

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.  
A61K 39/395 (2006.01)  
A61P 35/00 (2006.01)



# [12] 发明专利说明书

专利号 ZL 01822353.2

[45] 授权公告日 2009 年 1 月 7 日

[11] 授权公告号 CN 100448486C

[22] 申请日 2001.12.11 [21] 申请号 01822353.2  
[30] 优先权

[32] 2000.12.11 [33] AU [31] PR2015

[86] 国际申请 PCT/AU2001/001614 2001.12.11

[87] 国际公布 WO2002/048395 英 2002.6.20

[85] 进入国家阶段日期 2003.7.28

[73] 专利权人 生物权威控股有限公司

地址 澳大利亚新南威尔士

[72] 发明人 J·巴登 M·斯莱特

审查员 温庭江

[74] 专利代理机构 上海专利商标事务所有限公司  
代理人 周承泽

权利要求书 3 页 说明书 9 页 附图 10 页

[54] 发明名称

P2Y 嘌呤受体的表达在鉴定肿瘤前期和肿瘤  
状态中的应用

[57] 摘要

本发明涉及鉴定哺乳动物肿瘤前期和肿瘤状态  
的方法，具体是根据 P2Y 嘌呤受体差异性表达鉴定  
细胞和组织肿瘤形成前期和肿瘤形成的方法。

1. P2Y 嘌呤受体的特异性抗体的用途，其特征在于，用于制备诊断哺乳动物肿瘤前期和/或肿瘤状态、确定哺乳动物肿瘤前期和/或肿瘤状态阶段或鉴定所述细胞和/或组织处于哺乳动物肿瘤前期和/或肿瘤状态的试剂盒，所述肿瘤选自前列腺癌、乳腺癌和皮肤癌。

2. 如权利要求 1 所述的用途，其特征在于，所述诊断哺乳动物肿瘤前期和/或肿瘤状态、确定哺乳动物肿瘤前期和/或肿瘤状态阶段或鉴定所述细胞和/或组织处于哺乳动物肿瘤前期和/或肿瘤状态包括体外检测哺乳动物的细胞和/或组织中的 P2Y 嘌呤受体表达图，将表达图与预先确定的正常细胞和/或组织的表达图作比较。

3. 如权利要求 1 所述的用途，其中所述哺乳动物是人，马，牛，羊，狗，猫，大鼠或小鼠。

4. 如权利要求 3 所述的用途，其中哺乳动物是人。

5. 如权利要求 1 所述的用途，其中细胞和/或组织源于前列腺，乳腺，皮肤或其他上皮组织。

6. 如权利要求 1 所述的用途，其中肿瘤前期或肿瘤状态是前列腺癌前期或前列腺癌，其中前列腺细胞或前列腺组织中的 P2Y<sub>2</sub> 嘌呤受体表达图与正常前列腺细胞或前列腺组织中的表达图相比强度增加，是前列腺癌前期或前列腺癌的诊断性指标。

7. 如权利要求 1 所述的用途，其中肿瘤前期或肿瘤状态是乳腺癌前期或乳腺癌，其乳腺细胞或乳腺组织中的 P2Y<sub>2</sub> 嘌呤受体表达图与正常乳腺的乳腺细胞或乳腺组织中的表达图相比强度降低，是乳腺癌前期或乳腺癌的诊断性指标。

8. 如权利要求 1 所述的用途，其中肿瘤前期或肿瘤状态是皮肤癌前期或皮肤癌，该哺乳动物皮肤细胞和/或组织中的 P2Y<sub>2</sub> 嘌呤受体表达图与正常皮肤的皮肤细胞或组织中的表达图相比强度降低，是存在皮肤癌前期或皮肤癌的诊断性指标。

9. 如权利要求 8 所述的用途，其中皮肤癌是恶性黑色素瘤、鳞状细胞癌或基底细胞癌。

10. 如权利要求 2 所述的用途，其中 P2Y 受体表达图是 P2Y<sub>2</sub>，P2Y<sub>4</sub>和/或 P2Y<sub>6</sub>受体表达图。

11. 如权利要求 10 所述的用途，其中 P2Y 受体表达图是 P2Y<sub>2</sub>受体表达图。

12. 如权利要求 1 所述的用途，其中肿瘤前期状态是细胞的细胞核中 P2Y 受体表达图发生变化的早期肿瘤前期状态。

13. 如权利要求 1 所述的用途，其中肿瘤前期状态是 P2Y 受体出现在细胞质内和/或细胞侧膜和/或细胞基底膜中的 P2Y 受体表达图的较晚肿瘤前期状态。

14. 如权利要求 1 所述的用途，其中肿瘤前期状态是在内皮细胞顶膜上出现 P2Y 受体的 P2Y 受体表达图的肿瘤状态。

15. 如权利要求 1 所述的用途，其中 P2Y 受体表达图与其他标记的表达图联用。

16. 如权利要求 15 所述的用途，其中 P2Y 受体表达图与 P2X 受体表达图联用。

17. 如权利要求 16 所述的用途，其中 P2Y 受体表达图与 P2X<sub>1</sub> 和/或 P2X<sub>2</sub> 感受体表达图联用。

18. 如权利要求 2 所述的用途，其中 P2Y 受体表达图通过免疫组织化学法或 Western 或 Northern 印染技术检测。

19. 如权利要求 2 所述的用途，其中 P2Y 受体表达图通过 ELISA 法或 RIA 法检测。

20. 如权利要求 2 所述的用途，其中 P2Y 受体表达图通过比色试验检测。

21. 如权利要求 1 中所述的用途，其中所述抗体是 P2Y<sub>2</sub>、P2Y<sub>4</sub> 和/或 P2Y<sub>6</sub> 受体的特异性抗体。

