



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 117597363 A

(43) 申请公布日 2024. 02. 23

(21) 申请号 202280042376.1

郑宇喜

(22) 申请日 2022.06.16

(74) 专利代理机构 北京银龙知识产权代理有限公司 11243

(30) 优先权数据

专利代理师 许静 宋海花

10-2021-0079629 2021.06.18 KR

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

(51) Int. Cl.

2023.12.13

C07K 16/28 (2006.01)

(86) PCT国际申请的申请数据

A61K 39/00 (2006.01)

PCT/KR2022/008570 2022.06.16

A61P 35/00 (2006.01)

(87) PCT国际申请的公布数据

G01N 33/68 (2006.01)

W02022/265439 K0 2022.12.22

(71) 申请人 韩国原子力研究院

地址 韩国大田广域市

申请人 世宗大学校产学协力团

(72) 发明人 金仁圭 柳春济 金珉奎 金来权

权利要求书2页 说明书26页

朴晁绪 崔文柱 甘然智 申秉澈

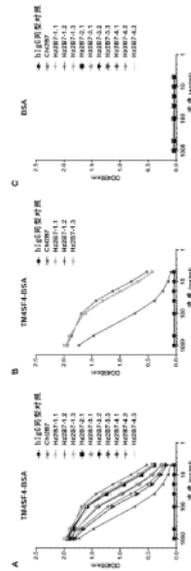
序列表24页 附图14页

(54) 发明名称

抗-TM4SF4人源化抗体及其用途

(57) 摘要

本发明涉及抗-TM4SF4(四跨膜蛋白超家族成员4(TransMembrane 4Superfamily Member 4))人源化抗体及其用途,本发明的抗-TM4SF4人源化抗体能够以高亲和力特异性结合于TM4SF4并对人类显示出低免疫原性,能够检测TM4SF4或者以过表达TM4SF4的癌细胞、癌干细胞为靶向有效地使用。



1. 一种人源化抗体或其抗原结合片段,其中,包括重链可变区和轻链可变区,
所述重链可变区包含具有SEQ ID NO:1的氨基酸序列的FR-H1、具有SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:3的氨基酸序列的FR-H2、具有SEQ ID NO:4的氨基酸序列的FR-H3和具有SEQ ID NO:5的氨基酸序列的FR-H4,
所述轻链可变区包含具有SEQ ID NO:6的氨基酸序列的FR-L1、具有SEQ ID NO:7的氨基酸序列的FR-L2、具有SEQ ID NO:8的氨基酸序列的FR-L3和具有SEQ ID NO:9的氨基酸序列的FR-L4,并且
所述人源化抗体或其抗原结合片段特异性地结合于TM4SF4即四跨膜蛋白超家族成员4。
2. 根据权利要求1所述的人源化抗体或其抗原结合片段,其中,所述重链可变区还包含选自具有SEQ ID NO:10的氨基酸序列的CDR-H1、具有SEQ ID NO:77的氨基酸序列的CDR-H2和具有SEQ ID NO:14的氨基酸序列的CDR-H3组成的组中的至少一个CDR,
所述轻链可变区还包含选自具有SEQ ID NO:79的氨基酸序列的CDR-L1、具有SEQ ID NO:18的氨基酸序列的CDR-L2和具有SEQ ID NO:80的氨基酸序列的CDR-L3组成的组中的至少一个CDR。
3. 根据权利要求2所述的人源化抗体或其抗原结合片段,其中,所述CDR-H2具有选自自由SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:12和SEQ ID NO:13构成的组中的任一个氨基酸序列,或者所述CDR-L1具有选自自由SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:16和SEQ ID NO:17构成的组中的任一个氨基酸序列,或者所述CDR-L3具有SEQ ID NO:19的氨基酸序列。
4. 根据权利要求3所述的人源化抗体或其抗原结合片段,其中,所述重链可变区还包含具有SEQ ID NO:10的氨基酸序列的CDR-H1、具有SEQ ID NO:11的氨基酸序列的CDR-H2和具有SEQ ID NO:14的氨基酸序列的CDR-H3,
所述轻链可变区还包含具有SEQ ID NO:16的氨基酸序列的CDR-L1、具有SEQ ID NO:18的氨基酸序列的CDR-L2和具有SEQ ID NO:19的氨基酸序列的CDR-L3。
5. 根据权利要求1所述的人源化抗体或其抗原结合片段,其中,所述重链可变区具有选自自由SEQ ID NO:20、SEQ ID NO:21、SEQ ID NO:22和SEQ ID NO:23组成的组中的任一个氨基酸序列,
所述轻链可变区具有选自自由SEQ ID NO:24、SEQ ID NO:25和SEQ ID NO:26组成的组中的任一个氨基酸序列。
6. 根据权利要求1至5中任一项所述的人源化抗体或其抗原结合片段,其中,所述人源化抗体还包含选自自由具有SEQ ID NO:27的氨基酸序列的重链恒定区和具有SEQ ID NO:28的氨基酸序列的轻链恒定区构成的组中的至少一个。
7. 根据权利要求1至5中任一项所述的抗体或其抗原结合片段,其中,所述抗原结合片段为选自自由Fab、F(ab')、F(ab')₂和Fv组成的组中的任一个。
8. 根据权利要求1至5中任一项所述的抗体或其抗原结合片段,其中,所述抗体或其抗原结合片段的平衡解离常数KD为 2.4×10^{-8} M以下。
9. 根据权利要求1至5中任一项所述的多核苷酸,其中,包含编码人源化抗体或其抗原结合片段的碱基序列。
10. 一种表达载体,其中,包含权利要求9所述的多核苷酸。

11. 一种宿主细胞,其中,包含权利要求10所述的表达载体。
12. 一种生产人源化抗体或其抗原结合片段的方法,其中,包括培养权利要求10所述的宿主细胞的步骤。
13. 一种TM4SF4检测用组合物,其中,包含权利要求1至5中任一项所述的人源化抗体或其抗原结合片段。
14. 一种TM4SF4检测用试剂盒,其中,包括权利要求13所述的TM4SF4检测用组合物。
15. 一种检测TM4SF4的方法,其中,包括使权利要求1至权利要求5中任一项所述的人源化抗体或其抗原结合片段与预想包含TM4SF4的检测对象样品接触的步骤。
16. 一种癌症的预防或治疗用药物组合物,其中,包含权利要求1至权利要求5中任一项所述的人源化抗体或其抗原结合片段。
17. 根据权利要求16所述的癌症的预防或治疗用药物组合物,其中,所述癌症的预防或治疗是对选自由癌症治疗过程中的癌症化学抗性、癌症治疗后的癌症化学抗性、癌症复发和癌症转移组成的组中的至少一种进行预防或治疗。
18. 根据权利要求16所述的癌症的预防或治疗用药物组合物,其中,所述癌症为选自由肺癌、胃癌、卵巢癌、宫颈癌、乳腺癌、胰腺癌、大肠癌、结肠癌、食道癌、皮肤癌、甲状腺癌、肾癌、肝癌、头颈部癌、膀胱癌、前列腺癌、血癌、多发性骨髓瘤、急性骨髓性白血病、恶性淋巴瘤、胸腺癌、骨肉瘤、纤维腺瘤和脑癌组成的组中的至少一种。
19. 一种癌干细胞生长抑制用组合物,其中,包含权利要求1至权利要求5中任一项所述的人源化抗体或其抗原结合片段。
20. 一种放射线抗癌症治疗辅助用组合物,其中,包含权利要求1至权利要求5中任一项所述的人源化抗体或其抗原结合片段。
21. 根据权利要求20所述的放射线抗癌症治疗辅助用组合物,其中,所述人源化抗体或其抗原结合片段增加癌细胞对放射线的敏感度,所述癌细胞包括癌干细胞。

抗-TM4SF4人源化抗体及其用途

技术领域

[0001] 本发明涉及能够以高亲和力特异性结合于TM4SF4 (四跨膜蛋白超家族成员4, TransMembrane 4Superfamily Member 4) 并人类显示出低免疫原性的人源化抗体及包含其的癌症的预防或治疗用组合物。

背景技术

[0002] TM4SF4(四跨膜蛋白超家族成员4) 是四跨膜蛋白(tetraspanin) 蛋白质的一种, 报道有该分类的其他蛋白质TM4SF1和TM4SF5在大多数的肿瘤中表达上调, 并与上皮间质转化和细胞迁移相关, 大量进行了癌细胞相关研究。有部分报告称TM4SF4在癌细胞中与细胞凋亡和分化以及细胞的侵袭能力相关, 最近本发明的研究团队报告了在人肺癌细胞中TM4SF4蛋白促进癌干细胞生长、自我复制(Self-renewal) 能力和转移/浸润, 并提示了TM4SF4促进作为对癌症发生而言重要的信号传递系统的IGF1R β /AKT/NF κ B或JAK2 (或FAK) /ST AT3活化, 由此通过被促进的细胞因子分泌而强化癌干细胞特性, 从而使肿瘤进一步恶化(Choi SI et al., Oncotarget.2014;5(20):9823-9837, Choi SI et al., Oncotarget.2017;8(60):101284-101297)。

[0003] 抗体由于对靶抗原的高结合特异性和在人体内的稳定性而作为治疗剂来应用。特别是, 抗癌功能的抗体以抗体工程技术的发展为基础, 被改善为人源化抗体、单链抗体、双重抗体、药物融合抗体等, 大幅提高癌症治疗功效而被应用。但是, 由于癌症特性的多样性和新抗原表达带来的治疗抗性诱导等, 所以现有的以癌细胞为靶向而应用的抗原的种类被指出存在局限性, 正在持续进行探索新型癌症特异抗原并导出针对它的抗体的研究。

[0004] 特别是, 报告了对现有的癌症治疗方法中正在应用的靶向药物或者放射线治疗显示抗性并复发的癌症的情况下, 癌干细胞的特性发挥重要作用, 能够以癌干细胞为靶向而应用的抗原的发掘和特异抗体的确保显得尤为重要。

[0005] 另一方面, 为了开发对特定抗原特异性地结合的单克隆抗体, 主要利用以下方法: 利用以人类以外的动物为对象注入抗原并通过动物的免疫系统而制造的抗体。但是, 通过上述方法制造的抗体由于是来源于人类以外的动物的抗体, 而非人类的蛋白质, 因此, 向人体进行给药时, 会发生免疫原性(immunogenicity) 的问题。即, 来源于人类以外的物种的抗体对人体进行给药时, 会诱导HAMA(人抗-小鼠抗体(Human Anti-Mouse Antibody)) 的发生, 基于上述来源于异种的抗体的治疗功效会减少。

[0006] 对此, 提出了如下方法: 在构成来源于上述人类以外的物种的抗体的氨基酸序列中, 获得与抗原的结合发挥重要作用的序列, 其余部分用人类抗体的序列来替换, 从而解决前面说明的问题。但是, 通过这种方法制造的嵌合体抗体(chimeric antibody) 或人源化抗体(humanized antibody) 由于融合了彼此不同的两种蛋白质区域, 从而会产生无法作为抗体发挥作用或者对抗原的结合亲和力减少的可能性。因此, 实际情况是开发出在人体中不诱导HAMA的发生且显示出对抗原的高特异性和亲和力的人源化抗体方面仍存在困难。

发明内容

[0007] 技术课题

[0008] 本发明的目的在于提供能够以高亲和力特异性地结合于在癌细胞的表面过表达而表现的TM4SF4(四跨膜蛋白超家族成员4)蛋白质且对人体进行给药时能够显示出低免疫原性的新型的人源化抗体或其抗原结合片段。

[0009] 另外,本发明的目的在于提供编码上述人源化抗体或其抗原结合片段并使其表达的多核苷酸、表达载体、宿主细胞、以及上述生产人源化抗体或其抗原结合片段的方法。另外,本发明提供一种生产抗体或其抗原结合片段的方法,包括培养上述宿主细胞的步骤。

[0010] 另外,本发明的目的在于提供用于检测TM4SF4的用途的组合物、试剂盒、以及检测TM4SF4的方法。

[0011] 另外,本发明的目的在于提供用于预防或治疗癌症的药物组合物、癌干细胞的生长抑制用组合物、以及放射线抗癌症治疗辅助用组合物。

[0012] 课题解决手段

[0013] 为了实现上述目的,提供人源化抗体或其抗原结合片段,其中,包括重链可变区和轻链可变区,上述重链可变区包含具有SEQ ID NO:1的氨基酸序列的FR-H1、具有SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:3的氨基酸序列的FR-H2、具有SEQ ID NO:4的氨基酸序列的FR-H3和具有SEQ ID NO:5的氨基酸序列的FR-H4,上述轻链可变区包含具有SEQ ID NO:6的氨基酸序列的FR-L1、具有SEQ ID NO:7的氨基酸序列的FR-L2、具有SEQ ID NO:8的氨基酸序列的FR-L3和具有SEQ ID NO:9的氨基酸序列的FR-L4,并且上述人源化抗体或其抗原结合片段特异性地结合于TM4SF4(四跨膜蛋白超家族成员4(TransMembrane 4Superfamily Member 4))。

[0014] 本发明的另一方面提供包含编码上述人源化抗体或其抗原结合片段的碱基序列的多核苷酸、包含上述多核苷酸的表达载体、以及包含上述表达载体的宿主细胞。

[0015] 本发明的另一方面提供包含上述人源化抗体或其抗原结合片段的TM4SF4检测用组合物和包含上述TM4SF4检测用组合物的TM4SF4检测用试剂盒。

[0016] 本发明的另一方面提供一种检测TM4SF4的方法,其中,包括使人源化抗体或其抗原结合片段与预想包含TM4SF4的检测对象样品接触的步骤。

[0017] 本发明的另一方面提供包含上述人源化抗体或其抗原结合片段的癌症的预防或治疗用药物组合物、癌干细胞生长抑制用组合物和放射线抗癌症治疗辅助用组合物。

[0018] 发明效果

[0019] 本发明的人源化抗体由于不结合于BSA之类的物质并能够特异性地结合于TM4SF4,所以能够检测TM4SF4或者能够以过表达TM4SF4的癌细胞、癌干细胞为靶向有效地使用。特别是,本发明的人源化抗体具有与来源于小鼠的抗体相似或者与嵌合体抗体相比结合亲和力明显高的特征,从而显示出优异的效果。

[0020] 另外,本发明的人源化抗体是除了大部分的CDR序列以外的其余序列利用来源于人类抗体的氨基酸序列或者改变了其一部分,因此,即使对人体进行给药时,诱导HAMA(人抗-小鼠抗体(Human Anti-Mouse Antibody))的可能性低,因而免疫原性(immunogenicity)也低的效果。因此,本发明的人源化抗体具有能够解决因利用来源于小鼠的抗体而可能发生的免疫反应的问题的优点。

[0021] 但是,本发明的效果不限于上述提及的效果,未提及的其他效果可以由下述的记

载清楚地被本领域技术人员所理解。

附图说明

[0022] 图1是对用于制造编码本发明的人源化抗体中被称为Hz2B7-1.0的重链可变区的基因序列的重组PCR过程进行说明的示意图。

[0023] 图2表示上述Hz2B7-1.0重链可变区基因的制造结果,A表示对T1、T2、T3片段的琼脂糖凝胶电泳结果,B表示包含连接了T、T2、T3的最终完成的Hz2B7-1.0重链可变区基因的DNA的电泳结果。

[0024] 图3表示包含编码本发明的人源化抗体中被称为Hz2B7-0.1的轻链可变区的基因的DNA的琼脂糖凝胶电泳结果。

[0025] 图4是以作为本发明的人源化抗体的Hz2B7-1.1抗体的氨基酸序列与作为抗原的TM4SF4的表位序列为基础,通过对接模拟而分析了它们的相互租用的结果,表示了与表位相互作用的抗体的主要氨基酸残基和结合自由能值。表示的抗体原子中,粉色表示碳,蓝色表示氮,红色表示氧。表位的碳原子用绿色表示。

[0026] 图5是在制造作为本发明的人源化抗体的Hz2B7抗体的过程中对原来的小鼠抗体(2B7)和与其相似的人类抗体(human-3QRG)重链(A)轻链(B)氨基酸序列与新制造的4种人源化抗体Hz2B7重链、3种轻链的氨基酸序列彼此进行比较的图。连字符(-)表示与原来的小鼠抗体氨基酸相同,由方框表示的是在本发明中发掘的对于与表位结合重要的氨基酸的位置。

[0027] 图6的A表示在本发明的人源化抗体中包含被称为Hz2B7-2.0的重链可变区(Hz2B7 HC V46A)、被称为Hz2B7-3.0的重链可变区(Hz2B7 HC W55Y)、被称为Hz2B7-4.0的重链可变区(Hz2B7 HC W55S)基因的DNA的琼脂糖凝胶电泳结果,B表示包含被称为Hz2B7-0.2的轻链可变区(Hz2B7 LC N31V)、被称为Hz2B7-0.3的轻链可变区(Hz2B7 LC N31F)基因的DNA的琼脂糖凝胶电泳结果。

[0028] 图7表示用作比较例的嵌合体抗体的重链和轻链基因的琼脂糖凝胶电泳结果(A)、包含上述重链基因的载体的电泳结果(B)、包含上述轻链基因的载体的电泳结果(C)。

[0029] 图8表示包含上述嵌合体抗体的基因的载体的结构。

[0030] 图9的A表示以本发明的人源化抗体、嵌合体抗体、来源于小鼠的2B7抗体、以及作为人类抗体的IgG为对象进行SDS-PAGE和考马斯亮蓝染色的结果。B表示以上述抗体为对象进行免疫印迹的结果,二次抗体利用了结合于人类抗体IgG伽马链和卡帕链的抗体。

[0031] 图10表示利用本发明的10种人源化抗体、嵌合体抗体(Chi2B7)、以及人IgG(Isotype hIgG)进行间接ELISA(Indirect ELISA)的结果,A为表示对TM4SF4-BSA抗原的全部抗体的结合亲和力的图表,B为表示在人源化抗体中显示更高的结合亲和力的Hz2B7-1.1、Hz2B7-1.2、Hz2B7-1.3的结合亲和力的图表,C表示对BSA的全部抗体的结合亲和力的图表。

[0032] 图11表示了利用表面等离子体共振(Surface plasmon resonance,SPR)分析而比较分析5种抗-TM4SF4人源化抗体对TM4SF4蛋白质表位的抗体亲和力,首先,将结合有生物素的TM4SF4肽贴合于传感芯片,一边使5种人源化抗体流过,一边计算抗体的结合速率(Association rate,Ka)和解离速率(Dissociation rate,Kd)以及平衡解离常数(KD,Kd/

Ka) 值。

[0033] 图12表示利用本发明的人源化抗体(Hz2B7-1.1、Hz2B7-1.2、Hz2B7-1.3)、嵌合体抗体(Chi2B7)、以及人IgG并以肺癌、人类原代肝细胞、肝癌细胞株为对象利用流式细胞分析仪进行FACS分析的结果。A为比较了作为肺癌细胞株的A549细胞与Ca1u-3细胞株中的抗体的结合能力的图表,B为在人类原代肝细胞(hPH)、作为肝癌细胞株的Huh-7、SNU-387、SNU-449细胞株中确认了Hz2B7-1.1与Hz2B7-1.2抗体的结合能力的图表。

[0034] 图13是向CHO-DG44细胞导入编码本发明的人源化抗体的基因并转化后,筛选具有G418抗性的克隆,通过ELISA测定OD值来比较各克隆的抗体生产量。作为阳性对照组,利用了1 μ g的人IgG。

[0035] 图14是以通过MTX使抗体基因扩增的Hz2B7-1.1-4H12克隆和Hz2B7-1.2-4A12克隆为对象通过夹心ELISA(sandwich ELISA)比较了抗体生产量,A比较了Hz2B7-1.1-4H12克隆中的未经MTX处理的克隆与利用0.08 μ M的MTX进行处理的克隆的抗体生产量,B比较了Hz2B7-1.2-4A12克隆之间的抗体生产量。

[0036] 图15是对利用0.08 μ M的MTX进行处理而使抗体基因扩增的Hz2B7-1.1-4H12克隆和Hz2B7-1.2-4A12克隆的抗体生产量(μ g/10⁶细胞/24hr)通过夹心ELISA测定并进行比较的。

[0037] 图16是测定、比较人血清内的小鼠和人源化抗体的稳定性的图表。

具体实施方式

[0038] 下面,详细说明本发明。

[0039] 1. 特异性地结合于TM4SF4的人源化抗体及其抗原结合片段

[0040] 本发明的一方面提供特异性地结合于TM4SF4并对人类显示出低免疫原性的人源化抗体或其抗原结合片段。

[0041] 在本发明中,用语“抗体(antibody)”是指在免疫学上与抗原的表位(epitope)特异性结合而具有反应性的免疫球蛋白分子。上述抗体可以将单克隆抗体、多克隆抗体、具有全部长度的链结构的抗体(全长抗体,full-length antibody)、至少具有抗原结合功能的功能性片段(抗原结合片段)和重组抗体全部包括在内,具体而言,本发明的抗体可以是单克隆抗体或其抗原结合片段。上述单克隆抗体是指由实质上相同的抗体群体中获得的单一分子组成的抗体分子,这种单克隆抗体对特定表位显示单一结合特异性和亲和力。上述全长抗体是具有2个全部长度的轻链和2个全部长度的重链的结构,各个轻链可以通过二硫键与重链连接。上述抗体包含重链(heavy chain,HC)和轻链(light chain,LC)多肽,上述重链和轻链可以包含可变区和恒定区。

