

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2004-533602

(P2004-533602A)

(43) 公表日 平成16年11月4日(2004.11.4)

(51) Int. Cl. <sup>7</sup>	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 33/574	GO 1 N 33/574	2 G O 5 4
C 1 2 Q 1/68	C 1 2 Q 1/68	4 B O 6 3
GO 1 N 21/78	GO 1 N 21/78	C
GO 1 N 33/53	GO 1 N 33/53	D

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 70 頁)

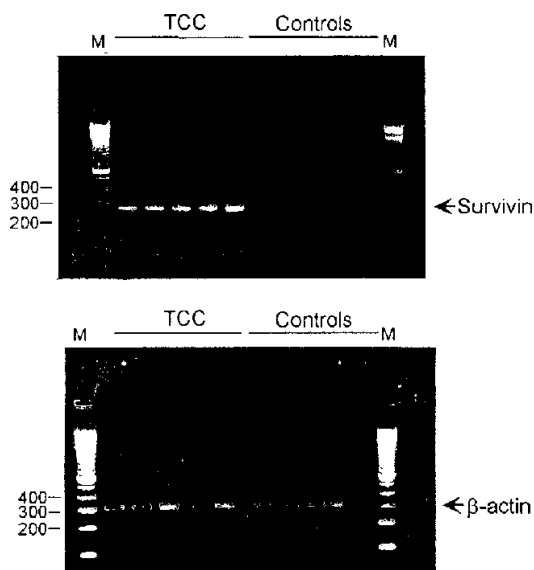
(21) 出願番号	特願2002-558017 (P2002-558017)	(71) 出願人	502224951 エール ユニヴァーシティ アメリカ合衆国, コネチカット州, ニューヘヴン, トゥーホイットニー アヴェニュー (番地なし)
(86) (22) 出願日	平成14年1月11日 (2002. 1. 11)	(74) 代理人	100094318 弁理士 山田 行一
(85) 翻訳文提出日	平成15年7月14日 (2003. 7. 14)	(74) 代理人	100104282 弁理士 鈴木 康仁
(86) 国際出願番号	PCT/US2002/000574	(72) 発明者	アルティエリ, ダリオ, シー. アメリカ合衆国, コネチカット州, ニューヘヴン, カレッジストリート 451, エール ユニヴァーシティ
(87) 国際公開番号	W02002/057787		
(87) 国際公開日	平成14年7月25日 (2002. 7. 25)		
(31) 優先権主張番号	60/260, 898		
(32) 優先日	平成13年1月12日 (2001. 1. 12)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 癌患者の生物学的流体中のサバイビンの検出

(57) 【要約】

本発明は、患者の生物学的流体中のサバイビンの存在を検出するステップを含む、癌を診断する方法を包含する。また、本発明は、サバイビンポリペプチド又はサバイビン核酸を検出する一つ以上の作用物質と、検査のために生物学的流体を集めるための容器とを備えるキットを提供する。



## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

サバイピンの存在又は不在について患者からの生物学的流体サンプルをアッセイするステップを含む、患者の癌を診断する方法であって、サンプル中のサバイピンの存在により患者が癌を有することが示される、前記方法。

## 【請求項 2】

生物学的流体が尿又は血清である、請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 3】

癌が尿生殖路に侵襲するあらゆる癌である、請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 4】

尿生殖路癌が、膀胱又は前立腺癌である、請求項 3 に記載の方法。

## 【請求項 5】

膀胱又は前立腺癌が、CISとグレード付けられている、請求項 4 に記載の方法。

## 【請求項 6】

膀胱又は前立腺癌が、いかなるグレード又はステージでもある、請求項 4 に記載の方法。

## 【請求項 7】

サバイピンが、サバイピンに結合する抗体、サバイピン結合パートナー、及びサバイピンをコードする核酸にハイブリダイズする核酸から成る群より選択される作用物質を使って検出される、請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 8】

作用物質がラベルで標識されている、請求項 7 に記載の方法。

## 【請求項 9】

ラベルが、放射性ラベル、蛍光ラベル、酵素又は化学発光標識である、請求項 8 に記載の方法。

## 【請求項 10】

サバイピンが、免疫アッセイによって検出される、請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 11】

免疫アッセイが、酵素連結免疫ソルベントアッセイ又は放射性免疫アッセイである、請求項 10 に記載の方法。

## 【請求項 12】

免疫アッセイが、免疫プロットティング、免疫拡散、免疫電気泳動又は免疫沈降反応を含む、請求項 10 に記載の方法。

## 【請求項 13】

サバイピンが、ドットプロットティングによって検出される、請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 14】

ドットプロットティングが、バイオドット S F モジュールを使用することを含む、請求項 13 に記載の方法。

## 【請求項 15】

サバイピンが、核酸ハイブリダイゼーションによって検出される、請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 16】

核酸ハイブリダイゼーションが、RT-PCR又はノーザンプロット分析である、請求項 15 に記載の方法。

## 【請求項 17】

癌を診断、予測又はモニタリングするためのキットであって、患者から生物学的流体を集める容器と、生物学的流体中のサバイピンの存在を検出する作用物質とを備える、前記キット。

## 【請求項 18】

作用物質が、サバイピンに結合する抗体、サバイピン結合パートナー、及びサバイピンをコードする核酸にハイブリダイズする核酸から成る群より選択される、請求項 17 に記載

10

20

30

40

50

のキット。

【請求項 19】

作用物質がラベルで標識されている、請求項 18 に記載のキット。

【請求項 20】

ラベルが、放射性ラベル、蛍光ラベル、酵素又は化学発光標識である、請求項 18 に記載のキット。

【請求項 21】

作用物質が、水溶媒質中にパックされているか、又は、凍結乾燥された様式でパックされている、請求項 17 に記載のキット。

【請求項 22】

サバイピンの存在を分析する手段を更に備える、請求項 17 に記載のキット。

10

【請求項 23】

癌が膀胱又は前立腺癌である、請求項 17 に記載のキット。

【請求項 24】

生物学的流体が尿又は血清である、請求項 17 に記載のキット。

【請求項 25】

患者の癌のグレードを決定する方法であって、患者からの生物学的流体サンプル中のサバイピンの量を数量化するステップと、癌のグレードを決定するために、サンプル中のサバイピンの量を、コントロールサンプル中のサバイピンの量と比較するステップと、  
を含む、前記方法。

20

【請求項 26】

患者の癌のステージを決定する方法であって、患者からの生物学的流体サンプル中のサバイピンの量を数量化するステップと、癌のステージを決定するために、サンプル中のサバイピンの量を、コントロールサンプル中のサバイピンの量と比較するステップと、  
を含む、前記方法。

【請求項 27】

患者の癌をモニタリングする方法であって、癌のグレードを決定するために、患者からの生物学的流体サンプル中のサバイピンの量を数量化するステップを含む、前記方法。

30

【請求項 28】

生物学的流体が、前立腺液、精液、全血、血清、尿、胸部生検流体、胃腸流体及び膣液から成る群より選択される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 29】

癌が、サバイピンを発現するあらゆる癌である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 30】

癌が、神経芽細胞腫、乳癌、肺癌、膀胱癌、結直腸癌、膵臓癌、尿生殖路癌、前立腺癌、腎癌及び膀胱癌から成る群より選択される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 31】

癌が、新発症癌又は再発癌である、請求項 1 に記載の方法。

40

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、患者の生物学的流体中のサバイピンの存在を検出するステップを含む、癌の診断方法に関する。特に、この方法は、患者の尿サンプル中のサバイピンの存在を検出するステップを含む、膀胱癌の診断に関する。更に、本発明は、患者の生物学的流体中のサバイピンを検出する作用物質と、生物学的流体を集めるための容器と、を備える癌を診断するためのキットに関する。

【背景技術】

【0002】

50

癌は、周囲の組織に侵入し新たな身体部位に転移する傾向にある悪性腫瘍を指す。癌は、除去が試みられた後でも再発し、十分な処置がされなければ患者を死に追いやる。癌の正確な原因は知られていない。しかし、喫煙又は発癌物質への暴露等の所定の活動と、癌及び腫瘍の所定のタイプの癌の発病率との間にはリンクがあることが数々の研究者によって示されてきた。

#### 【0003】

原発部位から遠隔臓器への癌の広がり（つまり、転移）は、今なお、ほとんどの癌患者の死の主な原因である。数年にわたって研究がされているにもかかわらず、そのプロセスに参与する遺伝的メカニズムは、主として特徴化されていないままである。このような情報は、疾患の不確実な経過を与えられた場合に、癌予測に特に重要である。癌予測は、現在の腫瘍グレード付け手法では常に正確には断定されないの、癌患者の処置に成功することの最大の障害の一つは、堅実な予測マーカーの欠如であり続ける。

10

#### 【0004】

##### 膀胱癌

膀胱癌は、悪性腫瘍の成長であり、膀胱に沿って並ぶ尿路上皮細胞（urothelial cells）（移行性細胞）から一般には起こる。膀胱の尿路上皮癌（つまり、膀胱癌）は、毎年54000ケースを超える新症例があり11200人の死亡があることから、米国では、男性において4番目に一般的な癌であり、女性において8番目に一般的な癌である。膀胱癌の再発は、患者の80%にまで起こり、長期にわたる緩解に対する手ごわい障害を構成する。このような再発は、頻繁には、筋侵襲と播種性疾患を含んでいる（Dawson et al., ABC of Urology: Urological Malignancies-II: Urothelial Tumors. BMJ, 1996, 312: 1090-1094）。

20

#### 【0005】

数々の因子が膀胱癌の成長には寄与するらしい。タバコ喫煙及び芳香1族アミン（ナフチルアミン、キセニルアミン、4-ニトロピフェニル、ベンジジン）と呼ばれる特定種類の有機化学剤への職業被曝は、確立した危険因子である。幾つかの研究は、人工甘味剤サッカリンの高用量と移行性細胞膀胱癌との間にはリンクがあるだろうと示唆する。他の研究は、子宮頸癌の処置のための放射線療法を受けた女性では、移行性細胞膀胱癌が成長する危険が増大すると示す。更に、化学療法剤であるシクロホスファミド（Cytosine）を受けた人々は、膀胱癌の成長についてより大きな危険を示してきた。

30

#### 【0006】

膀胱癌の最も一般的な臨床学的な現れは、血尿症である。しかし、膀胱癌の診断は、間欠性であるか他の原因（尿路感染症又は抗凝血物質の使用等）に帰するため、たびたび遅れる。膀胱癌の診断をするために、排泄された移行性細胞の尿細胞診断学が従来使われている。尿細胞診断学が陽性である場合には、尿路上皮の移行性細胞癌がほぼ確実に存在する。しかし、移行性細胞の細胞学検査は、膀胱癌を持つ患者の半数までにわたって陰性であろう。このように、陰性の細胞学的結果により膀胱癌の存在は規定されない（Badalament et al., Cancer, 1987, 59(12): 2078; Cohen et al., Urologic Clinics of North America, 1992, 19(3): 421）。

#### 【0007】

追加的診断の複雑性は、膀胱癌の初期診断がいったんされたら、全ての尿路を移行性細胞癌について評価しなければならないことである。これは、移行性細胞が、腎盂、輸尿管、膀胱及び大部分の尿道を含む、腎臓レベルで始まる尿路に沿って並ぶからである。腎臓及び輸尿管の腎盂は、経静脈腎盂X線像（IVP）又は回帰性の腎盂X線像によって最も評価されている。IVPは、コントラスト物質の静脈注射を必要とし、これは、その後、血液から腎臓によって尿中へと濾過される。このプロセスにおいて取られたプレーンなX線は、尿路を示す。一般的に、回帰性腎盂X線像は、静脈内のコントラスト・アレルギー又は不良なIVP可視化を有する患者のために確保される。回帰性腎盂X線像は、膀胱鏡検査のときに実行される。

40

#### 【0008】

50

膀胱の内部を見るために照明機器を必要とする膀胱鏡検査は、膀胱癌の明確な診断のために利用される不快な手法である。膀胱鏡を通して回帰性腎盂像を実行するにあたって、小さなプラスチックのチューブが尿管に挿入され、コントラスト物質が尿管及び腎臓に注入される。膀胱鏡検査は、他の診断モダリティ（例えば超音波、コンピュータドトモグラフィまたは磁気共鳴画像）では見逃すかもしれない小さな微妙な異常状態の同定を可能にする。従って、診察室膀胱鏡検査は、初期評価において本質的部分であり、この時期では他の検査で代理され得ない。今日、ほとんどの診察室膀胱鏡検査が、柔軟スコープを用いて実行されている。柔軟内視鏡検査は、硬直膀胱鏡検査法に比べて安楽で、医師に拡大された前立腺の屈曲部辺りの観察も許容する。

#### 【0009】

また、膀胱癌の診断のために生検を行うことができる。生検は、診断の確認又は確立、予後の推定、又は疾患の経過の追従のために、膀胱等の臓器から生組織の小さなサンプルを除去して顕微鏡検査をすることである。しかし、生検は、侵襲的な手法であり、故に望ましくなく、たびたび麻酔を人が受けることを必要とする。加えて、いかなるものでも侵襲的な手法を用いると、生検を受けた人は感染の危険性を受ける。更に、膀胱癌が存在するか否かを決定するために、膀胱全体を生検することはできない。

#### 【0010】

##### 膀胱癌のステージ付け

膀胱癌は、その侵襲性と周りの膀胱組織と異なるといかに異なるか（分化）とによって分類される。膀胱癌は、診断のときに医師によってステージ付け及びグレード付けがされる。

#### 【0011】

腫瘍をステージ付けるには幾つかの方法がある。ステージ付けシステムのうちで最も一般に使用されているものの2つは、A B C Dシステム（the Jewett-Strong-Marshall system）及びT N Mシステムである。A D C Dシステムのほうが古く、膀胱癌の異なったフェーズまたは過程を分類するために、A - B - C - Dのステージ付けをする。このシステムでは、基本的には次のスケールが使われる：0、上皮内癌（膀胱粘膜に制限された腫瘍（ライニング））；A、粘膜を通して伸張するが、粘膜下組織を超えない；B、筋肉に侵入する腫瘍；C、脂肪組織に侵入する腫瘍；D、所属リンパ節又は遠隔部位に広がった腫瘍。各英文字には番号が続く。例えば、A 1、B 2等である。T N Mシステムでは、膀胱はTで、リンパ節はNで、遠隔部位はMで記述される。各英文字には記述番号が続くT 2 a N 0 M 0。例えば、T aは、非侵襲性乳頭癌を示し、T i sは、上皮内癌を示し、T 1は、上皮結合組織に侵入している腫瘍を示す。

#### 【0012】

膀胱癌は、近くの臓器（前立腺、子宮、膣、輸尿管、直腸を含む）に伸張することによって、身体に残部に広がる。転移は、骨盤リンパ節を通して起こる。腫瘍は、次には腎臓、肺、骨に広がる。

#### 【0013】

##### 膀胱癌のグレード付け

膀胱癌は、生検材料から病理学者によってグレード付けされる。癌のグレードは、癌がどのくらい速く成長しているのか又はいかに侵襲的であるかに関する情報を提供する。高いグレードの癌は、グレードの低い癌に比べて速く成長し、より早期に広がる。現在のグレード付けシステムは、3つの異なるグレードのみを使っている：十分に分化している、適度に分化している、及び不十分に分化している（又はグレードI、II又はIII）。幾人かの病理学者は、4レベル（I、II、III及びIV）のグレード付けシステムを使う。どちらのシステムも許容され、病理学者は、II / III又はII / IVと癌を明言することによって彼らが幾つのレベルを使うのかについて常に言及する。分母又は二番目の番号は、彼らがどのシステムを使っているのかを示す。十分に分化した腫瘍は、癌が正常な膀胱組織に似ていて、故に迅速には成長又は広がらないことを一般に意味する。不十分に分化した腫瘍は、癌が正常な膀胱には似ていず迅速に成長して他の組織に早期に広がることを一般に意味する。適度に分化した腫瘍は、その中間である。

10

20

30

40

50

## 【0014】

グレードは重要ではあるが、ステージに比べて処置決定との関係が少ない。グレード及びステージがわかると、将来の処置について決定する前に、他の因子も活用される。

## 【0015】

## 前立腺癌

前立腺癌は、前立腺内での悪性腫瘍の成長である。前立腺癌は、全年齢の男性における癌に起因する死としては3番目に一般的な原因であり、75歳を超えた男性における癌に起因する死としては一番目に一般的な原因である。前立腺癌は、40歳未満の男性ではめったに見られない。

## 【0016】

原因は未知であるが、幾つかの研究によって、前立腺癌と高食物脂肪摂取量及びテストステロンレベルの増加との関係が示されてきた。良性の前立腺過形成症(BPH)に関連しては知られていない。

10

## 【0017】

膀胱癌と同様に、前立腺癌は、その侵襲性と周りの前立腺組織といかに異なるかによって分類又はステージ付けされる。ほとんどの前立腺癌は、A B C Dシステム又はT N Mシステムによってステージ付けされる。前立腺癌については、A B C Dシステムにより、基本的には以下のスケールを使って腫瘍が分類される：A、触知可能(感じられる)ではないが、顕微鏡生検によって検出可能な腫瘍；B、触知可能で前立腺に限られた腫瘍；C、遠隔転移を伴わない前立腺を超えて伸張した腫瘍；D、所属リンパ節に広がった癌。一方、T N Mシステムでは、前立腺を(T)で示し、リンパ節を(N)で示し、転移疾患(遠隔への広がり)の証拠を(M)で別々に示す。前立腺癌は、精囊、膀胱及び腹腔腔の中へ伸張することによって広がる。前立腺癌は、リンパ節、骨、肺、肝臓及び腎臓に転移する。

20

## 【0018】

今日では、前立腺癌は、ミネソタ大学の病理学者の名前をとったグリーソングレード付けシステム(Gleason grading system)を使ってグレード付けされる。このシステムには、前立腺内での異なる侵襲性パターンを観察し、1-5の2つのスコアを付けることが含まれる。これらの2つのスコアは加算されて、全グリーソンスコアを与える。このスコアは、2から10の範囲である。スコアが高いほど、腫瘍の侵襲性が高いと思われる。例えば、グリーソンによりグレード付けされた癌は、グリーソン4+3=7又はグリーソン2+2=4などと書かれる。

30

## 【0019】

## サバイピン

アポトーシス(プログラム化された細胞死)阻害剤の制限されない発現は、細胞生存度を異常に延長させることによって、突然変異の蓄積を支持することによって、且つ、治療に対する抵抗度を上げるため、癌に寄与すると考えられている(Reed, J. Clin. Oncol., 1999, 17:2941-53)。癌における細胞死/生存度バランスについての新規なモジュレーターは、最近、アポトーシス阻害剤(IAP)遺伝子ファミリー(Deveraux et al., Genes Dev., 1999, 13: 239-52)のメンバーであるサバイピン(Ambrosini et al., Nat. Med., 1997, 3: 917-21)と同定された。

40

## 【0020】

サバイピンは、単一の部分的に保存されたBIR(baculovirus IAP repeats)ドメインと、RNGフィンガーの代わりに非常に荷電されたC末端コイル-コイル領域とを含む16.5 kDaの細胞質タンパク質である。この領域は、B細胞前駆体に移された場合、成長因子(IL-3)撤退によって誘導されるアポトーシスを阻害する(Ambrosini et al., Nat. Med. 1997, 3:917-921)。全体的配列保存、C末端RNGフィンガーの不在及び単一の部分的に保存されたBIRドメインの存在に基づくと、サバイピンは、最もかすかに関連したIAPファミリーメンバーであり、NAIP(neuronal apoptosis inhibitory protein; Roy et al., Cell, 1995, 80:167-178)と高度の類似の程度を共有してい

