(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 105377895 B
(45)授权公告日 2019.07.05

(21)申请号 201480010508.8

(22)申请日 2014.02.26

(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 105377895 A

(43)申请公布日 2016.03.02

(30)优先权数据
10-2013-0020547 2013.02.26 KR

(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2015.08.26

(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/KR2014/001567 2014.02.26

(87)PCT国际申请的公布数据
WO2014/133316 EN 2014.09.04

(83)生物保藏信息
KCLRF-BP-00291 2013.02.18

(73)专利权人 翰林大学校产学协力团
地址 韩国江原道

(72)发明人 权滢周

(74)专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专利商标事务所 11038
代理人 郑天松

(51)Int.Cl.
C07K 16/30(2006.01)
C12N 15/13(2006.01)
A61K 39/395(2006.01)
A61P 35/00(2006.01)

(56)对比文件
WO 2010073694 A1,2010.07.01,
KR 20100019670 A,2010.02.19,
WO 2012015200 A2,2012.02.02,
F.Muller-Pillasch等.Identification of a new tumour-associated antigen TM4SF5.《Gene》.1998,

审查员 孙雅圣娴

权利要求书2页 说明书23页
序列表8页 附图30页

(54)发明名称

针对跨膜4超家族成员5蛋白的抗体或包含其的抗癌组合物

(57)摘要

本发明提供与跨膜4超家族成员5蛋白相结合的抗体或其的抗原结合片段及其的用途。本发明的抗体以高的亲和力与肿瘤特异抗原跨膜4超家族成员5蛋白相结合,并显著抑制表达跨膜4超家族成员5蛋白的癌细胞的生长、转移及浸润,因而可利用于表达跨膜4超家族成员5蛋白的多种癌症的诊断、预防或治疗。



CN 105377895 B

1.一种抗体或其的抗原结合片段,其与跨膜4超家族成员5蛋白相结合,

上述抗体或其的抗原结合片段包括:

重链可变域,包含序列表中序列19的互补性决定区H1、序列表中序列20的互补性决定区H2及序列表中序列21的互补性决定区H3;以及

轻链可变域,包含序列表中序列22的互补性决定区L1、序列表中序列23的互补性决定区L2及序列表中序列24的互补性决定区L3。

2.根据权利要求1所述的抗体或其的抗原结合片段,其中所述重链可变域包含序列表中序列25或序列表中序列29的氨基酸序列。

3.根据权利要求1所述的抗体或其的抗原结合片段,其中所述轻链可变域包含序列表中序列26或序列表中序列30的氨基酸序列。

4.根据权利要求1所述的抗体或其的抗原结合片段,其中所述抗体包括:

(i)序列表中序列25的重链可变域及序列表中序列26的轻链可变域;或者

(ii)序列表中序列29的重链可变域及序列表中序列30的轻链可变域。

5.根据权利要求1所述的抗体或其的抗原结合片段,其中所述抗体由保藏号为KCLRF-BP-00291的杂交瘤细胞生产。

6.根据权利要求1所述的抗体或其的抗原结合片段,其中所述抗原结合片段为Fab片段、F(ab')片段、F(ab')2片段或Fv片段。

7.根据权利要求1所述的抗体或其的抗原结合片段,其中所述抗体为单克隆抗体、多克隆抗体、嵌合抗体、人源化抗体或人类抗体。

8.根据权利要求1所述的抗体或其的抗原结合片段,其中所述抗体与功能性分子相结合。

9.根据权利要求8所述的抗体或其的抗原结合片段,其中所述功能性分子为化学物质、放射性核素、细胞毒素、细胞因子或趋化因子。

10.一种与跨膜4超家族成员5蛋白相结合的抗体或其的抗原结合片段,其包含由保藏号为KCLRF-BP-00291的杂交瘤细胞产生的抗体的互补性决定区。

11.一种杂交瘤细胞株,其保藏号为KCLRF-BP-00291,上述杂交瘤细胞株的特征在于,生产针对跨膜4超家族成员5蛋白的抗体。

12.一种核酸分子,其对权利要求1至10中任一项所述的抗体或其的抗原结合片段的重链可变域进行编码。

13.根据权利要求12所述的核酸分子,其中所述核酸分子包含序列表中序列27或序列表中序列31的核苷酸序列。

14.一种核酸分子,其对权利要求1至10中任一项所述的抗体或其的抗原结合片段的轻链可变域进行编码。

15.根据权利要求14所述的核酸分子,其中所述核酸分子包含序列表中序列28或序列表中序列32的核苷酸序列。

16.一种重组载体,其包含权利要求12的对重链可变域进行编码的核酸分子、权利要求14的对轻链可变域进行编码的核酸分子,或包含所有上述核酸分子。

17.一种宿主细胞,其包含权利要求16的重组载体。

18.一种抗体或其的抗原结合片段的制备方法,其中所述抗体或其的抗原结合片段与

跨膜4超家族成员5蛋白相结合，上述抗体或其的抗原结合片段的制备方法包括培养权利要求17的宿主细胞的步骤。

19.一种用于确认试样中是否存在跨膜4超家族成员5蛋白的非诊断性方法，其使用权利要求1至10中任一项所述的抗体或其的抗原结合片段。

20.根据权利要求19所述的方法，其中所述试样为组织、细胞、全血、血清、血浆、唾液、尿、淋巴液或脊髓液。

21.一种癌症的预防或治疗用药剂学组合物，其包含：

(a)药剂学有效剂量的权利要求1至10中任一项所述的抗体或其的抗原结合片段；以及

(b)药剂学上接受的载体。

22.权利要求1至10中任一项所述的抗体或其的抗原结合片段用于制造癌症的预防或治疗用药剂学组合物的用途，其中所述癌症选自肝癌及结肠癌。

23.权利要求1至10中任一项所述的抗体或其的抗原结合片段用于制造抑制癌细胞的转移或浸润的药剂学组合物的用途，其中所述癌选自肝癌及结肠癌。

24.一种跨膜4超家族成员5蛋白检测用试剂盒，其包含权利要求1至10中任一项所述的抗体或其的抗原结合片段。

25.权利要求1至10中任一项所述的抗体或其的抗原结合片段用于制造试样中跨膜4超家族成员5蛋白检测用试剂盒的用途，其中所述跨膜4超家族成员5蛋白检测用试剂盒为癌症诊断用试剂盒，其中所述癌症选自肝癌及结肠癌。

26.权利要求25的用途，其中所述试样为组织、细胞、全血、血清、血浆、唾液、尿、淋巴液或脊髓液。

针对跨膜4超家族成员5蛋白的抗体或包含其的抗癌组合物

[0001] 【相关申请的交叉引用】

[0002] 本申请是2014年2月26日提交的国际申请的国家阶段，该国际申请要求2013年2月26日提交的韩国专利申请No.2013-0020547的优先权，其全部内容通过引用并入本文。

【技术领域】

[0003] 本发明涉及与跨膜4超家族成员5蛋白(TM4SF5，transmembrane4superfamily member 5protein)相结合的抗体或其的抗原结合片段及对其进行编码的核酸分子、重组载体、转化体和由此制备抗体的方法及上述抗体的用途。

【背景技术】

[0004] 在人类癌症中，在胰腺癌、软组织肉瘤(soft tissue sarcoma)、胃癌、十二指肠乳头部上皮癌(carcinoma of the papilla vateri)及结肠癌中观察到跨膜4超家族成员5蛋白(TM4SF5，transmembrane 4superfamily member 5protein)的信使核糖核酸(mRNA)的表达(Muller-Pillasch F，et al.Gene 208，25-30(1998))。跨膜4超家族成员5蛋白通过诱导的形态学伸长及上皮-间质转化(epithelial-mesenchymal transition)在肝细胞癌(HCC，hepatocellular carcinoma)的形成中起到重要的作用，在体外引起异常细胞生长，在体内引起肿瘤的形成(Lee SA，et al.J Clin Invest 118，1354-1366(2008)；Lekishvili T，et al.J Cell Sci 121，685-694(2008))。据报告，在基于跨膜4超家族成员5蛋白和整联蛋白α2之间的细胞外相互作用的胶原蛋白类型I环境中抑制整联蛋白α2功能的情况下，发生表达-诱导跨膜4超家族成员5蛋白的、未调节的细胞增殖及新生血 管形成(Lee SA，et al.Carcinogenesis 30，1872-1879(2009))。作为靶向跨膜4超家族成员5蛋白的合成抑制剂的4'-(对甲苯磺酰-氨基)-4-羟基查耳酮(TSAHC，4'-(p-toluenesulfonyl-amido)-4-hydroxychalcone)在体外及体内抑制肝细胞癌生长及转移(Lee SA，et al.Hepatology 49，1316-1325(2009))。这种事实表明在肝细胞癌形成中，跨膜4超家族成员5蛋白的作用为用于开发肝细胞癌治疗药物的新型分子靶标。

[0005] 肝细胞癌为全世界最普遍存在的癌症之一，尤其在亚洲和撒哈拉沙漠以南的非洲(sub-Saharan Africa)广泛发病。众所周知，大部分肝细胞癌的发展为包含不典型增生结节(dysplastic nodule)、初期肝细胞癌、高分化度肝细胞癌、中间及低分化度肝细胞癌的多步骤过程(Forner A，et al.Lancet 379，1245-1255(2012))。

[0006] 结肠癌为全世界第三个普遍存在的癌症，与发展中国家相比，在发达国家更普遍存在。在结肠癌中最普遍的突变基因为与Wnt-APC-β-连环蛋白信号通路相关的别藻蓝蛋白(APC，allophycocyanin)、β-连环蛋白、AXIN1、AXIN2、TCF7L2或NKD1(Korinek V，et al.Science 275，1784-1787(1997)；Khan NP，et al.Mol Cell Biochem 355，149-155(2011)；Folsom AR，et al.Diabetes Care 31，905-909(2008)；Guo J，et al.PLoS One 4，e7982(2009))。

[0007] 在本说明书全文中，参照了多篇论文及专利文献，并表示了其引用。所引用的论文

及专利文献的公开内容全部插入于本说明书作为参照，从而更加明确说明本发明所属技术领域的水平及本发明的内容。

[0008] 【发明概述】

[0009] 本发明人为了开发可诊断、预防及治疗癌症的抗体而研究努力。其结果，制备对作为肿瘤特异抗原的跨膜4超家族成员5蛋白以高的亲和力相结合的新型抗体及其的抗原结合片段，并确认对癌细胞的生长、转移及浸润的上述抗体的优秀抑制活性，从而完成了本发明。

[0010] 因此，本发明的目的在于，提供与跨膜4超家族成员5蛋白相结 合的抗体或其的抗原结合片段。

[0011] 本发明的再一目的在于，提供与包含由杂交瘤细胞生产的抗体的互补性决定区(CDR，complementarity determining region)的跨膜4超家族成员5蛋白相结合的抗体或其的抗原结合片段。

[0012] 本发明的另一目的在于，提供用于生产上述抗体的杂交瘤细胞株。

[0013] 本发明的还一目的在于，提供对上述抗体或其的抗原结合片段的重链可变域进行编码的核酸分子。

[0014] 本发明的又一目的在于，提供对上述抗体或其的抗原结合片段的轻链可变域进行编码的核酸分子。

[0015] 本发明的又一目的在于，提供包含上述核酸分子的重组载体。

[0016] 本发明的又一目的在于，提供包含上述重组载体的宿主细胞。

[0017] 本发明的又一目的在于，提供上述抗体或其的抗原结合片段的制备方法。

[0018] 本发明的又一目的在于，提供确认或检测试样内是否存在跨膜4超家族成员5蛋白的方法。

[0019] 本发明的又一目的在于，提供癌症的预防或治疗用药剂学组合物。

[0020] 本发明的又一目的在于，提供跨膜4超家族成员5蛋白蛋白质检测用试剂盒。

[0021] 本发明的又一目的在于，提供癌症的预防或治疗方法。

[0022] 以下发明的详细说明、发明要求保护范围及附图更加明确本发明的其他目的及优点。

【附图说明】

[0023] 图1a、图1b、图1c、图1d及图1e示出生产抗-跨膜4超家族成员5蛋白单克隆抗体的杂交瘤细胞的筛选。图1a中，将h跨膜4超家族成员5蛋白肽给药到四只BALB/c小鼠的腹腔内来进行免疫化。采集血清，并用酶联免疫吸附测定法试剂盒分析了整个免疫球蛋白G。图1b为使用已进行h跨膜4超家族成员5蛋白肽免疫化的小鼠的脾细胞的细胞-融合实验的初期筛选的酶联免疫吸附测定法结果。图1c 中，为了生产单克隆抗体，筛选了图1b的6个杂交瘤(箭头)。图1d中，为了生成多个图1c的6个杂交瘤(箭头)，向BALB/c小鼠的腹腔内给药。利用酶联免疫吸附测定法对上述多个进行筛选，来检测了h跨膜4超家族成员5蛋白肽相关的特定抗体的杂交瘤。图1e中，为了生成多个，将2D4-18杂交瘤克隆给药到7只BALB/c小鼠的腹腔内。聚集血清(图1a)、杂交瘤培养上清液(图1b及图1c)及多个(图1d及图1e)之后，用酶联免疫吸附测定法试剂盒分析了肽特异性整个免疫球蛋白G的效价和量。

[0024] 图2示出从给药小鼠杂交瘤细胞株2D4-18的小鼠的腹水中纯化抗-跨膜4超家族成员5蛋白单克隆抗体2D4-18的结果。利用十二烷基硫酸钠(SDS,sodium dodecyl sulfate)-聚丙烯酰胺凝胶电泳(PAGE,polyacrylamide gelelectrophoresis)分离标记、腹水及纯化的单克隆抗体,并用考马斯亮蓝进行了染色。

[0025] 图3示出抗-跨膜4超家族成员5蛋白单克隆抗体2D4-18的结合亲和度。图3的(A)部分为对h跨膜4超家族成员5蛋白的结合亲和度,图3的(B)部分为对m跨膜4超家族成员5蛋白的结合亲和度。

[0026] 图4示出在肝细胞癌组织中跨膜4超家族成员5蛋白的表达。图4的(A)部分为正常肝组织,图4的(B)部分为表达＞75%、74-50%、49-11%的跨膜4超家族成员5蛋白的肝细胞癌组织的例,比例尺＝左侧200μm,右侧50μm。

[0027] 图5a及图5b示出在结肠癌组织中跨膜4超家族成员5蛋白的表达。图5a的(A)部分为正常结肠组织,图5a的(B)部分为表达＞75%、74-50%、49-11%及＜10%的跨膜4超家族成员5蛋白的结肠癌组织的例,图5b的(C)部分为具有已转移的肝癌的三个结肠癌患者的结肠癌组织及肝转移组织,比例尺＝左侧200μm,右侧50μm。

[0028] 图6a、图6b及图6c示出肝细胞癌细胞及结肠癌细胞生长的抗-跨膜4超家族成员5蛋白单克隆抗体2D4-18的抑制效果。图6a示出肝细胞癌细胞株及结肠癌细胞株中跨膜4超家族成员5蛋白信使核糖 核酸的表达。图6b示出肝细胞癌细胞株的生长的抗-跨膜4超家族成员5蛋白单克隆抗体2D4-18的效果。各个以三次实验的平均值(mean)±标准偏差(SD)表示。**P＜0.01(vs正常免疫球蛋白G对照组)。图6c示出结肠癌细胞的生长的抗-跨膜4超家族成员5蛋白单克隆抗体2D4-18的效果。各个以三次实验的平均值±标准偏差表示。**P＜0.01(vs正常免疫球蛋白G对照组)。

[0029] 图7示出肝细胞癌细胞的移动及浸润的抗-跨膜4超家族成员5蛋白单克隆抗体2D4-18的效果。图7的(A)部分为移动分析,图7的(B)部分为浸润分析,图7的(C)部分为伤口治疗分析,比例尺＝200μm。

[0030] 图8示出结肠癌细胞的移动及浸润的抗-跨膜4超家族成员5蛋白单克隆抗体2D4-18的效果。图8的(A)部分为移动分析,图8的(B)部分为浸润分析,图8的(C)部分为伤口治疗分析,比例尺＝200μm。

[0031] 图9a及图9b示出在肝细胞癌肿瘤组织中抗-跨膜4超家族成员5蛋白单克隆抗体2D4-18的生物体内分布。图9a中,剖切小鼠,并使用实时IVIS图像系统200来观察了小鼠生物体内抗体的位置(上面板),去除肿瘤组织并放置在小鼠的左侧(下面板)。图9b为利用共聚焦显微镜来观察肿瘤组织的结果,比例尺＝20μm。

[0032] 图10示出在异种移植小鼠模型中肝细胞癌肿瘤生长的已给药的抗-跨膜4超家族成员5蛋白单克隆抗体2D4-18的治疗功效。图10的(A)部分为肝细胞癌肿瘤组织的照片,图10的(B)部分为肿瘤体积,图10的(C)部分为肿瘤重量,图10的(D)部分为体重,图10的(E)部分表示在肿瘤组织中跨膜4超家族成员5蛋白的表达,用褐色表示跨膜4超家族成员5蛋白的阳性部位,并呈现比例尺＝20μm。

[0033] 图11示出在同种移植小鼠模型中肝细胞癌肿瘤生长的已给药的抗-跨膜4超家族成员5蛋白单克隆抗体2D4-18的治疗功效。图11的(A)部分为肝细胞癌肿瘤组织的照片,图11的(B)部分为肿瘤体积,图11的(C)部分为肿瘤重量,图11的(D)部分为体重,图 11的(E)

部分表示在肿瘤组织中跨膜4超家族成员5蛋白的表达，用褐色表示跨膜4超家族成员5蛋白的阳性部位，并呈现比例尺＝20μm。

[0034] 图12示出在异种移植小鼠模型中结肠癌生长的抗-跨膜4超家族成员5蛋白单克隆抗体2D4-18的治疗功效。图12的(A)部分为结肠癌组织的照片，图12的(B)部分为肿瘤体积，图12的(C)部分为肿瘤重量，图12的(D)部分为体重，图12的(E)部分表示在肿瘤组织中跨膜4超家族成员5蛋白的表达，用褐色表示跨膜4超家族成员5蛋白的阳性部位，并呈现比例尺＝20μm。

[0035] 图13示出在同种移植小鼠模型中结肠癌生长的抗-跨膜4超家族成员5蛋白单克隆抗体2D4-18的治疗功效。图13的(A)部分为结肠癌组织的照片，图13的(B)部分为肿瘤体积，图13的(C)部分为肿瘤重量，图13的(D)部分为体重，图13的(E)部分表示在肿瘤组织中跨膜4超家族成员5蛋白的表达，用褐色表示跨膜4超家族成员5蛋白的阳性部位，并呈现比例尺＝20μm。

[0036] 图14示出在异种移植结肠癌模型中抗-跨膜4超家族成员5蛋白单克隆抗体2D4-18的肺转移抑制效果。图14的(A)部分及图14的(B)部分为肺的照片，图14的(C)部分为肿瘤重量，图14的(D)部分为体重。

[0037] 图15示出从杂交瘤细胞克隆2D4-18分离的重链及轻链可变域的互补脱氧核糖核酸序列(2D4-18)。图15的(A)部分为重链可变域的序列，图15的(B)部分表示轻链可变域的序列，并在互补脱氧核糖核酸序列下面记载了预测到的氨基酸序列。

[0038] 图16示出从杂交瘤细胞克隆2D4-18分离的重链及轻链可变域的互补脱氧核糖核酸序列(2D4-18(1))。图16的(A)部分为重链可变域的序列，图16的(B)部分表示轻链可变域的序列，并在互补脱氧核糖核酸序列下面记载了预测到的氨基酸序列。

[0039] 图17示出表达载体pFabE-2D4-18及pFabE-2D4-18(1)的图谱(A)及从表达载体所表达的、预测到的蛋白质结构(B)。

[0040] 图18示出在大肠杆菌中重组Fab-2D4-18的小规模生产。图18的(A)部分为还原的整个细胞溶解物，图18的(B)部分为非-还原的整个细胞溶解物。

[0041] 图19示出在大肠杆菌中重组Fab-2D4-18的生产及纯化。图19的(A)部分为还原的蛋白质样品，图19的(B)部分为非-还原的蛋白质样品。

[0042] 图20示出在大肠杆菌中重组Fab-2D4-18(1)的生产及纯化。图20的(A)部分为十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳结果，图20的(B)部分为免疫印迹法结果。

[0043] 图21示出重组Fab-2D4-18的结合亲和度。

[0044] 图22示出肝细胞癌细胞生长的重组Fab-2D4-18的抑制效果。

[0045] 图23示出肝细胞癌细胞的重组Fab-2D4-18(1)的抑制效果。

[0046] 【发明详述】

[0047] 根据本发明的一实施方式，本发明提供抗体或其的抗原结合片段，上述抗体或其的抗原结合片段与跨膜4超家族成员5蛋白相结合，上述抗体或其的抗原结合片段包括：重链可变域，包含序列表中序列19的互补性决定区H1、序列表中序列20的互补性决定区H2及序列表中序列21的互补性决定区H3；以及轻链可变域，包含序列表中序列22的互补性决定区L1、序列表中序列23的互补性决定区L2及序列表中序列24的互补性决定区L3。

[0048] 本发明人为了开发可诊断、预防及治疗癌症的抗体而研究努力。其结果，制备对作

为肿瘤特异抗原的跨膜4超家族成员5蛋白以高的亲和力相结合的新型抗体及其的抗原结合片段，并确认了对癌细胞的生长、转移及浸润的上述抗体的优秀抑制活性。

[0049] 以下，在下述中进行详细的说明。

[0050] 【I.抗-跨膜4超家族成员5蛋白抗体及其的抗原结合片段】

[0051] 本发明的抗体针对跨膜4超家族成员5蛋白具有特异性结合能力。

[0052] 在本说明书中，提及跨膜4超家族成员5蛋白时所使用的术语“抗 体(antibody)”作为对跨膜4超家族成员5蛋白的特异抗体，对跨膜4超家族成员5蛋白的特定表位特异性地相结合，并且不仅包含完整的抗体形态，而且还包含抗体分子的抗原结合片段(抗体片段)。

[0053] 完整的抗体是具有两个整体长度的轻链及两个整体长度的重链的结构，各个轻链与重链以二硫键相连接。重链恒定区域具有伽玛(γ)、米尤(μ)、阿尔法(α)、德尔塔(δ)及艾普西隆(ε)类型，并且作为亚纲具有伽玛1(γ1)、伽玛2(γ2)、伽玛3(γ3)、伽玛4(γ4)、阿尔法1(α1)及阿尔法2(α2)。轻链恒定区域具有卡帕(κ)及兰姆达(λ)类型。

[0054] 抗体分子的抗原结合片段或抗体片段是指保留抗原结合功能的片段，包含Fab、F(ab')、F(ab')2及Fv等。在抗体片段中，Fab作为具有轻链及重链可变域和轻链恒定区域及重链的第一个恒定区域(C_{H1})的结构，具有一个抗原结合部位。Fab'在重链C_{H1}域的C-末端上具有包含一个以上的半胱氨酸残基的铰链区(hinge region)，在这点上与Fab存在差异。F(ab')2抗体是Fab'的铰链区的半胱氨酸残基形成二硫键而生成的。Fv以仅具有重链可变域及轻链可变域的最小的抗体片段生成Fv片段的重组技术公开在PCT国际公开特许申请WO 88/10649、WO 88/106630、WO 88/07085、WO 88/07086及WO 88/09344中。双链Fv(two-chain Fv)以非共价键与重链可变域和轻链可变域相连接，单链Fv(single-chain Fv)通常通过肽连接以共价键连接重链的可变域和单链的可变域，或在C-末端直接连接来可形成如双链Fv的二聚体之类的结构。这种抗体片段可利用蛋白质水解酶来取得(例如，若用木瓜蛋白酶以限制的方式切割整个抗体，则可取得Fab，若用胃蛋白酶切割，则可取得F(ab')2片段)，并且可通过基因重组技术制备而得。

[0055] 根据本发明的一实例，在本发明中，抗体呈Fab形态或完整的抗体形态。并且，重链恒定区域可选自伽玛(γ)、米尤(μ)、阿尔法(α)、德尔塔(δ)或艾普西隆(ε)中的一种同型中。在一个特定例中，恒定区域为伽玛1(免疫球蛋白G1)、伽玛2(免疫球蛋白G2) 及伽玛3(免疫球蛋白G3)或伽玛4(免疫球蛋白G4)，在另一特定例中，恒定区域为免疫球蛋白G2a同型。轻链恒定区域可以为卡帕或兰姆达形。在一个特定例中，上述轻链恒定区域为卡帕形。

[0056] 在本说明书中使用的术语“重链”是指所有、包含具有用于对抗原赋予特异性的充分的可变域序列的氨基酸序列的可变域V_H及包含3个恒定域(C_{H1}、C_{H2}及C_{H3})的整体长度重链及其的片段。并且，在本说明书中使用的术语“轻链”是指所有、包含具有用于对抗原赋予特异性的充分的可变域序列的氨基酸序列的可变域(V_L)及包含恒定域(C_L)的整体长度轻链及其的片段。

[0057] 本发明的抗体或其的抗原结合片段包含重链可变域，上述重链可变域包含序列表中序列19的互补性决定区H1、序列表中序列20的互补性决定区H2及序列表中序列21的互补性决定区H3。

[0058] 在本说明书中，术语“互补性决定区(CDR，complementarity determining region)”是指免疫球蛋白重链及轻链的高变区(hypervariable region)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))。在重链(互补性决定区H1、互补性决定区H2及互补性决定区H3)及轻链(互补性决定区L1、互补性决定区L2及互补性决定区L3)分别包含三个互补性决定区。互补性决定区在抗体与抗原或表位相结合时提供主要的接触残基。

[0059] 本发明的抗体或抗体片段的范围包含在互补性决定区具有保守氨基酸置换的变异体。并且,本发明的抗体或抗体片段可包含在可特异性地识别跨膜4超家族成员5蛋白的范围内添加的、记载于序列表中的氨基酸序列的变异体。例如,为了进一步改善抗体的结合亲和度和/或其他生物学特性,可对氨基酸序列施加追加变化。这种变形例如包含抗体的氨基酸序列残基的缺失、插入和/或取代。这种氨基酸变异基于氨基酸侧链取代基的相对类似性,例如疏水性、亲水性、电荷、大小等来实现。基于氨基酸侧链取代基的大小、形状及种类的分析,可 知精氨酸、赖氨酸和组氨酸均为带正电荷的残基,丙氨酸、甘氨酸和丝氨酸具有类似的大小,苯丙氨酸、色氨酸及酪氨酸具有类似的形状。因此,基于这种考虑事项,可知精氨酸、赖氨酸、组氨酸、丙氨酸、甘氨酸、丝氨酸、苯丙氨酸、色氨酸和酪氨酸为生物学上的功能等同物。

[0060] 在导入变异的过程中,可考虑氨基酸的疏水性指数(hydropathic index)。各个氨基酸根据疏水性和电荷来赋予疏水性指数,即:异亮氨酸(+4.5)、缬氨酸(+4.2)、亮氨酸(+3.8)、苯丙氨酸(+2.8)、半胱氨酸(+2.5)、蛋氨酸(+1.9)、丙氨酸(+1.8)、甘氨酸(-0.4)、苏氨酸(-0.7)、丝氨酸(-0.8)、色氨酸(-0.9)、酪氨酸(-1.3)、脯氨酸(-1.6)、组氨酸(-3.2)、谷氨酸(-3.5)、谷氨酰胺(-3.5)、天冬氨酸(-3.5)、天冬酰胺(-3.5)、赖氨酸(-3.9)及精氨酸(-4.5)。

