



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 108659131 B

(45) 授权公告日 2021.09.14

(21) 申请号 201810525042.5

G01N 33/574 (2006.01)

(22) 申请日 2018.05.28

(56) 对比文件

(65) 同一申请的已公布的文献号

CN 107880130 A, 2018.04.06

申请公布号 CN 108659131 A

CN 1563092 A, 2005.01.12

(43) 申请公布日 2018.10.16

CN 106432502 A, 2017.02.22

(73) 专利权人 长春力太生物技术有限公司

WO 2017025033 A1, 2017.02.16

地址 130103 吉林省长春市高新区锦湖大
路1357号七楼708

US 2004053340 A1, 2004.03.18

(72) 发明人 李文秋 谢英林 徐雪松 王珂
刘永红

CN 106749667 A, 2017.05.31

CN 106946989 A, 2017.07.14

(74) 专利代理机构 北京市众天律师事务所
11478

刘亚文等.“抗癌胚抗原纳米抗体展示文库
的构建与筛选”.《科学技术与工程》.2018,第18
卷(第28期),

代理人 李新军

HAO WANG等.“A nanobody targeting
carcinoembryonic antigen as a promising
molecular probe for non-small cell lung
cancer”.《MOLECULAR MEDICINE REPORTS》
.2017,第16卷

(51) Int. Cl.

C07K 16/30 (2006.01)

C07K 19/00 (2006.01)

C12N 15/13 (2006.01)

C12N 9/16 (2006.01)

审查员 夏颖

权利要求书1页 说明书8页

序列表6页 附图2页

(54) 发明名称

一种抗CEACAM-5的单域抗体及其应用

(57) 摘要

本发明公开了一种抗CEACAM-5的单域抗体,所述单域抗体具有独特的3个互补决定区CDR1、CDR2、CDR3,本发明还提供了含有该单域抗体可变区编码序列的表达载体,以及含有该表达载体的宿主细胞,本发明还提供了单域抗体可变区与人碱性磷酸酶的融合蛋白,所述单域抗体在制备CEACAM-5检测试剂盒中的应用,应用所述单域抗体进行CEACAM-5免疫检测的方法,以及相应的检测试剂盒。本发明提供的抗CEACAM-5单域抗体对CEACAM-5具有特异的识别和结合能力,该单域抗体亲和力可达到 $4.51E-09$,具有独特的抗原决定簇识别位点,能够在CEACAM-5免疫检测特别是双抗体夹心法中获得优异的检测效果。

1. 一种抗CEACAM-5的单域抗体,其特征在于,所述单域抗体的可变区具有3个互补决定区CDR1、CDR2、CDR3,其中,CDR1序列由SEQ ID NO.1所示氨基酸序列组成,CDR2序列由SEQ ID NO.2所示氨基酸序列组成,CDR3序列由SEQ ID NO.3所示氨基酸序列组成。
2. 根据权利要求1所述的单域抗体,其特征在于,所述单域抗体的可变区序列由SEQ ID NO.4所示氨基酸序列组成。
3. 一种权利要求2所述单域抗体与人碱性磷酸酶的融合蛋白,其特征在于,所述融合蛋白由所述单域抗体与人胎盘碱性磷酸酶串联而成。
4. 一种编码权利要求2所述单域抗体的多核苷酸,其特征在于,所述多核苷酸的序列如SEQ ID NO.5所示。
5. 一种含有权利要求4所述的多核苷酸的表达载体,其特征在于,所述载体为pMES4。
6. 一种含有权利要求5所述表达载体的宿主细胞,其特征在于,所述细胞为大肠杆菌BL21(DE3)。
7. 权利要求1或2所述的单域抗体在制备CEACAM-5抗原检测试剂盒中的应用。
8. 一种基于非诊断目的的CEACAM-5抗原免疫检测方法,其特征在于,所述方法为双抗体夹心酶联免疫检测法,一抗的可变区氨基酸序列如SEQ ID NO.6所示,二抗为酶联二抗,其可变区氨基酸序列如SEQ ID NO.4所示。
9. 根据权利要求8所述的方法,其特征在于,所述酶联二抗为抗CEACAM-5的单域抗体与人胎盘碱性磷酸酶的融合蛋白。
10. 一种运用双抗体夹心法检测CEACAM-5抗原的免疫试剂盒,所述试剂盒包括用于捕获抗原的一抗,以及用于与抗原结合引发酶联反应的二抗,其特征在于,所述一抗的可变区氨基酸序列如SEQ ID NO.6所示,所述二抗为抗CEACAM-5抗原的单域抗体与人碱性磷酸酶的融合蛋白,所述融合蛋白序列如SEQ ID NO.7所示。

一种抗CEACAM-5的单域抗体及其应用

技术领域

[0001] 本发明公开了一种多肽,更具体地,本发明公开了一种免疫球蛋白。

背景技术

[0002] 癌胚抗原(CEACAM-5,简称为CEA,又称为CD66e)是一种具有约180kDa分子量的糖蛋白。CEACAM-5是免疫球蛋白超家族的一名成员,并且含有经由糖基磷脂酰肌醇(GPI)锚与细胞膜连接的7个结构域。7个结构域包括单一N端Ig可变域和与Ig恒定域同源的6个结构域(A1-B1-A2-B2-A3-B3)。CEACAM-5最初分类为仅在胎儿组织中表达的蛋白质,现在已经在几种正常成年组织中鉴定出。CEACAM-5的过量表达在许多类型的癌症中观察到,包括结肠直肠癌、胰腺癌、肺癌、胃癌、肝细胞瘤、乳腺癌和甲状腺癌。因此,CEACAM-5已经被鉴定为肿瘤相关抗原。CEACAM-5容易自细胞表面切割,并直接或经由淋巴系统自肿瘤脱落入血流中。由于此特性,已经使用血清CEACAM-5的水平作为临床标志物以诊断癌症并筛选癌症。而且,CEACAM-5也已被用作肿瘤标记,测量癌症患者血液中升高的CEACAM-5的免疫学测定法已在临床上用于癌症的预后和控制。

[0003] 更重要的是,CEACAM-5已成为用于靶向治疗的潜在有用的肿瘤相关抗原。已经报道的使用CEACAM-5靶向免疫治疗癌症主要有2种主要方法。一种方法使用抗CEACAM-5抗体引发免疫细胞的溶解活性,特别是通过抗体依赖性细胞毒性(ADCC)或补体依赖性细胞毒性(CDC),以消除表达CEACAM-5的肿瘤细胞;另一种方法是通过抗CEACAM-5抗体或抗体片段与例如药物、毒素、放射性核苷酸、免疫调节剂或细胞因子等效应分子缀合,特异性靶向表达CEACAM-5的肿瘤细胞,从而发挥效应分子的治疗作用。

