



(12) 发明专利

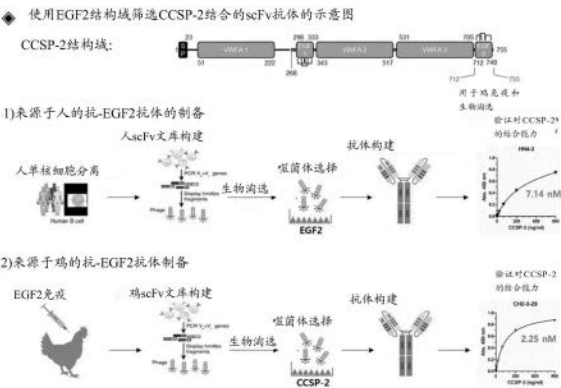
(10) 授权公告号 CN 113784988 B
(45) 授权公告日 2024. 09. 10

(21) 申请号 202080011664.1
(22) 申请日 2020.01.29
(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 113784988 A
(43) 申请公布日 2021.12.10
(30) 优先权数据
10-2019-0011172 2019.01.29 KR
(85) PCT国际申请进入国家阶段日
2021.07.29
(86) PCT国际申请的申请数据
PCT/KR2020/001370 2020.01.29
(87) PCT国际申请的公布数据
W02020/159229 KO 2020.08.06
(73) 专利权人 财团法人峨山社会福祉财团
地址 韩国首尔

专利权人 医帝思生物科技有限公司
蔚山大学校产学协力团
(72) 发明人 明承在 都恩珠 姜自英 孙溪男
金孝悌 阿-内乌姆·李 赵泳喜
(74) 专利代理机构 上海胜康律师事务所 31263
专利代理师 樊英如 张静
(51) Int.Cl.
C07K 16/30 (2006.01)
C07K 16/32 (2006.01)
G01N 33/574 (2006.01)
(56) 对比文件
CN 1766615 A, 2006.05.03
US 2010092470 A1, 2010.04.15
审查员 王静
权利要求书1页 说明书21页
序列表11页 附图12页

(54) 发明名称
特异性结合CCSP-2的单克隆抗体及其用途

(57) 摘要
本发明涉及与结肠癌分泌蛋白2 (CCSP-2) 的EGF2结构域特异性结合的单克隆抗体或其抗原结合片段。本发明的单克隆抗体或其抗原结合片段与CCSP-2的EGF2结构域特异性结合, 因此与现有的特异性结合到CCSP-2的肽相比具有显著增加的亲和力, 与现有的CCSP-2抗体相比, 进一步提高了特异性。因此, 在未来, 可通过在蛋白质水平特异性检测CCSP-2来实现准确诊断。



1. 一种特异性结合到结肠癌分泌蛋白-2 (CCSP-2) 的EGF2结构域的单克隆抗体或其抗原结合片段,其包含如下所示的重链可变区和轻链可变区:

包括由SEQ ID NO:1表示的CDR1区、由SEQ ID NO:2表示的CDR2区和由SEQ ID NO:3表示的CDR3区的重链可变区,以及包括由SEQ ID NO:4表示的CDR1区、由SEQ ID NO:5表示的CDR2区和由SEQ ID NO:6表示的CDR3区的轻链可变区,

其中所述单克隆抗体区分病变与正常组织。

2. 根据权利要求1所述的单克隆抗体或其抗原结合片段,其中所述抗原结合片段选自Fab、Fab'、F(ab')₂、scFv、Fv和dsFv。

3. 根据权利要求1所述的单克隆抗体或其抗原结合片段,其中所述EGF2结构域代表NCBI登录号AAT77225.1的氨基酸712-748的序列。

4. 一种多核苷酸,其编码根据权利要求1或2所述的单克隆抗体或其抗原结合片段。

5. 一种表达载体,其包含根据权利要求4所述的多核苷酸。

6. 一种转化体,其中引入了权利要求5所述的表达载体,其中所述转化体为细菌细胞、真菌细胞或动物细胞。

7. 权利要求6的转化体,其中所述真菌细胞是酵母细胞。

8. 一种用于癌症诊断的试剂盒,其包含根据权利要求1或2所述的单克隆抗体或其抗原结合片段,其中所述癌症是结肠癌或结直肠癌。

9. 根据权利要求1或2所述的单克隆抗体或其抗原结合片段在制备用于癌症诊断的组合物中的用途,其中所述癌症是结肠癌或结直肠癌。

特异性结合CCSP-2的单克隆抗体及其用途

技术领域

[0001] 本发明涉及与人结肠癌分泌蛋白-2 (CCSP-2) 的EGF2结构域特异性结合的单克隆抗体或其抗原结合片段。

背景技术

[0002] 大肠属于消化系统并且是位于小肠和肛门之间的器官。全长平均约1.5米,自右侧起分为盲肠、升结肠、横结肠、降结肠、乙状结肠和直肠。结直肠癌是发生在结肠和直肠中的恶性肿瘤,并且恶性肿瘤细胞(癌细胞)主要来源于上皮细胞。根据癌症发生的区域,发生在结肠的癌症称为结肠癌,发生在直肠的癌症称为直肠癌,并且这些统称为结直肠癌。

[0003] 据全国癌症登记统计,2011年结直肠癌共发生28,112例,占癌症总发病率(21,8017例)的12.9%,位居癌症发病率第3位,癌症死亡率第4位。

[0004] 结直肠癌死亡率持续上升的另一个原因是结直肠癌的初期症状很少,因此韩国结直肠癌的早期发现率低至小于10%。许多结直肠癌患者在第3和第4阶段,当开始转移到其他器官时才被诊断为转移性结直肠癌。3期结直肠癌的存活率相当低,为28%,4期大肠癌的存活率为6%,低于3期大肠癌的存活率。因此,结直肠癌的早期诊断非常重要。

[0005] 目前,最普遍使用的结直肠癌诊断方法是双重对比钡灌肠和结肠镜检查。双重对比钡灌肠是一种检查方法,在清洗大肠后,通过肛门插入小管以注入被称为钡的造影剂,在大肠壁上涂覆钡的薄层,同时通过注入空气使大肠膨胀,并使用X射线荧光镜拍摄图像。这种方法的优点是识别大肠的整体轮廓和形状,容易识别结直肠癌的整体位置,容易检测大肠壁(诸如炎症或缺血变化)和小肠远端中的变化。然而存在不能够利用检测获得组织以及小息肉的准确性不如结肠镜检查的缺点。

[0006] 作为一种用光和软管直接检查大肠的检查方法,结肠镜检查是诊断大肠疾病最准确的方法,这是因为医生可直接观察出血区域和病变表面,并确定组织的状况。活检也可与内窥镜检查同时进行,并且当患者在睡觉时通过静脉注射仅短时间起作用的镇静剂进行有意识的镇静内窥镜检查时,可在没有不适的情况下进行检查。

[0007] 结肠镜检查是发现结肠直肠癌的最佳诊断工具,但是在检查中漏检的息肉在患者的下一次测试中被检测为已发展为癌症的频率较高。由于大于1cm的息肉随时间的推移进展为癌症的可能性相对显著增加,因此有必要改进技术以便不在内窥镜检查中遗漏小息肉,并试图避免在退出检查期间遗漏弯曲和粘膜皱襞后面的病变并留有足够的余量。作为这些尝试中的一种,正在对用于分子成像的生物标志物和标志物的开发进行研究,以改善肿瘤检测率。

[0008] 同时,结肠癌分泌蛋白(例如,CCSP-2)是一种结直肠癌特异性标志物(biomarker),关于编码其的基因的信息在相关领域中是众所周知的。例如,CCSP-2可以为人CCSP-2,关于人CCSP-2蛋白的信息以登录号AAT77225.1在国家生物技术信息中心(NCBI)注册,关于编码其的基因的信息同样以登录号AY572972.1在NCBI注册。CCSP-2的功能和作用尚不清楚,但在RNA水平上,已知其在结直癌细胞和/或组织中的平均表达水平是正常组

织(无结直肠癌细胞组织)中的78倍。此外,CCSP-2是一种分泌蛋白和细胞外基质(ECM)蛋白,其在结直肠癌特异性表达中增加,并且具有通过靶向结直肠癌组织中积累的CCSP-2蛋白来标记结直肠癌组织以及使用血液诊断大肠癌的优点。因此,当在基因和/或蛋白质水平测量CCSP-2的表达和/或表达水平时,可准确地且容易地确认结直肠癌的存在和/或结直肠癌的进展程度。

[0009] 目前可商购获得的特异性结合到CCSP-2的抗体存在的问题是具有较低特异性,因此与约50%的正常细胞(或组织)结合而不是与用于标记的结直肠癌细胞(或组织)结合。

[0010] 为此,本发明人开发了一种特异性结合到CCSP-2的肽,其在蛋白质水平上证实了特异性检测CCSP-2的效果,并证明了结直肠癌和/或结直肠癌细胞和/或组织可被检测到,这在韩国专利申请公布10-2018-0060184中公开。

[0011] 在对特异性检测CCSP-2的技术进行持续研究的同时,本发明人开发了一种特异性结合到CCSP-2的EGF2结构域的单克隆抗体,并证实了与特异性结合到CCSP-2的常规肽相比,该抗体的亲和力显著改善,具体地讲特异性更加改善,从而完成了本发明。

[0012] 技术问题

[0013] 本发明涉及提供特异性结合到结肠癌分泌蛋白-2(CCSP-2)或其抗原结合片段的单克隆抗体。

[0014] 本发明还涉及提供编码单克隆抗体或其抗原结合片段的多核苷酸、包含该多核苷酸的表达载体和在其中引入该载体的转化体。

[0015] 本发明还涉及提供一种用于诊断癌症的组合物,其包括单克隆抗体或其抗原结合片段。

[0016] 本发明还涉及提供一种用于诊断癌症的试剂盒,其包括单克隆抗体或其抗原结合片段。

[0017] 本发明还涉及提供一种为癌症诊断提供信息的方法,该方法包括使用单克隆抗体或其抗原结合片段通过抗原抗体反应检测从怀疑患有癌症的受试者分离的生物样品中的CCSP-2蛋白。

[0018] 技术方案

[0019] 实现上述目的,本发明提供了一种特异性结合到人CCSP-2的EGF2结构域的单克隆抗体,其包括选自下列1)至4)的重链可变区和轻链可变区,或其抗原结合片段:

[0020] 1) 包括由SEQ ID NO:1表示的CDR1区、由SEQ ID NO:2表示的CDR2区和由SEQ ID NO:3表示的CDR3区的重链可变区,以及包括由SEQ ID NO:4表示的CDR1区、由SEQ ID NO:5表示的CDR2区和由SEQ ID NO:6表示的CDR3区的轻链可变区;

[0021] 2) 包括由SEQ ID NO:7表示的CDR1区、由SEQ ID NO:8表示的CDR2区和由SEQ ID NO:9表示的CDR3区的重链可变区,以及包括由SEQ ID NO:10表示的CDR1区、由SEQ ID NO:11表示的CDR2区和由SEQ ID NO:12表示的CDR3区的轻链可变区;

[0022] 3) 包括由SEQ ID NO:13表示的CDR1区、由SEQ ID NO:14表示的CDR2区和由SEQ ID NO:15表示的CDR3区的重链可变区,以及包括由SEQ ID NO:16表示的CDR1区、由SEQ ID NO:17表示的CDR2区和由SEQ ID NO:18表示的CDR3区的轻链可变区;以及

[0023] 4) 包括由SEQ ID NO:19表示的CDR1区、由SEQ ID NO:20表示的CDR2区和由SEQ ID NO:21表示的CDR3区的重链可变区,以及包括由SEQ ID NO:22表示的CDR1区、由SEQ ID NO:

23表示的CDR2区和由SEQ ID NO:24表示的CDR3区的轻链可变区。

[0024] 在本发明的一个实施方案中,抗原结合片段可选自Fab、Fab'、F(ab')₂、scFv、Fv、dsFv、双抗体、Fd和Fd'。

[0025] 在本发明的一个实施方案中,单克隆抗体或其抗原结合片段可以包括重链可变区和轻链可变区,其选自包括由SEQ ID NO:25表示的多肽序列的重链可变区和包括SEQ ID NO:26表示的多肽序列的轻链可变区;包括由SEQ ID NO:27表示的多肽序列的重链可变区和包括由SEQ ID NO:28表示的多肽序列的轻链可变区;包括由SEQ ID NO:29表示的多肽序列的重链可变区和包括由SEQ ID NO:30表示的多肽序列的轻链可变区;以及包括由SEQ ID NO:31表示的多肽序列的重链可变区和包括由SEQ ID NO:32表示的多肽序列的轻链可变区。

[0026] 本发明还提供编码该单克隆抗体的多核苷酸,或其抗原结合片段。

[0027] 本发明还提供了一种包含该多核苷酸的表达载体。

[0028] 本发明还提供了一种转化体,其中引入了表达载体,不包括人。

[0029] 本发明还提供了一种用于诊断癌症的组合物,其包括单克隆抗体或其抗原结合片段。

[0030] 在本发明的一个实施方案中,所述癌症选自:食管癌、胃癌、结直肠癌、直肠癌、口腔癌、咽癌、喉癌、肺癌、结肠癌、乳腺癌、宫颈癌、子宫内膜癌、卵巢癌、前列腺癌、睾丸癌、膀胱癌、肾癌、肝癌、胰腺癌、骨癌、结缔组织癌、皮肤癌、脑癌、甲状腺癌、白血病、霍奇金病、软组织肉瘤、淋巴瘤和多发性骨髓瘤血液癌。

[0031] 本发明还提供了一种用于诊断癌症的试剂盒,其包括该组合物。

[0032] 本发明还提供了一种提供用于癌症诊断的信息的方法,其包括使用该单克隆抗体或其抗原结合片段通过抗原抗体反应检测从怀疑患有癌症的受试者分离的生物样品中的CCSP-2蛋白。

[0033] 有益效果

[0034] 因为本发明的单克隆抗体或其抗原结合片段特异性结合到CCSP-2的EGF2结构域,与特异性结合到CCSP-2的常规肽相比,亲和力可显著改善,并且与抗CCSP-2的常规抗体相比,特异性可更加改善。因此,CCSP-2在蛋白质水平被特异性检测到,从而在未来实现准确诊断。

附图说明

[0035] 图1是示出根据本发明的一个实施方案克隆scFv抗体的可变区的策略的示意图。

[0036] 图2是示出CCSP-2的抗原CCSP-2-NT、CCSP-2-CT和CCSP-2-EGF2位点的示意图。

[0037] 图3是示出CCSP-2-CT和CCSP-2-EGF2抗原的各自表达载体的示意图。

[0038] 图4A和4B分别示出了通过对由第三次和第四次生物淘选产生的噬菌体(输出)的48个克隆体进行ELISA获得的噬菌体ELISA结果。

[0039] 图5是根据本发明一个实施方案的表达载体的遗传图谱。

[0040] 图6是示出由本发明制备的scFv的HN-1的分子量的SDS-PAGE凝胶图像。

[0041] 图7示出了用于确认本发明的scFv中HN-1的每个抗原(CCSP-2)结构域的结合能力的蛋白质印迹结果。

[0042] 图8是示出通过分析本发明的scFv中HN-1的抗原(CCSP-2)结合能力获得的ELISA结果的图。

[0043] 图9A、9B和9C示出了关于来自鸡文库1、2和3的第四次生物淘选产生的噬菌体(输出)的96个克隆体的抗原(CCSP-2)结合噬菌体ELISA结果。

[0044] 图10是表示根据本发明的一个实施方案的表达载体的遗传图谱。

[0045] 图11示出了用于确认由本发明产生的scFv中CH-1、CH-2和CH-3的每个抗原(CCSP-2)结构域的结合能力的蛋白质印迹结果。

[0046] 图12是示出通过分析本发明scFv中的CH-1、CH-2、CH-3的抗原(CCSP-2)结合能力获得的ELISA结果的一组图。

[0047] 图13A是示出每个结构域的CCSP2抗体位置以及每个CCSP-2抗体识别哪个结构域的示意图。图13B为示出CWRU抗体特异性识别EGF2结构域,并且Proteintech抗体特异性识别VWFA2结构域的蛋白质印迹结果。

[0048] 图14A示出用于比较分析细胞裂解物中CWRU抗体和Proteintech抗体的抗原(CCSP-2)特异性检测能力的蛋白质印迹结果。图14B示出用于比较分析在正常结直肠组织和结直肠癌组织中CWRU抗体和Proteintech抗体的抗原(CCSP-2)特异性检测能力的免疫组织化学结果。

[0049] 图15是比较目前可获得的抗CCSP-2抗体的结合(检测)位点的示意图。

[0050] 图16是示出特异性结合到CCSP-2的常规肽(韩国专利申请10-2018-0060184)的亲合力的一组图。

具体实施方式

[0051] 以下,将详细描述本发明。

[0052] 本发明提供了特异性结合到人结肠癌分泌蛋白2(CCSP-2)的EGF2结构域或抗原结合片段的单克隆抗体。CCSP-2对结肠直肠癌具有特异性(例如,在结肠直肠癌中特异性表达)。

