



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 106461666 B

(45)授权公告日 2020.11.03

(21)申请号 201580008934.2

(22)申请日 2015.02.17

(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 106461666 A

(43)申请公布日 2017.02.22

(30)优先权数据
2014900494 2014.02.17 AU

(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2016.08.17

(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/AU2015/050060 2015.02.17

(87)PCT国际申请的公布数据
W02015/120523 EN 2015.08.20

(73)专利权人 希艾娜癌症诊疗有限公司
地址 澳大利亚维多利亚

(72)发明人 M·拉拉 F·图拉蒂 S·威尔逊

(74)专利代理机构 永新专利商标代理有限公司
72002

代理人 左路 区斌

(51)Int.Cl.
G01N 33/574(2006.01)

(56)对比文件
Maria Aurora Sanchini et al.Urine
Telomerase: An Important Marker in the
Diagnosis of Bladder Cancer.《Neoplasia》
.2004,第6卷(第3期),
Yasushi Hashimoto et al.Detection of
human telomerase reverse transcriptase
(hTERT) expression in tissue and
pancreatic juice from pancreatic cancer.
《Surgery》.2008,第143卷(第1期),

审查员 王在竹

权利要求书1页 说明书28页 附图3页

(54)发明名称
检测癌症的方法

(57)摘要
本公开提供了用于解析获自患者的样品中的临床相关细胞的不确定性细胞学评估的方法,所述方法基于抗体与样品中的临床相关细胞中的端粒酶结合的细胞学检测,其中所述抗体与临床相关细胞的结合表明存在恶性或癌性细胞。

1. 抗端粒酶抗体在制备用于解析膀胱细胞形态学的不确定性细胞学评估的诊断试剂中的用途,其中所述解析通过以下方法进行:使来自样品的细胞与抗端粒酶抗体接触,其中所述样品包含具有不明确性恶性的细胞形态的膀胱上皮细胞,以及检测所述抗体与所述具有不明确性恶性的细胞形态的膀胱上皮细胞的结合,其中所述抗体与所述具有不明确性恶性的细胞形态的膀胱上皮细胞的结合表示恶性膀胱上皮细胞的存在。

2. 抗端粒酶抗体在制备用于通过将来自样品的细胞与抗端粒酶抗体接触来检测恶性膀胱上皮细胞的存在诊断试剂中的用途,其中所述样品包含具有不明确性恶性的细胞形态的膀胱上皮细胞,以及检测所述抗体与所述具有不明确性恶性的细胞形态的膀胱上皮细胞的结合,其中所述抗体与所述具有不明确性恶性的细胞形态的膀胱上皮细胞的结合表示恶性膀胱上皮细胞的存在。

3. 权利要求1或2所述的用途,其中所述抗体与所述具有不明确性恶性的细胞形态的膀胱上皮细胞的结合表示应当进行膀胱镜检查以确认膀胱癌的存在。

4. 权利要求1或2所述的用途,其中检测所述抗体与所述具有不明确性恶性的细胞形态的膀胱上皮细胞的结合是通过自动化免疫分析。

5. 权利要求1或2的用途,其中检测所述抗体与所述具有不明确性恶性的细胞形态的膀胱上皮细胞的结合是通过细胞学检测。

6. 权利要求1或2的用途,其中所述样品是液体样品。

7. 权利要求1或2的用途,其中所述样品选自由以下所组成的组:尿液、膀胱冲洗液、膀胱洗涤液。

8. 权利要求1或2的用途,其中所述样品是尿液。

9. 权利要求1或2的用途,其中所述抗端粒酶抗体是单克隆抗体分子、双特异性抗体分子、嵌合抗体分子、重组抗体分子、抗独特型抗体分子、人源化抗体分子、单链抗体分子或所述抗体分子的抗原结合片段。

10. 权利要求1或2的用途,其中所述抗端粒酶抗体是多克隆抗体。

11. 权利要求1或2的用途,其中所述抗体与所述样品中至少5%的具有不明确性恶性的细胞形态的膀胱上皮细胞的结合表示应当进行膀胱镜检查以确认膀胱癌的存在。

检测癌症的方法

技术领域

[0001] 本公开涉及确定受试者是否患有癌症的方法。更具体来说,本公开涉及一种当细胞形态的细胞学评估无法确定癌症时确定受试者是否患有癌症的方法。

[0002] 发明背景

[0003] 癌症的发展和进展对社会造成显著的情感和经济负担。

[0004] 膀胱癌是人类群体中第二常见的泌尿生殖系统肿瘤,在全世界具有每年约261,000个新增案例的发病率,这些案例中的约三分之一在诊断时很可能是侵袭性或转移性疾病(Parkin等人,1999)。

[0005] 与许多其它癌症一样,膀胱癌的临床诊断是一个困难的过程,特别在癌症发展的早期阶段。目前,膀胱镜检查 and 尿液细胞学检查是膀胱癌诊断与随访中的最重要工具。

[0006] 目前,膀胱镜检查伴活检通常被视为诊断膀胱癌的黄金标准。使用膀胱镜检查的缺点在于其需要侵入性程序。除具有侵入性以外,经由膀胱镜检查获得活检可以对患者具有潜在的不良结果。鉴于这些局限性,经由膀胱镜检查重复地从大量个体获得患者样品是非常困难的。

[0007] 因此,临床医生通常在膀胱镜检查之前依赖于常规细胞学检查以鉴别处于发展膀胱癌的风险下的患者。常规细胞学检查受到两种公认的限制,从而降低了其作为早期癌症的诊断工具的效用。

[0008] 第一,细胞学检查对低级癌症具有不良的灵敏度。因此,常规细胞学检查在完全不存在细胞形态异常的低级癌症样品中会得出高水平的假阴性结果。第二,细胞学检查对于检测低级疾病或难以诊断的病灶的有效性较为有限。例如,当使用细胞学检查诊断膀胱癌时,大部分的案例(20-25%)报道为非典型性,包括“意义不明的非典型性尿道上皮细胞(AUCUS)”和“非典型性尿道上皮细胞,无法排除高级尿道上皮癌(AUHGC)”(Rosenthal等人,2013)。AUCUS和AUHGC的报道结果极少具有或不具有诊断效用。

[0009] 因此,需要一种能够提供更准确的早期且经济上切实可行的癌症诊断的方法。这种方法可以辅助临床医生在可检测形态指标的描述之前实现早期诊断。另外,癌症在侵袭和转移之前的早期诊断通常与改善的预后相关。因此,提供一种可以更可靠地检测早期癌症以便可以在疾病负担轻微时施用抗癌疗法的方法具有社会和经济上的必要性。

[0010] 发明概述

[0011] 本公开可以用来辅助解析癌症的不确定性细胞学评估,且因此可以用作不确定性细胞学评估程序的自反测试。因此,在第一个方面中,本公开提供了一种解析获自患者的样品中的临床相关细胞的不确定性细胞学评估的方法,所述方法包括使来自所述样品的细胞与抗端粒酶抗体接触并进行所述细胞的细胞学评估以检测所述抗体与临床相关细胞的结合,其中所述抗体与临床相关细胞的结合表明存在恶性细胞。

[0012] 本公开的方法可以用来解析获自患者的样品中的临床相关细胞的不确定性细胞学评估。

[0013] 例如,本公开的方法可以包括使具有不确定性细胞学的临床相关细胞的患者样品

与抗端粒酶抗体接触并检测是否存在所述抗体与所述具有不确定性细胞学的临床相关细胞的结合,其中所述抗体与具有不确定性细胞学的临床相关细胞的结合表明存在恶性细胞。

[0014] 在上述方面的一个实施方案中,不存在抗体与临床相关细胞结合表明所述样品中不存在恶性细胞。

[0015] 在另一方面中,本公开涉及一种当细胞形态的细胞学评估无法确定癌症时确定受试者是否患有癌症的方法,所述方法包括:

[0016] i) 使来自所述受试者的细胞样品与抗端粒酶抗体接触;

[0017] ii) 进行所述细胞样品的细胞学评估以检测所述抗体与所述样品中的临床相关细胞的结合;

[0018] 其中所述抗体与所述样品中的一个或多个临床相关细胞的结合表明所述受试者患有癌症。

[0019] 当使用本公开的方法确定癌症时,关于治疗医师将决定疗程所依据的明确诊断,所述确定可以是或可以不是结论性的。如果有必要的话,例如通过显像技术(包括PET、MRI、超声波检查、CT、PET/CT),可以证实或确认经确定患有癌症的受试者的癌症状态的明确诊断。在上述方面的一个实施方案中,当被确定的癌症为膀胱癌时,可以使用经由膀胱镜检查伴活检或上尿路显像的进一步研究来获得癌症状态的明确诊断。

[0020] 本公开还可以用作在单一程序中更准确地确定恶性细胞的存在的前线辅助测试。因此,在其它方面中,本公开提供了一种确定受试者是否患有癌症的方法,所述方法包括:

[0021] i) 对来自所述受试者的细胞样品进行细胞形态的细胞学评估以确定所述样品中的一个或多个临床相关细胞的形态;

[0022] ii) 使来自所述受试者的细胞样品与抗端粒酶抗体接触并进行所述细胞样品的细胞学评估以检测所述抗体与所述样品中的临床相关细胞的结合;

[0023] 其中当细胞形态的细胞学评估无法确定癌症时,所述抗体与一个或多个临床相关细胞的结合表明所述受试者患有癌症。

[0024] 在上述方面的一个实施方案中,所述抗体与所述样品中的至少约5%的临床相关细胞的结合表明所述受试者患有癌症。

[0025] 另外,所述细胞学形态评估和端粒酶检测可以针对相同细胞以任何顺序进行或同时进行。

[0026] 在一个实施方案中,抗端粒酶抗体与具有非典型性细胞学的细胞的结合表明所述受试者患有癌症。例如,当检测到所述抗体与具有非典型性或不明确性细胞学的细胞的结合时,本公开的方法将受试者鉴别为患有恶性癌症。

[0027] 在一个实施方案中,不存在抗端粒酶抗体与临床相关细胞结合表明样品中的细胞不是恶性的。例如,当未检测到抗体与临床相关细胞结合时,本公开的方法鉴别出受试者不患有恶性癌症。

[0028] 在另一个实施方案中,本公开的方法包括当检测到所述抗体与具有非典型性或不明确性细胞学的细胞的结合时,指导受试者治疗恶性癌症。

[0029] 如所属领域中的技术人员所理解,细胞学评估涉及个别细胞的评估。因此,在进行本方法中,评估所述个别细胞的细胞学以检测抗端粒酶抗体与临床相关细胞的结合。端粒

酶的细胞学评估允许端粒酶染色的已知为非癌性的细胞类型被排除在基于其形态的评估之外。例如，本公开的方法包括从细胞学评估中排除非临床相关细胞。

[0030] 被排除的细胞视为与确定受试者是否患有癌症没有临床相关性。被排除的细胞将取决于被检测的癌症。更明确来说，技术人员将知道样品中与特定癌症有关的细胞类型。被排除的细胞的实例包括(但不一定限于) T细胞、B细胞、嗜中性粒细胞、巨噬细胞、粒细胞、树突细胞、肥大细胞、记忆细胞、浆细胞、嗜酸性粒细胞、肾小管细胞、精囊细胞、精子和鳞状细胞中的一个或多个或全部。例如，当使用本公开的方法评估膀胱癌时，上述所列的细胞将被排除。

