

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



# [12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200710048067.2

[51] Int. Cl.

C07K 16/26 (2006.01)  
G01N 33/531 (2006.01)  
G01N 33/577 (2006.01)  
C12N 15/13 (2006.01)  
C12N 5/18 (2006.01)

[43] 公开日 2009年5月13日

[11] 公开号 CN 101429249A

[22] 申请日 2007.11.9

[21] 申请号 200710048067.2

[71] 申请人 复旦大学

地址 200433 上海市邯郸路 220 号

[72] 发明人 熊思东 于宁 徐薇

[74] 专利代理机构 上海世贸专利代理有限责任公司

代理人 严新德

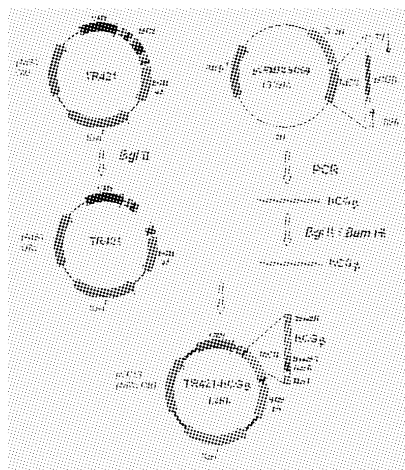
权利要求书 3 页 说明书 21 页 附图 11 页

## [54] 发明名称

抗人绒毛膜促性腺激素  $\beta$  亚基的单克隆抗体及其制备方法

## [57] 摘要

本发明公开了一种抗人绒毛膜促性腺激素  $\beta$  亚基的单克隆抗体、以及该单克隆抗体的制备方法，本发明通过以编码 hCG $\beta$  的真核表达质粒经肌肉免疫 BALB/c 小鼠，将分泌高效价抗 hCG $\beta$  抗体的小鼠脾细胞与小鼠 B 细胞淋巴瘤融合、经筛选、反复克隆化，获得能稳定分泌抗 hCG $\beta$  单克隆抗体的杂交瘤细胞株，通过该抗 hCG $\beta$  单克隆抗体的杂交瘤细胞株分泌抗 hCG $\beta$  的单克隆抗体。本发明公开的抗 hCG $\beta$  单克隆抗体可特异性结合 hCG $\beta$  蛋白以及肿瘤细胞表达的膜型 hCG $\beta$ ，可在体外和体内有效抑制肿瘤生长，可以直接诱导肿瘤细胞凋亡。



1. 一种抗人绒毛膜促性腺激素 $\beta$ 亚基的单克隆抗体, 其特征在于: 所述的单克隆抗体特异性结合人绒毛膜促性腺激素 $\beta$ 亚基蛋白、或者特异性结合表达人绒毛膜促性腺激素 $\beta$ 亚基蛋白的肿瘤细胞。
2. 如权利要求 1 所述的抗人绒毛膜促性腺激素 $\beta$ 亚基的单克隆抗体, 其特征在于: 所述的人绒毛膜促性腺激素 $\beta$ 亚基蛋白具有 SEQ ID NO: 1 所示的氨基酸序列。
3. 如权利要求 1 所述的抗人绒毛膜促性腺激素 $\beta$ 亚基的单克隆抗体, 其特征在于: 所述的人绒毛膜促性腺激素 $\beta$ 亚基蛋白具有 SEQ ID NO: 2 所示的 DNA 序列。
4. 如权利要求 1 所述的抗人绒毛膜促性腺激素 $\beta$ 亚基的单克隆抗体, 其特征在于: 所述的单克隆抗体的恒定区基因序列等同于所有 BALB/c 小鼠来源 IgG2a 抗体的相应序列, 与靶抗原特异结合的所述的抗体可变区具有 SEQ ID NO: 3 所示的氨基酸序列。
5. 如权利要求 1 所述的抗人绒毛膜促性腺激素 $\beta$ 亚基的单克隆抗体, 其特征在于: 所述的单克隆抗体的恒定区基因序列等同于所有 BALB/c 小鼠来源 IgG2a 抗体的相应序列, 与靶抗原特异结合的所述的抗体可变区具有 SEQ ID NO: 4 所示的 DNA 序列。
6. 如权利要求 5 所述的抗人绒毛膜促性腺激素 $\beta$ 亚基的单克隆抗体, 其特征在于: 与靶抗原特异结合的所述的可变区中的关键 CDR1 序列包括 SEQ ID NO: 5 所示的 DNA 序列。
7. 如权利要求 5 所述的抗人绒毛膜促性腺激素 $\beta$ 亚基的单克隆抗体, 其特征在于: 与靶抗原特异结合的所述的可变区中的关键 CDR2 序列包括 SEQ ID NO: 6 所示的 DNA 序列。
8. 如权利要求 5 所述的抗人绒毛膜促性腺激素 $\beta$ 亚基的单克隆抗体, 其特征在于: 与靶抗原特异结合的所述的可变区中的关键 CDR3 序列包括 SEQ

ID NO: 7 所示的 DNA 序列。

9. 如权利要求 1 所述的抗人绒毛膜促性腺激素 $\beta$ 亚基的单克隆抗体,其特征  
在于:所述的表达人绒毛膜促性腺激素 $\beta$ 亚基蛋白的肿瘤包括 HeLa 细  
胞、或者 HepG2 细胞、或者 HL-60 细胞、或者 7721 细胞、或者 K562  
细胞、或者 SKOV3 细胞、或者 PC-3 细胞。
10. 一种制备如权利要求 1 所述的的抗人绒毛膜促性腺激素 $\beta$ 亚基的单克隆  
抗体的制备方法,其特征  
在于:所述的制备方法中包括一个获得编码人  
绒毛膜促性腺激素 $\beta$ 亚基蛋白基因 DNA 的步骤,包括一个构建含有编码  
人绒毛膜促性腺激素 $\beta$ 亚基蛋白基因的质粒的步骤,包括一个利用表达质  
粒免疫小鼠的步骤,包括一个利用获得的分泌高效价抗 hCG $\beta$ 抗体的小  
鼠脾细胞与小鼠骨髓瘤细胞进行融合的步骤,包括一个反复筛选得到分  
泌抗人绒毛膜促性腺激素 $\beta$ 亚基的单克隆抗体的杂交瘤细胞株的步骤,包  
括一个利用获得的杂交瘤细胞株分泌抗人绒毛膜促性腺激素 $\beta$ 亚基的单  
克隆抗体的步骤。
11. 如权利要求 10 所述的抗人绒毛膜促性腺激素 $\beta$ 亚基的单克隆抗体的制  
备方法,其特征  
在于:所述的制备方法包括以下步骤:
  - (1) 获得编码 hCG $\beta$ 蛋白的基因 DNA;
  - (2) 通过酶切位点插入真核表达质粒载体中;
  - (3) 将表达质粒通过肌肉注射方式免疫;
  - (4) 免疫后以 ELISA 方法证实小鼠血清中诱导了高效价的抗 hCG $\beta$ 抗体  
后,分离得到小鼠脾细胞,与 B 淋巴细胞瘤进行融合,筛选永生化的分泌  
抗人绒毛膜促性腺激素 $\beta$ 亚基的单克隆抗体的融合杂交瘤细胞株;
  - (5) 利用获得的杂交瘤细胞株分泌的抗人绒毛膜促性腺激素 $\beta$ 亚基的单克  
隆抗体。
12. 如权利要求 11 所述的抗人绒毛膜促性腺激素 $\beta$ 亚基的单克隆抗体的制备  
方法,其特征  
在于:所述的小鼠为 BALB/c 小鼠。
13. 如权利要求 11 所述的一种抗人绒毛膜促性腺激素 $\beta$ 亚基的单克隆抗体的

- 制备方法，其特征在于：所述的真核表达质粒载体为 TR421、或者 pcDNA3、或者 pVAX。
14. 一种杂交瘤细胞株，其特征在于：采用如下步骤制备，包括一个获得编码人绒毛膜促性腺激素 $\beta$ 亚基蛋白基因 DNA 的步骤，包括一个构建含有编码人绒毛膜促性腺激素 $\beta$ 亚基蛋白基因的质粒的步骤，包括一个利用表达质粒免疫小鼠的步骤，包括一个利用获得的分泌高效价抗 hCG $\beta$ 抗体的小鼠脾细胞与小鼠骨髓瘤细胞进行融合的步骤，包括一个反复筛选得到分泌抗人绒毛膜促性腺激素 $\beta$ 亚基的单克隆抗体的杂交瘤细胞株的步骤。
15. 一种制备如权利要求 14 所述的杂交瘤细胞株的方法，其特征在于：包括以下步骤：
- (1) 获得编码 hCG $\beta$ 蛋白的基因 DNA；
  - (2) 通过酶切位点插入真核表达质粒载体中；
  - (3) 将表达质粒通过肌肉注射方式免疫；
  - (4) 免疫后以 ELISA 方法证实小鼠血清中诱导了高效价的抗 hCG $\beta$ 抗体后，分离得到小鼠脾细胞，与 B 淋巴细胞瘤进行融合，筛选永生化的分泌抗人绒毛膜促性腺激素 $\beta$ 亚基的单克隆抗体的融合杂交瘤细胞株。
16. 如权利要求 15 所述的杂交瘤细胞株的制备方法，其特征在于：所述的小鼠为 BALB/c 小鼠。
17. 如权利要求 15 所述的杂交瘤细胞株的制备方法，其特征在于：所述的真核表达质粒载体为 TR421、或者 pcDNA3、或者 pVAX。
18. 一种具有抗肿瘤功能的药物组合物，其特征在于：含有有效量的权利要求 1 所述的单克隆抗体、或者含有有效量的权利要求 14 所述的杂交瘤细胞株、或者含有有效量的权利要求 14 所述的杂交瘤细胞株和抗肿瘤药物的组合，以及药学上可接受的载体或赋形剂。
19. 一种检测试剂，其特征在于：含有有效量的抗人绒毛膜促性腺激素 $\beta$ 亚基的单克隆抗体。

## 抗人绒毛膜促性腺激素 $\beta$ 亚基的单克隆抗体及其制备方法

### 技术领域:

本发明涉及生物工程领域以及肿瘤免疫治疗领域，涉及一种单克隆抗体，特别是一种抗人绒毛膜促性腺激素 $\beta$ 亚基的单克隆抗体及其制备方法。

### 背景技术:

肿瘤生物治疗是继手术治疗、放射治疗和化学药物治疗之后新型的肿瘤治疗手段，其中，针对肿瘤抗原物质而研制的单克隆抗体(monoclonal antibody, mAb)是目前肿瘤生物治疗的热点之一。抗原抗体反应的特异性决定了针对肿瘤特异性靶抗原的 mAb 会优先与相应的肿瘤组织结合，而不识别正常的组织。单克隆抗体不仅可以通过 ADCC（抗体依赖的细胞介导的细胞毒作用）及 CDC（细胞依赖的细胞毒作用）等免疫效应机制发挥抗癌作用，还可以直接诱导肿瘤细胞凋亡；同时利用单克隆抗体识别肿瘤细胞的特异性，可通过将放疗化疗药物偶联到单克隆抗体上给药从而降低药物对正常组织的非特异损伤，减少治疗的副作用。单克隆抗体正是以其特异性和敏感性成为众所瞩目的肿瘤治疗的新方法。

