

República Federativa do Brasil
Ministério do Desenvolvimento, Indústria
e do Comércio Exterior
Instituto Nacional da Propriedade Industrial.

(21) **PI0805804-0 A2**

(22) Data de Depósito: 11/01/2008
(43) Data da Publicação: 30/08/2011
(RPI 2121)



(51) *Int.Cl.:*
C12Q 1/44
G01N 33/573

(54) Título: **KIT DE TESTE PARA DETECÇÃO DE CÂNCERES**

(30) Prioridade Unionista: 14/11/2006 CN 2006101384292

(73) Titular(es): Beijing ACCB Biotech Ltd.

(72) Inventor(es): Biao He, Haimeng Zhou, Jie Dai, Junpu Xu, Zhao Chen

(74) Procurador(es): Alberto Luís Camelier da Silva

(86) Pedido Internacional: PCT CN2008000081 de 11/01/2008

(87) Publicação Internacional: WO 2008/067777 de 12/06/2008

(57) Resumo: KIT DE TESTE PARA DETECÇÃO DE CÂNCERES. A presente invenção refere-se a um kit para detectar a atividade da arilsulfatase humana ou de suas isozimas, incluindo 4-MUS e 4-MU. O kit pode ser usado para rastreamento inicial, monitoração do efeito terapêutico e inspeção de recorrência de cânceres humanos.



KIT DE TESTE PARA DETECÇÃO DE CÂNCERES

CAMPO DA INVENÇÃO

5 A presente invenção refere-se a um kit para detectar câncer ou outras doenças.

HISTÓRICO DA INVENÇÃO

10 Câncer é altamente letal. Um fator para melhorar a taxa de sobrevivência ao câncer é a detecção precoce.

 Porém, ensaios de detecção precoce correntes e tratamentos efetivos de câncer apresentam muitas limitações.

 A incidência e desenvolvimento de câncer estão
15 estritamente correlacionados a expressão irregular de enzimas. Durante a caracterização de células, as atividades de enzimas e suas isozimas relacionadas à proliferação celular são supra-reguladas. Arilsulfatase (ARS) e suas isozimas, que podem hidrolisar arilsulfatos, estão
20 relacionadas à detoxificação em organismo. É geralmente aceito que o aumento de atividade da ARS sérica está relacionado à inflamação, sendo aplicável para distinguir tumor e não-tumor. A determinação da concentração de ARS em soro pode fornecer informações muito úteis para diagnóstico
25 clínico, tratamento e prognóstico da doença.

 Alguns estudos mostraram que a arilsulfatase (ARS) e suas isozimas são hidrolases, que podem catalisar a hidrólise de arilsulfatase, mostrou ser mais ativa em soro de pacientes com câncer pulmonar do que em soro humano normal,
30 sendo suas atividades reduzidas mediante tratamento. O aumento da atividade de enzimas de lisosoma, incluindo ARS, pode ser usado para um diagnóstico efetivo e para monitoração do efeito terapêutico (Wozniak, A., et al, Neoplasma, 2002, 49(1): p.10-5). Além disso, as atividades da ARSA e ARSB em

diferentes tipos histológicos de tumores humanos primários e secundários aumentam significativamente em quase todos os cânceres pulmonares primários (Gasa, S., et al, Cancer Res,1980,40(10): p.3804-9). As atividades ARS em pacientes com câncer de mama são 2 a 5 vezes maiores daquelas em mulheres saudáveis. A atividade é reduzida a um nível normal após cirurgia ou quimioterapia. A atividade de enzima está correlacionada ao tamanho do tumor e a sua metástase (Rozwodowska, M., et al, Pol Merkuriusz Lek,2004,17(99): p.252-4). Também se verificou que a atividade de sulfatase em tecido de câncer de mama é aproximadamente o dobro daquela em tecido normal (Chetrite, G.S., et al., Anticancer Res,2005,25(4): p.2827-30). Além disso, verificou-se que a atividade de ARS em câncer de estômago, câncer do reto, câncer de mama e câncer de pele é aumentada ao ser utilizado um substrato não-específico (Dzialoszynski, L.M., et al, Clin. Chim. Acta,1966,14(4): p.450-3).

O 4-metil umbeliferona sulfato (4-MUS) pode ser usado como um substrato adequado para detectar a atividade da ARS (Uchimura, K., et al, Methods In Enzymology,2006,416: p.243). Além disso, a 4-MUS apresenta melhor Km, Vmax, sensibilidade e estabilidade do que outros substratos, e seu hidrolisado 4-metil umbeliferona (4-UM) apresenta fluorescência mais alta em solução alcalina, que é conveniente para a detecção. As técnicas atuais examinam ou ARS A ou ARS B, mas a presente invenção tem como objetivo examinar a atividade das enzimas ARS A e B juntas em um ensaio, pois 4-MUS não pode distinguir A/B (Sherman, W.R., et al, Biochem J., 1967,102: p.905).

30

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

De acordo com a reação bioquímica de 4-MUS catalisado por enzimas ARS, com base no princípio de 4-UM

resultante em solução de reação, que reflete a atividade de enzima, examinamos a intensidade de fluorescência do 4-MU com excitação em 365nm e a um comprimento de onda de 445-450 nm, e traçamos a curva padrão baseada no produto padrão 4-UM com a concentração conhecida, tendo como finalidade examinar sob o aspecto quantitativo, a atividade da ARS em soro/amostras de urina. O rastreamento inicial, a monitoração do efeito terapêutico e a inspeção quanto à recorrência foram realizados dentro =.

10 A presente invenção refere-se a um kit para a detecção de câncer, incluindo 4-MUS e 4-UM. Preferivelmente, a concentração de 4-MUS no kit é de 1-10mM, a concentração de 4-UM é de 100-5000nM. O tampão no kit é acetato de sódio, com concentração preferida na faixa de 1-10000mM, com valor de pH entre 1 e 14, concentração mais preferida na faixa de 10-1000 mM, valor do pH entre 2 e 14. A solução de paragem no kit é solução misturada de carbonato de sódio e bicarbonato de sódio ou solução misturada de carbonato de sódio e glicina, com concentração preferida na faixa de 1-50000mM, valor do pH entre 1 e 14, concentração mais preferida na faixa de 10-5000mM, valor de pH entre 7 e 12. O precipitador no kit é acetato de chumbo, com concentração preferida na faixa de 1% - 90% (w/v), concentração mais preferida na faixa de 10% -40% (w/v).

25 A presente invenção pode ser usada para rastrear, monitorar o efeito terapêutico e inspecionar recorrência:

rastreamento em pessoas normais; diagnóstico em pacientes com sintomas e distinção entre tumores benignos e tumores malignos; determinação das condições do paciente e avaliação de planos de tratamento; monitoração dos efeitos curativos de tumores; previsão de recorrência e prognóstico.

Os tumores incluem: câncer pulmonar, câncer de estômago, câncer de ovário, câncer de pâncreas, câncer de mama, câncer de fígado, câncer de esôfago, câncer de

intestino, câncer de nasofaringe, câncer de rim, câncer de bexiga, câncer linfático, câncer de vesícula biliar, câncer da ampola, câncer de pênis, câncer de testículo, câncer de garganta, câncer de hipotiróide, câncer de próstata, câncer de endométrio, câncer coloretal, câncer dos ductos biliares, sarcoma de parênquima, tumor de espermatogônio, sarcoma de Ewing, leucemia, osteosarcoma, encefaloma e limfoma maligno. Mais preferivelmente são câncer de pulmão, câncer de estômago, câncer de ovário, câncer de pâncreas, câncer de mama, câncer de fígado, câncer de esôfago, câncer de rim, câncer linfático, câncer coloretal, leucemia e limfoma maligno.

As vantagens da presente invenção (comparadas a ELISA):

A reação entre enzimas e substratos é altamente eficaz e consistente, a determinação da atividade da enzima é melhor do que a técnica de reação antígeno-anticorpo, ou seja, sem resultados falsos positivos. Ao mesmo tempo, a determinação de atividade da enzima pode refletir melhor as funções biológicas da enzima em tumorigênese, ou seja, os resultados do experimento são mais fidedignos. E o produto a ser analisado apresenta comprimento de onda de excitação e de detecção especial, tornando todo o experimento operável.

BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

A figura 1 mostra o princípio da invenção.

A figura 2 mostra o impacto de agente anticoagulante na atividade de arilsulfatase de soro humano e suas isozimas.

A figura 3 mostra o impacto de preservativos na atividade de arilsulfatase de soro humano ou de suas isozimas.

A figura 4 é a curva padrão de 4-UM e leitura de unidade de fluorescência.

A figura 5 é a curva de tempo-[4-MU] para determinar o tempo de reação com 3 amostras séricas.

5 A figura 6 é a curva de tempo-[4-MU] de amostras séricas em diferentes condições de diluição.

A figura 7 é a comparação entre atividades de arilsulfatase ou suas isozimas em soro humano normal e soro de pacientes com câncer, como câncer de pulmão.

10 A figura 8 é a comparação entre atividades de arilsulfatase ou de suas isozimas em amostras de sangue humano total normal e aquelas de pacientes com câncer, tal como câncer de pulmão.

15 A figura 9 mostra sensibilidade-especificidade que corresponde às atividades de arilsulfatase ou de suas isozimas em soros humanos normais e soros de pacientes com câncer, como câncer de pulmão.

20 A figura 10 é a comparação entre atividade de arilsulfatase ou de suas isozimas em amostras de urina humana normal e aquelas de pacientes com câncer.

A figura 11 mostra a sensibilidade de acréscimos na atividade de arilsulfatase ou de sua isozimas em amostras de urina de pacientes com diferentes tipos de cânceres.

25 A figura 12 é a comparação entre atividades de arilsulfatase ou de suas isozimas em amostras de urina humana normal e aquelas de pacientes com câncer, submetidos a tratamento.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

30

(1) Determinação de parâmetros de reação

1 Parâmetros de reação

1.1 Impacto de agente anticoagulante sobre a atividade da enzima (figura 2)

A partir da figura 2, com o acréscimo de concentração de agente anticoagulante:

*EDTA não parece afetar a atividade de ARS

*heparina sódica e citrato de sódio apresentam
5 efeito dramático sobre a atividade de ARS, onde ela é reduzida com o aumento de dosagens

Para assegurar atividades da enzima, selecionamos amostras séricas sem tratamento com agente anticoagulante como amostras experimentais.

10 1.2 Impacto de preservativos sobre a atividade da enzima (figura 3).

Da figura 3

*sob condição preservativa a temperatura ambiente, a atividade da enzima ARS sérica é dramaticamente reduzida a
15 cada dia, com aproximadamente 10% de redução para cada dia em relação ao dia anterior.

*a 4° C, a atividade da enzima ARS sérica é significativamente alterada com o tempo

*através de congelamento-degelo por 10 vezes, a
20 atividade é reduzida em cerca de 20%.

Para não afetar a atividade da enzima, selecionamos a temperatura de -20° C.

1.3 Parâmetros de reação determinados por experimentos de enzima básica:

25 •OD-[P] é linear
•tempo-[P] é linear em fase precoce
•velocidade de reação inicial $v-[E]$ é linear (se $[S] \gg [E]_0$)

1.3.1 determinação da curva padrão OD-[4-MU]: com a
30 finalidade de assegurar que a leitura de unidade de fluorescência é linear com concentrações de 4-UM, foi desenhada a figura 4 (obtivemos resultados consistentes em experimentos repetidos):

1.3.2 Determinação da curva de tempo-[4-MU]:

Selecionamos 3 amostras de soro para determinar o tempo de reação ideal, o resultado mostra (figura) que: a leitura de [4-MU] é linear quando o tempo de reação da enzima
5 está dentro de 36 horas;

Para assegurar que valores de leituras [4-MU] a partir de medições experimentais estão dentro da faixa linear e são obviamente diferentes do valor de referência (comparativo), o tempo de reação foi estabelecido como sendo
10 de 24 horas. Por esse motivo, todos os nossos experimentos, utilizando amostras séricas descritas abaixo, empregaram 24 horas como sendo o tempo de reação nos casos em que não houve especificações contrárias.

1.3.3. Curva de tempo-[4-MU] de amostras séricas
15 sob diferentes condições de diluição (figura 6). Com a finalidade de assegurar que a razão de diluição de amostras séricas está dentro da faixa linear, foi selecionada a razão de 1:8, então adicionados 20µL destas ao sistema de reação.

2. Determinação de parâmetros de reação: o soro é
20 diluído à razão de 1/8, coletados 20µl para reação enzimática, sendo medida a leitura de unidade de fluorescência após 24 horas, ao mesmo tempo, sendo determinada a curva padrão OD-[4-MU], finalmente sendo convertido (ODamostra-OD controle(água)) em [4-MU].

25

(2)Etapas experimentais:

1 Exame de amostra sérica

Colocados 5mL de sangue em uma cuveta a vácuo com gel de separação e sem agente anticoagulante, permanecendo em
30 descanso por aproximadamente 30min a temperatura, depois centrifugado com máquina centrífuga horizontal durante 10min (3000r/min). O soro sobrenadante é aspirado /despejado em um tubo 1.5mL EP /ou em outro tipo de túbulo não usado, resfriado a -20°C antes de usar.

Na determinação de atividade, coletados 50µL de soro em 350µl de tampão (pH 5.4) de acetato de sódio 100mM.

20ml de soro diluído descrito é adicionado a 180ml do sistema de reação (contendo acetato de sódio 100mM, pH 5.4, 8mM 4-MUS).

Este é colocado em um recipiente térmico (37° C) por 24 horas, depois a reação é paralisada adicionando-se 1 ml de solução de paragem (carbonato de sódio 500mM/ tampão bicarbonato de sódio, pH 10.7), finalmente a fluorescência de cada amostra é determinada (excitação em 365nm, registrando valor de luz emissora 445-450nm).

Amostra padrão 4-MU (produto puro) é usada para curva padrão OD-[4-MU] e leituras de reação sérica são convertidas, de acordo com essa curva padrão, para render [4-MU] para cada reação.

Com base no [4-UM] descrito, a atividade do soro ARS ou de suas isozimas é determinada como a quantidade de 4-MU produzido por 1 L de proteína sérica em 1 minuto.

2. Exame da amostra de urina

Coletados aproximadamente 3mL de amostra de urina pela manhã em um tubo EP. Em caso de apresentar impureza, ela é centrifugada durante 10 minutos (3000 r/min) para remover impurezas e armazenada a 20° C.

Na determinação de atividade, coletados 40µL de amostra de urina com micropipetador em tubo de reação, adicionados 40µL de precipitador (30% de solução de acetato de chumbo), misturados bem, deixando as amostras descansar a 4° C durante 5 minutos. Depois, foram centrifugadas por 5 minutos a temperatura ambiente (3000r/min).

O sobrenadante é retirado com micropipetador. Adicionados 40µL de preparação de substrato (contendo 100mM de acetato de sódio, pH 5.4, 8mM 4-MUS) ao tubo, misturados bem, não deixando formar coágulo, cultivado a 37o C durante 30-40 minutos, o tempo de reação é registrado como T. Depois

disso, o tubo de reação é rapidamente colocado no gelo, adicionados 200µL de solução de paragem (500mM de tampão carbonato de sódio/bicarbonato de sódio, pH 10.7), sendo bem misturado. O tubo de reação é centrifugado durante 1 minuto
5 sob temperatura ambiente (6000-8000r/min).

Coletados 200µL de amostra de urina misturada pós-reação e solução de controle (100mM de tampão acetato de sódio, pH 5.4) para determinação por fluorescência (excitação em 365nm, registrando valor de luz emissora 445-450nm).

10 Amostra padrão 4-MU (produto puro) é usada para curva padrão OD-[4-MU] e leituras de reação urinária são convertidas, de acordo com essa curva padrão, para render [4-MU] para cada reação.

De acordo com o [4-MU] acima, a atividade da urina
15 ARS ou de suas isozimas é determinada como a quantidade de 4-MU produzida por 1 L de proteína urinária em 1 minuto.

