(19)国家知识产权局

(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 111620951 B
(45)授权公告日 2022.06.07

(21)申请号 201910363557.4

(22)申请日 2019.04.30

(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 111620951 A

(43)申请公布日 2020.09.04

(73)专利权人 杭州科兴生物科技有限公司
地址 311401 浙江省杭州市富阳区东洲街道工业功能区13号路1号

(72)发明人 付利 黄土雄 范春雷 武虎 陈喆 匡红 刘美星

(74)专利代理机构 广州市华学知识产权代理有限公司 44245
专利代理师 李欧

(51)Int.Cl.
C07K 19/00(2006.01)
C12N 15/62(2006.01)
C07K 16/22(2006.01)
C12N 15/13(2006.01)
A61K 39/395(2006.01)
A61P 35/00(2006.01)

(56)对比文件
CN 102380099 A,2012.03.21
CN 1984923 A,2007.06.20
CN 101153060 A,2008.04.02
CN 1981054 A,2007.06.13
Dawn T Bravo等.Frizzled-8 receptor is activated by the Wnt-2 ligand in non-small cell lung cancer.《BMC Cancer》.2013,第13卷
张志谦等.生长激素信号肽可诱导重组蛋白外分泌表达.《中国生物化学与分子生物学报》.2005,第21卷(第2期),
王秋艳等.小鼠 Wnt-1基因真核表达载体构建及其在大鼠成肌细胞中的表达.《国际病理科学与临床杂志》.2009,第29卷(第3期),
马晶莹等.EGFP-CD40L融合基因的构建、表达及功能鉴定.《第三军医大学学报》.2010,第32卷(第12期),
Ritsuko Takada等.Assembly of protein complexes restricts diffusion of Wnt3a proteins.《COMMUNICATIONS BIOLOGY》.2018,第1卷
Hong-Xing Wang等.WNT2 Regulates Proliferation of Mouse Granulosa Cells through Beta-Catenin1.《Biol Reprod.》.2010,第82卷(第5期),

审查员 田晓蓉

权利要求书1页 说明书13页
序列表5页 附图7页

(54)发明名称

EGFP-Wnt2融合蛋白抗原和Wnt2单克隆抗体以及Wnt2单克隆抗体的应用

(57)摘要

本发明涉及生物医学技术领域，尤其涉及EGFP-Wnt2融合蛋白抗原和Wnt2单克隆抗体以及Wnt2单克隆抗体的应用，EGFP-Wnt2融合蛋白抗原主要是EGFP与人源Wnt2除信号肽的全长氨基酸序列的融合蛋白，所述EGFP-Wnt2融合蛋白抗原包括EGFP氨基酸序列、TEV酶切位点和FLAG标签序列、Wnt2除信号肽全长氨基酸序列、6×His标签序列，抗Wnt2单克隆抗体能够用于抑制肿瘤细胞的免疫逃逸和生长。本发明的Wnt2单克隆抗体结合细胞分泌的人Wnt2抗原时，拮抗细胞对肿瘤内抑制性免疫微环境形成的促进，抑制肿瘤细胞的免疫逃逸及生长。本发明提供的Wnt2单克隆抗体能够用于食管鳞癌、胃癌、胰腺癌、直肠结肠癌、肺癌、乳腺癌、胶质细胞瘤、肝癌等实体肿瘤的免疫治疗中。

CN 111620951 B

1.可特异性结合Wnt2单克隆抗体,其特征在于,所述可特异性结合Wnt2单克隆抗体是能够与EGFP-Wnt2融合蛋白抗原以及用TEV酶或EK酶切除其EGFP后的Wnt2蛋白特异性结合的抗体,所述可特异性结合Wnt2单克隆抗体用于抑制食管鳞癌肿瘤细胞的免疫逃逸和生长;

所述EGFP-Wnt2融合蛋白抗原是EGFP与人源Wnt2去除信号肽的全长氨基酸序列的融合蛋白,所述EGFP-Wnt2融合蛋白抗原包括EGFP氨基酸序列、TEV-FLAG标签序列、Wnt2去除信号肽全长氨基酸序列、6×His标签序列,所述EGFP-Wnt2融合蛋白抗原的氨基酸序列如SEQ ID NO.2所示;

所述可特异性结合Wnt2单克隆抗体包括重链可变区和轻链可变区,重链可变区包括氨基酸序列如下的三个互补决定区:

H-CDR1:GYTFTDFD,

H-CDR2:HPESDYT,

和H-CDR3:TGDR;

轻链可变区包括氨基酸序列如下的三个互补决定区:

L-CDR1:KSVSTSGYSY,

L-CDR2:LVS,

L-CDR3:QHIRELTR。

2.根据权利要求1所述的可特异性结合Wnt2单克隆抗体,其特征在于,所述重链可变区的氨基酸序列如序列表中SEQ ID NO:4所示,所述轻链可变区的氨基酸序列如序列表中SEQ ID NO:6所示。

3. 一种分离的核苷酸分子,其特征在于,编码如权利要求2所述的可特异性结合Wnt2单克隆抗体重链可变区的核苷酸序列如SEQ ID NO:3所示,编码如权利要求2所述的可特异性结合Wnt2单克隆抗体轻链可变区的核苷酸序列如SEQ ID NO:5所示。

4.药物组合物,其特征在于,所述药用组合物包含(1)有效量的如权利要求2所述的可特异性结合Wnt2单克隆抗体或基于可特异性结合Wnt2单克隆抗体的抗原结合蛋白和药学上可接受的一种或多种药物赋形剂和/或药用载体;或者(2)有效量的如权利要求2所述的可特异性结合Wnt2单克隆抗体、基于可特异性结合Wnt2单克隆抗体的抗原结合蛋白与PD-1抗体联合,以及药学上可接受的一种或多种药物赋形剂和/或药用载体。

5.如权利要求1所述的可特异性结合Wnt2单克隆抗体在制备实体肿瘤免疫治疗药物中的应用,所述实体肿瘤是Wnt2高表达的食管鳞癌。

EGFP-Wnt2融合蛋白抗原和Wnt2单克隆抗体以及Wnt2单克隆抗体的应用

技术领域

[0001] 本发明涉及生物医学技术领域,尤其涉及EGFP-Wnt2融合蛋白抗原和Wnt2单克隆抗体以及Wnt2单克隆抗体的应用。

背景技术

[0002] 实体肿瘤细胞的免疫逃逸是临床肿瘤免疫治疗和肿瘤免疫学基础研究的热点和难点之一。目前PD-1/PD-L1阻断抗体在实体肿瘤治疗的早期临床试验中展现了不错的潜力,然而免疫疗法往往会受制于实体肿瘤免疫微环境及其复杂的免疫逃逸调控,导致总响应率不高甚至耐药。深入探讨肿瘤免疫逃逸分子机制,寻找新的免疫治疗靶点,将为发展新型高效的肿瘤免疫疗法提供十分重要的指导意义。

[0003] 目前,生物医学研究者越来越重视肿瘤微环境对肿瘤进展及治疗的作用,其中,肿瘤相关成纤维细胞(cancer-associated fibroblasts,CAFs)居重要地位。目前认为CAFs对肿瘤的演进起着促进作用,CAFs在肿瘤发生、进展、转移等各个过程中都产生重要的影响,可以通过肿瘤和非肿瘤成分促进肿瘤的演化。研究发现:靶向FAP^+CAFs分泌的CXCL12的治疗,可以促进T细胞的肿瘤浸润,从而有效增强PD-L1的免疫治疗效果,表明FAP^+CAFs可以通过释放CXCL12调节免疫抑制的微环境(Feig C et al,PNAS.2013)。此外,CAFs释放的FAP蛋白可以通过STAT3-CCL2信号通路促进MDSC的肿瘤浸润,从而抑制抗肿瘤免疫反应(Yang X et al,Cancer Res.2016)。虽然CAFs目前已被证实可以调节肿瘤细胞的免疫逃逸,但由于肿瘤细胞发生免疫耐受的机制复杂,CAFs参与其中的分子调控网络仍有待进一步的发掘和阐明。

[0004] 从食管癌患者的癌组织和癌旁组织中分别成功分离出CAFs和其相应的正常纤维母细胞(NFs),并应用基因芯片比较分析了CAF和NF的基因表达差异。结果显示,126个基因在功能方面分别与细胞增殖(61个基因),细胞外间质重构(40个基因)以及免疫反应(25个基因)有关。以往研究发现,Wnt2基因在食管鳞癌CAFs的表达显著上调(Zhang C et al,Clin Cancer Res.2009),既往也有研究报道Wnt/β-catenin信号通路能够促进免疫逃逸,提示CAFs分泌的Wnt2蛋白可能参与实体肿瘤免疫抑制微环境的调控。此外,Wnt2也被报道在多种肿瘤组织中高表达,包括食管鳞癌(Fu et al,Gut.2010)胰腺癌(Yu M et al,Nature.2012)、结直肠癌(Kramer N et al,Oncogene.2017)、胃癌(Katoh M,Int J Oncol.2001)、肺癌(Huang C et al,Am J Cancer Res.2015)、乳腺癌(Dale TC et al,Cancer Res.1996)等。综上所述,深入了解分泌性Wnt2蛋白的免疫调控机理,对于研发靶向Wnt2高表达肿瘤的新型免疫疗法、制定肿瘤风险评估以及预后判断的有效措施具有重要的临床意义。

发明内容

[0005] 有鉴于此,本发明的目的是提供一种新的Wnt2单克隆抗体,该Wnt2单克隆抗体结

合细胞分泌的人Wnt2抗原时，拮抗细胞对肿瘤内抑制性免疫微环境形成的促进，抑制肿瘤细胞的免疫逃逸及生长。本发明提供的Wnt2单克隆抗体能够用于食管鳞癌、胃癌、胰腺癌、直肠结肠癌、肺癌、乳腺癌、胶质细胞瘤、肝癌等实体肿瘤的免疫治疗中。

[0006] 本发明通过以下技术手段解决上述技术问题：

[0007] 在本发明的第一方面，提供了一种EGFP-Wnt2融合蛋白抗原，所述EGFP-Wnt2融合蛋白抗原主要是EGFP与人源Wnt2除信号肽的全长氨基酸序列的融合蛋白，所述EGFP-Wnt2融合蛋白抗原包括EGFP氨基酸序列、TEV酶切位点和FLAG标签序列、Wnt2除信号肽全长氨基酸序列、6×His标签序列。

[0008] 进一步，所述EGFP-Wnt2融合蛋白抗原的氨基酸序列如SEQ ID NO.2所示。

[0009] 在本发明的第二方面，提供了一种核苷酸，所述核苷酸编码如上述第一方面所述的EGFP-Wnt2融合蛋白抗原，所述核苷酸序列如SEQ ID NO.1所示。

[0010] 在本发明的第三方面，提供了一种表达载体，所述表达载体含有如上述第二方面所述的核苷酸。

[0011] 在本发明的第四方面，提供了EGFP-Wnt2融合蛋白抗原的制备方法，包括如下步骤：

[0012] S1.将EGFP基因与除去ER信号肽的人源野生型Wnt2基因融合，在两个基因之间插入TEV酶切位点和FLAG标签序列，并在氨基端加上大鼠生长激素的ER信号肽，进行分泌表达，在Wnt2的羧基末端接上6×His标签，产生的序列的前后端加上一对限制性内切酶BamH I和SexA I，用于构建到慢病毒表达载体pLV-Puro的CMV启动子下游，同时去除原有的Puro基因，获得质粒pCMV-EGFP-Wnt2；