[0031] 所述样品可以为已知可能包括恶性细胞的任何适宜类型。适宜样品的实例包括(但不一定限于) 活检材料、切除材料、尿液、膀胱冲洗液、膀胱洗涤液、血液、痰、脑脊液、胸腔积液、腹部腹水、肝、甲状腺、卵巢、淋巴结、乳房、子宫颈、肺、胆道系统、胰腺、肺和结肠。在一个实施方案中，所述样品为流体样品。

[0032] 在一个实施方案中，所述癌症为膀胱癌且所述样品为尿液、膀胱冲洗液或膀胱洗涤液。

[0033] 所述抗体可具有各种不同形式例如(但不限于) 单克隆、多克隆、双特异性、嵌合、重组、抗独特型、人源化、单链抗体分子或其抗原结合片段。

[0034] 适用于本公开的抗体的实例包括(但不限于) SCD-A7、2D8、C-12、H-231、抗端粒酶催化亚基、10E9-2、2C4和tel 336-10。在一个实施方案中，所述抗体为SCD-A7或其端粒酶结合片段。

[0035] 所述癌症可以为其中可以存在临床相关细胞的任何癌症，临床相关细胞的存在可以导致所述癌症的不确定性细胞学评估。例如，所述癌症可以为上皮癌。癌症的其它实例包括(但不一定限于) 膀胱癌、胰腺癌、肝癌、胆囊癌、甲状腺癌、乳腺癌、肺癌、间皮瘤、宫颈癌、卵巢癌、肾癌、淋巴瘤和结肠直肠癌。在一个实施方案中，所述癌症为膀胱癌。

[0036] 在另一个方面，本公开提供了一种解析获自患者的尿液样品中的膀胱上皮细胞的不确定性细胞学评估的方法，所述方法包括使所述样品中的上皮细胞与抗端粒酶抗体接触并进行所述上皮细胞的细胞学评估以检测所述抗体与所述上皮细胞的结合，其中所述抗体与所述上皮细胞的结合表明存在恶性细胞。

[0037] 在另一个方面中，本公开提供了一种当膀胱上皮细胞形态的细胞学评估无法确定膀胱癌时确定受试者是否患有膀胱癌的方法，所述方法包括：

[0038] i) 使来自所述受试者的膀胱上皮细胞样品与抗端粒酶抗体接触；

[0039] ii) 进行所述膀胱上皮细胞的细胞学评估以检测所述抗体与所述膀胱上皮细胞的结合；

[0040] 其中所述抗体与所述样品中的一个或多个膀胱上皮细胞的结合表明所述受试者患有癌症。

[0041] 在另一个方面中，本公开提供了一种确定受试者是否患有膀胱癌的方法，所述方法包括：

[0042] i) 对来自所述受试者的膀胱上皮细胞样品进行细胞形态的细胞学评估以确定所述样品中的一个或多个膀胱上皮细胞的形态；

[0043] ii) 使来自所述受试者的膀胱上皮细胞样品与抗端粒酶抗体接触并进行所述膀胱

上皮细胞的细胞学评估以检测所述抗体与所述膀胱上皮细胞的结合；

[0044] 其中当细胞形态的细胞学评估无法确定膀胱癌时，所述抗体与一个或多个膀胱上皮细胞的结合表明所述受试者患有癌症。

[0045] 在另一个方面中，本公开提供了一种解析获自患者的尿液样品中的膀胱上皮细胞的不确定性细胞学评估的方法，所述方法包括使包含具有不确定性细胞学的膀胱上皮细胞的患者样品与抗端粒酶抗体接触并检测是否存在所述抗体与具有不确定性细胞学的膀胱上皮细胞的结合，其中所述抗体与具有不确定性细胞学的膀胱上皮细胞的结合表面存在恶性细胞。

[0046] 在一个实施方案中，所述膀胱上皮细胞为膀胱尿道上皮细胞。

[0047] 本公开不限于文中所述的具体实施方案的范围，文中所述的具体实施方案仅意欲用于例证的目的。功能等效产物、组合物和方法明确位于文中所述的本公开的范围。

[0048] 在本说明书通篇中，除非另有明确规定或上下文另有要求，否则单个步骤、物质成分、步骤组、物质成分组的提及应视为涵盖这些步骤、物质成分、步骤组或物质成分组中的一个和多个（即一个或多个）。

[0049] 本公开在下文中通过以下非限制性实例并参考附图来描述。

[0050] 附图简述

[0051] 图1：在样品WH11-107中未观察到细胞染色（临床阴性；图1A）。利用抗hTERT（克隆2C4）抗体的临床阳性样品WH11-122中显示端粒酶免疫染色和其临床相关性的第一证据（图1B）。在最佳抗体浓度下，在40-75%的存在的尿道上皮细胞中观察到阳性细胞核染色。

[0052] 图2：在高级（图A和图B）和低级（图C和图D）临床样品中观察到的阳性和阴性细胞类型。非典型性尿道上皮细胞的细胞核通过端粒酶免疫染色呈阳性（图A和图B）。细胞学上外观正常的尿道上皮细胞的细胞核通过端粒酶免疫染色呈阳性（图C），且在相同样品内，细胞学上外观正常的尿道上皮细胞未染色（图D，嵌入箭头）。

[0053] 图3：来自患有低级（G1）膀胱癌的患者临床样品的因端粒酶hTERT蛋白而染色的细胞。图A：鳞状细胞（不是来自膀胱）；图B：正常膀胱细胞（和小型棕色血细胞）；图C：对于Sienna测试呈阳性的外观正常的膀胱细胞；图D：对于端粒酶免疫染色呈阳性的细胞学上异常的膀胱细胞。

[0054] 发明详述

[0055] 一般技术和定义

[0056] 除非另有明确定义，否则文中所用的所有技术和科学术语应具有所属领域（例如，细胞培养、分子遗传学、癌症诊断、免疫学、免疫组织化学、蛋白质化学和生物化学）中一般技术人员通常所理解的含义。

[0057] 除非另有指定，否则本公开中所利用的免疫分析、样品制备和免疫学技术为所属领域中的技术人员所熟知的标准程序。此类技术在以下来源的文献通篇中描述和解释：例如J.Perbal, A Practical Guide to Molecular Cloning, John Wiley and Sons (1984), J.Sambrook等人, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbour Laboratory Press (1989), T.A.Brown (编), Essential Molecular Biology: A Practical Approach, 第1和2卷, IRL Press (1991), D.M.Glover和B.D.Hames (编), DNA Cloning: A Practical Approach, 第1-4卷, IRL Press (1995和1996), 和F.M.Ausubel等人 (编),

Current Protocols in Molecular Biology, Greene Pub. Associates and Wiley-Interscience (1988, 包括所有的更新, 直到现在), Ed Harlow and David Lane (编) Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbour Laboratory, (1988), 和 J.E. Coligan 等人 (编) Current Protocols in Immunology, John Wiley & Sons (包括所有的更新, 直到现在)。

[0058] 术语“和/或”例如“X和/或Y”应理解为意指“X和Y”或“X或Y”且应被理解为提供两种含义或任一种含义的明确支持。

[0059] 如文中所使用, 除非有相反规定, 否则术语“约”指指定值的 $\pm 10\%$, 更优选地 $\pm 5\%$, 更优选地 $\pm 1\%$, 更优选地 $\pm 0.5\%$ 。

[0060] 在本说明书通篇中, 词“包含 (comprise)”或变型 (例如包含 (comprises) 或包含 (comprising)) 将被理解为意味包含规定元素、整数或步骤、或元素组、整数组或步骤组, 但不排除任何其它元素、整数或步骤、或元素组、整数组或步骤组。

[0061] 细胞学评估

[0062] 在癌症诊断中细胞形态的“细胞学评估”试图基于形态特征来鉴别恶性细胞。细胞形态的细胞学评估是护理标准的一部分且与其它研究一起或作为其它研究的反馈来用于癌症的复发检测或诊断的程序。其本质上不是一种测试, 而是一种基于特定样品或样品组的病理鉴定。所述评估程序是复杂的且在样品收集中需要专业知识和护理以提供正确评估。在膀胱癌的情况下, 细胞学评估可以和膀胱镜检查一起或作为膀胱镜检查的反馈来用于膀胱癌的复发检测或诊断。

[0063] 在进行细胞形态的细胞学评估中, 通常将细胞样品固定在载玻片上并在显微镜下观察以视觉评估形态和细胞特征。例如, 可以从尿液样品中获得膀胱尿道上皮细胞, 固定在载玻片上, 然后视觉评估。

[0064] 在视觉评估载玻片之前, 可以对样品染色以辅助视觉观察细胞和细胞组分 (例如, 细胞核) 的形态变化。这些染色可以包括苏木精和伊红染色或巴氏染色 (Papanicolaou stain; Pap stain)。

[0065] 有史以来, 细胞学的表现针对高级癌症被描述为是极佳的, 但最近的研究已对此观点提出了挑战。另一方面, 迄今为止大多数研究大致上同意细胞学在低级癌症中的低灵敏度。因此, 细胞学评估通常可以为不确定性且未实现其辅助癌症诊断的预期目标。另外, 鉴于细胞学评估的低灵敏度, 阴性或不确定性细胞学结果不排除存在癌症 (尤其是低级癌症)。

[0066] 细胞形态的不确定性细胞学评估

[0067] 如文中所使用, “细胞形态的不确定性细胞学评估”是对于癌症不确定且因此不能为实现癌症诊断提供信息。更具体来说, “细胞形态的不确定性细胞学评估”指鉴别已失去正常外观但尚未达到恶性细胞的异常水平的细胞的评估。

[0068] 已失去其正常外观但尚未达到恶性细胞的异常水平的细胞在所属领域中常被称作具有非典型性或不明确性细胞学的细胞。因此, 在本方法的情况下, “细胞形态的不确定性细胞学评估”是一种揭示从受试者获得的样品中的一个或多个临床相关细胞具有非典型性或不明确性细胞学的评估。

[0069] 术语“非典型性细胞学”或“不明确性细胞学”可以互换使用以指示不确定性细胞

学评估。在本公开的情况下,具有“非典型性细胞学”的细胞已失去其正常外观但尚未达到恶性细胞的异常水平。

[0070] 所属领域中的技术人员将理解指示此类细胞学的各种形态线索。细胞学上的非典型性称呼由所属领域的技术人员来确定且表明其等认为形态线索不足以被充分定义以便允许通过细胞学定义明确称呼为阳性或阴性。这些情况中的称呼取决于实验室或专家而有所不同,且可以包括例如“非典型性”或“非典型性细胞学”、“异型性(atypia)”、“不明确性”或“不明确性细胞学”、“不确定性”或“不确定性细胞学”、“模棱两可”或“未知”。此类称呼为不确定性细胞学评估。

[0071] 非典型性细胞学特征的实例提供于下文中。“非典型性”或“异型性”为细胞形态异常的病理学术语。细胞水平的形态变化可与异型性相关且因此“非典型性细胞学”可以包括密集染色的细胞核、多形性细胞核、核质比改变、异常有丝分裂、频繁有丝分裂、基底上层有丝分裂(supra-basal mitosis)、去分化、细胞粘附性丧失、细胞极性丧失、细胞凋亡。

