



(12) **PATENT**

(19) **NO**

(11) **328685**

(13) **B1**

NORGE

(51) Int Cl.

G01N 33/574 (2006.01)

Patentstyret

(21)	Søknadsnr	20006681	(86)	Int.inng.dag og søknadsnr	1999.07.01 PCT/DE99/02094
(22)	Inng.dag	2000.12.28	(85)	Videreføringsdag	2000.12.28
(24)	Løpedag	1999.07.01	(30)	Prioritet	1998.07.01, DE, 19829473
(41)	Alm.tilgj	2001.02.26			
(45)	Meddelt	2010.04.26			
(73)	Innehaver	Deutsches Krebsforschungszentrum, D-69111 Heidelberg, DE-, Tyskland Magnus von Knebel Döberitz, c/o Chirurgische Universitätsklinik, Im Neuenheimer Feld 110, D-69120 Heidelberg, DE-, Tyskland			
(72)	Oppfinner	Magnus von Knebel Doeberitz, Heidelberg, DE-, Tyskland			
(74)	Fullmektig	Oslo Patentkontor AS, Postboks 7007 Majorstua, 0306 OSLO, Norge			

(54)	Benevnelse	Fremgangsmåte ved tidlig diagnose av karsinomer
(56)	Anførte publikasjoner	WO9417414, Zhang T. et al., Cancer research, (Jan. 1997), vol. 57, s. 169-75 Betticher D. C. et al., Br. Jour. Cancer, (Feb 1996), vol. 73(3), s. 294-300 Esposito V. et al., Cancer Res. (Aug 1997), vol. 57(16), s. 3381-5
(57)	Sammen drag	

Det er beskrevet en fremgangsmåte for tidlig diagnose av karsinomer og prekursorer for dette omfattende bestemmelse av overekspressjonen av regulatoriske proteiner for cellesyklus i en organisk kroppsprøve. Det er også beskrevet et sett som kan bli anvendt for nevnte fremgangsmåte.

Foreliggende oppfinnelse angår en fremgangsmåte for tidlig diagnose av cervikale karsinomer så vel som deres prelimi-
nære stadier, hvor fremgangsmåten omfatter å bestemme over-
ekspressjon av et regulatorisk protein for cellecyklus i en
5 kroppsprøve hvor det regulatoriske protein for cellecyklus
er et protein p16 eller protein p19 syklinavhengig kinase-
inhibitor.

Preventive programmer har blitt gitt for de forskjelligste
karsinomer siden midten av 50-tallet. Med hensyn til ser-
10 vikal karsinomer er de basert i hovedsak på den morfolo-
giske og cytologiske undersøkelse av cytoutstrykninger av
cerviks uteri, hva som blir kalt Pap-testen og som blir fo-
retatt på basis av gynekologiske rutinemessige undersøkel-
ser ved jevne intervaller hos kvinner fra 20-års-alderen og
15 oppover. Ved hjelp av morfologien av cellene blir ut-stry-
kene oppdelt i forskjellige intensitetsgrader av dysplas-
tiske cellulære endringer. I henhold til Pap I-V blir
disse intensitetsgrader referert til som henholdsvis normal
mild dysplasia, og relativt alvorlig dysplasia, alvorlig
20 dysplasia og invasivt karsinom. Dersom Pap-testen fører
til et positivt resultat vil en liten biopsi bli tatt og
utsatt for histopatologisk undersøkelse hvorved typen og
intensiteten av dysplasiautviklingen blir bestemt og
klassifisert som cervical intraepitelial neoplasia (CINI-
25 III).

Fra WO 9417414 er det kjent en fremgangsmåte for å
detektere karsinomer, spesielt brystkarsinomer, ved å
bestemme genamplifisering eller avvikende
ekspressjon/overekspressjon av syklin E. I dette dokumentet
30 er det vist at sykliner (A, B og E) og syklinavhengige
kinaser (Cdc2 og CDK2) er overuttrykt i brystkreftceller i
forhold til normale celler. Videre er det i dette
dokumentet vist at overekspressjon av syklin E blir påvist i
vevsprøver av brystkreft i forskjellige stadier av
35 sykdommen.