[0013] S2.将pCMV-EGFP-Wnt2与质粒pH1、pH2共转染至慢病毒包装系细胞293V，经5代或20天以上培养获得稳定表达目的蛋白细胞后，荧光显微镜下，用50μl的移液枪挑取不同表达水平的EGFP-Wnt2/293细胞克隆25-30个，分别扩增培养这些细胞克隆，收集上清，进行促细胞迁移作用的Wnt2蛋白功能验证，将有功能的克隆扩增培养，并收集上清液，经镍离子亲和层析凝胶柱纯化后，得到融合蛋白EGFP-Wnt2融合蛋白。

[0014] 在本发明的第五方面，提供了一种Wnt2单克隆抗体，所述Wnt2单克隆抗体是能够与上述第一方面所述的EGFP-Wnt2融合蛋白抗原以及用TEV酶或EK酶切除其EGFP后的Wnt2蛋白特异性结合的抗体，所述Wnt2单克隆抗体用于抑制肿瘤细胞的免疫逃逸和生长。

[0015] 本发明提供Wnt2基因及其编码蛋白具有诱导DC前体细胞表达IDO1蛋白，促进抑制性DC(IDO1+CD11c+)细胞发育分化，进而一方面降低DC细胞的免疫活性，另一方面促进Treg细胞的形成，并抑制CD8+T细胞的功能，而针对人Wnt2制备的Wnt2单克隆抗体则可以有效降低逆转这一过程的应用。

[0016] 进一步，所述Wnt2单克隆抗体包括重链可变区和轻链可变区，重链可变区包括氨基酸序列如下的三个互补决定区：

[0017] H-CDR1:GYTFTDFD，

[0018] H-CDR2:HPESDYT，

[0019] 和H-CDR3:TGDR；

[0020] 轻链可变区包括氨基酸序列如下的三个互补决定区：

[0021] L-CDR1:KSVSTSGYSY，

[0022] L-CDR2:LVS,

[0023] L-CDR3:QHIRELTR。

[0024] 进一步,所述重链可变区的氨基酸序列如序列表中SEQ ID NO:4所示,所述轻链可变区的氨基酸序列如序列表中SEQ ID NO:6所示。

[0025] 在本发明的第六方面,提供了一种分离的核苷酸分子,编码如上述第五方面所述的Wnt2单克隆抗体重链可变区的核苷酸序列如SEQ ID NO:3所示,编码如上述第五方面所述的Wnt2单克隆抗体轻链可变区的核苷酸序列如SEQ ID NO:5所示。

[0026] 在本发明的第七方面,提供了一种含有上述第六方面描述的核苷酸分子的载体。

[0027] 在本发明的第八方面,提供了一种宿主细胞,该宿主细胞含有如上述第七方面所述的载体或整合有上述第六方面描述的核苷酸分子。

[0028] 在本发明的第九方面,提供了一种药物组合物,所述药用组合物包含(1)有效量的如上述第六方面所述的Wnt2单克隆抗体、基于Wnt2单克隆抗体的结合蛋白或抗体片段;以及(2)有效量的如上述第六方面所述的Wnt2单克隆抗体、基于Wnt2单克隆抗体的结合蛋白或抗体片段与PD-1抗体联合;以及(3)药学上可接受的一种或多种药物赋形剂和/或药用载体。

[0029] 在本发明的第十方面,提供了如上述第六方面所述的Wnt2单克隆抗体在实体肿瘤免疫治疗中的应用,所述实体肿瘤是Wnt2高表达的肿瘤,包括食管鳞癌、胃癌、胰腺癌、直肠结肠癌、肺癌、乳腺癌、胶质细胞瘤、肝癌。

[0030] 本发明提供的Wnt2基因及其编码的蛋白与肿瘤免疫微环境的抑制型组分成正相关,且与激活型组分成负相关,通过Wnt2单克隆抗体阻滞Wnt2基因及其编码的蛋白在癌细胞、组织中的分泌,通过减少IDO1阳性抑制性DC的形成,进而减少Treg的比例;另外,Wnt2抗体药物组合物在发病动物体内的释放可以更高效清除动物体内的癌组织,具有明显的食管癌治疗效果。此外,还通过对比实验验证了,与对照组相比,Wnt2抗体组织能够增强动物体内的抗肿瘤免疫反应,具有明显的抗肿瘤免疫治疗效果,治疗组的C57小鼠肿瘤组织中活化的DC细胞比例明显增高,并且Wnt2抗体治疗组C57小鼠的脾脏淋巴细胞对肿瘤细胞具有明显的杀伤能力。本发明的实施例足以证明:针对肿瘤微环境中分泌的Wnt2蛋白制备的Wnt2抗体药物组合物具有解除体内肿瘤微环境的免疫抑制状态,重新激活机体的抗肿瘤免疫效应,进而预防或治疗实体肿瘤的功能,为实体肿瘤的有效免疫治疗提供了新的药物和方法。

附图说明

[0031] 图1为Wnt2和Vimentin共阳性(Wnt2+/Vimentin+)的CAFs、FoxP3和CD4共阳性(FoxP3+/CD4+)的Treg细胞、以及IFN-γ和CD8+共阳性(IFN-γ+CD8+)的T细胞在食管鳞癌患者肿瘤组织中的分布情况;

[0032] 图2为50例食管癌患者肿瘤组织中,Wnt2+/Vimentin+CAFs的数量与Treg相对于CD4+T细胞的比例(Treg/CD4+T)成正相关;

[0033] 图3为50例食管癌患者肿瘤组织中,Wnt2+/Vimentin+CAFs的数量与IFN-γ+CD8+T细胞相对于CD8+T细胞的比例(IFN-γ+CD8+T/CD8+T)成负相关;

[0034] 图4为纯化抗原EGFP-Wnt2融合蛋白鉴定结果图;

[0035] 图5为小鼠血清效价测定结果图;

[0036] 图6为Wnt2单克隆抗体纯化后的SDS-PAGE鉴定结果图；

[0037] 图7为Wnt2单克隆抗体重链轻链可变区基因PCR结果示意图；

[0038] 图8为mCAFs和mEC-1细胞中Wnt2的表达情况；

[0039] 图9为Wnt2蛋白诱导小鼠DC前体细胞中免疫负调节因子IDO1的表达；

[0040] 图10为Wnt2抗体药物体外抑制分泌性Wnt2诱导的小鼠抑制性DC细胞的形成效果图；

[0041] 图11为Wnt2抗体药物体外缓解分泌性Wnt2对小鼠DC细胞活化功能的抑制效果图；

[0042] 图12为Wnt2蛋白处理的小鼠DC细胞诱导Treg细胞的形成效果图；

[0043] 图13为Wnt2蛋白处理的小鼠DC细胞抑制CD8+T细胞的活化效果图；

[0044] 图14为Wnt2抗体体外抑制分泌性WNT2蛋白诱导的小鼠抑制性T细胞的形成效果图；

[0045] 图15为Wnt2抗体药物组合物的体内治疗增加小鼠脾脏中杀伤性T淋巴细胞(IFN-γ+CD8+T)相对于CD8+T细胞的比例图；

[0046] 图16为Wnt2抗体药物组合物的体内治疗增强小鼠脾淋巴细胞杀伤肿瘤细胞的能力。

具体实施方式

[0047] 以下将结合附图和具体实施例对本发明进行详细说明：

[0048] 本发明公开了EGFP-Wnt2融合蛋白抗原和Wnt2单克隆抗体以及Wnt2单克隆抗体的应用，本领域技术人员可以借鉴本文内容，适当改进工艺参数实现。特别需要指出的是，所有类似的替换和改动对本领域技术人员来说是显而易见的，都被视为包括在本发明。本发明的制备方法及应用已经通过较佳实施例进行了描述，相关人员明显能在不脱离本发明内容、范围内，对本文所述的制备方法和应用进行改动或适当变更与组合，来实现和应用本发明技术。

[0049] 部分术语和缩略语说明：

[0050] CAFs:肿瘤相关成纤维细胞(cancer-associated fibroblasts)

[0051] MDSC:骨髓来源的抑制性细胞(Myeloid-derived suppressor cells)

[0052] PCR:聚合酶链式反应(Polymerase Chain Reaction)

[0053] ELISA:酶联免疫吸附实验(enzyme-linked immunosorbent assay)

[0054] EGFP:增强绿色荧光蛋白(Enhanced Green Fluorescent Protein)

[0055] Treg:调解性T细胞(Regulatory cells)

[0056] 以下实施例中所采用的分子生物学实验技术，包括PCR扩增、质粒提取、质粒转化、DNA片段连接、酶切、凝胶电泳等，如无特殊说明，通常按照常规方法操作，具体可参见《分子克隆实验指南》(第三版)(Sambrook J,Russell DW,Janssen K,Argentine J.黄培堂等译，2002，北京:科学出版社)，或按照制造厂商所建议的条件。以下实施例中所用到的原始试剂和材料均可商购得到。其中：

[0057] 实验用到以下动物:免疫缺陷BALB/C 4-5周龄裸鼠(购自广东省实验动物中心)；免疫力正常C57小鼠(购自广东省实验动物中心)。

[0058] 实验用到以下抗体:Wnt2单克隆抗体抗体、CD4抗体、FoxP3抗体、CD8抗体、CD3抗

体、CD28抗体、CD11c抗体(英国Abcam公司)、Vimentin抗体(美国Cell Signaling Technology公司)、IFN-γ抗体、TNF-α抗体(美国R&D公司)、PD-1抗体(美国BioX cell公司)、荧光鼠二抗(美国Life Technologies公司)、荧光兔二抗(美国Life Technologies公司)。

[0059] 实验用到以下细胞系:鼠源性食管鳞癌细胞系mEC-1(自主拥有)、鼠源性原代食管肿瘤成纤维细胞mCAFs(自主拥有)。

[0060] 实施例1 Wnt2的表达与肿瘤免疫微环境组分的关联性

[0061] 本实施例收集了50例食管鳞癌患者肿瘤组织病理切片,首先,通过免疫双荧光方法检测Wnt2和Vimentin共阳性(Wnt2+/Vimentin+)的CAFs、FoxP3和CD4共阳性(FoxP3+/CD4+)的Treg细胞,以及IFN-γ和CD8+共阳性(IFN-γ+CD8+)的T细胞在食管鳞癌患者肿瘤组织中的分布情况,结果如图1所示。

[0062] 然后利用TissueTAXS全景成像系统软件分析每例肿瘤组织中Wnt2+/Vimentin+CAFs的数量、Treg相对于CD4+T细胞的比例(Treg/CD4+T)、以及IFN-γ+CD8+T细胞相对于CD8+T细胞的比例(IFN-γ+CD8+T/CD8+T),最后利用统计学方法分析,得出结果:Wnt2+/Vimentin+CAFs的数量与Treg/CD4+T的细胞比例呈正相关性,如图2所示,而与IFN-γ+CD8+T/CD8+T的细胞比例呈负相关性,如图3所示。

