

(12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织
国际局

(43) 国际公布日
2016 年 7 月 28 日 (28.07.2016)



(10) 国际公布号
WO 2016/115953 A1

(51) 国际专利分类号:

C07K 19/00 (2006.01) C12N 15/63 (2006.01)
C07K 1/22 (2006.01) A61K 39/395 (2006.01)
C12N 15/62 (2006.01) A61P 35/00 (2006.01)

(21) 国际申请号: PCT/CN2015/097367

(22) 国际申请日: 2015 年 12 月 15 日 (15.12.2015)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(30) 优先权:

201510035410.4 2015 年 1 月 21 日 (21.01.2015) CN

(71) 申请人: 中国药科大学 (CHINA PHARMACEUTICAL UNIVERSITY) [CN/CN]; 中国江苏省南京市鼓楼区童家巷 24 号, Jiangsu 210009 (CN)。

(72) 发明人: 张娟 (ZHANG, Juan); 中国江苏省南京市鼓楼区童家巷 24 号, Jiangsu 210009 (CN)。王旻 (WANG, Min); 中国江苏省南京市鼓楼区童家巷 24 号, Jiangsu 210009 (CN)。王佑富 (WANG, Youfu); 中国江苏省南京市鼓楼区童家巷 24 号, Jiangsu

210009 (CN)。解伟 (XIE, Wei); 中国江苏省南京市鼓楼区童家巷 24 号, Jiangsu 210009 (CN)。柳芳 (LIU, Fang); 中国江苏省南京市鼓楼区童家巷 24 号, Jiangsu 210009 (CN)。任学艳 (REN, Xueyan); 中国江苏省南京市鼓楼区童家巷 24 号, Jiangsu 210009 (CN)。

(74) 代理人: 江苏永衡昭辉律师事务所 (JIANGSU YONGHENG ZHAOHUI LAW FIRM); 中国江苏省南京市珠江路 222 号长发科技大厦 13 楼, Jiangsu 210018 (CN)。

(81) 指定国 (除另有指明, 要求每一种可提供的国家保护): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW。

[见续页]

(54) Title: PREPARATION AND USE OF ANTIBODY FUSION PROTEIN TARGETING VEGFR2

(54) 发明名称: 一种靶向 VEGFR2 的抗体融合蛋白的制备及其用途

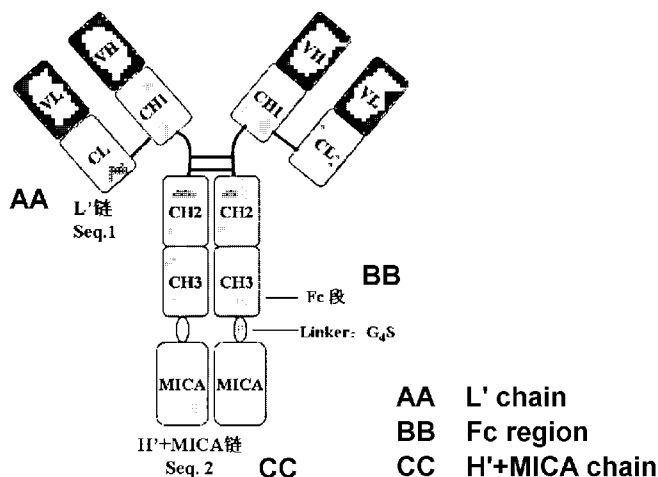


图 2

(57) Abstract: The present invention belongs to the technical field of genetically engineered antibodies, and provides a preparation method for and a use of a fusion protein of tumor VEGFR2 (KDR3) antibody and MHC class I polypeptide-related A (MICA). In particular, the fusion protein is expressed and prepared by linking a full-length antibody of VEGFR2 with MICA through a flexible peptide. The protein can inhibit or destroy tumor angiogenesis, increase the content of MICA on the surface of the tumor cell, reestablish the immunological surveillance of a body activated by NKG2D pathway, and enhance ADCC effect mediated by the Fc region of the antibody.

(57) 摘要: 本发明属于基因工程抗体技术领域, 提供一种肿瘤 VEGFR2 (KDR3) 抗体与 MHC I 类分子相关蛋白 A (MICA) 的融合蛋白的制备方法及用途。具体是将 VEGFR2 的全长抗体与 MICA 通过柔性肽连接并表达制备的融合蛋白, 该蛋白能抑制或破坏肿瘤的新生血管, 增加肿瘤细胞表面 MICA 的含量, 重建由 NKG2D 途径激活机体自身的免疫监视作用, 并增强抗体 Fc 段介导的 ADCC 效应。



WO 2016/115953 A1



(84) **指定国** (除另有指明, 要求每一种可提供的地区保护): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 欧洲 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ,

CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG)。

本国际公布:

- 包括国际检索报告(条约第 21 条(3))。
- 包括说明书序列表部分(细则 5.2(a))。

一种靶向 VEGFR2 的抗体融合蛋白的制备及其用途

技术领域

本发明属于生物工程领域，具体涉及一种可与肿瘤血管内皮生长因子受体（VEGFR/KDR）及 NK 细胞的活化型受体（NKG2D）特异结合的高亲和力全人源的融合蛋白，能抑制血管内皮生长因子(KDR)受体的活化，可抑制高表达血管内皮生长因子受体人血管内皮细胞 HUVEC 的生长，并且可增强 NK 细胞对人乳腺癌细胞的抗体依赖性的细胞介导的细胞毒作用（ADCC），是一种具有靶向 VEGFR 及 NKG2D 的抗肿瘤及血管生成活性的高特异性基因工程融合蛋白。

背景技术

如何在杀死肿瘤细胞的同时不伤害病人是我们一直面临的难题。目前抗肿瘤药物设计的关键是不仅要杀死肿瘤细胞，而且要恢复机体的免疫监视作用，让免疫系统来杀死肿瘤细胞。肿瘤和免疫系统之间的相互作用可以分为：早期免疫介导的肿瘤“清除”、“平衡”和肿瘤的“逃逸”三个阶段。免疫系统免疫监护作用的一个重要的机制就是肿瘤细胞表面 MHC-I 相关抗原分子 A 和 B（MHC class I-related chain molecules A and B，MICA/ B）的表达，MICA/ B 是表达于自然杀伤细胞（Natural killer cells，NK 细胞）的活化型受体 NKG2D 的配体。NK 细胞借 MICA/B 与 NKG2D 的相互作用而与肿瘤细胞靠近、结合，从而通过释放细胞因子等诱导肿瘤细胞的溶解，进而杀伤肿瘤细胞。但研究发现血清可溶性 MICA（sMIC）水平的显著升高，导致 NK 细胞功能缺陷，并进一步指出可溶性 MICA 由肿瘤细胞表面 MIC-A 的脱落产生，肿瘤细胞逃脱免疫即发生免疫逃逸。据此，有研究者设计可溶性肽和抗 MICA 的抗体阻止 MICA 的脱落，可能发展成为一种新的抗肿瘤治疗方法。

激活和重建机体肿瘤免疫作用的一种常规的药物是抗体，比如通过阻断 CTLA4 的抗体已经被批准上市。抗肿瘤抗体除了人们熟知的中和或抑制某种因子诱导的细胞增殖从而抑制肿瘤生长以外，它的免疫效应功能的主要机制是抗体通过其 Fc 段与 NK 或巨噬细胞表面的 Fc 受体（Fc gamma receptor, Fcγ R），Fcγ RIIIa 结合，免疫细胞接近结合有抗体的肿瘤细胞，激活免疫细胞以抗体依赖细胞介导的细胞毒性（antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity, ADCC）。

