(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 111902425 A
(43)申请公布日 2020.11.06

(21)申请号 201980019653.5
(22)申请日 2019.03.18
(30)优先权数据
2018-049435 2018.03.16 JP
(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2020.09.16
(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/JP2019/011201 2019.03.18
(87)PCT国际申请的公布数据
WO2019/177173 JA 2019.09.19
(71)申请人 国立大学法人东京大学
地址 日本东京都
(72)发明人 村上善则 伊东刚 浜洼隆雄 岩成宏子
(74)专利代理机构 北京市金杜律师事务所 11256
代理人 周莎
(51)Int.Cl.
C07K 16/18(2006.01)
G01N 33/574(2006.01)
C12P 21/08(2006.01)

权利要求书1页 说明书12页
序列表17页 附图8页

(54)发明名称

CADM1 v9识别抗体

(57)摘要

本发明提供识别细胞粘附分子CADM1的v9片段的抗体。

CN 111902425 A

1.抗体,其识别CADM1的v9片段。

2.根据权利要求1所述的抗体,其中,CADM1的v9片段是人CADM1的v9片段。

3.根据权利要求1或2所述的抗体,其识别序列号2所示的氨基酸序列,所述氨基酸序列来源于为DTTATTEPAVH的CADM1外显子9。

4.抗体,其包含:

包含序列号3所示氨基酸序列的重链CDR1、和

包含序列号4所示氨基酸序列的重链CDR2、和

包含序列号5所示氨基酸序列的重链CDR3、和

包含序列号6所示氨基酸序列的轻链CDR1、和

包含序列号7所示氨基酸序列的轻链CDR2、和

包含序列号8所示氨基酸序列的轻链CDR3。

5.抗体,其包含:

包含序列号9所示氨基酸序列的重链;和

包含序列号10所示氨基酸序列的轻链。

6.肿瘤检测用标志物,其包含权利要求1至5中任一项所述的抗体。

7.根据权利要求6所述的肿瘤检测用标志物,用于检测与CADM1的v9片段相关的肿瘤。

8.根据权利要求6或7所述的肿瘤检测用标志物,其中,与CADM1的v9片段相关的肿瘤是小细胞肺癌。

9.根据权利要求6至8中任一项所述的肿瘤检测用标志物,其中,以血清、血浆、胸水中的任一者作为生物试样。

10.肿瘤检测用试剂盒,其包含权利要求1至5中任一项所述的抗体、或权利要求6至9中任一项所述的肿瘤检测用标志物。

11.根据权利要求10所述的肿瘤检测用试剂盒,其中,将所述抗体或所述肿瘤检测用标志物用于ELISA法、CLEIA法、荧光抗体法、酶抗体法、Western印迹法、免疫沉淀法中的任一者。

CADM1 v9识别抗体

技术领域

[0001] 本发明涉及CADM1 v9识别抗体。

背景技术

[0002] 小细胞肺癌(small cell lung cancer,SCLC)是代表性的难治癌症,其占日本肺癌的约15%,年死亡1万人以上。SCLC虽然对作为首次化疗的抗癌剂应答良好,但之后必然会出现抗癌剂耐受性肿瘤。而且,小细胞肺癌从早期就开始向全身转移,并且缺乏作为灵敏的病情标志物的肿瘤检测用标志物,因此其5年生存率低至不足10%,预后不良。

[0003] 对于SCLC的治疗而言,用于抗癌剂效果判定和复发诊断的肿瘤检测用标志物是必需的,为此在使用神经元特异性烯醇化酶(NSE)和胃泌素释放肽前体(ProGRP)。

[0004] 现有技术文献

[0005] 非专利文献

[0006] 非专利文献1:Kikuchi等,Cancer Science,2012,103(6):1051-1057

[0007] 非专利文献2:Shirakabe等,Scientific Reports,2017,7:46714

[0008] 非专利文献3:Nagara等,Biochemical and Biophysical Research Communications,2012,417(1):462-467

发明内容

[0009] 发明所要解决的课题

[0010] 然而,即使已对SCLC检测方法中的灵敏度进行了最优化,NSE的灵敏度仍为约30%以下,ProGRP的灵敏度仍为45%左右。因此,使用这两种标志物仍无法检测出的SCLC占整体的一半左右,这两种标志物成为了SCLC诊断和治疗的盲点。尤其是在早期SCLC中,NSE完全不能检测出肿瘤,ProGRP仅能检测出极少数肿瘤。因此,非常期待开发出能够检测出现有肿瘤标志物无法检测到的SCLC、进而还能检测出早期SCLC的新型肿瘤标志物。

[0011] 因此,本发明要解决的问题是提供SCLC的新型肿瘤标志物。

[0012] 用于解决课题的手段

[0013] 首先,本申请的发明人为了解决上述问题而反复进行深入研究,结果发现:细胞粘附分子CADM1在SCLC中高水平表达剪切变体v8/9,以及,该剪切变体v8/9在正常组织中于精巢中表达;CADM1 v8/9的表达促进SCLC细胞的悬浮性增殖、促进在小鼠中的致瘤性,另一方面,通过抑制其表达,成球能力、存活、增殖均被抑制(非专利文献1)。

[0014] 此外,CADM1 v8/9将被ADAM17切割而导致胞外区作为片段游离(非专利文献2),CADM1 v8/9的特征性外显子9所编码的氨基酸序列紧贴细胞膜而被包含在游离片段中。另一方面,在精巢以外的正常组织(例如上皮细胞)中,CADM1将被ADAM10切割而导致胞外区作为片段游离(非专利文献3),但因CADM1 v8/9完全不表达,因此CADM1 v8/9的特征性外显子9所编码的氨基酸序列不会紧贴细胞膜、也不会被包含在游离片段中。并且,能从精巢游离出的CADM1 v9片段难以转移到血液等中,据此,本申请的发明人发现CADM1的v9片段有望作

为SCLC诊断中的特异性分子标志物。

[0015] 然而,使用哺乳动物来制备抗CADM1抗体非常困难。人的CADM1蛋白与哺乳类实验动物(小鼠、兔等)的CADM1蛋白同源性高,而且在正常个体的血液中存在有CADM1片段,因此即使用人的CADM1蛋白对哺乳类实验动物进行免疫,也得不到抗体。因此,长期以来难以制备能特异性识别CADM1的v9片段的抗体。

[0016] 本申请的发明人发现,通过准备将CADM1基因缺陷小鼠与Balb/c品系进行2年以上回交所获得的小鼠、用CADM1的v9片段对该小鼠进行免疫,能够制备出CADM1的v9片段的特异性抗体,从而完成了本发明。

[0017] 即,本发明如下所述。

[0018] [1]抗体,其识别CADM1的v9片段。

[0019] [2]根据[1]所述的抗体,其中,所述CADM1的v9片段是人CADM1的v9片段。

[0020] [3]根据[1]或[2]所述的抗体,其识别序列号2所示的氨基酸序列,所述氨基酸序列来源于为DTTATTEPAVH的CADM1的外显子9。

[0021] [4]抗体,其包含:

[0022] 包含序列号3所示氨基酸序列的重链CDR1、和

[0023] 包含序列号4所示氨基酸序列的重链CDR2、和

[0024] 包含序列号5所示氨基酸序列的重链CDR3、和

[0025] 包含序列号6所示氨基酸序列的轻链CDR1、和

[0026] 包含序列号7所示氨基酸序列的轻链CDR2、和

[0027] 包含序列号8所示氨基酸序列的轻链CDR3。

[0028] [5]抗体,其包含:

[0029] 包含序列号9所示氨基酸序列的重链;和

[0030] 包含序列号10所示氨基酸序列的轻链。

[0031] [6]肿瘤检测用标志物,其包含[1]～[5]中任一项所述的抗体。

[0032] [7]根据[6]所述的肿瘤检测用标志物,用于检测与CADM1的v9片段相关的肿瘤。

[0033] [8]根据[6]或[7]所述的肿瘤检测用标志物,其中,与CADM1的v9片段相关的肿瘤是小细胞肺癌。

[0034] [9]根据[6]至[8]中任一项所述的肿瘤检测用标志物,其中,以血清、血浆、胸水中的任一者作为生物试样。

[0035] [10]肿瘤检测用试剂盒,其包含[1]至[5]中任一项所述的抗体、或[6]至[9]中任一项所述的肿瘤检测用标志物。

[0036] [11]根据[10]所述的肿瘤检测用试剂盒,其中,将所述抗体或所述肿瘤检测用标志物用于ELISA法、CLEIA法、荧光抗体法、酶抗体法、Western印迹法、免疫沉淀法中的任一者。

[0037] [12]肿瘤检测方法,其使用[1]至[5]中任一项所述的抗体、[6]至[9]中任一项所述的肿瘤检测用标志物、或[10]或[11]所述的肿瘤检测用试剂盒来检测肿瘤。

[0038] 发明效果

[0039] 通过本发明,可以提供SCLC的新型肿瘤标志物。

附图说明

[0040] 图1显示了CADM1剪切变体v8/9的mRNA和蛋白质的结构示意图。

[0041] 图2显示了对细胞培养上清液中的CADM1的v9片段的检测结果。

[0042] 图3显示了对肺癌和炎症性肺病患者血清中的CADM1的v9片段的检测结果。

[0043] 图4显示了对SCLC患者血清中的ProGRP和CADM1的v9片段的比较。

[0044] 图5显示了SCLC治疗效果和CADM1的v9片段量的相关性。

[0045] 图6显示了CADM1的外显子8和9所编码的氨基酸序列以及蛋白酶切割位点。

[0046] 图7显示了对SCLC患者胸水中的CADM1的v9片段的检测结果。

[0047] 图8显示了CADM1的v9片段的纯化蛋白的获取结果。

[0048] 图9显示了抗CADM1 v9抗体的表位筛选结果。

[0049] 图10显示了F1222抗体重链和轻链的氨基酸序列和碱基序列。

[0050] 图11显示了E9919抗体重链和轻链的氨基酸序列。

[0051] 图12显示了E9935抗体重链和轻链的氨基酸序列。

具体实施方式

[0052] 通过具体实施方式来更具体地说明本发明，但是，本发明不限于以下具体实施方式，可以进行各种变化来实施。

[0053] 本发明中所参考的文献中公开的内容作为参考而并入本文。

[0054] (CADM1 v9识别抗体)

[0055] 尽管长期以来难以制备CADM1的v9片段的特异性抗体，但本发明所涉及的抗体可识别CADM1的v9片段。尤其是，本发明所涉及的抗体能够识别CADM1的胞外区经蛋白酶(ADAM10或ADAM17)切割而游离出的CADM1的v9片段。本发明中，“CADM1的v9片段”表示：包含细胞粘附分子CADM1的胞外区中外显子9对应的区域(序列号1)的CADM1 v8/9经蛋白酶切割等而作为片段自细胞游离的片段。此外，“CADM1 v8/9”表示细胞粘附分子CADM1在肿瘤及在正常组织中的精巢中表达的剪切变体v8/9。本发明所涉及的抗体也可称为“CADM1 v9识别抗体”、“v9识别抗体”、“抗CADM1 v9抗体”或“抗v9抗体”，“CADM1的v9片段”也可称为“CADM1的v9片段”、“CADM1 v9片段”或“v9片段”。

