



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102346188 A

(43) 申请公布日 2012. 02. 08

(21) 申请号 201010244444. 1

(22) 申请日 2010. 08. 03

(71) 申请人 中国人民解放军军事医学科学院生物
工程研究所

地址 100850 北京市海淀区太平路 27 号军
事医学科学院生物工程研究所

(72) 发明人 周建光 钱晓龙

(74) 专利代理机构 北京纪凯知识产权代理有限
公司 11245

代理人 关畅 任风华

(51) Int. Cl.

G01N 33/577(2006. 01)

G01N 33/574(2006. 01)

G01N 33/68(2006. 01)

权利要求书 1 页 说明书 6 页

序列表 5 页 附图 1 页

(54) 发明名称

THBS-1 的新用途

(57) 摘要

本发明公开了 THBS-1 的新用途。该新用途为凝血敏感蛋白 1 在设计和 / 或制备用于诊断前列腺癌的试剂盒中的应用。实验证明, 用 THBS-1 的单抗或检测 THBS-1 的试剂盒检测 THBS-1 浓度值, 进而诊断前列腺癌, 对前列腺癌的阳性诊断率为 100%, 更突出的是, 该方法能将 PSA 阴性 (血清 PSA 水平小于 10ng/ml) 的前列腺癌患者诊断为阳性, 说明该方法的精确度明显高于现有的 PSA 诊断方法。

1. 抗凝血敏感蛋白 1 的单克隆抗体和 / 或抗凝血敏感蛋白 1 的多克隆抗体在制备用于辅助诊断癌症的试剂盒中的应用。

2. 检测凝血敏感蛋白 1 的试剂盒在制备用于辅助诊断癌症的试剂盒中的应用。

3. 凝血敏感蛋白 1 在设计和 / 或制备用于辅助诊断癌症的试剂盒中的应用。

4. 根据权利要求 1-3 中任一所述的应用,其特征在於:所述癌症为前列腺癌、膀胱癌或肾透明细胞癌;

所述抗凝血敏感蛋白 1 的单克隆抗体为抗凝血敏感蛋白 1 鼠单克隆抗体。

5. 根据权利要求 4 所述的应用,其特征在於:所述前列腺癌为前列腺特异性抗原阴性的前列腺癌。

6. 根据权利要求 1-5 中任一所述的应用,其特征在於:所述前列腺特异性抗原阴性为血清中前列腺特异性抗原浓度小于等于 10ng/ml。

7. 根据权利要求 1-6 中任一所述的应用,其特征在於:所述凝血敏感蛋白 1 的氨基酸序列如 SEQ ID NO :1 所示;所述前列腺特异性抗原的氨基酸序列如 SEQ IDNO :2 所示。

THBS-1 的新用途

技术领域

[0001] 本发明涉 THBS-1 的新用途。

背景技术

[0002] 前列腺癌 (Prostate Cancer, PCa) 是北美国家男性中最常见的恶性肿瘤之一,据 2009 年美国癌症协会统计数字表明,新确诊为前列腺癌的患者占该年新确诊为恶性肿瘤患者的 25%^[1],占男性肿瘤的第一位;死亡人数占总男性恶性肿瘤死亡人数的 9%,仅次于肺癌 (33%)。在我国,随着人口结构逐步老龄化和生活环境的改变,前列腺癌的发病率正在逐年增高,处于快速发展阶段。

[0003] 分泌蛋白质组是指能分泌到细胞外的全部蛋白质总和,其广义的含义为通过多种方式、能够“释放”到细胞外的全部蛋白质。肿瘤细胞分泌蛋白中的一部分可以释放入血,成为潜在的血清标志物。质谱技术为肿瘤标志物的发现提供了一个庞大的蛋白质序列数据库。直接对恶性细胞的分泌蛋白进行分析,对鉴定血清中的恶性肿瘤标记物来说是一个更高效的方法。