50

る。更に、他のIAPタンパク質と異なり、サバイピンは、大人の正常組織では検出可能でないが、一般的なヒトの癌（肺癌、大腸癌、乳癌、膵臓癌及び前立腺癌）及び～50%ハイグレード非ホジキンリンパ腫においては、インピボで、トップから4番目に発現された翻訳物である（Ambrosini et al., Nat. Med., 1997, 3:917-21; Velculescu et al., Nat. Genet., 1999, 23:387-88）。尿路上皮癌における制限されないアポプトーシスの提案された役割と一致して（Gazzaniga et al., Int. J. Cancer, 1996, 69:100-04; Lara et al., Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys., 1999, 43:1015-19）、サバイピンは、78%の膀胱癌において発見されたが、正常な尿路上皮では発見されなかった。また、サバイピンの発現は、促進再発と関係していた（Swana et al., N. Engl. J. Med., 1999, 341:452-53）。正常組織でなく癌組織での過度発現（Ambrosini et al., Nat. Med., 1997, 3:917-21; Velculescu et al., Nat. Genet., 1999, 23:387-88）、及び種々の悪性腫瘍（Adida et al., Lancet, 1998, 351: 882-83; Islam et al., Oncogene, 2000, 19:617-23; Tanaka et al., Clin. Cancer Res., 2000, 6: 127-34; Monzo et al., J. Clin. Oncol., 1999, 17:2100-04; Kawasaki et al., Cancer Res., 1998, 58: 5071-74）における予測/予後の好ましくない意義のため、サバイピンは、癌の有効な分子マーカーを構成し得る。このことは、治療に対する反応をモニターする簡単で非侵襲的な診断手段及び簡単にフォローアップするプロトコルが緊急に必要とされている膀胱癌（Stein et al., J. Urol., 1998, 160: 645-59; Ozen, Curr. Opin. Oncol., 1998, 10: 273-78）において特に重要である。「ゴールドスタンダード」とみなされている（Brwon, Urol. Clin. North Am., 2000, 27:25-37）もかかわらず、膀胱癌において尿細胞診断学は低い感応性（30 - 40%）を持ち、表在性で低いグレードの病変を検出することができない。従って、本出願の発明者等は、身体流体のサバイピンについて癌検出（特に、膀胱癌の診断のための尿サバイピンの検出）のための新規な分子マーカーとしての可能性ある適性について調査した。

10

20

30

40

50

#### 【発明の概要】

##### 【0021】

本発明は、患者の癌を診断する方法を提供する。該方法は、患者からの生物学的流体サンプルを、サバイピンの存在又は不在についてアッセイするステップを含むものである。ここで、サンプル中にサバイピンが存在することにより患者が癌を有することが示される。好ましい実施形態では、生物学的流体は、前立腺液、精液、全血、血清、尿、胸部生検流体、胃腸流体及び腔液から成る群より選択され、癌は、肺癌、大腸癌、乳癌、膵臓癌、前立腺癌、膀胱癌、腎癌、尿生殖路癌、非ホジキンリンパ腫及び神経芽細胞腫から成る群より選択される新発症癌又は再発癌である。より好ましくは、生物学的流体は尿又は血清であり、癌は膀胱又は前立腺癌である。最も好ましくは、生物学的流体は尿であり、癌は膀胱癌である。

##### 【0022】

一つの態様において、本発明は、患者の生物学的流体中のサバイピンの量を数量化することによって、癌のグレードを決定する方法を企図する。ここで、サバイピンが高レベルであることは、癌のグレードが高いことを示す。更に、本発明は、癌のステージを決定する方法の使用を企図する。ここで、CISステージにある癌は、非侵襲性乳頭状癌ステージの癌よりも高いレベルのサバイピンを有する。

##### 【0023】

もう一つの態様において、本発明は、患者の癌をモニタリングする方法を企図する。該方法は、患者の生物学的流体中のサバイピンの量を数量化するステップを含むものである。更に、本発明は、患者の生物学的流体中のサバイピン量を検出又は数量化することによって、患者の予後を決定することを企図する。例えば、サバイピンの存在は、予後不良を示す。サバイピンの数量化には、サンプル中のサバイピンの比較的なレベルを測定することが含まれる。また、サバイピンの存在又は不在を検出することも含まれる。

##### 【0024】

好ましくは、サバイピンは、サバイピンに結合する作用物質又はサバイピンをコードする

核酸にハイブリダイズする作用物質を使って検出される。最も好ましくは、作用物質は、サバイピンに結合する抗体、サバイピン結合断片、及びサバイピンをコードする核酸にハイブリダイズする核酸から成る群より選択され、作用物質はラベルで標識されている。ラベルは、放射性ラベル、蛍光ラベル、酵素、化学発光標識又は比色標識であってよい。

【0025】

発明の一つの態様では、免疫アッセイによってサバイピンが検出される。好ましくは、免疫アッセイは、酵素連結免疫ソルベントアッセイ又は放射性免疫アッセイであり、免疫アッセイは、免疫プロットティング、免疫拡散、免疫電気泳動又は免疫沈降反応を含む。より好ましくは、ドットプロットティングによってサバイピンが検出され、最も好ましくは、バイオドット法 (Bio-Dot method) 及びバイオドット S F モジュール (Bio-Dot SF module) によってサバイピンが検出される。

10

【0026】

本発明のもう一つの態様では、核酸ハイブリダイゼーションによってサバイピンが検出される。

【0027】

好ましい実施形態では、核酸ハイブリダイゼーションは、RT-PCR 又はノーザンブロット分析である。核酸ハイブリダイゼーションに使われる作用物質は、放射性ラベル、蛍光ラベル、酵素、化学発光標識又は比色標識でラベル化されている。

【0028】

また、本発明は、患者の癌を診断、予測又はモニタリングするためのキットを提供する。該キットは、患者からの生物学的流体を集める容器と、生物学的流体中のサバイピンの存在を検出する一つ以上の作用物質とを備えるものである。

20

【0029】

1. 一般的説明

本発明は、癌、特に膀胱癌を検出するために、安全で信頼性のある非侵襲性のスクリーニングストラテジーを開発する必要性に基づくものである。疾患についての単一の予言/予測マーカーの同定は、確認されていない (Stein et al., J. Urol., 1998, 160: 645-59)。マーカーの同定及び癌、特に膀胱の移行上皮癌の診断及びスクリーニング、並びに癌活性のモニタリング及び膀胱癌を持つ個人の予測の決定は、癌の処置に有効である。

【0030】

本発明は、癌を持つ患者の尿又は他の身体流体中のアポトーシス阻害剤であるサバイピンを同定するための、抗体又は他のプローブに基づく単純な検査を開示する。

30

【0031】

本発明は、尿サバイピンが、新たに膀胱癌と診断された患者又は再発性の膀胱癌と診断された患者の全てに見つかるが (46 / 46)、正常なボランティアでは見つからず (0 / 17)、他の泌尿器学的癌を持つ患者でも見つからず (0 / 30)、非新生物尿生殖器障害を持つ患者では、ほんの 4 / 30 という発見に部分的に基づくものである。また、本発明は、尿サバイピン検査が陽性であるヘルマチュリア (hematuria) を持つ 3 人の患者で見られる知見に基づく。このうち 1 人は、膀胱癌について陽性と細胞診断されており、他の 1 人は、サバイピン検出の 6 月以内に膀胱癌を有すると診断された。更に、本発明は、膀胱癌の処置を受けていて膀胱鏡検査による緩解を達成している患者は尿サバイピンについて陰性 (32 / 35) であるという知見に基づく。

40

【0032】

また、本発明は、膀胱癌及び前立腺癌を持つ患者の血清においてサバイピンが検出されるという知見に部分的に基づく。

【0033】

II. 特定の実施形態

1. 生物学的流体

本明細書において、用語「患者の生物学的流体」は、生体系からの流体を指す。この用語は、生体系の身体に見出される「身体流体」を含む。

50

## 【0034】

本発明は、サバイピンの存在について、生物学的流体のスクリーニングに作用物質を使用することを含む。患者からの生物学的流体のインビトロ血清学的評価により、癌の非侵襲性診断が許容される。例えば、前立腺液、精液、全血、血清、尿、胸部生検流体、胃腸流体及び膿液等のヒト身体流体を患者から取り、放射性免疫アッセイ又は酵素連結免疫アッセイ、競合結合による酵素連結免疫アッセイ、ドットプロット、ウエスタンプロット、ノーザンプロット、PCR又は本技術分野で知られる他のアッセイによって、サバイピンを検出する作用物質を使ってサバイピンの存在についてアッセイをすることができる。

## 【0035】

好ましい実施形態では、膀胱癌又は前立腺癌の診断をするために、患者から血清を集めてサバイピンの存在を検出する。 10

## 【0036】

より好ましくは、膀胱癌の診断をするために、患者から尿サンプルを集めてサバイピンの存在を検出する。検査される尿サンプルは、検査のかなり前に集めることができ、処置の前に凍結できる。分析の前に尿サンプルが凍結される場合には、サンプルが集められて氷の上に置かれることが好ましい。約2時間以内に、冷やされたサンプルは遠心分離されて細胞破片にペレットされ、そして濾過された後、即座に $-20^{\circ}\text{C}$ （さらに好ましくは $-80^{\circ}\text{C}$ ）で凍結されることが好ましい。分析の直前に、 $37^{\circ}\text{C}$ の水槽で凍結サンプルを迅速に解凍するべきである。また、採尿し、最適遠心分離し、そして濾過した後の新鮮な尿サンプルも使うことができる。より好ましくは、尿全部は、 $-80^{\circ}\text{C}$ で凍結されるまで氷の上に保たれる。4で解かした後、尿は4で遠心分離され、サバイピンのアッセイが行われる。 20

## 【0037】

## 2. サバイピンを検出する作用物質

患者の生物学的流体中のサバイピンを検出することができる作用物質は、サバイピン又はサバイピンコード核酸と相互作用することができるものである。このような作用物質の例として、サバイピン抗体又はサバイピンに結合するその断片、 $\text{p34}^{\text{cdc}2}$ サイクリンB1キナーゼ等のサバイピン結合パートナー、及びサバイピンをコードする核酸にハイブリダイズする核酸が含まれるが、これらに限定されない。

## 【0038】

サバイピン抗体

サバイピン抗体は、当業者によって調製され使用されてきた。Lu等は、胃癌の免疫組織化学分析のために、組み換えにより製造されたサバイピン/グルタチオンSトランスフェラーゼ融合タンパク質からのマウスモノクローナルサバイピン抗体の調製について教示する(Cancer Res., 1998, 58(9): 1808-12)。Grossman等は、ヒト転移性悪性黒色腫細胞株においてサバイピンを検出するためのウサギポリクローナル抗体の使用について教示する(J. Invest. Dermatol., 1999, 113: 1076-81)。 30

## 【0039】

本技術分野において周知であり且つ説明されている標準的な免疫学的手法を使って抗体を作るためにサバイピン又はサバイピンペプチドを使うことができる(Practical Immunology, Butt, ed., Marcel Dekker, New York, 1984)。簡潔に述べると、例えば宿主細胞内で組み換えDNA発現によって製造された、単離されたサバイピン又はサバイピンペプチドを使用して、外因性宿主(xenogenic host)の中で抗体を作る。好ましい抗体は、サバイピタンパク質のエピトープに特異的に結合する抗体であり、好ましくは、エピトープに対して約 $10^5\text{M}^{-1}$ よりも大きな結合アフィニティーを持つものであり、最も好ましくは、エピトープに対して約 $10^7\text{M}^{-1}$ よりも大きなアフィニティーを持つものである。例えば、ヒトサバイピタンパク質についての抗体が望まれる場合には、適切な抗体を産生する宿主は、マウス、ヤギ、ウサギ、モルモット、又は抗体産生に適した他の動物である。サバイピタンパク質又はペプチドを、宿主内で抗体産生を向上させることができる適切なアジュバントと組み合わせ、宿主の中に、例えば腹腔内注射によって注入さ 50

せる。宿主の免疫反応を刺激するのに適当であればいかなるアジュバントを使ってもよい。現在好ましいアジュバントは、フロイントの完全アジュバント（殺されて乾燥した微生物細胞を含んでいるエマルジョン、例えば、Calbiochem Corp., San Diego 又は Gibco, Grand Island, N.Y.からのもの）である。多数の抗原注入が望ましい場合には、以降の注入には、不完全アジュバント（例えば、細胞が含まれないエマルジョン）と一緒に抗原が含まれる。

【0040】

好ましい実施形態では、生物学的流体中でサバイピンの存在を検出する開示方法は、サバイピンに特異的に結合する抗体を使って実行される。サバイピンに特異的に結合するポリクローナル及びモノクローナル抗体は、本技術分野で知られる方法によって調製することができる。抗体には、H u s e 等の方法（Science, 1989, 246: 1275-1281; Campbell, “Monoclonal Antibody Technology, The Production and Characterization of Rodent and Human Hybridomas” in Burdon et. al. Eds, Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology, 1985 Volume 13, Elsevier Science Publishers, Amsterdam についても参照）に従って調製される組み換えポリクローナル又はモノクローナル F a b 断片が含まれる。

10

【0041】

上述のように、ポリクローナル及びモノクローナル抗体を調製するための方法は、当業者に周知である。簡単に述べると、ウサギ、マウス、ラット又はヤギ等の宿主哺乳動物に、サバイピタンパク質又はサバイピンペプチド又は断片を注入することによって、ポリクローナル抗体を製造することができる。動物から血清を抽出してスクリーニングし、ペプチド又はペプチド断片に特異的なポリクローナル抗体を得る。

20

【0042】

抗体を産生するためのサバイピタンパク質、ペプチド又は断片は、その天然源からの単離によって、組み換え手段によって、又は合成手段によって得ることができる。

【0043】

モノクローナル抗体を製造するためには、宿主哺乳動物を、サバイピタンパク質又はペプチドで接種した後、ブースト（boost）させる。最終的なブーストの数日後に接種された哺乳動物から脾臓を集める。脾臓からの細胞懸濁液を、K o h l e r 及び M i l s t e i n （Nature, 1975, 256: 495-497）によって説明された一般的方法に従い、腫瘍細胞と融合させる。有効であるためには、ペプチド断片は、検出されるサバイピン分子のエピトープを定義するために十分なアミノ酸残基を含んでいなければならない。

30

【0044】

免疫原として断片が短すぎる場合には、フラグメントをキャリアー分子に複合化することができる。幾つかの適切なキャリアー分子として、キーホール リンペットヘモシニアンとウシ血清アルブミンが含まれる。複合化は、本技術分野で知られている方法によって実施される。このような方法の一つは、断片のシステイン残基を、キャリアー分子のシステイン残基と複合させることである。ペプチド断片は、本技術分野で知られる方法によって合成することができる。幾つかの適切な方法が、S t u a r t 及び Y o u n g によって “Solid Phase Peptide Synthesis”, Second Edition, Pierce Chemical Company (1984) に説明されている。

40

【0045】

抗体又は断片の精製は、当業者に知られる種々の方法によって達成することができる。これらの方法には、硫酸アンモニウム又は硫酸ナトリウムにより析出した後に塩類溶液に対しての透析、イオン交換クロマトグラフィー、アフィニティー又は免疫アフィニティークロマトグラフィー並びにゲル濾過、ゾーン電気泳動等がある（Goding in, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, 2d ed., pp. 104-126, Orland, Fla., Academic Press）。癌患者の流体（好ましくは、膀胱癌患者の尿）中のサバイピンを検出するためには、F v、F ( a b ' )<sub>2</sub>、F a b 断片（Harlow and Lane, 1998, Antibody Cold Spring Harbor）等のサバイピン結合領域部分を少なくとも有する、精製された抗体の断片又は

50

抗体を使うことが好ましい。

【0046】

癌の診断及び/又はモニタリングに使用する際に、精製された抗体を、サバイピンの存在の検出を許容するレポーターグループとして用いられる化合物に、直接又はリンカーを介して共有結合させることができる。種々の異なるタイプの物質がレポーターグループとして用いられ、酵素、色素、放射性金属又は非金属アイソトープ、発光性化合物 (fluorogenic compound)、蛍光化合物等が含まれるが、これらに限定されない。検出、モニタリングに有効な本発明の抗体 (又はその断片) の抗体コンジュゲートの調製については、米国特許第 4671958 号、第 4741900 号及び第 4867973 号に記載されている。

10

【0047】

本発明の一つの態様では、好ましい結合エピトープを、既知のサバイピン遺伝子配列及びそのコードされたアミノ酸配列から同定して、高い結合アフィニティを有するサバイピン抗体を産生するために使うことができる。また、サバイピンへの結合エピトープの同定は、好ましい抗体の考案及び構築において使うことができる。例えば、サバイピン上の好ましいエピトープをコードする DNA を、そのエピトープに選択的に結合する抗体を選択するために、組み換えにより表現させ使用することができる。その後、選択された抗体は、サバイピン上の特異的結合エピトープに、その抗体が選択的に結合できるように十分な条件下でサンプルに晒され、そして、形成された複合体が検出される。特異的な抗体方法は、文献においてよく理解されており記述されている。抗体調製のより詳細な記述は、例えば、Practical Immunology, Butt, W.R., ed., Marcel Dekker, New York, 1984 に見出すことができる。

20

【0048】

また、本発明は、サバイピン抗体の検出についても企図する。サバイピンは、癌の特異的マーカーである。従って、患者の生物学的流体中でのサバイピン抗体の検出により、癌の診断が可能となる。

【0049】

サバイピン結合パートナー

生物学的流体中のサバイピンの存在を検出するために、サバイピンに結合する他の分子もまた使うことができる。サバイピン抗体以外のサバイピン結合パートナーの例としては、P34<sup>c d c 2</sup>サイクリン B1 キナーゼ及びカスパーゼ 9 (caspase-9) があるが、これらに限定されない。

30

【0050】

核酸

サバイピンをコードする核酸にハイブリダイズする核酸 (天然に生じている核酸、オリゴヌクレオチド、アンチセンスオリゴヌクレオチド及び合成オリゴヌクレオチド等) は、癌患者の生物学的流体 (好ましくは、膀胱癌患者の尿) 中でサバイピンを検出するための作用物質として有効である。Ambrosini 等は、サバイピン遺伝子のクローニングについて開示している (Nat. Med, 1997, 3: 917-921)。本発明にとって有効な作用物質である核酸及びオリゴヌクレオチドとしては、Ambrosini 等 (Nat. Med, 1997, 3: 917-921) によって単離されたサバイピン遺伝子に相当するものがあるが、これらに限定されない。本発明は、サバイピンのコード配列、その相補配列並びにコード配列からアップストリーム又はダウンストリームで生じているサバイピン転写配列 (例えば、5' 及び 3' 非翻訳領域に含まれる配列、又は、5' 及び 3' 非翻訳領域中に伸張する配列) に相補的な配列、に相当する核酸配列を、癌患者の生物学的流体 (好ましくは、膀胱癌患者の尿) 中のサバイピン発現を検出するために、作用物質として使用することを企図する。

40

【0051】

生物学的流体中のサバイピンの存在を検出するための好ましいオリゴヌクレオチドは、サバイピンをコードする cDNA 配列の少なくとも部分に相補的なものである。これらの相補配列は、「アンチセンス」配列としても本技術分野では知られている。これらのオリゴ

50

ヌクレオチドは、オリゴリボヌクレオチド又はオリゴデオキシリボヌクレオチドであってよい。更に、オリゴヌクレオチドは、生物学的に意義のあるヌクレオチド（つまり、A（アデニン）、dA（デオキシアデニン）、G（グアニン）、dG（デオキシグアニン）、C（シトシン）、dC（デオキシシトシン）、T（チミジン）及びU（ウラシル））から構成される天然のオリゴマーであってもよく、又は、修飾されたオリゴヌクレオチド種（例えば、インター・ヌクレオチドホスホジエステル結合において、メチル基又は硫黄原子がリン酸塩酸素と置換されている）でもよい。更に、これらのヌクレオチド自身及び/又はリボース部分が修飾されていてもよい。

#### 【0052】

オリゴヌクレオチドは、本技術分野で詳述されている既知の化学オリゴヌクレオチド合成法を使って、化学的に合成することができる。例えば、いかなる市販の自動核酸シンセサイザーを使っても、オリゴヌクレオチドを調製することができる。代替的に、標準的な組み換えDNA手法（例えば、非コードストランドの転写を含む）によって、オリゴヌクレオチドを作出することができる。サバイピンをコードするDNA配列は、組み換えDNAシステムにおいて逆転されてもよい。すなわち、非コードストランドが転写されるように適切なプロモーターの逆方向ダウンストリームに挿入されてもよい。

