

(12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织
国际局

(43) 国际公布日
2013 年 10 月 24 日 (24.10.2013)



(10) 国际公布号
WO 2013/155686 A1

- (51) 国际专利分类号:
G01N 33/533 (2006.01)
- (21) 国际申请号: PCT/CN2012/074284
- (22) 国际申请日: 2012 年 4 月 18 日 (18.04.2012)
- (25) 申请语言: 中文
- (26) 公布语言: 中文
- (72) 发明人: 及
- (71) 申请人: 王乐民 (WANG, Lemin) [CN/CN]; 中国上海市普陀区新村路 389 号, Shanghai 200065 (CN)。
- (74) 代理人: 北京永新同创知识产权代理有限公司 (NTD UNIVATION INTELLECTUAL PROPERTY AGENCY LTD.); 中国北京市西城区金融大街 27 号投资广场 A 座 1802 室, Beijing 100033 (CN)。
- (81) 指定国 (除另有指明, 要求每一种可提供的国家保护): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU,

CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW。

- (84) 指定国 (除另有指明, 要求每一种可提供的地区保护): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), 欧洲 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG)。

本国际公布:

- 包括国际检索报告(条约第 21 条(3))。

(54) Title: APPLICATION OF INTEGRIN β SUBUNIT IN DIAGNOSING VENOUS THROMBOEMBOLISM

(54) 发明名称: 整合素 β 亚基在诊断静脉血栓栓塞中的应用

(57) Abstract: The present invention provides a method for diagnosing venous thromboembolism (VTE), comprising: detecting the level of an integrin $\beta 1$ subunit, an integrin $\beta 2$ subunit, and/or an integrin $\beta 3$ subunit in a blood sample. Also provided is a reagent kit for diagnosing the VTE, comprising a substance capable of specifically combining the integrin $\beta 1$ subunit, the integrin $\beta 2$ subunit, and/or the integrin $\beta 3$ subunit.

(57) 摘要: 本发明提供了一种诊断静脉血栓栓塞 (VTE) 的方法, 其中包括检测血液样品中的整合素 $\beta 1$ 亚基、整合素 $\beta 2$ 亚基、和/或整合素 $\beta 3$ 亚基的水平。还提供了用于诊断 VTE 的试剂盒, 其中包括能够特异性地结合整合素 $\beta 1$ 亚基、整合素 $\beta 2$ 亚基、和/或整合素 $\beta 3$ 亚基的物质。



WO 2013/155686 A1

整合素 β 亚基在诊断静脉血栓栓塞中的应用

5 技术领域

本发明涉及静脉血栓栓塞(VTE)领域。具体而言,本发明提供了一种新的诊断 VTE 的方法,其中包括检测对象血液样品中的整合素 $\beta 1$ 亚基、整合素 $\beta 2$ 亚基、和/或整合素 $\beta 3$ 亚基的水平。本发明还涉及能够特异性地结合整合素 $\beta 1$ 亚基、整合素 $\beta 2$ 亚基、和/或整合素 $\beta 3$ 亚基的物质在制备用于诊断 VTE 的诊断剂中的用途。此外,本发明还提供了用于诊断 VTE 的试剂盒,其中包括能够特异性地结合整合素 $\beta 1$ 亚基、整合素 $\beta 2$ 亚基、和/或整合素 $\beta 3$ 亚基的物质。

背景技术

15 静脉血栓栓塞是指在静脉中形成的血栓的总称,其包括肺动脉血栓栓塞症(PE)和深静脉血栓形成(DVT),其中 PE 包括急性肺栓塞(APE)、慢性血栓栓塞性肺动脉高压(CTEPH)。VTE 是一种多发病,其中 PE 由于其高发病率、高误诊率和高死亡率已经成为世界范围内的卫生保健难题 (Prevention and treatment of venous thromboembolism. International Consensus Statement (guidelines according to scientific evidence). *Int. Angiol.* 2006;25(2):101-161)。

根据传统的静脉血栓形成理论(phlebothrombosis theory),在血流缓慢状态下,静脉血管内皮细胞损伤或凝血因子功能亢进,损伤的内皮细胞和血小板被活化,凝血因子功能被激活,静脉血栓由此形成。其中静脉内所形成的血栓富含纤维蛋白以及红细胞,仅具有少量的血小板(Furie, Bruce; Furie, Barbara, Mechanisms of Thrombus Formation, *The New England Journal of Medicine* 2008;359 (9):938-949)。

25 本发明人最近的研究结果表明, APE 血栓中的蛋白组分主要由纤维蛋白原组成,其中还包含少量的血清蛋白和细胞骨架蛋白(Wang L, Gong Z, Jiang J, Xu W, Duan Q, Liu J, et al. Confusion of Wide Thrombolytic Time Window for Acute Pulmonary Embolism: Mass Spectrographic Analysis for Thrombus Proteins. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2011 184: 145-146)。这一发

现改变了静脉血栓蛋白主要是纤维蛋白这一传统观点，为 VTE 的诊断和治疗提供了新的途径。例如，对 VTE 血栓中的纤维蛋白原与血栓中的白细胞，血小板和红细胞之间结合方式的研究，则可以提供涉及静脉血栓的形成机制的信息。

5 整合素是介导细胞与细胞，细胞与其周围组织(如其它细胞或胞外基质)之间的附着的一类受体蛋白。其在细胞信号转导中也发挥着重要作用，并由此介导细胞与周围环境的信息交换，使得细胞可以对环境的变化作出快速应答(例如使血液通过血小板而凝结) (Hynes R, Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell* (2002), 110 (6): 673–87)。

10 整合素是异二聚体，其含有两个不同的链，分别称为 α 亚基和 β 亚基。目前在哺乳动物的整合素中共鉴别出 18 个 α 亚基和 9 个 β 亚基，通过这些亚基的分别组合，可构成 20 多种整合素 (Humphries MJ. Integrin structure. *Biochem Soc Trans.* 2000;28(4):311-39)。这 20 多种整合素构成了整合素家族，其中含有同一种 β 亚基的整合素构成了整合素 β 亚族。例如由 *ITGB1*、
15 *ITGB2*、和 *ITGB3* 基因编码的整合素 $\beta 1$ -3 亚基分别为 *ITGB1*(又称作 CD29)、*ITGB2*(又称作 CD18)、和 *ITGB3*(又称作 CD61)。含有 *ITGB1* 亚基的整合素 $\beta 1$ 亚族分布广泛，主要介导细胞与细胞外基质成分之间的附着，介导淋巴细胞的归巢以及白细胞与激活的内皮细胞间的粘附； $\beta 1$ 亚族主要分布于激活的淋巴细胞和血小板膜表面上(Billard MJ, McIntyre BW. CD45RA T-cell
20 activation without proliferation by a partial agonist monoclonal antibody to beta1 integrin. *Immunol Cell Biol.* 2008 May-Jun;86(4):381-4)。含有整合素 $\beta 2$ 亚族主要存在于各种白细胞表面，用于介导细胞间的相互作用，其主要分布于中性粒细胞、单核细胞中(Fu C, Tong C, Wang M, Gao Y, Zhang Y, Lü S, Liang S, Dong C, Long M. Determining beta2-integrin and intercellular adhesion
25 molecule 1 binding kinetics in tumor cell adhesion to leukocytes and endothelial cells by a gas-driven micropipette assay. *J Biol Chem.* 2011 Oct 7;286(40):34777-87)。含有整合素 $\beta 3$ 亚族主要分布于血小板的表面，其介导血小板的聚集，以及参与血栓的形成(Sachs UJ, Bakchoul T, Eva O, Giptner A, Bein G, Aster RH, Gitter M, Peterson J, Santoso S. A point mutation in EGF-4 domain of $\beta 3$ integrin is responsible for the formation of the Seca platelet
30 alloantigen and affects receptor function. *Thromb Haemost.* 2011;107(1))。

发明概述

一方面，本发明涉及特异性地结合整合素 $\beta 1$ 亚基、整合素 $\beta 2$ 亚基、和/或整合素 $\beta 3$ 亚基的物质在制备用于诊断静脉血栓栓塞的诊断剂中的用途。

在一个实施方案中，本发明涉及特异性地结合整合素 $\beta 1$ 亚基、整合素 $\beta 2$ 亚基、和/或整合素 $\beta 3$ 亚基的物质在制备用于检测对象血液样品中的整合素 $\beta 1$ 亚基、整合素 $\beta 2$ 亚基、和/或整合素 $\beta 3$ 亚基的水平从而诊断静脉血栓栓塞(VTE)的诊断剂中的用途。

在一个实施方案中，本发明的血液样品是外周血样品，优选外周静脉血样品。

在一个实施方案中，本发明涉及特异性地结合整合素 $\beta 1$ 亚基、整合素 $\beta 2$ 亚基、和/或整合素 $\beta 3$ 亚基中的至少两种的物质在制备用于检测对象血液样品中相应的整合素 $\beta 1$ 亚基、整合素 $\beta 2$ 亚基、和/或整合素 $\beta 3$ 亚基中至少两种的水平从而诊断静脉血栓栓塞的诊断剂中的用途。

在一个实施方案中，本发明涉及分别特异性地结合整合素 $\beta 1$ 亚基、整合素 $\beta 2$ 亚基、和整合素 $\beta 3$ 亚基的物质在制备用于检测对象血液样品中相应的整合素 $\beta 1$ 亚基、整合素 $\beta 2$ 亚基、和整合素 $\beta 3$ 亚基的升高水平，从而诊断静脉血栓栓塞的诊断剂中的用途。

