

[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 98812478.5

[43]公开日 2001年1月31日

[11]公开号 CN 1282422A

[22]申请日 1998.10.21 [21]申请号 98812478.5

[30]优先权

[32]1997.10.21 [33]GB [31]9722217.8

[32]1997.11.14 [33]GB [31]9724134.3

[32]1998.2.26 [33]GB [31]9804156.9

[32]1998.5.15 [33]GB [31]9810560.4

[32]1998.8.5 [33]GB [31]9817075.8

[86]国际申请 PCT/GB98/03153 1998.10.21

[87]国际公布 WO99/21014 英 1999.4.29

[85]进入国家阶段日期 2000.6.21

[71]申请人 癌症研究行动技术有限公司

地址 英国伦敦

[72]发明人 R·A·拉斯基 G·H·威廉斯

N·科莱曼

[74]专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

代理人 张广育 谭明胜

权利要求书4页 说明书40页 附图页数0页

[54]发明名称 对细胞生长异常的测定

[57]摘要

通过检测靶标多肽或其编码 mRNA 测定细胞生长的异常性,特别是癌变异常性,在此该靶标多肽是组织,细胞或体液中的 DNA 复制起始前复合物的成分。靶标多肽包括 CDC6, MCM2, MCM3, MCM4, MCM5, MCM6 和 MCM7。在测定癌变和癌变前细胞生长异常性时的检测样品包括,子宫颈组织(组织活检样品和涂片样品),乳腺,结肠,肺,膀胱,皮肤,喉,食道,支气管,淋巴结和泌尿道(组织活检样品和细胞涂片样品)组织,在测定血液癌和证明肉瘤的癌转移时,检测样品包括从尿液、血液和血清中离心获得的细胞。

I S S N 1 0 0 8 - 4 2 7 4

权 利 要 求 书

1. 一种检测人体样品中是否存在异常增殖细胞或细胞生长异常性的方法，此方法包括检测样品中的一种靶标多肽，其中该靶标多肽是 DNA 复制起始前复合物的一种成分；
- 5 先决条件是，在此靶标多肽是 MCM7 时，样品不经受抗原提取处理或加压蒸煮/高压灭菌处理。
 2. 权利要求 1 的方法，其中的靶标多肽是选自如下种类：CDC6, MCM2, MCM3, MCM4, MCM5, MCM6, MCM7, Cdc7 蛋白激酶, Dbf4, Cdc14 蛋白磷酸酶, Cdc45 和 MCM10.
 - 10 3. 权利要求 2 的方法，其中的靶标多肽是选自 CDC6, MCM2, MCM3, MCM4, MCM5, MCM6 和 MCM7。
 4. 权利要求 3 的方法，其中的靶标多肽是 CDC6.
 5. 权利要求 3 的方法，其中的靶标多肽是 MCM2.
 6. 权利要求 3 的方法，其中的靶标多肽是 MCM3.
 - 15 7. 权利要求 3 的方法，其中的靶标多肽是 MCM4.
 8. 权利要求 3 的方法，其中的靶标多肽是 MCM5.
 9. 权利要求 3 的方法，其中的靶标多肽是 MCM6.
 10. 权利要求 3 的方法，其中的靶标多肽是 MCM7.
 11. 权利要求 1-10 任一项的方法，其中该方法包括，使样品与
20 针对靶标多肽的一种或几种特异性结合成分接触，以及测定该特异性结合成分与样品的结合。
 12. 权利要求 11 的方法，其中所述的一种或几种特异性结合成分是针对所述靶标多肽的。
 13. 权利要求 1-12 任一项的方法，其中待测的是组织样品。
 - 25 14. 权利要求 13 的方法，其中的组织样品是新鲜的或冷冻的。
 15. 权利要求 13 的方法，其中的组织样品不经甲醛固定或石蜡包埋。
 16. 权利要求 13 的方法，其中的组织样品不经受抗原提取处理或加压蒸煮/高压灭菌处理。
 - 30 17. 权利要求 13-16 任一项的方法，其中的组织是选自肺，乳腺，结肠，前列腺，胃，皮肤，食道和膀胱。

18. 权利要求 17 的方法，其中的组织是乳腺组织。
19. 权利要求 1-12 任一项的方法，其中待测的是细胞样品。
20. 权利要求 1-12 任一项的方法，其中的样品是取自人体的体液。
- 5 21. 权利要求 20 的方法，其中的细胞样品是由所述的体液提供。
22. 权利要求 20 或 21 的方法，其中的体液是血液。
23. 权利要求 20 或 21 的方法，其中的体液是尿液。
24. 权利要求 1-23 任一项的方法，其中被筛选检查的是一个人群。
- 10 25. 权利要求 24 的方法，其中的个体可被分类为 (i) 具有正常的组织或 (ii) 具有包含潜在性或确实的癌变前细胞或癌细胞，异常发育细胞或赘生性细胞的异常组织。
26. 权利要求 25 的方法，其中被分类为具有异常组织的个体的组织或细胞将经受进一步检查或分析。
- 15 27. 一种检测人体子宫颈样品中是否存在异常增殖细胞或细胞生长异常性的方法，此方法包括，使样品与针对靶标多肽的一种或几种特异性结合成分接触，以及测定该特异性结合成分与样品的结合，其中的靶标多肽是一种 DNA 复制起始前复合物成分。
28. 权利要求 27 的方法，其中的样品是子宫颈涂片。
- 20 29. 权利要求 27 或 28 的方法，其中的靶标多肽是选自如下种类：CDC6, MCM2, MCM3, MCM4, MCM5, MCM6, MCM7, Cdc7 蛋白激酶, Dbf4, Cdc14 蛋白磷酸酶, Cdc45 和 MCM10。
30. 权利要求 29 的方法，其中的靶标多肽是选自 CDC6, MCM2, MCM3, MCM4, MCM5, MCM6 和 MCM7。
- 25 31. 权利要求 30 的方法，其中的靶标多肽是 Cdc6。
32. 权利要求 30 的方法，其中的靶标多肽是 MCM2。
33. 权利要求 30 的方法，其中的靶标多肽是 MCM3。
34. 权利要求 30 的方法，其中的靶标多肽是 MCM4。
35. 权利要求 30 的方法，其中的靶标多肽是 MCM5。
- 30 36. 权利要求 30 的方法，其中的靶标多肽是 MCM6。
37. 权利要求 30 的方法，其中的靶标多肽是 MCM7。

38. 权利要求 27-37 任一项的方法，其中所述的一种或几种特异性结合成分是针对所述多种靶标多肽的。

39. 权利要求 27-38 任一项的方法，其中被筛选检查的是一个
人群。

5 40. 权利要求 39 的方法，其中的个体可被分类为 (i) 具有正常的组织或 (ii) 具有包含潜在性或确实的癌变前细胞或癌细胞，异常发育细胞或赘生性细胞的异常组织。

41. 权利要求 40 的方法，其中被分类为具有异常组织的个体的组织或细胞将经受进一步检查或分析。

10 42. 一种检测人体内是否存在异常增殖细胞或细胞生长异常性的方法，此方法包括检测人体组织，体液或细胞中的靶标多肽，或者编码靶标多肽的 mRNA，其中的靶标多肽是 DNA 复制起始前复合物的一种成分；

15 先决条件是，在对取自人体的样品实行此方法，并且其靶标多肽是 MCM7 时，该样品不经受抗原提取处理或加压蒸煮/高压灭菌处理。

43. 权利要求 42 的方法，其中所述的组织，体液或细胞是在取自人体的样品中。

44. 权利要求 43 的方法，其中所述的样品是组织样品。

45. 权利要求 44 的方法，其中的样品是新鲜的或冷冻的。

20 46. 权利要求 44 的方法，其中的样品不经甲醛固定或石蜡包埋。

47. 权利要求 44 的方法，其中的组织样品不经受抗原提取处理或加压蒸煮/高压灭菌处理。

48. 权利要求 42-47 任一项的方法，其中被筛选检查的是一个
人群。

25 49. 权利要求 48 的方法，其中的个体可被分类为 (i) 具有正常的组织或 (ii) 具有包含潜在性或确实的癌变前细胞或癌细胞，异常发育细胞或赘生性细胞的异常组织。

50. 权利要求 49 的方法，其中被分类为具有异常组织的个体的组织或细胞将经受进一步检查或分析。

30 51. 一种试剂盒，它包含针对一种或几种靶标多肽的一种或几种特异性结合成分，其中的靶标多肽是 DNA 复制起始前复合物的一种

成分,此试剂盒还包含按照权利要求 11-48 任一项的方法使用此特异性结合成分的说明书。

52. 权利要求 51 的试剂盒,其中的靶标多肽是选自如下种类:
CDC6, MCM2, MCM3, MCM4, MCM5, MCM6, MCM7, Cdc7
5 蛋白激酶, Dbf4, Cdc14 蛋白磷酸酶, Cdc45, 和 MCM10.

53. 权利要求 52 的试剂盒,其中的靶标多肽是选自 CDC6,
MCM2, MCM3, MCM4, MCM5, MCM6 和 MCM7.

54. 权利要求 53 的试剂盒,其中的靶标多肽是 CDC6.

55. 权利要求 53 的试剂盒,其中的靶标多肽是 MCM2.

10 56. 权利要求 53 的试剂盒,其中的靶标多肽是 MCM3.

57. 权利要求 53 的试剂盒,其中的靶标多肽是 MCM4.

58. 权利要求 53 的试剂盒,其中的靶标多肽是 MCM5.

59. 权利要求 53 的试剂盒,其中的靶标多肽是 MCM6.

60. 权利要求 53 的试剂盒,其中的靶标多肽是 MCM7.

15 61. 权利要求 51-60 任一项的试剂盒,其中所述的一种或几种
特异性结合成分是针对多种所述靶标多肽的。

说明书

对细胞生长异常的测定

5 本发明是关于对组织，细胞或体液样品中细胞的检查，目的在于发觉细胞生长的异常性，特别是发觉潜在的（或真实的）癌细胞。本发明特别可用于筛选来自妇女的样品如子宫颈涂片，以便发现这些妇女子宫颈细胞的异常。本发明还可用于检查其它组织样品中的细胞，包括乳腺，如在此通过实验所证明的。对于发现是异常的样品可作更详细的检验，并且可对组织中细胞的状态作进一步的检查。发现恶性
10 的或恶性前状态之后，可随之通过适当的处理，进行更深入的诊断程序。

本发明是基于如下惊人的发现：可将一种特异性结合分子用于检测异常的细胞，这种特异性结合分子针对 DNA 复制起始前复合物的特殊蛋白质。针对 Cdc6 的结合分子对本发明特别有用。针对 MCM
15 蛋白，特别是 MCM5 的结合分子也特别有用。在此列举的实验证据表明，针对 Cdc6 的特异性结合分子，以及还有那些针对 MCM2，MCM3，MCM4，MCM5，MCM6 或 MCM7 的特异性结合分子，与抗 PCNA 和 Ki67 的抗体相比较，对于指示组织样品中细胞生长的异常性要有效得多。以前的研究者本应预料到，Cdc6 和 MCM's 将得到
20 与 Ki67 和 PCNA 类似的结果，因为所有的这些蛋白质都可被认为是“增殖标志”。对于经受抗原提取处理（加压蒸煮或高压灭菌处理）的子宫颈样品，下面的实验结果表明，实际上对于所有的这些样品，得到的结果是相似的，但是，对于子宫颈涂片和冷冻样品，存在明显的差异。主要以筛选为目的的这样一些样品，都不是稳定到足以经受
25 加压蒸煮。从筛选的角度特别重要的是，使用抗 - Cdc6 或抗 MCM 结合分子检查子宫颈样品得到了非常有力和明确的结果，显示出对异常细胞的高水平染色，以及对 LSIL 样品充分浓密的染色。这表明，对于检查取自子宫颈上皮表面的涂片样品是有效的，- 确实，在此已实验证实了这点。对于 HSIL 样品也观察到充分浓密的染色。

30 通过实验检查乳腺组织，尿液，血液和血清中的异常性，证实本发明具有通用性。借助于可自动化操作的生物化学方法，通过将相同

的抗体用于检测体液中是否存在发育异常的或赘生性细胞，提供了进一步的证据。在此已证明的实例包括，通过分析尿液检查膀胱癌，以及通过分析血液检查白血病和淋巴瘤。用于这种分析的适合方法是解离增强镧荧光免疫测定（Dissociation Enhanced Lanthanide

5 Fluorescence Immunoassay）“DELFIA”。证据还包括，借助于 DELFIA 对血液的分析检测肉瘤和癌症病例。

10 子宫颈上皮基本上由二种不同类型的细胞组成：扁平上皮细胞和柱状上皮细胞，每种细胞位于组织中不同的解剖区域。扁平上皮位于子宫颈开口（OS）的外表面（外子宫颈），而柱状上皮延伸进入子宫颈内的导管（内子宫颈）。这二种不同类型的上皮细胞在子宫颈开口附近相互接触，形成扁平-柱状结合。扁平-柱状结合是临床上重要的部位，因为大多数恶性肿瘤正是发生在此区域。为了能有效地诊断，子宫颈涂片样品应该包括来自此区域的细胞。为了确保能达到此目的，涂片应该包含柱状上皮细胞和扁平上皮细胞。

15 绝大多数在扁平-柱状结合发生的子宫颈癌来自扁平上皮，此扁平上皮是一个处于不断更新状态的，动态的多层干细胞系统。干细胞区本身位于邻近基质膜的基底细胞层中。干细胞分裂产生副基底细胞，中间型细胞和表面细胞三种衍生成分。这通常是根据它们的特征形态和在扁平上皮中的位置来确定。从位于扁平上皮最深层的基底细胞转变成位于其表面的表层细胞，涉及到逐步分化和丧失增殖能力的过程，直至最后分化成位于子宫颈表面的表面扁平上皮细胞。