(2) Processamento de dados I:

Medição da amostra padrão em tampões, conforme descrito acima (contendo acetato de sódio e componente de
20 solução de paragem na mesma concentração), ou seja, OD de 4-MU(0.003mM), registrada como ODs.

Determinação do OD de reação de controle (reação de 20µl de tampão acetato de sódio para substituir soro/reação de 40µl de tampão acetato de sódio para substituir urina),
25 que é registrado como OD0.

$$(ODn-OD0)/[4-MU]n=ODs/[4-MU]s$$

$$[4-MU]n=(ODn-OD0)*0.003mM/ODs$$

É possível calcular a quantidade de produto 4-MU
30 produzida a partir da reação de amostra n, isto é, amostra de substrato 4-MUS, adicionando-se à reação.

É possível obter a atividade de amostra n, ou seja, número molar de substrato que pode ser convertido por 1L de proteína enzimática em 1 min.

A equação é $[4\text{-MU}]_n / (L \cdot 24 \cdot 60)$

A unidade é convertida em nmol/min/L

Processamento de dados II:

Medição da amostra padrão em tampões, conforme
5 descrito acima (contendo acetato de sódio e componente de
solução de paragem na mesma concentração), ou seja, OD de 4-
MU (0.003nM), registrada como ODs.

Determinação da OD de reação de controle (reação de
20 μ l de tampão acetato de sódio para substituir soro/reação
10 de 40 μ l de tampão acetato de sódio para substituir urina),
que é registrado como OD0.

$$(OD_n - OD_0) / [4\text{-MU}]_n = OD_s / [4\text{-MU}]_s$$

$$[4\text{-MU}]_n = (OD_n - OD_0) \cdot 0.003 \text{ mM} / OD_s$$

É possível para calcular a quantidade de produto
15 4-MU a partir da reação de amostra n, ou seja, quantidade de
substrato 4-MUS, adicionando-se à reação.

Determinação da quantidade de proteína da amostra
n: detectada com albumina sérica bovina (BSA) como controle,
espectrofotômetro ultravioleta em $\lambda = 280$ nm para obter
20 concentração de proteína de amostra n, que é registrada como
Mn, a partir da qual a quantidade de proteína de amostra n
pode ser calculada como Mgn.

É possível obter a atividade específica de amostra
n, ou seja, número molar de substrato que pode ser convertido
25 por 1 mg de proteína enzimática em 1 minuto.

$$\text{Conforme fórmula: } [4\text{-MU}]_n / (Mgn \cdot 24 \cdot 60)$$

A unidade é convertida em nmol/min/MG

Processamento de dados III:

Os valores de fluorescência de amostras padrões de
30 4-MU, B1, B2, B3 e B4 são usados como ordenada(y), valores de
concentração correspondentes de solução padrão (em nM) como
abscissa (x), traçando-se a curva padrão através da origem:
 $y = kx$

Calculo do valor líquido de fluorescência das amostras $A_i' = A_i - A_0$, que é substituído na equação acima por y para obter a concentração de 4-MU e solução de pós-reação, ou seja $[4-MU]_i$, em nM

5 Atividades enzimáticas de amostras são calculadas conforme segue:

(aplicável para amostra de urina, na qual 240 μ L é o volume total de solução de pós-reação, 40 μ L é volume de urina inicial)

10 = (aplicável para amostra sérica, na qual 240 μ L é o volume total de solução de pós-reação, 0.4 μ L é o volume sérico inicial, ou seja, adicionados 4 μ L de soro diluente em 1/10).

15 Unidade de valor pode ser convertida em U/L, na qual

(3) Instrumentos para os experimentos:

Máquina de centrifuga horizontal: Heraeus Labofuge 400R

20 Instrumento de exame: dele pode detectar sinal de fluorescência em 365nm de comprimento de onda de excitação e 445-450nm de comprimento de onda de detecção

Incubador eletro-termoestático: Tianjin Zhonghuan Experimental Circuit Ltd

Misturador Vórtex: IKA MS2 Minishaker

25 Pipetman: Gilson 1mL, 200 μ L, 20 μ L

(5) Dados experimentais:

1. Medição da atividade ARS em cada amostra sérica de humanos normais (15 casos) e de pacientes com câncer (7 casos de câncer de pulmão, 1 caso de câncer de estômago, 3 casos de câncer de ovário, 1 caso de câncer do pâncreas, 1 caso de câncer de mama) é repetida 3 vezes. Consulte a figura 7 para todos os dados.

30

	Normal		Câncer	
	No.	Atividade	Tipo	Atividade
5	1	122.9998	Câncer de pulmão	128.5012
	2	122.6639		172.172
	3	77.29412		282.4619
	4	96.07889		204.933
	5	156.0704		203.5849
	6	184.3498		139.4111
	7	136.4092		131.9811
10	8	111.0366	Câncer de ovário	182.2981
	9	120.3559		103.233
	10	67.19366		102.8881
	11	97.60397	Câncer de mama	137.2793
15	12	54.82057	Câncer de estômago	112.9829
	13	74.34256	Câncer de pâncreas	118.5946
	14	74.15009		
	15	143.6181		

20 2. Média da atividade ARS em amostras séricas de humanos normais e pacientes com câncer

Tabela 2

	Soro de humano normal		Soro de pacientes com câncer	
	Número de amostras	15	13	
25	Atividade média			
	(nmol/min/L)	109.2658±36.6046	155.4093±51.9724	

30 Teste-T é completado para soro de humano normal (15 amostras no total) e soro de pacientes com câncer (13 amostras no total) a fim de obter $p=0.005415<0.01$.

3. Consulte a figura 2 para a correlação sensibilidade-especificidade correspondente a dados experimentais.

4. determinação de padrão:

De acordo com a correlação de sensibilidade-especificidade, selecionamos valores críticos com sensibilidade e especificidades relativamente elevadas como padrões.

5 5. Medição da atividade ARS em cada amostra de urina de humanos normais (54 casos) e de pacientes com câncer (12 casos de câncer de pulmão, 10 casos de câncer de estômago, 13 casos de câncer coloretal 9 casos de câncer de esôfago, 5 casos de câncer de rim e 5 casos de câncer de mama) é repetida 3 vezes. Consulte a figura 10 para todos os dados.

Conforme mostra a figura, as atividades de arilsulfatase em amostras de urina de pacientes com câncer são dramaticamente mais altas do que em humanos normais. Isto
15 indica que a atividade ARS na urina pode ser usada como um marcador para identificar tumores a partir de amostras normais.

6. As atividades de arilsulfatase e amostras de urina de pacientes com câncer (57 casos de câncer de esôfago, 83 casos de câncer de estômago, 79 casos de câncer coloretal, 51 casos de câncer de rim, 63 casos de câncer de bexiga, 211 casos de câncer de pulmão, 76 casos de câncer de fígado, 107 casos de câncer de mama, 91 casos de câncer de ovário, 28 casos de tumor hematopoiético) são examinadas, as
25 sensibilidades em diferentes tipos de câncer (casos positivos verdadeiros / (casos positivos verdadeiros + casos positivos falsos) são apresentadas na figura 11.

Entre muitas amostras de urina de pacientes com diferentes tipos de cânceres examinados, a sensibilidade
30 média das atividades de arilsulfatase não é inferior a 80%, indicando que aumentos anormais das atividades de ARS em amostras de urina são comuns em pacientes com câncer.

7. Medição da atividade de ARS em cada amostra de urina de humanos normais (29 casos) e pacientes com câncer

após tratamento (7 casos de câncer de pulmão, 9 casos de
câncer de esôfago, 9 casos de câncer de fígado, 2 casos de
câncer de rim, 3 casos de câncer de ovário, 1 caso de câncer
de hipofaringe e 2 casos de tumor hematopoiético) é repetida
5 3 vezes. Consulte a figura 12 para todos os dados.

Observamos que em pacientes com câncer, depois de
submetidos a tratamentos terapêuticos, a atividade de ARS na
urina foi dramaticamente reduzida a um nível próximo àquele
de níveis normais de controle (figura 12). Portanto, a
10 mudança nos níveis de atividade de ARS em amostras de urina
pode ser usada para monitoração do efeito terapêutico para
pacientes com câncer. Se o tratamento for eficaz, o valor da
atividade de ARS deve ser reduzido, aquele então antes do
tratamento, ficando próximo do nível de pessoas saudáveis. A
15 mudança no nível de atividade de ARS em amostras de urina
também pode ser usada para monitorar recorrência de câncer em
pacientes submetidos a tratamento.