在一个实施方案中，本发明中所述的静脉血栓栓塞是急性肺栓塞(APE)、慢性血栓栓塞性肺动脉高压(CTEPH)、或深静脉血栓形成(DVT)。

在一个实施方案中，本发明中所述的静脉血栓栓塞是急性肺栓塞(APE)或急性深静脉血栓形成(DVT)。

在一个实施方案中，本发明中特异性地结合 $\beta 1$ 亚基、整合素 $\beta 2$ 亚基、和/或整合素 $\beta 3$ 亚基的物质是抗体、配体或拮抗剂。在一个实施方案中，本发明的抗体、配体、和/或拮抗剂是经标记的。在一个实施方案中，本发明的抗体、配体、和/或拮抗剂是经荧光标记的。在一个实施方案中，本发明的抗体、配体、和/或拮抗剂是经藻红蛋白(PE)标记的抗体。

另一方面，本发明提供了一种检测对象血液样品例如外周静脉血样品中的整合素 $\beta 1$ 亚基、整合素 $\beta 2$ 亚基、和/或整合素 $\beta 3$ 亚基的水平从而诊断静脉血栓栓塞(VTE)的试剂盒。

在一个实施方案中，本发明提供了一种检测对象血液样品例如外周静脉血样品中的整合素 $\beta 1$ 亚基、整合素 $\beta 2$ 亚基、和/或整合素 $\beta 3$ 亚基的水平从而诊断静脉血栓栓塞(VTE)的试剂盒，其含有分别特异性地结合整合素 $\beta 1$ 亚基、整合素 $\beta 2$ 亚基、和/或整合素 $\beta 3$ 亚基的物质。

5 在一个实施方案中，本发明的试剂盒包括特异性地结合整合素 $\beta 1$ 亚基、整合素 $\beta 2$ 亚基、和/或整合素 $\beta 3$ 亚基中的至少两种的物质。在一个实施方案中，本发明的试剂盒中包括分别特异性地结合整合素 $\beta 1$ 亚基、整合素 $\beta 2$ 亚基、和整合素 $\beta 3$ 亚基的物质。

10 在一个实施方案中，本发明的试剂盒中所包括的特异性地结合 $\beta 1$ 亚基、整合素 $\beta 2$ 亚基、和/或整合素 $\beta 3$ 亚基的物质是抗体、配体、和/或拮抗剂。在一个实施方案中，本发明的抗体、配体、和/或拮抗剂是经标记的。在一个实施方案中，本发明的抗体、配体、和/或拮抗剂是经荧光标记的。在一个实施方案中，本发明的抗体、配体、和/或拮抗剂是经藻红蛋白(PE)标记的抗体。

15

附图说明

图 1： 血栓蛋白样品鸟枪法预分离结果。

图 2： 血栓蛋白样品酶解肽段、碎片序列信息结果。

20 图 3： 急性 PE 患者血栓样品串联蛋白质谱和信息分析，Gene Oncology 分析结果。

图 4： 急性 PE 患者血栓样品串联蛋白质谱和信息分析，相互作用网络分析结果，其表明 $\beta 2$ 、 $\beta 3$ 和 $\beta 1$ 亚基整合素是红色血栓的核心蛋白。

图 5： 急性下肢 VTE 患者血栓样品串联蛋白质谱和信息分析，Gene Oncology 分析结果。

25 图 6： 急性下肢 VTE 患者血栓样品串联蛋白质谱和信息分析，相互作用网络分析结果，其表明 $\beta 3$ 亚基整合素和 ITGA2B(即整合素 α 链 IIb)是红色血栓的核心蛋白。

图 7： 整合素 $\beta 1$ 、 $\beta 2$ 和 $\beta 3$ 亚基在健康人群对照组中的分布情况，其中图 7a 表明整合素 $\beta 1$ 亚基呈正态性分布，图 7b 表明整合素 $\beta 2$ 亚基呈非正态性分布，图 7c 表明整合素 $\beta 3$ 亚基呈正态性分布。

30 图 8： 健康人群对照组中整合素 $\beta 1$ 亚基的表达情况。图 8a 显示了

对照组中整合素 $\beta 1$ 亚基的表达均值和基线区间,其中均值为 $8.18 \pm 2.69(\%)$,基线区间为 $2.8-13.56(\%)$ 。图 8b 显示了对照组中整合素 $\beta 1$ 亚基表达水平的分布。

图 9: 健康人群对照组中整合素 $\beta 2$ 亚基的表达情况。图 9a 显示了对照组中整合素 $\beta 2$ 亚基的表达均值和基线区间,其中表达中位数为 $88.6(\%)$,基线区间为 $71.1-95.8(\%)$ 。图 9b 显示了对照组中整合素 $\beta 2$ 亚基表达水平的分布。

图 10: 健康人群对照组中整合素 $\beta 3$ 亚基的表达情况。图 10a 显示了对照组中整合素 $\beta 3$ 亚基的表达均值和基线区间,其中均值为 $9.65 \pm 2.53(\%)$,基线区间为 $4.59-14.71(\%)$ 。图 10b 显示了对照组中整合素 $\beta 3$ 亚基表达水平的分布。

发明详述

除非另有说明,所有技术和科学术语都具有本领域所知的常见含义。所有专利、专利申请、公开出版物、序列、以及其他公开材料均援引加入本文,除非另有说明。

在本发明中,经研究发现含有某些 β 亚基的整合素在 VTE 血栓形成中发挥着重要的作用,是静脉血栓蛋白网络的核心蛋白。其中所述整合素包括 $\beta 1-3$ 亚族的整合素。在这一发现的基础上,本发明提供了一种新的诊断或者治疗静脉血栓栓塞的方法,其中包括检测或者调节对象血液样品中的整合素 $\beta 1$ 亚基、整合素 $\beta 2$ 亚基、和/或整合素 $\beta 3$ 亚基的水平。另外,本发明还涉及能够特异性地结合、检测、或者调节整合素 β 亚基的物质,以及所述物质在制备用于诊断 VTE 的试剂盒中的用途。

术语“血栓”是指在血管中形成的血块,其会妨碍或阻断血流。当血管受损时,血液中的血小板和某些蛋白(如纤维蛋白、纤维蛋白原、血清蛋白和细胞骨架蛋白等)会聚集形成血块来修补损伤部位。但如果血块脱落其就可能成为血栓。

术语“静脉血栓栓塞”是指在静脉中形成的血栓的总称,其包括肺动脉血栓栓塞症(PE)和深静脉血栓形成(DVT),其中 PE 包括急性肺栓塞(APE)、慢性血栓栓塞性肺动脉高压(CTEPH)。深静脉血栓形成包括急性和慢性深静脉血栓形成。

术语“整合素”是指一类细胞表面受体蛋白。此类蛋白为异二聚体，其含有两个不同的链，分别称为 α 亚基和 β 亚基。其中含有同一种 β 亚基的整合素构成了整合素 β 亚族。例如含有整合素 $\beta 1$ 亚基(又称作 CD29)的 $\beta 1$ 亚族、含有整合素 $\beta 2$ 亚基(又称作 CD18)的 $\beta 2$ 亚族、和含有整合素 $\beta 3$ 亚基(又称作 CD61)的 $\beta 3$ 亚族。其中所述 α 亚基和 β 亚基涵盖了由于差别剪接所形成的变体，例如 ITGB1 的 4 种变体。

本文所述“差别剪接”是指在同一个人 mRNA 前体中，通过不同剪接方式(即通过不同剪接位点组合外显子)而产生不同的 mRNA 剪接异构体的过程。通过可变剪接所获得的蛋白质产物互为同种型，其可能会表现出不同功能和结构特性，或者在相同细胞中由于表达水平不同而导致不同表型。

术语“对象”是指哺乳动物个体，其中优选为人类。

一方面，本发明提供了一种新的诊断静脉血栓栓塞的方法。

在一个实施方案中，本发明的方法包括检测对象血液样品中的整合素 $\beta 1$ 亚基、整合素 $\beta 2$ 亚基、和/或整合素 $\beta 3$ 亚基的水平，并将该水平的检测结果与健康对象的对照血液样品中所测量的相应水平进行对比，其中所述水平的升高是用于诊断 VTE 的表征。

对血液样品中的蛋白进行定量检测的方法是本领域内的常规技术。本领域技术人员可以根据具体需要而进行选择。例如可以使用流式细胞术、ELISA 等基于抗体的相关方法。

术语“血液样品”是指取自对象循环系统的血液组织样品，优选是取自外周静脉的血液样品。本发明的血液样品中可以含有血细胞和细胞外液(即血浆)。

本发明中的“水平升高”可以例如通过如下方法进行确定，即以一定数量的健康人群作为对照组，确定健康人群中的正常水平的范围，然后如果待测量对象的水平高于所述正常水平的范围，则认为该待测对象的水平升高。

对于健康人群中的正常水平范围，可以通过统计学方法来进行确定。例如采用 Kolmogorov-Smirnov 检验来进行正态性检验， $P > 0.05$ 时为正态分布。对于正态分布的数据，以健康人群中所测量的平均值结合其标准差($\bar{x} \pm S$)来确定正常水平范围。对于非正态分布数据，则以中位数结合统计学中的 P2.5-P97.5 来表示正常水平范围。

在本发明中，“水平升高”可以例如是指是指所测量的水平与健康对象血

液样品中的对照水平相比提高了 5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、100%甚至更高。

“健康对象”是指体检正常的对象群体。“对照水平”是指从健康对象群体中所检测的整合素相关蛋白的水平，然后取统计平均值并结合标准差用作对照水平。用于取样作为对照的健康对象群体可以例如是 50 个对象、100 个对象、150 个对象、200 个对象、250 个对象、300 个对象、500 个对象甚至更多。

本发明的方法的步骤包括，从待测对象中提取血液样品，例如外周静脉血样品。然后利用特异性结合各种整合素 β 亚基的物质例如抗体来定量地检测所述血液样品中各种整合素 β 亚基的量，其中进行定量检测的方法可以例如是流式细胞术、ELISA 等常规技术。提取若干(例如 200 个或更多)健康对象的外周血样品，用上述同样的方法来分别检测其中各种整合素 β 亚基的量，然后取统计平均值并结合标准差用作对照水平。将待测对象中所测量的各种整合素 β 亚基的量与相应的对照水平进行比较，其中各种整合素 β 亚基水平的升高是用于诊断 VTE 的表征。

