



(10) 授权公告号 CN 113785200 B

(45) 授权公告日 2024. 12. 03

(21) 申请号 202080024586.9

(22) 申请日 2020.04.03

(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 113785200 A

(43) 申请公布日 2021.12.10

(30) 优先权数据
10-2019-0039052 2019.04.03 KR

(85) PCT国际申请进入国家阶段日
2021.09.26

(86) PCT国际申请的申请数据
PCT/KR2020/004589 2020.04.03

(87) PCT国际申请的公布数据
W02020/204665 KO 2020.10.08

(73) 专利权人 高丽大学校产学协力团
地址 韩国首尔市
专利权人 韩国科学技术院

(72) 发明人 金贤九 洪性会 朴龙 崔然皓
崔炳贤 朴志镐

(74) 专利代理机构 北京市柳沈律师事务所
11105

专利代理师 华英

(51) Int.Cl.
G01N 33/68 (2006.01)
G01N 33/574 (2006.01)
C12Q 1/6886 (2006.01)

(56) 对比文件
US 2014162888 A1, 2014.06.12
Radha Munagala等.Exosomal miRNAs as
biomarkers of recurrent lung
cancer.Tumour Biol.2016,第37卷第10703-
10714页.
Stephanie N. Hurwitz等.Proteomic
profiling of NCI-60 extracellular
vesicles uncovers common protein cargo
and cancer type-specific
biomarkers.Oncotarget.2016,第7卷(第52期),
第 86999-87015页.

审查员 马慧媛

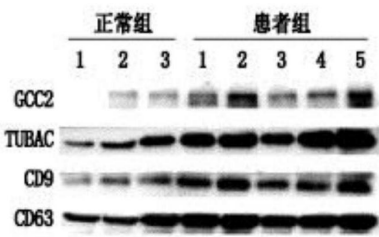
权利要求书1页 说明书6页 附图3页

(54) 发明名称

基于过表达TUBA1C蛋白的外泌体的标志物
组合物

(57) 摘要

根据本发明的一个实施方案,提供了一种用于
诊断癌症或预测预后的标志物组合物,其包含
过表达微管蛋白 α -1C链 (TUBA1C) 蛋白的外泌
体,一种试剂盒,以及一种用于提供诊断癌症或
预测预后所需信息的方法,其包括测量从生物样
品分离的外泌体中TUBA1C基因或蛋白的表达水
平的步骤。



1. 一种诊断癌症或预测预后的标志物组合物,其特征在于,包括过表达TUBA1C蛋白的外泌体;其中,所述外泌体还包括GCC2蛋白。
2. 根据权利要求1所述的诊断癌症或预测预后的标志物组合物,其特征在于,所述癌症是肺癌、胸腺癌或食管癌。
3. 一种诊断癌症或预测预后的组合物,其特征在于,包括特异性地结合至外泌体内TUBA1C基因的引物或探针,或特异性地结合至外泌体内TUBA1C蛋白的抗体;所述组合物还包括特异性地结合至外泌体内GCC2基因的引物或探针,或特异性地结合至外泌体内GCC2蛋白的抗体。
4. 根据权利要求3所述的诊断癌症或预测预后的组合物,其特征在于,所述癌症是肺癌、胸腺癌或食管癌。
5. 一种诊断癌症或预测预后的试剂盒,其特征在于,包括权利要求3或4所述的组合物。
6. 根据权利要求5所述的诊断癌症或预测预后的试剂盒,所述试剂盒是从由RT-PCR试剂盒、微阵列芯片试剂盒、DNA试剂盒及蛋白芯片试剂盒组成的组中选择的一种以上。
7. 检测TUBA1C基因或蛋白表达水平的试剂和检测GCC2基因或蛋白表达水平的试剂在制备用于诊断癌症或预测预后的试剂盒中的用途。
8. 权利要求7的用途,其中,所述检测GCC2基因或蛋白表达水平的试剂包括特异性地结合至外泌体内GCC2基因的引物或探针,或特异性地结合至外泌体内GCC2蛋白的抗体。
9. 权利要求7的用途,其中,所述试剂盒通过测量从生物样本分离的外泌体内的TUBA1C基因或蛋白表达水平、以及测量所述外泌体内的GCC2基因或蛋白表达水平来诊断癌症或预测预后。
10. 检测TUBA1C基因或蛋白表达水平的试剂在制备用于诊断胸腺癌或食管癌、或预测预后的试剂盒中的用途。
11. 权利要求7或10的用途,其中,所述检测TUBA1C基因或蛋白表达水平的试剂包括特异性地结合至外泌体内TUBA1C基因的引物或探针,或特异性地结合至外泌体内TUBA1C蛋白的抗体。
12. 权利要求10的用途,其中,所述试剂盒通过测量从生物样本分离的外泌体内的TUBA1C基因或蛋白表达水平来诊断食管癌或胸腺癌、或预测预后。
13. 根据权利要求9或12所述的用途,其特征在于,所述生物样本是从由全血、血清、血浆、唾液、尿液、痰、淋巴液和细胞组成的组中选择的一种以上。