[0004] 前列腺是一个雄激素依赖性器官,雄激素撤除治疗对于前列腺癌早期有效,但是患者往往会在这样的治疗后约两年时间发展为雄激素非依赖性,雄激素撤除治疗便失去了作用,肿瘤往往会获得更强的侵袭性和转移能力。LNCaP (雄激素依赖性 AR 阳性) 是具有代表性的前列腺癌细胞系,C4-2 细胞 (雄激素非依赖性和 AR 阳性) 是由 LNCaP 演变而来的细胞系。将 LNCaP 接种于裸鼠皮下 8 周并将裸鼠去势,4 周后取出肿瘤接种于裸鼠皮下,再次将裸鼠去势。这样就得到了 C4-2 细胞,它们与 LNCaP 细胞遗传背景相同,但却获得了雄激素非依赖的生长能力,并具有更强的成瘤性。LNCaP 和 C4-2 细胞很好地模拟了临床上患者的病情发展过程,是国际上承认的前列腺癌研究细胞模型。PC3 是前列腺癌骨转移的细胞模型,雄激素受体阴性;C4-2B,该细胞系也是由 LNCaP 演变而来,为骨转移的细胞系,同样也具有雄激素非依赖的性质;DU145 是前列腺癌脑转移的细胞系,雄激素受体阴性。

[0005] 凝血敏感蛋白 1 (thrombospondin-1, THBS-1) 是 α 血小板颗粒的主要成分,可以与细胞表面 CD36 结合抑制内皮细胞的迁移和管腔形成。THBS-1 的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 1 所示。

[0006] 前列腺特异性抗原 (PSA) 的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 2 所示。

发明内容

[0007] 本发明的一个目的是提供凝血敏感蛋白 1 的新用途、抗凝血敏感蛋白 1 的抗体的新用途及检测凝血敏感蛋白 1 的试剂盒的新用途。

[0008] 本发明所提供的抗凝血敏感蛋白 1 的抗体的新用途是抗凝血敏感蛋白 1 的单克隆抗体和 / 或抗凝血敏感蛋白 1 的多克隆抗体在制备用于辅助诊断癌症的试剂盒中的应用。

[0009] 上述抗体均是从商业途径得到的抗体,或经细胞体外培养得到的抗体,具体可购自 R&D 公司。

[0010] 本发明所提供的检测凝血敏感蛋白 1 的试剂盒的新用途是检测凝血敏感蛋白 1 的试剂盒在制备用于辅助诊断癌症的试剂盒中的应用。

[0011] 本发明所提供的凝血敏感蛋白 1 的新用途的新用途是凝血敏感蛋白 1 在设计和/或制备用于辅助诊断癌症的试剂盒中的应用。

[0012] 上述任一所述应用中,所述抗凝血敏感蛋白 1 的单克隆抗体为抗凝血敏感蛋白 1 鼠单克隆抗体。

[0013] 上述任一所述应用中,所述癌症为前列腺癌、膀胱癌或肾透明细胞癌。

[0014] 上述任一所述应用中,所述前列腺癌为前列腺特异性抗原 (PSA) 阴性的前列腺癌。

[0015] 上述任一所述应用中,所述 PSA 阴性为血清中 PSA 浓度小于等于 10ng/ml。

[0016] 上述任一所述应用中,检测凝血敏感蛋白 1 的试剂盒具体可购自 R&D 公司,产品目录号为 DTSP-10。

[0017] 上述任一所述应用中,所述凝血敏感蛋白 1 的氨基酸序列如 SEQ ID NO :1 所示 ;前列腺特异性抗原 (PSA) 的氨基酸序列如 SEQ ID NO :2 所示。

[0018] 实验证明,用 THBS-1 的单抗或检测 THBS-1 的试剂盒检测 THBS-1 浓度值,进而诊断前列腺癌,对前列腺癌的阳性诊断率为 100%,更突出的是,该方法能将 PSA 阴性 (血清 PSA 水平小于 10ng/ml) 的前列腺癌患者诊断为阳性,说明该方法的精确度明显高于现有的 PSA 诊断方法。