#### 【0053】

サバイピンをコードする核酸にハイブリダイズするものとしては、いかなる長さのオリゴヌクレオチドも利用可能であるが、典型的には8 - 100ヌクレオチド範囲にあるオリゴヌクレオチドが好ましい。尿サンプル中のサバイピン検出に使用するために最も好ましいオリゴヌクレオチドは、15 - 50ヌクレオチドの範囲にあるものである。

#### 【0054】

サバイピン核酸にハイブリダイズするように選択されたオリゴヌクレオチド（化学的に合成され又は組み換えDNA手法によるかにかかわらない）は、その後、標準的手法を使って単離され精製された後、標準的ラベル化プロトコールを使って（例えば、<sup>35</sup>S又は<sup>32</sup>Pで）ラベル化されることが好ましい。

#### 【0055】

また、本発明は、生物学的流体中のサバイピン発現を検出するために、ポリメライズ連鎖反応（PCR）においてオリゴヌクレオチドペアを使用することを企図する。オリゴヌクレオチドペアは、サバイピンプライマー及び逆サバイピンプライマーから成る。好ましいオリゴヌクレオチドペアは、配列番号1及び配列番号2のものである。より好ましくは、オリゴヌクレオチドペアは、配列番号3及び配列番号4のものである。

#### 【0056】

### 3. サバイピンを検出する作用物質 タンパク質結合アッセイ

当業者には認識されるように、癌患者の生物学的流体中のサバイピンタンパク質を特異的に同定し且つ定量化するためのいかなる手段も企図される。サンプル中のサバイピンタンパク質を検出するために現在好ましい手段は、マーカータンパク質と特異的に相互作用することができる結合タンパク質の手段によってである。好ましくは、ラベル化された抗体、その結合タンパク質、又は他のサバイピン結合パートナーが使われる。抗体は、起源としてモノクローナルでもポリクローナルでもよいし、生物合成的に製造されてもよい。サバイピン結合パートナーもまた、天然に生じた分子でも合成されたものでもよい。複合化サバイピンタンパク質の量（例えば、結合タンパク質と連結したサバイピンタンパク質の量）は、本技術分野で説明されている標準的なタンパク質検出法を使って決定される。免疫アッセイの考案、理論及びプロトコールの詳細なレビューについては、本技術分野の数々のテキスト（例えば、Practical Immunology, Butt, ed., Marcel Dekker, New York, 1984）に見出すことができる。

#### 【0057】

ラベル化された抗体を用いてタンパク質を検出するためには、様々なアッセイが利用可能である。ワンステップアッセイでは、サバイピン分子が（もしも存在する場合には）、固

定されて、ラベル化された抗体と一緒にインキュベートされる。ラベル化された抗体は、固定化された標的分子に結合する。結合していない分子を除去するために洗浄した後、サンプルは、ラベルの存在についてアッセイされる。

**【0058】**

ツーステップアッセイでは、固定されたサバイピン分子は、未ラベル化抗体と一緒にインキュベートされる。サバイピン-未ラベル化抗体の複合体は、その後、未ラベル化抗体に特異的な第二のラベル化された抗体と結合される。サンプルは、洗浄されてラベルの存在についてアッセイされる。

**【0059】**

抗体をラベル化するために使われるマーカーの選択は、適用ごとに異なる。しかし、マーカーの選択は、当業者であれば容易に決定することができる。これらのラベル化された抗体は、腫瘍の存在を検出するために、免疫アッセイ並びに組織学的適用において使うことができる。ラベル化された抗体は、ポリクローナルでもモノクローナルでもよい。好ましい実施形態では、抗体は、ポリクローナルウサギ抗体である。

**【0060】**

抗体は、放射性原子、酵素、色素又は蛍光成分、又は比色標識でラベル化される。標識するラベルの選択は、望まれる検出限界による。酵素アッセイ(ELISAs)は、一般的に、酵素標識された複合体と酵素基質との相互作用によって形成される有色産物の検出を許容する。放射性原子の数例として、 $^{32}\text{P}$ 、 $^{125}\text{I}$ 、 $^3\text{H}$ 及び $^{14}\text{C}$ が挙げられる。酵素の数例として、ホースラディッシュペルオキシダーゼ、アルカリ性ホスファターゼ、ガラクトシダーゼとグルコース-6-リン酸デヒドロゲナーゼが挙げられる。色素成分の数例として、フルオレセイン及びローダミンが挙げられる。抗体は、本技術分野で知られる方法によって、これらのラベルに接合(conjugate)されていてよい。例えば、酵素及び色素分子は、ジアルデヒド、カルボジイミド、ジマレイミド等のカップリング剤の手段によって抗体に接合される。代替的に、リガンド-レセプターのペアを介して接合が起こってもよい。幾つかの適切なリガンド-レセプターのペアとして、例えば、ビオチン-アビジン又はストレプトアビジン、又は抗体-抗原がある。

**【0061】**

今日までに知られるラベルで最も高感度のものは、化学発光標識である。この標識が、反応物と相互作用すると、光が産出される。有効なラベルとして、反応物が酵素基質である場合には化学発光酵素又はアクリジニウム・エステル等の化学発光分子を含む。アクリジニウムエステルがアルカリ性過酸化水溶液と反応すると、例えば、強い光フラッシュが発せられ、検出限界は、他のラベルによって提供される場合に比べて100から1000倍に増大する。さらに、反応は迅速である。化学発光及び免疫アッセイについての詳細なレビューは、Weeks等(Methods in Enzymology, 1983, 133: 366-387)、Kawaguchi等(Stabilized phenyl Acridinium Esters For Chemiluminescent Immunoassay-Bioluminescence and Chemiluminescence, Proceedings of 9<sup>th</sup> International Symposium 1996, Edited by Hastings, Kricka and Stanley, Jon Wiley & Sons, 1997, pp. 480-484)、及び米国特許第5468646号に見出すことができる。流体アッセイについての他の考慮としては、マイクロタイターウエル又はカラム免疫アッセイが挙げられる。カラムアッセイは、迅速に反応するラベル(化学発光ラベル等)が使われる場合に特に利益的である。標識された複合体は、反応物又は酵素を含むポストカラム検出器に溶出されることから、その後形成される産物を直ぐに検出することができる。

**【0062】**

一つの態様では、本発明は、血清及び他の生物学的流体中のサバイピンタンパク質を検出するためのサンドイッチ法の使用を企図する。1993年5月13日に発行されたPCT公表に記述されているように、この手法は、目的のタンパク質に結合することができる2つの抗体を必要とする。例えば、1つは、固体支持体に固定されており、他の1つは溶液中でフリーの状態にあるが、容易に検出することができる化合物によってラベル化されている。第二の抗体として使える化学的なラベルの例としては、放射性アイソトープ、蛍光

化合物、及び、反応物又は酵素基質に晒されると有色又は電気化学的に活性な産物を生ずる酵素又は他の分子が拳がられるが、これらに限定されない。このシステムにサバイピンタンパク質を含んでいるサンプルが配置されると、サバイピンタンパク質は、固定された抗体とラベル化された抗体の両方に結合する。その結果、支持体表面での「サンドイッチ」免疫複合体になる。複合化されたタンパク質は、結合していないサンプル成分及び過剰のラベル化抗体を洗浄して、支持体の表面にあるタンパク質と複合化したラベル化抗体の量を測定することによって検出される。このサンドイッチ免疫アッセイは、検出限界が良好なラベルが使われるという設定においては、非常に特異的でとても感度が高い。

#### 【0063】

また、本発明は、数々の生物学的流体サンプルを同時にスクリーニングすることを企図する。これは、広く使用されており且つ容易に自動化が可能な従来の96ウエルマイクロタイター形式を使って実行することができる。また、96ウエルプレートを用いたカロリメトリー法により (calorimetrically) 分析するためのスペクトロメーター (「プレートリーダー」) が幾つか市販されている。

10

#### 【0064】

好ましくは、身体流体サンプル中のサバイピンの存在は、放射性免疫アッセイ又は酵素連結免疫アッセイ、競合結合酵素連結免疫アッセイ、ドットプロット、ウエスタンブロット、クロマトグラフィー、好ましくは高速液体クロマトグラフィー (HPLC)、又は本技術分野で知られる他のアッセイ、で検出される。

#### 【0065】

ドットプロットは、抗体をプローブとして使うことによって所望のタンパク質を検出するために当業者によって日常的に実施されている (Promega Protocols and Applications Guide, Second Edition, 1991, Page 263, Promega Corporation)。サンプルは、ドットプロット装置を使って膜に適用される。ラベル化されたプローブを膜と一緒にインキュベートし、タンパク質の存在を検出する。

20

#### 【0066】

ウエスタンブロット分析は、当業者には周知である (Sambrook et al., Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 1989, Vol., 3, Chapter 18, Cold Spring Harbor Laboratory)。ウエスタンブロットでは、サンプルはSDS-PAGEによって分離される。ゲルは、膜に移される。その膜は、所望のタンパク質を検出するためにラベル化された抗体でインキュベートされる。

30

#### 【0067】

上述のアッセイは、免疫プロット、免疫拡散、免疫電気泳動、免疫沈降等のステップを含むが、これらに限定されるものではない。

#### 【0068】

好ましくは、サバイピンは、ドットプロット又はウエスタン・プロットによって検出される。より好ましくは、サバイピンは、バイオドット法及びバイオドットSFモジュールを使うドットプロットにより、癌患者の生物学的流体中で検出される。

#### 【0069】

#### 核酸の検出

患者の生物学的流体サンプル中のサバイピンの存在は、核酸ハイブリダイゼーションによっても決定することができる。核酸ハイブリダイゼーションとしては、ノーザンブロット分析、ドットプロット、サザンブロット分析、蛍光インシットハイブリダイゼーション (FISH) 及びPCRがあるが、これらに限定されない。クロマトグラフィー、好ましくはHPLC、及び他の既知のアッセイもまた、サンプル中のサバイピンのメッセンジャーRNAレベルを決定するために使うことができる。

40

#### 【0070】

サバイピンDNAは、おそらく、生物学的流体中、検査中の流体に注がれるか放出されるサバイピン陽性癌細胞内に見出される。

#### 【0071】

50

一つの態様では、本発明は、患者の生物学的流体中のサバイピンを検出するための作用物質としての核酸の使用を企図する。ここで、核酸はラベル化されているものである。核酸は、放射性活性ラベル、蛍光ラベル、酵素、化学発光標識、比色標識、又は先に議論され又は本技術分野で既知の他のラベル若しくは標識でラベル化されてよい。

#### 【0072】

もう一つの態様では、本発明は、身体流体のサンプル中のサバイピン mRNA の存在を検出するためにノーザンブロット分析を使用することを企図する。この分析の第一のステップには、ゲル電気泳動によって、サバイピン核酸を含むサンプルを分離することを含む。分散した核酸は、その後ニトロセルロースフィルター又はその他のフィルターに移される。引き続き、ラベル化されたオリゴヌクレオチドが、適切なハイブリダイゼーション条件（例えば、50%ホルムアルデヒド、5XSSPE、2X Denhardt's 溶液、42にて0.1%SDS、Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Maniatis 等(1982, CSH Laboratory)に記載)下で、そのフィルターに晒される。本技術分野で知られる他の有効な手順としては、溶液ハイブリダイゼーション、ドット及びスロットRNAハイブリダイゼーション、及びプローブをベースにしたマイクロアレイが挙げられる。本技術分野で知られる標準的な手順を使って、ハイブリダイズされた断片の放射性活性を測定することにより、患者の生物学的流体中に存在するサバイピン核酸の量を数量化することができる。

10

#### 【0073】

ドットブロッティングには、対象の核酸を含むサンプルを膜に適用することを含む。膜への適用の前又は後に、核酸を変性させることができる。膜は、ラベル化されたプローブでインキュベートされる。ドットブロット手順は、当業者には周知であり、米国特許第4582789号及び第4617261号により完全に記載されている。これらの開示は、参考文献として本明細書に組み込まれている。

20

#### 【0074】

ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)は、ポリメリゼーションの作用剤及びプライマーを使って、核酸サンプル中に存在する一つ以上の特異的な核酸配列を増幅した後、増幅された配列を検出するプロセスである。ある一つのプライマーが他のプライマーにハイブリダイズしたときの伸張産物は、所望の特異的核酸配列を産出するためのテンプレートになり、又は、その逆も成り立つ。そして、そのプロセスは、所望の量の配列が産出されるのに必要な回数にわたって繰り返される。所望の配列(米国特許第4683195号)の存在を検出するために当業者は、ポリメラーゼ連鎖反応を日常的に使用する。

30

#### 【0075】

所望の配列を検出するために当業者によって日常的に実行されるPCRの特定例は、逆転写PCR(RT-PCR; Saiki et al., Science, 1985, 230: 1350; Scharf et al., Science, 1986, 223: 1076)である。RT-PCRには、生物学的流体から全RNAを単離すること、所望の核酸配列を認識するプライマーの存在下でRNAを変性させること、プライマーを使って逆転写によりRNAのcDNAコピーを生じること、特定のプライマーを使ってPCRによりcDNAを増幅すること、及び、電気泳動又は当業者に既知の他の方法によって増幅したcDNAを検出することを含む。

40

#### 【0076】

好ましい実施形態では、癌患者の生物学的流体(好ましくは、膀胱癌患者の尿)中のサバイピン核酸を検出する方法には、ノーザンブロット分析、ドットブロッティング、サザンブロット分析、FISH及びPCRが含まれる。より好ましくは、検出の方法は、以下の2つのプライマーセットを使ったRT-PCRである: 配列番号1及び2、並びに、配列番号3及び4。

#### 【0077】

#### 4. 癌診断用キット

一つの態様では、本発明には、癌の診断に必要なエレメントを備えたキットが含まれる。好ましくは、このキットは、患者から生物学的流体を集めるための容器と、流体中のサバ

50

イピン又はそれをコードする核酸の存在を検出するための作用物質とを備えている。キットの構成要素は、水溶媒体中に又は凍結乾燥の様式で包装される。

【0078】

癌の診断又はモニタリングのためのキットは、サバイピンタンパク質を検出するための一つ以上の作用物質を含んでいる。これらとして、サバイピン抗体、その断片、又はサバイピン結合パートナーが調製され得るが、これらに限定されない。その作用物質（単数又は複数）は、患者から生物学的流体を集めるための容器と共に包装される。抗体又は抗体結合パートナーが、ラベル（放射性金属イオン又は成分）が付されたコンジュゲートの形態でキットの中で使用される場合には、このようなコンジュゲートの構成要素は、完全にコンジュゲートされた形態で供給されるか、又は、キットのユーザーによってコンジュゲートされる、分離した成分若しくは中間体の形態で供給される。

10

【0079】

また、サバイピン核酸（例えば、完全長サバイピン核酸、サバイピンオリゴヌクレオチド）を検出する一つ以上の作用物質及びサバイピンプライマーの対を含むキットを調製することができる。作用物質（単数又は複数）は、患者からの生物学的流体を集めるための容器と一緒に包装することができる。核酸は、ラベル化された形態でも、ラベル化される形態でもあり得る。

【0080】

キットの他の構成要素には、生物学的流体を集めるための手段、作用物質をラベル化するための手段、生物学的流体中のサバイピン又はサバイピン核酸を固定化するための膜、生物学的流体を膜に適用させる手段、患者の生物学的流体中のサバイピンに作用物質を結合させるために手段、第二の抗体、患者の生物学的流体から全RNAを単離するための手段、ゲル電気泳動を実行するための手段、単離された全RNAからcDNAを生じる手段、ハイブリダイゼーションアッセイを実行するための手段、及びPCRを実行するための手段等が含まれる。

20

【0081】

5. 本発明のアッセイ及びキットについての使用

本発明のアッセイ又は方法及びキットは、患者の癌を診断、予測及びモニタリングするために有効である。本発明の一つの態様では、患者の生物学的流体中にサバイピンが存在することは、その患者に癌があることを示す。癌は、新発症癌又は再発癌であり得る。本明細書において、用語「再発癌」は、癌が処置された後に戻ってきたこと（再発）を意味する。本明細書において、用語「新発症癌」は、新しく発生した癌を指す。

30

【0082】

サバイピンは、サバイピンが発現され、身体流体中に分泌、放出又は見出される場合のいかなる癌からの生物学的流体においても検出することができる。サバイピンは、肺癌、大腸癌、膵臓癌、乳癌、前立腺癌（Ambrosini et al., Nat. Med., 1997, 3: 917-21）、膀胱癌（Swana et al., N. Engl. J. Med., 1999, 341: 452-53）、及び非ホジキンリンパ腫で発現される。神経芽細胞腫、胸部、肺、膀胱及び結直腸癌でのサバイピン発現は、好ましくない疾患及び短縮された生存と関連した（Adida et al., Lancet, 1998, 351: 882-83; Islam et al., Oncogene, 2000, 19:617-23; Tanaka et al., Clin. Cancer Res., 2000, 6: 127-34; Monzo et al., J. Clin. Oncol., 1999, 17: 2100-04; Kawasaki et al., Cancer Res., 1998, 58: 5071-74; Swana et al., N. Engl. J. Med., 1999, 341:452-53）。

40

【0083】

サバイピンは、腫瘍が進行する間に、はぎ落された癌細胞から細胞外環境に放出されるらしい。従って、患者からのいかなる生物学的流体であってもサバイピンの存在についてアッセイすることができる。好ましくは、前立腺液、精液、全血、血清、尿、胸部生検流体、胃腸流体及び腔液等のヒト身体流体を患者から取り除いて、サバイピンの存在についてスクリーニングすることができる。

【0084】

50

好ましい実施形態では、本発明の方法及びキットは、患者の生物学的流体中のサバイピンを検出することによって、膀胱癌、前立腺癌及び腎癌を含む尿生殖路癌の診断をするために使われる。より好ましくは、本発明の方法及びキットは、患者の尿サンプル中のサバイピンの存在を検出することによって、膀胱癌を診断するために使われる。患者の尿サンプル中のサバイピンの存在は、その患者が膀胱癌を持っていることを示す。

【0085】

もう一つの態様では、本発明の方法及びキットは、患者の生物学的流体中のサバイピンを数量化するために使うことができる。患者の生物学的流体中のサバイピンの量は、癌をグレード付けするために有効である。患者の生物学的流体中でサバイピンのレベルが高いことは、癌のグレードが高いことを示す。代替的に、本発明の方法及びキットは、患者の癌のステージを決定するために使うことができる。CISステージにある癌は、非侵襲性乳頭癌ステージにある癌に比べてサバイピンのレベルが高い。

10

【0086】

本明細書において、用語「乳頭癌」は、腫瘍性の上皮細胞の表面相で覆われている、繊維状基質の、多数の不規則な指状突起の形成によって特徴づけられる悪性腫瘍を指す。

【0087】

本明細書において、用語「上皮内癌(CIS)」は、上皮内癌と同義である。この用語は、膀胱癌を指すために使われる場合には、膀胱ライニング(移行性細胞)における扁平状腫瘍を意味する。

【0088】

更に、患者の生物学的流体から数量化されたサバイピンの量は、患者の癌の進行度をモニターし、癌患者の予後を決定するために使うことができる。例えば、ある期間にわたって測定されたサバイピンの量により、癌がどのくらい速く成長しているかについての情報が提供される。

20

【0089】

尿サバイピンは、患者をモニターするための迅速且つ安価な方法として使うことができる。尿サバイピン検査は、再発についての早期検出の感度及び特異性を改良するために、尿マーカーの総合テストに統合され得る。

【0090】

患者が、生物学的流体中のサバイピンについて陽性と検査された後に、その患者は、より侵襲性で高価なアプローチ(例えば膀胱鏡検査)を使って更に検査される。

30

【0091】

前述の一般的な議論を考慮して、以下に示される特定の実施例は、単に例示のためであり、本発明の範囲を制限するものとは意図されない。他の一般的で特定の形態は、当業者には明らかである。

