



(12) 发明专利申请



(10) 申请公布号 CN 118837542 A

(43) 申请公布日 2024.10.25

(21) 申请号 202410476256.3

G01N 33/533 (2006.01)

(22) 申请日 2024.04.19

G07K 16/00 (2006.01)

(66) 本国优先权数据

G07K 1/107 (2006.01)

202310453142.2 2023.04.24 CN

G12N 15/13 (2006.01)

(71) 申请人 菲鹏生物股份有限公司

地址 518000 广东省深圳市南山区西丽留
仙洞中山园路1001号TCL科学园区研
发楼D2栋6层ABCD单元601;602;603;
604号房

(72) 发明人 季红斌 孟媛 钟冬梅 曹慧方

(74) 专利代理机构 北京清亦华知识产权代理事
务所(普通合伙) 11201

专利代理师 徐章伟

(51) Int. Cl.

G01N 33/532 (2006.01)

权利要求书3页 说明书33页
序列表(电子公布) 附图4页

(54) 发明名称

抗体和抗体缀合物及其用途

(57) 摘要

本发明公开了一种缀合物,其包括:抗体以及至少一个缀合部分,缀合部分与所述抗体相连,抗体包括CH1片段和CL片段,CH1片段和CL片段具有选自如下任意组的半胱氨酸位点或其等价位点:CH1片段的第67位和CL片段的第28位;CH1片段的第9位和CL片段的第17位;CH1片段的第9位和CL片段的第14位;CH1片段的第54位和CL片段的第55位;CH1片段的第53位和CL片段的第55位;CH1片段的第14位和CL片段的第12位;CH1片段的第14位和CL片段的第102位。本发明的缀合物具有活性高、灵敏度高或稳定性强等优点。

1. 一种缀合物,其特征在于,包括:抗体以及至少一个缀合部分,所述缀合部分与所述抗体相连;其中,所述抗体包括CH1片段和CL片段;所述抗体的CH1片段和CL片段具有选自如下任意组的半胱氨酸位点:

- 1) CH1片段的第67位和CL片段的第28位,或其等价位点;
- 2) CH1片段的第9位和CL片段的第17位,或其等价位点;
- 3) CH1片段的第9位和CL片段的第14位,或其等价位点;
- 4) CH1片段的第54位和CL片段的第55位,或其等价位点;
- 5) CH1片段的第53位和CL片段的第55位,或其等价位点;
- 6) CH1片段的第14位和CL片段的第12位,或其等价位点;
- 7) CH1片段的第14位和CL片段的第102位,或其等价位点。

2. 根据权利要求1所述的缀合物,其特征在于,所述CH1片段的第9位、第14位、第53位、第54位、第67位是以鼠源野生型IgHG的CH1所示的氨基酸序列从N端至C端进行依次顺序编号;所述CL片段的第12位、第14位、第17位、第28位、第55位、第102位是以鼠源野生型IGLK的CL所示的氨基酸序列从N端至C端进行依次顺序编号;

可选地,所述抗体具有选自如下任意组或与其具有90%以上同一性的CH1片段和CL片段:

	CH1片段	CL片段
1	SEQ ID NO:13	SEQ ID NO:14
2	SEQ ID NO:15	SEQ ID NO:16
3	SEQ ID NO:15	SEQ ID NO:17
4	SEQ ID NO:18	SEQ ID NO:19
5	SEQ ID NO:20	SEQ ID NO:19
6	SEQ ID NO:21	SEQ ID NO:22
7	SEQ ID NO:21	SEQ ID NO:23
8	SEQ ID NO:46	SEQ ID NO:14
9	SEQ ID NO:47	SEQ ID NO:16
10	SEQ ID NO:47	SEQ ID NO:17

可选地,所述抗体进一步包括Fc片段;

可选地,所述CH1片段的C端与所述Fc片段的N端相连;

可选地,所述抗体进一步包括铰链区;

可选地,所述铰链区的N端与所述CH1片段的C端相连,所述铰链区的C端与所述Fc片段的N端相连;

可选地,所述抗体包括如SEQ ID NO:26~SEQ ID NO:30、SEQ ID NO:50~SEQ ID NO:51任一项所示的重链恒定区,或与其具有90%以上同一性的氨基酸序列;

可选地,所述抗体进一步包括重链可变区和/或轻链可变区;

可选地,所述重链可变区的C端与所述CH1片段的N端相连,所述轻链可变区的C端与所述CL片段的N端相连;

可选地,所述抗体具有选自如下任意组的重链和轻链:

	重链	轻链

1	SEQ ID NO:33	SEQ ID NO:34
2	SEQ ID NO:35	SEQ ID NO:36
3	SEQ ID NO:35	SEQ ID NO:37
4	SEQ ID NO:38	SEQ ID NO:39
5	SEQ ID NO:40	SEQ ID NO:39
6	SEQ ID NO:41	SEQ ID NO:42
7	SEQ ID NO:41	SEQ ID NO:43
8	SEQ ID NO:78	SEQ ID NO:79
9	SEQ ID NO:80	SEQ ID NO:81

可选地,所述缀合部分与所述抗体的活性基团相连;

可选地,所述活性基团包括氨基、亚氨基、巯基、羟基和羧基中的至少之一;

可选地,所述缀合部分选自载体、标签中的至少之一;

可选地,所述载体包括固相载体、标记载体、亲和性物质、荧光物质、发光物质、放射性同位素、金胶体和有色物质中的至少之一;

可选地,所述亲和性物质包括生物素/抗生物素蛋白;

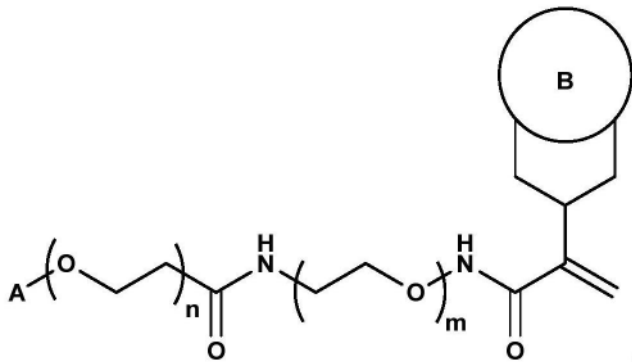
可选地,所述标签包括His标签、Flag标签、GST标签、MBP标签、SUMO标签和C-Myc标签中的至少之一;

可选地,进一步包括接头分子,所述缀合部分通过接头分子与所述活性基团相连;

可选地,所述接头分子与所述抗体中配对的两个半胱氨酸残基的巯基相连;

可选地,所述接头分子与抗体的链间形成硫碳桥连接;

可选地,所述抗体缀合物包括以下结构:



其中,n、m各自独立地选自0~24之间的任意整数;

A为所述缀合部分;

B为所述抗体;

可选地,A为载体;

可选地,n=4,m=4。

3. 一种抗体,其特征在于,所述抗体为权利要求1~2任一项所述的缀合物所限定的抗体;可选地,所述抗体包括选自多抗、全长单抗、Fab抗体、Fab'抗体、F(ab')₂抗体、F(ab)₂抗体、单链抗体中的至少之一。

4. 一种核酸分子、载体、细胞或宿主,其特征在于,所述核酸分子编码权利要求1~2任一项所述的缀合物中的抗体或权利要求3所述的抗体;所述载体包括上述的核酸分子所述

细胞或宿主包括：

上述的核酸分子、上述的载体或者

表达权利要求1~2任一项所述的缀合物中的抗体或权利要求3所述的抗体。

5. 权利要求3所述的抗体、权利要求4所述的核酸分子、载体、细胞或宿主在制备缀合物或试剂盒中的用途。

6. 一种制备缀合物的方法,其特征在於,包括:

采用权利要求1~2任一项所述的缀合物中的抗体或权利要求3所述的抗体与缀合部分进行第一缀合反应,获得所述缀合物。

7. 一种试剂或试剂盒,其特征在於,包括:

权利要求1~2任一项所述的缀合物或权利要求3所述的抗体。

8. 权利要求1~2任一项所述的缀合物、权利要求3所述的抗体、权利要求4所述的核酸分子、载体、细胞或宿主或权利要求7所述的试剂或试剂盒在免疫检测或制备免疫检测产品中的用途。

9. 一种免疫检测的方法,其特征在於,包括:

采用权利要求1~2任一项所述的缀合物或权利要求3所述的抗体与待检测样本进行接触,形成免疫复合物;

可选地,基于所述免疫复合物的信号,确定所述待检测样本中是否含有目标物质或所述目标物质的含量;

可选地,所述信号包括荧光信号。

10. 一种提高缀合物活性、稳定性或灵敏度的方法,所述缀合物包括抗体和至少一个缀合部分,所述缀合部分与所述抗体相连,其特征在於,包括:

将所述抗体中CH1片段和CL片段引入一组或多组半胱氨酸位点,所述半胱氨酸位点与权利要求1~2任一项所述的缀合物所限定的半胱氨酸位点一致。

抗体和抗体缀合物及其用途

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求于2023年04月24日提交的中国专利局的申请号为202310453142.2, 名称为“抗体和抗体缀合物及其用途”的中国专利申请的优先权, 其全部内容通过引用结合在本申请中。

技术领域

[0003] 本发明属于生物技术领域, 具体地, 本发明涉及一种抗体和抗体缀合物及其用途, 更具体地, 本发明涉及一种抗体、缀合物、核酸分子、载体、细胞或宿主、试剂或试剂盒及其用途、制备缀合物的方法、免疫检测的方法以及提高缀合物活性、稳定性或灵敏度的方法。

背景技术

[0004] 抗体与标记物的偶联物已广泛用于免疫检测领域, 偶联的方法通常包括基于赖氨酸侧链氨基的偶联和基于半胱氨酸巯基的偶联。基于赖氨酸侧链氨基的偶联是早期发展起来的一种偶联方法, 在一个抗体的结构中大约有80-100个赖氨酸的氨基分布, 这些赖氨酸胺是非常有效的载荷共轭, 因为它们能很好的暴露出来, 而且氨基是优良的亲核试剂。但其选择性是最差的, 有些位点的偶联会对抗体的稳定性或活性造成影响。

[0005] 半胱氨酸的巯基在中性pH值下具有反应性, 这一点不同于在中性pH附近被质子化并且具有较低亲核性的大多数胺。因为巯基的相对反应性, 所以具有半胱氨酸残基的抗体通常以其氧化形式作为二硫键连接的寡聚物存在或者具有内部桥接二硫键。细胞外抗体一般不具有游离巯基。可使用试剂(如二硫苏糖醇(DTT)、硒醇和三-(2-羧基乙基)膦(TCEP))将二硫键还原为反应性巯基。在具有四个链间二硫键的IgG1单克隆抗体中, 这种位点特异性缀合导致连接有最高达八个配体部分的偶联物。但是, 在与这些不同半胱氨酸残基偶联的过程中, 原来的二硫键不能总是被再次桥接, 可能导致结构改变和抗体功能受损。

[0006] 已通过基因工程技术将半胱氨酸残基引入抗体以形成与配体的共价连接或形成新的分子内二硫键。然而, 通过将抗体的不同氨基酸残基突变为半胱氨酸氨基酸设计半胱氨酸巯基可能是有问题的, 特别是在未配对的(游离Cys)残基为相对易于反应或氧化的残基的情况下。在抗体的浓缩溶液中, 不论是在大肠杆菌的周质、培养物上清或部分或完全纯化的蛋白质中, 在抗体表面上的未配对的Cys残基可配对并氧化形成分子间二硫化物, 并因此形成抗体二聚体或多聚体。此外, 如果蛋白质在新改造的Cys和已有的Cys残基之间氧化形成分子内二硫键, 则2个Cys基都不能用于活性位点参与和相互作用。此外, 通过错误折叠或三级结构的丢失, 会降低抗体的活性和特异性, 甚至是无活性或无特异性, 导致获得的抗体缀合物的活性和灵敏度大大降低。

[0007] 因此, 亟需提供一种高活性、稳定性或灵敏度的抗体和抗体缀合物。

发明内容

[0008] 本发明旨在提供了一种抗体、缀合物、核酸分子、载体、细胞或宿主、试剂或试剂盒

及其用途、制备缀合物的方法、免疫检测的方法以及提高缀合物活性、稳定性或灵敏度的方法。

[0009] 在本发明的第一方面,本发明提出了一种缀合物。根据本发明的实施例,所述缀合物包括:抗体以及至少一个缀合部分,所述缀合部分与所述抗体相连;其中,所述抗体包括CH1片段和CL片段;所述抗体的CH1片段和CL片段具有选自如下任意组的半胱氨酸位点:1) CH1片段的第67位和CL片段的第28位,或其等价位点;2) CH1片段的第9位和CL片段的第17位,或其等价位点;3) CH1片段的第9位和CL片段的第14位,或其等价位点;4) CH1片段的第54位和CL片段的第55位,或其等价位点;5) CH1片段的第53位和CL片段的第55位,或其等价位点;6) CH1片段的第14位和CL片段的第12位,或其等价位点;7) CH1片段的第14位和CL片段的第102位,或其等价位点。

[0010] 在本发明的第二方面,本发明提出了一种抗体。根据本发明的实施例,所述抗体为第一方面所述的缀合物所限定的抗体。

[0011] 在本发明的第三方面,本发明提出了一种核酸分子。根据本发明的实施例,所述核酸分子编码第一方面所述的缀合物中的抗体或第二方面所述的抗体。

[0012] 在本发明的第四方面,本发明提出了一种载体。根据本发明的实施例,所述载体包括第三方面所述的核酸分子。

[0013] 在本发明的第五方面,本发明提出了一种细胞或宿主。根据本发明的实施例,所述细胞或宿主包括:第三方面所述的核酸分子或第四方面所述的载体;或者表达第一方面所述的缀合物中的抗体或第二方面所述的抗体。

[0014] 在本发明的第六方面,本发明提出了一种第二方面所述的抗体、第三方面所述的核酸分子、第四方面所述的载体或第五方面所述的细胞或宿主在制备缀合物或试剂盒中的用途。

[0015] 在本发明的第七方面,本发明提出了一种制备缀合物的方法。根据本发明的实施例,所述方法包括:采用第一方面所述的缀合物中的抗体或第二方面所述的抗体与缀合部分进行第一缀合反应,获得所述缀合物。

[0016] 在本发明的第八方面,本发明提出了一种试剂或试剂盒。根据本发明的实施例,所述试剂或试剂盒包括:第一方面所述的缀合物或第二方面所述的抗体。

[0017] 在本发明的第九方面,本发明提出了一种第一方面所述的缀合物、第二方面所述的抗体、第三方面所述的核酸分子、第四方面所述的载体、第五方面所述的细胞或宿主或第八方面所述的试剂或试剂盒在免疫检测或制备免疫检测产品中的用途。

[0018] 在本发明的第十方面,本发明提出了一种免疫检测的方法。根据发明的实施例,所述方法包括:采用第一方面所述的缀合物或第二方面所述的抗体与待检测样本进行接触,形成免疫复合物。

[0019] 在本发明的第十一方面,本发明提出了一种提高缀合物活性、稳定性或灵敏度的方法,所述缀合物包括抗体和至少一个缀合部分,所述缀合部分与所述抗体相连,所述方法包括:将所述抗体中CH1片段和CL片段引入一组或多组半胱氨酸位点,所述半胱氨酸位点与第一方面所述的缀合物所限定的半胱氨酸位点一致。

[0020] 本发明的氨基酸序列列表如下所示:

[0021]