基于过表达TUBA1C蛋白的外泌体的标志物组合物

技术领域

[0001] 本发明涉及包括过表达 α -微管蛋白特异性1C链(Tubulin alpha-1C chain, TUBA1C)蛋白的外泌体的诊断癌症或预测预后的标志物组合物。

背景技术

[0002] 肿瘤(tumor)是非正常细胞过剩导致的不可控且无序的细胞增殖的产物,当这样的肿瘤破坏性地增殖、扩散以及转移时,将被分类为恶性肿瘤(malignant tumor),即癌症。

[0003] 目前,通过X光、内窥镜检查、病理检查等方法诊断癌症。尽管上述检查方法的检查过程相对简单,但诊断成功率不高,还存在卫生问题,并且在检查过程中患者会感到痛苦,因此,需要研发出替代上述方法的癌症诊断方法。

[0004] 为了治疗癌症,在治疗之前需要高敏感性与特异性地癌症诊断。只有通过这样的诊断在早期发现癌症才能够提高治愈率。

[0005] 因此,目前需要开发出一种方法,能够非侵入性地以高敏感性与特异性在早期诊断出癌症,但目前仍然缺乏能够在早期特异性地检测出病灶,从而判断是否发病的分子诊断技术,特别是仍未开发出特异性地适用于特定癌症的方法。

[0006] 在先专利文献

[0007] 专利文献

[0008] 韩国授权专利第10-2080887号

[0009] 发明的内容

[0010] 要解决的技术问题

[0011] 在这一背景下,本发明人为了开发出新的来源于外泌体的诊断癌症或预测预后的标志物持续进行研究,其结果确认到当使用在来源于癌细胞的外泌体中特异性表达的TUBA1C(Tubulin alpha-1C chain)蛋白时,可以准确且迅速诊断癌症或预测预后,由此完成了本发明。

[0012] 本发明的目的在于提供一种能够通过非侵入性方法提高癌症诊断的准确度的标志物组合物,该组合物包括基于过表达TUBA1C蛋白的外泌体,还提供利用该组合物来提供诊断癌症或预测预后所需信息的方法。

[0013] 然而,本发明要解决的问题并不限于上述技术问题,未言及的其他技术问题能够通过下面的说明被本领域普通技术人员所明确理解。

[0014] 解决问题的技术方法

[0015] 根据本发明的一实施例,提供一种诊断癌症或预测预后的标志物组合物,包括过表达TUBA1C(Tubulin alpha-1C chain)蛋白的外泌体。

