(19)国家知识产权局

(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 113646442 B
(45)授权公告日 2024.12.03

(21)申请号 201980092801.6
(22)申请日 2019.08.08
(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 113646442 A
(43)申请公布日 2021.11.12
(30)优先权数据
10-2018-0167948 2018.12.21 KR
(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2021.08.20
(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/KR2019/009956 2019.08.08
(87)PCT国际申请的公布数据
WO2020/130269 KO 2020.06.25
(73)专利权人 国立癌中心
地址 韩国京畿道高阳市一山东区一山路323号
专利权人 株式会社在鹏生物A
(72)发明人 金润姬 许钧 崔先一 金仁厚
(74)专利代理机构 上海弼兴律师事务所 31283
专利代理师 王卫彬 黄益澍
(51)Int.Cl.
C12N 15/115(2010.01)
C12Q 1/6886(2018.01)
(56)对比文件
CN 116157419 A,2023.05.23
KR 20220032276 A,2022.03.15
WO 2020130225 A1,2020.06.25
审查员 李非儿

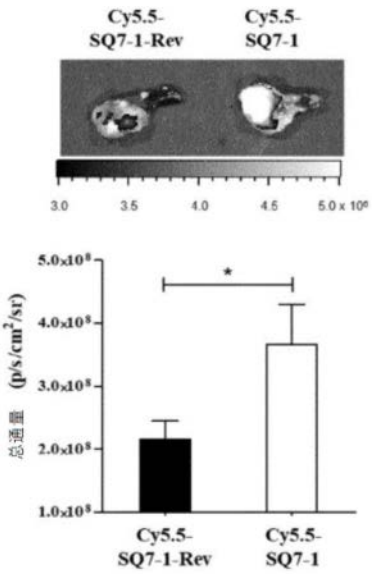
权利要求书1页 说明书15页
序列表6页 附图24页

(54)发明名称

新型DNA适配体及其用途

(57)摘要

本公开涉及新型DNA适配体及其用途。具体地,本公开涉及使用Cell-SELEX从DNA文库中选择与癌细胞特异性结合的DNA适配体。本公开中经选择和优化以获得与癌细胞高结合亲和力的DNA适配体,由于其具有增强的对靶细胞和组织的靶向效率以及高血清稳定性,可有效用于癌症诊断。



CN 113646442 B

1.一种DNA适配体,由如SEQ ID NO:6所示的核苷酸序列组成。

2.如权利要求1所述的DNA适配体,其中,所述适配体已被修饰为对DNA酶具有抗性;

所述修饰是将一个或多个核苷酸中的糖基2'碳上的-OH基团替换为-Me(甲基)、-OMe、-NH_2、-F(氟)、-O-2-甲氧基乙基-O-丙基、-O-2-甲硫基乙基、-O-3-氨基丙基、-O-3-二甲基氨基丙基、-O-N-甲基乙酰胺基或-O-二甲基酰胺氧基乙基。

3.如权利要求2所述的DNA适配体,其中,在SEQ ID NO:6的至少10%的核苷酸中存在所述修饰。

4.如权利要求2所述的DNA适配体,其中,所述DNA适配体具有如SEQ ID NO:8、12或14所示的核苷酸序列。

5.一种DNA适配体,所述DNA适配体由如SEQ ID NO:4所示的核苷酸序列组成。

6.一种靶向癌组织或用于诊断癌症的组合物,所述组合物包含如权利要求1～5任一项所述的DNA适配体。

7.如权利要求1～5任一项所述的DNA适配体在制备用于治疗癌症的组合物中的应用;

所述癌症为胰腺癌、结肠癌、肝癌、肺癌、脑瘤、口腔癌、卵巢癌或乳腺癌。

8.如权利要求7所述的应用,所述组合物进一步包含与所述DNA适配体偶联的抗癌剂。

9.如权利要求8所述的应用,其中,所述抗癌剂选自由MMAE(一甲基澳瑞他汀E,monomethyl auristatin E)、MMAF(一甲基澳瑞他汀F,monomethyl auristatin F)、加利车霉素(calicheamicin)、美登素(mertansine)、雷英妥昔(ravtansine)、特司林(tesirine)、阿霉素(doxorubicin)、顺铂(cisplatin)、SN-38、倍癌霉素(duocarmycin)和吡咯并苯并二氮杂卓(pyrrolobenzodiazepine)组成的组中的一种或多种。

10.如权利要求7所述的应用,其中,所述DNA适配体与聚乙二醇(PEG)、二酰基甘油(DAG)、树状大分子、抗体或含磷酸胆碱的聚合物偶联。

新型DNA适配体及其用途

技术领域

[0001] 本公开涉及新型DNA适配体(DNAaptamer)。具体而言,本公开涉及使用Cell-SELEX从癌症DNA文库中选择与癌细胞特异性结合的DNA适配体。本公开还涉及包含靶向癌组织、诊断癌症或治疗癌症的新型DNA适配体的组合物。本公开基于国立癌症中心(National Cancer Center,NCC)的原始研究项目和来自中小企业和初创企业部的TIPS计划(Tech Incubator Program for Startup)的一部分进行的研究。

[0002] [项目编号:NCC-1210080,标题:使用Cell-SELEX识别胰腺癌特异性转移因子]

[0003] [项目编号:NCC-1410270,标题:通过建立适配体-抗体偶联平台开发新型抗癌药物]

[0004] [项目编号:S2562351,标题:使用适配体-抗体-药物偶联物开发胰腺癌治疗药物]

背景技术

[0005] 适配体是指具有独特三维结构的单链DNA或RNA寡核苷酸,并以类似于抗体的方式与目标分子特异性结合。一般来说,适配体在浓度低至纳摩尔(nmol)到皮摩尔(pmol)时依旧具有高亲和力。

[0006] 由于两者都具有靶标特异结合特性,通常将适配体与抗体进行比较。与抗体相比,适配体易于通过化学合成产生,而无需使用细胞或动物的生物学过程,在高温下相对稳定,并且由于其体积小,在接近靶标方面具有优势。此外,适配体在作为治疗剂的潜力方面优于抗体,因为它们在化学合成过程中易于修饰,并且不具有免疫原性和无毒性。然而,适配体的缺点是它们的半衰期短,因为它们在体内易被核酸酶降解。这种缺点可以通过各种化学修饰来克服。

[0007] 癌症需要在早期发现和治疗。具体地,胰腺癌是一种预后最差的癌症,其1年死亡率是所有癌症中最高的。胰腺癌的2年生存率约为10%,5年生存率仅为8%或更低。在过去二十年中,几乎所有癌症的5年生存率都大幅上升,但胰腺癌的结果非常不佳,从1997年报道的3%上升到2016年的仅约8%。

[0008] 实际上,只有20%左右的胰腺癌患者被认为是可手术的,即使在这种情况下,只有当肿瘤大小小于等于1cm且没有淋巴结转移或远端转移时,手术后的存活率才可能高达90%或更高。然而,大多数患者在确诊时已经无法进行手术。当肿瘤无法手术时,患者通常依赖化疗或放疗。但是,由于目前还没有明确的标准化治疗方法,早期发现胰腺癌对于提高生存率非常重要。

[0009] 胰腺癌几乎没有早期症状,当患者意识到症状时,大多数情况下,癌症已经发展到晚期。因此,胰腺癌的早期诊断非常困难。目前,实践中几乎没有适用于胰腺癌的早期检测标志物。

[0010] 早期胰腺癌通常定义为大小小于2cm且局限于胰腺且无浸润或淋巴结转移的肿瘤。然而,即使胰腺癌的大小小于2cm(早期胰腺癌的阈值),也有多达50%的此类病例发现了转移。即使在II期(根据肿瘤大小、淋巴结转移和远端转移进行胰腺癌分期时分类为早期

胰腺癌),在连接肠系膜上静脉或门静脉的区域也常见浸润,以及少量细胞的早期转移。在这种情况下,肿瘤是不能切除的。在考虑到扫描未发现远端转移且确定肿瘤局限于胰腺而对肿瘤进行手术的情况下,手术后不久发现远端转移并不罕见。在这种情况下,即使手术,复发的风险也很高,由于没有疗效显著的抗癌剂,中位生存期仅为6～12个月。鉴于上述情况,有必要检测尚未发展为实质性远端转移或少量细胞早期转移的早期胰腺癌,至少是为了早期手术切除(胰腺癌唯一的治愈性治疗方法)。

[0011] 在开发靶向细胞表面蛋白的探针时,细胞表面蛋白的胞外结构域可以以重组蛋白的形式分离和纯化,然后用作抗原来开发抗体或选择适配体。选择适配体的筛选过程通常称为SELEX(通过指数富集的配体系统进化,systematic evolution of ligands by exponential enrichment)技术。这种技术通常使用分离的重组蛋白。然而,在分离过程中,细胞表面蛋白质的三维结构可能会发生改变,如果蛋白质的三维结构对与靶蛋白的结合至关重要,则可能导致所选的适配体实际上无法结合细胞表面上的靶蛋白。

[0012] 可通过使用Cell-SELEX方法克服此类限制,与传统的SELEX技术不同,该方法涉及使用活细胞特异性地选择适配体细胞膜。

[0013] 在本公开中,使用Cell-SELEX方法在胰腺癌细胞上选择对胰腺癌具有高结合亲和力的DNA适配体,然后对所选适配体进行进一步研究,以提高细胞和组织的靶向效率以及血清稳定性。已经发现,所选择的适配体可以特异性地结合胰腺癌以及结肠癌、肝癌、肺癌、脑瘤、口腔癌、卵巢癌和乳腺癌各种癌症。

[0014] [现有技术文献]

[0015] (专利文献1)KR 10-1458947

[0016] (专利文献2)KR 10-1250557

[0017] 发明简述

[0018] 本公开的一个目的是提供新型DNA适配体。具体而言,新型DNA适配体是表现出癌症特异性结合的DNA适配体。

[0019] 本公开的另一个目的是提供一种使用表现出癌症特异性结合的DNA适配体诊断或治疗癌症的方法。

[0020] 本公开的目的是开发能够探测癌细胞的适配体。利用Cell-SELEX技术选择了特异性结合胰腺癌细胞膜的适配体。具体而言,在本公开中,使用从转移性胰腺癌组织分离的CMLu-1细胞作为靶细胞、正常胰腺组织细胞HPNE作为对照,选择了特异性结合胰腺癌细胞的适配体。

[0021] 在一方面,本公开提供了包含如SEQ ID NO:6所示的核苷酸序列的DNA适配体。在另一方面,本公开提供了包含与如SEQ ID NO:6所示的核苷酸序列具有至少90％或95％同源性的核苷酸序列的DNA适配体。在本公开的一个方面,DNA适配体可能表现出癌症的特异性结合。在本公开的一个方面,DNA适配体可由如SEQ ID NO:6所示的核苷酸序列组成。

[0022] 在另一方面,本公开提供了一种DNA适配体,其由与如SEQ ID NO:4所示的核苷酸序列具有至少90％或95％同源性的核苷酸序列组成。在本公开的一个方面,DNA适配体可由如SEQ ID NO:4所示的核苷酸序列组成。

[0023] 本文所使用的“具有至少90％同源性的核苷酸序列”是指包含一至多个核苷酸的添加、缺失或取代以与参考序列具有大于等于90％但小于100％的核苷酸序列同一性的核

苷酸序列,并表现出类似的癌症特异性结合。

[0024] 在本公开的一个方面,与如SEQ ID NO:4所示的核苷酸序列具有至少90%的同源性可指在SEQ ID NO:4的一个区域,而不是在与SEQ ID NO:6的核苷酸序列相对应的区域中与SEQ ID NO:4不同的核苷酸序列。

[0025] 本文所使用的术语“DNA适配体”是指短的单链寡核苷酸,其以高亲和力和特异性结合相应的靶标并具有独特的三维结构。通过反复的体外选择和富集过程,可以从DNA适配体文库中选择特异性结合特定靶标的DNA分子,即DNA适配体。

[0026] 在本公开的一个实验实施例中,通过Cell-SELEX过程富集的一个DNA池的适配体基于它们的序列相似性聚类分为11个适配体家族(SQ1至SQ11)。在这些家族中,SQ7已被鉴定为对胰腺癌来源的转移性癌细胞CMLu-1具有高结合亲和力,此外SQ7家族中的适配体彼此的序列同源性高,仅一些核苷酸不同(表3中的SQ7a和SQ7b适配体)。

[0027] 此外,使用特异性结合胰腺癌组织来源细胞的SQ7(SEQ ID NO:4)适配体(80-mer)作为模板,制备截短的适配体(32-mer)以增加合成产量和降低合成成本。具体地,制备SQ7-1适配体(SEQ ID NO:6),其将适配体的大小减小一半以上,同时保持对CMLu-1靶细胞的结合亲和力。本公开的发明人得出结论,SQ7-1适配体是SQ7适配体序列的一个区域,该区域对于其靶向癌细胞和癌组织的能力是关键的,并且基于此进行进一步的实验。

[0028] 在本公开的一个方面,提供了修饰的DNA适配体,其中,所述修饰已引入本公开的DNA适配体中,使其具有DNA酶的抗性,并且在SEQ ID NO:6的至少10%的核苷酸中存在所述修饰。此外,所述修饰的DNA适配体具有如SEQ ID NO:8、12或14所示的核苷酸序列。

[0029] 在本公开的一个方面,为赋予DNA酶抗性而引入的修饰可以是用-Me(甲基)、-OMe、-NH_2、-F(氟)、-O-2-甲氧基乙基-O-丙基、-O-2-甲硫基乙基、-O-3-氨基丙基、-O-3-二甲基氨基丙基、-O-N-甲基乙酰胺基或-O-二甲基酰胺氧基乙基取代一个或多个核苷酸中糖基2’碳上的-OH基团。

[0030] 在本公开的一个工作实施例中,基于SQ7-1适配体作为模板,通过修饰SQ7-1适配体二级结构中的不同区域来制备内部2’-O-甲基修饰适配体,并测定修饰的适配体的血清半衰期以研究其血清稳定性。结果表明,与SQ7-1适配体相比,某些修饰的适配体的血清半衰期增加90倍或更大。

[0031] 本公开的工作实施例中用于Cell-SELEX的靶细胞为CMLu-1细胞,其通过原位移植实验从转移性胰腺癌组织中获得。因此,本公开可能特别适用于胰腺癌的诊断。

[0032] 本公开提供了一种靶向癌组织的组合物,其包含上述DNA适配体。在本公开的一个方面,除了上述成分外,包含DNA适配体的所述组合物还可包含具有相同或类似功能的活性成分、或稳定组合物配方、或增强适配体稳定性的成分。在本公开的一个方面,所述组合物可以是药物组合物。

[0033] 此外,本公开提供了一种诊断癌症的组合物,其包含如本公开一个方面所述的适配体。

[0034] 在本公开的一个方面,DNA适配体可以与效应子部分组合使用。

[0035] 在本公开的一个方面,所述效应子部分可以是细胞毒性剂、免疫抑制剂、显像剂(例如荧光部分或螯合剂)、纳米材料或毒素多肽。所述细胞毒性剂可以是化学治疗剂。

[0036] 在一个方面,本公开涉及治疗癌症的组合物,其包含如本公开一个方面所述的新

型DNA适配体和与所述DNA适配体偶联的抗癌剂。

[0037] 在本公开的一个方面,所述癌症可以是但不限于胰腺癌、结肠癌、肝癌、肺癌、脑瘤、口腔癌、卵巢癌或乳腺癌。

[0038] 在本公开的一个方面,所述抗癌剂可以选自但不限于MMAE(一甲基澳瑞他汀E,monomethyl auristatin E)、MMAF(一甲基澳瑞他汀F,monomethyl auristatin F)、加利车霉素(calicheamicin)、美登素(mertansine,DM1)、雷英妥昔(ravtansine,DM4)、特司林(tesirine,SCX)、阿霉素(doxorubicin)、顺铂(cisplatin)、SN-38、倍癌霉素(duocarmycin)和吡咯并苯并二氮杂卓(pyrrolobenzodiazepine,PBD)组成的组中的一种或多种。

[0039] 在本公开的一个方面,DNA适配体可以与聚乙二醇(PEG)或其衍生物、二酰基甘油(DAG)或其衍生物、抗体、树状大分子或含两性离子的生物相容性聚合物(例如,含磷酸胆碱的聚合物)偶联。

[0040] 在本公开的一个方面,该组合物可以进一步含有生理学上可接受的赋形剂、载体或添加剂,其可以包括但不限于淀粉、糊化淀粉、微晶纤维素、乳糖、聚维酮、胶体二氧化硅、磷酸氢钙、乳糖、甘露醇、乳脂糖(taffy)、阿拉伯树胶、预糊化淀粉、玉米淀粉、纤维素粉、羟丙基纤维素、欧巴代(Opadry)、乙醇酸淀粉钠、巴西棕榈蜡、合成硅酸铝、硬脂酸、硬脂酸镁、硬脂酸铝、硬脂酸钙、白糖、葡萄糖、山梨糖醇和滑石。