名称	氨基酸序列	SEQ ID NO:
鼠源野生型 IgG1 的 CH1 片段	AKTTPPSVYPLAPGSAAQTNSMVTLGCLVKGYFPEPVTVTWNSGSLSSGVHTFPAVLQSDLYTLSSSVTVPSSTWPSQTVTCNVAHPASSTKVDK KI	1
鼠源野生型 IgG1 的 CH1 片段	AKTTPPSVYPLAPGSAAQTNSMVTLGCLVKGYFPEPVTVTWNSGSLSSGVHTFPAVLES DLYTLSSSVTVPS S PRPSETVTCNVAHPASSTKVDK KI	2
鼠源野生型 IgG2a 的 CH1 片段	AKTTAPSVYPLAPVCGD TTGSSVTLGCLVKGYFPEPVTLTWNSGSLSSGVHTFPAVLQSDLYTLSSSVTVTSSTWPSQSITCNVAHPASSTKVDK KI	3
鼠源野生型 IgG2b 的 CH1 片段	AKTTPPSVYPLAPGCGD TTGSSVTSGLVKGYFPEPVTVTWNSGSLSSVHTFPALLQSGLYTMSSSVTVPSSTWPSQTVTCSVAHPASSTTVDK KL	4
鼠源野生型 IgG2c 的 CH1 片段	AKTTAPSVYPLAPVCGG TTGSSVTLGCLVKGYFPEPVTLTWNSGSLSSGVHTFPALLQSGLYTLSSSVTVTSNTWPSQTITCNVAHPASSTKVDK KI	5
鼠源野生型 IgG3 的 CH1 片段	ATTTAPSVYPLVPGCSDTSGSSVTLGCLVKGYFPEPVTVKWNYGALS SGVRTVSSVLQSGFYSLSSLVTVPSSTWPSQTVICNVAHPASKTELIKRI	6
羊源野生型 IgG1 的 CH1 片段	ASTTPPKVYPLTSCCGD TSSSIVTLGCLVSSYMPEPVTVTWNSGALTS GVHTFPAILQSSGLYSLSSVTV PASTSGAQTFCNVAHPASSTKVDKRV	7
羊源野生型 IgG2 的 CH1 片段	ASTTAPKVYPLTSCCGD TSSSSIVTLGCLVSSYMPEPVTVTWNSGALTS GVHTFPAILQSSGLYSLSSVTV PASTSGAQTFCNVAHPASSAKVDKRV	8
兔源野生型 IgG 的 CH1 片段	GQPKAPSVFPLAPCCGD TSSSTVTLGCLVKGYLPEPVTVTWNSGTLTNGVRTFPSVRQSSGLYSLSSVSVTSSSQPVTCNVAHPATNTKVDKTV	9
鼠源野生型 IGLK 的 CL 片段	RADAAPTVISIFPPSSEQLTSGGASVVCFLNNFYPKDINVKWKIDGSERQNGVLNSWTDQDSDSTYSMSSTLTLTKDEYERHNSYTCEATHKTS TSPIVKSFNRNEC	10
羊源野生型 IGLL 的 CL 片段	GQPKSAPSVTLFPPSTEELSTNKATVVCLINDFYPGSVNVVWKADGSTINQNVKTTQASKQSNKYAASSYLTLTGSEWKS KSSYTCEVTHEGSTVTKTVKPSECS	11
兔源野生型 IGLK 的 CL 片段	GDPVAPT VLIFFPAADQVATGVTIVCVANKYFPDVTVTWEVDGTTQTTGIENSKTPQNSADCTYNLSSTLTLTSTQYN SHKEYTCKVTQGTTSV VQSFNRGDC	12
突变组 3 的 CH1 片段	AKTTPPSVYPLAPGSAAQTNSMVTLGCLVKGYFPEPVTVTWNSGSLSSGVHTFPAVLQSDLYTLSSCVTVPSSTWPSQTVTCNVAHPASSTKVDK KI	13

[0022]

突变组 3 的 CL 片段	RADAAPTVSIFPPSSEQLTSGGASVVCCLNNFYPKDINVKWKIDGSER QNGVLNSWTDQDSKDSTYSMSSTLTLTKDEYERHNSYTCEATHKTS TSPIVKSFNRNEC	14
突变组 5 (突变组 6) 的 CH1 片段	AKTTPPSVCPLAPGSAQAQNSMVTLGCLVKGYFPEPVTVTWNSGSL SGVHTFPAVLQSDLYTLSSSVTVPSSTWPSQTVTCNVAHPASSTKVD KI	15
突变组 5 的 CL 片段	RADAAPTVSIFPPSSECLTSGGASVVCFLNNFYPKDINVKWKIDGSER QNGVLNSWTDQDSKDSTYSMSSTLTLTKDEYERHNSYTCEATHKTS TSPIVKSFNRNEC	16
突变组 6 的 CL 片段	RADAAPTVSIFPPCSEQLTSGGASVVCFLNNFYPKDINVKWKIDGSER QNGVLNSWTDQDSKDSTYSMSSTLTLTKDEYERHNSYTCEATHKTS TSPIVKSFNRNEC	17
突变组 7 的 CH1 片段	AKTTPPSVYPLAPGSAQAQNSMVTLGCLVKGYFPEPVTVTWNSGSL SSGVHTFCAVLQSDLYTLSSSVTVPSSTWPSQTVTCNVAHPASSTKVD KKI	18
突变组 7 (突变组 2) 的 CL 片段	RADAAPTVSIFPPSSEQLTSGGASVVCFLNNFYPKDINVKWKIDGSER QNGVLNCWTDQDSKDSTYSMSSTLTLTKDEYERHNSYTCEATHKTS TSPIVKSFNRNEC	19
突变组 2 的 CH1 片段	AKTTPPSVYPLAPGSAQAQNSMVTLGCLVKGYFPEPVTVTWNSGSL SSGVHTCPAVLQSDLYTLSSSVTVPSSTWPSQTVTCNVAHPASSTKVD KKI	20
突变组 1 (突变组 4) 的 CH1 片段	AKTTPPSVYPLAPCSAAQNSMVTLGCLVKGYFPEPVTVTWNSGSL SGVHTFPAVLQSDLYTLSSSVTVPSSTWPSQTVTCNVAHPASSTKVD KI	21
突变组 1 的 CL 片段	RADAAPTVSIFCPSEQLTSGGASVVCFLNNFYPKDINVKWKIDGSER QNGVLNSWTDQDSKDSTYSMSSTLTLTKDEYERHNSYTCEATHKTS TSPIVKSFNRNEC	22
突变组 4 的 CL 片段	RADAAPTVSIFPPSSEQLTSGGASVVCFLNNFYPKDINVKWKIDGSER QNGVLNSWTDQDSKDSTYSMSSTLTLTKDEYERHNSYTCEATHKTS TSPIVKSCNRNEC	23
Fc 片段 1	VPEVSSVFIFPPKPKDVLITLTPKVTVCVVVDISKDDPEVQFSWFVDD VEVHTAQTKPREEQFNSTFRSVSELPIMHQDWLNGKEFKCRVNSAA FPAPIEK TISKTKGRPKAPQVYTIPPPKEQMAKD KVS LTCMITNFFPED ITVEWQWNGQPAENYKNTQPIMDTDGSYFVY SKLNVQKSNWEAGN TFTCSVLHEGLHNNHTEKSLSHSPG	24
铰链区 1	VPRDCGCKPCICT	25
突变组 3 的重链恒定区	AKTTPPSVYPLAPGSAQAQNSMVTLGCLVKGYFPEPVTVTWNSGSL SSGVHTFPAVLQSDLYTLSSCVTVPSSTWPSQTVTCNVAHPASSTKVD KKIVPRDCGCKPCICTVPEVSSVFIFPPKPKDVLITLTPKVTVCVVVDIS KDDPEVQFSWFVDDVEVHTAQTKPREEQFNSTFRSVSELPIMHQDW LNGKEFKCRVNSAAFPAPIEKTISKTKGRPKAPQVYTIPPPKEQMAKD KVS LTCMITNFFPEDITVEWQWNGQPAENYKNTQPIMDTDGSYFVY SKLNVQKSNWEAGNTFTCSVLHEGLHNNHTEKSLSHSPG	26
突变组 5 (突变组 6) 的重链恒定区	AKTTPPSVCPLAPGSAQAQNSMVTLGCLVKGYFPEPVTVTWNSGSL SGVHTFPAVLQSDLYTLSSSVTVPSSTWPSQTVTCNVAHPASSTKVD KIVPRDCGCKPCICTVPEVSSVFIFPPKPKDVLITLTPKVTVCVVVDISK DDPEVQFSWFVDDVEVHTAQTKPREEQFNSTFRSVSELPIMHQDW NGKEFKCRVNSAAFPAPIEKTISKTKGRPKAPQVYTIPPPKEQMAKD KVS LTCMITNFFPEDITVEWQWNGQPAENYKNTQPIMDTDGSYFVY SKLNVQKSNWEAGNTFTCSVLHEGLHNNHTEKSLSHSPG	27
突变组 7 的重链恒定区	AKTTPPSVYPLAPGSAQAQNSMVTLGCLVKGYFPEPVTVTWNSGSL SSGVHTFCAVLQSDLYTLSSSVTVPSSTWPSQTVTCNVAHPASSTKVD KKIVPRDCGCKPCICTVPEVSSVFIFPPKPKDVLITLTPKVTVCVVVDIS KDDPEVQFSWFVDDVEVHTAQTKPREEQFNSTFRSVSELPIMHQDW LNGKEFKCRVNSAAFPAPIEKTISKTKGRPKAPQVYTIPPPKEQMAKD KVS LTCMITNFFPEDITVEWQWNGQPAENYKNTQPIMDTDGSYFVY SKLNVQKSNWEAGNTFTCSVLHEGLHNNHTEKSLSHSPG	28
突变组 2 的重链	AKTTPPSVYPLAPGSAQAQNSMVTLGCLVKGYFPEPVTVTWNSGSL SSGVHTCPAVLQSDLYTLSSSVTVPSSTWPSQTVTCNVAHPASSTKVD	29

[0023]

恒定区	KKIVPRDCGCKPCICTVPEVSSVFIFPPKPKDVLITITLTPKVTCVVVDISKDDPEVQFSWFVDDVEVHTAQTKPREEQFNSTFRSVSELPIMHQDWLNGKEFKCRVNSAAFPAPIEKTISKTKGRPKAPQVYTIPPPKEQMAKD KVSLTCMITNFFPEDITVEWQWNGQPAENYKNTQPIMDTDGSYFVY SKLNVQKSNWEAGNTFTCSVLHEGLHNHHTEKSLSHSPG	
突变组 1 (突变组 4) 的重链恒定区	AKTTPPSVYPLAPCSAAQTNSMVTLGCLVKGYFPEPVTVTWNSGSLSGVHTFPAVLQSDLYTLSSSVTVPSSTWPSQTVTCNVAHPASSTKVDK KIVPRDCGCKPCICTVPEVSSVFIFPPKPKDVLITITLTPKVTCVVVDISKDDPEVQFSWFVDDVEVHTAQTKPREEQFNSTFRSVSELPIMHQDWLNGKEFKCRVNSAAFPAPIEKTISKTKGRPKAPQVYTIPPPKEQMAKD KVSLTCMITNFFPEDITVEWQWNGQPAENYKNTQPIMDTDGSYFVY SKLNVQKSNWEAGNTFTCSVLHEGLHNHHTEKSLSHSPG	30
CA153 的重链可变区	EVQLVESGGGLVKPGGSLKLSAASGFAFSNYPMWVRQTPEMRLWVAYISSGGDSTYYPGTVKGRFTISRDNKSAKLYLQMSLKSSEDAMYYCTFWFRGFDYWGQGTTLTVSS	31
CA153 的轻链可变区	DVLMTQIPLSLPVSLGDQASLSCRSSQSIVHSNGNTYLEWYLQKPGQSPKLLIYKVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYYCFQGSHVPTYFGGGTKLEIK	32
突变组 3 的重链	EVQLVESGGGLVKPGGSLKLSAASGFAFSNYPMWVRQTPEMRLWVAYISSGGDSTYYPGTVKGRFTISRDNKSAKLYLQMSLKSSEDAMYYCTFWFRGFDYWGQGTTLTVSSAKTTPPSVYPLAPGSAQTNSMVTLGCLVKGYFPEPVTVTWNSGSLSSGVHTFPAVLQSDLYTLSSCVTVPSSTWPSQTVTCNVAHPASSTKVDKKIVPRDCGCKPCICTVPEVSSVFI FPPKPKDVLITITLTPKVTCVVVDISKDDPEVQFSWFVDDVEVHTAQT KPREEQFNSTFRSVSELPIMHQDWLNGKEFKCRVNSAAFPAPIEKTISKTKGRPKAPQVYTIPPPKEQMAKD KVSLTCMITNFFPEDITVEWQWNGQPAENYKNTQPIMDTDGSYFVY SKLNVQKSNWEAGNTFTCSVLHEGLHNHHTEKSLSHSPG	33
突变组 3 的轻链	DVLMTQIPLSLPVSLGDQASLSCRSSQSIVHSNGNTYLEWYLQKPGQSPKLLIYKVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYYCFQGSHVPTYFGGGTKLEIKRADAAPTVISIFPPSSEQLTSGGASVVCCLN FYPKDINVKWKIDGSRQNGVLNSWTDQDSKDYSTYSMSSTLTLTKD EYERHNSYTCEATHKTSTSPIVKSFNREK	34
突变组 5 (突变组 6) 的重链	EVQLVESGGGLVKPGGSLKLSAASGFAFSNYPMWVRQTPEMRLWVAYISSGGDSTYYPGTVKGRFTISRDNKSAKLYLQMSLKSSEDAMYYCTFWFRGFDYWGQGTTLTVSSAKTTPPSVYPLAPGSAQTNSMVTLGCLVKGYFPEPVTVTWNSGSLSSGVHTFPAVLQSDLYTLSSSVTVPSSTWPSQTVTCNVAHPASSTKVDKKIVPRDCGCKPCICTVPEVSSVFI FPPKPKDVLITITLTPKVTCVVVDISKDDPEVQFSWFVDDVEVHTAQT KPREEQFNSTFRSVSELPIMHQDWLNGKEFKCRVNSAAFPAPIEKTISKTKGRPKAPQVYTIPPPKEQMAKD KVSLTCMITNFFPEDITVEWQWNGQPAENYKNTQPIMDTDGSYFVY SKLNVQKSNWEAGNTFTCSVLHEGLHNHHTEKSLSHSPG	35
突变组 5 的轻链	DVLMTQIPLSLPVSLGDQASLSCRSSQSIVHSNGNTYLEWYLQKPGQSPKLLIYKVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYYCFQGSHVPTYFGGGTKLEIKRADAAPTVISIFPPSSECLTSGGASVVCFLN FYPKDINVKWKIDGSRQNGVLNSWTDQDSKDYSTYSMSSTLTLTKD EYERHNSYTCEATHKTSTSPIVKSFNREK	36
突变组 6 的轻链	DVLMTQIPLSLPVSLGDQASLSCRSSQSIVHSNGNTYLEWYLQKPGQSPKLLIYKVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYYCFQGSHVPTYFGGGTKLEIKRADAAPTVISIFPPCSEQLTSGGASVVCFLN FYPKDINVKWKIDGSRQNGVLNSWTDQDSKDYSTYSMSSTLTLTKD EYERHNSYTCEATHKTSTSPIVKSFNREK	37
突变组 7 的重链	EVQLVESGGGLVKPGGSLKLSAASGFAFSNYPMWVRQTPEMRLWVAYISSGGDSTYYPGTVKGRFTISRDNKSAKLYLQMSLKSSEDAMYYCTFWFRGFDYWGQGTTLTVSSAKTTPPSVYPLAPGSAQTNSMVTLGCLVKGYFPEPVTVTWNSGSLSSGVHTFCAVLQSDLYTLSSSVTVPSSTWPSQTVTCNVAHPASSTKVDKKIVPRDCGCKPCICTVPEVSSVFI FPPKPKDVLITITLTPKVTCVVVDISKDDPEVQFSWFVDDVEVHTAQT	38

[0024]

