



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103792364 A

(43) 申请公布日 2014. 05. 14

(21) 申请号 201210428989. 7

(22) 申请日 2012. 10. 31

(71) 申请人 张宝弘

地址 201204 上海市浦东新区花木路 916 弄
4 号 1903

(72) 发明人 张宝弘 林平

(74) 专利代理机构 北京康信知识产权代理有限
责任公司 11240

代理人 吴贵明 张永明

(51) Int. Cl.

G01N 33/68(2006. 01)

G01N 33/577(2006. 01)

G01N 33/53(2006. 01)

C12Q 1/68(2006. 01)

权利要求书2页 说明书7页 附图2页

(54) 发明名称

用于检测外周血中循环肿瘤细胞 ROR1 蛋白的试剂及其应用

(57) 摘要

本发明公开了用于检测循环血液中 ROR1 蛋白的试剂及其应用。其中,用于检测外周血中循环肿瘤细胞 ROR1 蛋白的试剂。该试剂包括:ROR1 抗体、缓冲液、标记物、核染料及淋巴细胞识别抗体。本发明利用 ROR1 只在癌细胞表达,而不在正常成人组织细胞表达这一特性,应用本发明的试剂检测循环血液中从原发肿瘤病灶脱落到血中的循环肿瘤细胞或肿瘤干细胞表达的 ROR1 蛋白,克服了传统方法的局限性,大大提高了循环肿瘤细胞检测的准确性和可靠性。本发明的试剂能够用于帮助检测肿瘤病人循环血中的肿瘤细胞,这对于肿瘤的疾病诊断,治疗效果的评估及癌转移监测是一个潜在的突破点。



1. 一种用于检测外周血中循环肿瘤细胞 ROR1 蛋白的试剂,其特征在于,包括:ROR1 抗体、缓冲液、标记物、核染料及淋巴细胞识别抗体。

2. 根据权利要求 1 所述的试剂,其特征在于,所述核染料为 DAPI ;淋巴细胞识别抗体为 CD45。

3. 根据权利要求 1 所述的试剂,其特征在于,所述 ROR1 抗体为单克隆抗体、多克隆抗体或免疫血清。

4. 一种用于检测循环肿瘤细胞 ROR1 蛋白的试剂盒,其特征在于,包括如权利要求 1 至 3 中任一项所述的试剂。

5. 一种如权利要求 1 至 3 中任一项所述的试剂在制备诊断癌症的试剂盒中的应用。

6. 一种如权利要求 1 至 3 中任一项所述的试剂在体外检测循环肿瘤细胞 ROR1 蛋白的应用。

7. 一种帮助癌症诊断的检测方法,其特征在于,包括以下步骤:

1) 从外周血或生物体液中分离非红细胞非白细胞的混合细胞群;

2) 检测所述细胞是否表达 ROR1 基因和 / 或蛋白 ;以及

3) 根据所述 ROR1 基因和 / 或蛋白表达信息帮助癌症诊断。

8. 一种用于帮助治疗方案的制定、评估癌症治疗效果和存活率的方法,其特征在于,包括以下步骤:

1) 从来自经治疗之后的癌症患者的全血或生物体液中分离肿瘤细胞;

2) 监测所述肿瘤细胞中 ROR1 基因和 / 或蛋白表达水平 ;以及

3) 根据所述 ROR1 基因和 / 或蛋白表达水平帮助治疗方案的制定,判断所述癌症治疗效果和存活率,

其中所述治疗选自手术、放射治疗、药物治疗、靶向治疗、或它们的联合疗法。

9. 一种用于帮助评估癌细胞转移、耐药性和复发可能性的方法,其特征在于,包括以下步骤:

1) 从来自经治疗之后的癌症患者的全血或生物体液中分离循环肿瘤细胞;

2) 监测所述循环肿瘤细胞中 ROR1 基因和 / 或蛋白表达水平 ;以及

3) 根据所述 ROR1 基因和 / 或蛋白表达水平帮助评估癌细胞转移、耐药性和复发可能性,

其中所述治疗选自手术、放射治疗、药物治疗、靶向治疗、或它们的联合疗法。

10. 根据权利要求 7 至 9 任一项所述的帮助癌症诊断检测方法、帮助评估癌症治疗效果和存活率的方法或帮助评估癌细胞转移、耐药性和复发可能性的方法,其特征在于,所述从生物体液中分离肿瘤细胞采用选自抗体直接捕获法、循环肿瘤细胞富集分离方法、过滤法中的一种 ;优选地,所述生物体液包括循环血液、骨髓、胸水、脑脊液、淋巴液、腹水、尿液、唾液、痰液、冲灌液、精液、腺体分泌物、炎性渗出物 ;优选地, ROR1 蛋白检测方法包括:免疫荧光法如荧光显微镜、流式细胞技术、微流体、免疫沉淀、西点墨点法、酶联免疫吸附测定、放射免疫分析法、和质谱方法 ;优选地,通过聚合酶链式反应和 / 或逆转录聚合酶链式反应检测所述 ROR1 基因的表达水平 ;优选地,所述循环血液取自正常人或癌症病人,所述癌症病人包括患有上皮来源的实体瘤的病人 ;优选地,所述癌症病人包括患肺癌、乳腺癌、卵巢癌、宫颈癌、前列腺癌、膀胱癌、睾丸癌、食管癌、结直肠癌、食管癌、胃癌、肝癌、脑癌、神经胶