[0004] 目前已经针对CEACAM-5生成多种单克隆抗体。Chester等已经自噬菌体展示文库分离出单链抗CEACAM-5抗体以在放射性免疫检测和放射性免疫疗法中使用(美国专利No.5,876,691),随后将抗体人源化(美国专利No.7,232,888)。放射性标记的抗CEACAM-5抗体已经在结肠直肠癌患者的临床试验中使用。

[0005] 1993年,Hamers-Casterman等研究发现,在骆驼科动物(骆驼,单峰骆驼和美洲驼)的体内发现了一类仅有重链二聚体抗体 H_2 ,其主要是IgG2和IgG3类型。此类抗体由于缺乏轻链,于是将这种抗体称为仅有重链的抗体(heavychain-only-like Antibody,HCAbs),而它们的抗原结合部位由一个结构域组成,称为VHH区,因此该类抗体也被称为单结构域抗体或者单域抗体(sdAb)。由于该类抗体为去除恒定区后的可变区序列,分子量只有15kD,大约10纳米的直径,因此也被称为纳米抗体(Nbs)。另外,在鲨鱼中也观察到这类单结构域抗体,称为VNAR。这种仅有重链的抗体原来只是作为一种人类B细胞增生性疾病(重链病)的病理形式被人们所认识,这种仅有重链的抗体可能是由于基因组水平的突变和缺失而导致重链CH1结构域不能表达,使得表达出的重链缺乏CH1,从而缺乏与轻链的结合能力,从而形成一种重链二聚体。

[0006] 相对于常规的四链抗体的scFv而言,单域抗体在亲和力方面与其对应的scFv相当,但在可溶性、稳定性、对聚集的抗性、可重折叠性、表达产率以及DNA操作、文库构建和3-

D结构测定的容易性方面超越scFv。

[0007] 单域抗体有来源于成年骆驼体内HCAbs的最小的功能性抗原结合片段,具有高度稳定性和与抗原结合的高亲合力,能与蛋白裂隙和酶活性位点的相互作用,使之作用类似于抑制剂。因此,单域抗体可以为从肽模拟药物设计小分子酶抑制物提供新的思路。由于仅有重链,单域抗体的制造较mAb容易。单域抗体的独特性质,如处于极端温度和pH环境中的稳定性,可以低成本制造大产量。因此,单域抗体在疾病的治疗和诊断中具有很大的价值,在肿瘤的抗体靶向诊断和治疗中也具有很大的发展前景。

[0008] 鉴于CEACAM-5更多地过量表达于一些诸如结肠直肠癌、胰腺癌、肺癌、胃癌、肝细胞瘤、乳腺癌和甲状腺癌等实体肿瘤中,因此研发抗CEACAM-5的单域抗体,充分发挥单域抗体超强的抗原识别能力,特别是识别一些隐匿于裂隙或空腔里的抗原决定簇成为抗体技术领域的一种新的需求。但是鉴于单域抗体分子过低而存在的一些诸如亲和力低、易于集聚、血清半衰期短等结构缺陷却阻碍着单域抗体的进一步应用。而在CEACAM-5的免疫检测具体应用中,如果抗CEACAM-5抗体识别CEACAM-5的抗原决定簇过于单一或者位点过于接近或者重叠,都会导致特异性的抗原抗体结合反应收到感染,从而严重影响检测效率。本发明的目的就是提供一种能够充分发挥单域抗体的优越性能,又能克服其固有缺陷的抗CEACAM-5的单域抗体,即,所述抗体既具有高度特异的抗原识别能力,具有高度的亲和力,并且具有独特的抗原决定簇识别位点,能够在CEACAM-5抗原的免疫检测特别是双抗体夹心法中获得优异的检测效率。

发明内容

[0009] 基于上述发明目的,本发明首先提供了一种抗CEACAM-5的单域抗体,所述单域抗体的可变区具有3个互补决定区CDR1、CDR2、CDR3,其中,CDR1序列由SEQ ID NO.1所述氨基酸序列组成,CDR2序列由SEQ ID NO.2所述氨基酸序列组成,CDR3序列由SEQ ID NO.3所述氨基酸序列组成。所述抗体具有独特的抗原决定簇识别位点。

[0010] 在一个优选的技术方案中,所述单域抗体的可变区序列由SEQ ID NO.4所述氨基酸序列组成。在本发明中具有该可变区序列的单域抗体的一个优选实施例为单域抗体2E5。

[0011] 其次,本发明提供了上述单域抗体与人碱性磷酸酶的融合蛋白,所述融合蛋白由所述单域抗体或其可变区片段与人胎盘碱性磷酸酶报告基因蛋白串联而成,在本发明的一个优选实施方案中,所述人胎盘碱性磷酸酶报告基因蛋白的序列如SEQ ID NO:8所示。

[0012] 第三,本发明还提供了一种上述单域抗体序列的核苷酸编码序列,所述编码序列由SEQ ID NO.5所示。

[0013] 第四,本发明提供了一种含有上述核苷酸编码序列的表达载体,所述载体为pMES4。

[0014] 第五,本发明提供了一种含有上述表达载体的宿主细胞,所述细胞为大肠杆菌BL₂₁(DE₃)。

[0015] 第六,本发明还提供了上述的单域抗体在制备CEACAM-5抗原检测试剂中的应用。

[0016] 第七,本发明提供了一种基于非诊断目的的CEACAM-5抗原免疫检测方法,所述方法为双抗体夹心酶联免疫检测法,所述一抗的可变区序列含有如SEQ ID NO.6所述的氨基酸序列所示,所述二抗为酶联二抗,其可变区序列含有如SEQ ID NO.4所述的氨基酸序列。

[0017] 在一个优选的技术方案中,所述酶联二抗为抗CEACAM-5抗原的单域抗体与人胎盘碱性磷酸酶的融合蛋白,在本发明的一个优选实施方案中,所述人胎盘碱性磷酸酶序列如SEQ ID NO:8所示。

[0018] 最后,本发明还提供了一种运用双抗体夹心法检测CEACAM-5抗原的免疫试剂盒,所述试剂盒包括用于捕获抗原的一抗,以及用于与抗原结合引发酶联反应的二抗,所述一抗的可变区序列含有如SEQ ID NO.6所述的氨基酸序列,所述二抗为抗CEACAM-5抗原的单域抗体与人碱性磷酸酶的融合蛋白,所述融合蛋白序列含有如SEQ ID NO.7所述的氨基酸序列。

