



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 101313219 B

(45)授权公告日 2016.10.05

(21)申请号 200680015320.8

(22)申请日 2006.03.31

(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 101313219 A

(43)申请公布日 2008.11.26

(30)优先权数据
2005901613 2005.04.01 AU

(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2007.11.05

(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/AU2006/000431 2006.03.31

(87)PCT国际申请的公布数据
W02006/102716 EN 2006.10.05

(73)专利权人 麦德维特科学控股有限公司
地址 澳大利亚南澳大利亚

(72)发明人 M·P·布朗

(74)专利代理机构 上海专利商标事务所有限公司
31100

代理人 陶家蓉

(51)Int.Cl.

G01N 33/574(2006.01)

G01N 33/53(2006.01)

G01N 33/577(2006.01)

A61K 51/10(2006.01)

A61K 39/395(2006.01)

A61P 35/00(2006.01)

C12Q 1/68(2006.01)

(56)对比文件

US 6639057 B1,2003.10.28,

CN 1533440 A,2004.09.29,

CN 1563412 A,2005.01.12,

Lloyd R Kelland.telomerase:biology and phase I trials.《the lancet oncology》.2001,第2卷

Yiqun Mo等.simultaneous targeting of telomeres and telomerase as a cancer therapeutic approach.《cancer research》.2003,第63卷

审查员 罗洋

权利要求书2页 说明书30页

序列表2页 附图29页

(54)发明名称

一种诊断和治疗方法及其所使用的试剂

(57)摘要

本发明一般涉及一种筛选对象体内赘生细胞死亡水平的方法。更具体地说,本发明提供了一种通过检测所述对象体内的或所述对象来源的生物样品中的死亡细胞所表达的端粒酶蛋白和/或基因的水平来筛选赘生细胞死亡水平的方法。本发明的应用范围很广,其中包括而不限于评价赘生疾病、监测这种疾病的进展、评价治疗剂或治疗方案的疗效以及预测对象向更高疾病阶段进展或者是进入缓解状态的可能性。本发明还提供了用于检测端粒酶蛋白和/或核酸分子的诊断试剂。

1. 与端粒酶RNA、端粒酶mRNA或端粒酶蛋白表达产物相互作用的抗体或其片段或成像探针或引物用于制备试剂盒的用途,其特征在于,所述试剂盒用于检测对象体内凋亡的赘生细胞,所述试剂盒包含针对所述对象或所述对象来源的生物样品内凋亡的细胞中与端粒酶RNA、端粒酶mRNA或端粒酶蛋白表达产物相互作用的抗体或其片段或成像探针或引物,其中凋亡细胞中所述端粒酶RNA、端粒酶mRNA或端粒酶蛋白表达产物的水平相对于非赘生凋亡细胞中的水平来说升高则说明存在凋亡的赘生细胞。

2. 如权利要求1所述的用途,其特征在于,其中相对于来自对象的较早经检测的样品,凋亡的细胞中所述端粒酶RNA、端粒酶mRNA或端粒酶蛋白表达产物的水平相对于非赘生凋亡细胞中的水平来说升高则说明赘生细胞凋亡增加,而下降则说明赘生细胞凋亡下降。

3. 如权利要求1或2所述的用途,其特征在于,所述细胞凋亡由抗赘生细胞治疗方案诱导。

4. 如权利要求1或2所述的用途,其特征在于,所述端粒酶RNA、端粒酶mRNA或端粒酶蛋白表达产物选自:

(i)hTERT蛋白;

(ii)hTERT mRNA;和/或

(iii)hTR RNA。

5. 如权利要求4所述的用途,其特征在于,所述端粒酶蛋白表达产物是能够用抗hTERT单克隆抗体检测的hTERT蛋白。

6. 如权利要求1所述的用途,其特征在于,所述赘生细胞来源于中枢神经系统肿瘤。

7. 如权利要求1所述的用途,其特征在于,所述赘生细胞来源于视网膜母细胞瘤。

8. 如权利要求1所述的用途,其特征在于,所述赘生细胞来源于儿科肿瘤。

9. 如权利要求1所述的用途,其特征在于,所述赘生细胞来源于头颈癌。

10. 如权利要求1所述的用途,其特征在于,所述赘生细胞来源于鳞状上皮细胞癌。

11. 如权利要求1所述的用途,其特征在于,所述赘生细胞来源于乳腺癌。

12. 如权利要求1所述的用途,其特征在于,所述赘生细胞来源于前列腺癌。

13. 如权利要求1所述的用途,其特征在于,所述赘生细胞来源于肺癌。

14. 如权利要求1所述的用途,其特征在于,所述赘生细胞来源于肾癌。

15. 如权利要求1所述的用途,其特征在于,所述赘生细胞来源于肾细胞腺癌。

16. 如权利要求1所述的用途,其特征在于,所述赘生细胞来源于食管胃癌。

17. 如权利要求1所述的用途,其特征在于,所述赘生细胞来源于肝细胞癌。

18. 如权利要求1所述的用途,其特征在于,所述赘生细胞来源于胰胆管瘤。

19. 如权利要求1所述的用途,其特征在于,所述赘生细胞来源于腺癌。

20. 如权利要求1所述的用途,其特征在于,所述赘生细胞来源于胰岛细胞肿瘤。

21. 如权利要求1所述的用途,其特征在于,所述赘生细胞来源于结肠直肠癌。

22. 如权利要求1所述的用途,其特征在于,所述赘生细胞来源于宫颈癌。

23. 如权利要求1所述的用途,其特征在于,所述赘生细胞来源于肛门癌。

24. 如权利要求1所述的用途,其特征在于,所述赘生细胞来源于生殖道癌。

25. 如权利要求1所述的用途,其特征在于,所述赘生细胞来源于尿道癌。

26. 如权利要求1所述的用途,其特征在于,所述赘生细胞来源于输尿管癌。

27. 如权利要求1所述的用途,其特征在于,所述赘生细胞来源于膀胱癌。
28. 如权利要求1所述的用途,其特征在于,所述赘生细胞来源于生殖细胞肿瘤。
29. 如权利要求1所述的用途,其特征在于,所述赘生细胞来源于卵巢生殖细胞肿瘤。
30. 如权利要求1所述的用途,其特征在于,所述赘生细胞来源于卵巢癌。
31. 如权利要求1所述的用途,其特征在于,所述赘生细胞来源于上皮癌。
32. 如权利要求1所述的用途,其特征在于,所述赘生细胞来源于未知的原发性癌。
33. 如权利要求1所述的用途,其特征在于,所述赘生细胞来源于人免疫缺陷相关的恶性肿瘤。
34. 如权利要求1所述的用途,其特征在于,所述赘生细胞来源于卡波西肉瘤或淋巴瘤。
35. 如权利要求1所述的用途,其特征在于,所述赘生细胞来源于白血病。
36. 如权利要求1所述的用途,其特征在于,所述赘生细胞来源于恶性黑色素瘤。
37. 如权利要求1所述的用途,其特征在于,所述赘生细胞来源于肉瘤。
38. 如权利要求1所述的用途,其特征在于,所述赘生细胞来源于内分泌肿瘤。
39. 如权利要求1所述的用途,其特征在于,所述赘生细胞来源于胸腺肿瘤。
40. 如权利要求1所述的用途,其特征在于,所述赘生细胞来源于胸膜瘤或腹膜瘤。
41. 如权利要求1所述的用途,其特征在于,所述赘生细胞来源于神经内分泌肿瘤或类癌瘤。
42. 如权利要求1所述的用途,其特征在于,所述赘生细胞来源于辜生殖细胞肿瘤。
43. 如权利要求1所述的用途,其特征在于,所述赘生细胞来源于子宫癌。
44. 如权利要求1所述的用途,其特征在于,所述赘生细胞来源于间皮瘤。
45. 如权利要求1所述的用途,其特征在于,所述赘生细胞来源于神经母细胞瘤。
46. 如权利要求1或2所述的用途,其特征在于,所述检测在对象体内进行。
47. 如权利要求1或2所述的用途,其特征在于,所述检测在体外用所述对象来源的生物样品进行。
48. 如权利要求47所述的用途,其特征在于,所述生物样品是血液、尿液、脑脊液、胸腔或腹膜腔积液及腹水、口咽、肺、胆道、结肠或膀胱的洗液和冲刷液、胆汁、胰腺和乳腺抽吸物,以及活检样品和手术切除物的样品。

一种诊断和治疗方法及其所使用的试剂

发明领域

[0001] 本发明一般涉及对象体内赘生细胞死亡水平的筛选方法。更具体地说,本发明提供了一种通过检测所述对象体内的或所述对象来源的生物样品内的死亡细胞所表达的端粒酶蛋白和/或基因的水平来评价赘生细胞死亡水平的方法。本发明的应用范围很广,其中包括而不仅限于评价赘生疾病、监测这种疾病的进展、评价治疗剂或治疗方案的疗效以及预测对象向更高疾病阶段进展或者是进入缓解状态的可能性。本发明还提供了用于检测端粒酶蛋白和/或核酸分子的诊断试剂。

[0002] 本发明还提供了一种使药物如细胞增殖抑制剂在体外或体内治疗性寻靶的方法。由于死亡或濒死赘生细胞位于活的赘生细胞附近,因此这种靶向所述死亡或濒死赘生细胞的能力可用于免疫治疗和免疫预防领域。

[0003] 发明背景

[0004] 本说明书中由作者所列出的参考文献的著录细节以字母排列的方式收集在说明书后。

[0005] 本说明书中任何现有技术的参考文献不能也不应该被视为承认或以任何形式暗示现有技术澳大利亚形成了常识的一部分。

[0006] 恶性肿瘤或癌的生长方式是不可控的,可侵入到正常组织,并且通常会转移,在远离原发组织的地方生长。一般来说,癌起源于一个或仅仅几个正常细胞,这些细胞经历了一种还未完全清楚的被称为恶性转化的过程。体内的几乎所有组织都可以形成癌。起源于上皮细胞的那些肿瘤被称为癌,是最常见的肿瘤类型。肉瘤是间充质组织来源的恶性肿瘤,起源于细胞如成纤维细胞、肌肉细胞和脂肪细胞。淋巴组织的实体恶性肿瘤被称为淋巴瘤,淋巴细胞和其他造血细胞的骨髓内和血液内恶性肿瘤被称为白血病。

[0007] 在工业化国家癌症是三大致死原因之一。由于对感染性疾病的治疗和对心血管疾病的预防不断取得进步,以及预期寿命的不断延长,癌症可能会成为这些国家最常见的致死疾病。因此,成功地治愈癌症需要去除或破坏所有的恶性细胞而不能导致对象死亡。达到此目的的一个理想途径可能是诱导出能够识别肿瘤细胞及其相对的正常细胞的抗肿瘤免疫应答。然而,治疗癌症的免疫方法尽管已经探索了超过一个世纪,但是还未取得稳定的疗效。

[0008] 因此,目前治疗癌症的方法依然是长期使用的方案,即手术切除(如果可能),如果需要再进行放疗和/或化疗。这种相当粗糙的治疗方法的成功率起伏很大,并且可能会因为肿瘤恶化和转移而显著下降。另外,这些治疗方法会产生严重的副作用,其中包括因手术而导致的毁容和瘢痕形成(如,乳房切除术和截肢术)、化疗引起的剧烈恶心和呕吐、以及最显著的对正常组织如毛囊、消化道和骨髓的损伤,这种损伤是毒性药物的非特异性靶向机制造成的,毒性药物是大多数癌症治疗方法的组成部分。

[0009] 另外,大多数抗癌治疗方法,其中包括细胞毒性化疗药物、信号转导抑制剂、放疗、单克隆抗体和细胞毒性淋巴细胞,是通过凋亡来杀死癌细胞的。尽管在进行抗癌治疗以前肿瘤内可能会包含一部分凋亡细胞,甚至有一些坏死区域,但是,在那些对抗癌治疗发生反

应的肿瘤内凋亡细胞的数量预计会增加,坏死的面积会扩大。然而,在利用细胞毒性化疗药物来治疗晚期肿瘤时,细胞死亡的程度以及肿瘤对首次治疗所产生的反应通常是难以评价的。常规的,在对肿瘤的反应进行临床评价和放射评价之前,对象至少要接受三个疗程的化疗。通常来说,只有少数晚期肿瘤对象会对细胞毒性药物产生反应,这样,对象可能会产生副作用而未得到任何好处。因此,现在需要找到一种诊断方法来快速、方便而可靠地在第一个疗程结束后检测肿瘤细胞的死亡情况,从而预测治疗所产生的反应,进而再预测存活率。例如,对手术前接受放化疗的食管腺癌对象进行带氟代脱氧葡萄糖的正电子发射断层扫描术(FDG-PET)可以将治疗应答者与非应答者区别开来,敏感性和特异性超过90%,可用于预测对哪些对象可施行肿瘤治愈性切除术。提前了解肿瘤是否对治疗产生反应可使大多数对象避免接受无效的和具有潜在毒性的治疗方案。这样,非应答对象可接受二线治疗方案或试验药物的临床试验。

[0010] 因此,目前急需的是开发出以靶向方式诊断和治疗肿瘤的新方法。到目前为止,这种有效地靶向杀伤恶性细胞的理想还是难以实现的。

[0011] 在最终导致本发明形成的研究工作中,我们惊奇地发现在死的癌细胞以及因抗癌治疗而死亡的特定癌细胞内,端粒酶的表达是升高的。这一发现明显区别于以前本领域中的理念,即,使用端粒酶可作为肿瘤存在的指示剂,因而推导出可利用端粒酶作为诊断工具通过测定其活性来筛选活的癌细胞。因此,这种结果有助于我们开发出一种新的方法,这种方法可根据死细胞所表达的端粒酶的水平相对于正常水平升高的结果来鉴定死的和濒死的赘生细胞。这种方法在评价可直接杀死赘生细胞的治疗性方案的疗效时非常重要。另外,这些结果还使端粒酶的应用成为了促进以高度靶向性和特异性的方式来使用抗肿瘤药物的一种方式。

[0012] 发明概述

[0013] 在本说明书中,除非上下文要求,单词“包含”及其同义词如“包括”和“含有”可被理解为包括所述整体或步骤或者整体或步骤组,但是并不排除任何其他整体或步骤或者整体或步骤组。

[0014] 本文所使用的术语“来源于”是指特定整体或整体组起源于特定物种,但是却不一定是直接得自该特定物种。

[0015] 本说明书包含利用PatentIn程序(3.1版本)制作的核苷酸序列信息,放在本文的参考文献后面。序列列表中的每一个核苷酸序列都通过数字指示符<210>及随后的序列标识符(如<210>1,<210>2等)来鉴别。每一个序列的长度、序列类型(DNA等)及来源物种都分别由数字指示符区<211>、<212>和<213>所提供的信息来标示。本说明书中所引用的核苷酸序列是通过指示符SEQ ID NO:及随后的序列标识符(如SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2等)来鉴别的。本说明书中所引用的序列标识符与序列列表中数字指示符区<400>及随后的序列标识符(如<400>1、<400>2等)所提供的信息相关。这就是说,本说明书中所描述的SEQ ID NO:1与序列列表中被标示为<400>1的序列相关。

[0016] 本发明的一个方面涉及检测对象体内无法存活的赘生细胞的方法,所述的方法包括检测所述对象体内或所述对象来源的生物样品内无法存活的细胞所表达的端粒酶蛋白和/或基因的水平,其中表达所述端粒酶的无法存活的细胞的水平相对于正常水平来说升高则说明存在无法存活的赘生细胞。

[0017] 本发明的另一方面提供了检测对象体内死亡的赘生细胞的方法,所述方法包括检测所述对象体内或所述对象来源的生物样品内死细胞所表达的端粒酶蛋白和/或基因的水平,其中表达所述端粒酶的死细胞水平相对于正常水平来说升高则说明存在死亡的赘生细胞。

[0018] 本发明另一方面提供了检测对象体内死亡的赘生细胞的方法,其中细胞死亡由抗赘生细胞治疗方案诱导,所述方法包括检测所述对象体内或所述对象来源的生物样品内死细胞所表达的端粒酶蛋白和/或基因的水平,其中表达所述端粒酶的死细胞水平相对于正常水平来说升高则说明存在死亡的赘生细胞。

[0019] 本发明另一方面提供了检测对象体内死亡的赘生细胞的方法,所述的方法包括检测所述对象体内或所述对象来源的生物样品内死细胞所表达的hTERT蛋白和/或基因的水平,其中表达所述hTERT的死细胞水平相对于正常水平来说升高则说明存在死亡的赘生细胞。

[0020] 本发明另一方面提供了检测对象体内死亡的赘生细胞的方法,所述的方法包括检测所述对象体内或所述对象来源的生物样品内死细胞所表达的hTRRNA的水平,其中表达所述hTR的死细胞水平相对于正常水平来说升高则说明存在死亡的赘生细胞。

[0021] 本发明的另一方面提供了评价和/或监测对象体内的赘生疾病的方法,所述方法包括检测所述对象体内或所述对象来源的生物样品内无法存活的细胞所表达的端粒酶蛋白和/或基因的水平,其中表达所述端粒酶无法存活的细胞的水平相对于正常水平来说升高则说明存在无法存活的赘生细胞。

[0022] 本发明的另一方面提供了评价和/或监测对象体内的赘生疾病的方法,所述方法包括检测所述对象体内或所述对象来源的生物样品内死细胞所表达的端粒酶蛋白和/或基因的水平,其中表达所述端粒酶的死细胞水平相对于正常水平来说升高则说明存在死亡的赘生细胞。

[0023] 本发明的另一方面提供了评价和/或监测对象体内的赘生疾病的方法,所述的方法包括检测所述对象体内或所述对象来源的生物样品内死细胞所表达的hTERT蛋白和/或基因的水平,其中表达所述hTERT的死细胞水平相对于正常水平来说升高则说明存在死亡的赘生细胞。

[0024] 本发明的另一方面提供了评价和/或监测对象体内的赘生疾病的方法,所述的方法包括检测所述对象体内或所述对象来源的生物样品内死细胞所表达的hTR RNA的水平,其中表达所述hTR RNA的死细胞水平相对于正常水平来说升高则说明存在死亡的赘生细胞。

[0025] 本发明的另一方面涉及评价和/或监测赘生物治疗方案在对象体内的有效性,所述方法包括检测所述对象体内或所述对象来源的生物样品内无法存活的细胞所表达的端粒酶蛋白和/或基因的水平,其中表达所述端粒酶无法存活的细胞的水平相对于正常水平来说升高则说明已经诱导赘生细胞发生死亡。

[0026] 本发明的另一方面提供了用于生物样品的诊断试剂盒,该试剂盒包含若干容器,其中第一容器适于盛装用于检测端粒酶或编码端粒酶的核酸分子的试剂,第二容器适于盛装有助于第一容器中的试剂所进行的检测的试剂。试剂盒内还可以包含其他容器,例如,用于盛装生物样品的容器。试剂可以是抗体或其他合适的检测分子。

[0027] 本发明的另一方面提供了能与端粒酶产生相互作用的活性分子在制备定量或半定量诊断试剂盒中的应用,其中所述试剂盒用于检测患者来源的生物样品中死亡的赘生细胞。所述试剂盒还可以附有说明书,可以是自动的或半自动的,或者是与自动化仪器或软件匹配的形式。

[0028] 本发明的另一方面涉及治疗对象体内赘生疾病的方法,所述方法包括给予所述对象有效量的能与端粒酶或其抗原性部分相互作用的活性分子,其中所述活性分子可与效应机制连接、结合或相关,其时间和条件是治疗所述疾病。

[0029] 本发明的另一方面涉及治疗对象体内赘生疾病的方法,所述方法包括给予所述对象有效量的针对hTERT蛋白或其抗原性部分的免疫活性分子,其中所述免疫活性分子可与效应机制连接、结合或相关,其时间和条件足以抑制、降低或下调赘生物的生长。

[0030] 本发明的另一方面涉及治疗对象体内赘生疾病的方法,所述方法包括给予所述对象有效量的针对hTERT或hTR RNA或其抗原性部分的免疫活性分子,其中所述免疫活性分子可与效应机制连接、结合或相关,其时间和条件足以抑制、降低或下调赘生物的生长。

[0031] 本发明的另一方面提供了治疗对象体内转移性癌的治疗方法,所述方法包括给予所述对象有效量的能与端粒酶或其抗原性部分相互作用的活性分子,其中所述活性分子可与治疗性效应机制连接、结合或相关,其时间和条件足以抑制、降低或下调所述转移癌的生长。

[0032] 本发明的另一方面涉及与效应机制偶联的抗端粒酶活性分子在制备用于治疗对象体内赘生疾病的药物中的应用,其中所述效应机制可治疗所述疾病。

[0033] 在本发明另外一个方面,本发明涉及包含上文所定义的调节剂和一种或多种药学上可接受的载体和/或稀释剂的药物组合物。

[0034] 本发明的另一方面涉及上文所定义的用于本发明方法中的试剂。

[0035] 附图简述

[0036] 图1是描述能与端粒酶产生相互作用的活性分子所具有的体内和体外诊断性和治疗性用途的示意图。A. 通过La蛋白与端粒酶核糖核蛋白(RNP)的结合,La活性分子可用于鉴定端粒酶RNP组分的间接方法中,其中包含完整的RNA(hTR)及催化组分(hTERT)。能与端粒酶相互作用的活性分子本身可用于检测hTR和hTERT的直接方法中。B. 在癌细胞死亡是自发的或者是被抗癌治疗诱导的情况下,能与端粒酶相互作用的活性分子可用于特异性地诊断癌的存在或预测癌对抗癌治疗的反应。C. 在首轮化疗过后,抗端粒酶因子可作为体内诊断试剂用于检测死亡的癌细胞(暗灰色),其位置靠近活的癌细胞(亮灰色)。同样,能与端粒酶相互作用的活性分子如果连接上非交叉耐药的抗癌治疗(紫色)就可以用作体内治疗性因子,这样就可以通过旁观效应杀死剩余的活的癌细胞(红色)。

[0037] 图2是描述调亡过程在体外所经历的各种状态的示意图。接受到调亡刺激信号以后,调亡细胞皱缩并片段化成称为调亡小体的膜包裹小囊,随着时间的推移,调亡小体逐渐渗漏性或继发性坏死。最后,调亡小体分解成寡核苷酸体(oligonucleosome),然后形成游离的DNA。

[0038] 图3描述的是恶性Jurkat T细胞在调亡以后与调亡的原代T细胞相比其La/SS-B表达的上调情况。FicoII纯化的外周血单个核细胞(PBMC)在含10%胎牛血清的RPMI-1640中培养4天,在培养的最后24小时用1 μ M十字孢碱处理。Jurkat细胞(Jurkat)在用0.5 μ M十字孢

碱处理后24小时开始凋亡。四象限光标设定为小于同型对照SaI5染色的3%。

[0039] 图4描述的是恶性人细胞在细胞毒性药物处理后所导致的凋亡细胞内的TRF2和La表达在处理24小时升高以及hTERT表达在处理48小时升高。A. 在用细胞毒性药物处理24小时后的Jurkat细胞。在用各种细胞毒性药物(人字标记)处理后24小时,PI^高和PI^中细胞内有明显的La染色,但是却没有发现hTERT染色。B. 在用细胞毒性药物处理48小时后的Jurkat细胞。在用各种细胞毒性药物(人字标记)处理后48小时,PI^高和PI^中细胞内有明显的La染色,但是在用依托泊甙、长春新碱和顺铂处理后48小时,只有PI^高细胞内的hTERT染色增加(箭头)。C. 在用细胞毒性药物处理24小时后的Raji细胞。在用各种细胞毒性药物(人字标记)处理后24小时,PI^高和PI^中细胞内有明显的La染色,但是在用长春新碱处理后24小时,只观察到在周边有hTERT的染色增加(箭头)。D. 在用细胞毒性药物处理24小时后的Jurkat细胞。在用各种细胞毒性药物处理后,凋亡细胞内有明显的La(3B9-FITC)和TRF2染色。E. 在用细胞毒性药物处理48小时后的Jurkat细胞。在用各种细胞毒性药物处理后,凋亡细胞内的La(3B9-FITC)和TRF2染色更加明显。F. 在用细胞毒性药物处理48小时后的Raji细胞。虽然在用细胞毒性药物处理后48小时凋亡细胞内有明显的La染色(人字标记),但是试验证明只有用长春新碱和顺铂处理的细胞内才出现TRF2染色的增加。G. 在用细胞毒性药物处理48小时后的HeLa细胞。十字孢碱、依托泊甙和长春新碱可诱导凋亡和La染色(人字标记)以及hTERT染色,但是对TRF2的染色很少(箭头)。H. 在用细胞毒性药物处理48小时后的U2OS细胞。只有十字孢碱可诱导凋亡和La染色(人字标记),而没有hTERT或TRF2相应的染色。在每个例子中,染色情况显示在每个图的上方,所使用的细胞毒性药物显示在每一排图的左侧。图中还指示出了PI对照和hTERT染色的阴性对照(只有纯化的大鼠IgG或抗大鼠二抗)以及TRF2染色的阴性对照(只有纯化的小鼠IgG或抗小鼠二抗)。

[0040] 图5描述的是用10 μ g/mL伴刀豆球蛋白A(conA)培养72小时后的PMBC。通过密度梯度离心获得活细胞,然后用十字孢碱诱导凋亡24小时。Jurkat细胞也用1 μ M十字孢碱处理24小时。圆点图描述的是对7-ADD和hTERT的染色。阴性对照是单独用二抗染色。

[0041] 图6描述的是在未处理的Jurkat细胞(对照)及依托泊甙处理的Jurkat细胞内端粒酶随时间的变化。细胞在没有(对照组)或有(处理组)200 μ g/mL依托泊甙的条件下分别培养24小时(空白柱)、48小时(浅灰柱)、72小时(深灰柱)和96小时(黑色柱)。在特定的时间点收集细胞,在室温下以5 \times 10⁶细胞/mL的密度在PBS(非固定的)或2%多聚甲醛溶液(固定的)内孵育10分钟。固定的细胞用-20 $^{\circ}$ C甲醇按1:10稀释5分钟。然后所有细胞都按照图7所描述的以50 μ g/mL的浓度进行双染色,FL2通道(PE)内死细胞(7-AAD⁺)的平均荧光强度对不同的条件(n=2)作图。平均值的标准差也已绘出,但是由于太小在图上难以看到。

[0042] 图7描述的是正常原始血细胞所对应的赘生细胞内的端粒酶检测情况。外周血单个核细胞培养过夜后可被分成两个主要亚群,因为这些细胞要么粘附在塑料培养皿上(主要是单核细胞系的细胞),要么保持悬浮状态(主要是T淋巴细胞)。单核细胞系细胞所对应的赘生细胞是U937细胞,T淋巴细胞所对应的赘生细胞是Jurkat细胞。比较转化细胞与原始细胞内hTERT蛋白的表达情况。为诱导凋亡,赘生细胞(U937或Jurkat细胞)和原始细胞(粘附的单核细胞系细胞或悬浮的淋巴细胞)在存在或不存在十字孢碱(STS)的条件下用含5% FCS的RPMI-1640培养24小时(空白柱)和48小时(灰色柱)。按照图6所描述的对未处理细胞(对照)进行通透化处理。通透化的对照细胞和未加工的STS处理的细胞与50 μ g/mL抗-

hTERT-生物素在室温下共孵育30分钟。细胞用PBS洗涤,然后在室温下与1:100稀释的链亲和素-PE共孵育30分钟。用PBS洗涤细胞,与2 μ g/mL 7-AAD溶液共孵育10分钟,然后利用流式细胞仪进行分析。图中显示了hTERT表达的倍差,该数据来自于Jurkat细胞和U937细胞与悬浮的原始淋巴细胞和粘附的单核细胞系细胞相比代表hTERT表达水平的平均荧光强度(MFI)的比例。上图中的数值来自于两个数值,图中显示了SEM。下图中的数值是单次测量值,代表了两个独立的试验。

