

(19)中华人民共和国国家知识产权局



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 106913870 A

(43)申请公布日 2017.07.04

(21)申请号 201710201961.2

(22)申请日 2014.06.27

(62)分案原申请数据

201410301523.X 2014.06.27

(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 涂滔 杨东玲 冯静

宋丽娜 晏慧文

(74)专利代理机构 中科专利商标代理有限责任

公司 11021

代理人 单骁越

(51)Int.Cl.

A61K 39/395(2006.01)

A61P 35/00(2006.01)

权利要求书1页 说明书8页

序列表2页 附图3页

(54)发明名称

用于阻断Netrin-1与CD146之间的相互作用的试剂及其肿瘤治疗用途

(57)摘要

本发明公开了阻断Netrin-1与CD146之间的相互作用的试剂在制备用于抑制新生血管形成的药物中的用途以及在制备用于治疗肿瘤的药物中的用途。本发明还公开了通过阻断Netrin-1与CD146之间的相互作用来抑制新生血管形成和治疗肿瘤的方法。

1. 针对CD146的抗体在制备用于阻断Netrin-1与CD146之间的相互作用的试剂中的用途。
2. 根据权利要求1所述的用途,其中所述抗体是针对CD146的单克隆抗体。
3. 根据权利要求2所述的用途,其中所述针对CD146的单克隆抗体是AA98。

用于阻断Netrin-1与CD146之间的相互作用的试剂及其肿瘤 治疗用途

[0001] 本申请是于2014年6月27日提交的申请号为201410301523.X的发明专利申请的分案申请。

技术领域

[0002] 本发明涉及阻断Netrin-1与CD146之间的相互作用的试剂在制备用于抑制新生血管形成的药物中的用途以及在制备用于治疗肿瘤的药物中的用途。本发明还涉及通过阻断Netrin-1与CD146之间的相互作用来抑制新生血管形成和治疗肿瘤的方法。

背景技术

[0003] 癌症是当前危害人类生命健康的头号杀手。我国每年恶性肿瘤的发病人数约312万。全国每分钟有6人被诊断为癌症,死于癌症者占死亡总人数的20%以上,居城市居民死亡原因的第一位(根据2012年统计资料)。

[0004] 目前,在肿瘤三大常规(放疗、化疗和手术)治疗中,药物治疗是一个重要方面。影响肿瘤药物治疗效果的因素是多方面的,包括药物的特异性、运输方式、渗透性以及诱发肿瘤耐药性。其中药物的特异性和诱发肿瘤的耐药性是肿瘤治疗学亟需解决的关键问题。抗肿瘤血管治疗以其肿瘤特异性、广谱性、无或低耐药性等优势已成为肿瘤治疗中的一种重要手段。其理论依据主要是上世纪七十年代Folkman提出的肿瘤血管生成的概念,即新生血管为肿瘤提供营养和氧分供应,进而促进肿瘤的生长及转移。

[0005] 已有研究发现,神经突起生长导向因子Netrin-1能够促进血管内皮细胞的生长和迁移,进而促进血管生成。在发育过程中,神经细胞,上皮细胞,淋巴细胞等多种细胞分泌Netrin-1,促进血管体系的发育和成型。在病理条件下,肿瘤细胞能合成并分泌大量Netrin-1,促进肿瘤血管生成。然而Netrin-1促进血管生成的机制尚不清楚,其受体及下游信号未知,因此目前尚无针对Netrin-1的抗肿瘤血管生成药物。

[0006] 在过去的研究中,已发现免疫球蛋白超家族粘附分子CD146在肿瘤血管内皮细胞上上调表达,并促进肿瘤血管生成。靶向CD146的单克隆抗体AA98能有效的抑制平滑肌肉瘤,胰腺癌和肝癌中的血管生成,切断肿瘤的养分供应,从而抑制肿瘤的生长,迁移和恶化。

发明内容

[0007] 本发明人首次提出Netrin-1是CD146的功能性配体,而CD146是Netrin-1在血管内皮细胞上的受体。Netrin-1通过结合到血管内皮细胞表面的CD146上来激活下游信号通路,促进内皮细胞的生长和迁移。抗CD146的单克隆抗体AA98能够阻碍Netrin-1与CD146的结合,因此能够在体内和体外水平上抑制Netrin-1引起的下游信号和血管生成过程。

[0008] 以Netrin-1作为潜在的治疗靶点在抗肿瘤治疗中的应用是基于以下重要的科学发现:(1) Netrin-1和CD146直接相互作用,是CD146的功能性配体;(2) 抗CD146的单克隆抗体AA98能够阻断Netrin-1与CD146之间的相互作用,进而阻断Netrin-1刺激引起的下游信

号(p38和ERK/NF-κB)的激活;(3)抗CD146单克隆抗体AA98能够抑制Netrin-1诱导引起的内皮细胞增殖,迁移和血管生成;(4)在小鼠动脉环和Matrigel plug模型中,AA98能够在体内水平上抑制Netrin-1诱导的血管生成;(5)在以往的研究报道中,已经证明抗CD146抗体AA98能够通过抑制肿瘤血管生成,从而抑制平滑肌肉瘤,胰腺癌和肝癌的生长和恶化。

[0009] 综上所述,Netrin-1作为CD146的功能性配体,能够激活CD146的下游信号,进而促进血管生成。过去的研究证实CD146是肿瘤治疗中的靶点分子,抗CD146的单克隆抗体AA98能够有效的抑制肿瘤血管生成。因此,我们提出靶向Netrin-1分子能够有效的抑制血管生成,进而阻断肿瘤的养分供应,抑制肿瘤生长。