[0016] 根据一侧面,所述外泌体还包括GCC2(GRIP and coiled-coil domain-containing protein)蛋白。

[0017] 根据一侧面,所述癌症是肺癌、胸腺癌或食管癌。

[0018] 根据本发明的另一实施例,提供一种诊断癌症或预测预后的组合物,包括特异性

地结合至外泌体内TUBA1C蛋白的引物或探针;以及特异性地结合至外泌体内TUBA1C蛋白的抗体中的任一个以上。

[0019] 根据一侧面,所述组合物还包括特异性地结合至外泌体内GCC2基因的引物或探针;以及特异性地结合至外泌体内GCC2蛋白的抗体中的任一个以上。

[0020] 根据一侧面,所述癌症是肺癌、胸腺癌或食管癌。

[0021] 根据本发明的又一实施例,提供一种包括所述组合物的诊断癌症或预测预后的试剂盒。

[0022] 根据一侧面,所述试剂盒是从由RT-PCR试剂盒、微阵列芯片试剂盒、DNA试剂盒及蛋白芯片试剂盒组成的组中选择的一种以上。

[0023] 根据本发明的又一实施例,提供一种诊断癌症或预测预后所需信息的提供方法,包括测量从生物样本分离的外泌体内的TUBA1C基因或蛋白表达水平的步骤。

[0024] 根据一侧面,还包括测量所述外泌体内GCC2基因或蛋白的表达水平的步骤。

[0025] 根据一侧面,所述生物样本是从由全血、血清、血浆、唾液、尿液、痰、淋巴液和细胞组成的组中选择的一种以上。

[0026] 发明的效果

[0027] 本发明的标志物组合物包括在癌症患者的外泌体中过表达的TUBA1C蛋白,通过测量其表达水平,能够非侵入性地准确诊断癌症或预测预后。

[0028] 并且,本发明的标志物组合物将在外泌体中过表达的TUBA1C及GCC2作为双重生物标志物,能够进一步提高癌症诊断的敏感度与准确度。

[0029] 然而,本发明要的效果并不限于上述效果,应包括能够基于本发明的具体实施方式或权利要求的记载推导出的全部效果。

附图说明

[0030] 图1是对肺癌患者的血液来源外泌体内GCC2及TUBA1C蛋白的表达水平与正常组进行比较的ELISA结果。

[0031] 图2是对食管癌患者的血浆来源外泌体内TUBA1C蛋白的表达水平与正常对照组进行比较的ELISA结果。

[0032] 图3是对胸腺癌患者的血浆来源外泌体内TUBA1C蛋白的表达水平与正常对照组进行比较的ELISA结果。

[0033] 图4是对肺癌患者的血浆来源外泌体内TUBA1C及GCC2的表达水平按照期数进行测量的ELISA结果。

[0034] 图5是确认单独使用TUBA1C与GCC2时与使用两种标志物时的肺癌诊断敏感度变化的ROC曲线。

具体实施方式

[0035] 下面参照附图对实施例进行详细说明。各附图中相同的附图标记表示相同部件。

[0036] 能够对下面说明的实施例进行多种变更。本发明的实施形式并不限于下面的实施例,而应包括对下列实施例的所有变更、其等同物乃至其替代物。

[0037] 实施利中使用的术语仅用于说明特定实施例,并非用于限定保护范围。在内容中

没有特别说明的情况下,单数表达包括复数含义。在本说明书中,“包括”或者“具有”等术语用于表达存在说明书中所记载的特征、数字、步骤、操作、构成要素、配件或其组合,并不排除还具有一个或一个以上其他特征、数字、步骤、操作、构成要素、配件或其组合或附加功能。

[0038] 在没有其他定义的情况下,包括技术或者科学术语在内的本文使用的全部术语,都具有本领域普通技术人员所理解的通常含义。通常使用的如词典定义的术语,应理解为相关技术内容中的含义,在本说明书中没有明确定义的情况下,不能解释为理想化或过于形式化的含义。

[0039] 并且,在参照附图进行说明的过程中,与附图标记无关,相同的构成要素使用相同的附图标记,并省略重复说明。在说明实施例的过程中,当判断对于相关公知技术的具体说明会不必要地混淆实施例时,省略其详细说明。

[0040] 根据本发明的一实施例,提供一种包括过表达TUBA1C(Tubulin alpha-1C chain)蛋白的外泌体的诊断癌症或预测预后的标志物组合物。并且,上述外泌体还可以包括GRIP和卷曲螺旋域2(GRIP and coiled-coil domain-containing protein,GCC2)蛋白。

[0041] 本说明书中使用的术语“过表达TUBA1C蛋白的外泌体”以及“过表达GCC2蛋白的外泌体”是指相比存在于正常细胞内的外泌体能够实现更高水平的GCC2或者TUBA1C蛋白表达的外泌体。

[0042] 外泌体(exosome)是大部分细胞分泌的纳米大小(30~150nm)的小膜泡。众所周知,在外泌体内部及磷脂双层膜中包括来源于细胞的多种蛋白、遗传物质(DNA、mRNA、miRNA)、脂质等。并且,来源于组织的外泌体能够反映分泌其的组织状态,因此能够用于诊断疾病。

