针测定试样中来自编码由尿路上皮癌细胞产生的CXCL1蛋白质的基因的核酸的表达量、或使用抗体采用免疫学方法测定由尿路上皮癌细胞产生的、试样中的CXCL1蛋白质。根据本发明的方法，不仅能够确定受试者是否患有尿路上皮癌，而且能够区别尿路上皮癌患者和非尿路上皮癌患者。并且，还可以根据本发明的方法，通过对试样中来自编码CXCL1蛋白质的基因的核酸的表达量或CXCL1蛋白质进行定量，也能够确定尿路上皮癌的进展程度。

根据本发明的实施方案，本发明提供一种通过使用与上述CXCL1蛋白质或其片段特异性结合的抗体或其片段，采用免疫学方法定量试样中的CXCL1蛋白质，来检测以膀胱癌为代表的尿路上皮癌的方法。

或者，根据其它实施方案，本发明提供一种使用由编码CXCL1蛋白质的碱基序列构成的核酸、由与其互补的序列构成的核酸、与上述核酸在严格条件下杂交的核酸、或者上述核酸的15个碱基以上的片段，测定试样中编码CXCL1蛋白质的基因的表达量，由此检测以膀胱癌为代表的尿路上皮癌的方法。

< CXCL1基因的检测 >

本发明中，作为尿路上皮癌的检测方法之一，可以举出使用核酸作为引物或探针，测定试样中编码由尿路上皮癌细胞产生的CXCL1蛋白质的基因的表达量的方法。

本发明中，可用于确定尿路上皮癌的存在及/或不存在、或者可用于诊断尿路上皮癌的核酸，能够定性及/或定量地测定来自人的CXCL1基因、其同源物、其转录产物或cDNA、或者其变异体或衍生物的存在、表达水平或存在量。

CXCL1基因，与非癌组织相比在尿路上皮癌组织中其表达水平显著增加。因此，本发明的组合物能够有效地用于测定、比较非癌组织和尿路上皮癌组织中CXCL1基因的表达水平。

可以用于本发明的核酸包含选自下述核酸中的1种或多种核酸的组合，所述核酸有：在患有尿路上皮癌的患者生物组织中含有序列号1表示的碱基序列的核酸及其互补核酸；与DNA在严格条件下分别杂交的核酸及其互补核酸，所述DNA由与上述碱基序列互补的碱基序列构成；及含有上述核酸组的碱基序列中15个以上连续碱基的核酸组。

上述多核苷酸的片段可以含有各核酸的碱基序列中的例如下述范围的连续碱基数，但并不限于此，所述范围包括15~序列的全部碱基数、15~300个碱基、15~250个碱基、15~200个碱基、15~150个碱基、15~140个碱基、15~130个碱基、15~120个碱基、15~110

个碱基、15~100个碱基、15~90个碱基、15~80个碱基、15~70个碱基、15~60个碱基、15~50个碱基、15~40个碱基、15~30个碱基或15~25碱基；25~序列的全部碱基数、25~300个碱基、25~250个碱基、25~200个碱基、25~150个碱基、25~140个碱基、25~130个碱基、25~120个碱基、25~110个碱基、25~100个碱基、25~90个碱基、25~80个碱基、25~70个碱基、25~60个碱基、25~50个碱基或25~40个碱基；50~序列的全部碱基数、50~300个碱基、50~250个碱基、50~200个碱基、50~150个碱基、50~140个碱基、50~130个碱基、50~120个碱基、50~110个碱基、50~100个碱基、50~90个碱基、50~80个碱基、50~70个碱基或50~60个碱基；60~序列的全部碱基数、60~300个碱基、60~250个碱基、60~200个碱基、60~150个碱基、60~140个碱基、60~130个碱基、60~120个碱基、60~110个碱基、60~100个碱基、60~90个碱基、60~80个碱基或60~70个碱基等。

本发明中使用的上述核酸或其片段均可作为DNA，也可以作为RNA。

在本发明的组合物中使用的核酸可以使用DNA重组技术、PCR法、使用DNA/RNA自动合成仪的方法等常规技术进行制备。

DNA重组技术及PCR法可以使用例如Ausubel等，*Current Protocols in Molecular Biology*, John Willey & Sons, US (1993)；Sambrook等，*Molecular Cloning A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, US (1989)等中记载的技术。

另外，本发明还提供一种尿路上皮癌诊断（检测）用试剂盒，所述试剂盒包含：上述方法中可以用作探针（及、根据情况用作引物）的核酸、其变异体及/或其片段中的1种或多种。

本发明的试剂盒，优选含有选自上述记载的核酸中的1种或多种核酸或其片段。

本发明的试剂盒可以包含含有序列号1表示的碱基序列的核酸、含有其互补序列的核酸、与上述核酸在严格条件下杂交的核酸、或上述核酸的片段中的至少1种。

优选实施方案中，上述核酸为由序列号1所示的碱基序列构成的核酸、由其互补序列构成的核酸、与上述核酸在严格条件下杂交的核酸、或含有上述核酸的15个以上连续碱基的片段。

优选实施方案中，上述片段可以为含有15个以上、优选30个以上、优选50个以上、优选60个以上、例如50~100个连续碱基的核酸。

构成本发明试剂盒的上述组合举例给出的仅为例示，其它多种可能的组合全部包含在本发明中。

本发明的试剂盒中所含的核酸、其变异体或其片段可以单独地或以任意组合被包装在不同的容器中。

本发明的试剂盒中所含的作为探针的核酸，可以与固相载体结合。载体可以包括例如DNA微阵列、DNA芯片等基板。即、含有上述核酸的DNA微阵列或DNA芯片均属于本发明的范围内。

能被固定化的核酸是如上所述的本发明的全部核酸。例如，上述核酸可以含有以下1个或多个核酸或其片段。

- 由序列号1所示的碱基序列构成的核酸、其变异体、或含有15个以上连续碱基的上述核酸的片段。

- 含有序列号1所示碱基序列的核酸。

- 与下述DNA在严格条件下杂交的核酸、或含有15个以上连续碱基的片段，所述DNA由与序列号1所示碱基序列互补的碱基序列构成。

- 与由序列号1所示碱基序列构成的DNA在严格条件下杂交的核酸、或含有15个以上连续碱基的片段。

- 含有序列号1所示碱基序列或其互补序列的各序列的60个以上连续碱基的核酸。

本发明中，固定化的核酸可以为基因组DNA、cDNA、RNA、合成DNA、合成RNA中的任一种，可以为单链或双链。

作为能够检测、测定靶基因、RNA或cDNA的表达水平的DNA芯片的例子，可以举出Affymetrix公司的Gene Chip Human Genome U133 Plus 2.0 Array，Agilent公司的Whole human genome oligo microarray，Takara Bio公司的IntelliGene (R) HS Human Expression CHIP等。

