抗体及其应用

技术领域

本发明属于生物医药领域。具体而言，本发明提供了衍生自 cTAGE5 蛋白的免疫原性多肽及其应用，还提供了特异性结合所述免疫原性多肽的抗体及其应用。

发明背景

皮肤 T 细胞淋巴瘤相关抗原 5(cTAGE5)，也称为 MEA6 或 MGEA6，被认为是多种肿瘤如脑(脊)膜瘤、神经胶质瘤、T-细胞淋巴瘤等的肿瘤标志物。然而，在将 cTAGE5 作为肿瘤标志物来研究肿瘤的同时，发现 cTAGE5 在正常细胞中也存在，而且是细胞功能中不可缺少的，例如参与内质网(Endoplasmic reticulum，ER)的转运和输出。

之前研究 cTAGE5 的功能时，主要聚焦于 cTAGE5/Mea6 的膜内部分。研究发现，在 ER 的输出端(Lumen)与该处膜上的 TANGO1 形成复合物的 804 个氨基酸残基的 cTAGE5/Mea6，与 COPII 的框架蛋白 Sec12、Sec22、Sec23 相连，促使 COPII 输出胶原蛋白，但它并不离开膜而随着 COPII 而去。类似的研究大多研究 cTAGE5/Mea6 的细胞膜内的行为，其是人类细胞正常工作不可缺少的成分。cTAGE5/MEA6 膜外部分的氨基酸序列，被认为是信号肽，没有关于这部分序列的功能的报道。

已可获得多种针对 cTAGE5 的商品化抗体，如 Sigma-Aldrich 的产品 HPA000387、HPA000922。然而，这些抗体针对的是 cTAGE5/Mea6(804 氨基酸)的胞内区片段。目前没有针对 cTAGE5 的胞外区的抗体。

附图简述

图 1. 示出 cTAGE5 的 Mea6 剪接变体的序列结构。

图 2. 示出针对 ZZS01 和 ZZS05 的兔多抗的代表性 IHC 结果。

图 3. 示出 1D6 和 F11 单克隆抗体的部分代表性 IHC 结果。

图 4. 示出 F11 单克隆抗体在小鼠体内显著抑制 A-375 移植瘤生长。A：代表性肿瘤形态；B：小鼠体重变化；C：肿瘤体积变化。结果表示为平均值±SD (n = 8)。**p < 0.01，相对于对照组具有显著性差异。

图 5. 示出 F11 单克隆抗体在小鼠体内显著抑制 HCC1937 移植瘤生长。A：代表性肿瘤形态；B：小鼠体重变化；C：肿瘤体积变化。结果表示为平均值± SD (n = 8)。**p < 0.01，相对于对照组具有显著性差异。

图 6. 人源抗 ZZS05 抗体 h32 在 ADCC 模型中介导肿瘤类器官的凋亡。A：胰腺癌类器官；B：小细胞肺癌类器官。

图 7. 人源抗 ZZS05 抗体 h35 介导不同肿瘤类器官的凋亡。

图 8. 人源抗 ZZS05 抗体 h35 介导的 LDH 释放。

发明详述

定义

在本发明中，除非另有说明，否则本文中使用的科学和技术名词具有本领域技术人员所通常理解的含义。并且，本文中所用的蛋白质和核酸化学、分子生物学、细胞和组织培养、微生物学、免疫学相关术语和实验室操作步骤均为相应领域内广泛使用的术语和常规步骤。同时，为了更好地理解本发明，下面提供相关术语的定义和解释。

如本文所用，术语“和/或”涵盖由该术语连接的项目的所有组合，应视作各个组合已经单独地在本文列出。例如，“A 和/或 B”涵盖了“A”、“A 和 B”以及“B”。例如，“A、B 和/或 C”涵盖“A”、“B”、“C”、“A 和 B”、“A 和 C”、“B 和 C”以及“A 和 B 和 C”。

“包含”一词在本文中用于描述蛋白质或核酸的序列时，所述蛋白质或核酸可以是由所述序列组成，或者在所述蛋白质或核酸的一端或两端可以具有额外的氨基酸或核苷酸，但仍然具有本发明所述的活性。此外，本领域技术人员清楚多肽 N 端由起始密码子编码的甲硫氨酸在某些实际情况下(例如在特定表达系统表达时)会被保留，但不实质影响多肽的功能。因此，本申请说明书和权利要求书中在描述具体的多肽氨基酸序列时，尽管其可能不包含 N 端由起始密码子编码的甲硫氨酸，然而此时也涵盖包含该甲硫氨酸的序列，相应地，其编码核苷酸序列也可以包含起始密码子；反之亦然。

如本文所用，“抗体”指免疫球蛋白和免疫球蛋白片段，无论天然的或者部分或全部合成(例如重组)产生的，包括其至少包含免疫球蛋白分子的部分可变区的保留全长免疫球蛋白的结合特异性能力的任何片段。因此，抗体包括具有与免疫球蛋白抗原结合结构域(抗体结合位点)同源或基本上同源的结合结构域的任何蛋白。抗体包括抗体片段。如本文所用，因此术语抗体包括合成抗体、重组产生的抗体、多特异性抗体(例如双特异性抗体)、人抗体、非人抗体、骆驼抗体、单域抗体、人源化抗体、嵌合抗体、胞内抗体以及抗体片段，例如但不限于 Fab 片段、Fab'片段、$F(ab')_2$ 片段、Fv 片段、二硫键连接的 Fv (dsFv)、Fd 片段、Fd’片段、单链 Fv (scFv)、单链 Fab (scFab)、双抗体、抗独特型(抗 Id)抗体、或者上述任何抗体的抗原结合片段。本文所提供的抗体包括任何免疫球蛋白类型(例如，IgG、IgM、IgD、IgE、IgA 和 IgY)、任何类别(例如 IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1 和 IgA2)或亚类(例如，IgG2a 和 IgG2b)的成员。

如本文所用，抗体的“抗体片段”或“抗原结合片段”指全长抗体的任何部分，其少于全长，但是至少包含结合抗原的所述抗体的部分可变区(例如一个或多个 CDR 和/或一个或多个抗体结合位点)，并且因此保留结合特异性以及所述全长抗体的至少部分特异性结合能力。因此，抗原结合片段指包含与衍生抗体片段的抗体结合相同抗原的抗原

结合部分的抗体片段。抗体片段包括通过酶促处理全长抗体所产生的抗体衍生物，以及合成产生的衍生物，例如重组产生的衍生物。抗体包括抗体片段。抗体片段的实例包括但不限于 Fab、Fab'、$F(ab')_2$、单链 Fv (scFv)、Fv、dsFv、双抗体、Fd 和 Fd'片段以及其他片段，包括修饰的片段(参见，例如，Methods in Molecular Biology, Vol 207: Recombinant Antibodies for Cancer Therapy Methods and Protocols (2003); Chapter 1; p 3-25, Kipriyanov)。所述片段可以包括连接在一起的多条链，例如通过二硫键和/或通过肽接头。抗体片段一般包含至少或约 50 个氨基酸，并且典型至少或约 200 个氨基酸。抗原结合片段包括任何抗体片段，其在被插入抗体框架(例如通过置换相应区域)时获得免疫特异性地结合(即表现出至少或至少约 10^7 M^{-1}- 10^8 M^{-1} 的 Ka)抗原的抗体。

如本文所用，“单克隆抗体”指相同抗体的群体，表示单克隆抗体群体中的每个单独的抗体分子与其他抗体分子相同。这种特性与抗体的多克隆群体的特性相反，所述抗体的多克隆群体包含具有多种不同序列的抗体。单克隆抗体可以通过许多公知的方法来制备(Smith et al. (2004) *J. Clin. Pathol.* 57, 912-917; 和 Nelson et al., *J Clin Pathol* (2000), 53, 111-117)。例如，单克隆抗体可以通过永生化 B 细胞来制备，例如通过与骨髓瘤细胞融合以产生杂交瘤细胞系或者通过用诸如 EBV 的病毒感染 B 细胞。重组技术还可以用来在体外通过用携带编码抗体的核苷酸的人工序列的质粒转化宿主细胞来从宿主细胞的克隆群体制备抗体。

如本文中所用，术语“杂交瘤”或“杂交瘤细胞”指由融合产抗体的淋巴细胞和不产抗体的癌细胞而产生的细胞或细胞系(通常为骨髓瘤或淋巴瘤细胞)。如本领域普通技术人员所知的，杂交瘤可增殖并持续供应产生特定单克隆抗体。用于产生杂交瘤的方法为本领域已知的(见例如，Harlow & Lane，1988)。当提及术语“杂交瘤”或“杂交瘤细胞”时，其还包括杂交瘤的亚克隆和后代细胞。

如本文所用，“常规抗体”指包含两条重链(其可以标示为 H 和 H')和两条轻链(其可以标示为 L 和 L')和两个抗原结合位点的抗体，其中每条重链可以是全长免疫球蛋白重链或保留抗原结合能力的其任何功能区(例如重链包括但不限于 V_H 链、V_H-C_H1 链和 V_H-C_H1-C_H2-C_H3 链)，并且每条轻链可以是全长轻链或任何功能区(例如轻链包括但不限于 V_L 链和 V_L-C_L 链)。每条重链(H 和 H')与一条轻链(分别为 L 和 L')配对。

如本文所用，全长抗体是具有两条全长重链(例如 V_H-C_H1-C_H2-C_H3 或 V_H-C_H1-C_H2-C_H3-C_H4)和两条全长轻链(V_L-C_L)和铰链区的抗体，例如通过抗体分泌 B 细胞天然产生的抗体以及合成产生的具有相同结构域的抗体。

如本文所用，dsFv 指具有稳定 V_H-V_L 对的工程化分子间二硫键的 Fv。

如本文所用，Fab 片段是用木瓜蛋白酶消化全长免疫球蛋白所获得的抗体片段，或者例如通过重组方法合成产生的具有相同结构的片段。Fab 片段包含轻链(包含 V_L 和 C_L)和另一条链，所述另一条链包含重链可变区(V_H)和重链的一个恒定区结构域(C_H1)。

如本文所用，$F(ab')_2$ 片段是在 pH 4.0-4.5 下用胃蛋白酶消化免疫球蛋白所导致的抗体片段，或者例如通过重组方法合成产生的具有相同结构的片段。$F(ab')_2$ 片段基本上

包含两个 Fab 片段，其中每个重链部分包含额外的几个氨基酸，包括形成连接两个片段的二硫键的半胱氨酸。

如本文所用，Fab'片段是包含 $F(ab')_2$ 片段的一半(一条重链和一条轻链)的片段。

如本文所用，scFv 片段指包含通过多肽接头以任何顺序共价连接的轻链可变区(V_L)和重链可变区(V_H)的抗体片段。接头长度使得两个可变结构域基本不干扰地桥接。示例性接头是分散有一些 Glu 或 Lys 残基以增加溶解性的$(Gly\text{-}Ser)_n$残基。

术语“嵌合抗体”是指这样的抗体，其中可变区序列源自一个物种，恒定区序列源自另一物种，如其中可变区序列源自小鼠抗体及恒定区序列源自人抗体的抗体。

“人源化”抗体是指非人(例如小鼠)抗体形式，其是嵌合的免疫球蛋白、免疫球蛋白链或者其片段(如 Fv、Fab、Fab'、$F(ab')_2$ 或者抗体的其它抗原结合亚序列)，含有源自非人免疫球蛋白的最小序列。优选地，人源化抗体是人免疫球蛋白(接受者抗体)，其中接受者抗体的互补决定区(CDR)的残基由来自具有希望的特异性、亲和性和能力的非人物种(供体抗体)如小鼠、大鼠或者兔的 CDR 残基置换。

此外，在人源化中，还可能对 VH 和/或 VL 的 CDR1、CDR2 和/或 CDR3 区内的氨基酸残基进行突变，由此改善抗体的一或多种结合特性(例如亲和性)。可进行例如 PCR 介导的突变引入突变，其对抗体结合或其它功能特性的影响可利用本文所述的体外或体内测试评估。通常，引入保守性突变。此类突变可为氨基酸取代、添加或缺失。另外，CDR 内的突变通常不超过一个或两个。因此，本发明所述人源化抗体还涵盖 CDR 内包含 1 或 2 两个氨基酸突变的抗体。

如本文所用，术语“表位”指抗体的互补位结合的抗原上的任何抗原决定簇。表位决定簇通常包含分子的化学活性表面分型，例如氨基酸或糖侧链，并且通常具有特定的三维结构特征以及特定的电荷特征。

如本文所用，可变结构域或可变区是抗体重链或轻链的特定 Ig 结构域，其包含在不同抗体之间变化的氨基酸序列。每条轻链和每条重链分别具有可变区结构域 VL(也表示为 V_L)和 VH(或也表示为 V_L)。可变结构域提供抗原特异性，并且因此负责抗原识别。每个可变区包含 CDR 和框架区(FR)，CDR 是抗原结合位点结构域的部分。

如本文所用，“抗原结合结构域”和“抗原结合位点(antigen-binding site)”同义地用来指识别并与同种(cognate)抗原物理相互作用的抗体内的结构域。天然的常规全长抗体分子具有两个常规抗原结合位点，每个包含重链可变区部分和轻链可变区部分。常规抗原结合位点包含连接可变区结构域内反向平行的 β 链的环。抗原结合位点可以包含可变区结构域的其他部分。每个常规抗原结合位点包含 3 个来自重链的高变区和 3 个来自轻链的高变区。高变区也称为互补决定区(CDR)。

如本文所用，“高变区”、“HV”、“互补决定区”和“CDR”和“抗体 CDR”可交换地用来指一起形成抗体的抗原结合位点的每个可变区内的多个部分中的一个。每个可变区结构域包含 3 个 CDR，命名为 CDR1、CDR2 和 CDR3。例如，轻链可变区结构域包含 3 个 CDR，命名为 VL CDR1、VL CDR2 和 VL CDR3 (或 LCDR1、LCDR2 和

LCDR3)；重链可变区结构域包含 3 个 CDR，命名为 VH CDR1、VH CDR2 和 VH CDR3(或 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3)。可变区中的 3 个 CDR 沿线性氨基酸序列是不连续的，但是在折叠的多肽中接近。CDR 位于连接可变结构域的 β 折叠的平行链的环内。如本文所述，本领域技术人员知道并且可以基于 Kabat 或 Chothia 编号鉴定 CDR(参见例如，Kabat, E.A. *et al.* (1991) *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242, 和 Chothia, C. *et al.* (1987) *J. Mol. Biol.* 196:901-917)。优选地，本发明中的 CDR 利用 IMGT 方法[2, 3]确定。具体可参见本文实施例所描述的方法。

如本文所用，框架区(FR)是位于 β 折叠内的抗体可变区结构域内的结构域；在氨基酸序列方面，FR 区比高变区相对更保守。

如本文所用，“恒定区”结构域是抗体重链或轻链中的结构域，其包含比可变区结构域的氨基酸序列相对更保守的氨基酸序列。在常规全长抗体分子中，每条轻链具有单个轻链恒定区(C_L)结构域，而每条重链包含一个或多个重链恒定区(C_H)结构域，包括 C_H1、C_H2、C_H3 和 C_H4。全长 IgA、IgD 和 IgG 同种型包含 C_H1、C_H2、C_H3 和铰链区，而 IgE 和 IgM 包含 C_H1、C_H2、C_H3 和 C_H4。C_H1 和 C_L 结构域延伸抗体分子的 Fab 臂，因此有助于与抗原相互作用以及转动抗体臂。抗体恒定区可以服务于效应子功能，例如但不限于清除该抗体特异性结合的抗原、病原体和毒素，例如通过与各种细胞、生物分子和组织相互作用。

如本文所用，抗体的功能区是包含该抗体的至少 VH、VL、C_H (例如 C_H1、C_H2 或 C_H3)、C_L 或铰链区结构域或者至少其功能区的抗体部分。

如本文所用，VH 结构域的功能区是保留完整 VH 结构域的至少部分结合特异性(例如通过保留完整 VH 结构域的一个或多个 CDR)的完整 VH 结构域的至少一部分，从而所述 VH 结构域的功能区单独地或者与另一抗体结构域(例如 V_L 结构域)或其区域组合地结合抗原。示例性 VH 结构域的功能区是包含 VH 结构域的 CDR1、CDR2 和/或 CDR3 的区域。

如本文所用，VL 结构域的功能区是保留完整 VL 结构域的至少部分结合特异性(例如通过保留完整 VL 结构域的一个或多个 CDR)的完整 VL 结构域的至少一部分，从而所述 VL 结构域的功能区单独地或者与另一抗体结构域(例如 VH 结构域)或其区域组合地结合抗原。示例性 VL 结构域的功能区是包含 VL 结构域的 CDR1、CDR2 和/或 CDR3 的区域。

如本文所用，关于抗体或其抗原结合片段的“特异性结合”或“免疫特异性地结合”在本文中可交换使用，并且指抗体或抗原结合片段通过抗体和抗原的抗体结合位点之间的非共价相互作用与同种抗原形成一个或多个非共价键的能力。所述抗原可以是分离的抗原或存在于肿瘤细胞。通常，免疫特异性地结合(或特异性结合)抗原的抗体是以约或 1×10^7 M^{-1} 或 $1x\ 10^8$ M^{-1} 或更大的亲和常数 Ka (或者 $1x\ 10^{-7}$ M 或 1×10^{-8} M 或更低的解离常数(K_d))结合所述抗原。亲和常数可以通过抗体反应的标准动力学方法来测定，例

如，免疫测定、表面等离子共振(SPR) (Rich and Myszka (2000) *Curr. Opin. Biotechnol* 11:54; Englebienne (1998) *Analyst.* 123:1599)、等温滴定量热法(ITC)或本领域已知的其他动力学相互作用测定(参见，例如，Paul, ed., Fundamental Immunology, 2nd ed., Raven Press, New York, pages 332-336 (1989)；还参见描述用于计算抗体的结合亲和力的示例性 SPR 和 ITC 方法的美国专利第 7,229,619 号)。用于实时检测和监测结合速率的仪器和方法是已知的，并且可商购(参见，BiaCore 2000, Biacore AB, Upsala, Sweden and GE Healthcare Life Sciences; Malmqvist (2000) *Biochem. Soc. Trans*. 27:335)。

如本文所用，关于抗体的术语“竞争”是指第一抗体或其抗原结合片段以与第二抗体或其抗原结合片段足够相似的方式结合一个表位，由此第一抗体与其关联表位的结合结果在存在第二抗体的条件下与不存在第二抗体的条件下相比可检测地降低。或者，在第二抗体与其表位的结合在存在第一抗体条件下也可检测地降低的情况中，可以但不必需是这种情况。也就是说，第一抗体可以抑制第二抗体与其表位的结合，而不用第二抗体抑制第一抗体与其各自表位的结合。然而，在每个抗体均可检测地抑制另一抗体与其关联表位或配体的结合的情况中，无论是相同、更高或更低程度，所述抗体被称为彼此“交叉竞争”结合其各自的表位。竞争及交叉竞争抗体均涵盖在本发明中。无论这种竞争或交叉竞争发生的机制如何(例如位阻、构象改变或者结合共同表位或其片段)，本领域技术人员基于本发明提供的教导将意识到这种竞争和/或交叉竞争抗体涵盖在本发明中且可用于本发明揭示的方法中。

如本文所用，“多肽”指共价连接的两个或更多个氨基酸。术语“多肽”和“蛋白质”在本文中可交换使用。

"分离的蛋白质"、"分离的多肽"或"分离的抗体"指所述蛋白质、多肽或抗体 (1)不与在其天然状态下伴随其天然相关成分关联，(2)不含来自相同物种的其它蛋白质，(3)由来自不同物种的细胞表达，或(4)不在天然中发生。因此，经化学合成的多肽或在不同于多肽的天然来源细胞的细胞系统中合成的多肽将会与其天然相关成分"分离"。还可通过分离以使蛋白质实质上不含天然相关成分，即使用本领域众所周知的蛋白质纯化技术。

在肽或蛋白中，合适的保守氨基酸取代是本领域技术人员已知的，并且一般可以进行而不改变所得分子的生物活性。通常，本领域技术人员认识到多肽的非必需区中的单个氨基酸取代基本上不改变生物活性(参见，例如，Watson et al., *Molecular Biology of the Gene*, 4th Edition, 1987, The Benjamin/Cummings Pub. co., p.224)。

如本文所用，术语“多核苷酸”和“核酸分子”指包含至少两个连接的核苷酸或核苷酸衍生物的寡聚体或聚合物，包括通常通过磷酸二酯键连接在一起的脱氧核糖核酸(DNA)和核糖核酸(RNA)。

如本文所用，分离的核酸分子是从存在于核酸分子的天然来源中的其他核酸分子分离的核酸分子。诸如 cDNA 分子的“分离的”核酸分子可以在通过重组技术制备时基本上不含其他细胞物质或培养基，或者在化学合成时基本上不含化学前体或其他化学

成分。本文所提供的示例性分离的核酸分子包括编码所提供的抗体或抗原结合片段的分离的核酸分子。

序列“相同性”具有本领域公认的含义，并且可以利用公开的技术计算两个核酸或多肽分子或区域之间序列相同性的百分比。可以沿着多核苷酸或多肽的全长或者沿着该分子的区域测量序列相同性。(参见，例如：*Computational Molecular Biology*, Lesk, A.M., ed., Oxford University Press, New York, 1988; *Biocomputing: Informatics and Genome Projects*, Smith, D.W., ed., Academic Press, New York, 1993; *Computer Analysis of Sequence Data*, Part I, Griffin, A.M., and Griffin, H.G., eds., Humana Press, New Jersey, 1994; *Sequence Analysis in Molecular Biology*, von Heinje, G., Academic Press, 1987; and Sequence Analysis Primer, Gribskov, M. and Devereux, J., eds., M Stockton Press, New York, 1991)。虽然存在许多测量两个多核苷酸或多肽之间的相同性的方法，但是术语“相同性”是技术人员公知的(Carrillo, H. & Lipman, D., *SIAM J Applied Math 48*:1073 (1988))。

如本文所用，关于核酸序列、区域、元件或结构域的“可操作地连接”表示核酸区域互相功能相关。例如，启动子可以可操作地连接至编码多肽的核酸，从而所述启动子调控或介导所述核酸的转录。

如本文所用，“表达”指通过多核苷酸的转录和翻译产生多肽的过程。多肽的表达水平可以利用本领域已知的任何方法来评价，包括例如测定从宿主细胞产生的多肽的量的方法。这类方法可以包括但不限于通过 ELISA 定量细胞裂解物中的多肽，凝胶电泳之后考马斯蓝染色，Lowry 蛋白测定以及 Bradford 蛋白测定。