20 在异常发育状态下，当细胞发展通过扁平上皮时，出现细胞增殖增加，伴随着细胞分化减少。通常，首先为方便起见，对于子宫颈的筛选检查包括检查取自其上皮表面的涂片，细胞病理学家寻找代表由于异常发育而降低分化的表面异常性。

25 在胎儿后期阶段，青春期以及妊娠过程中，在结合处的柱状上皮通过组织转化过程由扁平上皮取代了。取代柱状细胞的组织转化性扁平细胞，特别易受致癌因子的攻击。不应该将正常的组织转化与扁平上皮内不正常的异常发育相混淆，从筛选的角度，能够区分组织转化细胞和异常发育细胞，是重要的。

30 尽管有充分的和昂贵的国家筛选检查计划，子宫颈癌仍然是英国

妇女第八位最常见的恶性肿瘤，并且是 35 岁以下妇女中最常见的恶性肿瘤（癌症研究战役，子宫颈癌，1994，CRC：伦敦）。在发展中国家，子宫颈癌是 35 - 45 岁的妇女中最常见的恶性肿瘤，也是导致死亡的主要原因，估计每年有 437,000 新增病例（癌症研究战役，癌症 - 世界透视，1995，CRC：伦敦）。

大多数病例表现为扁平细胞癌（SCC），并且与“高危险”型人乳头状病毒如 16, 18 和 31 的感染密切相关（Park 等，癌，1995，76（增刊 10）：p. 1902 - 13）。子宫颈癌适合于通过人群筛选检查来预防，因为它的发展要通过明确认识的非侵害性“上皮内”阶段（Wright 等，子宫颈的癌前损伤，见 Blaustein 女性生殖道病理学，R. J. Kurman 编著，1994，Springer - Verlag：纽约，p. 229 - 78）。可应用 3 层（CIN）或 2 层（Bethesda）系统对扁平上皮内的异常性进行分类。不同的组织学异常一般与感染的 HPV 类型相关连，并且与 DNA 倍数性，纯系性和自然损伤史有关。当以 Bethesda 系统分类时，相应于 CIN1 和子宫颈 HPV 感染（HPVI）的低程度扁平上皮内损伤（LSIL），一般代表有效的 HPV 感染，具有比较低的发展成侵入性疾病的危险性

（Wright and Kurman. 有关子宫颈入侵前损伤形态学分类系统的主要述评：转换此范例的科学基础，见乳头状瘤病毒评述：有关乳头状瘤病毒的研究现状，C. Lacey 编著，1996，Leeds 大学出版：Leeds）。与 CIN1（LSIL）相比较，相应于 CIN2 和 CIN3 的高程度扁平上皮内损伤（HSIL）显示出较高的发展危险性，虽然认为这二者都代表恶性肿瘤的潜在性预兆。尽管有可能对每种上皮内损伤评估其恶性肿瘤的大致危险性，但是，目前还不可能对单个病例确定其发展的大致可能性。

1943 年 Papanicolau 和 Trout 引入了 Pap 涂片试验，以便发现妇女的先兆性子宫颈癌。这是一种细胞学筛选检查试验，已证明很可能是为预防癌症而引入的最成功的公众健康措施。在大规模筛选检查方案中，对妇女每 3 - 5 年至少作一次子宫颈涂片检查，已证明在某些国家这种大规模筛选检查措施，对降低子宫颈癌的死亡率和发病率非常有效。例如在英国的 Columbia 和 Finland，有组织地筛选检查使子宫颈癌的死亡率降低了 70%。如果早发现，子宫颈癌是容易治疗的。

尽管取得了这些成绩，但是，全世界的现实情况令人沮丧。在每年几十万发生子宫颈癌的妇女中，50%以上将死于这种疾病。所有这些妇女的75%是在发展中国家，在这些国家由于财政限制，应用现有的方法作大规模筛选检查的计划是不可行的。即使在许多发达国家，
5 在过去的十年中这种疾病的下降也不显著，而细胞学筛选检查的效果与所期望的相隔甚远。此外，专家观察到，在定期作筛选检查的病人，特别是年轻妇女中，有一个侵害性子宫颈癌病例的基本比例。

为什么细胞学筛选检查有时不能发现子宫颈癌的主要原因是，二次检查之间的间隔时间太长，以及假阴性结果的数量太多(10-30%)
10 (Pap 细胞学筛选检查：获得了最大的好处吗？WHO and EUROGIN 公报，关于子宫颈癌控制的报告，新闻公报 WHO/25, 1997年3月)。

大量的假阴性结果反映了如下事实：分析 Pap 涂片是一种最困难的形态学实践。与细针吸取法，体液细胞学检查或活组织检查相比较，Pap 涂片的结果更难分析，因为置于涂片上的混合细胞群具有复杂性和易变性，并且在宫颈内膜存在广泛发生的炎症和恢复过程。还存在
15 细胞群的周期性改变，妊娠引起的改变，以及发生在绝经后期的改变。因为妇科细胞学是如此困难，使对细胞技师的训练期很长，他们要求是受过教育的学生，要求有高等级的训练和图形识别技能。即使在完成了足够的培训计划之后，细胞技师还需要有几年的实践经验，然后
20 他们才能对 Pap 涂片结果是否正常或不正常，始终如一地作出精确的判断。类似的情况是，虽然可以训练病理学家分析组织学切片，但是，为了具有足够的组织和管理细胞学实验室的技能，并能对异常的涂片作出适当的诊断，他们还需要有细胞学的特殊补充训练。

关于 Pap 筛选检查方案的二个主要问题是，显然不可避免的假阴性率(10-30%)和比较高的检查费用。因此，现在正在考虑用另外的方法进行子宫颈筛选检查。二种最常讨论的建议是，应用 HPV DNA
25 测定和分型作为主要的筛选检查方式或作为对 Pap 涂片检查的补充，以及使用可对常规获得的 Pap 涂片进行自动化筛选检查的仪器，这样可减少对比较高工资细胞技师和细胞病理学家的需要 (Richart, 癌症
30 增刊, 1995, 76(10): 1919-1927; Birdsong, 人类病理学, 1996, 27(5): 468-481)。

前一种方法仍然有问题。问题是对 HPV 应用原位法的灵敏度和阳性预报值。将 PCR 用于 HPV DNA 检测在一般人群中得出了如此高比率的 HPV 感染，以致使人认为将 HPV DNA 测定用于临床筛选检查是不可靠的。

5 第二种方法涉及自动化技术。目前许多公司正在开发和销售自动化筛选检查仪。一般来说，这种仪器是应用一个高分辨率视频扫描器来捕捉图象，然后将它数字化，并以一系列阿拉伯数字进行分析，随后使数据通过一个干涉网络，借此可训练此机器区别正常的和异常的细胞成分。希望随着软件和硬件的进一步发展，可考虑使自动化筛选
10 检查用于主要的筛选检查过程，虽然目前美国 FDA 还没有批准任何仪器用于对 Pap 涂片进行预筛选或者用于单独筛选。对于试图克服常规 Pap 涂片检查中问题的这样一个昂贵和复杂的途径，那些公司准备投资是如此巨大，这说明问题的严重性和确实需要一个解决办法。

以前没有提出过以检测细胞增殖标志作为这种解决办法，本领域的
15 专家怀疑这种增殖标志能提供有用的临床信息（Hall 和 Coates, 组织病理学, 1995, 26: 105 - 112）。据信测定细胞增殖参数将提供关于肿瘤的客观信息，但是尽管进行了许多研究，却很少有直接证据表明应用细胞增殖标志如 PCNA, Ki67 等，对最恰当地采用的传统组织学检测确实是一个改进。甚至很少有研究选择这样一个关键性问题，
20 将增殖标志的相对数值同标准的组织病理学分级和构架进行比较。

将免疫细胞化学或免疫荧光染色与自动化子宫颈筛选检查共同使用的企图，受到正常细胞的非特异染色所限制。例如，已经显示上皮细胞膜抗原（EMA）可染色来自带有 CIN 子宫颈的赘生性细胞，但是有报告表明它也可染色来自正常子宫颈的某些组织转化细胞。因
25 此，虽然目前已可获得用于检测免疫组织学染色的技术，但是市场上还没有这种自动化筛选检查仪器，或者也没更进一步发展应用免疫组织化学技术。

最广泛研究的增殖标志有 Ki67 和 PCNA（增殖细胞核抗原），Ki67 是一种未知功能的蛋白质（Yu 和 Filipe, 组织化学杂志, 1993, 30 25: 843 - 853）。PCNA 参与 DNA 复制延伸，也参与 DNA 的修复机制中。因此，它出现在 DNA 复制或修复的实际合成过程中。

发明人已研究了参与 DNA 复制的较早起始阶段中的一些蛋白质。这些蛋白质是 Cdc6 和 MCM2-7 蛋白家族 (MCM2, MCM3, MCM4, MCM5, MCM6 和 MCM7)。Williams 等 (1997) (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1997, 94: 142-147) 曾报导, 培养中的人 HeLa 细胞在整个细胞增殖周期中都表达 Cdc6, 但是, 当通过血清饥饿使之静止时, WI 38 人二倍体成纤维细胞停止表达 Cdc6。在此发现, 这些观察可扩展至其它细胞系和其它动物种。MCMs 存在于 G1 期细胞核中 (DNA 合成之前), 并且在 DNA 合成的过程中, 从染色质逐渐位移进入可溶性的核质中。在此发现, 在静止期它们也不存在于染色质。在此还证明, MCM5 不存在于子宫颈和乳腺的分化细胞中。

根据这些背景事实, 可预期 MCMs 或 Cdc6 抗血清类似于 PCNA 或 Ki 67 的分布。对于这种预测的进一步证据来自于 Hiraiwa 等的报告 (国际癌症杂志, 1997, 74: 180-184), 他们在几种人组织和三种类型的人肿瘤中发现了对 PCNA 和 MCM7 (hCDC 47) 的类似免疫染色图形。

但是出乎预料的是, 发明人发现, 与 PCNA 和 Ki 67 相比较, MCMs 和 Cdc6 的潜在性诊断价值显著的不同。

发明人已试验将针对人 MCM 蛋白和人 Cdc6 产生的抗血清用于子宫颈细胞学。他们研究了正常人和患病人士子宫颈的切片以及子宫颈涂片。他们将这些结果同用 PCNA 和 Ki 67 获得的结果相比较。用 Cdc6 抗体或 MCM (例如 MCMs) 抗体检测 LSIL (HPVI/CIN 1) 损伤比用抗 PCNA 或抗 Ki 67 抗体更有效。而且, 基本上所有的 LSIL (HPVI/CIN 1) 或 HSIL (CIN 2/3) 损伤细胞都被染色。这与通过其它的增殖标志如 PCNA 染色的情况大不相同。它表明, 针对 DNA 复制起始前复合物蛋白质的, 特别是针对 Cdc6 或 MCM 蛋白质 (例如 MCM5, 但是在此也作为 MCM2, MCM3, MCM4, MCM6 和 MCM7 的例证) 的特异性结合分子, 对早期发现非典型的或赘生性细胞有特殊的诊断价值。对于可经受抗原提取处理 (加热蒸煮或高压灭菌处理) 的子宫颈样品, 对该样品用甲醛固定, 石蜡包埋, 抗-Cdc6 和抗-MCM 抗体给出了同用 PCNA 得到的结果相类似的染色图形, 但是涂片的结果最佳, 新鲜和冷冻样品都很清晰。

因此，概括地说，本发明从不同角度涉及到几种方法和途径，用于检测通常是取自人体内样品的组织，体液或细胞中的一种特殊靶标多肽，或编码一种靶标多肽的 mRNA。

根据它包含在 DNA 复制的起始前复合物中，可将本发明的靶标多肽例如 Cdc6 蛋白和 MCM 蛋白如 MCM5，区别于对本发明无用的其它细胞增殖标志。根据在静止期间和分化过程中是否从染色质转移也可将它们区分。例如，根据它在静止细胞中仍然结合于染色质，可将不能用于本发明靶标的 ORC2 (Gavin 等, 1995, 科学 270, 1667 - 1671)，与蛋白质如 Cdc6 和 MCM5 区分开。在静止细胞中 Orc2 不被下调，虽然 ORC 复合物的其它成分如 Orc1 可能有不同的行为表现。在静止期和分化过程中，Cdc6 被迅速下调。停止在 G0 期仅仅 48 小时的培养细胞不会有任何可测出的 Cdc6 蛋白。在体外较长时间停滞的细胞中，或者在体外的分化细胞中，都不能测出 Cdc6。在体外通过血清饥饿或接触抑制剂停滞的细胞，将丧失染色质结合的 MCMs (在几天之后)，虽然至少在 14 天内这些细胞中的总 MCMs 水平没有明显地降低。在体外经受分化的细胞 (例如用 DMSO 或 TPA 诱导分化的 HL-60 细胞) 下调了 MCM3，但是 Orc2 不下调 (Musahl, 关于 DNA 复制的 Aussois 讨论会, 法国 Aussois, 1997 年 6 月)。来自组织的分化细胞在体外不表达 MCM 蛋白如 MCM2 和 MCM5。六个 MCM 蛋白, MCM2 - MCM7, 形成一个多蛋白复合体, 它断开成为二个亚复合体: 即 MCM3 和 MCM5 二聚体, MCM2 - 4 - 6 - 7 四聚体。在 S 期间 MCM3 和 MCM5 可能比 MCM2 - 4 - 6 - 7 更缓慢地从染色质移出 (Kubota 等, 1997, EMBO 杂志, 16, 3320 - 3331)。在 G1 期 MCMs 处于染色质 - 结合状态, 在 S 期和核中位移, 但在 G2 期不与染色质结合。在酵母菌中 Cdc6 有类似的行为表现, 虽然除了从染色质被移出之外还被降解, 在 G1/S 转变时蛋白质水平显著地下降。还可能包括本发明的另一些 DNA 复制起始前复合体成分。例子包括酵母菌的人相似物成分, 例如 Cdc7 蛋白激酶 (Chapman 和 Johnston, 实验细胞研究, 1989, 180, 419 - 428 (酵母菌), Sao 等, 1997, EMBO 杂志, 16, 4340 - 4351 (人 - 在静止时下调的)), Cdc7 蛋白激酶的调节亚单位 Dbf4 (Jackson 等, 1993, 分子细胞生物学,

