



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 108484768 B

(45) 授权公告日 2021.03.30

(21) 申请号 201810227299.2

CN 1594363 A, 2005.03.16

(22) 申请日 2018.03.20

WO 2009042504 A1, 2009.04.02

(65) 同一申请的已公布的文献号

JP 2004131450 A, 2004.04.30

申请公布号 CN 108484768 A

WO 2009138762 A2, 2009.11.19

(43) 申请公布日 2018.09.04

Motohiro Maebuchi等.Low resistin

(73) 专利权人 中国人民解放军军事科学院军事医学研究院

levels in adipose tissues and serum in high-fat fed mice and genetically obese mice:development of an ELISA system for quantification of resistin.《Archives of Biochemistry and Biophysics》.2003,第416卷(第2期),第164-170页.

地址 100850 北京市海淀区太平路27号

(72) 发明人 袁增强 程金波 高宇豪 廖亚金

Motohiro Maebuchi等.Low resistin

(74) 专利代理机构 哈尔滨市阳光惠远知识产权代理有限公司 23211

levels in adipose tissues and serum in high-fat fed mice and genetically obese mice:development of an ELISA system for quantification of resistin.《Archives of Biochemistry and Biophysics》.2003,第416卷(第2期),第164-170页.

代理人 张勇

(51) Int.Cl.

C07K 16/28 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

(56) 对比文件

CN 1594363 A, 2005.03.16

KR 20080045953 A, 2008.05.26

KR 100493932 B1, 2005.06.10

WO 0196359 A1, 2001.12.20

和倩倩等.抵抗素在胰岛素抵抗及肿瘤发生中的作用.《肿瘤学杂志》.2013,第19卷(第10期),第804-808页.

审查员 李国顺

权利要求书1页 说明书5页

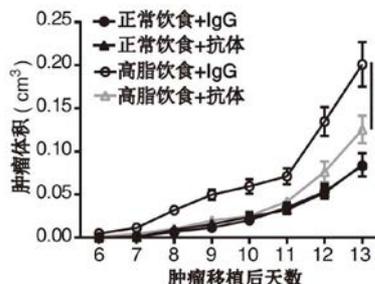
序列表1页 附图4页

(54) 发明名称

一种抗抵抗素免疫中和抗体及在治疗乳腺癌中的应用

(57) 摘要

本发明公开了一种抗抵抗素免疫中和抗体及在治疗乳腺癌中的应用,属于生物医药领域。本发明经过抗原多肽的选取、免疫方式的选择、抗体血清的纯化与抗体浓度的测定和抗体效果的检测,得到了抗抵抗素免疫中和抗体,该抗体可用于治疗肥胖模型下乳腺癌。



1. 一种抗抵抗素免疫中和抗体,其特征在于,抗原为Resistin蛋白特异多肽段,所述Resistin蛋白特异多肽段的氨基酸序列如SEQ ID NO:1所示。

2. 根据权利要求1所述的一种抗抵抗素免疫中和抗体,其特征在于,是兔源多克隆抗体,所述兔包括新西兰兔。

3. 制备权利要求1或2所述抗抵抗素免疫中和抗体的方法,其特征在于,包括选取氨基酸序列如SEQ ID NO.1所示的抗原多肽、选择免疫方式、纯化抗体血清。

4. 根据权利要求3所述的方法,其特征在于,还包括测定抗体浓度和抗体效果。

5. 根据权利要求3所述的方法,其特征在于,所述免疫方式是在Resistin蛋白特异多肽段的C端偶联牛血清蛋白得到抗原多肽液,与弗氏完全佐剂混合均匀后,获得抗原-佐剂混合液;往8周大雄性新西兰兔左右侧背部皮下、腹部皮下、左右后腿肌肉和左右后腿腘窝淋巴结共8个位置,注射所述抗原-佐剂混合液;

而后在第2、4、5、6、7周,提前将兔8周快速佐剂与抗原多肽液混合均匀,获得抗原-快速佐剂混合液,在所述8个位置,注射所述抗原-快速佐剂混合液。

6. 根据权利要求3所述的方法,其特征在于,所述纯化抗体血清是利用抗原抗体的特异性亲和纯化得到抗体。

7. 权利要求1或2所述抗抵抗素免疫中和抗体在制备用于治疗肥胖诱导的乳腺肿瘤的药物中的应用。

## 一种抗抵抗素免疫中和抗体及在治疗乳腺癌中的应用

### 技术领域

[0001] 本发明涉及一种抗抵抗素免疫中和抗体及在治疗乳腺癌中的应用,属于生物医药领域。

### 背景技术

[0002] 乳腺癌是困扰全球女性健康的重大问题,每年全世界约有140万人被诊断为乳腺癌,而大约有50万人死于该病,乳腺癌是40-55岁女性的第一位死亡原因。我国乳腺癌的年均增长速度为3%-4%,成为城市中死亡率增长最快的癌症,尤其以上海、北京、天津及沿海地区为我国乳腺癌的高发地区,已占女性恶性肿瘤发病率的首位。