抗血管内皮生长因子受体抗体（VEGFR2 antibody）

人 VEGFR2 称为 KDR（kinase inserted domain containing receptor），是血管内皮生长因子（vascular endothelial growth factor, VEGF）发挥刺激内皮细胞的增殖、迁移，促进新生血管形成的主要受体。肿瘤新生血管的形成是肿瘤向恶性肿瘤转变必不可少的条件。此外，VEGFR-2 还在乳腺癌、结肠癌、非小细胞肺癌、白血病等多种肿瘤细胞中高表达。因此，VEGF 或 VEGFR2 的抑制剂既可以通过抑制新生血管生成，以“饥饿疗法”阻断肿瘤的营养摄取，又可以抑制肿瘤细胞的增殖或者促进凋亡。

目前临床上使用的 VEGF 抗体-贝伐单抗（bevacizumab）是的一株抑制 VEGF 通路的单抗。FDA 于 2014 年 4 月批准靶向 VEGFR2 的抗体 Ramucirumab（IMC-1121B）上市，用于治疗化疗失败的胃癌、胃食管连接处腺癌。相对于临床伴有高血压和出血等副反应的贝伐单抗，抗 VEGFR2 抗体有较好的安全性。

肿瘤细胞表面 MHC-I 相关抗原分子 A（MICA）

说明书

主要组织相容性复合体(major histocompatibility complex, MHC)在免疫应答过程中参与抗原识别,与免疫系统密切相关。其中包括了对免疫起重要作用的 MIC(MHC class c ainrelated Gene) 家族。MIC 家族又称 PerB11, 位于 MHCI 类区域, 具有高度多态性,存在多种等位基因。它包括 MICA、MICB、MICC、MICD、MICE、MICF 和 MICG7 个成员, 其中只有 MICA、MICB 具有编码、表达、转录蛋白的功能,其余均为假基因。其中 MICA 位于 HLA-B 位点上游约 46kb, 全长 1722 bp 编码 1382bp 的转录子。

人体中 MICA 集中表达在肠道上皮中, 其他组织如脑、心脏、肺等中都无法表达, 但 MICA 能表达在大多数上皮性肿瘤细胞(乳腺癌、肺癌、肾癌及卵巢癌等)中, 被认为是一种肿瘤相关性抗原。因此, MIC-A 呈阳性表达的肿瘤细胞在机体的免疫机制中难以逃逸, MICA 的脱落则使上述肿瘤细胞虽然呈 MICA 阳性表达, 但依然能逃脱免疫监视。且在上述大多 MICA 呈阳性的上皮性肿瘤细胞(乳腺癌、肺癌、结肠癌等)中均存在血管内皮生长因子受体 2 (vascular endothelial growth factor receptor 2, VEGFR2) 高表达, 故 VEGFR-2 抗体可作为有效的载体连接 MIC-A 蛋白, 激活 NKG2D 途径, 从而恢复 NK 细胞免疫监视作用。

发明内容

发明目的

本发明提供一种具有潜在医学和药学价值的一种靶向 VEGFR2 的抗体融合蛋白。本发明融合蛋白的特征为特异性结合人 KDR 的胞外 3 区及 NKG2D, 在体外能够抑制人乳腺癌细胞 MDA-MB-231 和人血管内皮细胞 HUVEC 的生长, 且能够增强 NK 细胞对肿瘤细胞的 ADCC 效应, 其诱导产生的 ADCC 效应优于 VEGFR2 抗体诱导产生的效应。

技术方案

一种靶向 VEGFR2 的抗体融合蛋白, 该融合蛋白以全人源的抗 VEGFR2 的全长抗体和 NKG2D 的配体 MICA 为基础, 通过基因重组构建成融合蛋白, 利用柔性肽将两段蛋白连接起来。

其中一条链由 VEGFR2 全长抗体重链和 MICA 蛋白组成, 其氨基酸序列为 SEQ NO.1; 另一条链为 VEGFR2 全长抗体轻链, 其氨基酸序列为 SEQ NO.2。

一种表达纯化法, 其用于分离纯化上述的融合蛋白。

一种分离的核酸, 其特征在于: 该核酸编码权利要求 1 的靶向 VEGFR2 的抗体融合蛋白。

一组表达载体, 含有权利要求 4 所述的核酸。

一种重组宿主细胞, 含有权利要求 5 所述的表达载体。

上述任一项的蛋白或蛋白片段的应用, 其特征在于选择性地与 VEGFR2/NKG2D 结合或抑制 VEGFR2/NKG2D 与 VEGFR2 配体/NKG2D 配体的结合阻断其信号的转导。

上述任一项的蛋白或蛋白片段的偶联物。

靶向 VEGFR2 的抗体融合蛋白在治疗肿瘤中的应用。

发明进一步说明:

本发明中靶向 VEGFR2 的抗体融合蛋白由两条链组成, 其中一条链由全长抗体和 MICA 蛋白通过柔性肽 (GGGGS) 连接, 另一条是全长抗体的轻链。

说明书

含有本发明 VEGFR2 抗体/MICA 融合蛋白基因的表达载体和宿主细胞株均属于本发明的保护范围。

本发明的另一个目的是提供一种可以表达和纯化上述融合蛋白的方法。

本发明利用 PCR 技术将筛选获得的 MICA 蛋白与本实验室专利单链抗体(专利号:ZL200910264180.3)构建的 VEGFR2 全长抗体进行克隆重组,构建 VEGFR2 全长抗体/MICA 融合蛋白重组载体,电转入 CHO 细胞中,将融合蛋白基因整合到染色体上,利用新霉素 G418 进行筛选高表达融合抗体的稳定细胞株;对稳定细胞株扩大培养,低温离心取上清,将上清过 Protein A 柱进行分离纯化;Western Blot 鉴定分离纯化得到的抗体;SPR 实验分析抗体与抗原的亲合能力;MTT 检测融合蛋白对人血管内皮细胞 HUVEC 和人乳腺癌细胞 MDA-MB-231 的生长抑制作用;ADCC 实验证实融合蛋白能够增强 NK 细胞对肿瘤细胞的 ADCC 效应,其诱导产生的 ADCC 效应优于 VEGFR2 抗体诱导产生的效应。

附图说明

图 1 是融合蛋白基因重组分析图,重组基因包括重链基因大小约为 2303bp、轻链基因大小约为 762bp。

图 2 是融合蛋白的结构示意图,该蛋白由两条链组成,其中 VEGFR2 抗体的 Fc 区和 MICA 蛋白通过柔性肽(GGGGS)连接,而重链与轻链及重链是在表达细胞中自行通过二硫键结合组装在一起。

图 3 是 SDS-PAGE 蛋白质电泳图和 Western Blot 鉴定融合蛋白图。图 3A 描述发酵表达的融合蛋白通过镍柱进行分离纯化的结果,图 3B 描述 Western Blot 鉴定分离到的融合蛋白结果。图 3B 是孵育 anti-H+L,图 3C 是孵育 anti-MICA。泳道 1 为 VEGFR2 的全长抗体 mAb04,泳道 2 为 NKG2D 的配体 MICA,泳道 3 为分离得到的融合蛋白 mAb04-MICA。

图 4 是抗原抗体亲和力拟合曲线图,展示融合蛋白 mAb04-MICA 与抗原 VEGFR2(图 4A: k_a (1/Ms): $6.18E+05$, k_d (1/s): $8.00E-04$, KD (M): $1.29 E-09$) 或配体 NKG2D (图 4B: k_a (1/Ms): $2.65E+08$, k_d (1/s): 188.2 , KD (M): $7.10E-07$) 的结合测试实验(Biacore)。

