【19】中華民國　　【12】專利公報　（B）

【11】證書號數：I940569
【45】公告日： 中華民國 115 (2026) 年 10 月 01 日
【51】Int. Cl.：　*C07K16/40 (2006.01)*　*A61K39/395 (2006.01)*
A61P35/00 (2006.01)　*G01N33/575 (2026.01)*
發明　　全 41 頁

【54】名　稱：抗烯醇化酶 1（ENO1）抗體及其應用
【21】申請案號：111110591　　【22】申請日： 中華民國 111 (2022) 年 03 月 22 日
【11】公開編號：202246354　　【43】公開日期： 中華民國 111 (2022) 年 12 月 01 日
【30】優 先 權： 2021/03/22　美國　63/164,137
【72】發 明 人： 吳漢忠 (TW) WU, HAN-CHUNG；李欣蓉 (TW) LI, HSIN-JUNG
【71】申 請 人： 中央研究院　ACADEMIA SINICA
臺北市南港區研究院路二段 128 號
【74】代 理 人： 鄭志玲
【56】參考文獻：
TW　I549967B
期刊 Fu, Qiao-Fen et al. Alpha-enolase promotes cell glycolysis, growth, migration, and invasion in non-small cell lung cancer through FAK-mediated PI3K/AKT pathway. Journal of hematology & oncology vol. 8 Springer Nature 8 Mar. 2015
審查人員：陳婷妤

【57】申請專利範圍

1. 一種特異性結合烯醇化酶 1(ENO1)之抗體或其抗原結合片段，其包含：
(a)重鏈可變區(V_H)，其包含含有 SEQ ID NO: 2 的胺基酸序列的重鏈互補決定區 1(HC CDR1)、含有 SEQ ID NO: 4 的胺基酸序列的重鏈互補決定區 2(HC CDR2)、以及含有 SEQ ID NO: 6 的胺基酸序列的重鏈互補決定區 3(HC CDR3)；以及
(b)輕鏈可變區(V_L)，其包含含有 SEQ ID NO: 9 的胺基酸序列的輕鏈互補決定區 1(LC CDR1)、含有 SEQ ID NO: 11 的胺基酸序列的輕鏈互補決定區 2(LC CDR2)、以及含有 SEQ ID NO: 13 的胺基酸序列的輕鏈互補決定區 3(LC CDR3)。
2. 如請求項 1 之抗體或抗原結合片段，其中該 V_H 包含 SEQ ID NO: 15 的胺基酸序列。
3. 如請求項 1 之抗體或抗原結合片段，其中該 V_L 包含 SEQ ID NO: 16 的胺基酸序列。
4. 一種重組核酸，其包含編碼如請求項 1 到 3 中任一項所定義的抗體或其抗原結合片段的核苷酸序列。
5. 一種宿主細胞，其包含請求項 4 之重組核酸。
6. 一種組合物，其包含如請求項 1 到 3 中任一項所定義的抗體或其抗原結合片段及載體。
7. 一種如請求項 1 到 3 中任一項所定義的抗體或其抗原結合片段或如請求項 6 的組合物之用途，其係用於製備藥劑，該藥劑用於在有此需要的個體抑制烯醇化酶 1(ENO1)下游訊息傳遞及/或治療與 ENO1 下游訊息傳遞活化相關的疾病或病症。
8. 如請求項 7 之用途，其中該疾病或病症為癌症及癌症轉移。

9. 如請求項 8 之用途，其中該癌症選自由以下組成的群組：肺癌、腦癌、乳癌、子宮頸癌、大腸癌、胃癌、頭頸癌、腎癌、白血病、肝癌、卵巢癌、胰臟癌、前列腺癌、皮膚癌、及睪丸癌。
10. 如請求項 9 之用途，其中該癌症為肺癌。
11. 如請求項 8 到 10 中任一項之用途，其中該抗體或其抗原結合片段有效於抑制有此需要的該個體中的腫瘤生長及轉移。
12. 如請求項 7 到 10 中任一項之用途，其中該抗體或其抗原結合片段有效於延長有此需要的該個體的存活時間。
13. 一種於活體外檢測烯醇化酶 1(ENO1)之方法，其包含：
(i)使如請求項 1 到 3 中任一項所定義的抗體或其抗原結合片段與有此需要的個體的細胞接觸；以及
(ii)檢測該抗體或其抗原結合片段與該細胞的結合。
14. 如請求項 13 之方法，其中該細胞存在於從該個體獲得的生物樣品中。
15. 如請求項 13 之方法，其中該個體有患癌症的風險或被懷疑患有癌症。
16. 如請求項 13 之方法，其中該個體患有癌症。
17. 如請求項 16 之方法，其進一步包含使該檢測的結果與參考濃度進行比較，並基於該比較的結果判定該個體的預後，其中升高的 ENO1 濃度表明消極預後，其中該參考濃度為正常個體或非癌性的組織或細胞樣品中測量的 ENO1 濃度，或該參考濃度為癌症患者群體中的 ENO1 平均或中位數量。
18. 如請求項 17 之方法，其中該消極預後選自由以下組成的群組：降低的存活率、增加的腫瘤生長、增加的轉移風險、增加的復發風險、及其任何組合。
19. 如請求項 15 到 18 中任一項之方法，其中該癌症選自由以下組成的群組：肺癌、腦癌、乳癌、子宮頸癌、大腸癌、胃癌、頭頸癌、腎癌、白血病、肝癌、卵巢癌、胰臟癌、前列腺癌、皮膚癌、及睪丸癌。
20. 如請求項 19 之方法，其中該癌症為肺癌。
21. 一種監測患有癌症的患者中癌症惡化之方法，其包含：
(i)在第一時間點提供來自該患者的第一生物樣品；
(ii)在第二時間點提供來自該患者的第二生物樣品，該第二時間點晚於該第一時間點；
(iii)檢測該第一生物樣品及該第二生物樣品中烯醇化酶 1(ENO1)的濃度，其中藉由如請求項 1 到 3 中任一項所定義的抗體或其抗原結合片段的免疫測定來進行該檢測；以及
(iv)基於該第一生物樣品及該第二生物樣品中的 ENO1 濃度來判定該患者的癌症惡化，其中與該第一生物樣品相比，該第二生物樣品中升高的 ENO1 濃度表明癌症惡化。
22. 如請求項 21 之方法，其中該癌症選自由以下組成的群組：肺癌、腦癌、乳癌、子宮頸癌、大腸癌、胃癌、頭頸癌、腎癌、白血病、肝癌、卵巢癌、胰臟癌、前列腺癌、皮膚癌、及睪丸癌。
23. 如請求項 22 之方法，其中該癌症為肺癌。
24. 一種如請求項 1 到 3 中任一項所定義之抗體或其抗原結合片段或如請求項 6 之組合物之用途，其係用於製備試劑盒，該試劑盒用於檢測 ENO1、診斷及癌症預後、以及監測癌症惡化。
25. 一種用於進行如請求項 13 到 23 中任一項之方法之試劑盒，其包含如請求項 1 到 3 中任一項所定義之抗體或其抗原結合片段或如請求項 6 之組合物，以及使用該試劑盒檢測 ENO1 的說明書。

圖式簡單說明

當結合附圖閱讀時，將更好理解前面發明內容及下面本發明的詳細描述。為了說明本發明，附圖中示出目前較佳的具體實施例。然而，應理解到本發明不限於所示出的精確配置及手段。

在圖式中：

圖 1A 到圖 1I ： ENO1 在轉移性癌細胞株中高度表現，並與肺癌患者較差的整體存活率相關。(圖 1A)使用抗 ENO1 抗體，藉由西方墨點法在 NHBE、NL-20 及人類肺癌細胞株中來分析 ENO1 表現。α-微管蛋白用作內部對照組。(圖 1B)使用藻紅素(PE)共軛的山羊抗小鼠 IgG，藉由流式細胞術評估嵌合 ENO1 mAb(chENO1)或正常人類 IgG(NHIgG)與活 NHBE、NL-20 或 CL1-5 細胞的結合。X 軸：PE 螢光強度；Y 軸：事件的數目。(圖 1C)CL1-5 細胞中 ENO1 的免疫金標記。以 4%甲醛固定細胞，並加工用於冷凍切片。以 BSA 封閉切片，接著以 chENO1-22 (40 μg/ml)或 NHIgG 標記 ENO1。固定後，使樣品染色並在穿透式電子顯微鏡上檢查。(圖 1D)從 TCGA 數據庫分析 NSCLC 腫瘤組織(T)及鄰近的非癌組織(N)中 ENO1 的 mRNA 表現。(圖 1E)代表性影像示出在肺癌階段的全譜(原始放大倍數，40×；比例尺=200 μm)樣品中的 ENO1 免疫組織化學染色。(圖 1F)免疫組織化學染色數據表示為 ENO1 陽性染色的面積百分比。每組的中位數由水平線表示。(圖 1G)基於來自組織微陣列數據的肺癌患者預後訊息的 ENO1 蛋白表現的整體存活分析。使用 Kaplan-Meier 繪圖儀(KM 繪圖儀)(圖 1H)及 TCGA 數據庫(I)來分析 OS。提供來自網頁的具有 95%信賴區間的風險比(HR)及對數秩 P 值。** $P < 0.01$ 且*** $P < 0.001$。

圖 2A 到圖 2F ：活體外鑑定 ENO1 在肺癌細胞中的分子功能。(圖 2A)藉由西方墨點法分析被攜帶對照組 shRNA(shLacZ)或 ENO1 shRNA(shENO1-1 及 shENO1-2)的慢病毒感染的 CL1-5 或 CL-141 細胞中 ENO1 的表現。α-微管蛋白用作內部對照組。使用 ENO1 敲低 CL1-5 或 CL-141 細胞(圖 2B)及 CL1-0 細胞(圖 2E)進行細胞增殖(WST-1)測定。吸光度值以來自四個獨立實驗的平均值± SEM 表示。使用 ENO1 敲低 CL1-5 或 CL-141 細胞(圖 2C)及 CL1-0 細胞(圖 2F)進行基質膠侵入測定。計算侵入細胞的數目，且結果以來自三個獨立實驗的平均值± SEM 表示。(* $P < 0.5$ 及*** $P < 0.001$，學生 t 檢定)(圖 2D)以 AS2-ENO1-FLAG 轉染的 CL1-0 細胞或空載體中 ENO1 的表現，使用抗 FLAG 抗體藉由西方墨點法進行分析。

圖 3A 到圖 3E ： ENO1 敲低抑制小鼠異種移植模型中的腫瘤生長及肺腫瘤轉移。CL1-5-Luci 細胞被攜帶對照組 shLacZ 或 shENO1(各自也表現螢光素酶)的慢病毒感染，並移植到 NOD-SCID 小鼠的肺實質(1×10^5 細胞)(圖 3A 及圖 3B)或注射到 NOD-SCID 小鼠的尾靜脈(1×10^6 細胞)中。(圖 3C、圖 3D、圖 3E)。藉由生物發光成像來監測肺中的腫瘤形成。(圖 3E)在從示出在(圖 3C)中的小鼠切除的肺的蘇木精及伊紅染色後，計算腫瘤結節的數目。** $P < 0.05$；*** $P < 0.001$。

圖 4A 到圖 4G ： ENO1 藉由調控 SLUG 穩定性來促進 EMT 。(圖 4A)被攜帶對照組 shLacZ 或 shENO1 的慢病毒感染的 CL1-5 細胞的形態。(圖 4B)在被 shLacZ 或 shENO1 感染的 CL1-5 細胞(左)或被載體或 ENO1-FLAG 感染的 CL1-0 細胞(右)中，藉由西方墨點法檢測 EMT 標記或調控劑的表現。(圖 4C)在被 shLacZ 或 shENO1 感染的 CL1-5 細胞中藉由 qRT-PCR 檢測到 EMT 標記或調控劑的表現。(圖 4D)藉由使用或不使用 10 mM MG132(蛋白酶體抑制劑)處理 6 小時，接著進行西方墨點法，來分析 ENO1 敲低細胞中這些基因的蛋白表現。(圖 4E)被攜帶 shLacZ 或 shENO1 的慢病毒感染的 CL1-5 細胞。轉染後 24 小時，在細胞收集之前以 10mM MG132 處理細胞 6 小時。使用抗 SLUG 抗體(左圖)及輸入組(右圖)免疫沉澱溶胞產物。以所示抗體進行西方墨點法以檢測蛋白相互作用。(圖 4F)SLUG 蛋白在被 shLacZ 或 shENO1 感染的 CL1-5 細胞中的穩定性。以 100 μg 環己醯胺(CHX)在所示間隔處理細胞，並進行西方墨點法分析。(圖 4G)所示組中 SLUG 半衰期的定量。** $P < 0.05$；*** $P < 0.001$。

圖 5A 到圖 5G ： ENO1 經由活化 HGFR-Src-PI3K-AKT 及 Wnt-β- 連環蛋白訊息傳遞來降低 GSK3β 活性而穩定 SLUG 。(圖 5A)在使用或不使用 2 μM GSK3β 抑制劑(BIO)處理 24 小時後，藉由西方墨點法分析 ENO1 敲低細胞(shENO1-1)中的蛋白表現。(圖 5B)以 TOP 報導子轉染一組細胞，CMV：海腎螢光素酶；以 FOP 報導子轉染第二組細胞，CMV：海腎螢光素酶，如圖所示。TOP 及 FOP 報導子如下：驅動螢光素酶的 β-連環蛋白反應性「T 細胞因子(TCF)元件」(TOP)；及也驅動螢光素酶的非 β-連環蛋白反應性突變元件(FOP)。來自這兩個報導子的訊息的比率反映 β-連環蛋白特異性標準 Wnt 訊息傳遞，其中每個報導子標準化為海腎螢光素酶作為內部對照組。72 小時後，在 ENO1 敲低 CL1-5 細胞或對照組細胞中測量 Wnt 訊息傳遞。(圖 5C)使用共焦免疫螢光測定檢測 CL1-5 細胞中 β-連環蛋白的表現。使用 63x 物鏡觀察樣品。綠色螢光代表 β-連環蛋白，而藍色螢光為 DAPI 染劑。下圖示出核 SLUG 的平均強度的定量。(圖 5D)對表現所示質體組合的 CL1-5 細胞進行基質膠侵入測定。(圖 5E)NSCLC 患者整體存活率的 TCGA 數據分析(肺腺癌的 RNA-序列數據)，該等 NSCLC 患者具有 ENO1 低/SLUG 低、ENO1 高/SLUG 低、ENO1 低/SLUG 高、及 ENO1 高/SLUG 高。患者按照中位數進行分組。(圖 5F)在被 shLacZ 或 ENO1 shRNA 感染的 CL1-5 細胞中或以重組 ENO1 處理 30 分鐘(1 μg/mL)的 ENO1 shRNA 細胞中，藉由西方墨點法檢測蛋白濃度。P：磷酸化蛋白濃度，t：總蛋白濃度。(圖 5G)使用被 shLacZ 或 ENO1 shRNA 感染的 CL1-5 細胞或以重組 ENO1 處理 30 分鐘(1 或 2 μg/mL)的 ENO1 shRNA 細胞，進行基質膠侵入測定。計算侵入細胞的數目，且結果以來自三個獨立實驗的平均值± SEM 表示。**P ＜ 0.01；***P ＜ 0.001。

圖 6A 到圖 6G ： ENO1 與 HGFR 締合，且為 HGFR 所必需的。(圖 6A)以載體或人類 HGF 刺激被 shLacZ 或 ENO1 shRNA 細胞感染的 CL1-5 細胞 10 分鐘，接著進行免疫墨點法。(圖 6B)GST 下拉(pull-down)測定。GST-瓊脂糖珠結合的 GST-ENO1 或 GST 蛋白與經純化的 His-HGFR 一同培養。清洗後，藉由與 SDS-PAGE 上樣緩衝液一同煮沸來釋放珠結合蛋白及 5%輸入的 His-HGFR 蛋白。接著以抗 His 或 ENO1 抗體對樣品進行西方墨點法。(圖 6C)從 CL1-5 細胞提取膜蛋白，並使親和交聯的 ENO1 的 IP 與 HGFR 結合。(圖 6D)以 FLAG 標記的 ENO1 後，從 CL1-5 細胞製備免疫沉澱物。以抗 ENO1(IP:ENO1)或抗 HGFR(IP:HGFR)抗體免疫沉澱溶胞產物，並以抗 HGFR 及抗 ENO1 抗體進行墨點法。(圖 6E)從 CL1-5 細胞製備免疫沉澱物。以抗 ENO1(IP:ENO1)或抗 HGFR(IP:HGFR)抗體免疫沉澱溶胞產物，並以抗 HGFR 及抗 ENO1 抗體進行墨點法。(圖 6F)上圖：繪製 HGFR 結構域的示意圖。以抗 Myc 抗體免疫沉澱不同 Myc 標記的 HGFR 構築體或空載體進行 72 小時，並藉由 SDS-聚丙烯醯胺凝膠電泳(PAGE)分離。以抗 FLAG 或抗 Myc 抗體探測免疫墨點。(圖 6G)以 HGFR 抑制劑處理被 shLacZ 或 ENO1 shRNA 細胞感染的 CL1-5 細胞 24 小時，並以 hHGF 刺激 10 分鐘，接著進行免疫墨點法。

圖 7A 到圖 7I ： chENO1-22 抗體藉由抑制 ENO1-HGFR 軸媒介的下游訊息傳遞促進 SLUG 蛋白降解，來降低活體外癌細胞增殖及侵入。使用藻紅素(PE)共軛的山羊抗人類 IgG，藉由流式細胞術評估抗 chENO1-22 與被攜帶 LacZ 或 ENO1 shRNA 的慢病毒感染的活 CL1-5 細胞(圖 7A)或以 AS2-ENO1-FLAG 或空載體轉染的 CL1-0 細胞(圖 7B)的結合的定量。(圖 6C)使用兩種抗 ENO1 的小鼠 mAb 處理的 CL1-5 細胞進行細胞增殖(WST-1)測定。抗體濃度為 10 μg/ml，且在抗體處理後 8、24、48 或 72 小時測定 OD 值。(圖 6D)使用以抗 ENO1 的小鼠 mAb 處理的 CL1-5 細胞進行基質膠侵入測定。對侵入細胞進行定量，且結果以三個獨立實驗的平均值± SEM 表示(* P ＜ 0.05，學生 t 檢定)。下圖示出基質膠侵入測定中侵入細胞的區域。(圖 6E)藉由西方墨點法檢測以 NHIgG 或 chENO1-22 處理的 CL1-5 細胞的蛋白濃度。(圖 6F)以 NHIgG 或 chENO1-22 處理 CL1-5 細胞 4 小時，並以載體或 hHGF 刺激 10 分鐘，接著進行西方墨點法。(圖 6G)以 NHIgG 或 chENO1-22 處理 CL1-5 細胞 4 小時，並以抗 ENO1 (IP:ENO1)或抗 HGFR(IP:HGFR)抗體免疫沉澱，接著進行西方墨點法。(圖 6H)在細胞收集及