人绒毛膜促性腺激素(human chorionic gonadotrophin, hCG)是由孕妇胚胎合体滋养层细胞分泌的糖蛋白激素，在维持早孕妇女的黄体功能和促进妊娠进行、防止母体排斥妊娠产物等方面具有重要的生理功能。hCG 与人黄体生成素（hLH）、卵泡刺激素（FSH）和促甲状腺激素（TSH）等同属糖蛋白激素家族。hCG 由 $\alpha$ 链和 $\beta$ 链组成，hCG 与 hLH、FSH 和 TSH 具有完全相同的 $\alpha$ 链，而具有独特的与功能相关的 $\beta$ 链。

自 Gailani 等报道非滋养层肿瘤细胞异位表达 hCG 以来，肿瘤细胞表

达的异位 hCG(ectopice hCG, ehCG)与肿瘤发生、发展的关系受到人们关注。许多不同类别和组织来源的肿瘤细胞都能不同程度地表达 ehCG。肿瘤细胞自分泌的 ehCG 具有生长因子活性,能促进和调控肿瘤细胞的增殖、分化和生长,使肿瘤细胞在其微环境中能自我生长;膜结合型 ehCG 使肿瘤细胞表面呈负电荷,推测可能与肿瘤的转移特性、免疫耐受等有一定的关系,因而, ehCG 可以作为 mAb 生物治疗的一种理想靶抗原。

由于 hCG 与其他性激素具有相同的 $\alpha$ 链,因此以 hCG 独特的 $\beta$ 链(hCG $\beta$ )作为靶抗原,制备抗 hCG $\beta$ 的 mAb,可以成为肿瘤免疫生物治疗的一种理想手段。

#### 发明内容:

本发明的目的在于提供一种抗人绒毛膜促性腺激素 $\beta$ 亚基的单克隆抗体及其制备方法,所述的这种抗人绒毛膜促性腺激素 $\beta$ 亚基的单克隆抗体及其制备方法要解决现有技术中的抗肿瘤药物治疗肿瘤效果不佳,副作用大的技术问题。

本发明提供了一种抗人绒毛膜促性腺激素 $\beta$ 亚基的单克隆抗体,所述单克隆抗体特异性结合人绒毛膜促性腺激素 $\beta$ 亚基蛋白、或者特异性结合表达人绒毛膜促性腺激素 $\beta$ 亚基蛋白的肿瘤细胞。

进一步的,所述的人绒毛膜促性腺激素 $\beta$ 亚基蛋白具有 SEQ ID NO: 1 所示的氨基酸序列。

进一步的,所述的人绒毛膜促性腺激素 $\beta$ 亚基蛋白具有 SEQ ID NO: 2 所示的 DNA 序列。

进一步的,所述的单克隆抗体的恒定区基因序列等同于所有 BALB/c 小鼠来源 IgG2a 抗体的相应序列,与靶抗原特异结合的所述的可变区(含关键 CDR 序列和附属骨架区序列)具有 SEQ ID NO: 3 所示的氨基酸序列。

进一步的,所述的单克隆抗体的恒定区基因序列等同于所有 BALB/c 小鼠来源 IgG2a 抗体的相应序列,与靶抗原特异结合的所述的可变区(含

关键 CDR 序列和附属骨架区序列) 具有 SEQ ID NO: 4 所示的 DNA 序列。

具体的, 与靶抗原特异结合的所述的可变区中的关键 CDR1 序列包括 SEQ ID NO: 5 所示的 DNA 序列(ACG GTT AGC TCA AGT GTA AGT TCC AGT TAC TTG)。

具体的, 与靶抗原特异结合的所述的可变区中的关键 CDR2 序列包括 SEQ ID NO: 6 所示的 DNA 序列(AGG ACT TCC AAC CTG GCT TCT)。

具体的, 与靶抗原特异结合的所述的可变区中的关键 CDR3 序列包括 SEQ ID NO: 7 所示的 DNA 序列(CAC CAG TAT CAT CGT TCC CCA CGG ACG)。

进一步的, 所述的表达人绒毛膜促性腺激素 $\beta$ 亚基蛋白的肿瘤包括但不限于 HeLa 细胞、或者 HepG2 细胞、或者 HL-60 细胞、或者 7721 细胞、或者 K562 细胞、或者 SKOV3 细胞、或者 PC-3 细胞。

本发明还提供了一种抗人绒毛膜促性腺激素 $\beta$ 亚基的单克隆抗体的制备方法, 包括一个获得编码人绒毛膜促性腺激素 $\beta$ 亚基蛋白基因 DNA 的步骤, 包括一个构建含有编码人绒毛膜促性腺激素 $\beta$ 亚基蛋白基因的质粒的步骤, 包括一个利用表达质粒免疫小鼠的步骤, 包括一个利用获得的分泌高效价抗 hCG $\beta$ 抗体的小鼠脾细胞与小鼠骨髓瘤细胞进行融合的步骤, 包括一个反复筛选得到分泌抗人绒毛膜促性腺激素 $\beta$ 亚基的单克隆抗体的杂交瘤细胞株的步骤, 包括一个利用获得的杂交瘤细胞株分泌抗人绒毛膜促性腺激素 $\beta$ 亚基的单克隆抗体的步骤。

具体的, 所述的一种抗人绒毛膜促性腺激素 $\beta$ 亚基的单克隆抗体的制备方法包括以下步骤:

- (1) 获得编码 hCG $\beta$ 蛋白的基因 DNA;
- (2) 通过酶切位点插入真核表达质粒载体中;
- (3) 将表达质粒通过肌肉注射方式免疫;
- (4) 免疫后以 ELISA 方法证实小鼠血清中诱导了高效价的抗 hCG $\beta$ 抗体后, 分离得到小鼠脾细胞, 与 B 淋巴细胞瘤按照常规方法进行融合, 筛选

永生化的分泌抗人绒毛膜促性腺激素 $\beta$ 亚基的单克隆抗体的融合杂交瘤细胞株；

(5) 利用获得的杂交瘤细胞株分泌的抗人绒毛膜促性腺激素 $\beta$ 亚基的单克隆抗体。

具体的，所述的小鼠为 BALB/c 小鼠。

具体的，所述的真核表达质粒载体为 TR421、或者 pcDNA3、或者 pVAX。

本发明还提供了一种杂交瘤细胞株，采用如下步骤制备，包括一个获得编码人绒毛膜促性腺激素 $\beta$ 亚基蛋白基因 DNA 的步骤，包括一个构建含有编码人绒毛膜促性腺激素 $\beta$ 亚基蛋白基因的质粒的步骤，包括一个利用表达质粒免疫小鼠的步骤，包括一个利用获得的分泌高效价抗 hCG $\beta$ 抗体的小鼠脾细胞与小鼠骨髓瘤细胞进行融合的步骤，包括一个反复筛选得到分泌抗人绒毛膜促性腺激素 $\beta$ 亚基的单克隆抗体的杂交瘤细胞株的步骤。

具体的，所述的一种杂交瘤细胞株的制备方法，包括以下步骤：

- (1) 获得编码 hCG $\beta$ 蛋白的基因 DNA；
- (2) 通过酶切位点插入真核表达质粒载体中；
- (3) 将表达质粒通过肌肉注射方式免疫；

(4) 免疫后以 ELISA 方法证实小鼠血清中诱导了高效价的抗 hCG $\beta$ 抗体后，分离得到小鼠脾细胞，与 B 淋巴细胞瘤按照常规方法进行融合，筛选永生化的分泌抗人绒毛膜促性腺激素 $\beta$ 亚基的单克隆抗体的融合杂交瘤细胞株。

具体的，所述的小鼠为 BALB/c 小鼠。

具体的，所述的真核表达质粒载体为 TR421、或者 pcDNA3、或者 pVAX。

本发明还提供了一种具有抗肿瘤功能的药物组合物，含有有效量的上述的单克隆抗体、或者含有有效量的上述的杂交瘤细胞株、或者含有有效量的上述的杂交瘤细胞株和抗肿瘤药物的组合，以及药学上可接受的载体

或赋形剂。

本发明还提供了一种检测试剂，含有有效量的抗人绒毛膜促性腺激素 $\beta$ 亚基的单克隆抗体。

本发明所述的抗人绒毛膜促性腺激素 $\beta$ 亚基的单克隆抗体可在体外发挥抗肿瘤效应，加入肿瘤细胞培养上清中时，可以剂量依赖性的方式抑制体外培养的肿瘤细胞（HeLa）的增殖。

进一步的，所述的抗人绒毛膜促性腺激素 $\beta$ 亚基的单克隆抗体可以在体内发挥抗肿瘤效应。将单克隆抗体注射成瘤小鼠（HeLa 细胞注射的裸鼠）后，可以抑制肿瘤的生长并且可延长荷瘤小鼠的存活时间。

本发明所述的抗人绒毛膜促性腺激素 $\beta$ 亚基的单克隆抗体可在体内、外发挥抗肿瘤效应的机制在于：单克隆抗体可以诱导肿瘤细胞凋亡，可以导致肿瘤细胞出现明显的细胞皱缩、细胞核固缩、DNA 片段化等。

本发明人通过长期广泛的研究发现：虽然抗 hCG $\beta$ 单克隆抗体也可以通过常规的以 hCG $\beta$ 蛋白免疫的方法获得，但是所获得的单克隆抗体不一定具有较强的抗肿瘤活性，此外，蛋白免疫的代价相对基因免疫非常昂贵。更为重要的是，如需对 hCG $\beta$ 进行某种程度的必要的改造或修饰，则基因疫苗可在基因水平上快速简便地进行操作；而在 hCG $\beta$ 蛋白水平上操作难度大、费用昂贵。因此通过基因疫苗形式来构建表达 hCG $\beta$ 蛋白，并诱导 hCG $\beta$ 蛋白特异性抗体从而制备单克隆抗体技术，是行之有效而简便易行的新技术。

本发明中，所述的表达 hCG $\beta$ 的真核表达质粒的载体，包括任何可以转染哺乳动物细胞的高效真核表达质粒载体，包括但不限于：pcDNA3、pVAX 和 TR421 等以及常见和市售的真核质粒载体。

本发明中，hCG $\beta$ 蛋白编码基因的获得，可以通过多种方式获得，包括但不限于：1)化学合成 DNA；2)通过适当引物以 PCR 技术扩增得到 DNA。

本发明中，将编码 hCG $\beta$ 的基因疫苗注射小鼠的方法采用肌肉注射方式，以本领域技术人员熟知的常规技术进行：以注射器吸取<100 $\mu$ l 质粒液

体直接注射小鼠胫骨前肌肉，可仅注射小鼠一条腿，也可分别取 50 $\mu$ l 质粒注射于小鼠两条腿。除注射器外，也可选用其他有效的借助于市售仪器的基因免疫的方式，包括但不限于：基因枪技术、电穿孔辅助技术等。

本发明中，所述的含有抗 hCG $\beta$ 单克隆抗体 YN2 的药物复合物中有效成分的存在形式，包括但不限于以下几类：1) 抗 hCG $\beta$ 单克隆抗体 YN2 蛋白；2) 抗 hCG $\beta$ 单克隆抗体 YN2 蛋白与其他抗肿瘤药物或分子的组合。在给药时，可直接给予 1) 或 2) 所述的有效成分，以及药学上可接受的载体。