如本文所用，“宿主细胞”是用于接受、保持、复制和扩增载体的细胞。宿主细胞还可以用来表达载体所编码的多肽。当宿主细胞分裂时，载体中所含的核酸复制，从而扩增核酸。宿主细胞可以是真核细胞或原核细胞。合适的宿主细胞包括但不限于 CHO 细胞、各种 COS 细胞、HeLa 细胞、HEK 细胞例如 HEK 293 细胞。

“密码子优化”是指通过用在宿主细胞的基因中更频繁地或者最频繁地使用的密码子代替天然序列的至少一个密码子(例如约或多于约 1、2、3、4、5、10、15、20、25、50 个或更多个密码子同时维持该天然氨基酸序列而修饰核酸序列以便增强在感兴趣宿主细胞中的表达的方法。不同的物种对于特定氨基酸的某些密码子展示出特定的偏好。密码子偏好性(在生物之间的密码子使用的差异)经常与信使 RNA(mRNA)的翻译效率相关，而该翻译效率则被认为依赖于被翻译的密码子的性质和特定的转运 RNA(tRNA)分子的可用性。细胞内选定的 tRNA 的优势一般反映了最频繁用于肽合成的密码子。因此，可以将基因定制为基于密码子优化在给定生物中的最佳基因表达。密码子利用率表可以容易地获得，例如在 www.kazusa.orjp/codon/上可获得的密码子使用数据库(“Codon Usage Database”)中，并且这些表可以通过不同的方式调整适用。参见，Nakamura Y.等，“Codon usage tabulated from the international DNA sequence databases: status for the year2000. Nucl.Acids Res.，28:292 (2000)。

如本文所用，“载体”是可复制的核酸，当载体转化入适当的宿主细胞时，可以从

该载体表达一种或多种异源蛋白。关于载体包括那些通常通过限制酶切消化和连接可以将编码多肽或其片段的核酸引入其中的载体。关于载体还包括那些包含编码多肽的核酸的载体。载体用来将编码多肽的核酸引入宿主细胞，用于扩增核酸或者用于表达/展示核酸所编码的多肽。载体通常保持游离，但是可以设计为使基因或其部分整合入基因组的染色体。还考虑人工染色体的载体，例如酵母人工载体和哺乳动物人工染色体。这类媒介物的选择和用途是本领域技术人员公知的。

如本文所用，载体还包括“病毒载体”或“病毒的载体”。病毒的载体是工程化的病毒，其可操作地连接至外源基因以将外源基因转移(作为媒介物或穿梭(shuttle))入细胞。

如本文所用，“表达载体”包括能够表达 DNA 的载体，所述 DNA 与诸如启动子区的能够影响这类 DNA 片段表达的调控序列可操作地连接。这类额外的片段可以包括启动子和终止子序列，并且任选地可以包括一个或多个复制起点、一个或多个选择标记、增强子、多腺苷酸化信号等。表达载体一般来源于质粒或病毒 DNA，或者可以包含这两者的元件。因此，表达载体指重组 DNA 或 RNA 构建体，例如质粒、噬菌体、重组病毒或其他载体，当引入适当的宿主细胞时，导致克隆 DNA 的表达。适当的表达载体是本领域技术人员公知的，并且包括在真核细胞和/或原核细胞中可复制的表达载体以及保持游离的表达载体或者整合入宿主细胞基因组的表达载体。

如本文所用，“治疗”患有疾病或疾病状况的个体表示所述个体的症状部分或全部缓解，或者在治疗后保持不变。因此，治疗包括预防、治疗和/或治愈。预防指防止潜在疾病和/或防止症状恶化或疾病发展。治疗还包括所提供的任何抗体或其抗原结合片段以及本文所提供的组合物的任何药学用途。

如本文所用，“疗效”表示由个体的治疗所导致的效果，其改变、通常改良或改善疾病或疾病状况的症状，或者治愈疾病或疾病状况。

如本文所用，“治疗有效量”或“治疗有效剂量”指施用于对象之后至少足以产生疗效的物质、化合物、材料或包含化合物的组合物的量。因此，其为防止、治愈、改善、阻滞或部分阻滞疾病或病症的症状所必需的量。

如本文所用，“预防有效量”或“预防有效剂量”指在施用于对象时会具有预期的预防效果的物质、化合物、材料或包含化合物的组合物的量，例如，防止或延迟疾病或症状的发生或复发，减少疾病或症状发生或复发的可能性。完全预防有效剂量不必通过施用一个剂量发生，并且可以仅在施用一系列剂量之后发生。因此，预防有效量可以在一次或多次施用中施用。

如本文中所使用的，术语“对象”是指哺乳动物，例如人。

包含 cTAGE5 胞外区抗原性表位的多肽及其应用

在一方面，本发明提供一种分离的免疫原性多肽，其包含 SEQ ID NO:1 或 SEQ ID NO:2 所示的氨基酸序列，或包含与 SEQ ID NO:1 或 SEQ ID NO:2 具有至少 80%、至少

90%、至少 95%序列相同性的氨基酸序列，或包含相对于 SEQ ID NO:1 或 SEQ ID NO:2 具有一或多个(如 1 个、2 个、3 个、4 个、或 5 个)氨基酸取代、缺失或添加的氨基酸序列。在一些实施方案中，所述分离的多肽还可以包含标签。所述标签可以是用于分离和/纯化所述多肽的标签，例如 His 标签或 GST 标签。所述标签还可以是用于增强所述多肽的免疫原性的部分。

在另一方面，本发明提供了本发明所述分离的免疫原性多肽在制备抗体中的用途。在一些实施方案中，所述抗体能够特异性结合 cTAGE5 蛋白的胞外区。在一些实施方案中，所述 cTAGE5 胞外区包含 SEQ ID NO:1 所示氨基酸序列，或包含与 SEQ ID NO:1 具有至少 80%、至少 90%、至少 95%序列相同性的氨基酸序列，或包含相对于 SEQ ID NO:1 具有一或多个(如 1 个、2 个、3 个、4 个、或 5 个)氨基酸取代、缺失或添加的氨基酸序列。在一些实施方案中，所述 cTAGE5 胞外区包含 SEQ ID NO:2 所示氨基酸序列，或包含与 SEQ ID NO:2 具有至少 80%、至少 90%、至少 95%序列相同性的氨基酸序列，或包含相对于 SEQ ID NO:2 具有一或多个(如 1 个、2 个、3 个、4 个、或 5 个)氨基酸取代、缺失或添加的氨基酸序列。

示例性的 cTAGE5 蛋白包含 SEQ ID NO:415 或 SEQ ID NO:416 的氨基酸序列。

在另一方面，本发明提供了一种制备抗体的方法，所述方法包括用本发明所述的分离的免疫原性多肽免疫动物，然后从所述动物中分离特异性结合所述多肽的抗体或获得特异性结合所述多肽的抗体的序列信息。在一些实施方案中，所述抗体能够特异性结合 cTAGE5 蛋白的胞外区。在一些实施方案中，所述 cTAGE5 胞外区包含 SEQ ID NO:1 所示氨基酸序列，或包含与 SEQ ID NO:1 具有至少 80%、至少 90%、至少 95%序列相同性的氨基酸序列，或包含相对于 SEQ ID NO:1 具有一或多个(如 1 个、2 个、3 个、4 个、或 5 个)氨基酸取代、缺失或添加的氨基酸序列。在一些实施方案中，所述 cTAGE5 胞外区包含 SEQ ID NO:2 所示氨基酸序列，或包含与 SEQ ID NO:2 具有至少 80%、至少 90%、至少 95%序列相同性的氨基酸序列，或包含相对于 SEQ ID NO:2 具有一或多个(如 1 个、2 个、3 个、4 个、或 5 个)氨基酸取代、缺失或添加的氨基酸序列。在一些实施方案中，所述动物可以是本领域用于通过免疫制备抗体的任何动物，包括但不限于小鼠、大鼠、兔、山羊、羊驼等。

在另一方面，本发明提供了一种药物组合物，其包含本发明所述分离的免疫原性多肽和药学上可接受的载体。在一些实施方案中，所述药物组合物用于治疗和/或预防肿瘤。在一些实施方案中，所述药物组合物是疫苗。在一些实施方案中，所述疫苗还包含佐剂。

在另一方面，本发明提供了本发明所述分离的免疫原性多肽在制备药物中的用途。在一些实施方案中，所述药物用于治疗和/或预防肿瘤。在一些实施方案中，所述药物是疫苗。在一些实施方案中，所述疫苗还包含佐剂。

在另一方面，本发明提供了在有需要的对象中预防和/或治疗肿瘤的方法，包括给所述对象施用有效量的本发明所述分离的免疫原性多肽或本发明的药物组合物。

在另一方面，本发明提供了一种检测生物学样品中特异性结合 cTAGE5 蛋白抗体的存在和/或量的方法，包括 1)使本发明所述分离的免疫原性多肽与所述生物学样品接触，和 2)检测与所述分离的免疫原性多肽结合的抗体的存在和/或量。在一些实施方案中，所述生物学样品是来自对象的生物学样品。在一些实施方案中，所述对象是疑似患有肿瘤的对象。在一些实施方案中，所述生物学样品是组织样品、血液样品或淋巴样品。在一些实施方案中，所述生物学样品是血液样品，例如全血、血浆、血清。在一些实施方案，所述抗体特异性结合 cTAGE5 蛋白的胞外区。在一些实施方案中，所述 cTAGE5 胞外区包含 SEQ ID NO:1 所示氨基酸序列，或包含与 SEQ ID NO:1 具有至少 80%、至少 90%、至少 95%序列相同性的氨基酸序列，或包含相对于 SEQ ID NO:1 具有一或多个(如 1 个、2 个、3 个、4 个、或 5 个)氨基酸取代、缺失或添加的氨基酸序列。在一些实施方案中，所述 cTAGE5 胞外区包含 SEQ ID NO:2 所示氨基酸序列，或包含与 SEQ ID NO:2 具有至少 80%、至少 90%、至少 95%序列相同性的氨基酸序列，或包含相对于 SEQ ID NO:2 具有一或多个(如 1 个、2 个、3 个、4 个、或 5 个)氨基酸取代、缺失或添加的氨基酸序列。

在另一方面，本发明提供了本发明所述分离的免疫原性多肽在制备用于检测生物学样品中特异性结合 cTAGE5 蛋白的抗体的存在和/或量的方法中的试剂盒的用途。在一些实施方案中，所述生物学样品是来自对象的生物学样品。在一些实施方案中，所述对象是疑似患有肿瘤的对象。在一些实施方案中，所述生物学样品是组织样品、血液样品或淋巴样品。在一些实施方案中，所述生物学样品是血液样品，例如全血、血浆、血清。在一些实施方案，所述抗体特异性结合 cTAGE5 蛋白的胞外区。在一些实施方案中，所述 cTAGE5 胞外区包含 SEQ ID NO:1 所示氨基酸序列，或包含与 SEQ ID NO:1 具有至少 80%、至少 90%、至少 95%序列相同性的氨基酸序列，或包含相对于 SEQ ID NO:1 具有一或多个(如 1 个、2 个、3 个、4 个、或 5 个)氨基酸取代、缺失或添加的氨基酸序列。在一些实施方案中，所述 cTAGE5 胞外区包含 SEQ ID NO:2 所示氨基酸序列，或包含与 SEQ ID NO:2 具有至少 80%、至少 90%、至少 95%序列相同性的氨基酸序列，或包含相对于 SEQ ID NO:2 具有一或多个(如 1 个、2 个、3 个、4 个、或 5 个)氨基酸取代、缺失或添加的氨基酸序列。

在另一方面，本发明提供了包含 SEQ ID NO:1 或 2 所示氨基酸序列，或包含与 SEQ ID NO:1 具有至少 80%、至少 90%、至少 95%序列相同性的氨基酸序列，或包含相对于 SEQ ID NO:1 具有一或多个(如 1 个、2 个、3 个、4 个、或 5 个)氨基酸取代、缺失或添加的氨基酸序列，优选包含 SEQ ID NO: 2 所示氨基酸序列的 cTAGE5 蛋白作为肿瘤标志物的用途。

在另一方面，本发明提供了一种肿瘤筛查方法，所述方法包括检测来自对象的生物学样品中 cTAGE5 蛋白的存在或量，所述 cTAGE5 蛋白包含 SEQ ID NO:1 或 2 所示氨基酸序列，或包含与 SEQ ID NO:1 具有至少 80%、至少 90%、至少 95%序列相同性的氨基酸序列，或包含相对于 SEQ ID NO:1 具有一或多个(如 1 个、2 个、3 个、4 个、

或 5 个)氨基酸取代、缺失或添加的氨基酸序列，优选包含 SEQ ID NO: 2 所示氨基酸序列。

在另一方面，本发明提供了一种肿瘤筛查方法，所述方法包括检测检测来自对象的生物学样品中特异性结合 cTAGE5 蛋白的抗体的存在和/或量，所述抗体特异性结合 cTAGE5 蛋白的胞外区，所述 cTAGE5 蛋白胞外区包含 SEQ ID NO:1 或 2 所示氨基酸序列，或包含与 SEQ ID NO:1 具有至少 80%、至少 90%、至少 95%序列相同性的氨基酸序列，或包含相对于 SEQ ID NO:1 具有一或多个(如 1 个、2 个、3 个、4 个、或 5 个)氨基酸取代、缺失或添加的氨基酸序列，优选包含 SEQ ID NO: 2 所示氨基酸序列。

在本发明各方面的一些实施方案中，所述肿瘤是 cTAGE5 蛋白相关肿瘤，例如过表达 cTAGE5 蛋白的肿瘤。在一些实施方案中，所述 cTAGE5 蛋白具有胞外区。在一些实施方案中，所述 cTAGE5 胞外区包含 SEQ ID NO:1 所示氨基酸序列，或包含与 SEQ ID NO:1 具有至少 80%、至少 90%、至少 95%序列相同性的氨基酸序列，或包含相对于 SEQ ID NO:1 具有一或多个(如 1 个、2 个、3 个、4 个、或 5 个)氨基酸取代、缺失或添加的氨基酸序列。在一些实施方案中，所述 cTAGE5 胞外区包含 SEQ ID NO:2 所示氨基酸序列，或包含与 SEQ ID NO:2 具有至少 80%、至少 90%、至少 95%序列相同性的氨基酸序列，或包含相对于 SEQ ID NO:2 具有一或多个(如 1 个、2 个、3 个、4 个、或 5 个)氨基酸取代、缺失或添加的氨基酸序列。所述肿瘤的实例包括但不限于鼻咽癌、恶性黑色素瘤、肺癌、神经胶质瘤、皮肤癌、舌咽癌、淋巴瘤(包括 B-细胞淋巴瘤或 T-细胞淋巴瘤)、肝癌、宫颈癌、子宫内膜癌、甲状腺癌、结肠癌、卵巢癌、脑瘤、前列腺癌、乳腺癌(如三阴性乳腺癌)、食道癌、胃癌、胰腺癌、直肠癌、结直肠癌。在一些实施方案中，所述肿瘤是腺癌。在一些实施方案中，所述肿瘤是鳞癌。在一些实施方案中(例如 cTAGE5 胞外区包含 SEQ ID NO:1 所示氨基酸序列)，所述肿瘤选自鼻咽癌、恶性黑色素瘤、肺鳞癌、宫颈癌、皮肤癌、舌咽癌、食道鳞癌。在一些实施方案中(例如 cTAGE5 胞外区包含 SEQ ID NO:2 所示氨基酸序列)，所述肿瘤选自 B-细胞淋巴瘤、T-细胞淋巴瘤、恶性黑色素瘤、肺鳞癌、肺腺癌、肝癌、宫颈鳞癌、甲状腺癌、结肠腺癌、卵巢癌、脑瘤、皮肤鳞癌、前列腺癌、乳腺癌(如三阴性乳腺癌)、食道鳞癌、食道腺癌、胃癌、胰腺癌、直肠癌、子宫内膜癌、结直肠癌。

针对 cTAGE5 胞外区的抗体

在一方面，本发明提供一种特异性结合 cTAGE5 蛋白的胞外区的抗体或其抗原结合片段。在一些实施方案中，所述 cTAGE5 胞外区包含 SEQ ID NO:1 所示氨基酸序列，或包含与 SEQ ID NO:1 具有至少 80%、至少 90%、至少 95%序列相同性的氨基酸序列，或包含相对于 SEQ ID NO:1 具有一或多个(如 1 个、2 个、3 个、4 个、或 5 个)氨基酸取代、缺失或添加的氨基酸序列。在一些实施方案中，所述 cTAGE5 胞外区包含 SEQ ID NO:2 所示氨基酸序列，或包含与 SEQ ID NO:2 具有至少 80%、至少 90%、至少 95%序列相同性的氨基酸序列，或包含相对于 SEQ ID NO:2 具有一或多个(如 1 个、

2 个、3 个、4 个、或 5 个)氨基酸取代、缺失或添加的氨基酸序列。在一些实施方案中，所述抗体是多克隆抗体。在一些优选实施方案中，所述抗体是单克隆抗体。

在一方面，本发明提供一种特异性结合免疫原性多肽的抗体或其抗原结合片段，所述免疫源性多肽包含 SEQ ID NO:1 或 SEQ ID NO:2 所示的氨基酸序列，或包含与 SEQ ID NO:1 或 SEQ ID NO:2 具有至少 80%、至少 90%、至少 95%序列相同性的氨基酸序列，或包含相对于 SEQ ID NO:1 或 SEQ ID NO:2 具有一或多个(如 1 个、2 个、3 个、4 个、或 5 个)氨基酸取代、缺失或添加的氨基酸序列。在一些实施方案中，所述抗体是多克隆抗体。在一些优选实施方案中，所述抗体是单克隆抗体。

在一方面，本发明提供一种分离的单克隆抗体或其抗原结合片段，其中所述单克隆抗体包含表 2 和表 6 中的任一种抗体的重链 CDR 和轻链 CDR，和/或重链可变区和轻链可变区。

在一方面，本发明提供一种分离的单克隆抗体或其抗原结合片段，其中所述单克隆抗体包含重链可变区和轻链可变区，且包含选自以下任一组的重链 CDR 和轻链 CDR：

组	描述	SEQ ID NO
1	HCDR1	7
	HCDR2	8
	HCDR3	9
	LCDR1	10
	LCDR2	11
	LCDR3	12
2	HCDR1	17
	HCDR2	18
	HCDR3	19
	LCDR1	20
	LCDR2	21
	LCDR3	22
3	HCDR1	33
	HCDR2	34
	HCDR3	35
	LCDR1	36
	LCDR2	37
	LCDR3	38
4	HCDR1	41
	HCDR2	42
	HCDR3	43
	LCDR1	44
	LCDR2	45
	LCDR3	46
5	HCDR1	49
	HCDR2	50
	HCDR3	51
	LCDR1	52
	LCDR2	53
	LCDR3	54
6	HCDR1	57
	HCDR2	58

	HCDR3	59
	LCDR1	60
	LCDR2	61
	LCDR3	62
7	HCDR1	65
	HCDR2	66
	HCDR3	67
	LCDR1	68
	LCDR2	69
	LCDR3	70
8	HCDR1	73
	HCDR2	74
	HCDR3	75
	LCDR1	76
	LCDR2	77
	LCDR3	78
9	HCDR1	81
	HCDR2	82
	HCDR3	83
	LCDR1	84
	LCDR2	85
	LCDR3	86
10	HCDR1	89
	HCDR2	90
	HCDR3	91
	LCDR1	92
	LCDR2	93
	LCDR3	94
11	HCDR1	97
	HCDR2	98
	HCDR3	99
	LCDR1	100
	LCDR2	101
	LCDR3	102
12	HCDR1	105
	HCDR2	106
	HCDR3	107
	LCDR1	108
	LCDR2	109
	LCDR3	110
13	HCDR1	113
	HCDR2	114
	HCDR3	115
	LCDR1	116
	LCDR2	117
	LCDR3	118
14	HCDR1	121
	HCDR2	122
	HCDR3	123
	LCDR1	124
	LCDR2	125
	LCDR3	126
15	HCDR1	129
	HCDR2	130

	HCDR3	131
	LCDR1	132
	LCDR2	133
	LCDR3	134
16	HCDR1	137
	HCDR2	138
	HCDR3	139
	LCDR1	140
	LCDR2	141
	LCDR3	142
17	HCDR1	145
	HCDR2	146
	HCDR3	147
	LCDR1	148
	LCDR2	149
	LCDR3	150
18	HCDR1	153
	HCDR2	154
	HCDR3	155
	LCDR1	156
	LCDR2	157
	LCDR3	158
19	HCDR1	161
	HCDR2	162
	HCDR3	163
	LCDR1	164
	LCDR2	165
	LCDR3	166
20	HCDR1	169
	HCDR2	170
	HCDR3	171
	LCDR1	172
	LCDR2	173
	LCDR3	174
21	HCDR1	177
	HCDR2	178
	HCDR3	179
	LCDR1	180
	LCDR2	181
	LCDR3	182
22	HCDR1	185
	HCDR2	186
	HCDR3	187
	LCDR1	188
	LCDR2	189
	LCDR3	190
23	HCDR1	193
	HCDR2	194
	HCDR3	195
	LCDR1	196
	LCDR2	197
	LCDR3	198
24	HCDR1	201
	HCDR2	202

	HCDR3	203
	LCDR1	204
	LCDR2	205
	LCDR3	206
25	HCDR1	209
	HCDR2	210
	HCDR3	211
	LCDR1	212
	LCDR2	213
	LCDR3	214
26	HCDR1	217
	HCDR2	218
	HCDR3	219
	LCDR1	220
	LCDR2	221
	LCDR3	222
27	HCDR1	225
	HCDR2	226
	HCDR3	227
	LCDR1	228
	LCDR2	229
	LCDR3	230
28	HCDR1	233
	HCDR2	234
	HCDR3	235
	LCDR1	236
	LCDR2	237
	LCDR3	238
29	HCDR1	241
	HCDR2	242
	HCDR3	243
	LCDR1	244
	LCDR2	245
	LCDR3	246
30	HCDR1	249
	HCDR2	250
	HCDR3	251
	LCDR1	252
	LCDR2	253
	LCDR3	254
31	HCDR1	257
	HCDR2	258
	HCDR3	259
	LCDR1	260
	LCDR2	261
	LCDR3	262
32	HCDR1	265
	HCDR2	266
	HCDR3	267
	LCDR1	268
	LCDR2	269
	LCDR3	270
33	HCDR1	273
	HCDR2	274