[0043] 图8描述的是H69细胞用抗上皮标记物单克隆抗体BerEP4-FITC染色的情况。H69细胞(1×10^6 细胞/mL)在存在或不存在特定浓度的十字孢碱(0-400 μ g/mL)的条件下用含5% FCS的RPMI-1640培养。48小时后收集细胞,在室温下与(A)5 μ g/mL BerEP4-FITC或(B)5 μ g/mL 小鼠IgG_{1ak}-FITC同种型抗体共孵育15分钟。洗涤细胞,细胞团用含0.5 μ g/mL PI的PBS重新悬浮,然后用流式细胞仪分析。

[0044] 图9描述的是十字孢碱处理的H69细胞内hTERT蛋白的检测情况。H69细胞在存在200 μ g/mL十字孢碱的条件下培养48小时。收集细胞,洗涤,在室温下与(A)50 μ g/mL大鼠IgG_{2ak}-生物素或(B)50 μ g/mL、(C)25 μ g/mL、(D)12.5 μ g/mL或(E)2.5 μ g/mL生物素连接的大鼠抗人端粒酶单克隆抗体共孵育30分钟。细胞洗涤后与1:100稀释的链亲和素-PE在室温下共孵育30分钟。洗涤细胞后与2 μ g/mL 7-AAD在室温下共孵育10分钟后用流式细胞仪分析。

[0045] 图10描述的是十字孢碱处理的H69细胞的三色染色情况。H69细胞在存在400 μ g/mL十字孢碱的条件下培养48小时,收集细胞,然后在存在(A、C)5 μ g/mL小鼠IgG_{1ak}-FITC和50 μ g/mL大鼠IgG_{2ak}-生物素或(B、D)5 μ g/mL BerEP4-FITC和50 μ g/mL抗端粒酶-生物素存在的条件下孵育。细胞洗涤后与1:100稀释的链亲和素-PE在室温下共孵育30分钟。洗涤细胞后与2 μ g/mL 7-AAD在室温下共孵育10分钟。细胞直接用流式细胞仪分析(A、B)或者先用外周血单个核细胞按1:50稀释后再用流式细胞仪分析(C、D)。

[0046] 图11描述的是利用更敏感的技术对十字孢碱处理的H69细胞进行三色染色的情况。十字孢碱处理的H69细胞与作为同种型对照的10 μ g/mL小鼠IgG_{1ak}-PE和50 μ g/mL大鼠IgG_{2ak}-AIexa350或者10 μ g/mL BerEP4-PE和50 μ g/mL抗-hTERT-AIexa350在室温下共孵育15分钟。细胞用PBS洗涤后与1mg/mL TOPRO-3 DNA染料在室温下共孵育10分钟,然后用流式细胞仪(LSR-II系统)分析。

[0047] 图12描述的是APOTEL™与H69小细胞肺癌细胞系(SCLC)细胞的特异性结合,该细胞已被细胞毒药物处理开始凋亡。十字孢碱处理的H69细胞在被细胞毒药物处理24小时、48小时和72小时后通过流式细胞仪分析。(A)显示的是前向散射(FSC)对侧向散射(SSC)(图左侧部分)、7-AAD荧光对PE荧光(图中间部分)的密度曲线,以及7-AAD门控事件的PE荧光的直方图叠加曲线(图的右侧部分)。图中所描绘出的7-AAD对PE密度曲线内的四象限指示的是哪些位置的细胞是活的(7-AAD阴性的)以及同种型对照中 $\leq 3\%$ 的阳性细胞处于什么位置。直方图显示的是与同种型对照(空白)和APOTEL™(黑色)结合的PE荧光频度分布。(B)柱形图描述的是特异性的APOTEL™结合,图中显示的是平均荧光强度(MFI)的净值,通过APOTEL™和同种型对照结合的MFI的差值 \pm 平均值的标准差计算而得(SEM, n=3)*,利用所有配对的Tukey比较进行单向方差分析(ANOVA)的 $p < 0.001$ 。

[0048] 图13:小细胞肺癌(SCLC)患者的血液内含有表达EpCAM的肿瘤细胞,患者进行细胞毒药物化疗以后,循环中的肿瘤细胞在化疗处理后48小时会失去存活能力并且能与

APOTEL™结合。根据上皮细胞粘附分子的表达情况对来自于正常健康志愿者(正常对照;NC)或晚期SCLC患者(GP)的外周血样品内的细胞进行富集,然后通过流式细胞仪进行分析。绘制所有样品的FCS对SSC的密度曲线(上排图)。根据对排除任何特定的与红细胞相关的事件后的对照血样的分析绘制出了区域1(R1)。患者(GP)样品以R1区域进行门控,描述为7-AAD对PE荧光强度的密度曲线(图的中间一排)。框出第二区(R2)以选择死细胞(7-AAD⁺)。R1和R2所门控出的细胞群的PE荧光强度用APOTEL™染色的(黑色)或相匹配的同种型对照mAb染色的(空白)样品的重叠直方图来描述(下排图)。

[0049] 注:(i)24小时时间点的磁珠分离好像未成功,(ii)在48小时和72小时时间点的对照及试验样品中,我们都观察到了一致且高强度的荧光亚群,我们怀疑这是与死细胞或死细胞片段非特异性结合的磁珠所产生的自身荧光。那些样品的R2区作了调整以排除这些亚群。

[0050] 图14描述的是SCLC患者在进行细胞毒药物化疗后48小时,患者的血液内死细胞的数目出现峰值,其时的APOTEL™结合也达到峰值。来自于正常健康志愿者(正常对照;NC)或晚期SCLC患者(GP)的外周血样品经过红细胞裂解后进行流式细胞仪分析。绘制所有样品的FCS对SSC的密度曲线(上排图)。根据对排除任何特定的与红细胞相关的事件后的对照血样的分析绘制出了区域1(R1)。患者(GP)样品以R1区域进行门控,描述为7-AAD对FITC荧光强度的密度曲线(图的中间一排)。框出第二区(R2)以选择死细胞(7-AAD⁺)。R1和R2所门控出的细胞群的FITC荧光强度用APOTEL™染色的(黑色)或相匹配的同种型对照mAb染色的(空白)样品的重叠直方图来描述(下排图)。

[0051] 注:根据正常对照血样内7-AAD⁺事件所出现的情况来判断,红细胞裂解步骤可造成0小时时间点上所记录的死细胞数量增加。

[0052] 图15描述的是来自于SCLC患者(GP)的BerEP4富集的细胞和全血样品在用细胞毒药物化疗前后与APOTEL™结合的比较。图中显示的是来自于正常对照(NC)和患者(GP)的样品所产生的7-AAD对APOTEL™的R1和R2门控密度曲线。图中所描绘的这些曲线中的四象限显示出了哪些位置的细胞是活的(7-AAD阴性的)以及同种型对照中≤3%的阳性细胞处于什么位置。

[0053] 图16描述的是APOTEL™与外周血细胞的结合在用细胞毒药物对SCLC患者进行化疗后48小时达到峰值。柱形图描述的是APOTEL™的特异性结合,图中显示的是平均荧光强度(MFI)的净值,通过APOTEL™及同种型对照与如图2和图3所描述的R1和R2区所框出的亚群的结合所产生的平均荧光强度(MFI)差值计算而得。

[0054] 图17是来自于hTR阳性的Jurkat细胞和hTR阴性的U2OS细胞的GAPDH和hTRmRNA的RT-PCR图。M,分子量标记;1、8、15道:阴性对照;2、9、16道:凋亡的U2OS细胞在24小时时的cDNA;3、10、17道:凋亡的U2OS细胞在48小时时的cDNA;4、11、18道:凋亡的U2OS细胞在72小时时的cDNA;5、12、19道:凋亡的Jurkat细胞在24小时时的cDNA;6、13、20道:凋亡的Jurkat细胞在48小时时的cDNA;7、14、21道:凋亡的Jurkat细胞在72小时时的cDNA。

[0055] 图18:通透化的原始支气管上皮细胞和恶性支气管上皮细胞内端粒酶的表达是相同的,但是支气管癌细胞在用细胞毒药物处理后其表达的端粒酶明显升高。(A)描述通透化的和顺铂处理的原始和恶性支气管上皮细胞所产生的7-AAD荧光(y轴)对Alexa488荧光(x轴)的密度曲线。所设定的四象限可分辨出哪些位置的细胞是活的(7-AAD阴性的)以及同种

型对照染色的细胞<3%。(B)直方图描述的7-AAD门控事件中Alexa488荧光的频度分布。(C)柱形图描述的是以平均荧光强度(MFI)净值±SEM(n=2)表示的hTERT特异性结合,该值是根据ApoteI™结合与同种型对照结合的MFI之间的差值*。A549细胞用顺铂处理后与顺铂处理的原始支气管上皮细胞相比,其hTERT特异性结合显著提高(p<0.001,利用配对后比较的Tukey后检验(post-test))。细胞通透化后其hTERT特异性结合无显著差异。

[0056] 发明详述

[0057] 本发明部分依据于这样一个令人惊奇的研究结果:在频死的和已死的赘生细胞内可以检测到端粒酶的表达,更特别的是,诱导赘生细胞死亡,例如通过细胞毒性药物如DNA损伤药物,可导致端粒酶的表达升高。因此,对死细胞所表达的端粒酶水平升高程度的检测为我们提供了一种方便而准确的定量和/或定性分析死亡的赘生细胞水平的方法。因此,这些发现为我们提供了一种高度敏感而精确的评价哺乳动物恶性疾病的方式,特别是用于监测这种疾病的进展或评价治疗剂或治疗方案的疗效时。另外一个用途是提供了一种对赘生细胞部位进行靶向性治疗同时通过旁观杀伤机制达到杀伤赘生细胞目的的机制。

[0058] 因此,本发明的一个方面涉及对象体内无法存活的赘生细胞的检测方法,所述的方法包括检测所述对象体内或所述对象来源的生物样品内无法存活的细胞所表达的端粒酶蛋白和/或基因的水平,其中表达所述端粒酶无法存活的细胞的水平相对于正常水平来说升高则说明存在无法存活的赘生细胞。

[0059] 被称为“无法存活的”细胞应该被理解为已死的或频死的细胞。对于后者来说,某些杀伤机制可产生一系列导致细胞完全死亡的阶段。例如,凋亡的标志是在凋亡信号启动后但在细胞最终死亡前所发生的一系列细胞事件。术语“频死的”通常包括已接受注定会导致细胞死亡事件的信号或其他刺激的任何细胞。虽然本发明并不局限于任何单一理论或作用模式,但是赘生细胞的一般特征是同时具有无限复制潜能、逃避凋亡和关卡调控失效的特性,否则赘生细胞会被DNA损伤所诱导而发生凋亡。然而,即使在未进行药物治疗的情况下,瘤块通常也会因大家所熟知的肿瘤血供的异质性而产生一定比例的死细胞或频死细胞。但是更常见的是赘生细胞的死亡是被外源因素如治疗性的放疗或化疗所诱导的。这些治疗方案所导致的赘生细胞死亡的机制是易变的,其结果依赖于所选择治疗方案的特殊性质。尽管电离辐射和/或细胞毒药物所导致的DNA损伤通常会使受影响的细胞发生凋亡,但是恶性细胞的本质特征是无法自动进入凋亡通路。因此,可以预见的是恶性细胞会对DNA损伤的原凋亡效应产生耐受。然而,在进行电离辐射和/或细胞毒药物治疗时常常还会导致细胞的死亡,这是因为细胞死亡的其他机制被激活,如坏死、有丝分裂突变、自溶和成熟前衰老。因此,这些广泛使用的治疗方案所产生的诱导赘生细胞凋亡的结果并不象以前预想的那样常见。最近的研究表明,如果恶性细胞不死于凋亡所导致的早期死亡事件,那么这些细胞就有时间进行DNA修复。但是,如果没有修复或者在有丝分裂时发生了DNA的错误修复,那么就会发生有丝分裂后的细胞死亡(Brown和Attardi,2004,Nature Reviews Cancer 5:231-237)。但是,诱导赘生细胞凋亡仍然是所有较常用治疗方案的常见结果。术语“凋亡”细胞应当被理解为正在经历或者已经经历了凋亡的细胞。虽然本发明并不局限于任何单一理论或作用模式,但是凋亡是一种需要频死细胞提供代谢活性的主动过程。凋亡的一般特征是细胞皱缩、DNA裂解成片段(在凝胶上呈“梯形”条带)和染色质的凝集及边缘化。

[0060] 不幸的是,由于可使细胞快速分群(正常的和恶性的)的治疗方案(特别是全身给

药的化疗方案)具有相当程度的非特异性效应,因此本专利可能具有严重的与治疗有关的毒性。因此,为了更精确更快速地监测治疗方案的疗效(或者监测内源性免疫应答的效果)而设计出的方法是很有价值的,因为这种方法能够为我们提供一种更有效的评价和/或调整治疗方案的方式。因此,在本发明中,“无法存活的”赘生细胞应当理解为通过各种方式开始死亡的细胞,其中包括凋亡和非凋亡方式。凋亡的无法存活的赘生细胞的例子是那些因给予诱导细胞凋亡的药物而被杀死的细胞,而非凋亡的无法存活的赘生细胞的例子是那些通过经典的补体通路被裂解的细胞。优选的,所述的无法存活的赘生细胞是死的赘生细胞。

[0061] 因此,更具体地说,本发明提供了检测对象体内死亡的赘生细胞的方法,所述方法包括检测所述对象体内或所述对象来源的生物样品内死细胞所表达的端粒酶蛋白和/或基因的水平,其中表达所述端粒酶的死细胞水平相对于正常水平来说升高则说明存在死亡的赘生细胞。

[0062] 因此,更具体地说,本发明提供了检测对象体内死亡的赘生细胞的方法,其中细胞的死亡是被抗赘生细胞治疗方案所诱导的,所述方法包括检测所述对象体内或所述对象来源的生物样品内死细胞所表达的端粒酶蛋白和/或基因的水平,其中表达所述端粒酶的死细胞水平相对于正常水平来说升高则说明存在死亡的赘生细胞。

[0063] 术语“抗赘生细胞治疗方案”应该被理解为可直接杀伤赘生细胞的任何治疗方案。该治疗方案可以是特异性的,也可以是非特异性。这种治疗方案的例子包括以化疗和放疗为基础的措施。

[0064] 术语“赘生物”应当被理解为赘生细胞的有包膜的或无包膜的生长物。术语“赘生细胞”应当被理解为具有异常生长特性的细胞。术语“生长”应当以其最广泛的意义来理解,其中包括增殖。

[0065] 术语“异常生长”在本文中是指相对于正常细胞生长来说发生细胞分裂速度增加、细胞分裂数目增多、细胞分裂周期缩短、细胞分裂周期频率加快或未受控制的增殖和逃避凋亡这些现象中的一种或几种的细胞生长。虽然不能以任何方式限定本发明,但是术语“瘤形成”的常用医学意义是指因对正常生长调控反应的缺失而产生的“新细胞生长”,例如赘生细胞生长。瘤形成包括良性的、癌前的和恶性的“肿瘤”。术语“赘生物”应当被理解为包含赘生细胞的损伤、肿瘤或其他含包膜的或不包膜的组织块或其他形式的生长物。

[0066] 术语“赘生物”在本发明中应当被理解为任何类型的癌性生长物或致癌病变、转移组织或恶性转化细胞、组织或器官,而不管其组织病理学类型或侵袭状态。

[0067] 本领域的技术人员应当认识到术语“癌”是指上皮组织或内分泌组织的恶性肿瘤,其中包括呼吸系统癌、胃肠道系统癌、泌尿生殖系统癌、睾丸癌、乳腺癌、前列腺癌、内分泌系统癌和黑色素瘤。典型的癌包括那些乳腺组织形成的癌。该术语还包括肉瘤,如由癌组织或肉瘤组织组成的恶性肿瘤。“腺癌”是指来源于腺体组织的癌或者其中的肿瘤细胞形成了可识别的腺体结构。

[0068] 赘生物中所包含的赘生细胞可以是各种类型的、各种组织来源的,如上皮细胞或非上皮细胞。术语“恶性赘生物”和“癌”在本文中应当被理解为可以交互使用的术语。

[0069] 术语“赘生物”应当被理解为包含赘生细胞的损伤、肿瘤或其他带包膜的或不带包膜的组织块或其他形式的生长物。赘生物中所包含的赘生细胞可以是各种类型的、各种组织来源的,如上皮细胞或非上皮细胞。本发明所包括的赘生物和赘生细胞的例子包括而不

限于中枢神经系统肿瘤、视网膜母细胞瘤、神经母细胞瘤和其他儿科肿瘤、头颈癌(如鳞状上皮细胞癌)、乳腺和前列腺癌、肺癌(小细胞肺癌和非小细胞肺癌)、肾癌(如肾细胞腺癌)、食管胃癌、肝细胞癌、胰胆管瘤(如腺癌和胰岛细胞肿瘤)、结肠直肠癌、宫颈癌和肛门癌、子宫癌和其他生殖道癌、尿道癌(如输尿管癌和膀胱癌)、生殖细胞肿瘤(睾丸生殖细胞肿瘤或卵巢生殖细胞肿瘤)、卵巢癌(如卵巢上皮癌)、未知的原发癌、人免疫缺陷相关的恶性肿瘤(如卡波西肉瘤)、淋巴瘤、白血病、恶性黑色素瘤、肉瘤、内分泌肿瘤(如胸腺肿瘤)、间皮瘤及其他胸膜瘤和腹膜瘤、神经内分泌肿瘤和类癌瘤。

[0070] 如上文所详细描述,本发明的依据是,诱导赘生细胞死亡可导致端粒酶表达的上调。虽然本发明不局限于任何单一的理论或作用模式,但是端粒酶是一种核糖核蛋白复合体,它包含一个被称为人端粒酶逆转录酶(hTERT)的催化亚单位蛋白和一个被称为人端粒酶完整RNA(hTR)的用于端粒酶延伸的含451个碱基对的RNA模板。hTERT是端粒酶活性的关键亚单位和限速酶。在正常情况下,体内具有高复制潜能的细胞也表达端粒酶,如活化的淋巴细胞、能形成新个体的生殖细胞和在成年个体内负责多种组织更新的干细胞。

[0071] 因此,术语“端粒酶”应当被理解为所有形式的端粒酶复合体或其组成成分hTERT及其片段、突变体或变体。还应当理解的是,该术语还包括由hTERT mRNA的其他剪接方式而形成的任何异构体或突变体或hTERT的多态性形式。不应当限定术语“端粒酶”,该术语可被解读为任何形式的端粒酶复合体及其组成成分,其中包括任何蛋白质、RNA或mRNA形式、任何亚单位多肽如可被制备的前体形式,无论其作为单体、多聚体、融合蛋白还是作为其他复合体而存在。因此,应当理解的是,人们可以其hTERT/hTR复合体的形式或者以其游离的hTERT或hTR亚单位的形式来检测端粒酶。优选的所述端粒酶是hTERT或hTR。

[0072] 因此,本发明优先提供了检测对象体内死亡的赘生细胞的方法,所述的方法包括检测所述对象体内或所述对象来源的生物样品内死细胞所表达的hTERT蛋白和/或基因的水平,其中表达所述hTERT的死细胞水平相对于正常水平来说升高则说明存在死亡的赘生细胞。

[0073] 优选地,所述hTERT是蛋白质的形式。

[0074] 在另一个优选实施方式中,本发明提供了检测对象体内死亡的赘生细胞的方法,所述的方法包括检测所述对象体内或所述对象来源的生物样品内死细胞所表达的hTR RNA的水平,其中表达所述hTR的死细胞水平相对于正常水平来说升高则说明存在死亡的赘生细胞。

[0075] 优选地,所述细胞死亡是被抗赘生细胞治疗方案所诱导的。

[0076] 更优选地,所述赘生物是中枢神经系统肿瘤、视网膜母细胞瘤、神经母细胞瘤和其他儿科肿瘤、头颈癌(如鳞状上皮细胞癌)、乳腺和前列腺癌、肺癌(小细胞肺癌和非小细胞肺癌)、肾癌(如肾细胞腺癌)、食管胃癌、肝细胞癌、胰胆管瘤(如腺癌和胰岛细胞肿瘤)、结肠直肠癌、宫颈癌和肛门癌、子宫癌和其他生殖道癌、尿道癌(如输尿管癌和膀胱癌)、生殖细胞肿瘤(睾丸生殖细胞肿瘤或卵巢生殖细胞肿瘤)、卵巢癌(如卵巢上皮癌)、未知的原发癌、人免疫缺陷相关的恶性肿瘤(如卡波西肉瘤)、淋巴瘤、白血病、恶性黑色素瘤、肉瘤、内分泌肿瘤(如胸腺肿瘤)、间皮瘤及其他胸膜瘤和腹膜瘤、神经内分泌肿瘤和类癌瘤。

[0077] 仍旧不以任何方式限定本发明,但是在大多数真核细胞内,端粒都是位于每个染色体线性末端的特化结构,其包含一个长度为5-20 kb、包含重复DNA序列TTAGGG的结构,该

结构被大量的特定蛋白质结合。虽然断裂的染色体具有粘性末端,可彼此融合,但是端粒的功能就在于阻止染色体融合。在认识到其保护功能后,端粒上的DNA-蛋白复合体就被称为端粒“帽”。相反,端粒功能丧失或“脱帽”则显示会发生染色体末端融合而形成双着丝粒染色体,这样会在有丝分裂期间打破平衡而产生所谓的断裂-融合-桥循环。这样就造成了遗传物质在子代细胞内的不平等分配,导致基因组的不稳定,还可能导致致死事件如有丝分裂突变的发生。因此,端粒末端特化的DNA-蛋白复合体需要“加帽”或保护染色体末端以免其因双链断裂而暴露,它可以启动DNA损伤修复反应以修复DNA,如果损伤不能修复,则细胞发生凋亡。

[0078] 端粒是一个复合体结构,包含一个新的较高级别的DNA结构T-环和大量端粒相关蛋白及端粒酶相关蛋白。端粒重复结合因子-2(TRF2)是一个对端粒结构和功能特别重要的组分,与hTERT不同,它在所有类型的人正常细胞内都有表达。TRF2在抑制端粒发生DNA损伤反应中发挥重要作用。其他端粒相关蛋白在正常细胞内也有表达,其中包括端粒重复结合因子-1(TRF1)、端锚聚合酶、TRF1相互作用蛋白(TIN2)、hRapI、MreII/Rad50/NbsI DNA修复复合体、Ku70/80异源二聚体。端粒酶相关蛋白包括穹窿蛋白TEP1、伴侣蛋白p23和hsp90、小核仁(sno)RNA结合蛋白、角化不良蛋白和hGarI、核不均一核糖核蛋白(hnRNPs)C1/2、La核糖核蛋白和L22核糖体蛋白以及双链RNA结合蛋白hStau。

[0079] 术语“对象”应当被理解为包括人、灵长类动物、家畜(如羊、猪、牛、马、驴)、试验动物(如小鼠、兔、大鼠、豚鼠)、宠物(如狗、猫)和俘获的野生动物(如狐狸、袋鼠、鹿)。哺乳动物优选人。

[0080] 术语“生物样品”应当被理解为来源于动物的生物材料的任何样品,例如而不限于细胞材料、生物液体(如血液)、粪便、组织活检标本、手术标本或先引入动物体内然后取出的液体(如肺灌洗或灌肠取回的溶液)。根据本发明的方法进行检测的生物样品可直接检测,也可以在检测前进行某种形式的处理。例如,活检标本或手术标本可能在试验前需要匀浆,或者在进行原位检测前需要切片。另外,死细胞样品在试验前需要进行通透化处理。再者,对于非液体形式的生物样品来说,可能需要加入试剂如缓冲液以使其变成可流动的(如果这种形式是试验所需要的)。

[0081] 如果靶分子存在于生物样品内,那么生物样品可被直接检测,如果所有或某些核酸材料存在于生物样品内,那么在试验前可将其分离出来。在另一个实施例中,样品可在分析前进行部分纯化或富集。例如,如果生物样品包含多个不同的细胞群,那么我们希望筛选出特别感兴趣的亚群,例如富集死细胞或富集赘生细胞形式的细胞群。在试验前预处理靶细胞群或其来源的分子,例如灭活活病毒或进行凝胶电泳也包括在本发明的范围内。还应当理解的是,生物样品可以是试验前新鲜获取的,也可以是储存的(例如冷冻的),或者在试验前进行其他方式的处理(如进行培养)。

[0082] 选择哪种类型的样品最适合于根据本文所描述的方法所进行的试验要根据环境的性质而定,如被监测的疾病的性质。优选地,所述样品是血液、尿液、脑脊液、胸腔或腹腔积液及腹水、口咽、肺、胆道、结肠或膀胱的洗液和冲刷液、胆汁、胰腺和乳腺抽吸物,以及活检样品和手术切除物的样品。

[0083] 本发明的依据在于意外发现死的赘生细胞具有端粒酶表达水平上调的特性。因此,这个发现现在为我们提供了一种根据在特定时间点所检测到的死的或濒死的赘生细胞

的水平来监测赘生疾病的方法。这一方法在评价治疗方案的疗效从而提供一种高度敏感而快速的方式来优化治疗方案时特别有用。在这点上,本领域的技术人员应该清楚人们可以在蛋白质(如hTERT)水平上或者在编码蛋白的核酸分子(如hTERT或hTR mRNA)水平上来检测端粒酶表达水平的变化。在没有特殊说明的情况下,本文所用的术语检测“端粒酶”的水平应当被理解为包括检测相关蛋白质或其编码初级RNA转录物或mRNA。

[0084] 如上文所描述,端粒酶在正常情况下可由体内具有高度复制潜能的细胞如活化的淋巴细胞、生殖细胞和干细胞表达。在大多数体细胞内端粒酶是无活性的。因此,根据本发明,在主要由体细胞组成的多种生物样品内的死细胞群中存在端粒酶的表达本身就说明存在死的赘生细胞。例如,一群正常的外周血单个核细胞在其中的死细胞组分中有可忽略水平的端粒酶。但是,在某些生物样品如淋巴结活检样品中,发现有较高比例的非赘生细胞表达端粒酶,这是因为淋巴细胞在免疫应答过程中需要具有较高的复制潜能。

[0085] 因此,应当清楚本发明涉及端粒酶的表达水平相对于这个分子的对照水平的关系。“对照”水平可以是“正常”水平,也可以是来自于同一患者但是在以前的时间点所测得的水平。“正常”水平是指任何未产生赘生疾病的个体的样品相应的生物样品内端粒酶蛋白或编码核酸分子的水平。因此,这个结果提供了端粒酶的背景水平,如果存在的话,这种水平不是因为赘生细胞死亡造成的,而仅仅是因其复制活性高而表达端粒酶的非赘生死细胞相应的水平。可以预见的是,在大多数样品中这些“正常”或“背景”水平是可以忽略的。因此,本发明的方法应该被理解为包含所有合适形式的分析,例如反映来自健康个体的个别结果或整体结果的标准结果相关的试验结果的分析。在一个优选实施方式中,所述的正常参考水平是根据一个或多个受试者的水平所确定的水平,所述的受试者是本发明方法的检测对象相关的一群。“相关的一群”是指具有一个或多个特征的一群,这些特征也是检测对象所具有的特征。这些特征包括而不限于年龄、性别、种族、是否吸烟以及其他健康状况参数。如上文所描述,所述的试验结果也可以是相对于对照水平而分析出的结果,对照水平是从所述对象的体液中较早测得的端粒酶水平。这是一种相对分析的形式(也可以相对于“正常”水平来评价),这种分析为我们提供了在一个时期内与赘生细胞死亡的速度和程度相关的信息,例如在治疗方案实施期间。