图 5 是流式检测图,描述融合蛋白 mAb04-MICA 与 HUVEC 细胞表面 VEGFR2 或 U937 细胞表面 NKG2D 的结合(以正常无表达 VEGFR2 及 NKG2D 的 HEK293 细胞作为阴性对照)。图 5A, HUVEC 细胞;图 5B, U937 细胞;图 5C, HEK293 细胞。

图 6 是曲线图,描述融合蛋白 mAb04-MICA 对 HUVEC 细胞(图 6A,以 VEGFR2 的全长抗体 mAb04 为阳性对照,以 NKG2D 的配体 MICA 作为阴性对照)的生长抑制作用或对人乳腺癌细胞 MDA-MB-231 的生长抑制作用(图 6B,以 VEGFR2 的全长抗体 mAb04 为阳性对照,以 NKG2D 的配体 MICA 作为阴性对照)。

图 7 是流式检测图,描述融合蛋白 mAb04-MICA 对 MDA-MB-231 细胞的凋亡作用。

图 8 是 ADCC 实验结果柱形图,描述融合蛋白 mAb04-MICA 激活 NK 细胞杀伤人乳腺癌细胞 MDA-MB-231 的 ADCC 效应(以 VEGFR2 的全长抗体 mAb04 及 NKG2D 的配体 MICA 作为阴性对照)。

具体实施方式

实施例 1 融合蛋白 mAb04-MICA 的构建

分别以 mAb04 重轻链基因, MICA 基因及 pCA puro、pMH3 质粒为模板,设计并合成引物进行 PCR 扩增。融合蛋白 mAb04-MICA 的构建以 mAb04 重链基因 H'为基础,再进行重叠 PCR 延伸扩增获得完整

的 H²-MICA 基因。PCR 产物用 1.0%琼脂糖凝胶电泳检测，琼脂糖凝胶回收试剂盒回收目的基因。PCR 扩增产物及质粒 pCA puro、pMH3 用限制性内切酶进行双酶切，酶切产物切胶回收后，用 T4 连接酶 16℃ 过夜连接。连接后转化大肠杆菌 HB2151 感受态，涂布平板，次日挑取单克隆双酶切及测序鉴定。

实施例 2 融合蛋白 mAb04-MICA 的表达、纯化、鉴定

将重组质粒 H²-MICA-pCA puro、H²-MICA-pMH3、L-pCA puro、L-pMH3 电转进入 CHO 细胞株，通过三轮挑取单克隆，获得稳定表达融合蛋白的高产细胞株。将高产细胞株扩大培养，取上清，8000rpm 离心 15min，0.22μm 滤膜过滤样品用 Protein A 柱进行纯化，使用洗脱液进行洗脱，获得纯化后蛋白。A.8% (12%) SDS-PAGE 分析收集样品，挑选高纯度蛋白做鉴定。B.将高纯度蛋白样品进行 Western Blot 鉴定。4℃，250mA 恒流转印 1.5h，将蛋白转印到 PVDF 膜（购自 Millipore）；转印结束，将膜在 5%脱脂牛奶中室温封闭 2h；PBS 洗 3 遍，按 1: 2000 的比例加入 anti-H+L，anti-Fc，anti-MICA 抗体，37℃孵育 1h，用含 0.05%吐温的 PBS (TPBS) 洗 3 遍，再按 1: 5000 比例加入 HRP 偶联的羊抗鼠 IgG 多克隆抗体，37℃孵育 1h，TBS 洗 3 遍，滴加 ECL 发光显色液，凝胶成像仪曝光拍照。将最终纯化并鉴定后的样品透析或超滤至 PBS 中，液氮速冻，-70℃保存。

实施例 3 融合蛋白 mAb04-MICA 的 SPR 实验

该实验中融合蛋白 mAb04-MICA 和各自抗原结合使用 Biacore X100 作为 SPR-依赖的生物传感器来检测融合蛋白与 VEGFR2 或 NKG2D 之间的相互作用：A.使用 CM5 芯片，连接带有 Fc 片段的重组融合蛋白分子。分别检测浓度为 0.84375、1.6875、3.375、6.25、12.5、25、50、100、200nmol/L 的 VEGFR2 抗原，获得结合与解离曲线，用 BIA 评估软件分析 k_a (1/Ms)为 $6.18E+05$ ， k_d (1/s)为 $8.00E-04$ 计算获得平衡解离常数 KD (M)值为 $1.29 E-09$ 。B. 使用 CM5 芯片，连接带有 Fc 片段的重组融合蛋白分子。分别检测 3.906、7.8125、15.625、31.25、62.5、125、250nmol/L 的 NKG2D，获得结合与解离曲线，用 BIA 评估软件分析 k_a (1/Ms)为 $2.65E+08$ ， k_d (1/s)为 188.2 计算获得平衡解离常数 KD (M)值为 $7.1E-07$ 。

实施例 4 融合蛋白 mAb04-MICA 的流式结合实验

该实验中将融合蛋白 mAb04-MICA 与高表达 VEGFR2 的 HUVEC 细胞或高表达 NKG2D 的 U937 细胞作用后用流式进行检测，用于检测融合蛋白与抗原 VEGFR2 及配体 NKG2D 的结合以分析融合蛋白的结合能力。A. HUVEC 细胞经胰酶消化后悬浮于 PBS-0.5% BSA，细胞与抗体冰育 30 min。抗体与细胞表面天然 VEGFR2 结合后，先加入 anti-IgG 抗体冰育 60 min，PBS 洗 3 遍后用 FACs Calibur 流式细胞仪分析抗原抗体结合以分析融合蛋白与抗原的结合能力。B. U937 细胞离心后悬浮于 PBS-0.5% BSA，细胞与抗体冰育 30 min。抗体与细胞表面天然 VEGFR2 结合后，先加入 anti-IgG 抗体冰育 60 min，PBS 洗 3 遍后用 FACs Calibur 流式细胞仪分析抗原抗体结合以分析融合蛋白与抗原的结合能力。

实施例 5 融合蛋白 mAb04-MICA 对人乳腺癌细胞 MDA-MB-231/血管内皮细胞 HUVEC 的生长抑制作用

该实验中将融合蛋白 mAb04-MICA 与高表达 VEGFR2 的 HUVEC 细胞或高表达 VEGFR2 的 MDA-MB-231 细胞作用，并利用 SPSS 软件对实验数据进行分析，以评估该蛋白的抗新生血管和抗肿瘤活性。A.将 $3 \times 10^3 \sim 5 \times 10^3$ 个 HUVEC 细胞接种 96 孔细胞培养板，100μl/孔，在 37℃ 5%CO₂ 培养箱中培养。用含 20ng/ml VEGF 的 1%ECM 培养基将样品组、阳性对照 mAb04、阴性对照 MICA 分别稀释至 10 组不同浓度梯度 (0、2.5、5、10、20、40、80、160、200nmol/L)，24h 后加入 100μl 梯度稀释的抗体，每个浓

度设置三个平行孔, 继续培养 72h。B. 将 $1 \times 10^4 \sim 2 \times 10^4$ 个 A431 细胞接种 96 孔细胞培养板, $100 \mu\text{l}$ /孔, 在 37°C 5% CO_2 培养箱中培养。用 1% 胎牛血清培养基将样品组 Db、阳性对照 E10、阴性对照 AK404 分别稀释至 10 组不同浓度梯度 (0、2.5、5、10、20、40、80、160、200 nmol/L), 24h 后加入 $100 \mu\text{l}$ 梯度稀释的抗体, 每个浓度设置三个平行孔, 继续培养 72h。

