



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 108779169 A

(43)申请公布日 2018.11.09

(21)申请号 201680080642.4

(22)申请日 2016.12.21

(30)优先权数据

20155980 2015.12.21 FI

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2018.08.01

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/FI2016/050911 2016.12.21

(87)PCT国际申请的公布数据

W02017/109290 EN 2017.06.29

(71)申请人 图尔库大学

地址 芬兰图尔库大学

(72)发明人 M·韦赫尼埃宁 U·拉明玛基

S·阿克特

(74)专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专利商标事务所 11038

代理人 张小勇

(51)Int.Cl.

C07K 16/12(2006.01)

G01N 33/53(2006.01)

C07K 16/44(2006.01)

权利要求书3页 说明书28页

序列表46页 附图17页

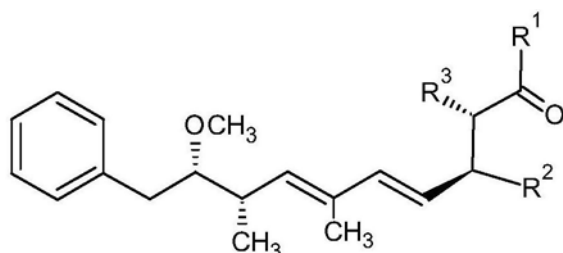
(54)发明名称

针对包含蓝细菌环肽肝毒素的免疫复合物的抗体

(57)摘要

本发明涉及用于检测含水样品中蓝细菌环肽肝毒素(CCPH)的工具和方法。更具体地,本发明提供结合一种或多种CCPH变体与抗-CCPH初级抗体之间形成的免疫复合物的重组抗-免疫复合物(抗-IC)抗体和使用该重组抗-免疫复合物(抗-IC)抗体的免疫测定法,优选非竞争性免疫测定法。

1. 抗体, 其结合蓝细菌环肽肝毒素 (CCPH) 和使用包含载体和式 (I) 的化合物的免疫原生成的抗体形成的免疫复合物,



其中

R¹是卤原子、-OSO₃、-OR'或-NR'R'';

R'结合氮时是氢、取代或未取代的(C₁-C₄)烷基或(C₁-C₄)酰基;

R''结合氮时是氢、取代或未取代的(C₁-C₄)烷基或(C₁-C₄)酰基;

R²是氢、(C₁-C₄)烷基、(C₁-C₄)烷氧基、(C₁-C₄)酰基、(C₁-C₄)氨基酰基或(C₁-C₄)羧基氨基酰基;

或R¹和R²彼此连接成环状部分;

R³是氢或(C₁-C₄)烷基,且

其中苯基可以被取代或未被取代。

2. 权利要求1的抗体, 其中R¹是Br。

3. 权利要求1或2的抗体, 其中R³是甲基。

4. 权利要求1-3任一项的抗体, 其中R¹是氨基酰基, 且R²是(C₁-C₄)酰基。

5. 权利要求1-4任一项的抗体, 其中R¹是甘氨酸酰基或D-丙氨酸酰基, 且R²是乙酰基。

6. 权利要求1-5任一项的抗体, 其中R¹是NH₂, 且基团R²是谷氨酸酰基或2-氨基丙氨酸酰基。

7. 权利要求1-6任一项的抗体, 其中CCPH是微囊藻毒素同源物或节球藻毒素同源物。

8. 权利要求1-7任一项的抗体, 其为组特异性的并且识别至少CCPH变体MC-LR、MC-dmLR、MC-LA、MC-RR、MC-dmRR、MC-YR、MC-LY、MC-LF、MC-LW、MC-WR和Nod-R。

9. 权利要求8的抗体, 包含:

轻链可变区, 其包含与SEQ ID NO:5或6中举出的CDR 1-3具有至少80%序列同一性的CDR 1-3; 和

相应的重链可变区, 其包含与SEQ ID NO:30或31中举出的CDR 1-3具有至少80%序列同一性的CDR 1-3。

10. 权利要求9的抗体, 包含:

与SEQ ID NO:5具有至少80%序列同一性的轻链可变区和与SEQ ID NO:30至具有至少80%序列同一性的重链可变区;

与SEQ ID NO:6具有至少80%序列同一性的轻链可变区和与SEQ ID NO:31具有至少80%序列同一性的重链可变区。

11. 权利要求任一项的抗体1-7, 其为亚组特异性的。

12. 权利要求11的抗体, 包含:

轻链可变区, 其包含与选自SEQ ID NO:15-29的序列中举出的CDR 1-3具有至少80%序列同一性的CDR 1-3; 和

相应的重链可变区,其包含与选自SEQ ID NO:40-55的序列中举出的CDR 1-3具有至少80%序列同一性的CDR 1-3。

13. 权利要求12的抗体,包含:

轻链可变区,其包含与选自SEQ ID NO:15-29的氨基酸序列具有至少80%序列同一性的氨基酸序列;和

相应的重链可变区,其包含与选自SEQ ID NO:40-55的氨基酸序列具有至少80%序列同一性的氨基酸序列。

14. 权利要求1-7任一项的抗体,其为变体特异性的。

15. 权利要求14的抗体,包含:

轻链可变区,其包含与选自SEQ ID NO:7-14的序列中举出的CDR 1-3具有至少80%序列同一性的CDR 1-3;和

相应的重链可变区,其包含与选自SEQ ID NO:32-39的序列中举出的CDR 1-3具有至少80%序列同一性的CDR 1-3。

16. 权利要求12的抗体,包含:

轻链可变区,其包含与选自SEQ ID NO:7-14的氨基酸序列具有至少80%序列同一性的氨基酸序列;和

相应的重链可变区,其包含与选自SEQ ID NO:32-39的氨基酸序列具有至少80%序列同一性的氨基酸序列。

17. 权利要求1-16任一项的抗体,其中该抗体是重组抗体或其片段的形式,优选为Fab、Fab'、F(ab')₂、Fv或scFv片段。

18. 权利要求17的抗体,其中该抗体是scFv片段形式,其包含接头肽,该接头肽包含SEQ ID NO:1中所示氨基酸序列或其保守序列变体或与SEQ ID NO:1具有至少80%序列同一性的变体。

19. 权利要求1-3任一项的抗体,其中该抗体包含选自SEQ ID NO:5-29的轻链可变区和选自SEQ ID NO:30-54的相应重链可变区或其保守序列变体或与所述序列具有至少80%序列同一性的变体。

20. 抗-IC抗体的抗体组,包含权利要求1-19任一项的至少两种抗体。

21. 权利要求20的抗体组,其中所述至少两种抗体选自包含如下的抗体:

轻链可变区,其包含选自SEQ ID NO:5-29的氨基酸序列;和

相应的重链可变区,其包含选自SEQ ID NO:30-54的氨基酸序列。

22. 权利要求20或21的抗体组,包含至少一种组特异性抗体,其选自包含如下的抗体:

轻链可变区,其包含选自SEQ ID NO:5-6的氨基酸序列;和

相应的重链可变区,其包含选自SEQ ID NO:30-31的氨基酸序列;和

至少另一种抗体,其选自包含如下的抗体:

轻链可变区,其包含选自SEQ ID NO:7-29的氨基酸序列;和

相应的重链可变区,其包含选自SEQ ID NO:32-54的氨基酸序列。

23. 用于制备权利要求1-19任一项的抗体的方法,其中该方法包括通过选择结合CCPH和使用包含载体和如上所述的式(I)的化合物的免疫原生成的初级抗体的免疫复合物的抗体由重组表达文库得到所述抗体。

24. 权利要求23的方法,其中重组抗-IC抗体片段由噬菌体展示文库制备。
25. 权利要求23或24的方法,其中不含CCPH的初级抗体用于阴性选择以选择识别所述免疫复合物、但不识别游离初级抗体、也不识别游离CCPH的抗-IC抗体。
26. 权利要求23-25任一项的方法,其中首先将展示噬菌体与结合的初级抗体一起预孵育,以分选出那些结合就其本身而言的初级抗体的抗体,此后,分离未结合的噬菌体并且与CCPH和固定的初级抗体的混合物一起孵育,以选择结合固定的初级抗体与CCPH之间形成的免疫复合物、但不结合就其本身而言的初级抗体的噬菌体。
27. 可通过权利要求23-26任一项的方法得到的抗-IC抗体。
28. 编码权利要求1-19或27任一项的抗体的多核苷酸。
29. 包含权利要求28的多核苷酸的表达载体。
30. 分离的宿主细胞或体外表达系统,包含编码权利要求1-19或27任一项的抗体的多核苷酸或权利要求9的表达载体。
31. 用于检测含水样品中的一种或多种CCPH变体的免疫测定法,包括:
- a) 使样品与抗体组反应,该抗体组包含权利要求1-19或27任一项的至少一种抗-IC抗体和抗-CCPH初级抗体,其中所述抗-CCPH初级抗体结合存在于样品中的一种或多种CCPH变体(如果有的话),并且与之形成免疫复合物,且其中所述至少一种抗-IC抗体结合所述免疫复合物,形成夹心式免疫复合物;和
- b) 检测所述夹心式免疫复合物的存在或不存在,表明在所述样品中分别存在或不存在所述一种或多种CCPH变体。
32. 权利要求31的测定法,其中所述抗-CCPH抗体是抗-Adda抗体。
33. 权利要求31或32的测定法,其为非竞争性均相免疫测定法。
34. 权利要求31或32的测定法,其为非竞争性异相免疫测定法。
35. 权利要求1-19或27任一项的抗-IC抗体或权利要求20-22任一项的抗-IC抗体的抗体组在检测含水样品中存在或不存在一种或多种CCPH变体中的用途。
36. 权利要求35的用途,其中所述含水样品是水样,优选选自饮用水样,井水样,再生水样,浴水样和环境水样。
37. 用于检测含水样品中的一种或多种CCPH变体的试剂盒,包含权利要求1-19或27任一项的至少一种抗-IC抗体或权利要求20-22任一项的抗-IC抗体的抗体组。
38. 权利要求37的试剂盒,还包含如权利要求1-6任一项中定义的抗-CCPH抗体,优选抗-Adda抗体或初级抗体。
39. 权利要求37或38的试剂盒,还包含用于进行免疫测定法的一种或多种成分,其选自印迹(例如尼龙或硝化纤维),微量滴定板,反应小瓶,横向流条,适合的标准品,和试剂,例如缓冲液、检测试剂(例如标记、生色底物、识别本发明抗-IC抗体的标记的另一种抗体),和洗涤溶液。

针对包含蓝细菌环肽肝毒素的免疫复合物的抗体

发明领域

[0001] 本发明涉及用检测含水样品中蓝细菌环肽肝毒素 (CCPH) 的工具和方法。更具体地,本发明涉及结合一种或多种不同CCPH变体与抗-CCPH初级抗体之间形成的免疫复合物的抗-免疫复合物(抗-IC)抗体和使用该抗-IC抗体的免疫测定法、优选非竞争性免疫测定法。本发明还涉及所述抗-IC抗体的用途和包含所述抗-IC抗体的试剂盒,以及编码所述抗-IC抗体的多核苷酸,编码所述多核苷酸的载体,和包含所述载体的分离的宿主细胞。本发明还涉及用于制备本发明的抗-IC抗体的方法。

[0002] 发明背景

[0003] 也称为蓝绿藻的蓝细菌是古老的光合原核生物,其在生态系统中作为主要生产者和氮固定剂具有重要作用。蓝细菌产生数百种生物活性化合物,这些化合物通常是具有多种酶抑制能力的小环肽或具有神经毒性或细胞毒性的不同生物碱。它们的生物活性物质中的一些具有药物潜力,但其中许多可归类为强效哺乳动物生物毒素。

[0004] 最常报告的蓝藻毒素是在一些淡水蓝细菌种中发现的环七肽肝毒素(微囊藻毒素)。微囊藻毒素形成一类超过90种的类似物。虽然相对较少的蓝细菌属产生微囊藻毒素,但不幸的是,主要的生产者生物在世界上最常见的蓝细菌中:微囊藻属(*Microcystis*)、鱼腥藻属(*Anabaena*)和浮丝藻属(*Planktothrix*)。已经在半咸水蓝藻菌节球藻属(*Nodularia*)中检测到相关的肝毒性五肽(节球藻毒素)。大多数微囊藻毒素和节球藻毒素是强效肝毒素(肝脏毒素),其急性LD₅₀值为50-600 μ g/kg(小鼠,腹膜内)。除了急性毒性外,微囊藻毒素和节球藻毒素是肿瘤促进剂和可能的致癌物。微囊藻毒素/节球藻毒素毒性的分子基础是抑制蛋白磷酸酶1和2A。已经报道了在用含毒素的水进行血液透析处理治疗的背景下与微囊藻毒素明显相关的人类死亡。此外,流行病学证据指出暴露于微囊藻毒素的人群肝癌患病率增加。

[0005] 蓝细菌通常在全世界的淡水和半咸水中形成大量出现。这类水华通常是有毒的,导致动物中毒并对人类健康构成威胁。蓝细菌毒素的问题源于使用地表水来制备饮用水和进行娱乐。没有区分毒性和无毒性蓝细菌菌株的形态学标志物。因此,视觉测试是不够的。

[0006] 目前用于蓝藻毒素的分析方法包括竞争性免疫测定,基于酶的蛋白磷酸酶抑制测定(PPIA)和色谱方法,包括使用不同检测器的高效液相色谱(HPLC),如UV吸光度,荧光或质谱测定(MS)。不幸的是,PPIA不对仅MC具有特异性,并且LC方法由于其复杂性和可用的毒素变体参比材料的数量有限而不适合用于初筛目的。竞争性免疫测定通常基于用MC-LR免疫得到的抗体,且由此具有有限的等同识别多个MC和Nod变体的能力。当存在于所有MC/Nod中的Adda组被特异性靶向时,可以获得更好的覆盖(WO 01/18059)。然而,竞争性免疫测定通常比非竞争性测定形式具有更低的总体灵敏度和特异性。

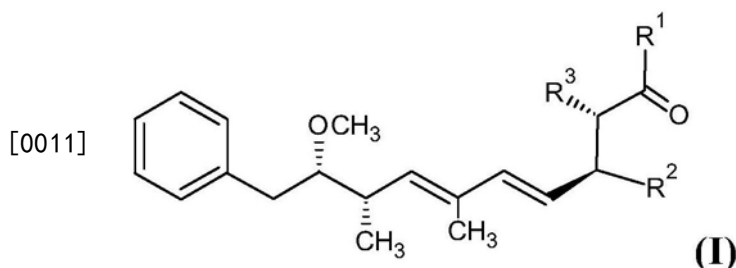
[0007] 由于抗原的小尺寸,尤其是使用基于免疫的传统方法,所以开发用于非竞争性测定形式的次级抗体非常困难。WO 2004/046733中公开了一种产生用于检测小分析物的抗体的工具,其描述了产生抗体的方法,所述抗体与初级抗体与其特异性分析物形成的免疫复合物结合,但在很大程度上不结合单独的初级抗体或分析物。该方法基于通过从展示重组

结合配偶体文库中选择来获得免疫复合物结合抗体。Nagata等人 (Nat.Toxins 7:49-55, 1999) 已经描述了获得上述抗体但使用动物免疫而不是重组结合配偶体文库的不同方法。Nagata等人设法产生部分对由MC-LR和抗-MC-LR mAb形成的免疫复合物具有特异性的三种mAb, 并公开了使用它们的非竞争性ELISA测定。然而, 例如, 由于免疫复合物结合抗体的不良性能特征, 该测定法需要一次乃至两次过夜孵育, 且因此从实际观点来看是不可接受的缓慢。他们还表明, 他们的抗-IC抗体对不含CCPH的初级抗体具有亲和力, 这解释了在他们的免疫测定中需要过夜孵育。

[0008] 因此, 对于快速、简便和灵敏的抗体存在需求, 所述抗体适合于野外和实验室条件下的蓝细菌肝毒素的高流通量一线筛选。

[0009] 发明概述

[0010] 在一个方面, 本发明证实结合由蓝细菌环肽肝毒素 (CCPH) 和使用包含载体和式 (I) 的化合物的免疫原生成的抗体形成的免疫复合物的抗体,



[0012] 其中

[0013] R^1 是卤原子、 $-OSO_3$ 、 $-OR'$ 或 $-NR'R''$,

[0014] R' 在结合氮时是氢、取代或未取代的 (C_1-C_4) 烷基或 (C_1-C_4) 酰基,

[0015] R'' 在结合氮时是氢、取代或未取代的 (C_1-C_4) 烷基或 (C_1-C_4) 酰基,

[0016] R^2 是氢、 (C_1-C_4) 烷基、 (C_1-C_4) 烷氧基、 (C_1-C_4) 酰基、 (C_1-C_4) 氨基酰基或 (C_1-C_4) 羧基氨基酰基,

[0017] 或 R^1 和 R^2 彼此连接形成环部分,

[0018] R^3 是氢或 (C_1-C_4) 烷基, 且

[0019] 其中苯基可以取代或未取代的。

[0020] 一些实施方案提供组特异性抗体, 其识别至少CCPH变体MC-LR、MC-dmLR、MC-LA、MC-RR、MC-dmRR、MC-YR、MC-LY、MC-LF、MC-LW、MC-WR和Nod-R。优选的抗体包括包含如下的抗体: 包含与SEQ ID NO:5或6中举出的CDR 1-3具有至少80%序列特异性的CDR 1-3的轻链可变区; 和包含与SEQ ID NO:30或31中举出的CDR1-3具有至少80%序列同一性的CDR 1-3的相应的重链可变区。另外优选的组特异性抗体包含与SEQ ID NO:5具有至少80%序列同一性的轻链可变区和与SEQ ID NO:30具有至少80%序列同一性的重链可变区; 与SEQ ID NO:6具有至少80%序列同一性的轻链可变区和与SEQ ID NO:31具有至少80%序列同一性的重链可变区。

[0021] 一些另外的实施方案提供组特异性抗体, 优选这样的组特异性抗体, 其包含: 轻链可变区, 其包含与选自SEQ ID NO:15-29的序列中举出的CDR 1-3具有至少80%序列同一性的CDR 1-3; 和相应的重链可变区, 其包含与选自SEQ ID NO:40-55的序列中举出的CDR 1-3具有至少80%序列同一性的CDR 1-3。另外优选的组特异性抗体包括这样的组特异性抗体,

其包含:轻链可变区,其包含与选自SEQ ID NO:15-29的氨基酸序列具有至少80%序列同一性的氨基酸序列;和相应的重链可变区,其包含与选自SEQ ID NO:40-55的氨基酸序列具有至少80%序列同一性的氨基酸序列。

[0022] 此外,一些另外的实施方案提供变体特异性抗体,其包含:轻链可变区,其包含与选自SEQ ID NO:7-14的序列中举出的CDR 1-3具有至少80%序列同一性的CDR 1-3;和相应的重链可变区,其包含与选自SEQ ID NO:32-39的序列中举出的CDR 1-3具有至少80%序列同一性的CDR 1-3。另一些变体特异性抗体包括这样的抗体,其包含:轻链可变区,其包含与选自SEQ ID NO:7-14的氨基酸序列具有至少80%序列同一性的氨基酸序列;和相应的重链可变区,其包含与选自SEQ ID NO:32-39的氨基酸序列具有至少80%序列同一性的氨基酸序列。

[0023] 本发明的另外的方面提供了本发明的抗体的不同组。

[0024] 还提供了用于制备本发明抗体的方法。该方法包含从重组表达文库得到抗体,该方法通过筛选结合CCPH和使用包含载体和上述举出的式(I)的化合物的免疫原生成的初级抗体的免疫复合物的抗体来进行。还提供了通过这样的方法得到的抗体,并且可以以与上述公开的抗体相同的方式使用或包含在抗体组中。

[0025] 在一些另外的方面,本文提供了编码本发明抗-IC抗体的多核苷酸,包含所述多核苷酸的表达载体,和包含所述载体的宿主细胞或体外表达系统。

[0026] 在另一个方面,本发明提供用于检测含水样品中的一种或多种CCPH变体的免疫测定法,包括:

[0027] a) 使样品与包含至少一种抗-IC抗体和抗-CCPH初级抗体的抗体组的反应,其中所述抗-CCPH初级抗体结合存在于该样品中的一种或多种CCPH变体(如果有的话),并且与之形成免疫复合物,且其中所述至少一种抗-IC抗体结合所述免疫复合物,形成夹心式免疫复合物;和

[0028] b) 检测所述夹心式免疫复合物的存在或不存在,表明在所述样品中分别存在或不存在所述一种或多种CCPH变体。

[0029] 在又一个方面,本文提供了本发明的抗-IC抗体或抗-IC抗体的抗体组用于检测含水样品中存在或不存在一种或多种CCPH变体的用途。

[0030] 在另一个方面,本文提供了用于检测含水样品中一种或多种CCPH变体的试剂盒,其包含本发明的至少一种抗-IC抗体或抗-IC抗体的抗体组。

[0031] 本发明的其它目的、方面、实施方案、细节和优点从如下附图、详述、实施例和从属权利要求中显而易见。

[0032] 附图简要说明

[0033] 在下文中,通过优选实施方案并且参考附图来描述本发明,其中

[0034] 图1A显示本研究中使用的MC变体(上图)和Nod-R(下图)的结构。描述了在位置X、Z和R处的常见变化。具有ADDA侧链的罕见氨基酸存在于MC和Nod中。

[0035] 图1B示例用于分离对不同MC和Nod具有特异性的抗-IC结合物的淘选和筛选方案。使用单一CCPH变体(MC-LR、MC-RR或Nod-R)进行两轮噬菌体展示选择。用MC-LR、MC-RR和Nod-R筛选来自每个第二次淘选轮中的在大肠杆菌(E.coli)中表达为ScFv-AP的单一克隆。用图1A中所示的不同CCPH进一步测试了几个克隆。

[0036] 图2示例实施例2的单步非竞争性免疫测定方法(A)和发明创造(concept)(B)。灵敏的TR-IFMA信号产生是基于使用Eu标记的抗-AP pAb。

[0037] 图3示例在实施例2的单步非竞争性测定中,范围为5min至4h的孵育时间的影响。在本实验中使用MC-LR。每个值代表使用相似条件在分开的日期进行的两次独立测定的平均值。

[0038] 图4显示使用SA51D1作为识别IC的次级抗体的单步TR-IFMA非竞争性免疫测定。图呈现了1h测定中11种不同CCPH变体的标准曲线。每个点是四次重复的平均信号。还显示了表示标准偏差的误差条。没有毒素的平均空白信号为每秒381个计数(cps),且空白+3SD为555cps。对于测试的毒素变体,灵敏度从0.0108 μ g/L(MC-LR)至0.05 μ g/L(MC-LA)变化。

[0039] 图5显示四种抗-IC结合物的交叉反应模式的实例:针对MC-XZ和Nod-R的SA56B8, SA55D1, SA58A12和SA32C11。将毒素浓度(0.1–60 μ g/L)绘制为X轴的对数刻度,并且将相应的信号(%)绘制为Y刻度。实心符号代表所有MC-XZ,其中X=L(Leu)。将其中Z=R(Arg)的Nod-R和MC-XZ绘制为虚线。每个值代表两次重复的平均值。发现结合物SA56B8对MC-LR和MC-dmLR具有特异性且MC-LW被弱识别(信号低于20%)。发现结合物SA55D1对MC-XZ(其中X=L(Leu))具有特异性而结合物SA58A12对MC-XZ(其中Z=R(Arg))具有特异性并且也对Nod-R具有特异性。结合物SA32C11仅显示对Nod-R具有特异性。

[0040] 图6示例使用SA51D1作为识别IC的次级抗体对9种不同CCPH的单步ELISA夹心免疫测定标准曲线。用pNPP作为用于405nm处产生信号的底物测定1h(A)、2h(B)、4h(C)或19h(D)的碱性磷酸酶活性。此外,在一个样品中以相等比例混合的九种毒素变体用于产生标准曲线。每个点是在不同日期进行的两次独立测定的平均信号。还显示了个体变体的平均值的标准误差。例如,在2h测定(B)时,MC-dmLR和MC-YR的灵敏度降至0.1 μ g/L以下,对于其余的变体,灵敏度降至0.3 μ g/L以下。此外,对于浓度为1 μ g/L的所有毒素变体,信背比的范围为2.1至5。

