



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103250055 A

(43) 申请公布日 2013. 08. 14

(21) 申请号 201180059177. 3

(74) 专利代理机构 北京冠和权律师事务所

(22) 申请日 2011. 12. 08

11399

代理人 朱健

(30) 优先权数据

10-2010-0125086 2010. 12. 08 KR

(51) Int. Cl.

G01N 33/574 (2006. 01)

(85) PCT申请进入国家阶段日

G01N 33/532 (2006. 01)

2013. 06. 08

(86) PCT申请的申请数据

PCT/KR2011/009446 2011. 12. 08

(87) PCT申请的公布数据

W02012/077983 KO 2012. 06. 14

(71) 申请人 忠南大学校产学协力团

地址 韩国大田广域市儒城区弓洞 220 忠南
大学校

(72) 发明人 田炳和 崔星儿 申珠贤

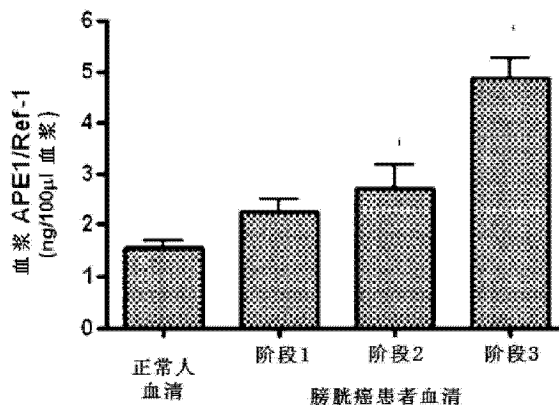
权利要求书1页 说明书6页 附图3页

(54) 发明名称

含有 APE1/Ref-1 的膀胱癌诊断用组合物及
利用其的膀胱癌诊断仪

(57) 摘要

本发明涉及含有 APE1/Ref-1 的膀胱癌诊断用组合物、含有特异性地结合于 APE1/Ref-1 的抗体的膀胱癌诊断仪,以及一种测定 APE1/Ref-1 的浓度的方法,该方法通过利用了特异性地结合于膀胱癌标记物即 APE1/Ref-1 的抗体的抗原-抗体结合反应在生物试样中测定 APE1/Ref-1 的浓度。本发明的 APE1/Ref-1 的浓度与正常人的血清中 APE1/Ref-1 蛋白质的浓度相比较,在膀胱癌患者的血清中,特别是在 2 期以上的膀胱癌患者的血清中有明显地增加。另外,在膀胱癌复发的情况下,与复发次数无关, APE1/Ref-1 的浓度与未复发的初期膀胱癌患者的血清中 APE1/Ref-1 的浓度相比较,在膀胱癌患者的血清中有明显地增加。由此,本发明的 APE1/Ref-1 蛋白质可早期预测膀胱癌的诊断或者预后,因此可有效地使用为膀胱癌诊断用标记物。



1. 一种膀胱癌诊断用组合物,其特征在于,该组合物含有 APE1/Ref-1。
2. 根据权利要求 1 所述的膀胱癌诊断用组合物,其特征在于,上述 APE1/Ref-1 在 2 期以上的膀胱癌中具有特异性。
3. 一种膀胱癌诊断仪,其特征在于,该诊断仪含有特异性地结合于 APE1/Ref-1 的抗体。
4. 一种测定 APE1/Ref-1 的浓度的方法,其特征在于,该方法通过利用了特异性地结合于膀胱癌标记物即 APE1/Ref-1 的抗体的抗原-抗体结合反应在生物试样中测定 APE1/Ref-1 的浓度。
5. 根据权利要求 4 所述的测定 APE1/Ref-1 的浓度的方法,其特征在于,上述生物试样包含选自由从哺乳动物中提取的组织、细胞、全血、血清、血浆、唾液、咳痰、及小便组成的组中的一种以上。
6. 根据权利要求 4 所述的测定 APE1/Ref-1 的浓度的方法,其特征在于,上述抗原-抗体结合反应利用选自由酶联免疫吸附测定法(ELISA)、放射免疫分析法(radioimmunoassay, RIA)、夹心酶联免疫吸附测试法(SANDWICH ELISA)、蛋白质印迹法、免疫沉淀法、免疫组织化学染色法(immunohistochemical staining)、流式细胞测定法(Flow Cytometry)、荧光活化细胞分类法(FACS)、酶基质发色法及抗原-抗体凝沉法组成的组中的一种以上方法来进行。
7. 根据权利要求 4 所述的测定 APE1/Ref-1 的浓度的方法,其特征在于,在膀胱癌患者的血清中 APE1/Ref-1 的浓度高于在正常人的血清中 APE1/Ref-1 的浓度的 1.5 ~ 3.5 倍。
8. 根据权利要求 4 所述的测定 APE1/Ref-1 的浓度的方法,其特征在于,上述 APE1/Ref-1 在 2 期以上的膀胱癌中具有特异性。