质瘤、胰腺癌、和 / 或皮肤癌的病人 ; 优选地, 通过 ROR1 抗体检测 ROR1 的蛋白表达水平, 采用荧光标记进行标记, 所述荧光标记采用免疫组织化学染色、免疫荧光抗体染色及其后续的借助荧光显微镜和 / 或荧光分析技术进行的定性与定量分析。

11. 一种用于抗肿瘤药物或抑制癌细胞转移的药物筛选的方法, 包括:

- 1) 从来自患癌实验动物的生物体液中分离循环肿瘤细胞;
- 2) 监测所述循环肿瘤细胞中 ROR1 基因或蛋白表达水平; 以及
- 3) 根据预定频率和用量及给药时间给予所述患癌的实验动物候选化合物,
- 4) 再次从来自给予所述候选化合物的所述患癌实验动物的生物体液中分离循环肿瘤细胞;
- 5) 再次监测来自所述给予候选化合物的所述实验动物的所述循环肿瘤细胞中 ROR1 基因或蛋白表达水平, 其中所述循环肿瘤细胞中 ROR1 基因或蛋白表达水平低于在步骤 2) 中所监测的所述循环肿瘤细胞中 ROR1 基因或蛋白表达水平的候选化合物即为目标化合物。

用于检测外周血中循环肿瘤细胞 ROR1 蛋白的试剂及其应用

技术领域

[0001] 本发明涉及蛋白质检测技术领域,具体而言,涉及一种用于检测外周血中循环肿瘤细胞 ROR1 蛋白的试剂及其应用。

背景技术

[0002] 在肿瘤的生长过程中,肿瘤细胞会从原发病灶脱落进入到循环系统中成为“循环肿瘤细胞”,并且作为一种检测肿瘤特异的检验指标。肿瘤转移是循环肿瘤细胞从原发肿瘤病灶进入到血液循环之后会依附到远端的组织开始生长发育成新的肿瘤。大量临床数据表明,循环肿瘤细胞是造成肿瘤患者死亡的主要原因。最近开发出来的对于循环肿瘤细胞的分离方法对肿瘤的早期诊断有着非常重要的意义。重要的是循环肿瘤细胞的定量可以用来预测肿瘤转移的后果。另外,肿瘤干细胞(循环肿瘤细胞的一种,会导致肿瘤的产生)可以被用于肿瘤转移以及复发的诊断。因此,循环肿瘤细胞的检测已被公认为可有效地应用于体外早期癌症诊断,化疗药物的快速评估,个体化治疗包括临床筛药、耐药性的检测,肿瘤复发的监测以及肿瘤新药物的开发等。然而,如何找到敏感特异和稳定的循环肿瘤细胞标记物以准确识别循环肿瘤细胞是目前困扰开发循环肿瘤细胞检测技术的难题。

[0003] 捕获循环肿瘤细胞的方法报道很多,基本分为三大类:抗体直接捕获,富集,过滤。相比之下,如何准确识别鉴定分离出的细胞为循环肿瘤细胞报道甚少,主要原因是缺乏稳定特异的肿瘤细胞识别物。现有的包括美国药监局批准的“细胞寻找系统(CellSearch System)”方法都采用细胞角蛋白(CK)和/或 EpCAM 阳性, CD45 阴性的有核细胞作为识别循环肿瘤细胞的判断标准。但是越来越多的试验证明并非所有癌细胞都表达 EpCAM。癌症发展进程中或在转移时,某些癌症的 EpCAM 表达增高而某些癌症的 EpCAM 降低。癌细胞特别在由上皮细胞源性到间质细胞性转换期间, CK 和 EpCAM 表达都降低。EpCAM 表达低的癌细胞容易从实体肿瘤脱落,而特殊结构功能的细胞角蛋白会促使癌细胞更具可塑性和迁移性。虽然人们试图用更多的肿瘤标记物抗体来增强鉴定循环肿瘤细胞的准确性和敏感性,由于这些肿瘤表达的蛋白或者只在部分人群中表达或者随肿瘤发展的不同阶段而改变,所以检测成本增加又解决不了根本问题。