[0056] CADM1 v9识别抗体可以用于检测与CADM1的v9片段相关的肿瘤(下文也称为“v9片段相关肿瘤”)。本发明中，“与CADM1的v9片段相关的肿瘤”表示其中将游离出v9片段的肿瘤组织。SCLC中，正常组织中几乎仅于精巢表达的CADM1 v8/9在肿瘤组织中表达，在精巢以外的组织中不表达CADM1 v8/9，因此，通过利用CADM1 v9识别抗体，能够特异性地识别CADM1的v9片段、检测出肿瘤组织。本发明中，“特异性地识别CADM1的v9片段”表示：较之对不包含细胞粘附分子CADM1的胞外区中外显子9对应的区域的CADM1片段的识别而言，更强地识别CADM1的v9片段。

[0057] 通过利用CADM1 v9识别抗体，能够以比使用传统抗体更高的特异性和更高的灵敏度检测出肿瘤组织的存在。因此，CADM1 v9识别抗体能够更有效地运用于对疑似为包括小细胞肺癌在内的癌症的受检者的筛查、和被诊断为癌症的患者的肿瘤复发的监视。例如，如下文实施例所示，即使在属于早期SCLC的局限型(病变限于同侧胸廓内、对侧纵膈、对侧锁骨上窝淋巴结，尚无恶性胸水和心包液)的患者中，通过利用CADM1 v9识别抗体，也能够以

高特异性和高灵敏度检测肿瘤组织。

[0058] CADM1 v9识别抗体具体识别以下中的至少一种氨基酸序列：

[0059] (1)来源于为DTTATTEPAVH的CADM1外显子9的、序列号2所示的氨基酸序列；

[0060] (2)在来源于为DTTATTEPAVH的CADM1外显子9的、序列号2所示的氨基酸序列中，具有一个或多个氨基酸的缺失、取代或添加的氨基酸序列；和

[0061] (3)与来源于为DTTATTEPAVH的CADM1的外显子9的序列号2所示的氨基酸序列具有90％以上、优选95％以上、更优选98％以上同一性的氨基酸序列。

[0062] CADM1 v9识别抗体的识别位点只要是与CADM1的v9片段中的外显子9对应的区域即可，无特殊限定。例如，CADM1 v9识别抗体所识别的CADM1的v9片段是与实施例所示人CADM1的v9片段、特别是外显子9对应的区域。

[0063] 本说明书中，“氨基酸”以其最宽泛的含义使用，意味着不仅包括天然的氨基酸，还包括氨基酸变体和衍生物这样的非天然氨基酸。作为氨基酸的例子，可举出天然蛋白质源性的L-氨基酸；D-氨基酸；氨基酸变体和衍生物等经化学修饰的氨基酸；正亮氨酸、β-丙氨酸、鸟氨酸等非天然蛋白质源性的氨基酸；具有本领域中已知的作为氨基酸特征的特性的以化学方式合成的化合物等，但不限于上述。作为非天然氨基酸的例子可列举α-甲基氨基酸(α-甲基丙氨酸等)、D-氨基酸、类组氨酸的氨基酸(2-氨基-组氨酸、β-羟基-组氨酸、高组氨酸、α-氟甲基-组氨酸、α-甲基-组氨酸等)、在侧链中具有多余亚甲基的氨基酸(“高”氨基酸)和侧链中的羧酸官能团氨基酸被磺酸基取代的氨基酸(半胱氨酸等)，但不限于上述。

[0064] 本说明书中提到“具有一个或多个氨基酸的缺失、取代或添加”时，对被缺失、取代等的氨基酸的数目没有特殊限定，只要作为结果获得的CDR的组合保持抗原识别功能即可。而且，本发明中的“多个”意味着2个以上的整数，优选是数个，例如2～5个，更优选是2个、3个、4个。对于各CDR中缺失、取代或添加的位置而言，只要作为结果获得的CDR的组合保持抗原识别功能即可，可以是在各CDR中的N末端、C末端、也可以在其中间。

[0065] 本说明书中，“与序列号X所示氨基酸序列具有Y％以上的同一性”表示：以使得两条多肽的氨基酸序列一致率最高的方式进行对齐(比对)时，共通的氨基酸残基数目相对于序列号X所示的氨基酸总数的比例为Y％以上。

[0066] CADM1 v9识别抗体可以是单克隆抗体，也可以是多克隆抗体。而且，本发明所涉及的抗体可以是IgG、IgM、IgA、IgD和IgE中的任一者的同型。

[0067] CADM1 v9识别抗体只要能识别从细胞游离出的CADM1的v9片段即可，其可以是小鼠抗体、人型CDR移植抗体、人型嵌合抗体、人源化抗体、或全人源化抗体，也可以是小分子抗体，但不限于上述。

[0068] 人型CDR移植抗体是用人抗体的CDR替换人以外的动物的抗体的CDR而成的抗体。人型嵌合抗体是包含来源于人以外的动物的抗体的可变区和来源于人抗体的恒定区的抗体。此外，人源化抗体是指在人以外的动物的抗体中保留安全性高的一部分区域、并组入来源于人的抗体的部分而成的抗体，其为包括人型嵌合抗体和人型CDR移植抗体在内的概念。

[0069] 本说明书中的“小分子抗体”表示抗体的片段或抗体的片段与任意分子结合而成的物质，其能识别原抗体所能识别的相同表位。具体而言，除包含VL、VH、CL和CH1区的Fab；两个Fab在铰链区经二硫键连接而成的F(ab')2；包含VL和VH的Fv；将VL和VH用人工的多肽接头连接而成的单链抗体scFv之外，还可列举sdFv、Diabody、sc(Fv)2，但不限于上述。

[0070] CADM1 v9识别抗体没有特殊的限定，可列举例如下述抗体，所述抗体包含：(a)包含序列号3所示氨基酸序列的重链CDR1、(b)包含序列号4所示氨基酸序列的重链CDR2、(c)包含序列号5所示氨基酸序列的重链CDR3、(d)包含序列号6所示氨基酸序列的轻链CDR1、(e)包含序列号7所示氨基酸序列的轻链CDR2、和(f)包含序列号8所示氨基酸序列的轻链CDR3。

[0071] CADM1 v9识别抗体还可列举例如以下中的任一种抗体：

[0072] (1)包含下述重链和下述轻链的抗体，所述重链包含序列号9所示氨基酸序列，所述轻链包含序列号10所示氨基酸序列；

[0073] (2)包含下述重链和下述轻链的抗体，所述重链包含序列号9所示氨基酸序列或者包含在序列号9所示氨基酸序列中具有一个或多个氨基酸的缺失、取代或添加的氨基酸序列，所述轻链包含序列号10所示氨基酸序列或者包含在序列号10所示氨基酸序列中具有一个或多个氨基酸的缺失、取代或添加的氨基酸序列；

[0074] (3)包含下述重链和下述轻链的抗体，所述重链包含与序列号9所示氨基酸序列具有90％以上、优选95％以上、更优选98％以上的同一性的氨基酸序列，所述轻链包含与序列号10所示氨基酸序列具有90％以上、优选95％以上、更优选98％以上的同一性的氨基酸序列。

[0075] (CADM1 v9识别抗体的制备方法)

[0076] CADM1 v9识别抗体的制备方法没有限定，例如，对于单克隆抗体而言，可以通过下述方法获得：从经CADM1的v9片段免疫的非人哺乳动物中分离出产生抗体的细胞，将其与骨髓瘤细胞等融合从而制备杂交瘤，对纯化该杂交瘤产生的抗体进行纯化。另外，多克隆抗体可从经CADM1的v9片段免疫的动物血清中得到。用于免疫的CADM1的v9片段只要所得到的抗体识别CADM1的v9片段即可，没有特殊的限定。

[0077] 市售CADM1单克隆抗体能实用的仅鸟抗体(鸟抗人CADM1抗体)(参见非专利文献2)，但无论是对鸟还是哺乳类的CADM1的v9片段，其均无法识别。此外，虽然全世界的研究者一直试图制造能够识别哺乳类的CADM1的v9片段的抗体，但尚未报道过成功案例，而本申请的发明人像下文实施例所示的那样通过长时期操作、将$Cadm1^{-/-}$小鼠与Balb/c品系进行2年的回交得到Balb/c，$Cadm1^{-/-}$小鼠，用CADM1 v9片段对其进行免疫，而首次获得了所述抗体。

[0078] 要制备具有特定氨基酸序列的抗体时，可通过例如下述方法来制备抗体：用含有编码抗体的核酸的表达载体转化合适的宿主，在合适的条件下培养该转化体使抗体表达，通过已知的方法进行分离纯化。作为分离纯化方法，可列举例如使用蛋白A等的亲和柱、其他色谱柱、过滤器、超滤、盐析、透析等，可以将上述进行适当组合。

[0079] 另外，对于“特异性地结合与某抗体X相同的表位的抗体Y”，如下文所述，可在确定表位序列后进行制备。

[0080] 例如，通过将多种随机序列的肽固定在固相担载体上并阵列化，使其与抗体X反应，利用经酶标记的二抗来检测结合，对抗体X特异地结合的肽的氨基酸序列进行调查，检索该氨基酸序列与抗原蛋白质的氨基酸序列的同源性，从而能够确定抗原蛋白质上的表位。也可将固定在固相担载体上的肽预先制成抗原蛋白质的部分肽组。另外，可以在存在抗原蛋白质的各种部分肽时，通过以ELISA法检测抗体X与抗原蛋白质的结合、调查有无竞争活性，从而确定抗原蛋白质上的表位。

[0081] 只要能够确定表位的序列，本领域技术人员就能够按照已知的方法制备与之特异性结合的抗体Y。例如，可通过将包含表位序列的肽固定在固相担载体上、检测该肽与各种抗体的结合，从而得到特异性地结合相同表位的抗体。

[0082] 本发明中，作为“各种抗体”，可以使用用抗原蛋白质或其部分肽对动物进行免疫而得到的抗体，也可以使用通过噬菌体展示制备而成的抗体文库或抗体片段文库。在使用利用噬菌体展示法的文库的情况下，通过将包含表位序列的肽固定在固相担载体上，重复进行淘选(panning)，也能够得到特异性地结合该表位的抗体Y。

[0083] 另外，人嵌合抗体和人CDR移植抗体可通过从产生人以外的动物的抗体的杂交瘤的mRNA克隆抗体基因、通过基因重组技术将所述基因与人抗体基因的一部分连接来制备。