13, 2899 - 2908 (酵母菌), Masai 等, 关于真核生物 DNA 复制的冷泉港讨论会, 1997 年 9 月 3 - 7 日(人), Cdc14 蛋白磷酸酶(Hogan 和 Koshland PNAS USA, 1992, 89, 3098 - 3102 (酵母菌)), 与 MCMs 相关, 并且具有与它相似表型的 Cdc45 (Zou 等, 分子细胞生物学, 1997, 17, 553 - 563 (酵母菌), Takisawa 等, 关于真核生物 DNA 复制的冷泉港讨论会, 1997 年 9 月 3 - 7 日(非洲爪蟾)), 与 MCMs 相关, 并且具有与它相似表型的 MCM 10 (Merchant 等, 1997, 分子细胞生物学, 17, 3261 - 3271)。可以说本发明的靶标多肽是多种多样的, 包括任何一种 DNA 复制前复合物成分, 参与限制每个细胞周期中 DNA 复制一次的复制感受态染色质成分, 参与允许染色质单环 DNA 复制并在开始 DNA 复制之前在复制起点装配的复制许可成分。

人 Cdc6 的氨基酸序列被公开于 Williams 等, 1997, PNAS USA 94: 142 - 147, GenBank 检索号 U 77949。

15 人 MCM2 的序列被公开于 Todorov 等, 1994, 细胞科学杂志, 107, 253 - 265, GenBank 检索号 X 67334。

人 MCM3 的序列被公开于 Thommes 等, 1992, 核酸研究, 20, 1069 - 1074, GenBank 检索号 P 25205。

20 人 MCM4 的序列被公开于 Ishimi 等, 1996, 生物化学杂志, 271, 24115 - 24122, GenBank 检索号 X 74794。

人 MCM5 的序列被公开于 Hu 等, 1993, 核酸研究, 21, 5289 - 5293, GenBank 检索号 X 74795。

人 MCM6 的序列被公开于 Holthoff 等, 1996, 基因组学, 37, 131 - 134, GenBank 检索号 X 67334。

25 人 MCM7 的序列被公开于 Hu 等, 1993, 核酸研究, 21, 5289 - 5293。

根据本发明的一个方面, 提供了一种检测来自个体的样品中是否存在异常增殖细胞或细胞生长异常性的方法, 此方法包括使样品与所述的针对靶标多肽的特异性结合成分相接触, 并测定此特异性结合成分对样品的结合。

30 本发明的另一方面提供了一种将组织分为如下二类的方法: (i)

正常或 (ii) 潜在性或确实的癌变前状态, 或者癌变状, 发育异常或
赘生性状态, 此方法包括测定所述的针对靶标多肽的特异性结合成分
对组织样品的结合。可以将这种结合的图形或程度同已知正常的样品
和/或已知异常的样品相比较。

5 发明人已单独地克隆了人 Cdc6, 如在此所述, 但是, 首先发表其
克隆过程的是 Williams 等人, 他们的论文 (PNAS USA 94: 142 - 147,
1997) 提供了其完整的氨基酸序列。如在此实验所证明的, 抗 - Cdc6
结合分子对于标记多种组织中的异常性非常有效, 特别是子宫颈样
品, 优选地是涂片。这与对正常的子宫颈组织涂片样品没有结合形成
10 对照。

人 MCM5 的氨基酸序列被公开于 Hu 等, 1993, 核酸研究, 21,
5289 - 5293, GenBank 检索号 X 74795。在此包括的实验证据显示,
针对它的结合分子同针对 Cdc6 的结合分子一样, 对于标记多种组织
中的异常性非常有效, 特别是子宫颈样品, 优选地是涂片。同对 Cdc6
15 相比较, 获得高亲和性抗 - MCM5 抗体似乎更容易些, 这可能表明
MCM5 具有较高的抗原性。

在此包括的另一方面的实验证据显示, 针对 MCM2, MCM3,
MCM4, MCM6 或 MCM7 的结合分子, 对于标记组织样品如子宫颈
涂片中的异常性也有效。已发现同抗 - MCM2 和抗 - MCM7 抗体相比
20 较, 抗 - MCM5 抗体给出较强的染色图形, 整体染色较强, 染色的细
胞数目也较多。还发现抗 - Cdc6 抗体给出类似于抗 - MCM5 的染色
图形。

这样, (例如) 抗 - Cdc6 或抗 MCM 特异性结合成分对样品的结
合, 可提供对组织的检测区分, 从中得出样品异常, 潜在性或确实的
25 癌变前状态, 或者癌变状态, 发育异常或赘生性状态的检测。根据当
前的惯例, 当应用 Pap 试验得到阳性结果时, 可对试验阳性的个体作
进一步检查, 例如通过该组织检查试验和/或重复的筛选检查。为了使
潜在的癌变前状态不致变成真正的癌变状态, 这是非常通行的作法。
一般采取每月一次的六次筛选检查, 以便监测异常生长的发展或消
30 退, 如果需要可即时采取适当的治疗措施。

如果基于本发明对组织样品的检测异常性, 组织被检测分类为潜

在性或确实的癌变前状态或癌变状态，则需要作适当的进一步诊断和/或临床跟踪。

值得注意的是，本发明并不局限于检测必然成为癌变前状态或癌变状态的细胞生长异常性。还可以检测其它一些细胞增殖性疾病，如后面的实验例证证明了这点，包括对牛皮癣（见后面实施例 24）以及炎症性肠道疾病如溃疡性结肠炎和 Crohn' 氏病（实施例 33 和 34）的检测。炎症性肠道疾病除了其本身有理由是细胞增殖性疾病外，还可能是癌症状态的前兆，虽然不是对于全部病人，这样，借助于本发明对它们的检测，可用于为密切跟踪提供有价值的结果。对于炎症性肠道疾病，由于存在结肠和肠道的脱落细胞，有可能对粪便样品和由此样品制备的细胞进行检测分析。后面实施例 32 描述了对粪便涂片的染色，是通过从粪便回收的细胞制备的涂片。

本发明可被用于预筛选样品，然后作进一步分析检查。还可将本发明用于筛选或分析已用现有的技术如 Pap 涂片检查法或 ThinPrep 2000 检查法检测过的样品。后面的实验还表明，应用适当的抗体，Pap 染色分析和本发明的检测分析可在相同的样品制备上进行。因此，例如子宫颈涂片既可用常规的 Pap 涂片试验检查，又可用本发明的试验检查。

本发明的另一方面提供一种标记组织样品内异常细胞的方法。此方法包括使样品与针对靶标多肽如所述 Cdc6, MCM5 或其它 MCM 的特异性结合成分相接触，在此条件下，其中的特异性结合成分与异常增殖的细胞相结合，而不结合于正常细胞。为了确定样品内是否存在异常增殖的细胞，可检测特异性结合成分是否与样品结合。

在另一方面，本发明提供了针对所述靶标多肽的特异性结合成分确定，检查或诊断在组织或其样品中是否存在异常的细胞增殖，细胞生长异常性，发育异常，瘤形成或者是否处于潜在性或真实的癌变前状态或癌变状态的应用。

可以以试剂盒的形式提供特异性结合分子，试剂盒内还可以包括根据本发明的使用说明书。作为本发明的另一方面是提供这样一种试剂盒。其中还可以包括一种或几种其它试剂如标记分子等（见后面）。试剂可包装在容器如密封的小药瓶内，防止暴露于外环境。取决于所

需要的组织，试剂盒内还可能包括一种或几种用于采集试验样品本身的工具，例如，用于从口腔获取细胞的棉拭子，用于采血的注射器，用于制备子宫颈涂片的刮片，以及活组织检查枪等（这些物品通常都要消毒灭菌）。试剂盒内还包括如下成分中的任何一种，其任何组合形式，或者其全部成分：为了减少非特异性染色的封闭剂，用于贮存中保存结合分子活性的贮存缓冲液，用于抗体染色过程中的染色缓冲液和/或漂洗缓冲液，以及阳性对照和阴性对照等。阳性和阴性对照可被用于确认试剂盒中根据本发明所采用的试剂的活性和正确使用。对照可以是已知对靶标如 Cdc6 或 MCM5 的存在显示阳性或阴性的样品，例如组织切片和固定在盖玻片上的细胞等。对照的设计和使用是标准的，是本领域正常能力的普通技术人员熟知的。

可使用任何简便的方法和技术从体内采集样品。对于子宫颈筛选检查，可以采用标准的涂片样品。另一方面，还可使用 ThinPrep 2000 技术（Cytec Corp, Boxborough, Mass, USA）。美国 FDA 已批准此项技术可作为常规的 Pap 涂片制备法的替代技术。将样品采集至液体培养基内，而不是在载玻片上作细胞涂片。然后借助于自动化处理器（ThinPrep 2000 仪）从液体中收集细胞，并将它们在载玻片上沉积形成一个薄层，用于分析。可使用刮片或棉拭子，例如从子宫颈或口腔采集内皮细胞。血液和其它液体样品可用注射器或针头采集。其它的组织样品可通过活组织检查或组织切片采集。

在优选的实施方案中，样品不经抗原提取处理或加压蒸煮/高压灭菌处理。抗原提取处理在本领域长时间以来已标准化了，是普通的技术人员所熟知的。Hiraiwa 等参考 Shin 等（1991），Lab. Invest. 64, 693-702，提出了一种示范性方法。样品可以是新鲜的或冷冻的，但通常不用甲醛固定或石蜡包埋。如上所述，特别优选的实施方案中样品是子宫颈涂片。子宫颈涂片不足以经受加压蒸煮。而且，抗原提取处理对于筛选检查一般不是很有利，在此高筛选量是所希望的。

本发明的实验性例证方面证明对如下检查的适用性：包括检查涂片的子宫颈检查，乳腺，尿道恶性肿瘤（通过对活组织样品和对尿中细胞涂片的检查），结肠，肺，膀胱，皮肤，喉，食道，支气管，淋巴结，以及血液癌检查，还包括检查血液和血清，用于证明肉瘤和癌

症的转移。本发明另外还可用于检查子宫颈腺上皮细胞恶性变前的异常性（腺上皮内瘤形成，GIN），或者其它组织内恶性变前的异常性。特别适合于对其它一些临床标本的细胞学或生物化学检查中，这种检查要检测出赘生性细胞，或者将它们与显示出活性改变的细胞区分开可能是非常困难的。这些标本包括痰，细支气管-肺泡洗出液标本，尿液，以及来自消化道（包括食道，胃和胰腺，胆管和胰管）的冲刷物标本。本发明还可用于对组织的组织学或生物学检查中，在此对增殖的检查使之能够较准确地预测临床结果，和/或更合理地选择治疗方法。这些标本可能包括腺细胞（例如肺，乳腺，结肠，前列腺，胃），扁平细胞（例如肺，皮肤，食道）或其它类型上皮细胞（例如，膀胱，输尿管，肾脏，卵巢）的恶性肿瘤。

在下述对一系列乳腺癌检测的实验中观测到，使用抗-Cdc6抗体，以及包括抗-MCM2，抗-MCM3，抗-MCM4，抗-MCM5，抗-MCM6和抗-MCM7在内的多种抗-MCM抗体，为诊断乳腺癌的免疫细胞学和生物化学方法提供了高程度的特异性。这种方法可用于乳腺活组织检查标本或细针吸取法（FNA）标本，或者取自乳腺导管的液体标本，随后用于筛选检查程序。

可应用任何一种现有技术制备将经受与本发明各种结合成分接触的检测样品，使特异性结合分子能够结合于靶标多肽如所述的Cdc6，MCM5或其它MCM，并能根据本发明不同实施方案测定核酸水平和酶活性等。在本领域多种技术都是规范的，例如（对于结合靶标多肽的抗体分子）Pap试验中用于固定细胞的技术。

可借助于任何适当的方法测定结合成分如抗体对正常和待测样品的反应性。一种可能性是以独特的指示分子进行标记。指示分子可直接或间接地产生可察觉的，而优选地是可测定的信号。指示分子的连接可能是直接或间接地连接，例如通过肽键的共价结合，或者非共价结合。经由肽键的连接可能是由于编码结合分子（例如抗体）和指示分子的融合基因重组表达的结果。

一种优选的方式是，借助于各种结合成分与具有单独的特异性吸收或发散特征的荧光染料，磷或激光染料的共价结合。适合的荧光染料包括荧光素，若丹明，藻红素和德克萨斯红。适合的生色染料包括

