



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 111018980 B

(45) 授权公告日 2021.12.03

(21) 申请号 201811183025.4

C12N 15/13 (2006.01)

(22) 申请日 2018.10.10

G01N 33/68 (2006.01)

(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 111018980 A

(56) 对比文件

CN 101942416 A, 2011.01.12

CN 107561289 A, 2018.01.09

(43) 申请公布日 2020.04.17

WO 2006132809 A2, 2006.12.14

(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
产业开发区台湾科技园桃园路1
号莞台生物技术合作育成中心1栋401
室

Moltu J. Guy等.The impact of antibody
selection on the detection of cardiac
troponin I.《Clinica Chimica Acta》.2012,第
420卷

(72) 发明人 崔鹏 何志强 孟媛

贾娟娟 等.抗人心肌肌钙蛋白I单克隆抗体
的制备及初步鉴定.《现代免疫学》.2010,第30卷
(第6期),

(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

审查员 冯晓亮

代理人 李进

(51) Int.Cl.

权利要求书4页 说明书20页

C07K 16/18 (2006.01)

序列表6页

(54) 发明名称

一种抗人心肌肌钙蛋白I的抗体及其应用

(57) 摘要

本发明涉及一种包含cTnI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,与人cTnI蛋白具有很高的亲和力,可广泛应用于cTnI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,所述抗原为人心肌肌钙蛋白I,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且与人心肌肌钙蛋白I具有 $K_D \leq 7.51 \times 10^{-8} \text{mol/L}$ 的亲合力;

互补决定区CDR-VH1为A-S-X1-Y-T-F-X2-X3-Y-W-M-Y,其中,

X1是G或D,X2是S或T,X3是T或S;

互补决定区CDR-VH2为Y-X1-N-P-S-X2-G-H-T-X3-Y-N-Q-X4-F-K-D,其中,

X1是I或L,X2是S或T,X3是D或E,X4是R或K;

互补决定区CDR-VH3为A-R-X1-Y-X2-G-P-F-X3-M-D,其中,

X1是K或R,X2是F、Y或W,X3是G或A;

互补决定区CDR-VL1为S-A-S-X1-X2-V-S-Y-X3-H,其中,

X1是S或T,X2是T或S,X3是A或V;

互补决定区CDR-VL2为W-X1-Y-D-X2-S-K-X3-A-S,其中,

X1是I或L,X2是T或S,X3是L或I;

互补决定区CDR-VL3为Q-X1-W-S-X2-X3-P-Y-T,其中,

X1是Q或N,X2是T或S,X3是Q或N。

2. 根据权利要求1所述的结合蛋白,其特征在于,所述互补决定区CDR-VH1中,X1是G;

所述互补决定区CDR-VH2中,X3是D;

所述互补决定区CDR-VH3中,X3是G;

所述互补决定区CDR-VL1中,X3是V;

所述互补决定区CDR-VL2中,X2是T;

所述互补决定区CDR-VL3中,X1是Q。

3. 根据权利要求1所述的结合蛋白,其特征在于,所述互补决定区CDR-VH1中,X1是D;

所述互补决定区CDR-VH2中,X3是E;

所述互补决定区CDR-VH3中,X3是A;

所述互补决定区CDR-VL1中,X3是A;

所述互补决定区CDR-VL2中,X2是S;

所述互补决定区CDR-VL3中,X1是N。

4. 一种包含抗原结合结构域的分离的结合蛋白,其特征在于,所述抗原为人心肌肌钙蛋白I,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A-S-X1-Y-T-F-X2-X3-Y-W-M-Y,其中,所述互补决定区CDR-VH1中,X1是G;

互补决定区CDR-VH2为Y-X1-N-P-S-X2-G-H-T-X3-Y-N-Q-X4-F-K-D,其中,X3是D;

互补决定区CDR-VH3为A-R-X1-Y-X2-G-P-F-X3-M-D,其中,X3是G;

互补决定区CDR-VL1为S-A-S-X1-X2-V-S-Y-X3-H,其中,X3是V;

互补决定区CDR-VL2为W-X1-Y-D-X2-S-K-X3-A-S,其中,X2是T;

互补决定区CDR-VL3为Q-X1-W-S-X2-X3-P-Y-T,其中,X1是Q;

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-VH1X2/ X3	CDR-VH2X1/ X2/ X4	CDR-VH3X1/ X2	CDR-VL1X1/ X2	CDR-VL2X1/ X3	CDR-VL3X2/ X3
突变组合1	S/T	L/S/R	K/F	T/T	L/I	T/ Q
突变组合2	S/T	I/T/K	R/Y	S/S	I/I	T/N
突变组合3	T/S	I/S/R	R/W	S/T	L/L	S/ Q
突变组合4	T/T	I/T/K	K/F	T/S	I/L	S/N
突变组合5	S/T	I/S/R	K/Y	T/T	L/I	T/N
突变组合6	S/S	L/T/K	K/W	S/S	I/I	T/N
突变组合7	T/S	L/S/R	R/F	S/T	L/L	T/N
突变组合8	T/T	L/T/K	R/Y	T/S	I/L	T/N
突变组合9	S/T	I/T/K	R/W	T/T	L/I	T/ Q
突变组合10	S/S	I/S/R	K/F	S/S	I/I	T/ Q
突变组合11	T/S	I/T/R	K/Y	S/T	L/L	T/ Q
突变组合12	T/S	I/S/K	K/W	T/S	I/L	T/ Q
突变组合13	S/T	L/T/R	R/F	T/T	L/I	T/ Q
突变组合14	S/S	L/S/R	R/Y	S/S	I/I	T/ Q
突变组合15	T/S	L/T/K	R/W	S/T	L/L	T/ Q
突变组合16	T/T	L/S/R	K/F	T/S	I/L	T/ Q
突变组合17	S/T	I/S/K	K/Y	T/T	L/I	T/ Q
突变组合18	S/S	I/T/R	K/W	S/S	I/I	S/ Q
突变组合19	T/T	I/S/R	R/F	T/T	L/L	S/ Q
突变组合20	T/S	L/T/K	R/Y	S/S	I/L	S/ Q
突变组合21	S/T	L/S/K	R/W	S/T	L/I	S/ Q
突变组合22	S/S	L/T/R	K/F	T/S	I/I	S/ Q
突变组合23	T/T	L/S/K	K/Y	T/T	L/L	S/ Q
突变组合24	T/S	I/T/R	K/W	S/S	I/L	S/N
突变组合25	S/T	I/T/K	R/F	S/T	L/I	S/N
突变组合26	S/S	I/S/R	R/Y	T/S	I/I	S/N
突变组合27	T/T	L/T/K	R/W	S/T	L/L	S/N
突变组合28	T/S	L/S/K	K/F	T/S	I/L	S/N
突变组合29	S/T	L/T/R	K/Y	T/T	L/I	S/N
突变组合30	S/S	I/S/K	K/W	S/S	I/I	S/N
突变组合31	T/S	L/S/R	R/F	T/T	L/L	S/N
突变组合32	T/T	I/T/K	R/Y	S/S	I/L	S/N
突变组合33	S/T	L/S/R	K/W	S/T	L/I	S/N
突变组合34	S/S	I/T/K	K/F	T/S	I/I	S/N
突变组合35	T/S	I/S/K	K/Y	T/T	L/L	S/N
突变组合36	T/T	I/T/K	R/W	S/S	I/L	T/ Q
突变组合37	S/T	I/S/R	R/W	S/T	L/I	T/N
突变组合38	S/S	L/T/R	K/F	T/S	I/L	T/ Q
突变组合39	T/S	L/S/K	K/Y	S/T	L/L	S/N
突变组合40	T/T	L/T/K	K/W	T/S	I/L	T/ Q
突变组合41	S/T	L/S/R	R/F	S/T	L/I	T/N
突变组合42	S/S	I/T/R	R/Y	T/S	I/I	S/ Q
突变组合43	T/S	I/S/K	R/W	S/T	L/L	S/N
突变组合44	T/S	I/T/K	K/F	T/S	I/L	T/ Q
突变组合45	S/T	I/S/R	K/Y	S/S	I/I	T/N
突变组合46	S/S	L/T/R	K/W	S/T	L/L	S/ Q
突变组合47	T/S	L/S/K	R/F	T/S	I/L	S/N