附图说明

[0019] 图 1 为 THBS-1 浓度的对数与血清双夹心 ELISA 检测获得的校正后 450nm 光吸收 (OD450Correct) 的对数拟合的标准曲线。

[0020] 图 2 为 THBS-1 在前列腺癌患者和其他男性泌尿系肿瘤患者血清中的表达明显高于正常老年人。

具体实施方式

[0021] 下述实施例中所使用的实验方法如无特殊说明,均为常规方法。

[0022] 下述实施例中所用的材料、试剂等,如无特殊说明,均可从商业途径得到。

[0023] 实施例 1、试剂盒的组成

[0024] 一、试剂盒组成

[0025] 试剂盒 (Human Thrombospondin-1 定量试剂盒) 购自 R&D 公司,产品目录号为 DTSP-10,具体组成如下:

[0026] 1、Thrombospondin-1Micorplate :包被了抗 Thrombospondin-1 鼠单克隆抗体的 96 孔聚苯乙烯微板 (8 孔 ×12 条);

[0027] 2、Thrombospondin-1Conjugate :21ml 偶联了辣根过氧化物酶的抗 Thrombospondin-1 多克隆抗体;

[0028] 3、Thrombospondin-1Standard :1000ng Thrombospondin-1 重组蛋白冻干粉;

[0029] 4、Assay Diluent RD1-56 :17ml 缓冲蛋白溶液;

[0030] 5、Calibrator Diluent RD5-33Concentrate :2 管 (21ml/ 管) 缓冲蛋白碱;

- [0031] 6、Wash Buffer Concentrate :21ml/ 管 25× 缓冲表面活性剂浓缩溶液（含防腐剂）；
- [0032] 7、Color Reagent A :12.5ml 稳态过氧化氢溶液；
- [0033] 8、Color Reagent B :12.5ml 稳态色原质（四甲基联苯胺）；
- [0034] 9、Stop Solution :6ml 2mol/L 硫酸水溶液；
- [0035] 10、Plate Covers :微板密封条 4 条。
- [0036] 实施例 2、试剂盒诊断前列腺癌
- [0037] 一、用试剂盒进行检测的方法
- [0038] （一）工作液的制备和标准品、样品的稀释
- [0039] Wash Buffer 工作液 :20ml Wash Buffer Concentrate, 加入去离子水定容至 500ml。
- [0040] Calibrator Diluent RD5-33 工 作 液 :20ml Calibrator Diluent RD5-33Concentrate 与 20ml 去离子水充分混匀。
- [0041] Thrombospondin-1 标准品稀释液 :1000ng Thrombospondin-1 重组蛋白冻干粉加入 1ml 去离子水, 轻轻搅动, 然后静置 15 分钟以上使其充分溶解, 即得 1000ng/ml Thrombospondin-1 标准品贮存液。用 Calibrator Diluent RD5-33 工作液对 Thrombospondin-1 标准品贮存液进行 7 次二倍稀释, 获得了浓度分别为 500, 250, 125, 62.5, 31.3, 3.1, 15.6 和 7.8ng/ml 的标准品稀释液。用不加标准品的 Calibrator Diluent RD5-33 工作液作为空白对照 (0ng/ml)；
- [0042] 用于上样血清样品 :10 μ l 血清加入 990 μ l Calibrator Diluent RD5-33 工作液, 充分混匀。
- [0043] （二）操作步骤：
- [0044] 2.1 标准曲线的制备
- [0045] (1) 取出两条 Thrombospondin-1 Micorplate, 余下重新用锡箔密封好；
- [0046] (2) 每孔加入 100 μ l Assay Diluent RD1-56；
- [0047] (3) 每孔分别加入 50 μ l Thrombospondin-1 浓度为 500, 250, 125, 62.5, 31.3, 3.1, 15.6 和 7.8ng/ml 的标准品稀释液及空白对照, 每个浓度做两个重复。用 Plate Covers 密封各个孔, 常温在微型摇床（转速为 500rpm）孵育两小时；
- [0048] (4) 彻底弃去每孔中的样品, 将每孔加满 Wash Buffer 工作液（约 400 μ l）, 常温在 ELISA 专用洗板机上洗 3 分钟, 彻底弃除 Wash Buffer 工作液, 重复该清洗 4 次, 最后一次结束后, 将 Thrombospondin-1 Micorplate 倒扣在清洁的纸巾上。
- [0049] (5) 每孔加入 200 μ l Thrombospondin-1 Conjugate, 用 Plate Covers 密封各个孔, 常温在微型摇床（转速为 500rpm）孵育两小时；
- [0050] (6) 彻底弃去每孔中的 Thrombospondin-1 Conjugate, 将每孔加满 Wash Buffer 工作液（约 400 μ l）, 常温在 ELISA 专用洗板机上洗 3 分钟, 彻底弃除 Wash Buffer 工作液, 重复该清洗 4 次, 最后一次结束后, 将 Thrombospondin-1 Micorplate 倒扣在清洁的纸巾上。
- [0051] (7) Color Reagent A 与 Color Reagent B 等体积混合, 混合后 15 分钟内必须使用；
- [0052] (8) 每孔加入 200 μ l (7) 混合液, 常温避光孵育 30 分钟；