[0041] 在本公开的一个方面,可根据相关技术领域的普通技术人员所理解的选择的施用途径,以各种形式向受试者施用所述组合物。例如,本公开的组合物可通过局部、肠内或肠外应用施用。局部应用包括但不限于表皮应用、吸入、灌肠、滴眼液、滴耳液和粘膜应用。肠内应用包括口服施用、直肠施用、阴道施用和胃饲管施用。肠外施用包括但不限于静脉内、动脉内、囊内、眶内、心内、皮内、经气管、表皮下、关节内、囊下、蛛网膜下腔、髓内、硬膜外、胸骨内、腹腔、皮下、肌内、经上皮、鼻内、肺内、鞘内、直肠和局部施用。

[0042] 此外,在本公开的一个方面,所述组合物可以配制成适合所选施用途径的任何形式。出于配方目的,可使用稀释剂或赋形剂制备所述组合物,所述稀释剂或赋形剂包括但不限于填料、填充剂、粘合剂、润湿剂、崩解剂、表面活性剂等。

[0043] 在本公开的一个方面,所述组合物可以包含本公开的一个方面的DNA适配体,由本领域普通技术人员考虑到施用途径以及有需要施用的受试者的体重、年龄、性别、健康状况、饮食、摄入时间、排泄率等而确定所述DNA适配体的有效量。

[0044] 本公开中经选择和优化以获得与癌细胞高结合亲和力的DNA适配体,由于其增强了针对靶细胞和组织的靶向效率并具有高血清稳定性,可有效用于癌症的诊断和治疗。

附图说明

[0045] 图1示出了本公开的DNA文库中包括的核苷酸序列的设计以及可用于扩增或鉴定上述核苷酸序列的正向引物和反向引物的设计。具体而言,DNA文库中的核苷酸序列在5'末端包含20个固定核苷酸,中间包含40个随机核苷酸,3'末端包含另外20个固定核苷酸。正向引物在其5'末端用Cy5标记(5'-Cy5-序列-3'),反向引物在其5'末端用生物素标记(5'-生物素-序列-3')。

[0046] 图2显示了从本公开的DNA文库中富集对胰腺癌细胞具有结合亲和力的ssDNA池的

结果,并用流式细胞仪(荧光激活细胞分选仪;FACS)测定所述池的细胞结合亲和力是否随着轮数增加。

[0047] 图3为在本公开中通过Cell-SELEX技术使用转移性胰腺癌细胞筛选适配体的过程的示意图。

[0048] 图4显示了在本公开中通过Cell-SELEX技术使用转移性胰腺癌细胞筛选适配体而获得的各个Cy5标记的候选适配体的细胞结合亲和力的测定结果。

[0049] 图5描述了在本公开中通过Cell-SELEX技术使用转移性胰腺癌细胞筛选适配体而获得的SQ7适配体的二级结构。

[0050] 图6a显示了使用流式细胞仪(FACS)测定本公开的SQ7适配体的靶细胞结合亲和力的结果。具体地,测定了SQ7适配体与靶细胞的结合,并且以无处理对照(NT)、DNA池文库和SQ8-Comp适配体作为对照。

[0051] 图6b显示了使用流式细胞仪(FACS)测定本公开的SQ7-1适配体的靶细胞结合亲和力的结果。具体地,测定了SQ7适配体和SQ7-1适配体与靶细胞的结合,并且以无处理对照(NT)、DNA池文库和SQ8-Comp适配体作为对照。

[0052] 图7描述了基于本公开的SQ7适配体制备的SQ7-1适配体的二级结构。

[0053] 图8显示了用共聚焦显微镜确定的本公开的SQ7适配体针对靶细胞的靶向分布。灰色椭圆代表细胞核,最亮的白色区域代表结合到细胞表面或内化到细胞中的适配体。

[0054] 图9显示了用共聚焦显微镜确定的本公开的SQ7-1适配体针对靶细胞的靶向分布。灰色椭圆代表细胞核,最亮的白色区域代表结合到细胞表面或内化到细胞中的适配体。

[0055] 图10显示了本公开的SQ7适配体在人胰腺癌细胞系的异种移植小鼠模型中通过生物发光成像测定的针对胰腺癌组织的靶向分布。

[0056] 图11显示了本公开的SQ7-1适配体在人胰腺癌细胞系的异种移植小鼠模型中通过生物发光成像测定的针对胰腺癌组织的靶向分布。

[0057] 图12a至图12d描述了SQ7-1(1)、SQ7-1(2)、SQ7-1(3)、SQ7-1(4)、SQ7-1(5)、SQ7-1(6)、和SQ7-1(1,5)适配体的二级结构和修饰位置,它们是基于本公开的SQ7-1适配体制备的内部2'-O-甲基修饰的适配体。图12a用矩形描绘了内部2'-O-甲基修饰的区域,并且图12b至图12d具体地公开了内部2'-O-甲基修饰的每个区域的核苷酸序列。

[0058] 图13a至图13d显示了测定的本公开的SQ7-1、SQ7-1(1)、SQ7-1(5)和SQ7-1(1,5)适配体血清半衰期。

[0059] 图14显示了用流式细胞仪测定的本公开的SQ7-1、SQ7-1(1)、SQ7-1(5)和SQ7-1(1,5)适配体的靶细胞结合亲和力。

[0060] 图15显示了本公开的SQ7-1适配体在人胰腺癌患者的各种胰腺癌细胞系的异种移植小鼠模型中通过生物发光成像测定的针对胰腺癌组织的靶向分布。

[0061] 图16a和图16b显示了用流式细胞仪(FACS)测定的本公开的SQ7-1适配体与各种胰腺癌细胞系的结合亲和力。

[0062] 图17显示了基于图16中得出的结果,SQ7-1适配体相对于SQ7-1-Rev适配体的相对荧光强度的几何平均数(以倍数表示)。

[0063] 图18显示了SQ7-1适配体相对于SQ7-1-Rev适配体的相对荧光强度的几何平均数(以倍数表示),其基于用流式细胞仪(FACS)测定的本公开的SQ7-1适配体与各种癌细胞系

的结合亲和力。

[0064] 图19显示了SQ7-1适配体相对于SQ7-1-Rev适配体的相对荧光强度的几何平均数(以倍数表示),其基于用流式细胞仪(FACS)测定的本公开的SQ7-1适配体与各种胰腺癌PDOX来源的细胞系的结合亲和力。

[0065] 发明详述

[0066] 本公开从上述各方面和以下所述的一个或多个实验实施例中可被清楚地理解。在下文中,将详细解释本公开,使得本领域的普通技术人员可以通过参考随附表格中所述的工作实施例来容易地理解和再现本公开。然而,下面给出的实验实施例或实施例仅用于说明本公开,并且本公开的范围不限于此类实验实施例或实施例。

[0067] [实验实施例1]用Cell-SELEX筛选适配体

[0068] 使用Cell-SELEX技术筛选特异性结合胰腺癌细胞的适配体的实验程序如图3所示。

[0069] 具体而言,为了获得表达细胞膜蛋白(胰腺癌特征)的细胞系,将胰腺癌细胞移植到动物模型中,并从肿瘤转移的组织中分离出胰腺癌细胞系CMLu-1(图3A)。

[0070] 制备ssDNA文库,然后使用胰腺癌细胞系CMLu-1细胞作为靶细胞(阳性细胞),hTERT/HPNE细胞(人胰腺巢蛋白表达细胞)作为对照细胞(阴性细胞)进行筛选。多轮重复选择仅与胰腺癌细胞结合而不与对照细胞结合的ssDNA分子,并对所得的富集ssDNA池进行克隆和测序,然后进行聚类。

[0071] (1)从人类胰腺癌细胞系的异种移植小鼠模型中构建转移性胰腺癌细胞系

[0072] 获得转移性胰腺癌细胞系CMLu-1的方法如下所述。使用NOD/SCID小鼠建立原位小鼠模型。首先,为了构建能够模拟胰腺癌转移的动物模型,建立了稳定表达萤火虫荧光素酶(CFPAC-1-Luci)的胰腺癌细胞系,并将其用于随时间对肿瘤发生进行无创监测。将CFPAC-1-Luci胰腺癌细胞原位移植到NOD/SCID小鼠体内。43天后,从胰腺癌转移的小鼠肺组织中取出肿瘤组织,并对分离的肿瘤组织进行基因分型,表明转移性肿瘤细胞的遗传属性与胰腺癌细胞的遗传属性相同。然后,从肿瘤组织中制备单个细胞并进行培养。从转移性肿瘤组织中分离的CMLu-1细胞在RPMI-1640培养基(Hyclone,Logan,UT,USA)加上10％的FBS(Thermo Fisher Scientific,USA)和100IU/mL的双抗(antibiotic-antimycotic;Gibco)中培养和维持。

[0073] 获得的CMLu-1细胞用作Cell-SELEX中的阳性选择的细胞,从ATCC Inc.购买的人胰管正常上皮细胞(HPNE)用作阴性选择的对照细胞。

[0074] (2)制备用于Cell-SELEX的ssDNA文库和引物

[0075] Cell-SELEX中用于胰腺癌特异性适配体的DNA文库是由固定的和特定的核苷酸组合而成的DNA序列池。该DNA序列包括在5’端的20个固定的核苷酸,中间的40个随机的核苷酸,3’端的20个固定的核苷酸。用Cy5标记DNA序列的5’端,以便使用荧光激活细胞分选仪(“FACS”,即“流式细胞仪”)监测选择的富集,3’端用生物素(biotin)标记以纯化ssDNA分子(图1)。此外,正向引物在其5’-末端用Cy5标记(5’-Cy5-序列-3’),反向引物在其5’-末端用生物素标记(5’-生物素-序列-3’)。DNA文库中的DNA组成以及正向引物和反向引物如表1所示。

[0076] [表1]

[0077]

DNA 文库核苷酸设计(SEQ ID NO: 1)	5'-ATA CCA GCT TAT TCA ATT -[40 个核苷酸(N40)]- AGA TAG TAA GTG CAA TCT-3'
正向引物；5'-引物(SEQ ID NO: 2)	5'-Cy5- ATA CCA GCT TAT TCA ATT-3'
反向引物；3'-引物(SEQ ID NO: 3)	5'-biotin- AGA TTG CAC TTA CTA TCT-3'

[0078] PCR用于扩增洗脱的DNA池。通过使用链霉亲和素-生物素键捕获生物素化的互补链并用NaOH变性双链DNA来分离ssDNA。制备PCR混合物,按照供应商的说明进行PCR。

[0079] (3)通过Cell-SELEX筛选文库

[0080] 使用CMLu-1细胞作为靶细胞(阳性细胞),hTERT/HPNE细胞作为对照细胞(阴性细胞),筛选如上所述制备的ssDNA文库。将10nmol的DNA文库溶解在1000μL的结合缓冲液(Dulbecco's PBS(Hyclone,USA),其中含有5mM $MgCl_2$、0.1mg/mL tRNA和1mg/mL BSA)中。将DNA文库或富集的池在95℃下变性10min,并在冰上冷却10min,然后在4℃的轨道摇床上与CMLu-1细胞孵育1小时。

[0081] 然后将CMLu-1细胞洗涤3次以去除未结合的DNA序列,并使用1000μL结合缓冲液在95℃下通过离心机洗脱结合的DNA分子15min。为了进行反向选择,将适配体池与hTERT/HPNE细胞孵育1小时,然后收集上清液进行阴性选择。使用FACS监测富集的池,并使用Quiagen的克隆测序试剂盒(Quiagen,Germany)克隆到大肠杆菌(Escherichia coli)中,以确定候选适配体。

[0082] (4)富集的ssDNA池的克隆和测序以及多序列比对

[0083] 为了选择候选序列,对5轮富集的ssDNA库进行克隆和测序。使用未经修饰的引物通过PCR扩增ssDNA池,连接到pGEM-T easy载体(Promega,USA)上,然后克隆到HIT™-DH5α感受态细胞(Promega,USA)中。此后,使用Cosmogenetech Inc.(Seoul,Korea)分析了200条克隆的序列,并使用ClustalX 1.83进行比对。

[0084] 根据选择轮数的富集程度如图2所示。

[0085] 上述(1)至(4)中所述的过程如图3所示。通过上述过程测序的适配体聚类,分为具有相似序列的适配体。最终,鉴定出11个Cy5标记的候选适配体家族(SQ1至SQ11)。整个池中单个适配体家族的含量如下表2所示。

[0086] [表2]

[0087]

适配体家族	在富集DNA池中的含量(%)
SQ1	14.09
SQ2	13.42
SQ3	5.37
SQ4	4.70
SQ5	4.70
SQ6	3.36
SQ7	2.01
SQ8	2.68
SQ9	1.34
SQ10	1.34

[0088]

SQ11	1.34

[0089] [实验实施例2]富集的候选适配体家族结合靶细胞特异性的测定

[0090] 使用流式细胞仪(FACS)测定在实验实施例1的(4)中获得的富集的候选适配体家族结合CMLu-1靶细胞的特异性。

[0091] 将每一种Cy5标记的候选适配体家族与3×10^5CMLu-1细胞和hTERT/HPNE细胞一起在Cell-SELEX的结合缓冲液中4℃孵育1小时。用含有0.1％NaN_3的结合缓冲液洗涤细胞3次,并将结合了序列的细胞重新悬浮在结合缓冲液中。使用BD Facscalibur™和FACSVerse™(BD Biosciences,USA)对10000个细胞进行荧光检测,并使用软件FlowJo v10.0.7对数据进行分析。

[0092] 图4显示了测定单个Cy5标记的候选适配体家族的靶细胞结合亲和力的结果。对转移性胰腺癌细胞(CMLu-1),即靶细胞,具有最高结合特异性的适配体鉴定为SQ7,其序列如下所示。

[0093] *SQ7适配体序列

[0094] 5’-AGCAGCACAGAGGTCAGATGATGTTGGTATATACTTCTTTAGCTTGGAACCAACTCTTGCCCTATGCGTGCTACCGTGAA-3’(SEQ ID NO:4)

[0095] 下表列出了SQ7家族中包含的适配体序列。

[0096] [表3]SQ7和SQ7亚型的序列

[0097]

适配体		序列	数量	%
SQ7		AGCAGCACAGAGGTCAGATGATGTTGGTATATACTTCTTTAGCTTGGAACCAACTCTTGCCCTATGCGTGCTACCGTGAA	3	4.03
	SQ7a	AGCAGCACAGAGGTCAGATGATGTTGGTATATACTTCTTTAGCTTGGAACCAACTCTT**CT**CCTATGCGTGCTACCGTGA (SEQ ID NO: 15)	1	
	SQ7b	AGCAACACAGAGGTCAGATGATGTTGGTATATACTTCTTTAGCTTGGAACC**C**ACTCTTG**T**CCTATGCGTGCTACCGTGAA (SEQ ID NO: 16)	2	

[0098] [实验实施例3]SQ7适配体的分析及适配体片段的功能鉴定

[0099] 测定的实验实施例2中选择的SQ7适配体二级结构如图5所示。此外,为了确认细胞结合亲和力,SQ7适配体以及作为对照的未处理对照(NT)、DNA池文库和SQ8-Comp适配体(具有与SQ8适配体部分互补的核苷酸序列的适配体;SEQ ID NO:5),并使用FACS以与实验实施例2中相同的方式测定其靶细胞结合。如图6所示,结果表明,尽管对照组(即NT、DNA池文库和SQ8-Comp适配体)均表现出类似的低水平结合亲和力,但SQ7适配体表现出显著优越的靶细胞结合亲和力。

[0100] 为了确定SQ7适配体的某些部分是否对胰腺癌特异性结合至关重要,制备了包含部分SQ7适配体的各种适配体,并研究了它们与靶细胞的结合亲和力。如果在保持其细胞结合亲和力的同时可以缩短适配体的长度,则在增强细胞渗透的同时很可能降低适配体的生产成本。结果表明,具有下表4所示序列的SQ7-1适配体在内吞作用方面具有优势,同时几乎完全保留了对靶细胞的结合亲和力。鉴于上述结果,使用FACS以与实验实施例2中相同的方式测定SQ7适配体、SQ7-1适配体、NT、DNA池文库和SQ8-Comp适配体的靶细胞结合亲和力。如图6b所示,结果表明,对照组(即NT、DNA文库和SQ8-Comp适配体)具有类似水平的低结合亲和力,而SQ7-1适配体与SQ7适配体一样,表现出显著优越的靶细胞结合亲和力。

[0101] SQ7-1适配体的核苷酸序列如下表所示(SEQ ID NO:6),相应的二级结构如图7所示。此外,制备了SQ7-1-Rev适配体(具有SQ7-1相反方向序列的适配体;SEQ ID NO:7),以便在后续实验中将其用作SQ7-1适配体的对照。

[0102] [表4]

[0103]