[0041] 图7示例使用两种不同的用于信号形成的次级抗体和链霉抗生物素蛋白包被的上转换纳米粒进行的9种不同的蓝细菌肝毒素变体的定量横向流试验结果(图1A)。(A)作为次级抗体的SA51D1识别所有测试的CCPH变体。(B)使用SA32C11作为次级抗体仅识别节球藻毒素。对于这两个图,显示了三次重复的误差条。每种CCPH在1 μ g/l的浓度下进行测试。

[0042] 图8显示建立的CCPH均相非竞争夹心型FRET免疫测定的基本原理。将Eu标记的Adda特异性单克隆抗体和Alexa 680标记的抗-IC scFv SA51D1加入含有或不含有MC/nod的水样中。在没有毒素的存在下,荧光团在溶液中游离并且检测不到荧光。当抗-IC scFv特异性结合抗-Adda mAb-MC/Nod IC时,仅在两个荧光团的紧密接近发生FRET。

[0043] 图9举例说明使用铈(III)标记的抗Adda-mAb作为供体和与荧光染料AF680缀合的SA51D1抗-IC scFv作为受体进行的均相测定。在BSA包被的微量滴定孔中,使用不同浓度(0.05–250 μ g/L)的MC-LR(以对数刻度绘制在X轴上)在不同的孵育时间(2–30min)点产生FRET信号(730nm,绘制在Y轴上)。显示了一式两份重复测定的误差条。将最短(2min)和最长(30min)孵育时间点绘制为实线。即使在2min的测定中,对于MC-LR,发现测定的灵敏度低于0.3 μ g/L。

[0044] 图10示例具有反向捕获的IC测定的功能。显示了使用Nod特异性结合物SA32C11的Nod-R的标准曲线,其中通过使用抗bAP pAb将次级抗体SA32C11与固相结合,在微量滴定孔

上捕获IC。通过使用Eu标记的抗Adda-mAb进行信号产生。毒素浓度(0.1-50 μ g/L)显示在X轴上,而TRF信号以对数刻度显示在Y轴上。每个点代表两次重复的平均值,并显示误差条(作为标准偏差)。

[0045] 图11显示克隆SA51D1与免疫复合物(由抗-Adda Mab和MC-LR形成)和不含MC-LR的抗-Adda mAb结合的特异性。传感图(Sensogram) A和B显示在缓冲液中MC-LR存在(A)或不存在(B)时SA51D1与免疫复合物的结合和解离。如传感图A所示,缓冲液中存在游离MC-LR对SA51D1与IC的结合或解离没有影响,因此表明SA51D1对游离MC-LR没有亲和力。传感图C显示SA51D1与单独的抗-Adda mAb的结合可忽略不计。传感图D表示基质背景(链霉抗生物素蛋白表面,D)。结果显示SA51D1特异性结合免疫复合物。

[0046] 图12显示示例性的抗-免疫复合物scFv-AP结合物即SA51D1、SA51F6、SA56B8、SA59G2、SA56E7、SA51D12、SA57D4、SA56D5、SA41B5、SA42A3、SA44E11、SA32C11、SA32F1、SA34G1、SA42E10、SA52C2、SA55D1、SA51H4、SA58A12、SA33D5、SA41F2和SA52B4的反应性数据。

[0047] 发明详述

[0048] 本发明提供抗-免疫复合物(抗-IC)抗体,其结合蓝细菌环肽肝毒素与识别它们的初级抗体形成的免疫复合物。

[0049] 如本文所用,单数形式“一种(a)”、“一种(an)”和“该(the)”包括复数,另有明确指示的除外。

[0050] 如本文所用,术语“蓝细菌环肽肝毒素”(CCPH)是指至少一种肝脏毒素,其选自蓝细菌产生的环七肽(微囊藻毒素)和五肽(节球藻毒素)。微囊藻毒素(MC)形成一类超过90种具有不同毒性的变体,它们由一些淡水蓝细菌产生。MC-LR是研究最多且分布最广的变体,其被认为是毒性最大的变体。节球藻毒素(Nod)形成一类约10种变体,且它们已经在半咸水蓝细菌节球藻属(Nodularia)和海洋海绵生物隋氏蒂壳海绵(Theonella swinhoei)中被检测到。除了急性毒性外,微囊藻毒素和节球藻毒素是肿瘤促进剂和可能的致癌物。

[0051] 如本文所用,术语“抗体”是指免疫球蛋白结构,其包含通过二硫键互连的两条重(H)链和两条轻(L)链。重链和轻链均由可变区(本文中分别缩写为V_H和V_L)和恒定区(本文中分别缩写为C_H和C_L)组成。C_H区还由三个结构域组成:C_{H1}、C_{H2}和C_{H3}。V_H和V_L区由称为互补决定区(CDR)的高变区构成,其间散布有称为框架区(FR)的更保守的区。每个V_H和V_L由三个CDR(分别为HCRD 1-3和LCDR 1-3)和四个FR(分别为HFR1-4和LFR 1-4)组成,从氨基末端到羧基末端排列,顺序为FR1,CDR1,FR2,CDR2,FR3,CDR3,FR4。在本文中,通过Kabat编号方案来鉴定CDR。

[0052] 抗体能够作为完整的免疫球蛋白或作为许多充分表征的抗原结合片段或其单链变体中的任何一种存在,所有这些在本文中均由术语“抗体”涵盖。所述片段和变体可通过重组DNA技术产生,或通过本领域众所周知的完整免疫球蛋白的酶促或化学分离产生。术语“抗体”还包括但不限于同种类型类别IgA、IgD、IgE、IgG和IgM及其亚型的多克隆、单克隆和重组抗体。

[0053] 如本文所用,术语“Fab片段”是指由V_L、V_H、C_L和C_{H1}结构域组成的抗体的单体抗原结合片段。

[0054] 如本文所用,术语“Fab'片段”是指主要为具有铰链区部分的Fab片段的抗体的抗

原结合片段。

[0055] 如本文所用,术语“F(ab')₂片段”是指包含通过铰链区处的二硫键连接的两个 Fab' 片段的抗体的二聚化抗原结合片段。

[0056] 如本文所用,术语“Fv片段”是指由V_L和V_H结构域组成的抗体的单体抗原结合片段。

[0057] 如本文所用,术语“单链可变片段”(scFv)是指为重组多肽的抗体的抗原结合片段,其中V_L和V_H彼此通过接头连接,例如肽接头。在具体的非限制性实施方案中,所述接头包含SEQ ID NO:1的氨基酸序列或其保守序列变体。还涵盖scFv,其包含与SEQ ID NO:1具有至少80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%序列同一性的接头,条件是scFv保留其特异性。另外可能的接头肽是本领域可得到的,并且本领域技术人员易于测试指定接头肽是否适用于本发明的scFv。

[0058] 如本文所用,术语“纳米抗体”或“VHH”是指骆驼重链抗体的单体可变结构域。

[0059] 如本文所用,术语“独立可变结构域”是指抗体的单体可变结构域。

[0060] 如本文所用,术语“darpin”、“亲和体”、“单抗体(monobody)”是指基于改造的重组蛋白质支架的分别来源于锚蛋白重复蛋白、3型纤连蛋白的第10结构域或金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)蛋白A的结合物。来源于它们的其它类型的重组蛋白质支架和结合物是本领域众所周知的。

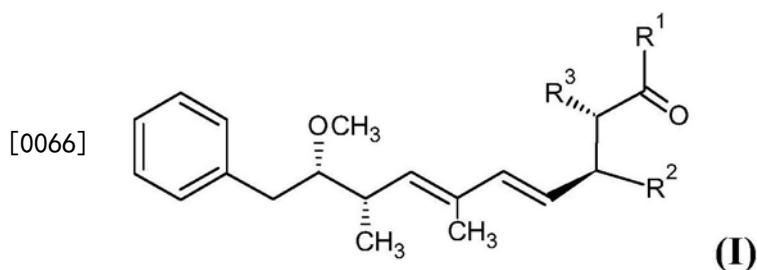
[0061] 如本文所用,术语“重组表达文库”是指基于其它蛋白质支架的抗体或结合物的异源宿主表达或体外表达库(repertoire)。在这类文库中不同抗体或其它类型的结合物的数量典型地>1E6,更优选>1E7,甚至更优选>1E8,甚至更优选>1E9,且最优选>1E10。

[0062] 如本文所用,术语“组特异性抗体”是指选择性地结合相关多肽例如CCPH或其免疫复合物的组中的所有或基本上所有的成员、而不选择性地结合所述相关多肽或免疫复合物的组以外的多肽或免疫复合物的抗体。术语“组特异性”在本文中与术语“属(generic)”可互换使用。

[0063] 如本文所用,术语“亚组特异性抗体”是指基本上选择性地结合相关多肽亚组中的所有成员例如MC、MC-LZ、MC-XR、XR或Nod或其免疫复合物、而不选择性地结合所述相关多肽或免疫复合物的亚组以外的多肽或免疫复合物的抗体。术语“亚组特异性”在本文中与术语“亚属(subgeneric)”可互换使用。

[0064] 如本文所用,术语“初级抗体”是指特异性地结合感兴趣的分析物的抗体。在一些具体的实施方案中,感兴趣的分析物是至少一种类型的CCPH变体,且初级抗-CCPH抗体是特异性地结合存在于MC/Nod中的所有中Adda-组的抗-Adda抗体。由于其宽的特异性,所以抗-Adda抗体可以称作对蓝细菌环肽肝毒素具有组特异性的抗体。优选的初级抗体是单克隆Adda-特异性抗体,例如由Enzo Life Sciences, Inc. (USA) 制备的商购可得的AD4G2或其任意的生物相似或抗原结合片段。

[0065] 根据一些实施方案,使用包含载体和式(I)的化合物的免疫原生成初级抗体,



[0067] 其中

[0068] R^1 是卤原子、 $-\text{OSO}_3$ 、 $-\text{OR}'$ 或 $-\text{NR}'\text{R}''$,

[0069] R' 在结合氮时是氢、取代或未取代的 $(\text{C}_1\text{-C}_4)$ 烷基或 $(\text{C}_1\text{-C}_4)$ 酰基,

[0070] R'' 在结合氮时是氢、取代或未取代的 $(\text{C}_1\text{-C}_4)$ 烷基或 $(\text{C}_1\text{-C}_4)$ 酰基,

[0071] R^2 是氢、 $(\text{C}_1\text{-C}_4)$ 烷基, $(\text{C}_1\text{-C}_4)$ 烷氧基、 $(\text{C}_1\text{-C}_4)$ 酰基, $(\text{C}_1\text{-C}_4)$ 氨基酰基或 $(\text{C}_1\text{-C}_4)$ 羧基氨基酰基,

[0072] 或 R^1 和 R^2 彼此连接成环部分,

[0073] R^3 是氢或 $(\text{C}_1\text{-C}_4)$ 烷基, 且

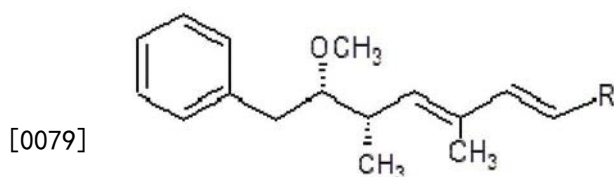
[0074] 其中苯基可以是取代或未取代的。

[0075] 在一些优选的实施方案中, R^1 是Br。

[0076] 在一些另外优选的实施方案中, R^3 是甲基。

[0077] 在一些另外的实施方案中, R^1 是氨基酰基, 且 R^2 是 $(\text{C}_1\text{-C}_4)$ 酰基或基团 R^1 是甘氨酸酰基或D-丙氨酸酰基, 且 R^2 是乙酰基或 R^1 是 NH_2 , 且基团 R^2 是谷氨酸酰基或2-氨基丙氨酸酰基。

[0078] 或者, 使用包含载体和式 (II) 的化合物的免疫原生成初级抗体,



(II)

[0080] 其中R是包含3-50、优选3-30、更优选3-20、甚至更优选3-15个原子的直链或支链接头, 所述原子选自C、N、S、P、O、H和卤素及其任意的组合。

[0081] 包含在免疫原中的适合的载体包括但不限于钥孔血蓝蛋白、牛血清白蛋白、卵清蛋白、阳离子化牛血清白蛋白和辣根过氧化物酶。

[0082] 如本文所用, 术语“使用免疫原生成的抗体”涵盖通过传统动物免疫得到的多克隆和单克隆抗体及其任意的重组变化形式。

[0083] 为了生成针对广泛类别的分子如CCPH的初级抗体, 谨慎选择的免疫策略是重要的。使用包含分析物分子Adda ((2S, 3S, 8S, 9S)-3-氨基-9-甲氧基-2, 6, 8-三甲基-10-苯基癸-4(E), 6(E)-二烯酸) 的属亚结构的免疫原的免疫用于实现类别选择性。呈现属Adda亚结构的分子共价缀合至适合的载体, 例如牛血清白蛋白或钥孔血蓝蛋白, 并且该缀合物用于免疫动物, 例如小鼠或家兔。同等重要的可以是使用极短的接头或在使半抗原偶联至载体蛋白时完全省略接头。这能够有利于生成初级抗体, 其具有针对CCPH's的共同部分Adda组的深部结合袋。当这种初级抗体结合来自Adda组的天然CCPH时, CCPH的环状氨基酸部分与

初级抗体自身的紧密定位的部分在免疫复合物的表面上呈现新的表位,利用它生成次级抗体。使用不同的CCPH's与抗-Adda抗体形成免疫复合物,可以使用例如用重组表达的抗体文库进行噬菌体展示淘选得到针对免疫复合物中的不同的CCPH's的次级抗体。

[0084] 如本文所用,术语“抗-IC抗体”是指特异性地结合初级抗体及其分析物形成的免疫复合物、而不结合单独的初级抗体或分析物至显著程度的抗体。抗-IC抗体也可以称作次级抗体。

[0085] 如本文所用,术语“保守序列变体”是指包含修饰的氨基酸序列,其不会显著改变所讨论的抗体的结合特性或特异性。保守氨基酸序列变体包括由具有相似氨基酸的氨基酸取代产生的变体。如本领域众所周知的,所述相似性可以基于所涉及残基的极性,电荷,溶解度,疏水性,亲水性和/或两亲性质的相似性来确定。例如,非极性(疏水)氨基酸包括丙氨酸(Ala,A),亮氨酸(Leu,L),异亮氨酸(Ile,I),缬氨酸(Val,V),脯氨酸(Pro,P),苯丙氨酸(Phe,F),色氨酸(Trp,W)和甲硫氨酸(Met,M);极性中性氨基酸包括甘氨酸(Gly,G),丝氨酸(Ser,S),苏氨酸(Thr,T),半胱氨酸(Cys,C),酪氨酸(Tyr,Y),天冬酰胺(Asn,N)和谷氨酰胺(Gln,Q);带正电荷的(碱性)氨基酸包括精氨酸(Arg,R),赖氨酸(Lys,K)和组氨酸(His,H);而带负电荷的(酸性)氨基酸包括天冬氨酸(Asp,D)和谷氨酸(Glu,E)。保守氨基酸序列变体还包括包含小的氨基酸缺失和/或插入的变体。

[0086] 如本文所用,两个氨基酸序列之间的百分比相似性等同于两个序列之间的同一性百分比。两个序列之间的同一性百分比随序列共有的相同位置数变化(即, $\% \text{同一性} = \text{相同位置数} / \text{位置总数} \times 100$),考虑到需要引入以实现两个序列的最佳比对的缺口的数量和每个缺口长度。可以使用本领域已知的标准方法完成序列的比较和两个序列之间的同一性百分比的确定。

[0087] 由于传统的动物免疫是繁琐且有问题的方法,其成功率低,特别是当针对包含小分析物的免疫复合物的抗体产生时,本发明的抗体优选从重组表达文库中获得,例如,通过采用基于噬菌体展示的策略。或者,其它展示技术如核糖体展示,细菌细胞表面展示,酵母细胞表面展示或哺乳动物细胞表面展示能够用于从重组表达文库中分离结合物。除抗体或抗体片段如Fab,scFv,纳米抗体或VHH之外,此类文库可用于基于替代蛋白质支架(例如,darpin,亲和体,单抗体)生成结合物。例如,重组表达文库使得能够使用阴性选择,其中在用IC选择之前去除识别初级抗体的抗体。使用免疫的策略是不可能做到这样的。例如,可以使用本领域众所周知的免疫复合物(IC)淘选方法从合成的抗体噬菌体文库(例如scFv或Fab文库)中分离抗-IC抗体。

[0088] 一方面,本发明提供了制备本文公开的抗-IC抗体的方法。在一些实施方案中,该方法包括通过选择结合在CCPH和抗-CCPH初级抗体之间形成的免疫复合物的抗体、优选抗-Adda抗体或使用包含载体和式(I)的化合物的免疫原产生的初级抗体适合的重组表达文库中获得抗-IC抗体。该方法可以包括一轮或多轮选择,使用或不使用负选择步骤,用于排除当与CCPH不复合时结合初级抗体的抗体。优选地,从噬菌体展示文库获得抗-IC抗体或其片段。因此,可以首先将表达文库与固定的初级抗体预孵育以分选出与初级抗体结合的那些抗体,此后将未结合的噬菌体分离并与CCPH和初级抗体的混合物一起孵育以选择结合固定化初级抗体和CCPH之间形成的免疫复合物而不结合就其本身而言的初级抗体的噬菌体。

[0089] 换言之,用于制备本发明抗-IC抗体的方法可以包含下列步骤:

[0090] a) 使用本领域众所周知的方法使初级抗体固定在固相支持物或载体上,例如微量滴定孔或珠;

[0091] b) 通过使固定的初级抗体与文库在本领域众所周知的条件中反应进行负选择;

[0092] c) 采集第一文库未结合级分;

[0093] d) 使固定的初级抗体接触CCPH物质,用于在CCPH物质与初级抗体之间形成免疫复合物;

[0094] e) 使步骤d)中得到的免疫复合物与步骤c)中得到的文库未结合级分反应;

[0095] f) 通过在本领域众所周知的条件下洗涤除去第二未结合文库;

[0096] g) 分离和采集结合免疫复合物的一种或多种抗-IC抗体;和

[0097] h) 在任意适合的表达系统中表达所述一种或多种抗-IC抗体。

[0098] 典型地,在进行步骤h)之前,通过使步骤g)中获得的抗-IC抗体经历重复轮的步骤b)至g)或步骤d)至g)将该方法重复2至5次。该方法也可以在没有负选择步骤b)的情况下进行。如果需要,可以在不同轮的步骤d)中使用不同的CCPH物质进行不同轮的该方法。每个噬菌体颗粒携带其在其表面上展示的重组多肽的遗传信息。该特征允许通过从可能非常复杂的噬菌体文库中选择携带它的噬菌体颗粒来鉴定编码表现出所需特异性的本发明抗体的DNA。然后可以分离来自最佳克隆的DNA,插入适合的表达载体中,并转染或转化入到相容性表达宿主中,以根据标准重组技术产生抗体。

[0099] 许多类型的适合表达载体是可获得的,并且包括但不限于质粒或修饰的病毒,其作为自主DNA分子维持在宿主细胞中或整合在基因组DNA中。如本领域众所周知的,载体系统必须与宿主细胞相容。优选地,编码本发明的抗-IC抗体的DNA与允许表达该抗体的一种或多种异源表达控制序列可操作地连接。适合的控制序列在本领域中是容易获得的,且包括但不限于启动子,前导序列,聚腺苷酸化和信号序列。

[0100] 在一些实施方案中,可能期望将本发明的抗-IC抗体表达为与一种或多种肽或小蛋白标签的融合体,其促进纯化、分离、固定和/或检测。用于纯化或固定目的的适合亲和标签的非限制性实例包括聚组氨酸标签(His标签),血凝素标签(HA标签),谷胱甘肽-S-转移酶标签(GST-标签)和生物素标签。适合检测标签包括荧光蛋白,例如GFP,和在与生色底物接触时将产生有色产物的酶标签。适合的酶标签的非限制性实例包括碱性磷酸酶(AP)和(辣根)过氧化氢酶(HRP)。其它标签如生物素,抗生物素蛋白和链霉抗生物素蛋白也可用于检测目的。能够用与酶、荧光团或其它报道分子缀合的生物素/抗生物素蛋白/链霉抗生物素蛋白结合蛋白检测它们。用于产生本发明的抗-IC抗体作为融合蛋白的载体,其它工具和方法在本领域中是容易获得的。

[0101] 适合的宿主细胞的非限制性实例包括原核宿主,例如细菌(例如大肠杆菌,杆菌),酵母(例如巴斯德毕赤酵母(*Pichia pastoris*),酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*))和真菌(例如丝状真菌(filamentous fungi)),以及真核宿主例如昆虫细胞(例如Sf9)和哺乳动物细胞(例如CHO细胞)。在一些实施方案中,将用包含编码本发明抗-IC抗体的多核苷酸的表达载体转染的宿主细胞在适于产生本发明抗-IC抗体的条件下培养,然后回收所得抗体。

[0102] 可以通过标准技术将表达载体转染到宿主细胞中。如本文所用,术语“转染”是指通常用于将外源DNA导入原核或真核宿主细胞的多种技术,包括但不限于电穿孔,核转染,

声致穿孔,磁转染,热休克,磷酸钙沉淀,DEAE-葡聚糖转染等。如本文所用,术语“转染”及其所有语言形式可分别与术语“转化”及其所有语言形式互换使用。

[0103] 本发明的抗-IC抗体还可以通过也称为体外翻译的体外蛋白质表达产生,无细胞蛋白质表达,无细胞翻译或无细胞蛋白质合成。基于例如细菌(例如大肠杆菌),家兔网织红细胞,CHO或人裂解物的几种无细胞表达系统是本领域可商购的。在一些实施方案中,体外蛋白质表达可以以分批反应或透析模式进行。

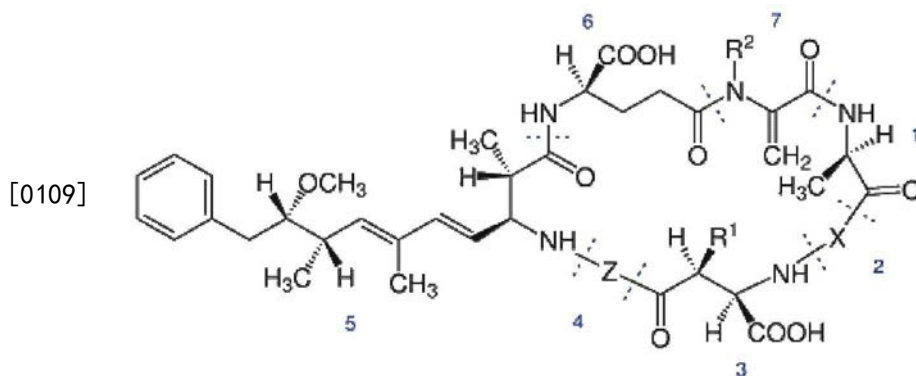
[0104] 本发明提供对CCPH和抗-CCPH初级抗体、优选单克隆抗-Adda抗体或使用包含载体和式(I)的化合物的免疫原产生的初级抗体之间形成的免疫复合物特异性的抗-IC抗体。重要的是,本发明的抗-IC抗体与就其本身而言的初级抗体或CCPH没有表现出显著的结合。

[0105] 由本文提供其序列的抗-IC抗体均包含含有SEQ ID NO:2的CDR1、含有SEQ ID NO:3的CDR2和含有SEQ ID NO:4的CDR3的轻链可变区。根据可替代的定义,所述抗-IC抗体包含轻链可变区,其中CDR1包含选自SEQ ID NO:5-29的氨基酸序列的氨基酸24-35,CDR2包含选自SEQ ID NO:5-29的氨基酸序列的氨基酸51-57,且CDR3包含选自SEQ ID NO:5-29的氨基酸序列的氨基酸90-98。所述抗-IC抗体包含如SEQ ID NO:30至54中所示的相应的重链CDR1、CDR2和CDR3序列。还涵盖保守序列变体和与所述CDR序列具有至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%序列同一性的变体,条件是抗体基本上保留其特异性。