[0072] 在癌症(例如,甲状腺癌、乳腺癌或膀胱癌)的细胞学评估中,不确定性细胞学评估可以报道为“非典型性细胞学”。

[0073] 例如,具有适量胶质和中等细胞性和/或成群地存在显示明显拥挤和重叠的滤泡细胞的甲状腺样品可能难以归类为良性或恶性且因此通常报道为“不明确性”。

[0074] 对于许多癌症,与“非典型性细胞学”相关的细胞特征可以取决于细胞学家和其临床实践。这可以导致“非典型性细胞学”被分成各种分类。

[0075] 例如,甲状腺癌中与“非典型性细胞学”相关的各种分类例示于表1中。

[0076] 在膀胱癌中,“非典型性细胞学”可以被分成低级异型性或高级异型性。膀胱癌中与低级异型性相关的组织学特征包括具有低恶性潜能的乳头状瘤、乳头状增生和乳头状尿道上皮肿瘤。膀胱癌中与高级异型性相关的组织学特征包括低于原位癌但具有明显的局灶性细胞学异型性和无组织性结构的异型性。另外指示高级尿道上皮癌的定义为非典型性的组织学特征可以包括个别异常细胞、浓染细胞核、不规则核边界、核质比增加、核大小变异相当大(anisonucleosis)、细长核和细胞群集。

[0077] 表1-甲状腺癌中与“非典型性细胞学”相关的示例性特征。

[0078]

细胞学分类	特征
存在非典型性细胞	大部分为良性细胞但包括具有不可能为恶性的非典型性外观的少部分细胞。
意义不明的异型性	抽吸物中含有显著量的微滤泡，其不以其它方式符合“滤泡性肿瘤/疑似为滤泡性肿瘤”的标准。
	中等或显著细胞样品中可以出现比普通量更明显的微滤泡(且在少数涂片上可为明显不成比例的)，但微滤泡的整体比例不足以诊断滤泡性肿瘤/疑似为滤泡性肿瘤。
	具有微量胶质的稀疏细胞抽吸物中主要为 Hürthle 细胞
	滤泡细胞异型性的解释受样品制备加工品的影响。
	中等或显著细胞样品由几乎仅 Hürthle 细胞群构成，然而临床环境表明为良性 Hürthle 细胞结节。
存在显示为乳头状癌的局灶性特征，包括核沟、核增大伴暗淡染色质，以及原本主要为良性外观的样品中核轮廓和形状的改变。	

[0079]		由于核沟、明显的核仁、细长核和细胞质的存在而可以出现非典型性的胞囊内衬细胞(cyst-lining cell), 和/或在原本主要为良性外观的样品中存在核内细胞质内含物。
		少量滤泡细胞显示核增大, 通常伴有明显的核仁。
		存在非典型性淋巴浸润(其中需要重复抽吸以进行流式细胞仪), 但异型性程度未达到一般类别“疑似为恶性”。
	滤泡性肿瘤 /疑似为滤泡性肿瘤	样品含有具有与良性滤泡结节有所区别的细胞形态学特征的细胞。
		异常细胞结构: 滤泡细胞主要呈微滤泡或梁状排列方式排列。
		细胞拥挤和重叠, 比正常滤泡细胞大。
		大多数滤泡细胞呈异常结构成群方式排列。
	疑似为恶性	样品含有一些保存较差的恶性外观细胞, 或细胞过少以致于无法作出肯定性诊断, 或被炎症、血液或细胞碎片所遮蔽
		所述样品是适当的且存在一些恶性特征, 但其缺乏明显的恶性细胞
		尽管存在一些恶性外观细胞(例如, 空洞性 TB 或支气管扩张、病毒性细胞病理效应、和化学疗法或放射疗法效应), 但临床历史提示需谨慎
	涂片背景表明肿瘤坏死, 然而保存完好的恶性细胞未被鉴别出	
	恶性的细胞学标准与良性病灶重叠	

[0080] 表1中所述的所有类别可以描述为对于癌症非典型性和不明确的且因此对实现癌症诊断不提供信息。在本公开的情况中, 这些类别为“细胞形态的不确定性细胞学评估”。

[0081] 解析细胞形态的不确定性细胞学评估

[0082] 如文中所使用, 术语“解析”指解析不确定性细胞学评估以确定样品的临床状态。以前, 难以解析细胞形态的不确定性细胞学评估以鉴别恶性细胞和确定受试者是否患有癌症。例如, 领先的泌尿病理学实验室通常报道所有尿液细胞学中的20-25%为不确定性。然而, 此数据可以在10至40%之间变化 (Raab等人2007; Zaak等人, 2001; Schneeweiss等人, 1999)。细胞学的用途和准确性是常规实践中诊断和后续管理膀胱癌患者的基础。因此, 解析“不确定性”细胞学评估以确定临床状态将在所有案例的多达40%中极具价值。

[0083] 现已发现可以使用端粒酶免疫染色测试和进一步细胞学评估以检测抗端粒酶抗体与临床相关细胞的结合来解析基于形态的不确定性细胞学评估以确定临床状态。

[0084] 此方法的优点在于可以在个别临床相关细胞中检测抗端粒酶抗体的结合。例如, 可以在从尿液样品中获得的个别膀胱尿道上皮细胞中检测抗端粒酶抗体的结合。

[0085] 具体来说,本发明人已发现抗端粒酶抗体与受试者样品中的一个或多个临床相关细胞的结合表明所述受试者患有癌症。如所属领域中的技术人员将理解,癌症的指征还表明样品中存在恶性细胞。在进行本方法中,端粒酶可以存在于一个以上的临床相关细胞中且表明受试者患有癌症。在各种实施方案中,抗端粒酶抗体与受试者样品中细胞学评估的至少约1、至少约2、至少约3、至少约4、至少约5、至少约6、至少约7、至少约8、至少约9、至少约10、至少约11、至少约12、至少约13、至少约14、至少约15、至少约20、至少约30、至少约40、至少约50、至少约60、至少约70、至少约80、至少约90、至少约100、至少约200个临床相关细胞的结合表明所述受试者患有癌症。相反,不存在抗端粒酶抗体与临床相关细胞结合表明所述样品中不存在恶性细胞。

[0086] 更具体来说,本发明人已发现抗端粒酶抗体与来自受试者的具有“非典型性”细胞学的样品中的一个或多个临床相关细胞的结合表明所述受试者患有癌症。在各种实施方案中,抗端粒酶抗体与受试者样品中的具有“非典型性”细胞学的至少约1、至少约2、至少约3、至少约4、至少约5、至少约6、至少约7、至少约8、至少约9、至少约10、至少约11、至少约12、至少约13、至少约14、至少约15、至少约20、至少约30、至少约40、至少约50、至少约60、至少约70、至少约80、至少约90、至少约100、至少约200个临床相关细胞的结合表明所述受试者患有癌症。相反,不存在抗端粒酶抗体与具有“非典型性”细胞学的临床相关细胞结合表明所述样品中不存在恶性细胞。

[0087] 另外,端粒酶可以存在于经细胞学评估的临床相关细胞的总量的百分比中且表明受试者患有癌症。在各种实施方案中,抗端粒酶抗体与受试者样品中经细胞学评估的临床相关细胞的至少约1%、至少约2%、至少约3%、至少约4%、至少约5%、至少约6%、至少约7%、至少约8%、至少约9%、至少约10%、至少约11%、至少约12%、至少约13%、至少约14%、至少约15%、至少约20%、至少约30%、至少约40%、至少约50%、至少约60%、至少约70%、至少约80%、至少约90%的结合表明所述受试者患有癌症。

[0088] 在一个实例中,抗端粒酶抗体与受试者样品中经细胞学评估的临床相关细胞的至少约5%的结合表明所述受试者患有癌症。为避免疑问,设想抗端粒酶抗体与每20个临床相关细胞中的一个细胞的结合表明所述受试者患有癌症。

[0089] 在各种实施方案中,抗端粒酶抗体与受试者样品中具有“非典型性”细胞学的临床相关细胞的至少约1%、至少约2%、至少约3%、至少约4%、至少约5%、至少约6%、至少约7%、至少约8%、至少约9%、至少约10%、至少约11%、至少约12%、至少约13%、至少约14%、至少约15%、至少约20%、至少约30%、至少约40%、至少约50%、至少约60%、至少约70%、至少约80%、至少约90%的结合表明所述受试者患有癌症。

[0090] 再次强调,为避免疑问,设想抗端粒酶抗体与每20个临床相关细胞的一个具有“非典型性”细胞学的细胞的结合表明所述受试者患有癌症。

[0091] 在一个实例中,抗端粒酶抗体与受试者样品中经细胞学评估的具有非典型性细胞学的临床相关细胞的至少约5%的结合表明所述受试者患有癌症。

[0092] 相反,不存在抗端粒酶抗体与临床相关细胞结合表明所述样品中的细胞不是恶性的。

[0093] 在一些实施方案中,灵敏度和/或特异性是针对癌症的临床诊断来测量。

[0094] 在各种实施方案中,通过当前要求保护的用于预测或确定受试者是否患有癌症的

方法所实现的灵敏度为至少约50%、至少约60%、至少约70%、至少约71%、至少约72%、至少约73%、至少约74%、至少约75%、至少约76%、至少约77%、至少约78%、至少约79%、至少约80%、至少约81%、至少约82%、至少约83%、至少约84%、至少约85%、至少约86%、至少约87%、至少约88%、至少约89%、至少约90%、至少约91%、至少约92%、至少约93%、至少约94%、至少约95%。

[0095] 在各种实施方案中,通过当前要求保护的用于预测或确定受试者是否患有癌症的方法所实现的特异性为至少约50%、至少约60%、至少约70%、至少约71%、至少约72%、至少约73%、至少约74%、至少约75%、至少约76%、至少约77%、至少约78%、至少约79%、至少约80%、至少约81%、至少约82%、至少约83%、至少约84%、至少约85%、至少约86%、至少约87%、至少约88%、至少约89%、至少约90%、至少约91%、至少约92%、至少约93%、至少约94%、至少约95%。

[0096] 检测抗端粒酶抗体结合

[0097] 端粒酶是一种天然存在的酶,其维持位于染色体末端的端粒的长度。在人类中,端粒酶在人干细胞、种系细胞和恶性细胞中过表达。端粒酶的功能是在每个染色体的末端合成新的单链TTAGGG重复。在正常细胞中,端粒酶通过允许细胞繁殖起着保护作用,从而防止端粒缩短并避免细胞衰老(Bodnar等人,1998)。相反,尽管有相同的作用方式,但端粒酶还可以在恶性的或可能变成恶性的细胞中表现出促癌性质。在没有衰老的情况下,细胞(肿瘤)无限地复制,从而引入和传播突变(Blackburn等人,2005)。端粒酶的这种促癌性质有助于细胞的永生性和癌症的发展。它与癌症的关联是明显的,因为它的存在是在几乎所有的肿瘤细胞中观察到的共同特征。

[0098] 本公开的目的是通过检测端粒酶是否存在于样品中来解析细胞形态的不确定性细胞学评估。为了检测端粒酶,使来自受试者的细胞样品与结合端粒酶的抗体(也被称为抗端粒酶抗体)接触。应该认为,术语如“接触”、“暴露”或“施加”是可以在本公开中的上下文中可互换地使用的术语。术语接触要求使抗端粒酶抗体与细胞样品接触,以检测端粒酶是否存在于样品的一个或多个细胞中。抗体与端粒酶的结合表明端粒酶存在于细胞中。此外,样品中存在端粒酶也可以被称为端粒酶阳性或对于端粒酶而言是阳性的。抗体与端粒酶的结合是经由细胞学评估来检测。例如,可以使用光学显微镜来检测抗体与临床相关细胞中的端粒酶的结合。

