



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 103476798 B

(45)授权公告日 2017.04.05

(21)申请号 201280018671.X

(22)申请日 2012.04.16

(65)同一申请的已公布的文献号  
申请公布号 CN 103476798 A

(43)申请公布日 2013.12.25

(30)优先权数据  
61/476,018 2011.04.15 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日  
2013.10.15

(86)PCT国际申请的申请数据  
PCT/KR2012/002873 2012.04.16

(87)PCT国际申请的公布数据  
W02012/141554 KO 2012.10.18

(73)专利权人 首尔大学校产学协力团  
地址 韩国首尔

(72)发明人 郑竣昊 朴仙荣 黄度彬 李花京

(74)专利代理机构 北京路浩知识产权代理有限公司 11002

代理人 谢顺星 刘成春

(51)Int.Cl.  
G07K 16/44(2006.01)  
G07K 14/575(2006.01)  
G01N 33/53(2006.01)  
G07K 17/02(2006.01)  
G07D 401/04(2006.01)  
G12N 15/115(2006.01)

(56)对比文件  
WO 02/49667 A2,2002.06.27,  
CN 1401257 A,2003.03.12,  
US 20080226650 A1,2008.09.18,  
审查员 滕文静

权利要求书1页 说明书19页  
序列表5页 附图16页

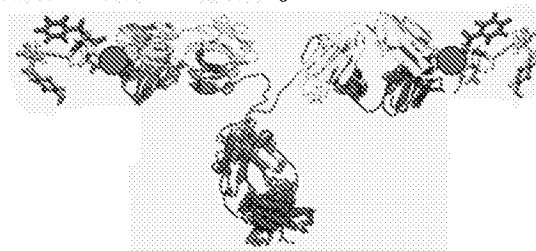
(54)发明名称

在粘合物质和可铁宁的粘合体上结合有抗-可铁宁抗体的复合体及其用途

(57)摘要

本发明涉及在粘合物质和可铁宁的粘合体上结合有抗-可铁宁抗体的复合体及其用途,依据本发明的复合体在体外生物学分析方法(in vitro biological assay)中可被用作分析工具,其可以保持粘合物质的特异反活性、生物学功能;以及补体依赖性细胞毒性(CDC)、抗体依赖细胞介导的细胞毒性(ADCC)以及在体内的长半衰期等抗体的固有特性。

粘合物质 可铁宁 抗可铁宁 IgG



1. 一种在可铁宁和粘合物质的粘合体上结合有抗-可铁宁抗体的复合体,所述粘合物质选自WKYMVm-NH<sub>2</sub>肽、AS1411适体、哌加他尼、阿昔单抗以及胰岛素组成的组中;所述粘合物质通过聚乙二醇连接体或者氨基连接体C6与可铁宁连接。

2. 如权利要求1所述的复合体,其特征在于,所述粘合体结合于抗-可铁宁抗体的抗原结合部位。

3. 如权利要求1所述的复合体,其特征在于,所述抗-可铁宁抗体选自所述抗体、抗体片段和以及包含所述抗体和抗体片段作为构成成分的融合蛋白质的组;所述抗体片段选自Fab、ScFv以及结构域抗体。

4. 一种体外生物学分析方法,其特征在于,其将可铁宁和粘合物质的粘合体作为分析工具使用,所述粘合物质选自WKYMVm-NH<sub>2</sub>肽、AS1411适体、哌加他尼、阿昔单抗以及胰岛素组成的组中;所述粘合物质通过聚乙二醇连接体或者氨基连接体C6与可铁宁连接。

5. 如权利要求4所述的体外生物学分析方法,其特征在于,所述方法选自由流式细胞分析法、蛋白免疫印迹分析法、免疫沉淀分析法以及酶联免疫化学分析法组成的组中。

6. 权利要求1所述的复合体在制备用于延长所述粘合物质的体内半衰期的药物中的应用。

7. 权利要求1所述的复合体在制备用于诱导所述粘合物质结合的细胞发生补体依赖性细胞毒性的药物中的应用。

8. 权利要求1所述的复合体在制备用于诱导所述粘合物质结合的细胞发生抗体依赖细胞介导的细胞毒性的药物中的应用。

## 在粘合物质和可铁宁的粘合物上结合有抗-可铁宁抗体的复合体及其用途

### 技术领域

[0001] 本发明涉及在粘合物质和可铁宁的粘合物上结合有抗-可铁宁抗体的复合体及其用途。

### 背景技术

[0002] 众多的肽以及适体生物药品均具有有望成为候选药物(drug candidate)的特性,但由于其在体内容易被蛋白分解酶(proteinase)、肽酶(peptidase)以及核酸酶(nuclease)等分解,或者通过肾脏迅速排出体外,因此其半衰期通常特别短,一般仅为数分钟至数小时(Sato A.K.et al.,Curr Opin Biotechnol,17,638-642,2006)。为了解决其不稳定性及药效持续时间短的问题,通常施行将聚乙二醇(polyethyleneglycol,PEG)与其粘合的技术(Veronese,F.M.&Pasut G.,Drug Discov Today,10,1451-1458,2005),阻碍由于体内酶引起的分解,抑制肾脏和血管内的吸收,从而延长在血中的滞留时间。但该方法的缺点在于聚乙二醇化所需时间较长,还需要根据不同粘合物质需要特定的最优化(specific optimization),且由于PEG的粘合是异质性(heterogenous)的,因此会产生多种分子粘合物。

[0003] 为满足作为新型递送平台(Novel delivery platform)使用的目的,半抗原(hapten)必须符合对于动物和人无毒且无生理活性的条件。可铁宁(cotinine)是尼古丁的主要代谢产物,而人类已长期暴露于尼古丁。因此,可铁宁是作为新型递送平台的合适的半抗原。并且,其在小鼠体内LD<sub>50</sub>值为2-4g/kg,相对来说非常安全的物质(Riah O.et al.,Toxicol.Lett.,109,21-29,1999),以每天服用1.8g的量,服用四天时也未发现其它副作用(Bowman,E.R.&Mc,K.H.,Jr.,J.Pharmacol.Exp.Ther.,135,306-311,1962)。并且,已对可铁宁在哺乳动物体内的物质代谢过程非常清楚,并对其血清半衰期大约为16小时的事实也非常清楚(Benowitz N.L.et al.,3<sup>rd</sup> Handb.Exp.Pharmacol.,29-60,2009)。另外,还有报告称可铁宁对于人没有生理活性,3天内吸收最高达160mg的可铁宁,也未显示任何生理上及行动上的变化(Hatsukami,D.K.et al.,Pharmacol.Biochem.Behav.,57,643-650,1997)。

[0004] 另外,适体可以以特异的、三维的形态折叠,其类似于抗体,可与靶标高亲和性的、特异性的结合,从而被广泛用于多种分析和实验。利用适体制备与抗体结合的复合体的现有方法主要是将适体与生物素(biotin)以及异羟基洋地黄毒苷(digoxigenin)粘合,使其与亲和素(avidin)以及抗-异羟基洋地黄毒苷抗体结合形成复合体。

[0005] 本发明人利用可铁宁作为半抗原,制备了在粘合物质和可铁宁的粘合物结合有抗-可铁宁抗体结合的复合体,并发现所述复合体可保持粘合物质的特异反应性、生物学功能;以及补体依赖性细胞毒性(complement-mediated cell cytotoxicity,CDC)、抗体依赖细胞介导的细胞毒性(antibody-dependent cell cytotoxicity,ADCC)以及在体内的长半衰期等抗体的固有特性,由此完成了本发明。

## 发明内容

[0006] 本发明要解决的技术问题

[0007] 本发明的目的是提供在粘合物质和可铁宁的粘合体上结合有抗-可铁宁抗体的复合体。

[0008] 本发明的另一个目的是提供体外生物学分析方法(*in vitro biological assay*),其特征在於,将可铁宁和粘合物质的粘合体作为分析工具使用。

[0009] 本发明的另一个目的是通过在可铁宁和粘合物质的粘合体上结合抗-可铁宁抗体,提供延长所述粘合物质的体内半衰期的方法。

[0010] 本发明的另一个目的是通过在可铁宁和粘合物质的粘合体上结合抗-可铁宁抗体,提供诱导所述粘合物质结合的细胞发生补体依赖性细胞毒性的方法。

[0011] 本发明的另一个目的是通过在可铁宁和粘合物质的粘合体上结合抗-可铁宁抗体,提供诱导所述粘合物质结合的细胞发生抗体依赖细胞介导的细胞毒性的方法。

[0012] 本发明的另一个目的是通过在可铁宁和粘合物质的粘合体上结合抗-可铁宁抗体,提供将所述粘合物质在体内的分布变化为一般抗体在体内的分布状况的方法。

[0013] 技术方案

[0014] 为了实现所述目的,本发明提供在粘合物质和可铁宁的粘合体上结合有抗-可铁宁抗体的复合体。

[0015] 为了实现所述另一个目的,本发明提供体外生物学分析方法,其特征在於,将可铁宁和粘合物质的粘合体作为分析工具使用。

[0016] 为了实现所述另一个目的,本发明通过在可铁宁和粘合物质的粘合体上结合抗-可铁宁抗体,提供延长所述粘合物质的体内半衰期的方法。

[0017] 为了实现所述另一个目的,本发明通过在可铁宁和粘合物质的粘合体上结合抗-可铁宁抗体,提供诱导所述粘合物质结合的细胞发生补体依赖性细胞毒性的方法。

[0018] 为了实现所述另一个目的,本发明通过在可铁宁和粘合物质的粘合体上结合抗-可铁宁抗体,提供诱导所述粘合物质结合的细胞发生抗体依赖细胞介导的细胞毒性的方法。

[0019] 为了实现所述另一个目的,本发明通过在可铁宁和粘合物质的粘合体上结合抗-可铁宁抗体,提供将所述粘合物质在体内的分布变化为一般抗体在体内的分布状况的方法。

## 附图说明

[0020] 本发明所述以及其它的目的和特征,将通过所附的附图和下述对于本发明的说明更加明确。

[0021] 图1是对于实施例2中纯化的抗-可铁宁抗体进行考马斯亮蓝染色的凝胶图片。

[0022] 图2以及图3是实施例(3-1)中合成的可铁宁-WKYMVm-NH<sub>2</sub>粘合体,以及实施例(3-2)中合成的可铁宁-AS1411以及可铁宁-派加他尼粘合体的结构式。

[0023] 图4是表示在试验例1中施行的,分析抗-可铁宁1gG抗体对于可铁宁的亲和性的曲线图。

[0024] 图5是表示可铁宁-WKYMVm-NH<sub>2</sub>/抗-可铁宁1gG复合体对于FPR2细胞受体的特异性结合能力的曲线图。

[0025] 图6至图8分别是分析可铁宁-WKYMVm-NH<sub>2</sub>/抗-可铁宁1gG复合体的细胞内钙浓度变化、超氧化物产生程度以及趋化性的结果。

[0026] 图9是比较可铁宁-WKYMVm-NH<sub>2</sub>粘合体以及可铁宁-WKYMVm-NH<sub>2</sub>/抗-可铁宁1gG复合体在小鼠体内半衰期的曲线图以及直方图。

[0027] 图10是表示抗-可铁宁1gG在血清中的体内半衰期的曲线图。

[0028] 图11是表示可铁宁-WKYMVm-NH<sub>2</sub>/抗-可铁宁1gG复合体在败血症模型中的改善的治疗效果的曲线图。

[0029] 图12是比较可铁宁-派加他尼粘合体以及可铁宁-派加他尼/抗-可铁宁1gG复合体在小鼠体内半衰期的曲线图。

[0030] 图13以及图14表示可铁宁-AS1411/抗-可铁宁1gG复合体对于核仁素细胞受体的特异性结合能力的试验结果。

[0031] 图15是对可铁宁-AS1411/抗-可铁宁1gG复合体进行蛋白免疫印迹的结果。

[0032] 图16是表示利用可铁宁-AS1411/抗-可铁宁1gG复合体的核仁素的免疫沉淀试验结果。

[0033] 图17是表示可铁宁-派加他尼/抗-可铁宁1gG复合体对于血管内皮生长因子(VEGF)的结合性的曲线图。

[0034] 图18是表示阿昔单抗、阿昔单抗-可铁宁粘合体以及可铁宁-阿昔单抗/抗-可铁宁1gG复合体对于整合素 $\alpha 2\beta 3$ 的反应性的曲线图。

[0035] 图19是可铁宁-阿昔单抗/抗-可铁宁1gG复合体对于血小板结合能力的试验结果。

[0036] 图20是可铁宁-胰岛素/抗-可铁宁抗体复合体对于MCF-7以及SK-Br-3细胞的结合能力的试验结果。

[0037] 图21是分析可铁宁-胰岛素/抗-可铁宁抗体复合体的补体依赖性毒性的分析结果。

[0038] 图22表示粘合物质和可铁宁的粘合物上结合有抗-可铁宁抗体的复合体的示意图。

[0039] 图23表示为了从细胞培养液中纯化对于人补体C5的ScFv抗体,利用蛋白A琼脂糖(protein A agarose)进行亲和层析(affinity chromatography)的结果。

## 具体实施方式

[0040] 以下,将对本发明进行更为详细的说明。

[0041] 本文中“抗体”是指免疫系统中通过抗原的刺激而产生的物质,对其种类没有特殊的限制。本说明书中所述抗体可包括动物抗体、嵌合(chimeric)抗体,人源化抗体或者全人源抗体。并且,本说明书所述抗体还包括保留抗原结合能力的抗体片段,例如Fab。

[0042] 本文中“嵌合抗体”是指抗体的可变区(variable region)或者其补偿决定区(complementarity-determining region, CDR)与抗体其它部分源于不同动物的抗体。例如,这类抗体的抗体可变区可以是源于人类以外的动物(例如,小鼠、兔子、家禽类等),而抗体恒定区(constant region)可以是源于人类。此类嵌合抗体由本领域公知的基因重组等

方法制备。

[0043] 本文中“重链”是指包含可变区结构域 $V_H$ 及3个恒定区结构域 $CH_1$ 、 $CH_2$ 以及 $CH_3$ 的全长重链及其片段。其中,所述可变区结构域 $V_H$ 包含充分的可变区氨基酸序列以使抗体具有对于抗原的特异性。

[0044] 本文中“轻链”是指包含可变区结构域 $V_L$ 及恒定区结构域 $C_L$ 的全长轻链及其片段。其中,所述可变区结构域 $V_L$ 包含充分的可变区氨基酸序列以使抗体具有对于抗原的特异性。

[0045] 本文中“补偿决定区”是指在抗体可变区中,使抗体具有与抗原结合的特异性的部位。

[0046] 本文中的“粘合体”属于异型分子,可在一个以上的非-多肽部分(特别是聚合物部分)以共价形式附着一种以上的多肽而成(典型为一个多肽)。所述非-多肽部分包括聚合物分子、亲脂性化合物、碳水化合物部分或者有机衍生剂(derivatizing)等。另外,粘合体还可在一个以上碳水化合物部分利用N-或者O-糖基化进行附着。以共价形式吸附是指多肽及非-多肽部分直接以共价键结合,或者通过桥接、空间(space)、连接部分、或者与部分相同的中介部分或者部分等,间接的以共价形式附着。例如,本文中公开的由粘合物质与可铁宁接合的粘合体就属于本定义的范围。

[0047] 本发明提供在粘合物质和可铁宁的粘合物上结合有抗-可铁宁抗体的复合体(图22)。

[0048] 并且,本发明提供的体外生物学分析方法,其特征在于,将可铁宁和粘合物质的粘合物作为分析工具。所述体外生物学分析方法的特征在于,其可选自由流式细胞分析法、蛋白免疫印迹分析法、免疫沉淀分析法以及酶联免疫化学分析法组成的组中。

[0049] 本发明中的在粘合物质和可铁宁的粘合物上结合抗-可铁宁抗体的复合体,使用可铁宁作为半抗原,因此可保留粘合物质和抗体所有的固有特性。具体的,所述复合体可保留分子的特异反应性和功能;以及补体依赖性细胞毒性(CDC)、抗体依赖细胞介导的细胞毒性(ADCC)以及体内的长半衰期等抗体的特性。

[0050] 因此,本发明通过在可铁宁和粘合物质的粘合物上结合抗-可铁宁抗体,提供延长所述粘合物质的体内半衰期的方法。

[0051] 并且,本发明通过在可铁宁和粘合物质的粘合物上结合抗-可铁宁抗体,提供诱导所述粘合物质结合的细胞发生补体依赖性细胞毒性的方法。

[0052] 并且,本发明通过在可铁宁和粘合物质的粘合物上结合抗-可铁宁抗体,提供诱导所述粘合物质结合的细胞发生抗体依赖细胞介导的细胞毒性的方法。

[0053] 并且,本发明通过在可铁宁和粘合物质的粘合物上结合抗-可铁宁抗体,提供将所述粘合物质在体内的分布变化为一般抗体在体内的分布状况的方法。

[0054] 本发明的复合体是由一种抗体和可铁宁构成的,其可通过将短序列的粘合物质与可铁宁进行简单得粘合物即可制备,因此可用作具有高集约、易开发、简单等特点的递送平台。

[0055] 从而,本发明的复合体是其抗原反应性(antigenic reactivity)由与可铁宁粘合物质的粘合物所决定的一种新型抗体,因此其可用作拥有分子固有的生物学或者化学功能的治疗用抗体。

[0056] 可铁宁是烟草烟雾的主要成分尼古丁的重要代谢产物,虽然人类暴露于烟草烟雾的时间很长,但仅有关于可铁宁即刻毒性少量报导,因此可铁宁被认为是非常稳定的分子。由于可铁宁的这种相对低毒性特性,使其成为了可用于体内的理想的分子用粘合体。本发明中通过将可铁宁与粘合物质进行粘合,使所述粘合物质的半衰期显著延长。

[0057] 本发明中所称的粘合物质可以是具有特定治疗活性或者结合反应性等的多种生物学以及化学物质。

[0058] 所述粘合物质例如可选自由肽、适体、激素、蛋白质以及化学物质组成的组中,可优选自由WKYVMm-NH<sub>2</sub>肽(WKYVMm-NH<sub>2</sub>)、wkymvm-NH<sub>2</sub>肽(wkymvm-NH<sub>2</sub>)、AS1411适体、派加他尼(pegaptanib)、阿昔单抗以及胰岛素组成的组中。

