



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 107715119 A

(43)申请公布日 2018.02.23

(21)申请号 201710835522.7

G01N 33/53(2006.01)

(22)申请日 2017.09.15

A61P 35/00(2006.01)

(71)申请人 四川大学

A61P 37/02(2006.01)

地址 610065 四川省成都市武侯区一环路
南一段24号

A61P 25/00(2006.01)

(72)发明人 姚于勤 杨金亮 余琳

(74)专利代理机构 成都虹桥专利事务所(普通
合伙) 51124

代理人 梁鑫

(51)Int.Cl.

A61K 47/68(2017.01)

A61K 31/407(2006.01)

A61K 31/437(2006.01)

C07K 16/28(2006.01)

G01N 33/574(2006.01)

权利要求书2页 说明书15页

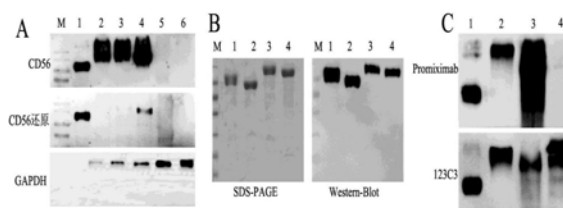
序列表9页 附图13页

(54)发明名称

抗CD56抗体与多卡霉素偶联复合物及其制
备方法和用途

(57)摘要

本发明属于抗体偶联药物制备领域,具体涉及一种抗CD56抗体与多卡霉素偶联复合物及其制备方法和用途。本发明提供了一种抗CD56抗体与多卡霉素偶联复合物,其特征在于,其组成包括:抗CD56抗体,多卡霉素,偶联抗体与多卡霉素的连接分子,偶联抗体与多卡霉素的连接分子一端通过马来酰亚胺与抗CD56抗体的游离巯基偶联,另一端通过酯键与多卡霉素的羟基偶联。本发明的抗体偶联复合物保留了抗CD56抗体的靶向结合CD56的高亲和能力又具有多卡霉素高效杀伤细胞的能力,在提高药物治疗效果的同时减少药物对机体的毒副作用,能够用于制备诊断、治疗肿瘤、免疫或神经系统疾病的药物,具有良好的应用前景。



1. 抗CD56抗体与多卡霉素偶联复合物, 其特征在于, 其组成包括: 抗CD56抗体, 多卡霉素, 偶联抗体与多卡霉素的连接分子; 连接分子一端通过马来酰亚胺与抗CD56抗体的游离巯基偶联, 另一端通过酯键与多卡霉素的羟基偶联。

2. 根据权利要求1所述的抗CD56抗体与多卡霉素偶联复合物, 其特征在于: 所述抗CD56抗体的游离巯基为: 还原剂还原抗CD56抗体轻链和重链后, 通过打开抗体链间或链内的二硫键形成的游离巯基。

3. 根据权利要求1或2所述的抗CD56抗体与多卡霉素偶联复合物, 其特征在于: 所述的还原剂为二硫苏糖醇, β -巯基乙醇或三(2-羧乙基)膦中的至少一种。

4. 根据权利要求1~3任一项所述的抗CD56抗体与多卡霉素偶联复合物, 其特征在于: 所述抗CD56抗体包括重链可变结构域、轻链可变结构域、恒定区; 所述重链可变结构域为与该抗体的重链互补性决定区相同的结构域, 所述轻链可变结构域为与该抗体的轻链互补性决定区相同的结构域。

5. 根据权利要求4所述的抗CD56抗体与多卡霉素偶联复合物, 其特征在于: 所述抗CD56抗体的重链可变结构域的氨基酸序列为Seq ID NO:1、Seq ID NO:2、Seq ID NO:3、Seq ID NO:4、Seq ID NO:5或Seq ID NO:6中的任意一种。

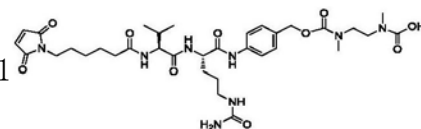
6. 根据权利要求4或5所述的抗CD56抗体与多卡霉素偶联复合物, 其特征在于: 所述抗CD56抗体的轻链可变结构域的氨基酸序列为Seq ID NO:7、Seq ID NO:8、Seq ID NO:9或Seq ID NO:10中的任意一种。

7. 根据权利要求4~6任一项所述的抗CD56抗体与多卡霉素偶联复合物, 其特征在于: 所述恒定区为天然抗体恒定区或基因工程改造后的抗体恒定区。

8. 根据权利要求1~7任一项所述的抗CD56抗体与多卡霉素偶联复合物, 其特征在于: 所述偶联抗体与多卡霉素的连接分子含有缬氨酸结构单元和瓜氨酸二肽结构单元。

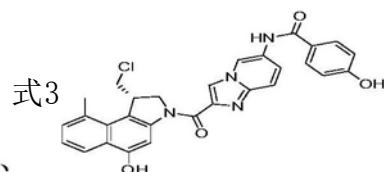
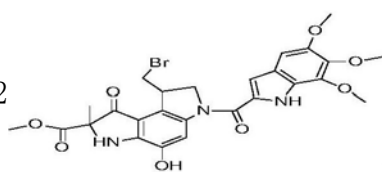
9. 根据权利要求1~8任一项所述的抗CD56抗体与多卡霉素偶联复合物, 其特征在于:

所述偶联抗体与多卡霉素的连接分子结构为式1所示。

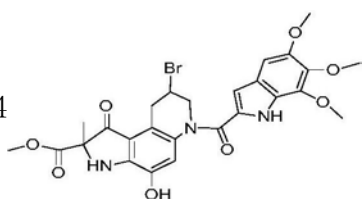


10. 根据权利要求1~9任一项所述的抗CD56抗体与多卡霉素偶联复合物, 其特征在于:

所述的多卡霉素的分子结构为式2

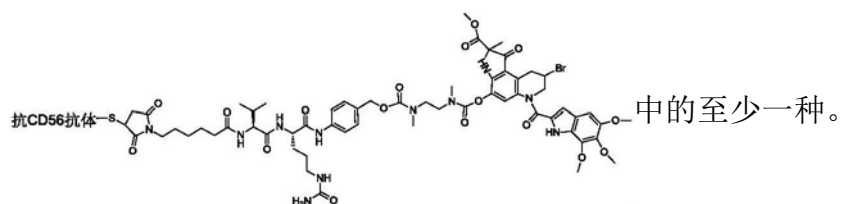
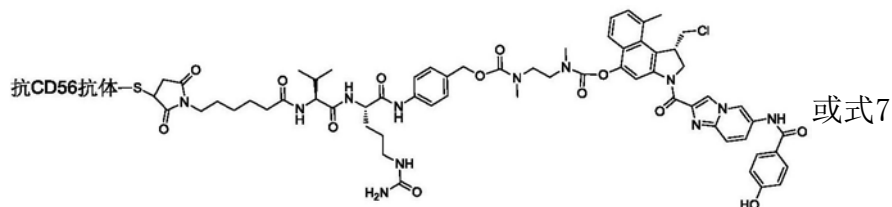
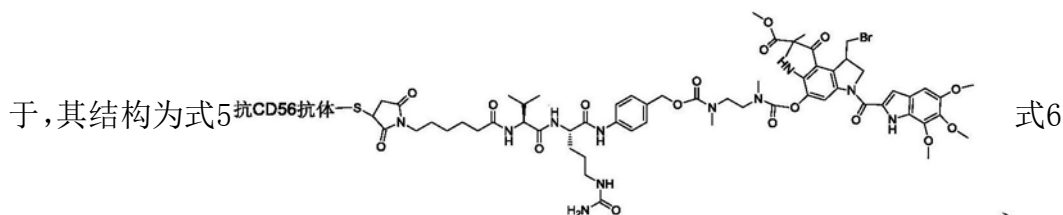


或式4



中的任意一种。

11. 根据权利要求1~10任一项所述的抗CD56抗体与多卡霉素偶联复合物, 其特征在



12. 根据权利要求1~11任一项所述的抗CD56抗体与多卡霉素偶联复合物,其特征在于:所述的抗CD56抗体与多卡霉素的摩尔比为1:1-10。

13. 根据权利要求1~12任一项所述的抗CD56抗体与多卡霉素偶联复合物,其特征在于:所述的抗CD56抗体与多卡霉素的摩尔比为1:3.5。

14. 权利要求1~13任一项所述的抗CD56抗体与多卡霉素偶联合物的制备方法,其特征在于,包括以下步骤:

- a、制备抗CD56抗体;
- b、采用还原剂还原抗CD56抗体,得到表面有二硫键的抗CD56抗体;
- c、加入多卡霉素和偶联抗体与多卡霉素的连接分子,反应0.5-3h,制得抗CD56抗体与多卡霉素偶联复合物。

15. 权利要求1~13任一项所述的抗CD56抗体与多卡霉素偶联复合物在制备诊断或治疗肿瘤、免疫系统疾病或神经系统疾病药物中的用途。

抗CD56抗体与多卡霉素偶联复合物及其制备方法和用途

技术领域

[0001] 本发明属于抗体偶联药物制备领域,具体涉及一种抗CD56抗体与多卡霉素偶联复合物及其制备方法和用途。

背景技术

[0002] 抗体-化疗药物偶联物,也叫抗体偶联药物(Antibody-drug conjugates,ADC),充分发挥了抗体的靶向安全性与化学药物的高效杀伤性,具有抗肿瘤活性高、毒副作用小的优点,是新一代针对难治性恶性肿瘤抗体靶向药物研发的方向。

[0003] ADC药物包括三个组成部分:针对肿瘤抗原的抗体、强效的细胞毒性化学药物(弹头药物)和连接抗体与弹头药物的连接分子(linker)。单克隆抗体的主要功能是药物载体同时也赋予ADC靶向性,其理想的肿瘤抗原为高特异表达于肿瘤细胞或者肿瘤微环境。靶抗原的选择是ADC药物设计中首要考虑的关键性因素。细胞毒性小分子化合物是ADC药物设计中第二个关键性参数,虽然ADC复合物仍然保留了单克隆抗体在体内的杀伤能力,但ADC的抗肿瘤效应主要取决于高细胞毒性弹头药物的杀伤效应。Linker的作用是桥梁作用,主要是将生物大分子与细胞毒性小分子化合物稳定的偶联形成ADC免疫复合物,linker承载了ADC的稳定性,水溶性,体内释放等多项功能,跟ADC体内代谢,药效和毒副作用也密切相关。

[0004] 目前,国际知名制药企业Genentech、Wyeth、Pfizer和ImmunoGen等纷纷投入巨资加速研制ADC药物。全球进入临床试验阶段的ADC药物就有40余个,其中进入III期临床试验的有3个,2011年以来,已被美国FDA批准上市的就有3个。ADC药物对难治性复发性恶性肿瘤仍具有非常好的治疗效果。

[0005] CD56分子为I型膜糖蛋白,属于免疫球蛋白超家族成员。其主要生物学功能是细胞与细胞的粘附和信号传导。CD56在多种原发和转移性肿瘤,如肺癌、多发性骨髓瘤、Merkel细胞癌、卵巢癌和脑胶质瘤等中高表达。其中,CD56在小细胞肺癌中的表达率为100%,每个小细胞肺癌细胞表面平均具有15万个CD56分子,是正常组织的60-100倍,与癌细胞分化、侵袭、转移和扩散密切相关。据文献报道,由抗CD56抗体MOC-31和SEN7与放射性核素、阿霉素,蓖麻毒素和DM1等偶联制备的偶联物在体外有较好的抗肿瘤效果,是肺癌等癌症ADC靶向化疗药物理想的靶点。同是CD56在一些免疫细胞和神经来源的细胞表面表达,因此CD56也可能为一些自身免疫和神经系统疾病的治疗靶点。

[0006] 多卡霉素(Duocarmycins)是一类DNA烷化剂,具有有效的抗肿瘤活性。在最近的报道中,研究者已选择多卡霉素类似物作为HER2靶向抗体-药物偶联物SYD985的小分子药物组成部分,结果表明能够有效的抑制肿瘤的生长,目前已经进入I期临床实验。但目前还没有将多卡霉素与抗CD56抗体偶联是否能够有效抗肿瘤的相关报道。

发明内容

[0007] 本发明要解决的技术问题是提供一种抗CD56抗体与多卡霉素偶联复合物及其制备方法和用途。

[0008] 本发明提供了一种抗CD56抗体与多卡霉素偶联复合物,其组成包括:抗CD56抗体,多卡霉素,偶联抗体与多卡霉素的连接分子;连接分子一端通过马来酰亚胺与抗CD56抗体的游离巯基偶联,另一端通过酯键与多卡霉素的羟基偶联。

[0009] 其中,上述抗CD56抗体与多卡霉素偶联复合物中,所述抗CD56抗体的游离巯基为:还原剂还原抗CD56抗体轻链和重链后,通过打开抗体链间或链内的二硫键形成的游离巯基。

[0010] 进一步的,上述抗CD56抗体与多卡霉素偶联复合物中,所述的还原剂为二硫苏糖醇, β -巯基乙醇或三(2-羧乙基)膦中的至少一种。

[0011] 其中,上述抗CD56抗体与多卡霉素偶联复合物中,所述抗CD56抗体包括重链可变结构域、轻链可变结构域、恒定区;所述重链可变结构域为与该抗体的重链互补性决定区相同的结构域,所述轻链可变结构域为与该抗体的轻链互补性决定区相同的结构域。

[0012] 其中,上述抗CD56抗体与多卡霉素偶联复合物中,所述抗CD56抗体的重链可变结构域的氨基酸序列为Seq ID NO:1、Seq ID NO:2、Seq ID NO:3、Seq ID NO:4、Seq ID NO:5或Seq ID NO:6中的任意一种。

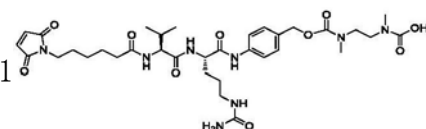
[0013] 进一步的,上述抗CD56抗体与多卡霉素偶联复合物中,所述抗CD56抗体的轻链可变结构域的氨基酸序列为Seq ID NO:7、Seq ID NO:8、Seq ID NO:9或Seq ID NO:10中的任意一种。

[0014] 进一步的,上述抗CD56抗体与多卡霉素偶联复合物中,所述恒定区为天然抗体恒定区或基因工程改造后的抗体恒定区。

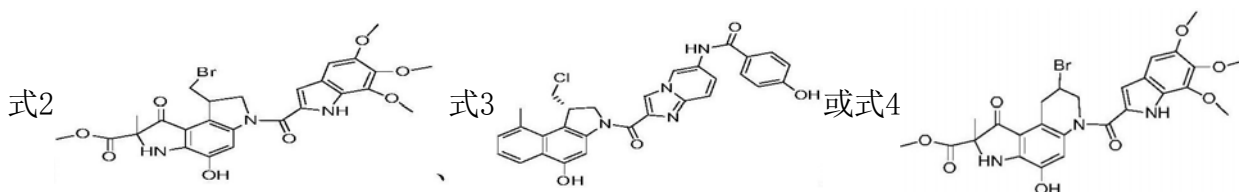
[0015] 其中,上述抗CD56抗体与多卡霉素偶联复合物中,所述偶联抗体与多卡霉素的连接分子含有缬氨酸结构单元和瓜氨酸二肽结构单元。这是为了便于释放多卡霉素而特别选择的,上述连接分子中二肽可以被细胞内的组织蛋白酶降解,释放出多卡霉素对细胞产生杀伤作用。

[0016] 进一步的,上述抗CD56抗体与多卡霉素偶联复合物中,所述的偶联抗体与多卡霉

素的连接分子的结构式为式1所示。

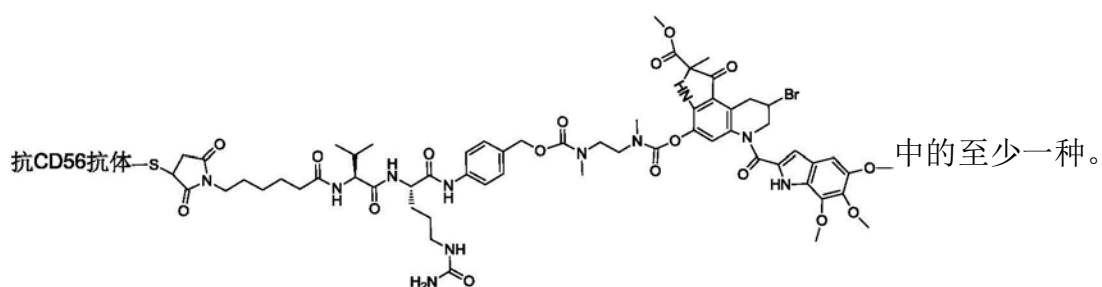
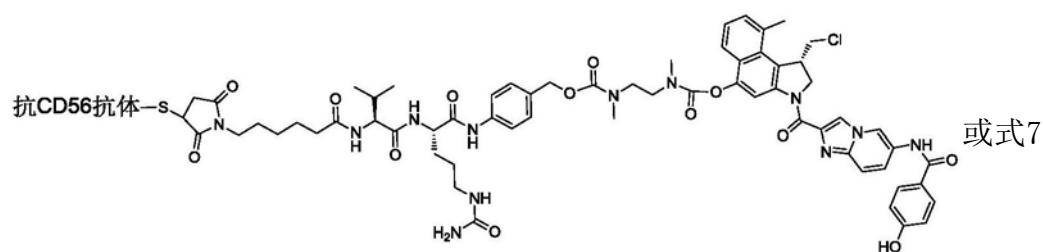
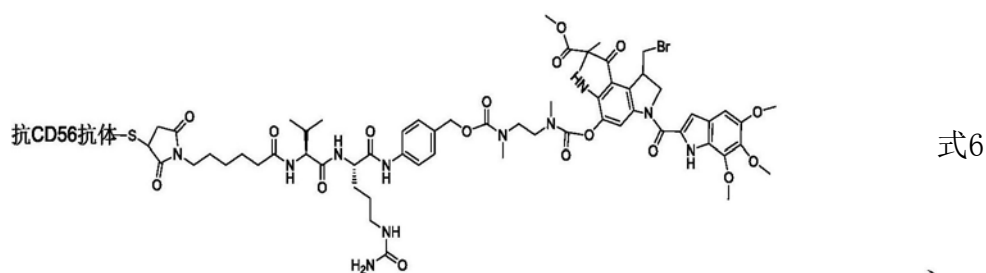