含有 APE1/REF-1 的膀胱癌诊断用组合物及利用其的膀胱癌诊断仪

技术领域

[0001] 本发明涉及含有 APE1/Ref-1 的膀胱癌诊断用组合物及利用其的膀胱癌诊断仪。

背景技术

[0002] 膀胱癌是在泌尿系统癌症中最常见的癌症,其产生原因也较多地被查明。主要被认为吸烟或者各种化学物质(例如,皮革等染色涂料、大气污染物、人造甜味剂、硝酸盐)被吸入到体内后,通过小便排泄出来的同时刺激膀胱壁,从而诱发癌症。

[0003] 在传统的膀胱癌检查中使用从小便中找出非正常细胞的方法,但是其精确度低。此外,将导液管(导管)插入到膀胱后,摘除并检查疑似癌变组织的膀胱镜检查是侵入式方法,从而具有较高的精确度。

[0004] 通常,如果在早期诊断出膀胱癌,则患者的生存率高,但是实际上不易在早期诊断出膀胱癌。现有使用的膀胱癌诊断方法是使用切开身体的一部分的方法,但是其很难在早期诊断出膀胱癌。膀胱癌根据是否侵袭到膀胱肌层来区分为浅表性或者浸润性癌症,在诊断时平均大约 30% 的患者属于浸润性膀胱癌。由此,如果要延长患者的生存期,则最好在病变范围小时进行早期诊断。由此,迫切需要开发与现有的各种膀胱癌诊断方法相比更有效率的诊断方法,换句话说,膀胱癌特异性生物标记物,其可进行早期诊断,并且可大量处理临床标本,并且灵敏度及特异性高。

[0005] 另外, APE1/Ref-1 (apurinic/aprimidinic endonuclease/redox factor-1) 是由包括氧化还原区(redox region)、DNA 修复区(DNA repair region)的 318 个氨基酸构成的多功能蛋白质。上述蛋白质被认为具有如下功能:在 DNA 损伤时复原损伤部位的 APE1 的功能,以及如 AP-1、NF- κ B 一样的转录因子的还原性调节功能(redox function) (Gurusamy, Malik et al. 2007)。APE1/Ref-1 的转录因子还原性调节功能在许多转录因子的 DNA 结合区中将作为氧化型半胱氨酸(cysteine)的残余物进行还原,从而执行易于转录的作用(Xanthoudakis, Miao et al. 1994; Tell, Damante et al. 2005)。

[0006] APE1/Ref-1 存在于所有的细胞及组织,并且细胞内表达位置被认为根据细胞而有所不同。在转录阶段及转录后阶段的水平时对 APE1/Ref-1 的表达调节进行调节。增加 APE1/Ref-1 的表达的主要原因是活性氧簇(reactive oxygen species; ROS)。在巨噬细胞及淋巴球对过氧化氢及次氯酸(hypochlorous acid; HOCl)进行处理时,细胞内 APE1/Ref-1 的表达会增加,上述 APE1/Ref-1 的表达增加被认为用于保护细胞的毒性及氧化性损伤的细胞的适应反应(Ramana Boldogh et al. 1998)。

[0007] 对于 APE1/Ref-1 的细胞内位置的报告有各种各样。如果对 APE1/Ref-1 的蛋白质序列进行分析,则可想到上述各种细胞内位置的多样性。在 APE1/Ref-1 的氨基酸末端部位(endsite)存在有核定位信号(nuclear localization signal; NLS) (Jackson, Theriot et al. 2005),并且被认为在作为半胱氨酸的 93 号和 310 号氨基酸的氮化合中存在有核输出信号(nuclear export signal; NES),上述核输出信号将存在于核内的 APE1/Ref-1 移动

至细胞质(Qu, Liu et al. 2007)。另外,在线粒体中也被确认有 APE1/Ref-1 蛋白质的表达(Chattopadhyay, Wiederhold et al. 2006)。

[0008] 生成于细胞内的 APE1/Ref-1 蛋白质可游离至细胞外。在巨噬细胞中,根据内毒素的细胞活性及炎症反应将 APE1/Ref-1 游离至细胞外。由此,正确测定 APE1/Ref-1 的能力被认为在心脑血管疾病、传染疾病及肿瘤等许多生物学过程中对 APE1/Ref-1 的潜在性作用等进行理解时很重要。

[0009] 但是,到目前为止还没有对于 APE1/Ref-1 蛋白质是否作为膀胱癌诊断用标记物进行作用的报告,与此相关的研究也处于全无的状态。由此,迫切需要生物标记物的开发,其在健康检查时,从血液中简便地早期诊断出膀胱癌,从而可增加患者的生存率。