[0053] (9) 每孔加入 50 μ l Stop Solution, 颜色应由蓝色变为黄色, 如果颜色不均一, 轻拍微板使其内容物充分混合;

[0054] (10) 30 分钟内用微板读数器 (Microplate Reader, Model 680, Biorad) 读取各个孔的 450nm 和 570nm 光吸收读数, 后者减去前者得到每孔的 OD450* 读数, 计算每个浓度两个重复 OD450* 读数的平均值, 该值减去空白对照孔两个重复 OD450* 读数的平均值即为每个 Thrombospondin-1 浓度对应的 OD450Correct 读数. 每个 Thrombospondin-1 浓度和对应的 OD450Correct 分别取对数, 应用 Microsoft Office Excel 2003 软件绘制散点图, 并拟合线形关系, 获得标准曲线 (举例如表 1, 图 1)。标准曲线的函数式为 $y = 0.6664X - 1.325$ 。 $R^2 = 0.9762$ 。

[0055] 表 1 Thrombospondin-1 双夹心 ELISA 检测

[0056]

OD 450 -1	OD 450 -2	OD 570 -1	OD 570 -2	OD 450 -1*	OD 450 -2*	average	OD450 Correct	THBS-1 含量 (ng)	lg (OD450 Correct)	lg (THBS-1 含量)
2.652	2.392	0.044	0.042	2.608	2.35	2.479	2.414	500	2.69897	0.382737
1.875	2.111	0.038	0.041	1.837	2.07	1.9535	1.889	250	2.39794	0.276117
1.478	1.475	0.044	0.045	1.434	1.43	1.432	1.367	125	2.09691	0.135769
0.94	0.934	0.034	0.04	0.906	0.894	0.9	0.835	62.5	1.79588	-0.07831
0.627	0.636	0.037	0.039	0.59	0.597	0.5935	0.529	31.25	1.49485	-0.27696
0.421	0.403	0.037	0.038	0.384	0.365	0.3745	0.31	15.625	1.19382	-0.50934
0.24	0.264	0.038	0.039	0.202	0.225	0.2135	0.149	7.8125	0.89279	-0.82827
0.1	0.1	0.034	0.036	0.066	0.064	0.065	0			