[0053] 本发明人鉴定了特异性识别CCSP-2的抗体、以及其重链可变区的氨基酸序列、其轻链可变区的氨基酸序列及其编码核苷酸序列。

[0054] 此外,根据本发明的一个示例性实施方案,通过提供与CCSP-2特异性结合的单克隆抗体或其抗原结合片段,可以通过特异性检测CCSP-2来准确诊断结直肠癌和/或结直肠癌细胞和/或组织,具体地讲,其通过利用与可见标记材料缀合的抗体使结直肠组织可视化,来有效地应用于结直肠癌的内窥镜诊断。

[0055] 本文所用的术语“抗体”是指用作特异性识别抗原的受体的蛋白质分子,其包括对特定抗原具有免疫反应性的免疫球蛋白分子,并且包括多克隆抗体、单克隆抗体和抗体分子的抗原结合片段(抗体片段)以及完整的抗体形式。此外,该术语包括嵌合抗体、人源化抗体、二价或双特异性分子(例如,双特异性抗)、双抗体、三抗体和四抗体。

[0056] 术语“完整抗体”具有含两条全长轻链和两条全长重链的结构,其中每条轻链通过二硫键与重链连接。完整的抗体包括IgA、IgD、IgE、IgM和IgG,其中IgG有亚型,例如IgG1、IgG2、IgG3和IgG4。

[0057] 本文所用术语“抗体的抗原结合片段”是指在完整抗体分子中保留抗原-抗体结合

功能的片段,并且包括Fab、Fab'、F(ab')₂、scFv、Fv、dsFv、双体、Fd和Fd'。Fab具有含轻链和重链可变区、轻链恒定区和重链的第一恒定区(CH1结构域)的结构,并且具有一个抗原结合位点。Fab'与Fab的区别在于,在重链的CH1结构域的C末端处存在具有一个或多个半胱氨酸残基的铰链区。F(ab')₂抗体是通过在Fab'铰链区的半胱氨酸残基之间形成二硫键而产生的。可变片段(Fv)是指仅具有重链可变区和轻链可变区的最小抗体片段。双链Fv(dsFv)通过使用二硫键连接重链可变区和轻链可变区而形成的,并且单链Fv(scFv)一般具有与诸如dsFv的二聚体相同的结构,因为重链可变区使用肽接头通过共价键与轻链可变区连接,或者可直接连接至C端。双抗体是两条或更多条多肽链或蛋白质的复合物,并且是指包括至少一个VL结构域和至少一个VH结构域或其片段的复合物,并且在单个多肽链中具有两个结构域。在一个实施方案中,双抗体包括含有Fc或铰链-Fc结构域的分子。此类复合物的多肽链可以相同或不同,换句话说讲,双抗体可以为单聚体或杂聚体。

[0058] 抗原结合片段可使用蛋白酶获得(例如,Fab可通过木瓜蛋白酶限制完整抗体获得,F(ab')₂片段可通过胃蛋白酶切割获得),并且优选地使用基因重组技术制造。

[0059] 本文所用的术语“重链”是指由可变区结构域VH和三个恒定区结构域CH1、CH2和CH3组成的全长重链及其片段,其包括具有赋予抗原特异性的足够可变区序列的氨基酸序列。此外,本文所用的术语“轻链”是指由可变区结构域VL和恒定区结构域CL组成的全长轻链或其片段,其包括具有赋予抗原特异性的足够可变区序列的氨基酸序列。

[0060] 本文所用的术语“单克隆抗体”是指从基本相同的抗体群体中获得的具有单一分子组成的抗体分子,并且表现出对特定表位的单一结合特异性和亲和力。通常,免疫球蛋白具有重链和轻链,其中重链和轻链中的每一者均包括恒定区和可变区(这些区域也称为结构域)。轻链和重链的可变区包括被称为互补决定区(以下简称“CDR”)的三个可变区和四个框架区(FR)。CDR主要用于结合到抗原的表位。每条链的CDR通常从N端开始依次被称为CDR1、CDR2和CDR3,并且还通过特定CDR所位于其中的链来区分。

[0061] 术语“互补决定区(CDR)”是指免疫球蛋白重链或轻链可变区(高变区)的氨基酸序列(Kabat et al. Sequences of Proteins of Immunological Interest, 4th Ed., U.S. Department of Health and Human Services, National Institutes of Health (1987))。每条重链(CDRH1、CDRH2和CDRH3)和每条轻链() CDRL1、CDRL2和CDRL3)中包含三个CDR,并为抗体提供主要接触残基以与抗原或表位结合。

[0062] 同时,如上所述,单克隆抗体可以呈具有降低的免疫原性的嵌合抗体或人源化抗体的形式以应用于人。

[0063] 术语“嵌合抗体”是通过DNA重组技术将来源于小鼠或鸡的异源抗体的可变区与人抗体的恒定区结合形成的抗体,并且与来源于小鼠或鸡的异源抗体相比,该嵌合抗体的免疫反应显著改善,因此可在临床上使用。

[0064] 本文所用的术语“人源化抗体”是指将来源于小鼠或鸡的异源单克隆抗体的全部或部分CDR序列移植到人抗体中形成的抗体,人源化可变区可以通过将鸡或小鼠单克隆抗体与人抗体衍生FR重组形成,并且人抗体可通过将可变区与优选的人抗体的恒定区重组形成,但本发明不限于此。此外,因为人源化抗体在仅插入来源于鸡或小鼠的CDR时亲和力降低,因此可以通过用鸡或小鼠抗体的氨基酸取代可被认为影响CDR的三维结构的FR氨基酸残基来改善亲和力,但本发明不限于此。

[0065] 术语“与结肠癌分泌蛋白-2 (CCSP-2) 的EGF2结构域特异性结合的单克隆抗体”是指能够与CCSP-2特异性结合的抗体,并且可与抗CCSP-2抗体互换使用。与CCSP-2蛋白特异性结合的单克隆抗体可以是但不限于任何与CCSP-2结合以抑制CCSP-2的生物活性的单克隆抗体

[0066] 此外,单克隆抗体的形式可包括如上所述的完整抗体和抗原结合片段两者,并且可以为嵌合抗体或人源化抗体,但本发明不限于此。此外,本发明的单克隆抗体可与CCSP-2的EGF2结构域特异性结合,以抑制通过CCSP-2的信号传导,导致抑制生物活性,因此可有效用于预防或治疗疾病,诸如作为由CCSP-2介导的癌症。此外,由于CCSP-2过表达被报道为癌症中的一种特异性现象,并且能够特异性结合到CCSP-2的本发明抗体在癌症诊断中具有高灵敏度和特异性的诊断能力,因此该抗体可有效用于癌症的诊断。在本发明的一个实施方案中,使用CCSP-2的EGF2位点作为抗原蛋白形成本发明的特异性结合到CCSP-2的抗原结合片段。

[0067] 特异性结合人CCSP-2的EGF2结构域的单克隆抗体或其抗原结合片段可包括选自下面1)至4)的任何一对重链可变区和轻链可变区,但本发明不限于此:

[0068] 1) 包括由SEQ ID NO:1表示的CDR1区、由SEQ ID NO:2表示的CDR2区和由SEQ ID NO:3表示的CDR3区的重链可变区,以及包括由SEQ ID NO:4表示的CDR1区、由SEQ ID NO:5表示的CDR2区和由SEQ ID NO:6表示的CDR3区的轻链可变区;

[0069] 2) 包括由SEQ ID NO:7表示的CDR1区、由SEQ ID NO:8表示的CDR2区和由SEQ ID NO:9表示的CDR3区的重链可变区,以及包括由SEQ ID NO:10表示的CDR1区、由SEQ ID NO:11表示的CDR2区和由SEQ ID NO:12表示的CDR3区的轻链可变区;

[0070] 3) 包括由SEQ ID NO:13表示的CDR1区、由SEQ ID NO:14表示的CDR2区和由SEQ ID NO:15表示的CDR3区的重链可变区,以及包括由SEQ ID NO:16表示的CDR1区、由SEQ ID NO:17表示的CDR2区和由SEQ ID NO:18表示的CDR3区的轻链可变区;以及

[0071] 4) 包括由SEQ ID NO:19表示的CDR1区、由SEQ ID NO:20表示的CDR2区和由SEQ ID NO:21表示的CDR3区的重链可变区,以及包括由SEQ ID NO:22表示的CDR1区、由SEQ ID NO:23表示的CDR2区和由SEQ ID NO:24表示的CDR3区的轻链可变区。

[0072] 在本发明的一个实施方案中,抗原结合片段优选为Fab、Fab'、F(ab')₂、scFv、Fv、dsFv、双抗体、Fd、Fd',包括本发明的CDR区的轻链或重链,或包括本发明的CDR区的可变结构域,但本发明不限于此。

[0073] 在本发明的另一实施方案中,单克隆抗体或其抗原结合片段优选包括一对重链可变区和轻链可变区,其选自包括由SEQ ID NO:25表示的多肽序列的重链可变区和包括SEQ ID NO:26表示的多肽序列的轻链可变区;包括由SEQ ID NO:27表示的多肽序列的重链可变区和包括由SEQ ID NO:28表示的多肽序列的轻链可变区;包括由SEQ ID NO:29表示的多肽序列的重链可变区和包括由SEQ ID NO:30表示的多肽序列的轻链可变区;以及包括由SEQ ID NO:31表示的多肽序列的重链可变区和包括由SEQ ID NO:32表示的多肽序列的轻链可变区。

[0074] 本发明的抗体或其抗原结合片段还包括实现本发明效果的所有突变体,这些突变体通过由上述序列限制的抗体的一个或多个突变(诸如取代、缺失、倒位或易位)获得。

[0075] 此外,本发明提供了编码单克隆抗体或其抗原结合片段的多核苷酸。

[0076] 多核苷酸可选自SEQ ID NO:33至36,但本发明不限于此。

[0077] 本发明还提供了一种表达载体,其包括多核苷酸和在其中引入该载体的转化体。

[0078] 包含编码根据本发明的单克隆抗体的多核苷酸的表达载体可以为但不特别限于能够在真核或原核细胞中复制和/或表达多核苷酸的载体,所述真核或原核细胞包括哺乳动物细胞(例如人、猴、兔、大鼠、仓鼠和小鼠细胞)、植物细胞、酵母细胞或细菌细胞(例如,大肠杆菌),以及优选地,可操作地连接到合适的启动子使得核苷酸可在宿主细胞中表达并且包括至少一个选择标记的载体。例如,表达载体可以是将多核苷酸引入噬菌体、质粒、粘粒、微型染色体、病毒或逆转录病毒载体中的形式。

[0079] 包含编码单克隆抗体的多核苷酸的表达载体可以为包含编码单克隆抗体的重链或轻链的多核苷酸的表达载体或包含编码重链和轻链的多核苷酸两者的表达载体。

[0080] 在其中引入本发明的表达载体的转化体可以为但不特别限于细菌细胞,诸如大肠杆菌、链霉菌或鼠伤寒沙门氏菌;酵母细胞;真菌细胞,诸如毕赤酵母;昆虫细胞,诸如果蝇或斜纹夜蛾Sf9细胞;动物细胞,诸如中国仓鼠卵巢(CHO)细胞、SP2/0(小鼠骨髓瘤)、人淋巴瘤细胞、COS、NS0(小鼠骨髓瘤)、293T、Bowes黑色素瘤细胞、HT-1080、幼仓鼠肾(BHK)细胞、人胚胎肾(HEK)细胞或PERC.6(人视网膜细胞);或通过引入表达载体转化的植物细胞。

[0081] 本文使用的术语“引入”是指将包含编码单克隆抗体的多核苷酸的载体递送至宿主细胞的方法。引入可通过本领域已知的各种方法进行,诸如磷酸钙-DNA共沉淀、DEAE-葡聚糖介导的转染、聚凝胺介导的转染、电穿孔、显微注射、脂质体融合、Lipofectamine和原生质体融合。此外,转导是指使用病毒颗粒通过感染将所需材料递送到细胞中。此外,转导可以为经由基因轰击将载体引入宿主细胞中。在本发明中,引入可与转化互换使用。

[0082] 本发明还提供一种用于诊断癌症的组合物,其包含所述单克隆抗体。

[0083] 本文使用的术语“癌症”可以为任何表达CCSP-2的癌症,并且示例包括但不限于食管癌、胃癌、结直肠癌、直肠癌、口腔癌、咽癌、喉癌、肺癌、结肠癌、乳腺癌、宫颈癌、子宫内膜癌、卵巢癌、前列腺癌、睾丸癌、膀胱癌、肾癌、肝癌、胰腺癌、骨癌、结缔组织癌、皮肤癌、脑癌、甲状腺癌、白血病、霍奇金病、软组织肉瘤、淋巴瘤和多发性骨髓瘤血液学癌,并且优选地结直肠癌或胰腺癌。

[0084] 本文使用的术语“诊断”是指确认病理状态的存在、严重性(症状)和/或特征。如本说明书中所用的,“结直肠癌的诊断”是对结直肠病理状态的确认,例如结直肠癌的发病、结直肠病变的进展、结直肠的位置(结直肠癌细胞)、或结直肠癌的阶段。为了更准确的诊断,重要的是准确快速地将结肠直肠癌细胞和/或组织与正常细胞或组织进行区分。

[0085] 作为本发明的一个示例性实施方案,本发明提供了与CCSP-2特异性结合的单克隆抗体,从而在蛋白质水平特异性检测CCSP-2,从而可以准确诊断结直肠癌和/或结直肠癌细胞和/或组织。具体地讲,可以使用与抗体缀合的用于可视化的标记材料来可视化结直肠组织,因此可以有效地应用于结直肠癌的内窥镜诊断。

[0086] 上面已经描述了单克隆抗体和癌症。可使用包含本发明的CCSP-2特异性单克隆抗体的诊断组合物诊断与CCSP-2的表达或CCSP-2介导的疾病的进展相关联的疾病,例如癌症。

[0087] 本发明还提供了一种用于诊断癌症的试剂盒,其包括用于诊断癌症的组合物。

[0088] 上文已经描述了组合物和癌症。此外,用于诊断癌症的试剂盒可被配置为还包括

组合物、溶液或装置,其具有适用于分析方法的一种或多种类型的成分。

[0089] 在本说明书中,通过提供与作为在结直肠癌中特异性表达的生物标志物的CCSP-2特异性结合的抗体,提供了可用于测量CCSP-2表达和/或CCSP-2表达水平的手段,因此,这种手段可有效地应用于癌症的诊断,特别是结直肠癌的诊断。此外,该抗体在与各种标记材料一起使用时可用于癌症的可视化,并应用于结直肠癌内窥镜检查,以提供关于确认结直肠癌和病变存在的更准确信息,以及对癌症位点的形态学观察,并且可以降低与结直肠癌相关的误诊率并有助于早期诊断。此外,当诸如药物等的生物活性物质与抗体结合时,生物活性物质可特异性递送至结直肠癌,因此可作用于生物活性物质的结直肠癌靶向递送的组合物。

[0090] 本发明提供了一种为癌症诊断提供信息的方法,其包括使用单克隆抗体通过抗原-抗体反应检测从怀疑患有癌症的受试者分离的生物样品中的CCSP-2蛋白。

[0091] 上面已经描述了单克隆抗体、癌症、受试者和CCSP-2蛋白。在提供用于癌症诊断的信息的方法中,可通过使对本发明的CCSP-2具有特异性的单克隆抗体与从怀疑患有癌症的受试者分离的生物样品反应并检测抗原抗体复合物的形成来检测CCSP-2蛋白,从而提供用于癌症诊断的信息。由于CCSP-2在各种癌细胞诸如结肠直肠癌或胰腺癌中过表达,因此可通过将表达水平与对照(诸如正常细胞或组织)的表达水平进行比较来诊断癌症,但本发明不限于此。

[0092] 本文使用的术语“生物样品”可指组织、细胞、全血、血清、血浆、组织解剖样品(脑、皮肤、淋巴结、脊髓等)、细胞培养上清液、破裂的真核细胞和细菌表达系统,但本发明不限于此。这些生物样品可以在进行或不进行操作处理的情况下与本发明的抗体反应,从而确认CCSP-2蛋白的存在或癌症的存在或不存在。

[0093] 本文所用的术语“抗原-抗体复合物”是指样品中的CCSP-2蛋白抗原与识别该抗原的根据本发明的单克隆抗体的缀合物,并且可通过选自下列的任何方法来检测此类抗原-抗体复合物的形成:比色法、电化学法、荧光法、发光法、粒子计数法、目视评估和闪烁计数法。然而,该方法不特别限于此,并且可以使用各种应用。

[0094] 在本发明中,为了检测抗原-抗体复合物,可使用各种标记物。作为具体的示例,标记物可以选自酶、荧光材料、配体、发光材料、微粒和放射性同位素,但本发明不限于此。

[0095] 用作检测标记的酶包括乙酰胆碱酯酶、碱性磷酸酶、 β -D-半乳糖苷酶、辣根过氧化物酶和 β -内酰胺酶,用作检测标记的荧光材料包括荧光素、 Eu^{3+} 、 Eu^{3+} 螯合物和穴状化合物,用作检测标记的配体包括生物素衍生物,用作检测标记的发光材料包括吖啶酯和异鲁米诺衍生物,用作检测标记的微粒包括胶体金和有色乳胶,用作检测标记的放射性同位素包括 ^{57}Co 、 ^3H 、 ^{125}I 、 ^{125}I -Bonton和亨特试剂。