[0061] 在赋予蛋白质的相互生物学功能(interactive biological function)的过程中,疏水性氨基酸指数非常重要。只有用具有类似的疏水性指数的氨基酸取代,才可以保留类似的生物学活性,这是公知的事实。在参照疏水性指数来导入变异的情况下,在一个特定例中,在表示±2以内、在再一特定例中,在表示±1以内、并在另一特定例中表示±0.5以内的疏水性指数差异的氨基酸之间进行取代。

[0062] 另一方面,众所周知,具有类似的亲水性值(hydrophilicity value)的氨基酸之间的取代导致具有等同的生物学活性的蛋白质。如美国专利第4554101号中所公开,以下亲水性值赋予各个氨基酸残基中,即:精氨酸(+3.0)、赖氨酸(+3.0)、天冬氨酸(+3.0±1)、谷氨酸(+3.0±1)、丝氨酸(+0.3)、天冬酰胺(+0.2)、谷氨酰胺(+0.2)、甘氨酸(0)、苏氨酸(-0.4)、脯氨酸(-0.5±1)、丙氨酸(-0.5)、组氨酸(-0.5)、半胱氨酸(-1.0)、蛋氨酸(-1.3)、缬氨酸(-1.5)、亮氨酸(-1.8)、异亮氨酸(-1.8)、酪氨酸(-2.3)、苯丙氨酸(-2.5)、色氨酸(-3.4)。

[0063] 在该领域中公知有未整体变更分子的活性的蛋白质中的氨基酸交换(H.Neurath, R.L.Hill,The Proteins,Academic Press,New York,1979)。最通常发生的交换为氨基酸残基Ala/Ser、Val/Ile、Asp/Glu、 Thr/Ser、Ala/Gly、Ala/Thr、Ser/Asn、Ala/Val、Ser/Gly、Thr/Phe、Ala/Pro、Lys/Arg、Asp/Asn、Leu/Ile、Leu/Val、Ala/Glu及Asp/Gly之间的交换。

[0064] 若考虑具有上述生物学等同活性的变异,则本发明的抗体或对其进行编码的核酸分子解释为还包括呈现与在序列表中记载的序列实质同一性(substantial identical)的

序列。上述实质同一性是指以使上述的本发明的序列和任意其他序列最大程度上对应的方式进行排比，并在利用该领域中通常所使用的算法来分析已排比的序列的情况下，优选地呈现至少61％的同源性，更优选地呈现至少70％的同源性，进而优选地呈现至少80％的同源性，最优选地呈现至少90％的同源性的序列。在该领域中公知有用于序列比较的排比方法。在Smith and Waterman,Adv.Appl.Math.2:482(1981)Needleman and Wunsch,J.Mol.Bio.48:443(1970);Pearson and Lipman,Methods in Mol.Biol.24:307-31(1988);Higgins and Sharp,Gene 73:237-44(1988);Higgins and Sharp,CABIOS 5:151-3(1989);Corpet et al.Nuc.Acids Res.16:10881-90(1988);Huang et al.Comp.Appl.BioSci.8:155-65(1992)及Pearson et al.Meth.Mol.Biol.24:307-31(1994)中公开有排比的多种方法及算法。NCBI Basic Local Alignment Search Tool(BLAST)(Altschul et al.J.Mol.Biol.215:403-10(1990))可在NBCI等连接，可在互联网上与序列分析程序相联动来利用，如blastp、blasm、blastx、tblastn及tblastx。BLSAT可在http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/连接。利用上述程序的序列同源性比较方法可在http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/blast_help.html中确认。

[0065] 根据本发明的一实例，本发明的抗体包含重链可变域，上述重链可变域包含序列表中序列25或序列表中序列29的氨基酸序列。

[0066] 根据本发明的一实例，本发明的抗体还包含含有以下轻链互补性决定区氨基酸序列的轻链可变域，上述轻链可变域包含含有序列表中序列22的互补性决定区L1、含有序列表中序列23的互补性决定区L2及含有序列表中序列24的互补性决定区L3。

[0067] 根据本发明的一实例，本发明的抗体包含轻链可变域，上述轻链可变域包含序列表中序列26或序列表中序列30的氨基酸序列。

[0068] 根据本发明的一实例，本发明的抗体包含：(i)序列表中序列25的重链可变域及序列表中序列26的轻链可变域；或者(ii)序列表中序列29的重链可变域及序列表中序列30的轻链可变域。

[0069] 本发明的抗体包含单克隆抗体、多克隆抗体、人类抗体、人源化抗体、嵌合抗体、单链Fvs(scFV)、单链抗体、Fab片段、F(ab')片段、二硫键Fvs(sdFV)及抗-独特型(抗-Id)抗体及上述抗体的表位-结合片段等，但并不局限于这些。

[0070] 根据本发明，本发明的抗体可制备成多种形态的抗体。例如，如以下实施例中所记载，本发明的抗体可制备成Fab抗体，并且可利用从Fab抗体得到的轻链及重链可变域来与来源于人的恒定区域进行重组，从而也可提供完整的(whole)形态的抗体。

[0071] 根据本发明的一实例，本发明的抗体为单克隆抗体。术语“单克隆抗体”是指从实际上相同的抗体组中获取的单分子组成的抗体分子，单克隆抗体对特定表位呈现单一结合特异性及亲和度。

[0072] 根据本发明的一实例，本发明的抗体为由杂交瘤细胞(保藏号:KCLRF-BP-00291)生产的抗体。

[0073] 根据本发明的一实例，本发明的抗体包含由保藏号为KCLRF-BP-00291的杂交瘤细胞生产的抗体的互补性决定区。上述杂交瘤细胞在2013年2月18日保藏于韩国细胞系研究基金会来赋予了保藏号KCLRF-BP-00291。

[0074] 根据本发明的一实例，本发明的抗体与功能性分子相结合。作为上述功能性分子

的例,可例举化学物质、放射性核素、细胞毒素、细胞因子或趋化因子,以下记载有与其相关的详细说明。

[0075] 根据本发明的一实例,本发明的抗体与作为公知的肿瘤特异抗原的跨膜4超家族成员5蛋白蛋白质相结合,来减少/抑制/去除其特性,从而可治疗癌症。

[0076] 【II.核酸分子及重组载体】

[0077] 根据本发明的再一实施方式,本发明提供对上述抗-跨膜4超家族成员5蛋白抗体或其的抗原结合片段的重链可变域进行编码的核酸分子。

[0078] 根据本发明的另一实施方式,本发明提供对上述抗-跨膜4超家族成员5蛋白抗体或其的抗原结合片段的轻链可变域进行编码的核酸分子。

[0079] 在本说明书中使用的术语“核酸分子”是指统筹包含脱氧核糖核酸(DNA)(基因组脱氧核糖核酸(gDNA)及互补脱氧核糖核酸(cDNA))及核糖核酸(RNA)分子,在核酸分子中,作为基本结构单位的核苷酸不仅包含自然的核苷酸,而且还包含糖或碱基部位变形的类似体(analogue)(Scheit,Nucleotide Analogs,John Wiley,New York(1980);Uhlman及Peyman,Chemical Reviews,90:543-584(1990))。对本发明的重链可变域及轻链可变域进行编码的核酸分子的序列可发生变形。上述变形包含核苷酸的追加、缺失或非保守置换或保守置换。

[0080] 根据本发明的一实例,对上述重链可变域进行编码的核酸分子包含序列表中序列27或序列表中序列31的核苷酸序列,对上述重链可变域进行编码的核酸分子包含序列表中序列28或序列表中序列32的核苷酸序列。

[0081] 本发明的核酸分子解释为还包含对上述的核苷酸序列呈现实质同一性的核苷酸序列。上述的实质同一性是指以使上述本发明的核苷酸序列和任意其他序列最大程度上对应的方式进行排比,并在利用该领域中通常所利用的算法来对已排比的序列进行分析的情况下,呈现至少80%的同源性,更优选为90%的同源性,最优选为95%的同源性的核苷酸序列。

[0082] 根据本发明的还一实施方式,本发明提供重组载体,上述重组载体包含(a)对本发明的重链可变域进行编码的核酸分子和/或(b)对本发明的轻链可变域进行编码的核酸分子。

[0083] 在本说明书中使用的术语“载体”作为在宿主细胞中用于表达靶基因的单元包含质粒载体、粘粒载体、噬菌体载体、腺病毒载体、逆转 录病毒载体及腺相关病毒载体之类的病毒载体等。

[0084] 根据本发明的一实例,在本发明的载体中对轻链可变域进行编码的核酸分子及对重链可变域进行编码的核酸分子与启动子操作性地相连接(operatively linked)。

[0085] 在本说明书中使用的术语“操作性地相连接”是指核酸表达调节序列(如启动子、信号序列或转录调节因子结合位置的阵列)和其他核酸序列之间的功能性结合,由此上述调节序列调节上述其他核酸序列的转录和/或翻译。

[0086] 根据本发明的一实例,本发明的重组载体包含:(i)对序列表中序列27的重链可变域进行编码的核酸分子及对序列表中序列28的轻链可变域进行编码的核酸分子;或者(ii)对序列表中序列31的重链可变域进行编码的核酸分子及对序列表中序列32的轻链可变域进行编码的核酸分子。

[0087] 本发明的重组载体系统可通过在该领域中公知的多种方法来构建,对此的具体方法在Sambrook et al.,Molecular Cloning,A Laboratory Manual,Cold Spring Harbor Laboratory Press(2001)中已公开,上述文献作为参照插入于本说明书中。

[0088] 本发明的载体典型地可由用于克隆的载体或用于表达的载体来构建。并且,本发明的载体可将原核细胞或真核细胞作为宿主来构建。例如,在本发明的载体为表达载体,并将原核细胞作为宿主的情况下,通常包含可进行转录的强力的启动子(例如,tac启动子、lac启动子、lacUV5启动子、lpp启动子、pL^{λ}启动子、pR^{λ}启动子、rac5启动子、amp启动子、recA启动子、SP6启动子、trp启动子及T7启动子等)、用于开始翻译的核糖体结合位点及转录/翻译终止序列。在作为宿主细胞利用大肠杆菌(例如HB101、BL21及DH5α等)的情况下,大肠杆菌的色氨酸生物合成途径的启动子及操纵子部位(Yanofsky,C.J.Bacteriol.158:1018-1024(1984))及噬菌体λ的左向启动子(pL^{λ}启动子,Herskowitz,I.and Hagen,D.Ann.Rev.Genet.14:399-445(1980))可作为调节部位来利用。在作为宿主细胞利用芽孢杆菌的 情况下,苏云金芽孢杆菌的毒素蛋白质基因的启动子(Appl.Environ.Microbiol.64:3932-3938(1998);Mol.Gen.Genet.250:734-741(1996))或在芽孢杆菌中可表达的任意启动子也可作为调节部位来利用。

[0089] 本发明的重组载体可操作在该领域中往往使用的质粒(例如pCL、pSC101、pGV1106、pACYC177、ColE1、pKT230、pME290、pBR322、pUC8/9、pUC6、pBD9、pHC79、pIJ61、pLAFR1、pHV14、pGEX系列、pET系列及pUC19等)、噬菌体(例如λgt4·λB、λ-Charon、λΔz1及M13等)或病毒(例如SV40等)来制备。

[0090] 根据本发明的一实例,本发明的重组载体为具有图17所示的裂解图的重组表达载体。

[0091] 另一方面,在本发明的载体为表达载体,并将真核细胞作为宿主的情况下,可利用来源于哺乳动物细胞的基因组的启动子(例如,金属硫蛋白启动子、β-肌动蛋白启动子、人血红蛋白启动子及人肌肉肌酸启动子)或来源于哺乳动物病毒的启动子(例如:腺病毒后期启动子、痘苗病毒7.5K启动子、SV40启动子、巨细胞病毒(CMV)启动子、单纯疱疹病毒(HSV,Herpes simplex virus)的tk启动子、小鼠乳房肿瘤病毒(MMTV)启动子、艾滋病病毒(HIV,human immunodeficiency virus)的LTR启动子、莫洛尼病毒的启动子艾普斯登-巴尔病毒(EBV,Epstein-Barr virus)的启动子及劳斯肉瘤病毒(RSV)的启动子),作为转录终止序列通常具有聚腺苷酸化序列。

[0092] 本发明的重组载体为了容易纯化由此表达的抗体,可与其他序列相融合。所融合的序列例如有谷胱甘肽-S-转移酶(美国法玛西亚(Pharmacia,USA)公司)、麦芽糖结合蛋白(美国纽英伦生物技术(NEB,USA)公司)、FLAG(IBI,USA)、6x His(六组氨酸(hexahistidine);Quiagen,USA)、Pre-S1及c-Myc之类的标记序列、如OmpA、PelB之类的前导序列等。并且,由于由本发明的载体表达的蛋白质为抗体,因而无需用于纯化的追加序列,已表达的抗体也可通过蛋白质A柱等容易进行纯化。

[0093] 另一方面,本发明的重组载体作为选择标记包含在该领域中通常利用的抗生素抗性基因,例如有对氨苄青霉素、庆大霉素、羧苄青霉素、氯霉素、链霉素、卡那霉素、遗传霉素、新霉素及四环素的抗性基因。

[0094] 表达本发明的抗体的载体可以为轻链和重链在一个载体中同时表达的载体系统

或使轻链和重链分别在单独的载体中表达的系统。在后者的情况下，两个载体通过共转化(co-transfomation)及靶向转化(targeted transformation)来导入宿主细胞。共转化是将对轻链及重链进行编码的各个载体脱氧核糖核酸一同导入宿主细胞之后，筛选均表达轻链和重链的细胞的方法。靶向转化是利用包含轻链(或重链)的载体筛选已转化的细胞，并利用包含重链(或轻链)的载体重新转化表达轻链的已筛选的细胞，来最终筛选均表达轻链及重链的细胞的方法。在以下实施例中，利用轻链(V_L及C_L)和重链(V_H及C_{H1})在一个载体中同时表达的载体系统来制备了抗体。

[0095] 【III.转化体】

[0096] 根据本发明的又一实施方式，本发明提供包含本发明的重组载体的宿主细胞。在一具体例中，上述宿主细胞为转化成重组载体的细胞。

[0097] 可稳定且连续克隆及表达本发明的载体的宿主细胞可利用本领域中公知的任意宿主细胞，例如，包含如大肠杆菌(Escherichia coli)、枯草芽孢杆菌及苏云金芽孢杆菌之类的芽孢杆菌属菌株、链霉菌(Streptomyces)、假单胞菌(Pseudomonas)(例如，恶臭假单胞菌(Pseudomonas putida))、奇异变形杆菌(Proteus mirabilis)或葡萄球菌(Staphylococcus)(例如，肉葡萄球菌(Staphylocus carnosus))之类的原核宿主细胞，但并不局限于这些。

[0098] 上述载体的适合的真核细胞宿主细胞可利用如曲霉属(Aspergillus species)之类的真菌、如毕赤酵母(Pichia pastoris)、酿酒酵母(Saccharomyces cerevisiae)、裂殖酵母(Schizosaccharomyces)及粗糙脉孢菌(Neurospora crassa)之类的酵母、除此之外的低等真核细胞、来源于昆虫的细胞之类的高等真核 生物的细胞以及来源于植物或哺乳动物的细胞。

[0099] 在本说明书中，向宿主细胞的“转化”和/或“转染”包括将核酸导入有机体、细胞、组织或器官的任意方法，如在该领域中所公知，可根据宿主细胞来选择适当的标准技术来执行。这种方法包括电穿孔(electroporation)、原生质体融合、磷酸钙($CaPO_4$)沉淀、氯化钙($CaCl_2$)沉淀、利用碳化硅纤维的搅拌、农杆菌介导的转化、聚乙二醇(PEG，polyethylene glycol)、葡聚糖硫酸酯(dextran sulfate)、脂质体及干燥/抑制介导的转化方法等，但并不局限于这些。

[0100] 【IV.抗-跨膜4超家族成员5蛋白抗体或其的抗原结合片段的制备方法】

[0101] 本发明的又一实施方式，提供抗-跨膜4超家族成员5蛋白抗体或其的抗原结合片段的制备方法，上述抗-跨膜4超家族成员5蛋白抗体或其的抗原结合片段的制备方法包括：步骤(a)，培养本发明的宿主细胞；以及步骤(b)，在上述宿主细胞中表达抗-跨膜4超家族成员5蛋白抗体或其的抗原结合片段。

[0102] 在上述抗体制备中，宿主细胞的培养可根据在该领域中公知的适当的培养基和培养条件来实现。有关这种培养过程，只要是本发明所属技术领域的普通技术人员，就可以根据所选择的菌株容易调节来使用。这种多种培养方法公开在多种文献(例如，James M.Lee, Biochemical Engineering,Prentice-Hall International Editions,138-176)中。细胞培养根据细胞的生长方式区分为悬浮培养和附着培养，并根据培养方法区分为分批式、补料分批式及连续培养式。使用于培养的培养基需要适当地满足特定菌株的要求条件。

[0103] 就动物细胞培养而言，上述培养基包含多种碳源、氮源及微量元素成分。可用作碳

源的例包含如葡萄糖、蔗糖、乳糖、果糖、麦芽糖、淀粉及纤维素之类的碳水化合物、如大豆油、葵花油、蓖麻油及椰子油之类的脂肪、棕榈酸、硬脂酸及亚油酸之类的脂肪酸、如甘油及乙醇之类的醇及如醋酸之类的有机酸。这些碳源可单独或组合使用。可用作氮源的例包含如胨、酵母提取物、肉汁、麦芽提取物、玉米浸渍 液(CSL)及大豆小麦之类的有机氮源及尿素、硫酸铵、氯化铵、磷酸铵、碳酸铵及硝酸铵之类的无机氮源。这些氮源可单独或组合使用。在上述培养基中,作为磷源可包含磷酸二氢钾、磷酸氢二钾及相应的含钠盐。并且,可包含硫酸镁或硫酸铁之类的金属盐。除此之外,可包含氨基酸、维生素及适当的前体等。

[0104] 在培养中,能够以适当的方式在培养物中添加如氢氧化铵、氢氧化钾、氨、磷酸及硫酸之类的化合物来调节培养物的pH。并且,在培养中,可使用脂肪酸聚乙二醇酯(fatty acid polyglycol ester)之类的消泡剂来抑制气泡的生成。并且,为了维持培养物的需氧状态,向培养物内注入如氧或含有氧的气体(如空气)。培养物的温度通常为20℃至45℃,优选为25℃至40℃。

[0105] 培养宿主细胞来获取的抗体能够以未纯化的状态使用,追加地可利用通常的方法例如透析、盐沉淀及层析等来以高纯度纯化而使用。其中,最普遍使用利用层析的方法,柱的种类和顺序可根据抗体的特性、培养方法等选自离子交换层析、大小排阻层析、亲和性层析等中。

[0106] 【V.癌症的预防或治疗】

[0107] 根据本发明的又一实施方式,本发明提供癌症的预防或治疗用药剂学组合物,上述癌症的预防或治疗用药剂学组合物包含:(a)上述抗-跨膜4超家族成员5蛋白抗体或其的抗原结合片段的药剂学有效剂量;以及(b)药剂学上接受的载体。

[0108] 根据本发明的又一实施方式,本发明提供癌症的预防或治疗方法,上述癌症的预防或治疗方法包括以药剂学有效剂量将上述药剂学组合物给药到个体的步骤。

[0109] 上述抗体以高的亲和度与跨膜4超家族成员5蛋白相结合,从而可抑制表达跨膜4超家族成员5蛋白的癌症的生长、浸润及转移,因而可单独使用抗体或与通常的药剂学上接受的载体一同使用于癌症的预防及治疗。

[0110] 在本说明书中使用的术语“预防”是指通过将本发明的抗体进行给药来抑制癌症或延缓癌症发展的所有行为,“治疗”是指癌症发展的抑 制、癌症的减轻或癌症的去除。

[0111] 根据本发明的一实例,上述癌症为表达跨膜4超家族成员5蛋白的癌症,作为这种癌症的例,可例举肝癌、结肠癌、胰腺癌、肺癌、胃癌、直肠癌、软组织肉瘤(soft-tissue sarcoma)、结肠癌、十二指肠乳头部上皮癌(carcinoma of the papilla vateri)、非内分泌肺肿瘤(nonendocrine lung tumor)及支气管类癌(bronchial carcinoid tumor)等。

[0112] 包含于本发明的药剂学组合物的药剂学上接受的载体通常用于制剂,可包含乳糖、葡萄糖、蔗糖、山梨糖醇、甘露醇、淀粉、阿拉伯胶、磷酸钙、藻酸盐、明胶、硅酸钙、微晶纤维素、聚乙烯吡咯烷酮(polyvinylpyrrolidone)、纤维素、水、糖浆、甲基纤维素、羟基苯甲酸甲酯(methyl hydroxybenzoate)、羟基苯甲酸丙酯(propyl hydroxybenzoate)、滑石、硬脂酸镁以及矿物油等,但并不限定于此。本发明的药剂学组合物除了上述成分之外,还可包含润滑剂、润湿剂、甜味剂、香味剂、乳化剂、悬浮剂、防腐剂等。适当的药剂学上接受的载体及制剂详细记载于Remington's Pharmaceutical Sciences(19th ed.,1995)中。

[0113] 本发明的药剂学组合物能够以口服或非口服方式进行给药,在以非口服方式进行

给药的情况下，能够以静脉内注射、皮下注射、肌肉注射、腹腔注射、内皮给药、局部给药、鼻内给药、肺内给药及直肠内给药等方式进行给药。当以口服方式给药时，由于蛋白质或肽被消化，因而口服用组合物需要涂敷活性药剂或剂型化来保护在胃中的分解。并且，药剂学组合物可借助活性物质向靶细胞移动的任意装置来给药。

[0114] 本发明的药剂学组合物的适当的给药量可根据制剂化方法、给药方式、患者的年龄、体重、性别、病态、饮食、给药时间、给药途径、排泄速度及反应灵敏性等因素来多样，一般熟练的医生可容易决定对希望的治疗或预防有效的给药量并开处方。根据本发明的一实例，本发明的药剂学组合物的给药量为每日0.0001～100mg/kg。在本说明书 中，术语“药剂学有效剂量”是指对预防或治疗癌症充分的量。

[0115] 本发明的药剂学组合物可根据本发明所属技术领域的普通技术人员能够容易实施的方法，利用药剂学上接受的载体和/或赋形剂来制剂化，从而可制备成单位容量形态或以放入大容量容器内的方式制备。此时，剂型可以为油或水性介质中的溶液、悬浮液或乳化液形态，或者也可以为浸膏剂、散剂、栓剂、粉剂、颗粒剂、片剂或胶囊剂，还可包含分散剂或稳定剂。

[0116] 本发明的组合物能够以个别治疗剂的方式给药或以与其他治疗剂并用的方式给药，并可与以往的治疗剂依次或同时给药。

[0117] 本发明的抗体能够以抗体-功能性分子结合体形态向生物体内投入来利用于癌症的治疗。上述功能性分子包含化学治疗剂、放射性核素、免疫治疗剂、细胞因子、趋化因子、细胞毒素、生物作用剂及酶抑制物质等。用于与本发明的抗体或其的片段耦合的、优选的功能性分子为化学物质、放射性核素、细胞因子或趋化因子。上述化学物质为抗癌药，例如为阿西维辛、阿柔比星、阿考达唑、山油柑碱、阿多来新、阿拉诺新、阿地白介素、别嘌呤醇钠、六甲蜜胺、氨鲁米特、氨萘非特、安普利近、安吖啶、雄激素、蛇形菌素、阿非迪霉素甘氨酸、亮氨酸溶肉瘤素、天冬酰胺酶、5-阿扎胞苷(5-azacitidine)、硫唑嘌呤、卡介苗(BCG，Bacillus Calmette-Guerin)、贝氏抗叶酸物、β-2-脱氧硫代鸟苷、盐酸比生群、硫酸博莱霉素、白消安、丁硫氨酸亚砜、BWA773U82、BW 502U83/HCl、BW 7U85甲醇化物、神经酰胺、卡贝替姆、卡铂、卡莫司汀、苯丁酸氮芥、氯喹喔啉磺酰胺、氯脲霉素、色霉素A3、顺铂、克拉屈滨、皮质甾类、短小棒状杆菌、CPT-11、克拉那托、环胞苷、环磷酰胺、阿糖胞苷、滇茴丙烯酸钠、Dabis马来酸、达卡巴嗪、放线菌素、盐酸多柔比星、脱氧鸟苷、右雷佐生、去水卫矛醇、地吖醌、二溴卫矛醇、膜海鞘素B、二乙基二硫代氨基甲酸酯(diethyl dithiocarbamate)、肌苷二醛、二氢-5-阿扎胞苷、多柔比星、棘霉素、依达曲沙、依地福新、依氟鸟氨酸、钠钾镁钙葡萄糖注射液、依沙芦星、表柔比星、伊索比星、雌莫司汀磷酸、 雌性激素、依他硝唑、阿米福汀、依托泊苷、法曲唑、法扎拉滨、芬维A胺、非格司亭、非那司提、黄酮醋酸、氟尿苷、磷酸氟达拉滨、5”-氟尿嘧啶、Fluosol™、氟他胺、硝酸镓、吉西他滨、醋酸戈舍瑞林、西磺非、六亚甲基双乙酰胺(hexamethylene bisacetamide)、高三尖杉酯碱、硫酸肼、4-羟雄甾烯二酮、羟基脲、盐酸伊达比星、异环磷酰胺、4-甘薯黑疤霉二醇、异丙铂、异维甲酸、甲酰四氢叶酸钙盐、醋酸亮丙瑞林、左旋咪唑、柔红霉素脂质体、捕获脂质体的阿霉素、环己亚硝脲、氯尼达明、美登素、氮芥盐酸盐、美法仑、美诺立尔、美巴龙、6-巯基嘌呤、美司钠、卡介苗甲醇提取物、甲氨蝶呤、N-甲基甲酰胺、米非司酮、米托胍腙、丝裂霉素-C、米托坦、盐酸米托蒽醌、单核细胞/巨噬细胞集落刺激因子、大麻隆、萘福昔定、新制癌菌素、醋酸奥曲肽、奥马铂、奥沙

利铂、紫杉醇、pala、喷司他丁、哌嗪二酮、哌泊溴烷、吡柔比星、吡曲克辛、盐酸吡咯蒽醌、PIXY-321、光神霉素、卟吩姆钠、泼尼氮芥、丙卡巴肼、孕激素、吡唑呋喃菌素、雷佐生、沙莫司亭、司莫司汀、螺锗、螺莫司汀、链黑菌素、链佐星、磺氯苯脲、苏拉明钠、他莫昔芬、替加氟、替尼泊苷、二酰胺、替罗昔隆、硫鸟嘌呤、赛替派、胸苷注射液、噻唑呋林、托泊替康、托瑞米芬、维甲酸、盐酸三氟拉嗪、三氟胸苷、三甲曲沙、肿瘤坏死因子(TNF,tumor necrosis factor)、乌拉莫司丁、硫酸长春碱、硫酸长春新碱、长春酰胺、长春瑞宾、长春利定、Yoshi 864、佐柔比星、胞嘧啶阿拉伯糖苷、依托泊苷、米尔法兰、泰索帝、紫杉酚及它们的混合物，但并不局限于这些。