隨後的西方墨點法之前，以 10 mM MG132 及 chENO1-22 處理 CL1-5 細胞 6 小時。(圖 6I)Slug 蛋白在以 NHIgG 或 chENO1-22 處理的 CL1-5 細胞中的穩定性。以 100 μg 環己醯胺(CHX)在所示間隔處理細胞，並進行西方墨點法分析。下圖示出所示組中 SLUG 半衰期的定量。*P ＜ 0.05；**P ＜ 0.01；***P ＜ 0.001。

圖 8A 到圖 8D ： chENO1-22 抗體減少活體內肺癌細胞轉移。(圖 8A)使一百萬個 CL1-5-Luci 細胞靜脈注射到 NOD-SCID 小鼠中，且使正常人類 IgG 對照組或 chENO1-22 抗體每周靜脈注射兩次，總共注射八次。進行每周生物發光成像以監測靜脈注射的腫瘤細胞的生長(存活天數中位數：對數秩，p = 0.0019)。(圖 8B)藉由生物發光成像來監測肺中的腫瘤形成。(圖 8C)生成 Kaplan-Meier 曲線以分析存活率。(圖 8D)工作模型描述藉由調控 HGFR-Src-PI3K-AKT-GSK3β-SLUG 及 HGFR-WNT-GSK3β-SLUG 軸，ENO1 促進細胞侵入。(a)ENO1 增加 HGFR 及 Wnt 共受體 LPR5/6 的磷酸化與降低 GSK-3β 活性，以增強 SLUG 穩定性及抑制 E-鈣黏蛋白表現。最終，癌細胞侵入能力增強。(b)chENO1-22 mAb 藉由阻斷 ENO1-HGFR 軸媒介的下游訊息傳遞來促進 SLUG 蛋白泛蛋白化及降解，從而抑制癌細胞侵入。

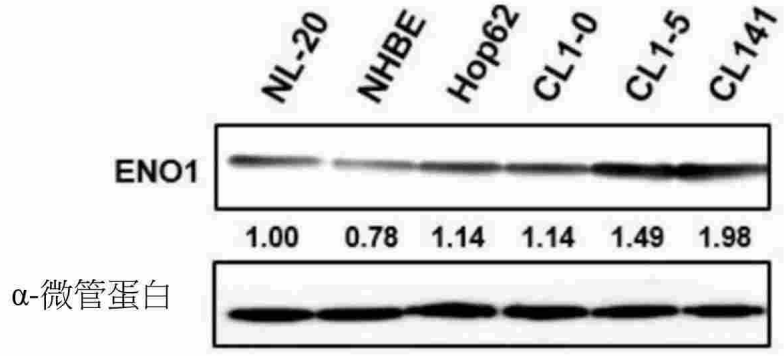
圖 9A 到圖 9D ：藉由融合瘤技術篩選抗 ENO1 mAb 的結合活性及特異性。在活細胞上藉由細胞 ELISA(圖 9A)及流式細胞術，使用藻紅素(PE)共軛的山羊抗小鼠 IgG 作為二級抗體，來分析四種抗 ENO1 mAb 與 CL1-5 細胞的結合活性(圖 9B)。X 軸：PE 螢光強度；Y 軸：事件的數目。使用藻紅素(PE)共軛的山羊抗人類 IgG，藉由流式細胞術評估抗 chENO1-22 與活 CL1-5 細胞(圖 9C)或被攜帶 LacZ 或 ENO1 shRNA 的慢病毒感染的 CL1-5 細胞(圖 9D)的結合的定量。

圖 10 ： ENO1 表現與肺癌患者更嚴重的癌症階段有關。免疫組織化學染色數據表示為 ENO1 陽性染色的強度百分比。根據 ENO1 染色強度，ENO1 表現被分為 4 個類別中的 1 個：3：強烈表現；2：中度表現；1：微弱或模糊表現；以及 0：無表現。

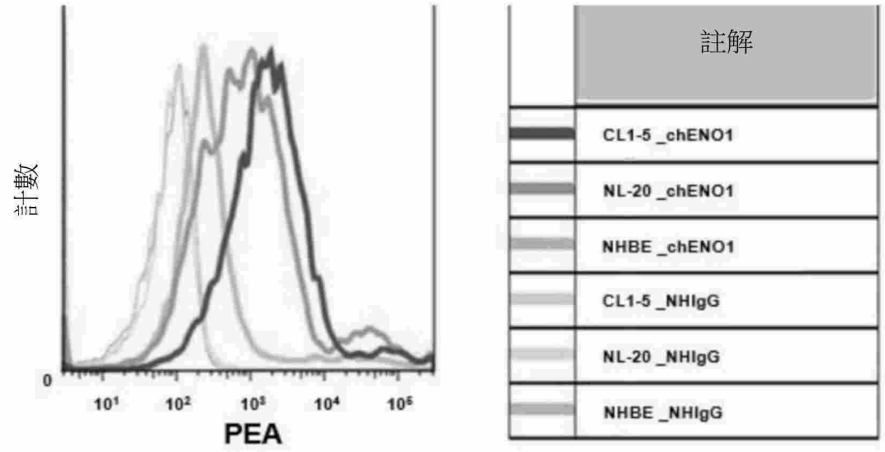
圖 11 ： LRP5 及 LRP6 對於 ENO1 誘導的 SLUG 及 β- 連環蛋白穩定性是必需的。以載體或 hHGF 刺激被 shLacZ 或 ENO1 shRNA 或 LRP5/6 shRNA 感染的 CL1-5 細胞 10 分鐘，接著進行西方墨點法。

圖 12 ： ChENO1-22 抗體減少活體內肺癌細胞轉移。給小鼠施用 10 或 20 mg/kg 的 chENO1，並示出經治療小鼠的體重。

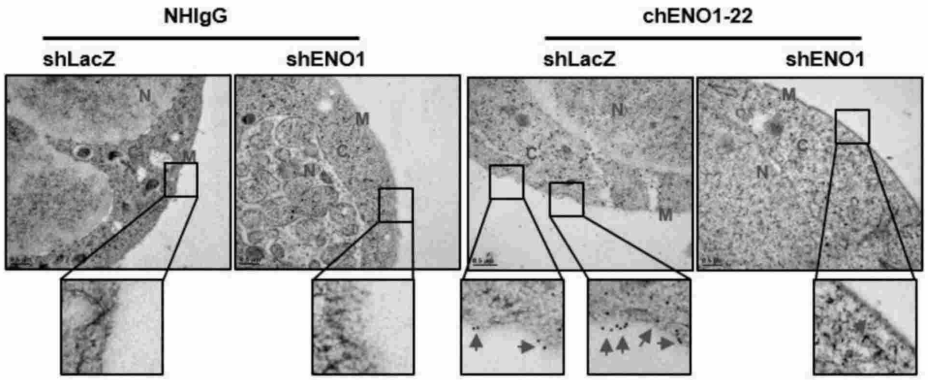
圖 13 ：本發明的 chENO1-22 抗體的 V_H 及 V_L 的胺基酸序列。



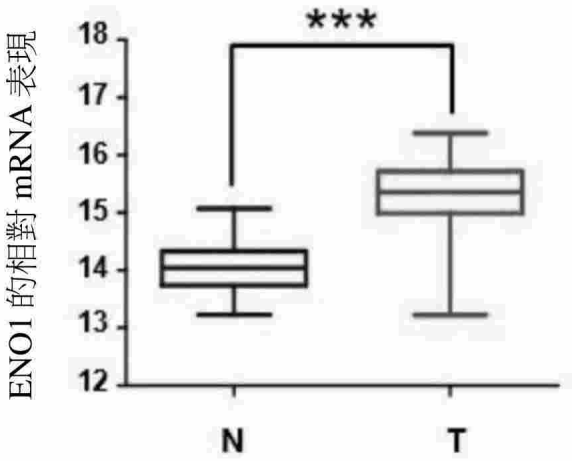
【圖1A】


計數
0
10^1
10^2
10^3
10^4
10^5
PEA
註解
CL1-5 _chENO1
NL-20 _chENO1
NHBE _chENO1
CL1-5 _NHIgG
NL-20 _NHIgG
NHBE _NHIgG

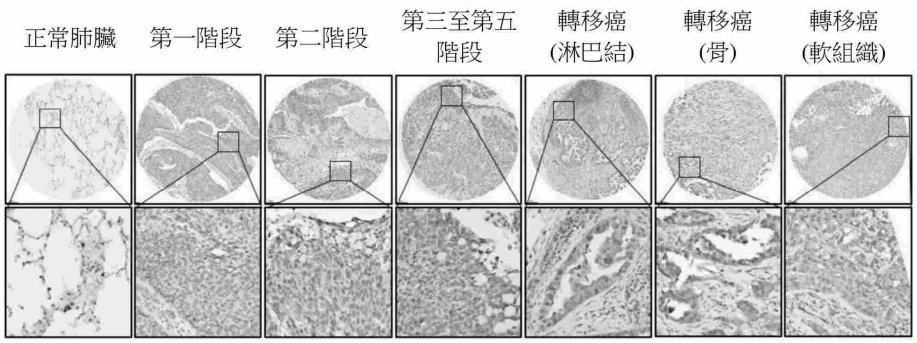
【圖1B】


NHIgG
chENO1-22
shLacZ
shENO1
shLacZ
shENO1
N
C
M

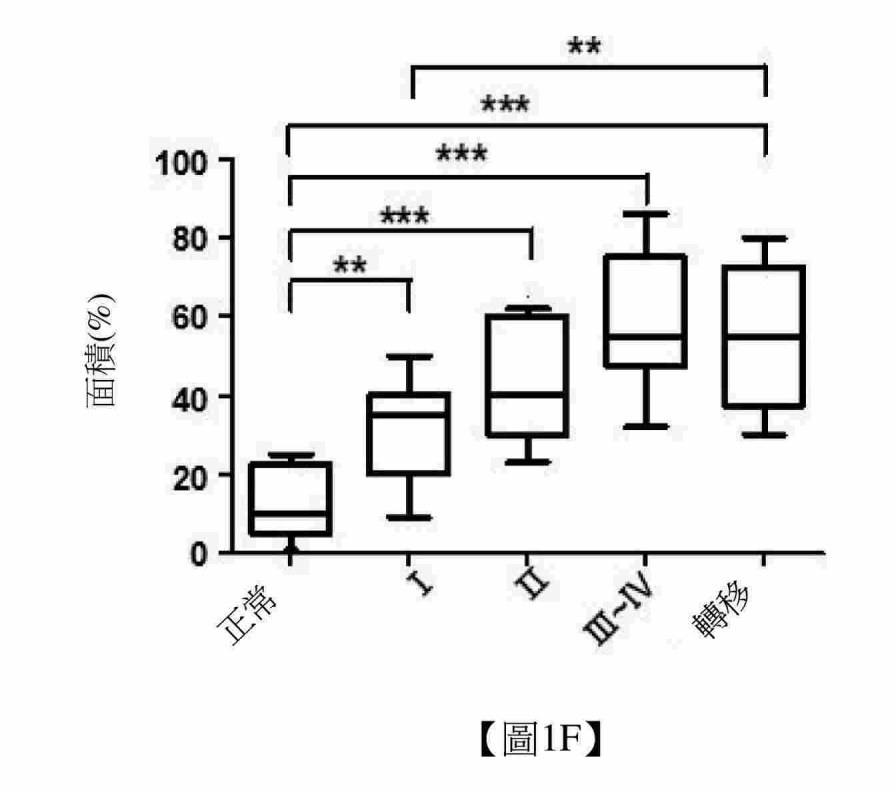
【圖1C】


***
ENO1 的相對 mRNA 表現
18
17
16
15
14
13
12
N
T

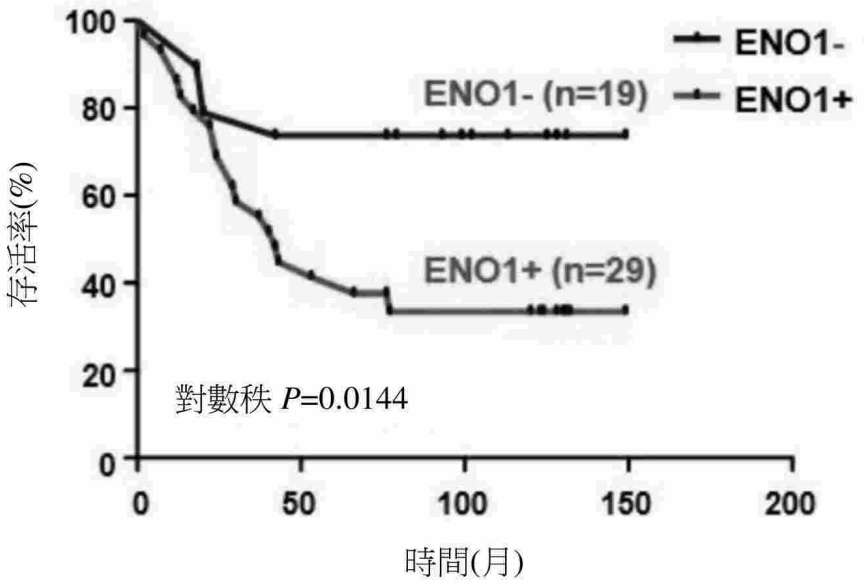
【圖1D】


正常肺臟
第一階段
第二階段
第三至第五階段
轉移癌(淋巴結)
轉移癌(骨)
轉移癌(軟組織)

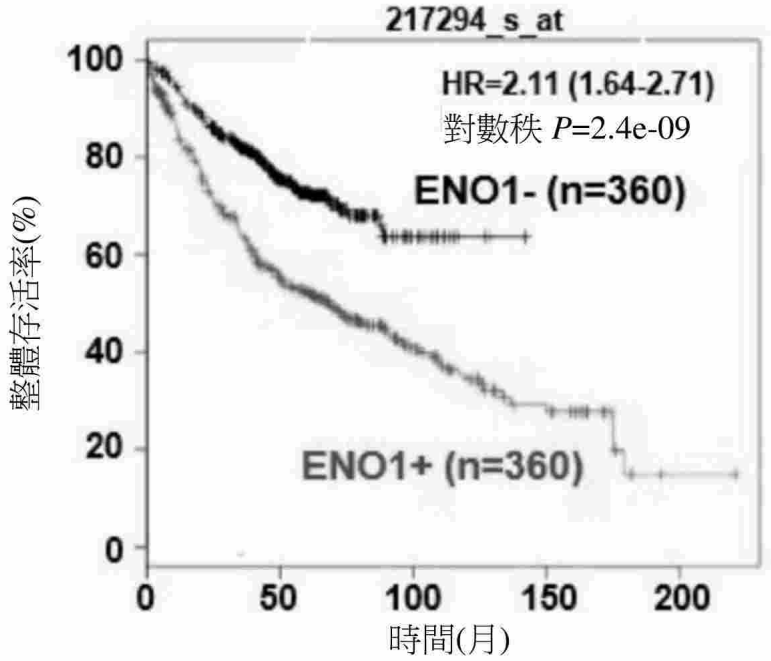
【圖1E】


面積(%)
100
80
60
40
20
0
**
***
***
***
**
正常
I
II
III~IV
轉移

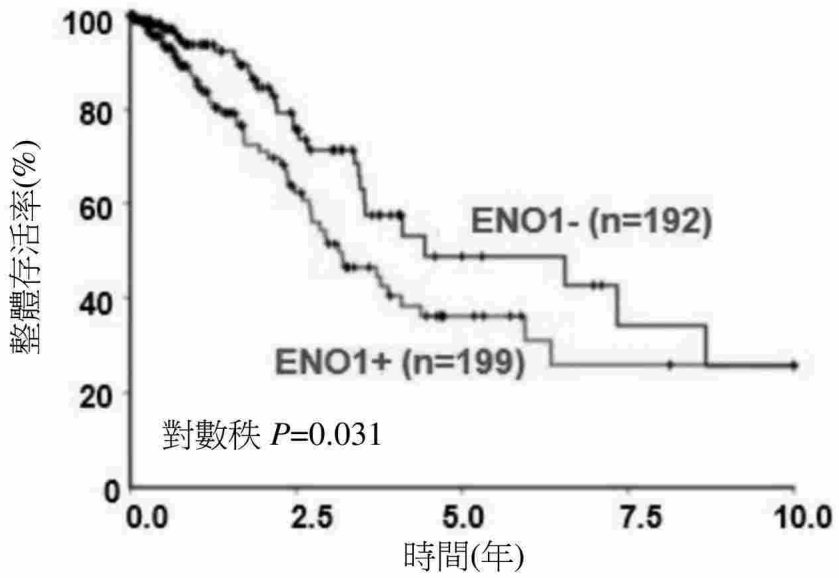
【圖1F】


ENO1-
ENO1+
ENO1- (n=19)
ENO1+ (n=29)
對數秩 P=0.0144
存活率(%)
時間(月)
100
80
60
40
20
0
0
50
100
150
200

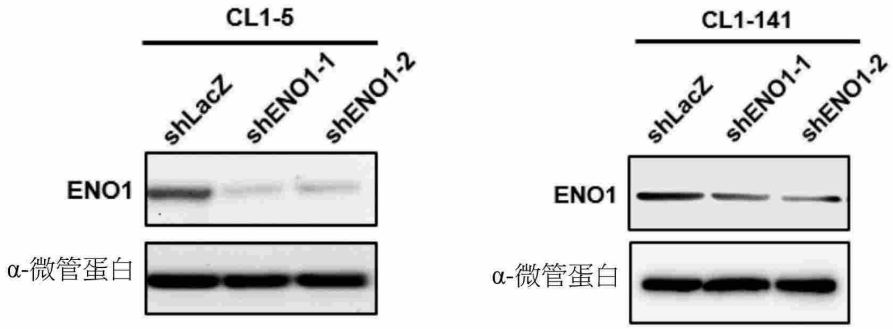
【圖1G】


217294_s_at
HR=2.11 (1.64-2.71)
對數秩 P=2.4e-09
ENO1- (n=360)
ENO1+ (n=360)
整體存活率(%)
時間(月)
100
80
60
40
20
0
0
50
100
150
200

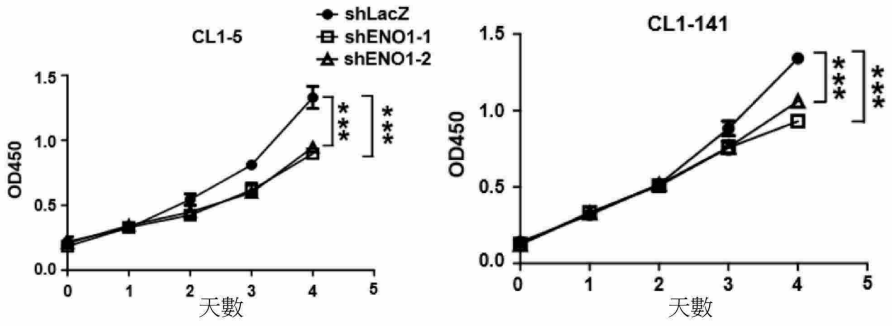
【圖1H】


整體存活率(%)
100
80
60
40
20
0
ENO1- (n=192)
ENO1+ (n=199)
對數秩 P=0.031
0.0
2.5
5.0
7.5
10.0
時間(年)