[0096] 优选地,可通过ELISA检测抗原-抗体复合物。ELISA包括各种ELISA方法,例如,直接ELISA使用标记的抗体识别附着在固体载体上的抗原,间接ELISA使用标记的二抗识别抗体复合物中的捕获抗体,从而识别附着在固体载体上的抗原,直接夹心ELISA使用另一种标记的抗体识别附着在固体载体上的抗体-抗原复合物中的抗原,以及间接夹心ELISA与识别附着在固体载体上的抗体-抗原复合物中的抗原的另一种抗体反应,并使用标记的二抗来识别该抗体。

[0097] 单克隆抗体可具有检测标记,当没有检测标记时,可通过处理另一种具有检测标

记的抗体来捕获和检测这些单克隆抗体。

[0098] 在本发明的一个实施方案中,通过使用抗原-抗体反应确认本发明的抗CCSP-2抗体特异性识别CCSP-2,示出本发明的抗体可有效地用于诊断各种类型的癌症,诸如结直肠癌。

[0099] 在下文中,将参考实施例详细描述根据本发明的单克隆抗体或其抗原结合片段。

[0100] 实施例

[0101] 制备例.CCSP-2抗原的构建

[0102] 图1是示出根据本发明的一个实施方案克隆scFv抗体的可变区的策略的示意图。

[0103] 此外,图2是示出根据本发明的一个实施方案的CCSP-2抗原 (NT、CT和EGF2) 的示意图。

[0104] 在抗原中,CCSP-2-CT和CCSP-2-EGF2含有EGF2结构域。

[0105] 具体地将,将CCSP-2-CT (AY57297231的268aa-755aa) 插入pBT7-C-his载体 (Bioneer,Korea) 中以转导到Origami2 (DE3) (Novagen,MA,USA) 中。

[0106] 将CCSP-2-EGF2 (AY572972.1的712aa-755aa) 插入到pBT7-N-His载体 (Bioneer,Korea) 中以转导到Origami2 (DE3) (Novagen,MA,USA) 中。

[0107] 图3是示出CCSP-2-CT和CCSP-2-EGF2的各自表达载体的示意图。

[0108] CCSP-2-CT和CCSP-2-EGF2用Ni-NTA琼脂糖珠 (Qiagen,USA) 纯化。

[0109] 实施例1.人源化抗EGF2抗体的制备

[0110] 1-1.从人天然抗体库中选择抗EGF2抗体

[0111] 1-1-1.分离人单核细胞

[0112] 通过用Ficoll-Paque溶液 (GE Healthcare) 处理16个人扁桃体组织的样本来收集外周血单个核细胞,并使用TRI试剂 (Invitrogen) 提取总RNA。第一链cDNA使用oligo-dT引物和SuperscriptIII第一链合成系统 (Invitrogen) 合成。

[0113] 1-1-2.人scFv文库的构建

[0114] scFv文库使用下表1中对免疫球蛋白的重链可变区和轻链可变区具有特异性的引物以及Expand High Fidelity PCR系统 (Roche Molecular Systems) 由得自人单核细胞的cDNA构建。

[0115] [表1]

[0116]	V _K 引物	
	前向	
	HCK1-F	GGGCCAGGCGGCCGAGCTCCAGATGACCCAGTCTCC
	HCK24-F	GGGCCAGGCGGCCGAGCTCGTGATGACYCAGTCTCC
	HCK3-F	GGGCCAGGCGGCCGAGCTCGTGWTGACRCAGTCTCC
	HCK5-F	GGGCCAGGCGGCCGAGCTCACACTCACGCAGTCTCC

[0117]

反向	
HSCJK14o-B	GGAAGATCTAGAGGAACCACCTTTGATYTCCACCTTGGTCCC
HSCJK2o-B	GGAAGATCTAGAGGAACCACCTTTGATCTCCAGCTTGGTCCC
HSCJK3o-B	GGAAGATCTAGAGGAACCACCTTTGATATCCACTTTGGTCCC
HSCJK5o-B	GGAAGATCTAGAGGAACCACCTTTAATCTCCAGTCGTGTCCC
V _λ 引物	
前向	
HSCLam1a	GGGCCCAGGCGGCCGAGCTCGTGBTGACGCAGCCGCCCTC
HSCLam1b	GGGCCCAGGCGGCCGAGCTCGTGCTGACTCAGCCACCCTC
HSCLam2	GGGCCCAGGCGGCCGAGCTCGCCCTGACTCAGCCTCCCTCCGT
HSCLam3	GGGCCCAGGCGGCCGAGCTCGAGCTGACTCAGCCACCCTCAGTGTC
HSCLam4	GGGCCCAGGCGGCCGAGCTCGTGCTGACTCAATCGCCCTC
HSCLam6	GGGCCCAGGCGGCCGAGCTCATGCTGACTCAGCCCCACTC
HSCLam78	GGGCCCAGGCGGCCGAGCTCGTGGTGACYCAGGAGCCMTC
HSCLam9	GGGCCCAGGCGGCCGAGCTCGTGCTGACTCAGCCACCTTC
反向	
HSCJLam1236	GGAAGATCTAGAGGAACCACCGCCTAGGACGGTCASCTTGGTSCC
HSCJLam57	GGAAGATCTAGAGGAACCACCGCCGAGGACGGTCAGCTSGGTSCC
VH 引物	
前向	
HSCVH1-FL	GGTGGTTCCTCTAGATCTTCCTCCTCTGGTGGCGGTGGCTCGGGCGGT GGTGGGCAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGG
HSCVH2-FL	GGTGGTTCCTCTAGATCTTCCTCCTCTGGTGGCGGTGGCTCGGGCGGT GGTGGGCAGATCACCTTGAAGGAGTCTGG

[0118]

HSCVH35-FL	GGTGGTTCCTCTAGATCTTCCTCCTCTGGTGGCGGTGGCTCGGGCGGT GGTGGGGAGGTGCAGCTGGTGSAGTCTGG
HSCVH3a-FL	GGTGGTTCCTCTAGATCTTCCTCCTCTGGTGGCGGTGGCTCGGGCGGT GGTGGGGAGGTGCAGCTGKTGGAGTCTG
HSCVH4-FL	GGTGGTTCCTCTAGATCTTCCTCCTCTGGTGGCGGTGGCTCGGGCGGT GGTGGGCAGGTGCAGCTGCAGGAGTCGGG
HSCVH4a-FL	GGTGGTTCCTCTAGATCTTCCTCCTCTGGTGGCGGTGGCTCGGGCGGT GGTGGGCAGGTGCAGCTACAGCAGTGGGG
反向	
HSCG1234-B	CCTGGCCGGCCTGGCCACTAGTGACCGATGGGCCCTTGGTGGARGC
HSCM-B	CCTGGCCGGCCTGGCCACTAGTAAGGGTTGGGGCGGATGCACTCCC
重叠扩展引物	
RSC-F	GAGGAGGAGGAGGAGGAGGCGGGGCCAGGCGGCCGAGCTC
RSC-B	GAGGAGGAGGAGGAGGAGCCTGGCCGGCCTGGCCACTAGTG

[0119] 在每个反应中,将2 μ L cDNA与60pmol每种引物、10 μ L 10X反应缓冲液、8 μ L 2.5mM dNTP(Promega)、0.5 μ L Tap DNA聚合酶和水混合,使最终体积变为100 μ L。在以下条件下进行PCR:30个循环,94 $^{\circ}$ C下15秒,56 $^{\circ}$ C下30秒,72 $^{\circ}$ C下90秒和72 $^{\circ}$ C下10分钟(最终扩展)。将长度约为350bp的片段加载到1.5%琼脂糖凝胶上进行电泳,并使用QIAGEN II凝胶提取试剂盒(QIAGEN)进行纯化。在OD 260nm处读取纯化的PCR产物并进行定量(10D单位=50 μ g/mL)。

[0120] 在第二次PCR中,将第一次VL和VH产物通过重叠扩展PCR随机连接。每次PCR均使用最终浓度为100 μ L的混合物进行,该混合物通过将100ng纯化的VL和VH产物、60pmol每种引物、10 μ L 10X反应缓冲液、8 μ L 2.5mM dNTP和0.5 μ L Taq DNA聚合酶与水混合来制备。在以下条件下执行PCR:25个循环,94 $^{\circ}$ C下15秒,56 $^{\circ}$ C下30秒,72 $^{\circ}$ C下2分钟且72 $^{\circ}$ C下10分钟(最终延伸)。将长度为大约700bp的scFv片段加载到1.5%琼脂糖凝胶上进行电泳,然后使用QIAGEN II凝胶提取试剂盒(QIAGEN)进行纯化。在OD 260nm处读取纯化的PCR产物并进行定量(10D单位=50 μ g/mL)。

[0121] 1-1-3.文库连接和转化

[0122] 为了克隆,使用SfiI限制酶切割作为PCR产物的scFv片段和pComb3X-SS载体(The Scripps Research Institute)。

[0123] 具体地讲,将10 μ g纯化的重叠PCR产物与360单位的SfiI(每 μ g DNA 16单位,Roche Molecular Systems)、20 μ L 10X反应缓冲液和水混合,并调整至终体积为200 μ L。将20 μ g pComb3X-SS载体与120单位的SfiI(每 μ g DNA 6单位)、20 μ L 10X反应缓冲液和水混合,并调整至终体积为200 μ L。混合物在50 $^{\circ}$ C下裂解8小时。将长度为大约700bp的scFv片段和长度为

3,400bp的载体加载到1%琼脂糖凝胶上进行电泳,并使用QIAGEN II凝胶提取试剂盒(QIAGEN)进行纯化。将1,400ng SfiI切割的pComb3X载体和700ng scFv片段与40μL 5X连接酶缓冲液、10μL T4 DNA连接酶(Invitrogen)和水混合,使最终体积变为200μL,并在16°C下温育16小时,之后进行连接反应。此后,将连接产物用乙醇沉淀,并仅将DNA颗粒溶解在15μL水中。

[0124] 使用基因脉冲器(Bio-Rad Laboratories)通过电穿孔将连接的文库样品转化到大肠杆菌菌株ER2738(New England Biolabs, Inc.)中。将细胞在5mL的Super Broth(SB)培养基中于37°C下混合,并在250rpm下搅拌的同时温育1小时。然后,将10mL的SB培养基和3μL的100mg/mL羧苄青霉素添加到培养基中。将0.1μL、1μL或10μL培养物接种在含有50μg/mL羧苄青霉素的Luria Broth(LB)琼脂板上以确定文库大小。将细胞培养物另外搅拌1小时,添加4.5μL的100mg/mL羧苄青霉素后,搅拌另外一小时。将2mL的VCM13辅助噬菌体(>1,011cfu/mL)、183mL的预热的SB和92.5μL的100mg/mL羧苄青霉素添加到细胞培养物中,并在250rpm和37°C下搅拌2小时。将280μL(50mg/mL)的卡那霉素添加到细胞培养液中,在250rpm和37°C下搅拌过夜。

[0125] 第二天,使用高速离心机(Beckman, JA-10转子)在3,000g和4°C下将细胞培养物离心。此后,储存细菌颗粒以制备噬菌粒DNA,并将上清液转移到经灭菌的离心管中。随后添加8g聚乙二醇-8000(PEG-8000, Sigma)和6g氯化钠(NaCl, Merck),在冰上储存30分钟,并且将上清液在15,000g和4°C下离心15分钟。弃去上清液,将噬菌体颗粒沉淀重新悬浮在含有1%BSA的Tris缓冲盐水(TBS)中。

[0126] 实施例1-2. 固定抗原的文库淘选(生物淘选)

[0127] 使用磁珠(Dynabeads M-270Epoxy, Invitrogen)进行生物淘选。将3μg的C末端片段EGF2重组蛋白与 1×10^7 珠在室温下搅拌20小时以涂覆抗原。经涂覆的珠用PBS洗涤4次,用含3%BSA的磷酸盐缓冲液(PBS)在室温下封闭1小时,与实施例3-3中获得的噬菌体展示scFv一起在室温下温育2小时。为了去除不结合到珠涂覆抗原的噬菌体,在用0.05%Tween20/PBS洗涤后,使用50μL的0.1M甘氨酸/氯化氢(0.1M甘氨酸盐酸盐, pH 2.2)洗脱结合的噬菌体,并使用3μL的2M Tris-HCl(pH 9.1)中和。用含噬菌体的上清液转染大肠杆菌ER2738,并使用VCSM13辅助噬菌体拯救以对噬菌体进行过夜扩增。此外,将被噬菌体感染的细胞培养物接种在含有50μg/mL羧苄青霉素的LB琼脂板上,以确定输入和输出噬菌体滴度。第二天,添加PEG-8000和NaCl以仅沉淀噬菌体,并且将沉淀的噬菌体用于下一轮生物淘选。

[0128] 通过重复上述过程进行最多四次淘选。此外,通过逐渐增加洗涤次数来选择和富集具有高亲和力的噬菌体,例如在第一轮洗涤一次,并且最终在第四轮洗涤三次。

[0129] 实施例1-3. 通过噬菌体ELISA选择克隆体

[0130] 为了分析从生物淘选中选择的克隆体,进行了ELISA以确认随机选择的噬菌体展示的scFv单个克隆体是否具有与CCSP-2-EGF2重组蛋白(单体)的结合能力。

[0131] 将CCSP-2-EGF2重组蛋白(单体)在0.1M NaHCO₃缓冲液中稀释,并在4°C下以100ng/孔涂覆在96孔微量滴定板上并持续16小时,并在第二天,用3%BSA/PBS在37°C下封闭1小时。随后,将噬菌体上清液与6%BSA/PBS等量混合,在37°C下温育2小时。用0.05%Tween20/PBS洗涤后,将HRP缀合的抗M13抗体(a-M13-HRP, Pierce Chemical Co.)以1/5000的比例稀释并各自以50μL添加到板中,之后在37°C下温育1小时。温育之后,对于洗涤后的

显色反应,将1 μ g/mL的2,2'-叠氮基-双(3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸)(ABTS,Amresco)的0.05M柠檬酸盐缓冲液和0.1% H_2O_2 溶液添加到每个孔中,然后显色。然后,在405nm处测量吸光度。结果示于图4A和图4B中。

[0132] 图4A和4B分别示出通过对来自第三次和第四次生物淘选产生的噬菌体(输出)的48个克隆体进行ELISA获得的噬菌体ELISA结果。通过分析与CCSP-2-EGF2重组蛋白结合的克隆体中吸光度高的24个克隆体的基因序列,获得总共11种具有不同序列的scFv克隆体。

[0133] 实施例1-4.抗-CCSP-2-EGF2 scFv hFc1融合蛋白的制备

[0134] 1-4-1.抗-CCSP-2-EGF2 scFv亚克隆(scFvhFc1)到哺乳动物表达载体中

[0135] 使用限制酶HindIII(New England Biolabs)和XhoI(New England Biolabs)将编码IgG2铰链和人IgG1杂交体CH2-CH3的基因插入到pCEP4载体(Invitrogen)中。编码抗-CCSP-2-EGF2 scFv的基因通过两个SfiI限制性位点亚克隆到Fc区的5'端。对于轻链,将人免疫球蛋白Fc基因亚克隆到哺乳动物表达载体中。对于重链,将编码人CH1区和从IgG2铰链到人IgG1杂交体CH2-CH3区域的区域的基因亚克隆到哺乳动物表达载体中(参见图5)。

[0136] 图5是根据本发明一个实施方案的表达载体的遗传图谱。

[0137] 实施例1-4-2.转染和蛋白纯化

[0138] 对过表达的重组蛋白进行转染。将每毫升培养体积2 μ g哺乳动物表达载体和4 μ g聚乙烯亚胺(PEI,Polysciences,Warrington,PA,USA)混合在对应于1/10细胞培养物体积的150mM氯化钠(NaCl,Merck)中,并在室温下保持15分钟。将混合物添加到哺乳动物细胞中,将HEK293F(1 $\times 10^6$ 个细胞/mL,Invitrogen)用于蛋白质过表达系统,并在以135rpm搅拌的同时,在含有100U/mL青霉素和链霉素(Invitrogen)的FreestyleTM293表达培养基(Invitrogen)中在37 $^{\circ}$ C和7% CO_2 下培养6天。

[0139] 收获细胞培养物的上清液,并且为了纯化Fc-融合蛋白,使用利用蛋白质A的亲凝胶色谱法。在使用PBS缓冲液通过透析纯化分离的scFv后,进行SDS-PAGE以确认分子量大约为55kDa(参见图6)。