[0086] 所述的“正常水平”可以是离散水平或者水平范围。死细胞端粒酶水平高于正常范围的那些个体一般被认为正在发生赘生细胞死亡,这对应于着令人鼓舞的预后,因为它说明出现了治疗反应和/或病情朝缓解的状态进展。在这方面,应当清楚端粒酶水平可通过定量或定性显示器来评价或监测。不同形式的端粒酶如hTERT对hTR之间的参考水平还可能是不同的。

[0087] 因此,本发明提供了评价对象体内死的赘生细胞群是否存在以及范围多大的方法。如上文所详细描述,这种方法在评价治疗方案的疗效时有非常重要的用途。为达到此目的,尽管对生物样品内赘生细胞死亡水平的一次性分析提供了与赘生细胞是否死亡相关的信息,但是本发明作为一种实时监测手段还是有用的,也是特别有价值的。这在鉴定和监测治疗方案时是必须的,在这里赘生细胞对正在使用的化疗药物的反应的初始事件最终会转移到对正在使用的化疗药物耐药的赘生细胞上。利用本文所描述的筛选方案而观察到的结果可能符合利用一次性试验所得到的存在高于正常水平的端粒酶表达水平这样的检测结果。另外,如果患者正在接受监测并且每一个连续的试验结果都与以前的结果相关,那么

我们可以观察到死细胞端粒酶表达水平的一系列降低或升高,根据这些结果可以绘制出选择应用的治疗方案所产生的作用和疗效。因此,死细胞端粒酶表达水平相对于正常水平升高则说明赘生细胞发生死亡,这可能是由多个事件中的任何一个引起的,其中包括患者自身的免疫应答或有效的治疗方案。死细胞端粒酶表达水平相对于以前所分析的患者样品而升高可能说明赘生细胞死亡的速度加快,而在这种环境下端粒酶表达水平下降可能说明所选择的治疗方案无效或者因几乎所有赘生细胞都死亡或被清除而使患者进入缓解状态。

[0088] 因此,在另一方面,本发明提供了评价和/或监测对象体内的赘生疾病的方法,所述的方法包括检测所述对象体内或所述对象来源的生物样品内无法存活的细胞所表达的端粒酶蛋白和/或基因的水平,其中表达所述端粒酶的无法存活的细胞的水平相对于正常水平来说升高则说明存在无法存活的赘生细胞。

[0089] 更具体地说,本发明提供了评价和/或监测对象体内的赘生疾病的方法,所述的方法包括检测所述对象体内或所述对象来源的生物样品内死细胞所表达的端粒酶蛋白和/或基因的水平,其中表达所述端粒酶的死细胞水平相对于正常水平来说升高则说明存在死的赘生细胞。

[0090] 优选地,所述端粒酶是hTERT或hTR。

[0091] 根据这个优选实施方式,本发明提供了评价和/或监测对象体内的赘生疾病的方法,所述的方法包括检测所述对象体内或所述对象来源的生物样品内死细胞所表达的hTERT蛋白和/或基因的水平,其中表达所述hTERT的死细胞水平相对于正常水平来说升高则说明存在死的赘生细胞。

[0092] 更优选地,所述hTERT是蛋白质形式的。

[0093] 在另一个优选实施方式中,本发明提供了评价和/或监测对象体内的赘生疾病的方法,所述的方法包括检测所述对象体内或所述对象来源的生物样品内死细胞所表达的hTR RNA的水平,其中表达所述hTR RNA的死细胞水平相对于正常水平来说升高则说明存在死的赘生细胞。

[0094] 优选地,所述细胞死亡是由抗赘生细胞治疗方案所诱导的。

[0095] 更优选地,所述的赘生疾病具有如下赘生物的特征:中枢神经系统肿瘤、视网膜母细胞瘤、神经母细胞瘤和其他儿科肿瘤、头颈癌(如鳞状上皮细胞癌)、乳腺和前列腺癌、肺癌(小细胞肺癌和非小细胞肺癌)、肾癌(如肾细胞腺癌)、食管胃癌、肝细胞癌、胰胆管瘤(如腺癌和胰岛细胞肿瘤)、结肠直肠癌、宫颈癌和肛门癌、子宫癌和其他生殖道癌、尿道癌(如输尿管癌和膀胱癌)、生殖细胞肿瘤(睾丸生殖细胞肿瘤或卵巢生殖细胞肿瘤)、卵巢癌(如卵巢上皮癌)、未知的原发癌、人免疫缺陷相关的恶性肿瘤(如卡波西肉瘤)、淋巴瘤、白血病、恶性黑色素瘤、肉瘤、内分泌肿瘤(如胸腺肿瘤)、间皮瘤及其他胸膜瘤和腹膜瘤、神经内分泌肿瘤和类癌瘤。

[0096] 本发明的另一方面涉及评价和/或监测赘生物治疗方案在对象体内的疗效的方法,所述方法包括检测所述对象体内或所述对象来源的生物样品内无法存活的细胞所表达的端粒酶蛋白和/或基因的水平,其中表达所述端粒酶的无法存活的细胞的水平相对于正常水平来说升高则说明存在无法存活的赘生细胞。

[0097] 优选地,所述端粒酶是hTERT蛋白或mRNA或hTR RNA。

[0098] 根据本发明的这个方面以及上文所详细描述,表达端粒酶的死细胞与对照水平

相比升高则说明直接杀伤赘生细胞的治疗方案产生了疗效。相反,如果端粒酶水平与正常水平相比基本未发生变化则说明治疗方案是无效的。同样,死的赘生细胞内端粒酶水平相对于以前得到的一个或多个结果下降可能说明治疗方案的疗效下降甚至耐药性升高。

[0099] 本发明还应当被理解为在某种程度上提供了一种诊断方法。即,除了利用这种方法来追踪在实施治疗方案期间和之后死细胞群的变化以外,检测出治疗前表达端粒酶的死细胞在整个肿瘤中所占的比例使这种方法具有了诊断意义。

[0100] 因此,本发明还提供了对象体内赘生疾病的诊断方法,所述方法包括检测所述对象体内或所述对象来源的生物样品内无法存活的细胞所表达的端粒酶蛋白和/或基因的水平,其中表达所述端粒酶的无法存活的细胞的水平相对于正常水平来说升高则说明存在肿瘤。

[0101] 如上文所详细描述,人们可以在蛋白质水平或mRNA水平检测端粒酶。在没有特殊说明的情况下,本文所用的术语检测“端粒酶”的水平应当被理解为包括检测端粒酶复合体或端粒酶亚单位蛋白或其编码初级RNA转录物或mRNA。

[0102] 对对象体内或对象来源的生物样品内端粒酶表达水平的变化的检测可通过任何合适的方法完成,这些方法都是本领域技术人员所熟知的。简言之,人们可以试图检测生物样品内的hTERT蛋白或完整的人端粒酶RNA(hTR)。抗端粒酶的免疫活性分子可直接用于鉴定hTERT或者提供一种分离完整端粒酶RNP复合体、随后再分析其hTERT催化活性和/或hTR RNA的方式。抗La免疫活性分子为我们提供了一种间接的分离完整端粒酶RNP复合体、随后再分析其hTERT催化活性和/或hTR RNA的方式。对于体内分析来说,抗端粒酶免疫活性分子可与医学成像剂连接,使我们能够看到其与死亡癌细胞的特异性结合,特别是在实施抗癌治疗之后。更具体地说,这些方法包括而不限于:

[0103] (i)体内检测端粒酶。可在给予成像探针或试剂后进行分子成像,这些成像探针或试剂能够揭示生物样品内端粒酶RNA、mRNA或蛋白表达水平的变化。

[0104] 分子成像(Moore等,BBA,1402:239-249,1988;Weissleder等,Nature Medicine,6:351-355,2000)是一种分子表达的体内成像技术,目前可利用“经典的”诊断性影像技术如X射线、计算机断层扫描(CT)、MRI、正电子发射断层扫描术(PET)或SPECT来显示与分子成像相关的大分子特征。在一个实施方式中,活性分子与核医学成像剂如铟-111或镓-67连接,或者与PET成像剂和MRI成像剂如毫微粒连接。在另一个实施例中,可利用酶作为检测试剂进行连接,如ADEPT样物质,其中端粒酶活性分子与靶位在体内结合并且在注射酶底物以后可产生出被分析物。

[0105] (ii)利用荧光素原位杂交技术(FISH)分析死细胞内的RNA表达情况,或者利用某些技术如定量逆转录酶链式反应(QRT-PCR)或分析竞争性RT-PCR产物的流式细胞术(Wedemeyer等,Clinical Chemistry 48:9 1398-1405,2002)或芯片技术来分析死细胞提取物内的RNA表达情况。

[0106] 例如,标记的编码端粒酶的多聚核苷酸可作为探针用于生物样品RNA提取物的RNA印迹试验中。优选地,来自于对象的核酸与端粒酶编码多聚核苷酸的正义序列及反义序列或其侧翼序列相应的寡核苷酸引物相符合,用于核酸扩增反应如RT-PCR、实时PCR或SAGE中。各种自动化的固相检测技术也适合本发明。例如,超大规模固相引物芯片技术(VLSIPS™)可用于检测核酸,如Fodor等,1991(Science251(4995):767-73)和Kazal等,1996

所描述。上述遗传技术是本领域技术人员所熟知的。

[0107] 例如,为了检测编码端粒酶的RNA转录物,从怀疑含有赘生细胞的细胞样品中分离RNA。RNA的分离可利用本领域熟知的技术进行,如利用TRIZOL™试剂(GIBCO-BRL/Life Technologies, Gaithersburg, Md.)。Oligo-dT或随机序列寡核苷酸以及序列特异性的寡核苷酸可作为引物用于逆转录反应中,从而从分离的RNA中合成第一链cDNA。然后利用序列特异性的寡核苷酸通过PCR反应扩增所得到的第一链cDNA以制备扩增产物。

[0108] “聚合酶链式反应”或“PCR”是指将核酸、RNA和/或DNA预先选定的片段进行扩增的过程或技术,如美国专利No.4,683,195所描述。一般来说,来自于目的区末端或其两侧的序列信息用于设计寡核苷酸引物。这些引物与要扩增的模板的反义链序列一致或相同。PCR可用于扩增特异的RNA序列以及从细胞总RNA中转录出cDNA。参见Mullis等,1987(*Methods Enzymol* 155:335-50)和Erlich,1989(*J Clin Immunol* 9(6):437-47)。因此,通过PCR扩增特异的核酸序列依赖于具有保守核苷酸序列的寡核苷酸或“引物”,其中的保守序列是从相关基因或蛋白序列的排列中推算出来的。例如,如果预计合成的一个引物与编码端粒酶的cDNA分子的反义链互补,那么所合成的另一个引物就要与其正义链互补。

[0109] 为了检测扩增的产物,反应混合物通常都要进行琼脂糖凝胶电泳或其他方便的分离技术以检测端粒酶特异性的扩增核酸是否存在。例如,可利用特异性的寡核苷酸探针通过DNA印迹来检测端粒酶扩增核酸,或者通过与已知分子量的核酸标准比较电泳迁移率来检测端粒酶扩增核酸。扩增的端粒酶核酸的分离、纯化及鉴定可通过如下过程来完成:从电泳上切下或洗出核酸片段(例如,参见Lawn等,1981;Goeddel等,1980),将扩增产物克隆到适当载体如pCR11载体(Invitrogen)的克隆位点上,对克隆的插入子进行测序并与端粒酶的已知序列进行比较。然后可以确定端粒酶mRNA和cDNA的相对量。

[0110] (iii)定性或定量地检测细胞提取物、血样或其他合适生物样品内端粒酶蛋白表达水平的变化,例如通过免疫分析试验、利用免疫活性分子如单克隆抗体(如抗端粒酶或抗La抗体,其中La可与端粒酶相互作用)。

[0111] 在一个实施例中,人们可以尝试检测端粒酶免疫活性分子复合物的形成。例如,根据本发明,连接有报告分子的抗体可用于免疫分析技术中。这种免疫分析技术包括而不仅限于放射免疫分析(RIAs)、酶联免疫吸附技术(ELISAs)、免疫层析技术(ICTs)以及蛋白印迹分析,这些都是本领域的技术人员所熟知的。例如,可以参考1994年出版的《当代免疫学技术手册》(*Current Protocols in Immunology*),该书所描写的许多免疫分析技术,都可用于本发明中。免疫分析技术包括竞争性分析。应当理解的是,本发明包括定性免疫分析和定量免疫分析。

[0112] 例如,合适的免疫分析技术在美国专利Nos.4,016,043、4,424,279和4,018,653中有描述。这些技术包括非竞争类型的单位点和双位点分析以及传统的竞争性结合试验。这些分析还包括标记的抗原结合分子与靶抗原直接结合。在这种情况下,抗原是端粒酶或其片段。

[0113] 双位点分析特别适用于本发明。这些分析方法有多种版本,都包括在本发明之中。简言之,在典型的正向试验中,将未标记的抗原结合分子如未标记的抗体固定在固相支持物上,然后使待测样品与固定的分子接触(抗原优选端粒酶,但是也可以是端粒酶相关蛋白,如La)。适当孵育一段时间之后,例如足以使抗体-抗原复合物形成的一段时间,加入另

一种抗原结合分子、标记有能产生可检测信号的报告分子的抗原特异性的合适二抗,然后孵育足够时间以使另一种抗体-抗原-标记抗体复合物形成。洗去未反应的材料,然后通过检测报告分子所产生的信号来确定是否存在抗原。结果可以是定性的,即,只简单地观察可视信号,也可以是定量的,即,通过与包含已知量抗原的对照样品进行比较。正向分析方法的改变包括同时分析,其中样品和标记抗体同时与固定抗体结合。这些技术是本领域技术人员所熟知的,包括微小的改变也都很容易理解。

[0114] 在典型的正向分析中,具有抗原或抗原性部位特异性的一抗可以与固相表面共价结合,也可以被动结合。固相表面通常是玻璃或聚合物,最常用的聚合物是纤维素、聚丙烯酰胺、尼龙、聚苯乙烯、聚氯乙烯或聚丙烯。固相支持物可以是管状、珠状、微孔板或其他任何适于进行免疫分析的表面。结合过程是本领域所熟知的,通常包括交联共价结合或物理吸附,聚合物-抗体复合物在试验样品的制备物中洗涤。然后将一份待测样品加到固相复合物上,在合适的条件下孵育足够的时间使存在的所有抗原都结合到抗体上。孵育过后,洗涤抗原-抗体复合物并干燥,再与抗原的一部分有特异性的二抗共孵育。二抗上通常连接有报告分子,用于显示二抗与抗原的结合。结合的标记抗体的量通过连接的报告分子来确定,其数量与结合到固定的第一抗体上的抗原量成正比。

[0115] 另一种方法包括固定生物样品中的抗原,然后使固定的抗原与标记有报告分子或未标记的特异性抗体接触。根据靶位的数量及报告分子信号的强度,可通过直接检测标记的抗体来测定结合抗原。另外,第一抗体特异性的第二标记抗体与靶分子-第一抗体复合物接触可形成靶分子-第一抗体-第二抗体三重复合物。然后根据报告分子所发出的信号来检测复合物。

[0116] 根据上文应当清楚,抗原结合分子与报告分子的连接可能包括如下几种形式:

[0117] (a)报告分子与抗体直接相连;

[0118] (b)报告分子与抗体间接连接,即,报告分子连接到另一种随后与抗体结合的分析试剂上;以及

[0119] (c)与抗体随后的反应产物相连接。

[0120] 报告分子可选自如下一组:色原体、催化剂、酶、荧光染料、化学发光分子、顺磁性离子、稀土元素的离子如铕(Eu^{34})、包含其他核标记的放射性同位素以及直接可视的标记物。

[0121] 可使用的直接可视标记物可以是由胶体金属或非金属粒子、染料粒子、酶或底物、有机聚合物、乳胶颗粒、脂质体或其他包含信号产生物质的囊泡等制备的。

[0122] 许多可用作报告分子的酶都描述于美国专利Nos. U.S. 4,366,241、U.S. 4,843,000和U.S. 4,849,338中。可用于本发明的合适酶包括碱性磷酸酶、辣根过氧化物酶、荧光素酶、 β -半乳糖苷酶、葡萄糖氧化酶、溶菌酶、苹果酸脱氢酶等。酶可单独使用,也可以和溶液中的第二种酶联合使用。

[0123] 合适的荧光染料包括而限于异硫氰酸荧光素(FITC)、四甲基若丹明异硫氰酸盐(TRITC)、R-藻红蛋白(RPE)和德克萨斯红。其他典型的荧光染料包括Dowe等在国际专利WO 93/06121中所描述的那些。另外还可以参考美国专利Nos. 5,573,909(Singer等)、5,326,692(Brmkley等)中所描述的荧光染料。另外,还可以参考美国专利Nos. 5,227,487、5,274,113、5,405,975、5,433,896、5,442,045、5,451,663、5,453,517、5,459,276、5,516,864、5,

648,270和5,723,218中所描述的那些荧光染料。

[0124] 在酶免疫分析中,酶通常通过戊二醛或高碘酸盐的方式与二抗偶联。然而,很容易地理解的是,本领域的技术人员可以很容易获得现有的许多不同的偶联技术。特异性酶所使用的底物一般选择在被相应的酶水解后能够产生可检测的染色变化的底物。合适的酶的例子包括上面所描述的那些。使用可产生荧光的底物也是可以的,这种底物可产生荧光产物而不是上面所提到的显色底物。在所有的情况下,酶标记的抗体都要加到第一抗体-抗原复合物中,使其结合,然后洗去多余的试剂。然后将包含合适底物的溶液加到抗体-抗原-抗体复合物中。底物与连接有二抗的酶反应,产生定性的可视信号,但是这种信号也可以被定量,通常是利用分光光度测定法来测定样品中存在的抗原的量。

[0125] 或者,荧光化合物如荧光素、罗丹明和稀土元素铕(EU)可以与抗体化学结合而不会改变其结合能力。当以特定波长的光照射使其活化时,荧光染料标记的抗体就会吸收光能,诱导分子进入激发状态、随后发射出特定颜色的光,利用光学显微镜就可以观察。荧光素标记的抗体可以和第一抗体-抗原复合物结合。洗去未结合的试剂以后,剩余的三重复合物用适当波长的光照射。观察到荧光则说明存在目的抗原。免疫荧光测定法(IFMA)是本领域熟知的方法,特别适用于本方法。但是,其他报告分子,如放射性同位素、化学发光分子或生物发光分子也可以使用。

[0126] (iv)根据任何合适的功能试验、酶试验或免疫学试验以及上述(iii)所详细描述的那些试验来确定蛋白表达的变化情况。

[0127] (v)纳米技术相关的技术,如Ferrari(Nature Reviews Cancer 5:161-171,2005)和Duncan (Nature Reviews DrugDiscovery,2:347-360,2003)所描述的那些技术。

[0128] 应当清楚的是,本发明的方法可作为独立的试验单独实施,也可以与能够提供更多诊断或预后信息的其他合适的诊断试验联合使用。例如,这并不意味着以任何方式限制本发明的应用范围,本发明的方法可以和分析技术如CellSearch®联合使用,该方法可以有效而准确地检测出外周血中所存在的低含量的循环肿瘤细胞。

[0129] 本发明的另一方面提供了适用于生物样品的诊断试剂盒,该试剂盒包含用于检测端粒酶或编码端粒酶的核酸分子的试剂以及用于帮助所述试剂所进行的检测的试剂。试剂可以是抗体或其他合适的检测分子。

[0130] 本发明还涉及能与端粒酶直接产生相互作用的分子在制备定量或半定量诊断试剂盒中的应用,其中的试剂盒可用于检测对象来源的生物样品中死亡的赘生细胞。试剂盒还可以附有说明书,可以是自动的或半自动的,或者是与自动化仪器或软件匹配的形式。

[0131] 本发明的方法除了具有明确的诊断意义之外,其准确靶向赘生细胞的能力现在为我们提供了一种以局域化且高度靶向性的方式运送治疗性药物的方式。目前,这种治疗方式(通常被称为“魔术弹”)还是不可行的。特别是对于肿瘤治疗来说,靶向性治疗的概念还是难以实现的,因为现实是不可能鉴定出合适的抗体可直接结合的肿瘤特异性抗原。然而,本发明通过将治疗剂直接作用于对象肿瘤内的死细胞上,从而克服了这些缺陷。如上文所详细描述,即使未进行任何治疗,肿瘤通常也包含一定比例的死细胞,可利用这些细胞作为治疗剂的靶位。即使是微小转移瘤也包含凋亡细胞,微小转移瘤降低了初始治疗如对乳腺癌实施的乳腺切除术或对结肠癌实施的结肠切除术成为治愈性治疗方案的机会。微小转移瘤通常是直径小于1mm的癌沉着物,这种微小转移瘤被认为处于静止状态,因为其肿瘤细

胞增殖的速度与肿瘤细胞凋亡的速度达到了平衡。在实施治疗性措施时,本发明的方法提供了一个设计及实施第二相治疗的机会,例如更高毒性的治疗方案,这种措施能够更特异地靶向到死的赘生细胞区,这些死的赘生细胞是被第一轮治疗诱导的,但是第一轮治疗可能不能足以诱导肿瘤缩小。另外,这种方法还提供了一种方式来实施低毒性的第一轮治疗以增加肿瘤部位的死的赘生细胞数目,从而提供了一种方式使我们可以精确地提高更高毒性的第二轮治疗的靶向性。这为我们提供了一种降低化疗常见的系统副作用的方式。通过选择治疗性作用机制,这种机制可与抗端粒酶活性分子(如La或抗端粒酶抗体)连接,但是其作用主要定位在死细胞,可以达到有效杀伤肿瘤内活的肿瘤细胞的目的。这种效应机制可以是任何合适的形式,但是优选可运送毒性分子或者主要杀伤活的肿瘤细胞的形式。

[0132] 因此,本发明的另一方面涉及治疗对象体内赘生疾病的方法,所述方法包括给予所述对象有效量的能直接作用于端粒酶的活性分子或其抗原性部分,其中的活性分子可与效应机制连接、结合或相关,其时间和条件足以处理所述疾病。

[0133] 优选地,所述端粒酶是hTERT蛋白或mRNA或hTR RNA。

[0134] 更优选地,所述的活性分子是免疫活性分子,更优选的是抗端粒酶抗体。

[0135] 优选地,所述的赘生疾病具有如下疾病的特征:中枢神经系统肿瘤、视网膜母细胞瘤、神经母细胞瘤和其他儿科肿瘤、头颈癌(如鳞状上皮细胞癌)、乳腺和前列腺癌、肺癌(小细胞肺癌和非小细胞肺癌)、肾癌(如肾细胞腺癌)、食管胃癌、肝细胞癌、胰胆管瘤(如腺癌和胰岛细胞肿瘤)、结肠直肠癌、宫颈癌和肛门癌、子宫癌和其他生殖道癌、尿道癌(如输尿管癌和膀胱癌)、生殖细胞肿瘤(睾丸生殖细胞肿瘤或卵巢生殖细胞肿瘤)、卵巢癌(如卵巢上皮癌)、未知的原发癌、人免疫缺陷相关的恶性肿瘤(如卡波西肉瘤)、淋巴瘤、白血病、恶性黑色素瘤、肉瘤、内分泌肿瘤(如胸腺肿瘤)、间皮瘤及其他胸膜瘤和腹膜瘤、神经内分泌肿瘤和类癌瘤。

[0136] 术语“端粒酶”、“赘生的”、“无法存活的”和“对象”应当被理解为与上文所描述的意思相同。

[0137] 本发明的另一方面涉及治疗对象体内赘生疾病的方法,所述方法包括给予所述对象有效量的针对hTERT蛋白或其抗原性部分的免疫活性分子,其中的免疫活性分子可与效应机制连接、结合或相关,其时间和条件足以抑制、降低或下调赘生物的生长。

[0138] 在另一个优选实施方式中,本发明提供了治疗对象体内赘生疾病的方法,所述方法包括给予所述对象有效量的针对hTERT或hTR RNA或其抗原性部分的免疫活性分子,其中的免疫活性分子可与效应机制连接、结合或相关,其时间和条件足以抑制、降低或下调赘生物的生长。

[0139] 优选地,所述赘生疾病是恶性肿瘤。

[0140] 术语“效应机制”应当被理解为任何合适的机制,该机制在定位到死细胞部位时可直接或间接治疗组织的赘生疾病,例如,下调附近活的肿瘤细胞的生长。在这个优选实施方式中,效应机制最可能是蛋白质性或非蛋白质性分子,或者能达到此效果的分子组合。适用于本发明方法的效应机制的例子包括而不限于:

[0141] (i)能与细胞因子、化学因子或其他因子如巨噬细胞、树突细胞和/或T细胞活化因子相连接的抗体的应用,这些因子能够诱导或增强免疫应答的一个或多个方面,从而增强旁观杀伤效应。例如,趋化肽、N-甲酰-甲硫氨酰-亮氨酰-苯丙氨酸(FMLP)(Morikawa等,

Cancer Immunol Immunother 27(1):1-6,1988)和新的细菌脂肽JBT 2002(Shinohara等, JImmunother 23(3):321-331,2000)都是巨噬细胞相关肿瘤的活化因子。

[0142] (ii)已与毒素偶联的抗体的应用。

[0143] 术语“毒素”应当被理解为任何合适的蛋白质性分子或非蛋白质性分子,这些分子能够达到提供信号的目的,所述的信号能降低、阻止或抑制目的细胞的增殖、分化或维持(在本文中被称为“下调所述细胞的生长”)。毒素可通过各种方式发挥作用,其中包括通过与细胞直接接触来提供信号,或者释放出分子或颗粒例如放射性同位素毒素的辐射,来为细胞提供信号。毒素优选放射性同位素,更优选的是在一个较小范围内具有较高毒性并且具有较短的半衰期从而使其对附近的非靶细胞所产生的毒性降到最低的放射性同位素。最优选地,所述的放射性同位素是能发射 α 粒子的放射性同位素。但是,应当理解的是,放射性同位素并不局限于能发射 α 粒子的放射性同位素,根据临床情况的不同还包括能发射 β 和 γ 粒子的放射性同位素。适用于本发明方法的能发射 α 粒子的放射性同位素包括而限于Tb-149、Bi-213或钍-229。应当清楚的是,用于本发明方法中的毒素可以是纯化的、部分纯化的或未纯化的形式。还可以成为较大分子的一个组分。毒素可以是天然的,也可以是合成的或重组制备的。

[0144] 可以被理解为包含在“毒素”范围内的其他分子的例子包括蓖麻毒素、colicheamicin、前药(作为抗体介导的酶解前药疗法[ADEPT,antibody-directed prodrugconverting enzyme therapy])和新的生物治疗剂,如催化抗体。

[0145] 应该清楚的是,本发明的方法可在体内实施,也可在体外实施。体外实施的例子包括而限于含赘生细胞的生物样品的净化。例如,可从患者体内取出骨髓和/或血液,按照本发明的方法使其净化以杀死肿瘤细胞,然后回输到患者体内。这种方法目前就在使用,虽然是以靶向性较低的方式,这种方法可以降低复发的风险,因为污染的恶性细胞可能被转移。

[0146] 效应机制与抗端粒酶抗体或其他免疫活性分子“连接、结合或相关”应当被理解为可使两个分子相连的任何共价或非共价相互作用机制。这包括而限于利用肽键、离子键、氢键、范德华力或其他任何相互作用的键合机制。

[0147] 细胞或赘生物的“生长”应当被理解为目的细胞的增殖、分化和/或生命的维持,而细胞或赘生物“生长的下调”是指目的细胞的衰老过程或者增殖、分化和/或生命维持的减少、阻止或抑制。在一个优选实施方式中,生长是指增殖,下调是指杀伤。在这方面,杀伤可以通过给细胞施加致命打击或者通过给细胞传递诱导细胞调亡的信号来完成。