[0042] 上述恒定区是为了使上述抗体能够结合于包含免疫系统中的多种细胞(T-细胞等)、补体系统的成分的宿主组织等而起到媒介作用的部位。上述恒定区只要是来源于相同物种的相同种类的抗体,则与抗原的种类无关地发挥相同功能,构成它的氨基酸序列也在每种抗体中具有相同或高相似度。上述恒定区可以分为重链的恒定区(可以简称为CH)和轻链恒定区(可以简称为CL)。上述重链可变区具有伽马(γ)、缪(μ)、阿尔法(α)、德尔塔(δ)和/或伊普西龙(ϵ)类型,作为子类,具有伽马1(γ 1)、伽马2(γ 2)、伽马3(γ 3)、伽马4(γ 4)、阿尔法1(α 1)和/或阿尔法2(α 2)。轻链可变区具有卡帕(κ)和兰布达(λ)类型。IgG为亚型(subtype),包括IgG1、IgG2、IgG3和IgG4。

[0043] 上述可变区是对抗原具有特异性的抗体部位,可以分为重链的可变区(可以简称为VH)和轻链的可变区(可以简称为VL)。上述可变区可以包含3个CD R(complementary-determining regions,或者互补性决定区)和4个FR(框架区(framework regions))。上述CDR可以是与抗原的识别相关的环状的部位,可以根据上述CDR的氨基酸序列而决定对抗原的特异性。上述CDR可以根据其顺序被称为CDR1、CDR2、CDR3,根据是重链和轻链中的哪一多肽的CDR,重链可变区的情况下,可以被称为CDR-H1、CDR-H2、CDR-H3,轻链可变区的情况下,可以被称为CDR-L1、CDR-L2、CDR-L3。FR也同样,重链可变区的情况下,可以被称为FR-H1、FR-H2、FR-H3、FR-H4,轻链可变区的情况下,可以被称为FR-L1、FR-L2、FR-L3、FR-L4。另外,上述CDR和FR在各个可变区中可以按如下的顺序排列。顺序是从N-末端(氨基-末端)向C-末端(羧基-末端)方向:重链可变区的情况下FR-H1、CDR-H1、FR-H2、CDR-H2、FR-H3、CDR-H3、FR-H4,轻链可变区的情况下FR-L1、CDR-L1、FR-L2、CDR-L2、FR-L3、CDR-L3、FR-L4。

[0044] 在本发明中,用语“抗原结合片段”保留有抗体的抗原结合功能的本发明的人源化抗体的任意的片段。上述抗原结合片段可以与“片段”、“抗体片段”等用语互换使用,上述抗原结合片段可以为等Fab、Fab'、F(ab')₂、Fv等,但并不限于于此。

[0045] 上述Fab是具有轻链和重链的可变区与轻链的恒定区和重链的第一个恒定区(CH1结构域)的结构,具有1个抗原结合部位。上述Fab'在具有在重链CH1结构域的C末端包含一个以上的半胱氨酸残基的铰链区(hinge region)的方面与上述Fab存在差异。上述F(ab')₂通过Fab'的铰链区的半胱氨酸残基形成二硫键而生成。上述Fv表示只具有重链可变区和轻链可变区的最小的抗体片段。双链Fv(two-chain Fv)通过非共价键连接重链可变区与轻链可变区,单链Fv(single-chain Fv)一般通过肽连接而使重链可变区与轻链可变区以共价键连接或者在C-末端直接连接,从而可以像双链Fv那样形成二聚体之类的结构。上述抗原结合片段可以利用蛋白水解酶(例如,将整个抗体用木瓜蛋白酶进行限制切割,则可获得Fab,用胃蛋白酶进行切割,则可获得F(ab')₂片段)、或者通过基因重组技术来制作,但并不限于于此。

[0046] 在本发明中,用语“人源化抗体(humanized antibody)”表示对人类显示出减少的免疫原性(immunogenicity)或者非-免疫原性(non-immunogenicity)的抗体。上述人源化抗体例如可通过使来源于人类以外的个体(非-人类物种)的CDR(互补性决定区(complementarity determining regions))与来源于人类抗体的恒定区、来源于人类抗体的可变区中的FR(框架区(framework regions))结合而制造。上述人源化抗体可以通过CDR-移植(CDR-grafting)方法,从而使非-人类物种抗体的CDR被移植到人类抗体的FR序列之间而制造。

[0047] 在本发明中,用语“FR(框架区(framework regions))”是指免疫球蛋白分子的可变区中的互补性决定区以外的部分。框架区在轻链、重链中分别具有4个框架区(框架区1、框架区2、框架区3和框架区4)。

[0048] 在本发明中,用语“人类抗体”是指轻链、重链均来源于人类的抗体。人类抗体根据重链的恒定区的差异而包括具有 γ 链的重链的IgG(包括IgG1、IgG2、IgG3和IgG4)、具有 μ 链的重链的IgM、具有 α 链的重链的IgA(包括IgA1、IgA2)、具有 δ 链的重链的IgD、或者具有 ϵ 链的重链的IgE。另外,原则上轻链包含 κ 链和 λ 链中的一种以上。

[0049] 在本发明中,用语“嵌合体抗体(chimeric antibody)”是指抗体的可变区来源于

人类以外的个体(非人类物种),恒定区来源于与上述个体不同的物种,例如人类的抗体。

[0050] 如果对上述人源化抗体和嵌合体抗体更详细地进行说明,则以来源于小鼠的抗体与人类抗体为对象进行比较时,按照小鼠抗体-嵌合体抗体-人源化抗体-人类抗体的顺序与人类抗体具有序列上的相似性。因此,人源化抗体在与小鼠抗体或嵌合体抗体进行比较时,与人类抗体的相似性更高,在对人体进行给药时,具有免疫原性更低的特征。

[0051] 在本发明中,用语“表位(epitope)”是指免疫球蛋白、抗体或其抗原结合片段能够特异性地识别并结合的抗原上的特定部位。上述表位可以由连续氨基酸或基于蛋白质的三维折叠而并列的不连续的氨基酸形成。

[0052] 本发明的人源化抗体或其抗原结合片段包括重链可变区和轻链可变区,上述重链可变区包含具有SEQ ID NO:1的氨基酸序列的FR-H1、具有SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:3的氨基酸序列的FR-H2、具有SEQ ID NO:4的氨基酸序列的FR-H3、具有SEQ ID NO:5的氨基酸序列的FR-H4,上述轻链可变区包含具有SEQ ID NO:6的氨基酸序列的FR-L1、具有SEQ ID NO:7的氨基酸序列的FR-L2、具有SEQ ID NO:8的氨基酸序列的FR-L3、具有SEQ ID NO:9的氨基酸序列的FR-L4,并且上述人源化抗体或其抗原结合片段特异性地结合于TM4SF4(四跨膜蛋白超家族成员4)。

[0053] 上述具有SEQ ID NO:1的氨基酸序列的FR-H1可以是在本发明中被称为“Hz2B7-1.0”、“Hz2B7-2.0”、“Hz2B7-3.0”、“Hz2B7-4.0”的重链可变区的FR1序列。上述具有SEQ ID NO:2的氨基酸序列的FR-H2可以是在本发明中被称为“Hz2B7-1.0”、“Hz2B7-3.0”、“Hz2B7-4.0”的重链可变区的FR2序列,上述具有SEQ ID NO:3的氨基酸序列的FR-H2可以是在本发明中被称为“Hz2B7-2.0”的重链可变区的FR2序列。上述具有SEQ ID NO:4的氨基酸序列的FR-H3可以是在本发明中被称为“Hz2B7-1.0”、“Hz2B7-2.0”、“Hz2B7-3.0”、“Hz2B7-4.0”的重链可变区的FR3序列。上述具有SEQ ID NO:5的氨基酸序列的FR-H4可以是在本发明中被称为“Hz2B7-1.0”、“Hz2B7-2.0”、“Hz2B7-3.0”、“Hz2B7-4.0”的重链可变区的FR4序列。

[0054] 上述具有SEQ ID NO:6的氨基酸序列的FR-L1可以是在本发明中被称为“Hz2B7-0.1”、“Hz2B7-0.2”、“Hz2B7-0.3”的轻链可变区的FR1序列。上述具有SEQ ID NO:7的氨基酸序列的FR-L2可以是在本发明中被称为“Hz2B7-0.1”、“Hz2B7-0.2”、“Hz2B7-0.3”的轻链可变区的FR2序列。上述具有SEQ ID NO:8的氨基酸序列的FR-L3可以是在本发明中被称为“Hz2B7-0.1”、“Hz2B7-0.2”、“Hz2B7-0.3”的轻链可变区的FR3序列。上述具有SEQ ID NO:9的氨基酸序列的FR-L4可以是在本发明中被称为“Hz2B7-0.1”、“Hz2B7-0.2”、“Hz2B7-0.3”的轻链可变区的FR4序列。

[0055] 上述TM4SF4是四跨膜蛋白(tetraspanin)蛋白质的一种,是已知在癌细胞中与细胞凋亡和分化、以及细胞的侵袭能力相关的蛋白质。另外,已知上述TM4SF4促进癌干细胞的生长、转移等,强化癌干细胞的特性而使肿瘤进一步恶化。上述TM4SF4蛋白质可以是存在于细胞的膜的膜蛋白, TM4SF4的一部分可以向细胞外部露出。上述露出部位可以包含2个环(loop)结构,上述TM4SF4的露出到细胞外的部位中的一部分氨基酸序列可以是本发明的人源化抗体或其抗原结合片段能够特异性地识别并结合的表位。上述TM4SF4的表位可以包含例如“TWGYPFHDG DYLNDE”(从N-末端到C-末端方向的顺序)的氨基酸序列。

[0056] 上述重链可变区还可以包含选自具有SEQ ID NO:10的氨基酸序列的CDR-H1、SEQ ID NO:77的氨基酸序列的CDR-H2和具有SEQ ID NO:14的氨基酸序列的CDR-H3组成的

组中的至少一个CDR。特别是,上述CDR-H2可以具有SEQ ID NO:78的氨基酸序列,具体而言,可以具有选自自由SEQ

[0057] ID NO:11、SEQ ID NO:12和SEQ ID NO:13构成的组中的任一个氨基酸序列。

[0058] 上述轻链可变区还可以包含选自自由具有SEQ ID NO:79的氨基酸序列的CDR-L1、具有SEQ ID NO:18的氨基酸序列的CDR-L2和具有SEQ ID NO:80的氨基酸序列的CDR-L3组成的组中的至少一个CDR。特别是,上述CDR-L1可以具有选自自由SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:16和SEQ ID NO:17构成的组中的至少一个氨基酸序列,上述CDR-L3可以具有SEQ ID NO:19的氨基酸序列。

[0059] 上述具有SEQ ID NO:10的氨基酸序列的CDR-H1可以是在本发明中被称为“Hz2B7-1.0”、“Hz2B7-2.0”、“Hz2B7-3.0”、“Hz2B7-4.0”的重链可变区的CDR1序列。上述具有SEQ ID NO:11的氨基酸序列的CDR-H2可以是在本发明中被称为“Hz2B7-1.0”、“Hz2B7-2.0”的重链可变区的CDR2序列,上述具有SEQ ID NO:12的氨基酸序列的CDR-H2可以是在本发明中被称为“Hz2B7-3.0”的重链可变区的CDR2序列,上述具有SEQ ID NO:13的氨基酸序列的CDR-H2可以是在本发明中被称为“Hz2B7-4.0”的重链可变区的CDR2序列。上述具有SEQ ID NO:14的氨基酸序列的CDR-H3可以是在本发明中被称为“Hz2B7-1.0”、“Hz2B7-2.0”、“Hz2B7-3.0”、“Hz2B7-4.0”的重链可变区的CDR3序列。

[0060] 上述具有SEQ ID NO:15的氨基酸序列的CDR-L1可以是在本发明中被称为“Hz2B7-0.1”的轻链可变区的CDR1序列,上述具有SEQ ID NO:16的氨基酸序列的CDR-L1可以是在本发明中被称为“Hz2B7-0.2”的轻链可变区的CDR1序列,上述具有SEQ ID NO:17的氨基酸序列的CDR-L1可以是在本发明中被称为“Hz2B7-0.3”的轻链可变区的CDR1序列。上述具有SEQ ID NO:18的氨基酸序列的CDR-L2可以是在本发明中被称为“Hz2B7-1.0”、“Hz2B7-2.0”、“Hz2B7-0.3”的轻链可变区的CDR2序列。上述具有SEQ ID NO:19的氨基酸序列的CDR-L3可以是在本发明中被称为“Hz2B7-1.0”、“Hz2B7-2.0”、“Hz2B7-0.3”的轻链可变区的CDR3序列。

[0061] 上述重链可变区可以具有选自自由SEQ ID NO:20、SEQ ID NO:21、SEQ ID NO:22和SEQ ID NO:23组成的组中的任一个氨基酸序列。

[0062] 上述轻链可变区可以具有选自自由SEQ ID NO:24、SEQ ID NO:25和SEQ ID NO:26组成的组中的任一个氨基酸序列。

[0063] 上述具有SEQ ID NO:20的氨基酸序列的重链可变区可以是在本发明中被称为“Hz2B7-1.0”的重链可变区的序列,上述具有SEQ ID NO:21的氨基酸序列的重链可变区可以是在本发明中被称为“Hz2B7-2.0”的重链可变区的序列,上述具有SEQ ID NO:22的氨基酸序列的重链可变区可以是在本发明中被称为“Hz2B7-3.0”的重链可变区的序列,上述具有SEQ ID NO:23的氨基酸序列的重链可变区可以是在本发明中被称为“Hz2B7-4.0”的重链可变区的序列。

[0064] 上述具有SEQ ID NO:24的氨基酸序列的轻链可变区可以是在本发明中被称为“Hz2B7-0.1”的轻链可变区的序列,上述具有SEQ ID NO:25的氨基酸序列的轻链可变区可以是在本发明中被称为“Hz2B7-0.2”的轻链可变区的序列,上述具有SEQ ID NO:26的氨基酸序列的轻链可变区可以是在本发明中被称为“Hz2B7-0.3”的轻链可变区的序列。

[0065] 本发明的人源化抗体或其抗原结合片段可以包含来源于人类的抗体的重链恒定

区和/或轻链恒定区,只要不阻碍上述人源化抗体或其抗原结合片段对TM4SF4特异性地结合的特性,就可以没有限制地利用上述来源于人类的抗体的重链恒定区和/或轻链恒定区。例如,上述重链恒定区可以是具有SEQ ID NO:27的氨基酸序列的重链恒定区,上述轻链恒定区可以是具有SEQ ID NO:28的氨基酸序列的轻链恒定区。

[0066] 前面说明的氨基酸序列在不对包含其的多肽的结构、功能、活性等造成影响的范围内可以包括通过氨基酸残基的缺失、插入、置换或它们的组合而具有不同序列的变体。另外,上述氨基酸序列可以包括发生了本领域中已知的通常的改变的氨基酸,上述氨基酸改变例如可以为磷酸化(phosphorylation)、硫酸化(sulfation)、丙烯酸化(acrylation)、糖化(glycosylation)、甲基化(methylation)、法尼基化(farnesylation)等。本发明的人源化抗体或其抗原结合片段不仅包含前面说明的氨基酸序列,还具有与其实质地相同的氨基酸序列或者包含其变体。上述具有实质上相同的氨基酸序列可以包含与前面说明的氨基酸序列具有90%以上、91%以上、92%以上、93%以上、94%以上、95%以上、96%以上、97%以上、98%以上、99%以上或者99.5%以上的同源性的氨基酸序列,但并不限于此。

[0067] 本发明的人源化抗体或其抗原结合片段的平衡解离常数(KD)可以为 $3.0 \times 10^{-8} \text{M}$ 以下,例如可以为 $2.9 \times 10^{-8} \text{M}$ 以下、 $2.8 \times 10^{-8} \text{M}$ 以下、 $2.7 \times 10^{-8} \text{M}$ 以下、 $2.6 \times 10^{-8} \text{M}$ 以下或 $2.5 \times 10^{-8} \text{M}$ 以下,具体而言,可以为 $2.4 \times 10^{-8} \text{M}$ 以下。

[0068] 根据本发明的具体的实施例,通过利用了本发明的人源化抗体的间接ELISA测定对于TM4SF4的结合能力并进行比较,结果可以确认本发明的人源化抗体与嵌合体抗体(将来源于小鼠的ECL-2B7抗体的可变区与人类抗体的恒定区组合的抗体)进行比较时,显示出明显高的结合能力(图10的A、B)。特别是,显示出在轻链可变区与重链可变区的多种组合人源化抗体中,被称为Hz2B7-1.2的人源化抗体的结合能力最优异(图10、图11)。另外,本发明的人源化抗体在以BSA为对象而进行的上述间接ELISA实验中不显示结合能力,可以确认是只对TM4SF4特异性地结合的抗体(图10)。

[0069] 根据本发明的另一具体的实施例,利用了本发明的人源化抗体的FACS实验结果,可以确认本发明的人源化抗体对在细胞表面过表达TM4SF4的肺癌细胞株Calu-3和A549细胞具有优异的结合能力(图12)。与利用了上述嵌合体抗体的FACS实验结果相比较时,在利用本发明的人源化抗体的情况下,测定出与肺癌细胞的结合能力更高,与上述间接ELISA实验同样,可以确认被称为Hz2B7-1.2的人源化抗体的效果最优异(图10至图12)。

[0070] 2. 用于表达TM4SF4特异性人源化抗体的技术

[0071] 本发明的另一方面提供能够为了表达并制造上述人源化抗体或其抗原结合片段而使用的多核苷酸、表达载体、宿主细胞和生产方法。

[0072] 关于上述人源化抗体、其抗原结合片段、TM4SF4等的说明与“1. 特异性地结合于TM4SF4的人源化抗体及其抗原结合片段”中对它们进行的说明相同,为了避免重复说明,省略记载,以下只对与多核苷酸、表达载体和宿主细胞相关的内容进行说明。

[0073] 在本发明中,用语“多核苷酸”总括性地包括DNA和RNA分子,作为上述多核苷酸的基本构成单元的核苷酸不仅包括自然界中存在的核苷酸,还可以包括糖或碱基部位被改变的类似物(analogue)。

[0074] 本发明的多核苷酸包含编码人源化抗体或其抗原结合片段的碱基序列。

[0075] 编码上述人源化抗体或其抗原结合片段是指上述多核苷酸经过转录、翻译等通常

的蛋白质表达过程而能够合成具有本发明的人源化抗体或其抗原结合片段的氨基酸序列的蛋白质的遗传信息被编码。此时,不仅是对具有与上述人源化抗体或其抗原结合片段完全相同的氨基酸序列的蛋白质、对如前面说明的那样具有与上述蛋白质实质上相同的氨基酸序列的蛋白质或者具有与上述蛋白质相同和/或类似的活性的蛋白质也进行编码的多核苷酸也可以包含在本发明的范围内。

[0076] 上述多核苷酸可以根据将其导入并表达的生物的种类和上述生物的生物的转录、翻译等表达系统而包含最佳的碱基序列。

[0077] 具体而言,上述多核苷酸可以包含选自由SEQ ID NO:29、SEQ ID NO:30、SEQ ID NO:31、SEQ ID NO:32、SEQ ID NO:33、SEQ ID NO:34、SEQ ID NO:35、SEQ ID NO:36、SEQ ID NO:37、SEQ ID NO:38、SEQ ID NO:39、SEQ ID NO:40、SEQ ID NO:41、SEQ ID NO:42、SEQ ID NO:43、SEQ ID NO:44、SEQ ID NO:45、SEQ ID NO:46、SEQ ID NO:47、SEQ ID NO:48、SEQ ID NO:49、SEQ ID NO:50、SEQ ID NO:51、SEQ ID NO:52、SEQ ID NO:53、SEQ ID NO:54、SEQ ID NO:55和SEQ ID NO:56组成的组中的至少一个碱基序列。

[0078] 上述SEQ ID NO:29的碱基序列可以编码上述SEQ ID NO:1的氨基酸序列,上述SEQ ID NO:30的碱基序列可以编码上述SEQ ID NO:2的氨基酸序列,上述SEQ ID NO:31的碱基序列可以编码上述SEQ ID NO:3的氨基酸序列,上述SEQ ID NO:32的碱基序列可以编码上述SEQ ID NO:4的氨基酸序列,上述SEQ ID NO:33的碱基序列可以编码上述SEQ ID NO:5的氨基酸序列,上述SEQ ID NO:34的碱基序列可以编码上述SEQ ID NO:6的氨基酸序列,上述SEQ ID NO:35的碱基序列可以编码上述SEQ ID NO:7的氨基酸序列,上述SEQ ID NO:36的碱基序列可以编码上述SEQ ID NO:8的氨基酸序列,上述SEQ ID NO:37的碱基序列可以编码上述SEQ ID NO:9的氨基酸序列,上述SEQ ID NO:38的碱基序列可以编码上述SEQ ID NO:10的氨基酸序列,上述SEQ ID NO:39的碱基序列可以编码上述SEQ ID NO:11的氨基酸序列,上述SEQ ID NO:40的碱基序列可以编码上述SEQ ID NO:12的氨基酸序列,上述SEQ ID NO:41的碱基序列可以编码上述SEQ ID NO:13的氨基酸序列,上述SEQ ID NO:42的碱基序列可以编码上述SEQ ID NO:14的氨基酸序列,上述SEQ ID NO:43的碱基序列可以编码上述SEQ ID NO:15的氨基酸序列,上述SEQ ID NO:44的碱基序列可以编码上述SEQ ID NO:16的氨基酸序列,上述SEQ ID NO:45的碱基序列可以编码上述SEQ ID NO:17的氨基酸序列,上述SEQ ID NO:46的碱基序列可以编码上述SEQ ID NO:18的氨基酸序列,上述SEQ ID NO:47的碱基序列可以编码上述SEQ ID NO:19的氨基酸序列,上述SEQ ID NO:48的碱基序列可以编码上述SEQ ID NO:20的氨基酸序列,上述SEQ ID NO:49的碱基序列可以编码上述SEQ ID NO:21的氨基酸序列,上述SEQ ID NO:50的碱基序列可以编码上述SEQ ID NO:22的氨基酸序列,上述SEQ ID NO:51的碱基序列可以编码上述SEQ ID NO:23的氨基酸序列,上述SEQ ID NO:52的碱基序列可以编码上述SEQ ID NO:24的氨基酸序列,上述SEQ ID NO:53的碱基序列可以编码上述SEQ ID NO:25的氨基酸序列,上述SEQ ID NO:54的碱基序列可以编码上述SEQ ID NO:26的氨基酸序列,上述SEQ ID NO:55的碱基序列可以编码上述SEQ ID NO:27的氨基酸序列,上述SEQ ID NO:56的碱基序列可以编码上述SEQ ID NO:28的氨基酸序列。