本发明中，“药学上可接受的”成分是适用于人和动物而无过度不良反应（如毒性、刺激、变态反应）、有合理效益/风险比的物质。

本发明中，“药学上可接受的载体”成分是由于将具有活性的有效成分传送给人或动物的药学上可接受的溶剂、悬浮剂和赋形剂。所述的载体可以是液体、固体或半固体。载体包括但不限于：水、PBS 缓冲液、生理盐水、葡萄糖、甘油、叠氮钠及其组合。

本发明的药物组合物，含有上述有效成分和药学上可接受的载体。通常将其配制于无毒、中性、惰性和药学上可接受的水性载体介质中，pH 值通常约 6—8，但根据具体肿瘤情况以及有效成分性质可有所改变。

本发明通过以编码 hCG $\beta$ 的真核表达质粒进行基因免疫的方式，最后筛选获得了具有较强抗肿瘤活性的单克隆抗体，可通过特异性结合 hCG $\beta$ 蛋白而与膜表达 hCG $\beta$ 蛋白的肿瘤细胞发生结合，进而诱导肿瘤细胞发生凋亡，因此可有效发挥体外、更重要的是体内的抗肿瘤效应。该抗 hCG $\beta$ 单克隆抗体在空间有效结合了 hCG $\beta$ 蛋白的功能部位，从而使肿瘤细胞的生长、转移特性被有效抑制。含有上述单克隆抗体的药物组合物能应用于肿瘤的免疫生物治疗。含有该单克隆抗体的检测试剂，可用于体内示踪技术、ELISA 检测方法中的抗体以及肿瘤原位组织切片检测中的抗体。

本发明与现有技术相对比，其效果是积极和明显的。本发明所制备的抗 hCG $\beta$ 单克隆抗体，经由基因免疫手段制备，具有有效的抗肿瘤效应。在

肿瘤免疫生物治疗、肿瘤定性定量免疫检测、肿瘤示踪定位等方面具有广阔的应用前景。同时本发明不采用常规的蛋白免疫方式制备抗 hCG $\beta$  单克隆抗体，而是利用基因免疫手段免疫小鼠制备抗 hCG $\beta$  单克隆抗体，能够得到高效价抗体，为更加有效的利用本发明的单克隆抗体治疗肿瘤提供了坚实的基础。

附图说明：

图 1 显示了真核表达质粒 TR421-hCG $\beta$  的构建示意图；其中基因经 PCR 扩增获得，TR421 购自 invitrogen，分别经 BglII 和 BamHI 酶切，再连接，得到 TR421-hCG $\beta$  质粒。

图 2 显示了真核表达质粒 TR421-hCG $\beta$  的鉴定结果；A 图：PCR 鉴定，利用不同引物可得到 495、625bp 条带，表明基因插入且方向正确；B 图显示 BglII/BamHI 酶切得到 503bp 条带；C 图显示 DNA 测序证实构建无误。

图 3 显示了 TR421-hCG $\beta$  质粒经肌肉注射 BALB/c 小鼠诱导的血清抗 hCG $\beta$  抗体效价；H1、H2 和 H3 为小鼠编号；Normal 为未免疫小鼠对照。结果显示三次基因免疫诱导了高强度的抗 hCG $\beta$  抗体，效价高于  $10^5$ 。

图 4 显示了获得的 9 株抗 hCG $\beta$  单抗对 HeLa 肿瘤细胞的抑制效率，其中 YN2 单抗抑制肿瘤效果最好。

图 5 显示了单克隆抗体 YN2 经腹水纯化后的特性，图 A：YN2 经腹水扩增后经 Protein G 亲和层析柱纯化，SDS-PAGE 鉴定纯度达到 90% 以上；1: Marker; 2: 未纯化腹水；3: 纯化 YN2 单克隆抗体(变性)；4: 纯化 YN2(非变性)；图 B: Western Blot 证实 YN2 可与纯的 hCG $\beta$  蛋白发生特异性结合；图 C: YN2 杂交瘤染色体核型分析表明染色体数目 90 条以上。

图 6 显示了 YN2 单克隆抗体与不同肿瘤细胞上表达的 hCG $\beta$  结合图，结果提示：YN2 单克隆抗体可与多种不同肿瘤细胞表达的 hCG $\beta$  特异结合。

图 7 显示了 YN2 单克隆抗体的体外抗肿瘤作用，将 YN2 加入培养细胞上清，可有效抑制 HeLa 细胞增值，YN2 浓度  $>60\mu\text{g/ml}$  时，抑瘤效率达 40

%, YN2 浓度为 100 $\mu$ g/ml 时, 抑瘤效率达 58%。

图 8 显示了 YN2 单克隆抗体的体内抗肿瘤作用, 对荷 HeLa 肿瘤裸鼠腹腔注射 YN2 抗体 500 $\mu$ g/只/次, 每星期 3 次, 其图 A 显示 YN2 对肿瘤生长的抑制, 荷瘤 28 天, YN2 组肿瘤体积为与对照相比缩小一半以上 ( $p<0.01$ ), 图 B 显示了荷瘤小鼠生存率: YN2 处理组的小鼠平均生存期为 77 天, 而对照小鼠仅为 30-37 天, 证明 YN2 可有效延长荷瘤动物存活。

图 9 显示了 YN2 单克隆抗体诱导 HeLa 细胞核凋亡, YN2 处理后, Hoechst 33258 染色发现细胞核固缩并出现核碎裂、分离, 证实细胞凋亡。

图 10 显示了 YN2 单克隆抗体诱导 HeLa 细胞染色体降解, YN2 处理后的细胞的染色体 DNA 发生了典型的 100bp 片段化, 证实发生细胞凋亡。

具体实施方式:

以下所述本发明的具体实施例用于描述本发明的使用和用途, 而不是限制本发明。

实施例中所采用的质粒载体可通过购买获得, SP2/0 细胞等可通过中国科学院上海细胞所购买; 常见生化试剂购自 Sigma 公司、限制性内切酶购自 Takara 公司; 细胞培养试剂购买自 Gibco BRL 和 Invitrogen 公司, 基因 DNA 合成委托上海生工公司; hCG $\beta$ 蛋白购买自上海麦莎生物科技有限公司, Annexin V 和 PI 购自 BD 公司。6-8 周龄雌性 BALB/c(H-2<sup>d</sup>)小鼠购自复旦大学实验动物中心, 清洁级饲养。动物饲养及操作符合国家相关规定。

**实施例 1 基因疫苗 TR421-hCG $\beta$ 真核质粒的构建、鉴定及其大量纯化**

### 1. PCR 法获得 ehCG $\beta$ -hCG $\beta$ 编码基因

引物序列 hCG $\beta$ -P1: 5'-GGAAGATCTATGGAGATGTTCCAGG-3' (SEQ ID NO:8)、和引物序列 hCG $\beta$ -P2: 5'-CGGGATCCTTGTGGGAGGATCGGGGT-3' (SEQ ID NO:9) 由上海

生工公司合成；Taq DNA 多聚酶、dNTP 等 PCR 试剂购自 Biostar 公司；胶回收试剂盒购自上海华舜生物公司。以 pGEM3Z-hCG $\beta$ 质粒（美国东卡罗来纳大学 Ross TM 教授馈赠）为模板、hCG $\beta$ -P1 和 hCG $\beta$ -P2 为上下游引物进行 PCR(美国 Perkin Elmer 公司 PE2400 型 PCR 仪)，PCR 反应条件：总体积 50 $\mu$ l，依次加入 10X 缓冲液 5 $\mu$ l、25mM MgCl<sub>2</sub>3 $\mu$ l、10mM dNTP 1 $\mu$ l、10mM 正反向引物各 1 $\mu$ l、Taq 酶 1U、模板 1 $\mu$ l，三蒸水至 50 $\mu$ l。反应程序为：94 $^{\circ}$ C 预变性 5 分钟，进入 PCR 循环：94 $^{\circ}$ C 变性 45 秒、58 $^{\circ}$ C 复性 45 秒、72 $^{\circ}$ C 延长 1 分钟，重复 30 个循环，最后延长 10 分钟。以 1%琼脂糖凝胶电泳回收 hCG $\beta$ 基因(503bp)。

## 2. TR421-hCG $\beta$ 重组质粒的构建与鉴定

TR421-hCG $\beta$ 重组质粒构建如图 1 所示。具体步骤如下：

### A. 基因片段和载体的酶切与回收

以 *Bam*HI 和 *Bg*II (TaKaRa) 对 hCG $\beta$ 基因的 PCR 回收产物进行双酶切，以 *Bg*II 对 TR421 质粒 (invitrogen) 进行单酶切，方法如下：1 $\mu$ g 的质粒 DNA 或 PCR 回收产物，2U 相应内切酶、2 $\mu$ l 缓冲液，加双蒸水至 20 $\mu$ l，37 $^{\circ}$ C 反应 6 小时，65 $^{\circ}$ C 终止反应，以 1%琼脂糖凝胶电泳回收酶切产物。

### B. 酶切载体与酶切基因片段的连接

取适量酶切载体和目的片段加入反应管，使载体和片段的摩尔数之比为 1:3，然后加 1 $\mu$ l T4 DNA 连接酶 (MBI 公司)、1 $\mu$ l 缓冲液，补双蒸水至 10 $\mu$ l，混合后置 16 $^{\circ}$ C 反应 4 $^{\circ}$ C 过夜。

### C. 连接产物转化宿主细菌

取 5 $\mu$ l 连接产物 DNA，加 200 $\mu$ l DH5 $\alpha$ 感受态，冰浴 30 分钟，42 $^{\circ}$ C 热休克 90 秒，冰浴 5 分钟，加入 800 $\mu$ l LB，37 $^{\circ}$ C 120rpm 振荡培养 45 分钟，3000rpm 离心 3 分钟，弃上清，留约 100 $\mu$ l 液体悬浮菌体，涂布卡那青霉素 (60 $\mu$ g/ml) 平板上，37 $^{\circ}$ C 培养 16 小时。

### D. 阳性克隆的筛选鉴定

菌落 PCR: 采用 TR421 载体上、下游引物 T7U: 5'- TTAAT ACGAC TCACT ATAG-3' (SEQ ID NO:10) 和 T7D: 5'- TAGAA GGCAC AGTCG AGGCT GAT -3 (SEQ ID NO:11)。将 PCR 所有试剂按比例混和, 用无菌牙签挑取菌落涂于管底, PCR 反应条件同上, 预变性时间延长至 15 分钟。以 ehCG $\beta$ -P1/ehCG $\beta$ -P2 为正反向引物进行 PCR 鉴定 hCG $\beta$  基因是否插入载体; 以 T7U/ ehCG $\beta$ -P2 或 hCG $\beta$ -P1/T7D 为正反向引物鉴定插入方向。

酶切鉴定: 小量抽提菌落质粒 DNA, 以 *Bam*HI 和 *Bgl*II 进行双酶切, 进行 1%琼脂糖凝胶电泳观察能否切下 503bp 左右的产物。

DNA 测序检测: 委托上海申友生物公司采用 ABI PRISMTM377 DNA Sequencer 测序仪完成。

按上述步骤将 hCG $\beta$  编码基因克隆于 TR421 质粒, 获得 TR421- hCG $\beta$  重组质粒。PCR、酶切法、DNA 测序证实 hCG $\beta$  基因插入方向正确, 读码框架准确 (图 2)。