二氨基联苯胺。

其它一些指示标记包括，可变色的大分子胶体颗粒或颗粒材料如胶乳小珠，可直接或间接引起可察觉信号的磁性或顺磁性的，以及生物学或化学的活性剂，可肉眼观察，电子检测或记录这些信号。这种分子也可以是催化某些反应的酶，例如，生成或改变颜色，或者引起电子特性改变的反应。它们可能是分子激发性反应，以致能级间的电子跃迁将引起特征性的吸收光谱或发散光谱。它们还可能包括用于与生物传感器连接的化学物质。生物素/亲合素或生物素/链亲合素，以及碱性磷酸酶检测系统都可以利用。另一些例子是辣根过氧化物酶和化学发光。

检测结合的方式不是本发明的特征，本领域的技术人员根据它们的喜好和常识能够选择一种适当的方式。

在下述的一些实验中使用了辣根过氧化物酶。另一些实验是用碱性磷酸酶进行的，获得了相似的结果（例如对于子宫颈涂片）。与辣根过氧化物酶相比，碱性磷酸酶可能是较灵敏的检测系统，但是，所形成的颜色与 Pap 染色不太适合。

下面是本发明实施方案中已采用的，用于子宫颈涂片抗体染色的一种方案。

1. 在 50:50 的丙酮：甲醇中固定新鲜的涂片 5 分钟（注意，当涂片已用“Cytofix”预固定时的另一种起始步骤是，在甲基化酒精中浸泡 10 分钟以便除去 Cytofix，Cytofix 预固定是一种在英国规范地用于处理涂片样品的醇和石蜡处理法，使携带样品时能安全地运送到筛选中心。还应该用任何其它的防护层盖住涂片，为了使样品暴露于抗体染色，可采用任何适当的处理法）。

2. 在 Tris 缓冲盐水（TBS）中浸洗 5 分钟。
3. 为了渗透，在以 TBS 配制的 4 mM 脱氧胆酸钠中浸洗 15 分钟。
4. 在 TBS 加 0.3% Triton X100 的溶液中浸洗 5 分钟。
5. 重复步骤 4。
6. 在 TBS 加 0.025% Triton X100 的溶液中浸洗 5 分钟。
7. 沥去过多的液体，而不使组织干脱。
8. 将涂片转移至湿盒内，对每张涂片加上以 TBS 配制的 10% 羊

- 血清试剂 200 μ l, 作用至少 2 小时 (或过夜)。
9. 沥去过多的液体而不使组织干脱。
 10. 在每张涂片上加上以含有 0.1% Triton 和 1% BSA 的 TBS 稀释的第一抗体 200 μ l, 在有轨摇床上 4 $^{\circ}$ C 振摇过夜。
 - 5 11. 将涂片转移至框架中, 在 TBS 加 0.3% Triton X100 的溶液中浸洗 5 分钟。
 12. 在 TBS 加 0.025% Triton X100 的溶液中浸洗 5 分钟。
 13. 重复步骤 12.
 14. 沥去过多的液体而不使组织干脱。
 - 10 15. 将涂片转移至湿盒内, 对每张涂片加上以含有 1% BSA 的 TBS 1:500 稀释的生物素化羊抗-兔第二抗体 (Dako) 200 μ l, 作用 1 小时。
 16. 在涂片与第二抗体作用时, 配制 SABC 溶液。
 17. 将涂片转移至框架内, 在 TBS 中浸洗 5 分钟。
 - 15 18. 将涂片置于含有 0.6% 过氧化氢的内源性过氧化物酶阻断剂中作用 10 分钟。
 19. 在 TBS 中浸洗 5 分钟。
 20. 重复步骤 19 二次。
 21. 将涂片转移至湿盒内, 对每张涂片加上 SABC 溶液 200 μ l, 作用 30 分钟。
 22. 将涂片转移至框架内, 在 TBS 中浸洗 5 分钟。
 23. 重复步骤 22.
 24. 在 DAB 溶液中显色 10 分钟。
 25. 在流动的自来水中浸洗 5 分钟。
 - 25 26. 将涂片置于 Harris' 苏木精溶液中染色 6 秒钟。
 27. 在流动的自来水中浸洗 1 分钟。
 28. 在 0.5% 盐酸中分化 1-2 秒钟。
 29. 在流动的自来水中浸洗 5 分钟。
 30. 在 50% 甲醇中漂洗 2 分钟。
 - 30 31. 在 70% 甲醇中漂洗 2 分钟。
 32. 在 90% 甲醇中漂洗 2 分钟。

33. 在 100% 甲醇中漂洗 2 分钟。
34. 置于橙黄 G 工作液中作用 2 分钟。
35. 在 100% 甲醇中漂洗 7 秒钟, 并缓慢搅动。
36. 重复步骤 35。
- 5 37. 置于 EA 50 液中作用 2 分钟。
38. 在 100% 甲醇中漂洗 7 秒钟, 并缓慢搅动。
39. 重复步骤 38。
40. 将涂片置于二甲苯中使透明 5 分钟。
41. 重复步骤 40 二次。
- 10 42. 用 DEPEX 封固剂对涂片加盖玻片。

可按类似的方式制备用于免疫荧光检测的涂片(已制备)。在加入第二抗体之后, 将它们置于链亲合素 FITC-结合标记的抗体中温育 1 小时, 并且用碘化丙锭/RNA 酶 A (均购自 Sigma, 以 50 ng/ml 的浓度) 对 DNA 作负染, 然后漂洗并在甘油/PBS/苯二胺中封固。

用于本发明的优选的结合分子包括抗体, 该靶标的天然配体, 对准该标本上一个或几个抗原表位的小分子, 以及 T-细胞受体结合功能区。

应用本领域规范性技术, 可获得对所需靶标如 Cdc6, MCM5 或其它的 MCM 特异性的抗体。产生抗体的方法包括用此蛋白质或其片段, 或者用表达此蛋白质或片段的细胞或病毒免疫哺乳动物(例如小鼠, 大鼠, 兔, 马, 山羊, 绵羊, 猴)或鸟类如鸡。用编码该靶标多肽的 DNA 进行免疫也是可能的。可应用本领域熟知的多种技术中的任何一种从免疫动物获得抗体, 并进行筛选, 优选地是通过抗体对所需抗原的结合。例如可应用蛋白质印迹技术或免疫沉淀技术(Armitage 等, 1992, 自然 357: 80-82)。

产生单克隆抗体的方法也是本领域完善确立的方法。可以使单克隆抗体经受重组 DNA 技术处理, 以便产生保持其原有抗体特异性的其它抗体或嵌合分子。这种技术包括将一个抗体的编码免疫球蛋白可变区的 DNA, 或互补性决定区(CDRs) 导入一个不同的免疫球蛋白的恒定区, 或恒定区加框架区内。参见例如, EP 184187A, GB 2188638A

或 EP - A - 0239400。产生单克隆抗体的杂交瘤可能经受基因突变或其它改变，这可能改变或不改变所产生抗体的结合特异性。

5 作为用肽免疫动物的另一种方式或补充，还可以从重组产生的表达免疫球蛋白可变区的文库，获得对靶标特异性的抗体，例如应用在其表面能展现功能性免疫球蛋白结合功能区的 λ 噬菌体或丝状噬菌体，参见例如 WO 92/01047。此文库可能是天然的，是由从未用靶标免疫过的细菌获得的序列构建的，或者可能是一种用从已暴露于所需抗原（或其片段）的细菌获得的序列构建的文库。

10 可用许多方式对抗体进行修饰。当然，除非文中另有说明，术语“抗体”应该被认为是包括任何一种具有抗体抗原结合功能区的特异性结合物质。因此，它包括抗体片段，衍生物和功能等价物，包括含有免疫球蛋白结合功能区的任何一种多肽，不论是天然的或者是合成的。因此还包括与另一多肽融合的，含有免疫球蛋白结合功能区的嵌合分子或等价物。在 EP - A - 0120694 和 EP - A - 0125023 中描述了
15 关于嵌合抗体的克隆和表达。

已经证明，结合抗原的功能可以借助于整个抗体的某些片段来实现。结合片段的实例包括 (i) 由 VL, VH, CL 和 CH1 功能区组成的 Fab 片段；(ii) 由 VH 和 CH1 功能区组成的 Fd 片段；(iii) 由单一抗体的 VL 和 VH 功能区组成的 Fv 片段；(iv) 由 VH 功能区组成的 dAb 片段 (Ward, E. S 等, 自然 341, 544 - 546, (1989))；
20 (v) 分离出的 CDR 区；(vi) F(ab')₂ 片段，含有二个连接的 Fab 片段的二价片段；(vii) 单链的 Fv 分子 (scFv)，其中的 VH 功能区
和 VL 功能区由肽键连接，使此二个功能区能相连形成抗原结合位点 (Bird 等, 科学, 242, 423 - 426, 1988; Huston 等, PNAS USA, 85, 5879 - 5883, 1988)；(viii) 双特异性的单链 Fv 二聚体 (PCT/
25 US 92/09965)；以及 (ix) “双体”，通过基因融合构建的多价或多特异性片段 (WO 94/13804; P. Hollige 等, 美国国家科学院学报, 90, 6444 - 6448, 1993)。

多肽，包括抗体和抗体片段的重组表达是本领域熟知的。

30 已熟知在多种不同宿主细胞中用于多肽的克隆和表达的系统。适合的宿主细胞包括细菌，哺乳动物细胞，酵母和杆状病毒系统。本领域

域可用来表达异源性多肽的哺乳动物细胞系包括中华仓鼠卵巢细胞，Hela 细胞，幼仓鼠肾细胞和其它许多细胞。常用的优选细菌宿主是大肠杆菌 (E. coli)。用于杆状病毒表达的优选宿主是昆虫细胞如 SF9 细胞系。

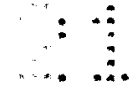
5 可以选择或构建含有适当调节序列的适合载体，这些调节序列包括启动子序列，终止子片段，聚腺苷酸化序列，增强子序列，标记基因，以及适当地包括其它一些序列。进一步的详细内容参见例如，分子克隆：实验室手册：第二版，Sambrook 等，1989，冷泉港实验室出版。转化程序取决于所采用的宿主，但也是熟知的。

10 通过从编码核酸表达产生针对本发明中有用的靶标如 Cdc6 的抗体或其它特异性结合分子之后，可将它们回收，并可能将它们分离出，如果必要，还可结合于适当的标记物或指示剂，然后根据本发明公开的方法提供来用于检测组织样品如子宫颈涂片中是否存在细胞生长异常性。

15 与正常组织相比较，肿瘤中 Cdc6 和 MCM 的表达水平要高得多，并且这些抗原可释放进入血液（例如由于肿瘤细胞坏死）或其它体液，如尿或粪便中。采用本领域技术人员可利用的任何一种技术如 DELFIA, ELISA, RIA, 蛋白质印迹试验，可将特异性结合分子用于检测体液如血清中的这种靶标。可能监测肿瘤的发展和衰退，例如对治疗的反应或复发。因此，可根据本发明检查血液和其它体液样品，
20 例如尿，前列腺液，乳头液，浆液和腹水渗出液，脑脊液，还有粪便。例如，应用如 Williams 等在临床化学学报，1986，155，329-344 中所描述的 DELFIA, ELISA, RIA, 可检查血液样品中是否存在靶标多肽如 MCM5 和 Cdc6。

25 检查体内对靶标的结合可用于确定体内异常细胞的定位。可以将针对本发明靶标的标记的结合分子对病人给药，并测定在体内的结合。

当将放射性核苷酸如碘 - 125，铟 - 111，铈 - 201，或镓 - 99m 附着于抗体时，如果此抗体优先定位于肿瘤而不是正常组织，则可借
30 助于 γ 照相机或闪烁法检测和定量测定肿瘤组织中存在的放射标记。所获得肿瘤图象的质量与信号：干扰比直接相关。在 Pck 等 (1992)，



核医学生物学, 19, 699 - 677 中描述了应用钨 - 99m 的放射性标记法。Goldenberg D. M, 国际生物学标记杂志, 1992, 7, 183 - 188 提供了关于用抗 - CEA 抗体进行瘤成像的述评。任何对人或动物体内实施的方法, 都应该是一种确实诊断疾病的方法, 当然, 为应用这样的任
5 何一种方法, 本发明将它扩展到所公开的针对靶标多肽的特异性结合成分。

已报导 Cdc6 蛋白和 MCM 蛋白具有 ATP 酶活性(Zwerschke 等, 1994, 生物化学杂志, 269, 23351 - 23356; Ishimi 等, 关于真核生物 DNA 复制的冷泉港研讨会, 1997 年 9 月 3 - 7 日)。这些蛋白质还可
10 能具有其它的酶活性, 例如, Ishimi 等(同上)报导的蜗牛酶活性。通过测定样品中的酶活性, 可以检测本发明靶标蛋白质的水平。例如, 对于酶活性已发展了特异性生色底物, 如辣根过氧化物酶(二氨基联苯胺), 和 β -半乳糖苷酶(X - GAL)。

可以在核酸水平检测 Cdc6, MCM5 或其它靶标蛋白的表达, 例
15 如通过测定 mRNA 的水平。Williams 等(关于真核生物 DNA 复制的冷泉港研讨会, 1997 年, 9 月 3 - 7 日)已报导了在小鼠消化道肠隐窝基底 Cdc6 mRNA 的表达。检测 RNA 的方法对本领域是熟知的, 包括 RNA 印迹试验, 斑点印迹试验, 原位杂交法, 定量 RT - PCR 法。可在用于选择性杂交和/或经受特异性核酸扩增反应如聚合酶链反应
20 (PCR) 的条件下, 探测从一种或几种细胞分离和/或纯化的核酸, 或者是从细胞分离和/或纯化的核酸得到的核酸文库(例如, 从细胞分离出的 mRNA 得到的 cDNA 文库)。应用本领域技术人员可自由选择的多种技术中的任何一种, 可测定探针与靶标核酸的结合。例如, 探针可能是放射性, 荧光或酶标记的。其它不采用探针标记的方法包括,
25 限制性片段长度多态性测定, 应用 PCR 的扩增, RNA 酶切割, 以及等位基因特异性寡核苷酸探测。