[0106] 在一些实施方案中,本发明的抗-IC抗体包含相同的构架区,使得例如LFR1包含任何SEQ ID NO:5的氨基酸1-23,LFR2包含任何SEQ ID NO:5的氨基酸36-50,LFR3包含任何SEQ ID NO:5的氨基酸58-89,和LFR4包含任何SEQ ID NO:5的氨基酸99-110,且其中例如HFR1包含SEQ ID NO:31的氨基酸1-30,HFR2包含SEQ ID NO:31的氨基酸36-49,HFR3包含SEQ ID NO:31的氨基酸67-98,并且HFR4包含SEQ ID NO:31的氨基酸111-121。但是,在一些实施方案中,框架区的一种或多种可以是保守序列变体或与上述举出的序列具有至少80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%序列同一性,条件是抗体的特异性没有显著改变。在一些另外的实施方案中,可以通过重组技术将本发明的CDR移植到不同的框架中,同样条件是抗体的特异性没有显著改变。

[0107] 在一些实施方案中,本发明抗-IC抗体的轻链可变区如SEQ ID NO:5-29中所述,而其相应的重链可变区如SEQ ID NO:31-55中所述。还涵盖保守序列变体和与所述序列具有至少80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%序列同一性的变体,条件是抗体基本上保留其特异性。

[0108] 出乎意料的是,一些本发明的抗-IC抗体是组特异性的,即它们识别多种不同的、优选全部或基本上全部的CCPH变体和抗-CCPH初级抗体、优选抗-Adda抗体之间形成的免疫复合物。这是令人惊讶的,因为这些抗体是通过仅用单一CCPH变体(即MC-LR、MC-RR或Nod-R)淘选噬菌体展示文库获得的。虽然如此,如实施例中所证实的,这些抗体对至少CCPH变体MC-LR,MC-dmLR,MC-LA,MC-RR,MC-dmRR,MC-YR,MC-LY,MC-LF,MC-LW,MC-WR和Nod-R具有特异性。然而,这些抗体的特异性比这相当更宽,因为它们在第2位容忍至少L,R,W或Y;且在第4位容忍A,R,Y,F或W;并且R¹在微囊藻毒素结构中甲基化或去甲基化,而对其结合特性没有显著影响。它们还能够容忍第1位和第2位不存在氨基酸,因此使得能够识别包含节球藻毒素的免疫复合物。



[0110] 具有所示氨基酸编号的微囊藻毒素的一般结构

[0111] 因此,本发明的组特异性抗-IC抗体能够识别11种或更多,例如,15种或更多,20种或更多,30种或更多,40种或更多,50种或更多,60种或更多,70种或更多,80种或更多或90种或更多不同的CCPH-抗-CCPH抗体免疫复合物。本发明的抗-IC抗体甚至可以结合在所有或基本上所有已知的CCPH变体和识别所述变体的抗-CCPH抗体之间形成的免疫复合物,优选组特异性抗体,例如抗-Adda抗体。

[0112] 在一些实施方案中,本发明的组特异性抗-IC抗体包含:轻链可变区,其中CDR1包含SEQ ID NO:2,CDR2包含SEQ ID NO:3,且CDR3包含SEQ ID NO:4;和重链可变区,其中CDR 1-3包含SEQ ID NO:30或31中所示的氨基酸序列。根据可替代的定义,轻链CDR 1-3包含SEQ ID NO:5或6中举出的氨基酸序列。

[0113] 优选的组特异性抗-IC抗体的非限制性实例包括这样的抗体,其包含:轻链可变区,其包含SEQ ID NO:5;和重链可变区,其包含SEQ ID NO:30;和这样的抗体,其包含:轻链可变区,其包含SEQ ID NO:6;和重链可变区,其包含SEQ ID NO:31。优选的组特异性抗-IC抗体的具体的非限制性实例包括SA51D1和SA51F6。

[0114] 本发明的抗体的一些是亚属的,尽管它们也仅用单一CCPH变体即MC-LR,MC-RR或Nod-R从噬菌体展示文库中淘选。例如,抗体SA42E10和SA52C2是MC亚组特异性结合物,其识别所有或基本上所有MC变体但不是Nod的免疫复合物,而抗体SA55D1是MC-LZ亚组特异性结合物,其识别在第2位上具有亮氨酸(L)的MC的免疫复合物。亚组MC-LZ的变体成员的非限制性实例包括MC-LR,dmMC-LR,MC-LY,MC-LF,MC-LA和MC-LW。此外,抗体SA41A5和SA51H4例如对于亚组MC-XR是特异性的,即它们识别在第4位具有精氨酸(R)的MC的免疫复合物,但不识别相应的Nod。亚组MC-XR的变体成员的非限制性实例包括MC-LR,MC-RR,dmMC-RR和MC-YR。此外,抗体SA58A12,SA41F2,SA52B4和SA33D5例如对于亚组XR是特异性的,即它们识别在第4位上具有精氨酸(R)的MC和Nod的免疫复合物。亚组XR的变体成员的非限制性实例包括MC-LR,MC-RR,dmMC-RR,MC-YR和Nod-R。最后,抗体如SA56D5,SA57A3和SA60A1是亚组特异性抗体,其具有MC-LR优选特异性,而例如抗体SA42A3是亚组特异性抗体,其具有MC-RR优选特异性。

[0115] 除了上述特定亚组特异性抗体的非限制性实例外,本发明还提供了MC亚组特异性抗体,其包含:轻链可变区,其中CDR 1-3包含SEQ ID NO:15或16中所示的氨基酸序列;和相应的重链可变区,其中CDR 1-3包含SEQ ID NO:40或41中所示的氨基酸序列;MC-LZ亚组特异性抗体,其包含:轻链可变区,其中CDR 1-3包含SEQ ID NO:18或19所示的氨基酸序列;和相应的重链可变区,其中CDR 1-3包含SEQ ID NO:42所示的氨基酸序列;MC-XR亚组特异性

抗体,其包含SEQ ID NO:17所示的氨基酸序列。轻链可变区,其中CDR 1-3包含SEQ ID NO:18或19中所示的氨基酸序列;和相应的重链可变区,其中CDR 1-3包含SEQ ID NO:43或44所示的氨基酸序列;XR亚组特异性抗体,其包含:轻链可变区,其中CDR 1-3包含SEQ ID NO:20-23所示的氨基酸序列;和相应的重链可变区,其中CDR 1-3包含SEQ ID NO:45-48所示的氨基酸序列;具有MC-LR优选特异性的抗体,其包含:轻链可变区,其中CDR 1-3包含SEQ ID NO:24-27所示的氨基酸序列;和相应的重链可变区,其中CDR 1-3包含氨基酸SEQ ID NO:49-52中所示的酸序列;和具有MC-RR-优选特异性的抗体,其包含:轻链可变区,其中CDR 1-3包含SEQ ID NO:28或29中所示的氨基酸序列;和相应的重链可变区,其中CDR 1-3包含SEQ ID NO:53或54中所示的氨基酸序列。

[0116] 优选的亚组特异性抗-IC抗体的其它非限制性实例包括为MC亚组特异性的那些且包含:轻链可变区,其包含SEQ ID NO:15;和重链可变区,其包含SEQ ID NO:40;或轻链可变区,其包含SEQ ID NO:16;和重链可变区,其包含SEQ ID NO:41;为MC-LZ亚组特异性的那些且包含:轻链可变区,其包含SEQ ID NO:17;和重链可变区,其包含SEQ ID NO:42;为MC亚组特异性的那些,其包含:轻链可变区,其包含SEQ ID NO:18;和重链可变区,其包含SEQ ID NO:43;或轻链可变区,其包含SEQ ID NO:19;和重链可变区,其包含SEQ ID NO:44;为XR亚组特异性的那些且包含:轻链可变区,其包含SEQ ID NO:20;和重链可变区,其包含SEQ ID NO:45;轻链可变区,其包含SEQ ID NO:21;和重链可变区,其包含SEQ ID NO:46;轻链可变区,其包含SEQ ID NO:22;和重链可变区,其包含SEQ ID NO:47;或轻链可变区,其包含SEQ ID NO:23;和重链可变区,其包含SEQ ID NO:48;显示MC-LR优选特异性的那些且包含:轻链可变区,其包含SEQ ID NO:24;和重链可变区,其包含SEQ ID NO:49;轻链可变区,其包含SEQ ID NO:25;和重链可变区,其包含SEQ ID NO:50;或轻链可变区,其包含SEQ ID NO:26;和重链可变区,其包含SEQ ID NO:51;或轻链可变区,其包含SEQ ID NO:27;和重链可变区,其包含SEQ ID NO:52;和显示MC-RR优选特异性的那些且包含:轻链可变区,其包含SEQ ID NO:28;和重链可变区,其包含SEQ ID NO:53;或轻链可变区,其包含SEQ ID NO:29;和重链可变区,其包含SEQ ID NO:54。

[0117] 本发明抗-IC抗体的一些是变体特异性的,即仅识别单一CCPH变体和识别它们的抗-CCPH抗体的免疫复合物。例如,抗体SA56B8、SA59G2、SA56E7和SA51D12识别包含MC-LR的免疫复合物,抗体SA41B5和SA44E11识别包含MC-RR的免疫复合物,而抗体SA32C11、SA32F1和SA34G1识别包含Nod-R的免疫复合物。

[0118] 除了上述特定变体特异性抗体的非限制性实例外,本发明还提供了MC-LR特异性抗体,其包含:轻链可变区,其中CDR 1-3包含在SEQ ID NO:7-10中举出的相应氨基酸序列;和重链可变区,其中CDR 1-3包含SEQ ID NO:32-35中所示的相应氨基酸序列;MC-RR亚组特异性抗体,其包含:轻链可变区,其中CDR 1-3包含SEQ ID NO:11所示的相应氨基酸序列;和重链可变区,其中CDR 1-3包含SEQ ID NO:36所示的相应氨基酸序列;Nod-R亚组特异性抗体,其包含:轻链可变区,其中CDR 1-3包含SEQ ID NO:12-14中所示的相应氨基酸序列;和重链可变区,其中CDR 1-3包含SEQ ID NO:37-39中所示的相应氨基酸序列。

[0119] 优选的变体特异性抗-IC抗体的其它非限制性实例包括为MC-LR特异性的那些且包含:轻链可变区,其包含SEQ ID NO:7;和重链可变区,其包含SEQ ID NO:32;或轻链可变区,其包含SEQ ID NO:8;和重链可变区,其包含SEQ ID NO:33;轻链可变区,其包含SEQ ID

NO:9;和重链可变区,其包含SEQ ID NO:34;或轻链可变区,其包含SEQ ID NO:10;和重链可变区,其包含SEQ ID NO:35;为MC-RR亚组特异性的那些且包含:轻链可变区,其包含SEQ ID NO:11;和重链可变区,其包含SEQ ID NO:36;和Nod-R亚组特异性的那些且包含:轻链可变区,其包含SEQ ID NO:12;和重链可变区,其包含SEQ ID NO:27;轻链可变区,其包含SEQ ID NO:13;和重链可变区,其包含SEQ ID NO:38;或轻链可变区,其包含SEQ ID NO:14;和重链可变区,其包含SEQ ID NO:39。

[0120] 在一个方面,本发明还提供抗-IC抗体的抗体组,其用于分析样品的CCPH。在一些实施方案中,所述抗体组包含至少两种抗体,其选自上述举出的组特异性抗-IC抗体,包括但不限于SA51D1和SA51F6;亚组特异性抗-IC抗体,包括但不限于SA42E10、SA52C2、SA55D1、SA41A5、SA51H4、SA58A12、SA41F2、SA52B4、SA33D5、SA56D5、SA57A3、SA60A1、SA57D4、SA42A3和SA44E11;和上述举出的变体特异性抗体,包括但不限于SA56B8、SA59G2、SA56E7、SA51D12、SA41B5、SA32C11、SA32F1和SA34G1。换言之,所述抗体组可以包含超出任意期望的组合的所述抗体的任意成员。

[0121] 在一些另外的实施方案中,所述抗体组包含至少一种抗体,其选自上述举出的属抗体,包括但不限于SA51D1和SA51F6;和至少另一种抗体,其选自亚组特异性抗体SA42E10、SA52C2、SA55D1、SA41A5、SA51H4、SA58A12、SA41F2、SA52B4、SA33D5、SA56D5、SA57A3、SA60A1、SA57D4、SA42A3、SA44E11;和上述举出的变体特异性抗体,包括但不限于SA56B8、SA59G2、SA56E7、SA51D12、SA41B5、SA32C11、SA32F1和SA34G1。

[0122] 对免疫复合物具有特异性使得本发明的抗体适用于非竞争性测定形式,其允许在皮摩尔范围内灵敏且简单地检测CCPH,即远低于MC-LR的WHO指导限(1 μ g/L)。非竞争性测定,也称为试剂过量测定,夹心式测定、免疫测定或双位点测定,通常涉及使用两种抗体靶向不同表位,一种抗体用于抗原捕获,另一种抗体标记用于检测。特别是捕获,但在某种程度上,与分析物相比,检测抗体也可以过量添加。在低分析物浓度下,总是可获得未占据的捕获结合位点,但由于信号测定仅在占据的结合位点发生,因此信号与存在的分析物的量成正比。在试剂有限的竞争性测定中情况相反,其中分析物和标记的示踪物分析物竞争所使用的单型抗-分析物抗体的有限数量的结合位点。通常,夹心形式在测定稳健性、灵敏度、特异性和动力学方面提供了相当大的益处。此外,与竞争性测定相比,工作范围典型地更加扩展。对于像CCPH这样的小尺寸分析物,通常采用竞争性测定法,因为发现具有分开表位的两个抗体是罕见的。

[0123] 正如本领域技术人员易于理解的,本发明的抗-IC抗体可以用于任意可得到的非竞争性免疫测定类型。适合的免疫测定法的非限制性实例包括酶联免疫吸附测定(ELISA)、免疫荧光测定(IFMA)、荧光免疫吸附测定(FIA),例如时间分辨免疫荧光测定(TR-IFMA)、化学发光免疫测定(CLIA)、放射性免疫测定(RIA)、开放夹心式免疫测定(OS)和基于微球的免疫测定(MIA)。

[0124] 根据所用的测定类型,初级抗-CCPH抗体或本发明的抗-IC抗体或两者可以缀合或以其它方式与可检测标记结合,所述可检测标记选自包括但不限于以下的组:光学试剂,例如荧光标记,包括各种有机和/或无机小分子或各种荧光蛋白及其衍生物,磷光标记,化学发光标记和生色标记;放射性标记,如放射性核素,其发射伽马射线、正电子、 β 或 α 粒子,或X射线,以及碱性磷酸酶(AP)或(辣根)氧化氢酶(HRP)这样的酶。所述结合可以是直接的,例

如通过共价键,或间接的,例如通过次级结合剂、螯合剂或接头。用于将可检测剂缀合或以其它方式结合抗体的技术是众所周知的,并且抗体标记试剂盒可从许多来源商购获得。抗体中的一种或两种也可以通过重组技术表达为与可检测标记或检测标记融合的融合蛋白。

[0125] 在一些实施方案中,抗-IC抗体是标记的。在一些其它实施方案中,抗-IC抗体被包含可检测标记的另一抗体(例如种特异性抗体)识别。在一些其它实施方案中,抗-IC抗体包含可被包含可检测标记的另一抗体识别的标签。在一些更进一步的实施方案中,抗-IC和所述另一抗体都用相同的标记物标记,例如,用于改善测定中预期罕见的待检测的免疫复合物的灵敏度。抗-IC抗体和所述另一抗体也可以用不同的标记物标记。

[0126] 本文提供的免疫测定可以是固相免疫,例如横向流测定或在固体表面例如微量滴定板上进行的常规夹心式测定。在这些测定形式中,初级抗-CCPH抗体或抗-IC抗体固定在固体表面上。优选地,待固定的抗体是初级抗-CCPH抗体,优选抗-Adda抗体。如果待分析的样品含有所述分析物,即一种或多种CCPH变体,则在分析物与初级和次级抗体之间形成可检测的夹心结构。所述固相免疫测定可以是异相的或均相的。在异相测定中,任何游离的分析物或抗体例如通过洗涤与形成的免疫复合物物理分离,而在均相测定中不需要这种分离,使得均相测定更优选。

[0127] 本发明的抗-IC抗体不仅适用于均相固相测定形式,也适用于在溶液中进行的均相免疫测定。这种溶液内免疫测定是特别有利的,因为不需要固定或洗涤步骤,使得它们简单且易于操作。因此,在一些优选的实施方案中,免疫测定是基于液体的均相免疫测定。

[0128] 在一些实施方案中,免疫测定可以是多重的,具有多个同时或依次测定,和/或它们可以使用本领域可获得的工具和方法自动进行。

[0129] 用于检测含水样品中至少一种CCPH变体的存在或不存在、对其定量和/或鉴定的本发明免疫测定法可包括以下步骤:a)使怀疑含有一种或多种CCPH变体的含水样品与抗体组接触,该抗体组包含本文公开的至少一种抗-IC抗体和抗-CCPH初级抗体,其中所述抗-CCPH初级抗体结合样品中存在的一种或多种CCPH变体(如果有的话),并且与之形成免疫复合物,并且其中所述至少一种抗-IC抗体结合所述免疫复合物,形成夹心式免疫复合物,和b)检测所述夹心式免疫复合物存在或不存在,表明在所述含水样品中分别存在或不存在所述一种或多种CCPH变体。

[0130] 本发明的抗-IC抗体或其组合的抗体组特别适用于测定,例如现场(on-site)检测测定,以及其中对一种或多种CCPH存在或不存在的简单的是/否的答案是足够的方法。因此,在一个方面,本发明提供了一种测定法,该测定法给出关于存在或不存在本测定法中使用的一种或多种抗-IC抗体与初级抗体的免疫复合物所针对的毒素变体的是/否的结果,其中在测定中使用的一种或多种抗-IC抗体对于免疫复合物与初级抗体是特异性的。该测定法可以给出关于存在或不存在任何或许多不同CCPH变体的单一组合结果。抗-IC抗体或其组合的特异性越宽,则假阴性结果的风险越低。或者或另外,该测定法可以给出关于特异性CCPH变体或其任何组合或亚组存在或不存在的多个是/否的结果。通过这类是/否的测试分析的样品的典型实例包括但不限于再生沐浴水样。

[0131] 本发明的抗-IC抗体及其组合也适用于含水样品如饮用水或环境水样中CCPH的快速和灵敏定量分析。实际上,检测到11种主要的肝毒素,即MC-LR、-dmLR、-LA、-RR、-dmRR、-YR、-LY、-LF、-LW、-WR和Nod-R,灵敏度范围在实施例2中公开的1hTR-FIA测定中为0.011μg/

L至0.0499 μ g/L。对于MC-LR,使用的测定时间低至10min,获得的灵敏度为0.029 $\pm$ 0.008 μ g/L,远低于世界卫生组织的指导限(1 μ g/L)。

[0132] 此外,本发明的抗-IC抗体及其组合施用于允许鉴定或分析待分析样品中存在的CCPH变体的测定形式。结果可表示为是/否的结果或表示待分析样品中所述CCPH变体量的绝对或相对值。

[0133] 根据上述描述,本发明还提供了本发明的抗-IC抗体或其组合的抗体组在检测含水样品、优选水样中至少一种CCPH变体存在或不存在、对其定量和/或鉴定中的用途,上述水样例如为饮用水样(例如井水样),再生水(例如浴水样)或任意其它环境水。

[0134] 在又一个方面,本发明提供了用于对含水样品中至少一种CCPH变体进行免疫检测、定量和/或鉴定的试剂盒,其中该试剂盒包含至少一种本文公开的抗-IC抗体。在一些实施方案中,所述至少一种抗-IC抗体被可检测地标记和/或包含用于固定目的的亲亲和标签。

[0135] 该试剂盒还可以包含初级抗-CCPH抗体,优选抗-Adda抗体,其可以包含或不包含可检测标记或用于固定目的的亲亲和标签。在一些另外的实施方案中,抗-IC抗体或抗-CCPH抗体被固定在固体表面上。抗-IC和抗-CCPH抗体可以彼此独立地是完整的免疫球蛋白或其任何抗原结合片段,例如Fab,Fab',F(ab')₂,Fv或scFv片段。在一些另外的实施方案中,所述抗体可以以干燥形式提供。

[0136] 在一些实施方案中,该试剂盒还可以包含用于进行免疫测定的一种或多种其它成分,例如印迹(例如尼龙或硝化纤维),微量滴定板,反应小瓶,横向流动条,适合的标准品和试剂,例如缓冲液,检测试剂(例如标记,生色底物,识别本发明的抗-IC抗体的标记的另外的抗体等)和洗涤溶液。

[0137] 典型地,该试剂盒还包括使用说明书或针对说明书外部来源例如互联网的指导。

[0138] 涉及本发明任意方面的任何公开的细节、优点、实施方案等也适用于本发明的另外的方面,另有明确指示的除外。

[0139] 对于本领域技术人员显而易见,因为技术进步,所以本发明的发明创造可以以不同方式实施。本发明及其实施方案不限于如下所述的实施例,而是可以在权利要求范围内改变。

实施例

[0140] 实施例1.抗-IC抗体的生成

[0141] 材料和方法

[0142] 常用材料、仪器和试剂

[0143] 常用无机和有机化学试剂得自商品来源Sigma或Merck,另有指定的除外。使用的水通过Millipore Milli-Q Plus滤水纯化系统(Millipore Corporation,country)纯化。限制酶来自Fermentas(Vilna,Lithuania)或来自New England Biolabs(Ipswich,UK)。寡核苷酸由Tag Copenhagen或biomers.net定制合成。如果没有举出,则根据标准方案实施分子生物学技术(Sambrook和Russell,2001)。DNA操作试剂盒来自Qiagen(Hamburg,Germany)或来自Thermo Scientific(Fisher Scientific,Finland)。链霉抗生物素蛋白偶联的磁珠(**Dynabeads®**MyOne™链霉抗生物素蛋白C1和**Dynabeads®**M-280链霉抗生物素蛋白)和Dyna1 MPC磁体购自Invitrogen Dynal AS,Oslo,Norway。用于荧光测定的多标记计

数器Victor™ 1420来自PerkinElmer Life Sciences,Finland。测定缓冲液、增强溶液、洗涤浓缩物和链霉抗生物素蛋白或家兔抗-小鼠 (RAM) IgG包被的微孔板来自Kaivogen (Turku,Finland)。单克隆抗-Adda抗体AD4G2 (Adda特异性的,抗-微囊藻毒素) 来自Enzo Life Sciences,Inc. (USA)。细菌抗-碱性磷酸酶多克隆抗体 (抗-bAP pAb) 来自LifeSpan Biosciences,Inc. (USA)。链霉抗生物素蛋白来自BioSpa (Milan,Italy)。通过His Spin Trap™试剂盒 (GE Healthcare,UK) 进行Histidin标签scFv纯化。通过NanoDrop ND1000分光光度计 (Thermo Scientific) 测量DNA和蛋白质浓度。辅助噬菌体VCS M13和细菌宿主大肠杆菌 (E.coli) XL1-Blue来自Stratagene,La Jolla,CA。用于噬菌体选择的TBT 0.05和TBT 0.5含有50mM TrisCl、150mM NaCl,pH 7.5和吐温20 (分别为0.05和0.5%)。

[0144] 抗-Adda mAb的生物素化

[0145] 抗-Adda mAb的生物素化用40倍摩尔过量的BITC (生物素异硫氰酸酯,MW 404g/mol) 或NHS-SS-PEG4-生物素 (Pierce Biotechnology,USA) 在50mM碳酸钠缓冲液 (pH 9.8) 中进行。通过两个连续脱盐柱 (NAP5和NAP10) 纯化生物素化的mAb,并在TSA缓冲液 (50mM Tris,150mM NaCl,0.02%NaN₃),0.1%BSA,pH 7.5中洗脱,并保持在4℃。

[0146] 检测抗体的Eu标记

[0147] 针对细菌碱性磷酸酶产生的多克隆抗体,即抗-bAP pAb (2mg) 与在50mM碳酸盐缓冲液 (pH9.8) 中120倍摩尔过量的铕 (Eu) 螯合物[N1-(4-异硫氰酸基苄基) 二亚乙基三胺-N1,N2,N3,N3'-四(乙酸) 铕 (III)] (Mukkala等人,1989) 偶联,总体积为1ml。在室温下在暗处反应过夜,用FPLC (Pharmacia Biotech,Sweden) 用Superdex 200柱纯化Eu标记的抗-bAP pAb,最后pH 7.75的TSA缓冲液中洗脱,并保存在4℃。