[0017] 进一步的,上述抗CD56抗体与多卡霉素偶联复合物中,所述的多卡霉素的分子结构为



中的任意一种。

[0018] 其中,上述抗CD56抗体与多卡霉素偶联复合物中,其结构为式5



[0019] 其中,上述抗CD56抗体与多卡霉素偶联复合物中,所述的抗CD56抗体与多卡霉素的摩尔比为1:1-10,摩尔比优选为1:3.5。

[0020] 本发明还提供了一种上述抗CD56抗体与多卡霉素偶联复合物的制备方法,包括以下步骤:

[0021] a、制备抗CD56抗体;

[0022] b、采用还原剂还原抗CD56抗体,得到表面有二硫键的抗CD56抗体;

[0023] c、加入多卡霉素和偶联抗体与多卡霉素的连接分子,反应0.5-3h,制得抗CD56抗体与多卡霉素偶联复合物。

[0024] 本发明要解决的第三个技术问题为提供了一种上述抗CD56抗体与多卡霉素偶联复合物在制备诊断或治疗肿瘤、免疫系统疾病或神经系统疾病药物中的用途。

[0025] 其中,Seq ID N0:1抗CD56抗体重链可变结构域1;Seq ID N0:2抗CD56抗体重链可变结构域2;Seq ID N0:3抗CD56抗体重链可变结构域3;Seq ID N0:4抗CD56抗体重链可变结构域4;Seq ID N0:5抗CD56抗体重链可变结构域5;Seq ID N0:6抗CD56抗体重链可变结构域6;Seq ID N0:7抗CD56抗体轻链可变结构域1;Seq ID N0:8抗CD56抗体轻链可变结构域2;Seq ID N0:9抗CD56抗体轻链可变结构域3;Seq ID N0:10抗CD56抗体轻链可变结构域4;Seq ID N0:11编码抗CD56抗体重链可变结构域1的核苷酸序列;Seq ID N0:12编码抗CD56抗体重链可变结构域2的核苷酸序列;Seq ID N0:13编码抗CD56抗体重链可变结构域3的核苷酸序列;Seq ID N0:14编码抗CD56抗体重链可变结构域4的核苷酸序列;Seq ID N0:15编码抗CD56抗体重链可变结构域6的核苷酸序列;Seq ID N0:16编码抗CD56抗体重链可变结构域6的核苷酸序列;Seq ID N0:17编码抗CD56抗体轻链可变结构域1的核苷酸序列;Seq ID N0:18编码抗CD56抗体轻链可变结构域2的核苷酸序列;Seq ID N0:19编码抗CD56

抗体轻链可变结构31的核苷酸序列;Seq ID NO:20编码抗CD56抗体轻链可变结构域1的核苷酸序列。

[0026] 本发明的有益效果为:本发明通过生物偶联技术将多卡霉素与抗CD56抗体交联得到抗CD56抗体与多卡霉素偶联复合物,既保留了抗CD56抗体的靶向结合CD56的高亲和能力又具有多卡霉素高效杀伤细胞的能力,在提高药物治疗效果的同时减少药物对机体的毒副作用;在体外抗CD56阳性肿瘤细胞的增殖活性高,具有抗肿瘤效果,毒副作用小,是一种靶向强和高效杀伤肿瘤的ADC候选药物,能够用于制备诊断、治疗肿瘤、免疫或神经系统疾病的药物,具有良好的应用前景。

附图说明

[0027] 图1所示为SDS-PAGE电泳和Western-Blot检测Promiximab(普诺米昔)的纯度,分子量,靶点识别和抗体特异性

[0028] 图A,M为Marker,1到6泳道分别是人CD56胞外端(CD56ECD),小细胞肺癌细胞株NCI-H526,NCI-H524,NCI-H69,NCI-H128,NCI-H446细胞裂解液中非还原状态下的表达情况,下为相应样品的还原状态下样品;B,M为Marker,1-4分别是CD56胞外端非还原上样,CD56胞外端去糖非还原上样,CD56胞外端还原上样,CD56胞外端去糖还原上样;C、图为Promiximab交叉反应性,采用CD56ECD作为对照,promiximab与人脾脏细胞裂解液、NK细胞裂解液,鼠脾脏细胞裂解交叉反应(对应泳道1-4);,并与商业化抗CD56抗体123C3进行比较检测其组织特异性。

[0029] 图2所示为Western-Blot检测CD56抗体与CD56阳性细胞裂解的结合情况

[0030] CD56抗体1-24与CD56阳性细胞NCI-H526和NCI-H446(CD56弱阳性)的Western-Blot检测结果,每个抗体对应的第一泳道为NCI-H526裂解液,第二泳道为NCI-H446细胞裂解液,结果显示抗CD56抗体除2号不能识别CD56线性表位外,其它抗体都能识别。

[0031] 图3A-X所示为CD56抗体亲和力检测

[0032] 用Biolayer interferometry技术分析24种抗CD56抗体与人CD56胞外域的亲和力。

[0033] 图4所示为Promiximab亲和力检测

[0034] 用Biolayer interferometry技术分析表明promiximab与CD56ECD亲和力为0.78pmol (k_a (1/Ms) = 1.27E+05, k_d (1/s) < 1.0E-07, K_D < 7.8E-13)。

[0035] 图5毛细管等点聚焦法检测Promiximab的PI值

[0036] 毛细管等点聚焦法用来检测Promiximab的PI值,经检测通过真核细胞表达并纯化的Promiximab的等电点为7.89。

[0037] 图6所示为流式细胞术检测抗CD56抗体Promiximab靶向性与CD56结合后的内化效应检测

[0038] 图A,Promiximab与小细胞肺癌细胞株膜抗原CD56结合情况,小细胞肺癌分别与PBS(黑色部分),promiximab(空心线)孵育;图B,Promiximab内化效率测定,小细胞肺癌细胞组分别与PBS(黑色区域,4℃,3h),promiximab(实线,4℃,3h),promiximab(虚线,37℃,3h);Promiximab在NCI-H526、NCI-H524和NCI-H69细胞系中的靶向性较好,内化效率分别是68.19%,53.14%和64.97%。总之,制备的全新的靶向CD56抗体promiximab具有特异性的

结合能力,较高的亲和力以及有效的内化效率。

[0039] 图7所示为用CCK-8检查抗CD56抗体Promiximab的体外活性

[0040] CCK-8抗增殖实验结果显示,Promiximab抗体对CD56阳性细胞NCI-H69的IC₅₀为968.54±34.76nM;对抗CD56抗体对CD56阳性细胞NCI-H526的IC₅₀为792.24±41.21nM。

[0041] 图8所示为Promiximab体内抗肿瘤活性。

[0042] 建立CD56阳性人小细胞肺癌NCI-H526裸鼠皮下瘤模型,研究promiximab的体内抗肿瘤活性。给药方式为尾静脉,每隔两天给药一次,连续给药三次。结果显示,在NCI-H526皮下模型中,promiximab(10mg/kg)剂量组在第24天表现出明显抑制肿瘤生长的体内活性。体重观察结果显示,对照组和给药组动物体重没有显著差异,该结果初步说明promiximab的毒性很小。

[0043] 图9所示为Promiximab对心肝脾肺肾的毒性分析

[0044] 小鼠一般状况评价分为体重和主要器官的病理学变化决定。尾静脉给药后的第20天,取各个实验组的裸鼠的心、肝、脾、肺、肾,采用H&E染色,结果显示Promiximab与对照组的正常器官比较,药组中各个器官没有发现明显的组织病变,说明无明显毒副作用。

[0045] 图10所示为SDS-PAGE检测promiximab-DUBA

[0046] 图中M为蛋白Marker,1和2分别为不做任何处理的promiximab和变性还原处理的promiximab,3和4分别为TCEP处理的promiximab和变性还原处理的promiximab,5和6为偶联反应得到的promiximab-DUBA和经变性还原处理的promiximab-DUBA;

[0047] 图11所示为Promiximab-DUBA结合能力和靶向性验证

[0048] Promiximab偶联DUBA后的结合能力,promiximab-DUBA与小细胞肺癌细胞株的结合能力采用流式细胞术测定,小细胞肺癌细胞与PBS(阴影部分),promiximab(实线),promiximab-DUBA(虚线)孵育;

[0049] 图12所示为Promiximab-DUBA的亲和力动力学分析

[0050] 采用biolayer interferometry binding assay技术测定不同浓度的promiximab-DUBA与CD56胞外端之间亲和力动力学检测promiximab-DUBA与CD56的结合常数并证明promiximab-DUBA能有效的识别与靶向CD56。

[0051] 图13所示为Promiximab与promiximab-DUBA体外细胞毒性分析

[0052] 以不处理的细胞为对照,小细胞肺癌细胞系和人NK细胞与不同浓度的promiximab和promiximab-DUBA体外作用72h后IC₅₀值。结果表明,promiximab-DUBA对小细胞肺癌细胞系NCI-H526、NCI-H524和NCI-H69具有较强的细胞杀伤作用,其IC₅₀分别为0.07nmol/L,0.18nmol/L和0.29nmol/L。

[0053] 图14所示为Promiximab和promiximab-DUBA体内抗NCI-H526和NCI-H69小细胞肺癌小鼠皮下移植瘤的疗效评价

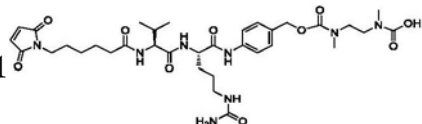
[0054] 图A和图B分别表示Promiximab和promiximab-MMAE治疗NCI-H526和NCI-H69小细胞肺癌小鼠皮下移植瘤肿瘤后肿瘤体积随时间变化图;图C和图D分别表示Promiximab和promiximab-DUBA治疗NCI-H526和NCI-H69小细胞肺癌小鼠皮下移植瘤肿瘤后裸鼠体重随时间变化图;

[0055] 图15所示为Promiximab和promiximab-DUBA治疗后裸鼠主要器官病理检测图。

具体实施方式

[0056] 本发明提供了一种抗CD56抗体与多卡霉素偶联复合物,其组成包括:抗CD56抗体,多卡霉素,偶联抗体与多卡霉素的连接分子;连接分子一端通过马来酰亚胺与抗CD56抗体的游离巯基偶联,另一端通过酯键与多卡霉素的羟基偶联。

[0057] 其中,上述抗CD56抗体与多卡霉素偶联复合物中,所述抗CD56抗体的游离巯基为:还原剂还原抗CD56抗体轻链和重链后,通过打开抗体链间或链内的二硫键形成游离巯基。为了便于释放多卡霉素,本发明选用的连接分子含有缬氨酸结构单元和瓜氨酸二肽结构单元,优选结构式为式1



的连接分子。

[0058] 本发明中的抗CD56抗体原则上是所有的能够与CD56靶向结合的抗体都可以,优选采用重链可变结构域的氨基酸序列为Seq ID N0:1、Seq ID N0:2、Seq ID N0:3、Seq ID N0:4、Seq ID N0:5或Seq ID N0:6中的任意一种和轻链可变结构域的氨基酸序列为Seq ID N0:7、Seq ID N0:8、Seq ID N0:9或Seq ID N0:10中的任意一种组合而成的抗CD56抗体,该抗体的恒定区可以为天然抗体恒定区或基因工程改造后的抗体恒定区。

[0059] 特别的,抗CD56抗体可以通过常规杂交瘤细胞分泌获得,也可以通过常规的基因重组技术所构建。将得到的能够编码CD56抗体重链可变结构域和轻链可变结构域的基因克隆到带有抗体恒定区基因的表达载体中,所述载体包括pAZ-V5-hCH,pAZ-V5-hCH,pAZ-V5-hCH,pAZ-V5-hCH,pAZ-V5-hCL,pAZ-V5-hCL,pTT5,pCEP4Mammalian Expression Vector等,通过真核细胞表达系统,如CHO和293等进行表达,再通过蛋白纯化方法获得CD56抗体。

[0060] 进一步的,针对上述制备的靶向性强的抗CD56抗体,本发明将其与多卡霉素通过连接分子进行偶联,能够特异性靶向肿瘤细胞,与肿瘤细胞具有较强的亲和力,能够提高多卡霉素的利用效率和治疗效果。

[0061] 本发明的抗体偶联物可以按照药剂学常规技术制备成各种形式的药物制剂,较优选的是注射剂,最优选的是冷冻干燥注射剂。

[0062] 本发明的抗CD56抗体与多卡霉素偶联复合物可用于制备诊断或治疗肿瘤、免疫和神经系统疾病药物。

[0063] 下面通过实施例对本发明的具体实施方式做进一步的解释说明,但不表示将本发明的保护范围限制在实施例所述范围内。

[0064] 实施例中所用的各试剂与耗材均为普通市售产品。

[0065] 实施例1制备CD56抗体偶联药物Promiximab-DUBA

[0066] 1、制备抗CD56抗体

[0067] 通过测序和序列分析,获得候选克隆的轻重链可变区氨基酸序列,选定各克隆对应的序列构建嵌合型表达载体进行人鼠嵌合抗体改造。将氨基酸序列如Seq ID N0:7所示的轻链可变区基因构建到pTT5表达载体上,EcoR I-Kozak序列-信号肽-VH-恒定区-终止密码子-Hind III,轻链恒定区基因序列为:NCBI Reference Sequence:NG_000834.1,EcoR I-信号肽-VL-Ig kappa chain C region-Hind III。将氨基酸序列如Seq ID N0:1所示的重链可变区基因克隆到表达载体为pTT5/抗CD56抗体-VH,组成为EcoR I-信号肽-VH-Ig

gamma-1chain C region-Hind III,重链恒定区序列为:NCBI Reference Sequence:NG_001019.6.根据哺乳细胞表达体系进行密码子优化并合成相关基因片段。通过以上构建的抗体命名为:抗CD56抗体Promiximab,按常规方法制备得到抗CD56抗体Promiximab。

[0068] 2、抗CD56抗体Promiximab性能测定

[0069] (1)、SDS-PAGE电泳和Western-Blot检测Promiximab的纯度,分子量,靶点识别和抗体特异性

[0070] 细胞样品制备,收集小细胞肺癌细胞系,用PBS重悬,3500rpm,离心5min,洗三次,按照细胞数量多少,加入适量细胞裂解液(含有蛋白酶抑制剂),充分混匀后,冰上放置30-60min,冰上放置30-60min后,4℃,10000-14000g,离心10min,取上清分装,做好标记-20℃保存备用,用于SDS-PAGE的纯蛋白加样浓度为3μg/孔,加样体系为10μL,用于Western Blot检测时,蛋白加样浓度为0.1-100ng/孔。细胞裂解液(或者蛋白样品)分别与5×变性还原样品缓冲液、5×非变性非还原样品缓冲液混匀,与变性还原样品缓冲液混合后在100℃放置5min后,10000rpm,离心1min,制备好电泳样品。根据抗原分子量大小,分离胶浓度为8%,浓缩胶浓度为5%,配制凝胶,装好电泳系统,加入电极缓冲液,上样,稳定电压200V,根据溴酚蓝的位置和实验目的,判断电泳时间,电泳结束后,卸下玻板,剥下凝胶,考马斯亮蓝染色过夜,采用脱色液脱色后,分析SDS-PAGE电泳结果。根据实验步骤先进行SDS-PAGE实验后,一份凝胶用于考马斯亮蓝染色分析,一份凝胶备用。Western-Blot按照操作规程转膜,孵育抗体曝光。

[0071] 经检测Promiximab有典型的IgG结构域特性,SDS-PAGE检测纯化后的Promiximab纯度在96%,具有典型的轻重链结构域(如图1A所示)。Western-Blot检测结果显示(如图1B所示),Promiximab能与纯的CD56结合,也能与CD56阳性细胞裂解后蛋白结合,抗体特异性实验证实(如图1C所示),Promiximab与商业化抗体123c3比较具有更好的特异性。

[0072] 抗体与CD56阳性细胞NCI-H526和NCI-H446(CD56弱阳性)的Western-Blot检测结果如图2所示,每个抗体对应的第一泳道为NCI-H526裂解液,第二泳道为NCI-H446细胞裂解液,结果显示抗CD56抗体除2号不能识别CD56线性表位外,其它抗体都能识别。