[0063] 实施例2通过人源野生型Wnt2基因制备的Wnt2抗体药物组合物

[0064] 1、重组人源野生型Wnt2蛋白的制备

[0065] 将EGFP基因与人源野生型Wnt2基因(NM_003391.2)的融合基因,通过限制性内切酶EcoRI和NotI构建在慢病毒表达载体pLV-Puro的CMV启动子下游,获得质粒pCMV-EGFP-Wnt2,并在Wnt2的羧基末端接上6×His标签,用于镍离子亲和柱纯化。将pCMV-Wnt2与质粒pH1、pH2共转染至慢病毒包装系细胞293V,经5代或20天以上培养获得稳定表达目的蛋白细胞后,用含5-10μg/ml嘌呤霉素、10%FBS的高糖DMEM培养基培养筛选,3-5天后用含2.5μg/ml嘌呤霉素、10%FBS的高糖DMEM培养基维持培养;适当扩增后以10^3个细胞/ml的细胞密度接种于6孔细胞培养板,2ml/孔,用含2.5μg/ml嘌呤霉素、10%FBS的高糖DMEM培养基;每天在显微镜下观察一次细胞生长情况,10-20天后根据细胞克隆生长情况,在显微镜下用50μl的移液枪挑取状态良好的EGFP-Wnt2/293细胞克隆10-20个,分别扩增培养后取培养液上清(Wnt2为分泌蛋白)做PAGE和WB(用His6抗体)检测,取高表达EGFP-Wnt2蛋白的克隆进行扩大培养。

[0066] EGFP-Wnt2融合蛋白主要分泌表达在细胞上清液里,细胞大规模培养后,离心收集细胞上清培养基,用50%硫酸铵4℃沉淀过夜,离心收集沉淀,再用柱结合缓冲液透析沉淀,浓缩透析所得产物,用0.22μm过滤膜过滤,所得产物流经镍离子亲和层析凝胶柱,分别用含有20mM、40mM咪唑的柱洗涤缓冲液洗涤20、10个柱体积,随后用5-10ml的pH值为8.0的含200mM咪唑的Tris盐酸缓冲液洗脱结合在镍离子柱上的EGFP-Wnt2,浓缩,随后进行蛋白纯化鉴定,待用。鉴定结果如图4所示,经过Anti-GFP Western Blot验证,融合蛋白符合预期分子量67.35KDa。

[0067] 1.1、用于表达EGFP-Wnt2融合蛋白人工设计的核苷酸序列如下(核苷酸序列如SEQ ID NO:1所示):

[0068] GGATCC*ATGGCAGCAGACAGCCAGACCCCTTGGCTGCTGACATTTTCCCTGCTGTGCCTGCTGTGGCCAC*
*AGGAGGCAGGAGCAA*ATGGTGAGCAAGGGAGAGGAGCTGTTCACCGGAGTGGTGCCAATCCTG
GTGGAGCTGGACGGCGATGTGAATGGCCACAAGTTTTCTGTGAGCGGAGAGGGAGAGGGC
GATGCAACCTACGGCAAGCTGACACTGAAGTTCATCTGCACCACAGGCAAGCTGCCCGTGC
CTTGGCCAACCCTGGTGACCACACTGACATACGGCGTGCAGTGTTTCAGCAGATATCCCGA
CCACATGAAGCAGCACGATTTCTTTAAGTCCGCCATGCCTGAGGGCTACGTGCAGGAGAGG
ACAATCTTCTTTAAGGACGATGGCAATTATAAGACCCGCGCCGAGGTGAAGTTCGAGGGCG
ACACACTGGTGAACCGGATCGAGCTGAAGGGCATCGACTTTAAGGAGGATGGCAATATCCT
GGGCCACAAGCTGGAGTACAACTATAATTCCCACAACGTGTATATCATGGCCGATAAGCAGA
AGAACGGCATCAAGGTGAACTTCAAGATCAGACACAACATCGAGGACGGCTCTGTGCAGCT
GGCCGATCACTACCAGCAGAACACCCCTATCGGCGACGGACCCGTGCTGCTGCCTGATAAT
CACTATCTGTCTACACAGAGCGCCCTGTCCAAGGACCCAAATGAGAAGAGGGATCACATGG
TGCTGCTGGAGTTTGTGACCGCAGCAGGAATCACACTGGGAATGGACGAGCTGTACAAGGC
*TAGC*GAGAACCTGTACTTCCAGGGCGATTATAAGGACGATGACGATAAGAGCTGGTG
GTATATGAGGGCAACCGGAGGCAGCTCCAGAGTGATGTGCGACAACGTGCCAGGCCT
GGTGTCTAGCCAGAGGCAGCTGTGCCACAGACACCCAGATGTGATGAGGGCAATCTC
CCAGGGAGTGGCAGAGTGGACCGCCGAGTGCCAGCACCAGTTCAGGCAGCACCGCTG
GAACTGTAATACACTGGACAGGGATCACTCCCTGTTTGGACGCGTGCTGCTGCGGAGC
AGCCGGGAGTCTGCCTTCGTGTACGCCATCAGCTCCGCCGGAGTGGTGTTTGCAATCA
CCAGGGCATGCTCCCAGGGAGAGGTGAAGTCCTGCTCTTGTGACCCCAAGAAGATGG
GCTCTGCCAAGGACAGCAAGGGCATCTTCGATTGGGGCGGCTGTAGCGACAATATCG
ACTATGGCATCAAGTTCGCCCGGGCCTTTGTGGACGCCAAGGAGAGGAAGGGCAAGG
ATGCCCGCGCCCTGATGAACCTGCACAACAATAGGGCCGGCCGCAAGGCCGTGAAGA
GATTTCTGAAGCAGGAGTGCAAGTGTCACGGCGTGAGCGGCTCCTGCACCCTGAGGA
CATGTTGGCTGGCCATGGCCGACTTCAGGAAGACCGGCGATTACCTGTGGCGCAAGTA
TAACGGCGCCATCCAGGTGGTCATGAATCAGGACGGCACCGGCTTCACAGTGGCCAA
TGAGCGGTTCAAGAAGCCAACAAAGAACGATCTGGTGTACTTTGAGAACAGCCCCGA
CTATTGCATCCGGGATAGAGAGGCAGGCAGCCTGGGAACCGCAGGACGGGTGTGCAA
CCTGACATCCAGAGGCATGGACTCTTGTGAAGTGATGTGCTGTGGCCGGGGCTACGAT
ACCAGCCACGTGACCAGAATGACAAAGTGCGGCTGTAAGTTCCACTGGTGCTGTGCCG
TGCGGTGCCAGGACTGTCTGGAGGCCCTGGATGTGCACACCTGTAAGGCCCCTAAGAA
CGCCGACTGGACCACAGCCACA*CACCACCACCACCACCAC*TAGTCTAGAGCGGCCGCATCTAGAAGATCTA
CCTGGT

[0069] 注释:前段下划线斜体部分为大鼠生长激素的ER信号肽,用于指导目标蛋白进入分泌途径;前段斜体部分为EGFP,点划线部分为TEV酶切位点和FLAG标签序列;后段下划线部分为Wnt2除信号肽全长序列,下划线斜体为6×His标签;序列前后端设计了一对酶切位点BanH Ⅰ(GGATCC)/SexA Ⅰ(ACCTGGT),用于亚克隆至慢病毒载体pLV。

[0070] 1.2、人工设计的基因序列(SEQ ID NO:1)表达的EGFP-Wnt2融合蛋白的氨基酸序列如下(氨基酸序列如SEQ ID NO:2所示):

[0071] *MAADSQTPWLLTFSLLCLLWPQEAGA*MVSKGEELFTGVVPILVELDGDVNGHKFSVSGEGEGD
ATYGKLTLKFICTTGKLPVPWPTLVTTLTYGVQCFSRYPDHMKQHDFFKSAMPEGYVQERTIFF
KDDGNYKTRAEVKFEGDTLVNRIELKGIDFKEDGNILGHKLEYNYNSHNVYIMADKQKNGIKV
NFKIRHNIEDGSVQLADHYQQNTPIGDGPVLLPDNHYLSTQSALSKDPNEKRDHMVLLEFVTAA
*GITLGMDELYKAS*ENLYFQGDYKDDDDKSWWYMRATGGSSRVMCDNVPGLVSSQRQLC
HRHPDVMRAISQGVAEWTAECQHQFRQHRWNCNTLDRDHSLFGRVLLRSSRESAFVYAI
SSAGVVFAITRACSQGEVKSCSCDPKKMGSAKDSKGIFDWGGCSDNIDYGIKFARAFVDA
KERKGKDARALMNLHNNRAGRKAVKRFLKQECKCHGVSGSCTLRTCWLAMADFRKTG
DYLWRKYNGAIQVVMNQDGTGFTVANERFKKPTKNDLVYFENSPDYCIRDREAGSLGTA
GRVCNLTSRGMDSCEVMCCGRGYDTSHVTRMTKCGCKFHWCCAVRCQDCLEALDVHT
CKAPKNADWTTAT*HHHHHH*

[0072] 注释:前段下划线斜体部分为大鼠生长激素的ER信号肽,用于指导目标蛋白进入分泌途径,并在完成其功能后被内质网膜上的ER信号肽酶切除,故并不出现在成熟蛋白中;前段斜体部分为EGFP,点划线部分为TEV酶切位点和FLAG标签序列;后段下划线部分为Wnt2

除信号肽全长序列,下划线斜体为6×His标签。

[0073] 2、Wnt2单克隆抗体制备

[0074] 将重组人源Wnt2融合蛋白EGFP-WNT2溶解于PBS缓冲液中,配制其浓度为0.25μg/μl,取25μg(100μl)抗原与等体积弗氏免疫佐剂(sigma)充分混匀乳化,乳化后5点肌肉注射到5-8周龄BAL b/c(购自上海)小鼠体内,每只注射200μl。首次免疫用完全弗氏佐剂,随后免疫均用不完全弗氏佐剂,每两周免疫一次,共进行3-5次免疫,第三次免疫后10天左右,小鼠尾静脉采血,间接ELISA法,利用抗体稀释液从1:1000倍比稀释血清来测定小鼠血清效价。