为了实用, 或者至少为商业的目的考虑到费用和时间, 在蛋白质水平上检测靶标蛋白的表达, 通常比在核酸水平上检测更为优选。

下面将参照实验例证对本发明的各方面进行说明。本发明的另一
30 些方面和实施方案对本领域的技术人员将是显而易见的。

实施例 1 - 抗体的制备

应用如下方案制备了针对 Cdc6 的抗体。

基于它们与人 Orc1 和酵母 Cdc6/Cdc18 的微弱的序列同源性，鉴定了编码人 Cdc6 - 样蛋白质片段 (GenBank 检索号: T 90351, H 59204, N 69246, AA 045217, AA 099980) 的表达序列标志物。从 IMAGE 协作组织 (美国研究基因公司) 获得了相应的文库克隆，并用 ABI PRISM 377 测序仪 (Applied Biosystems) 对双链测序。所有 5 个克隆的共有序列都含有一个 536 个氨基酸的开放读框。在同随后公布的人 Cdc6 序列对比时，揭示了在蛋白质水平具有 99.7% 的同源性。10 将二个单独的相应于氨基酸 145 - 360 和 364 - 547 的人 Cdc6 片段，作为 XbaI - BamHI 片段克隆进入了 pET 23a 表达载体 (Novagen)，并在 E. coli CL41 株中表达。借助于 Ni²⁺ 琼脂糖亲和层析 (Qiagen) 纯化重组蛋白质片段，并用于免疫动物。按以前所述的方法产生抗体并进行亲和性纯化 (Romanowski 等, 美国国家科学院学报, 1996, 15 93: 10189 - 10194)。三个抗体都能识别整个 HeLa 细胞提取物和核提取物中的 62 kD 优势带。

按如下制备了针对 MCM5 的抗体:

根据已公布的人 MCM5 序列 (Hu 等, 1993, 核酸研究, 21, 5289 - 5293) 设计了 PCR 引物。从反转录的 HeLa cDNA 扩增了相当于氨基酸 367 - 582 的 MCM5 编码序列的一个片段，并作为 SphI - BglII 片段被克隆进入 pQE 70 表达载体 (Qiagen)。在 BL 21 E. coli 细胞中表达此蛋白质，并应用 Ni²⁺ 琼脂糖亲和层析 (Qiagen) 纯化。如 Romanowski 等, 美国国家科学院学报, 1996, 93: 10189 - 10194 中所述产生了抗体。20

25

实施例 2 - Cdc6 和 MCM5 与细胞增殖的关系

借助于蛋白质印迹试验以前就发现，永生化人 HeLa 细胞系在其整个细胞周期中都表达 Cdc6 和 MCM5 (Williams 等, 美国国家科学院学报, 1997, 94: 142 - 147; Schulte 等, 欧洲生物化学杂志, 1996, 30 235, 144 - 151)。最近 Williams 报导了在静止的 Wi 38 人成纤维细胞中对 Cdc6 的下调。

发明人还借助于蛋白质印迹试验显示，当通过接触抑制使小鼠 3T3 成纤维细胞静止时，对 Cdc6 的表达将被下调（图 1A）。

5 通过生长至汇合使 NIH 3T3 细胞系停滞。使培养物保持静止状态 7 天。通过用胰蛋白酶分散细胞并重新接种，使细胞脱离 G0 停滞状态。每隔 3 小时制备一次可溶性（上清液）提取物和核蛋白（沉淀）提取物，并用抗 - 人 MCM5, Orc2 和 Cdc6 的抗体对二种提取物作免疫印迹试验。

10 在静止细胞（G0）中 Orc2（见 Gavin 等，克隆 - 科学（1995）270, 1667 - 1671）仍然结合于染色质，当细胞进入细胞周期后并没有明显地增加。可是，在静止细胞的染色质结合组分（沉淀）中不能检测出 MCM5，虽然在可溶性组分中含有显著含量的 MCM5。与 MCM5 不同，静止细胞中完全不存在 Cdc6，但是当细胞重新进入细胞周期时，对此蛋白质的表达被迅速地诱发。用人 EJ 13 细胞（来自膀胱癌的细胞）也得到了类似的结果。

15 这些结果表明，在静止细胞中不存在 Cdc6 是普遍现象。

借助于免疫荧光法并应用抗 - Cdc6 和抗 - MCM5 抗体，将这些研究扩展到完整的细胞。

20 当通过接触抑制使新生的人成纤维细胞（NHF）静止时，也发现对 Cdc6 和 MCM5 的表达被下调了。使 NHF 生长至汇合状态，保持静止 3 天。通过用胰蛋白酶分散细胞并重新接种，使细胞脱离 G0 停滞状态。然后在脱离 G0 后的多个时间点收获完整的细胞，直至进入 S - 期。以碘化丙锭染色，用于显示 DNA，并将此结果同用抗 Cdc6 和抗 MCM5 抗体对样品的染色结果相比较。

25 静止（G0）细胞显示没有 Cdc6 免疫反应性，而用抗 - MCM5 抗体时有非常微弱的信号。但是，在进入细胞周期和 S - 期的期间，观测到对 Cdc6 和 MCM5 的强核酸免疫反应性。

这些研究可能表明，类似于 PCNA 或 Ki 67，抗 - Cdc6 抗体可能对增殖中的细胞提供一种标志。但已证明 PCNA 或 Ki 67 都不能对子宫颈细胞提供满意的标志。

30

实施例 3 - 用抗 - Cdc6 和抗 - MCM5 结合分子检测异常的（例如肿

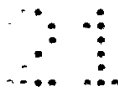
瘤) 细胞比用 PCNA 或 Ki 67 抗体有效得多

实施例 2 中所述的结果表明, Cdc6 的表达可能类似于 PCNA 或 Ki67 的表达, 但后者都不适合于子宫颈细胞学检查。发明人在正常的或患病的子宫颈切片上, 将针对这些蛋白质的抗体进行了比较。

5 对于常规的增殖标志 PCNA 和 Ki 67, 子宫颈 SILs 的免疫染色, 当与对于 Cdc6 或 MCM5 的染色相比较时, 显示出不同式样的免疫反应性。对于正常子宫颈, 针对所有四个抗原的抗体显示出局限于基底层和副基底层的上皮细胞阳性免疫染色。没有观察到对组织转化细胞, 基质细胞或炎症细胞的免疫染色。对于低级和高级 SILs (LSIL
10 和 HSIL), 抗 - Cdc6 抗体和抗 - MCM5 抗体都显示出有大部分 (> 95 %) 异常细胞的阳性免疫染色。可是, 对于 PCNA 和 Ki 67 的免疫染色, 在二个等级的 SIL 中都只有少量 (< 30 %) 的异常细胞群。作为 LSIL 特征性的, 并反映 HPV 细胞病变效应的 Koilocytes, 对于 Cdc6 和 MCM5 都显示出阳性免疫染色, 然而, 对于 PCNA 或 Ki 67 只有少
15 量 (20 %) 细胞显示出阳性染色。

在子宫颈筛选检查中, 其中的组织样品通过从上皮细胞表面涂片的方式最容易获得, 抗 - Cdc6 或抗 - MCM5 结合分子比抗 - Cdc6 和抗 - Ki 67 分子对异常细胞高得多的染色水平提供了明显的优势。

切出 5 μm 厚的切片置于载玻片上, 并在二甲苯中脱蜡。通过在
20 以 100% 甲醇配制的 0.6% 过氧化氢中室温下温育 3-5 分钟, 淬灭内源性过氧化物酶活性。在磷酸缓冲盐水中漂洗切片 2 次, 每次 5 分钟, 然后对每个切片用在磷酸缓冲盐水 (PBS) 中配制的 10% 胎牛血清 (FCS) 大约 100 μl 封闭。将玻片沥干, 擦去多余的血清。将第一抗体在含有 25% FCS 的 PBS 中按 1:20 稀释, 取 25-50 μl 加到每个切
25 片上。在湿盒内室温温育 45 分钟。然后在 PBS 内漂洗玻片 3 次, 每次 5 分钟, 随后用 PBS 配制的 20% 抗 - Ki 67 或抗 - PCNA 兔血清封闭 15 分, 用 PBS 配制的 20% 抗 - Cdc6 或抗 - MCM5 驴血清封闭 15 分钟。沥去封闭抗体并擦干玻片之后, 加入在含有 10% 正常人血清的 PBS 中 1:200 稀释的生物素化兔抗 - 小鼠第二抗体 (对于抗 - Ki 67
30 或抗 - PCNA), 或者生物素化的驴抗 - 兔第二抗体 (对于抗 - Cdc6 或抗 - MCM5), 室温下作用 30 分钟。在 PBS 中漂洗 3 次, 每次 5



分钟，然后加入在 PBS 中 1 : 500 稀释的链亲合素 - 生物素 - 辣根过氧化物酶复合物，在室温下作用 30 分钟。在 PBS 中漂洗 3 次，每次 5 分钟，然后加入以含有 0.005 % 过氧化氢的 100 mM Tris. Cl (pH 7.6) 配制的 1 % 二氨基联苯胺底物，室温下温育 5 分钟。通过在自来水中漂洗使反应停止，用 Gill 苏木精对切片轻微染色，用梯度浓度乙醇脱水，并在二甲苯中浸洗 2 次，每次 6 分钟。用 DPX 封固基质对切片加盖玻片。

将正常子宫颈的一系列切片，用各自的抗体对 PCNA, Ki 67, MCM5 和 Cdc6 染色。所有的这些抗体显示出类似的免疫反应图形，阳性细胞仅局限于基底层和副基底层。

将低级 SIL (CINI) 子宫颈的一系列切片，分别用抗体对 PCNA, Ki 67, MCM5 和 Cdc6 染色。在扁平上皮的较底部的第三层有显著的发育异常，是与 HPV 有关的病毒性改变 (Koilocytosis)，这种改变正向表面扩展。PCNA 和 Ki 67 显示出局限于上皮较底层 1/3 的散乱病灶的免疫反应性，其中只有少部分异常细胞被阳性染色。相比之下，Cdc6 和 MCM5 显示出全厚度的免疫反应性，包括在上皮较浅表层的 Koilocytes 在内的所有异常细胞都被阳性染色。

分别用 PCNA, Ki 67, MCM5 和 Cdc6 抗体对高级 SIL 的一系列切片染色。发育异常存在于整个上皮层。PCNA 和 Ki 67 显示出类似的免疫反应性图形，具有充分的染色厚度，但其中只有少部分异常细胞是阳性染色 (达到大约 30 %)。Cdc6 和 MCM5 也显示出全厚度的上皮染色。但是，与 PCNA 和 Ki 67 明显不同的是，Cdc6 和 MCM5 显示出对所有异常细胞的阳性染色。

这些结果表明，应用抗 Cdc6 或抗 - MCM5 特异性结合分子，通过测定其与涂片样品的结合，对于检查子宫颈的状态特别有用。涂片只是从子宫颈的上表层细胞取样，因此具有高水平的染色是重要的。用抗 - Cdc6 和抗 - MCM5 获得的这样高水平的染色，对于早期异常性 (低级的 SIL, CINI) 非常有意义，用抗 - PCNA 或抗 - Ki 67 都不能显示这种早期异常。而且，用抗 - Cdc6 和抗 - MCM5 抗体对 LSIL 样品获得的全厚度染色，用抗 - PCNA 或抗 - Ki 67 抗体都不能获得，使前者对于检查早期潜在性恶性变前状态涂片样品的特殊用途更令人

注目。

实施例 4 - Cdc6 和 MCM5 抗体可检测子宫颈涂片中的异常细胞

实施例 3 证明抗 - Cdc6 和抗 - MCM5 结合分子对检测子宫颈切片中潜在性恶变前损伤具有价值。进一步的实验结果表明，它们对于检测子宫颈涂片样品制备中的异常细胞也同样有效。

在 4% 甲醛中（从在磷酸缓冲盐水中的多聚甲醛新鲜配制）固定子宫颈涂片 10 分钟。然后用抗 - Cdc6 抗体（1:200）或抗 - MCM5 抗体（1:200）对已固定的材料染色，随之用异硫氰酸荧光素（Amersham, 1:100）结合标记的驴抗 - 兔多克隆抗体染色。用碘化丙锭标记总 DNA。应用激光扫描共焦显微镜（Bio - Rad MRC 1024）观察图像。在这些图像中，总 DNA 显红色，Cdc6 或 MCM5 的免疫染色是绿色，而免疫反应性核显出黄色。

正常子宫颈涂片的例子显示出特征性平行排列的宫颈内膜细胞带，以及浅表的和组织转化的扁平细胞的混合细胞群。没有证据表明存在与任何所试验抗体的特异性抗 - Cdc6 或抗 - MCM5 的免疫反应性。

包含异常核质细胞（异常扁平细胞）的不正常涂片，与三种不同的抗 - Cdc6 抗体和抗 - MCM5 抗体显示出阳性染色。Koilocytes 也与抗 - Cdc6 和抗 - MCM5 抗体显示出强免疫反应性。邻近的正常浅表扁平细胞/组织转化细胞未显示出 Cdc6 或 MCM5 免疫反应性。

用不同的抗 - Cdc6 抗体都获得了对 LSIL 细胞，包括 Koilocytes 细胞的优先染色结果，对比之下，对于正常子宫颈涂片，或者对于异常子宫颈涂片中的正常细胞，都只有非常低的背景染色。应用抗 - MCM5 抗体也获得了这种结果。