[0118] 【VI.跨膜4超家族成员5蛋白蛋白质检测方法及癌症的诊断】

[0119] 根据本发明的又一实施方式，本发明提供使用本发明的抗体或其的抗原结合片段来确认(检测)试样内是否存在跨膜4超家族成员5蛋白蛋白质的方法。

[0120] 根据本发明的又一实施方式，本发明提供包含本发明的抗体或其的抗原结合片段的跨膜4超家族成员5蛋白蛋白质检测用试剂盒。

[0121] 本发明的抗体可适应于生物学试样来检测跨膜4超家族成员5蛋 白蛋白质。在本说明书中使用的术语“生物学试样”可例举组织、细胞、全血、血清、血浆、唾液、尿、淋巴液、脊髓液、组织剖检试样(脑、皮肤、淋巴结、脊髓等)、细胞培养上清液、破裂的真核细胞及细菌表达系统等，但并不局限于这些。

[0122] 根据本发明的一实例，作为上述生物学试样，细胞为癌细胞。

[0123] 根据本发明的一实例，上述试剂盒为癌症诊断用试剂盒。本发明的试剂盒能够以操作生物学试样或以未操作的状态与本发明的抗体发生反应，从而可作为用于确认是否发生癌症的用途来使用。

[0124] 在生物学试样中，跨膜4超家族成员5蛋白蛋白质的检测可利用比色法(colormetric method)、电化学法(electrochemical method)、荧光法(fluorimetric method)、发光法(luminometry)、粒子计数法(particle counting method)、肉眼测定法(visual assessment)或闪烁计数法(scintillation counting method)来检测抗原-抗体复合体的形成而执行。本说明书中的“检测”用于检测抗原-抗体复合体，可使用多种标记物来实施。作为标记物的具体例，包含酶、荧光物、配体、发光物、微小粒子或放射性同位素。

[0125] 作为检测标记物使用的酶包含乙酰胆碱酯酶(acetylcholinesterase)、碱性磷酸酶(alkaline phosphatase)、β-D-半乳糖苷酶、辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase)及β-内酰胺酶(β-lactamase)等，作为荧光物包含荧光素、$Eu3^{+}$、$Eu3^{+}$螯合物或穴合物等，作为配体包含生物素衍生物等，作为发光物包含吖啶酯(acridinium ester)及异氨基苯二酰肼(isoluminol)衍生物等，作为微小粒子包含胶体金及着色的乳胶等，作为放射性同位素包含^{57}Co、^{3}H、^{125}I及^{125}I-邦东(Bonton)亨特(Hunter)试剂等。

[0126] 根据本发明的一实例，可利用酶联免疫吸附测定法(ELISA，enzymelinkedimmunosorbentassay)来检测抗原-抗体复合体。酶联免疫吸附测定法包括直接酶联免疫吸附测定法、间接酶联免疫吸附测定法、直接夹心酶联免疫吸附测定法及间接夹心酶联免疫吸附测定法等多种酶联免疫吸附测定法，上述直接酶联免疫吸附测定法利用用于识 别附着于固体载体的抗原的已标记的抗体，上述间接酶联免疫吸附测定法利用在附着于固体载体的抗原的抗体的复合体中识别捕获抗体的已标记的第二抗体，上述直接夹

心酶联免疫吸附测定法利用在附着于固体载体的抗体和抗原的复合体中识别抗原的已标记的另一抗体，上述间接夹心酶联免疫吸附测定法利用使附着于固体载体的抗体和在抗原的复合体中识别抗原的另一抗体发生反应之后，识别上述抗体的已标记的第二抗体。本发明的抗体可具有检测标记，在不具有检测标记的情况下，可捕获本发明的抗体，并处理具有检测标记的另一抗体来确认。

[0127] 归纳本发明的特征及优点如下：

[0128] (i)本发明提供与跨膜4超家族成员5蛋白相结合的抗体或其的抗原结合片段及其的用途。

[0129] (ii)本发明的抗体以高的亲和力与肿瘤特异抗原跨膜4超家族成员5蛋白相结合，并显著抑制表达跨膜4超家族成员5蛋白的癌细胞的生长、转移及浸润，因而可利用于表达跨膜4超家族成员5蛋白的多种癌症的诊断、预防或治疗。

[0130] 以下，通过实施例更详细地说明本发明。这些实施例只用于更详细地说明本发明，根据本发明的要旨，本发明的范围并不限制于这些实施例，这对于本发明所属技术领域的普通技术人员来说是显而易见的。

【实施例】

[0131] 【实验材料及实验方法】

[0132] 【小鼠抗-跨膜4超家族成员5蛋白单克隆抗体2D4-18的生产】

[0133] 以隔10日将h跨膜4超家族成员5蛋白肽(^{138}NRTLWDRCEAPPRV^{151})四次给药到雌性BALB/c小鼠的腹腔内。从已免疫化的脾脏取得脾细胞(Splenocytes)之后，根据标准杂交瘤技术(Yokoyama WM,et al.Curr Protoc Immunol Chapter 2, Unit 2.5(2006))，在存在有40％(w/v)的聚乙二醇(polyethylene glycol)的情况下，与HAT-sensitive SP2/0小鼠骨髓瘤细胞相融合。为了确认与h跨膜4超家族成员5蛋白肽的结合，利用酶联免疫吸附测定法来对杂交瘤细胞的培养上清液进行测验，并筛选了阳性杂交瘤细胞。亚克隆酶联免疫吸附测定法-阳性杂交瘤细胞组之后，为了产生腹水注射到BALB/c小鼠腹腔。使用蛋白质A柱层析(安发玛西亚生物技术公司(Amersham Pharmacia Biotech))来从腹水液中纯化了抗-跨膜4超家族成员5蛋白单克隆抗体(2D4-18)。

[0134] 【酶联免疫吸附测定法】

[0135] 在各个给药之前及最终给药10天之后，牺牲小鼠来得到了血清。为了确认整个免疫球蛋白G效价及量，用5μg/mlh跨膜4超家族成员5蛋白肽涂敷96-孔免疫板(Nalgen Nunc International)，并用含有1％的牛血清白蛋白(BSA)的0.05％的抗体稀释液(PBST)来封闭了两个小时。去除封闭溶液之后添加100μl的培养上清液，并在常温条件下培养两个小时之后，利用抗体稀释液来洗涤，之后与辣根过氧化物酶(HRP,horseradish peroxidase)-结合的抗-免疫球蛋白G抗体之类的检测抗体一同培养两个小时。用四甲基联苯胺(TMB，tetramethyl benzidine)底物溶液开发比色分析法，并在450nm下，使用Spectra Max 250微板阅读器来测定了吸光度。

[0136] 【表面等离子体共振(SPR,Surface plasmon resonance)的分析】

[0137] 在25℃温度下，使用Biacore T100(Biacore)来测定了与人类及小鼠跨膜4超家族成员5蛋白相结合的抗-h跨膜4超家族成员5蛋白单克隆抗体2D4-18的亲和度。在涂敷有链

霉亲和素的CM4传感器芯片的各个流经的细胞表面上捕获(capture)了生物素化肽。使用生物素作为阴性对照组。以30ml/分钟的速度注入了2～32nM浓度的抗-跨膜4超家族成员5蛋白单克隆抗体2D4-18。使用Biacore Bia评价软件(version 3.0)来评价了数据。

[0138] 【组织微阵列及免疫组织化学】

[0139] 使用以下阵列,即:肝癌组织(A204及A204(II))、结肠癌 组织(A203(VII))及结肠癌组织-肝转移(A203III)。肝癌组织阵列由与各个载玻片上的样品相应的4个或8个非-肿瘤(non-neoplastic)及多种组织型(histotypes)的相同的肝细胞癌组织核心形成。结肠癌组织阵列(A203(VII))包含了与各个载玻片上的样品相应的8个非-肿瘤及多种组织型(histotypes)的相同的结肠癌组织核心形成的45个病例。具有相应的结肠正常组织的结肠癌组织-肝转移(18病例)由与各个载玻片上的样品相应的18个非-肿瘤及来源于各个癌症病例的4个点形成。在二甲苯中将载玻片进行脱石蜡化,并且再水化之后在甲醇中,将新鲜的0.3%的过氧化氢处理了15分钟。用抗-跨膜4超家族成员5蛋白单克隆抗体将组织阵列进行了染色。

[0140] 【细胞培养】

[0141] 在韩国细胞系研究基金会取得了如Huh-7、Hep3B及SNU-761之类的人类肝细胞癌细胞株及如HT-29及LoVo之类的人类结肠癌细胞株及小鼠结肠癌细胞株CT-26。从ATCC(美国菌种保藏中心)取得了小鼠肝癌细胞株BNL-肝细胞癌。在含有10%的胎牛血清(FBS;Hyclone)、2mM的谷氨酰胺、100U/ml的青霉素及100μg/ml的链霉素的DMEM中管理了Hep3B、BNL-肝细胞癌及CT-26细胞。在含有10%的胎牛血清、25mM的4-羟乙基哌嗪乙磺酸(HEPES)、100U/ml的青霉素及100μg/ml的链霉素的RPMI 1640培养基中管理了其他细胞株。在95%的空气及5%的CO_2条件下,以37℃温度培养了所有细胞。

[0142] 【跨膜4超家族成员5蛋白信使核糖核酸表达的检测】

[0143] 为了分析跨膜4超家族成员5蛋白的表达,实施了逆转录聚合酶链式反应及流式细胞(FACS)分析。使用RNeasy Mini试剂盒(Qiagen)来提取整个核糖核酸,并合成了互补脱氧核糖核酸。使用以下引物对实施了25个循环的标准聚合酶链式反应(PCR,Polymerase Chain Reaction):小鼠GAPDH(序列表中序列1及序列表中序列2,501bp);小鼠跨膜4超家族成员5蛋白(序列表中序列3及序列表中序列4,174bp);人类β-肌动蛋白(序列表中序列5及序列表中序列6,500bp); 人类跨膜4超家族成员5蛋白(序列表中序列7及序列表中序列8,408bp)。

[0144] 【噻唑蓝(MTT)的分析】

[0145] 通过利用3-(4,5-二甲基噻唑-2-基)-2,5-二苯基四氮唑溴盐(3-(4,5-dimethylthiazole-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide)(噻唑蓝,Sigma-Aldrich(西格玛奥德里奇))溶液的噻唑蓝分析确认了将抗-跨膜4超家族成员5蛋白单克隆抗体2D4-18(10μg/ml)处理5天的癌细胞的生长。将噻唑蓝溶液添加到各孔中,并在37℃温度下将板培养了4个小时。在去除培养基之后,在二甲基亚砜(DMSO,Dimethyl sulfoxide)中溶解了甲臜结晶体。在595nm的分光光度计(参照波长650nm)中检测了发色现象。

[0146] 【细胞移动及浸润分析】

[0147] 将具有8μm的孔隙的Transwell小室(Corning Costar)使用于分析中。为了移动分析,用10μg/ml的明胶涂敷了Trans-well小室膜的下部面。为了浸润分析,用1.2mg/ml的基

质胶(BD Biosciences)及10μg/ml的明胶分别涂敷了小室膜的上部面和下部面。在正常免疫球蛋白G或包含抗-跨膜4超家族成员5蛋白单克隆抗体2D4-18的无血清培养基中悬浮细胞(Huh-7或CT-26)(5×10^4细胞/ml),并分注于Trans-well的最上面。将含有5%的胎牛血清的RPMI培养基放在下面小室。培养12小时之后,用4%的多聚甲醛将过滤器的下部表面上的浸润细胞(invaded cells)固定30分钟,并用0.005%的结晶紫染色30分钟之后,利用显微镜来进行计数。

[0148] 【伤口治疗(Wound-healing)分析】

[0149] 为了伤口治疗分析,将1×10^6细胞(Huh-7或CT-26)分注于6-孔板,并在包含血清的培养基中培养一晚之后,利用移液管的尖在单层诱发伤口。将正常免疫球蛋白G或抗-h跨膜4超家族成员5蛋白单克隆抗体2D4-18(10μg/ml)处理指定时间。用4%的多聚甲醛将细胞固定30分钟,并用吉母萨染色30分钟。

[0150] 【动物】

[0151] 在无特异病原体环境(specific-pathogen-free condition)下,维持并管理了4周龄的雄性BALB/cAnNCri-nu/nu小鼠及BALB/c小鼠(Central Lab,Animal,Inc)。根据NVRQS(National Veterinary Research&Quarantine Service)的实验室动物的饲养及利用来实施了动物研究的所有程序。用舒泰50+隆朋麻醉小鼠之后使其牺牲。

[0152] 【肝细胞癌小鼠模型】

[0153] 向30只BALB/cAnNCri-nu/nu小鼠及30只BALB/c小鼠的背部右侧面(dorsal right flank)分别皮下注射了包含50%的基质胶(BD biosciences)的5×10^6Huh-7细胞及包含50%的基质胶的5×10^6BNL-肝细胞癌细胞。当肿瘤直径达到5mm时,将小鼠任意分类为磷酸盐缓冲液、免疫球蛋白G对照组及抗-跨膜4超家族成员5蛋白单克隆抗体2D4-18的三个处理组(8只小鼠/组)。每周两次将抗体(2D4-18,25mg/kg)向腹腔内注射。注入癌细胞之后6周,以隔4天或隔7天的间隔测定肿瘤直径,并根据宽度^2×长度/2的公式计算了肿瘤体积。当肿留大小达到±2000mm^3时,牺牲BALB/cAnNCri-nu/nu小鼠,并测定了肿瘤重量。移植肿瘤细胞10周之后,牺牲BALB/c小鼠,并测定了肿瘤重量。

[0154] 【生物体内分布图像(Biodistribution imaging in vivo)】

[0155] 使DyLight 750-荧光(Molecular Probes)与抗-跨膜4超家族成员5蛋白单克隆抗体2D4-18及正常小鼠免疫球蛋白G相结合,并按照制备商的指示来进行纯化。将50μg的DyLight 750-荧光标记的抗-跨膜4超家族成员5蛋白单克隆抗体2D4-18或DyLight 750-荧光标记的正常小鼠免疫球蛋白G给药到BALB/c小鼠的腹腔内。在指示的时间间隔内,利用实时IVIS图像系统200(Xerogen Corp.)来以荧光方式对抗-跨膜4超家族成员5蛋白单克隆抗体2D4-18的分布图进行数量化。使用Living Image 2.50软件(Xenogen Corp.)来分析了数据。为了在肝细胞癌肿瘤组织中确认DyLight 750-荧光标记的2D4-18单克隆抗体的分布,在腹腔内给药72小时之后去除了组织。冻结组织,并切割成厚度为4μm的切片。用SYTOX绿色染料(Invitrogen)染 色切片之后,利用LSM 510META NLO扫描了样品。

[0156] 【结肠癌小鼠模型】

[0157] 向30只BALB/cAnNCri-nu/nu小鼠及30只BALB/c小鼠的背部右侧面分别皮下注射了含有50%的基质胶(BD biosciences)的5×10^6HT-29细胞及含有50%的基质胶的5×10^6CT-26细胞。当肿瘤直径达到5mm时,将小鼠任意分类为磷酸盐缓冲液、免疫球蛋白G对照

组及抗-跨膜4超家族成员5蛋白单克隆抗体2D4-18处理组的三个处理组(8只小鼠/组)。每周两次将抗体(2D4-18,25mg/kg)向腹腔内注射。在注入癌细胞之后,30天期间以隔2天或隔5天的间隔测定肿瘤直径,并根据宽度^2×长度/2的公式计算了肿瘤体积。当肿瘤大小达到±2000mm^{3}时,牺牲BALB/cAnNCri-nu/nu小鼠,并测定了肿瘤重量。移植肿瘤细胞18天之后,牺牲BALB/c小鼠,并测定了肿瘤重量。

[0158] 【肺转移】

[0159] 为了转移性癌症动物实验,将2×10^{5}小鼠CT-26结肠癌细胞(磷酸盐缓冲液对照组n=8,结肠癌细胞n=36)静脉注射到BALB/c小鼠的尾部血管。第5天将小鼠分类为磷酸盐缓冲液、免疫球蛋白G对照组及抗-跨膜4超家族成员5蛋白单克隆抗体2D4-18处理组的三组(每组n=12)。每周两次将上述抗体(25mg/kg)给药到尾部血管。第20天牺牲小鼠,并测定了肺的重量。

[0160] 【组织学(Histology)】

[0161] 为了组织病理学检查,去除肿瘤及器官,并在4%的福尔马林溶液中固定一宿并包埋于石蜡之后,切割成厚度为5μm的切片。用苏木精-伊红(H&E,hematoxylin and eosin)染色了脱石蜡化切片。

[0162] 【免疫组织化学】

[0163] 为了确认跨膜4超家族成员5蛋白的表达,用单克隆抗体来染色了试样。将试样切割成厚度为5μm的切片。用二甲苯进行脱石蜡,并用乙醇再水化之后,在磷酸盐缓冲液中用0.3%的过氧化氢及10%的甲醇封闭内在性过氧物酶活性之后,在含有0.2%的Triton X-100(抗 体稀释液)和3%的牛血清白蛋白(BSA,bovine serum albumin)的磷酸盐缓冲液中预培养两个小时。在4℃温度下,在含有单克隆抗体(1:400)的抗体稀释液中将切片培养一晚,之后与生物素化二次抗体一同培养。使试样与链霉亲和素-生物素过氧物酶发生反应,并且与3',3'-diaminobenzinidine(0.5mg/ml)及过氧化氢发生反应之后,用H&E进行对照染色。洗涤之后,固定切片并脱水之后用盖玻片覆盖。使用尼康Eclipse E-200显微镜(日本东京尼康(Nikon,Tpkyo,Japan))来确认了所有图像。

[0164] 【抗-跨膜4超家族成员5蛋白单克隆抗体2D4-18的重链及轻链可变域的克隆】

[0165] 培养生产抗-跨膜4超家族成员5蛋白单克隆抗体2D4-18的杂交瘤细胞(2D4-18),并使用小鼠单克隆抗体分型试剂盒(Dipstick format,Bibco BRL or Roche,Mannheim,Germany)来进行了分型(isotyping)。使用RNeasy Mini试剂盒(Qiagen)来从杂交瘤细胞中提取整个核糖核酸,并合成了互补脱氧核糖核酸。为了克隆抗-跨膜4超家族成员5蛋白单克隆抗体2D4-18的重链及轻链可变域(V_H及V_L)的序列,使用Vent聚合酶(NEB)及以下引物来扩增了上述互补脱氧核糖核酸。作为重链引物使用了免疫球蛋白G2A(序列表中序列9)及5'MH2(序列表中序列10)。作为K链引物使用了3'Kc(序列表中序列11)及5'Mk(序列表中序列12)。实施了25循环的标准聚合酶链式反应。用pGEM-T Easy载体(Promega)直接对聚合酶链式反应生产物起到连接作用。利用脱氧核糖核酸碱基序列分析法来分析了克隆的小鼠Ig插入物。

[0166] 【抗-跨膜4超家族成员5蛋白单克隆抗体2D4-18的Fab表达】

[0167] 扩增对抗-跨膜4超家族成员5蛋白单克隆抗体2D4-18的重链及轻链可变域(V_H及V_L)进行编码的序列,并使用Sfi I及BstX I来分别亚克隆于细菌表达载体FabE(Jeon et

al.Mol.Immunol.44:827-836(2007);Kwon et al.Oncol.Rep.18:513-517(2007))。使用的引物序列如下:V_H(391bp,序列表中序列13及序列表中序列14 序列;368bp,序列表中序列15及序列表中序列14,V_L(399bp,序列表中序列16及序列表中序列17;381bp,序列表中序列18及序列表中序列17)。通过限制分析(restriction analysis)和脱氧核糖核酸碱基序列分析确认了重组表达质粒(pFabE-2D4-18及pFabE-2D4-18(1))。在小规模用pFabE-2D4-18及pFabE-2D4-18(1)质粒转化TG1大肠杆菌细胞,并利用使用抗-PreS1抗体及抗-His抗体的免疫印迹法来将重组蛋白质的表达最优化及确认。为了重组Fab(Fab-2D4-18及Fab-2D4-18(1))的大规模生产及纯化,在500ml的培养液中处理0.5mM的异丙基硫代半乳糖苷(IPTG),并在18℃温度下,培养了16小时。进行离心分离来聚集培养上清液,并利用V_H-C_H融合蛋白质的His标记来适当地折叠之后,为了分离组装的Fab蛋白质,适用于Ni-NTA亲和性柱(Clontech)。用10mM的咪唑(pH8.0)稀释结合有重组Fab的柱,并使用离心超滤管(centricon)(3500xg,4℃)来透析及浓缩了蛋白质溶液。

[0168] 【抗-跨膜4超家族成员5蛋白单克隆抗体2D4-18对重组Fab的肝细胞癌细胞的功能性效果】

[0169] 为了测定细胞的生长,根据上述说明的方法实施了噻唑蓝分析。通过噻唑蓝分析确认了处理五天的单克隆抗体2D4-18的重组Fab(10μg/ml)的癌细胞(Hep3B及Huh-7)的生长。

[0170] 【抗-跨膜4超家族成员5蛋白单克隆抗体重组Fab的结合亲和度】

[0171] 在25℃温度下,使用Biacore T100(Biacore)来测定了抗-跨膜4超家族成员5蛋白单克隆抗体2D4-18的重组Fab对h跨膜4超家族成员5蛋白的亲和度。在由链霉亲和素涂敷的CM4传感器芯片的各个流经的细胞表面上捕获了生物素化肽。使用生物素作为阴性对照组。以30ml/分钟的流动速度注入了100～1600nM浓度范围的单克隆抗体的重组Fab。使用Biacore Bia评价软件(version 3.0)来分析了数据。

[0172] 【实验结果】

[0173] 【抗-跨膜4超家族成员5蛋白单克隆抗体2D4-18的生产】

[0174] 在进行四次免疫化之后,利用酶联免疫吸附测定法来取得了小鼠血清中的对h跨膜4超家族成员5蛋白肽的抗体的效价曲线(图1a)。最后接种三天之后,从具有最高的抗体效价(h跨膜4超家族成员5蛋白-4)的小鼠中取得脾脏,并将脾脏细胞与SP2/0骨髓瘤细胞相融合。14天之后,为了筛选对h跨膜4超家族成员5蛋白肽的分泌特定抗体的杂交瘤细胞,利用酶联免疫吸附测定法来分析了上清液。通过筛选分离了与h跨膜4超家族成员5蛋白发生反应的6个杂交瘤细胞(2D4、2E3、2G2、4B6、4C4及4D11)(图1b)。亚克隆之后,对单克隆抗体生产追加分析了上述6个杂交瘤细胞(图1c)。筛选6个杂交瘤克隆(4个2D4衍生物及2个4C4衍生物(derivative)),并向BALB/c小鼠的腹腔内进行给药来制备了腹水。为了检测以高的水平分泌对h跨膜4超家族成员5蛋白肽的特定抗体的杂交瘤,利用酶联免疫吸附测定法来筛选了腹水。最终,筛选了生产单克隆抗体2D4-18的一个杂交瘤克隆(图1d)。上述杂交瘤细胞以保藏号KCLRF-BP-00291于2013年2月18日保藏于韩国细胞系研究基金会。将上述克隆给药到7只BALB/c小鼠的腹腔内的情况下,在所有腹水中生产了抗-h跨膜4超家族成员5蛋白肽特异性抗体2D4-18(图1e)。利用蛋白质A柱层析来从腹水液中纯化了抗-跨膜4超家族成员5蛋白单克隆抗体2D4-18(99%以上的纯度;图2)。抗体的同型为免疫球蛋白G2a。

[0175] 【抗-跨膜4超家族成员5蛋白单克隆抗体2D4-18的亲和度】

[0176] 使用表面等离子共振生物传感器来以定量测定了跨膜4超家族成员5蛋白靶向mAB(2D4-18)的结合亲和力。其结果，上述mAb(2D4-18)不仅在小鼠跨膜4超家族成员5蛋白，而且还与人类跨膜4超家族成员5蛋白以小于2nM的Kd值发生了反应(图3)。这种结果示出可将本发明的单克隆抗体2D4-18有用地使用于跨膜4超家族成员5蛋白蛋白质检测。

[0177] 【肝细胞癌及结肠癌中跨膜4超家族成员5蛋白的表达】

[0178] 据报告，根据基于诺瑟杂交及逆转录聚合酶链式反应的信使核糖 核酸表达，在结肠癌、胰腺肿瘤及肝细胞癌中表达了跨膜4超家族成员5蛋白。因此，用抗-跨膜4超家族成员5蛋白单克隆抗体2D4-18进行免疫组织化学染色，来在人类肝细胞癌试样中确认了跨膜4超家族成员5蛋白的表达。如图4的(B)部分及表1所示，在所有肝细胞癌组织中表达了跨膜4超家族成员5蛋白(在肿瘤细胞的11％以上染色)。70个肝细胞癌试样的分析示出，肝细胞癌的31％在肿瘤细胞的75％以上表达了跨膜4超家族成员5蛋白，肝细胞癌的46％及肝细胞癌的23％分别在肿瘤细胞的74～50％及49～11％中表达了跨膜4超家族成员5蛋白(表1)。

[0179] 【表1】

[0180]

肝细胞癌组织切片（艾克迈斯阵列）（HCC tissue sections（AccuMax Array））	n	阳性跨膜 4 超家族成员 5 蛋白（TM4SF5 positive）(%)	No. (%)染色跨膜 4 超家族成员 5 蛋白（cases staining TM4SF5）			
			≥75%	74～50%	49～11%	＜10%
A204	35	100	10(28)	16(46)	9(26)	0(0)
A204II	35	100	12(34)	16(46)	7(20)	0(0)
total	70	100	22(31)	32(46)	16(23)	0(0)

[0181] 并且，如图5a、图5b及表2所示，在大部分结肠癌组织中，确认了跨膜4超家族成员5蛋白的表达(在98％，肿瘤细胞的11％以上染色)。63个结肠癌试样的分析示出，结肠癌组织的44％在肿瘤细胞的75％以上中表达了跨膜4超家族成员5蛋白，结肠癌组织的37％及结肠癌组织的17％分别在肿瘤组织的74～50％及49～11％中表达了跨膜4超家族成员5蛋白。具有肝转移的所有结肠癌患者不仅在肝癌组织，而且在结肠癌组织中示出跨膜4超家族成员5蛋白的阳性染色(图5b)。

[0182] 【表2】

[0183]

结肠组织切片（艾克迈斯阵列）（Colon tissue sections（AccuMax Array））n	n	阳性跨膜4超家族成员 5 蛋白（TM4SF5 positive）(%)	No. (%)染色跨膜 4 超家族成员 5 蛋白（cases staining TM4SF5）			
			≥75%	74～50%	49～11%	＜10%
A203III	18	100	12(67)	5(30)	1(0.5)	0(0)
A203VII	45	100	16(36)	18(40)	10(22)	1(2)
total	63	100	28(44)	23(37)	11(17)	1(2)