[0004] ROR 归属于膜表面氨酸激酶家族,有 ROR1 和 ROR2 成员,最先在脑胶质瘤细胞中发现。两者的基因分别在染色体 1 和 9 号上,编码 104KD 的蛋白。一直以来认为两个 ROR 受体都为“孤儿”受体,直到最近才发现 Wnt5A 是 ROR2 的内源性配体。然而 ROR1 的内源性配体至今还没找到。ROR 在胚胎神经器官发育表达很高而在成熟后消失。近来发现 ROR1 在急性和慢性白血病细胞中表达并对癌细胞的生长起决定作用。然而如何监测 ROR1 以及在肿瘤诊断、治疗、转移中的应用进展甚少。

发明内容

[0005] 本发明旨在提供一种用于检测循环血液中肿瘤细胞表达的 ROR1 蛋白的试剂及其

应用,以解决现有缺乏简便,灵敏和可靠的癌症早期诊断和癌症转移监测的技术问题。

[0006] 为了实现上述目的,根据本发明的一个方面,提供了一种用于检测外周血中循环肿瘤细胞 ROR1 蛋白的试剂。该试剂包括:ROR1 抗体、缓冲液、标记物、核染料及淋巴细胞识别抗体。

[0007] 进一步地,核染料为 DAPI ;淋巴细胞识别抗体为 CD45。

[0008] 进一步地,ROR1 抗体为单克隆抗体、多克隆抗体或免疫血清。

[0009] 根据本发明的另一个方面,提供了一种用于检测循环肿瘤细胞 ROR1 蛋白的试剂盒。该试剂盒包括如权利要求 1 或 2 的试剂。

[0010] 根据本发明的再一个方面,提供一种上述试剂在制备诊断癌症的试剂盒中的应用。

[0011] 根据本发明的再一个方面,提供一种上述试剂在体外检测循环肿瘤细胞 ROR1 蛋白的应用。

[0012] 根据本发明的再一个方面,提供一种帮助癌症诊断的检测方法。该方法包括以下步骤:1) 从外周血或生物体液中分离非红细胞非白细胞的混合细胞群;2) 检测细胞是否表达 ROR1 基因和蛋白;以及 3) 根据 ROR1 基因和 / 或蛋白表达信息帮助癌症诊断。

[0013] 根据本发明的再一个方面,提供一种用于帮助治疗方案的制定、评估癌症治疗效果和存活率的方法。该方法包括以下步骤:1) 从来自经治疗之后的癌症患者的全血或生物体液中分离肿瘤细胞;2) 监测肿瘤细胞中 ROR1 基因和 / 或蛋白表达水平;以及 3) 根据 ROR1 基因和 / 或蛋白表达水平帮助治疗方案的制定,判断癌症治疗效果和存活率,其中治疗选自手术、放射治疗、药物治疗、靶向治疗、或它们的联合疗法。

[0014] 根据本发明的再一个方面,提供一种用于帮助评估癌细胞转移、耐药性和复发可能性的方法。该方法包括以下步骤:1) 从来自经治疗之后的癌症患者的全血或生物体液中分离循环肿瘤细胞;2) 监测循环肿瘤细胞中 ROR1 基因和 / 或蛋白表达水平;以及 3) 根据 ROR1 基因和 / 或蛋白表达水平帮助评估癌细胞转移、耐药性和复发可能性,其中治疗选自手术、放射治疗、药物治疗、靶向治疗、或它们的联合疗法。

[0015] 根据本发明的再一个方面,提供一种帮助癌症诊断检测方法、帮助评估癌症治疗效果和存活率的方法或帮助评估癌细胞转移、耐药性和复发可能性,其中,从生物体液中分离肿瘤细胞采用选自抗体直接捕获法、循环肿瘤细胞富集分离方法、过滤法中的一种;优选地,生物体液包括循环血液、骨髓、胸水、脑脊液、淋巴液、腹水、尿液、唾液、痰液、冲灌液、精液、腺体分泌物、炎性渗出物;优选地,ROR1 蛋白检测方法包括:免疫荧光法如荧光显微镜、流式细胞技术、微流体、免疫沉淀、西点墨点法、,酶联免疫吸附测定、放射免疫分析法、和质谱方法;优选地,通过聚合酶链式反应和 / 或逆转录聚合酶链式反应检测 ROR1 基因的表达水平;优选地,循环血液取自正常人或癌症病人,癌症病人包括患有上皮来源的实体瘤的病人;优选地,癌症病人包括患肺癌、乳腺癌、卵巢癌、宫颈癌、前列腺癌、膀胱癌、睾丸癌、食管癌、结直肠癌、食管癌、胃癌、肝癌、脑癌、神经胶质瘤、胰腺癌、和 / 或皮肤癌的病人;优选地,通过 ROR1 抗体检测 ROR1 的蛋白表达水平,采用荧光标记进行标记,荧光标记采用免疫组织化学染色、免疫荧光抗体染色及其后续的借助荧光显微镜和 / 或荧光分析技术进行的定性与定量分析。