	HCDR3	275
	LCDR1	276
	LCDR2	277
	LCDR3	278
34	HCDR1	281
	HCDR2	282
	HCDR3	283
	LCDR1	284
	LCDR2	285
	LCDR3	286
35	HCDR1	289
	HCDR2	290
	HCDR3	291
	LCDR1	292
	LCDR2	293
	LCDR3	294
36	HCDR1	297
	HCDR2	298
	HCDR3	299
	LCDR1	300
	LCDR2	301
	LCDR3	302
37	HCDR1	305
	HCDR2	306
	HCDR3	307
	LCDR1	308
	LCDR2	309
	LCDR3	310
38	HCDR1	313
	HCDR2	314
	HCDR3	315
	LCDR1	316
	LCDR2	317
	LCDR3	318
39	HCDR1	321
	HCDR2	322
	HCDR3	323
	LCDR1	324
	LCDR2	325
	LCDR3	326
40	HCDR1	329
	HCDR2	330
	HCDR3	331
	LCDR1	332
	LCDR2	333
	LCDR3	334
41	HCDR1	337
	HCDR2	338
	HCDR3	339
	LCDR1	340
	LCDR2	341
	LCDR3	342
42	HCDR1	345
	HCDR2	346

	HCDR3	347
	LCDR1	348
	LCDR2	349
	LCDR3	350
43	HCDR1	353
	HCDR2	354
	HCDR3	355
	LCDR1	356
	LCDR2	357
	LCDR3	358
44	HCDR1	361
	HCDR2	362
	HCDR3	363
	LCDR1	364
	LCDR2	365
	LCDR3	366
45	HCDR1	369
	HCDR2	370
	HCDR3	371
	LCDR1	372
	LCDR2	373
	LCDR3	374
46	HCDR1	377
	HCDR2	378
	HCDR3	379
	LCDR1	380
	LCDR2	381
	LCDR3	382
47	HCDR1	385
	HCDR2	386
	HCDR3	387
	LCDR1	388
	LCDR2	389
	LCDR3	390
48	HCDR1	393
	HCDR2	394
	HCDR3	395
	LCDR1	396
	LCDR2	397
	LCDR3	398
49	HCDR1	401
	HCDR2	402
	HCDR3	403
	LCDR1	404
	LCDR2	405
	LCDR3	406
50	HCDR1	409
	HCDR2	410
	HCDR3	411
	LCDR1	412
	LCDR2	413
	LCDR3	414

在一些实施方式中，其中所述单克隆抗体包含轻链可变区和重链可变区，所述重链可变区(VH)和所述轻链可变区(VL)分别包含选自以下任一组的氨基酸序列或分别包含与选自以下任一组的氨基酸序列具有至少 70%、至少 75%、至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 95%或更高序列相同性的氨基酸序列：

组	描述	SEQ ID NO
1	VH	5
	VL	6
2	VH	15
	VL	16
3	VH	31
	VL	32
4	VH	39
	VL	40
5	VH	47
	VL	48
6	VH	55
	VL	56
7	VH	63
	VL	64
8	VH	71
	VL	72
9	VH	79
	VL	80
10	VH	87
	VL	88
11	VH	95
	VL	96
12	VH	103
	VL	104
13	VH	111
	VL	112
14	VH	119
	VL	120
15	VH	127
	VL	128
16	VH	135
	VL	136
17	VH	143
	VL	144
18	VH	151
	VL	152
19	VH	159
	VL	160
20	VH	167
	VL	168
21	VH	175
	VL	176
22	VH	183

	VL	184
23	VH	191
	VL	192
24	VH	199
	VL	200
25	VH	207
	VL	208
26	VH	215
	VL	216
27	VH	223
	VL	224
28	VH	231
	VL	232
29	VH	239
	VL	240
30	VH	247
	VL	248
31	VH	255
	VL	256
32	VH	263
	VL	264
33	VH	271
	VL	272
34	VH	279
	VL	280
35	VH	287
	VL	288
36	VH	295
	VL	296
37	VH	303
	VL	304
38	VH	311
	VL	312
39	VH	319
	VL	320
40	VH	327
	VL	328
41	VH	335
	VL	336
42	VH	343
	VL	344
43	VH	351
	VL	352
44	VH	359
	VL	360
45	VH	367
	VL	368
46	VH	375
	VL	376

47	VH	383
	VL	384
48	VH	391
	VL	392
49	VH	399
	VL	400
50	VH	407
	VL	408

。

在一些实施方式中，所述单克隆抗体是人源化抗体。在一些实施方案中，所述人源化抗体的重链可变区包含 SEQ ID NO:23 所示氨基酸序列，轻链可变区包含 SEQ ID NO:24 所示氨基酸序列。在一些实施方案中，所述人源化抗体的重链可变区包含 SEQ ID NO:25 所示氨基酸序列，轻链可变区包含 SEQ ID NO:26 所示氨基酸序列。在一些实施方案中，所述人源化抗体的重链可变区包含 SEQ ID NO:27 所示氨基酸序列，轻链可变区包含 SEQ ID NO:28 所示氨基酸序列。在一些实施方案中，所述人源化抗体的重链可变区包含 SEQ ID NO:29 所示氨基酸序列，轻链可变区包含 SEQ ID NO:30 所示氨基酸序列。

在一些实施方案中，所述单克隆抗体包含 SEQ ID NO:417 所示重链恒定区。在一些实施方案中，所述单克隆抗体包含 SEQ ID NO:418 所示轻链恒定区。在一些实施方案中，所述单克隆抗体包含 SEQ ID NO:417 所示重链恒定区和 SEQ ID NO:418 所示轻链恒定区。

在一些实施方案中，所述单克隆抗体包含 SEQ ID NO:3 所示重链，以及 SEQ ID NO:4 所示轻链。在一些实施方案中，所述单克隆抗体包含 SEQ ID NO:13 所示重链，以及 SEQ ID NO:14 所示轻链。

在一些实施方案中，所述单克隆抗体特异性结合 cTAGE5 蛋白的胞外区。在一些实施方案中，所述 cTAGE5 蛋白的胞外区包含 SEQ ID NO:1 所示氨基酸序列。在一些实施方案中，所述 cTAGE5 蛋白的胞外区包含 SEQ ID NO:2 所示氨基酸序列。

在一些实施方案中，所述单克隆抗体特异性结合包含 SEQ ID NO:1 或 2 所示氨基酸序列的免疫原性多肽。

在一方面，本发明还包含能够与由 SEQ ID NO:3 所示重链和 SEQ ID NO:4 所示轻链组成的单克隆抗体或与由 SEQ ID NO:13 所示重链和 SEQ ID NO:14 所示轻链组成的单克隆抗体竞争结合 cTAGE5 蛋白的胞外区的单克隆抗体或其抗原结合片段。在一些实施方案中，所述 cTAGE5 蛋白的胞外区包含 SEQ ID NO:1 所示氨基酸序列。在一些实施方案中，所述 cTAGE5 蛋白的胞外区包含 SEQ ID NO:2 所示氨基酸序列。

在一方面，本发明还包含能够与由 SEQ ID NO:3 所示重链和 SEQ ID NO:4 所示轻链组成的单克隆抗体或与由 SEQ ID NO:13 所示重链和 SEQ ID NO:14 所示轻链组成的单克隆抗体竞争结合包含 SEQ ID NO:1 或 2 所示氨基酸序列的免疫原性多肽的单克隆抗体或其抗原结合片段。

本发明的抗体如本发明的单克隆抗体或其抗原结合片段能够抑制肿瘤生长至少约10%，优选至少约 20%，更优选至少约 30%，更优选至少约 40%，更优选至少约50%，更优选至少约 60%，更优选至少约 70%，更优选至少约 80%。

本发明的抗体如本发明的单克隆抗体或其抗原结合片段结合 cTAGE5 蛋白的胞外区(例如，所述 cTAGE5 蛋白的胞外区包含 SEQ ID NO:1 或 2 所示氨基酸序列)或本发明的分离的免疫原性多肽(例如包含 SEQ ID NO:1 或 2 所示氨基酸序列的免疫原性多肽)的 K_D 值可以小于约 1×10^{-7} M，优选小于约 1×10^{-8} M、更优选小于约 1×10^{-9} M、更优选小于约 1×10^{-10} M。

核酸、载体和抗体产生方法

在另一方面，本发明提供分离的核酸分子，其编码前述本发明的抗体或其抗原结合片段。在一些实施方式中，所述核酸分子的核苷酸序列针对用于表达的宿主细胞进行密码子优化。在一些实施方式中，本发明的核酸分子与表达调控序列可操作地连接。

本发明还提供表达载体，其包含至少一种前述本发明的核酸分子。

本发明还提供宿主细胞，其由至少一种前述本发明的核酸分子或表达载体转化。

在另一方面，本发明提供一种生产本发明的抗体或其抗原结合片段的方法，包括：

(i) 在适合所述核酸分子或表达载体表达的情况下培养本发明的宿主细胞，和

(ii) 分离并纯化由所述宿主细胞表达的抗体或其抗原结合片段。

本发明还涉及通过上述本发明的方法获得的分离的抗体或其抗原结合片段，其能够特异性结合 cTAGE5 蛋白的胞外区。在一些实施方案中，所述 cTAGE5 胞外区包含 SEQ ID NO:1 所示氨基酸序列，或包含与 SEQ ID NO:1 具有至少 80%、至少 90%、至少 95%序列相同性的氨基酸序列，或包含相对于 SEQ ID NO:1 具有一或多个(如 1 个、2 个、3 个、4 个、或 5 个)氨基酸取代、缺失或添加的氨基酸序列。在一些实施方案中，所述 cTAGE5 胞外区包含 SEQ ID NO:2 所示氨基酸序列，或包含与 SEQ ID NO:2 具有至少 80%、至少 90%、至少 95%序列相同性的氨基酸序列，或包含相对于 SEQ ID NO:2 具有一或多个(如 1 个、2 个、3 个、4 个、或 5 个)氨基酸取代、缺失或添加的氨基酸序列。

抗体缀合物

本发明还提供一种抗体缀合物，其包含本发明的抗体或其抗原结合片段以及与所述抗体或其抗原结合片段缀合的治疗性部分。在一些实施方案中，所述治疗性部分包括诸如细胞毒素、放射性同位素或生物活性蛋白质等。

细胞毒素包括对细胞有害(例如杀伤细胞)的任何试剂。实例包括：紫杉醇、细胞松弛素 B、短杆菌肽 D、溴化乙啶、吐根碱、丝裂霉素、表鬼臼毒吡喃葡糖苷、表鬼臼

毒嘧吩糖苷、长春新碱、长春碱、秋水仙素、阿霉素、柔红霉素、二羟基炭疽菌素二酮、米托蒽醌、光辉霉素、放线菌素 D、1-脱氢睾酮、糖皮质激素、普鲁卡因、丁卡因、利多卡因、普萘洛尔和噁唑霉素和它们的类似物或同系物。

可用于缀合的治疗性部分还包括，例如：抗代谢物(例如，氨甲喋呤、6-巯基嘌呤、6-硫代鸟嘌呤、阿糖胞苷、5-氟尿嘧啶、氨烯咪胺)，烷化剂(例如，氮芥、苯丁酸氮芥、苯丙氨酸氮芥、卡莫司汀(BSNU)和洛莫司汀(CCNU)、环磷酰胺、白消安、二溴甘露糖醇、链唑霉素、丝裂霉素 C 和顺-二氯二胺合铂(II)(DDP)顺铂)，氨茴霉素类(例如，柔红菌素(以前称为道诺霉素)和阿霉素)，抗生素(例如，放线菌素 D(以前称为放线菌素)、博来霉素、光辉霉素和安曲霉素(AMC))，和抗有丝分裂剂(例如，长春新碱和长春碱)。

能与本发明的抗体或其片段缀合的治疗性细胞毒素的其他优选例子包括倍癌霉素、刺孢霉素、美坦生、阿里他汀、和它们的衍生物。

可以利用本领域使用的接头技术将细胞毒素与本发明的抗体缀合。已经用于将细胞毒素与抗体缀合的接头类型的实例包括但不限于腙、硫醚、酯、二硫化物和含肽的接头。可以选择，例如，在溶酶体区室内易被低 pH 切割或易被蛋白酶切割的接头，该蛋白酶例如是在肿瘤组织中优先表达的蛋白酶，如组织蛋白酶(例如组织蛋白酶 B、C、D)。

本发明的抗体也可以与放射性同位素缀合，产生细胞毒性放射性药物，也被称作放射性抗体缀合物。能够与诊断或治疗性使用的抗体缀合的放射性同位素的例子包括但不限于碘 131、铟 111、钇 90 和镥 177。制备放射性抗体缀合物的方法在本领域中已经建立。

本发明的抗体也可以与具有需要的生物活性的蛋白质缀合，可用于修饰特定的生物学反应。这样的生物活性蛋白质包括，例如：具有酶活性的毒素或其活性片段，如相思豆毒蛋白、蓖麻毒蛋白 A、假单胞菌外毒素或白喉毒素；蛋白质，如肿瘤坏死因子或干扰素-γ；或生物学反应调节物，如淋巴因子、白介素-1(“IL-1”)、白介素-2(“IL-2”)、白介素-6(“IL-6”)、白介素-10(“IL-10”)、粒细胞巨噬细胞集落刺激因子(“GM-CSF”)、粒细胞集落刺激因子(“G-CSF”)或其他免疫因子如 IFN 等。

疾病治疗和/或预防

由此，本发明提供了一种在对象中预防和/或治疗肿瘤的方法，所述方法包括给所述患者施用有效量的本发明的抗体或其抗原结合片段或本发明的抗体缀合物。

可以通过本发明的方法治疗和/或预防的肿瘤是 cTAGE5 蛋白相关肿瘤，例如过表达 cTAGE5 蛋白的肿瘤。在一些实施方案中，所述 cTAGE5 蛋白具有胞外区。在一些实施方案中，所述 cTAGE5 胞外区包含 SEQ ID NO:1 所示氨基酸序列，或包含与 SEQ ID NO:1 具有至少 80%、至少 90%、至少 95%序列相同性的氨基酸序列，或包含相对于 SEQ ID NO:1 具有一或多个(如 1 个、2 个、3 个、4 个、或 5 个)氨基酸取代、缺失或

添加的氨基酸序列。在一些实施方案中，所述 cTAGE5 胞外区包含 SEQ ID NO:2 所示氨基酸序列，或包含与 SEQ ID NO:2 具有至少 80%、至少 90%、至少 95%序列相同性的氨基酸序列，或包含相对于 SEQ ID NO:2 具有一或多个(如 1 个、2 个、3 个、4 个、或 5 个)氨基酸取代、缺失或添加的氨基酸序列。

可以通过本发明的方法治疗和/或预防的所述肿瘤的实例包括但不限于鼻咽癌、恶性黑色素瘤、肺癌、神经胶质瘤、皮肤癌、舌咽癌、淋巴瘤(包括 B-细胞淋巴瘤或 T-细胞淋巴瘤)、肝癌、宫颈癌、甲状腺癌、结肠癌、卵巢癌、脑瘤、前列腺癌、乳腺癌(如三阴性乳腺癌)、食道癌、胃癌、胰腺癌、直肠癌、子宫内膜癌、结直肠癌。在一些实施方案中，所述肿瘤是腺癌。在一些实施方案中，所述肿瘤是鳞癌。在一些实施方案中(例如 cTAGE5 胞外区包含 SEQ ID NO:1 所示氨基酸序列)，所述肿瘤选自鼻咽癌、恶性黑色素瘤、肺鳞癌、宫颈癌、皮肤癌、舌咽癌、食道鳞癌。在一些实施方案中(例如 cTAGE5 胞外区包含 SEQ ID NO:2 所示氨基酸序列)，所述肿瘤选自 B-细胞淋巴瘤、T-细胞淋巴瘤、恶性黑色素瘤、肺鳞癌、肺腺癌、肝癌、宫颈鳞癌、甲状腺癌、结肠腺癌、卵巢癌、脑瘤、皮肤鳞癌、前列腺癌、乳腺癌(如三阴性乳腺癌)、食道鳞癌、食道腺癌、胃癌、胰腺癌、直肠癌、子宫内膜癌、结直肠癌。

药物组合物

本发明还提供了一种药物组合物，其包含本发明的抗体或其抗原结合片段或本发明的抗体缀合物，以及药学上可接受的载体。所述药物组合物用于在对象中预防和/或治疗肿瘤。

本文使用的“药学上可接受的载体”包括生理学相容的任何和所有的溶剂、分散介质、包衣、抗细菌剂和抗真菌剂、等渗剂和吸收延迟剂等。优选地，该载体适合于静脉内、肌内、皮下、肠胃外、脊柱或表皮施用(如通过注射或输注)。根据施用途径，可将活性化合物即抗体分子、免疫缀合物包裹于一种材料中，以保护该化合物免受可使该化合物失活的酸和其他天然条件的作用。

本发明的药物组合物也可含有药学上可接受的抗氧化剂。药学上可接受的抗氧化剂的例子包括：(1)水溶性抗氧化剂，如抗坏血酸、盐酸半胱氨酸、硫酸氢钠、焦亚硫酸钠，亚硫酸钠等；(2)油溶性抗氧化剂，如棕榈酸抗坏血酸酯、丁羟茴醚(BHA)、丁羟甲苯(BHT)、卵磷脂、没食子酸丙酯、α-生育酚等；和(3)金属螯合剂，如柠檬酸、乙二胺四乙酸(EDTA)、山梨糖醇、酒石酸、磷酸等。

这些组合物还可含有佐剂，如防腐剂、润湿剂、乳化剂和分散剂。

可以通过灭菌程序或通过包含诸如对羟基苯甲酸酯、氯代丁醇、苯酚山梨酸等各种抗细菌剂和抗真菌剂确保防止存在微生物。在很多情况下，组合物中优选包含等渗剂，例如，糖、多元醇例如甘露糖醇、山梨糖醇或氧化钠。通过在组合物中加入延迟吸收剂，例如单硬脂酸盐和明胶，可实现注射型药物延长的吸收。

药学上可接受的载体包括无菌水溶液或分散液和用于临时制备无菌注射液或分

散液的粉末剂。这些用于药学活性物质的介质和试剂的使用是本领域公知的。常规介质或试剂，除了任何与活性化合物不相容的范围外，都可能在本发明的药物组合物中。还可以向组合物中掺入补充的活性化合物。

治疗性组合物一般必须是无菌的并且在制备和贮存条件下稳定的。可以将组合物配制成溶液、微乳状液、脂质体或其他适合高药物浓度的有序结构。载体可以是含有例如水、乙醇、多元醇(例如，甘油、丙二醇和液态聚乙二醇等)及其合适的混合物的溶剂或分散剂。例如，通过使用包衣，例如卵磷脂，在分散液的情况下通过保持所需的颗粒大小，以及通过使用表面活性剂，可以保持适当的流动性。

通过将活性化合物以需要的量混入合适的溶剂中，并且根据需要加入以上列举的成分中的一种或其组合，接着无菌微过滤，可制备无菌注射液。通常，通过将活性化合物掺入到含有基本分散介质和上面所列其他所需成分的无菌载体中制备分散剂。对于用于制备无菌注射液的无菌粉末剂，优选的制备方法是真空干燥和冷冻干燥(冻干)，由其预先无菌过滤的溶液得到活性成分加任何额外所需成分的粉末。

可以与载体材料组合制备单一剂量形式的活性成分的量根据所治疗的对象和特定给药方式而不同。可以与载体材料组合制备单一剂量形式的活性成分的量一般是产生治疗效果的组合物的量。通常，以 100%计，这个量的范围是大约 0.01%至大约 99%的活性成分，优选大约 0.1%至大约 70%，最优选大约 1%至大约 30%的活性成分，与药学上可接受的载体相组合。

可以调节剂量方案以提供最佳的期望的反应(例如，治疗反应)。例如，可以施用单一推注，可以随时间施用几次分开的剂量，或者根据治疗状况的紧急情况所需，可以按比例减小或增加剂量。特别有利的是将肠胃外组合物配制成容易给药并且剂量均匀的剂量单位形式。此处使用的剂量单位形式是指适合作为单位剂量用于所治疗的对象的物理不连续单位；每个单位含有预定量的活性化合物，经计算该预定量的活性化合物与需要的药物载体组合产生所需的治疗效果。对本发明剂量单位形式的具体说明限定于且直接依赖于(a)活性化合物的独特特性和要达到的特定治疗效果，和(b)本领域中固有的对于配制这种用于治疗个体敏感性的活性化合物的限制。

对于抗体分子的给药而言，剂量范围为约 0.0001 至 100mg/kg，更通常为 0.01 至 20mg/kg 受者体重。例如，剂量可以是 0.3mg/kg 体重、1mg/kg 体重、3mg/kg 体重、5mg/kg 体重，10mg/kg 体重或 20mg/kg 体重，或在 1-20mg/kg 范围内。示例性的治疗方案需要每周给药一次、每两周一次、每三周一次、每四周一次、每月一次、每 3 个月一次、每 3-6 个月一次、或起始给药间隔略短(如每周一次至每三周一次)后期给药间隔加长(如每月一次至每 3-6 个月一次)。

或者，抗体分子也可以作为持续释放制剂来给药，在此情况中需要频率较低的给药。剂量和频率根据抗体分子在患者中的半衰期而不同。通常，人抗体表现出最长的半衰期，之后是人源化抗体、嵌合抗体和非人类抗体。给药剂量和频率根据处理是预防性的还是治疗性的而不同。在预防性应用中，在长时间内以较不频繁的间

隔给予相对较低的剂量。有些患者在余生中持续接受处理。在治疗性应用中，有时需要以较短的间隔给予较高的剂量，直到疾病的进展减轻或停止，优选直到患者表现为疾病症状部分或完全改善。之后，可以以预防性方案给患者给药。

本发明药物组合物中活性成分的实际剂量水平可能改变，以获得可有效实现对特定患者、组合物和给药方式的所需治疗反应，而对患者无毒性的活性成分的量。选择的剂量水平取决于多种药物代谢动力学因素，包括应用的本发明特定组合物的活性，给药途径，给药时间，应用的特定化合物的排泄速率，治疗的持续时间，与应用的特定组合物联合应用的其他药物、化合物和/或材料，接受治疗的患者的年龄、性别、体重、状况、总体健康情况和病史，以及医学领域中公知的类似因素。

“有效量”的本发明的抗体或其抗原结合片段或本发明的抗体缀合物优选地导致疾病症状的严重性降低，疾病无症状期的频率和持续时间增加，或者防止因疾病痛苦而引起的损伤或失能。例如，对于肿瘤的治疗，相对于未接受治疗的对象，“有效量”的本发明的抗体或其抗原结合片段优选地将细胞生长或肿瘤生长抑制至少约10%，优选至少约 20%，更优选至少约 30%，更优选至少约 40%，更优选至少约50%，更优选至少约 60%，更优选至少约 70%，更优选至少约 80%。抑制肿瘤生长的能力可以在预测对人类肿瘤的疗效的动物模型系统中评价。或者，也可以通过检查抑制细胞生长的能力来评价，这种抑制可以通过本领域技术人员公知的试验在体外测定。有效量的本发明的抗体或其抗原结合片段能够减小肿瘤大小，或者以其他方式缓解对象的症状如预防和/或治疗转移或复发。本领域技术人员可以根据如下因素确定这种量，如对象的大小、对象症状的严重性和选择的特定组合物或给药途径。