22. 如权利要求 21 中所述的用途，其中抗体是 P2Y<sub>2</sub> 受体的特异性抗体。

23. 如权利要求 1 所述的用途，其中抗体是单克隆抗体。

24. 如权利要求 1 所述的用途，其中抗体是多克隆抗体。

25. 如权利要求 1 所述的用途，其特征在于，所述抗体与至少一种其他抗体联用。

26. 如权利要求 25 所述的用途，其中至少一种其他抗体是 P2Y 受体特异性抗体或 P2x 受体特异性抗体。

27. 如权利要求 26 所述的用途，其中 P2x 受体抗体是 P2X<sub>1</sub> 或 P2X<sub>2</sub> 受体特异性抗体。

28. 如权利要求 25 至 27 中任一项所述的用途，其中至少一种其他抗体是单克隆抗体。

29. 如权利要求 25 至 27 中任一项所述的用途，其中至少一种其他抗体是多克隆抗体。

30. 如权利要求 1 所述的用途，其中细胞和/或组织通过活体组织检查得到。

31. 如权利要求 30 中所述的用途，其中活体检查组织是通过细针抽吸从体液中得到前列腺细胞和/或组织，或从直肠指检渗出物中或精液中获得。

32. 如权利要求 1 所述的用途，其特征在于，所述诊断哺乳动物肿瘤前期和/或肿瘤状态、确定哺乳动物肿瘤前期和/或肿瘤状态阶段或鉴定所述细胞和/或组织处于哺乳动物肿瘤前期和/或肿瘤状态与一种互补试验联用。

33. 如权利要求 32 所述的用途，其中互补性试验是肿瘤恶性度试验。

34. 如权利要求 33 所述的用途，其中肿瘤恶性度试验是采用挤人端粒酶蛋白质 1(hTP1)特异性抗体的抗端粒酶抗体试验或抗肌腱蛋白试验。

35. 如权利要求 1 所述的用途，其中所述哺乳动物的细胞和/或组织邻近肿瘤前期细胞或肿瘤细胞，其本身并非是肿瘤前期或肿瘤细胞。

## P2Y 嘌呤受体的表达在鉴定肿瘤前期 和肿瘤状态中的应用

### 技术领域

本发明涉及鉴定哺乳动物的肿瘤前期和肿瘤状态的方法，特别是根据 P2Y 嘌呤受体的差异性表达鉴定细胞和组织中的肿瘤前期和肿瘤形成的方法。

### 背景技术

在进行癌症诊断时，必须考虑到活检样品中诸如癌细胞体积和形状的变异性程度、活跃分裂细胞的比例以及对邻近组织的入侵等细胞特点。常用的组织学染色剂是苏木精(初染)和伊红(复染)，它们可差异性标记亚细胞成分。其他诊断方法是采用针对细胞或组织中(通过细胞内表位)或细胞/组织表面(通过细胞外表位)的特定诊断性分子的抗体，使这些分子，如癌胚抗原(CEA)在显微镜/分析中可见，一些具体实施例叙述如下。

### 前列腺癌

在西方国家中，前列腺癌的发生率正以惊人的速率增长，过去五年中，其增长超过 1 倍。在所有肿瘤中，它有最高的发生率，仅次于全世界男性癌死亡最常见病因的肺癌，是澳大利亚的第一位癌症死亡病因[1]。良性前列腺增生(BPH)在 50 岁以上的男性中常见，它可能是前列腺 上皮内瘤形成(PIN)的前兆，其本身是前列腺癌的前兆。尸体解剖研究表明 70%男性达到 80 岁后，其前列腺中有恶性细胞[2]。

尽管这种情况很严重，但诊断方法却很少，且不精确。目前评估预后的方法，例如直肠指检法(DRE 法)、超声波法、前列腺酸性磷酸酶水平法、雄激素剥夺法，前列腺特异性抗原(PSA)密度法、PSA 速变法、PSA 年龄特异性参考范围法以及 Gleason 组织病理学分级法都不能对前列腺癌的临床结局提供可靠的预测信息[3]。例如，研究显示 DRE 的结果有 36.9%假阴性率[4]。PSA 是与前列腺外许多组织相关的一种 33-kDa 的丝氨酸蛋白酚[5]，受雄激素、糖皮质激素和黄体酮的上调，据认为参与生长因子的调节。不幸的是，血清 PSA 水平的假阴性诊断率为 23%，假阳性诊断率为 36.7%[5]。甚至有人提出超过半数的新筛检病例实际上为假阳性[6]。试图通过引进其他的测试法，例如 PSA 密度。速率以及年龄特异性参考范围

来改进筛检方法结果也是不确定的。一项研究表明，将正常 PSA 上限提高到 4.5ng/mL 的年龄特异性 PSA 参考范围的应用结果并不能检测出大量的临床上明显的癌症[7]。由于这种不确定性，常进行前列腺的活组织检查来证实恶性，但这种检测方法很令人不满意，存在 23%的假阴性诊断率[8]，原因是未能直接采到发生癌变部位的样品。

治疗方法的选择在很大程度上取决于根据组织切片显微镜分析得出的临床阶段[9]。这种技术依赖于对组织学表现与临床结局相关性的判断和相当的经验。不幸的是，前列腺癌组织是有名的异质性的，而某一种重要的诊断特征可能在切片检查时很容易被忽略。使这种情况更加复杂化的是，尚没有检验外科手术或是放射治疗结果的随机和可控制的试验[2]。可选择的治疗方法包括基本上前列腺切除术、放射治疗法、雄激素剥夺法和“观测性等待”。“观测性等待”对根治性干预问题的明确回答需等待前列腺癌干预对观察试验的结论[10]。这些决定的结果对于病人而言是严重的。例如前列腺切除术常常导致小便失禁，阳痿，膀胱颈狭窄，疼痛和消沉[11]。