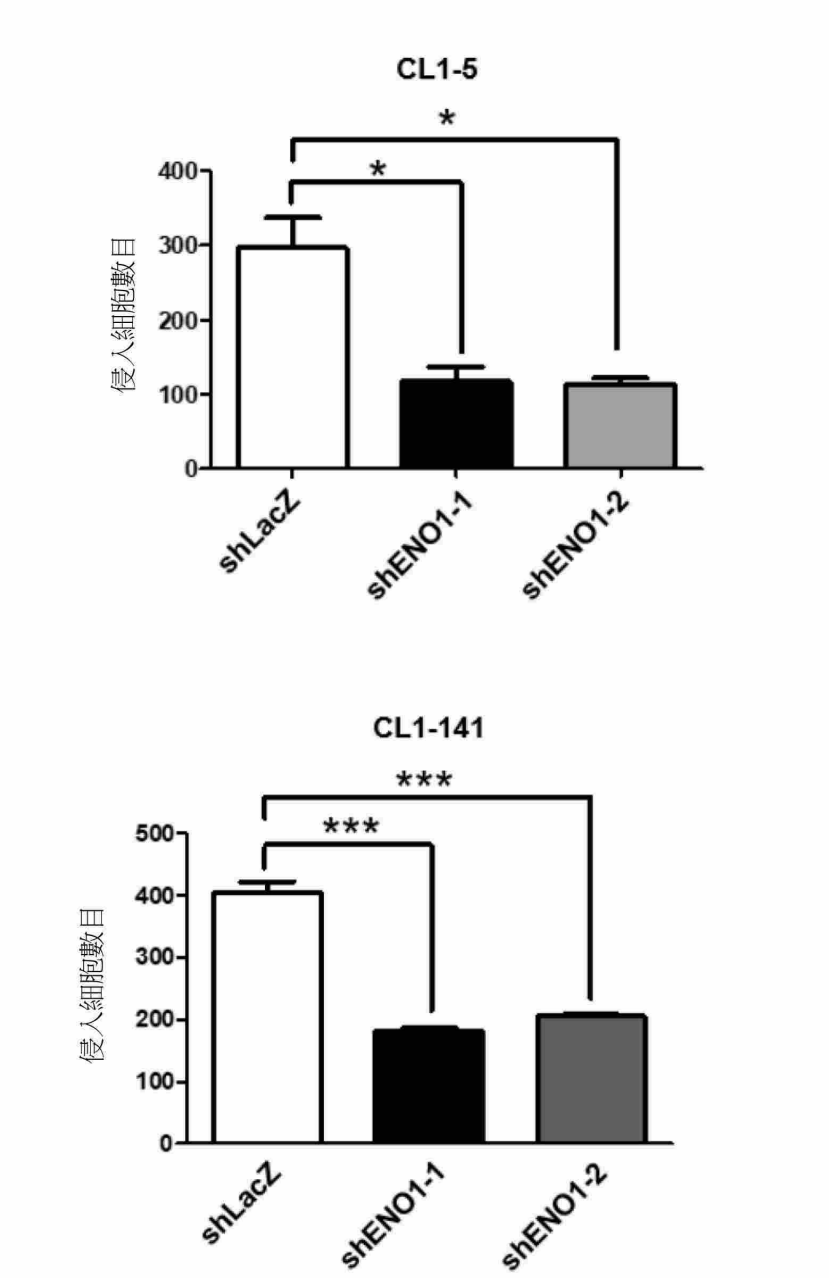
【圖1I】


CL1-5
shLacZ
shENO1-1
shENO1-2
ENO1
α-微管蛋白
CL1-141
shLacZ
shENO1-1
shENO1-2
ENO1
α-微管蛋白

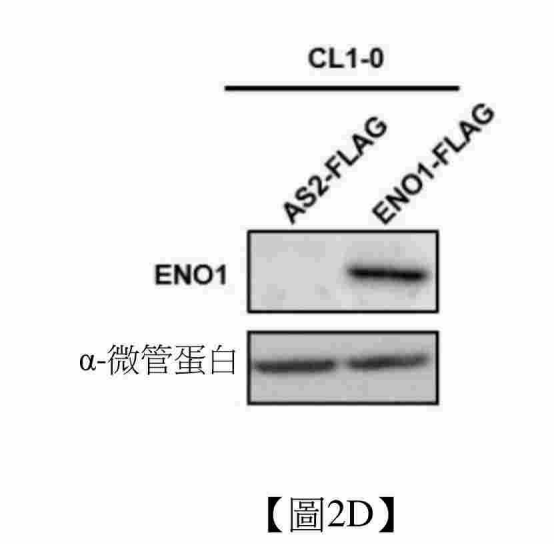
【圖2A】


CL1-5
shLacZ
shENO1-1
shENO1-2
OD450
1.5
1.0
0.5
0.0
0
1
2
3
4
5
天數
***
***
CL1-141
OD450
1.5
1.0
0.5
0.0
0
1
2
3
4
5
天數
***
***

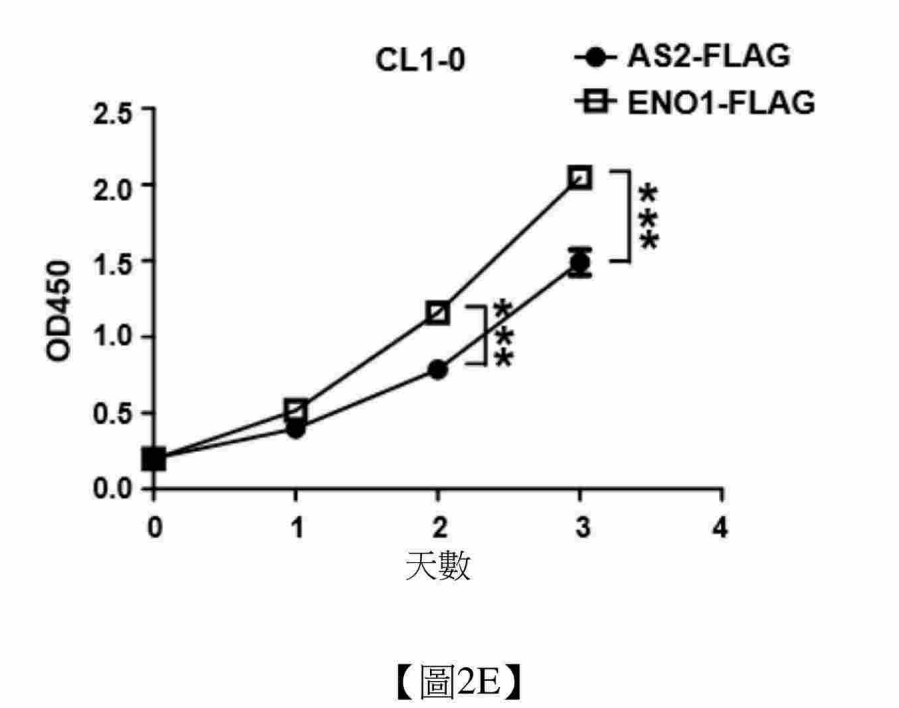
【圖2B】


CL1-5
*
*
400
300
200
100
0
侵入細胞數目
shLacZ
shENO1-1
shENO1-2
CL1-141
***
***
500
400
300
200
100
0
侵入細胞數目
shLacZ
shENO1-1
shENO1-2

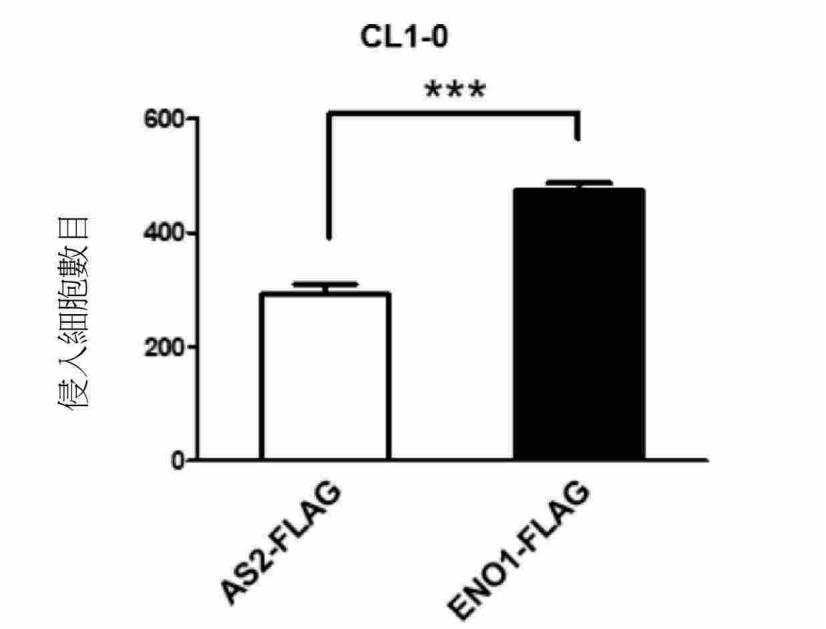
【圖2C】


CL1-0
AS2-FLAG
ENO1-FLAG
ENO1
α-微管蛋白

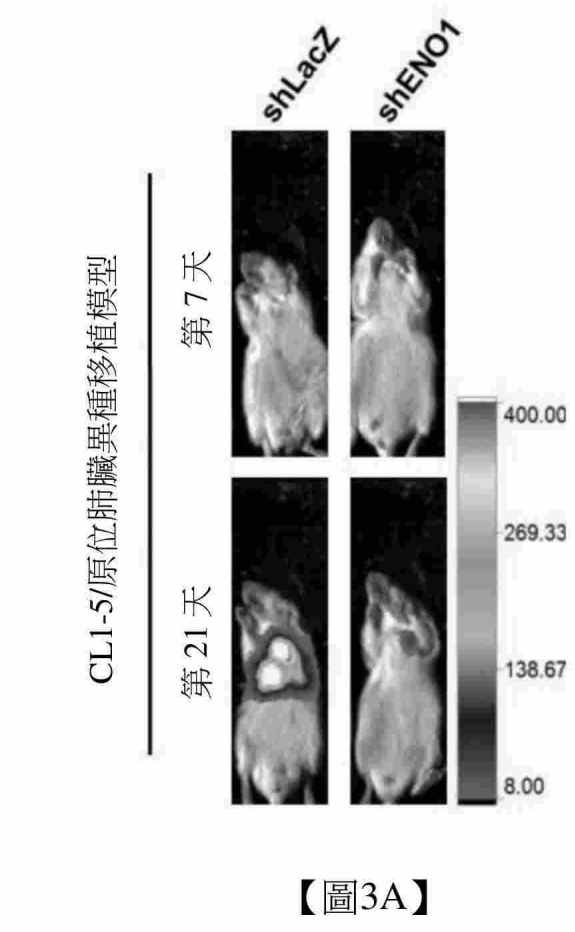
【圖2D】


CL1-0
AS2-FLAG
ENO1-FLAG
OD450
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
0
1
2
3
4
天數
***
***