[0057] 2.2 血清 Thrombospondin-1 浓度的检测。

[0058] (1) 取出若干条 Thrombospondin-1 Micorplate, 余下重新用锡箔密封好

[0059] (2) 每孔加入 100 μ l Assay Diluent RD1-56

[0060] (3) 每孔分别加入 50 μ l 用于上样血清样品 (见样品的稀释), 再加做一个空白对照孔, 方法同 2.1 中步骤 (3)。用 Plate Covers 密封各个孔, 常温在微型摇床 (转速为 500rpm) 孵育两小时;

[0061] (4) 彻底弃去每孔中的样品, 将每孔加满 Wash Buffer 工作液 (约 400 μ l), 常温在 ELISA 专用洗板机上洗 3 分钟, 彻底弃除 Wash Buffer 工作液, 重复该清洗 4 次, 最后一次结束后, 将 Thrombospondin-1 Micorplate 倒扣在清洁的纸巾上。

[0062] (5) 每孔加入 200 μ l Thrombospondin-1 Conjugate, 用 Plate Covers 密封各个孔, 常温在微型摇床 (转速为 500rpm) 孵育两小时;

[0063] (6) 彻底弃去每孔中的 Thrombospondin-1 Conjugate, 将每孔加满 Wash Buffer 工作液 (约 400 μ l), 常温在 ELISA 专用洗板机上洗 3 分钟, 彻底弃除 Wash Buffer 工作液, 重复该清洗 4 次, 最后一次结束后, 将 Thrombospondin-1 Micorplate 倒扣在清洁的纸巾上。

[0064] (7) Color Reagent A 与 Color Reagent B 等体积混合, 混合后 15 分钟内必须使用

[0065] (8) 每孔加入 200 μ l (7) 混合液, 常温避光孵育 30 分钟

[0066] (9) 每孔加入 50 μ l Stop Solution, 颜色应由蓝色变为黄色, 如果颜色不均一, 轻拍微板使其内容物充分混合

[0067] (10) 30 分钟内用微板读数器 (Microplate Reader, Model 680, Biorad) 读取各

个孔的 450nm 和 570nm 光吸收读数,后者减去前者得到每孔的 OD450* 读数,计算每个浓度两个重复 OD450* 读数的平均值,该值减去空白对照孔 OD450* 读数即为每个血清样品对应的 OD450Correct 读数.将该读数取对数作为 y 代入标准曲线求 x , $100 \times 1g^{(-1)}x$ 即为血清 Thrombospondin-1 含量.

[0068] 前列腺特异性抗原 (PSA) 浓度检测方法:应用电化学发光法,使用 Roche Elecsys2010 全自动电化学发光免疫分析仪及其配套的 PSA 试剂(由与仪器配套生产的德国罗氏诊断有限公司提供),均在效期内使用.标准曲线的制备和血清检测严格按照操作流程进行.PSA 的含量值用 $M(Q_R)$ 表示, M 表示样本中 THBS-1 含量的中位数; Q_R 表示样本中 THBS-1 含量的四分位数间距,即 $Q_R =$ 上四分位数值与下四分位数值之差的绝对值.

[0069] (三) 检测患者血清

[0070] 按照实验(二)中所述方法对以下实验者的血清中的 THBS-1 浓度进行检测:10 例正常老年男性,105 例前列腺癌患者,23 例其他男性泌尿系肿瘤的老年患者(膀胱癌 10 例,肾透明细胞癌 13 例).血清的收集均经过实验者的同意.

[0071] 结果如表 2 和图 2 所示.血清 PSA 浓度用 $M(Q_R)$ 表示,血清 THBS-1 浓度用(平均值 \pm 标准差)表示.

[0072] 显示 THBS-1 在正常老年人和前列腺癌患者血清中的表达量差异极显著,T 检验证实差异有统计学意义 (***) : $p < 0.001$).证明可以通过检测 THBS-1 的血清浓度来诊断前列腺癌.

