



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102532313 A

(43) 申请公布日 2012. 07. 04

(21) 申请号 201010585000. 4

(22) 申请日 2010. 12. 13

(71) 申请人 中国人民解放军第二军医大学  
地址 200433 上海市杨浦区翔殷路 800 号

(72) 发明人 王红阳 陈瑶 付静 胡栋平  
罗韬 董立巍

(74) 专利代理机构 上海德昭知识产权代理有限  
公司 31204

代理人 丁振英

(51) Int. Cl.

*C07K 16/18* (2006. 01)

*C12N 5/18* (2006. 01)

*G01N 33/53* (2006. 01)

*A61K 39/395* (2006. 01)

*A61P 35/00* (2006. 01)

权利要求书 1 页 说明书 4 页 附图 2 页

(54) 发明名称

一种 p28<sup>GANK</sup> 单克隆抗体及其用途

(57) 摘要

本发明涉及医学生物工程技术领域, 是一种 p28<sup>GANK</sup> 单克隆抗体及其用于制备肝癌的预后评估制剂或肝癌治疗药物的用途。p28<sup>GANK</sup> 蛋白在肝癌细胞中表达异常升高, 并且其表达强弱与患者预后密切相关, 因此 p28<sup>GANK</sup> 在肝癌发生发展中的作用已被日益重视。本发明提供了抗人 p28<sup>GANK</sup> 的单克隆抗体, 还提供了该抗人 p28<sup>GANK</sup> 的单克隆抗体在检测判别肝癌患者预后分析和个性化治疗中的应用价值。本发明为 p28<sup>GANK</sup> 的临床个性化治疗应用提供了新的思路。

1. 一种抗人 p28<sup>GANK</sup> 的单克隆抗体的制备方法,步骤如下:
  - a) 合成作为半抗原的多肽,其序列如 SEQ ID NO :1-3 所示;
  - b) 将上述多肽与匙孔碱血蓝蛋白 KLH 偶联,作为免疫原免疫小鼠;
  - c) 取免疫鼠的脾细胞,与小鼠骨髓瘤细胞融合;
  - d) 经多轮筛选出与合成多肽反应阳性的细胞克隆,作为抗人 p28<sup>GANK</sup> 单克隆抗体的杂交瘤细胞株,该杂交瘤细胞株保藏号为;
  - e) 通过在小鼠体内接种杂交瘤细胞产生腹水抗体,将腹水进行纯化,得到抗人 p28<sup>GANK</sup> 的单克隆抗体;或者通过体外细胞培养,分离纯化,得到抗人 p28<sup>GANK</sup> 的单克隆抗体。
2. 权利要求 1 所述方法制备的抗人 p28<sup>GANK</sup> 的单克隆抗体。
3. 权利要求 2 所述的抗人 p28<sup>GANK</sup> 的单克隆抗体在制备肝癌患者预后评估分析 Western Blot 和免疫组化检测试剂中的应用。
4. 权利要求 2 所述的抗人 p28<sup>GANK</sup> 单克隆抗体在制备治疗肝癌药物中的应用。

## 一种 p28<sup>GANK</sup> 单克隆抗体及其用途

### 技术领域

[0001] 本发明涉及医学生物工程技术领域,是一种 p28<sup>GANK</sup> 单克隆抗体及其用于制备肝癌的预后评估制剂或肝癌治疗药物的用途。

### 背景技术

[0002] p28<sup>GANK</sup> 是存在于人肝细胞中的一种蛋白,通常在正常细胞中含量较少,但在肝癌细胞中含量很高。它的编码框包含 226 个氨基酸,分子量为 25kDa,含有 6 个重复 ankyrin 序列, GeneID :5716。本发明人曾制备了兔抗人 p28<sup>GANK</sup> 多克隆抗体用于肝癌鉴别诊断并申请了专利(详见《肝癌鉴别诊断用 p28 抗体及其制备》,专利号 ZL 03116825.6)。