适配体	序列
SQ7	5'-AGCAGCACAGAGGTCAGATGATGTTGGTATATACTTCTTTAGCTTGGAACCAACTCTTGCCCTATGCGTGCTACCGTGAA-3'
SQ7-1	5'-GTTGGTATATACTTCTTTAGCTTGGAACCAAC-3' (SEQ ID NO: 6)
SQ7-1-Rev	5'-CAACCATATATGAAGAAATCGAACCTTGGTTG-3' (SEQ ID NO: 7)

[0104] [实验实施例4]所选适配体靶向细胞和组织的效率的测定

[0105] (1)通过共聚焦显微镜成像确定所选适配体的内吞作用效率。

[0106] 在实验前4小时将1×10^{4}个细胞/孔对照细胞(HPNE)和靶细胞(CMLu-1)铺在涂有聚-L-赖氨酸(Sigma,USA)的8孔室载玻片(Thermo scientific,USA)上。用洗涤缓冲液洗涤后,加入Cy5标记的适配体(250nM)或DNA池文库,在200μL结合缓冲液中4℃孵育。洗涤两次后,使用4%多聚甲醛固定细胞,然后用Hoechst33342将细胞核染色。之后,通过共聚焦显微镜(LSM780,Carl Zeiss,Germany)对细胞进行成像,并用软件Zen blue edition分析所获得的图像。

[0107] SQ7和SQ7-1适配体的共聚焦显微镜结果如图8和9所示,其中最明亮的白色区域代表了适配体密集的区域。如图8和9所示,SQ7和SQ7-1适配体靶向胰腺癌细胞而非对照细胞,并表现出良好的细胞内吞(内化)水平。

[0108] (2)通过体内外荧光成像测定适配体靶向胰腺癌

[0109] 6周龄的雌性Hsd:Athymic nude-Foxn1裸鼠购自法国Harlan Laboratories,Inc。在受控的光照和湿度条件下将小鼠饲养在无特定病原体(specific pathogen free,SPF)的环境中,其食物和水由NCC动物设施提供。所有动物研究均由国立癌症中心研究所(NCCRI)的机构动物护理和使用委员会(IACUC)(NCC-16-247)审查和批准。NCCRI是国际实验动物评估和认可委员会(AAALAC International)认可的机构。

[0110] 通过将从ATCC购买的CFPAC-1细胞(1×10^{6}个细胞)注射到小鼠胰腺的尾部来构建胰腺癌的原位异种移植小鼠模型。接种后3周,根据处理的方式将小鼠分成两组(Cy5.5-SQ8-Comp适配体vs Cy5.5-SQ7适配体或Cy5.5-SQ7-1-Rev适配体vs Cy5.5-SQ7-1适配体),然后静脉施用上述Cy5.5标记的适配体(300pmol/50μL PBS)。

[0111] 对于体外实验,施用15分钟或3小时后处死小鼠,然后解剖。分离肿瘤组织,并使用IVIS Lumina(Caliper Life Science,Hopkinton,MA,USA)进行生物发光成像。所有图像数据均使用软件Living Image Acquisition and Analysis进行分析。

[0112] 图10和11中的灰度图显示了SQ7和SQ7-1适配体的生物发光成像结果。从成像结果中获得的总通量绘制在图10和11中。

[0113] 在上述图顶部显示的成像结果中,区域越亮(越白),与该区域细胞结合的适配体数量越多。可以看出,SQ7和SQ7-1适配体的成像结果比其他适配体的成像结果更白。

[0114] 因此,可以表明,与其他对照适配体(SQ1适配体(SEQ ID NO:17)、SQ8-Comp适配体和SQ7-1-Rev适配体)相比,本公开的适配体向胰腺癌组织移动并与其特异性结合,并且对胰腺癌组织具有显著优越的靶向效率。

[0115] [实验实施例5]血清稳定性增强的适配体修饰的制备与鉴定

[0116] 基于上述实验实施例中制备的SQ7-1适配体,制备了内部2'-O-甲基(2'-O-methyl)修饰适配体,以增强适配体的血清稳定性。具体而言,通过修饰SQ7-1适配体二级结构中的不同区域制备SQ7-1(1)、SQ7-1(2)、SQ7-1(3)、SQ7-1(4)、SQ7-1(5)、SQ7-1(6)和SQ7-1(1,5)适配体(图12a至12d)。

[0117] 产生的内部2'-O-甲基修饰适配体的核苷酸序列总结在下表5中。

[0118] [表5]

[0119]

适配体	序列	2'-O-甲基-修饰的[A,G,C,U]数量
SQ7-1	5'-GTTGGTATATACTTCTTTAGCTTGGAACCAAC-3' (SEQ ID NO: 6)	0
SQ7-1(1)	5'-[2'-O-Methyl(G)][2'-O-Methyl(U)][2'-O-Methyl(U)][2'-O-Methyl(G)][2'-O-Methyl(G)][2'-O-Methyl(U)]ATATACTTCTTTAGCTTGGAACCAAC-3' (SEQ ID NO: 8)	6
SQ7-1(2)	GTTGGT[2'-O-Methyl(A)][2'-O-Methyl(U)][2'-O-Methyl(A)][2'-O-Methyl(U)][2'-O-Methyl(A)]CTTCTTTAGCTTGGAACCAAC (SEQ ID NO: 9)	5
SQ7-1(3)	GTTGGTATATACT[2'-O-Methyl(U)][2'-O-Methyl(C)][2'-O-Methyl(U)][2'-O-Methyl(U)][2'-O-Methyl(U)]AGCTTGGAACCAAC (SEQ ID NO: 10)	5
SQ7-1(4)	GTTGGTATATACTTCTTTAG[2'-O-Methyl(C)][2'-O-Methyl(U)][2'-O-Methyl(U)][2'-O-Methyl(G)][2'-O-Methyl(G)][2'-O-Methyl(A)]ACCAAC (SEQ ID NO: 11)	6
SQ7-1(5)	GTTGGTATATACTTCTTTAGCTTGGA[2'-O-Methyl(A)][2'-O-Methyl(C)][2'-O-Methyl(C)][2'-O-Methyl(A)][2'-O-Methyl(A)][2'-O-Methyl(C)] (SEQ ID NO: 12)	6
SQ7-1(6)	GTTGGT[2'-O-Methyl(A)][2'-O-Methyl(U)][2'-O-Methyl(A)][2'-O-Methyl(U)][2'-O-Methyl(A)][2'-O-Methyl(C)][2'-O-Methyl(U)][2'-O-Methyl(U)][2'-O-Methyl(C)][2'-O-Methyl(U)][2'-O-Methyl(U)][2'-O-	20

		Methyl(U)][2'-O-Methyl(A)][2'-O-Methyl(G)][2'-O-Methyl(C)][2'-O-Methyl(U)][2'-O-Methyl(U)][2'-O-Methyl(G)][2'-O-Methyl(G)][2'-O-Methyl(A)]ACCAAC (SEQ ID NO: 13)	
[0120]	SQ7-1(1,5)	[2'-O-Methyl(G)][2'-O-Methyl(U)][2'-O-Methyl(U)][2'-O-Methyl(G)][2'-O-Methyl(G)][2'-O-Methyl(U)]ATATACTTCTTTAGCTTGGA[2'-O-Methyl(A)][2'-O-Methyl(C)][2'-O-Methyl(C)][2'-O-Methyl(A)][2'-O-Methyl(A)][2'-O-Methyl(C)] (SEQ ID NO: 14)	12

[0121] 将上述制备的每种内部2'-O-甲基修饰的适配体各取5μg,于37℃在小鼠血清中孵育0、0.1、0.5、2、6和24小时。在上述各个时间点,向样品中加入0.5M EDTA以抑制DNA酶活性,然后加入EtOH-NaOAc以实现沉淀。用HPLC分析DNA适配体沉淀样品。

[0122] 用配备有可变波长检测器(VWD)QuatPump的Waters e2695 HPLC系统(MA,USA)进行色谱。使用安装有用于LC的Empower3 personal single system software的个人计算机处理色谱数据。使用购自Agela Technologies Inc.(Beijing,China)的Venusil,XBP C18柱(250mm×4.6mm,5μm)分离分析物。流动相为甲醇-水(55:45,体积比)混合物,流速为0.5mL/min。柱温为30℃,测量波长为260nm。从Shanghai GaoGe Industrial and Trading Co.,Ltd.(Shanghai,China)购买的15μL LC微量注射器用于注射。

[0123] 结果显示SQ7-1(1)、SQ7-1(5)和SQ7-1(1,5)适配体具有显著增加的半衰期。具体而言,如图13所示,SQ7-1(1)、SQ7-1(5)和SQ7-1(1,5)适配体的半衰期分别相对于SQ7-1适配体增加了91倍、145倍和760倍。与SQ7-1适配体相比,上述适配体与靶细胞的结合亲和力略低,但仍明显高于DNA池文库中的适配体(图中最左边的细实线)(图14)。

[0124] 总之,如上所述,本公开的DNA适配体以高结合亲和力特异地结合胰腺癌。已经表明,通过减小所选适配体的大小可以增加靶细胞或组织的靶向效率,并且可以通过增强对DNA酶的抗性的修饰来增加血清稳定性。

[0125] [实验实施例6]小鼠原位异种移植模型中人类胰腺癌组织(Patient-Derived Orthotopic Xenograft Model;PDOX模型)的靶向性测定

[0126] 为了确定本公开的适配体是否在能够再现患者肿瘤组织的复杂性和异质性的PDOX模型中也表现出优异的靶向效率,使用荧光成像进行了体内验证实验。

[0127] 经NCC伦理审查委员会(Institutional Review Board,"IRB")批准,向提交知情同意书的患者收集样本,并将样本直接移植到裸鼠胰腺(购自Harlan Laboratories,Inc.(法国))中,建立了患者来源的原位异种移植(PDOX)模型。对于胰腺癌患者的原发肿瘤样本(以下称为"HPT"),直接手术切除;对于不能手术的晚期胰腺癌患者,在收集患者肝转移组织活检样本(以下称为"GUN")后,将样本转移到含有培养基的试管中,并尽快移植到雌性Hsd:Athymic nude-Foxn1裸鼠(与实验实施例4相同的来源获得)中,通过在胰腺尾部切开

并在移植后封闭切口(第1代PDOX,F1)。此后,通过腹部触诊和MRI定期测量肿瘤大小,当肿瘤体积达到3000mm^{3}时,处死小鼠以获得肿瘤组织。然后将一定大小(3mm*3mm*3mm)的肿瘤组织片段原位重新植入多个裸鼠受试者体内,以产生后代(F2、F3、F4…),并增加受试者数量。

[0128] 在第4代(F4),将建立的PDOX小鼠模型分为两组,每组三只受试者,分别以Cy5.5标记的适配体形式的静脉注射SQ7-1适配体或SQ7-1-Rev适配体(300pmol/50μL PBS)。施用15分钟后,处死小鼠并解剖,去除肿瘤组织,然后使用IVIS Lumina(Caliper Life Science,Hopkinton,MA,USA)进行生物发光成像。所有图像数据均使用软件Living Image Acquisition and Analysis进行分析。图15中的灰度图显示了生物发光成像的结果。从成像结果中获得的总通量如图15所示。

[0129] 与图10和11一样,在图15顶部显示的成像结果中,区域越亮(越白),与该区域中细胞结合的适配体数量越大。可以看出,SQ7-1适配体比SQ7-1-Rev适配体的图像更白。

[0130] 因此,表明即使在保留患者肿瘤组织的复杂性和异质性的PDOX模型中,本公开的适配体也具有显著优越的靶向效率。

[0131] [实验实施例7]不同胰腺癌细胞系结合亲和力的测定

[0132] 进行另外的流式细胞仪(FACS)分析,以测定本公开的适配体对各种胰腺癌细胞系的结合亲和力。

[0133] [抗体结合适配体的制备]

[0134] 250nM地高辛(digoxigenin)标记的SQ7-1适体和125nM抗地高辛抗体(Abcam;Cat.No.ab420,USA)在室温下混合30分钟,以制备抗体结合适配体。

[0135] 以与实验实施例2中相同的方式进行流式细胞仪分析,不同之处在于使用如上所述制备的抗体结合适配体,并且使用Alexa 488标记的抗小鼠IgG(Invitrogen,USA)作为第二抗体,浓度为4μg/mL。使用来自CFPAC-1细胞系、SNU-213细胞系、SNU-410细胞系、Capan-2细胞系、HPAF-II细胞系、AsPC-1细胞系、Capan-1细胞系、MIA PaCa细胞系、BxPC-3细胞系和PANC-1细胞系的细胞。上述所有细胞系均购自ATCC。

[0136] 测定适配体与各种胰腺癌细胞系的结合亲和力的结果显示在图16和17中。图17展示了SQ7-1适配体相对于SQ7-1-Rev适配体的相对荧光强度的几何平均值(以倍数表示)。

[0137] 根据图16和17显示的结果,与SQ7-1-Rev适配体相比,本公开的SQ7-1适配体更有效且特异性地结合所有胰腺癌细胞系。结合上面讨论的实验实施例4和6的结果,可以看出,本公开的适配体可特异性结合各种类型的胰腺癌细胞。

[0138] 此外,SQ7适配体能够类似地特异性结合各种类型的胰腺癌细胞,因为它包含SQ7-1适配体序列。

[0139] [实验实施例8]各种肿瘤细胞系结合亲和力的测定

[0140] 进行另外的流式细胞仪(FACS)分析,以确定本公开的适配体对各种肿瘤细胞系的结合亲和力。

[0141] 以与实验实施例2中相同的方式进行流式细胞仪分析,但使用与实验实施例7相同的抗体结合适配体和第二抗体。使用来自U87细胞系、U251细胞系、CAL27细胞系、HEP3B细胞系、A549细胞系、HCT116细胞系、SK-OV3细胞系、ES-2细胞系、MCF7细胞系、SK-BR3细胞系、NCI-N87细胞系、KPL4细胞系、BT-474细胞系、MDA-MB231细胞系和HCC1938细胞系的细胞。上

述所有细胞系均购自ATCC。

[0142] 适配体与各种癌细胞系结合亲和力的测定结果如图18所示。图18显示了SQ7-1适配体与SQ7-1-Rev适配体的相对荧光强度的几何平均值(以倍数计)。

[0143] 根据图18所示的结果,与SQ7-1-Rev适配体相比,本公开的SQ7-1适配体更有效、更特异地结合到各种癌症细胞系,如结肠癌、肝癌、肺癌、脑瘤、口腔癌、卵巢癌和乳腺癌细胞系。结合上面讨论的实验实施例4和6的结果,可以看出本公开的适配体可特异性结合到各种类型的癌细胞。

[0144] 此外,SQ7适配体同样会特异性结合各种类型的癌细胞,因为它包含SQ7-1适配体序列。

[0145] [实验实施例9]胰腺导管腺癌PDOX-衍生细胞系结合亲和力的测定

[0146] 进行另外的流式细胞仪(FACS)分析,以确定本公开的适配体是否能够特异性结合临床患者的胰腺癌细胞。

[0147] 与在死亡前仅具有有限数量细胞分裂的正常细胞不同,癌细胞具有无限分裂的特征。因此,从肿瘤组织中分离的癌细胞被认为能够形成即使在没有转染的情况下也能够无限增殖的细胞系,并再现患者的临床和分子生物学特征。在该实验中,将从胰腺癌PDOX小鼠取出的肿瘤组织分成3mm×4mm的片段,与包含胶原酶的人细胞解离试剂盒(Miltenyi Biotech Inc.)混合,并置于组织解离器(Gentle Macs,Miltenyi Biotech Inc)1小时以将细胞与结缔组织分离。反应完成后,加入含有胎牛血清(FBS)的RPMI培养基以抑制酶活性,然后离心,得到从组织解离的细胞沉淀物。将沉淀物悬浮在含有FBS的RPMI培养基中,然后将细胞均匀地铺在10cm培养皿上至2×10^6个细胞的水平。每隔一天更换培养基,同时除去正常的成纤维细胞和死细胞,从而为每位胰腺癌患者建立PDOX来源的癌细胞系。建立的细胞系以与其来源的PDOX相同的方式命名。

[0148] 对从使用肝转移患者活检组织的PDOX模型的肿瘤组织中分离的癌细胞系(GUN#13、GUN#16、GUN#20、GUN#34、GUN#38、GUN#41和GUN#46),使用内窥镜超声引导细针活检样本的PDOX模型的肿瘤组织中分离的癌细胞系(EUS#16),以及使用手术切除样本的PDOX模型的肿瘤组织中分离的癌细胞系(HPT#19、HPT#22、HPT#43、HPT#45和HPT#48)的肿瘤组织中分离的癌细胞系,以与实验实施例2中相同的方式进行流式细胞仪分析,不同之处在于使用与实验实施例7中相同的抗体结合适配体。

[0149] 测定适配体与各种PDOX来源的细胞系的结合亲和力的结果显示在图19中。图19显示了SQ7-1适配体与SQ7-1-Rev适配体的相对荧光强度的几何平均值(以倍数计)。