本发明的抗体或其抗原结合片段、本发明的抗体缀合物或本发明的药物组合物可以利用本领域公知的一种或多种方法通过一种或多种给药途径给药。本领域技术人员应当理解，给药途径和/或方式根据期望的结果而不同。本发明的抗体优选给药途径包括静脉内、肌肉内、皮内、腹膜内、皮下、脊柱或其他肠胃外给药途径，例如注射或输注，或膀胱灌注。本文使用的短语“肠胃外给药”是指除肠和局部给药以外的给药模式，通常是注射，包括但不限于静脉内、肌内、动脉内、鞘内、囊内、眶内、心内、皮内、腹膜内、经气管、皮下、表皮下、关节内、囊下、蛛网膜下、脊柱内、硬膜外和胸骨内注射和输注。

或者，本发明的抗体或其抗原结合片段、或本发明的抗体缀合物或本发明的药物组合物也可以通过非肠胃外途径给药，如局部、表皮或粘膜途径给药，例如，鼻内、经口、阴道、直肠、舌下或局部。

活性化合物可以与保护化合物不被快速释放的载体一起制备，例如控释制剂，包括植入物、透皮贴剂和微胶囊递送系统。可以使用生物可降解的、生物相容的聚合物，例如乙烯乙酸乙烯酯、聚酐类、聚乙醇酸、胶原、聚原酸酯和聚乳酸。制备这样的制剂的很多方法受专利保护或者通常为本领域技术人员所公知。参见，例

如，Sustainedand controlled Release Drug Delivery Systems，J.R.Robinson，ed.，Marcel Dekker，Inc.，New York，1978。

在某些实施方案中，本发明的抗体可配制为确保在体内的正确分布。例如，血-脑屏障(BBB)阻止了许多高度亲水性的化合物。为了确保本发明的治疗性化合物能够跨过BBB(如果需要时)，可将它们配制在如脂质体中。

嵌合抗原受体(CAR)

本发明的抗体或其抗原结合片段也可以用于制备嵌合抗原受体(CAR)，其被导入T细胞或NK细胞后，可以用于相关肿瘤的细胞治疗(CAR-T或CAR-NK疗法)。因此，本发明也涵盖包含本发明的抗体或其抗原结合片段的嵌合抗原受体(CAR)、包含所述CAR的CAR-T或CAR-NK细胞，以及所述CAR-T或CAR-NK细胞在治疗肿瘤中的用途。

联合治疗

本发明的多肽、抗体或其抗原结合片段、抗体缀合物或药物组合物可以与化疗剂或靶向其他肿瘤抗原的抗体联合施用。

本发明的多肽、抗体或其抗原结合片段、抗体缀合物或药物组合物组合使用的化疗剂或靶向其他肿瘤抗原的抗体没有特别限制。所述化疗剂和靶向其他肿瘤抗原的抗体的实例包括但不限于：异环磷酰胺、环磷酰胺、达卡巴嗪、替莫唑胺、尼莫司汀、白消安、美法仑、依诺他宾、卡培他滨、卡莫氟、克拉屈滨、吉西他滨、阿糖胞苷、替加氟、替加氟-尿嘧啶、TS-1、去氧氟尿苷、奈拉滨、羟基脲、氟尿嘧啶、氟达拉滨、培美曲塞、喷司他丁、巯嘌呤、甲氨蝶呤、伊立替康、依托泊苷、艾立布林、索布佐生、多西他赛、紫杉醇、长春瑞滨、长春新碱、长春地辛、长春碱、放线菌素D、阿柔比星、氨柔比星、伊达比星、表柔比星、净司他丁酯、柔红霉素、多柔比星、吡柔比星、博来霉素、培洛霉素、丝裂霉素C、米托蒽醌、奥沙利铂、卡铂、顺铂、奈达铂、阿那曲唑、依西美坦、炔雌醇、氯地孕酮、戈舍瑞林、他莫昔芬、地塞米松、比卡鲁胺、托瑞米芬、氟他胺、泼尼松龙、磷雌酚、米托坦、甲睾酮、亮丙瑞林、来曲唑、甲基安宫黄体酮、替伊莫单抗、伊马替尼、依维莫司、厄洛替尼、吉非替尼、舒尼替尼、西妥昔单抗、索拉非尼、达沙替尼、他米巴罗汀、曲妥珠单抗、维甲酸、帕木单抗、贝伐单抗、硼替佐米、和拉帕替尼。

本发明的多肽、抗体或其抗原结合片段、抗体缀合物和所述化疗剂或靶向其他肿瘤抗原的抗体可以全部在一次施用或分开施用。当分开施用时(采用互相不同的施用方案的情况下)，它们可以连续施用而不中断或以预定的间隔施用。

本发明的多肽、抗体或其抗原结合片段、抗体缀合物和所述化疗剂或靶向其他肿瘤抗原的抗体在本发明的药物组合物中的组合剂量没有特别限制。如上所述，本发明的抗体的剂量可以通过参考当所述抗体单独使用时的剂量来确定。所述化疗剂和靶向其他肿瘤抗原的抗体可以根据各自药物标明的剂量使用或可以减少(考虑到和本发明的

抗体的组合效果)。

本发明的多肽、抗体或其抗原结合片段、抗体缀合物或本发明的药物组合物还可以与放疗联合，例如包括向患者施用电离辐射，其早于、在其过程中和/或晚于本发明的抗体或药物组合物的施用过程。

检测和诊断

在另一方面，本发明还提供检测生物学样品中 cTAGE5 蛋白的存在或 cTAGE5 蛋白的表达水平的方法，包括在本发明的抗体如单克隆抗体或其抗原结合片段与 cTAGE5 蛋白之间能够形成复合物的条件下，使所述生物学样品和任选的对照样品接触本发明的抗体如单克隆抗体或其抗原结合片段。然后检测复合物的形成，其中所述生物学样品中复合物的形成或所述生物学样品与对照样品之间复合物形成的差异指示样品中 cTAGE5 蛋白的存在或 cTAGE5 蛋白的表达水平。在一些实施方案中，所述 cTAGE5 蛋白具有胞外区。在一些实施方案中，所述 cTAGE5 胞外区包含 SEQ ID NO:1 所示氨基酸序列，或包含与 SEQ ID NO:1 具有至少 80%、至少 90%、至少 95%序列相同性的氨基酸序列，或包含相对于 SEQ ID NO:1 具有一或多个(如 1 个、2 个、3 个、4 个、或 5 个)氨基酸取代、缺失或添加的氨基酸序列。在一些实施方案中，所述 cTAGE5 胞外区包含 SEQ ID NO:2 所示氨基酸序列，或包含与 SEQ ID NO:2 具有至少 80%、至少 90%、至少 95%序列相同性的氨基酸序列，或包含相对于 SEQ ID NO:2 具有一或多个(如 1 个、2 个、3 个、4 个、或 5 个)氨基酸取代、缺失或添加的氨基酸序列。

在一些实施方案中，所述对照生物学样品是来自健康个体的生物学样品。在一些实施方案中，所述对照生物学样品是来自已知不具有肿瘤的个体的生物学样品。

在一些实施方案中，所述生物学样品是离体样品。所述生物学样品包括但不限于组织样品、血液样品、淋巴样品等。

在一些实施方案中，所述生物学样品是组织切片。在一些实施方案中，所述方法是免疫组化测定。在一些实施方案中，所述方法是免疫荧光测定。

本发明令人惊奇地发现包含 SEQ ID NO:1 所示氨基酸序列的 cTAGE5 在恶性黑色素瘤以及鳞癌中高表达；而包含 SEQ ID NO:2 所示氨基酸序列的 cTAGE5 在大多数常见肿瘤中都高表达。因此，本发明针抗体如单克隆抗体或其抗原结合片段可以用于筛查或诊断与 cTAGE5 相关的肿瘤。

因此，本发明还提供了一种检测患者中肿瘤(如肿瘤细胞)的存在的方法，包括检测(例如通过本发明的方法检测)来自所述患者的生物学样品中的 cTAGE5 蛋白的存在或表达水平，其中所述患者的生物学样品中的 cTAGE5 的存在或所述患者的生物学样品中的 cTAGE5 的表达水平高于来自对照生物学样品的 cTAGE5 的表达水平，表示所述患者中存在肿瘤(如肿瘤细胞)。在一些实施方案中，所述 cTAGE5 蛋白具有胞外区。在一些实施方案中，所述 cTAGE5 胞外区包含 SEQ ID NO:1 所示氨基酸序列，或包含与 SEQ ID NO:1 具有至少 80%、至少 90%、至少 95%序列相同性的氨基酸序列，或包含

相对于 SEQ ID NO:1 具有一或多个(如 1 个、2 个、3 个、4 个、或 5 个)氨基酸取代、缺失或添加的氨基酸序列。在一些实施方案中，所述 cTAGE5 胞外区包含 SEQ ID NO:2 所示氨基酸序列，或包含与 SEQ ID NO:2 具有至少 80%、至少 90%、至少 95%序列相同性的氨基酸序列，或包含相对于 SEQ ID NO:2 具有一或多个(如 1 个、2 个、3 个、4 个、或 5 个)氨基酸取代、缺失或添加的氨基酸序列。在一些实施方案中，所述 cTAGE5 蛋白的胞外区包含 SEQ ID NO:1 所示氨基酸序列。在一些优选实施方案中，所述 cTAGE5 蛋白的胞外区包含 SEQ ID NO:2 所示氨基酸序列。在一些实施方案中，所述方法还可以通过检测编码所述 cTAGE5 胞外区(如 SEQ ID NO:1 或 SEQ ID NO:2)的 mRNA 分子的存在和/或量来间接检测 cTAGE5 蛋白的存在或表达水平。

在一些实施方案中，所述对照生物学样品是来自健康个体的生物学样品。在一些实施方案中，所述对照生物学样品是来自已知不具有肿瘤的个体的生物学样品。

在一些实施方案中，所述生物学样品是离体样品。所述生物学样品包括但不限于组织样品、血液样品、淋巴样品等。

在一些实施方案中，所述生物学样品是组织切片。在一些实施方案中，所述方法是免疫组化测定。在一些实施方案中，所述方法是免疫荧光测定。

在另一方面，本发明提供一种用于检测和/或诊断 cTAGE5 相关疾病例如肿瘤的诊断剂，其包含本发明的抗体如单克隆抗体或其抗原结合片段，以及任选的生理学上可接受的载体。在一些实施方案中，所述诊断剂是造影剂。

在另一方面，本发明提供了本发明的抗体如单克隆抗体或其抗原结合片段在制备用于检测和/或诊断 cTAGE5 相关疾病例如肿瘤的诊断剂中的用途。在一些实施方案中，所述诊断剂是造影剂。

在另一方面，本发明提供一种在对象中检测和/或诊断 cTAGE5 相关疾病例如恶性肿瘤的方法，包括给所述对象施用本发明的抗体如单克隆抗体或其抗原结合片段或本发明的诊断剂。

在本发明上述方面的一些实施方案中，本发明的抗体、单克隆抗体或其抗原结合片段还缀合有可用于检测或可被其他试剂检测到的荧光染料、化学物质、多肽、酶、同位素、标签等。

在本发明各方面的一些实施方案中，所述肿瘤是 cTAGE5 蛋白相关肿瘤，例如过表达 cTAGE5 蛋白的肿瘤。在一些实施方案中，所述 cTAGE5 蛋白具有胞外区。在一些实施方案中，所述 cTAGE5 胞外区包含 SEQ ID NO:1 所示氨基酸序列，或包含与 SEQ ID NO:1 具有至少 80%、至少 90%、至少 95%序列相同性的氨基酸序列，或包含相对于 SEQ ID NO:1 具有一或多个(如 1 个、2 个、3 个、4 个、或 5 个)氨基酸取代、缺失或添加的氨基酸序列。在一些实施方案中，所述 cTAGE5 胞外区包含 SEQ ID NO:2 所示氨基酸序列，或包含与 SEQ ID NO:2 具有至少 80%、至少 90%、至少 95%序列相同性的氨基酸序列，或包含相对于 SEQ ID NO:2 具有一或多个(如 1 个、2 个、3 个、4 个、或 5 个)氨基酸取代、缺失或添加的氨基酸序列。所述肿瘤的实例包括但不限于鼻

咽癌、恶性黑色素瘤、肺癌、神经胶质瘤、皮肤癌、舌咽癌、淋巴瘤(包括 B-细胞淋巴瘤或 T-细胞淋巴瘤)、肝癌、宫颈癌、甲状腺癌、结肠癌、卵巢癌、脑瘤、前列腺癌、乳腺癌、食道癌、胃癌、胰腺癌、直肠癌。在一些实施方案中，所述肿瘤是腺癌。在一些实施方案中，所述肿瘤是鳞癌。在一些实施方案中(例如 cTAGE5 胞外区包含 SEQ ID NO:1 所示氨基酸序列)，所述肿瘤选自鼻咽癌、恶性黑色素瘤、肺鳞癌、宫颈癌、皮肤癌、舌咽癌、食道鳞癌。在一些实施方案中(例如 cTAGE5 胞外区包含 SEQ ID NO:2 所示氨基酸序列)，所述肿瘤选自 B-细胞淋巴瘤、T-细胞淋巴瘤、恶性黑色素瘤、肺鳞癌、肺腺癌、肝癌、宫颈鳞癌、甲状腺癌、结肠腺癌、卵巢癌、脑瘤、皮肤鳞癌、前列腺癌、乳腺癌、食道鳞癌、食道腺癌、胃癌、胰腺癌、直肠癌。

试剂盒

本发明的范围内还包括用于本发明的方法的试剂盒，该试剂盒包括本发明的多肽、抗体如单克隆抗体或其抗原结合片段、抗体缀合物，以及使用说明。该试剂盒可以进一步包括至少一种另外的检测试剂，其用于检测本发明的多肽或单克隆抗体的存在。试剂盒一般包括表明试剂盒内容物的预期用途和/或使用方法的标签。术语标签包括在试剂盒上或与试剂盒一起提供的或以其他方式随试剂盒提供的任何书面的或记录的材料。

实施例

通过参考在此给出的一些具体实施例可获得对本发明的进一步的理解，这些实施例仅用于说明本发明，其无意于对本发明的范围做出任何限制。显然，可以对本发明作出多种改动和变化而不脱离本发明的实质，因此，这些改动和变化同样在本申请要求保护的范围内。

IHC 实验方法及过程

1) 60℃烤片 30 分钟，常规脱蜡水化；
2) 抗原修复：以 0.01M 柠檬酸缓冲液 (pH6.0)高压 2 分钟修复抗原，冷却至室温，磷酸盐缓冲液(PBS)洗 5 分钟×3 次
3) 用 3%H_2O_2-甲醇封闭内源性过氧化物酶，室温 10 分钟， PBS 洗 5 分钟×3 次；
4) 滴加正常非免疫动物血清，室温 10 分钟；
5) 除去血清，滴加一抗(多抗或 ID6 或 F11)稀释液，4℃ 冰箱过夜；
6) 用 0.1%Tween-20 PBS 洗 5 分钟×3 次；
7) 滴加生物素标记的羊抗鼠/兔 IgG，室温孵育 10 分钟；
8) 用 0.1%Tween-20 PBS 洗 5 分钟×3 次；
9) 滴加链霉菌抗生物素蛋白-过氧化酶，室温孵育 10 分钟；
10) DAB 显色 5 分钟，蒸馏水洗终止显色；

11) 苏木素复染、水洗、分化后充分水洗返蓝；

12) 常规脱水透明，中性树胶封片。

实施例 1、鉴定 cTAGE5 细胞膜外区域(胞外区)

cTAGE5 基因有二十多个外显子，由于选择性的转录造成数据库中存在 28 个 cTAGE5 剪接变体。28 个 cTAGE5 剪接变体的蛋白总结于表 1。

表 1、cTAGE5 的 28 个剪接变体的膜内外结构。有 8 个变体没有跨膜区，还有 8 个变体跨膜区外有相同的序列的短肽，另有 12 个变体膜外区除含有那 8 个变体的膜外短肽外，向 N-端又延长了一段。

cTAGE5 剪接变体类型	**剪接变体的名称**
没有跨膜区域 (8 个)	cTAGE5-variant7, cTAGE5-variant13, cTAGE5-variant14, cTAGE5-variant15, cTAGE5-variant16, cTAGE5-variant17, cTAGE5-variant18, cTAGE5-variant29,
跨膜区外有短肽 (8 个)	cTAGE5-variant4, cTAGE5-variant5, cTAGE5-va riant10, cTAGE5-variant11, cTAGE5-variant12, cTAGE5-variant20, cTAGE5-variant21, cTAGE5-variant22
跨膜区外有较长的肽 (12 个)	cTAGE5-variant1, cTAGE5-variant2 , cTAGE5-variant3, cTAGE5-variant6, cTAGE5-variant19, cTAGE5-variant23, cTAGE5-variant24, cTAGE5-variant25, cTAGE5-variant26, cTAGE5-variant27, cTAGE5-variant28, cTAGE5-variant30

之前在研究 cTAGE5 输送蛋白功能时，大多是以 cTAGE5 的 Mea6 变体，亦称 Mgea6 的序列作为研究对象。它是上述跨膜区外有较长的肽的 12 个剪接变体之一，其结构大致如图 1 所示。

之前研究 cTAGE5 的功能时，主要聚焦于 cTAGE5/Mea6 的膜内部分。研究发现，在 ER 的输出端(Lumen)与该处膜上的 TANGO1 形成复合物的 804 个氨基酸残基的 cTAGE5/Mea6，与 COPII 的框架蛋白 Sec12、Sec22、Sec23 相连，促使 COPII 输出胶原蛋白，但它并不离开膜而随着 COPII 而去。类似的研究大多研究 cTAGE5/Mea6 的细胞膜内的行为，其是人类细胞正常工作不可缺少的成分。cTAGE5/MEA6 膜外部分的氨基酸序列，被认为是信号肽，没有关于这部分序列的功能的报道。

跨膜区外有较长的肽的 12 个剪接变体中包含三种不同的 N-端延长序列：有 9 个变体具有 N-端延长序列：MEEPGVTPQPYLGLLLEELRRVVAALPEG (SEQ ID NO:1)；另外两个变体具有 N-端长序列：MELKSPEEEVVAALPEG(SEQ ID NO:2)；另一个变体的延长序列没有免疫原性，在此不做考虑。

在本文中，序列 MEEPGVTPQPYLGLLLEELRRVVAALPEG (SEQ ID NO:1)命名为 ZZS01；序列 MELKSPEEEVVAALPEG(SEQ ID NO:2)命名为 ZZS05。

包含 ZZS01 的示例性 cTAGE5 蛋白(cTAGE5 variant 1; Protein_id="NP_005921.2")氨基酸序列如下：

MEEPGVTPQPYLGLLLEELRRVVAALPEGMRPDSNLYGFPWELVICAAVVGFFAV
LFFLWRSFRSVRSRLYVGREKKLALMLSGLIEEKSKLLEKFSLVQKEYEGYEVESSLK

DASFEKEATEAQSLEATCEKLNRSNSELEDEILCLEKELKEEKSKHSEQDELMADISKR
IQSLEDESKSLKSQVAEAKMTFKIFQMNEERLKIAIKDALNENSQLQESQKQLLQEAE
VWKEQVSELNKQKVTFEDSKVHAEQVLNDKESHIKTLTERLLKMKDWAAMLGEDIT
DDDNLELEMNSESENGAYLDNPPKGALKKLIHAAKLNASLKTLEGERNQIYIQLSEV
DKTKEELTEHIKNLQTEQASLQSENTHFENENQKLQQKLKVMTELYQENEMKLHRKL
TVEENYRLEKEEKLSKVDEKISHATEELETYRKRAKDLEEELERTIHSYQGQIISHEKK
AHDNWLAARNAERNLNDLRKENAHNRQKLTETELKFELLEKDPYALDVPNTAFGRE
HSPYGPSPLGWPSSETRAFLSPPTLLEGPLRLSPLLPGGGGRGSRGPGNPLDHQITNER
GESSCDRLTDPHRAPSDTGSLSPPWDQDRRMMFPPPGQSYPDSALPPQRQDRFCSNSG
RLSGPAELRSFNMPSLDKMDGSMPSEMESSRNDTKDDLGNLNVPDSSLPAENEATGP
GFVPPPLAPIRGPLFPVDARGPFLRRGPPFPPPPPGAMFGASRDYFPPGDFPGPPPAPFA
MRNVYPPRGFPPYLPPRPGFFPPPPHSEGRSEFPSGLIPPSNEPATEHPEPQQET (SEQ ID
NO:415)

包含 ZZS05 的示例性 cTAGE5 蛋白(cTAGE5 variant 2; Protein_id="NP_976229.1")氨基酸序列如下：

MELKSPEEEVVAALPEGMRPDSNLYGFPWELVICAAVVGFFAVLFFLWRSFRSVR
SRLYVGREKKLALMLSGLIEEKSKLLEKFSLVQKEYEGYEVESSLKDASFEKEATEAQ
SLEATCEKLNRSNSELEDEILCLEKELKEEKSKHSEQDELMADISKRIQSLEDESKSLKS
QVAEAKMTFKIFQMNEERLKIAIKDALNENSQLQESQKQLLQEAEVWKEQVSELNKQ
KVTFEDSKVHAEQVLNDKESHIKTLTERLLKMKDWAAMLGEDITDDDNLELEMNSE
SENGAYLDNPPKGALKKLIHAAKLNASLKTLEGERNQIYIQLSEVDKTKEELTEHIKN
LQTEQASLQSENTHFENENQKLQQKLKVMTELYQENEMKLHRKLTVEENYRLEKEE
KLSKVDEKISHATEELETYRKRAKDLEEELERTIHSYQGQIISHEKKAHDNWLAARNA
ERNLNDLRKENAHNRQKLTETELKFELLEKDPYALDVPNTAFGREHSPYGPSPLGWPS
SETRAFLSPPTLLEGPLRLSPLLPGGGGRGSRGPGNPLDHQITNERGESSCDRLTDPHR
APSDTGSLSPPWDQDRRMMFPPPGQSYPDSALPPQRQDRFCSNSGRLSGPAELRSFN
MPSLDKMDGSMPSEMESSRNDTKDDLGNLNVPDSSLPAENEATGPGFVPPPLAPIRGP
LFPVDARGPFLRRGPPFPPPPPGAMFGASRDYFPPGDFPGPPPAPFAMRNVYPPRGFPP
YLPPRPGFFPPPPHSEGRSEFPSGLIPPSNEPATEHPEPQQET (SEQ ID NO:416)