[0073] (2) BIACORE T200亲和力检测抗CD56抗体的亲和力

[0074] 亲和力检测抗原为Recombinant Human NCAM-1/CD56 120isoform,分子量为120kD,采用直接法,将抗原通过氨基偶联到CM5(BIACORE X100)或者sCM5(BIACORE T200)上;根据 $R_{max} = (MW_{analyte}/MW_{ligand}) \times RL \times S_m$,实际偶联量为RL的1.5倍。算出同时适宜检测抗原偶联量为120Ru;偶联操作:偶联缓冲液为1×HBS-EP buffer,50mM NaOH作为清洗液。使用pH 4.5的醋酸钠溶液配制抗原至10μg/mL。选择氨基偶联,在Target level中输入120Ru,将抗原样品、NaOH、乙醇胺、EDC、NSH以及空试管根据提示放到样品盘中相应的位置;再生条件摸索,最终选择pH 1.7甘氨酸盐酸再生10s;所有样品均设置复孔;程序设置,Kinetics/Affinity选项中的Flow pat选择2-1;Regeneration选择2;Contact time为180s;解离时间设置为5600s;再生条件:Gly 1.7、10s;重复检测的样品间隔开,并设置三个0浓度及3个start up。利用1:1计算模型进行拟合,进行动力学分析如图3所示。结果表明Promiximab与CD56ECD亲和力为0.78pmol ($k_a(1/Ms) = 1.27E+05$, $k_d(1/s) < 1.0E-07$, $K_D < 7.8E-13$,如图4所示),是一株高亲和力抗体。其它抗体也显示了较强的亲和力。

[0075] (3) 毛细管等电聚焦电泳检测Promiximab的等电点

[0076] 毛细管电泳等电聚焦是根据样品的pI值的不同来进行样品分析分离的方法。两性电解质在两端直流电压的作用下,能够在毛细管内部形成一个pH梯度。带有两性基团的样品以不同的速度向其所带电荷相反方向迁移。当其迁移到pH值为pI值时,其自身净电荷为零,停止移动。根据这一原理,可以达到分析pI值的目的。

[0077] 在EP管中加入17.5μL 1%MC(终浓度为0.35%),2μL pH 3-10的两性电解质(终浓度为4%),加入相应体积的蛋白样品(终浓度为0.2mg/ml)并用超纯水补足50μL,用涡旋混合器涡旋30s,在4℃离心机中13,000rpm/min离心5min。将样品加入到Vial Insert Pack后在4℃离心机中13,000rpm/min离心1min。将Vial Insert Pack放入到Vial Pack,再将其放到机器上的样品盘中;按照操作规程操作;Focus Period 1设置为1500V,1min,Focus Period 2设置为3000V,8min.Carrier Ampholytes:4%pH 3-10,Additives:0.35%MC,Concentration:0.2mg/ml进行检测。经检测通过真核细胞表达并纯化的Promiximab的等电点为7.89(如图5所示)。

[0078] (4) 流式细胞术检测抗CD56抗体Promiximab靶向性

[0079] 培养CD56阳性肿瘤细胞系,收集对数生长期的癌细胞,再将细胞平均分成若干组,每组细胞个数为 1×10^6 ;细胞分组:阴性对照组(PBS组)和实验组;用PBS缓冲盐重悬各组细胞,4℃,3500rpm离心3min,用枪尖吸取上清液;孵育一抗,向阴性对照组中加入100μL PBS,向实验组中加入100μL抗体(浓度为10μg/mL),重悬后,4℃孵育30min;将各组细胞在3500rpm,离心3min,吸去上清液,向各组中加入300μL PBS缓冲盐,将细胞重悬吹打两次,而后将各组细胞在3500rpm转速下离心3分钟,吸去上清液,如此重复2次;孵育二抗,向各组细胞中加入山羊抗人IgG/FITC标记50-100μL(稀释比例为1:200),重悬混匀,将细胞在4℃孵育30min;4℃孵育30min结束后,向各组中加入300μL PBS缓冲盐,将细胞重悬吹打两次,而后将各组细胞在3500rpm,离心3min,吸去上清液,如此重复2-3次;加入400μL PBS缓冲液重悬各组细胞检测;在流式细胞仪上,将各项参数设置好,用对照组的细胞调试且作为阴性对照,而后顺序测取各组细胞样品。实验结果显示Promiximab能较好识别并靶向CD56阳性小细胞肺癌细胞系NCI-H526、NCI-H524和NCI-H69(如图6所示)。

[0080] (5) 流式细胞术检测抗CD56抗体Promiximab与CD56结合后的内化效应

[0081] 培养CD56阳性肺癌细胞系,收集对数生长期细胞,再将细胞平均分成若干组,每组细胞个数为 1×10^6 细胞分组:阴性对照组(PBS组)和实验组用PBS缓冲盐重悬各组细胞,4℃,3500rpm离心3min,用枪尖吸取上清液。内化时将与抗体结合的细胞分为两组,用500μL PBS重悬细胞后,一组4℃放置3h,另一组在37℃内化3h,内化结束后,4℃,3500RMP离心3分钟,用枪尖吸取上清液,向各组中加入300μL 50mM PBS缓冲盐,将细胞重悬吹打两次,而后将各组细胞在3500RMP转速下离心3分钟,吸去上清液。如此重复上一步骤,向各组细胞中加入山羊抗鼠IgG/FITC标记二抗(稀释比例为1:200),重悬混匀,将细胞在4℃孵育30min,备注一抗为promiximab,二抗为山羊抗人IgG/FITC标记,向各组中加入300μL PBS缓冲液,将细胞重悬吹打两次,而后将各组细胞在3500rpm转速下离心3分钟,吸去上清液;如此重复2次,加入400μL PBS缓冲液重悬各组细胞检测,在流式细胞仪上,将各项参数设置好,用对照组的细胞调试且作为阴性对照,而后顺序测取各组细胞样品。实验结果显示Promiximab与CD56结合介导的内化消音在NCI-H526、NCI-H524和NCI-H69细胞系中的分别是68.19%, 53.14%和64.97%。该结果提示Promiximab具有较好的CD56靶向性,且同时具有向CD56阳

性细胞内输送药物的能力(如图6所示)。

[0082] (6) 抗CD56抗体Promiximab的活性检测

[0083] 用CCK-8检查抗CD56抗体Promiximab的体外活性

[0084] 用含20%胎牛血清的RPMI 1640培养基培养人小细胞肺癌细胞NCI-H526和NCI-H69,置5%CO₂,37℃恒温细胞培养箱中培养;收集对数生长期的CD56阳性肺癌细胞,计数并调整细胞密度;铺96孔板,根据不同细胞的生长速度,NCI-H526和NCI-H69细胞密度为10000个/孔,体积为100μL/孔;细胞置于培养箱中培养24小时,进行加药处理。抗体Promiximab用含20%胎牛血清RPMI 1640培养基稀释至起始浓度2.4μM,0.22μm滤器过滤,4℃保存;往铺有细胞的96孔板中加入梯度稀释的样品。每个药物设计8个浓度梯度,每个浓度梯度设置3个复孔,使抗体的最终浓度梯度为1.2μM、300nM、75nM、18.75nM、4.69nM、1.17nM、0.29nM、0.07nM、0.02nM,加药体系为100μL/孔。加入样品轻轻拍打孔板边缘混匀,置于5%CO₂,37℃恒温细胞培养箱中培养72小时。每24h置于显微镜下观察细胞生长情况;96孔板中加入0.22μm滤膜过滤的CCK-8试剂(Dojindo公司),20μL/孔;37℃避光孵育1-3h;将孔板置于酶联免疫检测仪中450nm处,测取各孔的OD值,并计算每组的平均值。抑制率(%)=(对照组-给药组)/对照组×100%。IC₅₀用GraphPad Prism 6.0计算。实验结果显示(如图7所示),抗CD56抗体对CD56阳性细胞NCI-H69的IC₅₀为968.54±34.76nM;对抗CD56抗体对CD56阳性细胞NCI-H526的IC₅₀为792.24±41.21nM。

[0085] Promiximab体内抗肿瘤活性

[0086] 细胞培养和接种用细胞用含20%胎牛血清的RPMI 1640培养基培养人CD56阳性肺癌细胞NCI-H526,置于5%CO₂,37℃恒温细胞培养箱中培养;接种前24小时换一次液;收集对数生长期细胞,用无血清无抗生素的RPMI 1640培养基清洗细胞两次,进行细胞计数。用无血清无抗生素的RPMI 1640培养基和基质胶(终浓度大于4mg/mL)将细胞密度调整为10⁸个活细胞/ml。

[0087] 实验动物为BALB/c无胸腺裸鼠(简称裸鼠,北京华阜康),5-6周龄,体重16-18克;实验动物饲养管理:每周更换一次繁殖用饲料、饮用水、垫料和笼具,同时要观察动物生理状态。

[0088] 细胞接种:接种量大于1-2×10⁷个cell/只,接种体积为100-150μL/只,接种部位为裸鼠右上肢背部皮下;裸鼠接种肿瘤细胞7-15天后,每隔3天观察一次肿瘤体积大小。待肿瘤体积达到150mm³,可进行分组和给药;挑取肿瘤大小均一的裸鼠,并按照实验目的进行随机分组,在NCI-H526皮下模型中体内抗肿瘤实验分组如下表1所示:

[0089] 表1 NCI-H526皮下模型分组

[0090]

| NCI-H526皮下模型分组 | 数目(只) |
|---------------------|-------|
| Control | 6 |
| Promiximab(10mg/kg) | 6 |

[0091] 称量各组裸鼠体重,测量肿瘤体积,开始以尾静脉注射方式给药;每隔三天给药一次,连续给药3次;裸鼠肿瘤生长情况监测:从给药开始,每三天使用游标卡尺测量肿瘤长短径,单位为mm,计算肿瘤体积大小,计算公式为V=长径×短径×短径/2。实验结果显示Promiximab体内有一定抗CD56阳性肿瘤的活性(如图8所示)。

[0092] 病理检测Promiximab在体内的毒性

[0093] 取对照组和抗体组s药物处理组裸鼠的心、肝、脾、肺和肾的组织样品在4%磷酸盐缓冲的甲醛中固定,并根据常规方法石蜡包埋。将组织切片用苏木精和曙红(H&E)染色后镜下分析并评价其对正常组织的破坏。实验结果显示同对照组的正常器官比较,Promiximab抗体组中各个器官没有发现明显的组织病变,说明无明显毒副作用(如图9所示)。

[0094] 3、摸索反应条件

[0095] (1) L-半胱氨酸游离巯基标准曲线建立

[0096] 按照0.1mmol/L、0.09mmol/L、0.08mmol/L、0.07mmol/L、0.06mmol/L、0.05mmol/L、0.04mmol/L、0.03mmol/L、0.02mmol/L配制半胱氨酸浓度;按照L-半胱氨酸与DTNB的摩尔比为1:1.2加入DTNB(2mg/mL,5mmol/L)显色;加入显色液37℃孵育10-15min后,溶液显淡黄色或者黄色;分光光度计测定412nm吸收值;根据不同浓度的半胱氨酸溶液所对应的吸收值输入制定标准曲线。

[0097] (2) 抗体链间二硫键的还原

[0098] 向promiximab抗体(5mg/mL,0.03125mmol/L)溶液中按照摩尔比1:3缓慢加入TCEP(0.5mg/mL,1.74mmol/L),37℃,120rpm反应3小时。

[0099] 备注:抗体的还原与体系和浓度没有关系,只与反应时抗体与TCEP的摩尔比有关系。

[0100] 取出反应液,加入10-20倍体积的水,采用Ultrafree 30K超滤离心管,4000rpm,离心至反应液体积,重复两次去除TCEP,得到具有游离二硫键的CD56抗体。抗体游离巯基个数的测定:取100μL去除TCEP抗体溶液,同时取相同量的抗体,将抗体的缓冲液置换到水中;采用Nano Drop 2000/2000c检测浓度;根据所得浓度将TCEP处理的抗体与未采用TCEP处理的抗体稀释至1mg/L(0.00625mmol/L),体系为0.2mL,采用DTNB(2mg/mL,5mmol/L)显色时,每个抗体分子按照还原产生8个游离巯基且与DTNB的摩尔比为1:1.2,那么加入DTNB的体系V=(0.00625mmol/L×8个×0.2mL×1.2)÷5=2.4μL后,37℃孵育10-15min,测定412nm处吸收值;用还原抗体的吸收值减去未经还原处理的抗体吸收值,将所得吸收值带入L-半胱氨酸游离巯基标准曲线中,最终计算出还原产生游离巯基的个数。

[0101] (3) 抗体与DUBA偶联

[0102] 抗体与DUBA按照一定的摩尔比,将溶解在DMF中的mc-vc-DUBA直接缓慢加入TCEP还原处理的抗体,充分混匀后,室温,40rpm,反应一定时间,具体反应摩尔比和反应时间按下表2进行摸索。

[0103] 表2摸索反应条件设置表

| [0104] | 摩尔比(抗体:小分子药物) | 偶联反应时间(h) | |
|--------|---------------|-----------|----|
| | 1:3 | 3 | 过夜 |
| | 1:6 | 3 | 过夜 |

[0105] 取出反应液,采用脱盐柱HiTrapTM Desalting 5mL去除反应体系中残留的未反应的小分子;将收集的洗脱液加入到润洗后的超滤管中,4000rpm/min转速离心15-20min后倒掉超滤管下层液体,向上层管内加入新的置换缓冲液,充分混匀内管中的蛋白样品,重复上述步骤1-2次,将ADCs样品的缓冲液置换为ADCs样品保存液;所得样品送于Waters公司通过

质谱分析其DAR,得出最适的投料比和偶联反应时间。

[0106] 通过摸索可知:按照上述条件还原抗体链间二硫键后,promiximab与小分子药物DUBA的摩尔比按照1:6进行偶联反应3小时以上效果更佳。

[0107] 4、制备抗CD56抗体与多卡霉素偶联复合物Promiximab-DUBA

[0108] 抗体promiximab (5mg/mL,0.03125mmol/L) 与TCEP (0.5mg/mL,1.74mmol/L) 按摩尔比1:3,缓慢加入TCEP,37℃,120rpm反应3h(细胞摇床);还原反应结束后,从中取出100uL反应液,去除反应液中的TCEP步骤同前,计算还原产生游离巯基,余下抗体反应液用于后续偶联反应(不需要去除反应液中的TCEP);抗体与小分子药物DUBA摩尔比为1:6,将溶解在DMF中的mc-vc-DUBA直接缓慢加入余下TCEP处理的抗体反应液中(加入后会有白色沉淀产生),充分混匀后,室温,40rpm,反应3h;偶联结束后取出反应液,采用脱盐柱HiTrap™ Desalting 5mL去除反应体系中残留的未反应的小分子;将收集的洗脱液加入到润洗后的超滤管中,4000rpm/min转速离心5-10min后倒掉超滤管下层液体,向上层管内加入新的置换缓冲液,充分混匀内管中的蛋白样品,重复上述步骤1-2次,将ADCs样品的缓冲液置换为ADCs样品保存液,剩余样品用于后续实验。制得抗CD抗体偶联复合物Promiximab-DUBA。

[0109] 实施例2抗CD56抗体偶联药物Promiximab-DUBA结合力和纯度检测

[0110] 1、SDS-PAGE验证promiximab-DUBA的结构与纯度

[0111] TCEP还原处理的抗体promiximab与小分子化疗药物按照摩尔比1:6,室温偶联(40rpm)3h后得到promiximab-DUBA ADCs复合物。为了证明CD56抗体经过此生物偶联过程后仍能保留原本的蛋白结构,我们用SDS-PAGE进行验证,由于小分子DUBA对整个抗体Promiximab-DUBA偶联物的整体分子质量贡献较小,如果Promiximab抗体经过生物偶联操作后仍与未偶联的抗体保持相近的电泳行为,说明我们的生物偶联工艺未对Promiximab抗体的蛋白结构产生巨大影响。

[0112] 实验步骤如下:取各分析蛋白样品,与5×变性还原样品缓冲液、5×非变性非还原样品缓冲液混匀,与变性还原样品缓冲液混合后在100℃放置5min后,10000rpm,离心1min,制备好电泳样品。用于SDS-PAGE的纯蛋白加样浓度为3μg/孔,加样体系为10μL。根据抗原分子量的大小,分离胶浓度为8-12%,浓缩胶浓度为5%,配制凝胶,装好电泳系统,加入电极缓冲液,上样,稳定电压200V,根据溴酚蓝的位置和实验目的,判断电泳时间,电泳结束后,卸下玻板,剥下凝胶,考马斯亮蓝染色过夜,采用脱色液脱色后,分析SDS-PAGE电泳结果。

[0113] 结果如图10所示,Promiximab经过生物偶联工艺前后的分子量没有显著变化,仍保持抗体特有的蛋白结构片段。说明,我们的生物偶联技术制备得到Promiximab-DUBA与Promiximab抗体具有相似的抗体片段为产生蛋白断裂,降解等现象。

[0114] 2、流式细胞术检测CD56抗体偶联药物Promiximab-DUBA靶向性

[0115] 培养CD56阳性小细胞肺癌细胞系,收集对数生长期的小细胞肺癌细胞系,再将细胞平均分成若干组,每组细胞个数为 1×10^6 ;细胞分组:阴性对照组(PBS组)、阳性对照(huN901)和实验组;用PBS缓冲盐重悬各组细胞,4℃,3500rpm离心3min,用枪尖吸取上清液;孵育一抗,向阴性对照组中加入100μL PBS,向实验组中加入100μL抗体huN901(浓度为10μg/mL),重悬后,4℃孵育30min;将各组细胞在3500rpm,离心3min,吸去上清液,向各组中加入300μL PBS缓冲盐,将细胞重悬吹打两次,而后将各组细胞在3500rpm转速下离心3分钟,吸去上清液,如此重复2次;孵育二抗,向各组细胞中加入山羊抗人IgG/FITC标记50-100

