



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 109750002 B

(45) 授权公告日 2022. 04. 19

(21) 申请号 201711062233.4

C07K 19/00 (2006.01)

(22) 申请日 2017.11.02

C12N 15/62 (2006.01)

(65) 同一申请的已公布的文献号

A61K 39/00 (2006.01)

申请公布号 CN 109750002 A

A61K 39/395 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

(43) 申请公布日 2019.05.14

(83) 生物保藏信息

(56) 对比文件

CGMCC No.14723 2017.09.26

W0 2010047117 A1,2010.04.29

W0 2016191305 A1,2016.12.01

(73) 专利权人 北京蛋白质组研究中心

W0 2010047117 A1,2010.04.29

地址 102206 北京市昌平区科学园路38号

CN 105457024 A,2016.04.06

专利权人 中国人民解放军军事科学院军事医学研究院

Yamashiro 等.“Stimulation of human butyrophilin 3 molecules results in negative regulation of cellular immunity”.《Journal of Leukocyte Biology》.2010,第88卷

(72) 发明人 唐丽 柳迪 贺福初 陆倩

陆倩 等.“BTN3A3 单克隆抗体的制备与鉴定”.《军事医学》.2018,第42卷(第2期),

(74) 专利代理机构 北京尚诚知识产权代理有限公司 11322

代理人 鲁兵

审查员 蔺娜

(51) Int.Cl.

C12N 5/20 (2006.01)

C07K 16/18 (2006.01)

权利要求书1页 说明书13页

序列表6页 附图5页

(54) 发明名称

杂交瘤细胞株及其分泌的具有抑制肿瘤进程活性的单克隆抗体与应用

(57) 摘要

本发明公开了一种具有抑制肿瘤进程活性的单克隆抗体5E08和分泌该抗体的小鼠抗人单克隆抗体杂交瘤细胞株Anti-P3 (5E08) 20170921 CGMCC No.14723,该杂交瘤细胞株是以人BTN3A3与小鼠IgG2a的融合蛋白BTN3A3-mIg为免疫原免疫小鼠获得,其分泌的单克隆抗体5E08能够阻断LSEctin与BTN3A3之间的相互作用,从而抑制肿瘤的发生与发展。本发明的单克隆抗体5E08可用于制备抗肿瘤药物,为肿瘤的免疫蛋白治疗提供了一个新思路。

CN 109750002 B

1. 能分泌阻断LSECtin与BTN3A3之间相互作用单克隆抗体的杂交瘤细胞株,是以将人BTN3A3与小鼠IgG2a通过连接肽连接得到的融合蛋白BTN3A3-mIg为免疫原免疫小鼠,获得持续、稳定分泌具有抑制肿瘤进程活性的单克隆抗体的杂交瘤细胞株;

所述杂交瘤细胞株命名为anti-P3 (5E08),保藏编号为CGMCC No.14723,保藏日期为2017年9月26日,保藏地址为中国普通微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心。

2. 根据权利要求1所述的杂交瘤细胞株,其特征在于,所述融合蛋白BTN3A3-mIg的氨基酸残基序列为序列表中的序列1所示。

3. 具有抑制肿瘤进程活性的单克隆抗体,由权利要求1或2所述的杂交瘤细胞株分泌的单克隆抗体,命名为5E08。

4. 根据权利要求3所述的单克隆抗体,其特征在于:

单克隆抗体5E08的重链可变区的氨基酸残基序列为序列表中序列3所示;

单克隆抗体5E08的轻链可变区的氨基酸残基序列为序列表中序列4所示。

5. 根据权利要求3或4所述的单克隆抗体,其特征在于:

单克隆抗体5E08的重链可变区编码基因为编码序列表中序列3的DNA序列;

单克隆抗体5E08的轻链可变区编码基因为编码序列表中序列4的DNA序列。

6. 根据权利要求5所述的单克隆抗体,其特征在于:

所述单克隆抗体5E08的重链可变区编码基因为序列表中序列5的DNA序列;

所述单克隆抗体5E08的轻链可变区编码基因为序列表中序列6的DNA序列。

7. 具有抑制肿瘤进程活性的单克隆抗体的制备方法,采用:

方式一:从权利要求1或2所述的能分泌阻断LSECtin与BTN3A3之间相互作用单克隆抗体的杂交瘤细胞株的培养液或接种所述杂交瘤细胞株的动物的腹水液中分离并纯化得到具有抑制肿瘤进程活性的单克隆抗体,或

方式二:利用权利要求4-6中任一项提及的单克隆抗体5E08的重链可变区和轻链可变区氨基酸序列或DNA序列构建单克隆抗体5E08的表达载体,通过常规蛋白表达方式得到具有抑制肿瘤进程活性的单克隆抗体。

8. 权利要求3-6中任一项所述的单克隆抗体5E08在制备抗肿瘤药物中的应用,所述肿瘤为肿瘤相关巨噬细胞表达LSECtin且肿瘤细胞表达BTN3A3的肿瘤。

9. 根据权利要求8所述的应用,其特征在于,所述肿瘤相关巨噬细胞表达LSECtin且肿瘤细胞表达BTN3A3的肿瘤包括但不限于乳腺癌、骨髓瘤、肝癌、胃癌、结肠癌、肺癌、骨巨细胞瘤、肾癌、喉癌和腮腺癌。

杂交瘤细胞株及其分泌的具有抑制肿瘤进程活性的单克隆抗体与应用

技术领域

[0001] 本发明属于生物技术领域中的杂交瘤细胞株及其分泌的单克隆抗体与应用,特别是涉及具有抑制肿瘤进程活性的单克隆抗体和分泌该抗体的杂交瘤细胞株以及该单克隆抗体在制备抗肿瘤药物中的应用。

背景技术

[0002] 全球肿瘤发病率自20世纪70年代末开始一直呈上升趋势。目前,对于肿瘤的治疗手段主要包括手术、放疗、化疗、内分泌治疗、靶向治疗及中医药辅助治疗等。困扰肿瘤治疗的根本原因是肿瘤具备一定的耐药性及复发能力。研究表明,导致肿瘤具有耐药性以及复发能力的根本原因在于肿瘤细胞干性的维持与提升,因此,肿瘤细胞干性的靶向性治疗日益成为研究的热点。肿瘤细胞的干性受基因多样性、表观遗传以及肿瘤微环境三个因素调控。鉴于肿瘤微环境因素促进肿瘤细胞干性依赖细胞间交互作用,因此,认识并挖掘促进肿瘤细胞干性的膜蛋白相互作用分子对,筛选抑制该类膜蛋白间相互作用的物质,有望为肿瘤细胞干性的靶向性治疗提供新思路。

[0003] 肿瘤相关巨噬细胞是肿瘤微环境中存在的巨噬细胞的总称,是肿瘤微环境中浸润免疫细胞的重要组成部分。已有研究显示,肿瘤相关巨噬细胞能够通过多种途径促进肿瘤进程,包括抑制肿瘤免疫反应、促进肿瘤免疫耐受环境的形成、促进肿瘤组织血管生成等。鉴于肿瘤相关巨噬细胞促进肿瘤进程现象明确,清除肿瘤相关巨噬细胞、促使肿瘤相关巨噬细胞向免疫激活方向转化已成为潜在的肿瘤治疗方法。

[0004] LSEctin(Liver Sinusoidal Endothelial Cells lectin)是Ⅱ型跨膜糖蛋白,位于人类19p13.3,是C型凝集素家族的新成员。已知LSEctin蛋白功能包括在黑色素瘤中负调节T细胞免疫反应,促进埃博拉病毒引发的炎症反应,抑制CTL依赖的HBV 病毒清除,促进结肠癌肿瘤细胞肝转移,发明人贺福初、唐丽等之前发现LSEctin可能作为黑色素瘤免疫治疗的靶点(CN104906575A,2014100898325);治疗和/或预防埃博拉病毒的靶点(CN107019703A,2016100731468);抗丙型肝炎病毒感染药物作用靶点(CN101152558,2007101755278);还发现LSEctin或含有LSEctin的融合蛋白可应用于制备抑制癌细胞向肝转移的药物,LSEctin蛋白及其融合蛋白能粘附结肠癌细胞、抑制结肠癌细胞往肝脏的归巢性迁移,成为抗粘附治疗肿瘤肝转移的一个新靶标(CN101732715A,2008102257147)。

发明内容

[0005] 本发明旨在提供能够阻断LSEctin与BTN3A3之间相互作用的物质,从而抑制肿瘤的发生与发展(抑制肿瘤进程)。该物质为能够阻断LSEctin与BTN3A3之间的相互作用,具有抑制肿瘤进程活性的单克隆抗体。

[0006] 为得到所述具有抑制肿瘤进程活性的单克隆抗体,本发明首先提出用于制备该抗体的免疫原,其为一种特别设计的融合蛋白,命名为BTN3A3-mIg,是将人BTN3A3与小鼠

IgG2a通过连接肽连接后获得的重组蛋白。

[0007] 具体来讲,所述融合蛋白BTN3A3-mIg是下述氨基酸残基序列之一:

[0008] 1) 序列表中的序列1;

[0009] 2) 将序列表中序列1的氨基酸残基序列经过一个或几个氨基酸残基的取代、缺失或添加且具有抗BTN3A3免疫原性的蛋白质;

[0010] 3) 将序列表中序列1的氨基酸残基序列经过氨基酸残基的取代、缺失或添加且具有抗BTN3A3免疫原性的蛋白质,新蛋白质与序列1同源性达到80%或更高。

[0011] 其中:序列表中的序列1由499个氨基酸残基组成,自氨基(N)端第1位为起始密码子,第2-15为信号肽,第16-262位为人BTN3A3,自氨基端第263-266位为连接肽(linker),自氨基端第267-498位为小鼠IgG2a,第499位为终止密码子。

[0012] 编码权利要求上述融合蛋白BTN3A3-mIg的基因,命名为BTN3A3-mIg,也属于本发明的保护范围。

[0013] 具体来讲,编码上述融合蛋白的基因BTN3A3-mIg,是下述核苷酸序列之一:

[0014] 1) 序列表中序列2的DNA序列;

[0015] 2) 编码序列表中序列1的DNA序列;

[0016] 3) 与所编码序列表中序列1的DNA序列有一个或几个碱基变化且具有抗BTN3A3 免疫原性的的核苷酸序列;

[0017] 4) 所编码的序列80%或以上同源于序列表中序列2且具有抗BTN3A3免疫原性的的核苷酸序列;

[0018] 5) 在高严谨条件下可与序列表中序列2限定的DNA序列杂交的核苷酸序列。

[0019] 所述高严谨条件为杂交后用含 $0.1 \times$ SSPE(或 $0.1 \times$ SSC)、0.1%SDS的溶液在 65℃ 下洗膜。

[0020] 其中:序列表中的序列2由1497个碱基组成,其编码序列为自5'端第1-1497位碱基,编码具有序列表中1所示氨基酸残基序列的蛋白质,自5'端1-3位为起始密码子,自5'端第4-45位碱基编码信号肽,自5'端第46-786位碱基编码人BTN3A3,自5'端第787-798位碱基编码连接肽(linker),自5'端第799-1494位碱基编码小鼠IgG2a,自5'端第1495-1497位为终止密码子。