【0092】

実施例

材料及び方法

(尿検体) エールニューヘーヴン病院の泌尿器科診療室及び復員軍人庁(ニューイングランドヘルスケアシステム、ウェストヘーヴン、コネティカット部局)において、158の尿検体を集めた。ランダムなクリーンキャッチ又はストレートカテーテルの尿サンプルを、5つの異なるグループに分類された個々人から得た。グループ1は、薬剤投与をとっていない平均年齢が $47.6 \pm 20.8$ の正常な健康ボランティアである( $n = 17$ )。グループ2は、非新生物尿路疾患又は血尿症と診断された平均年齢が $60.0 \pm 18.1$ の患者である( $n = 30$ )。グループ3は、膀胱癌を除外する尿生殖器癌と診断された平均年齢が $71.5 \pm 9.9$ の患者である( $n = 30$ )。グループ4は、新発症又は再発膀胱癌と診断された平均年齢が $69.7 \pm 8.7$ の患者である( $n = 46$ )。グループ5は、膀胱癌のための処置を受けている又は既に処置を受けた患者であって、採尿の日に陰性のサイトスコピック評価をされた、平均年齢が $76.1 \pm 8.9$ の患者ある( $n = 35$ )。グループ5の処置手段には、膀胱内バチルスカルメット-ゲラン(BCG)、チオテ

40

50

パ、経尿道的切除、部分的膀胱切除及び照射が含まれる。グループ4には、採尿の後に同様の処置手段を受けた患者及び/又はサルベージ膀胱切除若しくはラジカル膀胱切除を受けた患者が含まれた。

#### 【0093】

(統計的分析) カイ自乗検定 (Chi square test) によって、尿サバイピンと患者の診断との関係を分析した。エールニューヘーヴン病院で行われたグレード分類システムと、尿サバイピンの荷重スコア (weighted score) とを比較するために、ノンパラ統計的分析を使用した。

#### 【0094】

##### 実施例 1

##### バイオドット S F モジュールを用いた尿サバイピンの検出

48 ウェルスロットフォーマットを提供するモジュールの微量濾過装置を使って、ニトロセルロース膜上に、尿検体を濾過した。ポリクローナル抗体を使って、サバイピンの存在についてプロットを分析した。プロトコールは以下の通りである：採尿して、分析まで - 80 で保存した。分析の日に、20000 × g で20分間にわたって尿サンプルを遠心分離にかけた。その間に、0.2 μm ニトロセルロース膜 (バイオラッド研究所、ヘラクレス、CA) を用いてバイオドット微量濾過装置を組み立て、20 mM トリス緩衝塩溶液 (pH 7.5) で湿らせた。その後、標準として (0.001 - 1.0 μg/ml) 300 μl の TBS 中の E. coli 発現組み換えサバイピンの増大する濃度とともに、尿上澄み液 (300 μl) を、ニトロセルロース膜上に濾過した。濾過の後、膜を乾燥させ、4 で12時間にわたって、5% プロット及び0.01% アジ化ナトリウムの PBS (pH 7.4) 中でブロックした。PBS - Tween 20 (0.25%) で洗った後、22 で3時間にわたって、サバイピンに対するウサギ抗体 (Grossman et al., J. Invest. Dermatol., 1999, 113: 1076-81) 2 μg/ml で膜をインキュベートし、PBS - Tween で洗い、そして22 で1時間にわたって、ホースラディッシュペルオキシダーゼ結合のロバの抗ウサギ IgG (Amersham Biotech, Piscataway, NJ) の1:1000 希釈でインキュベートした。10分間にわたって PBS で2回、5分間にわたって PBS - Tween で2回、そして5分間にわたって PBS で2回洗浄した後に、増強された化学発光 (Amersham) 及びオートラジオグラフィを用いて、第一抗体の結合を検出した。デンストメトリーを用いてバンドを数量化し、サバイピンの荷重スコアを、組み換えサバイピンの増大する濃度とともに抗体反応度を基礎として以下のように計算した：0 = 検出不可；1 = 0.001 - 0.25 μg/ml；2 = 0.25 - 1 μg/ml；3 = > 1 μg/ml。各尿検体を、2つの異なる場合で少なくとも2回分析して、結果を得た。

#### 【0095】

##### 実施例 2

##### ウェスタンブロットティング

22 で10分間にわたって1200 × g で尿検体 (100 ml) を遠心分離にかけた。そして、TBS 中で細胞ペレットを2回洗浄して、プロテアーゼ阻害剤が存在する0.5% Triton - X 100 中で、4 で30分間にわたって可溶化した。SDSゲル電気泳動を用いてサンプルを分離して、ナイロン膜 (Millipore, Corp.) に移し、サバイピンに対する抗体 (Grossman et al., J. Invest. Dermatol., 1999, 113: 1076-81) 1 μg/ml で更にインキュベートし、続けてホースラディッシュペルオキシダーゼ (HRP) 結合ヤギ抗ウサギ IgG でインキュベートし、そして化学発光法を行った。

#### 【0096】

##### 実施例 3

##### RT - PCR

50 ml のクリーンキャッチ尿を、新発症又は再発尿路上皮癌を持つ15人の患者から得た。このうち、2人は処置された膀胱癌を、1人は前立腺癌を、1人は非新生物尿路疾患を持っており、1人は健常ボランティアであった。Trizol 試薬 (Life Technologies, Inc., Gaithersburg, MD, USA) を使って尿ペレットから全RNAを分離した。42

10

20

30

40

50

で1時間にわたって、スーパースクリプト逆転写酵素 (Gibco BRL, Life Technologies, Inc., Gaithersburg, MD, USA) 1  $\mu$  l を使って、1 - 5  $\mu$  g の全RNAのランダムプライミングによって一本鎖cDNAを合成した。70 で15分にわたって加熱した後、サバイビンプライマー5'CTGCCCTGGCAGCCCTTTCTCAAA-3' (フォワード; 配列番号1) 及び5'AATAAACCCCTGGAAGTGGTGC A-3' (リバーズ; 配列番号2) を用いて、94 で15秒間にわたって変性させ、53 で15秒間にわたってアニ-リングし、72 で1分間の間20サイクルにわたって伸張させ、続けて72 で5分間インキュベートすることによって、第一の増幅反応を実行した。サバイビンcDNAの463ベースペア (bp) 断片を、サバイビンのネストプライマー5'CCGCATCTCTACATTC AAGAAC-3' (フォワード; 配列番号3) 及び5'CTTGGCTCTTTCTCTGTCC-3' (リバーズ; 配列番号4) を用いて、94 で30秒間にわたって変性させ、60 で30秒間にわたってアニ-リングし、72 で45秒間の間30サイクルにわたって伸張させ、続けて72 で5分間インキュベートすることによって、第二ラウンド目の増幅にかけた。279 bpの増幅されたサバイビンcDNAを2.0%アガロース上で分離し、臭化エチジウム染色によって可視化した。コントロール反応を、アクチン特異的プライマー5'AGCGGGAATCGTGCGTG-3' (フォワード; 配列番号5) 及び5'CAGGGTACATGGTGGTGCC-3' (リバーズ; 配列番号6) を使って、309 bp断片のジェネレーションで増幅させた。

10

20

30

40

【0097】

### 結果

バイオドット検査を使って尿サバイビンを検出する代表的な実験を図1に示す。バイオドット法を用いた尿サバイビンの決定は、この研究のために集めた158試料のうちの138で実施した (表1)。20の追加の尿サンプルについては、バイオドット法の特異性を独立して評価するために、RT-PCRによりサバイビン発現を分析した。サバイビンは、正常のボランティアでは検出されず (0/16)、良性の前立腺過形成症を持つ患者でも検出されず (0/6)、間質性膀胱炎 (0/2)、腎性結石 (0/3)、尿路感染症 (0/6) 又は他の非腫瘍性尿路疾患 (0/6) でも検出されなかった (表1)。尿サバイビンは、原因不明の血尿症 (サバイビン荷重スコアは2) を持つ5人の患者のうち3人で検出された。これらの患者は、貯留及び排尿困難のポスト経尿道の前立腺切除の病歴を呈する者であり、膀胱鏡検査法によると、肉柱形成された (trabeculated) 不規則に厚い膀胱を現した。増大するレベルのPSAを持つが前立腺癌と診断されていない1人の患者は、尿サバイビンが陽性であった (表1)。この患者もまた、膀胱鏡検査法によると、trabeculatedされた不規則に厚い膀胱を現した。サバイビンは、前立腺癌 (0/19)、腎癌 (0/8)、膣癌 (0/1) 又は子宮頸癌 (0/1) の患者の尿試料では検出されなかった (表1)。一方で、新発症又は再発膀胱癌の患者 (31/31) 全員で尿サバイビンが検出された (表1)。バイオドットSFにより尿サバイビンについて分析された31人の患者の組織病理学的なグレード付け (グレードI乃至IV) の4グループは、グレードI腫瘍が13人、グレードIII腫瘍が7人、グレードIV腫瘍が5人を含んだ。上皮内癌 (carcinoma in situ, CIS) は、5人の患者の乳頭状で侵襲性の癌との関連では発見されず、1人の輸尿管の高いグレードの尿路上皮癌との関連でも発見されなかった。

【0098】

【表1】

尿試料	(n)	サバイピン陰性	サバイピン陽性
グループ1 (コントロール健常ボランティア)	16	16	0
グループ2 (非新生物尿路疾患)	29		
血尿症	5	2	3
UTI	6	6	0
BPH	6	6	0
上昇PSA	1	0	1
間質性膀胱炎	2	2	0
腎性結石	3	3	0
その他†	6	6	0
グループ3 (膀胱以外の尿生殖器癌)	29		
前立腺	19	19	0
腎性	8	8	0
膣	1	1	0
頸部	1	1	0
グループ4 (新発又は再発性の膀胱癌)	31§	0	31
グループ5 (処置膀胱癌¶)	33	30	3‡

10

UTI、尿路感染； BPH、良性の前立腺過形成症； PSA、前立腺特異的抗原。†乳頭状ネクロシス (n=1)、前立腺炎 (n=2)、膀胱尿管還流 (n=1) 及び上昇性クレアチンを伴う腎性移植体 (n=2) が含まれる。§尿管の尿路上皮癌を持つ1人の患者が含まれる。¶通常の膀胱鏡検査。‡これらの患者うち、2人は膀胱腫瘍の経尿道的切除処置を受けており、1人は高周波療法を受けていた。これらの患者のうちの1人は、膀胱癌について、陽性の尿細胞診断を受けていた。

20

## 【0099】

バイオドットSFによって分析されたグループ5の33人の患者のうちの30人は、検出可能なサバイピンを有していなかった(表1)。これらの30人の患者のうちの5人は、BCGを受けており3-5回の処置を完了していた。他の25人は、膀胱鏡検査陰性のポスト-処置状態であった。非侵襲性膀胱癌と最初に診断されたグループ5の3人の患者は、陰性の膀胱鏡検査を受けた後に、尿サバイピンが陽性と検査された。3人のうちの1人は、膀胱癌についての尿細胞診断が陽性であった。3人の患者のうちの2人は、膀胱腫瘍の経尿道的切除の処置を受けており、1人は、高周波療法で処置されていた。

30

## 【0100】

サバイピン荷重スコアについて正規化した場合、CISを持つ患者のサバイピンスコア(1.5...0.5、n=6)は、グレードII膀胱癌患者のスコア(1.3...0.6、n=13)よりもかなり高かった。サバイピン荷重スコアと、種々の膀胱癌症例の組織病理学又はグレード付けとの関係が、表2と表3にそれぞれ示されている。

## 【0101】

## 【表2】

組織検査	検査された症例	平均サバイピンスコア
ND	3	1.7±1.2
非侵襲性乳頭癌	4	1±0
非排尿筋侵襲	12	1.6±0.8
筋侵襲	6	1.7±0.8
CIS	6	2.5±0.5†

40

## 【0102】

## 【表3】

グレード	検査された症例	平均サバイピンスコア
グレード I I	13	1.3 ± 0.6
グレード I I I	7	1.5 ± 0.8
グレード I V	5	2 ± 1
グレード I V	1	3 *

サバイピン荷重スコアは、以下のようにして、増大する組み換えサバイピン濃度を有する標準曲線を使って計算した：0、検出不可能； 1、0.001-0.25 μg/ml； 2、0.25-1 μg/ml； 3、>1 μg/ml。\*関連CISを持つ6人の患者のうちの1人は、尿管の尿路上皮癌を持っていた（グレードIV；サバイピンスコア、3）。組織病理解析は、乳頭状移行性細胞腫瘍（階級I-IV）を分類するために、ブローダーの細胞学的グレード付けシステムを用いて実行された。ND、決定されていない。CIS、上皮内癌。†グレード I I 又は非侵襲性乳頭癌のいずれかよりも有意義に大きい（ $p < 0.02$ ）。

10

### 【0103】

ウエスタンブロットにより、膀胱癌の患者からの尿細胞ペレット中で16.5 KDaの単一サバイピンバンドが検出されたが、健常ボランティアからは検出されなかった（図2）。

### 【0104】

バイオドット法を用いて得られた結果をそれぞれに評価するために、新発症又は再発膀胱癌を持つ追加の患者15人について、RT-PCRにより尿サバイピン分析をした。279 bp サバイピン cDNA を、膀胱癌の新患者15人全員の尿細胞ペレットから増幅した（15/15）（図3及び図示されていないデータ）。一方で、追加の5人（1人は尿路感染症、2人は処置されて膀胱癌及び陰性膀胱鏡検査、1人は前立腺癌、1人は健常ボランティア）には、サバイピン cDNA は無かった（図3）。コントロール実験においては、309 bp アクチン cDNA 断片を、コントロール及び膀胱癌患者の尿から見分けがつかないように増幅した（図3）。RT-PCRによって分析された膀胱癌の組織病理学的症例には、グレード I I 腫瘍の患者が5人、グレード I I I の患者が1人、グレード I V の患者が6人及びCISの患者が3人含まれた。これらの実験により、腫瘍が進行する間、はぎ落された癌細胞が細胞外環境（つまり、尿）に受動的にサバイピンを放出することが示される。

20

30

### 【0105】

ここで調べられた一連の患者で、新発症又は再発膀胱癌についての尿サバイピン検査の感度は100%であり、他の新生物形成及び非新生物尿生殖器疾患についての尿サバイピン検査の感度は95%であった（ $p < 0.02$ ）。感度が高いため、尿サバイピン検査は、細胞診断学及び/又は他の診断マーカー（Ramakumar et al., J. Urol., 1999, 161:388-94; Lokeshwar et al., J. Urol., 2000, 163: 348-56）を補足して、膀胱癌患者のより良いモニタリング及び再発又はデノボ腫瘍（de novo neoplasms）のより良い同定に有効であろう。尿サバイピン検査の他の可能性のある利点としては、現在市販されているサバイピン単一抗体を用いたワンステップ検出を使うことによつての、単純性、ポイントオブサービスプロシージャ（point-of-service procedure）としての適切性、及び対費用効果が挙げられる。

40

### 【0106】

#### 実施例 4

#### 患者の血清中でのサバイピン検出

膀胱及び前立腺癌の患者から血液を集めた。血清を分離して実施例1で述べたドットブロット法により、サバイピンの存在について検査した。膀胱及び前立腺癌の患者の血清にサバイピンが検出された。組み換えサバイピンの濃度（μg/ml）を増大させて（左及び右コラム）、スロットブロット装置に尿又は血清サンプルを適用した。膜を、サバイピンへの抗体でインキュベートした後、HRP-結合ヤギ抗ウサギIgGでインキュベートした。化学発光法によりバンドを可視化させた。

50

## 【0107】

癌患者の血清中でのサバイピンの検出により、他の癌を検出するためのマーカーとしてサバイピンが有効であることが示される。サバイピンの存在について血清を検査することは、癌の再発及び回帰の検査及びスクリーニングに有効である。

## 【0108】

先行する議論及び例示は、特定の好ましい実施形態の詳細な説明を単に示すのみであることは理解されるべきである。従って、本発明の精神及び範囲を離れることなく、種々の修飾及び等価物が成され得ることは、当業者には明らかであろう。本出願において特定された全ての雑誌記事、他の参照文献、特許及び特許出願は、その全体が参照として本明細書に組み込まれている。

10

## 【図面の簡単な説明】

## 【0109】

【図1】バイオドットSFモジュールを使用したサバイピンの尿検出を示す。組み換えサバイピンの濃度 ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) を増大 (左のコラム) させるとともに、表示されている患者グループからの尿試料を、スロットプロット装置に適用した。膜を、サバイピンへの抗体でインキュベートし、続けてHRP-結合ヤギ抗ウサギIgGでインキュベートした。化学発光法によりバンドを可視化して、デンシトメトリーを用いてバンドを数量化した。TCC、膀胱癌 (グループ4); TCC/R、緩解 (グループ5); TCC/T、処置中 (グループ5); RCC、腎細胞癌、PC、前立腺癌 (グループ3); PSA、前立腺癌の診断はないが上昇したPSAのある患者 (グループ2); BPH、良性前立腺過形成症 (グループ2); Ctrl、健常ボランティア (グループ1)。

20

【図2】尿サバイピンのウェスタンブロッティングを示す。正常な健常ボランティア (正常) 及び膀胱癌を持つグループ4の患者 (TCC) からの尿の細胞ペレットを、電気泳動にかけ、ナイロン膜に移し、サバイピンに対する抗体でインキュベートし、続けて化学発光法を行った。比較分子量マーカーが左に示されている。

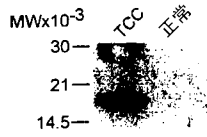
【図3】尿中のサバイピンmRNAのRT-PCR増幅を示す。尿の細胞ペレットから全RNAを抽出し、ランダムプライミングによって逆転写した。サバイピン特異的ネストプライマー (279bp) 又はアクチン特異的プライマー (309bp) を用いて増幅反応を実施した。分子量マーカーが、bpで示されている (M)。TCC、新又は再発性膀胱癌を持つ代表的な5人の患者の分析。

30

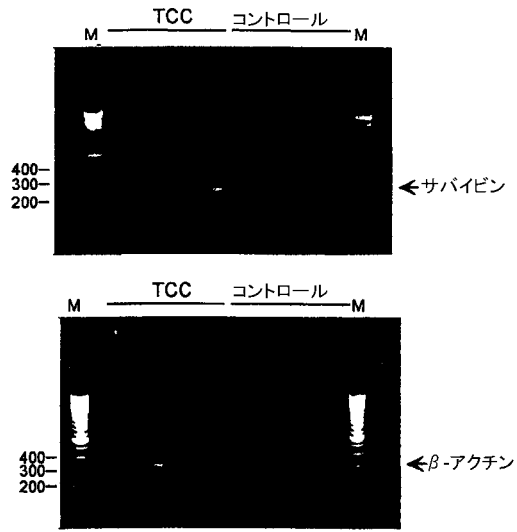
【図4】バイオドットSFモジュールを使用したサバイピンの血清検出を示す。組み換えサバイピンの濃度 ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) を増大させるとともに、尿又は血清サンプルを、スロットプロット装置に適用した。膜を、サバイピンへの抗体でインキュベートし、続けてHRP-結合ヤギ抗ウサギIgGでインキュベートした。化学発光法によりバンドを可視化した。「血清BICA」が後続するナンバーは、TCCを持つ患者からの血清を示す。これらのサンプルのほとんどは、二重にプロットに適用された。膀胱癌を持つ患者の血清サンプルの7/8が陽性であった。1つのサンプル (8 - 血清BICA) については、検査された2つのサンプルのうち1つが陰性であった。患者2BICAからの尿及び血清は陽性であった。「尿HxTCC」は、TCC前に診断された単一の患者からの尿を示す。この患者は、一部を切除されて、BCG処置を受けている。「3 - 血清PCA」は、前立腺癌を持つ患者からのサバイピン陽性血清を示す。「6 - 血清BPH」は、良性の前立腺肥大を持つ患者からの血清である。このサンプルは、検査されたものの1/2倍サバイピン陽性であった。この患者については、更なる情報が利用可能でない。「尿TCC」は、膀胱癌を持つ患者からの尿である。「Neg con」は、タンパク質コントロールである。「ブランク」はTBS緩衝液のみである。

40

【 図 2 】



【 図 3 】



【 図 4 】

0.1 STD	1-血清 BICA	2-尿 BICA	2-血清 BICA	尿 Hx TCC	膀胱
Neg Con	尿 Hx TCC	尿 Hx TCC	尿 Hx TCC	尿 Hx TCC	0.01 STD
0.01 STD	3-血清 P CA?	4-血清 BICA	5-血清 BICA	6-血清 BPH	膀胱
0.005 STD	7-血清 BICA	8-血清 BICA	9-血清 BICA	10-血清 BICA	0.005 STD
0.001 STD	尿 Hx TCC	2-血清 BICA	2-尿 BICA	1-血清 BICA	膀胱
0.0005 STD	尿 Hx TCC	尿 Hx TCC	尿 Hx TCC	尿 Hx TCC	Neg Con
0.0001 STD	6-血清 BPH	膀胱	4-血清 BICA	3-血清 P CA?	尿 TCC
膀胱	膀胱	9-血清 BICA	8-血清 BICA	7-血清 BICA	0.001 STD

【国際公開パンフレット】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization  
International Bureau



(43) International Publication Date  
25 July 2002 (25.07.2002)

PCT

(10) International Publication Number  
WO 02/057787 A2

- (51) International Patent Classification: G01N 33/574
- (21) International Application Number: PCT/US02/00574
- (22) International Filing Date: 11 January 2002 (11.01.2002)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data: 60/260,898 12 January 2001 (12.01.2001) US
- (71) Applicant (for all designated States except US): YALE UNIVERSITY [US/US]; Two Whitney Avenue, New Haven, CT 06511 (US).
- (74) Agents: TENG, Sally, P. et al.; Morgan Lewis & Bockius LLP, 1111 Pennsylvania Avenue, N.W., Washington, DC 20004 (US).
- (81) Designated States (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (84) Designated States (regional): ARIPO patent (GI, GM, KD, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NI, SN, TD, TG).