REIVINDICAÇÕES

1. Kit para teste de atividades de arilsulfatase ou de suas isozimas, caracterizado pelo fato
5 de incluir 4-metil umbeliferona sulfato e 4-metil umbeliferona.

2. Kit, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de ser usado para detectar câncer ou outras doenças e corresponde a um rastreamento inicial,
10 monitoração quanto ao efeito terapêutico e inspeção quanto à recorrência.

3. Kit, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de o câncer ser câncer de pulmão, câncer de estômago, câncer de ovário, câncer do pâncreas,
15 câncer de mama, câncer de fígado, câncer de esôfago, câncer de rim, câncer de bexiga, câncer linfático, câncer coloretal, leucemia e linfoma maligno.

4. Kit, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de as amostras biológicas a serem
20 usadas serem sangue humano total, soro, urina, saliva, flegma, fluido linfático ou outro fluido tecidual.

5. Kit, de acordo com a reivindicação 4, caracterizado pelo fato de as amostras biológicas a serem usadas serem soro humano.

25 6. Kit, de acordo com a reivindicação 4, caracterizado pelo fato de as amostras biológicas a serem usadas serem urina humana.

7. Kit, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de o 4-metil umbeliferona sulfato
30 se situar na faixa de 0.1-10mM.

8. Kit, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de o 4-metil umbeliferona situar-se na faixa de 100-2000mM.

9. Kit, de acordo com a reivindicação 5, caracterizado pelo fato de incluir um tampão e uma solução de paragem.

5 10. Kit, de acordo com a reivindicação 6, caracterizado pelo fato de incluir um tampão, um precipitador e uma solução de paragem.

11. Kit, de acordo com a reivindicação 9 ou 10, caracterizado pelo fato de o tampão ser acetato de sódio.

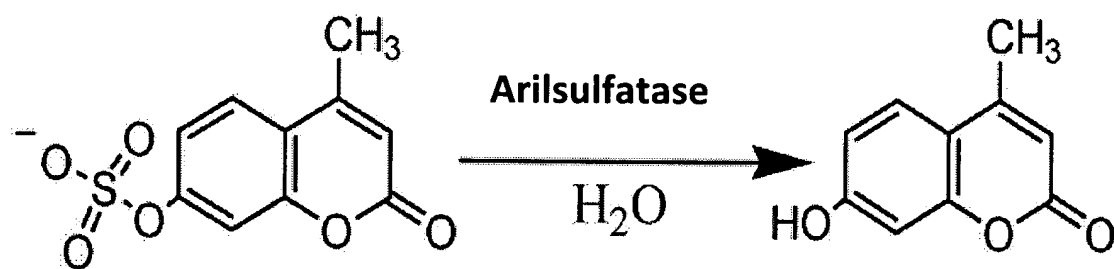
10 12. Kit, de acordo com a reivindicação 11, caracterizado pelo fato de o acetato de sódio situar-se na faixa de 10-10000mM, e o valor pH situar-se na faixa de 2-7.

15 13. Kit, de acordo com a reivindicação 9 ou 10, caracterizado pelo fato de a solução de paragem ser carbonato de sódio/bicarbonato de sódio ou carbonato de sódio/solução de glicina.

20 14. Kit, de acordo com a reivindicação 13, caracterizado pelo fato de o carbonato de sódio/ bicarbonato de sódio ou carbonato de sódio/ solução de glicina situar-se na faixa de 10-50000mM, o valor pH situar-se na faixa de 7-12.

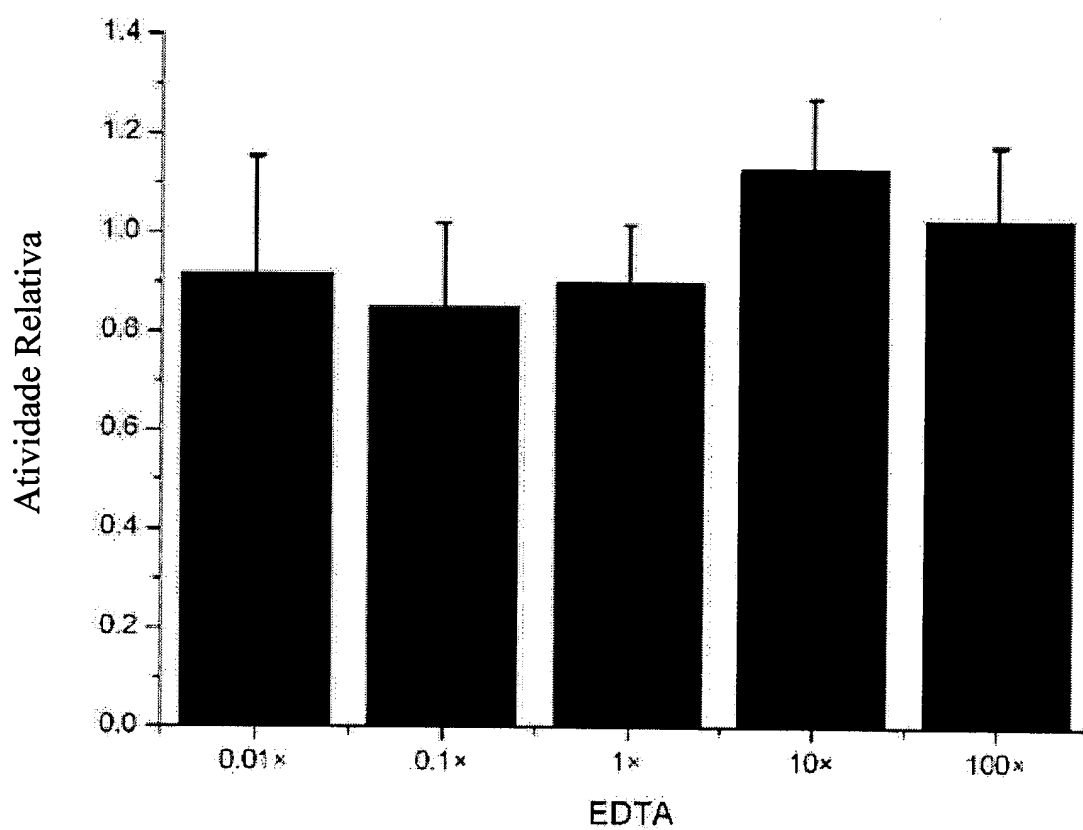
25 15. Kit, de acordo com a reivindicação 10, caracterizado pelo fato de o precipitador ser acetato de chumbo.