观察细胞生长状况后每孔加入 $11 \mu\text{L}$ 的 MTT, 37°C 继续培养 4h, 小心倾去上清, 每孔加入 $150 \mu\text{L}$ DMSO, 在酶标仪 570nm/630nm 波长处测定光吸收值 (OD 值), 计算细胞增殖。融合蛋白的生物活性由细胞生长的抑制率评价, 抑制率 = $(1 - \text{实验组 OD 值} / \text{对照组 OD 值}) \times 100\%$ 。

实施例 6 融合蛋白 mAb04-MICA 对人乳腺癌细胞 MDA-MB-231 的凋亡实验

融合蛋白 mAb04-MICA 对 MDA-MB-231 的凋亡实验证明蛋白对细胞的增殖抑制作用是通过细胞程序性死亡而非细胞毒死亡。取对数生长期 MDA-MB-231 细胞 4×10^5 个接种于 6 孔细胞培养板, 1 ml /孔, 另补充 1 ml /孔完全培养基, 在 37°C 5% CO_2 培养箱中培养。用培养基将样品组融合蛋白、阳性对照 mAb04、阴性对照 MICA 分别稀释至 4 组不同浓度梯度 (0、10、50、250 nmol/L), 48h 后加入 1.5 ml 梯度稀释的抗体, 继续培养 36h。

观察细胞生长状况后, 吸弃培养基, PBS 洗 2 遍, 0.25% 胰酶消化孔板细胞, 冷 PBS 温和洗涤细胞两次; 用 $195 \mu\text{L}$ 的 $1 \times \text{Binding Buffer}$ 重悬细胞, 使细胞密度为 $2 \sim 5 \times 10^5$ 个/ml; 加 $5 \mu\text{L}$ 的 Annexin V-FITC 至 $195 \mu\text{L}$ 细胞重悬液, 混匀后避光, 室温孵育 10 分钟; $200 \mu\text{L}$ 的 $1 \times \text{Binding Buffer}$ 洗涤细胞一次, 然后将细胞重悬于 $190 \mu\text{L}$ 的 $1 \times \text{Binding Buffer}$; 加入 $10 \mu\text{L}$ Propidium Iodie, 利用流式细胞仪分析。结果显示细胞凋亡率与抗体浓度成正相关, 证明抗体可诱导血管内皮细胞及表皮癌肿瘤细胞的凋亡。

实施例 7 融合蛋白 mAb04-MICA 对人乳腺癌细胞 MDA-MB-231 的 ADCC 实验

该实验中将融合蛋白 mAb04-MICA 与高表达 VEGFR2 的 MDA-MB-231 细胞及 NK92 细胞混合后作用 4h 后, 利用细胞毒性检测试剂盒进行检测。并利用 SPSS 软件对实验数据进行分析, 以评估该蛋白的刺激产生的 ADCC 效应。将 MDA-MB-231 细胞、NK92 细胞按比例加入 96 孔板中, 再将融合蛋白或阳性对照 mAb04 或阴性对照 MICA 按 100 nM 加入孔板中作用 4 小时, $250 \times g$ 离心平板 4 分钟, 将 $50 \mu\text{L}$ 上清液转移到酶分析板中, 把配好的底物 $50 \mu\text{L}$ /孔加到酶分析板中, 盖好平板, 室温孵育 30 分钟, 避光, 向每孔中加入 $50 \mu\text{L}$ 终止液, 在 490 nm 记录吸光值。按

$$\% \text{ cytotoxicity} = \frac{(\text{experimental effector spontaneous} - \text{target spontaneous})}{(\text{target maximum} - \text{target spontaneous})} \times 100$$

公式计算细胞毒性, 利用软件分析结果。

1. 一种靶向 VEGFR2 的抗体融合蛋白，其特征在于：该抗体以全人源的抗 VEGFR2 的全长抗体和 NKG2D 的配体 MICA 为基础，通过基因重组构建成融合蛋白，利用柔性肽将两段蛋白连接起来。
2. 根据权利要求 1 所述的一种靶向 VEGFR2 的抗体融合蛋白，其特征在于：其中一条链由 VEGFR2 全长抗体重链和 MICA 蛋白组成，其氨基酸序列为 SEQ NO.1；另一条链为 VEGFR2 全长抗体轻链，其氨基酸序列为 SEQ NO.2。
3. 一种表达纯化法，其用于分离纯化上述的融合蛋白。
4. 一种分离的核酸，其特征在于：该核酸编码权利要求 1 的靶向 VEGFR2 的抗体融合蛋白。
5. 一组表达载体，含有权利要求 4 所述的核酸。
6. 一种重组宿主细胞，含有权利要求 5 所述的表达载体。
7. 权利要求 1 或 2 任一项的蛋白或蛋白片段的应用，其特征在于选择性地与 VEGFR2/NKG2D 结合或抑制 VEGFR2/NKG2D 与 VEGFR2 配体/NKG2D 配体的结合阻断其信号的转导。
8. 权利要求 1 或 2 任一项的蛋白或蛋白片段的偶联物。
9. 权利要求 1 所述的靶向 VEGFR2 的抗体融合蛋白在治疗肿瘤中的应用。