在一个实施方案中，本发明的方法包括检测对象血液样品中的整合素 $\beta 1$ 亚基、整合素 $\beta 2$ 亚基、和/或整合素 $\beta 3$ 亚基中的至少两种的水平。在一个实施方案中，本发明的方法包括检测对象血液样品中的整合素 $\beta 1$ 亚基、整合素 $\beta 2$ 亚基、和/或整合素 $\beta 3$ 亚基中的至少两种的水平。在一个实施方案中，本发明的方法包括检测对象血液样品中的整合素 $\beta 1$ 亚基、整合素 $\beta 2$ 亚基、和整合素 $\beta 3$ 亚基的水平。

本发明中所述的静脉血栓栓塞可以是急性肺栓塞(APE)、慢性血栓栓塞性肺动脉高压(CTEPH)、或深静脉血栓形成(DVT)，优选是急性肺栓塞或者或深静脉血栓形成。

在一个实施方案中，本发明的方法通过使用流式细胞术来检测整合素 $\beta 1$ 亚基、整合素 $\beta 2$ 亚基、和/或整合素 $\beta 3$ 亚基的水平。

“流式细胞术”是本领域内常规的技术，其具体操作可参见相关的文献、教科书或者厂商的操作指引。例如可参见 (Loken MR (1990). *Immunofluorescence Techniques in Flow Cytometry and Sorting* (2nd ed.). Wiley. pp. 341–53)。

另一方面，本发明提供了用于特异性地检测整合素 $\beta 1$ 亚基、整合素 $\beta 2$ 亚基、和/或整合素 $\beta 3$ 亚基的水平的物质。在一个实施方案中，本发明中提供了特异性地结合整合素 $\beta 1$ 亚基、整合素 $\beta 2$ 亚基、和/或整合素 $\beta 3$ 亚基的物质，所述物质例如是抗体、配体和/或拮抗剂。在一个实施方案中，本发
5 明的抗体、配体和/或拮抗剂是经标记的。在一个实施方案中，本发明的抗体、配体和/或拮抗剂是经荧光标记的。在一个实施方案中，本发明的抗体、配体和/或拮抗剂是经藻红蛋白(PE)标记的。

整合素 $\beta 1$ 亚基的配体例如有层粘蛋白(LM)、胶原蛋白(COL)、纤连蛋白(FN)、血管细胞粘附分子-1(VCAM-1)等。整合素 $\beta 2$ 亚基的配体例如有纤维
10 蛋白原(FB)、细胞间粘附分子-1、细胞间粘附分子-2、细胞间粘附分子-2(ICAM-1、ICAM-2、ICAM-3)、X 因子、ic3b 等。整合素 $\beta 3$ 亚基的配体例如有 FB、FN、玻连蛋白(VN)、von Willebrand 因子(vWF)、凝血酶敏感蛋白(TSP)等。

另一方面，本发明涉及特异性地结合整合素 $\beta 1$ 亚基、整合素 $\beta 2$ 亚基、
15 和/或整合素 $\beta 3$ 亚基的物质在制备用于检测对象血液样品中的整合素 $\beta 1$ 亚基、整合素 $\beta 2$ 亚基、和/或整合素 $\beta 3$ 亚基的水平从而诊断静脉血栓栓塞的诊断剂中的用途。

在一个实施方案中，本发明涉及分别特异性地结合整合素 $\beta 1$ 亚基、整合素 $\beta 2$ 亚基、和/或整合素 $\beta 3$ 亚基中至少两种的物质在制备用于诊断静脉
20 血栓栓塞的诊断剂中的用途。

在一个实施方案中，本发明涉及至少两种分别特异性地结合 $\beta 1$ 亚基、整合素 $\beta 2$ 亚基、和/或整合素 $\beta 3$ 亚基中的至少两种的物质在制备用于诊断静脉血栓栓塞的组合物中的用途。

在一个实施方案中，分别特异性地结合 $\beta 1$ 亚基、整合素 $\beta 2$ 亚基、和/或整合素 $\beta 3$ 亚基中的至少两种的物质是指至少两种不同的物质，其中一种
25 物质特异性地结合 $\beta 1$ 亚基、整合素 $\beta 2$ 亚基、或整合素 $\beta 3$ 亚基中的一种，而另一种物质特异性地结合 $\beta 1$ 亚基、整合素 $\beta 2$ 亚基、或整合素 $\beta 3$ 亚基中的另一种。

在一个实施方案中，本发明涉及分别特异性地结合 $\beta 1$ 亚基、整合素 $\beta 2$ 亚基、和整合素 $\beta 3$ 亚基的物质在制备用于诊断静脉血栓栓塞的组合物中的
30 用途。

在一个实施方案中，分别特异性地结合 $\beta 1$ 亚基、整合素 $\beta 2$ 亚基、和整合素 $\beta 3$ 亚基的物质是指至少三种不同的物质，其中第一种物质特异性地结合 $\beta 1$ 亚基、整合素 $\beta 2$ 亚基、或整合素 $\beta 3$ 亚基中的一种，第二种物质特异性地结合 $\beta 1$ 亚基、整合素 $\beta 2$ 亚基、或整合素 $\beta 3$ 亚基中的第二种，而第三种物质特异性地结合 $\beta 1$ 亚基、整合素 $\beta 2$ 亚基、或整合素 $\beta 3$ 亚基中的第三种。

在一个实施方案中，能够特异性地结合整合素 $\beta 1$ 亚基、整合素 $\beta 2$ 亚基、和/或整合素 $\beta 3$ 亚基从而可用于特异性的检测血液样品中整合素 $\beta 1$ 亚基、整合素 $\beta 2$ 亚基、和/或整合素 $\beta 3$ 亚基水平的物质是抗体、拮抗剂和/或配体，优选经标记的抗体、拮抗剂和/或配体。在一个实施方案中，本发明的抗体、拮抗剂和/或配体经荧光标记，例如经藻红蛋白(PE)标记。

另一方面，本发明提供了用于诊断静脉血栓栓塞的试剂盒，其含有用于特异性地检测整合素 $\beta 1$ 亚基、整合素 $\beta 2$ 亚基、和/或整合素 $\beta 3$ 亚基的水平物质，其中所述物质是能够特异性地结合整合素 $\beta 1$ 亚基、整合素 $\beta 2$ 亚基、和/或整合素 $\beta 3$ 亚基的物质。

在一个实施方案中，本发明的试剂盒包括特异性地结合整合素 $\beta 1$ 亚基、整合素 $\beta 2$ 亚基、和/或整合素 $\beta 3$ 亚基中的至少两种的物质。

在一个实施方案中，本发明的试剂盒包括分别特异性地结合整合素 $\beta 1$ 亚基、整合素 $\beta 2$ 亚基、或整合素 $\beta 3$ 亚基中的至少两种的物质。

在一个实施方案中，本发明的试剂盒包括分别特异性地结合整合素 $\beta 1$ 亚基、整合素 $\beta 2$ 亚基、和整合素 $\beta 3$ 亚基的物质。

在另一个发明，本发明还涉及整合素 $\beta 1$ 亚基、整合素 $\beta 2$ 亚基、和/或整合素 $\beta 3$ 亚基的配体、抗体、拮抗剂和/或活性抑制剂。

本发明中所用的术语“配体”、“抗体”、“拮抗剂”、“活性抑制剂”等是本领域所常用的术语，其含义符合本领域技术人员一般的理解，也可以参考常用的教科书和手册对其的定义。

在本发明中，分别特异性地结合 $\beta 1$ 亚基、整合素 $\beta 2$ 亚基、和/或整合素 $\beta 3$ 亚基中的至少两种的物质是指至少两种不同的物质，其中一种物质特异性地结合 $\beta 1$ 亚基、整合素 $\beta 2$ 亚基、或整合素 $\beta 3$ 亚基中的一种，而另一种物质特异性地结合 $\beta 1$ 亚基、整合素 $\beta 2$ 亚基、或整合素 $\beta 3$ 亚基中的另一种。而分别特异性地结合 $\beta 1$ 亚基、整合素 $\beta 2$ 亚基、和整合素 $\beta 3$ 亚基的物

质是指至少三种不同的物质，其中第一种物质特异性地结合 $\beta 1$ 亚基、整合素 $\beta 2$ 亚基、或整合素 $\beta 3$ 亚基中的一种，第二种物质特异性地结合 $\beta 1$ 亚基、整合素 $\beta 2$ 亚基、或整合素 $\beta 3$ 亚基中的第二种，而第三种物质特异性地结合 $\beta 1$ 亚基、整合素 $\beta 2$ 亚基、或整合素 $\beta 3$ 亚基中的第三种。

5 在另一个方面，本发明还涉及使用本发明的方法进行诊断的装置。例如可以进行临床快速诊断的装置。

实施例

10 本发明将通过如下实施例来进行具体的描述。这些实施例仅仅是用于示例性的目的，而并非对本发明的范围进行限定。本发明具体包括如下实施例：

实施例 1：用导管取样急性 VTE 血栓：

15 采用股静脉穿刺法，用 7F 右冠状动脉导管(Metronic,USA)分别从一例 39 岁男性急性 PE(APE)患者肺动脉内和从一例男性 50 岁急性下肢股静脉内 (ADVT)取血栓长度 5-15mm、10g 的红色血栓 3-5 条，将所取得的新鲜血栓用于下述实施例中的串联蛋白质谱分析。

实施例 2：串联蛋白质谱检测及数据信息分析方法：

1. 方法学：

20 串联蛋白质谱(MS/MS)检测及数据信息分析方法的流程图：

急性 PE、DVT 血栓——MS/MS(型号 LTQ, Thermo Finnigan USA)——数据库——检索蛋白——相应基因——GO(Gene Oncology)分析——差异基因——差异蛋白——KEGG Pathway 分析——Gene Network 分析——鉴定网络核心蛋白。