[0010] 具体的,本发明提供以下各项:

[0011] 1. 阻断Netrin-1与CD146之间的相互作用的试剂在制备用于治疗肿瘤的药物中的用途。

[0012] 2. 根据1所述的用途,其中所述阻碍Netrin-1与CD146之间的相互作用的试剂是抗体。

[0013] 3. 根据2所述的用途,其中所述抗体是针对CD146的单克隆抗体。

[0014] 4. 根据3所述的用途,其中所述针对CD146的单克隆抗体是AA98。

[0015] 5. 根据4所述的用途,其中所述肿瘤选自平滑肌肉瘤、胰腺癌和肝癌。

[0016] 6. 阻断Netrin-1与CD146之间的相互作用的试剂在制备用于抑制新生血管形成的药物中的用途。

[0017] 7. 根据6所述的用途,其中所述阻碍Netrin-1与CD146之间的相互作用的试剂是抗体。

[0018] 8. 根据7所述的用途,其中所述抗体是针对CD146的单克隆抗体。

[0019] 9. 根据8所述的用途,其中所述针对CD146的单克隆抗体是AA98。

[0020] 10. 治疗肿瘤的方法,所述方法包括阻断Netrin-1与CD146之间的相互作用。

[0021] 11. 根据10所述的方法,其中通过施用针对CD146的单克隆抗体来阻断Netrin-1与CD146之间的相互作用。

[0022] 12. 根据11所述的方法,其中所述针对CD146的单克隆抗体是AA98。

[0023] 13. 根据12所述的方法,其中所述肿瘤选自平滑肌肉瘤、胰腺癌和肝癌。

[0024] 14. 抑制新生血管形成的方法,所述方法包括阻断Netrin-1与CD146之间的相互作用。

[0025] 15. 根据14所述的方法,其中通过施用针对CD146的单克隆抗体来阻断Netrin-1与CD146之间的相互作用。

[0026] 16. 根据15所述的方法,其中所述针对CD146的单克隆抗体是AA98。

附图说明

[0027] 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:

[0028] 图1. Netrin-1与CD146在分子水平相互作用。A,人胚胎肾上皮细胞(HEK293)中,转染质粒利用免疫共沉淀的方法发现Netrin-1和CD146相互作用;B,体外pull-down实验发现Netrin-1和CD146胞外区存在直接相互作用;C,体外pull-down实验发现抗CD146单克隆抗体AA98能阻断Netrin-1和CD146的相互作用;D,利用表面等离子共振(SPR)实验测定

Netrin-1和CD146之间相互作用的亲和力常数。

[0029] 图2,在体外水平,Netrin-1促进血管生成依赖于与血管内皮细胞表面的CD146结合。A-C,利用CD146特异性的siRNA敲低人脐静脉内皮细胞(HUVEC)中的CD146后,Netrin-1促进内皮细胞增殖,迁移和血管生成的功能被抑制;D-F,抗CD146的单克隆抗体AA98能够抑制Netrin-1诱导的HUVEC增殖,迁移和血管生成。

[0030] 图3,Netrin-1激活下游血管生成信号依赖于与血管内皮细胞表面的CD146结合。A,利用CD146特异性的siRNA敲低HUVEC中的CD146能抑制Netrin-1激活的下游信号;B,抗CD146的单克隆抗体AA98能够抑制Netrin-1诱导的信号激活。

[0031] 图4,在小鼠血管生成模型中,Netrin-1促进血管生成依赖于和CD146的结合。A-B,在动脉环模型中,使用CD146内皮特异性敲除小鼠或者AA98能够抑制Netrin-1引起的内皮细胞出芽;C-D,在Matrigel plug模型中,使用CD146内皮特异性敲除小鼠或者AA98能够抑制Netrin-1诱导的血管生成。

具体实施方式

[0032] 本说明书中使用的抗体AA98(Yan,X等A novel anti-CD146 monoclonal antibody,AA98,inhibits angiogenesis and tumor growth.Blood.2003;102(1):184-191.)、AA1(本实验室自主生产,保藏机构:中国普通微生物保藏中心;保藏号:CGMCC No.2310;保藏日期:2007.12.28)等可分别根据中国专利申请号99107586.2(CN1234405)、中国专利申请号200810057260.7(CN101245101)的描述获得。

[0033] 实施例1:细胞和体外水平,Netrin-1和CD146相互作用

[0034] CD146作为内皮细胞粘附分子在血管生成尤其是病理血管生成中起关键作用。Netrin-1也被报道促进血管生成过程,但其受体并不清楚。为了研究两者之间的关系,我们在细胞和体外水平,利用免疫共沉淀等方法证实Netrin-1与CD146存在直接相互作用。抗CD146的单克隆抗体能够阻断Netrin-1和CD146之间的相互作用。

[0035] 主要材料:人胚胎肾上皮细胞(HEK293)(ATCC,CRL-1573)。

[0036] 主要试剂:细胞裂解液,PBS,HEPES。鼠源抗CD146单克隆抗体AA1(本实验室自主生产。保藏机构:中国普通微生物保藏中心;保藏号:CGMCC No.2310;保藏日期:2007.12.28)。鼠源抗CD146单克隆抗体AA98,抗Netrin-1鼠单克隆抗体(购自Enzo Life Science公司,货号ALX-804-838),重组人Netrin-1蛋白(购自Enzo Life Science公司,货号ALX-522-100),Fc-CD146蛋白(购自Sino Biological Inc.,货号10115-H02H),Fc蛋白(购自Sino Biological Inc.,货号10702-HNAH),His-CD146蛋白(购自Sino Biological Inc.,货号10115-H08H)。CD146特异性siRNA和对照siRNA(由Invitrogen公司合成,CD146特异性siRNA序列如下)。

