



## (12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 105504060 A

(43) 申请公布日 2016. 04. 20

(21) 申请号 201511029117. 3

*A61P 35/00*(2006. 01)

(22) 申请日 2015. 12. 31

*G01N 33/577*(2006. 01)

(71) 申请人 陆梅生

地址 美国得克萨斯州休斯敦达内尔 5015 号

申请人 杰弗瑞·李 张冬青 刘炳亚

(72) 发明人 陆梅生 杰弗瑞·李 张冬青  
刘炳亚

(74) 专利代理机构 上海光华专利事务所 31219

代理人 严晨 许亦琳

(51) Int. Cl.

*C07K 16/28*(2006. 01)

*C12N 15/13*(2006. 01)

*C12N 15/63*(2006. 01)

*A61K 39/395*(2006. 01)

权利要求书1页 说明书12页

序列表3页 附图9页

(54) 发明名称

一种抗胃癌细胞表面功能性表达的足萼样蛋白前体亚型 2 的单克隆抗体及其制备方法和用途

(57) 摘要

本发明涉及生物制药领域,特别是涉及一种抗胃癌细胞表面功能性表达的足萼样蛋白前体亚型 2 (PODXL-v2)的单克隆抗体(命名为 MS17-38)及其制备方法和用途。本发明提供一种抗胃癌细胞表面功能性表达的足萼样蛋白前体亚型 2 的单克隆抗体,其抗体轻链可变区的氨基酸序列为 SEQ ID NO:2 或其保守型变异序列,其抗体重链可变区的氨基酸序列为 SEQ ID NO:4 或其保守型变异序列。本发明发现 MS17-38 单抗是针对一组人胃癌细胞的表面 PODXL 抗原而产生的,并可诱导特异性、功效性生物反应,能够特异性识别胃癌等消化道肿瘤并进行靶向治疗,同时可以应用在消化道肿瘤的诊断和影像中。

1. 一种抗胃癌细胞表面功能性表达的足萼样蛋白前体亚型2的单克隆抗体,其抗体轻链可变区的氨基酸序列为SEQ ID NO:2或其保守型变异序列,其抗体重链可变区的氨基酸序列为SEQ ID NO:4或其保守型变异序列。

2. 如权利要求1所述的一种单克隆抗体,其特征在于,所述轻链可变区的编码序列为SEQ ID NO:1或其保守型变异序列,所述重链可变区的编码序列为SEQ ID NO:3或其保守型变异序列。

3. 如权利要求1所述的一种单克隆抗体,其特征在于,所述单克隆抗体是鼠源性的。

4. 如权利要求1所述的一种单克隆抗体,其特征在于,所述单克隆抗体是IgG1重链和κ轻链亚型的免疫球蛋白。

5. 一种分离的DNA分子,编码如权利要求1-4任一权利要求所述的单克隆抗体的重链和/或轻链的可变区或全长氨基酸序列。

6. 一种构建体,包含所述权利要求5所述的分离的DNA分子。

7. 一种单克隆抗体的表达系统,由权利要求6所述的构建体转染到宿主细胞构建而成。

8. 如权利要求1-4任一权利要求所述的单克隆抗体的制备方法,包括如下步骤:在适合表达所述抗体的条件下,培养所述的单克隆抗体的表达系统,从而表达出所述的单克隆抗体,纯化分离出所述的单克隆抗体。

9. 如权利要求1-4任一权利要求所述的单克隆抗体在制备或筛选肿瘤治疗药物中的用途、或制备肿瘤诊断药物中的用途。

10. 如权利要求9所述的用途,其特征在于,所述肿瘤为胃癌,更优选为胃鳞状细胞癌、胃腺癌、胃小细胞癌、胃腺鳞癌、胃类癌或胃或胃及十二指肠癌。

11. 一种药物组合物,包括治疗有效剂量的所述抗胃癌细胞表面功能性表达的足萼样蛋白前体亚型2的单克隆抗体或其免疫偶联物。

12. 如权利要求11所述的药物组合物,其特征在于,还包括一种或多种药学上可接受的载体或赋形剂。

13. 一种诊断试剂盒,包含所述抗胃癌细胞表面功能性表达的足萼样蛋白前体亚型2的单克隆抗体或其免疫偶联物。

## 一种抗胃癌细胞表面功能性表达的足萼样蛋白前体亚型2的 单克隆抗体及其制备方法和用途

### 技术领域

[0001] 本发明涉及生物制药领域,特别是涉及一种抗胃癌细胞表面功能性表达的足萼样蛋白前体亚型2(PODXL-v2)的单克隆抗体(命名为MS17-38)及其制备方法和用途。

### 背景技术

[0002] 如同发明人陆梅生等早先申请的专利“抗细胞表面异位表达的单克隆抗体MS17-57及其制备方法和用途”(专利申请号为:201310090565.9,已公开和批准)所述的背景知识,胃癌(Gastric Cancer,GC)是人类最常见的消化系统恶性肿瘤并且是肿瘤相关死亡的主要原因之一。中国和日本等国家是世界上胃癌发病率最高的国家,每年新发病例近60-70万并占世界病例的多数。很多胃癌患者初次就诊已属临床晚期。胃癌的早期筛查和确诊目前主要依靠胃镜和组织病理学的活检,但是依靠这种早期筛查诊断的手段其特异性、敏感性、准确性和安全性均有一定程度限制性、普及困难以及诸多干扰因素存在和临床应用效果并不令人满意。因此,多数胃癌患者初诊时发现已转移至其它脏器,必须依靠外科手术、放疗和全身化疗等。这些传统治疗或补救措施不仅费用昂贵,大大增加个人和社会沉重经济负担,且存在治疗的特异性和疗效不尽人意等问题。据不完全统计晚期胃癌患者的五年生存率通常不超过10%,所以新的胃癌特异、高效临床治疗方法迫在眉睫。近年来,虽然有一些新的化学治疗药物以及联合治疗方案(个性化医疗)的实施使胃癌患者的治疗反应率有所提高,但在已经开展的随机临床研究调查中发现均未达到中位生存期1年以上的治疗目标。

[0003] 由于化疗及放疗对胃癌普遍不敏感,并缺乏对其有效的替补治疗方案,近年来新的胃癌治疗方法和药物的研发成为基础及临床研究的热点。2002年在美国国立癌症研究所(NCI)的癌症专家建议对肿瘤进行分子分析的定义,这样会有效地实现对肿瘤患者的个体化治疗、复发检测以及预后评估等。在这些新理念的指导下,胃癌的分子靶向治疗和分子生物学功能治疗得到快速的发展同时也成为肿瘤治疗的新趋势。

[0004] 发明人陆梅生等在早先申请的专利“抗细胞表面异位表达的单克隆抗体及其制备方法和用途”(专利申请号为:201310090565.9,已公开和批准)还阐述了肿瘤标志物靶向和生物学功能治疗是在肿瘤细胞表面过度表达或者功能性表达的某些生物标志分子作为靶点。从20世纪90年代开始,一直以来多种分子靶向治疗药物(包括抗体药物)相继进入临床试验的肿瘤治疗并显示出很好的疗效,它们包括两大类,大分子单克隆抗体(作用于细胞外的治疗性抗体药物)和小分子酪氨酸激酶抑制剂(作用于细胞内的化学类药物)。由于抗体药物可以高度特异性地识别、结合相应的肿瘤细胞外受体并随即对细胞激发生物学功能,如果不能激发功能的,分有另外几种抗体治疗方法1.抗体药物偶联(Antibody Drug Conjugation,ADC);2.抗体与放射性同位素结合而进行的特异性放射免疫治疗;3.嵌合抗原受体(Chimeric Antigen Receptor,CAR)的T细胞免疫治疗。我们把这些归纳为肿瘤的抗体靶向治疗(Antibody Targeting Therapy,ATT)和抗体生物学功能治疗(Antibody

Biofunctional Therapy, ABT), 后面那种的抗体生物功能治疗(ABT)又可以分为抗体与生物功能协同作用的激动剂(Agonist)和抗体与生物功能竞争性作用的拮抗剂(Antagonist)。抗体的生物功能作用主要对肿瘤细胞发生发展的相关分子作为靶点而实现对肿瘤的特异性杀伤,防止转移或对其生长微环境的干扰。因此,与传统的化疗、放疗和中医中药相比,抗体药物效果更为明显、效用期长而毒副作用低。肿瘤的抗体生物功能治疗将会成为肿瘤治疗发展的主要方向。

[0005] 发明人陆梅生等在早先申请的专利“抗细胞表面异位表达的单克隆抗体及其制备方法和用途”(专利申请号为:201310090565.9,已公开和批准)对于胃癌抗体治疗的背景还阐述了抗体药物对胃癌治疗近年来发展迅速。目前已经过美国FDA批准的一些抗体药物,它们的临床前研究毒理试验和各期临床病例报告显示着特异性不高、靶向性不强和实际临床治疗效果总体上还不十分理想,这些药物包括抗表皮生长因子受体(EGFR)的西妥昔(Cetuximab)单抗药物爱必妥(Erbix)、抗表皮生长因子受体-2(EGFR2)或叫HER2为靶点的曲妥珠(Trastuzumab)单抗药物赫赛汀(Herceptin)以及抗血管内皮生长因子(VEGF)为靶点的贝伐(Bevacizumab)单抗药物阿瓦斯丁(Avastin)等。所以我们必须制备胃癌靶向生物学功能的高效单抗药物,以面对当前肿瘤临床医学的急需。学者Brichory在世界上首先将蛋白质组学的多肽合成或构建方法引入到鉴定筛选肿瘤相关抗原及抗肿瘤自身抗体领域,通过这一思路和方法,人们揭示出了众多细胞内和细胞外的新肿瘤标志物蛋白分子,比如葡萄糖调节蛋白(Glucose Regulated Protein, GRP78),热休克蛋白-27,-60,-70等(Heat Shock Protein, HSP-27,-60,-70etc.)以及纤维蛋白肽-A(Fibrin Peptide-A)等。但是此手段也带来了很多的局限性,因为肿瘤生物功能靶点不仅具有细胞表面特异性抗原,而且其功能还必须带有蛋白质空间结构或天然构象,这样就大大地限制了Brichory思路的进一步研究和应用。毋庸置疑,本研究发明就是在人体生物自然状态下通过活细胞免疫和活细胞高通量流式细胞仪(FACS)筛选来鉴定胃癌或其它肿瘤细胞表面特异性抗原,从而捕捉和制备特异、高效的治疗性抗体药物,并为胃癌分子标志物鉴定以及胃癌靶向治疗单抗药物的临床应用提供有力工具。