25 1.1 对血栓蛋白鸟枪(shotgun)实验，将得出的肽段数据进行生物信息学分析，精确鉴定肽片段所对应的蛋白，并对该蛋白进行功能分类及生物学通路分析。

1.2 GO 分析：

30 GO 数据库包含了基因参与的生物过程、其所处的细胞位置、其所发挥的分子功能三方面的功能信息。差异表达蛋白被用作 GO 分析的输入。差异基因分别向 GO 数据库的各节点映射。计算每个节点的基因数目。

1.3 KEGG Pathway 分析方法:

对差异表达蛋白进行 KEGG pathway 分析。

1.4. Gene Network 分析方法:

整合 3 种不同的相互作用关系: (1) KEGG 数据库中基因之间的蛋白互
5 作用、基因调控、蛋白修饰等关系; (2) 已有的高通量实验; (3) 已有的文献
报道中提到的基因之间的相互作用。

通过 R(<http://www.r-project.org/>) 下的 KEGGSOAP 软件包
(<http://www.bioconductor.org/packages/2.4/bioc/html/KEGGSOAP.html>) , 对
10 KEGG 数据库中信号通路数据进行分析, 以鉴别基因组范围内的基因之间的
的相互作用, 包括 3 种关系:

ECrel 酶-酶关系, 表明催化相继的反应步骤(successive reaction
steps)的两种酶

PPrel 蛋白-蛋白相互作用, 如结合以及修饰

GErel 基因表达相互作用, 表明转录因子和靶基因产物之间的关系

蛋白 - 蛋白之间的相互作用数据可得自 MIPS 数据
(<http://mips.helmholtz-muenchen.de/proj/ppi/>)。采用共引用(co-citation)算法,
15 具体方法为: 下载 PubMed 数据库的文献摘要, 将每个摘要分解为句子, 然
后分析每个句子中共同存在的基因名称, 即共引用的基因。对于每对共引
用的基因对, 统计该基因对出现的频率。基因对出现的频率越高, 则该对
基因之间存在相互作用的可能性越大。将 PubMed 数据库文献总数记作 N ,
基因对中的两个基因在 PubMed 文献数据库中分别独立出现的频率, 分别记
20 作 m 、 n 。实际基因对同时出现的次数为 k , 基于超几何分布(hypergeometric
distribution), 计算出在完全随机的条件下出现大于 k 次共引用的概率:

$$p = 1 - \sum_{i=0}^{k-1} p(i | n, m, N)$$

其中

$$p(i | n, m, N) = \frac{n! (N-n)! m! (N-m)!}{(n-i)! i! (n-m)! (N-n-m+i)! N!}$$

最后基于数据结果, 将其整合为基因间的相互关系网络(network)。该关

系网络通过 medusa 软件进行图形展示。

2. 质谱步骤及数据分析:

将实施例 1 中所取得的 APE、ADVT 血栓样品分别进行质谱分析, 质谱
5 型号为 LTQ(Thermo Finnigan USA)。

2.1 LC-MS/MS

应用 Ettan™ MDLC 系统(GE Healthcare)进行胰蛋白酶混合物的脱盐
以及分离。在此系统中, 将样品在 RP 捕获柱(RP trap column, Zorbax 300 SB
10 C18, Agilent Technologies)上脱盐, 继而在 RP 柱(150 μ m i.d., 100 mm 长,
ColumnTechnology Inc., Fremont, CA)上分离。选择了移动相 A(HPLC-级的
水中的 0.1%甲酸)和移动相 B(乙腈中的 0.1%甲酸)。将 20 μ g 的胰蛋白酶
混合物上样至柱上, 通过使用 4-50% B 的线性梯度以 2 μ L/min 的流速进行
120 分钟来完成分离。将装备有电喷射界面的 Finnigan™ LTQ™ 线性离子捕
15 获 MS (Thermo Electron)连接至所述的 LC 装置用于检测洗脱的肽。同时获
得了数据依赖性的 MS/MS 波谱。每个扫描循环由如下所组成: 一个完整的
Profile 模式 MS 扫描、随后是 5 个 Centroid 模式的 MS/MS 扫描, 其中 Dynamic
Exclusion™ 设置如下: 重复计数 2, 重复时间 30 s, 排除时间 90 s。每种样
品一式三份进行分析。

2.1 数据分析

使用BioworksBrowser rev. 3.1(Thermo Electron, San Jose, CA.)针对非冗
余International Protein Index (IPI)人类蛋白数据库(版本3.26, 67687条目)对
MS/MS波谱进行自动搜寻。用BuildSummary从SEQUEST输出文件中提取蛋
白鉴定的结果(Dai J, Shieh CH, Sheng QH, Zhou H, Zeng R: Proteomic
25 analysis with integrated multiple dimensional liquid chromatography/mass
spectrometry based on elution of ion exchange column using pH steps. *Anal
Chem*)。

将肽限制在胰蛋白酶肽的形式并且允许最多两个丢失的裂缝。半胱氨酸
的氨甲酰甲基化被视为固定修饰, 而甲硫氨酸残基的氧化被看作是可变修
30 饰。所允许的质量公差(mass tolerance)分别是: 前体离子为2.0 Da、而片段
离子为0.8 Da。蛋白的鉴定标准是基于Delta CN (≥ 0.1)和交叉相关得分(Xcorr,

一个电荷 ≥ 1.9 , 两个电荷 ≥ 2.2 , 三个电荷 ≥ 3.75)。

3. 结果及分析:

将结果送交上海敏芯信息科技有限公司(中国上海)进行如下生物信息学分析: (来自实施例 1 中 APE 患者的样品的制备、蛋白样品鸟枪法预分离结果见图 1, 酶解肽段、碎片序列信息见图 2)基于数据库——检索蛋白——鉴别相应基因——进行 Gene Oncology(GO)分析——鉴别差异基因——鉴别差异蛋白——进行 KEGG Pathway 的信号通路分析——得到蛋白相互作用网络——鉴别网络核心蛋白。

结果:

(1) GO 分析方法: 差异表达蛋白被用作 GO 分析的输入。差异基因分别向 gene ontology 数据库的各节点映射。计算每个节点的基因数目。统计结果如下:

表 1: APE 血栓样品 GO 分析结果 (柱状图示于图 3)

功能范畴	蛋白计数	富集程度 p-值
细胞循环和增殖	20	0.002718086
应激反应	40	4.62E-11
转运	52	3.74E-07
RNA 代谢	14	0.999999301
DNA 代谢	4	0.925590145
蛋白代谢	17	0.394000101
其它代谢过程	23	0.000119964
发育过程	6	0.183137052
细胞组构和生物发生	82	9.92E-13
细胞-细胞信号	17	0.686695527
信号转导	45	0.998147085
细胞粘附	8	2.58E-08
死亡	9	0.353211866
其它生物学过程	99	0.984977572
未知	32	0.873823656

表 2: AVDT 血栓样品 GO 分析结果 (柱状图示于图 5)

功能范畴	蛋白计数	富集程度 p-值
细胞循环和增殖	6	0.091311
应激反应	28	7.98E-07
转运	32	1.90E-05
RNA 代谢	4	0.999605
蛋白代谢	2	0.06044
其它代谢过程	18	0.08507
发育过程	2	0.239812
细胞组构和生物发生	43	1.21E-06
细胞-细胞信号	1	0.580049
信号转导	20	0.998072
细胞粘附	5	0.000131
死亡	9	0.46574
其它生物学过程	27	0.794559

(2) KEGG 信号通路分析:将基因使用 GenMAPP v2.1 向 KEGG Pathway 数据库映射,并统计基因在每个 pathway 中的富集程度(p-值)。对于 APE 血栓样品,共找到 35 个相关的信号通路。而对于 AVDT 血栓样品,共找到 94 个相关的信号通路。

5 (3) 蛋白相互作用网络分析:同时整合 3 类不同的相互作用关系来得到蛋白相互作用的网络,即(a) KEGG 信号通路分析数据中的蛋白互做用、基因调控、蛋白修饰等关系;(b) 已有的高通量实验,如酵母双杂交等证实的蛋白-蛋白相互作用;(c)已有文献报道的中提到的基因之间和蛋白之间的相互作用。

10 APE 血栓样品生物信息学分析结果见图 3 和 4。该结果表明 $\beta 2$ 、 $\beta 3$ 和 $\beta 1$ 亚基整合素是红色血栓的核心蛋白。

AVDT 血栓样品生物信息学分析结果见图 5 和 6。该结果表明 $\beta 3$ 亚基整合素和 ITGA2B(即整合素 α 链 IIb)是红色血栓的核心蛋白。

15 实施例 3: 急性 VTE 患者血栓串联蛋白质谱分析:

1. 临床测试对象的背景资料:

(1) 24 例 VTE 为患者组,经影像学(CTA,MRA,肺部通气/灌注扫描、

血管造影或下肢静脉血管超声)检查证实患有 VTE。

其中男性 12 人, 女性 12 人, 年龄 25-82 岁, 平均年龄 62 ± 16 岁。8 人为急性 VTE(发病 1 个月内); 9 例亚急性 VTE(发病 1-3 个月内); 7 例慢性 VTE(发病 3 个月以上), 其中 4 例为 CTEPH 临床症状加重的再入院患者。8 例急性期 VTE 入院患者均采用低分子肝素皮下注射 5000 单位/Bid, 7-10 天, 停用低分子肝素的前 3-4 天, 口服华法林 2.5mg/Qd; 9 例入院的亚急性期 VTE 患者, 低分子肝素皮下注射 5000 单位/ Qd, 7 天, 或/和口服华法林 2.5mg/Qd; 4 例再入院 CTEPH 患者按亚急性期抗凝治疗, 其他 3 例慢性期的 VTE 患者门诊随访, 口服华法林 2.5mg/Qd 持续治疗。本研究检测过程中, 24 例 VTE 患者均未发现恶性肿瘤, 自身免疫性疾病和动脉血栓性疾病。