发明内容

[0010] 本发明者在对早期可迅速简便正确地诊断出膀胱癌的生物标记物进行研究中, APE1/Ref-1 蛋白质的浓度在与正常人的血清中 APE1/Ref-1 蛋白质的浓度相比较,在膀胱癌患者的血清中,特别是在 2 期以上的膀胱癌患者的血清中明显地增加,并且与复发次数无关,对如下进行确认后完成了本发明: APE1/Ref-1 蛋白质的浓度在膀胱癌患者的血清中增加。

[0011] 本发明提供含有 APE1/Ref-1 的膀胱癌诊断用组合物。

[0012] 另外,本发明提供膀胱癌诊断仪,其含有特异性地结合于 APE1/Ref-1 的抗体。

[0013] 另外,本发明提供一种测定 APE1/Ref-1 的浓度的方法,该方法通过利用了特异性地结合于膀胱癌标记物即 APE1/Ref-1 的抗体的抗原-抗体结合反应在生物试样中测定 APE1/Ref-1 的浓度。

[0014] 本发明的 APE1/Ref-1 的浓度与正常人的血清中 APE1/Ref-1 的浓度相比较,在膀胱癌患者的血清中,特别是在 2 期以上的膀胱癌患者的血清中明显地增加。另外,在膀胱癌复发的情况下,与复发次数无关, APE1/Ref-1 的蛋白质浓度与未复发的初期膀胱癌患者的血清中 APE1/Ref-1 的蛋白质浓度相比较,在膀胱癌患者的血清中有明显地增加。由此,本发明的 APE1/Ref-1 蛋白质可早期预测膀胱癌的诊断或者预后,因此可有效地使用为膀胱癌诊断用标记物。

附图说明

[0015] 图 1 是表示 APE1/Ref-1 蛋白质的酶联免疫吸附测定 (ELISA) 标准曲线的图。

[0016] 图 2 是在膀胱癌患者和正常人的血清中通过夹心酶联免疫分析 (SANDWICH ELISA) 法测定 APE1/Ref-1 蛋白质的浓度后进行比较的图。

[0017] 图 3 是表示根据膀胱癌各个阶段的膀胱癌患者的血清中 APE1/Ref-1 蛋白质的浓度的图。

[0018] 图 4 是表示根据膀胱癌的复发次数及病变数的膀胱癌患者的血清中 APE1/Ref-1 蛋白质的浓度的图 [(A) R_0 : 未复发, R_1 : 复发次数为 1 次, R_3 : 复发次数为 3 次, R_7 : 复发次数为 7 次; (B) single: 单发性, multiple: 多发性]。

具体实施方式

[0019] 本发明提供含有 APE1/Ref-1 的膀胱癌诊断用组合物。

[0020] 另外,本发明提供含有抗体的膀胱癌诊断仪,上述抗体特异性地结合于 APE1/Ref-1。

[0021] 另外,本发明提供一种测定 APE1/Ref-1 的浓度的方法,该方法通过利用了特异性地结合于膀胱癌标记物即 APE1/Ref-1 的抗体的抗原-抗体结合反应在生物试样中测定 APE1/Ref-1 的浓度。以下,对本发明进行详细说明。

[0022] 本发明的 APE1/Ref-1 蛋白质的浓度在膀胱癌患者的血清中高于正常人的血清中 APE1/Ref-1 蛋白质浓度的 1.5~3.5 倍,并且患膀胱癌的阶段越高,特别是在 2 期以上的膀胱癌患者的血清中明显地增加。另外,当膀胱癌复发时,与复发次数无关,APE1/Ref-1 蛋白质的浓度在膀胱癌患者的血清中与在未复发的初期膀胱癌患者的血清中的 APE1/Ref-1 蛋白质的浓度相比较明显地增加。由此,本发明的 APE1/Ref-1 蛋白质可早期预测膀胱癌的诊断或者预后,因此可有效地使用为膀胱癌诊断用标记物。

[0023] 另外,利用上述 APE1/Ref-1 蛋白质并根据通常使用于所属领域的制造方法可易于制造本发明的膀胱癌诊断仪,本发明的上述膀胱癌诊断仪包括有特异性地结合于 APE1/Ref-1 的抗体。

[0024] 上述膀胱癌诊断仪可包括与抗体、二次抗体接合物、标志物进行发色反应的发色基质溶液、清洗溶液及酶反应停止溶液等,上述抗体特异性地结合于 APE1/Ref-1,上述二次抗体接合物(conjugate)接合有通过与基质反应而发色的标志物。

[0025] 优选地,上述二次抗体接合物的标志物为进行发色反应的通常的发色剂,并且可使用辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase)、碱性磷酸酶(alkaline phosphatase)、胶体金(colloid gold)、异硫氰酸荧光素(poly L-lysine-fluorescein isothiocyanate)、罗丹明 B 异硫氰酸盐(rhodamine-B-isothiocyanate)等荧光物质(fluorescein)及色素(dye)等。