Fra en artikkel av Esposito V. et al., Cancer Res. (Aug. 1997), vol. 57(16), s. 3381-5 beskrevet P27 sin prognostiske rolle i NSCLC-lungekreft. Her vises ved hjelp av immunohistokjemi og protein-blot at pasienter som
5 uttrykker P27 har en bedre prognose enn de som ikke uttrykker P27. Det er også vist i denne artikkelen en økning av proteolytisk degradering av P27 i pasienter med lav eller uten ekspresjon av P27.

10 Til tross for alle preventive programmer er cervikalt karsinom som fører til 400.000 nye tilfeller pr. år det mest hyppige karsinom hos kvinner. Dette er blant annet grunnet det faktum at opptil 30% av resultatene av Pap-testen er falske negativer.

15 Følgelig er det et mål for foreliggende oppfinnelse å frem-skatte en fremgangsmåte hvorved cervikale karsinomer kan bli diagnostisert in vitro tidlig og pålitelig. I tillegg bør en differensiering være mulig ved denne fremgangsmåte med hensyn til godartede inflammatoriske eller metaplastiske endringer av dysplastiske preneoplasier.

20 I henhold til oppfinnelsen blir dette oppnådd ved de trekk som er angitt i krav 1, samt med et påvisningssett som angitt i krav 6

Foreliggende oppfinnelse er basert på Søkers innsikt at regulatoriske proteiner for cellesyklus blir overuttrykt i
25 mange karsinomer, for eksempel anogenitale karsinomer, spesielt henholdsvis cervikale karsinomer og preliminare stadier av disse karsinomer. Eksempler på regulatoriske proteiner for cellesyklus er sykliner. Syklin-avhengige kinaser som regulerer syklinene skal nevnes spesielt. Syklin-
30 navhengige kinaseinhibitorer som i sin tur regulerer de syklinavhengige kinaser skal bli nevnt enda mer spesielt. Eksempler på de syklinavhengige kinaseinhibitorer er proteinene p14, p15, p16, p19, p21 og p27. Søker har funnet at intensiteten av overekspresjonen av regulatoriske pro-

teiner p16 eller p19 for cellesyklus korrelerer med graden av celledysplasia.

I henhold til oppfinnelsen blir Søkers innsikt anvendt for en fremgangsmåte ved tidlig diagnose av karsinomer samt deres preliminære stadier og som omfatter å bestemme overekspresjonen av cellesyklusproteiner i en kroppsprøve.

Uttrykket "karsinomer og deres preliminære stadier" omfatter henholdsvis karsinomer av enhver type og opprinnelse samt preliminære stadier for disse. For eksempel kan de være cervikale karsinomer. I forbindelse med sistnevnte skal deres preliminære stadier, for eksempel cervikal intraepitelial neoplasia (CINI-III), karsinomer in situ (CIS), osv. nevnes spesielt.

Uttrykket "regulatoriske proteiner for cellesyklus" omfatter regulatoriske proteiner for cellesyklus av enhver type og opprinnelse. For eksempel kan proteinene være sykliner. Spesielt kan de være syklinavhengige kinaser som regulerer syklinene. Eksempler på syklinavhengige kinaser er proteinene cdk4 og cdk6. Mer spesielt kan de være syklinavhengige kinaseinhibitorer som i sin tur regulerer de syklinavhengige kinaser. Eksempler på syklinavhengige kinaseinhibitorer er proteinene p14, p15, p16, p18, p19, p21 og p27 hvor p16 er foretrukket.