[0016] 根据本发明的再一个方面,提供一种用于抗肿瘤药物或抑制癌细胞转移的药物筛

选的方法。该方法包括：1) 从来自患癌的实验动物的生物体液中分离循环肿瘤细胞；2) 监测循环肿瘤细胞中 ROR1 基因或蛋白表达水平；以及 3) 根据预定频率和用量和给药时间给予患癌的实验动物候选化合物，4) 再次从来自给予候选化合物的患癌的实验动物的生物体液中分离循环肿瘤细胞；5) 再次监测来自给予候选化合物的实验动物的循环肿瘤细胞中 ROR1 基因或蛋白表达水平，其中循环肿瘤细胞中 ROR1 基因或蛋白表达水平低于在步骤 2) 中所监测的循环肿瘤细胞中 ROR1 基因或蛋白表达水平的候选化合物即为目标化合物。

[0017] 本发明的用于检测循环血液中 ROR1 蛋白的试剂包括 ROR1 抗体、缓冲液、标记物、核染料及淋巴细胞分离抗体，利用 ROR1 只在癌细胞表达，而不在正常成人组织细胞表达这一特性，应用本发明的试剂检测循环血液中从原发肿瘤病灶脱落到血中的循环肿瘤细胞或肿瘤干细胞表达的 ROR1 蛋白，克服了传统方法的局限性，大大提高了循环肿瘤细胞检测的准确性和可靠性。临床前结果显示，本发明的试剂可以提供定量的、可重复的结果帮助医生们治疗病人。本发明的试剂能够用于帮助检测肿瘤病人循环血中的肿瘤细胞，这对于肿瘤的疾病诊断，治疗效果的评估及癌转移监测是一个潜在的突破点。

[0018] 附图表说明

[0019] 说明书附图用来提供对本发明的进一步理解，构成本发明的一部分，本发明的示意性实施例及其说明用于解释本发明，并不构成对本发明的不当限定。在附图中：

[0020] 图 1 示出了实施例 1 中免疫荧光染色法用于检测癌症病人血中 ROR1 表达的循环肿瘤细胞；

[0021] 图 2 示出了实施例 2 中 ROR1 在癌症病人血中循环肿瘤细胞的检测 - 流式细胞仪法；

[0022] 图 3 示出了实施例 4 中循环肿瘤细胞在不同恶性程度(临床分期)的肺癌病人中的检测；

[0023] 图 4 示出了实施例 5 中 ROR1 蛋白在肝癌病人癌组织的表达结果；以及

[0024] 图 5 示出了实施例 6 中荷瘤小鼠血中 ROR1 阳性的循环肿瘤细胞的检测结果。

具体实施方式

[0025] 需要说明的是，在不冲突的情况下，本发明中的实施例及实施例中的特征可以相互组合。下面将参考附图并结合实施例来详细说明本发明。

[0026] 本发明的用于检测循环血液中循环肿瘤细胞 ROR1 蛋白的试剂包括 ROR1 抗体、缓冲液、标记物、核染料及淋巴细胞分离抗体，可用于肺癌、乳腺癌、卵巢癌、前列腺癌、胃癌、结直肠癌等病人治疗效果、存活率的评估及癌细胞转移的监测。

[0027] 本发明的用于检测循环血液中循环肿瘤细胞 ROR1 蛋白的试剂可以单独使用，也可以与其他肿瘤标记物联用以特异识别鉴定全血或分离出的循环肿瘤细胞。例如用 ROR1 抗体与 ROR1 结合然后用免疫荧光等技术识别血中循环肿瘤细胞并定量 ROR1 表达水平。本发明中是首次利用 ROR1 抗体、缓冲液及标记物检测循环血液中循环肿瘤细胞表达的 ROR1 蛋白。

[0028] 本发明的 ROR1 抗体可以是抗人或动物的单克隆抗体、多克隆抗体、人源化抗体，或免疫血清等。本发明的用于检测循环血液中循环肿瘤细胞 ROR1 蛋白的试剂包括但不限于下述成份：ROR1 抗体、缓冲液、标记的 IgG (如荧光、酶等)。荧光检测办法包括：免疫组

织化学染色,免疫荧光抗体染色及其后续的借助荧光显微镜和 / 或荧光分析技术,如流式细胞仪(Flow Cytometry),荧光分光光度计和微流体(microfluidics)等,进行的定性与定量分析。

[0029] 本发明的用于检测循环血液中 ROR1 蛋白的试剂可以用于全血和各种办法分离的循环肿瘤细胞,包括抗体直接捕获法(如 FDA 批准的“细胞寻找系统”),各种循环肿瘤细胞富集分离方法及各种过滤方法等。

[0030] 本发明的用于检测循环血液中循环肿瘤细胞 ROR1 蛋白的试剂可以用于健康人筛选,根据能否捕获到表达 ROR1 的细胞(循环肿瘤细胞或其他细胞如干细胞等)帮助诊断受试者是否患有癌症。