[0003] 近来有报道 p28<sup>GANK</sup> 主要是通过调控内质网应激 (ER stress)、NF-κ B、P53 及 Rb 信号通路发挥其促癌作用。p28<sup>GANK</sup> 直接结合 RelA/NF-κ B 加速 NF-κ B 出核;p28<sup>GANK</sup> 结合泛素蛋白连接酶 MDM2 介导 p53 的泛素化降解;p28<sup>GANK</sup> 结合肿瘤抑制蛋白 Rb 并驱动 Rb 的核内磷酸化失活及核转录因子 E2F-1 释放,加速细胞周期 (Gastroenterology 2005 ;128 : 2029-2041 ;CellResearch 2009Nov ;19(11) :1243-57. ;2007Dec ;17(12) :1020-9)。

[0004] 曾有报道影响肝癌预后的因素主要是肿瘤大小和血管侵犯,并通常伴随肿瘤多发性。目前,越来越多的研究表明预判肝癌的复发尚需发掘其他更为有效的预后因素。以往研究提示 p28<sup>GANK</sup> 在肝癌发生发展中可能发挥了重要作用,但是它如何调控肝癌进程尚不明确,至今未见 p28<sup>GANK</sup> 的表达水平可直接作为肝癌复发转移的预后判断因素,以及用于肝癌个性化治疗的相关报道。

### 发明内容

[0005] 本发明的目的是提供一种 p28<sup>GANK</sup> 单克隆抗体,并将其用于制备肝癌预后检测试剂或用于制备治疗肝癌的药物。

[0006] 本发明人根据肝癌中 p28<sup>GANK</sup> 蛋白的高表达现象,研究了 p28<sup>GANK</sup> 对肝癌细胞转移能力的调控,通过实验发现,蛋白 p28<sup>GANK</sup> 可以促进肝癌细胞的转移,即 p28<sup>GANK</sup> 能够通过调控 PI3K-AKT-HIF1α 通路促进肝癌的转移,并且 p28<sup>GANK</sup> 蛋白的表达强弱与肝癌患者的预后密切相关。如果用它的单克隆抗体特异识别反映出肝病组织样本中 p28<sup>GANK</sup> 的本底表达水平,就能对患者的预后作出预判分析;进而设想,如果用相应单克隆抗体抑制 p28<sup>GANK</sup> 功能,阻断 p28<sup>GANK</sup> 的促癌作用,就有可能对那些自身肝脏中 p28<sup>GANK</sup> 本底表达水平较高的患者起到个性化的治疗效果。所以 p28<sup>GANK</sup> 的单克隆抗体可以用于肝癌的预后判别以及个性化治疗。本发明制备了 p28<sup>GANK</sup> 的单克隆抗体,并提供了新用途。

[0007] 本发明的鼠抗人 p28<sup>GANK</sup> 单克隆抗体的制备方法如下:

[0008] 1. 针对 p28<sup>GANK</sup> 的编码框氨基酸全序列设计并合成 3 个多肽,序列分别为:

[0009] 多肽 1 :131-145, NPDAKDHYEATAMHRC

[0010] 多肽 2 :180-194, CDEERVEEAKLLVSQ

[0011] 多肽 3 :199-214, YIENKEEKTPLQVAKGC ;