[0099] 在本公开的方法中检测抗端粒酶抗体与临床相关细胞的结合可以通过本领域中已知的任何抗体/抗原结合检测技术(其中抗体与临床相关细胞中的抗原的结合可以经由细胞学评估来检测)来实现。例如,可以使用并入抗端粒酶抗体的免疫分析。在这个实例中,细胞学被用来检测抗端粒酶抗体与端粒酶的结合。在本公开的方法中,端粒酶是“抗原”。还设想到可以将端粒酶检测方法并入自动化端粒酶检测系统中。这样的自动化免疫分析系统将提供样品的自动化处理和端粒酶的细胞学检测。预期这种系统将允许样品中端粒酶的高通量分析。

[0100] 免疫分析

[0101] 对于常规临床评估而言,预期基于免疫分析形式的方法将被用于检测样品中端粒酶的存在。在本公开的上下文中,免疫分析是通过使用抗体或免疫球蛋白测量溶液中抗原的存在或浓度的生化试验。

[0102] 在本公开中使用的抗体可以是能够检测端粒酶是否存在于样品的一个或多个细胞中的任何抗体。可以检测端粒酶是否存在于细胞中的各种市售抗体可用于本公开的方法中。此类抗体可以从Sapphire Biosciences、Life Span Biosciences、Novus Biologicals、Australian Biosearch、Epitomics、Santa Cruz、EMD Millipore、GenWay Biotech Inc、Jomar Biosciences、Sigma-Aldrich、BioCore Pty Ltd、US Biologicals、Thermo Scientific、Life Research、Resolving Images、Leica microsystems 和Sienna Cancer Diagnostics Ltd获得。在一个实例中,抗体结合端粒酶复合物(包括人端粒酶逆转录酶、端粒酶RNA (TR或TERC) 和角化不良蛋白 (DKC1) 中的每个) 和/或端粒酶逆转录酶酶 (hTERT)。优选地,抗体是抗hTERT抗体。最优选地,结合端粒酶的抗体是SCD-A7、2D8、C-12、H-231、抗端粒酶催化亚基、10E9-2、2C4和tel 336-10。

[0103] 这些抗体是本领域中已知的。例如,抗hTERT (tel 3) 抗体是从杂交瘤克隆36-10产生的单克隆抗体。为了纯化抗体,通过蛋白G亲和色谱法纯化腹水的IgG部分。抗hTERT (克隆SCD-A7) 抗体是从在中空纤维培养物中生长的杂交瘤克隆HJ123-2C4 (Masutomi等人,2003) 产生的IgM mAb。在制备该抗体的过程中,使用从被杆状病毒载体感染的昆虫细胞纯化的氨基末端FLAG表位标记的hTERT作为免疫原,以刺激抗hTERT克隆SCD-A7mAb的产生。

[0104] 抗hTERT (克隆2C4) 抗体描述于 (Masutomi等人,2003) 中。在制备该抗体的过程中,使用从被杆状病毒载体感染的昆虫细胞纯化的氨基末端FLAG表位标记的hTERT作为免疫原,以刺激抗hTERT克隆2C4mAb的产生。2C4是从在中空纤维培养物中生长的杂交瘤克隆HJ123-2C4产生的IgM mAb。

[0105] 在本公开的方法中使用的抗体还可以是市售的,诸如2D8 (Novus NB 100-297)、C-12 (Santa Cruz 377511)、H-231 (Santa Cruz 7212)、抗端粒酶催化亚基 (Rockland 600-401-252)、10E9-2 (MBL M216-3)、2C4 (Novus NB100-317)、SCD-A7 (Sienna Cancer Diagnostics P/N 01-5001)。

[0106] 在一个实例中,本公开的抗体被可检测地标记。可检测标记的实例包括用于分析、追踪或成像的染料、荧光团或其它报道分子的缀合物。

[0107] 在本公开中使用的抗体不限于由IgM代表的单价抗体和多价抗体,还包括由IgG代表的二价抗体,只要它们结合端粒酶即可。

[0108] 另外,在本公开中使用的抗体不限于整个抗体分子,而是包括微抗体、双抗体和其改性产物,只要它们结合端粒酶即可。

[0109] 微抗体包含缺乏全抗体 (例如全长IgG) 的一部分的抗体片段,并且没有特别的限制,只要其具有端粒酶结合能力即可。除了端粒酶结合能力以外,对本公开的抗体片段没有特别的限制,只要它们是全抗体的部分,但它们优选含有重链可变区 (VH) 和/或轻链可变区 (VL)。此外,只要它具有端粒酶抗原结合能力,VH和/或VL的部分可以缺失。可变区可以是嵌合的或人源化的。抗体片段的具体实例包括Fab、Fab'、F(ab')₂和Fv。微抗体的具体实例包括Fab、Fab'、F(ab')₂、Fv、scFv (单链Fv)、双抗体和sc(Fv)₂ (单链(Fv)₂)。这些抗体的多聚体 (例如,二聚体、三聚体、四聚体和聚合物) 也包括在可用于检测端粒酶的微抗体中。

[0110] 双抗体是由两个多肽链构成的二聚体,并且通常,所述多肽链个别地由例如五个残基左右的接头连接,所述接头足够短,从而防止在相同链中的VL和VH之间的结合。由相同的多肽链编码的VL和VH具有在它们之间的短接头,并且形成二聚体,因为它们不能形成单

链可变区片段。因此，双抗体具有两个抗原结合位点。

[0111] 优选地，结合端粒酶的抗体是单克隆抗体、多克隆抗体、双特异性抗体、嵌合抗体、重组抗体、抗独特型抗体、人源化抗体、单链抗体分子或其抗原结合片段。

[0112] 在根据本公开的优选实施方案中，用于检测端粒酶的方法使用端粒酶特异性的一级抗体。一级抗体与端粒酶的结合可以通过各种已知的方法进行视觉观察。例如，可以使用识别该一级抗体的标记的二级抗体。在这个实例中，标记可以是酶如辣根过氧化物酶、放射性同位素、荧光报道分子、电化学发光标记。标记的二级抗体与一级抗体的结合将通过细胞学评估来检测。

[0113] 在一个特定实例中，使样品与端粒酶特异性初级抗hTERT抗体接触。然后洗涤样品以除去任何未结合的一级抗体，接着将对一级抗体有特异性并连接过氧化物酶的二级抗体施加到样品中。然后洗涤样品以除去任何未结合的二级抗体并将3,3'-二氨基联苯胺(DAB)施加到样品中。通过常规细胞学评估视觉观察DAB向有色产物的转化，其中有色产物的存在表明样品中存在端粒酶。

[0114] 癌症类型

[0115] 在要求保护的方法中，癌症可以是任何癌症，只要受试者的癌细胞表达端粒酶即可。优选地，癌症是膀胱癌、胰腺癌、肝癌、胆囊癌、甲状腺癌、乳腺癌、肺癌、间皮瘤、宫颈癌、卵巢癌、肾癌、结肠直肠癌、淋巴瘤。最优选地，癌症是膀胱癌。

[0116] 本领域技术人员应该理解，每个癌症类型具有与癌症等级相关的各种特性。这些等级通常由癌症扩散或侵袭到周围组织中的水平来决定。例如，癌症的晚期等级或“高等级”通常与更高的转移可能性和较差的预后相关联。高级癌症通常已经从起源组织或器官扩散到周围组织或整个身体。相反地，“低级”癌症可以被表征为原位癌(CIS)，这意指细胞在异常增殖，但仍然包含在起源组织或器官内。

[0117] 在膀胱癌的情况下，“高级”或“更高级”膀胱癌是指更可能在受试者中复发和/或进展和/或变成侵袭性的膀胱癌，包括具有更高的转移可能性的恶性癌症(被认为更具侵袭性的膀胱癌)。未局限于膀胱的癌症(即肌肉侵袭性膀胱癌)被认为是更具侵袭性的膀胱癌。

[0118] 低级膀胱癌可以被表征为原位癌(CIS)，这意指细胞在异常增殖，但仍然包含在膀胱内。“低级”或“更低级”膀胱癌是指包括具有较低的复发、进展、侵袭和/或转移可能性的恶性癌症(即被认为是侵袭性较低的膀胱癌)的膀胱癌。局限于膀胱的癌症(即非肌肉侵袭性膀胱癌，NMIBC)被认为是侵袭性较低的膀胱癌。

[0119] 低级膀胱癌可以被分类为良性。良性膀胱癌构成在诊断时缺乏侵袭邻近组织或转移的能力的细胞团。良性膀胱癌通常具有比恶性癌症慢的生长速度，并且良性细胞通常分化良好。

[0120] 设想到本公开可以用于确定受试者是否患有低级癌症。

[0121] 样品制备和分析

[0122] 在进行本公开的方法时，需要来自受试者的细胞样品。如本文所使用，术语“样品”是指来自受试者的细胞或细胞群或大量组织或流体。大多数情况下，已经从受试者中移除样品。“样品”包括样品的提取物和/或衍生物和/或部分。应该认为，术语如“样品”和“样本”是可以在本公开中的上下文中可互换地使用的术语。在本公开中，任何生物材料都可以用作上述样品，只要它可以从受试者中收集即可。预期在本公开中使用的样品是来自人类的

生物样品。

[0123] 所述样品可以包括从活检或切除获得的材料。优选地,所述样品是流体样品。流体样品可以包括选自但不限于由下列组成的组的多种生物材料:血液(包括全血)、血浆、血清、溶血产物、淋巴、滑液、脊髓液、尿液、膀胱冲洗液、膀胱洗涤液、脑脊液、精液、粪便、痰、粘液、羊水、泪液、囊液、汗腺分泌物、胆汁、乳汁、眼泪或唾液。在膀胱癌的情况下,流体样品是尿液样品。

[0124] 设想在本公开的方法中使用的样品可以使用本领域中已知的技术来获得。例如,在膀胱癌的情况下,活检和切除材料可以通过细胞检查获得。在乳腺癌或甲状腺癌的情况下,样品可以经由细针抽吸而获得。或者,可以从由受试者提供的尿液样品获得膀胱尿道上皮细胞。

[0125] 在一个实例中,在本公开的方法中使用的样品是包含具有不确定细胞学的临床相关细胞的患者样品。在这个实例中,在使样品与抗端粒酶抗体接触并检测抗体与具有不确定细胞学的临床相关细胞的结合是否存在之前,鉴别出具有不确定细胞学的临床相关细胞。

[0126] 设想在进行本发明的方法时,细胞形态的细胞学评估和用于检测端粒酶的细胞学评估可以针对从相同患者获得的不同样品进行。例如,受试者可以提供两种样品,一种用于细胞形态的细胞学评估且另一种用于检测端粒酶的细胞学评估。在这个实例中,无法确定癌症的细胞形态的细胞学评估可以通过用于检测端粒酶的细胞学评估来解析,其中在临床相关细胞中检测到端粒酶指示受试者患有癌症。

[0127] 然而,在临床环境中,从例如其细胞形态的细胞学评估揭示样品中的一个或多个临床相关细胞具有对细胞形态的非典型细胞学评估的患者获取额外的样品用于进一步测试可能是困难的并且可能会延缓期望的进一步测试。另外,当需要在测试之前处理额外的样本时,希望最大程度地减少与处理相关的成本(例如,试剂等)。

[0128] 因此,优选的是,细胞形态的细胞学评估和用于检测端粒酶的细胞学评估是针对从受试者获得的相同样品进行。

[0129] 设想本发明方法可以通过制备具有来自相同样品的细胞的两个不同的载玻片来进行。在这种情况下,一个载玻片用于细胞形态的细胞学评估且另一个载玻片用于检测端粒酶的细胞学评估。在下面的实施例2中所讨论的方法可以用于制备载玻片。