μL (稀释比例为1:200), 重悬混匀, 将细胞在4℃孵育30min; 4℃孵育30min结束后, 向各组中加入300μL PBS缓冲盐, 将细胞重悬吹打两次, 而后将各组细胞在3500rpm, 离心3min, 吸去上清液, 如此重复2-3次; 加入400μL PBS缓冲液重悬各组细胞检测; 在流式细胞仪上, 将各项参数设置好, 用对照组的细胞调试且作为阴性对照, 而后顺序测取各组细胞样品。

[0116] 实验结果如图11所示: 偶联小分子药物DUBA后, 抗体promiximab结合CD56和靶向CD56阳性细胞的能力未改变, promiximab-DUBA与promiximab同小细胞肺癌细胞系的结合能力相同, 偶联小分子药物未影响抗体的结合能力。

[0117] 3、BIACORE T200检测CD56抗体偶联药物Promiximab-DUBA亲和力

[0118] 抗原为Recombinant Human NCAM-1/CD56 120isoform, 分子量为120kD, 采用直接法, 将抗原通过氨基偶联到CM5 (BIACORE X100) 或者sCM5 (BIACORE T200) 上; 根据 $R_{max} = (MW_{analyte}/MW_{ligand}) \times RL \times S_m$, 实际偶联量为RL的1.5倍。算出同时适宜检测抗原偶联量为120Ru; 偶联操作: 偶联缓冲液为1×HBS-EP buffer, 50mM NaOH作为清洗液。使用pH 4.5的醋酸钠溶液配制抗原至10μg/mL。选择氨基偶联, 在Target level中输入120Ru, 将抗原样品、NaOH、乙醇胺、EDC、NSH以及空试管根据提示放到样品盘中相应的位置; 再生条件摸索, 最终选择pH 1.7甘氨酸盐酸再生10s; 抗体huN901准备: 用1×HBS-EP buffer将抗体稀释至3.2nM、1.6nM、0.8nM、0.4nM、0.2nM、0.1nM、0.05nM和0.025nM, 13,000rpm/min, 离心3min; 所有样品均设置复孔; 杂交瘤上清样品准备: 收集杂交瘤细胞上清, 13,000rpm/min, 离心3min, 原液检测, 每一个样品均设置复孔; 程序设置, Kinetics/Affinity选项中的Flow pat选择2-1; Regeneration选择2; Contact time为180s; 解离时间设置为5600s; 再生条件: Gly 1.7、10s; 重复检测的样品间隔开, 并设置三个0浓度及3个start up, 点击开始, 运行程序。试验结果选取适宜的浓度对应响应单位变化曲线, 利用1:1计算模型进行拟合, 进行动力学分析。

[0119] Biolayer interferometry亲和力分析结果如图12所示, 结果显示: 通过本实例制备的promiximab-DUBA与promiximab同抗原CD56的亲和力动力学特征相似。这些结果表明, 偶联小分子药物未对抗体promiximab的结合能力产生影响, promiximab-DUBA仍具有与promiximab相同的与CD56的结合和识别能力。

[0120] 实施例3 CD56抗体偶联药物抗肿瘤活性

[0121] 1、Promiximab-DUBA体外细胞毒性检测

[0122] 用含20%胎牛血清的RPMI 1640培养基培养人小细胞肺癌细胞NCI-H446、NCI-H526、NCI-H524、NCI-H69和NCI-H128, 置5%CO₂, 37℃恒温细胞培养箱中培养; NK细胞新鲜分离提取; 收集对数生长期的的小细胞肺癌细胞, 计数并调整细胞密度; 铺96孔板, 根据不同细胞的生长速度, NCI-H128细胞密度为1000-1500个/孔, NCI-H526、NCI-H524、NCI-H69和NK细胞密度为10000个/孔, 体积为100μL/孔; 细胞置于培养箱中培养24小时, 进行加药处理。

[0123] 抗体和ADCs复合物分别用含20%胎牛血清RPMI 1640培养基稀释至起始浓度2.4μM, 0.22μm滤器过滤, 4℃保存; 往铺有细胞的96孔板中加入梯度稀释的样品。因每孔中装有100μl培养基, 使得待测样品的起始浓度均为1.2μM。每个药物设计8个浓度梯度, 每个浓度梯度设置3个复孔, 使抗体和ADCs复合物的最终浓度梯度为1.2μM、300nM、75nM、18.75nM、4.69nM、1.17nM、0.29nM、0.07nM、0.02nM, 加药体系为100μL/孔。加入样品轻轻拍打孔板边缘混匀, 置于5%CO₂, 37℃恒温细胞培养箱中培养72小时。每24h置于显微镜下观察细胞生

长情况;向上述步骤96孔板中加入0.22 μ m滤膜过滤的CCK-8试剂(Dojindo公司),20 μ L/孔;37℃避光孵育1-3h;将孔板置于酶联免疫检测仪中450nm处,测取各孔的OD值,并计算每组的平均值。抑制率(%)=(对照组-给药组)/对照组 \times 100%。IC50用GraphPad Prism 6.0计算[107]。

[0124] Promiximab-DUBA和promiximab对小细胞肺癌细胞系和人NK细胞的体外抗增殖实验研究,是通过体外作用小细胞肺癌细胞系和人NK细胞72h后,肉眼观察细胞杀伤效果并采用CCK-8检测。

[0125] 结果表明,promiximab-DUBA对小细胞肺癌细胞系NCI-H526、NCI-H524和NCI-H69具有较强的细胞杀伤作用,其IC50分别为0.07nmol/L,0.18nmol/L和0.29nmol/L(如图13和表3所示)。

[0126] 表3 Promiximab-DUBA体外细胞毒性检测结果

| [0127] | 细胞系 | Promiximab-DUBA IC50 (nmol/L) |
|--------|---------------|----------------------------------|
| | NCI-H69 | 0.07 \pm 0.03 |
| | NCI-H526 | 0.18 \pm 0.02 |
| | NCI-H524 | 0.29 \pm 0.04 |
| | NK Cell Lines | >1200 |

[0128] 虽然CD56也是NK的标记分子,且promiximab能够与表达在NK细胞表面的CD56结合,但肿瘤细胞表面CD56分子水平是NK细胞表面的60倍之多,因此,promiximab-DUBA对NK细胞的体外杀伤效果不明显,其IC50>1200nmol/L。这些结果表明在体外,promiximab-DUBA具有较强的体外杀伤CD56阳性小细胞肺癌细胞系活性。

[0129] 2、Promiximab-DUBA体内抗肿瘤活性

[0130] 用含20%胎牛血清的RPMI 1640培养基培养人小细胞肺癌细胞NCI-H526、NCI-H69,置于5%CO₂,37℃恒温细胞培养箱中培养;接种前24小时换一次液;收集对数生长期细胞,用无血清无抗生素的RPMI 1640培养基清洗细胞两次,进行细胞计数。用无血清无抗生素的RPMI 1640培养基和基质胶(终浓度大于4mg/mL)将细胞密度调整为108个活细胞/ml,由于小细胞肺癌细胞系NCI-H526、NCI-H69结团生长,细胞密度计算可能不是准确,接种密度 1×10^7 。

[0131] 实验动物为BALB/c无胸腺裸鼠(简称裸鼠,北京华阜康),5-6周龄,体重16-18克;实验动物到货时一般为4-5周龄,需要在动物房适应性饲养1周;实验动物饲养管理:每周更换一次繁殖用饲料、饮用水、垫料和笼具,同时要观察动物生理状态。

[0132] 细胞接种:接种量大于 $1-2 \times 10^7$ 个cell/只,接种体积为100-150 μ L/只,接种部位为裸鼠右上肢背部皮下;裸鼠接种肿瘤细胞7-15天后,每隔3天观察一次肿瘤体积大小。待肿瘤体积达到150mm³,可进行分组和给药;挑取肿瘤大小均一的裸鼠,并按照实验目的进行随机分组,在NCI-H526皮下模型中,promiximab-DUBA体内抗肿瘤实验分组如下表4所示。

[0133] 表4 NCI-H526皮下模型分组

| | | |
|--------|-----------------------------|--------|
| [0134] | NCI-H526 皮下模型分组 | 数目 (只) |
| | Control | 6 |
| | Promiximab (10 mg/kg) | 6 |
| | Promiximab-DUBA (10 mg/kg) | 6 |
| | Promiximab-DUBA (5 mg/kg) | 6 |
| | Promiximab-DUBA (2.5 mg/kg) | 6 |
| [0135] | Promiximab-DUBA (1 mg/kg) | 6 |

[0136] 在NCI-H69皮下模型中,promiximab-DUBA ADCs体内抗肿瘤实验分组如下表5所示。

[0137] 表5 NCI-H69皮下模型分组

[0138]

| | |
|----------------------------|--------|
| NCI-H69皮下模型分组 | 数目 (只) |
| Control | 6 |
| Promiximab (10mg/kg) | 6 |
| Promiximab-DUBA (10mg/kg) | 6 |
| Promiximab-DUBA (5mg/kg) | 6 |
| Promiximab-DUBA (2.5mg/kg) | 6 |

[0139] 称量各组裸鼠体重,测量肿瘤体积,开始以尾静脉注射方式给药;每隔三天给药一次,连续给药3次;裸鼠肿瘤生长情况监测:从给药开始,每三天使用游标卡尺测量肿瘤长短径,单位为mm,计算肿瘤体积大小,计算公式为 $V = \text{长径} \times \text{短径} \times \text{短径} / 2$,测量肿瘤时,应用酒精棉球擦拭肿瘤的轮廓,在量长短径的时候,以尺子正好能通过肿瘤为宜,注意不能卡紧,将测量的各组数据求平均值并计算出标准误差;裸鼠体重监测,使用电子天平称量动物体重,单位为g,将测量的各组数据求平均值并计算出标准差;观察裸鼠生理和生活状态,有无感染等治疗期限:治疗期限根据治疗效果与裸鼠生长情况而定。一般出现显著治疗效果,对照小鼠肿瘤体积大于 2000mm^3 情况下,结束治疗,处死小鼠。

[0140] CD56阳性人小细胞肺癌NCI-H526和NCI-H69两种裸鼠皮下瘤模型用以研究promiximab和promiximab-DUBA的体内抗肿瘤活性。

[0141] 结果如图14A和B所示:在NCI-H526皮下模型中,promiximab-DUBA (10mg/kg和5mg/kg) 剂量组,给药三次后均能使肿瘤完全消退且不复发,promiximab-DUBA (2.5mg/kg和1mg/kg) 剂量组也能明显抑制肿瘤生长,其中promiximab-DUBA (2.5mg/kg) 和promiximab-DUBA (1mg/kg) 剂量组中各有3只和2只裸鼠肿瘤完全消退。在NCI-H69皮下模型中,promiximab-DUBA所有剂量组均有1-2只裸鼠肿瘤完全消退,体重观察结果表明(如图14C和D所示),给药后裸鼠体重未发生明显改变,因此,本研究制备的promiximab-DUBA复合物具有良好的体内抗CD56阳性肿瘤活性,和低毒副作用。

[0142] 3、H&E染色

[0143] 小鼠一般状况评价分为体重和主要器官的病理学变化决定。肿瘤裸鼠的主要器官的H&E染色用于promiximab-DUBA潜在的毒副作用研究。取对照组、抗体组和ADCs药物处理

组裸鼠的心、肝、脾、肺和肾的组织样品在4%磷酸盐缓冲的甲醛中固定,并根据常规方法石蜡包埋。将组织切片用苏木精和曙红(H&E)染色后镜下分析。尾静脉给药后的第20天,取各个实验组的裸鼠的心、肝、脾、肺、肾,采用H&E染色,结果如图15所示,同对照组的正常器官比较,给药组中各个器官没有发现明显的组织病变,说明无明显毒副作用。

[0144] 由实施例可知,本发明制备的抗CD56抗体复合物既保留了靶向结合CD56的高亲和能力,又具有多卡霉素高效杀伤细胞的能力,在提高药物治疗效果的同时减少药物对机体的毒副作用;在体外抗CD56阳性肿瘤细胞的增殖活性高,具有抗肿瘤效果,毒副作用小,为ADCs提供了一种全新的选择。

序列表

<110> 四川大学

<120> 抗CD56抗体与多卡霉素偶联复合物及其制备方法和用途

<130> A170804K

<160> 20

<170> SIP0SequenceListing 1.0

<210> 1

<211> 115

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 1

```

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

```

<210> 2

<211> 120

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 2

```

Gln Ile Gln Leu Val Gln Ser Gly Pro Glu Leu Lys Lys Pro Gly Glu
1           5           10           15
Thr Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr
           20           25           30
Gly Met Asn Trp Val Lys Gln Thr Pro Gly Lys Gly Leu Lys Trp Met
           35           40           45

```

| | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Gly | Trp | Ile | Asn | Thr | Tyr | Thr | Gly | Glu | Ser | Thr | Tyr | Thr | Asp | Asp | Phe |
| 50 | | | | | | | 55 | | | | | 60 | | | |
| Lys | Gly | Arg | Phe | Ala | Phe | Ser | Leu | Glu | Thr | Ser | Thr | Ser | Thr | Ala | Tyr |
| 65 | | | | | | 70 | | | | 75 | | | | | 80 |
| Leu | Gln | Ile | Asn | Asn | Ile | Arg | Asn | Glu | Asp | Thr | Ala | Thr | Tyr | Phe | Cys |
| | | | | 85 | | | | | 90 | | | | | 95 | |
| Ala | Arg | Ser | Pro | Tyr | Tyr | Tyr | Gly | Ser | Gln | Arg | Gly | Tyr | Phe | Asp | Val |
| | | | 100 | | | | | | 105 | | | | | 110 | |
| Trp | Gly | Ala | Gly | Thr | Thr | Val | Thr | | | | | | | | |
| | | | 115 | | | | 120 | | | | | | | | |

<210> 3

<211> 115

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 3

| | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Lys | Arg | Val | Glu | Ser | Gly | Gly | Gly | Leu | Val | Gln | Pro | Gly | Gly | Ser | Arg |
| 1 | | | | 5 | | | | | 10 | | | | | 15 | |
| Lys | Leu | Ser | Cys | Ala | Ala | Ser | Gly | Phe | Thr | Phe | Ser | Asp | Tyr | Gly | Met |
| | | | 20 | | | | | 25 | | | | | | 30 | |
| Ala | Trp | Val | Arg | Gln | Val | Pro | Gly | Lys | Gly | Pro | Glu | Trp | Ile | Ala | Phe |
| | | | 35 | | | | 40 | | | | | 45 | | | |
| Ile | Ser | Asn | Leu | Ala | Tyr | Ser | Ile | Tyr | Tyr | Ile | Asp | Thr | Val | Thr | Gly |
| | | | 50 | | | | 55 | | | | 60 | | | | |
| Arg | Phe | Thr | Ile | Ser | Arg | Glu | Asn | Ala | Lys | Asn | Thr | Leu | Tyr | Leu | Glu |
| 65 | | | | | 70 | | | | | 75 | | | | | 80 |
| Met | Ser | Ser | Leu | Arg | Ser | Glu | Asp | Thr | Ala | Ile | Tyr | Tyr | Cys | Ala | Arg |
| | | | | 85 | | | | | 90 | | | | | 95 | |
| Val | Ser | Gly | Thr | Trp | Leu | Gly | Tyr | Trp | Gly | Gln | Gly | Thr | Leu | Val | Thr |
| | | | 100 | | | | | | 105 | | | | | 110 | |
| Val | Ser | Ala | | | | | | | | | | | | | |
| | | | 115 | | | | | | | | | | | | |

<210> 4

<211> 112

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 4

| | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Glu | Ser | Gly | Gly | Gly | Leu | Val | Gln | Pro | Gly | Gly | Ser | Arg | Lys | Leu | Ser |
| 1 | | | | | 5 | | | | | 10 | | | | 15 | |
| Cys | Ala | Ala | Ser | Gly | Phe | Thr | Phe | Ser | Asp | Ser | Gly | Met | Ala | Trp | Val |

| | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| | 20 | | 25 | | 30 | | | | | | | | | | |
| Arg | Gln | Ala | Pro | Gly | Lys | Gly | Pro | Glu | Trp | Val | Ala | Phe | Ile | Ser | Asn |
| | 35 | | 40 | | 45 | | | | | | | | | | |
| Leu | Ala | Tyr | Ser | Ile | Tyr | Tyr | Ala | Asp | Thr | Val | Thr | Gly | Arg | Phe | Thr |
| | 50 | | 55 | | 60 | | | | | | | | | | |
| Ile | Ser | Arg | Glu | Asn | Ala | Lys | Asn | Thr | Leu | Tyr | Leu | Glu | Met | Ser | Ser |
| 65 | | | 70 | | 75 | | | | | | | | | | 80 |
| Leu | Arg | Ser | Glu | Asp | Thr | Ala | Met | Tyr | Tyr | Cys | Ala | Arg | Ile | Ser | Tyr |
| | | | 85 | | 90 | | | | | | | | | | 95 |
| Asp | Tyr | Ile | Asp | Tyr | Trp | Gly | Gln | Gly | Thr | Thr | Leu | Thr | Val | Ser | Ser |
| | 100 | | 105 | | 110 | | | | | | | | | | |