[0084] 例如，人型嵌合抗体的情况下，利用逆转录酶从产生小鼠抗体的杂交瘤的mRNA合成cDNA，通过PCR克隆出重链可变区(VH)和轻链可变区(LH)，并对序列加以分析。然后，从一致率高的抗体碱基序列制备包含前导序列的5’引物，使用5’引物与可变部3’引物，通过PCR从上述cDNA克隆出从信号序列到可变区3’末端为止的序列。另一方面，对人IgG1的重链和轻链的恒定区进行克隆，分别针对重链和轻链，通过利用PCR的重叠悬挂(Overlapping Hanging)法将来源于小鼠抗体的可变区和来源于人抗体的恒定区连接起来，并加以扩增。将得到的DNA插入合适的载体中，进行转化，从而能够得到人型嵌合抗体。

[0085] CDR移植抗体的情况下，选用使用的小鼠抗体可变部同源性最高的人抗体可变部并对其进行克隆，通过利用大引物(megaprimer)法的位点选择性突变导入对CDR的碱基序列加以改变。需要说明，构成框架区的氨基酸序列人源化后无法实现与抗原的特异性结合的情况下，可以将框架区的一部分氨基酸从人型改变为大鼠型。

[0086] 作为其他的抗体制造方法，有从来源于经曲古柳菌素A(trichostatin A)处理的鸡B细胞的DT40细胞株获得生产抗体的细胞株的Adlib法(Seo,H.等,Nat.Biotechnol.,6:731-736,2002)，对KM小鼠(破坏小鼠抗体基因且导入了人抗体基因的小鼠)进行免疫来制备人抗体的方法(Itoh,K.等,Jpn.J.Cancer Res.,92:1313-1321,2001;Koide,A.等,J.Mol.Biol.,284:1141-1151,1998)等，上述方法也能够应用于CADM1 v9识别抗体的生产。

[0087] CADM1 v9识别抗体为小分子抗体的情况下，可以使用编码该小分子抗体的DNA，通过上述方法使其表达，另外，也可以使用木瓜蛋白酶、胃蛋白酶等酶对全长抗体进行处理来制备。

[0088] 取决于制备方法、纯化方法，CADM1 v9识别抗体的氨基酸序列、分子量、等电点、糖链有无、形态等可有所不同。但只要得到的抗体具有与CADM1 v9识别抗体同等的功能，所述抗体就涵盖于本发明中。例如，使CADM1 v9识别抗体在大肠杆菌等原核细胞中表达的情况下，在原本的抗体的氨基酸序列的N末端添加有甲硫氨酸残基。但本发明也涵盖这样的抗体。

[0089] (肿瘤检测用标志物)

[0090] 本发明所涉及的肿瘤检测用标志物包含CADM1 v9识别抗体，其还可以包含担载体、添加物。作为担载体和添加物的例子，可列举水、盐水、磷酸缓冲液、葡萄糖(dextrose)、甘油、乙醇等药学上允许的有机溶剂、胶原蛋白、聚乙烯醇、聚乙烯吡咯烷酮、羧基乙烯基聚合物、羧甲基纤维素钠、聚丙烯酸钠、海藻酸钠、水溶性葡聚糖、羧甲基淀粉钠、果胶、甲基纤维素、乙基纤维素、黄原酸胶、阿拉伯胶、酪蛋白、琼脂、聚乙二醇、二甘油、丙三醇

(glycerin)、丙二醇、凡士林、石蜡、硬脂醇、硬脂酸、人血清白蛋白、甘露糖醇、山梨糖醇、乳糖、表面活性剂等,但不限于上述。

[0091] 本发明所涉及的肿瘤检测用标志物通过包含CADM1 v9识别抗体而能够检测出传统标志物NSE、ProGRP不能识别的CADM1的v9片段。另外,本发明所涉及的肿瘤检测用标志物因能够检测出CADM1的v9片段,从而得以实现肿瘤检测灵敏度和特异性等检测率的提高。即,肿瘤中的尤其是早期SCLC中,传统的代表性标志物NSE完全不能检测出肿瘤,ProGRP仅能检测出极少数的肿瘤,而与之相对,通过利用本发明所述的肿瘤检测用标志物,能够提高肿瘤的检测率。

[0092] (肿瘤检测用试剂盒)

[0093] 本发明所涉及的肿瘤检测用试剂盒包含CADM1 v9识别抗体或肿瘤检测用标志物。用途没有特殊的限定,可用于CADM1的v9片段的检测、与CADM1的v9片段相关的肿瘤的检测。

[0094] 肿瘤检测用试剂盒可以根据其用途而包含试剂、与肿瘤检测用标志物同样地包含担载体、添加物,还可以包含缓冲液、容器、使用说明书等。

[0095] CADM1 v9识别抗体、肿瘤检测用标志物和试剂盒可用于与CADM1的v9片段相关的肿瘤(v9片段相关肿瘤)、尤其是癌症的检测。另外,癌症中,尤其可用于基于CADM1的v9片段自细胞游离的、神经内分泌肿瘤、神经母细胞瘤等神经源性肿瘤的检测。神经内分泌肿瘤只要是自神经内分泌细胞(生产激素细胞的)发生的肿瘤即可,没有特殊的限定,其可在肺(肺类癌、肺大细胞神经内分泌癌)、胰腺、消化道、甲状腺等处的神经内分泌细胞发生。作为在肺发生的肿瘤,可列举小细胞肺癌(SCLC)、肺类癌和肺大细胞神经内分泌癌。CADM1 v9识别抗体、肿瘤检测用标志物和试剂盒尤其适合用于小细胞肺癌(SCLC)的检测。由于在肿瘤检测中的特异性和灵敏度优异,CADM1 v9识别抗体能够合适地用于SCLC的检测。

[0096] (肿瘤检测方法)

[0097] 本发明所涉及的肿瘤检测方法使用CADM1 v9识别抗体、肿瘤检测用标志物或肿瘤检测用试剂盒来检测肿瘤。作为检测方法,只要是使用了抗体的检测方法即可,没有特殊的限定,例如,可以将CADM1v9识别抗体、肿瘤检测用标志物或肿瘤检测用试剂盒用于ELISA(酶联免疫吸附测定)法、CLEIA(化学发光酶免疫测定)法、荧光抗体法、酶抗体法、Western印迹法、免疫沉淀法中的任一者来检测肿瘤。

[0098] 关于本发明所涉及的肿瘤检测方法,具体而言,以ELISA法中的夹心ELISA法为例的话,其包括将针对来自被检体的样品的捕获抗体吸附到固相上的步骤、用脱脂牛奶等封闭固相的步骤、和向固相添加来自被检体的样品和CADM1 v9识别抗体的步骤,可以还包括洗去未反应的来自被检体的样品和CADM1 v9识别抗体的步骤。更详细地,可列举实施例中记载的方法。

[0099] 本说明书中,“来自被检体的样品”表示有可能包含自细胞游离出的CADM1的v9片段的样品。作为来自被检体的样品的具体例子,可列举血清、血浆、胸水、尿液、咳痰、腹膜液、膀胱冲洗物、分泌物(例如,乳房分泌物)、口腔冲洗物和抽吸液,血清、血浆和胸水在肿瘤检测的特异性和灵敏度方面更优异,故而优选。

[0100] 本发明所涉及的肿瘤检测方法是用于检测肿瘤的迅速且具有高特异性和高灵敏度的方法。该方法例如可用于对疑似为包括小细胞肺癌在内的癌症的受检者的筛查、和被诊断为癌症的患者的肿瘤复发的监视。

[0101] (治疗剂和预防剂)

[0102] 本发明所涉及的治疗剂或预防剂含有CADM1 v9识别抗体,还可以含有与针对上述的肿瘤检测用标志物所述相同的担载体、添加剂。

[0103] (治疗方法)

[0104] 本发明所述的治疗方法或预防方法使用CADM1 v9识别抗体来治疗或预防肿瘤。

[0105] 实施例

[0106] 下文中示出实施例以具体地说明本发明,但本发明不限于以下实施例。

[0107] (材料和方法)

[0108] 小鼠和细胞

[0109] 从CLEA Japan,Inc.购入野生型Balb/c小鼠。使用已知方法(Yamada D.等,Mol Cell Biol,2006)制备Cadm1缺陷小鼠(Cadm1$^{-/-}$),将其与Balb/c小鼠进行10次回交。使用已知方法(Saitoh R等,J Immunol Methods,2007)制备Balb/c品系的gp64-tg(转基因)小鼠。将这些小鼠交配,制备了Balb/c品系的Cadm1$^{-/-}$/gp64-tg小鼠。

[0110] 从JCRB细胞库购入SBC5细胞,从Thermo Fisher Scientific购入293FT细胞,从理化研究所生物资源中心购入ATN-1细胞,从美国典型培养物收藏中心(American Type Culture Collection)购入NCI-H69和NCI-H446细胞。SBC5细胞在EMEM(和光纯药工业)中培养,293FT细胞在DMEM(Nacalai tesque)中培养,ATN-1、NCI-H69、NCI-H446细胞是在RPMI1640(Nacalai tesque)中添加10%FBS(BioWest)、100单位/mL青霉素和100mg/mL链霉素(Sigma-Aldrich)而培养的。SBC5细胞的CADM1 v8(外显子7+8+11型)和CADM1 v8/9(外显子7+8+9+11型)的稳定表达株是通过将各自的cDNA克隆至pBactSTneo载体(由理化研究所提供)的SalI位点,利用Lipofectamine LTX(Invitrogen)瞬时转染后,用500mg/mL的G418(Nacalai tesque)筛选而得到的。

[0111] 抗CADM1单克隆抗体的制备

[0112] 抗CADM1抗体E9919(序列号11～18)、E9935(序列号19～26)如下制备。

[0113] 作为免疫动物,使用Balb/c品系的Cadm1$^{-/-}$/gp64-tg小鼠。作为抗原,使用表达CADM1 v8/9的杆状病毒。将CADM1 v8/9的cDNA克隆至pBlueBac4.5(Invitrogen)之后,通过已知方法(Masuda K等,J Biol Chem,2003)制备重组杆状病毒。通过将从免疫后摘出的脾脏得到的产生抗体的细胞、与来源于小鼠骨髓瘤的SP2/0细胞进行细胞融合而得到杂交瘤。使用ELISA法评价在培养上清液中产生特异性识别CADM1的抗体的杂交瘤的克隆针对在CADM1的胞外区的C末端侧添加有小鼠IgG的Fc区的CADM1 EC-Fc(Murakami S等,PLoS One,2014)的反应性,并进行选择。