[0021] 含有本发明融合基因BTN3A3-mIg的表达载体、转基因细胞系及宿主菌均属于本发明的保护范围。

[0022] 扩增融合基因BTN3A3-mIg中任一片段的引物对也在本发明的保护范围之内。

[0023] 表达上述融合蛋白BTN3A3-mIg的方法也属于本发明。

[0024] 本发明所提供的融合蛋白BTN3A3-mIg的表达方法,可包括以下步骤:

[0025] (1) 构建重组表达载体:将融合基因BTN3A3-mIg连接入表达载体中,得到含有融合基因BTN3A3-mIg的重组表达载体;

[0026] (2) 表达融合蛋白BTN3A3-mIg:将含有融合基因BTN3A3-mIg的重组表达载体转化或转染宿主细胞及其后代细胞,培养重组宿主细胞,使融合基因BTN3A3-mIg获得表达;

[0027] (3) 纯化:对重组表达蛋白进行纯化,得到融合蛋白BTN3A3-mIg。

[0028] 在上述融合蛋白BTN3A3-mIg的表达方法中,所述步骤1)中将融合基因 BTN3A3-mIg连接入载体pIRES2-EGFP中的NheI和SalI酶切位点之间,得到重组表达载体pIRES2-

EGFP-BTN3A3-mIg。

[0029] 所述步骤(2)中的宿主细胞为可表达外源基因的细胞,如293T细胞、293细胞或CHO-S细胞等,优选为293T细胞。

[0030] 所述步骤(2)中培养含有融合基因BTN3A3-mIg的重组宿主细胞的培养基为适于宿主细胞生长的培养基,如无血清培养基M293TI、CD CHO或CD OptiCHO™等,优选为无血清培养基M293TI。

[0031] 所述步骤(2)中含有融合基因BTN3A3-mIg的重组宿主细胞的培养条件为适于宿主细胞生长的培养条件,如36.5-37.5℃培养24-120小时,优选为37℃培养96小时。

[0032] 所述步骤(3)中可使用如Protein G Sepharose柱(蛋白G琼脂糖凝胶柱)、Protein A/G Sepharose柱(蛋白A/G琼脂糖凝胶柱)、或Protein A Sepharose柱(蛋白A 琼脂糖凝胶柱)等对重组表达蛋白进行纯化,优选为Protein G Sepharose柱,纯化方法为:将细胞(含有融合基因BTN3A3-mIg的重组宿主细胞)培养上清加入平衡缓冲液(20mM PBS,150mM NaCl,pH 8.0)至pH 8.0,将细胞上清加入已经用平衡缓冲液平衡好的Protein G Sepharose柱中,用平衡缓冲液洗柱,直到流出液中检测不到杂蛋白为止,用洗脱缓冲液(0.1M甘氨酸,pH 3.0)洗脱,收集流出液,立即用中和缓冲液(1M Tris·HCl,pH 9.0)中和,用pH 7.2 0.01mol/L PBS透析72h,得到融合蛋白BTN3A3-mIg。

[0033] 本发明的目的是提供一种分泌具有抑制肿瘤进程活性的单克隆抗体的杂交瘤细胞株及其产生的单克隆抗体。

[0034] 本发明以融合蛋白BTN3A3-mIg为免疫原免疫小鼠,获得持续、稳定分泌具有抑制肿瘤进程活性的特异性单克隆抗体的杂交瘤细胞株,分类命名为小鼠抗人单克隆抗体杂交瘤细胞株,名称为Anti-P3(5E08)20170921,该细胞株已于2017年9月26日保藏于位于中国北京市朝阳区北辰西路1号院3号的中国普通微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心,保藏编号为CGMCC No.14723。

[0035] 由杂交瘤细胞株anti-P3(5E08)分泌的单克隆抗体命名为5E08,来源于小鼠属小鼠(*Mus musculus*),也属于本发明的保护范围。

[0036] 单克隆抗体5E08的重链可变区为具有序列表中序列3的氨基酸残基序列、或将序列表中序列3的氨基酸残基序列经过一至十个氨基酸残基的取代、缺失或添加且可与人BTN3A3特异结合的多肽、或与序列表序列3有80%或以上同源性且可与人BTN3A3 特异结合的多肽;轻链可变区为具有序列表中的序列4的氨基酸残基序列、或将序列表中序列4的氨基酸残基序列经过一至十个氨基酸残基的取代、缺失或添加且可与人 BTN3A3特异结合的多肽、或与序列表序列4有80%或以上同源性且可与人BTN3A3特异结合的多肽。

[0037] 其中:序列表中的序列3由141个氨基酸残基组成,序列表中的序列4由130个氨基酸残基组成。

[0038] 编码单克隆抗体5E08的基因(5E08),其重链可变区编码基因为以下之一:具有序列表中序列5的DNA序列、编码序列表中序列3的DNA序列、与所编码序列表中序列3的DNA序列有一个或多个碱基变化的序列、所编码的序列80%或以上同源于序列表中序列5的序列、和在高严谨条件下可与序列表中序列5限定的DNA序列杂交的核苷酸序列,其轻链可变区编码基因为以下之一:具有序列表中序列6的DNA序列、编码序列表中序列4的DNA序列、与所编码序列表中序列4的DNA序列有一个或多个碱基变化的序列、所编码的序列80%或以上同源

于序列表中序列6的序列、或在高严谨条件下可与序列表中序列6限定的DNA序列杂交的核苷酸序列；

[0039] 所述高严谨条件为在 $0.1 \times$ SSPE (或 $0.1 \times$ SSC)、 0.1% SDS的溶液中, 65°C 条件下杂交并洗膜。

[0040] 其中: 序列表中的序列5由423个碱基组成, 编码具有序列表中序列3的氨基酸残基序列的蛋白质, 序列表中的序列6由390个碱基组成, 编码具有序列表中序列4 的氨基酸残基序列的蛋白质。

[0041] 含有本发明基因5E08的表达载体、转基因细胞系和宿主菌均属于本发明的保护范围。

[0042] 扩增本发明基因5E08中任一片段的引物对也在本发明的保护范围之内。

[0043] 获得本发明的杂交瘤细胞株anti-P3 (5E08) 的方法, 可包括以下步骤:

[0044] 1) 用融合蛋白BTN3A3-mIg作为免疫原免疫动物;

[0045] 2) 分离免疫动物的脾细胞, 将其与骨髓瘤细胞融合, 形成杂交瘤;

[0046] 3) 筛选杂交瘤细胞, 得到杂交瘤细胞株anti-P3 (5E08)。

[0047] 获得本发明单克隆抗体5E08的方法, 在上述步骤的基础上增加以下步骤:

[0048] 4) 从杂交瘤细胞株anti-P3 (5E08) 的培养液或接种杂交瘤细胞株anti-P3 (5E08) 的动物的腹水液中分离并纯化出单克隆抗体5E08。

[0049] 在上述杂交瘤细胞株anti-P3 (5E08) 的获得方法中, 所述步骤1) 中融合蛋白BTN3A3-mIg的浓度为 $100\text{-}400\mu\text{g/mL}$, 优选为 $400\mu\text{g/mL}$; 用于制备单克隆抗体的免疫动物可为小鼠、大鼠、兔、山羊、绵羊、猪、驴、马等哺乳动物, 优选为小鼠。

[0050] 所述步骤2) 中当被免疫动物的血清抗体水平达到峰值时, 可分离动物的脾细胞并制备成单细胞悬液。必要时, 可使用免疫吸附方法筛选脾细胞, 并在适当的融合剂 (如聚乙二醇) 的诱导下与骨髓瘤细胞 (优选为小鼠骨髓瘤细胞SP2/0) 融合以形成杂交瘤。

[0051] 所述步骤3) 中可以在选择性培养基 (如HAT培养基) 中培养以筛选融合的杂交瘤细胞, 并进一步可使用流式细胞术、Western印迹法、免疫沉淀法等方法鉴定所需的阳性抗性细胞株。

[0052] 所述步骤4) 中可于体外 (如在组织培养瓶或多孔纤维反应器中) 或体内 (小鼠腹水) 培养分泌具有抑制肿瘤进程活性的特异性单克隆抗体5E08的杂交瘤细胞株 anti-P3 (5E08), 并从细胞培养液或小鼠腹水液中收集和纯化出单克隆抗体5E08。

[0053] 获得本发明单克隆抗体5E08的方法, 还能利用所提及的单克隆抗体5E08的重链可变区和轻链可变区氨基酸序列或DNA序列构建单克隆抗体5E08的表达载体, 通过常规蛋白表达方式得到具有抑制肿瘤进程活性的单克隆抗体。

[0054] 本发明能够阻断LSECtin与BTN3A3之间的相互作用的单克隆抗体5E08作为活性成分在制备抗肿瘤药物中的应用也属于本发明, 基于所述融合蛋白BTN3A3-mIg、融合基因BTN3A3-mIg或杂交瘤细胞株anti-P3 (5E08) 制备抗肿瘤药物的应用也属于本发明。优选的, 所述肿瘤为肿瘤相关巨噬细胞表达LSECtin且肿瘤细胞表达BTN3A3的肿瘤, 肿瘤相关巨噬细胞表达LSECtin且肿瘤细胞表达BTN3A3的肿瘤包括但不限于乳腺癌、骨髓瘤、肝癌、胃癌、结肠癌、肺癌、骨巨细胞瘤、肾癌、喉癌和腮腺癌。

[0055] 本发明的融单克隆抗体5E08通过药学可接受的、适合于给药的药物载体制备成药

物组合物,合适的药物载体为本领域技术人员熟知的,包括但不限于生理盐水、磷酸缓冲液、水、脂质体、纳米载体等。含有单克隆抗体5E08的药物载体可通过常规方法制备。

[0056] 本发明单克隆抗体5E08的药物组合物可以通过各种给药途径施用有效剂量于人类或其它哺乳动物,给药途径包括但不限于静脉注射(iv)、静脉滴注(infusion)、肌肉注射(im)、皮下注射(sc)和口服(po)等。对于不同的疾病,可以选择不同的给药途径。

[0057] 本发明单克隆抗体5E08基于小鼠模型的给药剂量一般为2.5-5.0 μ g/g,疗程一般为15-30天。实际应用中的剂量和疗程应根据实际情况进行调整。

[0058] 本发明提供了一种具有抑制肿瘤进程活性的单克隆抗体5E08和分泌该抗体的小鼠抗人单克隆抗体杂交瘤细胞株Anti-P3(5E08)20170921CGMCC No.14723。单克隆抗体5E08能够阻断LSECtin与BTN3A3之间的相互作用,从而抑制肿瘤的发生与发展。实验证明,单克隆抗体5E08与BTN3A3蛋白具有结合活性,单克隆抗体5E08能够阻断LSECtin与BTN3A3之间的相互作用,单克隆抗体5E08能够阻断LSECtin促进肿瘤细胞的干性,单克隆抗体5E08能够抑制肿瘤生长。本发明的单克隆抗体5E08可用于制备抗肿瘤药物,为肿瘤的免疫蛋白治疗提供了一个新的思路,应用前景广阔。

