



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103157109 A

(43) 申请公布日 2013.06.19

(21) 申请号 201110412778.X

(22) 申请日 2011.12.12

(71) 申请人 中国科学院生物物理研究所
地址 100101 北京市朝阳区大屯路 15 号

(72) 发明人 阎锡蕴 曾启群 吴真真 卢迪
段红霞 罗永挺 杨东玲 冯静

(74) 专利代理机构 北京市汉信律师事务所
11373

代理人 王文生

(51) Int. Cl.

A61K 39/395(2006.01)

A61K 48/00(2006.01)

A61P 35/00(2006.01)

A61P 35/04(2006.01)

G01N 33/574(2006.01)

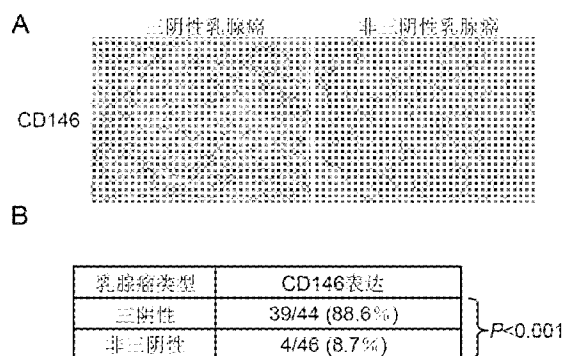
权利要求书1页 说明书6页
序列表5页 附图7页

(54) 发明名称

CD146 及其抗体诊断和治疗三阴性乳腺癌的应用

(57) 摘要

本发明涉及 CD146 及其抗体诊断和治疗三阴性乳腺癌的应用。本发明首次提出 CD146 是三阴性乳腺癌的新靶标,抗 CD146 抗体可能成为治疗这类疾病的新型靶向药物。因此,本发明提供 CD146 或抗 CD146 的抗体或该抗体的功能形式在制备用于诊断和 / 或治疗三阴性乳腺癌的药物中的应用。CD146 分子在三阴性乳腺癌组织中特异性高表达,并诱导肿瘤细胞发生上皮细胞向间质细胞转化,促进肿瘤侵袭迁移。因此,CD146 抗体治疗三阴性乳腺癌的作用机理主要是抑制三阴性乳腺癌细胞的间质细胞特征,降低其转移侵袭能力。与常规化疗药物相比,抗 CD146 抗体的副作用小,靶标明确,不会引起全身范围的副作用。



1. CD146 或抗 CD146 的抗体或该抗体的功能形式在制备用于诊断和 / 或治疗肿瘤的药物中的应用。
2. 根据权利要求 1 所述的应用,其中所述的肿瘤是乳腺癌。
3. 根据权利要求 1 或 2 所述的应用,其中所述乳腺癌包括三阴性乳腺癌。
4. 根据权利要求 1-3 中任意一项所述的应用,其中所述抗 CD146 的抗体或该抗体的功能形式包括抗 CD146 的单克隆抗体、基因工程抗体和人源化抗体。
5. 根据权利要求 1-4 中任意一项所述的应用,其中所述抗 CD146 的抗体或该抗体的功能形式是抗 CD146 的抗体的功能耦合物,其中与抗体结合的物质可以是药物、毒素、放射活性剂、酶、细胞因子或另一种抗体。
6. 根据权利要求 1-5 中任意一项所述的应用,其中所述抗 CD146 的抗体是单克隆抗体 AA4 或 AA98。
7. 根据权利要求 1-6 中任意一项所述的应用,其中所述应用是在制备诊断三阴性乳腺癌的药物中的应用,其特征在于检测受试者肿瘤组织病理切片 CD146 的水平。
8. 抗 CD146 的抗体或该抗体的功能形式在制备用于抑制三阴性乳腺癌转移以及导向治疗的药物中的应用。
9. 根据权利要求 8 所述的应用,其中所述抗 CD146 的抗体或该抗体的功能形式包括抗 CD146 的单克隆抗体、基因工程抗体和人源化抗体。
10. 根据权利要求 8 或 9 所述的应用,其中所述抗 CD146 的抗体是单克隆抗体 AA4 或 AA98。

CD146 及其抗体诊断和治疗三阴性乳腺癌的应用

技术领域

[0001] 本发明属于免疫诊断和生物治疗领域。具体地说,本发明涉及 CD146 分子及其抗体在诊断和治疗乳腺癌的应用。更具体地,本发明涉及的 CD146 单克隆抗体 AA4 可以诊断三阴性乳腺癌,而 CD146 单克隆抗体 AA98 及其功能形式的功能在于抑制三阴性乳腺癌细胞间质细胞特征及恶性特征,从而抑制肿瘤转移侵袭。

背景技术

[0002] 乳腺癌是女性中最常见且致死率最高的恶性肿瘤。全球每年有将近 130 万女性患上乳腺癌,并且有超过 40 万女性因为乳腺癌的转移复发而死亡。乳腺癌中恶性程度最高的一种亚型,称为三阴性乳腺癌,以雌激素受体 (ER) 阴性 / 黄体激素受体 (PR) 阴性 / 表皮生长因子受体 (HER2) 阴性为特征。三阴性乳腺癌的发病率约占乳腺癌中的 17%~25%,由于缺乏抗雌激素和抗 HER2 靶向治疗的靶标,以及极高的概率发生转移复发,是预后最差的一种乳腺癌类型。

[0003] 目前,在临床上治疗三阴性乳腺癌主要是化疗药物,例如顺铂及蒽环类药物,主要发挥预防肿瘤转移的功能。这类药物没有靶向性,对全身正常的组织器官也将造成损害,具有很强的毒副作用。另外,尽管三阴性乳腺癌在化疗早期对化疗药物比较敏感,但是预后依旧很糟糕。因此,探索三阴性乳腺癌的发病机理,并从中发掘新靶标,是三阴性乳腺癌治疗的新方向。

[0004] 大量文献报道,上皮细胞向间质细胞转化的机制 (epithelial to mesenchymal transition, EMT) 在三阴性乳腺癌的转移复发中发挥重要作用。EMT 赋予肿瘤细胞侵袭转移能力,耐药性以及干细胞特征。从基因分型来说,三阴性乳腺癌属于基底样乳腺癌的类型,其肿瘤细胞更倾向于表达间质细胞的标记分子,被认为是一类已经发生 EMT 的乳腺癌类型,并通过 EMT 的机制发生远端迁移至脑部、肺部等重要脏器。由于三阴性乳腺癌细胞的间质细胞性质特征在一定程度上解释了肿瘤的恶性转移程度,抑制其间质细胞特征并发掘新的相关靶标分子将成为三阴性乳腺癌细胞治疗的潜在方向。由于很多重要的生长因子受体相关的酪氨酸激酶活化、TGF- β 相关信号通路,以及整合素等细胞黏附分子相关的信号通路在诱导上皮来源的肿瘤细胞发生 EMT 的过程中发挥重要作用,以这些信号通路为靶标的抗体药物、小分子抑制剂以及拮抗剂被大量证明通过抑制 EMT 而达到治疗肿瘤转移侵袭的效果 (Targeted therapies in control of EMT in carcinoma and fibrosis. Kian-Ngiap Chua, Jing Ma, Jean-Paul Thiery. DOI :10. 1016/j. ddmec. 2008. 06. 002)。例如, cystatin C, 一种丝氨酸抑制剂,在乳腺癌细胞中被发现可以作为 TGF- β 受体的拮抗剂,进而抑制 TGF- β 与其受体的结合及激活下游诱导 EMT 发生的信号通路。因此, cystatin C 可以作为潜在的药物用于受 TGF- β 调节的乳腺癌治疗中。