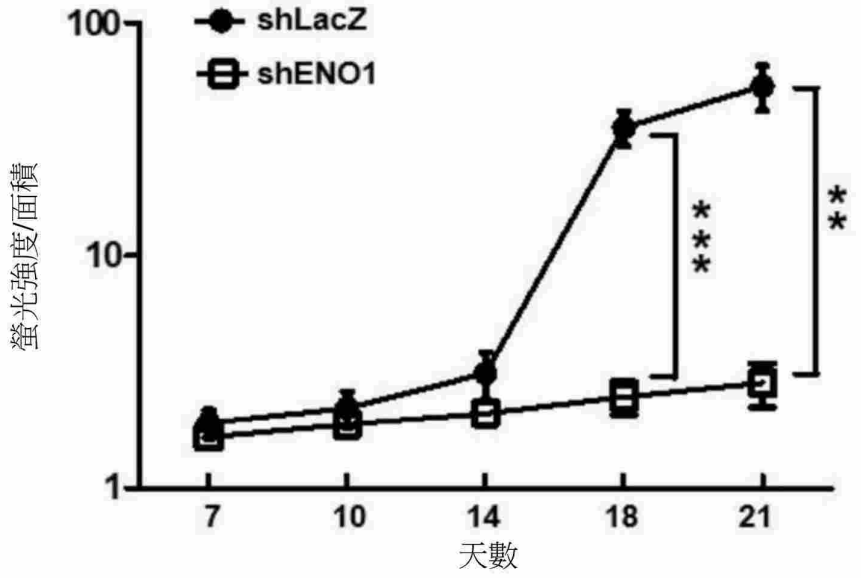
【圖2E】


CL1-0
***
600
400
200
0
侵入細胞數目
AS2-FLAG
ENO1-FLAG

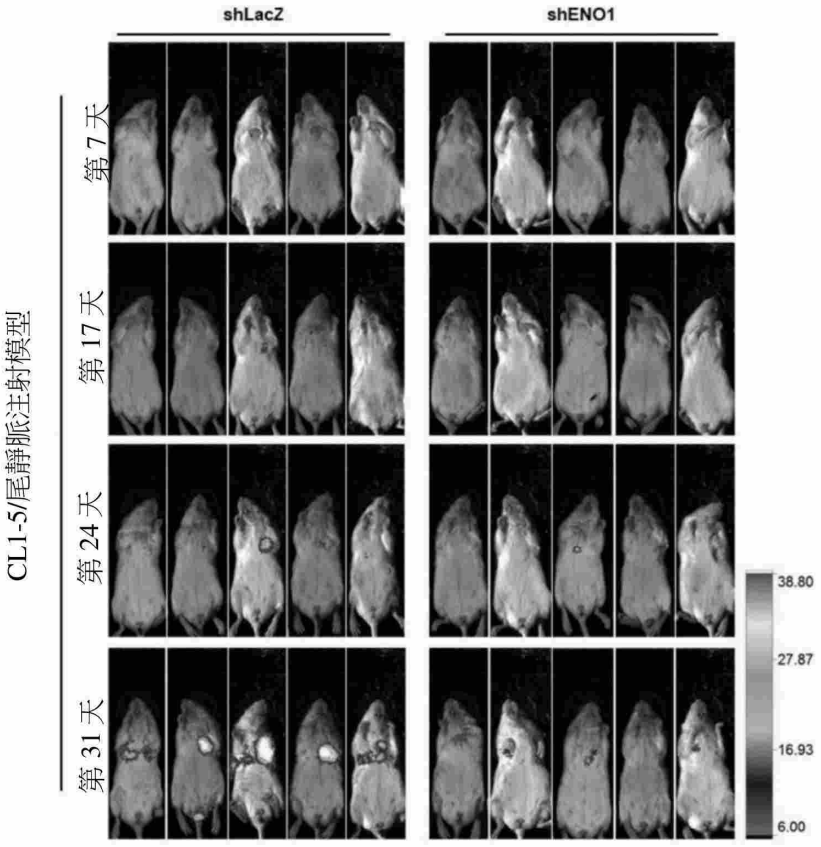
【圖2F】


shLacZ
shENO1
CL1-5/原位肺臟異種移植模型
第 7 天
第 21 天
400.00
269.33
138.67
8.00

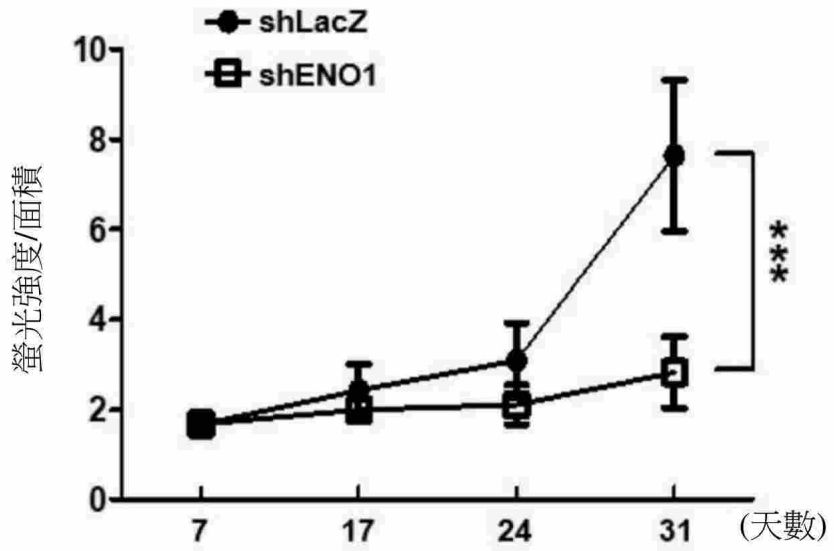
【圖3A】


100
10
1
shLacZ
shENO1
螢光強度/面積
***
**
7
10
14
18
21
天數

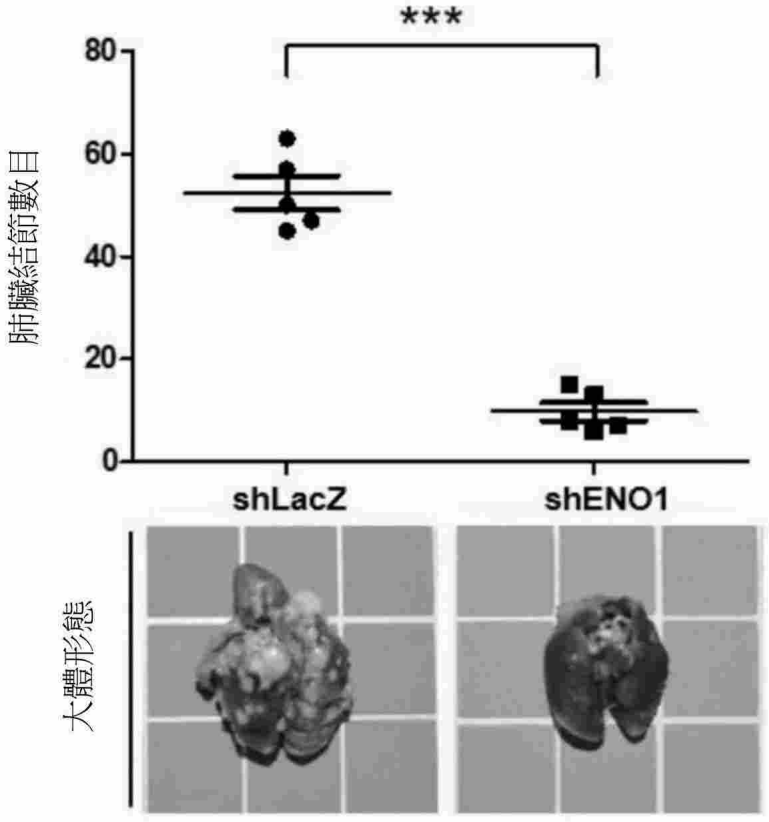
【圖3B】


shLacZ
shENO1
CL1-5/尾靜脈注射模型
第 7 天
第 17 天
第 24 天
第 31 天
38.80
27.87
16.93
6.00

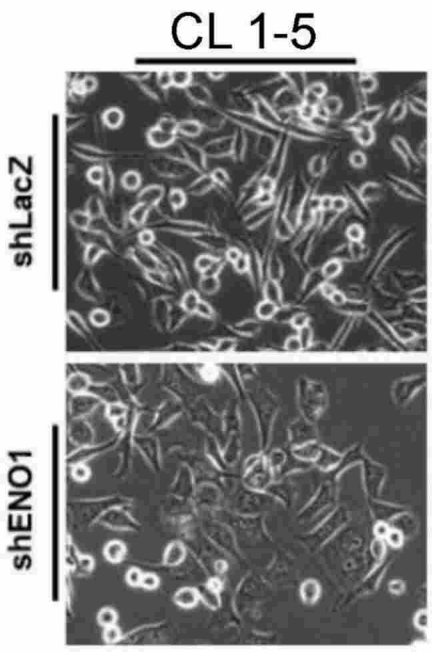
【圖3C】


shLacZ
shENO1
螢光強度/面積
10
8
6
4
2
0
7
17
24
31
(天數)
***

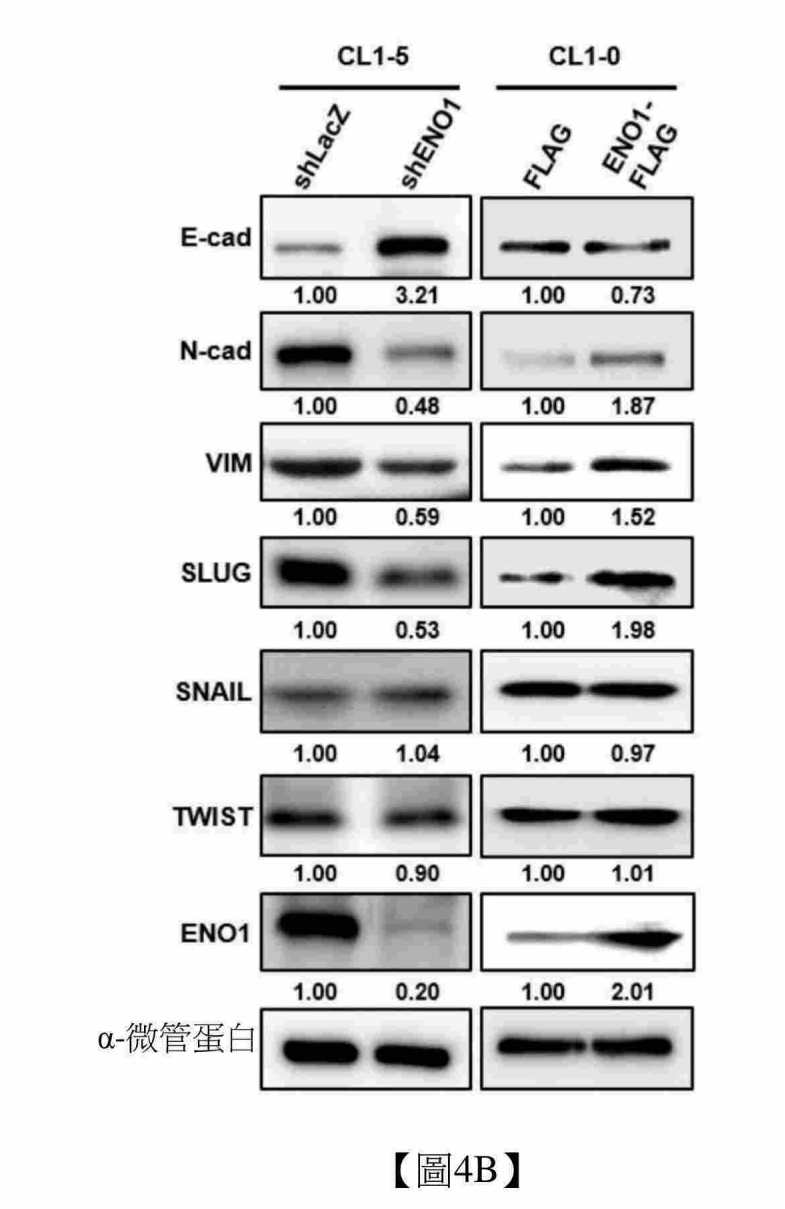
【圖3D】


***
肺臟結節數目
80
60
40
20
0
shLacZ
shENO1
大體形態

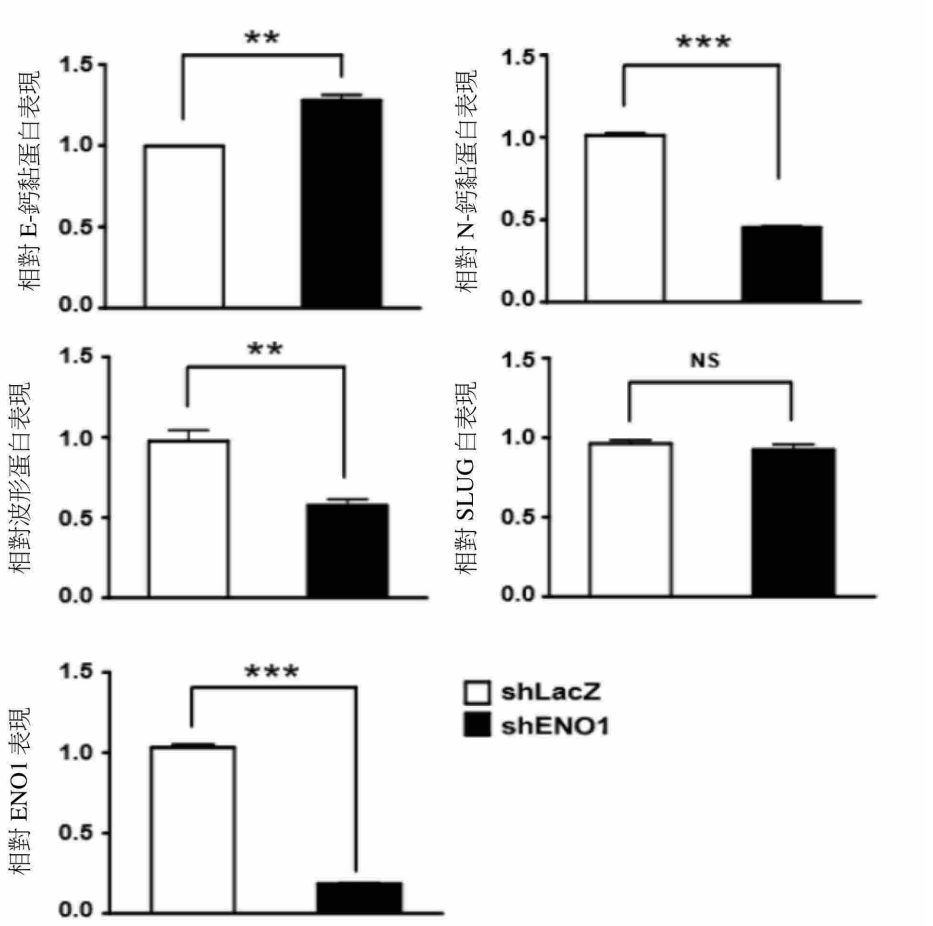
【圖3E】



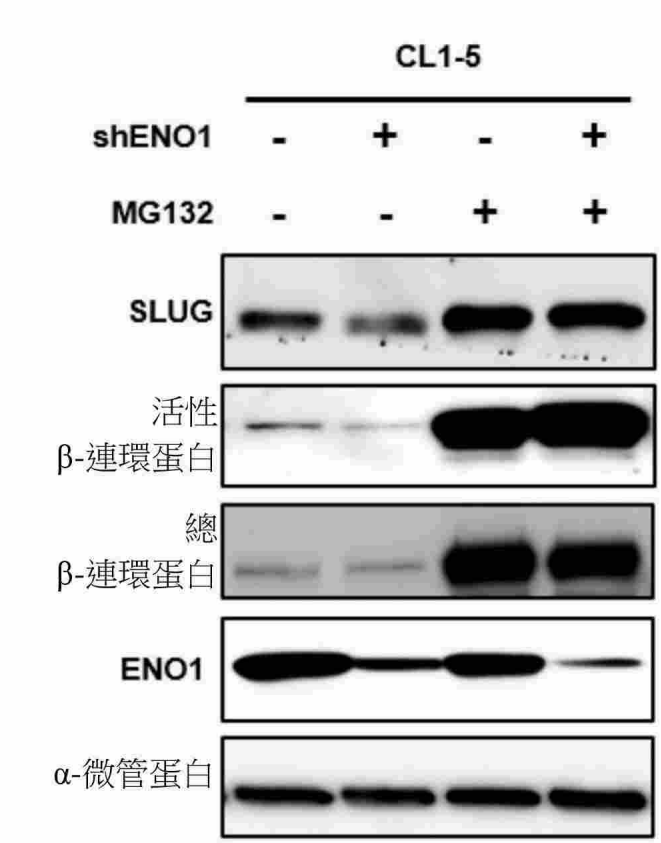
【圖4A】


CL1-5
CL1-0
shLacZ
shENO1
FLAG
ENO1-FLAG
E-cad
1.00 3.21 1.00 0.73
N-cad
1.00 0.48 1.00 1.87
VIM
1.00 0.59 1.00 1.52
SLUG
1.00 0.53 1.00 1.98
SNAIL
1.00 1.04 1.00 0.97
TWIST
1.00 0.90 1.00 1.01
ENO1
1.00 0.20 1.00 2.01
α-微管蛋白

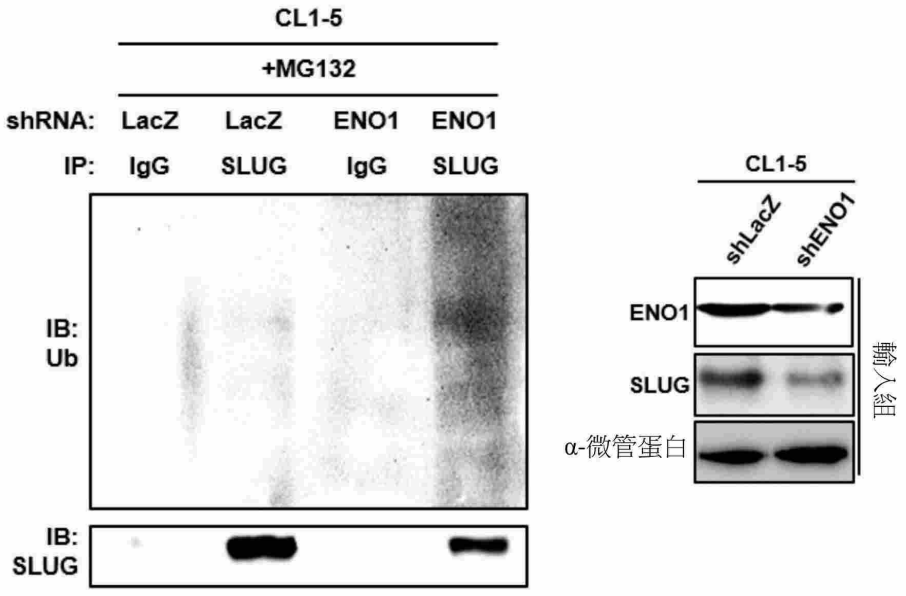
【圖4B】


相對 E-鈣黏蛋白表現
**
1.5
1.0
0.5
0.0
相對 N-鈣黏蛋白表現
***
相對波形蛋白表現
**
相對 SLUG 白表現
NS
相對 ENO1 表現
***
shLacZ
shENO1

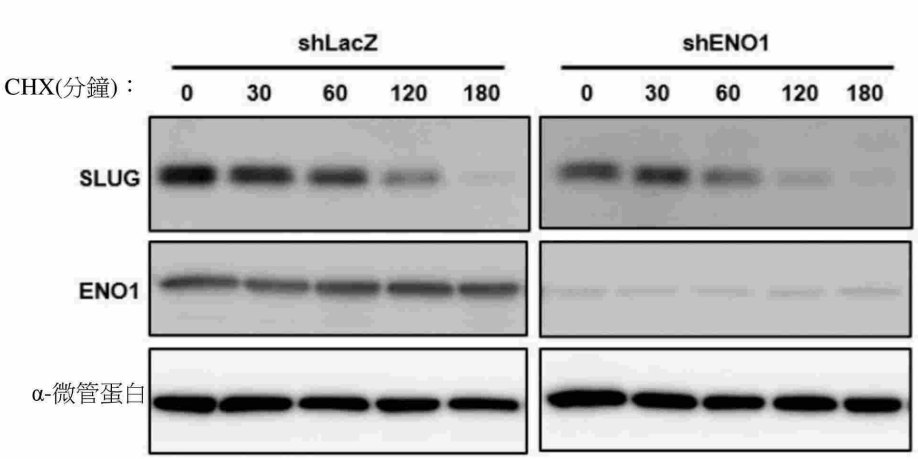
【圖4C】


CL1-5
shENO1 - + - +
MG132 - - + +
SLUG
活性
β-連環蛋白
總
β-連環蛋白
ENO1
α-微管蛋白

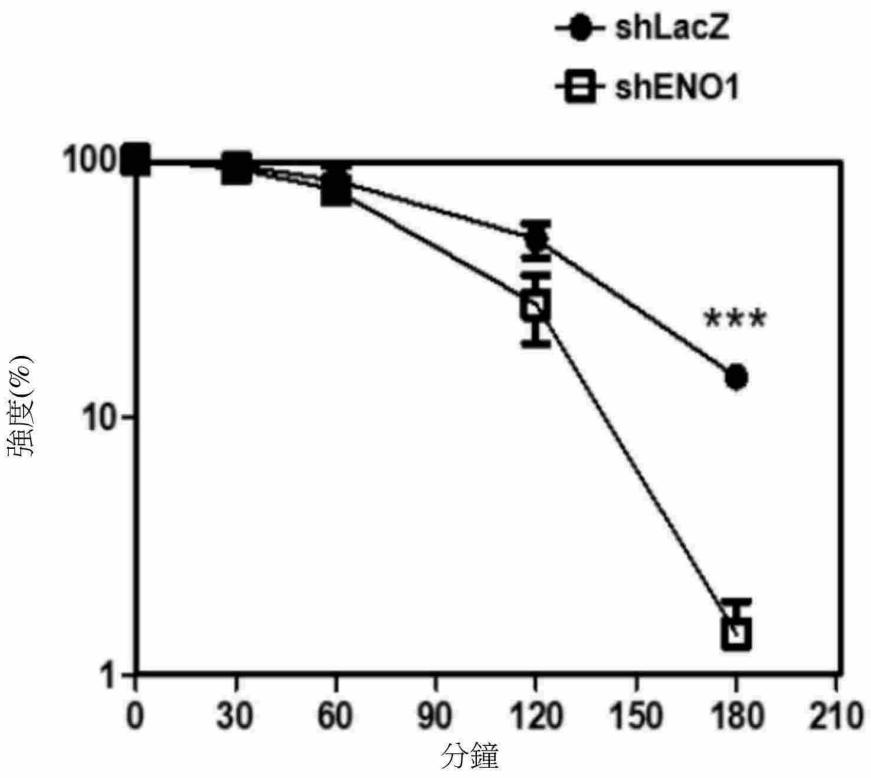
【圖4D】


CL1-5
+MG132
shRNA: LacZ LacZ ENO1 ENO1
IP: IgG SLUG IgG SLUG
IB: Ub
IB: SLUG
CL1-5
shLacZ
shENO1
ENO1
SLUG
α-微管蛋白
輸入組