(2) 体检健康者 270 例作为对照组。其中男性 140 人(年龄 20-75 岁), 20-39 岁组 49 人, 40-59 岁组 48 人, 60 岁以上组 43 人; 女性 130 人(年龄 21-72 岁), 20-39 岁组 46 人, 40-59 岁组 44 人, 60 岁以上组 40 人。

PE、DVT 的诊断均有具有影像学(CT、MRA、ECT 或血管造影)证据和临床表现, 标准可参照(Torbicki A, Perrier A, Konstantinides S, et al. Guidelines on the diagnosis and management of acute pulmonary embolism: the Task Force for the Diagnosis and Management of Acute Pulmonary Embolism of the European Society of Cardiology (ESC)[J]. *Eur Heart J*, 2008, 29(18):2276-2315; 以及 Qaseem A, Snow V, Barry P, et al. Current diagnosis of venous thromboembolism in primary care: a clinical practice guideline from the American Academy of Family Physicians and the American College of Physicians[J]. *Ann Intern Med*, 2007, 146(6):454-458)。

2. 整合素 β 分子检测

(1) 从对象中(VTE 患者、或对照)外周静脉血 2ml, 在试验管中加入 EDTA 2mg 抗凝和 20 μ l 荧光抗体; 其中抗体分别为: 针对整合素 $\beta 1$ 亚基(CD29)的抗体为 PE 标记, 类型为鼠抗人 IgG2a, κ , 克隆号 HUTS-21, 浓度为 50mg/L; 针对整合素 $\beta 2$ 亚基(CD18)的抗体为 PE 标记, 类型为鼠抗人 IgG1, κ , 克隆

号 6.7, 浓度为 50mg/L; 针对整合素 $\beta 2$ 亚基(CD61)的抗体为 PE 标记, 类型为鼠抗人 IgG1, κ , 克隆号 VI-PL2, 浓度为 50mg/L; CD29-PE($\beta 1$)、CD18-PE($\beta 2$)、CD61-PE($\beta 3$)荧光抗体可得自美国 BD 公司(Becton, Dickinson and Company, 美国);

5 (2)加样后充分混匀于室温下避光反应 30 分钟;

(3)在试验管中加入溶血素 500 μ l; 其中所使用的溶血素用于溶解红细胞, 型号为 OptiLyse C, 可得自美国 Beckman-Coulter 公司。

(4)37 $^{\circ}$ C 水浴 30 分钟;

10 (5)洗涤后加入 100 μ l 缓冲液(0.01M 的 PBS, PH7.2), 进行流式细胞仪检测。其中使用美国 BECKMAN-COULTER 公司 EPICS XL-4 型流式细胞仪;

3. 细胞免疫及整合素流式检测操作流程:

15 (1) 实验时在试管中加入 EDTA 2mg 抗凝血, 同时设置同型对照管, 按荧光标记不同分别加入 20 μ l 小鼠 IgG1-PC5、IgG1-FITC、IgG1-PE(CD29 分子检测加入 20 μ l 小鼠 IgG2-PE, 50mg/L), 再分别加入相应的荧光抗体 20 μ l (50mg/L)。充分混匀后至于室温下避光反应 30 分钟。然后加入溶血素型号 OptiLyse C (美国 BECKMAN-COULTER 公司产品)500 μ l, 置于 37 $^{\circ}$ C 水浴箱反应 30 分钟。取出后经过洗涤, 每管加入 500 μ l 鞘液(含活性成分为硫酸钠 9.84g/L, 氯化钠 4.07 g/L, 盐酸普鲁卡因 0.11 g/L), 得自美国 Beckman-Coulter 20 公司。随后进行流式细胞仪(美国 BECKMAN-COULTER 公司产品, 型号 EPICS XL-4)检测。

25 (2) 以 BECKMAN-COULTER 标准荧光微球调节流式细胞仪 PMT 电压、荧光补偿、灵敏度, 设定检测方案。每管收集 10000 个细胞。以同型对照管散点图中对应细胞群设门, 根据标记的荧光所相对应的象限确定阳性细胞百分比(%). 使用流式细胞仪自带的 SYSTEM-II 软件对结果进行分析。

30 4.统计学分析: 对照组采用 SPSS18 统计学软件进行统计分析。正态性检验采用 Kolmogorov-Smirnov 检验, $P>0.05$ 时为正态分布。正态分布数据以 $\bar{x} \pm S$ 表示, 不同年龄段组间比较采用方差分析, $P<0.05$ 表示

差异有统计学意义。非正态分布数据以中位数和 P2.5-P97.5 表示, 不同性别组间比较采用 Wilcoxon 秩和检验, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义; 不同年龄组间比较采用 Kruskal-Wallis H 检验, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

- 5 对于正态分布的数据, 以健康人群中所测量的平均值结合其标准差 ($\bar{x} \pm S$) 来确定正常水平范围。对于非正态分布数据, 则以中位数结合统计学中的 P2.5-P97.5 来表示正常水平范围。

VTE 组 $\beta 1$ 、 $\beta 2$ 和 $\beta 3$ 与对照组比较, 高于正常参考区间值视为表达增加。

10

5. 结果:

- 15 结果以总细胞计数中显示含有相应整合素亚基的细胞(阳性细胞)的百分比来表示(即, 以 10000 个细胞为单位, 阳性细胞占的百分比)。参见图 7-10 以及下表 3。270 例对照组, 整合素 $\beta 1$ 、 $\beta 3$ 亚基呈正态性分布, 整合素 $\beta 2$ 亚基呈非正态性分布。不同性别之间结果比较无显著性差异, 随年龄增加 $\beta 1$ 、 $\beta 3$ 有下降趋势; 整合素 $\beta 1$ 亚基基线区间为 2.8-13.56%, 整合素 $\beta 2$ 亚基基线区间为 71.1-95.8%; 整合素 $\beta 3$ 亚基基线区间为 4.59-14.71%。

表 3: VTE 患者的信息及检测结果

序号	性别	年龄	诊断	类别	诊断 方法	$\beta 1$ 2.8-13.56%	$\beta 2$ 70.1-95.8%	$\beta 3$ 4.59-14.71%	D-di <0.3mg/L	CRP <2.87mg/L	Fibrinogen 2-4.5g/L
1	男	82	下肢 DVT	亚急性期	超声	11.37	97.5 ↑	14.5	1.06 ↑	132 ↑	4.613 ↑
2	男	56	PE/下肢 DVT	亚急性期	CTA/ 超声	6.81	76.3	15.9 ↑	0.47 ↑	20.8 ↑	4.761 ↑
3	男	33	PE	亚急性期	CTA	11.4	75	18.9 ↑	0.22	51.8 ↑	4.553 ↑
4	女	58	下肢 DVT	慢性期	超声	21.6 ↑	66.8	8.63	0.05		2.863
5	女	66	CTEPH	慢性期	CTA	12.8	96.4 ↑	12.9	0.05	0.3	3.25
6	女	54	下肢 DVT	亚急性期	超声	18.5 ↑	85	18.8 ↑	0.7 ↑	0.7	2.56
7	女	56	下肢 DVT	慢性期	超声	10.1	94.7	16 ↑	0.05	0.7	3.65
8	男	68	CTEPH	慢性期	CTA	7.27	98.2 ↑	12.3	0.14	24.7 ↑	3.825
9	女	25	PE	亚急性期	CTA	5.8	94.2	16.9 ↑	0.35 ↑	36 ↑	2.761 ↑
10	女	82	PE	亚急性期 I	CTA	17.3 ↑	99.5 ↑	5.6	0.05	0.2	2.495
11	男	65	下肢 DVT	亚急性期	超声	14.5 ↑	96.8 ↑	9.85	0.05	1.7	3.04
12	女	61	PE	急性期	CTA	4.5	96.4 ↑	17.3 ↑			2.495
13	男	71	PE	急性期	PAG	14.3 ↑	95.6	13.1	1.48 ↑	16.4 ↑	3.761
14	女	81	PE	慢性期	CTA	10.2	96.7 ↑	7.4	0.08		3.383
15	男	49	PE	急性期	CTA	15.4 ↑	90.1	14.6			
16	女	53	PE	急性期	肺通气灌注	13.1	97.2 ↑	6.4	1.25 ↑	0.6	3.576
17	男	71	PE	急性期	CTA	17.52 ↑	98.2 ↑	19 ↑	0.24	0.7	2.714
18	男	80	CTEPH	慢性期	通气灌注扫描	23.5 ↑	99.4 ↑	18.7 ↑	0.75 ↑	32 ↑	3.264
19	女	75	PE	急性期	通气灌注扫描	6.27	94.7	15.4 ↑	0.64 ↑	2.6	2.11
20	女	78	PE	急性期	通气灌注扫描	6.92	96.9 ↑	13.4	0.96 ↑	38 ↑	4.481
21	男	64	下肢 DVT	亚急性期	超声	14.5 ↑	96.8 ↑	9.85	0.05		3.04
22	女	80	CTEPH	慢性期	CTA	17.3 ↑	99.5 ↑	5.6	0.09	2	2.607
23	男	48	PE	急性期	CTA	15.49 ↑	90.1	14.6	0.89 ↑	4 ↑	2.00
24	男	32	PE	亚急性期	CTA	11.4	75	18.9 ↑	0.25	92 ↑	4.533 ↑
合计:		62 ± 16				12.83 ± 5.07	91.96 ± 9.28	13.52 ± 4.94			