[0184] 【针对肝细胞癌细胞及结肠癌细胞的抗-跨膜4超家族成员5蛋白单克隆抗体2D4-18的功能性效果】

[0185] 在基于逆转录聚合酶链式反应的信使核糖核酸水平上，在肝细胞癌细胞(Hep3B、

Huh-7及SNU-761)及结肠癌细胞(HT-29、LoVo及CT-26)中检测到跨膜4超家族成员5蛋白的表达(图6a)。为了确认抗-跨膜4超家族成员5蛋白单克隆抗体2D4-18对细胞生长的效果,实施了噻唑蓝分析。作为肝细胞癌细胞的Hep3B细胞及Huh-7细胞的生长通过抗体处理来相当地得到延缓(图6b)。

[0186] 并且,确认了抗-跨膜4超家族成员5蛋白单克隆抗体2D4-18对结肠癌细胞的生长的效果。作为结肠癌细胞的HT-29、LoVo及CT-26细胞的生长通过抗体处理得到延缓(图6c)。

[0187] 这种结果表明,本发明的单克隆抗体2D4-18对肝细胞癌细胞及结肠癌细胞等的癌细胞呈现抗-增殖效果。

[0188] 【抗-跨膜4超家族成员5蛋白单克隆抗体2D4-18对肝细胞癌细胞及结肠癌细胞的移动产生的效果】

[0189] 包含跨膜4超家族成员5蛋白的四旋蛋白(tetraspanin)超家族导致作为细胞移动/浸润及肿瘤细胞运动型的中心的整联蛋白介导的信号通路。因此,调查了对细胞移动及浸润的抗-跨膜4超家族成员5蛋白单克隆抗体2D4-18的影响。如图7的(A)部分、图7的(B)部分、图8的(A)部分及图8的(B)部分所示,表达跨膜4超家族成员5蛋白的细胞的移动及浸润通过抗-跨膜4超家族成员5蛋白单克隆抗体2D4-18的处理来相当地得到减少。

[0190] 并且,实施了伤口治疗分析。如图7的(C)部分及图8的(C)部分所示,至伤口部位的Huh-7细胞及CT-26细胞的移动通过抗-跨膜4超家族成员5蛋白单克隆抗体2D4-18的处理来大大减少。

[0191] 这种结果表明,抗-跨膜4超家族成员5蛋白单克隆抗体2D4-18介导的跨膜4超家族成员5蛋白的靶向可在肝细胞癌细胞及结肠癌细胞等的癌细胞中抑制细胞移动。

[0192] 【针对肝细胞癌肿瘤的抗-跨膜4超家族成员5蛋白单克隆抗体 2D4-18的靶向】

[0193] 为了评价针对肝细胞癌肿瘤的抗-跨膜4超家族成员5蛋白单克隆抗体2D4-18的靶向,将抗-跨膜4超家族成员5蛋白单克隆抗体2D4-18及正常小鼠免疫球蛋白G与DyLight 750-荧光相结合,并向生长肿瘤的BALB/c小鼠的腹腔内进行给药。72小时之后,测定荧光的整体质子流量(质子/秒钟)来确认了DyLight 750-标记的抗体的分布。如图9a所示,DyLight 750-标记的抗-跨膜4超家族成员5蛋白单克隆抗体位于肿瘤,但DyLight 750-标记的正常免疫球蛋白G在小鼠中未检测到。根据肿瘤组织的分析结果,很多肿瘤细胞由DyLight 750-标记的抗-跨膜4超家族成员5蛋白抗体2D4-18染色(图9b)。相反,在将DyLight 750-标记的正常免疫球蛋白G给药的小鼠中未发现任何标记。

[0194] 这种结果表明,本发明的抗-跨膜4超家族成员5蛋白单克隆抗体2D4-18可在体内靶向表达跨膜4超家族成员5蛋白的肿瘤细胞。

[0195] 【抗-跨膜4超家族成员5蛋白单克隆抗体2D4-18在异种移植小鼠模型中抑制肝细胞癌肿瘤的生长】

[0196] 使用异种移植小鼠模型来确认靶向肝细胞癌细胞的生长的跨膜4超家族成员5蛋白的单克隆抗体2D4-18的体内效果。首先,能够以静脉注射的方式将Huh-7细胞给药到裸鼠,并使肿瘤生长。在肿瘤直径达到5mm的情况下,每周两次将正常小鼠免疫球蛋白G或抗-跨膜4超家族成员5蛋白单克隆抗体2D4-18给药到小鼠的腹腔内。根据肿瘤体积及重量,抗-跨膜4超家族成员5蛋白单克隆抗体2D4-18与正常小鼠免疫球蛋白G相比,弱化肝细胞癌肿瘤的发展(图10的(A)部分～图10的(C)部分)。抗体处理对体重未产生影响(图10的(D)部

分)。在肝细胞癌肿瘤组织中,用抗-跨膜4超家族成员5蛋白单克隆抗体2D4-18进行免疫染色来确认了跨膜4超家族成员5蛋白的表达(图10的(E)部分)。

[0197] 异种移植实验分析结果表明,靶向肝细胞癌肿瘤细胞的抗-跨膜4超家族成员5蛋白单克隆抗体2D4-18在体内减少肿瘤的生长方面充 分。

[0198] 【抗-跨膜4超家族成员5蛋白单克隆抗体2D4-18在同种移植小鼠模型中抑制肝细胞癌肿瘤的生长】

[0199] 为了确认在同种移植小鼠模型中,抗-跨膜4超家族成员5蛋白单克隆抗体2D4-18对肝细胞癌发生肿瘤的效果,使用了作为来源于正常BALB/c胚胎干细胞株BNL CL2的化学转化的小鼠肝细胞株的小鼠BNL 1ME A.7R.1肝细胞癌细胞株(BNL-肝细胞癌细胞)。如图11的(A)部分～图11的(C)部分所示,抗-跨膜4超家族成员5蛋白单克隆抗体2D4-18的处理与正常小鼠免疫球蛋白G处理的对照组相比,相当地抑制了肝细胞癌肿瘤的发展。上述抗体处理对体重未产生影响(图11的(D)部分)。在肝细胞癌肿瘤组织中,用抗-跨膜4超家族成员5蛋白单克隆抗体2D4-18进行免疫染色来重新确认了跨膜4超家族成员5蛋白的表达(图11的(E)部分)。

[0200] 【抗-跨膜4超家族成员5蛋白单克隆抗体2D4-18在异种移植小鼠模型中抑制结肠瘤的生长】

[0201] 使用异种移植小鼠模型来确认靶向结肠癌细胞的生长的跨膜4超家族成员5蛋白的单克隆抗体2D4-18的体内效果。首先,能够以静脉的方式将HT-29细胞给药到裸鼠,并使肿瘤生长。在肿瘤直径达到5mm的情况下,每周两次将正常小鼠免疫球蛋白G或抗-跨膜4超家族成员5蛋白单克隆抗体2D4-18给药到小鼠的腹腔内。根据肿瘤体积及重量,抗-跨膜4超家族成员5蛋白单克隆抗体2D4-18与正常小鼠免疫球蛋白G相比,弱化结肠瘤的发展(图12的(A)部分～图12的(C)部分)。抗体处理对体重未产生影响(图12的(D)部分)。在结肠癌组织中,用抗-跨膜4超家族成员5蛋白单克隆抗体2D4-18进行免疫染色来再次确认了跨膜4超家族成员5蛋白的表达(图12的(E)部分)。

[0202] 异种移植实验分析结果表明,靶向结肠癌细胞的抗-跨膜4超家族成员5蛋白单克隆抗体2D4-18在体内可减少肿瘤生长。

[0203] 【抗-跨膜4超家族成员5蛋白单克隆抗体2D4-18在同种移植小 鼠模型中抑制结肠癌的生长】

[0204] 如图13的(A)部分～图13的(C)部分所示,为了确认在同种移植小鼠模型中,抗-跨膜4超家族成员5蛋白单克隆抗体2D4-18对结肠癌发达的效果,使用了小鼠CT-26细胞。抗-跨膜4超家族成员5蛋白单克隆抗体2D4-18的处理相当地抑制了结肠癌的发展。上述抗体的处理对体重未产生影响(图13的(D)部分)。在结肠癌组织中,用抗-跨膜4超家族成员5蛋白单克隆抗体2D4-18进行免疫染色来再次确认了跨膜4超家族成员5蛋白的表达(图13的(E)部分)。

[0205] 【抗-跨膜4超家族成员5蛋白单克隆抗体2D4-18在同种移植小鼠模型中抑制结肠癌的转移】

[0206] 如14的(A)部分～图14的(C)部分所示,为了转移性癌症的实验,以静脉注射的方式将小鼠CT-26结肠癌细胞给药到BALB/c小鼠,并给药磷酸盐缓冲液、免疫球蛋白G对照组或抗-跨膜4超家族成员5蛋白单克隆抗体2D4-18。抗-跨膜4超家族成员5蛋白单克隆抗体

2D4-18抑制了肺癌的发生。2D4-18单克隆抗体的处理抑制了因将CT-26细胞给药而引起的体重损失(图14的(D)部分)。

[0207] 【抗-跨膜4超家族成员5蛋白单克隆抗体2D4-18的可变域的克隆】

[0208] 从生产抗-跨膜4超家族成员5蛋白单克隆抗体2D4-18的杂交瘤细胞2D4-18克隆对重链可变域及轻链可变域进行编码的互补脱氧核糖核酸。在图15(2D4-18)及图16(2D4-18(1))中示出用脱氧核糖核酸碱基序列分析确认的序列。

[0209] 【来源于抗-跨膜4超家族成员5蛋白单克隆抗体2D4-18的重组Fab的表达】

[0210] 在大肠杆菌中,为了表达重组Fab,使用了表达载体pFabE。上述pFabE包含κ轻链的恒定域(C_L)和重链的一个恒定域(C_{H1})及分别插入重链及轻链可变域(V_L及V_H)的两个克隆部位BstX I和Sfi I。通过2D4-18的V_L及V_H序列的连续的亚克隆,制备了重组表达质粒pFabE-2D4-18及pFabE-2D4-18(1)(图17的(A)部分)。上 述重组质粒在大肠杆菌中在LacZ启动子的调节下,以双顺反子(bi-cistronic)的方式表达V_L-C_L融合蛋白质和V_H-C_{H1}融合蛋白质。V_L-C_L融合蛋白质包含N-末端OmpA标记及C-末端Pre-S1标记,但V_H-C_{H1}融合蛋白质包含N-末端PelB标记及C-末端His标记(图17的(B)部分)。V_L-C_L融合蛋白质和V_H-C_{H1}融合蛋白质均具有用于分泌的前导序列(leader sequence),从而向培养上清液分泌,并且进行自组装(self-assembled)来制备作为二聚体蛋白质的Fab(Jeon YE,et al.Mol Immunol 44,827-836(2007);Kwon YS,et al.Oncol Rep18,513-517(2007))。首先,实施10ml的小规模(small scale)培养,并通过使用抗-PreS1抗体及抗-His抗体的整体细胞溶解物的免疫印迹法来确认了重组V_L-C_L融合蛋白质和V_H-C_{H1}融合蛋白质的表达(图18)。并且,确认到利用异丙基硫代半乳糖苷的重组Fab的表达调节的温度条件与23℃相比,18℃更优选(图18)。之后,实施大肠杆菌的大规模培养,并使用Ni-NTA亲和度柱层析来从培养上清液中纯化了2D4-18的重组Fab-2D4-18及Fab-2D4-18(1)(图19及图20)。如图19的(A)部分所示,在还原条件及免疫印迹法分析中,十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳的、已纯化的Fab-2D4-18蛋白质由两个聚肽(重组重链及轻链)形成,并示出可分别用抗-His抗体及抗-Pre-S1抗体检测上述两个聚肽。在非-还原条件下,主蛋白质带在小于55kDa的分子量中被发现,这种分子量与重组Fab的预测的大小相一致(图19的(B)部分)。如图20的(A)部分所示,在还原条件及非-还原条件下,十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳的、已纯化的Fab-2D4-18(1)蛋白质由两个聚肽(重组重链及轻链)形成,主蛋白质带在小于55kDa的分子量中被发现。在免疫印迹法分析中,已纯化的Fab-2D4-18(1)蛋白质由两个聚肽(重组重链及轻链)形成,并示出可分别用抗-His抗体检测上述两个聚肽。在非-还原条件下,主蛋白质带在小于55kDa的分子量中被发现,这种分子量与重组Fab的预测的大小相一致(图20的(B)部分)。为了追加确认Fab的功能性,使用Biacore来定量测定了重组Fab-2D4-18的结合亲和度。其 结果,Fab以小于0.15μM的Kd值与人类跨膜4超家族成员5蛋白发生反应(图21)。

[0211] 【对肝细胞癌细胞的抗-跨膜4超家族成员5蛋白单克隆抗体(2D4-18)重组Fab的功能性效果】

[0212] 为了调查对细胞生长的重组Fab-2D4-18及Fab-2D4-18(1)的效果,实施了噻唑蓝分析。通过抗体处理,作为肝细胞癌细胞的Hep3B细胞及Huh-7细胞的生长相当地被延缓(图22及图23)。这种结果意味着抗-跨膜4超家族成员5蛋白抗体2D4-18的重组Fab蛋白质具有抗-增值效果。

[0213] 以上，对本发明的特定部分进行了详细记述，对于本发明所属技术领域的普通技术人员来说，这种具体记述仅仅是优选实例，很显然，本发明的范围并不限定于此。因此，本发明的实质性范围根据所附的发明要求保护范围和其等同技术方案来定义。

[0214]



韩国细胞系研究基金会（KCLB，Korean Cell Line Bank）
Cancer Research Institute, Seoul National University College of Medicine,
28 Yungon-dong, Chongno-gu, Seoul 110-799, 韩国
韩国细胞系研究基金会(KCLB,Korean Cell Line Bank或KCLRF,Korean Cell Line Research Foundation）. WIPO承认的国际微生物保藏机构
Cancer Research Institute, Seoul National University College of Medicine,
28 Yungon-dong, Chongno-gu, Seoul 110-799, 韩国

国际承认用于专利程序的微生物保藏布达佩斯条约

国际表格

在原始保藏情况下的收条

根据实施细则第 7.1 款发给

至: 翰林大学校产学协力团
翰林大学校产学协力团
韩国 江原道 春川 翰林大学街 1 号，200-702

I. 微生物的鉴别	
由保藏人提供的鉴别参考号: 2D4-18	由国际保藏单位给予的登录号: KCLRF-BP-00291
II. 科学描述和/或建议的分类命名	
在上面 I 中鉴别的微生物附有下列信息: （x） 科学描述 （x） 建议的分类命名 （在合适的项目上打 x 号）	
III. 收到和受理	
本国际保藏单位受理在上面 I 中鉴别的微生物，其于 2013 年 2 月 18 日收到	
IV. 国际保藏单位	
名称: 总裁 韩国细胞系研究基金会 地址: Cancer Research Institute, Seoul National University College of Medicine, 28 Yungon-dong, Chongno-gu, Seoul 110-799, 韩国	签字: 日期: 2013-02-20

表 BP/4（KCLRF 表 17）

序列表

<110> Industry Academic Cooperation Foundation Hallym University

<120> 针对跨膜4超家族成员5蛋白的抗体或包含其的抗癌组合物

<130> PP140001

<150> KR10-2013-0020547
<151> 2013-02-26

<160> 32

<170> KopatentIn 2.0

<210> 1
<211> 22
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 小鼠GAPDH的正向引物

<400> 1
atggtgaagg tcggtgtgaa cg 22

<210> 2
<211> 22
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 小鼠GAPDH的反向引物

[0001]

<400> 2
gttgtcatgg atgatcttgg cc 22

<210> 3
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 小鼠TM4SF5的正向引物

<400> 3
cgcttacttg cgaaatgaca 20

<210> 4
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 小鼠TM4SF5的反向引物

<400> 4
tttcctgcaa tcgccacaca 20

<210> 5
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人β-肌动蛋白的正向引物

<400> 5
gggtcagaag gattcctatg 20

<210> 6
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人β-肌动蛋白的反向引物

<400> 6
ccttaatgtc acgcacgatt t 21

<210> 7
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人TM4SF5的正向引物

<400> 7
agcttgcaag tctggctcat 20

<210> 8
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人TM4SF5的反向引物

[0002]

<400> 8
gctggatccc acacagtact 20

<210> 9
<211> 32
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> IGG2A引物

<400> 9
ggaagatctc ttgaccaggc atcctagagt ca 32

<210> 10
<211> 35
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 5'MH2引物

<400> 10
cttccggaat tcsargtnma gctgsagsag tcwgg 35

<210> 11
<211> 30
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 3'Kc引物

<400> 11
ggtgcatgcg gatacagttg gtgcagcatc 30

<210> 12
<211> 32
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 5'Mk引物

<400> 12
gggagctcga yattgtgmts acmcarwctm ca 32

<210> 13
<211> 37
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> VH的正向引物

<400> 13
ggcccagccg gccatggccc aggtccagct ggagcag 37

<210> 14
<211> 30
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> VH的反向引物

[0003]

<400> 14
ggccgtgctg gccgaggaga ctgtgagagt 30

<210> 15
<211> 37
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> VH(1)的正向引物

<400> 15
ggcccagccg gccatggccg ggagacttag tgaagcc 37

<210> 16
<211> 65
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> VL的正向引物

<400> 16
ccattgcagt ggcactggct ggtttcgcta ccgtagcaca ggcagccgat attgtgatga 60

cccag 65

<210> 17
<211> 28
<212> DNA

<213> 人工序列

<220>
<223> VL的反向引物

<400> 17
ccaccgtact ggcccgtttt atttccaa 28

<210> 18
<211> 60
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> VL(1)的正向引物

<400> 18
ccattgcagt ggcactggct ggtttcgcta ccgtagcaca ggcagccctc tccctgcctg 60

60

<210> 19
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CDRH1

<400> 19
Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Gly Met Ser
1 5 10

[0004]

<210> 20
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CDRH2

<400> 20
Ile Ser Ser Gly Gly Gly Tyr Thr
1 5

<210> 21
<211> 13
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CDRH3

<400> 21
Ala Arg His Glu Gly Phe Thr Thr Tyr Tyr Phe Asp Tyr
1 5 10

<210> 22
<211> 16
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CDRL1

<400> 22
Arg Ser Ser Gln Ser Ile Leu His Ser Ser Gly Asn Thr Tyr Leu Glu
1 5 10 15

<210> 23
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CDRL2

<400> 23
Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser
1 5

<210> 24
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CDRL3

<400> 24
Phe Gln Gly Ser His Val Pro Phe Thr
1 5

[0005]

<210> 25
<211> 112
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 重链可变结构域

<400> 25
Gly Asp Leu Val Lys Pro Gly Gly Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala
1 5 10 15

Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Thr
20 25 30

Pro Asp Lys Arg Leu Glu Trp Val Ala Thr Ile Ser Ser Gly Gly Gly
35 40 45

Tyr Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg
50 55 60

Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Arg Ser Leu Lys Ser
65 70 75 80

Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys Ala Arg His Glu Gly Phe Thr Thr
85 90 95

Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser
100 105 110

<210> 26
<211> 105
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 轻链可变结构域

<400> 26
Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu Gly Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg
1 5 10 15

Ser Ser Gln Ser Ile Leu His Ser Ser Gly Asn Thr Tyr Leu Glu Trp
20 25 30

Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val
35 40 45

Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser
50 55 60

Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu
65 70 75 80

Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly Ser His Val Pro Phe Thr Phe Gly
85 90 95

Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
100 105

<210> 27
<211> 338
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 重链可变结构域

<400> 27
gggagactta gtgaagcctg gagggtccct gaaactctcc tgtgcagcct ctggattcac 60

tttcagtagc tatggcatgt cttgggttcg ccagactcca gacaagaggc tggagtgggt 120

[0006]

cgcaaccatt agtagtggtg gtggttacac ctactatcca gacagtgtga aggggcgatt 180

caccatctcc agagacaatg ccaagaacac cctgtacctg caaatgcgca gtctgaagtc 240

tgaggacaca gccatgtatt actgtgcaag acatgagggc tttacgacgt actactttga 300

ctactggggc caaggcacca ctctcacagt ctcctcag 338

<210> 28
<211> 316
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 轻链可变结构域

<400> 28
ctctccctgc ctgtcagtct tggagatcaa gcctccatct cttgcagatc tagtcagagc 60

attttacata gttctggaaa cacctattta gaatggtacc tgcagaaacc aggccagtct 120

ccaaagctcc tgatctacaa agtttccaac cgattttctg gggtcccaga caggttcagt 180

ggcagtggat cagggacaga tttcacactc aagatcagca gagtggaggc tgaggatctg 240

ggagtttatt actgctttca aggttcacat gttccattca cgttcggctc ggggacaaag 300

ttggaaataa aacggg 316

<210> 29
<211> 120
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 重链可变结构域 (1)

<400> 29
Gln Val Gln Leu Glu Gln Ser Gly Gly Asp Leu Val Lys Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Asp Lys Arg Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ala Thr Ile Ser Ser Gly Gly Gly Tyr Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Arg Ser Leu Lys Ser Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg His Glu Gly Phe Thr Thr Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 30
<211> 113
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 轻链可变结构域 (1)

[0007]

<400> 30
Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu Gly
1 5 10 15

Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Ile Leu His Ser
20 25 30

Ser Gly Asn Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
35 40 45

Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly
85 90 95

Ser His Val Pro Phe Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

Arg

<210> 31
<211> 361
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 重链可变结构域 (1)

<400> 31
caggtccagc tggagcagtc tgggggagac ttagtgaagc ctggagggtc cctgaaactc 60

tcctgtgcag cctctggatt cactttcagt agctatggca tgtcttgggt tcgccagact 120

ccagacaaga ggctggagtg ggtcgcaacc attagtagtg gtggtggtta cacctactat 180

ccagacagtg tgaaggggcg attcaccatc tccagagaca atgccaagaa caccctgtac 240

ctgcaaatgc gcagtctgaa gtctgaggac acagccatgt attactgtgc aagacatgag 300

ggctttacga cgtactactt tgactactgg ggccaaggca ccactctcac agtctcctca 360

g 361

[0008]

<210> 32
<211> 340
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 轻链可变结构域 (1)

<400> 32
gatattgtga tgacccagtc tccactctcc ctgcctgtca gtcttggaga tcaagcctcc 60

atctcttgca gatctagtca gagcatttta catagttctg gaaacaccta tttagaatgg 120

tacctgcaga aaccaggcca gtctccaaag ctcctgatct acaaagtttc caaccgattt 180

tctggggtcc cagacaggtt cagtggcagt ggatcaggga cagatttcac actcaagatc 240

agcagagtgg aggctgagga tctgggagtt tattactgct ttcaaggttc acatgttcca 300

ttcacgttcg gctcggggac aaagttggaa ataaaacggg 340

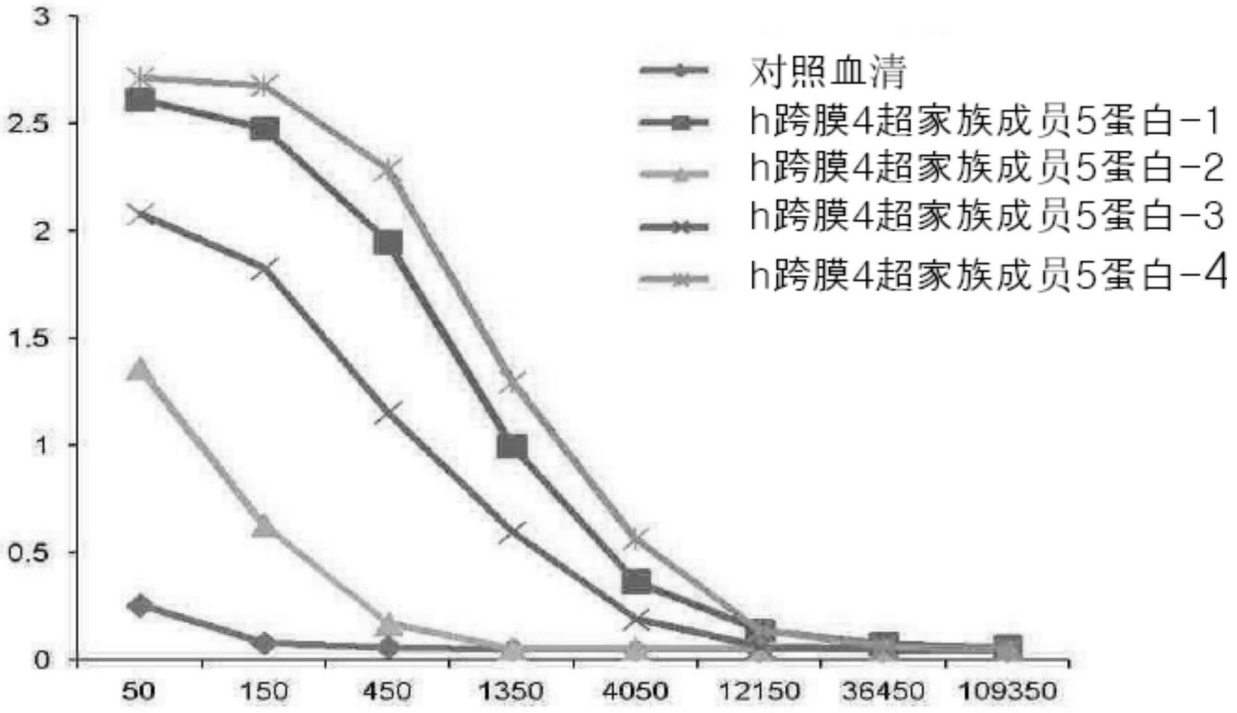

3
2.5
2
1.5
1
0.5
0
50
150
450
1350
4050
12150
36450
109350
对照血清
h跨膜4超家族成员5蛋白-1
h跨膜4超家族成员5蛋白-2
h跨膜4超家族成员5蛋白-3
h跨膜4超家族成员5蛋白-4

