



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 109336973 B

(45) 授权公告日 2021. 08. 24

(21) 申请号 201811183288.5

G01N 33/577 (2006.01)

(22) 申请日 2018.10.11

G01N 33/68 (2006.01)

(65) 同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 109336973 A

(56) 对比文件

CN 105158478 A, 2015.12.16

AU 2741788 A, 1989.06.29

CN 105358578 A, 2016.02.24

CN 105021830 A, 2015.11.04

CN 107001473 A, 2017.08.01

WO 2014144060 A1, 2014.09.18

(43) 申请公布日 2019.02.15

(73) 专利权人 中国科学院昆明动物研究所

地址 650223 云南省昆明市教场东路32号

翟源惠等. 人转铁蛋白受体特异性单克隆抗体的研制及.《广东药科大学学报》.2017, 第33卷(第3期), 全文.

(72) 发明人 赖仞 龙承波 唐小芑

(74) 专利代理机构 中国贸促会专利商标事务所有限公司 11038

代理人 李程达

审查员 张范范

(51) Int. Cl.

C07K 16/18 (2006.01)

C12N 15/13 (2006.01)

G01N 33/531 (2006.01)

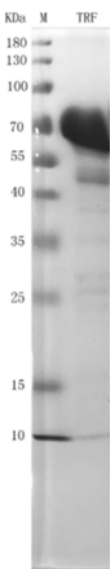
权利要求书3页 说明书16页
序列表6页 附图3页

(54) 发明名称

抗转铁蛋白抗体及其用途

(57) 摘要

本发明涉及抗体及免疫检测领域, 具体而言, 本发明涉及抗转铁蛋白抗体或其抗原结合片段, 编码它们的核酸分子, 制备它们的方法, 以及包含它们的试剂盒。本发明进一步涉及所述抗体或其抗原结合片段用于检测血浆中转铁蛋白的用途。



1. 能够特异性结合转铁蛋白的抗体或其抗原结合片段, 所述抗体或其抗原结合片段包含:

(a) 包含下述3个互补决定区 (CDR) 的重链可变区 (VH):

(i) VH CDR1, 其由如SEQ ID NO:3所示的序列组成;

(ii) VH CDR2, 其由如SEQ ID NO:4所示的序列组成;

(iii) VH CDR3, 其由如SEQ ID NO:5所示的序列组成;

和,

(b) 包含下述3个互补决定区 (CDR) 的轻链可变区 (VL):

(iv) VL CDR1, 其由如SEQ ID NO:6所示的序列组成;

(v) VL CDR2, 其由如SEQ ID NO:7所示的序列组成;

(vi) VL CDR3, 其由如SEQ ID NO:8所示的序列组成;

或者所述抗体或其抗原结合片段包含:

(c) 包含下述3个互补决定区 (CDR) 的重链可变区 (VH):

(i) VH CDR1, 其由如SEQ ID NO:11所示的序列组成;

(ii) VH CDR2, 其由如SEQ ID NO:12所示的序列组成;

(iii) VH CDR3, 其由如SEQ ID NO:13所示的序列组成;

和,

(d) 包含下述3个互补决定区 (CDR) 的轻链可变区 (VL):

(iv) VL CDR1, 其由如SEQ ID NO:14所示的序列组成;

(v) VL CDR2, 其由如SEQ ID NO:15所示的序列组成;

(vi) VL CDR3, 其由如SEQ ID NO:16所示的序列组成。

2. 权利要求1所述的抗体或其抗原结合片段, 其中, 所述抗体或其抗原结合片段包含:

(1) 如SEQ ID NO:1所示的序列的VH和如SEQ ID NO:2所示的序列的VL; 或

(2) 如SEQ ID NO:9所示的序列的VH和如SEQ ID NO:10所示的序列的VL; 或

(3) 如SEQ ID NO:17所示的核苷酸序列编码的VH和如SEQ ID NO:18所示的核苷酸序列编码的VL; 或

(4) 如SEQ ID NO:19所示的核苷酸序列编码的VH和如SEQ ID NO:20所示的核苷酸序列编码的VL。

3. 权利要求1-2任一项所述的抗体或其抗原结合片段, 其中所述抗体为鼠源抗体、嵌合抗体、人源化抗体、双特异性抗体或多特异性抗体, 和/或, 所述抗原结合片段选自Fab、Fab'、(Fab')₂、Fv、二硫键连接的Fv、scFv、双抗体 (diabody) 和单域抗体 (sdAb)。

4. 权利要求1-2任一项所述的抗体或其抗原结合片段, 其中, 所述抗体或其抗原结合片段带有标记, 所述标记选自辣根过氧化物酶、放射性核素、荧光染料、发光物质或生物素。

5. 分离的核酸分子, 其编码权利要求1-2任一项所述的抗体或其抗原结合片段, 或其重链可变区和轻链可变区。

6. 载体, 其包含权利要求5所述的分离的核酸分子, 其中所述载体为克隆载体或表达载体。

7. 宿主细胞, 其包含权利要求5所述的分离的核酸分子或权利要求6所述的载体。

8. 制备权利要求1-2任一项所述的抗体或其抗原结合片段的方法, 所述方法包括: 在允

许所述抗体或其抗原结合片段表达的条件下,培养权利要求7所述的宿主细胞,和从培养的宿主细胞培养物中回收所述抗体或其抗原结合片段。

9. 用于检测转铁蛋白在样品中的存在或其水平的试剂盒,其包含权利要求1-2任一项所述的抗体或其抗原结合片段,其作为双抗夹心酶联免疫检测的第一单克隆抗体即包被抗体;和另外一种权利要求1-2任一项所述的抗体或其抗原结合片段,其作为双抗夹心酶联免疫检测的第二单克隆抗体即酶标抗体,其中所述包被抗体和所述酶标抗体分别针对人转铁蛋白不同的抗原决定簇;

其中所述酶标抗体的标记酶为辣根过氧化物酶或碱性磷酸酶。

10. 根据权利要求9所述的试剂盒,其还包括以下中的一种或多种:酶联板、包被缓冲液、封闭液、显色底物、终止液、人转铁蛋白标准品。

11. 根据权利要求9或10所述的试剂盒,其中所述第一单克隆抗体包含:如SEQ ID NO:3所示的VH CDR1、如SEQ ID NO:4所示的VH CDR2、如SEQ ID NO:5所示的VH CDR3、如SEQ ID NO:6所示的VL CDR1、如SEQ ID NO:7所示的VL CDR2和如SEQ ID NO:8所示的VL CDR3,并且所述第二单克隆抗体包含:如SEQ ID NO:11所示的VH CDR1、如SEQ ID NO:12所示的VH CDR2、如SEQ ID NO:13所示的VH CDR3、如SEQ ID NO:14所示的VL CDR1、如SEQ ID NO:15所示的VL CDR2和如SEQ ID NO:16所示的VL CDR3。

12. 根据权利要求9或10所述的试剂盒,其中所述第一单克隆抗体包含如SEQ ID NO:1所示的序列的VH和如SEQ ID NO:2所示的序列的VL,并且所述第二单克隆抗体包含如SEQ ID NO:9所示的序列的VH和如SEQ ID NO:10所示的序列的VL;或者

所述第一单克隆抗体包含如SEQ ID NO:17所示的核苷酸序列编码的VH和如SEQ ID NO:18所示的核苷酸序列编码的VL,并且所述第二单克隆抗体包含如SEQ ID NO:19所示的核苷酸序列编码的VH和如SEQ ID NO:20所示的核苷酸序列编码的VL。

13. 检测转铁蛋白在样品中的存在或其水平的方法,包括:

- i) 将第一单克隆抗体包被于酶联板上;
- ii) 封闭经包被的酶联板;
- iii) 加入待检测样品;
- iv) 加入酶标记的第二单克隆抗体;
- v) 加入显色底物显色;

任选地,所述方法还包括vi) 使用梯度稀释后的人转铁蛋白标准品替代被检测样品,以获得标准曲线,然后通过标准曲线比对,定量检测人转铁蛋白,

其中所述第一单克隆抗体包含:如SEQ ID NO:3所示的VH CDR1、如SEQ ID NO:4所示的VH CDR2、如SEQ ID NO:5所示的VH CDR3、如SEQ ID NO:6所示的VL CDR1、如SEQ ID NO:7所示的VL CDR2和如SEQ ID NO:8所示的VL CDR3,并且所述第二单克隆抗体包含:如SEQ ID NO:11所示的VH CDR1、如SEQ ID NO:12所示的VH CDR2、如SEQ ID NO:13所示的VH CDR3、如SEQ ID NO:14所示的VL CDR1、如SEQ ID NO:15所示的VL CDR2和如SEQ ID NO:16所示的VL CDR3;或者

其中所述第一单克隆抗体包含如SEQ ID NO:1所示的序列的VH和如SEQ ID NO:2所示的序列的VL,并且所述第二单克隆抗体包含如SEQ ID NO:9所示的序列的VH和如SEQ ID NO:10所示的序列的VL;或者

所述第一单克隆抗体包含如SEQ ID NO:17所示的核苷酸序列编码的VH和如SEQ ID NO:18所示的核苷酸序列编码的VL,并且所述第二单克隆抗体包含如SEQ ID NO:19所示的核苷酸序列编码的VH和如SEQ ID NO:20所示的核苷酸序列编码的VL。

14. 使用权利要求9-12任一项的试剂盒检测转铁蛋白在样品中的存在或其水平的方法,包括:将第一单克隆抗体用包被缓冲液稀释后包被于酶联板上,然后用包被缓冲液洗去多余的第一单克隆抗体;接着用封闭液封闭经包被的酶联板,然后用包被缓冲液洗板以洗去多余的封闭液;接着加入待检测样品,然后用包被缓冲液洗板以洗去多余的待检测样品;接着加入酶标记的第二单克隆抗体,然后用包被缓冲液洗板以洗去多余的酶标记的第二单克隆抗体;接着加入显色底物显色,然后加终止液终止反应;测定OD值;任选地,所述方法还包括:使用梯度稀释后的人转铁蛋白标准品替代被检测样品,以获得标准曲线,然后通过标准曲线比对,定量检测人转铁蛋白。