[0006] 足糖萼蛋白(Podocalyxin, PC)是主要表达在肾小球基底膜足细胞(Podocyte)表面的糖蛋白,蛋白等电点(pI)小于7,是偏酸和带负电荷。它在肾小球足细胞上扮演了保持滤过缝隙的开发。足糖萼蛋白在血小板凝血、早期糖尿病发病中起了一定的作用。但是,足萼样蛋白(Podocalyxin-Like protein, PODXL)是人类独有的并由PODXL基因编码的唾液粘蛋白家族的一个成员蛋白。足萼样蛋白具有与细胞内结构元素的钠泵/氢泵交换因子组成一个复合物,同时在造血细胞的分化中扮演了一定的角色。它能在血管内皮细胞上表达和能与L型选择蛋白(L-selectin)结合。PODXL具有一些不同氨基酸序列,不同长短多肽片段的亚型体并在不同的组织、细胞和肿瘤上表达。

## 发明内容

[0007] 鉴于以上所述现有技术的缺点,本发明的目的在于提供一种抗胃癌细胞表面功能性表达的足萼样蛋白前体亚型2(英文简称为:PODXL-v2;英文全文为Podocalyxin Isoform 2Precursor, PODXL-v2)的单克隆抗体及其制备方法和用途,用于解决现有技术中的问题。

[0008] 为实现上述目的及其他相关目的,本发明第一方面提供一种抗胃癌细胞表面功能

性表达的足萼样蛋白前体亚型2(PODXL-v2)的单克隆抗体(MS17-38),其抗体轻链可变区的氨基酸序列为SEQ ID NO:2或其保守型变异序列,其抗体重链可变区的氨基酸序列为SEQ ID NO:4或其保守型变异序列。

[0009] 优选的,所述轻链可变区的编码序列为SEQ ID NO:1或其保守型变异序列,所述重链可变区的编码序列为SEQ ID NO:3或其保守型变异序列。

[0010] 优选的,所述MS17-38单克隆抗体是鼠源性的。

[0011] 更优选的,所述MS17-38单克隆抗体是IgG1重链和κ轻链亚型的免疫球蛋白。

[0012] 本发明所提供的MS17-38单克隆抗体是一种抗(结合或作用)肿瘤细胞表面功能性表达的PODXL-v2抗原(或受体、或表位)、或者部分抗(结合或作用)PODXL抗原、或者部分抗(结合或作用)PODXL-v1抗原的单克隆抗体。

[0013] 本发明进一步提供所述MS17-38单克隆抗体的衍生物,所述衍生物可以为所述MS17-38单克隆抗体片段、或包含所述MS17-38单克隆抗体或MS17-38单克隆抗体片段的融合蛋白,所述单克隆抗体的片段为Fab、Fab'、F(ab')<sub>2</sub>、Fv或scFv等。

[0014] 本发明第二方面提供一种分离的DNA分子,编码所述MS17-38单克隆抗体的重链和/或轻链的可变区或全长氨基酸。

[0015] 本发明第三方面提供一种包含所述分离的DNA分子的构建体。

[0016] 优选的,所述DNA载体表达构建体由所述分离的抗体DNA分子插入到表达载体的多克隆位点构建而成。

[0017] 所述表达载体具体可以是本领域的技术人员所熟知的现有常用的表达载体,具体可采用的表达载体包括但不限于:pET系列表达载体、pGEX系列表达载体、pcDNA系列表达载体等。

[0018] 本发明第四方面提供一种单克隆抗体的表达系统,由所述构建体转染到宿主细胞构建而成。

[0019] 任何适用于表达载体(构建体)进行表达本专利所述抗体的细胞都可以作为宿主细胞。例如,酵母、昆虫、植物等的细胞。优选的,所述宿主细胞为真核细胞,可采用不会产生抗体的哺乳动物宿主细胞系,具体可采用的细胞系包括但不限于:中国仓鼠的卵巢细胞(CHO)、幼仓鼠的肾脏细胞(BHK, ATCC CCL 10)、幼鼠的塞尔托利细胞(Sertoli cells)、猴的肾脏细胞(COS细胞)、通过SV40(COS-7, ATCC CRL 1651)转化的猴的肾脏CVI细胞、人的胚肾细胞(HEK-293)、猴肾脏细胞(CVI, ATCC CCL-70)、非洲绿猴的肾脏细胞(VERO-76, ATCC CRL-1587)、人的子宫颈癌细胞(HELA, ATCC CCL-2)等。

[0020] 本发明通过建立一个有效的肿瘤活细胞高通量筛选的方法,混合人胃癌细胞系活细胞免疫小鼠并选择高免疫反应的小鼠脾脏与小鼠的SP2/0细胞系融合而产生的抗体杂交瘤细胞,在通过对杂交瘤抗体抗胃癌细胞系的高通量活细胞筛选和对正常人的新鲜外周血单核白细胞(PBMC)对照筛选从而得到了此株杂交瘤细胞的对胃癌细胞高特异性反应的单克隆抗体MS17-38。本发明进一步从单克隆培养的细胞株中筛选获取目的抗体的基因编码序列,用以构建表达载体,通过表达系统表达后即可重建抗体的活性,获得MS17-38单克隆抗体。

[0021] 所述MS17-38单克隆抗体通过如下步骤筛选获得:采用四种混合的胃癌细胞株SGC7901、BGC823、MKN28、MKN45活细胞多点免疫小鼠,免疫后的小鼠脾脏细胞与小鼠骨髓瘤

细胞融合,筛选出能够分泌出能够结合上述四种胃癌活细胞表面抗原而不与人正常外周血单个核细胞相反应的杂交瘤细胞株,将此杂交瘤细胞株亚克隆后,获得所培养的杂交瘤细胞上清液,经亲和纯化即得到所述单克隆抗体MS17-38。在本发明一实施例中,所述四种混合的胃癌细胞株SGC7901、BGC823、MKN28、MKN45活细胞优选为等比例混合,所述小鼠骨髓瘤细胞为SP2/0小鼠骨髓瘤细胞,融合的具体方法为通过PEG化学融合,杂交瘤细胞培养上清液通过免疫亲和层析方法纯化。

[0022] 本发明第五方面提供所述MS17-38单克隆抗体的制备方法,包括如下步骤:在适合表达所述抗体的条件下,培养所述的单克隆抗体的表达系统,从而表达出所述的单克隆抗体,纯化分离出所述的单克隆抗体。

[0023] 在获得编码本发明的抗体的核酸序列后,可按照以下方法制备生产目的抗体。例如将含有编码目标抗体的核酸的载体直接导入宿主细胞,细胞在适当的条件下进行培养,从而诱导出被编码抗体的表达。本发明中所用的表达载体和宿主细胞均为现有技术,可通过商业途径直接获取,培养中所用的10%FBS的DMEM培养基亦为各种常规的哺乳细胞培养基,本领域技术人员可根据经验选择适用的DMEM培养基,在适于宿主细胞生长的条件下进行培养。当宿主细胞生长到适当的细胞密度后,用合适的方法(如温度转换或化学诱导)诱导选择的启动子,将细胞再培养一段时间。在上面的方法中的重组多肽可在细胞内、或在细胞膜上表达,或分泌到细胞外。一旦获得本发明所说的单克隆抗体,就可利用其物理的、化学的和其它特性通过各种分离方法分离和纯化所述单克隆抗体。这些方法是本领域技术人员所熟知的。这些方法的例子包括但并不限于:常规的复性处理、用蛋白沉淀剂处理(盐析方法)、离心、渗透破菌、超处理、超离心、分子筛层析(凝胶过滤)、吸附层析、离子交换层析、高效液相层析(HPLC)和其它各种液相层析技术及这些方法的结合。

[0024] 本发明第六方面提供所述MS17-38单克隆抗体在制备或筛选肿瘤治疗药物中的用途、或制备肿瘤诊断药物中的用途。

[0025] 所述肿瘤治疗药物具体指以肿瘤细胞表面功能性表达的PODXL-v2为抗原,结合或作用于所述抗原PODXL-v2,从而治疗癌症、预防原发性癌症转移的药物。所述结合或作用于所述抗原PODXL-v2具体包括但不限于:免疫抑制PODXL-v2抗原、或通过特异性的单克隆抗体识别肿瘤抗原,将肿瘤治疗药物定向地浓聚到肿瘤部位,选择性杀伤肿瘤细胞等。

[0026] 所以肿瘤诊断药物具体指针对肿瘤细胞的作用靶标PODXL-v2,以PODXL-v2作为生物标志物,鉴别诊断、病理诊断、早期诊断、影像诊断和预后诊断等诊断试剂。