[0059] 可使用为本发明粘合物质的阿昔单抗是对在血小板表面广泛表达的整合素 $\alpha 2b\beta 3$ 具有反应性的小鼠/人嵌合Fab。

[0060] 依据本发明的一个实施方式,可将所述阿昔单抗与可铁宁进行粘合制备可铁宁-阿昔单抗粘合体以及包含抗-可铁宁抗体的复合体(以下称为可铁宁-阿昔单抗/抗-可铁宁抗体复合体)。通过参考本文试验例9、图18以及图19可知,所述复合体对于整合素 $\alpha 2b\beta 3$ 和血小板维持与阿昔单抗相同水平的反应性。

[0061] 可使用为本发明粘合物质的胰岛素是在体内调节碳水化合物以及脂肪物质代谢的重要激素。胰岛素由2种多肽链构成,其中由21个氨基酸残基构成的A链内有一个分子间二硫键(intra molecular disulfide bond),而由30个氨基酸残基构成的B链内有2个将其与A链相连接的分子内二硫键(inter-molecular disulfide bond)(Nicol DS,Smith,LF., Nature.1960Aug6,187:483-5,PubMed PMID:14426955)。

[0062] 依据本发明的一个实施方式,可将所述胰岛素与可铁宁进行粘合制备可铁宁-胰岛素粘合体以及包含抗-可铁宁抗体的复合体(以下称为可铁宁-胰岛素/抗-可铁宁抗体复合体)。通过参考本文试验例10、图20以及图21可知,所述复合体对于表达胰岛素受体的细胞维持与胰岛素受体的结合能力。

[0063] 可使用为本发明粘合物质的WKYVMm-NH<sub>2</sub>肽是抗-败血症的治疗性肽,并且是对于甲酰肽受体(Formyl peptide receptors,FPRs)的拮抗剂。其还可在噬菌细胞(phagocyte)中诱导超化性移行(chemotactic migration),增加单核细胞(monocyte)和嗜中性粒细胞(neutrophil)的超氧化物(superoxide)的产生,因此具有抗生作用。

[0064] 依据本发明的一个实施方式,可将所述WKYVMm-NH<sub>2</sub>肽与可铁宁进行粘合制备可铁宁-WKYVMm-NH<sub>2</sub>肽粘合体(图2)以及包含抗-可铁宁抗体的复合体(以下称为可铁宁-WKYVMm-NH<sub>2</sub>/抗-可铁宁抗体复合体)。具体的,所述WKYVMm-NH<sub>2</sub>肽(参考文献[Baek SH,et al.,J Biol Chem.,1996Apr5;271(14):8170-5.PubMed PMID:8626507]以及[Kim SD,et al.,J Immunol.2009Nov1,183(9):5511-7.PubMed PMID:19843937])利用迷你PEG(mini-PEG)作为连接体与可铁宁进行结合。之后,可与抗-可铁宁抗体(Park S,et al.,Clin Chim Acta.2010Sep6,411(17-18):1238-42.Epub2010May11.PubMed PMID:20438723)形成复合体。

[0065] 由此制备的本发明的复合体在流式细胞分析法中对于表达甲酰肽受体的细胞显示反应性,由此可知其仍保留了WKYVMm-NH<sub>2</sub>的结合能力(参考图5)。并且,可铁宁-WKYVMm-NH<sub>2</sub>粘合体能使钙从细胞成功地释放出去,因此,能够推断与可铁宁粘合后WKYVMm-NH<sub>2</sub>仍能

维持其的生物学功能(参考图6至图8)。并且,在败血症小鼠模型中,给予所述可铁宁-WKYMVm-NH<sub>2</sub>/抗-可铁宁抗体复合体的组,以剂量依赖的方式(dose-dependent manner)使败血症小鼠恢复;而单独给予可铁宁-WKYMVm-NH<sub>2</sub>粘合体的组,未显示任何效果。这些结果显示所述复合体中的WKYMVm-NH<sub>2</sub>肽不仅维持了其生物学治疗效果,还因所述抗-可铁宁抗体的体内长半衰期,导致可铁宁-WKYMVm-NH<sub>2</sub>粘合体的半衰期也得到了延长(参考图9)。

[0066] 可使用为本发明粘合物质的派加他尼是聚乙二醇化的抗-血管内皮生长因子适体,它与在血管新生成的过程中起到重要作用的血管内皮生长因子165(VEGF165)结合。

[0067] 依据本发明的一个实施方式,可将所述派加他尼的核酸部分与可铁宁进行粘合制备可铁宁-派加他尼粘合物(参考图3)以及包含抗-可铁宁抗体的复合体(以下称为可铁宁-派加他尼/抗-可铁宁抗体复合体),并且可知所述复合体在体内的半衰期得到了极大的改善(参考试验例7)。

[0068] 可使用为本发明粘合物质的AS1411适体具有以G-rich寡核苷酸的形式与在癌细胞表面表达的核仁素结合后被吸收至癌细胞内,从而破坏核仁素的DNA复制和细胞增殖等正常功能的特征。

[0069] 本发明中可在所述适体的5' 粘合可铁宁,从而与抗体形成稳定的复合体。依据本发明的一个实施方式,可将所述AS1411与可铁宁进行粘合制备可铁宁-AS1411粘合物(参考图3)以及包含抗-可铁宁抗体的复合体(以下称为可铁宁-AS1411/抗-可铁宁抗体复合体),并且可知所述复合体与AS1411适体类似,仍保留了对于血管内皮生长因子的结合能力(参考试验例8)。

[0070] 本发明中所述粘合物物质通过聚乙二醇连接体(迷你聚乙二醇-12)或者氨基C6连接体与可铁宁进行连接。

[0071] 所述可铁宁和粘合物质的粘合物结合于抗-可铁宁抗体形成本发明的复合体,此时的粘合物可与抗体的重链或者轻链结合,尤其是优选结合于抗-可铁宁抗体的抗原结合部位。

[0072] 并且,本发明中的抗-可铁宁抗体可以使用将高亲和度的抗-可铁宁Fab抗体(参考美国专利US8,008,448B2)以IgG形式制备以及表达的抗体。

[0073] 例如,所述抗-可铁宁抗体可以通过如下的方法制备。将对所述美国专利第8,008,448号记载的方式进行变形而制备的轻链基因以及重链基因分别插入到表达载体(例如,pcDNA3.1)。接着,将其转化至哺乳动物细胞后表达抗体蛋白质,然后采用通常使用的方法对培养液进行纯化,制备本发明中的抗-可铁宁IgG抗体。

[0074] 此时,所述哺乳动物细胞可以使用CHO DG44细胞(英杰公司,美国),而纯化的方法优选对培养液进行浓缩后,用蛋白A柱(protein A column;吉诺泰,美国)进行纯化。

[0075] 本发明中所述抗-可铁宁抗体的特征在于,选自由所述抗体;选自Fab、ScFv以及结构域抗体的抗体片段;以及包含所述抗体和抗体片段作为构成成分的融合蛋白质(fusion protein)组成的组中。

[0076] 制备在粘合物物质和可铁宁的粘合物上结合抗-可铁宁抗体的复合体的方法,可包含以下步骤:1)制备粘合物物质和可铁宁的粘合体的步骤;2)制备抗-可铁宁抗体的步骤;以及3)使所述制备的粘合物物质和可铁宁粘合而成的粘合物以及抗-可铁宁抗体结合的步骤。

[0077] 具体的,所述方法可包含以下步骤:a)将编码在粘合物物质和可铁宁的粘合物上结

合抗-可铁宁抗体的复合体的核酸分子插入到载体的步骤;b)将所述载体导入至宿主细胞的步骤;以及c)培养所述宿主细胞的步骤。

[0078] 制备在粘合物质和可铁宁的粘合体上结合有抗-可铁宁抗体的复合体,可在临床阶段设定抗-可铁宁抗体生产系统时,成为制备治疗用抗体的有效的方法。重新开发新型治疗用抗体需要消耗很长的时间,但利用本发明中复合体制备方法,可在临床阶段以高通量方式制备可迅速、轻易合成的小分子形态的治疗用抗体。

[0079] 本发明中,使可铁宁和粘合物质粘合后,在制备出的粘合体上结合抗-可铁宁抗体而形成复合体。所述抗体的抗原反应性是由粘合于可铁宁的粘合物质产生。由此制备的本发明的复合体可保留包含补体依赖性细胞毒性、抗体依赖细胞介导的细胞毒性以及在体内的长半衰期的所述抗体的所有特征。

[0080] 相比于将粘合分子直接与抗体结合的现有的分子-抗体粘合体,本发明中的复合体还在免疫学方面具有其它的优点。

[0081] 具体地,现有的治疗用的分子和抗体的粘合体可用作半抗原-载体(hapten-carrier),对于直接结合于抗体的分子即刻发生免疫学反应。所述分子-抗体粘合体被抗原提呈细胞(antigen presenting cell)包围后,所述抗体会被分解成短肽。此时,无数的治疗用分子仍然与所述短肽以化学方式发生交联。如与所述治疗用分子连接的肽中的一个,与特定MHC分子具有高亲和性时,将会明显的出现在抗原提呈细胞的细胞表面。而这将能有效地诱导对于治疗用分子的免疫性。

[0082] 然而,本文中发明的复合体被抗原提呈细胞包围时,由于抗体被分解为短肽,可铁宁和粘合物质组成的粘合体与抗-可铁宁抗体即刻发生分离。此种方法的优点在于,这种方法可以使对于与可铁宁粘合的治疗用分子的免疫原性反应的激活变得较困难。

[0083] 以下,将根据下述实施例更加详细的说明本发明。下述实施例仅是为了例示本发明,本发明的范围并不仅仅局限于此。

[0084] 实施例1:抗-可铁宁兔子/人嵌合IgG基因的制备

[0085] (1-1)利用抗-可铁宁兔子scFv对抗体可变区进行扩增

[0086] 为了扩增兔子的抗体可变区(V<sub>L</sub>以及V<sub>H</sub>),将兔子抗-可铁宁scFv基因(参考美国专利第8,008,448号)为模板,并分别使用60pmole的V<sub>L</sub>用上游及下游引物(SEQ NO:11以及12)以及V<sub>H</sub>用上游及下游引物(SEQ NO:13以及14)施行聚合酶链式反应(PCR)。

[0087] 具体地,为进行PCR反应,将美国专利第8,008,448号中合成的cDNA(约0.5μg)1μl、60pmole的上游引物及下游引物、10μl的10×PCR缓冲液、8μl的2.5mM的dNTP混合物以及0.5μl的Taq聚合酶(polymerase)混合后,添加100μl的蒸馏水。将所述混合物在94℃下进行10分钟的变性(denaturation)后,再反复以下循环反应,共30回:94℃条件下15秒;56℃条件下30秒;72℃条件下90秒。然后在72℃下静置10分钟。

[0088] 将经所述过程扩增的DNA在1%的琼脂糖凝胶中进行电泳后,利用Q1A快速凝胶回收试剂盒(Q1Aquick gel extraction kit,凯杰,美国)进行纯化。

[0089] (1-2)对人抗体恒定区的扩增

[0090] 为扩增人轻链恒定区(C<sub>K</sub>)以及人重链恒定区(CH1-CH3)的抗体恒定区(Constant region),以20ng的pComb3XTT载体(Barbas et al.,Proc.Natl.Acad.Sci.,USA,(1991),15:88(18),7978-7982)为模板,分别使用60pmole的C<sub>K</sub>用上游引物及下游引物(SEQ NO:15

以及16)以及CH1-CH3用上游引物及下游引物(SEQ NO:17以及18)进行PCR。除所述部分外,其余部分都采用与所述实施例(1-1)相同的方法进行。然后,对扩增的DNA进行凝胶电泳及纯化。

#### [0091] (1-3)轻链的扩增

[0092] 为了进行轻链的PCR扩增,利用重叠延伸PCR,对所述实施例(1-1)以及(1-2)中制备并纯化的兔子抗体轻链可变区(V<sub>L</sub>)以及人抗体轻链恒定区(C<sub>κ</sub>)进行结合,从而制备出了轻链基因。

[0093] 具体地,为进行PCR反应分别加入100ng的V<sub>L</sub>以及C<sub>κ</sub>PCR产物,分别加入60pmole的抗-可铁宁兔子/人嵌合抗体轻链的上游引物以及下游引物(SEQ NO:7以及8)进行PCR。除所述部分外,其余部分都采用与所述实施例(1-1)相同的方法进行。并且,采用与实施例(1-1)相同的方法对扩增的DNA进行凝胶电泳及纯化。

#### [0094] (1-4)重链的扩增

[0095] 为了进行重链的PCR扩增,利用重叠延伸PCR,对所述实施例(1-1)以及(1-3)中制备并纯化的兔子抗体重链可变区(V<sub>H</sub>)以及人抗体重链恒定区(CH1-CH3)进行结合,从而制备出了重链基因。

[0096] 具体地说,为进行PCR反应分别加入100ng的V<sub>H</sub>以及CH1-CH3PCR产物、分别加入60pmole的抗-可铁宁兔子/人嵌合抗体重链的上游引物以及下游引物(SEQ NO:9以及10),并再加入10μl的10×PCR缓冲液、8μl的2.5mM的dNTP混合物以及0.5μl的Taq聚合酶混合后,添加100μl的蒸馏水。将所述混合物在94℃下进行10分钟的变性后,再反复以下循环反应,共20回:94℃条件下15秒;56℃条件下30秒;72℃条件下180秒。然后在72℃下静置10分钟。

[0097] 之后,采用与实施例(1-1)相同的方法对扩增的DNA进行凝胶电泳及纯化。

#### [0098] (1-5)制备包含抗-可铁宁兔子/人嵌合抗体IgG基因的表达载体

[0099] 将所述实施例(1-3)中制备以及纯化的轻链PCR产物,以及所述实施例(2-4)中制备以及纯化的重链PCR产物,分别利用限制酶Hind III/Xba I(NEB,美国)以及限制酶BamHI/Nhe I(NEB,美国)进行酶切,提纯后插入到表达载体(pcDNA3.1)的多克隆位点(Multiple cloning site,MCS)的部位。

[0100] 实施例2:为抗-可铁宁兔子/人嵌合IgG表达以及试管内分析进行的纯化

[0101] 用包含抗-可铁宁兔子/人嵌合IgG基因的表达载体DNA对哺乳动物CHO DG44(英杰,美国)细胞进行转染。在含有100U/ml青霉素以及100g/ml链霉素(GIBCO,美国)的CD OptiCHO™表达培养基(GIBCO)中加入500μg/ml的G418,将所述转化的细胞用此培养基,在37℃、135rpm的条件下培养。将培养液的上层液用小型切向流超滤系统(LabScale TFF system)(默克密理博,美国)进行浓缩,后利用蛋白A柱(Repligen Co.,美国)进行纯化。用考马斯亮蓝对纯化的150KDa的IgG进行染色,对其确认(参考图1)后用于之后的实验(试验例)。

[0102] 如图1所示,泳道1为大小标志物;泳道2为未还原的抗-可铁宁IgG(150KDa);泳道3为还原的抗-可铁宁IgG,可知为轻链(25KDa)以及重链(50KDa)。

[0103] 实施例3:可铁宁以及粘合物质组成的粘合体的制备

#### [0104] (3-1)可铁宁及肽的粘合体

[0105] 其中作为肽使用的是WKYVMm-NH<sub>2</sub>肽(WKYVMm-NH<sub>2</sub>, SEQ NO:1)以及wkymvm-NH<sub>2</sub>肽

(wkymvm-NH<sub>2</sub>, SEQ NO:2)。WKYVMm-NH<sub>2</sub>以及wkymvm-NH<sub>2</sub>是通过固相多肽合成(solid phase peptide synthesis)的方法,利用ASP48S多肽自动合成仪进行合成的。之后利用Vydac Everest C18柱(250mm×22mm,10μm),通过反相高效液相色谱法(reverse phase HPLC)进行纯化(>95%纯度),利用液相色谱/质谱联用技术(Agilent HP1100series)确认了肽的大小(>95%纯度)。

[0106] 并且,作为可铁宁和肽的粘合体,可铁宁-WKYVMm-NH<sub>2</sub>以及可铁宁-wkymvm-NH<sub>2</sub>,除了在肽合成的最后过程中导入聚乙二醇连接体和可铁宁之外,其合成采用均与上述方法相同的方法进行。

[0107] 可铁宁和肽的粘合体的制备方法首先利用ASP48S多肽自动合成仪合成最基本的肽后,为了C-末端酰胺化(C-terminal amidation)将第一个序列Fmoc-m-OH(8当量)和偶联剂HBTU(8当量)/HOBt(8当量)/NMM(16当量)溶解于二甲基甲酰胺(DMF)后加入至甲苯氢胺链酰胺树脂(MBHA link amide resin),在常温反应2小时。之后,在二甲基甲酰胺中加入20%的哌啶,并在常温下5分钟内反应2回,从而分解Fmoc。重复所述过程,制备肽的基本骨架,即NH<sub>2</sub>-W(Boc)-K(BOC)-Y(tBu)-M-V-m-MBHA链酰胺树脂。并取一些吸附上肽的树脂加入裂解混合物(cleavage cocktail,THA/TIS/H<sub>2</sub>O=95/2.5/2.5),将肽与树脂分离后,加入过量的二乙醚使肽发生沉淀。将获得的少量精炼的肽溶解于DW/CAN(1/1)后,利用液相色谱/质谱联用技术确认能否获得所需肽(WKYVMm-NH<sub>2</sub>)的分子量。之后采用与所述过程相同的方法偶联Fmoc-迷你PEG12-OH,并再取一些树脂利用液相色谱/质谱联用技术确认分子量。重新用反式-4-可铁宁羧酸,采用与所述过程相同的方法进行偶联,加入裂解混合物(TFA/TIS/H<sub>2</sub>O=95/2.5/2.5)将肽与树脂分离后,加入过量的二乙醚使肽发生沉淀。用高效液相色谱法进行纯化,再用液相色谱/质谱连用技术确认分子量后,进行了冷冻干燥。