15. 权利要求1-2任一项所述的抗体或其抗原结合片段在制备试剂盒中的用途,所述试剂盒用于检测转铁蛋白在样品中的存在或其水平。

抗转铁蛋白抗体及其用途

技术领域

[0001] 本发明涉及抗体及免疫检测领域,具体而言,本发明涉及抗转铁蛋白抗体或其抗原结合片段,编码它们的核酸分子,制备它们的方法,以及包含它们的试剂盒。本发明进一步涉及所述抗体或其抗原结合片段用于检测血浆中转铁蛋白的用途。

背景技术

[0002] 转铁蛋白(transferrin)是一种肝脏合成的单链糖基化蛋白,由676个氨基酸残基组成,相对分子质量约为 $79 \times 10^3 \text{Da}$,其为血浆中主要的含铁蛋白质,以 $\text{TRF} \cdot \text{Fe}^{3+}$ 的复合物形式负责机体内铁的转运。体内半衰期为7天。血浆中TRF的浓度受铁供应的调节,在缺铁状态时,血浆TRF浓度上升,经铁有效治疗后恢复到正常水平。因此临床上,血浆中TRF水平常用于贫血的诊断和对治疗的监测。

[0003] 转铁蛋白是人体中不可缺少的成分,不仅参与铁的运输与代谢,调节铁离子平衡和能量平衡,还能参与细胞增殖和免疫系统的调节,更具有抑菌功能,因而转铁蛋白具有非常重要的生理功能。

[0004] 近年来的研究表明人体血清TRF水平的变化对许多疾病具有鉴别诊断价值如肝损伤类疾病、妊娠期高血压、全身感染和心血管疾病等;而尿或粪便中TRF的检测对肾损伤类疾病、糖尿病、消化系统癌症、消化道创伤的诊断具非常重要的临床运用。

[0005] 虽然目前国内外报道了大量的转铁蛋白受体抗体,却没有报道转铁蛋白的单克隆抗体,因此大大限制了TRF检测试剂开发,特别是免疫检测。

发明内容

[0006] 本发明的目的是提供高亲和力和高特异性的抗人转铁蛋白的单克隆抗体。发明人开发了具有优良性质的鼠源抗体,其能够特异性识别/结合血浆中的人转铁蛋白。

[0007] 本发明的抗体

[0008] 在一个方面,本发明提供了能够特异性结合转铁蛋白的抗体或其抗原结合片段,所述抗体或其抗原结合片段包含:

[0009] (a) 包含下述3个互补决定区(CDR)的重链可变区(VH):

[0010] (i) VH CDR1,其由选自下列的序列组成:SEQ ID NOs:3或11所示的序列,或与其相比具有一个或几个氨基酸的置换、缺失或添加(例如1个,2个或3个氨基酸的置换、缺失或添加)的序列;

[0011] (ii) VH CDR2,其由选自下列的序列组成:SEQ ID NOs:4或12所示的序列,或与其相比具有一个或几个氨基酸的置换、缺失或添加(例如1个,2个或3个氨基酸的置换、缺失或添加)的序列;

[0012] (iii) VH CDR3,其由选自下列的序列组成:SEQ ID NOs:5或13所示的序列,或与其相比具有一个或几个氨基酸的置换、缺失或添加(例如1个,2个或3个氨基酸的置换、缺失或添加)的序列;

[0013] 和/或,

[0014] (b) 包含下述3个互补决定区(CDR)的轻链可变区(VL):

[0015] (iv) VL CDR1,其由选自下列的序列组成:SEQ ID NOs:6或14所示的序列,或与SEQ ID NOs:6或14所示的序列相比具有一个或几个氨基酸的置换、缺失或添加(例如1个,2个或3个氨基酸的置换、缺失或添加)的序列;

[0016] (v) VL CDR2,其由选自下列的序列组成:SEQ ID NOs:7或15所示的序列,或与SEQ ID NOs:7或15所示的序列相比具有一个或几个氨基酸的置换、缺失或添加(例如1个,2个或3个氨基酸的置换、缺失或添加)的序列;

[0017] (vi) VL CDR3,其由选自下列的序列组成:SEQ ID NOs:8或16任一项所示的序列,或与SEQ ID NOs:8或16任一项所示的序列相比具有一个或几个氨基酸的置换、缺失或添加(例如1个,2个或3个氨基酸的置换、缺失或添加)的序列。

[0018] 在优选的实施方案中,(i) - (vi)任一项中所述的置换为保守置换。

[0019] 在最优选的实施方案中,所述抗体或其抗原结合片段包含:

[0020] (1) SEQ ID NO:3所示的VH CDR1、SEQ ID NO:4所示的VH CDR2、SEQ ID NO:5所示的VH CDR3;SEQ ID NO:6所示的VL CDR1、SEQ ID NO:7所示的VL CDR2、SEQ ID NO:8所示的VL CDR3;或

[0021] (2) SEQ ID NO:11所示的VH CDR1、SEQ ID NO:12所示的VH CDR2、SEQ ID NO:13所示的VH CDR3;SEQ ID NO:14所示的VL CDR1、SEQ ID NO:15所示的VL CDR2、SEQ ID NO:16所示的VL CDR3。

[0022] 在另一个方面,本发明提供了能够特异性结合转铁蛋白的抗体或其抗原结合片段,所述抗体或其抗原结合片段包含重链可变区和轻链可变区,其中,

[0023] 所述重链可变区包含SEQ ID NOs:1或9所示的重链可变区中含有的3个CDR;并且,

[0024] 所述轻链可变区包含SEQ ID NOs:2或10所示的轻链可变区中含有的3个CDR。

[0025] 在优选的实施方案中,所述重链可变区中含有的3个CDR,和/或所述轻链可变区中含有的3个CDR,由Chothia编号系统定义。

[0026] 在优选的实施方案中,所述抗体或其抗原结合片段包含:

[0027] (1) SEQ ID NO:1所示的重链可变区中含有的3个CDR;以及,SEQ ID NO:2所示的轻链可变区中含有的3个CDR;或

[0028] (2) SEQ ID NO:9所示的重链可变区中含有的3个CDR;以及,SEQ ID NO:10所示的轻链可变区中含有的3个CDR。

[0029] 在另一个方面,本发明提供了能够特异性结合转铁蛋白的抗体或其抗原结合片段,所述抗体或其抗原结合片段包含:

[0030] (a) 重链可变区(VH),其包含选自下列的氨基酸序列:

[0031] (i) SEQ ID NOs:1或9所示的序列;

[0032] (ii) 与SEQ ID NOs:1或9所示的序列相比具有一个或几个氨基酸的置换、缺失或添加(例如1个,2个,3个,4个或5个氨基酸的置换、缺失或添加)的序列;或

[0033] (iii) 与SEQ ID NOs:1或9所示的序列具有至少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%、至少99%、或100%的序列同一性的序列;

[0034] 和,

[0035] (b) 轻链可变区 (VL), 其包含选自下列的氨基酸序列:

[0036] (iv) SEQ ID NOs:2或10所示的序列;

[0037] (v) 与SEQ ID NOs:2或10所示的序列相比具有一个或几个氨基酸的置换、缺失或添加(例如1个,2个,3个,4个或5个氨基酸的置换、缺失或添加)的序列;或

[0038] (vi) 与SEQ ID NOs:2或10所示的序列具有至少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%、至少99%、或100%的序列同一性的序列。

[0039] 在优选的实施方案中, (ii) 或 (v) 中所述的置换是保守置换。

[0040] 在优选的实施方案中, 所述抗体或其抗原结合片段包含:

[0041] (1) 具有SEQ ID NO:1所示的序列的VH和具有SEQ ID NO:2所示的序列的VL;或

[0042] (2) 具有SEQ ID NO:9所示的序列的VH和具有SEQ ID NO:10所示的序列的VL。

[0043] 在优选的实施方案中, 本发明的抗体或其抗原结合片段进一步包含来源于哺乳动物(例如, 鼠或人) 免疫球蛋白的恒定区序列或其变体, 所述变体与其所源自的序列相比具有一个或多个氨基酸的置换、缺失或添加。在优选的实施方案中, 所述变体与其所源自的序列相比具有一个或多个氨基酸的保守置换。

[0044] 在进一步的实施方案中, 本发明的抗体是嵌合抗体、人源化抗体。在优选的实施方案中, 本发明的抗原结合片段选自Fab、Fab'、(Fab')₂、Fv、二硫键连接的Fv、scFv、双抗体(diabody) 和单域抗体(sdAb)。

[0045] 在本发明中, 本发明的抗体或其抗原结合片段可以包括这样的变体, 所述变体与其所源自的抗体或其抗原结合片段相比差异仅在于一个或多个(例如, 至多20个、至多15个、至多10个、或至多5个氨基酸的保守置换) 氨基酸残基的保守置换, 或者与其所源自的抗体或其抗原结合片段具有至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%、或100%的序列同一性, 且基本保留了其所源自的抗体或其抗原结合片段的上述生物学功能。

[0046] 抗体的制备

[0047] 本发明的抗体可以本领域已知的各种方法来制备, 例如通过基因工程重组技术来获得。例如, 通过化学合成或PCR扩增获得编码本发明抗体的重链和轻链基因的DNA分子。将所得DNA分子插入表达载体内, 然后转染宿主细胞。然后, 在特定条件下培养转染后的宿主细胞, 并表达本发明的抗体。

[0048] 本发明的抗原结合片段可以通过水解完整的抗体分子获得(参见Morimoto et al., J.Biochem.Biophys.Methods 24:107-117 (1992) and Brennan et al., Science 229: 81 (1985))。另外, 这些抗原结合片段也可以直接由重组宿主细胞产生(reviewed in Hudson, Curr.Opin.Immunol.11:548-557 (1999); Little et al., Immunol.Today, 21:364-370 (2000))。比如, Fab' 片段可以直接从宿主细胞中获得; 可以将Fab' 片段化学偶联形成F(ab')₂片段(Carter et al., Bio/Technology, 10:163-167 (1992))。另外, Fv、Fab或F(ab')₂片段也可以直接从重组宿主细胞培养液中直接分离得到。本领域的普通技术人员完全知晓制备这些抗原结合片段的其它技术。

[0049] 因此, 在另一个方面, 本发明提供了一种分离的核酸分子, 其包含编码本发明的抗

体或其抗原结合片段,或其重链可变区和/或轻链可变区的核苷酸序列。在优选的实施方案中,所述分离的核酸分子编码本发明的抗体或其抗原结合片段,或其重链可变区和/或轻链可变区。