用抗 - MCM5 抗体观察到类似的结果。

实施例 5 - Cdc6 和 MCM5 抗体优先染色乳腺中的癌细胞

用抗 - Cdc6 和抗 - MCM5 抗体对另一部位的常见癌症，乳腺癌进行了试验。对乳腺组织固定和染色的方法同实施例 3 和 4 中对子宫颈涂片所述的方法。

用抗 - Cdc6 和抗 MCM5 抗体对一系列乳腺癌进行了试验。

用抗 - Cdc6 和抗 - MCM5 抗体对多种组织学类型的乳腺癌，包括低等级和高等级侵害的导管癌，都观察到强阳性染色反应，而正常的乳腺没有显示任何免疫染色反应的证据。对于低等级的粘膜癌也观察到与这二个抗体的强阳性染色反应。重要的是，与癌细胞靠近的正常基质细胞为阴性。

实施例 6 - 对血液样品的分析试验

应用在 Williams 等，临床化学学报，1986，155，329 - 344 中所述的酶联免疫吸附试验，检测来自患有散布性组织变形症病人的保存血样品，表明存在 MCM5 和 Cdc6。血清中可溶性 MCM5 和 Cdc6 的含量与肿瘤的大小有关。

实施例 7 - 涂片和冷冻切片与经受抗原提取处理的石蜡包埋组织切片的比较

用抗 - Ki 67, PCNA, MCM5 和 Cdc6 的抗体，对甲醛固定，石蜡包埋的如下组织的 5 μm 厚切片进行了过氧化物酶免疫染色试验：正常子宫颈（7 个样品），LSIL（5 个样品），HSIL（6 个样品），以及扁平细胞癌（6 个样品）。

切割 5 μm 厚的切片，置于载玻片上，在二甲苯中脱蜡。通过在以 100% 甲醇配制的 0.6% 过氧化氢中室温下温育 30 分钟，淬灭内源性过氧化物酶活性。在超纯水中浸洗玻片 2 分钟，然后在柠檬酸钠缓冲液中加压蒸煮 2 分钟。在 Tris 缓冲盐水（TBT）中浸洗 2 次，每次 5 分钟，然后对每个切片用以 TBS 配制的 10% 羊血清约 100 μl 封闭。将玻片沥干，擦去多余的血清。在含有 1% BSA 的 TBS 中将第一抗体稀释成 1:200，对每个切片加入 100 μl ，在温盒内 4 $^{\circ}\text{C}$ 温育过夜。然后在 TBS 中浸洗 3 次，每次 5 分钟，随后加入在含有 1% BSA 的 TBS 中以 1:500 稀释的生物素化羊抗 - 抗兔第二抗体，室温下作用 30 分钟。在 TBS 中浸洗 3 次，每次 5 分钟，然后加入在 TBS 中 1:500 稀释的链亲合素 - 生物素 - 辣根过氧化物酶复合物，室温下作用 30 分钟。以 TBS 漂洗 3 次，每次 5 分钟，然后加入在含有 0.005% 过氧化氢的 TBS 中配制的 1% 二氨基联苯胺底物，室温下温育 10 分钟。通

过在自来水中漂洗而终止反应，然后用苏木精对切片轻微染色，通过梯度浓度乙醇脱水，并在二甲苯中透明。用 DPX 封固基质对切片加盖玻片。

5 用抗 - PCNA, Ki 67, MCM5 和 Cdc6 抗体对如下组织的冷冻组织切片进行过氧化物酶免疫染色试验：正常子宫颈（8 个样品），HSIL（9 个样品），以及 LSIL（8 个样品）。

10 将冷冻切片在丙酮中固定 10 分钟。通过在以 100% 甲醇配制的 0.6% 过氧化氢中温育 30 分钟，淬灭内源性过氧化物酶活性。然后在 TBS 中洗切片，用以 TBS 配制的 10% 羊血清封闭过夜。加入在含有 1% BSA 的 TBS 中 1:200 稀释的第一抗体，4℃ 温育过夜。然后同上面用于固定组织切片的程序，引入第二抗体。

在用于冷冻切片时，用抗 - MCM5 和抗 - Cdc6 抗体染色的灵敏度，比用抗 - PCNA 和抗 - Ki 67 抗体高很多。

15 对于甲醛固定，石蜡包埋和加压蒸煮的正常组织，LSIL 和扁平细胞癌组织，抗 - PCNA, 抗 - MCM7, 抗 - MCM5 和抗 - Cdc6 给出了相似的染色图形。相比之下 Ki 67 的灵敏度非常弱，对 LSIL 和扁平细胞癌只有灶性微弱染色。

20 实施例 8 - 用抗 MCM7 抗体对冷冻切片和对经受抗原提取处理的组织染色

用抗 - MCM7 抗体对分类为 HSIL 的子宫颈 4 块冷冻切片进行了染色试验。

观察到与用抗 - Cdc6 和抗 - MCM5 抗体染色相同的染色图形。

25 此结果不同于 Hiraiva 等（国际癌症杂志，74: 180 - 184）的结果，他发现在已经受抗原提取处理方案的几种人组织和三种类型的人肿瘤，对 PCNA 和 MCM7 (hCDC47) 有相似的免疫染色图形。

30 但是，发现用抗 - MCM7 抗体对正常子宫颈，LSIL 和扁平细胞癌的，经受了抗原提取处理的石蜡包埋组织切片得到的与 Hiraiwa 等一致的染色图形，类似于用抗 - PCNA 抗体得到的染色图形。如在实施例 7 中所指出的，抗 - MCM5 和抗 - Cdc6 抗体对如此制备的这些切片的染色图形，也类似于抗 - PCNA 抗体的染色图形。

实施例 9 - 用抗 MCM2 抗体染色

用兔抗 - 人 MCM2 多克隆抗体对二个正常子宫颈的冷冻切片和 4 个 HSIL 的冷冻切片 (其中每个都包含正常的子宫颈上皮) 染色。

- 5 正常的外子宫颈仅在基底层显示出细胞核染色, 染色不表现在浅表的分化细胞内。相比之下, 对于异常的上皮, 整个厚度都有 HSIL 细胞的核染色。内子宫颈细胞为阴性。

实施例 10 - 用抗 - MCM3 抗体染色

- 10 将兔抗 - 人 MCM3 多克隆抗体用于对一个正常子宫颈的冷冻切片和 2 个 HSIL 的冷冻切片 (其中每个都包含正常的子宫颈上皮) 染色。

- 15 正常的外子宫颈仅在基底层显示出明显颗粒状的核染色, 浅表的分化细胞内不表现出核染色。可见对角质细胞质的某些背景染色。对比之下, 对于异常上皮, 整个厚度都有 HSIL 细胞的核染色。对宫颈内膜粘液有某些染色, 虽然宫颈内膜细胞核为阴性。

- 20 还将抗 - 人 MCM3 多克隆抗体用于对四个 HSIL 涂片和 2 个 LSIL 涂片 (其中每个都包含有正常的子宫颈细胞) 染色。在每种情况下都有对 SIL 细胞核的染色。此外, 在使用第一抗体的稀释液时, 对角质细胞有背景细胞质染色, 对宫颈内膜细胞核有某些染色。

- 25 将抗 - 非洲爪蟾 MCM3 多克隆抗体用于染色 HSIL 的冷冻切片。通过蛋白质印迹试验和组织切片定位, 证明抗 - 非洲爪蟾 MCM3 抗体与人 MCM3 有交叉反应性。对于异常上皮, 整个厚度都有 HSIL 细胞的核染色。

实施例 11 - 用抗 - MCM4 抗体的染色

将兔抗 - 人 MCM4 多克隆抗体用于对一个正常子宫颈冷冻切片和二个 HSIL 冷冻切片 (其中每个都包含正常的子宫颈上皮) 染色。

- 30 正常的子宫颈仅在基底层显示出明显颗粒状的核染色, 在浅表层分化细胞内未表现出核染色。可见对角质细胞质的某些背景染色。相比之下, 对于异常的上皮, 整个厚度都有 HSIL 细胞的核染色, 表面

的细胞核为强染色。在使用第一抗体的稀释液时，对宫颈内膜细胞核有微弱的染色。

5 还将抗-人 MCM4 多克隆抗体用于对二个 HSIL 涂片染色(其中每个涂片都包含正常的子宫颈细胞)。在每次情况下对 HSIL 细胞都有核染色。此外，在使用第一抗体的稀释液时，对角质细胞有细胞质背景染色，对宫颈内膜细胞核有某些染色。

实施例 12 - 用抗 MCM6 抗体染色

10 将兔抗-人 MCM6 多克隆抗体用于对一个正常子宫颈冷冻切片和二个 HSIL 冷冻切片(其中每个都包含正常的子宫颈上皮)染色。

正常的外子宫颈仅在基底层显示出细胞核强染色，在浅表层分化细胞中未表现出有核染色。相比之下，对于异常上皮，整个厚度都有 HSIL 细胞核的强染色。对宫颈内膜粘液也有某些染色，但对宫颈内膜细胞核只有微弱的染色。

15 还将抗-人 MCM6 多克隆抗体用于对 4 个 HSIL 涂片和 4 个 LSIL 涂片染色(其中每个都包含正常子宫颈细胞)。在每种情况都有对 SIL 细胞的核染色。此外，在使用第一抗体的稀释液时，对角质细胞有细胞质背景染色，对宫颈内膜细胞核有某些染色。

20 实施例 13 - 用抗 - MCM7 抗体的进一步染色实验

将兔抗-人 MCM7 多克隆抗体用于对 3 个正常子宫颈冷冻切片，6 个 HSIL 冷冻切片和一个子宫颈 SCC 冷冻切片(其中每个切片都包含正常的子宫颈上皮)染色。

25 正常的外子宫颈仅在基底层显示出核染色，在浅表层分化细胞中未表现出核染色。可见对角质细胞的细胞外质有某些背景染色。相比之下，对于异常的上皮，在整个厚度的大多数 HSIL 细胞都有细胞核强染色。在使用第一抗体的稀释液时，对宫颈内膜粘液有某些染色，对宫颈内膜细胞核有弱染色。

30 还将抗-人 MCM7 多克隆抗体用于对二个 HSIL 涂片和二个 LSIL 涂片染色(其中每个都包含正常子宫颈细胞)。在每次情况下，都有对 SIL 细胞的核染色。此外，在使用第一抗体的稀释液时，对角

质细胞有细胞质背景染色，对宫颈内膜细胞核有某些染色。

将抗-非洲爪蟾 MCM7 多克隆抗体（通过蛋白质印迹试验和对组织切片的定位证明与人 MCM7 有交叉反应）用于对 HSIL 的冷冻切片染色。对于异常的上皮，整个厚度都有 HSIL 细胞的核染色。

5

方法

子宫颈涂片的制备

固定新鲜的涂片（在 50:50 的丙酮：甲醇中固定 5 分钟），淬灭内源性过氧化物酶活性（如上面所述）之后，对细胞作渗透（4 mM 脱氧胆酸钠，10 分钟），漂洗（在含有 0.25% Triton X-100 的 TBS 中）处理，并用 TBS 配制的 10% 羊血清封闭过夜。加入在含有 1% BSA 的 TBS 中 1:200 稀释的第一抗体在 4℃ 温育过夜，然后在 TBS 中浸洗玻片 3 次，每次 5 分钟，随后加入在含有 1% BSA 的 TBS 中以 1:500 稀释的生物素化兔第二抗体（Dako），室温下作用 30 分钟。TBS 中漂洗 3 次，每次 5 分钟，然后加入在 TBS 中以 1:500 稀释的链亲合素辣根过氧化物酶复合物（Dako），室温下作用 30 分钟。TBS 中洗 3 次，每次 5 分钟之后，加入以含有 0.005% 过氧化氢的 TBS 配制的 1% 二氨基联苯胺底物，室温下温育 10 分钟。通过在自来水中漂洗使反应停止，用苏木精对玻片稍作负染，通过梯度乙醇脱水，并在二甲苯中透明。以 DPX 封固基质施加盖玻片。

20

免疫荧光

将新鲜收集的子宫颈涂片材料悬浮于 0.5 ml PBS 中，并加入 0.5 ml 8% 甲醛使之固定，然后使之沉淀在聚赖氨酸盖玻片上。如在 Romanowski 等，美国国家科学院学报，1996，93: 10189-10194 中所述的方法对盖玻片进行了处理。在 5% BSA/PBS/Triton X-100 和 SDS 中封闭之后，将它们与第一抗体共同温育，漂洗，与第二抗体（FITC 结合标记的抗-兔抗体，Amersham 1:100），然后用碘化丙锭/RNA 酶 A（二者均为 Sigma 产品，以 50 ng/ml 的浓度）对 DNA 负染，漂洗，并封固在甘油/PBS/苯二胺中。

25

30

在 BioRad MRC 1024 激光共焦扫描显微镜上用双通道（FITC & Texas Red）法收集荧光图像。对于某些图像，收集了 1-2 μl 间距的共焦序列，然后投射为单帧图像（图 4a 和 c）。从乳房切除标本收集

新鲜的正常乳腺组织和肿瘤乳腺组织。将其薄切片 (<1 mm) 在 4% 多聚甲醛中固定 30 分钟, 然后同上述处理, 但是允许较长时间地与二种抗体温育和漂洗。

5 实施例 14 - 本发明的实施方案与标准 Pap 染色法的盲法比较

对从同时在地方医院门诊病人诊断作阴道镜检的妇女获得的涂片, 进行盲法试验, 以便将用抗 - MCM5 抗体的检测效果同标准的 Pap 染色法进行比较。

10 表 1 显示, 对于通过常规 Pap 染色法检查为阳性的 26 例, 通过本发明的抗体试验, 全部 26 也被记录为阳性。在被常规 Pap 染色法记录为阴性的 16 例中, 13 例也被抗体试验记录为阴性。