[0114] 抗CADM1 v9抗体的制备

[0115] 抗CADM1 v9抗体F1222(序列号3～10、31～38)、F1315如下制备。

[0116] 作为免疫动物,使用Balb/c品系的Cadm1$^{-/-}$小鼠。作为抗原,使用在包含自CADM1 v8/9片段C末端起的12个氨基酸的肽CDTTATTEPAVHD(序列号2)的半胱氨酸残基上添加有KLH的抗原。肽合成和KLH添加均委托株式会社蛋白纯化工业进行。通过向腹腔内注射抗原来进行免疫,通过将脾脏细胞与来源于小鼠骨髓瘤的SP2/0细胞进行细胞融合而得到杂交瘤。关于对产生识别CADM1 v9片段的抗体的克隆的筛选,使用ELISA法评价针对自SBC5细胞的CADM1 v8/9稳定表达株的培养上清液纯化的CADM1 v8/9片段蛋白的反应性,并进行选

择。

[0117] CADM1 v9片段的纯化

[0118] CADM1 v9片段纯化蛋白是通过以下方法得到的。在15cm培养皿(TPP)中培养SBC5细胞的CADM1 v8/9稳定表达株,在达到半汇合(semi-confluence)时更换为无血清培养基培养过夜,回收上清液。接着,进行蛋白A琼脂糖凝胶(Protein A Sepharose)(Thermo Fisher Scientific)与抗CADM1体E9935的交联。混合蛋白A和E9935,使其于4℃反应过夜后,与溶解于0.15M硼酸钠(MP biomedicals)中的40mM DMP(Thermo Fisher Scientific)室温反应30分钟而交联。通过使其与0.2M甘氨酸(pH8)于室温反应2小时,终止交联,用PBS洗涤。向培养上清液中添加与E9935交联的蛋白A琼脂糖凝胶,使其于4℃反应过夜。用PBS洗涤4次后,向蛋白A琼脂糖凝胶中添加0.1M甘氨酸(pH2),通过使其于冰上反应1小时,溶出CADM1 v9片段,通过添加1M Tris-HCl(pH9)进行中和。得到的CADM1 v9片段的产量和纯度通过在进行聚丙烯酰胺电泳后利用Silver Stain MS Kit(和光纯药工业)进行银染来确定。

[0119] 夹心ELISA的方案

[0120] CADM1 v9片段的检测通过夹心ELISA法进行。作为捕获抗体,使用抗CADM1抗体E9935,关于检测抗体,在对CADM1 v8/9片段的检测中使用抗CADM1 v9抗体F1222,在对全部CADM1片段的检测中使用抗CADM1抗体E9919。使用Peroxidase Labeling Kit-NH_2(同仁化学研究所)对检测抗体进行了HRP标记。

[0121] 首先,向Nunc MaxiSorp 96孔板(Thermo Fisher Scientific)中添加用碳酸缓冲液(15mM Na_2CO_3、35mM $NaHCO_3$、0.2%NaN_3)稀释至1mg/mL的捕获抗体100mL,通过于4℃静置过夜而使其固相化。用PBS-T(137mM NaCl、8.1mM Na_2PO_4、2.68mM KCl、1.47mM KH_2PO_4、0.05%吐温20)洗涤2次,添加200mL的1%/BSA(和光纯药工业)/PBS-T,于室温静置1小时以进行封闭。用PBS-T洗涤2次后,添加用于制作标准曲线的标准品和培养上清液、血清、或胸水,于室温孵育1小时。用PBS-T洗涤4次,添加用1%BSA/PBS-T稀释至1ng/mL的检测抗体100mL,于室温孵育1小时。用PBS-T洗涤6次后,添加100mL的TMB Soluble Reagent(ScyTek Laboratories)使其显色,然后添加100mL的TMB Stop Buffer(ScyTek Laboratories)终止反应。最后,使用Ensight微孔板检测仪(PerkinElmer)测量450nm的波长。

[0122] 用于制作标准曲线的标准品使用了自SBC5细胞的CADM1 v8/9稳定表达株的培养上清液纯化的CADM1 v9片段蛋白。在测量血清中的CADM1 v9片段的情况下,以正常人血清(Jackson ImmunoResearch Laboratories)的值作为0进行校正。

[0123] 血清和胸水的获得

[0124] 将某患者的血液和胸水作为研究材料。当判断为出于诊断、治疗目的而必须进行采血检查时,一并采集用于研究的血液10mL。在进行胸水穿刺检查时,将临床判断中采集的胸水中的10mL用作研究用途。血液、胸水施以离心分离,除去细胞成分,血液的情况下,将血清作为研究材料使用。

[0125] 抗CADM1 v9抗体的表位的确定方法

[0126] 预先用Peroxidase Labeling Kit-NH_2(同仁化学研究所)对抗CADM1 v9抗体F1222、F1315进行HRP标记,并通过ELISA法进行表位筛选。肽合成委托东丽研究中心进行。使肽溶解于10%DMSO/PBS中,配制为1mg/mL。向Nunc MaxiSorp 96孔板(Thermo Fisher

Scientific)中添加用碳酸缓冲液稀释至10mg/mL的肽100mL，通过于4℃静置过夜而固相化。用PBS-T洗涤2次，添加200mL的1％/BSA/PBS-T，于室温静置1小时进行封闭。用PBS-T洗涤2次，添加用1％BSA/PBS-T稀释至100ng/mL的HRP标记抗体100mL，于室温孵育1小时。用PBS-T洗涤4次后，添加100mL的TMB Soluble Reagent(ScyTek Laboratories)使其显色，然后添加100mL的TMB Stop Buffer(ScyTek Laboratories)终止反应。最后，使用Ensight微孔板检测仪(PerkinElmer)测量450nm的波长。

[0127] 图1显示了CADM1剪切变体v8/9的mRNA和蛋白质的结构。(A)CADM1基因包含12个外显子，存在在脑中表达的v(-)、在上皮中表达的v8、在精巢和SCLC中表达的v8/9这3种主要的剪切变体。仅CADM1 v8/9包含外显子9。(B)CADM1 v8/9的特异性氨基酸序列紧贴细胞膜，被ADAM17切割而游离。该位点的周围富含苏氨酸残基，且被O型糖链修饰。Ig-V和Ig-C2表示免疫球蛋白样环结构。

[0128] (结果)

[0129] 图2显示了对细胞培养上清液中的CADM1 v9片段的检测结果。通过夹心ELISA法测量分泌至SCLC及其他细胞的培养上清液中的全部CADM1片段量(A)和CADM1 v9片段量(B)。作为捕获抗体，使用抗CADM1小鼠单克隆抗体E9935。作为检测抗体，使用对抗CADM1抗体E9919和抗CADM1 v8/9抗体F1222进行HRP标记而得的抗体。分别制备使CADM1 v8(上皮型)和CADM1 v8/9(SCLC·精巢型)在不表达CADM1的SBC5细胞中稳定表达的细胞，结果确认到CADM1 v8/9表达细胞的培养上清液中CADM1 v9片段的分泌。另外，从293FT(其来源于内源性地表达CADM1 v8的人胚胎肾细胞)和ATN-1(其来源于成人T细胞白血病)的培养上清液中几乎检测不到CADM1 v9片段，但从作为SCLC细胞的NCI-H69和NCI-H446细胞的培养上清液中检测到了CADM1 v9片段。因此，仅在表达CADM1 v8/9的细胞的培养上清液中检测到CADM1 v9片段这点表明，CADM1 v8/9确实经切割而游离出片段，并且，用于检测CADM1v9片段的夹心ELISA的特异性高。

[0130] 图3显示了对肺癌和炎症性肺病患者血清中的CADM1的v9片段的检测结果。对从上述患者采集的血液进行离心分离，使用去除细胞成分而得到的血清进行CADM1 v8/9片段的检测。针对小细胞肺癌(SCLC)患者30名、非小细胞肺癌(NSCLC)患者32名(其中肺腺癌20名、肺扁平上皮癌12名)、炎症性肺病(inflammatory lung disease)患者18名进行研究，结果仅在SCLC患者中确认了CADM1v9片段量高的病例。阈值设为3ng/mL时，特异度为92％(46/50)时的灵敏度为47％(14/30)，显示了CADM1 v9片段作为肿瘤标志物的有用性。

[0131] 下表显示了SCLC患者血清中的CADM1 v9片段(序列号27)的检测率。阈值设为3ng/mL时，CADM1 v8/9阳性的病例在SCLC总体中为47％(14/30)，在局限型(病变限于同侧胸廓内、对侧纵膈、对侧锁骨上窝淋巴结，尚无恶性胸水和心包液)中为3/12(25％)，在进展型(病变不仅限于同侧胸廓内、对侧纵膈、对侧锁骨上窝淋巴结，或者具有恶性胸水或心包液)中为10/13(77％)，显示了即使在比较早期的局限型SCLC中也能够检测出CADM1 v9片段。

[0132] 表1

[0133]

分类	CADM1 v8/9(+)
局限型	3/12(25％)
进展型	10/13(77％)
总体	14/30(47％)

[0134] 图4显示了对SCLC患者血清中的ProGRP和CADM1的v9片段的比较。使用Human Pro-Gastrin-releasing Peptide DuoSet Kit(R&D Systems)测量30例SCLC患者血清中的ProGRP,与CADM1 v9片段进行比较。对ProGRP而言,阈值设为46pg/mL时,14例(47%)为阳性,对CADM1 v9片段将阈值设为3ng/mL时,同样地有14例(47%)为阳性。ProGRP阳性且CADM1 v8/9阴性、以及ProGRP阴性且CADM1 v8/9阳性的病例各存在5例(17%),因此,通过联用ProGRP和CADM1 v8/9片段作为肿瘤标志物,有望提高检测率。需要说明的是,图中所示内容省略了ProGRP为300pg/mL以上、CADM1 v8/9片段为20ng/mL以上的值。

[0135] 图5显示了SCLC治疗效果与CADM1的v9片段量的相关性。关于在治疗前后进行了多次采血的SCLC病例,针对治疗效果与CADM1 v8/9片段量之间的相关性进行了研究。(A)在被判定为部分缓解(Partial Response,PR;肿瘤的大小减少30%以上的状态)的6例病例中,在4例病例中确认到CADM1 v9片段量显著降低,在其余2例病例中也略微减少。(B)在被判定为病情进展(Progressive Disease,PD;肿瘤的大小增加20%以上且增加5mm以上的状态,或者出现了新病变的状态)的2例病例中均确认到CADM1 v9片段量的增加。(C)关于确认了复发的1例病例,确认到经治疗而成为PR时CADM1 v9片段量减少,而复发时CADM1 v9片段量增加。上述内容显示,肿瘤大小的变化与血清中的CADM1 v9片段量相关,CADM1 v9片段作为反映病情的标志物是有用的。

[0136] 图6显示了CADM1外显子8和9所编码的氨基酸序列和蛋白酶切割位点。图中示出了CADM1的剪切变体v8和v8/9所编码的氨基酸的一部分。分别地,CADM1 v8被ADAM10切割,CADM1 v8/9被ADAM17切割(Nagara等,Biochem Biophys Res Commun,2012;Shirakabe等,Sci Rep,2017)。