[0148] 本文中“治疗性的”或“预防性的”治疗方案应该在一个最广泛的环境中来理解。术语“治疗方案”并不一定暗示对对象进行治疗直到完全康复。同样,“预防”也不一定意味着对象最终不会发生这种疾病。因此,治疗和预防包括特定疾病症状的改善或者发生某种特定疾病的风险被阻止或降低。术语“预防”可以被认为是某种特定疾病的严重程度降低或者其起始被阻止。“治疗”也可以是指减轻现有疾病的严重程度。

[0149] 虽然本发明不局限于任何单一理论或作用模式,但是抗癌治疗通常通过调亡来杀死癌细胞,但是对于许多晚期癌病例来说,某些癌细胞对特定抗癌治疗方案所诱导的调亡耐受。这些调亡耐受肿瘤细胞是疾病复发并最终导致大多数晚期癌症患者以及相当比例的早期癌症患者死亡的原因。在那些体内肿瘤细胞死亡可被证实因而对初始治疗模式产生反

应的晚期癌症患者中,如果再实施另外一种非交叉耐受的治疗模式,患者的存活率和生活质量就有可能得到进一步提高。因此,利用本发明的方法对产生反应的癌症患者进行诊断就可以鉴定出哪些患者能够从带治疗性偶联物或杂合融合蛋白的辅助治疗中受益,如上文所详细描述。

[0150] 使用抗端粒酶抗体还可能有益于辅助的临床环境。例如,虽然早期乳腺癌和结肠癌可能都可以通过手术而治愈,但是发生明显而难以治愈的系统复发的风险可能增高,因为这些对象的原发肿瘤具有某种程度的高风险特性和/或其区域淋巴结可能含有转移瘤,未被发现的系统转移可能已经存在。因此,利用辅助化疗和/或辅助激素治疗(特别是对于乳腺癌)可以治愈另外一小部分对象,这可能是由于系统转移被成功地清除了。

[0151] 另外,虽然休眠的肿瘤因缺乏血供而很小,但是病变内的肿瘤细胞可以快速地打破细胞分裂速度与调亡速度的平衡。因此,即使是休眠的肿瘤也是本发明方法的合适靶标。在临床症状明显的转移瘤和微小转移瘤内,调亡耐受细胞都可能混有易感癌细胞。如果肿瘤杀伤效应以非交叉耐受和/或协同方式传递给已被第一种治疗方案诱导而发生调亡的临近癌细胞,那么这些幸存的癌细胞可能被旁观效应所杀伤。使这个技术产生旁观杀伤潜能的其他技术能够提高其治疗效果。

[0152] 因此,本发明的一个最优选实施方式是针对转移瘤的治疗。

[0153] 根据这个优选实施方式,本发明提供了一种治疗对象转移瘤的方法,所述方法包括给予所述对象有效量的能直接作用于端粒酶或其抗原性部分的活性分子,其中的活性分子可与效应机制连接、结合或相关,其时间和条件足以抑制、降低或下调所述转移瘤的生长。

[0154] 如上文所详细描述,还应该清楚本发明可延伸到在体外环境中下调整生细胞的生长。例如,在进行自体移植前将骨髓或外周血干细胞接种物内的赘生细胞清除。

[0155] “有效量”是指至少部分获得所期望的反应所必须的量,或者至少部分延迟特定被处理疾病的起始、或者抑制特定被处理疾病的进展、或者完全阻止特定被处理疾病的起始和进展所必须的量。这个量因被治疗个体的健康状况和物理条件、被治疗个体的分类群、所期望的保护程度、组合物的剂型、医疗环境的评估以及其他相关因素的不同而不同。我们期望这个量能够落在通过常规试验而确定的相对较宽的范围。

[0156] 本发明还涉及疗法组合,例如,给予抗体加上在哺乳动物循环内注射细胞毒药物,或者给予抗体加上对对象的癌进行放疗。在另一个实施例中,放射性核素与放射敏感药物的协同作用是特别重要的。例如,可以设计出放射免疫疗法,其中使用的抗端粒酶抗体被连接到能产生电离辐射的放射性核素和放射敏感药物如吉西他滨上。

[0157] 以药物组合物的形式给予活性分子(在本文中被称为“调节剂”)可通过任何方便的方式实施。药物组合物的调节剂在以根据特定病例而确定的量给予时被认为具有治疗活性。根据人或动物的不同以及所选择的调节剂不同可以作出改变。可适用的剂量范围可以很宽。例如,考虑到对象的情况,给药剂量可以是每公斤体重每天约0.1mg到约1mg调节剂。可以对给药方案作出调整以达到最佳的治疗反应。例如,可以将几份分份剂量连续给予,或者每天、每周、每月或以其他合适的时间间隔给予,或者根据病情的严重程度按比例减少给药剂量。

[0158] 调节剂可以方便的方式给予,例如通过口服、静脉内射(可溶于水时)、腹膜内、肌

内、皮下、真皮内或栓剂途径或通过植入(例如使用缓释分子)。调节分子可以药学上可接受的非毒性盐的形式给予,例如酸加成盐或金属络合物,例如含锌、铁等(在这个用途中被认为是盐)。这种酸加成盐的例子有盐酸盐、溴化氢盐、硫酸盐、磷酸盐、马来酸盐、乙酸盐、柠檬酸盐、苯甲酸盐、琥珀酸盐、苹果酸盐、抗坏血酸盐、酒石酸盐等。如果活性成分以片剂的形式给予,那么片剂内可包含粘合剂如黄蓍胶、玉米淀粉或明胶;崩解剂如海藻酸;以及润滑剂如硬脂酸镁。

[0159] 给药途径包括而限于呼吸道内给药、气管内给药、鼻咽内给药、静脉注射、腹腔注射、皮下注射、颅内注射、真皮内注射、肌肉注射、眼内注射、鞘内注射、脑内注射、鼻内注射、输注、口服、直肠给药、通过IV滴注补丁给药和植入给药。

[0160] 按照这些方法,本发明所定义的因子可以和一种或多种其他化合物或分子同时给药。“同时给药”是指在同一个制剂中同时给予,或者在两个不同的制剂中通过相同或不同的途径同时给予,或者通过相同的或不同的途径先后给予。例如,因子与一种竞争性因子一同给药以增强其疗效。“先后”给药是指给予两种类型的分子之间的时间间隔为数秒、数分钟、数小时或数天。这些分子可以任何顺序给予。

[0161] 本发明的另一方面涉及与效应机制相连接的抗端粒酶活性分子在制备治疗对象体内赘生疾病的药物中的应用,其中所述的效应机制用于治疗所述的疾病。

[0162] 优选地,所述的活性分子是免疫活性分子,更优选的是端粒酶抗体,如单克隆抗体。

[0163] 优选地,所述的赘生疾病具有如下疾病的特征:中枢神经系统肿瘤、视网膜母细胞瘤、神经母细胞瘤和其他儿科肿瘤、头颈癌(如鳞状上皮细胞癌)、乳腺和前列腺癌、肺癌(小细胞肺癌和非小细胞肺癌)、肾癌(如肾细胞腺癌)、食管胃癌、肝细胞癌、胰胆管瘤(如腺癌和胰岛细胞肿瘤)、结肠直肠癌、宫颈癌和肛门癌、子宫癌和其他生殖道癌、尿道癌(如输尿管癌和膀胱癌)、生殖细胞肿瘤(睾丸生殖细胞肿瘤或卵巢生殖细胞肿瘤)、卵巢癌(如卵巢上皮癌)、未知的原发癌、人免疫缺陷相关的恶性肿瘤(如卡波西肉瘤)、淋巴瘤、白血病、恶性黑色素瘤、肉瘤、内分泌肿瘤(如胸腺肿瘤)、间皮瘤及其他胸膜瘤和腹膜瘤、神经内分泌肿瘤和类癌瘤。

[0164] 在本发明的另一方面,本发明涉及包含上文所定义的调节剂和一种或多种药学上可接受的载体和/或稀释剂的药物组合物。所述试剂是指活性成分。

[0165] 适于注射的药物剂型包括无菌水溶液(可溶于水时)或分散剂以及可临时配制成无菌注射液或分散剂的无菌粉末,也可以是乳膏的形式或适于局部使用的其他形式。这种形式在生产和储存条件下必须是稳定的,必须防腐以阻止微生物如细菌和真菌的污染。载体可以是含有水、乙醇、多元醇(如甘油、丙二醇和液体聚乙烯甘油等)、其合适的混合物以及蔬菜油的溶剂或分散介质。通过使用包被如卵磷脂、通过保持分散剂内所要求的颗粒直径以及通过使用表面活性剂(superfactant)可以保持适当的流动性。通过加入各种抗菌和抗真菌物质如对羟基苯甲酸酯、三氯叔丁醇、苯酚、山梨酸、硫柳汞等可阻止微生物的活动。在许多情况下,优选包含等渗物质,如蔗糖或氯化钠。通过在组合物中加入延缓吸附的物质如单硬脂酸铝和明胶可以使可注射组合物的吸附被延缓。

[0166] 无菌注射液可通过如下过程制备:将活性化合物以需要的量加入到合适的溶剂内,如果需要,溶剂内还可以包含上面所提到的各种组分,然后通过过滤除菌。一般来说,分

散液可通过将各种灭菌后的活性成分加入到包含基础分散介质及所需的上述其他组分的无菌载体内制备。如果是可配置成无菌注射液的无菌粉末,优选的制备方法是利用真空干燥或冷冻干燥技术将上述无菌过滤的溶液制备成活性组分加其他所需组分的粉末。当活性组分被适当保护时可通过口服给药,例如,用惰性的稀释剂或用可同化的食用载体包被,或者将活性成分用硬壳或软壳胶囊包裹,或者将活性成分压缩成片剂,或者将活性成分直接混入食物中。如果是口服给药,活性化合物中可加入赋形剂,以可吸收的片剂、含剂、含片、胶囊、酞剂、混悬液、糖浆、薄脆饼等的形式使用。这种组合物和制剂应至少包含重量百分比为1%的活性化合物。当然,组合物和制剂的百分比可以改变,可以占单位剂量重量的约5%到80%。这种适当剂量的治疗用组合物中所含的活性化合物的量可以计算出来。根据本发明可制备出优选的组合物或制剂,这样一个口服剂量单位所包含的活性化合物约为0.1 μ g到2000mg。

[0167] 片剂、含片、丸剂、胶囊等还可包含下列组分:粘合剂如树胶、阿拉伯胶、玉米淀粉或明胶;赋形剂如磷酸二钙;崩解剂如玉米淀粉、土豆淀粉、海藻酸等;润滑剂如硬脂酸镁;以及甜味剂如蔗糖、乳糖或糖精,或者调味剂如薄荷、冬青油或红色调味剂。如果剂量单位是胶囊,除了上述材料以外还可以包含流动载体。还可以加入其他各种材料作为包被,或者用于改变剂量单位的物理状态。例如,可以利用虫胶、糖或者二者的混合物包被片剂、丸剂或胶囊。糖浆或酞剂可包含活性化合物、作为甜味剂的蔗糖、作为防腐剂的对羟基苯甲酸甲酯和对羟基苯甲酸丙酯、着色剂和调味剂如红色或橙色调味剂。当然,制备任何剂量单位时所使用的所有材料都应该是药用纯度的,并且以其使用量来说基本无毒。另外,活性化合物还可以掺入到缓释制剂和剂型中。

[0168] 本发明的另一方面涉及本发明方法中所使用的上文所定义的试剂。

[0169] 本发明被下列非限定性的实施例作了进一步的定义:

[0170] 实施例1

[0171] 材料和方法

[0172] 人外周血单个核细胞和人Jurkat T细胞白血病细胞的体外培养和凋亡诱导

[0173] 外周血单个核细胞(PBMC)是从废弃的全血单位的血沉棕黄层中制备的,血液来自南澳洲红十字血库。首先利用Lymphoprep(Axis-Shield,Dundee,UK)通过密度梯度离心分离PBMC并利用可控速率的冰箱按等分量冷冻。然后将等分的细胞解冻,再用Lymphoprep纯化以获得活细胞。PBMC在添加10%胎牛血清(FCS)、50 U/mL青霉素和50 μ g/mL硫酸链霉素(JRH Biosciences,Lenexa,KA,USA)的RPMI中培养72小时。一半的培养物用10 μ g/mL T细胞丝裂原、伴刀豆球蛋白A(ConA)(Sigma,St Louis,MO,USA)处理,另一半培养物不进行任何处理。培养以后再用Lymphoprep纯化以去除死细胞,然后用1 μ M十字孢碱(STS)(Sigma)再培养24小时以诱导其凋亡。Jurkat细胞在添加10%FCS、50 U/mL青霉素、50 μ g/mL硫酸链霉素和0.5 μ M STS的RPMI中培养24小时以诱导其凋亡。为了研究PBMC来源的原始单核细胞系的细胞和淋巴细胞系的细胞,首先利用Lymphoprep[®]分离方法纯化PBMC。然后用含5%FCS的RPMI-1640培养过夜以分离粘附细胞(主要是单核细胞系的细胞)和悬浮细胞(主要是T淋巴细胞)。收集悬浮细胞并在含或不含1 μ M STS的RPMI-1640+5%FCS中孵育,Jurkat细胞在含或不含0.5 μ M STS的RPMI-1640+5%FCS中孵育。粘附的单核细胞系的细胞和U937细胞(单核细胞淋巴瘤细胞系)分别在含或不含1 μ M和0.5 μ M STS的RPMI-1640+5%FCS中孵育。在24和

48小时以后,收集未处理的(对照)和STS处理的细胞,对照细胞用2%多聚甲醛溶液进行通透化处理,然后用甲醇进行1:10稀释并置于-20℃放置5分钟。

[0174] 处理完成以后收集所有细胞,用PBS洗涤并用7-氨基放线菌素D(7-AAD)(2 μ g/mL)和抗-La 3B9 mAb或其同种型对照mAb Sa15染色,然后用连接有R-藻红蛋白抗小鼠二抗(Zymed, San Francisco, CA, USA)染色,或者先用大鼠抗-hTERT mAb(Alexis Biochemicals, San Diego, CA, USA)再用连接有FITC的抗大鼠二抗(Chemicon)染色。细胞用FACScan(Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA)检测,结果用WinMD1v2.8软件分析。

[0175] 对人恶性细胞系进行细胞毒剂处理及随后对凋亡的恶性细胞和原始细胞内hTERT的检测

[0176] Jurkat和Raji细胞系用添加10%FCS、50 U/mL青霉素和50 μ g/mL硫酸链霉素的RPM1培养,U2OS和HeLa细胞系用添加10%FCS、50 U/mL青霉素和50 μ g/mL硫酸链霉素(JRH Laboratories)的DMEM培养。细胞系用如下细胞毒剂处理24或48小时:Jurkat和Raji用20 μ g/mL十字孢碱;HeLa和U2OS细胞用1 μ g/mL顺铂和0.1 μ g/mL长春新碱;Jurkat、HeLa和U2OS细胞用0.5 μ M STS;Raji细胞用2 μ M STS。处理后细胞用0.5 μ g/mL碘化丙啶(P1)(Sigma)、连接有FITC的Sa15或3B9 mAb或者小鼠抗-TRF2 mAb(克隆36, Becton-Dickinson)染色,然后用抗小鼠FITC二抗(Chemicon, Temecula, CA, USA)染色,或者先用大鼠抗-hTERT mAb(克隆36-10, Alexis Biochemicals)再用抗大鼠FITC二抗(Caltag, Burlingame, CA, USA)染色。纯化的小鼠IgG或大鼠IgG(Institute of Medical and Veterinary Science, Adelaide, Australia)分别作为TRF2和hTERT染色的阴性对照。为了进一步改善hTERT检测方法以便于随后可用于全血染色,全血染色可能因为红细胞可产生自发荧光而受到干扰,在抗hTERT单克隆抗体克隆36-10上直接连接AlexaFluor350(Molecular Probes),该分子在355 nm处被激发,在420-460 nm之间有最大发射波长。抗-hTERT-Alexa350可与EpCAM单克隆抗体(BD Biosciences)连接,后者与PE偶联,PE的激发波长是488 nm,发射波长是560-590 nm,而核不透性(nuclear impermeant)DNA结合的染料TOPRO-3(Molecular Probes)的激发波长为560 nm,最大发射波长在远红外区(>650nm)。荧光染料的这种组合不需要对信号进行补偿,这是由于这些分子中的每一种是用不同激光激发的,并且在高通量LSR-11流式细胞仪(BD Biosciences)上用不同的滤镜收集发射。

[0177] 结果

[0178] 抗La抗体(单克隆抗体杂交瘤3B9)和凋亡的PBMC的结合情况与抗La抗体和凋亡的Jurkat细胞的结合情况比较,PBMC主要是T细胞,而Jurkat细胞是人T细胞白血病细胞系。很明显,凋亡的Jurkat细胞所呈现的荧光强度明显高于PBMC(图3),说明死的和濒死的肿瘤细胞所表达的La更高。

[0179] 人T细胞白血病细胞系Jurkat和人B细胞淋巴瘤细胞系Raji用如下细胞毒剂处理24和48小时:pan-激酶抑制剂十字孢碱,拓扑异构酶11抑制剂依托泊甙,微管解聚药物长春新碱以及DNA交联剂顺铂。然后用碘化丙啶(P1)和抗La单克隆抗体(mAb)3B9或其同种型对照抗体Sa15,或者是hTERT或TRF2特异性的mAb对细胞进行染色。大鼠IgG和抗大鼠二抗或者小鼠IgG和抗小鼠二抗分别用作hTERT或TRF2特异性mAb染色的阴性对照。

[0180] 通过流式细胞仪的检测发现,在细胞毒剂处理后24小时,各种细胞毒剂都能够诱导Jurkat细胞(图4A)和Raji细胞(图4C)死亡,表现为与P1和3B9的结合。同样,在用细胞毒

剂处理后24小时(图4D)和48小时(图4E),明显可以看到P1⁺死Jurkat细胞有TRF2染色。长春新碱和顺铂处理的Raji细胞在处理48小时(箭头所指,图4F)时可以观察到TRF2染色只有轻微增加。而用顺铂、依托泊甙和长春新碱处理后48小时,P1⁺死Jurkat细胞的hTERT染色非常明显(箭头所指,图4B)。用长春新碱处理后48小时,P1⁺死Raji细胞的hTERT染色也非常明显(箭头所指,图4C)。作为另外的对照细胞,表达端粒酶的人宫颈癌细胞系HeLa和不表达端粒酶的人骨肉瘤细胞系U2OS(M Frolkis等,Cancer Gene Therapy 10,239-249,2003)也用十字孢碱、长春新碱和依托泊甙处理,并在处理后48小时用流式细胞仪分析。在P1⁺死HeLa细胞(图4G)上可以看到明显hTERT和TRF2染色,但是在P1⁺死U2OS细胞上看不到(图4H)。端粒酶蛋白表达水平在细胞毒剂诱导癌细胞凋亡后升高可能代表一种对端粒酶去帽的反馈反应,这种端粒酶去帽现象是由DNA损伤药物诱导的。

[0181] 人淋巴细胞,特别是活化的淋巴细胞也表达端粒酶。如图5所示,在主要为淋巴细胞的死PBMC内或在十字孢碱诱导凋亡24小时后的Jurkat细胞内,即使有端粒酶的表达也很少。图6说明无论是作为人为固定的结果还是作为细胞毒剂损伤的结果,Jurkat细胞的通透化都是检测36-10 mAb对hTERT蛋白的结合所必须的。令人感兴趣的是,对依托泊甙处理的Jurkat细胞的固定结果显示36-10 mAb的结合还有其他位点,这些位点在不固定的细胞上以及处理48小时以内的细胞上是不明显的。另外,对未用依托泊甙处理的Jurkat细胞(对照)进行固定可导致更多的被36-10 mAb识别的决定簇暴露。P1中度染色的Jurkat细胞具有凋亡小体的特征,但这些细胞不能与36-10mAb结合,这些结果说明在程序性细胞死亡的过程中hTERT和/或其相关的其他蛋白质的构型发生了改变,这样就使36-10 mAb结合位点的可用性受到了限制(图6)。恶性细胞或原始细胞的通透化证明恶性的Jurkat细胞和U937细胞所表达的hTERT水平明显高于其相应的原始细胞-淋巴细胞系细胞和单核细胞系细胞(图7)。用十字孢碱处理这几种细胞以诱导其凋亡和凋亡后细胞发生通透化显示,这种恶性细胞内hTERT的表达水平升高,这说明hTERT是一个适于作为优选肿瘤靶位的肿瘤相关抗原。

[0182] 细胞毒药物依托泊甙也可用于处理H69以证明细胞死亡的程度是剂量依赖性的(图9),H69是一种来源于被称为小细胞肺癌(SCLC)的化疗反应性肿瘤的细胞系。单克隆抗体BerEP4可识别上皮细胞粘附分子(EpCAM)上的决定簇,EpCAM在许多类型的上皮细胞及其对应的恶性细胞上都有表达。碘化丙啶(P1)是一种核不透性核酸结合荧光染料,因此用P1染色可显示因细胞死亡而造成的细胞膜完整性的破坏情况。因此,BerEP4⁺P1⁺可被鉴定为死的H69癌细胞,在用200-400μg/mL依托泊甙处理时可使其比例达到最大(图8A)。然后,试验还证实,在用50μg/mL的细胞毒药物处理后确定抗hTERT单克隆抗体克隆36-10的最佳浓度需要检测死H69细胞内hTERT蛋白的表达上调情况(图9B)。与此相反,相同浓度的同种型对照单克隆抗体在细胞毒药物处理后不会使死H69细胞产生明显的染色(图9A)。被依托泊甙杀死而被鉴定为BerEP4⁺7-AAD⁺的H69细胞是用正常的外周血单个核细胞(PBMC)以1:50的稀释度稀释后检测的(图10)。但是,需要加上补偿步骤以确保在正常PBMC的背景中能够检测出依托泊甙处理的恶性细胞。这种检测依托泊甙处理的恶性细胞的方法可通过使用荧光染料组合来改善,这样就不需要在流式细胞仪上进行补充以标记DNA、hTERT和EpCAM,因而可以更准确地鉴定出依托泊甙处理的恶性细胞(图11)。

[0183] 实施例2

[0184] 材料和方法

[0185] 在体外用细胞毒药物处理癌细胞系

[0186] H69细胞用含5%胎牛血清(FCS)和400 μ g/mL依托泊甙的RPMI-1640处理,分别于24、48和72小时取出细胞,用磷酸缓冲盐水(PBS)洗涤,然后染色以便于进行细胞荧光图像(cytofluographic)分析。

[0187] 从小细胞肺癌(SCLC)患者的血液中富集循环肿瘤细胞

[0188] 将血样(2.5 mL)收集在肝素化的试管内,按照厂家的说明书利用CELLlection™上皮细胞富集试剂盒(Dynal Biotech, Invitrogen Corp., USA)根据BerEP4上皮细胞粘附分子(EpCAM)的表达情况进行富集。简言之,将250 μ L BerEP4-磁珠与血样在室温下混合30分钟。磁珠结合Dynal®磁铁,用PBS洗涤5次。按照厂家的说明书,利用含0.1%牛血清白蛋白(BSA)和脱氧核糖核酸酶1(DNase 1)的PBS将磁珠结合的细胞洗脱下来。然后将洗脱下来的细胞转移到一个新试管中,离心,用PBS洗涤。样品在室温下与抗小鼠IgG(2 μ g/mL)孵育30分钟以封闭游离细胞上的所有小鼠BerEP4抗体,然后用PBS洗涤,染色后用流式细胞仪分析。

[0189] 用于细胞荧光图像分析的全血样品的制备

[0190] 用红细胞裂解缓冲液(8g/L氯化铵和1.2g/L Tris-HCl, pH 7.2)按1:10的比例稀释血样后将肝素化的外周血血样(2.5 mL)中的红细胞裂解,然后在室温下不断振荡稀释的样品15分钟。然后以3,000 \times g离心10分钟,用PBS洗涤,染色后用流式细胞仪分析。

[0191] 细胞荧光图像分析

[0192] 细胞在室温下与浓度为50 μ g/mL的如下单克隆抗体共孵育30分钟:大鼠抗hTERTmAb APOTEL™(克隆36-10; Alexis Biochemicals)或与其相对应的无相关特异性的同种型(IgG_{2a}K)对照mAb。细胞用PBS洗涤,在室温下与2 μ g/mL生物素偶联的抗大鼠IgG抗体的(Fab')₂片段共孵育30分钟。细胞洗涤后与2 μ g/mL链亲和素-PE或链亲和素-FITC在室温下共孵育15分钟。最后,细胞用PBS洗涤,在与2 μ g/mL 7-氨基-放线菌素D(7-AAD)在室温下共孵育15分钟后用流式细胞仪(FACScan, Becton-Dickinson)分析。

[0193] 统计学分析

[0194] 利用GraphPad Prism v.4.0软件进行统计学分析。

[0195] 结果

[0196] 用细胞毒药物诱导细胞死亡后在体外和体内根据单克隆抗体(mAb)结合小细胞肺癌(SCLC)死细胞的能力来研究其特异性识别人端粒酶逆转录酶(hTERT)的能力。首先研究表达上皮细胞粘附分子(EpCAM)的BerEP4标记的SCLC细胞系H69。H69在体外培养并用依托泊甙处理以诱导细胞死亡。在细胞毒药物处理后24小时可以观察到癌细胞活力的丢失,因为这些细胞结合了DNA结合染料7-AAD(图12A)。虽然在用细胞毒药物处理后的24、48和72小时都可以观察到hTERT特异性单克隆抗体(mAb)APOTEL™与死H69细胞的结合,但是在处理后48小时APOTEL™的特异性结合明显升高(图1B)。

[0197] 下一步研究的是APOTEL™在一名73岁的男性GP患者外周血中的结合情况,该患者患有晚期SCLC。这位患者以前未对其癌症做过治疗,在第1天用卡铂以AUC5对该患者进行细胞毒化疗,并在第1、2、3天用120mg/m²的依托泊甙对患者进行化疗。在开始化疗前(0小时)和开始化疗后24、48、72小时从患者体内抽取外周血样品并使之肝素化。为了证明GP的血液中含有循环肿瘤细胞(CTC),在进行细胞毒药物治疗前和治疗后根据BerEP4-表达细胞对其血液进行富集,这种细胞在正常健康志愿者的外周血中是不存在的(图13上排图)。在

细胞毒化疗后48小时,死(7-AAD⁺)CTC的数目大量增加,可以明显而特异地结合APOTELTM(图13的中排和下排图)。另外,在细胞毒化疗前和化疗后从GP体内抽取全血样品,除了进行红细胞裂解外不进行其他处理,这些样品用于通过7-AAD分析其活力和分析7-AAD⁺细胞中hTERT的表达情况。在开始细胞毒化疗后的48小时,GP血液中的7-AAD⁺细胞达到最大值,并且7-AAD⁺细胞有最强的APOTELTM结合(图14)。与SCLC细胞的体外培养物所证明的结果一样,这些结果说明细胞毒化疗不仅可以诱导循环中的SCLC细胞死亡,而且也能够在进行细胞毒药物刺激后48小时提高死的肿瘤细胞所表达的hTERT(图15和16)。

[0198] 虽然实验室的结果与整个肿瘤对化疗反应的正式放射诊断结果还没有明显的相关关系,但是GP在化疗前有可触及且疼痛的胸骨区域,在两个星期的细胞毒化疗过程中,这个区域明显缩小且疼痛减轻。