实施例 2、多克隆抗体制备和免疫组化实验

将 ZZS01 和 ZZS05 的编码序列分别插入载体 pGEX-6p-1，并在 BL21 大肠杆菌分别表达 GST-ZZS01 和 GST-ZZS05 融合蛋白并纯化。用这两融合蛋白分别免疫兔子，收获针对 ZZS01 和 ZZS05 的兔血清。

利用所得的兔血清对 20 多种常见的肿瘤的组织切片进行免疫组化实验。结果显示，ZZS01 的多克隆抗体对恶性黑色素瘤和鳞癌敏感(对腺癌不敏感)，ZZZ05 的多克隆

抗体对这些肿瘤均敏感。代表性的兔多抗的 IHC 结果见图 2。

实施例 3、小鼠单克隆抗体制备和免疫组化实验

3.1、鼠单抗制备

GST-ZZS01 和 GST-ZZS05 两融合蛋白分别被用来制备鼠单抗。ZZS01 和 ZZS05 多肽分别用来选择特异性抗体的杂交瘤细胞。提取抗体高表达的杂交瘤细胞的总 RNA，用 RT-PCR 方法获得抗体的 mRNA 序列。两种抗体本身及其原有的信号肽一起分别插入 pCHO1.0、pcDNA3.1 两种载体在 CHO 中表达。表达的细胞培养液经离心后，进入 Protein-G 亲和柱。用 pH2.6 的甘氨酸溶液将抗体洗脱下来后，经过离子交换树脂进一步纯化。用合适的缓冲液浓缩后的抗体放入冰箱(-20℃)备用。

所获得的鼠单抗的序列信息如表 2 所示。

表 2、鼠单克隆抗体序列信息(下划线为 CDR)

鼠单克隆抗体名称	描述	SEQ ID NO	序列
1D6 (抗 zzs01)	全长重链	3	QIQLVQSGPELKKPGETVKISCKASGYTFTNYAVNWVIQAPGKGLKWMGWINAYTGEPTYADDFKGRFAFSLETSASTAYLQINNLKNEDMGIYFCARGGYDTYALDYWGQGTSVTVSSAKTTPPSVYPLAPGSAAQTNSMVTLGCLVKGYFPEPVTVTWNSGSLSSGVHTFPAVLQSDLYTLSSSVTVPSSTWPSETVTCNVAHPASSTKVDKKIVPRDCGCKPCICTVPEVSSVFIFPPKPKDVLTITLTPKVTCVVVDISKDDPEVQFSWFVDDVEVHTAQTQPREEQFNSTFRSVSELPIMHQDWLNGKEFKCRVNSAAFPAPIEKTISKTKGRPKAPQVYTIPPPKEQMAKDKVSLTCMITDFFPEDITVEWQWNGQPAENYKNTQPIMDTDGSYFVYSKLNVQKSNWEAGNTFTCSVLHEGLHNHHTEKSLSHSPGK
	全长轻链	4	DVVMTQTPLTLSVTIGQPASISCKSSQSLLYSNGKTYLSWFLQRPGQSPKRLIYLVSKLDSGVPDRFTGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYYCVQGTHFPFTFGSGTKLDIKRADAAPTVSIFPPSSEQLTSGGASVVCFLNNFYPKDINVKWKIDGSERQNGVLNSWTDQDSKDSTYSMSSTLTLTKDEYERHNSYTCEATHKTSTSPIVKSFNRNEC
	VH	5	QIQLVQSGPELKKPGETVKISCKAS<u>GYTFTNYA</u>VNWVIQAPGKGLKWMGW<u>INAYTGEP</u>TYADDFKGRFAFSLETSASTAYLQINNLKNEDMGIYFC<u>ARGGYDTYALDY</u>WGQGTSVTVSS
	VL	6	DVVMTQTPLTLSVTIGQPASISCK<u>SSQSLLYSNGKTY</u>LSWFLQRPGQSPKRLIY<u>LVS</u>KLDSGVPDRFTGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYYC<u>VQGTHFPFT</u>FGSGTKLDIK
	HCDR1	7	GYTFTNYA
	HCDR2	8	INAYTGEP
	HCDR3	9	ARGGYDTYALDY
	LCDR1	10	QSLLYSNGKTY
	LCDR2	11	LVS
	LCDR3	12	VQGTHFPFT
	全长重链	13	EVQLQQSGPELVKPGASVKISCKTSGYTFTEYTMHWVKQSHGKTLEWIGGIYPNNSGTRYNQKFRGKATLTADKSSSTAYMELRSLTTEDSAVYYCHRYELYWYFDVWGAGTTVTVSSAKTTPPSVYPLAPGSAAQTNSMVTLGCLVKGYFPEPVTVTWNSGSLSSGVHTFPAVLQSDLYTLSSSVTVPSSTWPSETVTCNVAHPASSTKVDKKIVPRDCGCKPCICTVPEVSSVFIFPPKPKDVLTITLTPKVTCVVVDISKDDPEVQFSWFVDDVEVHTAQTQPREEQFNSTFRSVSELPIMHQDWLNGKEFKCRVNSAAFPAPIEKTISKTKGRPKAPQVYTIPPPKEQMAKDKVSLTCMITDFFPEDITVEWQWNGQPAENYKNTQPIMDTDGSYFVYSKLNVQKSNWEAGNTFTCSVLHEGLHNHHTEKSLSHSPGK
	全长轻链	14	DIVLTQSPASLAVSLGQRATISCRASKSVSTAGYSYMHWYQQKP

F11 (抗 zzs05)			GQPPKLLIYLTSNLESGVPARFSGSGSGTDFTLNIHPVEEEDAATY YCQHSREVPYTFGGGTKLEIKRADAAPTVSIFPPSSEQLTSGGAS VVCFLNNFYPKDINVKWKIDGSERQNGVLNSWTDQDSKDSTYS MSSTLTLTKDEYERHNSYTCEATHKTSTSPIVKSFNRNEC
	VH	15	EVQLQQSGPELVKPGASVKISCKTSGYTFTEYTMHWVKQSHGK TLEWIGGIYPNNSGTRYNQKFRGKATLTADKSSSTAYMELRSLT TEDSAVYYCHRYELYWYFDVWGAGTTVTVSS
	VL	16	DIVLTQSPASLAVSLGQRATISCRASKSVSTAGYSYMHWYQQKP GQPPKLLIYLTSNLESGVPARFSGSGSGTDFTLNIHPVEEEDAATY YCQHSREVPYTFGGGTKLEIK
	HCDR1	17	GYTFTEYT
	HCDR2	18	IYPNNSGT
	HCDR3	19	HRYELYWYFDV
	LCDR1	20	KSVSTAGYSY
	LCDR2	21	LTS
	LCDR3	22	QHSREVPYT

3.2、免疫组化实验

根据下表 3 和表 4 所示，使用 1D6 抗体和 F11 抗体分别对肿瘤患者病理组织切片进行免疫组化检查。

表 3、1D6 抗体用于 IHC 的病人病理组织蜡块信息

蜡块编码	器官	病理类型	TNM
Des130745B4	食道	鳞状细胞癌III级	T3N1M0
Des130526B5	食道	鳞状细胞癌III级	T3N1M0
Rln100124B4	肺	鳞状细胞癌III级	T3N2M0
Rln140075B6	肺	鳞状细胞癌III级	T3N1M0
Kin070079B3	皮肤	鳞状细胞癌III级	T3N1M0
Kin040028B9	皮肤	鳞状细胞癌III级	T3N0M0
Fdu160107B5	宫颈	鳞状细胞癌 II 级	T1bN0MO
Fdu160110B7	宫颈	鳞状细胞癌 II 级	T1bN0MO
Doc140380B6	舌根	鳞状细胞癌 II 级	T2N0M0
Rla130028B6	左咽部	鳞状细胞癌 II 级	T3N1M0
Rns110055B6	鼻咽	鳞状细胞癌 II 级	T2N0M0
Kin060124B2	皮肤	恶性黑色素瘤(右足底)	T4N0M0
Kin060158B6	皮肤	恶性黑色素瘤(腹部)	T4N0M0

TNM：肿瘤临床分期系统，T、N、M、分别代表原发肿瘤大小状态、区域淋巴转移状态、有无远处转移(Tumor, Node, Metastasis)。

表 4、F11 抗体用于 IHC 的病人病理组织蜡块信息

蜡块编码	器官	病理类型	TNM
Dlv120009B2	肝脏	肝细胞肝癌III级	T2N0M0
Dlv110125B8	肝脏	肝细胞肝癌III级	T3N0M0
Dst150026B4	胃	腺癌III级	T3N1M0
Dst150034B20	胃	腺癌III级	T4N3M0
Fmg080053B8	乳腺	非特殊性浸润性导管癌III级	T2N1M0
Fmg150476B13	乳腺	非特殊性浸润性导管癌III级	T3N1M0
Dre160029B4	直肠	腺癌 II 级	T3N1M0
Dre160143B4	直肠	腺癌 II 级	T3N0M0
Etg170007B6	甲状腺	甲状腺乳头状癌	T4N0M0

Etg140027B7	甲状腺	甲状腺乳头状癌	T2N0M0
Mpr130014B9	前列腺	前列腺腺癌 Gleason4 级 (3+4)	T2N0M0
Mpr130032B4	前列腺	前列腺腺癌 Gleason3 级 (2+4)	T2N0M0
Fov160046B9	卵巢	粘液性癌	T1N0M0
Fov160002B8	卵巢	高级别浆液性癌	T1N0M0
Nct090046B10	大脑	少突胶质细胞瘤Ⅱ级	-
Nct130005B1	大脑	星形胶质细胞瘤Ⅱ级	-
Fdu160107B5	宫颈	鳞状细胞癌Ⅱ级	T1bN0MO
Fdu160110B7	宫颈	鳞状细胞癌Ⅱ级	T1bN0MO
Ily060231B2	淋巴结	(颈部)T 细胞淋巴瘤	-
Ily060244B3	淋巴结	(右颈部)弥漫性 T 细胞淋巴瘤	-
Ily060329B2	淋巴结	(左颈)弥漫性大 B 细胞淋巴瘤	-
Ily060385B2	淋巴结	(腹股沟)弥漫性大 B 细胞淋巴瘤	-
Rln060561B2	肺	腺癌Ⅲ级	T2N2M0
Rln070029B3	肺	腺癌Ⅲ级	T2N2M0
Rln100124B4	肺	鳞状细胞癌Ⅲ级	T3N2M0
Rln100055B2	肺	鳞状细胞癌Ⅲ级	T2N3M0
Des070256B6	食道	腺癌Ⅲ级	T3N1M0
Des051252B10	食道	腺癌Ⅲ级	T40N0M0
Des130745B4	食道	鳞状细胞癌Ⅲ级	T3N1M0
Des130526B5	食道	鳞状细胞癌Ⅲ级	T3N1M0
Dpa130297B2	胰腺	腺癌Ⅱ级	T4N0M0
Dpa030841B15	胰腺	腺癌Ⅲ级	T2N0M0
Dco120211B5	结肠	腺癌Ⅲ级	T3N1M0
Dco130380B3	结肠	腺癌Ⅲ级	T3N1M0
Kin070079B3	皮肤	(面部)鳞状细胞癌Ⅲ级	T3N1M0
Kin040028B9	皮肤	(头皮)鳞状细胞癌Ⅲ级	T3N0M0
Kin060124B2	皮肤	(右足底)恶性黑色素瘤	T4N0M0
Kin060158B6	皮肤	(腹部)恶性黑色素瘤	T4N0M0

TNM：肿瘤临床分期系统，T、N、M、分别代表原发肿瘤大小状态、区域淋巴转移状态、有无远处转移(Tumor, Node, Metastasis)。

结果表明，单克隆抗体 1D6 和 F11 对肿瘤细胞识别的特异性与实施例 2 中多克隆抗体的结果一致。抗体 1D6 能够特异性识别恶性黑色素瘤和鳞癌(包括全部表 3 中的肿瘤：鼻咽癌、恶性黑色素瘤、肺鳞癌、宫颈癌、皮肤癌、舌咽癌、食道鳞癌)；F11 则能特异性识别全部所测的肿瘤(表 4 中的肿瘤：B-细胞淋巴瘤、T-细胞淋巴瘤、恶性黑色素瘤、肺鳞癌、肺腺癌、肝癌、宫颈鳞癌、甲状腺癌、结肠腺癌、卵巢癌、脑瘤、皮肤鳞癌、前列腺癌、乳腺癌、食道鳞癌、食道腺癌、胃癌、胰腺癌、直肠癌)。同时，这些抗体并不结合癌旁组织 (正常细胞)。代表性的免疫组化结果见图 3。

这些结果提示，含 ZZS01 的 cTAGE5 蛋白在人恶性黑色素瘤和人鳞癌组织细胞中过表达，含 ZZS05 的 cTAGE5 蛋白在所做过的肿瘤免疫组化的实验中，所有的肿瘤组织细胞都有过表达。因此，ZZS01 为人恶性黑色素瘤和人鳞癌组织细胞特异性抗原表位，ZZS05 为人肿瘤组织细胞特异性抗原表位。

3.3、鼠源抗体亲和力测定

分别使用抗原 ZZS01 和 ZZS05 通过 Biacore 方法测定单克隆鼠源抗体 1D6 或 F11 的抗原结合亲和力。

一般通用过程：

1. 流动相缓冲液准备：10 倍的 HBS-EB+缓冲液稀释至 10 倍；
2. 25℃测试，流动相是 HBS-EP+缓冲液；
3. 抗原注入到包被到羊抗 GST 的抗体上的传感器芯片 CM5，固定好 GST-抗原融合蛋白；
4. 稀释的抗体注入到芯片的通道作为结合相，然后注入流动相作为解离相。

实验设置：

配体	抗原
抓取时间(s)	30
结合时间(s)	120
解离时间 (s)	360
流速 (μL/min)	30
样品浓度 (nM)	200, 100, 50, 25, 12.5, 6.25, 3.125 (F11) 2000, 1000, 500, 250, 125, 62.5, 31.25 (1D6)

结果如下所示：

鼠源抗体名	k_{on} (1/Ms)	k_{off}(1/s)	K_D (M)	抗原
1D6	2.48E+03	1.19E-05	4.82E-09	Zzs01
F11	1.37E+05	9.49E-04	6.90E-09	Zzs05

3.4、鼠源抗体人源化

NIH 的 Protein Blast 被用来寻找接近于 1D6 或 F11 的 Protein Data Bank (PDB)人源抗体 VH 以及 VL 的氨基酸序列。通过对氨基酸序列比对后，对应的空间结构作为 1D6 VH、1D6 VL、F11 VH、F11 VL 的模板，在 CCP4[5]中的模型建立和结构显示软件 WinCoot 上，将 PDB 里不同于它们各自的氨基酸序列换掉，构建了 1D6 VH，1D6 VL、F11 VH、F11 VL 各自的空间结构模型。将每个抗体的 VH 和 VL 比对 PDB 的相对位置组装起来而形成了一个可变区的 3D 空间模型。用软件 GROMACS[6]进行结构的能量最低的极值计算，从而得到计算机模拟的 1D6 可变区和 F11 可变区的空间结构模型。

1D6 人源化

对应于 1D6 VH 的 PDB 的结构和氨基酸序列是 1IHI，对应于 1D6 VL 的 PDB 的结构和氨基酸序列是 5MYX。在 WinCoot 上换掉不同于 1D6 可变区的氨基酸残基。每换一个都看看对结构是否合理，结果都合理，没有一个会影响模型的二级结构。用 GROMACS 进行结构的能量最低的极值计算，获得了计算机模拟的 1D6 的 3D 空间结构。

BioPhi[4]软件用来做 1D6 可变区人源化：

人源化设置：用 Chothia[1]氨基酸编号，用 IMGT[2, 3]定义 CDR

人源化方法一：Sapiens, 人源化迭代 4 次，阈值大于或等于 10%。

Sapiens 人源化的 1D6 可变区:

>Antibody1 VH (Humanized Antibody 1D6 Sapiens 4iter parental Imgt CDRs BioPhi)

QVQLVQSGSELKKPGASVKISCKASGYTFTNYAVNWVRQAPGQGLEWMGWINA
YTGEPTYAQDFTGRFVFSLDTSVSTAYLQINNLKAEDTAIYFCARGGYDTYALDYWG
QGTLVTVSS (SEQ ID NO:23)

>Antibody1 VL (Humanized Antibody 1D6 Sapiens 4iter parental Imgt CDRs BioPhi)

DVVMTQSPLSLPVTPGQPASISCRSSQSLLYSNGKTYLSWFLQRPGQSPRRLIYLV
SKRDSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCVQGTHFPFTFGQGTKLDIK(SE
Q ID NO:24)

人源化方法二：Graft，重轻链的 germline 均为自动，阈值大于或等于 10%, 其结果是：

>Antibody1 VH (Humanized Antibody 1D6 Imgt Straight graft auto auto BioPhi)

QVQLVQSGSELKKPGASVKVSCKASGYTFTNYAMNWVRQAPGQGLEWMGWIN
AYTGEPTYAQGFTGRFVFSLDTSVSTAYLQISSLKAEDTAVYYCARGGYDTYALDYW
GQGTTVTVSS(SEQ ID NO:25)

>Antibody1 VL (Humanized Antibody 1D6 Imgt Straight graft auto auto BioPhi)

DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCRSSQSLLYSNGKTYLNWFQQRPGQSPRRLIYLV
SNRDSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCVQGTHFPFTFGPGTKVDIK(SE
Q ID NO:26)

F11 人源化

对应于 F11 VH 的 PDB 的结构和氨基酸序列是 6TKC，对应于 F11 VL 的 PDB 的结构和氨基酸序列是 5FB8。在 WinCoot 上换掉不同于 F11 可变区的氨基酸残基。每换一个都看看对结构是否合理，结果都合理，没有一个会影响模型的二级结构。用 GROMACS 进行结构的能量最低的极值计算，获得了计算机模拟的 F11 的 3D 空间结构。

BioPhi 软件用来做 F11 可变区人源化

人源化设置：用 Chothia 氨基酸编号，用 IMGT 定义 CDR

人源化方法一：Sapiens, 人源化迭代 4 次，阈值大于或等于 10%

Sapiens 人源化的 F11 可变区:

>Antibody1 VH (Humanized Antibody F11 Sapiens 4iter parental Imgt CDRs BioPhi)

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKTSGYTFTEYTMHWVRQAPGQGLEWMGWI
YPNNSGTNYAQKFQGRVTLTADTSTSTAYMELRSLTSDDTAVYYCHRYELYWYFDVW
GRGTLVTVSS(SEQ ID NO:27)

>Antibody1 VL (Humanized Antibody1 Sapiens 4iter parental Imgt CDRs BioPhi)

DIVLTQSPASLAVSPGERATISCRASKSVSTAGYSYLHWYQQKPGQPPKLLIYLTS NRASGVPDRFSGSGSGTDFTLTISRVEAEDVAVYYCQHSREVPYTFGQGTKLEIK(SEQ ID NO:28)

人源化方法二：Graft，重轻链的 germline 均为自动，阈值大于或等于 10%， 其结果是：

>Antibody1 VH (Humanized Antibody F11 Imgt Straight graft auto auto BioPhi)

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTEYTMHWVRQAPGQRLEWMGWI YPNNSGTKYSQKFQGRVTITRDTSASTAYMELSSLRSEDTAVYYCHRYELYWYFDVW GRGTLVTVSS(SEQ ID NO:29)

>Antibody1 VL (Humanized Antibody1 Imgt Straight graft auto auto BioPhi)

DIVLTQSPASLAVSPGQRATITCRASKSVSTAGYSYIHWYQQKPGQPPKLLIYLTS NKDTGVPARFSGSGSGTDFTLTINPVEANDTANYYCQHSREVPYTFGQGTKLEIK(SEQ ID NO:30)

将 1D6 和 F11 人源化的序列带入计算机模拟的 1D6 和 F11 的 3D 结构中，没看到二级结构的改变，经能量极小极值计算后的二级结构没有明显的变化。人源化的 1D6 和 F11 能够保留其亲本抗体的结合能力。

实施例 4、单克隆抗体在小鼠中抑制肿瘤生长

本实施例研究抗体 F11 对人恶性黑色素瘤或人三阴性乳腺癌 CB-17 SCID 小鼠皮下移植瘤模型体内肿瘤增殖的影响。

A-375 细胞(恶性黑色素瘤细胞系)和 HCC1937 细胞(人乳腺癌细胞)购自 American Tissue Culture Collection (ATCC, Rockville, MD, USA)。

CB-17 SCID 小鼠，体重 18~20g，雌性，由北京维通利华提供(许可证号:SCXK(京)2016-0006)，饲养与 SPF 级饲养环境中，室内温度控制在 23±2℃，自由饮食和摄水。动物总数 32 只。接种前适应性饲养 3 天。

取对数生长期 A-375 细胞或 HCC1937 细胞，制备细胞悬液浓度为 2.5×10^6 细胞/ml，裸鼠右腋下接种 0.2ml/只，建立 A-375 细胞或 HCC1937 小鼠移植瘤模型。肿瘤细胞接种的次日，将每种肿瘤小鼠随机分成实验组(8 只)和对照组(8 只)，并标上记号，然后给药。

给药设计：尾静脉注射 F11 或缓冲液，共 4 次。肿瘤细胞接种的次日第一次给药，为给药的第 1 天，以后在第 3、7、13 天再给药。其中，实验组给 F11(10mg/Kg)，空白对照组给缓冲液(与 F11 等体积)。见表 5。

表 5、小鼠肿瘤实验设计

小鼠接种的肿瘤	实验方式	给药
A-375	实验组	F11
A-375	空白对照组	F11 的缓冲液
HCC1937	实验组	F11
HCC1937	空白对照组	F11 的缓冲液

用游标卡尺测量小鼠移植瘤直径。使用测量瘤径的方法，动态观察被试物抗肿瘤的效应。肿瘤直径的测量次数为每 3 天测 1 次，同时每 3 天检查一次小鼠体重。肿瘤细胞接种第 60 天后，二氧化碳法处死所有小鼠，剖腹观察，摘除肿瘤，仔细剔除无关组织，用 D-Hanks 液洗涤 2~3 次，洗去血液，沥干水分保存，称取重量和测量体积。肿瘤体积 (tumor volume，TV) 的计算公式为：

肿瘤体积测量计算(mm^3)= 0.5 [w1×$(w2)^2$]，W1 为最大的直径(mm)，W2 是垂直于 W1 的直径(mm)。

数据组间统计学差异采用 one-way ANOVA 和 Tukey's 检验，P 值小于 0.05 认为有显著性差异。

A-375 细胞移植瘤实验结果如图 4 所示，各组小鼠体重之间没有显著区别；与空白对照组相比，F11 组肿瘤体积显著减少。提示单克隆抗体 F11 可以抑制 A-375 细胞移植肿瘤的生长。(3 个对照小鼠在接种肿瘤细胞后 60 天内死亡)