Uttrykket "kroppsprøve" omfatter enhver kroppsprøve hvor regulatoriske proteiner for cellesyklus kan bli påvist. Eksempler på slike kroppsprøver er blod, utstrykninger, spytt, urin, avføring, væske, galle, gastrointestinale utskillinger, lymfe, benmarg, organpunktater eller aspirater og biopsier. Spesielt er utstrykninger og biopsier indikert når det gjelder påvisningen av anogenitale karsinomer, for eksempel cervikale karsinomer.

Uttrykket "bestemme overekspresjonen av regulatoriske proteiner for cellesyklus" omfatter enhver metode som er egnet

for påvisning av henholdsvis ekspresjonen av cellesyklusregulatoriske proteiner eller deres kodende mRNA og en amplifikering av de tilsvarende gener. For å bestemme en overekspresjon er det innlysende å sammenligne kroppsprøven som
5 skal undersøkes med en tilsvarende kroppsprøve som stammer fra en frisk person. En slik prøve kan være til stede i standardisert form. (Over)ekspresjonen av regulatoriske proteiner for cellesyklus kan bli påvist på et henholdsvis nukleinsyrenivå og proteinnivå. Med hensyn til påvisningen
10 på et proteinnivå er det mulig å anvende for eksempel antistoff som er rettet mot regulatoriske proteiner for cellesyklus. Disse antistoff kan bli brukt i de mest varierende metoder så som Western blot, ELISA eller immunutfelling. Det kan være gunstig for antistoffene å være festet på
15 faste bærematerialer så som forsøksstrimler eller latekspartikler.

Ved hjelp av foreliggende oppfinnelse er det mulig å diagnostisere karsinomer tidlig, dvs. i deres preliminære stadier.

20 En ytterligere gjenstand for foreliggende oppfinnelse angår et sett for å utføre fremgangsmåten i henhold til oppfinnelsen. Et slikt sett omfatter:

(a) et reagens for å påvise ekspresjonen av protein p16 eller p19 cyklinavhengig kinaseinhibitor, for eksempel henholdsvis et antistoff rettet mot et slikt protein eller en
25 nukleinsyre som koder for et slikt protein samt deler derav;

(b) konvensjonelle hjelpemidler så som buffere, bærematerialer, markører, etc. og eventuelt

30 (c) et middel for kontrollreaksjoner, for eksempel henholdsvis et regulatorisk protein for cellesyklus, en nukleinsyre som koder for et slikt protein og deler derav el-

ler et preparat av celler, for eksempel et vevssnitt eller celler festet på et objektivglass.

De ovennevnte angivelser gjelder tilsvarende for de enkelte komponenter av settet. Videre kan en eller flere deler av de individuelle komponenter være til stede.

Ved hjelp av foreliggende oppfinnelse er det mulig å diagnostisere karsinomer tidlig. Spesielt kan preliminære stadier av karsinomer bli påvist tidlig. Det må også bli uthevet at det er mulig å foreta differensiering med hensyn til godartede inflammatoriske eller metaplastiske endringer av dysplastiske preneoplasier. Et annet særtrekk er at resultatene oppnådd ved en fremgangsmåte i henhold til oppfinnelsen ikke er utsatt for en subjektiv vurdering slik at for eksempel henholdsvis falske negative resultater og falske positive resultater av en Pap-test eller av histologiske preparater kan bli unngått. I tillegg utpreger foreliggende oppfinnelse seg ved rask og enkel håndtering slik at den kan bli brukt for utstrakte utvelgelsestiltak, spesielt også i land i den tredje verden. Således representerer foreliggende oppfinnelse et viktig tillegg til dagens diagnoser av kreftsykdommer.

KORT BESKRIVELSE AV TEGNINGENE

Figur 1 viser påvisningen av overekspresjon av cdk4 i HPV16-transformerte cervikale karsinomceller CaSki. Angivelsene 4 h, 8 h, 12 h, 24 h refererer til ganger av celleekstraktfjerning. Angivelsen co står for kontroll, mens arr indikerer tilsetningen av serum.