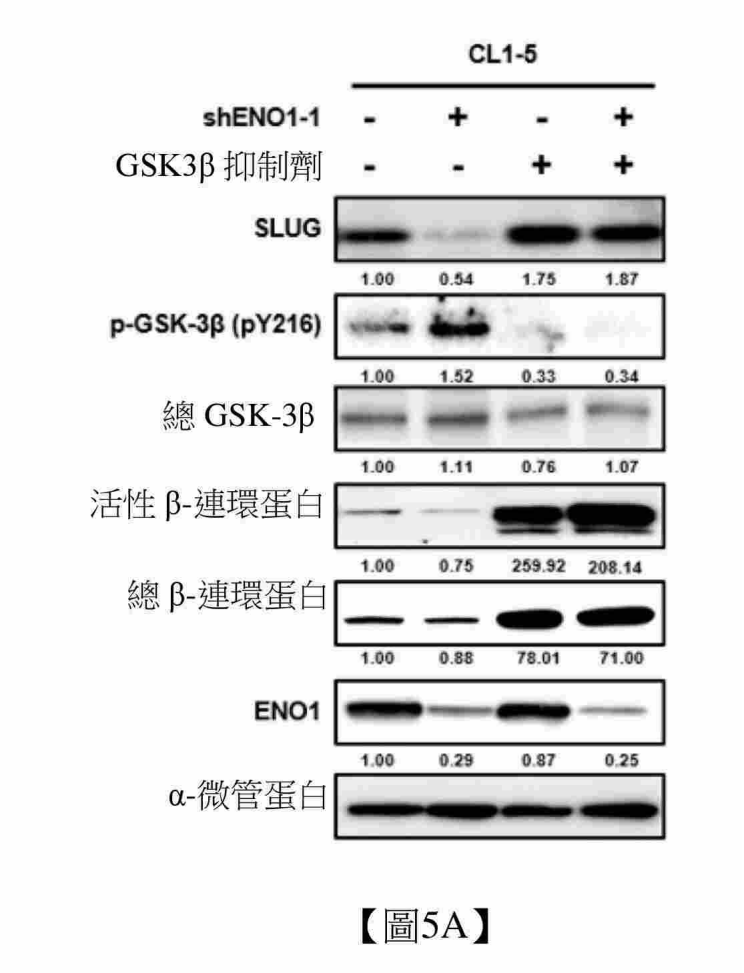
【圖4E】


shLacZ
shENO1
CHX(分鐘)：
0
30
60
120
180
0
30
60
120
180
SLUG
ENO1
α-微管蛋白

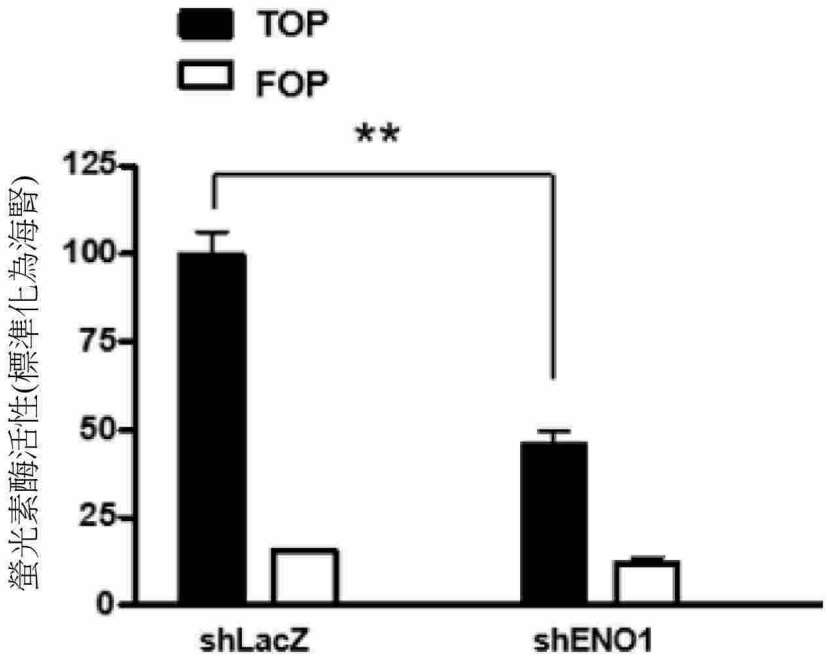
【圖4F】


shLacZ
shENO1
100
10
1
強度(%)
***
0
30
60
90
120
150
180
210
分鐘

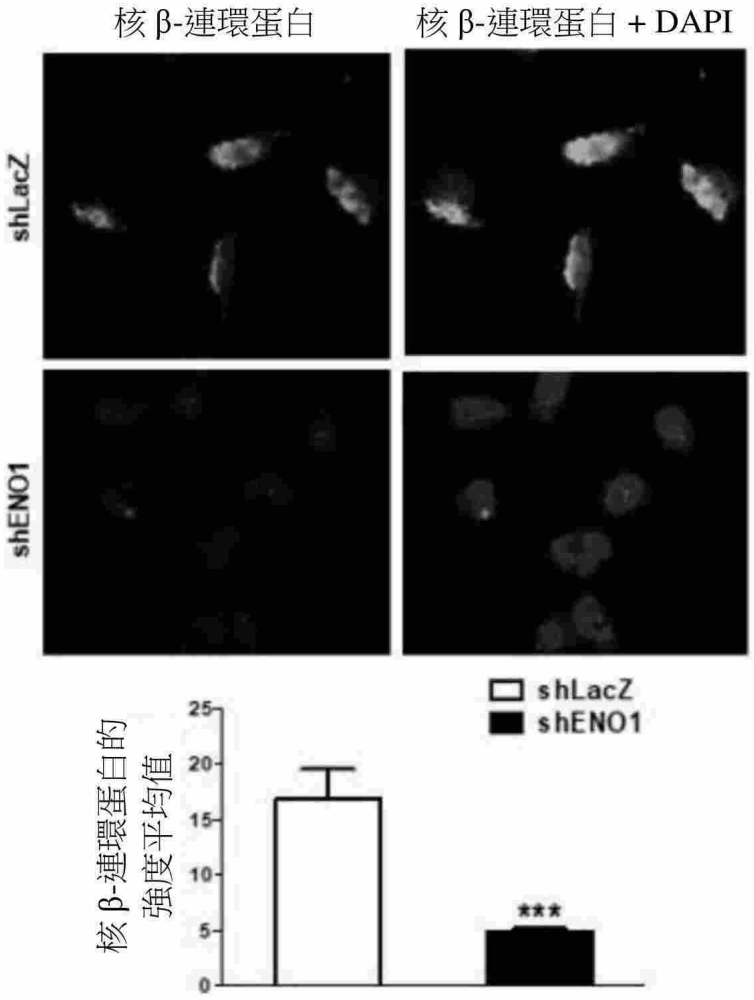
【圖4G】


CL1-5
shENO1-1 - + - +
GSK3β 抑制劑 - - + +
SLUG
1.00 0.54 1.75 1.87
p-GSK-3β (pY216)
1.00 1.52 0.33 0.34
總 GSK-3β
1.00 1.11 0.76 1.07
活性 β-連環蛋白
1.00 0.75 259.92 208.14
總 β-連環蛋白
1.00 0.88 78.01 71.00
ENO1
1.00 0.29 0.87 0.25
α-微管蛋白

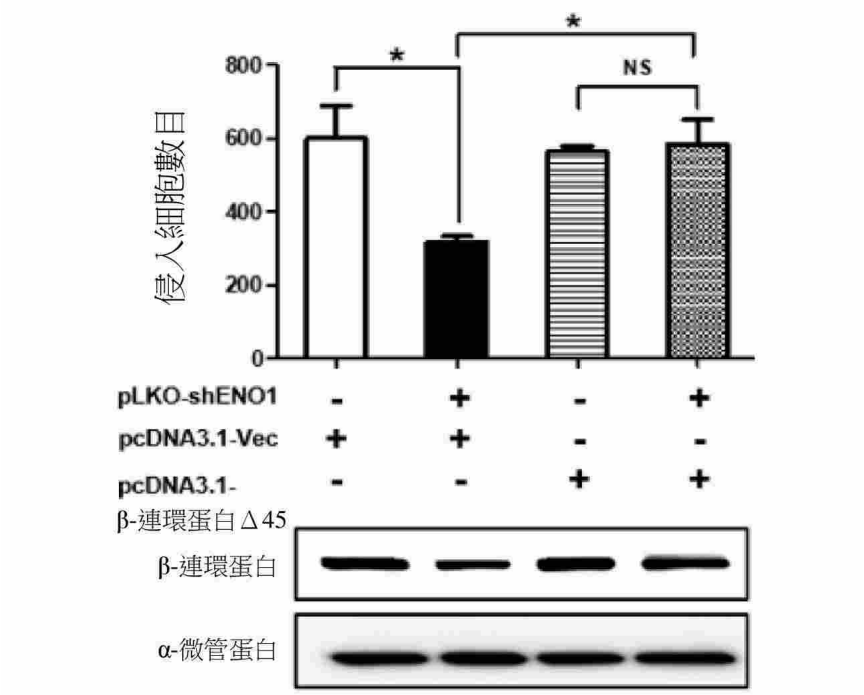
【圖5A】


TOP
FOP
**
螢光素酶活性(標準化為海腎)
125
100
75
50
25
0
shLacZ
shENO1

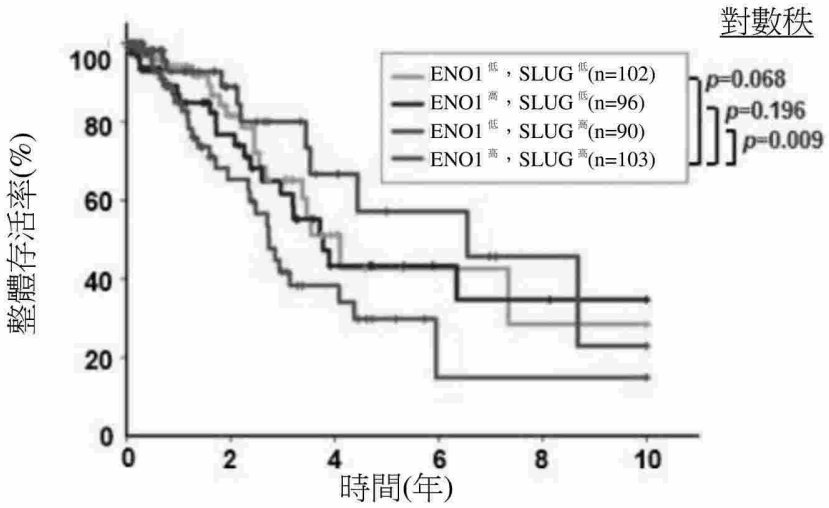
【圖5B】


核 β-連環蛋白
核 β-連環蛋白 + DAPI
shLacZ
shENO1
shLacZ
shENO1
核 β-連環蛋白的
強度平均值
25
20
15
10
5
0
***

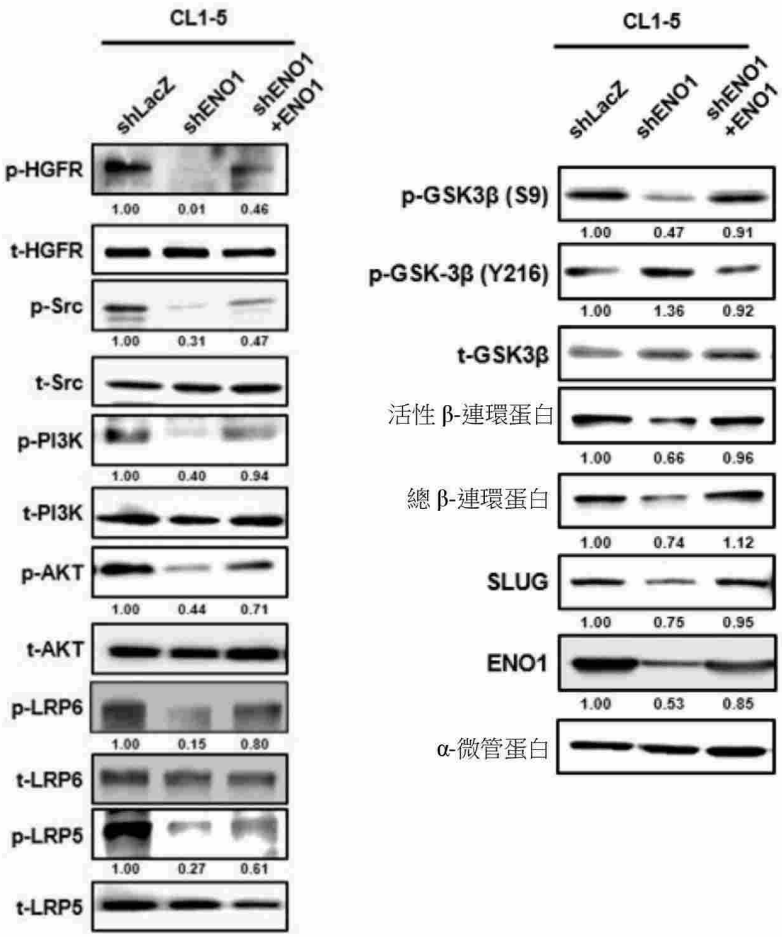
【圖5C】


侵入細胞數目
800
600
400
200
0
*
*
NS
pLKO-shENO1 - + - +
pcDNA3.1-Vec + + - -
pcDNA3.1- - - + +
β-連環蛋白Δ45
β-連環蛋白
α-微管蛋白

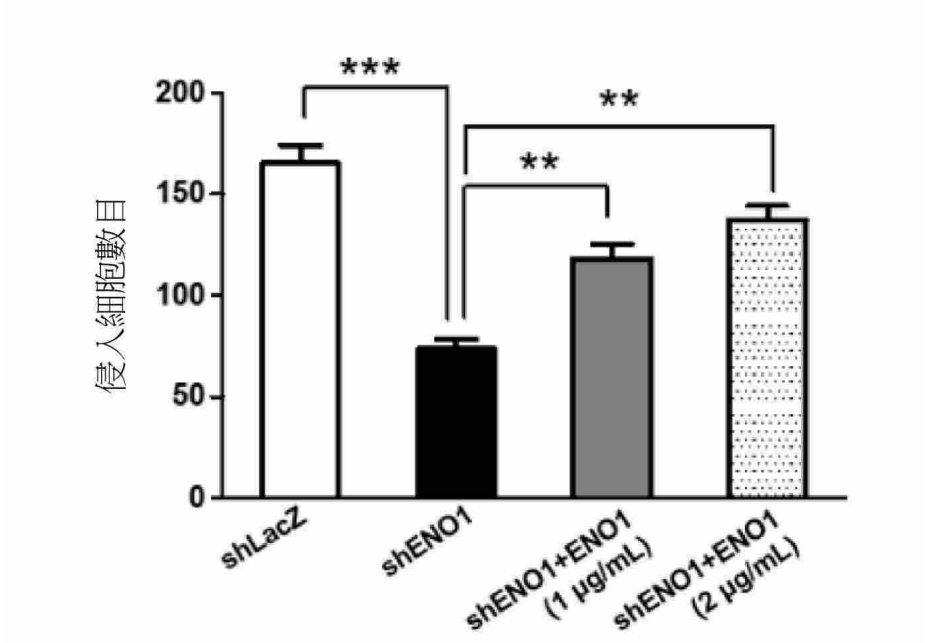
【圖5D】


對數秩
整體存活率(%)
100
80
60
40
20
0
0
2
4
6
8
10
時間(年)
ENO1低，SLUG低(n=102)
ENO1高，SLUG低(n=96)
ENO1低，SLUG高(n=90)
ENO1高，SLUG高(n=103)
p=0.068
p=0.196
p=0.009

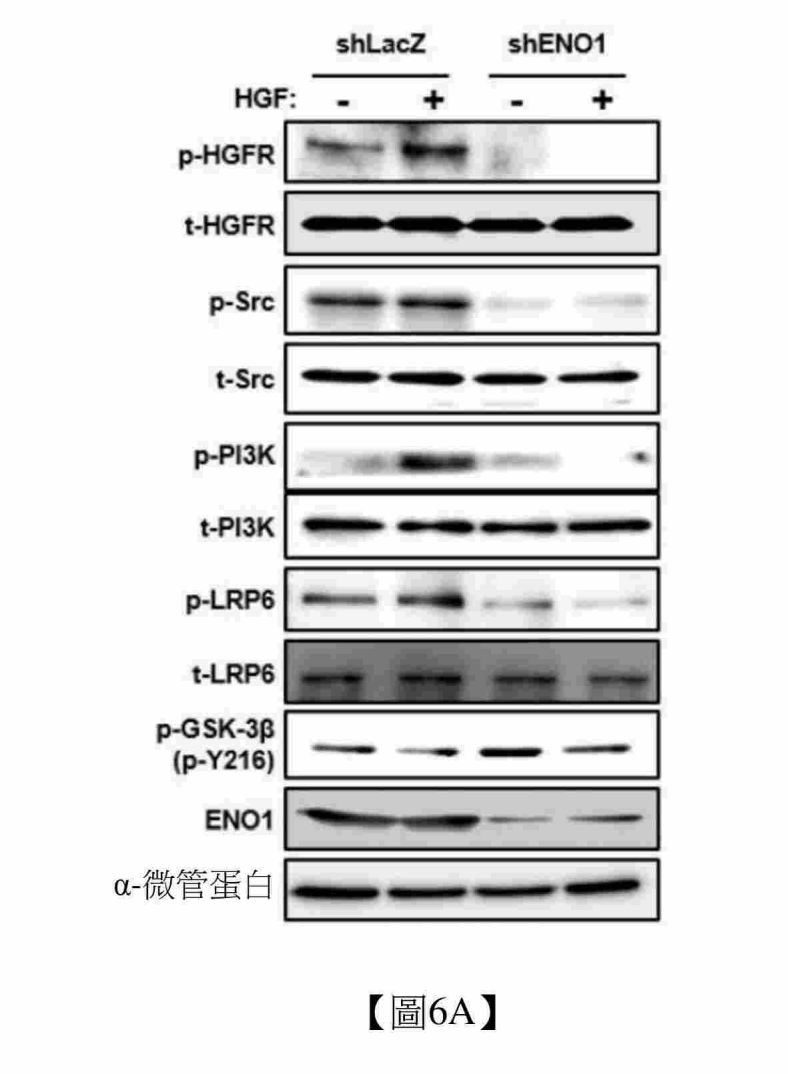
【圖5E】


CL1-5
shLacZ
shENO1
shENO1 +ENO1
p-HGFR
1.00 0.01 0.46
t-HGFR
p-Src
1.00 0.31 0.47
t-Src
p-PI3K
1.00 0.40 0.94
t-PI3K
p-AKT
1.00 0.44 0.71
t-AKT
p-LRP6
1.00 0.15 0.80
t-LRP6
p-LRP5
1.00 0.27 0.61
t-LRP5
CL1-5
shLacZ
shENO1
shENO1 +ENO1
p-GSK3β (S9)
1.00 0.47 0.91
p-GSK-3β (Y216)
1.00 1.36 0.92
t-GSK3β
活性 β-連環蛋白
1.00 0.66 0.96
總 β-連環蛋白
1.00 0.74 1.12
SLUG
1.00 0.75 0.95
ENO1
1.00 0.53 0.85
α-微管蛋白

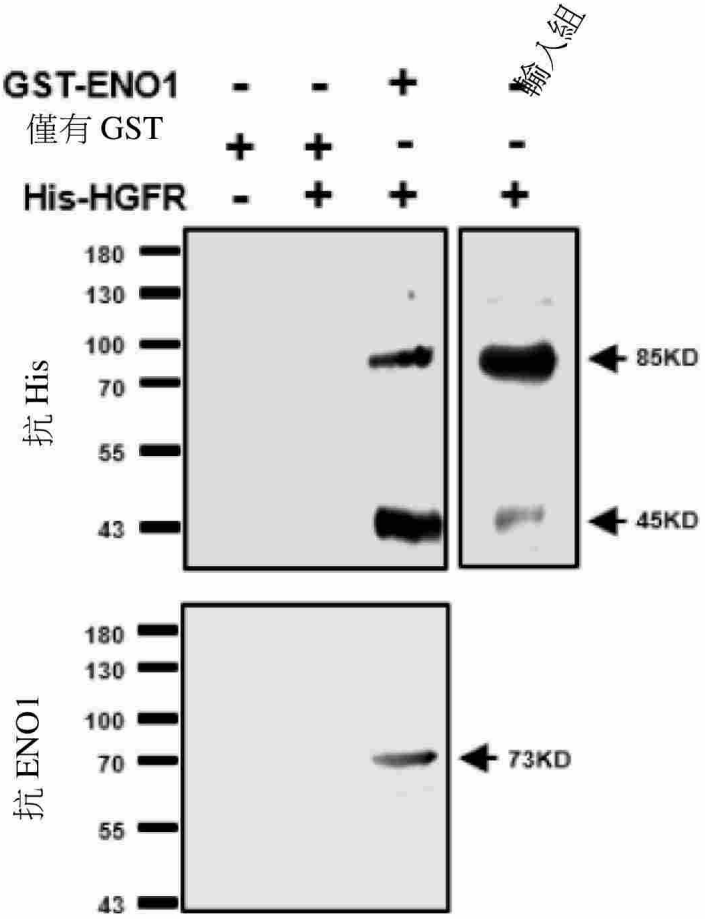
【圖5F】


侵入細胞數目
200
150
100
50
0
***
**
**
shLacZ
shENO1
shENO1+ENO1 (1 μg/mL)
shENO1+ENO1 (2 μg/mL)

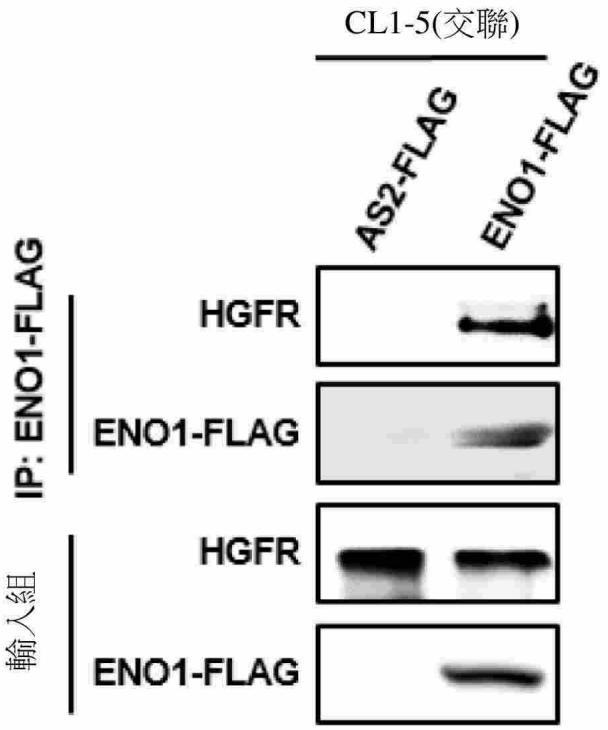
【圖5G】


shLacZ
shENO1
HGF: - + - +
p-HGFR
t-HGFR
p-Src
t-Src
p-PI3K
t-PI3K
p-LRP6
t-LRP6
p-GSK-3β (p-Y216)
ENO1
α-微管蛋白