突变组合48	T/T	L/T/K	R/Y	T/T	L/I	T/ Q
突变组合49	S/S	L/T/R	R/W	S/T	I/I	T/N
突变组合50	T/T	L/S/K	K/F	T/S	L/L	S/ Q
突变组合51	T/S	L/T/K	R/W	T/T	I/L	S/N
突变组合52	T/T	I/T/R	R/Y	T/S	I/I	S/Q
突变组合53	T/T	I/T/R	R/W	T/S	I/I	S/N
突变组合54	S/S	I/T/R	K/Y	T/T	I/L	T/N
突变组合55	S/S	L/S/K	R/F	T/T	L/I	T/ Q
突变组合56	S/T	L/S/K	K/Y	T/T	I/L	T/N
突变组合57	T/T	L/S/R	R/W	T/S	I/I	S/N

5. 一种包含抗原结合结构域的分离的结合蛋白,其特征在于,所述抗原为人心肌肌钙蛋白I,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A-S-X1-Y-T-F-X2-X3-Y-W-M-Y,其中,所述互补决定区CDR-VH1中,X1是D;

互补决定区CDR-VH2为Y-X1-N-P-S-X2-G-H-T-X3-Y-N-Q-X4-F-K-D,其中,X3是E;

互补决定区CDR-VH3为A-R-X1-Y-X2-G-P-F-X3-M-D,其中,X3是A;

互补决定区CDR-VL1为S-A-S-X1-X2-V-S-Y-X3-H,其中,X3是A;

互补决定区CDR-VL2为W-X1-Y-D-X2-S-K-X3-A-S,其中,X2是S;

互补决定区CDR-VL3为Q-X1-W-S-X2-X3-P-Y-T,其中,X1是N;

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-VH1X2/ X3	CDR-VH2X1/ X2/ X4	CDR-VH3X1/ X2	CDR-VL1X1/ X2	CDR-VL2X1/ X3	CDR-VL3X2/ X3
WT	S/T	L/S/R	K/F	T/T	L/I	T/ Q
WT 1-1	S/T	I/T/K	R/Y	S/S	I/I	T/N
WT 1-2	T/S	I/S/R	R/W	S/T	L/L	S/ Q
WT 1-3	T/T	I/T/K	K/F	T/S	I/L	S/N
WT 1-4	S/T	I/S/R	K/Y	T/T	L/I	T/N
WT 1-5	S/S	L/T/K	K/W	S/S	I/I	T/N
WT 1-6	T/S	L/S/R	R/F	S/T	L/L	T/N
WT 1-7	T/T	L/T/K	R/Y	T/S	I/L	T/N
WT 1-8	S/T	I/T/K	R/W	T/T	L/I	T/ Q

6. 根据权利要求1~5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。

7. 根据权利要求1~5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。

8. 根据权利要求1~5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。

9. 根据权利要求8所述的结合蛋白,其特征在于,所述恒定区序列选自IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA、IgM、IgE和IgD任何其中之一恒定区的序列。

10. 根据权利要求9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。

11. 根据权利要求10所述的结合蛋白,其特征在於,所述恒定区的种属来源为乳牛。

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

13. 根据权利要求10所述的结合蛋白,其特征在於,所述恒定区来源于小鼠。

14. 根据权利要求13所述的结合蛋白,其特征在於,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。

15. 一种分离的核酸,其特征在於,所述核酸编码权利要求1-14任一项所述的结合蛋白。

16. 一种载体,其特征在於,其包含权利要求15所述的核酸。

17. 一种宿主细胞,其特征在於,所述宿主细胞包括权利要求15所述的核酸或权利要求16所述的载体。

18. 一种生产权利要求1-14任一项所述的结合蛋白的方法,其特征在於,包括如下步骤:

在培养基中培养权利要求17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产生的结合蛋白。

19. 权利要求1-14任一项所述的结合蛋白在制备用于诊断急性心肌梗死、急性冠状动脉综合征、肺梗、不稳定性心绞痛、心肌损伤的诊断剂或试剂盒中的应用。

20. 一种检测人心肌肌钙蛋白I的试剂盒,其特征在於,所述试剂盒包括权利要求1-14任一项所述的结合蛋白、权利要求15所述的分离的核酸或权利要求16所述的载体中的一种或多种。

21. 根据权利要求20所述的检测人心肌肌钙蛋白I的试剂盒,其特征在於,所述试剂盒还包括用于标记所述结合蛋白的标记物。

一种抗人心肌肌钙蛋白I的抗体及其应用

技术领域

[0001] 本发明涉及生物技术和医学技术领域,尤其是涉及一种抗人心肌肌钙蛋白I的抗体及其应用。

背景技术

[0002] 20世纪80年代前,世界卫生组织(WHO)一直将心肌酶谱活性作为急性心肌梗死(AMI)的诊断标准之一。20世纪80年代末,科研人员发现,肌钙蛋白(troponin,Tn)的敏感性和特异性高于磷酸肌酸激酶(CK)、磷酸肌酸激酶同工酶(CK-MB)、乳酸脱氢酶和天冬氨酸氨基转移酶等生物标志物。心肌肌钙蛋白(cTnI)仅存于心肌,是心肌细胞的标志物,其异常改变可影响心脏的舒缩功能,并可用于诊断心肌坏死,判断心肌损伤等,成为心肌细胞损伤敏感性和特异性最强的标志物之一,是公认的快速诊断AMI和急性冠脉综合征(acute coronary syndromes,ACS)以及协助ACS危险分层和反映其预后的主要生化标志。

[0003] 正常人血液中cTnI含量一般低于0.3 μ g/L。当心肌细胞膜完整性因缺血或缺氧等受到破坏时,游离的cTnI可迅速透过细胞膜进入血流。因此,在发病初期快速、灵敏且准确的测定人血中的cTnI及其变化趋势对急性心肌梗死的诊断、急性冠状动脉综合症的危险分层、监测各种因素导致的心肌损伤等有着重要的临床意义。临床上用于检测cTnI水平的方法有酶联免疫吸附法(ELISA),化学发光,胶体金等,不同方法都有各自的优缺点,但是都需要针对于cTnI的特异性单克隆抗体。

[0004] 现有的cTnI抗体由于活性低、亲和力差,无法很好地应用于cTnI蛋白的检测中,因此本领域对于有效且特异性结合检测cTnI并对其进行检测的抗体存在着强烈需求。有鉴于此,特提出本发明。

发明内容

[0005] 本发明涉及一种新颖的包含cTnI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。

[0006] 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cTnI具有 $K_D \leq 7.51 \times 10^{-8}$ mol/L的亲和力;

[0007] 互补决定区CDR-VH1为A-S-X1-Y-T-F-X2-X3-Y-W-M-Y,其中,

[0008] X1是G或D,X2是S或T,X3是T或S;

[0009] 互补决定区CDR-VH2为Y-X1-N-P-S-X2-G-H-T-X3-Y-N-Q-X4-F-K-D,其中,

[0010] X1是I或L,X2是S或T,X3是D或E,X4是R或K;

[0011] 互补决定区CDR-VH3为A-R-X1-Y-X2-G-P-F-X3-M-D,其中,

[0012] X1是K或R,X2是F、Y或W,X3是G或A;

[0013] 互补决定区CDR-VL1为S-A-S-X1-X2-V-S-Y-X3-H,其中,

[0014] X1是S或T,X2是T或S,X3是A或V;

- [0015] 互补决定区CDR-VL2为W-X1-Y-D-X2-S-K-X3-A-S,其中,
- [0016] X1是I或L,X2是T或S,X3是L或I;
- [0017] 互补决定区CDR-VL3为Q-X1-W-S-X2-X3-P-Y-T,其中,
- [0018] X1是Q或N,X2是T或S,X3是Q或N。
- [0019] 一个重要优点在于,所述结合蛋白活性强,与人cTnI具有很高的亲和力。

具体实施方式

[0020] 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。

[0021] 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。

[0022] 除非本文另有定义,连同本发明使用的科学和技术术语应具有本领域普通技术人员通常理解的含义。术语的含义和范围应当清晰,然而,在任何潜在不明确性的情况下,本文提供的定义优先于任何字典或外来定义。在本申请中,除非另有说明,“或”的使用意味着“和/或”。此外,术语“包括”及其他形式的使用是非限制性的。

