



## (12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102782497 A

(43) 申请公布日 2012. 11. 14

(21) 申请号 201080056888. 0

(22) 申请日 2010. 12. 15

(30) 优先权数据

0921873. 6 2009. 12. 15 GB

(85) PCT申请进入国家阶段日

2012. 06. 14

(86) PCT申请的申请数据

PCT/GB2010/002274 2010. 12. 15

(87) PCT申请的公布数据

W02011/073619 EN 2011. 06. 23

(71) 申请人 赛托系统有限公司

地址 英国阿伯丁

(72) 发明人 R · A · 拉斯基

(74) 专利代理机构 北京泛华伟业知识产权代理

有限公司 11280

代理人 刘丹妮

(51) Int. Cl.

G01N 33/574 (2006. 01)

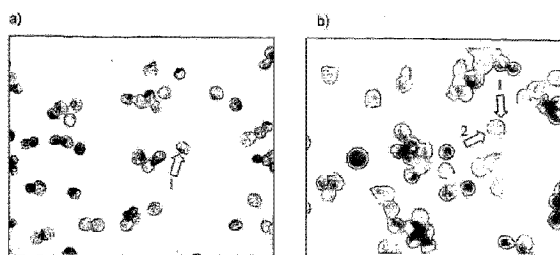
权利要求书 2 页 说明书 11 页 附图 7 页

(54) 发明名称

测定

(57) 摘要

本发明涉及一种用于前列腺癌的诊断性 / 预后性测定, 并且包括在该测定中使用的试剂盒。



1. 一种用于检测生物样本中前列腺癌细胞的诊断性或预后性的测定,所述诊断性或预后性的测定包括以下步骤:

i) 从所述生物样本中获得分离的细胞样本,并使所述分离的细胞样本与特异性结合至少一种 MCM 多肽的结合试剂接触;

ii) 使分离的细胞样本与另一个特异性结合雄激素受体多肽(AR)的结合试剂接触;任选地

iii) 使分离的细胞样本与又一个特异性结合前列腺特异性抗原(PSA)的结合试剂接触;

iv) 检测两种或多种结合试剂的结合;和

v) 确定阳性结合两种或多种结合试剂的所述分离的细胞样本中细胞的数量,其中所述阳性细胞的数量是生物样本中前列腺癌细胞的存在的指示剂。

2. 根据权利要求 1 所述的测定,其中所述 MCM 多肽选自:MCM2、MCM3、MCM4、MCM5、MCM6 或 MCM7 多肽。

3. 根据权利要求 2 所述的测定,其中所述 MCM 多肽是 MCM2 和 / 或 MCM7。

4. 根据权利要求 2 或 3 所述的测定,其中所述 MCM 多肽是 MCM2。

5. 根据权利要求 2 或 3 所述的测定,其中所述 MCM 多肽是 MCM7。

6. 根据权利要求 3 所述的测定,其中所述 MCM 多肽是 MCM2 和 MCM7。

7. 根据权利要求 1-6 中任一项所述的测定,其中通过图 1、2、3、4、5 或 6 中的氨基酸序列来表示所述 MCM 多肽。

8. 根据权利要求 1-7 中任一项所述的测定,其中将所述细胞样本与特异性结合 AR 的结合试剂和特异性结合 PSA 的结合试剂接触。

9. 根据权利要求 8 所述的测定,其中所述测定检测 MCM 多肽、AR 和 PSA 中的至少一种。

10. 根据权利要求 9 所述的测定,其中所述测定检测 MCM2 和 / 或 MCM7、AR 和 PSA。

11. 根据权利要求 1-10 中任一项所述的测定,其中将步骤(ii)和(iii)颠倒。

12. 根据权利要求 1-11 中任一项所述的测定,其中所述结合试剂是单克隆抗体,或其活性结合片段。

13. 根据权利要求 1-12 中任一项所述的测定,其中所述生物样本是分离的体液样本。

14. 根据权利要求 13 所述的测定,其中所述体液是尿液,精液(semen)或精液(seminal fluid)。

15. 根据权利要求 13 或 14 所述的测定,其中所述生物样本是经过滤的样本,其中所述经过滤的样本提供所述分离的细胞样本。

16. 一种用于确定受试者前列腺癌的的诊断性或预后性的测定,所述诊断性或预后性的测定包括以下步骤:

i) 获得第一分离的生物样本,并将该样本与特异性结合 PSA 的结合试剂接触;任选地

ii) 测定所述样本中 PSA 的存在;

iii) 从所述受试者中获得第二生物样本,制备分离的细胞样本,并将所述细胞样本与特异性结合至少一种 MCM 多肽和雄激素受体多肽的第一和第二结合试剂接触;

iv) 检测所述 MCM 多肽和雄激素受体的存在;和

v) 确定阳性结合 MCM 和雄激素受体两者的细胞样本中细胞的数量,其中所述阳性细胞

的数量是前列腺癌细胞的存在指示剂。

17. 根据权利要求 16 所述的测定,其中所述第一生物样本包含血清。
18. 根据权利要求 16 所述的测定,其中所述第二生物样本是尿液或精液。
19. 根据权利要求 16-18 中任一项所述的测定,其中所述 MCM 多肽是 MCM2 和 / 或 MCM7。
20. 根据权利要求 19 所述的测定,其中所述 MCM 多肽是 MCM2。
21. 根据权利要求 19 所述的测定,其中所述 MCM 多肽是 MCM7。
22. 根据权利要求 19 所述的测定,其中所述 MCM 多肽是 MCM2 和 MCM7。
23. 根据权利要求 1-22 中任一项所述的测定,其中所述结合试剂的检测是通过荧光发射进行。
24. 根据权利要求 1-22 中任一项所述的测定,其中所述结合试剂的检测是通过酶法进行。
25. 一种试剂盒,包括第一、第二和第三结合试剂,其中所述试剂分别结合 MCM 多肽、雄激素受体多肽和前列腺特异性抗原多肽。
26. 根据权利要求 25 所述的试剂盒,其中所述结合试剂是单克隆抗体。

## 测定

[0001] 本发明涉及前列腺癌的诊断性 / 预后性的测定, 并且包括所述测定中使用的试剂盒。

[0002] 癌症是一种非正常的疾病状态, 其中一种或多种细胞群体的不受控制的增殖干扰正常的生物学功能。增殖性改变通常伴随细胞特性的其他改变, 包括回归到缺乏组织的状态。癌细胞通常称为“转化的”。转化细胞通常表现出一些以下特性: 球形形态、胎儿抗原的表达、生长因子独立、接触抑制的缺乏、贴壁不依赖、以及生长至高密度。癌细胞形成肿瘤, 并被称为“原发性”或“继发性”肿瘤。原发性肿瘤导致癌细胞在原始转化细胞发育的器官中生长。继发性肿瘤由癌细胞从原发性肿瘤中逃逸, 并在另一器官中建立继发性肿瘤引起。这一过程被称为转移, 并且这一过程可以是侵袭性的, 例如在肝细胞瘤或肺癌的情况下。前列腺癌可以相对无害或具有极端的侵袭性。一些前列腺肿瘤生长缓慢并且导致很少的临床症状。侵袭性前列腺肿瘤向淋巴结或其他器官, 尤其是骨转移非常迅速。本领域技术人员已知前列腺癌的生长可以通过阻断雄性激素如睾酮而受到抑制。但是, 前列腺癌最终发展并变为不依赖于雄性激素(即它们变为不依赖雄激素型前列腺细胞)。这些细胞与侵袭性、恶性前列腺癌相关联。只有两个物种, 狗和人类患前列腺癌。

[0003] 先前的研究将微型染色体维持蛋白(MCM)鉴定为上皮组织的细胞周期过程中的关键调节因子(见 W099/21014 和 Gonzalez 等人, Nature Reviews/Cancer, 第 5 卷: 第 135-141 页, 2005 年 2 月)。MCM 被鉴定为“细胞周期状态”的有用的生物标记物, 即, 细胞是否能够增殖而不是静止或衰老。所有 6 种 MCM(MCM 2-7)的表达见于细胞周期的所有时期, 而在退出细胞周期进入静止期、分化或衰老期之后表达被下调。雄激素受体(AR)是一种结合雄激素睾酮和双氢睾酮的核蛋白。AR 是一种转录因子, 并且涉及到男性性别决定涉及的控制基因。AR 的克隆和测序在 W089/09791 中公开, W089/09791 描述了 AR 在原核和真核表达系统中的表达以及其在单克隆抗体的开发中的应用。作为用于检测前列腺癌的诊断测验的 PSA 的检测得到了很好的建立。PSA 是由前列腺细胞分泌的一种蛋白酶。血液样本中 PSA 的检测被认为是受试者的前列腺癌的征兆。这具有与清楚鉴定受试者是否需要进一步研究相关的重要问题。具有高血清水平的 PSA 的一些受试者最终却没有发现患前列腺癌。这既引起心理上的压力又造成不必要的生理检查。

[0004] 我们公开了这样的测定, 该测定为在来自生物样本的分离细胞样本中前列腺癌的检测提供了可靠的测验同时去除了与男性受试者血清样本中前列腺特异性抗原的检测相关的当前问题。

[0005] 根据本发明的一个方面, 提供了一种用于检测生物样本中前列腺癌细胞的诊断性或预后性的方法, 该方法包括以下步骤:

[0006] i) 从所述生物样本中获得分离的细胞样本, 并使所述分离的细胞样本与特异性结合至少一种 MCM 多肽的结合试剂(binding agent)接触;

[0007] ii) 使分离的细胞样本与另一个特异性结合核受体多肽的结合试剂接触; 任选地

[0008] iii) 使分离的细胞样本与又一个特异性结合前列腺特异性抗原(PSA)的结合试剂接触;

- [0009] iv) 检测两种或多种结合试剂的结合；
- [0010] v) 确定阳性结合两个或多个结合试剂的所述分离的细胞样本中细胞的数量，其中阳性细胞的数量是生物样本中前列腺癌细胞的存在的指示剂。
- [0011] 在本发明的优选测定中，所述的核受体多肽是雄激素受体多肽(AR)。
- [0012] 在本发明的优选测定中，所述的 MCM 多肽选自：MCM2、MCM3、MCM4、MCM5、MCM6 或 MCM7 多肽。
- [0013] 在本发明的优选测定中，所述的 MCM 多肽是 MCM2 和 / 或 MCM7。
- [0014] 在本发明的优选测定中，所述的 MCM 多肽是 MCM2。
- [0015] 在本发明的可选的优选测定中，所述的 MCM 多肽是 MCM7。
- [0016] 在本发明的进一步优选测定中，所述的 MCM 多肽是 MCM2 和 MCM7。
- [0017] 在本发明的优选测定中，将所述的细胞样本与特异性结合 AR 的结合试剂或特异性结合 PSA 的结合试剂接触。
- [0018] 在本发明的优选测定中，所述测定检测 MCM 多肽、AR 和 PSA 中的至少一种。
- [0019] 在本发明的优选测定中，所述测定检测 MCM2 和 / 或 MCM7，AR 和 PSA。
- [0020] 在本发明的优选测定中，将第(ii)步和第(iii)步颠倒。
- [0021] 在本发明的优选测定中，所述的结合试剂是单克隆抗体或其活性结合片段。
- [0022] 很明显，所述的测定提供了用于确定受试者是否具有患前列腺癌的倾向的诊断工具。还提供了用于确定已诊断或正接受如化疗或放射性治疗的受试者是否对治疗发生反应或是否需要其他的或可选择的治疗方案的手段。因此，本发明为受试者更好地管理其疾病提供了治疗方案。
- [0023] 在本发明的优选方法中，所述的生物样本是分离的体液，如尿液、精液(semen)或精液(seminal fluid)的样本。
- [0024] 通常，快速处理生物样本，以减少样本的降解并提供选择性标记物表达的可靠措施。例如，样本获取后在至少一个小时内经过冷藏(如 4℃)并处理。
- [0025] 在本发明的优选测定中，所述的生物样本是经过过滤的，其中所述过滤的样本提供所述分离细胞样本。
- [0026] 本发明操作中使用的过滤设备的实例在 W02009087375 中由申请人公开，将其引入作为参考。过滤设备包括收集预定大小的细胞所采用的过滤器、将流体传送给过滤器并由过滤器传送所布置的流体路径以及提供推动流体沿流体路径到过滤器的正压和沿着流体路径从过滤器吸取流体的负压的泵。
- [0027] 根据本发明的另一个方面，提供了用于确定受试者中前列腺癌的诊断性或预后性的测定：
- [0028] i) 获得第一分离的生物样本，并将该样本与特异性结合 PSA 的结合试剂接触；任选地
- [0029] ii) 检测所述样本中 PSA 的存在；
- [0030] iii) 从受试者获得第二生物样本，制备分离的细胞样本，并将所述细胞样本与特异性结合至少一种 MCM 多肽和雄激素受体多肽的第一结合试剂和第二结合试剂接触；
- [0031] iv) 测定所述 MCM 多肽和雄激素受体的存在；和
- [0032] v) 确定阳性结合 MCM 和雄激素受体两者的所述分离的细胞样本中细胞的数量，其

中所述阳性细胞的数量是前列腺癌细胞的存在指示剂。

[0033] 在本发明的优选测定中,所述的第一生物样本包含血清。

[0034] 在本发明的另一个优选测定中,所述的第二生物样本是尿液或精液。

[0035] 在本发明的优选测定中,所述的 MCM 多肽是 MCM2 和 / 或 MCM7。

[0036] 在本发明的优选测定中,所述的 MCM 多肽是 MCM2。

[0037] 本发明的可选的优选测定中,所述的 MCM 多肽是 MCM7。

[0038] 在本发明的优选测定中,所述结合试剂的检测是通过荧光发射检测。

[0039] 在本发明的可选的优选测定中,所述结合试剂的检测是通过酶方法检测。

[0040] 特异性结合试剂如抗体与正常样本和测试样本的结合可以通过任何合适的方法进行测定。标记包括具有光谱分离的吸收和发射特性的荧光染料、磷光体或激光染料。合适的荧光染料包括荧光黄、罗丹明、藻红素和德克萨斯红(Texas Red)。合适的显色染料包括二氨基联苯胺。其它的标记包括大分子胶体颗粒或颗粒物,所述颗粒物如为有色的、磁性或顺磁性的乳胶珠和可以直接或间接产生要视觉观察、电子检测或以其它方式记录的可检测信号的生物或化学活性剂。这些分子可以为酶,所述酶催化显示颜色或改变颜色或导致例如电特性的变化的反应。它们可以为可分子刺激的,使得能量状态间的电子转移导致特有的光谱吸收或发射。它们可以包括与生物传感器相连使用的化学实体。在下文所描述的实例中,使用了碱性磷酸酶或辣根过氧化物酶。

[0041] 根据本发明的另一方面,提供了包括第一、第二和第三结合试剂的试剂盒,其中所述试剂分别与 MCM 多肽、雄激素受体多肽和前列腺特异性抗原多肽结合。

[0042] 在本发明的优选实施方案中,所述结合试剂是单克隆抗体。

[0043] 在本发明的更优选实施方案中,所述试剂盒还包括与所述第一、第二和第三单克隆抗体结合的第二抗体,其中每一个所述第二抗体提供有促进检测所述多肽的荧光标记。

[0044] 在本说明书的整个说明书和权利要求书中,词语“包含”(comprise)和“含有”(contain)以及这些词的变化,如“包含(comprising)”和“包含(comprises)”,意为“包括但不限于”,并且无意于(和不)排除其它的部分、添加物、成分、整数或步骤。

[0045] 在本说明书的整个说明书和权利要求中,单数涵盖复数,除非上下文中另有要求。尤其是,如果使用冠词,说明书应理解为涵盖复数和单数,除非上下文中另有要求。

[0046] 结合本发明的特定方面、实施方案或实例描述的特征、整数、特性、化合物、化学部分或基团要理解为适用于本文描述的任何其它方面、实施方案或实例,除非与其不相容。

[0047] 定义

[0048] 如本文所使用的“结合试剂(binding agent)”为彼此具有结合特异性的一对分子的试剂。特异性结合对的成员可以为自然来源或者完全或部分合成产生。所述分子对的一个成员在其表面具有可以为突出或凹陷的区域,这个区域与分子对的另一个成员的特定空间和极性组织特异性结合并因此与其互补。因此,所述对的成员具有彼此特异性结合的特性。

[0049] 特异性结合试剂对的类型的例子为抗原-抗体、生物素-抗生物素蛋白、激素-激素受体、受体-配体、酶-底物、DNA-DNA(如寡核苷酸)。本发明一般涉及抗原-抗体类型的反应,尽管其也涉及与此处定义的抗原结合的小分子。

[0050] 如本文使用的术语“抗体”是指免疫球蛋白分子和免疫球蛋白分子的免疫活性部

分,即,包含特异性结合抗原的抗原结合位点的分子,不论是天然的或者部分或全部合成产生的。该术语也涵盖具有为抗体结合结构域的结合结构域的任意多肽或蛋白,或者具有与抗体结合结构域同源的结合结构域的任意多肽或蛋白。这些可以来源于天然来源,或者它们可以是部分或全部合成产生。抗体的例子为免疫球蛋白同种型(如 IgG、IgE、IgM、IgD 和 IgA)及其同种型亚类;包含抗原结合结构域的片段,如 Fab、scFv、Fv、dAb、Fd;以及双价抗体。抗体可以为多克隆的或单克隆抗体。

[0051] 由于抗体可以以多种方式进行修饰,所以术语“抗体”应解释为覆盖具有结合结构域的任意特异性结合试剂或物质,所述结合结构域具有所需要的特异性。因此,这个术语涵盖抗体片段、衍生物、抗体的功能等价物和同系物、人源化抗体,术语“抗体”包括包含免疫球蛋白结合结构域的任意多肽,不论是天然的或者全部或部分合成的。

[0052] 对于目标靶特异性的抗体,例如 MCM 或 AR 或 PSA,可以采用本领域的标准技术获得。制备抗体的方法包括用蛋白或蛋白的片段或表达所述蛋白或片段的细胞或病毒免疫哺乳动物(如小鼠、大鼠、兔子)。抗体可以使用本领域已知的多种技术中的任一种从被免疫的动物获得,并进行筛选,例如使用抗体与目标抗原的结合。