[0079] 本发明的多核苷酸可以包含与上述罗列的碱基序列实质上相同的碱基序列。上述实质上相同的碱基序列包括例如转录和翻译时能够合成相同的氨基酸的情形,可以是与上述罗列的碱基序列具有90%以上、91%以上、92%以上、93%以上、94%以上、95%以上、

96%以上、97%以上、98%以上、99%以上或者99.5%以上的同源性的碱基序列,但并不限定于此。

[0080] 本发明的表达载体包含上述多核苷酸。

[0081] 在本发明中,用语“表达载体”是指用于使特定基因在宿主细胞中表达的手段,具体而言,包括质粒载体;粘粒载体;以及噬菌体载体、腺病毒载体、逆转录病毒载体和腺相关病毒载体之类的病毒载体等,但并不限定于此。

[0082] 上述表达载体除了编码上述人源化抗体或其抗原结合片段的碱基序列以外,还可以包含启动子、终止子等调节序列,编码上述人源化抗体或其抗原结合片段的碱基序列可以可操作地连接(operatively linked)到启动子。上述可操作地连接是指调节序列(例如,启动子、信号序列、转录调节因子结合位点的阵列等)与其他碱基序列之间的功能性结合,由此,上述调节序列可以调节上述其他碱基序列的转录和/或翻译。

[0083] 本发明的表达载体系统可以通过本领域中公知的多种方法来构建。

[0084] 上述表达载体可以以原核细胞或真核细胞为宿主来构建。

[0085] 例如,上述表达载体以原核细胞为宿主的情况下,通常包含能够进行转录的强启动子(例如,tac启动子、lac启动子、lacUV5启动子、lpp启动子、pLλ启动子、pRλ启动子、rac5启动子、amp启动子、recA启动子、SP6启动子、trp启动子和T7启动子等)、用于启动翻译的核糖体结合位点和转录/翻译终止序列。利用E. coli(例如,HB101、BL21、DH5α等)作为宿主细胞的情况下,可以利用E. coli色氨酸生物合成途径的启动子和操纵子部位(Yanofsky,C, JBacteriol, (1984) 158:1018-1024)、以及噬菌体λ的左向启动子(pLλ启动子,Herskowitz, I and Hagen,D,Ann Rev Genet, (1980) 14:399-445)作为调节部位。作为宿主细胞而利用杆菌的情况下,苏云金杆菌的毒素蛋白质基因的启动子(Appl Environ Microbiol (1998) 64:3932-3938;Mol Gen Genet (1996) 250:734-741)或能够在杆菌中表达的任意启动子也可以用作调节部位。上述表达载体可以操作本领域中使用的各种质粒(例如,pCL、pSC101、pGV1106、pACYC177、ColE1、pKT230、pME290、pBR322、pUC8/9、pUC6、pBD9、pHC79、pIJ61、pLAFR1、pHV14、pGEX系列、pET系列和pUC19等)、噬菌体(例如,λgt4·λB、λ-Charon、λΔz1和M13等)或病毒(例如,SV40等)来制作。

[0086] 上述表达载体以真核细胞为宿主的情况下,可以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、人血红蛋白启动子和人肌肉肌酐启动子)或来源于哺乳动物病毒的启动子(例如,腺病毒晚期启动子、牛痘病毒75K启动子、SV40启动子、巨细胞病毒(CMV)启动子、HSV的tk启动子、小鼠乳腺肿瘤病毒(MMTV)启动子、HIV的LTR启动子、莫洛尼病毒的启动子、爱泼斯坦-巴尔病毒(EBV)的启动子和呼吸道合胞病毒(RSV)的启动子),作为转录终止序列,通常可以具有多聚腺苷酸化序列。上述表达载体可以具有CMV启动子。

[0087] 另外,上述表达载体为了使由它表达的抗体的纯化变得容易而可以与其他序列进行融合。融合的序列例如有谷胱甘肽S-转移酶(Pharmacia,USA)、麦芽糖结合蛋白质(NEB,USA)、FLAG(ABI,USA)和6x His(六聚组氨酸(hexahistidine);Quiagen,USA)等。另外,由本发明的表达载体所表达的蛋白质是人源化抗体或其抗原结合片段,因此考虑到它的特性时,即使没有用于纯化的追加的序列,也能将表达的蛋白质通过蛋白质A柱等容易地进行纯化。

[0088] 上述表达载体包含本领域中通常利用的抗生素耐性基因作为选择标记,例如可以包含对于氨基青霉素、庆大霉素、羧苄青霉素、氯霉素、链霉素、卡那霉素、遗传霉素、新霉素和四环素的耐性基因。

[0089] 上述表达载体可以是轻链和重链在一个载体中同时表达的载体系统或者使轻链和重链各自在不同的载体中表达的系统。后者的情况下,两个载体可以通过例如共转化(co-transformation)或靶向转化(targeted transformation)而导入宿主细胞。共转化是将编码轻链和重链的各个载体DNA同时导入宿主细胞后,筛选同时表达轻链和重链的细胞的方法。靶向转化是用包含轻链(或重链)的载体筛选被转化的细胞,将筛选的细胞用包含重链(或轻链)的载体再次转化而最终筛选同时表达轻链和重链的细胞的方法。

[0090] 本发明的宿主细胞包含上述表达载体。

[0091] 上述宿主细胞只要是能够稳定地连续克隆和表达本发明的上述表达载体的宿主细胞,就可以使用本领域中公知的任何宿主细胞,可以是例如大肠埃希氏菌(*Escherichia coli*)、枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)和苏云金杆菌(*Bacillus thuringiensis*)之类的杆菌属菌株、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*)、或者葡萄球菌(*Staphylococcus*)、例如肉葡萄球菌(*Staphylococcus carnosus*)之类的原核宿主细胞,但并不限于此。

[0092] 上述宿主细胞为真核宿主细胞时,可以利用曲霉菌属(*Aspergillus species*)之类的真菌、毕赤酵母(*Pichia pastoris*)、酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)、裂殖酵母(*Schizosaccharomyces*)和粗糙脉胞霉(*Neurospora crassa*)之类的酵母、除此以外的下等真核细胞、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。上述宿主细胞可以是COS7细胞(猴肾细胞(monkey kidney cells))、NS0细胞、SP2/0、中国仓鼠卵巢细胞(CHO:Chinese hamster ovary)细胞、W138、幼仓鼠肾细胞(BHK:baby hamster kidney)细胞、MDCK、骨髓瘤细胞株、HuT 78细胞或293细胞,但并不限于此。

[0093] 向上述宿主细胞的转化和/或转染可以利用将核酸导入有机体、细胞、组织或器官中的任何方法,如本领域中公知的那样,可以根据宿主细胞,选择合适的标准技术来进行。具体而言,包括电穿孔法(electroporation)、原生质体融合、磷酸钙(CaPO_4)沉淀、氯化钙(CaCl_2)沉淀、利用了碳化硅纤维的搅拌、农杆菌介导的转化、PEG、硫酸葡聚糖、阳离子脂质转染试剂(Lipofectamine,脂质体)和干燥/抑制介导的转化方法等,但并不限于此。

[0094] 本发明的生产人源化抗体或其抗原结合片段的方法还包括培养上述宿主细胞的步骤。

[0095] 上述生产人源化抗体或其抗原结合片段的方法还可以包括使上述人源化抗体或其抗原结合片段在上述宿主细胞中表达的步骤。

[0096] 上述宿主细胞的培养可以根据本领域中已知的适当的培养基和培养条件来进行。这样的培养过程,只要是本领域技术人员就可以根据所选择的菌株而容易地调整而使用。细胞培养根据细胞的生长方式而分为悬浮培养和附着培养,根据培养方法而分为分批式、补料分批式和连续培养式的方法。培养中使用的培养基需要适当地满足特定的菌株所要求的条件。

[0097] 在动物细胞培养中,上述培养基包含多种碳源、氮源和微量元素成分。作为能够使

用的碳源的例子可以包含葡萄糖、蔗糖、乳糖、果糖、麦芽糖、淀粉和纤维素之类的碳水化合物,大豆油、葵花籽油、蓖麻籽油和椰子油之类的脂肪,棕榈酸、硬脂酸和亚油酸之类的脂肪酸,甘油和乙醇之类的醇,以及乙酸之类的有机酸,这些碳源可以单独使用或者组合使用。

[0098] 上述氮源可以包含例如蛋白胨、酵母提取物、肉汁、麦芽提取物、玉米浆(CSL)和豆粕之类的有机氮源、以及碘、硫酸铵、氯化铵、磷酸铵、碳酸铵和硝酸铵之类的无机氮源,这些氮源可以单独使用或者组合使用。

[0099] 上述培养基中可以包含磷酸二氢钾、磷酸氢二钾和对应的含钠盐作为磷源。另外,可以包含硫酸镁或硫酸亚铁之类的金属盐。此外,可以包含氨基酸、维生素和适当的前体等。

[0100] 在上述培养的步骤中,在培养过程中,可以将氢氧化铵、氢氧化钾、氨、磷酸和硫酸之类的化合物以适当方式添加到培养物中来调节培养物的pH。另外,在培养过程中,可以使用脂肪酸多元醇酯之类的消泡剂来抑制气泡生成。另外,为了维持培养物的好氧状态,向培养物内注入氧或含氧气体(例如,空气)。培养物的温度通常可以为20℃至45℃或25℃至40℃。

[0101] 上述生产方法还可以包括回收在上述宿主细胞中表达的人源化抗体或其抗原结合片段的步骤。培养上述转化的宿主细胞而获得的上述人源化抗体或其抗原结合片段可以以没有纯化的状态使用,或者进一步利用例如透析、盐沉淀和色谱等多种通常的方法以高纯度进行纯化而使用。利用色谱的情况下,柱的种类和顺序可以根据抗体的特性、培养方法等,从离子交换色谱、尺寸排阻色谱、亲和色谱等进行选择。

[0102] 3. 本发明人源化抗体的TM4SF4检测用途

[0103] 本发明的另一方面提供上述人源化抗体或其抗原结合片段的TM4SF4检测用途。具体而言,在本发明中,提供TM4SF4检测用组合物、TM4SF4检测用试剂盒和检测TM4SF4的方法。

[0104] 关于上述人源化抗体、其抗原结合片段、TM4SF4等的说明与“1. 特异性地结合于TM4SF4的人源化抗体及其抗原结合片段”中对它们进行的说明相同,因此为了避免重复说明,省略记载。

[0105] 本发明的TM4SF4检测用组合物包含上述人源化抗体或其抗原结合片段,本发明的TM4SF4检测用试剂盒包含上述TM4SF4检测用组合物。

[0106] 另外,本发明的检测TM4SF4的方法包括使上述人源化抗体或其抗原结合片段与预想包含TM4SF4的检测对象样品接触的步骤。

[0107] 上述TM4SF4检测用组合物、包含其的试剂盒使特异性地结合于TM4SF4的本发明的人源化抗体或其抗原结合片段与检测对象样品接触,从而形成抗原-抗体复合物,可以有效地检测TM4SF4。

[0108] 上述抗原-抗体复合物是指用于确认样品中的表达TM4SF4的肿瘤或癌细胞的、TM4SF4与对其进行识别的抗体的结合物。

[0109] 利用了TM4SF4检测用组合物、包含其的试剂盒或上述人源化抗体、其抗原结合片段的TM4SF4抗原的定量方法可以确认抗原-抗体复合物的形成而进行,上述抗原-抗体复合物的形成确认可以通过酶联免疫吸附分析法(ELISA)、蛋白质印迹法(Western Blotting)、免疫荧光(Immunofluorescence)、免疫组织化学染色(Immunohistochemistry staining)、

流式细胞分析法 (Flow cytometry)、免疫细胞化学法 (Immunocytochemistry)、放射免疫分析法 (RIA)、免疫沉淀分析法 (Immunoprecipitation Assay)、免疫扩散分析法 (Immunodiffusion assay)、补体结合分析法 (Complement Fixation Assay)、蛋白质芯片 (Protein Chip) 等来进行,但并不限于此。上述酶联免疫吸附分析法 (ELISA) 包括:利用识别附着于固体支撑体的抗原的被标记的抗体的直接ELISA、利用在识别附着于固体支撑体的抗原的抗体的复合物中识别捕获抗体的被标记的二次抗体的间接ELISA、利用在附着于固体支撑体的抗体和抗原的复合物中识别抗原的被标记的其他抗体的直接夹心ELISA、利用与在附着于固体支撑体的抗体和抗原的复合物中识别抗原的其他抗体反应后识别该抗体的被标记的2次抗体的间接夹心ELISA等各种ELISA方法。

[0110] 能够定性或定量测定抗原-抗体复合物的形成的标记有酶、荧光物、配体、发光物、微粒 (microparticle)、氧化还原 (redox) 分子和放射线同位素等,但并不限于此。上述酶有 β -谷氨酰胺酶、 β -D-葡萄糖酸酶、 β -D-半乳糖苷酶、脲酶、过氧化物酶、碱性磷酸酶、乙酰胆碱酯酶、葡萄糖氧化酶、己糖激酶与GDPase、RNase、葡萄糖氧化酶与荧光素酶、磷酸果糖激酶、磷酸烯醇丙酮酸羧化酶、天门冬氨酸氨基转移酶、磷酸丙酮酸脱羧酶 (Phosphoenolpyruvate decarboxylase)、 β -内酰胺酶等,但不限于此。

[0111] 4. 本发明人源化抗体的癌症的预防或治疗用途、癌干细胞生长抑制用途和放射线抗癌治疗辅助用途

[0112] 本发明的另一方面提供包含上述人源化抗体或其抗原结合片段的癌症的预防或治疗用药物组合物、癌干细胞生长抑制用组合物和放射线抗癌治疗辅助用组合物。

[0113] 关于上述人源化抗体、其抗原结合片段、TM4SF4等的说明与在“1. 特异性地结合于TM4SF4的人源化抗体及其抗原结合片段”中对它们进行的说明相同,因此,为了避免重复说明,将省略其记载。

[0114] 其中,本发明的上述人源化抗体或其抗原结合片段可以包含与2B7抗体的CDR序列相同或变更其一部分序列而得到的CDR序列,上述2B7抗体的特征和效果可以参考韩国专利申请第2020-0168467号。

[0115] 本发明的癌症的预防或治疗用药物组合物包含上述人源化抗体或其抗原结合片段。

[0116] 上述人源化抗体或其抗原结合片段能够以高亲和力结合于TM4SF4,已知上述TM4SF4在癌细胞的表面过表达而存在,上述人源化抗体或其抗原结合片段可以以癌细胞为靶向来利用。

[0117] 上述组合物可以单独使用上述人源化抗体或其抗原结合片段,或者与通常的药学上可接受的载体一同用于癌症之类的过度增殖性疾病的治疗、预防和诊断。

[0118] 具体而言,上述癌可以是肺癌、胃癌、大肠癌、结肠癌、三阴性乳腺癌、胶质母细胞瘤、胰腺癌、头颈部癌、乳腺癌、卵巢癌、肾癌、膀胱癌、前列腺癌、子宫内膜癌、涎腺癌或甲状腺癌,更具体而言,可以是肺癌、乳腺癌、肝癌、肾癌、胃癌、胰腺癌、胰腺癌、脑癌,但并不限于此。在本发明中,癌尤其可以是由TM4SF4的过表达、扩增、突变或活化而形成的癌,但并不限于此。即,包含本发明的人源化抗体或其结合片段的组合物与TM4SF4的异常表达或突变无关而对所有癌症肿瘤具有增殖抑制效果,因此,本发明的医药用途不受TM4SF4的表达方式或突变与否的限制。

[0119] 上述组合物可以是药物组合物、医药外用品组合物、健康食品用组合物的形态。

[0120] 本发明的癌症的预防或治疗用组合物可以进一步包含药学上可接受的载体。上述“药学上可接受的”的意思是不抑制有效成分的活性且适用(处置)对象能够适应且不具有异常的毒性,上述“载体”被定义为使化合物向细胞或组织内的附加变得容易的化合物。

[0121] 本发明的上述药物组合物可以单独给药,或者与某些方便的载体等一同混合后进行给药,这样的给药剂型可以是单次给药剂型或重复给药剂型。上述药物组合物可以是固体制剂或者液体制剂。固体制剂有散剂、颗粒剂、片剂、胶囊剂、栓剂等,但并不限于此。固体制剂中可以包含载体、着色剂、结合剂、防腐剂、崩解剂、润滑剂、填充剂等,但并不限于此。液体制剂有水、丙二醇溶液之类的溶液制剂、悬浮液剂、乳剂等,但并不限于此,可以添加适当的着色剂、着色剂、稳定剂、增粘剂等而制造。例如,散剂可以通过将作为本发明的有效成分的多元不饱和脂肪酸的三羟基衍生物与乳糖、淀粉、微晶纤维素等药学上可接受的适当的载体简单混合而制造。颗粒剂可以通过将本发明的上述多元不饱和脂肪酸的三羟基衍生物、药学上可接受的适当的载体和聚吡咯烷酮、羟丙基纤维素等药学上可接受的适当的结合剂混合后,利用使用了水、乙醇、异丙醇等溶剂的湿式颗粒法或利用了压缩力的干式颗粒法来制造。另外,片剂可以通过将上述颗粒剂与硬脂酸镁等药学上可接受的适当的润滑剂混合后,利用打片机进行打片而制造。

[0122] 上述药物组合物根据治疗疾病和个体的状态而以口服剂、注射剂(例如,肌肉注射、腹腔注射、静脉注射、注入(infusion)、皮下注射、植入)、吸入剂、鼻腔给药剂、阴道剂、直肠给药剂、舌下剂、透皮剂、局部剂等的形式进行给药,但并不限于此。根据给药途径,可以制成包含通常使用的非毒性的、药学上可接受的载体、添加剂、媒介物的适当的给药单元剂型。

[0123] 上述药物组合物可以每天给药约0.0001mg/kg至约10g/kg,可以按照约0.001mg/kg至约1g/kg的1日给药用量进行给药。但是,上述给药量可根据上述混合物的纯化程度、患者的状态(年龄、性别、体重等)、治疗的状态的严重性等而不同。为了便利性,根据需要,将1日总给药量,一天分成多次进行给药。

[0124] 本发明的癌干细胞生长抑制用组合物包含上述人源化抗体或其抗原结合片段。

[0125] 上述癌干细胞(cancer stem cell,CSC)是指具有能够分化成多种癌细胞的能力的未分化细胞。癌干细胞在恶性肿瘤组织内存在1~2%左右,虽然具有作为正常干细胞的特性的自我复制能力和多能性,但是自我调节功能上存在异常,因此由于细胞分裂活化而细胞数增加,自己分化成恶性肿瘤细胞。已知基于这样的癌干细胞的特征,通过抗癌治疗,一般的癌细胞能够被清除,但是癌干细胞会存活,由于存活的一部分癌干细胞,出现癌症的复发和转移。

[0126] 具体而言,本发明的癌干细胞可以是作为癌干细胞的标记之一的ALDH1(醛脱氢酶1(aldehyde dehydrogenase 1))蛋白质过表达或者蛋白质活性为阳性的癌细胞。

[0127] 本发明的上述人源化抗体或其抗原结合片段可以选择性地抑制癌干细胞,特别是,通过杀死包含抗癌治疗抗性高的癌干细胞的癌细胞群,从而可以获得优异的抗癌效果。上述人源化抗体或其抗原结合片段通过减少癌干细胞的自我再生能力、浸润能力和转移能力,从而能够抑制癌干细胞的生长。

[0128] 上述抗体或其抗原结合片段可以用于预防或治疗具有癌干细胞的特性的癌症,但

并不限于此。由于具有上述癌干细胞特性的癌对现有的抗癌治疗显示出抗性,所以其预后不好,因此需要适用与现有的抗癌治疗不同的治疗。例如,即使是同一癌症肿瘤的患者,但如果该癌症肿瘤属于癌干细胞的比率高的情况,则该患者通过给予抗癌剂或者放射线治疗之类的现有已知的抗癌治疗无法获得癌症治疗效果。因此,即使是同一种类的癌症,癌症病变部位的细胞中的癌干细胞的比率高的情况下,适用与现有的抗癌治疗不同的新治疗方法是非常重要的。

[0129] 具有上述癌干细胞特性的癌可以是构成癌的细胞群中癌干细胞的比率比较高的癌。考虑到一般的癌细胞中的癌干细胞的比率为约1%以上且小于5%的程度时,可以将例如构成癌的细胞群中癌干细胞的比率为5%以上、10%以上、30%以上、50%以上、70%以上的情况定义为具有癌干细胞特性的癌,如上所述,可以以对现有的抗癌治疗显示抗性而抗癌治疗的预后不好为特征。具体而言,在本发明中,具有上述癌干细胞特性的癌可以是过表达ALDH1的癌。上述过表达ALDH1的癌可以是表达ALDH1或者其活性为阳性的癌干细胞的比率比一般的癌相对高的癌。