[0027] 优选的,所述肿瘤为胃癌。

[0028] 更优选的,所述胃癌为胃鳞状细胞癌、胃腺癌、胃小细胞癌、胃腺鳞癌、胃类癌或胃及十二指肠癌。

[0029] 本发明第七方面提供一种药物组合物,包括治疗有效量的所述MS17-38单克隆抗体或其免疫偶联物。

[0030] 所述免疫偶联物包括但不限于所述单克隆抗体或其片段与药物、毒素、细胞因子、放射性核素、酶或其他诊断试剂等结合而形成的偶联物。

[0031] 所述药物组合物以肿瘤细胞表面功能性表达的PODXL-v2为抗原,结合或作用于所述抗原,从而治疗癌症和/或预防原发性癌症转移。

[0032] 本发明的MS17-38单克隆抗体可以通过本领域任何已知的方式配制药物组合物来

使用。这种组合物以所述单克隆抗体为活性成分,加上一种或多种药物学上可接受的载体或赋形剂,所述载体或赋形剂应当于所述单克隆抗体相容。

[0033] 所述药物组合物用于治疗胃癌,优选用于治疗胃鳞状细胞癌、胃腺癌、胃小细胞癌、胃腺鳞癌、胃类癌或胃及十二指肠癌中的一种或多种的组合。所述药物组合物用于预防或治疗对象体内肿瘤时,可将有效剂量的所述的药物组合物施用于对象中。

[0034] 本发明第八方面提供一种诊断试剂盒,包含诊断有效剂量的所述MS17-38单克隆抗体或其免疫偶联物。

[0035] 所以诊断试剂盒针对肿瘤细胞的作用靶标PODXL-v2,以PODXL-v2作为生物标志物,进行鉴别诊断、病理诊断、早期诊断、影像诊断和预后诊断。

[0036] 优选的,所述诊断试剂盒还包括MS17-38单克隆抗体的标记物。

[0037] 所述MS17-38单克隆抗体的标记物与MS17-38单克隆抗体结合,可选用的标记物的种类包括但不限于荧光标记物、放射性标记物、酶标标记物、化学发光性标记物中的一种或多种的组合。

[0038] 根据试剂盒的检测原理,所述试剂盒中还可包含检测所需的一种或多种试剂。此外,所述试剂盒中还可根据需要包括:容器、对照物(阴性或阳性)、缓冲剂、助剂等。

[0039] 本发明制备获得了一种抗胃癌单克隆抗体,进一步反向筛选鉴定胃癌细胞表面的抗原,获得了一种新的生物标志物抗原。具体来说,本发明在发现和鉴定肿瘤生物标志物的同时已经制备了抗这个标志物抗原(胃癌细胞表面天然构象PODXL-v2抗原)的特异性MS17-38单抗,并根据该特异性抗体筛选鉴定了其对应的特异性胃癌分子标志物:细胞膜表达蛋白PODXL-v2。

[0040] 本发明通过以高通量筛选(HTS)抗体反向鉴定与抗体结合的肿瘤细胞表面表达抗原的策略,旨在实现在制备抗胃癌细胞表面分子标志物特异性单克隆抗体的同时筛选鉴定新的胃癌分子标志物。单克隆抗体是一种良好的蛋白质组学研究工具,传统的单抗制备途径是抗体杂交瘤方法,通常采用非分子标志物免疫,也较少采用融合后大量铺板的HTS方法,因此获得抗细胞抗原天然表位抗体的机率较低(传统抗体筛选制备方法很难获得识别肿瘤活细胞表面天然构象抗原的抗体)。本发明采用类似“鸟枪法”(“Shot-Gun” method)活细胞免疫,将抗体杂交瘤技术与流式细胞术高通量检测相结合,通过肿瘤活细胞免疫小鼠,采用独特的抗体杂交瘤高融合率方法进行融合、大批量铺板(每次在50至80块板)结合活细胞流式细胞荧光分析法(FACS)-HTS检测筛选的方法,在活细胞水平上直接筛选抗细胞表面带有构象性表位(Conformational Epitope)分子标志物的单克隆抗体,并通过复查鉴定和抗体杂交瘤细胞亚克隆,最终选定特异性高亲和力的单克隆抗体:抗胃癌细胞表面天然构象PODXL-v2抗原的MS17-38特异性抗体。在进行MS17-38抗体的鉴定及MS17-38抗体与胃癌临床病理学参数的相关性分析后,采用蛋白印迹法、免疫沉淀法和蛋白质谱法完成对所制备的MS17-38抗体特异性结合靶抗原蛋白的快捷鉴定,从而筛选和发现了这个PODXL-v2新的胃癌细胞表面分子标志物。

[0041] 本发明的MS17-38单抗能高度特异性地针对整体复合物分子量135kDa、并在肿瘤细胞表面自然表达、并具有空间异构像的足萼样蛋白前体亚型2(PODXL-v2)分子反应,而对PODXL-v2单体分子量约51kDa的分子线性体蛋白不反应。在本发明自有特殊的单抗杂交瘤筛选设计中,所表达的单克隆抗体是由命名为MS17-38的单抗杂交瘤细胞株分泌产生的,小

鼠单抗的亚型是属于IgG1重链和κ轻链。

[0042] 本发明对制备获得的抗胃癌混合细胞株特异性单克隆抗体与胃癌等消化道肿瘤进行临床病理学参数相关性分析后,对MS17-38单抗相作用于在肿瘤细胞表面的PODXL-v2分子作用功能进行了分析,发现MS17-38单抗是针对一组人胃癌细胞的表面PODXL抗原而产生的,并可诱导特异性、功效性生物反应,能够特异性识别胃癌等消化道肿瘤并进行靶向治疗,同时可以应用在消化道肿瘤的诊断和影像中。本发明建立了一套高通量制备抗胃癌及消化道实体瘤细胞表面天然构象抗原特异性抗体的全新方法,并以获得的MS17-38单抗作为蛋白质组学研究工具,反向筛选鉴定胃癌等消化道实体肿瘤细胞表面分子靶向标志物。所述单克隆抗体进行人/鼠嵌合化或人源化后可进一步开发用于人胃癌治疗的生物药剂。

### 附图说明

[0043] 图1是FACS对四种混合胃癌细胞株免疫后的小鼠血清与正常人PBMC、胃癌的SGC7901和BGC823细胞株滴度反应的检测。

[0044] 图2是FACS对MS17-38单抗分别与4种免疫用的胃癌细胞株和其他对照细胞株不同程度结合反应。其中A,MS17-38单抗和对照抗体与SGC-7901及BGC-823胃癌细胞株的结合反应。B,MS17-38单抗和对照抗体分别与MKN-45,BGC-823,正常人外周血PBMC细胞的结合反应。

[0045] 图3、图4是FACS检测对MS17-38单抗分别与2种胃癌细胞株和二一个对照细胞株不同程度结合反应。其中,图3为MS17-38单抗和对照抗体对MKN-28,AGS-N细胞株的反应。图4为MS17-38单抗和对照抗体分别与正常人外周血PBMC细胞和胎儿胃粘膜上皮转化细胞株GES-1细胞株结合反应。

[0046] 图5是MS17-38单抗与胃癌BGC823细胞膜抽提蛋白结合的ELISA检测反应。

[0047] 图6是MS17-38单抗与胃癌MKN45细胞膜抽提蛋白结合的ELISA检测反应。

[0048] 图7是MS17-38单抗与同型无关单抗在A.胃粘膜转化成形细胞GES-1,B.胃癌细胞MKN-45,C.胃癌细胞BGC-823的免疫组织化学反应检测。

[0049] 图8是MS17-38单抗对胃癌BGC823和MKN45细胞膜抽提靶蛋白进行的SDS-PAGE胶的纯化条带。

[0050] 图9是MS17-38单抗对胃癌BGC823和MKN45细胞膜抽提靶蛋白进行三次质谱分析结果。

[0051] 图10是MS17-38单抗对6-mer和8-mer氨基酸叠加微矩阵芯片分析。

[0052] 图11是PODXL,PODXL-v1和PODXL-v2氨基酸序列的比对及互相之间的差别,MS17-38单抗与PODXL-v2空间构象位点的具体结合二个位点。

[0053] 图12是Western Blot试验显示PODXL-v2siRNA干扰PODXL-v2在MKN45细胞膜上的表达。

### 具体实施方式

[0054] 以下通过特定的具体实例说明本发明的实施方式,本领域技术人员可由本说明书所揭露的内容轻易地了解本发明的其他优点与功效。本发明还可以通过另外不同的具体实施方式加以实施或应用,本说明书中的各项细节也可以基于不同观点与应用,在没有背离



本发明的精神下进行各种修饰或改变。

[0055] 在进一步描述本发明具体实施方式之前,应理解,本发明的保护范围不局限于下述特定的具体实施方案;还应当理解,本发明实施例中使用的术语是为了描述特定的具体实施方案,而不是为了限制本发明的保护范围;在本发明说明书和权利要求书中,除非文中另外明确指出,单数形式“一个”、“一”和“这个”包括复数形式。

[0056] 当实施例给出数值范围时,应理解,除非本发明另有说明,每个数值范围的两个端点以及两个端点之间任何一个数值均可选用。除非另外定义,本发明中使用的所有技术和科学术语与本技术领域技术人员通常理解的意义相同。除实施例中使用的具体方法、设备、材料外,根据本技术领域的技术人员对现有技术的掌握及本发明的记载,还可以使用与本发明实施例中所述的方法、设备、材料相似或等同的现有技术的任何方法、设备和材料来实现本发明。