	KPREEQFNSTFRSVSELPIMHQDWLNGKEFKCRVNSAAFPAPIEKTIS KTKGRPKAPQVYTIPPPKEQMAKDKVSLTCMITNFFPEDITVEWQW NGQPAENYKNTQPIMDTDGSYFVYSKLVQKSNWEAGNTFTCSVL HEGLNHHTEKSLSHSPG	
突变组 7 (突变组 2) 的轻链	DVLMTQIPLSLPVSLGDQASLSCRSSQSIVHSNGNTYLEWYLQKPGQ SPKLLIYKVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYYCFQ GSHVPYTFGGGKLEIKRADAAPTVISIFPPSSEQLTSGGASVVCFLNN FYPKDINVKWKIDGSERQNGVLNCWTDQDSKDSTYSMSSTLTITKD EYERHNSYTCEATHKTSTSPIVKSFNREK	39
突变组 2 的重链	EVQLVESGGGLVKPGGSLKLSAASGFQAFSNYPMSWVRQTPERMRL WVAYISSGGDSTYYPGTVKGRFTISRDNKSAALYLMSSLKSEDTAM YYCTFWFRGFYWGQGTTLTVSSAKTTPPSVYPLAPGSAQAQNSMV TLGCLVKGYFPEPVTVTWNSGSLSSGVHTCPAVLQSDLYTLSSSVTP SSTWPSQTVTCNVAHPASSTKVDKIVPRDCGCKPCICTVPEVSSVFI FPPKPKDVLITITLTPKVTCTVVDISKDDPEVQFSWFVDDVEVHTAQT KPREEQFNSTFRSVSELPIMHQDWLNGKEFKCRVNSAAFPAPIEKTIS KTKGRPKAPQVYTIPPPKEQMAKDKVSLTCMITNFFPEDITVEWQW NGQPAENYKNTQPIMDTDGSYFVYSKLVQKSNWEAGNTFTCSVL HEGLNHHTEKSLSHSPG	40
突变组 1 (突变组 4) 的重链	EVQLVESGGGLVKPGGSLKLSAASGFQAFSNYPMSWVRQTPERMRL WVAYISSGGDSTYYPGTVKGRFTISRDNKSAALYLMSSLKSEDTAM YYCTFWFRGFYWGQGTTLTVSSAKTTPPSVYPLAPCSAAQNSMV TLGCLVKGYFPEPVTVTWNSGSLSSGVHTFPAVLQSDLYTLSSSVTP SSTWPSQTVTCNVAHPASSTKVDKIVPRDCGCKPCICTVPEVSSVFI FPPKPKDVLITITLTPKVTCTVVDISKDDPEVQFSWFVDDVEVHTAQT KPREEQFNSTFRSVSELPIMHQDWLNGKEFKCRVNSAAFPAPIEKTIS KTKGRPKAPQVYTIPPPKEQMAKDKVSLTCMITNFFPEDITVEWQW NGQPAENYKNTQPIMDTDGSYFVYSKLVQKSNWEAGNTFTCSVL HEGLNHHTEKSLSHSPG	41
突变组 1 的轻链	DVLMTQIPLSLPVSLGDQASLSCRSSQSIVHSNGNTYLEWYLQKPGQ SPKLLIYKVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYYCFQ GSHVPYTFGGGKLEIKRADAAPTVISIFCPSSSEQLTSGGASVVCFLNN FYPKDINVKWKIDGSERQNGVLNSWTDQDSKDSTYSMSSTLTITKD EYERHNSYTCEATHKTSTSPIVKSFNREK	42
突变组 4 的轻链	DVLMTQIPLSLPVSLGDQASLSCRSSQSIVHSNGNTYLEWYLQKPGQ SPKLLIYKVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYYCFQ GSHVPYTFGGGKLEIKRADAAPTVISIFPPSSEQLTSGGASVVCFLNN FYPKDINVKWKIDGSERQNGVLNSWTDQDSKDSTYSMSSTLTITKD EYERHNSYTCEATHKTSTSPIVKSFNREK	43
CA153- 鼠源野生型 IgG1 的重链	EVQLVESGGGLVKPGGSLKLSAASGFQAFSNYPMSWVRQTPERMRL WVAYISSGGDSTYYPGTVKGRFTISRDNKSAALYLMSSLKSEDTAM YYCTFWFRGFYWGQGTTLTVSSAKTTPPSVYPLAPGSAQAQNSMV TLGCLVKGYFPEPVTVTWNSGSLSSGVHTFPAVLQSDLYTLSSSVTP SSTWPSQTVTCNVAHPASSTKVDKIVPRDCGCKPCICTVPEVSSVFI FPPKPKDVLITITLTPKVTCTVVDISKDDPEVQFSWFVDDVEVHTAQT KPREEQFNSTFRSVSELPIMHQDWLNGKEFKCRVNSAAFPAPIEKTIS KTKGRPKAPQVYTIPPPKEQMAKDKVSLTCMITNFFPEDITVEWQW NGQPAENYKNTQPIMDTDGSYFVYSKLVQKSNWEAGNTFTCSVL HEGLNHHTEKSLSHSPG	44
CA153- 鼠源野生型 IgG1 的轻链	DVLMTQIPLSLPVSLGDQASLSCRSSQSIVHSNGNTYLEWYLQKPGQ SPKLLIYKVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYYCFQ GSHVPYTFGGGKLEIKRADAAPTVISIFPPSSEQLTSGGASVVCFLNN FYPKDINVKWKIDGSERQNGVLNSWTDQDSKDSTYSMSSTLTITKD EYERHNSYTCEATHKTSTSPIVKSFNREK	45
鼠源 IgG2a 的 CHI 片段 (突变组 3)	AKTTAPSVYPLAPVCGDTTGSSVTLGCLVKGYFPEPVTLTWNSGSL SGVHTFPAVLQSDLYTLSSCVTVSSTWPSQSITCNVAHPASSTKVDK KI	46
鼠源 IgG2a 的	AKTTAPSVYPLAPVCGDTTGSSVTLGCLVKGYFPEPVTLTWNSGSL SGVHTFPAVLQSDLYTLSSSVTVSSTWPSQSITCNVAHPASSTKVDK	47

[0025]

CHI 片段(突变组 5 或突变组 6)	KI	
Fc 片段 2	APNLLGGPSVFIFPPKIKDVLMLISLPIVTCVVVDVSEDDPDVQISWVFN NNVEVHTAQTQTHREDYNSTLRVVSALPIQHQDWMMSGKEFKCKVN NKDLPAPIERTISKPKGSVRAPQVYVLPPEEEMTKKQVTLTCMVTD FMPEDIYVEWTNNGKTELNYKNTEPVLDSDGSYFMYSKLRVEKKN WVERNYSYSCSVVHEGLHNHHTTKSFSRTP EGLHNHHTTKSFSRTPGK	48
铰链区 2	EPRGPTIKPCPPCKCP	49
鼠源 IgG2a 的恒定区 (突变组 3)	AKTTAPSVYPLAPVCGDGTGSSVTLGCLVKGYFPEPVTLTWNSGSL SGVHTFPAVLQSDLYTLSSCVTVSSTWPSQSITCNVAHPASSTKV KIEPRGPTIKPCPPCKCPAPNLLGGPSVFIFPPKIKDVLMLISLPI VVDVSEDDPDVQISWVFNVEVHTAQTQTHREDYNSTLRVVSALPI QHQDWMMSGKEFKCKVNNKDLPAPIERTISKPKGSVRAPQVYVLP PEEEMTKKQVTLTCMVTDMPEDIYVEWTNNGKTELNYKNTEPVL DSDGSYFMYSKLRVEKKNWVERNYSYSCSVVHEGLHNHHTTKS FSRTP	50
鼠源 IgG2a 的恒定区(突变组 5 或突变组 6)	AKTTAPSVYPLAPVCGDGTGSSVTLGCLVKGYFPEPVTLTWNSGSL SGVHTFPAVLQSDLYTLSSSVTVSSTWPSQSITCNVAHPASSTKV KIEPRGPTIKPCPPCKCPAPNLLGGPSVFIFPPKIKDVLMLISLPI VVDVSEDDPDVQISWVFNVEVHTAQTQTHREDYNSTLRVVSALPI QHQDWMMSGKEFKCKVNNKDLPAPIERTISKPKGSVRAPQVYVLP PEEEMTKKQVTLTCMVTDMPEDIYVEWTNNGKTELNYKNTEPVL DSDGSYFMYSKLRVEKKNWVERNYSYSCSVVHEGLHNHHTTKS FSRTP	51
鼠源 IgG2b 的 CHI 片段(突变组 3)	AKTTPPSVYPLAPGCGDGTGSSVTSGLVKGYFPEPVTVTWNSGSL SSVHTFPALLQSGLYTMSSCVTVPSSTWPSQTVTCSVAHPASSTV DKKL	52
鼠源 IgG2b 的 CHI 片段(突变组 5 或 6)	AKTTPPSVYPLAPGCGDGTGSSVTSGLVKGYFPEPVTVTWNSGSL SSVHTFPALLQSGLYTMSSSVTVPSSTWPSQTVTCSVAHPASSTV DKKL	53
Fc 片段 3	APNLEGGPSVFIFPPNIKDVLMLISLTPKVTCVVVDVSEDDPDVQISW VFNVEVHTAQTQTHREDYNSTIRVSTLPIQHQDWMMSGKEFKCKVN NKDLPSPERTISKIKGLVRAPQVYTLPPPAEQLSRKDVSLTCLVGF NPGDISVEWTSNGHTEENYKDTAPVLDSDGSYFIYSKLNMKTSK WEKTDSFSCNVRHEGLKNYYLKKTISRSP	54
铰链区 3	EPSPGISTINPCPPCKECKCP	55
鼠源 IgG2b 的恒定区 (突变组 3)	AKTTPPSVYPLAPGCGDGTGSSVTSGLVKGYFPEPVTVTWNSGSL SSVHTFPALLQSGLYTMSSCVTVPSSTWPSQTVTCSVAHPASSTV DKKLEPSGPISTINPCPPCKECKCPAPNLEGGPSVFIFPPNIKDV LMLISLTPKVTCVVVDVSEDDPDVQISWVFNVEVHTAQTQTHRE DYNSTIRVSTLPIQHQDWMMSGKEFKCKVNNKDLPSPIERTISK IKGLVRAPQVYTLPPPAEQLSRKDVSLTCLVGFNPGDISVEWTS NGHTEENYKDTAPVLDSDGSYFIYSKLNMKTSKWEKTDSFSCN VRHEGLKNYYLKKTISRSP	56
鼠源 IgG2b 的恒定区(突变组 5 或突变组 6)	AKTTPPSVYPLAPGCGDGTGSSVTSGLVKGYFPEPVTVTWNSGSL SSVHTFPALLQSGLYTMSSSVTVPSSTWPSQTVTCSVAHPASSTV DKKLEPSGPISTINPCPPCKECKCPAPNLEGGPSVFIFPPNIKDV LMLISLTPKVTCVVVDVSEDDPDVQISWVFNVEVHTAQTQTHRE DYNSTIRVSTLPIQHQDWMMSGKEFKCKVNNKDLPSPIERTISK IKGLVRAPQVYTLPPPAEQLSRKDVSLTCLVGFNPGDISVEWTS NGHTEENYKDTAPVLDSDGSYFIYSKLNMKTSKWEKTDSFSCN VRHEGLKNYYLKKTISRSP	57
羊源 IgG1 的 CHI 片段 (突变组 3)	ASTTPPKVYPLTSCCGDTSSSIVTLGCLVSSYMPPEPVTVTWNSG ALTS GVHTFPAILQSSGLYSLSSCVTVPASTSGAQTFCNVAHPASSTK VDKRV	58
羊源 IgG1 的 CHI 片段(突变组 5 或突变组 6)	ASTTPPKVYPLTSCCGDTSSSIVTLGCLVSSYMPPEPVTVTWNSG ALTS GVHTFPAILQSSGLYSLSSVTVPASTSGAQTFCNVAHPASSTK VDKRV	59

[0026]

羊源 IGLL 的 CL 片段 (突变组 3)	GQPKSAPSVTLFPPSTEELSTNKATVVCCINDFYPGSVNVVWKADGS TINQNVKTTQASKQSNKYAASSYLTLTGSEWKS KSSYTCEVTHEGS TVTKTVKPSECS	60
羊源 IGLL 的 CL 片段 (突变组 5)	GQPKSAPSVTLFPPSTEELSTNKATVVCLINDFYPGSVNVVWKADGS TINQNVKTTQASKQSNKYAASSYLTLTGSEWKS KSSYTCEVTHEGS TVTKTVKPSECS	61
羊源 IGLL 的 CL 片段 (突变组 6)	GQPKSAPSVTLFPPCTEELSTNKATVVCLINDFYPGSVNVVWKADGS TINQNVKTTQASKQSNKYAASSYLTLTGSEWKS KSSYTCEVTHEGS TVTKTVKPSECS	62
Fc 片段 4	PELPGGPSVFIFPPKPKD TLTISGTPEVTCVVVDVGDDEPEVQFSWFV DNVEVRTARTKPREEQFNSTFRVVSALPIQH QDWTGGKEFKCKVHN EALPAPIVRTISRTKGQAREPQVYVLAPPQEELSKSTLSVTCLVTGFYP DYIAVEWQKNGQPESEDKYGTTSQLDADGSYFLYSRLRVDKNSWQ EGDTYACVVMHEALHNHYTQKSISKPPGK	63
铰链区 4	EPGCPDPCKHCRCPP	64
羊源 IgG1 的恒定区 (突变组 3)	ASTTPPKVYPLTSCCGDTSSSIVTLGCLVSSYMPEPVTVTWNSGALTS GVHTFPAILQSSGLYSLSSCVTPASTSGAQTFCINVAHPASSTKVDKR VEPGCPDPCKHCRCPPPELPGGPSVFIFPPKPKD TLTISGTPEVTCVVV DVGQDDPEVQFSWFVDNVEVRTARTKPREEQFNSTFRVVSALPIQH Q DWTGGKEFKCKVHNEALPAPIVRTISRTKGQAREPQVYVLAPPQEEL SKSTLSVTCLVTGFYPDYIAVEWQKNGQPESEDKYGTTSQLDADGS YFLYSRLRVDKNSWQEGDTYACVVMHEALHNHYTQKSISKPPGK	65
羊源 IgG1 的恒定区 (突变组 5 或突变体 6)	ASTTPPKVCPLTSCCGDTSSSIVTLGCLVSSYMPEPVTVTWNSGALTS GVHTFPAILQSSGLYSLSSVTVTPASTSGAQTFCINVAHPASSTKVDKR VEPGCPDPCKHCRCPPPELPGGPSVFIFPPKPKD TLTISGTPEVTCVVV DVGQDDPEVQFSWFVDNVEVRTARTKPREEQFNSTFRVVSALPIQH Q DWTGGKEFKCKVHNEALPAPIVRTISRTKGQAREPQVYVLAPPQEEL SKSTLSVTCLVTGFYPDYIAVEWQKNGQPESEDKYGTTSQLDADGS YFLYSRLRVDKNSWQEGDTYACVVMHEALHNHYTQKSISKPPGK	66
兔源 IgG 的 CH1 片段 (突变组 3)	GQPKAPSVFPLAPCCGDTSPSTVTLGCLVKGYLPEPVTVTWNSGTLT NGVRTFPSVRQSSGLYSLSSCVSVTSSSQPVTCNVAHPATNTKVDKTV	67
兔源 IgG 的 CH1 片段 (突变组 5 或突变组 6)	GQPKAPSVCLAPCCGDTSPSTVTLGCLVKGYLPEPVTVTWNSGTLT NGVRTFPSVRQSSGLYSLSSVSVTSSSQPVTCNVAHPATNTKVDKT V	68
兔源 IGLK 的 CL 片段 (突变组 3)	GDPVAPTVLIFPPAADQVATGVTIVCCANKYFPDVTVTWEVDGTTQ TTGIENSKTPQNSADCTYNLSSTLTLTSTQYNHKEYTCKVTQGTTSV VQSFNRGDC	69
兔源 IGLK 的 CL 片段 (突变组 5)	GDPVAPTVLIFPPAADCVATGVTIVCVANKYFPDVTVTWEVDGTTQ TTGIENSKTPQNSADCTYNLSSTLTLTSTQYNHKEYTCKVTQGTTSV VQSFNRGDC	70
兔源 IGLK 的 CL 片段 (突变组 6)	GDPVAPTVLIFPPCADQVATGVTIVCVANKYFPDVTVTWEVDGTTQ TTGIENSKTPQNSADCTYNLSSTLTLTSTQYNHKEYTCKVTQGTTSV VQSFNRGDC	71
Fc 片段 5	PPELLGGPSVFIFPPKPKD TLMISRTPEVTCVVVDVSEDDPEVQFTWY INNEQVRTARPLREQQFNSTIRVVSTLPIAHEDWLRGKEFKCKVHN KALPAPIEKTISKARGQPLEPKVYTMGPPREELSSRSVSLTCMINGFYP SDISVEWEKNGKAEDNYKTPAVLDS DGSYFLYSKLSVPTSEWQRG DVFTCSVMHEALHNHYTQKSISRSPGK	72
铰链区 5	APSTCSKPTCP	73
兔源 IgG 的恒定区 (突变组 3)	GQPKAPSVFPLAPCCGDTSPSTVTLGCLVKGYLPEPVTVTWNSGTLT NGVRTFPSVRQSSGLYSLSSCVSVTSSSQPVTCNVAHPATNTKVDKTV APSTCSKPTCPPPELLGGPSVFIFPPKPKD TLMISRTPEVTCVVVDVSE DDPEVQFTWYINNEQVRTARPLREQQFNSTIRVVSTLPIAHEDWLR GKEFKCKVHNKALPAPIEKTISKARGQPLEPKVYTMGPPREELSSRS VSLTCMINGFYPSDISVEWEKNGKAEDNYKTPAVLDS DGSYFLYSK LSVPTSEWQRGDVFTCSVMHEALHNHYTQKSISRSPGK	74
兔源 IgG 的恒定区 (突变组 5 或突	GQPKAPSVCLAPCCGDTSPSTVTLGCLVKGYLPEPVTVTWNSGTLT NGVRTFPSVRQSSGLYSLSSVSVTSSSQPVTCNVAHPATNTKVDKTV	75

[0027]