[0140] 图6为通过本发明制备的scFv的HN-1的分子量的SDS-PAGE凝胶图像。

[0141] 实施例1-5.确认重组抗体的结合能力

[0142] 1-5-1.蛋白质印迹

[0143] 按结构域制备CCSP-2蛋白质,向其中加入变性缓冲液,之后加热10分钟。然后,通过将变性样品加载到制备好的凝胶上进行SDS-PAGE电泳。电泳后,凝胶未染色,为了进行免疫学测定,通过电转移方法将蛋白质转移到Trans-Blot TurboTM Mini PVDF Transfer Packs(Bio-Rad)。为了抑制非特异性反应,将凝胶浸入5%脱脂牛奶/TBST溶液中并在搅拌器上处理1小时。作为一抗,将实施例1-4-2中获得的scFv稀释至预定浓度,并且作为二抗,使用HRP缀合的抗人免疫球蛋白Fc二抗(Invitrogen)。每个抗体反应进行1小时,并且在每一步后,反应产物用含0.1%Tween 20的TBST溶液洗涤3次。最后,为了确认抗原-抗体反应,使用增强的化学发光(ECL)底物(参见图7)。

[0144] 图7示出了用于确认本发明scFv中的HN-1的每个抗原(CCSP-2)结构域的结合能力的蛋白质印迹结果。

[0145] 参见图7,可证实根据本发明的scFv抗体与EGF2结构域特异性结合。

[0146] 1-5-2.夹心ELISA

[0147] 将根据实施例4-2获得的scFv以10 μ g/mL涂覆在96孔板上,然后用5%脱脂牛奶/TBST封闭1小时。然后用含有0.05%Tween 20的PBS缓冲液洗涤固定抗原的孔三次,以900ng/mL、300ng/mL、100ng/mL、33.3ng/mL或11.1ng/mL分配CCSP-2蛋白以诱导抗原-抗体反应并持续1小时。为测量与抗原反应的抗体量,依次使用以1:500的比率稀释的抗-CCSP-2一抗(Cloud-Clone Corp.,TX,USA)和以1:2000的比例稀释的HRP缀合的抗兔IgG二抗(Cell Signaling)反应1小时。此后,通过将四甲基联苯胺(TMB)底物分配到孔中而在室温下诱导显色20分钟,然后使用酶标仪在450nm处测量吸光度(参见图8)。

[0148] 图8是示出通过分析本发明scFv中的HN-1的抗原(CCSP-2)结合能力获得的ELISA结果的图。

[0149] 参照图8,可证实根据本发明的scFv抗体表现出对CCSP-2蛋白的剂量依赖性反应性。

[0150] 如上所述,由本发明构建的scFv抗体具有大约55kDa的尺寸,以及作为具有对抗原结合能力的抗体的功能。

[0151] 实施例1-6.抗体文库测序

[0152] 为了对所选抗体文库的可变区域进行测序,培养随机转化体以获得质粒,之后进行测序。结果示于下表2中。通过参考abYsis(<http://www.abysis.org/>)处的Chothia编号方案确认VL-VH的互补决定位点和骨架部分的序列。

[0153] [表2]

[0154]		VL			VH		
	克隆体	CDR1	CDR2	CDR3	CDR1	CDR2	CDR3
	HN-1	SGSSRWY	SNDKRPS	GSGDSSSNPGI	GFTFSDR	SNAGGY	GASYDAIDA

[0155] 实施例2.来源于鸡的抗-EGF2抗体的制备

[0156] 实施例2-1.从免疫抗体文库中选择抗-EGF2抗体

[0157] 2-1-1.免疫

[0158] 将作为抗原的实施例1中制备的30 μ g CCSP-2-EGF2蛋白在RIBI+MPL+TDM+CWS佐剂(Sigma,St.Louis,Mo,USA)中乳化,所述佐剂为2%角鲨烯中的含有MPL(单磷酸脂A种类)、TDW和CWS的油包水乳液,所述MPL为不含毒素的内毒素,它们是分枝杆菌的细胞壁成分,然后皮下注射到三只鸡中。三周后,然后在此后两周,通过同样的方法附加注射所得的抗原混合物,导致进行总共三次免疫。使用HRP缀合的抗-鸡IgG(Y)单克隆抗体(兔抗-鸡IgG(Y)-HRP,Millipore Corporation,Billerica,MA,美国)作为二抗通过酶联免疫吸附试验(ELISA)测定免疫鸡抗体的滴度。

[0159] 2-1-2.鸡scFv文库的构建

[0160] 用TRI试剂(Invitrogen,Carlsbad,CA,USA)从实施例2-1-1中制备的免疫鸡的脾、粘液囊和骨髓中提取总RNA。第一链cDNA使用oligo-dT引物和SuperscriptTM III第一链合成系统(Invitrogen)合成。

[0161] 由鸡的免疫系统获得的cDNA的scFv文库使用下表3中对免疫球蛋白的重链可变区和轻链可变区具有特异性的引物并使用Expand High Fidelity PCR系统(Roche

Molecular Systems,IN,USA) 构建。

[0162] [表3]

[0163]	Vλ 引物	
	CSCVK	GTG GCC CAG GCG GCC CTG ACT CAG CCG TCC TCG GTG TC
	CKJo-B	GGA AGA TCT AGA GGA CTG ACC TAG GAC GGT CAG G
	VH 引物	
	CSCVHo-	GGT CAG TCC TCT AGA TCT TCC GGC GGT GGT GGC AGC TCC GGT GGT
	FL	GGC GGT TCC GCC GTG ACG TTG GAC GCG
	CSCG-B	CTG GCC GGC CTG GCC ACT AGT GGA GGA GAC GAT GAC TTC GGT CC
	重叠扩展引物	
	CSC-F	GAG GAG GAG GAG GAG GAG GTG GCC CAG GCG GCC CTG ACT CAG
	CSC-B	GAG GAG GAG GAG GAG GAG GAG CTG GCC GGC CTG GCC ACT AGT GGA GG

[0164] 在每个反应中,将2μL cDNA与各60pmol引物、10μL 10X反应缓冲液、8μL 2.5mM dNTP(Promega,Madison,WI,USA)、0.5μL Tap DNA聚合酶和水混合,以便最终体积变为100μL。在如下条件下执行PCR:30个循环,94℃下15秒,56℃下30秒且72℃下90秒,之后在72℃进行最终扩展并持续10分钟。将长度大约为350bp的片段加载到1.5%琼脂糖凝胶上进行电泳,然后使用QIAGEN II凝胶提取试剂盒(QIAGEN,Valencia,CA,USA)进行纯化。在OD_{260nm}处读取纯化的PCR产物以进行定量(10D单位=50μg/mL)。

[0165] 在第二次PCR中,将第一次VL和VH产物通过重叠扩展PCR随机连接。每次PCR均使用最终体积为100μL的混合物进行,该混合物通过将100ng纯化的VL和VH产物、60pmol每种引物、10μL 10X反应缓冲液、8μL 2.5mM dNTP和0.5μL Taq DNA聚合酶与水混合来制备。在以下条件下执行PCR:25个循环,94℃下15秒,56℃下30秒,72℃下2分钟,之后在72℃下进行最终扩展并持续10分钟。将长度为大约700bp的scFv片段加载到1.5%琼脂糖凝胶上进行电泳,然后使用QIAGEN II凝胶提取试剂盒(QIAGEN)进行纯化。在OD_{260nm}处读取纯化的PCR产物以进行定量(10D单位=50μg/mL)。

[0166] 2-1-3. 免疫抗体文库连接和转化

[0167] 为了克隆,使用SfiI限制酶切割PCR产物(即scFv片段)和pComb3X-SS载体(The Scripps Research Institute,CA,USA)。将10μg纯化的重叠PCR产物与360单位的SfiI(每μg DNA 16单位,Roche Molecular Systems)、20μL 10X反应缓冲液和水混合,使得最终体积成为200μL。将20μg pComb3X-SS载体与120单位的SfiI(每μg DNA 6单位)、20μL 10X反应缓冲液和水混合,并调整至最终体积为200μL。将混合物在50℃下裂解5小时。将长度为大约700bp的scFv片段和长度为3,400bp的载体加载到1%琼脂糖凝胶上进行电泳,并使用QIAGEN II凝胶提取试剂盒(QIAGEN,Valencia,CA,USA)进行纯化。将1,400ng SfiI切割的

pComb3X载体和700ng scFv片段与40 μ L 5X连接酶缓冲液、10 μ L T4 DNA连接酶(Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)和水混合,使最终体积变为200 μ L,并在16 $^{\circ}$ C下温育16小时,之后进行连接反应。此后,将连接产物用乙醇沉淀,从而获得DNA颗粒,然后将DNA颗粒溶解在15 μ L水中

[0168] 使用基因脉冲器(Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA)通过电穿孔将连接的文库样品转化到大肠杆菌菌株ER2738(New England Biolabs Inc, Hitchin, Hertfordshire, SG4 0TY, England, UK)中。将细胞在5mL的Super Broth(SB)培养基中于37 $^{\circ}$ C下混合,并在250rpm下搅拌的同时温育1小时。随后,将10mL的SB培养基和3 μ L的100mg/mL羧苄青霉素添加到培养基中。将0.1 μ L、1 μ L或10 μ L培养物接种在含有50 μ g/mL羧苄青霉素的Luria Broth(LB)琼脂板上以确定文库大小。将细胞培养物另外搅拌1小时,然后通过向其中添加4.5 μ L 100mg/mL羧苄青霉素,搅拌另外一小时。将2mL的VCM13辅助噬菌体(>1,011cfu/mL)、183mL的预热的SB和92.5 μ L的100mg/mL羧苄青霉素添加到所得细胞培养物中,并在250rpm和37 $^{\circ}$ C下搅拌2小时。将280 μ L(50mg/mL)的卡那霉素添加到所得细胞培养物中,在250rpm和37 $^{\circ}$ C下搅拌过夜。

[0169] 第二天,使用高速离心机(Beckman, JA-10转子)在3,000g和4 $^{\circ}$ C下将细胞培养物离心。此后,储存细菌颗粒以制备噬菌粒DNA,并将上清液转移到经灭菌的离心管中。随后,添加8g PEG-8000(Sigma)和6g氯化钠(NaCl, Merck),在冰上储存30分钟,并且将上清液在15,000g和4 $^{\circ}$ C下离心15分钟。弃去上清液,将噬菌体颗粒沉淀重新悬浮在含有1%BSA的Tris缓冲盐水(TBS)中。

[0170] 实施例2-2.固定抗原的文库淘选(生物淘选)

[0171] 使用磁珠(Dynabeads M-270 Epoxy, Invitrogen)进行生物淘选。将3 μ g的CCSP-2-EGF重组蛋白与 1×10^7 珠在室温下搅拌20小时以涂覆抗原。经涂覆的珠用PBS洗涤4次,并且该反应用含3%BSA的PBS在室温下封闭1小时,之后与实施例2-3中获得的噬菌体展示scFv一起在室温下温育2小时。为了去除与珠上涂覆的抗原结合的噬菌体,将珠用0.05%Tween20/PBS洗涤,用50 μ L的0.1M甘氨酸盐酸盐(pH 2.2)洗脱结合的噬菌体,并用3 μ L的2M Tris-HCl(pH 9.1)中和。用含噬菌体的上清液转染大肠杆菌(ER2738),并使用VCSM13辅助噬菌体进行拯救以对噬菌体进行过夜扩增。此外,将被噬菌体感染的细胞培养物接种在含有50 μ g/mL羧苄青霉素的LB琼脂板上,以确定输入和输出噬菌体的滴度。第二天,如实施例2-3所述仅通过添加PEG-8000和NaCl沉淀噬菌体,并且将沉淀的噬菌体用于下一轮生物淘选。

[0172] 通过重复上述过程进行四次淘选。此外,第一轮洗涤一次,通过逐渐增加洗涤次数,选择和富集具有高亲和力的噬菌体,例如第一轮洗涤一次,最终第四轮洗涤四次。

[0173] 实施例2-3.通过噬菌体ELISA选择克隆体

[0174] 为了分析从生物淘选中选择的克隆体,进行了ELISA以确认随机选择的噬菌体展示的scFv单个克隆体是否具有与重组蛋白(单体)在含EGF2的CCSP2-C的末端处的结合能力。

[0175] 将含EGF2的CCSP2-C的末端处的重组蛋白(单体)在0.1M NaHCO₃缓冲液中稀释,并在100ng/孔和4 $^{\circ}$ C下施用涂覆96孔微量滴定板并保持16小时,并在第二天,反应用3%BSA/PBS在37 $^{\circ}$ C下封闭1小时。随后,将噬菌体上清液与6%BSA/PBS等量混合,在37 $^{\circ}$ C下温育

2小时。用0.05% Tween20/PBS洗涤所得产物,将以1/5000的比例稀释的HRP缀合的抗M13抗体(a-M13-HRP, Pierce Chemical Co., Rockford, IL, USA)各自以50 μ L添加到板中,之后在37 $^{\circ}$ C下温育1小时。温育之后,进行洗涤,将1 μ g/mL的2,2'-叠氮基-双(3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸)(ABTS, Amresco, Solon, OH, USA)和0.1% H₂O₂的0.05M柠檬酸盐缓冲液溶液添加到每个孔中以进行显色,并且进行显色,之后在405nm处测量吸光度。图9A、9B和9C显示了对来自通过每个鸡文库1、2或3进行生物淘选所产生的噬菌体(输出)的96个克隆体进行分析的结果。对同时在含EGF2的CCSP-2-C末端处结合到重组蛋白的克隆体中具有高吸光度的58个克隆体的基因序列进行分析,从而得到总共8种不同序列的scFv克隆体。

[0176] 实施例2-4. 抗-CCSP-2-EGF2 scFv hFc1融合蛋白的制备

[0177] 2-4-1. 抗-CCSP-2-EGF2 scFv亚克隆(scFvhFc1)到哺乳动物表达载体中

[0178] 通过HindIII (New England Biolabs)和XhoI (New England Biolabs)限制性酶将编码IgG2铰链和人IgG1杂交体CH2-CH3的基因插入到pCEP4载体(Invitrogen)中。编码抗-CCSP-2-EGF2 scFv的基因通过两个SfiI限制性位点亚克隆到Fc区的5'端。对于轻链,将人免疫球蛋白Fc基因亚克隆到哺乳动物表达载体中。对于重链,将编码人CH1区和从IgG2链到人IgG1杂交体CH2-CH3区域的区域的基因亚克隆到哺乳动物表达载体中(参见图10)。

[0179] 图10是根据本发明一个实施方案的表达载体的遗传图谱。

[0180] 2-4-2. 转染和蛋白纯化

[0181] 对过表达的重组蛋白进行转染。将每毫升培养体积2 μ g哺乳动物表达载体和4 μ g PEI (Polysciences, Warrington, PA, USA)混合在对应于1/10细胞培养物体积的150mM氯化钠(NaCl, Merck)中,并在室温下保持15分钟。将混合物添加到哺乳动物细胞中,将HEK293F (1 $\times 10^6$ 个细胞/mL, Invitrogen)用于蛋白质过表达系统,并在以135rpm搅拌的同时,在含有100U/mL青霉素和链霉素(Invitrogen)的FreestyleTM293表达培养基(Invitrogen)中在37 $^{\circ}$ C和7% CO₂下培养6天。

[0182] 收获细胞培养物的上清液,并且为了纯化Fc-融合蛋白,使用利用蛋白质A的亲亲和凝胶色谱法。在使用PBS缓冲液通过透析纯化分离的scFv后,进行SDS-PAGE以确认分子量大约为55kDa。

[0183] 实施例2-5. 确认重组抗体的结合能力

[0184] 2-5-1. 蛋白质印迹

[0185] 按结构域制备CCSP-2蛋白质,向其中加入变性缓冲液,之后加热10分钟。然后,通过将变性样品加载到制备好的凝胶上进行SDS-PAGE电泳。电泳后,凝胶未染色,为了进行免疫学测定,通过电转移方法将蛋白质转移到Trans-Blot TurboTM Mini PVDF Transfer Packs (Bio-Rad)。为了抑制非特异性反应,将凝胶浸入5%脱脂牛奶/TBST溶液中并在搅拌器上处理1小时。作为一抗,使用稀释至预定浓度的实施例4-2中获得的scFv,并且作为二抗,使用HRP结合的抗人免疫球蛋白Fc二抗(Invitrogen)。每个抗体反应进行1小时,并且在每一步后,用含0.05% Tween 20的PBS缓冲液进行洗涤3次。最后,为了确认抗原-抗体反应,使用增强的化学发光(ECL)底物(参见图11)。

[0186] 图11示出了用于确认根据本发明制备的scFv中的HN-1、CH-2和CH-3的每个抗原(CCSP-2)结构域的结合能力的蛋白质印迹结果。

[0187] 2-5-2. 夹心ELISA

[0188] 以10 μ g/mL的浓度用根据实施例4-2获得的scFv涂覆96孔板,然后用5%脱脂牛奶/TBST这些封闭1小时。然后用含0.05% Tween 20的PBS缓冲液洗涤固定抗原的孔三次,以900ng/mL、300ng/mL、100ng/mL、33.3ng/mL或11.1ng/mL分配CCSP-2蛋白以诱导抗原-抗体反应并持续1小时。为测量与抗原反应的抗体量,依次使用以1:500的比率稀释的抗-CCSP-2一抗(Cloud-Clone Corp., TX, USA)和以1:2000的比例稀释的HRP缀合的抗兔IgG二抗(Cell Signaling)进行反应1小时。此后,通过将四甲基联苯胺(TMB)底物分配到孔中以在室温下诱导显色20分钟,然后使用酶标仪在450nm处测量吸光度(参见图12)。