[0026] 优选地,上述发色基质溶液根据标志物进行使用,可使用四甲基联苯胺(3,3',5,5'-Tetramethyl benzidine)、2,2-联氮-二(3-乙基-苯并噻唑-6-磺酸)二铵盐(ABTS)、邻苯二胺(o-phenylenediamine)等。此时,更优选地,发色基质在溶解于缓冲溶液(0.1M NaOAc, Ph5.5)的状态下提供。

[0027] 优选地,清洗溶液包括磷酸盐缓冲溶液、氯化钠(NaCl)及吐温 20,并且更优选为由 0.02M 磷酸盐缓冲溶液、0.13M 氯化钠(NaCl)及 0.05% 吐温 20 构成的缓冲溶液(PBST)。清洗溶液在抗原-抗体结合反应后,将抗原-抗体结合物与 2 次抗体进行反应,之后将适当量添加于固定体,从而进行 3 至 6 次清洗。反应停止溶液可使用为磺酸溶液。

[0028] 另外,本发明中,通过抗原-抗体结合反应在生物试样中测定 APE1/Ref-1 蛋白质的浓度,从而可早期预测膀胱癌的诊断或者预后,上述抗原-抗体结合反应利用特异性地结合于作为膀胱癌标记物的 APE1/Ref-1 的抗体。

[0029] 具体地,将生物试样与固定化于固定体的捕获抗体进行接触,并且将从固定化的捕获抗体中剩余的试样进行分离后,将固定化的捕获抗体-分子靶向复合体与检测抗体进行接触。之后,利用可认知检测抗体的检测方法在生物试样中测定 APE1/Ref-1 蛋白质的浓度。换句话说,在膀胱癌患者和正常人的血清中测定 APE1/Ref-1 的浓度后进行比较,从而如果在膀胱癌患者的血清中的 APE1/Ref-1 的浓度高于正常人的血清中的 APE1/Ref-1 的

浓度,则诊断为具有膀胱癌或者预测为会具有膀胱癌。特别是,APE1/Ref-1 蛋白质的浓度在膀胱癌的阶段越高,优选地,2 期以上的膀胱癌患者的血清中有明显增加。

[0030] 上述生物试样可包括从哺乳动物中提取的如组织、细胞、全血、血清、血浆、唾液、咳痰、小便一样的试样,但是并不限于此。上述试样在使用之前可通过过滤、蒸馏、提取、浓缩、阻碍成分的失活、试剂的添加等进行预处理。

[0031] 用于上述抗原-抗体结合反应的固定体可使用硝酸纤维素膜、聚偏氟乙烯膜(polyvinylidene difluoride membrane)、聚乙烯树脂或者由聚苯乙烯树脂合成的 96 孔板以及形成为玻璃的载片等。

[0032] 上述抗原-抗体结合反应可利用通常的如下方法来执行:酶联免疫吸附测定法(ELISA)、放射免疫分析法(radioimmunoassay,RIA)、夹心酶联免疫吸附测试法(SANDWICH ELISA)、蛋白质印迹法、免疫沉淀法、免疫组织化学染色法(immunohistochemical staining)、流式细胞术测定法(Flow Cytometry)、荧光活化细胞分类法(FACS)、酶基质发色法、抗原-抗体凝沉法等。

[0033] 本发明中,抗体可以是整体形态的抗体(以下称为“全抗体”)或者其功能性的片段。上述全抗体可以是单体或者是结合有 2 个以上的全抗体的聚合体的形态。上述抗体的功能性片段为具有全抗体的中链及轻链可变区的抗体,实质上意味着认知与全抗体认知相同的抗原结合区(epitope)。在上述抗体的功能性的片段中包括有单链可变区片段(scFv)、(scFv)₂、Fab、Fab' 及 F(ab')₂ 等,但是并不限于此。上述单链可变区(scFv)意味着抗体片段,上述抗体片段中,中链可变区和轻链可变区通过连接肽进行连接,从而具有单链多肽形态。

[0034] 上述抗体结合于如酶、荧光物质、辐射物质及蛋白质等各种分子后可进行变形。变形的抗体可通过化学方法来进行变形并提取。上述变形方法通常使用于所属领域。另外,上述抗体可提取为嵌合抗体(chimeric antibody),上述嵌合抗体结合有来自于非人类抗体中的可变区(variable region)和来自于人类抗体中的恒定区(constant region),或者包括有从非人类抗体中诱导的互补性决定区,从而提取为从人类抗体中诱导的结构区(frame work region,FR)和结合有不变区的人源抗体(humanized antibody)。上述抗体可利用已知于所属领域的方法来制造。