[0075] 选择血清抗体特异性好,效价高小鼠作为融合候选小鼠。三次免疫后小鼠血清效价达到1:10^5以上者,视为可融合小鼠,可进行冲击免疫,若未达到融合要求可进一步免疫。图5为小鼠血清效价测定结果图,4只小鼠血清效价都符合融合标准,其中1#小鼠最为理想,所以选择小鼠血清效价最好的1#小鼠冲击免疫做融合。于融合前72h腹腔注射抗原冲击免疫,研磨法获取小鼠脾脏淋巴细胞悬液,采用PEG1450(购自北京博奥龙免疫技术有限公司)介导的脾脏淋巴细胞与SP/20细胞融合得到杂交瘤细胞,融合好的杂交瘤细胞用含1×HAT(sigma)、20%FBS的RPMI-1640培养基重悬,将细胞均匀接种到事先铺好饲养层细胞的96孔板中,于37℃、5%CO_2的细胞培养箱中培养,融合后4天用含有1×HT、20%FBS的RPMI-1640置换一半原有培养液,7天后将培养基全部换为含有1×HT、20%FBS的RPMI-1640,第10天取细胞培养上清,采用间接ELISA检测,挑选阳性克隆进行亚克隆。亚克隆采用有限稀释法,将阳性克隆细胞稀释至2.5-5个/ml,每孔200μl接种到96孔板中,待单克隆形成后,采用间接ELISA检测,挑选阳性克隆继续亚克隆,通过2-3轮亚克隆后,挑选阳性克隆扩大培养,即为稳定分泌抗Wnt2单克隆抗体的杂交瘤细胞株。挑选8-10周龄经产Bal b/c小鼠,腹腔注射500μl无菌石蜡,一周后向小鼠腹腔注射2.5×10^6个处在对数期增殖且状态良好的杂交瘤细胞,8-10天后采集小鼠腹水。所采集的腹水4℃静置过夜后,弃上层油状石蜡,剩余腹水于12000rpm/min离心20分钟,收集上清腹水,弃底层细胞沉淀。向收集的上清腹水中加入4倍腹水体积的亲和层析结合缓冲液Budding buffer稀释,然后用0.22μm过滤膜过滤除菌,通过ProteinA凝胶亲和层析株亲和层析纯化到抗Wnt2单克隆抗体,纯化后抗体纯度采用SDS-PAGE鉴定,分别取10μg纯化后的Wnt2单克隆抗体做变性还原,变性非还原条件电泳,如图6所示,变性非还原蛋白分子量约150KDa,变性还原条件下重链约50KDa,轻链25KDa,无其它杂带。

[0076] 3、抗体序列测序

[0077] 3.1抗Wnt2单克隆抗体重链轻链可变区基因获取与鉴定

[0078] 通过大量克隆筛选,挑出Wnt2优选抗体1C2,对其杂交瘤细胞进行扩大培养,待细胞长至对数期,计数并收集相应的的阳性杂交瘤细胞约5×10^6个,利用上海飞捷公司的RNA提取试剂盒快速提取总RNA(RNAfast200,220011),相应操作详见产品说明书。加入40μl RNase-free水溶解RNA,取10μl进行核酸电泳,175V/15min。剩余总RNA取部分进行反转录,其余暂放-80℃的环境中保存。

[0079] 根据TOYOBO公司的逆转录试剂盒(FSQ-101),以10μlRNA为模板加上相应的随机引物,酶buffer,反转录合成第一条cDNA,具体操作过程详见说明书,按照说明书反应条件反转录合成第一条cDNA,所得CDNA产物立即进行PCR扩增反应或暂放-20℃保存。

[0080] 3.2 PCR法调取抗体重链轻链可变区基因

[0081] 根据现有技术设计杂交瘤重轻链上下游的简并引物,引物序列如下:

[0082] MHV1:5’-ATGAAATGCAGCTGGGGCATSTTCTTC-3’

[0083] MHV2:5’-ATGGGATGGAGCTRTATCATSYTCTT-3’

[0084] MHV3:5’-ATGAAGWTGTGGTTAAACTGGGTTTTT-3’

[0085] MHV4:5’-ATGRACTTTGGGYTCAGCTTGRTTT-3’

[0086] MHV5:5’-ATGGGACTCCAGGCTTCAATTTAGTTTTCCTT-3’

[0087] MHV6:5’-ATGGCTTGTCYTTRGSGCTRCTCTTCTGC-3’

[0088] MHV7:5’-ATGGRATGGAGCKGGRGTCTTTMTCTT-3’

[0089] MHV8:5’-AGTAGAGTGCTGATTCTTTTGTG-3’

[0090] MHV9:5’-ATGGMTTGGGTGTGGAMCTTGCTTATTCCTG-3’

[0091] MHV10:5’-ATGGGCAGACTTACCATTCTCATTCCTG-3’

[0092] MHV11:5’-ATGGATTTTGGGCTGATTTTTTTTATTG-3’

[0093] MHV12:5’-ATGATGGTGTTAAGTCTTCTGTACCTG-3’

[0094] MHCG1:5’-CAGTGGATAGACAGATGGGGG-3’

[0095] MHCG2a:5’-CAGTGGATAGACCGATGGGGG-3’

[0096] MHCG2b:5’-CAGTGGATGAGCTGATGGGGG-3’

[0097] MHCG3:5’-CAAGGGATAGACAGATGGGGC-3’

[0098] MKV1:5’-ATGAAGATTGCCTGTTAGGCTGTTGGTGCTG-3’

[0099] MKV2:5’-ATGGAGWCAGACACACTCCTGYTATGGGTG-3’

[0100] MKV3:5’-ATGAGTGTGCTCACTCAGGTCCTGGSGTTG-3’

[0101] MKV4:5’-ATGAGGRCCCCTGCTCAGWTTYTTGGMWTCTTG-3’

[0102] MKV5:5’-ATGGATTTWCAGGTGCAGATTWTCAGCTTC-3’

[0103] MKV6:5’-ATGAGGTKCYYTGYTSAYCTYCTCTGRGG-3’

[0104] MKV7:5’-ATGGGCWTCAAAGATGGAGTCACAKWYYCWGG-3’

[0105] MKV8:5’-ATGTGGGGAYCTKTTTYCMMTTTTTCAATG-3’

[0106] MKV9:5’-ATGGTRTCCWCASCTCAGTTCCTTG-3’

[0107] MKV10:5’-ATGTATATATGTTTGTTGTCTATTTCT-3’

[0108] MKV11:5’-ATGGAAGCCCCAGCTCAGCTTCTCTTCC-3’

[0109] MKC:5’-ACTGGATGGTGGGAAGATGG-3’

[0110] CL12A:5’-ATGRAGTYWCAGACCCAGGTCTTYRT-3’

[0111] CL12B:5’-ATGGAGACACATTCTCAGGTCTTTGT-3’

[0112] CL13:5’-ATGGATTCACAGGCCCAGGTTCTTAT-3’

[0113] CL14:5’-ATGATGAGTCCTGCCCAGTTCCTGTT-3’

[0114] CL15:5’-ATGAATTTGCCTGGTCATCTCTTGGTGCT-3’

[0115] CL16:5’-ATGGATTTTCAATTGGTCCTCTTGGTGCT-3’

[0116] CL17A:5’-ATGAGGTGCCTARCTSAGTTCCTGRG-3’

[0117] CL17B:5’-ATGAAGTACTCTGCTCAGTTTCTAGG-3’

[0118] CL17C:5’-ATGAGGCATTCTCTTCAATTCTTGGG-3’

[0119] (简并密码子说明:R=A,G;Y=C,T;M=A,C;S=C,G;W=A,T)。

[0120] PCR反应体系为50μl,反应条件为:95℃3min;95℃10s;55℃30s;72℃30s,30个循环,最后72℃延伸10min。将PCR反应产物进行核酸胶电泳并回收350-400bp左右条带,如图7显示,PCR产物回收使用上海捷瑞生物工程有限公司凝胶产物回收试剂盒(GK2043-200),具体操作步骤详见试剂盒说明书。

[0121] 由于PCR所用酶为Taq酶,所以PCR产物3'端已带腺嘌呤(A),所以PCR产物无需进行3'端加A反应,可直接与T载体相连。将PCR产物用T4连接酶连接到PGM-T载体(北京天根生物,VT202-01),取0.5μl T载体,PCR产物3μl,加入0.5μl T4连接酶4μl连接酶buffer,25℃水浴连接5min,连接反应所用试剂盒为北京康为世纪快速连接试剂盒,操作过程详见试剂盒说明书。

[0122] 采用化学转化法将连接产物转化至感受态DH5α中,操作步骤:取100μl感受态细胞置于冰上5min中,将8μl相应连接产物加入到DH5α中,边加边搅拌,充分混匀后置于冰上静置30min,准备好42℃水浴锅,感受态42℃热激90s,迅速取出后置于冰上1min,向每管中加入700μl无抗性LB培养基,于温度37℃、转速240rpm条件下震荡培养40min。取出后在转速4000rpm离心3min,沉淀用100-200μl LB培养基重悬后涂布于含有氨苄抗性,X-gal,IPTG的平板上,倒置放置于37℃恒温培养箱中培养过夜。

[0123] 菌落PCR初步鉴定,挑取平板上白色克隆,在含氨苄抗性的100μlLB培养基中37℃,240rpm震荡培养2h。取3μl菌液,加入pcr反应体系中,反应条件为95℃3min;95℃10s;55℃30s;72℃30s,30个循环,最后72℃延伸10min。取10μl菌落PCR产物进行核酸电泳验证,挑取出条带在350-400bp左右的克隆扩大培养,挑选菌落鉴定阳性克隆,接种到5mlLB培养基37℃,240rpm震荡培养过夜,从中取500μl菌液送测序,其余菌液提质粒保存,并冻存相应菌液。

[0124] 3.3单克隆抗体重轻链可变结构域的基因测序结果分析

[0125] 根据测序结果,通过NCBI网站上的数据库(https://www.ncbi.nlm.nih.gov/igblast/)分析抗Wnt2单克隆抗体重轻链可变区基因,成功获得了杂交瘤细胞株抗体重轻链可变结构域基因。重链可变区包含了高可变区HCDR1、HCDR2、HCDR3,轻链可变区序列包含了高可变区LCDR1、LCDR2、LCDR3。

[0126] 鼠源抗体1C2序列信息如下:重链可变区基因全长333bp,编码氨基酸残基111个,核苷酸序列如SEQ ID NO:3所示,氨基酸序列如SEQ ID NO:4所示;轻链可变区基因序列全长312bp,编码氨基酸残基104个,核苷酸序列如SEQ ID NO:5所示,氨基酸序列如SEQ ID NO:6。

[0127] 经IgBLSAT序列比对Wnt2(1C2)抗体重链序列符合小鼠IgG可变区基因特征,Wnt2(1C2)抗体轻序列也均符合小鼠IgG可变区基因特征。依据kabat规则确定抗体的3个互补决定区(Complementarity-determining-region,CDR)和4个框架区序列(Frame region),重链互补决定区序列包括高可变区序列H-CDR1、H-CDR2和H-CDR3,轻链互补决定区序列包括高可变区序列L-CDR1、L-CDR2和L-CDR3。

[0128] 其中,Wnt2(1C2)重链互补决定区氨基酸序列高可变区序列H-CDR1、H-CDR2、H-CDR3分别如下:

[0129] H-CDR1:GYTFTDFD

[0130] H-CDR2:HPESDYT

[0131] H-CDR3:TGDR

[0132] Wnt2(1C2)轻链互补决定区序列包括高可变区序列L-CDR1、L-CDR2、L-CDR3分别如下：

[0133] L-CDR1:KSVSTSGYSY

[0134] L-CDR2:LVS

[0135] L-CDR3:QHIRELTR

[0136] 实施例3mCAFs分泌的Wnt2通过DC细胞调节T细胞的作用

[0137] 1、C57小鼠食管原位癌模型的建立

[0138] 方法:通过致癌剂4-硝基喹啉-1-氧化物(4NQO),利用饮水法诱导C57BL/6小鼠形成食管原发癌。小鼠连续饮用16个星期的4NQO溶液(100ug/ml)后,改成饮用无菌水12～16个星期;此方法可以诱导部分小鼠形成食管原位癌。