变组 6)	APSTCSKPTCPPPELLGGPSVFIFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSE DDPEVQFTWYINNEQVRTARPLREQQFNSTIRVVSTLPIAHEDWLR GKEFKCKVHNKALPAPIEKTISKARGQPLEPKVYTMGPPREELSSRS VSLTCMINGFYPSDISVEWEKNGKAEDNYKTTPAVLSDSGSYFLYSK LSVPTSEWQRGDVFTCSVMHEALHNHYTQKSISRSPGK	
CRP-鼠源野生型 IgG2a 的重链	EVQLQQSGAELVKPGASVKLSCTASGLNIKDTYIHVWKQRPEQG LEWIGRIDPANGHIKYDPKFQAKATITADTSSNTASLHLNSLTSEDS AVYYCARDALYGDGYHWYFDVWGAGTTVTVSSAKTTAPSVYPL APVCGDTTGSSVTLGCLVKGYFPEPVTLTWNSGSLSSGVHTFPAV LQSDLYTLSSSVTVTSSTWPSQSITCNVAHPASSTKVDKKEPRGP TIKPCPPCKCPAPNLLGGPSVFIFPPKIKDVLMSLSPIVTCVVVDV SEDDPDVQISWVFNNEVHTAQTQTHREDYNSTLRVVSALPIQH QDWMSGKEFKCKVNNKDLPAPIERTISKPKGSVRAPQVYVLPPEE EEMTKKQVTLTCMVTDFMPEDIYVEWTNNGKTELNYKNTEPVL DSDGSYFMYSKLRVEKKNWVERNYSYSCSVVHEGLHNHHTTKSF SRTP	76
CRP-鼠源野生型 IgG2a 的轻链	DIVMTQSHKFMSTSVGDRVSITCKANQDVNNAVAWYLQKPGQSP KLLIYSASYRYTGVPDRFTGSGSGTDFTFITSSVQAEDLAVYYCQ QQYSTPLTFGAGTKVELKRADAAPTVISIFPPSSEQLTSGGASVVCF LNNFYPKDINVKWKIDGSERQNGVLNSWTDQDSKDSTYSMSSTL TLTKDEYERHNSYTCEATHKTTSTSPIVKSFNRECE	77
鼠 IgG2a 突变组 3 的重链	EVQLQQSGAELVKPGASVKLSCTASGLNIKDTYIHVWKQRPEQG LEWIGRIDPANGHIKYDPKFQAKATITADTSSNTASLHLNSLTSEDS AVYYCARDALYGDGYHWYFDVWGAGTTVTVSSAKTTAPSVYPL APVCGDTTGSSVTLGCLVKGYFPEPVTLTWNSGSLSSGVHTFPAV LQSDLYTLSSCVTVTSSTWPSQSITCNVAHPASSTKVDKKEPRGP TIKPCPPCKCPAPNLLGGPSVFIFPPKIKDVLMSLSPIVTCVVVDV SEDDPDVQISWVFNNEVHTAQTQTHREDYNSTLRVVSALPIQH QDWMSGKEFKCKVNNKDLPAPIERTISKPKGSVRAPQVYVLPPEE EEMTKKQVTLTCMVTDFMPEDIYVEWTNNGKTELNYKNTEPVL DSDGSYFMYSKLRVEKKNWVERNYSYSCSVVHEGLHNHHTTKSF SRTP	78
鼠 IgG2a 突变组 3 的轻链	DIVMTQSHKFMSTSVGDRVSITCKANQDVNNAVAWYLQKPGQSP KLLIYSASYRYTGVPDRFTGSGSGTDFTFITSSVQAEDLAVYYCQ QQYSTPLTFGAGTKVELKRADAAPTVISIFPPSSEQLTSGGASVVC CLNNFYPKDINVKWKIDGSERQNGVLNSWTDQDSKDSTYSMS TLTLTKDEYERHNSYTCEATHKTTSTSPIVKSFNRECE	79
鼠 IgG2a 突变组 5 的重链	EVQLQQSGAELVKPGASVKLSCTASGLNIKDTYIHVWKQRPEQG LEWIGRIDPANGHIKYDPKFQAKATITADTSSNTASLHLNSLTSEDS AVYYCARDALYGDGYHWYFDVWGAGTTVTVSSAKTTAPSV <u>C</u> PL APVCGDTTGSSVTLGCLVKGYFPEPVTLTWNSGSLSSGVHTFPAV LQSDLYTLSSSVTVTSSTWPSQSITCNVAHPASSTKVDKKEPRGP TIKPCPPCKCPAPNLLGGPSVFIFPPKIKDVLMSLSPIVTCVVVDV SEDDPDVQISWVFNNEVHTAQTQTHREDYNSTLRVVSALPIQH QDWMSGKEFKCKVNNKDLPAPIERTISKPKGSVRAPQVYVLPPEE EEMTKKQVTLTCMVTDFMPEDIYVEWTNNGKTELNYKNTEPVL DSDGSYFMYSKLRVEKKNWVERNYSYSCSVVHEGLHNHHTTKSF SRTP	80
鼠 IgG2a 突变组 5 的轻链	DIVMTQSHKFMSTSVGDRVSITCKANQDVNNAVAWYLQKPGQSP KLLIYSASYRYTGVPDRFTGSGSGTDFTFITSSVQAEDLAVYYCQ QQYSTPLTFGAGTKVELKRADAAPTVISIFPPSSE <u>C</u> LTSGGASVVCF LNNFYPKDINVKWKIDGSERQNGVLNSWTDQDSKDSTYSMSSTL TLTKDEYERHNSYTCEATHKTTSTSPIVKSFNRECE	81

[0028] 本发明的附加方面和优点将在下面的描述中部分给出,部分将从下面的描述中变得明显,或通过本发明的实践了解到。

附图说明

[0029] 本发明的上述和/或附加的方面和优点从结合下面附图对实施例的描述中将变得

明显和容易理解,其中:

- [0030] 图1为本发明实施例1中各抗体还原SDS-Page检测结果;
- [0031] 图2为本发明实施例1中各抗体非还原SDS-Page检测结果;
- [0032] 图3为本发明实施例1中各抗体标记AP之后的热稳定性检测结果;
- [0033] 图4为本发明中鼠IgG1抗体与其它亚类的鼠抗(IgG2a、IgG2b、IgG2c、IgG3)和种属(羊IgG1、羊IgG2、兔IgG)的CH1和CL序列比对图,其中黑框框起来的为半胱氨酸位点及其等价位点;
- [0034] 图5为2-(甲苯磺酰)甲基丙烯酸酰胺-PEG4-酰胺-PEG4-甲基四嗪的色谱图;
- [0035] 图6为2-(甲苯磺酰)甲基丙烯酸酰胺-PEG4-酰胺-PEG4-甲基四嗪的质谱图;
- [0036] 图7为2-(甲苯磺酰)甲基丙烯酸酰胺-PEG4-酰胺-PEG4-甲基四嗪的质谱峰分析图;
- [0037] 图8为2-(甲苯磺酰)甲基丙烯酸酰胺-PEG4-酰胺-PEG4-甲基四嗪的核磁共振碳谱图;
- [0038] 图9为2-(甲苯磺酰)甲基丙烯酸酰胺-PEG4-酰胺-PEG4-甲基四嗪的核磁共振氢谱图。

具体实施方式

[0039] 下面详细描述本发明的实施例。下面描述的实施例是示例性的,仅用于解释本发明,而不能理解为对本发明的限制。

[0040] 需要说明的是,术语“第一”、“第二”仅用于描述目的,而不能理解为指示或暗示相对重要性或者隐含指明所指示的技术特征的数量。由此,限定有“第一”、“第二”的特征可以明示或者隐含地包括一个或者更多个该特征。进一步地,在本发明的描述中,除非另有说明,“多个”的含义是两个或两个以上。

[0041] 在本文中所披露的范围的端点和任何值都不限于该精确的范围或值,这些范围或值应当理解为包含接近这些范围或值的值。对于数值范围来说,各个范围的端点值之间、各个范围的端点值和单独的点值之间,以及单独的点值之间可以彼此组合而得到一个或多个新的数值范围,这些数值范围应被视为在本文中具体公开。

[0042] 为了更容易理解本发明,以下具体定义了某些技术和科学术语。除显而易见在本文件中的它处另有明确定义,否则本文中使用的所有其它技术和科学术语都具有本发明所属领域的一般技术人员通常理解的含义。氨基酸残基的缩写是本领域中所用的指代20个常用L-氨基酸之一的标准3字母和/或1字母代码。

[0043] 在本文中,术语“包含”或“包括”为开放式表达,即包括本发明所指明的内容,但并不排除其他方面的内容。

[0044] 在本文中,术语“可选地”、“可选的”、“任选地”、“任选的”或“任选”通常是指随后所述的事件或状况可以但未必发生,并且该描述包括其中发生该事件或状况的情况,以及其中未发生该事件或状况的情况。

[0045] 在本文中,术语“变体”或“突变体”可以指包含一个或多个核苷酸或氨基酸突变的任何天然存在的或工程化的分子。

[0046] 在本文中,术语“载体”通常是指能够插入在合适的宿主中自我复制的核酸分子,其将插入的核酸分子转移到细胞或宿主中和/或细胞或宿主之间。所述载体可包括主要用

于将DNA或RNA插入细胞中的载体、主要用于复制DNA或RNA的载体,以及主要用于DNA或RNA的转录和/或翻译的表达的载体。所述载体还包括具有多种上述功能的载体。所述载体可以是当引入合适的细胞或宿主时能够转录并翻译成多肽的多核苷酸。通常,通过培养包含所述载体的合适的细胞或宿主,所述载体可以产生期望的表达产物。

[0047] 在本文中,术语“细胞”通常是指采用基因工程技术或细胞融合技术对宿主细胞的遗传物质进行修饰改造或重组,获得具有稳定遗传的独特性状的细胞。其中,术语“宿主细胞”是指可导入重组载体的原核细胞或真核细胞。本文所用术语“转化的”或“转染的”是指通过本领域已知的各种技术将核酸(例如载体)引入细胞。合适的宿主细胞可以用本发明的DNA序列转化或转染,并且可以用于靶蛋白的表达和/或分泌。可用于本发明的合适宿主细胞的例子包括永生化杂交瘤细胞、NS/O骨髓瘤细胞、293细胞、中国仓鼠卵巢(CHO)细胞、HeLa细胞、Cap细胞(人羊水来源的细胞)和CoS细胞。

[0048] 本发明提出了一种抗体、缀合物、核酸分子、载体、细胞或宿主、试剂或试剂盒及其用途、制备缀合物的方法、免疫检测的方法以及提高缀合物活性、稳定性或灵敏度的方法,下面将分别对其进行详细描述。

[0049] 缀合物

[0050] 在本发明的第一方面,本发明提出了一种缀合物。根据本发明的实施例,所述缀合物包括:抗体以及至少一个缀合部分,所述缀合部分与所述抗体相连;其中,所述抗体包括CH1片段和CL片段;所述抗体的CH1片段和CL片段具有选自如下任意组的半胱氨酸位点:1) CH1片段的第67位和CL片段的第28位,或其等价位点;2) CH1片段的第9位和CL片段的第17位,或其等价位点;3) CH1片段的第9位和CL片段的第14位,或其等价位点;4) CH1片段的第54位和CL片段的第55位,或其等价位点;5) CH1片段的第53位和CL片段的第55位,或其等价位点;6) CH1片段的第14位和CL片段的第12位,或其等价位点;7) CH1片段的第14位和CL片段的第102位,或其等价位点。本发明的缀合物具有活性高、灵敏度高或稳定性强等优点。

[0051] 在本文中,术语“抗体”在最广义上使用,其可以包括全长单克隆抗体、多特异性抗体、以及嵌合抗体,具体结构不受限制,只要它们展示所需的生物学活性。其通常包括分子量较轻的轻链和分子量较重的重链,重链(H链)和轻链(L链)由二硫键连接形成的抗体分子。其中,肽链的氨基端(N端)氨基酸序列变化很大,称为可变区(V区);羧基端(C端)相对稳定,变化很小,称为恒定区(C区)。L链和H链的V区分别称为轻链可变区(VL)和重链可变区(VH),L链和H链的C区分别称为轻链恒定区(CL或CL片段)和重链恒定区(CH或CH片段),其中,重链恒定区包括CH1片段、铰链区和Fc片段(CH2和CH3片段)中的至少之一,优选地,重链恒定区从N端到C端依次包括CH1片段、铰链区、CH2片段和CH3片段。

[0052] 在本文中,可变区、恒定区、CH1、CH2、CH3序列的划分参照IMGT划分法,参见Lefranc, M.-P. *IMGT®*, the international ImMunoGeneTics database. *Nucl. Acids Res.*, 29(1):207-102(2001). DOI:10.1093/nar/29.1.207. PMID:11125093. 及Martinez-Jean C. and Bosc N. 或 François Ehrenmann, Patrice Duroux, Chantal Ginestoux, Gene table:house mouse (*Mus musculus*) IGHC, *IMGT Repertoire*. *IMGT®*, the international ImMunoGenetics information system® <http://www.imgt.org>. Created:16/03/2011. Version:17/01/2020. 或 François Ehrenmann, Patrice Duroux, Chantal Ginestoux, Gene table:house mouse (*Mus musculus*) IGLC, *IMGT Repertoire*. *IMGT®*, the

international ImmunoGenetics information system® <http://www.imgt.org>. Created: 16/03/2011. Version: 17/01/2020.

[0053] 在本文中,术语“半胱氨酸位点”是指该位点的氨基酸为半胱氨酸的位点。

[0054] 在本文中,术语“等价位点”是指由于不同的抗体来源(例如来源于不同的种源或种属的抗体)、种类(例如IgG、IgM、IgA等)、亚类(例如IgG可分为IgG1、IgG2等亚类)、亚型(例如k型、λ型)或等位基因的存在,某些特定位置的位置和氨基酸类型存在差异的位点。该特定位置的等价位点可以通过序列和结构的同源性比对进行确定。例如鼠源野生型IgHG1的CH1中67位的丝氨酸对应羊源野生型IgHG1的CH1中68位的缬氨酸。

[0055] 在本发明的一些可选实施例中,上述缀合物还可以进一步包括下列附加技术特征中的至少之一:

[0056] 在本发明的一些可选实施例中,所述CH1片段的第9位、第14位、第53位、第54位、第67位是以鼠源野生型IgHG的CH1所示的氨基酸序列从N端至C端进行依次顺序编号;所述CL片段的第12位、第14位、第17位、第28位、第55位、第102位是以鼠源野生型IGLK的CL所示的氨基酸序列从N端至C端进行依次顺序编号。

[0057] 在本发明的一些可选实施例中,所述鼠选自小鼠(*Mus musculus*)。

[0058] 在本发明的一些可选实施例中,所述IgHG选自IgHG1、IgHG2a、IgHG2b、IgHG2c或IgHG3。

[0059] 在本发明的一些可选实施例中,所述鼠源野生型IgHG的CH1的氨基酸序列如SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2所示。

[0060] 在本发明的一些可选实施例中,所述鼠源野生型IGLK的CL的氨基酸序列如SEQ ID NO:10所示。

[0061] 在本文中,术语“野生型”是指天然存在并且未被突变修饰的抗体型。应当理解,本发明所述抗体的CH1片段和CL片段的半胱氨酸位点均以野生型CH1或CL序列为定位基准,其并不意味着所述抗体必须为野生型。当所述抗体为野生型时,则所述抗体的半胱氨酸位点与野生型CH1或CL序列所限定的半胱氨酸位点相同。但对于存在例如插入或者缺失型突变的抗体,本领域技术人员可基于将其与野生型的CH1或CL序列进行同源性比较结果确定半胱氨酸位点,本领域技术人员可以理解的是,含有上述同源性比较后获得的半胱氨酸位点也在本发明的保护范围内。

[0062] 在本文中,术语“IgHG1”是指IgG1抗体的重链;术语“IgHG2a”是指IgG2a抗体的重链;术语“IgHG2b”是指IgG2b抗体的重链;术语“IgHG”是指IgG抗体的重链。

[0063] 在本文中,术语“IGLK”是指kappa型(κ型)抗体的轻链;术语“IGLL”是指Lamda型(λ型)抗体的轻链。需要说明的是,本领域技术人员可将Lamda型轻链的CL片段序列和Kappa型轻链的CL片段序列进行同源性比较,基于比较结果确定Lamda型轻链的CL片段的半胱氨酸位点,本领域技术人员可以理解的是,针对Lamda型轻链的CL片段或kappa型轻链的CL片段,含有上述同源性比较后获得的半胱氨酸位点的缀合物也在本发明的保护范围内。示例性地,同源性比较可通过Needleman等(1970) *J. Mol. Biol.* 48:443的同源性比对算法、Smith等(1981) *Adv. Appl. Math.* 2:482的局部同源性算法等方式确定。

[0064] 在本发明的一些可选实施例中,所述CH1片段的第9位、第14位、第53位、第54位、第67位是以鼠源野生型IgHG1的CH1所示的氨基酸序列从N端至C端进行依次顺序编号;所述CL

片段的第12位、第14位、第17位、第28位、第55位、第102位是以鼠源野生型IGLK的CL所示的氨基酸序列从N端至C端进行依次顺序编号。

[0065] 在本实施例中,所述半胱氨酸位点是依据鼠源野生型IgG1抗体的CH1(如SEQ ID NO:1)和鼠源野生型kappa型轻链的CL(如SEQ ID NO:10)所示的氨基酸序列从N端至C端进行依次顺序编号的,例如,CH1片段的第1位为A,第2位为K,第3位为T,⋯,以此类推,CH1片段的第9位是指基于SEQ ID NO:1所示的氨基酸序列,位于第9位的氨基酸Y;CL片段的第17位是指基于SEQ ID NO:10所示的氨基酸序列,位于第17位的氨基酸Q。同时,需要说明的是,针对鼠源的其他其它亚型抗体(例如IgG2a、IgG2b)或其它种属(例如羊、兔)的IgG抗体(例如羊源IgG1抗体、羊源IgG2抗体、兔源IgG抗体),本领域技术人员可基于将其与鼠源野生型IgG1的CH1或kappa型轻链的CL序列进行同源性比较结果确定半胱氨酸位点,本领域技术人员可以理解的是,含有上述同源性比较后获得的半胱氨酸位点的缀合物也在本发明的保护范围内。