[0031] 本发明的用于检测循环血液中 ROR1 蛋白的试剂可以用于帮助进行疗效和存活率评估。癌症病人经治疗(包括手术、放射治疗、药物治疗、靶向治疗或以上联合疗法)后,根据能否捕捉到 ROR1 表达的循环肿瘤细胞,细胞数量和 ROR1 表达水平帮助判断癌症患者对所施加的治疗方案的敏感性,治疗效果及存活率。

[0032] 本发明的用于检测循环血液中 ROR1 蛋白的试剂可以用于帮助监测判断癌细胞转移、耐药、及复发的可能性。根据能否捕捉到 ROR1 表达的循环肿瘤细胞,细胞数量和 / 或 ROR1 表达水平帮助判断癌症患者治疗后是否有转移及转移的程度,以及在治疗过程中是否产生耐药,及治疗后的存活过程期间是否复发的早期预警。

[0033] ROR1 蛋白检测方法包括但不限于如下方法:免疫荧光法如荧光显微镜或流式细胞技术(Flow Cytometry)、微流体(microfluidics)、免疫沉淀、西点墨点法(蛋白质印迹法, Western Blotting)、酶联免疫吸附测定(ELISA)、放射免疫分析法(RIA)和质谱方法等。

[0034] 本发明还提供了一种用于检测 ROR1 基因表达水平的试剂盒。基因检测方法包括但不限于以下方法:聚合酶链式反应(PCR)和逆转录聚合酶链式反应(RT-PCR)等。适用于从受试者(正常或癌症病人)获得的生物体液提取物,包括但不限于血液、骨髓、胸水、脑脊液、淋巴液、腹水、尿液、唾液、痰液、冲灌液、精液、腺体分泌物、炎性渗出物等。此试剂盒可以单独使用,也可以与其他肿瘤标记物或医院现有及待开发的其它临床肿瘤检测方法联合使用。

[0035] 本发明中的试剂、试剂盒可以用于检测实验动物的循环肿瘤细胞用于抗肿瘤新药开发,筛选包括抗肿瘤药物和抑制癌细胞转移药物的评估。实验动物包括但不限于荷瘤的免疫缺欠的小鼠(肿瘤源于接种的人源性的细胞系或人原代肿瘤组织或细胞)或非免疫缺欠的小鼠(自发肿瘤、药物诱导、转基因或由基因改变造成的,或接种同源性的细胞发生的)。

[0036] 实施例 1. ROR1 在循环肿瘤细胞上的检测 - 免疫荧光染色法

[0037] 循环肿瘤细胞 ROR1 蛋白检测试剂包括:固定液,缓冲液,荧光偶联的抗 ROR1 抗体,荧光偶联的抗 CD45 抗体混合液, DAPI 荧光染剂及封片液。ROR1 抗体是从 CHO 细胞转染人 ROR1 细胞外片段获得的重组蛋白制备而成(ROR1 抗体重组蛋白序列如下)。将固定在玻片上的富集的肺癌循环肿瘤细胞与 PBS 室温孵育 5 分钟后,吸弃 PBS。加入 1:200Alexa Flour 488 偶联的抗 ROR1 抗体及 1:400Alexa Flour 594 偶联的抗 CD45 抗体混合液(0.5%BSA-PBS),室温避光孵育 30 分钟。吸弃抗体。使用 0.5%BSA-PBS 洗涤玻片 3 次,每次 3 分钟。每个玻片滴加 20 微升含 DAPI 封片液,封片。荧光显微镜下观察。如图 1 所示,肿

瘤细胞为 ROR1+ (绿色)/DAPI+/CD45-, 白细胞为 ROR1-/DAPI+/CD45+ (红色)。ROR1 抗体重组蛋白序列如下:

[0038] 1 mhrprrrgtr ppllallaal llaargaaaq etelsvsael vptsswniss elnkdsyltl
[0039] 61 depmnitts lgqtaelhck vsgnppptir wfkndapvvq eprrlsfrst iygsrlrirn
[0040] 121 ldtttdtgyfq cvatngkev v sstgvlfvkf gppptaspgy sdeyeedgfc qpyrgiacar
[0041] 181 fignrtyyme slhmqgeien qitaaftmig tsshlsdkcs qfaipslchy afpycdetss
[0042] 241 vpkprdlcrd eceilenvlc qteyifarsn pmilmrlklp ncedlpqpes paancirig
[0043] 301 ipmadpinkn hkcyntstgvd yrgrtvsvtks grqcqpwnsq yphthtftal rfpelngghs
[0044] 361 ycrnpgnqke apwcfldden fksdlcdipa cds

[0045] 实施例 2. 流式细胞仪法用于检测癌症病人血中 ROR1 表达的循环肿瘤细胞

[0046] 将癌症病人的循环肿瘤细胞与荧光标记的 ROR1 抗体或对照抗体(Isotype IgG)在孵育液中 4° C 孵育 20 分钟。孵育液含 3%FBS 和 1M HEPES 的磷酸缓冲液(pH7.4)。用磷酸缓冲液洗两次后用流式细胞仪进行测定。结果用 FlowJo 软件分析并在图 2 中所示。图为代表性数量的循环细胞检测检测结果。左边为荧光标记的同型对照抗体染色的细胞(蓝色);右侧为荧光标记的 ROR1 抗体染色的细胞(红色)。