[0073] 进一步将正常老年男性血清中的 THBS-1 浓度与血清中 $PSA \leq 10ng/ml$ 前列腺癌患者的血清 THBS-1 浓度做了比较,同时对他们的血清 PSA 浓度也做了比较.结果: $PSA \leq 10ng/ml$ (*) 的前列腺癌患者和 $PSA > 10ng/ml$ (*) 的前列腺癌患者血清中 THBS-1 水平明显高于正常老年男性.应用 T 检验确定其具有统计学意义 (p 分别等于 0.0010 和 0.0004).而在 $PSA \leq 10ng/ml$ 的患者中,PSA 水平与正常老年人并无明显差异 ($p = 0.0937$),但 THBS-1 浓度值与正常老年男性差异显著.说明:THBS-1 有助于对血清 PSA 水平小于等于 $10ng/ml$ 的前列腺患者的诊断,而这些前列腺癌患者的血清 PSA 水平与正常老年男性并无明显差异(表 2).

[0074] 进一步将正常老年男性血清中的 THBS-1 浓度与膀胱癌 10 例,肾透明细胞癌 13 例老年患者的血清 THBS-1 浓度做了比较,血清 THBS-1 浓度用(平均值 \pm 标准差)表示).结果:膀胱癌和肾透明细胞癌的老年患者的血清 THBS-1 水平明显高于正常老年人.应用 T 检验确定其具有统计学意义 (p 分别等于 0.0022 和 0.0014).说明 THBS-1 有助于老年男性膀胱癌和肾透明细胞癌的诊断.

[0075] 表明,用该试剂盒检测 THBS-1 浓度值,可以用来诊断前列腺癌.

[0076]

表.2 应用双夹心 ELISA 检测 THBS-1 在正常人、PSA \leq 10 ng/ml 的前列腺癌患者和 PSA $>$ 10 ng/ml 的前列腺癌患者血清中的差异表达 (单位 ng/ml)

		样本数目	THBS-1	PSA M(Q _R)
正常老年人		10	5308 \pm 1973	0.48(2.30)
前列腺癌患者	PSA \leq 10 ng/ml	27	15682 \pm 6366*	3.74(6.28)
	PSA $>$ 10 ng/ml	78	16944 \pm 6882*	81.35(133.78)
膀胱癌		10	14602 \pm 4464*	
肾透明细胞癌		13	15497 \pm 5600*	

[0001]

序列表

<110>中国人民解放军军事医学科学院生物工程研究所

<120>THBS-1 的新用途

<160>2

<210>1

<211>215

<212> PRT

<213>人工序列

<220>

<223>

<400>1

Asn Arg Ile Pro Glu Ser Gly Gly Asp Asn Ser Val Phe Asp Ile Phe
 1 5 10 15

Glu Leu Thr Gly Ala Ala Arg Lys Gly Ser Gly Arg Arg Leu Val Lys
 20 25 30

Gly Pro Asp Pro Ser Ser Pro Ala Phe Arg Ile Glu Asp Ala Asn Leu
 35 40 45

Ile Pro Pro Val Pro Asp Asp Lys Phe Gln Asp Leu Val Asp Ala Val
 50 55 60

[0002]

Val Leu Gln Asn Val Arg Phe Val Phe Gly Thr Thr Pro Glu Asp Ile
 195 200 205

Leu Arg Asn Lys Gly Cys Ser
 210 215

<210>2

<211>227

<212> PRT

<213>人工序列

<220>

<223>

<400>2

Met Trp Val Pro Val Val Phe Leu Thr Leu Ser Val Thr Trp Ile Gly
 1 5 10 15

Ala Ala Pro Leu Ile Leu Ser Arg Ile Val Gly Gly Trp Glu Cys Glu
 20 25 30

Lys His Ser Gln Pro Trp Gln Val Leu Val Ala Ser Arg Gly Arg Ala
 35 40 45

Val Cys Gly Gly Val Leu Val His Pro Gln Trp Val Leu Thr Ala Ala

[0004]