[0003] 乳腺癌的发生发展主要归结于以下三种原因:1.遗传因素。乳腺癌有明显的家族遗传倾向,例如,部分患者罹患乳腺癌是由其父母通过特异的遗传基因(BRCA1/BRCA2基因)遗传下来的。2.雌性激素紊乱。由于乳房长期受雌性激素的异常刺激,导致乳腺组织癌变,高脂饮食是导致雌性激素异常增加的主要原因之一。3.环境因素影响。饮食结构的不合理以及电离辐射毒素刺激等都能导致正常乳腺上皮细胞癌变。

[0004] 目前,饮食结构的不合理以及遗传因素等导致的肥胖与乳腺癌的发病密切相关。临床上,乳腺癌的发病率与临床等级与肥胖呈正相关,过多的脂肪组织为肿瘤细胞的增殖与迁移提供能量,同时脂肪组织也为肿瘤细胞的转移和化学药物治疗提供空庇护场所。

[0005] 脂肪组织不仅作为脂滴的存储场所,更是机体重要的分泌器官,被报道与乳腺癌的发生密切相关。一方面,过多的脂肪组织导致机体葡萄糖与胰岛素耐受,过高水平的葡萄糖与胰岛素为肿瘤细胞的增殖以转移提供充足的能量与信号刺激。另一方面,肥胖导致脂肪组织处于低氧状态,诱导低氧诱导因子(HIF1 $\alpha$ )、转化生长因子- $\beta$ (TGF- $\beta$ )、基质金属蛋白酶(MMPs)等的表达,进一步重塑肿瘤微环境并诱导肿瘤血管生成与转移。另外,肥胖常常伴随着脂肪组织的慢性炎症,脂肪组织分泌的炎症因子,例如白介素家族,肿瘤坏死因子 $\alpha$ (TNF $\alpha$ )等,参与塑造肿瘤微环境并促进肿瘤的发生与发展。

[0006] 目前,乳腺癌的治疗主要是手术辅以放化疗的手段。临床上,乳腺癌根据雌激素受体(ER)、孕激素受体(PR)、HER2表达情况主要分为以下四类:管腔上皮A型(Luminal subtype A,ER+/PR+,HER2-)、管腔上皮B型(Luminal subtype B,ER+/PR+,HER2+)、HER2过表达型(HER2over-expression subtype,ER-,PR-,HER2+)、三阴乳腺癌(ER-,PR-,HER2-)。根据不同分子亚型,临床上辅以不同的化疗药治疗,例如针对ER/PR阳性患者给予雌性受体/孕激素受体靶向药治疗(三苯氧胺),同时利用芳香化酶抑制剂阻断雌激素合成;针对HER2的靶向药物赫赛丁;针对三阴性患者使用普通化疗药顺铂等。但是临床上乳腺癌的治疗常伴随着肿瘤的复发与化疗抵抗,特别是肥胖病人,通过减少脂肪蓄积、抵抗肥胖难以实现和保持并且难以达到治疗肿瘤的效果。因此,寻找新的安全有效的抑制乳腺癌的方法已经成为研究热点。

[0007] 抵抗素蛋白(Resistin)在小鼠中由脂肪细胞产生并分泌,在人体中主要由脂肪细胞和单核巨噬细胞产生和分泌。Resistin被报道与肥胖和二型糖尿病密切相关,在临床上,

血清中Resistin水平与乳腺癌病人恶性程度呈正相关,Resistin能促进体外培养乳腺癌细胞的迁移,同时体外实验证明,Resistin促进乳腺癌干细胞的增殖并促进乳腺癌的化疗抵抗。

[0008] 目前,针对Resistin的免疫中和抗体尚未有用于在体实验,且制作困难,成本高。我们寄希望于通过生物信息学手段寻找Resistin特定肽段用于免疫中和抗体的制备,大规模制备多克隆抗体,设计小鼠肥胖模型,并进行乳腺癌治疗的验证。

### 发明内容

[0009] 针对现有技术中存在的上述问题,本发明提供了一种有效的抗鼠源抵抗素免疫中和抗体制备方法。

[0010] 所述制备方法包括选取抗原多肽、选择免疫方式、纯化抗体血清。并进一步测定了抗体浓度和抗体效果。

[0011] 所述抗原多肽是Resistin蛋白特异多肽段,所述Resistin蛋白特异多肽段包括多肽序列EAIDKKIKQDF(鼠源Resistin全长序列从N端起第30-40位氨基酸)。