DNA微阵列的制备例如可以使用在固相表面固定预先制备的探针的方法。在固相表面固定预先制备的核酸探针的方法如下：合成导入了官能团的核酸，在经过表面处理的固相载体表面上点样寡核苷酸或多核苷酸，使其共价键合（例如、J.B.Lamture等、*Nucleic. Acids. Research*、1994年，第22卷，p.2121 - 2125，Z.Guo等、*Nucleic. Acids. Research*、1994年，第22卷，p.5456 - 5465）。核酸通常通过间隔臂（spacer）或交联剂（crosslinker）与经过表面处理的固相载体共价键合。还已知使聚丙烯酰胺凝胶的微小片排列在玻璃表面上，使合成核酸与其共价键合的方法（G.Yershov等、*Proceedings of the National Academic Sciences U.S.A.*、1996年，第94卷，p.4913）。还已知下述方法：在二氧化硅微阵列上制作微电极的阵列，在电极上设置含有链霉抗生物素蛋白的琼脂糖的渗透层，形成反应部位，通过使该部位带正电，固定生物素化多核苷酸，通过控制该部位的电荷，能高速且严格地进行杂交（R.G.Sosnowski等、*Proceedings of the National Academic Sciences U.S.A.*、1997年，第94卷，p.1119 - 1123）。

作为DNA芯片的基板，只要是能够将DNA固定化的基板即可，没有特别限定，可以举出载玻片、硅制芯片、聚合物制芯片及尼龙膜等。另外，可以对上述基板进行聚L-赖氨酸涂布或导入氨基、羧基等官能团等的表面处理。

另外，固定化法只要是通常使用的方法即可，没有特别限定，可以举出以下方法：使用被称为点样器（spotter）或阵列点样仪（arrayer）的高密度分液器点样DNA的方法、或使用通过压电元件等从喷嘴喷射微量的液滴的装置（喷墨）将DNA喷射到基板上的方法、或在基板上依次进行核苷酸合成的方法。使用高密度分液器时，例如如下进行固定化：在具有多个孔的平板的各孔中装入不同的基因溶液，用针取出该溶液，然后依次点到基板上。使用喷墨法时，如下进行固定化：从喷嘴喷射基因，将基因高速地排列在基板上。在基板上合成DNA时，如下进行固定化：用能在光的作用下离去的官能团保护与基板结合的碱基，通过使用掩模只对特定部位的碱基曝光，使官能团离去。然后，

反复进行向反应液中加入碱基、使其与基板上的碱基偶联的步骤。

杂交条件没有限定，例如，包括在30℃~50℃下，在3~4×SSC、0.1~0.5% SDS中杂交1~24小时，较优选在40℃~45℃下，在3.4×SSC、0.3% SDS中杂交1~24小时，然后进行清洗。作为清洗条件，例如可以举出利用含有2×SSC和0.1% SDS的溶液、及1×SSC溶液、0.2×SSC溶液在室温下连续清洗等的条件。此处，1×SSC是含有150mM氯化钠及15mM柠檬酸钠的水溶液（pH7.2）。互补链优选为即使在上述条件下进行清洗仍能保持与作为对象的正链杂交的状态的链。作为上述互补链，具体可以举出由与作为对象的正链的碱基序列具有完全互补关系的碱基序列组成的链、以及由与该链具有至少80%同源性的碱基序列组成的链。

作为以本发明试剂盒的多核苷酸片段为引物进行PCR时的严格的杂交条件的例子，例如可以举出使用组成为10mM Tris - HCL（pH8.3）、50mM KCl、1~2mM MgCl₂等的PCR缓冲液，在由该引物序列计算的溶解温度（T_m）- 5~10℃下处理15秒~1分钟左右等。作为上述T_m的计算方法，可以举出T_m = 2×（腺嘌呤残基数+胸腺嘧啶残基数）+4×（鸟嘌呤残基数+胞嘧啶残基数）等。

上述杂交的“严格条件”的其它例子，记载于例如Sambrook, J. & Russel, D.著，Molecular Cloning, A LABORATORY MANUAL、Cold Spring Harbor Laboratory Press、2001年1月15日出版，第1卷7.42~7.45，第2卷8.9~8.17等中，可以在本发明中使用。

< CXCL1蛋白质的检测 >

作为本发明涉及的尿路上皮癌的其它检测方法，可以举出使用抗体，测定试样中由尿路上皮癌细胞产生的CXCL1蛋白质的存在或量的方法。

本发明中，可用于确定尿路上皮癌的存在及/或不存在、或者可用于诊断尿路上皮癌的抗体，可以定性地及/或定量地测定来自人的CXCL1基因的翻译产物、其同源物、或者其变异体或衍生物的表达水

平或存在量。

作为本发明中能够使用的抗体，只要为能够与CXCL1蛋白质或其片段特异性结合的抗体即可，没有特殊的限定，可以使用单克隆抗体或多克隆抗体，但优选使用单克隆抗体。本发明的抗体的球蛋白类型，只要是具有上述特征的类型即可，没有特殊的限定，可以为IgG、IgM、IgA、IgE、IgD中的任一种，优选IgG及IgM。例如，作为单克隆抗体，可以使用20326.1(ab10375、Abcam社)等，多克隆抗体也可以从Abcam社等购买。另外，与CXCL1蛋白质特异性结合的抗体，也可以根据下述方法制备。

免疫原的制备

本发明中制备抗体时，制备用于作为免疫原（抗原）的蛋白质。使用CXCL1蛋白质或其片段作为免疫原蛋白质。本发明中可以作为免疫原使用的CXCL1蛋白质的氨基酸序列（序列号2）及编码该蛋白质的cDNA序列（序列号1），在GenBank中分别以登录号NP_001502、NM_001511公开。所以，可以利用公开的氨基酸序列信息，通过本技术领域中公知的方法、例如固相肽合成法等，合成用于用作免疫原的CXCL1蛋白质片段。作为免疫原使用CXCL1蛋白质片段时，优选使其与KLH、BSA等载体蛋白质连接进行使用。