[0043] 由此,本发明人发现利用在癌症患者的外泌体内特异性地表达的TUBA1C或GCC2蛋白,能够准确迅速地诊断癌症或预测预后,由此完成了本发明。

[0044] 这里癌症包括所有癌症,非限制性示例包括肺癌、食管癌、胸腺癌、乳腺癌、肝癌、胃癌、直肠癌、胰腺癌、宫颈癌、皮肤癌、前列腺癌、卵巢癌、甲状腺癌、膀胱癌、头颈癌、骨髓癌、胆道癌,其中优选为肺癌、食道癌或胸腺癌。

[0045] 在本说明书中使用的术语“诊断”是指确认是否存在病理状态或病理状态的特征,即确认是否患有癌症。并且,“预后”是指判断癌症治疗后相应个体是否出现复发、转移、药物反应、耐药性等。即通过测量从个体样本分离的外泌体内的TUBA1C或GCC2表达水平,由此来判断相应个体是否患有癌症,并预测相应个体生存后预后是否良好。

[0046] 如此,通过测量来源于外泌体的TUBA1C或GCC2蛋白的表达水平能够诊断癌症或预测预后,可以将特异性地结合至该基因的引物或探针、或特异性地结合至蛋白的抗体用于诊断癌症或预测预后的组合物。

[0047] 不仅如此,本发明能够通过将特异性地结合至TUBA1C或GCC2基因的引物、探针或特异性地结合至TUBA1C或GCC2蛋白的抗体中任一个以上适用于试剂盒来提供诊断癌症或预测预后的试剂盒。

[0048] 所述试剂盒的非限制性示例可包括RT-PCR试剂盒、微阵列芯片试剂盒、DNA试剂盒、蛋白芯片试剂盒等。所述试剂盒能够确认相当于标志物的TUBA1C、GCC2蛋白在外泌体内的表达水平并进行检测,从而诊断癌症或预测预后。

[0049] 为了诊断癌症或预测预后,所述试剂盒包括选择性地识别标志物的引物、探针或抗体,此外,还包括适合用于分析方法的一种或多种其他成分的组合物、溶液或装置。

[0050] 例如,为了进行抗体的免疫学检测,所述试剂盒可以包括底物、合适的缓冲溶液、用显色酶或荧光物质标记的二抗,以及显色底物等。并且,作为底物,可以使用硝酸纤维素膜、由聚乙烯树脂合成的96孔板、由聚苯乙烯树脂合成的96孔板以及由玻璃制成的载玻片;显色酶可以使用过氧化物酶(Peroxidase)、碱性磷酸酶(alkaline phosphatase)等;荧光物质可以使用异硫氰酸荧光素(FITC)、罗丹明异硫氰酸酯(RITC)等;显色底物可以使用ABTS(2,2-联氮-二(3-乙基-苯并噻唑-6-磺酸)二铵盐)或OPD(邻苯二胺)、TMB(四甲基联苯胺),但并非受限于此。

[0051] 根据本发明的另一实施例,提供一种诊断癌症或预测预后所需信息的提供方法,包括如下步骤:测量从生物样本分离的外泌体(exosome)内TUBA1C基因或蛋白的表达水平的步骤。

[0052] 为了提高诊断癌症的敏感度与准确度,本发明的方法还可以包括测量外泌体内GCC2基因或蛋白的表达水平的步骤。

[0053] 所述生物样本可以是全血、血清、血浆、唾液、尿液、痰、淋巴液和细胞组成的组中选择的一种或多种,并且优选可以是全血或细胞,但不限于此。

[0054] 测量基因表达水平是为了诊断癌症或预测预后而从生物样本确认是否存在TUBA1C、GCC2基因的mRNA及其表达程度的过程,即测量mRNA的表达量。

[0055] 为此所使用的分析方法的非限制性示例包括反转录-聚合酶链式反应(RT-PCR)、竞争性RT-PCR(Competitive RT-PCR)、实时RT-PCR(Real-time RT-PCR)和RNA酶保护分析法(RPA,RNase protection assay)、Northern印迹法(Northern blotting)、DNA芯片等。

