



(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公告本

(11)證書號數：TW I443107 B

(45)公告日：中華民國 103 (2014) 年 07 月 01 日

(21)申請案號：100149470

(22)申請日：中華民國 100 (2011) 年 12 月 29 日

(51)Int. Cl. : C07K16/18 (2006.01)

A61K39/395 (2006.01)

C07K4/12 (2006.01)

(71)申請人：財團法人工業技術研究院(中華民國) INDUSTRIAL TECHNOLOGY RESEARCH INSTITUTE (TW)

新竹縣竹東鎮中興路 4 段 195 號

(72)發明人：邱偉鈞 CHIU, WEI CHUN (TW)；周民元 CHOU, MIN YUAN (TW)

(74)代理人：洪澄文；顏錦順

(56)參考文獻：

WO 99/61629A1

WO 2009/079922A1

審查人員：林佳慧

申請專利範圍項數：40 項 圖式數：10 共 0 頁

(54)名稱

人源化之抗人類細胞表面抗原 CD 3 4 之單株抗體及其應用

HUMANIZED ANTI-HUMAN CD34 MONOCLONAL ANTIBODY AND USES THEREOF

(57)摘要

本案提供人源化之抗人類細胞表面抗原 CD34 之單株抗體，包括具有序列識別號 1 所示之胺基酸序列的重鏈變異區及具有序列識別號 2 所示之胺基酸序列的輕鏈變異區。

A humanized anti-human CD34 monoclonal antibody is provided, including a heavy chain variable region comprising an amino sequence as set forth in SEQ ID No. 1 and a light chain variable region comprising an amino sequence as set forth in SEQ ID No. 2.

hMy10 VH: EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAVSGFSLT SHGVHWVRQA PGKGLEWLGV IWGAGRTDYN
AAFISRLSIS RDISKSQVYL QMNSLRAEDT AVYYCARNRY ESYFDYWGGG TLVTVSS

hMy10 VL: DIQMTQSPSS LSASVGDRVIT ITCRSSQNLV HSNQNTYLHW YQQKPGKAPK LLIIYKVSNR
SGVPDRFSGS GSGTEFTLTI SSLQPEDFAT YYCSQSTHVP LTFGGGTKVE IKR

第 3 圖

發明專利說明書

(本說明書格式、順序，請勿任意更動，※記號部分請勿填寫)

※申請案號：100149470

C07K 16/18 (2006.01)

※申請日：100.12.29

※IPC 分類：

A61K 39/395 (2006.01)

C07K 4/12 (2006.01)

一、發明名稱：(中文/英文)

人源化之抗人類細胞表面抗原 CD34 之單株抗體及其應用/HUMANIZED ANTI-HUMAN CD34 MONOCLONAL ANTIBODY AND USES THEREOF

二、中文發明摘要：

本案提供人源化之抗人類細胞表面抗原 CD34 之單株抗體，包括具有序列識別號 1 所示之胺基酸序列的重鏈變異區及具有序列識別號 2 所示之胺基酸序列的輕鏈變異區。

三、英文發明摘要：

A humanized anti-human CD34 monoclonal antibody is provided, including a heavy chain variable region comprising an amino sequence as set forth in SEQ ID No. 1 and a light chain variable region comprising an amino sequence as set forth in SEQ ID No. 2.

四、指定代表圖：

(一)本案指定代表圖為：第 (3) 圖。

(二)本代表圖之元件符號簡單說明：

無。

五、本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式：

無。

六、發明說明：

【發明所屬之技術領域】

本案關於人源化之單株抗體，特別是關於與人類幹細胞表面抗原 CD34 結合的人源化單株抗體。

【先前技術】

人類幹細胞為一群尚未分化的細胞，具有分裂增殖成與原來相同的幹細胞以及分化成各種特定功能的細胞，例如造血幹細胞(hematopoietic stem cell; HSC)。造血幹細胞存在於人類骨髓與周邊血液中，具有自我更新與分化成各種其他類型細胞的能力。早期因為 HSC 的外在形態與單核球細胞類似，因此不易辨識，直到其表面蛋白被確定才可自眾多細胞中被分離出來。CD34 為表現在造血幹細胞細胞膜上的一種穿膜醣蛋白(transmembrane glycoprotein)，其分子量大小約為 110 kDa，是最早用來辨識人類造血幹細胞的一個生物標記(Civin, et al. 1984; Krause, D.S. et al. 1996)。目前，利用抗體專一性結合於 CD34 蛋白的特性，可以將 HSC 自人類血液中分離出來。分離出的 HSC 經過移植，也已經應用於治療多種人類疾病，例如惡性的血液疾病或腫瘤疾病。而如何自血液中獲得足夠量且純度夠的 HSC 是目前造血幹細胞移植治療中面臨最主要的問題(Shpall EJ, et al. 1994)。CD34⁺造血幹細胞除了應用於血液相關疾病的移植治療外，近幾年來科學家也發現純化過的 CD34⁺的造血幹細胞會再經過分化成為一種內皮型態的細

胞，稱為內皮前驅細胞(endothelial progenitor cells; EPC)。EPC 目前已知可促進血管新生(neovascularization)與再內皮化(re-endothelialization)的功能。有越來越多的研究結果顯示，這兩種功能對於心血管疾病的治療與傷口修復有很大的關係。因此，如何增加與截獲血液中的 EPC 是未來醫療器材應用的新方向(Carmen U and Stefanie D, 2004; Jiro A, et al. 2005)。綜合以上所述，利用抗體對 HSC 或 EPC 上表面抗原 CD34 的結合能力，可增加這些細胞對治療人類疾病的應用價值。

抗 My10 單株抗體是最早被發展用來結合 HSC 表面抗原 CD34 的單株抗體，是以注射人類急性骨髓瘤白血病細胞株-KG1a 進入小鼠體內致免所產生的鼠源抗體，對 CD34 具有高結合能力與專一性。目前已有許多研究利用抗 CD34 抗體做為分離與鑑定 HSC 的報告，是一個具有應用潛力的單株抗體(Watt SM, et al., 1987; W.E. Beschorner et al. 1985)。截至目前為止，抗體應用於 HSC 的純化、分離、標定或 EPC 的截獲等各方面應用都還在使用最初篩選獲得的鼠源抗體。然而，應用這些鼠源抗體可能衍生其他的問題，例如在進行人類周邊血 HSC 的分離純化時，可能因為純化管柱上鼠源抗體的脫離而進入即將移植進入人體的 HSC，或在進行 HSC 標定時，鼠源抗體隨著標定物進入人體，以及使用於人體中之生醫材料表面為經過鼠源抗體所處理。而鼠源抗體應用於人體則存在著潛在的風險。

鼠科動物之單株抗體於臨床實施上之主要阻礙在於其

可能在病患中引起人類抗鼠科動物抗體(human anti-murine antibody, HAMA)反應(Owens and Young, 1994; Sandhu, 1992; Schroff et al., 1985)。因此，為改善臨床使用的效能，已使用基因工程技術將屬於鼠科動物之胺基酸殘基置換為人類對應的胺基酸殘基，以減少誘發致免疫原性(immunogenicity)的可能性。

理想的抗體人源化應可維持抗體對抗原的專一性與親和力，並儘可能減低致免疫原性。到目前為止，對於抗體人源化已使用許多方式來進行，例如由鼠科抗原結合變異區基因融合至人類抗體不變區所組成的嵌合抗體(chimeric antibodies)為最早試圖用以減少致免疫原性(Morrison et al., 1984)。然而，嵌合抗體仍然產生非期望之抗變異區反應(Bruggemann et al., 1989)。互補決定區段移植法(complementarity determining region grafting, CDR-grafting)為1986年由Jones等人所提出之另一種人源化抗體的方式，也是目前世界上生技醫藥公司廣泛應用的抗體人源化技術。CDR-移植法(CDR-grafting)主要為將啮齒類抗體之互補決定區段轉移至人類抗體的Fv支架(Fv framework residue, FR)。不幸的是，介於互補決定區段與Fv支架之間的介面如有重要鼠源支架胺基酸被置換，將會嚴重妨礙與抗原的結合能力。最初的互補決定區段移植抗體傾向於失去來源抗體所具有的結合親和力，因此需要回復一些對於互補決定區段結構而言為必須的鼠源支架胺基酸的額外工作。但此方式不但耗時且成功機率不高。現今，隨著蛋白

質結構生物學的發展，可以在進行抗體人源化之前先以結構同源性模擬的方式建構出鼠源抗體的 3D 結構，再以此蛋白質結構找出 Fv 支架上可能妨礙抗原結合的重要胺基酸。之後在人源抗體骨架置換時保留這些重要的鼠源胺基酸，即可提高保留原抗體結合能力的機率，完成鼠源抗體人源化。

【發明內容】

因此，本案提供一種與人類細胞表面抗原 CD34 專一性結合的人源化單株抗體，包括重鏈變異區及輕鏈變異區，其中該重鏈變異區包括序列識別號 1 所示之胺基酸序列，該輕鏈變異區包括序列識別號 2 所示之胺基酸序列。

本案更提供一種與人類細胞表面抗原 CD34 專一性結合的人源化單株抗體，包括重鏈變異區及輕鏈變異區，其中該重鏈變異區包括由序列識別號 3 所示之核苷酸序列所編碼的胺基酸序列，該輕鏈變異區包括由序列識別號 4 所示之核苷酸序列所編碼的胺基酸序列。

另一方面，本案提供一種分離具有表面抗原 CD34 的人類細胞之方法，包括(i)提供一帶有上述人源化單株抗體的捕捉分子；(ii)混合該捕捉分子與欲分離的生物樣品混合，使該捕捉分子與該生物樣品中具有表面抗原 CD34 之細胞形成一結合分子；及(iii)分離該結合分子。

本案更提供一種體外標記細胞的方法，包括：(i) 提供一帶有上述人源化單株抗體之標記分子；及(ii) 混合該標

記分子與欲標記的生物樣品，使該標記分子與該生物樣品中具有表面抗原 CD34 細胞形成一結合分子。

本案再提供一種顯色劑，包括上述人源化單株抗體以及於該人源化單株抗體表面結合一顯色物質，以及一標記物，與該抗體連接。

再一方面，本案提供一種截獲細胞的裝置，該裝置包括一與液體動態接觸的表面，其中該表面上擔載如上述人源化單株抗體，用以截獲具有表面抗原 CD34 的人類細胞。

本案更提供一種磁珠，包括上述人源化單株抗體；以及磁性基材，用以擔載該抗體。

本發明之具體實施詳細說明如下，然而以下的實施例僅用於進一步揭露本發明之技術內容，不應藉以限制本案的發明範疇。

【實施方式】

本案所述之人源化單株抗體係基於已知的可與人類幹細胞表面抗原 CD34 結合的鼠源抗 My10 單株抗體(mMy10 IgG)，經過人源化過程所改良者。

本案一實施態樣中，人源化的步驟包括：(1)透過同源模擬程序(homology modeling process)建構鼠源 mMy10 IgG 的 3D 結構，以及確定與抗原結合有關的胺基酸殘基；以及(2)保留 mMy10 IgG 變異區中與抗原結合的必要胺基酸殘基，藉由 CDR 移植法(CDR-grafting)移植到人類抗體的骨架(backbone)，以完成人源化過程。