[0148] 抗-免疫复合物抗体的亲和力选择

[0149] 从合成的通用scFv文库中分离出免疫复合物特异性结合物,其中scFv展示为与丝状VCS M13噬菌体的截短的p3蛋白的融合物 (Brockmann等人,2011;Huovinen等人,2013)。使用与用MC-LR、MC-RR或Nod-R结合的生物素化的抗-Adda mAb饱和的链霉抗生物素蛋白偶联的磁珠平行进行三次独立的淘选。

[0150] 为了去除针对链霉抗生物素蛋白和抗-Adda mAb的不需要的结合物,将噬菌体文库悬浮液 [5×10^{12} 转化单位 (tfu) /ml,在TSA,pH 7.5,1%BSA中] 在用BITC生物素化的抗-Adda mAb (300ng/孔) 饱和的链霉抗生物素蛋白包被的微量滴定孔中孵育 (2h) 并收集。在扣除步骤后,加入非特异性天然小鼠Ig G (1μg/ml)、生物素化的抗-Adda mAb (35ng/ml)、生物素封闭的链霉抗生物素蛋白 (2.5μg/ml) 和游离生物素 (25μM) 作为封闭剂并分成5个等分试样 (每个1ml)。同时使用100μl (10mg/ml) 链霉抗生物素蛋白磁珠以使用生物素化的抗-Adda mAb饱和并分成4个等分试样。在3个等分试样中加入过量的游离毒素 (MC-LR、MC-RR或Nod-R) 以制备三种不同的免疫复合物饱和珠悬浮液 (200μl TBT 0.05)。将每份等分试样 (1ml) 的预处理文库悬浮液 (前面提到的) 在室温下与200μl相应的免疫复合物饱和珠 ($7-10 \times 10^9$ 个珠/ml) 一起孵育30min。为了监测背景结合,进行两个平行对照反应 (未包被的珠和仅用生物素化的adda mAb包被的珠)。用0.9ml TBT 0.5洗涤三次后,用100μl胰蛋白酶 (60μg/ml,在TBS中) 在37℃振荡 (300rpm) 洗脱与珠结合的噬菌体30min,并用100μl大豆胰蛋白酶抑制剂 (100μg/ml,在TBS中) 终止反应。每份洗脱液用于在37℃下感染1ml指数期 ($OD_{600} \approx 0.5$) XL1-Blue大肠杆菌细胞 (在补充有10μg/ml四环素的SB中生长) 30min。将10μl感染的细

胞用于滴定洗脱的噬菌体,并将其余细胞接种在LA (0.2% (w/v) 葡萄糖,12.5 μ g/ml tet和25 μ g/ml cam) 上,并在30 $^{\circ}$ C下生长过夜。然后将生长的细胞用于接种20ml SB[1% (w/v) 葡萄糖,10 μ g/ml四环素和25 μ g/ml cam]培养基,初始OD₆₀₀为0.1。为了扩增噬菌体,将培养物在37 $^{\circ}$ C、300rpm培养,并且当OD₆₀₀为0.5时,将细胞用20倍过量的辅助噬菌体VCS M13在37 $^{\circ}$ C下以50rpm感染30min。仅收集细胞并重悬于50ml新鲜的除了葡萄糖缺失的相同组成的SB培养基中。使培养物继续在30 $^{\circ}$ C、300rpm下生长,并且在1.5h后,通过加入50 μ g/ml卡那霉素选择噬菌粒,然后用100 μ M异丙基- β -D-1-硫代半乳糖吡喃糖苷 (IPTG) 诱导。噬菌体在26 $^{\circ}$ C, 250rpm下产生o/n,并通过用4%聚乙二醇 (PEG) 8000/3%NaCl双重沉淀在TSA缓冲液 (pH7.5,0.1%BSA) 中分离。

[0151] 对于每次淘选,使用相同的具有以下修饰的相应毒素重复选择用于另一个循环。在第二轮中,NHS-SS-PEG4-生物素化的抗-Adda mAb用于形成免疫复合物。此外,在扣除步骤后,将 1×10^{10} tfu的噬菌体与5 μ l ($\sim 6-7 \times 10^8$ 个珠/ml) 的免疫复合物包被的珠 (Dynabeads®M-280) 混合。非特异性天然小鼠Ig G (封闭剂) 的量增加至500 μ g/ml。通过加入200 μ l50mM二硫苏糖醇 (DTT) 从珠洗脱结合的噬菌体。

[0152] 噬菌体免疫测定

[0153] 在每轮选择后制备相应的噬菌体储备溶液,并在每次选择期间进行噬菌体富集,然后进行噬菌体免疫测定。在预洗涤的链霉抗生物素蛋白孔中,加入生物素化的抗-Adda mAb或作为阴性对照的非特异性生物素化的抗HK2mAb (6H10) (50ng/孔),振荡孵育1h并洗涤4次。用三种游离抗原 (MC-LR、MC-RR和Nod-R) 以50ng/孔测试每种噬菌体储备溶液。在空白对照孔和对照孔中加入无毒素的测定缓冲液。孵育1h后,将板洗涤四次,并加入来自每个淘选轮的 2×10^{10} 噬菌体并孵育1h并洗涤四次。用N1Eu标记的家兔抗-fd (抗-噬菌体) pAb (Sigma-Aldrich) 检测结合的噬菌体。每个样品以一式两份测定。

[0154] 克隆、表达、筛选纯化

[0155] 从第二轮淘选轮质粒DNA中分离的ScFv基因在载体pAK600His6 (来自pAK600的衍生物 (Kreber等人,1997)) 的SfiI位点连接,用于在XL1-Blue大肠杆菌细胞中表达为与碱性磷酸酶 (scFv-AP) 融合物的加组氨酸标签的scFv。

[0156] 使手动挑取的单菌落在96孔微量滴定板 (SARSTEDT) 上的SB (100 μ g/ml Amp,10 μ g/ml Tet,0.05%葡萄糖) 中生长,并且通过用100 μ M IPTG在26 $^{\circ}$ C o/n诱导表达scFv-AP蛋白。

[0157] 将表达培养物冻融至少两次,通过离心沉淀细胞,并将上清液用于初级筛选免疫测定。使用RAM或SA表面进行筛选以捕获包含MC-LR、MC-RR或Nod-R的IC (10 μ g/L)。通过AP活性或通过Eu标记的抗-AP抗体检测表达培养物上清液中抗-IC scFv-AP的存在。将选择的克隆 (基于特异性谱和高信号) 表达为5ml管培养物,并再次以类似的方式检查它们对9种不同毒素变体MC-LR、-dmLR、-RR、-dmRR、-YR、-LY、-LF、-LW和Nod-R的特异性 (图1A)。对具有针对九种毒素变体的不同特异性谱的所选克隆进行测序。最后,将选择的克隆表达为50ml培养物,并根据制造商的说明通过His捕获 (trap) 柱纯化。使用通用抗体SA51D1获得的结果显示在图4中,而使用抗体SA56B8,SA55D1,SA58A12和SA32C11获得的结果显示在图5中。

[0158] 测定抗体与MC变体和Nod的交叉反应性

[0159] 分析0.001至300 μ g/L的不同浓度范围的不同的纯化MC变体和Nod (图1A),以通过实施例2中公开的单步非竞争性测定确定所选克隆的交叉反应性特征。

[0160] 测定抗体与免疫复合物和裸抗-Adda mAb的交叉反应性

[0161] 使用Octet RED384仪器 (Pall ForteBio) 研究SA51D1的结合。使用倾斜底部384孔微量培养板 (ForteBio) 在30℃下以1000rpm搅拌一式两份进行三次测定 (A、B和C)。使用无色测定缓冲液 (Kaivogen) [0.05M Tris-HCl, pH 7.75, 0.9% (w/v) NaCl, 0.05% (w/v) NaN₃, 0.01% (v/v) 吐温40, 0.05% (w/v) 牛 γ -球蛋白, 20 μ M二亚乙基三胺五乙酸酯 (DTPA) 和 0.5% (w/v) 牛血清白蛋白 (BSA)]。

[0162] 将生物素化的ADDA Mab AD4G2 (1 μ g/ml) 在链霉抗生物素蛋白生物传感器 (Dip and Read SA Biosensors, ForteBio) 上固定200秒。为了形成IC, 用MC-LR (1 μ g/ml) 另外加载200秒。在空白测定 (C) 中, 仅使用缓冲液代替MC-LR。将所有传感器在缓冲液中孵育60秒。在测定B和C中, 观察到SA51D1 (1 μ g/ml) 的结合200秒, 此后, 将传感器导回缓冲液以进行解离阶段600秒。对于测定A, 将SA51D1 (1 μ g/ml) 在500 μ g/L的MC-LR存在下预孵育15min, 并且在500 μ g/L MC-LR存在下在缓冲液观察到结合。

[0163] 结果

[0164] 免疫复合物淘选

[0165] 如上文更详细地阐述的, 将生物素化的抗-Adda mAb与MC-LR、MC-RR一起在链霉抗生物素蛋白包被的磁珠的表面上固定, 从而形成免疫复合物 (IC)。珠用于从噬菌体上展示的合成scFv文库中选择结合物。对于每种抗原, 除了用于去除对链霉抗生物素蛋白或仅抗-Adda mAb具有特异性的结合物的扣除淘选外, 还进行两轮淘选。测试在不同淘选轮中拯救的噬菌体对IC的免疫反应性, 所述IC由与MC-LR、MC-RR或Nod结合的抗-Adda mAb组成。

[0166] 在第一轮淘选中, IC结合物的富集是明显的 (9-16X), 特别是在第二轮之后更明显了 (47-49X)。在第二轮淘选后, 虽然发生了一些游离抗-Adda mAb结合物的富集 (11.6X), 但与IC的结合明显更有效 (至少三倍)。对链霉抗生物素蛋白表面或非特异性IgG₁抗体没有显著的富集 (小于2.3X)。尽管在每次淘选期间仅使用单一抗原 (MC-LR、MC-RR或Nod-R), 但有意义的是噬菌体群体对所有三种类型的IC都显示出免疫反应性, 这表明可能存在能够识别其它毒素变体的通用或组特异性结合物。

[0167] 筛选概述

[0168] 将每次第二轮的选择输出亚克隆入表达载体PLK06H中, 其导致具有His标签的scFv-AP抗体片段的表达。筛选总计约1600个个体克隆以结合固定在RAM或链霉抗生物素蛋白孔上的MC-LR、MC-RR或Nod-R和抗-Adda mAb的IC。通过AP活性或通过Eu标记的抗-bAP抗体检测scFv-AP的结合。发现超过70%的克隆对于至少单一类型的IC是阳性的 (S/B>3)。

[0169] 将具有最高S/B比 (通常最高25-30%) 的克隆与具有有意义特征 (对单一毒素具有特异性) 的所有克隆进一步测试其对9种不同蓝藻毒素的交叉反应性: MC-LR、-dmLR、-RR、-dmRR、-YR、-LY、-LF、-LW和Nod-R (图1A)。对具有不同结合特征的潜在克隆进行测序以揭示其DNA和氨基酸组成。纯化选择的克隆。例如, 用his标签亲和柱纯化ScFv-AP克隆SA51D1, 并且所述克隆用于开发实施例2中公开的单步非竞争性测定。

[0170] 在Octet仪器上在MC-LR存在下观察到IC与抗-IC SA51D1之间的结合相互作用, 所述Octet仪器使用BioLayer干涉法 (BLI) 进行无标记测定。在实时测定中获得的传感图显示, 当没有形成IC时, scFv-AP SA51D1与初级抗体没有相互作用。此外, SA51D1与MC-LR的预孵育也不会阻碍scFv-AP SA51D1与IC的结合, 这揭示出scFv-AP对仅游离毒素没有亲和力

(图11)。

[0171] 实施例2. 单步非竞争性时间分辨免疫荧光测定

[0172] 本实施例证明本发明的抗-IC抗体在单步非竞争性(即夹心)时间分辨免疫荧光法(TR-IFMA)中的用途。该测定用加标以及用环境水样验证。

[0173] 材料和方法

[0174] 毒素标准品

[0175] 纯化毒素的具体用量: MC-LR, dm-MC-LR, MC-RR, dm-MC-RR, MC-YR, MC-LY, MC-LF, MC-LW, Nod-R (图1A) 得自Meriluoto博士实验室(**Abo** Akademi University), 为冻干粉末。通过制备型HPLC(柱: Nucleosil C 18 250×21mm, 7μm颗粒, 洗脱液: 27% ACN和73% 0.013M 乙酸铵)纯化毒素。在级分中鉴定毒素, 并用分析型HPLC检查纯度。用SPE筒(cartridge)进行浓缩。需要时, 在半制备型HPLC柱上进行第二次纯化。用LC-MS(离子阱(ion trap) HCT Ultra)检查纯度, 并通过分析型HPLC测定毒素浓度。MC-LA和MC-WR(图1A) 购自Enzo Life Science。所有毒素标准品均在-20℃下干燥储存, 直至需要。将干粉溶解在50% 甲醇中(100-250μg/ml原始储备溶液), 将进一步的工作储备溶液在MQ中稀释并在-20℃或4℃下在密封条件下保持。用Milli-Q水制备标准品并在4℃下短期储存。

[0176] 单步非竞争性测定

[0177] 在预洗涤的链霉抗生物素蛋白条中, 以100μl/孔添加样品或毒素标准品(0-300μg/L)。以100μl/孔加入包含生物素化的抗-Adda mAb(100ng/孔)、纯化的SA51D1scFv-AP(100ng/孔)和N1-Eu-抗-bAP PAb(50ng/孔)的试剂混合物。将条带在室温下缓慢摇动孵育55min, 然后洗涤四次。然后加入增强溶液(ES)(200μl/孔), 孵育5min(室温, 缓慢摇动), 并用多标记计数器Victor测定Eu荧光信号。使用Multicalc程序(Perkin Elmer)计算样品浓度。

[0178] 孵育时间的影响

[0179] 在室温下使用MC-LR(孔中浓度: 0-30μg/L)测试5min至4h的孵育时间对非竞争性测定的影响。

[0180] 来自加标的水样的MC-LR的检测

[0181] 使用五份水样(来自实验室的蒸馏MQ水, 来自实验室的自来水样和来自芬兰三个不同湖泊的三份环境水样)用MC-LR进行加标。先前用ELISA, PPIA, HPLC和MS/MS测试环境样品, 并且发现其不含胞内MC/Nod。用一系列浓度(0、0.2、0.4、1和4μg/L)的MC-LR对样品进行加标。

[0182] 来自环境水样的蓝藻毒素的检测

[0183] 使用测定水中的胞内/细胞和胞外/释放的毒素的单步非竞争性TR-IFMA测定法测试环境样品(在2009年期间从芬兰和爱沙尼亚采集)。每种样品有两组。将一组样品以-20℃保存在冻干形式中, 并且已经用ELISA, PPIA, HPLC和LC-MS测试细胞蓝藻毒素的量/变体以及蓝细菌的存在。包括样品收集的方法在之前描述过(Meriluoto和Codd, 2005), (Hautala等, 2013)。将冻干的样品在MQ中重构至4X或1X的最终浓度, 然后用于非竞争性测定。将新鲜冷冻并储存在-20℃的另一组样品(2ml等分试样)如此解冻至室温后用于通过所开发的非竞争性测定法测定(细胞外)毒素的量。

[0184] 结果

[0185] 单步非竞争性免疫测定

[0186] scFv-AP克隆SA51D1用于建立用于检测MC和Nod的单步非竞争性免疫测定。测定方法和发明创造如图2所示。简言之,移取100 μ l体积的样品或标准品至链霉抗生物素蛋白包被的微量滴定孔上,然后加入100 μ l含有所有免疫试剂即生物素化的抗-Adda mAb、抗-IC scFv-AP和Eu-标记的抗-AP pAb的试剂混合物。将得到的IC夹心捕获在链霉抗生物素蛋白表面上。在洗涤步骤之后,添加200 μ l增强溶液,孵育5min并且进行高度灵敏的时间分辨荧光(TR-IFMA)信号测定。

[0187] 测定成分的优化

[0188] 捕获生物素化的抗-Adda mAb (50-200ng/孔)、抗-IC结合物scFv-AP SA51D1 (50-500ng/孔)和示踪剂Eu抗-bAP pAb (25-300ng/孔)的量被优化用于单步检测。最后,在随后的实验中使用100ng生物抗-Adda mAb、100ng scFv-AP和50ng Eu抗-bAP pAb/孔。

[0189] 孵育时间的影响

[0190] 以单步非竞争性测定形式测试孵育时间的影响。将MC-LR (孔中浓度:0-30 μ g/L)、生物抗-Adda mAb、scFv-AP SA51D1和Eu抗-bAP pAb一起孵育5min至4h,然后进行4次洗涤,每孔加入200 μ l增强溶液且信号产生5min (图3)。对于5min、55min和4h孵育时间灵敏度(空白+3SD, n=6)分别为0.029 μ g/L、0.012 μ g/L和0.012 μ g/L。孵育超过1h似乎没有任何额外的益处。尽管通过5min孵育试验可以易于满足1 μ g/L的WHO指南值,但出于实际原因(例如样品处理, Eu信号饱和),总计1h测定 (55min孵育+5min信号生成)用于后来的实验。

[0191] 与不同蓝藻毒素变体的交叉反应性的测定

[0192] 评估对11种不同蓝藻毒素的测定特异性 (图1A) 且结果如图4和5中所示。

[0193] 加标的水样的单步测定

[0194] 通过加标水 (0、0.2-4 μ g/L) 测试所开发的测定,并且回收范围为80%至137%,没有样品的任何稀释和浓缩步骤。表1显示了测定浓度和回收百分比。发现相同的环境样品不含可检测的通过ELISA;PPIA;HPLC和LC/MS测试的胞内MC或Nod。虽然样品不含内部毒素,但存在水样可能已经释放出额外的细胞毒素的可能性。

[0195] 表1. 加标水样的检测结果

[0196]

原始水样 (采集日期)	添加到样品中的 MC-LR($\mu\text{g/L}$)	通过非竞争性免疫 测定法测定的 MC-LR($\mu\text{g/L}$)	CV (%)	回收率 (%)
1 MQ (9.8.2012)	0	0	-	-
	0.2	0.25	5.9	127
	0.4	0.46	3.5	114
	1	1.06	0.7	106
	4	5.49	4.0	137
2 自来水(9.8.2012)	0	0	-	-
	0.2	0.24	13.1	118
	0.4	0.38	4.8	95
	1	1.02	0.5	102
	4	4.85	6.3	121
3 Haunisten Allas, (4.11.2009)	0	0.05	31.2	-
	0.2	0.23	11.1	117
	0.4	0.42	2.6	105
	1	1.02	1.5	102
	4	4.99	5.4	125
4 Björby träsk, Åland (28.7.2009)	0	0.045	15.8	-
	0.2	0.20	6.4	101
	0.4	0.36	3.5	89
	1	0.80	5.9	80
	4	3.88	7.7	97
5 Toböle träsk, södra, Åland (28.7.2009)	0	0.031	9.5	-
	0.2	0.20	16.9	98
	0.4	0.36	2.3	90
	1	0.84	5.9	84
	4	4.17	8.2	104

[0197] 通过高压灭菌对MQ进行灭菌。将采集的环境样品储存在-20℃直至使用。变异系数% (CV%) 是两次重复测定的值。

[0198] 来自环境样品的MC和Nod的检测

[0199] 使用开发的单步非竞争性TR-IFMA测定法分析来自芬兰Åland岛, 芬兰和爱沙尼亚大陆的总计20份环境水样, 以确定水中存在的细胞和外部MC/Nod浓度。样品包括湖水和海水。预先用ELISA, PPIA, HPLC和LC-MS分析样品的细胞毒素的量。发现与通过其它方法测

定的细胞毒素浓度相比,通过单步测定法测定的细胞和胞外毒素浓度均为正相关。细胞毒素的相关系数分别为0.9969、0.8723、0.9807、0.9912,且通过ELISA,PPIA,HPLC和LC-MS测定的胞外毒素的相关系数分别为0.9569、0.9272、0.8969、0.968。发现几份样品中水中释放的毒素量高于许多样品中提取的细胞毒素。通过非竞争性免疫测定法测定的浓度落在不同的测定值之间,表明测定的实际适用性,包括直接使用环境水以及细胞提取的毒素样品。

[0200]

表 2. 来自芬兰和爱沙尼亚的环境水样中微囊藻毒素/节球藻毒素浓度、鉴定的毒素变体和主要蓝细菌属

地点和采样日期	MCs/Nod 量(µg/L)						观察到的 MCs/Nod 变体				主要蓝细菌属
	单步非竞争性测定法		ELISA		PPIA		HPLC		LC-MS		
	外部	细胞	细胞	细胞	细胞	细胞	LC-M S	HPLC	LC-MS		
Karviken (海), Åland, 芬兰, 28.7.2009	0.026	0	0	0	0	0	0	-	-	-	束丝藻属(<i>Aphanizomenon</i>)
Brantsbøle träsk, Åland, 芬兰, 27.7.2009	23.05	18.78	29.3	11.3	20.0	21.4	MC-LR, MC-LY	MC-LR, MC-LY	MC-dmLR, MC-LR, MC-LY, MC-LW, MC-LF	MC-dmLR, MC-LR, MC-LY, MC-LW, MC-LF	微囊藻属, 鱼腥藻属 (<i>Anabaena</i>)
Nätö hemviken, Åland, 芬兰, 30.7.2009	13.92	6.73	11.3	8.9	4.6	8.6	MC-RR, MC-YR, MC-LR	MC-RR, MC-YR, MC-LR	MC-dmRR, MC-RR, MC-YR, MC-dmLR, MC-LR	MC-dmRR, MC-RR, MC-YR, MC-dmLR, MC-LR	铜绿微囊藻属, <i>M. viridis</i> , <i>M. flosaquae</i> , 束丝藻属, 鱼腥藻属的种, <i>A. solitaria</i>
Nätö vägbank, (海), Åland, 芬兰, 29.7.2009	1.109	0.471	1.5	0.2	1.1	1.5	NOD	NOD	NOD	NOD	束丝藻属, 节球藻属
Hauninen, Turku, 芬兰, 1.7.2009	3.885	0.545	1.2	0.36	0.85	1.1	MC-dmRR	MC-dmRR	MC-dmRR	MC-dmRR	浮丝藻属, 束丝藻属, 鱼腥藻属, 微囊藻属
Hauninen, Turku, 芬兰, 17.8.2009	0.368	0.23	0.55	0.23	0.29	0.39	MC-dmRR	MC-dmRR	MC-dmRR, MC-RR, MC-dmLR, 1031.5	MC-dmRR, MC-RR, MC-dmLR, 1031.5	浮丝藻属, 束丝藻属, 鱼腥藻属
Savojärvi, 芬兰, 27.8.2009	15.21	10.36	14.8	4.8	11.3	13.3	MC-dmRR, MC-RR, MC-dmLR, MC-LR	MC-dmRR, MC-RR, MC-dmLR, MC-LR	MC-dmRR, MC-RR, MC-dmLR, MC-LR	MC-dmRR, MC-RR, MC-dmLR, MC-LR	鱼腥藻属, <i>Snowella</i>
Vandö kanal Åland, 芬兰, 28.07.2009	0	0	0	0	0	0	-	-	-	-	微囊藻属
Höckbøle träsk, Åland, 芬兰, 28.07.2009	0.04	0.06	0.07	0	0	0	-	-	-	-	<i>A. lemmermannii</i>
Dalkarby träsk, Åland, 芬兰, 29.07.2009	0	0	0	0	0	0	-	-	-	-	铜绿微囊藻属
Merttilän pato, Raisio-Naantali, 芬兰, 29.07.2009	0.15	0.073	0.08	0	0	0.04	-	-	MC-dmRR, MC-RR	MC-dmRR, MC-RR	NA

[0204] 将在100 μ L PBS, pH 7.4缓冲液中的生物素化的抗-Adda mAb (50ng) 和200ng SA51D1scFv-碱性磷酸酶融合蛋白与100 μ L的0.003至30 μ g/L的每种九种不同的CCPH标准品(图1A)溶液一起一式两份分配在链霉抗生物素蛋白包被的96孔微量滴定板(Kaivogen, Turku, Finland)中。将孔在室温下振荡孵育1小时,然后洗涤4次。通过添加200 μ L对硝基苯磷酸盐液体底物系统(Sigma Aldrich, USA)启动颜色形成。通过用Victor多标记计数器(Perkin-Elmer Wallac, Turku, Finland)读取405nm处的吸光度测定在1h至19h的不同时间点的颜色形成。