[0066] 本领域技术人员将理解,对于一条抗体序列,可以运用不同的编号系统进行氨基酸残基位置的编号,且在不同的编号系统之间进行转换是本领域公知的。本申请所述半胱氨酸位点是依据鼠源野生型IgG1抗体的CH1(如SEQ ID NO:1)和鼠源野生型kappa型轻链的CL(如SEQ ID NO:10)所示的氨基酸序列从N端至C端进行依次顺序编号的,但运用其他编号系统编号的相同或相似的位置也属于本发明的保护范围。

[0067] 示例性地,针对本发明提到的“CH1片段的第67位和CL片段的第28位”半胱氨酸位点组合,本领域技术人员可将鼠源野生型IgG2a、IgG2b、IgG2c、IgG3抗体的CH1与鼠源野生型IgG1抗体的CH1进行同源性比较,以便得到鼠源野生型IgG2a、IgG2b、IgG2c、IgG3抗体的半胱氨酸位点,例如将鼠源野生型IgG2a、IgG2b、IgG2c、IgG3的CH1和鼠源野生型IgG1的CH1进行同源性比较,即为鼠源野生型IgG2a、IgG2b、IgG2c、IgG3的CH1片段的第67位和CL片段的第28位。因此,针对含有鼠源IgG2a、IgG2b、IgG2c、IgG3抗体的缀合物,且抗体中含有CH1片段的第67位和CL片段的第28位的半胱氨酸位点,也属于本发明的保护范围。

[0068] 在本发明的一些可选实施例中,由于不同的抗体亚类的存在,针对上述“1) CH1片段的第67位和CL片段的第28位; 2) CH1片段的第9位和CL片段的第17位; 3) CH1片段的第9位和CL片段的第14位”的半胱氨酸位点,它们的等价位点可为如下半胱氨酸位点:

[0069] 示例A、所述抗体的CH1片段和CL片段具有选自如下任意组的半胱氨酸位点: 1) CH1片段的第67位和CL片段的第28位; 2) CH1片段的第9位和CL片段的第17位; 3) CH1片段的第9位和CL片段的第14位; 所述CH1片段的第9位、第67位是以鼠源野生型IgHG2a的CH1所示的氨基酸序列从N端至C端进行依次顺序编号; 所述CL片段的第14位、第17位、第28位是以鼠源野生型IGLK轻链所示的氨基酸序列从N端至C端进行依次顺序编号。

[0070] 示例B、所述抗体的CH1片段和CL片段具有选自如下任意组的半胱氨酸位点: 1) CH1片段的第67位和CL片段的第28位; 2) CH1片段的第9位和CL片段的第17位; 3) CH1片段的第9位和CL片段的第14位; 所述CH1片段的第9位、第67位是以鼠源野生型IgHG2b的CH1所示的氨基酸序列从N端至C端进行依次顺序编号; 所述CL片段的第14位、第17位、第28位是以鼠源野生型IGLK轻链所示的氨基酸序列从N端至C端进行依次顺序编号。

[0071] 在本发明的一些可选实施例中,由于不同的抗体来源(即来源于不同种属的抗体)的存在,针对上述“1) CH1片段的第67位和CL片段的第28位; 2) CH1片段的第9位和CL片段的

第17位;3)CH1片段的第9位和CL片段的第14位”的半胱氨酸位点,它们的等价位点可为如下半胱氨酸位点:

[0072] 示例A、所述抗体的CH1片段和CL片段具有选自如下任意组的半胱氨酸位点:1)CH1片段的第68位和CL片段的第29位;2)CH1片段的第9位和CL片段的第18位;3)CH1片段的第9位和CL片段的第15位;所述CH1片段的第9位、第68位是以羊源野生型IgHG的CH1所示的氨基酸序列从N端至C端进行依次顺序编号;所述CL片段的第15位、第18位、第29位是以羊源野生型IGLL的CL所示的氨基酸序列从N端至C端进行依次顺序编号。

[0073] 在本发明的一些可选的实施方式中,所述羊选自绵羊(sheep)。

[0074] 在本发明的一些可选的实施方式中,所述IgHG选自IgHG1或IgHG2。

[0075] 在本发明的一些可选的实施方式中,所述羊源野生型IgHG的CH1的氨基酸序列如SEQ ID NO:7或SEQ ID NO:8所示。

[0076] 在本发明的一些可选的实施方式中,所述羊源野生型IGLL的CL的氨基酸序列如SEQ ID NO:11所示。

[0077] 示例B、所述抗体的CH1片段和CL片段具有选自如下任意组的半胱氨酸位点:1)CH1片段的第68位和CL片段的第28位;2)CH1片段的第9位和CL片段的第17位;3)CH1片段的第9位和CL片段的第14位;所述CH1片段的第9位、第68位是以兔源野生型IgHG的CH1所示的氨基酸序列从N端至C端进行依次顺序编号;所述CL片段的第14位、第17位、第28位是以兔源野生型IGLK的CL所示的氨基酸序列从N端至C端进行依次顺序编号。

[0078] 在本发明的一些可选的实施方式中,所述兔源野生型IgHG的CH1的氨基酸序列如SEQ ID NO:9所示。

[0079] 在本发明的一些可选的实施方式中,所述兔源野生型IGLK的CL的氨基酸序列如SEQ ID NO:12所示。

[0080] 在本发明的一些可选实施例中,所述抗体的CH1片段和CL片段具有选自如下任意组的半胱氨酸位点:1)CH1片段中的S67C和CL片段中的F28C;2)CH1片段中的Y9C和CL片段中的Q17C;3)CH1片段中的Y9C和CL片段中的S14C;4)CH1片段中的P54C和CL片段中的S55C;5)CH1片段中的F53C和CL片段中的S55C;6)CH1片段中的G14C和CL片段中的P12C;7)CH1片段中的G14C和CL片段中的F102C。

[0081] 在本发明的一些可选实施例中,所述CH1片段的第9位、第14位、第53位、第54位、第67位是以鼠源野生型IgHG的CH1所示的氨基酸序列从N端至C端进行依次顺序编号;所述CL片段的第12位、第14位、第17位、第28位、第55位、第102位是以鼠源野生型IGLK的CL所示的氨基酸序列从N端至C端进行依次顺序编号。

[0082] 在本发明的一些可选实施例中,所述鼠选自小鼠(Mus musculus)。

[0083] 在本发明的一些可选实施例中,所述IgHG选自IgHG1、IgHG2a、IgHG2b、IgHG2c或IgHG3。

[0084] 在本发明的一些可选实施例中,所述鼠源野生型IgHG的CH1的氨基酸序列如SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2所示。

[0085] 在本发明的一些可选实施例中,所述鼠源野生型IGLK的CL的氨基酸序列如SEQ ID NO:10所示。

[0086] 在本发明的一些可选实施例中,由于不同的抗体亚类的存在,针对上述“1)CH1片

段中的S67C和CL片段中的F28C;2)CH1片段中的Y9C和CL片段中的Q17C;3)CH1片段中的Y9C和CL片段中的S14C”的半胱氨酸位点,它们的等价位点可为如下半胱氨酸位点:

[0087] 示例A、所述抗体的CH1片段和CL片段具有选自如下任意组的半胱氨酸位点:1)CH1片段中的S67C和CL片段中的F28C;2)CH1片段中的Y9C和CL片段中的Q17C;3)CH1片段中的Y9C和CL片段中的S14C;所述CH1片段的第9位、第67位是以鼠源野生型IgHG2a的CH1所示的氨基酸序列从N端至C端进行依次顺序编号;所述CL片段的第14位、第17位、第28位是以鼠源野生型IgLK的CL所示的氨基酸序列从N端至C端进行依次顺序编号。

[0088] 示例B、所述抗体的CH1片段和CL片段具有选自如下任意组的半胱氨酸位点:1)CH1片段中的S67C和CL片段中的F28C;2)CH1片段中的Y9C和CL片段中的Q17C;3)CH1片段中的Y9C和CL片段中的S14C;所述CH1片段的第9位、第67位是以鼠源野生型IgHG2b的CH1所示的氨基酸序列从N端至C端进行依次顺序编号;所述CL片段的第14位、第17位、第28位是以鼠源野生型IgLK的CL所示的氨基酸序列从N端至C端进行依次顺序编号。

[0089] 在本发明的一些可选实施例中,由于不同的抗体来源(即来源于不同种属的抗体)的存在,针对上述“1)CH1片段中的S67C和CL片段中的F28C;2)CH1片段中的Y9C和CL片段中的Q17C;3)CH1片段中的Y9C和CL片段中的S14C”的半胱氨酸位点,它们的等价位点可为如下半胱氨酸位点:

[0090] 示例A、所述抗体的CH1片段和CL片段具有如下选自任意组的半胱氨酸位点:1)CH1片段中的V68C和CL片段中的L29C;2)CH1片段中的Y9C和CL片段中的E18C;3)CH1片段中的Y9C和CL片段中的S15C;所述CH1片段的第9位、第68位是以羊源野生型IgHG的CH1所示的氨基酸序列从N端至C端进行依次顺序编号;所述CL片段的第15位、第18位、第29位是以羊源野生型IgLK的CL所示的氨基酸序列从N端至C端进行依次顺序编号。

[0091] 在本发明的一些可选的实施方式中,所述羊选自绵羊(sheep)。

[0092] 在本发明的一些可选的实施方式中,所述IgHG选自IgHG1或IgHG2。

[0093] 在本发明的一些可选的实施方式中,所述羊源野生型IgHG的CH1的氨基酸序列如SEQ ID NO:7或SEQ ID NO:8所示。

[0094] 在本发明的一些可选的实施方式中,所述羊源野生型IgLK的CL的氨基酸序列如SEQ ID NO:11所示。示例B、所述抗体的CH1片段和CL片段具有选自如下任意组的半胱氨酸位点:1)CH1片段中的V68C和CL片段中的V28C;2)CH1片段中的F9C和CL片段中的Q17C;3)CH1片段中的F9C和CL片段中的A14C;所述CH1片段的第9位、第68位是以兔源野生型IgHG的CH1所示的氨基酸序列从N端至C端进行依次顺序编号;所述CL片段的第14位、第17位、第28位是以兔源野生型IgLK的CL所示的氨基酸序列从N端至C端进行依次顺序编号。

[0095] 在本发明的一些可选的实施方式中,所述兔源野生型IgHG的CH1的氨基酸序列如SEQ ID NO:9所示。

[0096] 在本发明的一些可选的实施方式中,所述兔源野生型IgLK的CL的氨基酸序列如SEQ ID NO:12所示。

[0097] 在本发明的一些可选实施例中,所述抗体具有选自如下任意组或与其具有90%以上同一性的CH1片段和CL片段:

	CH1片段	CL片段
1	SEQ ID NO:13	SEQ ID NO:14

2	SEQ ID NO:15	SEQ ID NO:16
3	SEQ ID NO:15	SEQ ID NO:17
4	SEQ ID NO:18	SEQ ID NO:19
5	SEQ ID NO:20	SEQ ID NO:19
6	SEQ ID NO:21	SEQ ID NO:22
7	SEQ ID NO:21	SEQ ID NO:23
8	SEQ ID NO:46	SEQ ID NO:14
9	SEQ ID NO:47	SEQ ID NO:16
10	SEQ ID NO:47	SEQ ID NO:17
11	SEQ ID NO:52	SEQ ID NO:14
12	SEQ ID NO:53	SEQ ID NO:16
13	SEQ ID NO:53	SEQ ID NO:17
14	SEQ ID NO:58	SEQ ID NO:60
15	SEQ ID NO:59	SEQ ID NO:61
16	SEQ ID NO:59	SEQ ID NO:62
17	SEQ ID NO:67	SEQ ID NO:69
18	SEQ ID NO:68	SEQ ID NO:70
19	SEQ ID NO:68	SEQ ID NO:71

[0099] 需要说明的是,由于等位基因或其他突变的存在,本发明的抗体可选自与上表中任意组的CH1片段和CL片段具有90%以上同一性的CH1片段和CL片段。例如,针对鼠源野生型IgG1抗体,可能存在多条野生型IgG1抗体的的CH1,多条野生型IgG1抗体的的CH1之间具有等位基因的差异,但其均为鼠源野生型IgG1抗体。

[0100] 示例性地,如SEQ ID NO:1和SEQ ID NO:2所示的氨基酸序列的CH1片段,上述两条序列CH1片段存在4个等位基因的差异,本发明的缀合物中的抗体可包括在SEQ ID NO:2所示的氨基酸序列的CH1片段的基础上进行半胱氨酸突变的CH1片段,其半胱氨酸位点与如SEQ ID NO:1所示的氨基酸序列的CH1片段上的半胱氨酸位点一致。

[0101] 在本文中,术语“同一性”、“同源性”或“相似性”均用于描述相对于参考序列的氨基酸序列时,采用通过常规的方法进行确定两个氨基酸序列之间的相同氨基酸的百分比,例如参见,Ausubel等,编著(1995),Current Protocols in Molecular Biology,第19章(Greene Publishing and Wiley-Interscience,New York);和ALIGN程序(Dayhoff(1978),Atlas of Protein Sequence and Structure 5:Suppl.3(National Biomedical Research Foundation,Washington,D.C.))。关于比对序列和测定序列同一性有很多算法,包括,Needleman等(1970)J.Mol.Biol.48:443的同源性比对算法;Smith等(1981)Adv.Appl.Math.2:482的局部同源性算法;Pearson等(1988)Proc.Natl.Acad.Sci.85:2444的相似性搜索方法;Smith-Waterman算法(Meth.Mol.Biol.70:173-187(1997));和BLASTP, BLASTN,和BLASTX算法(参见Altschul等(1990)J.Mol.Biol.215:403-410)。利用这些算法的计算机程序也是可获得的,并且包括但不限于:ALIGN或Megalign(DNASTAR)软件,或者WU-BLAST-2(Altschul等,Meth.Enzym.,266:460-480(1996));或者GAP,BESTFIT,BLAST

Altschul等,上文,FASTA,和TFASTA,在Genetics Computing Group(GCG)包,8版,Madison, Wisconsin,USA中可获得;和Intelligenetics,Mountain View,California提供的PC/Gene程序中的CLUSTAL。

[0102] 在本文中,术语“90%以上同一性”指与各参考序列至少为90%的同一性,可为90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、99.5%、99.9%的同一性。

[0103] 在本发明的一些可选实施例中,所述抗体进一步包括Fc片段。

[0104] 在本发明的一些可选实施例中,所述CH1片段的C端与所述Fc片段的N端相连。

[0105] 在本文中,本发明的“Fc片段”包括但不限于选自IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA、IgM、IgE或IgD的重链恒定区的Fc片段或其突变体,具体序列不受限制,均在本发明的保护范围内。

[0106] 示例性地,所述Fc片段的氨基酸序列如SEQ ID NO:24、SEQ ID NO:48、SEQ ID NO:54、SEQ ID NO:63或SEQ ID NO:72所示。

[0107] 在本发明的一些可选实施例中,所述抗体进一步包括铰链区。

[0108] 在本发明的一些可选实施例中,所述铰链区的N端与所述CH1片段的C端相连,所述铰链区的C端与所述Fc片段的N端相连,具体序列不受限制,均在本发明的保护范围内。

[0109] 在本文中,本发明的“铰链区”包括但不限于选自IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA、IgM、IgE或IgD的重链恒定区的铰链区或其突变体,具体序列不受限制,均在本发明的保护范围内。

[0110] 示例性地,所述铰链区的氨基酸序列如SEQ ID NO:25、SEQ ID NO:49、SEQ ID NO:55、SEQ ID NO:64或SEQ ID NO:73所示。

[0111] 在本发明的一些可选实施例中,所述抗体包括如SEQ ID NO:26~SEQ ID NO:30、SEQ ID NO:50~SEQ ID NO:51、SEQ ID NO:56~SEQ ID NO:57、SEQ ID NO:65~SEQ ID NO:66和SEQ ID NO:74~SEQ ID NO:75任一项所示的重链恒定区,或与其具有90%以上同一性的氨基酸序列。

[0112] 在本发明的一些可选实施例中,所述CH1片段和CL片段通过链间二硫键相连。

[0113] 在本发明的一些可选实施例中,每组所述半胱氨酸位点中的两个半胱氨酸残基的巯基之间形成二硫键。

[0114] 在本发明的一些可选实施例中,所述抗体进一步包括重链可变区和/或轻链可变区。

[0115] 在本发明的一些可选实施例中,所述重链可变区的C端与所述CH1片段的N端相连,和/或,所述轻链可变区的C端与所述CL片段的N端相连。

[0116] 在本文中,本发明的“重链可变区”和“轻链可变区”可根据目标抗原确定,其只要可结合的目标抗原即可,具体序列不受限制。

[0117] 在本发明的一些可选具体实施例中,目标抗原为与传染性疾病、内分泌、肿瘤或药物相关的抗原。

[0118] 在本发明的一些可选具体实施例中,所述抗原为病毒性或细菌性传染性疾病的相关抗原。

[0119] 在本发明的一些可选具体实施例中,所述抗原包括但不限于艾滋病毒抗原、甲型肝炎病毒抗原、乙型肝炎病毒抗原、丙型肝炎病毒抗原、丁型肝炎病毒抗原、戊型肝炎病毒