[0047] 实施例 3. 肺癌病人循环肿瘤细胞的检测 :ROR1 试剂盒与传统方法的比较

[0048] 对临床病例诊断为原发性肺癌的 25 例病人进行了对比研究。从每例肺癌病人富集的肿瘤细胞悬浮后均分两部分。一部分用现有的技术检测循环肿瘤细胞的角蛋白(CK)表达;另一部分用本发明的技术检测循环肿瘤细胞的 ROR1 蛋白。丙酮固定后,前者用 FITC-偶联的抗 CK 抗体混合物(抗 CK18 等)和 DyLight 549-偶联的抗 CD45 抗体染色,细胞核用 DAPI 染色;后者用实施例 1 描述的 ROR1 蛋白试剂检测。循环肿瘤细胞为 CK 或 ROR1 阳性,CD45 阴性,和核染色阳性。如表 1 所示,用目前现有技术检测到的循环肿瘤细胞(CK18+/DAPI+/CD45-)的数量明显少于用本发明的技术检测到的肿瘤细胞(ROR1+/DAPI+/CD45-)的数量。用本发明检测出的循环肿瘤细胞数量也与肺癌恶性程度成正相关。

[0049] 表 1

[0050]

[0051]

病例 ID	CK18+/DAPI+/CD45-	ROR1+/DAPI+/CD45-	病例诊断
ASD-201	0	7	小细胞肺癌
ASD-202	3	16	
ASD-203	2	15	
ASD-204	12	43	
ASD-205	3	16	
ASD-206	10	54	
ASD-207	4	10	肺腺癌
ASD-208	0	6	
ASD-209	0	8	
ASD-210	2	9	
ASD-211	1	4	
ASD-212	0	13	
ASD-213	4	8	中低分化腺癌，部分高分化腺癌，部分乳头状腺癌
ASD-214	3	14	
ASD-215	3	9	低分化肺腺癌
ASD-216	1	10	
ASD-217	0	15	
ASD-218	3	18	
ASD-215	9	33	
ASD-216	2	12	
ASD-217	4	14	
ASD-218	1	12	ASD-215 第 2 次复查
ASD-215B	7	23	
ASD-220	3	14	低分化肺鳞癌
ASD-220B	1	13	ASD-220 第 2 次复查

[0052] 实施例 4. 循环肿瘤细胞在正常人和不同恶性程度(临床分期)的肺癌病人中的检测

[0053] 将从不同恶性程度肺癌病人(临床分级 I-IV)的全血中富集的细胞进行循环肿瘤细胞鉴定分析。鉴定循环肿瘤细胞的标准为表达 ROR1, 有核, 及无白细胞特征, 即 ROR1 染色阳性, DAPI 染色阳性及 CD45 染色表达阴性 (ROR1+/DAPI+/CD45-)。检测结果在图 3 中表明。在 136 例不同恶性程度的癌症病人中检测到不同数量的循环肿瘤细胞。即使在很多癌前病变的病人和 I 期原位癌的病人中已有循环肿瘤细胞在外周血出现, 其对早期诊断癌症有重要意义。其结果与其他临床检测结果如影像监测、组织活检等结合使用可以帮助癌症的确诊等。另外, 以上结果表明血中循环肿瘤细胞的数量与癌症分期即恶性程度呈正相关。特别临床 III 期和 IV 期病人其癌细胞已转移到其他组织或器官, 循环肿瘤细胞在血中的含量

较 I 期和 II 期病人明显增高。因此,本发明的检测结果与其他临床检测结果如影像监测、组织活检等结合使用可以帮助确定癌症的临床分期。

[0054] 用本发明的技术也对 31 例非肿瘤对照受试者(两例为非癌症肺炎病人,29 例为正常健康受试者)进行了研究。结果显示,无一对照受试者检测出肿瘤细胞(ROR1+/DAPI+/CD45-)。

[0055] 实施例 5

[0056] 病人肝癌组织石蜡切片脱蜡和水化后,用 PBS (PH 7.4) 冲洗三次后抗原热修复。用 3% 过氧化氢溶液阻断内源性过氧化物酶的活性, PBS 冲洗三次。甩去 PBS 后,滴加正常山羊血清封闭液,室温 20 分钟。甩去多余液体后滴加 ROR1 抗体或同型 IgG 对照,4℃ 过夜。用 PBS 冲洗并甩去后滴加生物素化二抗孵育 25℃,20 分钟。PBS 洗 4 次后进行 DAB 显色。蒸馏水洗后,用苏木素复染 2 分钟、盐酸酒精分化。然后脱水、透明、封片、镜检。图 4A 显示肝癌病人肝癌组织细胞表达 ROR1 蛋白,4B 为同型 IgG 阴性对照。