[0199] 这些结果说明APOTELTM可用于鉴定已死的癌细胞是否是细胞毒药物处理的结果,因此,APOTELTM可用于预测癌症对象的早期化疗反应。

[0200] 讨论

[0201] 除了在分离中的应用以外,APOTELTM试验还可以有效且唯一一种FDA批准的检测循环肿瘤细胞(CTC)的技术,这是一种以免疫磁珠为基础的计数循环肿瘤细胞(CTC)的方法,被称为CellSearch[®](Veridex,Warren,NJ,USA)。该系统可以计数上皮细胞,上皮细胞首先通过BerEP4特异性抗体包被的磁珠从血液中分离出来。在用双链DNA特异性的染料4,6-二咪基-2-苯基咪唑(DAPI)以及白细胞特异性mAb(CD45-别藻蓝蛋白)和上皮细胞特异性mAb(细胞角蛋白8-、18-和19-藻红蛋白)进行荧光标记以后,可以将CTC从分离的细胞中鉴定出来,然后利用CellSpotterAnalyzer[®](Veridex)分析。通过对正常个体以及患有恶性疾病和非恶性疾病的个体所进行的大规模调查显示,这项技术促进了CTC的特异性检测。在344名健康的或患有非恶性疾病的个体中,有一名个体(0.3%)的血液中每7.5 mL血液所含有的CTC \geq 2。而在2183个来自964位转移癌对象的血样中,每7.5 mL血液中所含有的CTC数目范围为0到23,618个(平均值为60 \pm 693 CTC/7.5 mL),有36%(2,183个中有781个)的标本的CTC \geq 2。超过2个CTC的检测结果显示发生率如下:前列腺癌57%(188个中有107个),乳腺癌37%(1316个中有489个),卵巢癌37%(53个中有20个),结肠直肠癌30%(333个中有99个),肺癌20%(168个中有34个),其他癌26%(125个中有32个)(Allard等,Clin Cancer Res 10:6897-6904,2004)。

[0202] 在首先进行了BerEP4富集步骤以后,对前列腺癌患者血样的研究结果显示CellSearch[®]技术可用于细胞检测。在这里,几乎没有CTC是完整的,在显微镜下观察发现大部分细胞是受损的细胞或细胞片段。这些CTC的DAPI染色情况变化很大,但是大多都表达凋亡诱导的半胱天冬酶裂解的细胞角蛋白-18(Larson等,Cytometry A部分62A,46-53,2004)。

[0203] 在一个转移乳腺癌患者体内CTC的研究中,145个正常对照患者中没有一个患者的血液中出现每7.5mL血液所含有的CTC超过2个,而177个癌症患者中有61%的患者出现每7.5mL血液所含有的CTC超过2个。但是,区分具有不良预后的患者与具有良性预后的患者所使用的标准是每7.5mL血液所含有的CTC超过5个。这个研究的结果说明,治疗前的CTC数目是转移乳腺癌患者无恶化存活率及总存活率的独立预测因子(Cristofanilli等,NewEngl

J Med 351:781-791,2004)。

[0204] 已经出版的这个研究的其他结果分析了接受一线化疗的转移乳腺癌患者体内发现CTC的意义。在这些患者中,在开始一线化疗之前外周血中发生每7.5mL血液所含有的CTC \geq 5个的现象与无恶化存活时间(PFS)和总存活时间(OS)短相关。在这个时间点上,CTC低于5个的患者的OS中间值为 >18 个月,而CTC \geq 5个的患者OS中间值为14.2个月。另外,那些接受化疗和荷尔蒙受体及HER2/neu阴性的内脏病患者中有一部分(22%)的OS中间值出现了最大的统计学差异。在治疗后约一个月时的第一次随访抽血检查中,CTC <5 的患者的PFS中间值是9.5个月,而CTC \geq 5的患者的PFS中间值为2.1个月($p=0.0057$),CTC <5 的患者的OS中间值超过18个月,而CTC \geq 5的患者的OS中间值为11.1个月($p=0.0012$)。在治疗后约9周时的第一次随访影像检查中,CTC <5 的患者的PFS中间值是8.9个月,而CTC \geq 5的患者的PFS中间值为1.8个月($p=0.0001$),CTC <5 的患者的OS中间值为18个月,而CTC \geq 5的患者的OS中间值为11.1个月($p=0.0001$)。这些数据说明在治疗后3-4周所进行的CTC检测可用于预测疗效,这种疗效是由治疗后8-10周所进行的医学影像检查所确认的(Cristofanilli等,J Clin Oncol.23:1420-1430,2005)。

[0205] 但是,由于APOTEL™检测死CTC是在开始细胞毒化疗后48小时进行的,所以这种方法比其他方法如治疗后3-4周测定的CTC数目或治疗后8-10周的医学影像学检查结果能够更快地提示化疗的疗效和存活期延长反应。

[0206] 实施例3

[0207] 材料和方法

[0208] 材料

[0209] 细胞培养介质RPMI 1640、DMEM和胰蛋白酶EDTA购自JRH Biosciences Inc (Lexona KS,USA)。十字孢碱和溴化乙啶购自Sigma-Aldrich Co.(St Louis,MO,USA)。Trizol和Superscript 11购自Invitrogen(Carlsbad,CA,USA),Amplitaq金是AppliedBiosystems(Foster City,CA,USA)的。所有的引物都是Geneworks(Adelaide,SA)制造的。

[0210] 细胞系及其培养

[0211] Jurkat细胞(ATCC#T1B-152)用添加5%胎牛血清(FCS)的RPMI 1640培养。U2OS细胞(ATCC#HTB-96)用添加5%FCS的DMEM培养,在用胰蛋白酶EDTA消化后,每48-72小时传代一次。Jurkat细胞表达端粒酶,因此含有完整的RNA组分hTR,而U2OS细胞不表达端粒酶和hTR。通过向培养基中加入0.5 μ M十字孢碱培养24、48或72小时来诱导凋亡。

[0212] RNA提取和逆转录

[0213] 细胞收获后用PBS洗涤,然后按照厂家的说明书用Trizol提取 5×10^6 细胞的RNA。将RNA悬浮于10 μ l DEPC水并确定其浓度。按照厂家的说明书利用Superscript11和寡dT对3 μ g RNA进行逆转录。

[0214] hTR PCR

[0215] 利用hTR特异性引物进行PCR。利用两组引物可以扩增出111 bp(Chen XQ等,Clin Cancer Res 6:3823-3826,2000)和153 bp(BodnarAG等,Exp Cell Res 228:58-64,1996)的PCR产物:

[0216] hTR正向5'-GAAGGGCGTAGGCGCCGTGCTTTTGC(SEQ ID NO:1)

[0217] hTR反向5'-GTTTGCTCTAGAATGAACGGTGAAGG(Chen等,同上)(SEQ ID NO:2)

[0218] hTR正向5'-GCCTGGGAGGGGTGGTGGCTATTTTTTGG(Bodnar等,同上)(SEQ ID NO:3)加上Chen的反向引物

[0219] 一组对照PCR引物用于扩增看家基因GAPDH的mRNA:

[0220] GAPDH正向5'-CGGAGTCAACGGATTTGGTCGTAT(SEQ ID NO:4)

[0221] GAPDH反向5'-AGCCTTCTCCATGGTGGTGAAGAC(308bp PCR产物)(SEQ ID NO:5)

[0222] 在25 μ L反应体系中进行聚合酶链式反应(PCR),其中包含1 μ L cDNA、1 \times PCR缓冲液、10 nmol MgCl₂和5 nmol dNTP、50 pmol各引物和0.625 U Amplitaq金。PCR扩增的反应条件如下:在95 $^{\circ}$ C先变性7分钟,然后进行30个循环(95 $^{\circ}$ C进行30秒,55 $^{\circ}$ C进行30秒,72 $^{\circ}$ C进行1分钟),最后在72 $^{\circ}$ C延伸5分钟。PCR产物在1%琼脂糖上进行电泳,通过溴化乙啶染色来观察。PCR的阴性对照为水加引物。

[0223] 结果

[0224] GAPDH的RT-PCR扩增结果显示在诱导凋亡后72小时两株细胞系内都可检测到mRNA。通过台盼蓝染色而进行的活力分析结果表明在24、48和72小时时分别有36%、95%和100%的U2OS细胞死亡,Jurkat细胞的死亡率分别为40%、85%和100%。在诱导凋亡后的24、48和72小时,在hTR阴性U2OS细胞内没有检测到hTR RNA,但是在hTR阳性Jurkat细胞内检测到了hTR RNA。

[0225] 讨论

[0226] 这些数据说明在体外通过PCR从死细胞中扩增RNA是可能的,其中包括GAPDH和hTR的RNA。有迹象表明包含mRNA的RNA隐藏在新形成的胞内纤维-颗粒结构中,这种结构是在凋亡过程中形成的,被称为异源的异位RNP衍生结构(HERDS)。HERDS被排出进入胞质并作为凋亡小泡的一部分移向细胞表面,最终作为凋亡小体被释放出来。虽然HERDS的形成被认为是转录停滞的不可逆标志,这种现象可在某些过程如热休克和其他生理应激、营养不良和使用DNA损伤药物时发生,但是当HERDS中确实有核仁蛋白时,HERDS形成和走向凋亡就是不可逆的了(Biggioera等,Biol Cell 96:603-615,2004)。到目前为止,还没有报道显示可以标记HERDS中的La抗原,但是,由于La可以结合hTR,因此,利用免疫亲和技术从死细胞内分离La有助于提高hTR的PCR扩增,特别是肿瘤细胞数目有限时,比如存在于生物液体内,这种生物液体可能包含循环于早期癌症患者的外周血中的肿瘤细胞。QZyme™技术(Clontech)是以定量PCR为基础的分析系统的一个例子,能够成功地用于通过免疫亲和方法所分离的La结合的hTR,因为该系统不受生物样品复杂性的影响,也不需要优化样品。

[0227] 材料和方法

[0228] 细胞通透化处理

[0229] 用Clonetics®条件培养的原始细胞和含视黄酸的人支气管上皮细胞(NHBE)得自Cambrex Corporation(NJ,USA),在商品化的培养基中培养。癌细胞系得自ATCC,用其推荐的培养基培养。细胞汇合后用胰蛋白酶-EDTA分离,用PBS洗涤后以5 \times 10⁶细胞/mL的浓度与2%多聚甲醛在室温下共孵育10分钟使其通透化,然后用-20 $^{\circ}$ C的无水甲醇按1:10的稀释度稀释。

[0230] 细胞毒剂处理

[0231] 向培养基中加入浓度为20 μ g/mL的顺铂,然后培养48小时来诱导细胞死亡。

[0232] 流式细胞术

[0233] 收集细胞并用PBS洗涤,在室温下与50 μ g/mL的APOTEL™或其相匹配的无相关特异性的同种型对照mAb共孵育30分钟。细胞用PBS洗涤然后在室温下与2 μ g/mL连接Alexa488的抗大鼠IgG抗体共孵育30分钟。洗涤细胞,然后与2 μ g/mL 7-AAD在室温下共孵育10分钟,利用B-D FACScan设备进行流式细胞术分析。

[0234] 结果

[0235] 原发性和恶性的支气管上皮细胞内的端粒酶表达水平相似(图18A&B)。在用顺铂处理以后,利用荧光细胞测定技术分析hTERT特异性mAb与恶性支气管上皮细胞系A549的结合,结果检测到了更多的hTERT(图18C)。顺铂处理的支气管癌细胞内hTERT表达明显升高可能是因为在细胞内重排的过程中蛋白质的合成增加和/或从其他亚细胞结构中释放的蛋白质增多,这种细胞内重排的特征是凋亡和/或抗hTERTmAb表位的暴露,表位的暴露可以使hTERT特异性的mAb有更多的结合。这个结果具有临床意义,因为通过它可以预测hTERT特异性的mAb在人体内的结合行为。因此,因细胞毒剂处理而受损和泄漏的原始细胞可能不会象受损和泄漏的癌细胞那样结合显著数量的抗端粒酶抗体,这些癌细胞才是抗癌治疗的真正靶位。

[0236] 这些体外结果说明携带有效载荷如放射性核素的hTERT特异性mAb能够在体内靶向向死的癌细胞以达到成像和治疗目的。

[0237] 本领域的技术人员应当清楚,除了本文所详细描述的外,可以对本文所描述的本发明作出改变和调整。还应当理解的是,本发明包括所有这些改变和调整。本发明还包括本说明书单独或集体参考或列出的所有步骤、特征、组合物和化合物,以及所述步骤或特征的任意两个或多个的组合。

[0238] 文献目录:

[0239] Allard WJ等,Clin Cancer Res 10:6897-6904,2004

[0240] Biggiogera M等,Biol Cell 96:603-615,2004

[0241] BodnarAG等,Exp Cell Res 228:58-64,1996

[0242] Brown,J.M.和Attardi,L.D.Nature Reviews Cancer 5:231-237,2005

[0243] Chen XQ等,Clin Cancer Res 6:3823-3826,2000

[0244] Cristofanilli M等,New Engl J Med 351,781-791,2004

[0245] Cristofanilli M 等,J Clin Oncol. 23:1420-1430,2005

[0246] Duncan,R.The dawning era of polymer therapeutics(聚合物治疗的黎明时代).Nature Reviews Drug Discovery.2:347-360,2003

[0247] Erlich HA(1989)J Clin Immunol 9(6):437-47

[0248] Ferrari,M.Cancer nanotechnology:opportunities and challenges(癌症纳米技术的机会和挑战).Nature Reviews Cancer 5:161-171,2005.

[0249] Fodor SP,Read JL,Pirrung MC,Stryer L,Lu AT,Solas D.(1991)Science251(4995):767-73

[0250] Frolkis M.等,Cancer Gene Therapy 10,239-249,2003

[0251] Goeddel等,1980

[0252] Larson CJ等,Cytometry A 部分62A,46-53,2004

- [0253] Lawn等,1981
- [0254] Moore,A.,Basilion,J.,Chiocca,E.和Weissleder,R.,BBA,1402:239-249,1988
- [0255] Morikawa等,Cancer Immunol Immunother 27(1):1-6,1988
- [0256] Mullis KB,Faloona FA.(1987)Methods Enzymol 155:335-50
- [0257] Shinohara等,JImmunother 23(3):321-331,2000
- [0258] Wedemeyer,N.,Potter,T.,Wetzlich,S.和Gohde,W.,Clinical Chemistry 48: 91398-1405,2002
- [0259] Weissleder,R.,Moore,A.,Ph.D.,Mahmood-Bhorade,U.,Benveniste,H., Chiocca,E.A.,Basilion,J.P.Nature Medicine,6:351-355,2000

<110>麦德维特科学控股有限公司(Medvet Science Pty.Ltd.)

<120>一种诊断和治疗方法及其所使用的试剂

<130>12729120/TDO

<150>2005901613

<151>2005-01-04

<160>5

<170>PatentIn version 3.1

<210>1

<211>26

<212>DNA

<213>引物

<400>1

gaagggcgta ggcgccgtgc ttttgc

26

<210>2

<211>27

<212>DNA

<213>引物

<400>2

gtttgctcta gaatgaacgg tggaagg

27

<210>3

<211>28

<212>DNA

<213>引物

<400>3

gcctgggagg ggtggtggct attttttg

28

<210>4

<211>24

<212>DNA

<213>引物

<400>4

cggagtcaac ggatttggtc gtat

24

<210>5

<211>24

<212>DNA

<213>引物

<400>5

agccttctcc atggtggtga agac

24

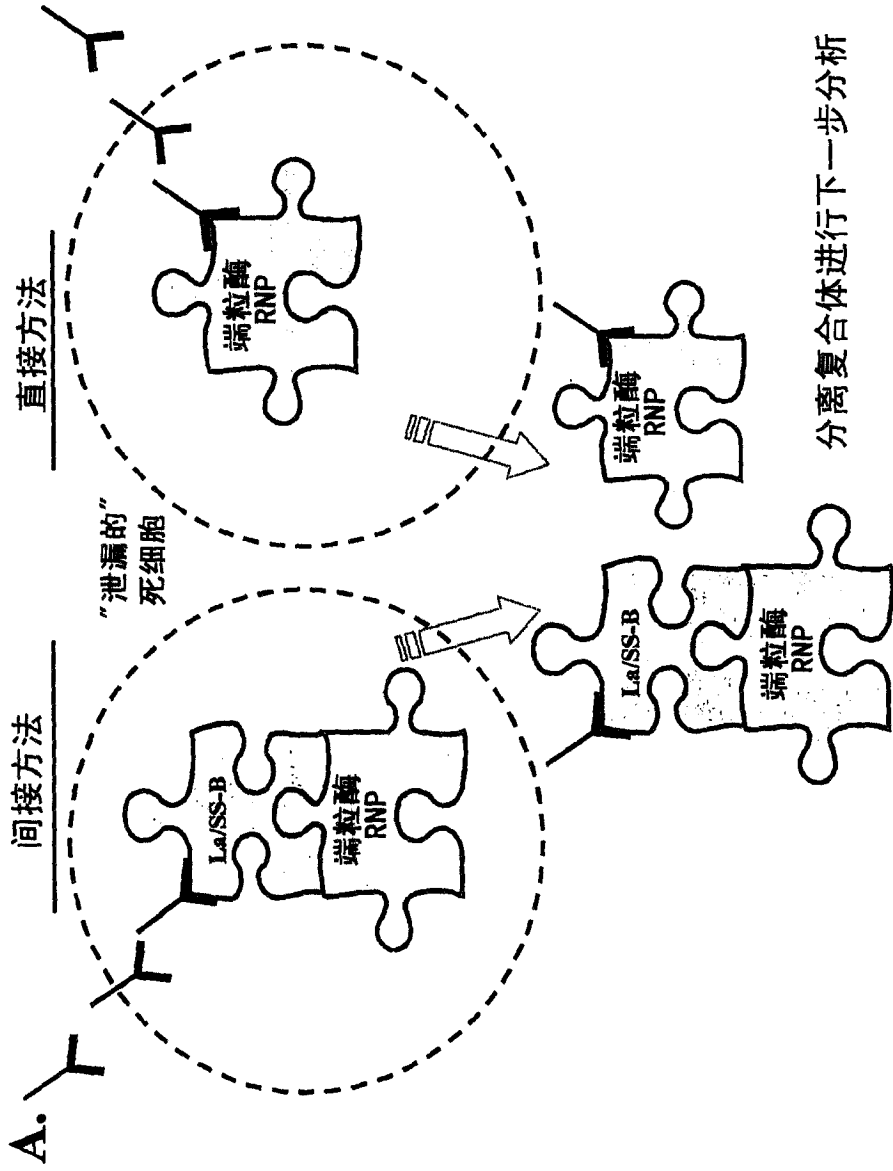


图 1(A)

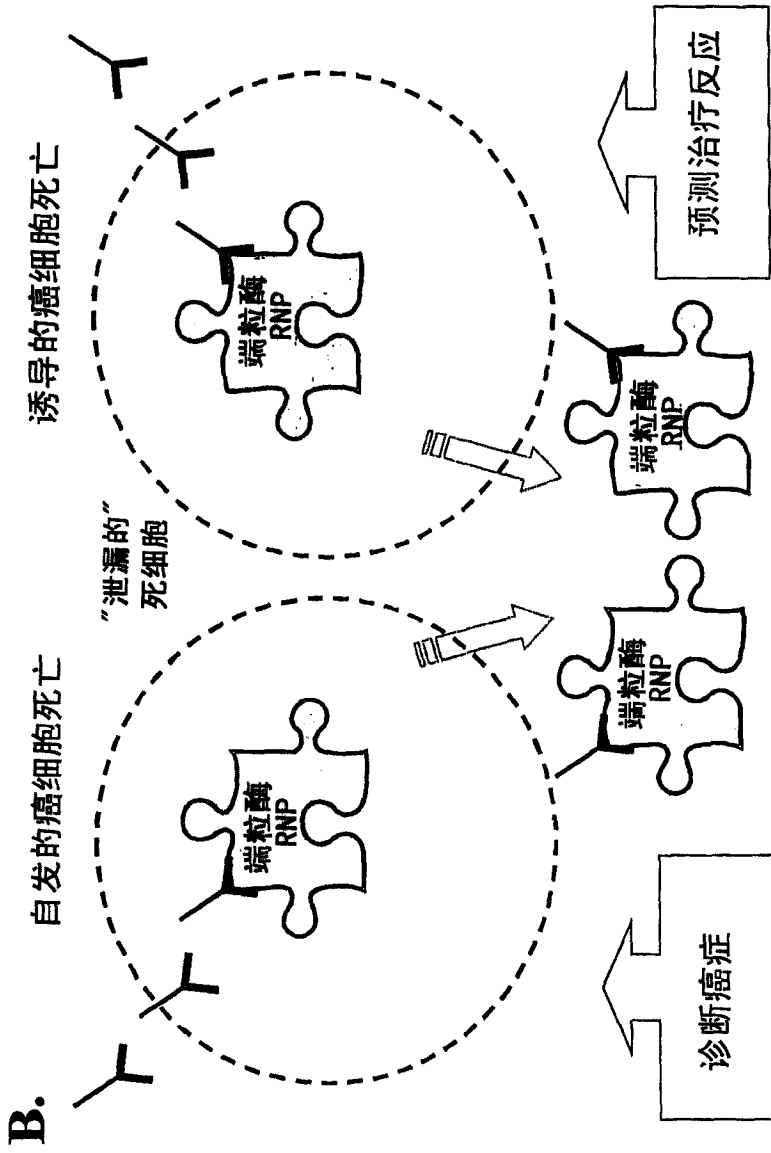


图 1(B)

C.

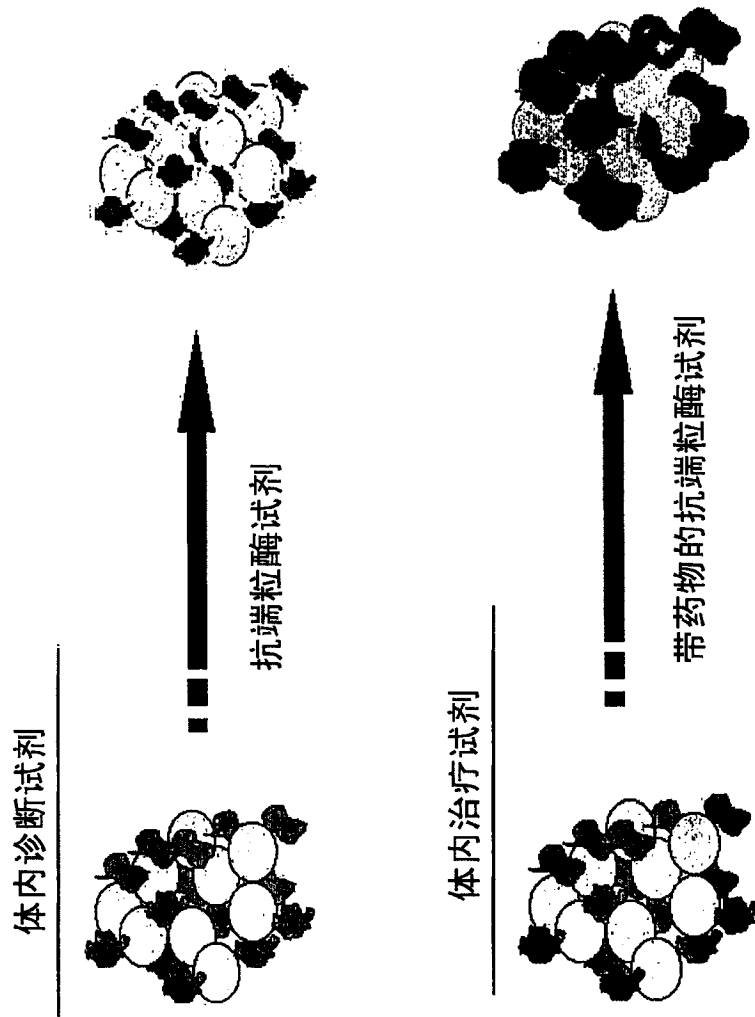


图 1 (C)

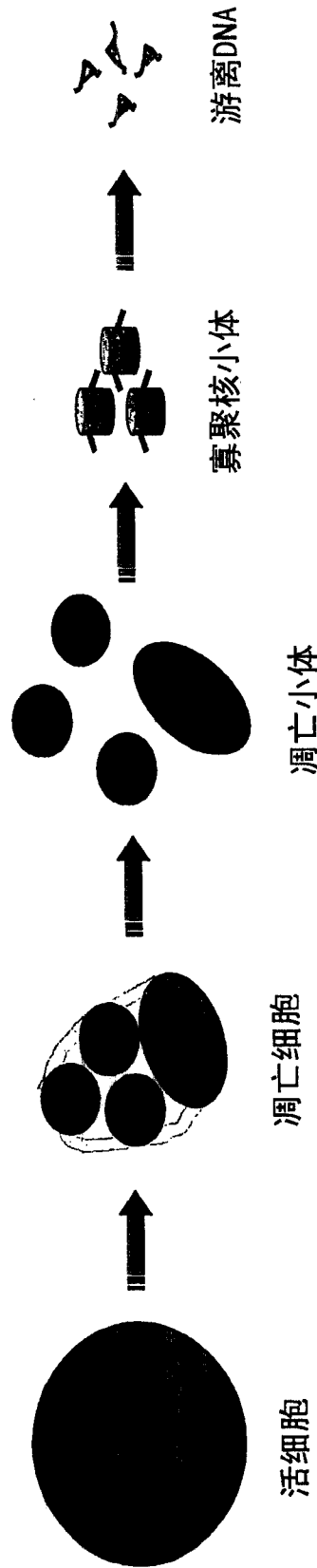
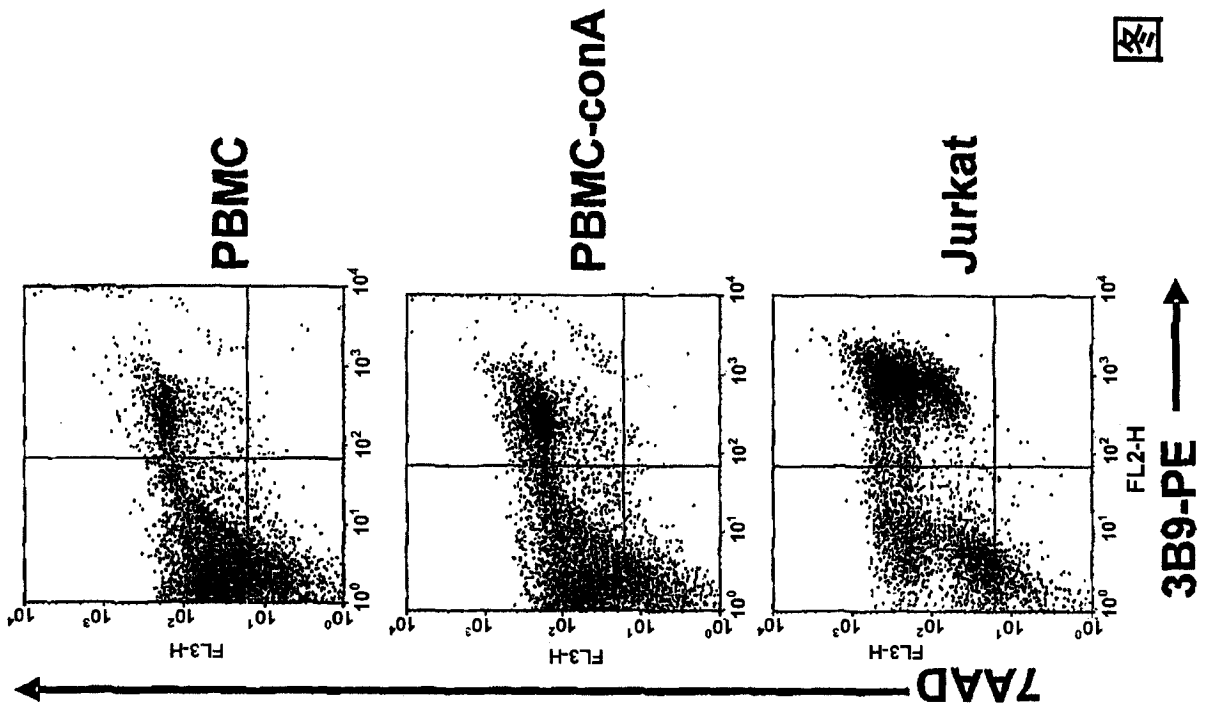