抗原、庚型肝炎病毒抗原、风疹病毒抗原、人巨细胞病毒抗原、单纯疱疹病毒1型抗原、单纯疱疹病毒2型抗原、狂犬病毒抗原、人类T淋巴细胞白血病病毒抗原、登革热病毒抗原、冠状病毒抗原、人乳头瘤病毒抗原、西尼罗河病毒抗原、森林脑炎病毒抗原、麻疹病毒抗原、流感病毒抗原、副流感病毒抗原、水痘病毒抗原、艾柯病毒型抗原、柯萨奇病毒抗原、乙型脑炎病毒抗原、柯萨奇病毒抗原、EB病毒抗原、腮腺炎病毒抗原、梅毒螺旋体抗原、包柔氏螺旋体抗原、沙眼衣原体抗原、肺炎衣原体抗原、鹦鹉热衣原体抗原、解脲脲原体抗原、肺炎支原体抗原、结核分枝杆菌抗原、幽门螺旋杆菌抗原、淋球菌抗原、疟原虫抗原、枯氏锥虫抗原、弓形虫抗原、CA153。示例性地,所述抗原为CA153,所述重链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO:31所示,所述轻链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO:32所示。

[0120] 在本发明的一些可选实施例中,所述抗体具有选自如下任意组的重链和轻链:

[0121]

	重链	轻链
1	SEQ ID NO:33	SEQ ID NO:34
2	SEQ ID NO:35	SEQ ID NO:36
3	SEQ ID NO:35	SEQ ID NO:37
4	SEQ ID NO:38	SEQ ID NO:39
5	SEQ ID NO:40	SEQ ID NO:39
6	SEQ ID NO:41	SEQ ID NO:42
7	SEQ ID NO:41	SEQ ID NO:43
8	SEQ ID NO:78	SEQ ID NO:79
9	SEQ ID NO:80	SEQ ID NO:81

[0122] 在本发明的一些可选实施例中,所述缀合部分与所述抗体的活性基团相连。

[0123] 在本发明的一些可选实施例中,所述活性基团包括巯基、氨基、亚氨基、羟基和羧基中的至少之一。

[0124] 在本发明的一些可选实施例中,所述缀合部分与所述半胱氨酸位点的巯基相连。

[0125] 在本发明的一些可选实施例中,所述缀合部分选自载体、标签中的至少之一。

[0126] 在本文中,所述载体可以为能够在液相中悬浊或分散的物质(例如,粒子、磁珠等固相载体),或者为能够收容或搭载液相的固相(例如,板、膜、试管等支持体,以及孔板、微流路、玻璃毛细管、纳米柱、整体柱等的容器);也可以为用于对抗体进行标记的标记载体,例如酶(例如,过氧化物酶、碱性磷酸酶、虫萤光素酶(luciferin)、 β 半乳糖苷酶)、亲和性物质(例如,链霉亲和素和生物素中的一者,相互互补的正义链和反义链的核酸中的一者)、荧光物质(例如,荧光素、异硫氰酸荧光素、罗丹明、绿色荧光蛋白质、红色荧光蛋白质)、发光物质(例如,虫萤光素、水母发光蛋白(Aequorin)、吡啶酯、三(2,2'联吡啶)钌、鲁米诺)、放射性同位素(例如, ^3H 、 ^{14}C 、 ^{32}P 、 ^{35}S 、 ^{125}I)以及金胶体等。

[0127] 在本发明的一些可选实施例中,所述载体包括固相载体、标记载体、亲和性物质、荧光物质、发光物质、放射性同位素、金胶体和有色物质中的至少之一。

[0128] 在本发明的一些可选实施例中,所述亲和性物质包括生物素/抗生物素蛋白。

[0129] 在本发明的一些可选实施例中,所述标签包括His标签、Flag标签、GST标签、MBP标签、SUMO标签和C-Myc标签中的至少之一。

[0130] 在本发明的一些具体实施例中,所述缀合部分选自吡啶酯、罗丹明及其衍生物、荧

光素酶、荧光素、辣根过氧化物酶、碱性磷酸酶、 β -半乳糖苷酶、葡糖淀粉酶、溶菌酶、糖类氧化酶、葡萄糖氧化酶、半乳糖氧化酶和葡萄糖-6-磷酸脱氢酶中的一种或多种。

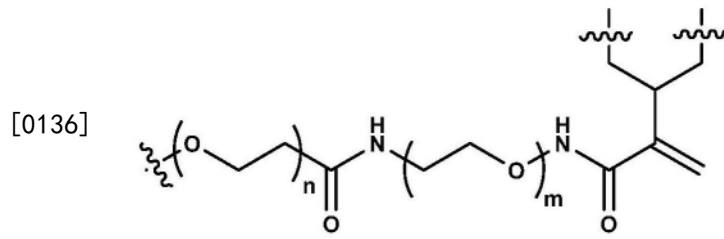
[0131] 在本发明的一些可选实施例中,进一步包括接头分子,所述缀合部分通过接头分子与所述活性基团相连。

[0132] 在本发明的一些可选实施例中,所述接头分子与所述抗体中配对的两个半胱氨酸残基的巯基相连。

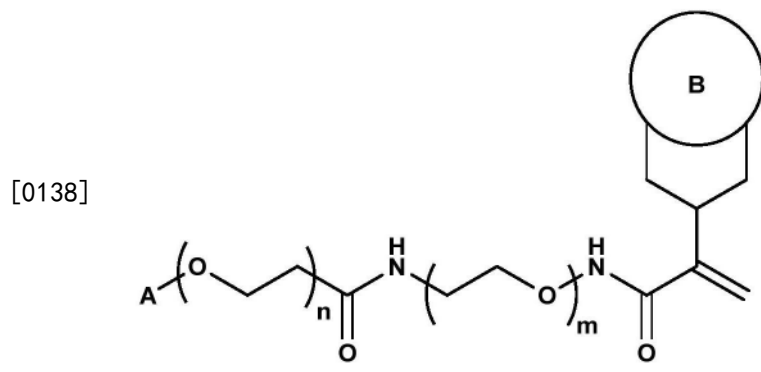
[0133] 在本发明的一些可选实施例中,所述接头分子与所述抗体中配对的两个半胱氨酸残基的巯基相连,且所述接头分子与所述缀合部分相连。

[0134] 在本发明的一些可选实施例中,所述接头分子与抗体的链间形成硫碳桥连接。

[0135] 在本发明的一些可选实施例中,所述接头分子具有选自如下的结构:



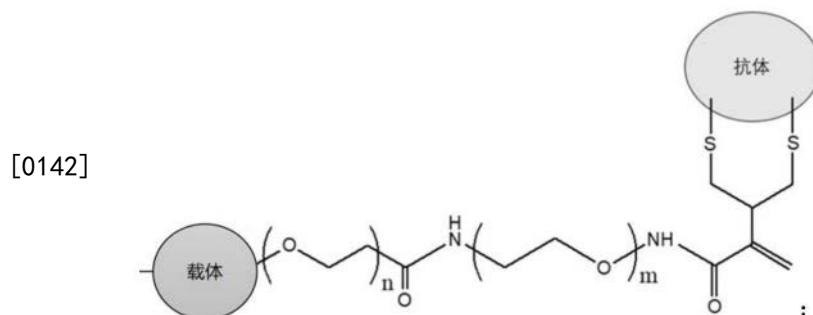
[0137] 在本发明的一些可选实施例中,所述抗体缀合物包括以下结构:



[0139] 其中,n和m各自独立地选自0~24之间的任意整数(例如0、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23或24);A为所述缀合部分;B为所述抗体。

[0140] 在本发明的一些可选实施例中,A为载体。

[0141] 在本发明的一些可选实施例中,所述抗体缀合物包括以下结构:



[0143] 其中,n和m各自独立地选自0~24之间的任意整数(例如0、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23或24),硫碳桥中的S原子为抗体中半胱氨酸的S原子。

[0144] 在本文中,术语“硫碳桥”是指-S-C-结构。

[0145] 在本发明的一些可选实施例中, $n=4$, $m=4$ 。

[0146] 抗体

[0147] 在本发明的第二方面,本发明提出了一种抗体。根据本发明的实施例,所述抗体包括重链恒定区和轻链恒定区;其中,所述重链恒定区包括CH1片段,所述CH1片段与第一方面所述的缀合物所限定的CH1片段一致;所述轻链恒定区包括CL片段,所述CL片段与第一方面所述的缀合物所限定的CL片段一致。本发明的抗体具有稳定性强或活性高等优点,采用该抗体制备的缀合物具有稳定性强、活性高或灵敏度高优点。

[0148] 在本发明的一些可选实施例中,上述抗体还可以进一步包括下列附加技术特征中的至少之一:

[0149] 在本发明的一些可选实施例中,所述抗体进一步包括Fc片段。

[0150] 在本发明的一些可选实施例中,所述CH1片段的C端与所述Fc片段的N端相连。

[0151] 在本文中,本发明的“Fc片段”包括但不限于选自IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA、IgM、IgE或IgD的重链恒定区的Fc片段或其突变体,具体序列不受限制,均在本发明的保护范围内。

[0152] 示例性地,所述Fc片段的氨基酸序列如SEQ ID NO:24、SEQ ID NO:48、SEQ ID NO:54、SEQ ID NO:63或SEQ ID NO:72所示。

[0153] 在本发明的一些可选实施例中,所述抗体进一步包括铰链区。

[0154] 在本发明的一些可选实施例中,所述铰链区的N端与所述CH1片段的C端相连,所述铰链区的C端与所述Fc片段的N端相连,具体序列不受限制,均在本发明的保护范围内。

[0155] 在本文中,本发明的“铰链区”包括但不限于选自IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA、IgM、IgE或IgD的重链恒定区的铰链区或其突变体,具体序列不受限制,均在本发明的保护范围内。

[0156] 示例性地,所述铰链区的氨基酸序列如SEQ ID NO:25、SEQ ID NO:49、SEQ ID NO:55、SEQ ID NO:64或SEQ ID NO:73所示。

[0157] 在本发明的一些可选实施例中,所述抗体包括如SEQ ID NO:26~SEQ ID NO:30、SEQ ID NO:50~SEQ ID NO:51、SEQ ID NO:56~SEQ ID NO:57、SEQ ID NO:65~SEQ ID NO:66和SEQ ID NO:74~SEQ ID NO:75任一项所示的重链恒定区,或与其具有90%以上同一性的氨基酸序列。

[0158] 在本发明的一些可选实施例中,所述CH1片段和CL片段通过链间二硫键相连。

[0159] 在本发明的一些可选实施例中,每组所述半胱氨酸位点中的两个半胱氨酸残基的巯基之间形成二硫键。

[0160] 在本发明的一些可选实施例中,所述抗体进一步包括重链可变区和/或轻链可变区。

[0161] 在本发明的一些可选实施例中,所述重链可变区的C端与所述CH1片段的N端相连,和/或,所述轻链可变区的C端与所述CL片段的N端相连。

[0162] 在本文中,本发明的“重链可变区”和“轻链可变区”可根据目标抗原确定,其只要可结合的目标抗原即可,具体序列不受限制,可参见第一方面所述的缀合物中的目标抗原。

[0163] 示例性地,所述目标抗原为CA153,所述重链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO:31

所示,所述轻链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO:32所示。

[0164] 在本发明的一些可选实施例中,所述抗体包括选自多抗、全长单抗、Fab抗体、Fab'抗体、F(ab')₂抗体、F(ab)₂抗体、Fv抗体、单链抗体、单域抗体以及最小识别单位中的至少之一。

[0165] 在本文中,术语“全长抗体”、“全长单抗”或“全长单克隆抗体”均是由至少两条相同的轻链和至少两条相同的重链通过链间二硫键连接而成,如免疫球蛋白G(IgG)、免疫球蛋白A(IgA)、免疫球蛋白M(IgM)、免疫球蛋白D(IgD)或免疫球蛋白E(IgE)。

[0166] 在本文中,术语“多抗”和“多特异性抗体”同义,均是指可识别多种抗原表位的抗体,例如可识别两种抗原表位的抗体(双特异性抗体,简称双抗)、三种抗原表位的抗体或者四种抗原表位的抗体,其为广义理解,具体结构不受限制,可识别多种抗原表位即可。

[0167] 在本文中,术语“单域抗体”、“纳米抗体”和“VHH抗体”可互换使用,其最初被描述为“重链抗体”(即“缺乏轻链的抗体”)的抗原结合免疫球蛋白(可变)域(Hamers-Casterman C, Atarhouch T, Muyldermans S, Robinson G, Hamers C, Songa EB, Bendahman N, Hamers R.: “Naturally occurring antibodies devoid of light chains”; Nature 363, 446-448 (1993)), 包含重链可变区(VH)和常规的CH2与CH3区,其通过重链可变区与抗原蛋白特异性结合。

[0168] 在本文中,术语“Fab抗体”或“Fab片段”通常是指仅含Fab分子的抗体或片段,其由重链的VH和CH1以及完整的轻链构成,轻链和重链之间通过一个二硫键连接。

[0169] 在本文中,术语“F(ab')₂抗体”或“F(ab')₂片段”具有通过二硫键连接在一起的两个抗原结合F(ab')部分。

[0170] 在本文中,术语“Fv抗体”或“Fv片段”通常是指仅由轻链可变区(VL)和重链可变区(VH)通过非共价键连接而成的抗体或片段,是抗体分子保留完整抗原结合部位的最小功能片段。

[0171] 在本文中,术语“单链抗体”、“scFv片段”是由抗体重链可变区和轻链可变区通过短肽连接而成的抗体或片段。

[0172] 在本文中,术语“最小识别单位”和“MRU”均是指仅由一个CDR组成的抗体或片段,其分子量十分小仅占完全抗体的1%左右。

[0173] 在本发明的一些可选实施例中,所述抗体包括或为如下所示的重链和轻链:

[0174]	重链	轻链
1	SEQ ID NO:33	SEQ ID NO:34
2	SEQ ID NO:35	SEQ ID NO:36
3	SEQ ID NO:35	SEQ ID NO:37
4	SEQ ID NO:38	SEQ ID NO:39
5	SEQ ID NO:40	SEQ ID NO:39
6	SEQ ID NO:41	SEQ ID NO:42
7	SEQ ID NO:41	SEQ ID NO:43
8	SEQ ID NO:78	SEQ ID NO:79
9	SEQ ID NO:80	SEQ ID NO:81

[0175] 需要说明的是,在本公开的抗体的氨基酸序列的基础上,本领域技术人员容易想到采用基因工程技术或其他技术(化学合成、重组表达)制备得到该抗体,例如从能够重组表达如上任一项所述的抗体的重组细胞的培养产物中分离纯化得到该抗体,这对本领域技术人员来说是容易实现的,基于此,无论采用何种技术制备本公开的抗体,其均属于本公开的保护范围。

[0176] 核酸分子、载体、细胞或宿主

[0177] 在制备或者获取第一方面所述的缀合物中的抗体或第二方面所述的抗体的过程中,可以利用表达这些抗体的核酸分子,与不同的载体连接,然后在不同细胞中表达,来获得相应抗体。

[0178] 在本发明的第三方面,本发明提出了一种核酸分子。根据本发明的实施例,所述核酸分子编码第一方面所述的缀合物中的抗体或第二方面所述的抗体。根据本发明实施例的核酸分子可编码获得上述的抗体。

[0179] 根据本发明的实施例,所述核酸分子包括DNA或RNA。

[0180] 需要说明的是,对于本文中所提及的核酸分子,本领域技术人员应当理解,实际包括互补双链的任意一条,或者两条。为了方便,在本文中,虽然多数情况下只给出了一条链,但实际上也公开了与之互补的另一条链。另外,本发明中的分子序列包括DNA形式或RNA形式,公开其中一种,意味着另一种也被公开。

[0181] 在本发明的第四方面,本发明提出了一种载体。根据本发明的实施例,所述载体包括第三方面所述的核酸分子。在将上述核酸分子连接到载体上时,可以将所述核酸分子与载体上的控制元件直接或者间接相连,只要这些控制元件能够控制所述核酸分子的翻译和表达等即可。当然这些控制元件可以直接来自于载体本身,也可以是外源性的,即并非来自于载体本身。当然,所述核酸分子与控制元件进行可操作地连接即可。本文中“可操作地连接”是指将外源基因连接到载体上,使得载体内的控制元件,例如转录控制序列和翻译控制序列等等,能够发挥其预期的调节外源基因的转录和翻译的功能。常用的载体例如可以为质粒、噬菌体等等。根据本发明的一些具体实施例的载体导入合适的受体细胞后,可在调控系统的介导下,有效实现前述的抗体的表达,进而实现抗体的体外大量获得。