[0053] 抗原结合结构域是抗体的部分,所述抗体包含与抗原的部分或全部特异性结合并互补的区域。如果抗原很大,抗体可以只与抗原的特定部分结合,这部分称为表位。抗原结合结构域可以由一个或多个抗体可变结构域提供。抗原结合结构域可以包含抗体轻链可变区(VL)和抗体重链可变区。

[0054] “特异性”一般用于指特异性结合对的一个成员不表现与除了其特异性结合对(specific binding partner)之外的分子的任何显著性结合的情形,例如,与任意其它分子的交叉反应性小于约 30%,优选 20%、10%或 1%。

[0055] 按照本发明,本发明的所述特异性结合试剂优选为“分离”的形式。各成员一般游离于或基本上游离于它们天然相关的物质,例如与它们一起在它们的自然环境或制备它们的环境(如细胞培养)中(当该制备在体外或体内通过重组 DNA 技术进行时)中发现的其它多肽。

[0056] 因此本发明中的特异性结合试剂优选为抗体或其片段。因此,例如特异性结合试剂可以为对 PSA 或 AR 具有特异性的抗原结合结构域的抗体或其片段。例如,特异性结合试剂可以是对 MCM,例如 MCM2 或 MCM7 具有特异性的抗原结合结构域的抗体或其片段。所述抗体可以为多克隆抗体、单克隆抗体、单链抗体或前述抗体的片段。优选地,所述特异性结合试剂是单克隆抗体。对 MCM、AR 和 PSA 特异性的单克隆抗体在本领域中是已知的。

[0057] 现将仅通过实例并结合以下的附图描述本发明中的实施方案:

[0058] 图 1:培养的 C4-2b 前列腺癌细胞系的 DAKO 比色染色,a)抗 -PSA(褐色,细胞质),b)抗 PSA(褐色,细胞质)和抗 MCM2(红色,细胞核)。图 a)显示了抗 PSA 抗体标记前列腺细胞的细胞质(1)和将细胞核极大地放大(蓝色苏木精染色)。图 b)显示了抗 PSA 抗体的细胞质褐色(1)以及抗 MCM2 抗体的细胞核红色的双染色。

[0059] 图 2:使用载体染色 ImmPRESS(Vector Stain ImmPRESS)试剂对 C4-2b 细胞系进行比色染色。对图进行标记如下:a)N-末端特异性抗 AR 抗体的仅细胞核的 DAB 染色(1)和对比染色的细胞质的 DAB 染色(2);b)用 C 末端特异性抗 AR 抗体对细胞的非定位的 DAB 染色;c)用抗 PSA 抗体的细胞质(箭头)的 DAB 染色;d)用抗 MCM2 抗体的细胞核(箭头)的

novaRED 染色 ;和 e) 用抗 MCM2 抗体的细胞核(箭头)的 novaRED 染色。

[0060] 图 3 :使用载体染色 ImmPRESS 试剂对 C4-2b 细胞系进行比色双染色。图显示了 DAB-Ni (灰色)标记的抗 PSA 细胞质(1),及 novaRED (红色)抗 MCM2 抗体标记的细胞核(2)。

[0061] 图 4 :培养的 C4-2b 前列腺癌细胞系的荧光(Alexafluor)染色。图 a)抗 PSA 抗体(绿色,细胞质);b)抗 MCM7 抗体(红色,细胞核);c)合并的,显示可两个细胞位置的明显独立染色和 d)使用显示独立位置的抗 PSA 抗体(绿色,细胞质)和抗 MCM2 (红色,细胞核)抗体的合并的图像。

[0062] 图 5 :培养的 C4-2b 前列腺癌细胞系的荧光(Alexafluor)染色。图 a)抗 AR 抗体(绿色,细胞核);b)抗 MCM7 抗体(红色,细胞核);和 c)合并的,显示了 AR 和 MCM7 抗体的细胞核的共定位。

[0063] 图 6 :分离自来自患有确认的前列腺癌的患者临床尿液样本的 C4-2b 前列腺癌细胞的双荧光染色,用抗 AR (绿色)和抗 MCM7 (红色)抗体。

[0064] 图 7 :受损细胞和细胞碎片的去除。分离自尿液样本的苏木素染色的膀胱内皮细胞,a)不经过 Immunosolv DeadCert 颗粒的预处理,和 b)去除已死亡或正发生死亡的细胞以及其他一些细胞碎片的处理后。

[0065] 图 8 :4 小时以上的尿液中培养的 C4-2b 细胞的细胞核的存活以及健康。清晰的红色细胞核染色表面细胞状况良好。较低的红色染色强度,染色缺失、以及细胞质染色增强表明这些细胞正失去活性,并且不能被清楚地鉴定为患者样本的前列腺癌细胞。

[0066] 图 9 :分离自来自患有确认的前列腺癌的患者临床尿液样本的前列腺癌细胞的双荧光染色,(a)抗 AR (绿色)抗体,和(b)抗 MCM7 (红色)抗体,以及(c)AR 和 MCM 双染色的合并图像。

#### [0067] 实施例 1

[0068] 用抗 PSA 和 MCM 抗原的 DAKO 双染试剂盒对培养的前列腺癌细胞进行的比色标记。

[0069] 在 T75 烧瓶中,在 37°C 和 5%CO<sub>2</sub> 下,用含有 10%FBS 和 2%链霉素的 RPMI 培养基将 C4-2b 细胞培养至 90%汇合。移液管吸去培养液,并用温 PBS 清洗细胞两次。通过在 10ml 胰蛋白酶中于 37°C 条件下孵育 2-3 分钟,接着温和搅拌,从烧瓶表面分离细胞。将细胞悬液转移到 50ml 离心管中并通过计数血球计数器上的样本来确定存在的细胞的数量。然后,通过离心颗粒化细胞并用温 PBS 将其重悬至密度为 1x10<sup>6</sup> 细胞 /ml。将 150 μl 等份加入到含有 20ml PreservCyt 溶液的小瓶中,并转移至 Thinprep-T2000 处理器中。这温和地打碎任何细胞碎片,并提供了均匀的细胞悬液。通过收集细胞的均匀层的过滤器吸取细胞悬液。通过监测流动阻力,仪器防止收集过少或过多的细胞层。将截留细胞以直径为 10mm 的圆环转移至 UroCyte 载玻片上。然后将载玻片浸没于酒精(spirit)(Cell Path Ltd. EGK-019500A)中,沥干,以 10cm 的距离喷洒 Surgipath 涂层固定液一次,并置于平整表面上风干。

[0070] 细胞染色 :用 DAKO G/2 双染色试剂盒(K5631)对细胞进行染色如下 :

[0071] 将载玻片在 50%甲醇中浸没 5min,并用蒸馏水漂洗,然后用 TBS(Tris-HCl 缓冲盐, DAKO 试剂)漂洗。然后,用蒸馏水漂洗,接着用 DAKO 清洗缓冲液(S3006)漂洗,并转移至自动染色仪(DAKO)中。用 20 μl DAKO 双内源性酶封闭液(product code(K5361)封闭载玻片 5min,然后用 PBS 漂洗两次。以 0.3 μg/ml 应用 200 μl 一抗 A0562 兔抗人 PSA 多克隆抗体(或对照兔抗体),并孵育 30min。除非另外说明,所有的孵育步骤均在室温下进行。用 TBS



漂洗载玻片两次,并加入 200  $\mu$ l Envision(抗兔)聚合物辣根过氧化物酶聚合物(HRP)的共轭物(DAKO K5361)并孵育 30min。用 TBS 再漂洗载玻片 2 次,使用 DAKO DAB 底物,并将载玻片孵育 5min。最后从自动染色仪上移除载玻片,并用自来水漂洗 3min。

[0072] 为了使 MCM 抗原接近抗体,接着进行热修复步骤:

[0073] 将载玻片浸没于 1mM pH 值为 7.8 的 EDTA 热修复缓冲液(DAKO)中,全功率进行微波处理(800W,10min)。补充热修复缓冲液,并重复微波 10min。以该种方式制备载玻片 10 批次。如果制备的样本数量较少,为达到热处理的一致性,将空白载玻片包括在内以达到总数量为 10。允许载玻片冷却 5min,并返回至自动染色仪。

[0074] 用 DAKO 双染色封闭液(辅助试剂)对载玻片再次封闭 3min,然后用 TBS 缓冲液漂洗两次。加入 200  $\mu$ l 1  $\mu$ g/ml 的第二一抗、小鼠抗 MCM2D1.12A3(MRC, Cambridge, UK)或对照小鼠抗体,并孵育 60min。TBS 漂洗载玻片 2 次,并加入 200  $\mu$ l Envision 聚合物碱性磷酸酶共轭物(DAKO K5361),保持 15min。用 TBS 进一步漂洗两次后,加入 200  $\mu$ l 液态的永固红碱性磷酸酶底物(vol, DAKA 代码)7min。使用前 30min 新鲜制备该试剂,并加入到自动染色仪中。补充 1 滴/ml 的 DAKO X3021 左旋咪唑(DAKO X3021)以阻断内源性碱性磷酸酶活性。