[0139] 2、mCAFs和mEC-1的原代分离、鉴定与培养

[0140] 方法:将C57小鼠食管原位癌组织取下,用干净的手术器械将肿瘤剪碎,剪碎的肿瘤组织利用1mg/ml胶原蛋白酶于37℃条件下消化30分钟,再利用70um网筛进行过滤;过滤后得到的单细胞悬液,离心洗涤后用含20％FBS的DMEM培养基重悬并置于37℃的培养皿中培养。培养30分钟后,吸出未贴壁的细胞悬液,离心并洗涤后用食管上皮培养基进行培养;而已经贴壁的细胞用PBS洗涤两次后重新加入含20％FBS的DMEM培养基进行培养,此部分细胞即为小鼠食管肿瘤相关成纤维细胞CAFs,如图8所示。

[0141] 上述中未贴壁的细胞经过食管上皮培养基培养5代后,在显微镜下将上皮细胞克隆团轻轻刮下,离心洗涤后用含10％FBS的DMEM培养基进行培养,此部分细胞即为小鼠食管肿瘤细胞mEC-1,如图8(a)所示。利用免疫荧光和流式细胞术的方法,对mEC-1的上皮细胞分子标志物(cytokeratin、E-cadherin和β-catenin)和mCAFs的纤维细胞分子标志物(Vimentin等)进行鉴定,得到如图8(b)所示的小鼠食管肿瘤相关成纤维细胞(mCAFs),以及如图8(c)所示的Wnt2在肿瘤细胞和CAFs细胞上的表达情况,MFI为平均免疫荧光强度。

[0142] 4、Wnt2对抑制性DC细胞形成能力影响的体外检测

[0143] 方法:分离小鼠骨髓细胞,置于$2x10^6$细胞/孔的6孔板中,用含有10ng/ml rmGM-CSF、10ng/ml rmIL-4和10％FBS的RPMI-1640培养基(4ml/孔)进行培养。48小时后,去除悬浮细胞,重新加入含rmGM-CSF、rmIL-4和10％FBS的RPMI-1640培养基(2ml/孔)继续培养;隔天半量换液,并补足GM-CSF和IL-4,培养6天即可形成DC细胞。往DC细胞加入鼠源Wnt2重组蛋白,培养3天后,利用流式细胞术检测发现:Wnt2处理后的DC细胞中免疫抑制因子IDO1表达水平明显升高,如图9所示。

[0144] 分别往DC细胞中加入mCAFs的培养上清和含有鼠源抗Wnt2的抗体(50ug/ml)mCAFs培养上清,培养3天后,利用流式细胞术检测IDO+CD11c+细胞占CD11c+细胞群体的比例,如图10所示,结果显示:Wnt2抗体药物可以体外抑制分泌性Wnt2诱导的IDO1阳性抑制性DC细胞的形成。

[0145] 5、Wnt2对DC细胞活化能力影响的体外检测

[0146] 方法:往小鼠DC细胞分别加入mCAFs的培养上清和含有鼠源抗Wnt2的抗体(50ug/ml)的mCAFs的培养上清,以相应的培养基处理DC细胞作为对照。培养3天后,用100ng/ml的

LPS处理各组DC细胞6小时，再利用流式细胞术检测TNF-α+CD11c+细胞占CD11c+细胞群体的比例，如图11所示，结果显示：Wnt2抗体药物可以体外缓解分泌性WNT2对DC细胞免疫活化能力的抑制。

[0147] 6、Wnt2处理后的DC细胞对T细胞调节功能的体外检测

[0148] 方法：体外将100ng/ml的重组小鼠Wnt2蛋白溶解于PBS中，用于处理DC细胞，对照组加入同体积的PBS，处理三天后，充分洗涤DC细胞；同时利用试剂盒从小鼠脾脏中分离出naïve CD4+T细胞。DC细胞与naïve CD4+T细胞均用含10％FBS的RPMI-1640培养基进行重悬，并按DC:T＝1:10的比例共培养5天，混合培养物中加入10ng/ml IL-2。共培养结束后，收集混合细胞，利用流式细胞术检测Treg细胞(FoxP3+CD4+T细胞)占CD4+T细胞群体的比例，如图12所示，结果显示：Wnt2重组蛋白处理的DC细胞，具有调节Treg细胞形成的能力。在另一组实验中，如上述一样处理DC细胞并洗涤、重悬。同时，利用试剂盒从脾脏中分离Pan-naïve T细胞，类似地，DC细胞与Pan-naïve T细胞按1:10的比例混合培养5天，然后，利用10ug/well小鼠CD3抗体和2ug/ml小鼠CD28抗体共刺激T细胞3天，以没有刺激的T细胞作为阴性对照。收集细胞混合物，利用流式细胞术检测IFNγ+CD8+T细胞占CD8+T细胞群体的比例，如图13所示，结果显示：Wnt2重组蛋白处理的DC细胞，可以通过与T细胞相互作用，进而抑制CD8+T细胞的活化能力。

[0149] 7、Wnt2单克隆抗体抑制Treg细胞形成的体外检测

[0150] 方法：利用试剂盒从小鼠脾细胞中分离出naïve T细胞，置于$2x10^6$细胞/孔的12孔板中，用含10％FBS和10ng/ml IL-2的RPMI-1640培养基进行培养，部分组别中分别加入mCAFs的培养上清和含有鼠源抗Wnt2的抗体(50ug/ml)mCAFs培养上清。培养5天后，利用流式细胞术检测Treg细胞(FoxP3+CD4+T细胞)占CD4+T细胞群体的比例，如图14所示，结果显示：Wnt2抗体药物可以体外抑制分泌性Wnt2诱导的抑制性T细胞Treg的形成。

[0151] 实施例4正常免疫力小鼠食管癌皮下移植瘤模型的建立

[0152] 正常免疫力C57小鼠(由广东省实验动物中心提供)，雌雄不拘，在无特殊致病菌环境中饲养。鼠源性食管鳞癌细胞株mEC-1经含10％胎牛血清的DMEM培养液培养后，将新鲜消化的1×10^6细胞悬液分别接种于3只C57小鼠皮下，小鼠荷瘤生长时间总体为21-23天，处死这3只C57小鼠，取形成的瘤组织再分别接种于C57小鼠皮下，接种7天后获得免疫力正常小鼠食管癌皮下移植瘤模型。

[0153] 实施例5 Wnt2抗体药物组合物的免疫治疗效果检测

[0154] 1、Wnt2抗体药物组合物抑制肿瘤生长的检测

[0155] 取构建好的C57小鼠食管癌皮下移植瘤模型，随机分成4组，每组10只，开始每2天在小鼠瘤内注射一次IgG空白对照、本发明实施例2通过人源野生型Wnt2基因制备得到的抗体药物组合物、商品化PD-1抗体、以及本发明实施例2通过人源野生型Wnt2基因制备得到的抗体药物组合物联合商品化PD-1抗体，注射量为5mg/kg，连续注射6次。用游标卡尺测量肿瘤的短径W和最大长径L观察肿瘤生长情况，计算公式：肿瘤体积＝$L\times W^2/Z$。数据进行统计后按均差加标准差方法表示。比较四组的生长生存情况，进行观察和记录。数据如表1所示。

[0156] 表1 C57小鼠食管癌抗体治疗后肿瘤体积相对于治疗前的变化率统计结果(n＝10)

[0157]

组别	第6天		第30天	
	平均值	误差值（SD）	平均值	误差值（SD）
对照组	2.20	±0.07	2.49	±0.60
Wnt2抗体	1.33	±0.24	0.39	±0.36
PD-1抗体	0.94	±0.34	0.06	±0.13
PD-1抗体+Wnt2抗体	0.58	±0.14	0	±0

[0158] 说明:空白对照组注射IgG;Wnt2抗体组注射通过人源野生型WNT2基因制备得到的药物组合物;PD-1抗体组注射商品化PD-1抗体;PD-1抗体+Wnt2抗体组通过Wnt2抗体药物组合物联合商品化PD-1抗体。

[0159] 每只小鼠,均以治疗前的肿瘤体积作为参考,计算治疗一定时间后肿瘤体积的变化比率。变化比率>1,说明肿瘤在增殖,数值越大增殖越快;变化速率<1,说明肿瘤在消退,数值越小,消退程度越高。在统计天数内肿瘤体积变化比率相对越小,肿瘤生长被抑制程度越高,说明注射的抗体药物组合物的治疗效果越好,表1的数据表明PD-1抗体+Wnt2抗体药物组合物的治疗效果最佳。

[0160] 2、Wnt2抗体药物组合物的肿瘤治愈率检测

[0161] 表2 C57小鼠食管癌抗体治疗后肿瘤治愈(完全消退)的比例(第30天)

[0162]

组别	比例(%)
对照组	0/10(0)
Wnt2抗体	5/10(50)
PD-1抗体	7/10(70)
PD-1抗体+Wnt2抗体	10/10(100)

[0163] 在治疗后第30天,肿瘤治愈(完全消退)的比例越大,说明注射的抗体药物组合物的治疗效果越好,表2的数据表明PD-1抗体+Wnt2抗体药物组合物的肿瘤治愈率最高,达到100%,治疗效果最好。

[0164] 3、Wnt2抗体药物组合物增强抗肿瘤免疫反应的检测

[0165] 将实施例4中所述的4组小鼠在治疗40天后取其脾脏,提取淋巴细胞,用肿瘤细胞裂解物重新刺激3天。重刺激后的淋巴细胞,取部分细胞通过流式细胞术的方法直接检测淋巴细胞中IFN-γ+CD8+T/CD8+T的细胞比率。另取经过重刺激的淋巴细胞与肿瘤细胞进行共孵育(淋巴细胞:肿瘤细胞=50:1),4小时后使用LDH检测试剂盒检测淋巴细胞杀伤肿瘤细胞的能力,如图15所示和图16所示。

[0166] 图15和图16的数据表明,与IgG对照组和商品化PD-1抗体组比较,Wnt2抗体药物单独或联合体内治疗均可以显著增加小鼠脾脏中杀伤性T淋巴细胞(IFN-γ+CD8+T)相对于CD8+T细胞的比例及其杀伤肿瘤细胞的能力。

[0167] 以上实验数据均证明:根据Wnt2基因或其编码蛋白的免疫负调节功能制备的Wnt2抗体药物组合物具有增强小鼠机体内的抗肿瘤免疫反应,进而抑制食管癌细胞的成瘤、预防或治疗食管癌的功能。Wnt2单克隆抗体能够通过抑制肿瘤细胞免疫逃逸,增强机体抗肿

瘤免疫反应进而抑制肿瘤生长,Wnt2单克隆抗体为食管癌的有效免疫治疗提供了新的药物和方法。

[0168] 以上实施例仅用以说明本发明的技术方案而非限制,尽管参照较佳实施例对本发明进行了详细说明,本领域的普通技术人员应当理解,可以对本发明的技术方案进行修改或者等同替换,而不脱离本发明技术方案的宗旨和范围,其均应涵盖在本发明的权利要求范围当中。本发明未详细描述的技术、形状、构造部分均为公知技术。