HCC1937 细胞移植瘤实验结果如图 5 所示，各组小鼠体重之间没有显著区别；与空白对照组相比，F11 组肿瘤体积显著减少。提示单克隆抗体 F11 可以抑制 HCC1937 细胞移植肿瘤的生长。(2 个对照小鼠在接种肿瘤细胞后 60 天内死亡)

实施例 5、全人单克隆抗体的制备和表征

融合蛋白 GST-ZZS01 和 GST-ZZS05 分别免疫 CAMouse(重庆金迈博生物科技有限公司的免疫基因人源化小鼠，专利申请公开号：CN 108486126 A)。常规免疫完成后，取小鼠脾脏和骨髓研磨重悬后，使用 Histopaque®-1083 进行密度梯度离心富集单核细胞。用 CD138+试剂盒分离 CD138+的 B 细胞。分离出浆细胞后，用下面两种方法获取人源抗体：

1. 将分离的浆细胞导入 Beacon 仪器(厂家：BLI，型号：BSN0079)。BEACON 针对目标蛋白获得的阳性克隆，然后进行抗体的基因测序。

2. 将 SP2/0 细胞悬液和脾(浆)细胞悬液混合，进行细胞融合。融合后，用融合培养基重悬融合后的细胞，混匀制成细胞悬液，然后铺到 96 孔细胞板中。将融合后的 96 孔细胞板放入 5.5% CO_2、37°C 二氧化碳培养箱进行培养 5-8 天。将细胞培养板中的上清吸入到相应的 ELISA 检测板中(包被了免疫抗原，检查抗原，反筛蛋白)，加杂交瘤母克隆上清(一抗)，37°C 中孵育 60 分钟后，加二抗 Anti-Human IgG (H&L) (GOAT) Antibody Peroxidase Conjugated (Min X Bv Ch Gt GP Ham Hs Ms Rb Rt & Sh Serum Proteins)，37°C 孵育 30 分钟。然后加 TMB 显色液，25°C 孵育 15 分钟后加 HCl 终止反应。将筛选出的阳性孔中的细胞进行有限稀释法进行细胞亚克隆。亚克隆后的 96 孔

板放入 37°C、5%-8%二氧化碳培养箱进行培养 6-11 天。筛选出单克隆抗体表达细胞后进行抗体的基因测序。

合并两种方法发现所获得的单克隆抗体表达细胞后，用 NGS 高通量测序方法来测抗体可变区的基因序列，获得抗体可变区序列。

测出的抗体基因对比 IMGT 数据库的基因序列[2, 3]，确认所有的抗体基因序列均为人的抗体基因序列。重组的人抗体用 CHO 表达，将表达出来的抗体采用 Biacore 方法(见前文实施例)测相对应的抗原亲和力。用 BioPhi[4] 软件获取 CDR 序列。抗体可变区氨基酸序列编号用 Chothia [1]的方法，用 IMGT[2, 3]方法定义确定 CDR。结果如表 6 和表 7 所示。

表 6、抗 zzs01 的人抗体列表

抗体编号	描述	SEQ ID NO	序列	亲和力 (K_D)
h1	VH	31	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYSMSWVRQAPGKGLEWVSSISSRSNYIYYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQVNSLRAEDTAVYYCARGSGSYYVFDYWGQGTLVTVSS	2.89E-10
	VL	32	EIVMTQSPATLSVSPGDRATLSCRASQSISSDLAWYQQKPGQAPRLLIYAASTRATGFPARFSGSGSGTEFTLTISSLQPEDFAVYYCQQYNNWPMYAFGQGTKLEIK	
	HCDR1	33	GFTFSSYS	
	HCDR2	34	ISSRSNYI	
	HCDR3	35	ARGSGSYYVFDY	
	LCDR1	36	QSISSD	
	LCDR2	37	AAS	
	LCDR3	38	QQYNNWPMYA	
h2	VH	39	QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSAHYMSWIRQAPGKGLEWVSYISPSSSYTVYADSVKGRFTISRDNAKNSLFLQMNSLRAEDTAVYYCAREGSPGGQGTLVTVSS	5.24E-09
	VL	40	DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCRPSQSLVDSDGNTYLSWFQQRPGQSPRRLIYKVSDRDSGVPDRFSGSGSVTDFTLKISRVEAEDVGIYYCMQGTHWPFTFGPGTKVDIK	
	HCDR1	41	GFTFSAHY	
	HCDR2	42	ISPSSSYT	
	HCDR3	43	AREGSP	
	LCDR1	44	QSLVDSDGNTY	
	LCDR2	45	KVS	
	LCDR3	46	MQGTHWPFT	
h3	VH	47	QVQLVQSGAEVKQPGASVKVSCKASGYTFTSYAMHWVRQAPGQRLEWMGWIHAGMGVTKSSQKFQGRITITRDTSASTAYMELSSLRSEDTAVYSCVRQQLGFDYWGQGTLVTVSS	3.29E-10
	VL	48	DIVMTQSPLSLPVTPGEPASIFCRSSQSLLHSNGNKYLDWYLQKPGQSPQLLIYLGSNRASGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCMQALQTPYTFGQGTKLEIK	
	HCDR1	49	GYTFTSYA	
	HCDR2	50	IHAGMGVT	
	HCDR3	51	VRQQLGFDY	
	LCDR1	52	QSLLHSNGNKY	
	LCDR2	53	LGS	
	LCDR3	54	MQALQTPYT	
h4	VH	55	QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSDHYMSWIRQTPGKGLEWVSYISSSGTYTNYADSVKGRFIISRDNAKNSLFLQMNSLRAEDTAVYYCAREGSPGGQGTLVTVSS	2.86E-09
	VL	56	DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCRSSQSLVFSDGNTYLNWFQQRPGQSPRRLIYKVSDRDPGVPERFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDIGVYYCMQGSHWPFTFGPGTKVDIK	
	HCDR1	57	GFTFSDHY	
	HCDR2	58	ISSSGTYT	
	HCDR3	59	AREGSP	
	LCDR1	60	QSLVFSDGNTY	
	LCDR2	61	KVS	

	LCDR3	62	MQGSHWPFT	
h5	VH	63	QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSDHYMSWIRQAPGKGL EWVAYISSSSTYTKYGDSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDT AVYYCAREGSPGGQGTLVTVSS	1.01E-08
	VL	64	DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCRSSQSLVFSDGNTYLSWFQQRPG QSPRRLIFKVSDRDSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRMEAEDVGVYY CMQGTQWPFTFGPGTKVDIK	
	HCDR1	65	GFTFSDHY	
	HCDR2	66	ISSSSTYTK	
	HCDR3	67	CAREGSP	
	LCDR1	68	QSLVFSDGNTY	
	LCDR2	69	KVS	
	LCDR3	70	MQGTQWPFT	
h6	VH	71	QVQLVESGGGLVKPGGTLRLSCEASGFTFSDHYMSWIRQAPGKGL EWVSYISSVSGYINYADSVKGRFTISRDNAKKSLYLQMNSLRAEDT AVYYCARGGERFFDYWGQGTLVTVSS	1.20E-09
	VL	72	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVLYNFNNKIYLAWYQQKP GQPPKLLISWASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYY CQQHYSTPLTFGGGTKVEIK	
	HCDR1	73	GFTFSDHY	
	HCDR2	74	ISSVSGYI	
	HCDR3	75	ARGGERFFDY	
	LCDR1	76	QSVLYNFNNKIY	
	LCDR2	77	WAS	
	LCDR3	78	QQHYSTPLT	
h7	VH	79	QVQLVESGGGLVKPGGTLRLSCEASGFTFSDHYMSWIRQAPGKGL EWVSYISSVSGYINYADSVKGRFTISRDNAKKSLYLQMNSLRAEDT AVYYCARGGERFFDYWGQGTLVTVSS	1.67E-09
	VL	80	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQNVLYNFNDKNYLAWYQQK PGQPPKLLISWASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVY YCQQHYSTPLTFGGGTKVEIK	
	HCDR1	81	GFTFSDHY	
	HCDR2	82	ISSVSGYI	
	HCDR3	83	ARGGERFFDY	
	LCDR1	84	QNVLYNFNDKNY	
	LCDR2	85	WAS	
	LCDR3	86	QQHYSTPLT	
h8	VH	87	QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCEASGFTFSDHYMSWIRQAPGKGL EWVSYISSSSGYTNYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDT AVYYCARGGERFFDYWGQGTLVTVSS	3.90E-09
	VL	88	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVLYSFNNKNYLAWYQQKP GQPPKLLIYWASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYY CQQHYSTPLTFGGGTKVEIK	
	HCDR1	89	GFTFSDHY	
	HCDR2	90	ISSSSGYT	
	HCDR3	91	ARGGERFFDY	
	LCDR1	92	QSVLYSFNNKNY	
	LCDR2	93	WAS	
	LCDR3	94	QQHYSTPLT	
h9	VH	95	QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCEASGFTFSDHYMSWIRQAPGKGL EWVSYISSSSGYTNYADSVKGRFTISRDNAKKSLYLQMNSLRAEDT AVYYCARGGERFFDYWGQGTLVTVSS	2.46E-09
	VL	96	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVLYSFNNKNYLAWYQQKS GQPPKLLISWASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYY CQQHYSTPLTFGGGTKVEIK	
	HCDR1	97	GFTFSDHY	
	HCDR2	98	ISSSSGYT	
	HCDR3	99	ARGGERFFDY	
	LCDR1	100	QSVLYSFNNKNY	
	LCDR2	101	WAS	
	LCDR3	102	QQHYSTPLT	
h10	VH	103	QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCEASGFTFSAHYMSWIRQAPGKGL EYVSYISSSSSYTNYVDSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRVEDT AVYYCAREGSPGGQGTLVTVSS	8.47E-11
	VL	104	DVVLTQSPLSLPVTLGQPASISCRSSQSLVDSDGNTYLSWFHQRPGQ SPRRLIYKVSDRDSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYC MEGTHWPFTFGPGTKVDIK	
	HCDR1	105	GFTFSAHY	

	HCDR2	106	ISSSSSYT	
	HCDR3	107	AREGSP	
	LCDR1	108	QSLVDSDGNTY	
	LCDR2	109	KVS	
	LCDR3	110	MEGTHWPFT	
h11	VH	111	QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCEASGFTFSAHYMSWIRQAPGKGL EYVSYISGSSSYTNYVDSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRVEDT AVYYCAREGSPGGQGTLVTVSS	6.52E-10
	VL	112	DVVLTQSPLSLPVTLGQPASISCRSSQSLVDSDGNTYLSWFHQRPGQ SPRRLIYKVSDRDSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYC MEGTHWPFTFGPGTKVDIK	
	HCDR1	113	GFTFSAHY	
	HCDR2	114	ISGSSSYT	
	HCDR3	115	AREGSP	
	LCDR1	116	QSLVDSDGNTY	
	LCDR2	117	KVS	
	LCDR3	118	MEGTHWPFT	
h12	VH	119	QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFSFSDSYMSWLRQAPGKGL EWVSYISSSSSYTKYTDSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMSSLRAEDT AVYYCAREGSPGGQGTLVTVSS	6.03E-09
	VL	120	DVVMTQSPLSLPVTLGQPASFSCRSSQSLVFTDGNTFLSWFLQRPG QSPRRLIYRVSNRDPGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYC MQGTQWPFTFGPGTKVDIK	
	HCDR1	121	GFSFSDSY	
	HCDR2	122	ISSSSSYT	
	HCDR3	123	AREGSP	
	LCDR1	124	QSLVFTDGNTF	
	LCDR2	125	RVS	
	LCDR3	126	MQGTQWPFT	
h13	VH	127	QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFSFSDSYMSWLRQAPGKGL EWVSYISSSSSYTKYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDT AVYYCAREGSPGGQGTLVTVSS	3.66E-09
	VL	128	DVVLTQSPLSLPVTLGQPASFSCRSSQSLVFTDGNTFLSWFLQRPGQ SPRRLIYRVSNRDPGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYC MQGTQWPFTFGPGTKVDIK	
	HCDR1	129	GFSFSDSY	
	HCDR2	130	ISSSSSYT	
	HCDR3	131	AREGSP	
	LCDR1	132	QSLVFTDGNTF	
	LCDR2	133	RVS	
	LCDR3	134	MQGTQWPFT	
h14	VH	135	QVQLVESGGGLVEPGGSLRLSCAASGFTFSDHYMSWIRQAPGRGL EWVSYISNSGGYTNYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAED TAVYYCAREGSPGGQGTLVTVSS	4.39E-09
	VL	136	DVVMTQSPLSLPVTLGQPASMSCRSSQSLVDSDGNTYLSWFQQRP GQSPRRLIYKVSDRDSGVPDRFSGGGSGTDFTLKISRVEAEDVGIYY CMQGTRWPFTFGPGTKVDIK	
	HCDR1	137	GFTFSDHY	
	HCDR2	138	ISNSGGYT	
	HCDR3	139	AREGSP	
	LCDR1	140	QSLVDSDGNTY	
	LCDR2	141	KVS	
	LCDR3	142	MQGTRWPFT	
h15	VH	143	QVQLVESGGGLVRPGGSLRLSCAASGFTFSDHYMSWIRQAPGKGL EWVSYISGSSSYTKYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDT AVYYCAREGSPGGQGTLVTVSS	5.78E-09
	VL	144	DVVLTQSPLSLPVTLGQPASISCRSSQSLVFSDGNTFLAWFQQRPGQ SPRRLIYRISNRDSGVPDRFSGSGSDTDFTLKISRVEAEDVGVYYCM QGTQWPFTFGPGTKVDIK	
	HCDR1	145	GFTFSDHY	
	HCDR2	146	ISGSSSYT	
	HCDR3	147	AREGSP	
	LCDR1	148	QSLVFSDGNTF	
	LCDR2	149	RIS	
	LCDR3	150	MQGTQWPFT	
h16	VH	151	QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCEASGFTFSAHYMSWIRQAPGKGL EYVSYISSSSSYTNYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDT AVYYCAREGSPGGQGTLVTVSS	2.17E-09

	VL	152	DVVLTQSPLSLPVTLGQPASISCRSSQSLVDSDGNTYLSWFHQRPGQSPRRLIYKVSDRDSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCMEGTHWPFTFGPGTKVDIK	
	HCDR1	153	GFTFSAHY	
	HCDR2	154	ISSSSSYT	
	HCDR3	155	AREGSP	
	LCDR1	156	QSLVDSDGNTY	
	LCDR2	157	KVS	
	LCDR3	158	MEGTHWPFT	
h17	VH	159	QVQLVESGGGLVEPGGSLRLSCAASGFTFSDHYMSWIRQAPGRGLEWVSYISNSGGYTNYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAREGSPGGQGTLVTVSS	3.18E-09
	VL	160	DVVMTQSPLSLPVTLGQPASMSCRSSQSLVDSDGNTYLSWFQQRPGQSPRRLIYKVSDRDSGVPDRFSGGGSGTDFTLKIRRVEAEDVGIYYCMQGTRWPFTFGPGTKVDIK	
	HCDR1	161	GFTFSDHY	
	HCDR2	162	ISNSGGYT	
	HCDR3	163	AREGSP	
	LCDR1	164	QSLVDSDGNTY	
	LCDR2	165	KVS	
	LCDR3	166	MQGTRWPFT	
18	VH	167	QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSASYMSWIRQAPGKGLEWVSYISSSSTYTNYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMDSLRAEDTAMYFCAREGSPGGQGTLVTVSS	3.46E-09
	VL	168	DVVMTQSPLSLPVTLGQSASISCRSSQSLVYSDGDTFLSWFQQRPGQSPRRLIYMVSNRDPGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGIYYCMQGTNWPFTFGPGTRVDIK	
	HCDR1	169	GFTFSASY	
	HCDR2	170	ISSSSTYT	
	HCDR3	171	AREGSP	
	LCDR1	172	QSLVYSDGDTF	
	LCDR2	173	MVS	
	LCDR3	174	MQGTNWPFT	
h19	VH	175	QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFSFSDSYMSWIRQAPGKGLEWVSYISSSSSYTNYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRVEDTAVYYCAREGSPGGQGTLVTVSS	3.53E-09
	VL	176	DVVLTQSPLSLPVTLGQPASISCRSSQSLVDSDGNTYLSWFQQRPGQSPRRLIYRVSNRDSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCMQGTHWPFTFGPGTKVDIK	
	HCDR1	177	GFSFSDSY	
	HCDR2	178	ISSSSSYT	
	HCDR3	179	AREGSP	
	LCDR1	180	QSLVDSDGNTY	
	LCDR2	181	RVS	
	LCDR3	182	MQGTHWPFT	
h20	VH	183	QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFSFSDSYMSWIRQAPGKGLEWVSYISSSSSYTNYVDSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRVEDTAVYYCAREGSPGGQGTLVTVSS	2.00E-09
	VL	184	DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCRSSQSLVDSDGNTYLSWFQQRPGQSPRRLIYRVSNRDSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCMQGTHWPFTFGPGTKVDIR	
	HCDR1	185	GFSFSDSY	
	HCDR2	186	ISSSSSYT	
	HCDR3	187	AREGSP	
	LCDR1	188	QSLVDSDGNTY	
	LCDR2	189	RVS	
	LCDR3	190	MQGTHWPFT	
h21	VH	191	QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSAHYMSWIRQAPGKGLEWVSYISPSSSYTVYADSVKGRFTISRDNAKNSLFLQMNSLRAEDTAVYYCAREGSPGGQGTLVTVSS	1.48E-09
	VL	192	DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCRSTQSLVDSDGNTYLSWFQQRPGQSPRRLIYKVSDRDSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDIGIYYCMQGTHWPFTFGPGTKVDIK	
	HCDR1	193	GFTFSAHY	
	HCDR2	194	ISPSSSYT	
	HCDR3	195	AREGSP	
	LCDR1	196	QSLVDSDGNTY	
	LCDR2	197	KVS	

	LCDR3	198	MQGTHWPFT	
h22	VH	199	QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSAHYMSWIRQAPGKGL EWVSYISPSSSYTVYADSVKGRFTISRDNAKNSLFLQMNSLRAEDT AVYYCAREGSPGGQGTLVTVSS	1.04E-10
	VL	200	DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCRSSQNLVDSDGNTYLSWFQQRPG QSPRRLIYKVSDRDSGVPDRFSGSGSGTDFTLKINRVEAEDIGIYYC MQGSHWPFTFGPGTKVDIK	
	HCDR1	201	GFTFSAHY	
	HCDR2	202	ISPSSSYT	
	HCDR3	203	AREGSP	
	LCDR1	204	QNLVDSDGNTY	
	LCDR2	205	KVS	
	LCDR3	206	MQGSHWPFT	
h23	VH	207	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGL EWVSGISGSVDITHHADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDT AVYYCVRGGFDYWGQGSLVTVSS	4.90E-10
	VL	208	DIQMTQSPSSVSASVGDRVTISCRASQDISTWLAWYQQKPGKAPRL LIYAASTLLIGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQTNSFP ITFGQGTRLEIK	
	HCDR1	209	GFTFSSYA	
	HCDR2	210	ISGSVDIT	
	HCDR3	211	VRGGFDY	
	LCDR1	212	QDISTW	
	LCDR2	213	AAS	
	LCDR3	214	QQTNSFPIT	
h24	VH	215	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMTWVRQAPGKGL EWVSGISGSIGITHHADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTA VYYCVRGGFDYWGQGSLVTVSS	7.79E-10
	VL	216	DIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCRASQDINTWLAWYQQKPGKAPK LLIYTSSTLLGGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFGTYYCQQTNT FPITFGQGTRLEIK	
	HCDR1	217	GFTFSSYA	
	HCDR2	218	ISGSIGIT	
	HCDR3	219	VRGGFDY	
	LCDR1	220	QDINTW	
	LCDR2	221	TSS	
	LCDR3	222	QQTNTFPIT	
h25	VH	223	EVQLVESGGGLVKRGGSLRLSCAASGFTFSSYSMHWVRQAPGKGL EWVSSISSRSTYIYYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLSAEDTA VYYCARGSGSYYVFDYWGQGTLVTVSS	3.20E-10
	VL	224	ELVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSVSSNLAWYQQKPGQAPRL LIYGASSRATNIPARFSGSGSGTEFTLTISSLQSEDFAVYYCQQYDN WPMYSFGQGTKLEIK	
	HCDR1	225	GFTFSSYS	
	HCDR2	226	ISSRSTYI	
	HCDR3	227	ARGSGSYYVFDY	
	LCDR1	228	QSVSSN	
	LCDR2	229	GAS	
	LCDR3	230	QQYDNWPMYS	
h26	VH	231	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMTWVRQAPGKGL EWVSGISGSVGITHHADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRVEDT AVYYCVRGGFDYWGQGSLVTVSS	4.31E-10
	VL	232	DIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCRASQDINTWLAWYQQKPGKAPK LLIYTTSTLLSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQTNT FPITFGQGTRLEIK	
	HCDR1	233	GFTFSSYA	
	HCDR2	234	ISGSVGIT	
	HCDR3	235	VRGGFDY	
	LCDR1	236	QDINTW	
	LCDR2	237	TTS	
	LCDR3	238	QQTNTFPIT	
h27	VH	239	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYSMSWVRQAPGKGL EWVSSISSRSNYIYYADSVKGRITISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTA VYYCARGSGSYYVFDYWGQGTLVTVSS	1.60E-10
	VL	240	ELVMTQSPATLSMSPGDRATLSCRASQSIRSDLAWYQQKPGQAPRL LIYDASTRATGIPARFSGSGSGTEFTLSISSLQSEDFAVYYCQQYNN WPMYTFGQGTKLEIK	
	HCDR1	241	GFTFSSYS	