[0075] 染色后,用蒸馏水漂洗载玻片,并浸没于  $\text{CuSO}_4$  溶液(10 克  $\text{CuSO}_4$ , 17 克 NaCl 的 2L 水溶液)中,浸没 5min,然后用水再次漂洗。然后用苏木精复染色 10s,并用水漂洗。最后将载玻片浸没于二甲苯中,浸没 5min,风干,并加上盖玻片准备分析。

[0076] 用 DAKO 抗体稀释剂(S0809 或 S2022)将抗体由储备液稀释至想要的浓度。使用配备有 Prog Res C14 彩色照相机的 Zeiss AxioSKOP 40 显微镜,于白光下观察载玻片。除了在白光下观察后,用于标记 MCM 抗原的碱性磷酸酶底物发射荧光。这使用具有黑白照相机 Axiocam MRm 和红色滤光器的 Zeiss-Imager M2 进行观察。采用 Axiovision 软件分析图像(图 1)。

[0077] 在可选择的测定模式中,0.3  $\mu$ g/ml 的 DAKO 兔抗 PSA 多克隆抗体 A0562 由以下中的一种替代:

[0078] i) 0.3  $\mu$ g/ml Insight BiotechnologyN-20 兔抗雄激素受体 N 末端特异性多克隆抗体(sc816)。

[0079] ii) 以 1/50 稀释的 Genetex 抗 PSGR 抗体(GTX72749)

[0080] iii) 0.3  $\mu$ g/ml Abcam 小鼠单克隆抗 PSA 表位 3 抗体 PS2(ab10189)。

[0081] iv) 0.3  $\mu$ g/ml Abcam 小鼠单克隆抗 PSA 表位 4 抗体 5G6(ab10186)。

[0082] v) 0.3  $\mu$ g/ml Abcam 兔抗 PSA 多克隆抗体(ab9537)。

[0083] 此外,1.0  $\mu$ g/ml 的 D1.12A3 小鼠抗人 MCM2 单克隆抗体由以下中的一种替代:

[0084] i) 3.0  $\mu$ g/ml Santacruz 141.2 小鼠抗 MCM7 单克隆抗体 sc-9966(特异性结合于细胞质而不是细胞核的 N 末端或 C 末端标记 MCM7 的抗体,因此仅适于在比色测定中与抗 AR 抗体联合使用。)

[0085] ii) 以 1/200 稀释的 Vision Biosystems(Novocastra)的来自 JCC07 细胞系的小鼠抗人 MCM3 单克隆抗体(NCL-MCM3)

[0086] iii) 以 1/20 稀释的 Vision Biosystems(Novocastra)的来自 CRCT5.1 细胞系的小鼠抗人 MCM5 单克隆抗体(NCL-MCM5)

[0087] 对于评估细胞质抗原(PSA)的单抗原染色,省略热修复和第二次染色步骤。对于评估细胞核抗原(AR, MCM')的抗原单染色,省略第一次染色步骤。

[0088] 发现细胞质 PSA 在培养的前列腺细胞中可以用 D1. 12. A3 抗体标记(图 1a)。PSA 也使用抗‘表位’3 和 4 的抗体,而不使用抗‘表位’1 的抗体(未显示)进行检测。类似地,针对前列腺特异性酸性磷酸酶的抗体标记前列腺细胞质,然而针对前列腺特异性 G 偶联受体(PSGR)的抗体没有作用。此外,核抗原微型染色体维持蛋白 MCM2 和 MCM7 以及雄激素受体(AR)提供了很强的标示,而 MCM3 和 MCM5 作用较小(未显示)。当与双染色测定联合使用时,PSA 和 MCM5(图 1b)以及 PSA 和 MCM7(未显示)可以标记前列腺细胞,并且由于它们不同的细胞定位而被独立的鉴定出来。

#### [0089] 实施例 2

[0090] 用 Vector Laboratories 的抗 PSA 雄激素受体(AR)和 MCM 抗原的 ImmPRESS 试剂对培养的 C4-2b 前列腺癌细胞系进行比色标记

[0091] 用 Thinprep T2000 仪器按照实施例 1 中所述准备载玻片。所有的标记和清洗步骤均为手工操作进行。首先将载玻片浸没于 50% 甲醇中,保持 5min,并加入 200  $\mu$ l DAKO 双内源酶阻断剂(产品编号(K5361)),保持 5min。然后用蒸馏水漂洗载玻片 3 次,并用 DAKO 清洗缓冲液(S3006)漂洗 5 次。将 2.5% 准备使用的 ImmPRESS 正常马血清(NHS)施用于载玻片上,保持 20min 用于封闭,接着加入 0.3  $\mu$ g/ml 200  $\mu$ l DAKO A0562 兔抗人 PSA 多克隆抗体(或者对照的兔抗体),并孵育 10min。除非另外说明,所有的孵育步骤均在室温下进行。用 DAKO 清洗缓冲液漂洗载玻片 5 次,并加入 200  $\mu$ l ImmPRESS 试剂(通用的 HRP 标记的抗兔和抗鼠),保持 30min。用 DAKO 清洗缓冲液漂洗载玻片 5 次,并加入 200  $\mu$ l ImmPRESS 底物,保持 5min。所使用的底物是 Vector VIP(SK-4600,紫色)、DAB(SK-4100,褐色)、DAB-Ni(SK-4100、灰色/黑色)或 Vector NovaRED(SK-4800,红色)中的任意一种。用清洗缓冲液漂洗载玻片 5 次。

[0092] 为了使 MCM 抗原接近抗体,接着进行热修复步骤:

[0093] 将载玻片浸没于 1mM pH 值为 7.8 的 EDTA 热修复缓冲液(DAKO)中,全功率进行微波处理(800W,10min)。补充热修复缓冲液,并重复微波 10min。采用这种方式制备载玻片 10 批次。如果制备的样本的数量较少,为达到热处理的一致性,将空白载玻片包括在内以达到总数量为 10。允许载玻片冷却 5min。

[0094] 用 2.5% 正常马血清再次封闭载玻片 20min。加入 200  $\mu$ l 浓度为 1  $\mu$ g/ml 的第二一抗、小鼠抗 MCM2D1. 12A3(MRC, Cambridge, UK)或对照小鼠抗体,并孵育 10min。用清洗缓冲液漂洗载玻片 5 次,并加入 200  $\mu$ l ImmPRESS 试剂(如上所述),保持 30min。进一步漂洗 5 次之后,加入 200  $\mu$ l ImmPRESS 底物,保持 5min。底物为以上所列四种中的任意一种,但与上一步骤中所用的不同。

[0095] 染色后,将载玻片用蒸馏水漂洗,并置于  $\text{CuSO}_4$  溶液(10 克  $\text{CuSO}_4$ 、17 克 NaCl 的 2L 水溶液)中,保持 5min,然后用水再次漂洗。然后,用苏木精或甲基绿复染色 10s,并用水漂洗。最后将载玻片浸没于二甲苯中,保持 5min,风干,并加上盖玻片准备分析。

[0096] 用 DAKO 抗体稀释液(S0809 或 S2022)和稀释的 2.5%NHS 将抗体由储备液稀释至想要的浓度。使用配备有 Prog Res C14 彩色照相机的 ZeissAxioSKOP 40 显微镜,于白光下观察载玻片。对于评估核染色抗原(AR, MCM's)的单染色测定,省略最初的染色步骤。对

于评估细胞质抗原 (PSA) 的单抗原染色测定, 省略热修复和第二个染色步骤。

[0097] 在可选择的测定模式中, 0.3  $\mu$ g/ml 的 DAKO 兔抗 PSA 多克隆抗体 A056 由 0.3  $\mu$ g/ml Insight Biotechnology 的 N-20 兔抗雄激素受体 N 末端特异性多克隆抗体 (sc816) 或 0.3  $\mu$ g/ml 抗雄激素受体 C 末端特异性多克隆抗体 (sc815) 替代。1.0  $\mu$ g/ml 的 D1.12A3 小鼠抗人 MCM2 单克隆抗体由 3.0  $\mu$ g/ml Santacruz141.2 小鼠抗 MCM7 单克隆抗体 sc-9966 替代。染色使用以下不同的 ImmPRESS 底物来实现: DAB(褐色)、DAB-Ni(灰色、黑色)、novaRED(红色) 或 VIP(紫色) 单染色或联合染色, 并且使用或不使用复染色。

[0098] 发现, 当对 N 末端特异性的 AR 抗体能够清楚地标记细胞核时(图 2a), 对 C 末端特异性的抗体没有显示任何清楚的细胞定位, 因此不适合(图 2b)。在细胞的细胞质中还检测到 PSA 抗原(图 2c)。抗细胞周期抗原 MCM2 和 MCM7 的抗体都能够标记细胞核(图 2d 和 2e)。发现所有不同的底物在用于单染色时都是有效的(未显示)。对于双染色, 一些组合由于它们的相似性表现, 因此与其他相比不太适合。发现 DAB-Ni 与 novaRED 以及 DAB 和 vectaVIP 生成良好的图像(图 3)。在这种测定模式中, PSA 与一种或多种 MCM 抗原联合, 必须用作前列腺细胞特异性标记物。由于它的细胞核定位, AR 不适合这种模式。

### [0099] 实施例 3

[0100] C4-2b 前列腺细胞系的荧光标记。

[0101] 培养前列腺癌细胞系 C4-2b, 并按照实施例 1 中所述细节制备“Thinprep”载玻片。

[0102] 细胞染色:

[0103] 将载玻片浸没于 50% 甲醇中, 保持 5min, 用蒸馏水清洗 5min, 并用 DAKO 清洗缓冲液漂洗一次。为了渗透细胞, 将 200ml 的 0.1%Triton X-100 施用到载玻片上, 保持 5min。然后用清洗缓冲液漂洗 3 次, 并用水漂洗一次。使用 100ml 的 Image-IT FX 信号增强剂 (Invitrogen I36933), 并在室温下孵育 30min。用清洗缓冲液漂洗载玻片 3 次, 随后用蒸馏水漂洗一次。

[0104] 将一抗混合物或对照抗体(0.3  $\mu$ g/ml 兔抗 PSA 和 1  $\mu$ g/ml 小鼠抗 MCM2) 施用于载玻片上(每张载玻片上施用 100  $\mu$ l), 并孵育 90min。混合物包含以下组合中的一种: i) DAKO 兔抗 -PSA 多克隆抗体 A0562(0.3  $\mu$ g/ml) 和小鼠抗 MCM2D1.12A3(1.0  $\mu$ g/ml); ii) DAKO 兔抗 PSA 多克隆抗体 A0562 和 Santacruz 141.2 小鼠抗 MCM7 单克隆抗体 sc-9966(1.0  $\mu$ g/ml); iii) Insight Biotechnology N-20 兔抗雄激素受体 N 末端特异性多克隆抗体 sc816(0.3  $\mu$ g/ml) 和小鼠抗 MCM2D 1.12A3; 或 iv) Insight Biotechnology N-20 兔抗雄激素受体 N 末端特异性多克隆抗体 sc816 和 Santacruz 141.2 小鼠抗 MCM7 单克隆抗体 sc-9966。

[0105] 用清洗缓冲液漂洗载玻片 3 次, 并用水漂洗 1 次。将 200  $\mu$ l 两种 Alexafluor 二抗 (1/1000 稀释) 的混合物应用到载玻片上并孵育 30min。所用的混合物如下并与以上所述的一抗混合物相关联: i) 和 iii) Alexafluor 488(绿色) 抗兔抗体 (Invitrogen A11034) 和 Alexafluor 594(红色) 抗小鼠 IgG2b 抗体 (Invitrogen A21145); ii) 和 iv) Alexafluor 488(绿色) 抗兔抗体 (Invitrogen A11034) 和 Alexafluor 594(红色) 抗小鼠 IgG1 抗体 (Invitrogen A21125)。

### [0106] 实施例 4

[0107] 来源于患者尿液的前列腺细胞的荧光标记。

[0108] 尿液样本由两名患有确认的前列腺癌的患者提供,并且迅速地进行以下处理。将样本在 50m l 离心管中以 600g 离心 5min,从而沉淀细胞,并弃去上清液。通过温和搅拌,将细胞沉淀重悬浮于小体积的 Cytolyt (Cytyc Corp) 中,管中充满 30ml CytoLyt。将悬液涡旋 5min 并再次离心。将细胞沉淀重悬浮于 100  $\mu$  l PreservCyt 溶液中,然后转移至含有 20ml PreservCyt 的小瓶中。将小瓶放置于 Thinprep T2000 中,并按照上面的实施例 3 制备载玻片。

[0109] 用 1.0  $\mu$  g/ml Santacruz 141.2 小鼠抗 MCM7 单克隆抗体 sc-9966 和 0.3  $\mu$  g/ml DAKO 兔抗 PSA 多克隆抗体 A0562 或 0.3  $\mu$  g/ml Insight BiotechnologyN-20 兔抗雄激素受体 N- 末端特异性多克隆抗体 (sc816) 标记细胞 (图 6)。在两个样本中均鉴定到前列腺细胞。它们均有不规则形状,并且由于长时间暴露于尿液中后状态不佳,从而展现出细胞质染色程度的变化。

#### [0110] 实施例 5

[0111] 从尿液样本中去除碎片的效果。

[0112] 将尿液样本在 600g 下离心 10min 从而沉淀细胞。将细胞在 1mlPBS 中重悬。利用血球计数仪确定总的细胞数。细胞悬液的体积调整至每 100  $\mu$  l 中含有  $5 \times 10^6$  个细胞 (通过添加 PBS,或通过重沉淀和重悬于适合体积的 PBS 中)。

[0113] 将 Immunosolv Dead Cert 纳米颗粒 (Imunosolv Ltd.,Edinburgh,UK) 的存贮小瓶涡旋 30s。将 25  $\mu$  l 的纳米颗粒转移至含有 1ml PBS 的 Eppendorf 管中。将管置于提供的磁性分选仪中,保持 3-5min,直到颗粒抗磁性而聚集。由移液管去除缓冲液,并移除管。将颗粒在 100  $\mu$  l PBS 中通过涡旋重悬。将 100  $\mu$  l 细胞 ( $5 \times 10^6$  细胞) 加入到颗粒悬液中,并 4℃ 下孵育混合物 40min。在该孵育过程中,磁性纳米粒子选择性地与在已死亡或者正在死亡的细胞表面上表达的抗原结合。向管中再加入 800  $\mu$  l PBS 并温和混合,然后将管重新置于磁性分选仪中,保持 5min。用移液管将含有活的健康细胞的上清液去除,并加入到一小瓶的 PreservCyt (20ml) 中。第二个 100  $\mu$  l 等份的未伴随 DeadCert 颗粒预耗尽 (pre-depleted) 的细胞加入到另一小瓶的 PreservCyt 中。然后,按照实施例 1 中所述,将两份样本均在 Thinprep T200 中处理。载玻片用苏木精染色,从而进行可视化,见图 7。

[0114] 在未处理的样本中,存在大量的主要由于无活性细胞产生的碎片的颗粒。这些碎片颗粒常可以非特异性地被标记,并且由于频繁观察到真正癌细胞的可变化的细胞形态,通常不能将这些碎片颗粒与真正的癌细胞区分开。相反,处理后的样本含有较少的碎片颗粒,使得对患者做出更准确和更稳健的评估成为可能。

#### [0115] 实施例 6

[0116] 尿液中前列腺癌细胞的存活率。

[0117] 按照实施例 1 中所述,培养前列腺细胞系 C4-2b。当培养瓶中达到 80% 汇合时,通过离心收集细胞,在 PBS 液 (磷酸盐缓冲液) 中重悬,并计数。将含有大约  $2 \times 10^7$  个细胞的 5ml PBS 加入到由健康供体提供的 25ml 尿液中并于 4℃ 保存。1h、2h、3h 和 4h 后从冰箱中移除样本,并按照实施例 1 所述采用 Thinprep T2000 设备制备载玻片。用实施例 1 中所述的小鼠抗 MCM2D1. 12A3 抗体和 DAKO 抗小鼠碱性磷酸酶试剂对载玻片染色,并在双白光下观察 (图 8)。在 1h 和 2h 细胞表现出清楚的强密度的核染色。到第 3h 染色不清楚的细胞核,并且密度减轻。在这个时间点一些细胞对 MCM 无染色阳性。到 4h 时健康细胞的比例明显

减少(数据未显示)。

[0118] 染色 MCM 的细胞具有特别的重要性,表明核完整性可以保持 4h,此后到 72h 逐渐解体(数据未显示)。表明保护细胞膜的消失/解离从 1h 开始,其中作为对前列腺特异性细胞的细胞质染色的细胞完整指数的 PSA,从 1h 开始迅速解体(数据未显示)。

#### [0119] 实施例 7

[0120] 具有雄激素受体(AR)和微型染色体维持蛋白(MCM)抗体的前列腺癌细胞系的染色

[0121] 对前列腺癌患者的早期研究表明,在患者尿液中可以捕获前列腺上皮细胞,同时伴随高血清前列腺特异性抗原(PSA)值。这些细胞数量很少,并且在排泄一小时必须经过处理。我们已经建立了一种利用 MCM 作为核标记物、而 PSA 作为细胞质标记物,检测尿液中前列腺细胞的方法。但是尿液中这些细胞的快速解体,尤其是细胞膜,因此细胞的细胞质需要更加稳健的抗体标记物。

[0122] 注意到,前列腺上皮细胞的核在排泄后高达 4h 保持完整(见实施例 6)。选择并研究了对前列腺组织有特异性亲和力的核标记物。利用雄激素受体抗体、和利用前列腺癌患者或者具有高血清 PSA 值人群的尿液中的两种前列腺癌细胞系实现了很好的前列腺细胞的定义。