对于其他诸如乳腺癌或皮肤癌等癌症，采样可能由于若干原因而被错误诊断。例如乳腺肿瘤，定位肿瘤的边界可能不很明确，类似于皮肤癌，(如果 H&E 染色判定)组织学上明显癌瘤和正常组织之间的边界也是常常变化的。在这些肿瘤的周围切下了或多或少的超过期望的正常组织。

本发明的目的是提供一种鉴定肿瘤前期和/或肿瘤细胞的方法，从克服或基本上改善当前技术的至少某些缺陷或提供有效的替代方法。

## 发明内容

P2Y 嘌呤受体是能结合三磷酸腺苷的 G 蛋白偶联组织受体，某些 P2Y 受体亚型能结合三磷酸尿苷。已令人惊奇地发现 P2Y 受体的表达模式可以用来诊断哺乳动物的肿瘤前期形成以及肿瘤的形成。

哺乳动物的癌前期和癌症各个阶段伴随着在生长，细胞外基质，新陈代谢和神经支配因子上的显著差异以及上皮离子钙和微管的增加。采用本发明的新的抗体，P2Y 受体可以容易地通过免疫细胞化学方法而观察到，并且已显示它们存在各种各样的表达模式，如细胞表面，管状和斑点标记。这些表达模式可以用于鉴定癌发展的不同阶段，从完全正常组织开始，发展至肿瘤前期。以 P2Y 受体在前列腺中表达为例，最初出现在单个受影响腺胞的细胞核内。在更进一步但尚没有出现癌形态迹象的肿瘤前状态中，这些受体离开细胞核而扩散进入腺胞中的细胞质、侧膜和

基底膜，然后沉积在上皮细胞的顶膜上，同步发生伴有早期癌症的形态学变化。由于这些阶段在性质上较形态学定义的肿瘤明显区域更普遍，这种诊断性分阶段并不限于用来指导紧邻肿瘤区域的取样，而且可以检测远处肿瘤的存在。因此，本发明为诊断癌症前期状态(如增生)至癌症阶段，以及为研究癌症发生的生理学和病因学提供了一种新方法。

根据第一方面内容，本发明为诊断哺乳动物肿瘤前期和/或肿瘤状态提供了一种方法，所述方法包括检测所述哺乳动物细胞和/或组织的 P2Y 嘌呤受体表达图，并将其与正常细胞和/或组织的预先确定的表达图作比较。

根据第二方面内容，本发明为确定哺乳动物肿瘤前期和肿瘤状态的各阶段提供了一种方法，包括检测所述哺乳动物细胞和/或组织的 P2Y 嘌呤受体表达图，并将其与正常细胞和/或组织的预先确定的表达图比较。

根据第三方面内容，本发明为确定哺乳动物癌发生的病因学提供了一种方法，包括检测所述哺乳动物细胞和/或组织的 P2Y 嘌呤受体表达图，并将其与正常细胞和/或组织的预先确定的表达图作比较。

优选所述的哺乳动物是人，但这一方法可以适用于包括马，牛，羊，狗，猫，大鼠和小鼠的任何适当的哺乳动物。

细胞和/或组织优选来自于前列腺/乳腺或皮肤。然而熟练技术人员将认识到这种方法也可能适用于包括上皮细胞的其他细胞类型。

当肿瘤前期或肿瘤状态是前列腺癌前期或前列腺癌时，与正常的前列腺细胞或组织的表达图相比，其前列腺细胞或中的 P2Y<sub>2</sub> 嘌呤受体表达图强度增强，本文即定义为存在前列腺癌前期或前列腺癌的诊断指标。

当肿瘤前期或肿瘤状态是乳腺癌前期或乳腺癌时，与正常的乳腺细胞或组织的表达图相比，其乳腺细胞或组织的 P2Y<sub>2</sub> 嘌呤受体的表达图强度减弱，本文即被定义为存在乳腺癌前期或乳腺癌的诊断指标。

当肿瘤前期或肿瘤状态是皮肤癌前期或皮肤癌时，与正常的皮肤细胞或组织的表达图相比，其皮肤细胞或组织的 P2Y<sub>2</sub> 嘌呤受体的表达图强度减弱，本文即定义为存在皮肤癌前期或皮肤癌的诊断指标。

皮肤癌宜为恶性黑色素瘤，鳞细胞癌或基底细胞癌。因而，按照本发明，辨别皮肤癌状态与那些所述及的角化棘皮瘤和光化性角化病等其他良性损害是可能的。

优选的 P2Y 受体表达图是 P2Y<sub>2</sub>，P2Y<sub>4</sub>，和/或 P2Y<sub>6</sub> 受体表达图，更优选的是 P2Y<sub>2</sub> 受体表达图。熟练技术人员能够不经过过多的实验而确定哪种 P2Y 受体最适合用来

实践该具体方法。一般而言，那些能够在肿瘤前期或肿瘤细胞/组织与正常细胞或组织相比在表达图强度的差异上产生最大对比的 P2Y 受体是最理想的。

在一个实施例中，肿瘤前期状态是 P2Y 受体表达图中细胞核发生变化的早期、肿瘤前期状态。或者，在另一实施例中，肿瘤前期状态是一种较晚的前期状态，其中 P2Y 受体表达图是 P2Y 受体在细胞质和/或侧膜和/或基底膜内表达的图谱。