注: 4 例 CTEPH 患者, 心脏超声收缩压 65-74mmHg 之间; 序号 4、7、14 号为门诊随访患者

本研究 24 例急性期、亚急性期和慢性期的 VTE 患者，尽管抗凝方案不同，抗凝时间长短不同，24 例 VTE 患者整合素 β 亚基均单项或联合表达高于健康人群区间的上限值。其中 15/24 例(62.5%)VTE 患者整合素 β 亚基单项表达升高，11/24 例(45.8%)整合素 $\beta 1$ 亚基升高，急性期 4/11 例，亚急性期 4/11 例，慢性期 3/11 例；13/24 例(54.2%)整合素 $\beta 2$ 亚基升高，急性期 4/13 例，亚急性期 4/13 例，慢性期 5/13 例；10/24 例(41.7%)整合素 $\beta 3$ 亚基升高，急性期 3/10 例，亚急性期 6/10 例，慢性期 1/10 例。9/24 例整合素 β 亚基两项以上联合升高(37.5%)，其中 $\beta 1, \beta 2$ 和 $\beta 3$ 共同升高 3/24 例(12.5%)， $\beta 1$ 和 $\beta 2$ 共同升高 6/24 例(25%)， $\beta 1$ 和 $\beta 3$ 共同升高 1/24 例(4.2%)， $\beta 2$ 和 $\beta 3$ 共同升高 1/24 例(4.2%)。上述细胞学检测结果表明 VTE 患者整合素 β 亚族高表达可用于对 VTE 进行诊断。

上述实施例中的结果表明，健康人群血细胞整合素 $\beta 1$ 、 $\beta 2$ 和 $\beta 3$ 亚基的表达是可以检测的， $\beta 1$ 和 $\beta 3$ 亚基的表达呈正态分布， $\beta 2$ 亚基的表达呈非正态分布。性别之间无统计学差异。随年龄增加 $\beta 1$ 和 $\beta 3$ 亚基的表达呈下降趋势。本发明中 8 例急性期、9 例亚急性期和 7 例慢性期的 VTE 患者，整合素 $\beta 1$ 、 $\beta 2$ 和 $\beta 3$ 亚基分别或联合表达升高，均高于对照组的参考区间上限，与血栓串联蛋白质谱信息分析的结果吻合。本研究 VTE 组整合素 $\beta 1$ 、 $\beta 2$ 、和/或 $\beta 3$ 亚基的表达分别或联合显著增高，表明整合素活化和信号转导作用增强，VTE 患者整合素 $\beta 1$ 、 $\beta 2$ 、 $\beta 3$ 亚基在持续抗凝治疗过程中的高表达，表明其稳定性，敏感性和特异性，同时也表明患者仍处于易栓状态。

权 利 要 求 书

1. 特异性地结合整合素 $\beta 1$ 亚基、整合素 $\beta 2$ 亚基、和/或整合素 $\beta 3$ 亚基的物质在制备用于检测对象血液样品例如外周静脉血样品中的整合素 $\beta 1$ 亚基、整合素 $\beta 2$ 亚基、和/或整合素 $\beta 3$ 亚基的水平从而诊断静脉血栓栓塞(VTE)的诊断剂中的用途。

2. 权利要求 1 的用途，其中所述诊断剂包括至少一种分别特异性地结合整合素 $\beta 1$ 亚基、整合素 $\beta 2$ 亚基、和/或整合素 $\beta 3$ 亚基中的至少一种的物质，其中优选所述诊断剂包括分别特异性地结合整合素 $\beta 1$ 亚基、整合素 $\beta 2$ 亚基、和整合素 $\beta 3$ 亚基的物质。

3. 权利要求 1 的用途，其中所述静脉血栓栓塞是急性肺栓塞(APE)、慢性血栓栓塞性肺动脉高压(CTEPH)、或深静脉血栓形成(DVT)，优选是急性肺栓塞或急性深静脉血栓形成。

4. 权利要求 1-3 中任一项的用途，其中所述物质为抗体、配体、和/或拮抗剂，优选是经标记的抗体、配体、和/或拮抗剂。

5. 权利要求 4 的用途，其中所述抗体、配体、和/或拮抗剂是经荧光标记的，例如经藻红蛋白(PE)标记。

6. 一种检测对象血液样品例如外周静脉血样品中的整合素 $\beta 1$ 亚基、整合素 $\beta 2$ 亚基、和/或整合素 $\beta 3$ 亚基的水平从而诊断静脉血栓栓塞(VTE)的试剂盒，其含有分别特异性地结合整合素 $\beta 1$ 亚基、整合素 $\beta 2$ 亚基、和/或整合素 $\beta 3$ 亚基的物质。

7. 权利要求 6 的试剂盒，其中包括至少两种分别特异性地结合整合素 $\beta 1$ 亚基、整合素 $\beta 2$ 亚基、和/或整合素 $\beta 3$ 亚基中的至少一种的物质，其中优选所述试剂盒中包括分别特异性地结合整合素 $\beta 1$ 亚基、整合素 $\beta 2$ 亚基、和整合素 $\beta 3$ 亚基的物质。

8. 权利要求 6 的试剂盒，其中所述静脉血栓栓塞是急性肺栓塞(APE)、慢性血栓栓塞性肺动脉高压(CTEPH)、或深静脉血栓形成(DVT)，优选是急性肺栓塞或急性深静脉血栓形成。