[0130] 具体而言,上述过表达ALDH1的癌可以是选自肺癌、乳腺癌、肝癌、肾癌、胃癌、胰腺癌和胰腺癌脑癌中的任一种以上,但并不限于此。

[0131] 上述癌症的预防或治疗通过减少癌干细胞的再生能力、生长能力、浸润能力或迁移能力来预防或治疗癌症治疗过程中或者癌症治疗后的癌症化学抗性(cancer chemoresistance)、癌症复发、或者癌症转移。

[0132] 本发明的放射线抗癌治疗辅助用组合物包含上述人源化抗体或其抗原结合片段。

[0133] 上述组合物包含上述人源化抗体或其抗原结合片段作为用于提高癌症相关细胞的放射线敏感性的有效成分。

[0134] 上述癌症相关细胞是构成癌的细胞,具有与正常细胞相比形状不规则、进行无限增殖、与周围细胞的粘结力(cohesion)弱的特征。具体而言,上述癌症相关细胞可以是癌细胞或癌干细胞,具体而言,可以是癌干细胞。

[0135] 上述癌干细胞可以是具有能够分化为各种癌细胞的能力的未分化细胞,具体而言,可以是表达ALDH1或者活性为阳性的癌细胞。在本发明中,上述癌干细胞可以具有利用放射线照射也无法抑制增殖且自我再生能力不降低且迁移和浸润能力不被抑制的特征。

[0136] 另外,上述癌症相关细胞可以是对放射线的敏感性低的细胞,即,对放射线治疗的抗性高的细胞,可以是实质上对放射线没有敏感性而无法进行利用放射线照射的抗癌治疗的细胞。

[0137] 上述抗癌可以通过放射线照射、外科手术和化疗等而诱导癌症相关细胞的增殖抑制、转移和浸润抑制、细胞的凋亡。在本发明中,上述抗癌可以与放射线照射一同并用而将上述人源化抗体或其抗原结合片段进行给药。像这样,将人源化抗体或抗原结合片段与放射线照射一同并用而进行给药的情况下,通过上述抗体或抗原结合片段而癌症相关细胞的放射线敏感性得到提高,能够使放射线照射导致的抗癌治疗效果极大化,进而可以阻止癌症的复发和转移。

[0138] 下面,利用实施例详细说明本发明。

[0139] 但是,下述实施例用于具体例示本发明,本发明的内容不限于下述实施例。

[0140] [实施例和比较例]

[0141] [实施例1]

[0142] 特异性地结合于TM4SF4的人源化抗体的设计和表达载体制造

[0143] 制造了对TM4SF4蛋白质具有高亲和力并能够特异性地结合的人源化抗体。为此,对用于与TM4SF4特异性地结合的抗体部位中的可变区的CDR(互补性决定区(complementarity determining regions))的氨基酸序列,利用人类抗体的恒定区的氨基酸序列和可变区的FR(框架区/framework regions))的氨基酸序列,制造了具有对TM4SF4的特异性结合性且对人体进行给药时能够显示出低免疫原性(immunogenicity)的新型人源化抗体。

[0144] 具体而言,本发明的人源化抗体的CDR序列是能够特异性地结合于TM4SF4的来源于小鼠的抗体的CDR序列,利用了以下序列。利用了重链可变区的CDR-H1(SEQ ID NO:10)、CDR-H2(SEQ ID NO:11)、CDR-H3(SEQ ID NO:14)、以及轻链可变区的CDR-L1(SEQ ID NO:15)、CDR-L2(SEQ ID NO:18)、CDR-L3(SEQ ID NO:19)。另外,作为FR序列,利用了重链可变区的FR-H1(SEQ ID NO:1)、FR-H2(SEQ ID NO:2)、FR-H3(SEQ ID NO:4)、FR-H4(SEQ ID NO:5)、以及FR-L1(SEQ ID NO:6)、FR-L2(SEQ ID NO:7)、FR-L3(SEQ ID NO:8)、FR-L4(SEQ ID NO:9)。上述CDR序列利用了作为来源于小鼠的TM4SF4抗体的ECL-2B7抗体的CDR序列,上述FR序列利用了作为人抗体的3QRG抗体的FR序列。上述3QRG抗体是利用美国国家生物技术信息中心(NCBI)的BLASTP分析程序而从与上述ECL-2B7抗体的重链和轻链氨基酸序列类似的人类抗体后补群中筛选出来的。将上述CDR序列利用CDR-移植(CDR-grafting)方法移植到上述FR序列,制造了本发明的人源化抗体。首先,在上述CDR序列中,以重链可变区的CDR序列(SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:11和SEQ ID NO:14)的前侧追加信号肽序列而获得的CDR序列的氨基酸序列为基础,利用反向翻译(reverse translate)程序(https://www.bioinformatics.org/sms2/rev_trans.html),变换成对其进行编码的碱基序列。然后,利用重组PCR,与上述FR序列(SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:4和SEQ ID NO:5)连接而合成了编码本发明人源化抗体的重链可变区的基因。将约450bp长度的基因分为3个区间,如图1所示,利用ECL-2B7-S-H-5'和ECL-2B7-S-H-3'引物合成了与T1(164bp)对应的部位的重链可变区基因的片段,利用ECL-2B7-HC-1-5'和ECL-2B7-HC-1-3'引物合成了与T2(167bp)对应的部位的重链可变区基因的片段,并且利用ECL-2B7-HC-2-5'和ECL-2B7-HC-2-3'引物合成了与T3(157bp)对应的部位的重链可变区基因的片段。然后,通过重组PCR将T1和T2片段连接,合成了310bp大小的片段,将T1与T2连接而成的片段再次利用Ch57-H.C-5'和ECL-2B7-WH-3'引物而与T3片段连接,从而合成了在两末端具有EcoRI和ApaI限制酶切割部位的约450bp的本发明人源化抗体的重链可变区(Hz2B7-1.0)基因。上述重链可变区按照FR-H1、CDR-H1、FR-H2、CDR-H2、FR-H3、CDR-H3、FR-H4的顺序排列而制作,将其在琼脂糖凝胶中进行确认(图2)。在此过程中使用的上述引物序列示于下述表1。并且,本发明人源化抗体的轻链可变区(Hz2B7-0.1)的基因委托基因合成企业(Bionics,韩国),按照FR-L1(SEQ ID NO:6)、CDR-L1(SEQ ID NO:15)、FR-L2(SEQ ID NO:7)、CDR-L2(SEQ ID NO:18)、FR-L3(SEQ ID NO:8)、CDR-L3(SEQ ID NO:19)、FR-L4(SEQ ID NO:9)的顺序进行排列,合成了约450bp长度的轻链可变区(Hz2B7-0.1)基因,将其在琼脂糖凝胶上进行了确认(图3)。并且,利用T4连接酶(T4 ligase,NEB,美国)将上述重链可变区基因克隆到pdCMV-dhfr载体的

EcoRI-ApaI位置,将上述轻链可变区基因利用T4连接酶克隆到HindIII-BsiWI位置(图8),制造了编码本发明的人源化抗体(Hz2B7-1.1)的载体pdCMV-dhfrC-Hz2B7-1.1。

[0145] [表1]

名称	序列(5'→3')	SEQ ID NO
[0146] ECL-2B7-S-H-5'引物	GAC GAA TTC ACT CTA ACC ATG GAA TGG AGC TGG GTC TTT CTC TTC TTC CTG TCA GTA ACT ACA GGT GTC CAC TCC GAG ATC ACC CTG AA	SEQ ID NO: 57
ECL-2B7-S-H-3'引物	CTC AGG CTG AAG CCG CTG AAG GTG CAG GTC AGG GTC AGG GTC TGG GTG GGC TTC ACC AGG GTG GGG CCG CTC	SEQ ID NO: 58
	TCC TTC AGG GTG ATC TCG GAG	
ECL-2B7-S-H-5'引物	CAG CGG CTT CAG CCT GAG CAC TTA TGG TAT AGG AGT AAG CTG GAT CAG GCA GCC CCC CGG CAA GGC CCT GGA GTG GCT GGC CCA CAT TTG	SEQ ID NO: 59
ECL-2B7-S-H-5'引物	CCT GGT TCT TGC TGG TGT CCT TGG TGA TGG TCA GCC TGC TCT TCA GGG CTG TGT TAT AGT ACT TAT TAT CAT TCC ACC AAA TGT GGG CCA GCC AC	SEQ ID NO: 60
[0147] ECL-2B7-S-H-5'引物	ACA CCA GCA AGA ACC AGG TGG TGC TGA CCA TGA CCA ACA TGG ACC CCG TGG ACA CCG CCA CCT ACT ACT GCG CCA GGA AGG AGG GCA GCT	SEQ ID NO: 61
ECL-2B7-S-H-5'引物	GGG CCC TTG GTG GAG GCG CTG CTC ACG GTC ACC AGG GTG CCC TGG CCC CAG TAA GCA AAG GGG GCC GAG CTG CCC TCC TTC CTG G	SEQ ID NO: 62
Ch57.H.C-5'引物	GAC GAA TTC ACT CTA ACC AT	SEQ ID NO: 63
ECL-2B7-WH-3'引物	TTG GGC CCT TGG TGG AGG CGC TGC T	SEQ ID NO: 64

[0148] [实施例2]本发明人源化抗体的变体抗体的设计和表达载体制造

[0149] [2-1]本发明人源化抗体和表位的相互作用分析和分子建模

[0150] 为了制造对通过上述实施例1设计的本发明的人源化抗体的氨基酸序列中的一部分序列进行改变的变体抗体,首先,确认了上述人源化抗体与作为靶向的TM4SF4的表位之间的相互作用。一般来说,抗原-抗体的结合能力可以通过对接模拟(docking simulation)来定性地进行预测,但由于上述实施例1的人源化抗体的X-射线结构未知,所以通过同源建模(Homology modeling)来预测了其结构,以此为基础,确认了上述抗体与表位之间的结合能力。为此使用了MODELLER程序的8.2版本,利用BLAST,将与上述实施例1的人源化抗体的氨基酸序列的相似度高的鼠的嵌合抗体X836用作同源建模的模板。上述X836抗体的235

个氨基酸与实施例1的人源化抗体相比,176个氨基酸一致,氨基酸序列相似性显示出75%左右,以此为基础,可以预测上述实施例1的人源化抗体的三维结构(图4)。

[0151] 作为抗原的TM4SF4蛋白质的表位是较短长度的多肽链,因此,被视作一个有机化合物而在上述实施例1的人源化抗体的CDR区域中进行了对接模拟,计算了结合自由能和结合模式。具体而言,将TM4SF4蛋白质的由第126号至第140号的氨基酸序列Thr-Trp-Gly-Tyr-Pro-Phe-His-Asp-Gly-Asp-Tyr-Leu-Asn-Asp-Glu构成的15-mer寡肽作为相对于全部抗原的简化模型而进行了计算。相对于上述人源化抗体的表位的结合自由能被计算出为-11.6kcal/mol,若换算成 K_d 值,则计算为3nM左右。这表示在本发明的人源化抗体与TM4SF4的表位之间形成了非常强的抗原-抗体结合。作为对接程序,使用了对美国斯克利普斯研究所(Scripps Research Institute)开发的AutoDock version 4.2.6进行变更的程序,为了提高准确度,改善蛋白质-配体结合自由能函数的一部分项而使用。具体而言,将静电相互作用项、氢键能量项和配体的氢化能量项中存在的参数更准确地进行优化,从而用于对接模拟。抗体与表位之间的静电相互作用部分中,直接计算抗体分子的介电常数值而使用,在氢键能这一项中,为了反映角度与距离的相互依赖度,以Morse函数的乘积来表示,从而提高了计算的准确度。配体水合能部分中,将参数增加至69个后,以通过遗传算法进行最优化的方法来改善了准确度。关于范德华键、氢键、静电相互作用、熵、以及水合能项的加权系数(weighting factor)值分别为0.1485、0.0656、0.1146、0.3113和0.1711,直接使用了现有的AutoDock程序中提供的值。

[0152] 通过由如上所述的对接模拟而获得的实施例1的人源化抗体与表位的复合物结构分析结果,可以确认对结合发挥重要作用的氨基酸部位。预测在上述人源化抗体Hz2B7-1.1的氨基酸中轻链第99号精氨酸(Arg,R)、重链第58号天冬酰胺(Asn,N)、重链(heavy chain)第60号酪氨酸(Tyr,Y)、重链第102号甘氨酸(Gly,G)、重链第103号丝氨酸(Ser,S)等五个属于CDR区且与表位形成氢键并对抗体的功能起到核心作用(图4、图5)。范德华键显示为相对较弱,在抗体-表位复合物的界面,只有观察到疏水性氨基酸中的轻链第38号酪氨酸和轻链第98号酪氨酸(图4、图5)。

[0153] 通过氢键或范德华键而与表位直接相互作用的氨基酸在抗体的功能上担当着重要作用,因此保留,为了增大与表位的结合能力,需要置换结合能力弱或者位于远距离的氨基酸。例如,在图4和图5中,将表位的苯丙氨酸和色氨酸残基结合的部分即相当于上述人源化抗体Hz2B7-1.1的轻链可变区的CDR1的第31号天冬酰胺(Asn,N)置换为疏水性更强的芳香族氨基酸的情况下,预测表位与抗体之间的范德华键得到强化,从而结合能力增加。另外,相当于上述人源化抗体Hz2B7-1.1的重链可变区的CDR2的第55号色氨酸(Trp,W)处于与表位的天冬氨酸相邻的位置,因此在被能够形成更强的氢键的氨基酸置换的情况下,预测会增加结合能力。因此,相当于轻链可变区的CDR1的第31号、相当于重链可变区的CDR2的第55号位置是能够增加与表位的亲和力的重要的位置(图4、图5)。另外,相当于轻链可变区的CDR3的第100号苏氨酸(Thr,T)、相当于重链可变区的CDR2的第54号色氨酸、相当于重链可变区的CDR2的第56号天冬酰胺等三个氨基酸也位于与表位比较相近的距离,因此,将它们用化学性质不同的氨基酸进行置换时,诱导与表位的新的氢键或范德华键,从而预料能够增加抗体的效能。因此,相当于轻链可变区的CDR3的第100号、相当于重链可变区的CDR2的第54号、第56号位置也是能够增加与表位的亲和力的又一重要位置(图4、图5)。

[0154] [2-2]变体人源化抗体氨基酸序列的设计和载体的制造

[0155] 通过上述实施例2-1的对接模拟分析,将上述实施例1的人源化抗体重链可变区的第46号丙氨酸(Ala,A)置换成缬氨酸(Val,V),从而在上述实施例1的人源化抗体序列中,使FR-H2为SEQ ID NO:3的氨基酸序列,设计了重链可变区Hz2B7-2.0(HC A46V)(图5)。

[0156] 另外,将上述实施例1的人源化抗体重链可变区的第55号色氨酸(Trp,W)分别置换为丝氨酸(Ser,S)或酪氨酸(Tyr,Y),从而在上述实施例1的人源化抗体序列中,使CDR-H2分别为SEQ ID NO:12或SEQ ID NO:13的氨基酸序列,设计了重链可变区Hz2B7-3.0(HC W55S)和重链可变区Hz2B7-4.0(HC W55Y)(图5)。为此,合成了h2B7-H.C-W55S-5'与h2B7-H.C-W55S-3'引物、以及h2B7-H.C-W55Y-5'与h2B7-H.C-W55Y-3'引物,为了无缝克隆(in-fusion cloning),利用h2B7-H.C-SLIC-3'引物与h2B7-H.C-SLIC-3'引物进行了重组PCR(图6的A)。将合成的基因的序列利用试剂盒(EZ-Fusion™ HT Cloning Kit,Enzymomics,韩国)克隆到用EcoR1和ApaI切割的pdCMV-dhfr-h2B7载体(图8)。通过碱基序列分析确认变异后,制造了能够表达上述变体人源化抗体的pdCMV-dhfr-Hz2B7-3.0和pdCMV-dhfr-Hz2B7-4.0。

[0157] 另外,将上述实施例1的人源化抗体轻链可变区的第31号天冬酰胺(Asn,N)分别置换为苯丙氨酸(Phe,F)或缬氨酸(Val,V),从而在上述实施例1的人源化抗体序列中,使CDR-L1分别为SEQ ID NO:16或SEQ ID NO:17的氨基酸序列,设计了轻链可变区Hz2B7-0.2(LC N31F)和轻链可变区Hz2B7-0.3(LC N31V),将其在琼脂糖凝胶中进行确认(图5)。为此,合成了h2B7-L.C-N31F-5'与h2B7-L.C-N31F-3'引物、以及h2B7-L.C-N31V-5'与h2B7-L.C-N31V-3'引物,为了无缝克隆(in-fusion cloning),利用h2B7-L.C-SLIC-3'引物和h2B7-L.C-SLIC-3'引物进行了重组PCR(图6的B)。将合成的基因的序列利用试剂盒(EZ-Fusion™ HT Cloning Kit,Enzymomics,韩国)克隆到利用HindIII与BsiWI切割的pdCMV-dhfr-h2B7-1.1载体(图8)。通过碱基序列分析确认变异后,制造了能够表达上述变体人源化抗体的pdCMV-dhfr-Hz2B7-0.2和pdCMV-dhfr-Hz2B7-0.3。

[0158] 在这过程中使用的上述引物序列示于下述表2。

[0159] [表2]

[0160]

名称	序列(5'→3')	SEQ ID NO
h2B7-H.C-W55Y-5'引物	TTT GGT ATA ATG ATA ATA AGT A	SEQ ID NO: 65
h2B7-H.C-W55Y-3'引物	TCA TTA TAC CAA ATG TGG GCC A	SEQ ID NO: 66
h2B7-H.C-W55S-5'引物	TTT GGT CGA ATG ATA ATA AGT A	SEQ ID NO: 67
h2B7-H.C-W55S-3'引物	TCA TTC GAC CAA ATG TGG GCC A	SEQ ID NO: 68
h2B7-H.C-SLIC-5'引物	GCC AGT GTG CTG GAA TTC ACT	SEQ ID NO: 69

物	CTA ACC	
h2B7-H.C-SLIC-3' 引物	AAG ACC GAT GGG CCC TTG GTG GAG	SEQ ID NO: 70
h2B7-L.C-N31V-5' 引物	TTT TAG TAA GTA GCA ATC AA	SEQ ID NO: 71
h2B7-L.C-N31V-3' 引物	CTA CTT ACT AAA AGG CTC TGA C	SEQ ID NO: 72
[0161] h2B7-L.C-N31F-5' 引物	TTT TAT TCA GTA GCA ATC AA	SEQ ID NO: 73
h2B7-L.C-N31F-3' 引物	CTA CTG AAT AAA AGG CTC TGA C	SEQ ID NO: 74
h2B7-L.C-SLIC 5' 引物	ATA GGG AGA CCC AAG CTT CGG CAC GAG CAG A	SEQ ID NO: 75
h2B7-L.C-SLIC 3' 引物	TGG TGC AGC CAC CGT ACG CTT GAT CTC CA	SEQ ID NO: 76

[0162] [比较例]以TM4SF4为靶向的嵌合体抗体的设计和表达载体制造

[0163] 上述实施例1和2的人源化抗体是在抗体的重链/轻链可变区中CDR序列利用小鼠抗体的CDR序列且抗体的恒定区和可变区中的FR序列利用人类抗体的序列而制造的。对此，为了与本发明的人源化抗体进行比较，重链/轻链可变区整体来源于小鼠抗体，恒定区制造了来源于人类抗体的嵌合体抗体(chimeric antibody)。即，上述嵌合体抗体在与人类抗体的相似度方面可以视为相当于小鼠抗体与人源化抗体的中间的抗体。

[0164] 首先，以来源于小鼠的上述ECL-2B7抗体的重链和轻链基因为对象进行PCR，利用凝胶提取试剂盒(gel extraction kit,FAVORGEN,中国台湾)，分离了约400bp和390bp的DNA。并且，为了合成重链基因的信号序列，以pdCMV-dhfr载体为模板，利用5'-signal-EcoR1(5'-GAC GAA TTC ACT CTA ACC ATG GAA TGG A)引物与ECL-2B7-S-H-3'(CTT CAC CTC GGA GTG GAC ACC TGT AGT TA-3')引物进行了PCR(图7的A)。另外，为了扩增重链可变区，以重链可变区的DNA为模板，利用2B7-S-H-5'(5'-GTC CAC TCC GAG GTG AAG CTG GAG GAG TC)引物与ECL-2B7-HC-Chi-3'(TTG GGC CCT TGG TGG AGG CTG CAG AGA CAG TGA CCA G-3')引物进行了PCR(图7的A)。然后，为了连接上述重链的信号序列与重链可变区基因，利用5'-signal-EcoR1引物与ECL-2B7-HC-Chi-3'引物进行了重组PCR。由此获得了连接了重链可变区与重链信号序列的基因，在1%琼脂糖凝胶上展开并进行确认，利用DNA分离试剂盒(FavorPrep GEL™ PCR Purification Kit, Farvorgen, 中国台湾)，分离了相当于约450bp的DNA(图7的A)。将连接有上述信号序列的重链可变区基因用EcoRI和ApaI处理后，利用上述FavorPrep GEL™ PCR Purification Kit进行分离(图7的B)。将这样获得的重链可变区基因利用T4 DNA连接酶(T4 DNA ligase, NEB, 美国)克隆到包含人类抗体的重链恒