在此實施態樣中，同源模擬程序係透過電腦軟體分析及確認 mMy10 IgG 變異區的胺基酸序列的同源性，並根據已揭露的 mMy10 IgG 相關資訊，模擬出如第 1 圖所示之 mMy10 IgG 變異區的 3D 結構。如第 1 圖中所示的 mMy10 IgG 的變異區結構，圖右方的粗實線部位表示重鏈變異區 (V_H)，圖左方的細實線部位表示輕鏈變異區 (V_L)，圖中間以虛線表示的線圈代表 CDR 區域，球狀體表示與抗原結合能力有關的胺基酸，為需要被保留的胺基酸。

根據同源模擬結果，合成與人源化 My10 IgG 變異區的胺基酸序列對應的 cDNA，與人類 IgG1 的骨架進行重組。之後，經轉染(transfection)進入細胞中，表現人源化 My10 IgG 抗體(hMy10 IgG)。

本案所述人源化抗體，具有下述特徵：(a)在重鏈變異區中包含序列識別號 1 所示之胺基酸序列，或者由序列識別號 3 所示之核苷酸編碼(encoding)的胺基酸序列；(b)在輕鏈變異區中包含序列識別號 2 所示之胺基酸序列，或者由序列識別號 4 所示之核苷酸編碼的胺基酸序列；以及(c)維持與原有鼠源單株抗體相同的抗體專一性及結合能力，該結合能力可達到奈莫耳(nanomole)的程度，具有其應用性。

因此，本案之人源化單株抗體可專一性結合於人類細胞表面抗原 CD34，特別是人類幹細胞(stem cell)、人類造血幹細胞(HSC)及幹細胞分化的內皮前驅細胞(endothelial progenitor cell, EPC)。

再者，本案之人源化單株抗體可減少習知使用鼠源抗

體可能產生的人類抗鼠科動物抗體(human anti-murine antibody, HAMA)反應。因此可減少誘發致免疫源性(immunogenicity)的機率，以及增加臨床上使用的生物安全性。

本案另一實施態樣中，提供一種體外分離具有表面抗原 CD34 之人類細胞的方法，包括(i) 提供一帶有申請專利範圍第 1 或 2 項所述之人源化單株抗體的捕捉分子；(ii) 混合該捕捉分子與欲分離的生物樣品混合，使該捕捉分子與該生物樣品中具有表面抗原 CD34 之細胞形成一結合分子；及(iii)分離該結合分子。

此實施態樣中，步驟(i)之帶有人源化單株抗體的捕捉分子可包括載體(solid support)、官能基、生物分子或其他可與抗體結合之分子，沒有特別限制。此述的載體可例如微珠(beads)、晶片(chip)或盤(plate)，但不限於此。此述的官能基包括抗體蛋白上可與載體或生物分子形成鍵結的官能基，例如胺基(-NH₂)、巰基(-SH)、羧基(-COOH)或羥基(-OH)。此生物分子可選用習知具有結合專一性的生物分子，例如生物素(biotin)、卵白素(avidin)或鏈黴素(Streptavidin)等。此述的微珠可為商業上可獲得者，例如氧化鐵奈米磁珠(iron oxide particle, IOP)或超順磁化鐵奈米磁珠(Superparamagnetic iron oxide particle, SPIO)，沒有特別限制。當上述人源化單株抗體上結合的生物分子為生物素(biotin)時，較佳使用表面攜帶抗生物素(anti-biotin)的微珠。當使用微珠作為捕捉分子時，步驟(iii)之分離步驟可

採用習知分離微珠的方法，例如以具有強磁鐵之磁座將微珠吸引住。

此實施態樣中可更包括一染色步驟，亦即在步驟(ii)中加入一染色抗體。該染色抗體具有可與上述人源化單株抗體結合之部分以及攜帶顯色物質之部分。此述的與上述人源化單株抗體結合的部位可為人類 IgG 等抗體。此述的顯色物質可例如螢光染劑(fluorochromes)，如 fluorescein isothiocyanate (FITC)、Alexa Fluor 系列螢光染劑、對稱型花青染料(Cyanine Dye, C2, Cy3 and Cy5)等；螢光蛋白(fluorescent protein)，如以光敏素為主的近紅外螢光蛋白(phytochrome-based near-infrared fluorescent protein, iRFP)；生物性冷光(bioluminescence)，如螢火蟲螢光素酶(firefly luciferase, Fluc)、*Gaussia* 螢光素酶(*Gaussia* luciferase, Gluc)；奈米粒子，如量子點(quantum dots)、氧化鐵奈米磁珠(iron oxide magnetic beads)或超順磁氧化鐵奈米磁珠(superparamagnetic iron oxide beads)等等。具體的染色抗體可例如商業上可購得的 Alexa fluor 647 山羊抗人類 IgG 抗體。

以此述實施態樣所截獲的細胞，例如人類幹細胞、人類造血幹細胞(HSC)或幹細胞分化的內皮前驅細胞(EPC)，可進一步應用於自體血液幹細胞的移植或心血管疾病(例如中風)的治療。

基於此述之實施態樣，本案更包括一種磁珠，其包含上述的人源化單株抗體以及用以擔載該抗體的磁性基材。

此述的磁性基材可為商業上可獲得者，例如氧化鐵奈米磁珠 (iron oxide particle, IOP) 或超順磁化鐵奈米磁珠 (Superparamagnetic iron oxide particle, SPIO)。藉由官能基或生物分子的結合性質，可使磁性基材與上述單株抗體結合。此述的官能基包括可與抗體結合之官能基，沒有特別限制，具體例如胺基(-NH₂)、巰基(-SH)、羧基(-COOH)或羥基(-OH)。此述的生物分子可例如生物素(biotin)、卵白素(avidin)或鏈黴素(Streptavidin)等。根據磁性基材的特性，本案所述之磁珠可應用於分離或純化、標記、或顯影具有表面抗原 CD34 的人類細胞，特別是人類幹細胞、人類造血幹細胞或幹細胞分化的內皮前驅細胞。

本案的另一實施態樣為體外標記具有表面抗原 CD34 的人類細胞之方法，包括：(i) 提供一帶有申請專利範圍第 1 或 2 項所述之人源化單株抗體之標記分子；及(ii) 混合該標記分子與欲標記的生物樣品，使該標記分子與該生物樣品中具有表面抗原 CD34 細胞形成一結合分子。此實施態樣中，標記分子包括可與抗體結合的顯色物質或放射物質，該顯色物質包括螢光染劑 (fluorochromes)，如 fluorescein isothiocyanate (FITC)、Alexa Fluor 系列螢光染劑、對稱型花青染料 (Cyanine Dye, C2, Cy3 and Cy5) 等；螢光蛋白 (fluorescent protein)，如以光敏素為主的近紅外螢光蛋白 (phytochrome-based near-infrared fluorescent protein, iRFP)；生物性冷光 (bioluminescence)，如螢火蟲螢光素酶 (firefly luciferase, Fluc)、*Gaussia* 螢光素酶 (*Gaussia*

luciferase, Gluc)；奈米粒子，如量子點(quantum dots)、氧化鐵奈米磁珠(iron oxide magnetic beads)或超順磁氧化鐵奈米磁珠(superparamagnetic iron oxide beads)等。該放射物質可包括鈾 90、銻 111、碘 131 或類似的放射性物質。由於本案之人源化單株抗體與表面抗原 CD34 的專一性結合，藉由上述方法可標記具有表面抗原 CD34 的人類細胞，例如人類幹細胞、人類造血幹細胞(HSC)或幹細胞分化的內皮前驅細胞(EPC)，以便於觀察或確認此類細胞的活性、型態等，以及應用於相關研究、檢查或治療等。

本案又一實施態樣為一種顯影劑，包括上述人源化單株抗體以及一標記物，與該抗體連接。此實施態樣中，標記分子包括可與抗體結合的顯色物質或放射物質，該顯色物質包括螢光染劑(fluorochromes)，如 fluorescein isothiocyanate (FITC)、Alexa Fluor 系列螢光染劑、對稱型花青染料(Cyanine Dye, C2, Cy3 and Cy5)等；螢光蛋白(fluorescent protein)，如以光敏素為主的近紅外螢光蛋白(phytochrome-based near-infrared fluorescent protein, iRFP)；生物性冷光(bioluminescence)，如螢火蟲螢光素酶(firefly luciferase, Fluc)、*Gaussia* 螢光素酶(*Gaussia* luciferase, Gluc)；奈米粒子，如量子點(quantum dots)、氧化鐵奈米磁珠(iron oxide magnetic beads)或超順磁氧化鐵奈米磁珠(superparamagnetic iron oxide beads)等。該放射物質可包括鈾 90、銻 111、碘 131 或類似的放射性物質。此實施態樣所述之顯影劑可應用於細胞螢光顯影、正子斷

層掃描(PET)、電腦斷層掃描(CT scan)、放射性核素成像(radionuclide imaging)或磁共振成像(MRI)顯影等顯影方法中。

本案另一實施態樣為一種捕獲細胞的裝置，包括一與液體動態接觸的表面，該表面上擔載上述之人源化單株抗體，用以截獲具有表面抗原 CD34 的人類細胞。此述截獲細胞裝置之一具體實施例，如第 9 圖所示，在人體的血管壁(101)內固定上述的截獲細胞裝置(201)。該截獲細胞裝置表面擔載本案所述之人源化單株抗體(301)。當血液通過時，血液中所含的具有表面抗原 CD34 的幹細胞分化的內皮前驅細胞 (401)會被該裝置(201)所截獲。

此述裝置包括可與血液接觸之醫療器材，例如冠狀動脈支架、心導管等。當以冠狀動脈支架或心導管等作為截獲細胞裝置的主體時，藉由截獲具有表面抗體 CD34 的細胞，可防止血栓的生成及增加該裝置的生物相容性(biocompatibility)。

本發明之具體實施詳細說明如下，然而以下的實施例僅用於進一步揭露本發明之技術內容，不應藉以限制本案的發明範疇。

【實施例】

材料與方法

A. 與人類造血幹細胞表面抗原 CD34 結合之鼠源單株抗體(mMy10 IgG)的電腦模擬

使用 Discovery Studio Modeling 2.1 (Accelrys, Inc., San Diego, CA)來執行與人類造血幹細胞表面抗原 CD34 結合之鼠源單株抗體(mMy10 IgG)的同源模擬程序(homology modeling process)。