<210> 5

<211> 117

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 5

| | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Asp | Val | Met | Leu | Val | Glu | Ser | Gly | Gly | Gly | Leu | Val | Gln | Pro | Gly | Gly |
| 1 | | | 5 | | | | | | 10 | | | | | 15 | |
| Ser | Arg | Lys | Leu | Ser | Cys | Ala | Ala | Ser | Gly | Phe | Thr | Phe | Ser | Asp | Tyr |
| | | | 20 | | | | | | 25 | | | | | 30 | |
| Gly | Met | Ala | Trp | Val | Arg | Gln | Val | Pro | Gly | Lys | Gly | Pro | Glu | Trp | Ile |
| | | | 35 | | | | | | 40 | | | | | 45 | |
| Ala | Phe | Ile | Ser | Asn | Leu | Ala | Tyr | Ser | Ile | Tyr | Tyr | Ile | Asp | Thr | Val |
| | | | 50 | | | | | | 55 | | | | | 60 | |
| Thr | Gly | Arg | Phe | Thr | Ile | Ser | Arg | Glu | Asn | Ala | Lys | Asn | Thr | Leu | Tyr |
| 65 | | | | | 70 | | | | | 75 | | | | | 80 |
| Leu | Glu | Met | Ser | Ser | Leu | Arg | Ser | Glu | Asp | Thr | Ala | Ile | Tyr | Tyr | Cys |
| | | | | | 85 | | | | | 90 | | | | | 95 |
| Ala | Arg | Val | Ser | Gly | Thr | Trp | Leu | Gly | Tyr | Trp | Gly | Gln | Gly | Thr | Leu |
| | | | 100 | | | | | | 105 | | | | | 110 | |
| Val | Thr | Val | Ser | Ala | | | | | | | | | | | |
| | | | 115 | | | | | | | | | | | | |

<210> 6

<211> 114

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 6

| | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Val | Gln | Leu | Gln | Gln | Ser | Gly | Pro | Glu | Leu | Val | Lys | Pro | Gly | Ala | Ser |
| 1 | | | | | 5 | | | | | 10 | | | | 15 | |

| | | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|--|
| Val | Lys | Ile | Ser | Cys | Lys | Ala | Ser | Gly | Tyr | Ser | Phe | Thr | Asp | Tyr | Tyr | |
| 20 | | | | | 25 | | | | | 30 | | | | | | |
| Met | His | Trp | Val | Lys | Gln | Ser | His | Val | Lys | Ser | Leu | Glu | Trp | Ile | Gly | |
| 35 | | | | | 40 | | | | | 45 | | | | | | |
| Arg | Ile | Asn | Pro | Tyr | Asn | Gly | Ala | Thr | Thr | Tyr | Asn | Gln | Asn | Phe | Lys | |
| 50 | | | | | 55 | | | | | 60 | | | | | | |
| Asp | Lys | Ala | Ser | Leu | Thr | Val | Asp | Lys | Ser | Ser | Ser | Thr | Val | Tyr | Met | |
| 65 | | | | | 70 | | | | | 75 | | | | | 80 | |
| Glu | Leu | His | Ser | Leu | Thr | Ser | Glu | Asp | Ser | Ala | Val | Tyr | Tyr | Cys | Ala | |
| 85 | | | | | 90 | | | | | 95 | | | | | | |
| Arg | Tyr | Pro | Leu | Phe | Gly | Tyr | Trp | Gly | Gln | Gly | Thr | Leu | Val | Thr | Val | |
| 100 | | | | | 105 | | | | | 110 | | | | | | |

Ser Ala

<210> 7

<211> 112

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 7

| | | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|--|
| Asp | Val | Leu | Leu | Thr | Gln | Thr | Pro | Leu | Ser | Leu | Pro | Val | Ser | Leu | Gly | |
| 1 | | | | 5 | | | | 10 | | | | 15 | | | | |
| Asp | Gln | Ala | Ser | Ile | Ser | Cys | Arg | Ser | Ser | Gln | Asn | Ile | Leu | His | Ser | |
| 20 | | | | | 25 | | | | | 30 | | | | | | |
| Asn | Gly | Asn | Thr | Tyr | Phe | Glu | Trp | Tyr | Leu | Gln | Lys | Pro | Gly | Gln | Ser | |
| 35 | | | | 40 | | | | 45 | | | | | | | | |
| Pro | Lys | Leu | Leu | Ile | Tyr | Lys | Val | Ser | Asn | Arg | Phe | Ser | Gly | Val | Pro | |
| 50 | | | | 55 | | | | 60 | | | | | | | | |
| Asp | Arg | Phe | Ser | Gly | Ser | Gly | Ser | Gly | Thr | Asp | Phe | Thr | Leu | Lys | Ile | |
| 65 | | | | | 70 | | | | | 75 | | | | | 80 | |
| Ser | Arg | Val | Glu | Ala | Glu | Asp | Leu | Gly | Val | Tyr | Tyr | Cys | Phe | Gln | Gly | |
| 85 | | | | | 90 | | | | | 95 | | | | | | |
| Ser | His | Val | Pro | Phe | Thr | Phe | Gly | Gly | Gly | Thr | Lys | Leu | Glu | Ile | Lys | |
| 100 | | | | | 105 | | | | | 110 | | | | | | |

<210> 8

<211> 107

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 8

| | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Asp | Ile | Ile | Ile | Ser | Arg | Ser | Pro | Ala | Thr | Leu | Ser | Val | Thr | Pro | Gly |
| 1 | | | | 5 | | | | 10 | | | | 15 | | | |

Asp Arg Val Ser Leu Ser Cys Arg Ala Ser Leu Ile Ile Thr Asp Tyr
 20 25 30
 Leu His Trp Tyr Gln Gln Pro Ser Asn Glu Ser Pro Arg Leu Leu Ile
 35 40 45
 Arg Tyr Val Cys Leu Ala Ile Ser Gly Ile Pro Ser Ser Phe Ala Asp
 50 55 60
 Ser Gly Ser Arg Thr Asp Phe Pro Leu Cys Ile Asn Ser Val Lys Pro
 65 70 75 80
 Glu His Val Gly Val Tyr Tyr Cys Gln Asn Gly His Thr Phe Pro Leu
 85 90 95
 Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Val Lys
 100 105

<210> 9

<211> 107

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 9

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

<210> 10

<211> 107

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 10

Asp Ile Val Val Thr Gln Phe Pro Asp Thr Leu Ser Val Thr Pro Gly
 1 5 10 15
 Asp Ser Val Ser Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Arg Asn Asn

| 20 | 25 | 30 |
|---|-----|----|
| Leu His Trp Tyr Gln Gln Gln Ser His Glu Ser Pro Arg Leu Leu Ile | | |
| 35 | 40 | 45 |
| Lys Tyr Ala Ser Gln Ser Ile Ser Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly | | |
| 50 | 55 | 60 |
| Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Ser Ile Asn Ser Val Glu Thr | | |
| 65 | 70 | 75 |
| Glu Asp Phe Gly Met Tyr Phe Cys Gln Gln Ser Asn Asn Trp Pro Tyr | | |
| 85 | 90 | 95 |
| Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys | | |
| 100 | 105 | |

<210> 11

<211> 346

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 11

gagatccagc tgcagcagtc tggacctgag ctggtgaagc ctggggcttc agtgaaggta 60
 tcctgcaagg cttctgggta tgcgttcact aactacaaca tgtactggat gaaacagagc 120
 catggaaaga gccttgagtg gattggatat attgatcctt acaatgggtg tactaggtac 180
 aaccagaagt tcaagggcaa ggccacattg actgttgaca agtcctccag cacagcctac 240
 atgcattctca acagcctgac atctgaggac tctgcagtct attactgtgc aagagaggat 300
 agtaccggct actggggcca aggcaccact ctacagtct cctcag 346

<210> 12

<211> 360

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 12

cagatccagt tggatgcagtc tggacctgaa ctgaagaagc ctggagagac agtcaagatc 60
 tcctgtaagg cttctgggata taccttcaca aactatggaa tgaactgggt gaagcagact 120
 ccaggaaagg gtttaaagtg gatgggctgg ataaacacct atactggaga gtcaacatat 180
 actgatgact tcaagggacg gtttgctttt tctttggaga cctctaccag caccgcctat 240
 ttgcagatca acaacatcag aaatgaggac acggctacat atttctgtgc aagatccctt 300
 tattactacg gtagtcaacg ggggtacttc gatgtctggg gcgcaggagac cacggtcacc 360

<210> 13

<211> 346

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 13

aaacgggtgg agtctggggg aggcttagtg cagcctggag ggtcccgaa actctcctgt 60

gcagcctctg gattcacttt cagtgactac ggaatggcgt gggttcgaca ggttccaggg 120
aaggggcctg agtggattgc attcattagt aatttggcat atagtatcta ctatatagac 180
actgtgacgg gccgattcac catctctaga gagaatgcca agaacaccct gtacctggaa 240
atgagcagtc tgaggctctga ggacacagcc atatactact gtgcaagggt ttctgggacc 300
tggcttgggt actggggcca agggactctg gtcactgtct ctgcag 346

<210> 14

<211> 339

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 14

tggagtctgg gggaggetta gtgcagcctg gagggteccg gaaactctcc tgtgcagcct 60
ctggattcac tttcagtac tccggaatgg cgtgggttcg acaggctcca gggaaggggc 120
ctgagtgggt agcattcatt agtaatttgg catatagtat ctactatgca gacactgtga 180
cgggccgatt caccatctct agagagaatg ccaagaacac cctgtacctg gaaatgagca 240
gtctgaggtc tgaggacaca gccatgtact actgtgcaag gatctcctat gattacattg 300
actactgggg ccaaggcacc actctcacag tctcctcag 339

<210> 15

<211> 351

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 15

gacgtgatgc tgggtggagtc tgggggaggc ttagtgcagc ctggagggtc ccgaaactc 60
tcctgtgcag cctctggatt cactttcagt gactacggaa tggcgtgggt tcgacaggtt 120
ccagggaagg ggcctgagtg gattgcattc attagtaatt tggcatatag tatctactat 180
atagacactg tgacgggccg attcaccatc tctagagaga atgccaagaa caccctgtac 240
ctggaaatga gcagtctgag gtctgaggac acagccatat actactgtgc aagggtttct 300
gggacctggc ttggttactg gggccaaggg actctggtca ctgtctctgc g 351

<210> 16

<211> 344

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 16

ggtccagctg caacagtctg gacctgaact ggtgaagcct ggggcttcag tgaagatata 60
ctgcaaggct tctggttact cattcactga ctactacatg cactgggtga agcaaagcca 120
tgtaaagagc cttgagtgga ttggacgtat taatccttac aatggtgcta ctacctaaa 180
ccagaatttc aaggacaagg ccagtttgac tgtagataag tcctccagca cagtctacat 240
ggagctccac agcctgacat ctgaggactc tgcagtctat tactgtgcaa gatacccttt 300
gttttggttac tggggccaag ggactctggt cactgtctct gcag 344

<210> 17

<211> 337

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 17

```
gatgttttgc tgacccaaac tccactctcc ctgcctgtca gtcttggaga tcaagcctcc 60
atctcttgca gatctagtca gaatatatta catagtaatg gcaacaccta tttcgaatgg 120
tacctgcaga aaccaggcca gtctccaaag ctctgatctt acaaagtttc caaccgattt 180
tctgggggtcc cagacagggt cagtggcagt ggatcaggga cagatttcac actcaagatc 240
agcagagtgg aggctgagga tctgggagtt tattactgct ttcaaggttc acatgttccg 300
ttcacgttcg gaggggggac caagctggaa ataaaac 337
```

<210> 18

<211> 322

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 18

```
gacattatta tatctcgttc tccagccacc ctgtctgtga ctccaggaga tagagtctct 60
ctttcctgca gggccagtct gattattacc gactacttac actggtatca acaaccatca 120
aatgaatctc caaggcttct catcagatat gtttgcttgg ccatctcttg gatccctcc 180
tccttcgctg acagtggatc acggacagat ttccctctct gtatcaacag tgtgaaacct 240
gaacatgttg gagtgtatta ctgtcaaaat ggtcacacct ttccgctcac gttcgggtgct 300
gggaccaagc tggaaagtga ac 322
```

<210> 19

<211> 322

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 19

```
gacatcttgc tgactcagtc tccagccatc ctgtctgtga gtccaggaga aagagtcagt 60
ttctcctgca gggccagtga gaacattggc acaagcatgc actggtatca gcaaagaaca 120
aatggttctc caaggcttct cataaagtat gttcttgagt ctatctcttg gatcccttcc 180
aggtttagtg gcagtggatc agggacagat tttactctta gcatcaacag tgtggagtct 240
gaagatattg cagattatta ctgtcaacaa actaatagct ggccgtacac gttcggaggg 300
gggaccaacc tggaaataaa ac 322
```

<210> 20

<211> 322

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 20

```
gacgttgtgg taactcagtt tccagacacc ctgtctgtga ctccaggaga tagcgtcagt 60
ctttcctgca gggccagcca aagtattcgt aacaacctac actggtatca acaacaatca 120
```

catgagtctc caaggcttct catcaagtat gcttcccagt ccatctcttg gatccctcc 180
aggttcagtg gcagtggatc agggacagat ttcactctca gtatcaacag tgtggagact 240
gaagattttg gaatgtattt ctgtcaacag agtaacaact ggccgtacac gttcggaggg 300
gggaccaagc tggaaataaa ac 322