附图说明

[0059] 图1为重组表达的融合蛋白BTN3A3-mIg的考马斯亮蓝染色结果图片;

[0060] 图2为重组表达的融合蛋白BTN3A3-mIg的Western Blot检测结果图片;

[0061] 图3为杂交瘤细胞分泌的单克隆抗体5E08与BTN3A3结合比例的流式细胞检测结果图片;

[0062] 图4为单克隆抗体5E08阻断LSECtin蛋白与膜形式BTN3A3相互作用活性的粘附实验检测结果图片;

[0063] 图5为单克隆抗体5E08阻断LSECtin促进肿瘤细胞干性的检测结果柱图;

[0064] 图6为单克隆抗体5E08对肿瘤进程的抑制效果的小鼠预防模型检测结果曲线;

[0065] 图7为单克隆抗体5E08对肿瘤进程的抑制效果的小鼠治疗模型检测结果曲线;

[0066] 图8为实施例8实验药物作用后心脏、肝脏、脾脏、肺脏以及肾脏组织切片图,显示单克隆抗体5E08对小鼠预防模型无毒副作用;

[0067] 图9为实施例8实验药物作用后心脏、肝脏、脾脏、肺脏以及肾脏组织切片图,显示单克隆抗体5E08对小鼠治疗模型无毒副作用。

具体实施方式

[0068] 现有技术中已披露某些肿瘤如黑色素瘤中存在的LSECtin蛋白能促进肿瘤发展,在肿瘤免疫治疗的研究中,发明人进一步了解到肿瘤相关巨噬细胞表达的LSECtin蛋白也具有促进肿瘤形成与发展的特性,还首次发现LSECtin能够与肿瘤细胞表面表达的BTN3A3相互作用,从而促进肿瘤细胞的干性,并且促进肿瘤的发生与发展。

[0069] BTN3A3(嗜乳脂蛋白3-A3,Butyrophilin subfamily 3member A3)为I型跨膜糖蛋白,位于人类6p22.2,是B7超家族的成员。已有文献提示BTN3A3蛋白有可能负调节淋巴细胞活性,并且编码BTN3A3蛋白的基因突变与肿瘤易感性相关 (Peedicayil,A.,et al.Risk of ovarian cancer and inherited variants in relapse-associated genes.PLoS One

5,e8884(2010).),专利文献CN105457024A(2014105357180)公开的抗butyrophilin-3人源化抗体能够同时识别BTN3A1, BTN3A2和BTN3A3,对治疗疾病(例如肿瘤、自身免疫性疾病和免疫排斥性疾病)是有益的。

[0070] 发明人首次发现LSECtin能与肿瘤细胞表面表达的BTN3A3相互作用,其机理是:肿瘤相关巨噬细胞表面高表达LSECtin,并能够通过与其膜受体——肿瘤细胞表面表达的BTN3A3(Butyrophilin subfamily 3member A3)相互作用促进肿瘤细胞干性的维持。因此,筛选并挖掘阻断LSECtin与BTN3A3相互作用的物质,有望成为肿瘤相关巨噬细胞促进肿瘤干性的靶向性药物,为肿瘤的治疗提供新思路。

[0071] 因此,本发明旨在提出一种物质以能阻断LSECtin与BTN3A3之间的相互作用,从而抑制肿瘤的发生与发展,抑制肿瘤进程。本发明提供的该物质为具有抑制肿瘤进程活性的单克隆抗体,命名为5E08,本发明同时提出能分泌5E08的杂交瘤细胞株 anti-P3(5E08)。

[0072] 下面结合具体实施例对本发明做进一步详细说明。

[0073] 下述实施例中所用方法如无特别说明均为常规方法,具体步骤可参见:《分子克隆实验指南》(《Molecular Cloning:A Laboratory Manual》Sambrook,J.,Russell, David W.,Molecular Cloning:A Laboratory Manual,3rd edition,2001,NY, Cold Spring Harbor)。

[0074] 所述百分比浓度如无特别说明均为质量/质量(W/W,单位g/100g)百分比浓度、质量/体积(W/V,单位g/100mL)百分比浓度或体积/体积(V/V,单位mL/100mL)百分比浓度。

[0075] 实施例中描述到的各种生物材料的取得途径仅是提供一种实验获取的途径以达到具体公开的目的,不应成为对本发明生物材料来源的限制。事实上,所用到的生物材料的来源是广泛的,任何不违反法律和道德伦理能够获取的生物材料都可以按照实施例中的提示替换使用。

[0076] 实施例在以本发明技术方案为前提下进行实施,给出了详细的实施方式和具体的操作过程,实施例将有助于理解本发明,但是本发明的保护范围不限于下述的实施例。

[0077] 实施例1、融合蛋白BTN3A3-mIg的表达

[0078] 本发明融合蛋白BTN3A3-mIg的表达方法,包括以下步骤:

[0079] 1) 构建融合基因BTN3A3-mIg:根据基因库中搜索到的人BTN3A3基因序列(GenBank号:BT007251.1)和小鼠IgG2a基因序列(GenBank号:BC018535.1),选择BTN3A3胞外区蛋白(本发明考虑LSECtin与BTN3A3胞外区相互作用,封闭其相互作用的蛋白需要与膜形式BTN3A竞争结合LSECtin,因此选择BTN3A3胞外区蛋白),选择合适的连接肽编码序列,用人工合成的方法获得融合基因BTN3A3-mIg,其核苷酸序列如序列表中序列2所示,其编码序列为自5'端第1-1497位碱基,编码具有序列表中1所示氨基酸残基序列的蛋白质,自5'端第1-3位为起始密码子,自5'端第4-45位碱基编码信号肽,自5'端第46-786位碱基编码人BTN3A3,自5'端第787-798位碱基编码连接肽(linker),自5'端第799-1494位碱基编码小鼠IgG2a,自5'端第1495-1497位为终止密码子;

[0080] 2) 构建重组表达载体:将融合基因BTN3A3-mIg接入载体pIRES2-EGFP(购自Clontech公司)中的NheI和SalI酶切位点之间,得到重组表达载体,命名为 pIRES2-EGFP-BTN3A3-mIg;

[0081] 3) 表达融合蛋白BTN3A3-mIg:将含有融合基因BTN3A3-mIg的重组表达载体

pIRES2-EGFP-BTN3A3-mIg转染293T细胞(来源于国家实验细胞资源共享平台),用无血清培养基M293TI(购自北京义翘神州科技有限公司,用0.45 μ m滤膜(PN4614, Pa11)过滤,冰上保存)在37 $^{\circ}$ C($\pm$ 0.5 $^{\circ}$ C)下培养重组293T细胞,每24小时收集细胞上清并更换培养基,至96小时(24-120小时均可)培养结束,使融合基因BTN3A3-mIg 获得表达;

[0082] 4) 纯化:用Protein G Sepharose柱(购自康为世纪生物科技公司)(蛋白G琼脂糖凝胶柱天然蛋白G(Protein G)是一种分离自G型或C型链球菌属的细胞表面蛋白,主要通过与免疫球蛋白(Ig)的Fc区相互作用,可结合大多数哺乳动物的IgG。天然蛋白G具有白蛋白和细胞表面结合域,重组Protein G去除了白蛋白和细胞表面结合域,以减少非特异性结合,该蛋白与Sepharose偶联后可用于纯化IgG。)对重组表达蛋白进行纯化,纯化方法为:将细胞(含有融合基因BTN3A3-mIg的重组293T细胞)培养上清加入平衡缓冲液(20mM PBS, 150mM NaCl, pH 8.0)至pH 8.0,将细胞上清加入已经用平衡缓冲液平衡好的Protein G Sepharose柱中,用平衡缓冲液洗柱,直到流出液中检测不到杂蛋白为止,用洗脱缓冲液(0.1M甘氨酸, pH 3.0)洗脱,收集流出液,立即用中和缓冲液(1M Tris $\cdot$ HCl, pH 9.0)中和,用pH 7.2 0.01mol/L PBS透析72h,得到融合蛋白BTN3A3-mIg,与预期结果相符,融合蛋白BTN3A3-mIg 氨基酸序列如序列表中的序列1所示,序列表中的序列1由499个氨基酸残基组成,自氨基(N)端第1位为起始密码子,第2-15为信号肽,第16-262位为人BTN3A3,自氨基端第263-266位为连接肽(linker),自氨基端第267-498位为小鼠IgG2a,第499位为终止密码子。

[0083] 取样在紫外分光光度计上测OD260、OD280,用BCA蛋白定量试剂盒(购自康为世纪生物科技公司)计算蛋白质含量,结果为1mg/ml,分装后于-80 $^{\circ}$ C保存。

[0084] 实施例2、融合蛋白BTN3A3-mIg的考马斯亮蓝染色及Western Blot检测

[0085] 一、融合蛋白BTN3A3-mIg的考马斯亮蓝染色

[0086] 收集实施例1重组表达的BTN3A3-mIg融合蛋白样品,配制10%SDS-PAGE凝胶,电泳,进行考马斯亮蓝染色。对照为细胞(含有融合基因BTN3A3-mIg的重组293T细胞)裂解液。

[0087] 考马斯亮蓝染色结果如图1所示,经表达获得了分子量约55kD的蛋白,与预期结果相符。

[0088] 二、融合蛋白BTN3A3-mIg的Western Blot检测

[0089] 收集实施例1重组表达的BTN3A3-mIg融合蛋白样品,配制10%SDS-PAGE凝胶,电泳,转膜,用含有5%脱脂奶粉的TBST溶液封闭,用抗人BTN3A3抗体(购自赛默飞)进行一抗孵育,用Mouse IgG HRP-conjugated Antibody(购自R&D, HAF007)进行二抗孵育。实验对照蛋白为小鼠IgG(购自Abcam, ab37355)。

[0090] Western Blot检测结果如图2所示,可以看出,实施例1重组表达的融合蛋白可以与抗人BTN3A3抗体特异结合,表明BTN3A3-mIg蛋白能够从上述蛋白表达及纯化体系中获得。融合蛋白BTN3A3-mIg能作为制备BTN3A3抗体的免疫抗原。

[0091] 实施例3、获得持续、稳定分泌具有抑制肿瘤进程活性的单克隆抗体5E08的杂交瘤细胞株anti-P3(5E08)

[0092] 杂交瘤细胞株anti-P3(5E08)的获得方法,包括以下步骤:

[0093] 一、动物免疫

[0094] 1、抗原制备方法

[0095] 取100 μ g (50-100 μ g均可)融合蛋白BTN3A3-mIg,用生理盐水稀释为0.25mL (0.25-0.50mL均可),与等体积的弗氏完全佐剂(购自Sigma公司)充分混合、搅拌、乳化。