发明内容

[0005] 本发明首次提出 CD146 是三阴性乳腺癌的新靶标,抗 CD146 抗体是治疗这类疾病

的新型靶向药物。与传统的化疗药物相比,抗 CD146 抗体的副作用小,不会引起全身范围的组织器官损伤。CD146 及其抗体在三阴性乳腺癌诊断和治疗中的应用是基于以下重要的科学发现:(1)CD146 分子在三阴性乳腺癌病理组织中特异性高表达;(2)CD146 在上皮性质乳腺癌细胞 MCF-7 细胞中过表达之后,诱导细胞发生 EMT,赋予细胞侵袭转移能力;(3)在原位乳腺癌老鼠模型 (Orthotopic Breast Cancer Mouse Model) 中 CD146 分子的过表达促进乳腺肿瘤的形成,降低肿瘤的分化程度,以及促进肿瘤的原位侵袭及远端迁移;(4)在三阴性乳腺癌细胞 MDA-MB-231 中使用 siRNA 下调 CD146 分子的表达或使用 CD146 的功能性抗体 AA98,可以抑制其间质细胞性质特征,降低细胞转移侵袭能力。

[0006] 综上所述,CD146 的过表达可以诱导上皮性质的肿瘤细胞发生 EMT,这对三阴性乳腺癌的发生及进展具有重要作用。同时,CD146 分子对维持三阴性乳腺癌的间质细胞特征及恶性程度有重要功能。我们自主研制的抗 CD146 功能性抗体 AA98 可以在体外抑制三阴性乳腺癌细胞 MDA-MB-231 的迁移及侵袭能力。因此,我们提出 CD146 可以作为三阴性乳腺癌的靶标分子,其功能性抗体 AA98 可以通过结合细胞膜表面的 CD146 分子,通过抑制其下游信号通路,从而阻断其诱导 EMT 的功能,或者抑制恶性肿瘤细胞的间质性质特征。同时,该种抗体的特异性较好,不会引起全身范围的免疫功能性的损伤。

[0007] 因此,本发明一方面涉及 CD146 在制备用于诊断和 / 或治疗三阴性乳腺癌药物中的应用。本领域技术人员可以通过现有技术中公开的各种方法生产针对 CD146 或其信号通路的抑制剂 (例如抗体、siRNA 等) 进而制备用于诊断和 / 或治疗三阴性乳腺癌的药物。在诊断乳腺癌时,本发明这一方面包括用于检测 CD146 表达量的各种方法,例如可检测该分子在乳腺癌细胞中的 RNA 水平或蛋白质水平,进而辅助诊断三阴性乳腺癌。

[0008] 本发明再一方面涉及抗 CD146 的抗体或该抗体的功能形式在制备用于诊断和 / 或治疗三阴性乳腺癌药物中的应用。

[0009] 在本发明中,抗 CD146 的抗体或该抗体的功能形式可包括抗 CD146 的单克隆抗体、基因工程抗体和人源化抗体。此类抗体可根据本领域大量公开的文献容易地制备。

[0010] 在本发明中,抗 CD146 的抗体或该抗体的功能形式是抗 CD146 的抗体的功能耦合物,其中与抗体结合的物质可以是药物、毒素、放射活性剂、酶、细胞因子或另一种抗体。

[0011] 在本发明中,抗 CD146 的抗体优选地是单克隆抗体 AA98 和 AA4。

[0012] 本发明又一方面涉及 CD146 或抗 CD146 的抗体或该抗体的功能形式在制备诊断三阴性乳腺癌药物中的应用,其特征在于检测受试者肿瘤组织病理切片中 CD146 的水平。在本发明的这一方面,药物可制备成试剂盒的形式。

[0013] 本发明又一方面涉及抗 CD146 的抗体或该抗体的功能形式在制备用于三阴性靶向性治疗的药物中的应用。优选地,所述抗 CD146 的抗体或该抗体的功能形式包括抗 CD146 的单克隆抗体、基因工程抗体和人源化抗体。更优选地,所述抗 CD146 的抗体是单克隆抗体 AA98 和 AA4。

[0014] 本说明书中使用的抗体 AA98、AA4、AA1 等可根据中国专利申请号 99107586.2、中国专利申请号 200810057260.7 的描述获得。

[0015] 为了更全面地理解和应用本发明,提供下列实施例。

附图说明

[0016] 从下面结合附图的详细描述中,本发明的上述特征和优点将更明显,其中:

[0017] 图 1. A:临床标本:CD146 在三阴性乳腺癌病人肿瘤组织病理切片中特异性高表达;B:三阴性乳腺癌 vs. 非三阴性乳腺癌:88.9% vs. 8.7%, $p < 0.0001$ 。

[0018] 图 2. CD146 在 MCF-7 细胞中过表达,筛选出稳定克隆。其中 Mock 为对照,转入空载;B10 和 A5 是 CD146 表达株,B10 中等表达 CD146,A5 为高表达 CD146。

[0019] 图 3. CD146 的过表达诱导细胞发生 EMT。A-B, Mock、B10 和 A5 依次发生 EMT 相关的细胞形态及信号分子变化;C, Mock、B10 和 A5 细胞迁移能力依次增强;D, Mock、B10 和 A5 侵袭细胞数。

[0020] 图 4. 在体内水平,CD146 过表达导致增加乳腺癌肿瘤生成(A),并减低肿瘤分化程度(B),以及肿瘤的原位迁移(C);

[0021] 图 5. 在体内水平,CD146 过表达促进乳腺癌远端迁移(A-D);

[0022] 图 6. 在三阴性乳腺癌细胞系 MDA-MB-231 中下调 CD146 表达逆转其间质细胞特征。(A)Western Blot 鉴定乳腺癌细胞系 MCF-7、MDA-MB-231 以及 Hs78T 细胞 EMT 相关标记分子(B)CD146 表达下调导致 EMT 相关标记分子的变化;(C)CD146 表达下调导致细胞形态的逆转;(D-E)CD146 表达下调导致细胞迁移及侵袭能力的下降;

[0023] 图 7. 抗 CD146 功能性抗体 AA98 抑制三阴性乳腺癌细胞系 MDA-MB-231 的间质细胞特征(A-D)。

[0024] 图 8. Sigma 公司真核表达质粒 p3XFLAG-HA-cmv-14 图谱。

具体实施方式

[0025] 实施例一:CD146 在三阴性乳腺癌病人肿瘤组织病理切片中特异性高表达;

[0026] 细胞黏附分子在乳腺癌发生发挥过程中发挥重要作用。CD146 分子是一个有关血管新生及肿瘤转移的重要细胞黏附分子。为了研究 CD146 在乳腺癌中的作用,我们对 90 例乳腺癌组织病理切片进行免疫组化分析,发现 CD146 分子在三阴性乳腺癌中特异性高表达。

[0027] 主要材料:乳腺癌病人肿瘤组织石蜡切片,包括 44 例三阴性乳腺癌及 46 例非三阴性乳腺癌组织,均来源于天津肿瘤医院;

[0028] 主要试剂:4%多聚甲醛,二甲苯,无水乙醇,无水甲醇,过氧化氢,PBS,小鼠抗 CD146 单克隆抗体 AA4;本说明书中使用的抗体 AA98、AA4、AA1 等可根据中国专利申请号 99107586.2、中国专利申请号 200810057260.7 的描述获得。