定区(IgG1)基因的pdCMV-dhfr载体的EcoRI和ApaI位置(图8)。轻链基因的情况下也同样,为了合成信号序列,将pdCMV-dhfr-ch57载体作为模板,利用ch57-LC-whole 5'(5'-CTG CAA AGC TTC GGC ACG AGC A)引物与ECL-2B7-S-L-3'(CAC AAT ATC TCC TTC AAC ACC AGA CAA CC-3')引物进行了PCR,为了轻链可变区基因的扩增,利用ECL-2B7-S-L-5'(5'-GTT GAA GGA GAT ATT GTG ATG ACC CAG TCT)引物与ECL-2B7-LC-chi-3'(CCA CCG TAC GTT TGA TTT CCA GCT T-3')引物,进行了PCR(图7的A)。为了上述信号序列与轻链可变区的连接,利用ch57-LC-whole 5'引物和ECL-2B7-LC-chi-3'引物,进行重组PCR后,在1%琼脂糖凝胶上展开而进行确认,利用与重链可变区基因相同的方法进行分离(图7的A)。将上述轻链可变区基因用HindIII和BsiwI处理并分离后,克隆到包含人类抗体的轻链恒定区(Ck)基因并插入有前面制作的重链基因的pdCMV-dhfr-chi 2B7-HC载体的HindIII和BisWI位置(图7的C),从而制造了能够表达上述嵌合体抗体的载体(pdCMV-dhfr-chi2B7,图8)。将上述载体用RbC12方法转化到大肠杆菌DH5 α 后,筛选出具有约450bp大小的大肠杆菌。将该大肠杆菌在含有50 μ g/ml的氨苄青霉素的5ml的LB培养基中培养一夜后,利用用于质粒DNA分离的试剂盒(DNA-spinTM Plasmid DNA purification kit,INTRON,韩国)分离质粒DNA,确认了碱基序列(Bionics,韩国)。其结果,确认了从上述转化体分离的cDNA的碱基序列与上述ECL-2B7抗体的可变区基因相同,正确地与人类抗体的重链和轻链可变区基因连接。

[0165] [实验例1]

[0166] 人源化抗体和嵌合体抗体的表达和纯化

[0167] 由通过上述实施例1、2制造的本发明人源化抗体的载体和上述比较例的嵌合体抗体载体表达抗体蛋白质,进行纯化。

[0168] 首先,为了使上述嵌合体抗体("Chi2B7")表达并纯化,利用150mm的培养皿,将 1×10^7 的HEK293T细胞(人胚胎肾细胞株)在20ml的DMEM培养基(Biowest,法国)中培养。向培养的细胞混合50 μ g的上述pdCMV-dhfr-chi2B7表达载体和75 μ l的聚乙烯亚胺(polyethyleneimine,1mg/ml)后,与转染优化培养基500 μ l混合,并均匀地撒在培养细胞的培养基上。第二天收集上清液,加入新的培养基,收集由细胞株表达出来的嵌合体抗体,将其上清液加入装有珠(蛋白G琼脂糖珠(Protein G agarose beads),Amicogen,韩国)的柱中,使抗体能够与上述珠进行结合。然后,用PBS(pH8.0)清洗珠,利用0.1M甘氨酸(pH2.8)10ml和1M Tris-HCl(pH9.0),使抗体从珠溶出,从而纯化了Chi2B7嵌合体抗体,通过SDS-PAGE和考马斯蓝(Coomassie blue)染色法对此进行确认(图9的A)。另外,对于上述纯化的嵌合体抗体是否具有人类抗体的恒定区,利用山羊的抗体(goat- α -hIgG-gamma chain-HRP,Invitrogen,美国,以及goat- α -hIgG-kappa chain-HRP,Bethyl,美国)作为二次抗体,通过免疫印迹进行检测,结果可以确认上述嵌合体抗体是包含人类抗体的恒定区的抗体(图9的B)。

[0169] 另外,将上述实施例1、2的人源化抗体进行表达、纯化。通过上述实施例1和2,制造了4种本发明人源化抗体的重链可变区、3种轻链可变区,通过它们的组合,可以制造多种形态的人源化抗体。由此,将上述实施例1、2的表达载体导入HEK293T细胞,通过与上述嵌合体抗体相同的方法表达人源化抗体,利用蛋白G珠和柱进行了分离和纯化。

[0170] 为了确认纯化的上述嵌合体抗体和本发明的人源化抗体以及来源于小鼠的2B7抗体的纯化纯度,实施了10% SDS-PAGE。在全部10种人源化抗体中,分析了代表性的6种

(Hz2B7-1.1、Hz2B7-1.2、Hz2B7-1.3、Hz2B7-2.1、Hz2B7-3.2、Hz2B7-4.3),此时,各抗体分别使用各1 μ g,在SDS-PAGE之后,进行了考马斯亮蓝染色和免疫印迹分析(图9)。利用用于考马斯亮蓝染色的溶液(Pa geBlue staining solution,Thermo Scientific,美国)进行处理,并进行染色,结果各抗体的重链和轻链在约55kDa、25kDa的位置被确认(图9的A)。这表示上述嵌合体抗体和人源化抗体均为IgG类型的抗体,具有人类抗体的一部分序列。为了免疫印迹,利用山羊的抗体(goat- α -hIgG-gamma chain-HRP,Invitro gen,美国,以及goat- α -hIgG-kappa chain-HRP,Bethyl,美国)作为二次抗体,利用ECL试剂盒(Western Bright ECL kit,advansta,美国)检测出条带。其结果,ECL-2B7抗体为小鼠抗体,因此,通过免疫印迹没有检测出来,其他抗体(嵌合体抗体和人源化抗体)的情况下,与SDS-PAGE结果同样检测出各抗体的重链和轻链,从而可以确认它们具有人类抗体序列,并且可以确认抗体的纯化纯度(图9的B)。

[0171] [实验例2]

[0172] 通过ELISA的人源化抗体的TM4SF4抗原结合能力比较

[0173] 利用本发明的人源化抗体以及嵌合体抗体,通过间接ELISA(indirect ELISA),确认了对TM4SF4的结合能力。

[0174] 具体而言,上述人源化抗体是将通过上述实施例1、2设计的4种重链可变区变种和3种轻链可变区变种进行组合,以Hz2B7-1.1、Hz2B7-1.2、Hz2B7-1.3、Hz2B7-2.1、Hz2B7-3.1、Hz2B7-3.2、Hz2B7-3.3、Hz2B7-4.1、Hz2B7-4.2和Hz2B7-4.3这10中形态制造的。为此,在96孔板的各孔的底部加入用包被缓冲溶液(100mM碳酸盐/碳酸氢盐包被缓冲溶液(carbonate/bicarbonate coating buffer)、pH 9.6)溶解的TM4SF4-BSA(1 μ g/ml)或BSA溶液(1 μ g/ml)100 μ l,在4 $^{\circ}$ C吸附16小时以上。然后,将包被的抗原用清洗缓冲溶液(wash buffer,0.05%PBS-T,Tween-20)清洗3次后,在各孔的底部的没有吸附抗原的部分加入封闭缓冲溶液(blocking buffer,含5%脱脂牛奶的清洗缓冲溶液(5%skim milk in wash buffer))200 μ l,在4 $^{\circ}$ C反应16小时以上后,再次用清洗缓冲溶液清洗3次。然后,将通过上述实验例1进行纯化的上述10种组合的人源化抗体和嵌合体抗体利用封闭缓冲溶液稀释成多种浓度而准备后,按照不同浓度,在各孔中分别加入100 μ l,在室温下反应2小时。再次清洗3次后,将用于对其进行检测的1mg/ml的抗体(α -human IgG-Kappa chain-HRP,Bethyl,美国),利用封闭缓冲溶液稀释10000倍,并在各孔中分别加入100 μ l,在室温下反应1小时。反应结束后,用清洗缓冲溶液清洗3次,将基质溶液(OPD溶液,30%H₂O₂ 4 μ l,100 μ lOPD stock(40mg/ml),用磷酸盐柠檬酸盐缓冲液(phosphat e citrate buffer)调整到10ml)在各孔中分别加入100 μ l,在室温下反应后,加入2.5M的H₂SO₄ 50 μ l,结束反应。最后,为了测定固体上结合的酶的活性,利用酶标仪(ELISA reader),在490nm测定了吸光度(图10)。

[0175] 其结果显示出10种本发明的人源化抗体均未与BSA结合,对TM4SF4-BSA抗原以高特异性进行结合(图10)。因此,可以确认本发明的人源化抗体不仅具有对TM4SF4的结合能力,并且具有对其特异性地结合的特性。另外,比较对TM4SF4-BSA的亲和力时,10种人源化抗体与嵌合体抗体Chi2B7相比均显示出显著高的TM4SF4亲和力。并且,10种人源化抗体分别显示出不同的结合亲和力(binding affinity),其中,Hz2B7-1.2人源化抗体的情况下,显示出与Hz2B7-1.1相比明显增加的结合亲和力,从而可以确认对TM4SF4的结合能力最优异(图10的A和B)。

[0176] [实验例3]

[0177] 通过SPR分析对抗-TM4SF4人源化单克隆抗体敏感度进行比较

[0178] 为了比较所构建的抗-TM4SF4人源化单克隆抗体的人TM4SF4-肽(hTM4SF4 aa 126-140)抗原的结合能力,进行了表面等离子体共振(Surface plasmon resonance,SPR)分析。

[0179] 作为分析物 (Analyte) 的人源化抗体共5种,如表3所示,分析出了超突变型1种(HzE2B7-1.1)、轻链突变型2种(HzE2B7-1.2(LC N31F)、HzE2B7-1.3(LC N31V))、重链/轻链突变型2种(HzE2B7-4.3(HC W55Y,LC N31V)、HzE2B7-3.2(HC W55S,LC N31F)),将人类TM4SF4蛋白质的第126号至第140号的氨基酸序列结合有生物素(biotin)的形态的合成肽(Biotin-GSAGGS TWGYPFHDGDYLNDE,GSAGGS:生物素与TM4SF4 aa126-140即TWGYPFHDGDYLNDE之间的空间序列)用作配体(Ligand)。

[0180] [表3]

	抗体	重链突变	轻链突变	KD (M)
[0181]	HzE2B7-1.1(起源(Origin))	-	-	2.442×10^{-8}
	HzE2B7-4.3(HC W55Y, LC N31V)	W55Y	N31V	8.165×10^{-8}
[0182]	HzE2B7-1.2(LC N31F)	-	N31F	6.030×10^{-9}
	HzE2B7-1.3(LC N31V)	-	N31V	3.542×10^{-8}
	HzE2B7-3.2(HC W55S, LC N31F)	W55S	N31F	1.119×10^{-7}

[0183] 首先,将链霉亲和素接合传感芯片(Series S Sensor Chip SA,Cytiva公司)插入Biacore T200(Cytiva公司),使活化缓冲液(1M NaCl,50mM NaOH)流过30秒后,使HBS-EP缓冲液(Cytiva公司)流过,从而诱导了传感芯片表面的活化和稳定化。对已经稳定的传感芯片,使配体(Biotin-hTM4SF4 aa 126-140)以1nM~128nM的浓度流过,使配体固定在传感芯片表面,使再生溶液(Regeneration buffer,20mM NaOH)流过,从而构建了生物素-肽配体稳定地结合的链霉亲和素接合传感芯片。用于亲和力分析的分析物抗体从512nmole/L以1/2依次稀释而准备至16nmol/L浓度,对构建的配体结合链霉亲和素接合传感芯片,使各个不同浓度的分析物抗体以30ul/min的速度流过480秒来诱导结合后,使HBS-EP缓冲液以相同的时间和速度流动,以反应值(Response unit)的形态获得分析物抗体从配体肽解离的程度,按照相同的方法,以排除所获得的配体非结合传感芯片的反应值的方式,使用Biacore T200评价软件(Cytiva公司),计算出结合速率(Association rate, K_a)和解离速率(Dissociation rate, K_d)以及平衡解离常数(KD, K_d/K_a)值。作为计算标准,对于配体肽与分析物抗体的相互作用的物质传递拟合模型使用1:1结合而进行分析。以图11中标记的平衡解离常数值(KD)为基准,抗-TM4SF4人源化单克隆抗体对人类TM4SF4-肽(hT M4SF4 aa 126-140)抗原的结合能力中,HzE2B7-1.2(LC N31F)抗体被评价为 6.03×10^{-9} M,最低,HzE2B7-1.1被评价为 2.442×10^{-8} M、HzE2B7-1.3(LC N31V)被评价为 3.542×10^{-8} M、HzE2B7-4.3(HC W55Y LC N31V)被评价为 8.165×10^{-8} M、HzE2B7-3.2(HC W55S LC N31F)被评价为 1.119×10^{-7} M(表3)。人源化抗体的平衡解离常数(KD)值是优选较低者,在商业上可接受的一

般的人源化抗体中,其值通常为 10^{-8} M以下,下限没有特别限定。因此,最初设计的人源化抗体(HzE2B7-1.1)的KD已经具有有用的 2.442×10^{-8} M,以通过对接模型而获得的信息为基础,将轻链第31号天冬酰胺(Asparagine,N)替换为苯丙氨酸(Phenylalanine,F)的HzE2B7-1.2(LC N31F)抗体对抗原的结合能力相比于设计的HzE2B7-1.1最少增加约4倍,显示出平衡解离常数(KD)值达到 6.03×10^{-9} M,可知是商业价值更高的抗体。

[0184] [实验例4]

[0185] 通过FACS的人源化抗体的癌细胞结合能力比较

[0186] 通过上述实验例2,确认了本发明人源化抗体对TM4SF4具有高亲和力,特异性地进行结合,因此,对具有过表达上述TM4SF4的特征的癌细胞用本发明的人源化抗体进行处理,从而确认了是否结合。

[0187] 具体而言,将作为肺癌细胞株的Calu-3、A549细胞株在DMEM培养基(Biowest,法国)中用10%胎牛血清(WelGene)进行培养。并且,将作为肝癌细胞株的Huh7、SNU-387、SNU-449细胞株在RPMI-1640培养基(Biowest)中使用10%胎牛血清进行培养。然后,对生长80%左右的上述细胞用酶(TrypLE™ Express Enzyme,Gibco™)进行处理来使其分离,将该细胞用PBS(pH7.4)清洗后,用4%多聚甲醛(PFA)在4℃固定15分钟。然后,用PBA(0.1%BSA in PBS)清洗2次后,按照不同抗体,向 5×10^5 个细胞中,加入分别包含来源于小鼠的2B7抗体(10μg/ml)、嵌合体抗体Chi2B7(10μg/ml)、本发明的人源化抗体Hz2B7-1.1(10μg/ml)、Hz2B7-1.2(10μg/ml)、Hz2B7-1.3(10μg/ml)、小鼠与人类的同型对照组IgG1抗体(10μg/μl)的PBA,在4℃反应1小时。反应后,用PBA清洗2次后,在包含来源于小鼠的2B7抗体和小鼠同型(Isotype)IgG(2μg/μl,Invitrogen)的组中,加入结合有FITC荧光且对小鼠IgG特异性的α-小鼠IgG-FITC(2μg/μl)抗体。并且,在包含人类同型(Isotype)IgG、嵌合体抗体和人源化抗体的组中,加入结合有FITC且对人IgG特异性的α-人IgG-FITC(2μg/ml,Invitrogen)抗体,在4℃反应30分钟。反应之后,用PBA清洗后,用500μl的PBA使其悬浮,然后利用流式细胞分析仪(FACS Calibur,BD,美国),确认上述抗体是否对抗原具有特异性。

[0188] 其结果,可以确认,与来源于小鼠的2B7抗体同样,本发明的人源化抗体和比较例的嵌合体抗体特异性地结合于在表面表达TM4SF4的Calu-3和A549肺癌细胞。另外,可以确认,虽然与人类原代肝细胞(human primary hepatocyte,hPH)的表面不进行结合,但是与作为肝癌细胞株的Huh7、SNU-387和SNU-449肝癌细胞也特异性地结合。其中,本发明的人源化抗体Hz2B7-1.2的情况下,分析结果可以确认尤其对A549细胞株具有显著高的结合能力(图12)。

[0189] [实验例5]

[0190] 能够以高生产率生产本发明人源化抗体的细胞株的制造

[0191] 为了制造能够生产本发明的人源化抗体的细胞株,利用了在中国仓鼠卵巢巢细胞(Chinese ovary hamster cells)中编码二氢叶酸还原酶(dihydrofolate reductase)的基因缺失的DG44细胞株。上述DG44细胞在IMD M培养基(Welgene,韩国)中添加H.T.(hypoxanthine-thymidine,sigma,Germany)和Dialyed FBS(Gibco,USA)而进行培养,用胰蛋白酶-EDTA(welgene,韩国)分离细胞株后,在6孔板中分别注入 1×10^6 细胞/孔。其中,为了转化(转染(transfection))本发明的人源化抗体中编码Hz2B7-1.1和Hz2B7-1.2(LC N31F)的表达载体,将分别用15μg的PvuI限制酶(Enzynomics,韩国)进行处理而使其线

性化的pdCMV-dhfr-hz2B7-1.1和pdCMV-dhfr-hz2B7-1.2良好地混合于TOM培养基(转染优化培养基(transfection optimized medium))来进行准备,然后使15 μ l的脂质体(lipofectamine)2000(Invitrogen,USA)在TOM培养基中反应后,与含有上述载体的培养基混合,反应20分钟。另外,将反应的溶液滴加于上述DG44细胞来进行转化。

[0192] 导入有编码本发明的人源化抗体的基因的上述细胞在含有100 μ g/ml浓度的G418的培养基中,通过新霉素(neomycin)抗性与否,进行筛查,从而获得了形成集落的细胞的上清液。利用包含在上清液中的本发明的人源化抗体,进行夹心ELISA(Sandwich ELISA),确认了抗体的生产。在各个转化体中筛选ELISA结果显示出OD值高的结果且抗体表达量优异的5个克隆,然后用MTX(甲氨蝶呤(methotrexate))进行处理,使本发明的抗体基因扩增。以0.02 μ M的浓度处理MTX,使上述抗体基因扩增1周后,再次通过ELISA,测定抗体生产量,再次筛选生产量增加的克隆各5个,以0.08 μ M的浓度增加MTX,使基因进行2次扩增。

[0193] 由此,筛选出高产Hz2B7-1.1人源化抗体的细胞株3A12、H12、4A12、4B12和4H12这共5个克隆。并且,筛选出高产Hz2B7-1.2抗体(LC N31F)的细胞株4A9、4A12、4B9、4C7和4H12克隆,包括通过追加的转化而获得的7A8和6G10克隆在内,筛选出共7个克隆(图13)。制作上述12个克隆的储备液(cell stock),将其在IMDM培养基中添加10%透析型(Dialyzed)FBS而培养,细胞生长50%左右后,将MTX每2天按0.08 μ M的浓度进行处理而使抗体基因扩增。用MTX处理约30天并进行培养的结果,在0.08 μ M浓度的MTX中能够获得具有抗性的细胞株,作为Hz2B7-1.1抗体高表达细胞株,选定了4H12克隆,作为Hz2B7-1.2抗体高表达细胞株,选定了4A12克隆。

[0194] 为了单克隆筛选,将在上述0.08 μ M浓度的MTX下存活的被选定的克隆向100mm皿中分别注入 3×10^4 细胞。利用约10天后形成的各集落,制作储备液,进行保管,其余细胞通过夹心ELISA确认了抗体生产量的增加与否。具体而言,在96孔板的各孔的底部加入用包被缓冲溶液(100mM碳酸盐/碳酸氢盐包被缓冲溶液,pH 9.6)进行溶解的 α -人IgG-Fc特异性抗体(2 μ g/ml)100 μ l,在4 $^{\circ}$ C吸附16小时以上。进行清洗和封闭后,将上述4H12克隆(Hz2B7-1.1-4H12)、4A12克隆(Hz2B7-1.2-4A12)和在0.08 μ M浓度的MTX中筛选的抗体基因被扩增的各个单克隆在37 $^{\circ}$ C CO₂培养箱中培养24小时后,收集培养液。将上述培养液和人IgG Isotype对照组抗体稀释成各种浓度来准备后,按照不同浓度在各孔中加入100 μ l,在室温下反应2小时。然后,利用封闭缓冲液将 α -人IgG-Kappa链-HRP(1mg/ml,Bethyl,美国)稀释10000倍,在各孔中加入100 μ l,在室温下反应1小时。反应结束后,将作为基质的OPD储备液(30% H₂O₂ 4 μ l,100 μ l OPD stock(40mg/ml),用磷酸盐柠檬酸盐缓冲液(phosphate citrate buffer)调整到10ml)在各孔中加入100 μ l,在室温下反应10分钟后,加入2.5M的H₂SO₄ 50 μ l来结束反应。

[0195] 进行ELISA的结果,在利用MTX扩增抗体基因的Hz2B7-1.1-4H12-0.08和Hz2B7-1.2-4A12-0.08的各克隆中确认了与利用MTX进行扩增之前的克隆相比显示出更高的吸光度的克隆。并且,通过定量性抗体生产量分析,计算了抗体浓度(图14和图15)。其结果,Hz2B7-1.1-4H12克隆的情况下,利用MTX扩增抗体基因之前的细胞的抗体生产量为约2.8 μ g/10⁶细胞/24hr,但利用MTX扩增抗体基因的Hz2B7-1.1-4H12-0.08-#1克隆的抗体生产量增加约3.8倍,显示为10.8 μ g/10⁶细胞/24hr,Hz2B7-1.2-4A12克隆的情况下,扩增前抗体生产量为2.5 μ g/10⁶细胞/24hr,将该克隆用浓度0.08 μ M的MTX扩增的Hz2B7-1.2-4A12-0.08克

隆的情况下, #9克隆显示出约 $14.2\mu\text{g}/10^6$ 细胞/24hr、#20克隆显示出 $7.9\mu\text{g}/10^6$ 细胞/24hr的抗体生产量, 与基因没有扩增的克隆相比, 显示出各增加约5.7倍、3.1倍的抗体生产量, 可知增加了最大5.7倍抗体生产率(图15)。