[0019] 本发明提供的抗CEACAM-5抗原的单域抗体2E5对CEACAM-5抗原具有特异的识别和结合能力,该单域抗体亲和力可达到 $4.51E-09$,且与几种抗CEACAM-5单域抗体相比,识别不同的抗原决定簇,具有独特的抗原决定簇识别位点。本发明提供的抗CEACAM-5抗原的单域抗体与人碱性磷酸酶的融合蛋白既保留了对CEACAM-5抗原具有特异的识别和结合能力,还引入了人碱性磷酸酶的完整活性,其在作为双抗体夹心免疫法检测标本中CEACAM-5抗原含量的应用中显示了良好的应用前景,尤其是独特的抗原识别位点,使其能够与许多其它的抗CEACAM-5抗体配合,分别作为一抗和二抗使用,极大地提高了检测效率,保证了检测的特异性,尤其是其与2C2单域抗体的配合使用,呈现了良好的线性曲线, R^2 达到0.9934,接近完全的线性关系。

附图说明

- [0020] 图1.单域抗体2E5的SDS-PAGE鉴定图;
[0021] 图2.单域抗体2E5亲和力测试曲线图;
[0022] 图3.单域抗体2E5交叉反应原性测定结果图;
[0023] 图4.Biacore分析单域抗体2E5结合位点流程图。

具体实施方式

[0024] 下面结合具体实施例来进一步描述本发明,本发明的优点和特点将会随着描述而更为清楚。但这些实施例仅是范例性的,并不对本发明的保护范围构成任何限制。

[0025] 实施例1抗CEACAM-5单域抗体噬菌体展示文库的构建及筛选

[0026] 1.1羊驼的免疫:选取健康成年羊驼一只羊,将重组蛋白CEACAM-5抗原与弗氏佐剂按1:1的比例混匀,按6-7 μ g/Kg采用背部皮下多点注射的方式免疫羊驼,共免疫四次,免疫间隔为2周。之后采集羊驼外周血,用于构建噬菌体展示文库。

[0027] 1.2驼源淋巴细胞的分离:按照本技术领域常规程序从采集的驼源抗凝全血中分析淋巴细胞,每 2.5×10^7 个活细胞加入1mL RNA分离试剂,取1mL进行RNA提取,其余-80 $^{\circ}$ C保存。

[0028] 1.3总RNA提取:按照本技术领域常规程序提取总RNA,用RNase-free水调整浓度到1 μ g/ μ L。

[0029] 1.4反转录合成cDNA:

[0030] 根据逆转录试剂盒说明书(Roche公司的transcripor first stand cDNA synthesis KIT)以1.3步骤获得的RNA为模板进行逆转录cDNA

[0031] 1.5抗体可变区基因扩增:将反转录得到的cDNA作为模版进行PCR反应。扩增共进行两轮,第一轮PCR的引物序列如下:

[0032] CALL001:GTCCTGGCTGCTCTTCTACAAGG

[0033] CALL002:GGTACGTGCTGTTGAACTGTTCC

[0034] PCR反应条件及程序为:95℃5min;95℃30s,57℃30s,72℃30s,30cycles;72℃7min

[0035] 使用琼脂糖凝胶回收试剂盒回收700bp左右的条带,最终用水调整核酸浓度至5ng/ μ l。

[0036] 第二轮PCR的引物序列如下:

[0037] VHH-Back:GATGTGCAGCTGCAGGAGTCTGGRGGAGG

[0038] VHH-For:CTAGTGC GGCCGCTGGAGACGGTGACCTGGGT

[0039] PCR反应条件及程序为:95℃5min;95℃30s,55℃30s,72℃30s,15cycles;72℃7min

[0040] 使用PCR产物回收试剂盒纯化PCR产物。

[0041] 1.6载体构建

[0042] 将pMES4与第二次PCR产物分别进行PstI、BstEII双酶切,取1.5 μ g酶切后载体和450ng酶切后的第二次PCR产物,加15 μ L T4DNA连接酶,补充缓冲液和水至150 μ L总体积,16℃过夜连接并回收连接产物。使用PCR产物回收试剂盒进行产物回收,20 μ L水洗脱。

[0043] 1.7电转化及库容测定

[0044] 取10 μ L纯化后的连接产物,加入到含有50 μ L大肠杆菌TG1感受态细胞的预冷电转杯中置入电转仪(美国BTX的ECM630电转仪)进行电转化,取出电转杯,复苏并培养转化子。随机挑选克隆,进行菌落PCR鉴定。根据PCR阳性率推算库容(库容量=克隆数 \times 稀释倍数 \times [阳性率]PCR鉴定 \times 10)。

[0045] 引物序列如下:

[0046] MP57:TTATGCTTCCGGCTCGTATG

[0047] GIII:CCACAGACAGCCCTCATAG

[0048] 1.8噬菌体扩增

[0049] 取复苏的菌液接种至YT-AG培养基中,37℃200rpm培养到培养物OD₆₀₀=0.5。取出10ml菌液加入 4×10^{10} VCSM13,37℃静止感染30min。4000rpm,常温离心10min,去净上清。用2 \times YT-AK(含氨苄青霉素和卡那霉素)培养基重悬菌体,37℃200rpm培养过夜。离心取上清40ml管中,加入10ml PEG/NaCl(20%/2.5M)溶液充分混合,离心弃上清,沉淀用1ml冰PBS洗涤离心,取上清250 μ l预冷的PEG/NaCl,充分混匀并洗涤重悬。

[0050] 测定噬菌体滴度:将TG1培养至OD₆₀₀=0.4,用LB培养基梯度稀释噬菌体,取倍比稀释的噬菌体TG1培养物混合培养,次日观察培养板中噬菌斑形成情况,对噬菌斑数在30-300的稀释梯度平板进行计数并按照下列公式计算噬菌体滴度(pfu)。

[0051] 噬菌体滴度(pfu/ml)=稀释倍数 \times 噬菌斑数目 \times 100

[0052] 1.9单域抗体筛选

[0053] 通过ELISA方法以重组CEACAM-5抗原筛选阳性克隆。以重组CEACAM-5抗原包被ELISA板,5%BSA封闭,PBST洗涤。每孔加入100 μ l噬菌体上清液,37℃放置1h。弃上清,加入