[0096] 2、免疫方案

[0097] 首次免疫:以融合蛋白BTN3A3-mIg为抗原免疫小鼠,浓度为400 μ g/mL (200-400 μ g/mL均可),免疫剂量为0.25mL (0.25-0.50mL均可),颈背部皮下注射Balb/c健康雌性小鼠(6-8周龄,购自北京维通利华实验动物技术有限公司),其余腹腔注射;

[0098] 二次免疫:首次免疫30天后,免疫方法与首次免疫相同;

[0099] 测定血清效价:二次免疫7天后,尾静脉采血,ELISA测定血清效价;

[0100] 加强免疫:在融合前3-4天,加强免疫,不加免疫佐剂,采用腹腔注射或尾静脉注射,免疫浓度和免疫剂量与首次免疫相同。

[0101] 3、免疫小鼠外周血以及腹水效价的Elisa检测

[0102] 3.1用1 μ g/mL浓度BTN3A3-his重组蛋白(购自北京义翘神州科技有限公司)包被酶标板,200 μ l/孔,4 $^{\circ}$ C过夜(12-16小时)后,PBST洗液洗涤3次;

[0103] 3.2每孔加150 μ L封闭液,4 $^{\circ}$ C过夜(12-16小时),洗涤3次,拍干,置4 $^{\circ}$ C冰箱保存备用;

[0104] 3.3检测效价时,取免疫小鼠外周血血清或腹水进行四倍比稀释(稀释度依次为500,2000,8000,32000,128000,512000,2048000,8192000),以100 μ l/孔加样到包被好的酶标板中,同时,每板分别选取未免疫小鼠血清及正常IgG作为阴性对照,37 $^{\circ}$ C孵育30分钟,洗板4次,拍干;

[0105] 3.4加二抗Mouse IgG HRP-conjugated Antibody(购自R&D公司,HAF007),37 $^{\circ}$ C孵育40分钟,洗板8次,拍干;

[0106] 3.5加显色液(购自赛默飞公司)10-20分钟,显色;

[0107] 3.6加终止液(浓度为2mol/L浓度的硫酸水溶液),终止显色反应;

[0108] 3.7测定OD_{450nm}值,获得检测结果。

[0109] 用目测法比较,比阴性对照颜色深的腹水最高稀释度作为腹水效价。

[0110] 免疫小鼠血清与未免疫小鼠血清读数之比大于2(即以OD_{450nm}值大于阴性对照2倍为阳性判断依据),可用于制备杂交瘤细胞。

[0111] 二、杂交瘤细胞的融合和筛选

[0112] 1、制备滋养细胞

[0113] 将Balb/c小鼠拉颈脱臼处死,浸泡于75%酒精5分钟,随即放入超净工作台内,腹部朝上放于平皿内或固定于解剖板上。用镊子夹起小鼠腹部皮肤,用剪刀剪一小口,注意切勿剪破腹膜,以免腹腔液外流。然后,用剪刀上下两侧做钝性分离,充分暴露腹膜,用酒精棉球擦拭腹膜消毒。用注射器吸取5mL RPMI1640基础培养液(购自Hyclone公司),注入小鼠腹腔,注射器停留不动,晃动小鼠或反复抽吸几次,用原注射器抽回腹腔内液体,注入离心管,如此反复操作3-4次。1000rpm离心10分钟,弃上清,留下部细胞备用。用20-50mL完全培养液(含10%FBS的RPMI1640培养基,FBS购自Gibico公司)重悬细胞,100 μ L/孔滴加到培养板,置37 $^{\circ}$ C培养箱作为滋养细胞备用。

[0114] 2、脾细胞与骨髓瘤细胞融合

[0115] 2.1取加强免疫小鼠1只,眼眶采血后脱臼处死,在75%酒精中消毒后取脾脏,制备

脾细胞悬液(细胞浓度为 2.5×10^6 - 5.0×10^6 个/mL),转移到50mL离心管中,加RPMI1640培养基至30mL,1500-2000rpm离心5分钟,弃上清,计数,取 1×10^8 个细胞待用。取2瓶生长状态良好的(活细胞数>95%)骨髓瘤细胞(来源于国家实验细胞资源共享平台),将骨髓瘤细胞完全吹下,转移到50mL离心管中,加RPMI1640培养基至30mL,1500-2000rpm离心5分钟,弃上清,加RPMI1640培养基至30mL,计数,取 1×10^7 个细胞待用。

[0116] 2.2将脾细胞:骨髓瘤细胞以10:1细胞数比例混合,2000rpm离心3分钟。将上清倒干,把细胞沉淀弹成糊状,置37℃水浴。在1分钟内加入1mL融合剂(购自Sigma公司),搅拌细胞,37℃水浴45秒,在1分钟内加入1mL RPMI1640培养基并搅拌细胞,每2分钟内加入5mL RPMI1640培养基并搅拌细胞。

[0117] 2.3轻轻弹匀细胞,缓缓加入HAT培养液(购自Sigma公司)至体积为40ml-50ml,将细胞重悬,轻轻地混匀,加到步骤1预先准备好的滋养细胞板中。排枪滴加 80-100μL(配10mL/板),37℃、CO₂培养箱培养、观察。

[0118] 从细胞融合后第1天开始,对细胞进行仔细观察,记录细胞的生长状态、每孔杂交瘤细胞个数、块数、培养液有无污染、滋养细胞等情况。培养3-5天用HAT培养液换液,10天后换HT培养液(购自Sigma公司)培养至20天,换RPMI1640培养基继续培养48小时,收集上清并按照克隆板上排列的顺序进行编号,例如,5E08等。

[0119] 3、筛选分泌与BTN3A3特异结合的单克隆抗体5E08的杂交瘤细胞

[0120] 将细胞上清按步骤一中的方法进行Elisa检测,选择阳性值大于1.5的克隆(5E08等)进行流式检测,具体方法如下:

[0121] 3.1构建BTN3A3过表达载体

[0122] 将BTN3A3基因序列(GenBank号:BC018535.1,BTN3A3cDNA全长)替换 pIRES2-EGFP载体(购自Clontech公司)中NheI和SalI酶切位点之间的DNA片段,获得BTN3A3过表达载体,命名为pIRES2-EGFP-BTN3A3,其核苷酸序列如序列表中序列7所示。

[0123] 3.2将BTN3A3过表达载体pIRES2-EGFP-BTN3A3及pIRES2-EGFP空载体分别转染BT474细胞(来源于国家实验细胞资源共享平台),转染36h后,得到重组细胞:过表达BTN3A3的细胞BT474-BTN3A3和过表达pIRES2-EGFP空载体的细胞BT474-EGFP。

[0124] 3.3消化收集步骤3.2获得的重组细胞,分别用小鼠IgG(购自赛默飞公司)、商业化BTN3A3流式抗体(购自赛默飞公司)以及杂交瘤细胞分泌的单克隆抗体(步骤2.3收集的)抗体标记,以1:50体积比稀释羊抗小鼠PE标记荧光二抗(购自 Biolegend公司)标记细胞,4℃孵育30分钟。用1×PBS洗细胞3次后,弃上清。4℃孵育30分钟。用1×PBS洗细胞3次后,弃上清,用300μL PBS重悬后进行流式细胞检测。

[0125] 3.4将杂交瘤细胞株进行亚克隆,方法为,将杂交瘤细胞制成单细胞悬液并稀释,滴入铺有滋养细胞的96孔板中,使得每孔杂交瘤细胞数量不超过1个。正常培养10天后,取上清进行Elisa检测,阳性值最高的5个孔中的细胞,进行再次亚克隆,直至完成五次亚克隆,从而获得持续、稳定分泌抗体的杂交瘤细胞。检测结果如图3所示,其中筛选出的杂交瘤细胞分泌的单克隆抗体5E08能够识别人肿瘤细胞表面表达的BTN3A3,表明获得了分泌与BTN3A3特异结合的单克隆抗体5E08的杂交瘤细胞,分类命名为小鼠抗人单克隆抗体杂交瘤细胞株,命名为Anti-P3(5E08)20170921,该细胞株已于2017年9月26日保藏于位于中国北京市朝阳区北辰西路1号院3号的中国普通微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心,保

藏编号为CGMCC No.14723。

[0126] 实施例4、杂交瘤细胞株anti-P3 (5E08) 分泌的单克隆抗体5E08的特征检测及纯化

[0127] 一、腹水的制备及单克隆抗体5E08的纯化

[0128] 1、制备腹水

[0129] 在接种杂交瘤细胞anti-P3 (5E08) 前1-2周,先给小鼠腹腔注射0.5mL液体石蜡,预处理过的小鼠在2-3个月内均可使用。将培养状态良好的杂交瘤细胞anti-P3 (5E08) 吹打下来,室温1000rpm离心5分钟,弃上清,用无血清RPMI1640培养液将杂交瘤细胞anti-P3 (5E08) 重悬混匀,将细胞浓度调整至 2×10^6 个/mL,每只小鼠腹腔注射 0.5mL。接种杂交瘤细胞anti-P3 (5E08) 后的7-12天,可见小鼠腹部明显膨大,腹部膨大一定程度后,颈椎脱臼处死,将腹腔剪开一个小口,用1mL移液器将腹水收集起来,抽取的腹水经3000rpm离心20分钟,收集上清,-20℃冻存储备用。

[0130] 2、纯化单克隆抗体5E08

[0131] 使用IgM类单克隆抗体纯化试剂盒(购自北京博奥龙免疫技术有限公司)纯化步骤1收集的小鼠腹水中的单克隆抗体5E08。

[0132] 3、鉴定纯化的单克隆抗体5E08

[0133] 纯化后的单克隆抗体5E08按实施例3中的方法进行流式细胞检测。

[0134] 检测结果表明单克隆抗体5E08能够识别人肿瘤细胞表面表达的BTN3A3,表明获得了纯化的单克隆抗体5E08。

[0135] 二、单克隆抗体5E08的特征检测

[0136] 1、亚型检测

[0137] 将BTN3A3-his重组蛋白(购自北京义翘神州科技有限公司)用PBS缓冲液包被酶标8个微孔板孔,4℃放置12小时,随后用洗板机PBST洗1遍。接下来,每孔加入100μL杂交瘤细胞anti-P3 (5E08) 培养上清,37℃温育30分钟,而后用洗板机PBST 洗5遍。此后,每孔添加100μL Goat Anti-Mouse Ig (G1\G2a\G2b\G3\M\A\κ\λ) -HRP 二抗(购自北京博奥龙免疫技术有限公司),37℃温育30分钟后继续用洗板机PBST洗 5遍,随后加入TMB显色液(购自赛默飞公司),37℃避光显色,20分钟即可判定结果,肉眼观察蓝色孔即为阳性。