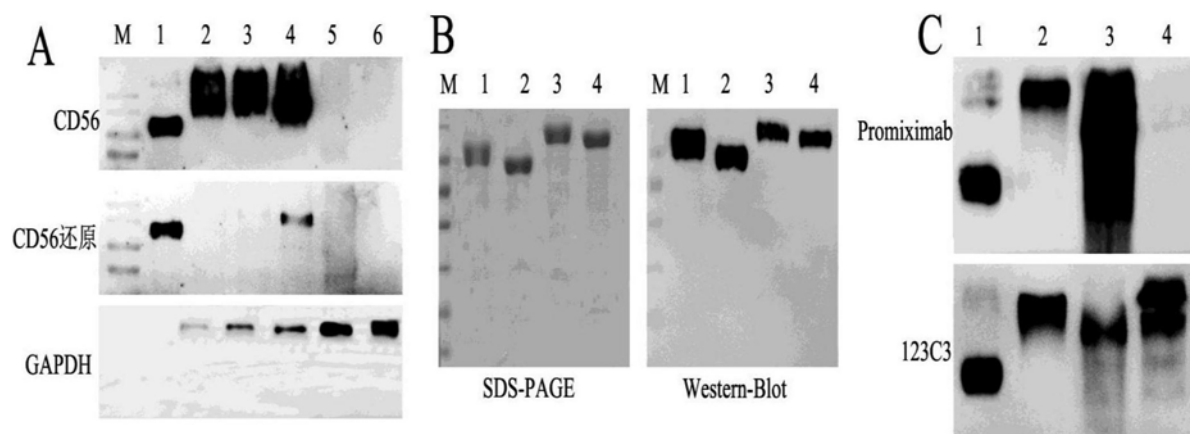


图1

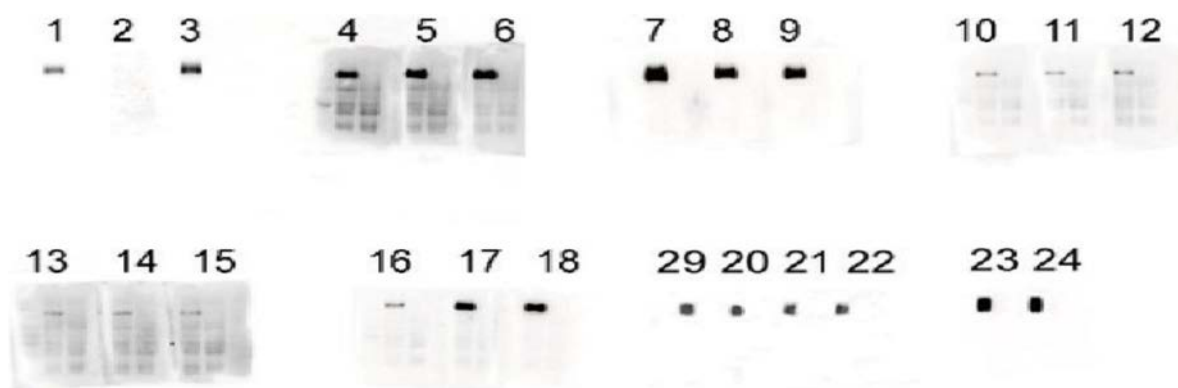


图2

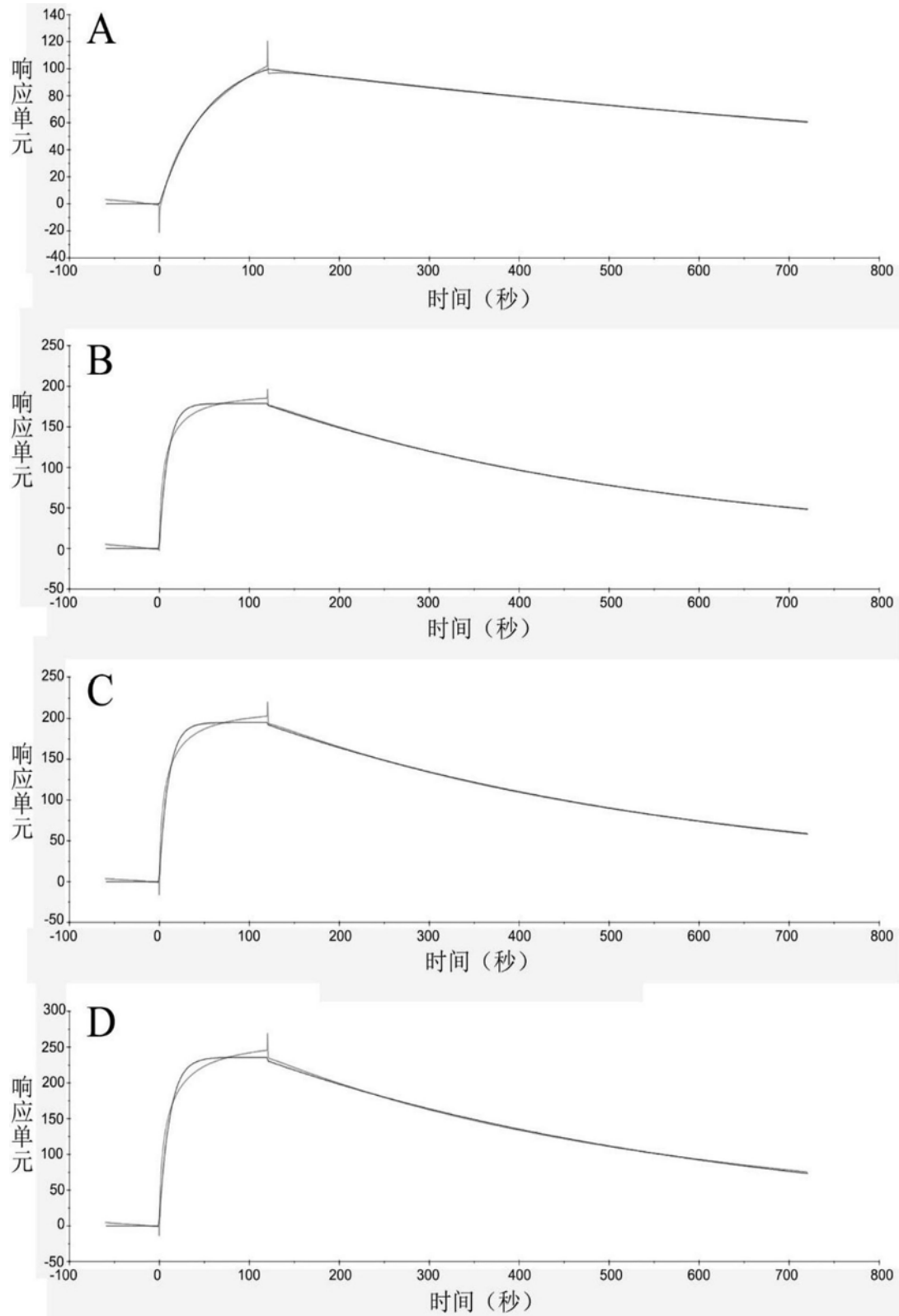


图3A-D

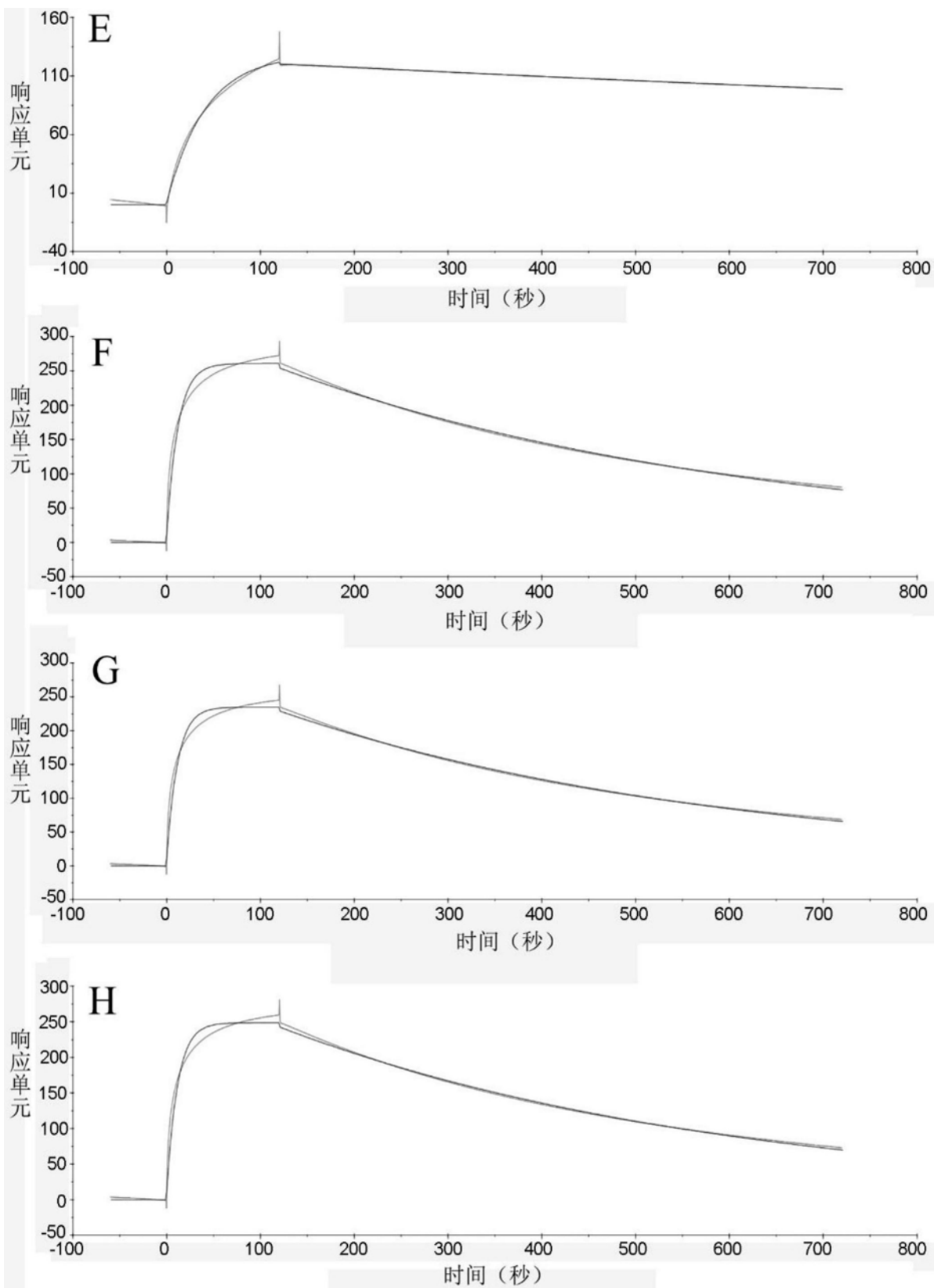


图3E-H

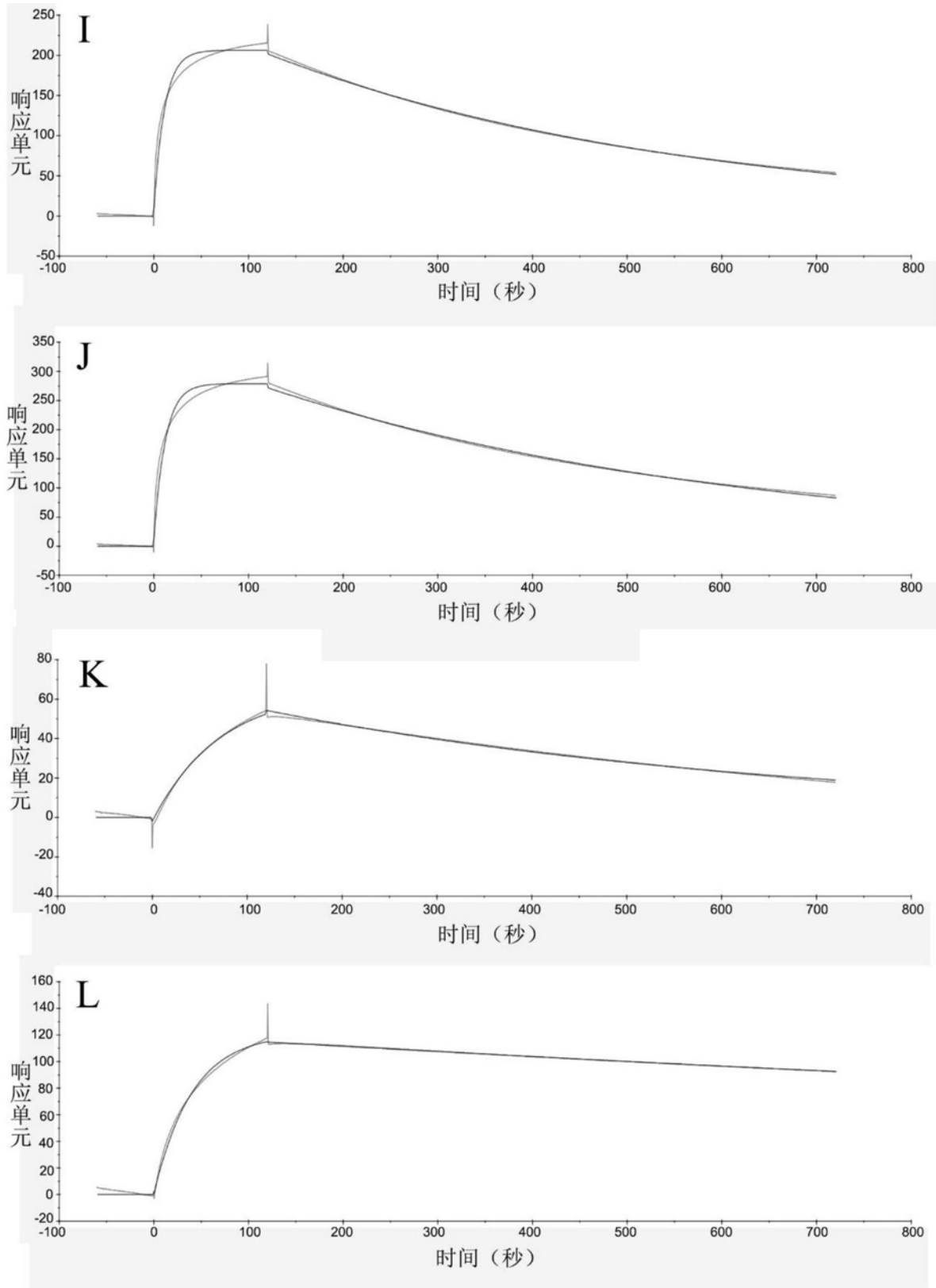


图3I-L

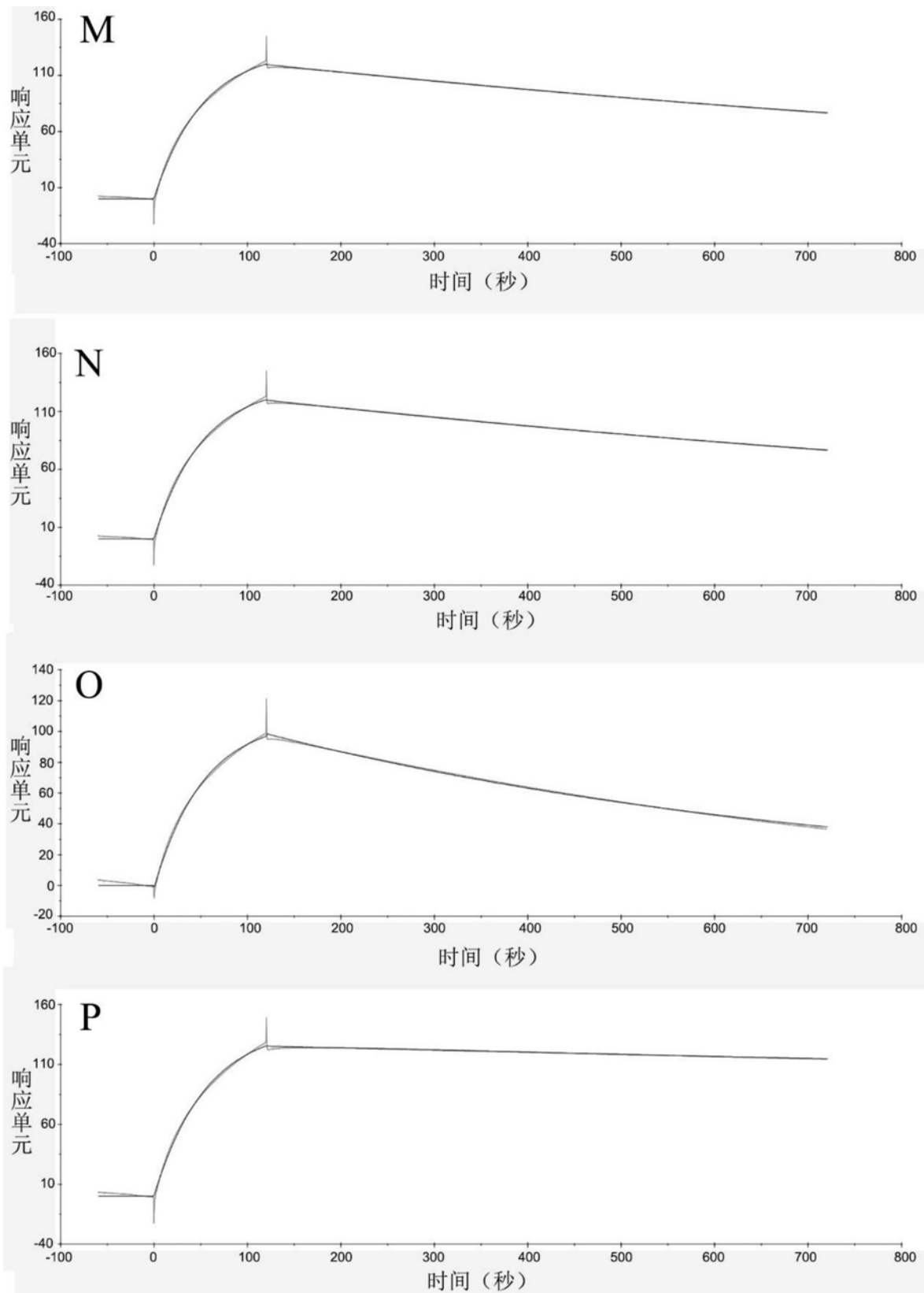


图3M-P

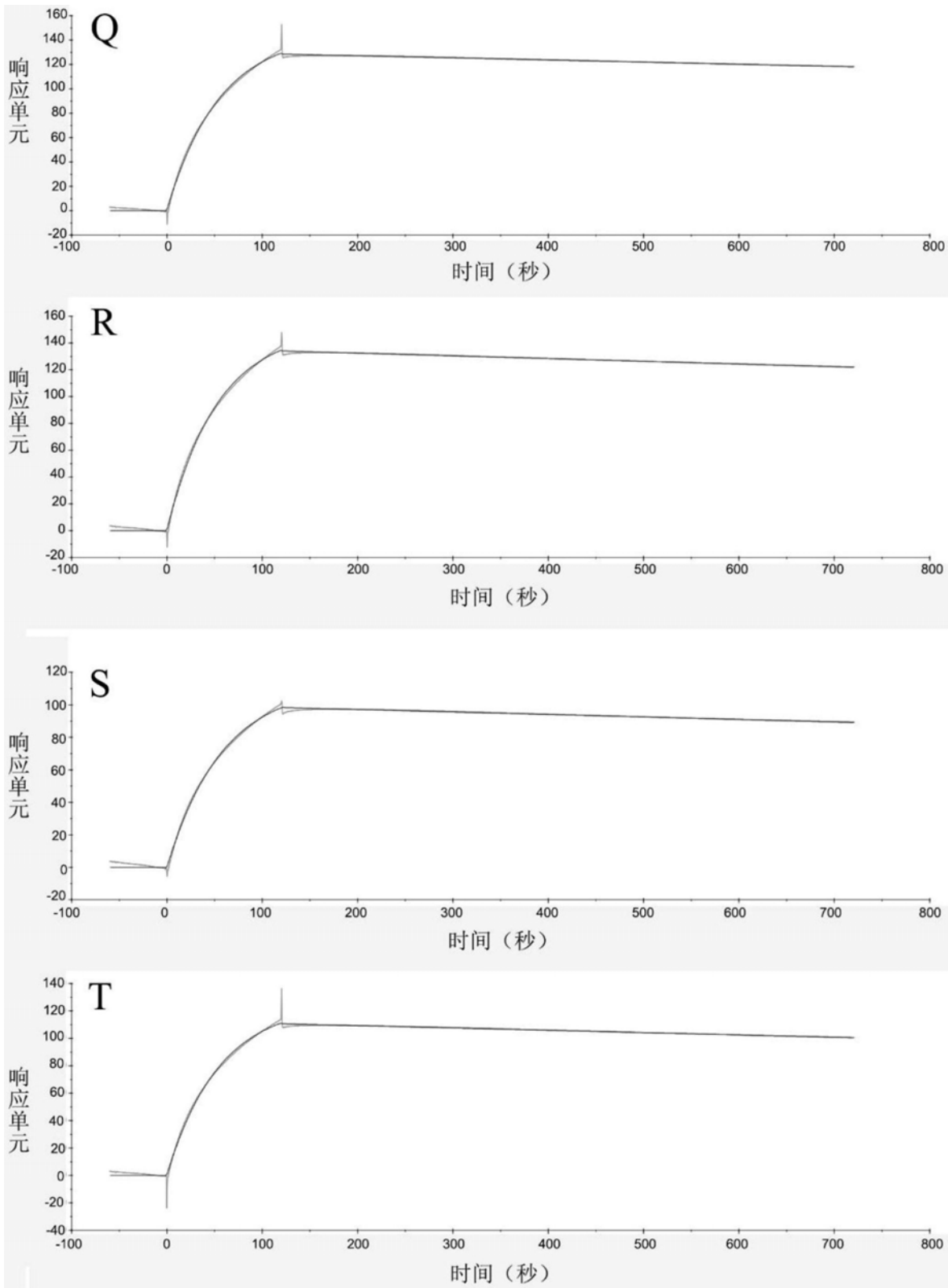


图3Q-T

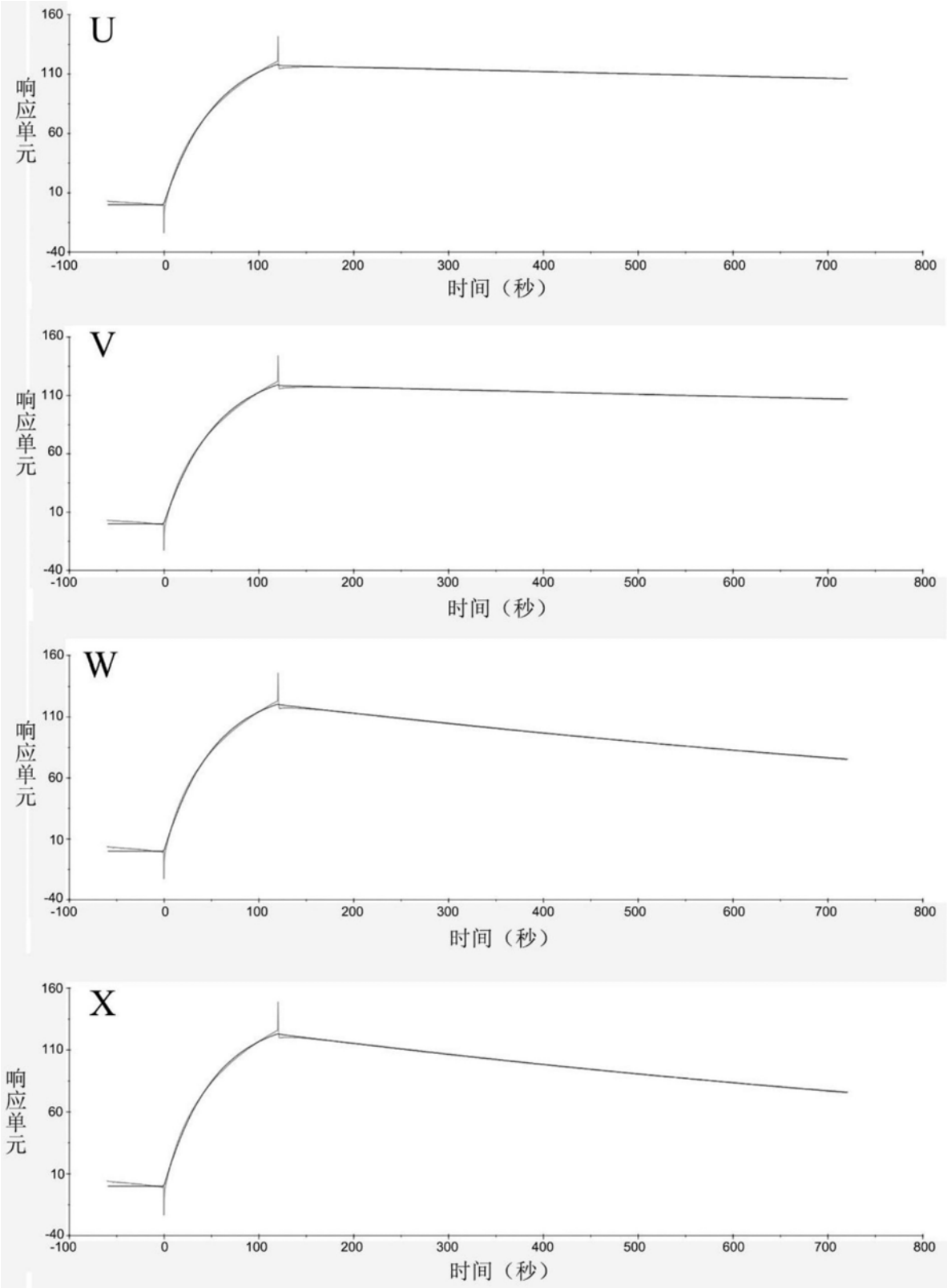


图3U-X

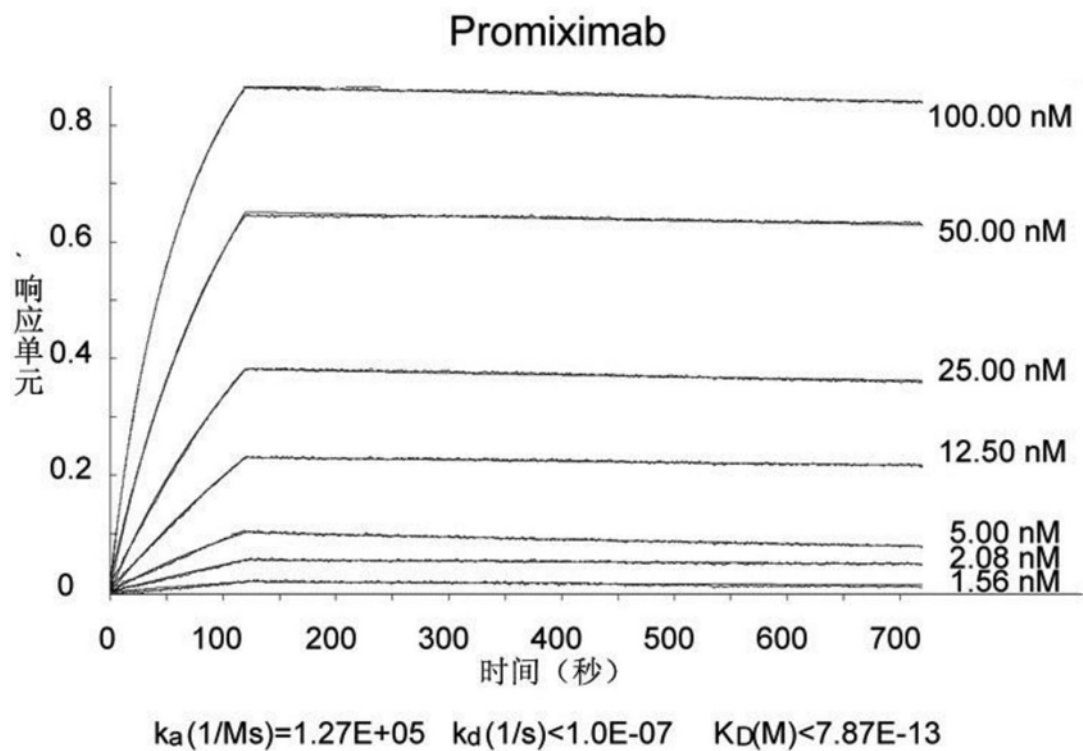


图4

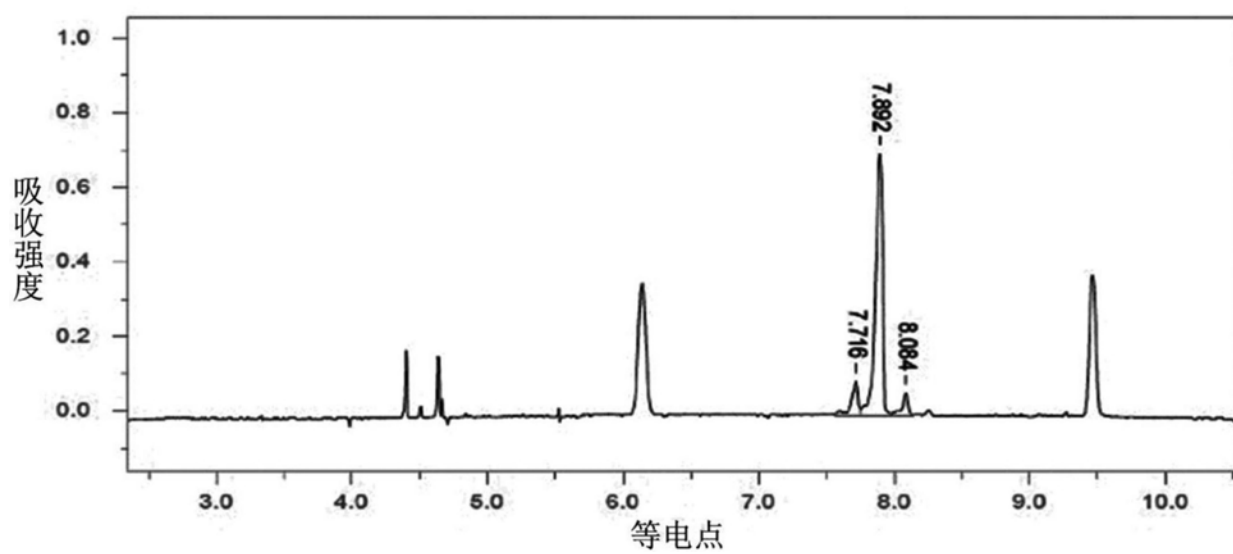


图5

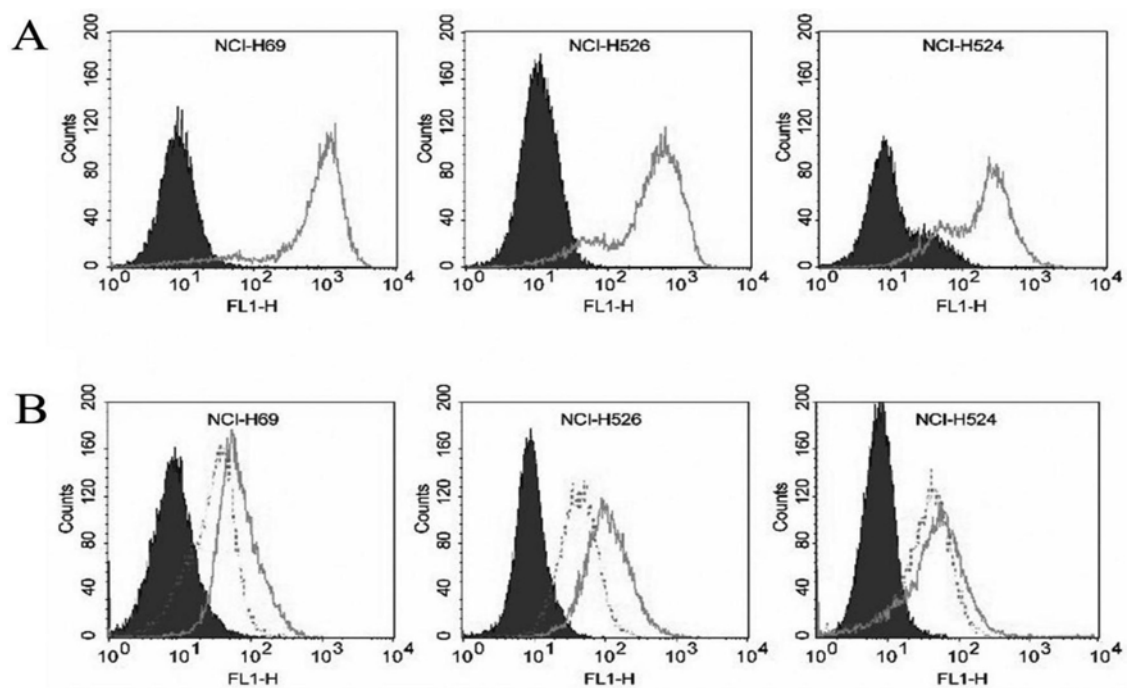


图6

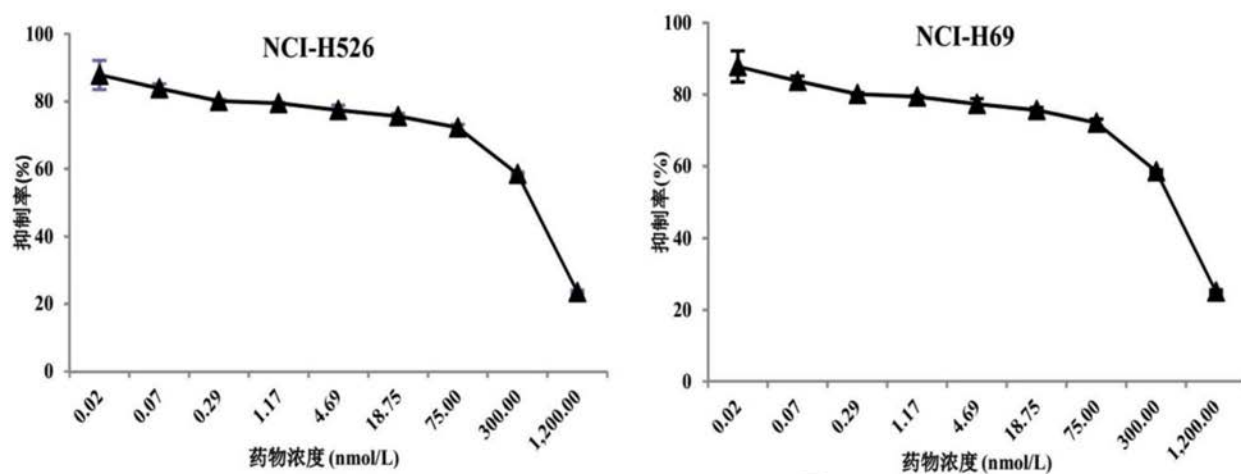


图7

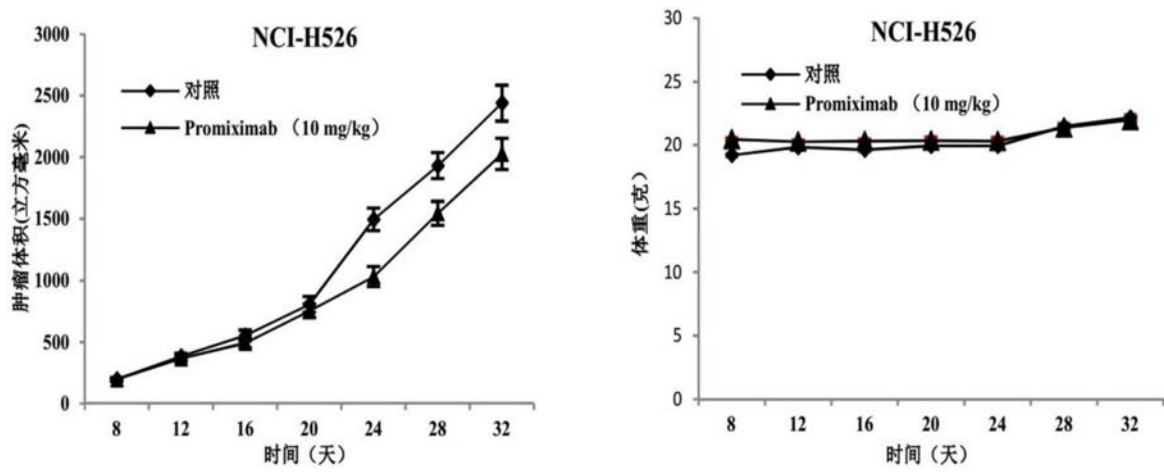