根據前人研究可得 mMy10 IgG 的變異區胺基酸序列 (Chris A., et al. 1996)，對 mMy10 IgG 之輕鏈變異區(V_L)與重鏈變異區(V_H)執行兩個分開之 BLASTP 搜尋。經由在蛋白質資料銀行 (Protein Data Bank, PDB) (<http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>)中搜尋來分析序列以確認 mMy10 變異區胺基酸序列的同源性。藉由根據鼠源抗 N-型血型抗原抗體 Fab 片段之重鏈變異區 [PDB entry: 1T2Q](Xie, K. et al., 2004)與抗人類碳酸酐酶 IX 單株抗體之輕鏈變異區結構 [PDB entry: 2HKH](Kral, V. et al., 2008)結構的同源模擬來建構 mMy10 Fv 片段的三維 (three-dimensional, 3D) 結構。最終的三維模型為藉由 MODELLER 模組 (Sali et al., 1995) 來產生，其藉由滿足空間限制 (satisfaction of spatial restraints) 來執行來一比較蛋白質結構模擬 (comparative protein structure modeling) 的自動方法。其自動對 mMy10 IgG 執行蛋白質同源模擬與圈環模擬 (loop modeling)。藉由使用 Model antibody Loops 模組以最高序列鑑別度自 PDB 資料庫選擇模板結構來執行 CDR 環 (CDR loop) 的模擬建構，且使用 Loop Refinement 模組來使 CDR 環的模擬建構完善以將空間碰撞 (steric clash) 最小化並確認正確鍵長度與鍵角。之後，藉由在

Discovery Studio Modeling 2.1 中之 CHARMM (B.R. Brooks, 1983) 程式並以 Accelrys CHARMM forcefield 來進行結構的能量最小化，可使此整個模擬更加完善。將結構進行能量最小化於兩個步驟中，首先執行受限之最陡坡降最小化 (restrained steepest descent minimization) 的 5000 個步驟，接著，執行共軛梯度最小化 (conjugated gradient minimization) 的 5000 個步驟，直到當支架 (framework) 之 α 碳 (alpha carbon) 被維持固定於適當位置中。

B.mMy10 IgG 抗體的生產與純化

將產生與人類造血幹細胞表面抗原 CD34 結合之鼠源單株抗體的融合瘤 (hybridoma) 細胞株 HB-8483 (購自美國 ATCC)，將此融合瘤細胞以無血清培養基 Hybridoma-SFM (GIBCO, 12045) 培養，收集上清液通過蛋白質 A (protein A) 管柱 (GE Health-care) 來進行純化以獲得與人類造血幹細胞表面抗原 CD34 結合之鼠源單株抗體 (mMy10 IgG)。

C. 與人類造血幹細胞表面抗原 CD34 結合之人源化單株抗體 hMy10 IgG 之建構、表現與純化

根據人源化結果獲得之人源化 My10 IgG 變異區胺基酸序列後，委託美國 GeneDirex 公司分別合成重鏈變異區與輕鏈變異區之 DNA 序列。接著將來自人類 IgG₁ 之保守區序列與委託合成之輕、重鏈變異區序列次選殖 (sub-cloning) 於哺乳動物表現載體 pSecTag2/Hygro (重鏈)

(Invitrogen)與 pcDNA3.3-TOPO TA (輕鏈) (Invitrogen)中。之後利用 EcoRV 限制切點(restriction site)將兩個構築體(construct)融合，產生 pSec-pcDNA-hMy10-IgG。根據廠商之操作指南，使用 Effectene (Qiagen)將含重鏈與輕鏈之基因的質體轉染(transfect)進入小鼠骨髓瘤(myeloma) NS0 細胞(European Collection of Animal Cell cultures, Salisbury, Wiltshire, UK)。再以 Hygromycin (400 µg/ml)篩選 4 週後，將穩定的選殖體(clone)以無血清化學定義培養基(chemically-defined medium) HyQNS0 (Hyclone)中 5×10^5 cells/ml 的起始接種密度培養於搖瓶中。於 37°C 下培養 5 天後，收集上清液，再以蛋白質 A 層析管柱(protein A column; GE Health-care)自上清液中純化抗體。

D. hMy10 IgG 與 mMy10 IgG 對 KG1a 細胞之結合能力測試

KG1a 為表現 CD34 抗原之細胞株，以此細胞株作為抗體結合能力測試之材料。將系列稀釋好之抗體分別加入相同數目之 KG1a 細胞(約 1×10^6 顆細胞)，4°C 下作用 1 小時，再以 FACS 緩衝液(DPBS 緩衝液加 2%胎牛血清)清洗細胞三次，再分別以對 mMy10 IgG 反應之 Alexa Fluor 488 山羊抗小鼠 IgG (H+L)與對 hMy10 IgG 之反應之 Alexa Fluor 647 山羊抗人類 IgG (H+L)在 4°C 進行培養 1 小時。將細胞以 FACS 緩衝液清洗之後以 FACSCalibur 流式細胞儀(flow cytometer)來分析。

E. hMy10 IgG 與 QBen10 IgG 對 KG1a 細胞之結合能力測試

將系列稀釋好之抗體分別加入相同數目之 KG1a 細胞 (約 1×10^6 顆細胞)， 4°C 下作用 1 小時，再以 FACS 緩衝液 (DPBS 緩衝液加 2%胎牛血清)清洗細胞三次，再分別以對 QBen10 IgG 反應之 Alexa Fluor 488 山羊抗小鼠 IgG (H+L) 與對 hMy10 IgG 之反應之 Alexa Fluor 647 山羊抗人類 IgG (H+L)在 4°C 進行培養 1 小時。將細胞以 FACS 緩衝液清洗之後以 FACSCalibur 流式細胞儀(flow cytometer)來分析。

F. 應用 hMy10 IgG 之免疫磁珠進行 CD34⁺細胞株的分離實驗

hMy10 IgG 之免疫磁珠的製備是結合 Thermo(Scientific) 公司生產之 EZ-Link NHS-Biotin Reagents(no. 20217) 與 MACS(Miltenyi Biotec)公司生產之 Anti-biotin microbeads(no. 130-090-485)完成，首先將 1 mg 之 hMy10 IgG 抗體蛋白加入適當量之生物素試劑(biotin reagent) (Thermo)，置於冰上反應兩小時，再將此已標定生物素(biotin)之 hMy10 IgG (hMy10 IgG-biotinylated)以 PBS 緩衝液進行透析，以去除未標定的生物素(biotin)。將 CD34⁻之 NS0 細胞與 CD34⁺之 KG1a 細胞以 10:1(NS0 約 1×10^7 顆細胞；KG1a 約 1×10^6 顆細胞)的比例混合，加入 hMy10 IgG-biotinylated 抗體蛋白， 4°C 下作用 30 分鐘，以 MACS 緩衝液清洗細胞三次，再加入 80 μl MACS 緩衝液與 20 μl

之 Anti-Biotin MicroBeads (MACS), 4°C 下作用 15 分鐘, 加入偵測抗體 Alexa Fluor 647 山羊抗人類 IgG (H+L), 4°C 下作用 30 分鐘, 以 MACS 緩衝液清洗細胞三次, 最後回溶細胞團塊於 500 µl 之 MACS buffer 中。細胞的分離裝置依照 MACS 公司生產之 MS column 與 MiniMACS separator 操作手冊進行, 將 MS column 架在 MiniMACS separator 磁座上, MS column 先以 500 µl 之已去除氣泡的 MACS 緩衝液平衡, 將上述經過抗體處理好之細胞通過 MS column, 以 500 µl 之 MACS 緩衝液沖洗 MS column 三次以去除沒有被磁珠結合之細胞, 並收集之, 之後將 MS column 離開 separator 磁座, 再以 1 ml MACS 緩衝液快速沖出目標細胞並收集。將分離前之細胞、沖洗過細胞與目標細胞分別以 FACSCalibur 流式細胞儀 (flow cytometer) 來分析。

G. 應用 hMy10 IgG 做為截獲 CD34⁺細胞株實驗

先將 96 孔盤塗覆 (coating) 山羊抗人類 IgG Fc 片段抗體 (2µg/ml), 4°C 下作用隔夜, 以 PBST 緩衝液清洗孔盤 3 次, 再加入 blocking buffer (300 µl/well), 37°C 下作用 1 小時, PBST 緩衝液清洗孔盤 3 次, 加入系列稀釋之 hMy10 IgG 抗體 (4µg/ml ~ 0µg/ml), 37°C 下作用 1 小時, PBST 緩衝液清洗孔盤 3 次, 每個 well 加入相同 1×10^5 顆細胞, 將 96 孔盤做 200 rpm 的震盪於 37°C 下作用 1 小時, 以 FACS 緩衝液 (DPBS 緩衝液加 2% 胎牛血清) 清洗孔盤三次以去除沒有結合的細胞, 剩下有結合的細胞以 Almar Blue 測定細胞剩

餘比例，剩餘比率依照控制組(細胞量 0~5000 顆/well Almar Blue 呈色)所繪出之標準曲線計算之。

H. 應用 hMy10 IgG 做為截獲 CD34⁺細胞株實驗(動態模擬血管血液流動截獲 CD34⁺細胞株實驗)

將 μ -slide(Ibidi)塗覆(coating)濃度 2 μ g/ml 之 hMy10 IgG 抗體，4°C 下作用隔夜，再以 FACS 緩衝液清洗 μ -slide 三次。取 CD34⁺之 KG1a 1x10⁶ 顆細胞先以 PKH67 Fluorescent Cell Linker Kits 標定，再加入 CD34⁻之 NS0 1x10⁷ 顆細胞，混合均勻，以蠕動幫浦將混合細胞液通過 μ -slide，室溫下流動 2 小時，再以蠕動幫浦將 FACS 緩衝液流過 μ -slide，以去除沒有結合在 μ -slide 上之細胞，截獲在 μ -slide 的細胞以螢光顯微鏡觀察並記錄。

結果

A. mMy10 IgG 變異區片段之分子模擬

根據前人研究可得 mMy10 IgG 的變異區胺基酸序列，藉由如“材料與方法”中所述之同源模擬(program MODELLER)來分別建構 mMy10 IgG 的重鏈變異區及輕鏈變異區之推演之胺基酸序列的三維結構。之後，以來自 PDB 之 1T2Q (享有序列相同度為 84%) 模板結構為 2.50 Å 的解析度與來自 PDB 之 2HKH (享有序列相同度為 94%) 模板結構為 2.20 Å 的解析度分別模擬出 mMy10 IgG 的重鏈變異區及輕鏈變異區。經由 Discovery Studio modeling 2.1

program 獲得 mMy10 IgG 之重鏈變異區及輕鏈變異區的最終精確結構，如第 1 圖中所示。

第 1 圖顯示 mMy10 IgG 的變異區。藉由分別與對應於重鏈變異區之 1T2Q 與對應於輕鏈變異區之 2HKH 的結晶結構進行比較的同源模擬來產生 mMy10 IgG 的三維結構。CDR 環圈以虛線顯示。接近 CDR 圈環於 5Å 內之殘基可能影響抗原結合所以必須保留為“鼠源”胺基酸的 9 個 Fv 支架殘基 (framework residue, FR) 以球狀體形式顯示。於重鏈變異區支架中有 7 個殘基須保留，而於輕鏈變異區支架中有 2 個殘基須被保留。