在另一实施例子中，肿瘤状态是一种 P2Y 受体在上皮细胞的顶膜上表达的图谱。

熟练技术人员将会明白，P2Y 受体表达图可以联合其他标记的表达图。具体说，P2Y 受体表达图可以联合 P2X 受体表达图，优选 P2X<sub>1</sub> 和/或 P2X<sub>2</sub> 表达图。

优选 P2Y 受体表达图用免疫组织化学方法来检测。然而，熟练技术人员将会明白，根据细胞或组织样品的来源以及可获得的试剂，P2Y 受体可以用包括 ELISA, RIA 或类似的免疫学技术等其他方法检测。优选 P2Y 受体用比色试验例如 DAB(二氨基联苯胺)或 LSAB(标记的链霉亲和素生物素技术)第二抗体检测试剂盒(Dako)来检测。

本领域熟练技术人员将会明白，标准的 Western 印迹技术和标准的 P2Y 嘌呤受体 mRNA 的 Northern 测定方法也可用于测定 P2Y 受体表达图。

根据第四方面内容，本发明提供了可用于辨别肿瘤前期或肿瘤细胞和/或组织与正常细胞和/或组织的 P2Y 嘌呤受体的特异性抗体。

优选该抗体对于 P2Y<sub>2</sub>, P2Y<sub>4</sub>, 和/或 P2Y<sub>6</sub> 受体是特异性的。最优选该抗体对于 P2Y<sub>2</sub> 受体是特异性的。

本领域熟练技术人员将会明白，P2Y 受体特异性抗体可以是多克隆或单克隆抗体。本领域熟练技术人员将会明白，P2Y 受体特异性抗体可与其他抗体联用，具体说与一种或多种 P2X 受体特异性抗体联用。P2X 受体特异性抗体也可以是单克隆或多克隆抗体。在优选实施例中，P2X 受体的抗体是 P2X 和/或 P2X<sub>2</sub> 受体特异性抗体。

根据第五方面内容，本发明提供了包括前述第四方面抗体的一组抗体。

根据第六方面内容，本发明提供了用于第一方面方法中的分离的哺乳动物细胞或组织样品。

本发明中所用的细胞和/或组织可以从活组织检查中得到(例如通过细针抽取，特别是从乳腺组织中抽取)，但也可以用任何其他方法获得，包括从体液中获得，或者如果是前列腺细胞和/或组织，则可从直肠指检渗出物或精液中获得。

本领域技术人员将会明白，本发明的方法和 P2Y 受体特异性抗体可以与其他

互补性检测方法联用，例如肿瘤恶性试验。肿瘤恶性度试验可以采用针对人端粒酶蛋白质(hTP<sub>1</sub>)的特异性抗体进行抗端粒酶抗体测试，或者任何其他适当的试验，例如抗肌腱蛋白试验。

根据第七方面内容，本发明提供了可用于诊断哺乳动物肿瘤前期和/或肿瘤状态的试剂盒，其中含有检测 P2Y 嘌呤受体表达图的试剂。

根据第八方面内容，本发明提供了可用于确定哺乳动物肿瘤前期和/或肿瘤状态阶段的试剂盒，其中含有检测 P2Y 嘌呤受体表达图的试剂。

根据第九方面内容，本发明提供了可用于确定哺乳动物癌发生病因学的试剂盒，其中含有检测 P2Y 嘌呤受体表达图的试剂。

优选测定 P2Y 嘌呤受体表达图的试剂，是第四方面所述的抗体或是第五方面所述的一组抗体。

该试剂盒优选应用于第一方面至第三方面任一所述的方法中。

在本发明上下文中所述及的“肿瘤细胞”和“肿瘤组织”术语，按其普通含义理解，包括但不限于具有肿瘤细胞或组织特征的细胞或组织，例如，增生或肥大性生长模式以及被苏木精和伊红染料(即 H&E)特征性着染突现异常的细胞形状大小和细胞核大小。

在本发明上下文中所述及的“肿瘤前期细胞”和“肿瘤前期组织”术语，按其普通含义理解，包括但不限于增生或肥大性生长的细胞或组织。但是所述的细胞或组织并没有肿瘤细胞或组织的特征，例如被 H&E 特征性着染的肿瘤细胞或组织突现异常的细胞形状大小和细胞核大小。

在本发明上下文中所述及的“正常细胞”和“正常组织”的术语，按其普通含义理解，包括但不限于与既没有肿瘤前期形成也没有肿瘤形成的个体的细胞的 P2Y 表达图(相比)没有可见的实质性改变的细胞或组织。在本发明上下文中所述及的与前列腺状态相关的“正常细胞”术语还包括从良性前列腺增生的前列腺获得的细胞。

在本发明上下文中所述及的“一组抗体”术语包含多克隆抗体，其含有对相同或不同抗原具有特异性的几种不同抗体而能特异性辨别各种受体亚型。当此抗体为单克隆抗体时，“一组抗体”还包括能够特异性辨别每种受体如 P2Y 和 P2X 或受体亚型如 P2Y<sub>2</sub> 和 P2Y<sub>4</sub> 的抗体组。