HRP标记的小鼠抗M13的二抗,37℃放置1h。弃上清,加入TMB溶液,室温孵育5min,每孔加入2M硫酸终止液,用酶标仪450nm读数。

[0054] 挑选噬菌体ELSIA结果阳性的克隆,提取质粒。用Vector NTI软件对测序结果进行分析,登录IMGT (http://www.imgt.org/IMGT_vquest),对抗体轻链和重链基因进行分析,以确定可变区的框架区 (framework regions,FR) 和互补决定区 (complementarity determining regions,CDR)。

[0055] 抗CEACAM-5抗原单域抗体2E5重链核苷酸序列为SEQ ID NO.5所示,可变区氨基酸序列为SEQ ID NO.4所示,其中第1-25位氨基酸序列为FR1,第26-32位氨基酸序列为CDR1,第33-48位氨基酸序列为FR2,第49-56位氨基酸序列为CDR2,第57-94位氨基酸序列为FR3,第95-105位氨基酸序列为CDR3,第106-116位氨基酸序列为FR4。

[0056] 实施例2抗CEACAM-5抗原单域抗体2E5的制备

[0057] 2.1单域抗体原始菌株TG1扩增及单域抗体重组质粒转化大肠杆菌BL21 (DE3)

[0058] 将含有单域抗体核酸的原始菌株TG1甘油菌,按照1:1000比例接种于5mL新鲜的LB-A培养基,37℃,200rpm过夜培养。次日,使用Plasmid mini kit (OMEGA)按照说明书提取质粒。经验证后将上述质粒1 μ l转化于100 μ l感受态细胞中,轻轻混匀,在冰上放置30min,42℃水浴热击90s,冰浴冷却3min。向离心管加入600 μ l LB培养基,37℃振荡培养60min。取上清100 μ l,用三角涂布器涂布在LB-A平板上,37℃倒置培养过夜。

[0059] 2.2单域抗体的诱导表达

[0060] 挑取上述单克隆菌落于LB-A培养基中,37℃振荡培养过夜。次日,取该菌液按照1:100比例加入100ml新鲜LB-A培养基,37℃振荡培养3h至菌液OD₆₀₀=0.8左右,加入终浓度为1mM IPTG,30℃诱导过夜。第三日,8000rpm,离心10min收集菌体,加入1.5mL的预冷TES缓冲液重悬沉淀。冰浴2min后,轻柔振荡30s,重复此循环6次。加3.0ml TES/4 (将TES用水稀释4倍),轻柔振荡30s后,冰浴静置2min,同样重复振荡和静置步骤共6次。9000rpm,4℃离心10min,收集上清即为周质提取物。

[0061] 2.3单域抗体的纯化和鉴定

[0062] 将IMAC Sepharose (GE公司)重悬后,取2ml加入到重力柱内,静置30min,使sepharose自然沉降于重力柱底部,流出保存缓冲液。加入2倍柱体积的硫酸镍溶液(0.1M),按照约8s/滴的流速流出硫酸镍溶液;加入10倍柱体积的平衡缓冲液平衡并洗涤sepharose,流速维持不变;将样品使用平衡缓冲液2倍稀释后,加入重力柱中,调节流速为6s/滴,收集穿透液;加入10倍柱体积洗涤缓冲液洗涤sepharose,维持流速不变,收集洗涤液;加入3倍柱体积的洗脱缓冲液,流速维持在6s/滴,收集含有目的蛋白的洗脱液;最后依次加入10倍柱体积的平衡缓冲液、10倍柱体积的纯水和10倍柱体积的20%乙醇洗涤sepharose,并最终保留4ml的20%乙醇保存层析柱。将上述收集的样品分别进行SDS-PAGE检测(图1:M为彩虹180广谱蛋白Marker;1为纯化后的单域抗体2E5)。

[0063] 实施例3抗CEACAM-5单域抗体与CEACAM-5抗原的亲合活性

[0064] 3.1芯片抗原偶联

[0065] 将CEACAM-5抗原用不同pH的醋酸钠缓冲液(pH 5.5,pH 5.0,pH 4.5,pH 4.0)配制成为20 μ g/mL的工作液,同时准备50mM的NaOH再生溶液,利用Biacore T100蛋白相互作用分析系统仪器中的模板方法对不同pH条件的抗原与芯片(GE公司)表面之间的静电结合进行分

析,以信号增加的量达到5倍RL为标准,选择合适的最偏中性的pH体系并根据需要调整抗原浓度作为偶联时的条件。按照仪器中自带的模板方法对芯片进行偶联:其中1通道选择空白偶联模式,2通道选择Target偶联模式,目标设置为设计好的理论偶联量。偶联过程大概耗时60min。

[0066] 3.2分析物浓度设置条件探索及再生条件优化

[0067] 采取手动进样模式,选择1,2通道2-1模式进样,流速设置为30 μ L/min。进样条件均为120s,30 μ L/min。再生条件均为30s,30 μ L/min。首先持续空走运行缓冲液直至所有基线均稳定。准备浓度跨度较大的单域抗体溶液,以运行缓冲液配置,建议设置200 μ g/mL,150 μ g/mL,100 μ g/mL,50 μ g/mL,20 μ g/mL,10 μ g/mL,2 μ g/mL。准备再生溶液,选择谷氨酸盐酸体系四个pH梯度的再生溶液:1.5,2.0,2.5,3.0。手动进样200 μ g/mL分析物样品,观察2通道,从最偏中性pH的再生缓冲液进行再生,直至2通道再生后的响应线回到与基线同一高度。再手动进样一次200 μ g/mL分析物样品,观察2-1通道的信号变化并记录结合量,用上一步中最后使响应线回到基线的再生溶液进行再生后,再次收手动进样200 μ g/mL分析物样品,观察2-1通道的信号变化并记录结合量与刚才的结合量数值对比,若偏差小于5%,即认为此pH的再生溶液为最佳的再生溶液,若再次进样的结合量偏低,则继续以更低pH的再生缓冲液进行实验。以选择的最佳再生溶液,作为每次进样后的芯片表面再生试剂。分别进样上面设置的分析物浓度样品,并对每个浓度的结合量进行分析,最终确定亲和力测试所需的浓度梯度。

[0068] 3.3亲和力测试

[0069] 按优化好的样品浓度梯度,再生溶液,使用仪器自带的模板方法(其中设置进样条件为60s,30 μ L/min;解离时间:600s;再生条件:30s,30 μ L/min)对单域抗体及抗原之间的亲和力进行测试。随时观察2-1通道的信号情况。亲和力测试过程大概耗时200min。