[0050] 在另一个方面,本发明提供了一种载体(例如克隆载体或表达载体),其包含本发明的分离的核酸分子。在优选的实施方案中,本发明的载体是例如质粒,粘粒,噬菌体等。在优选的实施方案中,所述载体能够在受试者(例如哺乳动物,例如人)体内表达本发明的抗体或其抗原结合片段。

[0051] 在另一个方面,本发明提供了一种宿主细胞,其包含本发明的分离的核酸分子或本发明的载体。此类宿主细胞包括但不限于,原核细胞例如大肠杆菌细胞,以及真核细胞例如酵母细胞,昆虫细胞,植物细胞和动物细胞(如哺乳动物细胞,例如小鼠细胞、人细胞等)。在优选的实施方案中,本发明的宿主细胞是哺乳动物细胞,例如CHO(例如CHO-K1、CHO-S、CHO DG44)。

[0052] 在另一个方面,提供了制备本发明的抗体或其抗原结合片段的方法,其包括,在允许所述抗体或其抗原结合片段表达的条件下,培养本发明的宿主细胞,和从培养的宿主细胞培养物中回收所述抗体或其抗原结合片段。

[0053] 衍生的抗体

[0054] 本发明的抗体或其抗原结合片段可进行衍生化,例如被连接至另一个分子(例如另一个多肽或蛋白)。通常,抗体或其抗原结合片段的衍生化(例如,标记)不会不利影响其对转铁蛋白(特别是人转铁蛋白)的结合。因此,本发明的抗体或其抗原结合片段还意欲包括此类衍生化的形式。例如,可以将本发明的抗体或其抗原结合片段功能性连接(通过化学偶合、基因融合、非共价连接或其它方式)于一个或多个其它分子基团,例如另一个抗体(例如,形成双特异性抗体),检测试剂,药用试剂,和/或能够介导抗体或抗原结合片段与另一个分子结合的蛋白或多肽(例如,抗生物素蛋白或多组氨酸标签)。此外,本发明的抗体或其抗原结合片段还可以用化学基团进行衍生,例如聚乙二醇(PEG),甲基或乙基,或者糖基。这些基团可用于改善抗体的生物学特性,例如增加血清半衰期。

[0055] 因此,在优选的实施方案中,本发明的抗体或其抗原结合片段带有标记。在优选的实施方案中,本发明的抗体或其抗原结合片段带有可检测的标记,例如酶、放射性核素、荧光染料、发光物质(如化学发光物质)或生物素。本发明所述的可检测的标记可以是可通过荧光、光谱、光化学、生物化学、免疫学、电学、光学或化学手段检测的任何物质。这类标记是本领域熟知的,其实例包括但不限于,酶(例如,辣根过氧化物酶、碱性磷酸酶、 β -半乳糖苷酶、脲酶、葡萄糖氧化酶,等)、放射性核素(例如, ^3H 、 ^{125}I 、 ^{35}S 、 ^{14}C 或 ^{32}P)、荧光染料(例如,异硫氰酸荧光素(FITC)、荧光素、异硫氰酸四甲基罗丹明(TRITC)、藻红蛋白(PE)、德克萨斯红、罗丹明、量子点或花菁染料衍生物(例如Cy7、Alexa 750))、发光物质(例如化学发光物质,如吖啶酯类化合物)、磁珠(例如,**Dynabeads**[®])、测热标记物例如胶体金或有色玻璃或塑料(例如,聚苯乙烯、聚丙烯、乳胶,等)珠、以及用于结合上述标记物修饰的亲合素(例如,链霉亲和素)的生物素。教导该标记物的使用的专利包括,但不限于,美国专利3,817,837;3,850,752;3,939,350;3,996,345;4,277,437;4,275,149;及4,366,241(全部通过引用并入本文)。如上所述的可检测的标记可通过本领域已知的方法检测。例如,放射性标记可使用摄影胶片或闪烁计数器检测,荧光标记物可使用光检测器检测,以检测发射的光。酶

标记物一般通过给酶提供底物及检测通过酶对底物的作用产生的反应产物来检测,及测热标记物通过简单可视化着色标记物来检测。在某些实施方案中,此类标记能够适用于免疫学检测(例如,酶联免疫测定法、放射免疫测定法、荧光免疫测定法、化学发光免疫测定法等)。在某些实施方案中,可通过不同长度的接头(linker)将如上所述的可检测的标记连接至本发明的抗体或其抗原结合片段,以降低潜在的位阻。

[0056] 检测方法和试剂盒

[0057] 本发明的抗体或其抗原结合片段能够特异性结合转铁蛋白,从而可用于检测转铁蛋白在样品中的存在或其水平。

[0058] 因此,在另一个方面,本发明提供了一种试剂盒,其包括本发明的抗体或其抗原结合片段。在一个优选的实施方案中,所述试剂盒包括两种本发明的抗体。优选地,所述试剂盒包含作为包被抗体的第一单克隆抗体和作为酶标抗体的第二单克隆抗体,其中所述第二单克隆抗体包括可检测的标记。在另一个方面,提供了本发明的抗体或其抗原结合片段在制备试剂盒中的用途,所述试剂盒用于检测转铁蛋白在样品中的存在或其量。在优选的实施方案中,所述转铁蛋白是人转铁蛋白。

[0059] 在优选的实施方式中,本发明提供了一种人转铁蛋白双抗夹心酶联免疫检测试剂盒,其中,该试剂盒包括:酶联板、包被缓冲液、第一单克隆抗体、封闭液、酶标记的第二单克隆抗体、显色底物和终止液;优选地,所述第一单克隆抗体为MC-32,其包含:SEQ ID NO:3所示的VH CDR1、SEQ ID NO:4所示的VH CDR2、SEQ ID NO:5所示的VH CDR3;和SEQ ID NO:6所示的VL CDR1、SEQ ID NO:7所示的VL CDR2、SEQ ID NO:8所示的VL CDR3。所述第二单克隆抗体为MC-50,其包含:SEQ ID NO:11所示的VH CDR1、SEQ ID NO:12所示的VH CDR2、SEQ ID NO:13所示的VH CDR3;和SEQ ID NO:14所示的VL CDR1、SEQ ID NO:15所示的VL CDR2、SEQ ID NO:16所示的VL CDR3。

[0060] 为了提高定量检测的准确性并提高试剂盒的易用性,优选地,该试剂盒还含有人转铁蛋白标准品。

[0061] 其中,所述包被缓冲液可以为常规的ELISA包被缓冲液,例如pH9.6的0.05M碳酸盐缓冲液,可以如下制备:碳酸钠1.59g+碳酸氢钠2.93g,溶解在1L去离子水里。所述封闭液可以为常规的ELISA封闭液,例如可以如下制备:氯化钾,0.2g;磷酸二氢钾,0.2g;氯化钠,8g;七水磷酸二氢钠,2.16g;0.1%的Tween-20;1%牛血清白蛋白(BSA),去离子水1L。

[0062] 其中,对第二单克隆抗体的酶标记可以为本领域常规的酶标记方案,例如,可以按照HRP标记试剂盒(Cat AZK001)的说明书中的方法进行酶标记。优选地,酶标记的第二单克隆抗体的标记酶为辣根过氧化物酶或碱性磷酸酶,当标记酶为辣根过氧化物酶时,所述显色底物包括显色底物A和显色底物B,所述显色底物A为过氧化氢或过氧化脲,所述显色底物B为邻苯二胺或四甲基联苯胺,所述终止液为1-2mol/L的硫酸或盐酸缓冲液;当标记酶为碱性磷酸酶时,所述显色底物为3-(2-螺旋金刚烷-4-甲氧基-4-甲基-4-(3-磷酸氧基)-苯基-1,2-二氧乙烷(AMPPD),所述终止液为1-2mol/L氢氧化钠。

[0063] 本发明的试剂盒的使用方法可以包括:将第一单克隆抗体(人转铁蛋白单克隆抗体MC-32)用包被缓冲液稀释后包被于酶联板上,然后用包被缓冲液洗去多余的第一单克隆抗体;接着用封闭液封闭经包被的酶联板,然后用包被缓冲液洗板以洗去多余的封闭液;接着加入待检测样品,然后用包被缓冲液洗板以洗去多余的待检测样品;接着加入酶标记的

第二单克隆抗体(人转铁蛋白单克隆抗体MC-50),然后用包被缓冲液洗板以洗去多余的酶标记的第二单克隆抗体;接着加入显色底物显色,然后加终止液终止反应;测定OD值;若待测样品中含有人转铁蛋白,则会有显色反应,若不含人转铁蛋白,则呈阴性。可以使用梯度稀释后的人转铁蛋白标准品替代被检测样品,以获得标准曲线,然后通过与标准曲线比对,定量检测人转铁蛋白。

[0064] 本发明的试剂盒的可能原理包括:第一单克隆抗体首先结合至酶联板上,而后封闭液封闭酶联板上的空白位点,接着待检测样品若含有人转铁蛋白,则人转铁蛋白与第一单克隆抗体结合,然后酶标记的第二单克隆抗体与人转铁蛋白结合,形成第一单克隆抗体-人转铁蛋白-酶标记的第二单克隆抗体复合体,而后通过显色底物显示出复合体中酶的存在,从而显示出人转铁蛋白的存在,由此进行人转铁蛋白的定性和定量分析。

[0065] 其中,用于构建本发明的试剂盒的第一单克隆抗体和第二单克隆抗体分别针对人转铁蛋白的不同抗原表位并且具有配对检测效果。

[0066] 术语定义

[0067] 在本发明中,除非另有说明,否则本文中使用的科学和技术名词具有本领域技术人员所通常理解的含义。并且,本文中所用的细胞培养、生物化学、核酸化学、免疫学实验室等操作步骤均为相应领域内广泛使用的常规步骤。同时,为了更好地理解本发明,下面提供相关术语的定义和解释。