图1a

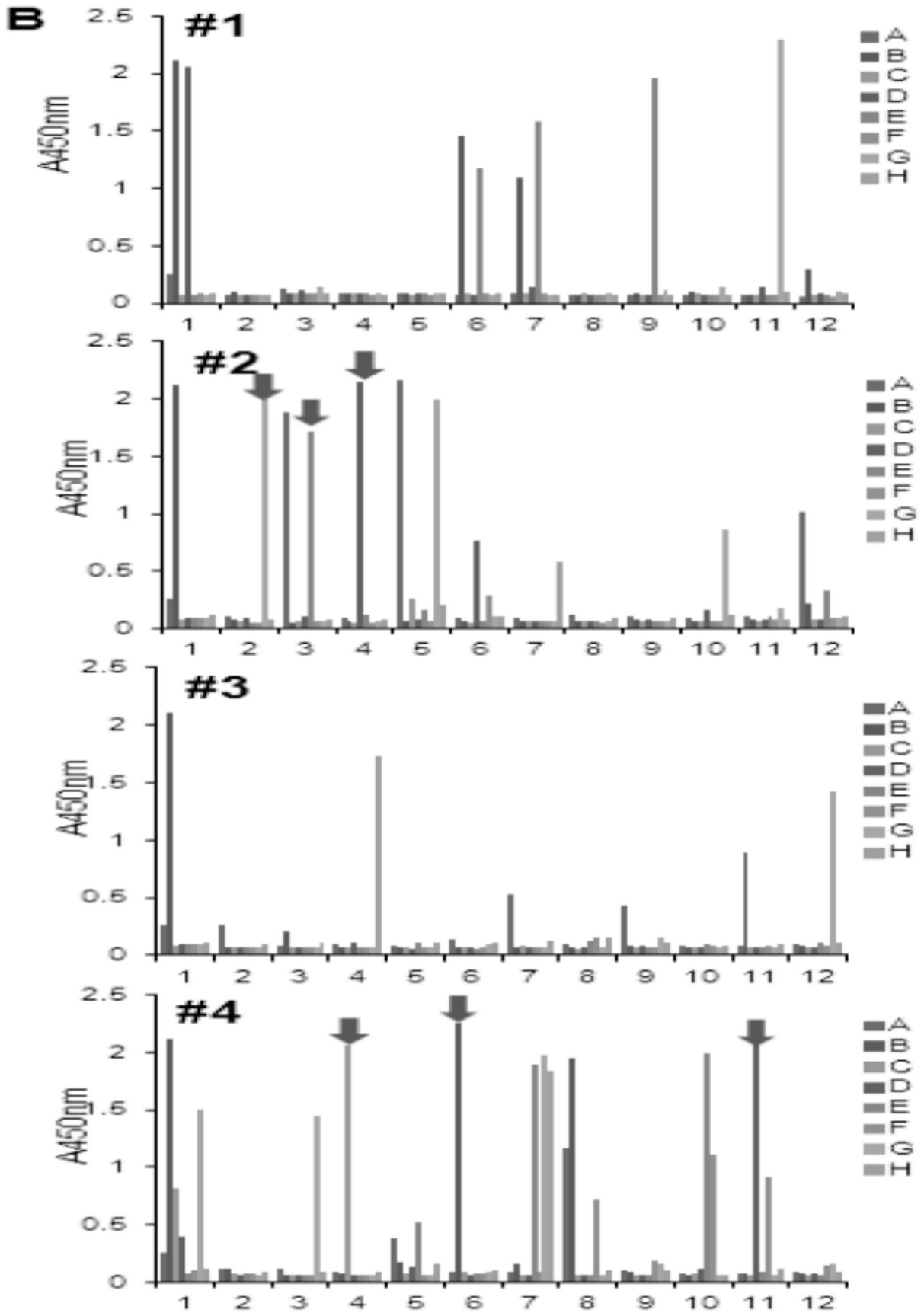


图1b

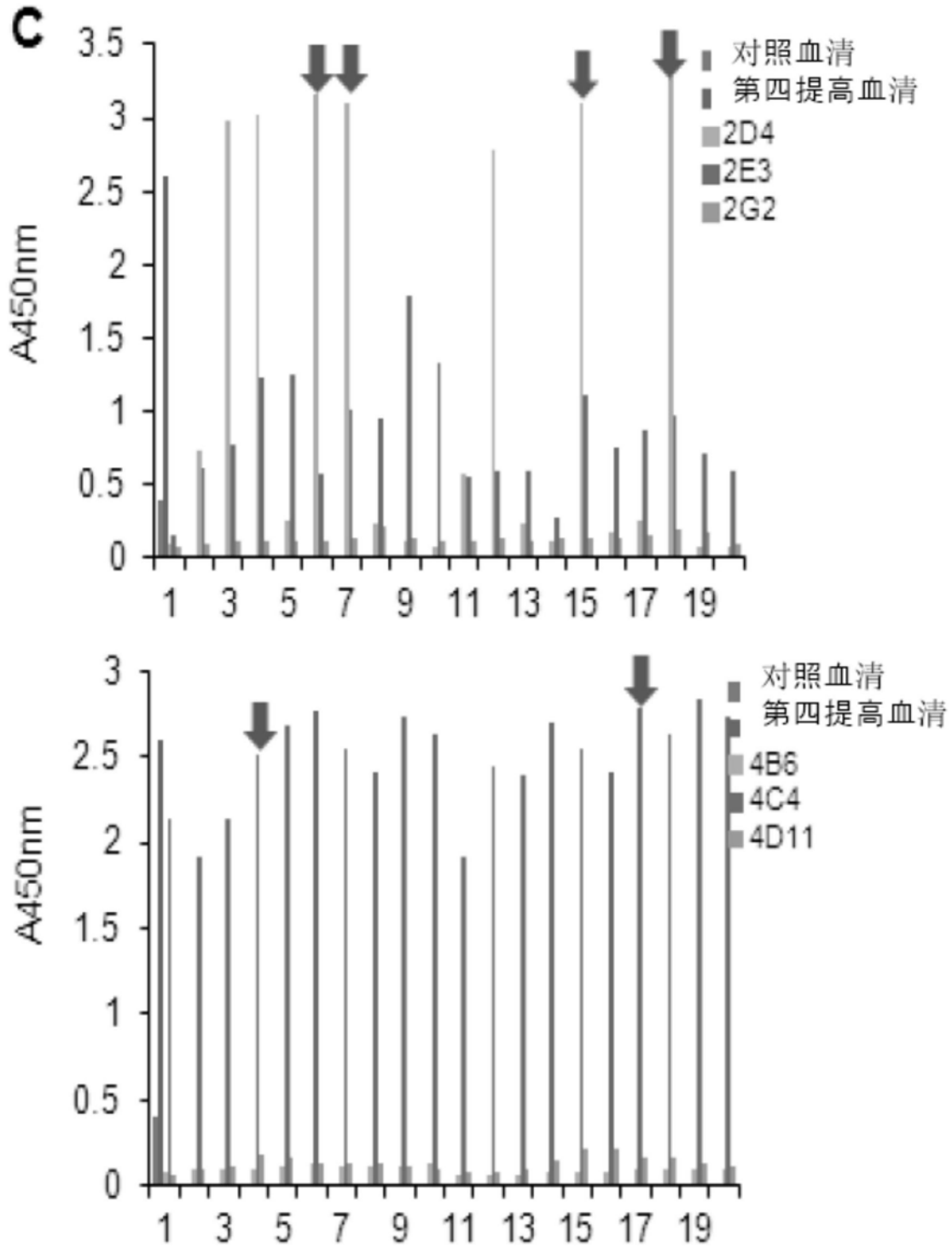

C
A450nm
3.5
3
2.5
2
1.5
1
0.5
0
1 3 5 7 9 11 13 15 17 19
对照血清
第四提高血清
2D4
2E3
2G2
A450nm
3
2.5
2
1.5
1
0.5
0
1 3 5 7 9 11 13 15 17 19
对照血清
第四提高血清
4B6
4C4
4D11

图1c

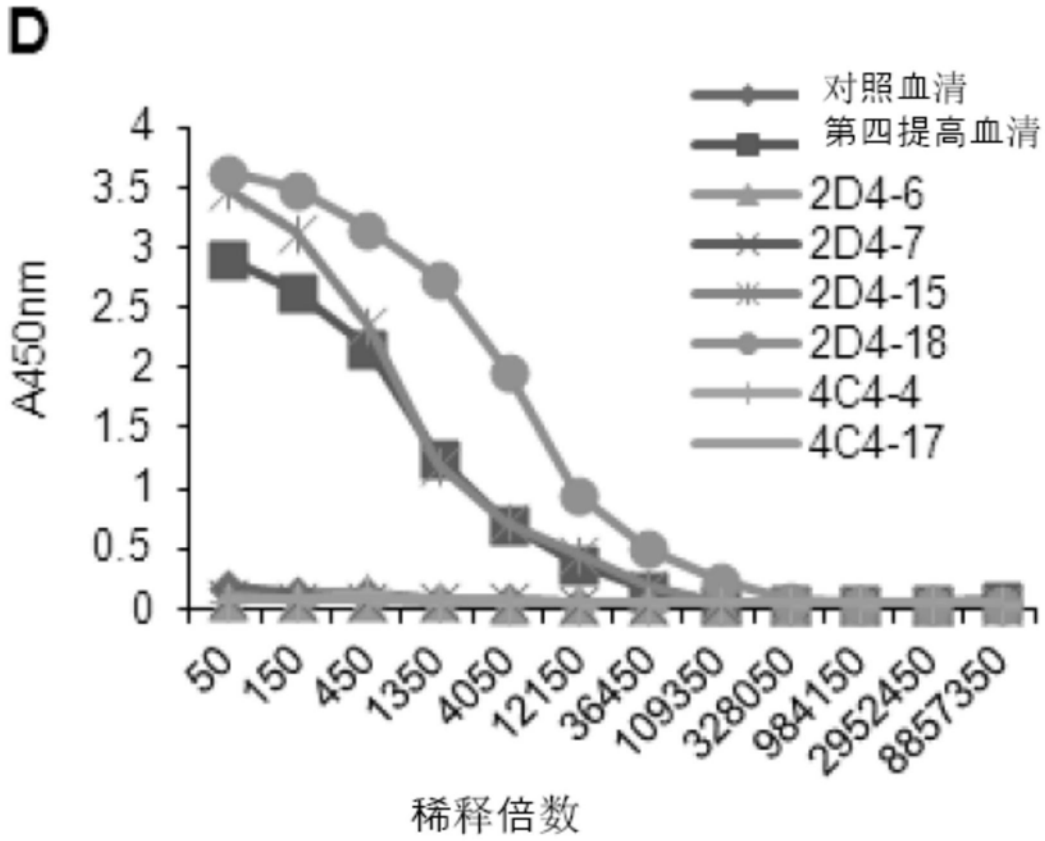

D
对照血清
第四提高血清
2D4-6
2D4-7
2D4-15
2D4-18
4C4-4
4C4-17
A450nm
4
3.5
3
2.5
2
1.5
1
0.5
0
50
150
450
1350
4050
12150
36450
109350
328050
984150
2952450
8857350
稀释倍数

图1d

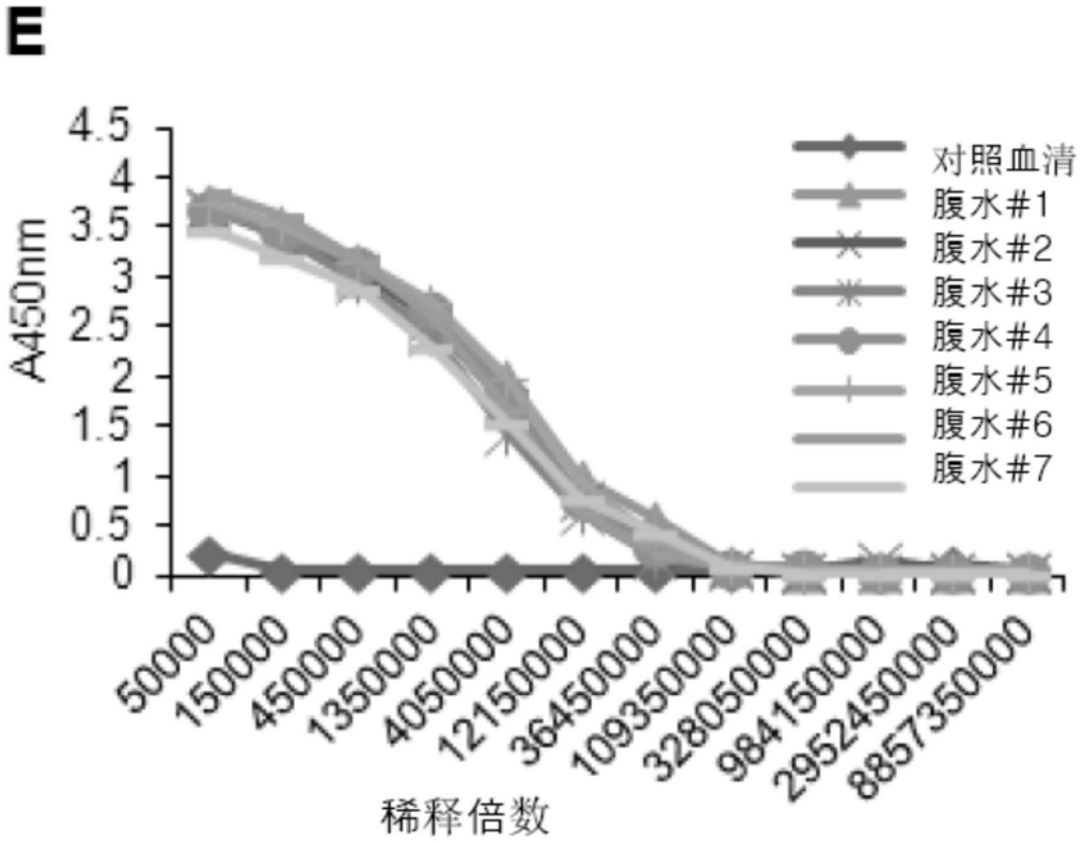

E
A450nm
4.5
4
3.5
3
2.5
2
1.5
1
0.5
0
对照血清
腹水#1
腹水#2
腹水#3
腹水#4
腹水#5
腹水#6
腹水#7
50000
150000
450000
1350000
4050000
12150000
36450000
109350000
328050000
984150000
2952450000
8857350000
稀释倍数

图1e

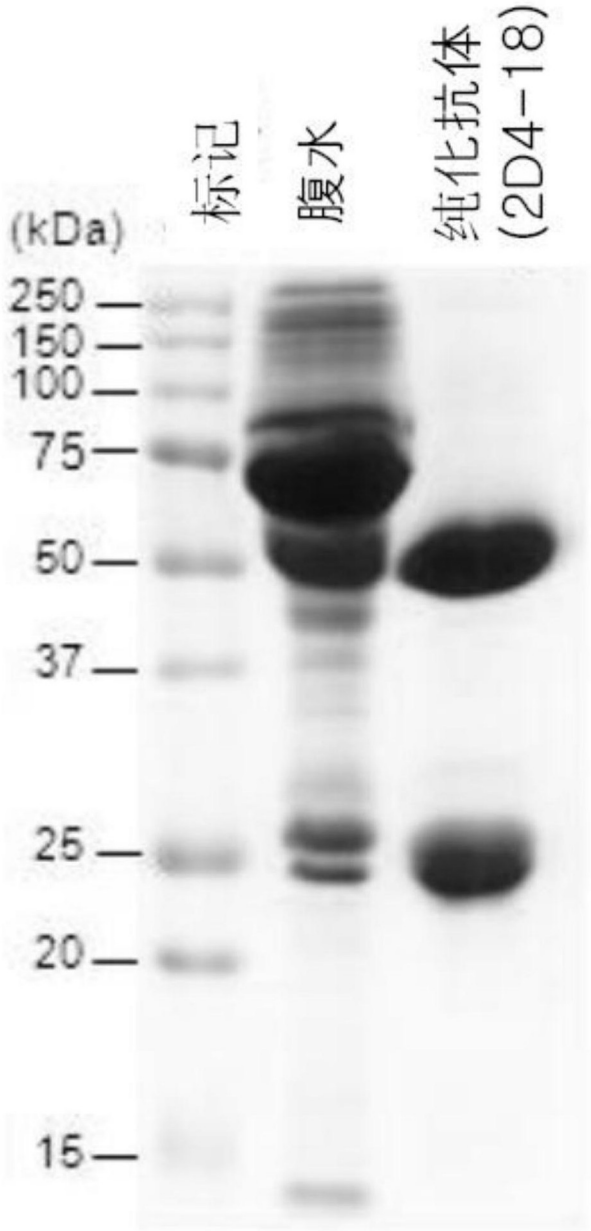


图2

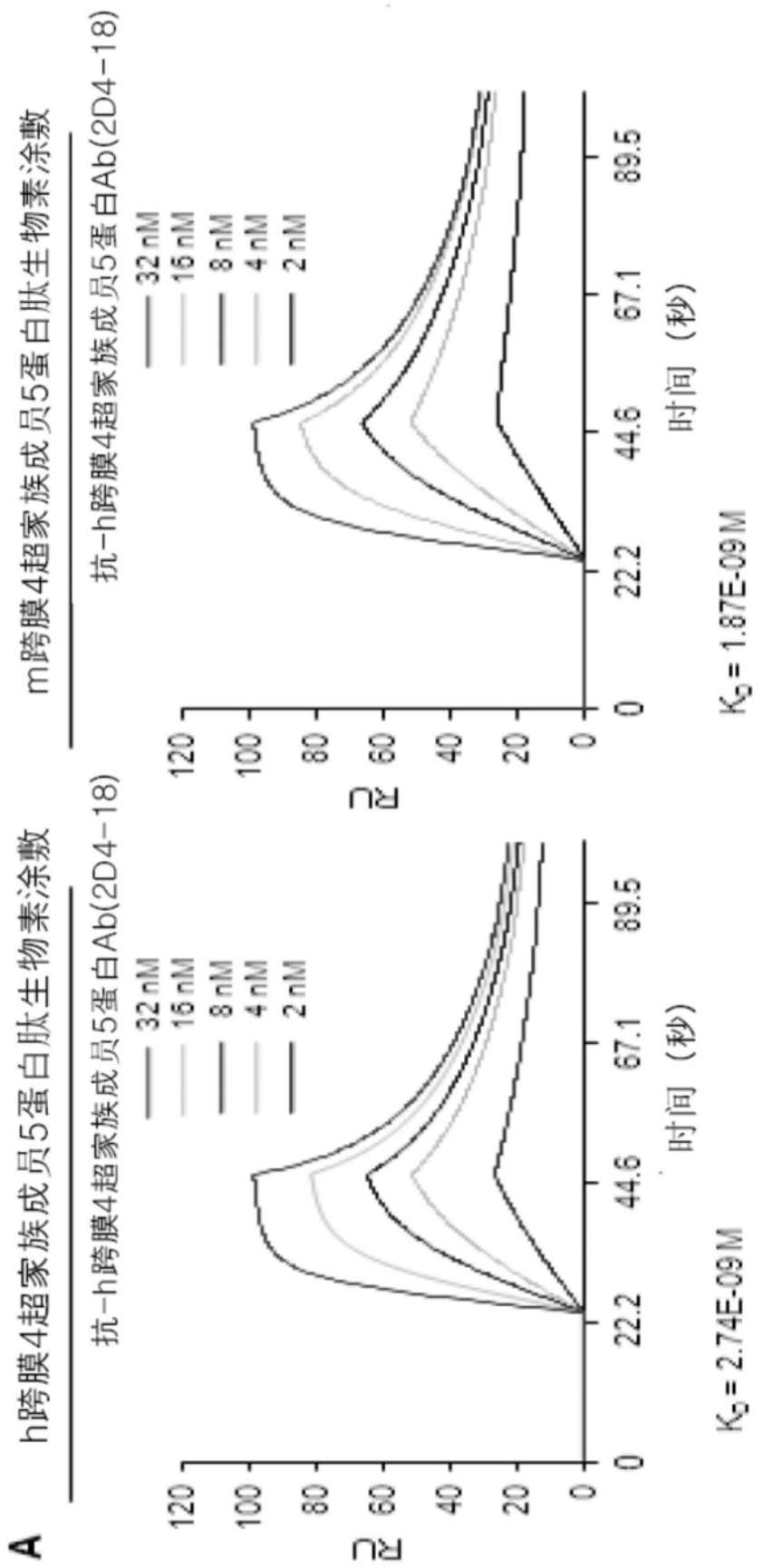

A
h跨膜4超家族成员5蛋白肽生物素涂敷
抗-h跨膜4超家族成员5蛋白Ab(2D4-18)
32 nM
16 nM
8 nM
4 nM
2 nM
RU
时间（秒）
K_D = 2.74E-09 M
m跨膜4超家族成员5蛋白肽生物素涂敷
抗-h跨膜4超家族成员5蛋白Ab(2D4-18)
32 nM
16 nM
8 nM
4 nM
2 nM
RU
时间（秒）
K_D = 1.87E-09 M