[0029] 主要方法:石蜡切片制作:用 4%多聚甲醛固定新鲜组织 24 小时后,石蜡包埋,以下为石蜡切片的免疫组化过程:

[0030] 1) 取出片子,入二甲苯溶液 37℃脱蜡两次,每次 30 分钟;

[0031] 2) 入无水乙醇 ×2-95% -80% -70% -50% -30%和蒸馏水中水化,室温每次 5 分钟;

[0032] 3)0.3%过氧化氢/甲醇溶液 37℃避光处理 30 分钟,消除内源性过氧化物酶的活性,PBS 洗三次;

[0033] 4)pH6.0 柠檬酸修复液 100℃水浴 30 分钟抗原热修复,自然冷却;

[0034] 5)5%的正常羊血清 37℃封闭 1 小时;

[0035] 6) 加入 PBS 稀释的一抗 (兔抗 CD146 多抗或 AA4), 4℃ 孵育过夜;

[0036] 7) PBS 洗三次; 山羊抗-兔-生物素或山羊-抗-小鼠-生物素二抗 (购自中衫金桥) (1 : 1000) 在 37℃ 孵育 1 小时, PBS 洗三次;

[0037] 8) 亲和素-HRP (1 : 1000) 在 37℃ 孵育 45 分钟;

[0038] 9) 用现配的 DAB 避光显色 2-7 分钟, 再进行苏木素复染。

[0039] 10) 逐级脱水 :50-70-80-90-100-100% 乙醇-二甲苯, 晾干, 中性树脂封片。

[0040] 11) 显微成像系统中拍片。

[0041] 结果显示, 如图 1 所示, 相比于非三阴性乳腺癌组织, CD146 分子在三阴性乳腺癌组织中特异性高表达。CD146 表达在肿瘤细胞的细胞膜, 并更倾向于表达在肿瘤迁移的边缘。

[0042] 实施例二 :CD146 过表达诱导上皮性质乳腺癌细胞 MCF-7 发生 EMT ;

[0043] 我们选择了 CD146 阴性的细胞系 MCF-7 细胞 (购自上海细胞库, 目录号为 TCHu74) 作为细胞模型, 发现 CD146 在恶性的三阴性乳腺癌组织中高表达具有重要意义。MCF-7 是一个上皮性质的乳腺癌肿瘤细胞系, 恶性程度低, 分化程度高, 细胞迁移能力极弱。我们在 MCF-7 中过表达 CD146 分子, 构建获得了 2 个稳定表达株, B10 和 A5, 其中 B10 中等表达 CD146, A5 为高表达 CD146。同时, 我们也在 MCF-7 细胞中转入空载体, 构建了对照稳定株 Mock。具体过程如下详述。

[0044] 主要试剂 :CD146 cDNA (SEQ ID NO :7) 最初为法国慕尼黑大学 Judith P. Johnson 教授馈赠, 目前在国内也可以通过武汉三鹰生物技术有限公司购买获得 (编号 :BC056418, 载体质粒为 pCMV-SPORT6), 所编码的蛋白质序列见 SEQ ID NO :8。我们选择了真核表达质粒 p3XFLAG-HA-cmv-14 (购买于 Sigma 公司, 编号 E4901) 构建 CD146 真核表达质粒, 原始质粒图谱见图 8。CD146 cDNA 通过 EcoRI 与 BamHI 两个酶切位点插入 p3XFLAF-HA-cmv-14, 构建后所得的目的质粒由本实验室长期保存。其中从含有 CD146 cDNA 的载体质粒上 PCR 出 5' 及 3' 端分别带有 EcoRI 与 BamHI 的 CD146 cDNA 片段运用的引物为 :正向 5' -CGG AAT TCAATG GGG CTT CCC AGG CTG-3' (SEQ ID NO :1); 反向 5' -GCG GATTCA TGC CTC AGA TCG ATG TA-3' (SEQ ID NO :2)。转染试剂为罗氏 Fugene HD。G418 试剂购买于 Sigma。Transwell 技术使用的 96 孔板 (8 μm) 购买于美国康宁 (Corning)。本说明书中使用的抗体 AA98、AA4、AA1 等可根据中国专利申请号 99107586.2、中国专利申请号 200810057260.7 的描述获得。抗 E-cadherin 抗体、抗 cytokeratin 抗体、抗 Fibronectin 抗体、抗 GAPDH 抗体购买于 Abcam, 抗 Vimentin 抗体购买于 Sigma。胰酶购买于 Gibco。Matrigel 购于 BD biosciences 公司。

[0045] 主要方法 :采用脂质体转染试剂转染真核细胞, 并采用 G418 抗性筛选出单克隆, 再运用 Western Blot、流式细胞仪、Transwell 技术等鉴定所得细胞的特性。

[0046] (1) 将 MCF-7 细胞种在 2 个 35mm 的细胞培养皿中, 使第二天转染时细胞密度达到 80% 左右。

[0047] (2) 根据罗氏 Fugen HD 转染试剂的说明, 分别对两个 25mm 培养皿中的 MCF-7 细胞转染 p3XFlag 质粒或 p3XFlag-CD146 质粒, 48h 后分别加入 G418 (0.5 μg/ml) 进行筛选;

[0048] (3) 1 周后, 等存活的细胞长满后, 胰酶消化细胞后, 用新鲜培养基稀释细胞密度至 1×10^4 个 /ml, 种于 96 孔板, 对多克隆进行单克隆化。

[0049] (4) 96 孔板的细胞长满后, 扩大到 35mm 培养皿进行培养, 并采用流式分析的方法对 CD146 的表达量进行检测, 挑选不同表达量的 CD146 克隆。

[0050] (5) 对挑选出的克隆继续在 G418 存在的情况下培养约 2-3 月, 待克隆稳定后即可进行后续细胞形态观察、细胞迁移侵袭测试等实验。对于细胞迁徙实验, 5×10^3 个细胞种于 Transwell 板中的上孔, 培养在 $50 \mu\text{l}$ 无血清的 MEM 培养基中, 下孔中为含 $200 \mu\text{l}$ 10% 血清的 MEM 培养基作为诱导, 14-18h 后, 上孔中的培养基被吸干, 覆盖于膜上的细胞被蘸了 70% 的酒精的棉球棒擦干净, 膜被揭下并倒扣在玻片上。迁移过来的细胞用 4% 的 PFA 固定并结晶紫染色, 显微镜拍照并计数。每个细胞需要设计 3 个平行对照孔。对于细胞侵袭实验, 膜上需预先覆盖 2.5mg/ml 的 Matrigel 胶, 1×10^4 个细胞将用于该实验。接下步骤与上同。

[0051] 如图 3 所示, 在 MCF-7 稳定克隆株 Mock、B10 和 A5 这一系列中, 我们观察到有关 EMT 的相关变化。首先, Mock 细胞维持母本 MCF-7 细胞的典型的上皮性质细胞的形态, 细胞成片生长, 呈铺路石状, 其紧密连接。然而, 高表达 CD146 分子的 A5 细胞形态发生极大变化, 细胞分散生长成梭形。中等表达 CD146 分子的 B10 细胞形态处于两种的中间状态。其次, Western Blot 实验表明 Mock 细胞表达典型的上皮细胞的标记分子, 例如 E-cadherin 和 Cytokeratin。而 A5 细胞表达典型的间质细胞的标记分子, 例如 Vimentin 和 Fibronectin。(Epithelial-Mesenchymal Transitions in Development and Disease, Jean Paul Thiery, Hervé Acloque, Ruby Y. J. Huang and M. Angela Nieto. Cell 139, November 25, 2009)。最重要的是, 应用 Transwell 技术 (Leukocyte transmigration through vascular endothelium. An in vitro method. Allavena P, Del Maschio A. Methods Mol Biol. 1999; 96:171-6), 我们能发现 CD146 在 A5 细胞中的高表达显著地增强了细胞迁徙及侵袭能力。

