



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 111363044 B

(45) 授权公告日 2021.10.12

(21) 申请号 201811595399.7

(22) 申请日 2018.12.25

(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 111363044 A

(43) 申请公布日 2020.07.03

(73) 专利权人 东莞市朋志生物科技有限公司
地址 523000 广东省东莞市松山湖高新技术
产业开发区台湾高科技园桃园路1
号莞台生物技术合作育成中心1栋401
室

(72) 发明人 崔鹏 何志强 孟媛 钟冬梅
唐丽娜 梁碧 游辉

(74) 专利代理机构 北京超凡志成知识产权代理
事务所(普通合伙) 11371
代理人 王术兰

(51) Int.Cl.

C07K 16/40 (2006.01)

C12Q 1/32 (2006.01)

G01N 33/53 (2006.01)

C12N 15/85 (2006.01)

C12N 5/10 (2006.01)

(56) 对比文件

CN 101921337 A, 2010.12.22

CN 104450625 A, 2015.03.25

US 2012316325 A1, 2012.12.13

审查员 冯晓亮

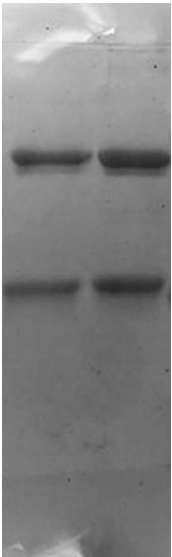
权利要求书5页 说明书19页
序列表6页 附图1页

(54) 发明名称

一种抗泛种特异性疟原虫乳酸脱氢酶的抗
体

(57) 摘要

本发明涉及一种新颖的包含泛种特异性疟原虫乳酸脱氢酶抗原结合结构域的分离的结合蛋白,并对该结合蛋白的制备、应用等方面进行研究。所述结合蛋白活性强,与泛种特异性抗原疟原虫乳酸脱氢酶蛋白具有很高的亲和力,可广泛应用于疟原虫乳酸脱氢酶蛋白的检测领域。



1. 一种包含抗原结合结构域的分离的结合蛋白,其特征在于,所述抗原为泛种特异性抗原疟原虫乳酸脱氢酶,其中所述抗原结合结构域包括互补决定区CDR-VH1、互补决定区CDR-VH2、互补决定区CDR-VH3、互补决定区CDR-VL1、互补决定区CDR-VL2和互补决定区CDR-VL3;与泛种特异性疟原虫乳酸脱氢酶具有 $K_D \leq 1.5647 \times 10^{-9}$ mol/L的亲和力;

互补决定区CDR-VH1为G-X1-S-F-T-N-Y-X2-M-N,其中,

X1是S、Y或T,X2是W或F;

互补决定区CDR-VH2为I-X1-P-S-X2-S-E-T-R-X3-N-Q,其中,

X1是H或N,X2是E或D,X3是I、V或L;

互补决定区CDR-VH3为A-X1-S-G-X2-F-Y-T-X3-Y-X4-D-Y,其中,

X1是K或R,X2是D或E,X3是S、Y或T,X4是F或W;

互补决定区CDR-VL1为R-G-X1-G-N-X2-H-N-Y-X3-A,其中,

X1是S或T,X2是I、V或L,X3是I或L;

互补决定区CDR-VL2为N-A-X1-T-X2-A-D,其中,

X1是R或K,X2是I、V或L;

互补决定区CDR-VL3为Q-X1-F-W-S-X2-Y-T,其中,

X1是S、Y或T,X2是S或T。

2. 一种包含抗原结合结构域的分离的结合蛋白,其特征在于,所述抗原为泛种特异性抗原疟原虫乳酸脱氢酶,所述抗原结合结构域包括互补决定区CDR-VH1、互补决定区CDR-VH2、互补决定区CDR-VH3、互补决定区CDR-VL1、互补决定区CDR-VL2和互补决定区CDR-VL3;

互补决定区CDR-VH1为G-X1-S-F-T-N-Y-X2-M-N,其中,X2为W;互补决定区CDR-VH2为I-X1-P-S-X2-S-E-T-R-X3-N-Q,其中,X1为H;

互补决定区CDR-VH3为A-X1-S-G-X2-F-Y-T-X3-Y-X4-D-Y,其中,X4为F;

互补决定区CDR-VL1为R-G-X1-G-N-X2-H-N-Y-X3-A,其中,X3为L;

互补决定区CDR-VL2为N-A-X1-T-X2-A-D;

互补决定区CDR-VL3为Q-X1-F-W-S-X2-Y-T,其中,X2为T;

各互补决定区的突变位点选自下述突变组合中的任一种:

位点	CDR-VH1	CDR-VH2	CDR-VH3	CDR-VL1	CDR-VL2	CDR-VL3
	X1	X2/X3	X1/X2/X3	X1/X2	X1/X2	X1
突变组合 1	S	E/I	K/D/S	S/L	R/I	S
突变组合 2	Y	E/L	K/D/Y	T/L	R/V	Y

突变组合 3	T	E/V	K/D/T	S/V	R/L	T
突变组合 4	T	D/I	K/E/S	T/V	K/I	Y
突变组合 5	Y	D/L	K/E/Y	S/I	K/V	T
突变组合 6	S	D/V	K/E/T	T/I	K/L	S
突变组合 7	T	D/I	R/D/S	T/I	K/L	T
突变组合 8	S	D/L	R/D/Y	S/I	K/V	S
突变组合 9	Y	D/V	R/D/T	T/V	K/I	Y
突变组合 10	S	E/I	R/E/S	S/V	R/L	S
突变组合 11	T	E/L	R/E/Y	T/L	R/V	Y
突变组合 12	Y	E/V	R/E/T	S/L	R/I	T
突变组合 13	Y	D/I	K/D/S	S/L	K/V	Y
突变组合 14	T	D/L	K/D/Y	T/L	K/L	T
突变组合 15	S	D/V	K/D/T	S/V	K/I	S
突变组合 16	S	E/I	K/E/S	T/V	R/V	T
突变组合 17	Y	E/L	K/E/Y	S/I	R/L	S
突变组合 18	T	E/V	K/E/T	T/I	R/V	T
突变组合 19	T	D/I	R/D/S	T/I	K/I	S
突变组合 20	Y	D/L	R/D/Y	S/I	K/L	Y
突变组合 21	S	D/V	R/D/T	T/V	KV	T
突变组合 22	T	E/I	R/E/S	S/V	R/I	Y
突变组合 23	S	E/L	R/E/Y	T/L	R/L	T
突变组合 24	Y	E/V	R/E/T	S/L	R/V	S
突变组合 25	S	D/I	K/D/S	S/L	K/L	T
突变组合 26	T	D/L	K/D/Y	T/L	K/I	S
突变组合 27	Y	D/V	K/D/T	S/V	K/V	Y
突变组合 28	Y	E/I	K/E/S	T/V	R/L	S
突变组合 29	T	E/L	K/E/Y	S/I	R/I	Y
突变组合 30	S	E/V	K/E/T	T/I	R/V	T
突变组合 31	S	D/I	R/D/S	T/I	K/L	Y
突变组合 32	Y	D/L	R/D/Y	S/I	K/V	T
突变组合 33	T	D/V	R/D/T	T/V	K/I	S
突变组合 34	T	E/I	R/E/S	S/V	R/L	T
突变组合 35	Y	E/L	R/E/Y	T/L	R/V	S
突变组合 36	S	E/V	R/E/T	S/L	R/I	Y
突变组合 37	T	D/I	K/D/S	S/L	K/V	S
突变组合 38	S	D/L	K/D/Y	T/L	K/I	Y
突变组合 39	Y	D/V	K/D/T	S/V	K/L	T
突变组合 40	S	E/I	K/E/S	T/V	R/V	Y
突变组合 41	T	E/L	K/E/Y	S/I	R/I	T
突变组合 42	Y	E/V	K/E/T	T/I	R/L	S
突变组合 43	Y	D/I	R/D/S	T/I	K/I	T
突变组合 44	T	D/L	R/D/Y	S/I	K/V	S
突变组合 45	S	D/V	R/E/S	T/V	K/L	Y

突变组合 46	Y	E/I	R/E/Y	S/V	R/I	S
突变组合 47	T	E/L	R/E/T	T/L	R/V	Y
突变组合 48	T	E/V	K/D/S	S/L	R/L	T
突变组合 49	Y	D/I	K/D/Y	S/L	K/L	Y
突变组合 50	S	D/L	K/D/T	T/L	K/V	T
突变组合 51	T	D/V	K/E/S	S/V	K/I	S
突变组合 52	S	E/I	K/E/Y	T/V	R/L	T
突变组合 53	Y	E/L	K/E/T	S/I	R/V	S
突变组合 54	S	E/V	R/D/S	T/I	R/I	Y
突变组合 55	T	D/I	R/D/Y	T/I	K/V	S
突变组合 56	Y	D/L	R/D/T	S/I	K/I	Y

3. 一种包含抗原结合结构域的分离的结合蛋白,其特征在于,所述抗原为泛种特异性抗原疟原虫乳酸脱氢酶,所述抗原结合结构域包括互补决定区CDR-VH1、互补决定区CDR-VH2、互补决定区CDR-VH3、互补决定区CDR-VL1、互补决定区CDR-VL2和互补决定区CDR-VL3;

互补决定区CDR-VH1为G-X1-S-F-T-N-Y-X2-M-N,其中,X2为F;

互补决定区CDR-VH2为I-X1-P-S-X2-S-E-T-R-X3-N-Q,其中,X1为N;

互补决定区CDR-VH3为A-X1-S-G-X2-F-Y-T-X3-Y-X4-D-Y,其中,X4为W;

互补决定区CDR-VL1为R-G-X1-G-N-X2-H-N-Y-X3-A,其中,X3为I;

互补决定区CDR-VL2为N-A-X1-T-X2-A-D;

互补决定区CDR-VL3为Q-X1-F-W-S-X2-Y-T,其中,X2为S;

各互补决定区的突变位点选自下述突变组合中的任一种:

位点	CDR-VH1	CDR-VH2	CDR-VH3	CDR-VL1	CDR-VL2	CDR-VL3
	X1	X2/X3	X1/X2/X3	X1/X2	X1/X2	X1
WT	S	E/I	K/D/S	S/L	R/I	S
WT 1-1	T	D/I	R/D/S	T/I	K/L	T
WT 1-2	Y	D/V	R/D/T	T/V	K/I	Y
WT 1-3	S	E/L	R/E/Y	T/L	R/L	T
WT 1-4	Y	D/V	K/D/T	S/V	K/V	Y
WT 1-5	Y	E/V	K/E/T	T/I	R/L	S

WT 1-6	T	D/L	R/D/Y	S/I	K/V	S
WT 1-7	S	D/V	R/E/S	T/V	K/L	Y
WT 1-8	T	D/V	K/E/S	S/V	K/I	S
WT 1-9	S	E/I	K/E/Y	T/V	R/L	T

4. 如权利要求1~3任一项所述的结合蛋白,其特征在于,所述结合蛋白为F(ab')₂、Fab'、Fab、Fv、scFv和双特异抗体中的一种。

5. 根据权利要求1~3任一项所述的结合蛋白,其特征在于,所述结合蛋白包括序列依次如SEQ ID NO:1-4所示的轻链骨架区FR-L1、FR-L2、FR-L3及FR-L4,和/或,序列依次如SEQ ID NO:5-8所示的重链骨架区FR-H1、FR-H2、FR-H3及FR-H4。

6. 如权利要求1~3任一项所述的结合蛋白,其特征在于,所述结合蛋白还包含抗体恒定区序列。

7. 根据权利要求6所述的结合蛋白,其特征在于,所述恒定区序列选自IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA、IgM、IgE、IgD任何其中之一恒定区的序列。

8. 根据权利要求7所述的结合蛋白,其特征在于,所述恒定区的种属来源为牛、马、猪、绵羊、山羊、大鼠、小鼠、狗、猫、兔、驴、鹿、貂、鸡、鸭、鹅、或人。

9. 根据权利要求8所述的结合蛋白,其特征在于,所述恒定区的种属来源为乳牛。

10. 根据权利要求8所述的结合蛋白,其特征在于,所述恒定区的种属来源为火鸡或斗鸡。

11. 根据权利要求8所述的结合蛋白,其特征在于,所述恒定区来源于小鼠。

12. 根据权利要求11所述的结合蛋白,其特征在于,轻链恒定区序列如SEQ ID NO:9所示;

重链恒定区序列如SEQ ID NO:10所示。

13. 一种分离的核酸分子,其特征在于,所述核酸分子为DNA或RNA,其编码权利要求1~12任一项所述的结合蛋白。

14. 一种载体,其包含权利要求13所述的核酸分子。

15. 一种宿主细胞,其被权利要求14所述的载体转化。

16. 一种生产权利要求1~12任一项所述的结合蛋白的方法,其特征在于,包括如下步骤:

在培养基中和合适的培养条件下培养权利要求15所述的宿主细胞,从培养基中或从所培养的宿主细胞中回收如此产生的结合蛋白。

17. 权利要求1~12任一项所述的结合蛋白在制备用于诊断疟疾的诊断剂中的应用。

18. 如权利要求1~12任一项所述的结合蛋白在制备检测测试样品中的泛种特异性抗原疟原虫乳酸脱氢酶的试剂盒的应用。

19. 根据权利要求18所述的应用,其特征在于,所述试剂盒用于:

a) 在足以发生抗体/抗原结合反应的条件下,使所述测试样品中的泛种特异性抗原疟

原虫乳酸脱氢酶抗原与权利要求1~12任一项所述的结合蛋白接触以形成免疫复合物;和

b) 检测所述免疫复合物的存在,所述免疫复合物的存在指示所述测试样品中所述泛种特异性抗原疟原虫乳酸脱氢酶的存在。

20. 根据权利要求19所述的应用,其特征在于,所述免疫复合物中还包括第二抗体,所述第二抗体与所述结合蛋白结合。

21. 根据权利要求19所述的应用,其特征在于,在步骤a) 中,所述免疫复合物中还包括第二抗体,所述第二抗体与所述泛种特异性抗原疟原虫乳酸脱氢酶结合。

22. 一种检测泛种特异性抗原疟原虫乳酸脱氢酶的试剂盒,其包括权利要求1~12任一项所述的结合蛋白。

一种抗泛种特异性疟原虫乳酸脱氢酶的抗体

技术领域

[0001] 本发明涉及免疫技术领域,具体而言,涉及一种抗泛种特异性疟原虫乳酸脱氢酶的抗体。

背景技术

[0002] 疟疾(Malaria)是经按蚊叮咬或输入带疟原虫者的血液而感染疟原虫所引起的一种虫媒传染病。寄生于人体的疟原虫主要有四种:间日疟原虫(*Plasmodium vivax*,pv)、恶性疟原虫(*Plasmodium falciparum*,pf)、三日疟原虫(*Plasmodium malariae*,pm)、卵形疟原虫(*Plasmodium ovale*,po)。恶性疟原虫是常见的感染性疟原虫(75%),是危害最大的病原体,它感染力强,增殖迅速,症状严重,初次感染者致死率高,由其引起的死亡占感染者死亡总数的95%以上,主要存在于非洲、南美和亚洲的热带地区;间日疟原虫是第二常见的疟原虫(20%),也是非洲以外地区最常见的种类。WHO建议所有疟疾疑似患者应该即时进行疟疾的检测,疾病的快速、准确诊断对于抗疟药的正确使用,避免耐药株的产生及控制病情恶化、降低死亡率至关重要。

[0003] 疟疾诊断是疟疾防治工作的重点。从检测技术原理上进行归类,目前检测疟原虫的方法可以分为四类。一是显微镜直接检测疟原虫,包括厚血膜和薄血膜,这也是目前临床上疟疾诊断的金标准。但费时,费力,需要熟练的技术人员和一定的实验条件。二是疟原虫核酸检测,检测靶标为疟原虫18S核糖体RNA等特异性核苷酸片段,常用的方法为荧光PCR方法和环介导等温扩增技术(loop-mediated isothermal amplification LAMP)技术。该方法虽然灵敏度和特异性高,但需要更复杂的仪器设备和条件作为支持,不适合作为疟疾流行区常规的检测手段,难以在基层推广应用。三是检测疟原虫色素,通常采用流式细胞检测技术或质谱方法。该方法需要专业的检测仪器,一般用于实验室研究,不适用现场检测。四是抗原抗体的免疫反应检测疟原虫,方法学上有免疫层析快速诊断试剂(RDT)和酶联免疫吸附(ELISA),检测的靶抗原大多为PLDH、HRP-Ⅱ等诊断抗原。以抗原为检测目标的RDT应用在恶性疟原虫流行的落后地区具有重要意义,因其操作简便、快速、结果直观,无需复杂设备、敏感性和特异性高等优点,是WHO推荐用于现场诊断的方法。

[0004] 目前,RDT方法常用的检测疟疾抗原主要为恶性疟原虫特有的富组氨酸蛋白-Ⅱ(Histidine-rich protein Ⅱ,HRP-Ⅱ)和疟原虫乳酸脱氢酶(*Plasmodium Lactate dehydrogenase*,PLDH)。HRP-Ⅱ是一种恶性疟原虫虫体特异性抗原,是恶性疟疾检测中最常用的靶抗原。疟原虫乳酸脱氢酶(*Plasmodium Lactate dehydrogenase*,PLDH)是保证疟原虫糖酵解正常进行的重要酶,与人红细胞和其他许多微生物的乳酸脱氢酶相比具有显著不同的物理、生化特性,是疟原虫生命活动过程中必需表达的蛋白,且有较高的丰度,因此成为疟原虫检测的重要靶点。由于PLDH仅由活的疟原虫产生,因而使用PLDH为检测抗原的方法还可以鉴别病人体内虫体的死活,由此可评价监测治疗效果及复燃的情况。另外,四种疟原虫产生的PLDH有不同的异构体,具有种、属特异性的抗原,主要可分为两大类:一是具有种特异性的LDH,包括pf LDH、pv LDH、pm LDH、po LDH,以此为靶蛋白生产的单抗只识别特

异性种类疟原虫的LDH;二是泛种特异性抗原疟原虫乳酸脱氢酶(Pan-PLDH),以此为靶蛋白生产的单抗可以识别四种疟原虫的LDH。

[0005] 目前,市场上以Pan-PLDH作为靶蛋白用于检测疟原虫的试剂盒主要有CareStart疟疾HRP-Ⅱ/PLDH复合测试盒、OptiMAL诊断试剂盒。CareStart疟疾HRP-Ⅱ/PLDH复合测试盒是由美国Access Bio公司生产,用2种单克隆抗体在膜上形成独立的两条检测线,分别是抗疟原虫属(恶性疟、间日疟、卵形疟、三日疟)的乳酸脱氢酶(Pan-PLDH)单抗和抗HRP-Ⅱ单抗,专用于恶性疟和其他型疟疾的鉴别诊断。OptiMAL诊断试剂盒为波兰俄勒冈生产,层析条上包被两株恶性疟原虫LDH单抗,一株为恶性疟种特异性单抗,另一株为与四种人疟原虫都能产生反应的属特异性单抗,因而它能区分恶性疟原虫或非恶性疟原虫感染。此外,类似的试剂盒还有美国NovaBios疟原虫抗原(pf/pan-PLDH)检测试剂盒、韩国SD间日疟抗原检测试剂盒P.f/Pan(HRP-2/pLDH)、美国Binax NOW疟疾快速检测试剂盒、万孚疟原虫检测试剂盒(Pf-LDH/Pan-PLDH)等。

[0006] 上述各种试剂盒中,均使用了抗Pan-PLDH单克隆抗体。目前,市场上用于诊断的单克隆抗体的常规制备方法是杂交瘤技术,即利用基因工程技术表达泛种特异性抗原疟原虫乳酸脱氢酶(Pan-PLDH)蛋白免疫小鼠,将免疫的小鼠脾细胞与瘤细胞融合获得杂交瘤细胞,最后筛选出分泌目标抗体的单克隆在杂交瘤细胞,然后进行抗体生产。迄今为止,传统的杂交瘤技术凭借其低成本、可持续生产、操作性好以及在临床诊断方面的优势,仍然是制备单克隆抗体的主要方法之一。但是传统的杂交瘤技术,杂交瘤细胞在培养或冻存复苏的过程中,部分细胞会丢失分泌抗体的能力,造成一些珍贵细胞株的丢失。此外,大量生产抗体时体外大量培养杂交瘤细胞,其产量低,一般培养液内抗体含量为10~60mg/L,如果大量生产,费用较高;小鼠腹腔诱生,因小鼠个体大小的影响,抗体的生产不稳定、批间差大、含小鼠自身抗体纯化难度大。