[0138] 亚型检测结果显示杂交瘤细胞anti-P3 (5E08) 分泌的单克隆抗体5E08的重链为IgM,轻链为Kappa。

[0139] 2、测定单克隆抗体5E08的可变区序列

[0140] 委托金斯瑞公司对杂交瘤细胞anti-P3 (5E08) 分泌的单克隆抗体5E08的可变区进行测序。结果5E08的重链可变区编码基因具有序列表中序列5的DNA序列,编码序列表中序列3所示的氨基酸残基序列;轻链可变区编码基因具有序列表中序列6的 DNA序列,编码序列表中序列4所示的氨基酸残基序列。

[0141] 序列表中的序列3由141个氨基酸残基组成,序列表中的序列4由130个氨基酸残基组成;序列表中的序列5由423个碱基组成,编码具有序列表中序列3的氨基酸残基序列的蛋白质,序列表中的序列6由390个碱基组成,编码具有序列表中序列4 的氨基酸残基序列的蛋白质。

[0142] 可以了解,本领域技术人员利用以上所述单克隆抗体5E08的重链可变区和轻链可变区氨基酸序列或DNA序列通过常规分子克隆手段可获得单克隆抗体5E08的表达载体,利

用常规蛋白表达方法能够更便捷获取具有抑制肿瘤进程活性的单克隆抗体,利用该方式制备具有抑制肿瘤进程活性的单克隆抗体属于本实施例公开内容。

[0143] 实施例5、粘附实验检测单克隆抗体5E08阻断LSECtin蛋白与膜形式BTN3A3相互作用的活性

[0144] 粘附实验过程中,将纯化后的单克隆抗体5E08与LSECtin蛋白按照物质的量比为1:1的比例混合,孵育过表达BTN3A3的BT474细胞系BT474-BTN3A3细胞,然后进行粘附实验。粘附实验具体步骤参照文献“Tang L,Yang J,Tang X,et al.The DC -SIGN family member LSECtin is a novel ligand of CD44on activated T cells[J]. European journal of immunology,2010,40 (4):1185-1191.”中记载的方法。实验对照蛋白为人IgG。

[0145] 单克隆抗体5E08阻断LSECtin蛋白与膜形式BTN3A3相互作用活性的粘附实验检测结果如图4所示,LSECtin粘附率的计算方法为LSECtin粘附阳性细胞且ZSG阳性细胞/ZSG阳性细胞,结果加入对照人IgG时,LSECtin与过表达BTN3A3细胞的粘附率为16.1%,计算公式为 $9.72/(9.72+50.6)$,但加入单克隆抗体5E08,LSECtin与过表达BTN3A3细胞的粘附率为1.4%,计算公式为 $0.828/(0.828+58.8)$ 。

[0146] 检测结果表明单克隆抗体5E08能够阻断LSECtin与BTN3A3之间的相互作用。

[0147] 实施例6、检测单克隆抗体5E08阻断LSECtin促进肿瘤细胞干性

[0148] 将B27 (购自Life公司)、bFGF (购自Sigma公司)、EGF (购自Sigma公司)、胰岛素 (购自Sigma公司)、肝素 (购自Sigma公司) 和DMEM/F12无血清培养基混匀后,得到培养体系,各个组分在培养体系中的浓度为:B27 (10ng/mL)、bFGF (20ng/mL)、EGF (20ng/mL)、胰岛素 (5μg/mL)、肝素 (4μg/mL)。

[0149] 将乳腺癌细胞MDA-MB-231 (来源于国家实验细胞资源共享平台) 制成单细胞悬液,以20,000个/mL铺板。加入100ng LSECtin后,分别加入0μg/mL、12.5μg/mL、25μg/mL、50μg/mL、100μg/mL单克隆抗体5E08,以人IgG为对照,培养7-10天后,计算直径大于75μm的球体数量并拍照。

[0150] 检测结果如图5所示,在刺激浓度下,LSECtin能够促进MDA-MB-231细胞球形成,但不能促进加入了50μg/mL浓度以及100μg/mL浓度单克隆抗体5E08后MDA-MB-231 细胞球形成。

[0151] 检测结果表明单克隆抗体5E08可阻断LSECtin促进肿瘤细胞干性。

[0152] 实施例7、检测单克隆抗体5E08抑制肿瘤进程

[0153] 一、用小鼠预防模型检测单克隆抗体5E08对肿瘤进程的抑制效果

[0154] 将10000个人乳腺癌细胞MDA-MB-231、基质胶 (BD,354230) 及PBS (Hyclone,SH30256.01) 混匀,得到混合物;将混合物分别种植5周雌性裸鼠的下乳腺,建立人-裸鼠乳腺癌移植模型。两个月中每隔一周观测一次,使用游标卡尺分别测量小鼠肿瘤的长径a和短径b,计算肿瘤体积和成瘤率,肿瘤体积计算公式为 $0.5*ab^2$,成瘤率计算公式为成瘤(只)/建模总数(只)。

[0155] 在细胞种植小鼠建模前一天,按照注射药剂的不同分为如下组:

[0156] IgG对照组:腹腔注射人IgG (50μg/只);

[0157] 5E08组:腹腔注射单克隆抗体5E08 (50μg/只)。

[0158] 将MDA-MB-231细胞分别接种于上述各组小鼠中。建模后,每3天腹腔注射蛋白,通

过测量肿瘤体积观测单克隆抗体5E08对肿瘤进程的抑制效果。

[0159] 建模后第1、2、3、4、5、6、7周肿瘤体积如下：

[0160] IgG组为 0.00 ± 0.00 、 0.00 ± 0.00 、 0.00 ± 0.00 、 0.00 ± 0.00 、 20.67 ± 18.82 、 64.98 ± 34.16 、 124.03 ± 47.41 、 350.71 ± 165.45 和 848.36 ± 243.67 单位为 mm^3 ；

[0161] 5E08组为 0.00 ± 0.00 、 0.00 ± 0.00 、 0.00 ± 0.00 、 0.00 ± 0.00 、 4.38 ± 12.37 、 24.49 ± 24.97 、 35.57 ± 37.09 、 110.98 ± 86.41 和 325.89 ± 233.46 (单位为 mm^3)。

[0162] 检测结果如图6所示,注射单克隆抗体5E08组肿瘤体积明显小于注射人IgG组。

[0163] 检测结果表明单克隆抗体5E08能够抑制肿瘤生长,可用于制备抗肿瘤药物及肿瘤的治疗。

[0164] 二、用小鼠治疗模型检测单克隆抗体5E08对肿瘤进程的抑制效果

[0165] 在MDA-MB-231细胞种植小鼠建模1个月时,按照等平均肿瘤体积分为IgG对照组,即肿瘤内注射人IgG ($50\mu\text{g}/\text{只}$) ;5E08组,即肿瘤内注射单克隆抗体5E08 ($50\mu\text{g}/\text{只}$)。通过测量肿瘤体积观测单克隆抗体5E08对肿瘤进程的抑制效果。

[0166] 治疗后第肿瘤体积如下：

[0167] IgG组为 197.40 ± 47.98 、 270.52 ± 28.76 、 389.69 ± 17.26 、 571.45 ± 59.02 、 933.05 ± 158.71 和 1202.53 ± 60.31 (单位为 mm^3)；

[0168] 5E08组为 179.87 ± 42.91 、 269.22 ± 54.97 、 276.68 ± 58.52 、 331.02 ± 94.42 、 443.16 ± 48.39 和 492.66 ± 71.39 (单位为 mm^3)。

[0169] 检测结果如图7所示,注射单克隆抗体5E08组肿瘤体积明显小于注射人IgG组。

[0170] 检测结果表明单克隆抗体5E08能够抑制肿瘤生长,可用于制备抗肿瘤药物及肿瘤的治疗。

[0171] 实施例8、单克隆抗体5E08抑制肿瘤无毒副作用

[0172] 一、小鼠预防模型中单克隆抗体5E08抑制肿瘤无毒副作用

[0173] 实验使用实施例7中的预防模型。取实验药物IgG或5E08治疗后,小鼠中的心脏、肝脏、脾脏、肺脏以及肾脏组织,放入福尔马林溶液后,送北京集思佳阳公司进行组织包埋、切片及HE染色。

[0174] 实验药物作用后各组织切片如图8所示,腹腔注射IgG或单克隆抗体5E08后,小鼠中的心脏、肝脏、脾脏、肺脏以及肾脏组织无损伤,亦无出现明显的炎性细胞浸润,说明腹腔注射单克隆抗体5E08无毒副作用。

[0175] 二、小鼠治疗模型中单克隆抗体5E08抑制肿瘤无毒副作用

[0176] 实验使用实施例7中的治疗模型。取实验药物IgG或5E08治疗后,小鼠中的心脏、肝脏、脾脏、肺脏以及肾脏组织,放入福尔马林溶液后,送北京集思佳阳公司进行组织包埋、切片及HE染色。

[0177] 实验药物作用后各组织切片如图9所示,肿瘤内注射IgG或单克隆抗体5E08后,小鼠中的心脏、肝脏、脾脏、肺脏以及肾脏组织无损伤,亦无出现明显的炎性细胞浸润,说明肿瘤内注射单克隆抗体5E08无毒副作用。

[0178] 以上实施例6-实施例8是以乳腺癌细胞MDA-MB-231为例进行实验验证,但本发明提出的单克隆抗体5E08同样适用于其他肿瘤相关巨噬细胞表达LSECtin且肿瘤细胞表达BTN3A3的肿瘤细胞。发明人已有实验证实:LSECtin高表达于乳腺癌