[0001] 序列表

[0002] <110> 杭州科兴生物科技有限公司

[0003] <120> EGFP-Wnt2融合蛋白抗原和Wnt2单克隆抗体以及Wnt2单克隆抗体的应用

[0004] <130> 201904

[0005] <141> 2019-04-30

[0006] <160> 6

[0007] <170> SIPOSequenceListing 1.0

[0008] <210> 1

[0009] <211> 1912

[0010] <212> DNA

[0011] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[0012] <400> 1

[0013] ggatccatgg cagcagacag ccagacccct tggctgctga cattttccct gctgtgcctg 60

[0014] ctgtggccac aggaggcagg agcaatggtg agcaagggag aggagctgtt caccggagtg 120

[0015] gtgccaatcc tggtggagct ggacggcgat gtgaatggcc acaagttttc tgtgagcgga 180

[0016] gagggagagg gcgatgcaac ctacggcaag ctgacactga agttcatctg caccacaggc 240

[0017] aagctgcccg tgccttggcc aaccctggtg accacactga catacggcgt gcagtgtttc 300

[0018] agcagatatc ccgaccacat gaagcagcac gatttcttta agtccgccat gcctgagggc 360

[0019] tacgtgcagg agaggacaat cttctttaag gacgatggca attataagac ccgcgccgag 420

[0020] gtgaagttcg agggcgacac actggtgaac cggatcgagc tgaagggcat cgactttaag 480

[0021] gaggatggca atatcctggg ccacaagctg gagtacaact ataattccca caacgtgtat 540

[0022] atcatggccg ataagcagaa gaacggcatc aaggtgaact tcaagatcag acacaacatc 600

[0023] gaggacggct ctgtgcagct ggccgatcac taccagcaga acacccctat cggcgacgga 660

[0024] cccgtgctgc tgcctgataa tcactatctg tctacacaga gcgccctgtc caaggaccca 720

[0025] aatgagaaga gggatcacat ggtgctgctg gagtttgtga ccgcagcagg aatcacactg 780

[0026] ggaatggacg agctgtacaa ggctagcgag aacctgtact tccagggcga ttataaggac 840

[0027] gatgacgata agagctggtg gtatatgagg gcaaccggag gcagctccag agtgatgtgc 900

[0028] gacaacgtgc caggcctggt gtctagccag aggcagctgt gccacagaca cccagatgtg 960

[0029] atgagggcaa tctcccaggg agtggcagag tggaccgccg agtgccagca ccagttcagg 1020

[0030] cagcaccgct ggaactgtaa tacactggac agggatcact ccctgtttgg acgcgtgctg 1080

[0031] ctgcggagca gccgggagtc tgccttcgtg tacgccatca gctccgccgg agtggtgttt 1140

[0032] gcaatcacca gggcatgctc ccagggagag gtgaagtcct gctcttgtga ccccaagaag 1200

[0033] atgggctctg ccaaggacag caagggcatc ttcgattggg gcggctgtag cgacaatatc 1260

[0034] gactatggca tcaagttcgc ccgggccttt gtggacgcca aggagaggaa gggcaaggat 1320

[0035] gcccgcgccc tgatgaacct gcacaacaat agggccggcc gcaaggccgt gaagagattt 1380

[0036] ctgaagcagg agtgcaagtg tcacggcgtg agcggctcct gcaccctgag gacatgttgg 1440

[0037] ctggccatgg ccgacttcag gaagaccggc gattacctgt ggcgcaagta taacggcgcc 1500

[0038] atccaggtgg tcatgaatca ggacggcacc ggcttcacag tggccaatga gcggttcaag 1560

[0039] aagccaacaa agaacgatct ggtgtacttt gagaacagcc ccgactattg catccgggat 1620

[0040] agagaggcag gcagcctggg aaccgcagga cgggtgtgca acctgacatc cagaggcatg 1680

[0041] gactcttgtg aagtgatgtg ctgtggccgg ggctacgata ccagccacgt gaccagaatg 1740

[0042] acaaagtgcg gctgtaagtt ccactggtgc tgtgccgtgc ggtgccagga ctgtctggag 1800

[0043] gccctggatg tgcacacctg taaggcccct aagaacgccg actggaccac agccacacac 1860

[0044] caccaccacc accactagtc tagagcggcc gcatctagaa gatctacctg gt 1912

[0045] <210> 2

[0046] <211> 623

[0047] <212> PRT

[0048] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[0049] <400> 2

[0050] Met Ala Ala Asp Ser Gln Thr Pro Trp Leu Leu Thr Phe Ser Leu Leu

[0051] 1 5 10 15

[0052] Cys Leu Leu Trp Pro Gln Glu Ala Gly Ala Met Val Ser Lys Gly Glu

[0053] 20 25 30

[0054] Glu Leu Phe Thr Gly Val Val Pro Ile Leu Val Glu Leu Asp Gly Asp

[0055] 35 40 45

[0056] Val Asn Gly His Lys Phe Ser Val Ser Gly Glu Gly Glu Gly Asp Ala

[0057] 50 55 60

[0058] Thr Tyr Gly Lys Leu Thr Leu Lys Phe Ile Cys Thr Thr Gly Lys Leu

[0059] 65 70 75 80

[0060] Pro Val Pro Trp Pro Thr Leu Val Thr Thr Leu Thr Tyr Gly Val Gln

[0061] 85 90 95

[0062] Cys Phe Ser Arg Tyr Pro Asp His Met Lys Gln His Asp Phe Phe Lys

[0063] 100 105 110

[0064] Ser Ala Met Pro Glu Gly Tyr Val Gln Glu Arg Thr Ile Phe Phe Lys

[0065] 115 120 125

[0066] Asp Asp Gly Asn Tyr Lys Thr Arg Ala Glu Val Lys Phe Glu Gly Asp

[0067] 130 135 140

[0068] Thr Leu Val Asn Arg Ile Glu Leu Lys Gly Ile Asp Phe Lys Glu Asp

[0069] 145 150 155 160

[0070] Gly Asn Ile Leu Gly His Lys Leu Glu Tyr Asn Tyr Asn Ser His Asn

[0071] 165 170 175

[0072] Val Tyr Ile Met Ala Asp Lys Gln Lys Asn Gly Ile Lys Val Asn Phe

[0073] 180 185 190

[0074] Lys Ile Arg His Asn Ile Glu Asp Gly Ser Val Gln Leu Ala Asp His

[0075] 195 200 205

[0076] Tyr Gln Gln Asn Thr Pro Ile Gly Asp Gly Pro Val Leu Leu Pro Asp

[0077] 210 215 220

[0078] Asn His Tyr Leu Ser Thr Gln Ser Ala Leu Ser Lys Asp Pro Asn Glu

[0079] 225 230 235 240

[0080] Lys Arg Asp His Met Val Leu Leu Glu Phe Val Thr Ala Ala Gly Ile

[0081] 245 250 255

[0082] Thr Leu Gly Met Asp Glu Leu Tyr Lys Ala Ser Glu Asn Leu Tyr Phe

[0083] 260 265 270

[0084] Gln Gly Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys Ser Trp Trp Tyr Met Arg
[0085] 275 280 285
[0086] Ala Thr Gly Gly Ser Ser Arg Val Met Cys Asp Asn Val Pro Gly Leu
[0087] 290 295 300
[0088] Val Ser Ser Gln Arg Gln Leu Cys His Arg His Pro Asp Val Met Arg
[0089] 305 310 315 320
[0090] Ala Ile Ser Gln Gly Val Ala Glu Trp Thr Ala Glu Cys Gln His Gln
[0091] 325 330 335
[0092] Phe Arg Gln His Arg Trp Asn Cys Asn Thr Leu Asp Arg Asp His Ser
[0093] 340 345 350
[0094] Leu Phe Gly Arg Val Leu Leu Arg Ser Ser Arg Glu Ser Ala Phe Val
[0095] 355 360 365
[0096] Tyr Ala Ile Ser Ser Ala Gly Val Val Phe Ala Ile Thr Arg Ala Cys
[0097] 370 375 380
[0098] Ser Gln Gly Glu Val Lys Ser Cys Ser Cys Asp Pro Lys Lys Met Gly
[0099] 385 390 395 400
[0100] Ser Ala Lys Asp Ser Lys Gly Ile Phe Asp Trp Gly Gly Cys Ser Asp
[0101] 405 410 415
[0102] Asn Ile Asp Tyr Gly Ile Lys Phe Ala Arg Ala Phe Val Asp Ala Lys
[0103] 420 425 430
[0104] Glu Arg Lys Gly Lys Asp Ala Arg Ala Leu Met Asn Leu His Asn Asn
[0105] 435 440 445
[0106] Arg Ala Gly Arg Lys Ala Val Lys Arg Phe Leu Lys Gln Glu Cys Lys
[0107] 450 455 460
[0108] Cys His Gly Val Ser Gly Ser Cys Thr Leu Arg Thr Cys Trp Leu Ala
[0109] 465 470 475 480
[0110] Met Ala Asp Phe Arg Lys Thr Gly Asp Tyr Leu Trp Arg Lys Tyr Asn
[0111] 485 490 495
[0112] Gly Ala Ile Gln Val Val Met Asn Gln Asp Gly Thr Gly Phe Thr Val
[0113] 500 505 510
[0114] Ala Asn Glu Arg Phe Lys Lys Pro Thr Lys Asn Asp Leu Val Tyr Phe
[0115] 515 520 525
[0116] Glu Asn Ser Pro Asp Tyr Cys Ile Arg Asp Arg Glu Ala Gly Ser Leu
[0117] 530 535 540
[0118] Gly Thr Ala Gly Arg Val Cys Asn Leu Thr Ser Arg Gly Met Asp Ser
[0119] 545 550 555 560
[0120] Cys Glu Val Met Cys Cys Gly Arg Gly Tyr Asp Thr Ser His Val Thr
[0121] 565 570 575
[0122] Arg Met Thr Lys Cys Gly Cys Lys Phe His Trp Cys Cys Ala Val Arg
[0123] 580 585 590
[0124] Cys Gln Asp Cys Leu Glu Ala Leu Asp Val His Thr Cys Lys Ala Pro
[0125] 595 600 605

[0126] Lys Asn Ala Asp Trp Thr Thr Ala Thr His His His His His His

[0127] 610 615 620

[0128] <210> 3

[0129] <211> 333

[0130] <212> DNA

[0131] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[0132] <400> 3

[0133] caggttcaac tgcagcagtc tggggctgag ctggtgaggc ctggggcttc agtgaagctg 60

[0134] tcctgcaagg ctttgggcta cacatttact gactttgaca tacactgggt gaagcagaca 120

[0135] cctgtgcatg gcctggaatg gattggagct attcatccag aaagtgatta tactgcctac 180

[0136] aatcagaagt tcaagggcaa ggccacactg actgcagaca aatcctccaa cacagcctac 240

[0137] atggagctca ccagcctgac atctgaggac tctgctgtct attactgtac aggagaccgc 300

[0138] tggggccaag gcaccactct cacagtctcc tca 333

[0139] <210> 4

[0140] <211> 111

[0141] <212> PRT

[0142] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[0143] <400> 4

[0144] Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Arg Pro Gly Ala

[0145] 1 5 10 15

[0146] Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Leu Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Phe