### 3. TR421-hCG $\beta$ 重组质粒的大量纯化

按照 QIAGEN Plasmid Mega Kit 质粒 DNA 纯化试剂盒 (基因公司) 说明操作, 以 PBS 溶解 DNA。以紫外分光光度计测定 DNA 溶液的 OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub> 比值, 接近 1.9 时认为达到纯度, 以 OD<sub>260</sub>=0.1 时 DNA 的含量为 50 $\mu$ g/ml 计算 DNA 的浓度, 将质粒 DNA 调整为 1 $\mu$ g/ $\mu$ l, -20 $^{\circ}$ C 冻存。

#### 实施例 2 TR421-hCG $\beta$ 基因免疫小鼠

质粒 DNA 免疫前 24 小时, 用 0.75% 戊巴比妥钠 120-180 $\mu$ l 腹腔注射麻醉小鼠 (50 $\mu$ g/g 体重), 消毒腿部皮毛, 在胫骨前肌肉中注射 100 $\mu$ l 0.25% 丁哌卡因 (Sigma 公司), 促进局部肌肉坏死再生。24 小时后麻醉小鼠在同一部位注射质粒 DNA (100 $\mu$ g/100 $\mu$ l)-PBS 溶液, 于第 14、第 28 天按同样方法经肌肉免疫小鼠, 眼眶后眦静脉采血, 血清于 -20 $^{\circ}$ C 冻存。第 42 天经小鼠尾静脉注射 hCG $\beta$  纯蛋白 20 $\mu$ g, 5 天后处死小鼠取脾脏用于细胞融合。

### 实施例 3 TR421-hCG $\beta$ 基因免疫诱导特异性血清抗体

三次基因免疫后在小鼠血清诱导的抗 hCG $\beta$  抗体采用常规, ELISA 方法检测: 以 10ug/ml hCG $\beta$ 蛋白溶解于包被液中 (0.1M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, pH9.6、0.1%BSA) 4℃包被 96 孔酶标板; 以 5% milk-PBS 封闭; 依次加 1: 100 稀释血清、HRP-羊抗小鼠 IgG、OPD, 显色中止, 测 OD<sub>490nm</sub>。

结果如图 3 所示, 三次基因免疫后在小鼠诱导了高滴度的血清抗 hCG $\beta$  IgG 抗体, 抗体效价高于 10<sup>5</sup>。加强免疫后抗体的水平持续增高, 各免疫小鼠的抗体上升水平趋向一致, 提示 TR421-hCG $\beta$ 基因免疫小鼠可诱生高效价的特异性抗体。

### 实施例 4 抗 hCG $\beta$ 单克隆抗体的制备:

#### 1. 细胞融合:

1) 饲养细胞的制备: 取未免疫过的小鼠摘眼球放血, 置于 EP 管中, 留取血清作阴性对照。脱颈推处死小鼠, 超净台内剪开小鼠腹腔, 吸取少许无血清 1640 培养基注入小鼠腹腔内, 吹打 2-3 次, 吸出腹腔内细胞悬液 (主要为巨噬细胞), 1500rpm 离心 5 分钟, 弃上清加入 HAT 培养基, 制成饲养细胞悬液置 CO<sub>2</sub> 培养箱中培养, 次日供细胞融合用。

2) SP2/0 淋巴瘤细胞的准备: 融合前两周用 8-氮杂鸟嘌呤(8-AG)对 SP2/0 细胞作选择培养。融合当天收集处于指数生长期的、活率大于 95%的 SP2/0 细胞, 用无血清 RPMI-1640 洗细胞一次, 取 5×10<sup>7</sup> SP2/0 细胞备用。

3) 小鼠脾细胞制备: 选取血清抗体效价最高小鼠, 脱颈处死, 无菌取脾, 用 200 目尼龙指套制成单细胞悬液, 无血清 1640 悬浮, 取 2×10<sup>8</sup> 细胞备用。

4) 细胞融合: 采用常规方法进行细胞融合: 将小鼠脾细胞和 SP2/0 按 4:1~5:1 的比例混合, 无血清 1640 洗涤 2~3 次, 离心弃上清; 轻弹使沉淀细胞疏松, 37℃下将预热的 1ml 50% PEG 于 1 分钟内逐滴加入细胞沉淀中, 边加边缓慢均匀地旋转离心管, 使液滴沿管壁加入, 静置融合 90 秒, 然后

于 2 分钟内加完 1ml 无血清 1640, 再于 1 分钟内加完 1ml 无血清 1640, 再于 30 秒钟内加 1ml 无血清 1640, 逐滴加入无血清 1640 30-40ml, 低速离心 5 分钟, 弃上清, 沉淀细胞用含 20%小牛血清 HAT 培养液重悬, 滴加于预先铺有饲养细胞的 96 孔培养板中, 每孔 100 $\mu$ l。置 37 $^{\circ}$ C, 5% CO<sub>2</sub> 孵箱培养。融合后的细胞在 HAT 培养基中培养 14 天后换用 HT 培养基, 再过两周后逐步换成含 20%胎牛血-RPMI1640 完全培养液。

## 2. 阳性杂交瘤细胞筛选:

待杂交瘤细胞长至孔底 1/3 面积时, 取培养上清液, 用 ELISA 法进行阳性克隆检测。标本 OD 值大于阴性对照值 2.1 倍判为阳性。记录好阳性培养孔, 1-2 日后对阳性孔进行复测, 保留阳性孔, 及时进行亚克隆。

## 3. 杂交瘤细胞克隆化培养:

克隆前一天按照前述方法制备  $1 \times 10^5$ /ml 小鼠腹腔巨噬细胞, 每孔加入 100 $\mu$ l。挑取阳性孔的细胞计数并以有限稀释法克隆: 取 50 个活细胞悬浮于 10ml 培养液中(5 /ml), 按每孔 100 $\mu$ l 接种于 96 孔板中, 置 37 $^{\circ}$ C, 5 %CO<sub>2</sub> 孵箱中培养, 于第五天补加一次培养液, 之后每三天换液一次。待克隆长大后再次行抗体检测, 连续进行克隆化直至所检测的克隆阳性率达 100%, 挑取阳性反应最强克隆扩大培养并冻存。

## 4. 阳性杂交瘤细胞的扩大培养及冷冻保存:

将阳性单克隆杂交瘤细胞依次转入 24 孔、6 孔培养板, 与完全 1640 培养液中扩大培养; 待细胞长满孔底时, 取出 1500rpm 离心 10 分钟, 弃上清; 用冻存液稀释(含 10%DMSO 的完全培养液), 分装至冻存管中(1ml/管); 4 $^{\circ}$ C 放置 30 分钟; -20 $^{\circ}$ C 放置 2 个小时; -70 $^{\circ}$ C 放置 1 小时; 转至液氮中冻存, 第一、二、三代筛选的克隆分别按上述方法冻存于液氮中。

结果显示: 在 8 块 96 孔板中, 共有 340 孔可见明显杂交瘤细胞生长, 融合率为 45%。对已融合的杂交瘤细胞用 ELISA 检测其抗 hCG $\beta$  抗体分泌, 对阳性孔进行有限稀释法克隆和上清筛选, 经过三次亚克隆, 共获得 9 株分泌特异性抗 hCG $\beta$  单抗的杂交瘤细胞。将杂交瘤细胞经体外连续传代培

养，液氮冻存半年后复苏，仍生长良好，持续稳定分泌抗体。

通过检测 9 株杂交瘤细胞的培养上清对 HeLa 细胞增殖的影响，如图 4 显示：YN2 杂交瘤细胞培养上清与 HeLa 细胞共孵育 48 小时后，抗体处理组活细胞数占未处理组细胞数的  $81.67 \pm 7.63\%$ ，提示 YN2 能够抑制体外培养的 HeLa 细胞的增殖。

### 实施例 5 YN2 单克隆抗体的制备和纯化

采用小鼠腹水法制备高效价高纯度的 YN2 单克隆抗体，取 8-10 周龄的雌性 BALB/c 小鼠，腹腔注入液体石蜡 0.5ml/只，一周后腹腔注射杂交瘤细胞  $1 \times 10^6$ /只，同时另一侧腹腔再次注入液体石蜡和 IFA 的，一般在 7-10 天后收获腹水，腹水产生阳性率为 80%，收获量平均 5ml/只，腹水抗体效价达  $1: 10^6$ 。离心取腹水上清按 50%饱和度加入等体积的饱和  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  溶液，混匀后置  $40^\circ\text{C}$  4-6 小时，离心弃上清。取沉淀加 0.01mol/L PBS(PH7.4) 复溶。透析去除  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ，按照 Pharmacia 公司提供的 Protein G 亲和层析进行单抗纯化，步骤如下：柱子再生与平衡：先用 5CV 甘氨酸-盐酸 (20mmol/L, pH 2.7) 再生层析柱，再用 5CV 平衡缓冲的磷酸盐缓冲液 (PB 20mmol/l, pH7.0) 平衡层析柱，流速 1.0ml/min；上样：将预处理好的腹水上样，流速 1.0ml/min；再平衡：用平衡缓冲液冲洗层析柱，使其在 280nm 处紫外吸收接近基线，流速 1.0ml/min；洗脱：用甘氨酸-盐酸 (20mmol/L, pH 2.7) 洗脱液洗脱，流速 1.0ml/min，接收蛋白洗脱峰，立即用 1mol/L Tris-HCl (pH9.0) 调节至中性。PBS (PH 7.0) 透析后用紫外分光光度计测定抗体蛋白的含量，其浓度的计算公式为：抗体蛋白含量 (mg/ml) =  $\text{OD}_{280} \times 1.55 - \text{OD}_{260} \times 0.76$ 。用 SDS-PAGE 鉴定单克隆抗体纯度：分离胶浓度 10%，浓缩胶浓度 5%，分别在还原状态和非还原状态下处理样品，上样量 15ml，电泳采用恒压方式，浓缩胶 150V，分离胶 120V。电泳后以考马斯亮蓝 R250 染色，然后经凝胶成像仪扫描鉴定纯度，结果显示：腹水经 Protein G 亲和层析柱纯化，用 SDS-PAGE 电泳鉴定纯度达到 90% 以上 (图 5A)。Western Blot 检测证实：

该单抗 YN2 可与纯的 hCG $\beta$ 蛋白发生特异性结合 (图 5B)。此外, YN2 杂交瘤细胞染色体分析表明: 染色体数目 90 条以上 (图 5C)。

#### 实施例 6 流式细胞术证实 YN2 可与肿瘤细胞表面 hCG $\beta$ 有效结合:

收获对数生长期的 SP2/0 细胞、HeLa 细胞、HepG2 细胞、HL-60 细胞、7721 细胞、K562 细胞、SKOV3 细胞、PC-3 细胞, ECV-304 细胞, PBS 洗 3 次, 弃上清, 使每管细胞总数为  $5 \times 10^5$ , 加入 100 $\mu$ l 杂交瘤培养上清, 轻混细胞置 4 $^{\circ}$ C 冰箱 30min, PBS 洗 1 次, 加 50 $\mu$ l FITC 标记羊抗小鼠 IgG 多抗置 4 $^{\circ}$ C 冰箱 0.5 h, PBS 洗 3 次, 用流式细胞检测仪检测,

结果如图 6A、图 6B、图 6C、图 6D、图 6E、图 6F、图 6G、图 6H、图 6I 所示: YN2 可与多种不同肿瘤细胞表面 hCG $\beta$ 有效结合。