- [0179] CD45⁺CD3⁻CD15⁻CD19⁻CD56⁻CD11b⁺CD14⁺的肿瘤相关巨噬细胞、骨髓瘤
- [0180] CD45⁺CD3⁻CD15⁻CD19⁻CD56⁻CD11b⁺CD14⁺的肿瘤相关巨噬细胞、肺癌
- [0181] CD45⁺CD3⁻CD15⁻CD19⁻CD56⁻CD11b⁺CD14⁺的肿瘤相关巨噬细胞、结肠癌
- [0182] CD45⁺CD3⁻CD15⁻CD19⁻CD56⁻CD11b⁺CD14⁺的肿瘤相关巨噬细胞、骨巨细胞瘤
- [0183] CD45⁺CD3⁻CD15⁻CD19⁻CD56⁻CD11b⁺CD14⁺的肿瘤相关巨噬细胞、肾癌
- [0184] CD45⁺CD3⁻CD15⁻CD19⁻CD56⁻CD11b⁺CD14⁺的肿瘤相关巨噬细胞、喉癌
- [0185] CD45⁺CD3⁻CD15⁻CD19⁻CD56⁻CD11b⁺CD14⁺的肿瘤相关巨噬细胞、和腮腺癌
- [0186] CD45⁺CD3⁻CD15⁻CD19⁻CD56⁻CD11b⁺的肿瘤相关巨噬细胞等;以CD45⁻定义的乳腺癌肿瘤细胞、肺癌肿瘤细胞、结肠癌肿瘤细胞、骨巨细胞瘤肿瘤细胞、肾癌肿瘤细胞、腮腺癌肿瘤细胞表面均表达BTN3A,多种肿瘤细胞系均表达BTN3A3,细胞系包括乳腺癌细胞系:MCF7 (3111C0001CCC000013)、ZR75-1 (3111C0001CCC000090)、BT474
- [0187] (3111C0001CCC000129)、T47D (3111C0001CCC000265)、MDA-MB-453
- [0188] (3111C0001CCC000016)、SKBR3 (3111C0001CCC000085)、MDA-MB-468
- [0189] (3111C0001CCC000249)、MDA-MB-436 (3111C0001CCC000352);MDA-MB-231
- [0190] (3111C0001CCC000013);肝癌细胞系:BEL-7402 (3131C0001000700010)、HepG2
- [0191] (3111C0001CCC000035)、HCC-LM3 (3142C0001000000316)、HHCC
- [0192] (3111C0002000000069)、Hep3B (3111C0001CCC000376)、QGY7701
- [0193] (3131C0001000700042)、SMCC7721 (3111C0001CCC000087)、Huh7
- [0194] (3131C0001000700182);黑色素瘤细胞系:A875 (3111C0001CCC000094)、A375
- [0195] (3131C0001000700004);胃癌细胞系:MKN28 (3111C0001CCC000482)、NCI-N87
- [0196] (3111C0001CCC000481)、MGC-803 (3111C0001CCC000227)、SGC-7901
- [0197] (3131C0001000700046);结肠癌细胞系:LOVO (3111C0001CCC000164)、SW480
- [0198] (3142C0001000000064)、LS174T (3111C0001CCC000248)、DLD-1
- [0199] (3131C0001000700134),因此肿瘤相关巨噬细胞表达LSECtin且肿瘤细胞表达BTN3A3的肿瘤包括但不限于乳腺癌、骨髓瘤、肝癌、胃癌、结肠癌、肺癌、骨巨细胞瘤、肾癌、喉癌和腮腺癌。

[0001]	序列表															
[0002]	<110>	北京蛋白质组研究中心														
[0003]	<120>	杂交瘤细胞株及其分泌的具有抑制肿瘤进程活性的单克隆抗体与应用														
[0004]	<130>	CGCNB175141W														
[0005]	<141>	2017-11-02														
[0006]	<160>	7														
[0007]	<170>	SIPOSequenceListing 1.0														
[0008]	<210>	1														
[0009]	<211>	499														
[0010]	<212>	PRT														
[0011]	<213>	人工序列(Artificial Sequence)														
[0012]	<400>	1														
[0013]	Met	Ser	Ala	Leu	Leu	Ile	Leu	Ala	Leu	Val	Gly	Ala	Ala	Val	Ala	Lys
[0014]	1				5					10					15	
[0015]	Met	Ala	Ser	Ser	Leu	Ala	Phe	Leu	Leu	Leu	Asn	Phe	His	Val	Ser	Leu
[0016]					20					25					30	
[0017]	Phe	Leu	Val	Gln	Leu	Leu	Thr	Pro	Cys	Ser	Ala	Gln	Phe	Ser	Val	Leu
[0018]					35					40					45	
[0019]	Gly	Pro	Ser	Gly	Pro	Ile	Leu	Ala	Met	Val	Gly	Glu	Asp	Ala	Asp	Leu
[0020]					50					55					60	
[0021]	Pro	Cys	His	Leu	Phe	Pro	Thr	Met	Ser	Ala	Glu	Thr	Met	Glu	Leu	Arg
[0022]	65						70					75				80
[0023]	Trp	Val	Ser	Ser	Ser	Leu	Arg	Gln	Val	Val	Asn	Val	Tyr	Ala	Asp	Gly
[0024]							85					90				95
[0025]	Lys	Glu	Val	Glu	Asp	Arg	Gln	Ser	Ala	Pro	Tyr	Arg	Gly	Arg	Thr	Ser
[0026]							100					105				110
[0027]	Ile	Leu	Arg	Asp	Gly	Ile	Thr	Ala	Gly	Lys	Ala	Ala	Leu	Arg	Ile	His
[0028]							115					120				125
[0029]	Asn	Val	Thr	Ala	Ser	Asp	Ser	Gly	Lys	Tyr	Leu	Cys	Tyr	Phe	Gln	Asp
[0030]							130					135				140
[0031]	Gly	Asp	Phe	Tyr	Glu	Lys	Ala	Leu	Val	Glu	Leu	Lys	Val	Ala	Ala	Leu
[0032]	145						150					155				160
[0033]	Gly	Ser	Asp	Leu	His	Ile	Glu	Val	Lys	Gly	Tyr	Glu	Asp	Gly	Gly	Ile
[0034]							165					170				175
[0035]	His	Leu	Glu	Cys	Arg	Ser	Thr	Gly	Trp	Tyr	Pro	Gln	Pro	Gln	Ile	Lys
[0036]							180					185				190
[0037]	Trp	Ser	Asp	Thr	Lys	Gly	Glu	Asn	Ile	Pro	Ala	Val	Glu	Ala	Pro	Val
[0038]							195					200				205
[0039]	Val	Ala	Asp	Gly	Val	Gly	Leu	Tyr	Ala	Val	Ala	Ala	Ser	Val	Ile	Met
[0040]							210					215				220
[0041]	Arg	Gly	Ser	Ser	Gly	Gly	Gly	Val	Ser	Cys	Ile	Ile	Arg	Asn	Ser	Leu

[0042]	225	230	235	240
[0043]	Leu Gly Leu Glu Lys Thr Ala Ser Ile Ser Ile Ala Asp Pro Phe Phe			
[0044]		245	250	255
[0045]	Arg Ser Ala Gln Pro Trp Ser Arg Leu Glu Pro Arg Gly Pro Thr Ile			
[0046]		260	265	270
[0047]	Lys Pro Cys Pro Pro Cys Lys Cys Pro Ala Pro Asn Leu Leu Gly Gly			
[0048]		275	280	285
[0049]	Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Lys Ile Lys Asp Val Leu Met Ile			
[0050]		290	295	300
[0051]	Ser Leu Ser Pro Ile Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Glu Asp			
[0052]	305	310	315	320
[0053]	Asp Pro Asp Val Gln Ile Ser Trp Phe Val Asn Asn Val Glu Val His			
[0054]		325	330	335
[0055]	Thr Ala Gln Thr Gln Thr His Arg Glu Asp Tyr Asn Ser Thr Leu Arg			
[0056]		340	345	350
[0057]	Val Val Ser Ala Leu Pro Ile Gln His Gln Asp Trp Met Ser Gly Lys			
[0058]		355	360	365
[0059]	Glu Phe Lys Cys Lys Val Asn Asn Lys Asp Leu Pro Ala Pro Ile Glu			
[0060]		370	375	380
[0061]	Arg Thr Ile Ser Lys Pro Lys Gly Ser Val Arg Ala Pro Gln Val Tyr			
[0062]	385	390	395	400
[0063]	Val Leu Pro Pro Pro Glu Glu Glu Met Thr Lys Lys Gln Val Thr Leu			
[0064]		405	410	415
[0065]	Thr Cys Met Val Thr Asp Phe Met Pro Glu Asp Ile Tyr Val Glu Trp			
[0066]		420	425	430
[0067]	Thr Asn Asn Gly Lys Thr Glu Leu Asn Tyr Lys Asn Thr Glu Pro Val			
[0068]		435	440	445
[0069]	Leu Asp Ser Asp Gly Ser Tyr Phe Met Tyr Ser Lys Leu Arg Val Glu			
[0070]		450	455	460
[0071]	Lys Lys Asn Trp Val Glu Arg Asn Ser Tyr Ser Cys Ser Val Val His			
[0072]	465	470	475	480
[0073]	Glu Gly Leu His Asn His His Thr Thr Lys Ser Phe Ser Arg Thr Pro			
[0074]		485	490	495
[0075]	Gly Lys Glx			
[0076]	<210> 2			
[0077]	<211> 1497			
[0078]	<212> DNA			
[0079]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)			
[0080]	<400> 2			
[0081]	atgtctgctc tgctgaccc ggcgctggtg ggcgccgagg tggctaagat ggcttcctcc	60		
[0082]	ctggcattcc tgctgctgaa ctttcacgtc tctctgtttc tgggtccagct gctgactccc	120		
[0083]	tgctctgcac agttctccgt gctggggcct tctggcccaa tcttggaat ggtgggagag	180		

[0084]	gacgcagatc tgccatgcca cctgtttccc accatgagcg ccgagacaat ggagctgcgg	240
[0085]	tggtgtgagct cctctctgag acaggtggtg aacgtgtacg ccgacggcaa ggaggtggag	300
[0086]	gatcggcagt ctgccctta tcggggcaga accagcatcc tgagggacgg aatcacagca	360
[0087]	ggcaaggccg ccctgagaat ccacaatgtg accgcctctg atagcggcaa gtacctgtgc	420
[0088]	tatttcagg acggcgactt ctacgagaag gccctggtgg agctgaaggt ggccgccctg	480
[0089]	ggatctgacc tgcacatcga ggtgaagggc tacgaggatg gcggcatcca cctggagtgt	540
[0090]	cggagcaccg gctggtatcc tcagccacag atcaagtgtt ccgacacaaa gggagagaac	600
[0091]	atccctgcag tggaggcacc agtgggtgga gatggagtgg gcctgtatgc agtggcagca	660
[0092]	tccgtgatca tgaggggcag ctccggagga ggcgtgtcct gtatcatccg caattctctg	720
[0093]	ctgggcctgg agaagaccgc ctccatctct atcgccgacc ctttctttag gagcgcccag	780
[0094]	ccttggtcca ggctcgagcc cagaggccct acaatcaagc catgcccacc ttgcaagtgt	840
[0095]	ccagcaccta acctgctggg aggacctagc gtgttcatct ttccacccaa gatcaaggac	900
[0096]	gtgctgatga tcagcctgtc ccctatctgt acctgcgtgg tgggtggacgt gtccgaggac	960
[0097]	gatccagatg tgcagatctc ttggttctgt aacaatgtgg aggtgcacac cgcccagacc	1020
[0098]	cagacacaca gggaggatta caatagcaca ctgagggtgg tgtccgccct gccaatccag	1080
[0099]	caccaggact ggatgtccgg caaggagttt aagtgcagg tgaacaataa ggatctgcca	1140
[0100]	gccccatcg agaggaccat ctctaagcca aagggaagcg tgcgcgcacc acaggtgtat	1200
[0101]	gtgtcgcctc caccgagga ggagatgacc aagaagcagg tgaccctgac atgtatggtg	1260
[0102]	acagacttca tgccagagga tatctacgtg gagtggacca acaatggcaa gacagagctg	1320
[0103]	aactataaga atacagagcc cgtgctggac tctgatggca gctactttat gtatagcaag	1380
[0104]	ctgcgggtgg agaagaagaa ctgggtggag agaaattctt acagctgtc cgtggtgcac	1440
[0105]	gaaggactgc ataatcacca tacaacaaa tctttttcaa ggaccctgg caaatga	1497
[0106]	<210>	3
[0107]	<211>	141
[0108]	<212>	PRT
[0109]	<213>	人工序列 (Artificial Sequence)
[0110]	<400>	3
[0111]	Met Gly Trp Ile Trp Ile Phe Leu Phe Leu Leu Ser Gly Thr Ala Gly	
[0112]	1 5 10 15	
[0113]	Val His Ser Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys	
[0114]	20 25 30	
[0115]	Thr Gly Ala Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe	
[0116]	35 40 45	
[0117]	Thr Gly Phe Tyr Met His Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Ser Leu	
[0118]	50 55 60	
[0119]	Glu Trp Ile Gly Tyr Val Ser Cys Tyr Asn Gly Ala Thr Ser Tyr Asn	
[0120]	65 70 75 80	
[0121]	Gln Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Phe Thr Val Asp Thr Ser Ser Ser	
[0122]	85 90 95	
[0123]	Thr Ala Tyr Met Gln Phe Asn Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val	
[0124]	100 105 110	
[0125]	Tyr Tyr Cys Ala Arg Ala Gly Gly Tyr Asp Tyr Glu Gly Tyr Ala Leu	