[0023] 一般地,连同本文描述的细胞和组织培养、分子生物学、免疫学、微生物学、遗传学以及蛋白和核酸化学和杂交使用的命名法和其技术是本领域众所周知和通常使用的那些。除非另有说明,本发明的方法和技术一般根据本领域众所周知,且如各种一般和更具体的参考文献中所述的常规方法来进行,所述参考文献在本说明书自始至终引用和讨论。酶促反应和纯化技术根据制造商的说明书、如本领域通常实现的或如本文所述来进行。连同本文描述的分析化学、合成有机化学以及医学和药物化学使用的命名法、以及其实验室程序和技术是本领域众所周知和通常使用的那些。

[0024] 为了本发明可以更容易地理解,选择的术语在下文定义。

[0025] 术语“氨基酸”表示天然存在或非天然存在的 α -氨基酸。术语“氨基酸”用在本申请中可以包括天然存在的氨基酸和非天然存在的氨基酸。天然存在的氨基酸包括丙氨酸(三字母密码:Ala,单字母密码:A),精氨酸(Arg,R),天冬酰胺(Asn,N),天冬氨酸(Asp,D),半胱氨酸(Cys,c),谷氨酰胺(Gln,Q),谷氨酸(Glu,E),甘氨酸(Gly,G),组氨酸(His,H),异亮氨酸(Ile,I),亮氨酸(Leu,L),赖氨酸(Lys,K),甲硫氨酸(Met,M),苯丙氨酸(Phe,F),脯氨酸(Pro,P),丝氨酸(Ser,S),苏氨酸(Thr,T),色氨酸(Trp,W),酪氨酸(Tyr,Y),和缬氨酸(Val,V)。非天然存在的氨基酸包括但不限于 α -氨基己二酸,氨基丁酸,瓜氨酸,高瓜氨酸,高亮氨酸,高精氨酸,羟基脯氨酸,正亮氨酸,吡啶基丙氨酸,肌氨酸等等。

[0026] 术语“分离的结合蛋白”是这样的蛋白,其由于衍生起源或来源不与天然结合的组分结合,所述天然结合的组分在其天然状态下与其伴随;基本上不含来自相同物种的其他蛋白;由来自不同物种的细胞表达;或在自然界中不存在。因此,化学合成或在不同于其天然起源的细胞的细胞系统中合成的蛋白将是与其天然结合的组分“分离的”。还可以通过分离,使用本领域众所周知的蛋白纯化技术,使得蛋白基本上不含天然结合的组分。

[0027] 术语“包括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。

[0028] 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。抗体的构架区,即构成要件轻链和重链的组成的构架区,起到定位和对齐CDR的作用,所述CDR主要负责与抗原的结合。

[0029] 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)。

[0030] 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。

[0031] 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)。

[0032] 本发明提供的一种包含抗原结合结构域的分离的结合蛋白,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cTnI具有 $K_D \leq 7.51 \times 10^{-8}$ mol/L的亲合力;

[0033] 互补决定区CDR-VH1为A-S-X1-Y-T-F-X2-X3-Y-W-M-Y,其中,

[0034] X1是G或D,X2是S或T,X3是T或S;

[0035] 互补决定区CDR-VH2为Y-X1-N-P-S-X2-G-H-T-X3-Y-N-Q-X4-F-K-D,其中,

[0036] X1是I或L,X2是S或T,X3是D或E,X4是R或K;

[0037] 互补决定区CDR-VH3为A-R-X1-Y-X2-G-P-F-X3-M-D,其中,

[0038] X1是K或R,X2是F、Y或W,X3是G或A;

[0039] 互补决定区CDR-VL1为S-A-S-X1-X2-V-S-Y-X3-H,其中,

[0040] X1是S或T,X2是T或S,X3是A或V;

[0041] 互补决定区CDR-VL2为W-X1-Y-D-X2-S-K-X3-A-S,其中,

[0042] X1是I或L,X2是T或S,X3是L或I;

[0043] 互补决定区CDR-VL3为Q-X1-W-S-X2-X3-P-Y-T,其中,

[0044] X1是Q或N,X2是T或S,X3是Q或N。

[0045] 本领域公知,抗体的结合特异性及亲合力均主要由CDR序列决定,根据成熟、公知

的现有各项技术可轻易地将非CDR区域的氨基酸序列改变而获得具有相类似的生物活性的变体。因此,本发明也包括该结合蛋白的“功能性衍生物”。“功能性衍生物”是指氨基酸替换的变体,一个功能性衍生物保留有可检测的结合蛋白活性,优选为能结合cTnI的抗体的活性。“功能性衍生物”可以包含“变体”和“片段”,因其具有与本发明所述的结合蛋白完全相同的CDR序列,因此具有相类似的生物活性。

[0046] 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%的序列同一性且与心肌肌钙蛋白I具有 $KD \leq 7.51 \times 10^{-8} \text{mol/L}$,KD值也可以选择 $4.86 \times 10^{-8} \text{mol/L}$ 、 $5.15 \times 10^{-8} \text{mol/L}$ 、 $3.18 \times 10^{-8} \text{mol/L}$ 、 $1.01 \times 10^{-9} \text{mol/L}$ 、 $3.70 \times 10^{-9} \text{mol/L}$ 、 $5.49 \times 10^{-9} \text{mol/L}$ 、 $7.96 \times 10^{-9} \text{mol/L}$ 、 $9.53 \times 10^{-9} \text{mol/L}$ 、 $2.21 \times 10^{-10} \text{mol/L}$ 、 $5.34 \times 10^{-10} \text{mol/L}$ 、 $8.13 \times 10^{-10} \text{mol/L}$ 、 $9.60 \times 10^{-10} \text{mol/L}$,或者 $2.21 \times 10^{-10} \text{mol/L} \leq KD \leq 7.51 \times 10^{-8} \text{mol/L}$,或者 $2.21 \times 10^{-10} \text{mol/L} \leq KD \leq 9.53 \times 10^{-9} \text{mol/L}$ 。

[0047] 其中,亲和力按照本发明说明书中的方法测定。

[0048] 在一些实施方式中,

[0049] 所述互补决定区CDR-VH1中,X1是G;

[0050] 所述互补决定区CDR-VH2中,X3是D;

[0051] 所述互补决定区CDR-VH3中,X3是G;

[0052] 所述互补决定区CDR-VL1中,X3是V;

[0053] 所述互补决定区CDR-VL2中,X2是T;

[0054] 所述互补决定区CDR-VL3中,X1是Q。

[0055] 在一些实施方式中,所述互补决定区CDR-VH1中,X2是S,X3是T。

[0056] 在一些实施方式中,所述互补决定区CDR-VH1中,X2是S,X3是S。

[0057] 在一些实施方式中,所述互补决定区CDR-VH1中,X2是T,X3是T。

[0058] 在一些实施方式中,所述互补决定区CDR-VH1中,X2是T,X3是S。

[0059] 在一些实施方式中,所述互补决定区CDR-VH2中,X1是I,X2是S,X4是R。

[0060] 在一些实施方式中,所述互补决定区CDR-VH2中,X1是I,X2是T,X4是R。

[0061] 在一些实施方式中,所述互补决定区CDR-VH2中,X1是I,X2是S,X4是K。

[0062] 在一些实施方式中,所述互补决定区CDR-VH2中,X1是I,X2是T,X4是K。

[0063] 在一些实施方式中,所述互补决定区CDR-VH2中,X1是L,X2是S,X4是R。

[0064] 在一些实施方式中,所述互补决定区CDR-VH2中,X1是L,X2是T,X4是R。

[0065] 在一些实施方式中,所述互补决定区CDR-VH2中,X1是L,X2是S,X4是K。

[0066] 在一些实施方式中,所述互补决定区CDR-VH2中,X1是L,X2是T,X4是K。

[0067] 在一些实施方式中,所述互补决定区CDR-VH3中,X1是K,X2是F。

[0068] 在一些实施方式中,所述互补决定区CDR-VH3中,X1是K,X2是Y。

[0069] 在一些实施方式中,所述互补决定区CDR-VH3中,X1是K,X2是W。

[0070] 在一些实施方式中,所述互补决定区CDR-VH3中,X1是R,X2是F。

[0071] 在一些实施方式中,所述互补决定区CDR-VH3中,X1是R,X2是Y。

[0072] 在一些实施方式中,所述互补决定区CDR-VH3中,X1是R,X2是W。

[0073] 在一些实施方式中,所述互补决定区CDR-VL1中,X1是S,X2是T。

- [0074] 在一些实施方式中,所述互补决定区CDR-VL1中,X1是S,X2是S。
 [0075] 在一些实施方式中,所述互补决定区CDR-VL1中,X1是T,X2是T。
 [0076] 在一些实施方式中,所述互补决定区CDR-VL1中,X1是T,X2是S。
 [0077] 在一些实施方式中,所述互补决定区CDR-VL2中,X1是I,X3是L。
 [0078] 在一些实施方式中,所述互补决定区CDR-VL2中,X1是I,X3是I。
 [0079] 在一些实施方式中,所述互补决定区CDR-VL2中,X1是L,X3是L。
 [0080] 在一些实施方式中,所述互补决定区CDR-VL2中,X1是L,X3是I。
 [0081] 在一些实施方式中,所述互补决定区CDR-VL3中,X2是T,X3是Q。
 [0082] 在一些实施方式中,所述互补决定区CDR-VL3中,X2是T,X3是N。
 [0083] 在一些实施方式中,所述互补决定区CDR-VL3中,X2是S,X3是Q。
 [0084] 在一些实施方式中,所述互补决定区CDR-VL3中,X2是S,X3是N。
 [0085] 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:

[0086]

位点	CDR-VH1 X2/ X3	CDR-VH2 X1/ X2/ X4	CDR-VH3 X1/ X2	CDR-VL1 X1/ X2	CDR-VL2 X1/ X3	CDR-V L3 X2/ X3
突变组合 1	S/T	L/S/R	K/F	T/T	L/I	T/ Q
突变组合 2	S/T	I/T/K	R/Y	S/S	I/I	T/N
突变组合 3	T/S	I/S/R	R/W	S/T	L/L	S/ Q
突变组合 4	T/T	I/T/K	K/F	T/S	I/L	S/N
突变组合 5	S/T	I/S/R	K/Y	T/T	L/I	T/N
突变组合 6	S/S	L/T/K	K/W	S/S	I/I	T/N
突变组合 7	T/S	L/S/R	R/F	S/T	L/L	T/N
突变组合 8	T/T	L/T/K	R/Y	T/S	I/L	T/N
突变组合 9	S/T	I/T/K	R/W	T/T	L/I	T/ Q
突变组合 10	S/S	I/S/R	K/F	S/S	I/I	T/ Q
突变组合 11	T/S	I/T/R	K/Y	S/T	L/L	T/ Q
突变组合 12	T/S	I/S/K	K/W	T/S	I/L	T/ Q

[0087]

突变组合 13	S/T	L/T/R	R/F	T/T	L/I	T/Q
突变组合 14	S/S	L/S/R	R/Y	S/S	I/I	T/Q
突变组合 15	T/S	L/T/K	R/W	S/T	L/L	T/Q
突变组合 16	T/T	L/S/R	K/F	T/S	I/L	T/Q
突变组合 17	S/T	I/S/K	K/Y	T/T	L/I	T/Q
突变组合 18	S/S	I/T/R	K/W	S/S	I/I	S/Q
突变组合 19	T/T	I/S/R	R/F	T/T	L/L	S/Q
突变组合 20	T/S	L/T/K	R/Y	S/S	I/L	S/Q
突变组合 21	S/T	L/S/K	R/W	S/T	L/I	S/Q
突变组合 22	S/S	L/T/R	K/F	T/S	I/I	S/Q
突变组合 23	T/T	L/S/K	K/Y	T/T	L/L	S/Q
突变组合 24	T/S	I/T/R	K/W	S/S	I/L	S/N
突变组合 25	S/T	I/T/K	R/F	S/T	L/I	S/N
突变组合 26	S/S	I/S/R	R/Y	T/S	I/I	S/N
突变组合 27	T/T	L/T/K	R/W	S/T	L/L	S/N
突变组合 28	T/S	L/S/K	K/F	T/S	I/L	S/N
突变组合 29	S/T	L/T/R	K/Y	T/T	L/I	S/N
突变组合 30	S/S	I/S/K	K/W	S/S	I/I	S/N
突变组合 31	T/S	L/S/R	R/F	T/T	L/L	S/N
突变组合 32	T/T	I/T/K	R/Y	S/S	I/L	S/N
突变组合 33	S/T	L/S/R	K/W	S/T	L/I	S/N
突变组合 34	S/S	I/T/K	K/F	T/S	I/I	S/N

[0088]

突变组合 35	T/S	I/S/K	K/Y	T/T	L/L	S/N
突变组合 36	T/T	I/T/K	R/W	S/S	I/L	T/Q
突变组合 37	S/T	I/S/R	R/W	S/T	L/I	T/N
突变组合 38	S/S	L/T/R	K/F	T/S	I/L	T/Q
突变组合 39	T/S	L/S/K	K/Y	S/T	L/L	S/N
突变组合 40	T/T	L/T/K	K/W	T/S	I/L	T/Q
突变组合 41	S/T	L/S/R	R/F	S/T	L/I	T/N
突变组合 42	S/S	I/T/R	R/Y	T/S	I/I	S/Q
突变组合 43	T/S	I/S/K	R/W	S/T	L/L	S/N
突变组合 44	T/S	I/T/K	K/F	T/S	I/L	T/Q
突变组合 45	S/T	I/S/R	K/Y	S/S	I/I	T/N
突变组合 46	S/S	L/T/R	K/W	S/T	L/L	S/Q
突变组合 47	T/S	L/S/K	R/F	T/S	I/L	S/N
突变组合 48	T/T	L/T/K	R/Y	T/T	L/I	T/Q
突变组合 49	S/S	L/T/R	R/W	S/T	I/I	T/N
突变组合 50	T/T	L/S/K	K/F	T/S	L/L	S/Q
突变组合 51	T/S	L/T/K	R/W	T/T	I/L	S/N
突变组合 52	T/T	I/T/R	R/Y	T/S	I/I	S/Q
突变组合 53	T/T	I/T/R	R/W	T/S	I/I	S/N
突变组合 54	S/S	I/T/R	K/Y	T/T	I/L	T/N
突变组合 55	S/S	L/S/K	R/F	T/T	L/I	T/Q
突变组合 56	S/T	L/S/K	K/Y	T/T	I/L	T/N

[0089]

突变组合 57	T/T	L/S/R	R/W	T/S	I/I	S/N
---------	-----	-------	-----	-----	-----	-----

。

[0090] 在一些实施方式中,所述结合蛋白中包括至少3个CDRs;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] 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。
- [0094] 在一些实施方式中,所述结合蛋白还包含抗体恒定区序列。
- [0095] 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。
- [0096] 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。
- [0097] 在一些实施方式中,所述恒定区来源于小鼠;
- [0098] 轻链恒定区序列如SEQ ID NO:9所示;
- [0099] 重链恒定区序列如SEQ ID NO:10所示。
- [0100] 本发明还提供了一种分离的核酸,所述核酸编码上述的结合蛋白。
- [0101] 在本文中,核酸包含其保守置换的变体(例如简并密码子的置换)和互补序列。术语“核酸”和“多核苷酸”是同义的,包含基因、cDNA分子、mRNA分子以及它们的片段例如寡核苷酸。
- [0102] 本发明还提供了一种载体,所述载体包含上述的核酸。
- [0103] 其中的核酸序列与至少一种调节序列可操作连接。“可操作连接”指的是编码序列以允许编码序列的表达的方式与调节序列连接。调节序列选择用来在合适的宿主细胞中指导目的蛋白质的表达,包含启动子、增强子和其它的表达调控元件。
- [0104] 在本文中,载体可以指包含本发明的核酸或其片段的、能够携带遗传信息并且可以将遗传信息递送到细胞中的分子或试剂。典型的载体包括质粒、病毒、噬菌体、黏粒和微型染色体。载体可以是克隆载体(即用于将遗传信息转移到细胞中的载体,可以繁殖所述细胞并且可以选择存在或不存在所述遗传信息的所述细胞)或表达载体(即包含必要的遗传元件从而允许所述载体的遗传信息在细胞中表达的载体)。因此,克隆载体可以包含选择标记,以及与所述克隆载体所指定的细胞类型相匹配的复制起点,而表达载体则包含对于影响指定靶细胞中的表达必要的调节元件。
- [0105] 本发明的核酸或其片段可以插入到合适的载体中以形成携带本发明核酸片段的克隆载体或表达载体。这种新载体也是本发明的一部分。所述载体可以包括质粒、噬菌体、黏粒、微型染色体或病毒,也包括只在特定细胞中瞬时表达的裸DNA。本发明克隆载体和表达载体能够自发的复制,因此能够为用于随后克隆的高水平表达或高水平复制目的提供高拷贝数。表达载体可以包括用于驱动本发明的核酸片段表达的启动子,可选的编码使所述肽表达产物分泌或整合到膜上的信号肽的核酸序列,本发明的核酸片段,以及可选的编码终止子的核酸序列。当在生产菌株或细胞系中操作表达载体时,载体引入到宿主细胞中时可以整合到宿主细胞的基因组中,也可以不能被整合到宿主细胞基因组中。载体通常携带复制位点,以及能够在转化细胞中提供表型选择的标记序列。
- [0106] 本发明的表达载体用于转化宿主细胞。这种转化细胞也是本发明的一部分,可以