9. 权利要求 6-8 中任一项的试剂盒，其中所述物质为抗体、配体、和/或拮抗剂，优选是经标记的抗体、配体、或拮抗剂。

10. 权利要求 9 的试剂盒，其中所述抗体、配体、和/或拮抗剂是经荧光标记的，例如经藻红蛋白(PE)标记。

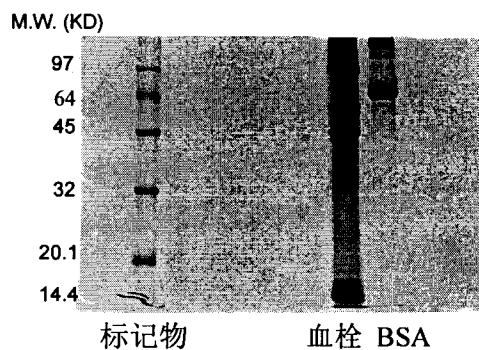


图 1

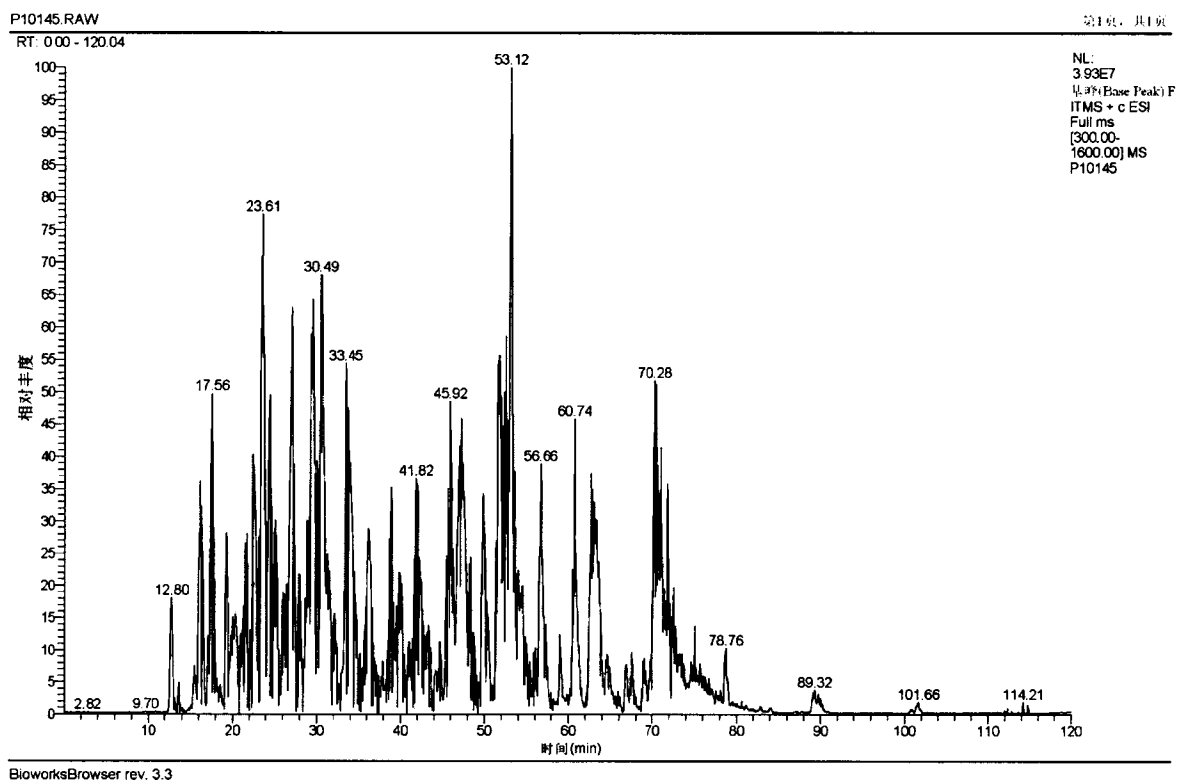


图 2

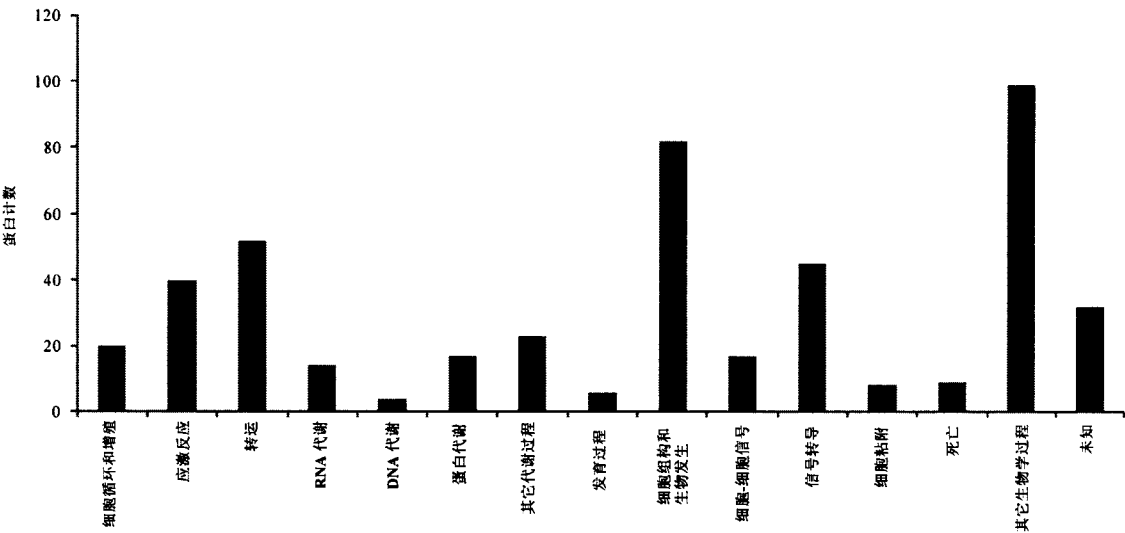


图 3

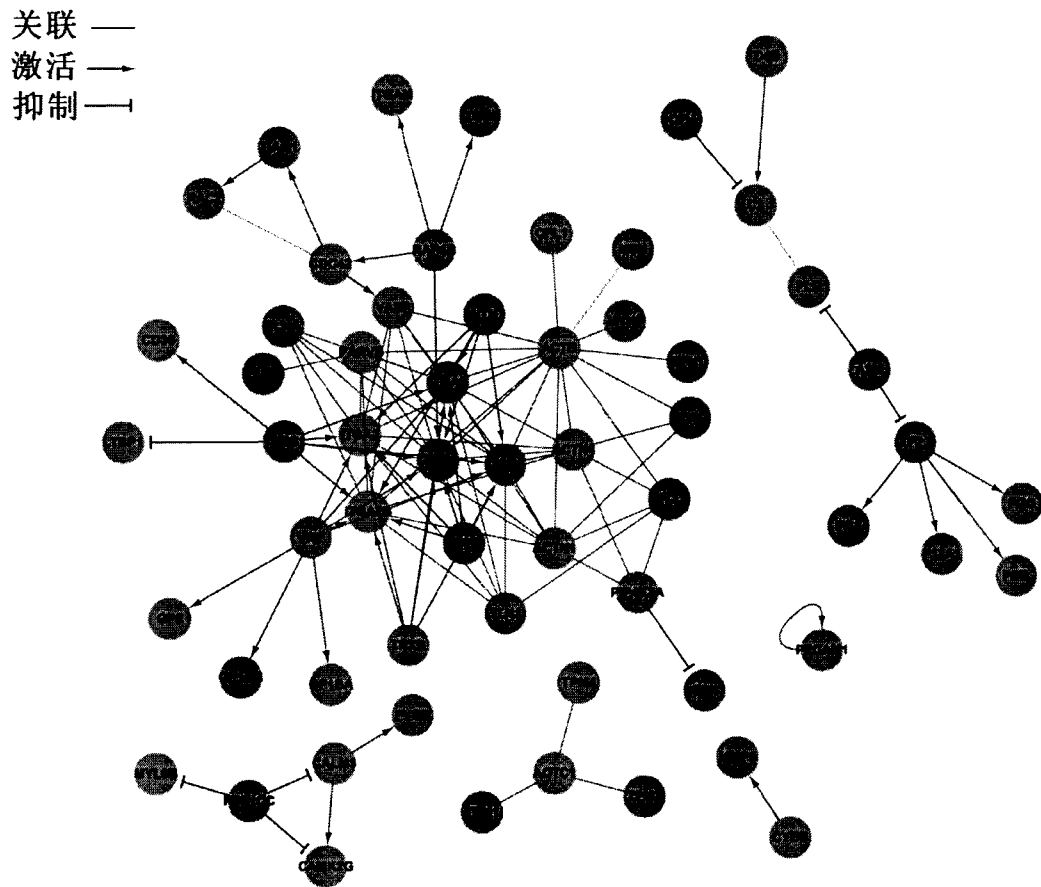


图 4

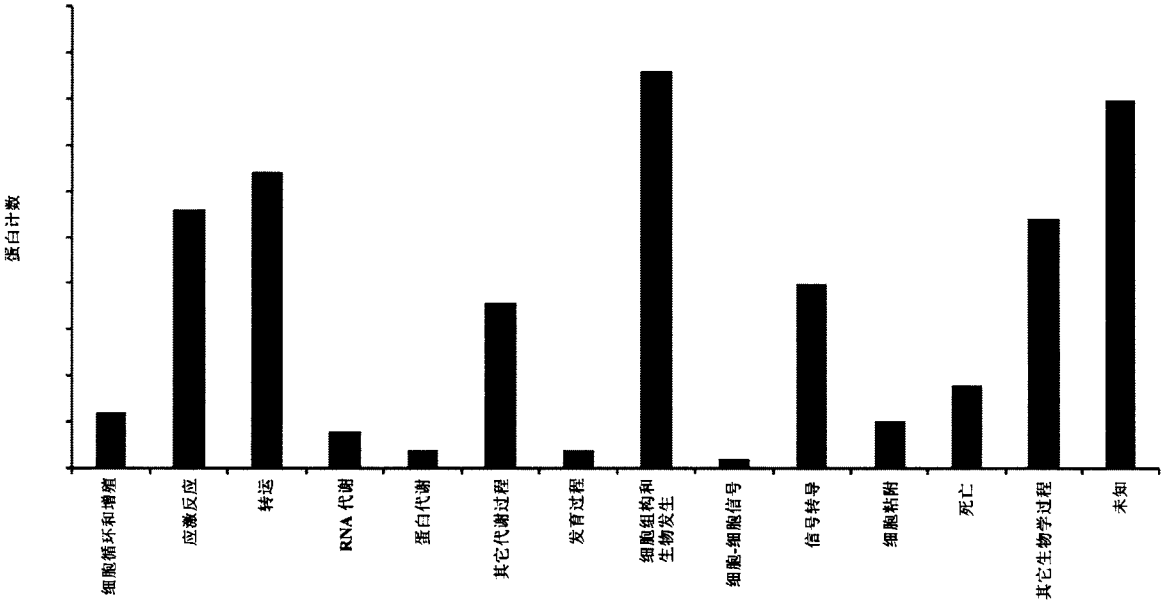


图 5

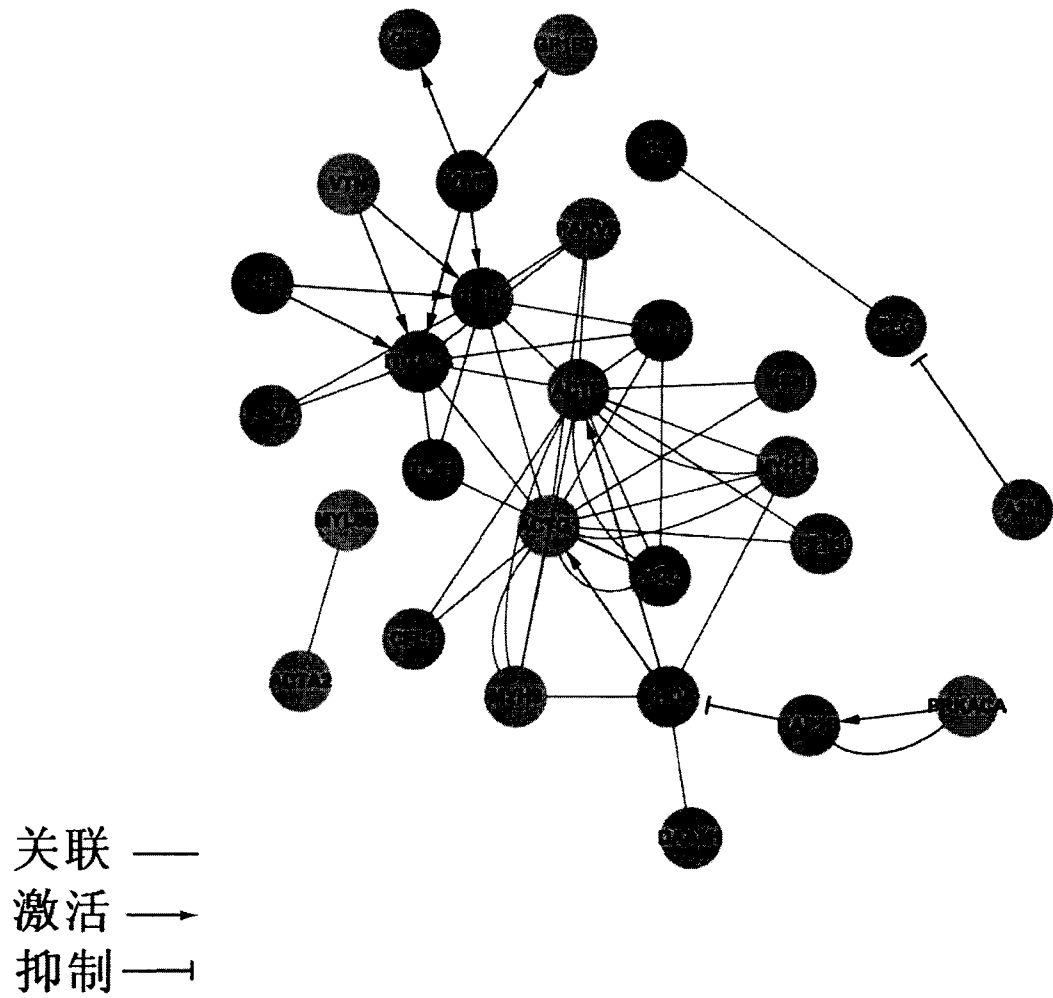


图 6

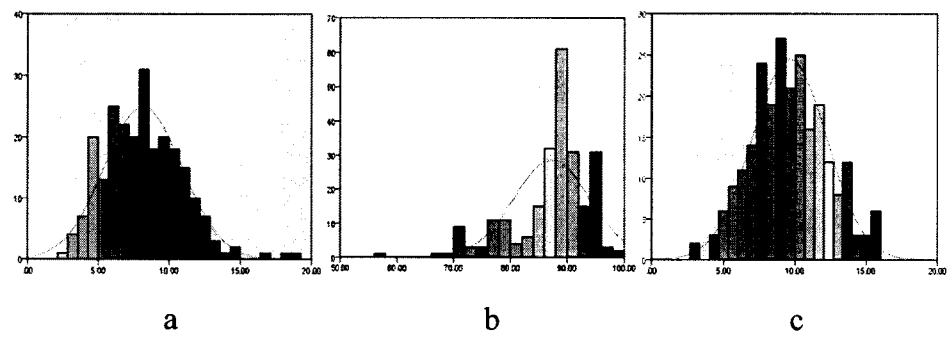


图 7

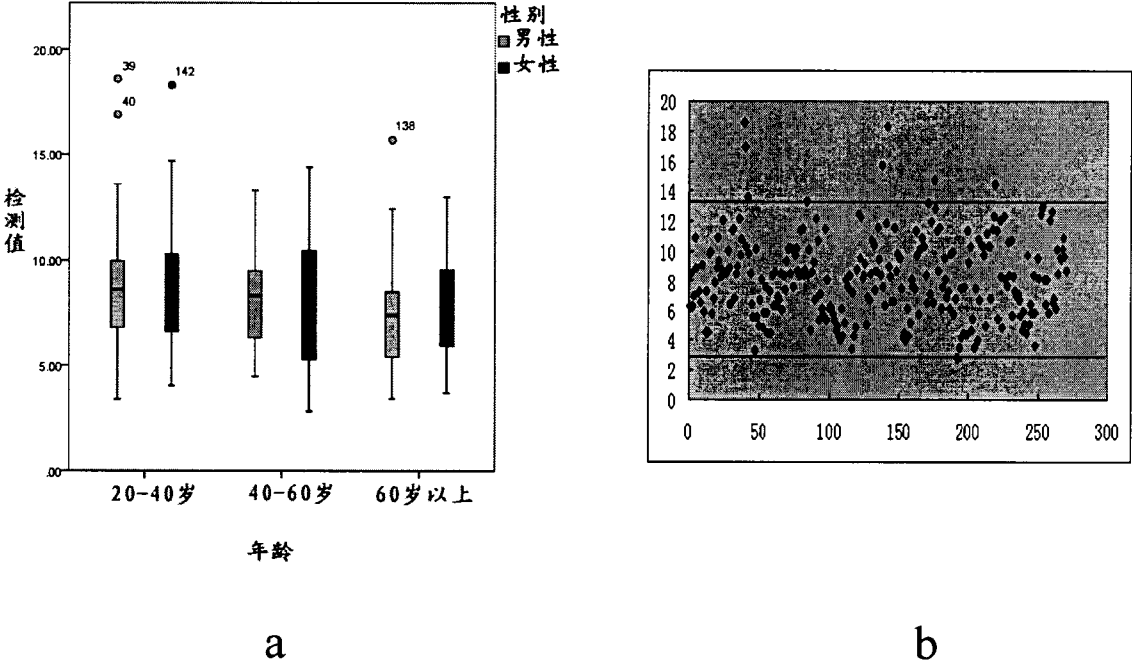
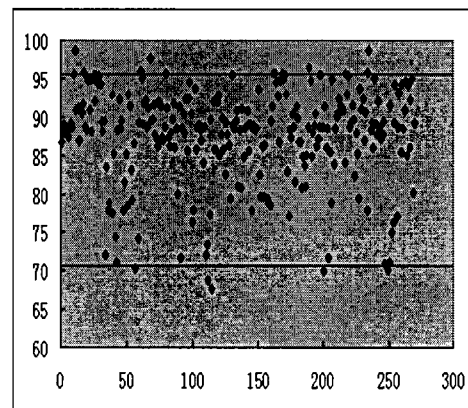
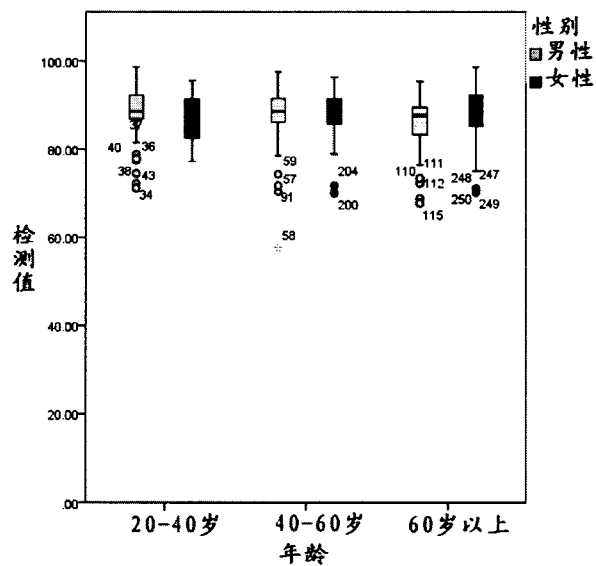


图 8

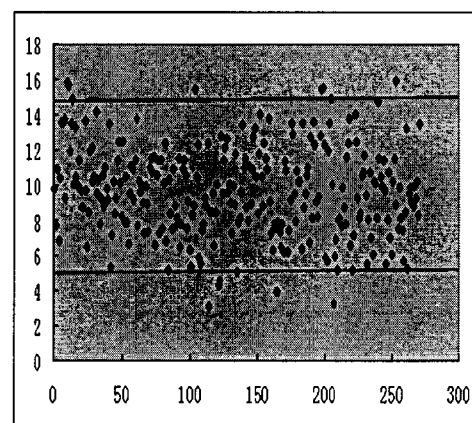
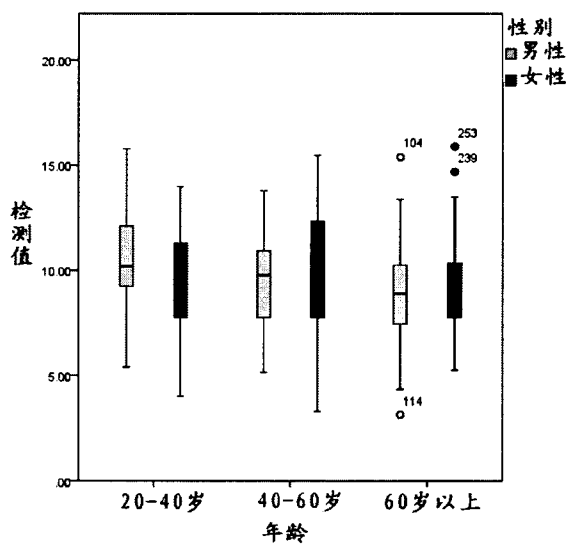


a

b

图

9



a

b

图

10

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2012/074284

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

G01N 33/533 (2006.01) i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC: G01N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

DWPI, SIPOABS, CNABS, CPRSABS, CNKI:

integrin?, ITGB1, ITGB2, ITGB3, CD18, CD29, CD61, venous thromboembolism, VTE, deep venous thrombosis, DVT, acute pulmonary embolism, APE, chronic thromboembolic pulmonary hypertension, CTEPH

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	XIE, Yuan et al., The significance of the differential expression of surface receptors mRNA of integrins in pulmonary thromboembolism patients, Chinese Journal of New Clinical Medicine, 2009, vol. 2, no. 12, pages 1227-1231.	1-10
Y	XUE, Shenwu et al., Nao Geng Sei Xue Xiao Ban Mo Ts, Lin Ba Xi Bao Mo Zheng He Su Han Liang Yu Lin Chuang, JOURNAL OF HEBEI MEDICAL UNIVERSITY, 2002, vol. 23, no. 2, pages 98-99.	1-10

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search 15 January 2013 (15.01.2013)	Date of mailing of the international search report 07 February 2013 (07.02.2013)