[0147] 20 25 30

[0148] Asp Ile His Trp Val Lys Gln Thr Pro Val His Gly Leu Glu Trp Ile

[0149] 35 40 45

[0150] Gly Ala Ile His Pro Glu Ser Asp Tyr Thr Ala Tyr Asn Gln Lys Phe

[0151] 50 55 60

[0152] Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Asn Thr Ala Tyr

[0153] 65 70 75 80

[0154] Met Glu Leu Thr Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys

[0155] 85 90 95

[0156] Thr Gly Asp Arg Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser

[0157] 100 105 110

[0158] <210> 5

[0159] <211> 312

[0160] <212> DNA

[0161] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[0162] <400> 5

[0163] gacattgtgc tgacacagtc tcctgcttcc ttagctgtat ctctggggca gagggccacc 60

[0164] atctcataca gggccagcaa aagtgtcagt acatctggct atagttatat gcactggaac 120

[0165] caacagaaac caggacagcc acccagactc ctcatctatc ttgtatccaa cctagaatct 180

[0166] ggggtccctg ccaggttcag tggcagtggg tctgggacag acttcaccct caacatccat 240

[0167] cctgtggagg aggaggatgc tgcaacctat tactgtcagc acattaggga gcttacacgt 300

[0168] tcggaggggg ga 312

[0169] <210> 6

[0170] <211> 104

[0171] <212> PRT

[0172] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[0173] <400> 6

[0174] Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly

[0175] 1 5 10 15

[0176] Gln Arg Ala Thr Ile Ser Tyr Arg Ala Ser Lys Ser Val Ser Thr Ser

[0177] 20 25 30

[0178] Gly Tyr Ser Tyr Met His Trp Asn Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro

[0179] 35 40 45

[0180] Arg Leu Leu Ile Tyr Leu Val Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro Ala

[0181] 50 55 60

[0182] Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Asn Ile His

[0183] 65 70 75 80

[0184] Pro Val Glu Glu Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Ile Arg

[0185] 85 90 95

[0186] Glu Leu Thr Arg Ser Glu Gly Gly

[0187] 100

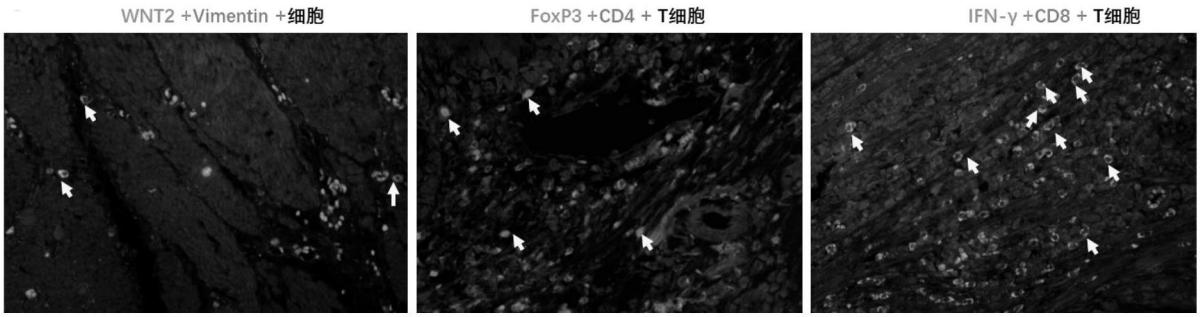

WNT2 +Vimentin +细胞
FoxP3 +CD4 + T细胞
IFN-γ +CD8 + T细胞

图1

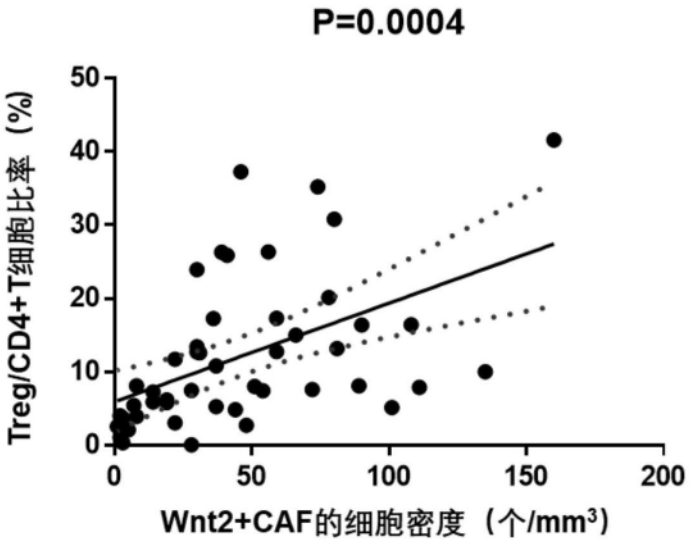

P=0.0004
Treg/CD4+T细胞比率（%）
50
40
30
20
10
0
0
50
100
150
200
Wnt2+CAF的细胞密度（个/mm³）

图2

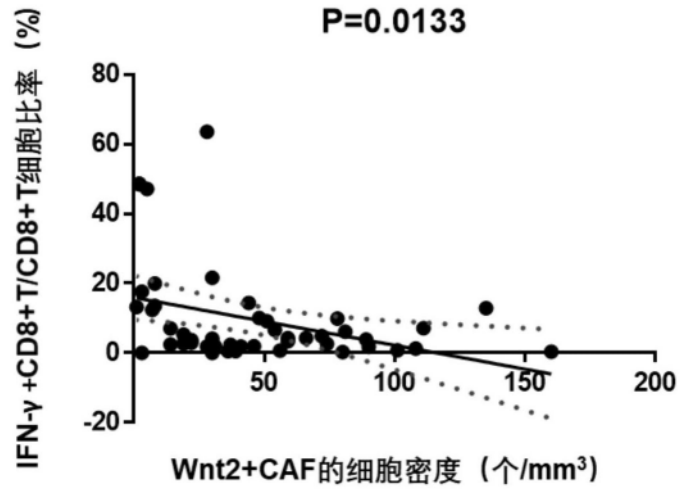
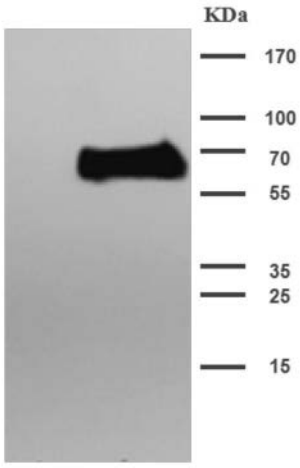

P=0.0133
IFN-γ +CD8+ T/CD8+ T细胞比率（%）
80
60
40
20
0
-20
50
100
150
200
Wnt2+CAF的细胞密度（个/mm³）

图3



LaneA:EGFP-WNT2 (100ng)

Anti-GFP: 0.1μg/ml

HRP-Goat Anti mouse IgG :0.2μg/ml

图4

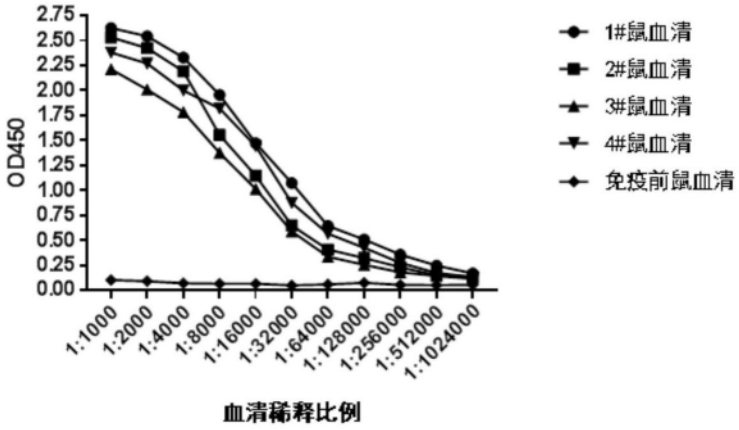
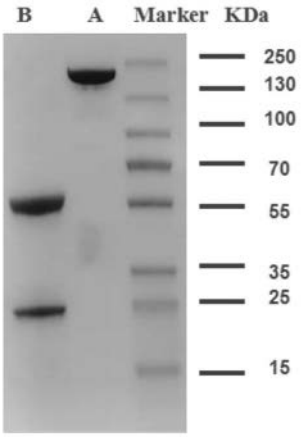