[0012] 所述免疫方式是在Resistin蛋白特异多肽段的C端通过半胱氨酸偶联BSA得到抗原多肽液,与弗氏完全佐剂混合均匀后,往8周大雄性新西兰兔左右侧背部皮下、腹部皮下、左右后腿肌肉和左右后腿腘窝淋巴结共8个位置,注射上述抗原-佐剂混合液;而后在第2、4、5、6、7周,提前将兔8周快速佐剂与抗原多肽液混合均匀,在上述8个位置,注射上述抗原-快速佐剂混合液。

[0013] 所述纯化抗体血清是利用抗原抗体的特异性亲和纯化得到抗体。

[0014] 另一方面,本发明提供了抗鼠源抵抗素免疫中和抗体在治疗乳腺肿瘤中的应用,所述乳腺肿瘤是肥胖诱导的,通过原位注射发挥作用。

[0015] 本发明以序列包括EAIDKKIKQDF的蛋白多肽为抗原免疫新西兰兔,通过抗原抗体亲和纯化从血清中纯化得到抗抵抗素免疫中和抗体,所得抗Resistin免疫中和抗体能显著减轻肥胖小鼠乳腺肿瘤重量和体积,达到有效的控制和治疗效果。

### 附图说明

[0016] 本发明附图中出现的\*表示 $P < 0.05$ ,\*\*表示 $P < 0.01$ ,\*\*\*表示 $P < 0.001$ 。

[0017] 图1显示Resistin蛋白的单体结构(a)、三聚体(b)、六聚体结构图(c)以及Resistin的全长序列信息(d)。其中箭头所指以及红色标注(1#)为所选用于制备免疫中和抗体肽段。

[0018] 图2显示通过抗原注射新西兰兔制备抗体的免疫流程图。在第0周往新西兰兔背部皮下、大腿肌肉和腘窝淋巴结注射弗氏完全佐剂(Sigma-Aldrich公司)与抗原混合液(1:1, 500 $\mu$ g)。而后在第2、4、5、6、7周往同样部位注射兔8周快速佐剂(北京博奥龙免疫技术有限公司)与抗原混合液(1:1, 250 $\mu$ g)。在第8周耳缘静脉采血进行抗体鉴定,在第9周通过颈总动脉采集新西兰兔全血。

[0019] 图3显示Western Blot验证新西兰兔血清对于分化成熟的3T3-L1脂肪细胞中Resistin的识别能力。

[0020] 图4显示利用偶联BSA的1#多肽亲和纯化新西兰兔血清中抗Resistin抗体,洗脱液

洗脱后蛋白质电泳后,用考马斯亮蓝染色测定的洗脱液中抗体浓度。

[0021] 图5ELISA实验显示纯化后抗体对于3T3-L1脂肪细胞上清液中Resistin的识别,阳性对照为商业用抗Resistin抗体(PEPROTECH公司),阴性对照为兔IgG(图a)。图b显示将纯化后抗体进行梯度稀释后,进行ELISA实验,检测对于3T3-L1脂肪细胞上清液中Resistin蛋白以及1#多肽的结合情况。

[0022] 图6显示Resitin抗体治疗肥胖模型下小鼠乳腺癌的给药流程图。利用12周高脂饮食诱导雌性C57BL/6小鼠肥胖后,往正常/肥胖小鼠第二乳腺脂肪垫注射鼠源乳腺癌细胞系E0771 ( $5 \times 10^5$ ),然后在第1、4、8、12天往乳腺脂肪垫原位注射抗Resistin免疫中和抗体(0.7mg/kg体重/次)或等量的兔IgG,同时检测相关指标,在第13天将小鼠宰杀,统计。

[0023] 图7正常/肥胖小鼠在给予抗Resistin抗体与否的情况下,小鼠胸部对侧乳腺脂肪垫的重量统计图(a)以及内脏脂肪重量统计图(b)。

[0024] 图8正常/肥胖小鼠在给予抗Resistin抗体或兔IgG情况下,小鼠肿瘤体积的每天测量图。

[0025] 图9在第13天将小鼠宰杀后,测量正常与肥胖条件下给予抗Resistin抗体与否的小鼠乳腺肿瘤重量图(b),与各个分组肿瘤大小的直观图(a)。

## 具体实施方式

[0026] 除非特别指明,以下实施例中注射抗原所用的新西兰兔为雄性、8周大,C57BL/6雌鼠从出生后第四周开始喂养高脂饲料12周,高脂饲料脂肪比例为60%。

[0027] 除非特别指明,以下实施例中所用的试剂和材料均为分析纯级别的试剂,且可从正规渠道商购合成或购买,其中免疫新西兰兔所需1#多肽纯度为 $\geq 95\%$ 。