B. mMy10 IgG 變異區片段之人源化

CDR-移植法 (CDR-grafting) 人源化鼠源抗體的方式為現今生技公司普遍採用來人源化抗體的方式，也已經受到美國 FDA 認證，而在臨床研究中也證實 CDR-移植法 (CDR-grafting) 的人源化抗體可以降低致免疫源性。但因為這種 CDR 置換的方式經常造成抗體活性的大幅下降，因此常需經過回復一些對於 CDR 區段結構而言是必須的鼠源支架胺基酸的額外工作。有了結構同源性模擬的協助，可以更容易掌握 CDR 區段結構附近重要的鼠源支架胺基酸，進而保留住抗體活性。在本實施例中，以下列三個步驟執行 mMy10 IgG 的人源化，首先，分別建構 mMy10 IgG 之重鏈變異區與輕鏈變異區的同源性模擬結構；第二，依據這些結構找出距離 CDR 區域約 5Å 附近的胺基酸，這些

胺基酸即為推測可能影響抗體與抗原結合能力的支架胺基酸，在人源化的過程中需要被保留。第三，在人類 IgG 抗體變異區序列的選擇上，參考前人研究綜合人類 $V_L k$ 第一次群與 V_H 第三次群最為保守的人類序列當做人類變異區模板(Paul C. et al., 1992)，經過比對其序列相同度分別為重鏈變異區為 52%與輕鏈變異區為 51%，並且根據第二步驟在重鏈區需被保留的鼠源胺基酸除了 CDR 區域之外還有 V19, L62, S63, I68, S71, Q72, V73 一共 7 個胺基酸，而在輕鏈區需被保留的鼠源胺基酸除了 CDR 區域之外還有 D60, E70 一共 2 個胺基酸(第 2 圖)，其他胺基酸則採用人類變異區序列為模板，最後則可得 hMy IgG 變異區序列如第 3 圖所示。

C. mMy10 IgG 抗體的生產與純化

將經純化之 mMy10 IgG 進行 SDS-PAGE 分析，結果如第 4 圖之 lane 1 與 lane 2 所示。lane 1 為非還原狀態，lane 2 為還原狀態。lane 1 為非還原狀態之 mMy10 IgG，約 155 kDa，lane 2 為還原狀態 mMy10 IgG，有約 55 kDa (重鏈) 與 26 kDa (輕鏈) 之分子量的兩蛋白質條帶。

D. 人源化之 My10 IgG (hMy10 IgG) 之建構、表現與純化

分別將 mMy10 IgG 之人源化重鏈變異區與輕鏈變異區的胺基酸序列讀框內(in-frame)融合至人類 IgG₁ 之重鏈與

kappa 輕鏈保守區。為了表現一完整之人源化 My10(hMy10) IgG₁ 分子，使用兩種哺乳動物表現載體，pSecTag2/Hygro 與 pcDNA3.3-TOPO TA，以分別表現 hMy10 IgG 之人源化重鏈與輕鏈。之後將輕鏈表現載體 pcDNA3.3-TOPO TA 連接至重鏈表現 pSecTag2/Hygro 載體。重組 hMy10 IgG 之表現程度為~13 mg/L。藉由蛋白質 A 管柱(protein A column)來純化含 hMy10 IgG 之培養基上清液，並藉由 SDS-PAGE 來確認蛋白質純化物(第 4 圖)。如第 4 圖之 lane 3 與 lane 4 所示。lane 3 為非還原狀態之 hMy10 IgG，約 155 kDa，lane 4 為還原狀態 hMy10 IgG，有約 55 kDa(重鏈)與 26 kDa(輕鏈)之分子量的兩蛋白質條帶。

E. hMy10 IgG 與 mMy10 IgG 對 KG1a 細胞之結合能力測試

為了測試人源化之 My10 IgG 與鼠源 My10 IgG 對人類幹細胞表面抗原 CD34 的結合能力，以可以表現 CD34 抗原的細胞株 KG1a 做為材料，在不同抗體濃度下觀察與 KG1a 細胞株的結合強度，並使用流式細胞儀以評估 mMy10 IgG 與 hMy10 IgG 兩者之結合活性。結果如第 5 圖顯示，兩抗體對 KG1a 細胞皆具有濃度依賴(dose dependent)的方式結合於 CD34⁺ KG1a 細胞，其 K_D 值分別為 mMy10 IgG: 6.7 nM 與 hMy10 IgG: 6.9 nM。相似之 K_D 值指出人源化過程並沒有改變 My10 IgG 對人類幹細胞表面抗原 CD34 的結合能力。

F. hMy10 IgG 與 QBen10 IgG 對 KG1a 細胞之結合能力測試

QBen10 IgG 為市售常用來偵測與分離人類幹細胞表面抗原 CD34 細胞的鼠源抗體，為比較 QBen10 IgG 與 hMy10 IgG 與 mMy10 IgG 的結合於 CD34 的能力。根據實施例 E 的方法，如第 6 圖所示，QBen10 IgG 的 K_D 值為 14.4 nM，顯示 hMy10 IgG 不但對人類幹細胞表面抗原 CD34 的結合能力與市售抗體 QBen10 IgG 相當，而且其人源化優勢更可增加其應用性與價值。

G. 應用 hMy10 IgG 之免疫磁珠進行 CD34⁺細胞株的分離實驗

為測試 hMy10 IgG 是否可以應用在周邊血或臍帶血幹細胞分離，以 10:1 的比例混合 CD34⁻之 NS0 細胞與 CD34⁺之 KG1a 細胞，再將製備好的 hMy10 IgG 免疫磁珠與混合細胞結合，通過磁座分離出 CD34⁺之 KG1a，再以流式細胞儀分析偵測抗體的訊號(detection antibody)來計算其產量與純度。結果如第 7 圖所示，在以磁座分離前之細胞(Before cell separation)可分成兩群，左邊群為沒有訊號的 CD34⁻之 NS0 細胞，顯示 hMy10 IgG 無法與之結合，而右邊群為有訊號之 CD34⁺之 KG1a 細胞，顯示 hMy10 IgG 可與之結合。而在 MACS 緩衝液沖洗下來之未結合於免疫磁珠之細胞(Flow through)經過分析，只可見到一群沒有訊號之細胞，此為無法結合之 CD34⁻之 NS0 細胞，顯示不具

有 CD34 抗原之細胞可被緩衝液沖下，而具有 CD34 抗原之細胞則因為緊密結合於磁珠上而無法被緩衝液沖下。而最後將免疫磁珠與磁座分離後再以緩衝液沖提(elute)下來之目標細胞經過分析，為一群有訊號之細胞，此為可結合於免疫磁珠之 CD34⁺之 KG1a 細胞。經過計算其產量(回收率)為原有加入 KG1a 細胞量的 80%，而純度為 97%。根據這些結果顯示，以 hMy10 IgG 製備之免疫磁珠可以有效的分離 CD34⁻與 CD34⁺細胞，而 hMy10 IgG 所具有之人源化優勢更可以防止因為鼠源抗體自磁珠上脫落而進入人體中造成 HAMA 反應的風險。

H. 應用 hMy10 IgG 做為截獲 CD34⁺細胞株實驗

為測試 hMy10 IgG 在塗覆(coating)於固態物體表面後，是否可截獲動態液體中具有 CD34⁺細胞株 KG1a，以此測試此抗體應用在截獲周邊血液中造血幹細胞(HSC)或內皮前驅細胞(EPC)的應用價值。將不同濃度之 hMy10 IgG 抗體塗覆於 ELISA 盤上，再加入 CD34⁺ KG1a 細胞，以 200 rpm 震動方式培養 1 小時。之後，沖洗掉沒有被截獲的細胞後，以 Almar Blue 去偵測被截獲的細胞量。結果如第 8 圖所示，CD34⁺ KG1a 細胞可以抗體濃度依賴(dose dependent)的方式被截獲於 ELISA 盤上。在抗體濃度約 0.035 $\mu\text{g/ml}$ 時仍有一半的細胞可被截獲。此結果證明當 hMy10 IgG 在塗覆(coating)於固態物體表面後，可以截獲 CD34⁺細胞，例如造血幹細胞(HSC)或內皮前驅細胞(EPC)。

I. 應用 hMy10 IgG 做為截獲 CD34⁺細胞株實驗(動態模擬血管血液流動截獲 CD34⁺細胞株實驗)

為了更進一步測試當 hMy10 IgG 在塗覆(coating)於固態物體表面後，是否可截獲在動態液體中(類似血管中血液流動的狀態)具有 CD34⁺細胞株 KG1a。此實驗以具有微流通道之玻片(u-slide, Idibi)通過培養液以模擬血管血液流動之狀態，來驗證此抗體應用在截獲周邊血液中造血幹細胞(HSC)或內皮前驅細胞(EPC)的應用價值。先將 CD34⁺ KG1a 細胞以 PKH67 標定綠色螢光，再混合 CD34⁻ NS0 細胞，數量比例約 1:10。再將細胞混合液以蠕動幫浦送入已塗覆 hMy10 IgG 抗體之 u-slide 中。對照組則以塗覆一般老鼠 IgG 做為比較。實驗結果以螢光顯微鏡觀察 u-slide 上被截獲的細胞。結果如第 9 圖所示，在實驗組中可以清楚見到被塗覆 hMy10 IgG 抗體之 u-slide 上被截獲的細胞幾乎全部皆為已標定綠色螢光之 CD34⁺ KG1a 細胞。對照組中之 u-slide 則幾乎沒有細胞可以被截獲。此實驗證明將 hMy10 IgG 在塗覆(coating)於固態物體表面後，可在液體流動之狀態，例如血管中之血液流動狀態下，可專一性的截獲帶有 CD34⁺細胞，例如造血幹細胞(HSC)或內皮前驅細胞(EPC)。且因為人源化的優勢，可直接塗覆在設於血管中之醫療器材上，例如心血管支架，而可避免因塗覆鼠源抗體造成抗體活性下降或引起 HAMA 反應之風險。