Thr Lys Phe Met Leu Cys Ala Gly Arg Trp Thr Gly Gly Lys Ser Thr
195 200 205

Cys Ser Val Ser His Pro Tyr Ser Gln Asp Leu Glu Gly Lys Gly Glu
210 215 220

Trp Gly Pro
225

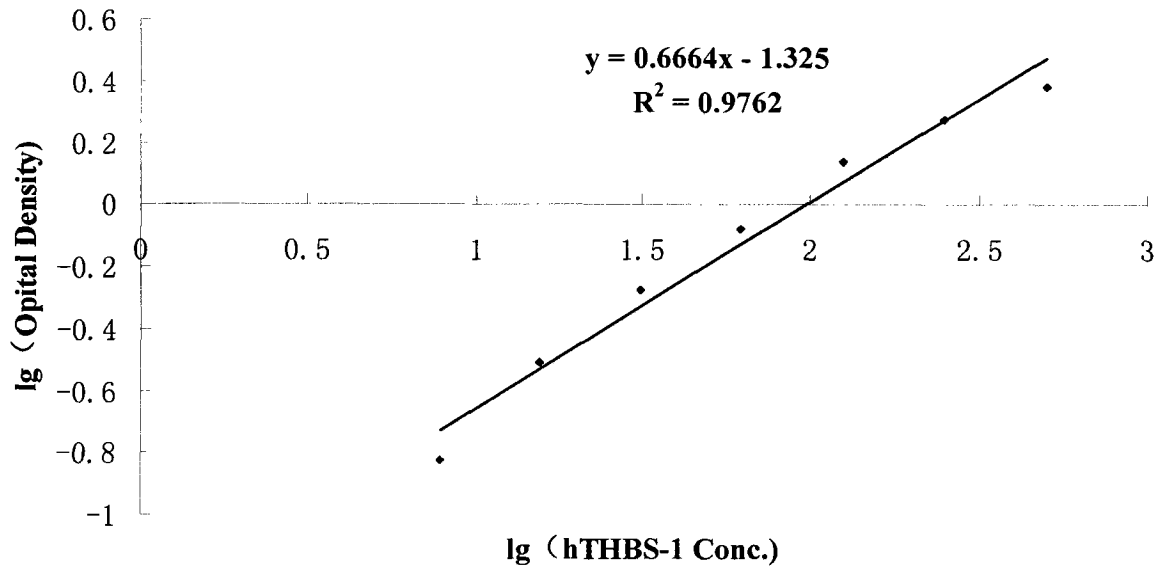


图 1

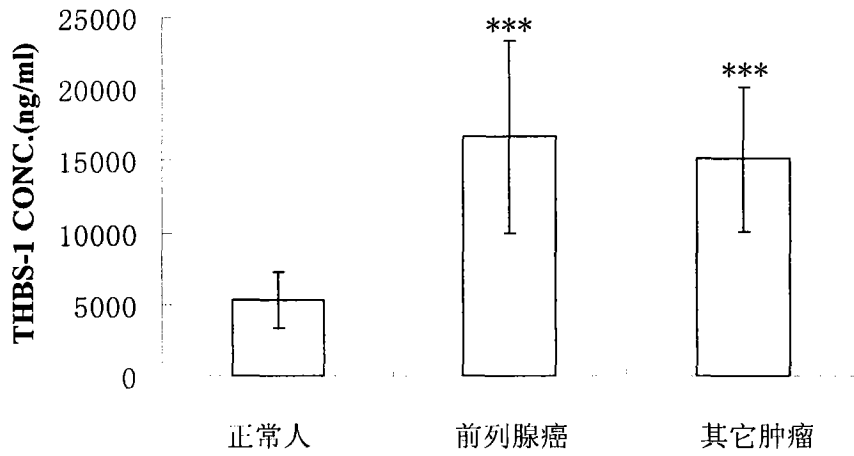


图 2