[0007] 为了避免传统杂交瘤技术的不足之处,本发明设计了一种抗泛种特异性抗原疟原虫乳酸脱氢酶(Pan-PLDH)单克隆抗体的表达载体,提供了一种抗泛种特异性抗原疟原虫乳酸脱氢酶(Pan-PLDH)单克隆抗体序列,用于通过重组技术表达抗泛种特异性抗原疟原虫乳酸脱氢酶(Pan-PLDH)单克隆抗体,用于恶性疟的诊断。

[0008] 有鉴于此,特提出本发明。

发明内容

[0009] 本发明涉及一种新颖的包含泛种特异性抗原疟原虫乳酸脱氢酶抗原结合结构域的分离的结合蛋白,并对该结合蛋白的制备、应用等方面进行研究。

[0010] 其中所述抗原结合结构域包括选自下述氨基酸序列的至少一个互补决定区:或;与下述氨基酸序列的互补决定区具有至少80%的序列同一性且与泛种特异性疟原虫乳酸脱氢酶具有 $K_D \leq 1.5647 \times 10^{-9} \text{mol/L}$ 的亲合力;

[0011] 互补决定区CDR-VH1为G-X1-S-F-T-N-Y-X2-M-N,其中,

[0012] X1是S、Y或T,X2是W或F;

[0013] 互补决定区CDR-VH2为I-X1-P-S-X2-S-E-T-R-X3-N-Q,其中,

[0014] X1是H或N,X2是E或D,X3是I、V或L;

[0015] 互补决定区CDR-VH3为A-X1-S-G-X2-F-Y-T-X3-Y-X4-D-Y,其中,

- [0016] X1是K或R,X2是D或E,X3是S、Y或T,X4是F或W;
- [0017] 互补决定区CDR-VL1为R-G-X1-G-N-X2-H-N-Y-X3-A,其中,
- [0018] X1是S或T,X2是I、V或L,X3是I或L;
- [0019] 互补决定区CDR-VL2为N-A-X1-T-X2-A-D,其中,
- [0020] X1是R或K,X2是I、V或L;
- [0021] 互补决定区CDR-VL3为Q-X1-F-W-S-X2-Y-T,其中,
- [0022] X1是S、Y或T,X2是S或T。
- [0023] 一个重要优点在于,所述结合蛋白活性强,与泛种特异性抗原疟原虫乳酸脱氢酶具有很高的亲和力。

附图说明

[0024] 为了更清楚地说明本发明具体实施方式或现有技术中的技术方案,下面将对具体实施方式或现有技术描述中所需要使用的附图作简单地介绍,显而易见地,下面描述中的附图是本发明的一些实施方式,对于本领域普通技术人员来讲,在不付出创造性劳动的前提下,还可以根据这些附图获得其他的附图。

[0025] 图1为本发明一个实施例中抗泛种特异性抗原疟原虫乳酸脱氢酶的单克隆抗体电泳图。

具体实施方式

[0026] 本发明可通过后续对于本发明一些实施方案描述以及其中所包括的实施例的详细内容而更容易被了解。

[0027] 在进一步叙述本发明之前,应明了本发明不会被局限于所述特定实施方案中,因为这些实施方案必然是多样的。亦应明了本说明书中所使用的用语仅是为了阐述特定实施方案,而非作为限制,因为本发明的范围将会被仅仅界定在所附的权利要求中。

[0028] 名词定义

[0029] “包含抗原结合结构域的分离的结合蛋白”泛指包含CDR区的一切蛋白/蛋白片段。“抗体”此用语包括多克隆抗体及单克隆抗体以及这些抗体的抗原化合物结合片段,包括Fab、F(ab')₂、Fd、Fv、scFv、双特异抗体和抗体最小识别单位,以及这些抗体和片段的单链衍生物。抗体的类型可以选择IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA、IgM、IgE、IgD。此外,“抗体”此用语包括天然发生的抗体以及非天然发生的抗体,包括例如嵌合型(chimeric)、双功能型(bifunctional)和人源化(humanized)抗体,以及相关的合成异构形式(isoforms)。“抗体”此用语可和“免疫球蛋白”互换使用。

[0030] 抗体的“可变区”或“可变结构域”是指抗体的重链或轻链的氨基端结构域。重链的可变结构域可以被称为“VH”。轻链的可变结构域可以被称为“VL”。这些结构域通常是抗体的最可变的部分,并含有抗原结合位点。轻链或重链可变区(VL或VH)由被三个称为“互补决定区”或“CDR”的高变区打断的构架区构成。构架区和CDR的范围已被精确定义,例如在Kabat(参见《免疫重要的蛋白质的序列》(Sequences of Proteins of Immunological Interest),E.Kabat等,美国卫生与人类服务部(U.S.Department of Health and Human Services),(1983))和Chothia中。抗体的构架区,即构成要件轻链和重链的組合的构架区,

起到定位和对齐CDR的作用,所述CDR主要负责与抗原的结合。

[0031] 当在本文中使用时,“构架”或“FR”区意味着抗体可变结构域的排除被定义为CDR的那些区域之外的区域。每个抗体可变结构域构架可以被进一步细分成被CDR分隔开的毗邻区域(FR1、FR2、FR3和FR4)。

[0032] 通常情况下,重链和轻链的可变区VL/VH可由以下编号的CDR与FR按如下组合排列连接获得:FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4。

[0033] 当在本文中使用时,与多肽或核酸相关联的术语“纯化的”或“分离的”是指多肽或核酸不是处于其天然介质中或天然形式下。因此,术语“分离的”包括从其原始环境,例如如果它是天然存在的,从天然环境取出的多肽或核酸。例如,分离的多肽通常不含通常与其结合或通常与其混合或在溶液中的至少某些蛋白质或其他细胞组分。分离的多肽包括细胞裂解物中包含的天然生产的所述多肽,纯化或部分纯化形式的所述多肽,重组多肽,被细胞表达或分泌的所述多肽,以及在异源宿主细胞或培养物中的所述多肽。与核酸相关联,术语分离的或纯化的指示例如所述核酸不在其天然的基因组背景中(例如在载体中,作为表达盒,连接到启动子,或人工引入到异源宿主细胞中)。

[0034] 本发明的示例性实施方案

[0035] 本发明涉及一种包含抗原结合结构域的分离的结合蛋白,其中所述抗原结合结构域包括选自下述氨基酸序列的至少一个互补决定区:或;与下述氨基酸序列的互补决定区具有至少80%的序列同一性且与泛种特异性疟原虫乳酸脱氢酶具有 $K_D \leq 1.5647 \times 10^{-9} \text{ mol/L}$ 的亲合力;

[0036] 互补决定区CDR-VH1为G-X1-S-F-T-N-Y-X2-M-N,其中,

[0037] X1是S、Y或T,X2是W或F;

[0038] 互补决定区CDR-VH2为I-X1-P-S-X2-S-E-T-R-X3-N-Q,其中,

[0039] X1是H或N,X2是E或D,X3是I、V或L;

[0040] 互补决定区CDR-VH3为A-X1-S-G-X2-F-Y-T-X3-Y-X4-D-Y,其中,

[0041] X1是K或R,X2是D或E,X3是S、Y或T,X4是F或W;

[0042] 互补决定区CDR-VL1为R-G-X1-G-N-X2-H-N-Y-X3-A,其中,

[0043] X1是S或T,X2是I、V或L,X3是I或L;

[0044] 互补决定区CDR-VL2为N-A-X1-T-X2-A-D,其中,

[0045] X1是R或K,X2是I、V或L;

[0046] 互补决定区CDR-VL3为Q-X1-F-W-S-X2-Y-T,其中,

[0047] X1是S、Y或T,X2是S或T。

[0048] 该抗体可用于定性、定量检测样本中的泛种特异性疟原虫乳酸脱氢酶(panLDH),适用于疟疾疑似患者的辅助诊断或疟区病例的筛选检查。

[0049] 恶性疟原虫、间日疟原虫、三日疟原虫或卵形疟原虫的乳酸脱氢酶具有很高的保守性,本发明所提供的抗体是泛特异性的,能上述四种疟原虫的乳酸脱氢酶结合。

[0050] 在一些实施方式中,所述抗原结合结构域与下述氨基酸序列的互补决定区具有至少85%,或90%,或91%,或92%,或93%,或94%,或95%,或96%,或97%,或98%,或99%的序列同一性且与泛种特异性抗原疟原虫乳酸脱氢酶具有 $K_D \leq 1.5647 \times 10^{-9} \text{ mol/L}$, K_D 值也可以选择 $1 \times 10^{-9} \text{ mol/L}$ 、 $2 \times 10^{-9} \text{ mol/L}$ 、 $3 \times 10^{-9} \text{ mol/L}$ 、 $4 \times 10^{-9} \text{ mol/L}$ 、 $4.5 \times 10^{-9} \text{ mol/L}$ 、 $5 \times 10^{-9} \text{ mol/L}$ 。

10^{-9} mol/L、 6×10^{-9} mol/L、 7×10^{-9} mol/L、 8×10^{-9} mol/L、 9×10^{-9} mol/L、 1×10^{-10} mol/L、 3×10^{-10} mol/L、 5×10^{-10} mol/L、 7×10^{-10} mol/L、 9×10^{-10} mol/L或 1×10^{-11} mol/L、 2×10^{-11} 、 3×10^{-11} 、 4×10^{-11} 、 5×10^{-11} 、 6×10^{-11} 、 7×10^{-11} 、 8×10^{-11} 、 9×10^{-11} ;

[0051] 或者 8.7941×10^{-11} mol/L $\leq K_D \leq 1.5647 \times 10^{-9}$ mol/L;

[0052] 其中,亲和力按照本发明说明书中的方法测定。

[0053] 在一些实施方式中:

[0054] 所述互补决定区CDR-VH1中,X2是W;

[0055] 所述互补决定区CDR-VH2中,X1是H;

[0056] 所述互补决定区CDR-VH3中,X4是F;

[0057] 所述互补决定区CDR-VL1中,X3是L;

[0058] 所述互补决定区CDR-VL3中,X2是T。

[0059] 在一些实施方式中,所述互补决定区CDR-VH1中,X1是S。

[0060] 在一些实施方式中,所述互补决定区CDR-VH1中,X1是Y。

[0061] 在一些实施方式中,所述互补决定区CDR-VH1中,X1是T。

[0062] 在一些实施方式中,所述互补决定区CDR-VH2中,X2是E。

[0063] 在一些实施方式中,所述互补决定区CDR-VH2中,X2是D。

[0064] 在一些实施方式中,所述互补决定区CDR-VH2中,X3是I。

[0065] 在一些实施方式中,所述互补决定区CDR-VH2中,X3是V。

[0066] 在一些实施方式中,所述互补决定区CDR-VH2中,X3是L。

[0067] 在一些实施方式中,所述互补决定区CDR-VH3中,X1是K。

[0068] 在一些实施方式中,所述互补决定区CDR-VH3中,X1是R。

[0069] 在一些实施方式中,所述互补决定区CDR-VH3中,X2是D。

[0070] 在一些实施方式中,所述互补决定区CDR-VH3中,X2是E。

[0071] 在一些实施方式中,所述互补决定区CDR-VH3中,X3是S。

[0072] 在一些实施方式中,所述互补决定区CDR-VH3中,X3是Y。

[0073] 在一些实施方式中,所述互补决定区CDR-VH3中,X3是T。

[0074] 在一些实施方式中,所述互补决定区CDR-VL1中,X1是S。

[0075] 在一些实施方式中,所述互补决定区CDR-VL1中,X1是T。

[0076] 在一些实施方式中,所述互补决定区CDR-VL1中,X2是I。

[0077] 在一些实施方式中,所述互补决定区CDR-VL1中,X2是V。

[0078] 在一些实施方式中,所述互补决定区CDR-V L1中,X2是L。

[0079] 在一些实施方式中,所述互补决定区CDR-VL2中,X1是R。

[0080] 在一些实施方式中,所述互补决定区CDR-VL2中,X1是K。

[0081] 在一些实施方式中,所述互补决定区CDR-VL2中,X2是I。

[0082] 在一些实施方式中,所述互补决定区CDR-VL2中,X2是V。

[0083] 在一些实施方式中,所述互补决定区CDR-VL2中,X2是L。

[0084] 在一些实施方式中,所述互补决定区CDR-VL3中,X1是S。

[0085] 在一些实施方式中,所述互补决定区CDR-VL3中,X1是Y。

[0086] 在一些实施方式中,所述互补决定区CDR-VL3中,X1是T。

[0087] 在一些实施方式中,各互补决定区的突变位点选自下述突变组合中的任一种:

位点	CDR-VH1	CDR-VH2	CDR-VH3	CDR-VL1	CDR-VL2	CDR-VL3
	X1	X2/X3	X1/X2/X3	X1/X2	X1/X2	X1
突变组合 1	S	E/I	K/D/S	S/L	R/I	S
突变组合 2	Y	E/L	K/D/Y	T/L	R/V	Y
突变组合 3	T	E/V	K/D/T	S/V	R/L	T
突变组合 4	T	D/I	K/E/S	T/V	K/I	Y
突变组合 5	Y	D/L	K/E/Y	S/I	K/V	T
突变组合 6	S	D/V	K/E/T	T/I	K/L	S
突变组合 7	T	D/I	R/D/S	T/I	K/L	T
突变组合 8	S	D/L	R/D/Y	S/I	K/V	S
突变组合 9	Y	D/V	R/D/T	T/V	K/I	Y
突变组合 10	S	E/I	R/E/S	S/V	R/L	S
突变组合 11	T	E/L	R/E/Y	T/L	R/V	Y
突变组合 12	Y	E/V	R/E/T	S/L	R/I	T
突变组合 13	Y	D/I	K/D/S	S/L	K/V	Y
突变组合 14	T	D/L	K/D/Y	T/L	K/L	T
突变组合 15	S	D/V	K/D/T	S/V	K/I	S
突变组合 16	S	E/I	K/E/S	T/V	R/V	T
突变组合 17	Y	E/L	K/E/Y	S/I	R/L	S
突变组合 18	T	E/V	K/E/T	T/I	R/V	T
突变组合 19	T	D/I	R/D/S	T/I	K/I	S
突变组合 20	Y	D/L	R/D/Y	S/I	K/L	Y
突变组合 21	S	D/V	R/D/T	T/V	KV	T
突变组合 22	T	E/I	R/E/S	S/V	R/I	Y
突变组合 23	S	E/L	R/E/Y	T/L	R/L	T
突变组合 24	Y	E/V	R/E/T	S/L	R/V	S
突变组合 25	S	D/I	K/D/S	S/L	K/L	T
突变组合 26	T	D/L	K/D/Y	T/L	K/I	S
突变组合 27	Y	D/V	K/D/T	S/V	K/V	Y
突变组合 28	Y	E/I	K/E/S	T/V	R/L	S
突变组合 29	T	E/L	K/E/Y	S/I	R/I	Y

[0088]

[0089]

突变组合 30	S	E/V	K/E/T	T/I	R/V	T
突变组合 31	S	D/I	R/D/S	T/I	K/L	Y
突变组合 32	Y	D/L	R/D/Y	S/I	K/V	T
突变组合 33	T	D/V	R/D/T	T/V	K/I	S
突变组合 34	T	E/I	R/E/S	S/V	R/L	T
突变组合 35	Y	E/L	R/E/Y	T/L	R/V	S
突变组合 36	S	E/V	R/E/T	S/L	R/I	Y
突变组合 37	T	D/I	K/D/S	S/L	K/V	S
突变组合 38	S	D/L	K/D/Y	T/L	K/I	Y
突变组合 39	Y	D/V	K/D/T	S/V	K/L	T
突变组合 40	S	E/I	K/E/S	T/V	R/V	Y
突变组合 41	T	E/L	K/E/Y	S/I	R/I	T
突变组合 42	Y	E/V	K/E/T	T/I	R/L	S
突变组合 43	Y	D/I	R/D/S	T/I	K/I	T
突变组合 44	T	D/L	R/D/Y	S/I	K/V	S
突变组合 45	S	D/V	R/E/S	T/V	K/L	Y
突变组合 46	Y	E/I	R/E/Y	S/V	R/I	S
突变组合 47	T	E/L	R/E/T	T/L	R/V	Y
突变组合 48	T	E/V	K/D/S	S/L	R/L	T
突变组合 49	Y	D/I	K/D/Y	S/L	K/L	Y
突变组合 50	S	D/L	K/D/T	T/L	K/V	T
突变组合 51	T	D/V	K/E/S	S/V	K/I	S
突变组合 52	S	E/I	K/E/Y	T/V	R/L	T
突变组合 53	Y	E/L	K/E/T	S/I	R/V	S
突变组合 54	S	E/V	R/D/S	T/I	R/I	Y
突变组合 55	T	D/I	R/D/Y	T/I	K/V	S
突变组合 56	Y	D/L	R/D/T	S/I	K/I	Y

。

[0090] 在一些实施方式中,所述结合蛋白中包括至少3个CDRs (例如3个轻链CDR或3个重链CDR);或者,所述结合蛋白包括至少6个CDRs。

[0091] 在一些实施方式中,所述结合蛋白为包含可变区和恒定区的完整抗体。

[0092] 在一些实施方式中,所述结合蛋白为抗体的“功能片段”,例如纳米抗体、F(ab')₂、Fab'、Fab、Fv、scFv、双特异抗体和抗体最小识别单位中的一种。

[0093] scFv(sc=单链),双特异抗体(diabodies)。

[0094] 本发明所述的“功能片段”特别地指对于泛种特异性抗原疟原虫乳酸脱氢酶具有与母体抗体相同特异性的抗体片段。除上述功能片段外,还包括半衰期已增加的任何片段。

[0095] 这些功能片段通常具有与其来源抗体相同的结合特异性。本领域技术人员根据本发明说明中记载的内容推断,本发明的抗体片段可以通过比如酶消化的方法(包括胃蛋白酶或木瓜蛋白酶)和/或通过化学还原分裂二硫键的方法获得上述的功能片段。

[0096] 抗体片段还可以通过也是本领域技术人员所知的重组遗传学技术或通过例如自动肽合成仪,比如Applied BioSystems等销售的自动肽合成仪,通过肽合成获得。

[0097] 在一些实施方式中,所述结合蛋白包括序列依次如SEQ ID NO:1-4所示的轻链骨架区FR-L1、FR-L2、FR-L3及FR-L4,和/或,序列依次如SEQ ID NO:5-8所示的重链骨架区FR-

H1、FR-H2、FR-H3及FR-H4。

[0098] 在一些实施方式中,所述结合蛋白还包含抗体恒定区序列。

[0099] 在一些实施方式中,所述恒定区序列选自IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA、IgM、IgE、IgD任何其中之一恒定区的序列。

[0100] 在一些实施方式中,所述恒定区的种属来源为牛、马、乳牛、猪、绵羊、山羊、大鼠、小鼠、狗、猫、兔、骆驼、驴、鹿、貂、鸡、鸭、鹅、火鸡、斗鸡或人。

[0101] 在一些实施方式中,所述恒定区来源于鼠;

[0102] 轻链恒定区序列如SEQ ID NO:9所示;

[0103] 重链恒定区序列如SEQ ID NO:10所示。

[0104] 根据本发明的一方面,本发明还涉及一种分离的核酸分子,所述核酸分子为DNA或RNA,其编码如上所述的结合蛋白。

[0105] 根据本发明的一方面,本发明还涉及一种载体,其包含如上所述的核酸分子。

[0106] 本发明进一步包含至少一种编码如上所述的核酸分子的核构建体,例如质粒,进一步为表达质粒,在本申请的一个实施例中会介绍该载体的构建方法。

[0107] 根据本发明的一方面,本发明还涉及一种宿主细胞,其被如上所述的载体转化。

[0108] 所述宿主细胞可以为真核细胞,比如哺乳动物细胞。

[0109] 在一些实施方式中,所述宿主细胞为CHO细胞。

[0110] 根据本发明的一方面,本发明还涉及一种生产如上所述的结合蛋白的方法,所述方法包括如下步骤:

[0111] 在培养基中和合适的培养条件下培养如上所述的宿主细胞,从培养基中或从所培养的宿主细胞中回收如此产生的结合蛋白。

[0112] 根据本发明的一方面,本发明还涉及如上所述的结合蛋白在制备用于诊断疟疾的诊断剂中的应用。

[0113] 根据本发明的一方面,本发明还涉及一种检测测试样品中泛种特异性抗原疟原虫乳酸脱氢酶的方法,其包括:

[0114] a) 在足以发生抗体/抗原结合反应的条件下,使所述测试样品中的泛种特异性抗原疟原虫乳酸脱氢酶抗原与如上所述的结合蛋白接触以形成免疫复合物;和

[0115] b) 检测所述免疫复合物的存在,所述复合物的存在指示所述测试样品中所述泛种特异性抗原疟原虫乳酸脱氢酶的存在。

[0116] 在此实施方式中,所述结合蛋白可以标记由显示信号强度的指示剂,以使得所述复合物容易被检测。

[0117] 在一些实施方式中,在步骤a)中,所述免疫复合物中还包括第二抗体,所述第二抗体与所述结合蛋白结合。

[0118] 在一些实施方式中,在步骤a)中,所述免疫复合物中还包括第二抗体,所述第二抗体与所述泛种特异性抗原疟原虫乳酸脱氢酶结合;

[0119] 在此实施方式中,所述结合蛋白以第一抗体的形式与所述第二抗体形成配对抗体,用于结合泛种特异性抗原疟原虫乳酸脱氢酶的不同抗原表位;

[0120] 所述的第二抗体可以标记由显示信号强度的指示剂,以使得所述复合物容易被检测。

[0121] 在一些实施方式中,在步骤a)中,所述免疫复合物中还包括第二抗体,所述第二抗体与所述泛种特异性抗原疟原虫乳酸脱氢酶抗原结合;

[0122] 在此实施方式中,所述结合蛋白作为所述第二抗体的抗原,所述的第二抗体可以标记由显示信号强度的指示剂,以使得所述复合物容易被检测。

[0123] 在一些实施方式中,所述显示信号强度的指示剂包括荧光物质、量子点、地高辛标记探针、生物素、放射性同位素、放射性造影剂、顺磁离子荧光微球、电子致密物质、化学发光标记物、超声造影剂、光敏剂、胶体金或酶中的任一种。

[0124] 在一些实施方式中,所述荧光物质包括Alexa 350、Alexa 405、Alexa 430、Alexa 488、Alexa 555、Alexa 647、AMCA、氨基吡啶、BODIPY 630/650、BODIPY 650/665、BODIPY-FL、BODIPY-R6G、BODIPY-TMR、BODIPY-TRX、5-羧基-4',5'-二氯-2',7'-二甲氧基荧光素、5-羧基-2',4',5',7'-四氯荧光素、5-羧基荧光素、5-羧基罗丹明、6-羧基罗丹明、6-羧基四甲基罗丹明、Cascade Blue、Cy2、Cy3、Cy5、Cy7、6-FAM、丹磺酰氯、荧光素、HEX、6-JOE、NBD (7-硝基苯并-2-氧杂-1,3-二唑)、Oregon Green 488、Oregon Green 500、Oregon Green 514、Pacific Blue、邻苯二甲酸、对苯二甲酸、间苯二甲酸、甲酚固紫、甲酚蓝紫、亮甲酚蓝、对氨基苯甲酸、赤藓红、酞菁、偶氮甲碱、花青、黄嘌呤、琥珀酰荧光素、稀土金属穴状化合物、三双吡啶基二胺铜、铜穴状化合物或螯合物、二胺、双花青苷、La Jolla蓝染料、别藻蓝蛋白、allocoyanin B、藻蓝蛋白C、藻蓝蛋白R、硫胺、藻红青蛋白、藻红蛋白R、REG、罗丹明绿、罗丹明异硫氰酸酯、罗丹明红、ROX、TAMRA、TET、TRIT (四甲基罗丹明异硫醇)、四甲基罗丹明和德克萨斯红中的任一种。

[0125] 在一些实施方式中,所述放射性同位素包括¹¹⁰In、¹¹¹In、¹⁷⁷Lu、¹⁸F、⁵²Fe、⁶²Cu、⁶⁴Cu、⁶⁷Cu、⁶⁷Ga、⁶⁸Ga、⁸⁶Y、⁹⁰Y、⁸⁹Zr、⁹⁴mTc、⁹⁴Tc、⁹⁹mTc、¹²⁰I、¹²³I、¹²⁴I、¹²⁵I、¹³¹I、¹⁵⁴⁻¹⁵⁸Gd、³²P、¹¹C、¹³N、¹⁵O、¹⁸⁶Re、¹⁸⁸Re、⁵¹Mn、⁵²mMn、⁵⁵Co、⁷²As、⁷⁵Br、⁷⁶Br、⁸²mRb和⁸³Sr中的任一种。

[0126] 在一些实施方式中,所述酶包括辣根过氧化酶、碱性磷酸酶和葡萄糖氧化酶中的任一种。

[0127] 在一些实施方式中,所述荧光微球为:聚苯乙烯荧光微球,内部包裹有稀土荧光离子铕。

[0128] 根据本发明的一方面,本发明还涉及一种试剂盒,其包括如上所述的结合蛋白。

[0129] 下面将结合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会理解,下列实施例仅用于说明本发明,而不应视为限制本发明的范围。实施例中未注明具体条件者,按照常规条件或制造商建议的条件进行。所用试剂或仪器未注明生产厂商者,均为可以通过市购获得的常规产品。

[0130] 实施例1

[0131] 本实施例提供了一种抗泛种特异性抗原疟原虫乳酸脱氢酶的重组抗体的示例性制备方法。

[0132] S1. 构建表达质粒:

[0133] 本实施例中限制性内切酶、Prime Star DNA聚合酶购自Takara公司;

[0134] MagExtractor-RNA提取试剂盒购自TOYOBO公司;

[0135] BD SMARTTMRACE cDNA Amplification Kit试剂盒购自Takara公司;

[0136] pMD-18T载体购自Takara公司;

- [0137] 质粒提取试剂盒购自天根公司；
- [0138] 引物合成和基因测序由Invitrogen公司完成；
- [0139] 分泌Anti-PAN-PLDH单克隆抗体为已有的杂交瘤细胞株，复苏备用。
- [0140] S11,引物的设计与合成：
- [0141] 扩增重链和轻链的5' RACE上游引物：
- [0142] SMARTER II A Oligonucleotide：
- [0143] 5' >AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTACXXXXX<3' ；
- [0144] 5'-RACE CDS Primer (5'-CDS) :5' >(T)₂₅VN<3' (N=A,C,G,orT;V=A,G,orC) ；
- [0145] Universal Primer A Mix (UPM) ；
- [0146] 5' >CTAATACGACTCACTATAGGGCAAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT<3' ；
- [0147] Nested Universal Primer A (NUP) ；
- [0148] 5' >AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT<3' ；
- [0149] mkR:5' >CGCCTAACACTCATTCTGTTGAAGC<3' ；
- [0150] mHR:5' >CCGCTCATTTACCCGGAGACCG<3' 。
- [0151] S12,抗体可变区基因克隆及测序：
- [0152] 从分泌anti-Pan-PLDH 9G7单克隆抗体的杂交瘤细胞株中提取中RNA,用SMARTERTM RACE cDNA Amplification Kit试剂盒及试剂盒中的SMARTER II A Oligonucleotide和5'-CDS引物进行第一链cDNA合成,获得的第一链cDNA产物作为PCR扩增模板.Light Chain基因以Universal Primer AMix (UPM)、Nested Universal Primer A (NUP) 和mkR引物进行扩增,Heavy Chain基因以Universal Primer AMix (UPM)、Nested Universal Primer A (NUP) 和mHR引物进行扩增。其中Light Chain的引物对扩增出0.7KB左右的目的条带,Heavy Chain的引物对扩增出1.5KB左右的目的条带。用琼脂糖凝胶电泳纯化回收,产物用rTaq DNA聚合酶进行加A反应后插入到pMD-18T载体中,转化到DH5 α 感受态细胞中,长出菌落后分别取Heavy Chain及Light Chain基因克隆各10个克隆送Invitrogen公司进行测序。
- [0153] S13,Anti-PAN-PLDH 9G7抗体可变区基因的序列分析：
- [0154] 将上述测序得到的基因序列放在IMGT抗体数据库中进行分析,并利用VNTI11.5软件进行分析确定重链和轻链引物对扩增出的基因都是正确的,其中Light Chain扩增出的基因片段中,VL基因序列为375bp,属于VkII基因家族,其前方有57bp的前导肽序列;Heavy Chain引物对扩增出的基因片段中,VH基因序列为417bp,属于VH1基因家族,其前方有57bp的前导肽序列。
- [0155] S14,重组抗体表达质粒的构建：
- [0156] pcDNATM3.4TOPO® vector为构建的重组抗体真核表达载体,该表达载体已经引入HindIII、BamHI、EcoRI等多克隆酶切位点,并命名为pcDNA3.4A表达载体,后续简称3.4A表达载体;根据上述pMD-18T中抗体可变区基因测序结果,设计anti-Pan-PLDH9G7的VL和VH基因特异性引物,两端分别带有HindIII、EcoRI酶切位点和保护碱基,引物如下：
- [0157] Pan-9G7-HF：
- [0158] 5' >CCCAAGCTTGCCGCCACCATGAGTGTGCTCACTCAGGTCCTGGGGT<3' ；
- [0159] Pan-9G7-HR：

[0160] 5' >GGGGAATTCTCATTTACCCGGAGACCGGGAGATGGTCTTC<3' ;

[0161] Pan-9G7-LF:

[0162] 5' >CCCAAGCTTGCCGCCACCATGAAGTCACAGACCCAGGTCTTCGTA<3' ;

[0163] Pan-9G7-LR:

[0164] 5' >CCCGAATTCTCAACACTCATTCTGTTGAAGCTCTTGACGATG<3' ;

[0165] 通过PCR扩增方法扩出723bp的Light Chain基因片段和1.452kb的Heavy Chain基因片段。Heavy Chain和Light Chain基因片段分别采用HindIII/EcoRI双酶切,3.4A载体采用HindIII/EcoRI双酶切,将片段和载体纯化回收后Heavy Chain基因和Light Chain基因分别连接3.4A表达载体中,分别得到Heavy Chain和Light Chain的重组表达质粒。

[0166] S2. 抗体制备

[0167] S21重组质粒瞬时转染CHO细胞

[0168] 质粒用超纯水稀释至400 μ g/ml,调节CHO细胞 1.7×10^7 cells/ml于离心管中,100 μ l质粒与700 μ l细胞混合,转入电转杯,电转,转入10ml含CD CHO AGT培养基中,37 $^{\circ}$ C摇床中培养(8%CO₂、震幅115~200rpm);每天取样检测细胞活率,当细胞活率低于50%,离心细胞培养上清。

[0169] S22表达上清的抗体活性鉴定

[0170] 被液稀释Pan-PLDH蛋白到指定浓度,每孔100 μ L,4 $^{\circ}$ C过夜;次日,洗涤液清洗2次,拍干;加入封闭液(20%BSA+80%PBS),每孔120 μ L,37 $^{\circ}$ C孵育1h,拍干;加入倍比稀释后的细胞上清,100 μ L/孔,37 $^{\circ}$ C孵育30min(部分上清1h);洗涤液清洗5次,拍干;加入羊抗鼠IgG-HRP,每孔100 μ L,37 $^{\circ}$ C,30min;洗涤液清洗5次,拍干;加入显色液A液(50 μ L/孔),加入显色液B液(50 μ L/孔),10min;加入终止液,50 μ L/孔;酶标仪上450nm(参考630nm)处读OD值。经过鉴定,构建的表达质粒瞬转后产生的抗体对Pan-PLDH蛋白都有活性。

[0171] ProteinA亲和层析柱纯化表达上清

[0172] 取发酵液的上清,用0.22 μ m的膜过滤,将上清在一定流速的条件下通过Mab Slect SuRe LX(GE Healthcare)亲和填料的柱子进行挂柱,再使用20mM NaAc(pH3.4)溶液进行洗脱,样品收集管中加入一定量的1M Tris溶液进行预中和。洗脱的样品在PBS(pH7.4)溶液中透析换液三次后得到纯化的抗体。取纯化的抗体进行还原性SDS-PAGE。结果如图1所示,第一泳道为0.5mg/ml,第二泳道为1mg/ml,其中分子量较大的为重链,分子量较小的为轻链。

[0173] 实施例2

[0174] 抗体亲和力和分析及活性鉴定

[0175] 实施例1中得到的抗体经分析具有序列如SEQ ID NO:11所示的轻链以及12所示的重链。

[0176] 经分析,重链的互补决定区(WT):

[0177] CDR-VH1为G-S(X1)-S-F-T-N-Y-F(X2)-M-N;

[0178] CDR-VH2为I-N(X1)-P-S-E(X2)-S-E-T-R-I(X3)-N-Q;

[0179] CDR-VH3为A-K(X1)-S-G-D(X2)-F-Y-T-S(X3)-Y-W(X4)-D-Y;

[0180] 轻链的互补决定区:

[0181] CDR-VL1为R-G-S(X1)-G-N-L(X2)-H-N-Y-I(X3)-A;

[0182] CDR-VL2为N-A-R (X1) -T-I (X2) -A-D;

[0183] CDR-VL3为Q-S (X1) -F-W-S-S (X2) -Y-T;

[0184] 其中,X1、X2、X3均为待突变位点。

[0185] 表1与抗体活性有关的突变位点

[0186]	位点	CDR-VH1	CDR-VH2	CDR-VH3	CDR-VL1	CDR-VL3
		X2	X1	X4	X3	X2
	WT	F	N	W	I	S
	突变 1	W	H	F	L	T
	突变 2	F	H	F	L	S
[0187]	突变 3	W	N	F	I	T
	突变 4	F	H	W	I	T

[0188] 发明人将WT中的CDR位点进行上述突变,以获得活性更好的抗体。

[0189] 包被液稀释重组MA蛋白(自产150520-1)到1ug/ml进行微孔板包被,每孔100uL,4℃过夜;次日,洗涤液清洗2次,拍干;加入封闭液(20%BSA+80%PBS),每孔120uL,37℃,1h,拍干;加入稀释后的MA单克隆抗体,100uL/孔,37℃,30min(部分上清1h);洗涤液清洗5次,拍干;加入羊抗鼠IgG-HRP,每孔100uL,37℃,30min;洗涤液清洗5次,拍干;加入显色液A液(50uL/孔),加入显色液B液(50uL/孔),10min;加入终止液,50uL/孔;酶标仪上450nm(参考630nm)处读OD值。

[0190] 表2抗体活性分析数据

样品浓度ng/ml	WT	突变1	突变2	突变3	突变4
1000	1.936	2.264	2.213	2.229	2.148
200	1.819	2.188	2.137	2.140	2.030
40	1.428	2.024	1.978	2.010	1.921
8	0.635	1.100	1.001	1.013	0.939
1.6	0.205	0.339	0.297	0.274	0.251
0.32	0.173	0.270	0.231	0.255	0.211
0	0.072	0.060	0.072	0.053	0.066

[0192] 从上表可知,突变1的活性效果最佳,因而以突变1作为骨架序列筛选效价较好的突变位点(保证筛选得到的抗体活性与突变1相近,抗体活性±10%),部分结果如下。

[0193] 表3与抗体亲和力有关的突变位点

[0194]

位点	CDR-VH1	CDR-VH2	CDR-VH3	CDR-VL1	CDR-VL2	CDR-VL3
	X1	X2/X3	X1/X2/X3	X1/X2	X1/X2	X1
突变 1	S	E/I	K/D/S	S/L	R/I	S

[0195]

突变 1-1	Y	E/L	K/D/Y	T/L	R/V	Y
突变 1-2	T	E/V	K/D/T	S/V	R/L	T
突变 1-3	T	D/I	K/E/S	T/V	K/I	Y
突变 1-4	Y	D/L	K/E/Y	S/I	K/V	T
突变 1-5	S	D/V	K/E/T	T/I	K/L	S
突变 1-6	T	D/I	R/D/S	T/I	K/L	T
突变 1-7	S	D/L	R/D/Y	S/I	K/V	S
突变 1-8	Y	D/V	R/D/T	T/V	K/I	Y
突变 1-9	S	E/I	R/E/S	S/V	R/L	S
突变 1-10	T	E/L	R/E/Y	T/L	R/V	Y
突变 1-11	Y	E/V	R/E/T	S/L	R/I	T
突变 1-12	Y	D/I	K/D/S	S/L	K/V	Y
突变 1-13	T	D/L	K/D/Y	T/L	K/L	T
突变 1-14	S	D/V	K/D/T	S/V	K/I	S
突变 1-15	S	E/I	K/E/S	T/V	R/V	T
突变 1-16	Y	E/L	K/E/Y	S/I	R/L	S
突变 1-17	T	E/V	K/E/T	T/I	R/V	T
突变 1-18	T	D/I	R/D/S	T/I	K/I	S
突变 1-19	Y	D/L	R/D/Y	S/I	K/L	Y
突变 1-20	S	D/V	R/D/T	T/V	KV	T

[0196]

突变 1-21	T	E/I	R/E/S	S/V	R/I	Y
突变 1-22	S	E/L	R/E/Y	T/L	R/L	T
突变 1-23	Y	E/V	R/E/T	S/L	R/V	S
突变 1-24	S	D/I	K/D/S	S/L	K/L	T
突变 1-25	T	D/L	K/D/Y	T/L	K/I	S
突变 1-26	Y	D/V	K/D/T	S/V	K/V	Y
突变 1-27	Y	E/I	K/E/S	T/V	R/L	S
突变 1-28	T	E/L	K/E/Y	S/I	R/I	Y
突变 1-29	S	E/V	K/E/T	T/I	R/V	T
突变 1-30	S	D/I	R/D/S	T/I	K/L	Y
突变 1-31	Y	D/L	R/D/Y	S/I	K/V	T
突变 1-32	T	D/V	R/D/T	T/V	K/I	S
突变 1-33	T	E/I	R/E/S	S/V	R/L	T
突变 1-34	Y	E/L	R/E/Y	T/L	R/V	S
突变 1-35	S	E/V	R/E/T	S/L	R/I	Y
突变 1-36	T	D/I	K/D/S	S/L	K/V	S
突变 1-37	S	D/L	K/D/Y	T/L	K/I	Y
突变 1-38	Y	D/V	K/D/T	S/V	K/L	T
突变 1-39	S	E/I	K/E/S	T/V	R/V	Y
突变 1-40	T	E/L	K/E/Y	S/I	R/I	T

[0197]

突变 1-41	Y	E/V	K/E/T	T/I	R/L	S
突变 1-42	Y	D/I	R/D/S	T/I	K/I	T
突变 1-43	T	D/L	R/D/Y	S/I	K/V	S
突变 1-44	S	D/V	R/E/S	T/V	K/L	Y
突变 1-45	Y	E/I	R/E/Y	S/V	R/I	S
突变 1-46	T	E/L	R/E/T	T/L	R/V	Y
突变 1-47	T	E/V	K/D/S	S/L	R/L	T
突变 1-48	Y	D/I	K/D/Y	S/L	K/L	Y
突变 1-49	S	D/L	K/D/T	T/L	K/V	T
突变 1-50	T	D/V	K/E/S	S/V	K/I	S
突变 1-51	S	E/I	K/E/Y	T/V	R/L	T
突变 1-52	Y	E/L	K/E/T	S/I	R/V	S
突变 1-53	S	E/V	R/D/S	T/I	R/I	Y
突变 1-54	T	D/I	R/D/Y	T/I	K/V	S
突变 1-55	Y	D/L	R/D/T	S/I	K/I	Y