另外，CXCL1蛋白质能够使用编码CXCL1蛋白质的cDNA的信息、利用公知的DNA重组技术获得。编码CXCL1蛋白质的cDNA可以采用cDNA克隆法制备。从表达本发明中作为靶标的CXCL1基因的单核细胞、黑素瘤细胞、呼吸道上皮细胞、角质形成细胞、肺泡巨噬细胞等生物组织中提取总RNA，将所得的总RNA用寡dT纤维素柱处理得到聚A（+）RNA，采用RT-PCR法由所得的聚A（+）RNA制备cDNA文库，通过杂交筛选、表达筛选、抗体筛选等筛选方法，可以从此文库中得到目的cDNA克隆。必要时，也可以采用PCR法扩增cDNA克隆。探针或引物可以以序列号1所示的碱基序列为基础，从15~100个连续碱基的序列中选择、合成。cDNA克隆技术，记载于例如Sambrook, J. &

Russel, D.著, Molecular Cloning, A LABORATORY MANUAL, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001年1月15日发行的第1卷7.42~7.45、第2卷8.9~8.17。

CXCL1蛋白质可以如下获得,例如将如上所述得到的cDNA克隆整合到表达载体中,通过培养由该载体转化或转染的原核或真核宿主细胞,从该细胞或培养上清液得到CXCL1蛋白质。作为表达载体,可以举出来自大肠杆菌的质粒(例如pET21a、pGEX4T、pC118、pC119、pC18、pC19等)、来自枯草杆菌的质粒(例如pUB110、pTP5等)、来自酵母的质粒(例如YEp13、YEp24、YCp50等)等,作为噬菌体DNA,可以举出 λ 噬菌体(λ gt11、 λ ZAP等)。并且,也可以使用痘苗病毒等动物病毒载体、杆状病毒等昆虫病毒载体。载体及表达体系可以从Novagen社、宝酒造、第一化学药品、Qiagen社、Stratagene社、Promega社、Roche Diagnostis社、Invitrogen社、Genetics Institute社、Amersham Bioscience社等购入。

为了将CXCL1的cDNA插入载体中,可以采用首先将纯化的DNA用适当的限制酶切断,插入到适当载体的限制酶切位点或多克隆位点中,与载体连接的方法等。载体中除编码该蛋白质的DNA之外,还包含调节元件,例如启动子、增强子、聚腺苷酸化信号、核糖体结合部位、复制起点、终止子、选择标记物等。另外,为了容易进行多肽的纯化,可以将多肽制成在多肽的C末端或N末端结合了标记肽的融合多肽。作为代表性的标记肽,可以举出6~10个残基的组氨酸重复序列、FLAG、myc肽、GFP蛋白质等,但标记肽并不限于于此。另外,DNA重组技术记载于Sambrook, J. & Russel, D. (上述)。为了连接DNA片段和载体片段,使用公知的DNA连接酶。

作为宿主细胞,可以使用细菌等原核细胞(例如大肠杆菌、枯草杆菌)、酵母(例如酿酒酵母)、昆虫细胞(例如Sf细胞)、哺乳动物细胞(例如COS、CHO、BHK)等。向宿主细胞中导入重组载体的方法,只要是向各宿主中导入DNA的方法即可,没有特殊的限定,例如可以举出使用钙离子的方法、使用脂质体的方法、电穿孔法、微注

射法等。

作为培养以大肠杆菌或酵母菌等微生物作为宿主得到的转化体的培养基，只要为含有微生物能同化的碳源、氮源、无机盐类等、并且能够有效地进行转化体培养的培养基即可，可以为天然培养基、合成培养基中的任一种。通常情况下在振荡培养或通气搅拌培养等需氧条件下、在37℃下培养6~24小时。培养期间，pH保持在中性左右。pH的调整使用无机或有机酸、碱溶液等进行。培养中，根据需要可以向培养基中添加氨基青霉素或四环素等抗生素。培养哺乳动物细胞等的转化体时，在适合各细胞的培养基中培养后，回收在培养上清液或细胞内产生的蛋白质。此时，培养基中可以含有血清，也可以不含，但在无血清培养基中培养较理想。在菌体内或细胞内产生CXCL1蛋白质时，通过破碎菌体或细胞提取蛋白质。另外，在菌体外或细胞外产生CXCL1蛋白质时，可以直接使用培养液，或通过离心分离等除去菌体或细胞。

在不结合标记肽的状态下制备本发明的蛋白质时，作为其纯化方法，例如可以举出超滤、盐析、凝胶过滤、离子交换色谱法等方法。除此之外，也可以采用组合亲和色谱、HPLC、疏水性色谱、等电点色谱等的方法。另一方面，在该蛋白质上结合组氨酸重复序列、FLAG、myc、GFP等标记肽时，可以举出适合通常使用的各种标记肽的亲和色谱法。可以构建能容易分离、纯化的表达载体。特别是构建能以多肽和标记肽的融合蛋白质的状态进行表达的表达载体，利用基因工程技术制备该蛋白质时，也可容易地进行分离、精制。可以通过SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳等确认是否得到CXCL1蛋白质。

识别如上所述得到的蛋白质的抗体，能够通过抗体的抗原结合部位，与该蛋白质特异地结合。具体而言，CXCL1蛋白质或其片段、其变异体蛋白质或融合蛋白质等可以分别用作免疫原，所述免疫原用于产生具有免疫反应性的抗体。

更具体而言，蛋白质、片段、变异体、融合蛋白质等含有促使抗体形成的抗原决定簇或表位，上述抗原决定簇或表位可以是直链，也

可以是较高级结构（断开）。需要说明的是，该抗原决定簇或表位可以通过本领域公知的所有方法进行鉴定。

通过本发明的蛋白质，诱导产生所有状态的抗体。如果分离该蛋白质的全部或一部分或表位，那么使用常规技术即可制备多克隆抗体及单克隆抗体中的任一种。方法例如包括Kennet等(主编), *Monoclonal Antibodies, Hybridomas: A New Dimension in Biological Analyses*, Plenum Press, New York, 1980中举出的方法。

接下来，将所得的蛋白质溶解于缓冲液中制备免疫原。需要说明的是，必要时，为了有效地进行免疫可以添加佐剂。作为佐剂，可以举出市售的完全弗氏佐剂、不完全弗氏佐剂、氢氧化铝（明矾）、胞壁酰肽等，也可以将上述佐剂混合使用。

单克隆抗体的制备

(1) 免疫及抗体产生细胞的采集

对哺乳动物例如大鼠、小鼠（例如近交系小鼠Balb/c）、兔等给予上述所得的免疫原。免疫原的1次给药量可以根据免疫动物种类、给药途径等适当确定，每1只动物给药约50~200 μ g。主要通过皮下、腹腔内注入免疫原进行免疫。另外，免疫的间隔没有特别限定，初次免疫后，间隔数日至数周，优选间隔1~4周，进行2~10次、优选3~4次加强免疫。初次免疫后，利用ELISA（酶联免疫吸附测定）法等反复测定免疫动物血清中的抗体值，抗体值达到平台时，向静脉内或腹腔内注射免疫原，进行最终免疫。从最终免疫日起2~5日后，优选3日后，采集抗体产生细胞。作为抗体产生细胞，可以举出脾细胞、淋巴结细胞、外周血细胞等，优选脾细胞或局部淋巴结细胞。