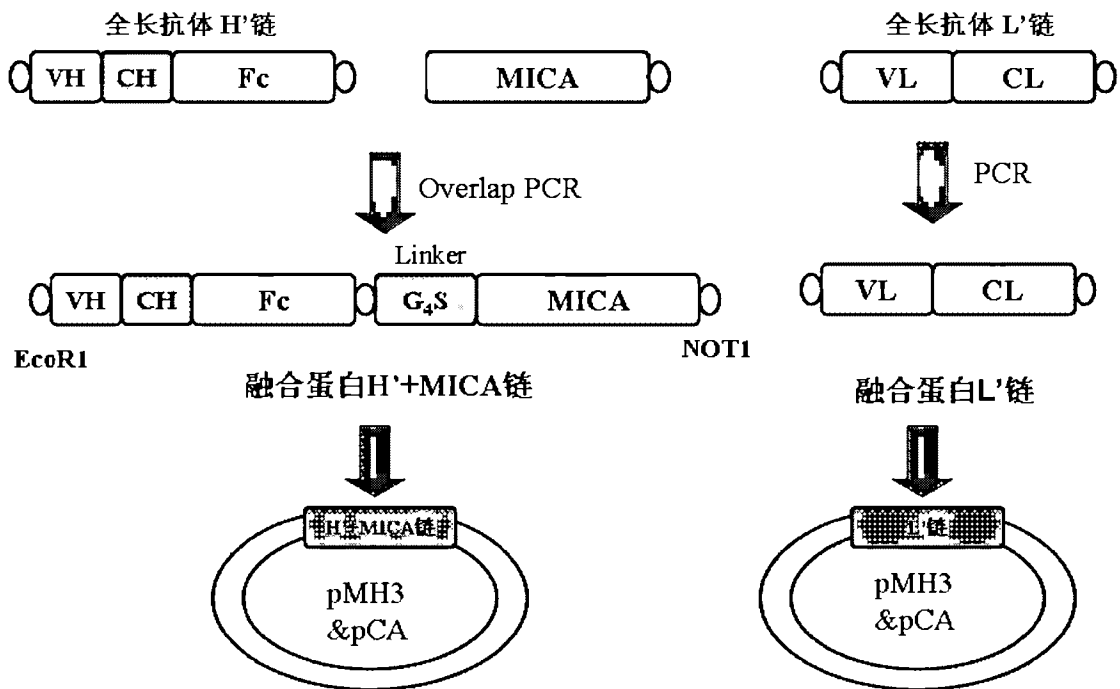


图 1

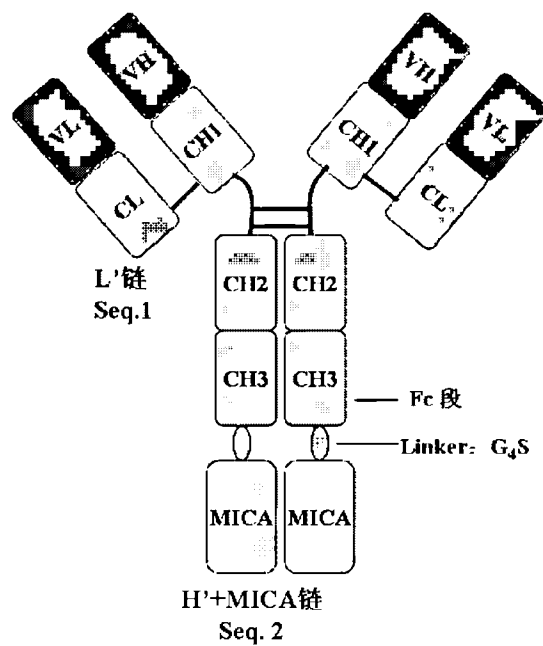


图 2

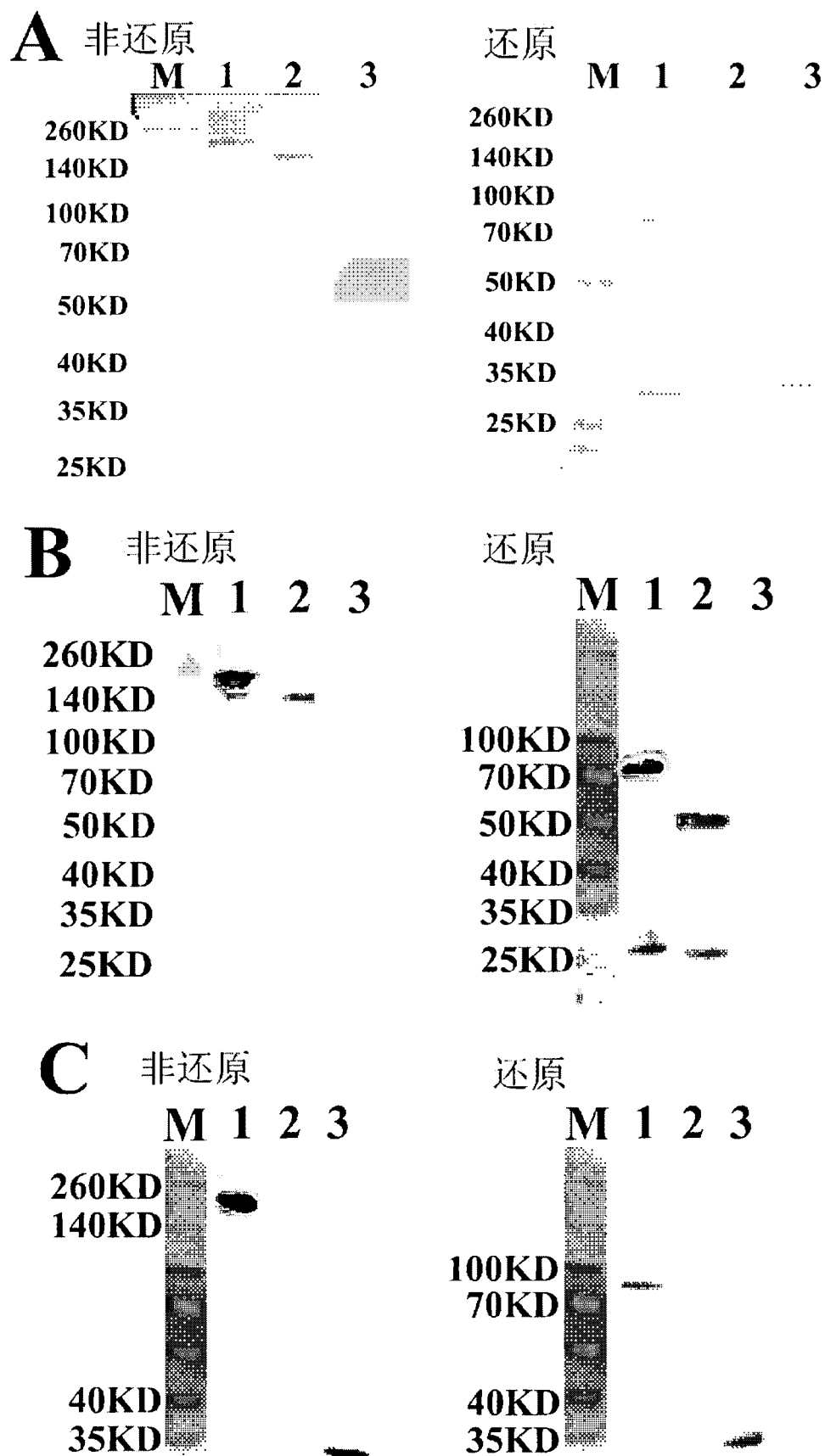


图3

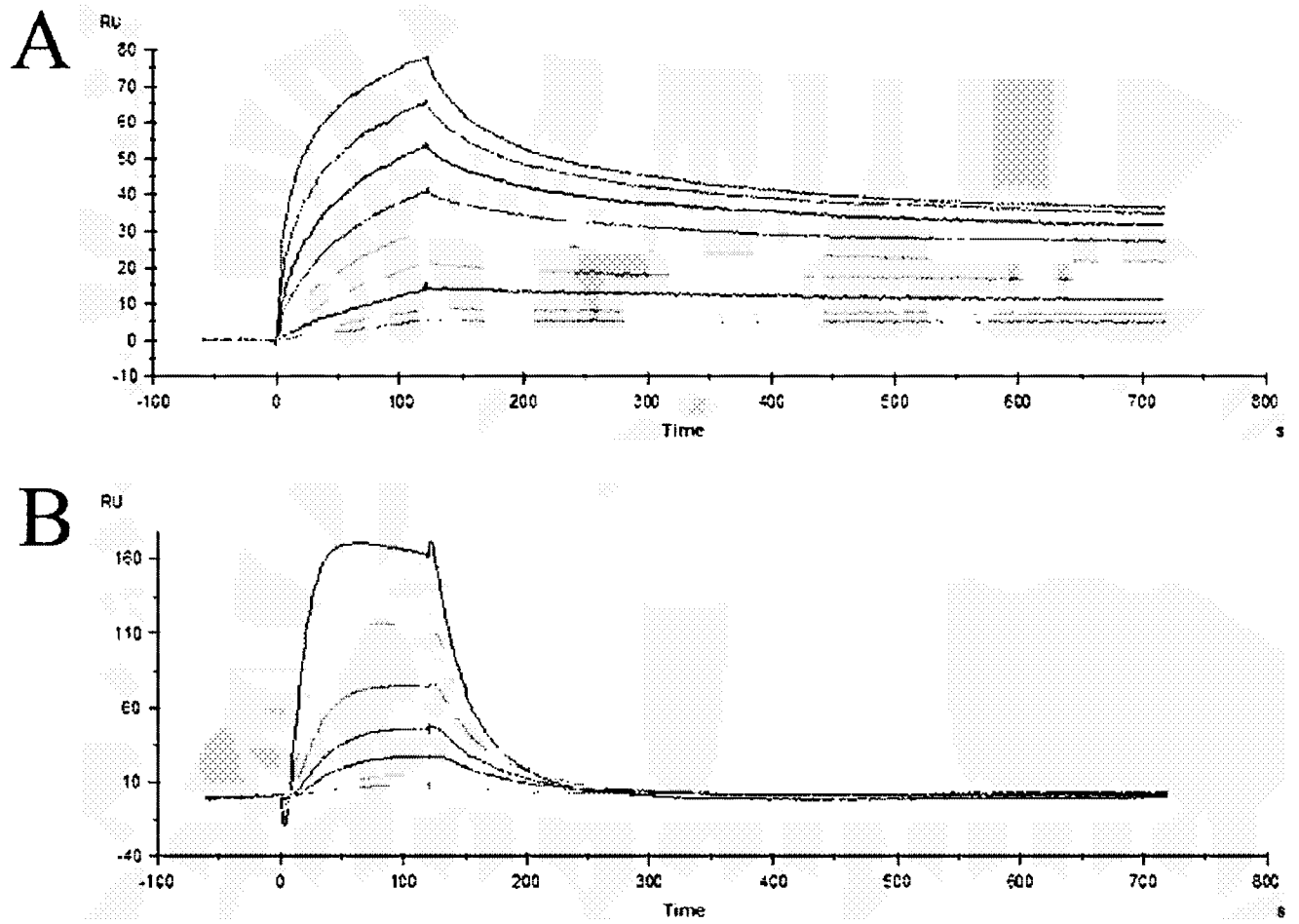


图 4

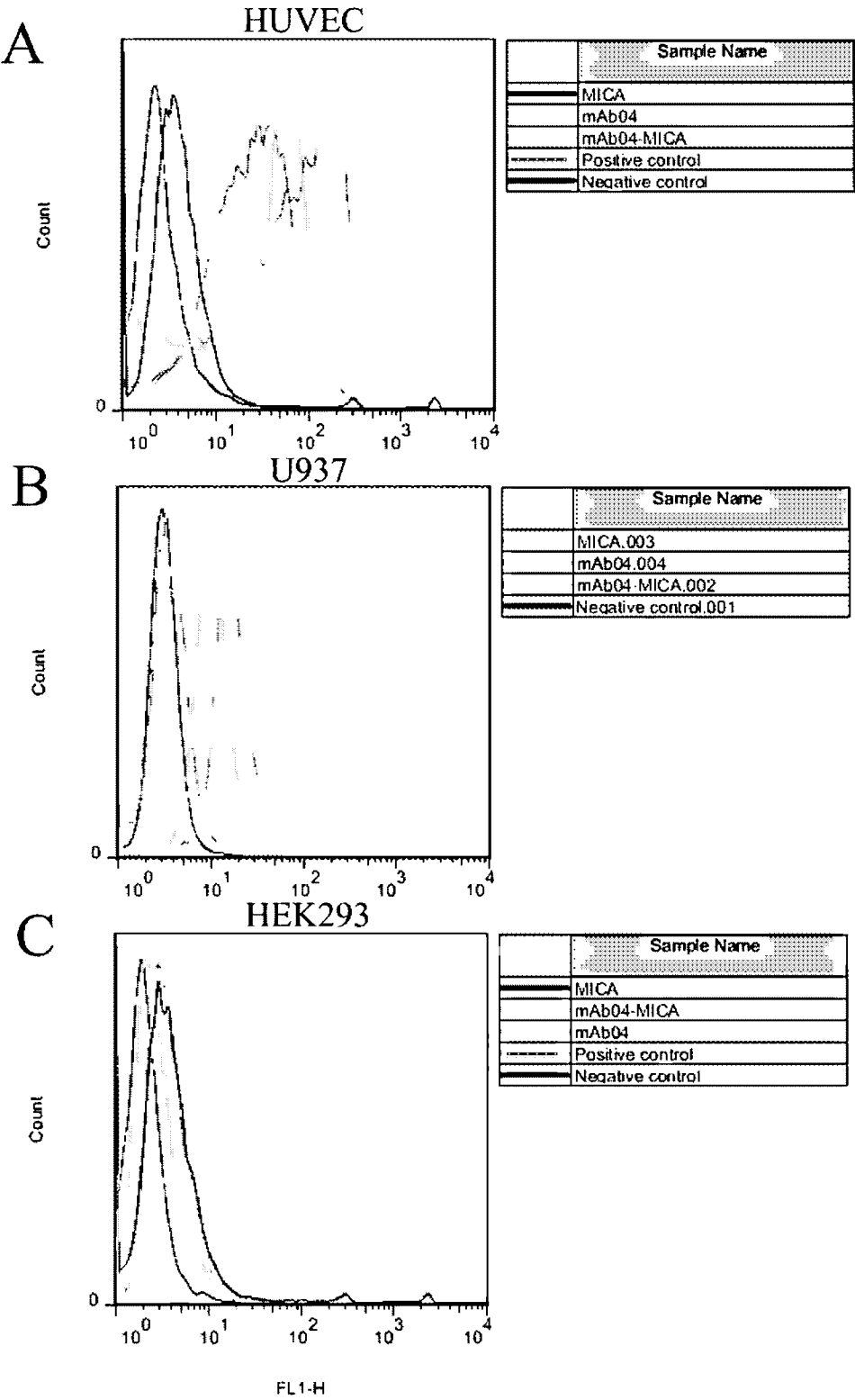


图 5