#### 实施例 7 YN2 单克隆抗体发挥体内外抗肿瘤作用:

##### 1. YN2 可在体外有效抑制肿瘤细胞增殖活性:

获取对数生长期的天然高表达 hCG $\beta$ 的人 HeLa 细胞, 按  $1 \times 10^4/100\mu$ l/孔加入 96 孔细胞板, 加入 100 $\mu$ l 单克隆抗体溶液, 置 37 $^{\circ}$ C、CO $_2$  条件培养 44h, 观察肿瘤细胞形态变化, 然后每孔加入 CCK-8 溶液继续培养 2h 后, 在 450nm 测定吸光度, 以单纯加入培养液的对照孔 OD 值为 100%, 根据处理组细胞培养孔的 OD 值, 计算 YN2 抗体孵育后细胞的相对增殖活性。

结果如图 7 证实, YN2 与 HeLa 细胞共孵育后显示明显的细胞毒作用, 并且呈剂量依赖性, 当 YN2 达 100  $\mu$ g/ml 时, HeLa 细胞生长抑制率达 58%。

##### 2. YN2 可在体内有效抑制肿瘤在荷瘤裸鼠体内的生长:

收集 HeLa 细胞, 按  $5 \times 10^6/100\mu$ l 注射于裸鼠肩胛部皮下, 定期观察肿瘤大小和生存率。每周用游标卡尺测量肿瘤的长径和短径, 计算肿瘤的体积。肿瘤的体积以如下公式计算:  $1/2 \times l \times w^2$ , 其中 l 是肿瘤的长径(mm), w 代表肿瘤与长径垂直的短径(mm)。在接种后第 3 天, 将成瘤裸鼠随机分

组，8只/组，共三组，分别为PBS处理组、抗HBV M蛋白（无关）单克隆抗体(同型对照)组和YN2单克隆抗体处理组，腹腔注射抗体500 $\mu$ g/只/次，每星期3次，进行抗体干预。记录小鼠的生存率。

结果如图8显示：通过YN2抗体对裸鼠HeLa肿瘤的干预，荷瘤后第28天，YN2处理组肿瘤平均体积为1.76 $\text{cm}^3$ ，与对照抗体组3.41 $\text{cm}^3$ 、PBS组3.63 $\text{cm}^3$ 相比，显著减小（ $p < 0.01$ ）。荷瘤小鼠生存周期表明：PBS、对照抗体处理小鼠的平均生存期分别为30和37天，而YN2处理组的小鼠直至第48天，仍有100%的存活率，小鼠平均生存期为77天。证明YN2单克隆抗体可以抑制体内HeLa肿瘤细胞的生长，有效延长荷瘤动物存活。

### 实施例8 YN2单克隆抗体可诱导肿瘤细胞凋亡：

#### 1. Hoechst 33258染色检测细胞核崩解：

在6孔板内铺清洁无菌盖玻片，将处于对数生长期肿瘤细胞消化后均匀铺在板内，24小时后，细胞在玻片上生长至80%后，加入6H1单克隆抗体及对照抗体作用24-48小时，细胞出现明显凋亡迹象后，弃去培养液，加入PBS洗涤，以3.7%多聚甲醛1ml固定细胞爬片30min，PBS洗涤一次，滴加100 $\mu$ l Hoechst 33258染液，37 $^{\circ}\text{C}$ 孵箱染色5min，荧光显微镜下观察。

结果如图9所示：YN2单克隆抗体处理后，Hoechst 33258染色从形态学上提示：细胞核出现固缩，细胞核亮度增加，并出现核碎裂、分离，证实YN2单克隆抗体可以诱导HeLa细胞凋亡。

#### 2. DNA片段化检测：

收集经不同浓度抗体作用的HeLa细胞( $5 \times 10^6$ )，以PBS洗1次，抽取细胞总DNA：加含蛋白酶K和RNase的细胞裂解液500 $\mu$ l，混匀后于50 $^{\circ}\text{C}$ 水浴5h；加0.5ml酚：氯仿：异戊醇抽提；离心后上清移至另一离心管，加0.5ml氯仿：异戊醇抽提；离心后上清移至另一离心管，加10 $\mu$ l的3 mol/L乙酸钠和1ml预冷无水乙醇，混匀后置液氮5min，沉淀DNA，离心去上清，经70%乙醇洗涤后置室温干燥10min，加30TE缓冲液溶解DNA。以1.5%琼脂糖凝

胶电泳，电泳后用EB染色。以凝胶图像分析仪拍摄照片。

结果如图10，与正常对照组细胞基因组DNA相比，YN2单克隆抗体处理后的细胞的染色体DNA发生了典型的100bp为基础的片段化现象，证实发生了细胞凋亡。

### 3. 流式细胞仪测定细胞凋亡：

采用Annexin V-FITC / PI双色标记法，HeLa细胞以不同浓度抗体作用，调为 $10^6$  /ml。PBS洗涤2次，弃上清，细胞重悬于100 $\mu$ l的标记缓冲液中，每管分别加入AnnexinV-FITC溶液和PI溶液，混匀后于室温下避光孵育15 min。最后补PBS 400 $\mu$ l，以流式细胞仪检测细胞凋亡。每个样品检测1万个细胞，用cellquest软件进行细胞凋亡分析。

对YN2处理的HeLa细胞进行Annexin V/PI双染，FACS检测结果显示：YN2作用48小时后，发生早期凋亡 (Annexin V +/PI -)的HeLa 细胞占12.16%，发生晚期凋亡 (Annexin V +/PI +)的占 6.95%，显著多于对照组 (0.80%，0.71%)，坏死细胞(Annexin V -/PI +)也较对照组有部分增加。说明YN2通过引起肿瘤细胞凋亡介导其抗肿瘤作用。

## 序列表

- <110> 复旦大学  
 <120> 抗人绒毛膜促性腺激素β亚基的单克隆抗体及其制备方法  
 <160> 11  
 <170> PatentIn version 3.1

- <210> 1  
 <211> 165  
 <212> PRT  
 <213> 人hCGβ蛋白  
 <400> 1

```

Met Glu Met Phe Gln Gly Leu Leu Leu Leu Leu Leu Leu Ser Met Gly
1           5           10           15
Gly Thr Trp Ala Ser Lys Glu Pro Leu Arg Pro Arg Cys Arg Pro Ile
           20           25           30
Asn Ala Thr Leu Ala Val Glu Lys Glu Gly Cys Pro Val Cys Ile Thr
           35           40           45
Val Asn Thr Thr Ile Cys Ala Gly Tyr Cys Pro Thr Met Thr Arg Val
           50           55           60
Leu Gln Gly Val Leu Pro Ala Leu Pro Gln Val Val Cys Asn Tyr Arg
65           70           75           80
Asp Val Arg Phe Glu Ser Ile Arg Leu Pro Gly Cys Pro Arg Gly Val
           85           90           95
Asn Pro Val Val Ser Tyr Ala Val Ala Leu Ser Cys Gln Cys Ala Leu
           100          105          110
Cys Arg Arg Ser Thr Thr Asp Cys Gly Gly Pro Lys Asp His Pro Leu
           115          120          125
Thr Cys Asp Asp Pro Arg Phe Gln Asp Ser Ser Ser Ser Lys Ala Pro
           130          135          140
Pro Pro Ser Leu Pro Ser Pro Ser Arg Leu Pro Gly Pro Ser Asp Thr
145           150           155           160
Pro Ile Leu Pro Gln
           165

```

<210> 2  
 <211> 495  
 <212> DNA  
 <213> 人 hCG $\beta$   
 <400> 2

```

atggagatgt tccaggggct gctgctgttg ctgctgctga gcatgggagg gacatgggca    60
tccaaggagc cgcttcggcc acggtgccgc cccatcaatg ccaccctggc tgtggagaag    120
gagggtgcc  cegtgtgcat caccgtcaac accaccatct gtgccggcta ctgccccacc    180
atgacccgcg tgctgcaggg ggtcctgccg gccctgcctc aggtggtgtg caactaccgc    240
gatgtgcgct tcgagtccat cgggtccct  ggctgcccgc gcggcgtgaa ccccggtggtc    300
tcctacgccg tggtctctcag ctgtcaatgt gcactctgcc gccgcagcac cactgactgc    360
gggggtccca aggaccaccc cttgacctgt gatgaccccc gcttccagga ctctctttcc    420
tcaaaggccc ctccccccag cttccaagt  ceateccgac tcccggggcc ctgggacacc    480
ccgatcctcc cacaa                                         495
  
```

<210> 3  
 <211> 108  
 <212> PRT  
 <213> 抗 hCG $\beta$  单抗轻链可变区蛋白  
 <400> 3

```

Asp Ile Glu Met Thr Glu Ser Pro Ala Ile Met Ser Ala Ser Leu Gly
1           5           10          15
Lys Arg Val Ser Cys Thr Cys Thr Val Ser Ser Ser Val Ser Ser Ser
           20          25          30

Tyr Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Ser Ser pro Lys Leu Trp
           35          40          45

Ile Tyr Arg Thr Ser Asn Val Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser
           50          55          60

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Met Glu
65          70          75          80

Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Ser His Gln Tyr His Arg Ser Pro
           85          90          95

Arg Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Asn
  
```

100

105

<210> 4  
 <211> 324  
 <212> DNA  
 <213> 抗 hCG $\beta$  单抗轻链可变区基因  
 <400> 4

```

gacattgtga tgaccagtc tccagcaatc atgtctgcat ctctaggaaa acgggtagc      60
tgcacctgca cggtagctc aagtgtaagt tccagttact tgcactggta ccagcagaag    120
ccaggatcct ccccaaaact ctggatttat aggacttcca acctggcttc tggagtcca     180
gctcgcttca gtggcagtgg gtctgggacc tcttactctc tcactatcag cagcatggag    240
gctgaagatg ctgccactta ttactcgcac cagtatcacc gttccccacg gacgttcggt    300
ggaggcacca agctggaaat aaat                                           324
  