(2) 细胞融合

另外，根据本发明，还能够提供一种可产生对各蛋白质特异性的单克隆抗体的杂交瘤细胞株。该杂交瘤可以通过常规技术进行生产并鉴定。用于生产该杂交瘤细胞株的方法之一包括用本发明的蛋白质免疫动物，从被免疫的动物中采集脾细胞，使该脾细胞与骨髓瘤细胞株

融合，由此生成杂交瘤细胞，鉴定能够产生与该酶结合的单克隆抗体的杂交瘤细胞株。作为与抗体产生细胞融合的骨髓瘤细胞株，可以使用通常能购买到的小鼠等动物的细胞株。作为使用的细胞株，优选具有下述性质的细胞株，即具有药剂选择性，并具有在未融合状态下在HAT选择培养基（含有次黄嘌呤、氨基蝶呤、胸腺嘧啶）中不能存活，只有在与抗体产生细胞融合的状态下能存活的性质。细胞株优选来自与免疫动物同种系的动物的细胞。作为骨髓瘤细胞株的具体例子，可以举出来自BALB/c小鼠的次黄嘌呤·鸟嘌呤·磷酸核糖基·转移酶（HGPRT）缺陷细胞株P3X63 - Ag.8株（ATCC TIB9）等。

接下来使上述骨髓瘤细胞株与抗体产生细胞进行细胞融合。细胞融合如下进行：在不含有血清的DMEM、RPMI - 1640培养基等动物细胞培养用培养基中，以约1: 1~20: 1的比例混合抗体产生细胞和骨髓瘤细胞株，在细胞融合促进剂的存在下进行融合反应。作为细胞融合促进剂，可以使用浓度约为10~80%、平均分子量为1500~4000道尔顿的聚乙二醇等。另外，视情况的不同，为了提高融合效率，可以并用二甲基亚砷等辅助剂。还可以使用利用电刺激（例如电穿孔）的市售的细胞融合装置使抗体产生细胞和骨髓瘤细胞株融合。

（3）杂交瘤的筛选及克隆

从细胞融合处理后的细胞中筛选目标杂交瘤。作为筛选方法，使用例如含有胎牛血清的RPMI - 1640培养基等适当稀释细胞悬浮液后，以约200万个细胞/孔接种到微孔板上，向各孔中加入选择培养基，并在以后适当更换选择培养基，进行培养。培养温度为20~40℃、优选为约37℃。骨髓瘤细胞是HGPRT缺陷株或胸苷激酶缺陷株时，通过使用含有次黄嘌呤·氨基蝶呤·胸腺嘧啶核苷的选择培养基（HAT培养基），能够仅选择性培养、增殖具有抗体产生能力的细胞与骨髓瘤细胞株的杂交瘤。结果在用选择性培养基开始培养后，生长约14天左右的细胞可以作为杂交瘤被得到。

接下来，在进行了增殖的杂交瘤的培养上清液中对是否存在目标抗体进行筛选。杂交瘤的筛选可以按照常规方法进行，没有特别限定。

例如，采集作为杂交瘤培养的包含在孔中的培养上清液的一部分，通过酶免疫测定法（EIA: Enzyme Immuno Assay、及ELISA）、放射免疫测定法（RIA: Radio Immuno Assay）等进行筛选。融合细胞的克隆通过极限稀释法等进行，从而最终确立产生单克隆抗体的细胞即杂交瘤。本发明的杂交瘤如后所述，在RPMI - 1640、DMEM等基本培养基中的培养稳定，并能产生、分泌与来自尿路上皮癌的CXCL1蛋白质特异性反应的单克隆抗体。

（4）抗体的回收

单克隆抗体可以利用常规技术进行回收。即，作为从确立的杂交瘤中采集单克隆抗体的方法，可以采用通常的细胞培养法或腹水形成法等。采用细胞培养法时，在通常的培养条件（例如，37℃、5% CO₂浓度）下，在含有10%胎牛血清的RPMI - 1640培养基、MEM培养基或无血清培养基等动物细胞培养基中培养杂交瘤2~10日，从该培养上清液中获得抗体。采用腹水形成法的情况下，向与提供骨髓瘤细胞的哺乳动物同种系的动物的腹腔内给予约1000万个杂交瘤，使杂交瘤大量增殖。并在1~2周后采集腹水或血清。

对于上述抗体的采集方法，在需要纯化抗体的情况下，可以通过适当选择硫酸铵盐析法、离子交换色谱法、亲和色谱法、凝胶色谱法等公知的方法，或组合使用上述方法，得到纯化的本发明的单克隆抗体。

本发明的单克隆抗体包括嵌合抗体，例如小鼠单克隆抗体的人源化类型。另外，根据本发明，也可以提供上述抗体的抗原结合片段。可采用常用技术产生的抗原结合片段的例子包括Fab及F(ab')₂片段，但并不限于此。本发明还提供了可采用基因工程技术产生的抗体片段及衍生物。本发明的抗体可以采用体外及体内任一种方式在用于检测本发明多肽或其（多）肽片段的存在的分析中使用。另外，本发明的抗体可以用于采用免疫亲和层析法纯化蛋白质或蛋白质片段。

多克隆抗体的制备

制备多克隆抗体时，与上述相同地免疫动物，从最终免疫日起

6~60天后,利用酶免疫测定法(EIA及ELISA)、放射免疫测定法(RIA)等测定抗体值,在显示最大抗体值的当天采血,得到抗血清。然后,利用ELISA法等测定抗血清中的多克隆抗体的反应性。

<检测法>

本发明的方法优选使用本发明的上述抗体的测定法,即、免疫学测定法、或测定编码CXCL1蛋白质的基因的表达量的方法中的任一种方法。

作为免疫学测定法,例如可以举出酶免疫测定法(ELISA、EIA)、荧光免疫测定法、放射免疫测定法(RIA)、发光免疫测定法、免疫比浊法、乳胶凝集反应、乳胶比浊法、红血球凝集反应、粒子凝集反应或蛋白质印迹法。