[0150] 根据图19所示的结果,与SQ7-1-Rev适配体相比,本公开的SQ7-1适配体更有效、更特异性地结合各种PDOX-来源的细胞系,这些细胞系来源于收集自不同患者的胰腺癌组织。结合上面讨论的实验实施例4和6的结果,可以看出,本公开的适配体能够特异性结合临床患者的胰腺癌组织。

[0151] 此外,SQ7适配体同样会特异性结合患者的胰腺癌组织,因为它包含SQ7-1适配体序列。

[0152] 尽管本公开的技术思想已在上文中通过参考工作实施例中提供的实施方案进行了描述并在附图中进行了说明,但应当注意,在不脱离本公开所属领域的普通技术人员可以理解的本公开的技术思想和范围的情况下,可以进行各种替换、修改和变化。此外,应当

注意,此类替换、修改和变化包含在所附权利要求书的范围内。

[0001] SEQUENCE LISTING
[0002] <110> 国立癌中心
[0003] 株式会社在鹏生物A
[0004] <120> 新型DNA适配体及其用途
[0005] <130> P21116432WP
[0006] <150> KR10-2018-0167948
[0007] <151> 2018-12-21
[0008] <160> 17
[0009] <170> PatentIn version 3.5
[0010] <210> 1
[0011] <211> 76
[0012] <212> DNA
[0013] <213> Artificial Sequence
[0014] <220>
[0015] <223> DNA文库核苷酸设计
[0016] <220>
[0017] <221> Unsure
[0018] <222> (19)..(58)
[0019] <223> DNA文库随机序列N19-N58
[0020] <220>
[0021] <221> misc_feature
[0022] <222> (19)..(58)
[0023] <223> n is a, c, g, or t
[0024] <400> 1
[0025] ataccagctt attcaattnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnag 60
[0026] atagtaagtg caatct 76
[0027] <210> 2
[0028] <211> 18
[0029] <212> DNA
[0030] <213> Artificial Sequence
[0031] <220>
[0032] <223> DNA文库正向引物
[0033] <220>
[0034] <221> 5'clip
[0035] <222> (1)..(1)
[0036] <223> 5'端加Cy5
[0037] <400> 2
[0038] ataccagctt attcaatt 18

[0039] <210> 3

[0040] <211> 18

[0041] <212> DNA

[0042] <213> Artificial Sequence

[0043] <220>

[0044] <223> DNA文库反向引物

[0045] <220>

[0046] <221> 5'clip

[0047] <222> (1)..(1)

[0048] <223> 5'端加biotin

[0049] <400> 3

[0050] agattgcact tactatct 18

[0051] <210> 4

[0052] <211> 80

[0053] <212> DNA

[0054] <213> Artificial Sequence

[0055] <220>

[0056] <223> DNA适配体SQ7

[0057] <400> 4

[0058] agcagcacag aggtcagatg atgttggtat atacttcttt agcttggaac caactcttgc 60

[0059] cctatgcgtg ctaccgtgaa 80

[0060] <210> 5

[0061] <211> 80

[0062] <212> DNA

[0063] <213> Artificial Sequence

[0064] <220>

[0065] <223> DNA适配体SQ8-Comp

[0066] <400> 5

[0067] agcagcacag aggtcagatg gaacccgata aagaataagt acgacaaggt ggcgagagcc 60

[0068] cctatgcgtg ctaccgtgaa 80

[0069] <210> 6

[0070] <211> 32

[0071] <212> DNA

[0072] <213> Artificial Sequence

[0073] <220>

[0074] <223> DNA适配体SQ7-1

[0075] <400> 6

[0076] gttggtatat acttctttag cttggaacca ac 32

[0077] <210> 7

[0078] <211> 32
[0079] <212> DNA
[0080] <213> Artificial Sequence
[0081] <220>
[0082] <223> DNA适配体SQ7-1-Rev
[0083] <400> 7
[0084] caaccatata tgaagaaatc gaaccttggt tg 32
[0085] <210> 8
[0086] <211> 32
[0087] <212> DNA
[0088] <213> Artificial Sequence
[0089] <220>
[0090] <223> 内部2'-O-甲基修饰的适配体SQ7-1(1)
[0091] <220>
[0092] <221> modified_base
[0093] <222> (1)..(6)
[0094] <223> 2'-O-甲基修饰的碱基(1-6)
[0095] <400> 8
[0096] guugguatat acttctttag cttggaacca ac 32
[0097] <210> 9
[0098] <211> 32
[0099] <212> DNA
[0100] <213> Artificial Sequence
[0101] <220>
[0102] <223> 内部2'-O-甲基修饰的适配体SQ7-1(2)
[0103] <220>
[0104] <221> modified_base
[0105] <222> (7)..(11)
[0106] <223> 2'-O-甲基修饰的碱基(7-11)
[0107] <400> 9
[0108] gttggtauau acttctttag cttggaacca ac 32
[0109] <210> 10
[0110] <211> 32
[0111] <212> DNA
[0112] <213> Artificial Sequence
[0113] <220>
[0114] <223> 内部2'-O-甲基修饰的适配体SQ7-1(3)
[0115] <220>
[0116] <221> modified_base

[0117] <222> (14)..(18)

[0118] <223> 2'-O-甲基修饰的碱基(14-18)

[0119] <400> 10

[0120] gttggtatat actucuuuag cttggaacca ac 32

[0121] <210> 11

[0122] <211> 32

[0123] <212> DNA

[0124] <213> Artificial Sequence

[0125] <220>

[0126] <223> 内部2'-O-甲基修饰的适配体SQ7-1(4)

[0127] <220>

[0128] <221> modified_base

[0129] <222> (21)..(26)

[0130] <223> 2'-O-甲基修饰的碱基(21-26)

[0131] <400> 11

[0132] gttggtatat acttctttag cuuggaacca ac 32

[0133] <210> 12

[0134] <211> 32

[0135] <212> DNA

[0136] <213> Artificial Sequence

[0137] <220>

[0138] <223> 内部2'-O-甲基修饰的适配体SQ7-1(5)

[0139] <220>

[0140] <221> modified_base

[0141] <222> (27)..(32)

[0142] <223> 2'-O-甲基修饰的碱基(27-32)

[0143] <400> 12

[0144] gttggtatat acttctttag cttggaacca ac 32

[0145] <210> 13

[0146] <211> 32

[0147] <212> DNA

[0148] <213> Artificial Sequence

[0149] <220>

[0150] <223> 内部2'-O-甲基修饰的适配体SQ7-1(6)

[0151] <220>

[0152] <221> modified_base

[0153] <222> (7)..(26)

[0154] <223> 2'-O-甲基修饰的碱基(7-26)

[0155] <400> 13

[0156] gttggtauau acuucuuuag cuuggaacca ac 32

[0157] <210> 14

[0158] <211> 32

[0159] <212> DNA

[0160] <213> Artificial Sequence

[0161] <220>

[0162] <223> 内部2'-O-甲基修饰的适配体SQ7-1(1,5)

[0163] <220>

[0164] <221> modified_base

[0165] <222> (1)..(6)

[0166] <223> 2'-O-甲基修饰的碱基(1-6)

[0167] <220>

[0168] <221> modified_base

[0169] <222> (27)..(32)

[0170] <223> 2'-O-甲基修饰的碱基(27-32)

[0171] <400> 14

[0172] guugguatat acttctttag cttggaacca ac 32

[0173] <210> 15

[0174] <211> 79

[0175] <212> DNA

[0176] <213> Artificial Sequence

[0177] <220>

[0178] <223> DNA适配体SQ7a

[0179] <400> 15

[0180] agcagcacag aggtcagatg atgttggtat atacttcttt agcttggaac caactcttct 60

[0181] cctatgcgtg ctaccgtga 79

[0182] <210> 16

[0183] <211> 80

[0184] <212> DNA

[0185] <213> Artificial Sequence

[0186] <220>

[0187] <223> DNA适配体SQ7b

[0188] <400> 16

[0189] agcaacacag aggtcagatg atgttggtat atacttcttt agcttggaac ccactcttgt 60

[0190] cctatgcgtg ctaccgtgaa 80

[0191] <210> 17

[0192] <211> 80

[0193] <212> DNA

[0194] <213> Artificial Sequence

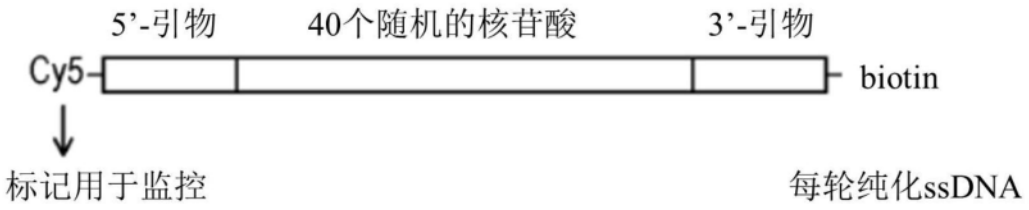
[0195] <220>

[0196] <223> DNA适配体SQ1

[0197] <400> 17

[0198] agcagcacag aggtcagatg cttgggctat ctcttattca tgctgttcca ccgctctcgg 60

[0199] cctatgcgtg ctaccgtgaa 80

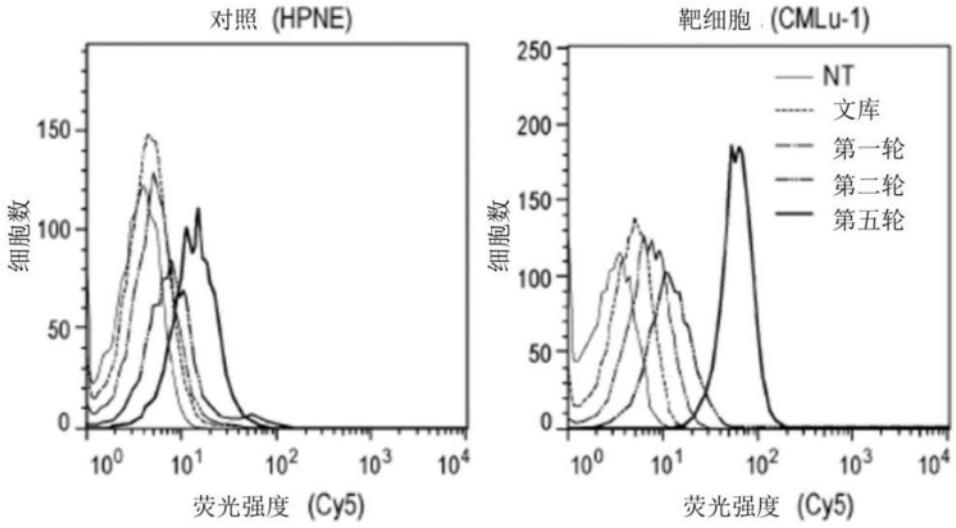


5'-ATA CCA GCT TAT TCA ATT-(N40)- AGA TAG TAA GTG CAA TCT -3'

5'-引物: Cy-5 -ATA CCA GCT TAT TCA ATT

3'-引物: biotin- AGA TTG CAC TTA CTA TCT

图1



第5轮适配体池的富集

图2

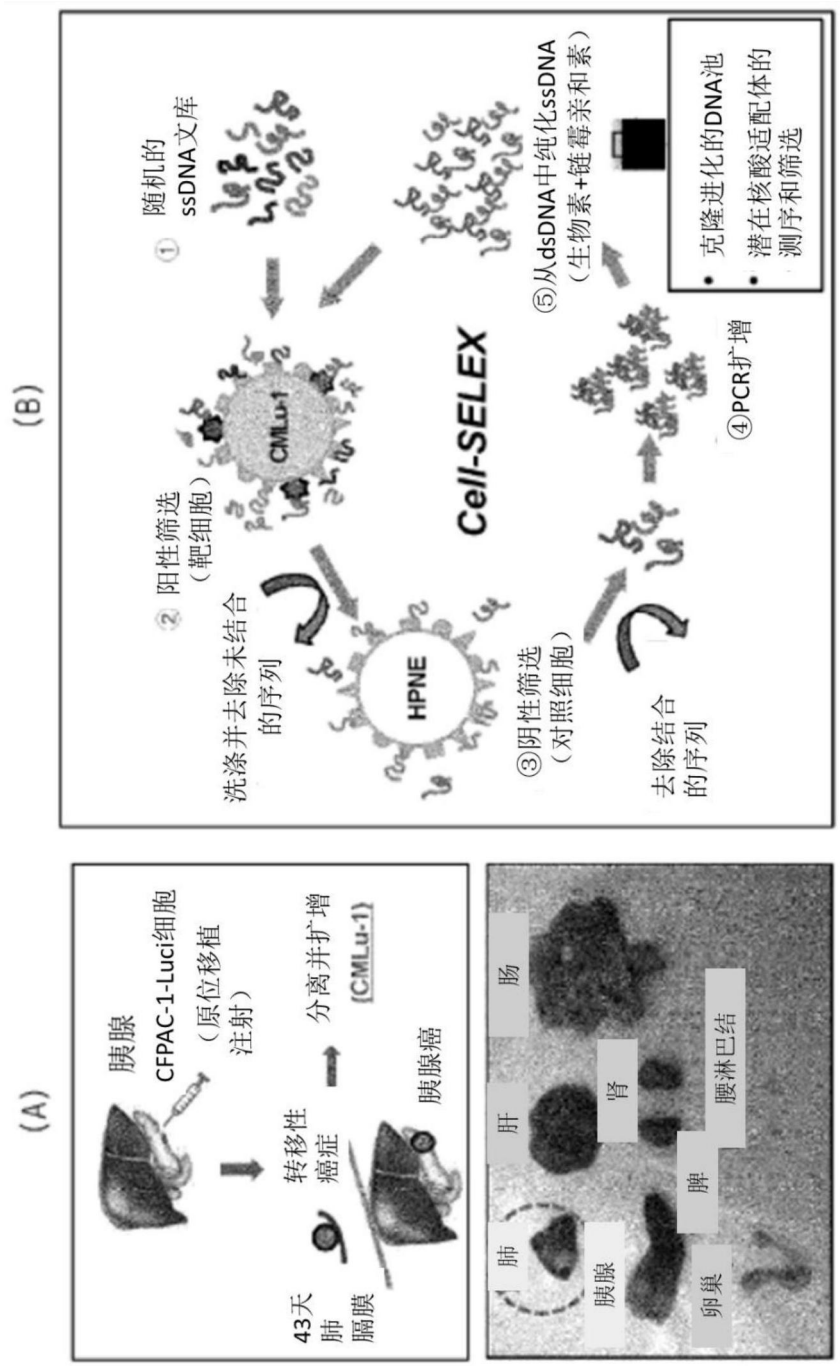

(A)
胰腺
CFPAC-1-Luci细胞
（原位移植
注射）
转移性
癌症
分离并扩增
(CMLu-1)
胰腺癌
43天
肺
膈膜
肺
肝
肠
胰腺
肾
脾
腰淋巴结
卵巢
(B)
随机的
ssDNA文库
①
②阳性筛选
（靶细胞）
CMLu-1
洗涤并去除未结合
的序列
HPNE
Cell-SELEX
③阴性筛选
（对照细胞）
去除结合
的序列
④PCR扩增
⑤从dsDNA中纯化ssDNA
（生物素+链霉亲和素）
• 克隆进化的DNA池
• 潜在核酸适配体的
测序和筛选

图3

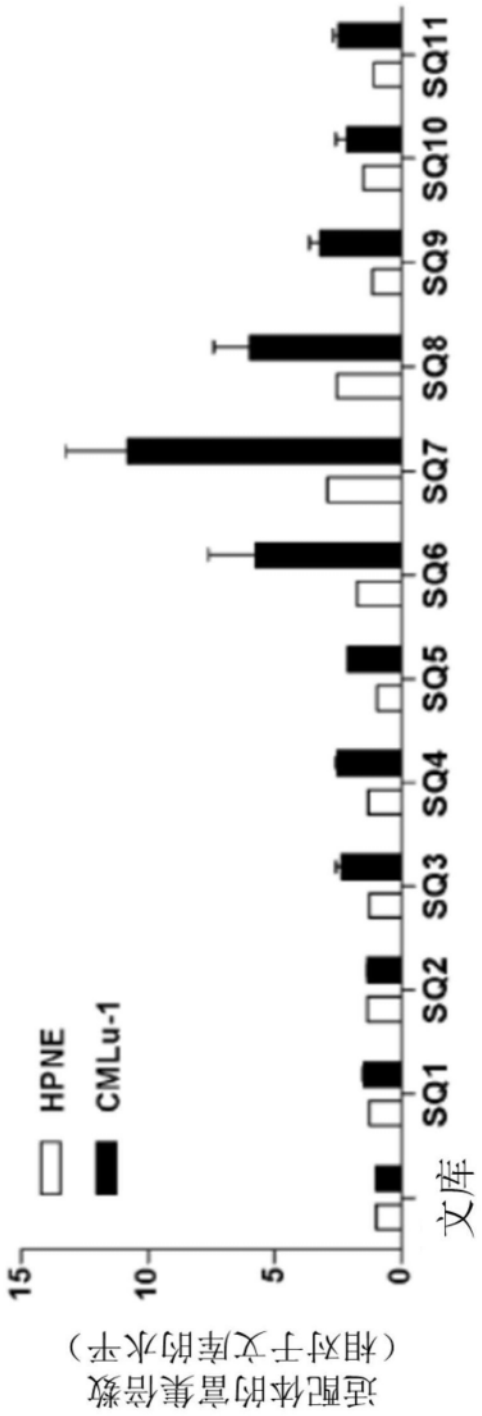

适配体的富集倍数
（相对于文库的水平）
15
10
5
0
HPNE
CMLu-1
文库
SQ1
SQ2
SQ3
SQ4
SQ5
SQ6
SQ7
SQ8
SQ9
SQ10
SQ11