图 2

3



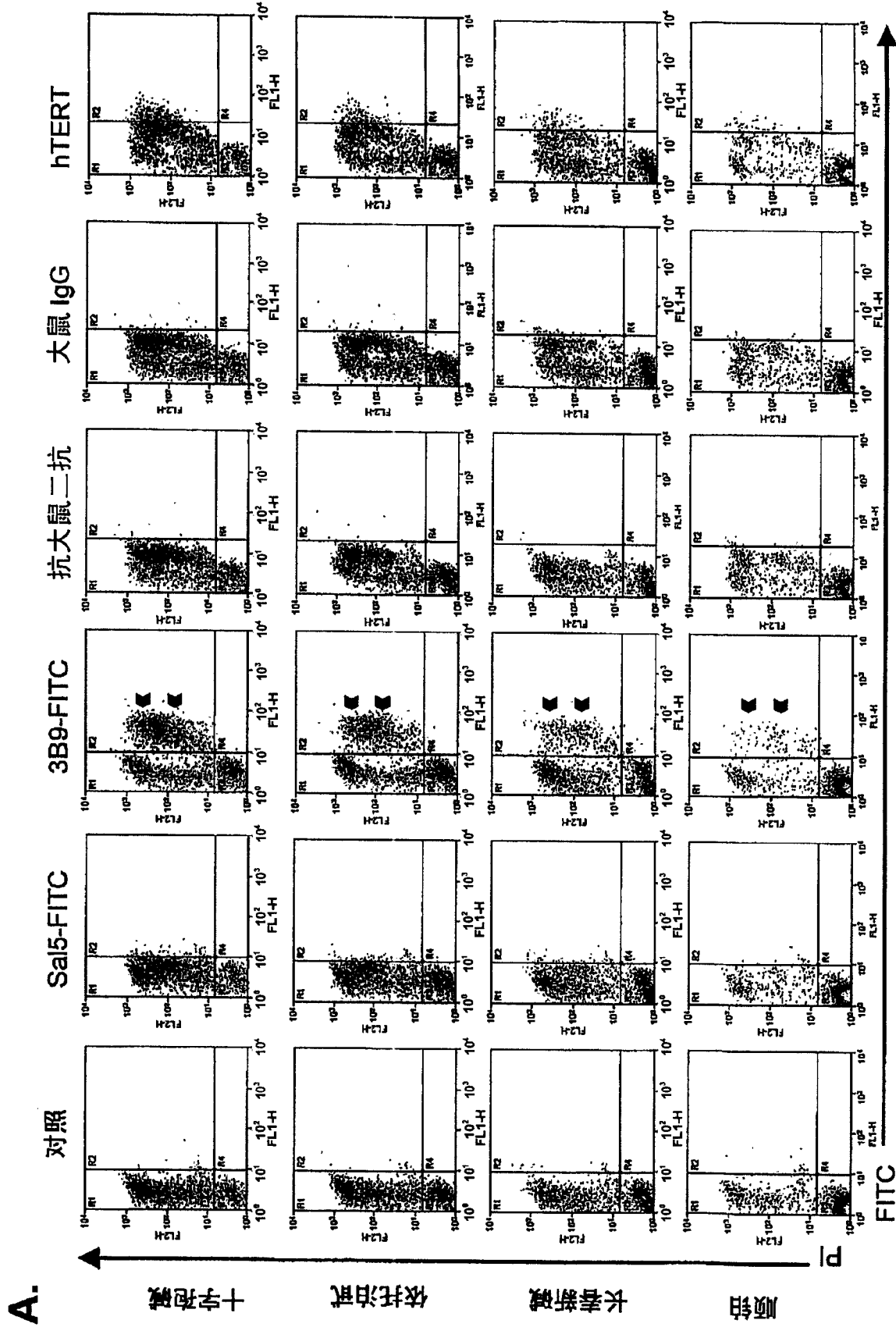


图 4(A)

B.

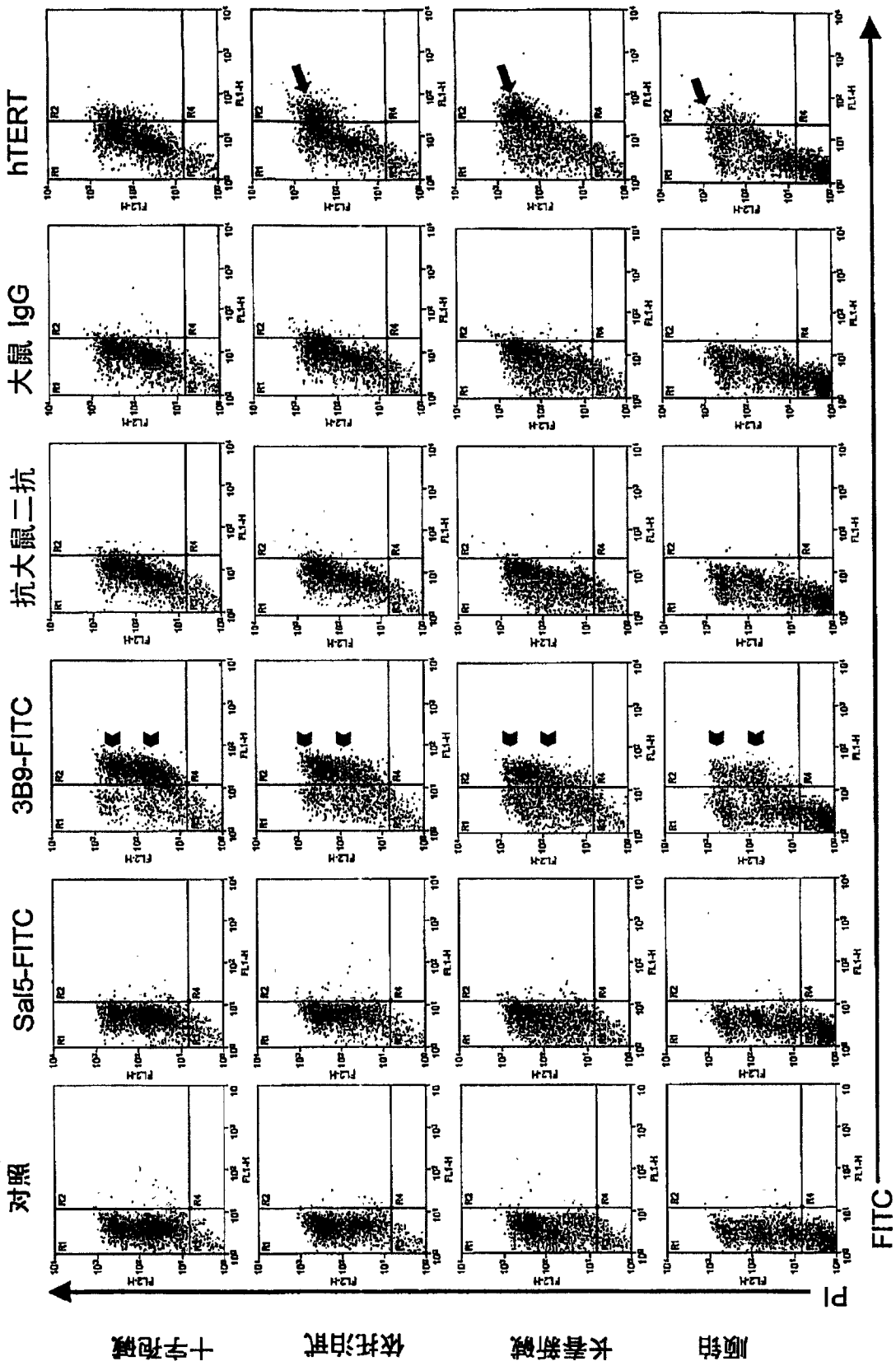


图 4(B)

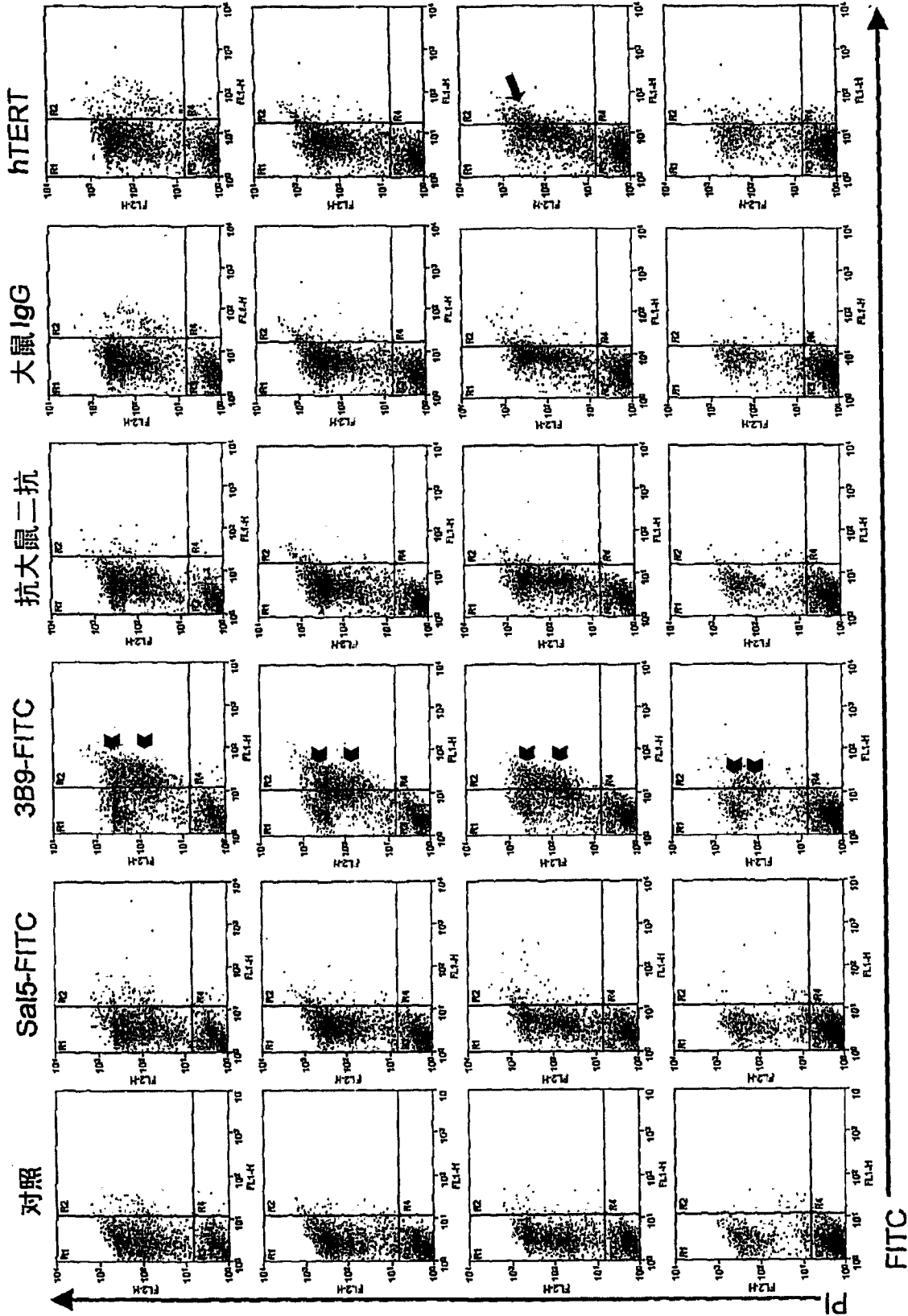
C.

十字孢霉

依托泊甙

长春新碱

顺铂



4(C)



FITC

D.

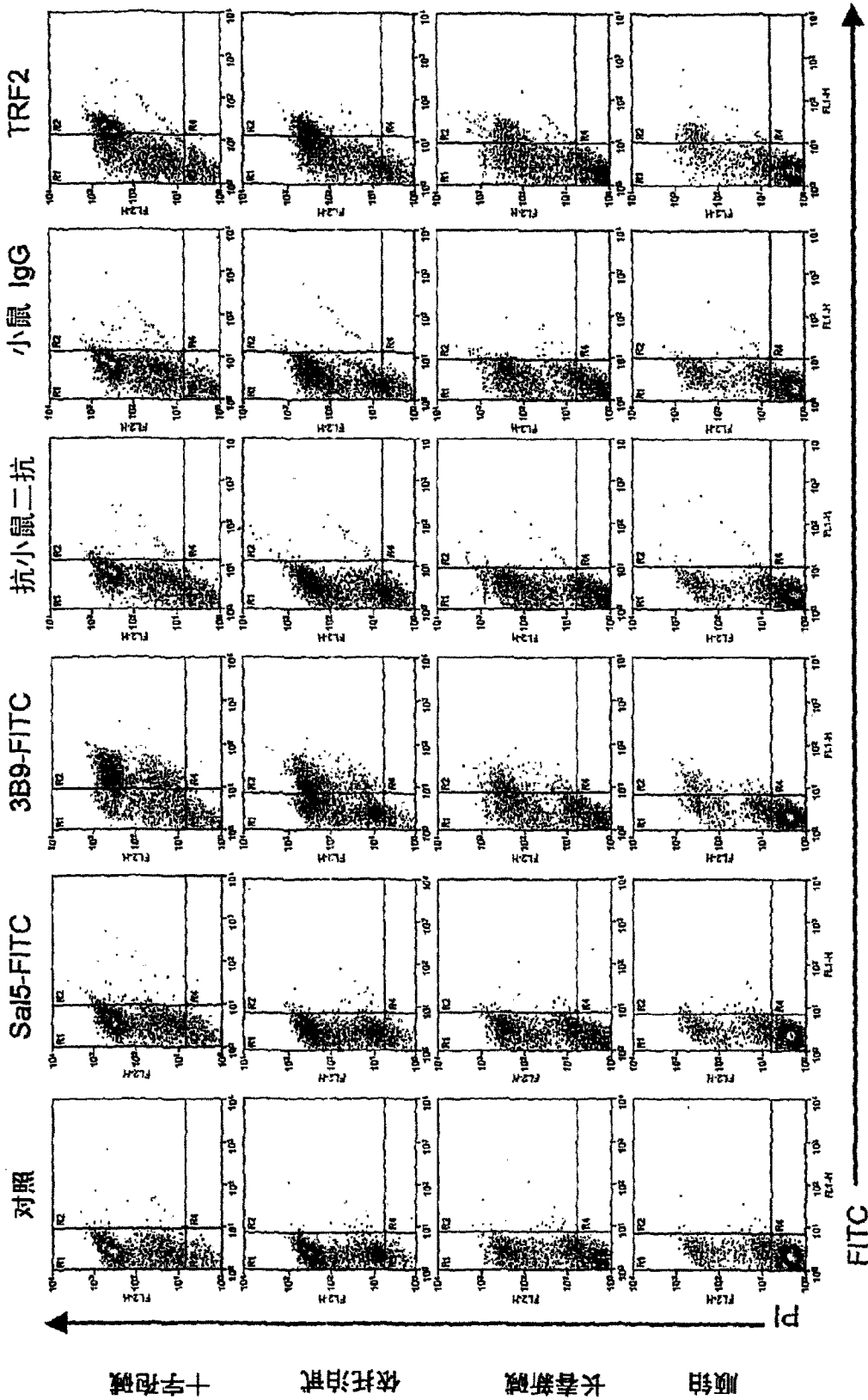


图 4(D)

E.

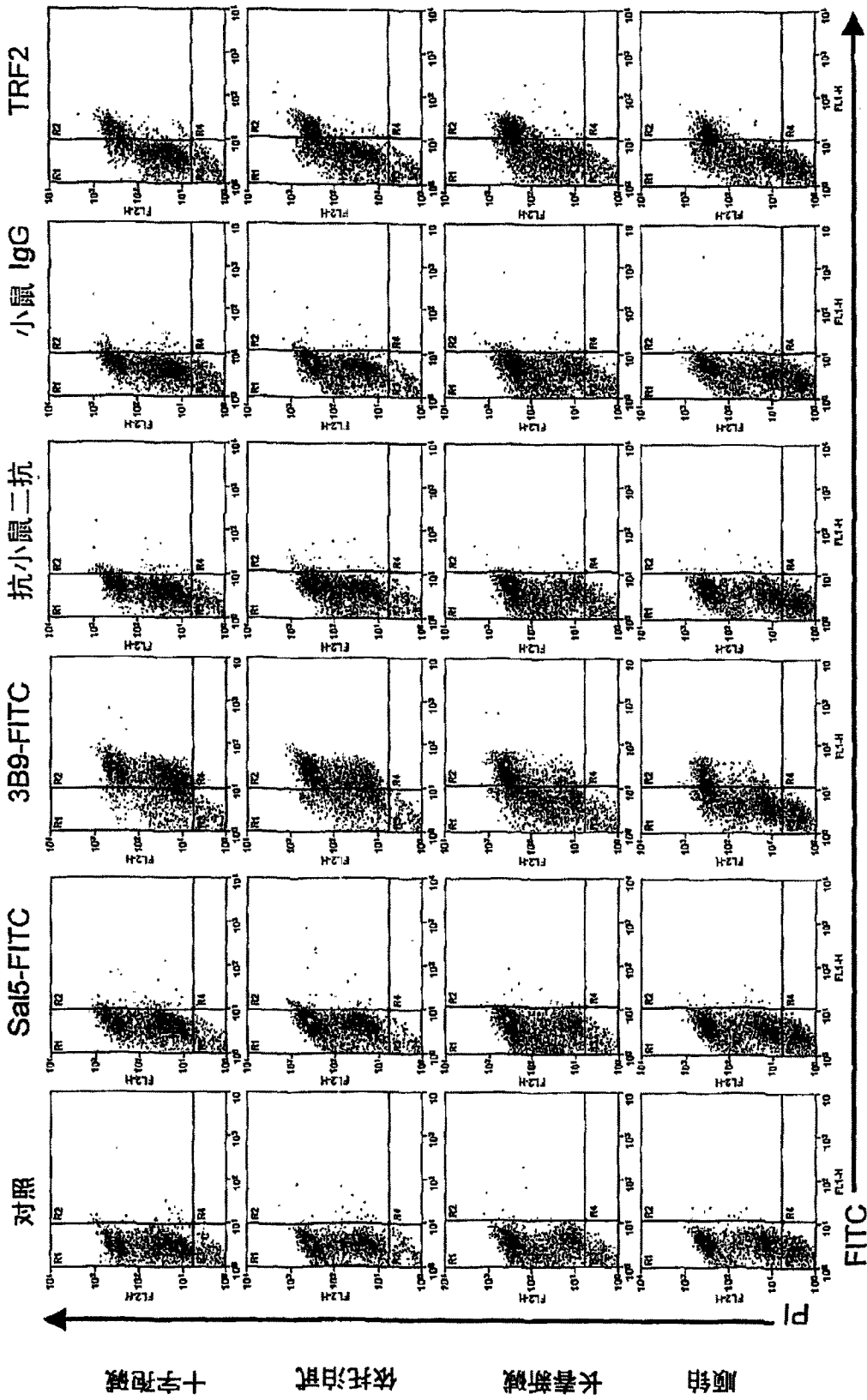


图 4(E)

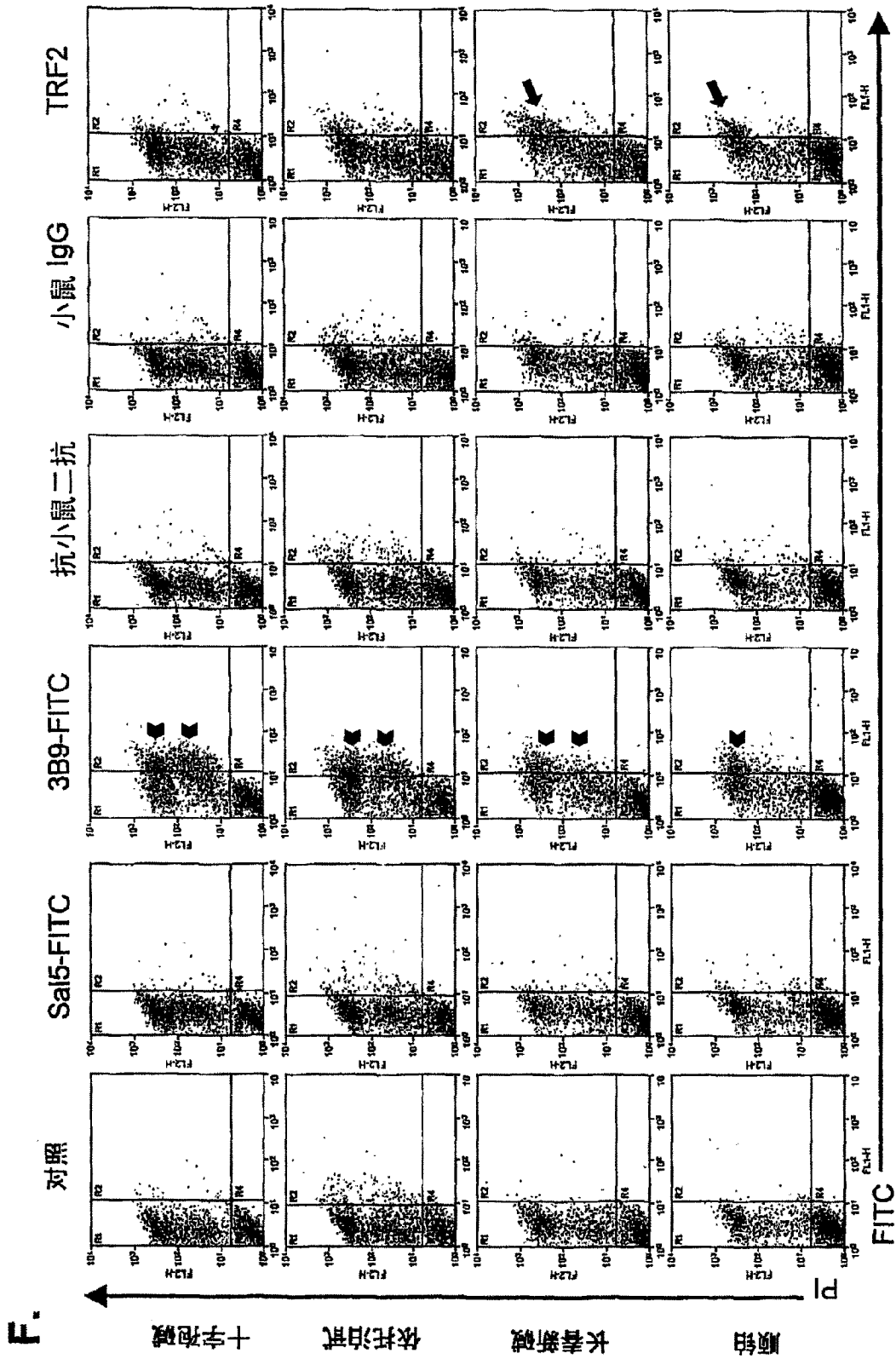


图 4(F)