[0130] 本发明人已发现,当细胞形态的细胞学评估无法确定癌症时,抗端粒酶抗体与这些细胞的结合表明受试者患有癌症。因此,优选的是,将相同的载玻片用于细胞形态的细胞学评估和检测端粒酶的细胞学评估。

[0131] 临床相关细胞

[0132] 短语“临床相关细胞”是指细胞学家或细胞病理学家正在检查以确定患者的癌症状态的那些细胞。

[0133] 临床相关细胞将取决于所研究的癌症并且在本公开的上下文中可以包括:乳腺的导管和小叶细胞、肺的呼吸细胞、消化道的粘膜细胞、胰腺的导管和胰岛细胞、肝细胞、滤泡细胞、间皮细胞、生殖细胞、卵巢的颗粒细胞和上皮细胞、前列腺的腺细胞和基底细胞、输尿管上皮细胞、尿道上皮细胞、肾脏的导管细胞和肾小管细胞、子宫内膜细胞。

[0134] 因为正常细胞不表达端粒酶而恶性细胞表达端粒酶的一般原则,所以可以进行癌

症的确定。然而,本领域技术人员应该理解,这种一般原则存在例外,因为某些非恶性细胞类型也表达端粒酶。这些细胞不被认为是临床相关的并且应该排除在评估之外。优选地,排除的细胞选自包括下列的组:T细胞、B细胞、嗜中性粒细胞、巨噬细胞、粒细胞、树突细胞、肥大细胞、记忆细胞、浆细胞、嗜酸性粒细胞、精囊细胞、精子。最优选地,排除的细胞是嗜中性粒细胞、巨噬细胞和嗜酸性粒细胞、精囊细胞和精子。这些细胞不与癌症的评估临床相关且具有与临床相关细胞明显不同的形态,因此可以在进行细胞学评估时容易地在视觉上排除。

[0135] 例如,当使用本发明方法来确定膀胱癌时,存在本领域技术人员将在视觉上排除在细胞学分析之外的几种细胞类型。这些细胞包括炎性细胞如中性粒细胞、巨噬细胞和嗜酸性粒细胞,以及肾小管细胞、精囊细胞、精子和鳞状细胞。这些细胞不与膀胱癌的评估临床相关且具有与临床相关的正常尿道上皮细胞(膀胱壁细胞)明显不同的形态,因此可以在进行细胞学评估时容易地在视觉上排除。

[0136] 自反测试

[0137] 设想到要求保护的方法可以作为自反测试来进行。“自反测试”是指基于在先前测试(例如,第一测试)中获得的结果而进行的随后的测试(例如,第二测试)。当确定受试者是否患有癌症时,样品的细胞学评估可以导致希望测试另一个目标。在本公开的上下文中,希望测试另一个目标(即检测抗端粒酶抗体与临床相关细胞的结合)是由细胞形态的细胞学评估所导致,所述细胞学评估无法确定在样品中展现一个或多个非典型细胞的癌症。

[0138] 辅助测试

[0139] 还设想到要求保护的方法可以作为辅助测试来进行。提供补充或有助于解释其它测试的结果的信息以及提供可用于解析不确定性较早期评估的信息的测试可以被分类为辅助测试。在临床环境中,可能要求进行细胞形态的细胞学评估来确定受试者是否患有癌症。然而,细胞学评估可能无法确定癌症。因此,为了辅助确定受试者是否患有癌症,进行进一步的细胞学评估来检测抗端粒酶抗体与来自受试者的样品中的临床相关细胞的结合,以作为细胞形态的细胞学评估的辅助。在这种情况下,抗端粒酶抗体与一个或多个临床相关细胞的结合表明受试者患有癌症,从而解析细胞形态的不确定性细胞学评估。

[0140] 在进行辅助测试时,设想到细胞形态的细胞学评估可以与端粒酶的细胞学检测同时或大致同时进行。然而,这些步骤可以分别进行。

[0141] 受试者

[0142] 如本文中所使用,“受试者”是可以患有癌症的任何生物体。在一个优选的实施方案中,受试者是哺乳动物。哺乳动物可以是伴侣动物如狗或猫,或家畜动物如马或牛。在一个实施方案中,受试者是人类。术语如“受试者”、“患者”或“个体”是在本公开中的上下文中可互换地使用的术语。

[0143] 如果使用本公开的方法在受试者中鉴别出恶性细胞,则可以对所述受试者指导或处方癌症的治疗。例如,如果在受试者中鉴别出膀胱癌,则可以指导所述受试者诸如手术干预(如膀胱切除术)、化疗、放疗、免疫疗法、抗体疗法或其组合的治疗。

[0144] 设想到本公开的方法可以用于确定任何受试者是否患有癌症。优选地,所述方法被用来确定具有指示癌症的症状的受试者中的癌症。例如,在膀胱癌的情况下,本发明的方法将适用于临床上呈现指示膀胱疾病的症状(如血尿(尿中有血液);尿频尿急;排尿烧灼

感)的受试者。

[0145] 在本公开中使用的样品还可以从需要定期监视以监测新的或复发的癌症的受试者获得。例如,癌症存活者可能需要定期监视以监测新的或复发的病变。临床医生目前依靠从这些患者回收的样品的形态变化。一旦在样品中鉴别细胞形态的异常细胞学评估,则患者经受进一步的研究以获得另一个细胞学样品和/或活检来鉴别和确认第一异常细胞群体的来源。如果癌症被鉴别出,则通过手术程序和/或膀胱内化疗或免疫疗法处理患者以根除恶性细胞。如果细胞形态的细胞学评估无法确定癌症,那么临床医生可以从监视下的受试者获得样品,并且应用本发明的方法来确定它们是否患有癌症。如果癌症被确定,则患者经受进一步的研究,以确认端粒酶阳性细胞群的来源。

[0146] 在膀胱癌的情况下,治疗后的监视开始于在一到两年内每3个月进行一次细胞形态的泌尿细胞学评估,这取决于患者的风险因素和癌症分期。根据先前的细胞和膀胱镜检查发现,延长细胞形态的细胞学评估的筛查间隔。设想到用于检测抗端粒酶抗体与临床相关细胞的结合的细胞学评估将与上述细胞学监视方案搭配。如果通过检测抗端粒酶抗体与临床相关细胞的结合解析了细胞形态的不确定细胞学评估,则患者经受细胞检查以确认端粒酶阳性细胞群的来源。

[0147] 诊断确定

[0148] 设想到在进行要求保护的方法时,端粒酶的细胞学评估和细胞形态的细胞学评估的特定结果将与每个受试者的具体诊断确定相关联。在进行要求保护的方法时可得到的端粒酶和细胞形态的结果汇总于下表2中。

[0149] 表2:与细胞形态的细胞学评估和端粒酶结果的细胞学评估相关的诊断确定和临床结果

端粒酶的细胞学评估	细胞形态的细胞学评估	诊断确定和临床结果
阳性	阴性	<ul style="list-style-type: none"> 阳性端粒酶和细胞学结果指示受试者患有癌症。膀胱镜检查研究或上尿路成像是必要的。
阳性	阴性	<ul style="list-style-type: none"> 阳性端粒酶结果指示受试者患有癌症。膀胱镜检查研究或上尿路成像是必要的。
阳性	非典型	<ul style="list-style-type: none"> 阳性端粒酶结果指示受试者患有癌症。膀胱镜检查研究或上尿路成像是必要的。
阴性	阳性	<ul style="list-style-type: none"> 细胞形态的细胞学检查的高阳性预测值和特异性仅表明受试者患有癌症。膀胱镜检查研究或上尿路成像是必要的。
阴性	阴性	<ul style="list-style-type: none"> 受试者没有疾病。
阴性	非典型	<ul style="list-style-type: none"> 受试者可能具有与癌症无关的良性/反应性改变。

[0151] 以下结果表明受试者患有癌症,因此膀胱镜检查研究或上尿路成像是必要的:

[0152] -抗端粒酶抗体与临床相关细胞的结合和细胞形态的阳性细胞学评估
[0153] -抗端粒酶抗体与临床相关细胞的结合和细胞形态的阴性细胞学评估
[0154] -抗端粒酶抗体与临床相关细胞的结合和细胞形态的不确定性细胞学评估
[0155] -虽然鉴于细胞形态的阳性细胞学评估以及抗端粒酶抗体与临床相关细胞的结合的匹配灵敏度而不太可能发生;不存在抗端粒酶抗体与临床相关细胞结合以及细胞形态的阳性细胞学评估。

[0156] 不存在抗端粒酶抗体与临床相关细胞结合以及细胞形态的阴性细胞学评估表明样品中的细胞不是恶性的。此外,不存在抗端粒酶抗体与临床相关细胞结合以及细胞形态的不确定性细胞学评估表明受试者可能具有与癌症无关的良性/反应性改变。因此,经由膀胱镜检查进行进一步研究是不必要的。

[0157] 在本公开的上下文中,细胞形态的阳性细胞学评估是指鉴别出具有指示癌症的形态变化的细胞。可能与癌症相关的形态变化包括具有不规则尺寸和形状的增大的核、核仁明显、颜色可以是深或浅的细胞质稀少。相反地,细胞形态的阴性细胞学评估被定义为不存在指示异型性或癌症的任何形态变化。

[0158] 明确诊断

[0159] 在应用本公开的方法来解析对癌症的不确定性细胞学评估并确定样品的临床状态和受试者是否患有癌症时,认为可以基于抗端粒酶抗体与来自从受试者获得的细胞样品的一个或多个临床相关细胞的结合作出关于癌症存在的诊断确定。然而,诊断确定相对于治疗医师将基于其来确定疗程的明确诊断可以是或可以不是结论性的。换句话说,使用本公开的技术得到的诊断确定将被本领域技术人员理解为意指试图确定或鉴别出可能的癌症的方法。

[0160] 本公开的方法可以用于在评估癌症发展的风险中提供辅助,并且将被认为有助于进行关于癌症的易感性或前兆的存在或性质的临床前测定的评估。这将被认为意指得出受试者具有显著提高的发展癌症可能性的结论。

[0161] 将会预期到本公开的方法还可以与本领域中已知的癌症临床评估的其它方法组合使用,以提供癌症的存在或癌症风险增加的评价。

[0162] 如果有必要,可以验证或确认经确定患有癌症的受试者的癌症状态的明确诊断,诸如通过包括PET、MRI、超声、CT、PET/CT的成像技术。因此,本公开的方法可以以预筛查或预后方式被用来评估受试者是否患有癌症,如果有必要,可以进行进一步的明确诊断。在膀胱癌的情况下,经由膀胱镜检查 and 活检或上尿路成像的研究将用于获得癌症状态的明确诊断。还设想到本公开的方法可以用于筛选使用先前确认的诊断测试进行临床评估(特别是经由膀胱镜检查的评估)的患者。

实施例

[0163] 实施例1:临床样品

[0164] 对来自疑似患有膀胱癌(尿道上皮细胞癌)或具有膀胱癌(尿道上皮细胞癌)病史的泌尿科患者的临床材料进行受道德约束且获批的概念证明研究,以展示端粒酶hTERT蛋白免疫染色的临床诊断潜力。此外,这项研究旨在证实,hTERT免疫染色可以区分来自低级患者和高级患者的样品。

[0165] 在这项研究中,临床阳性患者患有活检证实的膀胱癌(包括非浸润性和肌肉浸润性)。所有阶段和等级确定都是根据组织学。在患者具有不同阶段/等级的多发性膀胱癌灶的情况下,记录较高阶段/等级。