[0205] 图6中所示的结果示例使用SA51D1scFv-碱性磷酸酶融合蛋白的单步ELISA测定甚至在1小时信号产生时也识别所有测试的CCPH,其中灵敏度低于1 μ g/L,其为在饮用水中MC-LR最大WHO指导水平。

[0206] 实施例4. 使用与抗-IC抗体缀合的荧光纳米粒的定量横向流测试

[0207] 本实施例证明,本发明抗-IC抗体还适用于横向流测定形式。

[0208] 使用1mg UCNP激活上转换纳米粒(UCNP, $\Phi \sim 40$ nm NaYF₄:Yb³⁺, Er³⁺上转换磷光体纳米粒)并在室温下在20mM MES, pH 6.1缓冲液, 30mM磺基-NHS和10mM EDC中孵育45min。用Nanosep 30K过滤器(Pall Life Sciences)和20mM MES, pH 6.1缓冲液除去并洗掉过量的试剂。将链霉抗生物素蛋白(BioSpa, Italy) (50 μ g)加入到活化的UCNP溶液中并在室温下孵育2.5小时。加入甘氨酸(50mM)以终止缀合反应,并且通过用300K Omega过滤器(Pall Life Sciences)离心并在相同步骤用5mM Tris, pH 8.5; 0.05%吐温-85; 0.5%BSA; 0.05%NaN₃缓冲液洗涤除去未反应的成分。将链霉抗生物素蛋白-UCNP缀合物储存在+4 $^{\circ}$ C。

[0209] 使用40倍摩尔过量的生物素的异硫氰酸酯衍生物(Perkin-Elmer Life Sciences, Turku, Finland)在50mM碳酸盐缓冲液(pH 9.8)中在室温下将抗-ADDA mAb (100 μ g)生物素化4小时。根据制造商的说明书使用两个NAP柱和50mM Tris-HCl, 150mM NaCl, 0.02%NaN₃, pH 7.75作为缓冲液,在反应后纯化混合物。

[0210] 对于横向流测试条,使用Linomat 5打印机(Camag, Switzerland),用0.6mg/mL抗-碱性磷酸酶多克隆抗体(Lifespan LS-C59288)对HF180硝化纤维(Millipore)打印测试线。横向流条还具有16mm宽的玻璃纤维样品垫(Millipore)和24mm宽的纤维素作为吸附垫(Millipore)。

[0211] 通过将40 μ L离子纯化水中1 μ g/L的微囊藻毒素或节球藻毒素标准品(图1A)与40 μ L在PBS, pH 7.4, 0.02%吐温20, 0.1%BSA缓冲液中含有100ng生物素化的抗-ADDA Mab, 20ng SA51D1或SA32C11scFv-碱性磷酸酶融合蛋白和 5×10^6 片(piece)的SA-UCNP的抗体溶液混合,开始定量横向流测试。对于阴性对照,使用40 μ L离子纯化水代替CCPH标准品。每个样品一式三份进行测定。将混合物在室温下孵育10分钟。将横向流测试条添加到每个样品中,并孵育20min以使液体吸附至测试条上。将测试条转移至100 μ L PBS, pH 7.4, 0.02%吐温20, 0.1%BSA缓冲液中以洗涤条带。为了进行时间分辨荧光测定,使用改进的Chameleon 8多标记读数器(Hidex, Turku, Finland),其具有550nm发射波长和1mm步长。

[0212] 图7A中的结果显示,使用SA51D1作为次级抗体,通过具有信背比为>33的横向流测试识别所有8种微囊藻毒素变体和节球藻毒素,且图7B显示,使用SA32C11作为次级抗体,通过具有信背比为38的横向流测试仅识别节球藻毒素。

[0213] 实施例5. 均匀混合和量度测定

[0214] 本实施例证明,本发明的抗-IC抗体还适用于均匀混合和量度型TR-FRET测定形式。图8示例了由使用Eu-螯合物标记的Adda特异性单克隆抗体和Alexa 680标记的抗-IC抗体SA51D1示例的测定法的基本原理。

[0215] 使用内在发光的七齿螯合物(7d-EuIII) [2,2',2'',2'''-[[4-[(4-异硫氰酸基苯基)乙炔基]吡啶-2,6-二基]双(亚甲基次氮基)]四(乙酸)铕(III)] (Takalo等人,1994) 来标记用于同源FRET测定的抗-Adda mAb。将抗adda mAb (700μg) 和100倍摩尔过量的Eu (III) 螯合物溶解于总体积为438μl的50mM pH 9.8的碳酸盐缓冲液中。将标记反应体系在+4℃避光孵育过夜。用Superdex 200柱凝胶过滤纯化标记的抗体,并在TSA缓冲液(50mM Tris-HCl, pH 7.75, 150mM NaCl和0.5g L⁻¹NaN₃) 中洗脱。测定纯化产物的标记度。通过比较纯化产物与已知的Eu (III) 标准品的荧光测定标记的Eu (III) Adda mAb中的铕(III) 螯合物浓度。通过280nm处的吸光度测定Adda mAb浓度。在纯化的产物中,加入DTPA处理的BSA至0.1%的最终浓度,并通过0.22μm过滤并在+4℃下储存。

[0216] 对于抗IC-scFv与受体荧光团的缀合,将350μg纯scFv SA51D1与8倍摩尔过量的AF680(溶解于来自Sigma-Aldrich的N,N-二甲基甲酰胺)在50mM碳酸盐缓冲液(pH 9.3)中以500μL体积混合在室温下保持1小时。使用来自GE Healthcare的NAP5和NAP10柱通过双凝胶过滤纯化标记的产物,并在TSA, pH7.5缓冲液中洗脱。通过吸光度以及受体的适当波长和摩尔吸光度(由制造商提供)测定纯化产物的标记度。

[0217] 将来自Nunc (Roskilde, Denmark) 的低荧光黄96-孔Maxisorp微量滴定板用BSA预包被,然后使用含有0.1%BSA (Bioreba, Switzerland) 的饱和溶液在溶于0.05M Tris-HCl, pH 7.2中的0.1% (w/v) Germall II (ISP, Wayne, NJ) 和3% (w/v) 海藻糖(Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) 的存在下进行测定。简言之,加入250μl/孔的饱和溶液,在室温下缓慢摇动孵育1h,然后抽吸液体。将板干燥2h并在+4℃下储存在密封袋中直至使用。

[0218] 在BSA包被的微量滴定孔中,一式两份加入20μl/孔的CCPH标准品(储备溶液浓度:0-1000μg/L) 或样品。然后以60μl/孔加入由Eu Adda mAb (15ng) 和Alexa 680标记的scfv-AP (96ng) 组成的试剂混合物,使每孔的总体积为80μl。然后将孔在室温下低振荡孵育2至30min。在不同的时间点,使用Victor 1420多标记计数器在720nm处测定FRET产生的来自AF680的敏化发射,所述Victor 1420多标记计数器配备红色敏感性R4632型光电倍增管(Hamamatsu Photonics, Hama-matsu, Japan) 和730nm带通发射滤波器,该滤波器具有10nm带宽,且最大传输为70% (Nabburg, Interferenzoptik Elektronik GmbH, Germany)。激发波长为340nm,而延迟时间和测定时间分别为75和50μs。

[0219] 图9中显示的结果表明能够在没有任何洗涤步骤的情况下通过快速(2-30min)混合和量度均相测定在低于世界卫生组织指导限(1μg/L MC-LR) 的浓度下检测MC-LR。在2min测定中仅使用20μl水样,MC-LR的灵敏度(空白+3SD) 低于0.3μg/L。在不同时间点检查孵育时间对MC-LR标准品的影响。超过10min的孵育时间似乎没有任何额外的受益效果。

[0220] 实施例6. 功能性逆转测定

[0221] 本实施例证明,非竞争性测定法还可以通过用用于固定抗-AP pAb捕获IC-次级抗体复合物来进行。

[0222] 事先使用1μg/200μl/孔的抗bAP pAb包被Maxisorb微量滴定板,并且在使用前干燥储存在+4℃。

[0223] 预先洗涤抗bAP pAb包被的孔,并且在RT用Fab-AP (200ng/200 μ l/孔) 饱和1h,然后进行2次洗涤。每个孔中加入90 μ l AB。以10 μ l/孔一式两份加入Nod-R标准品储备溶液(在MQ中)或空白(MQ)。加入100 μ l试剂混合物(在含有Eu标记的Adda-mAb和SA32C11scFv-AP的AB中制备)(每种成分为100ng/孔)。孔中标准品的终浓度为0.01-50 μ g/L。将孔室温缓慢摇动孵育30min,然后进行4次洗涤。最终加入增强溶液(ES) (200 μ l/孔),并且在5min孵育后,通过VICTOR使用时间分辨荧光测定法测定Eu信号。

[0224] 如实施例5中所述用Eu (III) 螯合物标记抗-Adda mAb。

[0225] 实施例7. 通过免疫得到的抗-CCPH抗体的比较

[0226] IC结合物抗体的亲和力和特异性是影响免疫测定性能的最关键因素。当不存在抗原(CCPH)时,IC结合物不应识别初级抗体,但当存在CCPH时,而应当以高亲和力结合。Nagata等人(1999)在其文章的图2中显示,他们最好的IC结合物,即称作3F7的克隆,其在满足这一要求方面存在严重问题。这种不需要的识别是为什么Nagata描述了极为耗时(至少40小时,包含2-3次过夜孵育)的免疫测定的最可能的原因,其中需要长的孵育时间以将测定的动力学推动至期望的水平。相比之下,我们已经证明,能够生成与裸初级抗体结合最小的IC结合物(图11),并且将其转换为非常快速和简单的一次孵育(one-incubation)步骤免疫测定,其中总孵育时间低至10分钟。

[0227] 作为实例,SA51D1对免疫复合物的特异性也见于我们的免疫测定中,其中链霉抗生物素蛋白包被的96-孔微量滴定孔用于捕获由生物素化的抗-Adda Mab,CCPH,与碱性磷酸酶融合的SA51D1抗体形成的复合物,并且用铕标记的抗碱性磷酸酶Pab检测该复合物。在该测定中,背景荧光信号水平(生物素化的抗-Adda Mab,无CCPH,与碱性磷酸酶融合的SA51D1抗体和铕标记的抗碱性磷酸酶Pab) 极低,即当不存在CCPH时,提供SA51D1与抗-Adda Mab无显著结合的证据的404个计数。使用10 μ g/l水平的MC-LR,荧光信号为789966个计数。当其它7种抗-IC抗体克隆(SA56B8,SA55D1,SA51D12,SA41B5,SA42A3,SA44C11和SA32C11)与SA51D1克隆一起在相应的免疫测定中进行测试时,它们的背景荧光信号水平相似(140-444个计数),从而证明当不存在MC时,它们不与抗-Adda Mab直接结合。

[0228] 实施例8. 盲水样的检测结果

[0229] 通过参加2016年4月至8月期间的“Abraxis Microcystins proficiency testing program for recreational waters 2016-03”,评估了CCPH-变体特异性IC结合抗体的有效性。在该计划中,30个实验室使用其常规分析方法测试4种由Abraxis Inc, Pennsylvania,USA制备的未知水样。我们使用Akter等人(2016)中描述的测定法,其中广谱特异性SA51D1正确地检测了4个未知样品(表1)。通过使用7种不同的抗-IC抗体变体来改变测定,以分析未知样品。测试的抗-IC抗体为SA56B8 (MC-LR特异性),SA55D1 (MC-LZ特异性),SA51D12 (MC-LR和MC-LZ特异性),SA41B5 (MC-RR特异性),SA42A3 (MC-RR和MC-dmRR特异性)和SA44C11 (MC-XR和Nod-R特异性)和SA32C11 (节球藻毒素-R特异性)。结果显示在表3中。这是首次使用7种抗-IC抗体的组合正确分析样品毒素谱。使用克隆SA41B5 (MC-RR特异性),SA42A3 (MC-RR和MC-dmRR特异性)和SA44C11 (MC-XR或Nod-R特异性)发现含有MC-RR和MC-YR (均为1 μ g/l)的MC-TK6样品为阳性,而使用其它抗体则为阴性。使用克隆SA56B8 (MC-LR特异性),SA55D1 (MC-LZ特异性),SA51D12 (MC-LR和MC-LZ特异性)和SA44C11 (MC-XR或Nod-R特异性)发现含有1 μ g/l MC-LR的样品MC-TK7为阳性,而使用其它抗体则为阴性。使用抗体

SA56B8 (MC-LR特异性), SA55D1 (MC-LZ特异性), SA51D12 (MC-LR和MC-LZ特异性), SA41B5 (MC-RR特异性), SA42A3 (MC-RR和MC-dmRR特异性) 和SA44C11 (MC-XR或Nod-R特异性) 发现含有4 μ g/l MC-LR、1 μ g/l MC-RR和1 μ g/l MC-YR的样品MC-TK8为阳性, 但用Nod5 (节球藻毒素特异性) 则不为阳性。样品MC-TK5没有可检测的微囊藻毒素, 并且对所有测试的免疫测定形式都是阴性的。该免疫测定组合允许分析具有无可检测的CCPH、具有MC但不是最相关的MC同源物MC-LR、具有WHO指导浓度为1 μ g/l的MC-LR或具有几种相关MC同源物的组合 (MC-LR、MC-RR和MC-YR) 的水样。

[0230] 表3. 四种未知水样的CCPH谱

[0231] 使用不同的抗-IC体通过抗-IC免疫测定法分析未知样品, 以揭示出样品的CCPH谱。

[0232]

未知样品代码	MC-TK5	MC-TK6	MC-TK7	MC-TK8
验证的 CCPH 内含物	无	MC-RR + MC-YR	MC-LR	MC-LR + MC-RR + MC-YR
验证的浓度(μ g/l)	0	1+1, 总计 2	1	4+1+1, 总计 6
特异性抗-IC 测定(克隆)				
总 CCPH, μ g/l (SA51D1)	<LOD*	1.88	1.38	6.57
MC-LR? (SA56B8)	-	-	++	+++

[0233]

MC-LX? (SA55D1)	-	-	+	++
MC-LR 或 MC-LX?(SA51D12)	-	-	+++	+++
MC-RR? (SA41B5)	-	++	-	(+)
MC-RR 或 MC-dmRR? (SA42A3)	-	+++	-	++
节球藻毒素? (SA32C11)	-	-	-	-
解释	阴性	MC-RR	MC-LR $\pm$ MC-LX	MC-LR $\pm$ MC-LX

[0234] 实施例9. 交叉反应性研究

[0235] 使本文示例的抗-IC抗体如下进行交叉反应性研究。在链霉抗生物素蛋白包被的孔中每孔加入50 μ l的20 μ g/L毒素标准品溶液 (A=MC-LR, B=MC-dmLR, C=RR, D=MC-dmRR, E=MC-LA, F=MC-LY, G=MC-LF, H=MC-LW, I=MC-YR, J=MC-WR, K=节球藻毒素-R) (在试剂水中制备) (最终100 μ l反应孔毒素浓度变为10 μ g/L)。对于孔X和Y, 加入50 μ l试剂水代替毒素。然后在每个孔中, 除了条件X之外, 每孔加入25 μ l (1 μ g/ml溶液) 生物素化的抗-Adda-mab。在孔X中, 使用25 μ l测定缓冲液。此后, 在每个孔中加入25 μ l/孔的scFv-AP (~2 μ g/ml His亲和纯scFv-AP溶液或粗超声培养提取物的稀释溶液)。然后将孔孵育30至40min并洗涤两次。然后在每个孔中加入100 μ l/孔 (10ng) 的铕标记的细菌抗碱性磷酸酶抗体。将孔在RT (室温) 孵育1h并洗涤四次。然后以每孔200 μ l加入铕荧光增强剂溶液。将板孵育至少5分钟, 并用victor1420多标记计数器测定Eu-螯合物标记的时间分辨荧光信号。交叉反应性研究

的结果如图12所示。

序列表

<110> 图尔库大学

<120> 针对包含蓝细菌环肽肝毒素的免疫复合物的抗体

<130> 2152161

<160> 54

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Peptide linker

<400> 1

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Ala Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Thr Gly

1 5 10 15

Gly Gly Gly Ser

20

<210> 2

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> LCDR1

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (10) .. (10)

<223> Xaa is N, A, or Y

<400> 2

Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser Xaa Leu Ala

1 5 10

<210> 3

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> LCDR2

<400> 3

Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr

1 5
<210> 4
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> LCDR3
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (3) .. (3)
<223> Xaa is Y, S, or M
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (4) .. (4)
<223> Xaa is S, Y, or H
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (6) .. (6)
<223> Xaa is T, Y, L
<400> 4
Gln Gln Xaa Xaa Ser Xaa Pro Trp Thr
1 5
<210> 5
<211> 110
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Clone SA51D1
<220>
<221> DOMAIN
<222> (24) .. (35)
<223> CDR1
<220>
<221> DOMAIN
<222> (51) .. (57)
<223> CDR2
<220>
<221> DOMAIN
<222> (90) .. (98)

<223> CDR3

<400> 5

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

<210> 6

<211> 110

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Clone SA51F6

<220>

<221> DOMAIN

<222> (24) .. (35)

<223> CDR1

<220>

<221> DOMAIN

<222> (51) .. (57)

<223> CDR2

<220>

<221> DOMAIN

<222> (90) .. (98)

<223> CDR3

<400> 6

Glu	Ile	Val	Leu	Thr	Gln	Ser	Pro	Gly	Thr	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly
1				5				10						15	
Glu	Arg	Ala	Thr	Leu	Ser	Cys	Arg	Ala	Ser	Gln	Ser	Val	Ser	Ser	Ser
			20					25					30		

Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
 35 40 45
 Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser
 50 55 60
 Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu
 65 70 75 80
 Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Ser Ser Thr Pro
 85 90 95
 Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr
 100 105 110

<210> 7

<211> 110

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Clone SA56B8

<220>

<221> DOMAIN

<222> (24) .. (35)

<223> CDR1

<220>

<221> DOMAIN

<222> (51) .. (57)

<223> CDR2

<220>

<221> DOMAIN

<222> (90) .. (98)

<223> CDR3

<400> 7

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

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Ser Ser Tyr Pro
 85 90 95
 Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr
 100 105 110

<210> 8

<211> 110

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Clone SA59G2

<220>

<221> DOMAIN

<222> (24) .. (35)

<223> CDR1

<220>

<221> DOMAIN

<222> (51) .. (57)

<223> CDR2

<220>

<221> DOMAIN

<222> (90) .. (98)

<223> CDR3

<400> 8

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

<210> 9

<211> 110

<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Clone SA56E7
<220>
<221> DOMAIN
<222> (24) .. (35)
<223> CDR1
<220>
<221> DOMAIN
<222> (51) .. (57)
<223> CDR2
<220>
<221> DOMAIN
<222> (90) .. (98)
<223> CDR3
<400> 9

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

<210> 10
<211> 109
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Clone SA51D12
<220>
<221> DOMAIN

<222> (24) .. (35)

<223> CDR1

<220>

<221> DOMAIN

<222> (51) .. (57)

<223> CDR2

<220>

<221> DOMAIN

<222> (90) .. (98)

<223> CDR3

<400> 10

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

1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser

20 25 30

Asn Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu

35 40 45

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

50 55 60

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu

65 70 75 80

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Ser Thr Pro Trp

85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr

100 105

<210> 11

<211> 110

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Clone SA41B5

<220>

<221> DOMAIN

<222> (24) .. (35)

<223> CDR1

<220>

<221> DOMAIN

<222> (51) .. (57)

<223> CDR2

<220>

<221> DOMAIN

<222> (90) .. (98)

<223> CDR3

<400> 11

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

<210> 12

<211> 110

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Clone SA32C11

<220>

<221> DOMAIN

<222> (24) .. (35)

<223> CDR1

<220>

<221> DOMAIN

<222> (51) .. (57)

<223> CDR2

<220>

<221> DOMAIN

<222> (90) .. (98)

<223> CDR3

<400> 12

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

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

<210> 13

<211> 110

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Clone SA32F1

<220>

<221> DOMAIN

<222> (24) .. (35)

<223> CDR1

<220>

<221> DOMAIN

<222> (51) .. (57)

<223> CDR2

<220>

<221> DOMAIN

<222> (90) .. (98)

<223> CDR3

<400> 13

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly			
1	5	10	15
Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser			
20	25	30	
Ala Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu			
35	40	45	
Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser			

50		55		60	
Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu					
65		70		75	80
Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Ser Ser Tyr Pro					
	85		90		95
Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr					
	100		105		110

<210> 14

<211> 110

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Clone SA34G1

<220>

<221> DOMAIN

<222> (24) .. (35)

<223> CDR1

<220>

<221> DOMAIN

<222> (51) .. (57)

<223> CDR2

<220>

<221> DOMAIN

<222> (90) .. (98)

<223> CDR3

<400> 14

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

100	105	110
<210> 15		
<211> 110		
<212> PRT		
<213> Artificial Sequence		
<220>		
<223> Clone SA42E10		
<220>		
<221> DOMAIN		
<222> (24) .. (35)		
<223> CDR1		
<220>		
<221> DOMAIN		
<222> (51) .. (57)		
<223> CDR2		
<220>		
<221> DOMAIN		
<222> (90) .. (98)		
<223> CDR3		
<400> 15		
Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly		
1 5 10 15		
Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser		
20 25 30		
Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu		
35 40 45		
Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser		
50 55 60		
Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu		
65 70 75 80		
Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Ser Ser Leu Pro		
85 90 95		
Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr		
100 105 110		
<210> 16		
<211> 110		
<212> PRT		
<213> Artificial Sequence		
<220>		

<223> Clone SA52C2

<220>

<221> DOMAIN

<222> (24) .. (35)

<223> CDR1

<220>

<221> DOMAIN

<222> (51) .. (57)

<223> CDR2

<220>

<221> DOMAIN

<222> (90) .. (98)

<223> CDR3

<400> 16

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

<210> 17

<211> 110

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Clone SA55D1

<220>

<221> DOMAIN

<222> (24) .. (35)

<223> CDR1

<220>

<221> DOMAIN
 <222> (51) .. (57)
 <223> CDR2
 <220>
 <221> DOMAIN
 <222> (90) .. (98)
 <223> CDR3
 <400> 17
 Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 1 5 10 15
 Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser
 20 25 30
 Ala Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
 35 40 45
 Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser
 50 55 60
 Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu
 65 70 75 80
 Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Tyr Ser Tyr Pro
 85 90 95
 Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr
 100 105 110
 <210> 18
 <211> 110
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Clone SA51H4
 <220>
 <221> DOMAIN
 <222> (24) .. (35)
 <223> CDR1
 <220>
 <221> DOMAIN
 <222> (51) .. (57)
 <223> CDR2
 <220>
 <221> DOMAIN
 <222> (90) .. (98)

<223> CDR3

<400> 18

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

<210> 19

<211> 110

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Clone SA41A5

<220>

<221> DOMAIN

<222> (24) .. (35)

<223> CDR1

<220>

<221> DOMAIN

<222> (51) .. (57)

<223> CDR2

<220>

<221> DOMAIN

<222> (90) .. (98)

<223> CDR3

<400> 19

Glu	Ile	Val	Leu	Thr	Gln	Ser	Pro	Gly	Thr	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly
1				5				10						15	
Glu	Arg	Ala	Thr	Leu	Ser	Cys	Arg	Ala	Ser	Gln	Ser	Val	Ser	Ser	Ser
			20					25					30		

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

<210> 20

<211> 110

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Clone SA58A12

<220>

<221> DOMAIN

<222> (24) .. (35)

<223> CDR1

<220>

<221> DOMAIN

<222> (51) .. (57)

<223> CDR2

<220>

<221> DOMAIN

<222> (90) .. (98)

<223> CDR3

<400> 20

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

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Ser Ser Tyr Pro
 85 90 95
 Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr
 100 105 110

<210> 21

<211> 110

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Clone SA33D5

<220>

<221> DOMAIN

<222> (24) .. (35)

<223> CDR1

<220>

<221> DOMAIN

<222> (51) .. (57)