(75) Inventors; and  
 Inventors/Applicants (for US only): **ALTIERI, Dario, C.** [US/US]; Yale University, 451 College Street, New Haven, CT 06520 (US); **WEISS, Robert, M.** [US/US]; Yale University, 451 College Street, New Haven, CT 06520 (US); **SMITH, Shannon, D.** [US/US]; Yale University, 451 College Street, New Haven, CT 06520 (US); **WHEELER, Marcia, A.** [US/US]; Yale University, 451 College Street, New Haven, CT 06520 (US); **PLESCIA, Janet** [US/US]; Yale University, 451 College Street, New Haven, CT 06520 (US).

**Published:**  
 without international search report and to be republished upon receipt of that report

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.

(54) Title: DETECTION OF SURVIVIN IN THE BIOLOGICAL FLUIDS OF CANCER PATIENTS

WO 02/057787 A2

0	PC	TCC	TCC/R	TCC/R	CH
0.001	PC	TCC	TCC/R	TCC/R	CH
0.005	PC	TCC	TCC/R	TCC/R	CH
0.01	PC	TCC	TCC/R	TCC/R	CH
0.05	PC	TCC	TCC/R	TCC/R	CH
0.25	PSA	TCC/R	TCC/R	TCC/R	CH
1	BPH	TCC	TCC/R	TCC/R	CH

(57) Abstract: The present invention includes a method for diagnosing cancer comprising detecting the presence of survivin in the biological fluid of a patient. The present invention also provides kits comprising one or more agents that detect survivin polypeptide or survivin nucleic acid and a container for collecting biological fluid for testing.

WO 02/057787

PCT/US02/00574

**Detection of Survivin in the Biological Fluids of Cancer Patients**

**INVENTORS:** Dario C. Altieri, Robert M. Weiss, Shannon D. Smith,  
Marcia A. Wheeler, and Janet Plescia

5

**FIELD OF THE INVENTION**

The present invention relates to a method of diagnosing cancer comprising detecting the presence of survivin in the biological fluids of a patient. Specifically, the method relates to the diagnosis of bladder cancer, comprising detecting the presence of survivin in urine samples of a patient. Additionally, the present invention relates to kits for diagnosing cancer comprising an agent that detects survivin in the biological fluids of a patient and a container for collecting the biological fluids.

**BACKGROUND**

15 Cancer refers to malignant neoplasms that tend to invade surrounding tissues and that metastasize to new body sites. They are likely to recur after attempted removal and to cause death of the patient unless adequately treated. The exact cause of cancer is not known, but links between certain activities such as smoking or exposure to carcinogens and the incidence of certain types of cancers and tumors have been shown by a number of  
20 researchers.

The spread of cancer from a primary site to distant organs, *i.e.*, metastasis, still remains the main cause of death for most cancer patients. Despite years of research, the genetic mechanisms involved in the process remain largely uncharacterized. Such information is of special importance in cancer prognosis given the uncertain course of the  
25 disease. Since cancer prognosis cannot always be accurately assessed using current tumor grading techniques, one of the greatest obstacles to the successful treatment of the cancer patient continues to be the lack of sound prognostic markers.

WO 02/057787

PCT/US02/00574

-2-

**Bladder Cancer**

Bladder cancer is a malignant tumor growth which usually arises from the urothelial cells, (transitional cells) that line the bladder. Urothelial carcinoma of the bladder, *i.e.* bladder cancer, is the fourth most common cancer in men and the eighth most common cancer in women in the United States, accounting for more than 54,000 new cases and 11,200 deaths every year. Recurrences of bladder cancer occur in up to 80% of patients and constitute a formidable obstacle to long-lasting remissions, with such recurrences frequently involving muscle invasion and disseminated disease (Dawson *et al.*, ABC of Urology: Urological Malignancies-II: Urothelial Tumors. BMJ, 1996, 312: 1090-94).

Numerous factors may contribute to the development of bladder cancer. Cigarette smoking and occupational exposure to a certain class of organic chemicals called aromatic amines (beta-naphthylamines, xenylamine, 4-nitrobiphenyl, benzidine) are well-established risk factors. Some studies indicate that there may be a link between high doses of the artificial sweetener saccharin and transitional cell bladder cancer. Other studies have shown that women who received radiation therapy for the treatment of cervical cancer have an increased risk of developing transitional cell bladder cancer. Additionally, people who received the chemotherapy drug, cyclophosphamide (Cytosan), have demonstrated a greater risk of developing bladder cancer.

The most common clinical presentation of bladder cancer is hematuria. Frequently, however, the diagnosis of bladder cancer is delayed because the hematuria is either intermittent or attributed to other causes, such as a urinary tract infection or the use of anti-coagulants. Voided urine cytology of transitional cells is conventionally used to diagnose bladder cancer. If the urinary cytology is positive, then transitional cell cancer of the urothelium is almost certainly present. However, cytological examination of transitional cells may be negative in up to half of the patients with bladder cancer. Thus, negative cytological results do not rule out the presence of bladder cancer (Badalament *et al.*, Cancer, 1987, 59(12): 2078; Cohen *et al.*, Urologic Clinics of North America, 1992, 19(3): 421).

WO 02/057787

PCT/US02/00574

-3-

As an added diagnostic complication, the entire urinary tract must be evaluated for transitional cell cancer once an initial diagnosis of bladder cancer is made because transitional cells line the urinary tract starting at the level of the kidneys, including the renal pelvis, the ureters, the bladder, and most of the urethra. The renal pelvis of the kidneys and ureters is best evaluated by intravenous pyelogram (IVP) or retrograde pyelogram. An IVP involves an intravenous injection of contrast material which is then filtered out of the blood into the urine by the kidney. Plain x-rays taken during this process show the urinary tract. Typically a retrograde pyelogram is reserved for patients with an intravenous contrast allergy or poor visualization on IVP. A retrograde pyelogram is performed at the time of cystoscopy.

Cystoscopy, which involves the use of a lighted instrument to view inside the bladder, is an uncomfortable procedure utilized for the unambiguous diagnosis of bladder cancer. In performing a retrograde pyelogram through the cystoscope a small plastic tube is inserted into the ureter, and contrast material is injected into the ureter and kidney. Cystoscopy enables the identification of small subtle abnormalities that may be missed by other diagnostic modalities such as ultrasound, computed tomography, or magnetic resonance imaging. Thus, office cystoscopy is an essential part of the initial evaluation and at this time cannot be substituted by other tests. Today, most office cystoscopic examinations are performed with a flexible scope. Compared to rigid cystoscopy, flexible endoscopy is more comfortable and allows the physician to see around the curves of an enlarged prostate.

A biopsy may also be performed to diagnose bladder cancer. A biopsy is the removal of a small sample of living tissue from an organ, such as the bladder, for microscopic examination to confirm or establish a diagnosis, estimate prognosis, or follow the course of a disease. However, biopsies are invasive procedures, and are therefore not desirable and it frequently is necessary for a person to undergo anesthesia. In addition, as with any invasive procedure, an individual undergoing biopsy runs the risk of infection. Further, the entire bladder cannot be biopsied to determine whether bladder cancer is present.

30

WO 02/057787

PCT/US02/00574

-4-

**Staging Bladder Cancer**

Bladder cancers are classified based on their aggressiveness and how different they are from the surrounding bladder tissue (differentiation). They are staged and graded by physicians while diagnosing bladder cancer.

- 5 There are several different ways to stage tumors. The two most commonly used staging systems for bladder cancer are the ABCD system (the Jewett-Strong-Marshall system) and the TNM system. The ABCD system is older and uses A-B-C-D staging to classify the distinct phases or periods of bladder cancer. The system basically uses the following scale: 0, carcinoma *in situ* (tumor limited to the bladder mucosa (lining)); A, 10 tumor extends through the mucosa but does not extend beyond the submucosa; B, tumor invades the muscle; C, tumor invades into the fat; and D, cancer has spread to regional lymph nodes or to distant sites. Each letter is followed by a number, for example A1, B2, *etc.* With the TNM system, the bladder is described by the T, the lymph nodes by the N, and distant spread by the M. Each letter is followed by a describing number, T2aN0M0. 15 For example, Ta denotes a non-invasive papillary carcinoma; Tis denotes a carcinoma *in situ*; and T1 denotes a tumor invading subepithelial connective tissue.

Bladder cancers spread to the rest of the body by extending into the nearby organs, including the prostate, uterus, vagina, ureters, and rectum. Metastasis occurs through the pelvic lymph nodes, where the tumor next spreads to the liver, lungs and bones.

20

**Grading Bladder Cancer**

- Bladder cancers are graded by a pathologist from the biopsy. The grade of a cancer provides information regarding how fast the cancer might be growing or how aggressive it might be. High grade cancers grow faster and spread earlier than low grade 25 cancers. The current system of grading uses only three different grades: well-differentiated, moderately differentiated, and poorly differentiated (or Grade I, II or III). Some pathologists will use a 4-level grading system, I, II, III and IV. Either system is acceptable, and the pathologist will always note how many levels they use by declaring the cancer as a II/III or II/IV. The denominator or second number states what system they 30 use. A well-differentiated tumor means that the cancer has more resemblance to normal

WO 02/057787

PCT/US02/00574

-5-

bladder tissue and therefore usually does not grow or spread quickly. A poorly differentiated tumor means that the cancer does not resemble normal bladder and usually grows quickly and spreads to other tissues earlier. Moderately differentiated tumors are in the middle.

5           Grade, while important, has less bearing on the treatment decisions than does the stage. After the grade and stage are known, other factors also come into play before making any decision about future treatment.

#### **Prostate Cancer**

10           Prostate cancer is a malignant tumor growth within the prostate gland. It is the third most common cause of death from cancer among men of all ages and is the most common cause of death from cancer in men over 75 years old. Prostate cancer is rarely found in men younger than 40 years of age.

15           Although the cause is unknown, some studies have shown a relationship between prostate cancer and high dietary fat intake and increased testosterone levels. There is no known association with benign prostatic hyperplasia (BPH).

          Like bladder cancer, prostate cancers are classified or staged based on their aggressiveness and the degree that they are different from the surrounding prostate tissue. Most prostate cancers are staged using the A-B-C-D staging system or the TNM system. 20           For prostate cancer, the A-B-C-D system basically categorizes tumors using the following scale: A tumor not palpable (able to be felt) but detectable in microscopic biopsy; B palpable tumor confined to prostate; C extension of tumor beyond prostate with no distant metastasis; and D cancer has spread to regional lymph nodes. The TNM system, on the other hand, describes the prostate (T), the lymph nodes (N), and evidence of metastatic 25           disease (distant spread) (M) separately. Prostate cancers spread by extending into the seminal vesicles, bladder, and peritoneal cavity. Prostate cancers typically metastasize to the lymph nodes, bones, lungs, liver, and kidneys.

          Today, prostate cancer is usually graded using the Gleason grading system, named after a pathologist from the University of Minnesota. The system involves looking for 30           different patterns of aggressiveness within the prostate and then giving two scores of 1 -

WO 02/057787

PCT/US02/00574

-6-

5. These two scores are added up to give the total Gleason score which will range from 2 - 10. The higher the score, the more aggressive the tumor will be. For example, a typical Gleason graded cancer might be written as Gleason 4+3 =7, or Gleason 2+2 =4.

#### 5 **Survivin**

Deregulated expression of inhibitors of apoptosis (programmed cell death) is thought to contribute to cancer by abnormally extending cell viability, favoring the accumulation of mutations, and promoting resistance to therapy (Reed, *J. Clin. Oncol.*, 1999, 17: 2941-53). A novel modulator of the cell death/viability balance in cancer was recently identified as survivin (Ambrosini *et al.*, *Nat. Med.*, 1997, 3: 917-21), a member of the Inhibitor of Apoptosis (IAP) gene family (Deveraux *et al.*, *Genes Dev.*, 1999, 13: 239-52).

Survivin is a 16.5 kDa cytoplasmic protein containing a single partially conserved BIR (baculovirus IAP repeats) domain, and a highly charged carboxyl-terminal coiled-coil region instead of a RING finger, which inhibits apoptosis induced by growth factor (IL-3) withdrawal when transferred in B cell precursors (Ambrosini *et al.*, *Nat Med* 1997, 3:917-921). Based on overall sequence conservation, the absence of a carboxyl-terminal RING finger and the presence of a single, partially conserved BIR domain, survivin is the most distantly related member of the IAP family, sharing the highest degree of similarity with NAIP (neuronal apoptosis inhibitory protein; Roy *et al.*, *Cell*, 1995, 80:167-178). Additionally, unlike other IAP proteins, survivin is undetectable in normal adult tissues, but becomes the top fourth transcript expressed in common human cancers (Ambrosini *et al.*, *Nat. Med.*, 1997, 3: 917-21; Velculescu *et al.*, *Nat. Genet.*, 1999, 23:387-88), such as lung, colon, breast, pancreas, and prostate, and in ~50% of high-grade non-Hodgkin's lymphomas, *in vivo*. Consistent with a proposed role of deregulated apoptosis in urothelial cancer (Gazzaniga *et al.*, *Int. J. Cancer*, 1996, 69:100-04; Lara *et al.*, *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.*, 1999, 43:1015-19), survivin was found in 78% of bladder cancers, but not in normal urothelium, and its expression correlated with accelerated recurrences (Swana *et al.*, *N. Engl. J. Med.*, 1999, 341:452-53). Because of its over-expression in cancer but not in normal tissues (Ambrosini *et al.*, *Nat. Med.*, 1997, 3:917-

WO 02/057787

PCT/US02/00574

-7-

21; Velculescu *et al.*, *Nat. Genet.*, 1999, 23: 387-88), and its unfavorable predictive/prognostic significance in various malignancies (Adida *et al.*, *Lancet*, 1998, 351: 882-83; Islam *et al.*, *Oncogene*, 2000, 19: 617-23; Tanaka *et al.*, *Clin. Cancer Res.*, 2000, 6: 127-34; Monzo *et al.*, *J. Clin. Oncol.*, 1999, 17: 2100-04; Kawasaki *et al.*, 5 *Cancer Res.*, 1998, 58: 5071-74), survivin may constitute a useful molecular marker in cancer. This is particularly relevant in bladder cancer (Stein *et al.*, *J. Urol.*, 1998, 160: 645-59; Ozen, *Curr. Opin. Oncol.*, 1998, 10: 273-78) where simple and non-invasive diagnostic means to monitor response to therapy and simplify follow up protocols are urgently needed. Although regarded as "gold standard" (Brown, *Urol. Clin. North Am.*, 10 *2000*, 27: 25-37), urine cytology has a low sensitivity (30-40%) in bladder cancer, and fails to detect superficial, low-grade lesions. Accordingly, the inventors of the instant application investigated the potential suitability of bodily fluid survivin as a new molecular marker for detection of cancer, specifically detection of urine survivin for the diagnosis of bladder cancer.

15

#### SUMMARY OF THE INVENTION

The present invention provides a method of diagnosing cancer in a patient comprising assaying a sample of biological fluid from a patient for the presence or absence of survivin, wherein the presence of survivin in the sample indicates that the 20 patient has cancer. In a preferred embodiment, the biological fluid is selected from the group consisting of prostatic fluid, seminal fluid, whole blood, serum, urine, breast biopsy fluid, gastrointestinal fluid, and vaginal fluid, and the cancer is new onset or recurrent cancer selected from the group consisting of lung cancer, colon cancer, breast cancer, pancreatic cancer, prostate cancer, bladder cancer, renal cancer, genitourinary tract cancer, 25 non-hodgkin's lymphoma, and neuroblastoma. More preferably, the biological fluid is urine or blood serum, and the cancer is bladder or prostate cancer. Most preferably, the biological fluid is urine, and the cancer is bladder cancer.

In one aspect, the present invention contemplates a method to determine the grade of the cancer by quantitating the amount of survivin in the biological fluid of a patient, 30 wherein a high level of survivin indicates that the cancer is of a high grade. Additionally,

WO 02/057787

PCT/US02/00574

-8-

the present invention contemplates the use of the method to determine the stage of the cancer, wherein a cancer of the CIS stage has a higher level of survivin than the cancer of the non-invasive papillary carcinoma stage.

In another aspect, the present invention contemplates a method of monitoring  
5 cancer in a patient comprising quantitating the amount of survivin in the biological fluid of a patient. Additionally, the present invention contemplates determining the prognosis of a patient by detecting or quantitating the amount of survivin in the biological fluid of the patient. In some instances, the presence of survivin indicates a poor prognosis. Quantitation of survivin includes measuring relative levels of survivin in a sample. It  
10 may also include detection of the presence or absence of survivin.

Preferably, the survivin is detected using an agent that binds to survivin or hybridizes to the nucleic acid encoding survivin. Most preferably, the agent is selected from the group consisting of antibodies that bind survivin, survivin binding fragments, and nucleic acids that hybridize to a nucleic acid encoding survivin, and the agent is  
15 tagged with a label. The label may be a radioactive label, a fluorescent label, an enzyme, a chemiluminescent tag, or a colorimetric tag.

In one aspect of the invention, survivin is detected by an immunoassay. Preferably, the immunoassay is an enzyme linked immunosorbent assay or radioimmunoassay, and the immunoassay comprises immunoblotting, immunodiffusion,  
20 immunoelectrophoresis, or immunoprecipitation. More preferably, survivin is detected by dot blotting, most preferably, by using the Bio-Dot method and the Bio-Dot SF module.

In another aspect of the invention, survivin is detected by nucleic acid hybridization.

In a preferred embodiment, the nucleic acid hybridization is RT-PCR or Northern blot  
25 analysis. The agent used in nucleic acid hybridization is labeled with a radioactive label, a fluorescent label, an enzyme, a chemiluminescent tag, or a colorimetric tag.

The present invention also provides kits for diagnosis, prognosis, or monitoring cancer in a patient, comprising a container for collecting biological fluid from a patient and one or more agents that detect the presence of survivin in the biological fluid. The  
30 agents in the kit can be tagged with a label. Alternatively, other components can be

WO 02/057787

PCT/US02/00574

-9-

included in the kit for tagging the agents. The present invention also contemplates kits comprising other components for diagnosing and monitoring cancer in a patient, and determining the prognosis of the cancer. In one embodiment, the components of the kit are packaged either in aqueous medium or in a lyophilized form.