[0068] 如本文中所使用的,术语“抗体”是指,通常由两对多肽链(每对具有一条轻链(LC)和一条重链(HC))组成的免疫球蛋白分子。抗体轻链可分类为 κ (kappa) 和 λ (lambda) 轻链。重链可分类为 μ 、 δ 、 γ 、 α 或 ϵ ,并且分别将抗体的同种型定义为IgM、IgD、IgG、IgA和IgE。在轻链和重链内,可变区和恒定区通过大约12或更多个氨基酸的“J”区连接,重链还包含大约3个或更多个氨基酸的“D”区。各重链由重链可变区(VH)和重链恒定区(CH)组成。重链恒定区由3个结构域(CH1、CH2和CH3)组成。各轻链由轻链可变区(VL)和轻链恒定区(CL)组成。轻链恒定区由一个结构域CL组成。恒定结构域不直接参与抗体与抗原的结合,但展现出多种效应子功能,如可介导免疫球蛋白与宿主组织或因子,包括免疫系统的各种细胞(例如,效应细胞)和经典补系统的第一组分(C1q)的结合。VH和VL区还可被细分为具有高变性的区域(称为互补决定区(CDR)),其间散布有较保守的称为构架区(FR)的区域。各 V_H 和 V_L 由按下列顺序:FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4从氨基末端至羧基末端排列的3个CDR和4个FR组成。各重链/轻链对的可变区(VH和VL)分别形成抗原结合部位。氨基酸在各区域或结构域的分配可遵循Kabat, Sequences of Proteins of Immunological Interest (National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1987 and 1991)), 或Chothia&Lesk (1987) J. Mol. Biol. 196:901-917; Chothia等人(1989) Nature 342:878-883的定义。

[0069] 如本文中所使用的,术语“互补决定区”或“CDR”是指抗体可变区中负责抗原结合的氨基酸残基。在重链和轻链的可变区中各含有三个CDR,命名为CDR1、CDR2和CDR3。这些CDR的精确边界可根据本领域已知的各种编号系统进行定义,例如可按照Kabat编号系统(Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md., 1991)、Chothia编号系统(Chothia&Lesk (1987) J. Mol. Biol. 196:901-917; Chothia等人(1989) Nature 342:878-883)或IMGT编号系统(Lefranc et al., Dev. Comparat. Immunol. 27:55-77, 2003)中的定

义。对于给定的抗体,本领域技术人员将容易地鉴别各编号系统所定义的CDR。并且,不同编号系统之间的对应关系是本领域技术人员熟知的(例如,可参见Lefranc et al., Dev.Comparat.Immunol.27:55-77,2003)。

[0070] 在本发明中,本发明的抗体或其抗原结合片段含有的CDR可根据本领域已知的各种编号系统确定。在某些实施方案中,本发明的抗体或其抗原结合片段含有的CDR优选地通过Kabat、Chothia或IMGT编号系统确定。在某些实施方案中,本发明的抗体或其抗原结合片段含有的CDR优选地通过Kabat编号系统确定。

[0071] 如本文中所使用的,术语“构架区”或“FR”残基是指,抗体可变区中除了如上定义的CDR残基以外的那些氨基酸残基。

[0072] 术语“抗体”不受任何特定的产生抗体的方法限制。例如,其包括,重组抗体、单克隆抗体和多克隆抗体。抗体可以是不同同种型的抗体,例如,IgG(例如,IgG1,IgG2,IgG3或IgG4亚型),IgA1,IgA2,IgD,IgE或IgM抗体。

[0073] 如本文中所使用的,术语抗体的“抗原结合片段”是指包含全长抗体的片段的多肽,其保持特异性结合全长抗体所结合的相同抗原的能力,和/或与全长抗体竞争对抗原的特异性结合,其也被称为“抗原结合部分”。通常参见,Fundamental Immunology,Ch.7 (Paul,W.,ed.,第2版,Raven Press,N.Y.(1989),其以其全文通过引用合并入本文,用于所有目的。可通过重组DNA技术或通过完整抗体的酶促或化学断裂产生抗体的抗原结合片段。抗原结合片段的非限制性实例包括Fab、Fab'、F(ab')₂、Fd、Fv、互补决定区(CDR)片段、scFv、双抗体(diabody)、单域抗体(single domain antibody)、嵌合抗体、线性抗体(linear antibody)、纳米抗体(技术来自Domantis)、probody和这样的多肽,其包含足以赋予多肽特异性抗原结合能力的抗体的至少一部分。工程改造的抗体变体综述于Holliger等,2005;Nat Biotechnol,23:1126-1136中。

[0074] 如本文中所使用的,术语“全长抗体”意指,由两条“全长重链”和两条“全长轻链”组成的抗体。其中,“全长重链”是指这样的多肽链,其在N端到C端的方向上由重链可变区(VH)、重链恒定区CH1结构域、铰链区(HR)、重链恒定区CH2结构域、重链恒定区CH3结构域组成;并且,当所述全长抗体为IgE同种型时,任选地还包括重链恒定区CH4结构域。优选地,“全长重链”是在N端到C端方向上由VH、CH1、HR、CH2和CH3组成的多肽链。“全长轻链”是在N端到C端方向上由轻链可变区(VL)和轻链恒定区(CL)组成的多肽链。两对全长抗体链通过在CL和CH1之间的二硫键和两条全长重链的HR之间的二硫键连接在一起。本发明的全长抗体可以来自单一物种,例如人;也可以是嵌合抗体或人源化抗体。本发明的全长抗体包含分别由VH和VL对形成的两个抗原结合部位,这两个抗原结合部位特异性识别/结合相同的抗原。

[0075] 如本文中所使用的,术语“Fd”意指由VH和CH1结构域组成的抗体片段;术语“dAb片段”意指由VH结构域组成的抗体片段(Ward等人,Nature 341:544-546(1989));术语“Fab片段”意指由VL、VH、CL和CH1结构域组成的抗体片段;术语“F(ab')₂片段”意指包含通过铰链区上的二硫桥连接的两个Fab片段的抗体片段;术语“Fab'片段”意指还原连接F(ab')₂片段中两个重链片段的二硫键后所获片段,由一条完整的轻链和重链的Fd片段(由VH和CH1结构域组成)组成。

[0076] 如本文中所使用的,术语“Fv”意指由抗体的单臂的VL和VH结构域组成的抗体片

段。Fv片段通常被认为是,能形成完整的抗原结合位点的最小抗体片段。一般认为,六个CDR赋予抗体的抗原结合特异性。然而,即便是一个可变区(例如Fd片段,其仅仅含有三个对抗原特异的CDR)也能够识别并结合抗原,尽管其亲和力可能低于完整的结合位点。

[0077] 如本文中所使用的,术语“Fc”意指,由抗体的第一重链的第二、第三恒定区与第二重链的第二、第三恒定区经二硫键结合而形成的抗体片段。抗体的Fc片段具有多种不同的功能,但不参与抗原的结合。

[0078] 如本文中所使用的,术语“scFv”是指,包含VL和VH结构域的单个多肽链,其中所述VL和VH通过接头(linker)相连(参见,例如,Bird等人,Science 242:423-426(1988);Huston等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 85:5879-5883(1988);和Pluckthun,The Pharmacology of Monoclonal Antibodies,第113卷,Roseburg和Moore编,Springer-Verlag,纽约,第269-315页(1994))。此类scFv分子可具有一般结构:NH₂-VL-接头-VH-COOH或NH₂-VH-接头-VL-COOH。合适的现有技术接头由重复的GGGGS氨基酸序列或其变体组成。例如,可使用具有氨基酸序列(GGGGS)₄的接头,但也可使用其变体(Holliger等人(1993),Proc.Natl.Acad.Sci.USA 90:6444-6448)。可用于本发明的其他接头由Alfthan等人(1995),Protein Eng.8:725-731,Choi等人(2001),Eur.J.Immunol.31:94-106,Hu等人(1996),Cancer Res.56:3055-3061,Kipriyanov等人(1999),J.Mol.Biol.293:41-56和Roovers等人(2001),Cancer Immunol.描述。在一些情况下,scFv的VH与VL之间还可以存在二硫键。

[0079] 如本文中所使用的,术语“双抗体”意指,其VH和VL结构域在单个多肽链上表达,但使用太短的连接体以致不允许在相同链的两个结构域之间配对,从而迫使结构域与另一条链的互补结构域配对并且产生两个抗原结合部位(参见,例如,Holliger P.等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 90:6444-6448(1993),和Poljak R.J.等人,Structure 2:1121-1123(1994))。

[0080] 如本文中所使用的,术语“单域抗体(single-domain antibody,sdAb)”具有本领域技术人员通常理解的含义,其是指由单个单体可变抗体结构域(例如单个重链可变区)所组成的抗体片段,其保持特异性结合全长抗体所结合的共同抗原的能力。单域抗体也称为纳米抗体(nanobody)。单域抗体可以通过将常规IgG的可变结构域

[0081] 上述各个抗体片段均保持了特异性结合全长抗体所结合的共同抗原的能力,和/或与全长抗体竞争对抗原的特异性结合。

[0082] 可使用本领域技术人员已知的常规技术(例如,重组DNA技术或酶促或化学断裂法)从给定的抗体(例如本发明提供的抗体)获得抗体的抗原结合片段(例如,上述抗体片段),并且以与用于完整抗体的方式相同的方式就特异性筛选抗体的抗原结合片段。

[0083] 在本文中,除非上下文明确指出,否则当提及术语“抗体”时,其不仅包括完整抗体,而且包括抗体的抗原结合片段。

[0084] 如本文中所使用的,术语“单克隆抗体”、“单抗”、“mAb”具有相同的含义且可互换使用可互换,其是指,来自一群高度同源的抗体分子中的一个抗体或抗体的一个片段,也即,除可能自发出现的自然突变外,一群完全相同的抗体分子。单抗对抗原上的单一表位具有高特异性。多克隆抗体是相对于单克隆抗体而言的,其通常包含至少2种或更多种的不同抗体,这些不同的抗体通常识别抗原上的不同表位。此外,修饰语“单克隆”仅表明该抗体的

特征为从高度同源的抗体群中获得,不能理解为需要通过任何特定方法来制备所述抗体。

[0085] 本发明的单克隆抗体可以通过多种技术进行制备,例如杂交瘤技术(参见,例如Kohler等人.Nature,256:495,1975),重组DNA技术(参见,例如美国专利申请4,816,567),或噬菌体抗体库技术(参见,例如Clackson等.Nature352:624-628,1991,或Marks等.J.Mol.Biol.222:581-597,1991)。

[0086] 抗体可通过公知的技术,例如使用蛋白A或蛋白G的亲合层析进行纯化。随后或作为替代,可将特异性抗原(该抗体识别的靶分子)或其抗原表位固定在柱上,并通过免疫亲和层析法来纯化免疫特异性抗体。免疫球蛋白的纯化可参考例如D.Wilkinson(The Scientist,published by The Scientist,Inc.,Philadelphia Pa.,Vol.14,No.8 (Apr.17,2000),pp.25-28)。