Figur 2 viser påvisningen av overekspresjonen av cdk6 og p19 i HPV16-transformerte NIH3T3-celler. Angivelsen co står for kontroll.

Oppfinnelsen blir forklart ved de følgende eksempler.

Eksempel 1: Påvisning av overekspresjonen av p16 i biopsier av cervix uteri.

(A) Parafinsnitt som har en tykkelse på 3 - 5 μm fremstilles fra 20 biopsier av cervix uteri som omfatter
5 alle grader av dysplastisk progresjon fra normalt vev (n=2) via CIN I (n=4), II (n=4), III (n=5) lesjoner til det invasive karsinom (n=5). De blir deparafinisert i xylen i 2 x 10 minutter og rehydrogenert ved å bruke etanol. Antigene
10 nene blir demaskert i 10 mM citratbuffer (pH 6,0) i en autoklav ved 110°C i 10 minutter. Deretter blir de endogene peroksidaser inaktivert ved å bruke 0,25% H₂O₂ i PBS. Etter
15 blokkeringen av uspesifikke bindingssteder med hestese- rum (Vectastain ABC detection kit, Vector Laboratories, Burlingame, California, USA) ved romtemperatur i 20 minuter
20 blir snittene inkubert med et p16-spesifikt monoklonalt antistoff (Neomarkers, Fremont, California, USA) i nærvær av 3% føtalt kalveserum ved romtemperatur i 45 minutter. For påvisningen av p16 antistoffbinding blir et biotinylert sekundært antistoff (heste-anti-mus IgG Vectastain kit, se
25 ovenfor) så tilsatt i 30 minutter. Deretter blir det bundne sekundære antistoff påvist ved hjelp av reagensene og i samsvar med Vectastain kit-instruksjonene og en kjerne-
30 motfarging blir utført ved å bruke Mayers hemalumoppløsning.

25 Det vises at en overekspresjon av p16 eksisterer i dysplasiaceller. Det vises også at intensiteten av p16 overekspresjon korrelerer med graden av celledysplasia.

(B) I tillegg blir parafinsnitt fremstilt fra 78
30 biopsier av cervix uteri. Biopsiene relaterer til normalt vev (n=12), dysplastiske lesjoner av stadier CIN I (n=15), II (n=14) og III (n=18) så vel som invasive karsinomer (n=19). Parafinsnittene blir behandlet som beskrevet i (A). Data angitt i tabell 1 blir oppnådd.

Tabell 1
p16 ekspresjonsintensitet

histologi	n=	-	+	++	+++
normal	12	9	3		
CIN I	15	10	3	2	
CIN II	14	1	4	9	
CIN III	18			9	9
CxCa	19			1	18
total	78	20	10	21	27

Det følger fra dataene i tabell 1 at p16 blir overuttrykt i
 5 celler av dysplasier og invasive karsinomer hvor overeks-
 presjonen øker med graden av dysplasia mot invasivt karsi-
 nom.

(C) Videre blir parafinsnitt fra 180 biopsier av cer-
 vix uteri behandlet som beskrevet i (A). I tillegg blir
 10 det prosentvise celleantall bestemt som reagerer med det
 ovennevnte p16-spesifikke monoklonale antistoff. En dis-
 tingsjon ble også foretatt mellom henholdsvis HPV-positive
 og HPV-negative dysplasier og invasive karsinomer. Dataene
 angitt i tabell 2 blir oppnådd.