5

#### BRIEF DESCRIPTION OF THE DRAWINGS

**Figure 1** shows urine detection of survivin using the Bio-Dot SF module. Increasing concentrations of recombinant survivin in  $\mu\text{g/ml}$  (*left column*), or urine specimens from the indicated patient groups were applied to a slot-blot apparatus. The membrane was incubated with an antibody to survivin followed by HRP-conjugated goat anti-rabbit IgG. Bands were visualized by chemiluminescence and quantitated by densitometry. TCC, bladder cancer (Group 4); TCC/R, remission (Group 5); TCC/T, under treatment (Group 5); RCC, renal cell carcinoma, PC, prostate cancer (Group 3); PSA, patient with rising PSA without diagnosis of prostate cancer (Group 2); BPH, benign prostate hyperplasia (Group 2); Ctrl. healthy volunteers (Group 1).

**Figure 2** shows Western blotting of urine survivin. Urine cell pellets from a normal healthy volunteer (Normal) and a Group 4 patient with bladder cancer (TCC) were electrophoresed, transferred to nylon membranes and immunoblotted with an antibody to survivin followed by chemiluminescence. Relative molecular weight markers are indicated on the left.

**Figure 3** shows RT-PCR amplification of survivin mRNA in urine. Total RNA was extracted from urine cell pellets and reverse-transcribed by random priming. Amplification reactions were carried out with survivin-specific nested primers (279 bp) or  $\beta$ -actin-specific primers (309 bp). Molecular weight markers in bp are indicated (M). TCC, analysis of 5 representative patients with new or recurrent bladder cancer (Group 4).

**Figure 4** shows serum detection of survivin using the Bio-Dot SF module.

WO 02/057787

PCT/US02/00574

-10-

Increasing concentrations of recombinant survivin in  $\mu\text{g/ml}$  (left and right column), urine or serum samples were applied to a slot-blot apparatus. The membrane was incubated with an antibody to survivin followed by HRP-conjugated goat anti rabbit IgG. Bands were visualized by chemiluminescence. A number followed by "serum BI CA" indicates serum from patients with TCC. Most of these samples were applied to the blot in duplicate. 7/8 serum samples from patients with bladder cancer were positive. One sample (8- serum BI CA) was negative for one of the two samples tested. Urine and serum from patient 2 BI CA were positive. "Urine Hx TCC" indicates urine from a single patient previously diagnosed with TCC. This patient was resected and is undergoing BCG treatment. "3- serum P CA" indicates survivin positive serum from a patient with prostate cancer. "6-serum BPH" is serum from a patient with benign prostate hypertrophy. This sample was survivin positive 1/2 times that it was tested. No additional information is available for this patient. "Urine TCC" is urine from a patient with bladder cancer. "Neg con" is a protein control. "Blank" is TBS buffer only.

15

## DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION

### I. General Description

The present invention is based on the need to develop safe, reliable, non-invasive screening strategies for detecting cancer, specifically bladder cancer. The identification of a single predictive/prognostic marker of the disease has remained elusive (Stein *et al.*, *J. Urol.*, 1998, 160: 645-59). The identification of a marker and the development of a method to diagnose and screen for cancer, especially transitional cell carcinoma of the bladder, as well as for monitoring cancer activity and determining the prognosis of an individual having bladder cancer would be useful to the treatment of cancer.

The present invention discloses a simple, antibody or other probe based test to identify the apoptosis inhibitor, survivin, in the urine or other bodily fluid of patients with cancer.

The present invention is based in part on the discovery that urine survivin is found in all patients with newly diagnosed or recurrent bladder cancer (46/46), but not in normal volunteers (0/17), or in patients with other urologic cancers (0/30), and only in 4/30

WO 02/057787

PCT/US02/00574

-11-

patients with non-neoplastic genito-urinary disorders. The present invention is also based on the finding that of the three patients with hematuria who tested positive for urine survivin, one had a positive cytology for bladder cancer and another one was diagnosed with bladder cancer within six months of survivin detection. Moreover, the present  
5 invention is based on the finding that patients treated for bladder cancer and achieving cystoscopic remission are negative for urine survivin (32/35).

The present invention is also based in part on the finding that survivin is detected in the blood serum of patients with bladder and prostate cancer.

## 10 II. Specific Embodiments

### 1. Biological Fluids

As used herein, the term "biological fluids of patients" refers to fluids from living organisms. The term encompasses "bodily fluids" which are found in the body of living organisms.

15 The present invention includes the use of agents in the screening of biological fluids for the presence of survivin. *In vitro* serological evaluation of biological fluids withdrawn from patients thereby permits non-invasive diagnosis of cancers. For example, human bodily fluids such as prostatic fluid, seminal fluid, whole blood, serum, urine, breast biopsy fluid, gastrointestinal fluid, and vaginal fluid can be taken from a patient  
20 and assayed for the presence of survivin using an agent that can detect survivin by radioimmunoassays or enzyme-linked immunoassays, competitive binding enzyme-linked immunoassays, dot blot, Western blot, Northern blot, PCR, or other assays known in the art.

In a preferred embodiment, blood serum from patients is collected to detect the  
25 presence of survivin for diagnosis of bladder or prostate cancer.

More preferably, urine samples from patients are collected to detect the presence of survivin for diagnosis of bladder cancer. Urine samples to be tested may be collected well in advance of testing and frozen prior to treatment. If the urine sample is to be frozen prior to analysis, it is preferred that the sample be collected and placed on ice.  
30 Preferably within a time period of about 2 hours, the iced sample is centrifuged to pellet

WO 02/057787

PCT/US02/00574

-12-

cellular debris, then filtered, and the filtrate then promptly frozen at  $-20^{\circ}\text{C}$ , more preferably at  $-80^{\circ}\text{C}$ . Just prior to analysis, frozen samples should be rapidly thawed in a  $37^{\circ}\text{C}$  water bath. Fresh urine samples may also be used immediately after collection, optimal centrifugation, and filtration. More preferably, whole urine is kept on ice until it is frozen at  $-80^{\circ}\text{C}$ . After thawing at  $4^{\circ}\text{C}$ , the urine is centrifuged at  $4^{\circ}\text{C}$  and assayed for survivin.

## 2. Agents that Detect Survivin

Agents that are capable of detecting survivin in the biological fluids of patients are those that interact with survivin or the nucleic acid encoding survivin. Examples of such agents include, but are not limited to survivin antibodies or fragments thereof that bind survivin, survivin binding partners such as p34<sup>cdc2</sup>-cyclin B1 kinase, and nucleic acids that hybridize to the nucleic acid encoding survivin.

### Survivin Antibodies

Survivin antibodies have been prepared and used by the skilled artisan. Lu *et al.* (Cancer Res., 1998, 58(9):1808-12) teach the preparation of mouse monoclonal survivin antibodies from recombinantly produced survivin/glutathione S-transferase fusion protein for immunohistochemical analysis of gastric carcinomas. Grossman *et al.* (J. Invest. Dermatol., 1999, 113: 1076-81) disclose the use of rabbit polyclonal antibodies to detect survivin in human metastatic malignant melanoma cell lines.

Survivin or survivin peptides may be used to raise antibodies using standard immunological procedures well known and described in the art (Practical Immunology, Butt, ed., Marchel Dekker, New York, 1984). Briefly, an isolated survivin or survivin peptide produced, for example, by recombinant DNA expression in a host cell, is used to raise antibodies in a xenogenic host. Preferred antibodies are antibodies that bind specifically to an epitope on the survivin protein, preferably having a binding affinity greater than about  $10^5 \text{ M}^{-1}$ , most preferably having an affinity greater than about  $10^7 \text{ M}^{-1}$  for that epitope. For example, where antibodies to a human survivin protein are desired, a

suitable antibody generating host is a mouse, goat, rabbit, guinea pig, or other mammal useful for generating antibodies. The survivin protein or peptide is combined with a suitable adjuvant capable of enhancing antibody production in the host, and injected into the host, for example, by intraperitoneal administration. Any adjuvant suitable for stimulating the host's immune response may be used. A currently preferred adjuvant is Freund's complete adjuvant (an emulsion comprising killed and dried microbial cells, *e.g.*, from Calbiochem Corp., San Diego, or Gibco, Grand Island, N.Y.). Where multiple antigen injections are desired, the subsequent injections comprise the antigen in combination with an incomplete adjuvant (*e.g.* cell-free emulsion).

In a preferred embodiment, the disclosed method of detecting the presence of survivin in biological fluids is performed using antibodies that bind specifically to survivin. Polyclonal and monoclonal antibodies that bind specifically to survivin may be prepared by methods known in the art. Antibodies include recombinant polyclonal or monoclonal Fab fragments prepared in accordance with the method of Huse *et al.* (Science, 1989, 246: 1275-1281; see also Campbell, "Monoclonal Antibody Technology, The Production and Characterization of Rodent and Human Hybridomas" in Burdon *et al.*, Eds, Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology, 1985 Volume 13, Elsevier Science Publishers, Amsterdam).

As mentioned above, methods for preparing polyclonal and monoclonal antibodies are well known to the skilled artisan. Briefly, polyclonal antibodies may be produced by injecting a host mammal, such as a rabbit, mouse, rat, or goat, with the survivin protein or a survivin peptide or fragment. Sera from the mammal are extracted and screened to obtain polyclonal antibodies that are specific to the peptide or peptide fragment.

The survivin protein, peptide, or fragment for generation of antibodies may be obtained by isolation from its natural source, by recombinant means, or by synthetic means.

In order to produce monoclonal antibodies, a host mammal is inoculated with a survivin protein or peptide and then boosted. Spleens are collected from inoculated mammals a few days after the final boost. Cell suspensions from the spleens are fused with a tumor cell in accordance with the general method described by Kohler and Milstein

WO 02/057787

PCT/US02/00574

-14-

(Nature, 1975, 256: 495-497). In order to be useful, a peptide fragment must contain sufficient amino acid residues to define the epitope of the survivin molecule being detected.

If the fragment is too short to be immunogenic, it may be conjugated to a carrier molecule. Some suitable carrier molecules include keyhole limpet hemocyanin and bovine serum albumin. Conjugation may be carried out by methods known in the art. One such method is to combine a cysteine residue of the fragment with a cysteine residue on the carrier molecule. The peptide fragments may be synthesized by methods known in the art. Some suitable methods are described by Stuart and Young in "Solid Phase Peptide Synthesis," Second Edition, Pierce Chemical Company (1984).

Purification of the antibodies or fragments can be accomplished by a variety of methods known to those of skill including, precipitation by ammonium sulfate or sodium sulfate followed by dialysis against saline, ion exchange chromatography, affinity or immunoaffinity chromatography as well as gel filtration, zone electrophoresis, *etc.* (Goding in, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, 2d ed., pp. 104-126, Orlando, Fla., Academic Press). It is preferable to use purified antibodies or purified fragments of the antibodies having at least a portion of a survivin binding region, including such as Fv, F(ab)<sub>2</sub>, Fab fragments (Harlow and Lane, 1988, Antibody Cold Spring Harbor) for the detection of survivin in the fluids of cancer patients, preferably in the urine of bladder cancer patients.

For use in detection and/or monitoring of cancer, the purified antibodies can be covalently attached, either directly or via linker, to a compound which serves as a reporter group to permit detection of the presence of survivin. A variety of different types of substances can serve as the reporter group, including but not limited to enzymes, dyes, radioactive metal and non-metal isotopes, fluorogenic compounds, fluorescent compounds, *etc.* Methods for preparation of antibody conjugates of the antibodies (or fragments thereof) of the invention useful for detection, monitoring are described in U.S. Pat. Nos. 4,671,958; 4,741,900 and 4,867,973.

In one aspect of the invention, preferred binding epitopes may be identified from a known survivin gene sequence and its encoded amino acid sequence and used to generate

WO 02/057787

PCT/US02/00574

-15-

survivin antibodies with high binding affinity. Also, identification of binding epitopes on survivin can be used in the design and construction of preferred antibodies. For example, a DNA encoding a preferred epitope on survivin may be recombinantly expressed and used to select an antibody which binds selectively to that epitope. The selected antibodies then are exposed to the sample under conditions sufficient to allow specific binding of the antibody to the specific binding epitope on survivin and the amount of complex formed can then be detected. Specific antibody methodologies are well understood and described in the literature. A more detailed description of their preparation can be found, for example, in Practical Immunology, Butt, W. R., ed., Marcel Dekker, New York, 1984.

The present invention also contemplates the detection of survivin antibodies. Survivin is a cancer specific marker. Thus, detection of survivin antibodies in biological fluids of a patient may enable the diagnosis of cancer.

#### Survivin Binding Partners

Other molecules that bind survivin can also be used to detect the presence of survivin in biological fluids. Examples of survivin binding partners, other than survivin antibodies, include but are not limited to p34<sup>cdc2</sup>-cyclin B1 kinase and caspase-9.

#### Nucleic Acids

Nucleic acids including naturally occurring nucleic acids, oligonucleotides, antisense oligonucleotides, and synthetic oligonucleotides that hybridize to the nucleic acid encoding survivin, are useful as agents to detect the presence of survivin in the biological fluids of cancer patients, preferably in the urine of bladder cancer patients. Ambrosini *et al.* (Nat Med, 1997, 3: 917-921) disclose cloning of the survivin gene. Nucleic acids and oligonucleotides that are useful agents for the present invention include but are not limited to those corresponding to the survivin gene isolated by Ambrosini *et al.* (Nat Med, 1997, 3: 917-921). The present invention contemplates the use of nucleic acid sequences corresponding to the coding sequence of survivin and to the complementary sequence thereof, as well as sequences complementary to the survivin transcript sequences occurring further upstream or downstream from the coding sequence

WO 02/057787

PCT/US02/00574

-16-

(*e.g.*, sequences contained in, or extending into, the 5' and 3' untranslated regions) for use as agents for detecting the expression of survivin in biological fluids of cancer patients, preferably in the urine of bladder cancer patients.

The preferred oligonucleotides for detecting the presence of survivin in biological fluids are those that are complementary to at least part of the cDNA sequence encoding survivin. These complementary sequences are also known in the art as "antisense" sequences. These oligonucleotides may be oligoribonucleotides or oligodeoxyribonucleotides. In addition, oligonucleotides may be natural oligomers composed of the biologically significant nucleotides, *i.e.*, A (adenine), dA (deoxyadenine), G (guanine), dG (deoxyguanine), C (cytosine), dC (deoxycytosine), T (thymine) and U (uracil), or modified oligonucleotide species, substituting, for example, a methyl group or a sulfur atom for a phosphate oxygen in the inter-nucleotide phosphodiester linkage. Additionally, these nucleotides themselves, and/or the ribose moieties may be modified.

The oligonucleotides may be synthesized chemically, using any of the known chemical oligonucleotide synthesis methods well described in the art. For example, the oligonucleotides are prepared by using any of the commercially available, automated nucleic acid synthesizers. Alternatively, the oligonucleotides may be created by standard recombinant DNA techniques, for example, inducing transcription of the noncoding strand. The DNA sequence encoding survivin may be inverted in a recombinant DNA system, *e.g.*, inserted in reverse orientation downstream of a suitable promoter, such that the noncoding strand now is transcribed.

Although any length oligonucleotide may be utilized to hybridize to a nucleic acid encoding survivin, oligonucleotides typically within the range of 8-100 nucleotides are preferred. Most preferable oligonucleotides for use in detecting survivin in urine samples are those within the range of 15-50 nucleotides.

The oligonucleotide selected for hybridizing to the survivin nucleic acid, whether synthesized chemically or by recombinant DNA technology, is then isolated and purified using standard techniques and then preferably labeled (*e.g.*, with <sup>35</sup>S or <sup>32</sup>P) using standard labeling protocols.

WO 02/057787

PCT/US02/00574

-17-

The present invention also contemplates the use of oligonucleotide pairs in polymerize chain reactions (PCR) to detect the expression of survivin in biological fluids. The oligonucleotide pairs consist of a survivin primer and a reverse survivin primer. The preferred oligonucleotide pairs are SEQ ID NO: 1 and SEQ ID NO: 2. More preferably, the oligonucleotide pairs are SEQ ID NO: 3 and SEQ ID NO: 4.

### 3. Methods of Detection

#### Protein Binding Assays

As will be appreciated by those skilled in the art, any means for specifically identifying and quantifying a survivin protein in the biological fluid of a cancer patient is contemplated. The currently preferred means for detecting survivin protein in a sample is by means of a binding protein capable of interacting specifically with a marker protein. Preferably, labeled antibodies, binding portions thereof, or other survivin binding partners may be used. The antibodies may be monoclonal or polyclonal in origin, or may be biosynthetically produced. The survivin binding partners may also be naturally occurring molecules or synthetically produced. The amount of complexed survivin protein, *e.g.*, the amount of survivin protein associated with the binding protein, is determined using standard protein detection methodologies described in the art. A detailed review of immunological assay design, theory and protocols can be found in numerous texts in the art, including Practical Immunology, Butt, ed., Marcel Dekker, New York, 1984.

A variety of assays are available for detecting proteins with labeled antibodies. In a one-step assay, the survivin molecule, if it is present, is immobilized and incubated with a labeled antibody. The labeled antibody binds to the immobilized target molecule. After washing to remove unbound molecules, the sample is assayed for the presence of the label.

In a two-step assay, immobilized survivin molecule is incubated with an unlabeled antibody. The survivin-unlabeled antibody complex, if present, is then bound to a second, labeled antibody that is specific for the unlabeled antibody. The sample is washed and assayed for the presence of the label.

WO 02/057787

PCT/US02/00574

-18-

The choice of marker used to label the antibodies will vary depending upon the application. However, the choice of the marker is readily determinable to one skilled in the art. These labeled antibodies may be used in immunoassays as well as in histological applications to detect the presence of tumors. The labeled antibodies may be polyclonal or monoclonal. In a preferred embodiment, the antibodies are polyclonal rabbit antibodies.

The antibodies may be labeled with a radioactive atom, an enzyme, a chromophoric or fluorescent moiety, or a colorimetric tag. The choice of tagging label also will depend on the detection limitations desired. Enzyme assays (ELISAs) typically allow detection of a colored product formed by interaction of the enzyme-tagged complex with an enzyme substrate. Some examples of radioactive atoms include  $^{32}\text{P}$ ,  $^{125}\text{I}$ ,  $^3\text{H}$ , and  $^{14}\text{C}$ . Some examples of enzymes include horseradish peroxidase, alkaline phosphatase, beta-galactosidase, and glucose-6-phosphate dehydrogenase. Some examples of chromophoric moieties include fluorescein and rhodamine. The antibodies may be conjugated to these labels by methods known in the art. For example, enzymes and chromophoric molecules may be conjugated to the antibodies by means of coupling agents, such as dialdehydes, carbodiimides, dimaleimides, and the like. Alternatively, conjugation may occur through a ligand-receptor pair. Some suitable ligand-receptor pairs include, for example, biotin-avidin or -streptavidin, and antibody-antigen.

The most sensitive label known to date is a chemiluminescent tag in which interaction of the tag with a reactant results in the production of light. Useful labels include chemiluminescent molecules such as acridium esters or chemiluminescent enzymes where the reactant is an enzyme substrate. When, for example, acridium esters are reacted with an alkaline peroxide solution, an intense flash of light is emitted, allowing the limit of detection to be increased 100 to 10,000 times over those provided by other labels. In addition, the reaction is rapid. A detailed review of chemiluminescence and immunoassays can be found in Weeks *et al.* (Methods in Enzymology, 1983, 133: 366-387), Kawaguichi *et al.* (Stabilized Phenyl Acridinium Esters For Chemiluminescent Immunoassay--Bioluminescence and Chemiluminescence, Proceedings of 9th International Symposium 1996, Edited by Hastings, Kricka and Stanley, John Wiley &

WO 02/057787

PCT/US02/00574

-19-

Sons, 1997, pp. 480-484), and U.S. Pat. No. 5,468,646. Other considerations for fluid assays include the use of microtiter wells or column immunoassays. Column assays may be particularly advantageous where rapidly reacting labels, such as chemiluminescent labels, are used. The tagged complex can be eluted to a post-column detector which also  
5 contains the reactant or enzyme substrate, allowing the subsequent product formed to be detected immediately.