[0056] 并且,测量所述蛋白的表达水平是为了诊断癌症或预测预后而确认生物样本中是否存在TUBA1C、GCC2蛋白及其表达程度的过程。

[0057] 所述蛋白的表达水平的测量方法或比较分析方法的非限制性示例包括:蛋白芯片分析法、免疫测量法、配体结合分析法、基质辅助激光解吸-电离飞行时间质谱(Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization Time of Flight Mass Spectrometry,MALDI-TOF)分析、表面增强激光解吸-电离飞行时间质谱(Surface Enhanced Laser Desorption/Ionization Time of Flight Mass Spectrometry,SELDI-TOF)分析、放射免疫分析法、放射免疫扩散法、奥氏(Ouchterlony)免疫扩散法、火箭免疫电泳、免疫组织染色法、补体固定法、二维电泳分析、液相色谱-质谱(liquid chromatography-Mass Spectrometry,LC-MS)、液相色谱-质谱/质谱(liquid chromatography-Mass Spectrometry/Mass Spectrometry,LC-MS/MS)、西方墨点法和酶联免疫吸附法(enzyme-linked immunosorbent assay,ELISA)等。

[0058] 测量所述TUBA1C、GCC2的基因或蛋白表达水平后,与正常对照组进行比较,当其表达水平相比正常对照组高时,可以判断癌症发病或发病可能性较高。

[0059] 并且,根据本发明的一实施例,提供一种癌症治疗剂筛选方法,包括以下步骤:(a)在采集的癌症患者生物样本中应用癌症治疗剂候选物质的步骤;(b)从所述生物样本分离外泌体(exosome)的步骤;以及(c)测量所述外泌体内TUBA1C基因或蛋白的表达水平的步骤。

[0060] 对诊断癌症或预测预后的所需信息的提供方法进行延伸,可以用作筛选所述治疗剂候选物质。即,将癌症治疗剂候选物质应用至从癌症患者分离的生物样本后,当确认存在于其中的外泌体中TUBA1C基因或蛋白的表达水平降低时,即可确认相应候选物质作为癌症治疗剂具有有效功能。

[0061] 下面,通过实施例对本发明进行更详细地说明。下面的实施例用于对本发明进行示例,本发明的范围并非限定于此。

[0062] 实施例1:准备分离外泌体及分析蛋白质组

[0063] 将5种癌症细胞株(H522、A549、H1650、PC9、H1299)、胸腺癌细胞株以及食管癌细胞株分别在150mm直径的培养皿中培养。此时,利用超高速离心分离机于120000g离心分离4小时,将去除外泌体的胎牛血清(FBS,Fetal Bovine Serum)的上清液作为培养液进行使用。利用所述培养液连续培养2-3天,直到细胞融合度达到70-80%。

[0064] 将得到的培养液于10000g离心分离30分钟去除细胞碎片(cell debris),然后依次通过0.45 μ m、0.22 μ m过滤器优先去除体积较大的物质。之后,对于过滤后的细胞培养液,利用Amicon管100K(Amicon tube 100K)(Millipore公司,美国)只保留中所需大小的粒子,然后进行浓缩。

[0065] 之后,将浓缩细胞培养液利用柱液相色谱法(column liquid chromatography)只分离外泌体大小(50-100nm)的粒子,利用Amicon管100K再次浓缩。

[0066] 利用RIPA裂解液(RIPA lysis buffer,Thermo Fisher Scientific公司,美国)从浓缩的外泌体中获取蛋白,委托韩国基础科学研究院(KBSI)获得蛋白质组分析结果。

[0067] 以此为基础,最终筛选出在癌症细胞株的外泌体中过表达的TUBA1C(Tubulin alpha-1C chain)以及GCC2(GRIP and coiled-coil domain-containing protein 2)。

[0068] 实施例2:测量肺癌患者的外泌体内GCC2及TUBA1C蛋白的表达水平

[0069] 为了确认在实施例1中筛选的包括GCC2及TUBA1C蛋白的外泌体作为诊断肺癌或预测预后的标志物是否可行,利用ELISA(Enzyme linked immunoassay)分析了从正常组(n=3)与肺癌患者组(n=5)的血液中提取的外泌体中的GCC2及TUBA1C表达水平。