图4

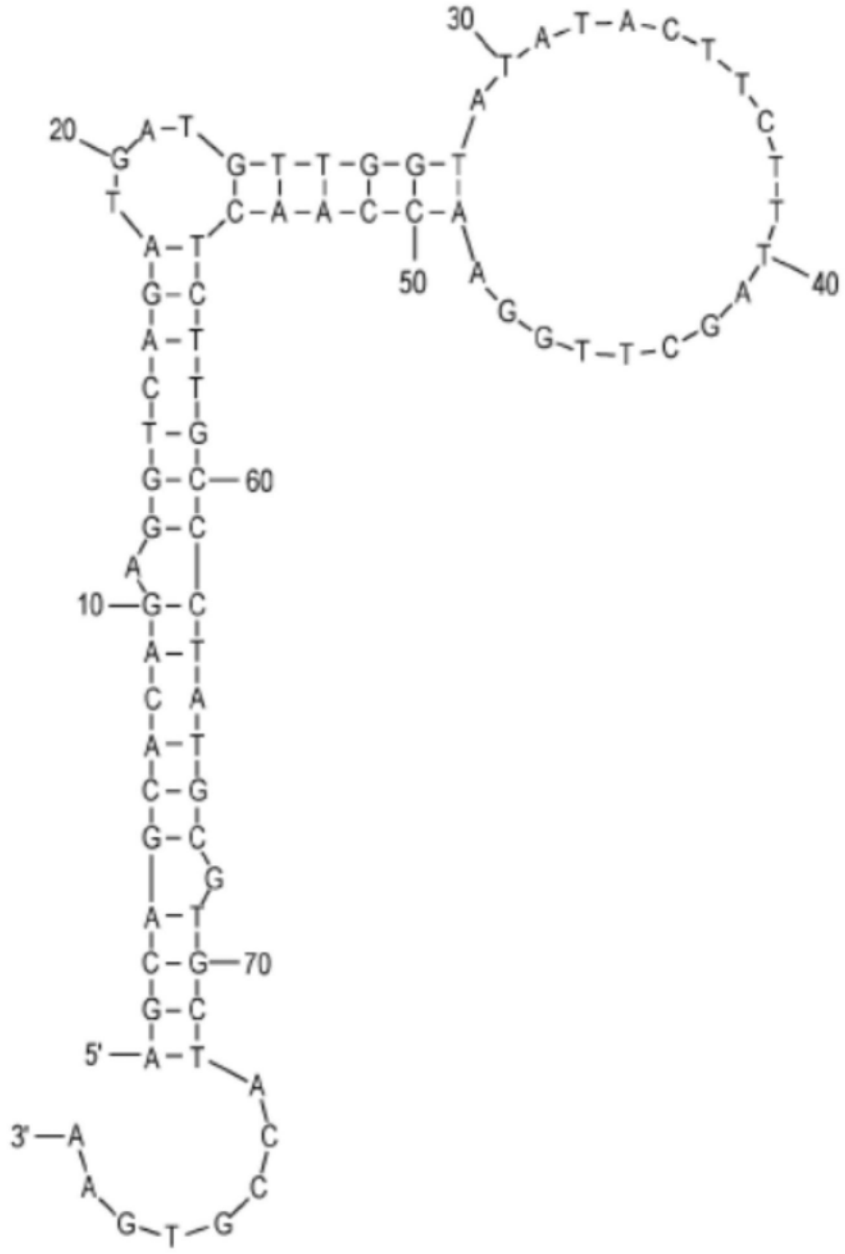


图5

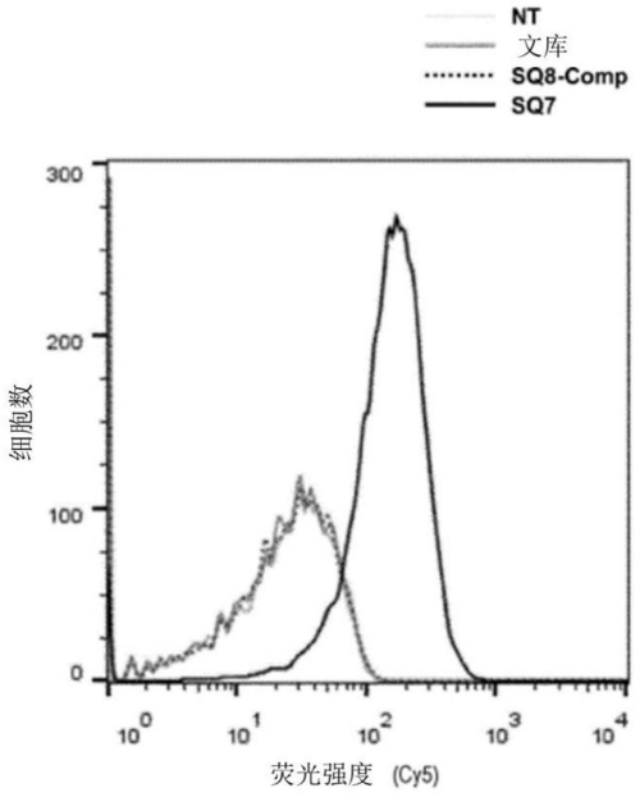

NT
文库
SQ8-Comp
SQ7
300
200
100
0
细胞数
10^0
10^1
10^2
10^3
10^4
荧光强度 (Cy5)

图6a

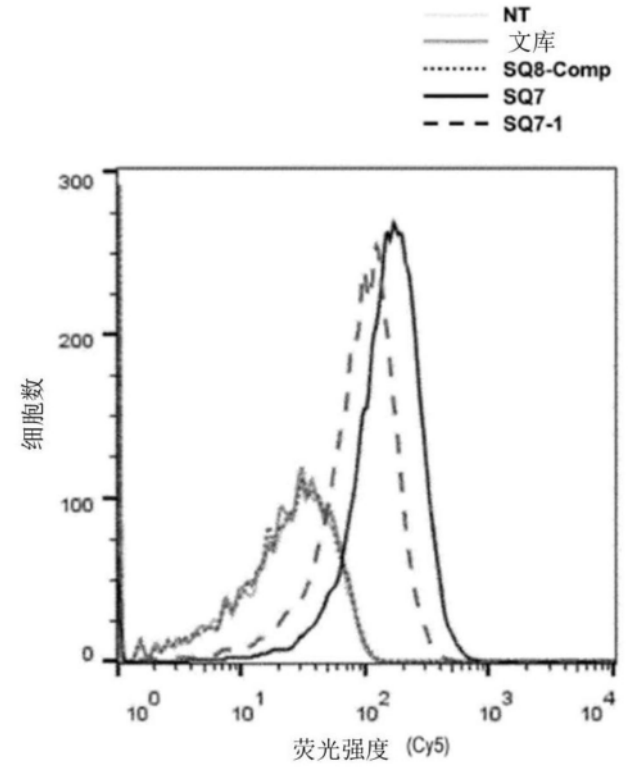

NT
文库
SQ8-Comp
SQ7
SQ7-1
300
200
100
0
细胞数
10^0
10^1
10^2
10^3
10^4
荧光强度 (Cy5)

图6b

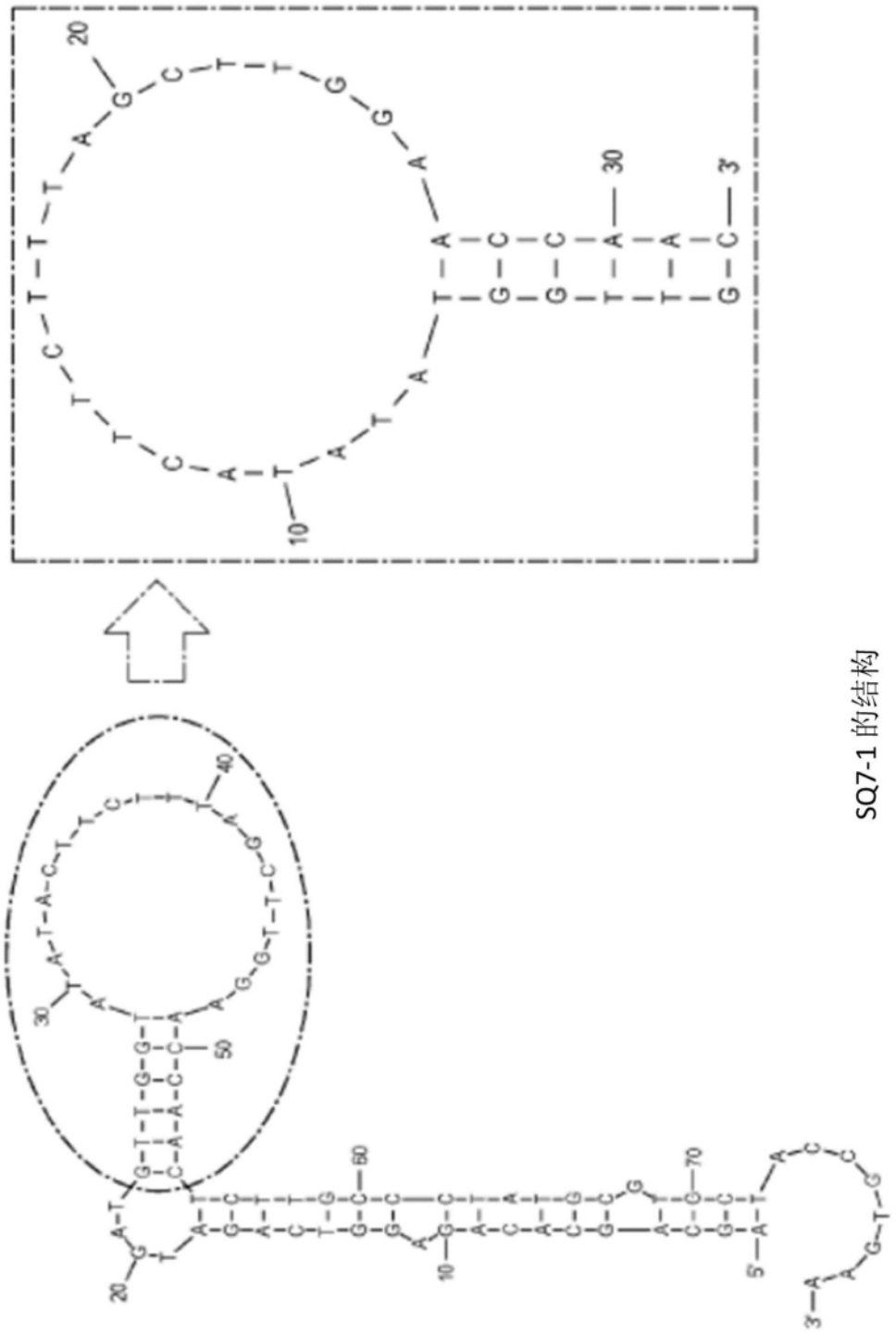


图7

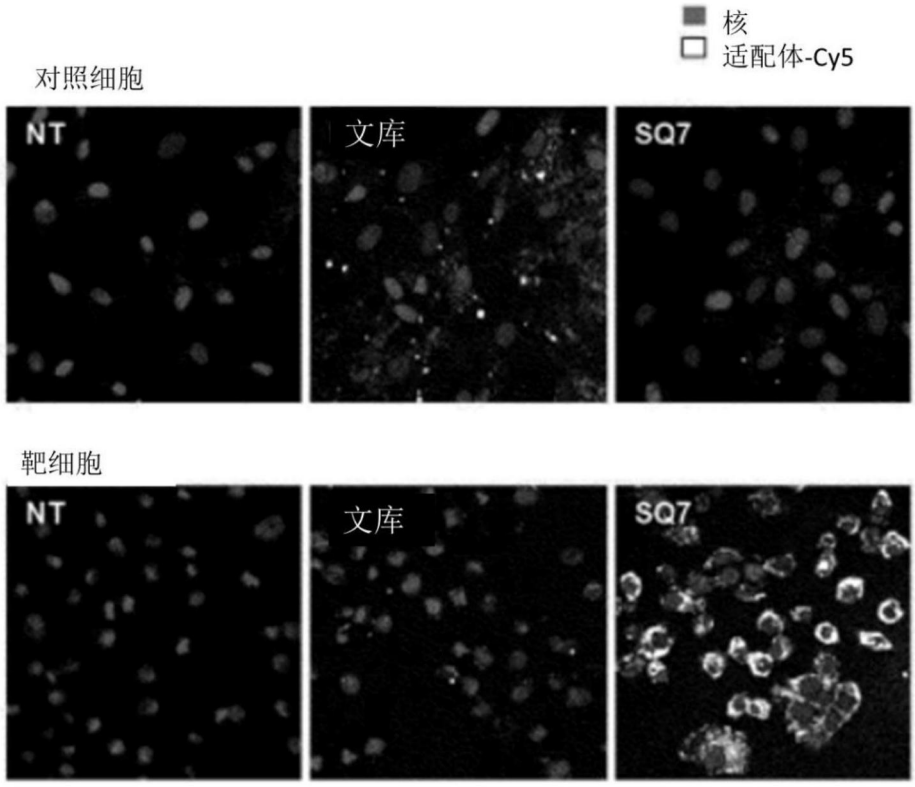

核
适配体-Cy5
对照细胞
NT
文库
SQ7
靶细胞
NT
文库
SQ7

图8

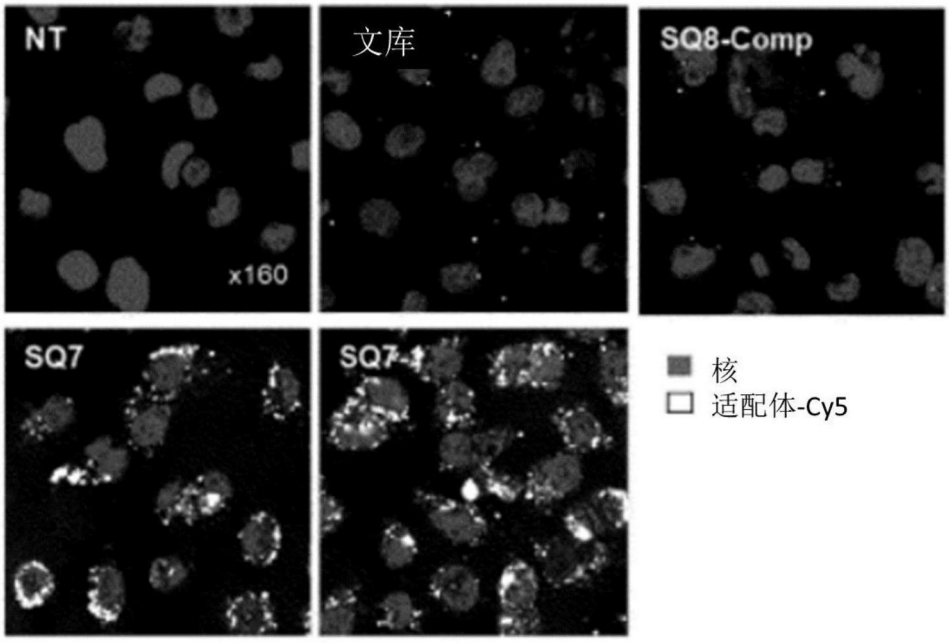

NT
x160
文库
SQ8-Comp
SQ7
SQ7-1
核
适配体-Cy5

图9

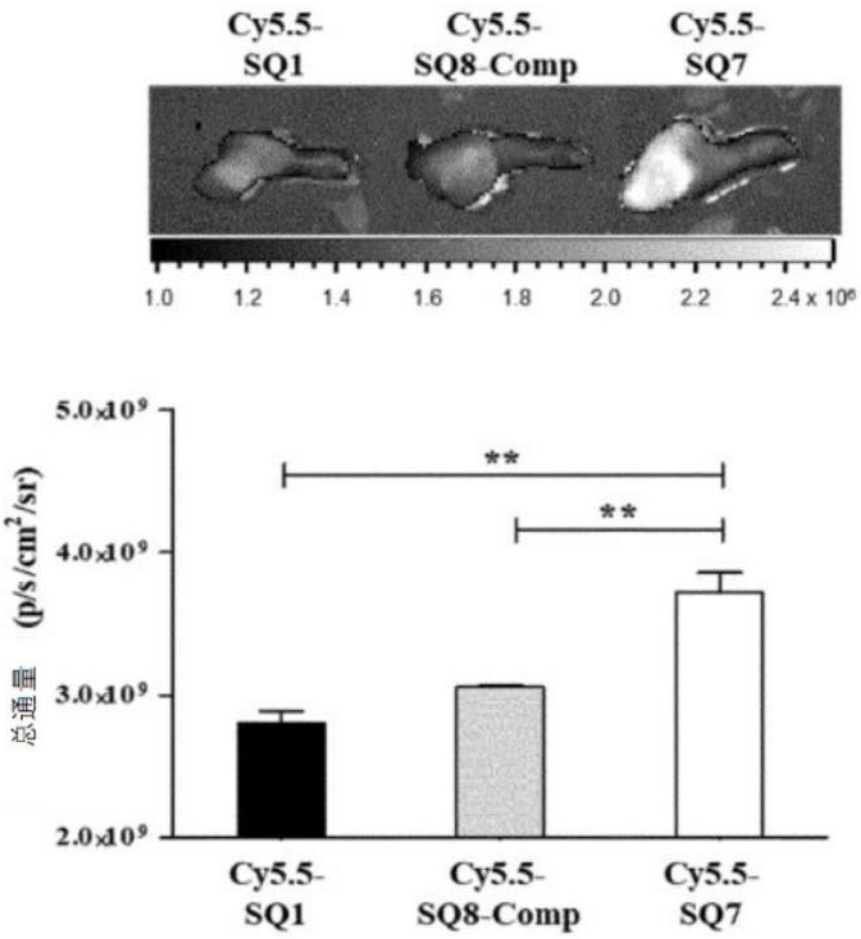

Cy5.5-SQ1
Cy5.5-SQ8-Comp
Cy5.5-SQ7
1.0
1.2
1.4
1.6
1.8
2.0
2.2
2.4 x 10⁶
总通量 (p/s/cm²/sr)
5.0x10⁹
4.0x10⁹
3.0x10⁹
2.0x10⁹
**
**
Cy5.5-SQ1
Cy5.5-SQ8-Comp
Cy5.5-SQ7