是用于增殖本发明的核酸片段和载体、或用于重组制备本发明的多肽的培养细胞或细胞系。本发明的转化细胞包括微生物如细菌(如大肠杆菌、芽孢杆菌等)。宿主细胞也包括来自多细胞生物如真菌、昆虫细胞、植物细胞或哺乳动物细胞,优选来自哺乳动物的细胞,例如CHO细胞。所述转化细胞能够复制本发明的核酸片段。当重组制备本发明的肽组合时,所述表达产物可以输出到培养基中或携带在所述转化细胞的表面。

[0107] 本发明还提供了一种生产上述结合蛋白的方法,包括如下步骤:

[0108] 在培养基中培养上述的宿主细胞,从培养基中或从所培养的宿主细胞中回收产生的结合蛋白。

[0109] 所述方法可以是例如,用编码至少一部分结合蛋白的核酸载体转染宿主细胞,在合适的条件下培养该宿主细胞使其表达该结合蛋白。宿主细胞也可以用一个或多个表达载体转染,该表达载体可以单独或结合地包含编码至少一部分结合蛋白的DNA。利用常规的纯化蛋白质和肽的技术可从培养基或细胞裂解物中分离结合蛋白,所述技术包括硫酸铵沉淀,层析(如离子交换,凝胶过滤,亲和层析等)和/或电泳。

[0110] 构建合适的含有目的编码和调控序列的载体可以使用本领域公知的标准连接和限制技术进行。将分离的质粒、DNA序列或合成的寡核苷酸按需要的形式切割、加尾和再连接。可以用任何方法向编码序列中引入突变以产生本发明的变体,这些突变可以包含缺失或插入或置换等。

[0111] 本发明也提供抗体,能与cTnI的表位发生反应,包含单克隆的和多克隆的抗体。该抗体可以含有完整的结合蛋白,或其片段或衍生物。优选的抗体含有全部或部分的结合蛋白。

[0112] 本发明还提供了上述的结合蛋白在制备用于诊断急性心肌梗死、急性冠状动脉综合征、肺梗、不稳定性心绞痛、心肌损伤的诊断剂或试剂盒中的应用。

[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的肌钙蛋白I抗原的方法,其包括:

[0114] a) 在足以发生抗体/抗原结合反应条件下,使所述测试样品中的肌钙蛋白I抗原与权利要求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肌钙蛋白I抗原的存在;

[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cTnI的不同抗原表位;

[0119] 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。

[0120] 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肌钙蛋白I抗原结合;

[0121] 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。

[0122] 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。

[0123] 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 Green514、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、三双吡啶基二胺铈、铈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。

[0124] 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、^{94m}Tc、⁹⁴Tc、^{99m}Tc、¹²⁰I、¹²³I、¹²⁴I、¹²⁵I、¹³¹I、¹⁵⁴⁻¹⁵⁸Gd、³²P、¹¹C、¹³N、¹⁵O、¹⁸⁶Re、¹⁸⁸Re、⁵¹Mn、^{52m}Mn、⁵⁵Co、⁷²As、⁷⁵Br、⁷⁶Br、^{82m}Rb和⁸³Sr中的任一种。

[0125] 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。

[0126] 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铈。

[0127] 如在一些进一步地,本发明还提供了一种试剂盒,所述试剂盒包括上述的结合蛋白、上述的分离的核酸或上述的载体中的一种或多种。

[0128] 优选地,所述试剂盒还包括用于标记所述结合蛋白的标记物。

[0129] 实施方案中,本发明提供用于确定例如心肌细胞感染的受试者中的肌钙蛋白I存在的试剂盒,所述试剂盒包含至少一种本发明提供的结合蛋白,相关的缓冲剂,用于使液体样品与所述结合蛋白反应所需的试剂,以及用于确定肌钙蛋白I和结合蛋白之间存在阳性或阴性结合反应的试剂。为了确定肌钙蛋白I的存在,所述试剂盒可以例如利用带有标记的结合蛋白作为抗体,其中所述标记可以是任何合适的标记,如胶体金标记。

[0130] 下文提供了一些实例用于示例性说明本发明,而不是限制本发明的范围。

[0131] 实施例1

[0132] 本实施例中限制性内切酶、Prime Star DNA聚合酶购自Takara公司。MagExtractor-RNA提取试剂盒购自TOYOBO公司。SMARTERTM RACE cDNA Amplification Kit试剂盒购自Takara公司。pMD-18T载体购自Takara公司。质粒提取试剂盒购自天根公司。引物合成和基因测序由Invitrogen公司完成。分泌Anti-cTnI 7B9单克隆抗体的杂交瘤细胞株为本申请人已有的杂交瘤细胞株,复苏备用。

[0133] 1、引物

[0134] 扩增Heavy Chain和Light Chain 5' RACE引物:

[0135] SMARTER II A Oligonucleotide:

[0136] 5' -AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTACXXXXX-3' ;

[0137] 5' -RACE CDS Primer (5' -CDS) :5' - (T)₂₅ VN-3' (N=A,C,G,orT;V=A,G,orC) ;

[0138] Universal Primer A Mix (UPM) :5' -CTAATACGACTCACTATAGGGCAAGCAGTGGTATCAA CGCAGAGT-3' ;

[0139] Nested Universal Primer A (NUP) :5' -AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT-3' ;

[0140] mIg-KR:5' -CTAACACTCATTCTGTTGAAGCTCTTGACAAT-3' ;

[0141] mIg-HR:5' -TCATTTACCAGGAGAGTGGGAGAGGC-3' 。

[0142] 2、抗体可变区基因克隆及测序

[0143] 从分泌Anti-cTnI 7B9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 A Mix (UPM)、Nested Universal Primer A (NUP)和mIg-KR引物进行扩增,Heavy Chain基因以Universal Primer A Mix (UPM)、Nested Universal Primer A (NUP)和mIg-HR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1.4KB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4个克隆送Invitrogen公司进行测序。

[0144] 3、Anti-cTnI 7B9抗体可变区基因的序列分析

[0145] 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VNTI1.5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321bp,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357bp,属于VH1基因家族,其前方有57bp的前导肽序列。

[0146] 4、重组抗体表达质粒的构建

[0147] 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pcDNA 3.4A表达载体,后续简称3.4A表达载体;根据上述pMD-18T中抗体基因测序结果,设计Anti-cTnI 7B9抗体的Heavy Chain和Light Chain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:

[0148] cTnI-7B9-HF:5' -CCCAAGCTTATGGAATGCAGCTGTGTCATGCTCTTCTTC-3' ;

[0149] cTnI-7B9-HR:5' -CCCGAATTCTCATTTACCAGGAGAGTGGGAGAGGC-3' ;

[0150] cTnI-7B9-LF:5' -CCCAAGCTTATGAAGTTGCCTGTTAGGCTGTTGG-3' ;

[0151] cTnI-7B9-LR:5' -CCCGAATTCCTAACACTCATTCTGTTGAAGCTCTTGACAA-3' 。

[0152] 通过PCR扩增方法扩出0.72KB的Light Chain基因片段和1.4KB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。

[0153] 5、筛选稳定细胞株

[0154] 5.1质粒用超纯水稀释至400ng/ml,调节CHO细胞 1.43×10^7 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,第3、5、7天取样计数,第7天收样检测。

[0155] 包被液稀释相应抗原到指定浓度,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,1h,拍干;加入稀释后的细胞上清,100 μ L/孔,37 $^{\circ}$ C,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。以标准品浓度和OD值作标准曲线,计算细胞上清中抗体含量。