[0189] 图12是示出通过分析本发明scFv中的HN-1、CH-2和CH-3的抗原(CCSP-2)结合能力获得的ELISA结果的一组图。

[0190] 参照图12,可证实根据本发明的scFv抗体表现出对CCSP-2蛋白的剂量依赖性反应性。

[0191] 如上所述,根据本发明构建的scFv抗体具有大约55kDa的尺寸,以及作为具有对抗原结合能力的抗体的功能。

[0192] 实施例2-6. 抗体文库测序

[0193] 为了对所选抗体文库的可变区域进行测序,培养随机转化体以获得质粒,之后进行测序。结果示于下表4中。通过参考abYsis (<http://www.abysis.org/>) 处的Chothia编号方案确认VL-VH的互补决定位点和骨架部分的序列。

[0194] [表4]

克隆体	VL			VH		
	CDR1	CDR2	CDR3	CDR1	CDR2	CDR3
1	SGGSNSYYG	DNTNRPS	GSTDSSYVDI	GFSFSGV	SSTGSG	DAYGYRISGSWSYGYSIDA
2	SGGGSYYG	DNTNRPS	GSADSSAEPV	GFTFSSV	SNTGSG	DAYGYTISGSWSYGYSIDA
3	SGDNSWYG	DSDQRPS	CGSYDSSAGYIGI	GFSFSDR	RSDGSS	DYGNNGWIAGDIDA

[0196] 实验例1. 由特异性结合到CCSP-2的EGF2结构域导致的效果

[0197] 将根据本发明的抗体与针对CCSP-2的常规抗体进行比较以检查由特异性结合到CCSP-2的EGF2结构域导致的效果。

[0198] 首先,旨在确认每个结构域的每个CCSP2抗体的识别位点。

[0199] 制备CCSP-2-CT或CCSP-2的每个结构域EGF1、VWFA2、VWFA3或EGF2的重组蛋白。此外,利用His-tag与Ni-NTA树脂的亲和性,纯化重组蛋白。将经纯化的重组蛋白以100ng/孔加载到12% SDS-PAGE凝胶上,并用各种CCSP-2抗体检测CCSP-2和CCSP-2的结构域。实验中使用的CCSP-2抗体为①由凯斯西储大学提供的抗体(未市售,以下简称CWRU抗体),②Proteintech抗体,③Cloud-Clone抗体。

[0200] 图13A为示出每个结构域的CCSP2抗体的位置以及每个CCSP-2抗体识别哪个结构域的示意图。

[0201] 图13B为蛋白质印迹结果,其示出CWRU抗体特异性识别EGF2结构域,而Proteintech抗体特异性识别VWFA2结构域。

[0202] 参见图13,可以明确地证实,在包括CWRU抗体、Proteintech抗体和Cloud-Clone抗体在内的抗CCSP-2抗体中,CWRU抗体特异性识别EGF2结构域(包括至CCSP-2的氨基酸755),

而Proteintech抗体和Cloud-Clone抗体特异性识别VWFA2结构域。

[0203] 此外,通过将识别CCSP2的EGF2结构域的抗CCSP2抗体和不识别CCSP2的EGF2结构域的抗CCSP2抗体施用于免疫染色方法,旨在确认是否可以清楚地区分正常组织与病变。

[0204] 为此,首先在HeLa细胞中诱导CCSP-2蛋白过表达,并使用其细胞裂解物通过蛋白质印迹比较和分析CWRU抗体和Proteintech抗体之间的CCSP-2特异性检测能力。尽管根据CCSP-2表达的存在与否可对CWRU抗体进行CCSP-2特异性检测,但在Proteintech抗体的情况下,无论CCSP-2表达如何,都确认了非特异性信号。此外,从结直肠癌患者的癌组织和正常结直肠组织中制造石蜡块,通过使用诸如CWRU抗体、Proteintech抗体等的CCSP-2表达特异性抗体进行免疫染色来分析。免疫染色法使用自动化设备(Ventana Medical System)进行,并且抗体以1:100的浓度反应32分钟,然后使用Nentana OptiView DAB试剂盒进行检测。CWRU抗体在正常组织中未染色,而仅在病变中染色,然而50%的Proteintech抗体即使在正常组织中也染色,因此Proteintech抗体不能清楚地区分正常组织和病变。

[0205] 由该结果,可推测由CWRU抗体特异性识别的EGF2结构域下游的氨基酸序列的识别对于区分疾病(即正常组织和病变)的目的是有效的。基于该假设,本发明人使用由从EGF2结构域开始到CCSP2结束的序列(CCSP2氨基酸712-755的序列)组成的蛋白质进行抗体筛选。

[0206] 图14A示出比较分析细胞裂解物中CWRU抗体和Proteintech抗体的抗原(CCSP-2)特异性检测能力的蛋白质印迹结果。图14B示出比较分析在正常结直肠组织和结直肠癌组织中CWRU抗体和Proteintech抗体的抗原(CCSP-2)特异性检测能力的免疫组织化学结果。

[0207] 参见图14,在用由凯斯西储大学提供的抗体进行处理的情况下,可确认抗体在配对的正常细胞中均不被染色,并且在用比较例的抗体进行处理的情况下,可确认大约50%的抗体在配对的正常细胞中被染色。

[0208] 即,由于与不能检测常规EGF2结构域的抗CCSP-2抗体相比,特异性结合到CCSP-2的EGF2结构域的抗体更清楚地区分正常组织与病变,这对于区分正常组织和病变是意义的,所以更准确的诊断是可能的。

[0209] 图15为比较目前可获得的抗-CCSP-2抗体的结合(检测)位点的示意图。

[0210] 参见图15,因为Proteintech抗体结合到CCSP-2的氨基酸序列341-517,Abcam抗体结合到氨基酸序列201-373,而Cloud-Clone抗体结合到氨基酸序列457-517,所以Proteintech、Abcam和Cloud-Clone抗体不能检测到EGF2结构域,即CCSP-2的氨基酸序列712-748,这对区分正常位点和病变位点是有意义的。

[0211] 实验例2. 与特异性结合到常规CCSP-2的肽的亲合力比较

[0212] 比较了根据本发明实施例的抗体(scFv)与特异性结合到CCSP-2的常规肽(韩国专利申请10-2018-0060184)之间的亲合力。

[0213] 然而,由于肽和抗体的物质特性,不能使用相同的实验方法来比较亲合力。因此,对于肽和抗体,均设定CCSP-2蛋白的浓度范围,通过FCS测量肽与CCSP-2蛋白之间的结合能力(韩国专利申请10-2018-0060184),并通过ELISA测量抗体与CCSP-2蛋白的结合能力(参见本发明实施例2-5-2),然后计算解离常数。

[0214] 图16是示出特异性结合到CCSP-2的常规肽(韩国专利申请10-2018-0060184)的亲合力的一组图。

[0215] 参见图16,可确认常规肽与CCSP-2结合的KD值(亲和力)以 μM 单位表示。

[0216] 因为根据本发明实施例1的HN-1(scFv)与CCSP-2结合的KD值(亲和力)以nM单位表示(见图1),因此可以证实根据本发明的抗体对CCSP-2的亲和力相当高。

[0217] 关于以上描述,本领域普通技术人员应当理解,本申请的以上描述是示例性的,并且在不改变本申请的技术精神或基本特征的情况下,可容易地将本文所公开的示例性实施方案修改为其他具体形式。因此,应当理解,上述示例性实施方案在所有方面都是示例性的,而不是限制性的。本申请的范围由所附权利要求书限定,并且包括由所附权利要求书的含义、范围和等同物得出的所有修改和变更。

[0218] 序列表自由文本

[0219] SEQ ID NO:1:HN-1的VH CDR1

[0220] SEQ ID NO:2:HN-1的VH CDR2

[0221] SEQ ID NO:3:HN-1的VH CDR3

[0222] SEQ ID NO:4:HN-1的VL CDR1

[0223] SEQ ID NO:5:HN-1的VL CDR2

[0224] SEQ ID NO:6:HN-1的VL CDR3

[0225] SEQ ID NO:7:CH-1的VH CDR1

[0226] SEQ ID NO:8:CH-1的VH CDR2

[0227] SEQ ID NO:9:CH-1的VH CDR3

[0228] SEQ ID NO:10:CH-1的VL CDR1

[0229] SEQ ID NO:11:CH-1的VL CDR2

[0230] SEQ ID NO:12:CH-1的VL CDR3

[0231] SEQ ID NO:13:CH-2的VH CDR1

[0232] SEQ ID NO:14:CH-2的VH CDR2

[0233] SEQ ID NO:15:CH-2的VH CDR3

[0234] SEQ ID NO:16:CH-2的VL CDR1

[0235] SEQ ID NO:17:CH-2的VL CDR2

[0236] SEQ ID NO:18:CH-2的VL CDR3

[0237] SEQ ID NO:19:CH-3的VH CDR1

[0238] SEQ ID NO:20:CH-3的VH CDR2

[0239] SEQ ID NO:21:CH-3的VH CDR3

[0240] SEQ ID NO:22:CH-3的VL CDR1

[0241] SEQ ID NO:23:CH-3的VL CDR2

[0242] SEQ ID NO:24:CH-3的VL CDR3

[0243] SEQ ID NO:25:HN-1的VH

[0244] SEQ ID NO:26:HN-1的VL

[0245] SEQ ID NO:27:CH-1的VH

[0246] SEQ ID NO:28:CH-1的VL

[0247] SEQ ID NO:29:CH-2的VH

[0248] SEQ ID NO:30:CH-2的VL

- [0249] SEQ ID NO:31:CH-3的VH
- [0250] SEQ ID NO:32:CH-3的VL
- [0251] SEQ ID NO:33:HN-1
- [0252] SEQ ID NO:34:CH-1
- [0253] SEQ ID NO:35:CH-2
- [0254] SEQ ID NO:36:CH-3。

- [0001] <110> 财团法人峨山社会福祉财团
[0002] 医帝思生物科技有限公司
[0003] 蔚山大学校产学协力团
[0004] <120> 特异性结合CCSP-2的单克隆抗体及其用途
[0005] <130> MP021-024US
[0006] <160> 36
[0007] <170> KoPatentIn 3.0
[0008] <210> 1
[0009] <211> 7
[0010] <212> PRT
[0011] <213> 人工序列
[0012] <220>
[0013] <223> HN-1的 VH_CDR1
[0014] <400> 1
[0015] Gly Phe Thr Phe Ser Asp Arg
[0016] 1 5
[0017] <210> 2
[0018] <211> 6
[0019] <212> PRT
[0020] <213> 人工序列
[0021] <220>
[0022] <223> HN-1的VH_CDR2
[0023] <400> 2
[0024] Ser Asn Ala Gly Gly Tyr
[0025] 1 5
[0026] <210> 3
[0027] <211> 9
[0028] <212> PRT
[0029] <213> 人工序列
[0030] <220>
[0031] <223> HN-1的VH_CDR3
[0032] <400> 3
[0033] Gly Ala Ser Tyr Asp Ala Ile Asp Ala
[0034] 1 5
[0035] <210> 4
[0036] <211> 7
[0037] <212> PRT
[0038] <213> 人工序列

[0039] <220>
[0040] <223> HN-1的VL_CDR1
[0041] <400> 4
[0042] Ser Gly Ser Ser Arg Trp Tyr
[0043] 1 5
[0044] <210> 5
[0045] <211> 7
[0046] <212> PRT
[0047] <213> 人工序列
[0048] <220>
[0049] <223> HN-1的VL_CDR2
[0050] <400> 5
[0051] Ser Asn Asp Lys Arg Pro Ser
[0052] 1 5
[0053] <210> 6
[0054] <211> 11
[0055] <212> PRT
[0056] <213> 人工序列
[0057] <220>
[0058] <223> HN-1的VL_CDR3
[0059] <400> 6
[0060] Gly Ser Gly Asp Ser Ser Ser Asn Pro Gly Ile
[0061] 1 5 10
[0062] <210> 7
[0063] <211> 7
[0064] <212> PRT
[0065] <213> 人工序列
[0066] <220>
[0067] <223> CH-1的 VH_CDR1
[0068] <400> 7
[0069] Gly Phe Ser Phe Ser Gly Val
[0070] 1 5
[0071] <210> 8
[0072] <211> 6
[0073] <212> PRT
[0074] <213> 人工序列
[0075] <220>
[0076] <223> CH-1的VH_CDR2
[0077] <400> 8

[0078] Ser Ser Thr Gly Ser Gly
 [0079] 1 5
 [0080] <210> 9
 [0081] <211> 19
 [0082] <212> PRT
 [0083] <213> 人工序列
 [0084] <220>
 [0085] <223> CH-1的VH_CDR3
 [0086] <400> 9
 [0087] Asp Ala Tyr Gly Tyr Arg Ile Ser Gly Ser Trp Ser Tyr Gly Tyr Ser
 [0088] 1 5 10 15
 [0089] Ile Asp Ala
 [0090] <210> 10
 [0091] <211> 9
 [0092] <212> PRT
 [0093] <213> 人工序列
 [0094] <220>
 [0095] <223> CH-1的VL_CDR1
 [0096] <400> 10
 [0097] Ser Gly Gly Ser Asn Ser Tyr Tyr Gly
 [0098] 1 5
 [0099] <210> 11
 [0100] <211> 7
 [0101] <212> PRT
 [0102] <213> 人工序列
 [0103] <220>
 [0104] <223> CH-1的VL_CDR2
 [0105] <400> 11
 [0106] Asp Asn Thr Asn Arg Pro Ser
 [0107] 1 5
 [0108] <210> 12
 [0109] <211> 10
 [0110] <212> PRT
 [0111] <213> 人工序列
 [0112] <220>
 [0113] <223> CH-1的VL_CDR3
 [0114] <400> 12
 [0115] Gly Ser Thr Asp Ser Ser Tyr Val Asp Ile
 [0116] 1 5 10

[0117] <210> 13
[0118] <211> 7
[0119] <212> PRT
[0120] <213> 人工序列
[0121] <220>
[0122] <223> CH-2的VH_CDR1
[0123] <400> 13
[0124] Gly Phe Thr Phe Ser Ser Val
[0125] 1 5
[0126] <210> 14
[0127] <211> 6
[0128] <212> PRT
[0129] <213> 人工序列
[0130] <220>
[0131] <223> CH-2的VH_CDR2
[0132] <400> 14
[0133] Ser Asn Thr Gly Ser Gly
[0134] 1 5
[0135] <210> 15
[0136] <211> 19
[0137] <212> PRT
[0138] <213> 人工序列
[0139] <220>
[0140] <223> CH-2的 VH_CDR3
[0141] <400> 15
[0142] Asp Ala Tyr Gly Tyr Thr Ile Ser Gly Ser Trp Ser Tyr Gly Tyr Ser
[0143] 1 5 10 15
[0144] Ile Asp Ala
[0145] <210> 16
[0146] <211> 8
[0147] <212> PRT
[0148] <213> 人工序列
[0149] <220>
[0150] <223> CH-2的 VL_CDR1
[0151] <400> 16
[0152] Ser Gly Gly Gly Ser Tyr Tyr Gly
[0153] 1 5
[0154] <210> 17
[0155] <211> 7

[0156] <212> PRT
[0157] <213> 人工序列
[0158] <220>
[0159] <223> CH-2的VL_CDR2
[0160] <400> 17
[0161] Asp Asn Thr Asn Arg Pro Ser
[0162] 1 5
[0163] <210> 18
[0164] <211> 10
[0165] <212> PRT
[0166] <213> 人工序列
[0167] <220>
[0168] <223> CH-2的 VL_CDR3
[0169] <400> 18
[0170] Gly Ser Ala Asp Ser Ser Ala Glu Pro Val
[0171] 1 5 10
[0172] <210> 19
[0173] <211> 7
[0174] <212> PRT
[0175] <213> 人工序列
[0176] <220>
[0177] <223> CH-3的VH_CDR1
[0178] <400> 19
[0179] Gly Phe Ser Phe Ser Asp Arg
[0180] 1 5
[0181] <210> 20
[0182] <211> 6
[0183] <212> PRT
[0184] <213> 人工序列
[0185] <220>
[0186] <223> CH-3的 VH_CDR2
[0187] <400> 20
[0188] Arg Ser Asp Gly Ser Ser
[0189] 1 5
[0190] <210> 21
[0191] <211> 14
[0192] <212> PRT
[0193] <213> 人工序列
[0194] <220>