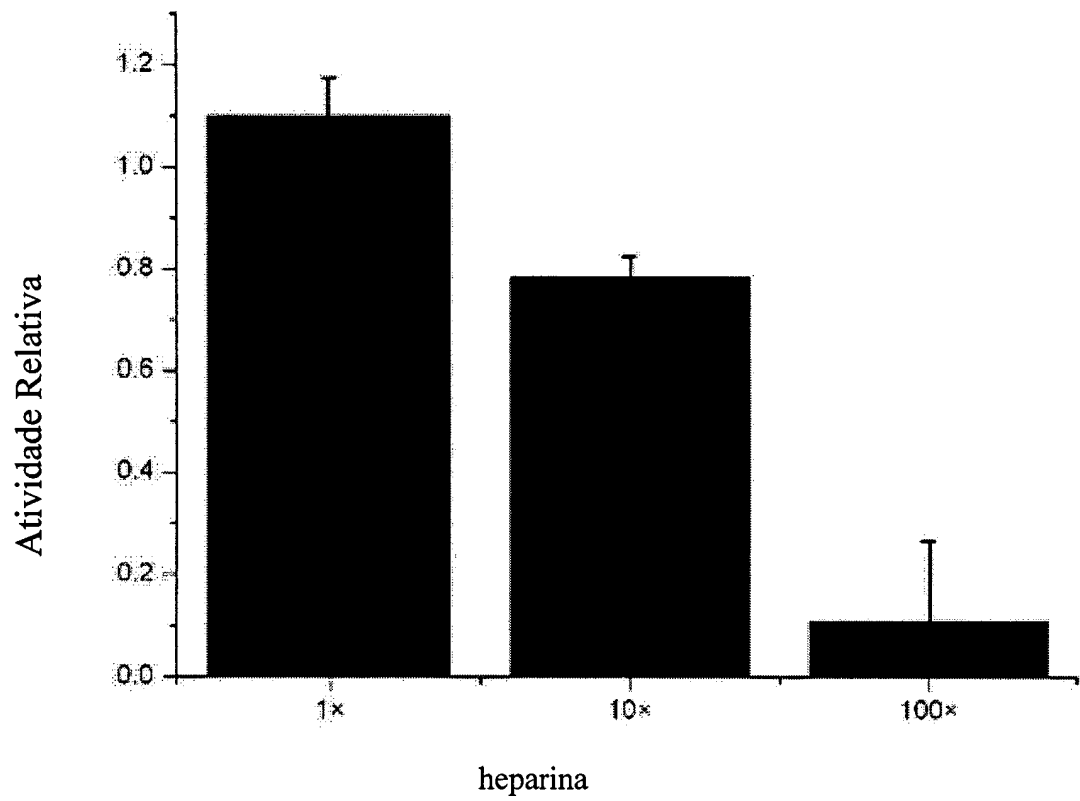
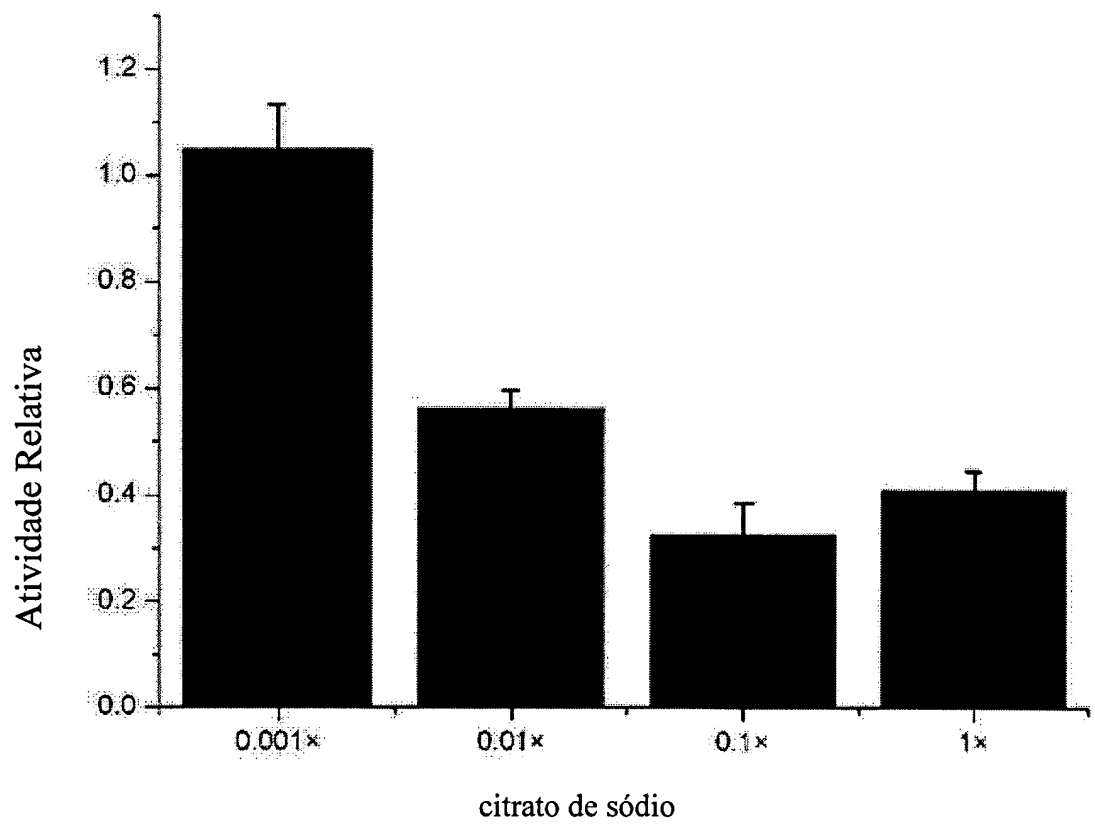
16. Kit, de acordo com a reivindicação 15, caracterizado pelo fato de o acetato de chumbo situar-se na faixa de 10%-40% (peso/volume).

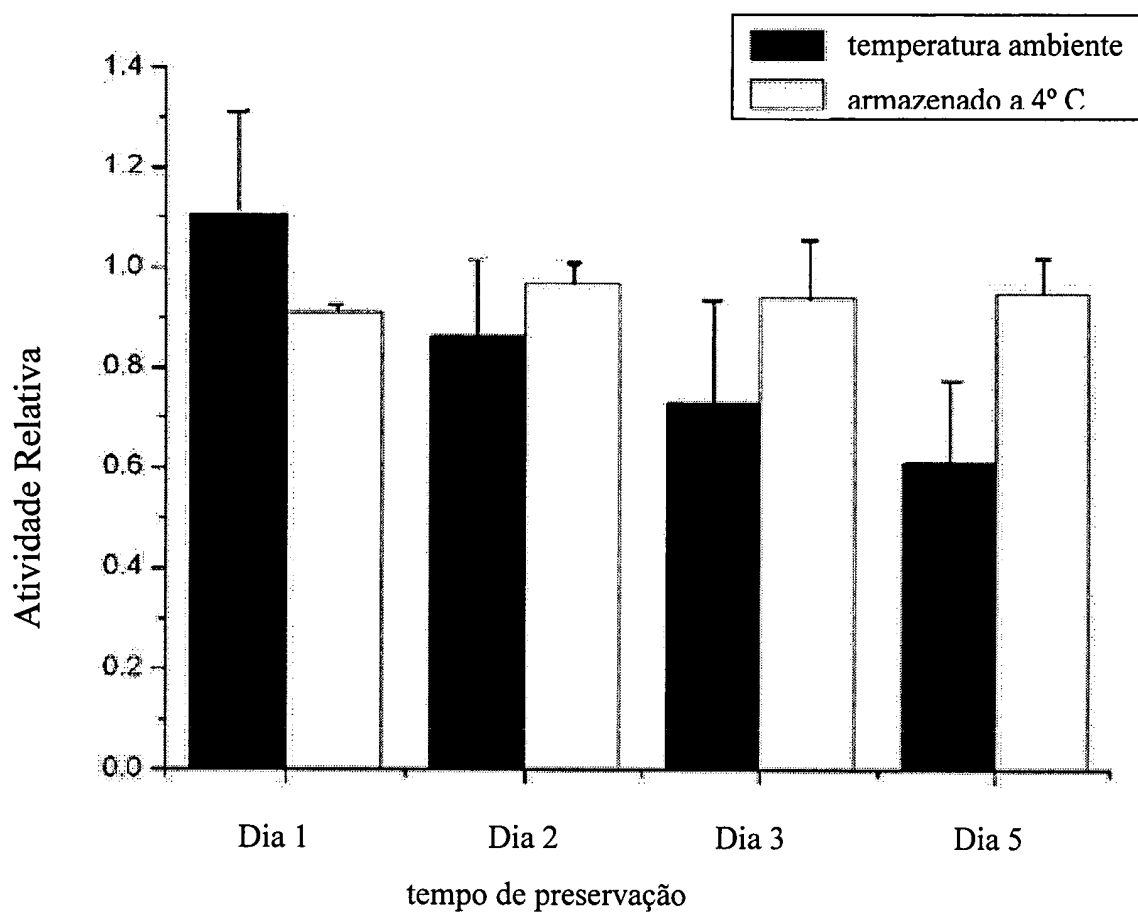
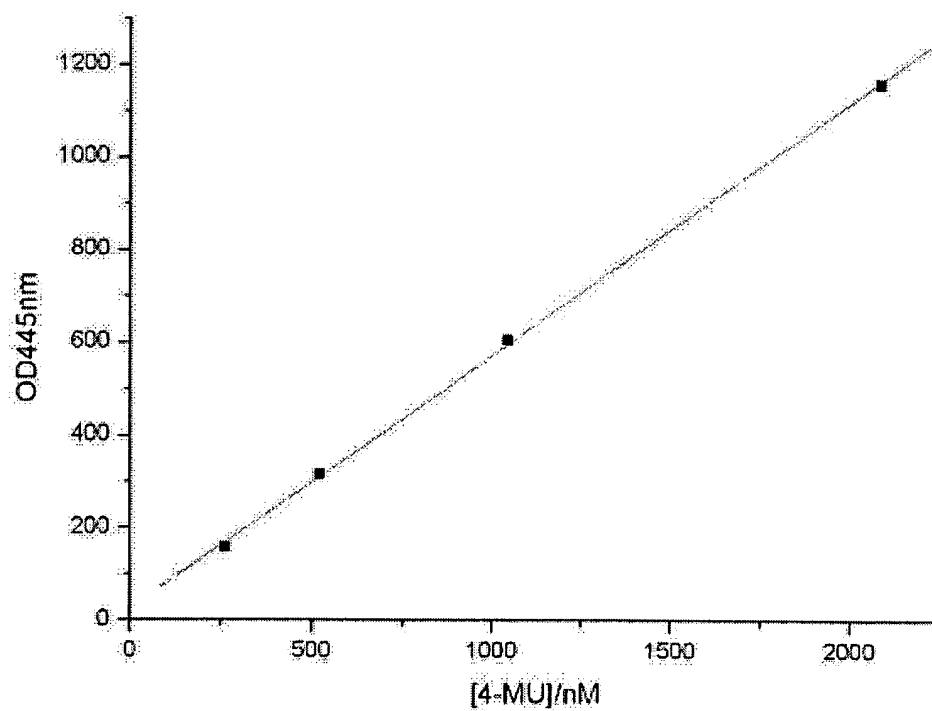