[0070] 3.4结果分析

[0071] 选择合适的几个浓度梯度的结合解离曲线采用1:1binding的模式对所有曲线进行拟合,最终得到亲和力数值及结合常数和解离常数等重要参数(图2:单域抗体2E5与CEACAM-5抗原的结合常数为2.186E+5,解离常数为9.864E-5)。抗CEACAM-5单域抗体2E5亲和力数值为4.51E-9

[0072] 实施例4抗CEACAM-5单域抗体2E5的交叉反应原性测定

[0073] 将抗原CEACAM5、CEACAM1和CEACAM6分别以0.2 μ g/孔包被酶标板,于4 $^{\circ}$ C过夜孵育;次日,每孔加入200 μ l封闭液(1%BSA),37 $^{\circ}$ C温育1h后,PBST洗涤5次,每次3min;每孔加入50 μ l,共3 μ g的单域抗体2E5,37 $^{\circ}$ C孵育0.5h,PBST洗涤5次,每次3min;以HRP标记的山羊抗羊驼的抗体(GE公司)作为二抗,按照梯度的稀释比例,50 μ l/孔,37 $^{\circ}$ C孵育0.5h;加入TMB显色底物,室温避光反应10min后,加入2M H₂SO₄终止反应,于450nm处读取OD值。同时使用阴性羊驼血清作为对照。结果见图3,CEACAM1和CEACAM6两种抗原在二抗的工作浓度达到1:2000时,检测的OD值仍低于阴性血清,表明了本项目单域抗体的特异性良好。

[0074] 实施例5单域抗体2E5的ELISA叠加数据分析

[0075] 4.1抗原饱和浓度的确定

[0076] 以2 μ g/ml的浓度包被CEACAM-5抗原,100 μ l/孔,4 $^{\circ}$ C包被24h,洗板5遍。以1%BSA作为封闭剂过夜封闭,洗板5遍。酶标板中加入不同梯度稀释的单域抗体,阴性对照(阴性血清1:100),PBS空白对照,37 $^{\circ}$ C孵育30min,洗板5遍。加入1:4000比例稀释的HRP标记的羊抗羊

驼IgG,37℃孵育30min,洗板5遍。加TMB显色液,37℃孵育10min,2M硫酸终止反应。读取吸光度450nm读数,绘制抗体饱和曲线,根据结果选择随浓度增加读数不再增加的浓度为饱和浓度。

[0077] 4.2位点叠加实验

[0078] 先加入第一种抗体进行反应,洗板后再加第二种抗体,洗板后加酶标二抗,TMB显色读数(方法同4.1)。计算两株抗体叠加率AI,AI>50%说明被测2株抗体抗原位点不同,AI<50%说明被测两株抗体抗原表位相同,AI值越大,位点重叠可能性越低。公式为:AI=[2*A(1+2)-(A1+A2)]/A(1+2)*100%

[0079] A1—第一株抗体读数

[0080] A2—第二株抗体读数

[0081] A(1+2)—叠加2种抗体读数

[0082] 表1:抗体抗原表位叠加实验

[0083]

	1st抗体	2nd抗体	1st抗体+2nd抗体	叠加率
2E5+11C12	0.335	0.529	0.762	86.61%
2E5+15E7	0.335	0.466	0.691	84.08%
2E5+2C2	0.335	0.508	0.738	85.77%

[0084] 实验结果见表1,2E5与11C12(该抗体序列公布于CN106946989A的SEQ ID NO.1)、15E7(该抗体序列公开于CN106749667A的抗体VHH-CEA 1,SEQ ID NO.4)、2C2(该抗体序列公布于CN106946989A的SEQ ID NO.4,)三株单域抗体分别针对CEACAM-5抗原不同的抗原表位,这预示着在单域抗体的诊断和治疗应用上,2E5单域抗体可以作为其他单域抗体的表位互补的组合物联合应用,从而可以增大诊断或治疗的效率。

[0085] 实施例6利用Biacore分析单域抗体2E5结合位点

[0086] Biacore系统主要原理就是通过表面分子的浓度改变使SPR(折射率)发生偏移,在监测器上表现为RU值的变化。由于该系统的灵敏度更高,我们设计了相关实验来验证ELISA叠加的实验结果。如图4所示,首先重复进2针第一个单域抗体A,观察RU值的变化,以确认相应的抗原结合位点的饱和并记录;之后进入第二个单域抗体B,观察并记录RU值:如该RU值比单一的单域抗体B的RU值相差不超过20%,即可认为两者识别不同的抗原决定簇;如相差值超过20%但低于60%,认为两者有位阻效应;若相差值超过了60%,判定两者识别了同一抗原。具体操作为首先单纯进样抗体B记录RU增加值 R_{B1} ,并对芯片再生;之后重复进两次抗体A,记录RU增加值 R_A ,并确认饱和后,直接进样抗体B,观察RU值的增加量 R_{B2} ;之后使用公式 $(R_{B2}-R_A)/R_{B1}$ 来计算位阻率,以此判定二者是否识别同一抗原决定簇。该实施例结果见表2。2E5单域抗体与11C12(该抗体序列公布于CN106946989A的SEQ ID NO.1)、15E7(该抗体序列公开于CN106749667A的抗体VHH-CEA 1,SEQ ID NO.4)、2C2(该抗体序列公布于CN106946989A的SEQ ID NO.4)三株单域抗体的位阻率分别为5.79%、17.98%和13.64%。依次判断2E5与其他三株单域抗体均识别不同抗原位点,该结果与ELISA叠加实验推测的结果一致。更加验证了抗CEACAM-5单域抗体2E5在诊断和治疗CEA领域的应用前景。

[0087] 表2:Biacore检测单域抗体叠加实验RU值变化表

样品名称	相对 RU 值增加量			位阻率	
	抗体 A	抗体 B	抗体 (A*2)		抗体 (A+B)
[0088] 11C12	2E5	18.9	45.6	48.4	5.79%
15E7	2E5	19	39.7	48.4	17.98%
2C2	2E5	33.6	41.8	48.4	13.64%