[0182] 在本发明的一些具体实施例中,所述载体为真核表达载体、原核表达载体、病毒或噬菌体。

[0183] 在本发明的一个可选实施例中,所述表达载体为质粒表达载体或慢病毒表达载体。

[0184] 在本发明的第五方面,本发明提出了一种细胞或宿主。根据本发明的实施例,所述细胞或宿主包括:第三方面所述的核酸分子或第四方面所述的载体;或者表达第一方面所述的缀合物中的抗体或第二方面所述的抗体。利用该细胞在适合条件下,能够在细胞内有效地表达前述的抗体。

[0185] 根据本发明的实施例,所述细胞是通过将第四方面所述的载体引入至细胞中而获得的。

[0186] 需要说明的是,本发明的细胞不受特别限制,可以为原核细胞、真核细胞或噬菌体。所述原核细胞可以为大肠杆菌、枯草杆菌、链霉菌或奇异变形菌等。所述真核细胞包括巴斯德毕赤酵母、酿酒酵母、裂殖酵母、木霉等真菌,草地粘虫等昆虫细胞,烟草等植物细

胞,BHK细胞、CHO细胞、COS细胞、骨髓瘤细胞等哺乳动物细胞。

[0187] 在本发明的一个可选实施例中,所述细胞为哺乳动物细胞,包括BHK细胞、CHO细胞、NSO细胞或COS细胞,且不包括动物生殖细胞、受精卵或胚胎干细胞。

[0188] 需要说明的是,本发明中所述的“适合条件”,是指适合本发明所述抗体表达的条件。本领域技术人员容易理解的是,适合所述抗体表达的条件包括但不限于合适的转化或转染方式、合适的转化或转染条件、健康的细胞状态、合适的细胞密度、适宜的细胞培养环境、适宜的细胞培养时间。“适合条件”不受特别限制,本领域技术人员可根据实验室的具体环境,优化最适的所述抗体表达的条件。

[0189] 用途和制备缀合物的方法

[0190] 在本发明的第六方面,本发明提出了一种第二方面所述的抗体、第三方面所述的核酸分子、第四方面所述的载体或第五方面所述的细胞或宿主在制备缀合物或试剂盒中的用途。

[0191] 在本发明的第七方面,本发明提出了一种制备缀合物的方法。根据本发明的实施例,所述方法包括:采用第一方面所述的缀合物中的抗体或第二方面所述的抗体与缀合部分进行第一缀合反应,获得所述缀合物。由此,可有效制备得到缀合物,且制备方法简单。

[0192] 在本发明的一些可选实施例中,所述缀合反应之前,预先将交联剂和所述抗体进行第二缀合反应。

[0193] 在本发明的一些可选实施例中,所述交联剂选自双矾类化合物、马来酰亚胺类化合物、哒嗪类化合物、双乙烯磺酰胺类化合物、烯丙基矾类化合物、溴代吡啶二酮类化合物、二乙烯基吡啶类化合物、N-取代-3-溴-5-亚甲基吡咯-2-酮类化合物、琥珀酰亚胺酯类化合物、亚氨酸酯类化合物和叠氮苯类化合物中的至少之一。

[0194] 在本发明的一些可选实施例中,所述交联剂选自双矾类化合物、马来酰亚胺类化合物、哒嗪类化合物、双乙烯磺酰胺类化合物、烯丙基矾类化合物、溴代吡啶二酮类化合物、二乙烯基吡啶类化合物和N-取代-3-溴-5-亚甲基吡咯-2-酮类化合物中的至少之一。

[0195] 在本发明的一些可选实施例中,所述交联剂选自2-(甲苯磺酰)甲基丙烯酸酰胺-PEG4-酰胺-PEG4-甲基四嗪、马来酰亚胺、吡啶二硫基、乙烯基矾、碘乙酰基、溴乙酰基和半胱氨酸衍生物中的至少之一。

[0196] 在本发明的一些可选实施例中,所述交联剂选自2-(甲苯磺酰)甲基丙烯酸酰胺-PEG4-酰胺-PEG4-甲基四嗪。

[0197] 在本发明的一些可选实施例中,所述缀合反应是通过如下方法的至少之一进行的:混合酸酐法、碳二亚胺法、戊二醛法、戊二酸酐法、重氮化法、琥珀酸酐法、羰基二咪唑法、点击化学法和过碘酸钠法。

[0198] 试剂或试剂盒及其用途

[0199] 在本发明的第八方面,本发明提出了一种试剂或试剂盒。根据本发明的实施例,所述试剂或试剂盒包括:第一方面所述的缀合物或第二方面所述的抗体。本发明的试剂或试剂盒具有活性高和灵敏度强等优点,可用于免疫检测。

[0200] 在本发明的第九方面,本发明提出了一种第一方面所述的缀合物、第二方面所述的抗体、第三方面所述的核酸分子、第四方面所述的载体、第五方面所述的细胞或宿主或第八方面所述的试剂或试剂盒在免疫检测或制备免疫检测产品中的用途。

[0201] 免疫检测的方法和提高缀合物活性、稳定性或灵敏度的方法

[0202] 在本发明的第十方面,本发明提出了一种免疫检测的方法。根据发明的实施例,所述方法包括:采用第一方面所述的缀合物或第二方面所述的抗体与待检测样本进行接触,形成免疫复合物。

[0203] 在本发明的一些可选实施例中,基于所述免疫复合物的信号,确定所述待检测样本中是否含有目标物质或所述目标物质的含量。

[0204] 需要说明的是,上述的“待检测样本”可为患者的待检测样本,例如血清等样本;也可为可能是非患者样本,例如在可科学研究中,采用上述方法仅仅用于检测样本中的抗原的存在情况或其含量,并不涉及疾病诊断。

[0205] 在本发明的一些可选实施例中,所述信号包括荧光信号。

[0206] 在本发明的第十一方面,本发明提出了一种提高缀合物活性、稳定性或灵敏度的方法,所述缀合物包括抗体和至少一个缀合部分,所述缀合部分与所述抗体相连,所述方法包括:将所述抗体中CH1片段和CL片段引入一组或多组半胱氨酸位点,所述半胱氨酸位点与第一方面所述的缀合物所限定的半胱氨酸位点一致。

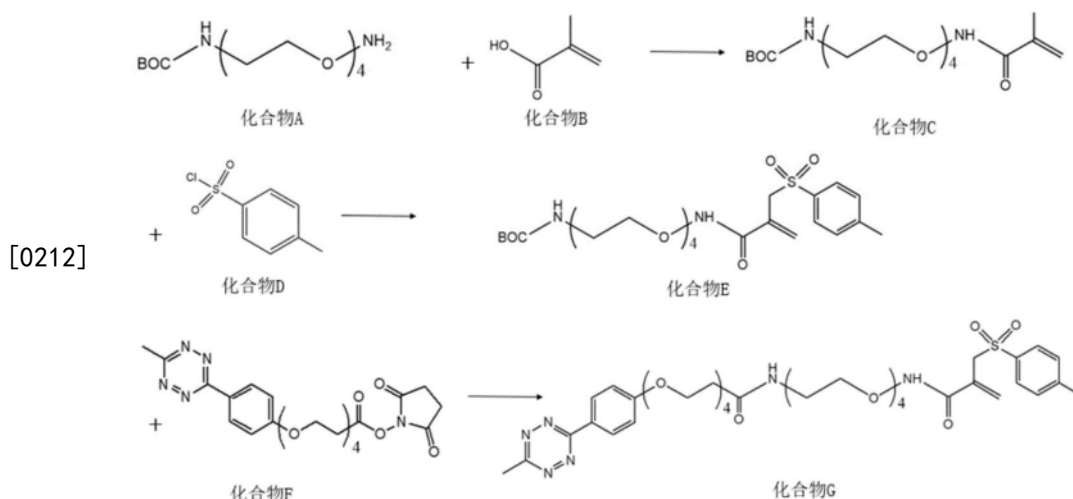
[0207] 下面将结合实施例对本发明的方案进行解释。本领域技术人员将会理解,下面的实施例仅用于说明本发明,而不应视为限定本发明的范围。实施例中未注明具体技术或条件的,按照本领域内的文献所描述的技术或条件或者按照产品说明书进行。所用试剂或仪器未注明生产厂商者,均为可以通过市购获得的常规产品。

[0208] 除非另有定义,否则本文使用的所有技术和科学术语具有与本公开内容所属领域的普通技术人员通常理解的含义相同的含义。尽管与本文描述的那些方法和材料类似或等同的任何方法和材料都可用于本文的制剂或单位剂量的实践或测试,但现在描述一些方法和材料。除非另有说明,否则本文采用或考虑的技术是标准方法。材料、方法和实例仅是说明性而非限制性的。

[0209] 除非另外指明,否则实践本公开将采用细胞生物学、分子生物学(包含重组技术)、微生物学、生物化学和免疫学的常规技术,所述常规技术在本领域技术人员的能力范围内。文献中充分解释了这种技术,如《分子克隆:实验室手册(Molecular Cloning:A Laboratory Manual)》,第二版(Sambrook等人,1989);《寡核苷酸合成(Oligonucleotide Synthesis)》(M.J.Gait编,1984);《动物细胞培养(Animal Cell Culture)》(R.I.Freshney编,1987);《酶学方法(Methods in Enzymology)》(学术出版社有限公司(Academic Press, Inc.);《实验免疫学手册(Handbook of Experimental Immunology)》(D.M.Weir和C.C.Blackwell编);《哺乳动物细胞用基因转移载体(Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells)》(J.M.Miller和M.P.Calos编,1987);《当代分子生物学方法(Current Protocols in Molecular Biology)》(F.M.Ausubel等人编,1987);《PCR:聚合酶链反应(PCR:The Polymerase Chain Reaction)》(Mullis等人编,1994);以及《当代免疫学方法(Current Protocols in Immunology)》(J.E.Coligan等人编,2011),所述文献中的每个文献均通过引用明确并入本文中。

[0210] 制备例1:2-(甲苯磺酰)甲基丙烯酰胺-PEG4-酰胺-PEG4-甲基四嗪的制备

[0211] 制备步骤如下所示:



[0213] (1) 2-(甲苯磺酰)甲基丙烯酰胺-(PEG)4-酰胺(TSMA)的制备

[0214] ①

[0215] a. 将叔丁氧羰基-亚氨基-四聚乙二醇-胺(化合物A)溶于10mL DMF(N,N-二甲基甲酰胺)中,加入甲基丙烯酸(化合物B)、DCC(二环己基碳二亚胺)以及NHS(N-羟基丁二酰亚胺),25℃磁力搅拌12小时。

[0216] b. 旋蒸除去溶剂,将粗产物溶于10mL去离子水中,过滤除去沉淀,旋蒸除去溶剂后,使用柱色谱提纯,得到叔丁氧羰基-亚氨基-四聚乙二醇-甲基丙烯酰胺(化合物C),产率约90%。

[0217] 上述步骤中,甲基丙烯酸可由但不限于如甲基丙烯酰卤(如甲基丙烯酰氯、甲基丙烯酰溴、甲基丙烯酰氟等)或甲基丙烯酸酐替换。当使用甲基丙烯酰卤或甲基丙烯酸酐时,合成步骤如下:

[0218] a. 将叔丁氧羰基-亚氨基-四聚乙二醇-胺(化合物A)溶于10mL二氯甲烷中,在0℃下加入三乙胺,甲基丙烯酰卤或甲基丙烯酸酐,磁力搅拌12小时。

[0219] b. 旋蒸除去溶剂,将粗产物溶于30mL二氯甲烷中,使用1M HCl和饱和氯化钠溶液洗涤,有机层使用无水硫酸钠干燥后,旋蒸除去溶剂。使用柱色谱提纯,得到叔丁氧羰基-亚氨基-四聚乙二醇-甲基丙烯酰胺(化合物C),产率约90%。

[0220] ②

[0221] a. 将化合物C溶于5mL二氯甲烷中,加入4-甲苯磺酰氯(化合物D),25℃磁力搅拌24小时。

[0222] b. 之后加入三乙胺搅拌12小时。将粗产物用1M HCl,饱和碳酸氢钠溶液,饱和氯化钠溶液洗涤后,使用无水硫酸镁干燥,旋蒸除去溶剂。

[0223] c. 将粗产物溶于10mL乙酸乙酯中,在0℃下加入三乙胺回流12小时。旋蒸除去溶剂后,使用柱色谱提纯,得到叔丁氧羰基-2-(甲苯磺酰)甲基丙烯酸酯(化合物E),产率约70%。

[0224] 上述步骤中,4-甲苯磺酰氯可由但不限于如4-甲苯亚磺酸钠替换。当使用4-甲苯亚磺酸钠时,上述合成步骤中的a和b步骤如下:

[0225] a. 将化合物C溶于5mL二氯甲烷中,加入4-甲苯亚磺酸钠和碘,25℃磁力搅拌72小时。

[0226] b.之后加入三乙胺搅拌12小时。将粗产物用1M HCl,饱和碳酸氢钠溶液,饱和硫代硫酸钠溶液,饱和氯化钠溶液洗涤后,使用无水硫酸镁干燥,旋蒸除去溶剂。

[0227] c步骤相同。

[0228] ③将化合物E溶于5mL二氯甲烷中,加入三氟乙酸(278mg,2.50mmol),25℃磁力搅拌12小时,旋蒸除去溶剂得到TSMA,产率约98%。

[0229] (2)2-(甲苯磺酰)甲基丙烯酸酰胺-PEG4-酰胺-PEG4-甲基四嗪(TSMA-MTz)的制备

[0230] ①将TSMA(13mg,0.03mmol)溶于2mL二氯甲烷中,加入DIEA(N,N-二异丙基乙基胺,7.5mg,0.06mmol)或三乙胺(6.1mg,8.4μL,0.06mmol),搅拌溶匀。将甲基四嗪-PEG4-NHS酯(化合物F,购买自西安康福诺生物科技有限公司,16.7mg,0.03mmol)溶于1mL二氯甲烷中,溶匀后加入TSMA的上述溶液中。

[0231] ②混合物在25℃下磁力搅拌12小时,旋蒸除去溶剂,将粗产物溶于20mL二氯甲烷中,用饱和氯化钠溶液洗涤后,使用无水硫酸镁干燥,旋蒸除去溶剂后,使用柱色谱(二氯甲烷:甲醇=20:1)提纯,得到2-(甲苯磺酰)甲基丙烯酸酰胺-PEG4-酰胺-PEG4-甲基四嗪(化合物G,TSMA-MTz),产率约50%。

[0232] 对产物进行液相色谱-质谱联用检测和核磁共振检测,检测结果见附图5-9,结果证明该方法成功制备得到2-(甲苯磺酰)甲基丙烯酸酰胺-PEG4-酰胺-PEG4-甲基四嗪。

[0233] 实施例1:

[0234] 1、突变点的确定

[0235] 将小鼠IgG1的重链轻链氨基酸序列(重链、轻链的氨基酸序列分别如SEQ ID NO:44和SEQ ID NO:45所示,即为野生型)输入到Molecular Operating Environment(MOE),在CH1和CL1上选取7组氨基酸突变为C。其中,突变后的7组(突变组1~突变组7)小鼠IgG1抗体的突变位点(突变位点从CH1或CL的N端至C端第一个氨基酸依次顺序编号)和氨基酸序列如表1所示:

[0236] 表1:突变组1~突变组7的突变位点和氨基酸序列

抗体名称	轻链(k型)+重链的突变位点的突变组合	重链的氨基酸序列	轻链的氨基酸序列
[0237] 突变组 1	P12C+G14C	SEQ ID NO:41	SEQ ID NO:42
突变组 2	S55C+F53C	SEQ ID NO:40	SEQ ID NO:39
突变组 3	F28C+S67C	SEQ ID NO:33	SEQ ID NO:34
[0238] 突变组 4	F102C+G14C	SEQ ID NO:41	SEQ ID NO:43
突变组 5	Q17C+Y9C	SEQ ID NO:35	SEQ ID NO:36
突变组 6	S14C+Y9C	SEQ ID NO:35	SEQ ID NO:37
突变组 7	S55C+P54C	SEQ ID NO:38	SEQ ID NO:39

[0239] 2、质粒构建表达

[0240] 2.1重组抗体表达质粒的构建

[0241] 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。BD SMARTTMRACE 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基因测序公司完成。pcDNATM3.4TOPO[®] vector为构建的重组抗体真核表达载体,该表达载体经改造引入多克隆酶切位点,后续简称3.4A表达载体。

[0242] 根据上述pMD-18T中抗体可变区基因测序结果,设计Anti-CA153抗体的VL和VH基因特异性引物,两端分别带有限制性内切酶酶切位点和保护碱基,通过PCR扩增方法扩出0.72KB的轻链(Light Chain)基因片段和1.40kb的重链(Heavy Chain)基因片段。

[0243] Heavy Chain和Light Chain基因片段分别采用限制性内切酶进行双酶切,3.4A载体采用限制性内切酶进行双酶切,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。