```

<210> 5  
 <211> 33  
 <212> DNA  
 <213> 抗 hCG $\beta$  单抗轻链可变区 CDR1 基因  
 <400> 5

acggtagct caagtgtaag ttccagttac ttg 33

<210> 6  
 <211> 21  
 <212> DNA  
 <213> 抗 hCG $\beta$  单抗轻链可变区 CDR2 基因  
 <400> 6

aggacttcca acctggcttc t 21

<210> 7  
 <211> 27  
 <212> DNA

<213>抗 hCG $\beta$  单抗轻链可变区 CDR3 基因

<400> 7

caccagtatc atcggtcccc acggacg 27

<210> 8

<211> 25

<212> DNA

<213> 人 hCG 蛋白的上游引物

<400> 8

ggaagatcta tggagatggt ccagg 25

<210> 9

<211> 26

<212> DNA

<213> 人 hCG 蛋白的下游引物

<400> 9

cgggatcctt gtgggaggat cggggt 26

<210> 10

<211> 19

<212> DNA

<213> TR421 载体上游引物 t7u

<400> 10

ttaatacgac tcactatag 19

<210> 11

<211> 23

<212> DNA

<213> TR421 载体下游引物 T7U

<400> 11

tagaaggcac agtcgaggct gat

23

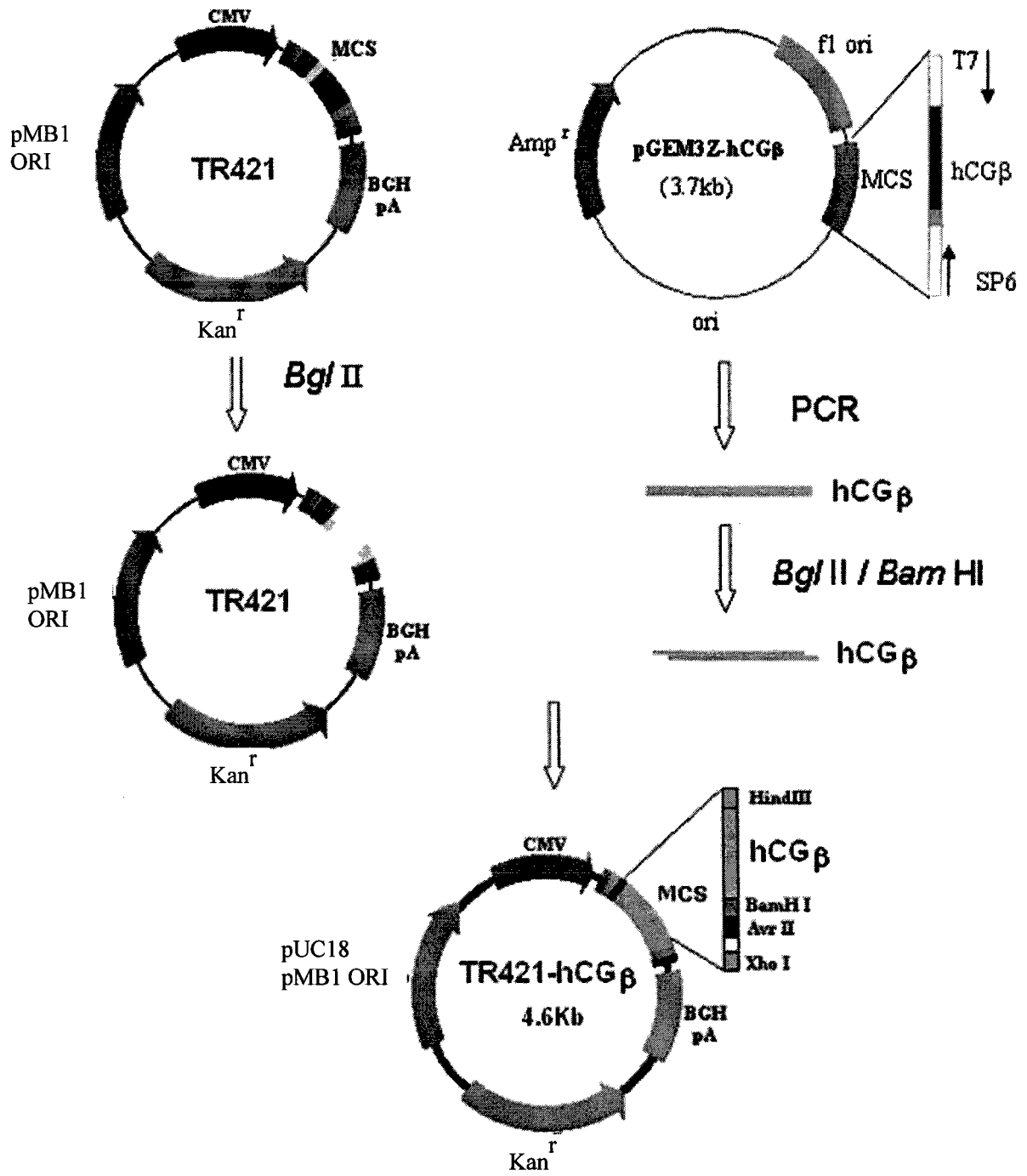


图 1