- [0012] 2. 将上述多肽分别与钥孔血蓝蛋白 (keyhole limpet hemocyanin, KLH) 耦联, 作为免疫原免疫小鼠;
- [0013] 3. 取免疫鼠的脾细胞, 与小鼠骨髓瘤细胞融合;
- [0014] 4. 经多轮筛选出合成多肽反应阳性的细胞克隆, 作为抗人 p28<sup>GANK</sup> 蛋白单克隆抗体的杂交瘤细胞株;
- [0015] 5. 通过在小鼠体内接种杂交瘤细胞生产腹水抗体, 将腹水进行纯化, 得到抗人 p28<sup>GANK</sup> 的单克隆抗体。
- [0016] 本发明提供了抗人 p28<sup>GANK</sup> 的单克隆抗体, 该单克隆抗体识别分别位于 p28<sup>GANK</sup> 氨基酸序列 NPDAKDHYEATAMHRC、CDEERVEAKLLVSQ 和 YIENKEEKTPLQVAKGC 的抗原表位。
- [0017] 本发明中的多肽可用多肽合成仪合成。多肽片段可用戊二醛连接法等与 KLH 等载体蛋白耦联, 作为免疫原免疫小鼠, 并用于单克隆抗体筛选。
- [0018] 抗人 p28<sup>GANK</sup> 的单克隆抗体的杂交瘤细胞株可采用本技术领域常规的方法制备。比如, 取经免疫的小鼠的脾细胞, 与小鼠的骨髓瘤细胞如 SP2/0 细胞融合, 经筛选后即可获得杂交瘤细胞。
- [0019] 单克隆抗体的获得可采用本技术领域常规的方法, 即通过在小鼠体内接种杂交瘤细胞并产生腹水抗体, 取出腹水经纯化而得到。
- [0020] 本发明的杂交瘤细胞株, 也称杂交瘤细胞系 160CT8531 和 161CT7112, 所制备的单克隆抗体是一种免疫球蛋白, 可特异性结合人 p28<sup>GANK</sup> 蛋白。经鉴定, 所制备的免疫球蛋白是 IgG 型的单克隆抗体。
- [0021] 本发明还提供了上述抗人 p28<sup>GANK</sup> 的单克隆抗体在检测肝病患者预后判别中的应用, 其中的检测是指 Western Blot 和免疫组化检测。
- [0022] 本发明为 p28<sup>GANK</sup> 的临床个性化治疗应用提供了新的思路。

### 附图说明

- [0023] 图 1. 是单克隆抗体 Western Blot 检测人 p28<sup>GANK</sup> 蛋白的扫描图。
- [0024] 其中, 泳道 1,3,5 是肝癌细胞 SMMC-7721 裂解液, 泳道 2,4,6 是含有外转 myc-p28<sup>GANK</sup> 的细胞系 SMMC-7721-p28<sup>GANK</sup> 裂解液。→ 标识的是外源性 p28<sup>GANK</sup>。
- [0025] 图 2. 是单克隆抗体 p28<sup>GANK</sup> 免疫组化检测人 p28<sup>GANK</sup> 蛋白的组织切片图, 其中, A 为单克隆抗体 160CT8531 免疫组化检测的肝癌组织 (200×);
- [0026] B 为单克隆抗体 161CT7112 免疫组化检测的肝癌组织 (200×)。
- [0027] 图 3. 是单克隆抗体 p28<sup>GANK</sup> 免疫组化检测 200 例人肝癌样本中 p28<sup>GANK</sup> 表达水平后统计分析对患者预后 (无瘤生存率 Disease-Free Survival 和总生存率 Overall Survival) 的曲线图。

### 具体实施方式

- [0028] 下面结合附图和实施例对本发明作详细描述, 但本发明的实施不仅限于此。
- [0029] 实施例 1. 抗人 p28<sup>GANK</sup> 的单克隆抗体的制备和纯化
- [0030] 1. 抗原的合成和耦联
- [0031] 抗原多肽合成设计参考 GenBank, GeneID :5716, 具体序列

为 NPDAKDHYEATAMHRC (SEQ ID NO :1), CDEERVEEAKLLVSQ (SEQ ID NO :2), YIENKEEKTPLQVAKGC (SEQ ID NO :3), 由百奇生物科技 (上海) 有限公司通过多肽自动合成仪用固相多肽合成法合成。

[0032] 多肽与钥孔血蓝蛋白 (KLH) 的耦联采用《分子克隆实验指导》第 2 版, 萨姆布鲁克著, 金冬雁译, 科学出版社, 北京, 1999, 第 865 页描述的戊二醛连接法。