[0028] 本发明将对照组和抗Resistin免疫中和抗体组进行统计学分析, $P < 0.05$ 即表示组间差异具有统计学意义。

[0029] 实施例1 Resistin免疫中和抗体的大规模制备

[0030] 在小鼠体内,Resistin主要由成熟脂肪细胞分泌,且在体内主要以三聚体以及六聚体形式存在。首先,利用B细胞抗原表位预测分析软件分析Resistin蛋白序列具备较强免疫原性的区域,然后,利用蛋白三维结构分析软件分析预测所得抗原性较强的区域,根据蛋白质单体以及多聚体3D结构中所处的位置选取暴露在蛋白3D结构表面且抗原性较强的序列合成短肽并进行后续实验评估。

[0031] 以1#多肽(N端 $\alpha$ 螺旋,序列EAIDKKIKQDF)做为抗原,同时在其C端通过半胱氨酸偶联BSA,方便抗原呈递,增强免疫。

[0032] 按照图二的实验方案,在第0周提前将弗氏完全佐剂500 $\mu$ l(Sigma-Aldrich公司)与抗原多肽液500 $\mu$ L(1 $\mu$ g/ $\mu$ L,溶于生理盐水)混合,并至于冰上,用真空混合仪混合均匀。往8周大雄性新西兰兔左右侧背部皮下、腹部皮下、左右后腿肌肉和左右后腿腓窝淋巴结共8个位置,注射上述抗原-佐剂混合液,每个点约120 $\mu$ L。而后在第2、4、5、6、7周,提前将兔8周快速佐剂(北京博奥龙免疫技术有限公司)250 $\mu$ L与抗原多肽液250 $\mu$ L(1 $\mu$ g/ $\mu$ L,溶于生理盐水)快速混合均匀后,在上述8个位置,注射上述抗原-佐剂混合液,每个点约60 $\mu$ L。

[0033] 第8周耳缘静脉采血约1ml于抗凝管中,室温静置20分钟后,于4 $^{\circ}$ C离心机3500转/分钟离心15分钟,吸取上清液(血清),分装保存于-20摄氏度。同时,用一抗稀释液以1:500

比例稀释新西兰兔血清,利用蛋白质免疫印迹实验,验证血清中产生的抗体对于3T3-L1脂肪细胞中Resistin蛋白的识别(以3T3-L1前体细胞样为阴性对照(不表达Resistin),以PEPROTECH公司生产的Resistin抗体为阳性对照)。实验结果显示免疫后的新西兰兔血清中产生了Resistin抗体,可以特异性的识别全长和分泌形式的Resistin(图3)。

[0034] 在第9周通过颈总动脉采集新西兰兔全血约100mL,室温静置2小时后,于4℃离心机3500转/分钟离心30分钟,吸取上清液约50ml(血清),液氮速冻后于-80摄氏度冻存用于以后的纯化实验。

[0035] 实施例2 Resistin免疫中和抗体的纯化以及活性检测

[0036] 为了得到大量的纯净的抗Resistin免疫中和抗体,我们利用抗原偶联的琼脂糖凝胶进行血清中抗体的纯化,

[0037] 1.在4℃下将1mg 1#多肽抗原-BSA融合蛋白在偶联缓冲液中溶解过夜(偶联缓冲液配方:100mM NaHCO<sub>3</sub>、500mMNaCl,调节pH至8.3)。

[0038] 2.在4℃环境下,在20ml冷的1mM HCl溶液中激活1ml溴化氰(CNBr)活化过的Sepharose4B珠子15分钟。

[0039] 3.用20ml 1mM HCl清洗珠子两遍。

[0040] 4.将活化的琼脂糖珠与透析的1#多肽抗原-BSA融合蛋白4℃摇床孵育过夜。

[0041] 6.用15ml偶联缓冲液洗涤蛋白偶联的琼脂糖凝胶珠子2次,离心,弃上清。

[0042] 7.加入5ml 0.1M Tris-HCl缓冲液(pH8.0)以封闭珠粒上的脱偶联位点,并在4℃下放置过夜。

[0043] 8.接下来,通过抗原蛋白偶联Sepharose珠子来纯化抗血清:

[0044] 1)首先用酸碱缓冲液洗涤Sepharose珠子5次。(酸碱缓冲液配方:0.1M乙酸/乙酸钠,pH4.0;0.1M Tris-HCl,0.5M NaCl,pH8.0)。

[0045] 2)将珠子与用PBS缓冲液稀释2倍后的血清4℃摇床孵育过夜(PBS缓冲液配方:10mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>,1.8mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>,137mM NaCl,2.7mM KCl,调节pH至7.4)。