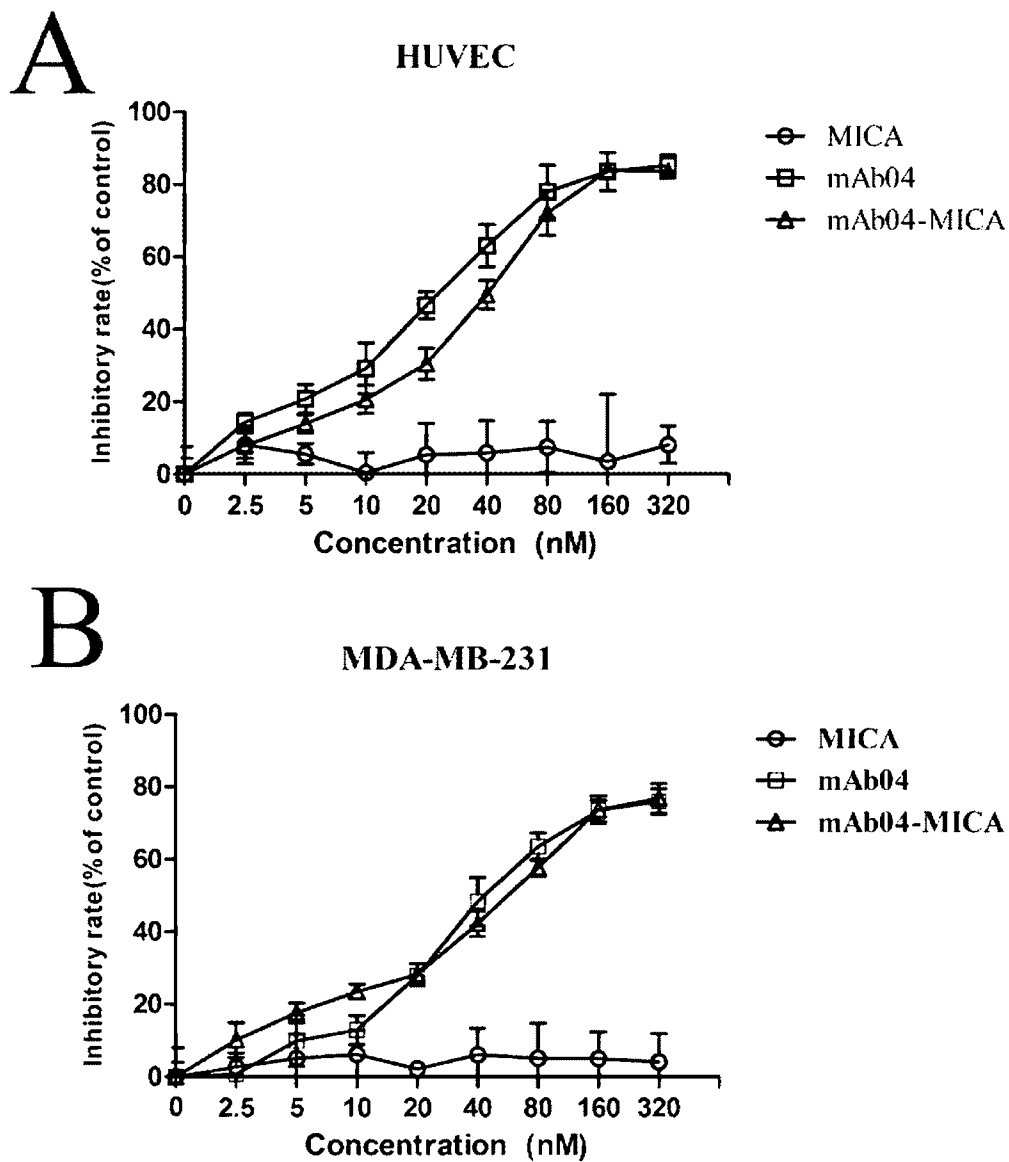


图 6

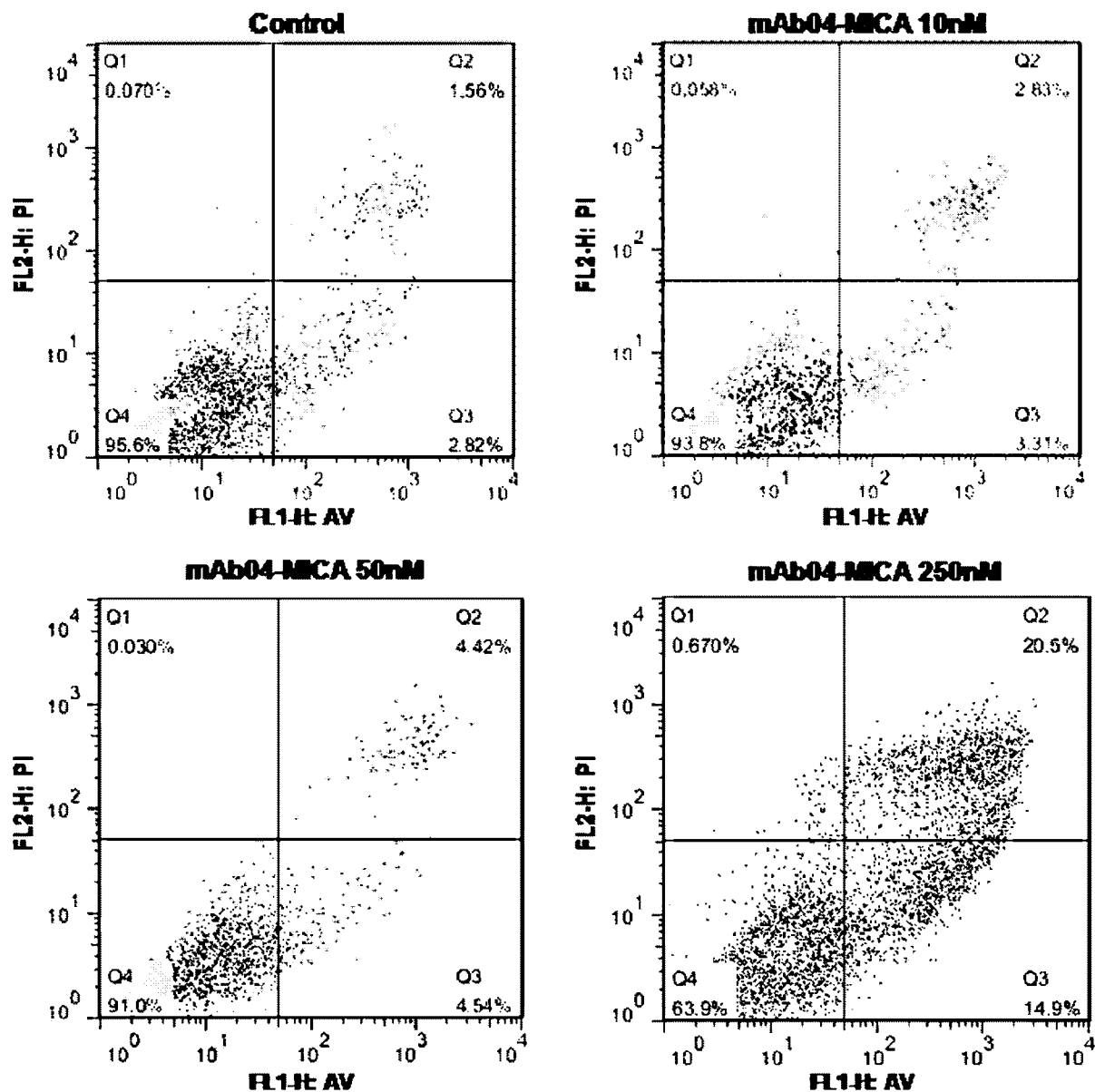


图 7

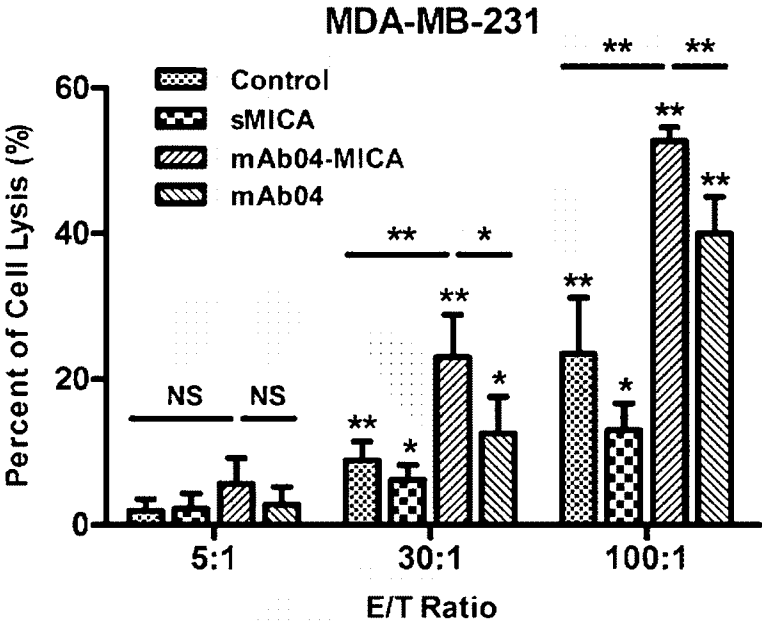


图8

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2015/097367

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C07K 19/00 (2006.01) i; C07K 1/22 (2006.01) i; C12N 15/62 (2006.01) i; C12N 15/63 (2006.01) i; A61K 39/395 (2006.01) i; A61P 35/00 (2006.01) i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C07K; C12N; A61K; A61P