[0166] 临床阴性患者全部是健康状况良好的无症状个体,且无泌尿生殖疾病病史或者所有无疾病患者首次出现或正在监测先前膀胱癌,供视觉检查膀胱壁(借助柔性/硬性膀胱镜检查)。

[0167] 如果满足以下标准中的任一条,将患者从研究中排除:

[0168] a) 患者在视觉检查(柔性/硬性膀胱镜检查)而没进行组织学检查时诊断为疑似/未表征非膀胱癌;

[0169] b) 监测到患者已经进行根治性膀胱切除术;

[0170] c) 患者患有腺癌和非尿道上皮性膀胱癌(包括小细胞癌、癌肉瘤、原发性淋巴瘤和肉瘤);和/或

[0171] d) 患者患有其它泌尿生殖肿瘤(肾脏、前列腺、输尿管上段肿瘤)。

[0172] 起初测试总共253份样品。其中,108份样品利用下文在实施例2中概述的方案进行评估,其中采用通过冻融或热诱导的表位修复形式。其中,90份样品存在至少一种尿道上皮(膀胱壁)细胞。将其余的18份样品从所有进一步分析中去除,因为没发现相关膀胱细胞壁细胞(即:尿道上皮细胞)。在那90份样品中,将五份临床阳性样品从进一步分析中去除,因为没有活检证实的疾病。其余的85份样品提供在表3(所有临床阳性样品-活检证实)和表4(所有临床阴性样品-膀胱镜检查干净),针对每份样品示出细胞形态的细胞学评估和端粒酶免疫染色结果。对于所分析的八十五份样品,在临床阳性和阴性患者中,临床相关细胞的数量范围为5至3000。

[0173] • 临床阴性样品:范围为5-900个尿道上皮细胞。

[0174] • 临床阳性样品:范围为10-3000个尿道上皮细胞。

[0175] 对于所有患者,对相同样品进行端粒酶免疫染色和细胞形态的平行细胞学评估并记录结果。互盲且对临床状态(通过膀胱镜检查+/-活检获得)盲性地进行端粒酶hTERT蛋白免疫染色和细胞形态的细胞学评估。免疫染色、细胞形态的细胞学评估和膀胱镜检查全部是由受过训练的临床医生和/或病理学家进行,经登记可在他们各自临床诊断和/或医学领域中的进行这些分析。

[0176] 端粒酶免疫染色的评分由细胞学家确定,所述细胞学家扫视足够数量视野以获得对载玻片的有把握地评估。读数细胞学家记录展现细胞核染色的尿道上皮细胞的数量/百分比。将测试阳性的截止值设定为>5%的尿道上皮细胞显示细胞核染色。

[0177] 表5中给出进行细胞形态的细胞学评估后归类为非典型的所有样品(临床阳性和阴性)。

[0178] 实施例2:收集和处理样品

[0179] 立即处理患者的排尿,或者保持在4℃下不超过4-6小时时间,然后进行处理。将样品转移至50mL无菌离心管中,并在4℃下以600g离心10分钟。取出管并弃去上清液。将细胞沉淀物重新悬浮在15mL 1x PBS中,并转移至15mL无菌离心管中。使样品在4℃下以600g再次离心10分钟,并再次弃去上清液。最后将细胞沉淀物重新悬浮在1ml 1x PBS中,然后进行细胞计数。

[0180] 将约30,000个细胞/样品转移到15mL无菌离心管中,并用Shandon Cytospin收集液(Thermo Scientific,参考号:6768001,批号:226955)将体积调整为10mL。将管再次在4℃下以600g离心10分钟。弃去上清液,然后以250 μ L/30,000个细胞的比例重新悬浮在Shandon Cytospin收集液中。通过以1000rpm用低加速度对细胞离心4分钟,使用Shandon Cytospin 4(Thermo Scientific,零件号:A778300101,序列号:CY6695 1055)将细胞固定至显微镜载玻片。

[0181] 将固定细胞的载玻片储存在4℃显微镜载玻片盒中过夜,然后将载玻片转移到-20℃冷冻机中。

[0182] 本文报道的所有染色结果都是在Ventana Benchmark XT或Ventana Benchmark Ultra自动染色平台上进行。最优化后,在其它自动染色平台(包括但不限于Leica Bond和Biocare IntelliPATH FLX)上已获得相同结果。除自动染色平台以外,最优化后,利用手动免疫染色方法也已获得相同结果。

[0183] 对于手动免疫染色方法,将载玻片后固定于50%冷丙酮:甲醇中10分钟。在1x磷酸盐缓冲液(pH 7.4)(目录号:10010-023,5x 500mL Gibco®,Life Technologies)中清洗载玻片以移除残余固定剂,然后放在含柠檬酸盐缓冲液(pH 6.0)的染色皿中。在95℃微波炉中处理载玻片30分钟,得到手动抗原修复形式。再次用1xPBS pH 7.4清洗载玻片。修复后,用1x PBS中的5%BSA和0.5%Tween 20封闭载玻片1小时,然后在室温下用端粒酶特异性初级抗hTERT抗体孵育2小时,并在1xPBS和0.5%Tween 20中清洗。在室温下用后一级抗体阻断剂Novacastra Post Primary(Ref:RE7159,批号6012593,125mL,Leica Microsystems)处理载玻片1小时,并再次在1xPBS和0.5%Tween 20中清洗。在室温下用二级抗体Novacastra Novolink Polymer(Ref:RE7161,批号6012594,125mL,Leica Microsystems)孵育载玻片30分钟,并在1x PBS和0.5%Tween 20中清洗,然后在室温下用3,3'-二氨基联苯胺(DAB)增强的液体底物(产品编号:D3939,Sigma)孵育2分钟。用1xPBS pH 7.4冲洗载玻片以使反应停止。然后载玻片在60℃下在0.5%甲基绿溶液中孵育5分钟(产品编号:M8884-25G,批号MKBD8768V,25g,Sigma),并在自来水中清洗。如下使载玻片脱水:用在丙酮中的0.05%(v/v)冰醋酸、然后95%乙醇、100%乙醇,随后在二甲苯中进行最后步骤。用Ultramount No:4固封介质(产品编号:II065C,批次#1305141450,100mL)固封载玻片,并立即施加盖玻片,然后干燥1小时。在光学显微镜下观察载玻片。

[0184] 对于自动免疫染色方法,将载玻片于冷50%丙酮:甲醇中后固定10分钟。载玻片在Ventana抗体稀释缓冲液(Ventana Medical Systems, Inc目录号:ADB250)中清洗/浸渍,以移除残余固定剂,然后放在自动染色平台上,并在95℃下进行板上(on-board)抗原修复8分钟。修复后,用Ventana Discovery试剂(Ventana Medical Systems, Inc,目录号:760-108)封闭载玻片4分钟,然后在36℃下用端粒酶特异性初级抗hTERT抗体孵育32分钟。其余的步骤依赖标准Ventana平台设置,使用Ventana Discovery和Ventana UltraView Universal DAB检测试剂盒(Ventana Medical Systems Inc,目录号:760-500)。在标准浸渍-浸泡染色器中进行板下(off-board)苏木精对比染色。对比染色也可以在板上进行,获得相同结果。

[0185] 利用(Masutomi等人,2003)中所述抗hTERT(克隆2C4)抗体获得本文结果。

[0186] 表3:临床阳性样品(活检证实)的细胞形态的细胞学评估和端粒酶免疫染色结果。

#	ID	细胞形态的细胞学 评估*	免疫染色结果	
			测试结果	染色的 尿道上 皮细胞 %
1	WH12-263 [^]	良性	阳性	80
2	AUA12-055	阳性	阳性	45
3	WH12-278	阳性	阳性	12.5
4	AUA12-057	非典型性	阳性	10
5	AUA12-059 [^]	阳性	阳性	90
6	WH12-287	阳性	阳性	75
7	WH12-307 [^]	良性	阳性	50
8	WH12-320	阳性	阳性	40
[0187] 9	AUA12-087	阳性	阳性	100
10	WH12-373	良性	阴性	0
11	WH12-390	良性	阴性	0
12	AUA12-088	阳性	阳性	80
13	AUA12-090	良性	阴性	1
14	WH12-401	良性	阴性	1
15	WH12-406	非典型性	阳性	30
16	WH12-407	良性	阴性	0
17	WH12-411	良性	阴性	0
18	RMH12-001	良性	阳性	10
19	WH12-422	阳性	阳性	95
20	RMH12-010	非典型性	阳性	10
21	WH12-424	良性	阳性	10
22	AUA12-101	阳性	阳性	80

[0188] *细胞形态的“非典型”细胞学评估表明样品中的细胞已丧失其正常外观,但尚未达到恶性细胞的异常水平。

[0189] [^]样品重新染色

[0190] 表4:临床阴性样品(活检证实)的细胞形态的细胞学评估和端粒酶免疫染色结果。

[0191]

#	Sienna ID	细胞形态的细胞学 评估*	免疫染色结果	
			测试结果	染色的尿道 上皮细胞%
1	AUA12-054	良性	阴性	1
2	WH12-268	良性	阳性	10
3	WH12-269	良性	阴性	2
4	WH12-274	良性	阴性	0
5	WH12-276	良性	阴性	2
6	WH12-279	良性	阴性	0
7	WH12-282	良性	阴性	0
8	AUA12-058	非典型性	阳性	20
9	WH12-283	良性	阳性	20
10	WH12-284	良性	阴性	1
11	WH12-285	良性	阳性	10
12	WH12-286	良性	阴性	0
13	AUA12-060	良性	阴性	1
14	WH12-288	良性	阳性	10
15	WH12-290	良性	阴性	0
16	WH12-291	非典型性	阳性	15
17	WH12-294	阳性	阳性	50
18	WH12-295	良性	阴性	0
19	WH12-297	良性	阴性	0
20	WH12-298	良性	阴性	0
21	WH12-299	良性	阴性	5
22	WH12-301	良性	阴性	1.5
23	WH12-302	良性	阳性	10
24	WH12-304	良性	阴性	1
25	WH12-305	良性	阴性	1
26	WH12-309	良性	阴性	2
27	WH12-312	良性	阴性	2
28	WH12-313	良性	阳性	20
29	WH12-318	非典型性	阳性	10
30	WH12-319	良性	阴性	2

[0192]

#	Sienna ID	细胞形态的细胞学 评估*	免疫染色结果	
			测试结果	染色的尿道 上皮细胞%
31	WH12-322	良性	阴性	1
32	WH12-324	良性	阴性	5
33	WH12-326	良性	阴性	0
34	WH12-327	良性	阴性	0
35	WH12-329	良性	阴性	1
36	WH12-330	良性	阴性	1
37	WH12-331	良性	阴性	2
38	WH12-332	良性	阴性	1
39	WH12-336	良性	阴性	1
40	WH12-337	良性	阴性	1
41	WH12-339	良性	阴性	2
42	WH12-341	良性	阴性	2
43	WH12-342	良性	阴性	2
44	AUA12-061	良性	阴性	5
45	AUA12-064	良性	阴性	2
46	AUA12-065	良性	阴性	5
47	AUA12-092	良性	阴性	1
48	WH12-368	良性	阴性	2
49	WH12-377	良性	阴性	1
50	WH12-378	良性	阳性	10
51	WH12-387	良性	阴性	0
52	WH12-396	良性	阴性	0
53	AUA12-093	良性	阴性	5
54	AUA12-095	良性	阴性	1
55	WH12-400	良性	阴性	0
56	WH12-410	良性	阴性	0
57	WH12-412	良性	阳性	10
58	RMH12-006	良性	阴性	2
59	RMH12-007	非典型性	阴性	5
60	RMH12-008	良性	阳性	20
61	AUA12-098	良性	阳性	20
62	RMH12-009	良性	阳性	10
63	AUA12-099	良性	阴性	0