图3

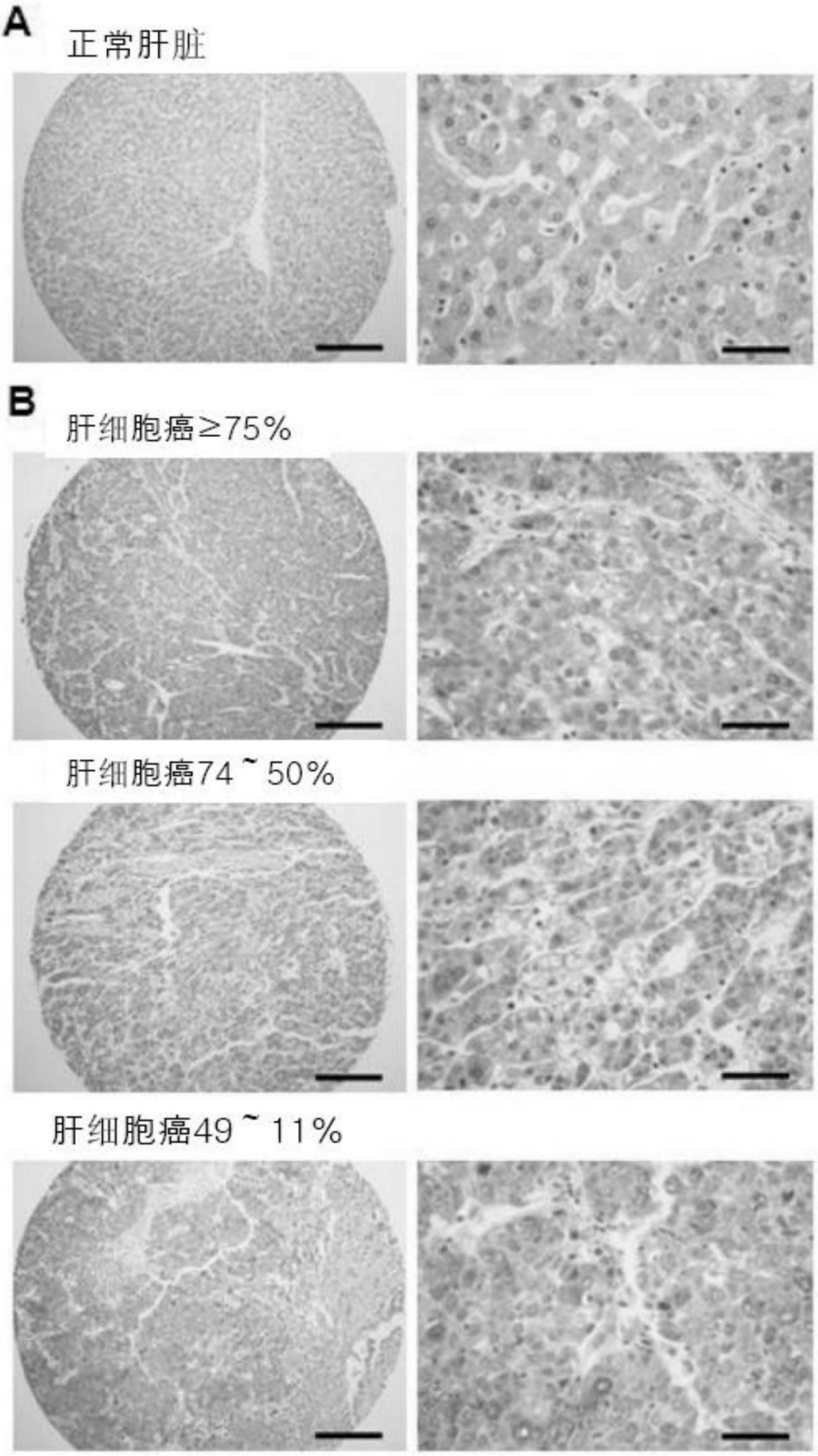


图4

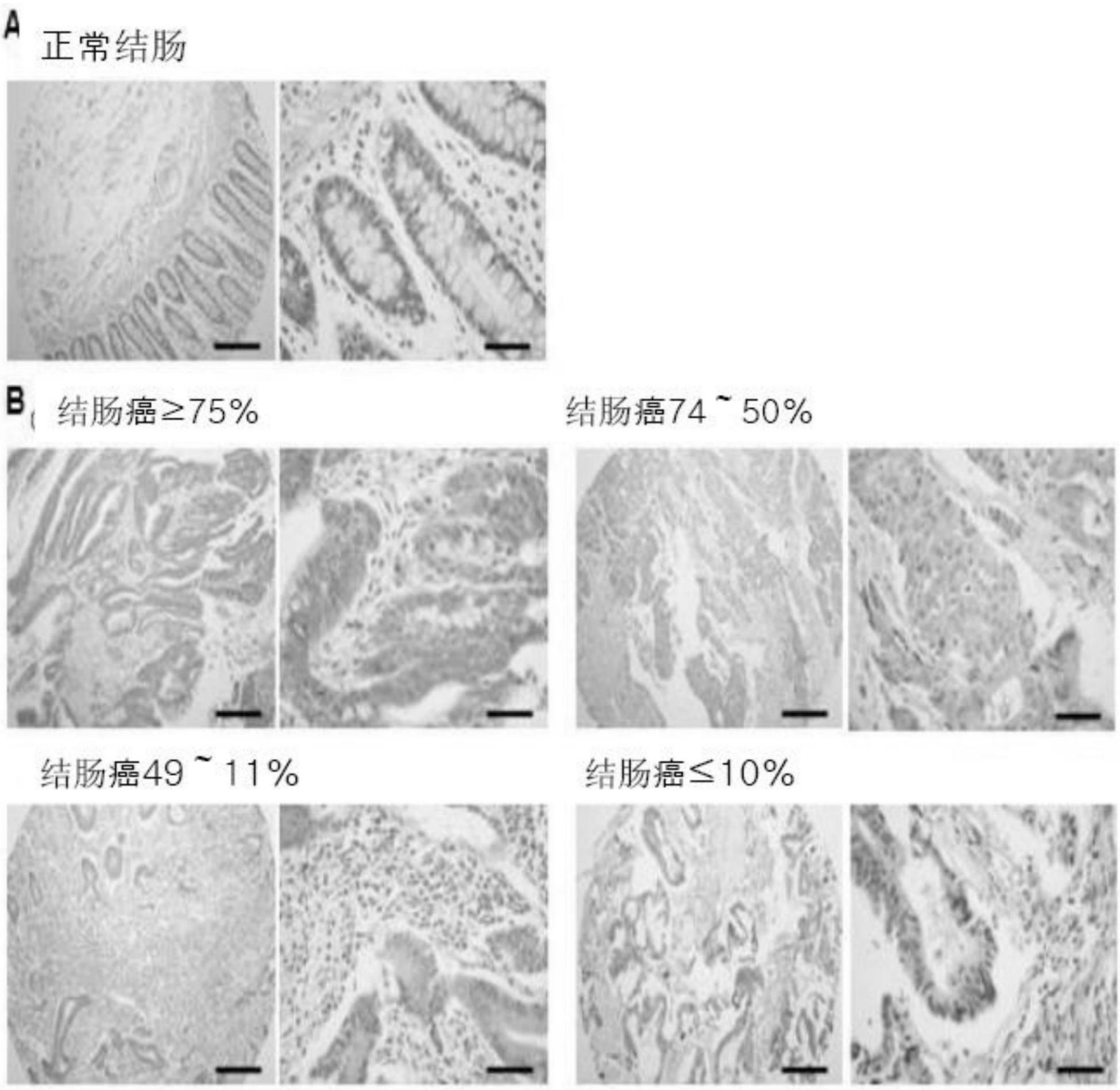


图5a

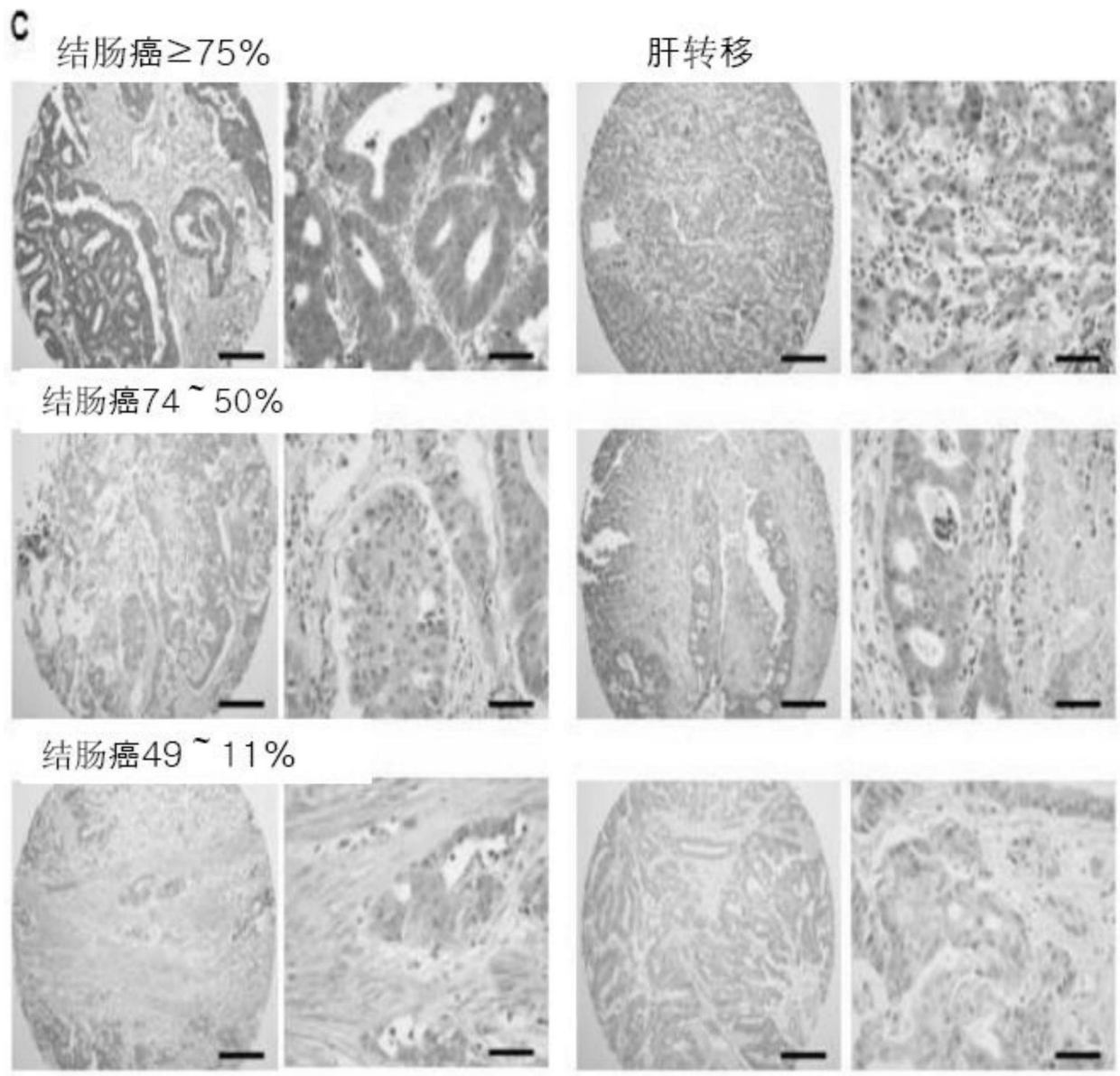


图5b

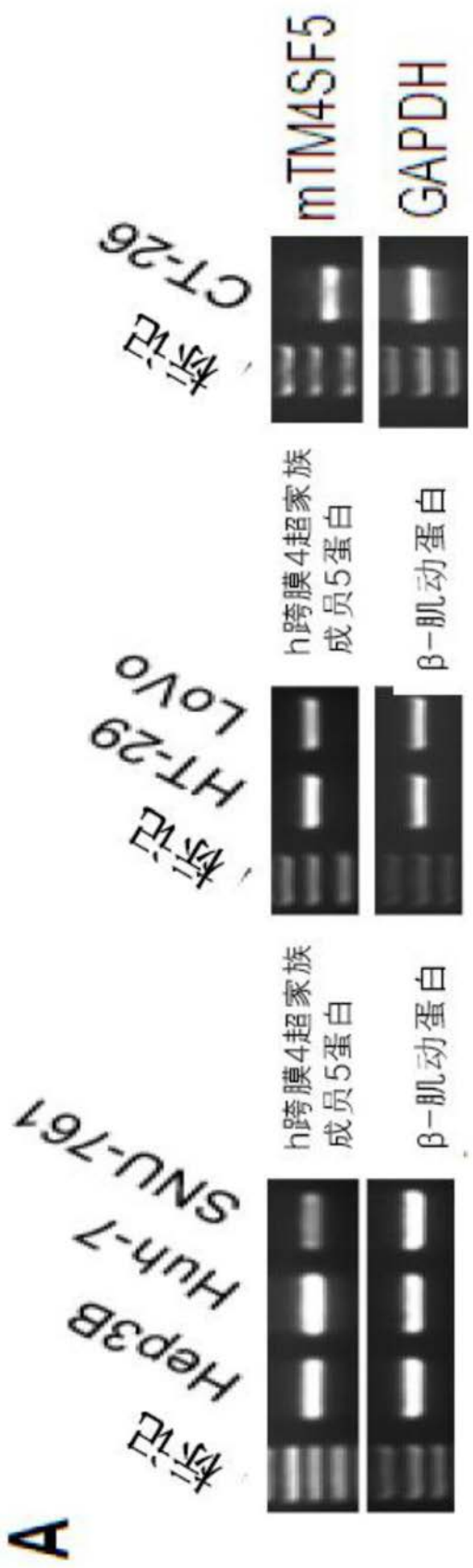

A
标记
Hep3B
Huh-7
SNU-761
h跨膜4超家族
成员5蛋白
β-肌动蛋白
标记
HT-29
LoVo
h跨膜4超家族
成员5蛋白
β-肌动蛋白
标记
CT-26
mTM4SF5
GAPDH

图6a

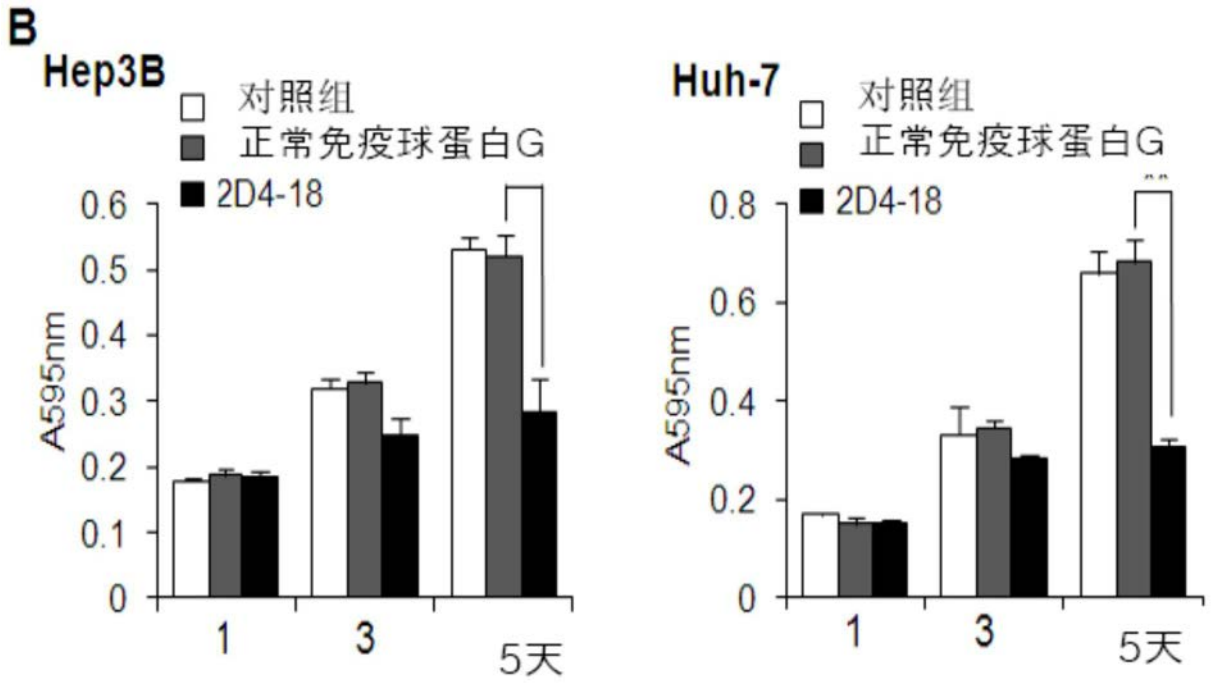

B
Hep3B
对照组
正常免疫球蛋白G
2D4-18
A595nm
0.6
0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
0
1
3
5天
Huh-7
对照组
正常免疫球蛋白G
2D4-18
A595nm
0.8
0.6
0.4
0.2
0
1
3
5天

图6b

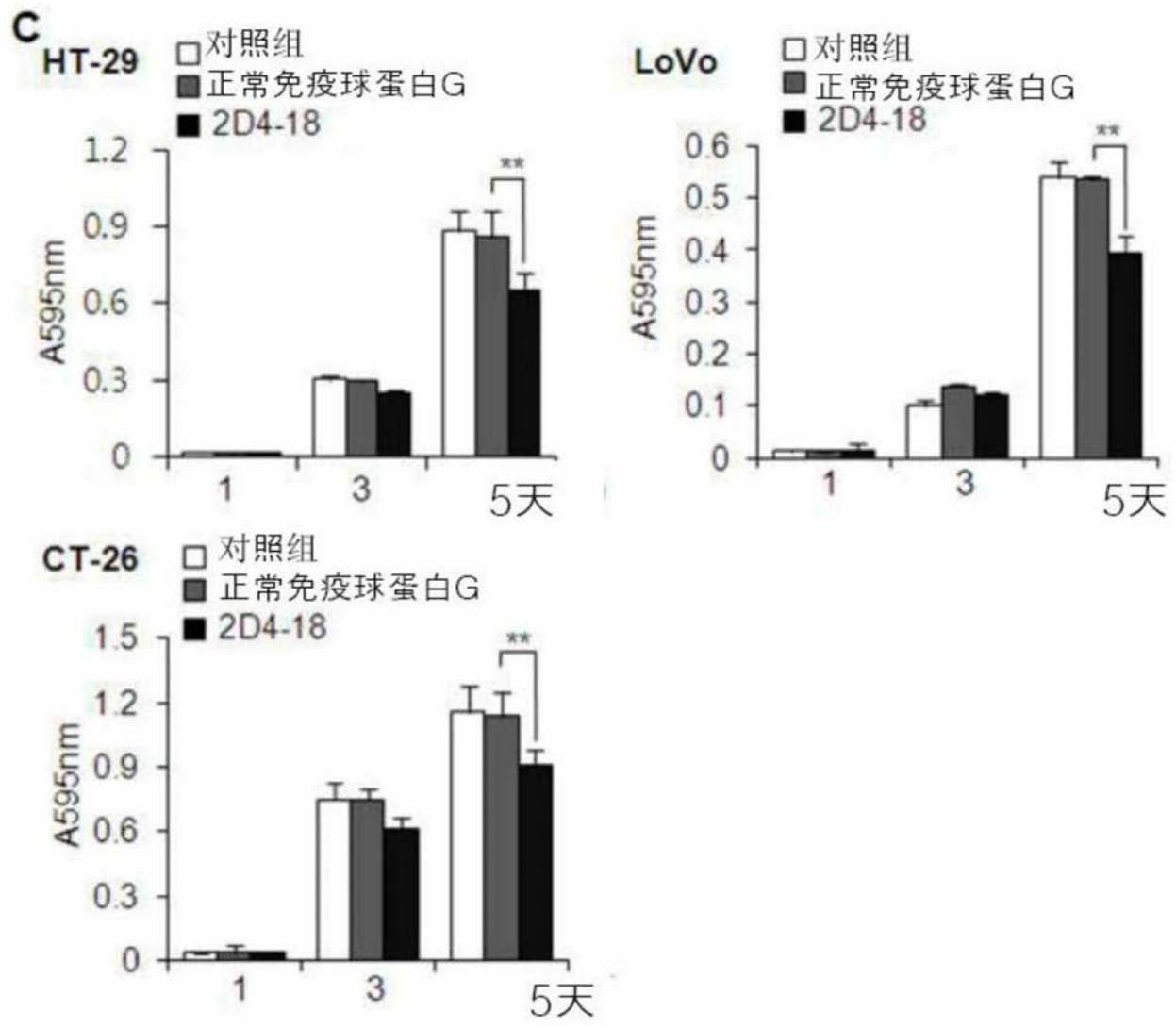

C
HT-29
对照组
正常免疫球蛋白G
2D4-18
A595nm
1.2
0.9
0.6
0.3
0
1
3
5天
**
LoVo
对照组
正常免疫球蛋白G
2D4-18
A595nm
0.6
0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
0
1
3
5天
**
CT-26
对照组
正常免疫球蛋白G
2D4-18
A595nm
1.5
1.2
0.9
0.6
0.3
0
1
3
5天
**

图6c

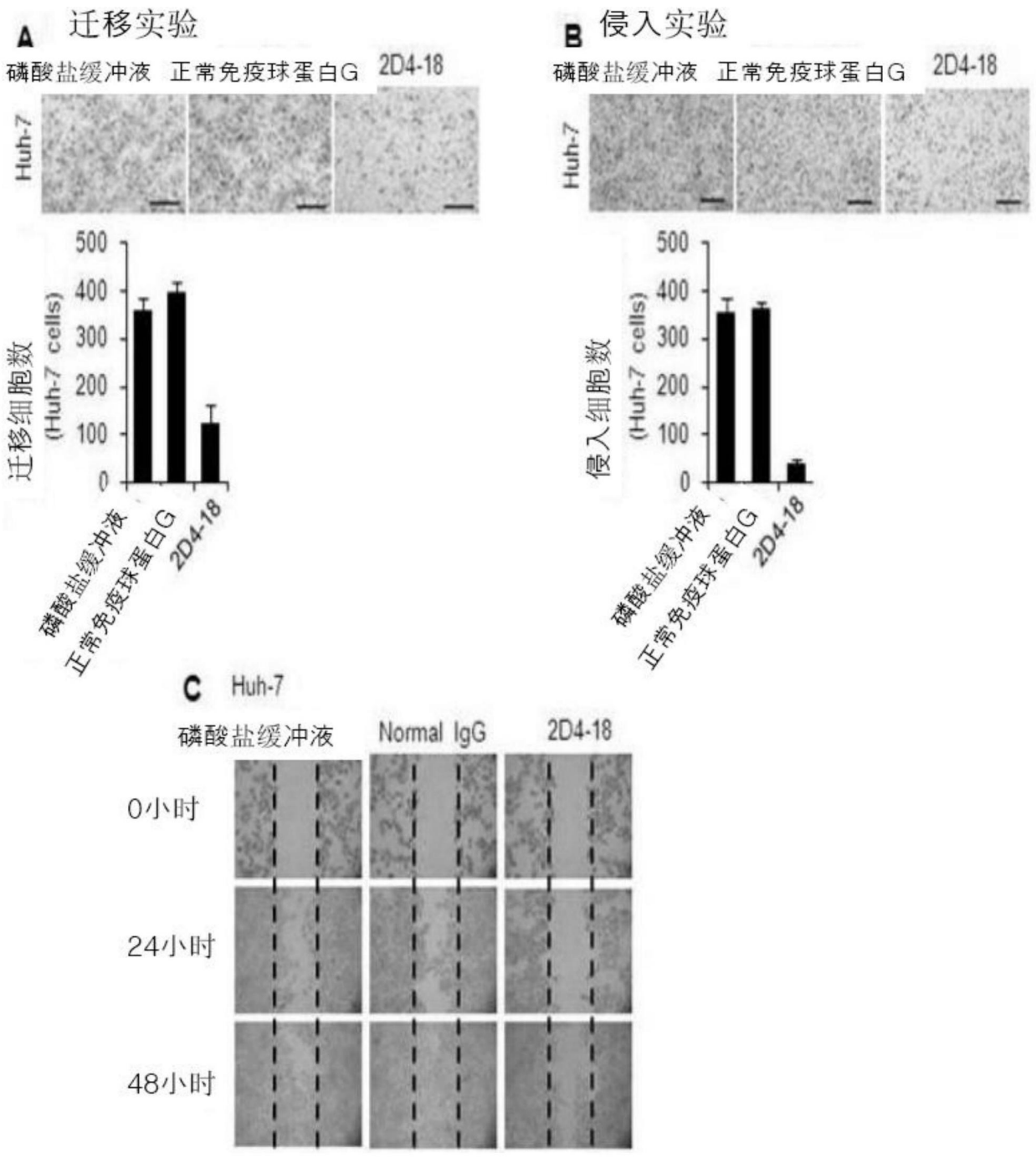

A 迁移实验
磷酸盐缓冲液 正常免疫球蛋白G 2D4-18
Huh-7
迁移细胞数 (Huh-7 cells)
500
400
300
200
100
0
磷酸盐缓冲液
正常免疫球蛋白G
2D4-18
B 侵入实验
磷酸盐缓冲液 正常免疫球蛋白G 2D4-18
Huh-7
侵入细胞数 (Huh-7 cells)
500
400
300
200
100
0
磷酸盐缓冲液
正常免疫球蛋白G
2D4-18
C Huh-7
磷酸盐缓冲液 Normal IgG 2D4-18
0小时
24小时
48小时

图7

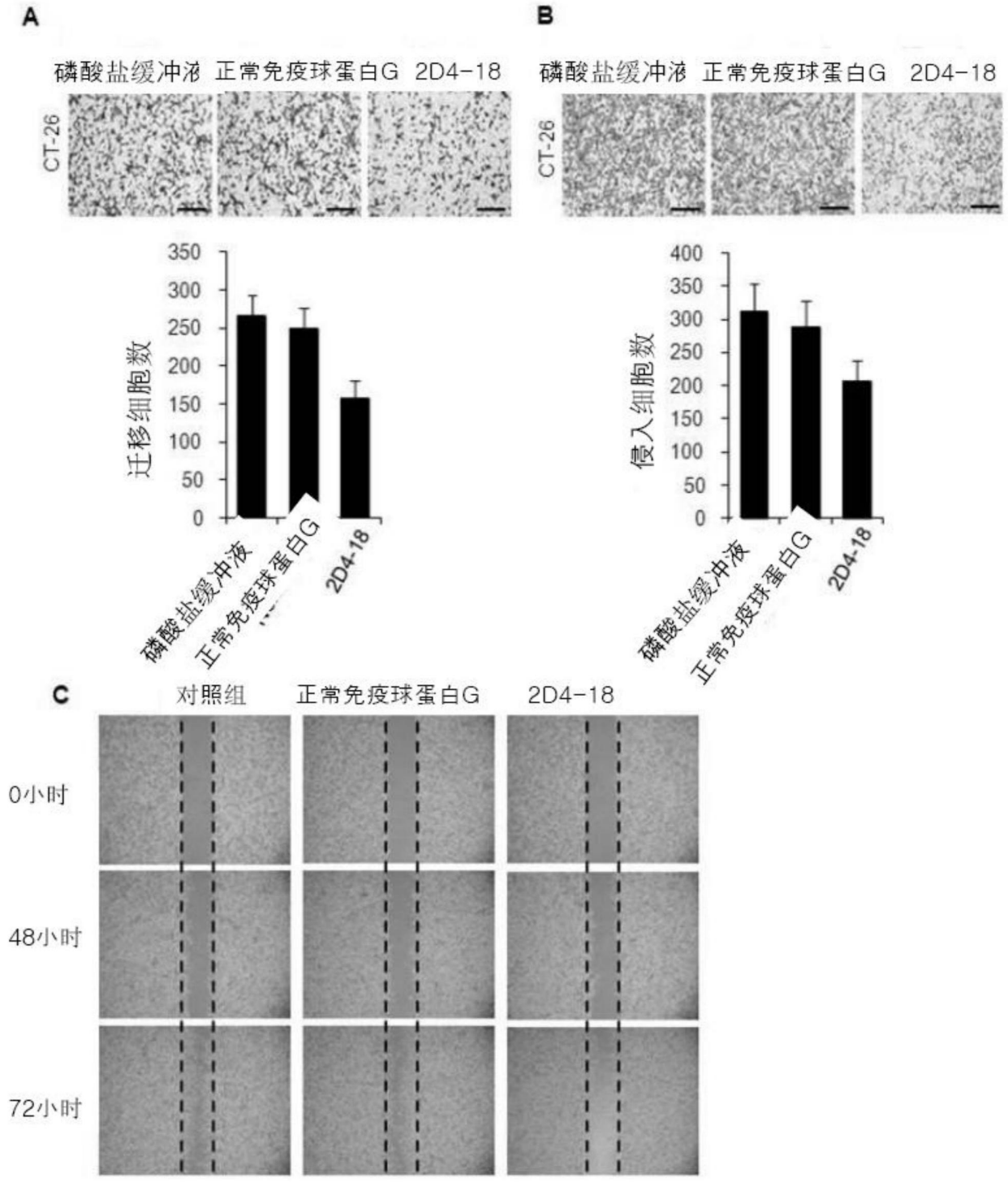

A
磷酸盐缓冲液
正常免疫球蛋白G
2D4-18
CT-26
迁移细胞数
350
300
250
200
150
100
50
0
磷酸盐缓冲液
正常免疫球蛋白G
2D4-18
B
磷酸盐缓冲液
正常免疫球蛋白G
2D4-18
CT-26
侵入细胞数
400
350
300
250
200
150
100
50
0
磷酸盐缓冲液
正常免疫球蛋白G
2D4-18
C
对照组
正常免疫球蛋白G
2D4-18
0小时
48小时
72小时

图8

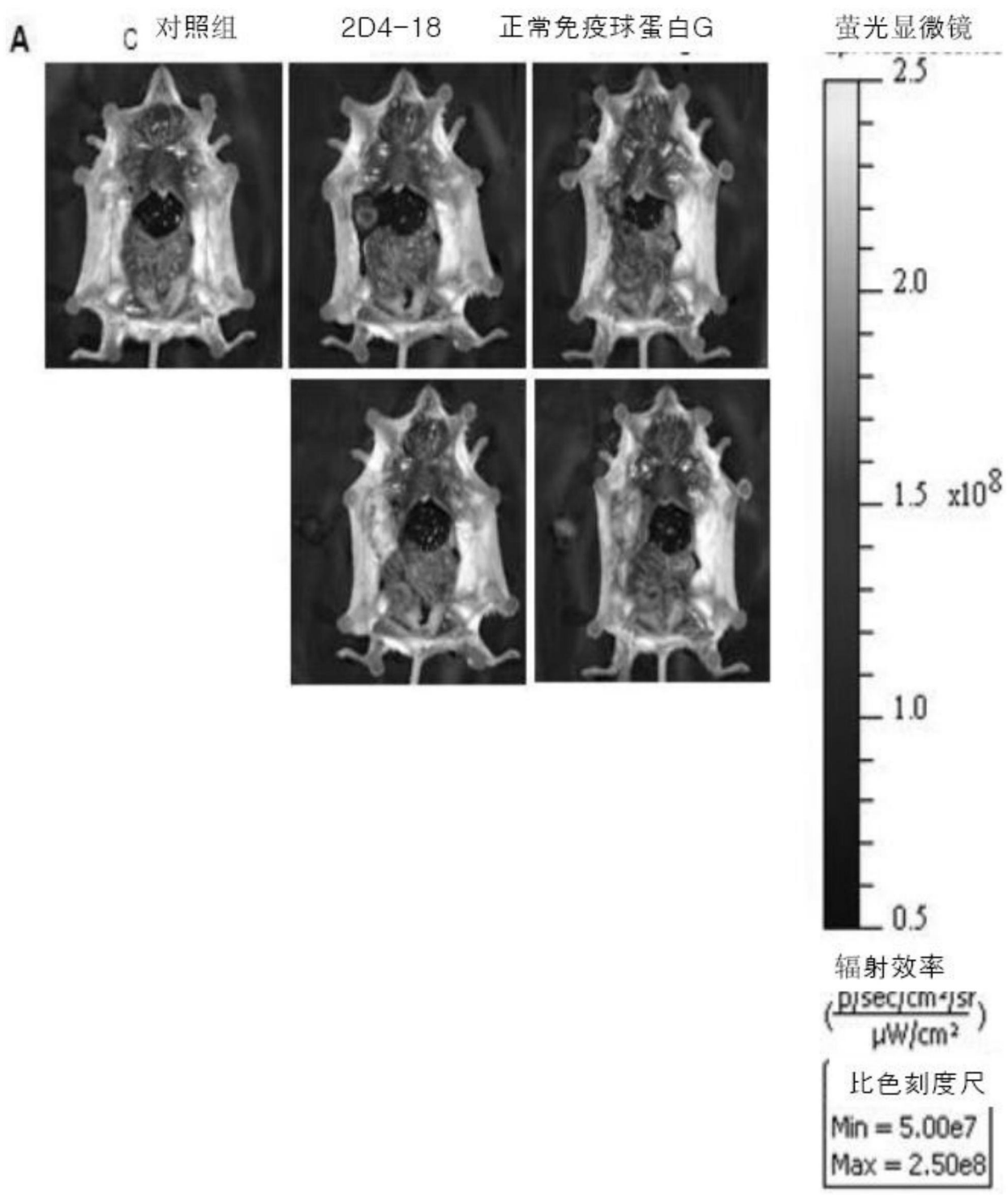

A
C
对照组
2D4-18
正常免疫球蛋白G
荧光显微镜
2.5
2.0
1.5 x10^8
1.0
0.5
辐射效率
(p/sec/cm²/sr / μW/cm²)
比色刻度尺
Min = 5.00e7
Max = 2.50e8