[0137] 图7显示了对SCLC患者胸水中的CADM1的v9片段的检测结果。对从9名SCLC患者采集的胸水中的CADM1 v9片段进行测定时,确认到与血清同样地CADM1 v9片段量高的病例。这表明:不仅是使用血液,使用胸水也能够检测到来源于SCLC的CADM1 v9片段,使用胸水的诊断是可行的。

[0138] 图8显示了CADM1 v9片段的纯化蛋白的获取结果。从SBC5细胞的CADM1 v8/9稳定表达株的培养上清液,使用抗CADM1抗体纯化CADM1 v9片段。通过在SDS-PAGE之后进行银染测定纯化蛋白质的产量和纯度。于箭头所示位置(约80kDa)处确认了CADM1 v9片段的纯化蛋白。将BSA用作为浓度测定的标准蛋白。

[0139] 图9显示了抗CADM1 v9抗体表位的筛选结果。为了筛选抗CADM1 v9抗体的表位,合成作为免疫原使用的全长为13个氨基酸的肽(序列号2)和将其较短地分割而成的肽(序列号28～30),使用ELISA法研究与抗CADM1 v9抗体间的反应性。结果显示,F1222和F1315抗体均能与全长的肽反应,但不与分割为各7个氨基酸的肽反应,显示具有长于7个氨基酸的表位。

[0140] 图10～12针对各个实施例中制备、使用的抗体,显示了F1222抗体的重链和轻链的氨基酸序列和碱基序列、E9919抗体的重链和轻链的氨基酸序列、E9935抗体的重链和轻链的氨基酸序列。

[0141] (序列表自由文本)

[0142] 序列号1表示CADM1的外显子9的氨基酸序列。

[0143] 序列号2表示F1222抗体和F1315抗体的制备中使用的抗原的氨基酸序列。

[0144] 序列号3表示F1222抗体的重链CDR1的氨基酸序列。

[0145] 序列号4表示F1222抗体的重链CDR2的氨基酸序列。

[0146] 序列号5表示F1222抗体的重链CDR3的氨基酸序列。

[0147] 序列号6表示F1222抗体的轻链CDR1的氨基酸序列。

[0148] 序列号7表示F1222抗体的轻链CDR2的氨基酸序列。

[0149] 序列号8表示F1222抗体的轻链CDR3的氨基酸序列。

[0150] 序列号9表示包含于F1222抗体的重链中的氨基酸序列。

[0151] 序列号10表示包含于F1222抗体的轻链中的氨基酸序列。

[0152] 序列号11表示E9919抗体的重链CDR1的氨基酸序列。

[0153] 序列号12表示E9919抗体的重链CDR2的氨基酸序列。

[0154] 序列号13表示E9919抗体的重链CDR3的氨基酸序列。

[0155] 序列号14表示E9919抗体的轻链CDR1的氨基酸序列。

[0156] 序列号15表示E9919抗体的轻链CDR2的氨基酸序列。

[0157] 序列号16表示E9919抗体的轻链CDR3的氨基酸序列。

[0158] 序列号17表示包含于E9919抗体的重链中的氨基酸序列。

[0159] 序列号18表示包含于E9919抗体的轻链中的氨基酸序列。

[0160] 序列号19表示E9935抗体的重链CDR1的氨基酸序列。

[0161] 序列号20表示E9935抗体的重链CDR2的氨基酸序列。

[0162] 序列号21表示E9935抗体的重链CDR3的氨基酸序列。

[0163] 序列号22表示E9935抗体的轻链CDR1的氨基酸序列。

[0164] 序列号23表示E9935抗体的轻链CDR2的氨基酸序列。

[0165] 序列号24表示E9935抗体的轻链CDR3的氨基酸序列。

[0166] 序列号25表示包含于E9935抗体的重链中的氨基酸序列。

[0167] 序列号26表示包含于E9935抗体的轻链中的氨基酸序列。

[0168] 序列号27表示人CADM1 v9片段的氨基酸序列。

[0169] 序列号28表示7个氨基酸的肽的氨基酸序列。

[0170] 序列号29表示7个氨基酸的肽的氨基酸序列。

[0171] 序列号30表示7个氨基酸的肽的氨基酸序列。

[0172] 序列号31表示F1222抗体的重链CDR1的碱基序列。

[0173] 序列号32表示F1222抗体的重链CDR2的碱基序列。

[0174] 序列号33表示F1222抗体的重链CDR3的碱基序列。

[0175] 序列号34表示F1222抗体的轻链CDR1的碱基序列。

[0176] 序列号35表示F1222抗体的轻链CDR2的碱基序列。

[0177] 序列号36表示F1222抗体的轻链CDR3的碱基序列。

[0178] 序列号37表示包含于F1222抗体的重链中的碱基序列。

[0179] 序列号38表示包含于F1222抗体的轻链中的碱基序列。

序列表

<110> 国立大学法人东京大学

<120> CADM1 v9 识别抗体

<130> T0529AKP07

<150> JP 2018-049435
<151> 2018-03-16

<160> 38

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1
<211> 11
<212> PRT
<213> 智人

<400> 1

[0001]

Asp Thr Thr Ala Thr Thr Glu Pro Ala Val His
1 5 10

<210> 2
<211> 13
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 可产生F1222抗体的抗原

<400> 2

Cys Asp Thr Thr Ala Thr Thr Glu Pro Ala Val His Asp
1 5 10

<210> 3
<211> 5
<212> PRT
<213> 小鼠

<400> 3

Thr Tyr Ala Met Asn
1 5

<210> 4
<211> 19
<212> PRT
<213> 小鼠

<400> 4

Arg Ile Arg Ser Lys Ser Asn Tyr Tyr Thr Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser
1 5 10 15

Val Lys Asp

[0002]

<210> 5
<211> 7
<212> PRT
<213> 小鼠

<400> 5

Gln Arg His Gly Asn Phe Tyr
1 5

<210> 6
<211> 15
<212> PRT
<213> 小鼠

<400> 6

Lys Ala Ser Gln Ser Val Asp Tyr Asp Gly Tyr Ser Tyr Met Asn
1 5 10 15

<210> 7
<211> 7
<212> PRT
<213> 小鼠

<400> 7

Ala Ala Ser Asn Leu Glu Ser
1 5

<210> 8
<211> 9
<212> PRT
<213> 小鼠

<400> 8

Gln Gln Ser Asn Glu Asp Pro Pro Thr
1 5

[0003]

<210> 9
<211> 141
<212> PRT
<213> 小鼠

<400> 9

Met Thr Leu Asn Met Leu Leu Gly Leu Lys Trp Val Phe Phe Val Val
1 5 10 15

Phe Tyr Gln Gly Val His Cys Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly
20 25 30

Gly Leu Val Gln Pro Lys Gly Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser
35 40 45

Gly Phe Thr Phe Asn Thr Tyr Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro
50 55 60

Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala Arg Ile Arg Ser Lys Ser Asn Tyr
65 70 75 80

Tyr Thr Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Asp Arg Phe Thr Ile Ser
85 90 95

Arg Asp Asp Ser Gln Ser Met Leu Tyr Leu Gln Met Asn Asn Leu Lys
100 105 110

Thr Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys Ile Arg Gln Arg His Gly Asn
115 120 125

Phe Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala
130 135 140

[0004] <210> 10
<211> 131
<212> PRT
<213> 小鼠

<400> 10

Met Glu Thr Asp Thr Ile Leu Leu Trp Val Leu Leu Leu Trp Val Pro
1 5 10 15

Gly Ser Thr Gly Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala
20 25 30

Val Ser Leu Gly Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gln Ser
35 40 45

Val Asp Tyr Asp Gly Tyr Ser Tyr Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro
50 55 60

Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Asn Leu Glu Ser
65 70 75 80

Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
85 90 95

Leu Asn Ile His Pro Val Glu Glu Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys
100 105 110

Gln Gln Ser Asn Glu Asp Pro Pro Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu
115 120 125

Glu Leu Lys
130

[0005]

<210> 11
<211> 10
<212> PRT
<213> 小鼠

<400> 11

Gly Phe Ser Ile Ile Ser Ser Ser Tyr Cys
1 5 10

<210> 12
<211> 7
<212> PRT
<213> 小鼠

<400> 12

Ile Cys Tyr Glu Gly Ser Ile
1 5

<210> 13
<211> 10

<212> PRT
<213> 小鼠

<400> 13

Ser Arg Glu Arg Lys Ser Thr Met Asp Tyr
1 5 10

<210> 14
<211> 6
<212> PRT
<213> 小鼠

<400> 14

Gln Asp Ile Ser Asn Tyr
1 5

[0006]

<210> 15
<211> 3
<212> PRT
<213> 小鼠

<400> 15

Tyr Thr Ser
1

<210> 16
<211> 9
<212> PRT
<213> 小鼠

<400> 16

Gln Gln Val Asn Ala Leu Pro Trp Thr
1 5

<210> 17
<211> 137

<212> PRT
<213> 小鼠

<400> 17

Met Arg Leu Leu Gly Phe Leu Leu Cys Leu Ala Ala Ala Leu Lys Ser
1 5 10 15

Val Leu Ser Gln Ile Gln Leu Lys Glu Ser Gly Pro Ala Val Ile Glu
20 25 30

Pro Ser Gln Ser Leu Ser Leu Thr Cys Ile Val Ser Gly Phe Ser Ile
35 40 45

Ile Ser Ser Ser Tyr Cys Trp His Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys
50 55 60

[0007]

Gly Leu Glu Trp Met Gly Arg Ile Cys Tyr Glu Gly Ser Ile Tyr Tyr
65 70 75 80

Ser Pro Ser Ile Lys Ser Arg Ser Thr Ile Ser Arg Asp Thr Ser Leu
85 90 95

Asn Lys Phe Phe Ile Gln Leu Ser Ser Val Thr Asn Glu Asp Thr Ala
100 105 110

Met Tyr Tyr Cys Ser Arg Glu Arg Lys Ser Thr Met Asp Tyr Trp Gly
115 120 125

Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
130 135

<210> 18
<211> 127
<212> PRT

<213> 小鼠

<400> 18

Met Met Ser Ser Ala Gln Phe Leu Gly Leu Leu Leu Leu Cys Phe Gln
1 5 10 15

Gly Thr Arg Cys Asp Ile Gln Val Thr Gln Thr Thr Ser Ser Leu Ser
20 25 30

Ala Ser Leu Gly Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Gln Asp
35 40 45

Ile Ser Asn Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gly Thr Leu
50 55 60

Lys Leu Leu Ile Tyr Tyr Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Val Pro Ser
65 70 75 80

[0008]

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser
85 90 95

Asn Leu Asp Gln Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Val Asn
100 105 110