[0057] 除非另外说明,本发明中所公开的实验方法、检测方法、制备方法均采用本技术领域常规的分子生物学、生物化学、染色质结构和分析、分析化学、细胞培养、重组DNA技术及相关领域的常规技术。这些技术在现有文献中已有完善说明,具体可参见Sambrook等MOLECULAR CLONING:A LABORATORY MANUAL,Second edition,Cold Spring Harbor Laboratory Press,1989 and Third edition,2001;Ausubel等,CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY,John Wiley&Sons,New York,1987 and periodic updates;the series METHODS IN ENZYMOLOGY,Academic Press,San Diego;Wolffe,CHROMATIN STRUCTURE AND FUNCTION,Third edition,Academic Press,San Diego,1998;METHODS IN ENZYMOLOGY,Vol.304,Chromatin(P.M.Wassarman and A.P.Wolffe,eds.),Academic Press,San Diego,1999;和METHODS IN MOLECULAR BIOLOGY,Vol.119,Chromatin Protocols(P.B.Becker,ed.)Humana Press,Totowa,1999等。

[0058] 实施例1

[0059] 采用四种等比例混合的4株胃癌细胞(BGC-823、MKN-28、MKN-45和SGC-7901,均来源于中国科学院上海细胞生物学研究所)经在含10%FBS的DMEM培养基中和在5%CO<sub>2</sub>、37°C环境下培养后,收集的活细胞在PBS缓冲液中混合作为免疫原,在A/J-JAX小鼠(购置于南京大学实验动物模式中心,小鼠来源于The Jackson Laboratory,美国)背部皮下及尾静脉内注射进行免疫,每次每点每只小鼠3-5百万个细胞(0.1毫升中)。,隔周免疫一次;在第3次免疫1周后,取小鼠血清,流式细胞术高通量系统(FACS-HTS)检测血清与4株混合胃癌细胞的反应情况(具体参见实施例3),健康志愿者PBMC作为对照细胞【健康志愿者外周血经Ficoll液分离外周单个核细胞(Peripheral Blood Mononuclear Cells,PBMC)并作为在荧光流式细胞仪高通量筛选(FACS-HTS)的正常人细胞抗原对照筛选】。选择血清效价较高以及与对照细胞PBMC交叉反应程度较低的小鼠(同一稀释比例下,血清与胃癌细胞及对照细胞的平均荧光强度值的差值>500)进行融合前加强免疫。

[0060] 取已经加强免疫过的小鼠脾脏,用无血清的DMEM培养液将免疫反应性比较高的1号小鼠的脾脏细胞制备成单细胞悬液;在50%PEG(pH7.4)条件下,将脾细胞和SP2/0小鼠骨髓瘤细胞进行融合,融合后大批量铺板(50块板)并用HAT选择性培养基培养10天至抗体杂交瘤细胞克隆的形成。收集及混合大批量培养的上述四种胃癌细胞株作为筛选对象,分离正常人外周血PBMC细胞作为筛选对照细胞,二组细胞(第一组为四种胃癌细胞的等比例混

合、第二组为正常人外周血PBMC细胞)都分别在冰块上预冷的1.5%BSA/PBS封闭液中重悬并平均分配(约每孔十万至二十万个细胞)各加入51块96孔U型板中【总共102块板,二个第51块板分别为阳性(免疫后的小鼠血清并梯度稀释)和阴性(正常小鼠血清并梯度稀释和HAT选择性培养液)对照板】。

[0061] 将50块抗体杂交瘤细胞融合板(96孔板)的上清液(相当于第一抗体即原始的单抗)每次70微升/孔分别移入相应的筛选板和对照板中并震荡混合,在冰浴中反应和用封闭液洗涤后,再加入100微升/孔的FITC荧光标记的羊抗鼠而进行的细胞荧光染色实验反应,由此的荧光流式细胞标记高通量筛选(FACS-HTS),先以空白对照孔以及同型对照孔的细胞调节FACS参数并作为本底,对两组96孔U型板每一孔的细胞样本逐一进行FACS检测。同时满足以下两个条件的定为阳性细胞孔:(1)与4株胃癌细胞表面抗原结合反应(即与同型对照信号峰相比,样品信号峰偏移幅度大于一个对数值的);(2)与PBMC细胞无结合反应(即与同型对照信号峰相比,样品信号峰偏移幅度小于5-10%的)。所选择和挑取结合独特的杂交瘤高通量筛选细胞,经选择性培养基和普通10%FBS的DMEM培养基的过渡、杂交瘤细胞的亚克隆及多次对抗体杂交瘤细胞培养上清的检测,MS-17-38单抗所对应的杂交瘤细胞上清的经过亲和纯化并经0.2微米膜过滤后4°C无菌保存,或加入50%甘油在-20°C中长期保存。

[0062] 实施例2

[0063] 用Qiagen(Valencia,美国加州)的RNeasy试剂盒从MS17-38单抗杂交瘤细胞株中抽提总RNA,用Invitrogen(Grand Island,美国纽约州)的SuperScript III First-Strand试剂盒将mRNA反转录成MS17-38单抗的cDNA文库。利用德国的Progen Biotechnik公司”Mouse IgG Library Primer Set”(F2010)试剂盒中所含有的23个引物和实验方法进行21个特定的引物配对PCR反应(不包含λ轻链的反应),所产生的特异轻、重链产物进行DNA测序、氨基酸多肽序列的翻译和CDRs(抗原决定簇区域)和FW(骨架区域)的辨认,具体结果如下:MS17-38单抗轻链的可变区的编码序列如SEQ ID NO:1所示:

[0064]

```

1  gatatccagatgacacagaactccactcaactttgtcgtttataattggacaaccagcctcc 60
61  atctcttgcaagtcagtcagagcctcttagatagtgatggaagacattttgaattgg 120
121 ttgttacagaggccaggccagttctccacagcgcotaatctatctgggtgtctaaactggac 180
181 tctggagtgccctgacaggttcaactggcagtgatctgggacagatttcacactgaaaatc 240
241 agcagagtgagggtgaggatttgggaatttattattgtcctggcaaggtacacaagtg 300
301 acgttcgggtggaggcaccagctggaactcaaacgggctgatgctgcaaaaccctgtatc 360

```

[0065] (SEQ ID NO:1)

[0066] MS17-38单抗轻链的可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO:2所示:

[0067]

DIQMTQTPLTSLFIIIGQPASISCKSSQSLLDSDGKTFLNWLLQRPQGSPQRLIYLVSKLDSGVPDRFTGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGIYYCPGKVKWTFGGGTKLELKRADAAPKCI(SEQ ID NO:2)

[0068] MS17-38单抗重链的可变区的编码序列如SEQ ID NO:3所示:

[0069]

```

1 gaggtgcagctggaggagtctgggggaggcttagtgaagcctggagggtccctgaaagtc 60
61 tctgtgcagcctctggattcactttcagtacctataccatgtcttgggttcgccagact 120
121 ccggagaagaggetggagtggggtcgcaaccattagtggtggtgttatttacacctaactat 180
181 ccagacagtggtgaagggccgattcaccatctccagagacgatgccagaacactctgtat 240
241 ctgcaaatgagcagctctgaggtctgaggacacggccttgtattactgtgcaagacactat 300
301 agtaactacgagggccaaggtatggactcctgggggtcaaggaacctcagtcaccgtctcc 360
361 tcagccaaaacgacacccccatctgac 387

```

[0070] (SEQ ID NO:3)

[0071] MS17-38单抗重链的可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO:4所示:

[0072]

EVQLEESGGGLVLPKGGSLKVSAAASGFTFSTYTM~~SWVRQ~~TPEKRL~~EWV~~ATISGGVIY~~TYYP~~PDSVKGRFTISRDDAKN  
 TLYLQMS~~SLR~~SEDTALYYCARHYSNYEGQGMS~~SWG~~QTSVTVSSAKTTPPSD(SEQ ID NO:4)

[0073] 编码序列SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:3分别与氨基酸序列SEQ ID NO:2和SEQ ID NO:4相对应。在氨基酸序列中的下划线是表明CDR区域的位置,是按CDR1、CDR2和CDR3顺序排列并在它们之间的区域序列是骨架蛋白序列(FW)。

[0074] 实施例3

[0075] MS17-38单抗全长真核表达载体的构建及其表达细胞株的建立:

[0076] 使用PCR反应对上述轻链可变区和重链可变区的编码DNA序列进行

[0077] 扩增,在抗体重链可变区和轻链可变区的基因两端引入适当的酶切位点。PCR扩增后,将轻链可变区基因和重链可变区基因的PCR产物经琼脂糖凝胶电泳回收纯化。轻链和重链的扩增产物分别加入对应的限制性内切酶,酶切产物经DNA回收纯化试剂盒进行纯化,将PCR所得重链(VH)和轻链(VL)产物与含有人IgG1CH1的和CL的中间载体(pGEM-T)进行连接反应,分别获得中间载体pGEM-T-H和pGEM-T-L,再将获得的VL+CL和VH+CH1基因重组到载体pcDNA3.1。连接产物转化到DH5 $\alpha$ 大肠杆菌,涂布在含有50 $\mu$ g/ml羧苄青霉素的2YT琼脂培养基上。获得的阳性克隆在含有50 $\mu$ g/ml羧苄青霉素的2YT液体培养基中培养,经过Invitrogen公司测序验证后,用质粒大抽试剂盒提取阳性克隆质粒。

[0078] 利用Invitrogen公司的Neon系统,将线性化的质粒DNA转染至CHO细胞。转染后的CHO细胞进行稀释克隆化培养,在含有50微摩尔( $\mu$ mol)蛋氨酸亚氨基代砒(methionine sulfoximine,MSX)的94113培养基(Irvine Scientific公司产品)中进行筛选,从而获得单克隆的抗体表达细胞系。

[0079] 将获得的单克隆细胞系在含有50 $\mu$ mol蛋氨酸亚氨基代砒的94113培养基中进行摇瓶培养,当活细胞密度低于30%时收获细胞培养液上清。采用Protein A亲和层析柱从细胞培养上清中分离纯化目的抗体。