作为测定来自基因的核酸的表达量的方法,可以举出定量RT-PCR法、DNA阵列法、RNA印迹法、RNA杂交法、DNA印迹法、DNA杂交法等。

作为本发明的蛋白质检测方法中成为被检对象的试样,只要是可能含有来自尿路上皮癌的CXCL1蛋白质、或含有来自编码该蛋白质的基因的核酸的生物试样即可,没有特殊的限定。特别指出的是,尿、血液、血浆、血清之类的体液试样中得到的CXCL1蛋白质的测定值,作为尿路上皮癌的指标是有用的。如上所述,本发明的尿路上皮癌的检测方法,不仅可以在癌组织中检测尿路上皮癌,也可以在血液或尿中检测尿路上皮癌,因此作为简便的检测法非常有用。

本发明的蛋白质检测方法通过酶免疫测定法、荧光免疫测定法、放射免疫测定法或发光免疫测定法等使用标记的免疫测定法实施时,优选将本发明的抗体固定化、或将试样中的成分固定化,进行其免疫学反应。

作为固相载体,可以使用由聚苯乙烯、聚碳酸酯、聚乙烯基甲苯、聚丙烯、聚乙烯、聚氯乙烯、尼龙、聚甲基丙烯酸酯、乳胶、明胶、琼脂糖、纤维素、琼脂糖凝胶、玻璃、金属、陶瓷或磁性体等材料组

成的微珠、微量培养板、试管、棒 (stick) 或试验片等形状的不溶性载体。

可以通过物理吸附法、化学结合法或并用两种方法等公知的方法，使固相载体和本发明的抗体或试样成分结合，进行固定化。

本发明中，为了容易地检测本发明的抗体与试样中的来自尿路上皮癌细胞的CXCL1蛋白质的反应，通过标记本发明的抗体直接检测该反应，或通过使用标记二抗间接检测该反应。本发明的检测方法，从灵敏度方面考虑，优选使用后者的间接检测（例如，夹心法等）。

作为标记物质，使用酶免疫测定法时，可以使用过氧化物酶（POD）、碱性磷酸酶、 β -半乳糖苷酶、脲酶、过氧化氢酶、葡萄糖氧化酶、乳酸脱氢酶、淀粉酶或生物素-抗生物素蛋白复合体等；使用荧光免疫测定法时，可以使用异硫氰酸荧光素、四甲基罗丹明异硫氰酸盐、取代异硫氰酸罗丹明、二氯三嗪异硫氰酸盐、Alexa或AlexaFluoro等；使用放射免疫测定法时，可以使用氚、碘125或碘131等。另外，使用发光免疫测定法时，可以使用NADH-、FMNH₂-、萤光素酶类、鲁米诺-过氧化氢-POD类、吡啶酯类或二氧杂环丁烷化合物类等。

作为标记物质和抗体的结合方法，在使用酶免疫测定法时，可以使用戊二醛法、马来酰亚胺法、吡啶基二硫化物法或高碘酸法等公知方法；在使用放射免疫测定法时，可以使用氯胺T法、Bolton-Hunter法等公知方法。测定操作方法可以通过公知的方法（Current protocols in Protein Sciences、1995年，John Wiley & Sons Inc.、Current protocols in Immunology、2001年，John Wiley & Sons Inc.）进行。例如，直接标记本发明的抗体时，将试样中的成分固定化，使其与标记的本发明的抗体接触，形成CXCL1蛋白质-本发明的抗体的复合体。然后将未结合的标记抗体洗涤分离，可以由结合的标记抗体的量或未结合的标记抗体的量测定试样中的CXCL1蛋白质的量。

另外，使用例如标记二抗时，使本发明的抗体与试样反应（一次反应），再与标记二抗反应（二次反应）。一次反应和二次反应可以

以相反的顺序进行，也可以同时进行，还可以错开时间进行。通过一次反应及二次反应，形成固定化的CXCL1蛋白质 - 本发明的抗体 - 标记二抗的复合体、或固定化的本发明的抗体 - CXCL1蛋白质 - 标记二抗的复合体。然后洗涤分离未结合的标记二抗，可以通过结合的标记二抗的量或未结合的标记二抗的量测定试样中的CXCL1蛋白质的量。

具体而言，使用酶免疫测定法时，在标记酶的最适条件下使其与底物反应，通过光学方法等测定反应生成物的量。使用荧光免疫测定法时，测定由荧光物质标记产生的荧光强度，使用放射免疫测定法时，测定由放射性物质标记产生的放射能量。使用发光免疫测定法时，测定由发光反应体系产生的发光量。

本发明的方法中，通过采用光学方法测定或者肉眼观测其透射光或散射光的测定方法来测定免疫比浊法、乳胶凝聚反应、乳胶比浊法、红细胞凝集反应或粒子凝集反应等中免疫复合体凝集物的生成，此时，作为溶剂可以使用磷酸缓冲液、甘氨酸缓冲液、Tris缓冲液或Good's缓冲液等，还可以在反应体系中含有聚乙二醇等反应促进剂或非特异性反应抑制剂。

以下，说明本发明的检测法的优选实施方案的一例。

首先，将本发明的抗体作为第一抗体固定在不溶性载体上。然后，优选通过与抗原无关的蛋白质（胎牛血清、牛血清白蛋白、明胶等）封闭未吸附抗原的固相表面。接下来，使固定化的第一抗体和受试试样接触。然后，和在与上述第一抗体不同的部位与CXCL1蛋白质反应的标记二抗接触，检测来自该标记的信号。此处，使用的“在与第一抗体不同的部位与CXCL1蛋白质反应的第二抗体”，只要是能够识别第一抗体与CXCL1蛋白质结合部位以外的部位的抗体即可，没有特殊的限制，无论免疫原的种类如何，可以为多克隆抗体、抗血清、单克隆抗体中的任一种，另外，也可以使用上述抗体的片段（Fab、F(ab')₂、Fab、Fv、ScFv等）。进而，作为第二抗体，也可以使用多种单克隆抗体。

另外，与上述相反，也可以对本发明的抗体进行标记，成为第二

抗体,在与本发明的抗体不同的部位将与CXCL1蛋白质反应的抗体作为第一抗体固定在不溶性载体上,使此固定化的第一抗体和受试试样接触,然后,使其与作为第二抗体的标记的本发明抗体接触,检测来自上述标记的信号。

另外,如上所述,由于本发明的抗体能够特异地与来自尿路上皮癌细胞的CXCL1蛋白质反应,所以能够作为癌症诊断剂使用。本发明的诊断剂是含有本发明的抗体的药剂,所以,使用本发明的诊断剂,检测从怀疑患有尿路上皮癌的个体采集的试样中所含的来自尿路上皮癌细胞的CXCL1蛋白质,由此能够诊断该个体是否患有尿路上皮癌。