图10

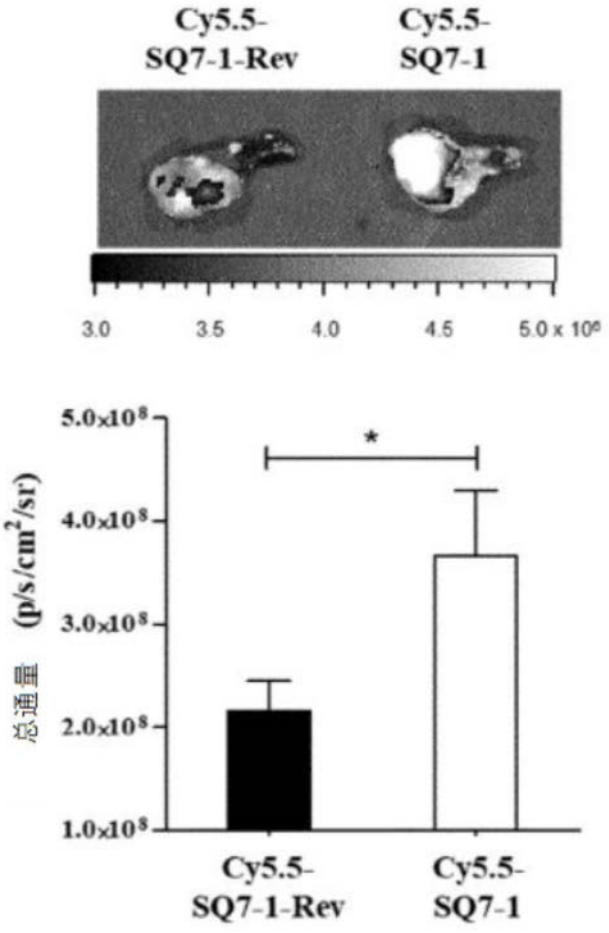

Cy5.5-
SQ7-1-Rev
Cy5.5-
SQ7-1
3.0
3.5
4.0
4.5
5.0 x 10⁶
5.0x10⁸
4.0x10⁸
3.0x10⁸
2.0x10⁸
1.0x10⁸
总通量 (p/s/cm²/sr)
*
Cy5.5-
SQ7-1-Rev
Cy5.5-
SQ7-1

图11

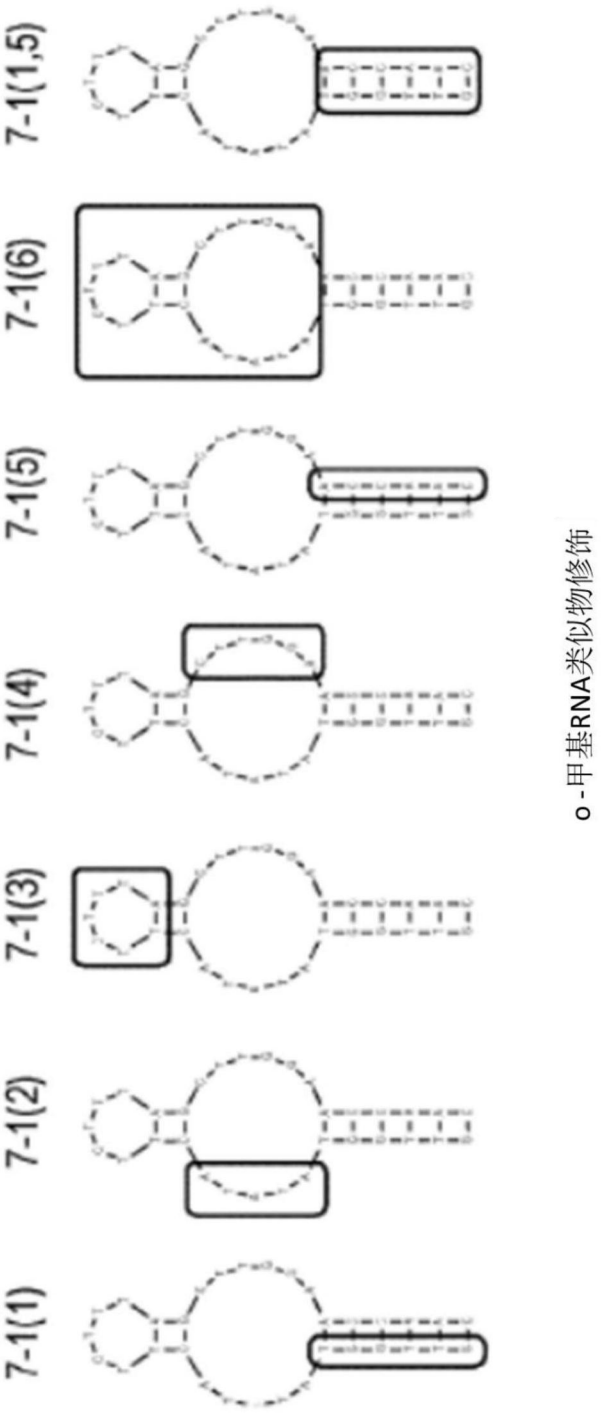


图12a

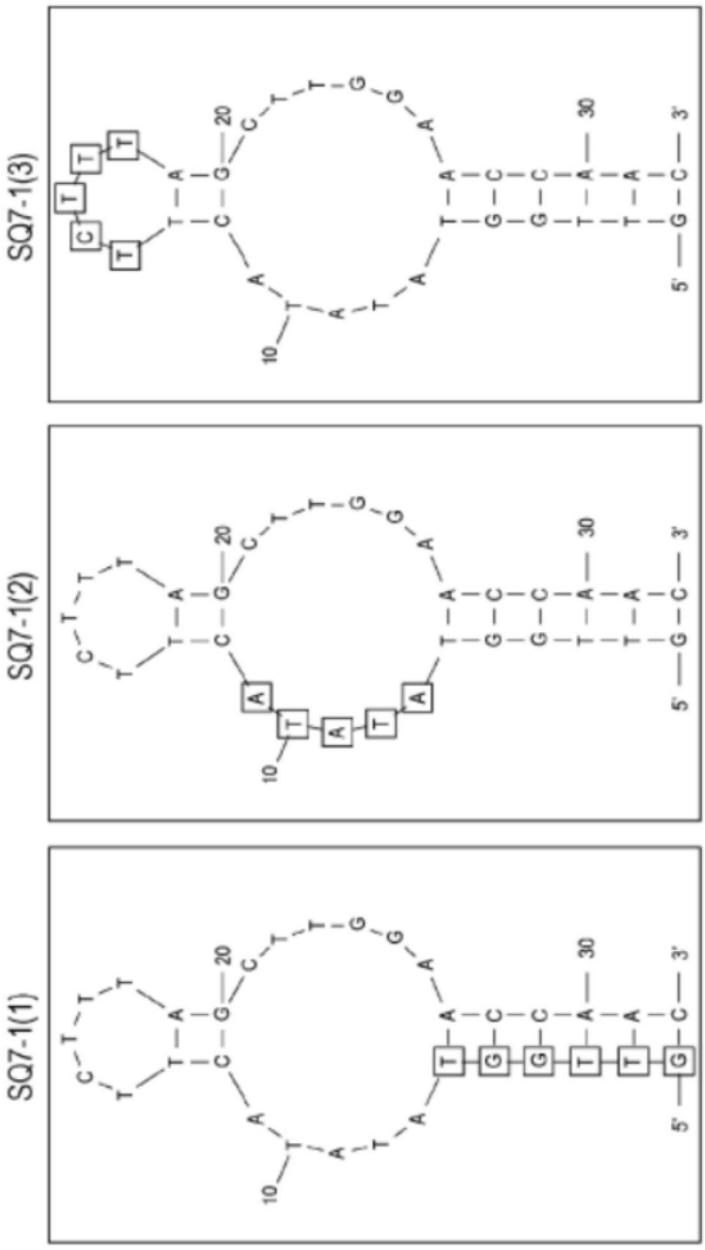


图12b

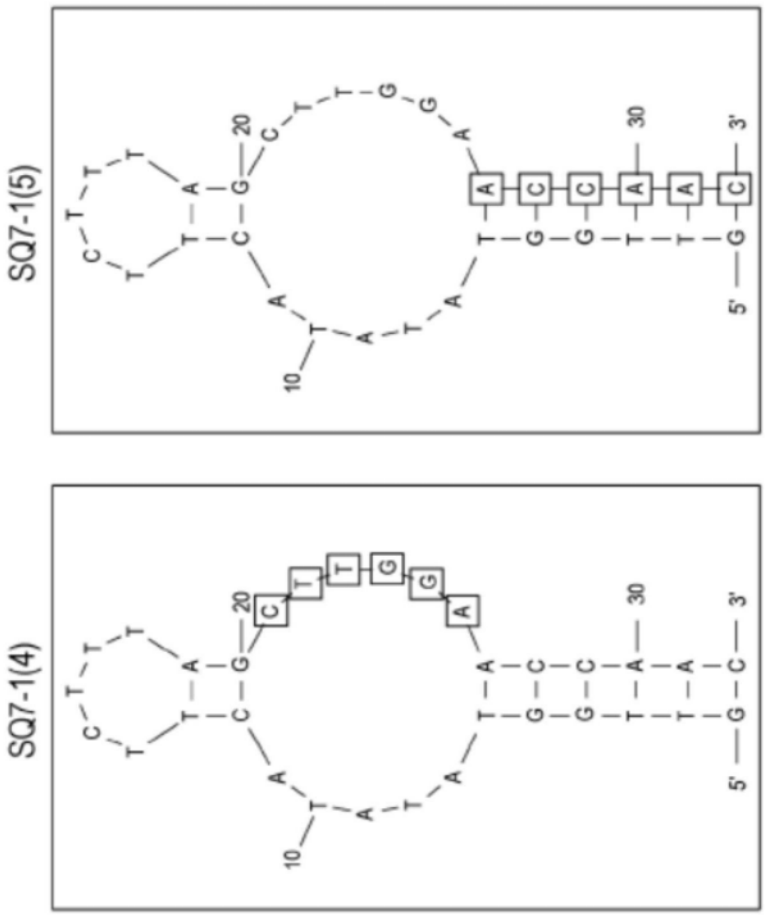


图12c

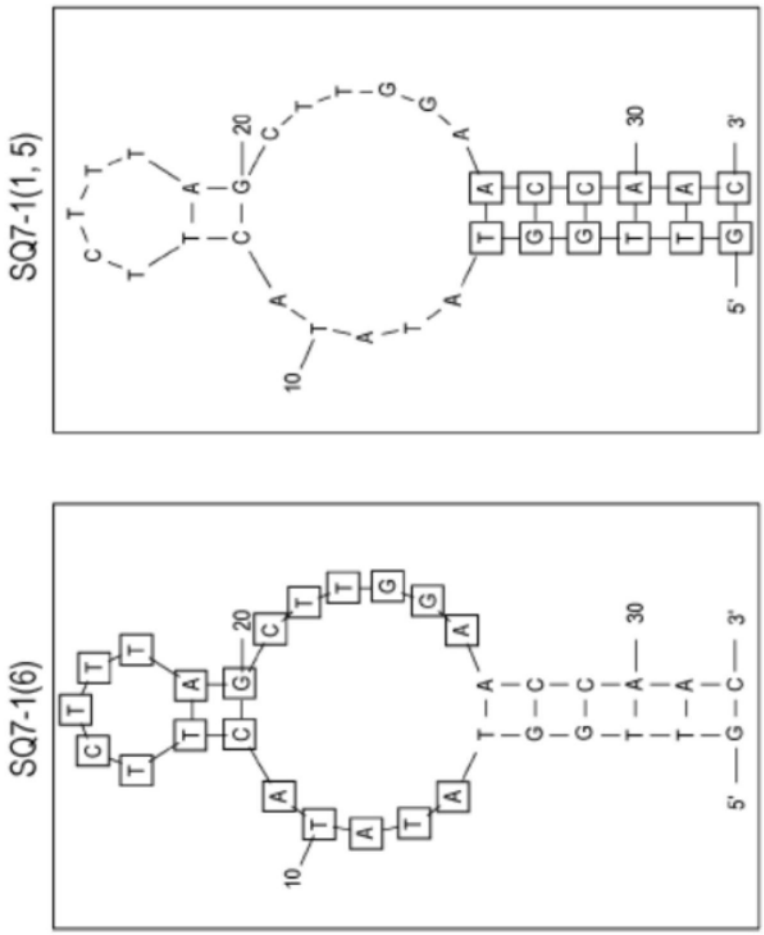


图12d

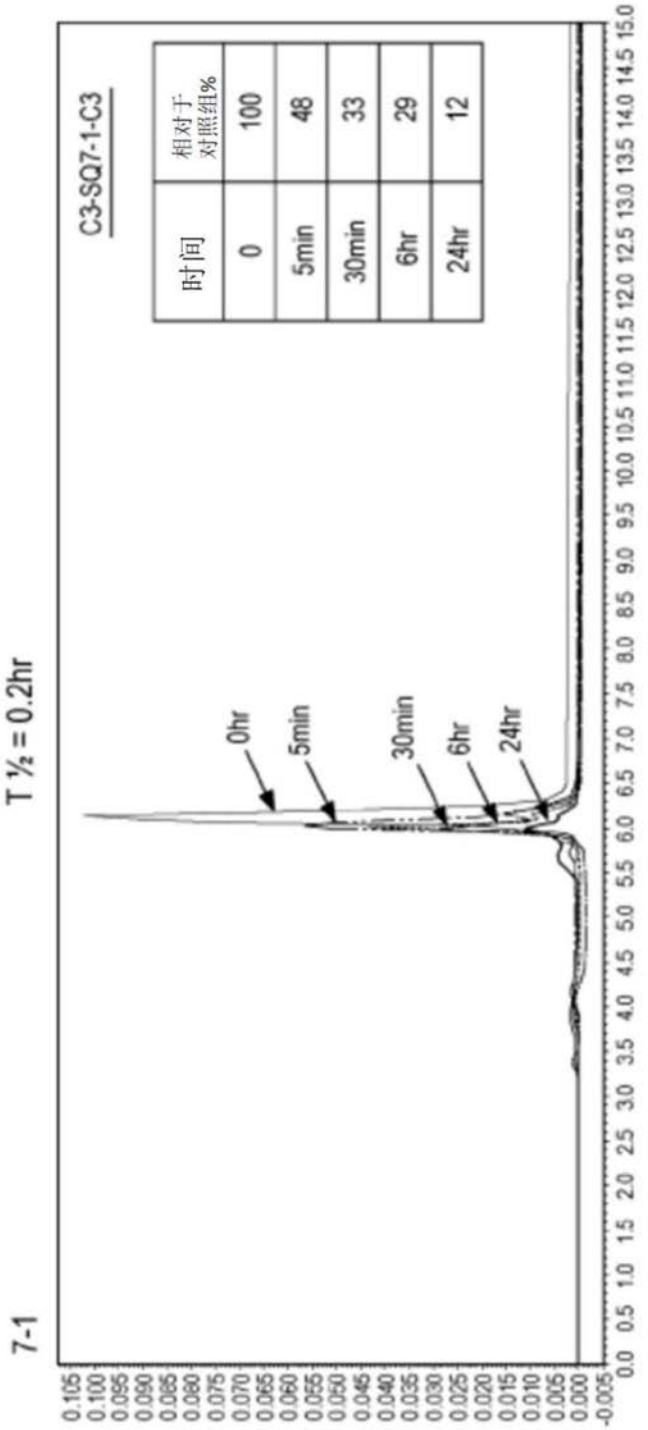

C3-SQ7-1-C3
时间
相对于对照组%
0
100
5min
48
30min
33
6hr
29
24hr
12
T ½ = 0.2hr
7-1
0hr
5min
30min
6hr
24hr