[0046] 3)将珠子和血清混合液通过纯化柱收集流穿液,并将流穿液保存于-20摄氏度用于ELISA测试。

[0047] 4)用10ml PBS缓冲液洗涤珠子3次。

[0048] 5)用10ml 150mM NaCl-HCl(pH 5)溶液洗涤柱子。

[0049] 6)用7ml洗脱缓冲液洗脱抗体,并用500μl饱和磷酸盐缓冲液中和溶液。(洗脱液配方:150mM NaCl,用盐酸调节pH至2.5;饱和磷酸盐缓冲液配方:往PBS缓冲液中加入Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>固体直至饱和)。

[0050] 7)将抗体溶液分装为每管1ml,于-80℃保存。

[0051] 将上述抗体溶液进行蛋白质电泳并用考马斯亮蓝染色定量。测的洗脱液中抗体浓度约150μg/ml(图4)。

[0052] 接下来利用ELISA实验检测纯化出的免疫中和抗体是否能识别1#抗原多肽以及自然状态下的Resistin蛋白。

[0053] 将10ml成熟3T3-L1脂肪细胞培养上清液(成熟脂肪细胞用不含FBS的DMEM培养基培养12h后收取上清液)3000转/分钟离心10min,再用0.22μm滤膜过滤后置于冷冻干燥仪内干燥成粉末。将上述粉末用抗原包被液溶解成2mg/ml(抗原包被液配方:Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>0.159g/

100ml,  $\text{NaHCO}_3$  0.293g/100ml) 并包被ELISA用96孔板, 用于ELISA检测。如图5a显示, 在1:500的稀释比例下, 纯化所得抗Resistin抗体能很好地识别自然状态下的Resistin蛋白, 阴性对照为兔IgG (与纯化所得抗体在1:500稀释浓度下一致), 阳性对照为商业用抗Resistin抗体 (PEPROTECH公司, 稀释比例1:2000)。另外, 将成熟3T3-L1脂肪细胞培养上清液包被或1#多肽段抗原包被ELISA板子, 检测在梯度稀释条件下, 纯化所得抗Resistin抗体的效价, 实验结果如图5b所示, 在梯度稀释条件下, 抗体对于两种抗原的识别呈梯度减弱, 说明纯化所得抗体的特异性。

[0054] 实施例3 Resistin免疫中和抗体有效治疗肥胖引起的乳腺肿瘤过度增生

[0055] 首先, 构建小鼠肥胖模型。挑选大小重量均一的雌性C57BL/6小鼠, 利用高脂饮食 (60%脂类) 从出生后第4周开始喂养12周至小鼠肥胖。

[0056] 按图6规划所示, 在第13周往小鼠右侧第二乳腺脂肪垫注射C57BL/6小鼠来源E0771乳腺癌细胞 $5 \times 10^5$ 个 (细胞重悬于100 $\mu$ l PBS缓冲液中), 而后分别在第1、4、8、12天往正常/肥胖小鼠右侧第二乳腺脂肪垫肿瘤组织周围脂肪组织中注射入0.7mg/kg体重/次的纯化所得抗Resistin抗体, 对照组则用等体积等量的兔IgG溶于实施例2中经饱和磷酸盐缓冲液中和后的洗脱液中。

[0057] 在注射完乳腺癌细胞E0771后的第六天, 乳腺脂肪垫中出现触摸可见的乳腺肿瘤, 利用游标卡尺测量每只小鼠所产生肿瘤的长径 (cm) 和短径 (cm), 并利用公式计算出肿瘤体积。肿瘤体积 ( $\text{cm}^3$ ) =  $0.5 \times \text{长径 (cm)} \times \text{短径 (cm)}^2$ 。从第六天起, 连续8天每天在同一时间, 测量肿瘤的长径与短径, 并计算肿瘤的体积大小, 并做图比较。如图8所示, 肥胖 (高脂饮食) 组小鼠乳腺肿瘤体积明显大于正常 (正常饮食) 组小鼠, 另外, 在肥胖组小鼠内, 注射抗Resistin免疫中和抗体后, 小鼠乳腺肿瘤体积显著减小。

[0058] 更进一步, 在第13天将小鼠宰杀, 取出小鼠肿瘤组织、内脏脂肪组织以及左侧乳腺脂肪垫 (肿瘤对侧脂肪组织) 称重, 并拍照, 如图9。实验结果显示, 肥胖组小鼠乳腺肿瘤重量明显高于正常体重组小鼠; 注射抗Resistin免疫中和抗体治疗后, 小鼠乳腺肿瘤体积显著减小到正常组水平 (图9), 而抗Resistin免疫中和抗体的抗肿瘤效应的发挥并不依赖于脂肪组织重量的减少 (图7), 提示抗Resistin免疫中和抗体在体内作用的发挥是直接结合到Resistin蛋白, 并阻遏Resistin蛋白对于肿瘤生长的促进作用。