[0108] 所述合成的WKYVMm-NH<sub>2</sub>以及wkymvm-NH<sub>2</sub>肽和可铁宁-肽粘合体溶解于DMSO后在-20℃条件下保存。以这种方法制备的可铁宁-WKYVMm-NH<sub>2</sub>粘合体的结构如图2所示。

[0109] (3-2)可铁宁-适体的粘合体

[0110] 其中作为适体使用的是AS1411DNA适体(5'-dTGGTGGTGGTGGTTGTGGTGGTGGTGG-3',SEQ NO:3),CR026DNA适体(5'-dCCTCCTCCTCCTCCTCCTCCTCC-3',SEQ NO:4)以及派加他尼RNA适体(5'-pCfpGmpGmpArpArpUfpCfpAmpGmpUfpGmpAmpAmpUfpGmpCfpUfpUfpAmpUfpAmpCfpAmpUfpCfpCfpGm3'-p-dT-3,SEQ NO:5)。

[0111] 并且,作为可铁宁和适体的粘合体,可铁宁-AS1411、可铁宁-CR026以及可铁宁派加他尼,可通过固相寡肽合成(solid phase oligonucleotide synthesis)的方法,利用寡肽合成仪(oligonucleotide synthesizer)从3'至5'的方向合成后,在合成最后过程就加上了氨基C6连接体(ST Pharm,韩国)。之后利用Xbridge Prep C18柱(5μm,10×150mm,沃特世,美国),通过反相高效液相色谱法(reverse phase HPLC)进行纯化(>95%纯度),利用质谱分析技术(mass spectrometry,MS)确认了适体的大小。

[0112] 将所述合成的可铁宁-AS1411以及可铁宁-CR026溶解于蒸馏水,而可铁宁派加他尼由于是RNA,因此溶解于用焦炭酸二乙酯(diethyl pyrocarbonate)处理的蒸馏水中,在95℃条件下,静置5分钟后,在常温下缓慢使其降温,之后再-20℃条件下保存。以这种方法制备的可铁宁-AS1411以及可铁宁-派加他尼的结构如图3所示。

[0113] (3-3)可铁宁及阿昔单抗的粘合体

[0114] 利用阿昔单抗(Reopro)制备了可铁宁和阿昔单抗的粘合体(可铁宁-阿昔单抗)。

[0115] 可铁宁及阿昔单抗的粘合体通过活泼酯法(active ester method)制备。在1ml的二甲基甲酰胺中加入0.1mmol的可铁宁,常温下溶解后再加入极少量二甲基氨基吡啶(DMAP)、0.118mmol的二环己基碳二亚胺(DCC)和0.12mmol的N-羟基琥珀酰亚胺(NHS),常温下旋转(rotation)4小时左右。10000×g条件下离心30分钟,分离上层液。将20mg的阿昔单抗加入到2ml碳酸盐缓冲液(carbonate buffer)溶解,再加入1ml的二甲基甲酰胺,缓慢倒入所述上层液,常温下旋转3小时左右。之后,在4℃条件下进行6小时以上的透析(dialysis),再进行离心分离获得上层液,从而制备出粘合体。

[0116] (3-4)可铁宁及胰岛素的粘合体

[0117] 利用胰岛素(SEQ NO:6)制备可铁宁和胰岛素的粘合体(可铁宁-胰岛素)。

[0118] 可铁宁及胰岛素的粘合体,采用与所述实施例3-3的制备可铁宁-阿昔单抗粘合体相同的方法进行制备。

[0119] 实施例4:包含在可铁宁和粘合物质的粘合体上结合有抗-可铁宁抗体的复合体的制备

[0120] 为了制备包含所述实施例1制备的可铁宁和粘合物质的粘合体以及实施例2中制备的抗-可铁宁抗体的复合体,即可铁宁-WKYMVm-NH<sub>2</sub>/抗-可铁宁1gG复合体,实施了如下的步骤。

[0121] 试验例1:对于可铁宁的抗-可铁宁兔子/人嵌合1gG的亲合性分析

[0122] 对于可铁宁的抗-可铁宁兔子/人嵌合1gG的亲合性是使用BIAcore3000(BIAcore AB,乌普萨拉,瑞士),通过表面等离子共振技术(Surface plasmon Resonance,SPR)进行分析。

[0123] 具体地,使10mM的醋酸钠缓冲溶液(pH4.0)以5μl/分钟的速度流过,在此条件下使用胺类偶联试剂盒(Biocore AB),并根据试剂盒所附的说明书,将可铁宁-卵清蛋白(ovalbumin,OVA)固定于CM5(羧甲基葡聚糖改性,carboxymethyl dextran-modified)传感芯片(Biacore AB)。将溶解于包含0.005%吐温20(西格玛,美国)的磷酸盐缓冲液(pH7.4)的抗-可铁宁兔子/人嵌合1gG抗体,在25℃条件下,以30μl/分钟的速度注入到芯片中。抗-可铁宁兔子/人嵌合1gG抗体被稀释成0.15625-10nM的浓度。

[0124] 用1M NaCl/50mM NaOH对表面进行再生,利用分析软件(BIAevaluation software)获得运动速率常速(k<sub>on</sub>以及k<sub>off</sub>)和平衡解离常数(K<sub>d</sub>)。其结果如表1所示,图4示出了其曲线图。

[0125] 如图4所示,随着抗-可铁宁兔子/人嵌合1gG抗体的注入量的增加,固定于CM5芯片的与可铁宁结合的抗-可铁宁1gG抗体的量逐渐增加。

[0126] 表1

[0127]

克隆	K <sub>on</sub> (M <sup>-1</sup> S <sup>-1</sup> )	K <sub>off</sub> (M <sup>1</sup> S <sup>-1</sup> )	K <sub>D</sub> (M)
抗-可铁宁兔子/人嵌合 IgG 抗体	2.559×10 <sup>6</sup>	1.253×10 <sup>-5</sup>	4.896×10 <sup>-12</sup>

[0128] 试验例2:可铁宁-WKYMVm-NH<sub>2</sub>/抗-可铁宁1gG复合体对于细胞受体反应性的实验

[0129] 为了确认可铁宁-WKYMVm-NH<sub>2</sub>/抗-可铁宁1gG复合体是否与WKYMVm-NH<sub>2</sub>的细胞受体FPR2结合,利用流式细胞分析法进行检测。

[0130] 用FPR2或者载体(pcDNA3.1)转染的RBL-2H3细胞(Yoe-Sik Bae et al. J Immunol 2004; 173; 607-614),利用含有10%的胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)的RPMI培养基,在37℃以及5%的CO<sub>2</sub>条件下进行培养。之后,将细胞以每孔1×10<sup>5</sup>个的密度,接种到96孔板中,然后用PBS洗涤2次,用分析缓冲液(assay buffer)(1%的胎牛血清以及磷酸盐缓冲液中包含0.02%的叠氮化钠)洗涤1次。

[0131] 在含有用FPR2进行转染的RBL-2H3细胞的各孔中,加入50μl用分析缓冲液稀释的可铁宁-WKYMVm-NH<sub>2</sub>/抗-可铁宁1gG复合体,在4℃条件下,反应30分钟。此时,对于0、1、10以及100nM等4个浓度的可铁宁-WKYMVm-NH<sub>2</sub>进行了实验,抗-可铁宁1gG固定为100nM。

[0132] 此时,为了对照,对于用载体进行转染的RBL-2H3细胞,也利用可铁宁-WKYMVm-NH<sub>2</sub>/抗-可铁宁1gG复合体,重复进行了与上述相同的实验。

[0133] 并且,作为对照组使用了以下几个组别:以上述相同的浓度利用可铁宁-WKYMVm-NH<sub>2</sub>/非特异性IgG(Palivizumab; Synagis; Abbot Laboratories, 英国)处理用FPR2转染的RBL-2H3细胞的实验组1; 以及利用作为WKYMVm-NH<sub>2</sub>的负肽(negative peptide)的wkymvm-NH<sub>2</sub>,处理100nM可铁宁-wkymvm-NH<sub>2</sub>/100nM抗-可铁宁抗体的实验组2。

[0134] 用分析缓冲液洗涤2次细胞后,将FITC标记的单克隆抗-人Fc特异性IgG(赛默飞世尔,美国)以1:100的比例稀释于分析缓冲液,每孔添加50μl,在4℃条件下反应20分钟。接着,用分析缓冲液洗涤2次细胞后,用磷酸盐缓冲液进行重悬(resuspension),再用2%多聚甲醛(paraformaldehyde, 1:1 (v/v))固定。之后用FACSCanto™11流式细胞分析仪(BD Bioscience, 德国)进行测定,并用flowJo数据分析软件(Treestar, 美国)分析数据。其结果如图5所示。

[0135] 如图5所示,可铁宁-WKYMVm-NH<sub>2</sub>/抗-可铁宁1gG复合体能与用FPR2转染的RBL-2H3细胞特异性结合,且随着可铁宁-WKYMVm-NH<sub>2</sub>浓度的增加,其结合能力也逐渐增加。

[0136] 另一方面,确认了用载体转染的RBL-2H3细胞与所述复合体不发生结合。并且,确认了可铁宁-WKYMVm-NH<sub>2</sub>/非特异性IgG复合体以及可铁宁-wkymvm-NH<sub>2</sub>/抗-可铁宁1gG复合体也不会与用FRP2转染的RBL-2H3细胞结合。

[0137] 试验例3:可铁宁-WKYMVm-NH<sub>2</sub>/抗体复合体能否维持对WKYMVm-NH<sub>2</sub>肽的功能活性的测定(体外分析)

[0138] (3-1) 细胞内钙(Calcium)浓度的变化

[0139] 细胞内钙浓度([Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>)采用Grynkiewicz的利用Fura-2/AM的方法(参考文献[Grynkiewicz G. et al., J Biol Chem., 260, p3440-3450 1985])进行测定。

[0140] 利用葡聚糖沉降法(dextran sedimentation)、红细胞低渗溶血(hypotonic lysis of erythrocytes)以及淋巴细胞梯度分离培养基(lymphocyte separation medium gradient),从人类末梢血液分离出新鲜的中性粒细胞。然后,在此加入4mL的稀释于新鲜无血清RPMI 1640培养基的3μM Fura-2/AM, 37℃条件下,持续搅拌50分钟进行培养。用无血清RPMI 1640洗涤3次后,在1ml的无Ca<sup>2+</sup>Locke溶液(154mM NaCl, 5.6mM KCl, 1.2mM MgCl<sub>2</sub>, 5mM HEPES [pH7.3], 10mM葡萄糖、以及0.2mM EGTA)中接种2×10<sup>6</sup>个细胞。在接种的细胞中分别添加WKYMVm-NH<sub>2</sub>(1、2.5、5、10以及100nM)、可铁宁-WKYMVm-NH<sub>2</sub>(1、2.5、5、10以及100nM)、可

铁宁-WKYMVm-NH<sub>2</sub> (1、2.5、5、10以及100nM) /抗-可铁宁1gG复合体(摩尔浓度2:1)。

[0141] 此时,作为对照组分别使用处理了非特异性肽wkymvm-NH<sub>2</sub> (100nM)、可铁宁-wkymvm-NH<sub>2</sub> (100nM)、可铁宁-wkymvm-NH<sub>2</sub> (100nM) /50nM抗-可铁宁1gG的实验组。

[0142] 利用RF-5301PC荧光分光光度计(spectrofluorophotometer, Shimadzu Instruments Inc., 日本)测定在500nm波长下的,对于340nm以及380nm两个激发(excitation)波长的荧光值(fluorescence)。其结果如图6所示。此时,细胞内钙离子浓度的增加表明380nm的激发效率(excitation efficiency)与340nm的激发效率的荧光值的比值增加。

[0143] 如图6所示,WKYMVm-NH<sub>2</sub>、可铁宁-WKYMVm-NH<sub>2</sub>以及可铁宁-WKYMVm-NH<sub>2</sub>/抗-可铁宁1gG复合体的浓度依赖性(concentration-dependencies)相似。并且,与WKYMVm-NH<sub>2</sub>一样,可铁宁-WKYMVm-NH<sub>2</sub>以及可铁宁-WKYMVm-NH<sub>2</sub>/抗-可铁宁1gG复合体也能较强的诱导细胞内钙浓度的增加。而另一方面,wkymvm-NH<sub>2</sub>、可铁宁-wkymvm-NH<sub>2</sub>、可铁宁-wkymvm-NH<sub>2</sub>/抗-可铁宁1gG复合体则没有显示任何特异性的钙的增加。

#### [0144] (3-2) 超氧化物的产生(superoxide generation)

[0145] 超氧化物的产生可以通过检测依赖于超氧化物的细胞色素(cytochrome)c的还原值而测定(参考文献[Bae et al., Blood, 97, p2854-2862, 2001])。

[0146] 具体地说,将RPM11640培养基中以 $2 \times 10^6$ 个细胞接种的人中性粒细胞与50 $\mu$ M的细胞色素c,在37 $^{\circ}$ C条件下预培养1分钟后,使其分别与WKYMVm-NH<sub>2</sub> (0、10、100以及1000nM)、可铁宁-WKYMVm-NH<sub>2</sub> (0、10、100以及1000nM)、可铁宁-WKYMVm-NH<sub>2</sub> (0、10、100以及1000nM) /抗-可铁宁1gG(摩尔比2:1)反应。

[0147] 此时,作为对照组,使用以wkymvm-NH<sub>2</sub> (0、10、100以及1000nM)、可铁宁-wkymvm-NH<sub>2</sub> (0、10、100以及1000nM)及可铁宁-wkymvm-NH<sub>2</sub> (0、10、100以及1000nM) /抗-可铁宁1gG(摩尔比2:1)处理的实验组。

[0148] 由细胞色素c还原引起的,在550nm下的吸光度变化,利用分光光度计(spectrophotometer, EL312e; Bio-Tek instruments, Winooski, VT),以1分钟间隔共测定5分钟。0分钟的吸光度值从之后测定的吸光度值中减去后,除以吸光系数(extinction coefficient)  $0.022 \mu\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$ ,从而以纳摩尔(nanomole)为单位显示。其结果如图7所示。

[0149] 如图7所示,WKYMVm-NH<sub>2</sub>、可铁宁-WKYMVm-NH<sub>2</sub>以及可铁宁-WKYMVm-NH<sub>2</sub>/抗-可铁宁1gG复合体的浓度依赖性相似。并且,确认了与WKYMVm-NH<sub>2</sub>一样,可铁宁-WKYMVm-NH<sub>2</sub>以及可铁宁-WKYMVm-NH<sub>2</sub>/抗-可铁宁1gG复合体也能较强的诱导超氧化物的产生。而另一方面,wkymvm-NH<sub>2</sub>、可铁宁-wkymvm-NH<sub>2</sub>粘合体、可铁宁-wkymvm-NH<sub>2</sub>/抗-可铁宁1gG复合体则没有显示任何特异性的超氧化物的产生。

#### [0150] (3-3) 趋化性(chemotaxis)分析

[0151] 将人中性粒细胞以 $1 \times 10^6$ /ml的浓度接种在RPM11640培养基后,在多层室(multiwell chamber, Neuroprobe, 美国)孔板的上层孔中添加25 $\mu$ l所述细胞混悬液(参考文献[Bae et al., Blood, 97, p2854-2862, 2001])。多层室孔板的上层孔与含有WKYMVm-NH<sub>2</sub> (0、10或100nM)、可铁宁-WKYMVm-NH<sub>2</sub> (0、10或100nM)及可铁宁-WKYMVm-NH<sub>2</sub> (0、10以及100nM) /抗-可铁宁1gG(摩尔比2:1)的下层孔,由3 $\mu$ m聚烃过滤器(polyhydrocarbon filter)分开。

[0152] 此时,作为对照组,使用以wkymvm-NH<sub>2</sub> (0、10以及100nM)、可铁宁-wkymvm-NH<sub>2</sub> (0、10以及100nM)及可铁宁-wkymvm-NH<sub>2</sub> (0、10以及100nM)/抗-可铁宁1gG(摩尔比2:1)处理的实验组。

[0153] 37℃条件下,静置90分钟后,将未迁移的细胞用细胞刮(scraping)去除,并将4%多聚甲醛添加到发生迁移的细胞中过夜固定。将固定的过滤器依次用90%、80%、70%的乙醇以及去离子水处理后,在空气中进行干燥,之后用苏木精(西格玛奥德里奇,美国)对干燥后的过滤器进行染色。在高倍镜视野下(high-power fields) (400×)对各个孔中被染色的细胞,进行5次随机的选择计数,其结果如图8所示。

[0154] 如图8所示,WKYMVm-NH<sub>2</sub>、可铁宁-WKYMVm-NH<sub>2</sub>以及可铁宁-WKYMVm-NH<sub>2</sub>/抗-可铁宁1gG复合体的浓度依赖性相似。并且,均强烈地诱导了中性粒细胞的迁移(migration)。而另一方面,wkymvm-NH<sub>2</sub>、可铁宁-wkymvm-NH<sub>2</sub>粘合体、可铁宁-wkymvm-NH<sub>2</sub>/抗-可铁宁1gG复合体则没有显示任何特异性的细胞迁移。

[0155] 试验例4:可铁宁-WKYMVm-NH<sub>2</sub>以及可铁宁-WKYMVm-NH<sub>2</sub>/抗-可铁宁1gG复合体的药动学实验

[0156] 取4-6周龄的雄性野生型白化1CR小鼠(癌症研究所,东方生物公司,韩国),分别将可铁宁-WKYMVm-NH<sub>2</sub> (0.5mg/kg)及可铁宁-WKYMVm-NH<sub>2</sub> (0.5mg/kg)/抗-可铁宁1gG (10mg/kg)分别稀释于100μl的磷酸盐缓冲液,给所述小鼠进行尾静脉注射。

[0157] 注射可铁宁-WKYMVm-NH<sub>2</sub>的小鼠,分别在注射后0、0.5、1、2、3、4、5、6、8、10、12、16、20以及24小时,从眼眶静脉丛获得外周血;而注射可铁宁-WKYMVm-NH<sub>2</sub>/抗-可铁宁1gG复合体的小鼠,分别在注射后0、0.5、1、2、3、4、5、6、8、10、12、16、20、24、48、72、96、120、144以及168小时,从眼眶静脉丛获得外周血。获得的外周血在常温静置30分钟后,以800g的转速离心15分钟,收集上层液获得血清,并利用流式细胞分析法分析血清。