[0195] <223> CH-3的VH_CDR3
[0196] <400> 21
[0197] Asp Tyr Gly Asn Gly Gly Trp Ile Ala Gly Asp Ile Asp Ala
[0198] 1 5 10
[0199] <210> 22
[0200] <211> 8
[0201] <212> PRT
[0202] <213> 人工序列
[0203] <220>
[0204] <223> CH-3的VL_CDR1
[0205] <400> 22
[0206] Ser Gly Asp Asn Ser Trp Tyr Gly
[0207] 1 5
[0208] <210> 23
[0209] <211> 7
[0210] <212> PRT
[0211] <213> 人工序列
[0212] <220>
[0213] <223> CH-3的VL_CDR2
[0214] <400> 23
[0215] Asp Ser Asp Gln Arg Pro Ser
[0216] 1 5
[0217] <210> 24
[0218] <211> 13
[0219] <212> PRT
[0220] <213> 人工序列
[0221] <220>
[0222] <223> CH-3的VL_CDR3
[0223] <400> 24
[0224] Cys Gly Ser Tyr Asp Ser Ser Ala Gly Tyr Ile Gly Ile
[0225] 1 5 10
[0226] <210> 25
[0227] <211> 22
[0228] <212> PRT
[0229] <213> 人工序列
[0230] <220>
[0231] <223> HN-1的VH
[0232] <400> 25
[0233] Gly Phe Thr Phe Ser Asp Arg Ser Asn Ala Gly Gly Tyr Gly Ala Ser

[0234]	1	5	10	15
[0235]	Tyr Asp Ala Ile Asp Ala			
[0236]	20			
[0237]	<210> 26			
[0238]	<211> 25			
[0239]	<212> PRT			
[0240]	<213> 人工序列			
[0241]	<220>			
[0242]	<223> HN-1的VL			
[0243]	<400> 26			
[0244]	Ser Gly Ser Ser Arg Trp Tyr Ser Asn Asp Lys Arg Pro Ser Gly Ser			
[0245]	1	5	10	15
[0246]	Gly Asp Ser Ser Ser Asn Pro Gly Ile			
[0247]	20		25	
[0248]	<210> 27			
[0249]	<211> 32			
[0250]	<212> PRT			
[0251]	<213> 人工序列			
[0252]	<220>			
[0253]	<223> CH-1的VH			
[0254]	<400> 27			
[0255]	Gly Phe Ser Phe Ser Gly Val Ser Ser Thr Gly Ser Gly Asp Ala Tyr			
[0256]	1	5	10	15
[0257]	Gly Tyr Arg Ile Ser Gly Ser Trp Ser Tyr Gly Tyr Ser Ile Asp Ala			
[0258]	20		25 30	
[0259]	<210> 28			
[0260]	<211> 26			
[0261]	<212> PRT			
[0262]	<213> 人工序列			
[0263]	<220>			
[0264]	<223> CH-1的VL			
[0265]	<400> 28			
[0266]	Ser Gly Gly Ser Asn Ser Tyr Tyr Gly Asp Asn Thr Asn Arg Pro Ser			
[0267]	1	5	10	15
[0268]	Gly Ser Thr Asp Ser Ser Tyr Val Asp Ile			
[0269]	20		25	
[0270]	<210> 29			
[0271]	<211> 32			
[0272]	<212> PRT			

[0273]	<213>	人工序列
[0274]	<220>	
[0275]	<223>	CH-2的VH
[0276]	<400>	29
[0277]	Gly Phe Thr Phe Ser Ser Val Ser Asn Thr Gly Ser Gly Asp Ala Tyr	
[0278]	1 5 10 15	
[0279]	Gly Tyr Thr Ile Ser Gly Ser Trp Ser Tyr Gly Tyr Ser Ile Asp Ala	
[0280]	20 25 30	
[0281]	<210>	30
[0282]	<211>	25
[0283]	<212>	PRT
[0284]	<213>	人工序列
[0285]	<220>	
[0286]	<223>	CH-2的VL
[0287]	<400>	30
[0288]	Ser Gly Gly Gly Ser Tyr Tyr Gly Asp Asn Thr Asn Arg Pro Ser Gly	
[0289]	1 5 10 15	
[0290]	Ser Ala Asp Ser Ser Ala Glu Pro Val	
[0291]	20 25	
[0292]	<210>	31
[0293]	<211>	27
[0294]	<212>	PRT
[0295]	<213>	人工序列
[0296]	<220>	
[0297]	<223>	CH-3的VH
[0298]	<400>	31
[0299]	Gly Phe Ser Phe Ser Asp Arg Arg Ser Asp Gly Ser Ser Asp Tyr Gly	
[0300]	1 5 10 15	
[0301]	Asn Gly Gly Trp Ile Ala Gly Asp Ile Asp Ala	
[0302]	20 25	
[0303]	<210>	32
[0304]	<211>	28
[0305]	<212>	PRT
[0306]	<213>	人工序列
[0307]	<220>	
[0308]	<223>	CH-3的VL
[0309]	<400>	32
[0310]	Ser Gly Asp Asn Ser Trp Tyr Gly Asp Ser Asp Gln Arg Pro Ser Cys	
[0311]	1 5 10 15	

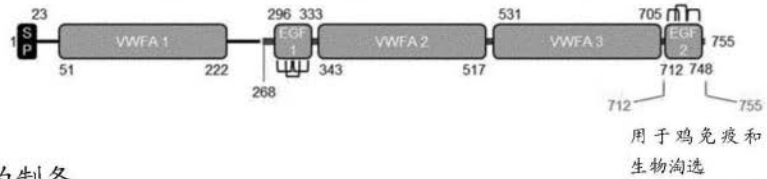
[0312]	Gly Ser Tyr Asp Ser Ser Ala Gly Tyr Ile Gly Ile	
[0313]	20	25
[0314]	<210> 33	
[0315]	<211> 723	
[0316]	<212> DNA	
[0317]	<213> 人工序列	
[0318]	<220>	
[0319]	<223> HN-1	
[0320]	<400> 33	
[0321]	ctgactcagc cgtcctcggg gtcagcgaac ccgggagaaa ccgtcaagat cacctgctcc	60
[0322]	gggagtagca gatggtacgg ctggttccag cagaagtctc ctggcagtg cccctgtcact	120
[0323]	ctgatctata gcaacgacaa gagaccctcg gacatccctt cacgattctc cggttccaca	180
[0324]	tccggctcca caagcacatt aaccatcact ggggtccaag ccgacgacga ggctgtctat	240
[0325]	tactgtggga gtggagacag cagcagtaat cctggtatat ttggggccgg gacaaccctg	300
[0326]	accgtcctag gtcagtcctc tagatcttcc ggcggtgggt gcagctccgg tgggtggcgg	360
[0327]	tccgccgtga cgttggacga gtccgggggc ggccctccaga cggccggagg agggctcagc	420
[0328]	ctcgtctgca aggcctccgg gttcaccttc agtgaccgtg gcatgcactg ggtgcgacag	480
[0329]	gcgcccggca aggggttggg actcgtcgca agtattagca acgctgggtg ttacacaaac	540
[0330]	tacgggtcgg cgggtgaagg ccgtgccacc atctcgaggg acaacgggca gagcacactg	600
[0331]	aggctgcagc tgaacaacct cagggtgag gacaccgcca cctactactg cgccagaggt	660
[0332]	gctagttatg atgcaatcga cgcattgggg cacgggaccg aagtcacgt ctcctccact	720
[0333]	agt 723	
[0334]	<210> 34	
[0335]	<211> 753	
[0336]	<212> DNA	
[0337]	<213> 人工序列	
[0338]	<220>	
[0339]	<223> CH-1	
[0340]	<400> 34	
[0341]	ctgactcagc cgtcctcggg gtcagcaaac ccaggagaaa ccgtcgagat cacctgctcc	60
[0342]	gggggtagca acagctacta tggctggtac cagcagaagt ctcttggcag tgcccctgtc	120
[0343]	actgtgatct atgacaacac caacagaccc tcgaacatcc ctccacgatt ctccggttcc	180
[0344]	acatccggct ccacaagcac attaacatc actgggggtcc aagccgacga cgaggctgtc	240
[0345]	tattactgtg ggagcacgga cagcagctat gttgatatat ttggggccgg gacaaccctg	300
[0346]	accgtcctag gtcagtcctc tagatcttcc ggcggtgggt gcagctccgg tgggtggcgg	360
[0347]	tccgccgtga cgttggacga gtccgggggc ggccctccaga cggccggagg agcgtcagc	420
[0348]	ctcgtctgca aggcctccgg gttctcttcc agcggcggtc acatgcactg ggtgcgccag	480
[0349]	gctccaggca aggggttggg atacgtcgct caaattagca gcaactgtag tggcacagga	540
[0350]	tacgggtcgg cgggtgcagg ccgtgccacc atctcgaggg acaacgggca gagcacagt	600

[0351]	aggctgcagc tgaacaacct cagggctgag gacaccggca tctactactg tgccaaagat	660
[0352]	gcttacgggtt atcgtattag tggtagttag agttatgggt acagtatcga cgcatggggc	720
[0353]	cacgggaccg aagtcacgt ctcctccact agt	753
[0354]	<210>	35
[0355]	<211>	750
[0356]	<212>	DNA
[0357]	<213>	人工序列
[0358]	<220>	
[0359]	<223>	CH-2
[0360]	<400>	35
[0361]	ctgactcagc cgtcctcggt gtcagcgaac ccgggagaaa ccgtcaagat cacctgctcc	60
[0362]	gggggtggca gctactatgg ctggtaccag cagaaggcac ctggcagtgc ccctgtcact	120
[0363]	ctgatctatg acaacaccaa cagaccctcg gacatccctt cacgattctc cggttccaca	180
[0364]	tctggctcca caagcacatt aaccatcact ggggtccaag ccgacgacga ggctgtctat	240
[0365]	ttctgtggga gtgcagacag cagtgtctgag cctgtatttg gggccgggac aaccctgacc	300
[0366]	gtcctaggtc agtcctctag atcttccggc ggtgggtggca gctccgggtg tggcggttcc	360
[0367]	gccgtgacgt tggacgagtc cgggggcggc ctccagacgc ccggaggagc gctcagcctc	420
[0368]	gtctgcaagg cctccgggtt caccttcagc agcgtcaaca tgcactgggt gcgccaggct	480
[0369]	ccaggcaagg ggttggaata cgtcgtcaa attagcaaca ctggtagtgg tacaggctac	540
[0370]	ggggcggcgg tgcagggccg tgccaccatc tcgagggaca acgggcagag cacagtgagg	600
[0371]	ctgcagctga acaacctcag ggctgaggac accggcatct actactgtgc caaagatgct	660
[0372]	tacggttata ctattagtgg tagttggagt tatggttaca gtatcgacgc atggggccac	720
[0373]	gggaccgaag tcacgtctc ctccactagt	750
[0374]	<210>	36
[0375]	<211>	741
[0376]	<212>	DNA
[0377]	<213>	人工序列
[0378]	<220>	
[0379]	<223>	CH-3
[0380]	<400>	36
[0381]	ctgactcagc cgtcctcggt gtcagcaaac ccaggagaaa ccgtcgagat cacctgctcc	60
[0382]	ggggataaca gctggtatgg ctggtatcag cagaagtcac ctggcagtgc ccctgtcact	120
[0383]	ctgatctatg acagcgacca gagaccctcg ggcatccctt cacgattctc cggttccaca	180
[0384]	tctgactcca cgggcacatt aaccatcact ggggtccaag tcgacgacga ggctgtctat	240
[0385]	tactgtggga gctacgacag cagtgtggt tatattggta tatttggggc cgggacaacc	300
[0386]	ctgaccgtcc taggtcagtc ctctagatct tccggcggtg gtggcagctc cgggtggtggc	360
[0387]	ggttccgccg tgacgttggc cgagtcggg ggcggcctcc agacgcccgg aggagcgtc	420
[0388]	agcctcgtct gcaaggcctc cgggttctcc ttcagtgacc gtggcatgca ctgggtgcga	480
[0389]	caggcaccgc gcaaggggct ggagtgggtc gcgggtatta gaagtgatgg tagtagcaca	540

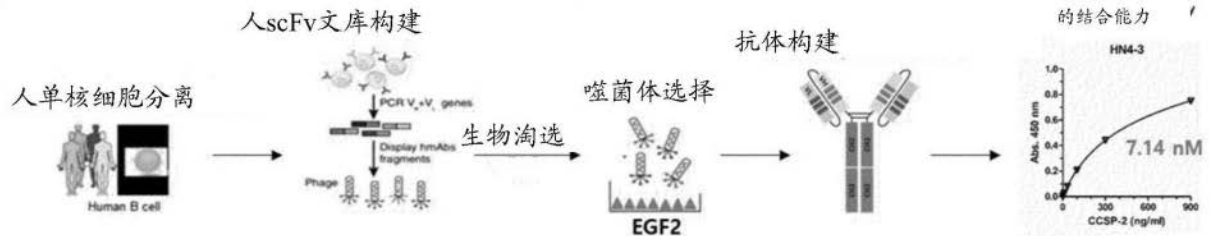
[0390] tactacgggg cggcggtgaa gggccgtgcc accatctcga gggacaacgg gcagagcaca 600
[0391] gtgaggatgc agctgaacaa cctcagggtc gaggacaccg gcacctacta ctgcgccaga 660
[0392] gattatggca atggtggttg gattgctggt gacatcgacg catggggcca cgggaccgaa 720
[0393] gtcacgtctt cctccactag t 741

◆ 使用EGF2结构域筛选CCSP-2结合的scFv抗体的示意图

CCSP-2结构域:



1) 来源于人的抗-EGF2抗体的制备



2) 来源于鸡的抗-EGF2抗体制备

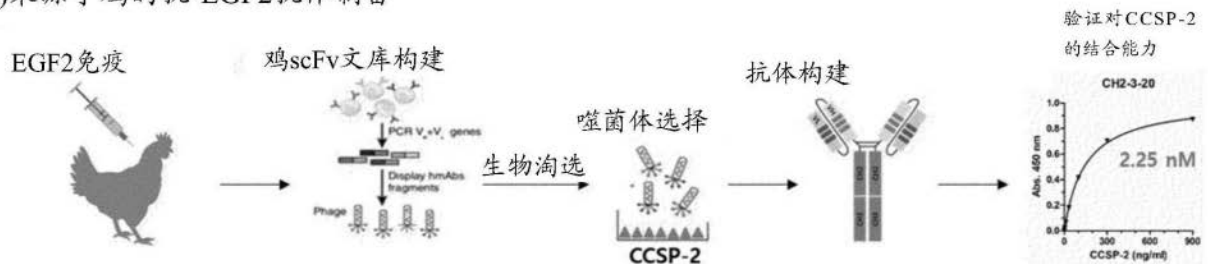


图1

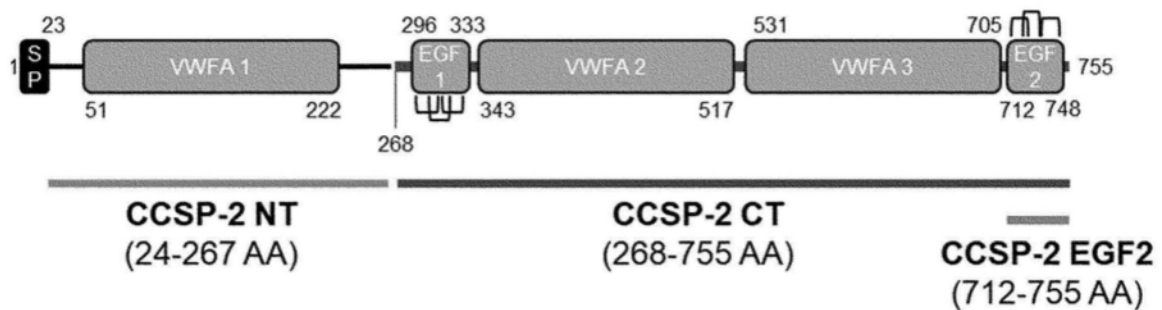


图2

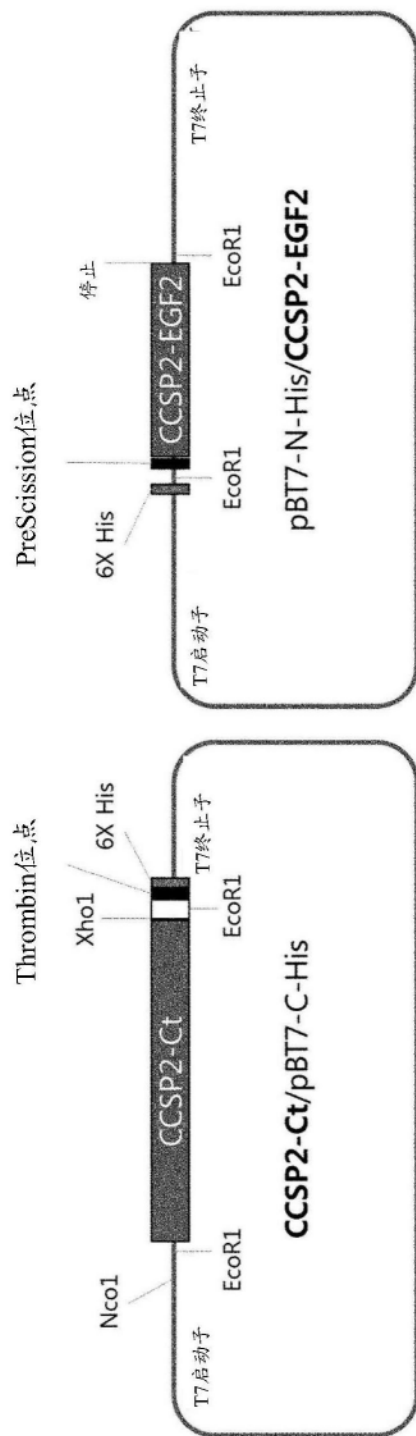


图3

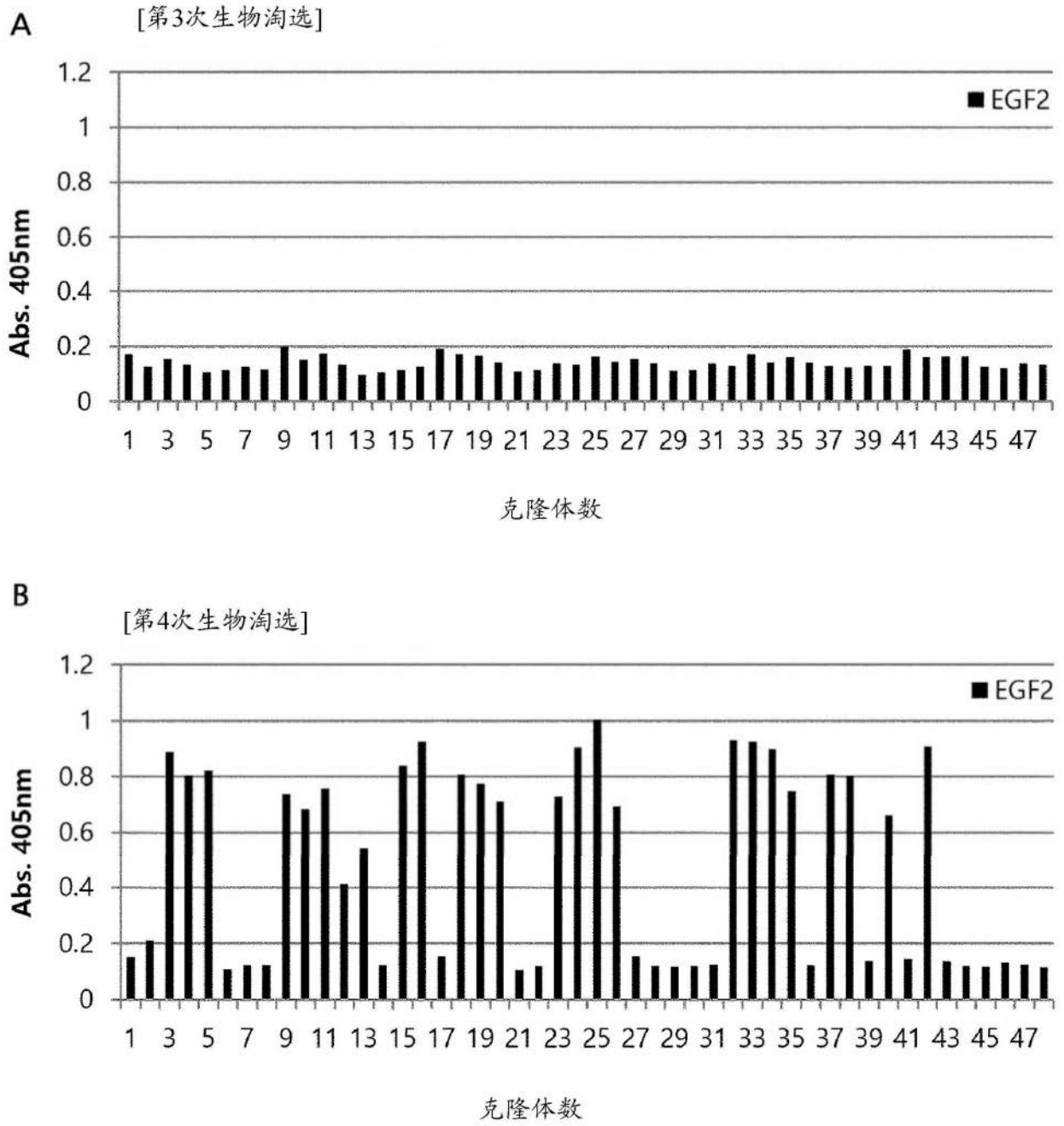


图4

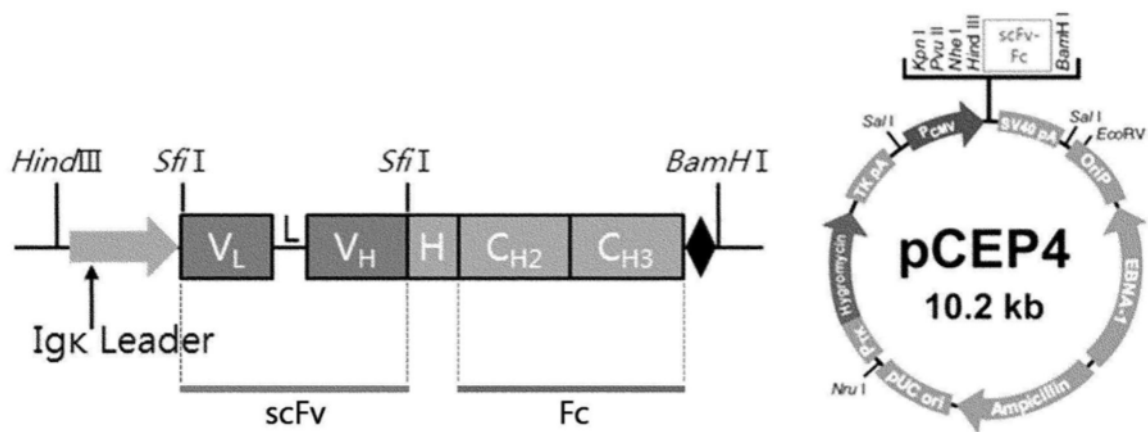


图5

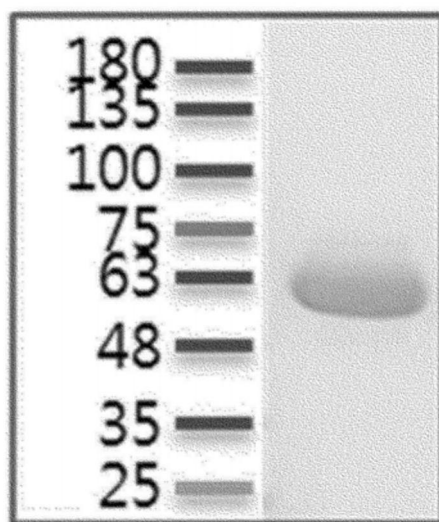


图6

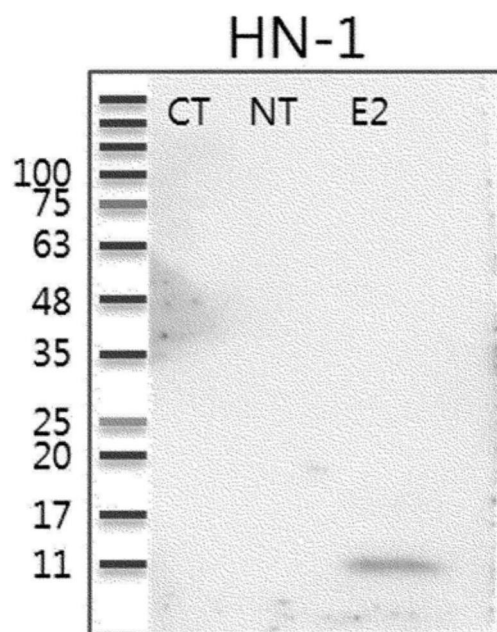


图7

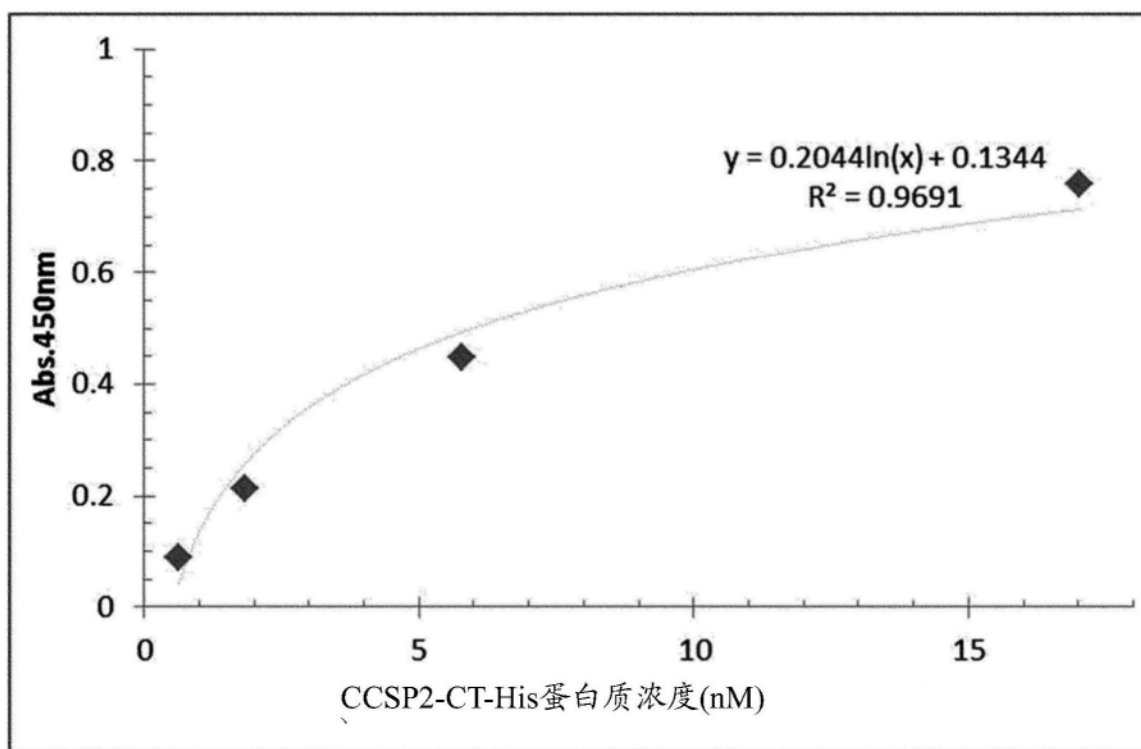


图8