雖然本發明已以較佳實施例揭露如上，然其並非用以限定本發明，任何熟悉此項技藝者，在不脫離本發明之精

神和範圍內，當可做些許更動與潤飾，因此本發明之保護範圍當視後附之申請專利範圍所界定者為準。

【圖式簡單說明】

第 1 圖顯示 mMy10 IgG 之重鏈變異區及輕鏈變異區的同源性模擬結構的結果。圖右方粗實線部分為重鏈變異區，圖左方細實線部分為輕鏈變異區，圖中間虛線環圈為 CDR 區域。以球狀體形式顯示的胺基酸為接近 CDR 區域 5Å 以內推測可能影響抗原結合能力，需要被保留的鼠源胺基酸。被認為是需要被保留的鼠源胺基酸在重鏈變異區中有 V19, L62, S63, I68, S71, Q72, V73 一共 7 個胺基酸，在輕鏈區中有 D60, E70, 一共 2 個胺基酸。

第 2 圖顯示 mMy10 IgG 的重鏈變異區(mMy10 VH)與 Human V_H 第三次群(Human H III)之重鏈變異區的胺基酸序列比對以及 mMy10 IgG 的輕鏈變異區(mMy10 VL)與人類 V_L k 第一次群(Human K I)之輕鏈變異區的胺基酸序列比對。黑色框架內之胺基酸表示為 CDR 區域胺基酸，而黑色三角形所指示之胺基酸為接近 CDR 區域 5Å 以內推測可能影響抗原結合能力，需要被保留的鼠源胺基酸。

第 3 圖顯示 hMy10 IgG 的重鏈變異區(hMy10 VH)與輕鏈變異區(hMy10 VL)的胺基酸序列。

第 4 圖顯示經純化之 mMy10 IgG 與 hMy10 IgG 之 SDS-PAGE 分析結果。樣本在非還原狀態與還原狀態下以 MES 緩衝溶液於 4~12 % SDS/聚丙稀醯胺凝膠(Bis-Tris polyacrylamide gel)進行電泳。M 為分子量標準品。Lane 1 與 Lane 2 分別為 mMy10 IgG 之非還原狀態與還原狀態電泳結果，Lane 3 與 Lane 4 分別為 hMy10 IgG 之非還原狀態

與還原狀態電泳結果。

第 5 圖顯示 mMy10 IgG 與 hMy10 IgG 抗體以 2 倍濃度稀釋對 CD34⁺ KG1a 細胞的結合能力測試結果。

第 6 圖顯示比較 QBen10 IgG 與 mMy10 IgG 及 hMy10 IgG 對 CD34⁺ KG1a 細胞的結合能力測試結果。

第 7 圖顯示應用 hMy10 IgG 之免疫磁珠進行 CD34⁺ 細胞株的分離實驗結果。將已標定生物素之 hMy10 IgG (hMy10 IgG-biotinylated) 與 10:1 混合之 CD34⁻ 之 NS0 細胞與 CD34⁺ 之 KG1a 細胞做結合。再加入 Anti-Biotin MicroBeads，並加入抗體 Alexa Fluor 647 山羊抗人類 IgG (H+L) 作為偵測標記。在磁座上做細胞分離測試後以 FACSCalibur 流式細胞儀(flow cytometer)來分析。未分離前 (Before cell separation) 為兩群細胞，左邊為沒有訊號之 CD34⁻ NS0 細胞，右邊為有訊號之 CD34⁺ KG1a 細胞；以緩衝液沖洗下來之結果 (Flow-through) 只顯示為一群沒有訊號之 CD34⁻ NS0 細胞，表示 CD34⁺ KG1a 細胞仍被結合於免疫磁珠上被磁座吸住。最後，沖提(elution)的結果顯示為一群有訊號之 CD34⁺ KG1a 細胞。表中顯示分別為計算其產量(回收率)為原有加入 KG1a 細胞量的 80%，純度為 97%。

第 8 圖顯示應用 hMy10 IgG 做為截獲 CD34⁺ 細胞株實驗結果，將 2 倍稀釋濃度之 hMy10 IgG 抗體塗覆於 ELISA 盤上，加入 CD34⁺ KG1a 細胞，以震動方式培養 1 小時候，沖洗掉沒有被截獲的細胞後，以 Almar Blue 去偵測被截獲

的細胞量。

第 9 圖顯示本案一實施例之截獲細胞裝置之示意圖，其係使表面擔載本案所述人源化單株抗體(301)的裝置(201)，固定於血管壁(101)，以截獲血流中具有表面抗原 CD34 的細胞(401)。

第 10 圖顯示應用 hMy10 IgG 做為截獲 CD34⁺細胞株實驗(動態模擬血管血液流動截獲 CD34⁺細胞株實驗)的細胞截獲的結果。在有塗覆(coating) hMy10 IgG 抗體與塗覆一般小鼠 IgG 抗體(mouse IgG)情況下分別觀察明視野(bright field)、螢光視野(FITC field)與疊合視野(overly)及不同倍率的觀察(100 倍與 400 倍)。結果顯示在塗覆 hMy10 IgG 抗體之微流玻片上可專一截獲有 PKH67 標定綠色螢光之 CD34⁺之 KG1a 細胞，而對照組中塗覆一般老鼠 IgG 抗體(mouse IgG)的微流玻片則無法截獲任何細胞。

【主要元件符號說明】

101~血管壁；

201~截獲細胞裝置；

301~人源化單株抗體；

401~被截獲的細胞。

序列表

<110> 財團法人工業技術研究院

<120> 人源化之抗人類細胞表面抗原 CD34 之單株抗體及其應用

<130> 0965-A23832-TW

<160> 4

<210> 1

<211> 117

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人源化抗體之重鏈變異區

<400> 1

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly

1

5

10

15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Val Ser Gly Phe Ser Leu Thr Ser His

20

25

30

Gly Val His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu

35

40

45

Gly Val Ile Trp Gly Ala Gly Arg Thr Asp Tyr Asn Ala Ala Phe Ile

50

55

60

Ser Arg Leu Ser Ile Ser Arg Asp Ile Ser Lys Ser Gln Val Tyr Leu

65

70

75

80

Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala

85

90

95

Arg Asn Arg Tyr Glu Ser Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu

100

105

110

Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 2

<211> 113

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人源化抗體之輕鏈變異區

<400> 2

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly

1

5

10

15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ser Ser Gln Asn Leu Val His Ser

20

25

30

Asn Gly Asn Thr Tyr Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala

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 Glu Phe Thr Leu Thr Ile

65

70

75

80

Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Ser Gln Ser

85

90

95

Thr His Val Pro Leu Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

100

105

110

Arg

<210> 3

<211> 351

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人源化抗體之重鏈變異區

<400> 3

gaggtgcagc tgggtggaatc cggaggagga ctggtgcagc caggaggatc cctgaggctg 60

tcttgcgccg tgtctggggt cagtctgaca agccacggcg tgcattgggt caggcaggct 120

cctggaaagg gactggagtg gctgggtgtg atctggggag ctgggagaac cgactataac 180

gccgctttta ttctcggct gtctatcagt cgcgatatta gcaaatccca agtctacctg 240

cagatgaaca gtctgagagc cgaggacacc gctgtgtact attgtgctag gaatagatac 300

gaaagctatt tcgattactg gggccaggga accctggtga cagtgagctc c 351

<210> 4

<211> 340

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人源化抗體之輕鏈變異區

<400> 4

gacatccaga tgaccagag tcctagctcc ctgtctgcca gtgtggcgca tcgggtgacc 60

attacatgcc gctctagtca gaacctggtg cactccaacg gaaatacata cctgcattgg 120
tatacagcaga agcccgggaa agctcctaag ctgctgatct acaaagtgtc caatagggtc 180
tctggagtgc cagacagggt tagcgggtcc ggtctggca cagagttcac tctgaccatt 240
agctccctgc agccagaaga tttgccact tactattgta gtcagagcac acacgtgccc 300
ctgactttcg gccaggggaac caaagtggag atcaagcggc 340

七、申請專利範圍：

1.一種人源化單株抗體，包括重鏈變異區及輕鏈變異區，其中該重鏈變異區包括序列識別號 1 所示之胺基酸序列，該輕鏈變異區包括序列識別號 2 所示之胺基酸序列，該人源化單株抗體與人類細胞表面抗原 CD34 專一性結合。

2.一種人源化單株抗體，包括重鏈變異區及輕鏈變異區，其中該重鏈變異區包括由序列識別號 3 所示之核苷酸序列所編碼的胺基酸序列，該輕鏈變異區包括由序列識別號 4 所示之核苷酸序列所編碼的胺基酸序列，該人源化單株抗體與人類細胞表面抗原 CD34 專一性結合。

3.如申請專利範圍第 1 或 2 項所述之人源化單株抗體，其中該人類細胞包括人類幹細胞。

4.如申請專利範圍第 3 項所述之人源化單株抗體，其中該人類幹細胞包括人類造血幹細胞(HSC)或幹細胞分化的內皮前驅細胞(EPC)。

5.一種分離細胞的方法，包括下列步驟：

(i)提供一帶有如申請專利範圍第 1 或 2 項所述之人源化單株抗體的捕捉分子；

(ii)混合該捕捉分子與欲分離的生物樣品混合，使該捕捉分子與該生物樣品中具有表面抗原 CD34 之細胞形成一結合分子；以及

(iii)分離該結合分子。

6.如申請專利範圍第 5 項所述之分離細胞的方法，其中，該捕捉分子包括載體、官能基或生物分子。

7.如申請專利範圍第 6 項所述之分離細胞的方法，其中，該載體包括微珠(beads)、晶片(chip)或盤(plate)。

8.如申請專利範圍第 6 項所述之分離細胞的方法，其中，該官能基包括胺基(-NH₂)、巰基(-SH)、羧基(-COOH)或羥基(-OH)。

9.如申請專利範圍第 6 項所述之分離細胞的方法，其中，該生物分子包括生物素(biotin)、卵白素(avidin)或鏈黴素(streptavidin)。

10.如申請專利範圍第 7 項所述之分離細胞的方法，其中，該微珠包括氧化鐵奈米磁珠或超順磁化鐵奈米磁珠。

11.如申請專利範圍第 10 項所述之分離細胞的方法，其中，藉由磁座吸引住該微珠以分離該結合分子。

12.如申請專利範圍第 5 項所述之分離細胞的方法，其中，所分離的細胞包括人類幹細胞。

13.如申請專利範圍第 12 項所述之分離細胞的方法，其中，該人類幹細胞包括人類造血幹細胞(HSC)或幹細胞分化的內皮前驅細胞(EPC)。

14.一種體外標記細胞的方法，包括：

(i)提供一帶有如申請專利範圍第 1 或 2 項所述之人源化單株抗體之標記分子；以及

(ii)混合該標記分子與欲標記的生物樣品，使該標記分子與該生物樣品中具有表面抗原 CD34 細胞形成一結合分子。

15.如申請專利範圍第 14 項所述之體外標記細胞的方

法，其中該標記分子包括一顯色物質或放射物質。

16.如申請專利範圍第 15 項所述之體外標記細胞的方法，其中該顯色物質包括螢光染劑(fluorochromes)、螢光蛋白(fluorescent protein)、生物性冷光(bioluminescence)、量子點(quantum dots)、氧化鐵奈米磁珠或超順磁化鐵奈米磁珠。