图9a

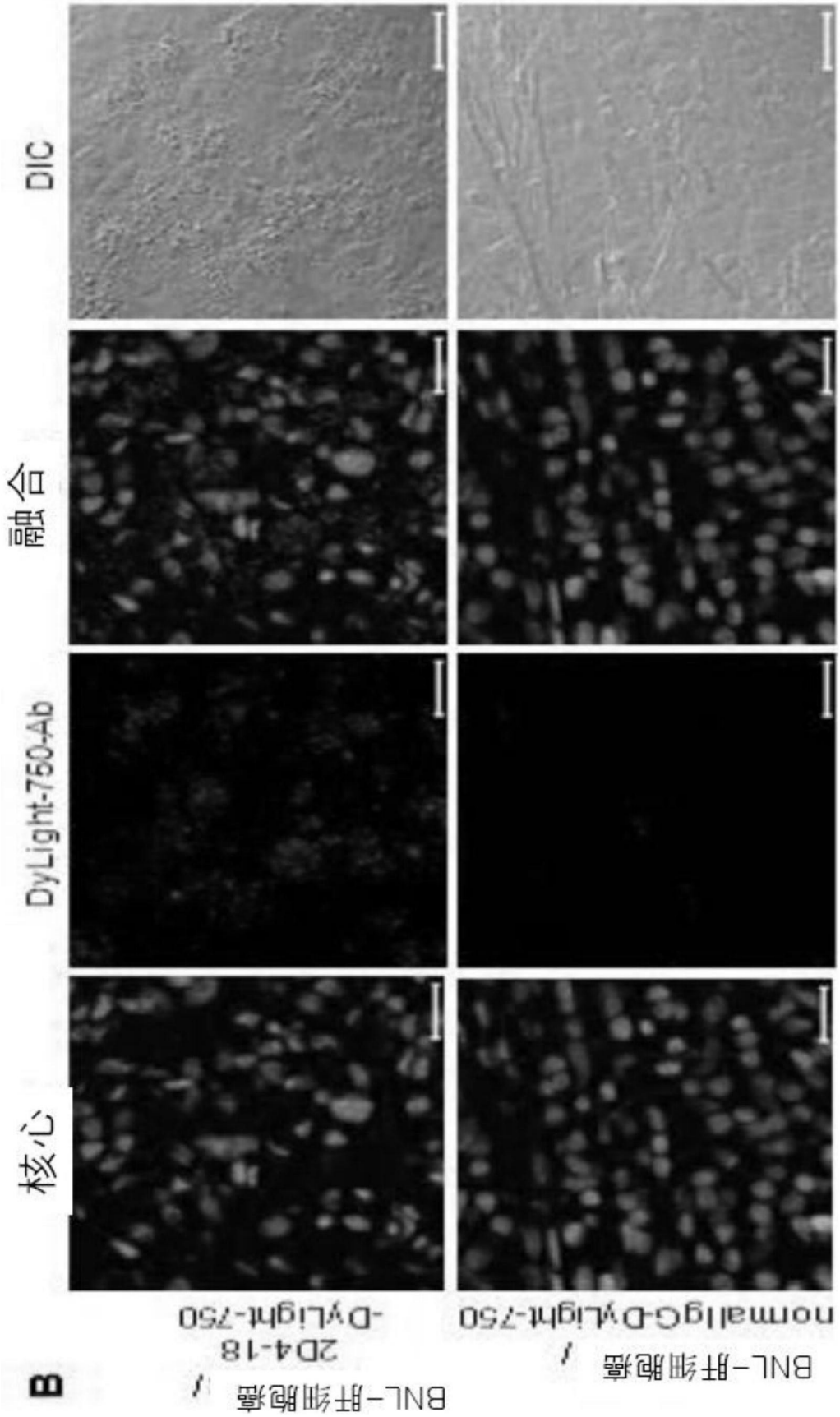

B
BNL-肝细胞癌 /
2D4-18
-DyLight-750
normalIgG-DyLight-750
BNL-肝细胞癌 /
核心
DyLight-750-Ab
融合
DIC

图9b

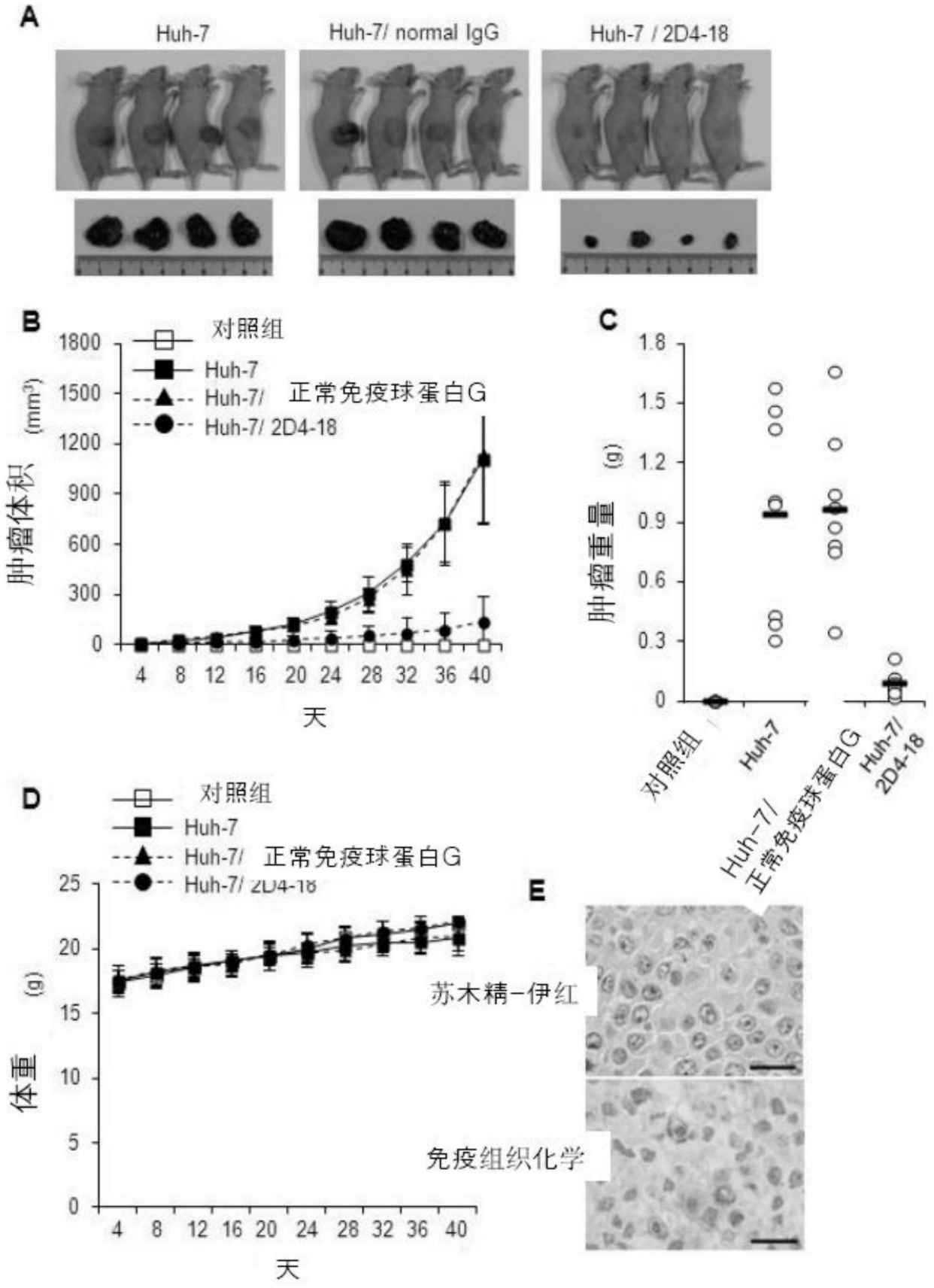

A
Huh-7
Huh-7/ normal IgG
Huh-7 / 2D4-18
B
对照组
Huh-7
Huh-7/ 正常免疫球蛋白G
Huh-7/ 2D4-18
肿瘤体积 (mm³)
1800
1500
1200
900
600
300
0
4 8 12 16 20 24 28 32 36 40
天
C
肿瘤重量 (g)
1.8
1.5
1.2
0.9
0.6
0.3
0
对照组
Huh-7
Huh-7/ 正常免疫球蛋白G
Huh-7/ 2D4-18
D
对照组
Huh-7
Huh-7/ 正常免疫球蛋白G
Huh-7/ 2D4-18
体重 (g)
25
20
15
10
5
0
4 8 12 16 20 24 28 32 36 40
天
E
苏木精-伊红
免疫组织化学

图10

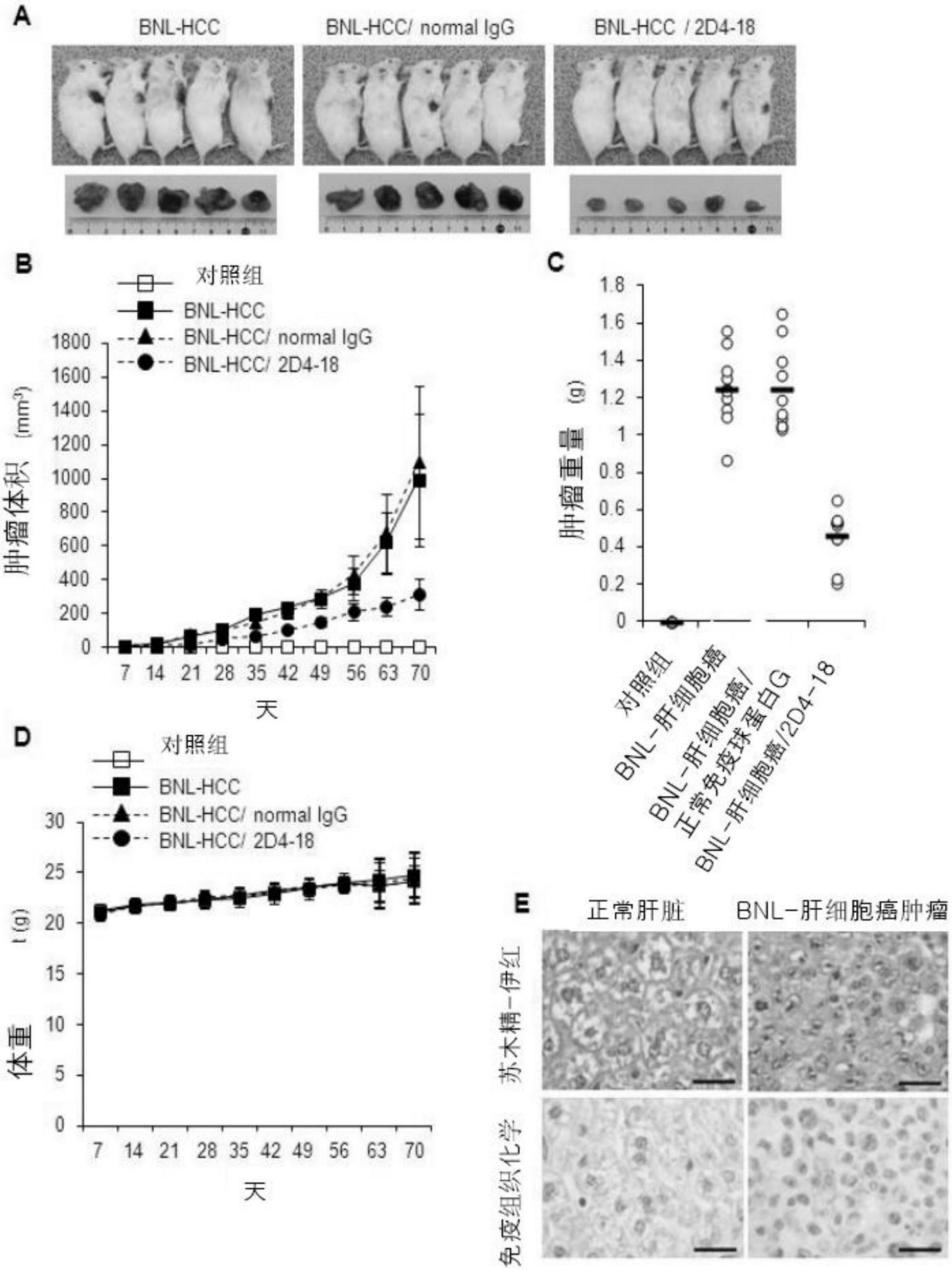

A
BNL-HCC
BNL-HCC/ normal IgG
BNL-HCC / 2D4-18
B
对照组
BNL-HCC
BNL-HCC/ normal IgG
BNL-HCC/ 2D4-18
肿瘤体积 (mm³)
1800
1600
1400
1200
1000
800
600
400
200
0
7 14 21 28 35 42 49 56 63 70
天
C
肿瘤重量 (g)
1.8
1.6
1.4
1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
对照组
BNL-肝细胞癌
BNL-肝细胞癌/正常免疫球蛋白G
BNL-肝细胞癌/2D4-18
D
对照组
BNL-HCC
BNL-HCC/ normal IgG
BNL-HCC/ 2D4-18
体重 t (g)
30
25
20
15
10
5
0
7 14 21 28 35 42 49 56 63 70
天
E
正常肝脏
BNL-肝细胞癌肿瘤
苏木精-伊红
免疫组织化学

图11

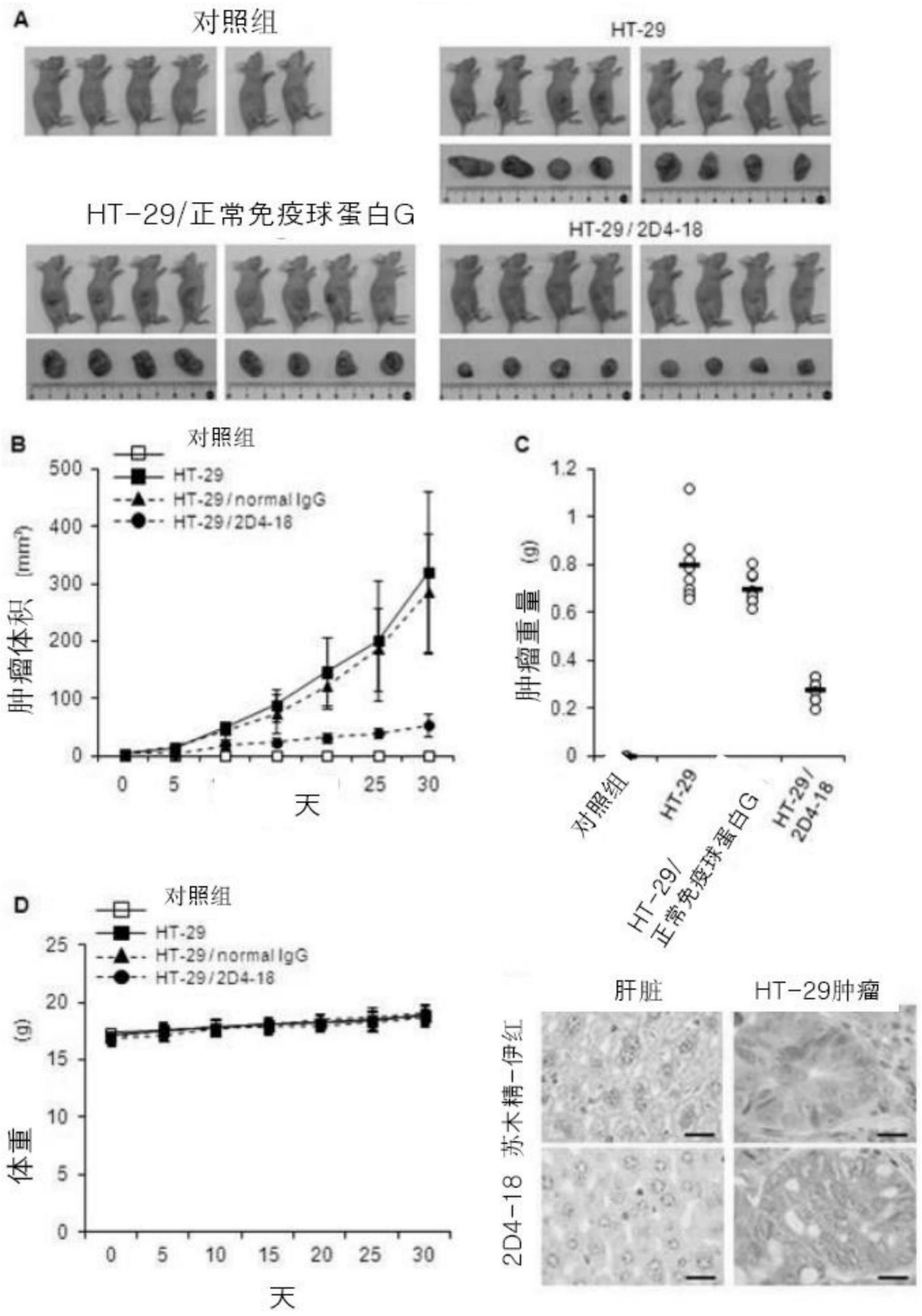

A
对照组
HT-29
HT-29/正常免疫球蛋白G
HT-29/2D4-18
B
对照组
HT-29
HT-29/normal IgG
HT-29/2D4-18
肿瘤体积 (mm³)
天
C
肿瘤重量 (g)
对照组
HT-29
HT-29/正常免疫球蛋白G
HT-29/2D4-18
D
对照组
HT-29
HT-29/normal IgG
HT-29/2D4-18
体重 (g)
天
肝脏
HT-29肿瘤
苏木精-伊红
2D4-18

图12

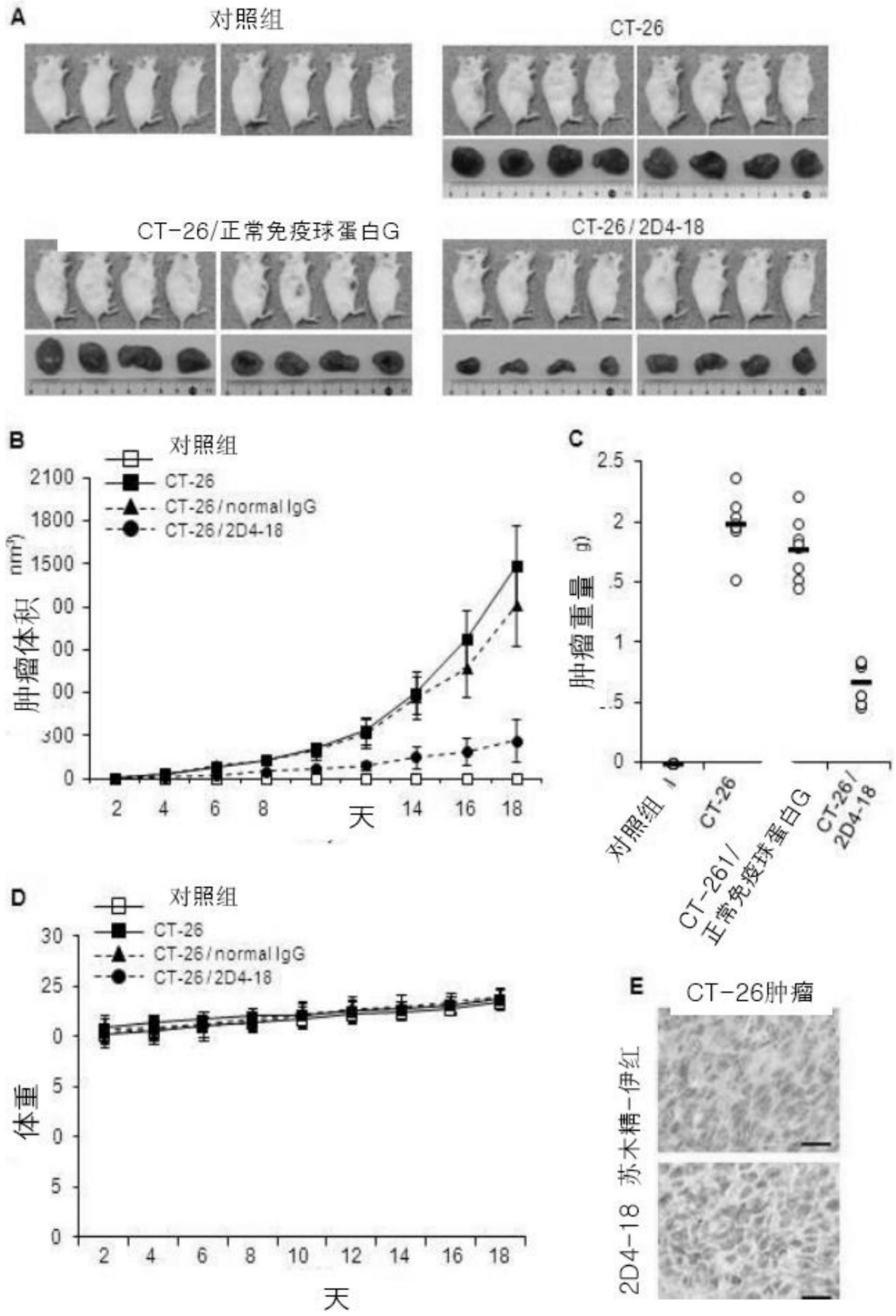

A
对照组
CT-26
CT-26/正常免疫球蛋白G
CT-26/2D4-18
B
对照组
CT-26
CT-26/normal IgG
CT-26/2D4-18
肿瘤体积
天
C
肿瘤重量
对照组
CT-26
CT-26/正常免疫球蛋白G
CT-26/2D4-18
D
对照组
CT-26
CT-26/normal IgG
CT-26/2D4-18
体重
天
E
CT-26肿瘤
2D4-18
苏木精-伊红

图13

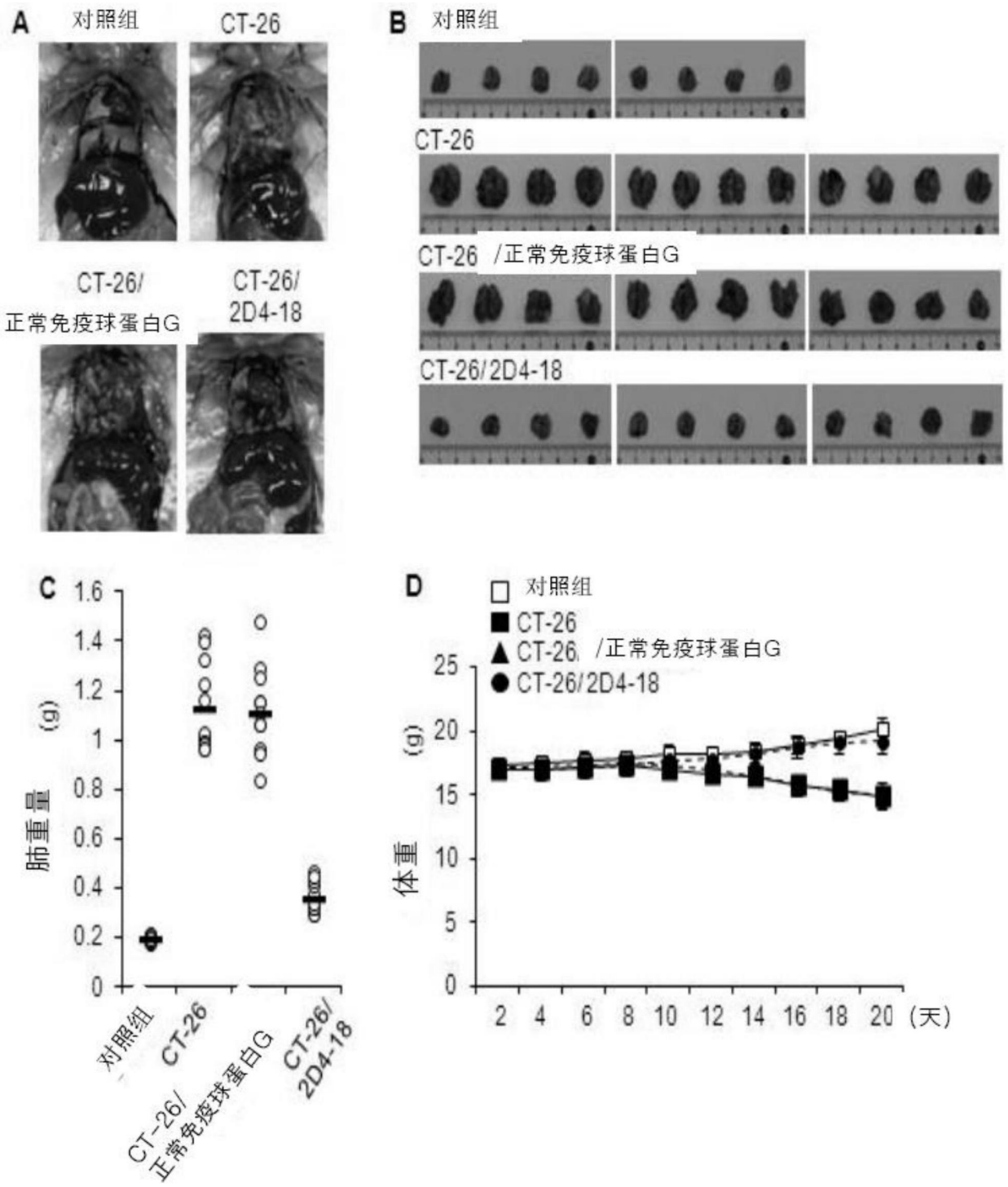

A
对照组
CT-26
CT-26/
正常免疫球蛋白G
CT-26/
2D4-18
B
对照组
CT-26
CT-26 /正常免疫球蛋白G
CT-26/2D4-18
C
肺重量 (g)
1.6
1.4
1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
对照组
CT-26
CT-26/
正常免疫球蛋白G
CT-26/
2D4-18
D
对照组
CT-26
CT-26 /正常免疫球蛋白G
CT-26/2D4-18
体重 (g)
25
20
15
10
5
0
2 4 6 8 10 12 14 16 18 20 (天)

图14

A

2D4-18重链可变域（V_H）

```
gggagacttagtgaagcctggagggtccctgaaactctcctgtgcagcctctggattcact
  G   D   L   V   K   P   G   G   S   L   K   L   S   C   A   A   S   G   F   T
ttcagtagctatggcatgtcttgggttcgccagactccagacaagaggctggagtgggtc
 F   S   S   Y   G   M   S   W   V   R   Q   T   P   D   K   R   L   E   W   V
gcaaccattagtagtggtggtggttacacctactatccagacagtgtgaaggggcgattc
 A   T   I   S   S   G   G   G   Y   T   Y   Y   P   D   S   V   K   G   R   F
accatctccagagacaatgccaagaacaccctgtacctgcaaatgcgcagtctgaagtct
 T   I   S   R   D   N   A   K   N   T   L   Y   L   Q   M   R   S   L   K   S
gaggacacagccatgtattactgtgcaagacatgagggctttacgacgtactactttgac
 E   D   T   A   M   Y   Y   C   A   R   H   E   G   F   T   T   Y   Y   F   D
tactggggccaaggcaccactctcacagtctcctcag
 Y   W   G   Q   G   T   T   L   T   V   S   S
```

B

2D4-18轻链可变域（V_L）

```
ctctccctgcctgtcagtcttggagatcaagcctccatctcttgcagatctagtcagagc
 L   S   L   P   V   S   L   G   D   Q   A   S   I   S   C   R   S   S   Q   S
attttacatagttctggaaacacctatttagaatggtacctgcagaaaccaggccagtct
 I   L   H   S   S   G   N   T   Y   L   E   W   Y   L   Q   K   P   G   Q   S
ccaaagctcctgatctacaaagtttccaaccgattttctggggtcccagacaggttcagt
 P   K   L   L   I   Y   K   V   S   N   R   F   S   G   V   P   D   R   F   S
ggcagtggatcagggacagatttcacactcaagatcagcagagtggaggctgaggatctg
 G   S   G   S   G   T   D   F   T   L   K   I   S   R   V   E   A   E   D   L
ggagtttattactgctttcaaggttcacatgttccattcacgttcggctcggggacaaag
 G   V   Y   Y   C   F   Q   G   S   H   V   P   F   T   F   G   S   G   T   K
ttggaaataaaacggg
 L   E   I   K   R
```