图8

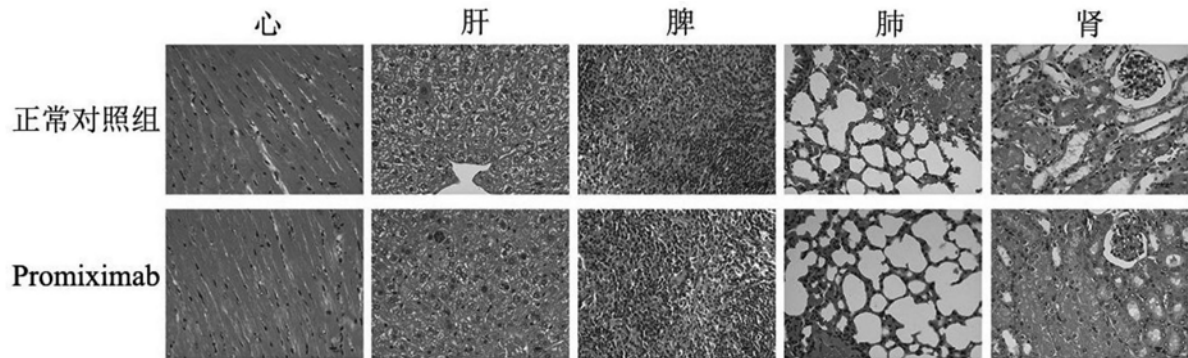


图9

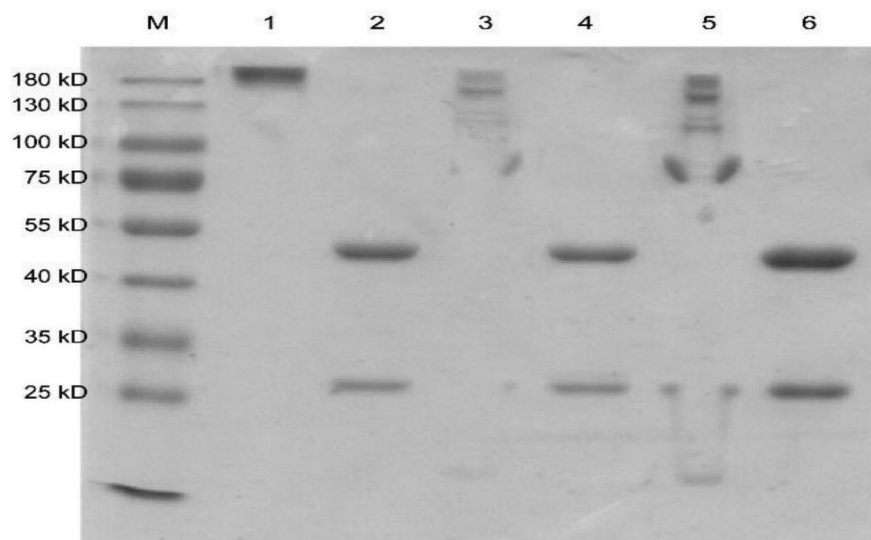


图10

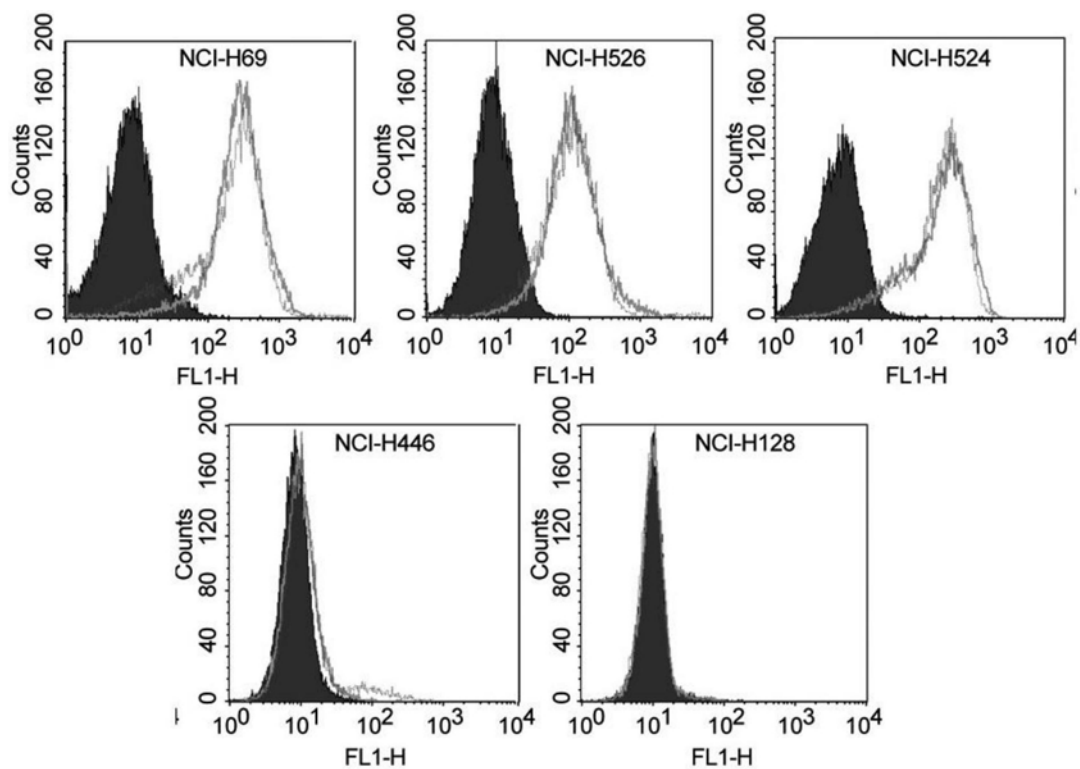


图11

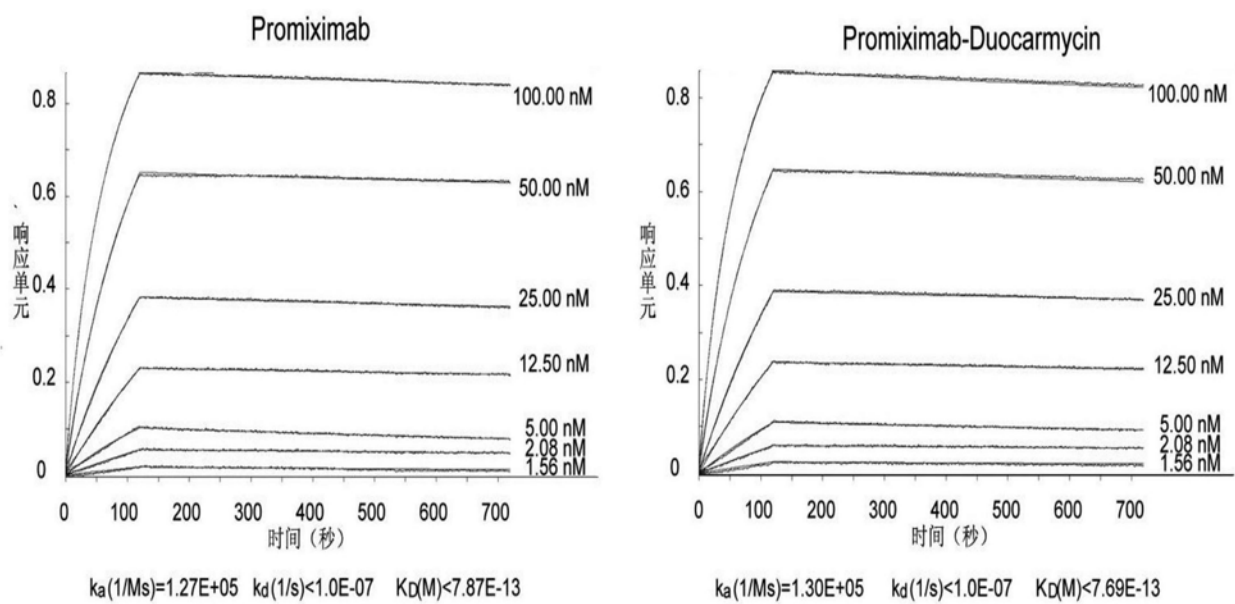


图12

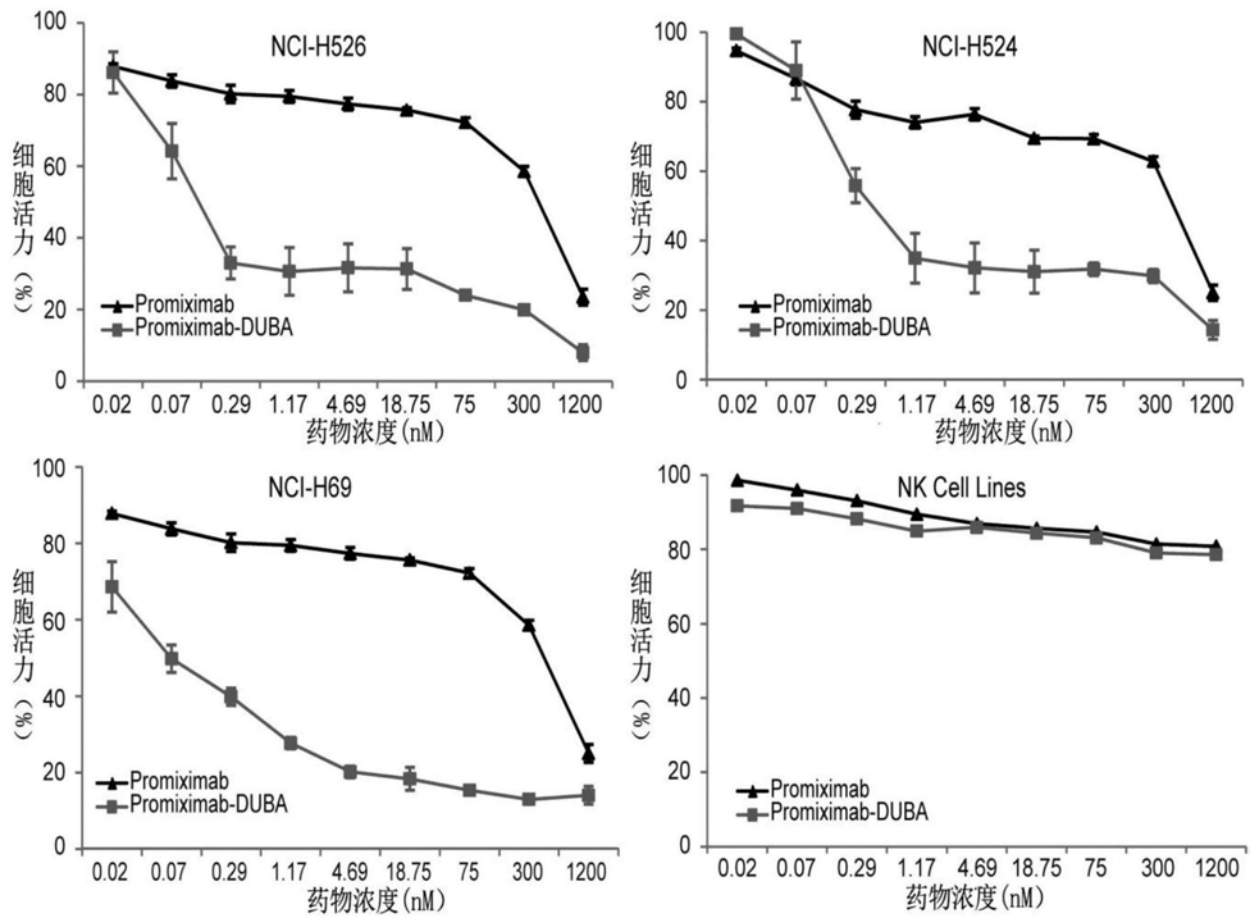


图13

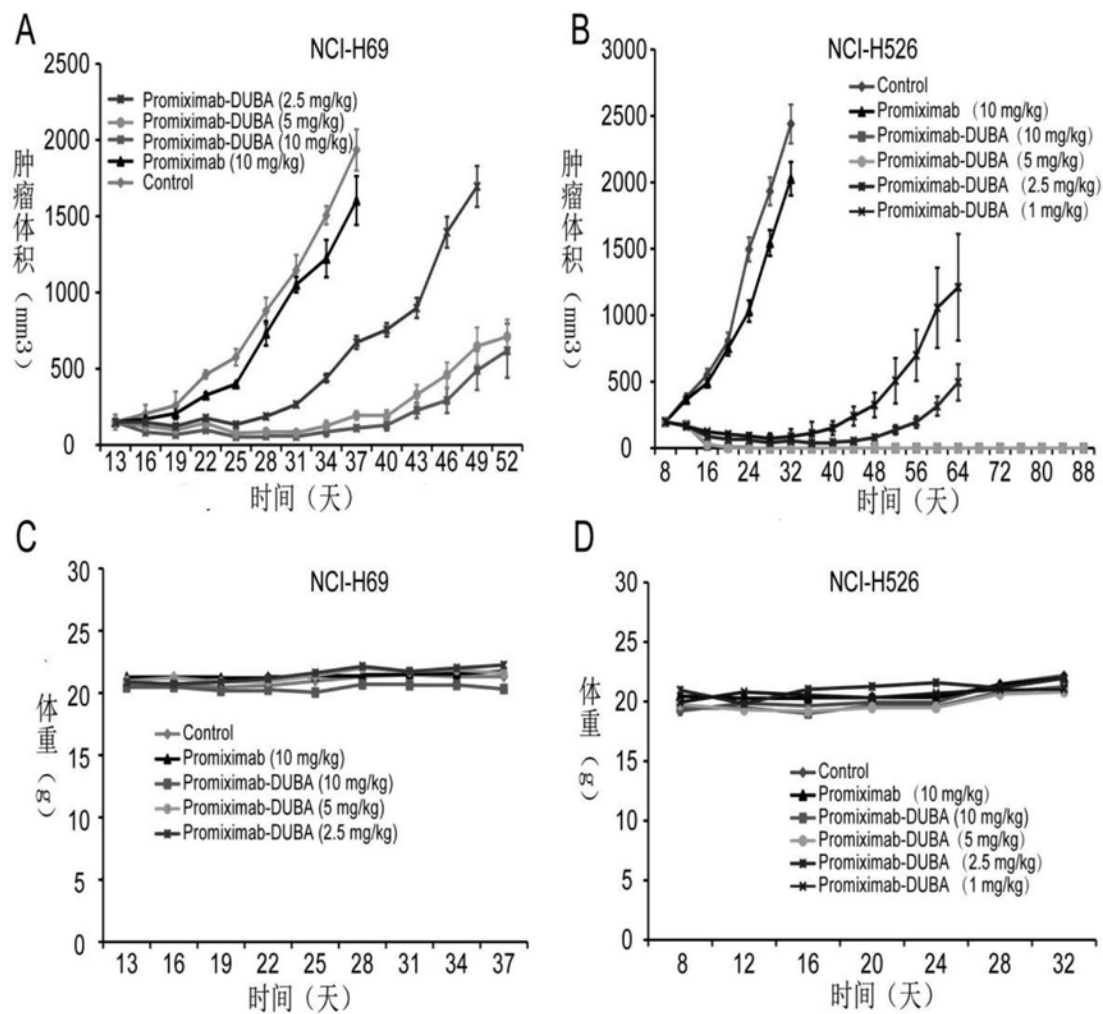


图14

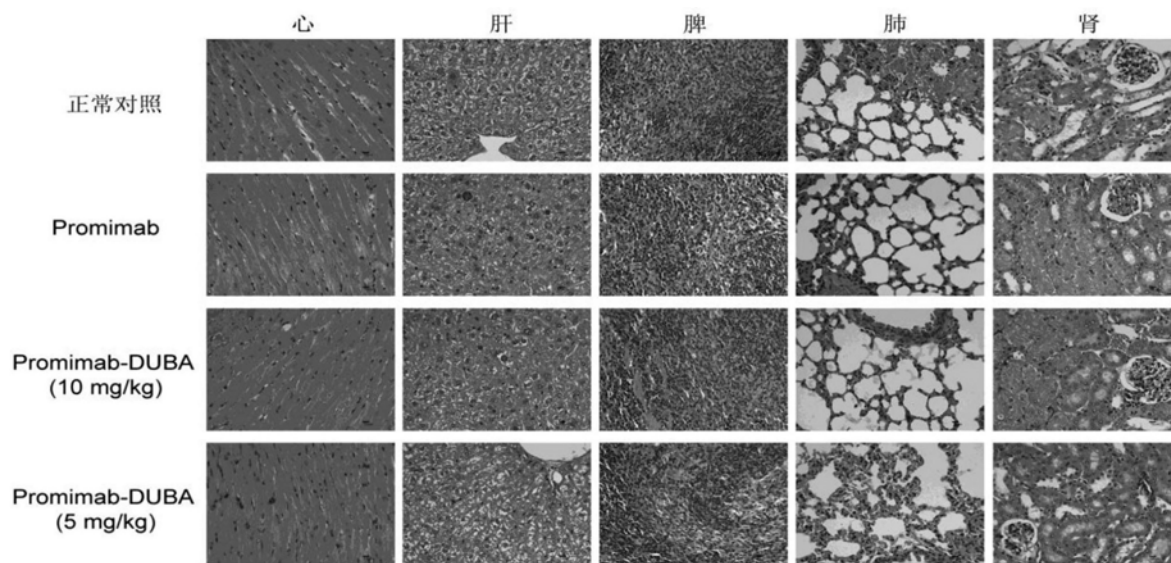


图15

| | | | |
|----------------|--|---------|------------|
| 专利名称(译) | 抗CD56抗体与多卡霉素偶联复合物及其制备方法和用途 | | |
| 公开(公告)号 | CN107715119A | 公开(公告)日 | 2018-02-23 |
| 申请号 | CN201711083552.7 | 申请日 | 2017-09-15 |
| [标]申请(专利权)人(译) | 四川大学 | | |
| 申请(专利权)人(译) | 四川大学 | | |