[0193] *细胞形态的“非典型性”细胞学评估表明样品中的细胞已丧失其正常外观,但尚未达到恶性细胞的异常水平。

[0194] 表5:所有具有非典型性细胞学的样品(临床阳性和阴性)的临床状态、细胞形态的细胞学评估和端粒酶免疫染色结果。

#	Sienna ID	临床状态	细胞形态的 细胞学评估*	免疫染色结果			
				测试结果	染色的 尿道上 皮细胞 %	随访 临床 诊断	
1	WH12-174 [^]	阳性	非典型性	阳性	80		
2	WH12-178	阴性	非典型性	阴性	0		
3	WH12-197	阴性	非典型性	阴性	0		
4	WH12-233	阴性	非典型性	阴性	0		
5	WH12-234	阴性	非典型性	阴性	0		
6	AUA12-057	阳性	非典型性	阳性	10		
[0195]	7	AUA12-058	阴性	非典型性	阳性	20	阳性
8	WH12-289	阳性	非典型性	阳性	75		
9	WH12-291	阴性	非典型性	阳性	15	阳性	
10	WH12-318	阴性	非典型性	阳性	10	膀胱 切除 术	
11	WH12-353	阴性	非典型性	阴性	0		
12	WH12-361	阴性	非典型性	阴性	0		
13	WH12-374	阴性	非典型性	阴性	1		
14	WH12-406	阳性	非典型性	阳性	30		
15	RMH12-007	阴性	非典型性	阴性	5		
16	RMH12-010	阳性	非典型性	阳性	10		

[0196] *细胞形态的“非典型性”细胞学评估表明样品中的细胞已丧失其正常外观,但尚未达到恶性细胞的异常水平。

[0197] [^]样品重新染色

[0198] 实施例3:膀胱癌样品中的端粒酶免疫染色与疾病相关

[0199] 在显微镜载玻片上处理85份临床样品,并用上述方案染色。基于逐个样品经验地测定抗体条件或细胞样品制剂的微小调整。每个接受端粒酶免疫染色的样品还在相同样品上经历细胞形态的标准细胞学评估。将细胞形态的细胞学评估评为阳性、阴性或非典型性。

[0200] 比较临床阳性(表3)和临床阴性样品(表4)中的细胞形态的细胞学评估和端粒酶免疫染色结果。评估22个临床阳性结果,16个具有端粒酶阳性染色。在其余的6个临床阳性样品中,在细胞形态的细胞学评估后,6个被鉴别为良性。因此,端粒酶指示16/22(72%)的恶性膀胱癌。

[0201] 评估63个临床阴性样品,48个(76%)具有端粒酶阴性染色。在其余的15个临床阴性样品中,在细胞形态的细胞学评估后,11个(73%)被鉴别为良性。在细胞形态的细胞学评估后,其余的4个(27%)被鉴别为未确定(n=3)或阳性(n=1)。

[0202] 图1中示出与疾病相关的端粒酶染色。样品WH11-107中没有观察到细胞染色(临床阴性;图1A)。相比之下,临床阳性样品WH11-122中观察到明显细胞染色(图1B)。在这个样品中,在最佳抗体浓度下,在40-75%存在的尿道上皮细胞中观察到阳性染色,形式为强细胞

核染色。有意思的是,注意到并非这个临床样品中存在的所有尿道上皮细胞都被染色来检测端粒酶hTERT蛋白的存在,表明所述样品中并非所有细胞都是癌性细胞。

[0203] 实施例4:解析细胞形态的假阴性和不确定细胞学评估

[0204] 每个接受端粒酶免疫染色的样品(n=85)还在相同样品上经历细胞形态的标准细胞学评估。将细胞形态的细胞学评估评估为阳性、阴性或非典型性。表5中示出进行细胞形态的细胞学评估后归类为非典型性的所有样品(临床阳性和阴性)(n=16)以及端粒酶免疫染色的相关评分。

[0205] 利用两个不同免疫染色方案中的一个评估具有非典型性细胞学的十六份样品,具有或不具有表位修复形式。每个方案组中有八份样品,每份给出类似结果。在16份样品中,5份样品是临床阳性,且11份是临床阴性。端粒酶免疫染色方法将这5份样品中的5份评估为阳性(>5%尿道上皮细胞染色细胞核阳性)。

[0206] 在11份临床阴性样品中,8份通过免疫染色测试显示为阴性,且三份显示为阳性。在这三份中,两个患者在纵向随访中后来被评估为临床阳性(活检证实;临床样品AUA12-058;WH12-291)。另一样品是当前等待确认的临床随访(WH12-318)。然而,这个患者经历膀胱切除术。这个程序的性能表明患者的膀胱癌为阳性。

[0207] 基于当前临床状态,端粒酶免疫染色测试的性能的特异性为80%,且针对膀胱镜检查的敏感性为83%。此外,在至少94%的病例(15/16)(有可能100%的病例;16/16,因为WH12-318经历膀胱切除术)中,免疫染色结果提供正确诊断指标(相对于膀胱镜检查),其中细胞形态的细胞学评估给出不确定读数。

[0208] 实施例5:改善诊断读出

[0209] 制备临床样品并对临床样品进行免疫染色以检测端粒酶的存在且同时以细胞学方式评估抗端粒酶抗体与临床相关细胞的结合并以细胞学方式评估每个细胞的细胞形态的独特方法比只有细胞形态的细胞学评估允许显著改善诊断。

[0210] 在图3中,示出通过基于每个细胞的端粒酶免疫染色解析细胞形态结果的不确定细胞学评估或者补救细胞形态结果的假阳性细胞评估的能力。在该图中,所有图中示出的细胞都是来自对于端粒酶免疫染色最佳的低级膀胱癌临床样品。

[0211] 在图A中,示出了非膀胱鳞状细胞。这种细胞不是来自膀胱,且被受过训练的细胞学家从所有诊断确定中视觉上排除。这种细胞在这个临床样品中充当阴性免疫染色对照。如图A中所示,如预期的,鳞状细胞完全没有细胞核染色。

[0212] 在图B中,示出了正常尿道上皮细胞。示出的两种细胞具有良好限定的形状和核质比。对于受过训练的细胞学家,这些细胞看起来完全正常,且在细胞形态的细胞学评估后将适当地定义为细胞学阴性。不存在针对端粒酶hTERT蛋白的细胞核免疫染色,表明虽然在已知患有低级膀胱癌的患者的小便中发现这些尿道上皮细胞,但它们很有可能是来自膀胱壁正常区域的正常尿道上皮细胞。

[0213] 图C示出了具有确定形状和核质比的形态学上正常的尿道上皮细胞,而在这种情况下,示出了针对端粒酶hTERT蛋白的强细胞核免疫染色。相反,这个细胞学上阴性的尿道上皮细胞表达异常水平的细胞核端粒酶,且极有可能是尚未显示任何形态学异常的早期恶性细胞。这个结论受到端粒酶hTERT免疫染色与图2中所示临床结果之间的强临床相关性的支持。

[0214] 基于细胞形态的细胞学评估进行测定的相同样品和相同细胞上不存在端粒酶免疫染色时,这个细胞将被受过训练的细胞学家和/或病理学家定义为正常或非癌细胞。这将是错误的,并导致将那个具体细胞称为假阴性。因此,端粒酶的每个细胞免疫染色正确地确定这个称呼。

[0215] 在图D中,示出了少量非典型性特征,强度不足以在细胞形态的细胞学评估后被受过训练的细胞学家称为细胞学阳性的尿道上皮细胞展示强细胞核端粒酶免疫染色。这是其中在细胞形态的细胞学评估后被归类为不确定的个别细胞仍然可以在优化条件下被端粒酶hTERT免疫染色成功解析的实例。

[0216] 实施例6:预测膀胱癌的后续发展

[0217] 在细胞形态的细胞学评估后被归类为不确定的三份临床阴性样品通过免疫染色测试显示为阳性。在这三份样品中,两个患者在纵向随访中后来被评估为临床阳性(活检证实;临床样品AUA12-058;WH12-291)。另一样品当前等待确认的随访(WH12-318),然而,这个患者经历膀胱切除术。这个程序的性能表明患者的膀胱癌为阳性。

[0218] 这些数据表明,端粒酶可以指示发展膀胱癌风险增加的患者。因此,可以将已提供具有阳性端粒酶染色的样品的癌症临床阴性的患者置于提高的临床监测下。

[0219] 实施例7:临床环境中用于诊断膀胱癌的端粒酶染色

[0220] 将具有指示膀胱疾病的症状(诸如血尿(尿液中的血液)、尿频尿急或排尿灼热感)的患者送到诊所。虽然这些症状可以由其它严重性比癌症轻得多的病症(诸如尿路感染)引起,但它们是膀胱癌的特性。

[0221] 因此,从患者获得尿液样品,并送去进行细胞形态的细胞学评估和端粒酶免疫染色。如果细胞形态的细胞学评估结果对于膀胱癌来说是不确定,那么临床医生可以使用端粒酶免疫染色结果确定患者是否患有膀胱癌。

[0222] 如果样品呈端粒酶阳性,端粒酶测定相比细胞学具有改善敏感性至少证明对于膀胱癌的膀胱镜检查研究。

[0223] 然后可以对患者进行膀胱镜检查,如果随后鉴别出膀胱癌,可以建立合适治疗方案。

[0224] 实施例8:临床环境中用于鉴别发展膀胱癌的风险的端粒酶染色

[0225] 从具有与上文所述的那些类似的症状的患者获得尿液样品。将样品送去进行细胞形态的细胞学评估和端粒酶免疫染色。如果细胞形态的细胞学评估结果不确定,且样品是端粒酶阳性,那么临床医生可以要求对膀胱癌进行膀胱镜检查研究。

[0226] 如果随后在膀胱镜检查后在患者中未鉴别出膀胱癌,那么抗端粒酶抗体与临床相关细胞的结合与癌症发展之间的相关性的证据表明患者有可能具有增加的癌症风险。因此,可以建立适当监测方案。

[0227] 实施例9:膀胱癌样品中端粒酶的比较免疫染色

[0228] 利用上文在实施例2中概述的方法比较临床样品中的端粒酶染色。用SCD-A7、Novus2C4、Novus NB100-297、Santa Cruz377511、Santa Cruz7212、Rockland600-401-252和MBL M216-3抗体进行比较免疫染色。比较免疫染色结果示于表6中。

[0229] 因此,可使用各种抗端粒酶抗体来解析不确定细胞评估。

[0230]

表 6: 临床验证样品(活检证实)的细胞形态的细胞学评估和端粒酶免疫染色结果。

Sienna ID	临床状态	细胞形态的细胞学评估*	抗端粒酶抗体测试结果							
			Sienna SCD-A7	Novus 2C4	Novus NB 100-297	Santa Cruz SC-377511	Santa Cruz SC-7212	Rockland 600-401-252	MBL M216-3	
AUA14-151	阴性	非典型性	阴性	阴性	阴性	阴性	阴性	阴性	阴性	阴性
AUA14-160	阳性	非典型性	阳性	#	#	#	#	#	#	阳性
AUA14-168	阳性	非典型性	阳性	阳性	阳性	阳性	阳性	阳性	阳性	阳性
AUA14-173	阳性	非典型性	阳性	#	#	#	阳性	阳性	#	#
AUA14-187	阳性	非典型性	阳性	阳性	阳性	阳性	阳性	阳性	阳性	阴性
RMH13-058	阳性	非典型性	阳性	#	阳性	阳性	#	#	#	#
RMH13-069	阳性	非典型性	阳性	阳性	#	#	#	#	阳性	#
正确解析的不确定细胞评估%			7/7	4/4	4/4	4/4	4/4	4/4	4/4	3/4