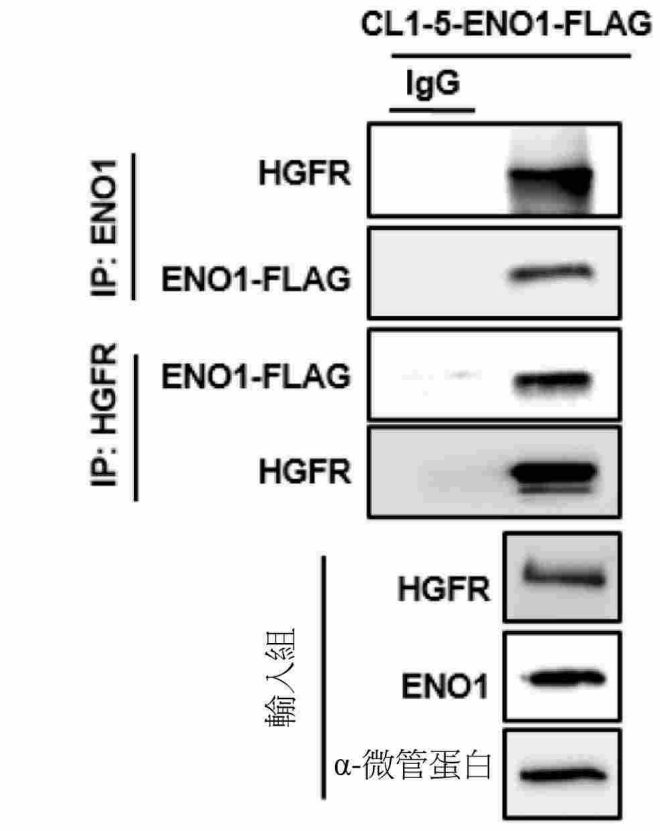
【圖6A】


GST-ENO1
僅有 GST
His-HGFR
輸入組
抗 His
抗 ENO1
180
130
100
70
55
43
85KD
45KD
73KD

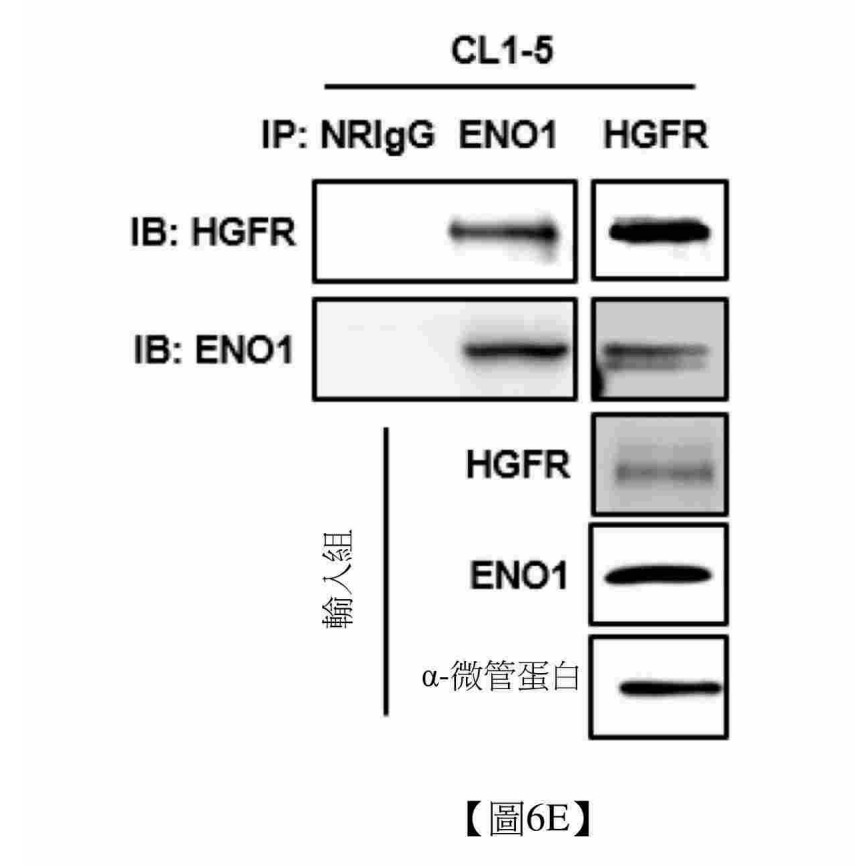
【圖6B】


CL1-5(交聯)
AS2-FLAG
ENO1-FLAG
IP: ENO1-FLAG
HGFR
ENO1-FLAG
輸入組
HGFR
ENO1-FLAG

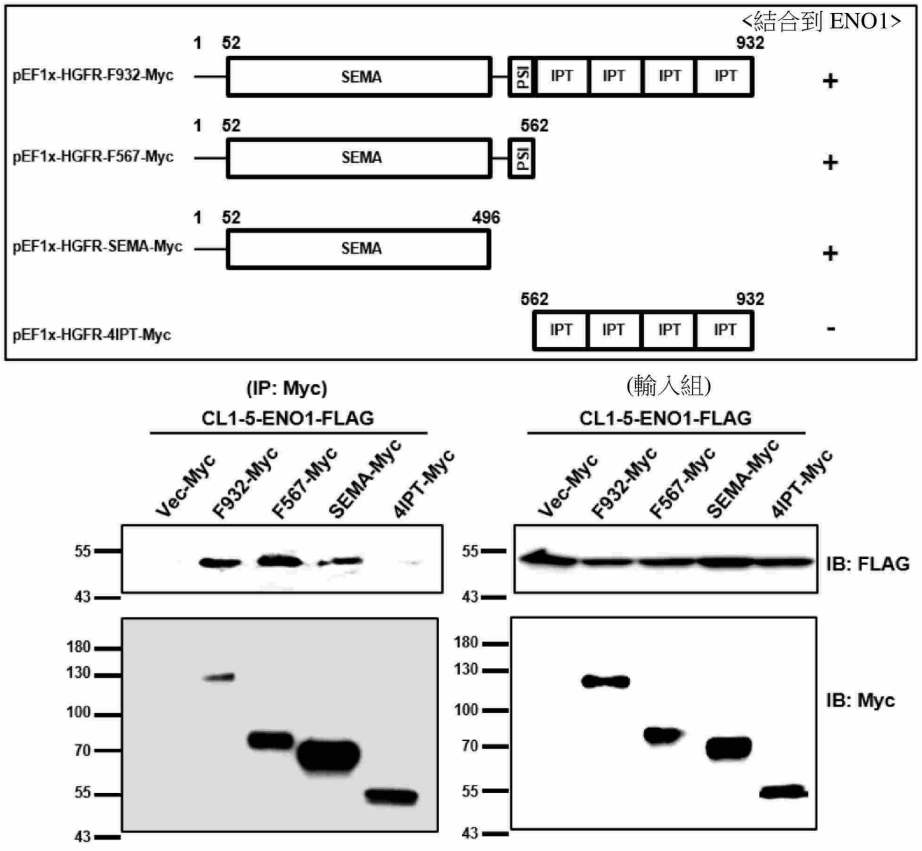
【圖6C】


CL1-5-ENO1-FLAG
IgG
IP: ENO1
HGFR
ENO1-FLAG
IP: HGFR
ENO1-FLAG
HGFR
輸入組
HGFR
ENO1
α-微管蛋白

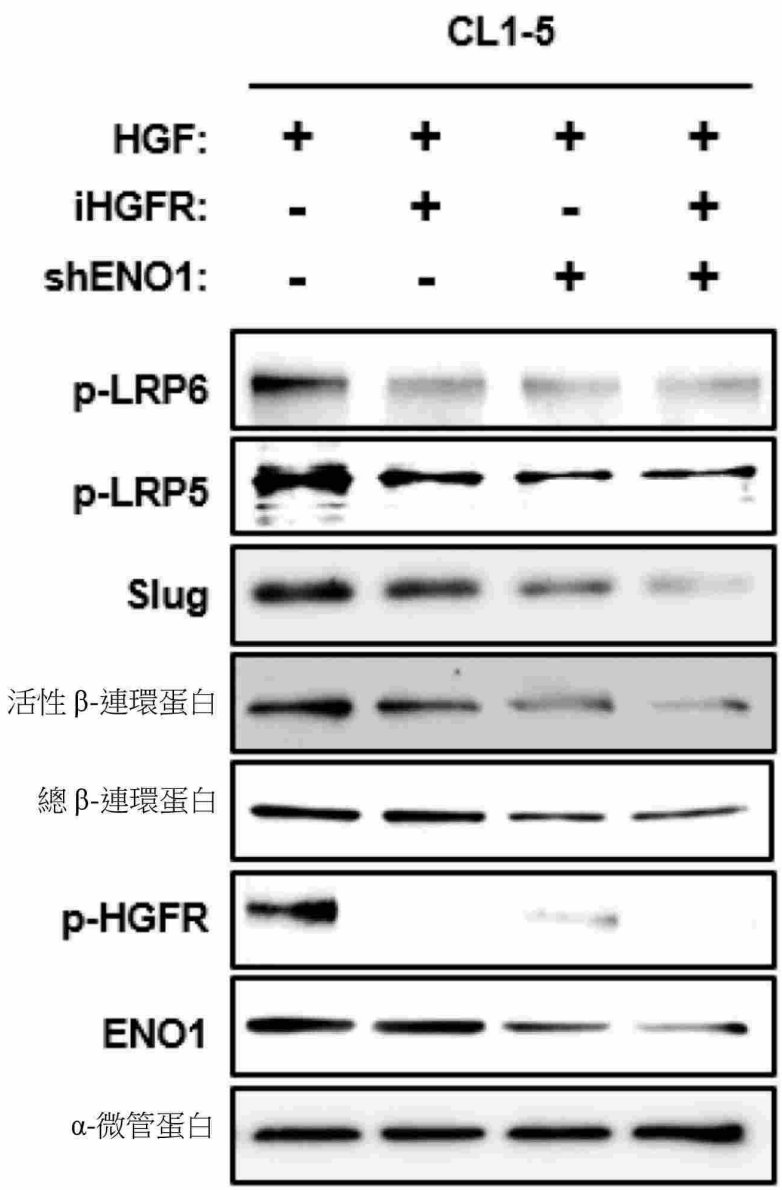
【圖6D】


CL1-5
IP: NRIgG ENO1 HGFR
IB: HGFR
IB: ENO1
輸入組
HGFR
ENO1
α-微管蛋白

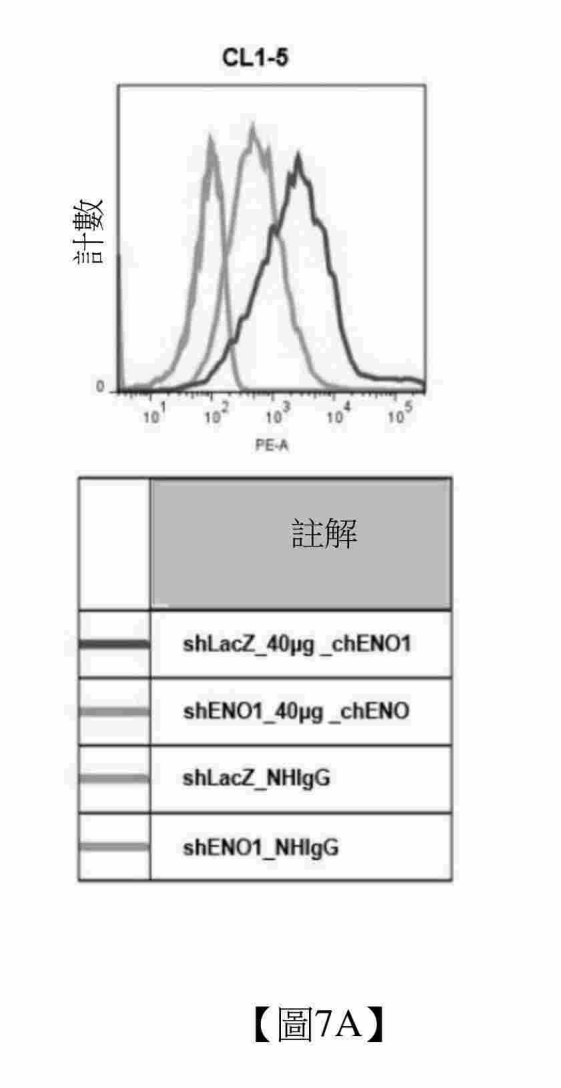
【圖6E】


<結合到 ENO1>
pEF1x-HGFR-F932-Myc
pEF1x-HGFR-F567-Myc
pEF1x-HGFR-SEMA-Myc
pEF1x-HGFR-4IPT-Myc
SEMA
PSI
IPT
(IP: Myc)
(輸入組)
CL1-5-ENO1-FLAG
Vec-Myc
F932-Myc
F567-Myc
SEMA-Myc
4IPT-Myc
IB: FLAG
IB: Myc

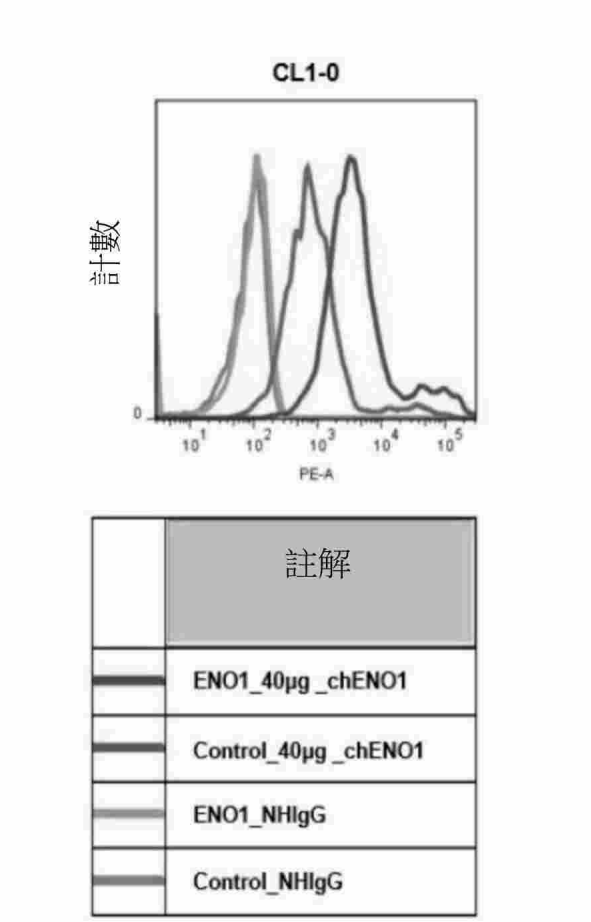
【圖6F】


CL1-5
HGF: + + + +
iHGFR: - + - +
shENO1: - - + +
p-LRP6
p-LRP5
Slug
活性 β-連環蛋白
總 β-連環蛋白
p-HGFR
ENO1
α-微管蛋白

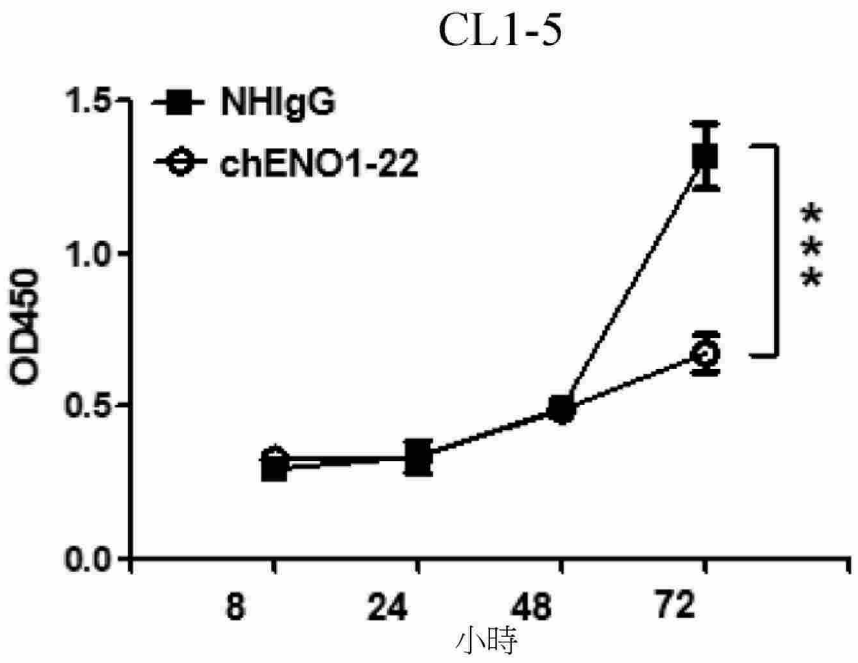
【圖6G】


CL1-5
計數
0
10^1
10^2
10^3
10^4
10^5
PE-A
註解
shLacZ_40μg _chENO1
shENO1_40μg _chENO
shLacZ_NHIgG
shENO1_NHIgG

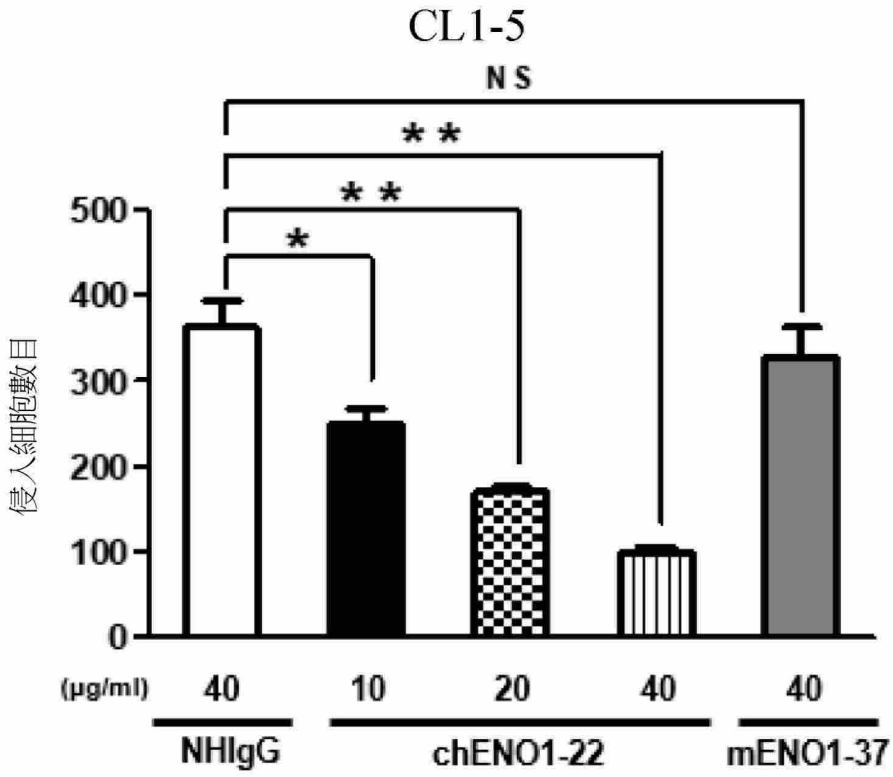
【圖7A】


CL1-0
計數
0
10^1
10^2
10^3
10^4
10^5
PE-A
註解
ENO1_40μg _chENO1
Control_40μg _chENO1
ENO1_NHIgG
Control_NHIgG