[0198] 亲和力分析

[0199] 以活性鉴定相同方式酶免间接法做数据, 包被做四个梯度0.5ug/ml、0.25ug/ml、0.125ug/ml、0.0625ug/ml; 抗体从100ng/ml开始2倍梯度稀释至0.195ng/ml上样。得出不用包被浓度下不同抗体浓度对应的OD值。在同一包被浓度下, 以抗体浓度为横坐标, OD值为纵坐标, 对数作图, 根据拟合方程计算出50%最大OD值时的抗体浓度; 带入公式: $K = (n-1) / (2 \times (n \times Ab^* - Ab))$ 计算出亲和力常数的倒数, 其中Ab和Ab`分别表示对应包被浓度(Ag、Ag`)下50%最大OD值时的抗体浓度, $n = Ag / Ag^*$; 每两个包被浓度可以组合计算出一个K值, 最后可得六个K值, 取其平均数值, 再求其倒数则为亲和力常数KD。

[0200] 表4亲和力分析数据

[0201]

	K_D		K_D
突变 1	4.1173E-10	突变 1-28	7.5891E-10
突变 1-1	5.207E-10	突变 1-29	4.1109E-10
突变 1-2	3.378E-10	突变 1-30	1.9802E-10
突变 1-3	9.8033E-11	突变 1-31	5.1366E-10
突变 1-4	5.9577E-10	突变 1-32	3.2867E-10
突变 1-5	5.325E-10	突变 1-33	3.7186E-10
突变 1-6	6.6414E-10	突变 1-34	5.6535E-10
突变 1-7	2.079E-10	突变 1-35	4.2376E-10
突变 1-8	4.8103E-10	突变 1-36	5.1794E-10
突变 1-9	6.1629E-10	突变 1-37	5.1988E-10
突变 1-10	5.2522E-10	突变 1-38	6.1272E-10
突变 1-11	4.6525E-10	突变 1-39	5.4978E-10
突变 1-12	1.1780E-10	突变 1-40	4.3886E-10
突变 1-13	5.3124E-10	突变 1-41	7.4323E-10
突变 1-14	4.8778E-10	突变 1-42	5.4479E-10

[0202]

突变 1-15	4.6962E-10	突变 1-43	5.2955E-10
突变 1-16	4.1056E-10	突变 1-44	3.1776E-10
突变 1-17	3.7036E-10	突变 1-45	4.1529E-10
突变 1-18	5.6654E-10	突变 1-46	3.3166E-10
突变 1-19	3.2891E-10	突变 1-47	4.5364E-10
突变 1-20	2.0374E-10	突变 1-48	3.362E-10
突变 1-21	6.5511E-10	突变 1-49	3.4246E-10
突变 1-22	3.7768E-10	突变 1-50	8.7941E-11
突变 1-23	3.1937E-10	突变 1-51	5.2612E-10
突变 1-24	4.0181E-10	突变 1-52	6.5918E-10
突变 1-25	4.9287E-10	突变 1-53	7.174E-10
突变 1-26	3.7374E-10	突变 1-54	6.326E-10
突变 1-27	4.2673E-10	突变 1-55	5.5916E-10

[0203] 从表4可以看出,表3中列出的突变位点对抗体的亲和力影响不大。

[0204] 为验证上述结果,以WT作为骨架序列重复上述实验,进行突变位点的亲和力验证,部分结果如下。

[0205] 表5以WT为骨架进行的突变

[0206]

位点	CDR-VH1	CDR-VH2	CDR-VH3	CDR-VL1	CDR-VL2	CDR-VL3
	X1	X2/X3	X1/X2/X3	X1/X2	X1/X2	X1
WT	S	E/I	K/D/S	S/L	R/I	S
WT 1-1	T	D/I	R/D/S	T/I	K/L	T

[0207]

WT 1-2	Y	D/V	R/D/T	T/V	K/I	Y
WT 1-3	S	E/L	R/E/Y	T/L	R/L	T
WT 1-4	Y	D/V	K/D/T	S/V	K/V	Y
WT 1-5	Y	E/V	K/E/T	T/I	R/L	S
WT 1-6	T	D/L	R/D/Y	S/I	K/V	S
WT 1-7	S	D/V	R/E/S	T/V	K/L	Y
WT 1-8	T	D/V	K/E/S	S/V	K/I	S
WT 1-9	S	E/I	K/E/Y	T/V	R/L	T

[0208] 表6亲和力和分析数据

[0209]

	K_D		K_D
WT	8.8652E-10	WT 1-5	5.1628E-10
WT 1-1	7.5867E-10	WT 1-6	1.5647E-09
WT 1-2	6.3858E-10	WT 1-7	7.5695E-10
WT 1-3	4.8503E-10	WT 1-8	1.3634E-09
WT 1-4	8.4959E-10	WT 1-9	6.2091E-10

[0210] 从表5和表6分析,在保证具有抗体活性的前提下,上述突变位点与其他位点的关联也不大。

[0211] 最后应说明的是:以上各实施例仅用以说明本发明的技术方案,而非对其限制;尽管参照前述各实施例对本发明进行了详细的说明,但本领域的普通技术人员应当理解:其依然可以对前述各实施例所记载的技术方案进行修改,或者对其中部分或者全部技术特征进行等同替换;而这些修改或者替换,并不使相应技术方案的本质脱离本发明各实施例技术方案的范围。

[0001]	SEQUENCE LISTING														
[0002]	<110> 东莞市朋志生物科技有限公司														
[0003]	<120> 一种抗泛种特异性疟原虫乳酸脱氢酶的抗体														
[0004]	<160> 12														
[0005]	<170> PatentIn version 3.3														
[0006]	<210> 1														
[0007]	<211> 23														
[0008]	<212> PRT														
[0009]	<213> Mus musculus														
[0010]	<400> 1														
[0011]	Asp	Ile	Gln	Leu	Thr	Gln	Ser	Pro	Ala	Ser	Leu	Ser	Ala	Ser	Val Gly
[0012]	1				5					10					15
[0013]	Glu	Thr	Val	Thr	Ile	Thr	Cys								
[0014]					20										
[0015]	<210> 2														
[0016]	<211> 15														
[0017]	<212> PRT														
[0018]	<213> Mus musculus														
[0019]	<400> 2														
[0020]	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Gln	Gly	Lys	Ser	Pro	Gln	Leu	Leu	Val	Tyr
[0021]	1				5					10					15
[0022]	<210> 3														
[0023]	<211> 32														
[0024]	<212> PRT														
[0025]	<213> Mus musculus														
[0026]	<400> 3														
[0027]	Gly	Val	Pro	Ser	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Gln	Tyr Ser
[0028]	1				5					10					15
[0029]	Leu	Lys	Ile	Asn	Ser	Leu	Gln	Pro	Glu	Asp	Phe	Gly	Ser	Tyr	Tyr Cys
[0030]					20					25					30
[0031]	<210> 4														
[0032]	<211> 10														
[0033]	<212> PRT														
[0034]	<213> Mus musculus														
[0035]	<400> 4														
[0036]	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Ile	Lys					
[0037]	1				5					10					
[0038]	<210> 5														

[0039]	<211>	25
[0040]	<212>	PRT
[0041]	<213>	Mus musculus
[0042]	<400>	5
[0043]	Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ala Glu Leu Val Arg Pro Gly Ala	
[0044]	1	5 10 15
[0045]	Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser	
[0046]		20 25
[0047]	<210>	6
[0048]	<211>	15
[0049]	<212>	PRT
[0050]	<213>	Mus musculus
[0051]	<400>	6
[0052]	Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Met	
[0053]	1	5 10 15
[0054]	<210>	7
[0055]	<211>	34
[0056]	<212>	PRT
[0057]	<213>	Mus musculus
[0058]	<400>	7
[0059]	Lys Phe Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr	
[0060]	1	5 10 15
[0061]	Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ala Glu Asp Ser Ala Val Tyr	
[0062]		20 25 30
[0063]	Tyr Cys	
[0064]	<210>	8
[0065]	<211>	11
[0066]	<212>	PRT
[0067]	<213>	Mus musculus
[0068]	<400>	8
[0069]	Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser	
[0070]	1	5 10
[0071]	<210>	9
[0072]	<211>	107
[0073]	<212>	PRT
[0074]	<213>	Mus musculus
[0075]	<400>	9
[0076]	Arg Ala Asp Ala Ala Pro Thr Val Ser Ile Phe Pro Pro Ser Ser Glu	
[0077]	1	5 10 15

[0078]	Gln	Leu	Thr	Ser	Gly	Gly	Ala	Ser	Val	Val	Cys	Phe	Leu	Asn	Asn	Phe
[0079]				20				25					30			
[0080]	Tyr	Pro	Lys	Asp	Ile	Asn	Val	Lys	Trp	Lys	Ile	Asp	Gly	Ser	Glu	Arg
[0081]			35					40					45			
[0082]	Gln	Asn	Gly	Val	Leu	Asn	Ser	Trp	Thr	Asp	Gln	Asp	Ser	Lys	Asp	Ser
[0083]		50						55				60				
[0084]	Thr	Tyr	Ser	Met	Ser	Ser	Thr	Leu	Thr	Leu	Thr	Lys	Asp	Glu	Tyr	Glu
[0085]	65					70					75				80	
[0086]	Arg	His	Asn	Ser	Tyr	Thr	Cys	Glu	Ala	Thr	His	Lys	Thr	Ser	Thr	Ser
[0087]				85						90					95	
[0088]	Pro	Ile	Val	Lys	Ser	Phe	Asn	Arg	Asn	Glu	Cys					
[0089]				100						105						
[0090]	<210>	10														
[0091]	<211>	335														
[0092]	<212>	PRT														
[0093]	<213>	Mus musculus														
[0094]	<400>	10														
[0095]	Ala	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Ser	Val	Tyr	Pro	Leu	Ala	Pro	Gly	Cys	Gly
[0096]	1			5					10					15		
[0097]	Asp	Thr	Thr	Gly	Ser	Ser	Val	Thr	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Tyr
[0098]			20					25					30			
[0099]	Phe	Pro	Glu	Ser	Val	Thr	Val	Thr	Trp	Asn	Ser	Gly	Ser	Leu	Ser	Ser
[0100]		35						40					45			
[0101]	Ser	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Leu	Leu	Gln	Ser	Gly	Leu	Tyr	Thr	Met
[0102]		50						55				60				
[0103]	Ser	Ser	Ser	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Thr	Trp	Pro	Ser	Gln	Thr	Val
[0104]	65					70					75				80	
[0105]	Thr	Cys	Ser	Val	Ala	His	Pro	Ala	Ser	Ser	Thr	Thr	Val	Asp	Lys	Lys
[0106]				85						90					95	
[0107]	Leu	Glu	Pro	Ser	Gly	Pro	Ile	Ser	Thr	Ile	Asn	Pro	Cys	Pro	Pro	Cys
[0108]				100						105				110		
[0109]	Lys	Glu	Cys	His	Lys	Cys	Pro	Ala	Pro	Asn	Leu	Glu	Gly	Gly	Pro	Ser
[0110]			115					120					125			
[0111]	Val	Phe	Ile	Phe	Pro	Pro	Asn	Ile	Lys	Asp	Val	Leu	Met	Ile	Ser	Leu
[0112]		130						135					140			
[0113]	Thr	Pro	Lys	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	Glu	Asp	Asp	Pro
[0114]	145					150					155					160
[0115]	Asp	Val	Gln	Ile	Ser	Trp	Phe	Val	Asn	Asn	Val	Glu	Val	His	Thr	Ala
[0116]				165						170					175	