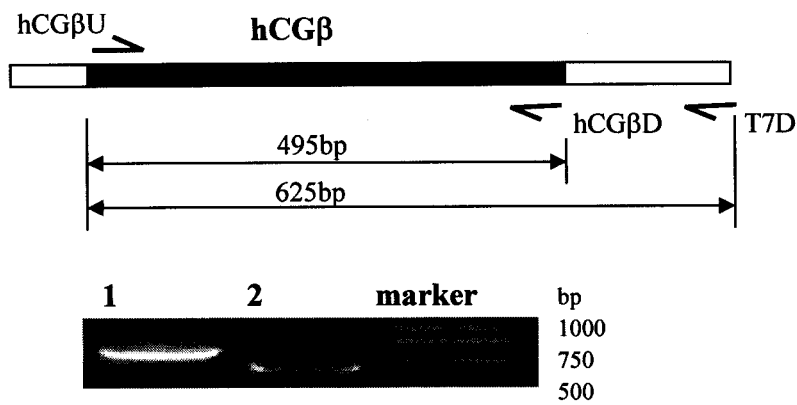


图 2A

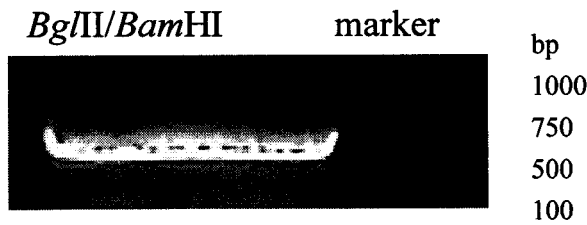


图 2B

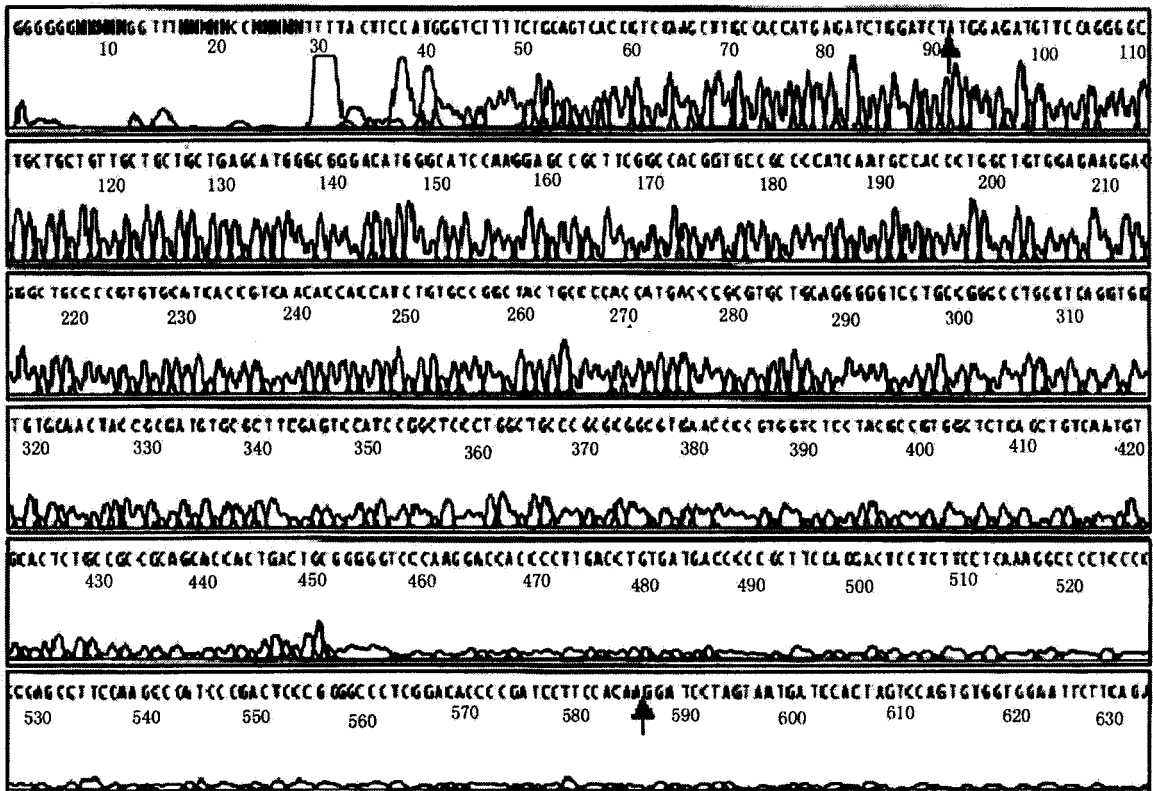


图 2C

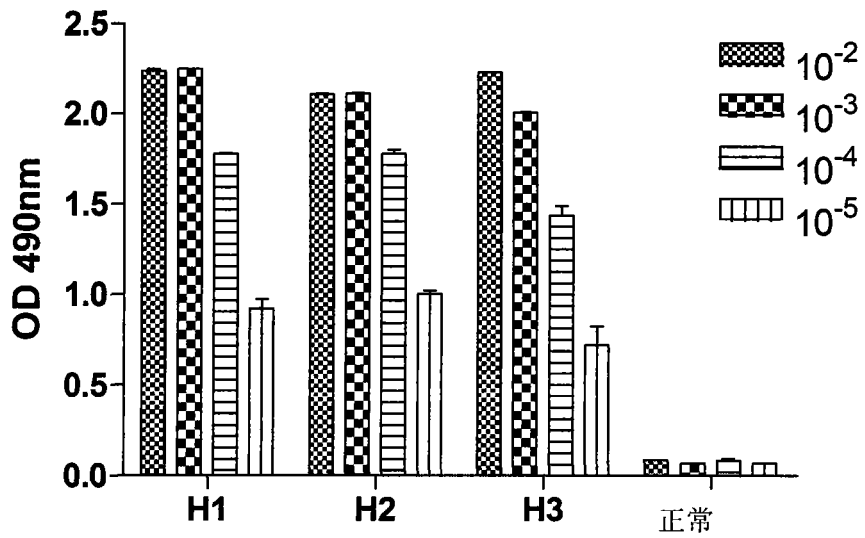


图 3

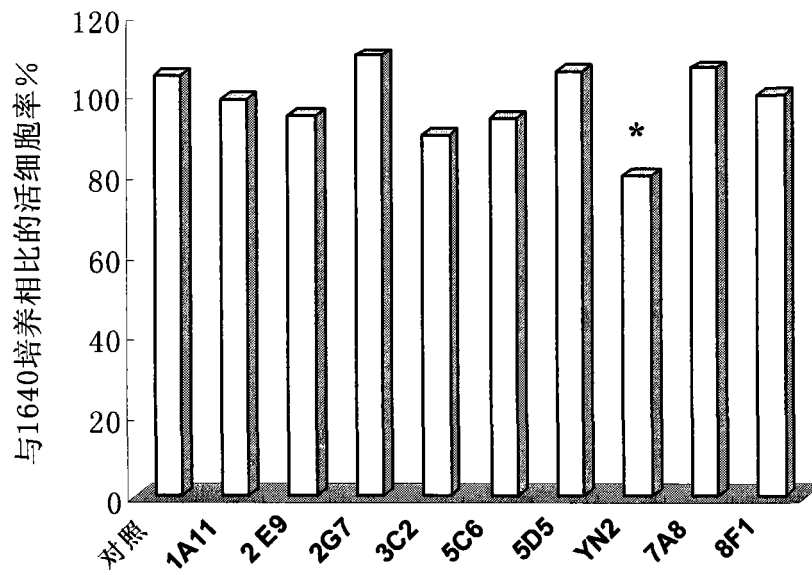


图 4

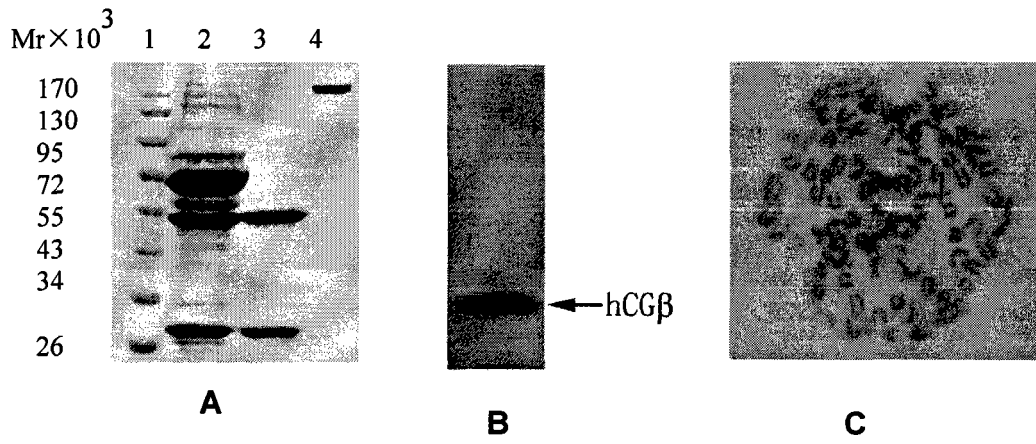


图 5

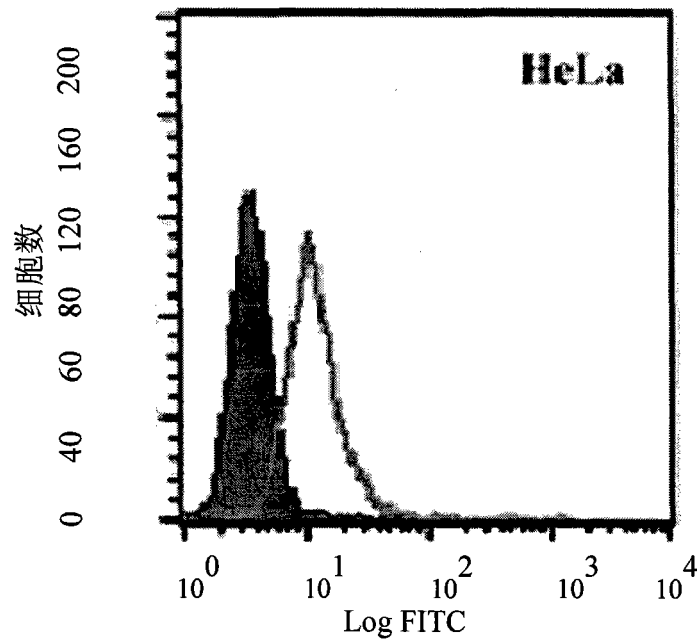


图 6A

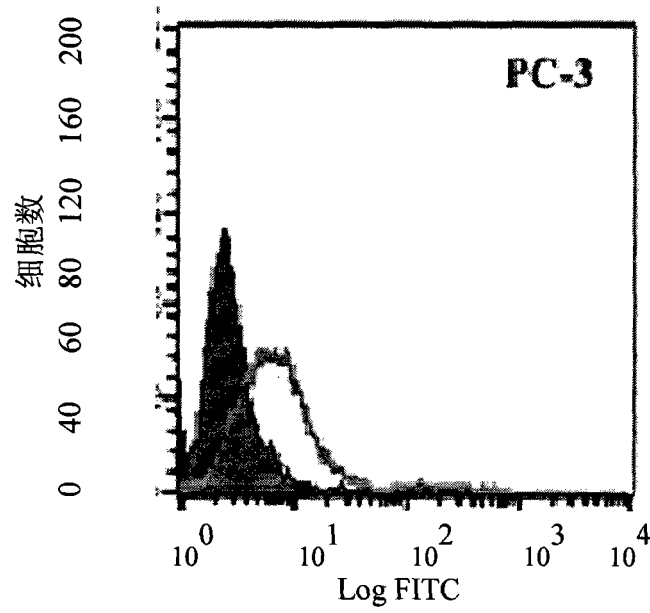


图 6B

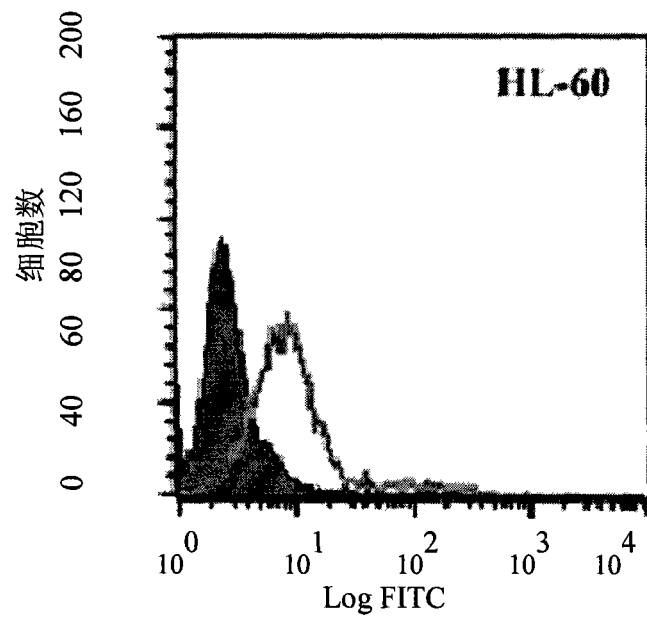


图 6C

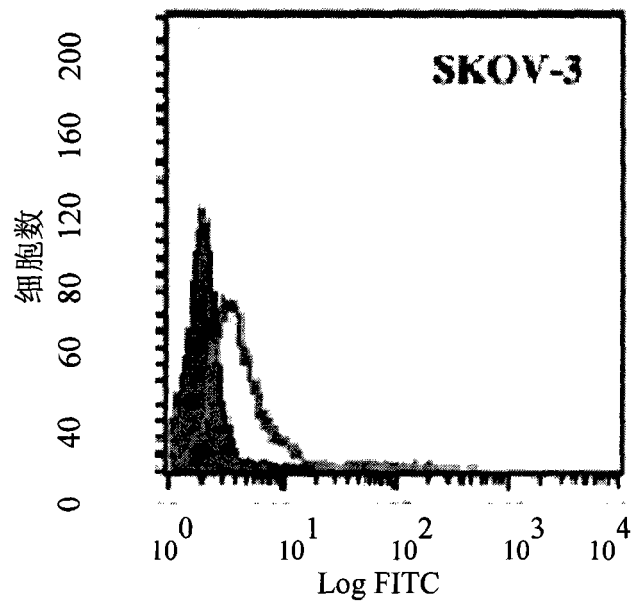


图 6D

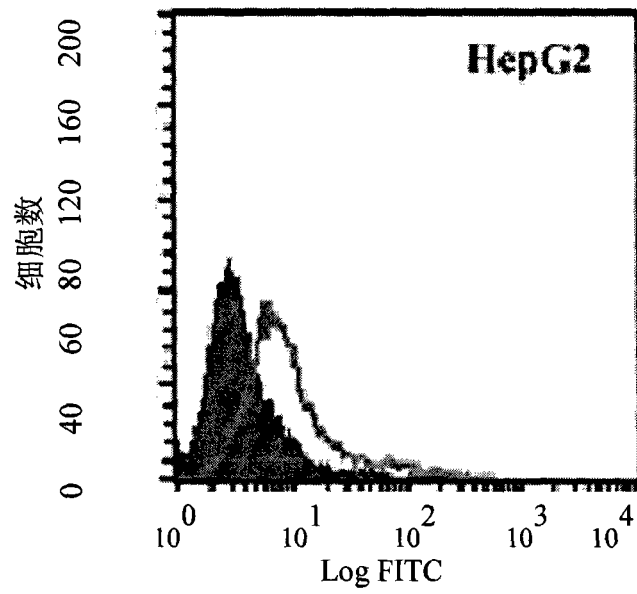


图 6E

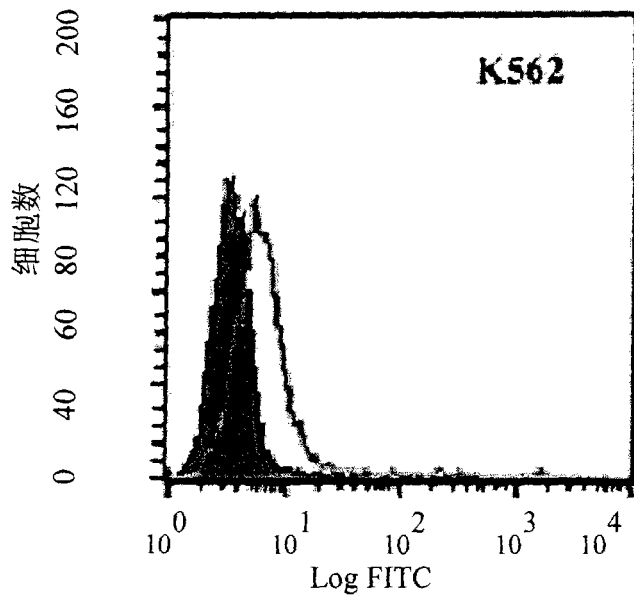


图 6F

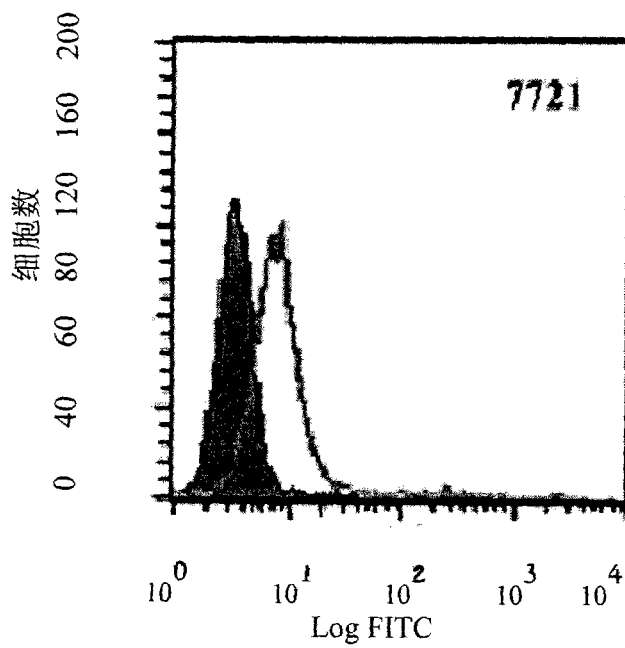


图 6G

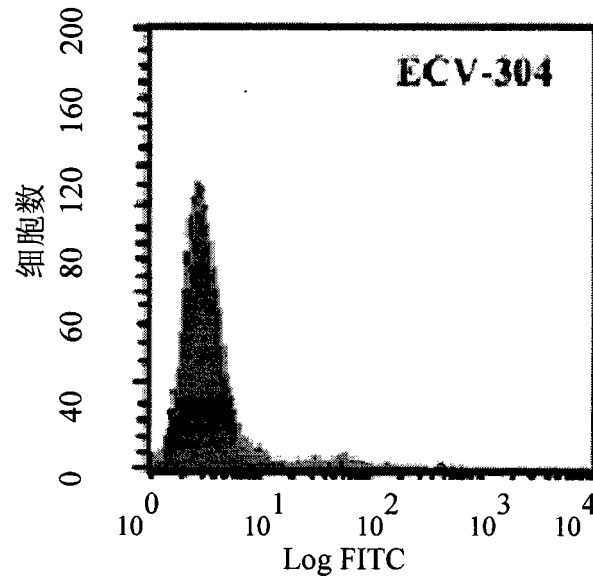


图 6H

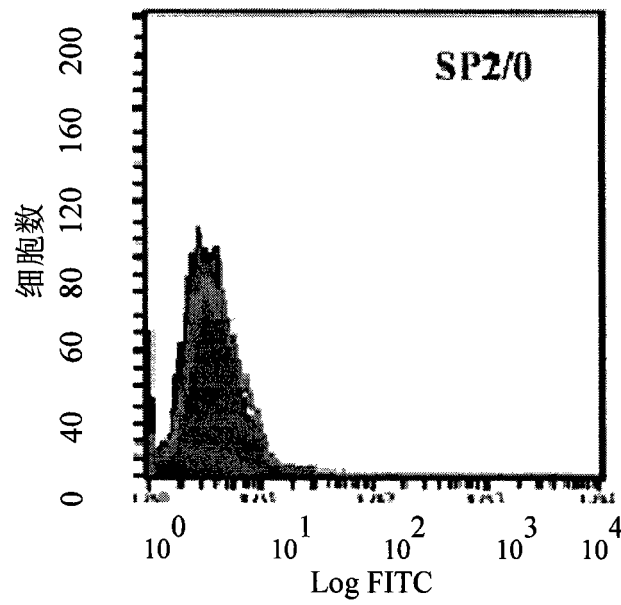


图 6I

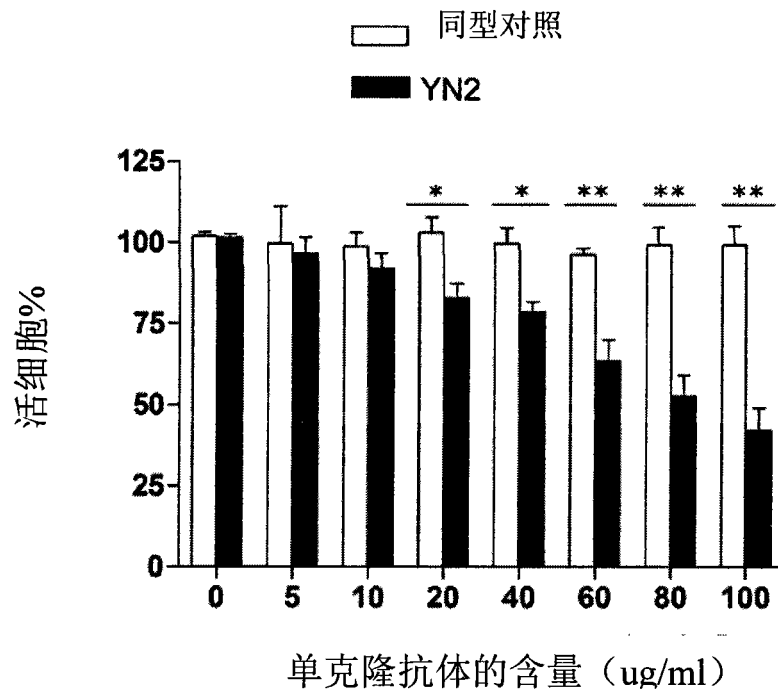


图 7