[0037] 正向:5'-CCAGCUCGCGUCUACAAAdTdT-3'

[0038] 反向:5'-UUUGUAGACGGGAGCUGGdTdT-3'

[0039] 主要方法:免疫共沉淀,体外pull-down及表面等离子共振实验,具体方法如下:

[0040] 免疫共沉淀:

[0041] 1)将经过瞬时转染Netrin-1-pcDNA3.1/myc-his(-)b质粒和CD146-p3xFLAG-cmv-14质粒(10 μ g)的HEK293细胞接种于100mm培养皿中,当细胞密度达到90%后将细胞轻轻刮

下,4℃离心5分钟离心收集于Ep管中。

[0042] CD146-p3xFLAG-cmv-14质粒的相关信息见文献Zheng,C.等Endothelial CD146 is required for in vitro tumor-induced angiogenesis:the role of a disulfide bond in signaling and dimerization.The international journal of biochemistry&cell biology 41,2163-2172,doi:10.1016/j.biocel.2009.03.014(2009)。

[0043] Netrin-1-pEGFP-N1质粒由本实验室构建。使用pEGFP-N1载体。人源Netrin-1的基因序列如下(Gene ID:9423)：

[0044] ATGATGCGCGCAGTGTGGGAGGCGCTGGCGGCGCTGGCGGCGGTGGCGTGCCTGGTGGGCGCGGTGCGCGGGGGCCCGGCTCAGCATGTTTCGCGGGCCAGGCGGCGCAGCCCGATCCCTGCTCGGACGAGAACGGCCACCCGCGCCGCTGCATCCCGGACTTTGTCAATGCGGCCTTCGGCAAGGACGTGCGCGTGTCCAGCACCTGCGGCCGGCCCCGGCGCGCTACTGCGTGGTGAGCGAGCGGCGAGGAGCGGCTGCGCTCGTGCCACCTTGCAACGCGTCCGACCCCAAGAAGGCGCACCCGCCCCCTTCCTCACCGACCTCAACAACCCGCACAACCTGACGTGCTGGCAGTCCGAGAACTACCTGCAGTTCGGCACAACGTCACGTCACACTGTCCCTCGGCAAGAAGTTCGAAGTGACCTACGTGAGCCTGCAGTTCTGCTCGCCGCGGCCGAGTCCATGGCCATCTACAAGTCCATGGACTACGGGCGCACGTGGGTGCCCTTCCAGTTCTACTCCACGCAGTGCCGAAGATGTACAACCGGCCGACCGCGCGCCATCACCAAGCAGAACGAGCAGGAGGCCGTGTGCACCGACTCGCACACCGACATGCGCCCGCTCTCGGGCGGCCTCATCGCCTCAGCACGCTGGACGGGCGGCCCTCGGCGCAGACTTCGACAACCTGCCCCGTGCTGCAGGACTGGGTACGGCCACAGACATCCGCGTGGCCTTACGCCGCTGCACACGTTTCGGCGACGAGAACGAGGACGACTCGGAGCTGGCGCGGACTCGTACTTCTACGCGGTGTCCGACCTGCAAGTGGGCGGCCGCTGCAAGTGCAACGGCCACGCGGCCGCTGCGTGCAGGACCGCGACGACAGCCTGGTGTGCGACTGCAGGCACAACACGGCCCGCCGGAGTGCAGCCGCTGCAAGCCCTTCCACTACGACCGGCCCTGGCAGCGCGCCACAGCCCGGAAGCCAACGAGTGCAGTGGCCTGTAAGTGCACCTGCATGCCCGGCGTGCAGCCTTCAACATGGAGCTCTACAAGCTTTCGGGGCGCAAGAGCGGAGGTGTCTGCCTCAACTGTGCCACAACACCGCCCGCCACTGCCATTACTGCAAGGAGGGCTACTACCGCGACATGGGCAAGCCCATCACCCACCGAAGGCCTGCAAAGCCTGTGATTGCCACCCTGTGGGTGCTGCTGGCAAAACCTGCAACCAAAACCACCGGCCAGTGTCCCTGCAAGGACGGCGTGACGGGTATCACCTGCAACCGCTGCGCCAAAGGCTACCAGCAGAGCCGCTCTCCATCGCCCCCTGCATAAAGATCCCTGTAGCGCCCGACGACTGCAGCCAGCAGCGTGGAGGACCTGAAGACTGCGATTCCTACTGCAAGGCCTCCAAGGGGAAGCTGAAGATTAAACATGAAAAAGTACTGCAAGAAGGACTATGCCGTCCAGATCCACATCCTGAAGGCGGACAAGGCGGGGACTGGTGAAGTTCACGGTGAACATCATCTCCGTGTATAAGCAGGGCACGAGCCGCATCCGCCGCGGTGACCAGAGCCTGTGGATCCGCTCGCGGGACATCGCCTGCAAGTGTCCAAAAATCAAGCCCCTCAAGAAGTACCTGCTGCTGGGCAACGCGGAGGACTCTCCGGACCAGAGCGGCATCGTGGCCGATAAAAGCAGCCTGGTGATCCAGTGGCGGGACACGTGGGCGCGGGCGCTGCGCAAGTTCAGCAGCGTGAGAAGAAGGGCAAGTGCAAGAAGGCCTAG