17.如申請專利範圍第 16 項所述之體外標記細胞的方法，其中該螢光染劑包括 fluorescein isothiocyanate (FITC)、Alexa Fluor 系列螢光染劑或對稱型花青染料(Cyanine Dye, C2, Cy3 and Cy5)。

18.如申請專利範圍第 16 項所述之體外標記細胞的方法，其中該螢光蛋白包括近紅外螢光蛋白(phytochrome-based near-infrared fluorescent protein, iRFP)。

19.如申請專利範圍第 16 項所述之體外標記細胞的方法，其中該生物性冷光包括螢火蟲螢光素酶(firefly luciferase, Fluc)或 *Gaussia* 螢光素酶(*Gaussia* luciferase, Gluc)。

20.如申請專利範圍第 15 項所述之體外標記細胞的方法，其中該放射物質包括鈾 90、銻 111 或碘 131。

21.如申請專利範圍第 14 項所述之體外標記細胞的方法，其中被標記的細胞包括人類幹細胞。

22.如申請專利範圍第 21 項所述之體外標記細胞的方法，其中該人類幹細胞包括造血幹細胞(HSC)或幹細胞分化

的內皮前驅細胞(EPC)。

23.一種顯影劑，包括：

如申請專利範圍第 1 或 2 項所述之人源化單株抗體；
以及

一標記物，與該抗體連接。

24.如申請專利範圍第 23 項所述之顯影劑，其中該標記物包括一顯色物質或放射物質。

25.如申請專利範圍第 24 項所述之顯影劑，其中該顯色物質包括螢光染劑(fluorochromes)、螢光蛋白(fluorescent protein)、生物性冷光(bioluminescence)、量子點(quantum dots)、氧化鐵奈米磁珠或超順磁化鐵奈米磁珠。

26.如申請專利範圍第 25 項所述之顯影劑，其中該螢光染劑包括 fluorescein isothiocyanate (FITC)、Alexa Fluor 系列螢光染劑或對稱型花青染料(Cyanine Dye, C2, Cy3 and Cy5)。

27.如申請專利範圍第 25 項所述之顯影劑，其中該螢光蛋白包括近紅外螢光蛋白(phytochrome-based near-infrared fluorescent protein, iRFP)。

28.如申請專利範圍第 25 項所述之顯影劑，其中該生物性冷光包括螢火蟲螢光素酶(firefly luciferase, Fluc)或 *Gaussia* 螢光素酶(*Gaussia* luciferase, Gluc)。

29.如申請專利範圍第 24 項所述之顯影劑，其中該放射物質包括釷 90、銻 111 或碘 131。

30.如申請專利範圍第 23 項所述之顯影劑，其中該顯影

劑用於細胞螢光顯影、正子斷層掃描(PET)、電腦斷層掃描(CT scan)、放射性核素成像(radionuclide imaging)或磁共振成像(MRI)顯影。

31.一種磁珠，包括：

如申請專利範圍第 1 或 2 項所述之人源化單株抗體；
以及

磁性基材，用以擔載該抗體。

32.如申請專利範圍第 31 項所述之磁珠，其中，該磁性基材包括氧化鐵奈米磁珠或超順磁化鐵奈米磁珠。

33.如申請專利範圍第 32 項所述之磁珠，其中該磁性基材表面修飾一官能基或生物分子，以與該抗體結合。

34.如申請專利範圍第 33 項所述之磁珠，其中該官能基包括胺基(-NH₂)、巰基(-SH)、羧基(-COOH)或羥基(-OH)。

35.如申請專利範圍第 33 項所述之磁珠，其中，該生物分子包括生物素(biotin)、卵白素(avidin)或鏈黴素(Streptavidin)。

36.一種截獲細胞的裝置，包括一與液體動態接觸的表面，其中該裝置表面上擔載如申請專利範圍第 1 或 2 項所述之人源化單株抗體，用以截獲具有表面抗原 CD34 的人類細胞。

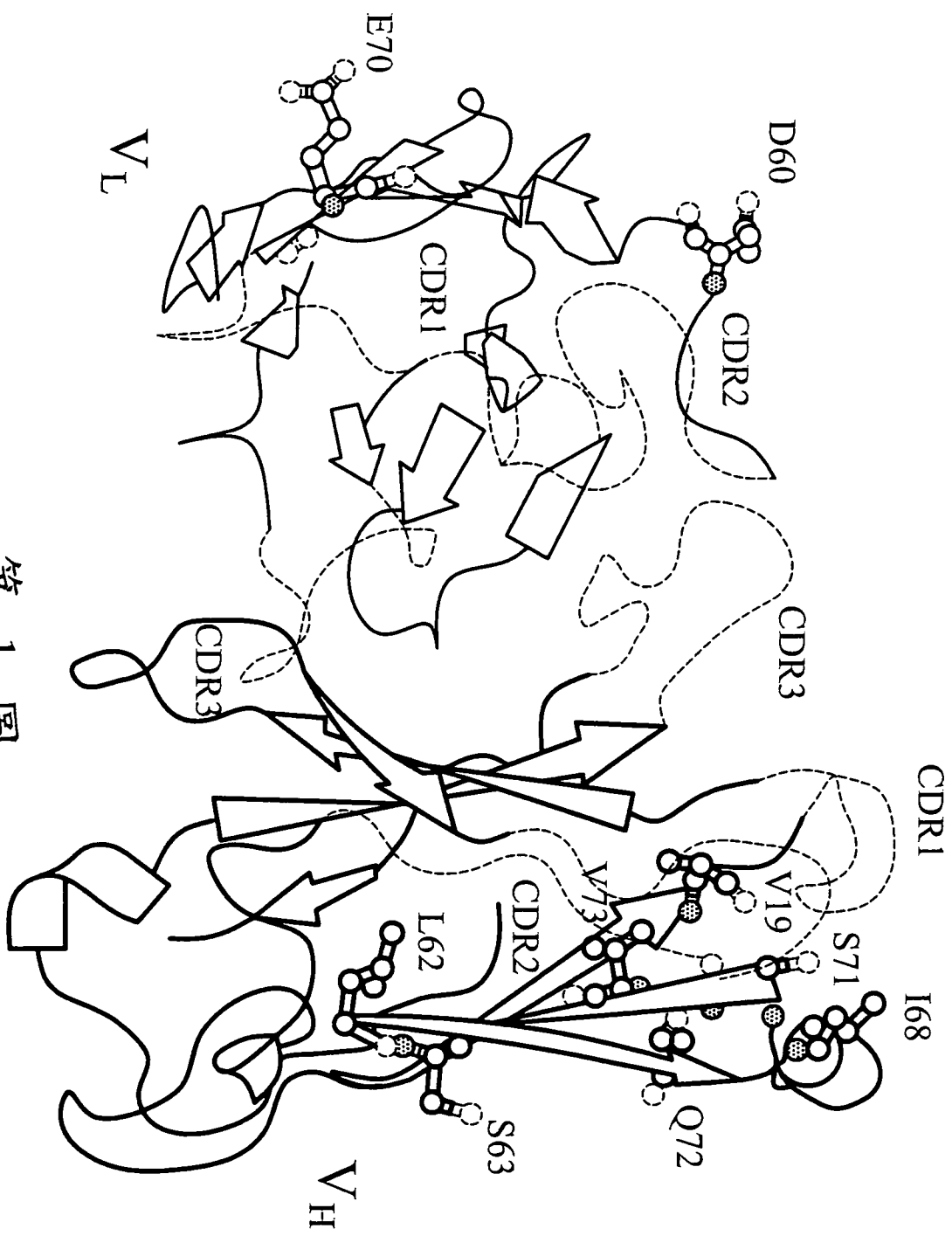
37.如申請專利範圍第 36 項所述之截獲細胞的裝置，其中該液體包括人類的血液。

38.如申請專利範圍第 36 項所述之截獲細胞的裝置，其中，所截獲的細胞包括人類幹細胞。

39.如申請專利範圍第 38 項所述之截獲細胞的裝置，其中，該人類幹細胞包括人類造血幹細胞(HSC)或幹細胞分化的內皮前驅細胞(EPC)。

40.如申請專利範圍第 36 項所述之截獲細胞的裝置，其中，該裝置包括冠狀動脈支架、心導管或可與血液接觸之醫療器材。

八、圖式：(如後所示)



第 1 圖

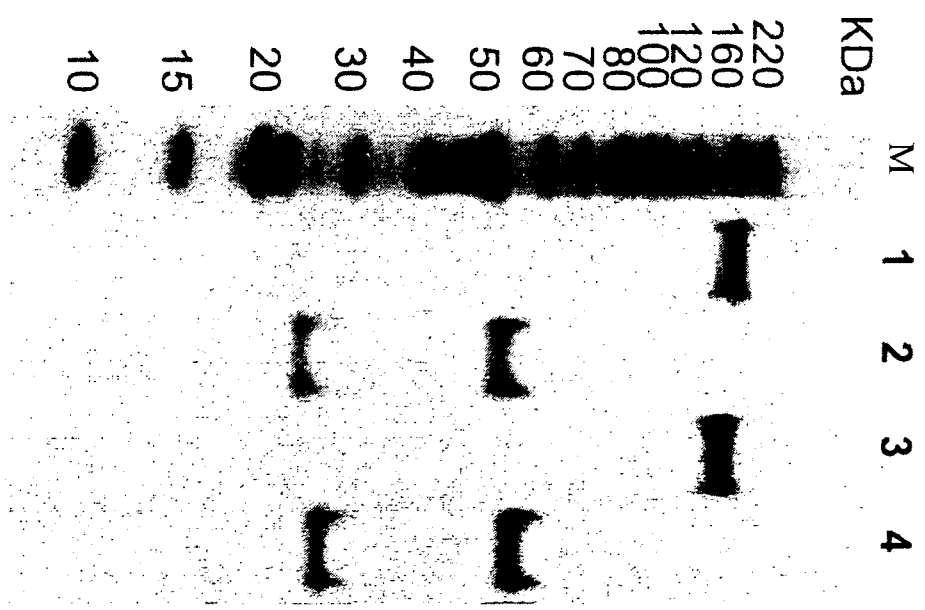
			CDR1		CDR2
mMy10 VH	-----KQSGPGLVQPSQSLSFICTVSGFSLTSHGVHWVRSQSPGKLENLGVWIG-AGRIDY				
				
Human H III	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYAMSWVRQAPGKGLHWVAIISENGSDTY				
				