[0059] 虽然本发明已以较佳实施例公开如上, 但其并非用以限定本发明, 任何熟悉此技术的人, 在不脱离本发明的精神和范围内, 都可做各种的改动与修饰, 因此本发明的保护范围应该以权利要求书所界定的为准。

---

[0001]	SEQUENCE LISTING		
[0002]	<110>	中国人民解放军军事科学院军事医学研究院	
[0003]	<120>	一种抗抵抗素免疫中和抗体及在治疗乳腺癌中的应用	
[0004]	<160>	1	
[0005]	<170>	PatentIn version 3.3	
[0006]	<210>	1	
[0007]	<211>	11	
[0008]	<212>	PRT	
[0009]	<213>	鼠	
[0010]	<400>	1	
[0011]	Glu Ala Ile Asp Lys Lys Ile Lys Gln Asp Phe		
[0012]	1	5	10

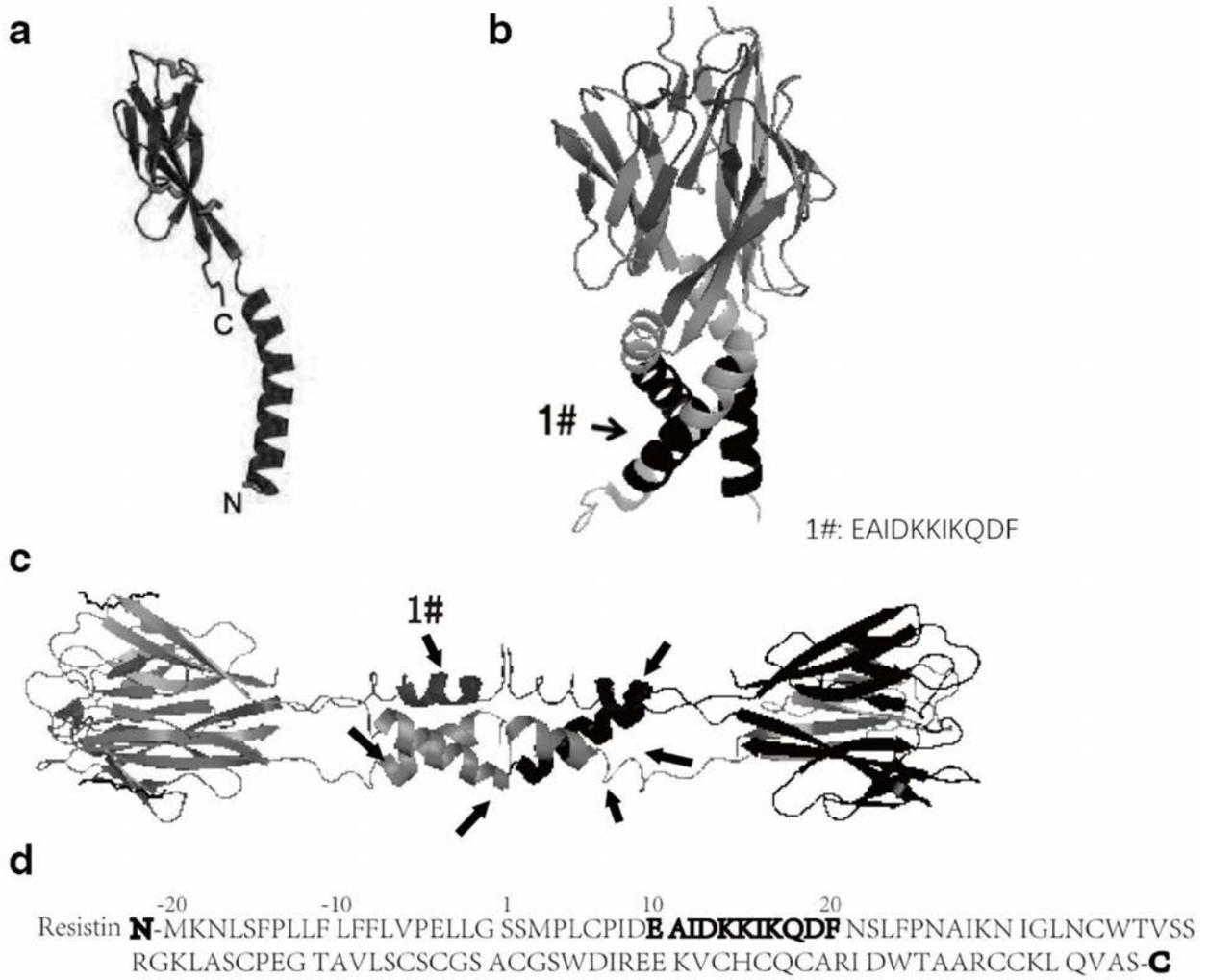


图1

抗原注射时间表

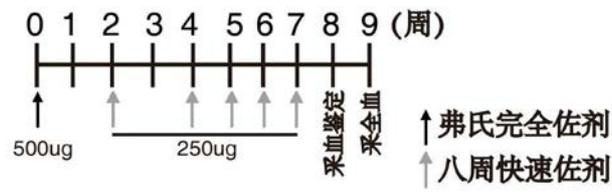


图2

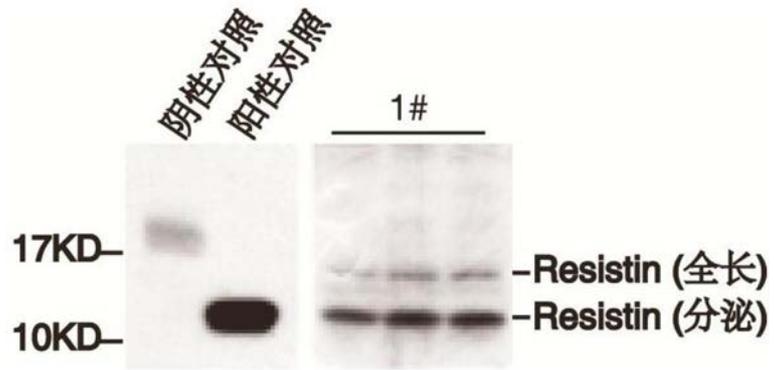


图3