[0035] 以下,为了易于理解本发明,提供优选实施例。但是以下实施例只是为了更易于理解本发明而提供的,而不是通过实施例限定本发明的内容。

[0036] 实施例 1:在膀胱癌患者的血清中测定 APE1/Ref-1 蛋白质的浓度

[0037] 为了在膀胱癌患者的血清中测定 APE1/Ref-1 蛋白质的浓度,利用夹心酶联免疫分析法来执行如下所述的实验。

[0038] 1. 准备用于酶联免疫吸附测定法(ELISA)的试样

[0039] 为了测定膀胱癌患者和正常人的血清内的 APE1/Ref-1 的量,利用装有阻凝剂的全血采集管来采集正常人和膀胱癌患者的血液。从 51 名膀胱癌患者和 56 名为了健康检查而提供帮助的正常人中分别采集 10ml 左右的血液。将上述采集的血液在常温中进行摇动并放置后,在 2500rpm 的情况下进行 10 分钟离心分离,并且将上层液(即,血浆)进行分离。将分离的上层液在 4℃低温中保管后,在执行夹心酶联免疫分析时,每个试样使用 100 μl。

[0040] 2. 决定用于酶联免疫吸附测定法(ELISA)的抗体和标准物质

[0041] 作为认知 APE1/Ref-1 的捕获抗体使用了抗 -APE1/Ref-1 多克隆抗体 (Abcam, ab64865)。作为认知结合于捕获抗体的 APE1/Ref-1 的检测抗体使用了抗 -APE1/Ref-1 单克隆抗体 (Abcam, ab194)。作为 APE1/Ref-1 的标志物质将从大肠菌中分离、纯化的再组合人类 APE1/Ref-1-His 每 5 倍连续稀释 (0-25ng) 而使用。

[0042] 3. 夹心酶联免疫分析法

[0043] 在涂层缓冲液 (0.5 M 碳酸氢钠缓冲液, pH9.6) 中将捕获抗体按照 200ng/ml 的浓度进行稀释, 从而涂层于用于酶联免疫吸附测定 (ELISA) 的 96 孔微孔板 (BD Falcon3072, Franklin, NJ)。在 4℃ 中对板进行整夜涂层。为了去除未结合的 APE1/Ref-1 多克隆抗体, 使用清洗溶液 (PBS, 0.05% Tween20) 来将板清洗 3 次。在清洗后, 使用 250 μl 封闭溶液 (PBS, 5% Bovine Serum Albumin, BSA) 来在常温下将板封闭一个小时。将每 100 μl 膀胱癌患者和正常人的血浆试样分别添加至 96 孔板, 并且在 37℃ 下反应 90 分钟。利用清洗溶液将板清洗 5 次。为了调查结合于捕获抗体的 APE1/Ref-1 的程度, 将检测抗体抗 -APE1/Ref-1 单克隆抗体稀释为 200ng/ml 的浓度, 在常温下反应 2 个小时。利用清洗溶液将板清洗 7 次。将认知检测抗体的 HRP- 结合的抗 - 小鼠 IgG 二次抗体按照 1:5000 进行稀释, 并且添加至板上。将板在常温下反应 30 分钟, 并且使用清洗溶液清洗 5 次。在板中添加了四甲基联苯胺 (tetramethyl benzidine, TMB) 过氧化物酶基质及过氧化物酶溶液 (BD555214, Franklin, NJ)。将板在常温下产生变色开始的同时反应 4 分钟, 并且有规则地进行摇动。将 2.5M H₂SO₄ 作为反应停止液进行添加, 并且在 450nm 的情况下测定了吸光度。

[0044] 4. 决定根据本发明的酶联免疫吸附测定 (ELISA) 的标准范围

[0045] 将纯化并分离的再组合人类 APE1/Ref-His 在 0-25ng 范围内连续稀释, 从而获得表示直线性的标准曲线, 并且表示于表 1 及图 1 中。

[0046] 1. 在膀胱癌患者和正常人的血清中利用夹心酶联免疫分析法来测定 APE1/Ref-1 蛋白质的浓度后进行比较的结果表示于表 2 及图 2 中, 根据处于膀胱癌的各个阶段的膀胱癌患者的血清中的 APE1/Ref-1 蛋白质的浓度表示于图 3 中, 根据膀胱癌的复发次数及病变数的膀胱癌患者的血清中的 APE1/Ref-1 蛋白质的浓度表示于图 4 中 [(A) R₀: 未复发, R₁: 复发次数为 1 次, R₃: 复发次数为 3 次, R₇: 复发次数为 7 次; (B) single: 单发性, multiple: 多发性]。