[0156] 5.2重组抗体表达质粒线性化

[0157] 准备下述试剂:Buffer 50 μ l、DNA 100 μ g/管、PuvI酶10 μ l、无菌水补至500 μ l,37 $^{\circ}$ C水浴酶切过夜;先用等体积酚/氯仿/异戊醇(下层)25:24:1,再用氯仿(水相)依次进行抽提;0.1倍体积(水相)3M醋酸钠和2倍体积乙醇冰上沉淀,70%乙醇漂洗沉淀,去除有机溶剂,待乙醇挥发完全用适量的灭菌水进行复融,最后进行浓度的测定。

[0158] 重组抗体表达质粒稳定转染,加压筛选稳定细胞株:

[0159] 质粒用超纯水稀释至400ng/ml,调节CHO细胞 1.43×10^7 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,次日计数;25 μ mol/L MSX 96孔加压培养约25天。

[0160] 显微镜下观察标记长有细胞的克隆孔,并记录汇合度;取培养上清,送样检测;挑选抗体浓度、相对浓度高的细胞株转24孔,3天左右转6孔;3天后保种批培,调整细胞密度 0.5×10^6 cells/ml,2.2ml进行批培养,细胞密度 0.3×10^6 cells/ml,2ml进行保种;7天6孔批培上清送样检测,挑选抗体浓度及细胞直径较小的细胞株转TPP保种传代。

[0161] 6、生产重组抗体

[0162] 6.1细胞扩培

[0163] 细胞复苏之后先在125ml规格的摇瓶中培养,接种体积为30ml,培养基为100% Dynamis培养基,放置于转速120r/min,温度为37 $^{\circ}$ C,二氧化碳为8%的摇床中。培养72h,以50万cells/ml接种密度接种扩培,扩培体积根据生产需求进行计算,培养基为100% Dynamis培养基。之后每72h扩培一次。当细胞量满足生产需求时,严格控制接种密度为50万cells/ml左右进行生产。

[0164] 6.2摇瓶生产及纯化

[0165] 摇瓶参数:转速120r/min,温度为37 $^{\circ}$ C,二氧化碳为8%。流加补料:在摇瓶中培养至72h时开始每天补料,HyCloneTM Cell BoostTM Feed 7a每天流加初始培养体积的3%,Feed 7b每天流加量为初始培养体积的千分之一,一直补到第12天(第12天补料)。葡萄糖在第六天补加3g/L。第13天收样。用proteinA亲和层析柱进行亲和纯化。纯化后得到500mg重组抗体,取4 μ g纯化的抗体进行还原性SDS-PAGE。在还原性SDS-PAGE后显示两条带,1条为25KD左右的轻链(序列如SEQ ID NO:11所示),另一条为50KD左右的重链(序列如SEQ ID NO:12所示)。

[0166] 实施例2

[0167] 实施例1得到的样品1的抗体(具有序列如SEQ ID NO:11以及12所示的轻链和重

链)虽然具备结合cTnI蛋白的能力,但亲和力和抗体活性均不够理想,因而申请人通过对该抗体的轻链CDR及重链CDR进行突变。

[0168] 经分析,重链的互补决定区(WT):

[0169] CDR-VH1为A-S-D(X1)-Y-T-F-S(X2)-T(X3)-Y-W-M-Y;

[0170] CDR-VH2为Y-L(X1)-N-P-S-S(X2)-G-H-T-E(X3)-Y-N-Q-R(X4)-F-K-D;

[0171] CDR-VH3为A-R-K(X1)-Y-F(X2)-G-P-F-A(X3)-M-D;

[0172] 轻链的互补决定区:

[0173] CDR-VL1为S-A-S-T(X1)-T(X2)-V-S-Y-A(X3)-H;

[0174] CDR-VL2为W-L(X1)-Y-D-S(X2)-S-K-I(X3)-A-S;

[0175] CDR-VL3为Q-N(X1)-W-S-T(X2)-Q(X3)-P-Y-T;

[0176] 其中,X1、X2、X3、X4均为突变位点。

[0177] 表1与抗体活性有关的突变位点

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

[0179] 在突变后对抗体活性进行检测,包被液稀释羊抗鼠IgG 1 μ g/ml进行微孔板包被,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,1h,拍干;加入稀释后的cTnI单克隆抗体,100 μ L/孔,37 $^{\circ}$ C,60min;甩掉板内液体,拍干,加入20%鼠阴性血封闭,每孔120 μ L,37 $^{\circ}$ C,1h;甩掉板内液体,拍干,加入稀释的cTnI抗原(0.15 μ g/ml),每孔100 μ L,37 $^{\circ}$ C,40min;洗涤液清洗5次,拍干;加入标记HRP的另一株cTnI单克隆抗体(1:5K),每孔100 μ L,37 $^{\circ}$ C,30min;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。

[0180] 部分结果如下:

[0181] 表2抗体活性分析数据

浓度 (ng/ml)	WT	突变 1	突变 2	突变 3	突变 4	突变 5
1000.000	2.104	2.344	2.327	2.207	1.278	1.117
333.333	2.008	2.401	2.297	2.109	0.678	0.514
111.111	1.878	2.402	2.173	2.001	0.374	0.247
37.037	1.697	2.363	2.133	2.000	-	-
12.346	0.947	2.342	1.607	1.411	-	-
4.115	0.475	1.969	1.146	0.978	-	-
1.372	0.174	1.031	0.528	0.367	-	-
0.000	0.144	0.193	0.224	0.204	-	-

[0184] “-”代表无活性。

[0185] 亲和力分析

[0186] 利用AMC传感器,纯化出来的抗体用PBST稀释到10 μ g/ml,cTnI质控品重组蛋白(公司自产重组抗原)用PBST进行梯度稀释:769.2nmol/ml、384.6nmol/ml、192.3nmol/ml、96.2nmol/ml、48.1nmol/ml、24nmol/ml、12nmol/ml、0nmol/ml;

[0187] 运行流程:缓冲液1(PBST)中平衡60s,抗体溶液中固化抗体300s,缓冲液2(PBST)中孵育180s,抗原溶液中结合420s,缓冲液2中解离1200s,用10mM pH 1.69GLY溶液及缓冲液3进行传感器再生,输出数据。

[0188] KD表示平衡解亲常数即亲和力;Kon表示结合速率;Kdis表示解离速率。

[0189] 表3亲和力分析数据

[0190]

不同突变	KD (M)	Kon (1/Ms)	Kdis (1/S)
WT	1.29E-08	2.86E+04	3.68E-04
突变1	9.96E-09	2.64E+04	2.63E-04
突变2	1.56E-08	2.78E+04	4.34E-04
突变3	1.78E-08	2.70E+04	4.81E-04
突变4	5.67E-05	6.54E+02	3.71E-02
突变5	9.78E-04	7.02E+02	6.87E-01

[0191] 从表2和表3可知,突变1的活性效果和亲和力最佳,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 \pm 10%),部分结果如下。

[0192] 表4与抗体亲和力有关的突变位点

[0193]

位点	CDR-VH1 X2/ X3	CDR-VH2 X1/ X2/ X4	CDR-VH3 X1/ X2	CDR-VL1 X1/ X2	CDR-VL2 X1/ X3	CDR-V L3 X2/ X3
突变 1	S/T	L/S/R	K/F	T/T	L/I	T/Q

[0194]