[0158] 将各个血清稀释于分析缓冲液(包含1%胎牛血清以及0.02%叠氮化钠(NaN<sub>3</sub>)的磷酸盐缓冲液)后,加入相同量的200nM抗-可铁宁1gG,使血清中的可铁宁-WKYMVm-NH<sub>2</sub>均能与抗-可铁宁1gG形成复合体从而可进行测定。

[0159] 将1×10<sup>5</sup>个用FPR2转染的RBL-2H3细胞与所述混合物在4℃条件下反应30分钟。用分析缓冲液洗涤2次细胞后,将FITC标记的单克隆抗-人Fc特异性1gG(赛默飞世尔,美国)以1:100的比例稀释于分析缓冲液后,加入到各孔中在4℃条件下反应20分钟。

[0160] 用分析缓冲液洗涤2次细胞后,将FITC标记的单克隆抗-人Fc特异性1gG以1:100的比例稀释于分析缓冲液后,每孔添加50μl,在4℃条件下反应20分钟。接着,用分析缓冲液洗涤2次细胞后,用磷酸盐缓冲液进行重悬,再用2%多聚甲醛(1:1(v/v))固定。之后用FACSCanto™ 11流式细胞分析仪进行测定,并用flowJo数据分析软件分析数据。其结果如图9所示。

[0161] 如图9所示,比较平均荧光强度(mean fluorescence intensity)值可知,注射可铁宁-WKYMVm-NH<sub>2</sub>/抗-可铁宁1gG复合体的小鼠血清中,约有8个小时荧光强度维持高于峰值一半的状态,而有16个小时维持比背景(background)更高的状态。相反,注射可铁宁-WKYMVm-NH<sub>2</sub>的小鼠血清,在1小时后荧光强度便会降至比背景低的状态。

[0162] 试验例5:抗-可铁宁1gG药动学实验

[0163] 取4-6周龄的雄性野生型白化1CR小鼠(东方生物公司,韩国),将抗-可铁宁1gG

(10mg/kg) 稀释于100 $\mu$ l的磷酸盐缓冲液,给所述小鼠进行尾静脉注射。注射后分别在0、1、3、6、12小时,以及1、2、3、4、5、6、7、10、14、21、28天时,从眼眶静脉丛获得外周血。获得的外周血在常温静置30分钟后,以800 $\times$ g的转速离心15分钟,收集上层液获得血清,为了测定血清内抗-可铁宁1gG的量,进行了酶联免疫吸附实验(ELISA)。

[0164] 将96孔酶联免疫吸附实验板,利用以5 $\mu$ g/ml的浓度溶解于磷酸盐缓冲液的可铁宁-牛血清白蛋白(BSA),在4 $^{\circ}$ C条件下过夜包被后,用PBSB(包含3%牛血清白蛋白的磷酸盐缓冲液)进行封闭。将获得的所述血清用PBSB稀释(1:10至1:1000)后,添加到包被好的各个孔中,每孔加入50 $\mu$ l。接着,在常温放置1小时后,用PBS-T(包含0.02%吐温20的磷酸盐缓冲液)洗涤。将ABTS(one-step ABTS溶液,西格玛)作为底物,加入结合辣根过氧化物酶(HRP)的羊(sheep)抗-人Fc特异性1gG(赛默飞世尔),常温放置30分钟后,在405nm处测定光密度。其结果如图10所示。

[0165] 如图10所示,可知抗-可铁宁1gG在血清内的半衰期为6天以上。

[0166] 试验例6:可铁宁-WKYMVm-NH<sub>2</sub>/抗-可铁宁1gG复合体对于小鼠败血症模型的治疗效果

[0167] 在1CR小鼠腹壁上切开2cm的切口后,取出阑尾,在回盲瓣(ileocecal valve)直下方,结扎25%的阑尾,用22尺寸(gauge)的针进行一次贯通后,使大便渗漏至腹腔内。之后对腹壁肌肉以及皮肤层进行缝合。做假手术(Sham-operated)的实验组,在腹壁上切开2cm的切口后,取出阑尾,但不做任何处理,便放回腹腔内。将施行CLP的小鼠,分为6组,每组20只。各组分别为可铁宁-WKYMVm-NH<sub>2</sub>(0.4mg/kg以及0.04mg/kg)/抗-可铁宁1gG(18mg/kg以及1.8mg/kg)复合体实验组、可铁宁-WKYMVm-NH<sub>2</sub>(0.4mg/kg)实验组、WKYMVm-NH<sub>2</sub>单独(0.2mg/kg)实验组、抗-可铁宁1gG(18mg/kg)单独实验组以及磷酸盐缓冲液载体对照组。从进行CLP后的2小时开始,以12小时的间隔,对于各组小鼠进行尾静脉注射100 $\mu$ l相应浓度的相应物质,并培养在饲养设施中,给予水和饲料的条件下观察10天。分析其生存率,结果如图11。

[0168] 如图11所示,可知注射可铁宁-WKYMVm-NH<sub>2</sub>/抗-可铁宁1gG复合体的实验组的生存率为80%左右。其生存率相比于可铁宁-WKYMVm-NH<sub>2</sub>实验组的生存率(40%)、WKYMVm-NH<sub>2</sub>实验组的生存率(45%)以及磷酸盐缓冲液载体对照组的生存率(20%),得到了相对的改善。

[0169] 试验例7:可铁宁-派加他尼以及可铁宁-派加他尼/抗-可铁宁1gG复合体的药动学实验。

[0170] 取4-6周龄的雄性野生型白化1CR小鼠,将可铁宁-派加他尼(0.135mg/kg)以及可铁宁-派加他尼(0.135mg/kg)/抗-可铁宁1gG(1mg/kg)复合体分别稀释于100 $\mu$ l的磷酸盐缓冲液,给所述小鼠进行尾静脉注射。注射后分别在0、0.5、1、1.5以及2小时,通过眼眶静脉丛获得外周血。获得的外周血在常温静置30分钟后,以800 $\times$ g的转速离心15分钟,收集上层液获得血清,进行了酶联免疫吸附实验(ELISA)。

[0171] 利用溶解有50ng人血管内皮生长因子的磷酸盐缓冲液,在4 $^{\circ}$ C条件下对96孔酶联免疫吸附实验板过夜包被后,用PBSB进行封闭。将获得的所述血清分别与PBSB以1:100的比例稀释后,与抗-可铁宁1gG一同添加到各个孔中。接着,在常温放置1小时后用PBS-T洗涤后,加入结合辣根过氧化物酶(HRP)的兔抗-人Fc特异性1gG(赛默飞世尔),常温放置1小时。接着,加入3,3',5,5'-四甲基联苯胺(3,3',5,5'-tetramethylbenzidine(TMB),赛默飞世尔)作为底物,在常温下放置15分钟后,在650nm处测定光密度。其结果如图12所示。

[0172] 如图12所示,可知可铁宁-派加他尼/抗-可铁宁IgG复合体在血清内的半衰期较可铁宁-派加他尼有了显著的增加。并且,0小时时的浓度也较高,因此可预测可铁宁-派加他尼在进入体内后会立即发生分解,而以可铁宁-派加他尼/抗-可铁宁IgG复合体形式注射时,可阻碍可铁宁-派加他尼的迅速分解。

[0173] 试验例8:可铁宁-适体/抗-可铁宁IgG的生物学分析

[0174] (8-1)可铁宁-AS1411/抗-可铁宁IgG复合体对于可铁宁-适体/抗-可铁宁IgG细胞表面核仁素的结合

[0175] 将Raji(人伯基特淋巴瘤,美国典型培养物保藏中心,美国)细胞以每孔 $1 \times 10^5$ 个细胞接种后,用可铁宁-AS1411(1、10、50以及100nM)/抗-可铁宁IgG(100nM)复合体,以50 $\mu$ l/样品的量进行处理,在4 $^{\circ}$ C条件下反应20分钟。用分析缓冲液(包含1%胎牛血清以及0.02%叠氮化钠的磷酸盐缓冲液)洗涤2次,后将FITC标记的单克隆抗-人Fc特异性IgG以1:100的比例稀释于分析缓冲液后,加入到各孔中,在4 $^{\circ}$ C条件下反应15分钟。

[0176] 此时,将利用非特异性适体CR026(ST Pharm,韩国)制备的可铁宁-CR026/抗-可铁宁IgG复合体作为对照组;以及将非特异性帕利珠单抗(palivizumab)(雅培公司,肯特郡,英国)作为对照抗体制备的可铁宁-AS1411/帕利珠单抗复合体,采用与所述相同的方法施行。

[0177] 并且,作为背景对照(background control),将FITC标记的单克隆抗-人Fc特异性IgG仅与细胞反应,而之后的反应采用与上述相同的方法施行。

[0178] 以所述方法获得的细胞,用分析缓冲液洗涤2次细胞后,用磷酸盐缓冲液进行重悬,再用2%多聚甲醛(1:1(v/v))固定。之后用FACSCanto<sup>TM</sup> II流式细胞分析仪(BD Bioscience,德国)进行测定,并用FlowJo数据分析软件(Treestar,美国)分析数据。其结果如图13以及14所示。

[0179] 如图13所示,随着可铁宁-AS1411浓度的增加,可铁宁-AS1411/抗-可铁宁IgG复合体对于细胞表面核仁素的结合能力增加。相反,是包含非特异性配体(CR026)或者非特异性抗体(帕利珠单抗)的复合体时,未能观察到对于核仁素的结合能力。

[0180] 并且,如图14所示,用可铁宁-AS1411(50nM)/抗-可铁宁IgG(100nM)复合体处理人肝细胞癌细胞(human hepatocellular carcinoma, HepG2),人恶性胶质瘤细胞(human glioblastoma, U87MG)以及小鼠胚胎成纤维细胞(mouse embryonic fibroblast, NIH3T3)(美国典型培养物保藏中心,美国),从而确认了不同细胞间核仁素表达率的差异。从结果可知,相比于Raji细胞HepG2以及U87MG细胞表现出了很强的结合,而NIH3T3细胞表现出了较低的结合能力。

[0181] (8-2)利用可铁宁-AS1411/抗-可铁宁IgG复合体的蛋白免疫印迹实验

[0182] 用磷酸盐缓冲液洗涤3次Raji细胞后,加入1ml的溶解缓冲液[20mM三羟甲基氨基甲烷盐酸、pH7.5、150mM NaCl、1%曲通X-100、0.25mM葡萄糖完全合成培养基(synthetic dextrose complete medium)、1mM苯甲基磺酰氟(phenylmethanesulfonyl fluoride)、1 $\mu$ g/ml抑肽酶(aprotinin)、1 $\mu$ g/ml亮抑酶肽(leupeptin)以及1 $\mu$ g/ml胃酶抑素(pepstatin)A],用声波破坏模型500(sonic Dismembrator model500,赛默飞世尔)仪,以输出设置(output setting)7的条件,进行3次声波破碎(sonication),每次维持10秒。以17000 $\times$ g离心10分钟后收集上清液,进行考马斯亮蓝法(bradford assay,伯乐公司,美国)测定其浓

度。

[0183] 将50 $\mu$ g的溶解物加入到4 $\times$ SDS加样缓冲液[50mM 2-(N-吗啉代)乙磺酸(MES)、50mM 三羟甲基氨基甲烷(tris-base)、0.1%十二烷基硫酸钠(SDS)、1mM 乙二胺四乙酸(EDTA)以及二硫苏糖醇(dithiothreitol, pH7.3)]后,在95 $^{\circ}$ C条件下煮沸10分钟使蛋白质变性,之后在4-12%的Bis-三羟甲基氨基甲烷凝胶(英杰)中进行了SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)。利用XCell SureLock<sup>TM</sup> Novex Mini-CeII(英杰)将蛋白质转到了硝酸纤维素膜(沃特曼,德国)上。用包含5%脱脂奶(BD Biosciences Diagnostic Systems,美国)的TBST(10mM三羟甲基氨基甲烷、pH7.5、150mM NaCl以及0.1%吐温-20)在常温下摇晃培养30分钟,与可铁宁-AS1411(100nM)/抗-可铁宁IgG(50nM)复合体在常温摇晃培养2小时。

[0184] 此时,为了作比较,利用以1:100用封闭缓冲液稀释的小鼠抗-核仁素IgG(圣克鲁斯生物技术公司,美国),反复了与上述实验相同的实验。

[0185] 并且,作为对照组使用了可铁宁-AS1411(100nM)/非特异性抗体(帕利珠单抗)(50nM)复合体和可铁宁-CR026(100nM)/抗-可铁宁IgG(50nM)复合体实验组。

[0186] 将膜用TBST洗涤3次。并将结合辣根过氧化物酶(HRP)的兔抗-人IgG(赛默飞世尔)以及结合辣根过氧化物酶(HRP)的抗-小鼠IgG(赛默飞世尔)用洗涤缓冲液以1:5000的比例稀释,后添加至膜,常温下摇晃培养1小时。用TBST洗涤3次膜后,加入SuperSignal Pico West化学荧光底物(chemiluminescent substrate,赛默飞世尔),使蛋白质的条带可视化,其结果如图15所示。

[0187] 如图15所示,用可铁宁-AS1411/抗-可铁宁IgG复合体处理的泳道1不仅能观察到长度为100kDa的全长核仁素条带,还可在40kDa以下观察到几个条带。根据现有的报道,这是由于核仁素的自溶活性(autolytic activity)而被剪切形成的小片段。可铁宁-AS1411/抗-可铁宁IgG复合体不仅能检测出全长度的条带,还可检测出小片段的条带。

[0188] 而另一方面,泳道4的小鼠抗-核仁素IgG仅能检测出全长的核仁素。作为对照组的泳道2的可铁宁-AS1411(100nM)/帕利珠单抗(50nM)复合体和泳道3的可铁宁-CR026(100nM)/抗-可铁宁IgG复合体未显示出任何条带。

[0189] (8-3) 确认利用可铁宁-AS1411/抗-可铁宁IgG复合体进行的核仁素的免疫沉淀实验可行与否

[0190] 将Raji细胞溶解物1mg与可铁宁-AS1411(40nM)/抗-可铁宁IgG(20nM)复合体、可铁宁-CR026(40nM)/抗-可铁宁IgG(20nM)复合体以及可铁宁-AS1411(40nM)/非特异性抗体(20nM)复合体分别在4 $^{\circ}$ C条件下旋转过夜。

[0191] 每个样品中加入40 $\mu$ l的蛋白A-琼脂糖(sepharose)珠,4 $^{\circ}$ C条件下旋转2小时后,以800 $\times$ g离心1分钟。此后,将免疫沉淀的小球用洗涤缓冲液(20mM三羟甲基氨基甲烷盐酸、pH7.5,150mM NaCl,1%曲通X-100)洗涤3次。加入4 $\times$ SDS加样缓冲液,在95 $^{\circ}$ C条件下煮沸10分钟使蛋白质变性后,进行免疫印迹(immunoblot)。将与0.2%TBST以1:100的比例稀释的小鼠抗-核仁素IgG(Santa Cruz Biotechnology,美国)作为1抗添加,然后在常温放置2小时;将以1:5000的比例稀释的结合辣根过氧化物酶的兔子抗-小鼠IgG作为2抗添加,然后在常温放置1小时。洗涤膜后添加SuperSignal Pico West化学荧光底物使印迹可视化,其结果如图16所示。

[0192] 如图16所示,第1个泳道的用可铁宁-AS1411/抗-可铁宁IgG复合体进行免疫沉淀

时,可确认100KDa的核仁素条带。相反,第2泳道和第3泳道,即用可铁宁-CR026/抗-可铁宁IgG复合体、以及可铁宁-AS1411/非特异性抗体进行免疫沉淀时,未能够确认条带。由此可知,可铁宁-AS1411/抗-可铁宁IgG复合体在Raji细胞的溶解物中成功使核仁素发生免疫沉淀。

#### [0193] (8-4) 测定可铁宁-派加他尼/抗-可铁宁IgG复合体对于血管内皮生长因子的特异性结合能力

[0194] 利用溶解于磷酸盐缓冲液的50ng人血管内皮生长因子,对96孔酶联免疫吸附实验板的各孔,在4℃条件下过夜包被,并用PBSB封闭。将100nM可铁宁-派加他尼/50nM抗-可铁宁抗体复合体,以10倍稀释于PBSB后,加入到包被好的各孔中,每孔添加50μI。接着常温下放置1小时,用PBS-T进行洗涤。为了进行对比,利用100nM血管内皮生长因子的抗体贝伐单抗(bevacizumab)代替所述复合体,重复进行了与上述相同的实验。

[0195] 之后,用3,3',5,5'-四甲基联苯胺作为底物,加入结合辣根过氧化物酶的兔子抗-人Fc特异性IgG在常温放置1小时后,在650nm处测定光密度。其结果如图17所示。

[0196] 如图17所示,可铁宁-派加他尼/抗-可铁宁IgG复合体对于血管内皮生长因子,在0.1至1000pM的区间内以依赖于可铁宁-派加他尼的浓度的方式结合能力增强。这类似于抗-血管内皮生长因子抗体贝伐单抗以浓度依赖方式与血管内皮生长因子的结合。