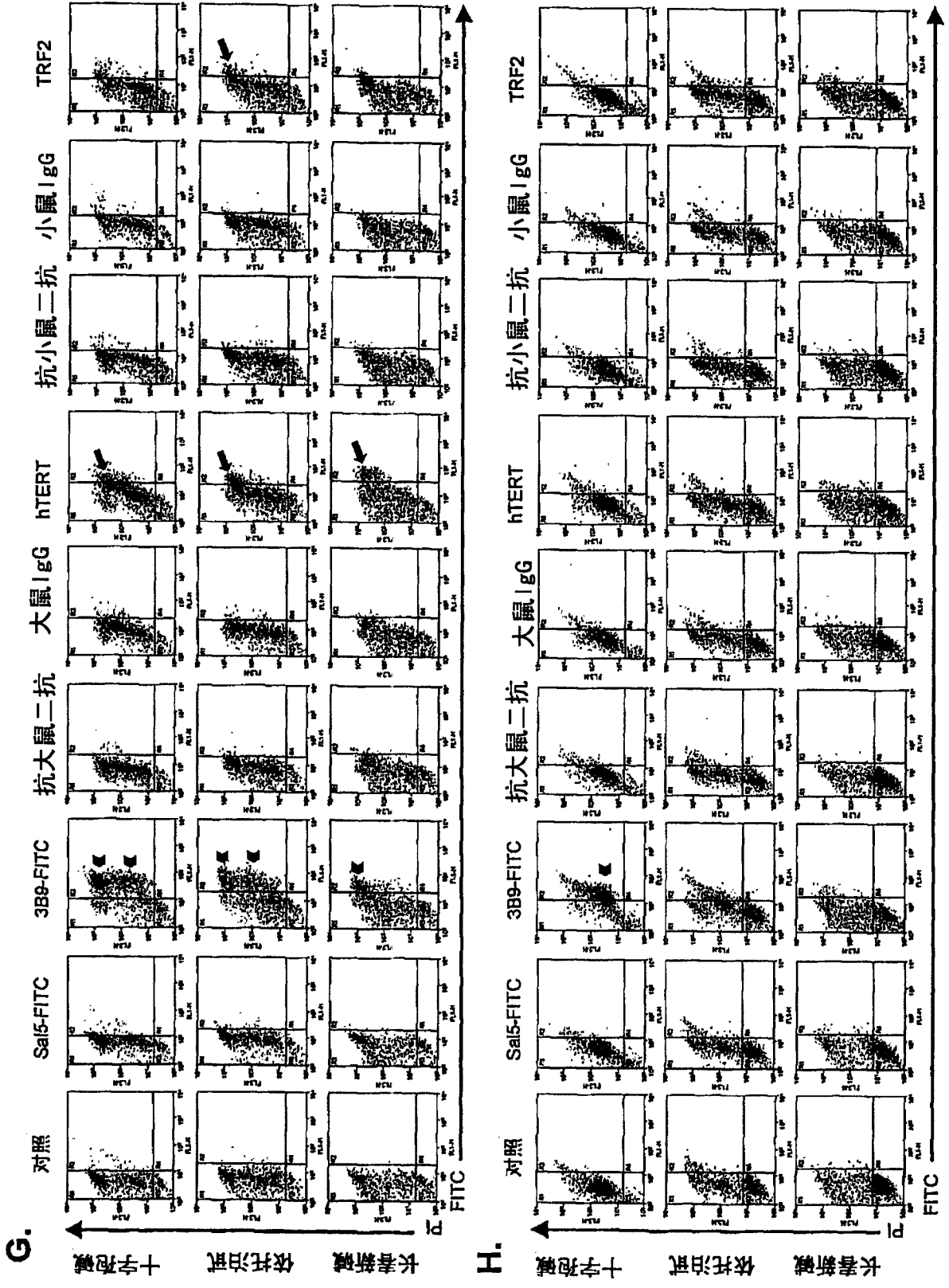


图4

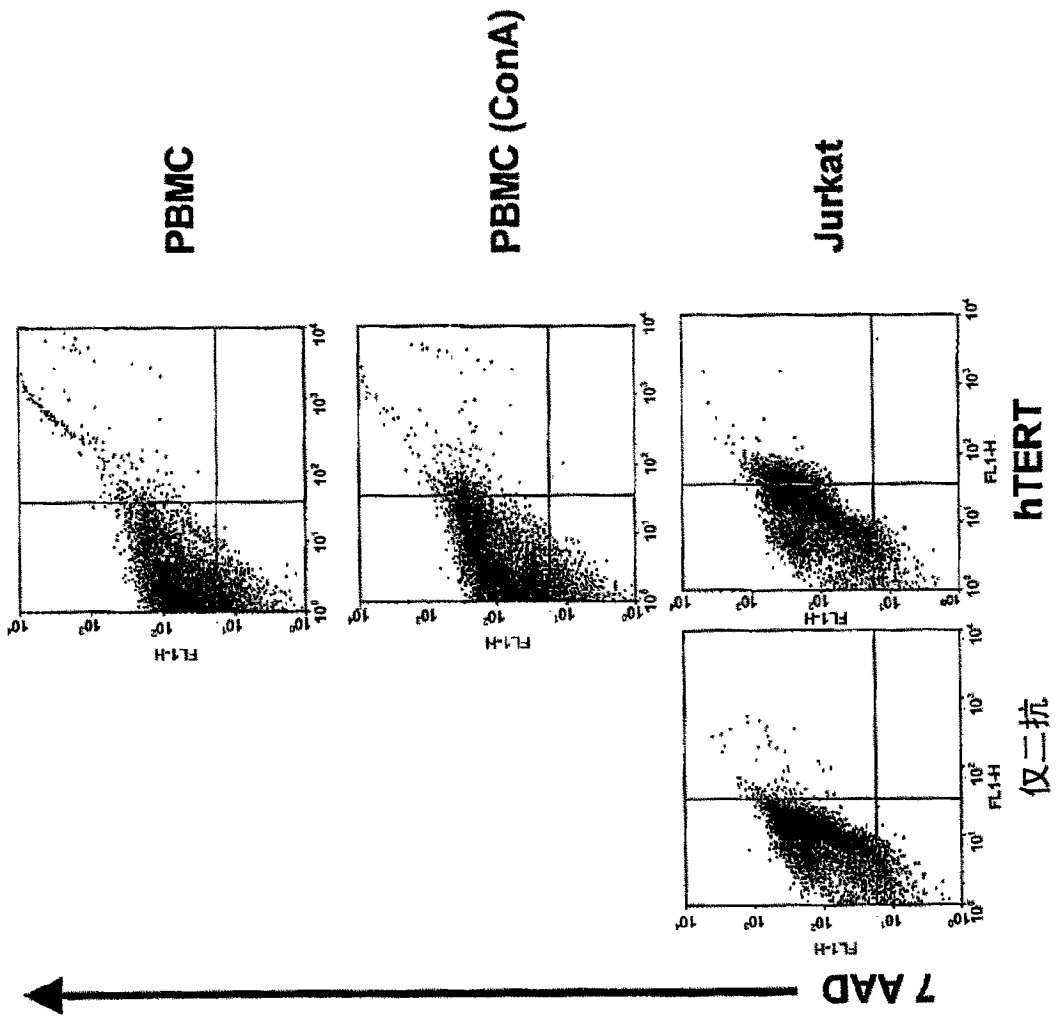


图 5

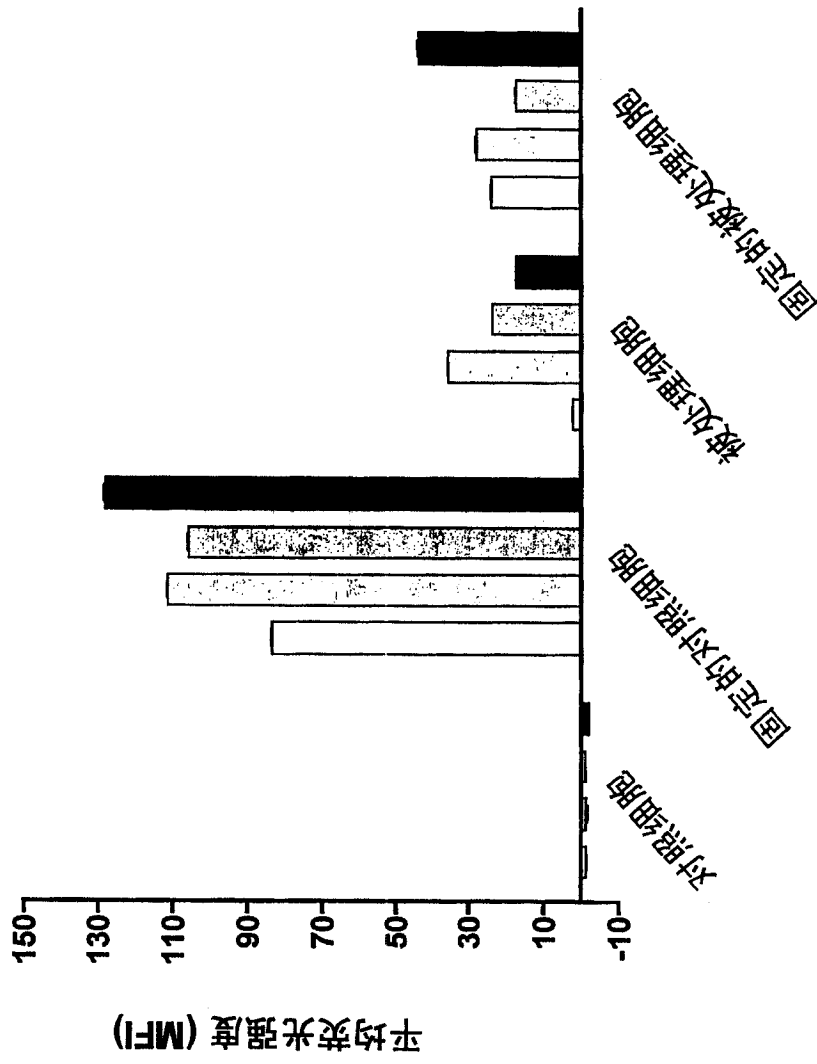


图 6

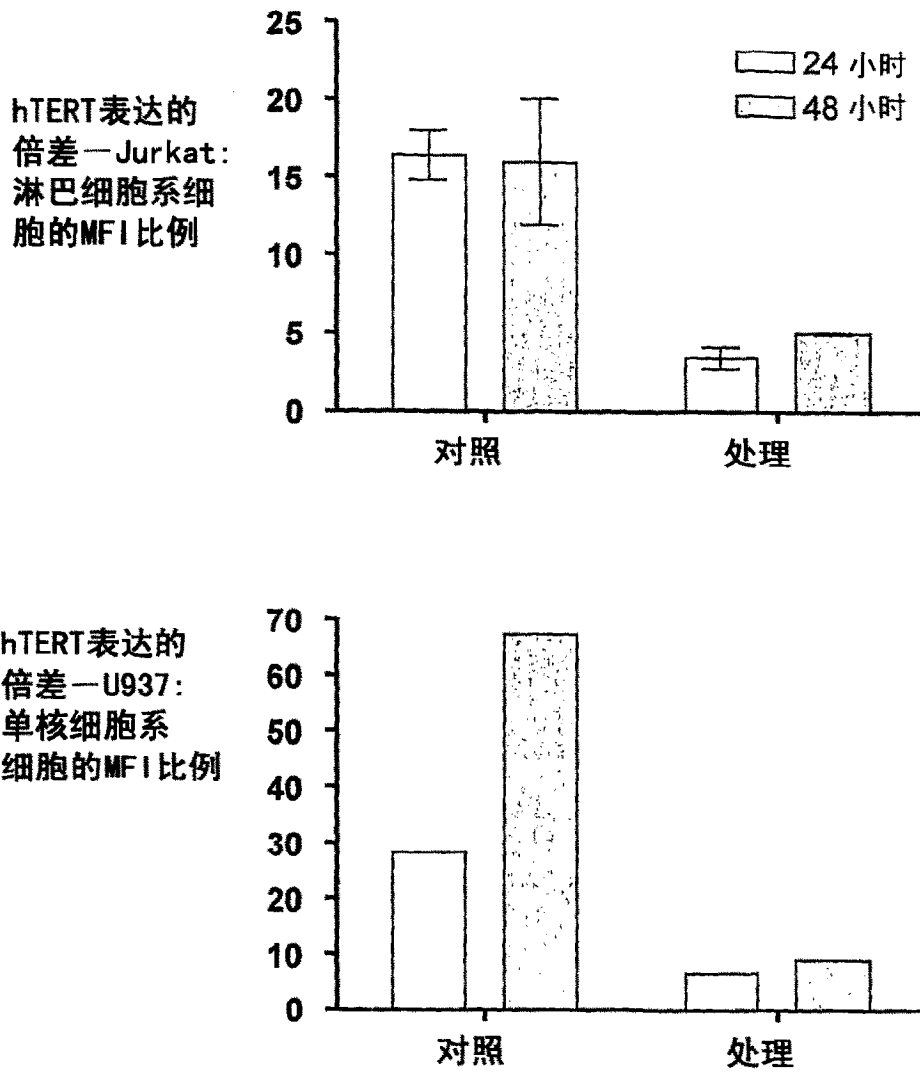
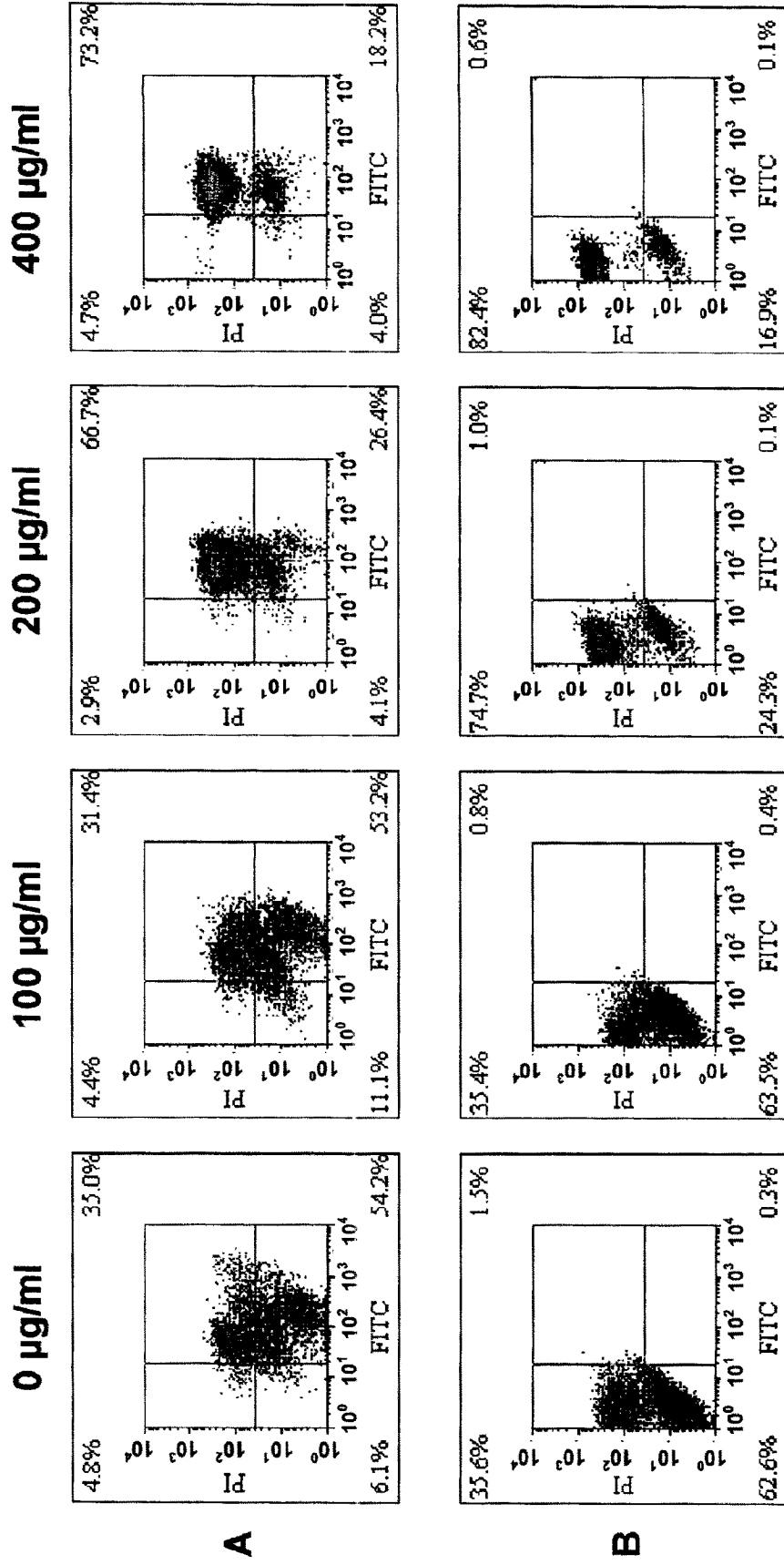