<223> CDR2

<220>

<221> DOMAIN

<222> (90) .. (98)

<223> CDR3

<400> 21

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

<210> 22

<211> 110

<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Clone SA41F2
<220>
<221> DOMAIN
<222> (24) .. (35)
<223> CDR1
<220>
<221> DOMAIN
<222> (51) .. (57)
<223> CDR2
<220>
<221> DOMAIN
<222> (90) .. (98)
<223> CDR3
<400> 22

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

<210> 23
<211> 110
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Clone SA52B4
<220>
<221> DOMAIN

<222> (24) .. (35)
<223> CDR1
<220>
<221> DOMAIN
<222> (51) .. (57)
<223> CDR2
<220>
<221> DOMAIN
<222> (90) .. (98)
<223> CDR3
<400> 23
Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15
Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser
 20 25 30
Ala Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
 35 40 45
Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60
Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu
65 70 75 80
Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Ser Ser Thr Pro
 85 90 95
Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr
 100 105 110
<210> 24
<211> 110
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Clone SA57D4
<220>
<221> DOMAIN
<222> (24) .. (35)
<223> CDR1
<220>
<221> DOMAIN
<222> (51) .. (57)
<223> CDR2

<220>

<221> DOMAIN

<222> (90) .. (98)

<223> CDR3

<400> 24

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

<210> 25

<211> 110

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Clone SA56D5

<220>

<221> DOMAIN

<222> (24) .. (35)

<223> CDR1

<220>

<221> DOMAIN

<222> (51) .. (57)

<223> CDR2

<220>

<221> DOMAIN

<222> (90) .. (98)

<223> CDR3

<400> 25

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

Glu	Ile	Val	Leu	Thr	Gln	Ser	Pro	Gly	Thr	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly
1				5					10					15	
Glu	Arg	Ala	Thr	Leu	Ser	Cys	Arg	Ala	Ser	Gln	Ser	Val	Ser	Ser	Ser
			20					25					30		
Asn	Leu	Ala	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	Ala	Pro	Arg	Leu	Leu
		35					40					45			
Ile	Tyr	Gly	Ala	Ser	Ser	Arg	Ala	Thr	Gly	Val	Pro	Asp	Arg	Phe	Ser

50		55		60
Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu				
65		70		80
Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Ser Ser Tyr Pro				
	85		90	95
Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr				
	100		105	110

<210> 27

<211> 110

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Clone SA60A1

<220>

<221> DOMAIN

<222> (24) .. (35)

<223> CDR1

<220>

<221> DOMAIN

<222> (51) .. (57)

<223> CDR2

<220>

<221> DOMAIN

<222> (90) .. (98)

<223> CDR3

<400> 27

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

100	105	110
<210> 28		
<211> 110		
<212> PRT		
<213> Artificial Sequence		
<220>		
<223> Clone SA42A3		
<220>		
<221> DOMAIN		
<222> (24) .. (35)		
<223> CDR1		
<220>		
<221> DOMAIN		
<222> (51) .. (57)		
<223> CDR2		
<220>		
<221> DOMAIN		
<222> (90) .. (90)		
<223> CDR3		
<400> 28		
Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly		
1 5 10 15		
Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser		
20 25 30		
Asn Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu		
35 40 45		
Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser		
50 55 60		
Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu		
65 70 75 80		
Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Ser Ser Tyr Pro		
85 90 95		
Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr		
100 105 110		
<210> 29		
<211> 110		
<212> PRT		
<213> Artificial Sequence		
<220>		

<223> Clone SA44E11

<220>

<221> DOMAIN

<222> (24) .. (35)

<223> CDR1

<220>

<221> DOMAIN

<222> (51) .. (57)

<223> CDR2

<220>

<221> DOMAIN

<222> (90) .. (98)

<223> CDR3

<400> 29

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

<210> 30

<211> 121

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Clone SA51D1

<220>

<221> DOMAIN

<222> (31) .. (35)

<223> CDR1

<220>

56

<221> DOMAIN
<222> (99) .. (108)
<223> CDR3
<400> 31
Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr
 20 25 30
Trp Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
Ser Glu Ile Trp Tyr Ser Ser Gly Tyr Thr Asn Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
Ala Arg Asp Ala Phe Pro Trp Asp Val Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110
Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115
<210> 32
<211> 117
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Clone SA56B8
<220>
<221> DOMAIN
<222> (31) .. (35)
<223> CDR1
<220>
<221> DOMAIN
<222> (50) .. (66)
<223> CDR2
<220>
<221> DOMAIN
<222> (99) .. (106)
<223> CDR3
<400> 32

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

<210> 33

<211> 120

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Clone SA59G2

<220>

<221> DOMAIN

<222> (31) .. (35)

<223> CDR1

<220>

<221> DOMAIN

<222> (51) .. (66)

<223> CDR2

<220>

<221> DOMAIN

<222> (99) .. (109)

<223> CDR3

<400> 33

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr
 20 25 30

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

<210> 34

<211> 122

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Clone SA56E7

<220>

<221> DOMAIN

<222> (31) .. (35)

<223> CDR1

<220>

<221> DOMAIN

<222> (50) .. (66)

<223> CDR2

<220>

<221> DOMAIN

<222> (99) .. (111)

<223> CDR3

<400> 34

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Arg Tyr
 20 25 30
 Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser Tyr Ile Trp Pro Val Asp Gly Glu Thr Asp Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Gly Val Pro Tyr Leu Tyr Gly Ala Tyr Ser Phe Asp Tyr Trp
100 105 110
Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120
<210> 36
<211> 120
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Clone SA41B5
<220>
<221> DOMAIN
<222> (31) .. (35)
<223> CDR1
<220>
<221> DOMAIN
<222> (50) .. (66)
<223> CDR2
<220>
<221> DOMAIN
<222> (99) .. (109)
<223> CDR3
<400> 36
Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Asp
20 25 30
Val Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
Ser Val Ile Asn Pro Tyr Asp Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Arg Ala Val Ala Gly Gln Gly Gly Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110
Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 37
<211> 119
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Clone SA32C11
<220>
<221> DOMAIN
<222> (31) .. (35)
<223> CDR1
<220>
<221> DOMAIN
<222> (50) .. (66)
<223> CDR2
<220>
<221> DOMAIN
<222> (99) .. (108)
<223> CDR3
<400> 37

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

<210> 38
<211> 122
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Clone SA32F1

<220>

<221> DOMAIN

<222> (31) .. (35)

<223> CDR1

<220>

<221> DOMAIN

<222> (50) .. (66)

<223> CDR2

<220>

<221> DOMAIN

<222> (99) .. (110)

<223> CDR3

<400> 38

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

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr

20 25 30

Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Phe Glu Trp Val

35 40 45

Ser Ser Ile Ile Thr Asn Gly Gly Glu Thr Asp Tyr Ala Asp Ser Val

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Arg Leu Pro Val Thr Arg Pro Tyr Tyr Ala Val Phe Asp Tyr Trp

100 105 110

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 39

<211> 119

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Clone SA34G1

<220>

<221> DOMAIN

<222> (31) .. (35)

<223> CDR1

<220>

<221> DOMAIN

<222> (50) .. (66)

<223> CDR2

<220>

<221> DOMAIN

<222> (99) .. (108)

<223> CDR3

<400> 39

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr
 20 25 30

Trp Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Ser Glu Ile Ile Pro Tyr Ser Gly Tyr Thr Asn Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg Glu Thr Trp Gly Tyr Pro Ser Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 40

<211> 125

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Clone SA42E10

<220>

<221> DOMAIN

<222> (31) .. (35)

<223> CDR1

<220>

<221> DOMAIN

<222> (50) .. (66)

<223> CDR2

<220>

<221> DOMAIN

<222> (99) .. (114)

<223> CDR3

<400> 40

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

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr

20 25 30

Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Arg Thr Asp Asp Leu Ile Gly His Tyr Asp Val Tyr Tyr Tyr Phe

100 105 110

Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115 120 125

<210> 41

<211> 118

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Clone SA52C2

<220>

<221> DOMAIN

<222> (31) .. (35)

<223> CDR1

<220>

<221> DOMAIN

<222> (50) .. (66)

<223> CDR2

<220>

<221> DOMAIN

<222> (99) .. (107)

<223> CDR3

<400> 41

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

<210> 42

<211> 121

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Clone SA55D1

<220>

<221> DOMAIN

<222> (31) .. (35)

<223> CDR1

<220>

<221> DOMAIN

<222> (50) .. (66)

<223> CDR2

<220>

<221> DOMAIN

<222> (99) .. (110)

<223> CDR3

<400> 42

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

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

<210> 43

<211> 119

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Clone SA51H4

<220>

<221> DOMAIN

<222> (31) .. (35)

<223> CDR1

<220>

<221> DOMAIN

<222> (50) .. (66)

<223> CDR2

<220>

<221> DOMAIN

<222> (99) .. (108)

<223> CDR3

<400> 43

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly			
1	5	10	15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr			
20	25	30	
Trp Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val			

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

65	70	75	80
Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala			
	85	90	95
Arg Asp Gly Phe Trp Tyr Gly Thr Ala Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly			
	100	105	110
Thr Leu Val Thr Val Ser Ser			
115			
<210> 45			
<211> 121			
<212> PRT			
<213> Artificial Sequence			
<220>			
<223> Clone SA58A12			
<220>			
<221> DOMAIN			
<222> (31) .. (35)			
<223> CDR1			
<220>			
<221> DOMAIN			
<222> (50) .. (65)			
<223> CDR2			
<220>			
<221> DOMAIN			
<222> (98) .. (110)			
<223> CDR3			
<400> 45			
Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly			
1	5	10	15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr			
	20	25	30
Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val			
	35	40	45
Ser Glu Ile Trp Pro Asn Asn Gly Thr Thr Asn Tyr Ala Asp Ser Val			
	50	55	60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr			
65	70	75	80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys			
	85	90	95
Ala Arg Glu Ser Gly Gln Trp Trp Tyr Gly Val Phe Asp Tyr Trp Gly			

	100		105		110
Gln Gly Thr	Leu Val Thr Val	Ser Ser			
	115		120		
<210> 46					
<211> 123					
<212> PRT					
<213> Artificial Sequence					
<220>					
<223> Clone SA33D5					
<220>					
<221> DOMAIN					
<222> (31) .. (35)					
<223> CDR1					
<220>					
<221> DOMAIN					
<222> (50) .. (66)					
<223> CDR2					
<220>					
<221> DOMAIN					
<222> (99) .. (112)					
<223> CDR3					
<400> 46					
Glu Val Gln	Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly	Leu Val Gln Pro Gly Gly			
1	5	10	15		
Ser Leu Arg	Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe	Ser Ser Asp			
	20	25	30		
Val Met His	Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly	Leu Glu Trp Val			
	35	40	45		
Ser Glu Ile	Asp Pro Asn Asp Gly Ser Thr Arg Tyr Ala Asp Ser Val				
50	55	60			
Lys Gly Arg	Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr				
65	70	75	80		
Leu Gln Met	Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys				
	85	90	95		
Ala Arg Glu	Tyr Gly Ala Val Ser Trp Ser Val Val Val Phe Asp Tyr				
	100	105	110		
Trp Gly Gln	Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser				
	115	120			
<210> 47					

<211> 121
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Clone SA41F2
<220>
<221> DOMAIN
<222> (31) .. (35)
<223> CDR1
<220>
<221> DOMAIN
<222> (50) .. (66)
<223> CDR2
<220>
<221> DOMAIN
<222> (99) .. (110)
<223> CDR3
<400> 47

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

<210> 48
<211> 121
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>

<223> Clone SA52B4

<220>

<221> DISULFID

<222> (31) .. (35)

<223> CDR1

<220>

<221> DISULFID

<222> (50) .. (66)

<223> CDR2

<220>

<221> DISULFID

<222> (99) .. (110)

<223> CDR3

<400> 48

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

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr

20 25 30

Ser Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

35 40 45

Ser Glu Ile Trp Thr Asn Thr Gly Tyr Thr Asn Tyr Ala Asp Ser Val

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Arg Glu Ser Trp Glu Trp Phe Ser Ile Val Phe Asp Tyr Trp Gly

100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 49

<211> 117

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Clone SA57D4

<220>

<221> DOMAIN

<222> (31) .. (35)

73

<223> CDR2
<220>
<221> DOMAIN
<222> (99) .. (112)
<223> CDR3
<400> 50
Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr
 20 25 30
Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
Ser Tyr Ile Asp Gly Asn Gly Gly Tyr Thr Asp Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
Ala Arg Tyr Trp Phe Asp Ser Ser Tyr Lys His Arg Tyr Phe Asp Tyr
 100 105 110
Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120
<210> 51
<211> 122
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Clone SA57A3
<220>
<221> DOMAIN
<222> (31) .. (35)
<223> CDR1
<220>
<221> DOMAIN
<222> (50) .. (66)
<223> CDR2
<220>
<221> DOMAIN
<222> (99) .. (111)

<223> CDR3

<400> 51

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

<210> 52

<211> 123

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Clone SA60A1

<220>

<221> DOMAIN

<222> (31) .. (35)

<223> CDR1

<220>

<221> DOMAIN

<222> (50) .. (66)

<223> CDR2

<220>

<221> DOMAIN

<222> (99) .. (112)

<223> CDR3

<400> 52

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

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

<210> 53

<211> 115

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Clone SA42A3

<220>

<221> DOMAIN

<222> (31) .. (35)

<223> CDR1

<220>

<221> DOMAIN

<222> (50) .. (66)

<223> CDR2

<220>

<221> DOMAIN

<222> (99) .. (104)

<223> CDR3

<400> 53

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr
 20 25 30
 Ser Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Ser Ser Ile Tyr Tyr Asp Gly Glu Thr Asp Tyr Ala Asp Ser Val Lys
 50 55 60
 Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu
 65 70 75 80
 Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
 85 90 95
 Arg Ser Asp Gly Asp Val Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
 100 105 110
 Val Ser Ser
 115

<210> 54

<211> 116

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Clone SA44E11

<220>

<221> DOMAIN

<222> (31) .. (35)

<223> CDR1

<220>

<221> DOMAIN

<222> (50) .. (66)

<223> CDR2

<220>

<221> DOMAIN

<222> (99) .. (105)

<223> CDR3

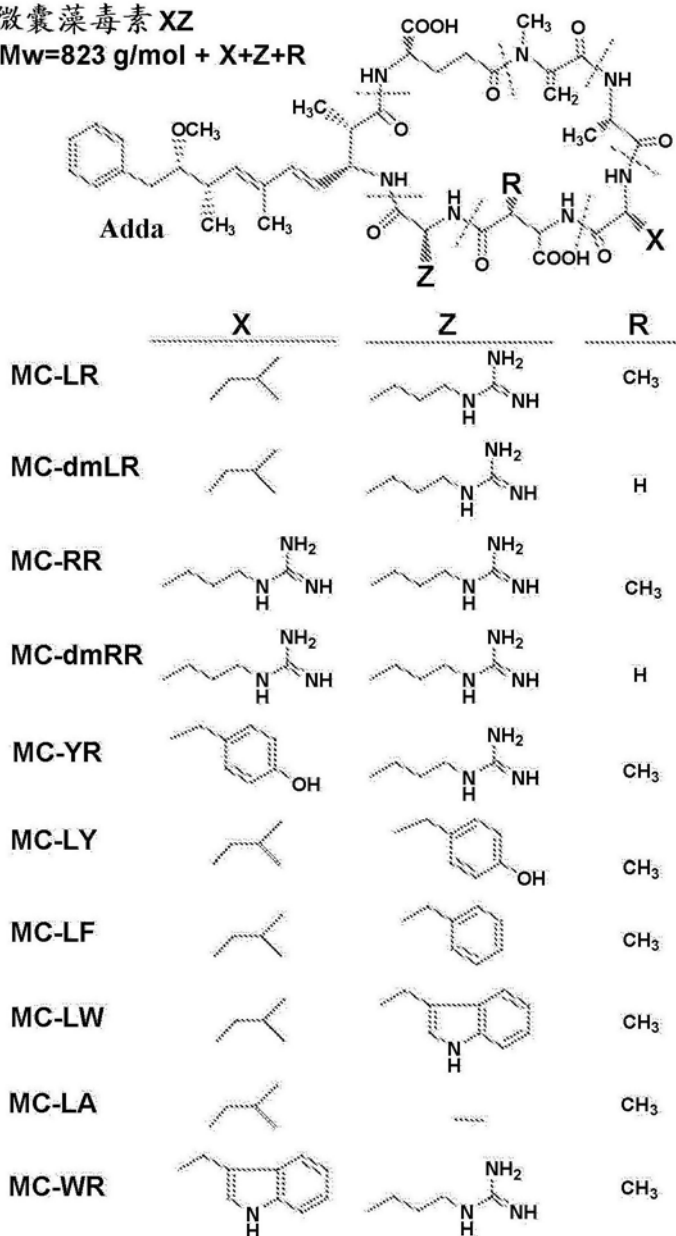
<400> 54

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

Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys
				85					90					95	
Ala	Arg	Gly	Gly	Glu	Pro	Gly	Asp	Asp	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val
				100					105					110	
Thr	Val	Ser	Ser												
				115											