[0089] 实施例7 2E5-HAP在检测临床样品血清中的CEACAM-5含量中的应用

[0090] 以人碱性磷酸酶的结合位点序列作为化学发光区氨基酸序列,如SEQ ID NO:8所示。使之通过柔性多肽与2E5单域抗体相融合成为带有化学发光区序列的单域抗体2E5-HAP,其氨基酸序列如SEQ ID NO:7所示。在所述核苷酸编码序列的两个末端添加有HindIII和EcoRI两个酶切位点,以该两个酶切位点连接到载体pcDNA3.1(+)上。无内毒素大提质粒后利用状态处于对数生长的293细胞进行转染。获得转染的细胞培养至36h后将细胞培养液倒入50ml离心管中,12000g离心5min,收集上清,用0.22um滤膜过滤,利用阴离子交换层析对培养上清进行纯化。利用实施例3相同的方法对2E5-HAP进行亲和力测试,结果2E5-HAP的亲和力数值为 $9.173E-11$ 。经过筛选配对,结果见表3所示。选取FC融合单域抗体2C2(该抗体序列公布于CN106946989A的SEQ ID NO.4)为捕获一抗,其可变区序列含有如SEQ ID NO.6所述的氨基酸序列所示,2E5-HAP为酶标二抗进行双抗体夹心免疫法检测血清标本中的CEACAM-5抗原,获得了优异的检测效果,具体过程如下:

[0091] 使用无菌CBS稀释FC融合单域抗体2C2至终浓度为 $10\mu\text{g/ml}$;按照每孔 $100\mu\text{l}$ 加入96孔酶标板中, 4°C 静置18h;弃上清后,每孔加入 $300\mu\text{L}$ 洗涤液,水平震动3min,吸弃上清;重复洗板四次。每孔加入 $200\mu\text{l}$ 1%BSA,于 37°C 静置1h。重复洗板四次;每孔中加入 $50\mu\text{L}$ 阳性对照、阴性对照或者待测样本;随即每孔加入 $50\mu\text{L}$ 新鲜稀释的酶标二抗(即单域抗体2E5-HAP,稀释至工作浓度为 $2\mu\text{g/ml}$),置于摇床上摇动3~5s; 37°C 下温育1h。重复洗板四次;每孔加入 $100\mu\text{L}$ AP化学发光显色液(BM Chemiluminescence ELISA Substrate),在摇床上摇动3~5s;室温避光孵育10min;选择酶标仪程序Luminescence,测定各孔的Lum值并计算质控血清的CEACAM-5抗原值。结果2E5与2C2单域抗体对呈现出最佳配对结果,阳性血清样本均检测为阳性,没有漏检情况,得出阳性血清CEACAM-5含量的平均值为 45.8ng/ml 。且检测CEA样本血清呈现良好的线性曲线, $R^2=0.9934$ 。

[0092] 表3单域抗体2E5-HAP与11C12、15E7、2C2三株单域抗体配对检测CEACAM-5抗原阳性血清结果

捕获抗体	检测抗体	线性指数 (R^2)	阳性血清 漏检数	阳性血清 CEACAM-5 抗原含量平均值
[0093] 11C12	2E5-HAP	0.9902	0	46.5
15E7	2E5-HAP	0.9889	2	47.4
2C2	2E5-HAP	0.9934	0	45.8

[0039]	50	55	60	
[0040]	Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Val Tyr Leu Gln			
[0041]	65	70	75	80
[0042]	Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Asn Ala			
[0043]		85	90	95
[0044]	Tyr Asp Ser Gln Arg Ser Arg Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val			
[0045]		100	105	110
[0046]	Thr Val Ser Ser			
[0047]		115		
[0048]	<210> 5			
[0049]	<211> 348			
[0050]	<212> DNA			
[0051]	<213> Lama pacos			
[0052]	<400> 5			
[0053]	caggtgcagc tgcaggagtc cggaggagga ctggtgcaag cggcggaag cctgaggctg	60		
[0054]	gcctgtgccg cttccggaag gtccttcggc acctacggct ggtacagaca ggccccggc	120		
[0055]	aaagagaggg agttcgtggc cgccatttcc tggagcggcg gctccatctg gtatgctgac	180		
[0056]	tccgtgaagg gcaggttcac aatctccagg gacaacgcca agaataccgt gtacctccag	240		
[0057]	atgaacagcc tgaagcctga ggacaccgcc gtctactact gcaacgccta cgactcccag	300		
[0058]	aggtccagag actactgggg acagggcacc caggtgaccg tgagctcc	348		
[0059]	<210> 6			
[0060]	<211> 126			
[0061]	<212> PRT			
[0062]	<213> Lama pacos			
[0063]	<400> 6			
[0064]	Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Gly			
[0065]	1	5	10	15
[0066]	Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Thr Phe Ser Ser His			
[0067]		20	25	30
[0068]	Pro Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val			
[0069]		35	40	45
[0070]	Ala Gly Ile Ser Trp Ser Gly Gly Ser Thr His Tyr Ala Asp Ser Val			
[0071]		50	55	60
[0072]	Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Thr Ala Lys Asn Thr Val Tyr			
[0073]		65	70	75
[0074]	Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys			
[0075]		85	90	95
[0076]	Asn Ala Ala Leu Ser Glu Arg Thr Pro Ile Ala Thr Met Pro Ser Gln			
[0077]		100	105	110

[0078]	Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
[0079]	115 120 125
[0080]	<210> 7
[0081]	<211> 626
[0082]	<212> PRT
[0083]	<213> Artificial
[0084]	<400> 7
[0085]	Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Gly
[0086]	1 5 10 15
[0087]	Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Thr Phe Ser Ser His
[0088]	20 25 30
[0089]	Pro Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val
[0090]	35 40 45
[0091]	Ala Gly Ile Ser Trp Ser Gly Gly Ser Thr His Tyr Ala Asp Ser Val
[0092]	50 55 60
[0093]	Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Thr Ala Lys Asn Thr Val Tyr
[0094]	65 70 75 80
[0095]	Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
[0096]	85 90 95
[0097]	Asn Ala Ala Leu Ser Glu Arg Thr Pro Ile Ala Thr Met Pro Ser Gln
[0098]	100 105 110
[0099]	Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser Ser Gly
[0100]	115 120 125
[0101]	Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ile Ile
[0102]	130 135 140
[0103]	Pro Val Glu Glu Glu Asn Pro Asp Phe Trp Asn Arg Glu Ala Ala Glu
[0104]	145 150 155 160
[0105]	Ala Leu Gly Ala Ala Lys Lys Leu Gln Pro Ala Gln Thr Ala Ala Lys
[0106]	165 170 175
[0107]	Asn Leu Ile Ile Phe Leu Gly Asp Gly Met Gly Val Ser Thr Val Thr
[0108]	180 185 190
[0109]	Ala Ala Arg Ile Leu Lys Gly Gln Lys Lys Asp Lys Leu Gly Pro Glu
[0110]	195 200 205
[0111]	Ile Pro Leu Ala Met Asp Arg Phe Pro Tyr Val Ala Leu Ser Lys Thr
[0112]	210 215 220
[0113]	Tyr Asn Val Asp Lys His Val Pro Asp Ser Gly Ala Thr Ala Thr Ala
[0114]	225 230 235 240
[0115]	Tyr Leu Cys Gly Val Lys Gly Asn Phe Gln Thr Ile Gly Leu Ser Ala
[0116]	245 250 255