图13a

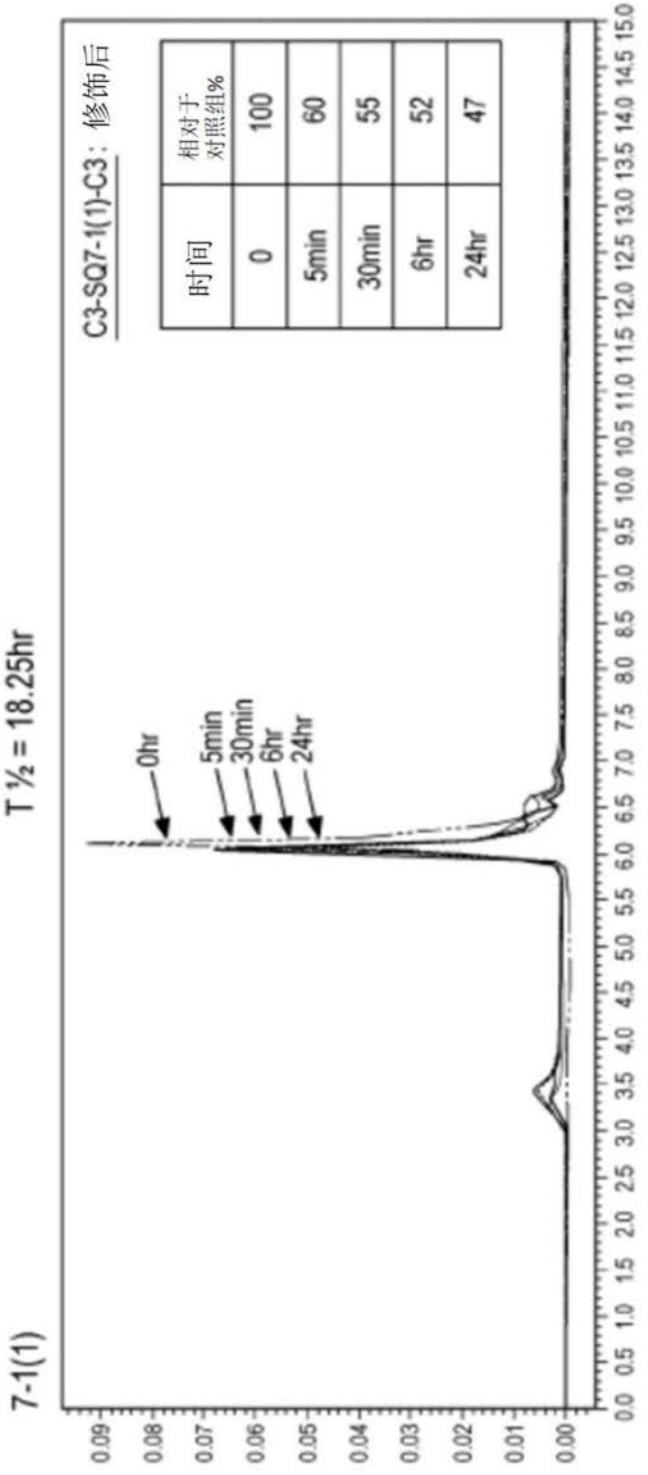

C3-SQ7-1(1)-C3：修饰后
时间 | 相对于对照组%
0 | 100
5min | 60
30min | 55
6hr | 52
24hr | 47
T ½ = 18.25hr
0hr
5min
30min
6hr
24hr
7-1(1)

图13b

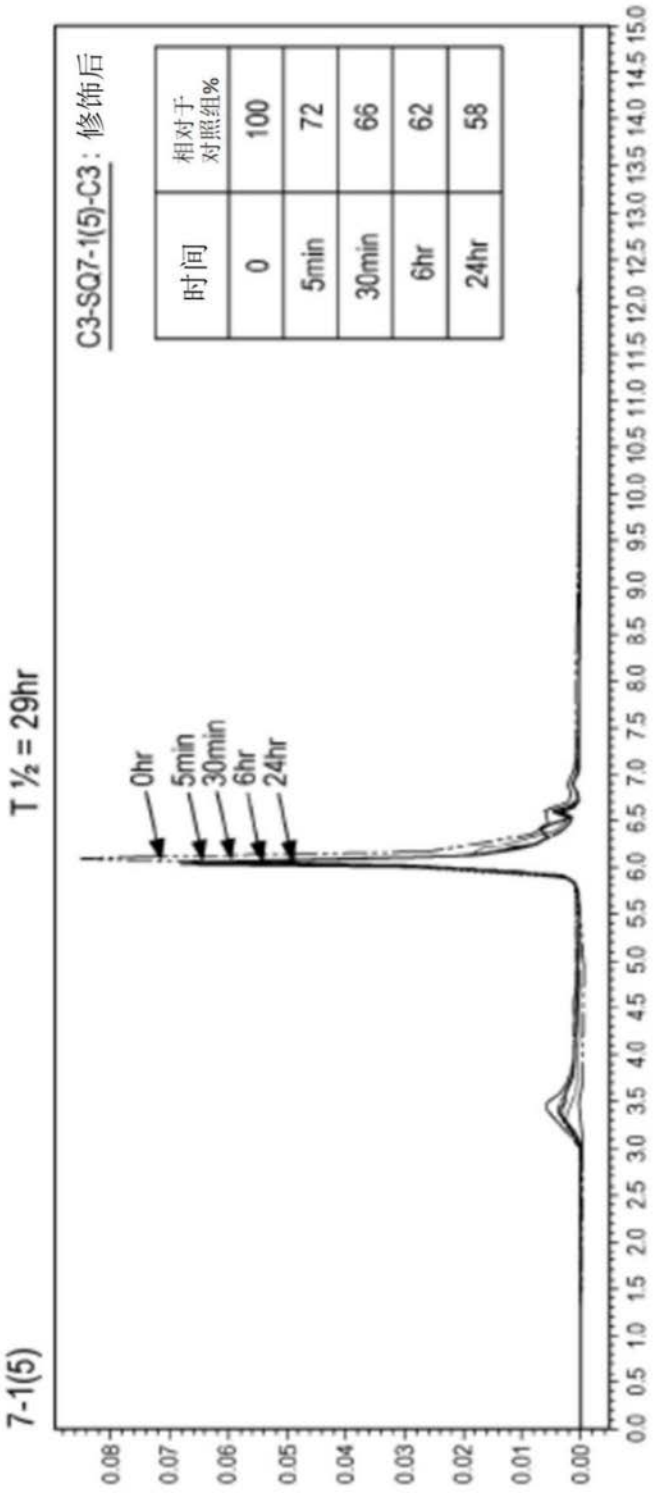

C3-SQ7-1(5)-C3：修饰后
时间 | 相对于对照组%
0 | 100
5min | 72
30min | 66
6hr | 62
24hr | 58
T ½ = 29hr
0hr
5min
30min
6hr
24hr
7-1(5)

图13c

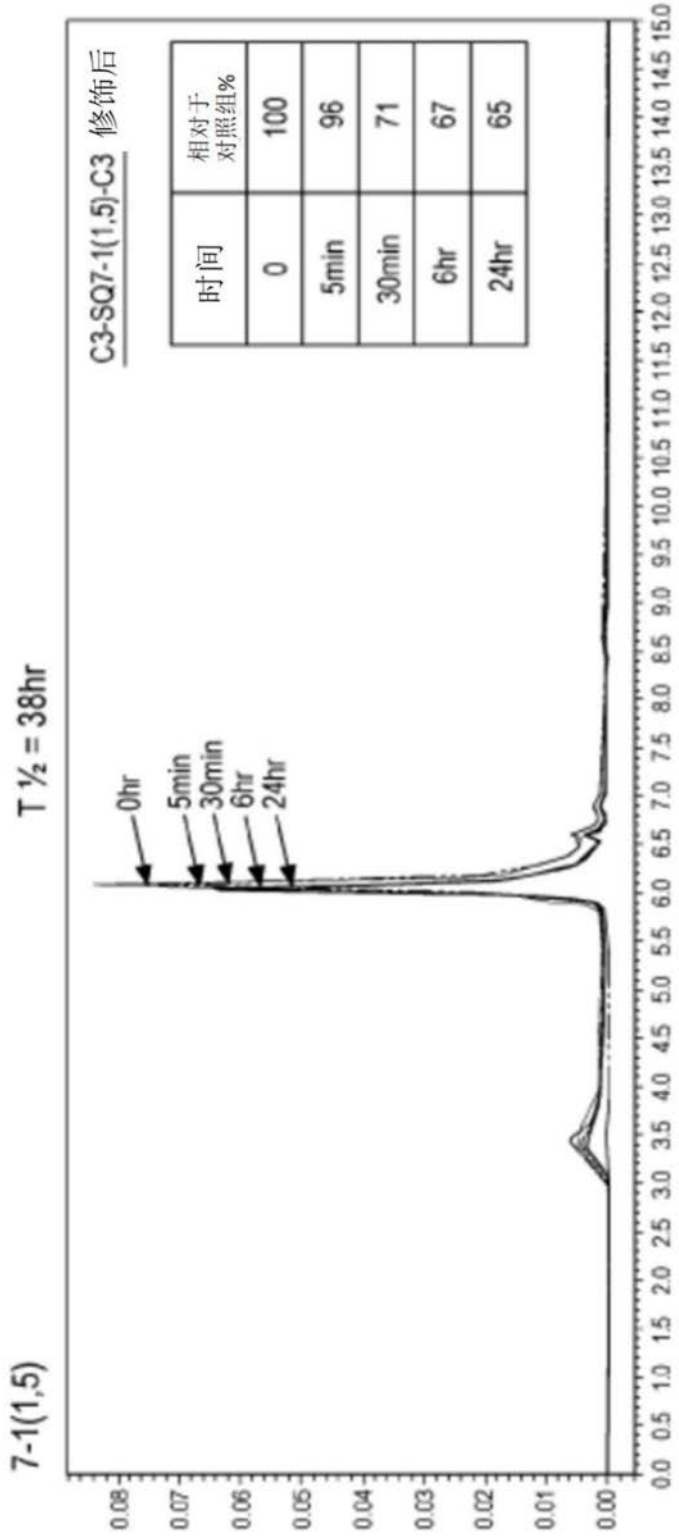

C3-SQ7-1(1,5)-C3 修饰后
时间 | 相对于对照组%
0 | 100
5min | 96
30min | 71
6hr | 67
24hr | 65
T ½ = 38hr
0hr
5min
30min
6hr
24hr
7-1(1,5)

图13d

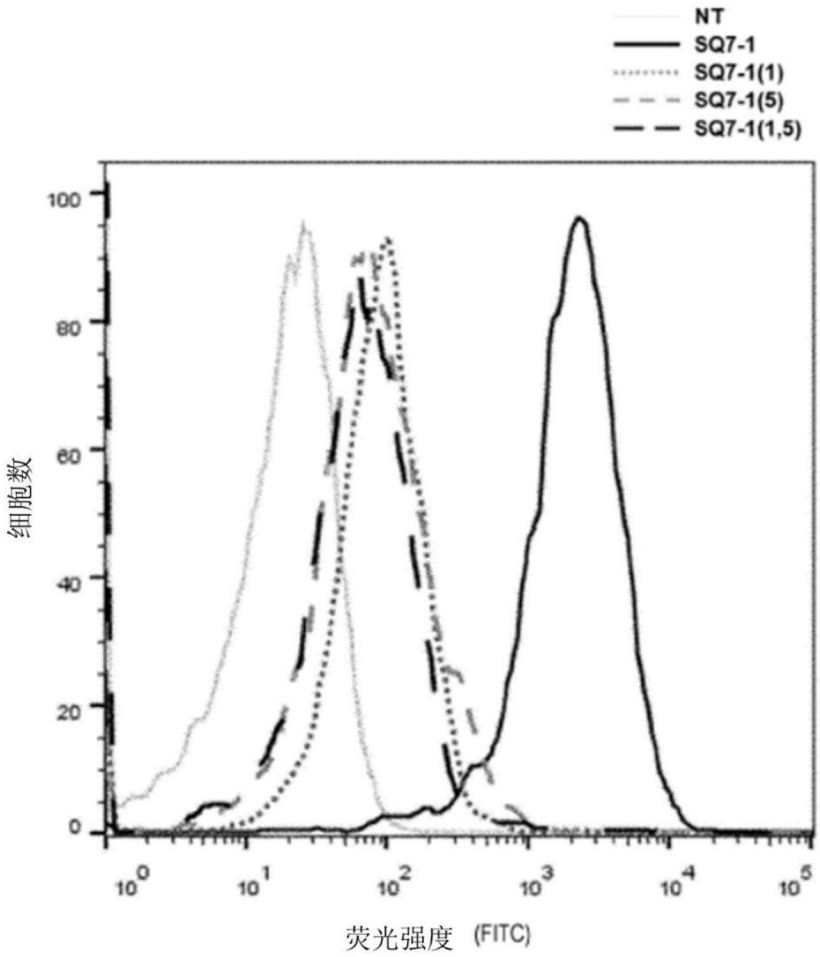

NT
SQ7-1
SQ7-1(1)
SQ7-1(5)
SQ7-1(1,5)
细胞数
100
80
60
40
20
0
10^0
10^1
10^2
10^3
10^4
10^5
荧光强度 (FITC)

图14

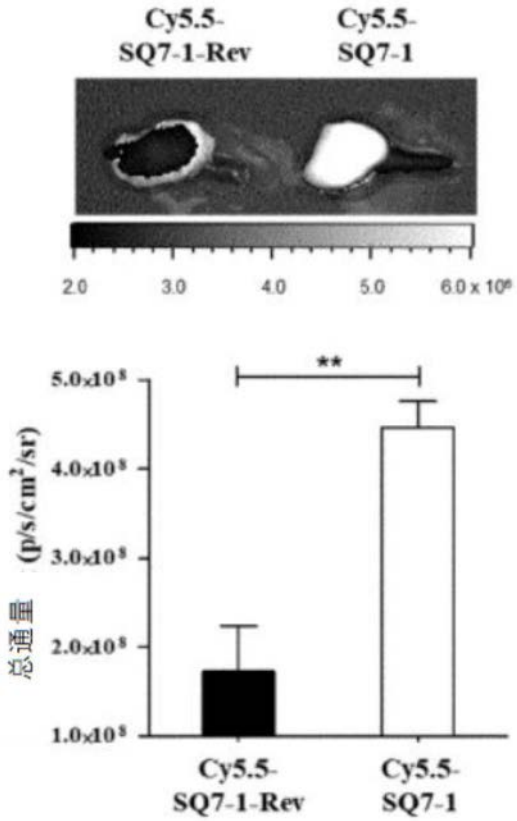

Cy5.5-
SQ7-1-Rev
Cy5.5-
SQ7-1
2.0
3.0
4.0
5.0
6.0 x 10⁶
**
5.0x10⁵
4.0x10⁵
3.0x10⁵
2.0x10⁵
1.0x10⁵
总通量 (p/s/cm²/sr)
Cy5.5-
SQ7-1-Rev
Cy5.5-
SQ7-1