[0033] 2. 单克隆抗体的制备和纯化

[0034] 将上述 1 中纯化的多肽 KLH 偶联物 100  $\mu$ g 以 PBS 稀释后与等体积完全弗氏佐剂 (CFA) 混匀乳化, 免疫 5-6 周龄的雌性 BALB/c 小鼠 5 只, 双肩周围的皮下进行皮下注射和后双腿进行肌肉注射, 每个区域大约用 1/8 的免疫原, 将剩余免疫原的 1/2 进行腹腔注射。1 周后加强免疫 50  $\mu$ g, 完全弗氏佐剂, 腹腔注射。2 周后加强免疫 50  $\mu$ g, 不完全弗氏佐剂 (IFA), 腹腔注射。3 周及以后, 每周直接腹腔注射 50  $\mu$ g 加强免疫。第 5 周起, 每周尾静脉采血, ELISA 测定效价, 应用多肽 KLH 偶联物抗原 1.25  $\mu$ g/ml 包被, 10% FCS 封闭, 将血清稀释后加入, 应用羊抗小鼠 IgG 标记 HRP 作为二抗, OPD 显色, 使用酶标仪 (Bio-Rad550 型) 在 492nm 读数。

[0035] 第 4 次采血的 ELISA 结果 OD 值均大于 0.75。取传染了人 p28<sup>GANK</sup> 蛋白的稳定细胞系 SMMC-7721/p28<sup>GANK</sup>  $1 \times 10^6$  个, 用细胞裂解液裂解后, 常规 Western Blot 检测。

[0036] 在免疫小鼠的同时准备小鼠骨髓瘤细胞 SP2/0 细胞 (购自 ATCC)。最后一次加强免疫 3 天后, 取 Western Blot 和免疫组化检测效果最好的小鼠的脾细胞, 与 SP2/0 细胞比例 5 : 1, 在 PEG1500 的作用下进行融合反应, 植入 96 孔板, 37 $^{\circ}$ C、5% CO<sub>2</sub> 条件下培养。培养 14 天后, 镜下检测生长出克隆细孔为融合阳性孔, 计算总融合率 > 95%。尽量选择单克隆细胞孔的上清进行 ELISA 检测。ELISA 阳性的克隆用 Western Blot 和免疫组化检测 SMMC-7721/p28<sup>GANK</sup> 细胞, 筛选出来的克隆亚克隆两次, 每次 Western Blot 和免疫组化检测效果最好的克隆。筛选得到 3 个克隆。

[0037] 6-8 周龄的雌性 BALB/c 小鼠用石蜡油腹腔注射 10 天后, 取杂交瘤细胞以  $2 \times 10^6$  个细胞 / 只进行腹腔注射。7-14 天后从小鼠腹腔抽出富含抗体的腹水进行检测和纯化。纯化采用 ProteinG 亲和层析法。ProteinG 亲和层析柱用 PBS 平衡柱子后取腹水过柱, 然后用 PBS 洗柱至 OD 值接近零, 以 50nmol/L 的甘氨酸盐酸溶液洗脱, 收集洗脱液, 测定各收集管的 OD 值, 保留峰值区的洗脱液, 透析纯化。

[0038] 实施例 2. 抗人 p28<sup>GANK</sup> 的单克隆抗体的鉴定和检测应用

[0039] 1. 单克隆抗体的 Western Blot 检测应用

[0040] 变性的蛋白样品进行 SDS-PAGE 蛋白电泳; 通过电转仪将蛋白转移至硝酸纤维素膜 (Schleicher&Schell 公司); 含 5% BSA 的 TBST 封闭 1h, TBST 洗一次, 5min; 含 4% BSA 的 TBST 稀释抗 p28<sup>GANK</sup> 单克隆抗体一抗 (1  $\mu$ g/ml), 孵育 2h, TBST 洗三次, 每次 5min; 含 4% BSA 的 TBST 稀释 IR-800 标记的抗小鼠二抗, 孵育 1h, TBST 洗四次, 每次 5min; 用红外线激光扫描仪 Odyssey 扫描。结果见图 1。结果表明该单克隆抗体能较为特异地识别人 p28<sup>GANK</sup> 分子。