[0117]	Ala Ala Arg Phe Asn Gln Cys Asn Thr Thr Arg Gly Asn Glu Val Ile
[0118]	260 265 270
[0119]	Ser Val Met Asn Arg Ala Lys Lys Ala Gly Lys Ser Val Gly Val Val
[0120]	275 280 285
[0121]	Thr Thr Thr Arg Val Gln His Ala Ser Pro Ala Gly Thr Tyr Ala His
[0122]	290 295 300
[0123]	Thr Val Asn Arg Asn Trp Tyr Ser Asp Ala Asp Val Pro Ala Ser Ala
[0124]	305 310 315 320
[0125]	Arg Gln Glu Gly Cys Gln Asp Ile Ala Thr Gln Leu Ile Ser Asn Met
[0126]	325 330 335
[0127]	Asp Ile Asp Val Ile Leu Gly Gly Gly Arg Lys Tyr Met Phe Arg Met
[0128]	340 345 350
[0129]	Gly Thr Pro Asp Pro Glu Tyr Pro Asp Asp Tyr Ser Gln Gly Gly Thr
[0130]	355 360 365
[0131]	Arg Leu Asp Gly Lys Asn Leu Val Gln Glu Trp Leu Ala Lys Arg Gln
[0132]	370 375 380
[0133]	Gly Ala Arg Tyr Val Trp Asn Arg Thr Glu Leu Met Gln Ala Ser Leu
[0134]	385 390 395 400
[0135]	Asp Pro Ser Val Thr His Leu Met Gly Leu Phe Glu Pro Gly Asp Met
[0136]	405 410 415
[0137]	Lys Tyr Glu Ile His Arg Asp Ser Thr Leu Asp Pro Ser Leu Met Glu
[0138]	420 425 430
[0139]	Met Thr Glu Ala Ala Leu Arg Leu Leu Ser Arg Asn Pro Arg Gly Phe
[0140]	435 440 445
[0141]	Phe Leu Phe Val Glu Gly Gly Arg Ile Asp His Gly His His Glu Ser
[0142]	450 455 460
[0143]	Arg Ala Tyr Arg Ala Leu Thr Glu Thr Ile Met Phe Asp Asp Ala Ile
[0144]	465 470 475 480
[0145]	Glu Arg Ala Gly Gln Leu Thr Ser Glu Glu Asp Thr Leu Ser Leu Val
[0146]	485 490 495
[0147]	Thr Ala Asp His Ser His Val Phe Ser Phe Gly Gly Tyr Pro Leu Arg
[0148]	500 505 510
[0149]	Gly Ser Ser Ile Phe Gly Leu Ala Pro Gly Lys Ala Arg Asp Arg Lys
[0150]	515 520 525
[0151]	Ala Tyr Thr Val Leu Leu Tyr Gly Asn Gly Pro Gly Tyr Val Leu Lys
[0152]	530 535 540
[0153]	Asp Gly Ala Arg Pro Asp Val Thr Glu Ser Glu Ser Gly Ser Pro Glu
[0154]	545 550 555 560
[0155]	Tyr Arg Gln Gln Ser Ala Val Pro Leu Asp Glu Glu Thr His Ala Gly

[0195]	195	200	205
[0196]	Arg Met Gly Thr Pro Asp Pro Glu Tyr Pro Asp Asp Tyr Ser Gln Gly		
[0197]	210	215	220
[0198]	Gly Thr Arg Leu Asp Gly Lys Asn Leu Val Gln Glu Trp Leu Ala Lys		
[0199]	225	230	235
[0200]	Arg Gln Gly Ala Arg Tyr Val Trp Asn Arg Thr Glu Leu Met Gln Ala		
[0201]	245	250	255
[0202]	Ser Leu Asp Pro Ser Val Thr His Leu Met Gly Leu Phe Glu Pro Gly		
[0203]	260	265	270
[0204]	Asp Met Lys Tyr Glu Ile His Arg Asp Ser Thr Leu Asp Pro Ser Leu		
[0205]	275	280	285
[0206]	Met Glu Met Thr Glu Ala Ala Leu Arg Leu Leu Ser Arg Asn Pro Arg		
[0207]	290	295	300
[0208]	Gly Phe Phe Leu Phe Val Glu Gly Gly Arg Ile Asp His Gly His His		
[0209]	305	310	315
[0210]	Glu Ser Arg Ala Tyr Arg Ala Leu Thr Glu Thr Ile Met Phe Asp Asp		
[0211]	325	330	335
[0212]	Ala Ile Glu Arg Ala Gly Gln Leu Thr Ser Glu Glu Asp Thr Leu Ser		
[0213]	340	345	350
[0214]	Leu Val Thr Ala Asp His Ser His Val Phe Ser Phe Gly Gly Tyr Pro		
[0215]	355	360	365
[0216]	Leu Arg Gly Ser Ser Ile Phe Gly Leu Ala Pro Gly Lys Ala Arg Asp		
[0217]	370	375	380
[0218]	Arg Lys Ala Tyr Thr Val Leu Leu Tyr Gly Asn Gly Pro Gly Tyr Val		
[0219]	385	390	395
[0220]	Leu Lys Asp Gly Ala Arg Pro Asp Val Thr Glu Ser Glu Ser Gly Ser		
[0221]	405	410	415
[0222]	Pro Glu Tyr Arg Gln Gln Ser Ala Val Pro Leu Asp Glu Glu Thr His		
[0223]	420	425	430
[0224]	Ala Gly Glu Asp Val Ala Val Phe Ala Arg Gly Pro Gln Ala His Leu		
[0225]	435	440	445
[0226]	Val His Gly Val Gln Glu Gln Thr Phe Ile Ala His Val Met Ala Phe		
[0227]	450	455	460
[0228]	Ala Ala Cys Leu Glu Pro Tyr Thr Ala Cys Asp Leu Ala Pro Pro Ala		
[0229]	465	470	475
[0230]	Gly Thr Thr Asp		480