[0126]	115	120	125
[0127]	Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser		
[0128]	130	135	140
[0129]	<210> 4		
[0130]	<211> 130		
[0131]	<212> PRT		
[0132]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)		
[0133]	<400> 4		
[0134]	Met Asp Phe Gln Val Gln Ile Phe Ser Phe Leu Leu Ile Ser Ala Ser		
[0135]	1 5 10 15		
[0136]	Val Ile Met Ser Arg Gly Gln Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr		
[0137]	20 25 30		
[0138]	Met Ser Ala Ser Leu Gly Glu Arg Val Thr Met Thr Cys Thr Ala Ser		
[0139]	35 40 45		
[0140]	Ser Ser Val Ser Ser Thr Tyr Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly		
[0141]	50 55 60		
[0142]	Ser Ser Pro Lys Leu Trp Ile Tyr Thr Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly		
[0143]	65 70 75 80		
[0144]	Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu		
[0145]	85 90 95		
[0146]	Thr Leu Ser Ser Met Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys His		
[0147]	100 105 110		
[0148]	Gln Tyr His Arg Ser Pro Phe Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu		
[0149]	115 120 125		
[0150]	Ile Lys		
[0151]	130		
[0152]	<210> 5		
[0153]	<211> 423		
[0154]	<212> DNA		
[0155]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)		
[0156]	<400> 5		
[0157]	atgggatgga tctggatctt tctcttcctc ctgtcaggaa ctgcagggtgt ccactctgag 60		
[0158]	gtccagctgc agcagtctgg acctgagcta gtgaagactg gggcttcagt gaagatatcc 120		
[0159]	tgcaaggett ctggttactc attcactggg ttctacatgc actgggtcaa gcagagccat 180		
[0160]	ggaaagagcc ttgagtggat tggatatgtc agttgtttaca atgggtgctac tagctacaat 240		
[0161]	cagaagttca agggcaaggc cacatttact gtagacacat cctccagcac agcctacatg 300		
[0162]	cagttaaca gcctgacatc tgaagactct gcggtctatt actgtgcaag agctggggga 360		
[0163]	tatgattacg aaggctatgc tctggactac tgggggtcaag gaacctcagt caccgtctcc 420		
[0164]	tca 423		
[0165]	<210> 6		
[0166]	<211> 390		
[0167]	<212> DNA		

[0168]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
[0169]	<400> 6	
[0170]	atggattttc aggtgcagat tttcagcttc ctgctaataca gtgcctcagt cataatgtcc	60
[0171]	agaggacaaa ttgttctcac ccagtctcca gcaacatgt ctgcatctct aggggaacgg	120
[0172]	gtcaccatga cctgcactgc cagctcaagt gtaagttcca cttacttgca ctggtaccag	180
[0173]	cagaagccag gatcctcccc caaactctgg atctatacca catccaacct ggcttctgga	240
[0174]	gtcccagctc gcttcagtgg cagtgggtct gggacctctt actctctcac actcagcagc	300
[0175]	atggagctg aagatgctgc cacttattac tgccaccagt atcatcggtc cccattcacg	360
[0176]	ttcggctcgg ggacaaagtt ggaaataaaa	390
[0177]	<210> 7	
[0178]	<211> 1755	
[0179]	<212> DNA	
[0180]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
[0181]	<400> 7	
[0182]	atgaaaatgg caagttccct ggctttcctt ctgctcaact ttcattgtct cctcttcttg	60
[0183]	gtccagctgc tcaactcttg ctacagtcag ttttctgtgc ttggaccctc tgggcccatc	120
[0184]	ctggccatgg tgggtgaaga cgctgatctg ccctgtcacc tgttcccgac catgagtga	180
[0185]	gagaccatgg agctgaggtg ggtgagttcc agcctaaggc aggtggtgaa cgtgtatga	240
[0186]	gatggaaaagg aagtgggaaga caggcagagt gcaccgtatc gagggagaac ttcgattctg	300
[0187]	cgggatggca tcaactgcagg gaaggtgct ctccgaatac acaacgtcac agcctctgac	360
[0188]	agtggaaagt acttgtgtta tttccaagat ggtgacttct acgaaaaagc cctggtggag	420
[0189]	ctgaaggttg cagcattggg ttctgatctt cacattgaag tgaagggtta tgaggatgga	480
[0190]	gggatccatc tggagtgcag gtccactggc tggtagcccc aaccccaaat aaagtggagc	540
[0191]	gacaccaagg gagagaacat cccggctgtg gaagcacctg tggttgcaga tggagtgggc	600
[0192]	ctgtatgcag tagcagcatc tgtgatcatg agaggcagct ctggtggggg tgtatcctgc	660
[0193]	atcatcagaa attccctcct cggcctggaa aagacagcca gcatatccat cgcagacccc	720
[0194]	ttcttcagga gcgccagcc ctggatcgcg gccctggcag ggaccctgcc tatctcgttg	780
[0195]	ctgcttctcg caggagccag ttacttcttg tggagacaac agaaggaaaa aattgctctg	840
[0196]	tccagggaga cagaaagaga gcgagagatg aaagaaatgg gatacgtgc aacagagcaa	900
[0197]	gaaataagcc taagagagaa gctccaggag gaactcaagt ggaggaaaa cagtagatg	960
[0198]	gctcgtggag agaagtcttt ggcctatcat gaatggaaaa tggccctctt caaacctgcg	1020
[0199]	gatgtgattc tggatccaga cacggcaaac gccatcctcc ttgtttctga ggaccagagg	1080
[0200]	agtgtgcagc gtgctgaaga gccgcgggat ctgccagaca accctgagag atttgaatgg	1140
[0201]	cgttactgtg tccttggtg tgaaaacttc acatcaggga gacattactg ggaggtggaa	1200
[0202]	gtgggggaca gaaaagagtg gcatattggg gtatgtagta agaactgga gaggaaaaa	1260
[0203]	ggttggttca aaatgacacc ggagaacgga tactggacta tgggcctgac tgatgggaat	1320
[0204]	aagtatcggg ctctcactga gcccagaacc aacctgaaac ttctgagcc tcctagga	1380
[0205]	gtggggatct tcctggacta tgagactgga gagatctcgt tctataatgc cacagatgga	1440
[0206]	tctcatatct acaccttcc gcacgcctct ttctctgagc ctctatatcc tgttttcaga	1500
[0207]	attttgacct tggagccac tgccctgacc atttgcccaa taccaaaaga agtagagagt	1560
[0208]	tccccgatc ctgacctagt gcctgatcat tccctggaga caccactgac cccgggctta	1620
[0209]	gctaataaaa gtggggagcc tcaggctgaa gtaacatctc tgcttctccc tgcccacct	1680

[0210]	ggagctgagg tctccccttc tgcaacaacc aatcagaacc ataagctaca ggcacgcact	1740
[0211]	gaagcacttt actga	1755