[0052] 实施例三: 在原位乳腺癌老鼠模型中 CD146 过表达促进乳腺肿瘤的形成, 降低肿瘤的分化程度, 并促进肿瘤的原位侵袭及远端迁移;

[0053] 我们利用 SCID/Beige 构建了原位移植的乳腺癌小鼠模型, 发现在体内水平 CD146 的高表达对乳腺癌的发生发展具有重要作用。

[0054] 实验方法: 选择 20 只 4 周大小雌性的 SCID/Beige (购于维通利华) 小鼠, 随机分为 2 组。分别在乳腺脂肪组织垫注射 1×10^6 个 MCF-7 细胞来源的克隆 Mock 或 A5 细胞重悬在 50ul PBS, 与 50ul 2.5mg/ml 的 Matrigel 混合。每周观察 1 次, 测量长、宽及高, 以便计算肿瘤体积。10 周后, 当有荷瘤鼠变得虚弱后, 脱颈法处死所有小鼠, 剥离肿瘤和重要脏器, 4% PFA 固定 24 小时后, 石蜡包埋, 切片并做免疫组化分析。

[0055] 结果如图 4、图 5 所示, Mock 细胞在 SCID/Beige 小鼠上成瘤性差, 10 只小鼠中只有 3 只成瘤, 且肿瘤体积偏小, 肿瘤组织结构完整, 表明分化程度高, 且没有发生原位侵袭及远端迁移。而形成鲜明对比的是, CD146 高表达的 A5 细胞成瘤容易, 10 只小鼠中只有 8 只成瘤, 且肿瘤体积普遍偏大, 肿瘤组织结构混乱, 表明分化程度低。更重要的是, A5 形成的肿瘤显著地侵袭到邻近的正常组织, 例如皮肤, 乳腺, 肋骨等, 且转移到了肺部及肝脏。

[0056] 实施例四: 在三阴性乳腺癌细胞系 MDA-MB-231 下调 CD146 或抗 CD146 功能性抗体 AA98 表达抑制其间质细胞特征。

[0057] 主要试剂: 靶向 CD146 的 siRNA 序列: 正向 5' -CCAGCU CCG CGUCUA CAA AdTdT-3' (SEQ ID NO:3), 反向 5' -UUU GUA GAC GCGGAG CUG GdTdT-3' (SEQ ID NO:4); 靶向 GFP 的 siRNA 序列: 正向 5' -CUU CAG CCU CAG CUU GCC GdTdT-3' (SEQ ID NO:5), 反

向 5' -CGGCAA GCU GAC CCU GAA GdTdT-3' (SEQ ID NO :6).Lipofectin 2000 转染试剂购于 Invitrogen 公司。

[0058] 主要方法:(1)MDA-MB-231 细胞分于 2 个 35mm 细胞培养皿中,以使第二天转染 siRNA 时密度达到 70%左右。根据 Lipofectin 2000 的转染要求,分别对两个 35mm 培养皿的 MDA-MB-231 细胞转染 siRNA-GFP 或者 siRNA-CD146,48h 后使用 RIPI 裂解缓冲液裂解细胞,做总蛋白定量之后跑 SDS-PAGE,并进行 Western Blot 进行相关分子的检测。确认 CD146 在 MDA-MB-231 细胞中表达下调的效果后,进一步进行细胞形态变化观察、细胞侵袭迁移能力等测试。

[0059] (2)MDA-MB-231 细胞分于 2 个 35mm 细胞培养皿后,立即加入 mIgG 及 AA98 (50mg/ml) 进行刺激,48h 后进行各种检测,与上同。

[0060] 我们进一步选择三阴性乳腺癌细胞系 MDA-MB-231 (购自 ATCC, 编号 HTB-26™) 为研究模型,使用靶向 CD146 分子的 siRNA (于 Invitrogen 合成) 下调 CD146 的表达或抗 CD146 功能性抗体 AA98,发现 CD146 对维持间质细胞特征的肿瘤细胞的恶性程度具有重要功能。

[0061] 结果如图 6、图 7 所示,靶向 CD146 分子的 siRNA 将 MDA-MB-231 细胞中 CD146 蛋白水平下调到原来的三分之一。我们观察到梭形的细胞开始部分回圆。与此同时,间质细胞的标记分子 vimentin 及 Fibronectin 表达下调,上皮细胞的标记分子 E-cadherin 表达上调。更重要的是,细胞迁移及侵袭能力受到了抑制。同时,抗 CD146 功能性抗体 AA98 也可以显著抑制 MDA-MB-231 细胞间质细胞标记分子 Slug 表达,上调上皮细胞标记分子 E-cadherin 的表达,并抑制细胞迁移能力。

[0001]

IB117443序列表

序列表

<110>	中国科学院生物物理研究所	
<120>	CD146及其抗体诊断和治疗三阴性乳腺癌的应用	
<130>	IB117443	
<160>	8	
<170>	PatentIn version 3.3	
<210>	1	
<211>	27	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<400>	1	
	cggaattcaa tggggcttcc caggctg	27
<210>	2	
<211>	26	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<400>	2	
	gcggattcat gcctcagatc gatgta	26
<210>	3	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<400>	3	
	ccagcuccgc gucuacaaat t	21
<210>	4	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<400>	4	
	uuuguagacg cggagcuggt t	21
<210>	5	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<400>	5	
	cuucagccuc agcuugccgt t	21
<210>	6	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<400>	6	
	cggcaagcug acccugaagt t	21
<210>	7	
<211>	1941	
<212>	DNA	
<213>	人	
<400>	7	
	atggggcttc ccaggctggt ctgcgccttc ttgctgcgcg cctgctgctg ctgtcctcgc	60
	gtcgcgggtg tgccccgaga gctcagcag cctcgcctc agctggtgga ggtggaagtg	120

[0002]