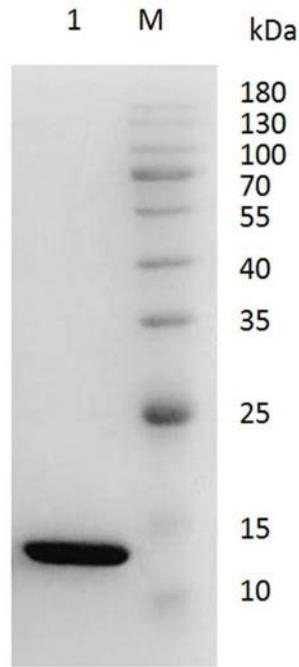


图1

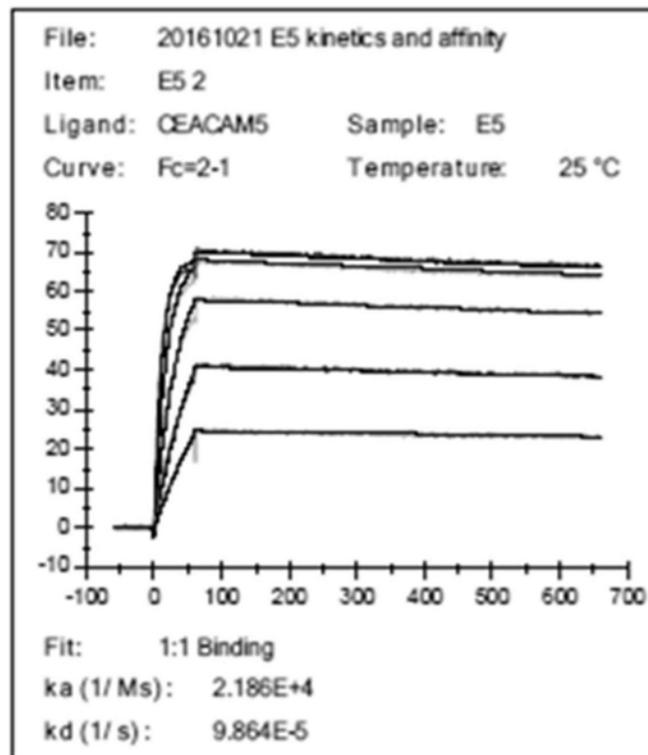


图2

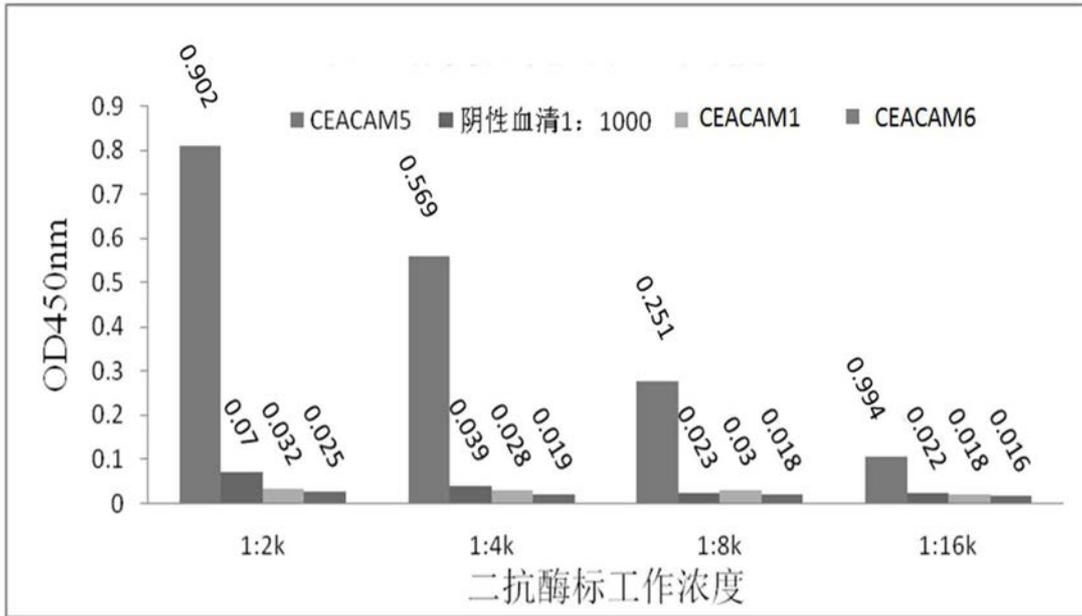


图3

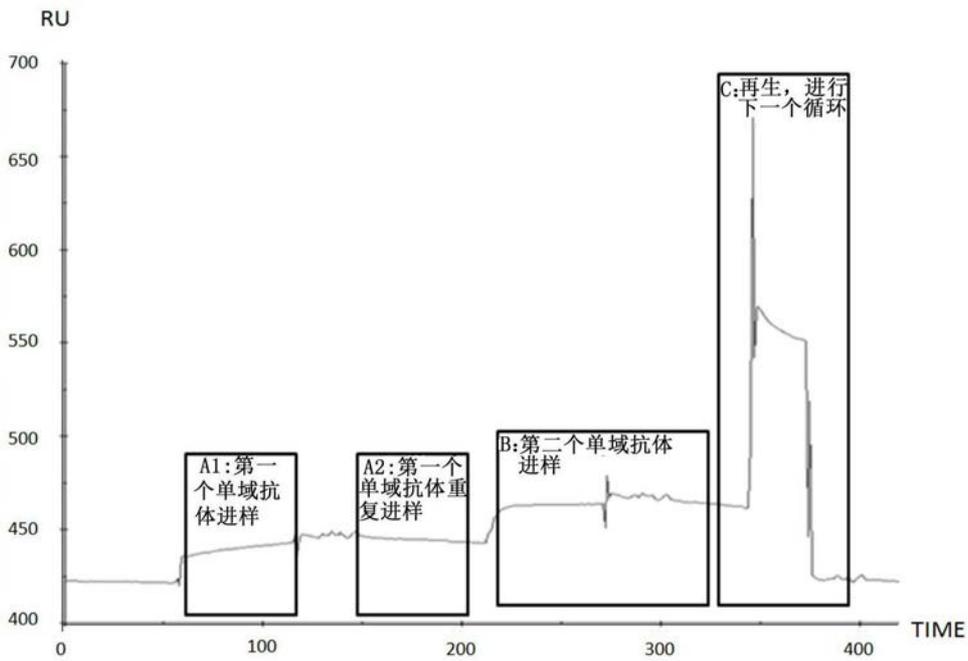


图4