另外,本发明的诊断剂可用于任一种方法,只要所述方法是用于进行免疫学测定的方法,通过与该技术领域中公知的免疫层析用试纸条等简便手段组合使用,能够更加简便且迅速地诊断癌症。所谓免疫层析用试纸条由下述部分构成,例如,由易于吸收试样的材料构成的试样接受部、含有本发明诊断剂的试剂部、试样和诊断剂的反应产物移动的展开部、将逐渐展开的反应产物着色的标记部、被着色的反应产物逐渐展开的展示部等,可以为与妊娠诊断剂相同的形态。首先,将试样加至试样接受部时,试样接受部吸收试样,使试样到达至试剂部。然后,在试剂部中,试样中的来自尿路上皮癌细胞的CXCL1蛋白质和本发明抗体发生反应,反应的复合体移动到展开部,到达标记部。在标记部中,上述反应复合体和标记二抗发生反应,与上述标记二抗的反应产物展开至展示部时,确认着色。上述免疫层析用试纸条,是丝毫不会给使用者带来由试剂使用导致的痛苦或危险性的用品,因此,可以用于家庭监测,由各医疗机构对其结果进行彻底检查、治疗(外科切除等),能够预防转移、复发。目前此试纸条可以通过例如特开平10-54830号公报所述的制造方法廉价地大量生产。另外,通过将本发明的诊断剂和用于已知的尿路上皮癌的肿瘤标记物的诊断剂组合使用,能够可靠性更高地进行诊断。

所以,本发明还涉及一种尿路上皮癌诊断用试剂盒,所述试剂盒

含有与CXCL1蛋白质或其片段特异地反应的抗体或其片段。本发明的试剂盒中的抗体可以与上述固相载体结合。并且，本发明的试剂盒还可以含有标记二抗、载体、洗涤缓冲液、试样稀释液、酶底物、反应终止液、作为纯化的标准物质的CXCL1蛋白质等。

以下，通过实施例，更加具体地说明本发明，但本发明的范围并不限于此。

实施例

(1) 正常尿路上皮细胞培养上清液的蛋白质组学分析

正常尿路上皮细胞由来自肾切除患者的正常尿管获得。将从正常尿管提取的尿路上皮细胞在10cm的培养皿内采用Defined KSFM培养基进行培养 (Scriven, S.D.等, 1997年, Journal of Urology, 第158卷, p.1147 - 1152)。在4个直径10cm的培养皿中培养的尿路上皮细胞90%汇合时, 用PBS (-) 洗涤3次, 然后, 用不含血清的RPMI1640培养基进行培养基交换, 培养24小时, 回收培养上清液。将此培养上清液进行超离心 (150,000g、30分钟、4°C) 处理, 除去沉渣后, 通过使用Amicon Ultra - 15 (Millipore社) 的离心处理将离心上清液浓缩 (4,000g、20分钟、4°C)。结果从40mL培养细胞上清液中提取到1mg蛋白质。

将200 μ g提取的蛋白质用ProteomeLabTM PF2D System (Beckman Coulter社) 反相层析分离成26馏分, 胰蛋白酶消化后, 用Q - TOF Ultima (Micromass社) 彻底地进行蛋白质鉴定。结果鉴定出约600种蛋白质, 推测其中约20种具有生长因子活性。

(2) 表达基因的分析

膀胱癌株化细胞 (RT112、5637、T24、EJ) 用含有10%胎牛血清的RPMI1640进行培养, 正常尿路上皮细胞用defined - KSFM进行培养。使用Trizol试剂 (Invitrogen社) 及RNeasy Mini试剂盒 (Qiagen), 按照该社推荐的流程, 分别由上述细胞制备总RNA。使用第一链cDNA合成试剂盒 (First - Strand cDNA synthesis kit) (Amersham

Biosciences), 由总RNA 3 μ g合成cDNA。以上述cDNA为模板, 分别针对作为由蛋白质组学分析发现的生长因子之一的CXCL1及作为其受体的CXCR2设计引物, 通过RT-PCR法分析基因表达, 以分子量为指标, 通过琼脂糖凝胶电泳确认有无表达(图1)。作为分子量标记物, 使用Hi-Lo DNA Marker (BIONEXUS)。

在作为来自浸润性膀胱癌的细胞株的5637、T24中, CXCL1的mRNA高度表达。在正常组织中虽能够检测到表达, 但与来自浸润性癌的细胞株相比其程度较低。

(3) 培养上清液中的CXCL1浓度测定

膀胱癌株化细胞(5637、T24)用含有10%胎牛血清的RPMI1640培养, 正常尿路上皮细胞用defined-KSFM进行培养。将各细胞在96孔培养板内培养24小时, 在几乎完全汇合的状态下交换培养液。再培养24小时后, 回收培养上清液。使用Human GRO alpha / CXCL1 Quantikine ELISA试剂盒(R&D Systems社)测定各培养上清液中的CXCL1蛋白质浓度。结果正常尿路上皮细胞的培养上清液中未检测到CXCL1, 而在作为来自浸润性癌的细胞株的5637、T24的培养上清液中检测到约5~20ng/mL以上的高浓度的CXCL1(图2)。

(4) 膀胱癌患者尿中的CXCL1浓度测定

从3名浸润性的膀胱癌患者及1名健康对照者获取尿样, 使用Human GRO alpha / CXCL1 Quantikine ELISA试剂盒(R&D Systems社)测定尿中的CXCL1蛋白质浓度。使用尿中肌酐浓度, 对各样品进行CXCL1蛋白质浓度的校正时, 与健康对照者相比, 可检测到膀胱癌患者的尿中CXCL1蛋白质浓度的值较高(图3)。

(5) 进展程度不同的膀胱癌患者尿中的CXCL1浓度测定

从32名早期(Ta)的膀胱癌患者、35名进行性(T1以上)的膀胱癌患者及40名健康对照者获取尿样, 使用Human GRO alpha / CXCL1 Quantikine ELISA试剂盒(R&D Systems社), 测定尿中的CXCL1蛋白质浓度。与健康对照者相比, 可检测到早期及进行性膀胱癌患者的尿中CXCL1蛋白质浓度的值较高(图4)。