IB117443序列表

ggccagacag cccttctgaa gtgcggcctc tcccagtecc aaggcaacct cagccatgtc 180
 gactggtttt ctgtccacaa ggagaagcgg acgctcatct tccgtgtgcg ccagggccag 240
 ggccagagcg aacctgggga gtacgagcag cggctcagcc tccaggacag aggggctact 300
 ctggccctga ctcaagtac cccccaagac gagcgcatct tcttgtgcca gggcaagcgc 360
 cctcggctcc aggagtaccg catccagctc cgcgtctaca aagctccgga ggagccaaac 420
 atccaggtca accccctggg catccctgtg aacagtaagg agcctgagga ggtcgtctacc 480
 tgtttaggga ggaacgggta ccccattcct caagtcatct ggtacaagaa tggccggcct 540
 ctgaaggagg agaagaaccg ggtccacatt cagtcgtccc agactgtgga gtcgagtggt 600
 ttgtacacct tgcagagtat tctgaaggca cagctgggta aagaagacaa agatgccccag 660
 ttttactgtg agctcaacta ccggtgccc agtgggaacc acatgaagga gtcagggaa 720
 gtcaccgtcc ctgttttcta cccgacagaa aaagtgtggc tggaaagtga gcccggtgga 780
 atgtgaagg aaggggaccg cgtggaatc aggtgttgg ctgatggcaa cctccacca 840
 cacttcagca tcagcaagca gaaccccagc accaggagg cagaggaaga gacaaccaac 900
 gacaacgggg tcctggtgct ggagcctgcc cggaaagAAC acagtgggcg ctatgaatgt 960
 caggccctgg acttgacac catgatatcg ctgctgagtg aaccacagga actactggtg 1020
 aactatgtgt ctgacgtccg agtgagtccc gcagcccctg agagacagga aggcagcagc 1080
 ctcaccctga cctgtgaggc agagagtagc caggacctcg agttccagtg gctgagagaa 1140
 gagacagccc aggtgctgga aaggggcct gtgcttcagt tgcattgacct gaaacgggag 1200
 gcaggaggcg gctatcgtg cgtggcgtct gtgccagca taccggcct gaaccgaca 1260
 cagctgtgca acgtggccat ttttgcccc ctttgatgg cattcaagga gaggaaggtg 1320
 tgggtgaaag agaatatggt gttgaatctg tcttgtgaag cgtcagggca ccccgcccc 1380
 accatctcct gaaacgtcaa cggcacggca agtgaacaag accaagatcc acagcgagtc 1440
 ctgagcacc tgaatgtcct cgtgacccc gagctgttgg agacaggtgt tgaatgcacg 1500
 gcctccaacg acctgggcaa aaacaccagc atcctcttcc tggagctggt caatttaacc 1560
 accctcacac cagactccaa cacaaccact gcctcagca ctccactgc cagtcctcat 1620
 accagagcca acagcacctc cacagagaga aagctgccgg agccggagag cggggcgtg 1680
 gtcatcgtg ctgtgattgt gtgcacctg gtccctggcg tgctgggccc gtctctctat 1740
 ttctctata agaagggcaa gctgccgtgc aggcctcag ggaagcagga gatcacgctg 1800
 cccccgtctc gtaagagcga actttagtt gaagttaagt cagataagct cccagaagag 1860
 atgggcctcc tgcagggcag cagcgggtgac aagagggtc cgggagacca gggagagaaa 1920
 tacatcgtc ttaggcatta g 1941

<210> 8
 <211> 646
 <212> PRT
 <213> 人

<400> 8

Met Gly Leu Pro Arg Leu Val Cys Ala Phe Leu Leu Ala Ala Cys Cys
 1 5 10 15

[0003]

IB117443序列表

Cys Cys Pro Arg Val Ala Gly Val Pro Gly Glu Ala Glu Gln Pro Ala
 20 25 30

Pro Glu Leu Val Glu Val Glu Val Gly Ser Thr Ala Leu Leu Lys Cys
 35 40 45

Gly Leu Ser Gln Ser Gln Gly Asn Leu Ser His Val Asp Trp Phe Ser
 50 55 60

Val His Lys Glu Lys Arg Thr Leu Ile Phe Arg Val Arg Gln Gly Gln
 65 70 75 80

Gly Gln Ser Glu Pro Gly Glu Tyr Glu Gln Arg Leu Ser Leu Gln Asp
 85 90 95

Arg Gly Ala Thr Leu Ala Leu Thr Gln Val Thr Pro Gln Asp Glu Arg
 100 105 110

Ile Phe Leu Cys Gln Gly Lys Arg Pro Arg Ser Gln Glu Tyr Arg Ile
 115 120 125

Gln Leu Arg Val Tyr Lys Ala Pro Glu Glu Pro Asn Ile Gln Val Asn
 130 135 140

Pro Leu Gly Ile Pro Val Asn Ser Lys Glu Pro Glu Glu Val Ala Thr
 145 150 155 160

Cys Val Gly Arg Asn Gly Tyr Pro Ile Pro Gln Val Ile Trp Tyr Lys
 165 170 175

Asn Gly Arg Pro Leu Lys Glu Glu Lys Asn Arg Val His Ile Gln Ser
 180 185 190

Ser Gln Thr Val Glu Ser Ser Gly Leu Tyr Thr Leu Gln Ser Ile Leu
 195 200 205

Lys Ala Gln Leu Val Lys Glu Asp Lys Asp Ala Gln Phe Tyr Cys Glu
 210 215 220

Leu Asn Tyr Arg Leu Pro Ser Gly Asn His Met Lys Glu Ser Arg Glu
 225 230 235 240

Val Thr Val Pro Val Phe Tyr Pro Thr Glu Lys Val Trp Leu Glu Val
 245 250 255

Glu Pro Val Gly Met Leu Lys Glu Gly Asp Arg Val Glu Ile Arg Cys
 260 265 270

Leu Ala Asp Gly Asn Pro Pro Pro His Phe Ser Ile Ser Lys Gln Asn
 275 280 285

Pro Ser Thr Arg Glu Ala Glu Glu Glu Thr Thr Asn Asp Asn Gly Val
 290 295 300

Leu Val Leu Glu Pro Ala Arg Lys Glu His Ser Gly Arg Tyr Glu Cys
 305 310 315 320

[0004]

IB117443序列表

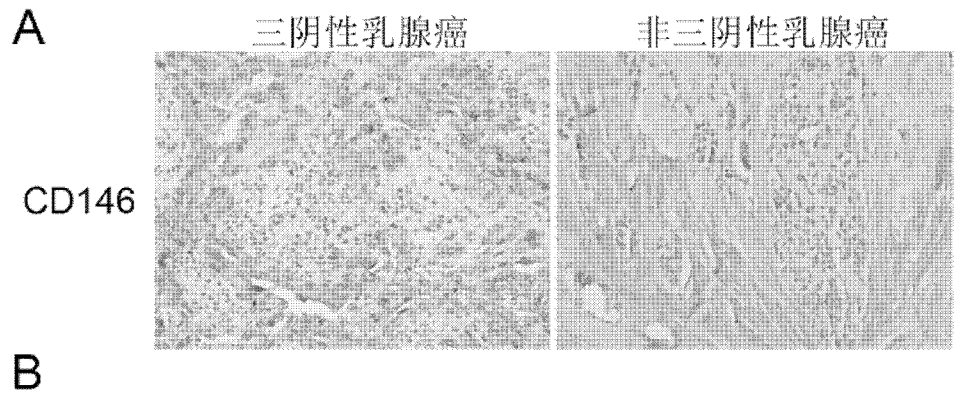
Gln Gly Leu Asp Leu Asp Thr Met Ile Ser Leu Leu Ser Glu Pro Gln
 325 330 335
 Glu Leu Leu Val Asn Tyr Val Ser Asp Val Arg Val Ser Pro Ala Ala
 340 345 350
 Pro Glu Arg Gln Glu Gly Ser Ser Leu Thr Leu Thr Cys Glu Ala Glu
 355 360 365
 Ser Ser Gln Asp Leu Glu Phe Gln Trp Leu Arg Glu Glu Thr Gly Gln
 370 375 380
 Val Leu Glu Arg Gly Pro Val Leu Gln Leu His Asp Leu Lys Arg Glu
 385 390 395 400
 Ala Gly Gly Gly Tyr Arg Cys Val Ala Ser Val Pro Ser Ile Pro Gly
 405 410 415
 Leu Asn Arg Thr Gln Leu Val Asn Val Ala Ile Phe Gly Pro Pro Trp
 420 425 430
 Met Ala Phe Lys Glu Arg Lys Val Trp Val Lys Glu Asn Met Val Leu
 435 440 445
 Asn Leu Ser Cys Glu Ala Ser Gly His Pro Arg Pro Thr Ile Ser Trp
 450 455 460
 Asn Val Asn Gly Thr Ala Ser Glu Gln Asp Gln Asp Pro Gln Arg Val
 465 470 475 480
 Leu Ser Thr Leu Asn Val Leu Val Thr Pro Glu Leu Leu Glu Thr Gly
 485 490 495
 Val Glu Cys Thr Ala Ser Asn Asp Leu Gly Lys Asn Thr Ser Ile Leu
 500 505 510
 Phe Leu Glu Leu Val Asn Leu Thr Thr Leu Thr Pro Asp Ser Asn Thr
 515 520 525
 Thr Thr Gly Leu Ser Thr Ser Thr Ala Ser Pro His Thr Arg Ala Asn
 530 535 540
 Ser Thr Ser Thr Glu Arg Lys Leu Pro Glu Pro Glu Ser Arg Gly Val
 545 550 555 560
 Val Ile Val Ala Val Ile Val Cys Ile Leu Val Leu Ala Val Leu Gly
 565 570 575
 Ala Val Leu Tyr Phe Leu Tyr Lys Lys Gly Lys Leu Pro Cys Arg Arg
 580 585 590
 Ser Gly Lys Gln Glu Ile Thr Leu Pro Pro Ser Arg Lys Ser Glu Leu
 595 600 605
 Val Val Glu Val Lys Ser Asp Lys Leu Pro Glu Glu Met Gly Leu Leu
 610 615 620