在本发明上下文中所述及的“表达图谱”的测定，包括表达模式或强度的测定。

除非在上下文中另有明确要求，本说明书和权利要求中的词汇“包含”，“包括”以及类似的措词，构成了包含含义，与排除或去除含义相反；即，含义为“包括，但不限于”。

### 附图简要说明

图 1 显示肿瘤形成前期的第一阶段，用 P2Y<sub>2</sub> 抗体标记的突出的上皮细胞核。

图 2 显示典型的肿瘤形成前期的第二阶段，(箭头处)肿瘤着色，标示形成一点状模式而细胞核内无着色，尚无癌症的形态学证据。

图 3 着色显示 P2Y<sub>2</sub> 聚集在组织的顶部上皮(箭头)上，显示伴随癌瘤的进展，形态学变化的证据。

图 4 显示第三期病例前列腺组织(明显的癌肿瘤)的 P2Y<sub>2</sub>，P2X<sub>1</sub> 和 P2X<sub>2</sub> 抗体联合标记。

图 5 显示用 P2Y<sub>2</sub>，P2X<sub>1</sub> 和 P2X<sub>2</sub> 抗体联合标记的非癌性乳腺组织(纤维腺瘤)。用此混合抗体标记后，观察到标记强度有小的提高。

图 6 显示用 P2Y<sub>2</sub> 标记的一组相似的非癌性纤维腺瘤切片，显示接近的相似着色。

图 7 显示用 P2Y<sub>2</sub>，P2X<sub>1</sub> 和 P2X<sub>2</sub> 抗体联合标记的癌性乳腺组织。该癌性组织没有被标记。

图 8 显示用 P2Y<sub>2</sub> 标记的乳腺癌组织，显示非常相似的阳性着色缺失。

图 9 显示用 P2Y<sub>2</sub> 抗体标记的正常皮肤良性损伤的活组织切片检查的实例，可见受标记的突出的细胞核(PN)。

图 10 显示用 P2Y<sub>2</sub> 抗体标记的恶性黑色素瘤的活组织切片，所有在正常样品中可见的标记在恶性黑色素瘤中都缺失了。小于 2mm 的黑色素的正常标记得到恢复。联合应用上述抗体得到相同的结果。

### 具体实施方式

本发明的基础是发现肿瘤前期和肿瘤细胞差异性表达了 P2Y 嘌呤受体。这种差异性表达可以用来鉴定肿瘤前期和肿瘤细胞。另外，由于在肿瘤形成前期和肿瘤形成的不同阶段，P2Y 嘌呤受体在细胞中分布不同，P2Y 嘌呤受体的表达图可用于肿瘤前期和肿瘤状态阶段的确定。P2Y 的差异性表达模式也可用于确定癌发生的病

因学。并且，本发明包括：含有检测 P2Y 嘌呤受体表达图的试剂的诊断肿瘤前期和/或肿瘤状态的试剂盒；含有检测 P2Y 嘌呤受体表达图试剂的确定肿瘤前期和/或肿瘤状态阶段的试剂盒，含有检测 P2Y 嘌呤受体表达图的试剂的确定癌发生病因学的试剂盒。

现在通过实施例描述的优选实施方式：

#### 实施例 1. 抗体的产生

按照 Hansen 等[15]采用的方法，检验了人 P2Y<sub>2</sub>[12]、人 P2Y<sub>4</sub>[13]和人 P2Y<sub>6</sub>[14]克隆受体共有序列的适当的抗原性表位。采用了与 P2Y<sub>2</sub> 中 Leu226-Lys242 区段相对应的非同源性抗原表位和相当的 P2Y<sub>4</sub>(Arg226-Arg242)及 P2Y<sub>6</sub>(Cys220-Lys236)序列。各种通过在 P2Y<sub>2</sub> 和 P2Y<sub>4</sub> 表位添加 N-末端 Cys 经马来酰亚胺辛酸-N-羟基琥珀酰亚胺交联接头与白喉类毒素相连。所有的合成均用标准的 t-BOC 化学材料在 ABI 合成器中完成[16]。将此肽-抗原交联物用水配成 5mg/ml 的悬浮液，取等份与完全 Freund's 佐剂混合乳化。随后肌肉注射含有 2mg 肽和不完全 Freund's 佐剂的 1ml 乳液，间隔两周进行第二，第三，第四，第五次免疫。在第 10 到 12 周，在确认所用兔子或羊已得到了针对各抗原表位的足够的抗体滴度后，通过静脉穿刺作最终采血。将血液 37°C 温育 30 分钟，4°C 保存 15 小时后离心收集血清，分成小等份零下 20°C 存储。用 ELISA 试验测定血清中针对各个肽的特异性抗体。抗体滴度定义为：EUSA 试验中产生的吸光值高于本底 1.0 的血清稀释度的倒数。其测定值在 75000+/-4000 范围内，与之相比，免疫前血清样品的滴度为 225±25。发现各抗体对特定亚型均有特异性。

将各抗体用其特定抗原表位作亲和纯化，结果该抗体的本底降低但标记倾向相同。抗小鼠 P2Y<sub>2</sub> 抗原表位的单克隆抗体产生了相同结果。

#### 实施例 2. 免疫组织化学程序

用 Reichert Jung 2800 冷冻低温切割刀从非固定的冰冻组织中或从石蜡包埋组织中切得厚度 8μm 的切片。使切片在室温中空气干燥 1 小时后，在零下 20 的丙酮中固定 12 小时，在室温中再空气干燥 1 小时然后进行抗体标记。将其与单克隆的小鼠，兔或绵羊抗-P2Y<sub>2</sub> 第一抗体一起室温培育。洗涤之后，将切片与第二抗体一起培育 30 分钟：对小鼠第一抗体为 1:30 稀释的 HRP-偶联的山羊抗小鼠第二抗体(Dako)，对家兔第一抗体为 HRP-偶联的抗兔第二抗体或 HRP-偶联的山羊抗绵羊第二抗体。再洗涤切片之后，将其浸在 15%的二氨基联苯胺四氢氯化物(DAB-