[0117]	Gln Thr Gln Thr His Arg Glu Asp Tyr Asn Ser Thr Ile Arg Val Val
[0118]	180 185 190
[0119]	Ser Thr Leu Pro Ile Gln His Gln Asp Trp Met Ser Gly Lys Glu Phe
[0120]	195 200 205
[0121]	Lys Cys Lys Val Asn Asn Lys Asp Leu Pro Ser Pro Ile Glu Arg Thr
[0122]	210 215 220
[0123]	Ile Ser Lys Ile Lys Gly Leu Val Arg Ala Pro Gln Val Tyr Ile Leu
[0124]	225 230 235 240
[0125]	Pro Pro Pro Ala Glu Gln Leu Ser Arg Lys Asp Val Ser Leu Thr Cys
[0126]	245 250 255
[0127]	Leu Val Val Gly Phe Asn Pro Gly Asp Ile Ser Val Glu Trp Thr Ser
[0128]	260 265 270
[0129]	Asn Gly His Thr Glu Glu Asn Tyr Lys Asp Thr Ala Pro Val Leu Asp
[0130]	275 280 285
[0131]	Ser Asp Gly Ser Tyr Phe Ile Tyr Ser Lys Leu Asn Met Lys Thr Ser
[0132]	290 295 300
[0133]	Lys Trp Glu Lys Thr Asp Ser Phe Ser Cys Asn Val Arg His Glu Gly
[0134]	305 310 315 320
[0135]	Leu Lys Asn Tyr Tyr Leu Lys Lys Thr Ile Ser Arg Ser Pro Gly
[0136]	325 330 335
[0137]	<210> 11
[0138]	<211> 213
[0139]	<212> PRT
[0140]	<213> Mus musculus
[0141]	<400> 11
[0142]	Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
[0143]	1 5 10 15
[0144]	Glu Thr Val Thr Ile Thr Cys Arg Gly Ser Gly Asn Leu His Asn Tyr
[0145]	20 25 30
[0146]	Ile Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Gln Gly Lys Ser Pro Gln Leu Leu Val
[0147]	35 40 45
[0148]	Tyr Asn Ala Arg Thr Ile Ala Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
[0149]	50 55 60
[0150]	Ser Gly Ser Gly Thr Gln Tyr Ser Leu Lys Ile Asn Ser Leu Gln Pro
[0151]	65 70 75 80
[0152]	Glu Asp Phe Gly Ser Tyr Tyr Cys Gln Ser Phe Trp Ser Ser Tyr Thr
[0153]	85 90 95
[0154]	Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Ala Asp Ala Ala Pro
[0155]	100 105 110

[0156]	Thr	Val	Ser	Ile	Phe	Pro	Pro	Ser	Ser	Glu	Gln	Leu	Thr	Ser	Gly	Gly
[0157]				115				120					125			
[0158]	Ala	Ser	Val	Val	Cys	Phe	Leu	Asn	Asn	Phe	Tyr	Pro	Lys	Asp	Ile	Asn
[0159]			130				135					140				
[0160]	Val	Lys	Trp	Lys	Ile	Asp	Gly	Ser	Glu	Arg	Gln	Asn	Gly	Val	Leu	Asn
[0161]	145					150					155					160
[0162]	Ser	Trp	Thr	Asp	Gln	Asp	Ser	Lys	Asp	Ser	Thr	Tyr	Ser	Met	Ser	Ser
[0163]					165					170					175	
[0164]	Thr	Leu	Thr	Leu	Thr	Lys	Asp	Glu	Tyr	Glu	Arg	His	Asn	Ser	Tyr	Thr
[0165]				180					185					190		
[0166]	Cys	Glu	Ala	Thr	His	Lys	Thr	Ser	Thr	Ser	Pro	Ile	Val	Lys	Ser	Phe
[0167]			195					200					205			
[0168]	Asn	Arg	Asn	Glu	Cys											
[0169]			210													
[0170]	<210>	12														
[0171]	<211>	455														
[0172]	<212>	PRT														
[0173]	<213>	Mus musculus														
[0174]	<400>	12														
[0175]	Gln	Val	Gln	Leu	Gln	Gln	Pro	Gly	Ala	Glu	Leu	Val	Arg	Pro	Gly	Ala
[0176]	1			5					10					15		
[0177]	Ser	Val	Lys	Leu	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Ser	Ser	Phe	Thr	Asn	Tyr
[0178]				20					25					30		
[0179]	Phe	Met	Asn	Trp	Val	Lys	Gln	Arg	Pro	Gly	Gln	Gly	Leu	Glu	Trp	Ile
[0180]			35					40					45			
[0181]	Gly	Met	Ile	Asn	Pro	Ser	Glu	Ser	Glu	Thr	Arg	Ile	Asn	Gln	Lys	Phe
[0182]		50					55					60				
[0183]	Lys	Asp	Lys	Ala	Thr	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Ser	Ser	Thr	Ala	Tyr
[0184]	65					70					75				80	
[0185]	Met	Gln	Leu	Ser	Ser	Leu	Thr	Ala	Glu	Asp	Ser	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys
[0186]					85					90					95	
[0187]	Ala	Lys	Ser	Gly	Asp	Phe	Tyr	Thr	Ser	Tyr	Trp	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln
[0188]				100					105					110		
[0189]	Gly	Thr	Thr	Leu	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Ser	Val
[0190]			115						120				125			
[0191]	Tyr	Pro	Leu	Ala	Pro	Gly	Cys	Gly	Asp	Thr	Thr	Gly	Ser	Ser	Val	Thr
[0192]		130					135					140				
[0193]	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Tyr	Phe	Pro	Glu	Ser	Val	Thr	Val	Thr
[0194]	145					150					155					160

[0195]	Trp Asn Ser Gly Ser Leu Ser Ser Ser Val His Thr Phe Pro Ala Leu
[0196]	165 170 175
[0197]	Leu Gln Ser Gly Leu Tyr Thr Met Ser Ser Ser Val Thr Val Pro Ser
[0198]	180 185 190
[0199]	Ser Thr Trp Pro Ser Gln Thr Val Thr Cys Ser Val Ala His Pro Ala
[0200]	195 200 205
[0201]	Ser Ser Thr Thr Val Asp Lys Lys Leu Glu Pro Ser Gly Pro Ile Ser
[0202]	210 215 220
[0203]	Thr Ile Asn Pro Cys Pro Pro Cys Lys Glu Cys His Lys Cys Pro Ala
[0204]	225 230 235 240
[0205]	Pro Asn Leu Glu Gly Gly Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Asn Ile
[0206]	245 250 255
[0207]	Lys Asp Val Leu Met Ile Ser Leu Thr Pro Lys Val Thr Cys Val Val
[0208]	260 265 270
[0209]	Val Asp Val Ser Glu Asp Asp Pro Asp Val Gln Ile Ser Trp Phe Val
[0210]	275 280 285
[0211]	Asn Asn Val Glu Val His Thr Ala Gln Thr Gln Thr His Arg Glu Asp
[0212]	290 295 300
[0213]	Tyr Asn Ser Thr Ile Arg Val Val Ser Thr Leu Pro Ile Gln His Gln
[0214]	305 310 315 320
[0215]	Asp Trp Met Ser Gly Lys Glu Phe Lys Cys Lys Val Asn Asn Lys Asp
[0216]	325 330 335
[0217]	Leu Pro Ser Pro Ile Glu Arg Thr Ile Ser Lys Ile Lys Gly Leu Val
[0218]	340 345 350
[0219]	Arg Ala Pro Gln Val Tyr Ile Leu Pro Pro Pro Ala Glu Gln Leu Ser
[0220]	355 360 365
[0221]	Arg Lys Asp Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Val Gly Phe Asn Pro Gly
[0222]	370 375 380
[0223]	Asp Ile Ser Val Glu Trp Thr Ser Asn Gly His Thr Glu Glu Asn Tyr
[0224]	385 390 395 400
[0225]	Lys Asp Thr Ala Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Tyr Phe Ile Tyr
[0226]	405 410 415
[0227]	Ser Lys Leu Asn Met Lys Thr Ser Lys Trp Glu Lys Thr Asp Ser Phe
[0228]	420 425 430
[0229]	Ser Cys Asn Val Arg His Glu Gly Leu Lys Asn Tyr Tyr Leu Lys Lys
[0230]	435 440 445
[0231]	Thr Ile Ser Arg Ser Pro Gly
[0232]	450 455

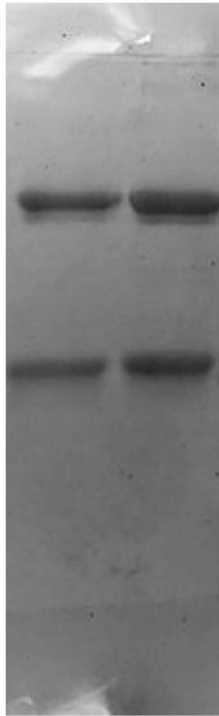


图1