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CPRSABS; CNABS; CNKI; CNTXT; VEN; MEDLINE; EPTXT; USTXT; WOTXT and Keywords: ZHANG, Juan; vascular endothelial growth factor receptor, MHC-I associated antigen molecule A, VEGFR, KDR, fusion protein?, antibod+, mAb04, MICA, MHC class I polypeptide-related sequence A, etc. NATIONAL BIO-SEQUENCE DATABASE OF CHINESE PATENT; Genbank; EMBL; STN and searched sequences: SEQ ID NO: 1-11

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
PX	CN 104628866 A (CHINA PHARMACEUTICAL UNIVERSITY), 20 May 2015 (20.05.2015), claims 1-9	1-9
A	CN 101863980 A (CHINA PHARMACEUTICAL UNIVERSITY), 20 October 2010 (20.10.2010) see embodiments 1-5, and claims 1-7	1-9
A	CN 103864935 A (CHINA PHARMACEUTICAL UNIVERSITY), 18 June 2014 (18.06.2014) see abstract, and embodiments 1-6	1-9
A	CN 103789340 A (UNIVERSITY OF SCIENCE AND TECHNOLOGY OF CHINA), 14 May 2014 (14.05.2014) see abstract, and embodiments 1-2	1-9
A	WO 2014079000 A1 (WUHAN YZY BIOPHARMA CO., LTD.), 30 May 2014 (30.05.2014) see abstract, and embodiments 1-4	1-9

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search 09 March 2016 (09.03.2016)	Date of mailing of the international search report 17 March 2016 (17.03.2016)
Name and mailing address of the ISA/CN: State Intellectual Property Office of the P. R. China No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao Haidian District, Beijing 100088, China Facsimile No.: (86-10) 62019451	Authorized officer WANG, Jinfeng Telephone No.: (86-10) 62412282

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2015/097367

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing filed or furnished:
 - a. (means)
 - ☐ on paper
 - ☒ in electronic form
 - b. (time)
 - ☒ in the international application as filed
 - ☐ together with the international application in electronic form
 - ☐ subsequently to this Authority for the purposes of search
2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2015/097367

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: 7 and 9
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
[1] PCT Rule 39.1 (iv) - a surgical method or a treatment method for the disposal of a human or animal body. The search on claims 7 and 9 is carried out on the basis of the following subject matter which may be reasonably expected to be amended, i.e., the use of said protein for preparing a pharmaceutical composition.
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2015/097367

Patent Documents referred in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
CN 104628866 A	20 May 2015	None	
CN 101863980 A	20 October 2010	CN 101863980 B	08 May 2013
CN 103864935 A	18 June 2014	None	
CN 103789340 A	14 May 2014	None	
WO 2014079000 A1	30 May 2014	US 2015284475 A1	08 October 2015
		EP 2922874 A1	30 September 2015
		US 2014243505 A1	28 August 2014
		CN 104271602 A	07 January 2015
		US 9079965 B2	14 July 2015
		TW 201425338 A	01 July 2014
		JP 2015537034 A	24 December 2015
		CA 2892059 A1	30 May 2014

A. 主题的分类		
C07K 19/00(2006.01)i; C07K 1/22(2006.01)i; C12N 15/62(2006.01)i; C12N 15/63(2006.01)i; A61K 39/395(2006.01)i; A61P 35/00(2006.01)i		
按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和IPC两种分类		
B. 检索领域		
检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)		
C07K;C12N;A61K;A61P		
包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献		
在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称,和使用的检索词(如使用))		
CPRSABS; CNABS; CNKI; CNTXT; VEN; MEDLINE; EPTXT; USTXT; WOTXT和关键词: 张娟, 血管内皮生长因子受体, 融合蛋白, 抗体, MHC-I相关抗原分子A, Zhang Juan, VEGFR, KDR, fusion protein?, antibod+, mAb04, MICA, MHC class I polypeptide-related sequence A, 等 中国专利生物序列检索系统; Genbank; EMBL; STN和检索的序列: SEQ ID NO:1-11		
C. 相关文件		
类 型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求
PX	CN 104628866 A (中国药科大学) 2015年 5月 20日 (2015 - 05 - 20) 权利要求1-9	1-9
A	CN 101863980 A (中国药科大学) 2010年 10月 20日 (2010 - 10 - 20) 见实施例1-5及权利要求1-7	1-9
A	CN 103864935 A (中国药科大学) 2014年 6月 18日 (2014 - 06 - 18) 见摘要及实施例1-6	1-9
A	CN 103789340 A (中国科学技术大学) 2014年 5月 14日 (2014 - 05 - 14) 见摘要及实施例1-2	1-9
A	WO 2014079000 A1 (WUHAN YZY BIOPHARMA CO LTD) 2014年 5月 30日 (2014 - 05 - 30) 见摘要及实施例1-4	1-9
☐ 其余文件在C栏的续页中列出。 ☒ 见同族专利附件。		
* 引用文件的具体类型: “A” 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件 “E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利 “L” 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件(如具体说明的) “O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件 “P” 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件 “T” 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了理解发明之理论或原理的在后文件 “X” 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性 “Y” 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性 “&” 同族专利的文件		
国际检索实际完成的日期		国际检索报告邮寄日期
2016年 3月 9日		2016年 3月 17日
ISA/CN的名称和邮寄地址		授权官员
中华人民共和国国家知识产权局(ISA/CN) 中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088		王金凤
传真号 (86-10)62019451		电话号码 (86-10)62412282

第I栏

核苷酸和/或氨基酸序列(续第1页第1.c项)

1. 关于国际申请中所公开的任何对要求保护的发明必要的核苷酸和/或氨基酸序列，国际检索是在下列基础上进行的：

a. (提交提供)

☐

纸件形式

☒

电子形式

b. (提交时间)

☒

含在申请提交时的国际申请中

☐

以电子形式与国际申请一起提交

☐

为检索之用随后提交本单位

2. ☐ 另外，在提交/提供了多个版本或副本的序列表的情况下，提供了关于随后提交的或附加的副本中的信息与申请时提交的申请中的信息相同或未超出申请时提交的申请中的信息范围（如适用）的所需声明。

3. 补充意见：

第II栏

某些权利要求被认为是不能检索的意见(续第1页第2项)

根据条约第17条(2)(a)，对某些权利要求未做国际检索报告的理由如下：

1. ☒ 权利要求： 7和9
因为它们涉及不要求本单位进行检索的主题，即：
[1] PCT细则39.1 (iv) ——处置人体或者动物体的外科手术方法或治疗方法。对权利要求7和9的检索是基于以下合理预期修改的主题做出的，即所述蛋白制备药物组合物的用途。
2. ☐ 权利要求：
因为它们涉及国际申请中不符合规定的要求的部分，以致不能进行任何有意义的国际检索， 具体地说：
3. ☐ 权利要求：
因为它们是从属权利要求，并且没有按照细则6.4(a)第2句和第3句的要求撰写。

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2015/097367

检索报告引用的专利文件			公布日 (年/月/日)	同族专利			公布日 (年/月/日)
CN	104628866	A	2015年 5月 20日	无			
CN	101863980	A	2010年 10月 20日	CN	101863980	B	2013年 5月 8日
CN	103864935	A	2014年 6月 18日	无			
CN	103789340	A	2014年 5月 14日	无			
WO	2014079000	A1	2014年 5月 30日	US	2015284475	A1	2015年 10月 8日
				EP	2922874	A1	2015年 9月 30日
				US	2014243505	A1	2014年 8月 28日
				CN	104271602	A	2015年 1月 7日
				US	9079965	B2	2015年 7月 14日
				TW	201425338	A	2014年 7月 1日
				JP	2015537034	A	2015年 12月 24日
				CA	2892059	A1	2014年 5月 30日