Sigma) 中 10 分钟。淋洗切片，空气干燥后安置于 DPX (Merck) 中。对照切片与第一次培育稀释缓冲液一起培育，之后用与实验切片相同的方式进行处理。除了第一抗体用非免疫血清替代外，阴性对照切片用与实验切片相同的方式进行处理。

证实了所有抗体的独特特异性。

### 实施例 3. 人(前列腺)癌组织中的 P2Y 受体

在一项对 40 个正常人和 40 个人前列腺癌病例的研究中，人前列腺癌组织中的 P2Y<sub>2</sub> 亚型显著增加。正常组织或良性前列腺增生没有可见的标记。癌组织中的 P2Y<sub>2</sub> 标记模式非常独特，在前列腺癌的各阶段有更大比例的被标记的腺泡上皮细胞，这表明癌瘤转化与 P2Y<sub>2</sub> 腺泡标记的程度之间直接相关，始于细胞核(阶段 1; 图 1)，发展到细胞核外或细胞质中点状标记(第 2 阶段，图 2)，再发展到顶端和侧面上皮细胞出现沉积(阶段 3; 图 3)，在晚期第 3 期病例还伴随有形态学上的变化。

#### P2Y 和 P2X 受体抗体联用

P2X 是快速起作用的配体(ATP)-门控离子通道，其将离子尤其是钙离子进入细胞的通道打开。P2Y 受体是代谢回归作用相对较慢的感受体，其进行内部细胞钙存储时须先由 ATP 或 UTP 甚或 ADP 通过引发 G-蛋白层叠结合的活性激活，其功能与 P2X 受体完全不同。

当 P2X 受体抗体与 P2Y 受体抗体联用时，得到了与单用 P2Y 受体抗体所述的相似模式。特别是用抗 P2Y<sub>2</sub> 受体抗体和抗 P2X<sub>1</sub> 或 P2X<sub>2</sub> 受体亚型抗体的一种或两种标记前列腺细胞/组织时，得到的结果要比单用抗 P2Y<sub>2</sub> 受体抗体更好。

按下述方法产生了 P2X 抗体：

按照大鼠抗体[15、24]所用的方法检查了人 P2X<sub>1</sub>[17]、人 P2X<sub>2</sub>[18]、人 P2X<sub>3</sub>[19]、人 P2X<sub>4</sub>[20]、人 P2X<sub>5</sub>[21]、人 P2X<sub>6</sub>[22] 和人 P2X<sub>7</sub>[23] 的共有序列中的合适的抗原表位。与 P2X<sub>1</sub> 中所用的 Lys68-Val184 区段相对应的非同源性抗原表位中添加了 N-末端 Cys。从 P2X<sub>2</sub> 选择得到 His209-Cys226。从 P2X<sub>3</sub> 选择得到 Asn185-Cys203。从 P2X<sub>4</sub> 选择得到 Cys270-Glu285。从 P2X<sub>5</sub> 选择得到 Cys272-Ser288。从 P2X<sub>6</sub> 选择得到 Asn200-Cys218。从 P2X<sub>7</sub> 选择得到添加了 C-末端 Cys 的 Val65-Lys81。将所有表位通过马来酰亚胺辛基-N-羟基琥珀酰亚胺交联与白喉类毒素相连。在家兔和绵羊中产生了抗体并如上述对 P2Y 抗体的方法进行纯化。

图 4 显示联用 P2Y<sub>2</sub>, P2X<sub>1</sub>, P2X<sub>2</sub> 抗体标记的第三期病例(明显癌症)的前列腺组织。

同诸如 P2X<sub>3</sub>, P2X<sub>7</sub> 等其他 P2x 亚型结果与前列腺样品的结果相类似。

#### 实施例 4. 人(乳腺和皮肤)癌组织中的 P2Y 受体

在其他癌症例如乳腺癌(单一或多个病灶)和包括恶性黑色素瘤的皮肤癌中,此标记模式是相反的。在这些组织中,正常组织的 P2Y<sub>2</sub> 抗体标记强列(提示 P2Y<sub>2</sub> 在正常细胞中表达较高),而在癌组织中没见到 P2Y<sub>2</sub> 抗体标记。在联用抗 P2X 受体抗体和抗 P2Y<sub>2</sub> 受体抗体,尤其是抗 P2X<sub>1</sub> 和 P2X<sub>2</sub> 亚型抗体,结果更为明显(图 5-图 10)。

#### 实施例 5. P2Y 受体抗体诊断与其他检验方法联用

显然,上述的 P2Y(和 P2X)受体抗体诊断法可以与其他互补检验方法联用。这些检验方法可能对癌症的性质提供更多的信息,例如,用来诊断肿瘤恶性的试验,如抗端粒酶抗体试验,和/或抗-肌键蛋白试验可用于设计治疗方案。