突变 1-1	S/T	I/T/K	R/Y	S/S	I/I	T/N
突变 1-2	T/S	I/S/R	R/W	S/T	L/L	S/Q
突变 1-3	T/T	I/T/K	K/F	T/S	I/L	S/N
突变 1-4	S/T	I/S/R	K/Y	T/T	L/I	T/N
突变 1-5	S/S	L/T/K	K/W	S/S	I/I	T/N
突变 1-6	T/S	L/S/R	R/F	S/T	L/L	T/N
突变 1-7	T/T	L/T/K	R/Y	T/S	I/L	T/N
突变 1-8	S/T	I/T/K	R/W	T/T	L/I	T/Q
突变 1-9	S/S	I/S/R	K/F	S/S	I/I	T/Q
突变 1-10	T/S	I/T/R	K/Y	S/T	L/L	T/Q
突变 1-11	T/S	I/S/K	K/W	T/S	I/L	T/Q
突变 1-12	S/T	L/T/R	R/F	T/T	L/I	T/Q
突变 1-13	S/S	L/S/R	R/Y	S/S	I/I	T/Q
突变 1-14	T/S	L/T/K	R/W	S/T	L/L	T/Q
突变 1-15	T/T	L/S/R	K/F	T/S	I/L	T/Q
突变 1-16	S/T	I/S/K	K/Y	T/T	L/I	T/Q
突变 1-17	S/S	I/T/R	K/W	S/S	I/I	S/Q
突变 1-18	T/T	I/S/R	R/F	T/T	L/L	S/Q
突变 1-19	T/S	L/T/K	R/Y	S/S	I/L	S/Q
突变 1-20	S/T	L/S/K	R/W	S/T	L/I	S/Q
突变 1-21	S/S	L/T/R	K/F	T/S	I/I	S/Q
突变 1-22	T/T	L/S/K	K/Y	T/T	L/L	S/Q
突变 1-23	T/S	I/T/R	K/W	S/S	I/L	S/N
突变 1-24	S/T	I/T/K	R/F	S/T	L/I	S/N
突变 1-25	S/S	I/S/R	R/Y	T/S	I/I	S/N
突变 1-26	T/T	L/T/K	R/W	S/T	L/L	S/N
突变 1-27	T/S	L/S/K	K/F	T/S	I/L	S/N
突变 1-28	S/T	L/T/R	K/Y	T/T	L/I	S/N
突变 1-29	S/S	I/S/K	K/W	S/S	I/I	S/N
突变 1-30	T/S	L/S/R	R/F	T/T	L/L	S/N
突变 1-31	T/T	I/T/K	R/Y	S/S	I/L	S/N
突变 1-32	S/T	L/S/R	K/W	S/T	L/I	S/N
突变 1-33	S/S	I/T/K	K/F	T/S	I/I	S/N
突变 1-34	T/S	I/S/K	K/Y	T/T	L/L	S/N
突变 1-35	T/T	I/T/K	R/W	S/S	I/L	T/Q
突变 1-36	S/T	I/S/R	R/W	S/T	L/I	T/N
突变 1-37	S/S	L/T/R	K/F	T/S	I/L	T/Q
突变 1-38	T/S	L/S/K	K/Y	S/T	L/L	S/N
突变 1-39	T/T	L/T/K	K/W	T/S	I/L	T/Q

[0195]

突变 1-40	S/T	L/S/R	R/F	S/T	L/I	T/N
突变 1-41	S/S	I/T/R	R/Y	T/S	I/I	S/Q
突变 1-42	T/S	I/S/K	R/W	S/T	L/L	S/N
突变 1-43	T/S	I/T/K	K/F	T/S	I/L	T/Q
突变 1-44	S/T	I/S/R	K/Y	S/S	I/I	T/N
突变 1-45	S/S	L/T/R	K/W	S/T	L/L	S/Q
突变 1-46	T/S	L/S/K	R/F	T/S	I/L	S/N
突变 1-47	T/T	L/T/K	R/Y	T/T	L/I	T/Q
突变 1-48	S/S	L/T/R	R/W	S/T	I/I	T/N
突变 1-49	T/T	L/S/K	K/F	T/S	L/L	S/Q
突变 1-50	T/S	L/T/K	R/W	T/T	I/L	S/N
突变 1-51	T/T	I/T/R	R/Y	T/S	I/I	S/Q
突变 1-52	T/T	I/T/R	R/W	T/S	I/I	S/N
突变 1-53	S/S	I/T/R	K/Y	T/T	I/L	T/N
突变 1-54	S/S	L/S/K	R/F	T/T	L/I	T/Q
突变 1-55	S/T	L/S/K	K/Y	T/T	I/L	T/N
突变 1-56	T/T	L/S/R	R/W	T/S	I/I	S/N

[0196] 亲和力分析,方法同上,结果如表5所示。表5亲和力分析数据

[0197]

不同突变	KD (M)	Kon (1/Ms)	Kdis(1/S)
突变 1	9.96 E-09	2.64E+04	2.63E-04
突变 1-1	7.73E-09	1.53E+04	1.18E-04
突变 1-2	7.96E-09	3.79E+04	3.02E-04
突变 1-3	9.45E-09	1.92E+04	1.81E-04
突变 1-4	5.72E-09	3.69E+04	2.11E-04
突变 1-5	2.38E-10	4.93E+04	1.17E-05
突变 1-6	2.32E-09	2.60E+04	6.03E-05
突变 1-7	2.92E-09	1.39E+04	4.05E-05
突变 1-8	9.35E-09	1.12E+04	1.05E-04

[0198]

突变 1-9	8.13E-10	3.01E+04	2.45E-05
突变 1-10	4.19E-09	3.70E+04	1.55E-04
突变 1-11	2.21E-10	2.03E+04	4.49E-06
突变 1-12	3.29E-09	2.09E+04	6.88E-05
突变 1-13	4.42E-09	1.77E+04	7.82E-05
突变 1-14	7.84E-09	2.77E+04	2.17E-04
突变 1-15	1.16E-09	1.81E+04	2.10E-05
突变 1-16	1.39E-09	4.77E+04	6.64E-05
突变 1-17	2.98E-09	3.35E+04	9.97E-05
突变 1-18	2.30E-09	3.65E+04	8.41E-05
突变 1-19	6.54E-09	1.09E+04	7.12E-05
突变 1-20	1.38E-09	1.66E+04	2.30E-05
突变 1-21	9.92E-09	2.61E+04	2.62E-04
突变 1-22	1.73E-09	4.78E+04	8.25E-05
突变 1-23	1.76E-09	1.16E+04	2.04E-05
突变 1-24	9.29E-09	1.86E+04	1.73E-04
突变 1-25	1.70E-09	3.62E+04	6.15E-05
突变 1-26	2.08E-09	1.59E+04	3.31E-05
突变 1-27	9.42E-09	3.95E+04	3.72E-04
突变 1-28	9.41E-10	1.48E+04	1.39E-05
突变 1-29	9.60E-10	1.58E+04	1.52E-05

[0199]

突变 1-30	7.20E-09	3.58E+04	2.58E-04
突变 1-31	1.27E-08	2.84E+04	3.65E-04
突变 1-32	5.48E-10	3.24E+04	1.78E-05
突变 1-33	2.75E-09	3.47E+04	9.53E-05
突变 1-34	4.04E-10	4.75E+04	1.92E-05
突变 1-35	2.60E-09	1.89E+04	4.92E-05
突变 1-36	5.49E-09	1.73E+04	9.50E-05
突变 1-37	8.01E-09	3.34E+04	2.68E-04
突变 1-38	7.30E-09	3.05E+04	2.23E-04
突变 1-39	1.03E-09	2.70E+04	2.79E-05
突变 1-40	4.16E-09	3.32E+04	1.38E-04
突变 1-41	3.27E-09	1.85E+04	6.06E-05
突变 1-42	7.37E-09	4.91E+04	3.62E-04
突变 1-43	1.29E-08	2.86E+04	3.68E-04
突变 1-44	4.18E-09	1.65E+04	6.90E-05
突变 1-45	3.70E-09	2.61E+04	9.65E-05
突变 1-46	5.57E-09	2.12E+04	1.18E-04
突变 1-47	2.03E-09	3.41E+04	6.94E-05
突变 1-48	6.60E-09	1.30E+04	8.58E-05
突变 1-49	5.94E-09	3.28E+04	1.95E-04
突变 1-50	1.09E-09	1.02E+04	1.11E-05

[0200]	突变 1-51	8.10E-10	2.65E+04	2.15E-05
	突变 1-52	1.01E-09	1.36E+04	1.38E-05
	突变 1-53	8.00E-09	5.00E+04	4.00E-04
	突变 1-54	1.63E-09	4.49E+04	7.30E-05
	突变 1-55	2.07E-09	3.07E+04	6.36E-05
	突变 1-56	6.07E-09	1.46E+04	8.86E-05