	HCDR2	242	ISSRSNYI	
	HCDR3	243	ARGSGSYYVFDY	
	LCDR1	244	QSIRSD	
	LCDR2	245	DAS	
	LCDR3	246	QQYNNWPMYT	

表 7、抗 zzs05 的人抗体列表

抗体编号	描述	SEQ ID NO	序列	亲和力 (KD)
h28	VH	247	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSRYGIHWVRQAPGKGLEWVAVITYDGRKKFYADSVQGRFTISRDNSRNTLSLQMNSLRAEDTAVYYCAKDLLIGYGMDVWGQGTTVTVSS	1.09E-09
	VL	248	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVLFSSNNKNFLAWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDVALYFCQQCYSTPYTFGQGTKLEIK	
	HCDR1	249	GFTFSRYG	
	HCDR2	250	ITYDGRKK	
	HCDR3	251	AKDLLIGYGMDV	
	LCDR1	252	QSVLFSSNNKNF	
	LCDR2	253	WAS	
	LCDR3	254	QQCYSTPYT	
h29	VH	255	QVQLVESGGGVVQPGRSLTLSCAASGFTFSRYGMHWVRQAPGKGLEWVTVITYDGRKKYYADSVKGRFTISRDNSQNTLSLQMNSLRAEDTAVYYCAKDLLIGYGMDVWGQGTTVTVSS	1.20E-09
	VL	256	DIVMTQSPDSLAVSLGERATIKCKSSQSVFFSSSNKNFLTWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTINNLQAEDVTVYYCQQCFSTPYSFGQGTKLEIK	
	HCDR1	257	GFTFSRYG	
	HCDR2	258	ITYDGRKK	
	HCDR3	259	AKDLLIGYGMDV	
	LCDR1	260	QSVFFSSSNKNF	
	LCDR2	261	WAS	
	LCDR3	262	QQCFSTPYS	
h30	VH	263	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSRYGIHWVRQAPGKGLEWVAVITYDGRKKFYADSVKGRFTISRDNSRNTLSLQMNSLRAEDTAVYYCAKDLLIGYGMDVWGQGTTVTVSS	8.32E-10
	VL	264	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVLFSSNNKNFLAWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDVALYFCQQCYSTPYTFGQGTKLEIK	
	HCDR1	265	GFTFSRYG	
	HCDR2	266	ITYDGRKK	
	HCDR3	267	AKDLLIGYGMDV	
	LCDR1	268	QSVLFSSNNKNF	
	LCDR2	269	WAS	
	LCDR3	270	QQCYSTPYT	
h31	VH	271	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAVISYDGSNKYYADSVKGRFTISKDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKDLLAGYGMDVWGQGTTVTVSS	1.87E-07
	VL	272	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVLYSSNNKNFLAWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQYYSTPYTFGQGTKLEIK	
	HCDR1	273	GFTFSSYG	
	HCDR2	274	ISYDGSNK	
	HCDR3	275	AKDLLAGYGMDV	
	LCDR1	276	QSVLYSSNNKNF	
	LCDR2	277	WAS	
	LCDR3	278	QQYYSTPYT	
h32	VH	279	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVTVITYDGSRKFYADSVKGRFTISRDSSKNTLYLQMNSLRVEDTAVYYCAKDHLRGYGMDVWGQGTTVTVSS	8.17E-10
	VL	280	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVLFSSNNKNFLAWYQQKPGQPPVLLIKWASTRYSGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQYYSTPYTFGQGTKLEIK	
	HCDR1	281	GFTFSSYG	
	HCDR2	282	ITYDGSRK	
	HCDR3	283	AKDHLRGYGMDV	

	LCDR1	284	QSVLFSSNNKNF	
	LCDR2	285	WAS	
	LCDR3	286	QQYYSTPYT	
h33	VH	287	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSRYGIHWVRQAPGKGL EWVAVITYDGRKKYYADSVKGRFTISRDNSQNTLSLQMNSLTTED TGVYYCAKDLLIGYGMDVWGQGTTVTVSS	1.04E-09
	VL	288	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVLFSSNKKNFLTWYQQKP GQPPKLLIYWASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYY CQQCYSTPYSFGRGTKLEIK	
	HCDR1	289	GFTFSRYG	
	HCDR2	290	ITYDGRKK	
	HCDR3	291	AKDLLIGYGMDV	
	LCDR1	292	QSVLFSSNKKNF	
	LCDR2	293	WAS	
	LCDR3	294	QQCYSTPYS	
h34	VH	295	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSRYGIHWVRQAPGKGL EWVAVITYDGRKKFYADSVKGRFTISRDNSRNTLSLQMNSLRAED TAVYYCAKDLLIGYGLDVWGQGTTVTVSS	5.74E-10
	VL	296	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVLFSSNNKNFLAWYQQKP GQPPKLLIYWASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDVALYF CQQCYSTPYSFGQGTKLEIK	
	HCDR1	297	GFTFSRYG	
	HCDR2	298	ITYDGRKK	
	HCDR3	299	AKDLLIGYGLDV	
	LCDR1	300	QSVLFSSNNKNF	
	LCDR2	301	WAS	
	LCDR3	302	QQCYSTPYS	
h35	VH	303	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKG LEWVTVITYDGSRKFYADSVKGRFTISRDSSKNTLFLQMNSLRVED TAVYYCAKDHLRGYGMDVWGQGTTVTVSS	7.93E-10
	VL	304	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVLFSSNNKNFLAWYQQKP GQPPVLLIKWASTRYSGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYY CQQYYSTPYTFGQGTKLEIK	
	HCDR1	305	GFTFSSYG	
	HCDR2	306	ITYDGSRK	
	HCDR3	307	AKDHLRGYGMDV	
	LCDR1	308	QSVLFSSNNKNF	
	LCDR2	309	WAS	
	LCDR3	310	QQYYSTPYT	
h36	VH	311	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKG LEWVAVITYDGSKKYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAE DTAVYYCAKDRAVGYGMDAWGQGTTVTVSS	6.80E-9
	VL	312	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVLFSSNNKNFLAWYQQKS GQPPKQLIFWASIRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYS CQQYYSTPYTFGQGTKLEIK	
	HCDR1	313	GFTFSSYG	
	HCDR2	314	ITYDGSKK	
	HCDR3	315	AKDRAVGYGMDA	
	LCDR1	316	QSVLFSSNNKNF	
	LCDR2	317	WAS	
	LCDR3	318	QQYYSTPYT	
h37	VH	319	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKG LEWVAVITYDGSKKYYADSVKGRFTISKDNSKNTLYLQMNSLRAE DTAVFYCAKDRALGYGMDVWGQGTTVTVSS	6.25E-09
	VL	320	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQTVLFSSNNKNFLTWYQQKS GQPPKQIIYWASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTINSLQAEDVAVYY CQQYFSTPYTFGQGTKLEIK	
	HCDR1	321	GFTFSSYG	
	HCDR2	322	ITYDGSKK	
	HCDR3	323	AKDRALGYGMDV	
	LCDR1	324	QTVLFSSNNKNF	
	LCDR2	325	WAS	
	LCDR3	326	QQYFSTPYT	
h38	VH	327	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFNSYGMHWVRQAPGKG LEWVAVISKDGSKKYYADSVKGRFTISRDKSKNTLYLQMNSLRAE DTAVYYCAKDRALGYGMDVWGQGTTVTVSS	1.72E-09
	VL	328	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVLYSVNNKNFLTWYQQKP GQPPKQLIYWASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYY	

			CQHYYSTPYTFGQGTKLEIK	
	HCDR1	329	GFTFNSYG	
	HCDR2	330	ISKDGSKK	
	HCDR3	331	AKDRALGYGMDV	
	LCDR1	332	QSVLYSVNNKNF	
	LCDR2	333	WAS	
	LCDR3	334	QHYYSTPYT	
h39	VH	335	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKG LEWVAVITYDGSKKYYADSVKGRFTISKDNSKNTLYLQMNSLRAE DTAVFYCAKDRALGYGMDVWGQGTTVTVSS	3.57E-09
	VL	336	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQTVLFSSNNKNFLTWYQQKS GQPPKQIIYWASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYY CQQYFSTPYTFGQGTKLEIK	
	HCDR1	337	GFTFSSYG	
	HCDR2	338	ITYDGSKK	
	HCDR3	339	AKDRALGYGMDV	
	LCDR1	340	QTVLFSSNNKNF	
	LCDR2	341	WAS	
	LCDR3	342	QQYFSTPYT	
h40	VH	343	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFNSYGMHWVRQAPGKG LEWVAVISKDGSKKYYADSVKGRFTISRDKSKNTLYLQMNSLRAE DTAVYYCAKDRALGYGMDVWGQGTTVTVSS	2.59E-09
	VL	344	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVLYSVNNKNFLTWYQQKP GQPPKQLIYWASTRESGVPDRFSGSGSGTDFSLTISGLQAEDVAVY YCQHYYSAPYTFGQGTKLEIK	
	HCDR1	345	GFTFNSYG	
	HCDR2	346	ISKDGSKK	
	HCDR3	347	AKDRALGYGMDV	
	LCDR1	348	QSVLYSVNNKN	
	LCDR2	349	WAS	
	LCDR3	350	QHYYSAPYT	
h41	VH	351	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCVASGFTFSSYGMHWVRQAPGKG LEWVAVITYDGSKKYYADSVKGRFTISRDSSKNTLYLQMNSLRAE DTAVYYCAKDRAVGYGMDVWGQGTTVTVSS	3.00E-09
	VL	352	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVLYRSNNKNFLTWYQQKS GQSPKQLIYWASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYY CQQYYSTPYTFGQGTKLEIK	
	HCDR1	353	GFTFSSYG	
	HCDR2	354	ITYDGSKK	
	HCDR3	355	AKDRAVGYGMDV	
	LCDR1	356	QSVLYRSNNKNF	
	LCDR2	357	WAS	
	LCDR3	358	QQYYSTPYT	
h42	VH	359	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSRYGIHWVRQAPGKGL EWVAVISYHGSNKYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAED TAVYYCAKDRALGYGMDVWGQGTTVTVSS	2.98E-09
	VL	360	DIVVTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVLFNSNNKNFLTWYQQKP GQPPKQLIYWASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYY CQQYYSTPYAFGQGTKLEIK	
	HCDR1	361	GFTFSRYG	
	HCDR2	362	ISYHGSNK	
	HCDR3	363	AKDRALGYGMDV	
	LCDR1	364	QSVLFNSNNKNF	
	LCDR2	365	WAS	
	LCDR3	366	QQYYSTPYA	
h43	VH	367	QVQLVESGGGAVQPGRSLRLSCAASGFTFSRYGMHWVRQAPGKG LEWVAVITYDGSKKYYADSVKGRFTISRDNSKNTLSLQMNSLRAE DTAVYYCAKDRALGYGMDVWGQGTTVTVSS	5.42E-09
	VL	368	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVLYTANNKNFLTWYQQKS GQPPKQLIYWASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYY CQQYYSTPYTFGQGTKLEIK	
	HCDR1	369	GFTFSRYG	
	HCDR2	370	ITYDGSKK	
	HCDR3	371	AKDRALGYGMDV	
	LCDR1	372	QSVLYTANNKNF	
	LCDR2	373	WAS	
	LCDR3	374	QQYYSTPYT	
h44	VH	375	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCVASGFTFSSYGMHWVRQAPGKG	3.48E-09

			LEWVAVITYDGSKKYYADSVKGRFTISRDSSKNTLYLQMNSLRAE DTAVYYCAKDRAVGYGMDVWGQGTTVTVSS	
	VL	376	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVLYRSNNKNFLTWYQQKS GQSPKQLIYWASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYY CQQYYSTPYTFGQGTKLEIK	
	HCDR1	377	GFTFSSYG	
	HCDR2	378	ITYDGSKK	
	HCDR3	379	AKDRAVGYGMDV	
	LCDR1	380	QSVLYRSNNKN	
	LCDR2	381	WAS	
	LCDR3	382	QQYYSTPYT	
h45	VH	383	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKG LEWVAVISYDGSKKYYADSVKGRFTISRDISKNTLYLQMNSLRAED TAVYYCAKDRALGYGMDVWGQGTTVTVSS	5.56E-09
	VL	384	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVLYSANNKNFLTWYQQKP GQPPKQLIYWASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLIISSLQAEDVAVYY CQQYYSTPYTFGQGTKLEIK	
	HCDR1	385	GFTFSSYG	
	HCDR2	386	ISYDGSKK	
	HCDR3	387	AKDRALGYGMDV	
	LCDR1	388	QSVLYSANNKN	
	LCDR2	389	WAS	
	LCDR3	390	QQYYSTPYT	
h46	VH	391	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSRYGIHWVRQAPGKGL EWVAVISYHGSNKYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAED TAVYYCAKDRALGYGMDVWGQGTTVTVSS	3.95E-09
	VL	392	DIVVTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVLFNSNNKNFLTWYQQKP GQPPKQLIYWASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAIYY CQQYYSTPYAFGQGTKLEIK	
	HCDR1	393	GFTFSRYG	
	HCDR2	394	ISYHGSNK	
	HCDR3	395	AKDRALGYGMDV	
	LCDR1	396	QSVLFNSNNKNF	
	LCDR2	397	WAS	
	LCDR3	398	QQYYSTPYA	
h47	VH	399	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKG LEWVAVISYDGSKKYYADSVKGRFTISRDISKNTLYLQMNSLRAED TAVYYCAKDRALGYGMDVWGQGTTVTVSS	5.55E-09
	VL	400	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVLYSANNKNFLTWYQQKP GQPPKQLIYWASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLIISSLQAEDVAVYY CQQYYSTPYTFGQGTKLEIK	
	HCDR1	401	GFTFSSYG	
	HCDR2	402	ISYDGSKK	
	HCDR3	403	AKDRALGYGMDV	
	LCDR1	404	QSVLYSANNKN	
	LCDR2	405	WAS	
	LCDR3	406	QQYYSTPYT	
h48	VH	407	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFNSYGMHWVRQAPGKG LEWVAVISKDGSKKYYADSVKGRFTISRDKSKNTLYLQMNSLRAE DTAVYYCAKDRALGYGMDVWGQGTTVTVSS	3.63E-09
	VL	408	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVLYSVNNKNFLTWYQQKP GQPPKQLIYWASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYY CQHYYSTPYTFGQGTKLEIK	
	HCDR1	409	GFTFNSYG	
	HCDR2	410	ISKDGSKK	
	HCDR3	411	AKDRALGYGMDV	
	LCDR1	412	QSVLYSVNNKN	
	LCDR2	413	WAS	
	LCDR3	414	QHYYSTPYT	

相应的重链恒定区和轻链恒定区序列如下：

重链恒定区(SEQ ID NO:417)：

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPA

VLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPA
PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK
TKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPRE
PQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGS
FFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

轻链恒定区(SEQ ID NO:418)：

RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQES
VTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

实施例 6、全人单克隆抗体介导的对于肿瘤类器官细胞的 ADCC 作用

6.1 检测人源抗 ZZS05 抗体 h32 (也命名为 A-1P13)介导的 NK 细胞对胰腺癌和小细胞肺癌的肿瘤类器官细胞的 ADCC 作用 (北京大橡科技有限公司)

实验细胞：

类器官：胰腺癌类器官 DXPC-ZY-001(来自 III 期中低分化胰腺癌患者)、小细胞肺癌类器官 DXSCLC-ZY-001(来自 IV 期低分化小细胞肺癌患者)

NK 细胞：商售 PBMC 扩增 NK 细胞 DXNK-ZY-001

实验抗体：

人源抗 ZZS05 抗体 A-1P13 (实验组)

人源化的抗流感病 A 蛋白 HA 的抗体的 IgG1(H7N9(A/Anhui/2013))(对照组)

实验概述：

基于 384 孔板构建肿瘤类器官和免疫细胞共培养模型。取培养好的肿瘤类器官，消化成单细胞后，进行活细胞示踪染色(Calcein, AM)，将类器官肿瘤细胞与待测药物 A-1P13 共同孵育 20 分钟，按照效靶比 5:1 将 NK 细胞与肿瘤类器官细胞进行共培养，孵育 5 小时后进死细胞示踪染色(SYTOX-Red)，上机流式细胞仪检测。

实验分组：

序号	分组	药物	药物浓度（μg/mL）	效靶比	生物学重复	共培养时间
1	单类器官	PBS	NA	5:1	3	5 h
2	NK+类器官	PBS	NA			
3	NK+类器官	IgG1	1			
4	NK+类器官	A-1P13	10			
5	NK+类器官	A-1P13	1			
6	NK+类器官	A-1P13	0.1			

实验结果：

胰腺癌类器官的结果如图 6A 所示。对 ADCC 模型中肿瘤类器官的凋亡进行统计分析。T Test “*”：P＜0.05，“**”：P＜0.01。与单类器官(O)组相比，O+NK+PBS/IgG 组的类器官凋亡显著上升，O+NK+PBS 和 O+NK+IgG 两组之间无显著性差异。与 O+NK+PBS 和 O+NK+IgG 相比，10μg/mL 加药组的类器官凋亡上升最为显著。加药组之间无显著性差异。

小细胞肺癌类器官的结果如图 6B 所示。对 ADCC 模型中肿瘤类器官的凋亡进行统计分析。T Test “*”：P＜0.05，“**”：P＜0.01。与 O+NK+PBS 组相比，加了 A-1P13 药物组的类器官凋亡显著上升，O+NK+PBS 和 O+NK+IgG 两组之间无显著性差异。与 O+NK+PBS 相比，0.1μg/mL 加药组的类器官凋亡上升最为显著。加药组之间无显著性差异。

6.2 检测人源抗 ZZS05 抗体 h35 (也命名为 A-1P22)对不同肿瘤类器官的作用 (上海捷方凯瑞生物技术有限公司)

试验设计：

1) 结直肠癌(CRC)、肺癌(LC)、胃癌(GC)、子宫内膜癌(EC)、乳腺癌(BC)、胰腺癌(PADC)、肝癌(HCC)、卵巢癌(AOC)类器官的构建；

2) 类器官构建完成后，分为类器官+PBS 组、类器官+NK 细胞组、类器官+NK 细胞+候选抗体(h35)组、类器官+NK 细胞+与肿瘤无关的抗体(兔抗人 PSA 抗体)组；

3) 类器官与候选抗体，NK 细胞共培养：类器官在 96 孔板培养，分为类器官+PBS 组、类器官+NK 细胞组、类器官+NK 细胞+候选抗体组、类器官+NK 细胞+与肿瘤无关的抗体组。细胞活体成像连续拍照类器官生长明场图；连续用药 48 小时候后，进行细胞活死染色，拍照；检测类器官活性、LDH 释放；

4) 每组各三个孔为生物学重复。

试验方法：

类器官原代培养

(1) 取材后的癌组织须在 2 - 8℃清洗，准备若干培养皿，加入 4℃预冷的原代培养缓冲液备用(添加双抗和庆大霉素)。

(2) 将组织放入培养皿中，利用原代培养缓冲液 B 清洗三次后，去除杂质，利用眼科剪或手术刀将癌组织轻柔按压，除去部分红细胞，剪切成体积约为 1-3 mm^3 的组织块。

(3) 组织用原代组织消化液 C 消化，37℃震荡消化 25-30 min (消化过程中随时观察消化情况)。

(4) 取少量液体在显微镜下观察，镜下观察到较多的隐窝，加入三倍体积原代培养缓冲液终止消化。

(5) 使用 100μm 孔径的筛网进行过滤，将滤液收集后，于 300g 富集离心 5min 后

移去上清， 添加原代培养缓冲液 B 重新重悬离心。

(6) 基质胶计算：第 6 步后观察收集到的组织体积，添加 40 倍组织体积的基质胶重悬铺板。

(7) 24 孔细胞培养板为例，每孔点胶 25ul 组织基质胶混合物进行铺板(4℃下操作)

(8) 将铺好的培养板放入 37℃培养箱中 10-15min 成胶，添加肠癌类器官培养基 A(恢复室温)进行培养。

类器官传代培养

(1) 移液器吸去培养基，每孔添加 1-2ml 4℃类器官传代培养缓冲液 G 放置 2min。

(2) 移液器轻柔吹打基质胶，收集在 15ml 离心管中，4℃静置 10min。(6-8 孔为一组) 300g，5min 离心弃去上清，添加 2ml 类器官传代消化液 D 消化 3min，添加类器官传代培养缓冲液 G 终止消化，300g 离心 5min 弃去液体进行第 4 步。

(3) 类器官收集后，添加基质胶重悬，每孔 30μl 基质胶混合物铺在 24 孔细胞培养板中，放置培养箱中 10-15min 添加 500μl 类器官培养基 A。

类器官与候选抗体、NK 细胞共培养

(1) 用含有 200 ng/mL IFNγ 的类器官培养基孵育类器官 24h。

(2) 移液器吸去培养基，每孔添加 1-2ml 4℃类器官传代培养缓冲液 G 放置 2min。

(3) 移液抢轻柔吹打基质胶，收集在 15ml 离心管中，4℃静置 10min。(每 6-8 孔为一组)。

(4) 类器官收集后，NK 细胞培养基重悬类器官，将 50ul 类器官混合液添加至 96 孔细胞培养板中(类器官数量为每孔 10-20 个为佳)。注：类器官空白组 PBS 重悬类器官

(5) 将收集好的 NK 细胞与候选抗体(5ug/ml)、肿瘤无关抗体(5ug/ml)共孵育，补液 NK 细胞培养基至 100ul，NK 细胞与类器官比例为：500:1。

(6) 高内涵连续拍照 48h 整理结果。

(7) 传根据试剂盒说明书进行细胞活死染色，拍照。

(8) 检测 LDH(乳酸脱氢酶)释放。

实验结果：

<u>类器官与候选抗体、NK 细胞连续拍照视频结果：</u>

相较于类器官+PBS 组、类器官+NK 组，类器官+NK+候选抗体组在作用 48h 后，以下组的 NK 细胞识别增加：AOC:卵巢癌类器官；BC 乳腺癌类器官；CRC 结直肠癌类器官；EC：子宫内膜癌类器官；GC 胃癌类器官；HCC 肝癌类器官；LC 肺癌类器官；PADC：胰腺癌类器官。

<u>类器官与候选抗体、NK 细胞荧光活死染色结果(图 7)：</u>

相较于类器官+PBS 组、类器官+NK 组，类器官+NK+候选抗体组在作用 48h 后，以下组的类器官细胞凋亡增加：AOC:卵巢癌类器官；BC 乳腺癌类器官；EC：子宫内膜癌类器官；HCC 肝癌类器官；LC 肺癌类器官；PADC：胰腺癌类器官。

LDH 释放结果(图 8)：

EC：子宫内膜癌类器官

相较于类器官+PBS 组；类器官+NK 组，类器官+NK+候选抗体组在作用 48h 后 LDH 释放量显著增加，类器官+NK+肿瘤无关抗体无明显变化；相较于类器官+NK 组，类器官+NK+候选抗体组在作用 48h 后 LDH 释放量显著增加。

CRC：结直肠癌类器官

相较于类器官+PBS 组；类器官+NK 组，类器官+NK+候选抗体组在作用 48h 后 LDH 释放量显著增加，类器官+NK+肿瘤无关抗体无明显变化；相较于类器官+NK 组，类器官+NK+候选抗体组在作用 48h 后 LDH 释放量无显著变化。

BC：乳腺癌类器官

相较于类器官+PBS 组；类器官+NK 组，类器官+NK+候选抗体组在作用 48h 后 LDH 释放量显著增加，类器官+NK+肿瘤无关抗体无明显变化；相较于类器官+NK 组，类器官+NK+候选抗体组在作用 48h 后 LDH 释放量无显著变化。

GC：胃癌类器官

相较于类器官+PBS 组；类器官+NK 组，类器官+NK+候选抗体组、类器官+NK+肿瘤无关抗体组在作用 48h 后 LDH 释放量无明显变化；相较于类器官+NK 组，类器官+NK+候选抗体组在作用 48h 后 LDH 释放量无显著变化。

AOC：卵巢癌类器官

相较于类器官+PBS 组；类器官+NK+候选抗体组在作用 48h 后 LDH 释放量显著增加，类器官+NK 组、类器官+NK+肿瘤无关抗体无明显变化；相较于类器官+NK 组，类器官+NK+候选抗体组在作用 48h 后 LDH 释放量无显著变化。

PADC：胰腺癌类器官

相较于类器官+PBS 组；类器官+NK 组、类器官+NK+候选抗体组在作用 48h 后 LDH 释放量显著增加，类器官+NK+肿瘤无关抗体无明显变化；相较于类器官+NK 组，类器官+NK+候选抗体组在作用 48h 后 LDH 释放量无显著变化。

HCC：肝癌类器官

相较于类器官+PBS 组；类器官+NK 组、类器官+NK+候选抗体组、类器官+NK+肿瘤无关抗体组在作用 48h 后 LDH 释放量显著增加；相较于类器官+NK 组，类器官+NK+候选抗体组在作用 48h 后 LDH 释放量无显著变化。

LC：肺癌类器官

相较于类器官+PBS 组；类器官+NK 组、类器官+NK+候选抗体组、类器官+NK+肿瘤无关抗体组在作用 48h 后 LDH 释放量显著增加；相较于类器官+NK 组，类器官+NK+候选抗体组在作用 48h 后 LDH 释放量显著增加。

参考文献：

1. Chothia C, Lesk a M. Canonical structures for the hypervariable regions of immunoglobulins. J Mol Biol. (1987) 196:901–17. doi: 10.1016/0022-2836(87)90412-8

2. Lefranc, M.P. IMGT, the international ImMunoGeneTics information system: A standardized approach for immunogenetics and immunoinformatics. Immunome Res 2005, 1, 3.