[0087] 如本文中所使用的,术语“嵌合抗体(Chimeric antibody)”是指,这样的抗体,其轻链或/和重链的一部分源自一个抗体(其可以源自某一特定物种或属于某一特定抗体类或亚类),且轻链或/和重链的另一部分源自另一个抗体(其可以源自相同或不同的物种或属于相同或不同的抗体类或亚类),但无论如何,其仍保留对目标抗原的结合活性(U.S.P 4,816,567to Cabilly et al.;Morrison et al.,Proc.Natl.Acad.Sci.USA,81:6851-6855 (1984))。例如,术语“嵌合抗体”可包括这样的抗体(例如人鼠嵌合抗体),其中抗体的重链和轻链可变区来自第一抗体(例如鼠源抗体),而抗体的重链和轻链可变区来自第二抗体(例如人抗体)。

[0088] 如本文中所使用的,术语“人源化抗体”是指,经基因工程改造的非人源抗体,其氨基酸序列经修饰以提高与人源抗体的序列的同源性。通常而言,人源化抗体的全部或部分CDR区来自于非人源抗体(供体抗体),全部或部分的非CDR区(例如,可变区FR和/或恒定区)来自于人源免疫球蛋白(受体抗体)。人源化抗体通常保留了供体抗体的预期性质,包括但不限于,抗原特异性、亲和性、反应性等。供体抗体可以是有预期性质(例如,抗原特异性、亲和性、反应性等)的小鼠、大鼠、兔或非人灵长类动物(例如,食蟹猴)抗体。

[0089] 本发明的嵌合抗体或人源化抗体可以根据上述制备的鼠单克隆抗体的序列进行制备。编码重链和轻链的DNA可以从目标鼠杂交瘤中获得,并且使用标准分子生物学技术进行工程改造以包含非鼠(例如人)免疫球蛋白序列。

[0090] 为制备嵌合抗体,可使用本领域已知的方法将鼠免疫球蛋白可变区连接至人免疫球蛋白恒定区(参见例如Cabilly等人的美国专利No.4,816,567)。例如,将编码VH的DNA可操作的连接至编码重链恒定区的另一DNA分子以获得全长重链基因。人重链恒定区基因的序列是本领域已知的(参见例如Kabat,E.A.等人(1991)Sequences of Proteins of Immunological Interest,Fifth Edition,U.S.Department of Health and Human Services,NIH Publication No.91-3242),包含这些区的DNA片段可以通过标准PCR扩增获得。重链恒定区可以是IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA、IgE、IgM或IgD恒定区,但是通常优选为IgG1或IgG4恒定区。例如,将编码VL的DNA可操作的连接至编码轻链恒定区CL的另一DNA分子以获得全长轻链基因(以及Fab轻链基因)。人轻链恒定区基因的序列是本领域已知的(参见例如Kabat,E.A.等人(1991)Sequences of Proteins of Immunological Interest,Fifth Edition,U.S.Department of Health and Human Services,NIH Publication No.91-3242),包含这些区的DNA片段可以通过标准PCR扩增获得。轻链恒定区可以是 κ 或 λ 恒

定区,但通常优选为 κ 恒定区。

[0091] 为制备人源化抗体,可以使用本领域已知的方法将鼠CDR区插入人源框架序列(参见Winter的美国专利No.5,225,539;Queen等人的美国专利Nos.5,530,101;5,585,089;5,693,762和6,180,370;以及Lo,Benny,K.C.,editor,in *Antibody Engineering:Methods and Protocols*,volume 248,Humana Press,New Jersey,2004)。或者,还可以利用转基因动物,其能够在免疫后不产生内源性免疫球蛋白、并且能够产生完整人抗体库。例如,已有报道在嵌合和种系突变小鼠中抗体重链连接区(JH)基因的纯合缺失可以完全抑制了内源性抗体产生,然后将人种系免疫球蛋白基因阵列转移到所述种系突变小鼠中将导致该小鼠在遇到抗原刺激时产生人抗体(参见例如,Jakobovits等,1993,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 90:2551;Jakobovits等,1993,Nature362:255-258;Bruggermann等,1993,Year in Immunology 7:33;和Duchosal等,1992,Nature 355:258)。上述转基因动物的非限制性实例包括,HuMAb小鼠(Medarex,Inc.),其含有编码未重排的人重链(μ 和 γ)和 κ 轻链免疫球蛋白序列的人免疫球蛋白基因微型基因座(miniloci),加之使内源 μ 和 κ 链基因座失活的靶向突变(参见例如Lonberg等人(1994)Nature 368(6474):856-859);或携带人重链转基因和人轻链转染色体的“KM小鼠TM”(参见专利申请W002/43478)。其他抗体人源化改造的方法还包括噬菌体展示技术(Hoogenboom等,1991,J.Mol.Biol.227:381;Marks等,J.Mol.Biol.1991,222:581-597;Vaughan等,1996,Nature Biotech 14:309)。

[0092] 如本文中所使用的,术语“特异性结合”是指,两分子间的非随机的结合反应,如抗体和其所针对的抗原之间的反应。特异性结合相互作用的强度或亲和力可以该相互作用的平衡解离常数(K_D)表示。在本发明中,术语“ K_D ”是指特定抗体-抗原相互作用的解离平衡常数,其用于描述抗体与抗原之间的结合亲和力。平衡解离常数越小,抗体-抗原结合越紧密,抗体与抗原之间的亲和力越高。在某些实施方式中,特异性结合某抗原的抗体(或对某抗原具有特异性的抗体)是指,抗体以小于约 10^{-9} M,例如小于约 10^{-9} M、 10^{-10} M、 10^{-11} M或 10^{-12} M或更小的亲和力(K_D)结合该抗原。两分子间的特异性结合性质可使用本领域公知的方法进行测定,例如使用表面等离子体共振术(SPR)在BIAcore仪中测定。

[0093] 如本文中所使用的,术语“同一性”用于指两个多肽之间或两个核酸之间序列的匹配情况。当两个进行比较的序列中的某个位置都被相同的碱基或氨基酸单体亚单元占据时(例如,两个DNA分子的每一个中的某个位置都被腺嘌呤占据,或两个多肽的每一个中的某个位置都被赖氨酸占据),那么各分子在该位置上是同一的。两个序列之间的“百分数同一性”是由这两个序列共有的匹配位置数目除以进行比较的位置数目 $\times 100$ 的函数。例如,如果两个序列的10个位置中有6个匹配,那么这两个序列具有60%的同一性。例如,DNA序列CTGACT和CAGGTT共有50%的同一性(总共6个位置中有3个位置匹配)。通常,在将两个序列比对以产生最大同一性时进行比较。这样的比对可通过使用,例如,可通过计算机程序例如Align程序(DNASTAR,Inc.)方便地进行的Needleman等人(1970)J.Mol.Biol.48:443-453的方法来实现。还可使用已整合入ALIGN程序(版本2.0)的E.Meyers和W.Miller(Comput.Appl.Biosci.,4:11-17(1988))的算法,使用PAM120权重残基表(weight residue table)、12的缺口长度罚分和4的缺口罚分来测定两个氨基酸序列之间的百分数同一性。此外,可使用已整合入GCG软件包(可在www.gcg.com上获得)的GAP程序中的Needleman和Wunsch(J.Mol.Biol.48:444-453(1970))算法,使用Blossum 62矩阵或PAM250矩阵以及16、14、12、10、8、6

或4的缺口权重 (gap weight) 和1、2、3、4、5或6的长度权重来测定两个氨基酸序列之间的百分数同一性。

[0094] 如本文中所使用的,术语“保守置换”意指不会不利地影响或改变包含氨基酸序列的蛋白/多肽的预期性质的氨基酸置换。例如,可通过本领域内已知的标准技术例如定点诱变和PCR介导的诱变引入保守置换。保守氨基酸置换包括用具有相似侧链的氨基酸残基替代氨基酸残基的置换,例如用在物理学上或功能上与相应的氨基酸残基相似(例如具有相似大小、形状、电荷、化学性质,包括形成共价键或氢键的能力等)的残基进行的置换。已在本领域内定义了具有相似侧链的氨基酸残基的家族。这些家族包括具有碱性侧链(例如,赖氨酸、精氨酸和组氨酸)、酸性侧链(例如天冬氨酸、谷氨酸)、不带电荷的极性侧链(例如甘氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺、丝氨酸、苏氨酸、酪氨酸、半胱氨酸、色氨酸)、非极性侧链(例如丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、脯氨酸、苯丙氨酸、甲硫氨酸)、 β 分支侧链(例如,苏氨酸、缬氨酸、异亮氨酸)和芳香族侧链(例如,酪氨酸、苯丙氨酸、色氨酸、组氨酸)的氨基酸。因此,优选用来自相同侧链家族的另一个氨基酸残基替代相应的氨基酸残基。鉴定氨基酸保守置换的方法在本领域内是熟知的(参见,例如,Brummell等人,Biochem.32:1180-1187 (1993);Kobayashi等人Protein Eng.12(10):879-884 (1999);和Burks等人Proc.Natl Acad.Sci USA 94:412-417 (1997),其通过引用并入本文)。

[0095] 本文涉及的二十个常规氨基酸的编写遵循常规用法。参见例如,Immunology-A Synthesis (2nd Edition,E.S.Golub and D.R.Gren,Eds.,Sinauer Associates,Sunderland,Mass.(1991)),其以引用的方式并入本文中。在本发明中,术语“多肽”和“蛋白质”具有相同的含义且可互换使用。并且在本发明中,氨基酸通常用本领域公知的单字母和三字母缩写来表示。例如,丙氨酸可用A或Ala表示。

[0096] 本发明的有益效果

[0097] 通过使用本发明的包被抗体和标记抗体的特定组合,本发明能够通过双抗夹心酶联免疫检测方法,对人转铁蛋白的检测取得20pg/mL的灵敏度,并具有较高的特异性。

[0098] 下面将结合附图和实施例对本发明的实施方案进行详细描述,但是本领域技术人员将理解,下列附图和实施例仅用于说明本发明,而不是对本发明的范围的限定。根据附图和优选实施方案的下列详细描述,本发明的各种目的和有利方面对于本领域技术人员来说将变得可实施。

附图说明

[0099] 图1为分离纯化后的人天然转铁蛋白SDS-PAGE电泳并进行考马斯亮蓝染色的结果。KDa,千道尔顿;M,蛋白电泳Marker;TRF,转铁蛋白。

[0100] 图2显示MC-32和MC-50抗体在人血浆样品Western blot检测中特异性结合人天然转铁蛋白且无其他杂带存在,说明MC-32和MC-50在检测人转铁蛋白方面具有非常高的特异性。nTRF/TRF,人天然转铁蛋白;1/2,不同人来源血浆。