[0057] 实施例 6. 荷瘤小鼠血中表达 ROR1 的循环肿瘤细胞的检测

[0058] ROR1 检测方法用于检测实验动物的循环肿瘤细胞可应用于新药筛选,包括抗肿瘤药物和抑制癌细胞转移药物的评估。

[0059] 将荧光素标记的人乳腺癌细胞(MDA-MB-231-Luc)接种到免疫缺欠小鼠乳腺脂肪垫后,小鼠发生原位肿瘤,待肿瘤生长不同时期收集全血然后对分离的循环肿瘤细胞检测 ROR1 的表达(见实施例 1 或 2,免疫荧光法或流式细胞仪法)。图 5 结果显示我们在 3 只小鼠(1,2,3)皮下接种肿瘤细胞然后每周检测血中的循环肿瘤细胞和大体影像监测肿瘤转移(4,6 和 8 周)。另 3 只(小鼠 4,5,6)皮下接种肿瘤细胞后每周检测血中的循环肿瘤细胞,但在第六周开始接受抗肿瘤药物(得舒缓,Tarceva,100mg/kg,每天一次)治疗到实验结束。结果显示荷瘤小鼠在四周后血中出现循环肿瘤细胞,而此阶段大体影像检测并无迹象表明有转移征象(表 2)。到第 5 周,已有大量肿瘤细胞出现在血中,而大体影像才检测到淋巴结转移。这些都证明本发明可以更敏感地监测肿瘤转移。表 2 示出了肿瘤实验动物模型中 ROR1 表达的循环肿瘤细胞可作为癌转移敏感的检测手段。从图 5 可以看出在接受抗肿瘤治疗的小鼠中,血中的循环肿瘤细胞量明显降低。治疗两周后有的动物血中甚至查不到肿瘤细胞,而此时没有接受肿瘤治疗(溶媒对照)的动物血中循环肿瘤细胞数持续增高。这些证据表明血中循环肿瘤细胞可作为肿瘤药物治疗效果评估。

[0060] 表 2

[0061]

小鼠编号	第四周			第六周			第八周		
	循环肿瘤细胞数量	转移		循环肿瘤细胞数量	转移		循环肿瘤细胞数量	转移	
		肺	淋巴结		肺	淋巴结		肺	淋巴结
1	2	-	-	22	-	+	35	+	+
2	2	-	-	15	-	-	76	+	-
3	5	-	-	16	-	-	19	+	-

[0062] 以上所述仅为本发明的优选实施例而已,并不用于限制本发明,对于本领域的技术人员来说,本发明可以有各种更改和变化。凡在本发明的精神和原则之内,所作的任何修改、等同替换、改进等,均应包含在本发明的保护范围之内。