[0047] 表 1

APE1/Ref-His 的浓度 (ng)	吸光度			零标准值 (zero standard subtracted)
	OD1	OD2	平均值	
0	0.0490	0.0480	0.0477	0.00
0.16	0.0530	0.0560	0.0543	0.01
0.8	0.0820	0.0810	0.0867	0.04
4	0.1940	0.2110	0.2083	0.12
20	0.5440	0.5110	0.5297	0.48

[0049] 表 2

[0050]

	血中 APE1/Ref-1 蛋白质的浓度 (ng/100 μ l)
正常人的血清	1.547 $\pm$ 0.319
膀胱癌患者的血清	3.548 $\pm$ 0.333

[0051] 如表 2 及图 2 所示,在膀胱癌患者的血清中 APE1/Ref-1 蛋白质的浓度增加为在正常人的血清中 APE1/Ref-1 蛋白质的浓度的 1.5 ~ 3.5 倍。

[0052] 另外,如图 3 所示,可确认为膀胱癌的阶段越高,特别是 2 期以上的膀胱癌患者的血清中 APE1/Ref-1 蛋白质的浓度明显地增加。

[0053] 另外,如图 4 所示,在膀胱癌复发的情况下(R1、R3、R7),与复发次数无关,在膀胱癌患者的血清中 APE1/Ref-1 蛋白质的浓度与在未复发(R0)的初期膀胱癌患者的血清中 APE1/Ref-1 蛋白质的浓度相比较明显地增加了。但是,膀胱癌患者的血清中 APE1/Ref-1 蛋白质的浓度不会与膀胱癌复发次数成比例进行增加(图 4A)。另外,在膀胱癌的病变数为多发性的情况下,与单发性的情况相比较,可看出 APE1/Ref-1 蛋白质的浓度增加的倾向,但是未显示明显的差异(图 4B)。