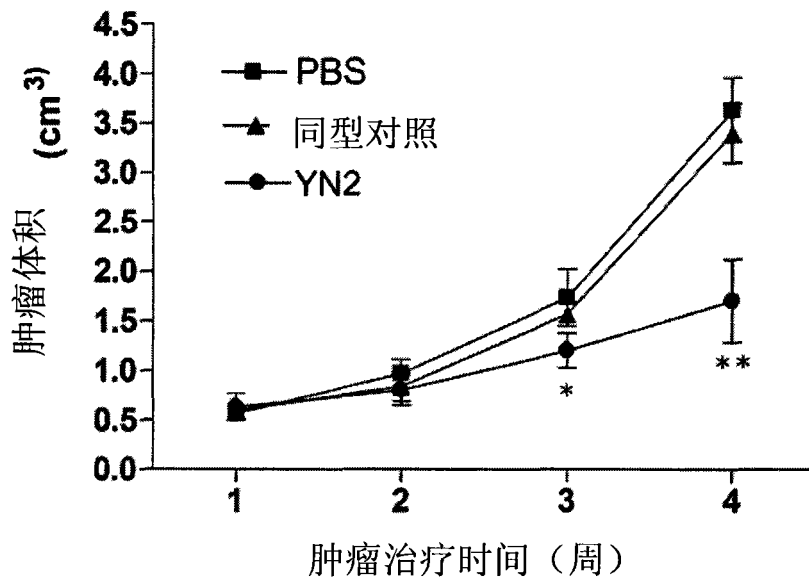


图 8A

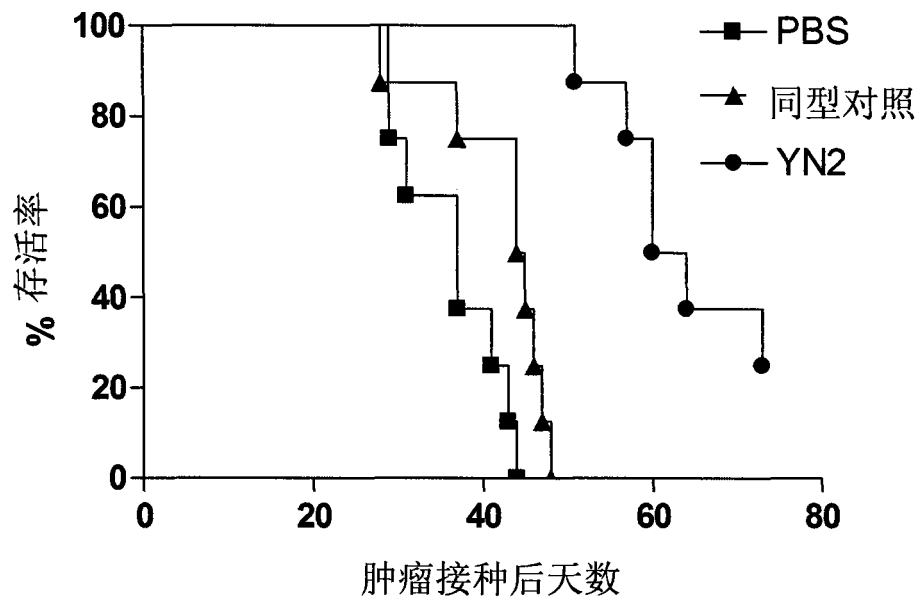


图 8B

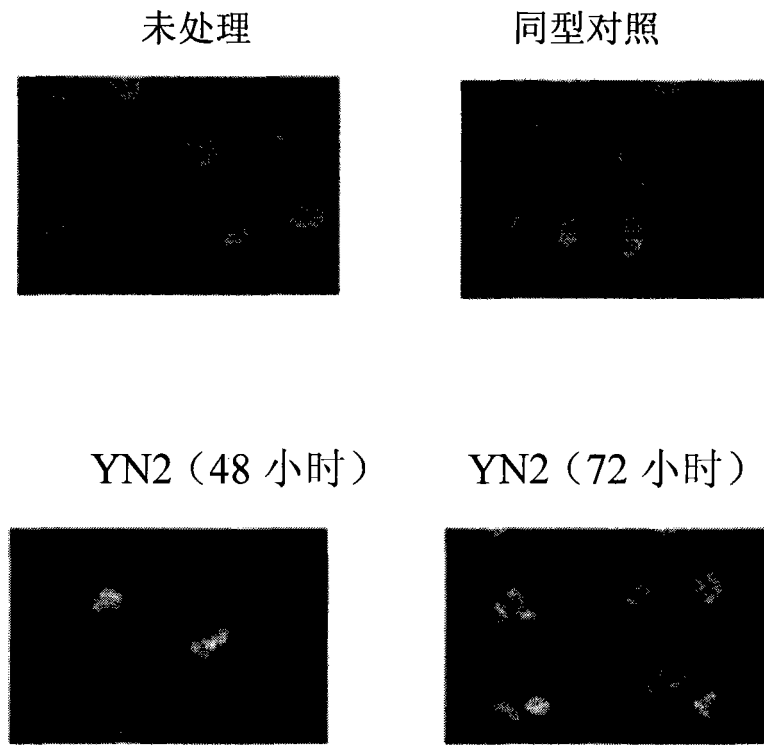


图 9

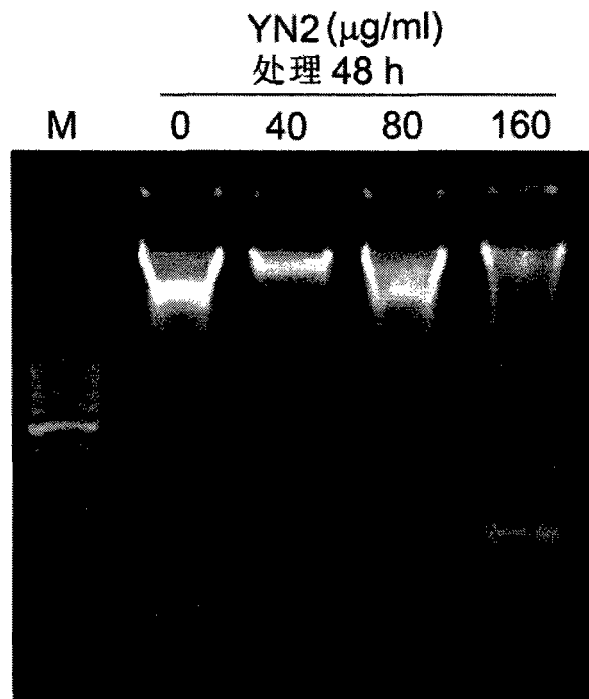


图 10

专利名称(译)	抗人绒毛膜促性腺激素β亚基的单克隆抗体及其制备方法		
公开(公告)号	<a href="#">CN101429249A</a>	公开(公告)日	2009-05-13
申请号	CN200710048067.2	申请日	2007-11-09
[标]申请(专利权)人(译)	复旦大学		
申请(专利权)人(译)	复旦大学		
当前申请(专利权)人(译)	复旦大学		
[标]发明人	熊思东 于宁 徐薇		
发明人	熊思东 于宁 徐薇		
IPC分类号	C07K16/26 G01N33/531 G01N33/577 C12N15/13 C12N5/18		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明公开了一种抗人绒毛膜促性腺激素β亚基的单克隆抗体、以及该单克隆抗体的制备方法，本发明通过以编码hCGβ的真核表达质粒经肌肉免疫BALB/c小鼠，将分泌高效价抗hCGβ抗体的小鼠脾细胞与小鼠B细胞淋巴瘤融合、经筛选、反复克隆化，获得能稳定分泌抗hCGβ单克隆抗体的杂交瘤细胞株，通过该抗hCGβ单克隆抗体的杂交瘤细胞株分泌抗hCGβ的单克隆抗体。本发明公开的抗hCGβ单克隆抗体可特异性结合hCGβ蛋白以及肿瘤细胞表达的膜型hCGβ，可在体外和体内有效抑制肿瘤生长，可以直接诱导肿瘤细胞凋亡。