[0101] 图3显示MC-32和MC-50抗体在人血浆样品Co-IP检测中特异性拉下人天然转铁蛋白且无其他杂带存在,说明MC-32和MC-50在Co-IP检测方面具有非常高的特异性。

[0102] 图4以MC-32/MC-50为包被抗体以MC-50/MC-32为酶标抗体检测抗体与TRF结合情况。mc-32-mc-50,MC-32为包被抗体、MC-50为酶标抗体;mc-50-mc-32,MC-50为包被抗体、

MC-32为酶标抗体;control,MC-32为包被抗体、MC-50为酶标抗体但不加TRF。

[0103] 序列信息

[0104] 本发明涉及的部分序列的信息提供于下面的表1中。

[0105] 表1:序列的描述

[0106]	SEQ ID NO	描述
	1	MC-32 重链可变区氨基酸序列
[0107]	2	MC-32 轻链可变区氨基酸序列
	3	MC-32 HCDR1 氨基酸序列
	4	MC-32 HCDR2 氨基酸序列
	5	MC-32 HCDR3 氨基酸序列
	6	MC-32 LCDR1 氨基酸序列
	7	MC-32 LCDR2 氨基酸序列
	8	MC-32 LCDR3 氨基酸序列
	9	MC-50 重链可变区氨基酸序列
	10	MC-50 轻链可变区氨基酸序列
	11	MC-50 HCDR1 氨基酸序列
	12	MC-50 HCDR2 氨基酸序列
	13	MC-50 HCDR3 氨基酸序列
	14	MC-50 LCDR1 氨基酸序列
	15	MC-50 LCDR2 氨基酸序列
	16	MC-50 LCDR3 氨基酸序列
	17	MC-32 重链可变区核苷酸序列
	18	MC-32 轻链可变区核苷酸序列
	19	MC-50 重链可变区核苷酸序列
	20	MC-50 轻链可变区核苷酸序列

具体实施方式

[0108] 现参照下列意在举例说明本发明(而非限定本发明)的实施例来描述本发明。

[0109] 除非特别指明,本发明中所使用的分子生物学实验方法和免疫检测法,基本上参照J.Sambrook等人,分子克隆:实验室手册,第2版,冷泉港实验室出版社,1989,以及F.M.Ausubel等人,精编分子生物学实验指南,第3版,John Wiley&Sons,Inc.,1995中所述的方法进行;限制性内切酶的使用依照产品制造商推荐的条件。本领域技术人员知晓,实施例以举例方式描述本发明,且不意欲限制本发明所要求保护的范围。

[0110] 实施例1:抗原制备和抗转铁蛋白鼠源抗体的产生

[0111] 抗原制备

[0112] 人血浆(昆明市血液中心)首先通过Protein G Aagrose (P2006,碧云天)除掉血浆中抗体。将上述样品用pH 8.0 20mM Tris-HCl缓冲液稀释5倍,用0.22 μ m滤膜过滤,再上样于AKTA Resource Q柱,用0~1M NaCl的线性梯度进行洗脱,流速为1ml/min,在280nm波长下检测并收集各洗脱峰,冻干,用购买的TRF抗体(ab82411,Abcam)进行western blot检测和考马斯亮蓝染色并确定目的峰。发现目的峰中还有其他蛋白,目的峰按以上条件进行再次分离纯化,再次进行western blot检测和考马斯亮蓝染色最终得到纯度大于95%TRF,结果见图1。

[0113] 免疫小鼠、细胞融合及阳性细胞筛选

[0114] 利用上一步制备的TRF作为免疫原分别进行免疫,共免疫Ba1b/c小鼠5只。每只均完成至少4次免疫与3次采血检测,在经第一、二、三次采血检测后选择效价较高符合实验要求的目标小鼠进行融合。共从5只小鼠中优选出2只小鼠进行融合。利用SP2/0小鼠骨髓瘤细胞与优选小鼠的脾细胞进行细胞融合,融合后经培养、观察、检测及阴阳性对照试验,获得符合实验要求的杂交瘤细胞,并对其继续培养与选择。

[0115] 腹水制备和抗体质量检测

[0116] 在接种杂交瘤细胞前,先给小鼠腹腔注射液体石蜡0.5mL/只,一周后腹腔注射采用上述方法制备的杂交瘤细胞悬液 2×10^6 /mL,每只0.5mL。在接种杂交瘤细胞后约7~10d后,无菌条件下采集腹部明显膨胀小鼠腹水,10000g离心10min,取上清并56℃灭活30min。以ELISA法检测其TRF抗体效价,具体方法同文献^[13];选出效价比较高的抗体并通过Western blot和Co-IP验证抗体在人血浆中的特异性,最终得到两种优选抗体MC-32和MC-50。

[0117] 实施例2:抗转铁蛋白抗体的序列测定

[0118] 抗人转铁蛋白鼠源抗体可变区序列的测定

[0119] 首先,通过TRIzol法提取分泌TRF抗体杂交瘤细胞(MC-32和MC-50) RNA,具体操作参照TRIzol reagent kit说明书;其次,通过RT-PCR扩增获得TRF抗体可变区序列。使用Super SCRIP cDNA试剂盒合成cDNA第1条链合成(具体操作见说明书),通过RT-PCR扩增获得TRF抗体轻链和重链可变区序列。PCR引物由昆明硕擎生物科技有限公司合成,重链可变区引物为5'-GCCTGCGGCCGCGAGAGGTTTTAAGGACTCACCTGAGGAGACTGTGAGAGTG-3'和5'-GGGGTCGACCTCACCATGG[A/G]ATG[C/G]AGCTG[T/G]GT[C/A]AT[C/G]CTCTT-3',轻链可变区引物为5'-GGCCTGCGGCCGCTTTAAATTCTACTCACGTTT[G/T]ATTTCCAG CTT GGT-3'和5'-GGGGTCGACCTCACCATGGAGACAGACACACTCCTGCTA-3';最终,通过轻链和重链可变区序列pGEM-T载体克隆和测序得到可变区单核苷酸序列。最终结果得到MC-32重链可变区序列Seq ID NO:17, MC-32轻链可变区序列Seq ID NO:18;MC-50重链可变区序列Seq ID NO:19,MC-35轻链可变区序列Seq ID NO:20。

[0120] 进一步,还使用Immunoglobulin BLAST(IgBlast) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/igblast/>)在线分析方法,确定了两种单抗的CDR序列(见表1)。

[0121] 实施例3:单克隆抗体辣根过氧化物酶HRP标记

[0122] 实施例1中所得抗体通过抗体辣根过氧化物酶HRP标记试剂盒(Cat AZK001)进行标记,具体步骤如下:

- [0123] 1) 在每10ul抗体样品中加入1ul的LL-Modifier修饰试剂,轻轻混匀。
- [0124] 2) 打开Ligtening-Link混合物管盖,吸取步骤1已混好的抗体样品至管内冻干混合物中,用吸液器轻轻吸打1-2次,使粉末完全溶解。
- [0125] 3) 盖上玻璃瓶盖,室温(20-25℃)避光孵育3小时,或过夜。
- [0126] 4) 孵育3小时后,按每10ul抗体的量加入1ul LL-淬灭试剂,静置30分钟后即可使用,4℃可短期保存。
- [0127] 实施例4:抗转铁蛋白抗体的抗原结合活性评价
- [0128] i) Western blot法检测单克隆抗体对人血浆转铁蛋白特异性
- [0129] 运用单克隆抗体检测人血浆中转铁蛋白,参考Burnette, WN等人的western blot方法(参见,Anal Biochem.112:195-203. (1981))并作一定改动,详细步骤如下:
- [0130] 1) 电泳:取来自两位正常人血浆各10μl跑十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-GAGE)。电泳采用恒压电泳法,条件如下:浓缩胶90V,分离胶120V。
- [0131] 2) 转膜:电泳结束后取出凝胶块,用转膜缓冲液冲洗后放置在提前用甲醇处理好的PVDF膜上,再在凝胶上放置3层滤纸,即制作滤纸-胶-膜-滤纸的“三明治结构”,整个过程均保持湿润状态,注意避免产生气泡。装好电转移仪,选定200mA电流转1.5小时。
- [0132] 3) 封闭:转膜结束后用TBST缓冲液洗涤5分钟,再用封闭液室温封闭PVDF膜1h。
- [0133] 4) 一抗孵育:封闭结束后用TBST缓冲液洗3次PVDF膜,再将膜放入提前准备好的本发明的单克隆抗体5000倍稀释液中,4℃孵育过夜。
- [0134] 5) 二抗孵育:一抗孵育结束后,用TBST缓冲液洗3次,每次5分钟。然后将膜放置在提前准备好的HRP标记的山羊抗鼠IgG二抗(3000倍稀释,CST,USA)稀释液中,37℃孵育1h。
- [0135] 6) 显色:TBST缓冲液洗膜三次后,使用化学发光法进行显色反应(PA112,天根生化科技(北京)有限公司)。
- [0136] 其中,上述所用到的主要溶液的配方如下:
- [0137] 1、电泳液缓冲液(25mmol/L Tris,0.25mol/L甘氨酸,0.1%SDS)
- [0138] Tris:3.03g
- [0139] 甘氨酸:18.77g
- [0140] SDS:1g
- [0141] 蒸馏水:1000ml
- [0142] 2、转膜缓冲液(48mmol/L Tris,39mmol/L甘氨酸,0.037%SDS,20%甲醇)
- [0143] 甘氨酸:2.9g
- [0144] Tris:5.8g
- [0145] SDS:0.37g
- [0146] 甲醇:200ml
- [0147] 蒸馏水:1000ml
- [0148] 3、TBS缓冲液(100mmol/L Tris • HCl pH7.5,150mmol/L NaCl)
- [0149] 1mol/LTris • HCl (pH7.5):10ml
- [0150] NaCl:8.8g
- [0151] 蒸馏水:1000ml
- [0152] 4、TBST缓冲液(含0.05%Tween20的TBS缓冲液)

[0153] 20%Tween20:1.65ml

[0154] TBS:700ml

[0155] 5、封闭液(含5%脱脂奶粉的TBST缓冲液)