[0045] 插入位点：正向为限制性内切酶Bgl II (AGATCT) 酶切位点,反向为EcoR I (GAATTC) 酶切位点。

[0046] 2) 加入600μl裂解液RIPA Buffer (50mM Tris-HCl,pH 7.4,1%NP-40,0.25%Na-deoxycholate,150mM NaCl,1mM EDTA,1mM Na3VO4,1mM NaF,1mM PMSF和1mM proteinase inhibitors cocktails (蛋白酶抑制剂,购自Roche公司,货号04693116001)),冰上裂解30分钟,4℃离心(12,000g)15分钟。

[0047] 3) 吸取上清为细胞裂解液,经Bradford法测定蛋白浓度之后,将总蛋白浓度稀释至1mg/ml。

[0048] 4) 在裂解液中加入20 μ l protein G-Agarose,4 $^{\circ}$ C孵育1小时,去除与20 μ l protein G-Agarose非特异结合的蛋白质。

[0049] 5) 离心取上清,加入2 μ g的CD146单克隆抗体AA1或Netrin-1单克隆抗体,4 $^{\circ}$ C孵育2小时。

[0050] 6) 再次加入30 μ l protein G-Agarose,4 $^{\circ}$ C孵育1小时。

[0051] 7) 离心弃上清,沉淀的agarose beads用含蛋白酶抑制剂的PBS洗3次,每次5分钟后加入上样缓冲液100 μ l涡旋2分钟,100 $^{\circ}$ C煮10分钟,离心取上清。

[0052] 8) 处理好的蛋白样品及全细胞裂解液留样一起用于Western blot检测。

[0053] 体外pull-down实验:

[0054] 1) 将Fc-CD146蛋白200ng或Fc蛋白200ng与Netrin-1蛋白200ng一起融于500 μ l HEPES的EP管中,或将2 μ g抗CD146单克隆抗体AA1或AA98与His-CD146蛋白200ng及Netrin-1蛋白200ng一起融于500 μ l PBS的EP管中,4 $^{\circ}$ C孵育1小时。

[0055] 2) 加入20 μ l protein G beads,4 $^{\circ}$ C孵育1小时。

[0056] 3) 4 $^{\circ}$ C离心5分钟,弃上清,沉淀的agarose beads用含蛋白酶抑制剂的PBS洗3次,每次5分钟后,加入上样缓冲液50 μ l涡旋2分钟,100 $^{\circ}$ C煮10分钟。

[0057] 4) 处理好的蛋白样品用于Western blot检测。

[0058] 表面等离子共振实验:

[0059] 1) 将1 μ g Fc-CD146溶于HEPES溶液,固定在CM5传感芯片上,置于BIACORE 3000仪器中。

[0060] 2) 将Netrin-1蛋白稀释成不同浓度(18.75nM,37.5nM,75nM,150nM and 300nM),以5 μ l/min的流速流过CM5传感芯片。

[0061] 3) Netrin-1与Fc-CD146的结合通过共振单元(RU)来测量,经过仪器计算,得到Netrin-1与CD146相互作用的亲和力常数。

[0062] 结果如图1显示,在HEK293细胞中,用抗CD146抗体AA1捕获CD146的同时可以检测到Netrin-1,反之亦然,说明CD146与Netrin-1存在相互作用(A)。在体外pull-down实验中,如(B)所示,CD146与Netrin-1之间存在直接相互作用。另外,利用抗CD146单克隆抗体AA98或AA1捕获CD146时(C),AA1组能检测到Netrin-1蛋白而AA98组未检测到,说明AA98能够阻断Netrin-1和CD146的结合。利用表面等离子共振的方法,测定了Netrin-1和CD146的亲和力常数为1.33nM(D)。以上结果说明Netrin-1与CD146直接相互作用,而抗CD146单克隆抗体AA98能够阻断两者之间的相互作用。

[0063] 实施例2:Netrin-1诱导的内皮细胞增殖,迁移和成血管依赖于Netrin-1与受体CD146的结合

[0064] 血管生成主要为肿瘤提供养分,并为肿瘤细胞转移的提供途径,因此对于肿瘤的生长起到至关重要的作用。抑制血管生成就能够很大程度的抑制肿瘤的生长。Netrin-1通过与内皮细胞表面的受体CD146结合,促进内皮细胞的增殖,迁移和成血管,抗CD146的单克隆抗体通过阻断Netrin-1与CD146的结合来抑制Netrin-1诱导的内皮细胞功能。

[0065] 主要材料:人脐静脉内皮细胞系(HUVEC,购自CellSystems Biotechnologie Vertrieb),96孔transwell板(Corning HTS Transwell-96Cell Migration Products)。

[0066] 主要试剂:重组人Netrin-1蛋白,CD146特异性siRNA(合成于invitrogen公司),抗

CD146的抗体AA98,鼠IgG (mIgG,购自Sigma-Aldrich公司,货号I5381),Matrigel (不含生长因子,BD Biosciences,货号354234),CCK8细胞增殖试剂盒。

[0067] 主要方法:细胞增殖,迁移实验,内皮细胞成血管实验。具体方法如下:

[0068] 细胞增殖实验:

[0069] 1) 将瞬时转染CD146特异性siRNA或对照siRNA的HUVEC细胞以完全培养基悬浮,制成单细胞悬液(5×10^4 /ml)。

[0070] 2) 将细胞接种于96孔板中(100 μ l/孔,每种处理设三个平行孔)。

[0071] 3) 向细胞培养基中加入抗体AA98或对照mIgG (50 μ g/ml) 与刺激剂Netrin-1蛋白 (50ng/ml),在37 $^{\circ}$ C二氧化碳培养箱中培养48小时。

[0072] 4) 使用CCK8细胞增殖试剂盒测定细胞密度。

[0073] 细胞迁移实验:

[0074] 1) 将瞬时转染CD146特异性siRNA或对照siRNA的HUVEC细胞以完全培养基重悬,制成单细胞悬液(1×10^5 /ml)。

[0075] 2) Transwell下室加入含10%胎牛血清的RPMI-1640培养基(购自Gibco,货号31800-022) (200 μ l/孔),上室加入细胞悬液(100 μ l/孔,每种处理设三个平行孔),

[0076] 3) 向上室的细胞中加入抗体AA98或AA1 (50 μ g/ml) 与刺激剂Netrin-1 (50ng/ml)。在37 $^{\circ}$ C二氧化碳培养箱中孵育过夜。

[0077] 4) 将膜上层的细胞用棉签擦掉,用镊子将96孔transwell板的膜揭下,膜下层朝上放于载玻片上。

[0078] 5) 下层细胞以4%多聚甲醛室温固定15分钟后,用1%结晶紫染色15分钟,镜检记录每个视野下的细胞数量。

[0079] 内皮细胞成血管实验是在Nagata等人建立的实验方法的基础上改进而来,具体操作如下:

[0080] 1) HUVECs细胞以完全培养基重悬,制成单细胞悬液(1×10^5 /ml)。

[0081] 2) 在96孔板中包被冰浴的Matrigel (50 μ l/孔),37 $^{\circ}$ C固化30分钟。

[0082] 3) 向每个孔中加入100 μ l细胞悬液,同时相应地加入刺激剂Netrin-1 (200ng/ml) 及抗体AA98或mIgG (50 μ g/ml)。

[0083] 4) 37 $^{\circ}$ C培养箱中孵育过夜,之后在倒置显微镜下观察,拍照。

[0084] 实验结果如图2(A-C)所示,Netrin-1能够增加内皮细胞的增殖,迁移和成血管能力,与对照组相比,转染CD146特异性siRNA能明显降低VEGF刺激所引起的内皮细胞功能。同样的,抗CD146单克隆抗体AA98能明显抑制Netrin-1刺激引起的内皮细胞增殖,迁移和成血管(D-F)。以上结果证实,与CD146的结合对于Netrin-1所介导的血管生成过程是必须的。

[0085] 实施例3:CD146特异性siRNA或抗CD146单克隆抗体AA98能够阻断Netrin-1刺激引起的信号通路的活化

[0086] 在内皮细胞中,Netrin-1结合到受体CD146上,能激活下游的ERM,p38,ERK,NF- κ B等信号分子。CD146特异性的siRNA能够敲低内皮细胞上CD146的表达,抑制Netrin-1诱导的下游信号通路。同样,抗体AA98通过阻断Netrin-1与CD146的结合,能抑制Netrin-1激活的下游信号。

[0087] 主要材料:人脐静脉内皮细胞系。

[0088] 主要试剂:重组人Netrin-1蛋白,CD146特异性siRNA,抗CD146的抗体AA98,鼠IgG等。

[0089] 主要方法:将转染过CD146特异性siRNA或对照siRNA的HUVEC细胞用Netrin-1 (50ng/ml) 刺激后裂解细胞用于生化分析信号通路(A)。或利用抗CD146单克隆抗体AA98或mIgG (50 μ g/ml) 分别孵育HUVEC细胞,37 $^{\circ}$ C 1小时后,用细胞培养基清洗三遍后,再用Netrin-1 (50ng/ml) 刺激后裂解细胞用于生化分析信号通路。如图所示,Netrin-1刺激能够引起下游信号分子ERM,p38,ERK (10分钟) 以及NF- κ B (6小时) 的活化。当使用转染过CD146特异性siRNA或抗CD146单克隆抗体AA98,能够阻断由Netrin-1引起的下游信号活化。说明Netrin-1通过结合到细胞表面的CD146上来激活下游信号通路。

[0090] 实施例4:在小鼠动脉环和Matrigel plug模型中,使用内皮细胞特异性敲除CD146的小鼠或AA98能够抑制Netrin-1刺激引起的血管生成

[0091] 在评估体内血管生成的实验中,动脉环和Matrigel plug是常用的两个模型。动脉环实验通过离体培养小鼠胸总动脉环,观察内皮细胞出芽的数量。Matrigel plug实验通过小鼠皮下注射Matrigel,在一定天数后取出并切片,观察血管生成的情况。动物实验证实,Netrin-1在体内能促进血管生成,并且这种促进作用依赖于受体CD146。

[0092] 实验方法:

[0093] 动脉环实验:选取8周大小的野生型小鼠 (C57/BL6J,购自维通利华) 和CD146内皮特异性敲除小鼠 (CD146^{EC-KO},C57/BL6J背景),将小鼠断颈处死后取出胸总动脉,切成厚度为0.5-1毫米的动脉环。将动脉环接种于由Matrigel胶包被的96孔板中,每组10个动脉环。在细胞培养基中对应加入抗体AA98或对照mIgG (100ug/ml),以及刺激剂重组人Netrin-1蛋白 (200ng/ml)。于37 $^{\circ}$ C培养箱培养4-6天后,将动脉环置于光学显微镜下观察,计算内皮细胞出芽数量。