%-因为无法确定临床状态, 2 份样品不纳入分析; AUA14-158; AUA14-172。
 #-可用于染色的材料不足。
 *细胞形态的“非典型性”细胞学评估表明样品中的细胞已丧失其正常外观, 但尚未达到恶性细胞的异常水平。

替换页 (细则第 26 条)

[0231] 实施例10-载玻片读取算法

[0232] 已经利用实施例1中所述的临床样品评估两种载玻片读取算法。第一种算法涉及给具有针对端粒酶的阳性细胞核染色的尿道上皮细胞和鳞状细胞计数。阳性测试结果是基于染色细胞的百分比确定。第二种算法涉及评估尿道上皮细胞的形态学变化以及针对端粒酶的阳性细胞核染色来导出阳性测试结果。

[0233] 读取算法-5%截止

[0234] 在放大x200-400时评估载玻片,并视觉扫视足够数量视野,以鉴别出超过20个尿道上皮细胞。记录以下细胞数量:

[0235] 1. 示出细胞核染色的尿道上皮细胞的数量。

[0236] 2. 在上文记录点(1)的过程中鉴别/评估的尿道上皮细胞的数量。

[0237] 还要注意以下细节:

[0238] 1. 尿道上皮染色特征(细胞核/细胞质)。

[0239] 2. 示出细胞核染色的鳞状细胞(包括具有或不具有细胞质染色的细胞)的百分比。

[0240] 3. 所评估的鳞状上皮细胞的总数量。

[0241] 对于这个算法,将阳性测试结果定义为超过5%的尿道上皮细胞展现阳性细胞核染色(即,每20个尿道上皮细胞超过约2至3个细胞具有阳性细胞核染色)的载玻片。

[0242] 读取算法-基于形态学

[0243] 评估载玻片以鉴别展现形态异型性(例如,高核质比、细胞核染色质变异、不规则细胞核轮廓)的尿道上皮细胞。然后评估展现形态异型性的细胞是否存在阳性免疫细胞化学信号。

[0244] 在评估临床样品期间,连同端粒酶免疫细胞化学载玻片一起检查相应巴氏涂片染色尿液制剂。

[0245] 对于这个算法,将阳性测试结果定义为尿道上皮细胞在存在阳性细胞核染色时展现形态异型性的载玻片。

[0246] 比较读取算法

[0247] 表7中汇总上述读取算法的比较。利用细胞的形态学和端粒酶阳性染色检查载玻片,得到83.3%的总体敏感性,而5%截止算法得到57.1%的总体敏感性。利用基于形态学的读取算法,低级尿道上皮癌的检测敏感性增加至75.0%,与之相比,5%截止算法达到50.0%。

[0248] 基于形态学的算法证实,与5%截止算法相比,尿道上皮癌的总检测敏感性和特异性增加,且高级和低级疾病类别的敏感性和特异性增加。

[0249] 尽管如此,5%截止算法还在被分析的膀胱癌样品提供解析不确定细胞评估的有效方法。例如,预期每20个尿道上皮细胞中有1个具有阳性细胞核染色的细胞指示阳性测试结果。

[0250] 表7. 5%截止算法和基于形态学的算法结果的比较。

测试统计	5%截止算法			基于形态学的算法		
	总体	高级疾病	低级疾病	总体	高级疾病	低级疾病
数量	31	20	27	27	18	23
敏感性	57.1%	100.0%	50.0%	83.3%	100.0%	75.0%
特异性	58.8%	58.8%	58.8%	86.7%	86.7%	86.7%
阳性测试的似然比(LR+)	1.39	2.43	1.21	6.25	7.50	5.63
阴性测试的似然比(LR-)	0.73	0.00	0.85	0.19	0.00	0.29
阳性预测值(PPV)	53.3%	30.0%	41.7%	83.3%	60.0%	75.0%
阴性预测值(NPV)	62.5%	100.0%	66.7%	86.7%	100.0%	86.7%
诊断正确率	58.1%	65.0%	55.6%	85.2%	88.9%	82.6%

[0251] 本领域的技术人员应当理解,可以如具体实施方案中所示对本公开进行许多变化和/或修改,而不会脱离如广泛描述的本公开的精神和范围。因此,本实施方案应在所有方面均视为说明性而非限制性。

[0252] 本申请要求2014年2月17日提交的AU 2014900494的优先权,其公开内容以引用的方式并入本文。

[0253] 本文所讨论和/或参考的所有出版物整体并入本文。

[0254] 已纳入本说明书中的关于文献、行为、材料、装置、物品等的任何讨论仅仅是为了给本公开提供上下文。不应被视为承认任何或所有这些事件形成现有技术基础的一部分,或因为出现在本申请的每个权利要求的优先权日之前而成为与本公开相关的领域内的一般常识。

[0255] 参考文献

[0256] Ausubel et al. (1988) Current Protocols in Molecular Biology, Greene Pub. Associates and Wiley-Interscience (including all updates until present).

[0257] Blackburn et al. (2005) Molecular Cancer Research 3, 477-482.

[0258] Bodnar et al. (1998) Science 279, 349-52.

[0259] Brown (1991) Essential Molecular Biology: A Practical Approach, Volumes 1 and 2, IRL Press.

[0260] Cibas et al. (2009) The Bethesda System for Reporting Thyroid Cytopathology, Am J Clin Pathol., 132, 658-665.

[0261] Coligan et al. (1994) Current Protocols in Immunology, John Wiley & Sons (including all updates until present).

[0262] Glover et al. (1991) DNA Cloning: A Practical Approach, Volumes 1-4, IRL Press.

[0263] Harlow and Lane (1988) Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbour Laboratory.

[0264] Parkin et al. (1999) CA Cancer J Clin 49, 33-64.

[0265] Perbal (1984) A Practical Guide to Molecular Cloning, John Wiley and Sons.

- [0267] Masutomi et al., (2003) Cell, 114 (2), 241-253.
- [0268] National Cancer Institute Fine-Needle Aspiration of Breast Workshop Subcommittees (1997) Diagn Cytopathol 16 (4), 295-311.
- [0269] Raab et al. (2007) Am J Clin Pathol 127, 946-953.
- [0270] Rosenthal et al. (2013) Cancer Cytopathol 121, 15-20.
- [0271] Sambrook et al. (1989) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbour Laboratory Press.
- [0272] Schneeweiss et al. (1999) J Urol 161, 1116-1119.
- [0273] Suen et al. (1997) Diagn Cytopathol 17 (4), 239-247.
- [0274] Zaak et al. (2001) Urology 57, 690-694.

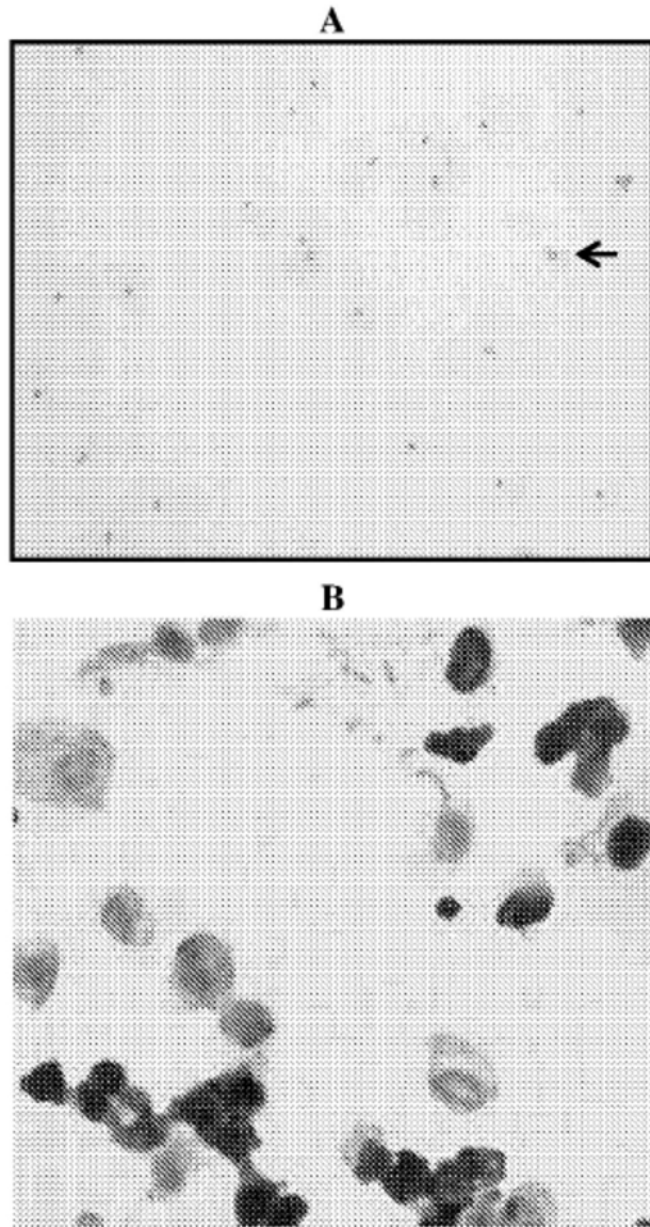


图1



图2

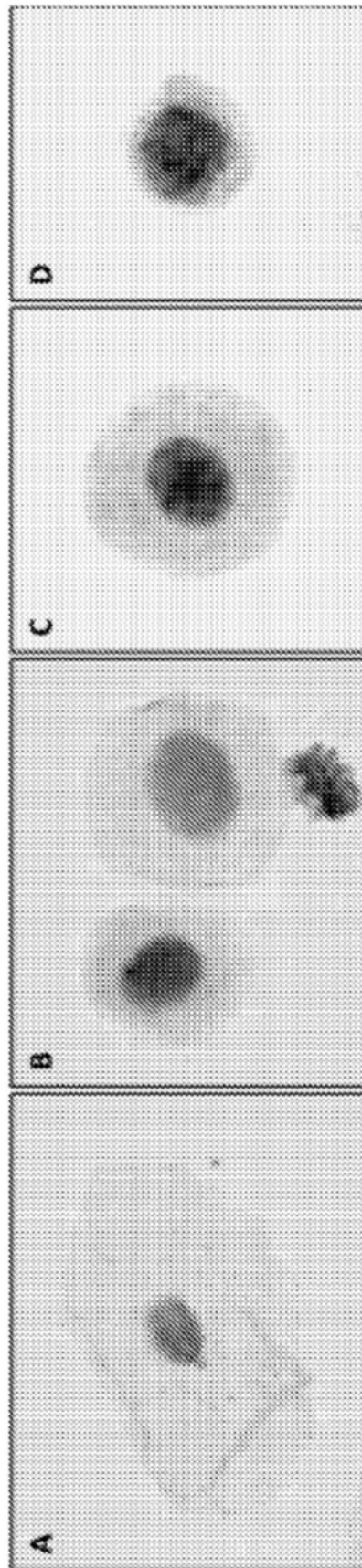


图3