[0123] 具有已建立的前列腺癌细胞系(C42b)的正常尿液在 Hologic T2000 仪器上用尿酸盐细胞(urocyte)载玻片在实验室中进行制备。将载玻片浸没于 50% 甲醇中,保持 5min,用去离子水清洗,然后加入 200  $\mu$ l 0.2% Triton X-100,保持 5min 以渗透细胞。用 DAKO 缓冲液进一步漂洗 3 次和用去离子水进一步漂洗 1 次,接着滴加 2 滴(100  $\mu$ l) Image-IT Fx 信号增强剂或足以覆盖盖玻片或切片的体积,然后于室温下孵育 30min。用 DAKO 缓冲液进一步漂洗 3 次和用水进一步漂洗 1 次,接着与 200  $\mu$ l 的一抗 AR(0.3  $\mu$ g/ml 的 AR-N20,来源于 Santa Cruz 公司,产品编号为 sc-816)和 1.15  $\mu$ g/ml MCM(MCM7,来源于 Santa Cruz 公司,产品编号为 sc9966)在 0.5% 奶粉中孵育 60min。载玻片用缓冲液漂洗 3 次和用去离子水漂洗 1 次,然后与相关的 Alexafluor 二抗 (alexafluor 488 山羊抗兔 IgG(H+L; Invitrogen 产品编号 A-11034,和 Alexafluor 594 山羊抗小鼠 IgG1( $\gamma$ 1); Invitrogen 产品编号 A-21125)在黑暗中孵育 30min。在室温下滴加一滴 Prolong Gold Anti-fade 试剂,接着对所有载玻片封片之前,再次用缓冲液漂洗 3 次和用水漂洗 1 次。通过将固定的样本放置于平坦干燥的表面上并且于室温下黑暗条件中孵育 24 小时来处理载玻片。使用在 10s 处具有不同荧光滤光器的荧光显微镜检测荧光(图 9)。

[0124] 对于雄激素受体和微型染色体维持蛋白,实验均显示了清楚和明确的核染色。

[0125] 使用 MCM7(以 1:100 稀释)和兔雄激素受体单克隆抗体(AR)(来源于 Epitomics 公司)进行同样的实验。此外,使用以 1:50 稀释的 MCM2 和兔雄激素受体单克隆抗体(AR)(来源于 Epitomics 公司)进行另一个实验。采用两种不同的组合方式染色载玻片,使用了采用作为通过 MCM2 或 MCM7 评估前列腺细胞核的特异性和固定的阴性对照的 C42b 前列腺上皮细胞和 EJ28 膀胱癌细胞的混合群体和雄激素受体的组合。所采用的方法学与合并雄激素受体多克隆抗体(如上所述)和 MCM7 的 C42b 细胞系中所用方法相同。该实验中 C42b 细胞用 1:50 稀释的 MCM2 和 1:100 稀释的 RabMAb AR 染色。使用 AF488-1/1000 和 1:100 稀释的雄激素受体以及 AF594-1/1000 和 1:50 稀释的 MCM2 在荧光显微镜清

楚地鉴别独立的核染色组分(数据未显示)。在这些情况下染色的前列腺细胞系的单独图像显示出在鉴定的前列腺细胞的细胞核中染色特性的清楚鉴定。当雄激素受体和组合有相关 Alexafluor 荧光抗体的 MCM2 抗体组合,这提供了清楚和确定的核染色模式的证据,从而绿色标记的雄激素受体和红色标记的 MCM2 核染色一起产生了橘黄色的组合,从而将前列腺上皮细胞和双核染特性的标准化前列腺恶性细胞系区分开来(数据未显示)。进一步的工作中分别单独使用 C42b 与 EJ28 前列腺和膀胱恶性细胞系两者的混合群体,当联合使用雄激素受体和 MCM7 时显示了很好的前列腺细胞核黄色染色的证据。EJ28 膀胱癌细胞根本没有被染色。同样, C42b 与 EJ28 细胞系的混合群体当用 1 : 100 稀释的雄激素受体和 1 : 50 稀释的 MCM2 染色时,显示了 C42b 与 EJ28 染色细胞的合并图像,其中 EJ28 染色细胞没有雄激素受体染色的证据。

[0126] 这些实验证实用 MAb AR 加 MCM7 的组合具有清楚和确定的核染色,同样用 MAb AR 和 MCM2 也具有染色活性。这些数据证实上皮前列腺癌细胞系可以应用 MCM2 和 MCM7 联合雄激素受体抗体,该情况下为 MAb AR,进行核水平染色。

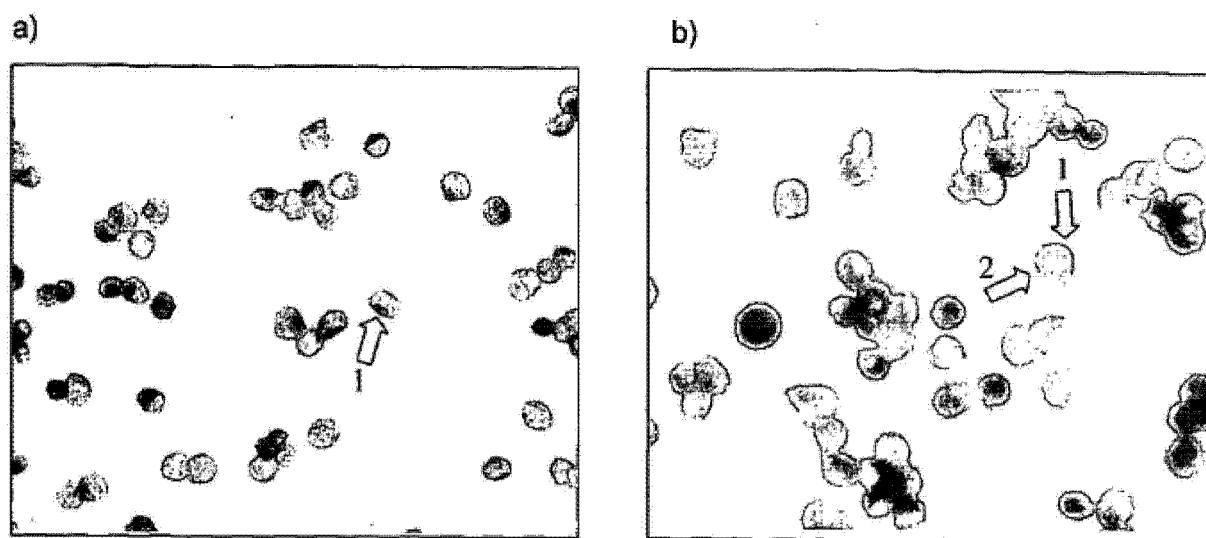
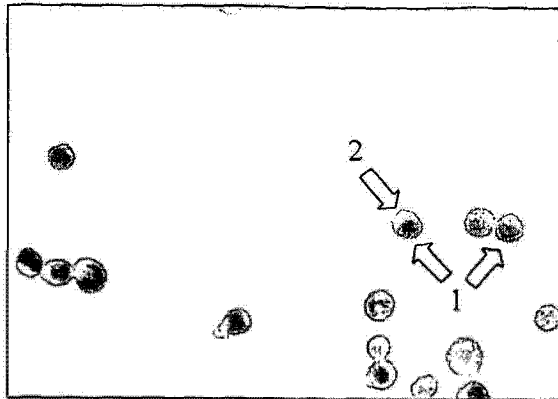


图 1

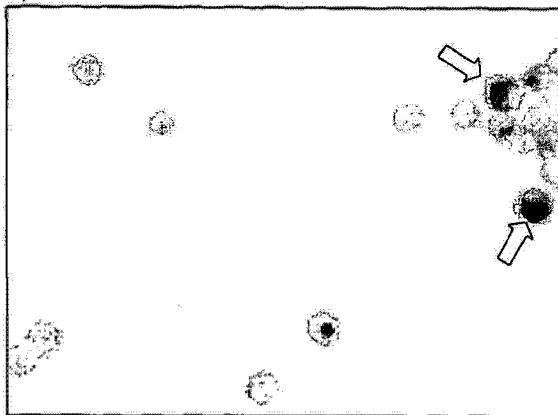
a) AR-N20 DAB



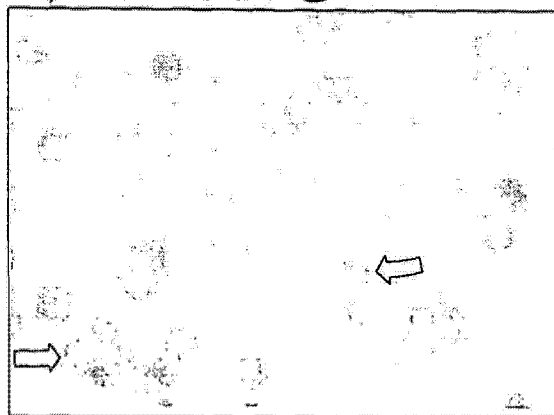
b) AR-C19 DAB



c) PSA DAB



d) MCM2 Nova 红色



e) MCM7 Nova 红色

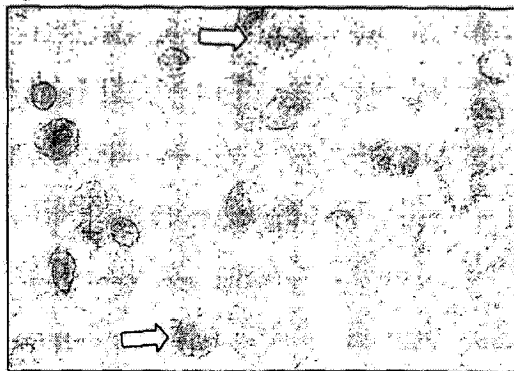


图 2



PSA DAB-Ni, MCM2 红色

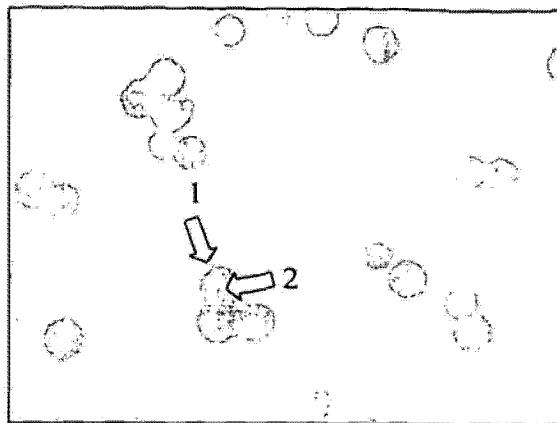
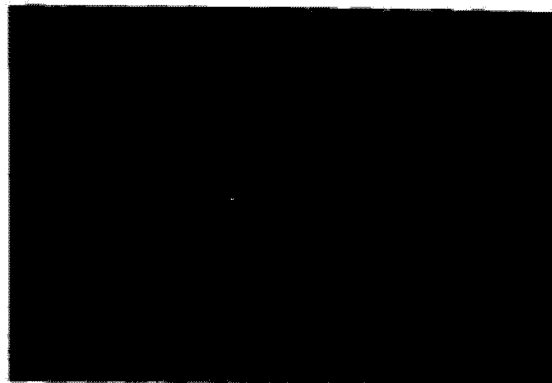