[0070] 其结果,如在图1中所示,相比正常组(control),肺癌患者组中GCC2及TUBA1C的表达得到提高。

[0071] 之后,为了确认肺癌患者血浆中分离的外泌体特性,采集医院的20名1期至3期肺癌患者血液,利用Exoquick(Systembio公司,美国)从血浆分离外泌体。通过ELISA来确认了来源于分离血液的外泌体的GCC2及TUBA1C的表达水平(GCC2:Mybiosource公司的GRIP and coiled-coil domain containing proten 2;ELISA KIT(Cat No.MBS9330667),2)TUBA1C:Mybiosource公司的TUBA1C ELISA KIT(Cat No.MBS9336377))。其结果,如图4所示,相比正常组,在全部肺癌期数中GCC2及TUBA1C的表达量显著增加,随着肺癌期数的增加,GCC2及TUBA1C的表达量也一同增加。

[0072] 实施例3:测量食管癌及胸腺癌患者的外泌体内TUBA1C表达水平

[0073] 首先,从正常人5人、食管癌患者5人的血浆(plasma)样本中提取外泌体,然后利用TUBA1C ELISA KIT(Mybiosource公司的TUBA1C ELISA KIT(Cat No.MBS9336377))确认了样本内TUBA1C蛋白浓度。

[0074] 其结果如图2所示,正常人的外泌体来源TUBA1C蛋白的平均浓度为939.306ng/ml,

相反,食管癌患者的外泌体来源TUBA1C蛋白的平均浓度更高是1236.764ng/ml。食管癌患者的外泌体来源TUBA1C蛋白的浓度相比正常人增加了1.36倍,p值(value p value)为0.021,在统计上有意义。

[0075] 然后,从正常人5人、胸腺癌患者5人的血浆(plasma)样本中提取外泌体,然后利用TUBA1C ELISA KIT(Mybiosource公司的TUBA1C ELISA KIT(Cat No.MBS9336377))确认了样本内TUBA1C蛋白浓度。

[0076] 其结果如图3所示,正常人的外泌体来源TUBA1C蛋白的平均浓度为939.306ng/ml,相反,食管癌患者的外泌体来源TUBA1C蛋白的平均浓度非常高,是3503.15ng/ml。食管癌患者的外泌体来源TUBA1C蛋白的浓度相比正常人增加了3.85倍,p值为0.005,在统计上有意义。

[0077] 实施例4:将TUBA1C及GCC2作为双重生物标志物时的诊断有效性评价

[0078] 为了评价在诊断癌症时将TUBA1C及GCC2作为双重生物标志物时的有效性,通过ROC曲线确认了单独使用TUBA1C与GCC2的情况和同时使用两种标志物的情况下的诊断敏感度变化。具体地,从正常人7人、肺癌患者21人的血浆(plasma)中提取外泌体后,利用GCC2ELISA KIT、TUBA1C ELISA KIT获得外泌体内GCC2、TUBA1C蛋白的浓度后,利用统计上的ROC曲线来确认AUC值并显示在图5中。

[0079] 参照图5,当单独使用GCC2抗体时AUC是0.905($p=0.002$),单独使用TUBA1C抗体时AUC值是0.8787($p=0.003$)。相反,同时使用GCC2及TUBA1C抗体时,AUC是1($P0.0000963$),相比单独使用TUBA1C或GCC2的情况,使用TUBA1C及GCC2作为双重生物标志物时可以更精密地进行诊断。

[0080] 综上,通过有限的附图对实施例进行了说明,本领域普通技术人员能够基于所述记载进行多种技术修改与变形。例如,所说明的技术按照与说明的方法不同的顺序执行,和/或所说明的构成要素按照与说明的方法不同的形态进行结合或组合,或者由其他构成要素或者等同物置换或代替,也能得到适当的结果。