			CDR3		
mMy10 VH	NAAFISRLSISRDISKQVFFKMNLSLQVDDIAIYYGARFRRYESYF---DYNWGQGITLVSS				
				
Human H III	ADSVKGRFTISRDDSKNITLYQMNSLRRAEDTAVYYGARFDRGGAVSYFDYWGQGITLVVSS				
				
			CDR1		CDR2
mMy10 VL	-----TQTPLSLPVSLGDQASISGRSSQNLVHNGNTYLLHWYLQKPGQSPNLLIYKYSNRF				
				
Human KI	DIQMTQSPSSLSASVGDRTVITCRASQDV-----SSYLAWYQQKPKGAPKLLIYAASSLE				
				
			CDR3		
mMy10 VL	SGVPDRFSGSGSGTEFTLKISRVEAEDLGVYFQSSTHVPPLTFGAGTKVELKRAADA				
				
Human KI	SGVPSRFSGSGSGTDFTLTITSSLPEDFATYYCQQYNSLPYTFGGGTKVEIKRT----				

第 2 圖

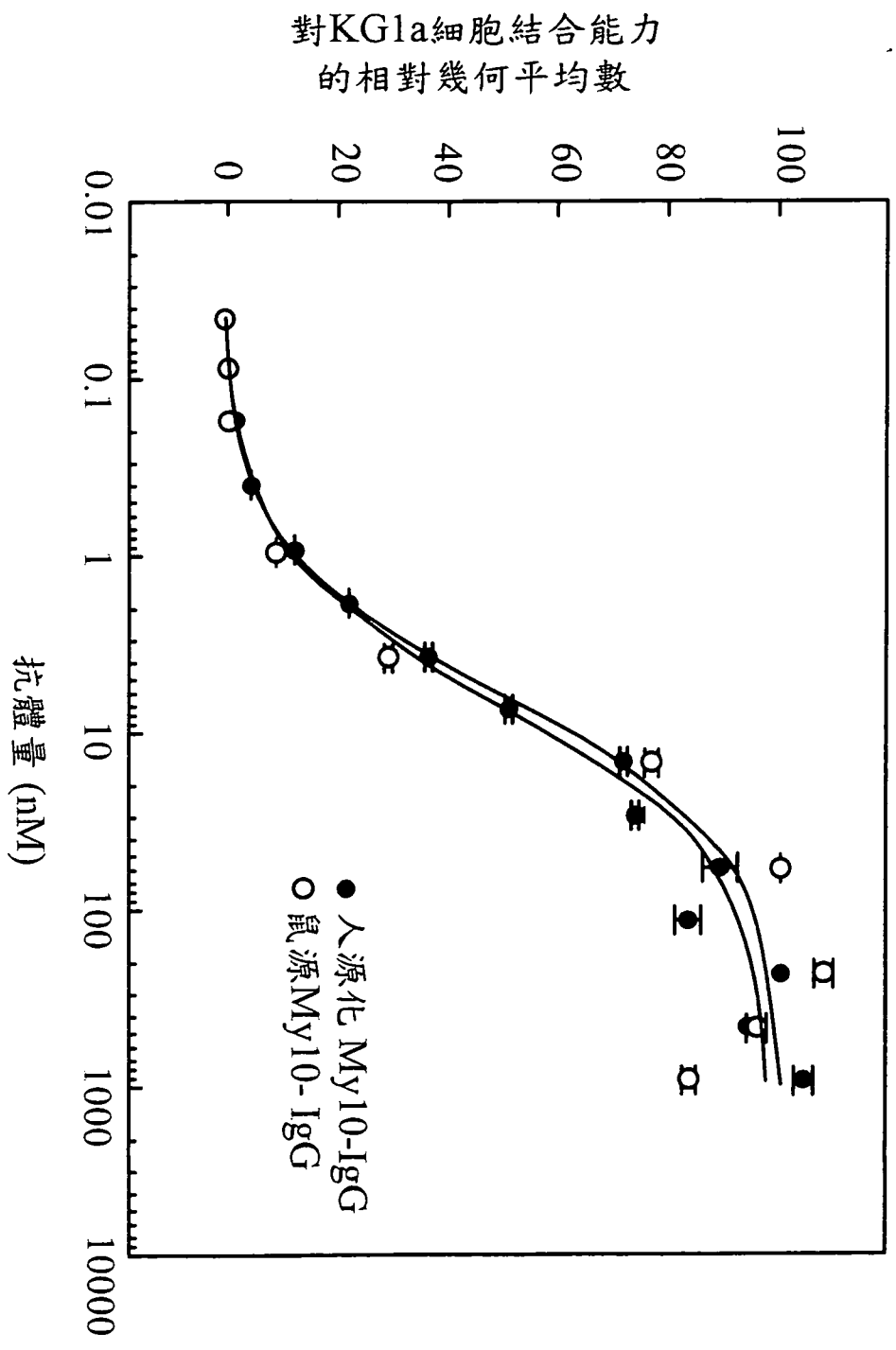
hMy10 VH: EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAVSGFSLT SHGVHWVRQA PGKGLEWLGV IWGAGRTDYN
 AAFISRLSIS RDISKSGVYL QMNSLRAEDT AVYYCARNRY ESYFDYWGQG TLVTYSS

hMy10 VL: DIQMTQSPSS LSASVGDRTV ITCRSSQNLV HSNGNTYLHW YQOKPGKAPK LL1YKVSNRF
 SGVPDRFSGS GSGTEFTLTI SSLQPEDFAT YYCSQSTHVP LTFGGGTKVE IKR