[0041] 2. 单克隆抗体的免疫组化检测应用

[0042] 切片置于 60 $^{\circ}$ C 恒温箱中烘烤 20 分钟并脱蜡; 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (80% 甲醇) 室温 10 分钟灭活内源性过氧化物酶, PBS 洗 3 次各 5 分钟。0.01M 枸橼酸钠缓冲液 (pH6.0) 高压修复抗

原, PBS 洗 3 次各 5 分钟; 山羊血清封闭, 室温 20 分钟, 甩去多余液体; 滴加以抗体稀释液稀释的抗 p28<sup>GANK</sup> 单克隆抗体一抗 (10  $\mu$ g/ml), 室温孵育 2h, PBS 洗 3 次各 5 分钟; 滴加 HRP 标记的二抗 50  $\mu$ l, 室温孵育 1h, PBS 洗 3 次各 5 分钟; DAB 显色 5-10 分钟, 在显微镜下掌握染色程度, PBS 洗 3 次各 5 分钟; 苏木精复染 2 分钟, 盐酸酒精分化, 自来水冲洗 10-15 分钟; 脱水、透明、封片、拍照。结果见

[0043] 图 2。结果表明, 该单克隆抗体能较为特异地识别人 p28<sup>GANK</sup> 分子。

[0044] 3. 抗人 p28<sup>GANK</sup> 单克隆抗体针对肝癌患者的预后判断应用

[0045] ①运用肝癌组织芯片 (其中包含随机选取 2001 年-2006 年在上海东方肝胆外科医院行肝癌根治术的原发性肝细胞癌患者标本 200 例), 相应标本具有完善病史及随访资料: 记录入选患者的性别、年龄, 肿块大小、肿块象限、具体病理亚型、免疫组化结果、淋巴结转移、门脉癌栓、肝内血管侵犯等情况。记录术后无瘤生存时间 (Disease-Free Survival, DFS)、总生存时间 (Overall Survival, OS) 及复发转移情况。

[0046] ② p28<sup>GANK</sup> 表达检测及评估: 利用免疫组化方法检测组织芯片中 p28<sup>GANK</sup> 的表达情况, 计算出每张照片中 p28<sup>GANK</sup> 的表达强度, 并通过计算得出每位患者癌及癌旁组织中 p28<sup>GANK</sup> 的平均表达强度。利用统计软件分析 p28<sup>GANK</sup> 的表达与肝癌患者各种临床特征及预后参数 (总生存率、无瘤生存率、总生存时间、无瘤生存时间等) 的关系, 制成曲线图, 结果见图 3。结果表明, 该抗体检测到的样本本底 p28<sup>GANK</sup> 的表达强弱与患者预后密切相关。