图 3

a)



b)



c)



d)



图 4

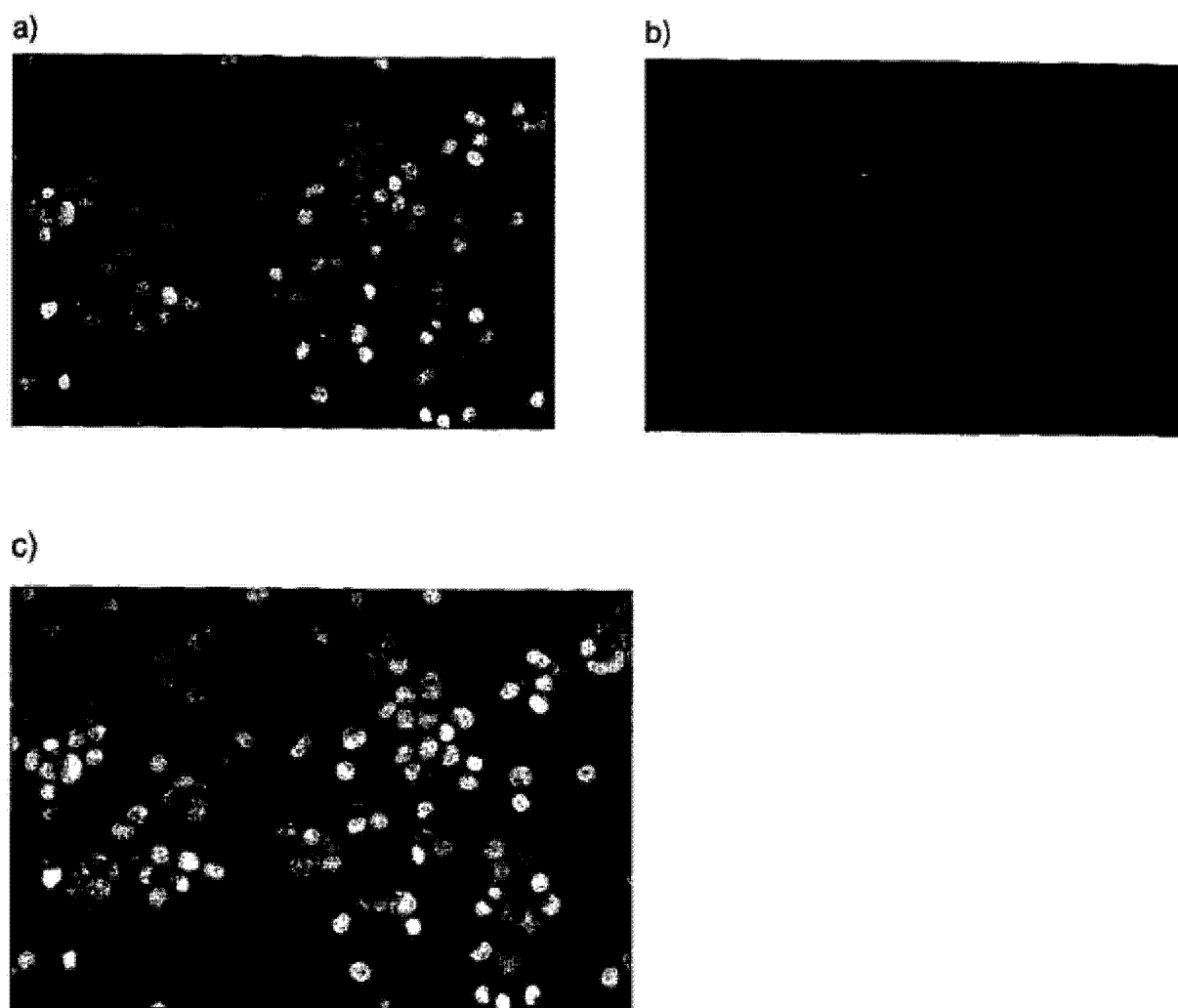


图 5

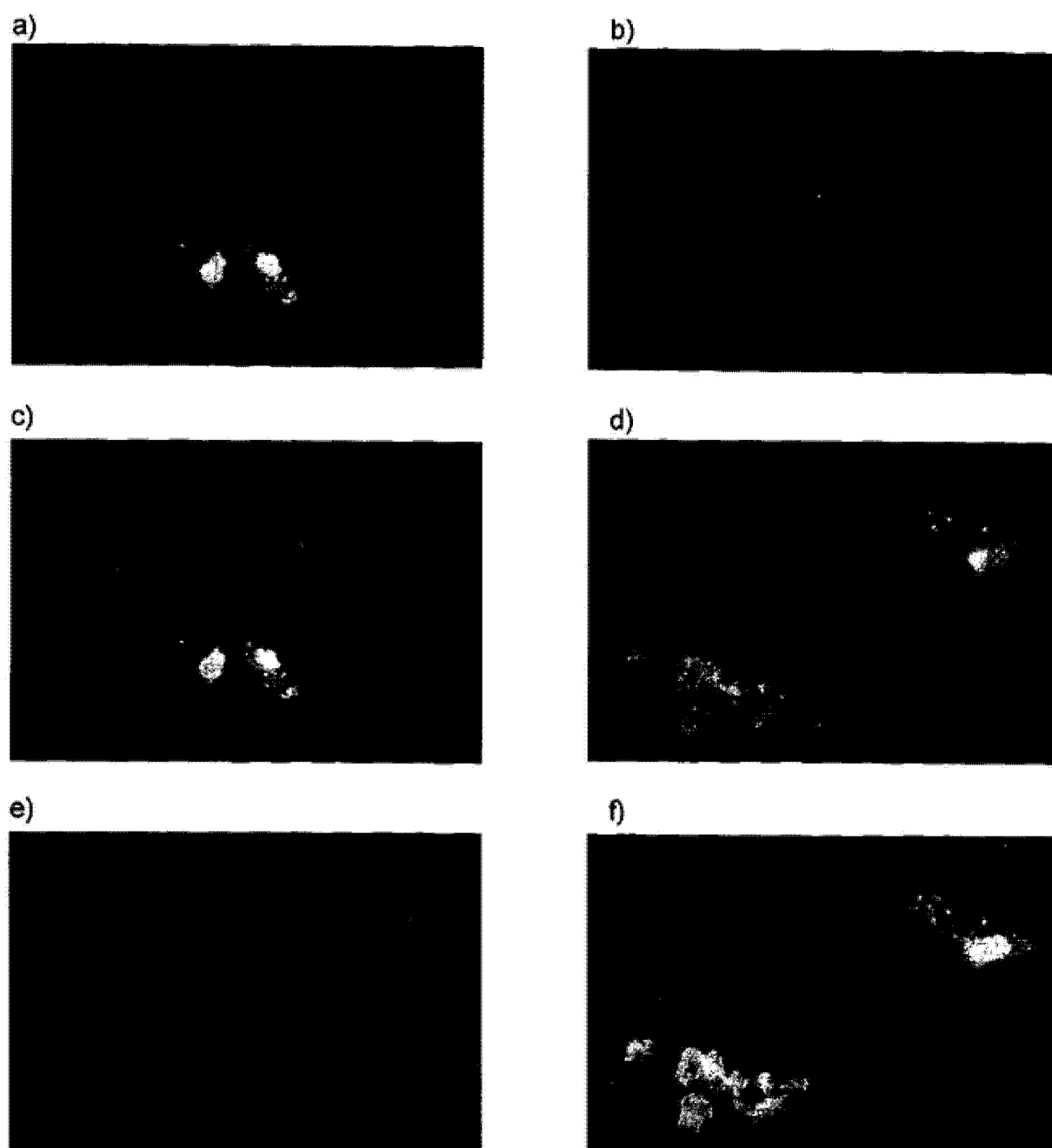


图 6