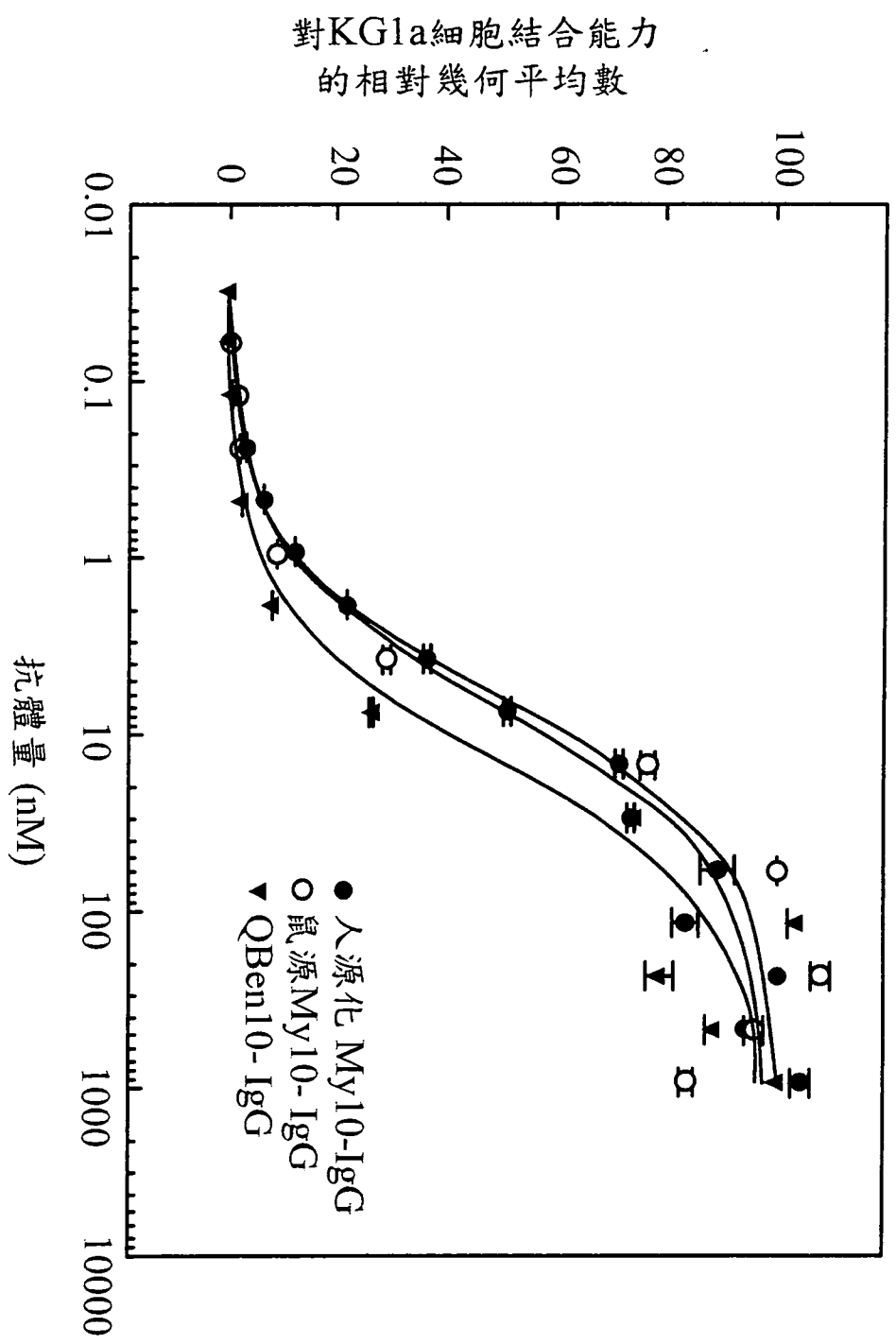
第 3 圖



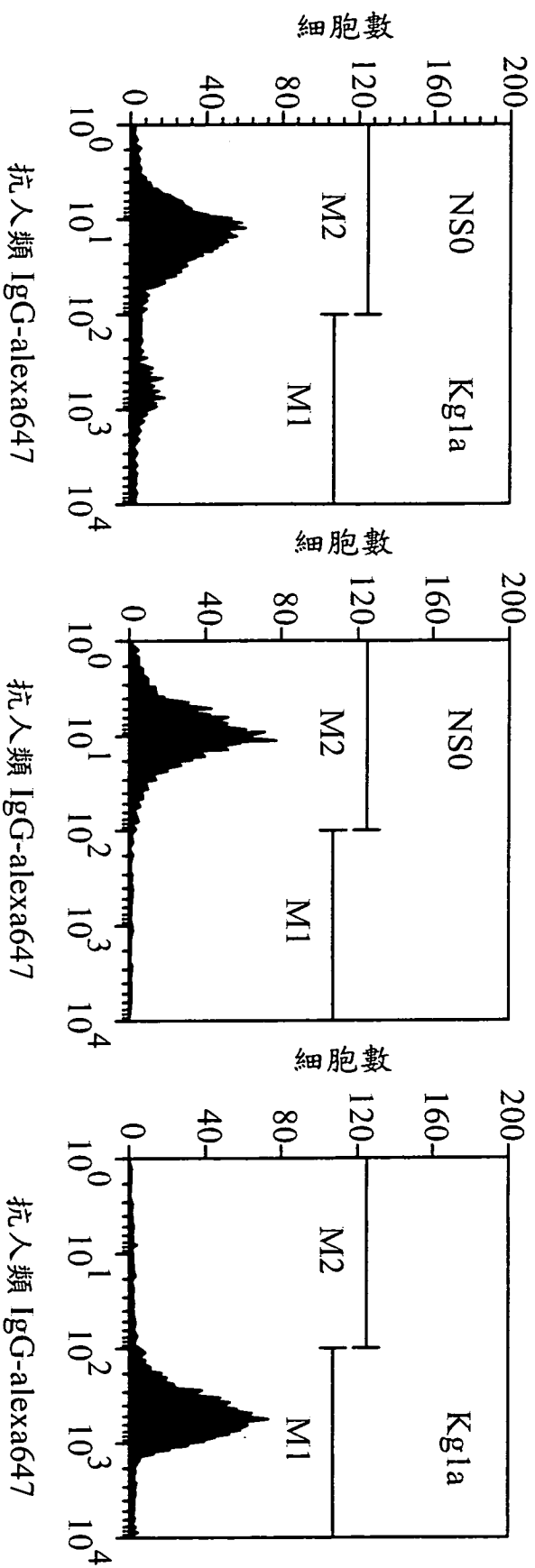
第4圖



第 5 圖



第 6 圖



未分離前

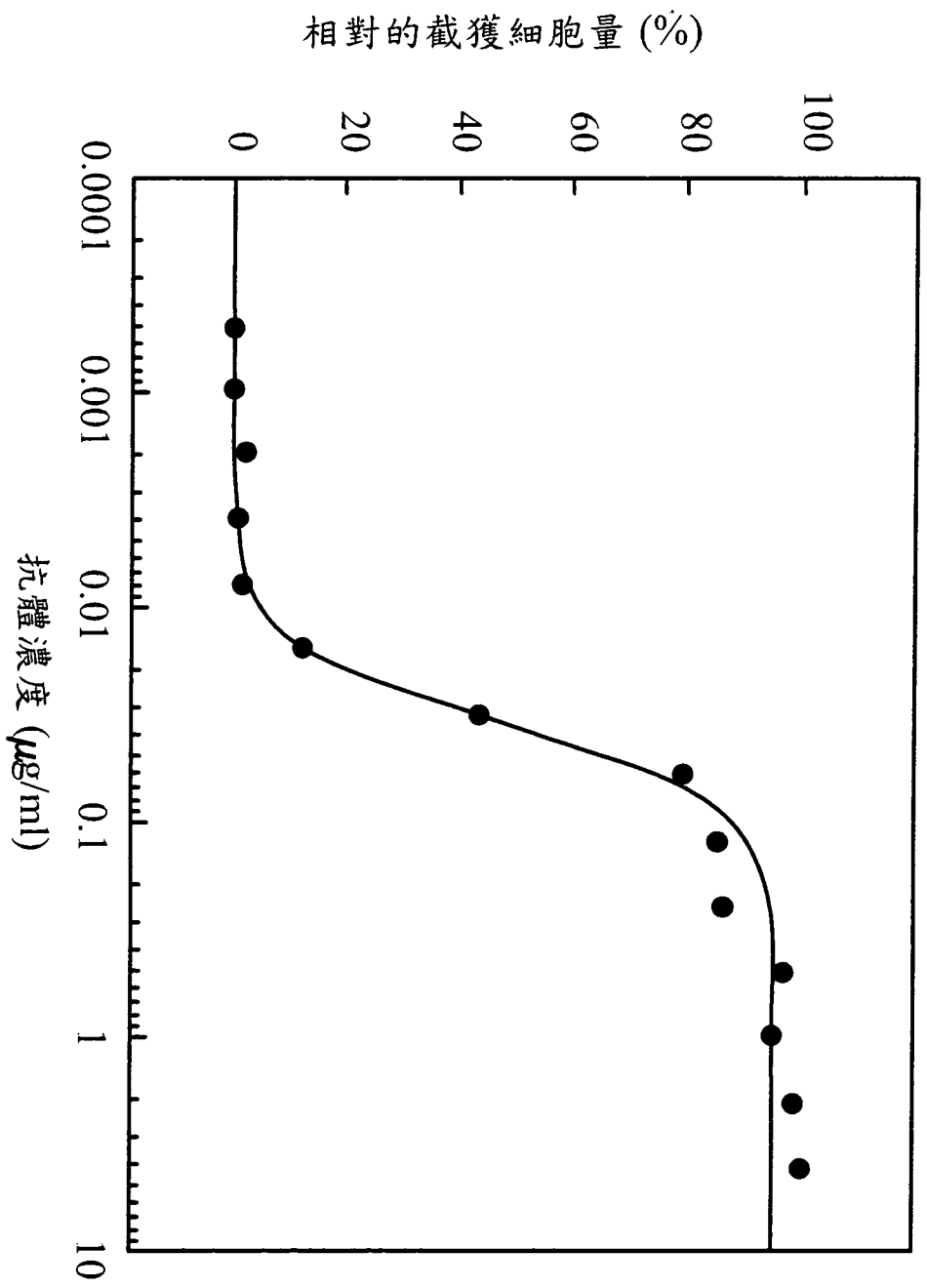
緩衝液沖洗

沖提

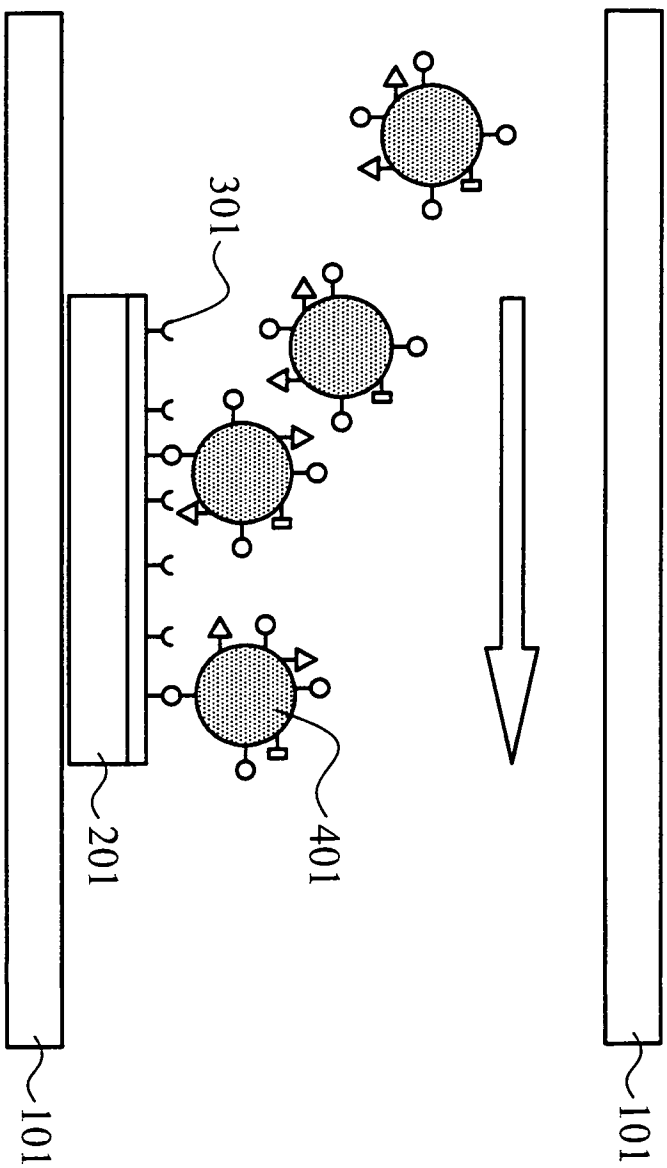
人源化 My10-IgG的免疫磁珠

產量 (%)	80%
純度 (%)	97%

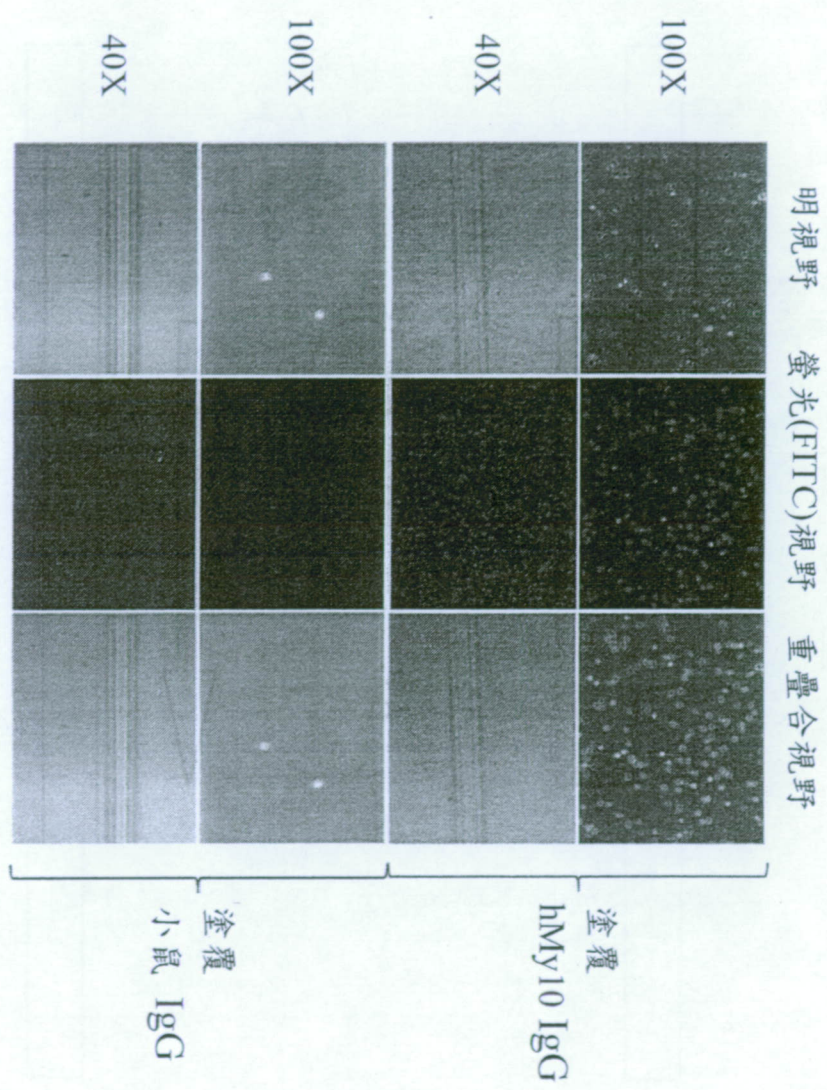
第 7 圖



第 8 圖



第 9 圖



第 10 圖