[0054] 本发明的 APE1/Ref-1 蛋白质可早期预测膀胱癌的诊断或者预后,因此可有效地使用为膀胱癌诊断用标记物。

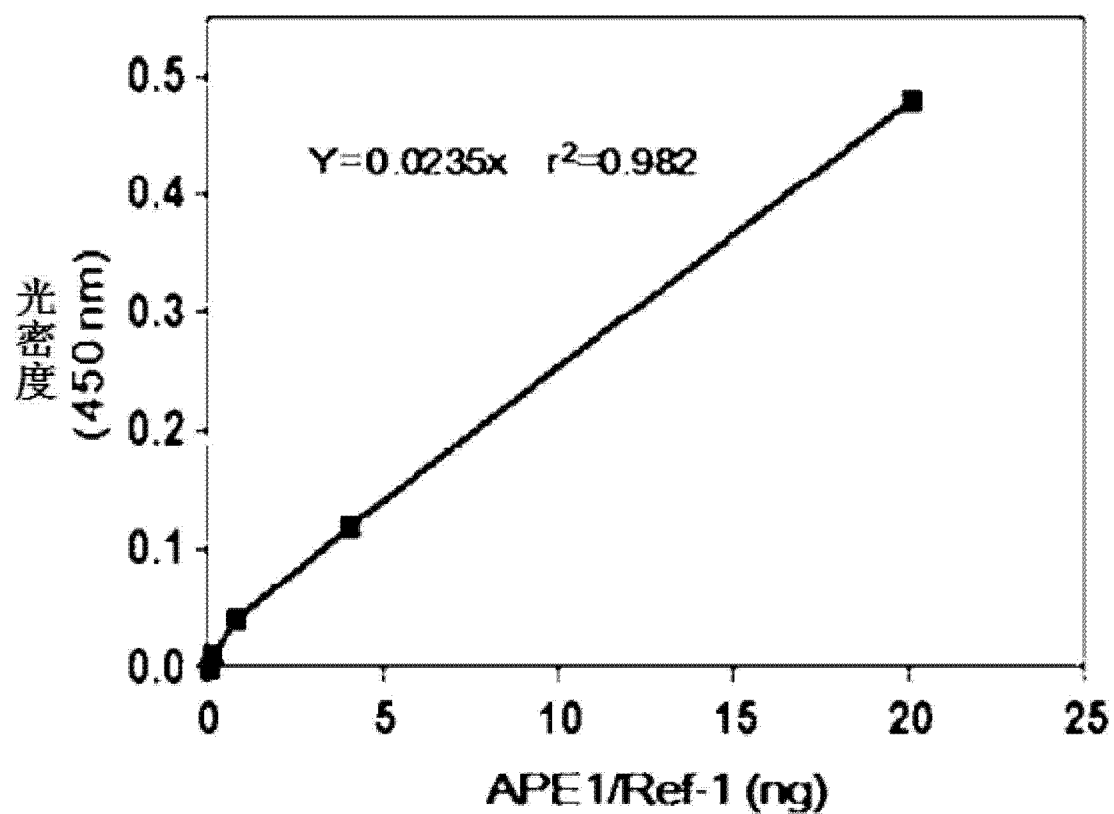


图 1