[0197] 试验例9:可铁宁-阿昔单抗/抗-可铁宁-IgG复合体的反应性

#### [0198] (9-1) 为确认可铁宁-阿昔单抗/抗-可铁宁IgG复合体,可铁宁-阿昔单抗以及阿昔单抗的反应性进行的酶联免疫吸附实验(Enzyme-linked immunosorbent assay)

[0199] 利用0.001nM-1000nM的阿昔单抗以及可铁宁-阿昔单抗测定了对整合素α2bβ3的反应性。此时,使用了1μM的抗-可铁宁IgG抗体。

[0200] 具体地说,将溶解于20μI金属缓冲液(25mM三羟甲基氨基甲烷盐酸、137mMNaCl、1mMMgCl<sub>2</sub>、1mM CaCl<sub>2</sub>、1mM MnCl<sub>2</sub>以及1mMKCl;pH7.5)的100ng整合素α2bβ3添加至各孔后,37℃条件下培养2小时,从而用整合素α2bβ3包被96孔半(half-area)微量滴定板的各孔。用150μI的PBSB(包含3%牛血清白蛋白的磷酸盐缓冲液)在37℃条件下封闭1小时。将包含或者不包含抗-可铁宁抗体的阿昔单抗/可铁宁以及阿昔单抗,用3%PBSB调节成多种不同浓度,并在每孔添加50μI。将所述板在37℃条件下培养1小时后,用含有0.05%吐温20的磷酸盐缓冲液(PBST)洗涤3次。用抗-人Fc-辣根过氧化物酶处理后,检测出可铁宁-阿昔单抗/抗-可铁宁IgG抗体复合体,用抗-人Fab-辣根过氧化物酶处理后,分别检测出可铁宁-阿昔单抗以及阿昔单抗。37℃下培养45分钟,用0.05%PBS-T洗涤4次后,将各孔用100μI ABTS底物溶液处理,在37℃条件下培养30分钟,并在405nm处测定吸光度。结果如图18所示。

[0201] 如图18所示,本发明的可铁宁-阿昔单抗/抗-可铁宁抗体复合体对于整合素α2bβ3,可维持与阿昔单抗相同的反应性。

#### [0202] (9-2) 可铁宁-阿昔单抗/抗-可铁宁抗体复合体对于人血小板特异性结合能力的试验

[0203] 用0.5以及50nM的可铁宁-阿昔单抗处理利用0.0.1μM以及1μM的抗-可铁宁抗体活化的血小板。后将抗-人Fc-FITC(赛默飞世尔,美国)稀释成1:75后,处理血小板并培养20分钟。后采用与所述试验例8相同方式的流式细胞分析法分析收获的细胞。

[0204] 具体地说,将1.5mI血液收集于包括0.84mI的酸-枸橼酸-葡萄糖(ACD)以及10mM的

乙二胺四乙酸的真空采血管(vacutainer tube),。将所述血液转移至离心管后以 $250 \times g$ 离心10分钟。将富血小板血浆(platelet rich plasma, PRP)转移至新管后,常温下以1500rpm离心10分钟。去除上层液,用1mI的台式缓冲液(Tyrode's buffer; 137mMNaCl、2.7mMKCl、2mMMgCl<sub>2</sub>、0.5mMNaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、5mM葡萄糖、10mM羟乙基哌嗪乙磺磺酸(HEPES)及0.2%牛血清白蛋白(BSA); pH7.4)洗涤。以1500rpm离心7分钟后去除上清液,将小球用300 $\mu$ I含有0.1%BSA的金属缓冲液(25mM三羟甲基氨基甲烷盐酸、137mMNaCl、1mMMgCl<sub>2</sub>、1mICaCl<sub>2</sub>、1mMMnCl<sub>2</sub>以及1mMKCl; pH7.5)重悬。50 $\mu$ I制备的PRP混悬液用于流式细胞分析。25 $\mu$ I多种浓度的阿昔单抗-可铁宁以及25 $\mu$ I的抗-可铁宁抗体或者西那吉斯(Synagis<sup>®</sup>),在含有0.1%牛血清白蛋白的金属缓冲液中施用45分钟。用相同缓冲液洗涤2次,并用50 $\mu$ I含有0.1%BSA的金属缓冲液配制1 $\mu$ g/mI浓度的2抗,使其在暗条件室温条件下放置30分钟,其中2抗为抗-人Fc-FITC。接着,将收获的细胞用相同缓冲液洗涤2次后用100 $\mu$ I的磷酸盐缓冲液重悬。利用FACScan荧光细胞分析仪(BD Biosciences)对两种细胞株进行荧光分析,其结果如图19所示。

[0205] 此时,将采用与抗-可铁宁抗体相同浓度处理的西那吉斯作为阴性抗体对照组;而将阿昔单抗(0nM、5nM以及50nM)作为阳性对照组。

[0206] 从图19可知,对于血小板,可铁宁-阿昔单抗/抗-可铁宁抗体复合体维持了与阿昔单抗相同的反应性,并且随着可铁宁-阿昔单抗或者抗-可铁宁抗体浓度的增加,其结合能力也会增加。相反,抗-可铁宁抗体(10 $\mu$ M)处理的FBL-可铁宁未与血小板结合。

[0207] 试验例10:可铁宁-胰岛素/抗-可铁宁抗体复合体的反应性

[0208] (10-1)检测可铁宁-胰岛素/抗-可铁宁抗体复合体对于MCF-7以及SK-Br-3细胞的特异性结合能力

[0209] 具体地,SK-Br-3或者MCF-7细胞(胰岛素受体阳性乳腺癌细胞株)(ATCC,美国)( $1 \times 10^6$ /反应)用FACS缓冲液(流式细胞缓冲液,包含1%胎牛血清以及0.02%叠氮化钠的磷酸盐缓冲液)洗涤3次。25 $\mu$ I的不同浓度(0-5000nM)的可铁宁-胰岛素以及25 $\mu$ I的抗-可铁宁抗体(1000nM)或者西那吉斯(1000nM),在FACS缓冲液中,室温下施用45分钟。此时,西那吉斯作为阴性抗体对照组使用。用FACS缓冲液洗涤2次,并用50 $\mu$ I的FACS缓冲液配制1 $\mu$ g/mI浓度的2抗,使其在暗条件室温条件下放置30分钟,其中2抗为抗-人Fc-FITC。之后,用流式细胞缓冲液洗涤2次,用100 $\mu$ I的磷酸盐缓冲液重悬。利用FACScan荧光细胞分析仪对上述两种细胞株进行荧光分析,其结果如图20A所示。

[0210] 另外,利用5000nM的可铁宁-胰岛素/抗-可铁宁抗体复合体以及可铁宁-阴性肽/抗-可铁宁抗体复合体,采用与上述相同方法,利用抗-人Fc-FITC培养后,采用流式细胞分析法进行分析。其中,利用滤泡性B淋巴细胞(follicular B lymphocyte)结合肽-可铁宁-FBL(SEQ NO:19)粘合体、爱帕琳肽受体(apelin receptor)结合肽-可铁宁-A13(SEQ NO:20)粘合体、以及可铁宁-F13A粘合体(SEQ NO:21)作为可铁宁-阴性肽粘合体。(ST Pharm, 韩国)其结果如图20B所示。

[0211] 如图20所示,胰岛素-可铁宁/抗-可铁宁抗体复合体可成功与表达胰岛素受体的细胞结合,从而可知所述复合体维持对于胰岛素受体的结合能力。

[0212] (10-2)可铁宁-胰岛素/抗-可铁宁抗体复合体的人补体依赖性细胞毒性(CDC)分析

[0213] 为分析抗补体依赖性细胞毒性,对于可铁宁-胰岛素/抗-可铁宁抗体复合体,采用

细胞活性指标(cell viability indicator)WST-1(Takara)进行了实验。

[0214] 具体地说,将表达胰岛素受体的MCF-7细胞(ATCC,美国)用分析培养基(DMEM,1%胎牛血清)洗涤,并稀释至 $1 \times 10^5$ /mI。将所述细胞混悬液加入到灭菌96孔组织培养板中,每孔100 $\mu$ I,在5%CO<sub>2</sub>的培养箱内过夜培养,使细胞充分贴壁。从所述细胞中去除分析培养基,将包含25 $\mu$ I可铁宁-胰岛素、25 $\mu$ I多种浓度(0、0.1以及1 $\mu$ M)的抗-可铁宁抗体以及50 $\mu$ I的1/12人补充稀释剂(complement dilution)的孔板( 웰 세트 )在37°C以及5%CO<sub>2</sub>的培养箱内进行培养,促进了人补体介导的细胞溶解(complement-mediated cell lysis)。过夜培养后,每个孔加入10 $\mu$ I的WET-1(宝生物),37°C继续培养3个小时后,在450nm处测定吸光度。将1%曲通X-100以及培养基与人血清一同分别施用于高-对照组(high-control)以及低对照组(low-control)细胞中。并且,作为补充对照组(supplement control),使用了不含细胞的,且经可铁宁-胰岛素/抗-可铁宁抗体复合体与人血清一同处理的孔。分别进行了3次分析,其结果如图21所示。其中,高-对照组是指由于1%曲通X-100的作用,发生100%的细胞死亡的组;而低-对照组是指未发生由补体诱导的细胞死亡的组;缓冲液对照组是与其它条件无关的,仅是为了确定缓冲液的不同是否会导致结果差异的组。

[0215] 从图21可知,本发明的可铁宁-胰岛素/抗-可铁宁抗体复合体能够维持抗-可铁宁抗体的人补体依赖性细胞毒性能力,所述人补体依赖性细胞毒性能力是指对于过表达乳腺癌细胞的胰岛素受体,作为特异性细胞毒性剂(cytotoxic agent)而作用。

[0216] 试验例11

[0217] 具有与人补体C5(complement component C5)结合能力的免疫球蛋白伊库丽单抗(eculizumab)的氨基酸序列(US6355245B1)的仅利用VH、VL序列,组合单链抗体(ScFv),使其位于cotinibody(与可铁宁结合的抗体ScFv)的第一个ScFv。将此载体转化到293F细胞株,使其表达蛋白质后,为从细胞培养液纯化抗体,进行了利用蛋白A琼脂糖的亲和层析(affinity chromatography)。利用稀释成1/10、1/20、1/40、1/80(泳道1、2、3、4)的人血清20 $\mu$ I和纯化的人补体C5100ng(泳道5)进行聚丙烯酰胺凝胶电泳,并将经过电泳后的蛋白质转移到了硝酸纤维素膜。用含有5%脱脂奶的三羟甲基氨基甲烷缓冲盐水(Tris-buffered saline)将人补体C5-cotinibody蛋白质稀释成2 $\mu$ g/mI,在与膜接触的状态下,在4°C,反应16小时。膜用含有0.2%吐温20的三羟甲基氨基甲烷缓冲盐水溶液洗涤,将结合辣根过氧化物酶的可铁宁稀释1/1000的溶液,在常温下与膜反应2小时。之后,膜用含有0.2%吐温20的三羟甲基氨基甲烷缓冲盐水溶液洗涤,处理化学发光物质后,将其在胶片上显影。确认了人补体C5-cotinibody可选择性的与人补体C5结合(图23)。

[0218] 以上,虽然利用所述具体的实施例描述了本发明,在由权利要求书限定的本发明的保护范围内,本领域的研究人员可轻易对本发明进行变形或者变化。

## 序列表

- <110> 首尔大学校产学协力团  
 <120> 在粘合物质和可铁宁的粘合体上结合有抗-可铁宁抗体的复合体及其用途  
 <130> KHP13212525.1  
 <150> US 61/476,018  
 <151> 2011-04-15  
 <160> 21  
 <170> KopatentIn 1.71  
 <210> 1  
 <211> 6  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列  
 <220>  
 <223> WKYMYm-NH2肽  
 <400> 1  
 Trp Lys Tyr Met Val Met  
 1 5  
 <210> 2  
 <211> 6  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列  
 <220>  
 <223> wkyym-NH2肽  
 [0001] <400> 2  
 Trp Lys Tyr Met Val Met  
 1 5  
 <210> 3  
 <211> 29  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列  
 <220>  
 <223> AS1411 DNA适体  
 <400> 3  
 dttggtggtg gtggttggtg tgggtggtg 29  
 <210> 4  
 <211> 27  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列  
 <220>  
 <223> CRO26 DNA适体  
 <400> 4  
 dactctctct ccttctctct cctctctc 27  
 <210> 5  
 <211> 27  
 <212> RNA  
 <213> 人工序列  
 <220>  
 <223> 派加他尼RNA适体

序列表

<220>  
 <221> 修饰的碱基  
 <222> (1)..(27)  
 <223> C和U是2'-氟基, G和A是2'-甲基, 其中A4和A5是2'-羟基

<400> 5  
 cggaucagu gaugcuuau acauccg 27

<210> 6  
 <211> 107  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 胰岛素

<400> 6  
 Met Ala Leu Trp Met Arg Leu Leu Pro Leu Leu Ala Leu Leu Ala Leu  
 1 5 10 15  
 Trp Gly Pro Asp Pro Ala Ala Ala Phe Val Asn Gln His Leu Cys Gly  
 20 25 30  
 Ser His Leu Val Glu Ala Leu Tyr Leu Val Cys Gly Glu Arg Gly Phe  
 35 40 45  
 Phe Tyr Thr Pro Lys Arg Arg Glu Ala Glu Asp Leu Gln Val Gly Gly  
 50 55 60  
 Val Leu Gly Gly Gly Pro Gly Ala Gly Ser Leu Gln Pro Leu Ala Leu  
 65 70 75 80  
 [0002] Glu Gly Ser Leu Gln Lys Arg Gly Ile Val Glu Gln Cys Cys Thr Ser  
 85 90 95  
 Ile Cys Ser Leu Gln Leu Glu Asn Tyr Cys Asn  
 100 105

<210> 7  
 <211> 48  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 抗-可铁宁兔/人嵌合抗体轻链的上游引物

<400> 7  
 acttaagctt gcgccacat gggctgtgcc tgcateatcc tgttcctg 48

<210> 8  
 <211> 24  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 抗-可铁宁兔/人嵌合抗体轻链的下游引物

<400> 8  
 gcaagctcta gactagcact cgcc 24

<210> 9  
 <211> 49  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列

<220>

## 序列表

	<223>	抗-可铁宁兔/人嵌合抗体重链的上游引物	
	<400>	9	
		acatcggcta gccgccacca tgggctggtc ctgcatcacc ctgttcctg	49
	<210>	10	
	<211>	24	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	抗-可铁宁兔/人嵌合抗体重链的下游引物	
	<400>	10	
		gagctcggat cccttgccgg ccgt	24
	<210>	11	
	<211>	48	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	来自抗-可铁宁兔单链抗体的用于轻链可变区的上游引物	
	<400>	11	
		atcctgttcc tggtgccac gccaccggc gagctcgatc tgaccacg	48
	<210>	12	
	<211>	24	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	来自抗-可铁宁兔单链抗体的用于轻链可变区的下游引物	
[0003]	<400>	12	
		taggatctcc agctcggctc ctcc	24
	<210>	13	
	<211>	48	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	来自抗-可铁宁兔单链抗体的用于重链可变区的上游引物	
	<400>	13	
		atcctgttcc tggtgccac gccaccggc cagtcggtga aggagfcc	48
	<210>	14	
	<211>	24	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	来自抗-可铁宁兔单链抗体的用于重链可变区的下游引物	
	<400>	14	
		tgaagagatg gtgaccaggg tgcc	24
	<210>	15	
	<211>	24	
	<212>	DNA	



序列表

Gln	Arg	Pro	Arg	Leu	Ser	His	Lys	Gly	Pro	Met	Pro
1				5					10		

[0005]