[0201] 从表5可以看出,表4中列出的突变位点对抗体的亲和力影响不大。

[0202] 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。

[0203] 表6以WT为骨架进行的突变

位点	CDR-VH1 X2/ X3	CDR-VH2 X1/ X2/ X4	CDR-VH3 X1/ X2	CDR-VL1 X1/ X2	CDR-VL2 X1/ X3	CDR-VL3 X2/ X3
WT	S/T	L/S/R	K/F	T/T	L/I	T/ Q
WT 1-1	S/T	I/T/K	R/Y	S/S	I/I	T/N
WT 1-2	T/S	I/S/R	R/W	S/T	L/L	S/ Q
WT 1-3	T/T	I/T/K	K/F	T/S	I/L	S/N
WT 1-4	S/T	I/S/R	K/Y	T/T	L/I	T/N
WT 1-5	S/S	L/T/K	K/W	S/S	I/I	T/N
WT 1-6	T/S	L/S/R	R/F	S/T	L/L	T/N
WT 1-7	T/T	L/T/K	R/Y	T/S	I/L	T/N
WT 1-8	S/T	I/T/K	R/W	T/T	L/I	T/ Q

[0205] 表7亲和力分析数据

不同突变	KD (M)	Kon (1/Ms)	Kdis(1/S)
WT	1.29E-08	2.86E+04	3.68E-04
WT 1-1	6.84E-08	2.41E+04	1.65E-03
WT 1-2	2.85E-08	2.60E+04	7.41E-04
WT 1-3	1.08E-08	3.44E+04	3.72E-04
WT 1-4	3.18E-08	2.90E+04	9.22E-04

[0207]	WT 1-5	4.86E-08	3.50E+04	1.70E-03
	WT 1-6	5.15E-08	2.55E+04	1.31E-03
	WT 1-7	2.86E-08	2.78E+04	7.95E-04
	WT 1-8	7.51E-08	2.94E+04	2.21E-03

[0208] 从表6和表7分析,表6中列出的突变位点对抗体的亲和力影响也不大。

[0209] 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,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> 一种抗人心肌肌钙蛋白I的抗体及其应用
- [0004] <130> 2010
- [0005] <160> 12
- [0006] <170> PatentIn version 3.3
- [0007] <210> 1
- [0008] <211> 23
- [0009] <212> PRT
- [0010] <213> Mus musculus
- [0011] <400> 1
- [0012] Glu Ile Phe Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Met Ser Ala Ser Pro Gly
- [0013] 1 5 10 15
- [0014] Glu Lys Val Thr Met Thr Cys
- [0015] 20
- [0016] <210> 2
- [0017] <211> 12
- [0018] <212> PRT
- [0019] <213> Mus musculus
- [0020] <400> 2
- [0021] Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Gly Thr Ser Pro Lys Arg
- [0022] 1 5 10
- [0023] <210> 3
- [0024] <211> 32
- [0025] <212> PRT
- [0026] <213> Mus musculus
- [0027] <400> 3
- [0028] Gly Ile Pro Val Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser
- [0029] 1 5 10 15
- [0030] Leu Thr Ile Ser Ser Met Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys
- [0031] 20 25 30
- [0032] <210> 4
- [0033] <211> 11
- [0034] <212> PRT
- [0035] <213> Mus musculus
- [0036] <400> 4
- [0037] Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
- [0038] 1 5 10

[0039] <210> 5
 [0040] <211> 23
 [0041] <212> PRT
 [0042] <213> Mus musculus
 [0043] <400> 5
 [0044] Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Thr Glu Leu Ala Lys Pro Gly Ala
 [0045] 1 5 10 15
 [0046] Ser Val Lys Phe Ser Cys Lys
 [0047] 20
 [0048] <210> 6
 [0049] <211> 14
 [0050] <212> PRT
 [0051] <213> Mus musculus
 [0052] <400> 6
 [0053] Trp Ile Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly
 [0054] 1 5 10
 [0055] <210> 7
 [0056] <211> 30
 [0057] <212> PRT
 [0058] <213> Mus musculus
 [0059] <400> 7
 [0060] Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr Met Gln
 [0061] 1 5 10 15
 [0062] Leu Asn Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
 [0063] 20 25 30
 [0064] <210> 8
 [0065] <211> 12
 [0066] <212> PRT
 [0067] <213> Mus musculus
 [0068] <400> 8
 [0069] Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
 [0070] 1 5 10
 [0071] <210> 9
 [0072] <211> 106
 [0073] <212> PRT
 [0074] <213> Mus musculus
 [0075] <400> 9
 [0076] Ala Asp Ala Ala Pro Thr Val Ser Ile Phe Pro Pro Ser Ser Glu Gln
 [0077] 1 5 10 15

[0078]	Leu Thr Ser Gly Gly Ala Ser Val Val Cys Phe Leu Asn Asn Phe Tyr
[0079]	20 25 30
[0080]	Pro Lys Asp Ile Asn Val Lys Trp Lys Ile Asp Gly Ser Glu Arg Gln
[0081]	35 40 45
[0082]	Asn Gly Val Leu Asn Ser Trp Thr Asp Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr
[0083]	50 55 60
[0084]	Tyr Ser Met Ser Ser Thr Leu Thr Leu Thr Lys Asp Glu Tyr Glu Arg
[0085]	65 70 75 80
[0086]	His Asn Ser Tyr Thr Cys Glu Ala Thr His Lys Thr Ser Thr Ser Pro
[0087]	85 90 95
[0088]	Ile Val Lys Ser Phe Asn Arg Asn Glu Cys
[0089]	100 105
[0090]	<210> 10
[0091]	<211> 324
[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 Ser Ala
[0096]	1 5 10 15
[0097]	Ala Gln Thr Asn Ser Met Val Thr Leu Gly Cys Leu Val Lys Gly Tyr
[0098]	20 25 30
[0099]	Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Thr Trp Asn Ser Gly Ser Leu Ser Ser
[0100]	35 40 45
[0101]	Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Asp Leu Tyr Thr Leu
[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 Asn Val Ala His Pro Ala Ser Ser Thr Lys Val Asp Lys Lys
[0106]	85 90 95
[0107]	Ile Val Pro Arg Asp Cys Gly Cys Lys Pro Cys Ile Cys Thr Val Pro
[0108]	100 105 110
[0109]	Glu Val Ser Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Val Leu
[0110]	115 120 125
[0111]	Thr Ile Thr Leu Thr Pro Lys Val Thr Cys Val Val Val Asp Ile Ser
[0112]	130 135 140
[0113]	Lys Asp Asp Pro Glu Val Gln Phe Ser Trp Phe Val Asp Asp Val Glu
[0114]	145 150 155 160
[0115]	Val His Thr Ala Gln Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Ile Asn Ser Thr
[0116]	165 170 175

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

[0156]	115	120	125
[0157]	Ala Ser Val Val Cys Phe Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Lys Asp Ile Asn		
[0158]	130	135	140
[0159]	Val Lys Trp Lys Ile Asp Gly Ser Glu Arg Gln Asn Gly Val Leu Asn		
[0160]	145	150	155
[0161]	Ser Trp Thr Asp Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Met Ser Ser		
[0162]	165	170	175
[0163]	Thr Leu Thr Leu Thr Lys Asp Glu Tyr Glu Arg His Asn Ser Tyr Thr		
[0164]	180	185	190
[0165]	Cys Glu Ala Thr His Lys Thr Ser Thr Ser Pro Ile Val Lys Ser Phe		
[0166]	195	200	205
[0167]	Asn Arg Asn Glu Cys		
[0168]	210		
[0169]	<210> 12		
[0170]	<211> 443		
[0171]	<212> PRT		
[0172]	<213> Mus musculus		
[0173]	<400> 12		
[0174]	Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Thr Glu Leu Ala Lys Pro Gly Ala		
[0175]	1	5	10
[0176]	Ser Val Lys Phe Ser Cys Lys Ala Ser Asp Tyr Thr Phe Ser Thr Tyr		
[0177]	20	25	30
[0178]	Trp Met Tyr Trp Ile Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile		
[0179]	35	40	45
[0180]	Gly Tyr Leu Asn Pro Ser Ser Gly His Thr Glu Tyr Asn Gln Arg Phe		
[0181]	50	55	60
[0182]	Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr		
[0183]	65	70	75
[0184]	Met Gln Leu Asn Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys		
[0185]	85	90	95
[0186]	Ala Arg Lys Tyr Phe Gly Pro Phe Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly		
[0187]	100	105	110
[0188]	Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Ala Lys Thr Thr Pro Pro Ser Val Tyr		
[0189]	115	120	125
[0190]	Pro Leu Ala Pro Gly Ser Ala Ala Gln Thr Asn Ser Met Val Thr Leu		
[0191]	130	135	140
[0192]	Gly Cys Leu Val Lys Gly Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Thr Trp		
[0193]	145	150	155
[0194]	Asn Ser Gly Ser Leu Ser Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu		

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