图 1

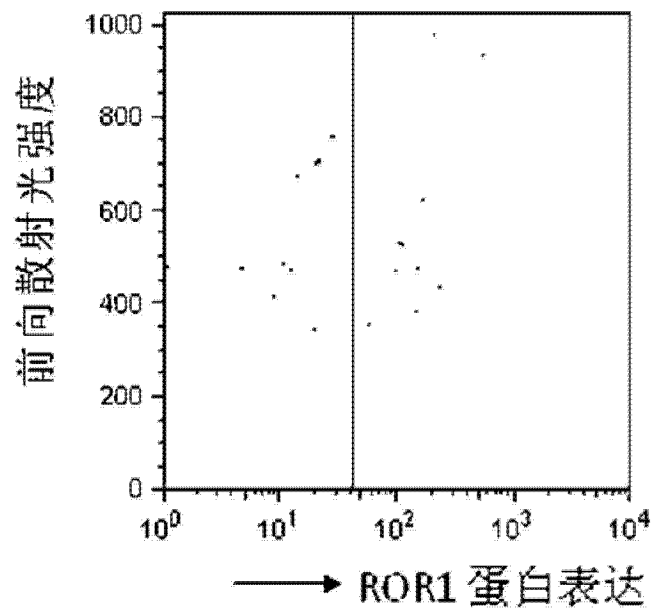


图 2

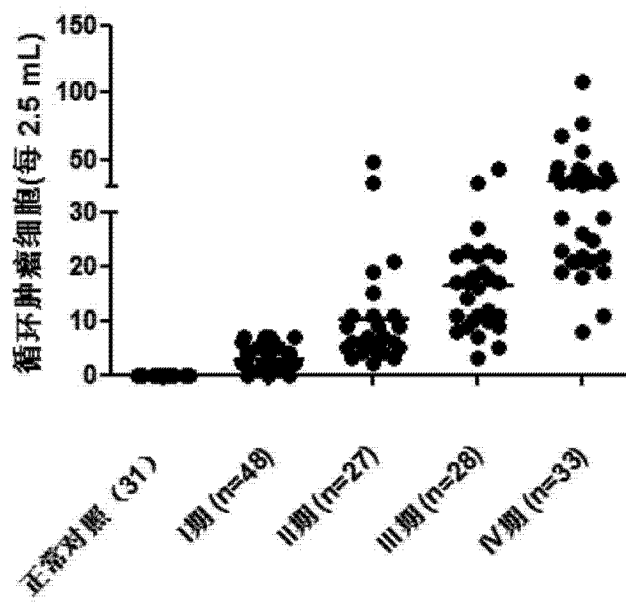


图 3

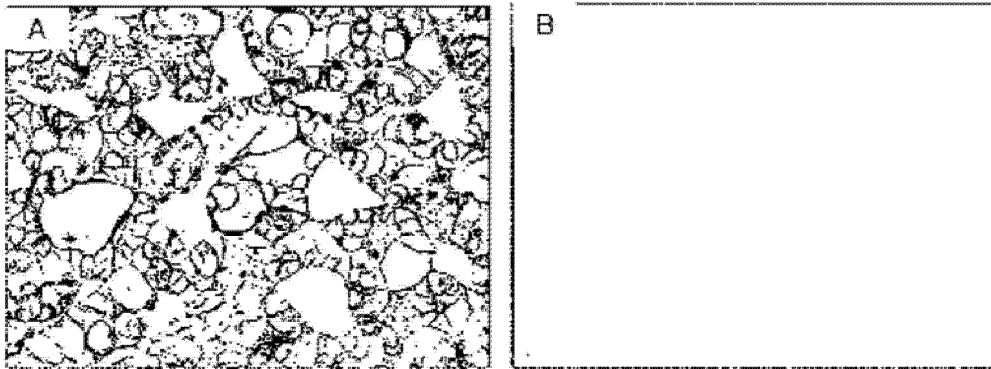


图 4

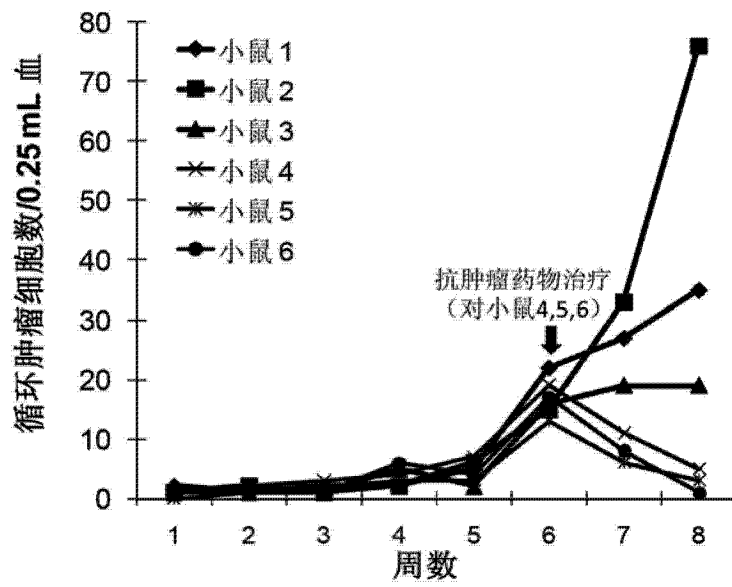


图 5

专利名称(译)	用于检测外周血中循环肿瘤细胞ROR1蛋白的试剂及其应用		
公开(公告)号	CN103792364A	公开(公告)日	2014-05-14
申请号	CN201210428989.7	申请日	2012-10-31
[标]申请(专利权)人(译)	张宝弘		
申请(专利权)人(译)	张宝弘		
当前申请(专利权)人(译)	张宝弘		
[标]发明人	张宝弘 林平		
发明人	张宝弘 林平		
IPC分类号	G01N33/68 G01N33/577 G01N33/53 C12Q1/68		
CPC分类号	G01N33/57488 G01N33/6893 G01N2500/00		
代理人(译)	吴贵明 张永明		
其他公开文献	CN103792364B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了用于检测循环血液中ROR1蛋白的试剂及其应用。其中，用于检测外周血中循环肿瘤细胞ROR1蛋白的试剂。该试剂包括：ROR1抗体、缓冲液、标记物、核染料及淋巴细胞识别抗体。本发明利用ROR1只在癌细胞表达，而不在正常成人组织细胞表达这一特性，应用本发明的试剂检测循环血液中从原发肿瘤病灶脱落到血中的循环肿瘤细胞或肿瘤干细胞表达的ROR1蛋白，克服了传统方法的局限性，大大提高了循环肿瘤细胞检测的准确性和可靠性。本发明的试剂能够用于帮助检测肿瘤病人循环血中的肿瘤细胞，这对于肿瘤的疾病诊断，治疗效果的评估及癌转移监测是一个潜在的突破点。