Name and mailing address of the ISA State Intellectual Property Office of the P. R. China No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao Haidian District, Beijing 100088, China Facsimile No. (86-10) 62019451	Authorized officer LU, Chun Telephone No. (86-10) 62411048

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2012/074284

A. 主题的分类

G01N 33/533 (2006.01) i

按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和 IPC 两种分类

B. 检索领域

检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)

IPC: G01N

包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献

在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称, 和使用的检索词(如使用))

DWPI, SIPOABS, CNABS, CPRSABS, CNKI:

整合素, 血栓, 栓塞, 栓, 静脉, 血小板, integrin?, ITGB1, ITGB2, ITGB3, CD18, CD29, CD61, venous thromboembolism, VTE, deep venous thrombosis, DVT, acute pulmonary embolism, APE, chronic thromboembolic pulmonary hypertension, CTEPH

C. 相关文件

类 型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求
Y	解元等: “PTE 患者整合素相关 mRNA 差异性表达的意义”, 中国临床新医学, 2009, 第 2 卷第 12 期, 第 1227-1231 页。	1-10
Y	薛慎伍等: “脑梗塞血小板膜 Ts、淋巴细胞膜整合素含量与临床”, 河北医科大学学报, 2002, 第 23 卷第 2 期, 第 98-99 页。	1-10

☐ 其余文件在 C 栏的续页中列出。

☐ 见同族专利附件。

* 引用文件的具体类型:

“A” 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件

“E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利

“L” 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件(如具体说明的)

“O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件

“P” 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件

“T” 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了理解发明之理论或原理的在后文件

“X” 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性

“Y” 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性

“&” 同族专利的文件

国际检索实际完成的日期
15.1 月 2013 (15.01.2013)

国际检索报告邮寄日期
07.2 月 2013 (07.02.2013)

ISA/CN 的名称和邮寄地址:
中华人民共和国国家知识产权局
中国北京市海淀区蓟门桥西土城路 6 号 100088
传真号: (86-10)62019451

受权官员

陆纯
电话号码: (86-10) **62411048**