<210>	21
<211>	13
<212>	PRT
<213>	人工序列

<220>	
<223>	F13A肽

Gln	Arg	Pro	Arg	Leu	Ser	His	Lys	Gly	Pro	Met	Pro	Ala
1				5					10			

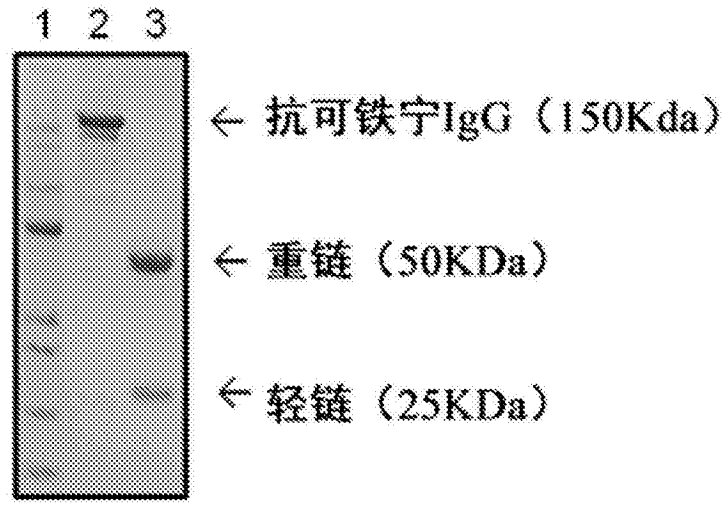


图1

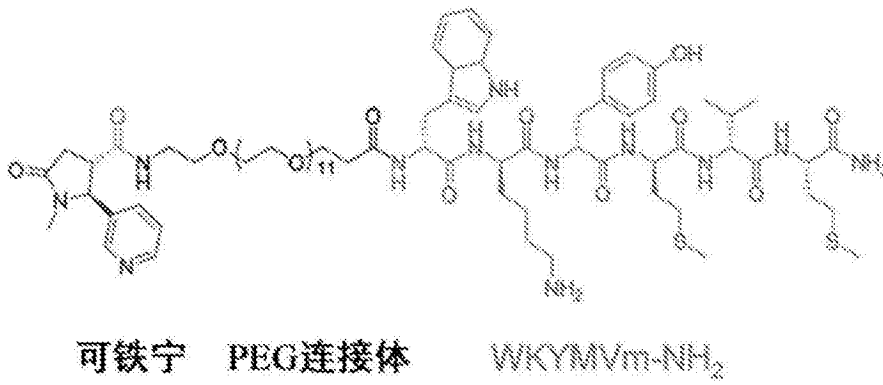


图2

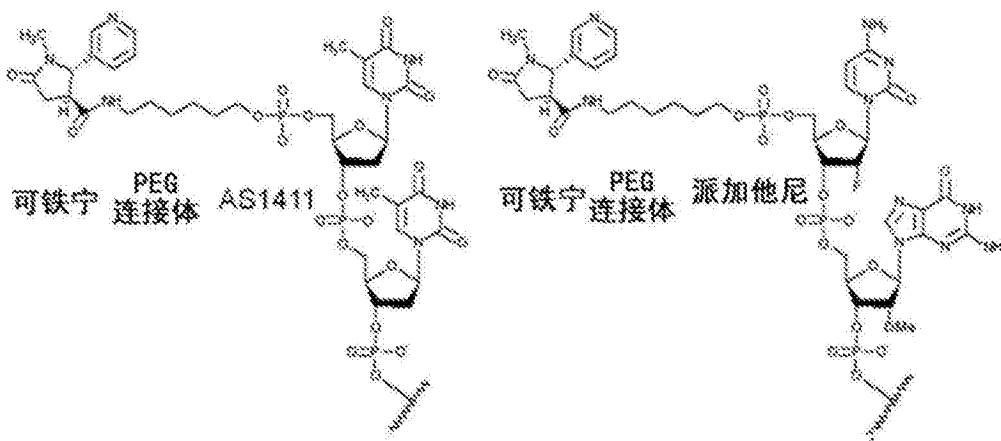


图3

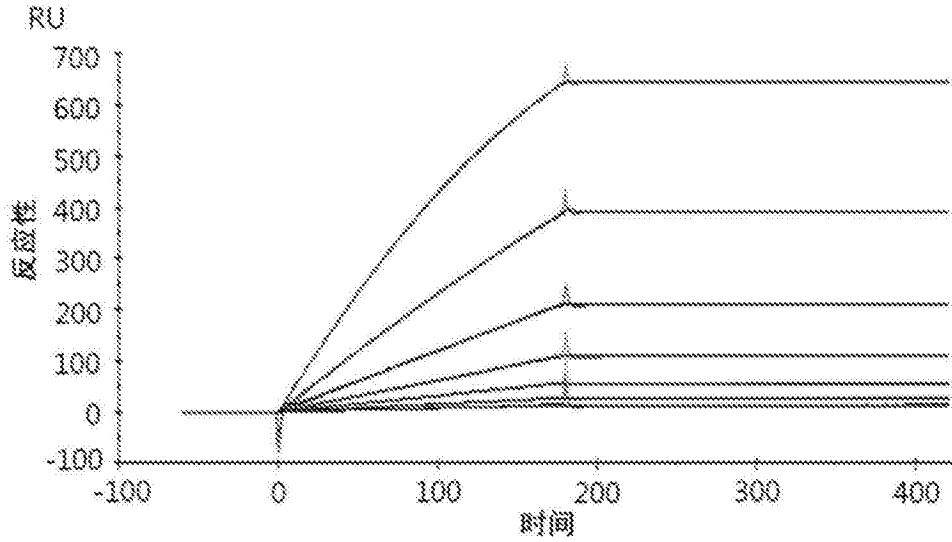


图4

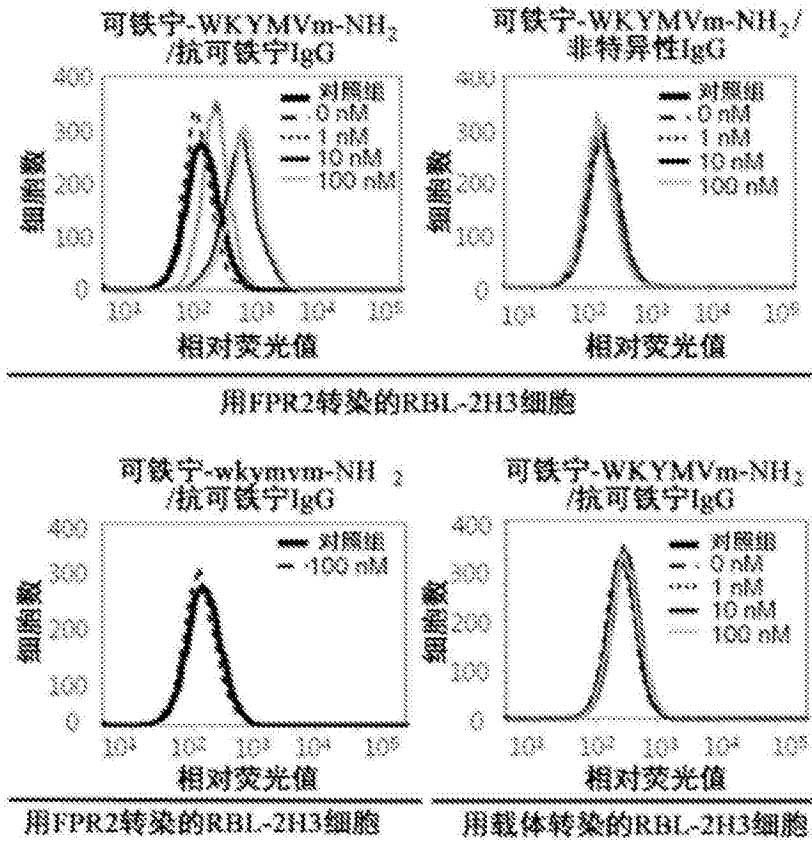


图5

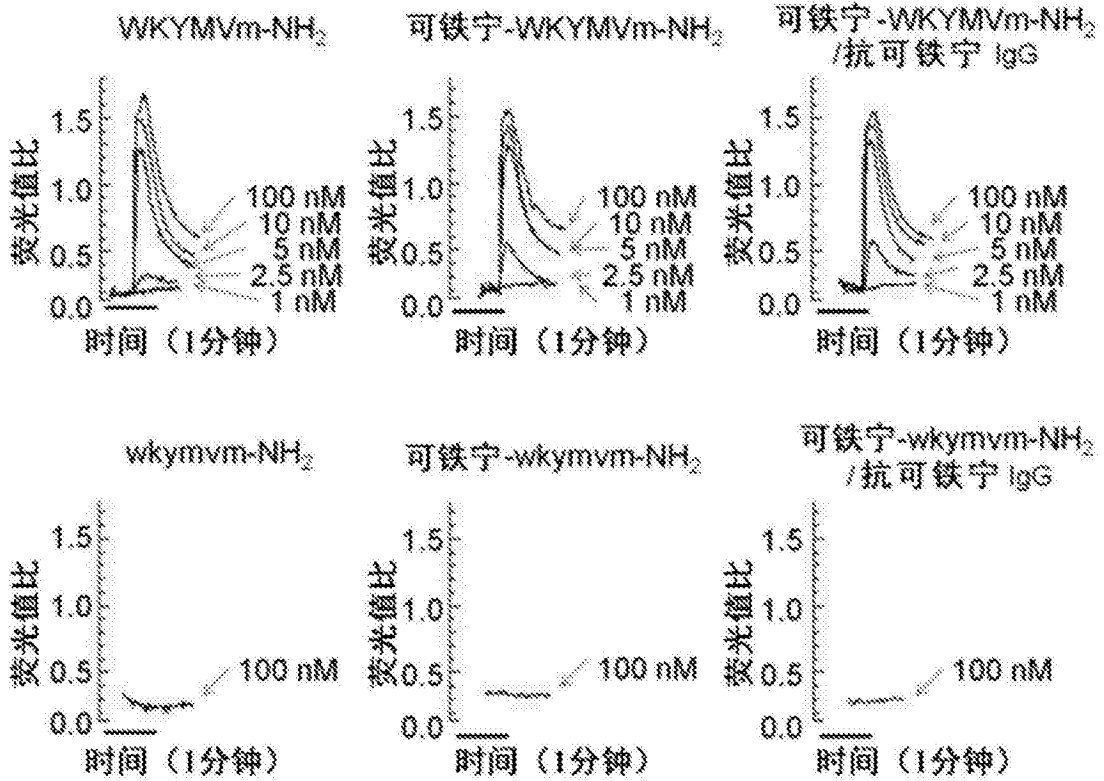


图6

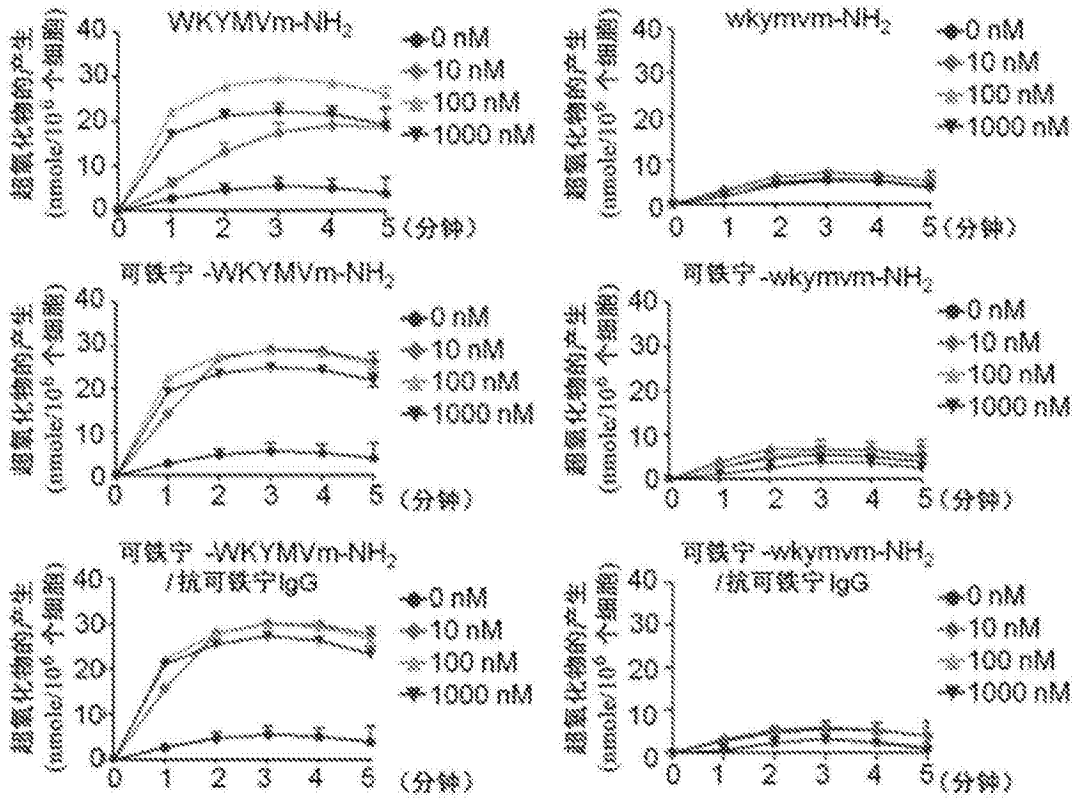


图7

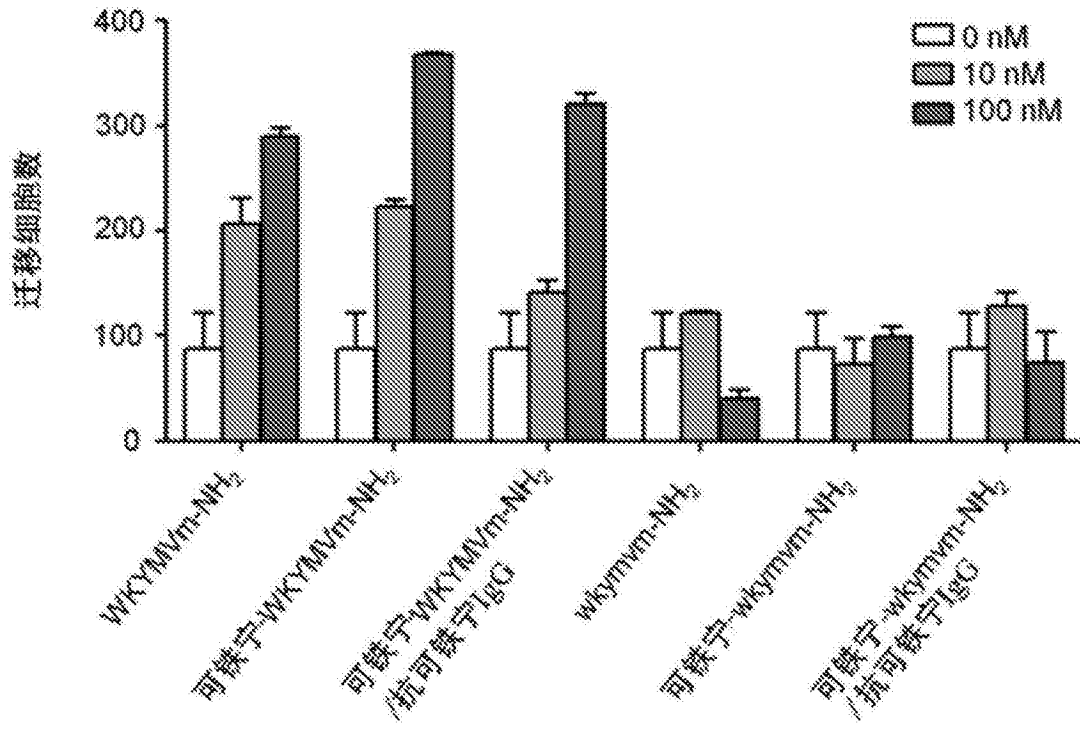


图8

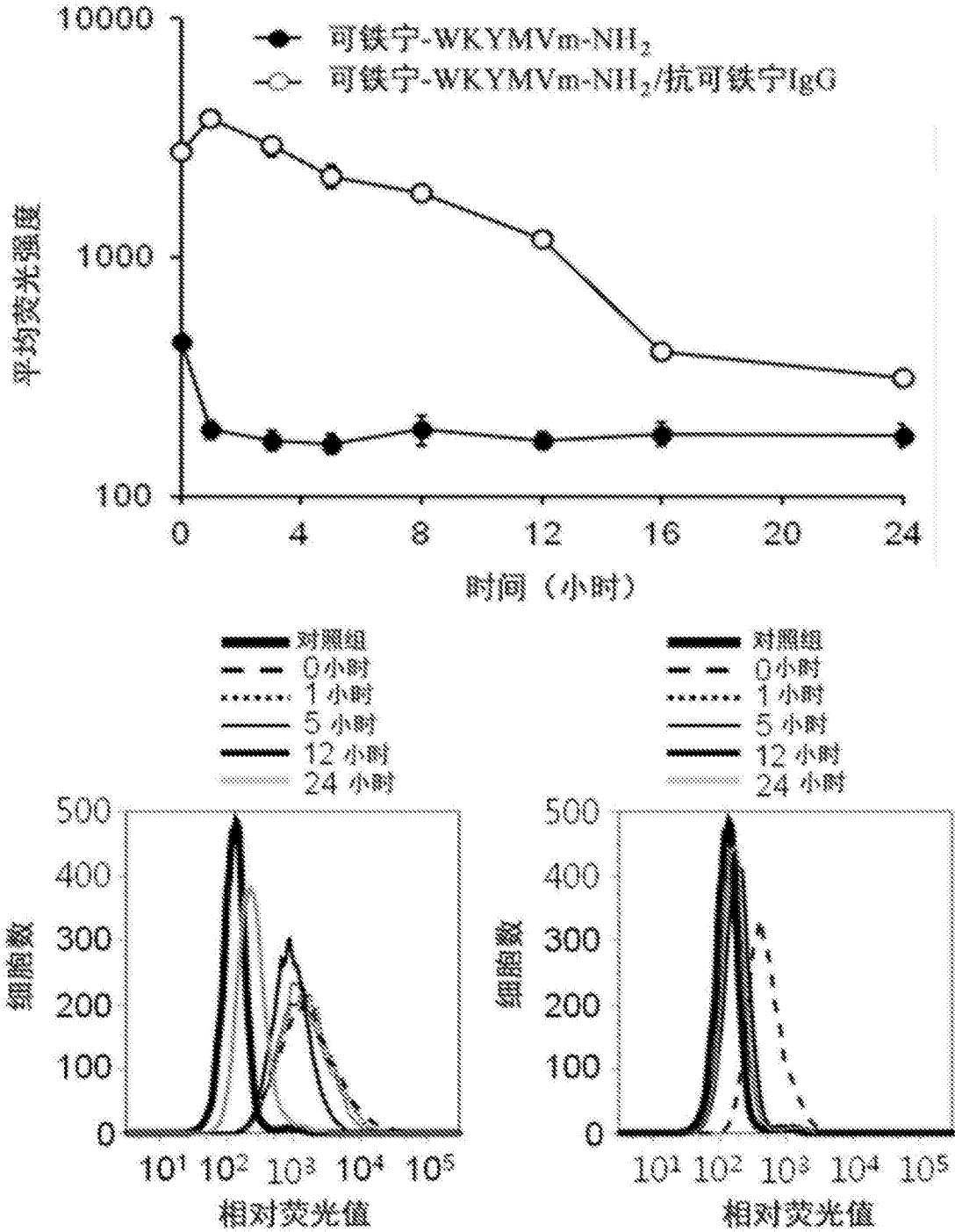


图9

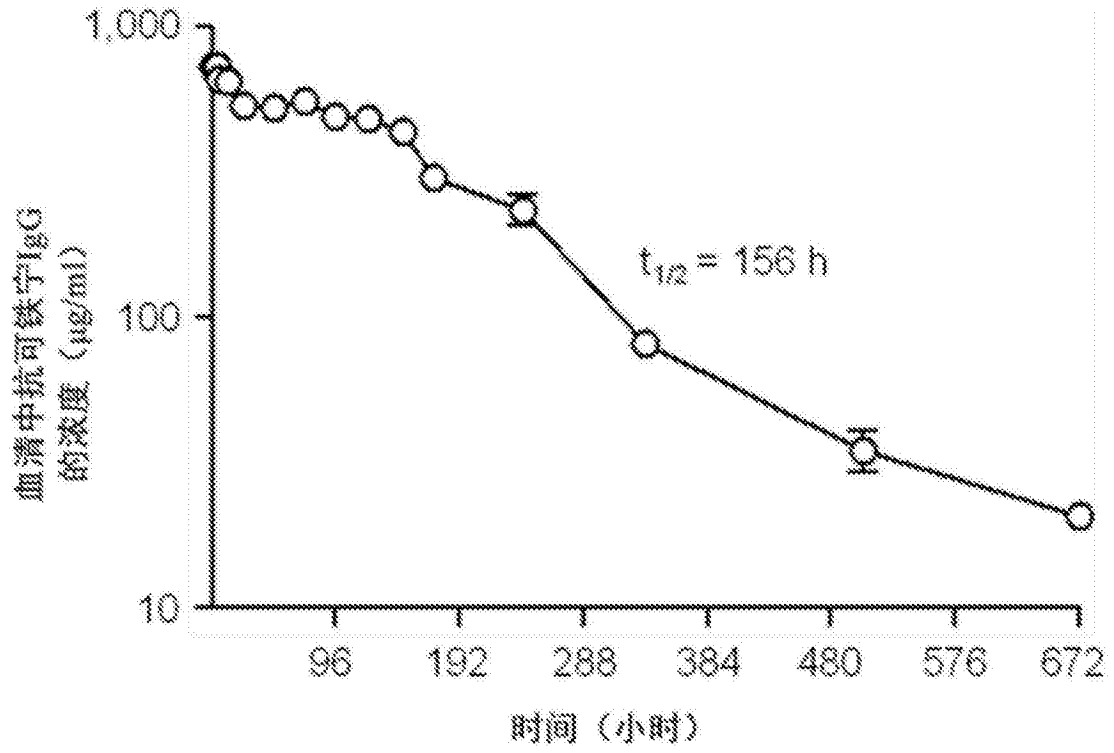


图10

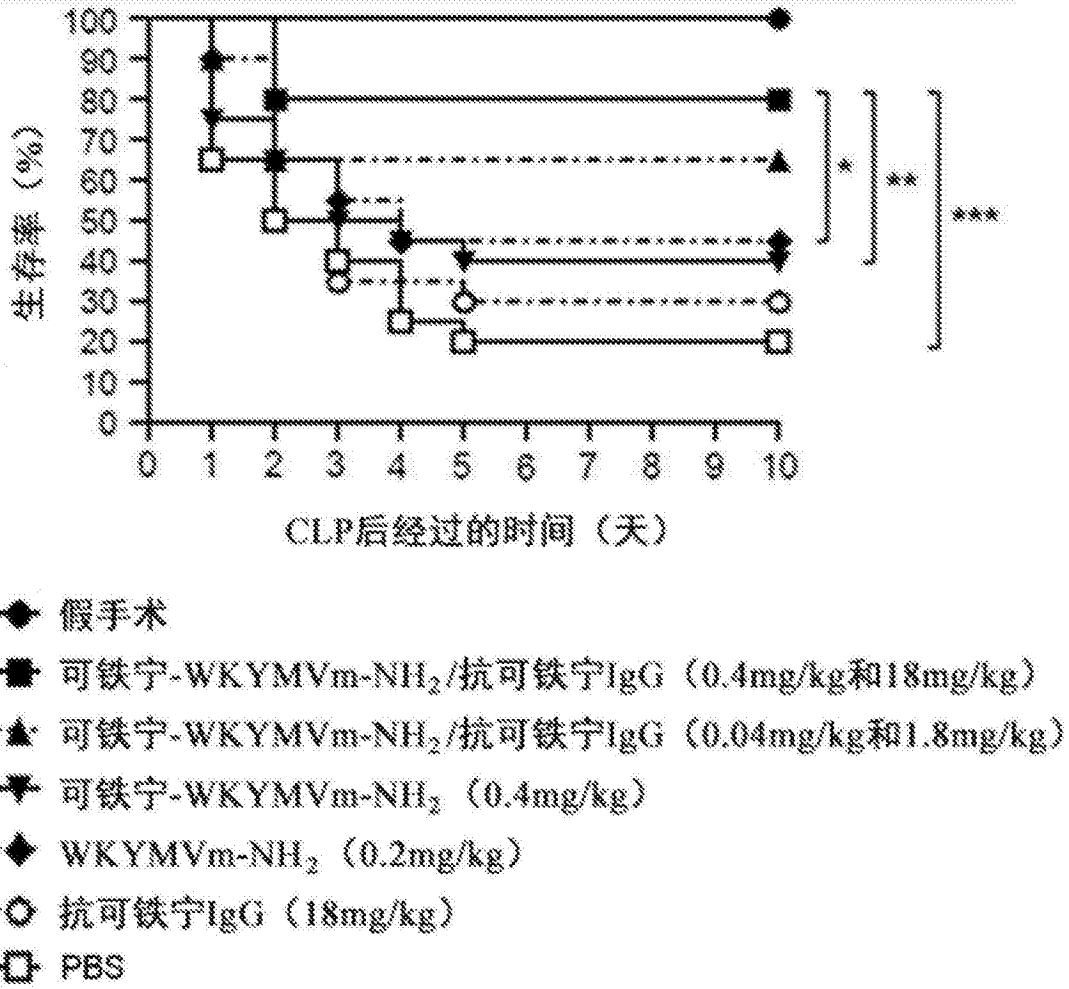


图11

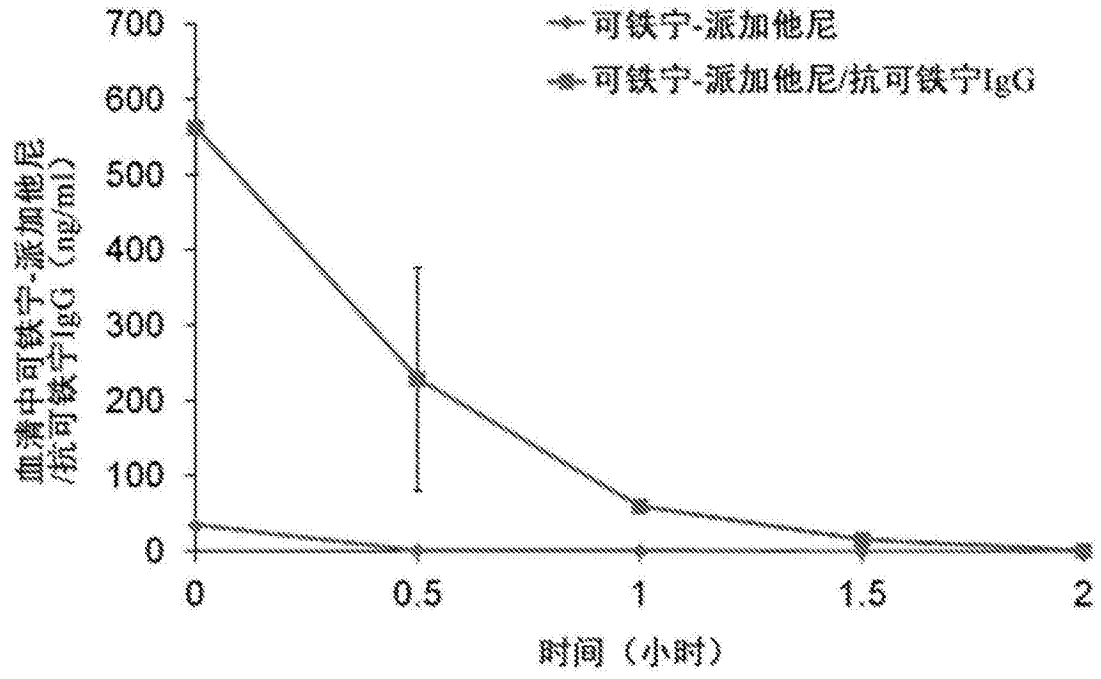


图12