Ala Leu Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
115 120 125

<210> 19
<211> 8
<212> PRT
<213> 小鼠

<400> 19

Gly Tyr Thr Phe Thr His Tyr Trp

1 5

<210> 20
<211> 8
<212> PRT
<213> 小鼠

<400> 20

Ile Asn Pro Gly Thr Gly Tyr Thr
1 5

<210> 21
<211> 16
<212> PRT
<213> 小鼠

<400> 21

[0009]

Ser Arg Ala Ser Tyr Tyr Ser Gly Ser Ser His Ala Trp Phe Gly Phe
1 5 10 15

<210> 22
<211> 10
<212> PRT
<213> 小鼠

<400> 22

Gln Ser Val Asn Tyr Asp Gly Asp Asn Tyr
1 5 10

<210> 23
<211> 3
<212> PRT
<213> 小鼠

<400> 23

Ala Ala Ser

1

<210> 24
<211> 9
<212> PRT
<213> 小鼠

<400> 24

Gln Gln Ser Tyr Glu Asp Pro Trp Thr
1 5

<210> 25
<211> 142
<212> PRT
<213> 小鼠

<400> 25

[0010] Met Glu Arg His Trp Ile Phe Leu Phe Leu Phe Ser Val Thr Ala Gly
1 5 10 15

Val His Ser Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Thr Glu Leu Ala Lys
20 25 30

Pro Gly Ala Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe
35 40 45

Thr His Tyr Trp Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu
50 55 60

Glu Trp Ile Gly Phe Ile Asn Pro Gly Thr Gly Tyr Thr Glu Tyr Asn
65 70 75 80

Gln Lys Phe Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser
85 90 95

Thr Ala Tyr Ile Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val
100 105 110

Tyr Tyr Cys Ser Arg Ala Ser Tyr Tyr Ser Gly Ser Ser His Ala Trp
115 120 125

Phe Gly Phe Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala
130 135 140

<210> 26
<211> 131
<212> PRT
<213> 小鼠

<400> 26

Met Glu Thr Asp Thr Ile Leu Leu Trp Val Leu Leu Leu Trp Val Pro
[0011] 1 5 10 15

Gly Ser Thr Gly Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala
20 25 30

Val Ser Leu Gly Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gln Ser
35 40 45

Val Asn Tyr Asp Gly Asp Asn Tyr Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro
50 55 60

Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Asn Leu Glu Ser
65 70 75 80

Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
85 90 95

Leu Asn Ile His Pro Val Glu Glu Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys
100 105 110

Gln Gln Ser Tyr Glu Asp Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu
115 120 125

Glu Ile Lys
130

<210> 27
<211> 327
<212> PRT
<213> 智人

<400> 27

Gln Asn Leu Phe Thr Lys Asp Val Thr Val Ile Glu Gly Glu Val Ala
1 5 10 15

[0012]

Thr Ile Ser Cys Gln Val Asn Lys Ser Asp Asp Ser Val Ile Gln Leu
20 25 30

Leu Asn Pro Asn Arg Gln Thr Ile Tyr Phe Arg Asp Phe Arg Pro Leu
35 40 45

Lys Asp Ser Arg Phe Gln Leu Leu Asn Phe Ser Ser Ser Glu Leu Lys
50 55 60

Val Ser Leu Thr Asn Val Ser Ile Ser Asp Glu Gly Arg Tyr Phe Cys
65 70 75 80

Gln Leu Tyr Thr Asp Pro Pro Gln Glu Ser Tyr Thr Thr Ile Thr Val
85 90 95

Leu Val Pro Pro Arg Asn Leu Met Ile Asp Ile Gln Lys Asp Thr Ala

100 105 110

Val Glu Gly Glu Glu Ile Glu Val Asn Cys Thr Ala Met Ala Ser Lys
115 120 125

Pro Ala Thr Thr Ile Arg Trp Phe Lys Gly Asn Thr Glu Leu Lys Gly
130 135 140

Lys Ser Glu Val Glu Glu Trp Ser Asp Met Tyr Thr Val Thr Ser Gln
145 150 155 160

Leu Met Leu Lys Val His Lys Glu Asp Asp Gly Val Pro Val Ile Cys
165 170 175

Gln Val Glu His Pro Ala Val Thr Gly Asn Leu Gln Thr Gln Arg Tyr
180 185 190

[0013]

Leu Glu Val Gln Tyr Lys Pro Gln Val His Ile Gln Met Thr Tyr Pro
195 200 205

Leu Gln Gly Leu Thr Arg Glu Gly Asp Ala Leu Glu Leu Thr Cys Glu
210 215 220

Ala Ile Gly Lys Pro Gln Pro Val Met Val Thr Trp Val Arg Val Asp
225 230 235 240

Asp Glu Met Pro Gln His Ala Val Leu Ser Gly Pro Asn Leu Phe Ile
245 250 255

Asn Asn Leu Asn Lys Thr Asp Asn Gly Thr Tyr Arg Cys Glu Ala Ser
260 265 270

Asn Ile Val Gly Lys Ala His Ser Asp Tyr Met Leu Tyr Val Tyr Asp

275 280 285

Pro Pro Thr Thr Ile Pro Pro Pro Thr Thr Thr Thr Thr Thr Thr Thr
290 295 300

Thr Thr Thr Thr Thr Ile Leu Thr Ile Ile Thr Asp Thr Thr Ala Thr
305 310 315 320

Thr Glu Pro Ala Val His Asp
325

<210> 28
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 7 个氨基酸的肽

[0014]

<400> 28

Cys Asp Thr Thr Ala Thr Thr
1 5

<210> 29
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 7 个氨基酸的肽

<400> 29

Thr Ala Thr Thr Glu Pro Ala
1 5

<210> 30

<211> 7
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 7 个氨基酸的肽

<400> 30

Thr Glu Pro Ala Val His Asp
1 5

<210> 31
<211> 15
<212> DNA
<213> 小鼠

<400> 31
acctacgcca tgaac 15

[0015]

<210> 32
<211> 57
<212> DNA
<213> 小鼠

<400> 32
cgcataagaa gtaaaagtaa ttattataca acatattatg ccgattcagt gaaagac 57

<210> 33
<211> 21
<212> DNA
<213> 小鼠

<400> 33
cagaggcatg gtaacttcta c 21

<210> 34
<211> 45
<212> DNA
<213> 小鼠

<400> 34
aaggccagcc aaagtgttga ttatgatggt tatagttata tgaac 45

<210> 35
<211> 21
<212> DNA
<213> 小鼠

<400> 35
gctgcatcca atctagaatc t 21

<210> 36
<211> 27
<212> DNA
<213> 小鼠

<400> 36
cagcaaagta atgaggatcc tcccacg 27

[0016]

<210> 37
<211> 423
<212> DNA
<213> 小鼠

<400> 37
atgacattga acatgctgtt ggggctgaag tgggttttct ttgttgtttt ttatcaaggt 60

gtgcattgtg aggtgcagct tgttgagtct ggtggaggat tggtgcagcc taaagggtca 120

ttgaaactct catgtgcagc ctctggattc accttcaata cctacgccat gaactgggtc 180

cgccaggctc caggaaaggg tttggaatgg gttgctcgca taagaagtaa aagtaattat 240

tatacaacat attatgccga ttcagtgaaa gacaggttca ccatctccag agatgattca 300

caaagcatgc tctatctgca aatgaacaat ttgaagactg aggacacagc catgtattac 360

tgtatacgac agaggcatgg taacttctac tggggccaag gactctggt cactgtctct 420

gca 423

<210> 38
<211> 393
<212> DNA
<213> 小鼠

<400> 38
atggagacag acacaatcct gctatgggtg ctgctgctct gggttccagg ctccactggt 60

gacattgtgc tgacccaatc tccagcttct ttggctgtgt ctctagggca gagggccacc 120

[0017]

atctcctgca aggccagcca aagtgttgat tatgatggtt atagttatat gaactggtac 180

caacagaaac caggacagcc acccaaactc ctcatctatg ctgcatccaa tctagaatct 240

gggatcccag ccaggtttag tggcagtggg tctgggacag acttcaccct caacatccat 300

cctgtggagg aggaggatgc tgcaacctat tactgtcagc aaagtaatga ggatcctccc 360

acgttcggag ctgggaccaa gctggagctg aaa 393

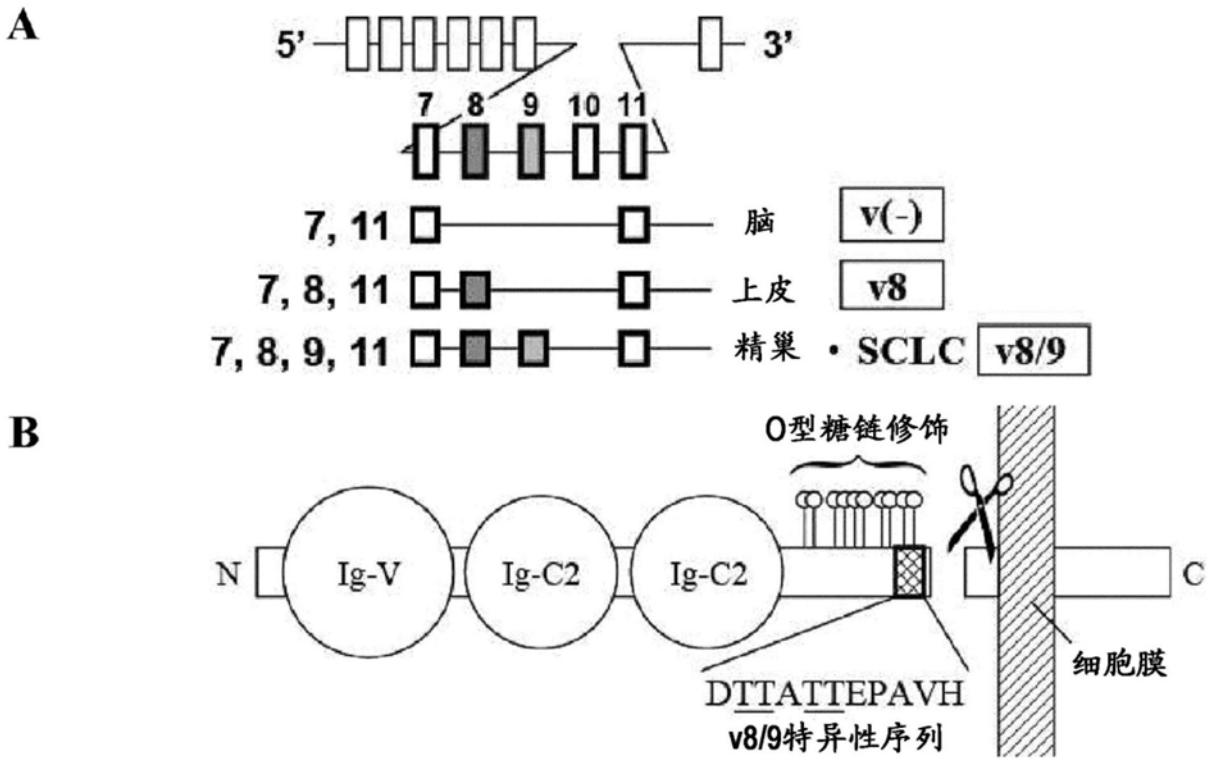

A
5'
3'
7 8 9 10 11
7, 11
脑
v(-)
7, 8, 11
上皮
v8
7, 8, 9, 11
精巢 · SCLC
v8/9
B
O型糖链修饰
N
Ig-V
Ig-C2
Ig-C2
C
细胞膜
DTTATTEPAVH
v8/9特异性序列