In one aspect, the present invention contemplates the use of a sandwich technique for detecting survivin proteins in serum and other biological fluids. As described in PCT Publication WO93/09437, published May 13, 1993, the technique requires two antibodies  
10 capable of binding the protein of interest: *e.g.*, one immobilized onto a solid support, and one free in solution, but labeled with some easily detectable chemical compound. Examples of chemical labels that may be used for the second antibody include but are not limited to radioisotopes, fluorescent compounds, and enzymes or other molecules which  
15 generate colored or electrochemically active products when exposed to a reactant or enzyme substrate. When samples containing the survivin protein are placed in this system, the survivin protein binds to both the immobilized antibody and the labeled antibody. The result is a "sandwich" immune complex on the support's surface. The complexed protein is detected by washing away nonbound sample components and excess  
20 labeled antibody, and measuring the amount of labeled antibody complexed to protein on the support's surface. The sandwich immunoassay is highly specific and very sensitive, provided that labels with good limits of detection are used.

The present invention also contemplates screening numerous samples of biological fluids at the same time. This can be performed using the conventional 96-well microtiter format which is widely used and easily automatable. There are also several  
25 commercially available spectrometers ("plate readers") for calorimetrically analyzing 96-well plates.

Preferably, the presence of survivin in a sample of bodily fluid is detected by radioimmunoassays or enzyme-linked immunoassays, competitive binding enzyme-linked immunoassays, dot blot, Western blot, chromatography, preferably high performance  
30 liquid chromatography (HPLC), or other assays known in the art.

WO 02/057787

PCT/US02/00574

-20-

Dot blotting is routinely practiced by the skilled artisan to detect a desired protein using an antibody as a probe (Promega Protocols and Applications Guide, Second Edition, 1991, Page 263, Promega Corporation). Samples are applied to a membrane using a dot blot apparatus. A labeled probe is incubated with the membrane, and the presence of the protein is detected.

Western blot analysis is well known to the skilled artisan (Sambrook *et al.*, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 1989, Vol. 3, Chapter 18, Cold Spring Harbor Laboratory). In Western blot, the sample is separated by SDS-PAGE. The gel is transferred to a membrane. The membrane is incubated with labeled antibody for detection of the desired protein.

The assays described above involve steps such as but not limited to, immunoblotting, immunodiffusion, immunoelectrophoresis, or immunoprecipitation.

Preferably, the survivin is detected by dot blotting or by Western blotting. More preferably, survivin is detected in the biological fluid of cancer patients by dot blotting using the Bio-Dot method and the Bio-Dot SF module.

#### Nucleic Acid Detection

The presence of survivin in a sample of biological fluid of a patient may also be determined by nucleic acid hybridization, such as but not limited to Northern blot analysis, dot blotting, Southern blot analysis, fluorescence *in situ* hybridization (FISH), and PCR. Chromatography, preferably HPLC, and other known assays may also be used to determine messenger RNA levels of survivin in a sample.

The survivin DNA conceivably may be found in the biological fluids inside a survivin-positive cancer cell that is being shed or released in the fluid under investigation.

In one aspect, the present invention contemplates the use of nucleic acids as agents for detecting survivin in biological fluids of patients, wherein the nucleic acids are labeled. The nucleic agents may be labeled with a radioactive label, a fluorescent label, an enzyme, a chemiluminescent tag, a colorimetric tag or other labels or tags that are discussed above or that are known in the art.

WO 02/057787

PCT/US02/00574

-21-

In another aspect, the present invention contemplates the use of Northern blot analysis to detect the presence of survivin mRNA in a sample of bodily fluid. The first step of the analysis involves separating a sample containing survivin nucleic acid by gel electrophoresis. The dispersed nucleic acids are then transferred to a nitrocellulose filter or another filter. Subsequently, the labeled oligonucleotide is exposed to the filter under suitable hybridizing conditions, *e.g.* 50% formamide, 5 X SSPE, 2 X Denhardt's solution, 0.1% SDS at 42°C., as described in Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Maniatis *et al.* (1982, CSH Laboratory). Other useful procedures known in the art include solution hybridization, dot and slot RNA hybridization, and probe based microarrays. Measuring the radioactivity of hybridized fragments, using standard procedures known in the art quantitates the amount of survivin nucleic acid present in the biological fluid of a patient.

Dot blotting involves applying samples containing the nucleic acid of interest to a membrane. The nucleic acid can be denatured before or after application to the membrane. The membrane is incubated with a labeled probe. Dot blot procedures are well known to the skilled artisan and are described more fully in U.S. Pat. Nos. 4,582,789 and 4,617,261, the disclosures of which are incorporated herein by reference.

Polymerase chain reaction (PCR) is a process for amplifying one or more specific nucleic acid sequences present in a nucleic acid sample using primers and agents for polymerization and then detecting the amplified sequence. The extension product of one primer when hybridized to the other becomes a template for the production of the desired specific nucleic acid sequence, and vice versa, and the process is repeated as often as is necessary to produce the desired amount of the sequence. The skilled artisan to detect the presence of desired sequence (U. S. Patent 4,683,195) routinely uses polymerase chain reaction.

A specific example of PCR that is routinely performed by the skilled artisan to detect desired sequences is reverse transcript PCR (RT-PCR; Saiki *et al.*, Science, 1985, 230: 1350; Scharf *et al.*, Science, 1986, 233: 1076). RT-PCR involves isolating total RNA from biological fluid, denaturing the RNA in the presence of primers that recognize the desired nucleic acid sequence, using the primers to generate a cDNA copy of the RNA by reverse transcription, amplifying the cDNA by PCR using specific primers, and

WO 02/057787

PCT/US02/00574

-22-

detecting the amplified cDNA by electrophoresis or other methods known to the skilled artisan.

In a preferred embodiment, the methods of detecting survivin nucleic acid in biological fluids of cancer patients, preferably urine of bladder cancer patients, include Northern blot analysis, dot blotting, Southern blot analysis, FISH, and PCR. More preferably, the method of detection is RT-PCR using the following two sets of primers: SEQ ID NO: 1 and 2 and SEQ ID NO: 3 and 4.

#### 4. Kits for Diagnosing Cancer

10 In one aspect, the present invention includes kits comprising the required elements for diagnosing cancer. Preferably, the kits comprise a container for collecting biological fluid from a patient and an agent for detecting the presence of survivin or its encoding nucleic acid in the fluid. The components of the kits can be packaged either in aqueous medium or in lyophilized form.

15 Kits for diagnosing or monitoring cancer containing one or more agents that detect the survivin protein, such as but not limited to survivin antibodies, fragments thereof, or survivin binding partners can be prepared. The agent(s) can be packaged with a container for collecting the biological fluid from a patient. When the antibodies or binding partner are used in the kits in the form of conjugates in which a label is attached, such as a  
20 radioactive metal ion or a moiety, the components of such conjugates can be supplied either in fully conjugated form, in the form of intermediates or as separate moieties to be conjugated by the user of the kit.

Kits containing one or more agents that detect survivin nucleic acid, such as but not limited to the full length survivin nucleic acid, survivin oligonucleotides, and pairs of  
25 survivin primers can also be prepared. The agent(s) can be packaged with a container for collecting biological fluid from a patient. The nucleic acid can be in the labeled form or to be labeled form.

Other components of the kit may include but are not limited to, means for  
30 collecting biological fluid, means for labeling the agent, membranes for immobilizing the survivin or survivin nucleic acid in the biological fluid, means for applying the biological

WO 02/057787

PCT/US02/00574

-23-

fluid to the membrane, means for binding the agent to survivin in the biological fluid of a patient, a second antibody, a means for isolating total RNA from a biological fluid of a patient, means for performing gel electrophoresis, means for generating cDNA from isolated total RNA, means for performing hybridization assays, and means for performing  
5 PCR, etc.

##### 5. Uses for Assays and Kits of the Present Invention

The assays or methods and kits of the present invention are useful for diagnosis, prognosis, and monitoring cancer in a patient. In one aspect of the invention, the presence  
10 of survivin in the biological fluid of a patient indicates that the patient has cancer. The cancer could be a new onset cancer or a recurrent cancer. As used herein, the term "recurrent cancer" means that the cancer has come back (recurred) after it has been treated. As used herein the term "new onset cancer" refers to newly developed cancer.

Survivin may be detected in biological fluids from any of the cancers where  
15 survivin is expressed and secreted, released, or found in a bodily fluid. Survivin is expressed in cancers of the lung, colon, pancreas, breast, prostate (Ambrosini *et al.*, *Nat. Med.*, 1997, 3: 917-21), bladder (Swana *et al.*, *N. Engl. J. Med.*, 1999, 341: 452-53), and in non-Hodgkin's lymphoma. Expression of survivin in neuroblastoma, breast, lung bladder and colorectal cancers correlated with unfavorable disease and abbreviated  
20 survival (Adida *et al.*, *Lancet*, 1998, 351: 882-83; Islam *et al.*, *Oncogene*, 2000, 19:617-23; Tanaka *et al.*, *Clin. Cancer Res.*, 2000, 6: 127-34; Monzo *et al.*, *J. Clin. Oncol.*, 1999, 17: 2100-04; Kawasaki *et al.*, *Cancer Res.*, 1998, 58: 5071-74; Swana *et al.*, *N. Engl. J. Med.*, 1999, 341: 452-53).

Survivin may be released by exfoliated cancer cells into the extracellular  
25 environment during tumor progression. Accordingly, any biological fluid from a patient can be assayed for the presence of survivin. Preferably, human bodily fluids such as prostatic fluid, seminal fluid, whole blood, serum, urine, breast biopsy fluid, gastrointestinal fluid, and vaginal fluid can be taken from a patient and screened for the presence of survivin.

WO 02/057787

PCT/US02/00574

-24-

In a preferred embodiment, the methods and kits of the present invention are used to diagnose genitourinary tract cancer including bladder cancer, prostate cancer, and renal cancer by detecting survivin in the biological fluids of patients. More preferably, the methods and kits of the present invention are used to diagnose bladder cancer by detecting the presence of survivin in the urine samples of patients. The presence of survivin in the urine samples of a patient indicates that the patient has bladder cancer.

In another aspect, the methods and kits of the present invention may be used to quantitate the amount of survivin in the biological fluid of a patient. The amount of survivin in the biological fluid of a patient may be useful for grading the cancer. A high level of survivin in the biological fluid of a patient may indicate that the cancer is of a high grade. Alternatively, the methods and kits of the present invention may be used to determine the stage of the cancer in a patient. A cancer of the CIS stage has a higher level of survivin than the cancer of the non-invasive papillary carcinoma stage.

As used herein, the term "papillary carcinoma" refers to a malignant neoplasm characterized by the formation of numerous, irregular, fingerlike projections of fibrous stroma that is covered with a surface layer of neoplastic epithelial cells.

As used herein, the term "carcinoma *in situ* (CIS)" is synonymous with intraepithelial carcinoma. The term when used to refer to bladder cancer means a flat tumor in the bladder lining (the transitional cells).

Further, the amount of survivin quantitated from the biological fluid of a patient may be used to monitor the progression of the cancer in the patient and to determine the prognosis of a cancer patient. For example, the amount of survivin measured over a period of time provides information as to how fast the cancer is growing.

Urine survivin can be used as a quick and inexpensive method for monitoring patients. The urine survivin test can be integrated in a battery of urine markers to improve the sensitivity and specificity of early detection of recurrences.

It is contemplated that after patients are tested positive for survivin in their biological fluids, they will be further tested using more invasive and expensive approaches, such as cystoscopy.

30

WO 02/057787

PCT/US02/00574

-25-

In light of the foregoing general discussion, the specific examples presented below are illustrative only and are not intended to limit the scope of the invention. Other generic and specific configurations will be apparent to those persons skilled in the art.

5

**EXAMPLES****Materials and Methods**

*Urine Specimens:* One hundred fifty eight urine specimens were collected at the urology clinics at Yale-New Haven Hospital and at the Veterans Administration, New England Health Care Systems, West Haven, Connecticut Division. Random clean-catch or straight catheter urine samples were obtained from individuals who were categorized into 5 different groups. Group 1, normal healthy volunteers of mean age of 47.6±20.8 years taking no medications (n=17). Group 2, patients of mean age of 60.0±18.1 years with diagnosis of non-neoplastic urinary tract disease or hematuria (n=30). Group 3, patients of mean age of 71.5±9.9 years with diagnosis of genitourinary cancer, excluding bladder cancer (n=30). Group 4, patients of mean age of 69.7±8.7 years with diagnosis of new onset or recurrent bladder cancer (n=46). Group 5, patients of mean age of 76.1±8.9 years who were undergoing treatment or had already received treatment for bladder cancer and had a negative cystoscopic evaluation on the day of urine collection (n=35). Treatment measures in group 5 included intravesical bacillus Calmette-Guerin (BCG), thiotepa, transurethral resection, partial cystectomy and radiation. Group 4 included patients who after urine collection underwent similar treatment measures and/or salvage cystectomy or radical cystectomy.

*Statistical Analysis:* The relationship between urine survivin and patients' diagnosis was analyzed by a Chi square test. Non-parametric statistical analysis was used to compare the weighted urine survivin score with the grading classification system performed at the Yale-New Haven Hospital.

30

**Example 1****Urine Detection of Survivin using the Bio-Dot SF Module**

WO 02/057787

PCT/US02/00574

-26-

Urine specimens were filtered onto a nitrocellulose membrane using a microfiltration apparatus in a module providing a 48-well slot format. The blot was analyzed for the presence of survivin using a polyclonal antibody. The protocol is as follows: urine was collected and stored at -80°C until analysis. On the day of analysis, urine samples were centrifuged at 20,000 x g for 20 min. Meanwhile, the Bio-Dot Microfiltration Apparatus was assembled with a 0.2 µm nitrocellulose membrane (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA) and moistened in 20 mM Tris-buffered saline (pH 7.5). Then, the urine supernatant (300 µl) along with increasing concentrations of *E.coli*-expressed recombinant survivin (Li *et al.*, Nature, 1998, 396: 580-84) as a standard (0.001-1.0 µg/ml) in 300 µl of TBS were filtered onto the membrane. After filtration, the membrane was dried, blocked in 5% Blotto and 0.01% sodium azide in PBS, pH 7.4, for 12 h at 4°C. After washing in PBS-Tween 20 (0.25%), the membrane was incubated with 2 µg/ml of a rabbit antibody to survivin (Grossman *et al.*, J. Invest. Dermatol., 1999, 113: 1076-81.) for 3 h at 22°C, washed in PBS-Tween, and incubated with a 1:1000 dilution of horseradish peroxidase-conjugated donkey anti-rabbit IgG (Amersham Biotech, Piscataway NJ) for 1 h at 22°C. After washes in PBS x 2 for 10 min, PBS-Tween x 2 for 5 min, and PBS x 2 for 5 min, binding of the primary antibody was detected by enhanced chemiluminescence (Amersham) and autoradiography. Bands were quantitated by densitometry and a weighted survivin score was calculated on the basis of the antibody reactivity with increasing concentrations of recombinant survivin as follows: 0=not detectable; 1=0.001- 0.25 µg/ml; 2=0.25-1 µg/ml; and 3=>1 µg/ml. Each urine specimen was analyzed at least twice on two different occasions and comparable results were obtained.

25

**Example 2**Western Blotting

Urine specimens (100 ml) were centrifuged at 1,200 x g for 10 min at 22°C, and the cell pellet was washed twice in TBS and solubilized in 0.5% Triton X-100 in the presence of protease inhibitors for 30 min at 4°C. Samples were separated by SDS gel

WO 02/057787

PCT/US02/00574

-27-

electrophoresis, transferred to nylon membranes (Millipore, Corp.), and further incubated with 1 µg/ml of an antibody to survivin (Grossman *et al.*, *J. Invest. Dermatol.*, 1999, 113: 1076-81) followed by horseradish peroxidase (HRP)-conjugated goat anti-rabbit IgG and chemiluminescence.

5

**Example 3**RT-PCR

Fifty milliliters of clean catch urine was obtained from 15 patients with new or recurrent urothelial cancer, 2 patients with treated bladder cancer, 1 patient with prostate cancer, 1 patient with non-neoplastic urinary tract disease and 1 healthy volunteer. Total RNA was isolated from urine pellets using the Trizol reagent (Life Technologies, Inc., Gaithersburg, MD, USA). Single strand cDNA was synthesized by random priming of 1-5 µg total RNA using 1 µl of Superscript reverse transcriptase (Gibco BRL, Life Technologies, Inc., Gaithersburg, MD, USA) for 1 h at 43°C. After heating at 70°C for 15 min, a first amplification reaction was carried out with survivin primers 5'-CTGCCTGGCAGCCCTTCTCAA-3' (forward; SEQ ID NO: 1) and 5'-AATAAACCCCTGGAAGTGGTGCA-3' (reverse; SEQ ID NO: 2) with denaturation at 94°C for 15 sec, annealing at 53°C for 15 sec and extension at 72°C for 1 min for 20 cycles, followed by incubation at 72°C for 5 min. A 463-base pair (bp) fragment of the survivin cDNA was subjected to a second round of amplification with nested survivin primers 5'-CCGCATCTCTACATTCAAGAAC-3' (forward; SEQ ID NO: 3) and 5'-CTTGCTCTTTCTCTGTCC-3' (reverse; SEQ ID NO: 4), with denaturation at 94°C for 30 sec, annealing at 60°C for 30 sec, and extension at 72°C for 45 sec for 30 cycles, followed by incubation at 72°C for 5 min. The amplified survivin cDNA of 279 bp was separated on a 2.0% agarose gel and visualized by ethidium bromide staining. Control reactions were amplified using β-actin-specific primers 5'-AGCGGAAATCGTGCGTG-3' (forward; SEQ ID NO: 5) and 5'-CAGGGTACATGGTGGTGCC-3' (reverse; SEQ ID NO: 6) with generation of a 309-bp fragment.

WO 02/057787

PCT/US02/00574

-28-

### Results

A representative experiment of detection of urine survivin using the Bio-Dot test is shown in Figure 1. Determination of urine survivin with the Bio-Dot method was carried out in 138 out of the 158 specimens collected for this study (Table 1). Twenty additional urine samples were analyzed for survivin expression by RT-PCR to independently evaluate the specificity of the Bio-Dot method. Survivin was not detected in urine of normal volunteers (0/16), or patients with benign prostate hyperplasia (0/6), interstitial cystitis (0/2), renal calculi (0/3), urinary tract infection (0/6), or other non-neoplastic urinary tract disease (0/6) (Table 1). Urine survivin was detected in 3 out of 5 patients with cryptogenic hematuria (weighted survivin score, 2), who presented with a history of retention and dysuria post trans-urethral prostate resection, and revealed a trabeculated, irregularly thickened bladder, by cystoscopy. One patient with increased PSA levels but without diagnosis of prostate cancer was positive for urine survivin (Table 1). This patient also revealed a trabeculated, thickened bladder, by cystoscopy. Survivin was not detected in urine specimens of patients with prostate (0/19), renal (0/8), vaginal (0/1), or cervical (0/1) cancer (Table 1). In contrast, urine survivin was detected in all patients (31/31) with new onset or recurrent bladder cancer (Table 1). Histopathologic grading (grades I through IV) of the 31 patients in group 4 analyzed for urine survivin by Bio-Dot SF included 13 patients with grade II, seven patients with grade III, and five patients with grade IV tumors. Carcinoma in situ (CIS) was found in association with the papillary and invasive carcinomas of 5 patients and in association with high grade urothelial cancer of the ureter in one patient.

WO 02/057787

PCT/US02/00574

-29-

Table 1. Survivin Detection in 138 Urine Specimens by the Bio-Dot SF module.