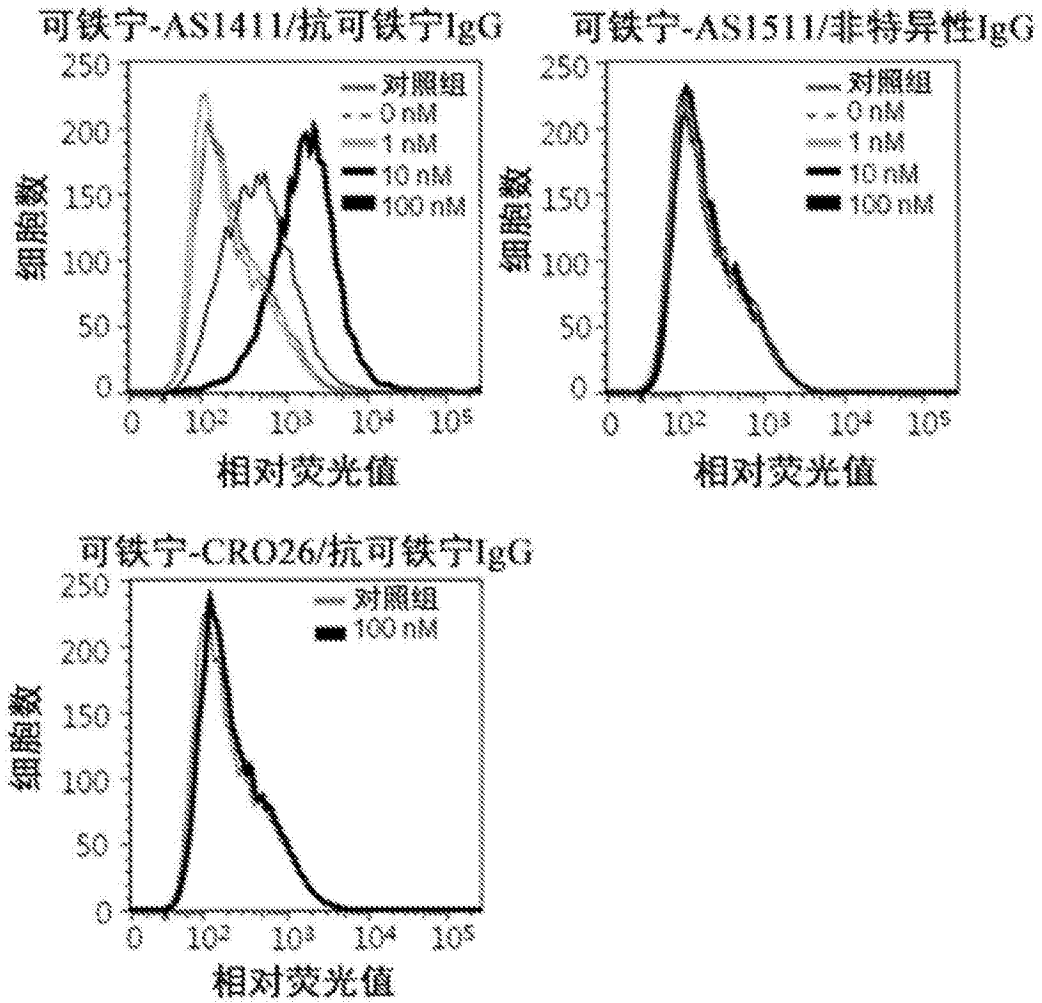


图13

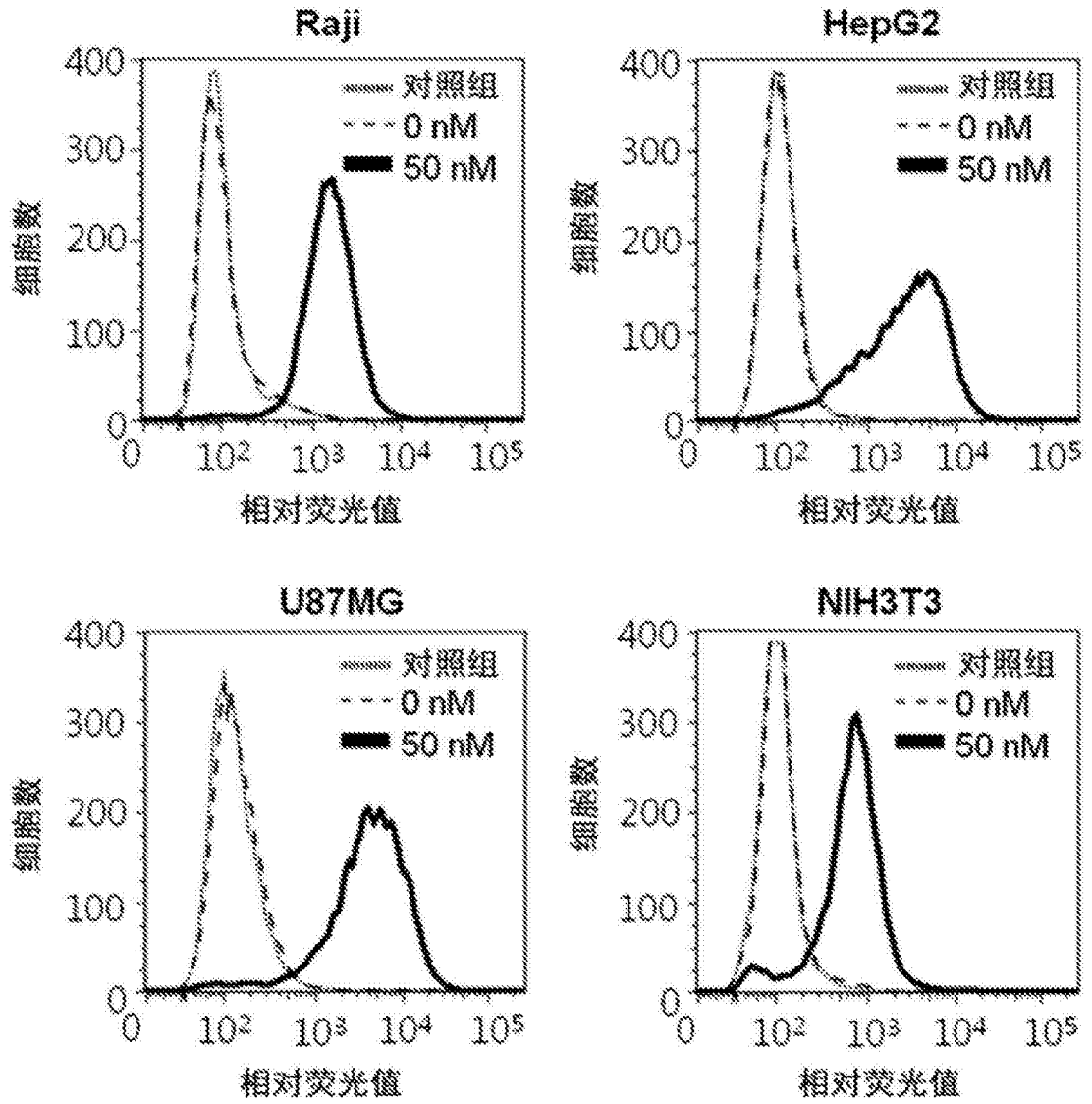


图14

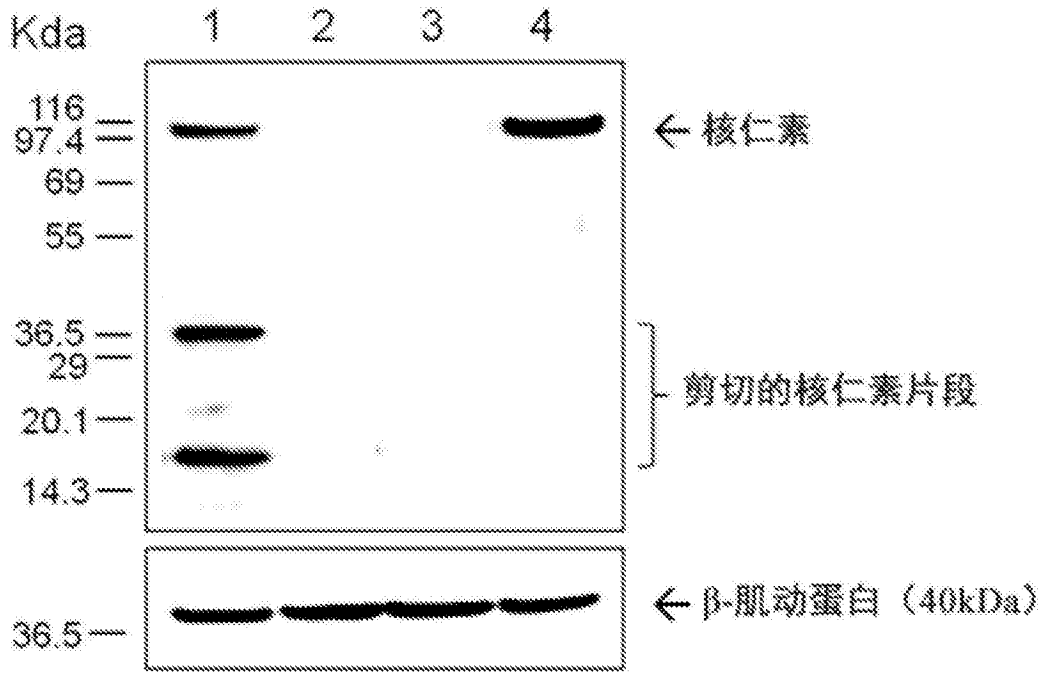


图15

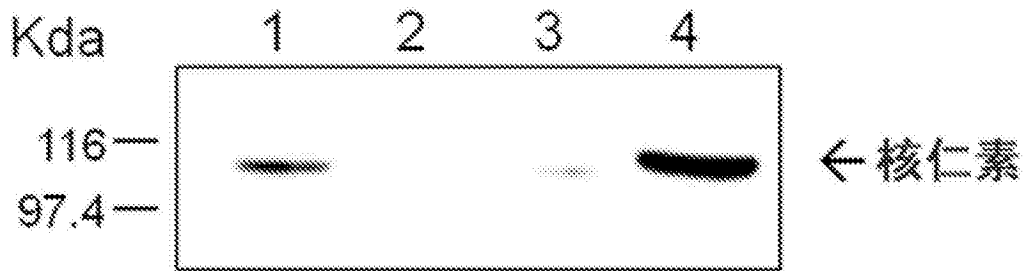


图16

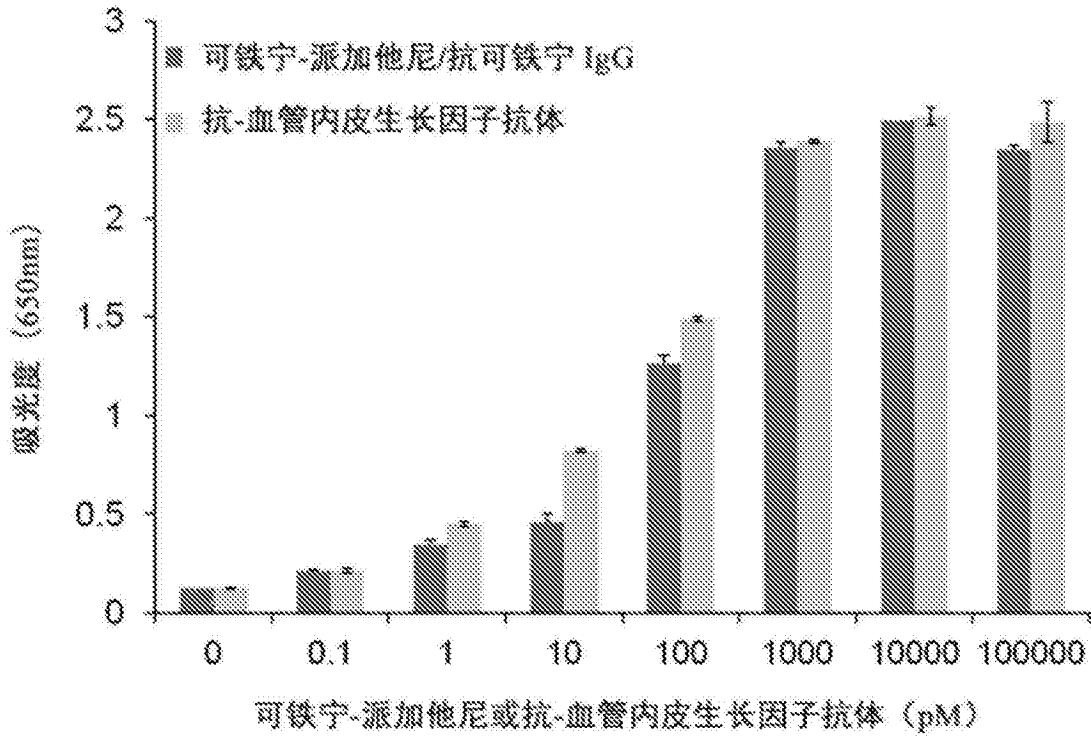


图17

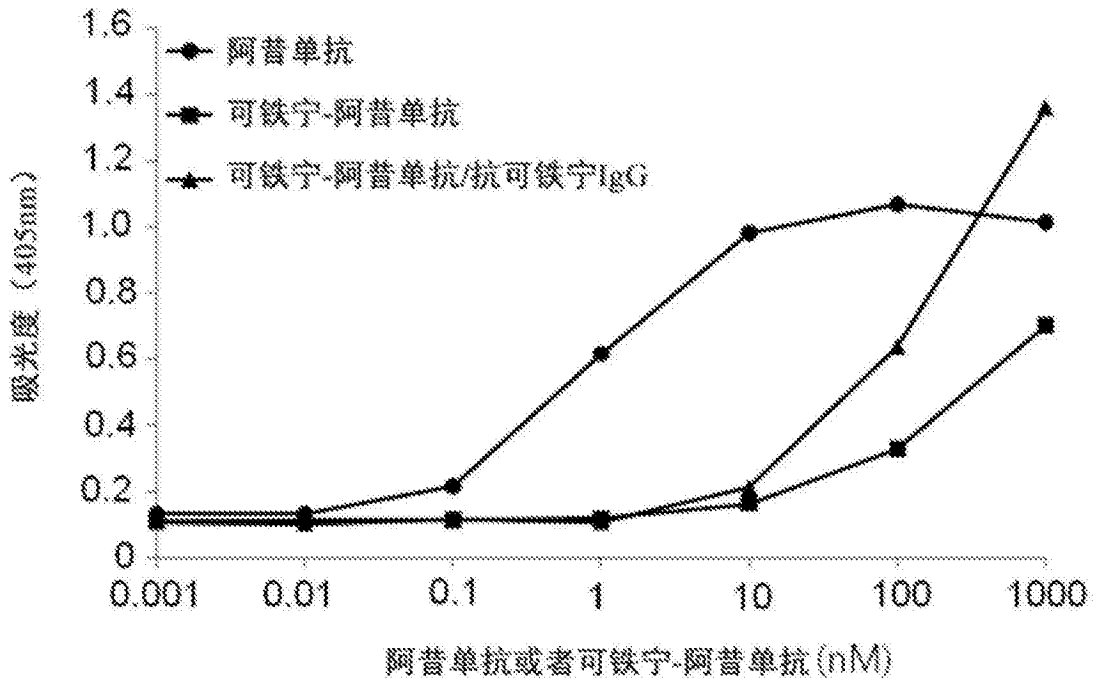


图18

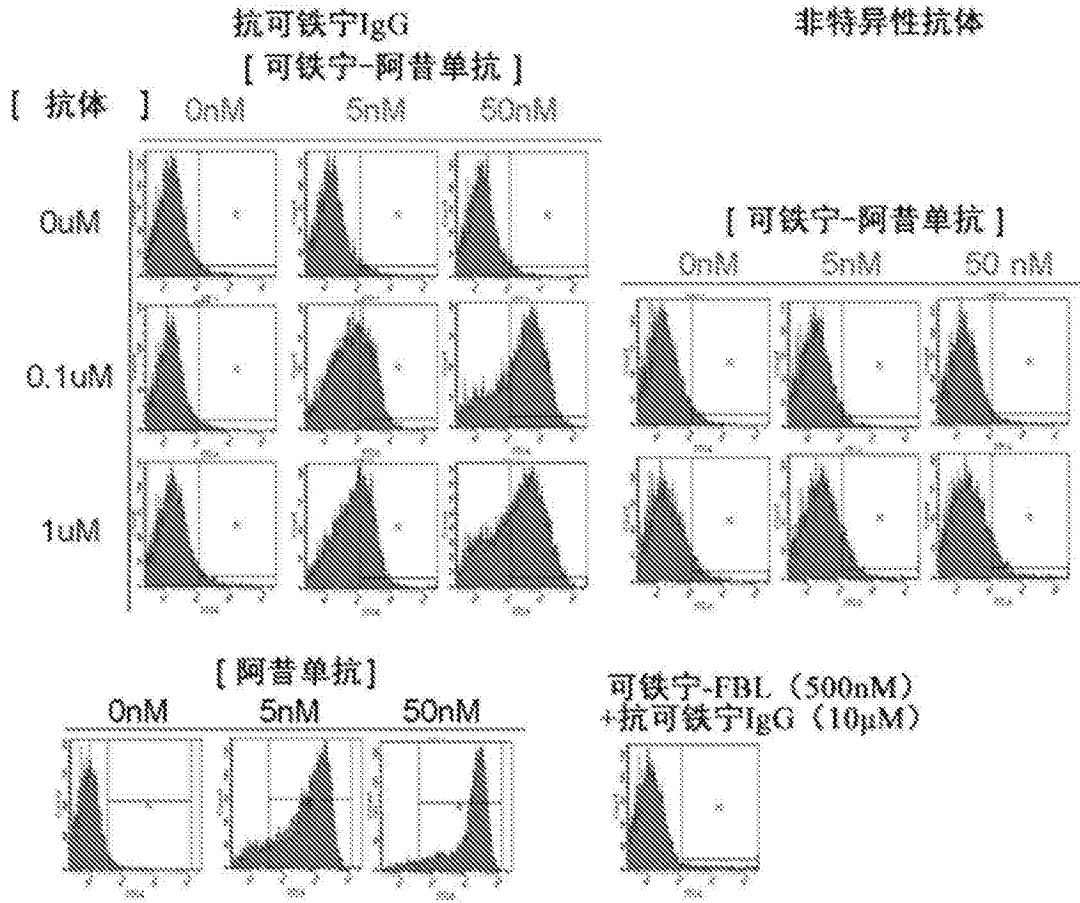


图19

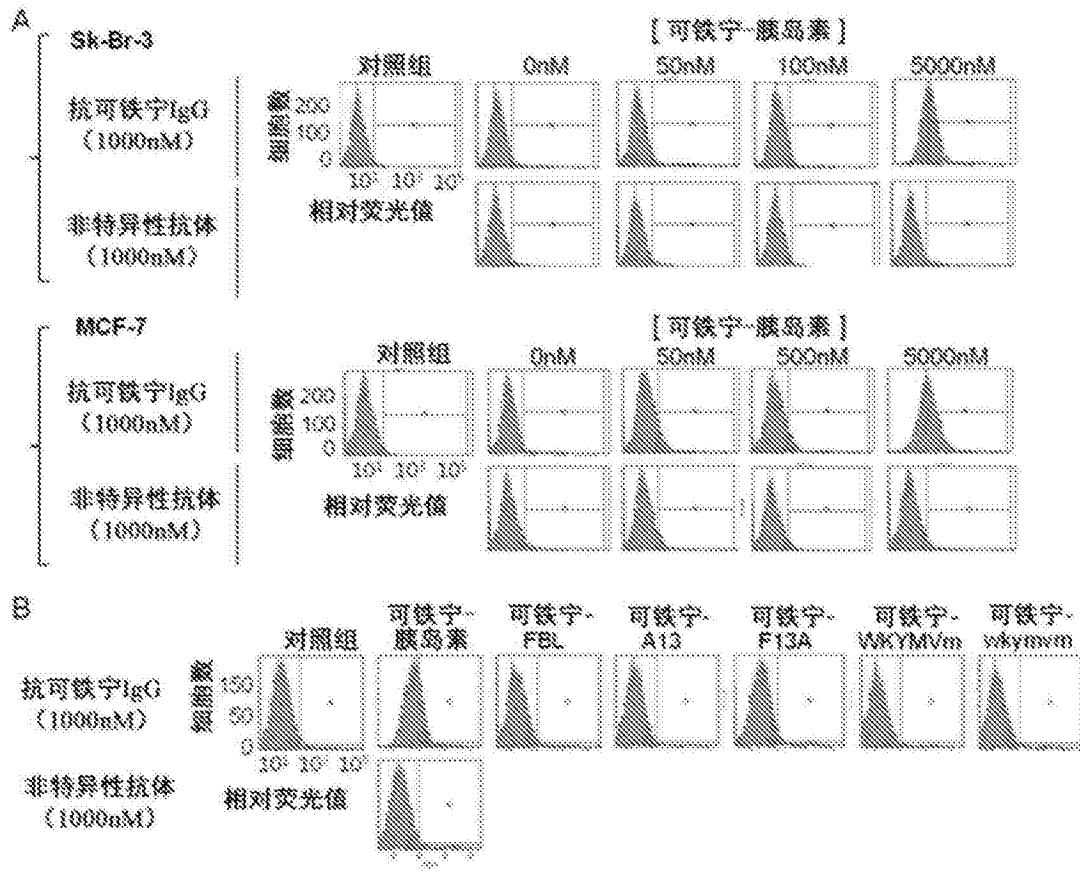


图20

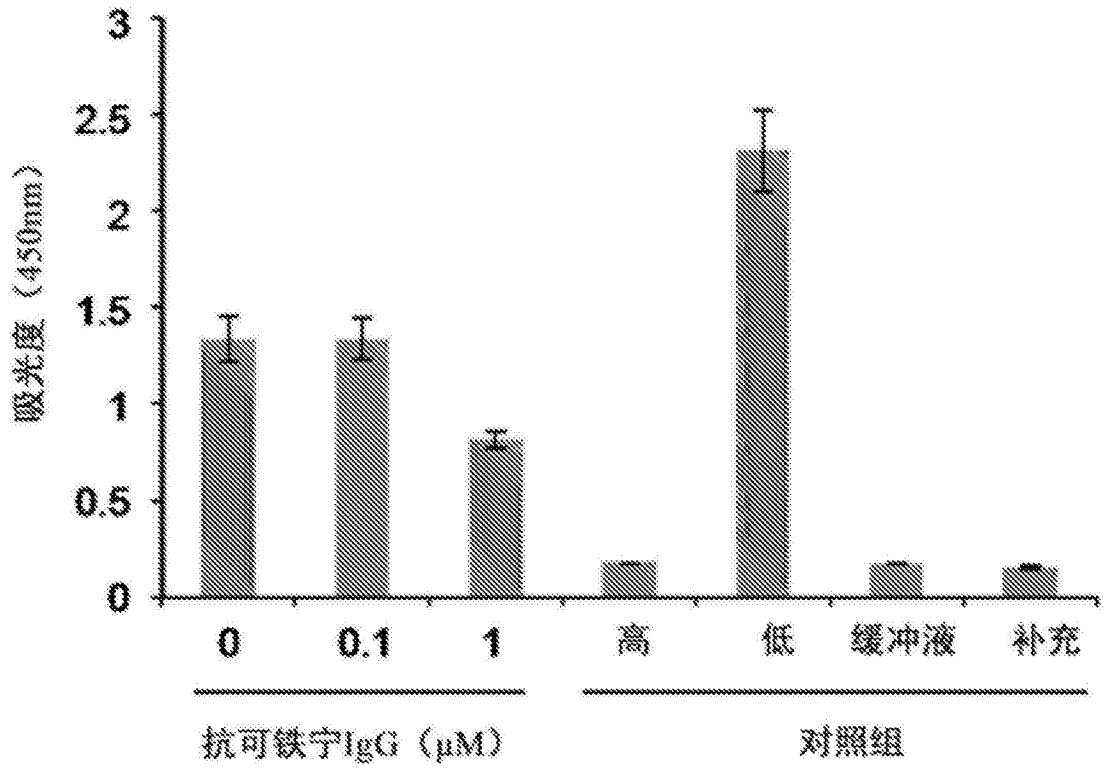


图21

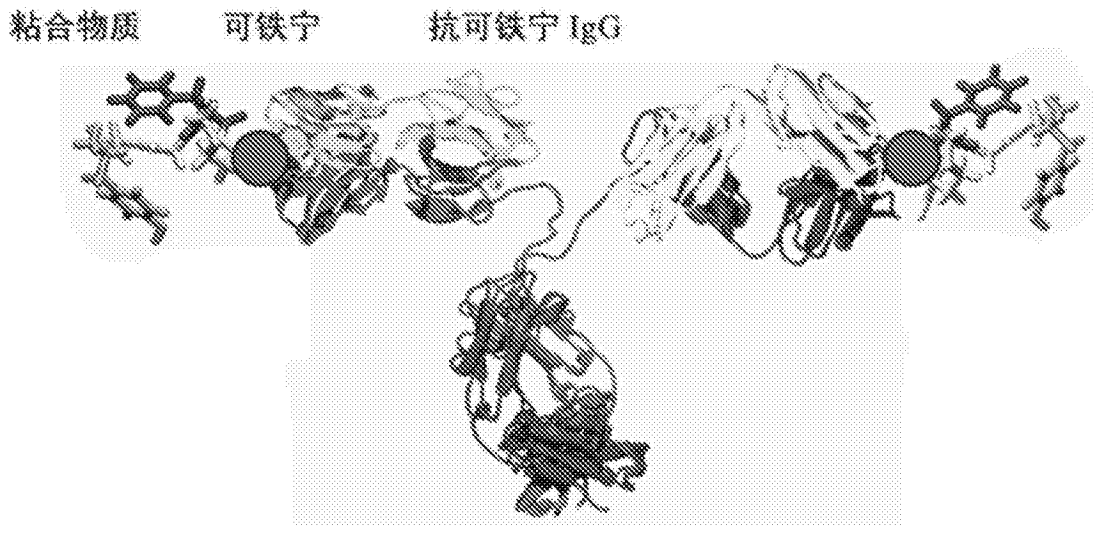


图22

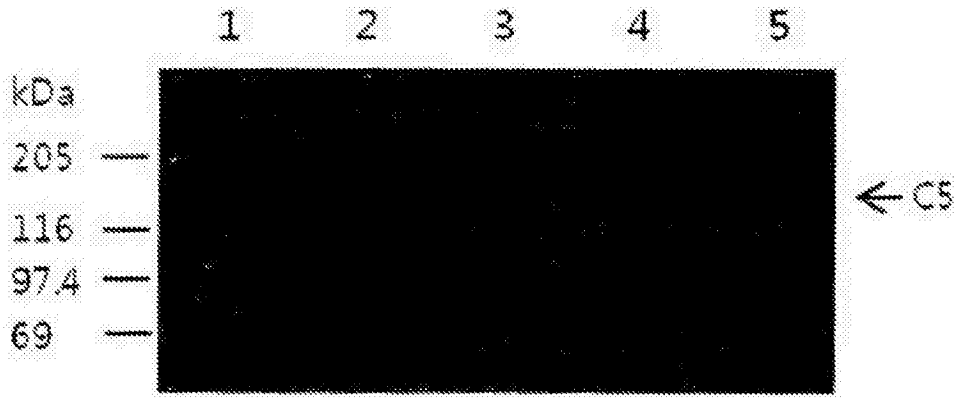


图23

专利名称(译)	在粘合物质和可铁宁的粘合体上结合有抗-可铁宁抗体的复合体及其用途		
公开(公告)号	<a href="#">CN103476798B</a>	公开(公告)日	2017-04-05
申请号	CN201280018671.X	申请日	2012-04-16
[标]申请(专利权)人(译)	首尔大学校产学协力团		
申请(专利权)人(译)	首尔大学校产学协力团		