[0156] 脱脂奶粉(Sigma,USA):5g

[0157] TBST:100ml

[0158] ii) Co-IP法检测单克隆抗体对人血浆转铁蛋白特异性

[0159] 1) 取正常人血浆两份每份20μl,各加入1μg单克隆抗体MC-32和MC-50,4℃过夜孵育;每份加入20μl protein A agarose(碧云天,中国),4℃孵育3小时,用PBS(氯化钾,0.2g;磷酸二氢钾,0.2g;氯化钠,8g;7水磷酸二氢钠,2.16g,去离子水1L。)洗涤5次,加20μl SDS-PAGE电泳缓冲液(Biosharp,中国)并煮沸10分钟

[0160] 2) 取上述样品10μl跑十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-GAGE)和western blot检测。具体方法同该实施例中i)步骤。

[0161] Western blot检测结果和Co-IP检测结果显示MC-32和MC-50抗体在人血浆样品中特异性结合人天然转铁蛋白且无其他杂带存在(见图2和图3),说明MC-32和MC-50在检测人转铁蛋白方面具有非常高的特异性。

[0162] 实施例5:抗转铁蛋白抗体MC-32和MC-50与人转铁蛋白不同抗原表位结合

[0163] 通过竞争性结合实验证明MC-32和MC-50是否与人转铁蛋白不同抗原表位结合。包被入转铁蛋白于96孔板内并运用MC-32或MC-50测定与人转铁蛋白的竞争性结合。具体步骤如下:

[0164] 1) 包被:人转铁蛋白(5μg/ml)用包被液稀释后按照每孔100μl的量加入96孔板且空白孔加100μl包被液,4℃包被过夜。

[0165] 2) 洗涤:第二天倒掉板孔内包被液,用洗涤液洗涤三次,每孔250μl,每次3-5分钟,尽量拍干。

[0166] 3) 封闭:封闭液每孔200μl,37℃1h。之后洗涤三次,拍干。

[0167] 4) 阳性孔加入100μl MC-32或MC-50(5μg/ml),阴性孔和空白孔则加入100μl封闭液,37℃1h。之后洗涤三次,拍干。

[0168] 5) 阳性孔、阴性孔和空白孔加入100μl辣根过氧化物酶(HRP)标记MC-50或MC-32(5μg/ml),37℃避光温箱孵育1h。之后洗涤三次,拍干。

[0169] 6) 显色:洗涤后每孔100μl加入显色液,37℃避光孵育15-30分钟。

[0170] 7) 终止:终止液每孔100μl,用酶标仪进行450/630nm双波长读值。

[0171] 结果见下表,当在包被于转铁蛋白的孔中加入MC-32再加入HRP标记的MC-50或加入MC-50再加入HRP标记的MC-32的情况下,阳性孔OD值(3.621和3.712)明显比阴性孔高(0.103和0.087)。该结果说明MC-32和MC-50与人转铁蛋白不同抗原表位结合。

[0172]

MC-32+ MC-50(HRP)		MC-50 +MC-32(HRP)	
空白	0.021	空白	0.019
阴性	0.103	阴性	0.087
阳性	3.621	阳性	3.712

[0173] 其中,上述所用到的溶液配方如下:

[0174] 1、包被液:pH 9.6的0.05M碳酸盐缓冲液;碳酸钠1.59g+碳酸氢钠2.93g,溶解至1L去离子水里。

[0175] 2、洗涤液:细胞用磷酸盐缓冲液(PBS)+0.1%的Tween-20。注:细胞用PBS:氯化钾,0.2g;磷酸二氢钾,0.2g;氯化钠,8g;12水磷酸二氢钠,2.16g,去离子水1L。

[0176] 3、封闭液(抗体稀释液):洗涤液每100ml+牛血清白蛋白(BSA)1g。

[0177] 4、显色液:3,3',5,5'-四甲基联苯胺(TMB)单组份显色液(Solarbio,北京)。

[0178] 5、终止液:2mol/L的硫酸,178.3ml水+21.7ml浓硫酸,慢慢搅拌混匀。

[0179] 实施例6:ELISA检测方法检测人转铁蛋白和临床血浆样本中的转铁蛋白

[0180] MC-32和MC-50最优配对方式筛选

[0181] 1)包被:MC-32或MC-50(5 μ g/ml)用包被液稀释后按照每孔100 μ l的量加入96孔板,4 $^{\circ}$ C包被过夜。

[0182] 2)洗涤:第二天倒掉板孔内包被液,用洗涤液洗涤三次,每孔250 μ l,每次3-5分钟,尽量拍干。

[0183] 3)封闭:封闭液每孔200 μ l,37 $^{\circ}$ C 1h。之后洗涤三次,拍干。

[0184] 4)加入人转铁蛋白标准品(0.0016、0.008、0.04、0.2、1和5 μ g/ml),每孔100 μ l,同时设空白对照和阴性对照,加完后,于37 $^{\circ}$ C温箱孵育1h。

[0185] 5)加酶标MC-50或MC-32抗体:上述人转铁蛋白孵育结束并洗涤后加入辣根过氧化物酶(HRP)标记的MC-50或MC-32(0.5 μ g/ml),每孔100 μ l,37 $^{\circ}$ C避光温箱孵育1h。

[0186] 6)显色:洗涤后每孔100 μ l加入显色液,37 $^{\circ}$ C避光孵育15-30分钟。

[0187] 7)终止:终止液每孔100 μ l,用酶标仪进行450/630nm双波长读值。

[0188] 结果显示,当以MC-32为包被抗体和以MC-50为酶标抗体时检测灵敏度明显高于以MC-50为包被抗体和以MC-32为酶标抗体时的检测灵敏度;前者的检测下限比后者低(分别为8-40pg/ml和40-200pg/ml)(结果见图4)。综上所述,MC-32和MC-50最优配对方式为以MC-32为包被抗体和以MC-50为酶标抗体。

[0189] 临床样本检测

[0190] 以MC-32为包被抗体包被96孔板并结合酶标MC-50抗体进行临床样本检测。整个检测过程与上述步骤基本相同,除了4)中加入的样品为临床样本(血浆)外。检测结果如下:

[0191]	组别	浓度(mg/ml)
	正常人	2.65 $\pm$ 0.78
	缺铁性贫血病人	5.9 $\pm$ 0.97

[0192] 尽管本发明的具体实施方式已经得到详细的描述,但本领域技术人员将理解:根据已经公布的所有教导,可以对细节进行各种修改和变动,并且这些改变均在本发明的保护范围之内。本发明的全部分为由所附权利要求及其任何等同物给出。

[0001] 序列表
 [0002] <110> 中国科学院昆明动物研究所
 [0003] <120> 抗转铁蛋白抗体及其用途
 [0004] <130> IDC180198
 [0005] <160> 20
 [0006] <170> PatentIn version 3.5
 [0007] <210> 1
 [0008] <211> 128
 [0009] <212> PRT
 [0010] <213> 人工序列
 [0011] <400> 1
 [0012] Gln Val Gln Leu Lys Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Ala Pro Ser Gln
 [0013] 1 5 10 15
 [0014] Ser Leu Ser Ile Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Pro Leu Ser Lys Phe
 [0015] 20 25 30
 [0016] Gly Ile Ser Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu
 [0017] 35 40 45
 [0018] Gly Val Ile Trp Gly Asp Gly Asn Thr Asn Tyr His Ser Ala Leu Ile
 [0019] 50 55 60
 [0020] Ser Arg Leu Ser Ile Ser Lys Asp Asn Ser Lys Ser Gln Val Phe Leu
 [0021] 65 70 75 80
 [0022] Lys Leu Asn Ser Leu Gln Thr Asp Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala
 [0023] 85 90 95
 [0024] Arg Arg Gly Phe Tyr Gly Met Asp Asn Trp Gly Gln Gly Ala Ser Val
 [0025] 100 105 110
 [0026] Ile Val Ser Ser Ala Lys Thr Thr Pro Pro Ser Asp Tyr Pro Leu Ala
 [0027] 115 120 125
 [0028] <210> 2
 [0029] <211> 116
 [0030] <212> PRT
 [0031] <213> 人工序列
 [0032] <400> 2
 [0033] Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser His Lys Phe Met Ser Thr Ser Val Gly
 [0034] 1 5 10 15
 [0035] Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Val Gly Thr Ala
 [0036] 20 25 30
 [0037] Val Thr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Glu Leu Ile
 [0038] 35 40 45

[0039]	Tyr Trp Ala Ser Thr Arg His Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly
[0040]	50 55 60
[0041]	Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Asn Val Gln Ser
[0042]	65 70 75 80
[0043]	Glu Asp Leu Ala Asp Tyr Phe Cys Gln Gln Tyr Ser Ser Tyr Pro Leu
[0044]	85 90 95
[0045]	Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Arg Arg Ala Asp Ala Ala
[0046]	100 105 110
[0047]	Pro Thr Val Ser
[0048]	115
[0049]	<210> 3
[0050]	<211> 8
[0051]	<212> PRT
[0052]	<213> 人工序列
[0053]	<400> 3
[0054]	Gly Phe Pro Leu Ser Lys Phe Gly
[0055]	1 5
[0056]	<210> 4
[0057]	<211> 7
[0058]	<212> PRT
[0059]	<213> 人工序列
[0060]	<400> 4
[0061]	Ile Trp Gly Asp Gly Asn Thr
[0062]	1 5
[0063]	<210> 5
[0064]	<211> 10
[0065]	<212> PRT
[0066]	<213> 人工序列
[0067]	<400> 5
[0068]	Ala Arg Arg Gly Phe Tyr Gly Met Asp Asn
[0069]	1 5 10
[0070]	<210> 6
[0071]	<211> 6
[0072]	<212> PRT
[0073]	<213> 人工序列
[0074]	<400> 6
[0075]	Gln Asp Val Gly Thr Ala
[0076]	1 5
[0077]	<210> 7