[0094] Matrigel plug实验:选取8周大小的野生型小鼠 (C57/BL6J,购自维通利华) 和CD146内皮特异性敲除小鼠 (CD146^{EC-KO},C57/BL6J背景),每组5只。分别在背部皮下注射500ul Matrigel胶。Matrigel胶中分别混有抗体AA98或对照mIgG (100ug/ml),以及Netrin-1 (200ng/ml)。注射10天后,断颈处死小鼠。将Matrigel形成的结构取出,拍照后用4%PFA固定24小时,石蜡包埋,切片,免疫组化分析。以下为石蜡切片的免疫组化过程:

[0095] 1) 取出片子,入二甲苯溶液37 $^{\circ}$ C脱蜡两次,每次30分钟;

[0096] 2) 入无水乙醇 \times 2-95%-80%-70%-50%-30%和蒸馏水中水化,室温每次5分钟;

[0097] 3) 0.3%过氧化氢/甲醇溶液37 $^{\circ}$ C避光处理30分钟,消除内源性过氧化物酶的活性,PBS洗三次;

[0098] 4) pH 6.0柠檬酸修复液100 $^{\circ}$ C水浴30分钟抗原热修复,自然冷却;

[0099] 5) 5%的正常羊血清 (购自中杉金桥公司,货号ZLI-9021) 37 $^{\circ}$ C封闭1小时;

[0100] 6) 加入PBS稀释的一抗 (兔抗CD31多抗,购自Abcam公司,货号ab28364;1:50稀释),4 $^{\circ}$ C孵育过夜;

[0101] 7) PBS洗三次;山羊抗-兔-生物素 (购自中杉金桥公司,货号ZB-2010;1:1000稀释) 在37 $^{\circ}$ C孵育1小时,PBS洗三次;

[0102] 8) 亲和素-HRP (购自Hyclone-pierce公司,货号N100;1:1000) 在37 $^{\circ}$ C孵育45分钟;

[0103] 9) 现配的DAB (购自中杉金桥公司,货号ZLI-9032;1:1000稀释) 避光显色2-7分钟, 苏木素复染。

[0104] 10) 逐级脱水:50-70-80-90-100-100%乙醇-二甲苯,晾干,中性树脂封片。

[0105] 11) 显微成像系统中拍片。

[0106] 结果显示,在野生型小鼠中,Netrin-1能够诱导小鼠内皮细胞的出芽以及血管生成。当使用CD146内皮特异性敲除小鼠,或者使用抗体AA98阻断Netrin-1和CD146之间相互作用时,Netrin-1促进血管生成的功能受到抑制。以上结果表明,Netrin-1促进血管生成依赖于与其受体CD146的结合。

序列表

<110> 中国科学院生物物理研究所

<120> 用于阻断Netrin-1与CD146之间的相互作用的试剂及其肿瘤治疗用途

<130> IB177714

<160> 1

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 1815

<212> DNA

<213> 人

<400> 1

```

atgatgcgcg cagtgtggga ggcgctggcg gcgctggcgg cgggtggcgtg cctggtgggc 60
gcggtgcgcg gcgggcccgg gctcagcatg ttgcggggcc aggcggcgca gcccgatecc 120
tgctcggacg agaacggcca cccgcgccgc tgcateccgg actttgtcaa tgcggccttc 180
ggcaaggacg tgcgcgtgtc cagcacctgc ggccggcccc cggcgcgcta ctgcgtggtg 240
agcgagcgcg gcgaggagcg gctgcgctcg tgccacctct gcaacgcgtc cgaccccaag 300
aaggcgcacc cgcccgcctt cctcaccgac ctcaacaacc cgcacaacct gacgtgctgg 360
cagtccgaga actacctgca gttcccgcac aacgtcacgc tcacactgtc cctcggcaag 420
aagttcgaag tgacctacgt gagcctgcag ttctgctcgc cgcggcccga gtccatggcc 480
atctacaagt ccatggacta cgggcgcacg tgggtgcctt tccagtteta ctccacgcag 540
tgccgcaaga tgtacaaccg gccgcaccgc gcgcccata ccaagcagaa cgagcaggag 600
gccgtgtgca ccgactcgca caccgacatg cgcccgtctt cgggcggcct catcgccttc 660
agcacgctgg acgggcggcc ctcggcgcac gacttcgaca actcggcccgt gctgcaggac 720
tgggtcacgg ccacagacat ccgctggcc ttcagccgcc tgcacacggt cggcgacgag 780
aacgaggacg actcggagct ggcgcgcgac tcgtacttct acgcggtgtc cgacctgcag 840
gtgggcggcc ggtgcaagtg caacggccac gcggcccgtc gcgtgcgca ccgcgacgac 900
agcctggtgt gcgactgcag gcacaacacg gccggcccgg agtgcgaccg ctgcaagccc 960
ttccactacg accggccctg gcagegcgcc acagcccggg aagccaacga gtgcgtggcc 1020
tgtaactgca acctgcatgc ccggcgtgc cgttcaaca tggagctcta caagctttcg 1080
ggcgcaaga gcggaggtgt ctgctcaac tgcgccaca acaccgccgg ccgccactgc 1140
cattactgca aggagggcta ctaccgcgac atgggcaage ccateacca ccggaaggcc 1200
tgcaaagcct gtgattgcca cctgtgggt gctgctggca aaacctgca ccaaaccacc 1260
ggccagtgtc cctgcaagga cggcgtgacg ggtateacct gcaaccgctg cgccaaaggc 1320
taccagcaga gccgctctcc catcgcctc tgcataaaga tcctgtagc gccgccgacg 1380
actgcagcca gcagcgtgga ggagcctgaa gactgcgatt cctactgca ggctccaag 1440
gggaagctga agattaacat gaaaaagtac tgcaagaagg actatgccgt ccagatccac 1500
atcctgaagg cggacaaggc gggggactgg tggaagtcca cggatgaacat catctccgtg 1560
tataagcagg gcacgagccg catccgccgc ggtgaccaga gcctgtgat ccgctcgcgg 1620