(6) 正常尿路上皮组织及膀胱癌中的CXCL1表达的测定

将正常尿路上皮组织及膀胱癌组织用10%中性福尔马林固定，用石蜡包埋。将此石蜡块切成5 μ m厚的切片，脱石蜡化和湿润化，固定在载玻片上。通过过氧化氢抑制内源性过氧化酶活性。将载玻片用PBS洗涤后，用含有1%兔血清的PBS处理30分钟。将抗CXCL1抗体（Gro α （C-15）：SC1374、Santa Cruz Biotechnology社）稀释至1:150，用作第一抗体，在4 $^{\circ}$ C下静置一晚。进而使用Histofine Simple Stain MAX-PO（株式会社Nichirei Biosciences，日本），在二氨基联苯胺作用下显色。进而，用苏木精将切片轻度染色。肿瘤细胞的细胞质的10%以上被染色时确定为CXCL1阳性。

正常尿路上皮组织不被染色，可确认无CXCL1表达，但在进行性（pT2G3）膀胱癌组织及淋巴结转移灶中可见强染色，表明CXCL1较强地表达（图5）。

因此，根据本发明，使用上述抗体或核酸探针，测定尿路上皮组织或细胞等中的CXCL1基因的表达或表达量，通过与对照比较，以检测到该基因表达或表达量的增加为指标，能够有效地检测早期或进行性膀胱癌等尿路上皮癌。

产业上的可利用性

根据本发明，能够采用简易且廉价的方法有效地检测尿路上皮癌，因此，能够早期发现、诊断及治疗尿路上皮癌。另外，根据本发明的方法，能够使用患者的尿，非侵袭性地检测尿路上皮癌，因此能够简便且迅速地检测尿路上皮癌。

本说明书中引用的全部刊行物、专利及专利申请直接作为参考记入本说明书。

<110> 东丽株式会社

国立大学法人京都大学

<120> 用于检测尿路上皮癌的试剂盒及方法

<130> PH-2869-PCT

<140> PCT/JP2006/317379

<141> 2006-09-01

<150> JP 2005-255370

<151> 2005-09-02

<160> 2

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 1103

<212> DNA

<213> 人

<400> 1

```

cacagagccc gggccgcagg cacctcctcg ccagctcttc cgtcctctc acagccgcca      60
gaccgcctg ctgagcecca tggcccgcgc tgcctctctc gccgceccca gcaatccccg      120
gctcctgcga gtggcactgc tgctcctgct cctggtagcc gctggccggc gcgcagcagg      180
agcgtccgtg gccactgaac tgcgctgcca gtgcttgag accctgcagg gaattcacc      240
caagaacatc caaagtgtga acgtgaagtc ccccggacc cactgcgccc aaaccgaagt      300
catagccaca ctcaagaatg ggcggaagc ttgcctcaat cctgcatccc ccatagttaa      360
gaaaatcatc gaaaagatgc tgaacagtga caaatccaac tgaccagaag ggaggaggaa      420
gctcactggt ggctgttcct gaaggaggcc ctgcccttat agaacagaa gaggaaagag      480
agacacagct gcagaggcca cctggattgt gcctaattgt ttgagcatc gcttaggaga      540
agtcttctat ttatttattt attcattagt tttgaagatt ctatgttaat attttaggtg      600
taaaataatt aagggtatga ttaactctac ctgcacactg tcctattata ttattcttt      660
ttgaaatgtc aaccccaagt tagttcaatc tggattcata ttaatttga aggtagaatg      720
ttttcaaatg ttctccagtc attatgttaa ttttctgag ggcctgcaa catgccagcc      780
actgtgatag aggctggcgg atccaagcaa atggccaatg agatcattgt gaaggcaggg      840
gaatgtatgt gcacatctgt ttgttaactg tttagatgaa tgtcagttgt tatttattga      900
aatgatattca cagtgtgttg tcaacatttc tcatgttgaa actttaagaa ctaaaatggt      960
ctaaatatcc cttggacatt ttatgtcttt cttgtaaggc atactgcctt gtttaatggt      1020
agttttacag tgtttctggc ttagaacaaa ggggcttaat tattgatgtt ttcatagaga      1080
atataaaaat aaagcactta tag                                     1103

```

<210> 2

<211> 107

<212> PRT

<213> 人

<400> 2

```

Met Ala Arg Ala Ala Leu Ser Ala Ala Pro Ser Asn Pro Arg Leu Leu
1          5          10          15

Arg Val Ala Leu Leu Leu Leu Leu Val Ala Ala Gly Arg Arg Ala
          20          25          30

Ala Gly Ala Ser Val Ala Thr Glu Leu Arg Cys Gln Cys Leu Gln Thr
          35          40          45

Leu Gln Gly Ile His Pro Lys Asn Ile Gln Ser Val Asn Val Lys Ser
          50          55          60

Pro Gly Pro His Cys Ala Gln Thr Glu Val Ile Ala Thr Leu Lys Asn
          65          70          75          80

Gly Arg Lys Ala Cys Leu Asn Pro Ala Ser Pro Ile Val Lys Lys Ile
          85          90          95

Ile Glu Lys Met Leu Asn Ser Asp Lys Ser Asn
          100          105