Tabell 2

Prosentdel av celler som overuttrykker p16.

	n	gjennomsnittlig prosentdel \pm standardavvik
CIN I	32	54,9 \pm 24,0
HPV-negative	17	54,0 \pm 27,2
HPV-positive	15	55,9 \pm 21,0
CIN II	32	70,8 \pm 18,9
HPV-negative	14	76,0 \pm 15,8
HPV-positive	18	66,8 \pm 20,5
CIN III	60	92,4 \pm 10,2
HPV-negative	9	94,4 \pm 7,5
HPV-positive	51	92,1 \pm 10,7
Invasiv karsinom	58	97,8 \pm 5,2
HPV-negative	5	96,4 \pm 8,1
HPV-positive	53	97,9 \pm 4,9

Dataene fra tabell 2 beskriver at p16 blir overuttrykt i både HPV-positive celler og HPV-negative celler av dysplasier og invasive karsinomer. Dette resultat blir bekreftet av kontroller med normalt vev. Dataene viser også at prosentdelen av celler som reagerer med p16 øker med graden av dysplasia mot det invasive karsinom.

EKSEMPEL 2: Påvisning av overekspressjonen av regulatoriske proteiner for cellesyklus i HPV-transformerte celler.

(A) Cervikale karsinomceller CaSki som er transformert med HPV16 dyrkes ved fravær av serum i 72 timer. Etter tilsetningen av serum blir celleekstrakter samlet opp ved forskjellige tidspunkter utsatt for SDS-PAGE og overført til PVDF-membraner (Du Pont). Ekspressjonen av cdk4 blir bestemt ved å bruke polyklonalt antiserum (1:1000) fra Santa Cruz. Videre blir ekspressjonen av HPV16 - E7 protein bestemt med et monoklonalt antistoff mot HPV16 - E7 (1:50) fra Triton. De individuelle immunresponser blir påvist via

peroksidase-bundne sekundære antistoff og et kjemiluminesens påvisningssystem (NEN, Du Pont).

Det viser seg at cdk4 blir overuttrykt (se figur 1).

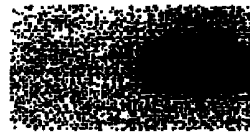
(B) NIH3T3-celler transformeres med HPV16 for å oppnå en
5 ekspresjon av HPV16-E7-protein. Celleekstrakter av de
transformerte celler blir oppnådd og behandlet som beskrevet i (A). For å påvise ekspresjonen av henholdsvis cdk6 og p19 blir polyklonalt antiserum (1:1000) fra Santa Cruz benyttet. Når det angår påvisningen av ekspresjonen av
10 HPV16-E7-protein og påvisningen av de individuelle immunresponser blir det referert til de ovennevnte angivelser under (A).

Det viser seg at cdk6 og p19 er overuttrykt (se figur 2).

1/2

NIH3T3

8 E7



← p19



← cdk6

Fig. 1

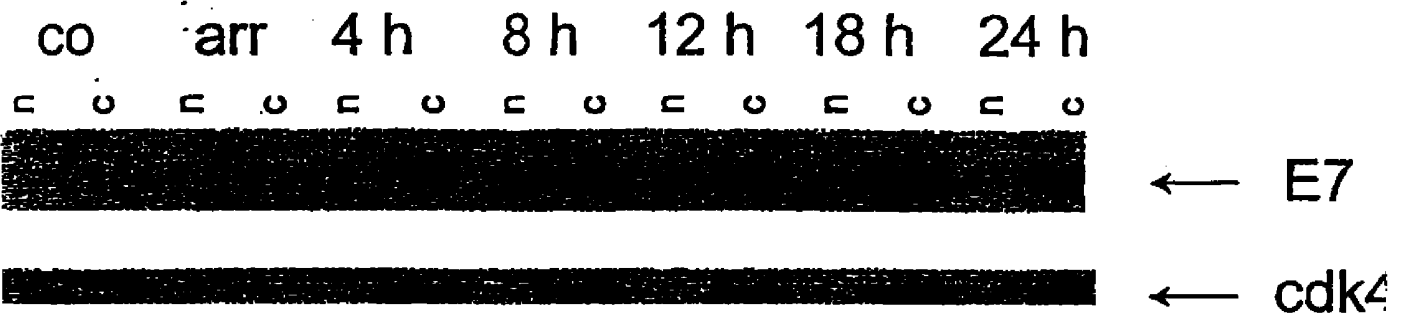


Fig. 2