Urine specimens	(n)	Survivin-negative	Survivin-positive
Group 1 (control healthy volunteers)	16	16	0
Group 2 (Non-neoplastic urinary tract diseases)	29		
Hematuria	5	2	3
UTI	6	6	0
BPH	6	6	0
Rising PSA	1	0	1
Interstitial cystitis	2	2	0
Renal calculi	3	3	0
Other†	6	6	0
Group 3 (Genito-urinary cancers except bladder)	29		
Prostate	19	19	0
Renal	8	8	0
Vaginal	1	1	0
Cervical	1	1	0
Group 4 (new or recurrent bladder cancer)	31§	0	31
Group 5 (treated bladder cancer¶)	33	30	3‡

UTI, urinary tract infection; BPH, benign prostate hyperplasia; PSA, prostate specific antigen. †Includes patients with papillary necrosis (n=1), prostatitis (n=2), vesicouretral reflux (n=1), and renal transplant with rising creatinine (n=2). §Includes one patient with urothelial cancer of the ureter. ¶Normal cystoscopy.

‡Two of these patients were treated with transurethral resection of the bladder tumor, and one with fulguration. One of these patients had urine cytology positive for bladder cancer.

Thirty of 33 patients in group 5 analyzed by Bio-Dot SF had no detectable urine survivin (Table 1). Five of these 30 patients were receiving BCG and had completed 3-5 treatments, the other 25 were status post-treatment with negative cystoscopy. Three patients in group 5 with initial diagnosis of GII non-invasive bladder cancer tested positive for urine survivin after undergoing negative cystoscopic examination. One of the 3 patients had urine cytology positive for bladder cancer. Two of the 3 patients were treated with transurethral resection of the bladder tumor and one was treated with fulguration.

When normalized for a weighted survivin score, patients with CIS had

WO 02/057787

PCT/US02/00574

-30-

considerably higher survivin score (2.5...0.5, n=6) than patients with grade II bladder cancer (1.3...0.6, n=13). The correlation between weighted survivin score and histopathology or grading of the various bladder cancer cases is shown in Tables 2 and 3, respectively.

5

Table 2. Correlation Between Weighted Urine Survivin Score and Bladder Cancer

Histopathology.

Histopathology	Cases tested	Average survivin score
ND	3	1.7±1.2
Non-invasive papillary carcinoma	4	1±0
No detrusor muscle invasion	12	1.6±0.8
Muscle invasion	6	1.7±0.8
CIS	6	2.5±0.5†

Table 3. Correlation Between Weighted Urine Survivin Score and Bladder Cancer

10 Grading.

Grade	Cases tested	Average survivin score
Grade II	13	1.3±0.6
Grade III	7	1.5±0.8
Grade IV	5	2±1
Grade IV	1	3*

The weighted survivin score was calculated using a standard curve with increasing concentrations of recombinant survivin as follows: 0, not detectable; 1, 0.001-0.25 µg/ml; 2, 0.25-1 µg/ml; and 3, >1 µg/ml.

\*One of the six patients with associated CIS had urothelial cancer of the ureter (Grade IV; survivin score, 3). Histopathological analysis was carried out using the Broder's cytologic grading system for the classification of papillary transitional cell tumors, grades I-IV. ND, not determined. CIS, carcinoma in situ.

15

†Significantly greater than either Grade II or non-invasive papillary carcinoma (p<0.02).

By Western blotting, a single survivin band of 16.5 kDa was detected in the urine cell pellet from a patient with bladder cancer but not in that from a healthy volunteer

WO 02/057787

PCT/US02/00574

-31-

(Figure 2).

To independently evaluate the results obtained with the Bio-Dot method, 15 additional patients with new or recurrent bladder cancer were analyzed for urine survivin by RT-PCR. A 279 bp survivin cDNA was amplified from urine cell pellets of all the 15 new patients with bladder cancer (15/15) (Figure 3 and data not shown). In contrast, urine cell pellets from 5 additional individuals, one with urinary tract infection, two with treated bladder cancer and negative cystoscopy, one with prostate cancer, and one from a normal volunteer, had no survivin cDNA (Figure 3). In control experiments, a 309 bp  $\beta$ -actin cDNA fragment was indistinguishably amplified from urine of controls and patients with bladder cancer (Figure 3). Histopathologic cases of bladder cancer analyzed by RT-PCR included five patients with grade II tumors, one patient with grade III, six patients with grade IV and 3 patients with CIS. These experiments suggest that exfoliated cancer cells passively release survivin in the extracellular milieu, *i.e.* urine, during tumor progression.

In the patient series examined here, the sensitivity of the urine survivin test for new or recurrent bladder cancer was 100%, and its specificity for other neoplastic and non-neoplastic genito-urinary diseases was 95% ( $p < 0.02$ ). Because of its high specificity, the urine survivin test may be useful to complement cytology and/or other diagnostics markers (Ramakumar *et al.*, *J. Urol.*, 1999, 161: 388-94; Lokeshwar *et al.*, *J. Urol.*, 2000, 163: 348-56) to better monitor bladder cancer patients and identify early recurrences or *de novo* neoplasms. Other potential advantages of the urine survivin test include its simplicity, suitability as a point-of-service procedure, and its cost-effectiveness, using one-step detection with a single antibody to survivin that has now become commercially available.

25

#### Example 4

##### Detection of Survivin in Blood Serum of Patients

Blood was collected from bladder and prostate cancer patients. The blood serum was isolated and tested for the presence of survivin by the dot blot method described in Example 1. Survivin was detected in the blood serum of bladder and prostate cancer patients. Increasing concentrations of recombinant survivin in  $\mu\text{g/ml}$  (left and right

30

WO 02/057787

PCT/US02/00574

-32-

column), urine or serum samples were applied to a slot-blot apparatus. The membrane was incubated with an antibody to survivin followed by HRP-conjugated goat anti rabbit IgG. Bands were visualized by chemiluminescence.

The detection of survivin in blood serum of cancer patients indicates that survivin  
5 is useful as a marker for detecting other cancers. Testing the serum for the presence of  
survivin is useful for screening and for detection of recurrences and relapses of cancer.

It should be understood that the foregoing discussion and examples merely present  
a detailed description of certain preferred embodiments. It therefore should be apparent  
10 to those of ordinary skill in the art that various modifications and equivalents can be made  
without departing from the spirit and scope of the invention. All journal articles, other  
references, patents, and patent applications that are identified in this patent application are  
incorporated by reference in their entirety.

WO 02/057787

PCT/US02/00574

-33-

**CLAIMS**

1. A method of diagnosing cancer in a patient comprising assaying a sample of biological fluid from a patient for the presence or absence of survivin, wherein the presence of survivin in the sample indicates that the patient has cancer.  
5
2. The method of claim 1, wherein the biological fluid is urine or blood serum.
3. The method of claim 1, wherein the cancer is any cancer invading the  
10 genitourinary tract.
4. The method for claim 3, wherein the genitourinary tract cancer is bladder or prostate cancer.
- 15 5. The method of claim 4, wherein the bladder or prostate cancer is graded as a CIS.
6. The method of claim 4, wherein the bladder or prostate cancer is any grade or any stage.  
20
7. The method of claim 1, wherein survivin is detected using an agent selected from the group consisting of antibodies that bind survivin, survivin binding partners, and nucleic acids that hybridize to a nucleic acid encoding survivin.
- 25 8. The method of claim 7, wherein the agent is tagged with a label.
9. The method of claim 8, wherein the label is a radioactive label, a fluorescent label, an enzyme, or a chemiluminescent tag.
- 30 10. The method of claim 1, wherein survivin is detected by an immunoassay.

WO 02/057787

PCT/US02/00574

-34-

11. The method of claim 10, wherein the immunoassay is an enzyme linked immunosorbent assay or radioimmunoassay.
- 5 12. The method of claim 10, wherein the immunoassay comprises immunoblotting, immunodiffusion, immunoelectrophoresis, or immunoprecipitation.
13. The method of claim 1, wherein survivin is detected by dot blotting.
- 10 14. The method of claim 13, wherein dot blotting comprises using a Bio-Dot SF module.
- 15 15. The method of claim 1, wherein survivin is detected by nucleic acid hybridization.
16. The method of claim 15, wherein the nucleic acid hybridization is RT-PCR or Northern blot analysis.
17. A kit for diagnosis, prognosis, or monitoring cancer, comprising a  
20 container for collecting biological fluid from a patient and an agent that detects the presence of survivin in the biological fluid.
18. The kit of claim 17, wherein the agent is selected from the group  
25 consisting of antibodies that bind survivin, survivin binding partners, and nucleic acids that hybridize to the nucleic acid encoding survivin.
19. The kit of claim 18, wherein the agent is tagged with a label.
20. The kit of claim 18, wherein the label is a radioactive label, a fluorescent  
30 label, an enzyme, or a chemiluminescent tag.

WO 02/057787

PCT/US02/00574

-35-

21. The kit of claim 17, wherein the agent is packaged in an aqueous medium or in lyophilized form.
- 5 22. The kit of claim 17, further comprising a means to analyze the presence of survivin.
23. The kit of claim 17, wherein the cancer is bladder or prostate cancer.
- 10 24. The kit of claim 17, wherein the biological fluid is urine or blood serum.
25. A method of determining the grade of a cancer in a patient comprising quantitating the amount of survivin in the sample of biological fluid from a patient and comparing the amount of survivin in the sample with the amount of survivin in control  
15 samples to determine the grade of the cancer.
26. A method of determining the stage of a cancer in a patient comprising quantitating the amount of survivin in the sample of biological fluid from a patient and comparing the amount of survivin in the sample with the amount of survivin in control  
20 samples to determine the stage of the cancer.
27. A method of monitoring cancer in a patient comprising quantitating the amount of survivin in the sample of biological fluid from a patient to determine the grade  
25 of the cancer.
28. The method of claim 1, wherein the biological fluid is selected from the group consisting of prostatic fluid, seminal fluid, whole blood, serum, urine, breast biopsy fluid, gastrointestinal fluid, and vaginal fluid.

WO 02/057787

PCT/US02/00574

-36-

29. The method of claim 1, wherein the cancer is any cancer that expresses survivin.
30. The method of claim 1, wherein the cancer is selected from the group  
5 consisting of neuroblastoma, breast cancer, lung cancer, bladder cancer, colorectal cancer, pancreatic cancer, genitourinary tract cancer, prostate cancer, renal cancer, and bladder cancer.
31. The method of claim 1, wherein the cancer is new onset cancer or recurrent  
10 cancer.

FIG. 1

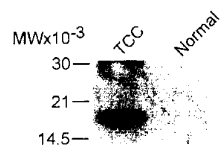
0	RCC	TCC	TCC/R	TCC/R	Ctrl
0.001	PC	TCC	TCC/R	TCC/R	Ctrl
0.005	PC	TCC	TCC/R	TCC/R	Ctrl
0.01	PC	TCC	TCC/R	TCC/R	Ctrl
0.05	PC	TCC	TCC/R	TCC/R	Ctrl
0.25	PSA	TCC/R	TCC/R	TCC/R	Ctrl
1	BPH	TCC	TCC/R	TCC/R	Ctrl

WO 02/057787

PCT/US02/00574

2/4

**FIG. 2**



SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

**FIG. 3**

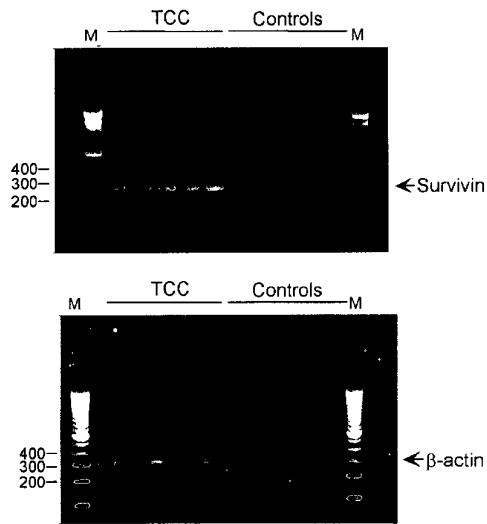


FIG. 4

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

【国際公開パンフレット(コレクション)】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization  
International Bureau



(43) International Publication Date  
25 July 2002 (25.07.2002)

PCT

(10) International Publication Number  
**WO 02/057787 A3**

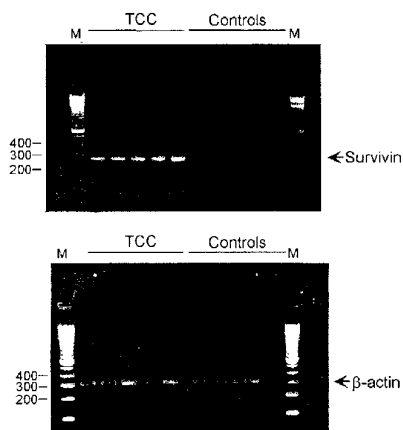
- (51) International Patent Classification: **G01N 33/574** [US/US]; Yale University, 451 College Street, New Haven, CT 06520 (US), **WEISS, Robert, M.** [US/US]; Yale University, 451 College Street, New Haven, CT 06520 (US), **SMITH, Shannon, D.** [US/US]; Yale University, 451 College Street, New Haven, CT 06520 (US), **WHEELER, Marcia, A.** [US/US]; Yale University, 451 College Street, New Haven, CT 06520 (US), **PLESCIA, Janet** [US/US]; Yale University, 451 College Street, New Haven, CT 06520 (US).
- (21) International Application Number: PCT/US02/00574
- (22) International Filing Date: 11 January 2002 (11.01.2002)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data: 60/260,898 12 January 2001 (12.01.2001) US
- (71) Applicant (for all designated States except US): **YALE UNIVERSITY** [US/US]; Two Whitney Avenue, New Haven, CT 06511 (US).
- (74) Agents: **TENG, Sally, P.** et al.; Morgan Lewis & Bockius LLP, 1111 Pennsylvania Avenue, N. W., Washington, DC 20004 (US).
- (81) Designated States (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG,
- (72) Inventors; and
- (75) Inventors/Applicants (for US only): **ALTIERI, Dario, C.**

[Continued on next page]

(54) Title: DETECTION OF SURVIVIN IN THE BIOLOGICAL FLUIDS OF CANCER PATIENTS



WO 02/057787 A3



(57) Abstract: The present invention includes a method for diagnosing cancer comprising detecting the presence of survivin in the biological fluid of a patient. The present invention also provides kits comprising one or more agents that detect survivin polypeptide or survivin nucleic acid and a container for collecting biological fluid for testing.

WO 02/057787 A3 

SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ,  
VN, YU, ZA, ZM, ZW.

**Published:**  
— with international search report

**(84) Designated States (regional):** ARIPO patent (GH, GM, KI, LS, MW, MZ, SD, SI, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BF, BJ, CI, CG, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NI, SN, TD, TG).

**(88) Date of publication of the international search report:**  
19 December 2002

*For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.*

## 【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		Inventor's Application No. PCT/US 02/00574
<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> IPC 7 G01N33/574		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b>		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 G01N		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, MEDLINE, BIOSIS, WPI Data		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JOUBEN-STEELE L M ET AL: "SURVIVIN EXPRESSION IN THE SURVEILLANCE OF UROTHELIAL NEOPLASIA" LABORATORY INVESTIGATION, UNITED STATES AND CANADIAN ACADEMY OF PATHOLOGY, BALTIMORE, , US, vol. 1, no. 79, January 1999 (1999-01), page 99A,AN569 XP008003632 ISSN: 0023-6837 abstract -- -- -- --	1-31
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.		
* Special categories of cited documents: *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *E* earlier document but published on or after the international filing date *L* document which may throw doubts on priority claims) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed ** later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is considered with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. *Z* document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 9 September 2002	Date of mailing of the international search report 23/09/2002	
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 6818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV The Hague Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016	Authorized officer Luis Alves, D	

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International Application No PCT/US 02/00574
C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	SARELA A I ET AL: "Expression of the antiapoptosis gene, Survivin, predicts death from recurrent colorectal carcinoma." GUT, vol. 46, no. 5, May 2000 (2000-05), pages 645-650, XP001098316 ISSN: 0017-5749 abstract	1,7-27, 29-31
X	WO 98 22589 A (UNIV YALE ;ALTIERI DARIO C (US)) 28 May 1998 (1998-05-28) page 67, line 20 -page 70, line 2; claims 30-33	1-3,7-31
P,X	SMITH S D ET AL: "Urine detection of survivin and diagnosis of bladder cancer." JAMA: THE JOURNAL OF THE AMERICAN MEDICAL ASSOCIATION. UNITED STATES 17 JAN 2001, vol. 285, no. 3, 17 January 2001 (2001-01-17), pages 324-328, XP008003639 ISSN: 0098-7484 cited in the application abstract	1-31
P,X	MOORE M: "Urine detection of survivin and diagnosis of bladder cancer." JOURNAL OF INSURANCE MEDICINE (NEW YORK, N.Y.) UNITED STATES 2001, vol. 33, no. 2, 8 May 2001 (2001-05-08), pages 202-203, XP001104860 ISSN: 0743-6661 the whole document	1-31
P,X	WO 01 53535 A (CEDARS SINAI MEDICAL CENTER) 26 July 2001 (2001-07-26) claims	1-31
A	AMBROSINI G ET AL: "A novel anti-apoptosis gene, survivin, expressed in cancer and lymphoma" NATURE MEDICINE, NATURE PUBLISHING, CO, US, XP002074968 ISSN: 1078-8956 abstract	1-31

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT  
information on patent family members

International Application No  
PCT/US 02/00574

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9822589 A	28-05-1998	US 6245523 B1	12-06-2001
		AU 736587 B2	02-08-2001
		AU 7301898 A	10-06-1998
		EP 0950103 A2	20-10-1999
		JP 2002514060 T	14-05-2002
		WO 9822589 A2	28-05-1998
WO 0153535 A	26-07-2001	AU 3102501 A	31-07-2001
		WO 0153535 A2	26-07-2001

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (July 1998)

---

 フロントページの続き

(81) 指定国 AP(GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW

(72) 発明者 ワイス, ロバート, エム.  
 アメリカ合衆国, コネチカット州, ニューヘヴン, カレッジストリート 451, エールユニヴァーシティ

(72) 発明者 スミス, シャンノン, ディー.  
 アメリカ合衆国, コネチカット州, ニューヘヴン, カレッジストリート 451, エールユニヴァーシティ

(72) 発明者 ホイラー, マルシア, エー.  
 アメリカ合衆国, コネチカット州, ニューヘヴン, カレッジストリート 451, エールユニヴァーシティ

(72) 発明者 プレシラ, ジャネット  
 アメリカ合衆国, コネチカット州, ニューヘヴン, カレッジストリート 451, エールユニヴァーシティ

Fターム(参考) 2G054 AB05 CA23 EA01 GA09

4B063 QA01 QA19 QQ03 QQ43 QR32 QR55 QR62 QS25 QS34 QS36

QX02

专利名称(译)	<无法获取翻译>		
公开(公告)号	<a href="#">JP2004533602A5</a>	公开(公告)日	2005-12-22
申请号	JP2002558017	申请日	2002-01-11
[标]申请(专利权)人(译)	耶鲁大学		
申请(专利权)人(译)	耶鲁大学盐湖城		
[标]发明人	アルティエリダリオシー ワイスロバートエム スミスシャンノンディー ホイーラーマルシアエー プレシラジャネット		
发明人	アルティエリ, ダリオ, シー. ワイス, ロバート, エム. スミス, シャンノン, ディー. ホイーラー, マルシア, エー. プレシラ, ジャネット		
IPC分类号	C07K14/47 C12Q1/68 G01N21/78 G01N33/53 G01N33/574		
CPC分类号	G01N33/57488 C07K14/4747 G01N33/57407 G01N33/57434 G01N2333/47 Y10S435/81		
FI分类号	G01N33/574.A C12Q1/68.ZNA.A G01N21/78.C G01N33/53.D		
F-TERM分类号	2G054/AB05 2G054/CA23 2G054/EA01 2G054/GA09 4B063/QA01 4B063/QA19 4B063/QQ03 4B063/QQ43 4B063/QR32 4B063/QR55 4B063/QR62 4B063/QS25 4B063/QS34 4B063/QS36 4B063/QX02		
代理人(译)	铃木康仁		
优先权	60/260898 2001-01-12 US		
其他公开文献	JP4368110B2 JP2004533602A		

#### 摘要(译)

本发明包括诊断癌症的方法，包括检测患者生物体液中存活蛋白的存在。本发明还提供了试剂盒，其包含一种或多种用于检测存活蛋白多肽或存活蛋白核酸的试剂和用于收集用于测试的生物流体的容器。