当前申请(专利权)人(译)	首尔大学校产学协力团		
[标]发明人	郑峻昊 朴仙荣 黄度彬 李花京		
发明人	郑峻昊 朴仙荣 黄度彬 李花京		
IPC分类号	C07K16/44 C07K14/575 G01N33/53 C07K17/02 C07D401/04 C12N15/115		
CPC分类号	A61K31/465 A61K47/545 A61K47/6891 A61K2039/505 A61P35/00 A61P43/00 B82Y5/00 C07D401/04 C07D401/14 C07K16/18 C07K16/2848 C07K16/44 C07K2317/24 C07K2317/31 C07K2317/622 C07K2317/92 C07K2317/94 G01N33/94 C07K14/575 C07K17/02 A61K47/6803 A61K47/6849		
审查员(译)	滕文静		
优先权	61/476018 2011-04-15 US		
其他公开文献	CN103476798A		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明涉及在粘合物质和可铁宁的粘合体上结合有抗-可铁宁抗体的复合体及其用途，依据本发明的复合体在体外生物学分析方法 ( in vitro biological assay ) 中可被用作分析工具，其可以保持粘合物质的特异反活性、生物学功能；以及补体依赖性细胞毒性 ( CDC )、抗体依赖细胞介导的细胞毒性 ( ADCC ) 以及在体内的长半衰期等抗体的固有特性。

粘合物质 可铁宁 抗可铁宁 IgG