尽管本发明通过参见特定的实施例进行了描述,但本领域熟练技术人员会懂得本发明可以用许多其他的形式进行实施。



图 1



图 2

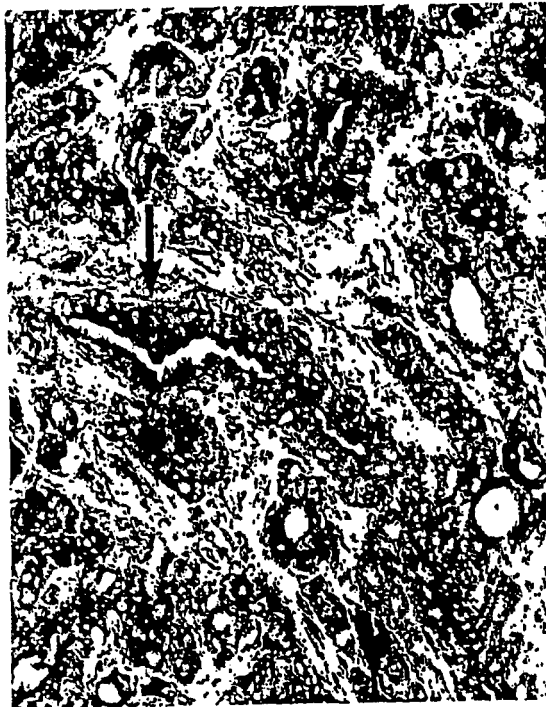


图 3

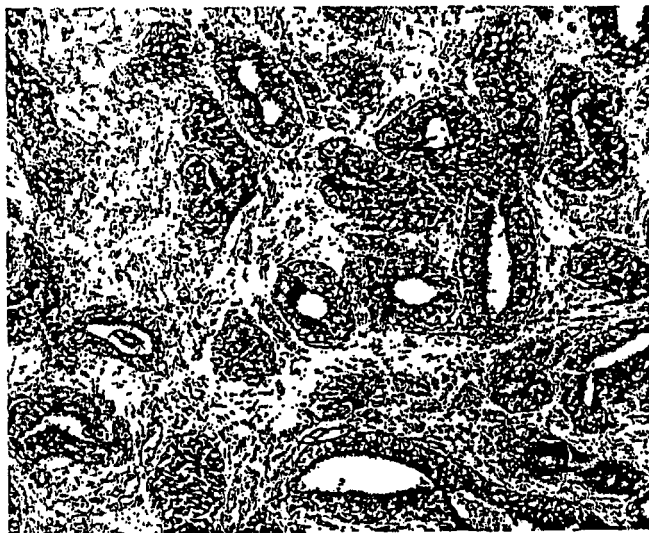


图 4

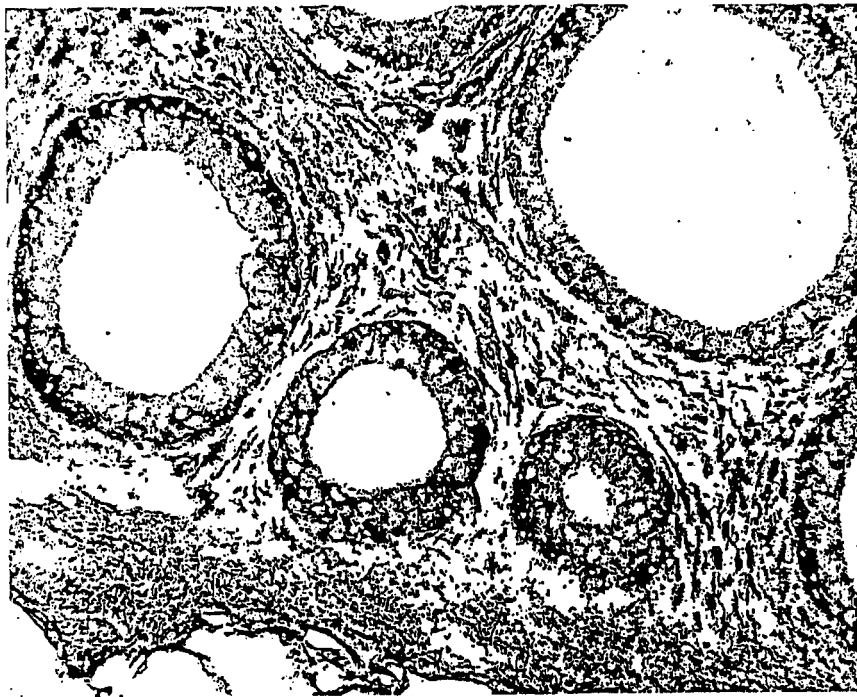


图 5



图 6



图 7

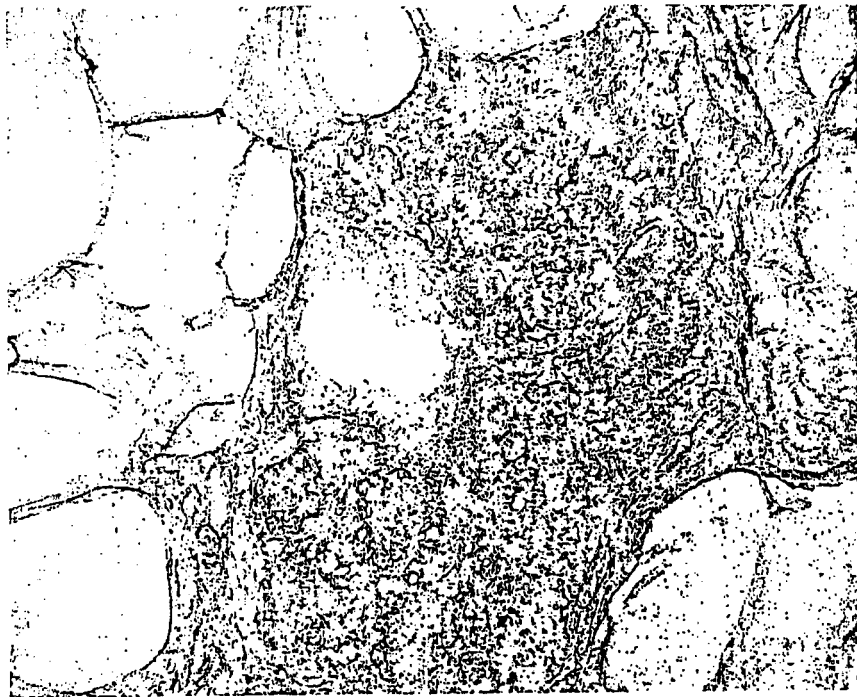


图 8

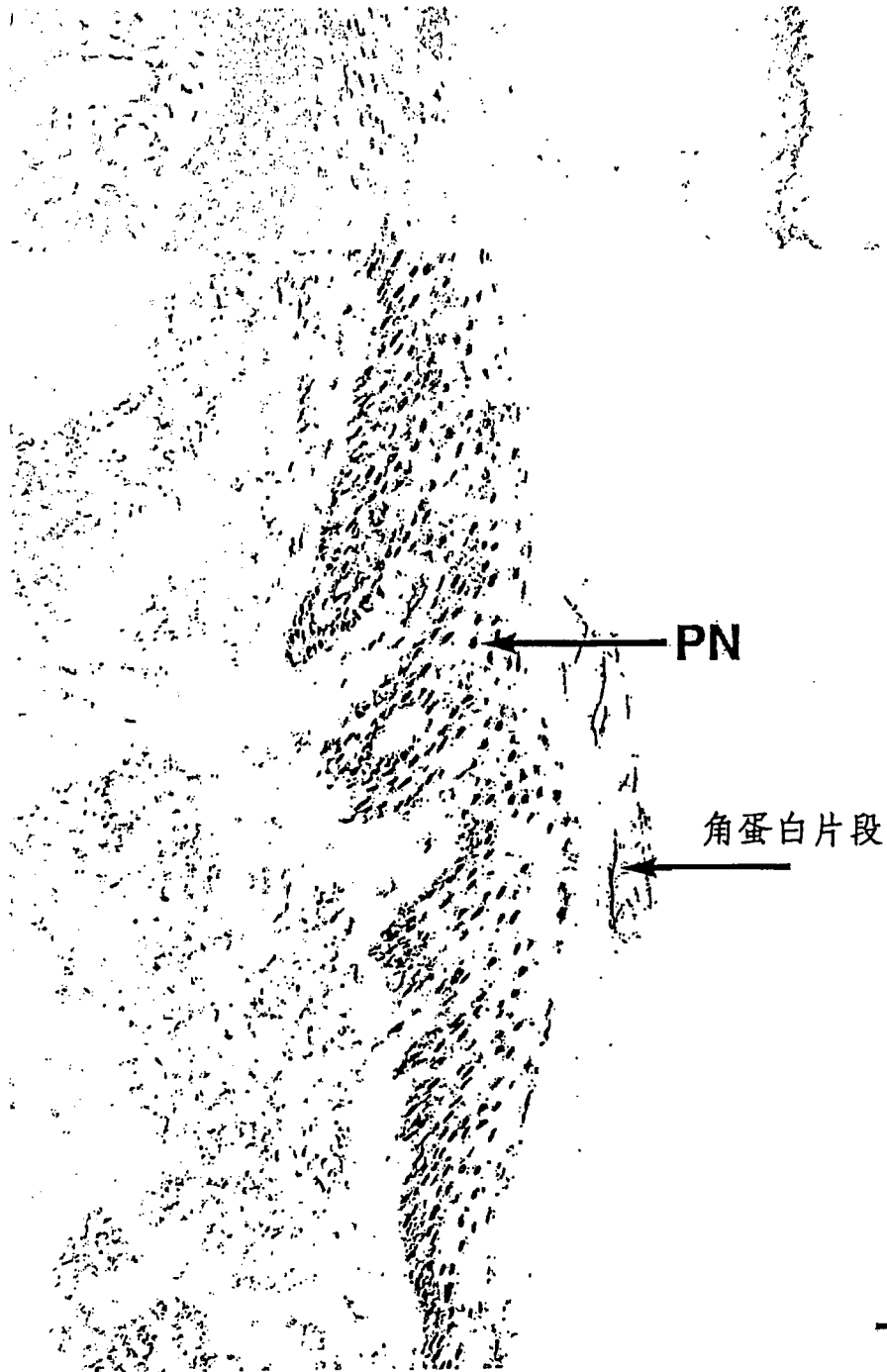


图 9



图 10

专利名称(译)	P2Y嘌呤受体的表达在鉴定肿瘤前期和肿瘤状态中的应用		
公开(公告)号	<a href="#">CN100448486C</a>	公开(公告)日	2009-01-07
申请号	CN01822353.2	申请日	2001-12-11
[标]申请(专利权)人(译)	生物权威控股有限公司		
申请(专利权)人(译)	生物权威控股有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	生物权威控股有限公司		
[标]发明人	J巴登 M斯莱特		
发明人	J·巴登 M·斯莱特		
IPC分类号	A61K39/395 A61P35/00 G01N33/48 C07K16/28 C07K16/30 C12N15/09 C12P21/08 C12Q1/02 C12Q1/68 G01N33/52 G01N33/53 G01N33/574		
CPC分类号	C07K16/28 G01N2333/705 G01N33/574 A61P35/00		
代理人(译)	周承泽		
优先权	2000PR2015 2000-12-11 AU		
其他公开文献	CN1533440A		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明涉及鉴定哺乳动物肿瘤前期和肿瘤状态的方法，具体是根据P2Y嘌呤受体差异性表达鉴定细胞和组织肿瘤形成前期和肿瘤形成的方法。