图1

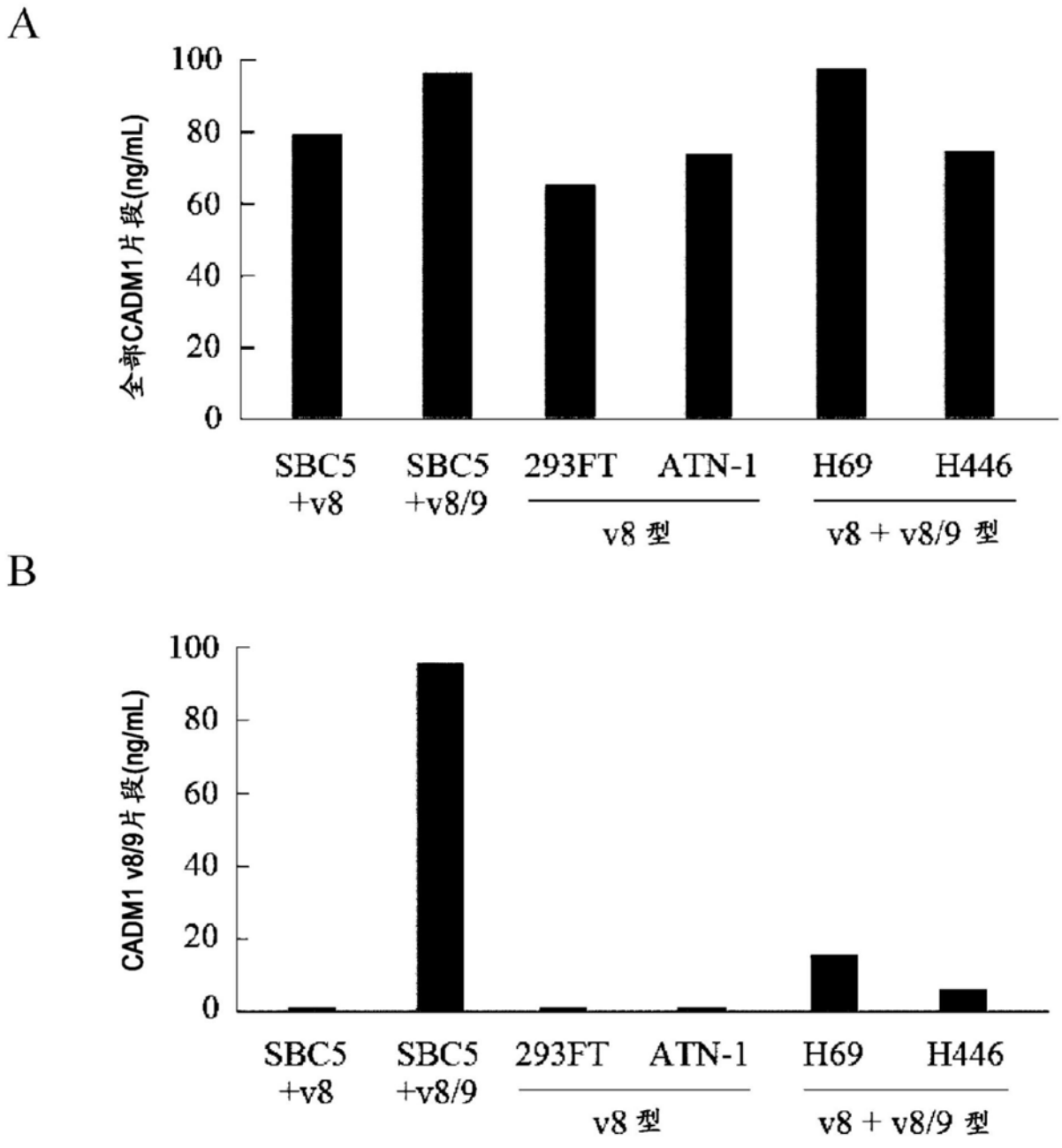

A
100
80
60
40
20
0
全部CADM1片段(ng/mL)
SBC5 +v8
SBC5 +v8/9
293FT
ATN-1
H69
H446
v8 型
v8 + v8/9 型
B
100
80
60
40
20
0
CADM1 v8/9片段(ng/mL)
SBC5 +v8
SBC5 +v8/9
293FT
ATN-1
H69
H446
v8 型
v8 + v8/9 型

图2

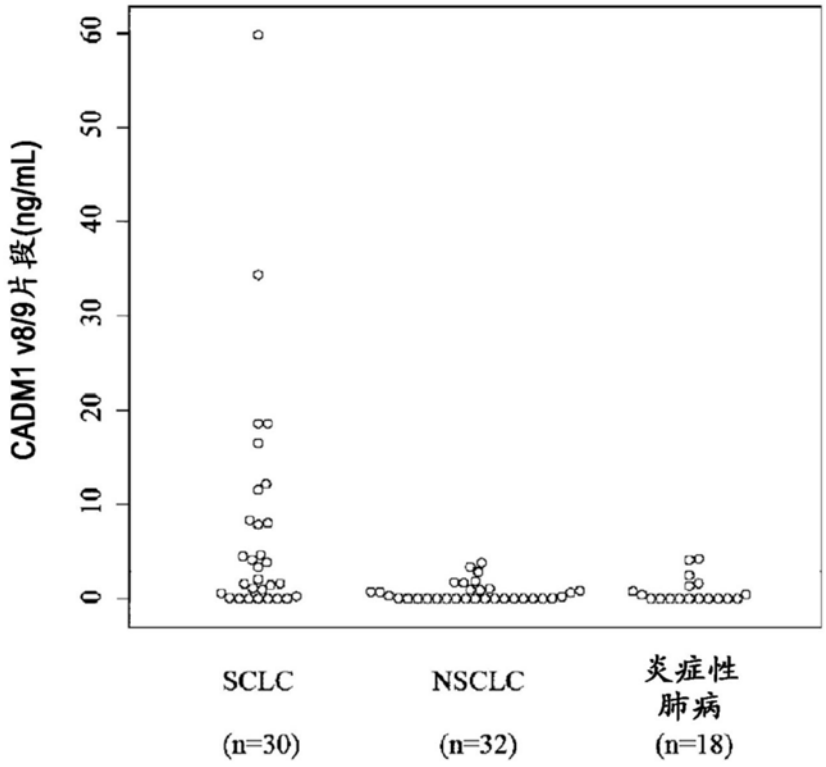

CADM1 v8/9片段(ng/mL)
0
10
20
30
40
50
60
SCLC
(n=30)
NSCLC
(n=32)
炎症性
肺病
(n=18)

图3

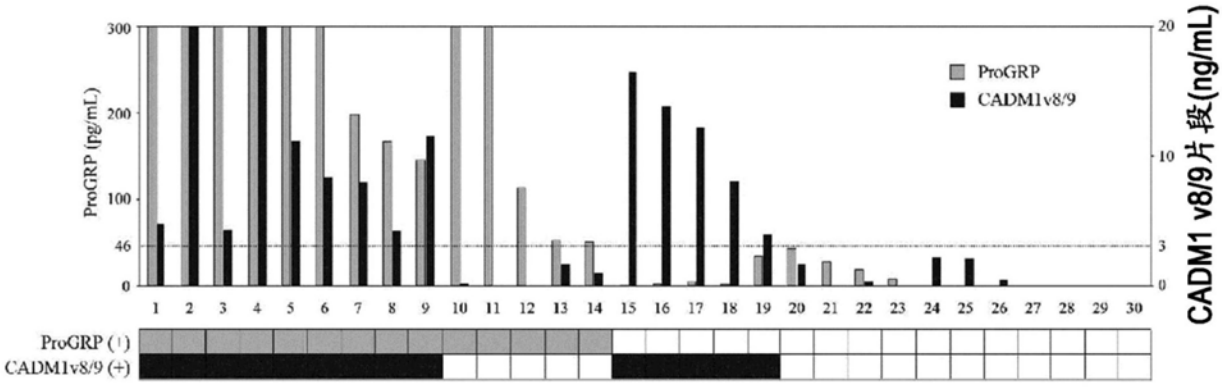

ProGRP (pg/mL)
300
200
100
46
0
20
10
3
0
CADM1 v8/9片段(ng/mL)
ProGRP
CADM1v8/9
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30
ProGRP (+)
CADM1v8/9 (+)