[0005]

IB117443序列表

Gln Gly Ser Ser Gly Asp Lys Arg Ala Pro Gly Asp Gln Gly Glu Lys
625 630 635 640

Tyr Ile Asp Leu Arg His
645



B

乳腺癌类型	CD146表达
三阴性	39/44 (88.6%)
非三阴性	4/46 (8.7%)

} $P < 0.001$

图 1

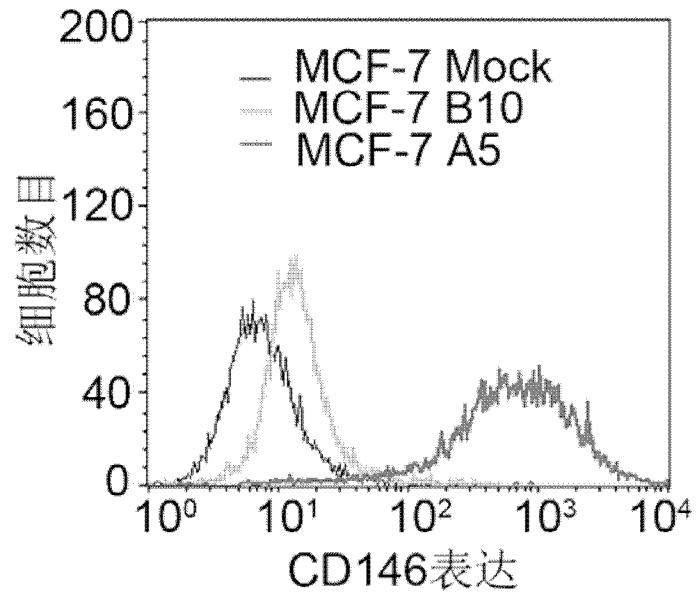


图 2

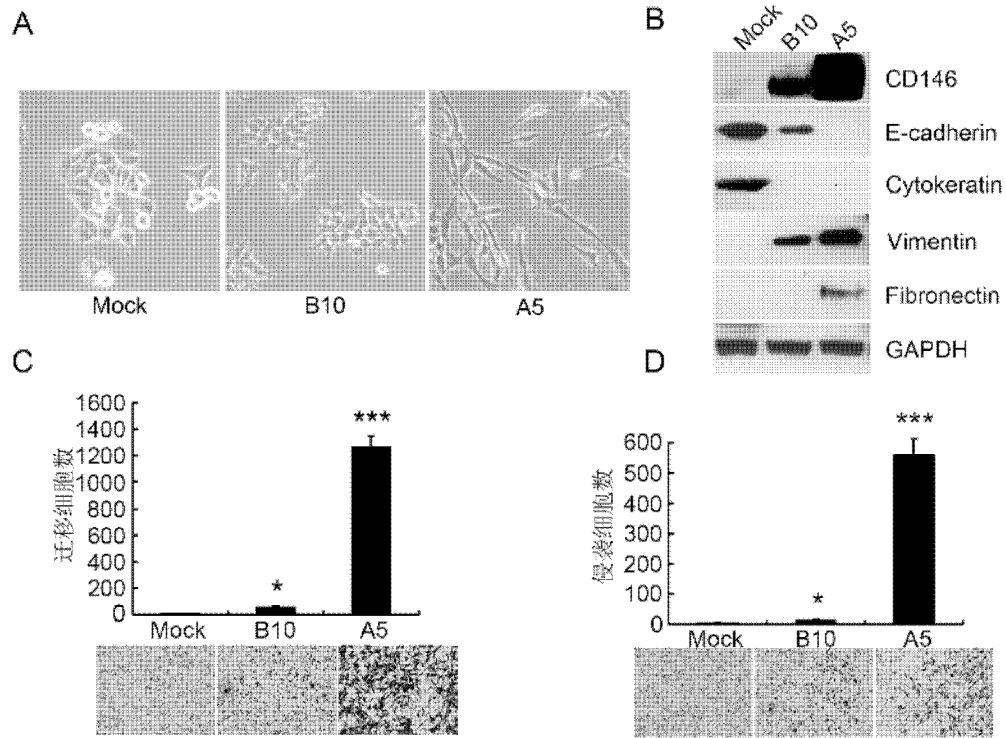


图 3

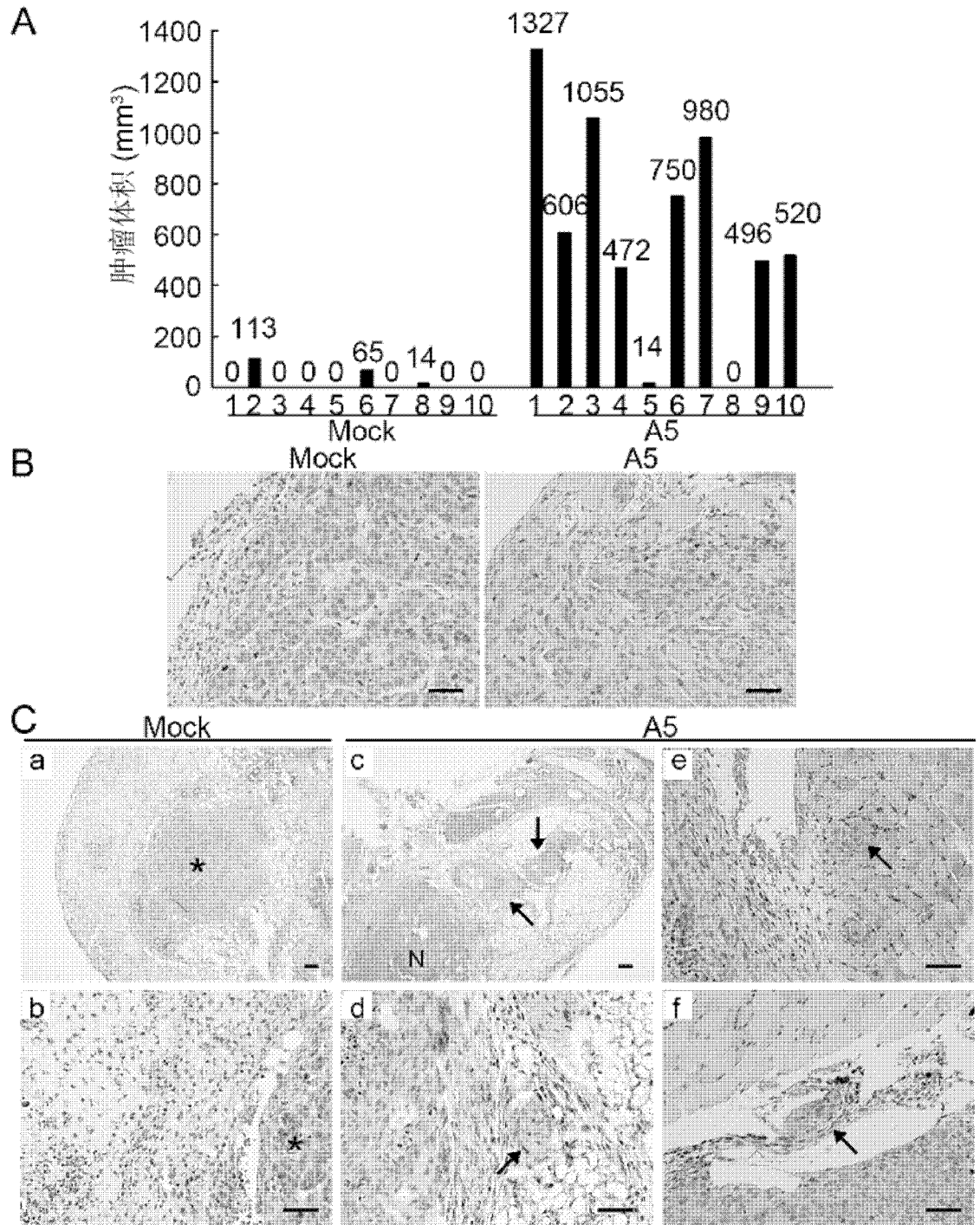


图 4