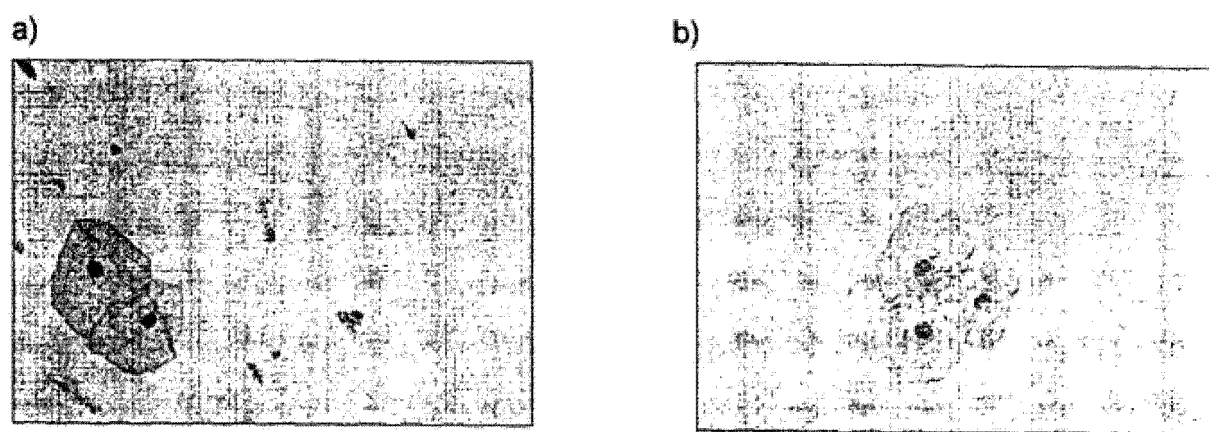


图 7

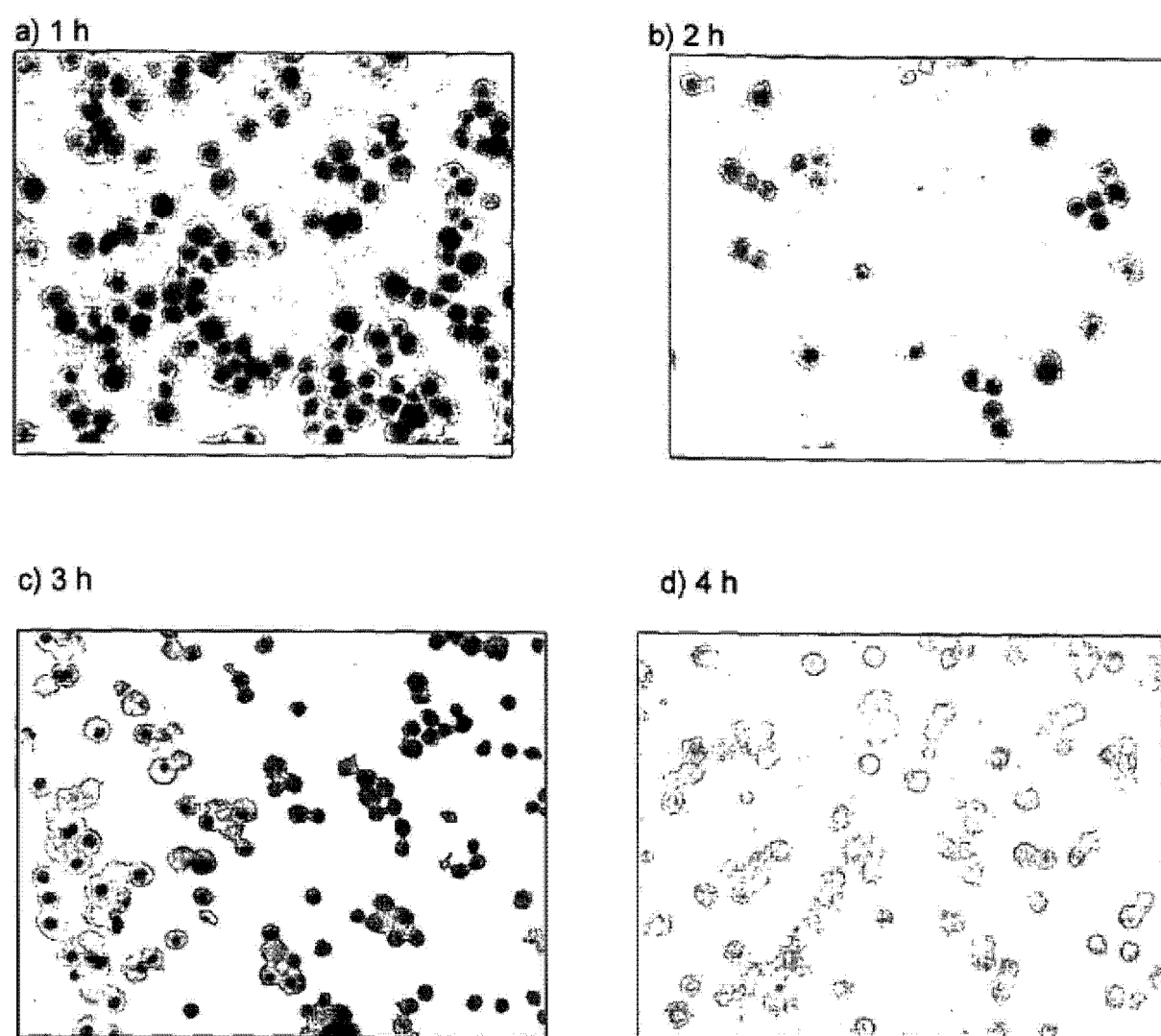


图 8

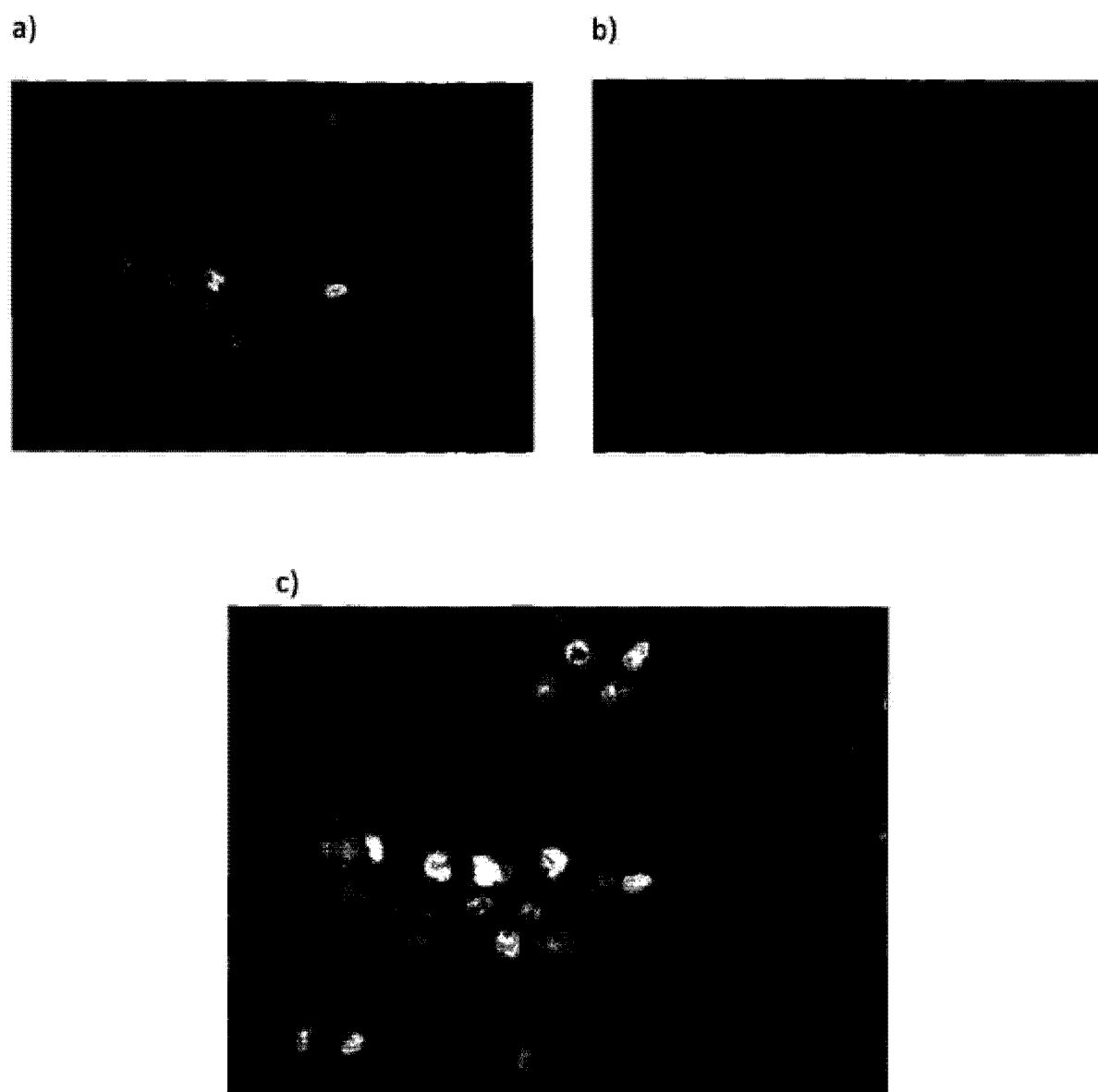


图 9