[0196] 然后, 为了测定血液内的抗体的稳定性, 进行了血清稳定性 (serum stability) 实验。将由小鼠杂种瘤细胞株纯化的小鼠抗体2B7以及由CHO细胞株纯化的人源化抗体Hz2B7-1.1和Hz2B7-1.2分别在 37°C 的60%人血清 (human serum) (Sigma-Aldrich) 中培养最长4天后, 利用间接酶联免疫吸附试验 (Indirect ELISA) 测定了0、3、24、48、72、96小时的抗原结合能力。具体而言, 将 $0.5\mu\text{g}/\text{ml}$ 的TM4SF4-BSA抗原利用包被液 (100mM碳酸盐/碳酸氢盐包被缓冲液, pH 9.6) 在 4°C 吸附16小时以上后, 进行了清洗和封闭过程。然后, 将在人血清中培养的抗体用作一次抗体, 与之前同样进行ELISA步骤, 确认了是否能够随着时间的变化而维持抗原结合能力。测定吸光度后, 假设0小时的抗原结合能力为100%, 进行比较的结果, 小鼠抗体2B7在人血清内直至96小时为止具有同等的抗原结合能力(图16的A)。另外, 确认了改变抗体的序列和结构的人源化抗体Hz2B7-1.1和Hz2B7-1.2在人血清内直至约4天未分解, 维持了一定的抗原结合能力(图16的B和C)。

[0197] 因此, 在本发明的人源化抗体基因转化的CHO-DG44细胞中利用MTX特异性地扩增抗体基因, 从而作为生产本发明的抗体的细胞株, 可以确立Hz2B7-1.1-4H12-0.08-#1、Hz2B7-1.2-4A12-0.08-#9细胞株。

[0198] 以上, 本发明只对记载的实施例进行了详细说明, 但本领域技术人员应该清楚可以在本发明的技术思想范围内进行各种变形和修改, 而这样的变形和修改当然也属于本发明要求保护的范围内。

<110> 韩国原子力研究院(KOREA ATOMIC ENERGY RESEARCH INSTITUTE)
世宗大学校产学协力团(INDUSTRY ACADEMY COOPERATION FOUNDATION OF SEJONG UNIVERSITY)

<120> 抗-TM4SF4人源化抗体及其用途

<130> 20220PA7021PCT

<150> KR 10-2021-0079629

<151> 2021-06-18

<160> 80

<170> KoPatentIn 3.0

<210> 1

<211> 30

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> Hz2B7-1.0~4.0 FR1

<400> 1

Glu Ile Thr Leu Lys Glu Ser Gly Pro Thr Leu Val Lys Pro Thr Gln

1 5 10 15

Thr Leu Thr Leu Thr Cys Thr Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ser

20 25 30

<210> 2

<211> 14

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> Hz2B7-1.0,3.0,4.0 FR2

<400> 2

Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Ala Leu Glu Trp Leu Ala

1 5 10

<210> 3

<211> 14

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> Hz2B7-2.0 FR2

<400> 3

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

1 5 10

<210> 4
 <211> 32
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> Hz2B7-1.0~4.0 FR3
 <400> 4
 Arg Leu Thr Ile Thr Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val Val Leu Thr
 1 5 10 15
 Met Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Arg
 20 25 30
 <210> 5
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> Hz2B7-1.0~4.0 FR4
 <400> 5
 Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 1 5 10
 <210> 6
 <211> 23
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> Hz2B7-0.1~0.3 FR1
 <400> 6
 Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
 1 5 10 15
 Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys
 20
 <210> 7
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> Hz2B7-0.1~0.3 FR2
 <400> 7
 Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr

1	5	10	15
<210>	8		
<211>	32		
<212>	PRT		
<213>	人工序列		
<220>			
<223>	Hz2B7-0.1~0.3 FR3		
<400>	8		
Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr			
1	5	10	15
Leu Thr Ile Ser Leu Met Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys			
	20	25	30
<210>	9		
<211>	10		
<212>	PRT		
<213>	人工序列		
<220>			
<223>	Hz2B7-0.1~0.3 FR4		
<400>	9		
Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys			
1	5	10	
<210>	10		
<211>	7		
<212>	PRT		
<213>	人工序列		
<220>			
<223>	Hz2B7-1.0~4.0 CDR1		
<400>	10		
Thr Tyr Gly Ile Gly Val Ser			
1	5		
<210>	11		
<211>	16		
<212>	PRT		
<213>	人工序列		
<220>			
<223>	Hz2B7-1.0,2.0 CDR2		
<400>	11		
His Ile Trp Trp Asn Asp Asn Lys Tyr Tyr Asn Thr Ala Leu Lys Ser			
1	5	10	15

<210> 12
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> Hz2B7-3.0 CDR2
 <400> 12
 His Ile Trp Ser Asn Asp Asn Lys Tyr Tyr Asn Thr Ala Leu Lys Ser
 1 5 10 15
 <210> 13
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> Hz2B7-4.0 CDR2
 <400> 13
 His Ile Trp Tyr Asn Asp Asn Lys Tyr Tyr Asn Thr Ala Leu Lys Ser
 1 5 10 15
 <210> 14
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> Hz2B7-1.0~4.0 CDR3
 <400> 14
 Lys Glu Gly Ser Ser Ala Pro Phe Ala Tyr
 1 5 10
 <210> 15
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> Hz2B7-0.1 CDR1
 <400> 15
 Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Ser Ser Asn Gln Lys Asn Tyr Leu
 1 5 10 15
 Ala
 <210> 16
 <211> 17

<212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> Hz2B7-0.2 CDR1
 <400> 16
 Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Phe Ser Ser Asn Gln Lys Asn Tyr Leu
 1 5 10 15
 Ala
 <210> 17
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> Hz2B7-0.3 CDR1
 <400> 17
 Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Val Ser Ser Asn Gln Lys Asn Tyr Leu
 1 5 10 15
 Ala
 <210> 18
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> Hz2B7-0.1~0.3 CDR2
 <400> 18
 Phe Ala Ser Thr Arg Glu Ser
 1 5
 <210> 19
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> Hz2B7-0.1~0.3 CDR3
 <400> 19
 Gln Gln His Tyr Arg Thr Pro Pro Thr
 1 5
 <210> 20
 <211> 120
 <212> PRT

<213> 人工序列
 <220>
 <223> Hz2B7-1.0
 <400> 20
 Glu Ile Thr Leu Lys Glu Ser Gly Pro Thr Leu Val Lys Pro Thr Gln
 1 5 10 15
 Thr Leu Thr Leu Thr Cys Thr Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ser Thr Tyr
 20 25 30
 Gly Ile Gly Val Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Ala Leu Glu
 35 40 45
 Trp Leu Ala His Ile Trp Trp Asn Asp Asn Lys Tyr Tyr Asn Thr Ala
 50 55 60
 Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Thr Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val
 65 70 75 80
 Val Leu Thr Met Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr
 85 90 95
 Cys Ala Arg Lys Glu Gly Ser Ser Ala Pro Phe Ala Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110
 Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120
 <210> 21
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> Hz2B7-2.0
 <400> 21
 Glu Ile Thr Leu Lys Glu Ser Gly Pro Thr Leu Val Lys Pro Thr Gln
 1 5 10 15
 Thr Leu Thr Leu Thr Cys Thr Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ser Thr Tyr
 20 25 30
 Gly Ile Gly Val Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Val Leu Glu
 35 40 45
 Trp Leu Ala His Ile Trp Trp Asn Asp Asn Lys Tyr Tyr Asn Thr Ala
 50 55 60
 Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Thr Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val
 65 70 75 80
 Val Leu Thr Met Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr
 85 90 95

Cys Ala Arg Lys Glu Gly Ser Ser Ala Pro Phe Ala Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110
 Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120
 <210> 22
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> Hz2B7-3.0
 <400> 22
 Glu Ile Thr Leu Lys Glu Ser Gly Pro Thr Leu Val Lys Pro Thr Gln
 1 5 10 15
 Thr Leu Thr Leu Thr Cys Thr Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ser Thr Tyr
 20 25 30
 Gly Ile Gly Val Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Ala Leu Glu
 35 40 45
 Trp Leu Ala His Ile Trp Ser Asn Asp Asn Lys Tyr Tyr Asn Thr Ala
 50 55 60
 Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Thr Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val
 65 70 75 80
 Val Leu Thr Met Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr
 85 90 95
 Cys Ala Arg Lys Glu Gly Ser Ser Ala Pro Phe Ala Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110
 Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120
 <210> 23
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> Hz2B7-4.0
 <400> 23
 Glu Ile Thr Leu Lys Glu Ser Gly Pro Thr Leu Val Lys Pro Thr Gln
 1 5 10 15
 Thr Leu Thr Leu Thr Cys Thr Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ser Thr Tyr
 20 25 30
 Gly Ile Gly Val Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Ala Leu Glu

	35		40		45														
	Trp	Leu	Ala	His	Ile	Trp	Tyr	Asn	Asp	Asn	Lys	Tyr	Tyr	Asn	Thr	Ala			
	50						55						60						
	Leu	Lys	Ser	Arg	Leu	Thr	Ile	Thr	Lys	Asp	Thr	Ser	Lys	Asn	Gln	Val			
	65					70							75			80			
	Val	Leu	Thr	Met	Thr	Asn	Met	Asp	Pro	Val	Asp	Thr	Ala	Thr	Tyr	Tyr			
					85					90					95				
	Cys	Ala	Arg	Lys	Glu	Gly	Ser	Ser	Ala	Pro	Phe	Ala	Tyr	Trp	Gly	Gln			
				100					105					110					
	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser											
	115								120										
<210>	24																		
<211>	113																		
<212>	PRT																		
<213>	人工序列																		
<220>																			
<223>	Hz2B7-0.1																		
<400>	24																		
	Asp	Ile	Val	Met	Thr	Gln	Ser	Pro	Asp	Ser	Leu	Ala	Val	Ser	Leu	Gly			
	1				5					10					15				
	Glu	Arg	Ala	Thr	Ile	Asn	Cys	Lys	Ser	Ser	Gln	Ser	Leu	Leu	Asn	Ser			
				20					25					30					
	Ser	Asn	Gln	Lys	Asn	Tyr	Leu	Ala	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln			
			35					40					45						
	Pro	Pro	Lys	Leu	Leu	Ile	Tyr	Phe	Ala	Ser	Thr	Arg	Glu	Ser	Gly	Val			
	50						55						60						
	Pro	Asp	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr			
	65					70					75				80				
	Ile	Ser	Leu	Met	Gln	Ala	Glu	Asp	Val	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln			
					85					90				95					
	His	Tyr	Arg	Thr	Pro	Pro	Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Ile			
				100					105					110					
	Lys																		
<210>	25																		
<211>	113																		
<212>	PRT																		
<213>	人工序列																		
<220>																			
<223>	Hz2B7-0.2																		

<400> 25
 Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
 1 5 10 15
 Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Phe Ser
 20 25 30
 Ser Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln
 35 40 45
 Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Phe Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
 50 55 60
 Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
 65 70 75 80
 Ile Ser Leu Met Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln
 85 90 95
 His Tyr Arg Thr Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile
 100 105 110

Lys

<210> 26
 <211> 113
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> Hz2B7-0.3
 <400> 26

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
 1 5 10 15
 Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Val Ser
 20 25 30
 Ser Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln
 35 40 45
 Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Phe Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
 50 55 60
 Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
 65 70 75 80
 Ile Ser Leu Met Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln
 85 90 95
 His Tyr Arg Thr Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile
 100 105 110

Lys

<210> 27

<211> 330
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 重链恒定区
 <400> 27
 Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
 1 5 10 15
 Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
 20 25 30
 Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
 35 40 45
 Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
 50 55 60
 Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
 65 70 75 80
 Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
 85 90 95
 Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
 100 105 110
 Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
 115 120 125
 Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
 130 135 140
 Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
 145 150 155 160
 Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
 165 170 175
 Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
 180 185 190
 His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
 195 200 205
 Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
 210 215 220
 Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu
 225 230 235 240
 Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
 245 250 255
 Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn

	260		265		270
Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe					
	275		280		285
Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn					
	290		295		300
Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr					
305		310		315	320
Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys					
	325		330		

- <210> 28
- <211> 107
- <212> PRT
- <213> 人工序列
- <220>
- <223> 轻链恒定区
- <400> 28

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu					
1		5		10	15
Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe					
	20		25		30
Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln					
	35		40		45
Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser					
50		55		60	
Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu					
65		70		75	80
Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser					
	85		90		95
Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys					
	100		105		

- <210> 29
- <211> 90
- <212> DNA
- <213> 人工序列
- <220>
- <223> Hz2B7-1.0~4.0 FR1
- <400> 29

gagatcacc tgaaggagag cggccccacc ctggtgaagc ccaccagac cctgaccctg	60
acctgcacct tcagcggctt cagcctgagc	90

<210>	30	
<211>	42	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	Hz2B7-1.0,3.0,4.0 FR2	
<400>	30	
	tggatcaggc agccccccgg caaggcctg gaggctgg cc	42
<210>	31	
<211>	42	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	Hz2B7-2.0 FR2	
<400>	31	
	tggatcaggc agccccccgg caaggtcctg gaggctgg cc	42
<210>	32	
<211>	96	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	Hz2B7-1.0~4.0 FR3	
<400>	32	
	aggctgacca tcaccaagga caccagcaag aaccaggtgg tgctgacat gaccaacatg	60
	gaccccgtagg acaccgccac ctactactgc gccagg	96
<210>	33	
<211>	33	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	Hz2B7-1.0~4.0 FR4	
<400>	33	
	tggggccagg gcaccctggt gaccgtgagc agc	33
<210>	34	
<211>	69	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	Hz2B7-0.1~0.3 FR1	

<400>	34		
		gacatcgtga tgaccagag ccccgacagc ctggccgtga gcctgggcca gagggccacc	60
		atcaactgc	69
<210>	35		
<211>	45		
<212>	DNA		
<213>	人工序列		
<220>			
<223>	Hz2B7-0.1~0.3 FR2		
<400>	35		
		tggtaccagc agaagcccgg ccagcccccc aagctgctga tctac	45
<210>	36		
<211>	96		
<212>	DNA		
<213>	人工序列		
<220>			
<223>	Hz2B7-0.1~0.3 FR3		
<400>	36		
		ggcgtgcccg acaggttcag cggcagcggc agcggcaccg acttcaccct gaccatcagc	60
		agcctgcagg ccgaggacgt ggccgtgtac tactgc	96
<210>	37		
<211>	30		
<212>	DNA		
<213>	人工序列		
<220>			
<223>	Hz2B7-0.1~0.3 FR4		
<400>	37		
		ttcggccagg gcaccaaggt ggagatcaag	30
<210>	38		
<211>	21		
<212>	DNA		
<213>	人工序列		
<220>			
<223>	Hz2B7-1.0~4.0 CDR1		
<400>	38		
		acttatggta taggagtaag c	21
<210>	39		
<211>	48		
<212>	DNA		

<213>	人工序列	
<220>		
<223>	Hz2B7-1.0,2.0 CDR2	
<400>	39	
	cacatttggg ggaatgataa taagtactat aacacagccc tgaagagc	48
<210>	40	
<211>	48	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	Hz2B7-3.0 CDR2	
<400>	40	
	cacatttggg cgaatgataa taagtactat aacacagccc tgaagagc	48
<210>	41	
<211>	48	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	Hz2B7-4.0 CDR2	
<400>	41	
	cacatttggg ataatgataa taagtactat aacacagccc tgaagagc	48
<210>	42	
<211>	30	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	Hz2B7-1.0~4.0 CDR3	
<400>	42	
	aaggagggca gctcggcccc ctttgcttac	30
<210>	43	
<211>	51	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	Hz2B7-0.1 CDR1	
<400>	43	
	aagtccagtc agagcctttt aaatagtagc aatcaaaaga actatttggc c	51
<210>	44	
<211>	51	

<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	Hz2B7-0.2 CDR1	
<400>	44	
	aagtccagtc agagcctttt attcagtagc aatcaaaaga actatttggc c	51
<210>	45	
<211>	51	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	Hz2B7-0.3 CDR1	
<400>	45	
	aagtccagtc agagcctttt agtaagtagc aatcaaaaga actatttggc c	51
<210>	46	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	Hz2B7-0.1~0.3 CDR2	
<400>	46	
	tttgcattcca ctagggaatc t	21
<210>	47	
<211>	27	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	Hz2B7-0.1~0.3 CDR3	
<400>	47	
	cagcaacatt atagaactcc tccgacg	27
<210>	48	
<211>	360	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	Hz2B7-1.0	
<400>	48	
	gagatcacc tgaaggagag cggccccacc ctggtgaage ccaccagac cctgaccctg	60
	acctgcacct tcagcggctt cagcctgagc acttatggta taggagtaag ctggatcagg	120

cagccccccg gcaaggccct ggagtggctg gcccacattt ggtggaatga taataagtac 180
 tataacacag ccctgaagag caggctgacc atcaccaagg acaccagcaa gaaccaggtg 240
 gtgctgacca tgaccaacat ggaccccgtg gacaccgcca cctactactg cgccaggaag 300
 gagggcagct cggccccctt tgcttactgg ggccagggca ccctggtgac cgtgagcagc 360
 360

<210> 49

<211> 360

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> Hz2B7-2.0

<400> 49

gagatcacc tgaaggagag cggccccacc ctggtgaagc ccaccagac cctgaccctg 60
 acctgcacct tcagcggctt cagcctgagc acttatggta taggagtaag ctggatcagg 120
 cagccccccg gcaaggcctt ggagtggctg gcccacattt ggtggaatga taataagtac 180
 tataacacag ccctgaagag caggctgacc atcaccaagg acaccagcaa gaaccaggtg 240
 gtgctgacca tgaccaacat ggaccccgtg gacaccgcca cctactactg cgccaggaag 300
 gagggcagct cggccccctt tgcttactgg ggccagggca ccctggtgac cgtgagcagc 360
 360

<210> 50

<211> 360

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> Hz2B7-3.0

<400> 50

gagatcacc tgaaggagag cggccccacc ctggtgaagc ccaccagac cctgaccctg 60
 acctgcacct tcagcggctt cagcctgagc acttatggta taggagtaag ctggatcagg 120
 cagccccccg gcaaggcctt ggagtggctg gcccacattt ggtcgaatga taataagtac 180
 tataacacag ccctgaagag caggctgacc atcaccaagg acaccagcaa gaaccaggtg 240
 gtgctgacca tgaccaacat ggaccccgtg gacaccgcca cctactactg cgccaggaag 300
 gagggcagct cggccccctt tgcttactgg ggccagggca ccctggtgac cgtgagcagc 360
 360

<210> 51

<211> 360

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> Hz2B7-4.0

<400>	51		
		gagatcaccc tgaaggagag cggccccacc ctggtgaagc ccaccagac cctgaccctg	60
		acctgcacct tcagcggctt cagcctgagc acttatggta taggagtaag ctggatcagg	120
		cagccccccg gcaaggcctt ggagtggctg gccacattt ggtataatga taataagtac	180
		tataacacag ccctgaagag caggctgacc atcaccaagg acaccagcaa gaaccaggtg	240
		gtgctgacca tgaccaacat ggacccctg gacaccgcca cctactactg cgccaggaag	300
		gagggcagct cggccccctt tgcttactgg ggccagggca ccctggtgac cgtgagcagc	360
			360
<210>	52		
<211>	339		
<212>	DNA		
<213>	人工序列		
<220>			
<223>	Hz2B7-0.1		
<400>	52		
		gacatcgtga tgaccagag ccccagacagc ctggccgtga gcctgggcga gagggccacc	60
		atcaactgca agtccagtca gagcctttta aatagtagca atcaaaagaa ctatttggcc	120
		tggtaccagc agaagcccgg ccagcccccc aagctgctga tctactttgc atccactagg	180
		gaatctggcg tgcccagacag gttcagcggc agcggcagcg gcaccgactt caccctgacc	240
		atcagcagcc tgcaggccga ggacgtggcc gtgtactact gccagcaaca ttatagaact	300
		cctccgacgt tcggccaggg caccaaggtg gagatcaag	339
<210>	53		
<211>	339		
<212>	DNA		
<213>	人工序列		
<220>			
<223>	Hz2B7-0.2		
<400>	53		
		gacatcgtga tgaccagag ccccagacagc ctggccgtga gcctgggcga gagggccacc	60
		atcaactgca agtccagtca gagcctttta ttcagtagca atcaaaagaa ctatttggcc	120
		tggtaccagc agaagcccgg ccagcccccc aagctgctga tctactttgc atccactagg	180
		gaatctggcg tgcccagacag gttcagcggc agcggcagcg gcaccgactt caccctgacc	240
		atcagcagcc tgcaggccga ggacgtggcc gtgtactact gccagcaaca ttatagaact	300
		cctccgacgt tcggccaggg caccaaggtg gagatcaag	339
<210>	54		
<211>	339		
<212>	DNA		
<213>	人工序列		
<220>			