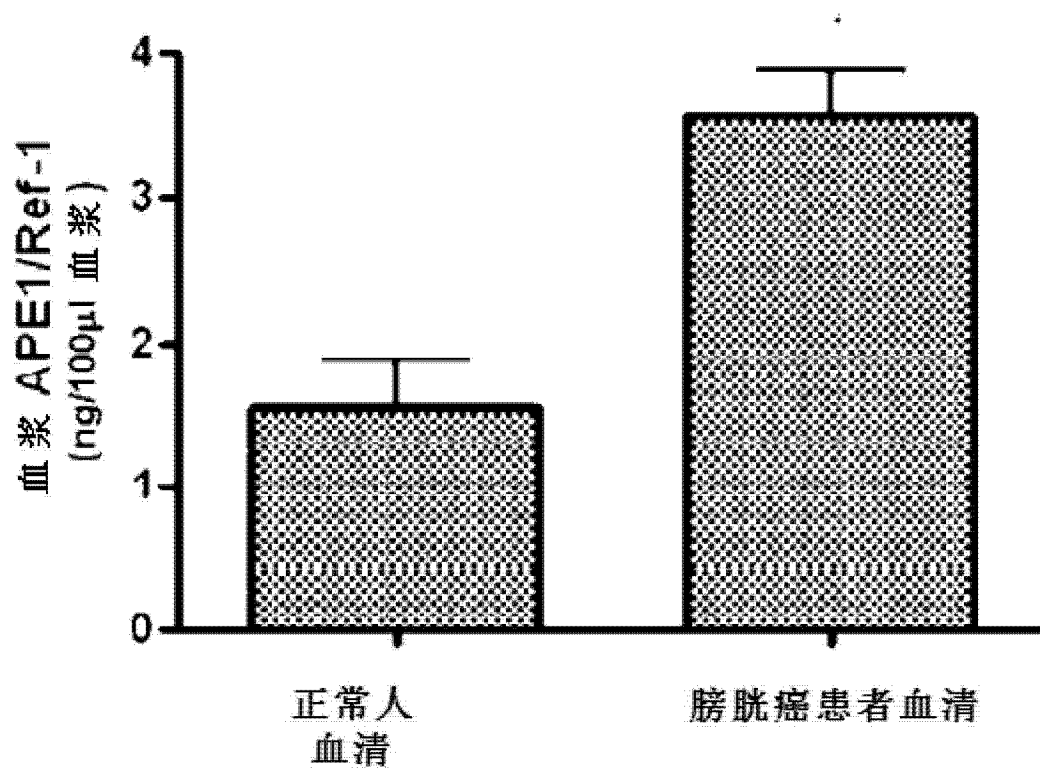


图 2

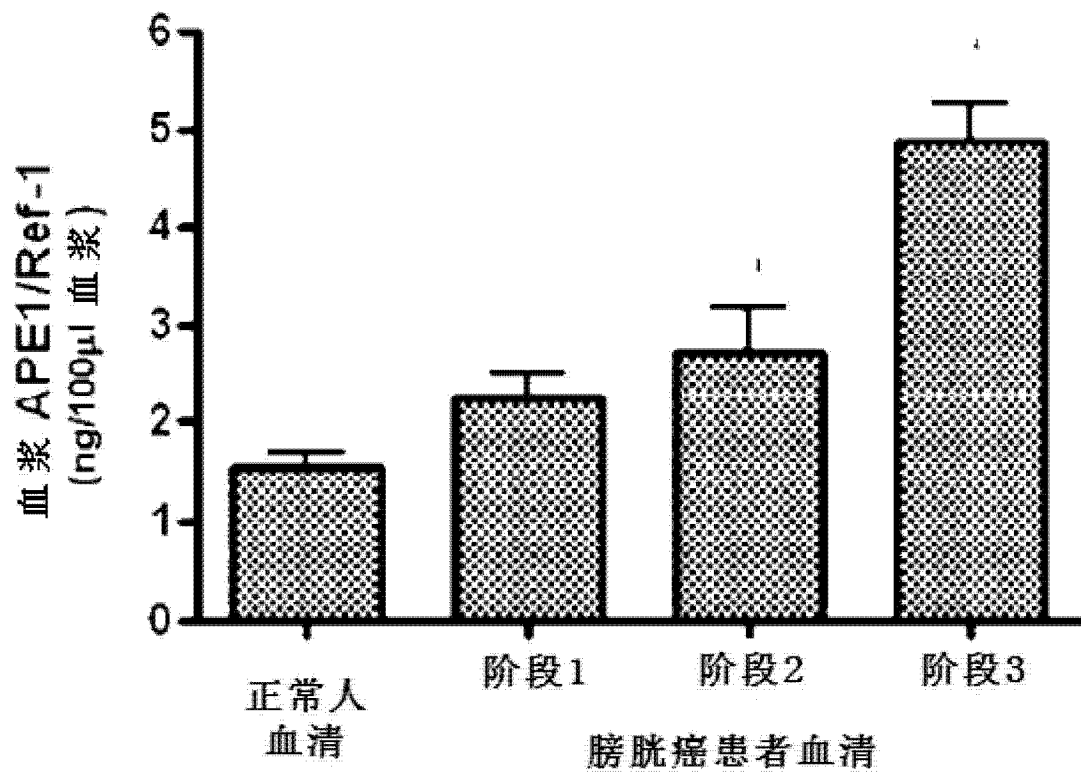


图 3

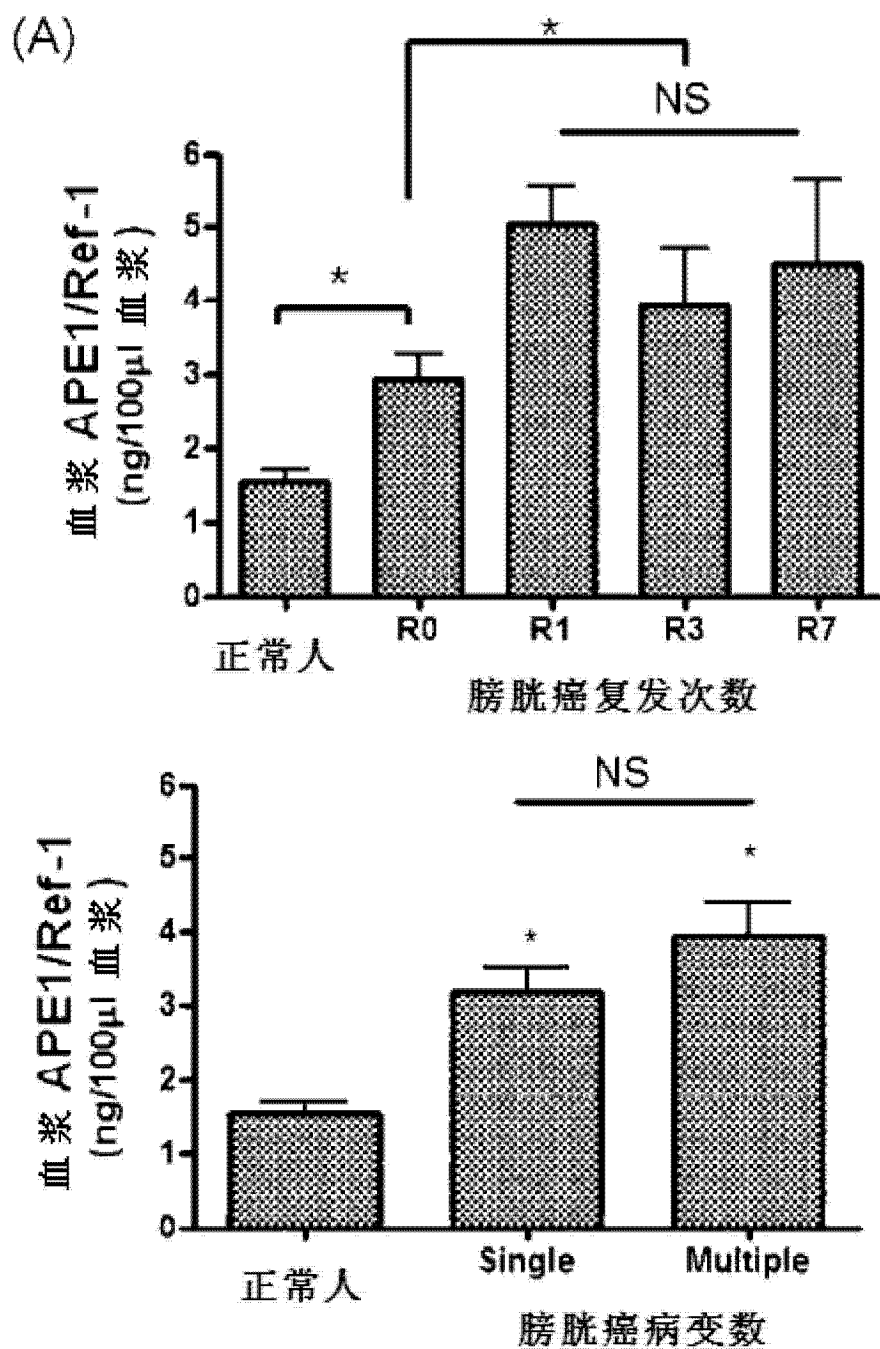


图 4