15 余下的三例中, 一例含有被染色的未成熟组织转化扁平上皮细胞, 显示出炎症性背景反应改变。其余 2 例经 Pap 染色法再次检查证实含有异常的 (LSIL) 细胞, 也就是说, 本发明可用于排除这种 Pap 染色法的假阴性结果。

这些结果证明, 应用本发明的抗体试验, 没有丢失来自 Pap 染色的任何信息, 反而增加了信息。这允许用常规的 Pap 染色对抗体试验可能的失败提供保险。

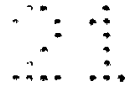
20 实施例 15 - 对患有尿道恶性肿瘤病人尿样品的检查

建立了离解增强镧荧光免疫测定法 (“DELFLIA”), 以便应用二种不同的兔抗 - hMCM5 多克隆抗血清检测人 MCM5。

25 基于夹心检测法, 将过量的特异性抗体固相化在一种表面上 (在此是聚苯乙烯微量滴定板的孔表面) - 即为 “捕捉抗体”。在与第一抗体结合反应之后, 过量加入具有不同抗原表位特异性的标记的 (在此用钡标记) 第二抗体。免疫反应完成之后, 洗去多余的材料, 并加入了增强液 (Wallac Oy), 然后用时间分辨荧光计测定时间分辨性荧光。信号强度与分析物的浓度成正比。

应用了如下的检测步骤:

- 30
1. 用兔抗 - MCM5 多克隆抗体包被过夜 (4°C, 每孔 1600 ng);
 2. 用 DELFLIA 漂洗缓冲液 (Wallac Oy) 洗 3 次;
 3. 在 5% BSA/PBS 中封闭 1 小时;



4. 用 DELFIA 漂洗缓冲液 (Wallac Oy) 洗 3 次;
5. 第一抗体 - 结合反应 (在含有 0.02% TWEEN 的 Wallac multi 缓冲液中 1:3 稀释分析物) 过夜 (4℃);
6. 用 DELFIA 漂洗缓冲液 (Wallac Oy) 洗 4 次;
- 5 7. 以铕标记的兔抗 - MCM5 多克隆抗体 (4 ²⁰Eu/TgG) 进行第二抗体结合反应, 3 小时;
8. 用 DELFIA 漂洗缓冲液 (Wallac Oy) 洗 6 次;
9. 加入增强液, 振荡温育 10 分钟。用时间分辨荧光计 (Wallac Oy) 测定时间分辨荧光。

10 用来自二只不同兔的兔抗 - MCM5 多克隆抗血清和以 5% BSA/PBS 配制的重组人 MCM5 作分析物, 制作了 13 pM - 41250 pM 范围内的标准曲线。通过将样品 DELFIA 测定数与由重组 hMCM5 5% BSA/PBS 制作的标准曲线相比较, 可确定样品中 hMCM5 的浓度。预计使用单克隆抗体时会有更好的灵敏度。

15 以 3000 rpm 转速将取自英国剑桥 Addenbrookes 医院尿道恶性肿瘤病人的尿样品离心 (50 - 150 ml, SIGMA 4K10, 7 分钟, 4℃), 并通过对 DNA - 结合蛋白进行低渗膨胀, douncing 和盐提取处理, 得到了来自细胞沉淀的可溶性组分。应用 MCM5 DELFIA 测定此可溶性组分, 将其生物化学数据同医院泌尿科病理室的诊断报导相比较。

20 5 份临床确定为恶性肿瘤阳性的标本中, 应用本发明的 DELFIA 测定 4 份记分为阳性 (80%), 显示有可测定量 MCM5 (29 - 58 pM)。6 份临床确定为恶性肿瘤阴性的样品中, 全部给出类似于 DELFIA 零标准的反应。

25 实施例 16 - 对患有急性和慢性白血病/淋巴瘤病人血样品的分析

将实施例 15 中所述的 DELFIA 试验用于检测从剑桥 Addenbrookes 医院急性和慢性白血病/淋巴瘤病人得到的血液样品。以 3000 rpm 转速将血液样品离心 (SIGMA 4K10, 7 分钟, 4℃), 并通过对 DNA - 结合蛋白进行低渗膨胀, douncing 和盐提取处理, 得到了来自细胞沉淀的可溶性组份。随后应用 DELFIA 检测此可溶性组份。

6 个恶性肿瘤病例中, 5 例用本发明的 DELFIA 测定为阳性

(83%)，显示有可测定量的 MCM5 (24 - 1945 pM)。6 例对照样品 (来自门诊糖尿病患者的血液) 全部给出类似于“0”标准的反应。

实施例 17 - 对转移性恶性肿瘤的血清学检测

5 应用实施例 15 中所述的 DELFIA 试验，对来自英国剑桥 Addenbrookes 医院恶性乳腺癌和卵巢癌病人的血清进行了检测。

2 例肉瘤和 3 例癌症 (乳腺和卵巢腺癌) 都显示出了可测定量的 MCM5。

10 实施例 18 - 制备用于本发明的全 - MCM - 多克隆抗体

按如下方法获得了能够结合 MCM2, MCM3, MCM4, MCM5, MCM6 和 MCM7 的多克隆抗体制备物。

应用 t-BOC 化学过程合成了肽片段

15 VVCIDFDKMSDMRTAC，此片段相当于 MCM 蛋白质家族共同的共有序列。使此肽结合于 PPD (纯化的蛋白质衍生物 - 结核菌素)。

每隔 21 天对兔免疫注射一次。第三次免疫后的第 10 天采集血清，用于以后的实验 (在下面的实验实施例中被称为全 - MCM)。

20 实施例 19 - 用抗 Cdc6, 抗 - MCM2, 抗 - MCM5, 抗 - MCM7 和全 - MCM 抗体对正常乳腺组织和乳腺癌组织的染色

用抗 Cdc6, MCM2, MCM5 和 MCM7 的抗体，以及全 - MCM 抗体，对正常乳腺 (乳房复位手术接受者的) 和组织活检证明为导管和小叶癌的乳腺组织学标本进行染色。抗 - MCM2 抗体是 BM28 小鼠单克隆抗体，可从 Transduction 实验室购得 (见他们的 1998 抗体产
25 品目录)。如上所述，对每个抗体单独进行染色。

对经受了加压蒸煮的甲醛固定，石蜡包埋的样品和冷冻样品进行了测定。

30 根据医院赞同的伦理道德准则，使用了 Addenbrooke 医院为组织活检诊断或切除术后得到的甲醛固定，石蜡包埋的人组织。从这些组织切割了 5 μ m 厚的切片，置于 APES (氨丙基三乙氧基硅烷) 涂布的载玻片上，在二甲苯中脱蜡，并经过从乙醇直到水的处理。在柠檬酸

缓冲液中对组织切片加压蒸煮，以便有助于抗原表位的回收，随后在 Tris - 缓冲盐水 (TBS) 中漂洗。通过在 TBS 中配制的 0.6% 过氧化氢中温育 30 分钟淬灭内源性过氧化物酶活性。

5 在 TBS 中洗切片，并用 TBS 中配制的 10% 羊血清封闭达 2 小时之久。在含有 0.1% Triton 和 1% 牛血清白蛋白 (BSA) 的 TBS 中稀释第一抗体。对每个切片加 100 μ l 抗体，在温盒中 4 $^{\circ}$ C 温育切片。

10 然后在含有 0.025% Triton 的 TBS 中洗玻片，随后在含有 1% BSA 的 TBS 中以 1:500 稀释的生物素化羊抗 - 兔第二抗体 (DAKO) 中室温下温育 1 小时。在 TBS 中漂洗之后，将应用底物二氨基联苯胺的链亲合素辣根过氧化物酶系统用于染色切片。通过在水中漂洗使反应停止，并用 Harris 苏木精作轻微负染，通过梯度乙醇脱水，并在二甲苯中透明。用 DEPEX 封固基质施加盖玻片。

如上面实施例 7 中所述制备冷冻切片，不同的是用 10% 羊血清封闭 30 分钟而不是过夜。

15 在正常乳腺组织中，只有 1 - 3% 的导管细胞或小叶细胞为染色阳性。基质细胞为阴性。

在各种乳腺癌中，包括低度和高度损伤的，以及小叶和导管型的，50 - 80% 的异常细胞显示出染色阳性，周围的基质细胞和炎症细胞仍然未被染色。

20 这些结果是用每个抗体单独获得的。

与抗 - PCNA 和抗 - ki 67 抗体进行了比较。对于石蜡切片，抗 - PCNA 染色得到与抗 - MCM5 和抗 - CDC6 类似的结果，然而抗 - Ki67 仅显示出微弱的灶性染色。对于冷冻切片，用抗 - MCM 和抗 - CDC6 抗体染色获得比抗 - PCNA 或抗 - Ki 67 抗体好得多的结果。

25

实施例 20 - 用抗 - MCM5, MCM7 和全 - MCM 抗体对正常前列腺和前列腺癌的染色

30 如在实施例 19 中对乳腺细组织所述的方法，制备前列腺正常组织和前列腺癌的石蜡包埋组织学切片标本，以分别的实验用抗 - MCM5, 抗 - MCM7 和全 - MCM 抗体对切片染色。

对每种抗体，正常组织显示阳性染色的细胞小于 10%，而腺癌组

织显示出 30 - 50% 的肿瘤细胞染色，周围的基质细胞和炎症细胞仍未被染色。

5 实施例 21 - 用抗 - MCM2, MCM5, MCM7, 全 - MCM 和 CDC6 抗体对正常结肠和结肠癌组织的染色

用抗 MCM2, MCM5, MCM7, 全 - MCM 和 CDC6 抗体, 分别对结肠腺癌和结肠管绒毛腺癌的组织学切片标本染色。正常标本也用这些抗体染色。

10 在正常组织中, 仅在较底层的第三结肠隐窝看见对每种抗体的染色, 隐窝内较浅表层的分化细胞仍未被染色。

在管绒毛腺癌和腺癌组织中, 大于 50% 的肿瘤细胞对每种抗体的染色为阳性, 周围结缔组织成分未被染色。

15 象实施例 19 中对乳腺组织一样, 检测了冷冻样品和石蜡包埋样品。一方面抗 - MCM 和抗 - CDC6 抗体间的结果相类似, 另一方面抗 - PCNA 和抗 - Ki 67 抗体间的结果相类似, 也就是说, 对于冷冻样品, 用抗 - MCM 和抗 - CDC6 抗体的染色结果优于用抗 - PCNA 和抗 - Ki 67 抗体获得的染色结果。

20 实施例 22 - 用抗 MCM2, MCM5, MCM7 和全 - MCM 抗体对正常肺组织和肺癌组织的染色

分别用抗 - MCM2, 抗 - MCM5, 抗 - MCM7 和全 - MCM 抗体, 对来自肺扁平细胞癌或肺腺癌病人的组织活检或切片的石蜡包埋组织学标本进行了染色。如实施例 19 中对乳腺组织所述的方法制备标本。用对正常肺实质组织的染色进行比较。

25 在正常组织中, 被染色的增生部分非常少。

在所有的癌组织中, 30% 以上的肿瘤细胞为染色阳性, 周围的炎症细胞或结缔组织细胞未被染色。

30 实施例 23 - 用抗 - MCM2, 抗 - MCM5, 抗 - MCM7, 全 - MCM 和抗 - CDC6 抗体对正常膀胱和膀胱癌组织的染色

用抗 - MCM2, 抗 - MCM5, 抗 - MCM7, 全 - MCM 和抗 - CDC6

抗体，对来自膀胱镜检时取样的移行细胞癌组织活检的组织学标本进行了染色。

对于正常膀胱组织，在移行上皮的基底层有强染色，而较浅表的分化细胞仍未被染色。

5 在包含肿瘤的原位组织碎片中，全厚度的异常发育细胞被阳性染色。

对于侵入性移行细胞癌，50-100%的肿瘤细胞显示出核染色，伴有染色阴性的基质细胞和炎症细胞成分。

10 用实施例 19 中对乳腺组织的检测，测定了冷冻和石蜡包埋的两种样品。一方面抗-MCM 和抗-CDC6 抗体间的结果相类似，另一方面抗-PCNA 和抗-Ki 67 抗体的结果相类似，也就是说，对于冷冻样品，用抗-MCM 和抗-CDC6 抗体的染色结果优于应用抗-PCNA 和抗-Ki 67 得到的染色结果。