图15

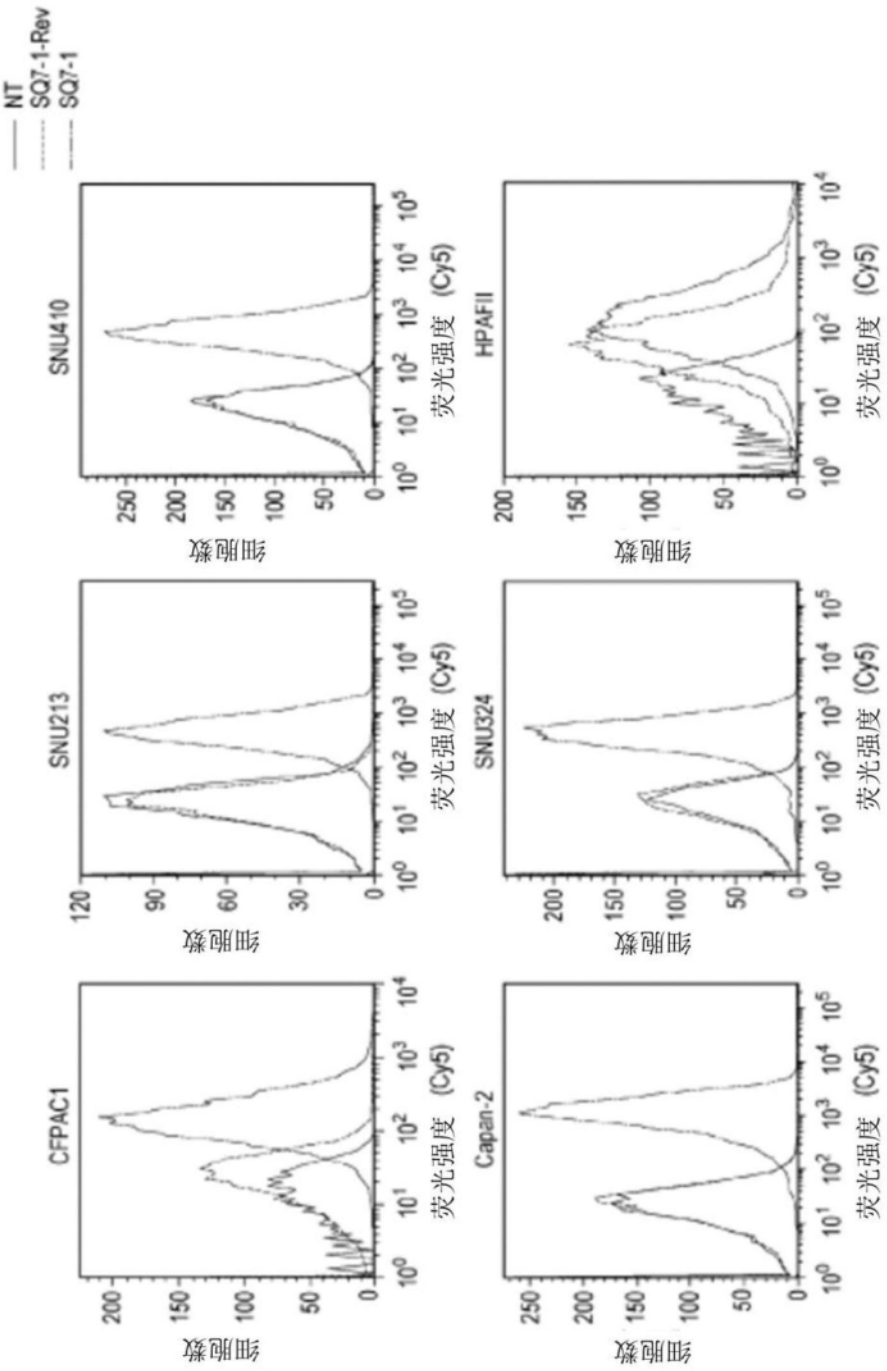

NT
SQ7-1-Rev
SQ7-1
SNU410
HPAFII
SNU213
SNU324
CFPAC1
Capan-2
细胞数
荧光强度 (Cy5)

图16a

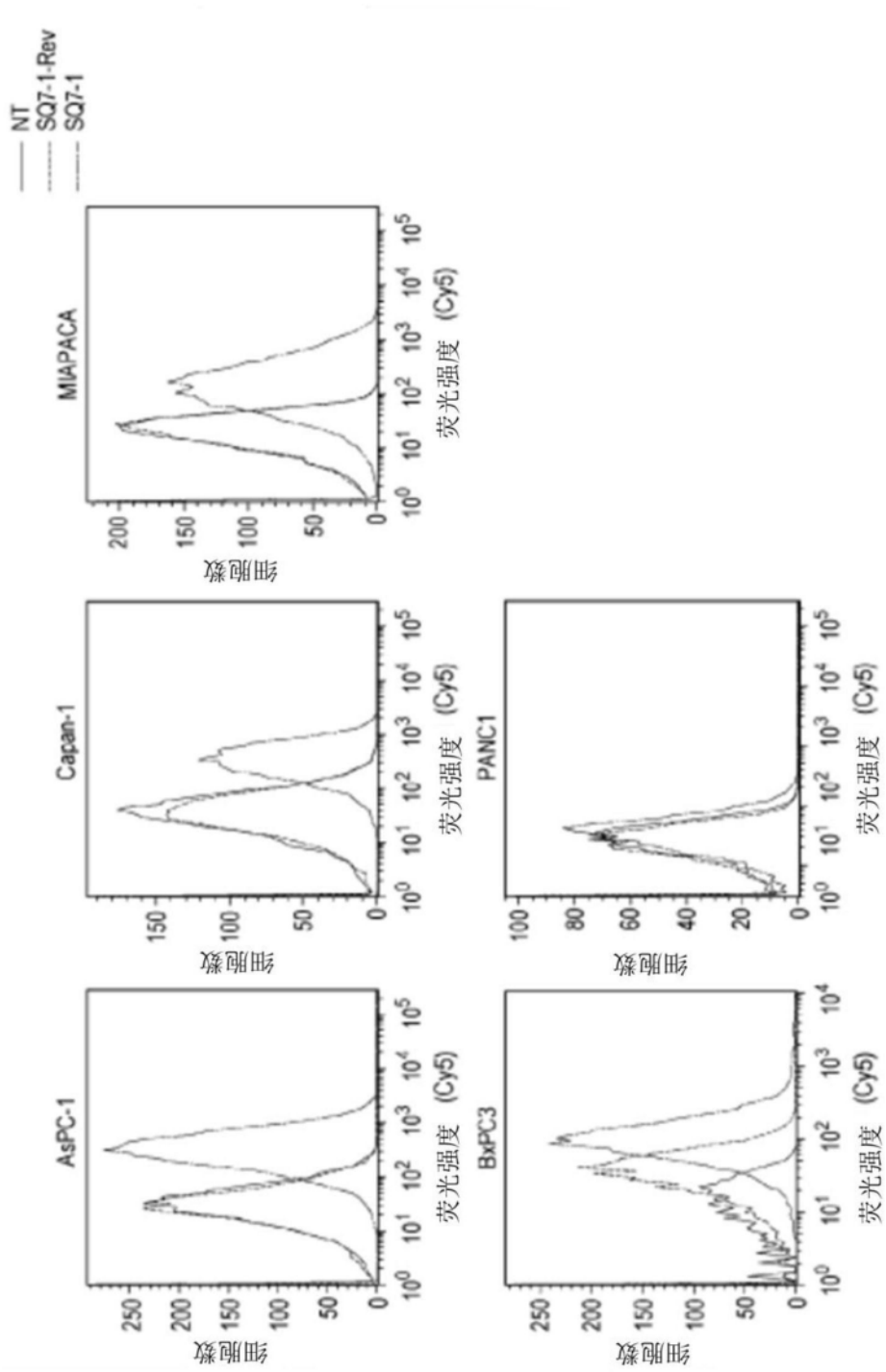

NT
SQ7-1-Rev
SQ7-1
MIAPACA
Capan-1
PANC1
AsPC-1
BxPC3
细胞数
荧光强度 (Cy5)

图16b

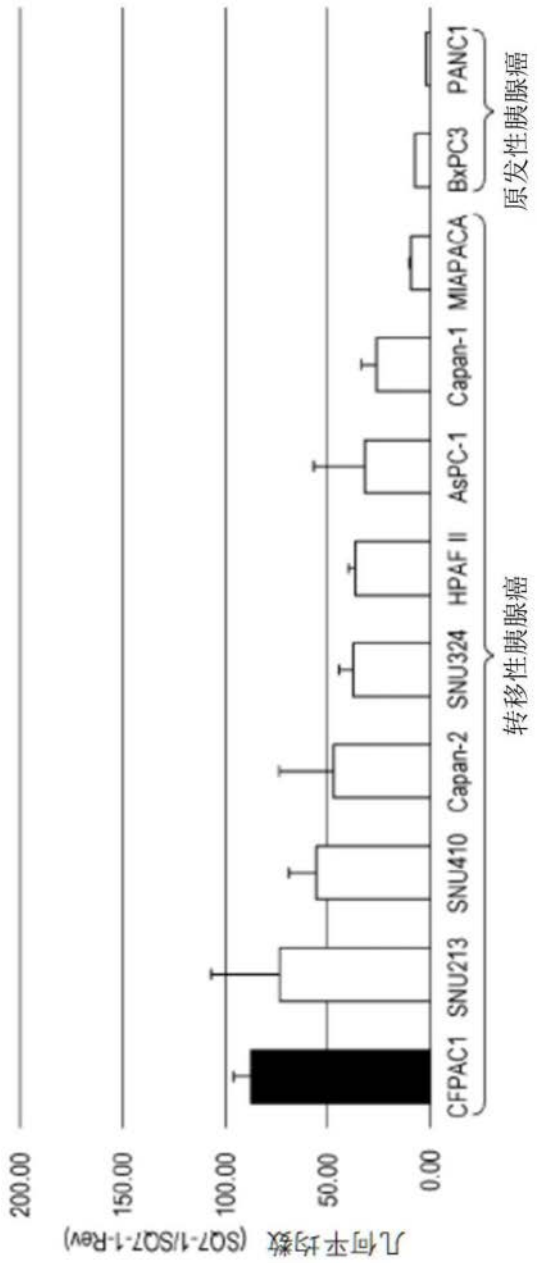

几何平均数 (SO7-1/SO7-1-Rev)
200.00
150.00
100.00
50.00
0.00
CFPAC1
SNU213
SNU410
Capan-2
SNU324
HPAF II
AsPC-1
Capan-1
MIAPACA
BxPC3
PANC1
转移性胰腺癌
原发性胰腺癌

图17

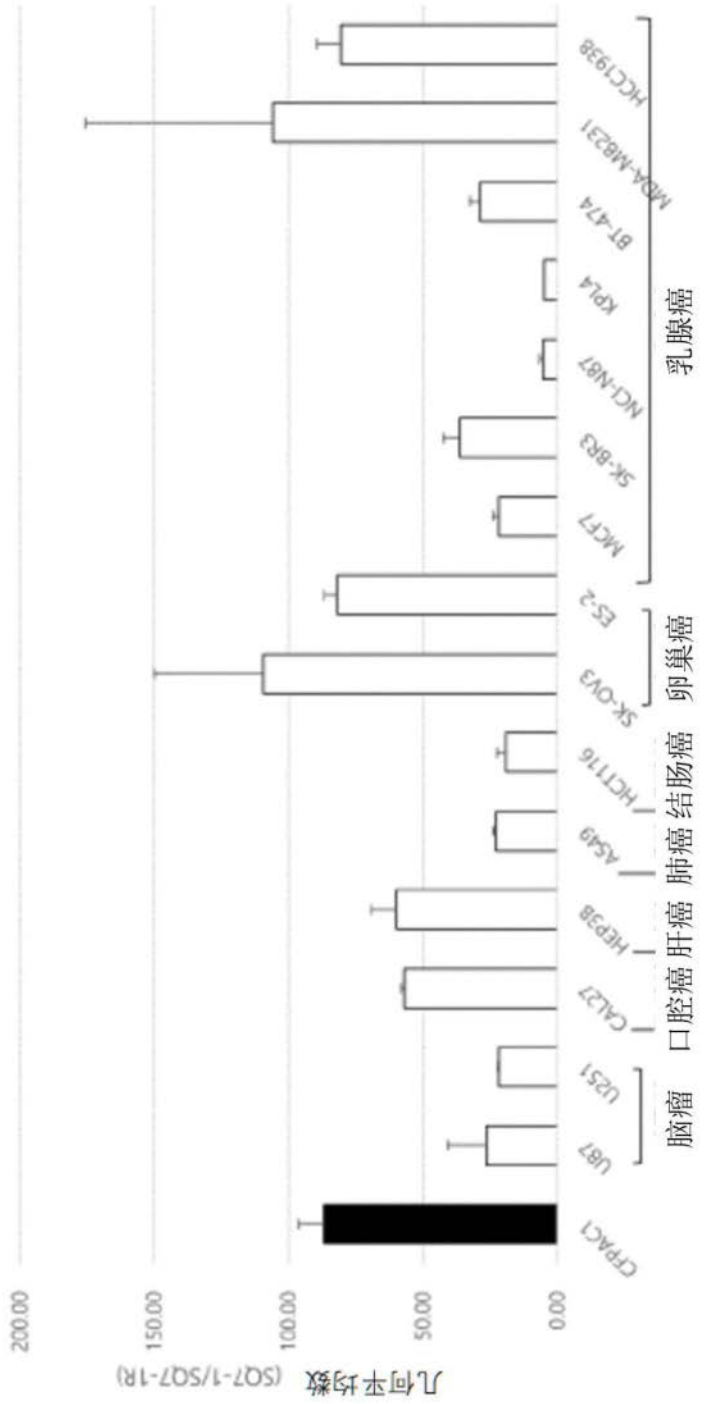

几何平均数 (SQ7-1/SQ7-1R)
200.00
150.00
100.00
50.00
0.00
CFPAC1
U87
U251
CAL27
HEP38
A549
HCT116
SK-OV3
ES-2
MCF7
SK-BR3
NCI-N87
KPL4
BT-474
MDA-MB231
HCC1938
脑瘤
口腔癌
肝癌
肺癌
结肠癌
卵巢癌
乳腺癌

图18

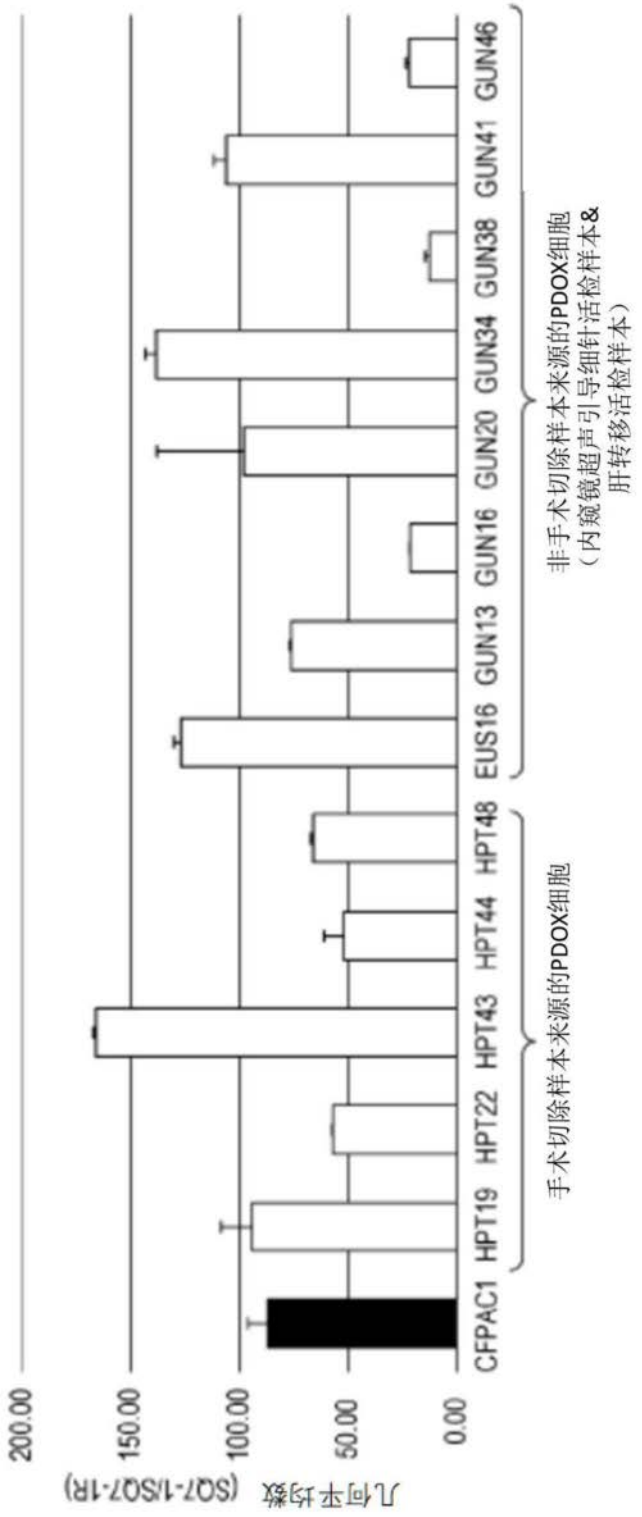

200.00
150.00
100.00
50.00
0.00
几何平均数 (SQ7-1/SQ7-1R)
CFPAC1
HPT19
HPT22
HPT43
HPT44
HPT48
EUS16
GUN13
GUN16
GUN20
GUN34
GUN38
GUN41
GUN46
手术切除样本来源的PDOX细胞
非手术切除样本来源的PDOX细胞
（内窥镜超声引导细针活检样本&
肝转移活检样本）

图19