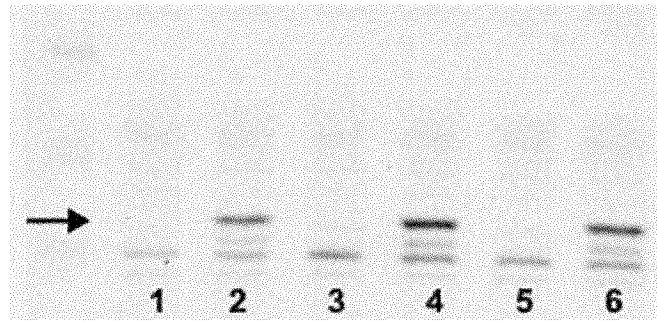


图 1

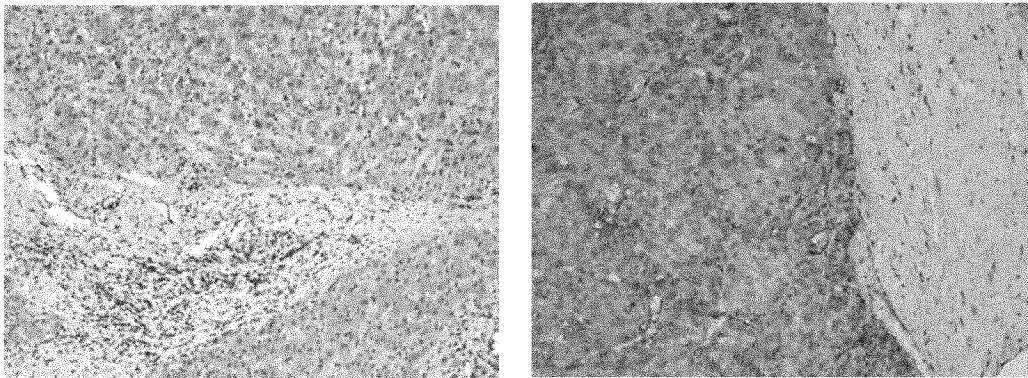


图 2

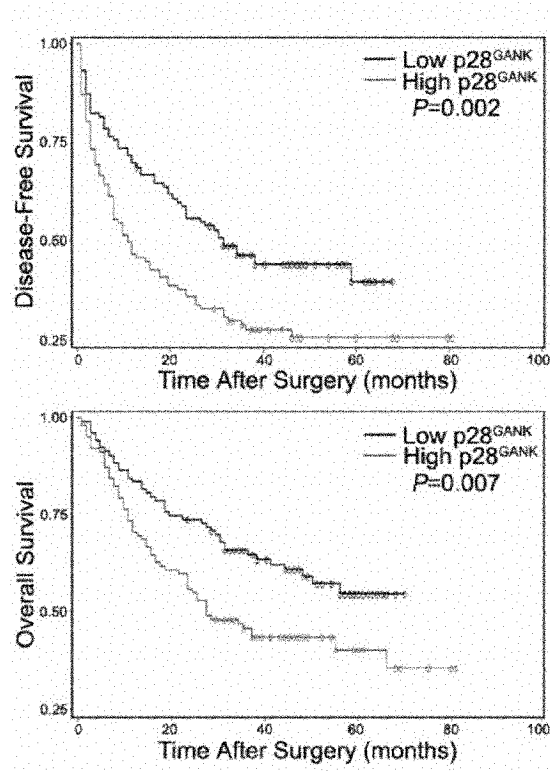


图 3

专利名称(译)	一种p28GANK单克隆抗体及其用途		
公开(公告)号	<a href="#">CN102532313A</a>	公开(公告)日	2012-07-04
申请号	CN201010585000.4	申请日	2010-12-13
申请(专利权)人(译)	中国人民解放军第二军医大学		
当前申请(专利权)人(译)	中国人民解放军第二军医大学		
[标]发明人	王红阳 陈瑶 付静 胡栋平 罗韬 董立巍		
发明人	王红阳 陈瑶 付静 胡栋平 罗韬 董立巍		
IPC分类号	C07K16/18 C12N5/18 G01N33/53 A61K39/395 A61P35/00		
CPC分类号	G01N2333/775 C07K2317/34 G01N33/57438 C07K16/18 C07K14/775 G01N33/5748 C07K16/303 G01N2333/82		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明涉及医学生物工程技术领域，是一种p28GANK单克隆抗体及其用于制备肝癌的预后评估制剂或肝癌治疗药物的用途。p28GANK蛋白在肝癌细胞中表达异常升高，并且其表达强弱与患者预后密切相关，因此p28GANK在肝癌发生发展中的作用已被日益重视。本发明提供了抗人p28GANK的单克隆抗体，还提供了该抗人p28GANK的单克隆抗体在检测判别肝癌患者预后分析和个性化治疗中的应用价值。本发明为p28GANK的临床个性化治疗应用提供了新的思路。