[0080] 取单克隆细胞提取RNA,进行目的基因的检测,确认所得到的单克隆细胞的目的基因拷贝数,验证为所述MS17-38单克隆抗体。进行抗体蛋白N端测序,结果与抗体杂交瘤细胞株测出的抗体氨基酸顺序一致。

[0081] 实施例4

[0082] 在96孔“U”型板上,用1%BSA/PBS调配平均每孔约20万个不同胃癌细胞(胃癌的SGC7901和BGC823细胞株,正常人PBMC作为对照)/100微升而加入U型板中,分别将胃癌活细胞免疫后的血清(实施例1所得的免疫后的小鼠血清)成5倍滴度连续稀释,然后每孔分别加入100微升( $\mu\text{L}$ ),混匀后冰上或4 $^{\circ}\text{C}$ 反应20分钟,经2次洗涤后再加入1:333稀释的羊抗鼠IgGFc-FITC 100 $\mu\text{L}$ /孔,4 $^{\circ}\text{C}$ 反应和洗涤后,在BD公司的LSR-II荧光流式细胞仪-HTS机上读取各孔的平均荧光强度值(MFI)。

[0083] 结果表明:免疫反应性比较高的1号小鼠血清与胃癌细胞结合的滴度反应明显高于与正常人PBMC结合的滴度,此小鼠脾细胞用于MS17-38单抗杂交瘤产生的融合实验。(如图1 FACS对四种混合胃癌细胞株免疫后的小鼠血清与正常人PBMC、胃癌的SGC7901和BGC823细胞株滴度反应的检测所示)。

[0084] 实施例5

[0085] 亲和纯化后的MS17-38单抗经与实施例4说明所述的U孔板细胞染色方法,对四种免疫用的胃癌细胞株进行结合染色反应,并在LSR-II FACS仪上读取MFI。其它实验步骤与实施例4相同。

[0086] 结果显示了FACS对MS17-38单抗分别与3种免疫用的胃癌细胞株不同程度的结合反应,其中MS17-38单抗对MKN-45胃癌细胞株反应最高,而对SGC-7901细胞和BGC-823细胞反应相对略低,与正常PBMC的反应性没有结合反应(如图2 FACS对MS17-38单抗分别与3种免疫用的胃癌细胞株和正常PBMC细胞不同程度结合反应。其中A,MS17-38单抗和对照抗体(无关同型小鼠单抗,IgG1重链,Kappa轻链,后面陈述中的对照抗体都是相同的对照单抗)与SGC-7901及BGC-823胃癌细胞株的结合反应。B,MS17-38单抗和对照抗体分别与MKN-45, BGC-823,正常人外周血PBMC细胞的结合反应所示)。

[0087] 实施例6

[0088] 亲和纯化后的MS17-38单抗经与实施例4说明所述的U孔板细胞染色方法,对正常人PBMC、胃癌细胞株MKN-28、GES-1、AGS-N进行结合染色反应,并在LSR-II FACS仪上读取FITC荧光的MFI值。

[0089] 结果说明MS17-38单抗对GES-1和AGS细胞株都具有较高的结合反应性,而与正常人PBMC无结合反应,同时同型对照的无关单抗都是无结合反应的阴性对照【如图3和图4给出FACS检测对MS17-38单抗分别与2种胃癌细胞株和二个对照细胞株不同程度结合反应。其中,图3为MS17-38单抗和对照抗体对MKN-28,AGS-N细胞株的反应。图4为MS17-38单抗和对照抗体分别与正常人外周血PBMC细胞和GES-1(胎儿胃粘膜上皮转化细胞)细胞株结合反应所示】。

[0090] 实施例7

[0091] 亲和纯化后的MS17-38单抗分别与胃癌细胞株BGC823和胃癌细胞株MKN-45的细胞膜抽提蛋白(事先已包被于美国Fisher Scientific公司的Immunlon-II 96-孔ELISA反应板中)进行系列酶联结合反应如ELISA等,并在ELISA读板仪上450-nm光密度读取OD值和作图。

[0092] ELISA结果显示了MS17-38单抗与胃癌BGC823和胃癌MKN-45膜抽提蛋白没有结合反应,说明MS17-38单抗不能与附着ELISA板上降解后的结合靶蛋白反应,也提示了MS17-38单抗与构象性表位抗原的特异反应,这为后面的抗体免疫共沉淀特殊的工作条件做了准备

实验(MS17-38单抗与胃癌BGC823(如图-5)和胃癌MKN-45(如图-6)的细胞膜抽提蛋白结合的ELISA检测反应所示)。

#### [0093] 实施例8

[0094] 胃粘膜转化细胞GES-1和胃癌细胞BGC823、MKN45经细胞玻片离心(Cytospin)后再与MS17-38单抗结合,过氧化氢酶染色反应显示靶点蛋白均分布于细胞膜表面(放大倍数分别为40x)(免疫组织化学法)。胃粘膜转化细胞GES-1经细胞玻片离心(Cytospin)后再与将培养上清液亲和纯化后所得的MS17-38单抗结合,过氧化氢酶染色反应显示单抗能够与细胞膜表面的靶点蛋白结合。

[0095] 免疫组织化学法检测结果显示了MS17-38单抗能够结合于胃粘膜转化细胞GES-1和胃癌细胞BGC823、MKN45的细胞膜表面上,这也是对MS17-38单抗靶蛋白定位的一个佐证(如图-7MS17-38单抗与同型无关单抗在A.胃粘膜转化成形细胞GES-1,B.胃癌细胞MKN-45,C.胃癌细胞BGC-823的免疫组织化学反应检测所示)。

#### [0096] 实施例9

[0097] 胃癌细胞株BGC823和MKN45细胞膜抽提蛋白经与MS17-38单抗亲和柱(特别偶联的MS17-38单抗亲和纯化珠)纯化和免疫共沉淀(IP)后的产物与不同的分子量分子标记样本一起分别加样和电泳(SDS-PAGE)。电泳后SDS-PAGE胶溴酚蓝染色结果显示了用MS17-38单抗纯化的胃癌MKN45和BGC823细胞膜抽提蛋白的抗原纯度很高,在分别挖抗原条带胶后符合进一步做抗原质谱分析的要求。(如图-8MS17-38单抗对胃癌BGC823和MKN45细胞膜抽提靶蛋白进行的SDS-PAGE胶的纯化条带所示)。

#### [0098] 实施例10

[0099] 如实施例9所述,间接免疫沉淀法是将MS17-38单抗的亲和柱将结合的抗原在胃癌细胞(MKN45和BGC823)膜抽提蛋白中纯化,抗体的Fc端与Protein-A磁珠特异性结合并洗去非特异性吸附蛋白,然后SDS-PAGE上样、加入缓冲液加热解离。直接免疫沉淀法是用MS17-38单抗直接偶联于美国Invitrogen公司(Grand Island,美国纽约州)活化的Dynabeads磁珠上,然后的几步反应与间接免疫沉淀法相同。实践证明对于MS17-38单抗的免疫沉淀法必须要用直接法才能得到特异而清晰的靶点条带(如图-8所示)。后续的多次高敏质谱分析确定了MS17-38单抗相应的靶点为PODXL-v2蛋白(如图-9MS17-38单抗对胃癌BGC823和MKN45细胞膜抽提靶蛋白进行三次质谱分析结果)。

#### [0100] 实施例11

[0101] 根据NCBI大数据库资料,将PODXL几个亚型中最长的一个的氨基酸序列的8联氨基酸和6联氨基酸重复和重叠排列在微矩阵芯片上,然后用MS17-38单抗加上荧光标记的山羊抗体对此进行间接杂交反应,结果发现在221-224和473-477的两段氨基酸序列有较强的荧光结合强度,即表明MS17-38单抗是与异构体PODXL-v2结合的(如图-10MS17-38单抗对6-mer和8-mer氨基酸叠加微矩阵芯片分析),同时MS17-38单抗是与异构体PODXL-v2特异性结合的,因为只有PODXL-v2在二个空间构象结合位点之间缺失了一段序列,这样二个构象结合位点的形成需经过空间折叠,而PODXL和PODXL-v1都不可能形成MS17-38单抗与PODXL-v2结合的构像位点(如图-11是PODXL,PODXL-v1和PODXL-v2氨基酸序列的比对及互相之间的差别,MS17-38单抗与PODXL-v2空间构象位点的具体结合二个位点)。

#### [0102] 实施例12

[0103] 在MKN-45细胞培养中,分别加入Ambion Lifetech公司(现在为ThermoFisher Scientific公司)购买来的每个25nM(毫微摩尔)最终浓度的PODXL-v2(产品号s10769,)、FAM120B、Sec16A、SMARCC1和空白对照的siRNA,进行siRNA对细胞的转染而最终对每个siRNA靶点蛋白的抑制表达。抽提处理过的细胞蛋白并分别在SDS-PAGE中分离各个蛋白的条带。用MS17-38单抗和 $\beta$ -Actin抗体(Western Blot的对照)与之特异性反应,发现只有PODXL-v2siRNA处理过的MKN-45细胞抽提蛋白中能与MS17-38单抗结合的PODXL-v2条带消失了,所以从另一个方面证明MS17-38单抗是与PODXL-v2特异性反应的(如图-12Western Blot试验显示PODXL-v2siRNA干扰PODXL-v2在MKN45细胞膜上的表达)。

[0104] 综上所述,本发明有效克服了现有技术中的种种缺点而具高度产业利用价值。

[0105] 上述实施例仅例示性说明本发明的原理及其功效,而非用于限制本发明。任何熟悉此技术的人士皆可在不违背本发明的精神及范畴下,对上述实施例进行修饰或改变。因此,举凡所属技术领域中具有通常知识者在未脱离本发明所揭示的精神与技术思想下所完成的一切等效修饰或改变,仍应由本发明的权利要求所涵盖。