图5



Lane A：Anti-Wnt2 (10μg)变性非还原

Lane B：Anti-Wnt2 (10μg)变性还原

图6

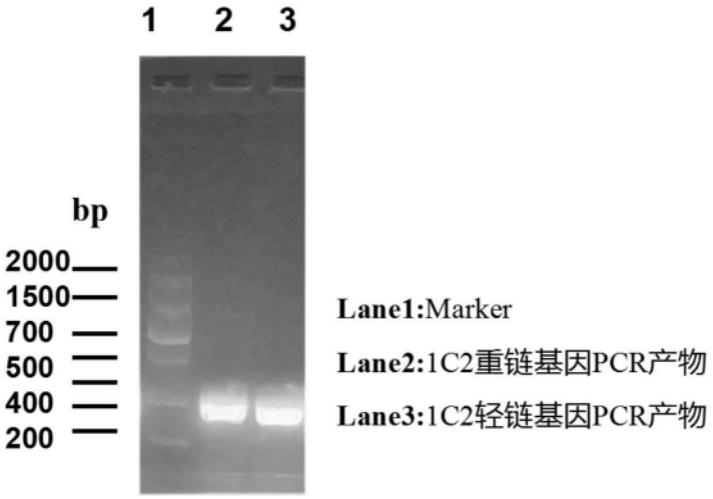


图7

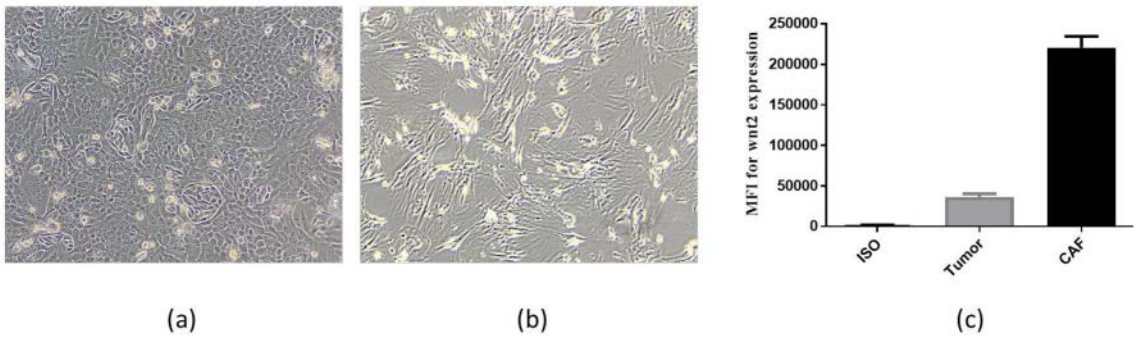


图8

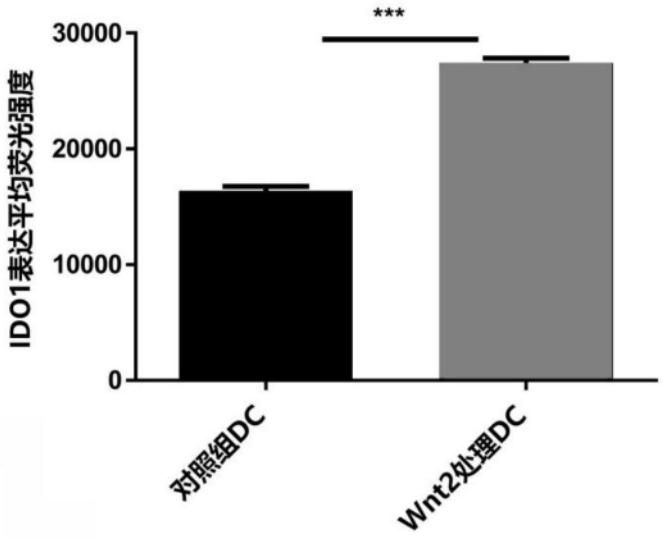

***
30000
20000
10000
0
IDO1表达平均荧光强度
对照组DC
Wnt2处理DC

图9

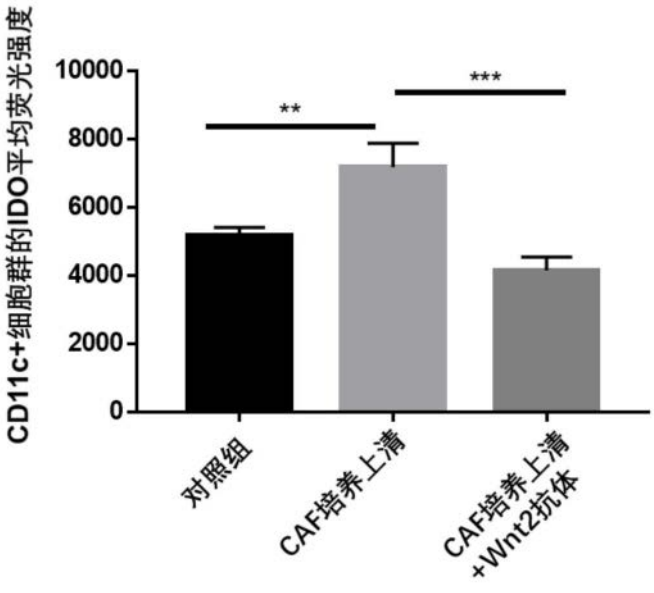

**
***
10000
8000
6000
4000
2000
0
CD11c+细胞群的IDO平均荧光强度
对照组
CAF培养上清
CAF培养上清
+Wnt2抗体

图10

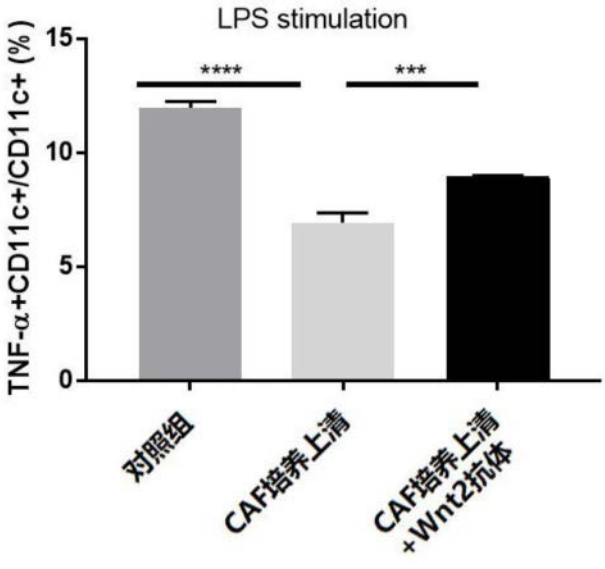

LPS stimulation
TNF-α+CD11c+/CD11c+ (%)
15
10
5
0
****
***
对照组
CAF培养上清
CAF培养上清
+Wnt2抗体

图11

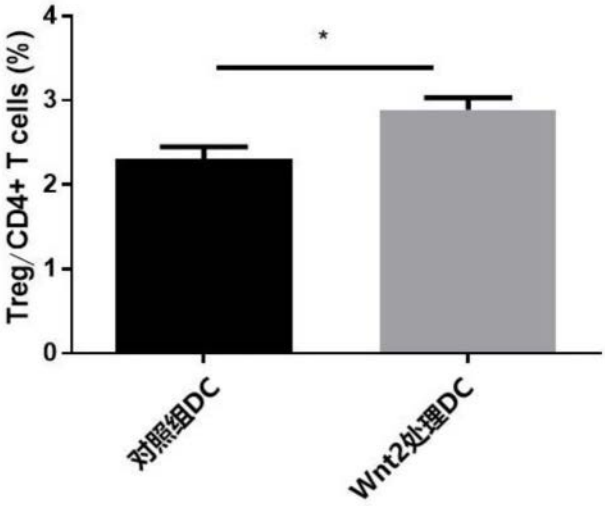

Treg/CD4+ T cells (%)
4
3
2
1
0
*
对照组DC
Wnt2处理DC

图12

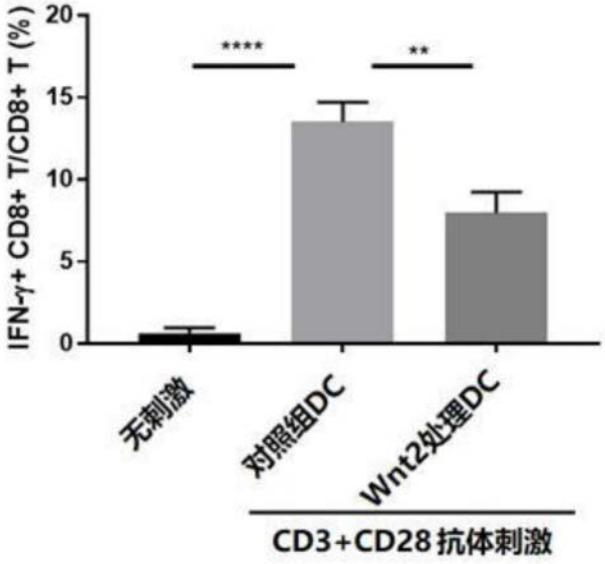

IFN-γ+ CD8+ T/CD8+ T (%)
20
15
10
5
0
****
**
无刺激
对照组DC
Wnt2处理DC
CD3+CD28抗体刺激

图13

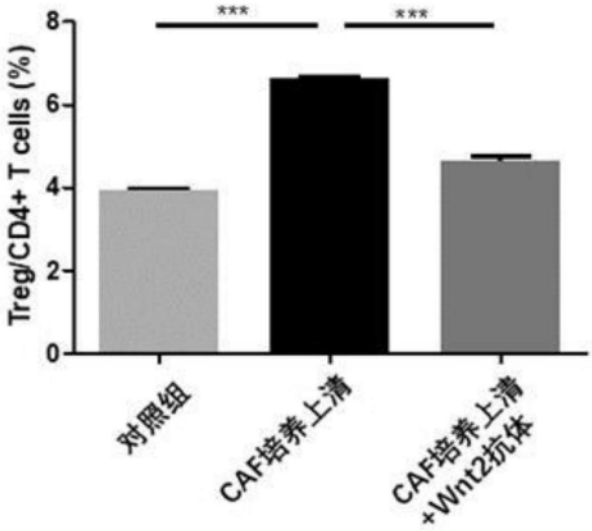

Treg/CD4+ T cells (%)
8
6
4
2
0
***
***
对照组
CAF培养上清
CAF培养上清
+Wnt2抗体

图14

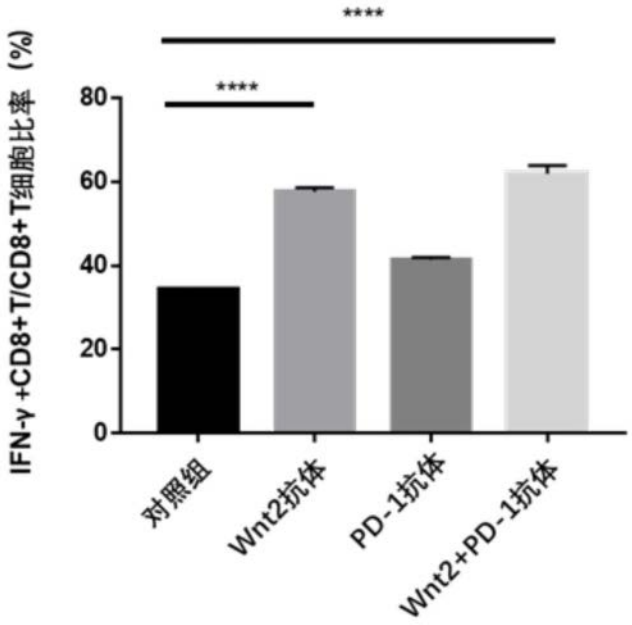

****
****
IFN-γ +CD8+T/CD8+T细胞比率（%）
80
60
40
20
0
对照组
Wnt2抗体
PD-1抗体
Wnt2+PD-1抗体

图15

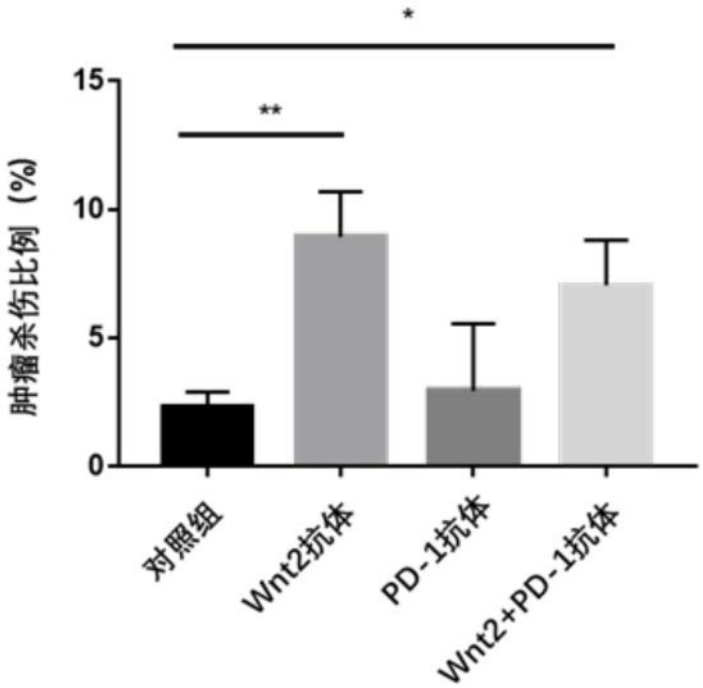

*
**
肿瘤杀伤比例（%）
15
10
5
0
对照组
Wnt2抗体
PD-1抗体
Wnt2+PD-1抗体

图16