15 实施例 24 - 用抗-MCM5 抗体对多种皮肤样品的染色

用抗-MCM5 抗体对如下的皮肤组织学样品染色：正常皮肤，增生状态的皮肤（包括牛皮癣），阳光性角化症，Bowen 氏病，以及侵害性扁平细胞癌。

20 正常皮肤显示主要对上皮基底层染色，偶见上皮第三底层中的细胞也被染色，但是较浅表的分化细胞仍未被染色。

在牛皮癣的情况下，较显著的染色存在于表皮最下面的 3-4 层，反映皮肤的更新率增加了。

对于阳光性角化症和 Bowen 氏病（原位癌），显示表皮中所有的异常发育细胞都被染色，直达全厚度。

25 在侵害性扁平细胞癌，显示出 70% 以上的细胞被染色，对于良好分化的肿瘤，显示出邻近珠状角蛋白的分化细胞阴性染色小病灶。

实施例 25 - 用抗-MCM5 抗体对喉组织的染色

30 如同实施例 19 中所述的制备乳腺组织石蜡包埋标本的方法，制备正常喉和喉癌组织学样品，用抗-MCM5 抗体对其染色。

正常组织显示仅对基底增殖的上皮细胞染色（小于 10%）。

癌组织显示对 50% 以上的细胞具有核染色。基质细胞和炎症细胞全都为阴性。

实施例 26 - 用抗 MCM5 抗体对食道组织的染色

5 如同实施例 19 中所述的制备乳腺组织石蜡包埋标本的方法，制备正常食道和食道癌组织学样品，用抗 - MCM5 抗体对其染色。

正常组织显示仅对基底增殖的上皮细胞染色（小于 10%）。

癌组织显示对 50% 以上的细胞具有核染色。基质细胞和炎症细胞全都为阴性。

10

实施例 27 - 用抗 - MCM5 抗体对支气管组织的染色

如同实施例 19 中所述的制备乳腺组织石蜡包埋标本的方法，制备正常支气管和支气管癌组织学样品，用抗 - MCM5 抗体对其染色。

正常组织显示仅对基底增殖的上皮细胞染色（小于 10%）。

15 癌组织显示对 50% 以上的细胞具有核染色。基质细胞和炎症细胞全都为阴性。

实施例 28 - 用抗 - MCM5 抗体对正常淋巴结和一类淋巴癌组织的染色

20 如在实施例 19 中对乳腺组织所述的方法，制备反应性淋巴结和一类 Hodgkin 氏和非 Hodgkin 氏淋巴癌组织的冷冻组织学样品和石蜡包埋组织学样品。

反应性淋巴结显示在淋巴样滤泡的生发中心内的细胞有强染色，偶见在旁滤泡区内有散布的阳性染色细胞。

25 淋巴癌组织显示对 50% 以上的恶性淋巴细胞有核染色。

实施例 29 - 用抗 - MCM5 抗体对尿细胞涂片的检查

30 从已知患有移行细胞癌的病人和从泌尿科诊断正常病人收集尿样品。将 20 ml 尿以 3000 g 离心 10 分钟，取出上清液，沉淀再悬浮于 50 μ l 上清液内。将此沉淀物在 APES 载玻片上作涂片，并在乙醇中固定。

在 Tris 缓冲盐水 (TBS) 中洗玻片, 然后在 4 mM 脱氧胆酸钠内渗透 10 分钟。以加有 0.025% Triton 的 TBS 洗玻片, 并用 TBS 配制的 10% 羊血清封闭 2 小时。将预先吸附的抗 - MCM5 抗体在含有 0.1% Triton 和 1% BSA 的 TBS 中稀释, 对每个玻片加入 200 μ l。置于湿盒内在有轨摇床上 4 $^{\circ}$ C 温育过夜。

在含有 0.025% Triton 的 TBS 中洗此玻片, 随后在含有 1% BSA 的 TBS 中 1:500 稀释的生物素化羊抗 - 兔第二抗体 (DAKO) 中室温下温育 1 小时。用 TBS 配制的 0.6% 过氧化氢封闭内源性过氧化物酶 10 分钟, 随后在 TBS 中漂洗。将使用底物二氨基联苯胺的链亲合素辣根过氧化物酶系统用于染色此玻片。通过在水中漂洗使反应停止, 用 Harris 苏木精对玻片稍加染色, 随之用橙黄 G 和 EA50 (PAP 染料) 染色。

对于 6 例按此方法制备尿细胞涂片, 并用抗 - MCM5 抗体染色的移行细胞癌样品, 所有的恶性移行细胞都显示出强染色, 背景中伴有未被染色的炎症细胞和扁平细胞。从泌尿科诊断正常的病人尿液制备的相似涂片, 扁平细胞或正常的移行细胞都显示未被染色。

实施例 30 - 对正常子宫颈样品和扁平上皮内损伤病人的子宫颈样品的 DELFIA 检测

为了如上面实施例 15 中所描述的用二个不同的兔抗 - MCM5 多克隆抗血清检测人 MCM5, 建立了离解增强镧荧光免疫测定法 (DELFI A)。

检查了二个正常子宫颈样品和二个 HSIL 子宫颈样品。通过低渗膨胀和 douncing 处理使组织样品溶液化, 随后盐提取 DNA 结合颗粒。

二个正常样品得到类似于零标准的反应。

二个 HSIL 样品记分为阳性, 表明应用免疫检测法可以检测子宫颈样品中的异常性。

实施例 31 - 用抗 - MCM5 抗体对多种癌组织的染色

用抗 - MCM5 抗体对多种癌组织和白血病骨髓的组织学标本进行了染色, 结果如下:

胃癌显示 50% 以上的肿瘤细胞被染色。

肾癌显示 30 - 50% 的肿瘤细胞被染色。

卵巢癌显示 30 - 50% 的肿瘤细胞被染色。

睾丸癌显示 30 - 50% 的肿瘤细胞被染色。

5 急性白血病骨髓显示 90% 以上的肿瘤细胞被染色。

实施例 32 - 对结肠涂片的染色

10 从健康患者收集粪便材料，应用 WO 97/09600 中所述的方法，借助于以上皮 - 特异性抗体包被的磁珠从粪便样品中提取出脱落的表面结肠细胞，此包被的磁珠由 Dynal AS (Oslo, Norway) 提供。

在含有 0.025% Triton 的 TBS (Tris - 缓冲盐水) 中洗涤提取出的磁珠和上皮细胞混合物。在缓冲的 4% 多聚甲醛中固定之后，在 TBS 中洗此细胞，并从形成的细胞沉淀作细胞涂片。随后的处理同对尿样品涂片的处理。

15 PAP 染色的涂片显示出磁珠，一些纤维素和细胞碎片的混合物，存在许多来自结肠的粒状上皮细胞和少量来自肛门沟的扁平细胞。

1 用抗 - MCM5 抗体染色时，对于正常细胞和异常细胞获得了类似于对膀胱或子宫颈的结果。

20

实施例 33 - 对溃疡性结肠炎病人肠切片的染色

用抗 - MCM5 抗体对来自活动的溃疡性结肠炎病人的肠石蜡包埋切片染色。

25 在所有被检查的切片中，在炎症区大约 50% 的表面上皮细胞显示出对 MCM5 的核表达。在活动的溃疡性结肠炎组织内存在大量淋巴细胞，这些细胞也常常显示出对 MCM5 的核表达。

30 还检查了静止的溃疡性结肠炎组织 (即不存在活动性炎症)。在所有的这些组织内，其表面上皮细胞不显示对 MCM5 的染色。在存在于静止的溃疡性结肠炎组织的少量淋巴细胞中，只有很少量的细胞显示出对 MCM5 的核染色。

发现在石蜡包埋的切片中，对于 MCM5 和 PCNA 的活动的和静

止的溃疡性结肠炎染色是相似的。

实施例 34 - 对 Crohn 氏病患者肠切片的染色

5 对活动性 Crohn 氏病患者肠石蜡包埋切片的染色，显示出在邻接溃疡和炎症区的表面上皮细胞中有对 MCM5 的核表达。在炎症组织中的淋巴细胞也常常显示出对 MCM5 的核表达。

还检查了静止性 Crohn 氏病患者的肠组织，在表面上皮细胞和存在的少量淋巴细胞中对 MCM5 的染色都是阴性。

10 对于活动性和静止性 Crohn 氏病的石蜡包埋切片，用抗 - MCM5 抗体与用抗 - PCNA 抗体得到了类似的结果。

用冷冻切片和石蜡包埋切片对抗 - MCM5 和抗 - PCNA 的染色进行比较表明，对于冷冻切片，用抗 - MCM5 抗体的染色优于用抗 - PCNA 抗体的染色，具有较多的核被染色。

15 实施例 35 - 用抗 - MCM5 抗体对正常和癌变子宫内膜的染色

用抗 - MCM5 抗体对正常和癌变子宫内膜的冷冻和石蜡包埋切片进行染色。

当与正常组织相比较时，在癌变的子宫内膜显示了较好的染色，并且，与石蜡包埋的切片相比较，冷冻切片较优越。

20

实施例 36 - 对子宫颈涂片单层细胞 (ThinPrep) 的染色

25 在 APES 玻片上作涂片之后，将用于制作子宫颈涂片的刷子/刮片置于 75% 甲醇中，通过搅动取下剩余的细胞。将此细胞悬液在 MSE Harrier 离心机中以 1000 rpm 的转速离心 2 分钟对 20% 蔗糖液离心分层，取出并弃去上层液。将剩下的液层以 3000 rpm 转速再离心 5 分钟，将此细胞沉淀再悬浮于 200 μ l 水中。取 50 μ l 置于每张玻片上，让细胞沉淀在玻片上，并除去水分。然后执行同实施例 29 中(尿细胞涂片)的步骤，并作 PAP 染色。

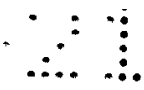
30 在多次实验中，用单层涂片得到的结果与用常规涂片得到的结果相同。用单层制备的优越性可能在于，可除去粘液和大部分炎症细胞。

讨论

在此所述的结果表明，在体内正常分化的组织中 Cdc6 和 MCM5 被下调了，培养中的一系列静止的哺乳动物细胞染色质内也不存在 Cdc6 和 MCM5。这提供了某种暗示，表明这些蛋白质可能具有作为细胞增殖标本的潜在价值。Hiraiwa 等曾证实，MCM7 可被免疫定位于多种类型的肿瘤内，例如起始的皮肤肿瘤，以及胃，胰腺和结肠的恶性肿瘤，PCNA 也有类似的分布。他们得出结论：可能将 MCM7 的免疫定位用作组织切片中细胞增殖的指针。但是，如上面已注意到的，病理学领域的专家怀疑，借助于标志物如 PCNA 和 Ki 67 对肿瘤内细胞增殖速度的检测是否具有临床用途，因为几乎没有直接的证据表明，这些标志物对最佳应用的传统组织学检测法如分级和分步检测能提供真正的改进。

在此报导的观察结果显示，针对 Cdc6，MCM5 和 MCM7 的特异性结合分子，与传统的增殖标志物如 PCNA 和 Ki 67 相比较，在新鲜和冷冻的宫颈 SILs 样品中表现出对潜在的恶变前细胞具有高得多的特异性。抗 - Cdc6 和抗 - MCM5 能够明确地区分 LSIL 和 HSIL 中的异常细胞和邻近的正常细胞，包括宫颈内膜细胞，宫颈外细胞，组织转化细胞和基质细胞。鉴于这种情况，已将所述的抗 - Cdc6 和抗 - MCM 抗体应用于取自 SILs 病人和无此病患者的宫颈涂片。对这些蛋白质观测到的惊人程度的特异性和灵敏度结果是令人震惊的。在赘生性细胞和 HPV - 感染的 Koilocyte 细胞都观测到很强的核染色和细胞质染色。在显示出不明确异常性的组织转化扁平细胞（未确定功能意义的非典型扁平细胞）中也发现有阳性免疫染色。但是，涂片中其余的混合正常细胞群，包括宫颈外细胞，宫颈内膜细胞，组织转化扁平细胞和炎症细胞（包括淋巴细胞和嗜中性白细胞），对 Cdc6 和 MCM 的免疫染色都是阴性。

当用于宫颈涂片和冷冻切片时，抗 - MCM5，抗 - Cdc6 和抗 - MCM7 的灵敏度比抗 - PCNA 高得多，但是用于甲醛固定，石蜡包埋和暴露于通过加压蒸煮作抗原提取处理的组织时，这些抗体得出了相似的染色图形。宫颈涂片和其它的细胞样品，以及冷冻切片，都不如甲醛固定，石蜡包埋的组织切片坚实，因此不能经受加压蒸煮处理。



Cdc6 和 MCM 抗体用于子宫颈涂片时的惊人特异性和灵敏度, 为将生物化学/免疫细胞学技术引入子宫颈大规模自动化筛选检查提供了条件。而且, 这些抗体还可能有助于改进对 LSILs 的发现和分级, 对于 LSILs 的分级, 目前在同一观察者和不同的观察者之间都存在明显的差异, 即使对于子宫颈细胞学的专家也是如此。应用这些抗体还将有助于以较高的准确性和客观性鉴别 HSIL, 因此有助于减少高数量的假阴性结果, 这是关系到目前全球子宫颈筛选检查计划的一个主要问题。

如已注意到, 对下列样品检测的进一步实验例证表明, 本发明具有不限于子宫颈筛选检查的通用性: 乳腺组织, 胃, 肾, 卵巢, 睾丸和结肠, 尿样品和血样品 (白血病/淋巴瘤病人的血样品, 以及转移性肉瘤和癌病人的血样品), 还有炎症性肠道病的组织, 包括溃疡性结肠炎和 Crohn 氏病的肠组织, 以及粪便涂片, 虽然在多种实施方案中优选地是检查子宫颈样品, 特别是子宫颈涂片。除细胞学技术外, 还证明可应用生物化学技术。

在上面实施例 14 中所述的, 用盲法试验将本发明的实施方案与应用规范的 PAP 涂片法的子宫颈涂片检查相比较, 结果证实了本发明具有令人振奋的实用性。

所有在此被提到的文献均被引入作为参考。

表 1

用盲法试验对被召回作阴道镜检门诊的病人, 抗 - MCM5 抗体检测法与常规 Pap 检测法的比较

		规范的 Pap 检测结果		
		正常	低等级	高等级
抗 MCM5 抗体检测法	存在阳性细胞	3 ^a	9	17
	不存在阳性细胞	13	0	0

a) 见正文