序列表

<110> 陆, 梅生  
 李, 杰弗瑞  
 张, 冬青  
 刘, 炳亚

<120> 一种抗胃癌细胞表面功能性表达的足萼样蛋白前体亚型 2 的单克隆抗体及其制备方法 and 用途

<130> PCNMB

<160> 4

<170> PatentIn version 3.3

[0001]

<210> 1

<211> 360

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> MS17-38 单抗轻链的可变区

<400> 1

gatatccaga tgacacagac tccactcact ttgtcgttta taattggaca accagcctcc	60
atctctttgca agtcaagtea gagcctctta gatagtgatg gaaagacatt tttgaattgg	120
ttgttacaga ggccaggcca gtctccacag cgcctaatct atctggtgtc taaactggac	180
tctggagtcc ctgacaggtt cactggcagt ggatctggga cagatttcac aetgaaaatc	240
agcagagtgg aggctgagga tttgggaatt tattattgtc ctggcaaggt acacaagtg	300
acgttcggtg gaggcaccaa gctggaactc aaacgggctg atgctgcaaa accctgtate	360

<210> 2

<211> 120

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> MS17-38 单抗轻链的可变区

<400> 2

Asp Ile Gln Met Thr Gln Thr Pro Leu Thr Leu Ser Phe Ile Ile Gly

1                    5                    10                    15  
 Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asp Ser  
                   20                    25                    30  
 Asp Gly Lys Thr Phe Leu Asn Trp Leu Leu Gln Arg Pro Gly Gln Ser  
                   35                    40                    45  
 Pro Gln Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Lys Leu Asp Ser Gly Val Pro  
                   50                    55                    60  
 Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile  
 65                    70                    75                    80  
 Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Ile Tyr Tyr Cys Pro Gly Lys  
                   85                    90                    95  
 Val His Lys Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Arg  
                   100                    105                    110  
 Ala Asp Ala Ala Lys Pro Cys Ile  
                   115                    120

[0002] <210> 3  
 <211> 387  
 <212> DNA  
 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> MS17-38 单抗重链的可变区  
 <400> 3  
 gaggtgcagc tggaggagtc tgggggaggc ttagtgaagc ctggagggtc cctgaaagtc 60  
 tectgtgcag cctctggatt cactttcagt acctatacca tgtcttgggt tcgccagact 120  
 ccggagaaga ggctggagtg ggtcgcaacc attagtggtg gtgitattta cacctactat 180  
 ccagacagtg tgaagggccg attcaccatc tecagagacg atgccaagaa cactctgtat 240  
 ctgcaaatga gcagtctgag gtctgaggac acggcettgt attactgtgc aagacaactat 300  
 agtaactacg agggccaagg tatggactcc tgggtcaag gaacctcagt caccgtctcc 360  
 tcagccaaaa egacaccccc atctgac 387  
  
 <210> 4  
 <211> 129  
 <212> PRT  
 <213> Artificial



&lt;220&gt;

&lt;223&gt; MS17-38 单抗重链的可变区

&lt;400&gt; 4

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

I 5 10 15

Ser Leu Lys Val Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Thr Tyr

20 25 30

Thr Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Glu Lys Arg Leu Glu Trp Val

35 40 45

Ala Thr Ile Ser Gly Gly Val Ile Tyr Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val

[0003]

50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ala Lys Asn Thr Leu Tyr

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Arg His Tyr Ser Asn Tyr Glu Gly Gln Gly Met Asp Ser Trp Gly

100 105 110

Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Ala Lys Thr Thr Pro Pro Ser

115 120 125

Asp

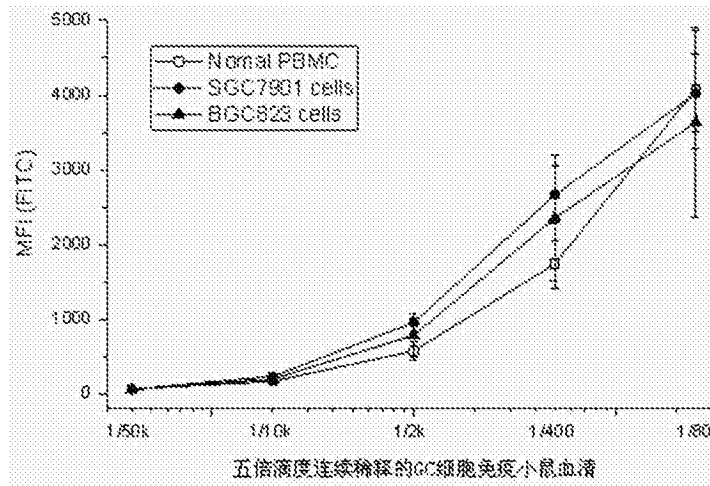


图1

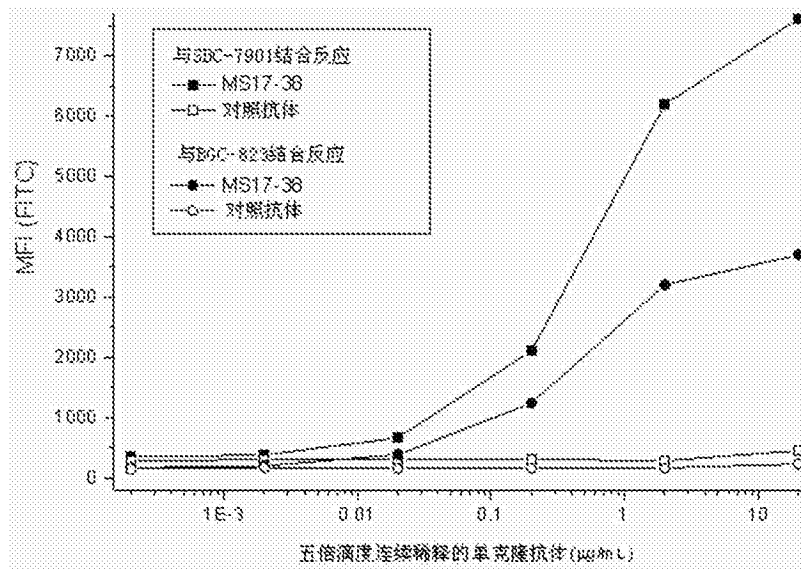


图2(A)

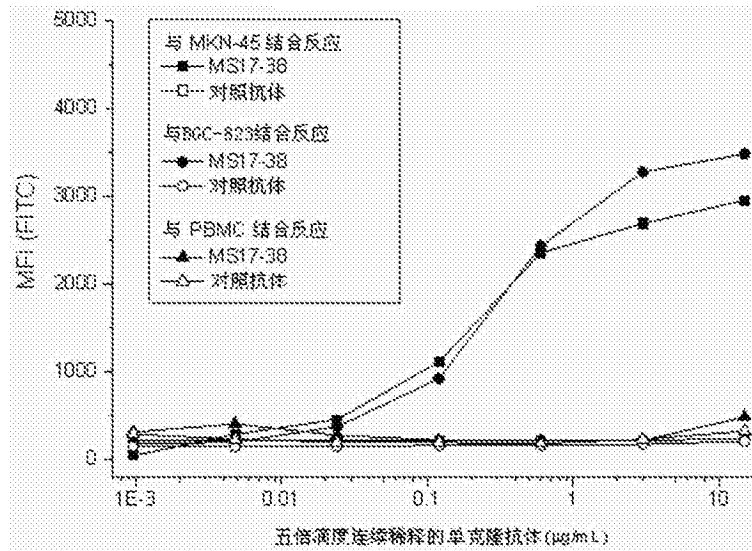


图2(B)