[0078]	<211> 3
[0079]	<212> PRT
[0080]	<213> 人工序列
[0081]	<400> 7
[0082]	Trp Ala Ser
[0083]	1
[0084]	<210> 8
[0085]	<211> 9
[0086]	<212> PRT
[0087]	<213> 人工序列
[0088]	<400> 8
[0089]	Gln Gln Tyr Ser Ser Tyr Pro Leu Thr
[0090]	1 5
[0091]	<210> 9
[0092]	<211> 132
[0093]	<212> PRT
[0094]	<213> 人工序列
[0095]	<400> 9
[0096]	Asp Val Lys Leu Gln Glu Ser Gly Pro Ser Leu Val Lys Pro Ser Gln
[0097]	1 5 10 15
[0098]	Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ser Val Thr Gly Asp Ser Ile Thr Ser Gly
[0099]	20 25 30
[0100]	Tyr Trp Asn Trp Ile Arg Lys Phe Pro Gly Ser Lys Leu Glu Tyr Met
[0101]	35 40 45
[0102]	Gly Tyr Ile Ser Tyr Gly Gly Arg Ala Tyr Tyr Asn Pro Ser Leu Glu
[0103]	50 55 60
[0104]	Ser Arg Ile Ser Ile Thr Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Tyr Tyr Val
[0105]	65 70 75 80
[0106]	Leu Leu Asn Ser Val Thr Thr Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala
[0107]	85 90 95
[0108]	Ser Glu Gly His Gly Asn Ser Asp Val Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln
[0109]	100 105 110
[0110]	Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala Ala Lys Thr Thr Pro Pro Ser Asp
[0111]	115 120 125
[0112]	Tyr Pro Leu Ala
[0113]	130
[0114]	<210> 10
[0115]	<211> 121
[0116]	<212> PRT

[0117]	<213>	人工序列
[0118]	<400>	10
[0119]	Asp Val Leu Met Thr Gln Thr Pro Leu Thr Leu Ser Val Thr Ile Gly	
[0120]	1	5 10 15
[0121]	Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Thr Leu Leu His Ser	
[0122]		20 25 30
[0123]	Asn Gly Lys Thr Tyr Leu Asn Trp Leu Leu Gln Arg Pro Gly Gln Ser	
[0124]		35 40 45
[0125]	Pro Lys Arg Leu Ile Tyr Leu Leu Ser Lys Leu Asp Ser Gly Val Pro	
[0126]		50 55 60
[0127]	Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile	
[0128]	65	70 75 80
[0129]	Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Tyr Cys Val Gln Gly	
[0130]		85 90 95
[0131]	Thr His Phe Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys	
[0132]		100 105 110
[0133]	Arg Ala Asp Ala Ala Pro Thr Val Ser	
[0134]		115 120
[0135]	<210>	11
[0136]	<211>	8
[0137]	<212>	PRT
[0138]	<213>	人工序列
[0139]	<400>	11
[0140]	Gly Asp Ser Ile Thr Ser Gly Tyr	
[0141]	1	5
[0142]	<210>	12
[0143]	<211>	7
[0144]	<212>	PRT
[0145]	<213>	人工序列
[0146]	<400>	12
[0147]	Ile Ser Tyr Gly Gly Arg Ala	
[0148]	1	5
[0149]	<210>	13
[0150]	<211>	14
[0151]	<212>	PRT
[0152]	<213>	人工序列
[0153]	<400>	13
[0154]	Ala Ser Glu Gly His Gly Asn Ser Asp Val Trp Phe Ala Tyr	
[0155]	1	5 10

[0156]	<210> 14
[0157]	<211> 11
[0158]	<212> PRT
[0159]	<213> 人工序列
[0160]	<400> 14
[0161]	Gln Thr Leu Leu His Ser Asn Gly Lys Thr Tyr
[0162]	1 5 10
[0163]	<210> 15
[0164]	<211> 3
[0165]	<212> PRT
[0166]	<213> 人工序列
[0167]	<400> 15
[0168]	Leu Leu Ser
[0169]	1
[0170]	<210> 16
[0171]	<211> 9
[0172]	<212> PRT
[0173]	<213> 人工序列
[0174]	<400> 16
[0175]	Val Gln Gly Thr His Phe Pro Tyr Thr
[0176]	1 5
[0177]	<210> 17
[0178]	<211> 384
[0179]	<212> DNA
[0180]	<213> 人工序列
[0181]	<400> 17
[0182]	caggtgcagc tgaaggagtc gggacctggc ctggtggcgc cctcacagag cctgtccatc 60
[0183]	acatgcactg tctcagggtt cccattatcc aaatttggtg taagttgggt tcgccagcct 120
[0184]	ccaggaaagg gtctggagtg gctgggagtt atatggggtg acggaaacac aaattatcat 180
[0185]	tcagctctca tatccagact gagcatcagc aaagataatt ccaagagcca agttttctta 240
[0186]	aagctgaaca gtctgcaaac tgatgacaca gccacgtact actgtgccag aaggggattc 300
[0187]	tatggtatgg acaactgggg tcaggagacc tcagtcacg tctcctcagc caaaacgaca 360
[0188]	ccccatctg actatccact ggcc 384
[0189]	<210> 18
[0190]	<211> 348
[0191]	<212> DNA
[0192]	<213> 人工序列
[0193]	<400> 18
[0194]	gacattgtgc tgacceaatc tcacaaattc atgtccacat cagtgggaga cagggtcacc 60

[0195]	atcacctgca aggccagtca ggatgtgggt actgctgtaa cctggatatca acagaaacca 120
[0196]	gggcagtctc ctaaagaact gattttattgg gcatccaccc ggcacactgg agtccctgat 180
[0197]	cgcttcacag gcagtggatc tgggacagat ttactctca ccattagcaa tgtgcagtct 240
[0198]	gaagacttgg cagattatct ctgtcagcaa tatagcagct atcctctcac gttcgggtgct 300
[0199]	gggaccaagc tggagctgag acgggctgat gctgcaccaa ctgtatcc 348
[0200]	<210> 19
[0201]	<211> 396
[0202]	<212> DNA
[0203]	<213> 人工序列
[0204]	<400> 19
[0205]	gatgtgaagc ttcaggagtc aggacctagc ctcgtaaaac cttctcagac tctgtccctc 60
[0206]	acctgttctg tcaactggcg ctccatcacc agtggttatt ggaactggat ccggaattc 120
[0207]	ccaggagta aacttgaata catggggtag attagctacg gtggtagagc ttactacaat 180
[0208]	ccatctctcg aaagtcgaat ctccatcaca cgagacacat ccaagaacca atattacgtg 240
[0209]	ctgttgaatt ctgtgactac tgaggacaca gccacatatt actgtgcaag cgagggacat 300
[0210]	ggtaattccg atgtctggtt tgcttactgg ggccaaggga ctctggtcac tgtatctgca 360
[0211]	gccaaaacga ccccccatc tgactatcca ctggcc 396
[0212]	<210> 20
[0213]	<211> 363
[0214]	<212> DNA
[0215]	<213> 人工序列
[0216]	<400> 20
[0217]	gatgttttga tgacccaaac tccactcact ttgtcggtta ccattggaca accagcctct 60
[0218]	atctcttgca agtcaagtca gaccctctta catagtaatg gaaaaaccta tttgaattgg 120
[0219]	ttgttacaga ggccaggcca gtctccaaag cgcctaattc atctgttgtc taaactggac 180
[0220]	tctggagtcc ctgacaggtt cactggcagt ggatcaggaa cagattttac actgaaaatc 240
[0221]	agcagagtgg aggctgagga tttgggagtt tattactgcg tgcaaggtac acattttccg 300
[0222]	tacacgttcg gaggggggac caagctggaa ataaaacggg ctgatgctgc accaactgta 360
[0223]	tcc 363

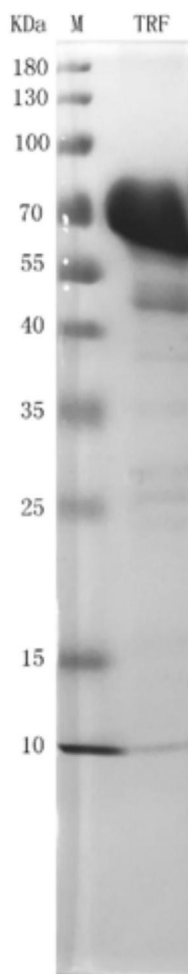


图1

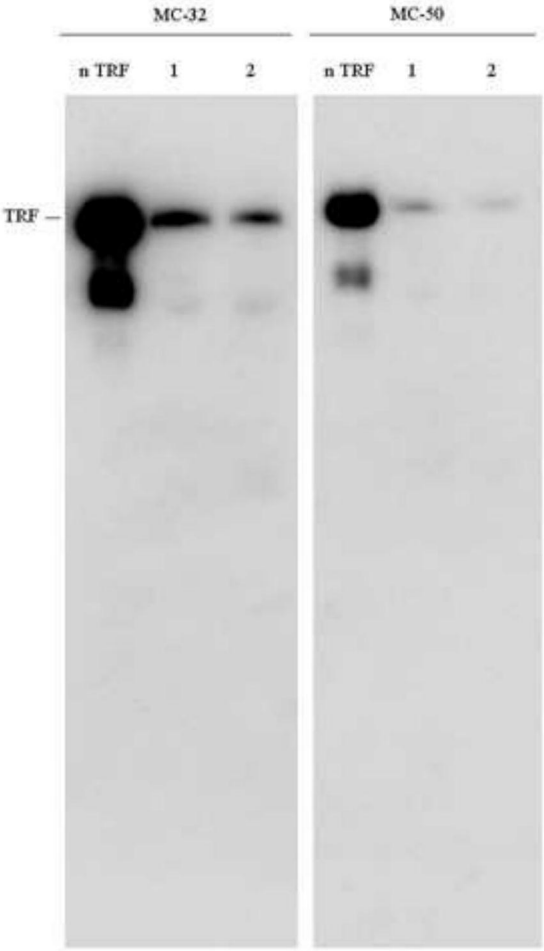


图2



图3

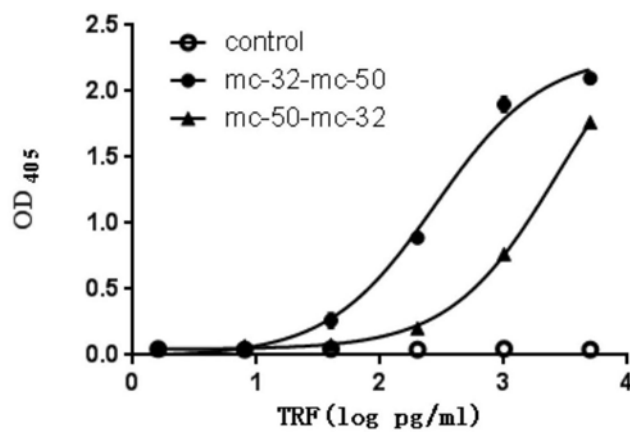


图4