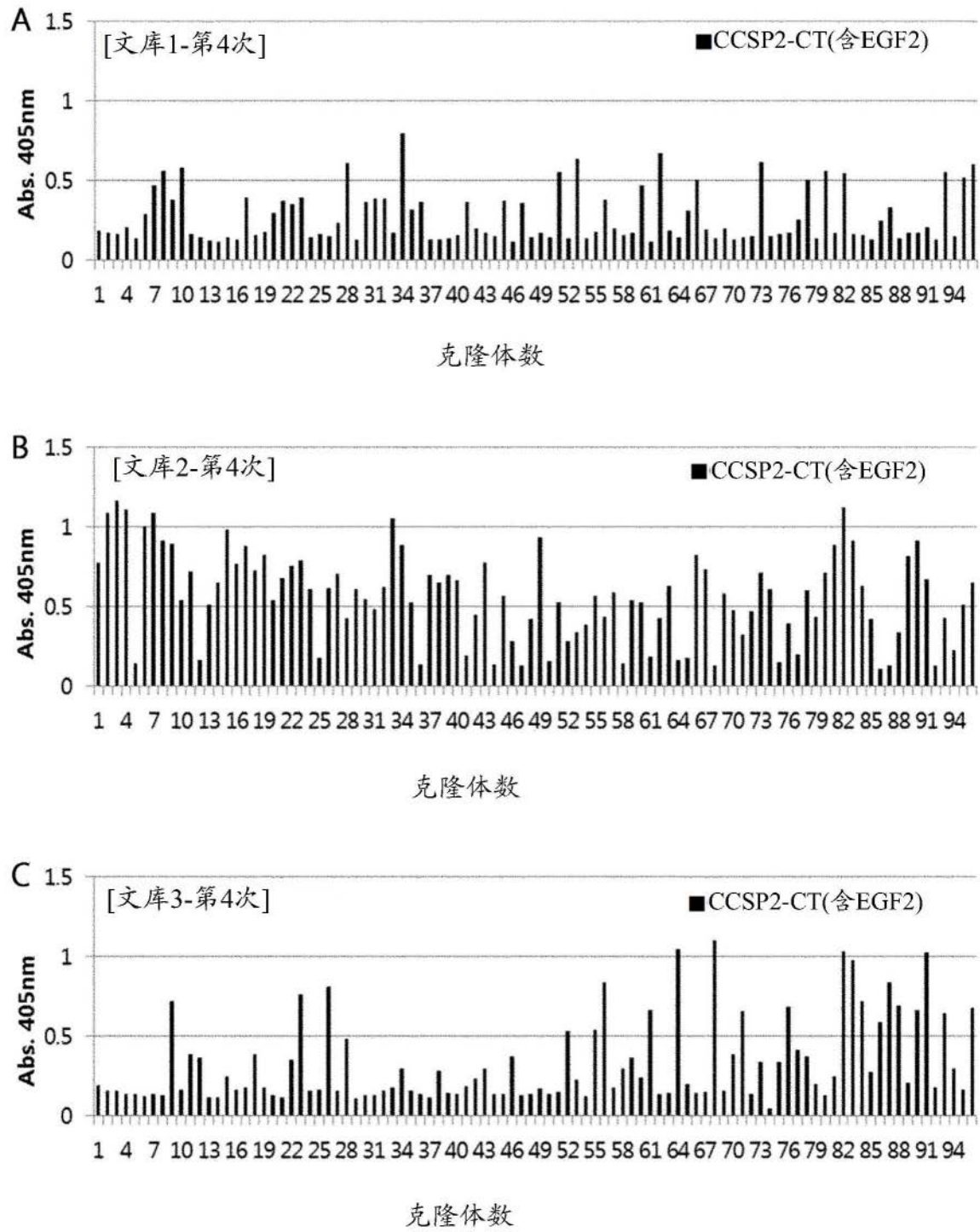


图9

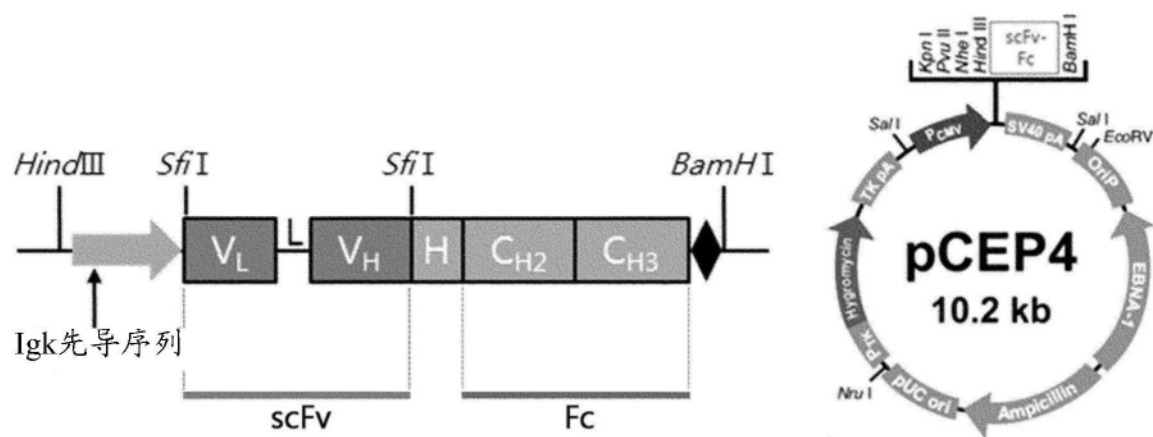


图10

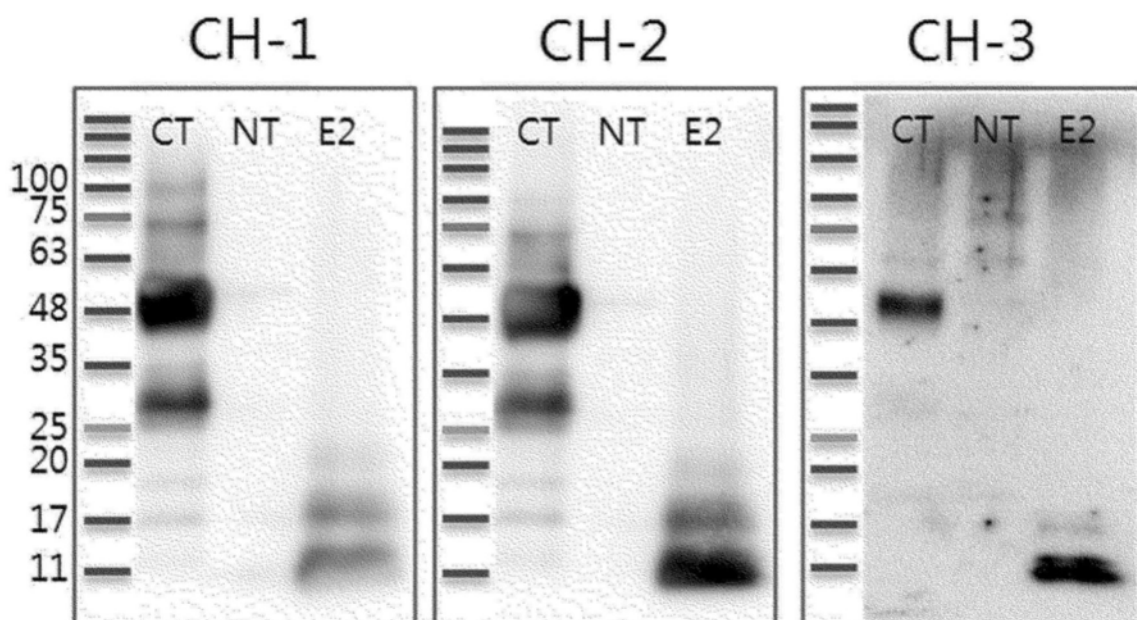


图11

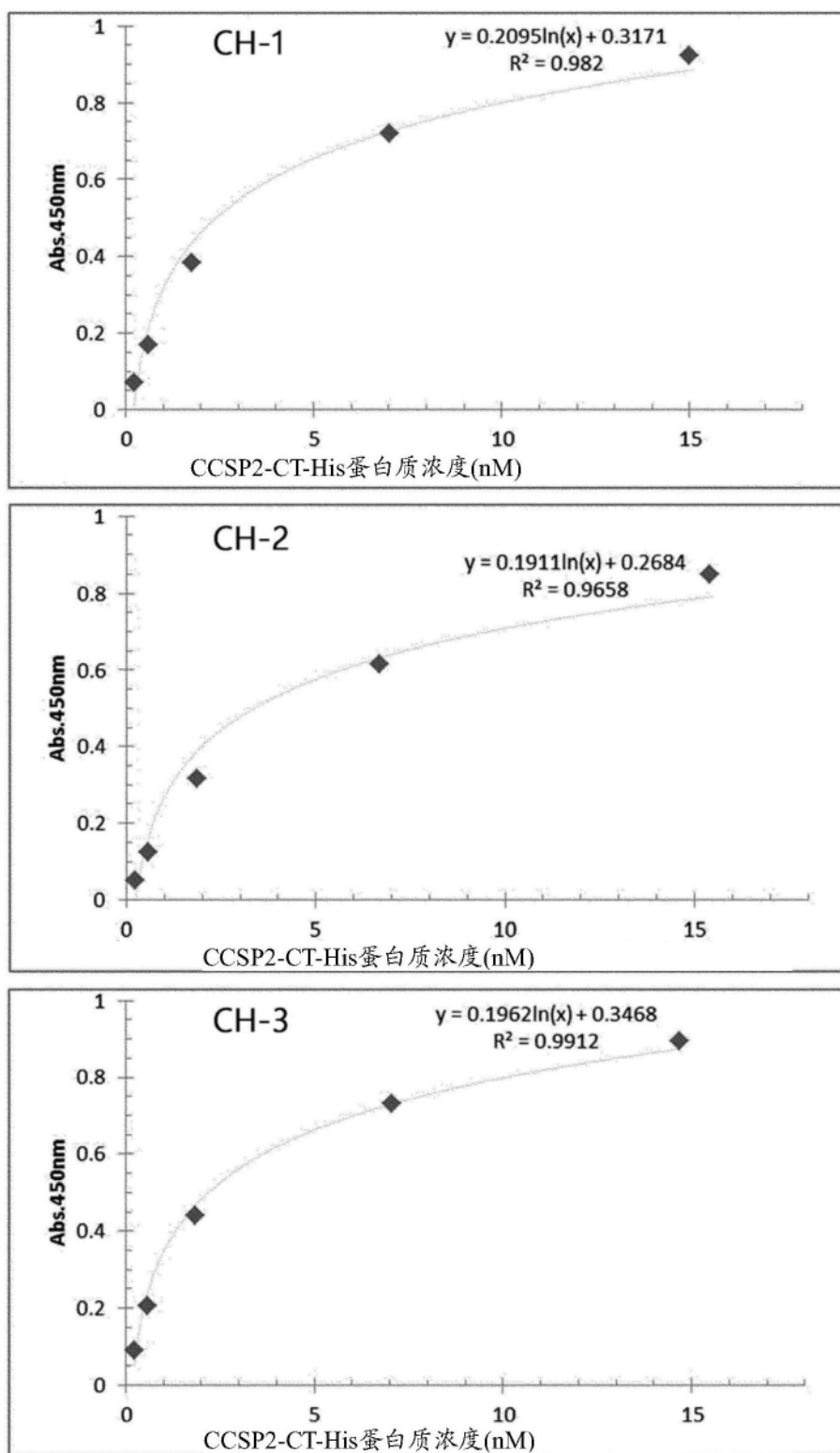
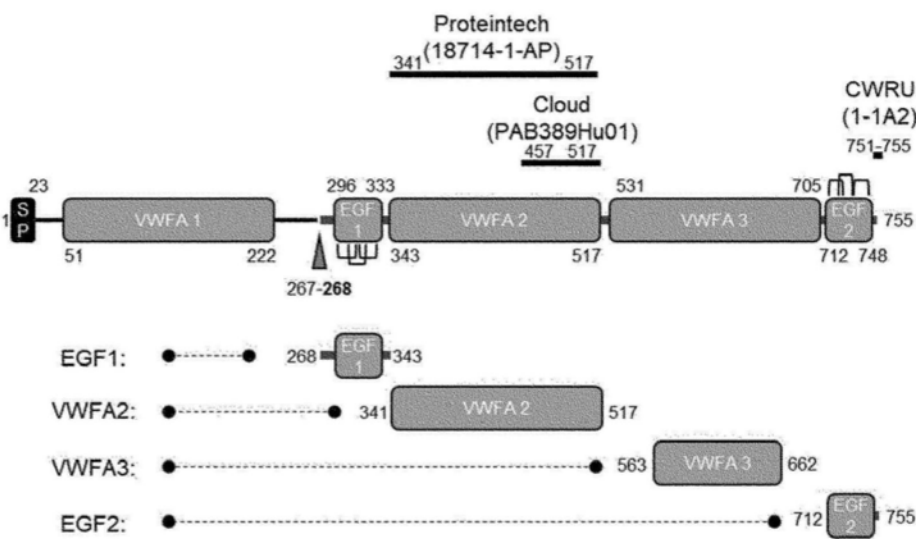


图12

A



B

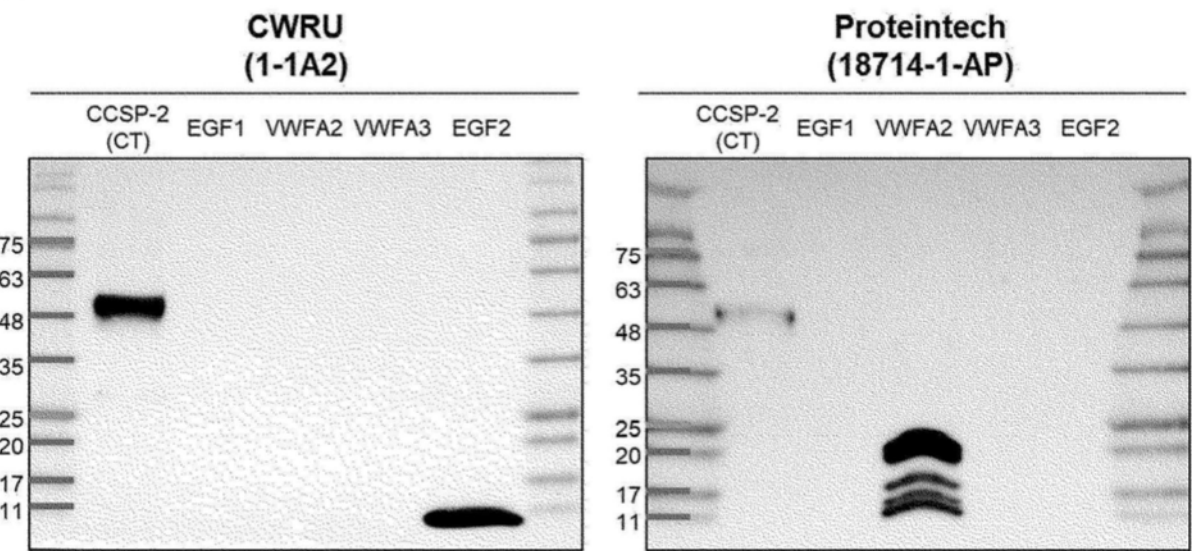


图13

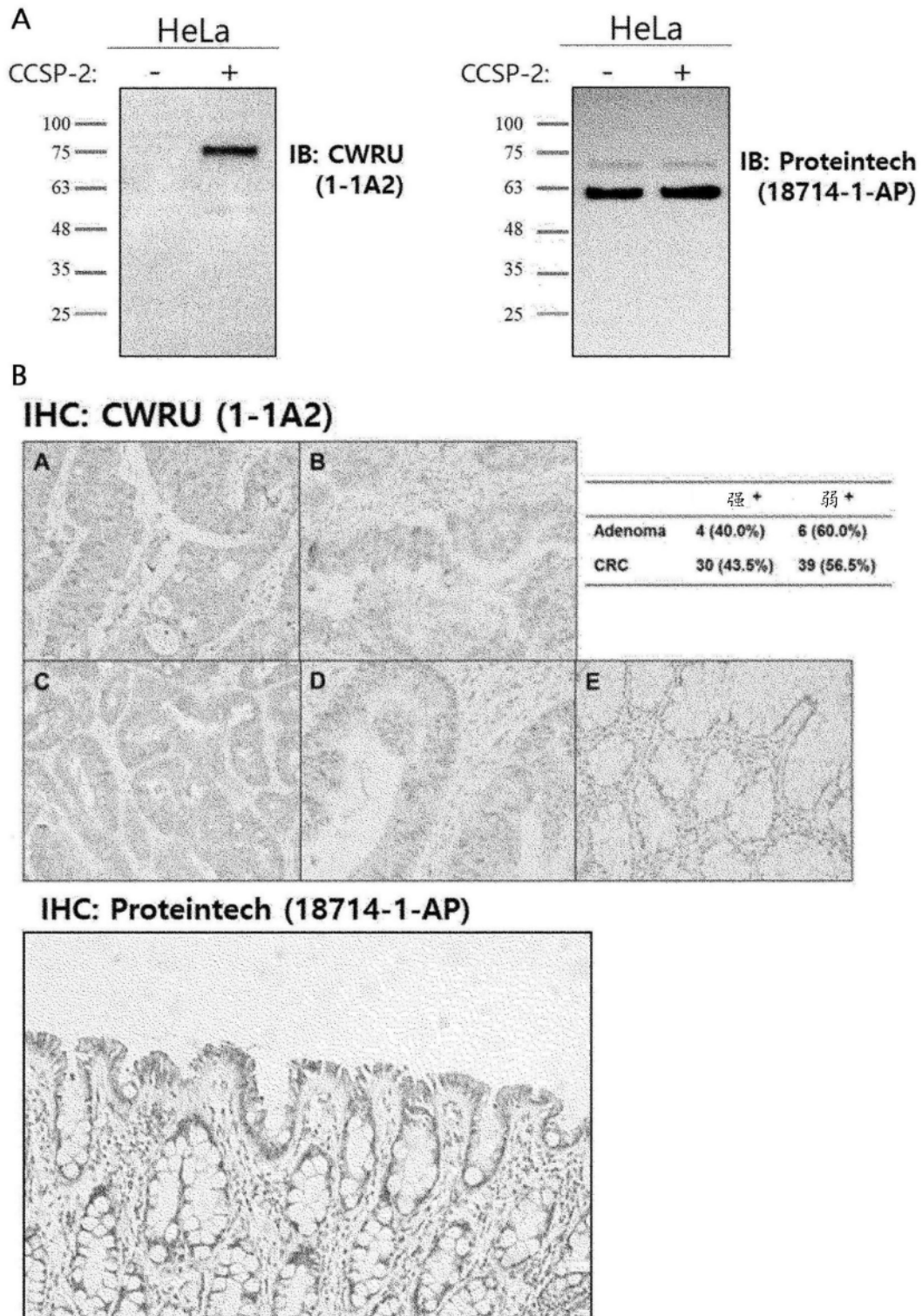


图14

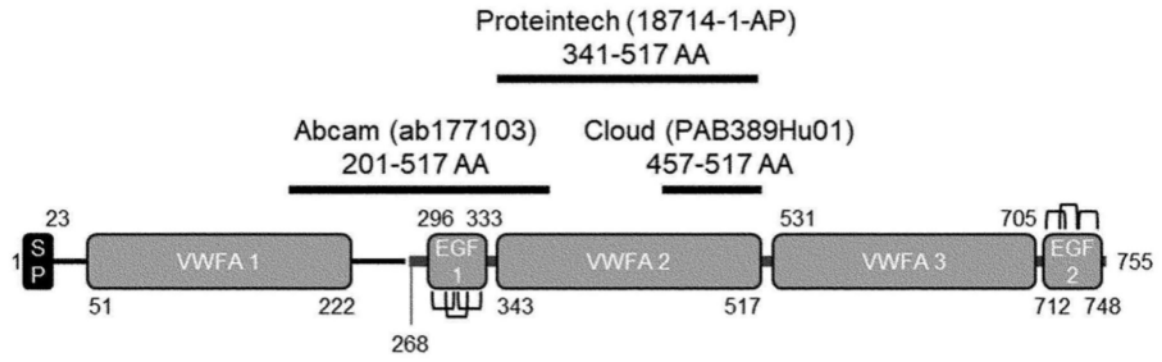


图15

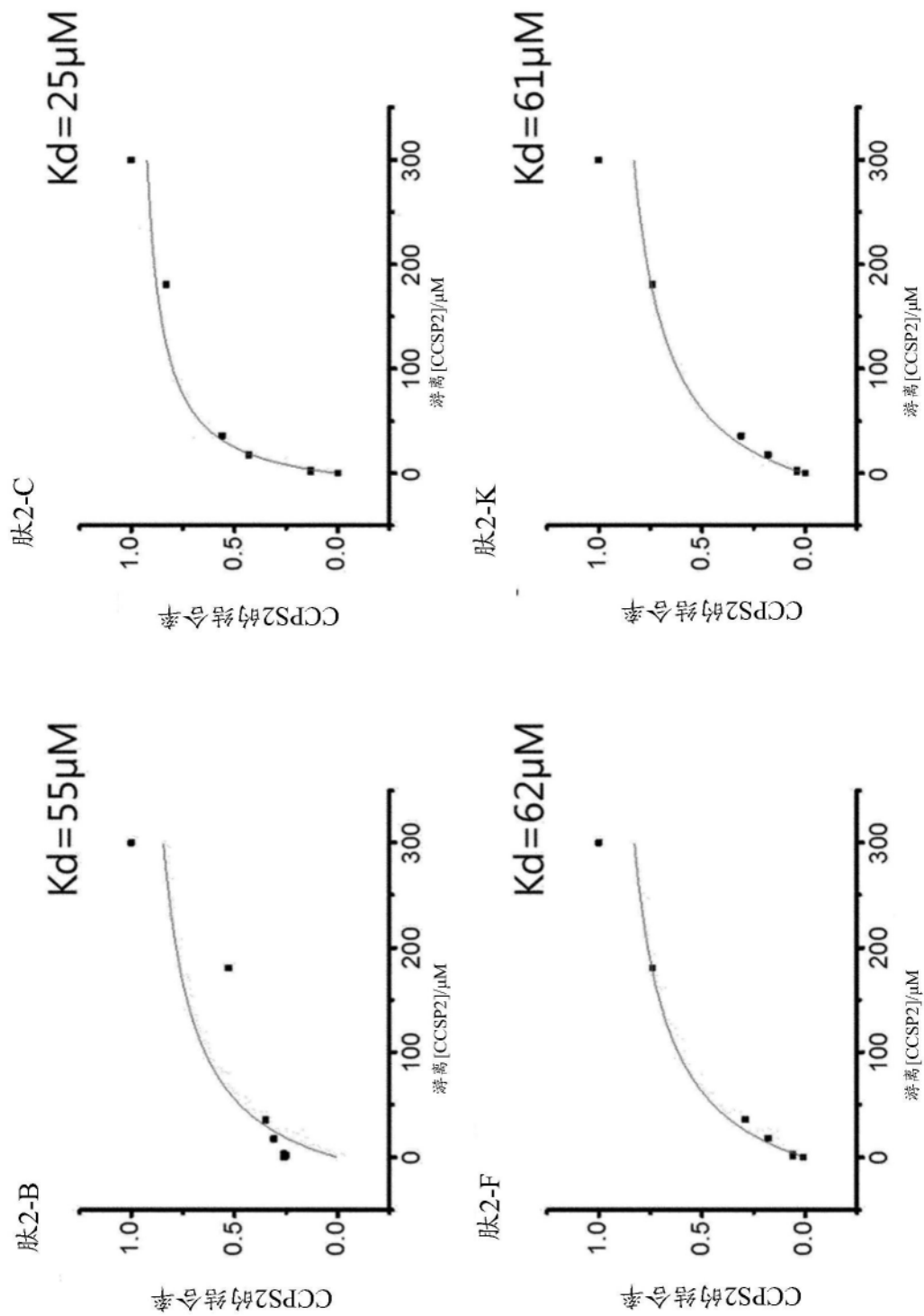


图16