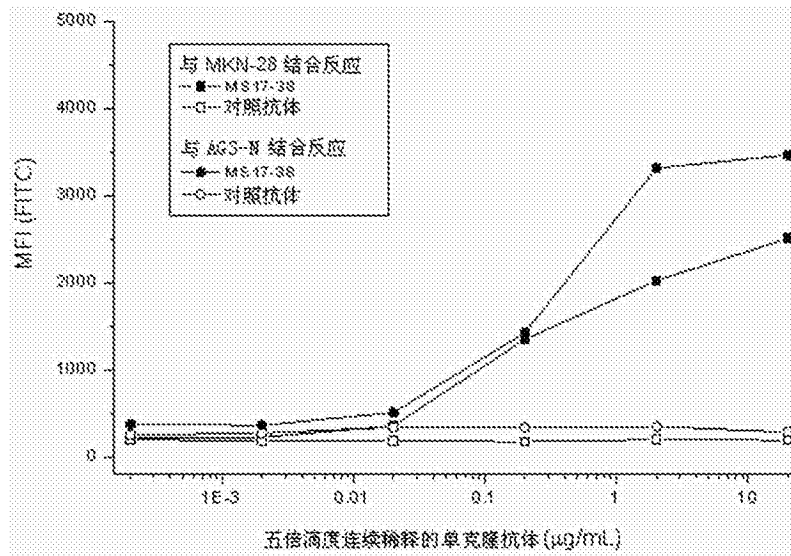


图3

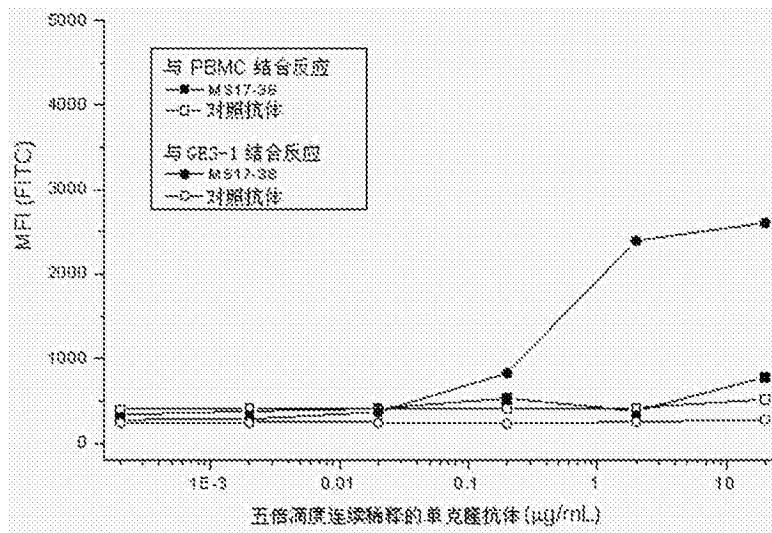


图4

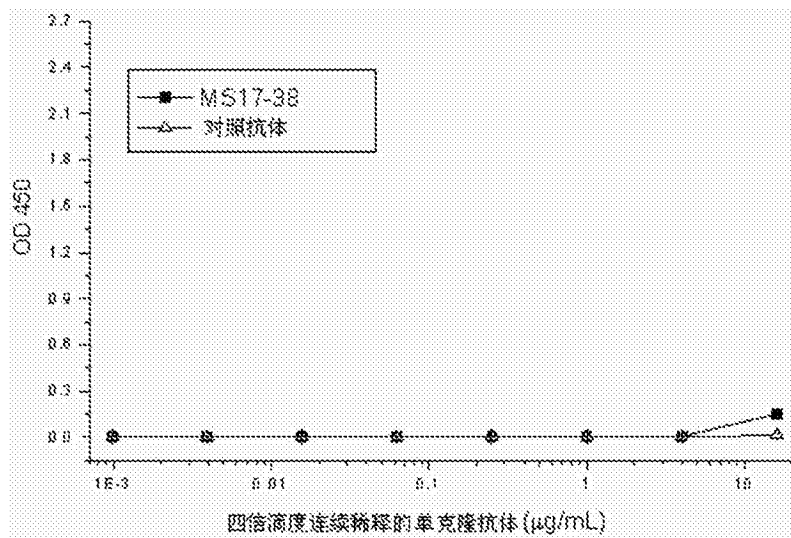


图5

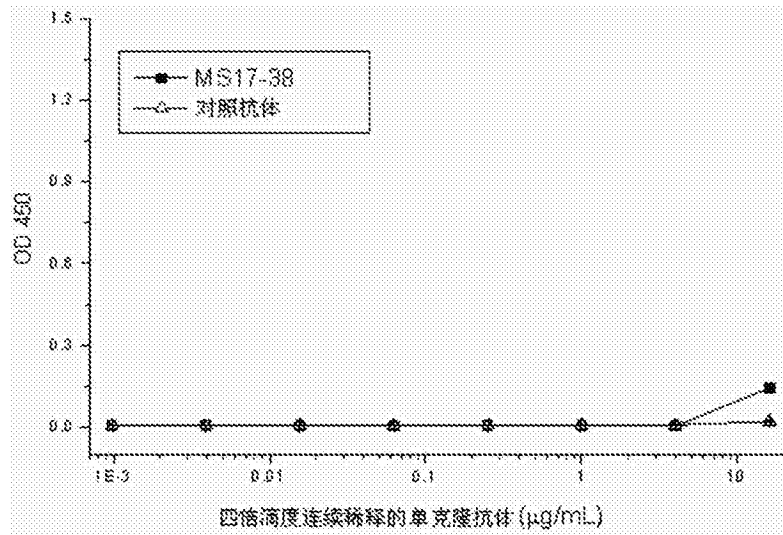


图6

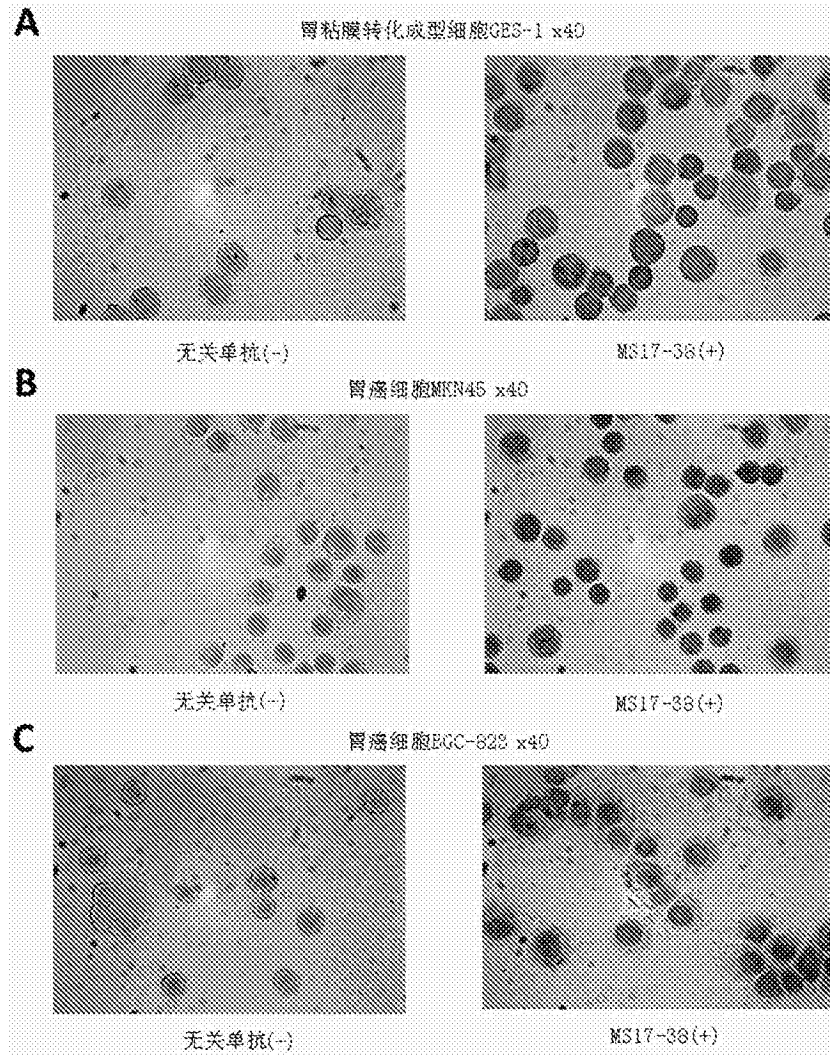


图7

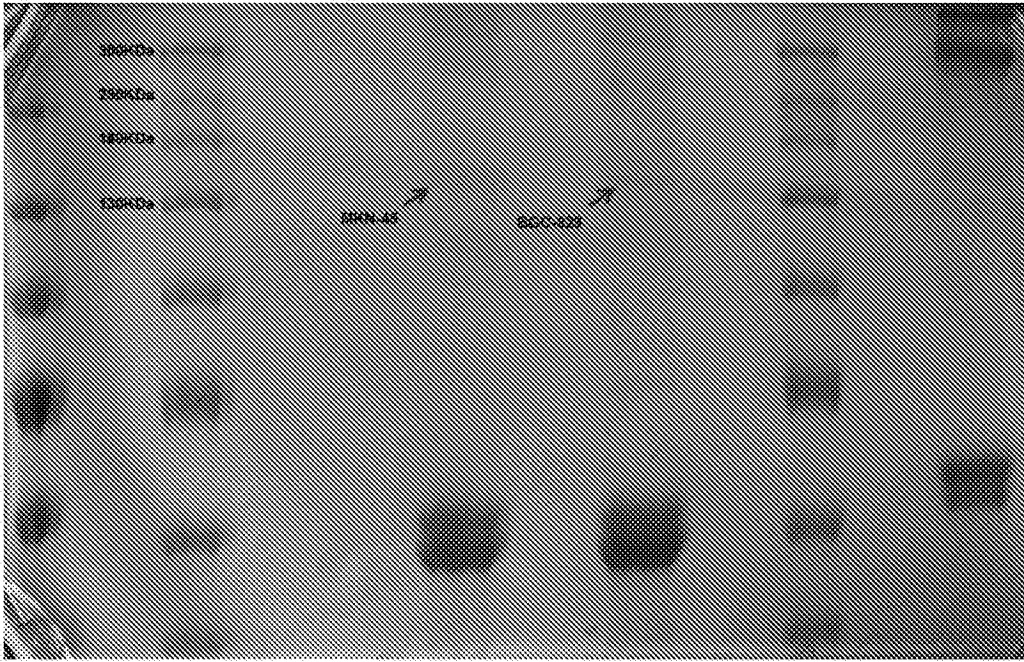


图8

由Barlor的Dr. Jung实验室完成质谱分析实验

			120-180
<b>MKN45 cell for MS17-38 on May 13, 2013</b>			
	# PSMs	Modified Area	Mass
4. podocalyxin isoform 2 precursor (PODXL)[Homo sapiens]	51	1.9E+07	55.4
3. 蛋白质转运蛋白 (protein transport protein) (Sec16A)[Homo sapiens]	90	1.8E+05	251.7
RNA结合蛋白33(RNA-binding protein 23)[Homo sapiens]	70	4.2E+05	129.9
2. 过氧化物酶体增殖物激活受体 $\gamma$ 结构共激活因子 (constitutive coactivator of peroxisome proliferator-activated receptor gamma) [Homo sapiens] (FAM120B)	75	5.6E+05	103.7
1. SWI/SNF复合物亚基(SWI/SNF complex subunit) (SMARCC1)[Homo sapiens]	94	<b>6.6E+04</b>	122.8
<b>MKN45 cells for MS17-38 on May 10, 2013</b>			
podocalyxin isoform 3 precursor (PODXL)	42	4.0E+05	55.4
富含脯氨酸的蛋白HaeIII亚科1前体 (proline-rich protein HaeIII subfamily 1 precursor)	3	1.5E+05	17.0
SWI/SNF复合物亚基 SMARCC1	173	1.0E+05	<b>122.8</b>
SWI/SNF复合物亚基 SMARCC2 isoform-a	83	7.1E+05	132.8
蛋白质转运蛋白 (Sec16A)	70	5.2E+04	251.7
过氧化物酶体增殖物激活受体 $\gamma$ 结构共激活因子	57	1.6E+05	103.7
<b>BGC623 cell for MS17-38 on May 13, 2013</b>			
过氧化物酶体增殖物激活受体 $\gamma$ 结构共激活因子	66	6.4E+05	103.7
蛋白质转运蛋白 (Sec16A)[Homo sapiens]	102	3.5E+05	251.7
SWI/SNF复合物亚基 SMARCC1[Homo sapiens]	73	3.5E+05	122.8
podocalyxin isoform 2 precursor (PODXL)[Homo sapiens]	51	1.9E+07	55.4