微囊藻毒素 XZ

Mw=823 g/mol + X+Z+R



节球藻毒素-R

Mw=825 g/mol

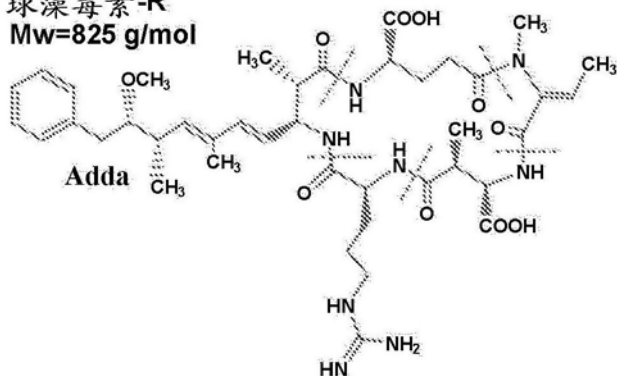


图1A

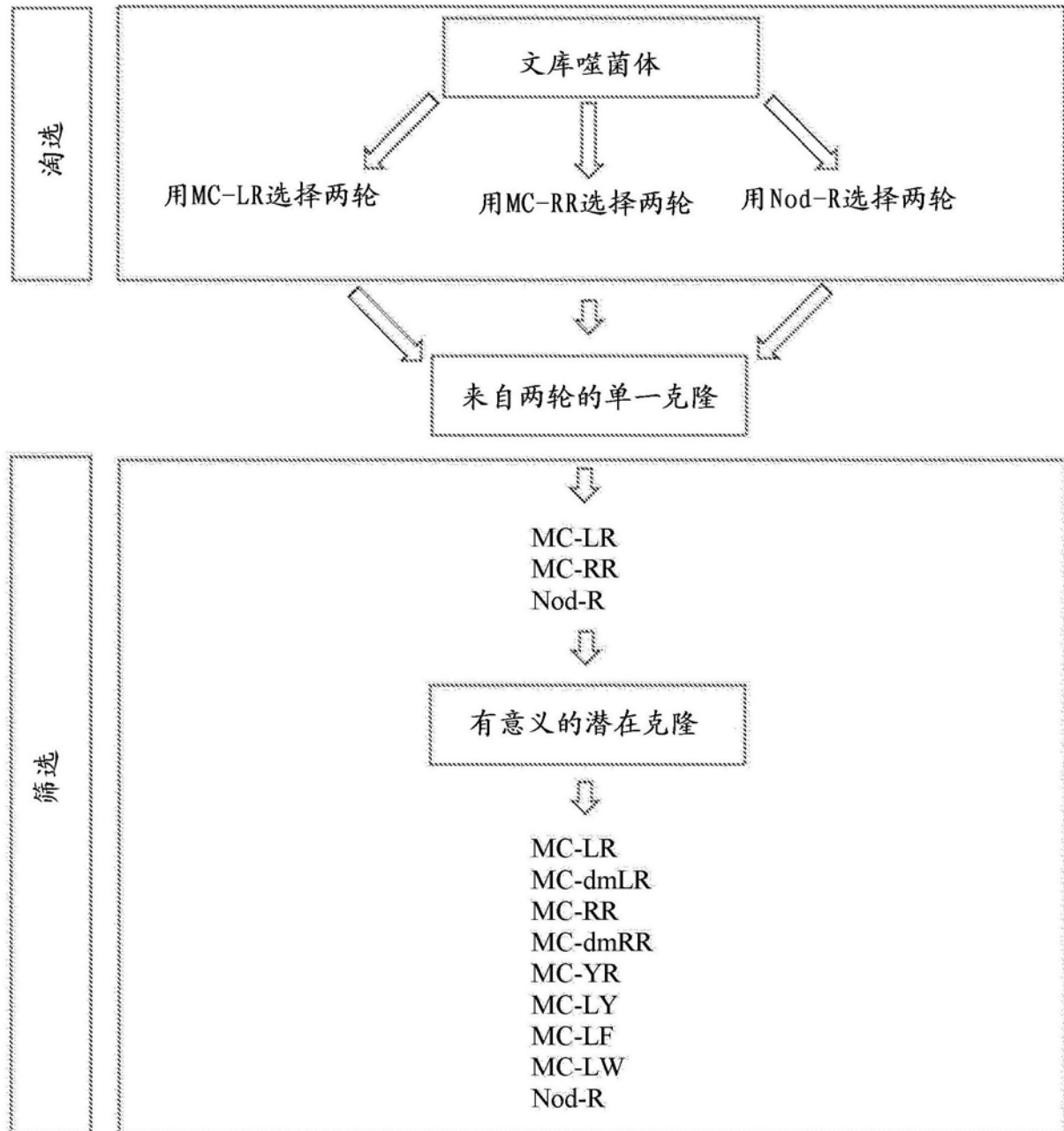


图1B

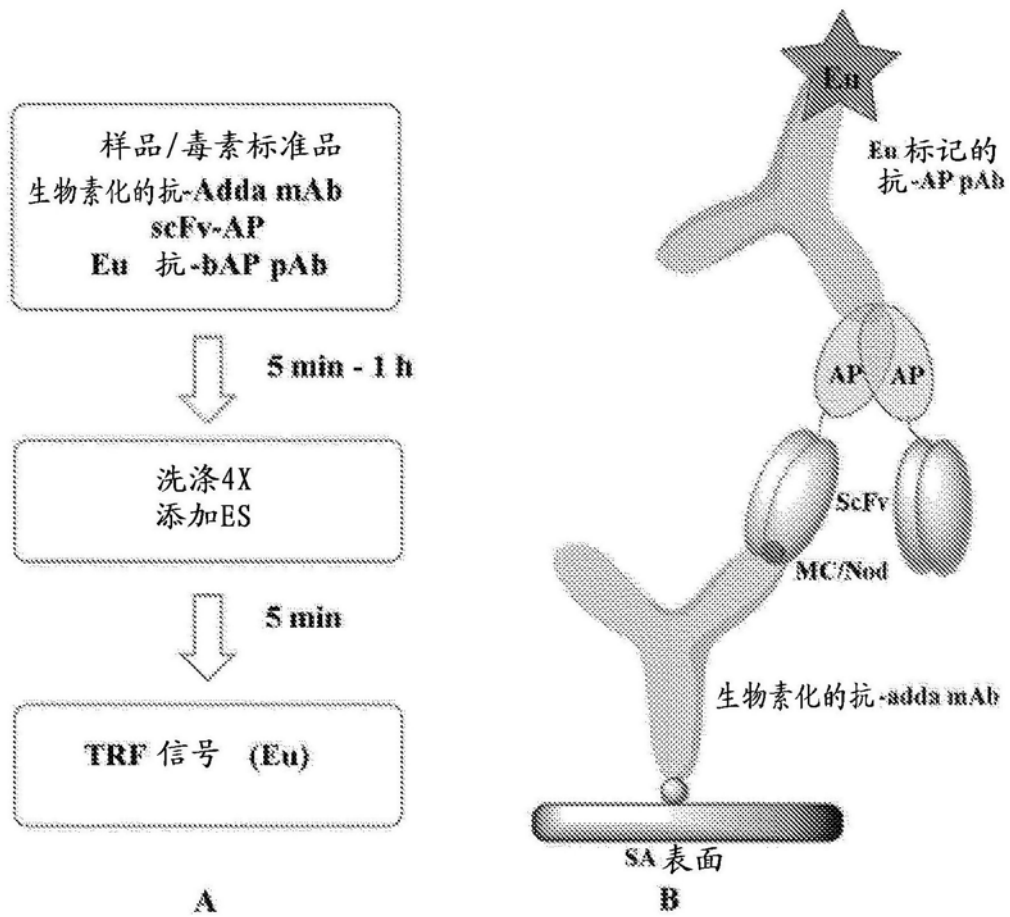


图2

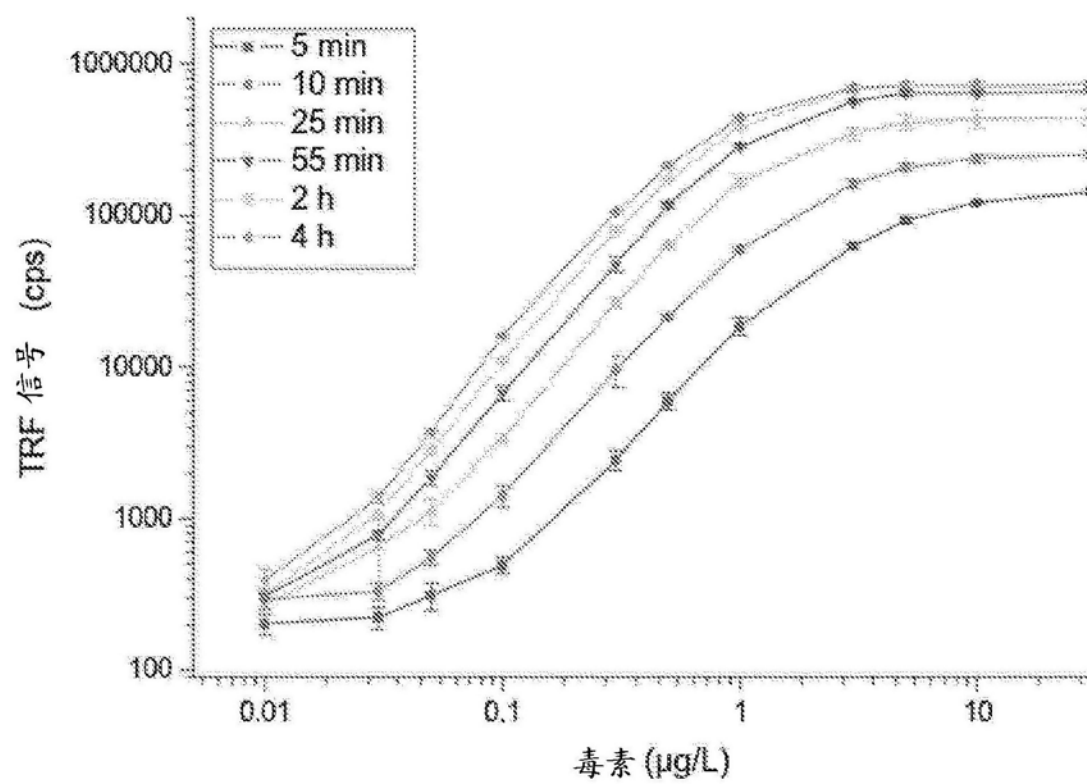


图3

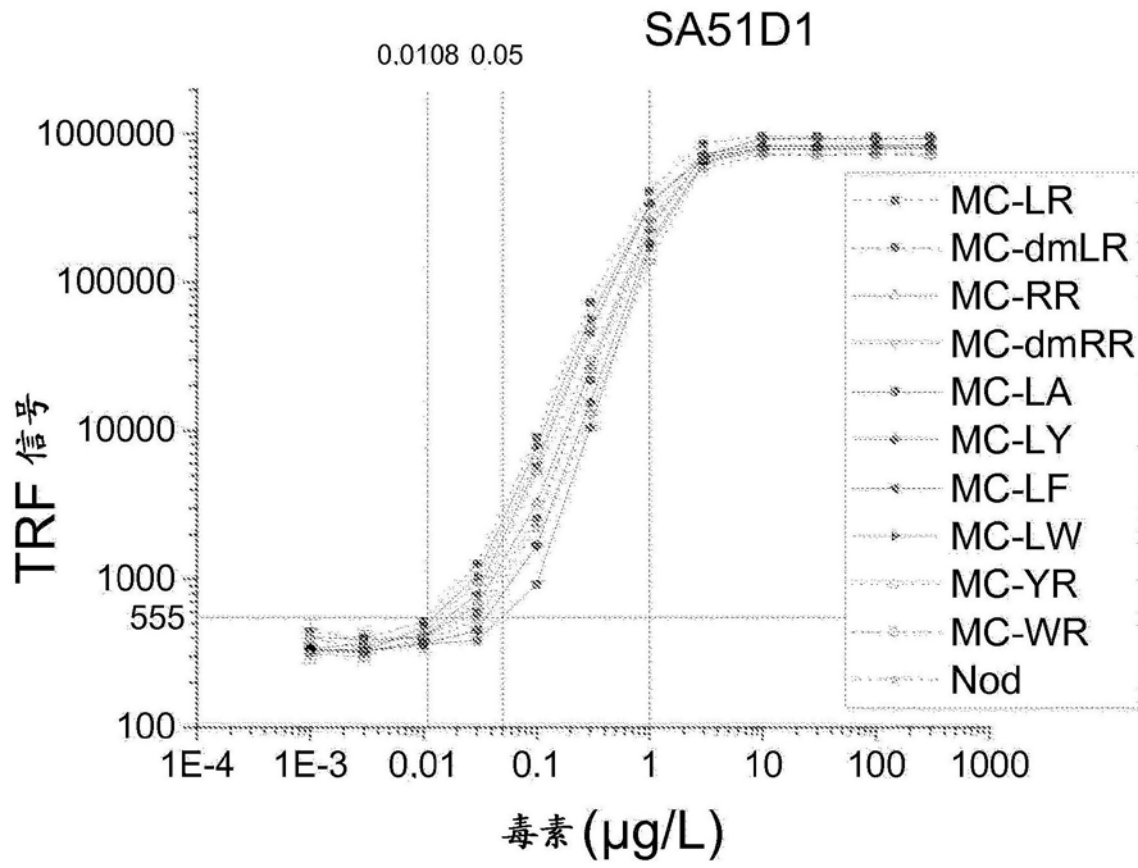


图4

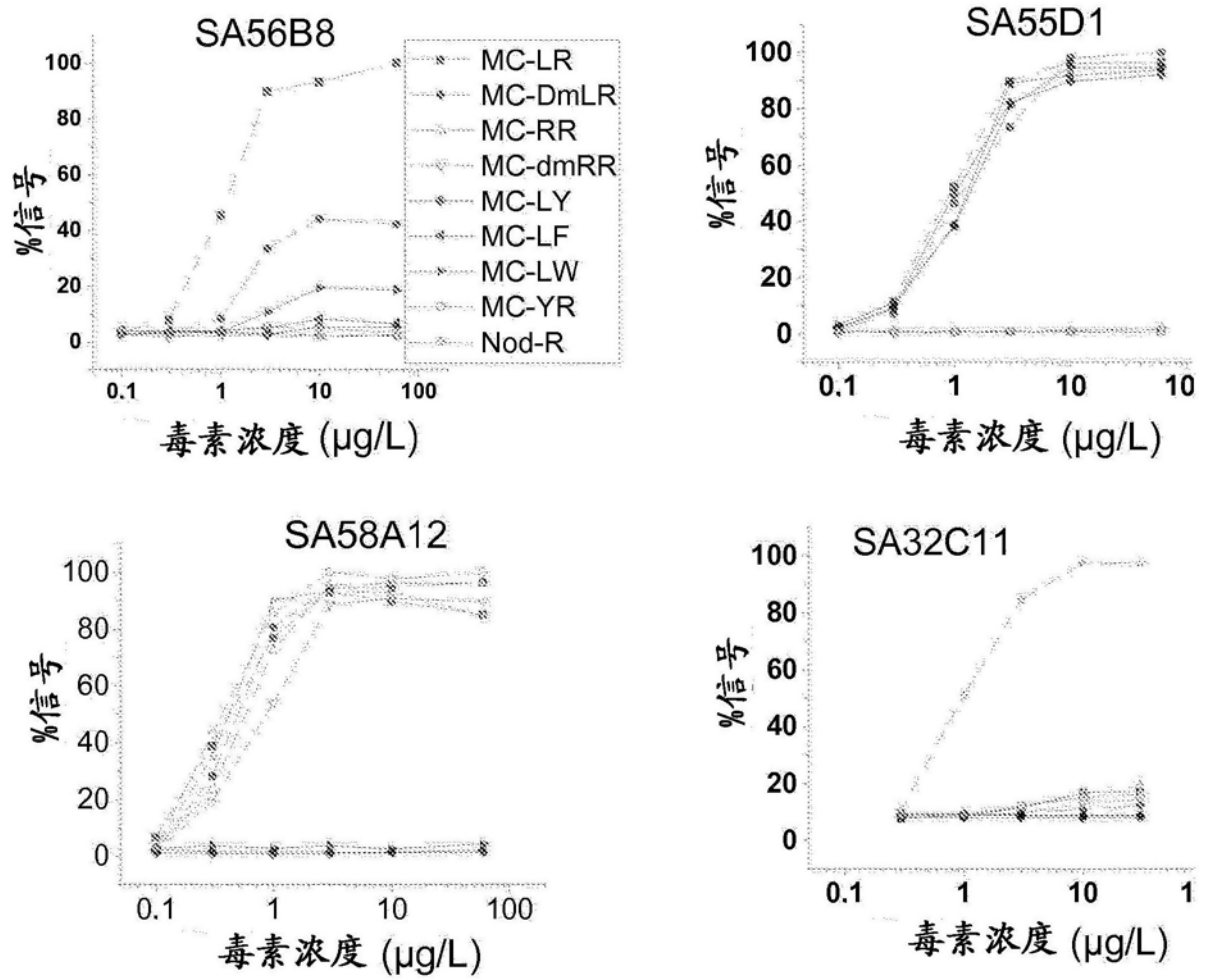


图5

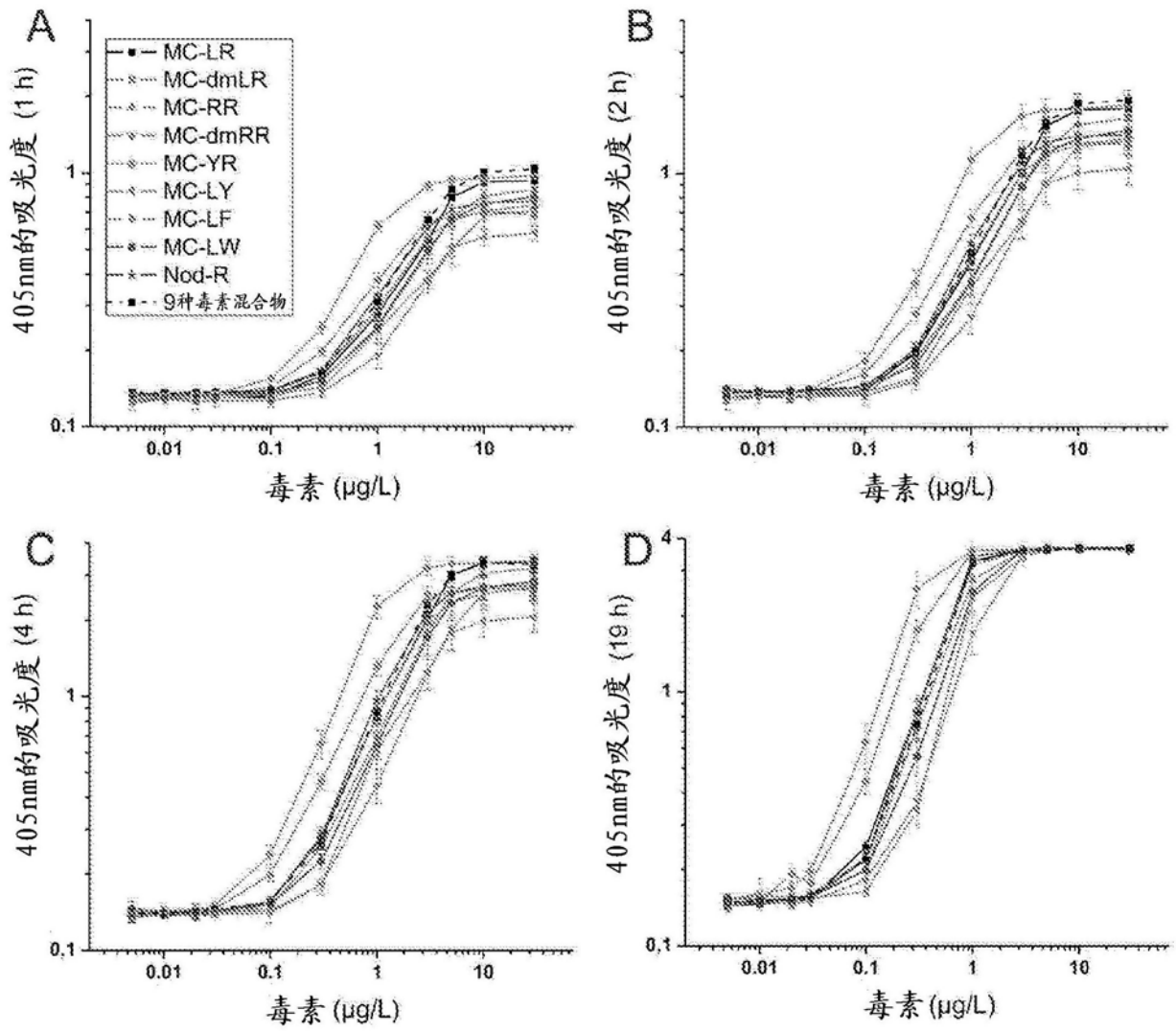


图6

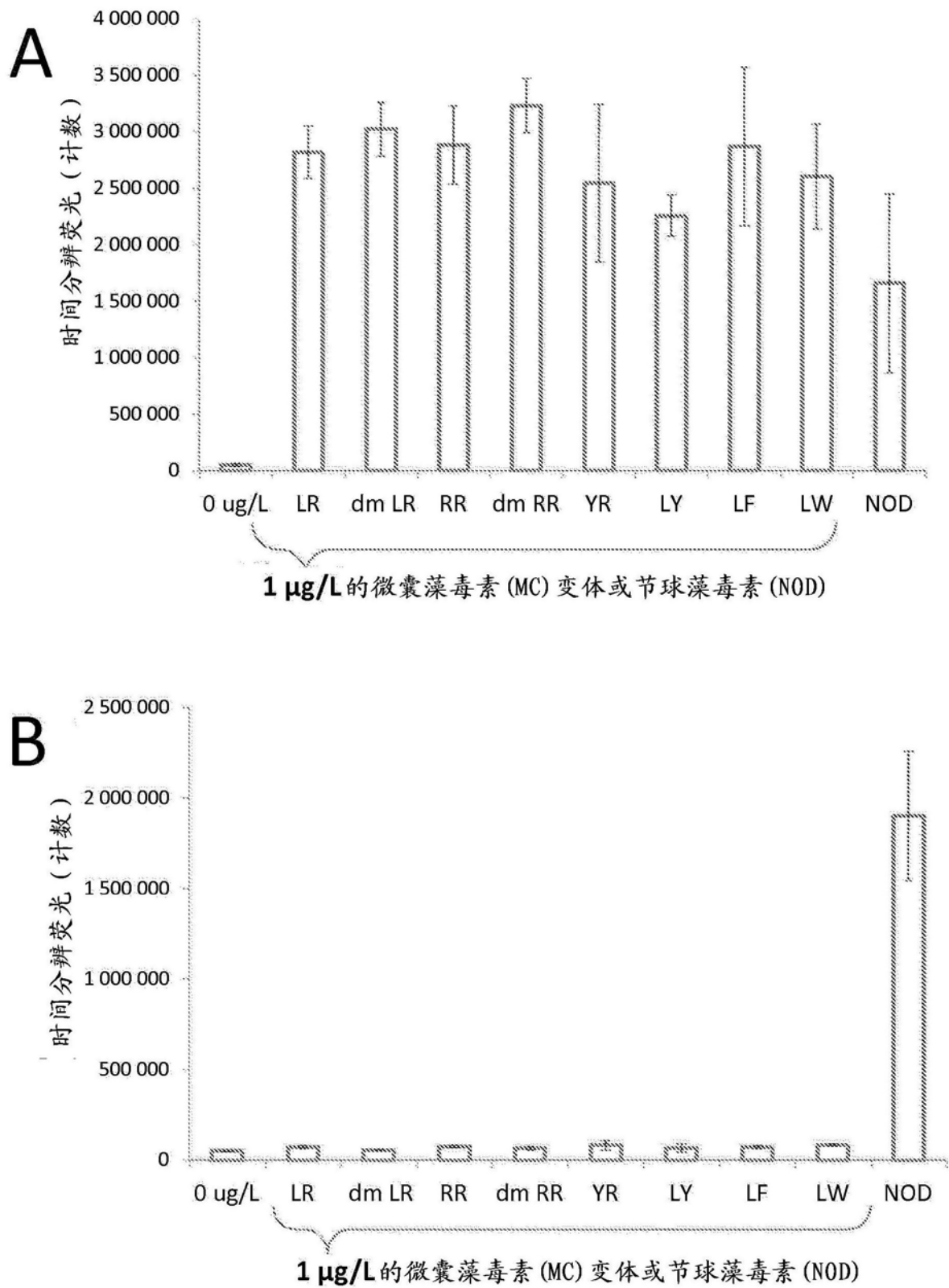


图7

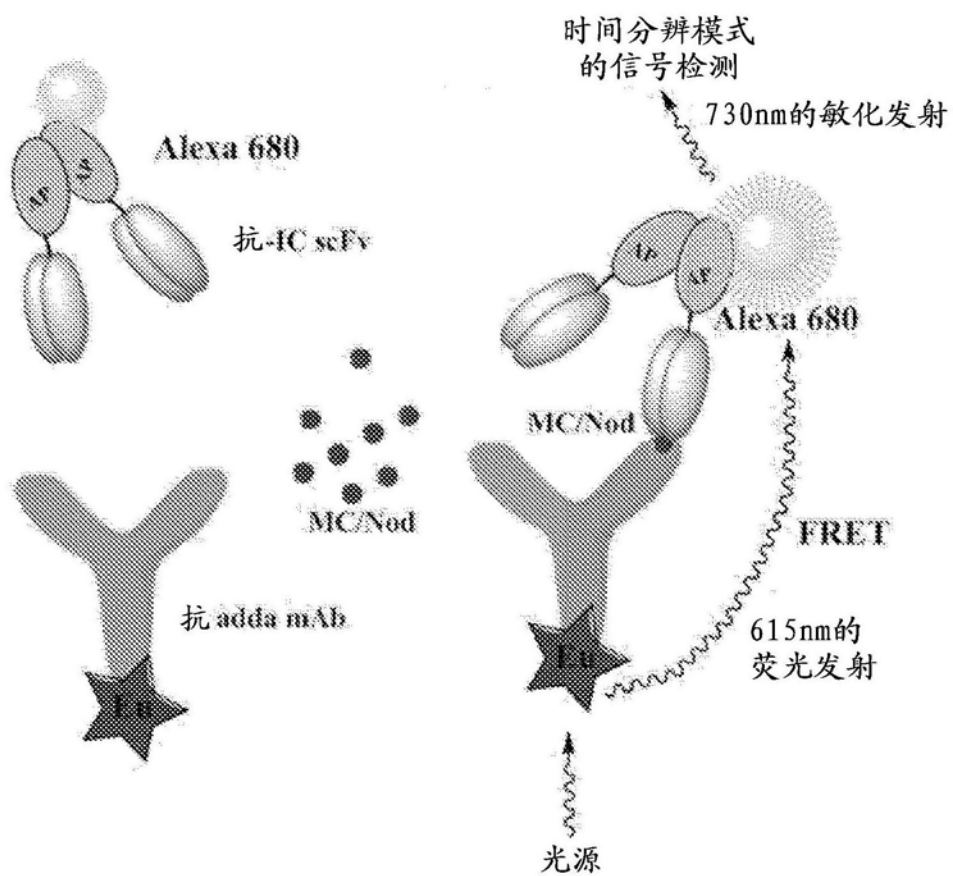


图8

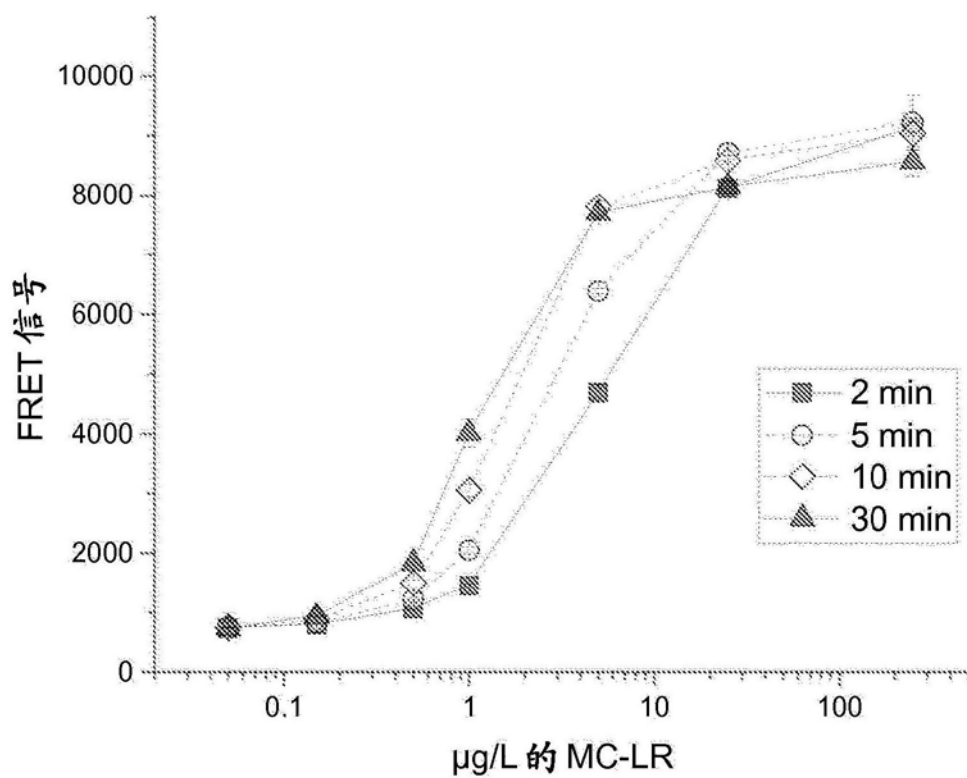


图9

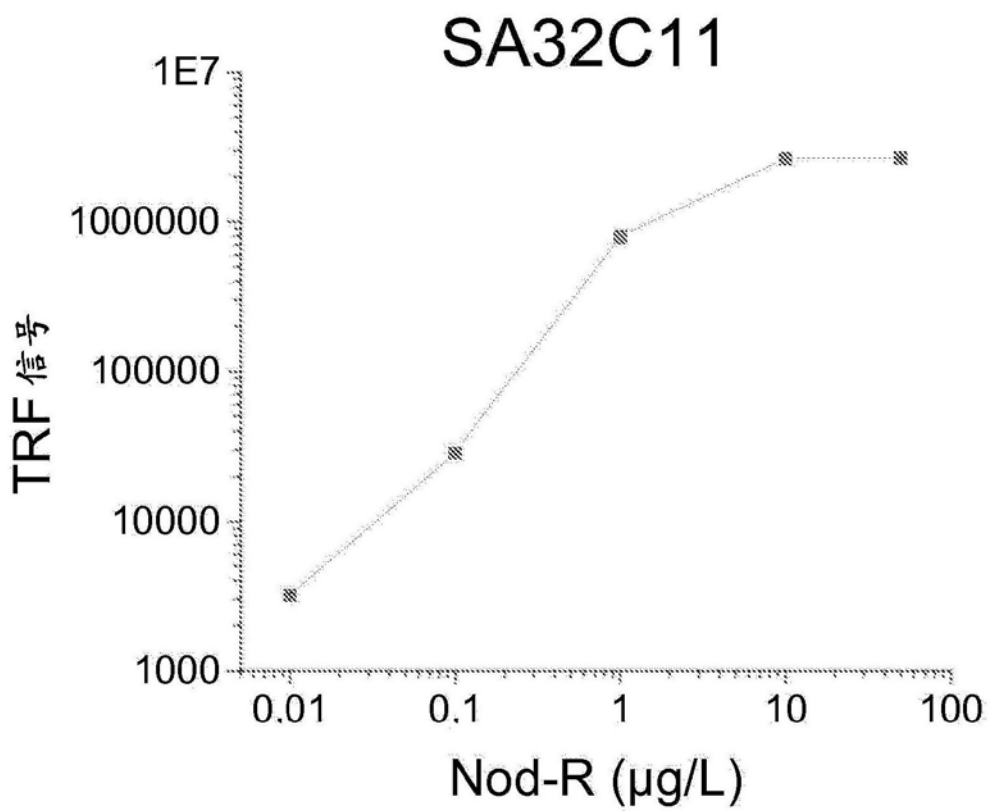


图10

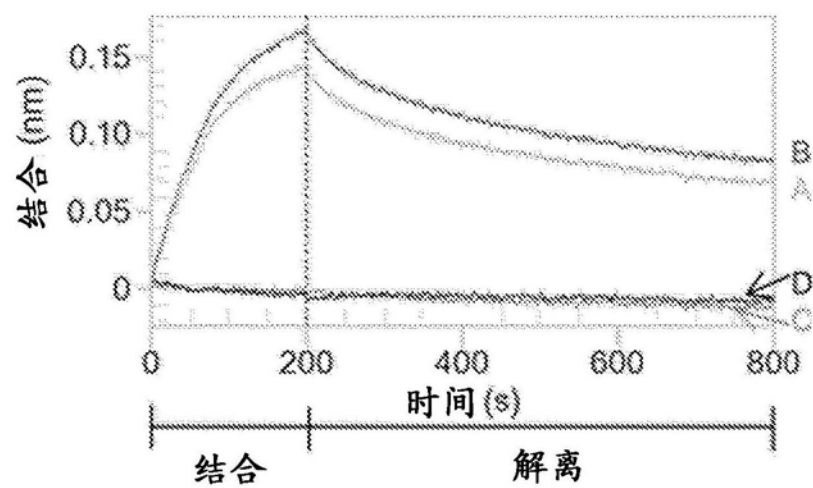
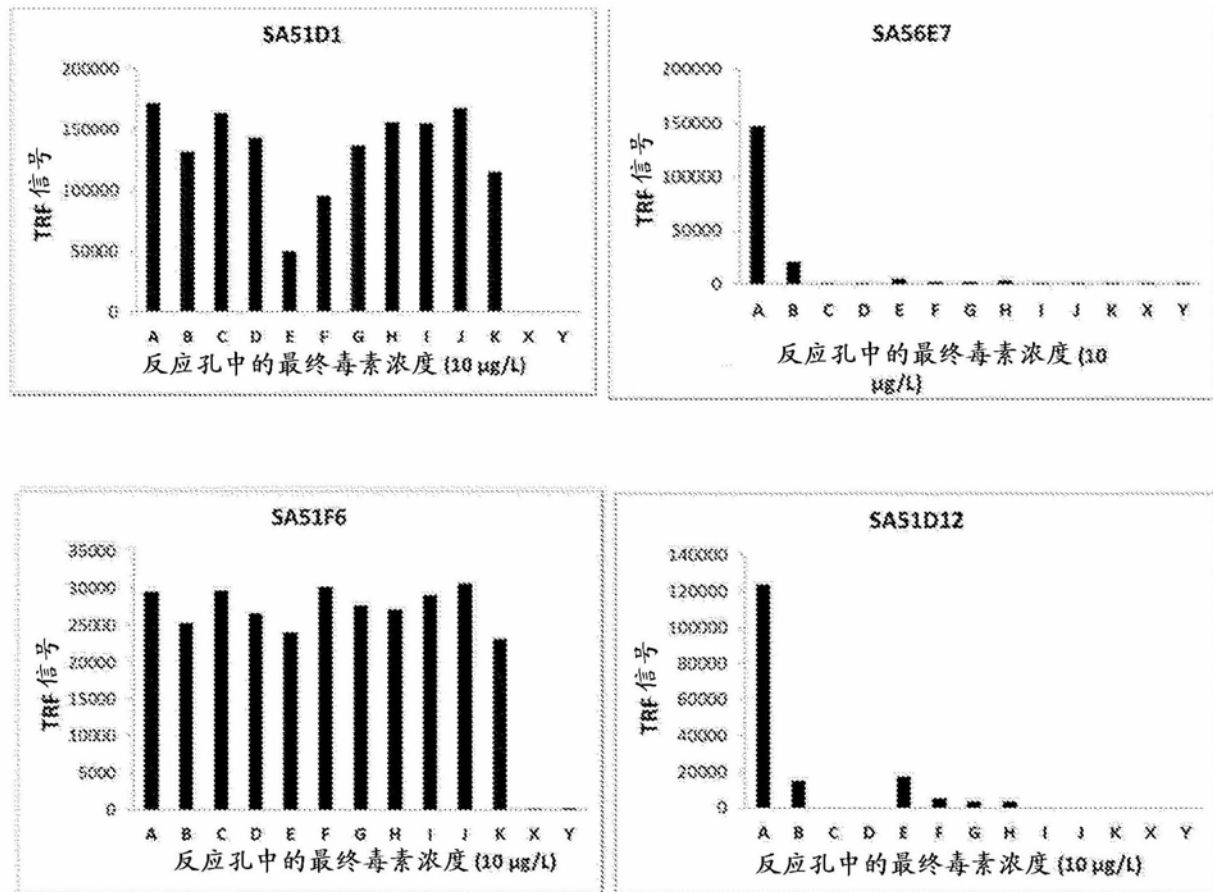
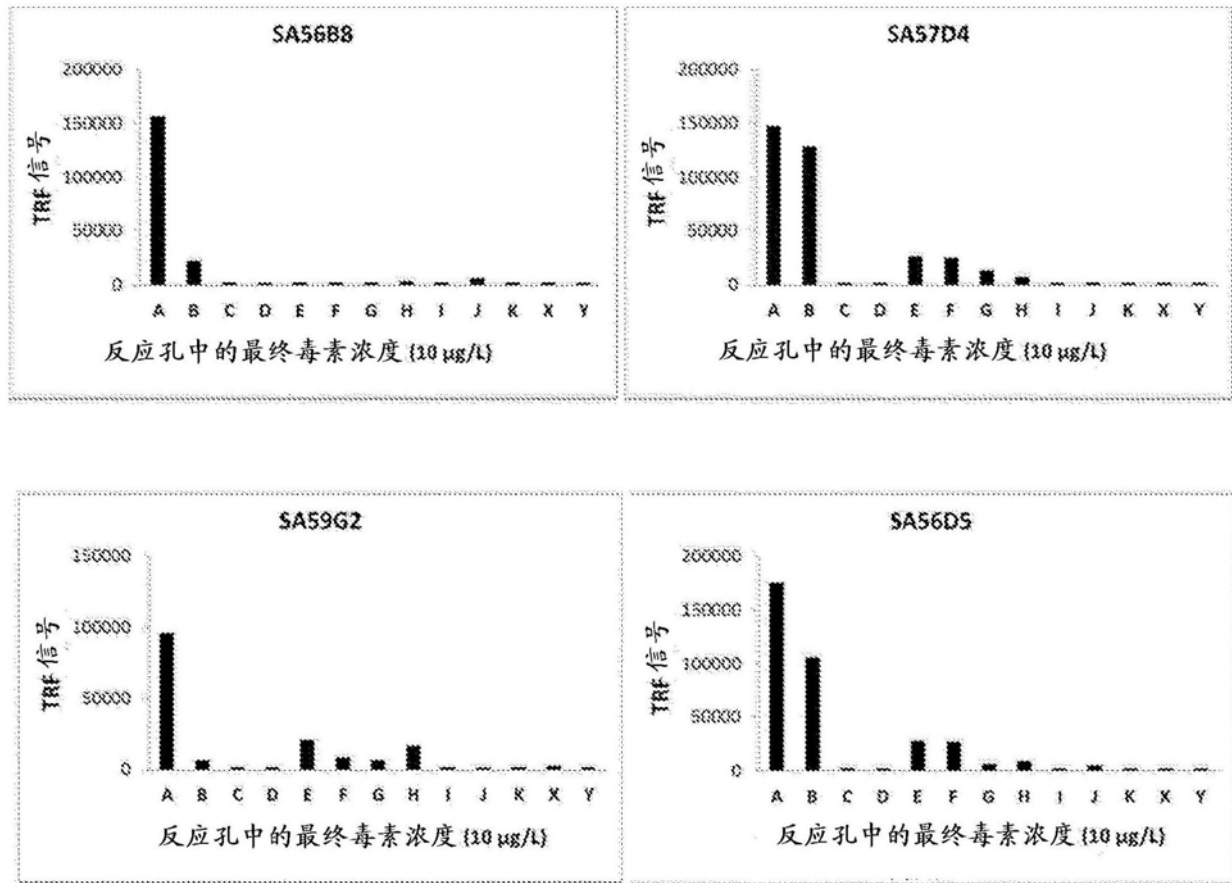


图11



A	B	C		D	E	F	G	H	I	J	K	X	Y
LR	dmLR	RR		dmRR	LA	LY	LF	LW	YR	WR	节球藻毒素 R	无 CCPH, 无 ADDA Mab	无 CCPH, 有 ADDA Mab
微囊藻毒素 (MC)													

图12



A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	X	Y
LR	dmLR	RR	dmRR	LA	LY	LF	LW	YR	WR	节球藻毒素 R	无 CCPH, 无 ADDA Mab	无 CCPH, 有 ADDA Mab