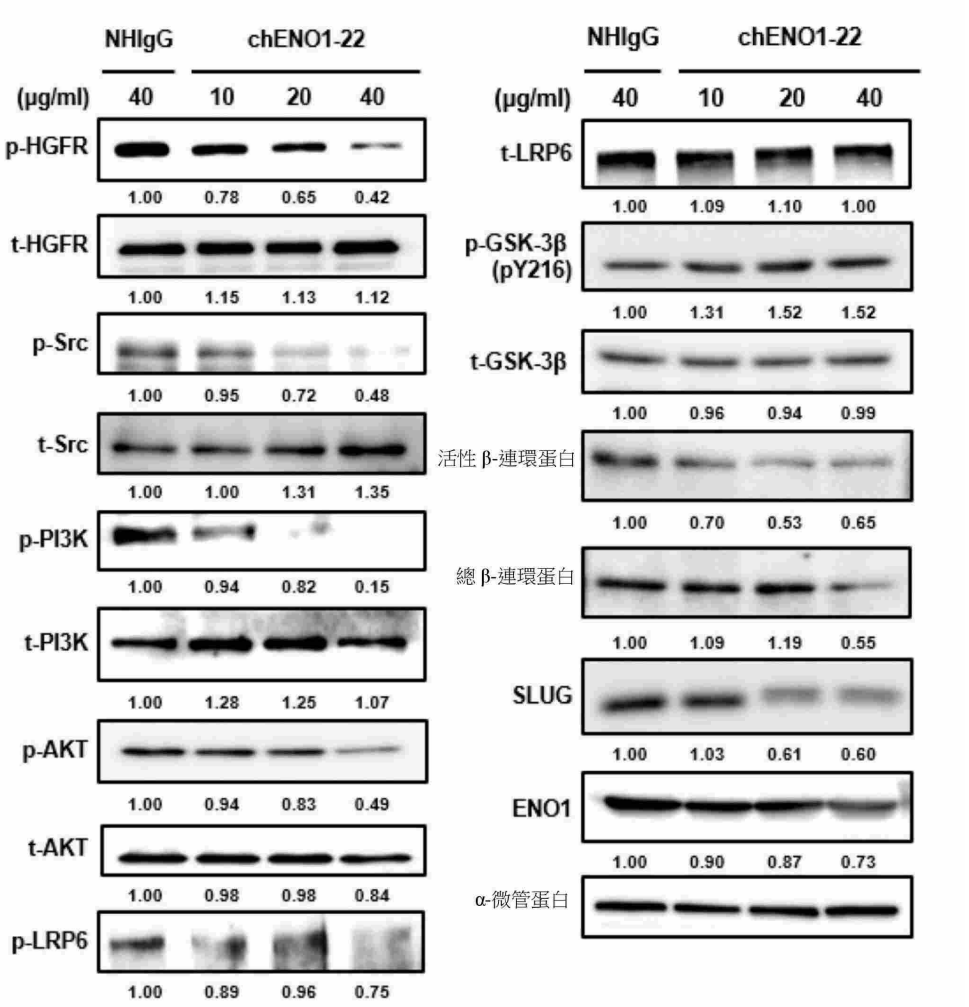
【圖7B】


CL1-5
NHIgG
chENO1-22
OD450
1.5
1.0
0.5
0.0
8
24
48
72
小時
***

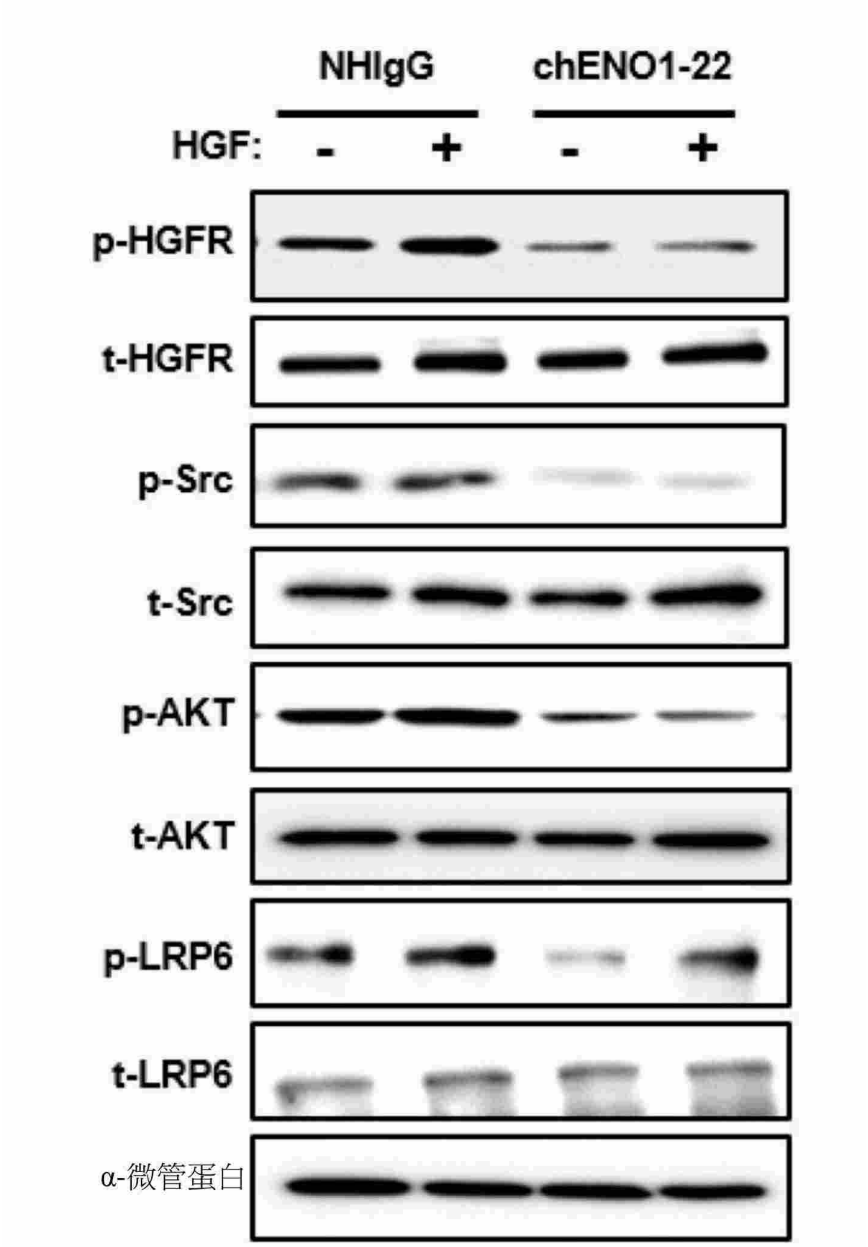
【圖7C】


CL1-5
NS
**
**
*
侵入細胞數目
500
400
300
200
100
0
(μg/ml)
40
10
20
40
40
NHIgG
chENO1-22
mENO1-37

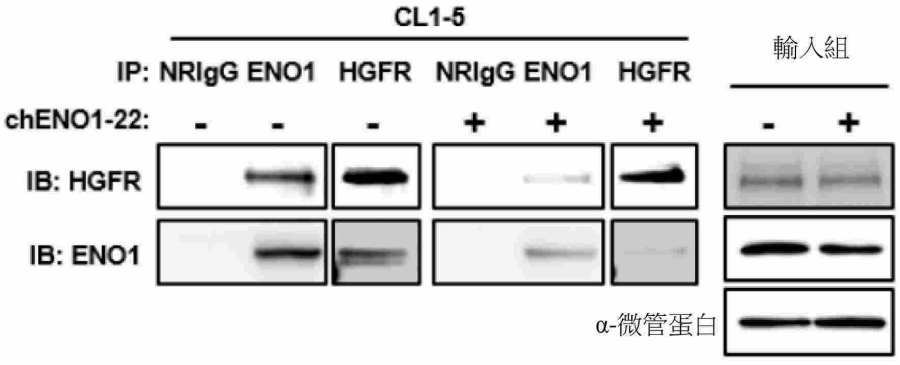
【圖7D】


NHIgG
chENO1-22
(μg/ml)
40
10
20
40
p-HGFR
1.00 0.78 0.65 0.42
t-HGFR
1.00 1.15 1.13 1.12
p-Src
1.00 0.95 0.72 0.48
t-Src
1.00 1.00 1.31 1.35
p-PI3K
1.00 0.94 0.82 0.15
t-PI3K
1.00 1.28 1.25 1.07
p-AKT
1.00 0.94 0.83 0.49
t-AKT
1.00 0.98 0.98 0.84
p-LRP6
1.00 0.89 0.96 0.75
NHIgG
chENO1-22
(μg/ml)
40
10
20
40
t-LRP6
1.00 1.09 1.10 1.00
p-GSK-3β (pY216)
1.00 1.31 1.52 1.52
t-GSK-3β
1.00 0.96 0.94 0.99
活性 β-連環蛋白
1.00 0.70 0.53 0.65
總 β-連環蛋白
1.00 1.09 1.19 0.55
SLUG
1.00 1.03 0.61 0.60
ENO1
1.00 0.90 0.87 0.73
α-微管蛋白

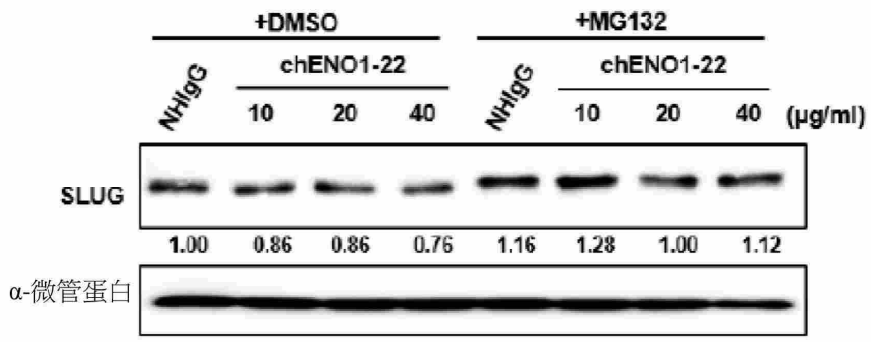
【圖7E】


NHIgG
chENO1-22
HGF: - + - +
p-HGFR
t-HGFR
p-Src
t-Src
p-AKT
t-AKT
p-LRP6
t-LRP6
α-微管蛋白

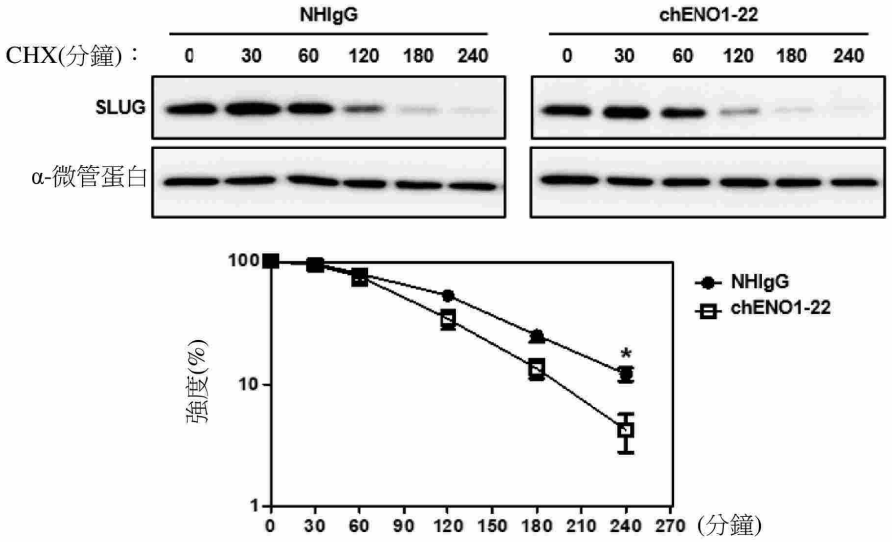
【圖7F】


CL1-5
輸入組
IP: NRIgG ENO1 HGFR NRIgG ENO1 HGFR
chENO1-22: - - - + + + - +
IB: HGFR
IB: ENO1
α-微管蛋白

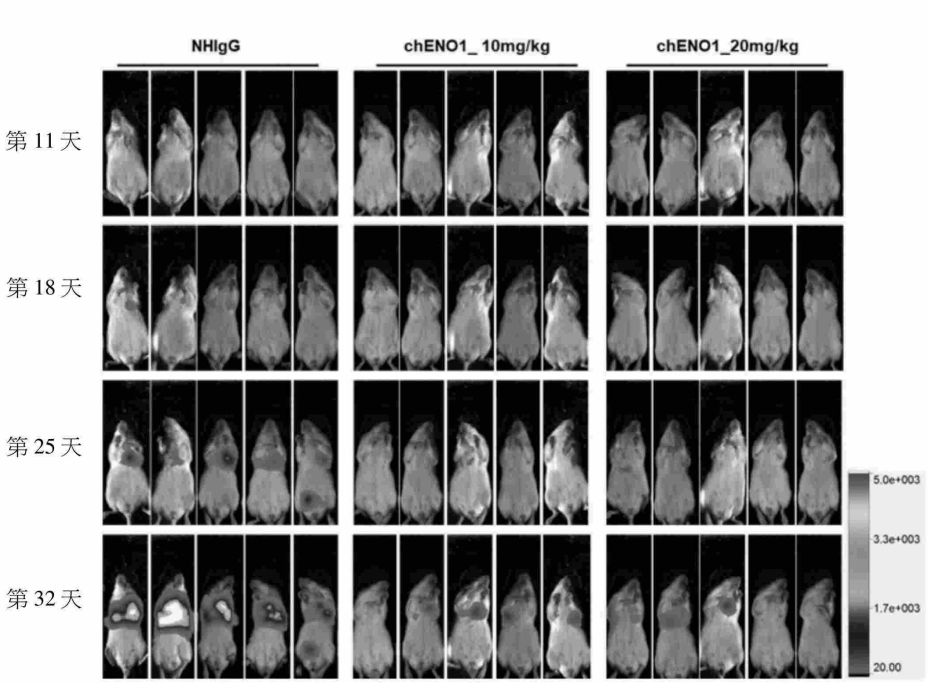
【圖7G】


+DMSO
+MG132
NHIgG
chENO1-22
10
20
40
NHIgG
chENO1-22
10
20
40
(μg/ml)
SLUG
1.00
0.86
0.86
0.76
1.16
1.28
1.00
1.12
α-微管蛋白

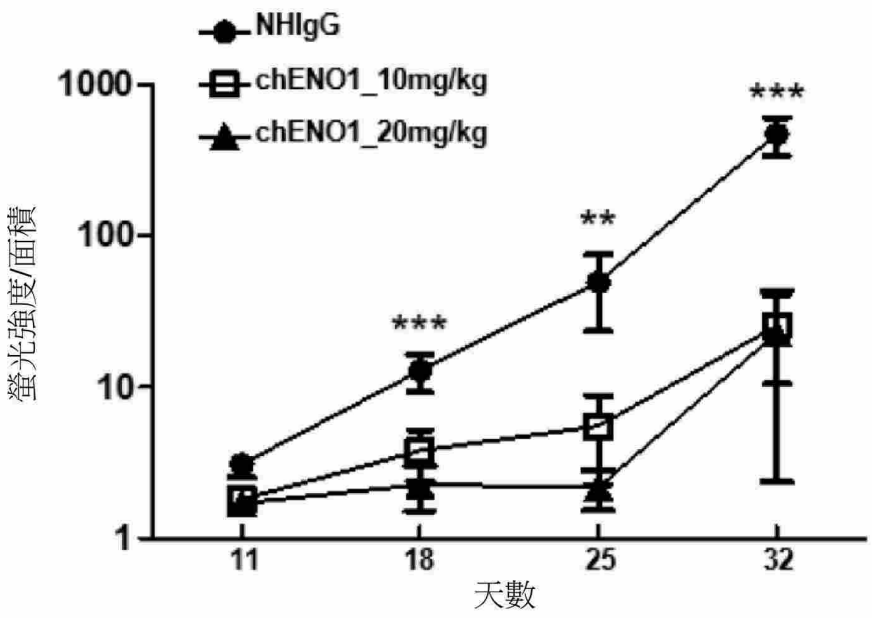
【圖7H】


NHIgG
chENO1-22
CHX(分鐘)：
0
30
60
120
180
240
0
30
60
120
180
240
SLUG
α-微管蛋白
100
10
1
強度(%)
0
30
60
90
120
150
180
210
240
270
(分鐘)
NHIgG
chENO1-22
*

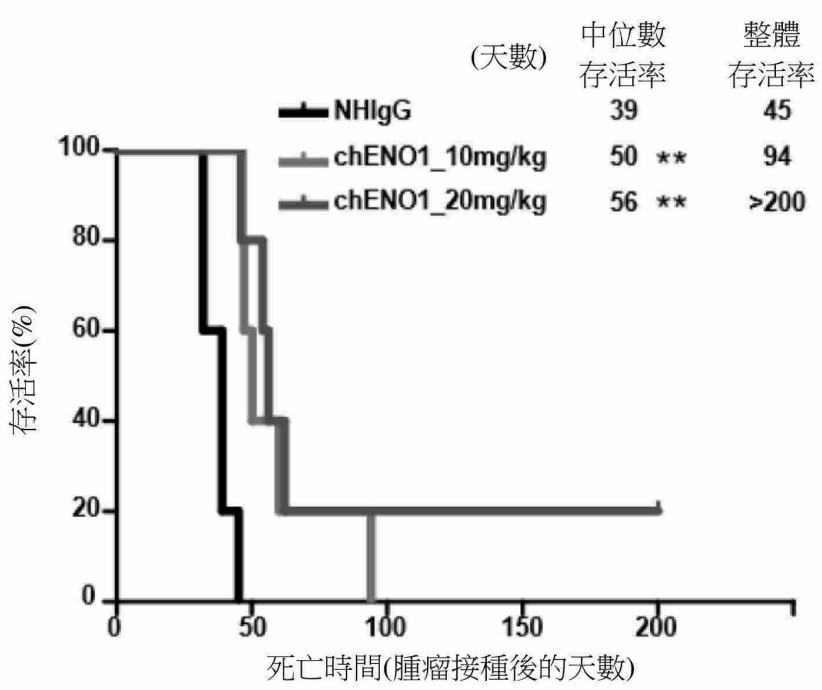
【圖7I】


NHIgG
chENO1_ 10mg/kg
chENO1_20mg/kg
第 11 天
第 18 天
第 25 天
第 32 天
5.0e+003
3.3e+003
1.7e+003
20.00