<223>	Hz2B7-0.3	
<400>	54	
	gacatcgtga tgacccagag ccccgacagc ctggccgtga gcctgggcga gagggccacc	60
	atcaactgca agtccagtca gagcctttta gtaagtagca atcaaaagaa ctatttggcc	120
	tgggtaccagc agaagcccgg ccagccccc aagctgctga tctactttgc atccactagg	180
	gaatctggcg tgcccagacag gttcagcggc agcggcagcg gcaccgactt caccctgacc	240
	atcagcagcc tgcaggccga ggacgtggcc gtgtactact gccagcaaca ttatagaact	300
	cctccgacgt tcggccaggg caccaaggtg gagatcaag	339
<210>	55	
<211>	990	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	重链恒定区	
<400>	55	
	gcctccacca agggcccatc ggttctccc ctggcacct cctccaagag cacctctggg	60
	ggcacagcag ccctgggctg cctggtaag gactacttcc ccgaaccggt gacggtgtcg	120
	tggaactcag gcgccctgac cagcggcgtg cacaccttcc cggtgtctct acagtctca	180
	ggactctact ccctcagcag cgtggtgacc gtgccctcca gcagcttggg caccagacc	240
	tacatctgca acgtgaatca caagcccagc aacaccaagg tggacaagaa agttgagccc	300
	aaatcttgtg acaaaaactca cacatgcca ccgtgccag cacctgaact cctgggggga	360
	ccgtcagtct tcctcttccc cccaaaacce aaggacacce tcatgatctc ccggaccct	420
	gaggtcacat gcgtgggtgt ggacgtgagc cacgaagacc ctgaggtcaa gttcaactgg	480
	tacgtggacg gcgtggaggt gcataatgcc aagacaaagc cgcgggagga gcagtacaac	540
	agcacgtacc gtgtggtcag cgtcctcacc gtctgcacc aggactggct gaatggcaag	600
	gagtacaagt gcaaggtctc caacaaagcc ctcccagccc ccatcgagaa aaccatctcc	660
	aaagccaaaag ggcagccccg agaaccacag gtgtacacc tgccccatc ccgggatgag	720
	ctgaccaaga accaggtcag cctgacctgc ctggtaaaag gcttctatcc cagcgacatc	780
	gccgtggagt gggagagcaa tgggcagccg gagaacaact acaagaccac gcctcccgtg	840
	ctggactccg acggctcctt ctctcttac agcaagctca ccgtggacaa gagcaggtgg	900
	cagcagggga acgtcttctc atgctccgtg atgcatgagg ctctgcacaa ccactacaca	960
	cagaagagcc tctccctgtc tccgggtaaa	990
<210>	56	
<211>	321	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	轻链恒定区	
<400>	56	

cgtacgggtg ctgcaccatc tgtcttcac ttccegccat ctgatgagca gttgaaatct	60
ggaactgcct ctgttgtgtg cctgctgaat aacttctatc ccagagaggc caaagtacag	120
tggaagggtg ataacgccct ccaatcgggt aactcccagg agagtgtcac agagcaggac	180
agcaaggaca gcacctacag cctcagcagc acctgacgc tgagcaaagc agactacgag	240
aaacacaaaag tctacgcctg cgaagtcacc catcagggcc tgagtctgcc cgtcaciaag	300
agcttcaaca ggggagagtg t	321
<210> 57	
<211> 89	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> ECL-2B7-S-H-5' 引物	
<400> 57	
gacgaattca ctctaaccat ggaatggagc tgggtctttc tcttcttct gtcagtaact	60
acaggtgtcc actccgagat caccctgaa	89
<210> 58	
<211> 93	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> ECL-2B7-S-H-3' 引物	
<400> 58	
ctcaggctga agccgctgaa ggtgcaggtc agggtcaggg tctgggtggg cttcaccagg	60
gtggggccgc tctccttcag ggtgatctcg gag	93
<210> 59	
<211> 90	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> ECL-2B7-HC-1-5' 引物	
<400> 59	
cagcggcttc agcctgagca cttatggat aggagtaagc tggatcaggc agccccccgg	60
caaggccctg gagggtctgg cccacatttg	90
<210> 60	
<211> 95	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> ECL-2B7-HC-1-3' 引物	

<400>	60		
		cctggttctt gctggtgtcc ttggtgatgg tcagcctgct cttcagggtg gtgttatagt	60
		acttattatc attccaccaa atgtgggcca gccac	95
<210>	61		
<211>	90		
<212>	DNA		
<213>	人工序列		
<220>			
<223>	ECL-2B7-HC-2-5' 引物		
<400>	61		
		acaccagcaa gaaccagggtg gtgctgacca tgaccaacat ggaccccggtg gacaccgcca	60
		cctactactg cgccaggaag gagggcagct	90
<210>	62		
<211>	85		
<212>	DNA		
<213>	人工序列		
<220>			
<223>	ECL-2B7-HC-2-3' 引物		
<400>	62		
		gggcccttgg tggaggcgct gctcacggtc accagggtgc cctggcccca gtaagcaaag	60
		ggggccgagc tgccctcctt cctgg	85
<210>	63		
<211>	20		
<212>	DNA		
<213>	人工序列		
<220>			
<223>	Ch57.H.C-5' 引物		
<400>	63		
		gacgaattca ctctaaccat	20
<210>	64		
<211>	25		
<212>	DNA		
<213>	人工序列		
<220>			
<223>	ECL-2B7-WH-3' 引物		
<400>	64		
		ttgggcccctt ggtggaggcg ctgct	25
<210>	65		
<211>	22		

<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	h2B7-H.C-W55Y-5` 引物	
<400>	65	
	tttggataaa tgataataag ta	22
<210>	66	
<211>	22	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	h2B7-H.C-W55Y-3` 引物	
<400>	66	
	tcattataacc aaatgtgggc ca	22
<210>	67	
<211>	22	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	h2B7-H.C-W55S-5` 引物	
<400>	67	
	tttggtcgaa tgataataag ta	22
<210>	68	
<211>	22	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	h2B7-H.C-W55S-3` 引物	
<400>	68	
	tcattcgacc aaatgtgggc ca	22
<210>	69	
<211>	27	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	h2B7-H.C-SLIC-5` 引物	
<400>	69	
	gccagtgtgc tggaattcac tctaacc	27
<210>	70	

<211>	24	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	h2B7-H.C-SLIC-3 引物	
<400>	70	
	aagaccgatg ggcccttggt ggag	24
<210>	71	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	h2B7-L.C-N31V-5` 引物	
<400>	71	
	ttttagtaag tagcaatcaa	20
<210>	72	
<211>	22	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	h2B7-L.C-N31V-3` 引物	
<400>	72	
	ctacttacta aaaggctctg ac	22
<210>	73	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	h2B7-L.C-N31F-5` 引物	
<400>	73	
	ttttattcag tagcaatcaa	20
<210>	74	
<211>	22	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	h2B7-L.C-N31F-3` 引物	
<400>	74	
	ctactgaata aaaggctctg ac	22

<223> Hz2B7-0.1~0.3 CDR1

<400> 79

Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Xaa Ser Ser Asn Gln Lys Asn Tyr Leu

1

5

10

15

Ala

<210> 80

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> Hz2B7-0.1~0.3 CDR3

<400> 80

Gln Gln His Tyr Arg Xaa Pro Pro Thr

1

5

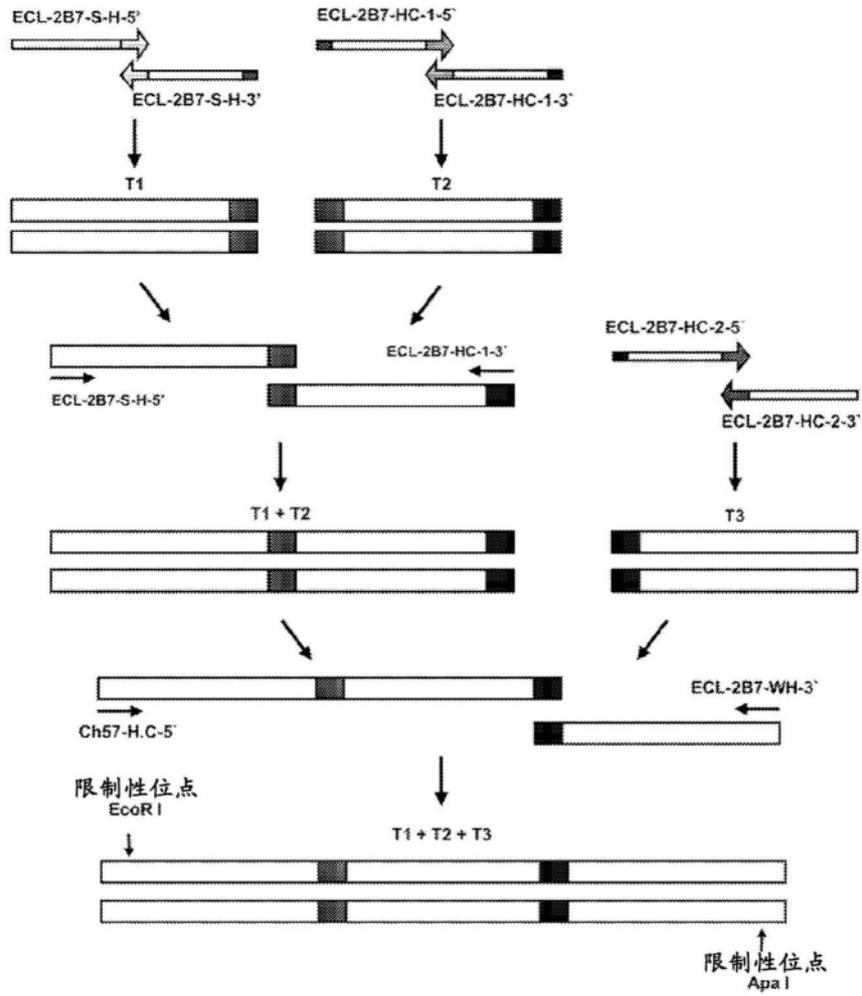


图1

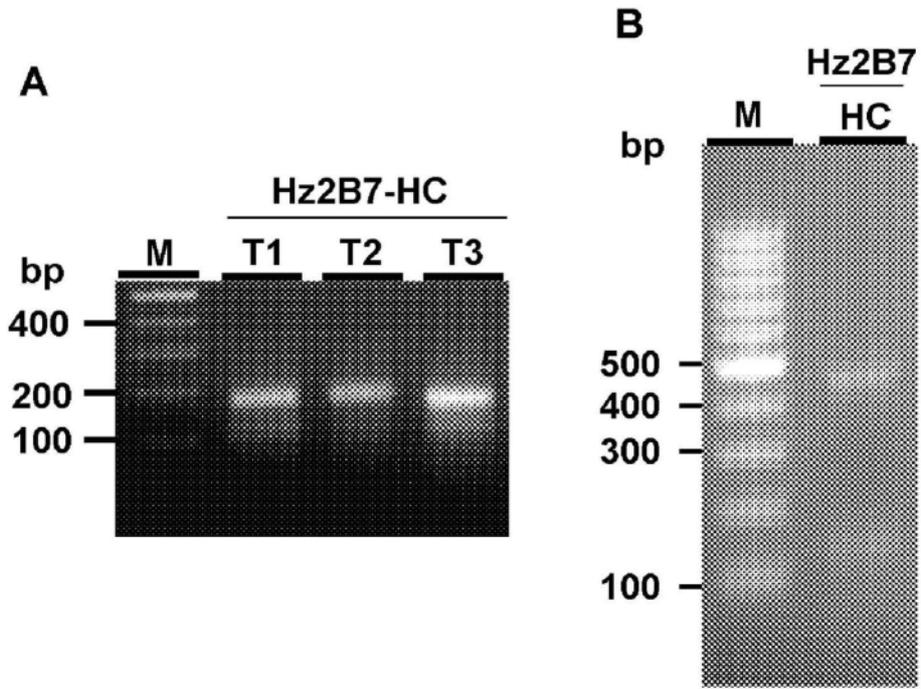


图2

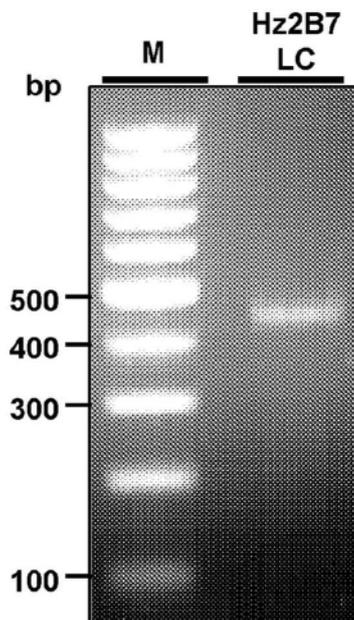


图3

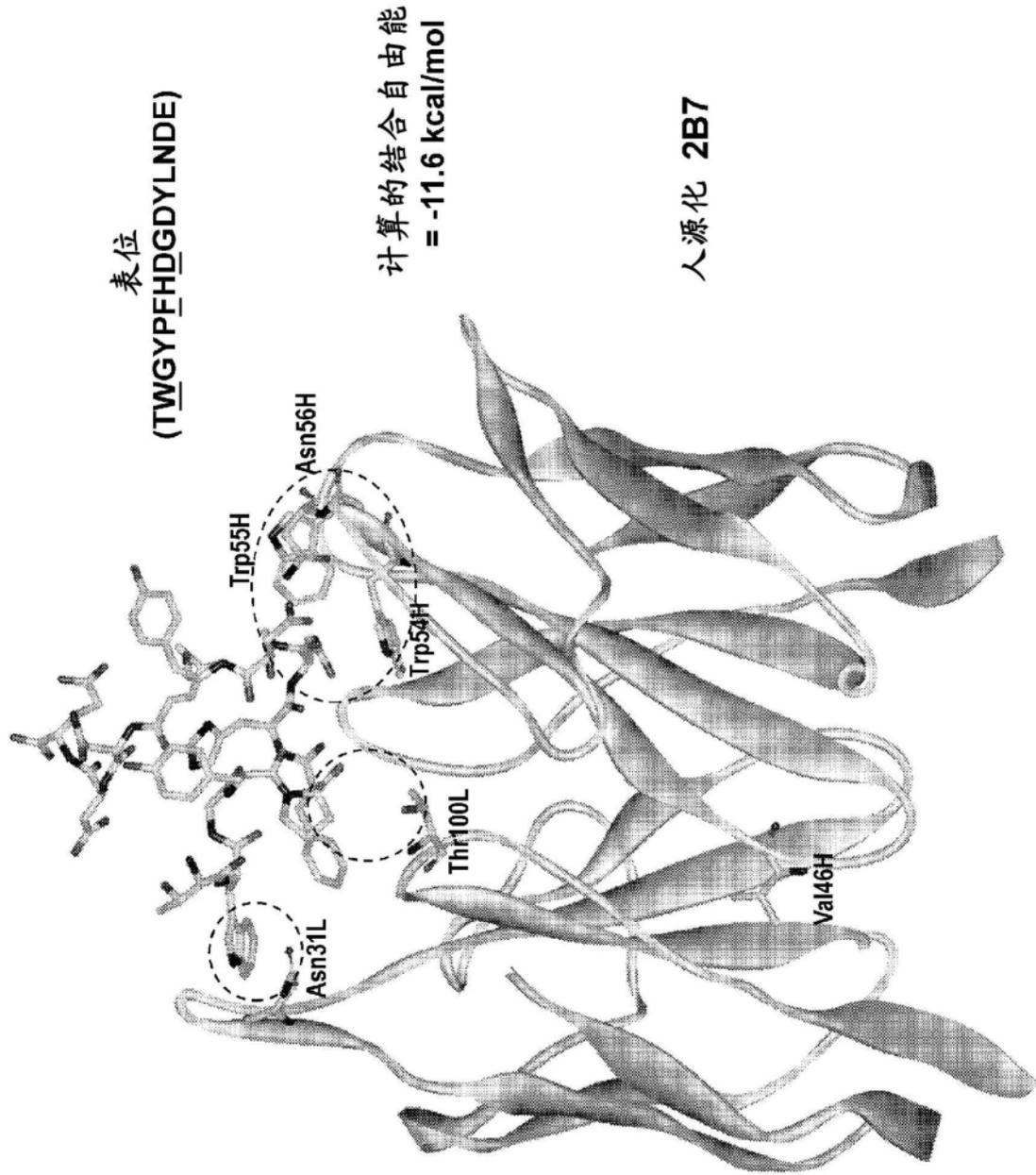


图4

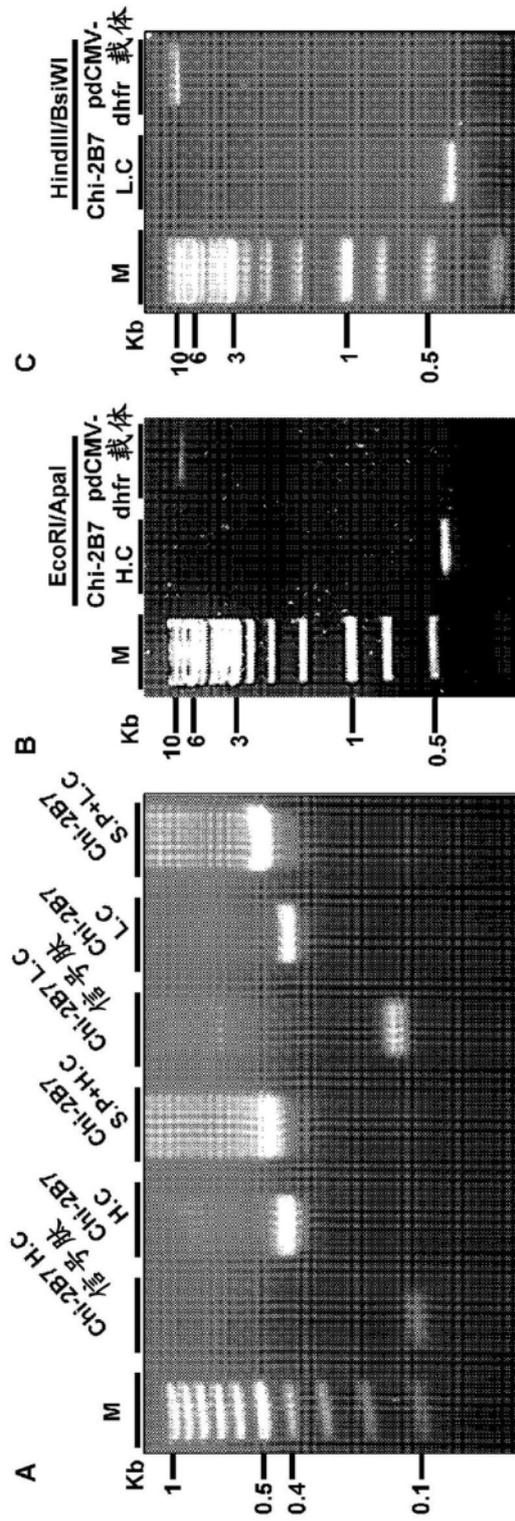


图7

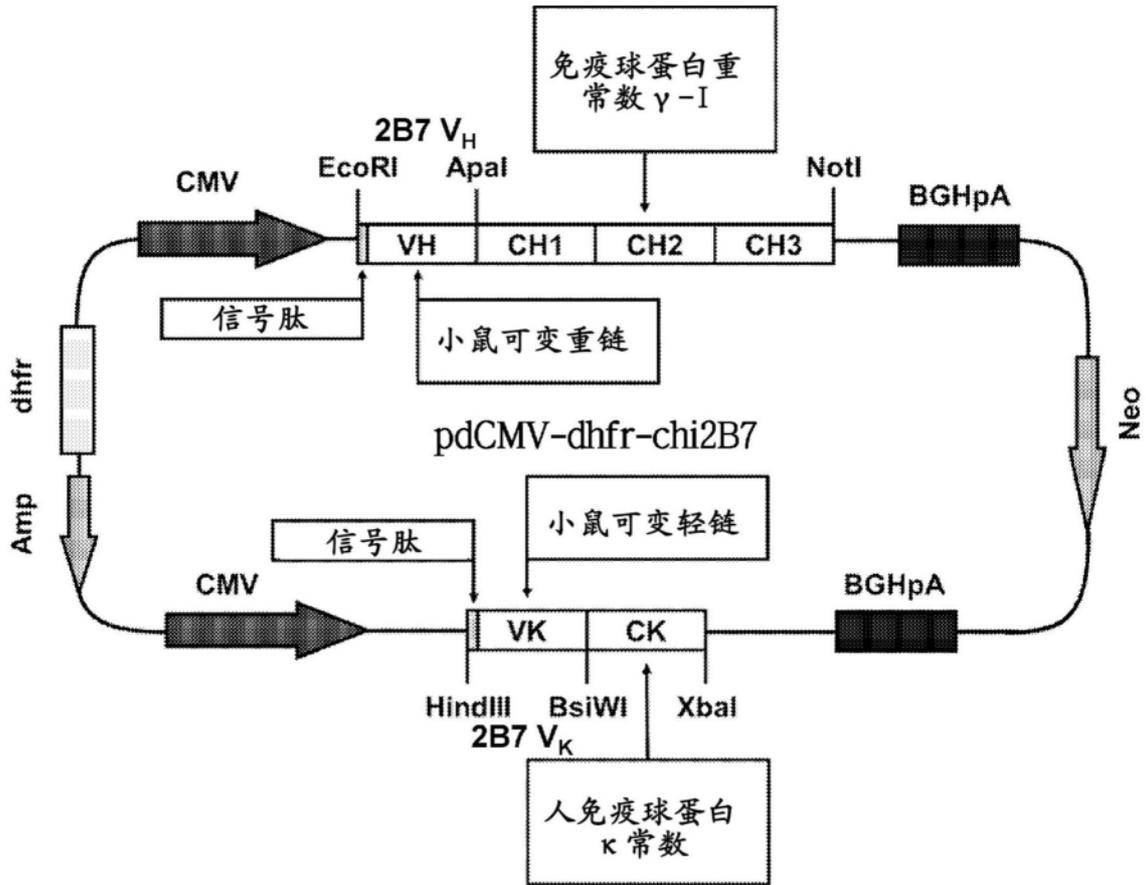


图8

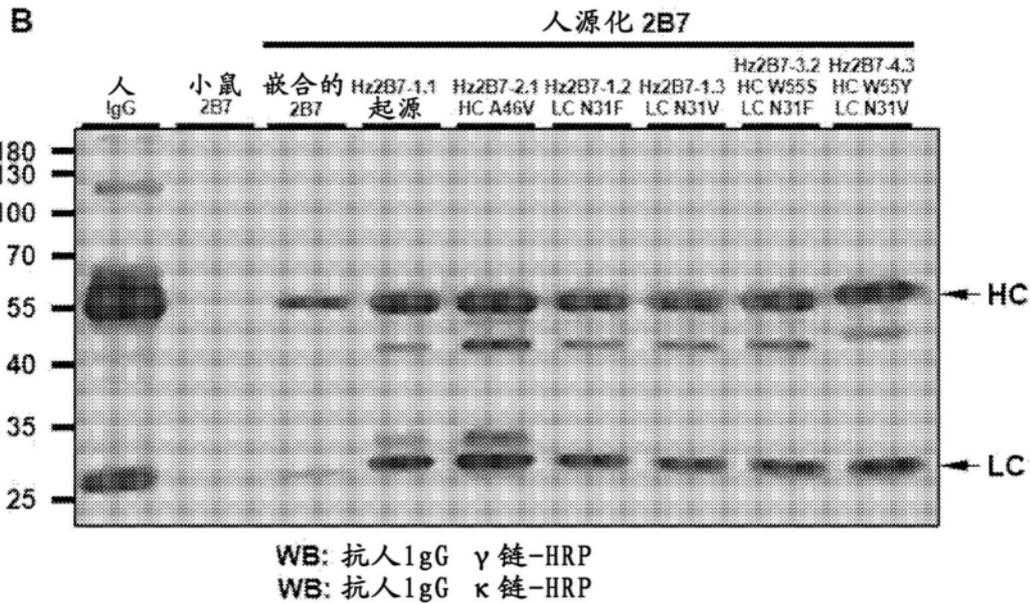
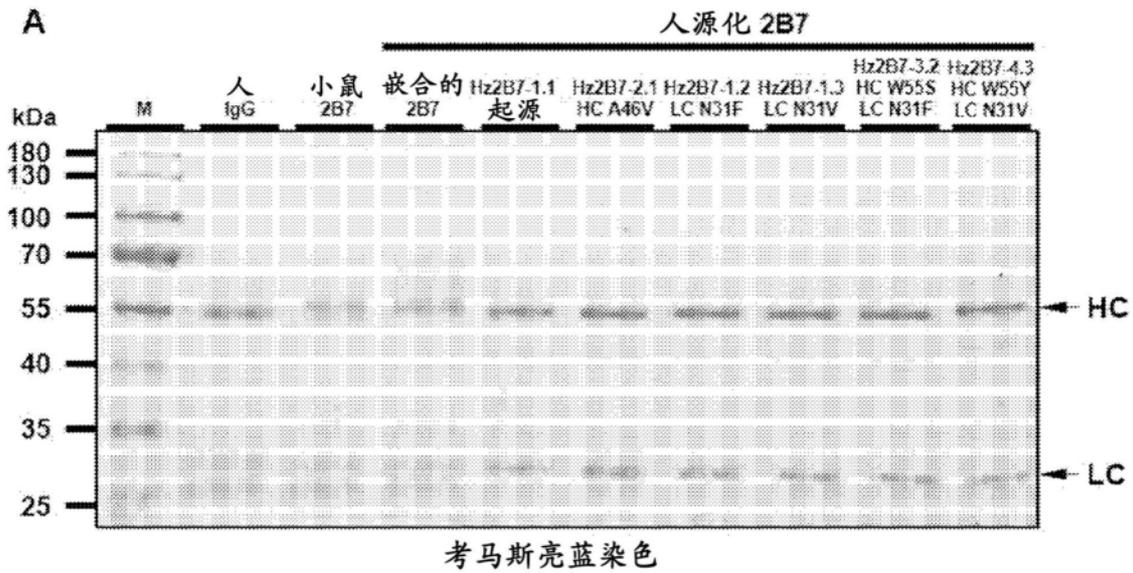