图7



8

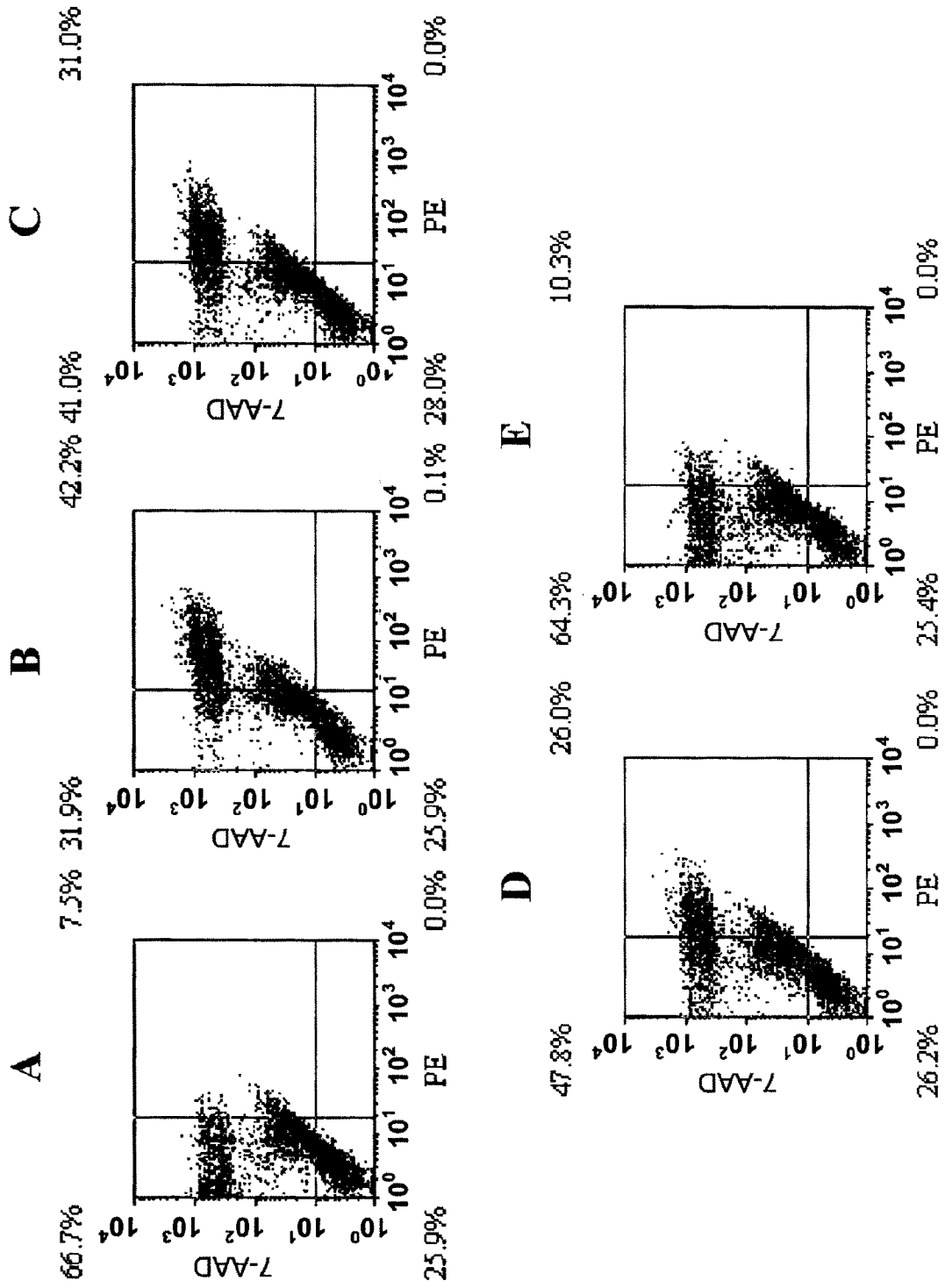


图 9

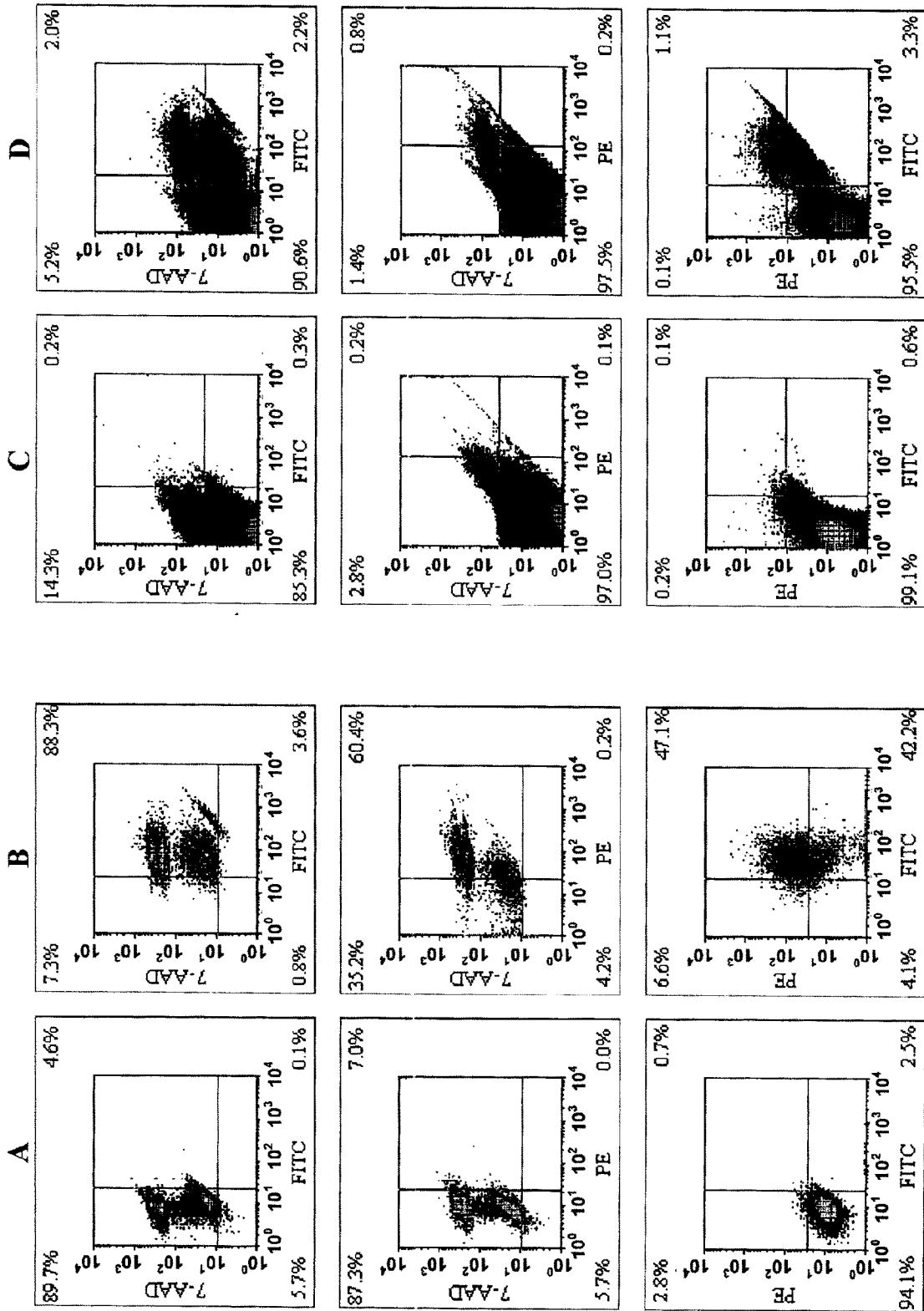


图 10

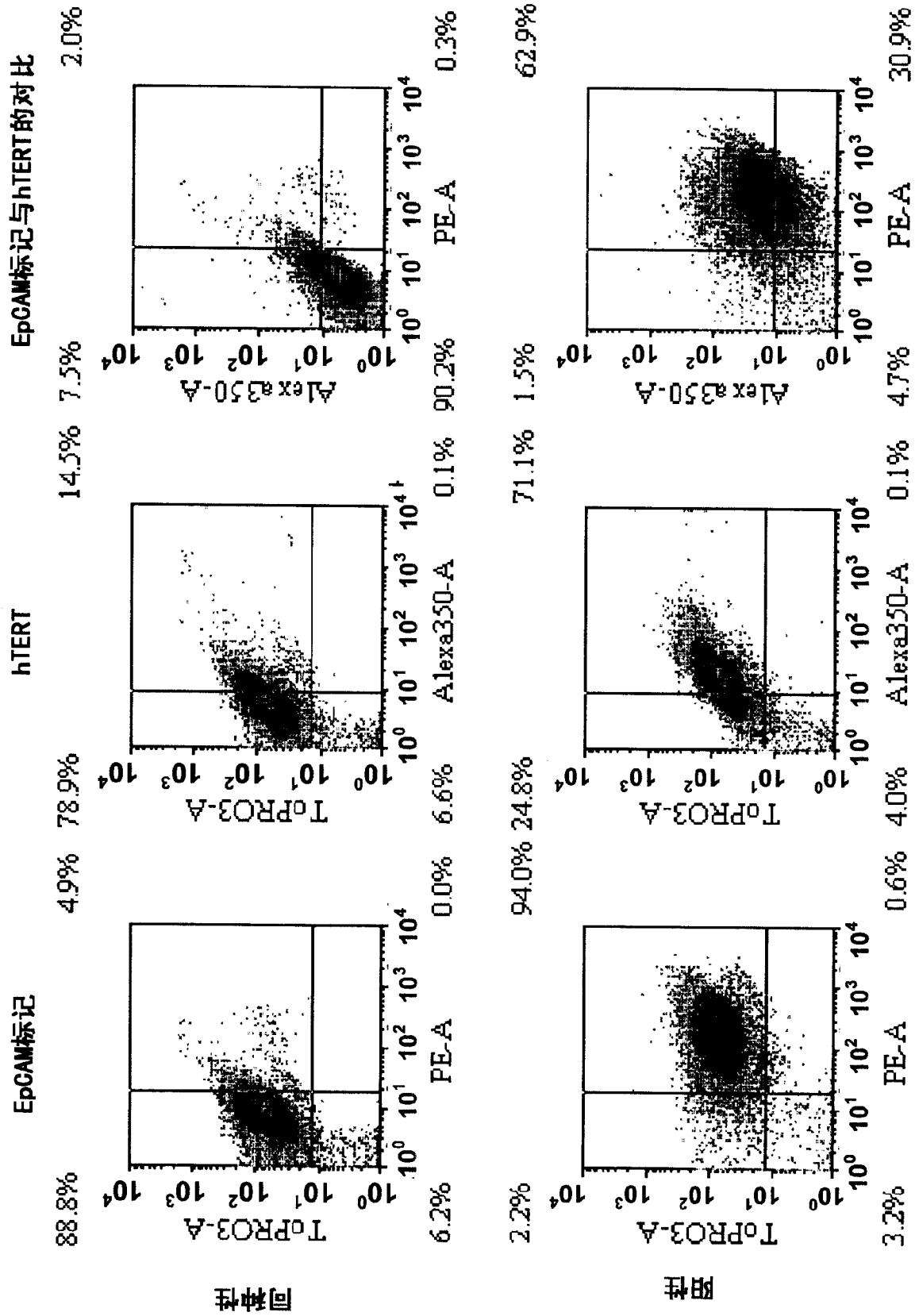


图 11

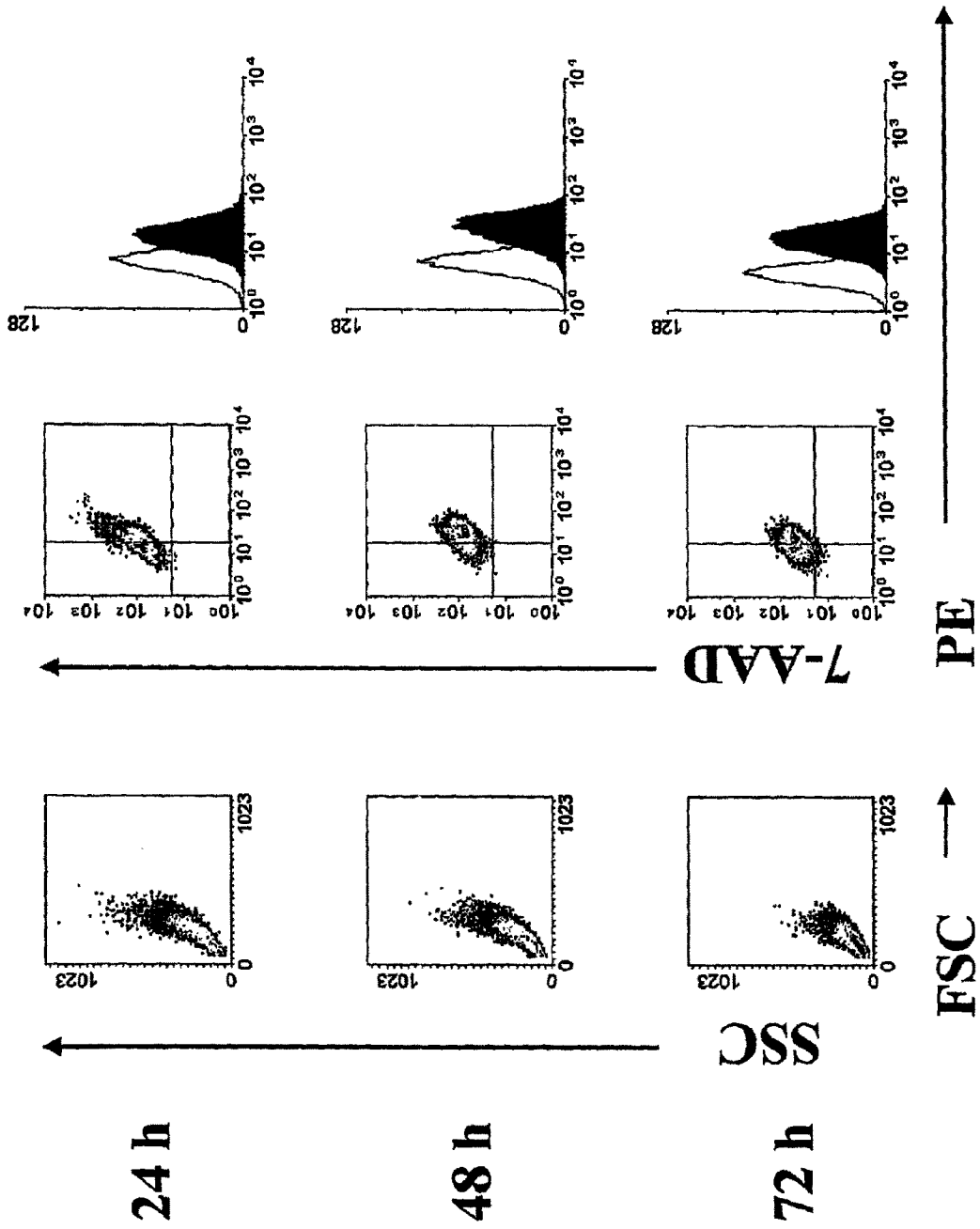


图 12A

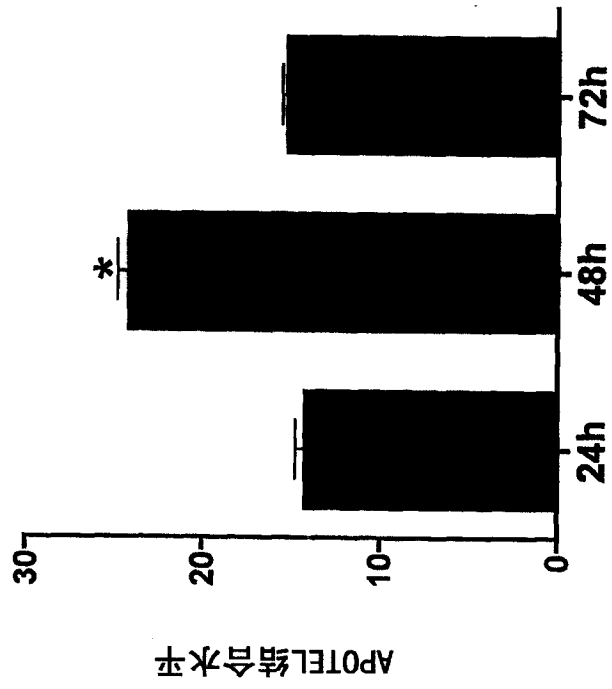


图 12B

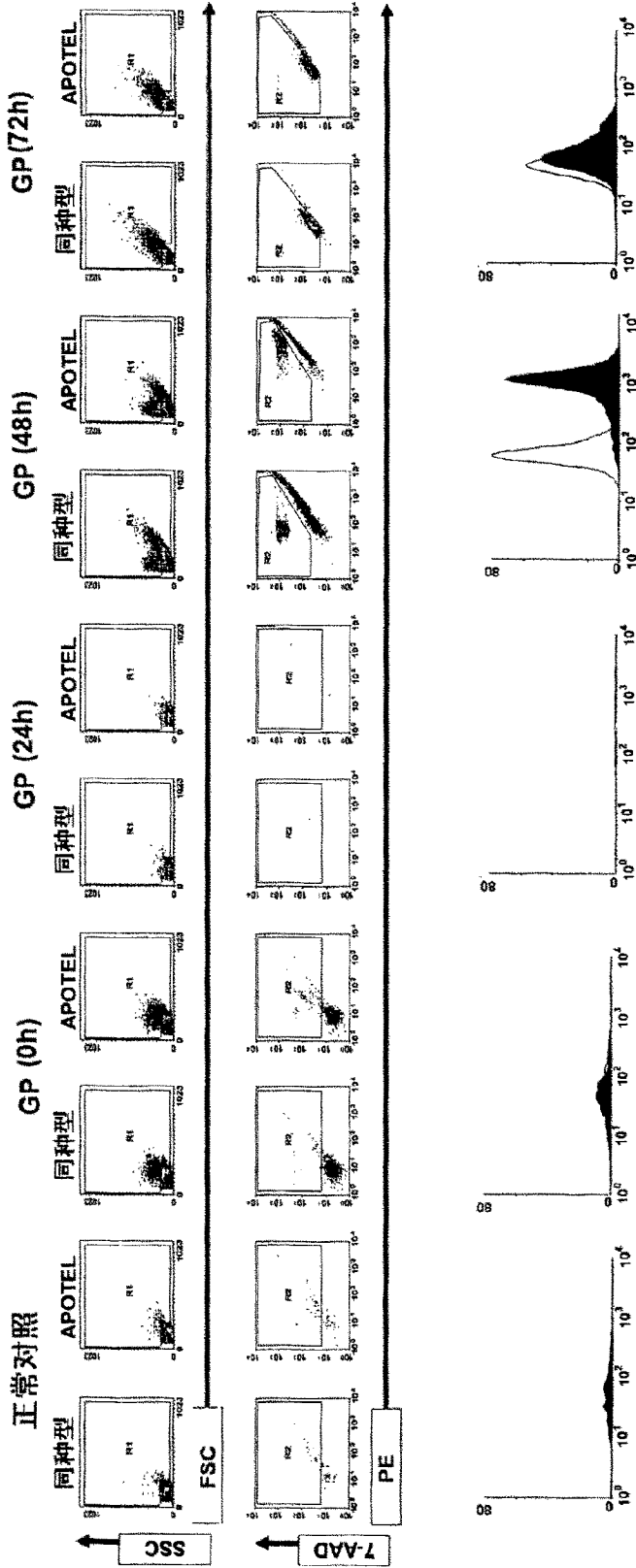


图 13

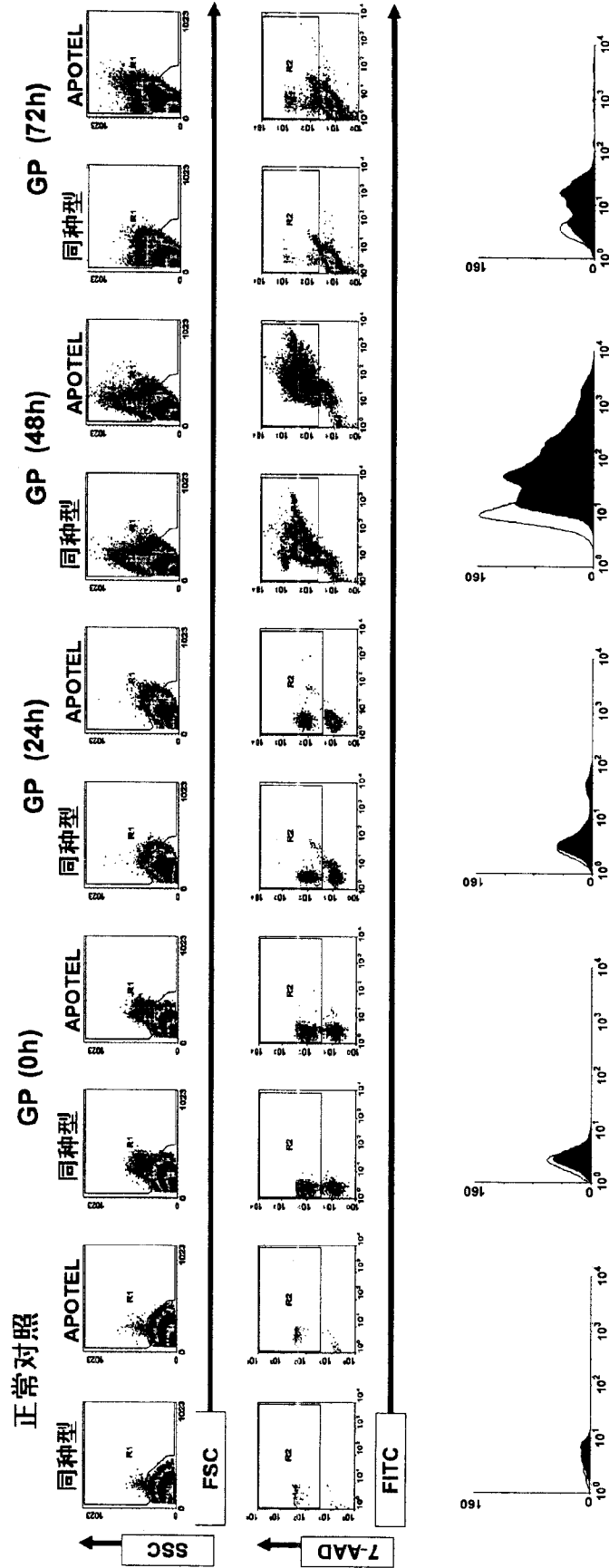


图 14

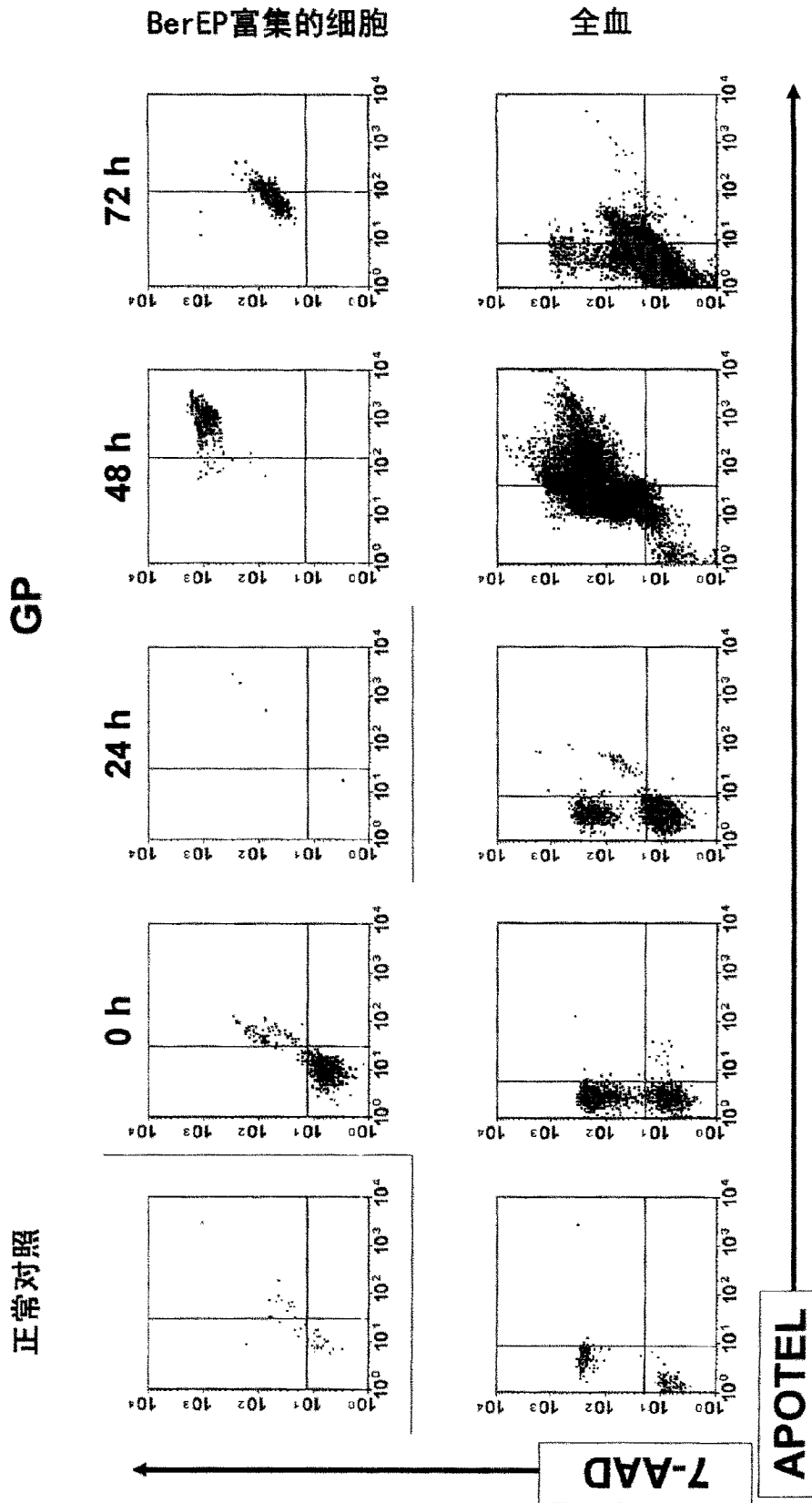


图 15

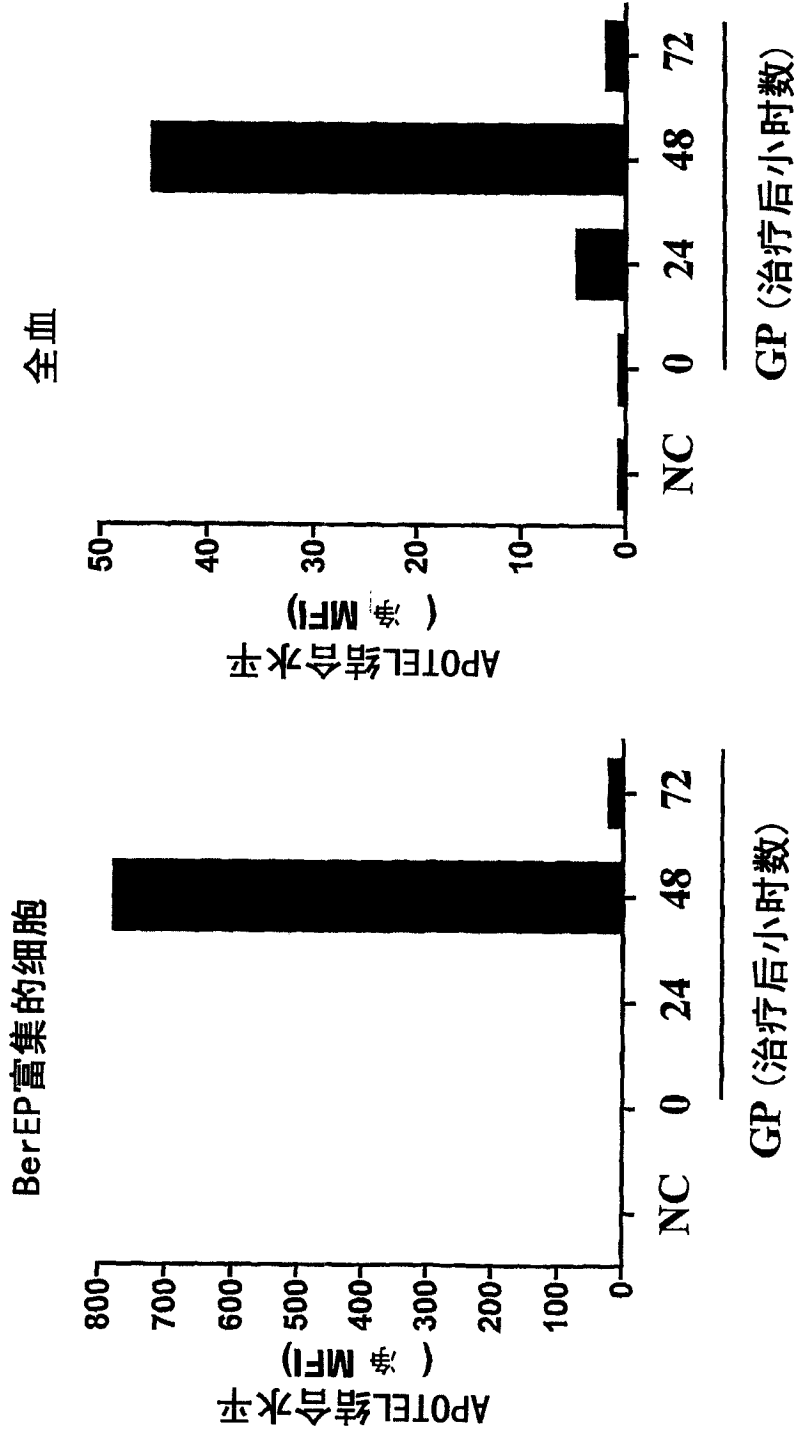


图 16

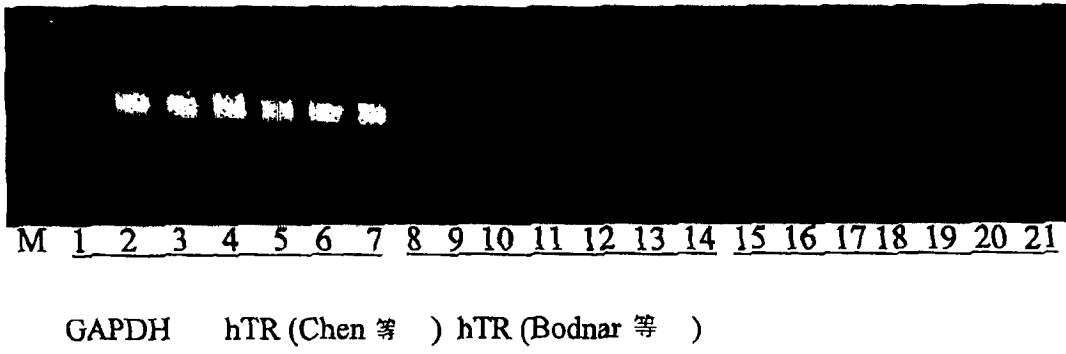


图17

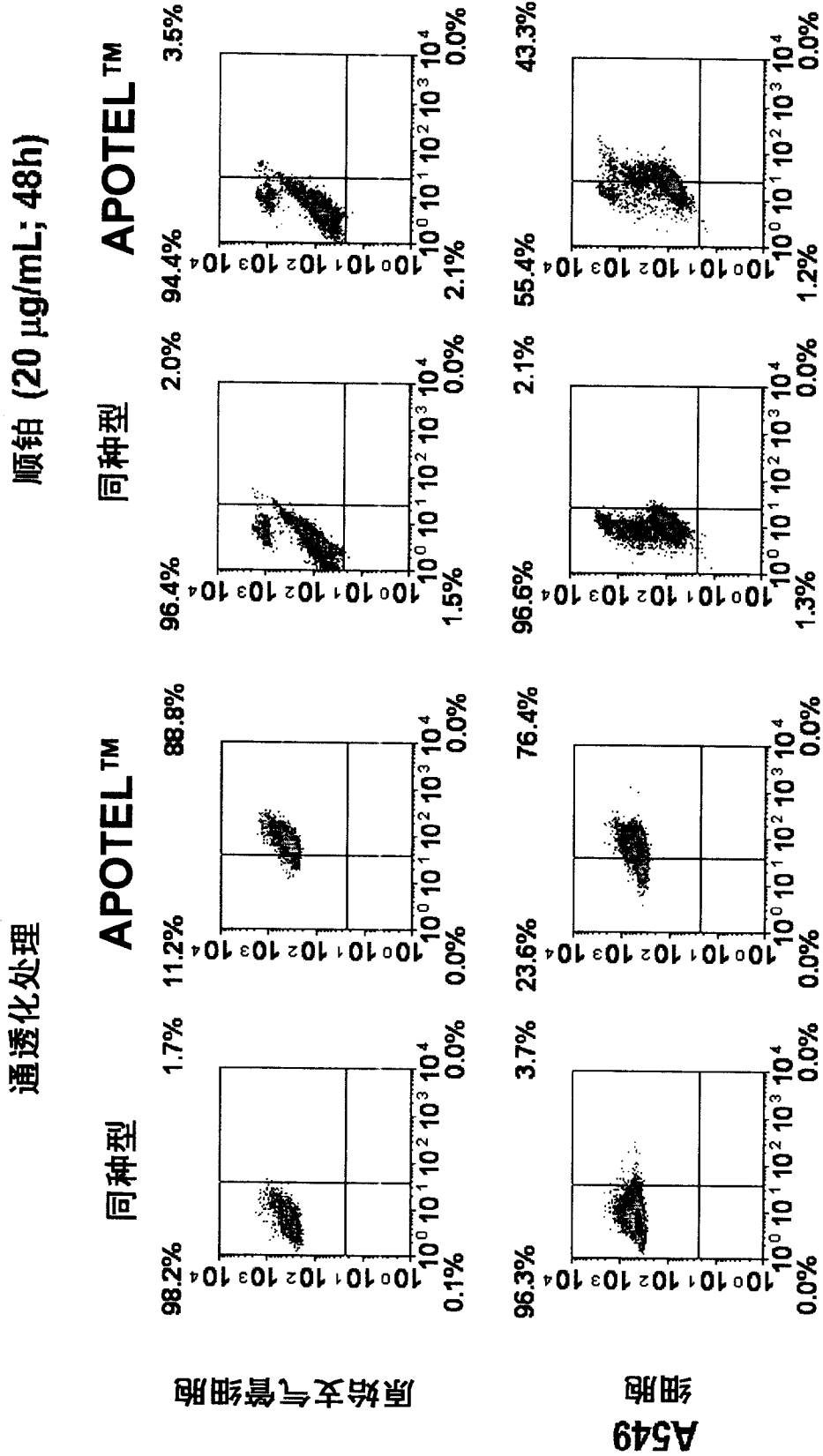


图 18A

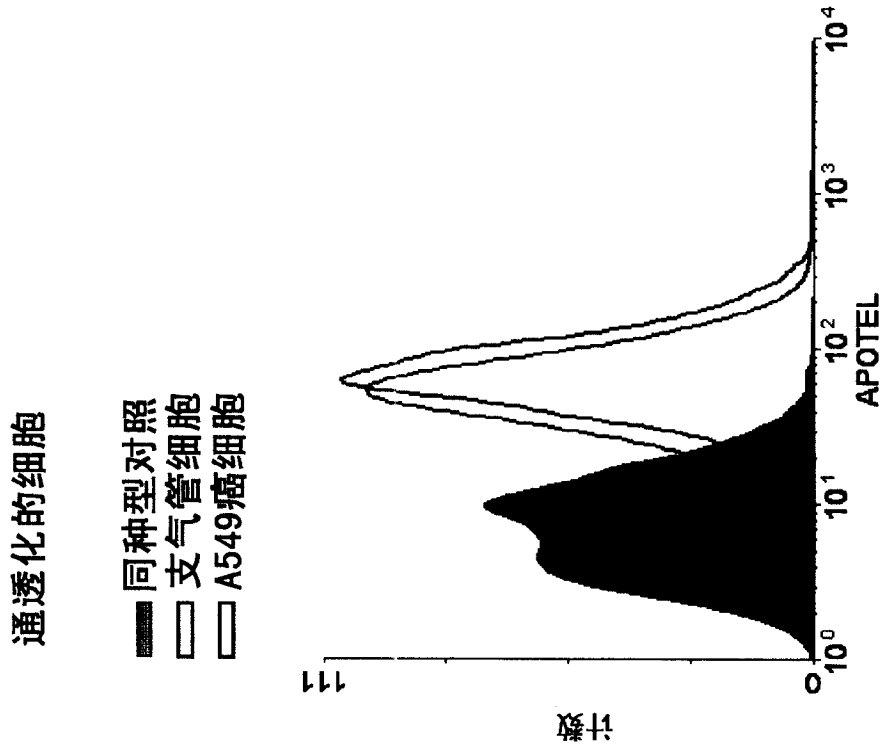
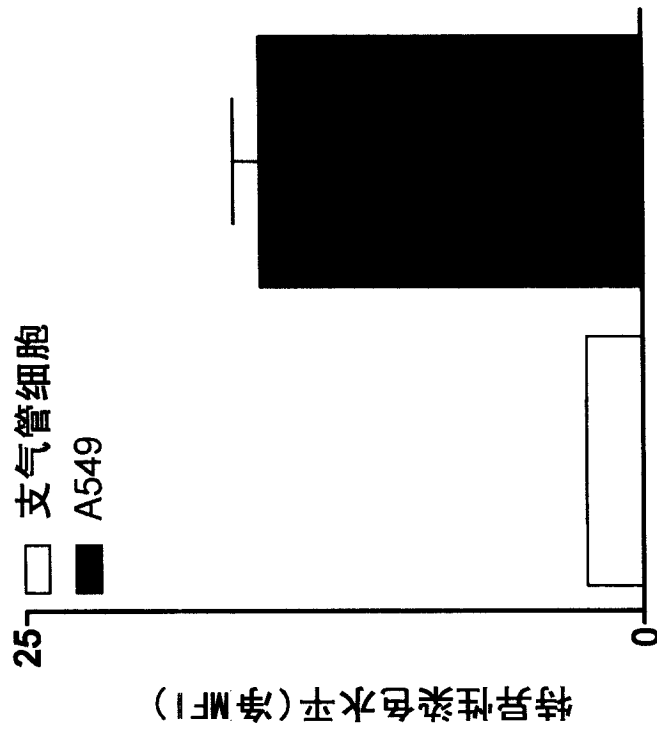


图 18B

顺铂 (20 μ g/mL; 48h)



通透化处理

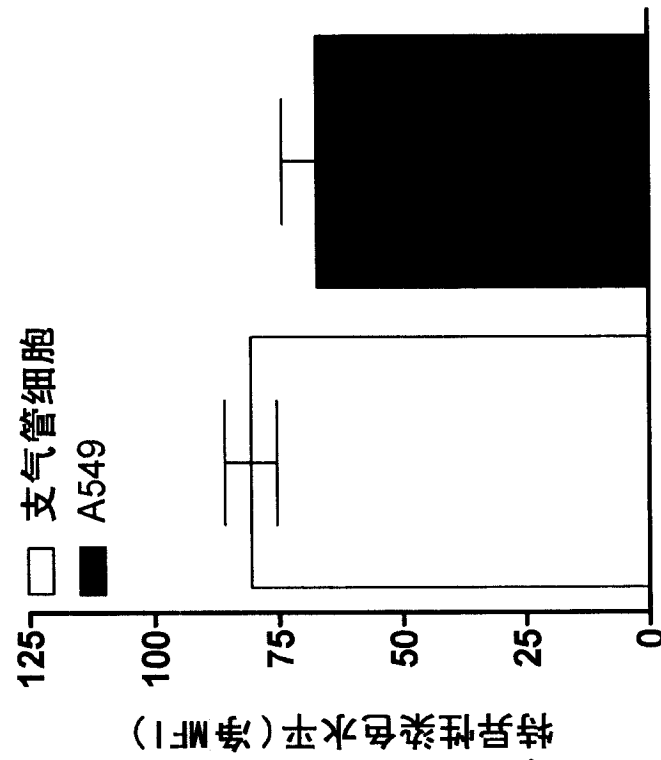


图 18C

专利名称(译)	一种诊断和治疗方法及其所使用的试剂		
公开(公告)号	CN101313219B	公开(公告)日	2016-10-05
申请号	CN200680015320.8	申请日	2006-03-31
[标]申请(专利权)人(译)	麦德维特科学控股有限公司		
申请(专利权)人(译)	麦德维特科学控股有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	麦德维特科学控股有限公司		
[标]发明人	MP布朗		
发明人	M·P·布朗		
IPC分类号	G01N33/574 G01N33/53 G01N33/577 A61K51/10 A61K39/395 A61P35/00 C12Q1/68		
CPC分类号	G01N33/573 C07K16/40 G01N33/5011 G01N33/57488 G01N2800/52		
审查员(译)	罗洋		
优先权	2005901613 2005-04-01 AU		
其他公开文献	CN101313219A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明一般涉及一种筛选对象体内赘生细胞死亡水平的方法。更具体地说，本发明提供了一种通过检测所述对象体内的或所述对象来源的生物样品中的死亡细胞所表达的端粒酶蛋白和/或基因的水平来筛选赘生细胞死亡水平的方法。本发明的应用范围很广，其中包括但不限于评价赘生疾病、监测这种疾病的进展、评价治疗剂或治疗方案的疗效以及预测对象向更高疾病阶段进展或者是进入缓解状态的可能性。本发明还提供了用于检测端粒酶蛋白和/或核酸分子的诊断试剂。

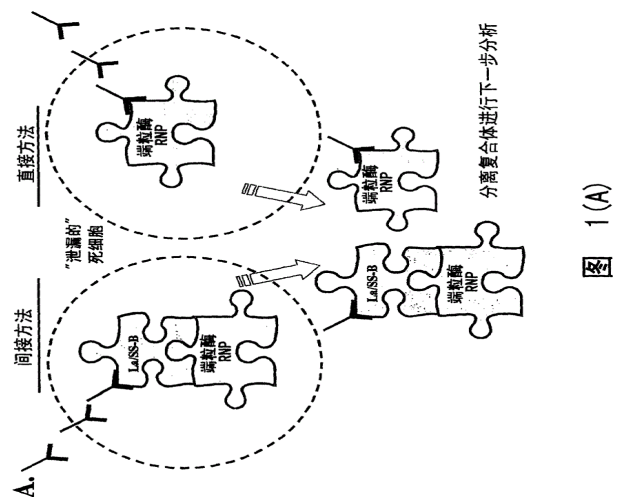


图 1(A)