```

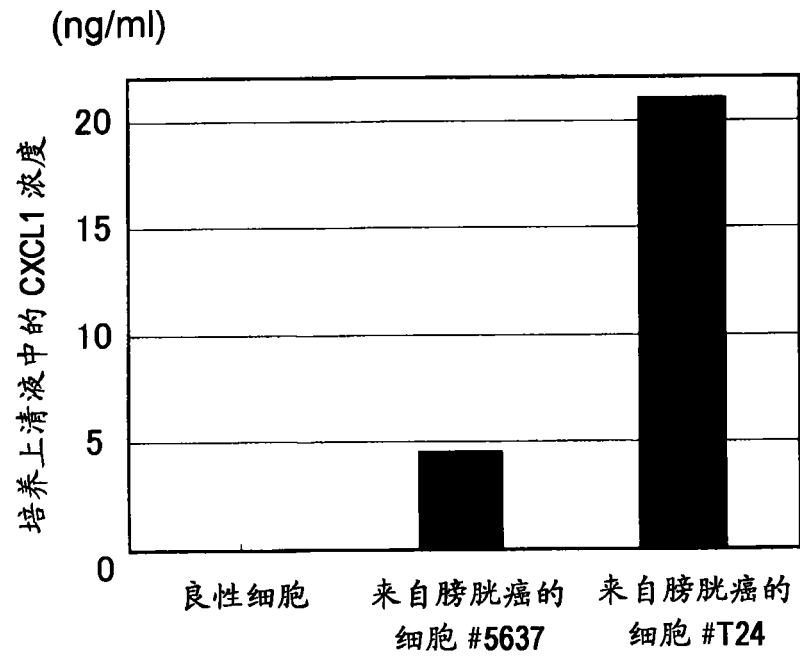



图 2

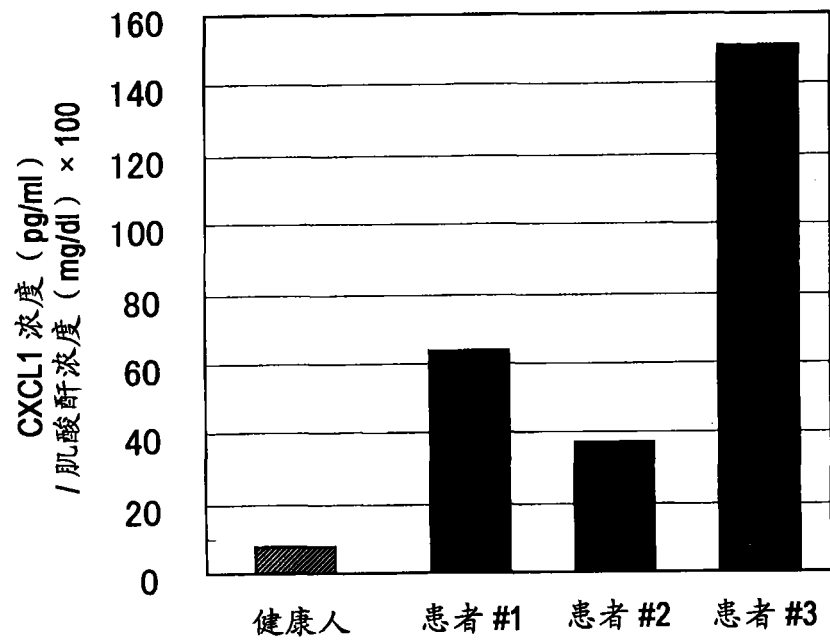


图 3

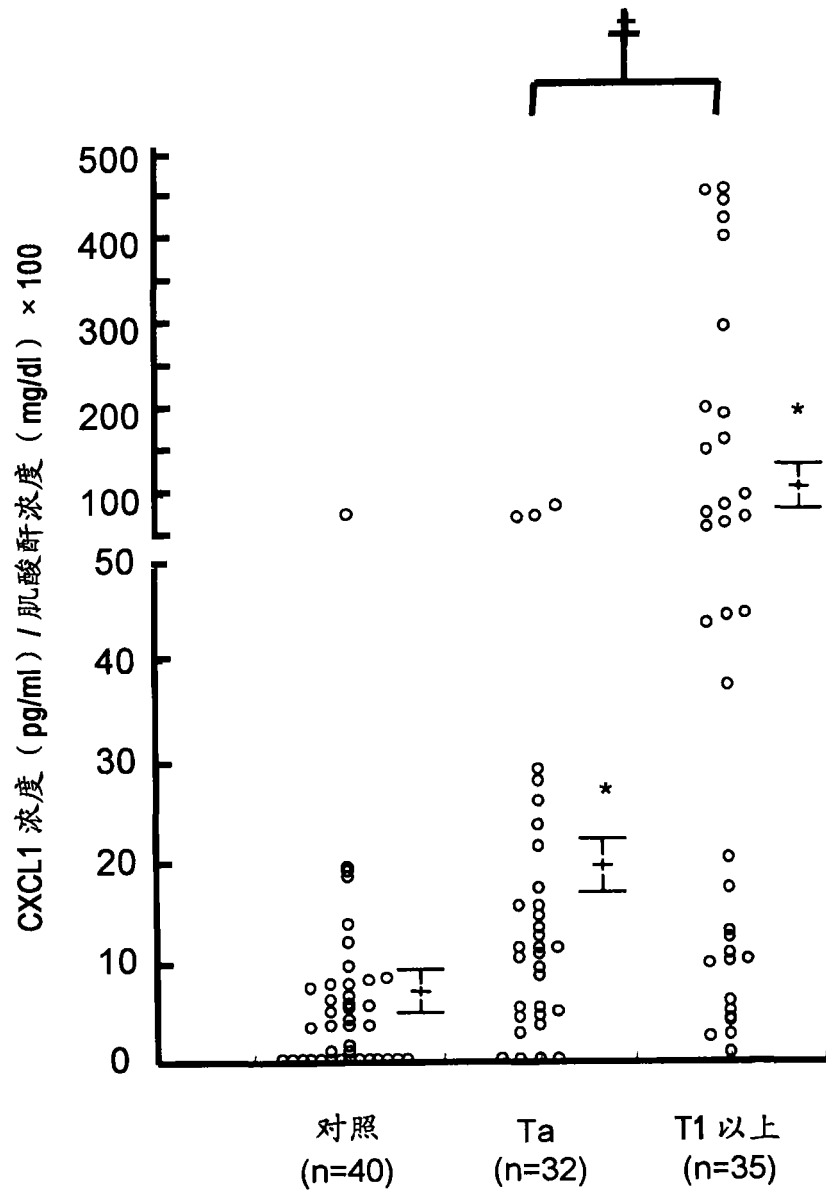


图 4

| | | | |
|----------------|--|---------|------------|
| 专利名称(译) | 尿路上皮癌的检测用试剂盒及方法 | | |
| 公开(公告)号 | CN101297046A | 公开(公告)日 | 2008-10-29 |
| 申请号 | CN200680039458.1 | 申请日 | 2006-09-01 |
| [标]申请(专利权)人(译) | 东丽株式会社 国立大学法人京都大学 | | |
| 申请(专利权)人(译) | 东丽株式会社 国立大学法人京都大学 | | |
| 当前申请(专利权)人(译) | 东丽株式会社 国立大学法人京都大学 | | |
| [标]发明人 | 秋山英雄 田中祥德 小园聪子 信正均 小川修 高桥毅 | | |
| 发明人 | 秋山英雄 田中祥德 小园聪子 信正均 小川修 高桥毅 | | |
| IPC分类号 | C12Q1/68 C12N15/09 G01N33/53 G01N33/566 G01N33/574 G01N37/00 | | |
| CPC分类号 | C12Q2600/112 G01N33/57438 G01N33/57407 C12Q1/6886 G01N33/57434 | | |
| 代理人(译) | 杨宏军 | | |
| 优先权 | 2005255370 2005-09-02 JP | | |
| 其他公开文献 | CN101297046B | | |
| 外部链接 | Espacenet SIPO | | |

摘要(译)

本发明涉及一种检测尿路上皮癌的方法，所述方法包括体外测定来自受试者的生物试样中的CXCL1蛋白质、或编码该蛋白质的基因的表达，本发明还涉及一种尿路上皮癌诊断用试剂盒，所述试剂盒包含能够与该蛋白质或基因特异性结合的抗体或核酸探针。