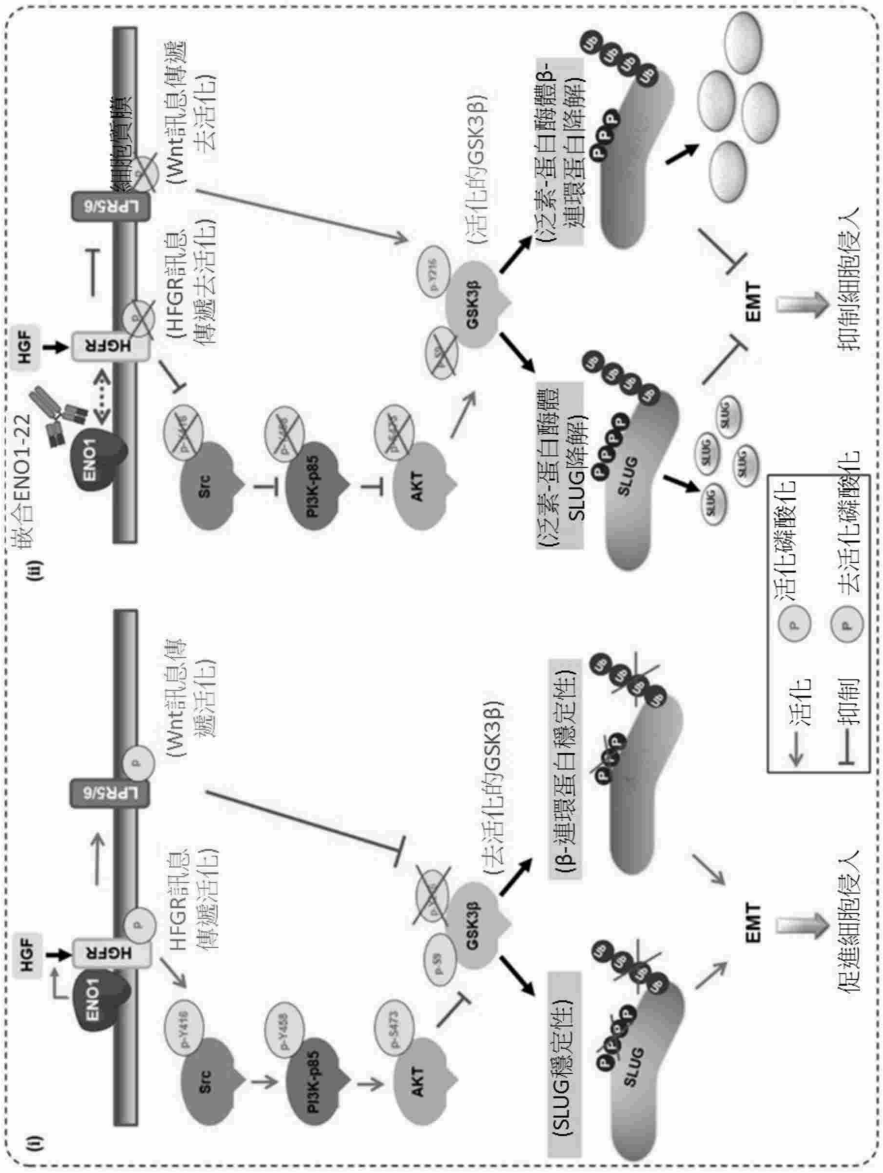
【圖8A】


NHIgG
chENO1_10mg/kg
chENO1_20mg/kg
1000
100
10
1
螢光強度/面積
11
18
25
32
天數
***
**
***

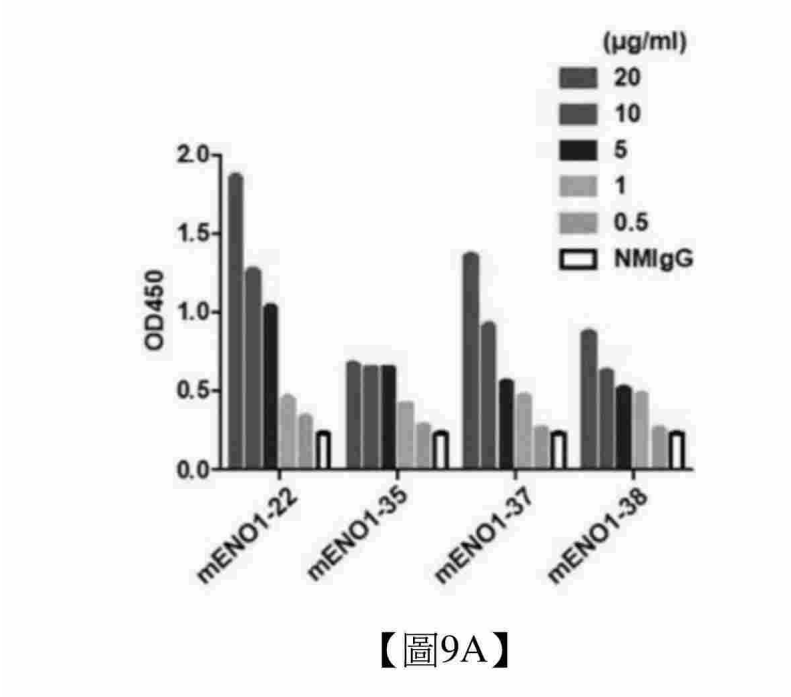
【圖8B】


(天數)
中位數
存活率
整體
存活率
NHIgG
39
45
chENO1_10mg/kg
50 **
94
chENO1_20mg/kg
56 **
>200
存活率(%)
100
80
60
40
20
0
0
50
100
150
200
死亡時間(腫瘤接種後的天數)

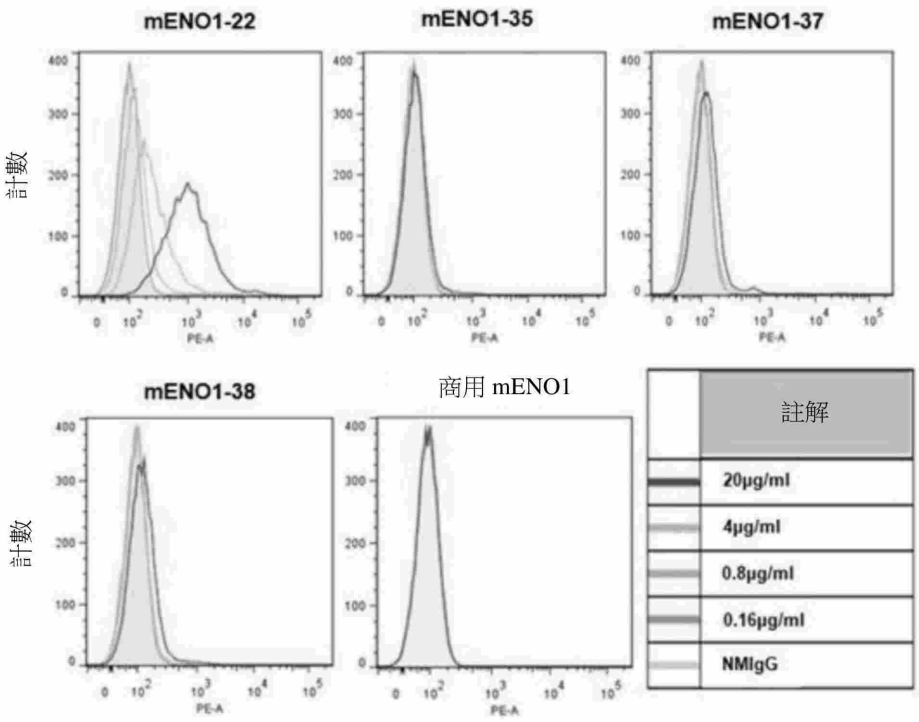
【圖8C】


(i)
HGF
HGFR
ENO1
LPR5/6
HFGR訊息傳遞活化)
(Wnt訊息傳遞活化)
Src
PI3K-p85
AKT
GSK3β
(去活化的GSK3β)
(SLUG穩定性)
(β-連環蛋白穩定性)
SLUG
EMT
促進細胞侵入
(ii)
嵌合ENO1-22
細胞質膜
(HFGR訊息傳遞去活化)
(Wnt訊息傳遞去活化)
(活化的GSK3β)
(泛素-蛋白酶體SLUG降解)
(泛素-蛋白酶體β-連環蛋白降解)
抑制細胞侵入
活化
抑制
活化磷酸化
去活化磷酸化

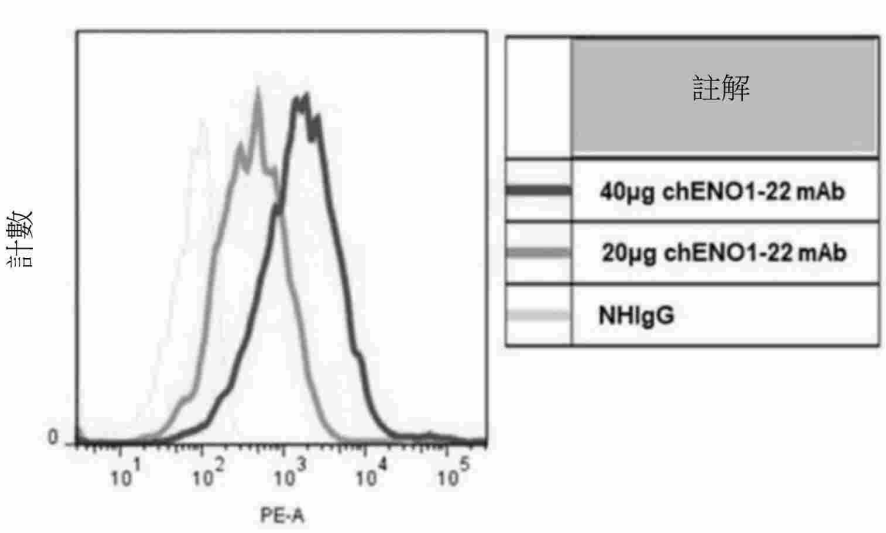
【圖8D】


(μg/ml)
20
10
5
1
0.5
NMIgG
OD450
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
mENO1-22
mENO1-35
mENO1-37
mENO1-38

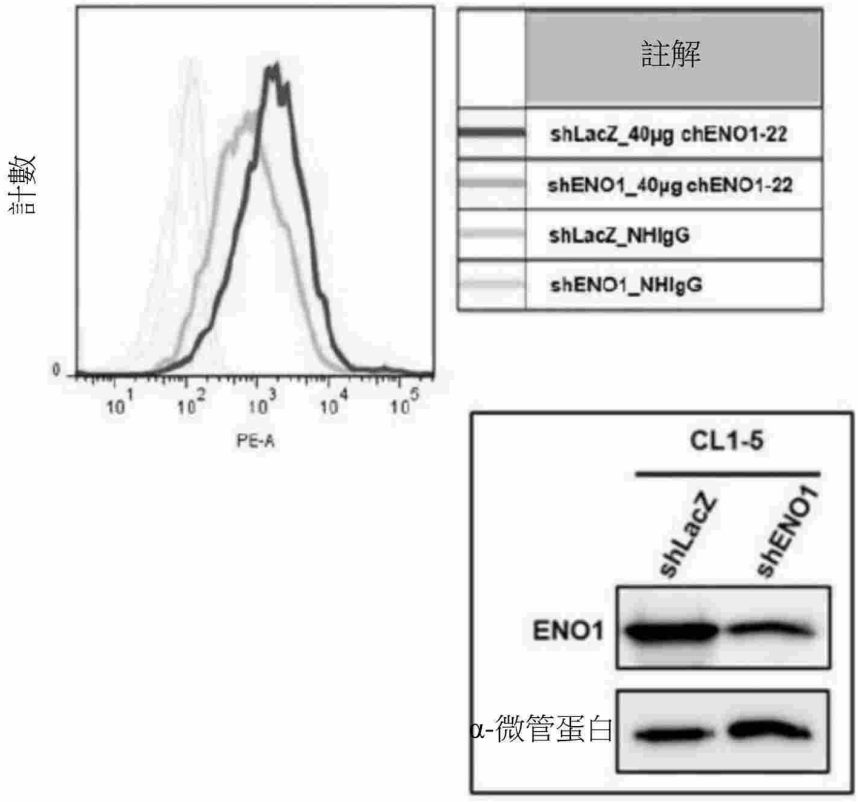
【圖9A】


mENO1-22
mENO1-35
mENO1-37
mENO1-38
商用 mENO1
計數
PE-A
註解
20μg/ml
4μg/ml
0.8μg/ml
0.16μg/ml
NMIgG

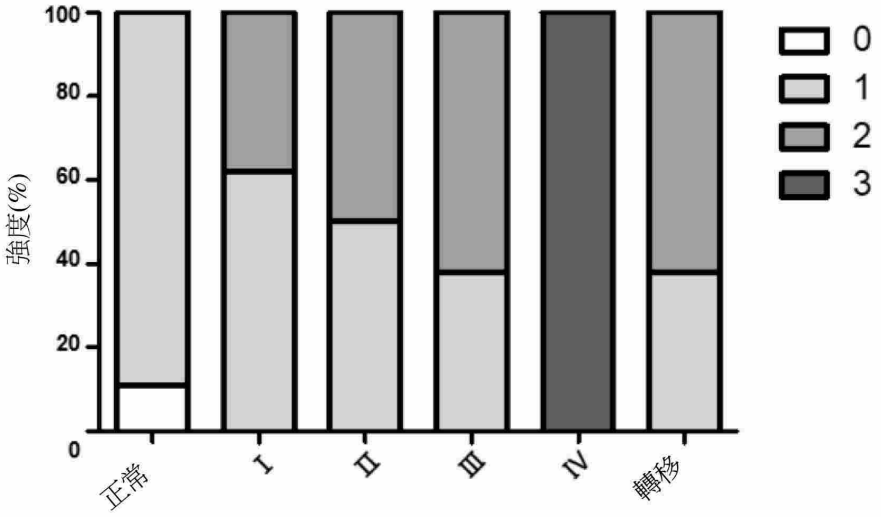
【圖9B】


計數
0
10^1
10^2
10^3
10^4
10^5
PE-A
註解
40μg chENO1-22 mAb
20μg chENO1-22 mAb
NHIgG

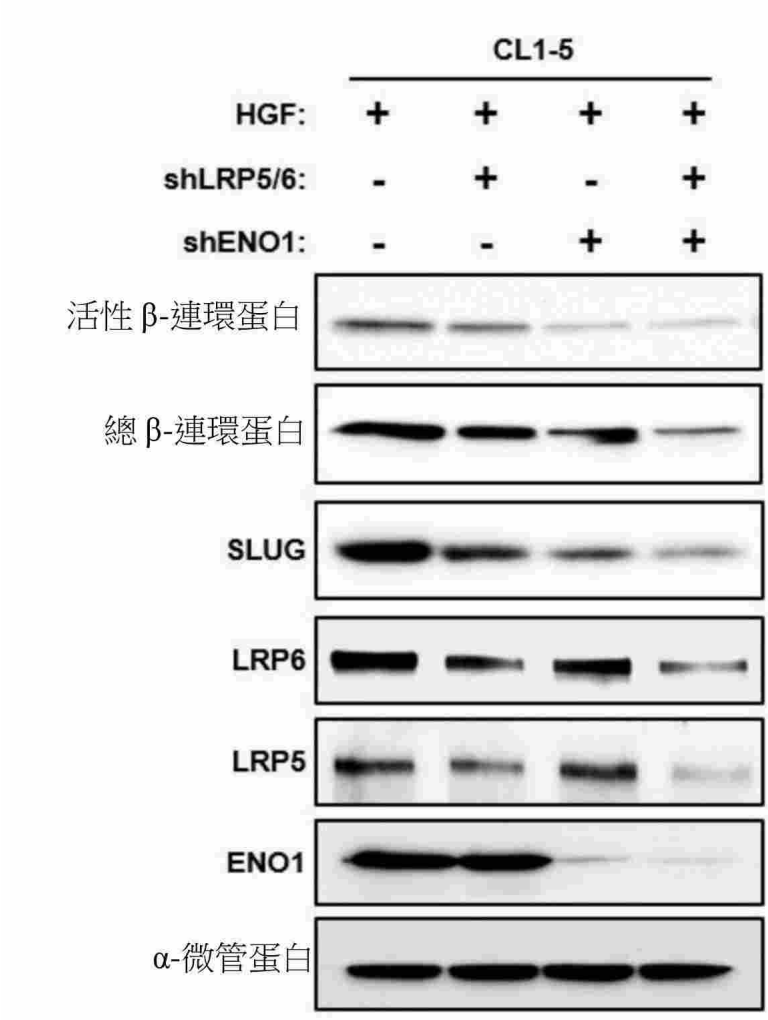
【圖9C】


計數
0
10^1
10^2
10^3
10^4
10^5
PE-A
註解
shLacZ_40μg chENO1-22
shENO1_40μg chENO1-22
shLacZ_NHIgG
shENO1_NHIgG
CL1-5
shLacZ
shENO1
ENO1
α-微管蛋白

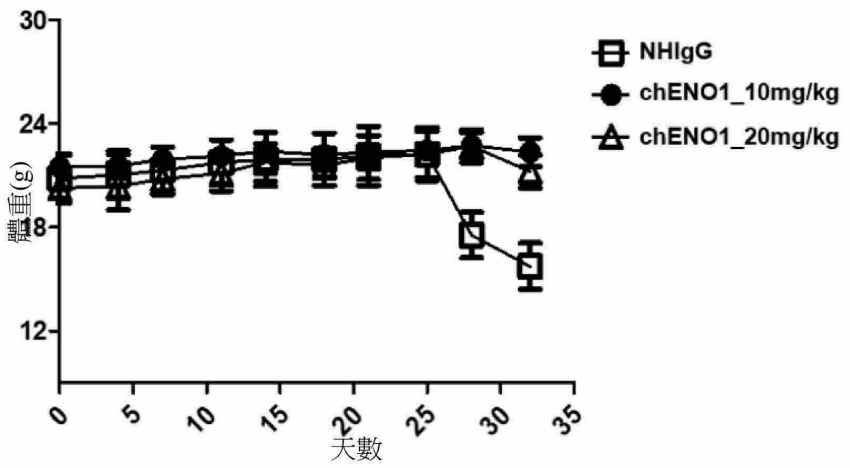
【圖9D】


100
80
60
40
20
0
強度(%)
0
1
2
3
正常
I
II
III
IV
轉移

【圖10】


CL1-5
HGF: + + + +
shLRP5/6: - + - +
shENO1: - - + +
活性 β-連環蛋白
總 β-連環蛋白
SLUG
LRP6
LRP5
ENO1
α-微管蛋白

【圖11】



【圖12】

Domain	FR1	CDR1	FR2	CDR2	FR3	CDR3	FR4
VH	QVQLQQSGP EVVRPGVSV KISCKGSGY TFT	**DYAMH**	WVKQSH AKSLEWI G	**VISTYNGNTNYNQKFKG**	KATMTVDKSS STAYMELARL TSEDSAIYYCA R	**SPLRY**	WGQGT TLTVSS
VL	QIVLSQSPAI LSASPGEKV TMTC	**RASSSVSYMH**	WYQQKP GSSPKPWI Y	**ATSNLAS**	GVPARFSGSG SGTSYSLTISR VEAEDAATYY C	**QQWSSNPLT**	FGAGTK LELK

【圖13】