4-metil umbeliferona sulfato, 4-MUS

4-metil umbeliferona 4-MU

FIG. 1**FIG. 2-1**

**FIG. 2-2****FIG. 2-3**

**FIG. 3****FIG. 4**

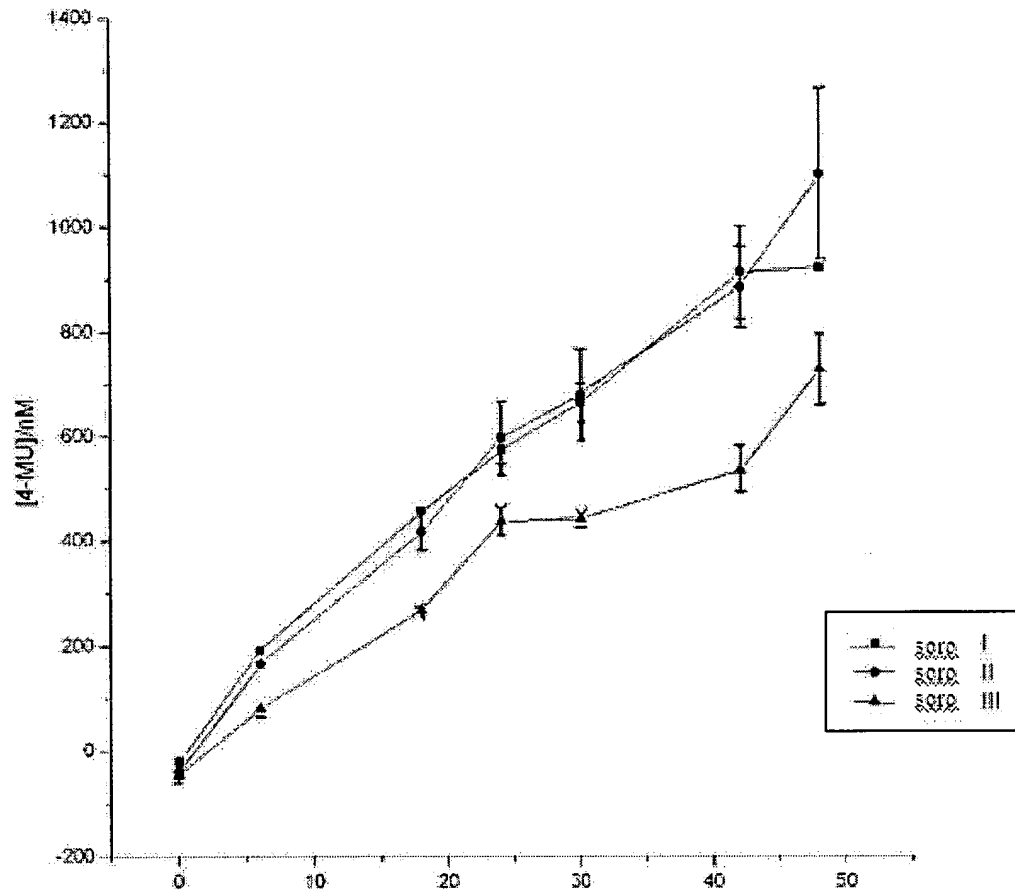


FIG. 5

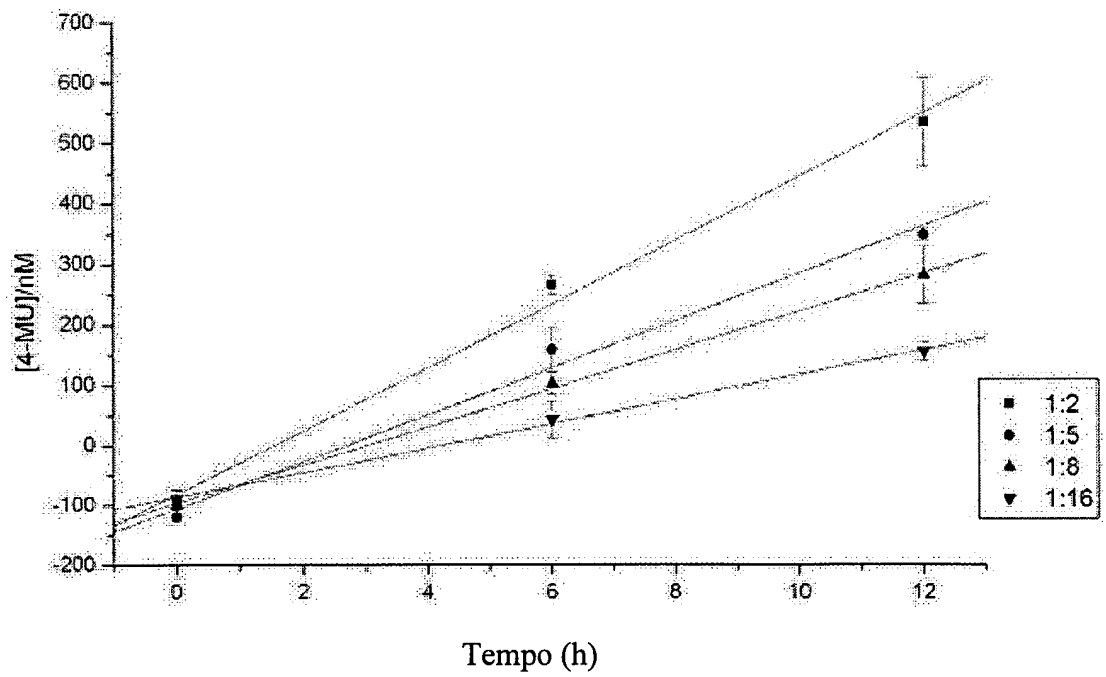
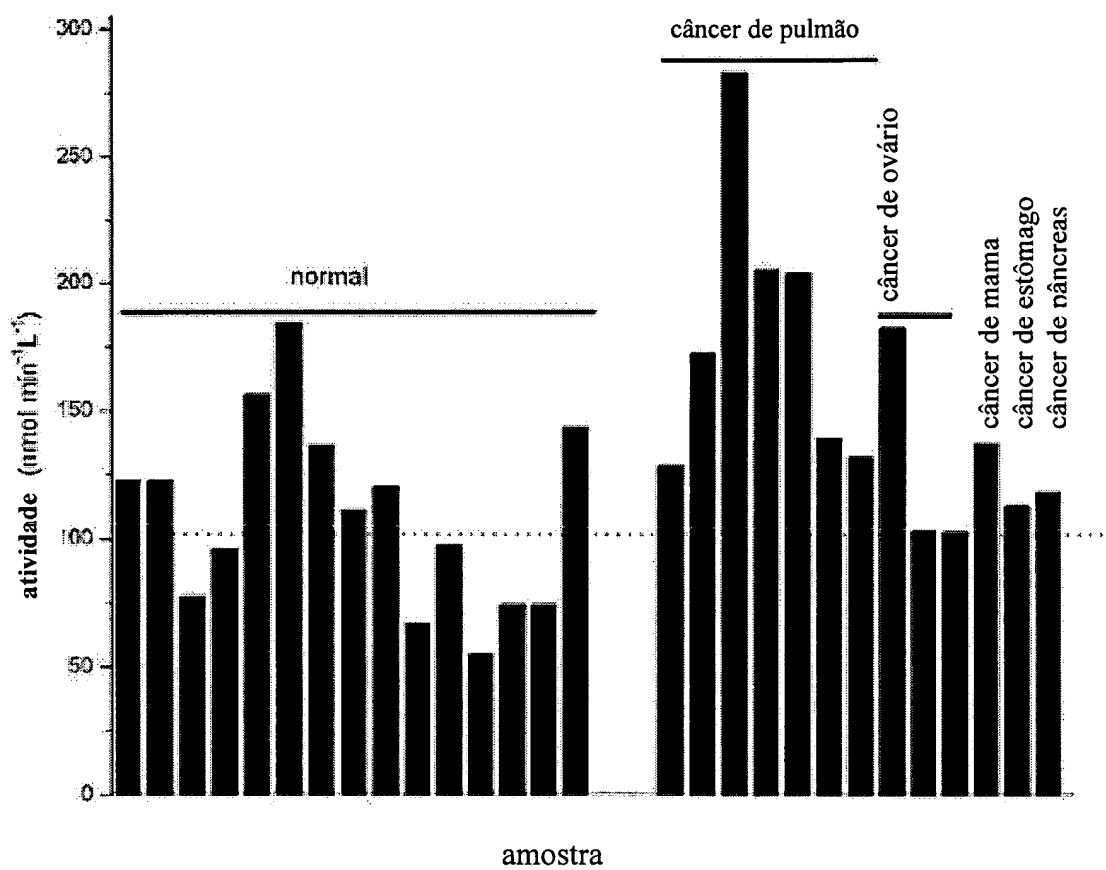