图9

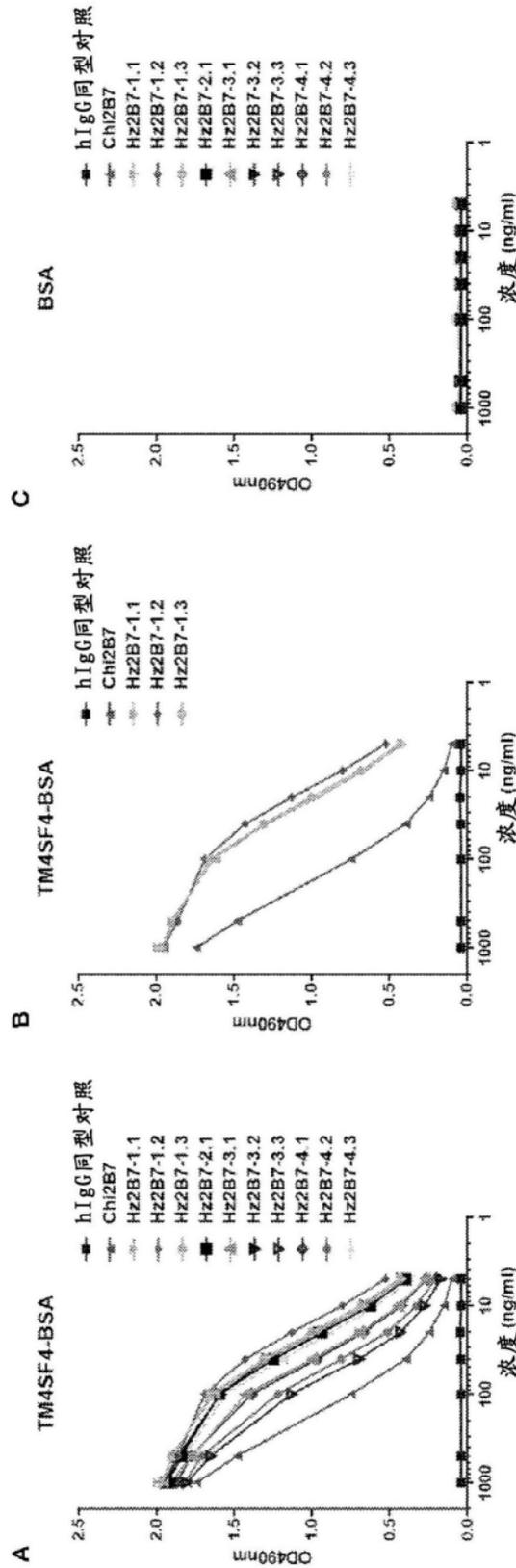
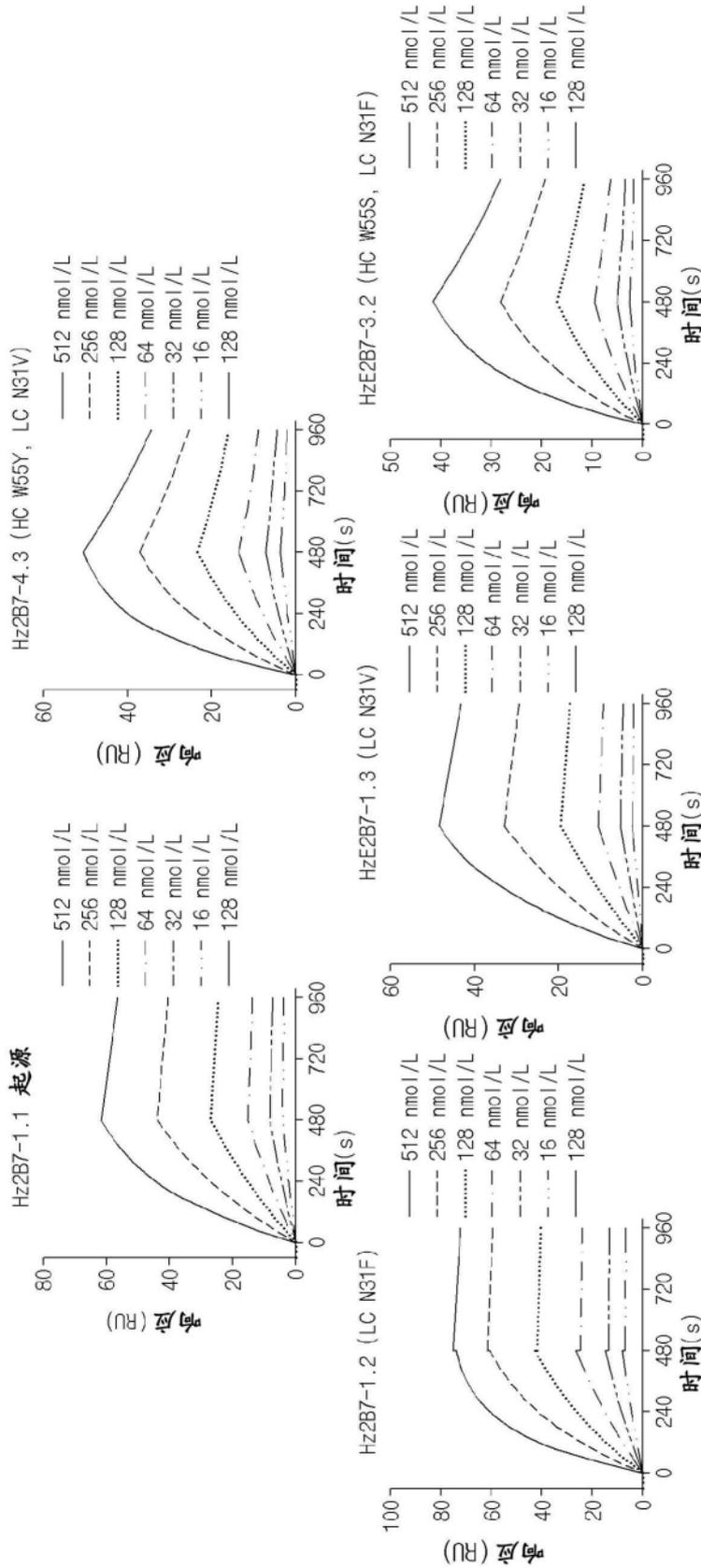


图10



mAb	Hz2B7-1.1 起源	Hz2B7-1.2 LC N31F	Hz2B7-1.3 LC N31V	Hz2B7-3.2 HC W55S LC N31F
k_a (1/MS) ^{1,2}	7.523E+03	1.259E+04	6.469E+03	7.080E+03
k_a (1/s)	1.837E-04	7.590E-05	2.292E-04	7.921E-04
K_D (M)	2.442E-08	6.030E-09	3.542E-08	1.119E-07
Rmax (RU)	76.30	81.32	65.36	58.37
χ^2 (RU ²)	0.252	1.78	0.114	0.115
U值	2	12	1	1

传感芯片：生物素-TM4SF4(126-140) 肽捕获SA传感器
 \$ k_a/k_d 模型：1:1结合传质
 \$ χ^2 : 小于Rmax的10%对于实验数据来说是显著的
 † The U-value: 速率常数和Rmax的计算值的唯一性的估计。
 如果U值低于约15, 则参数值没有显著相关性.

图11

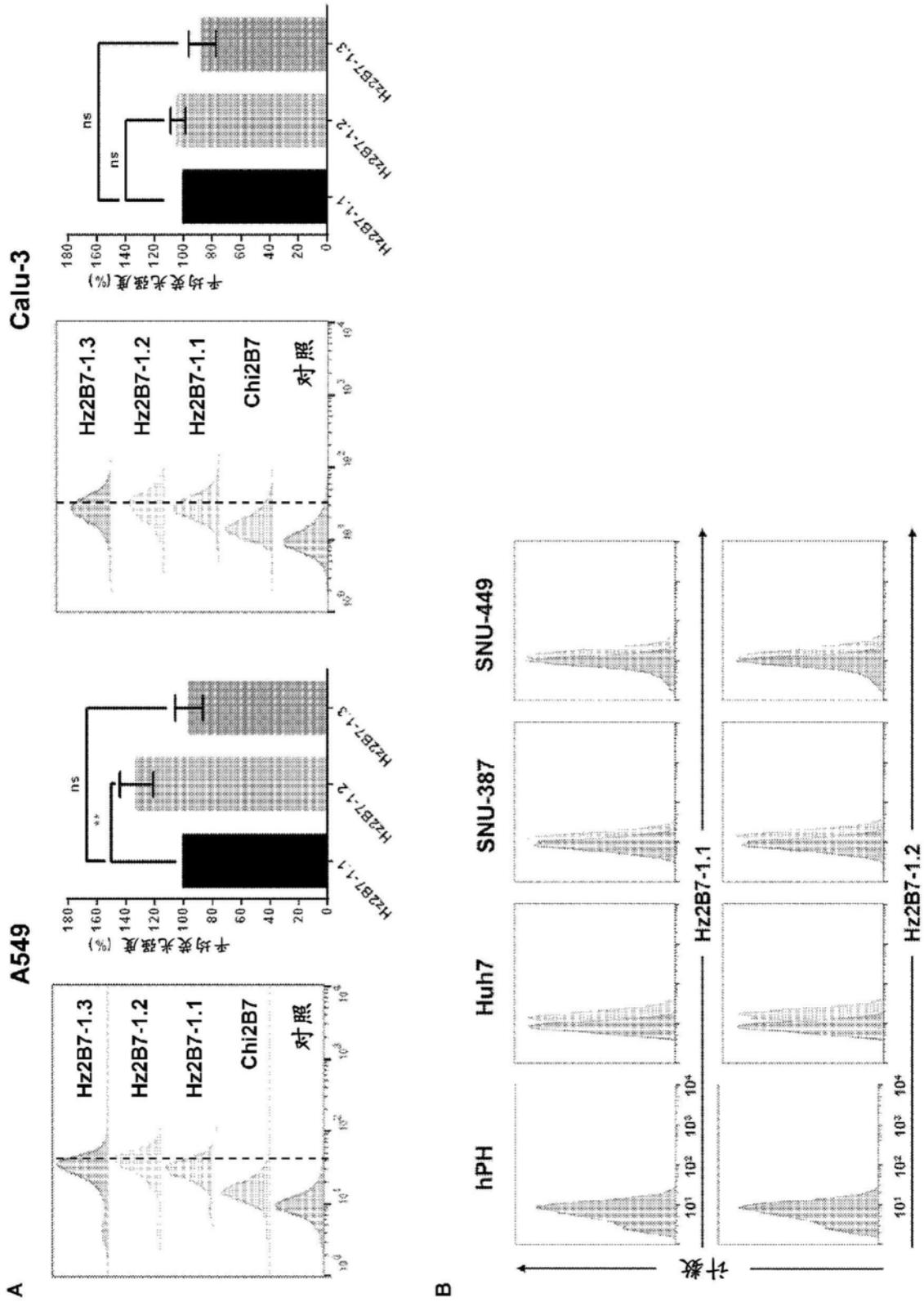


图12

Hz2B7-1.1 (起源)	克隆号	PC	NC	1A6	3A12	3H10	3H12	4A12	4B12	4D7	4H12		
	OD 490nm	2.7	0.05	0.99	2.72	0.99	2.79	2.78	2.74	1.23	2.73		
Hz2B7-1.2 (LC N31F)	克隆号	PC	NC	3C3	4A9	4A12	4B9	4C7	4H12	5B12	6G10	7A8	7E3
	OD 490nm	2.7	0.05	0.25	2.75	2.81	2.77	2.83	2.79	0.62	1.7	1.78	0.12

图13

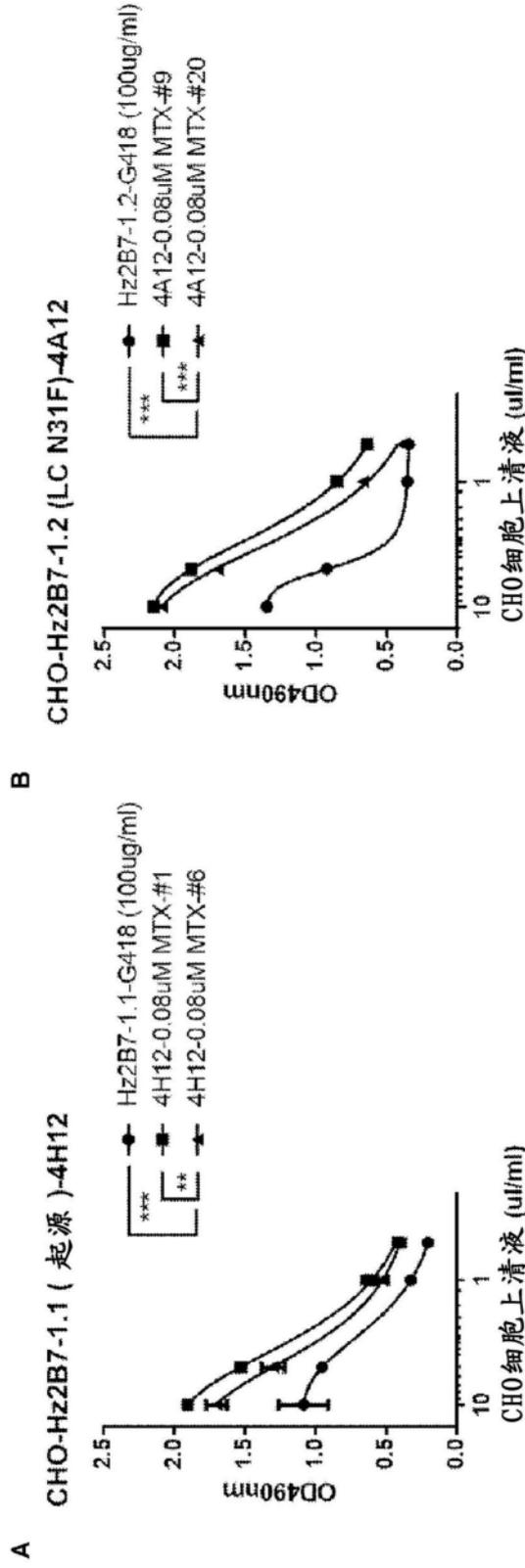


图14

CHO-DG44 Hz2B7 稳定细胞系		G418 (100µg/ml)	0.08µM MTX 抗性克隆							
Hz2B7-1.1 (起源)	4H12	2.8µg	克隆号	#1	#2	#3	#4	#5	#6	#7
			抗体生产率 (µg/10 ⁶ 细胞/24hr)	10.8µg	6.1µg	5.1µg	5.5µg	4µg	6.4µg	3.4µg
Hz2B7-1.2 (LC N31F)	4A12	2.5µg	克隆号	#4	#5	#8	#9	#12	#20	
			抗体生产率 (µg/10 ⁶ 细胞/24hr)	4.8µg	4.2µg	3.8µg	14.2µg	2.2µg	7.9µg	

图15

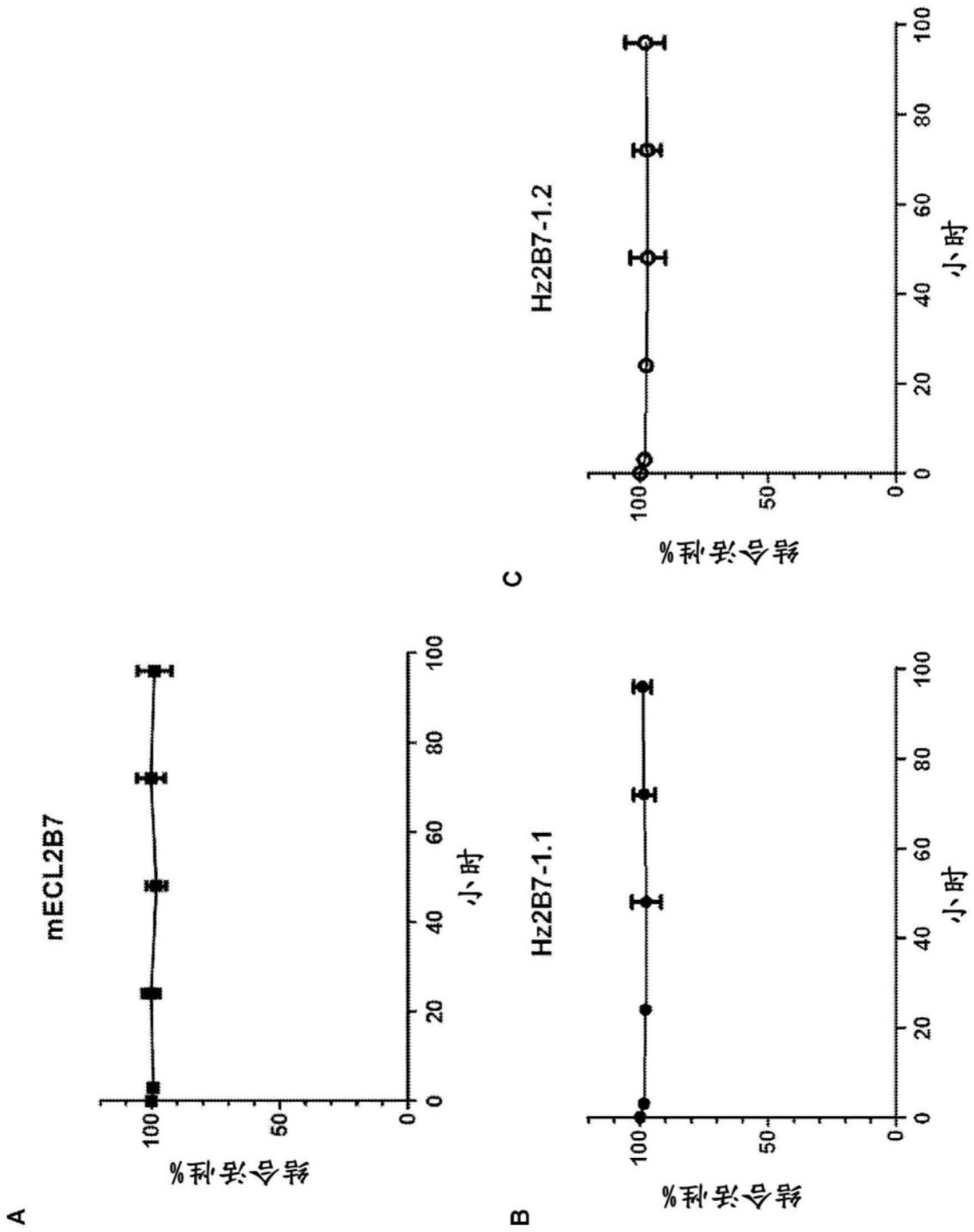


图16