[0081] 因此,其他体现、其他实施例及与权利要求的等同物均属于所附权利要求书的范围。

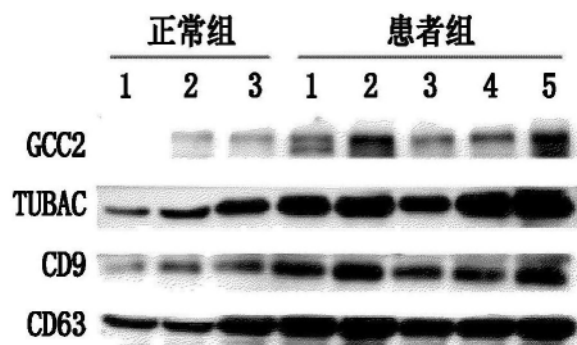


图1

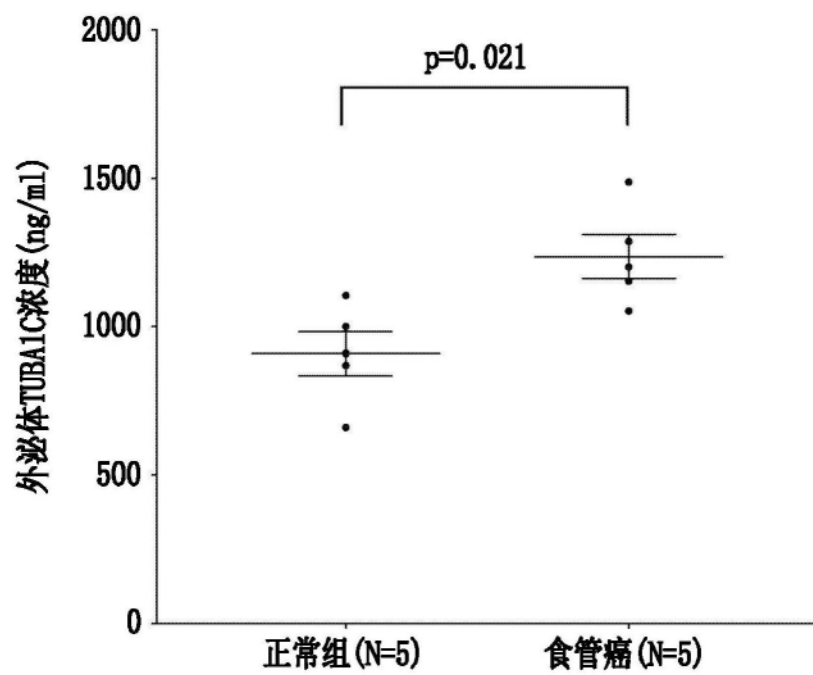


图2