3. Lefranc, M.P.; Giudicelli, V.; Kaas, Q.; Duprat, E.; Jabado-Michaloud, J.; Scaviner, D.; Ginestoux, C.; Clement, O.; Chaume, D.; Lefranc, G. IMGT, the international ImMunoGeneTics information system. Nucleic Acids Res. 2005, 33, D593–D597.

4. David Prihoda, Jad Maamaryc, Andrew Waightd, Veronica Juand, Laurence Fayadat-Dilmand, Daniel Svozil a,e, and Danny A. Bitton ： BioPhi: A platform for antibody design, humanization, and humanness evaluation based on natural antibody repertoires and deep learning.

5. Collaborative Computational Project No. 4 (CCP4)-Software for Macromolecular X-Ray Crystallography.

6. A free and open-source software suite for high-performance molecular dynamics and output analysis。

权 利 要 求 书

1. 一种抗体或其抗原结合片段，所述抗体 i) 特异性结合 cTAGE5 蛋白的包含 SEQ ID NO:1 或 2 所示氨基酸序列的胞外区，或 ii) 特异性结合包含 SEQ ID NO:1 或 2 所示氨基酸序列的免疫原性多肽。

2. 权利要求 1 的抗体或其抗原结合片段，其中所述抗体是多克隆抗体，或者所述抗体是单克隆抗体。

3. 权利要求 1 或 2 的抗体或其抗原结合片段，其中所述抗体包含重链可变区和轻链可变区，且包含选自以下任一组的重链 CDR 和轻链 CDR：

组	描述	SEQ ID NO:
1	HCDR1	7
	HCDR2	8
	HCDR3	9
	LCDR1	10
	LCDR2	11
	LCDR3	12
2	HCDR1	17
	HCDR2	18
	HCDR3	19
	LCDR1	20
	LCDR2	21
	LCDR3	22
3	HCDR1	33
	HCDR2	34
	HCDR3	35
	LCDR1	36
	LCDR2	37
	LCDR3	38
4	HCDR1	41
	HCDR2	42
	HCDR3	43
	LCDR1	44
	LCDR2	45
	LCDR3	46
5	HCDR1	49
	HCDR2	50
	HCDR3	51
	LCDR1	52
	LCDR2	53
	LCDR3	54
6	HCDR1	57
	HCDR2	58
	HCDR3	59
	LCDR1	60
	LCDR2	61
	LCDR3	62
7	HCDR1	65
	HCDR2	66
	HCDR3	67

	LCDR1	68
	LCDR2	69
	LCDR3	70
8	HCDR1	73
	HCDR2	74
	HCDR3	75
	LCDR1	76
	LCDR2	77
	LCDR3	78
9	HCDR1	81
	HCDR2	82
	HCDR3	83
	LCDR1	84
	LCDR2	85
	LCDR3	86
10	HCDR1	89
	HCDR2	90
	HCDR3	91
	LCDR1	92
	LCDR2	93
	LCDR3	94
11	HCDR1	97
	HCDR2	98
	HCDR3	99
	LCDR1	100
	LCDR2	101
	LCDR3	102
12	HCDR1	105
	HCDR2	106
	HCDR3	107
	LCDR1	108
	LCDR2	109
	LCDR3	110
13	HCDR1	113
	HCDR2	114
	HCDR3	115
	LCDR1	116
	LCDR2	117
	LCDR3	118
14	HCDR1	121
	HCDR2	122
	HCDR3	123
	LCDR1	124
	LCDR2	125
	LCDR3	126
15	HCDR1	129
	HCDR2	130
	HCDR3	131
	LCDR1	132
	LCDR2	133
	LCDR3	134
16	HCDR1	137
	HCDR2	138
	HCDR3	139

	LCDR1	140
	LCDR2	141
	LCDR3	142
17	HCDR1	145
	HCDR2	146
	HCDR3	147
	LCDR1	148
	LCDR2	149
	LCDR3	150
18	HCDR1	153
	HCDR2	154
	HCDR3	155
	LCDR1	156
	LCDR2	157
	LCDR3	158
19	HCDR1	161
	HCDR2	162
	HCDR3	163
	LCDR1	164
	LCDR2	165
	LCDR3	166
20	HCDR1	169
	HCDR2	170
	HCDR3	171
	LCDR1	172
	LCDR2	173
	LCDR3	174
21	HCDR1	177
	HCDR2	178
	HCDR3	179
	LCDR1	180
	LCDR2	181
	LCDR3	182
22	HCDR1	185
	HCDR2	186
	HCDR3	187
	LCDR1	188
	LCDR2	189
	LCDR3	190
23	HCDR1	193
	HCDR2	194
	HCDR3	195
	LCDR1	196
	LCDR2	197
	LCDR3	198
24	HCDR1	201
	HCDR2	202
	HCDR3	203
	LCDR1	204
	LCDR2	205
	LCDR3	206
25	HCDR1	209
	HCDR2	210
	HCDR3	211

	LCDR1	212
	LCDR2	213
	LCDR3	214
26	HCDR1	217
	HCDR2	218
	HCDR3	219
	LCDR1	220
	LCDR2	221
	LCDR3	222
27	HCDR1	225
	HCDR2	226
	HCDR3	227
	LCDR1	228
	LCDR2	229
	LCDR3	230
28	HCDR1	233
	HCDR2	234
	HCDR3	235
	LCDR1	236
	LCDR2	237
	LCDR3	238
29	HCDR1	241
	HCDR2	242
	HCDR3	243
	LCDR1	244
	LCDR2	245
	LCDR3	246
30	HCDR1	249
	HCDR2	250
	HCDR3	251
	LCDR1	252
	LCDR2	253
	LCDR3	254
31	HCDR1	257
	HCDR2	258
	HCDR3	259
	LCDR1	260
	LCDR2	261
	LCDR3	262
32	HCDR1	265
	HCDR2	266
	HCDR3	267
	LCDR1	268
	LCDR2	269
	LCDR3	270
33	HCDR1	273
	HCDR2	274
	HCDR3	275
	LCDR1	276
	LCDR2	277
	LCDR3	278
34	HCDR1	281
	HCDR2	282
	HCDR3	283

	LCDR1	284
	LCDR2	285
	LCDR3	286
35	HCDR1	289
	HCDR2	290
	HCDR3	291
	LCDR1	292
	LCDR2	293
	LCDR3	294
36	HCDR1	297
	HCDR2	298
	HCDR3	299
	LCDR1	300
	LCDR2	301
	LCDR3	302
37	HCDR1	305
	HCDR2	306
	HCDR3	307
	LCDR1	308
	LCDR2	309
	LCDR3	310
38	HCDR1	313
	HCDR2	314
	HCDR3	315
	LCDR1	316
	LCDR2	317
	LCDR3	318
39	HCDR1	321
	HCDR2	322
	HCDR3	323
	LCDR1	324
	LCDR2	325
	LCDR3	326
40	HCDR1	329
	HCDR2	330
	HCDR3	331
	LCDR1	332
	LCDR2	333
	LCDR3	334
41	HCDR1	337
	HCDR2	338
	HCDR3	339
	LCDR1	340
	LCDR2	341
	LCDR3	342
42	HCDR1	345
	HCDR2	346
	HCDR3	347
	LCDR1	348
	LCDR2	349
	LCDR3	350
43	HCDR1	353
	HCDR2	354
	HCDR3	355

	LCDR1	356
	LCDR2	357
	LCDR3	358
44	HCDR1	361
	HCDR2	362
	HCDR3	363
	LCDR1	364
	LCDR2	365
	LCDR3	366
45	HCDR1	369
	HCDR2	370
	HCDR3	371
	LCDR1	372
	LCDR2	373
	LCDR3	374
46	HCDR1	377
	HCDR2	378
	HCDR3	379
	LCDR1	380
	LCDR2	381
	LCDR3	382
47	HCDR1	385
	HCDR2	386
	HCDR3	387
	LCDR1	388
	LCDR2	389
	LCDR3	390
48	HCDR1	393
	HCDR2	394
	HCDR3	395
	LCDR1	396
	LCDR2	397
	LCDR3	398
49	HCDR1	401
	HCDR2	402
	HCDR3	403
	LCDR1	404
	LCDR2	405
	LCDR3	406
50	HCDR1	409
	HCDR2	410
	HCDR3	411
	LCDR1	412
	LCDR2	413
	LCDR3	414

。

4. 权利要求 3 的抗体或其抗原结合片段，其中所述抗体包含轻链可变区和重链可变区，所述重链可变区(VH)和所述轻链可变区(VL)分别包含选自以下任一组的氨基酸序列或分别包含与选自以下任一组的氨基酸序列具有至少 70%、至少 75%、至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 95%或更高序列相同性的氨基酸序列：

组	描述	SEQ ID NO:
1	VH	5
	VL	6
2	VH	15
	VL	16
3	VH	31
	VL	32
4	VH	39
	VL	40
5	VH	47
	VL	48
6	VH	55
	VL	56
7	VH	63
	VL	64
8	VH	71
	VL	72
9	VH	79
	VL	80
10	VH	87
	VL	88
11	VH	95
	VL	96
12	VH	103
	VL	104
13	VH	111
	VL	112
14	VH	119
	VL	120
15	VH	127
	VL	128
16	VH	135
	VL	136
17	VH	143
	VL	144
18	VH	151
	VL	152
19	VH	159
	VL	160
20	VH	167
	VL	168
21	VH	175
	VL	176
22	VH	183
	VL	184
23	VH	191
	VL	192
24	VH	199
	VL	200

25	VH	207
	VL	208
26	VH	215
	VL	216
27	VH	223
	VL	224
28	VH	231
	VL	232
29	VH	239
	VL	240
30	VH	247
	VL	248
31	VH	255
	VL	256
32	VH	263
	VL	264
33	VH	271
	VL	272
34	VH	279
	VL	280
35	VH	287
	VL	288
36	VH	295
	VL	296
37	VH	303
	VL	304
38	VH	311
	VL	312
39	VH	319
	VL	320
40	VH	327
	VL	328
41	VH	335
	VL	336
42	VH	343
	VL	344
43	VH	351
	VL	352
44	VH	359
	VL	360
45	VH	367
	VL	368
46	VH	375
	VL	376
47	VH	383
	VL	384
48	VH	391
	VL	392
49	VH	399

	VL	400
50	VH	407
	VL	408

。

5. 权利要求 1-4 中任一项的抗体或其抗原结合片段，其中所述抗体是人源化抗体。

6. 权利要求 5 的抗体或其抗原结合片段，其中所述人源化抗体

i) 重链可变区包含 SEQ ID NO:23 所示氨基酸序列，轻链可变区包含 SEQ ID NO:24 所示氨基酸序列；

ii) 重链可变区包含 SEQ ID NO:25 所示氨基酸序列，轻链可变区包含 SEQ ID NO:26 所示氨基酸序列；

iii) 重链可变区包含 SEQ ID NO:27 所示氨基酸序列，轻链可变区包含 SEQ ID NO:28 所示氨基酸序列；或

iv)重链可变区包含 SEQ ID NO:29 所示氨基酸序列，轻链可变区包含 SEQ ID NO:30 所示氨基酸序列。

7. 权利要求 1-4 中任一项的抗体或其抗原结合片段，其中所述抗体包含 SEQ ID NO:3 所示重链，以及 SEQ ID NO:4 所示轻链；或者所述抗体包含 SEQ ID NO:13 所示重链，以及 SEQ ID NO:14 所示轻链。

8. 权利要求 1-7 中任一项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能够抑制肿瘤生长至少约 10%，优选至少约 20%，更优选至少约 30%，更优选至少约 40%，更优选至少约 50%，更优选至少约 60%，更优选至少约 70%，更优选至少约 80%。

9. 权利要求 1-8 中任一项的抗体或其抗原结合片段，其中抗体或其抗原结合片段结合包含 SEQ ID NO:1 或 2 所示氨基酸序列的 cTAGE5 蛋白的胞外区或包含 SEQ ID NO:1 或 2 所示氨基酸序列的免疫原性多肽的 K_D 值小于 1×10^{-7} M，优选小于 1×10^{-8} M、更优选小于 1×10^{-9} M、更优选小于 1×10^{-10} M。

10. 一种抗体缀合物，其包含权利要求 1-9 中任一项的抗体或其抗原结合片段，以及与所述抗体或其抗原结合片段缀合的选自细胞毒素、放射性同位素或生物活性蛋白质的治疗性部分。

11. 一种药物组合物，其包含权利要求 1-9 中任一项的抗体或其抗原结合片段或权利要求 10 的抗体缀合物，以及药学上可接受的载体。

12. 一种在患者中治疗和/或预防肿瘤的方法，所述方法包括给所述患者施用有效量的权利要求 1-9 中任一项的抗体或其抗原结合片段或权利要求 10 的抗体缀合物或权利要求 11 的药物组合物。

13. 权利要求 12 的方法，其中所述肿瘤是 cTAGE5 蛋白相关肿瘤，例如过表达 cTAGE5 蛋白的肿瘤，其中所述 cTAGE5 蛋白具有胞外区，所述 cTAGE5 蛋白的胞外区包含 SEQ ID NO:1 或 2 所示氨基酸序列。

14. 权利要求 12 或 13 的方法，其中所述肿瘤选自鼻咽癌、恶性黑色素瘤、肺癌、皮肤癌、舌咽癌、淋巴瘤(包括 B-细胞淋巴瘤或 T-细胞淋巴瘤)、肝癌、宫颈癌、甲状腺癌、结肠癌、卵巢癌、脑瘤、前列腺癌、乳腺癌、食道癌、胃癌、胰腺癌、直肠癌。

15. 权利要求 12-14 中任一项的方法，还包括给所述患者施用其它抗肿瘤治疗手段，例如施用化疗剂、靶向其它肿瘤特异性抗原的抗体或放疗。

16. 权利要求 1-9 中任一项的抗体或其抗原结合片段、权利要求 10 的抗体缀合物或权利要求 11 的药物组合物在制备用于治疗和/或预防肿瘤的药物中的用途。

17. 权利要求 16 的用途，其中所述肿瘤是 cTAGE5 蛋白相关肿瘤，例如过表达 cTAGE5 蛋白的肿瘤，其中所述 cTAGE5 蛋白具有胞外区，所述 cTAGE5 蛋白的胞外区包含 SEQ ID NO:1 或 2 所示氨基酸序列。

18. 权利要求 17 的用途，其中所述肿瘤选自鼻咽癌、恶性黑色素瘤、肺癌、神经胶质瘤、皮肤癌、舌咽癌、淋巴瘤(包括 B-细胞淋巴瘤或 T-细胞淋巴瘤)、肝癌、宫颈癌、甲状腺癌、结肠癌、卵巢癌、脑瘤、前列腺癌、乳腺癌、食道癌、胃癌、胰腺癌、直肠癌、子宫内膜癌、结直肠癌。

19. 一种检测生物学样品中 cTAGE5 蛋白的存在或 cTAGE5 蛋白的表达水平的方法，包括：

在权利要求 1-9 中任一项的抗体或其抗原结合片段与 cTAGE5 蛋白之间能够形成复合物的条件下，使所述生物学样品和任选的对照样品接触本发明的抗体如单克隆抗体或其抗原结合片段；和

检测复合物的形成，

其中所述生物学样品中复合物的形成或所述生物学样品与对照样品之间复合物形成的差异指示样品中 cTAGE5 蛋白的存在或 cTAGE5 蛋白的表达水平，

其中所述 cTAGE5 蛋白具有包含 SEQ ID NO:1 或 2 所示氨基酸序列的胞外区。

20. 权利要求 19 的方法，其中所述生物学样品是离体样品，例如组织样品、血液样品、淋巴样品等。

21. 权利要求 19 或 20 的方法，所述方法是免疫组化测定或免疫荧光测定。

22. 一种检测患者中肿瘤的存在的方法，包括检测，例如通过权利要求 19-21 中任一项的方法检测来自所述患者的生物学样品中的 cTAGE5 蛋白的表达水平，

其中所述患者的生物学样品中的 cTAGE5 的存在或所述患者的生物学样品中的 cTAGE5 的表达水平高于来自对照生物学样品的 cTAGE5 的表达水平，表示所述患者中存在肿瘤，

其中所述 cTAGE5 蛋白具有包含 SEQ ID NO:1 或 2 所示氨基酸序列的胞外区。

23.权利要求 22 的方法，其中所述肿瘤是 cTAGE5 蛋白相关肿瘤，例如过表达 cTAGE5 蛋白的肿瘤，其中所述 cTAGE5 蛋白具有胞外区，所述 cTAGE5 蛋白的胞外区包含 SEQ ID NO:1 或 2 所示氨基酸序列。

24. 权利要求 23 的用途，其中所述肿瘤选自鼻咽癌、恶性黑色素瘤、肺癌、神经胶质瘤、皮肤癌、舌咽癌、淋巴瘤(包括 B-细胞淋巴瘤或 T-细胞淋巴瘤)、肝癌、宫颈癌、甲状腺癌、结肠癌、卵巢癌、脑瘤、前列腺癌、乳腺癌、食道癌、胃癌、胰腺癌、直肠癌、子宫内膜癌、结直肠癌。

25. 一种分离的免疫原性多肽，其包含 SEQ ID NO:1 或 SEQ ID NO:2 所示的氨基酸序列，或包含与 SEQ ID NO:1 或 SEQ ID NO:2 具有至少 80%、至少 90%、至少 95%序列相同性的氨基酸序列，或包含相对于 SEQ ID NO:1 或 SEQ ID NO:2 具有一或多个(如 1 个、2 个、3 个、4 个、或 5 个)氨基酸取代、缺失或添加的氨基酸序列。

26. 权利要求 25 所述分离的免疫原性多肽在制备抗体中的用途。

27. 一种制备抗体的方法，所述方法包括用权利要求 25 所述的分离的免疫原性多肽免疫动物，然后从所述动物中分离特异性结合所述多肽的抗体或获得特异性结合所述多肽的抗体的序列信息。

28. 一种药物组合物，其包含权利要求 25 所述分离的免疫原性多肽和药学上可接受的载体。

29. 权利要求 25 所述分离的免疫原性多肽在制备药物中的用途，例如，所述药物用于治疗和/或预防肿瘤。

30. 一种在有需要的对象中预防和/或治疗肿瘤的方法，包括给所述对象施用有效量的权利要求 25 所述分离的免疫原性多肽或权利要求 28 所述的药物组合物。

31. 一种检测生物学样品中特异性结合 cTAGE5 蛋白抗体的存在和/或量的方法，包括 1)使权利要求 25 所述分离的免疫原性多肽与所述生物学样品接触，和 2)检测与所述分离的免疫原性多肽结合的抗体的存在和/或量。

32. 权利要求 25 所述分离的免疫原性多肽在制备用于检测生物学样品中特异性结合 cTAGE5 蛋白的抗体的存在和/或量的方法中的试剂盒的用途。

33. 包含 SEQ ID NO:1 或 2 所示氨基酸序列，或包含与 SEQ ID NO:1 具有至少 80%、至少 90%、至少 95%序列相同性的氨基酸序列，或包含相对于 SEQ ID NO:1 具有一或多个(如 1 个、2 个、3 个、4 个、或 5 个)氨基酸取代、缺失或添加的氨基酸序列，优选包含 SEQ ID NO: 2 所示氨基酸序列的 cTAGE5 蛋白作为肿瘤标志物的用途。

34. 一种肿瘤筛查方法，所述方法包括检测来自对象的生物学样品中 cTAGE5 蛋白的存在或量，所述 cTAGE5 蛋白包含 SEQ ID NO:1 或 2 所示氨基酸序列，或包含与 SEQ ID NO:1 具有至少 80%、至少 90%、至少 95%序列相同性的氨基酸序列，或包含相对于 SEQ ID NO:1 具有一或多个(如 1 个、2 个、3 个、4 个、或 5 个)氨基酸取代、缺失或添加的氨基酸序列，优选包含 SEQ ID NO: 2 所示氨基酸序列。

35. 一种肿瘤筛查方法，所述方法包括检测检测来自对象的生物学样品中特异性结合 cTAGE5 蛋白的抗体的存在和/或量，所述抗体特异性结合 cTAGE5 蛋白的胞外区，所述 cTAGE5 蛋白胞外区包含 SEQ ID NO:1 或 2 所示氨基酸序列，或包含与 SEQ ID NO:1 具有至少 80%、至少 90%、至少 95%序列相同性的氨基酸序列，或包含相对于

SEQ ID NO:1 具有一或多个(如 1 个、2 个、3 个、4 个、或 5 个)氨基酸取代、缺失或添加的氨基酸序列，优选包含 SEQ ID NO: 2 所示氨基酸序列。