图9

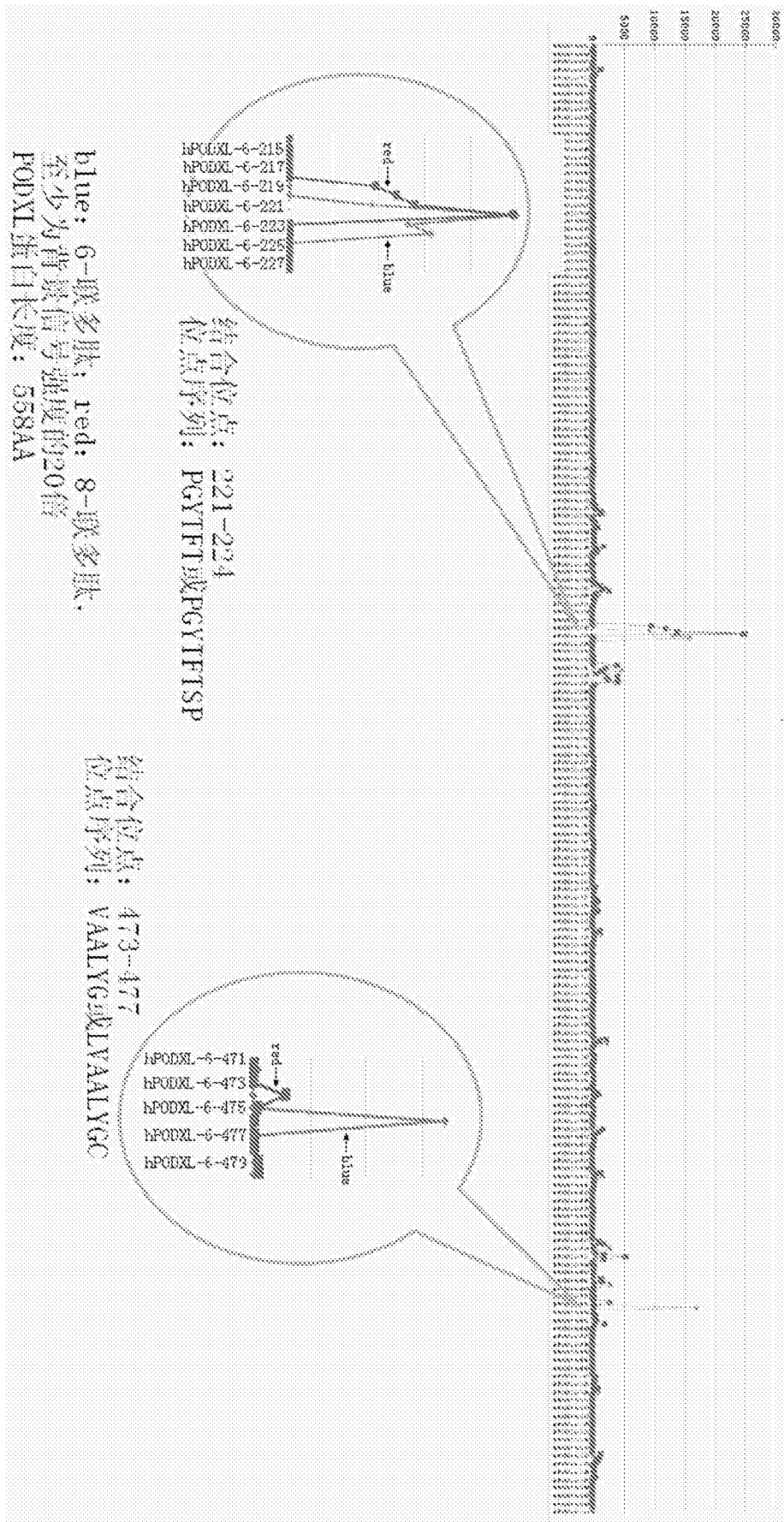


图10



```

PODKL: MRCALALSALLLLLSTPPLLPSSPSPSPSPSQNATQTTTDSNKRITAPTPASSVTINATDTAQQSTVET 70
PODKL-isoform1 (v1): MRCALALSALLLLLSTPPLLPSSPSPSPSPSPSQNATQTTTDSNKRITAPTPASSVTINATDTAQQSTVET 70
PODKL-isoform2 (v2): MRCALALSALLLLLSTPPLLPSSPSPSPSPSQNATQTTTDSNKRITAPTPASSVTINATDTAQQSTVET 70

PODKL: SKANEILASVKATTLGVSSDSPGTTTLAQQVSGPVTNTTVARGGSGGNPTTIESPKSTRSADTTTVAATST 140
PODKL-isoform1 (v1): SKANEILASVKATTLGVSSDSPGTTTLAQQVSGPVTNTTVARGGSGGNPTTIESPKSTRSADTTTVAATST 140
PODKL-isoform2 (v2): SKANEILASVKATTLGVSSDSPGTTTLAQQVSGPVTNTTVARGGSGGNPTTIESPKSTRSADTTTVAATST 140

PODKL: ATAKPNTTSSQNGAEDTTNCGKSSRSVTTDLTSTKAEHLTTPHPTSPLSPRQPTLIRPVATPTSSGHDH 210
PODKL-isoform1 (v1): ATAKPNTTSSQNGAEDTTNCGKSSRSVTTDLTSTKAEHLTTPHPTSPLSPRQPTLIRPVATPTSSGHDH 210
PODKL-isoform2 (v2): ATAKPNTTSSQNGAEDTTNCGKSSRSVTTDLTSTKAEHLTTPHPTSPLSPRQPTLIRPVATPTSSGHDH 210

PODKL: LMKISSSSSTVAIPGYTTTSPGMTTTLETVFHHVSOAGLELLTSGDLPTLASQSSAGITASSVISQRTQQ 280
PODKL-isoform1 (v1): LMKISSSSSTVAIPGYTTTSPGMTTTLETVFHHVSOAGLELLTSGDLPTLASQSSAGITASSVISQRTQQ 280
PODKL-isoform2 (v2): LMKISSSSSTVAIPGYTTTSPGMTTTLE-----SSVISQRTQQ 280

PODKL: TSSQMPASSTAPSSQETVQPTSPATALRTPFLPETMSSSPAASTTHRYPKTSPPTVAHESNNAKCEDLE 350
PODKL-isoform1 (v1): TSSQMPASSTAPSSQETVQPTSPATALRTPFLPETMSSSPAASTTHRYPKTSPPTVAHESNNAKCEDLE 350
PODKL-isoform2 (v2): TSSQMPASSTAPSSQETVQPTSPATALRTPFLPETMSSSPAASTTHRYPKTSPPTVAHESNNAKCEDLE 350

PODKL: TQTQSEKQLVNLGTGNTLCAGGASDEKLISLICRAVKATFNPAQDKGIRLASVPGSQTVVVKIITIRK 420
PODKL-isoform1 (v1): TQTQSEKQLVNLGTGNTLCAGGASDEKLISLICRAVKATFNPAQDKGIRLASVPGSQTVVVKIITIRK 420
PODKL-isoform2 (v2): TQTQSEKQLVNLGTGNTLCAGGASDEKLISLICRAVKATFNPAQDKGIRLASVPGSQTVVVKIITIRK 420

PODKL: LPAKDVYERLRKDKWDELKEAGVSDMKLGDQGPPEEAEDRFSMPLIITIVCMASFLLLVYALYQOCHQRLS 490
PODKL-isoform1 (v1): LPAKDVYERLRKDKWDELKEAGVSDMKLGDQGPPEEAEDRFSMPLIITIVCMASFLLLVYALYQOCHQRLS 490
PODKL-isoform2 (v2): LPAKDVYERLRKDKWDELKEAGVSDMKLGDQGPPEEAEDRFSMPLIITIVCMASFLLLVYALYQOCHQRLS 490

PODKL: QRKDQQRLTEELQTVENGYRDNPTLEVMEETSSEMQEKRVVSLNGELGDSWIVFLDNLTRDLDDEEDTHL 560
PODKL-isoform1 (v1): QRKDQQRLTEELQTVENGYRDNPTLEVMEETSSEMQEKRVVSLNGELGDSWIVFLDNLTRDLDDEEDTHL 560
PODKL-isoform2 (v2): QRKDQQRLTEELQTVENGYRDNPTLEVMEETSSEMQEKRVVSLNGELGDSWIVFLDNLTRDLDDEEDTHL 560

```

图11