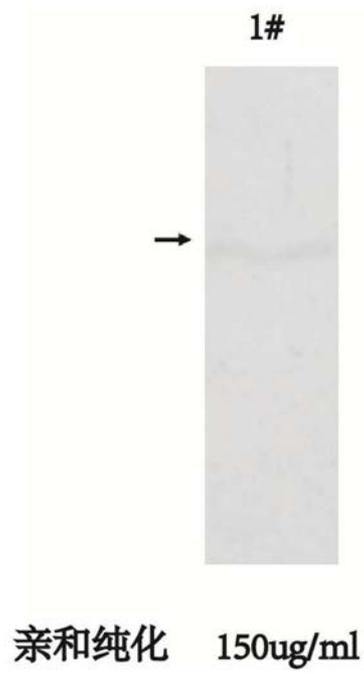


图4

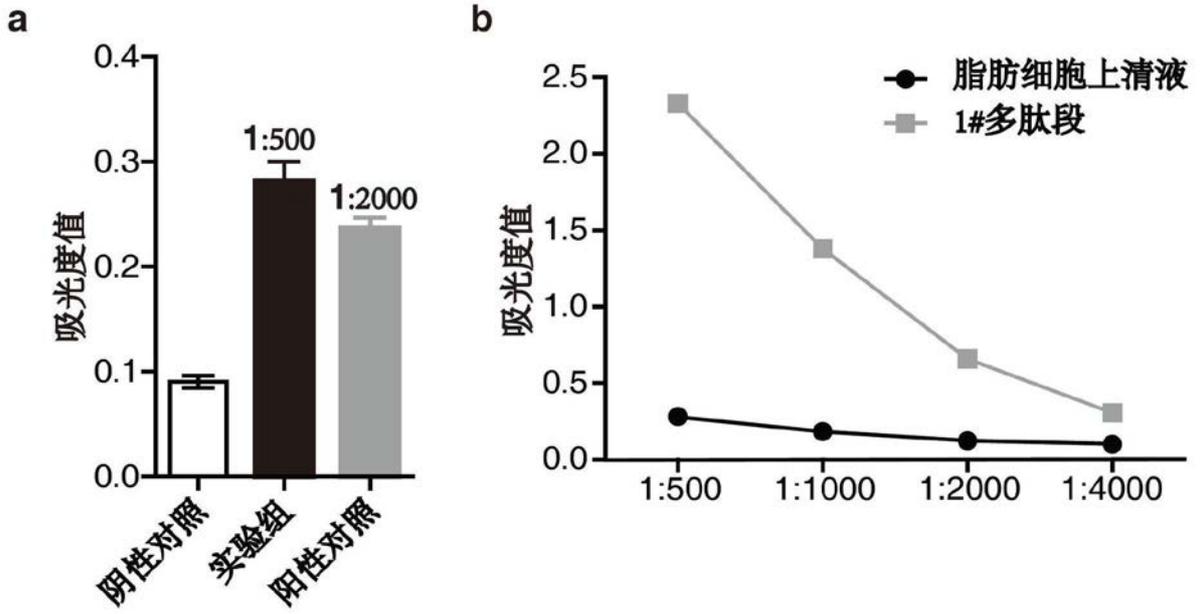


图5

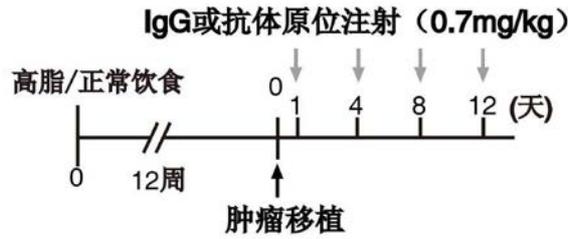


图6

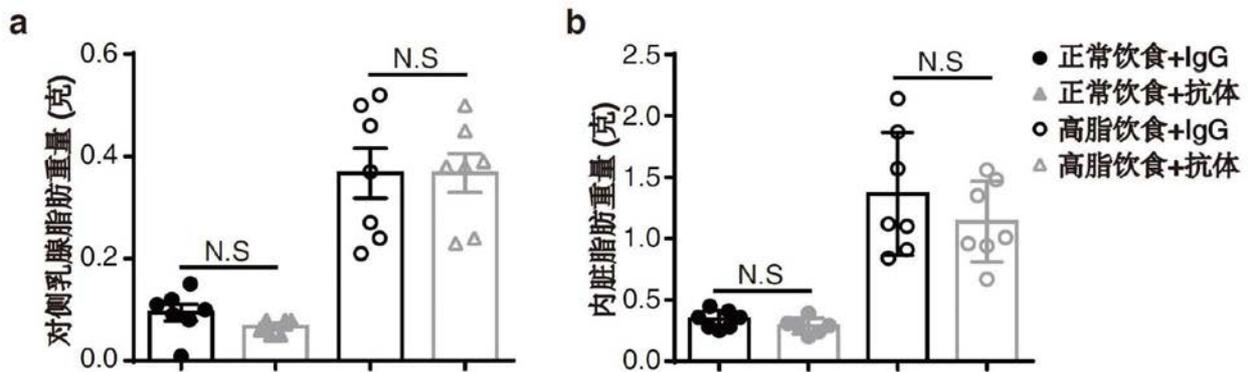


图7

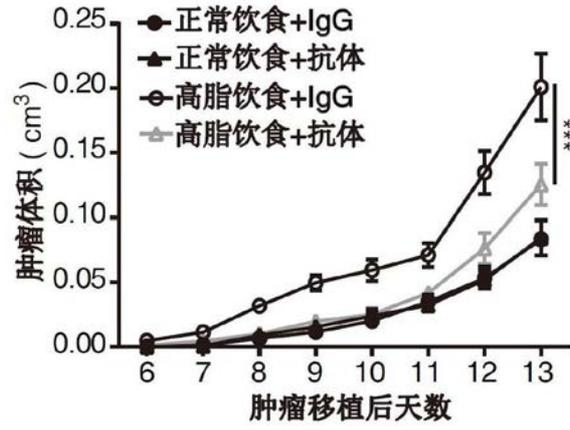


图8

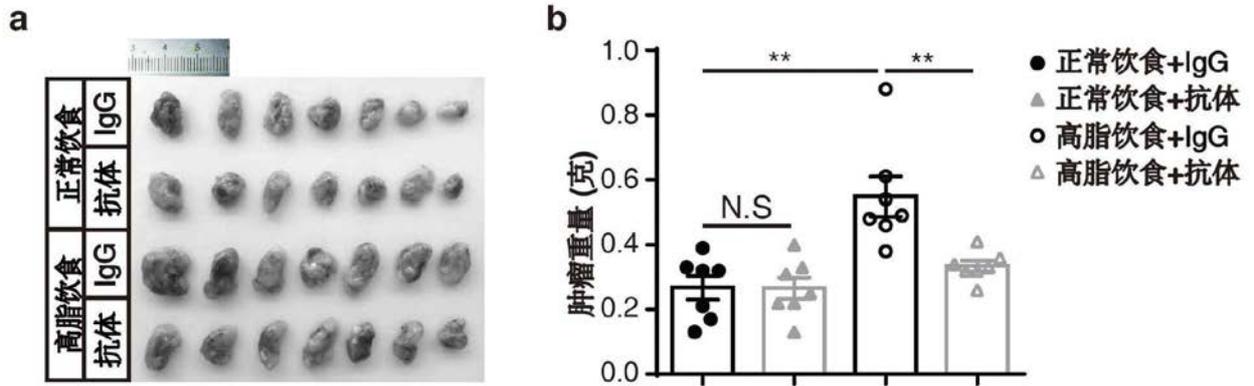


图9