图15

A

2D4-18（1）重链可变域（V_H）

```
caggtccagctggagcagtctgg
 Q  V  Q  L  E  Q  S  G

gggagacttagtgaagcctggagggtccctgaaactctcctgtgcagcctctggattcact
  G  D  L  V  K  P  G  G  S  L  K  L  S  C  A  A  S  G  F  T
ttcagtagctatggcatgtcttgggttcgccagactccagacaagaggctggagtgggtc
 F  S  S  Y  G  M  S  W  V  R  Q  T  P  D  K  R  L  E  W  V
gcaaccattagtagtggtggtggttacacctactatccagacagtgtgaaggggcgattc
 A  T  I  S  S  G  G  G  Y  T  Y  Y  P  D  S  V  K  G  R  F
accatctccagagacaatgccaagaacaccctgtacctgcaaatgcgcagtctgaagtct
 T  I  S  R  D  N  A  K  N  T  L  Y  L  Q  M  R  S  L  K  S
gaggacacagccatgtattactgtgcaagacatgagggctttacgacgtactactttgac
 E  D  T  A  M  Y  Y  C  A  R  H  E  G  F  T  T  Y  Y  F  D
tactggggccaaggcaccactctcacagtctcctcag
 Y  W  G  Q  G  T  T  L  T  V  S  S
```

B

2D4-18（1）轻链可变域（V_L）

```
gatattgtgatgacccagtctcca
 D  I  V  M  T  Q  S  P
ctctccctgcctgtcagtcttggagatcaagcctccatctcttgcagatctagtcagagc
 L  S  L  P  V  S  L  G  D  Q  A  S  I  S  C  R  S  S  Q  S
attttacatagttctggaaacacctatttagaatggtacctgcagaaaccaggccagtct
 I  L  H  S  S  G  N  T  Y  L  E  W  Y  L  Q  K  P  G  Q  S
ccaaagctcctgatctacaaagtttccaaccgattttctggggtcccagacaggttcagt
 P  K  L  L  I  Y  K  V  S  N  R  F  S  G  V  P  D  R  F  S
ggcagtggatcagggacagatttcacactcaagatcagcagagtggaggctgaggatctg
 G  S  G  S  G  T  D  F  T  L  K  I  S  R  V  E  A  E  D  L
ggagtttattactgctttcaaggttcacatgttccattcacgttcggctcggggacaaag
 G  V  Y  Y  C  F  Q  G  S  H  V  P  F  T  F  G  S  G  T  K
ttggaaataaaacggg
 L  E  I  K  R
```

图16

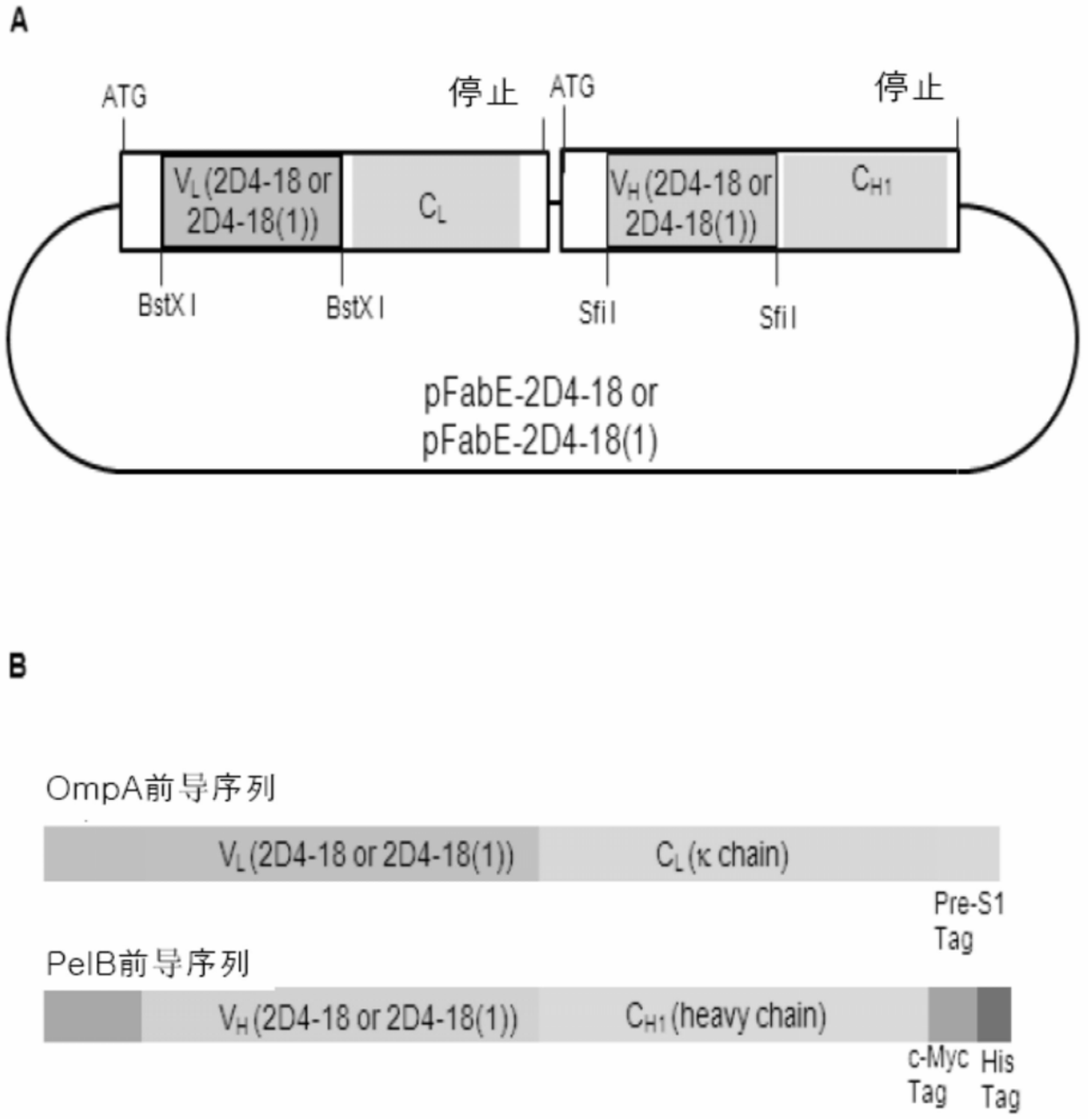

A
ATG
停止
ATG
停止
VL(2D4-18 or 2D4-18(1))
CL
VH(2D4-18 or 2D4-18(1))
CH1
BstX I
BstX I
Sfi I
Sfi I
pFabE-2D4-18 or
pFabE-2D4-18(1)
B
OmpA前导序列
VL(2D4-18 or 2D4-18(1))
CL(κ chain)
Pre-S1
Tag
PelB前导序列
VH(2D4-18 or 2D4-18(1))
CH1(heavy chain)
c-Myc
Tag
His
Tag

图17

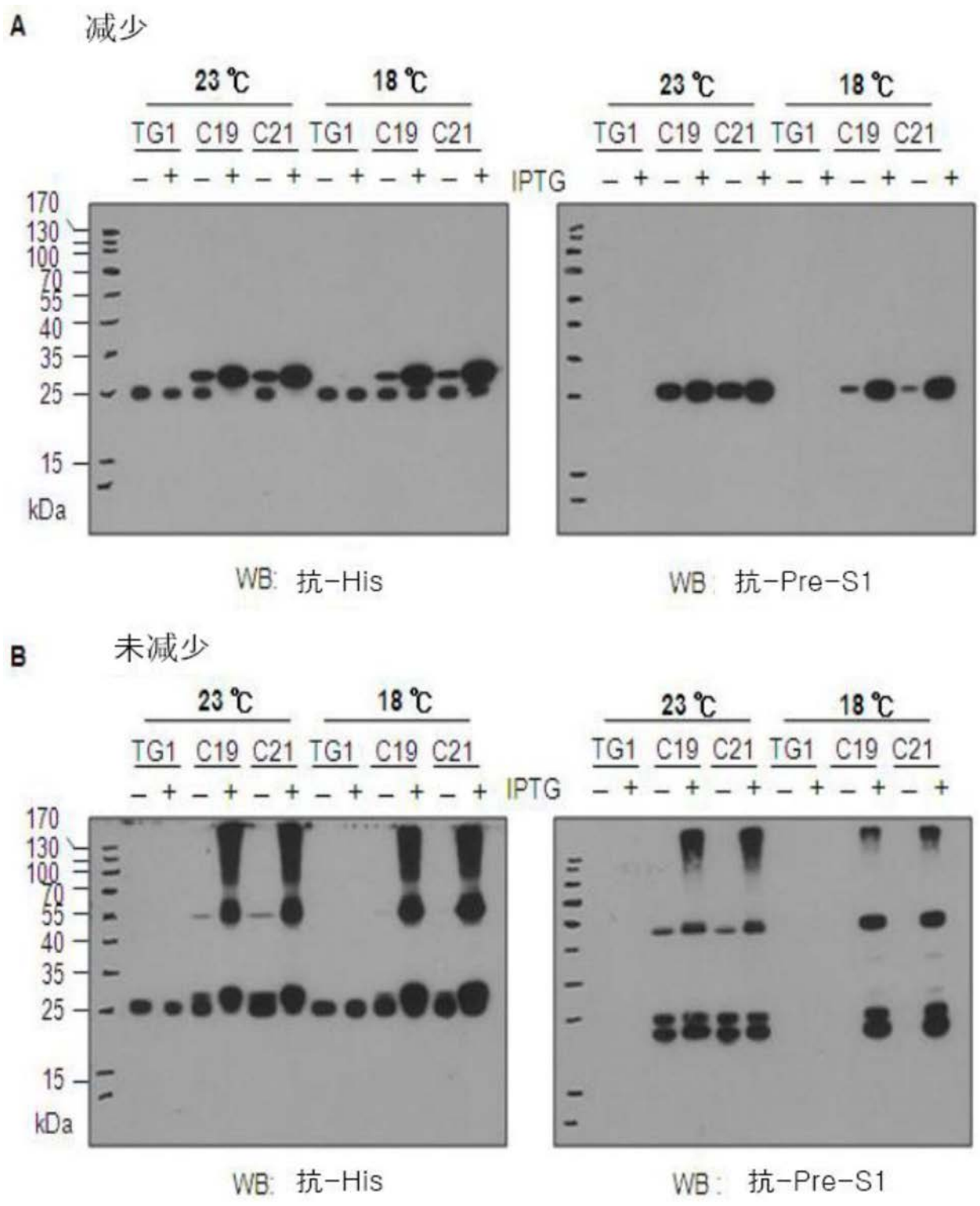

A
减少
23℃
18℃
TG1 C19 C21 TG1 C19 C21
IPTG
170
130
100
70
55
40
35
25
15
kDa
WB: 抗-His
WB: 抗-Pre-S1
B
未减少
WB: 抗-His
WB: 抗-Pre-S1

图18

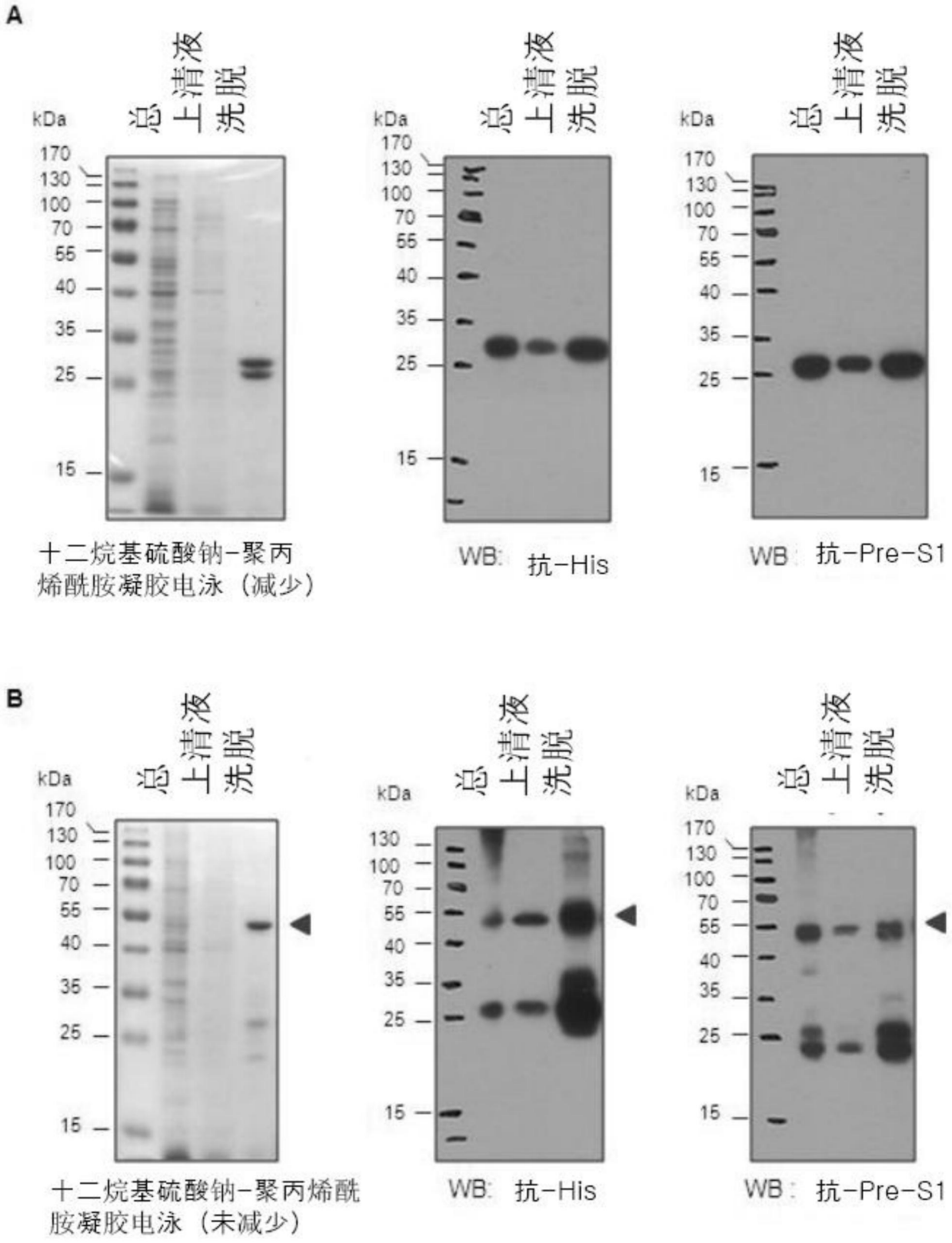

A
总
上清液
洗脱
kDa
170
130
100
70
55
40
35
25
15
十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳（减少）
WB: 抗-His
WB: 抗-Pre-S1
B
十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳（未减少）
WB: 抗-His
WB: 抗-Pre-S1

图19

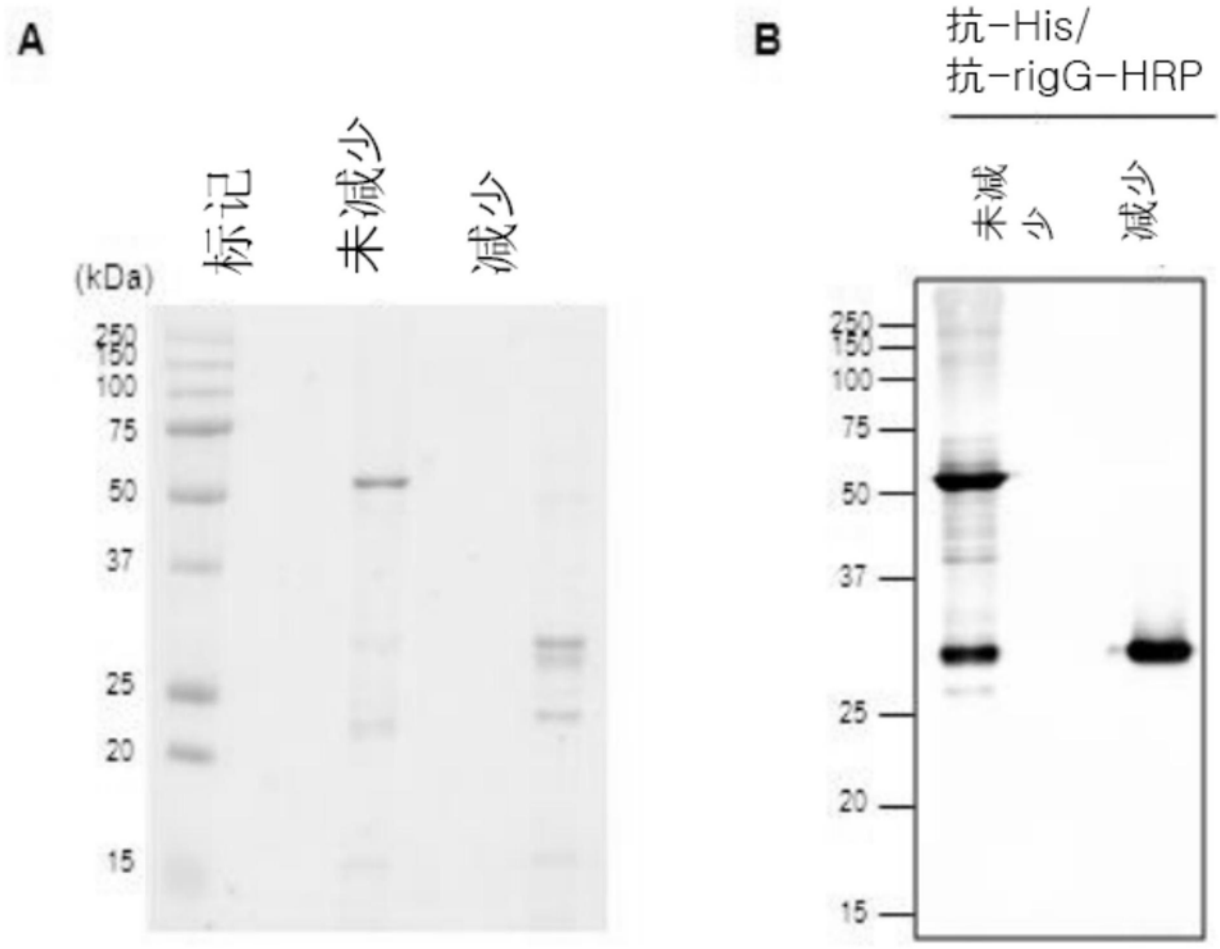

A
标记
未减少
减少
(kDa)
250
150
100
75
50
37
25
20
15
B
抗-His/
抗-rigG-HRP
未减少
减少
250
150
100
75
50
37
25
20
15

图20

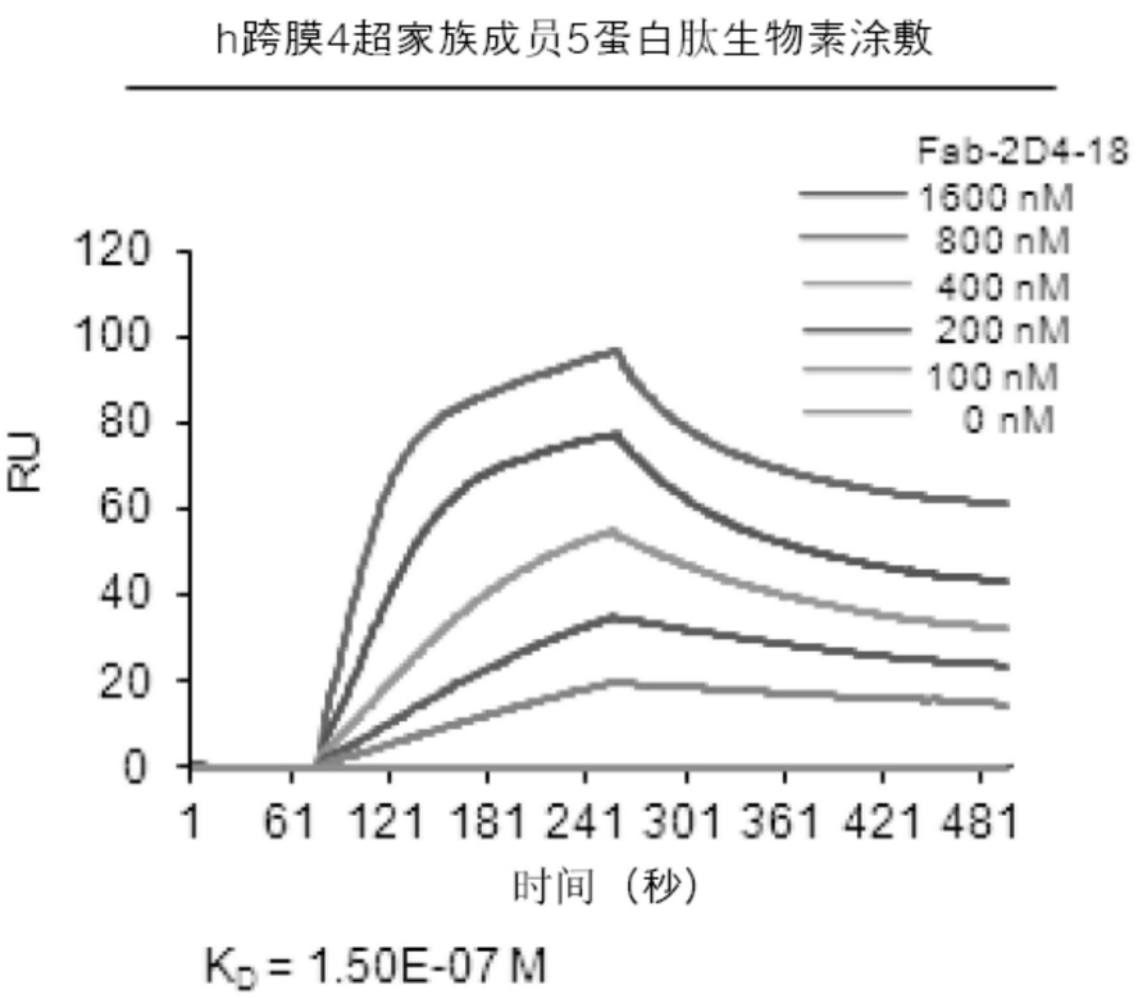

h跨膜4超家族成员5蛋白肽生物素涂敷
Fab-2D4-18
1600 nM
800 nM
400 nM
200 nM
100 nM
0 nM
RU
120
100
80
60
40
20
0
1 61 121 181 241 301 361 421 481
时间（秒）
K_D = 1.50E-07 M

图21

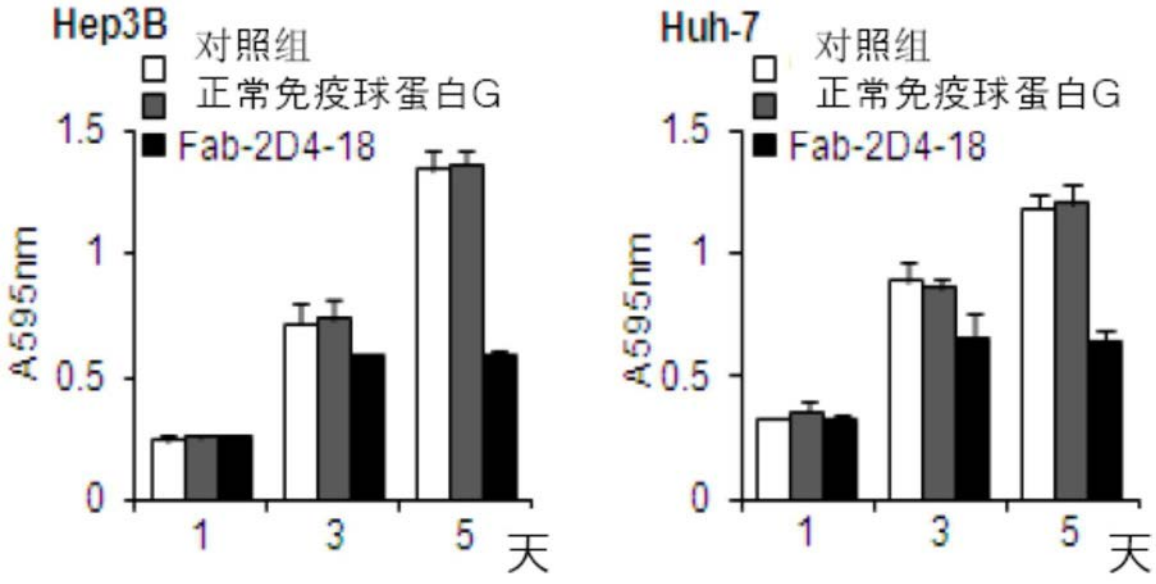

Hep3B
对照组
正常免疫球蛋白G
Fab-2D4-18
A595nm
1.5
1
0.5
0
1 3 5 天
Huh-7
对照组
正常免疫球蛋白G
Fab-2D4-18
A595nm
1.5
1
0.5
0
1 3 5 天

图22

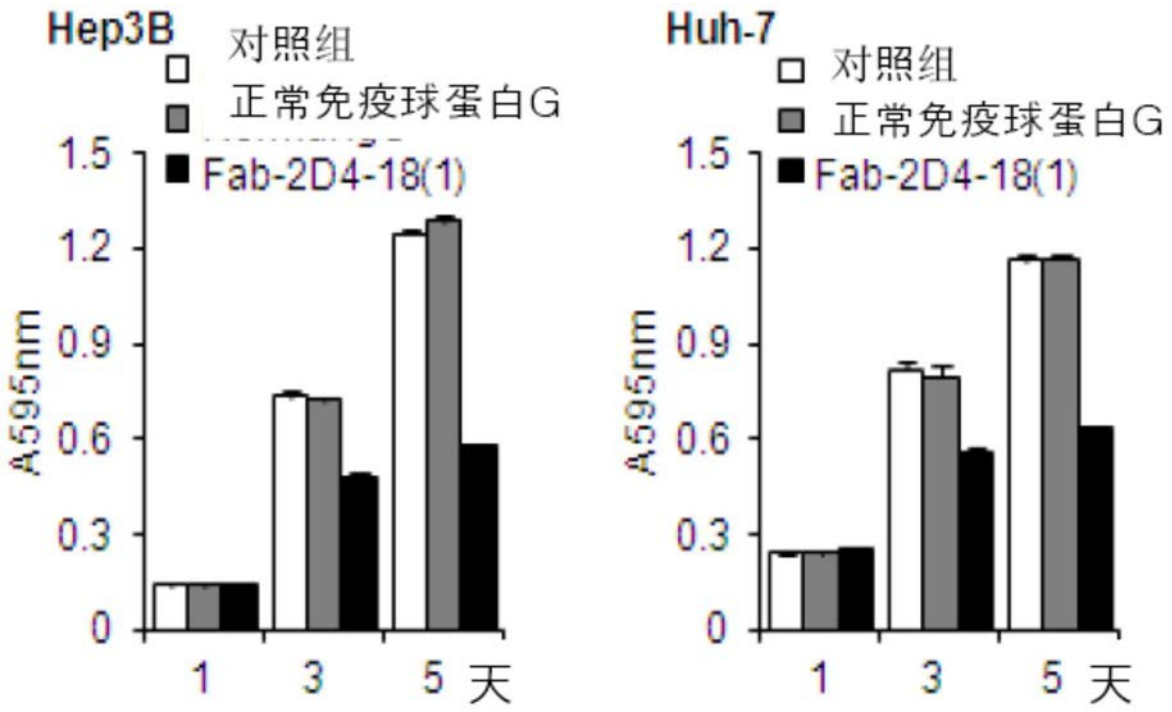

Hep3B
对照组
正常免疫球蛋白G
Fab-2D4-18(1)
A595nm
1.5
1.2
0.9
0.6
0.3
0
1
3
5
天
Huh-7
对照组
正常免疫球蛋白G
Fab-2D4-18(1)
A595nm
1.5
1.2
0.9
0.6
0.3
0
1
3
5
天

图23