| 当前申请(专利权)人(译) | 四川大学 | | |
| [标]发明人 | 姚于勤 杨金亮 余琳 | | |
| 发明人 | 姚于勤 杨金亮 余琳 | | |
| IPC分类号 | A61K47/68 A61K31/407 A61K31/437 C07K16/28 G01N33/574 G01N33/53 A61P35/00 A61P37/02 A61P25/00 | | |
| CPC分类号 | A61K31/407 A61K31/437 C07K16/2803 G01N33/53 G01N33/574 | | |
| 代理人(译) | 梁鑫 | | |
| 外部链接 | Espacenet SIPO | | |

摘要(译)

本发明属于抗体偶联药物制备领域，具体涉及一种抗CD56抗体与多卡霉素偶联复合物及其制备方法和用途。本发明提供了一种抗CD56抗体与多卡霉素偶联复合物，其特征在于，其组成包括：抗CD56抗体，多卡霉素，偶联抗体与多卡霉素的连接分子，偶联抗体与多卡霉素的连接分子一端通过马来酰亚胺与抗CD56抗体的游离巯基偶联，另一端通过酯键与多卡霉素的羟基偶联。本发明的抗体偶联复合物保留了抗CD56抗体的靶向结合CD56的高亲和能力又具有多卡霉素高效杀伤细胞的能力，在提高药物治疗效果的同时减少药物对机体的毒副作用，能够用于制备诊断、治疗肿瘤、免疫或神经系统疾病的药物，具有良好的应用前景。