图4

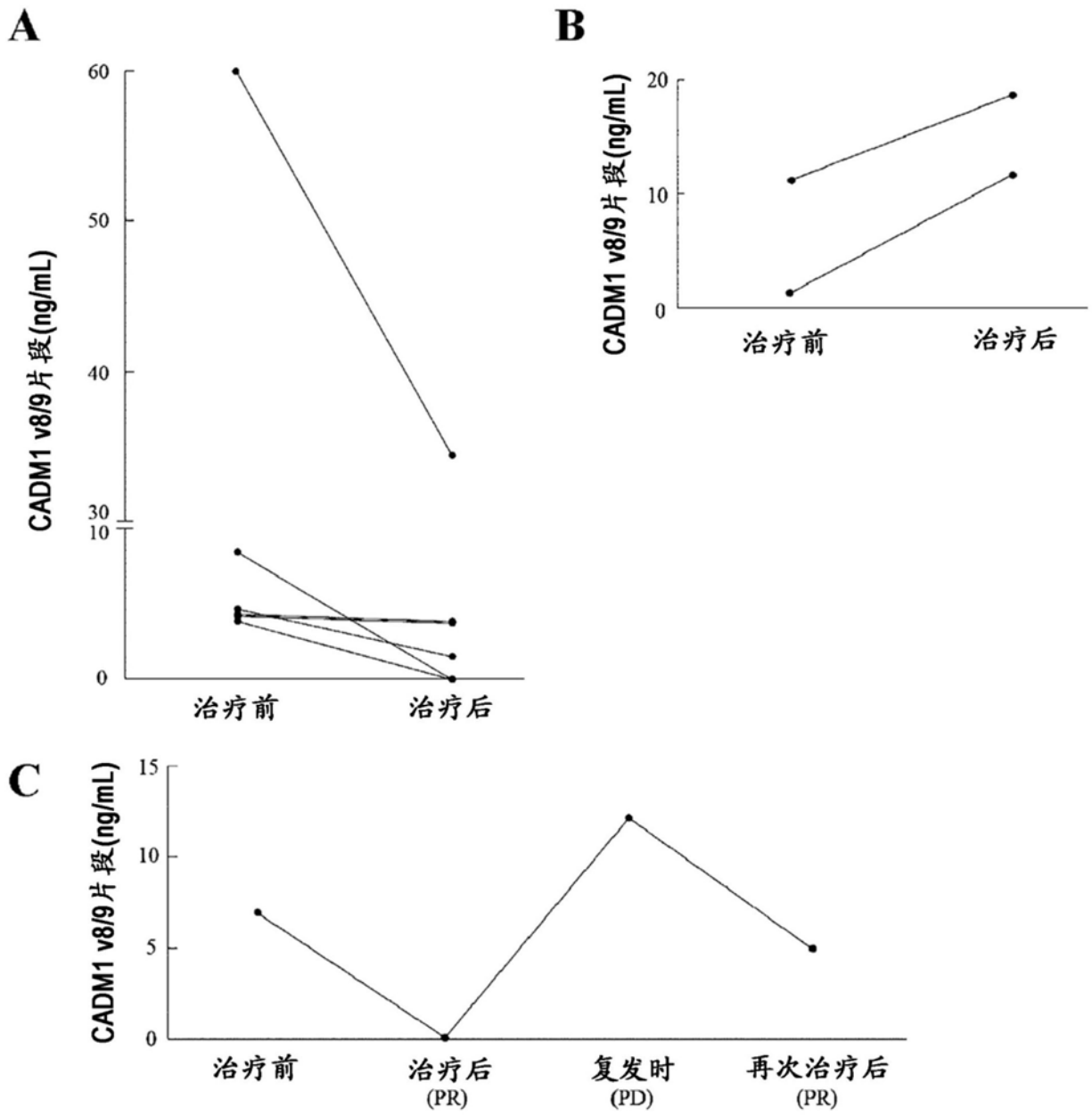

A
60
50
40
30
10
0
CADM1 v8/9片段(ng/mL)
治疗前
治疗后
B
20
10
0
CADM1 v8/9片段(ng/mL)
治疗前
治疗后
C
15
10
5
0
CADM1 v8/9片段(ng/mL)
治疗前
治疗后
(PR)
复发时
(PD)
再次治疗后
(PR)

图5

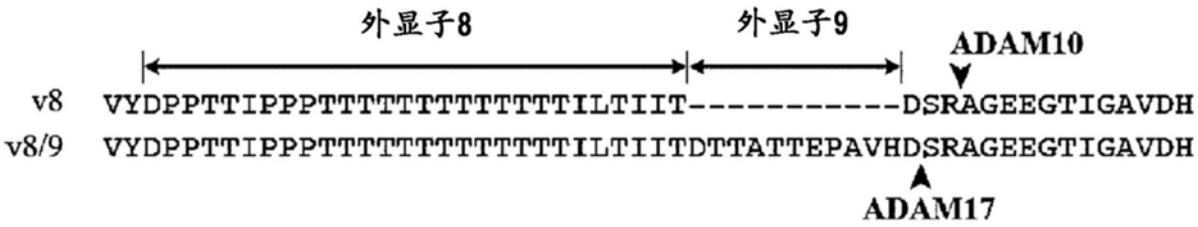

外显子8
外显子9
ADAM10
v8 VYDPPTTIPPPTTTTTTTTTTTTTILTIIT----------DSRAGEEGTIGAVDH
v8/9 VYDPPTTIPPPTTTTTTTTTTTTTILTIITDTTATTEPAVHDSRAGEEGTIGAVDH
ADAM17

图6

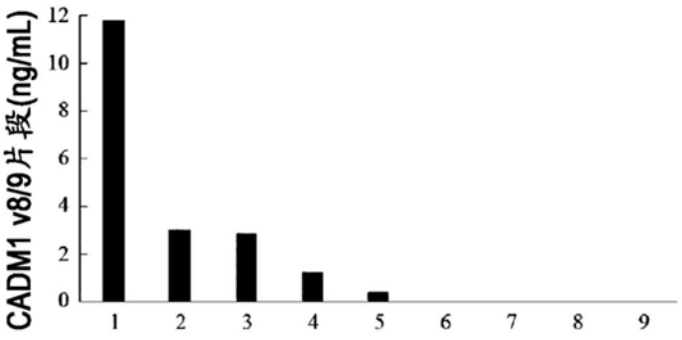

CADM1 v8/9片段(ng/mL)
12
10
8
6
4
2
0
1
2
3
4
5
6
7
8
9

图7

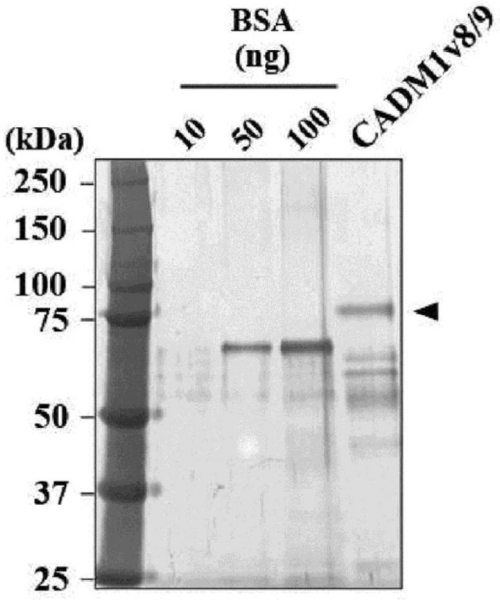

BSA
(ng)
CADM1v8/9
(kDa)
10
50
100
250
150
100
75
50
37
25

图8

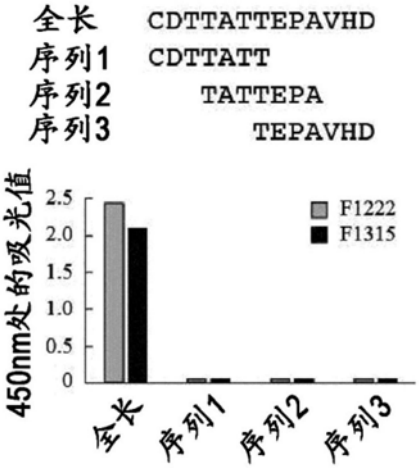

全长 CDTTATTEPAVHD
序列1 CDTTATT
序列2 TATTEPA
序列3 TEPAVHD
450nm处的吸光值
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0
F1222
F1315
全长
序列1
序列2
序列3

图9

重链:DNA序列 (423 bp)

前导序列-FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4

ATGACATTGAACATGCTGTTGGGGCTGAAGTGGGTTTTCTTTGTTGTTTTTTATCAAGGTGTGCATT
GTGAGGTGCAGCTTGTTGAGTCTGGTGGAGGATTGGTGCAGCCTAAAGGGTCATTGAAACTCTCATG
TGCAGCCTCTGGATTCACCTTCAATACCTACGCCATGAACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGAAAGGGT
TTGGAATGGGTTGCTCGCATAAGAAGTAAAAGTAATTATTATACAACATATTATGCCGATTCAGTGA
AAGACAGGTTCACCATCTCCAGAGATGATTCACAAAGCATGCTCTATCTGCAAATGAACAATTTGAA
GACTGAGGACACAGCCATGTATTACTGTATACGACAGAGGCATGGTAACTTCTACTGGGGCCAAGGG
ACTCTGGTCACTGTCTCTGCA

重链: 氨基酸序列 (141 aa)

前导序列 -FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4

MTLNMLLGLKWVFFVVFYQGVHCEVQLVESGGGLVQPKGSLKLSCAASGFTFNTYAMNWVRQAPGKG
LEWVARIRSKSNYYTTYYADSVKDRFTISRDDSQSMLYLQMNNLKTEDTAMYYCIRQRHGNFYWGQG
TLVTVSA

轻链:DNA序列 (393 bp)

前导序列 -FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4

ATGGAGACAGACACAATCCTGCTATGGGTGCTGCTGCTCTGGGTTCCAGGCTCCACTGGTGACATTG
TGCTGACCCAATCTCCAGCTTCTTTGGCTGTGTCTCTAGGGCAGAGGGCCACCATCTCCTGCAAGGC
CAGCCAAAGTGTTGATTATGATGGTTATAGTTATATGAACTGGTACCAACAGAAACCAGGACAGCCA
CCCAAACTCCTCATCTATGCTGCATCCAATCTAGAATCTGGGATCCCAGCCAGGTTTAGTGGCAGTG
GGTCTGGGACAGACTTCACCCTCAACATCCATCCTGTGGAGGAGGAGGATGCTGCAACCTATTACTG
TCAGCAAAGTAATGAGGATCCTCCCACGTTCGGAGCTGGGACCAAGCTGGAGCTGAAA

轻链: 氨基酸序列 (131 aa)

前导序列-FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4

METDTILLWVLLLWVPGSTGDIVLTQSPASLAVSLGQRATISCKASQSVDYDGYSYMNWYQQKPGQP
PKLLIYAASNLESGIPARFSGSGSGTDFTLNIHPVEEEDAATYYCQQSNEDPPTFGAGTKLELK

图10

信号序列

重链

MRLLGFLLCLAAALKSVLS

```
          10         20         30         40         50
QIQLKESGPA VIEPSQSLSL TCIVSGFSII SSSYCWHWIR QPPGKGLEWM

          60         70         80         90         100
GRICYEGSIY YSPSIKSRST ISRDTSLNKF FIQLSSVTNE DTAMYYCSRE

          110        120
RKSTMDYWGQ GTSVTVSS
```

轻链

MMSSAQFLGLLLLCFQGTRC

```
          10         20         30         40         50
DIQVTQTTSS LSASLGDRVT ISCRASQDIS NYLNWYQQKP DGTLKLLIYY

          60         70         80         90         100
TSRLHSGVPS RFSGSGSGTD YSLTISNLDQ EDIATYFCQQ VNALPWTFGG

          110
GTKLEIK
```

图11

信号序列

重链

MERHWIFLFLFSVTAGVHS

```
          10        20        30        40        50
QVQLQQSGTE LAKPGASVKM SCKASGYTFT HYWMHWVKQR PGQGLEWIGF

          60        70        80        90        100
INPGTGYTEY NQKFKDKATL TADKSSSTAY IQLSSLTSED SAVYYCSRAS

          110       120       130
YYSGSSHAWF GFWGQGTLVT VSA
```

轻链

METDTILLWVLLLWVPGSTG

```
          10        20        30        40        50
DIVLTQSPAS LAVSLGQRAT ISCKASQSVN YDGDNYMNWY QQKPGQPPKL

          60        70        80        90        100
LIYAASNLES GIPARFSGSG SGTDFTLNIH PVEEEDAATY YCQQSYEDPW

          110       120
TFGGGTKLEI K
```

图12