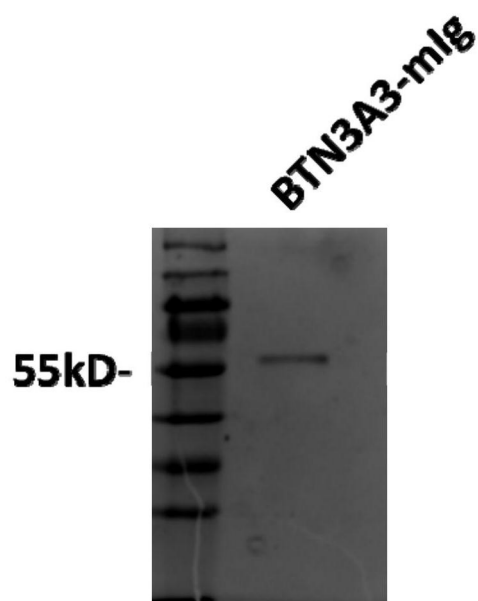


图1

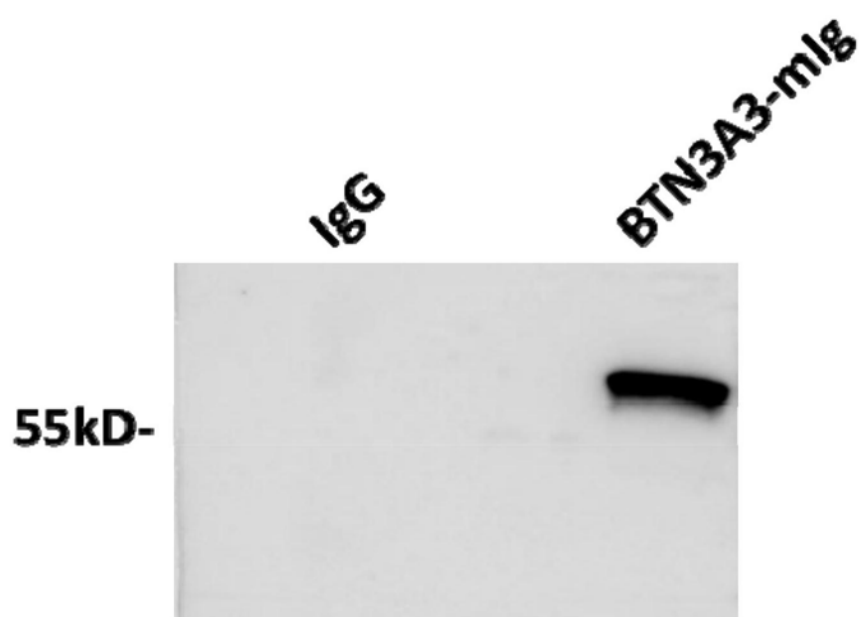


图2

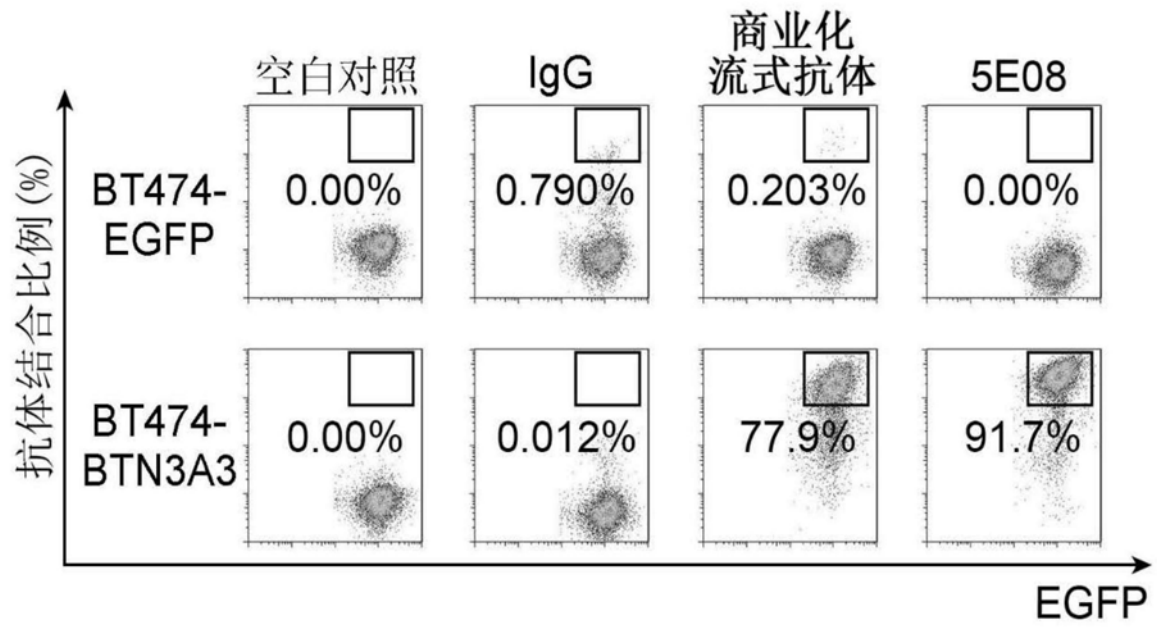


图3

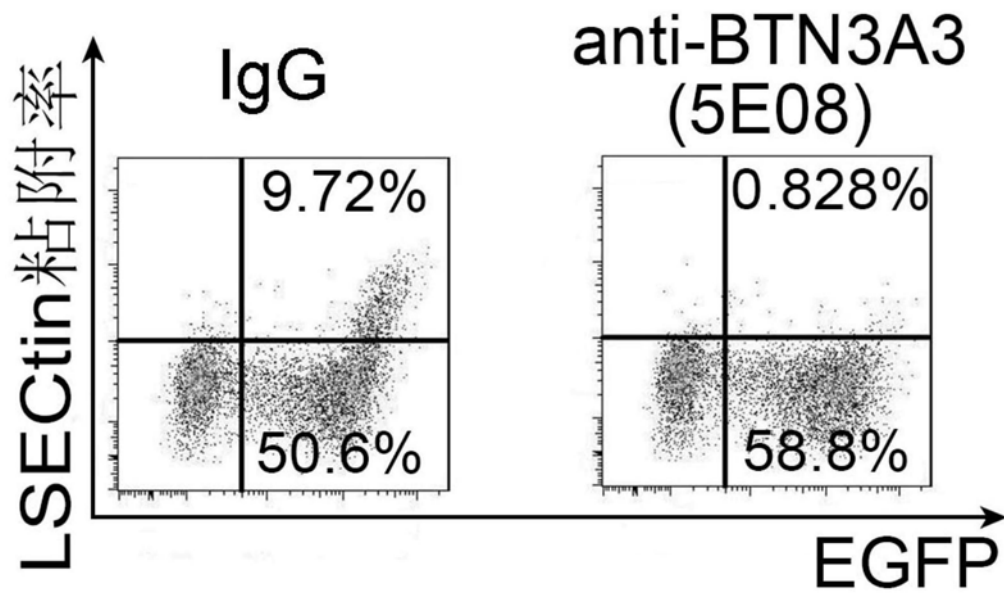


图4

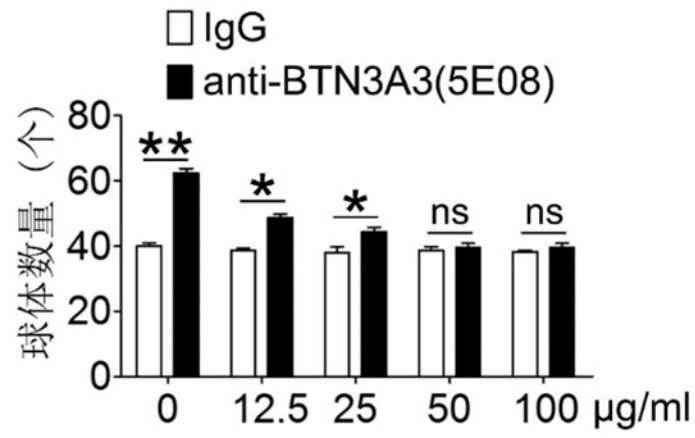


图5

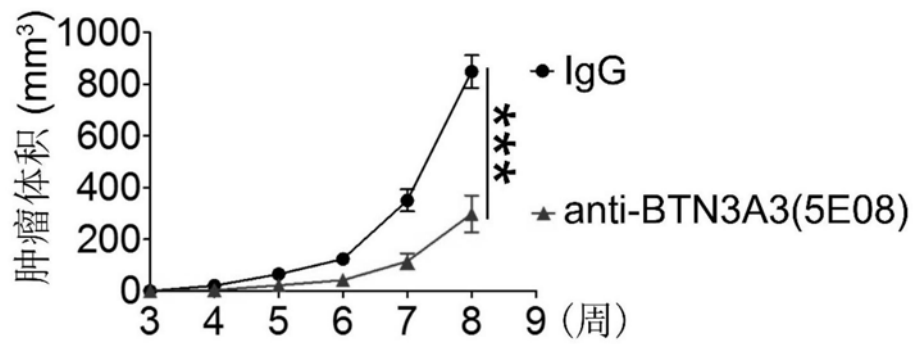


图6

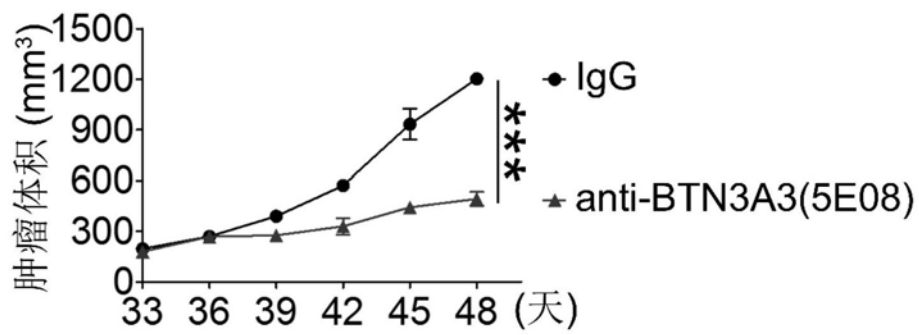


图7

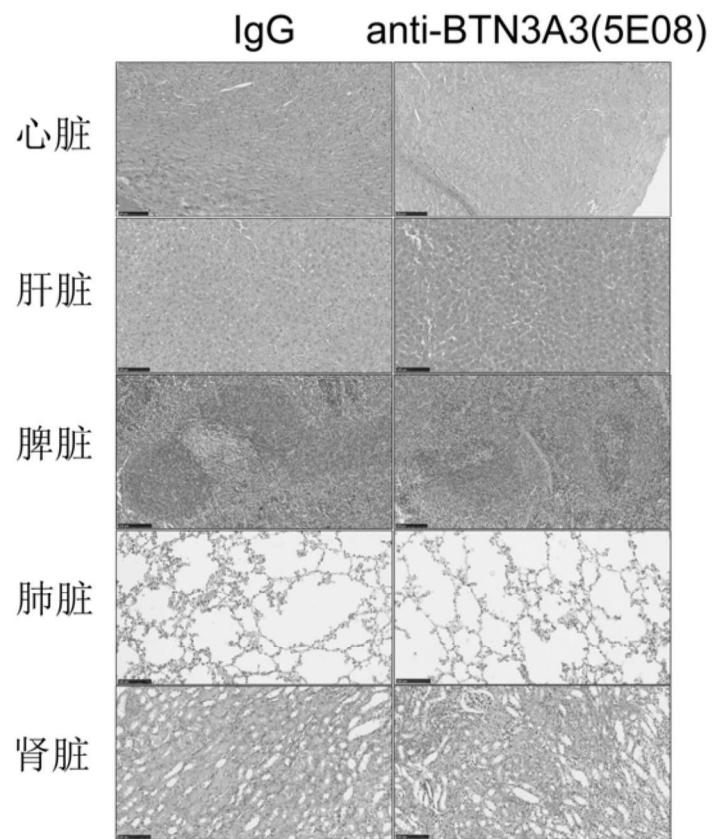


图8

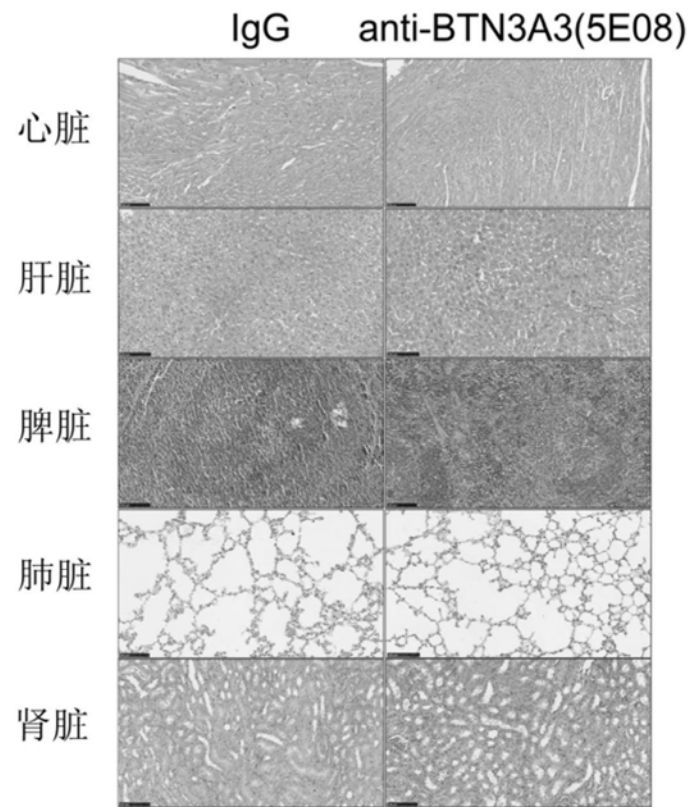


图9