FIG. 6

**FIG. 7**

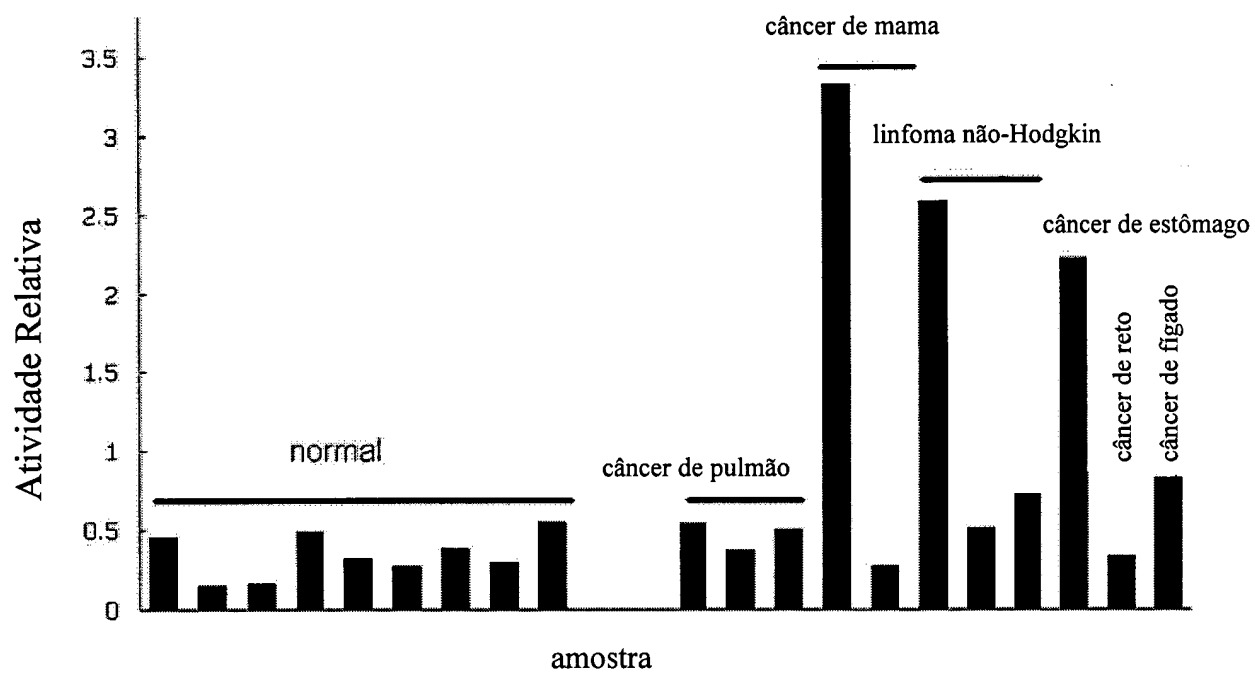


FIG. 8

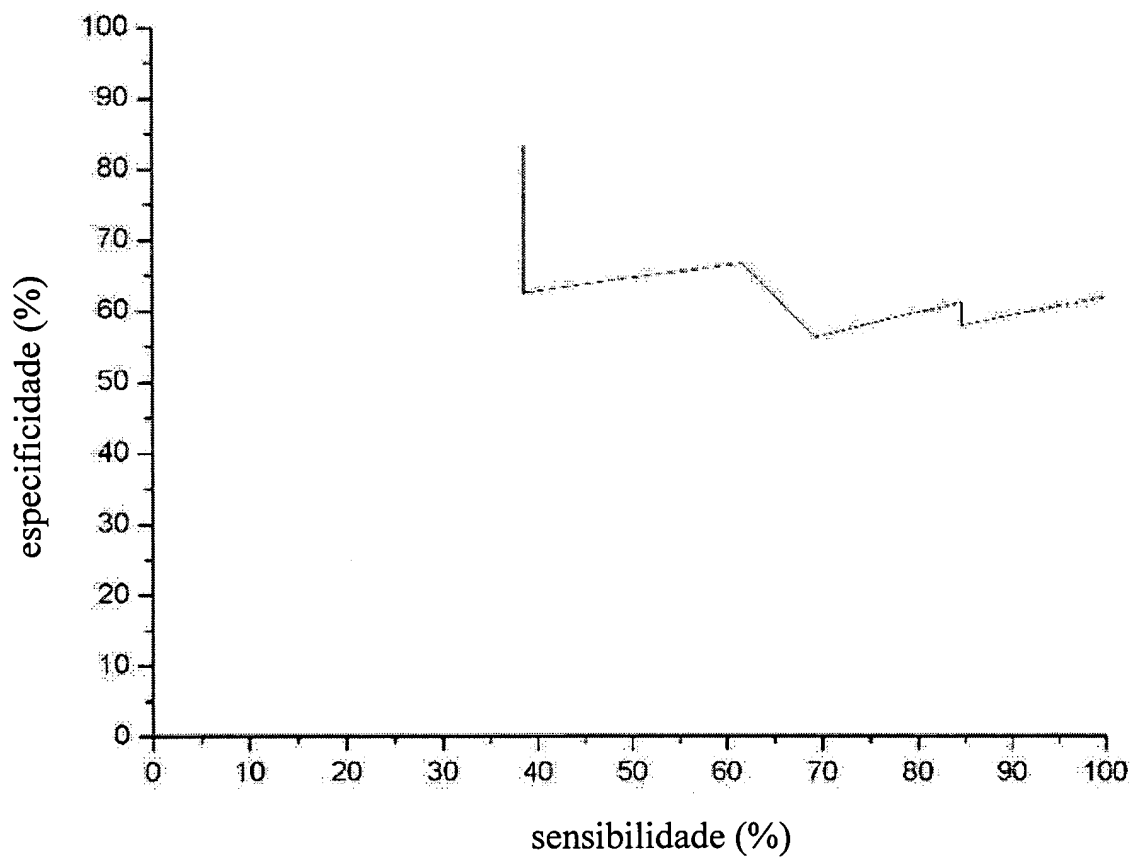


FIG. 9

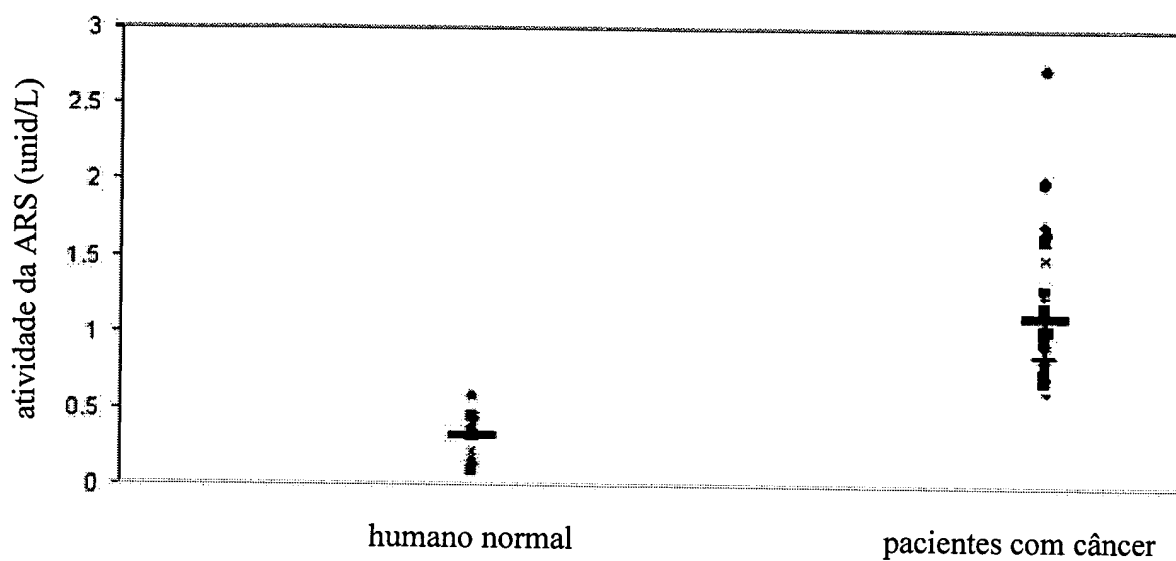


FIG. 10

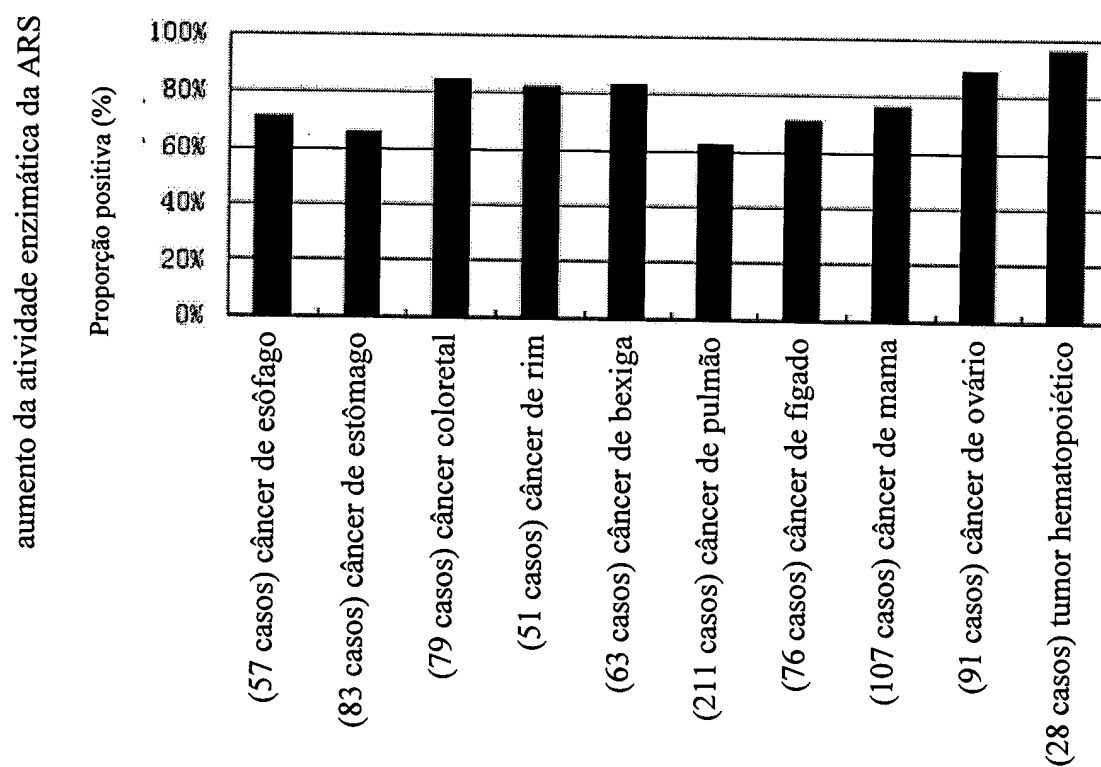
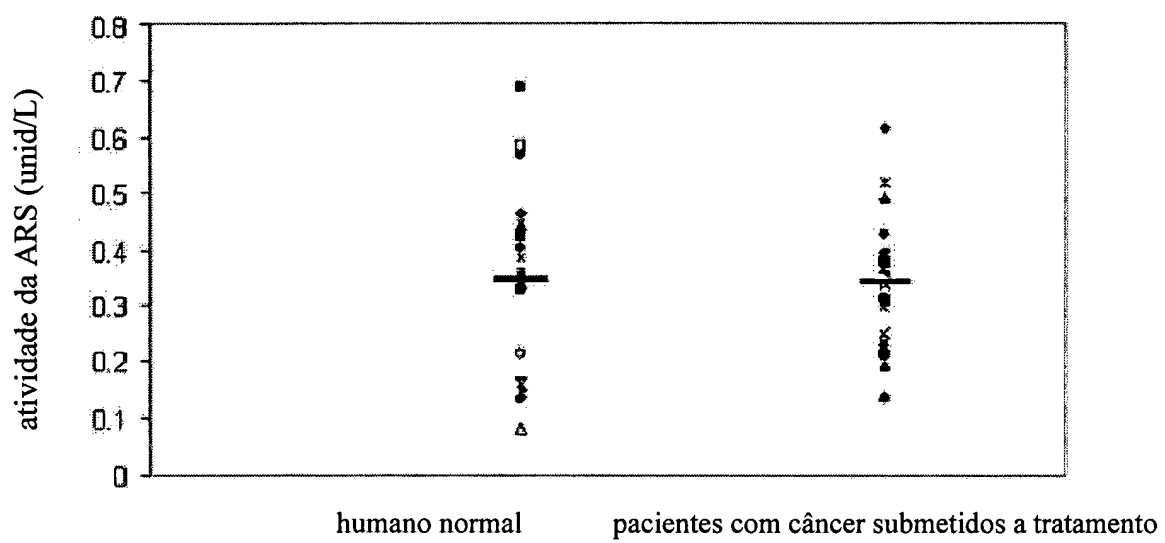


FIG. 11

**FIG. 12**

RESUMO

KIT DE TESTE PARA DETECÇÃO DE CÂNCERES; a presente invenção refere-se a um kit para detectar a
5 atividade da arilsulfatase humana ou de suas isozimas, incluindo 4-MUS e 4-MU. O kit pode ser usado para rastreamento inicial, monitoração do efeito terapêutico e inspeção de recorrência de cânceres humanos.