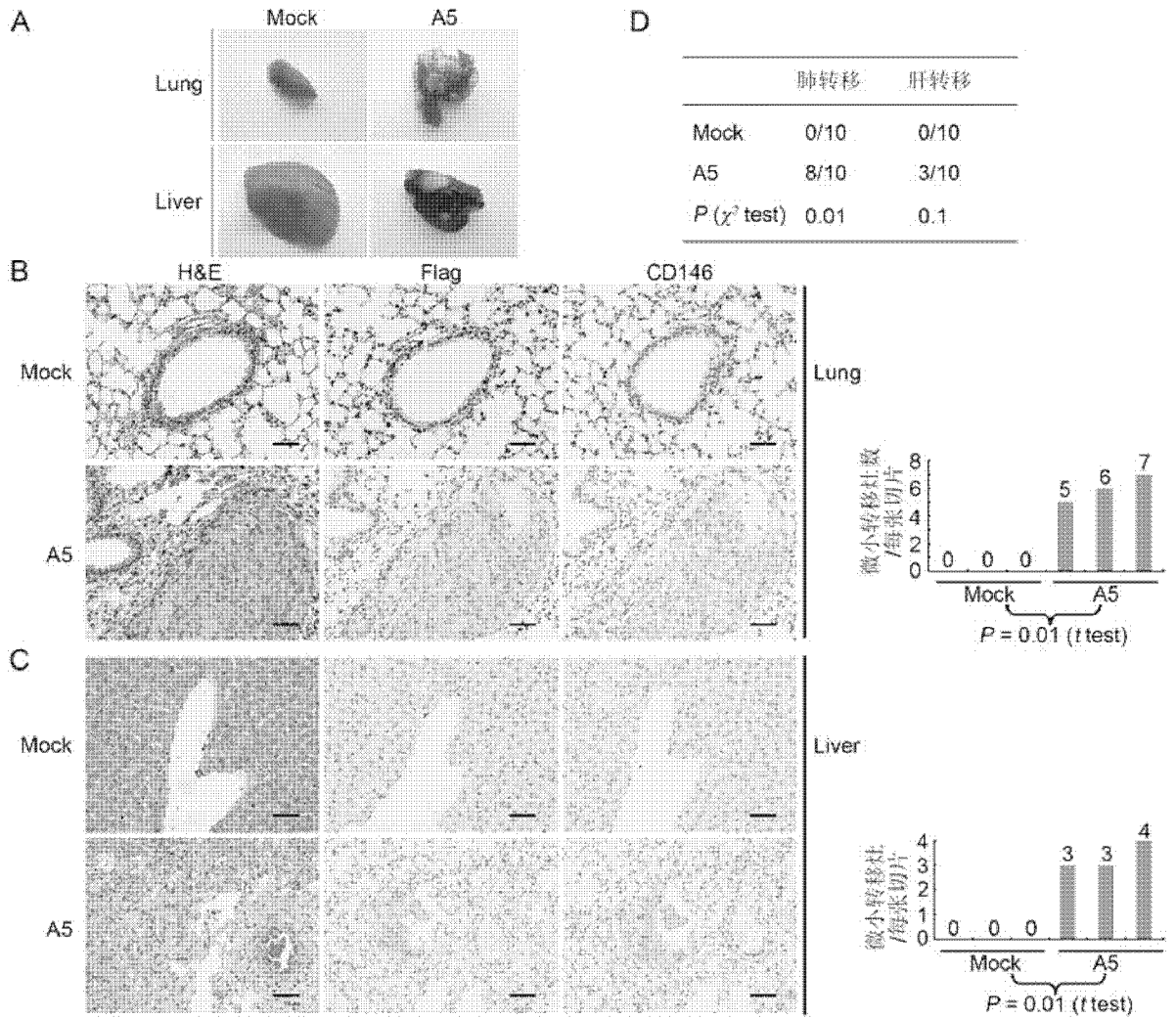


图 5

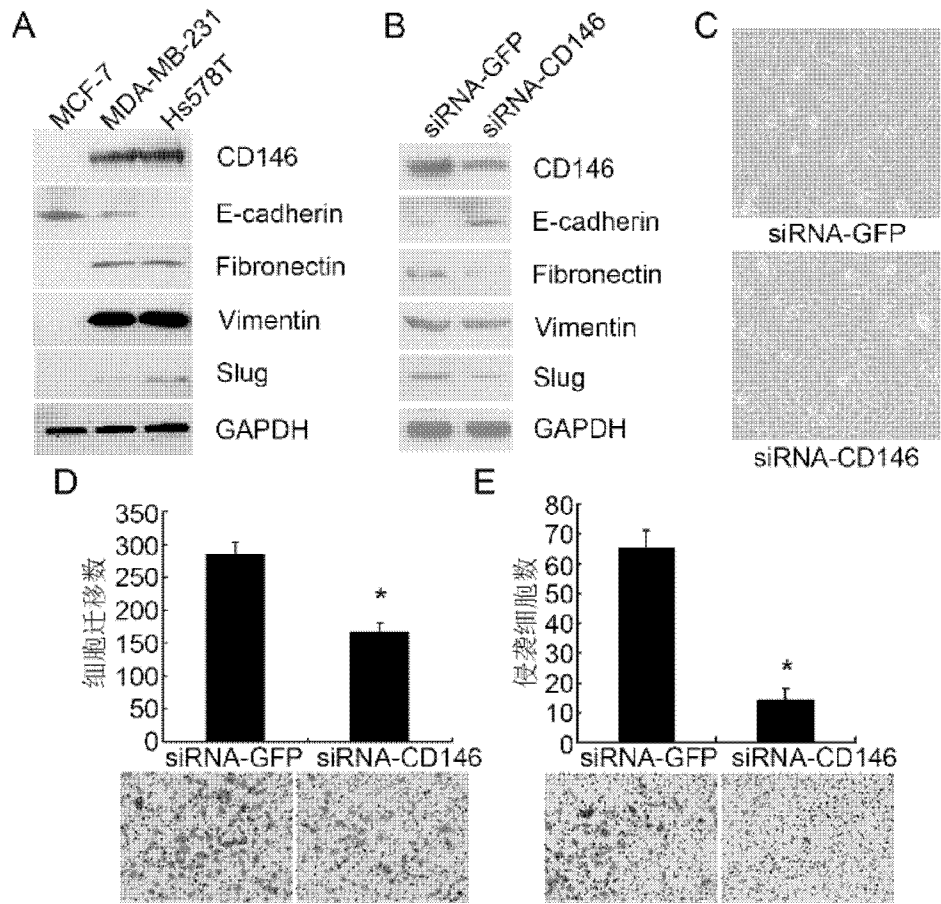


图 6

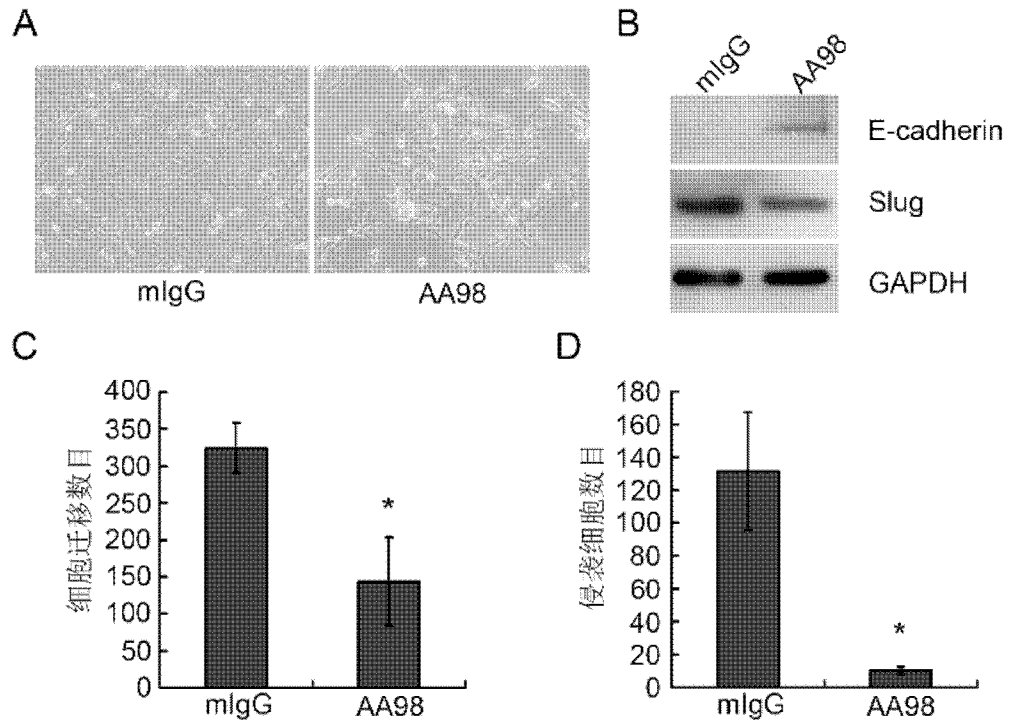


图 7

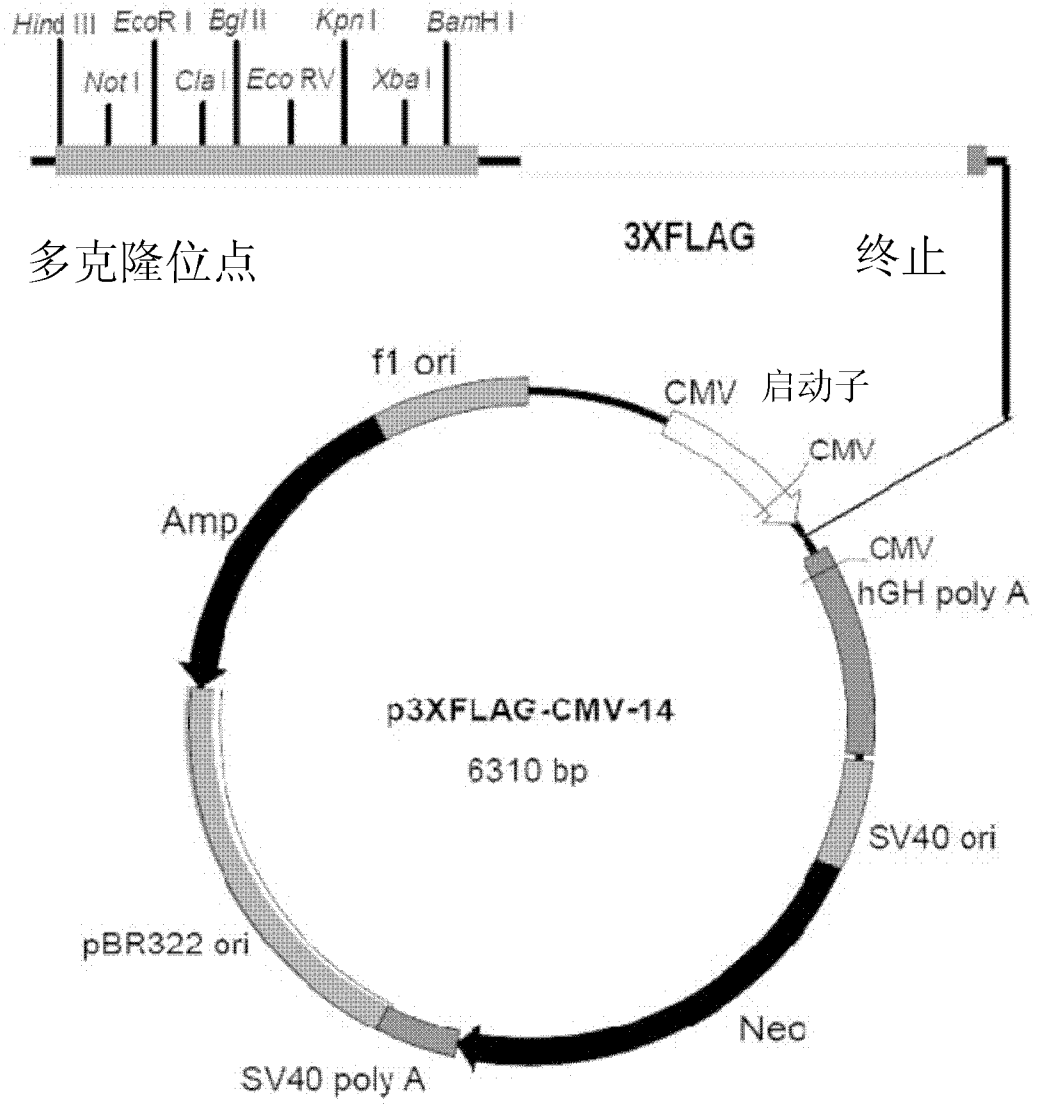


图 8