微囊藻毒素 (MC)												

图12续

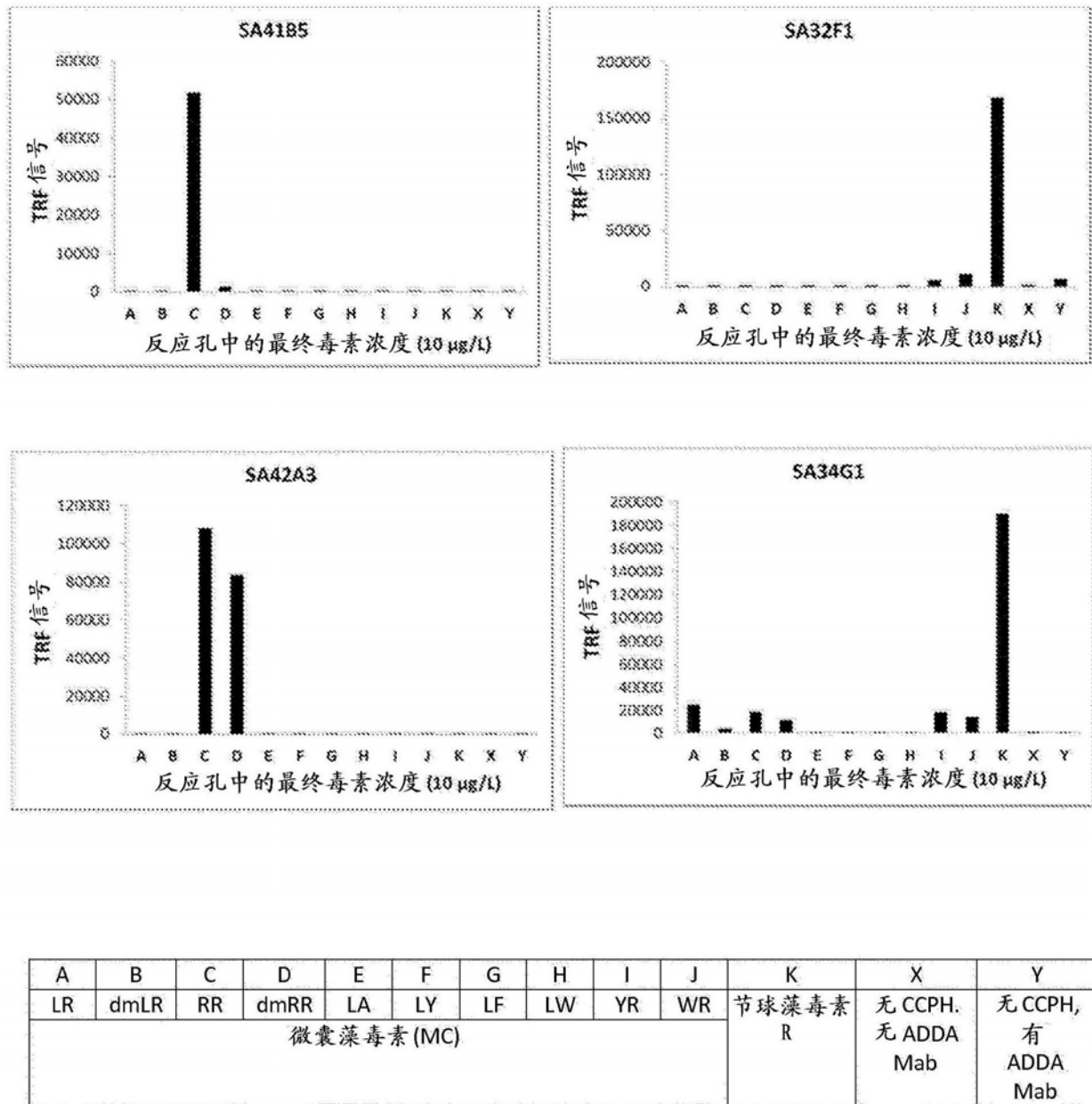


图12续

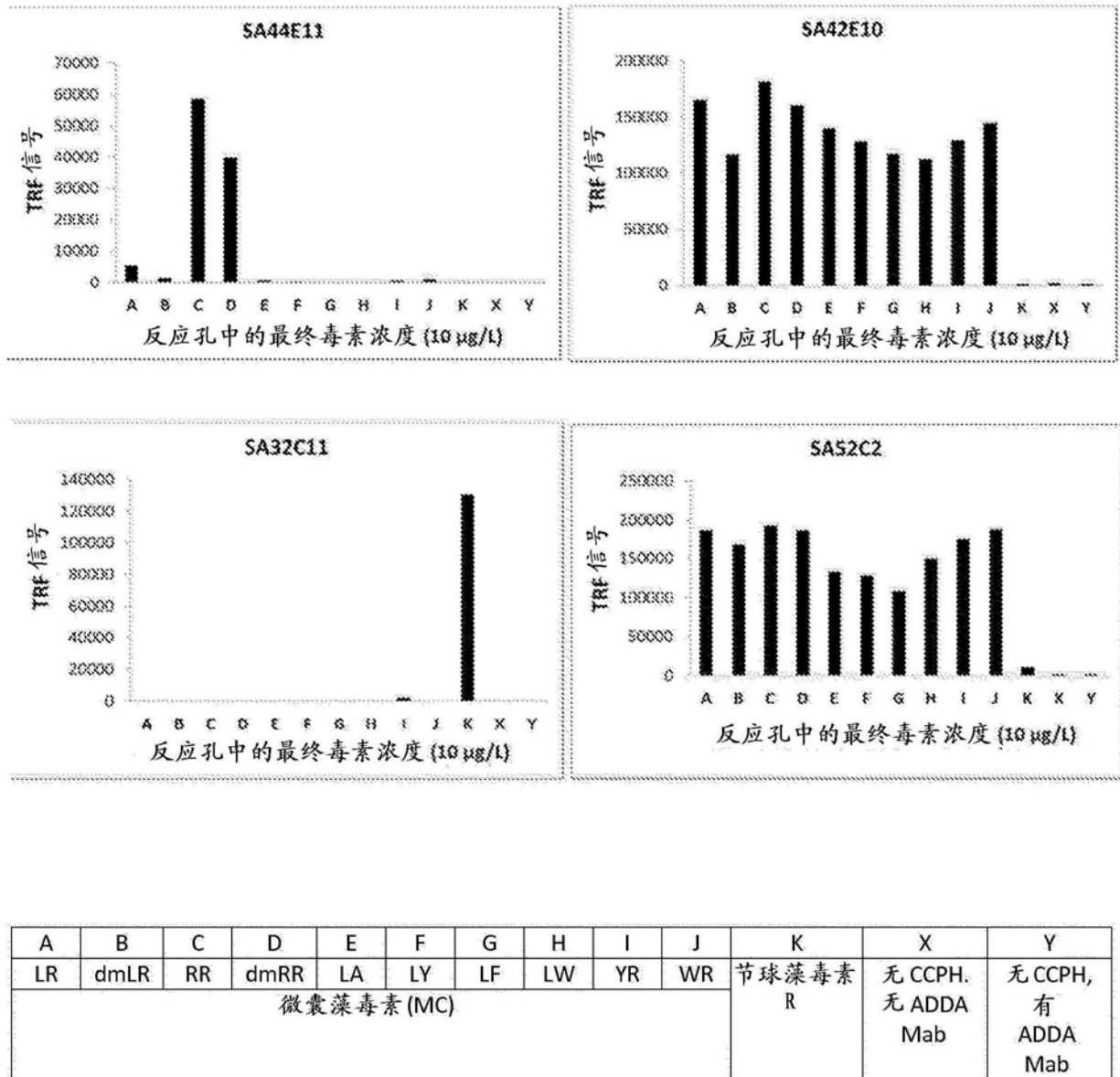


图12续

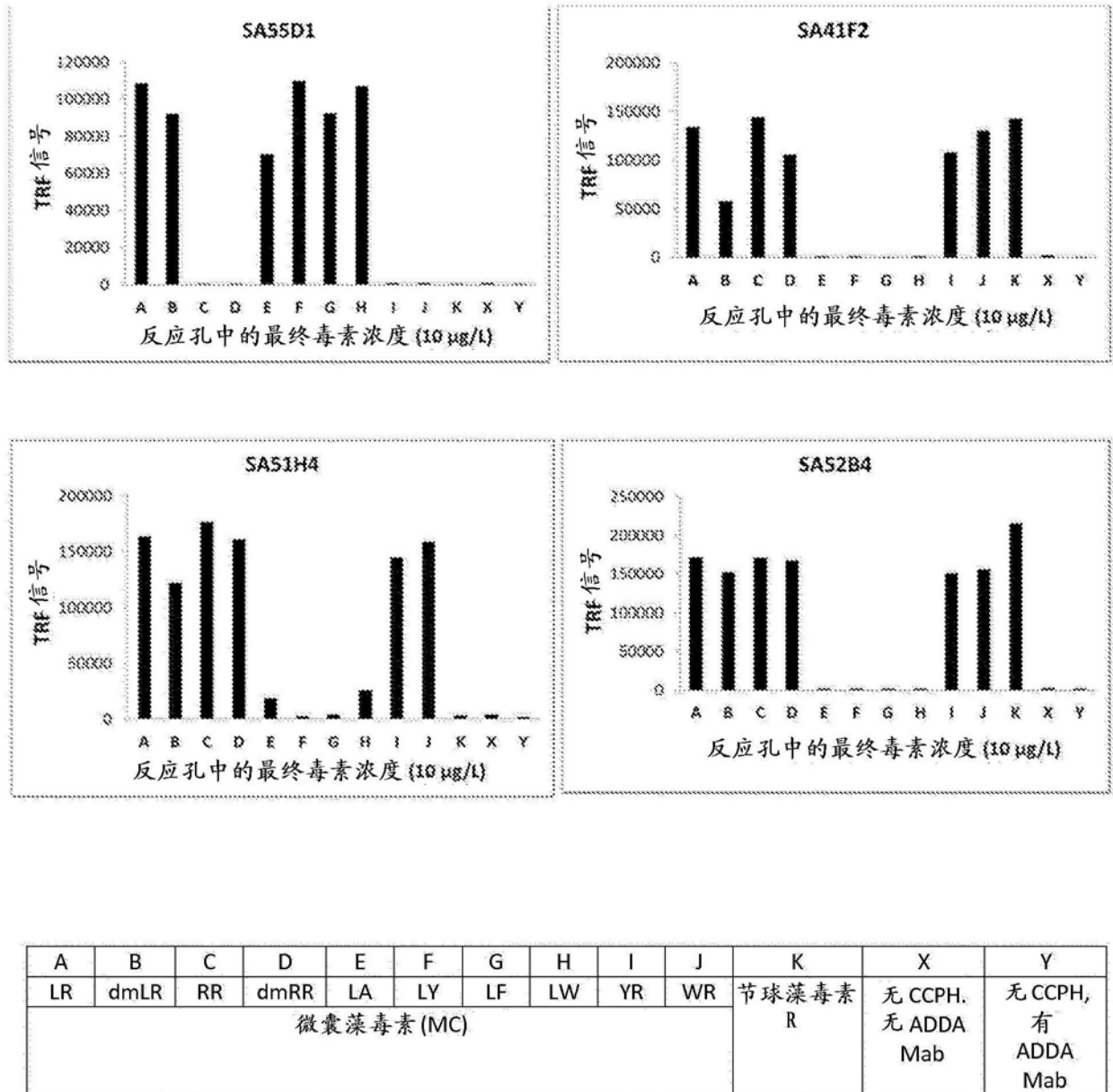
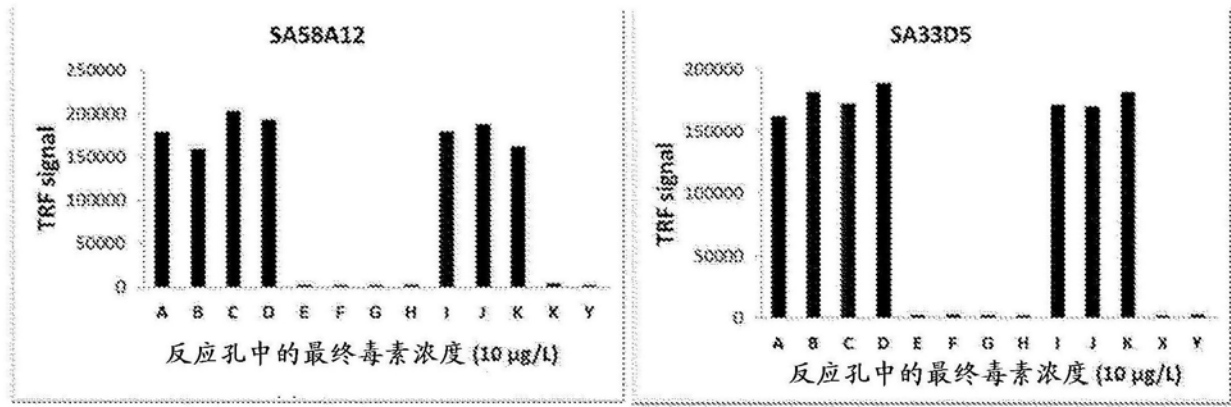


图12续



A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	X	Y
LR	dmLR	RR	dmRR	LA	LY	LF	LW	YR	WR	节球藻毒素 R	无 CCPH, 无 ADDA Mab	无 CCPH, 有 ADDA Mab
微囊藻毒素 (MC)												

图12续

专利名称(译)	针对包含蓝细菌环肽肝毒素的免疫复合物的抗体		
公开(公告)号	CN108779169A	公开(公告)日	2018-11-09
申请号	CN201680080642.4	申请日	2016-12-21
[标]申请(专利权)人(译)	图尔库大学		
申请(专利权)人(译)	图尔库大学		
当前申请(专利权)人(译)	图尔库大学		
发明人	M·韦赫尼埃宁 U·拉明玛基 S·阿克特		
IPC分类号	C07K16/12 G01N33/53 C07K16/44		
CPC分类号	C07K16/12 C07K16/005 C07K16/44 C07K2317/33 C07K2317/622 C12N15/62 C12N15/85 G01N33/54306 G01N33/564 G01N33/56911 G01N2333/195		
代理人(译)	张小勇		
优先权	2015005980 2015-12-21 FI		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及用于检测含水样品中蓝细菌环肽肝毒素(CCPH)的工具和方法。更具体地,本发明提供结合一种或多种CCPH变体与抗-CCPH初级抗体之间形成的免疫复合物的重组抗-免疫复合物(抗-IC)抗体和使用该重组抗-免疫复合物(抗-IC)抗体的免疫测定法,优选非竞争性免疫测定法。