```

gacatcgctt gcaagtgtcc caaaatcaag ccctcaaga agtacctgct gctgggcaac 1680
gcggaggact ctccggacca gageggcatt gtggccgata aaagcagcct ggtgatccag 1740
tggcgggaca cgtgggcgcg gcggctgcgc aagttccagc agcgtgagaa gaaggcaag 1800
tgcaagaagg cctag 1815

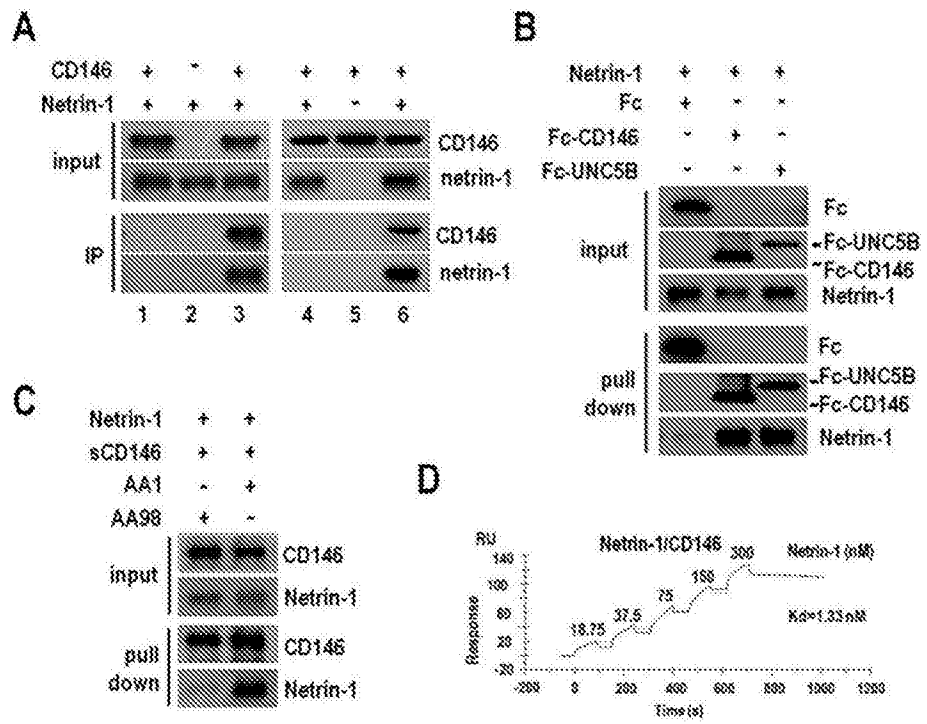


图1

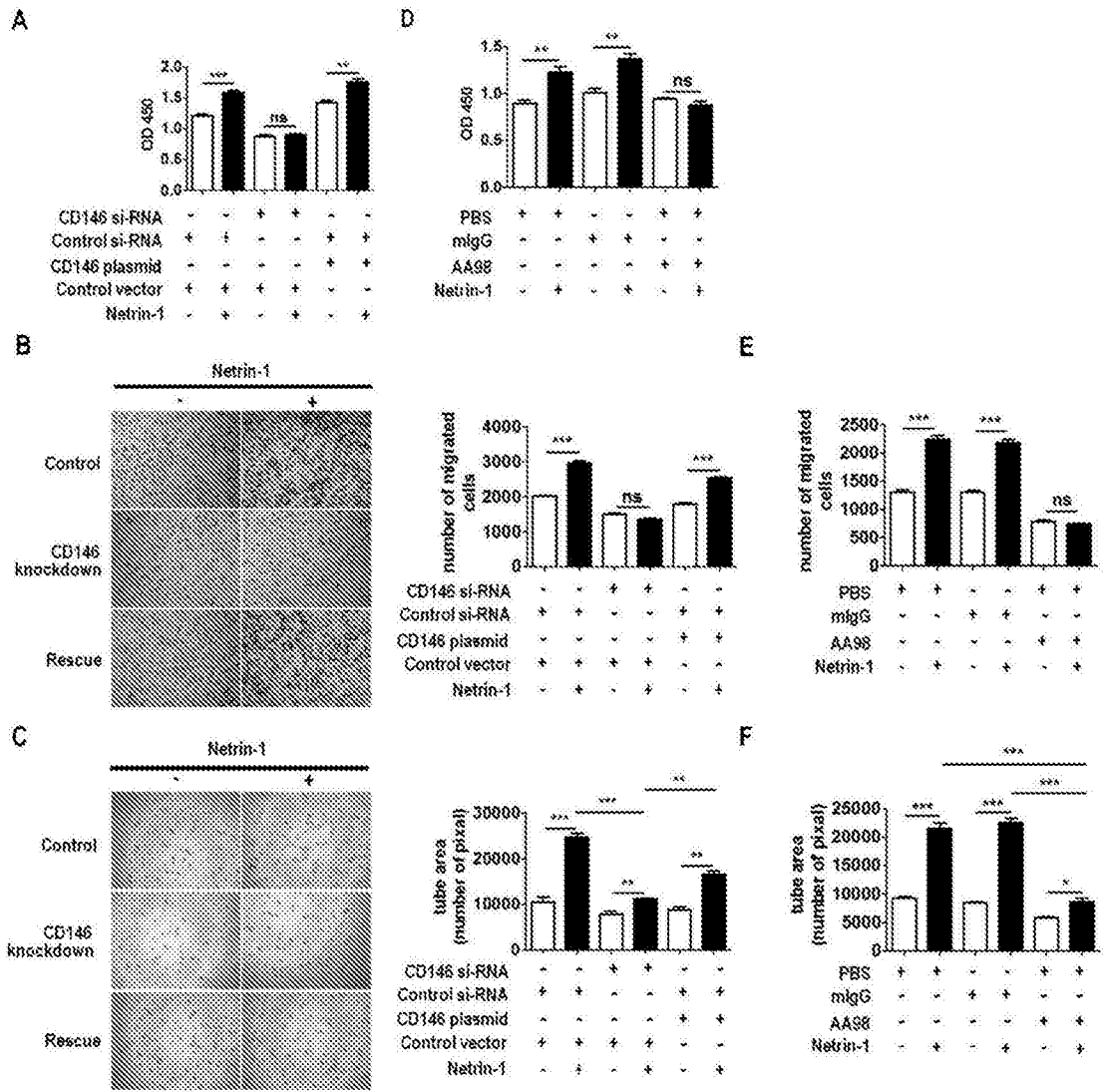


图2

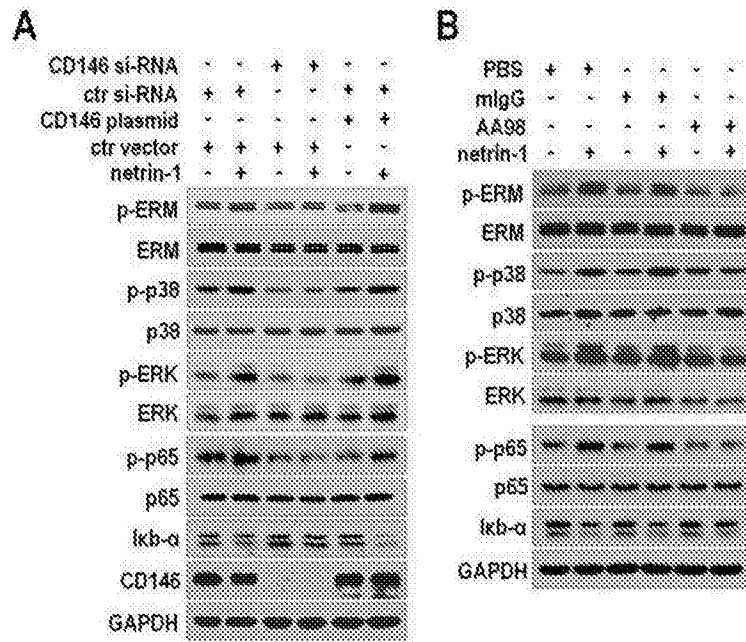


图3

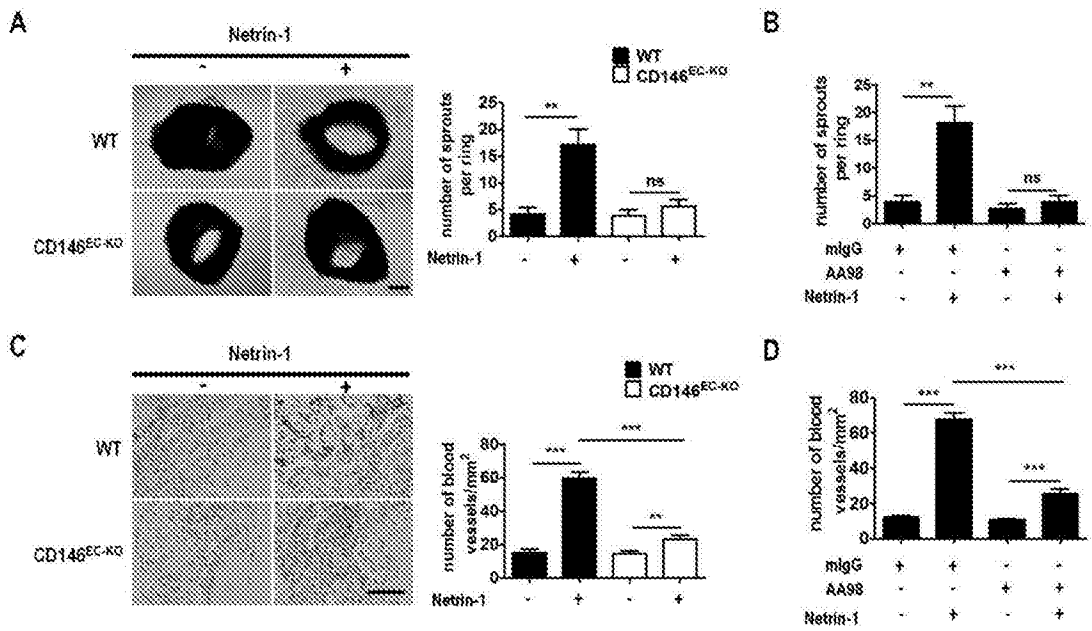


图4