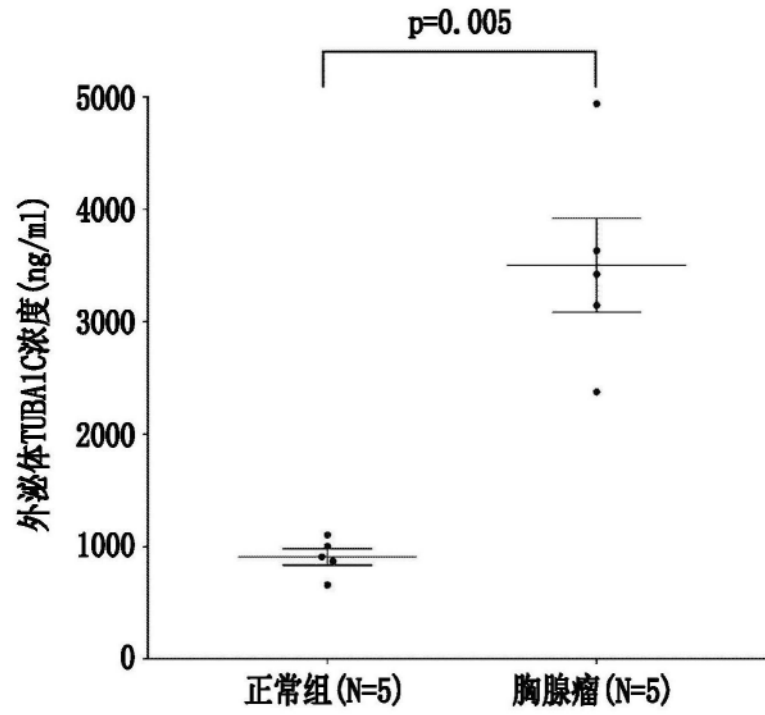


图3

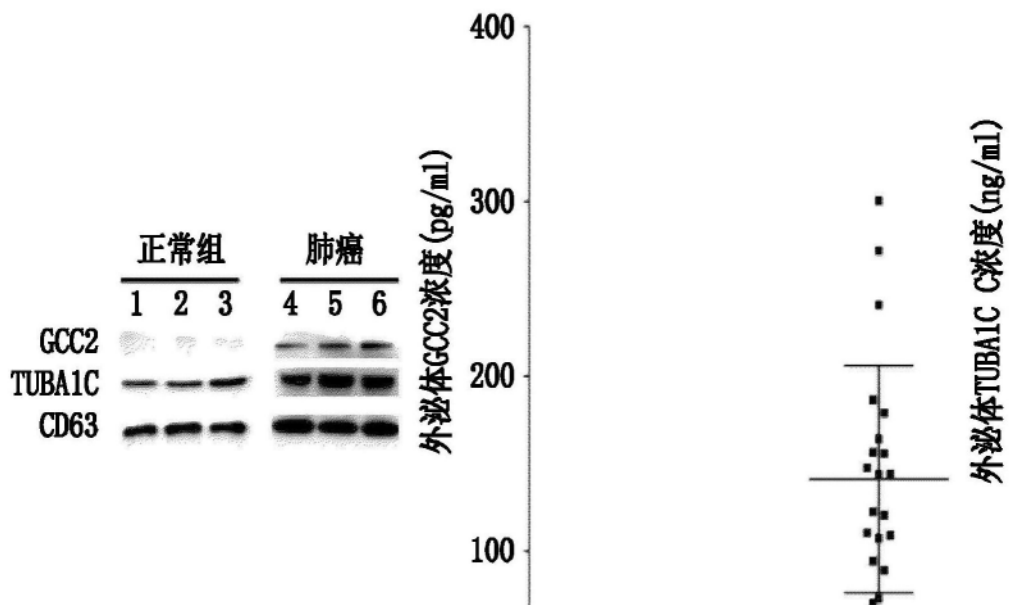


图4

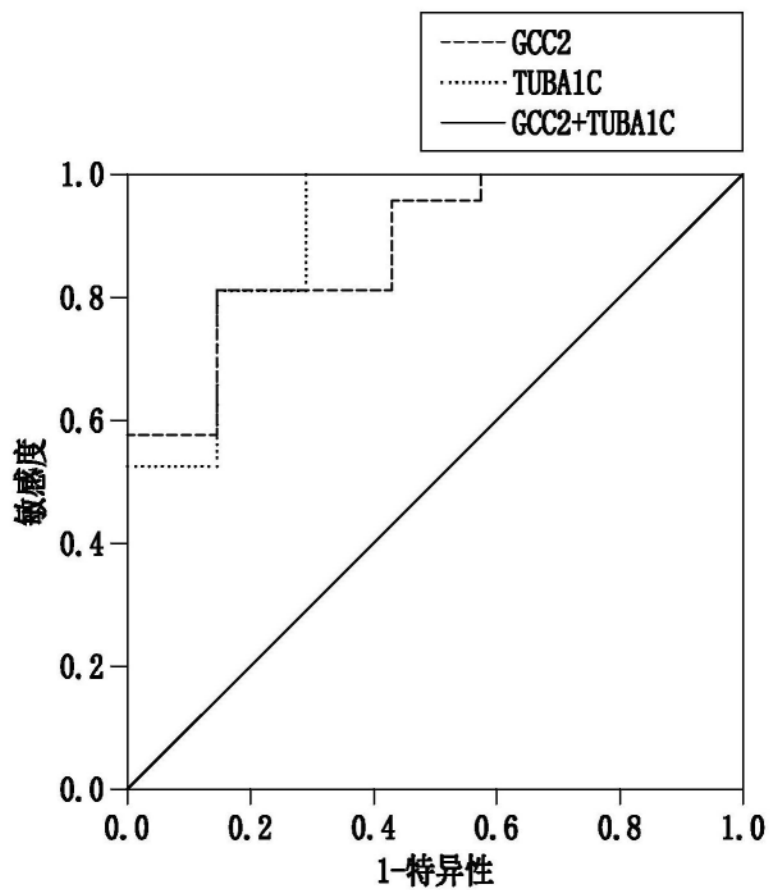


图5