[0244] 2.2重组抗体的样品的表达

[0245] 提前复苏CHOK1细胞,传代培养到500ml体系,使细胞密度达到 $(3 \sim 5) \times 10^6$ cells/ml,细胞活力>95%;离心清洗细胞,用培养基复溶,同时将细胞密度调整到 2.9×10^6 cells/ml,作为细胞稀释液。用培养基分别配制转染试剂稀释液和本申请步骤2.1获得的重组表达质粒的质粒DNA稀释液。将转染试剂稀释液加入到质粒DNA稀释液中,混匀后室温静置放置15min;将该混合物在1min内缓慢加入细胞稀释液中,混匀后取样计数,记录并观察细胞转染后的活力,并将其放置于35℃恒温培养箱中培养,转速120rpm,CO₂含量8%,13天后离心收样,得到各细胞培养物。

[0246] 3、重组抗体样品的纯化及SDS-PAGE鉴定

[0247] 在1000rpm下对本实施例2.2获得的各细胞培养物进行5分钟离心处理,回收培养上清。培养上清中含有从被转染的分泌的抗体。再次在10000×g下对得到的培养上清进行10分钟离心处理,回收上清将离心上清用0.22μm膜过滤处理,澄清后的上清用proteinA (Mab select SuRe LX,Cytiva)亲和层析柱进行亲和纯化。

[0248] 取6μg纯化的抗体进行还原性SDS-PAGE(4~12%金斯瑞预制胶)和非还原SDS-PAGE(4~12%金斯瑞预制胶),电泳图分布如图1和图2所示,其中,图1和图2中,泳道1:野生型,泳道2:突变组1,泳道3:突变组2,泳道4:突变组3,泳道5:突变组4,泳道6:突变组5,泳道7:突变组6,泳道8:突变组7。

[0249] 图1中,在还原性SDS-PAGE后显示两条带,1条Mr为50KD(重链),另一条Mr为28KD(轻链)。

[0250] 图2中,突变组1~突变组7新增加的二硫键组装完全,且突变组2、突变组3、突变组4、突变组5、突变组6和突变组7的表达稳定性和组装同WT相当。

[0251] 4、重组抗体样品的HPLC-SEC(高效液相色谱法-尺寸排阻色谱法)检测

[0252] 分别取20μg本实施例步骤3获得的纯化后的多组重组抗体样品,经高效液相色谱法-尺寸排阻色谱法(HPLC-SEC)测定各重组抗体(突变组1~突变组7)SEC纯度,采用峰面积归一法分析纯化,SEC结果如表2所示。

[0253] 表2:突变组1~突变组7对应的HPLC-SEC结果

[0254]

名称	聚体%	主峰SEC%
野生型	1.5	98.5

突变组1	0.5	99.5
突变组2	0.92	99.18
突变组3	2.66	98.34
突变组4	0.46	99.54
突变组5	0.21	99.79
突变组6	0.29	99.71
突变组7	1.06	98.94

[0255] 由表2可知,突变组1~突变组7都形成了完整的IgG1抗体。

[0256] 5、热稳定T_m值测定

[0257] 取本实施例步骤3获得的纯化后的多组重组抗体样品,分别将各重组抗体(突变组1~突变组7)稀释到1mg/ml,利用DSF(差示扫描荧光法)测样品的热稳定性T_m,检测结果参见表3。

[0258] 表3:突变组1~突变组7的热稳定性T_m的检测结果

名称	T _m /°C	ΔT _m /°C
野生型	62.064	0
突变组 1	70.999	7.936

[0259]

突变组 2	71.21	9.146
突变组 3	68.67	6.606
突变组 4	70.398	8.334
突变组 5	70.453	8.389
突变组 6	71.715	9.651

[0260]

[0261] 从表3中的ΔT_m可看出,突变组1~6的热稳定性明显提升,突变组2和突变组6的热稳定性最好,提升最高可达9°C。

[0262] 6、突变组1~突变组7标记AE(吡啶酯)之后的稳定性检测

[0263] 标记AE(吡啶酯)的步骤:

[0264] 1) 缓冲置换:取本实施例步骤3获得的纯化后的多组重组抗体样品(后续简称抗体),分别用透析袋透析2h,45min换一次液。

[0265] 2) 反应:抗体取到离心管中,加入经NHS(N-羟基琥珀酰亚胺)活化的AE母液反应15min后再加入Gly溶液终止反应30min,得到含有抗体-AE的溶液。

[0266] 3) 除杂:将反应完成后的抗体-AE进行透析,第一天30~60min换液一次(至少换4次),过夜后第二天60min换液一次(至少换4次)。

[0267] 4) 回收及保存:将透析袋内的抗体-AE取出,加相同体积高压甘油混匀后于-20°C长期保存。

[0268] 采用双抗夹心法检测抗体-AE稳定性的步骤:

[0269] 取50μL上述制备的抗体-AE,加Ab-磁珠工作液50μL,加Ab-AE工作液50μL,37°C反

应15min。将反应后的溶液采用1*PBST清洗三遍。然后加激发液A+激发液B,立刻读值,将突变组1~突变组7标记AE之后,37°C考核7天,以4°C为对照,对比稳定性(10%以内认为考核7天是合格的),检测结果参见图3所示。

[0270] 从图3可以看出,与野生型抗体相比,突变组1~突变组7的标记AE之后的稳定性均提高。

[0271] 7、突变组1~突变组7定点标记活性鉴定

[0272] 选择突变组2、突变组3、突变组5、突变组6和突变组7安排定点标记检测活性,具体检测方法如下所示:

[0273] 1) 抗体的还原:取本实施例步骤3获得的纯化后的多组重组抗体样品(后续简称抗体),抗体(5mg/mL)用Zeba™脱盐柱(10K MWC0)置换到PB(50mM,pH7.4,1mM EDTA)缓冲液中。TCEP(Sigma)用PB(50mM,pH7.4,1mM EDTA)配置成10mM溶液。在抗体溶液中加入2eq(2等倍量)的TCEP,37°C下温和振荡(400rpm)反应2个小时。还原处理的抗体置于4°C下保存备用。

[0274] 2) 抗体二硫键的重构2-(甲苯磺酰)甲基丙烯酸酰胺-PEG4-酰胺-PEG4-甲基四嗪(TSMA-MTz,其制备方法参见制备例1)接头分子的引入:TSMA-MTz在干燥条件下用DMSO配置成10mM溶液。在还原的抗体溶液中加入20eq的TSMA-MTz,在4°C条件下反应16个小时。抗体溶液中多余的化学试剂用Zeba™脱盐柱(10K MWC0)置换到PB(50mM,pH7.4)的缓冲液中。制备得到抗体-甲基四嗪(抗体-MTz),用PB(50mM,pH7.4)稀释至4mg/mL,置于4°C下保存备用。

[0275] 3) 抗体-AE(吡啶酯)缀合物的制备:抗体-甲基四嗪(4mg/mL)与吡啶酯-反式环辛烯(4mg/mL,DMSO溶解),按摩尔比是1:10进行交联,25°C下反应一个小时,得到抗体-AE(吡啶酯)缀合物。反应完后,置于4°C下保存备用。

[0276] 4) 抗体-AE(吡啶酯)缀合物的活性和稳定性检测:取100μl标记bio的配对抗体和100μl步骤3)抗体-AE缀合物,不同浓度的CA153质控品(0U/mL、1U/mL、10.3U/mL、292.9U/mL)混匀,37°C孵育10min,然后再加入23μl磁珠工作液,再孵育10min,280μl清洗液PBST,清洗6次;加100μl激发液A。上机检测:加100μl激发液B,增益100000。

[0277] 计算定向标记时的抗体活性如表4,信噪比P/N(P为实验组在不同样本浓度下的读值,N为对照读值)如表5。

[0278] 计算定向标记时的抗体低值活性提升和低值灵敏度提升如表6。

[0279] 表4:各抗体定点标记后活性结果

样本编号	样本浓度(U/ml)	野生型	突变组 2	突变组 3	突变组 5	突变组 6	突变组 7
S0	0	6500	6891	7011	7665	7546	7797.5
S1	1	113374.5	110489	126648	147793	136931.5	157019
S2	10.3	1514081.5	1500288	1720711	2112913.5	1953024.5	1518311.5
S3	292.9	6907833	6822769	7630732	8855447.5	8218389.5	6398317.5

[0281] 表5:各抗体定点标记后信噪比P/N

信噪比	名称	野生型	突变组 2	突变组 3	突变组 5	突变组 6	突变组 7
P/N	S1/S0	17.44	16.03	18.06	19.28	18.15	20.14
	S2/S0	232.94	217.72	245.43	275.66	258.82	194.72
	S3/S0	1062.74	990.10	1088.39	1155.31	1089.11	820.56

[0283] 表6:各抗体定点标记后的低值活性提升和低值灵敏度提升

样本编号	S0	S1	低值(S1)活性提升	低值灵敏度 S1/S0	低值灵敏度 S1/S0 提升
样本浓度 (U/ml)	0	1	——	——	——
[0284] 野生型	6500	113374.5	0%	17.44	0%
突变组 2	6891	110489	-3%	16.03	-8%
突变组 3	7011	126648	12%	18.06	4%
突变组 5	7665	147793	30%	19.28	11%
突变组 6	7546	136931.5	21%	18.15	4%
突变组 7	7797.5	157019	20%	20.14	15%

[0285] 由表6可以看出,突变组3、突变组5、突变组6和突变组7抗体优于野生型抗体,低值活性提升了10%以上,低值灵敏度P/N提升了4%以上。

[0286] 实施例2:其他种属和亚型抗体的突变设计及其效果验证

[0287] 1、将上述鼠IgG1抗体与其它亚类的鼠抗(IgG2a、IgG2b)以及其他种属(羊、兔)的抗体IgG进行序列比对和空间结构模拟,序列比对结果参见图4(图4为不同亚类、种属的CH1和CL序列比对图,黑框框起来的为突变位点及其等价位点)。

[0288] 其它亚类的鼠抗(IgG2a、IgG2b)以及其他种属(羊、兔)的抗体IgG的突变位点以及CH1和CL的氨基酸序列如表7所示。

[0289] 表7:其它亚类的鼠抗以及其他种属的抗体IgG的突变位点以及CH1和CL的氨基酸序列

抗体名称	轻链 (k 型) + 重链的突变位点的突变组合	CH1 片段的氨基酸序列	CL 片段的氨基酸序列
鼠源抗体 IgG2a (突变组 3)	F28C+ S67C	SEQ ID NO:46	SEQ ID NO:14
鼠源抗体 IgG2a (突变组 5)	Q17C+ Y9C	SEQ ID NO:47	SEQ ID NO:16
鼠源抗体 IgG2a (突变组 6)	S14C+ Y9C	SEQ ID NO:47	SEQ ID NO:17
鼠源抗体 IgG2b (突变组 3)	F28C+ S67C	SEQ ID NO:52	SEQ ID NO:14
鼠源抗体 IgG2b (突变组 5)	Q17C+ Y9C	SEQ ID NO:53	SEQ ID NO:16
鼠源抗体 IgG2b (突变组 6)	S14C+ Y9C	SEQ ID NO:53	SEQ ID NO:17
[0290] 兔源抗体 IgG (突变组 3)	V28C+ V68C	SEQ ID NO:58	SEQ ID NO:60
兔源抗体 IgG (突变组 5)	Q17C+ F9C	SEQ ID NO:59	SEQ ID NO:61
兔源抗体 IgG (突变组 6)	A14C+ F9C	SEQ ID NO:59	SEQ ID NO:62
抗体名称	轻链 (λ 型) + 重链的突变位点的突变组合	CH1 片段的氨基酸序列	CL 片段的氨基酸序列
羊源抗体 IgG1 (突变组 3)	L29C+ V68C	SEQ ID NO:67	SEQ ID NO:69
羊源抗体 IgG1 (突变组 5)	E18C+ Y9C	SEQ ID NO:68	SEQ ID NO:70
羊源抗体 IgG1 (突变组 6)	S15C+ Y9C	SEQ ID NO:68	SEQ ID NO:71

[0291] 2、其他种属和亚型抗体的稳定性效果验证

[0292] 采用实施例1步骤2和步骤3的方法制备得到纯化后的目标抗体,并进行稳定性测试。结果表明,表7所述抗体的稳定性较野生型均有提高。示例性详细展示鼠抗体IgG2a的稳定性验证过程及结果如下。2.1鼠抗体IgG2a的稳定性验证

[0293] 在鼠IgG2a抗体(抗CRP抗体)上验证突变组3和突变组5的突变效果,突变抗体的氨基酸序列如表8所示:

[0294] 表8:鼠抗IgG2a的突变抗体序列

抗体名称	轻链 (k 型) + 重链的突变位点的突变组合	重链的氨基酸序列	轻链的氨基酸序列
[0295] 鼠源抗体 IgG2a-野生型	/	SEQ ID NO:76	SEQ ID NO:77
鼠源抗体 IgG2a (突变组 3)	F28C+ S67C	SEQ ID NO:78	SEQ ID NO:79
鼠源抗体 IgG2a (突变组 5)	Q17C+ Y9C	SEQ ID NO:80	SEQ ID NO:81

[0296] 采用实施例1步骤2和步骤3的方法制备得到纯化后的目标抗体,然后每个抗体样

品取2mg分别放置4℃、37℃、45℃考核7天、-20℃考核21天,或在-20℃反复冻融5次。取考核后的样品通过荧光POCT平台检测抗体的活性。具体方法如下:

[0297] 1) 抗体标记:取100uL 1%含量的荧光微球,加入900uL活化缓冲液后混匀,离心去上清后,加入1mL活化缓冲液超声混匀,再加入活化剂(EDC NHS),避光震荡混匀20min后离心去上清,加入和微球等体积的偶联缓冲液,超声混匀后加入标记抗体0.2-0.4mg,避光震荡混匀3h,最后加入封闭缓冲液进行封闭,避光震荡混合45min后终止标记,离心去上清,用微球保存液复溶微球,超声混匀于4℃保存使用。

[0298] 2) 配制微球工作液:用微球稀释液将抗体标记物稀释至最终浓度10-20%后,使用喷垫仪将标记物喷于玻璃纤维上。

[0299] 3) 制备干燥好的微球垫:将喷涂好的荧光垫放入50℃烘箱烘干2h以上。

[0300] 4) 样品垫处理:将阻断剂使用样品垫稀释液稀释至0.4mg/ml铺于玻璃纤维上,放入50℃烘箱干燥过夜。

[0301] 5) NC膜包被:将包被抗体使用包被稀释液稀释至1.0mg/ml后进行包被;放50℃烘箱干燥过夜。

[0302] 6) 制备荧光层析条:用切条机将荧光层析条切条,组装后加样进行检测。

[0303] 7) 检测(1) 质控品:重组抗原,使用样本稀释液稀释到对应浓度,进行配对抗体检测(2) 检测方法:加样15min后,进行仪器判断。

[0304] 偏差 = (热考活性 - 4℃, 7d活性) / -4℃, 7d活性;

[0305] 平均偏差 = 总偏差 / 偏差组数。

[0306] 表9:鼠抗IgG2a-抗体的稳定性

考核条件	4℃ 7d		37℃ 7d		45℃ 7d		冻融 5 次		-20℃ 21d		
	T/C	偏差	T/C	偏差	T/C	偏差	T/C	偏差	T/C	偏差	
鼠源 IgG2a 野生型	185	2.87327	0.0%	3.12063	8.61%	2.50629	-12.77%	2.33101	-18.9%	2.83709	-1.26%
	68.9	1.16022	0.0%	1.12963	-2.64%	0.88141	-24.03%	0.86263	-25.6%	1.22249	5.37%
	26.7	0.44906	0.0%	0.50646	12.78%	0.33308	-25.83%	0.32078	-28.6%	0.38735	-13.74%
	11.3	0.12465	0.0%	0.14832	18.99%	0.08285	-33.53%	0.10244	-17.8%	0.11381	-8.70%
平均偏差		0.0%		9.44%		-24.04%		-22.7%		-4.58%	
鼠源 IgG2a (突变组 5)	185	3.00994	0.0%	3.1934	6.1%	2.86241	-4.9%	3.14511	4.5%	2.99968	-0.3%
	68.9	1.19637	0.0%	1.43203	19.7%	1.34342	12.3%	1.30865	9.4%	1.35216	13.0%
	26.7	0.60242	0.0%	0.54049	-10.3%	0.43461	-27.9%	0.50246	-16.6%	0.5582	-7.3%
	11.3	0.14604	0.0%	0.16843	15.3%	0.1309	-10.4%	0.12987	-11.1%	0.14843	1.6%
	平均偏差		0.0%		7.7%		-7.7%		-3.4%		1.7%
鼠源 IgG2a (突变组 3)	185	2.84326	0.0%	2.96945	4.4%	2.41722	-15.0%	2.69447	-5.2%	3.07722	8.2%
	68.9	0.84863	0.0%	1.20308	41.8%	0.95503	12.5%	1.08401	27.7%	1.07533	26.7%
	26.7	0.49195	0.0%	0.41607	-15.4%	0.4048	-17.7%	0.39545	-19.6%	0.45451	-7.6%
	11.3	0.14532	0.0%	0.14793	1.8%	0.12147	-16.4%	0.12659	-12.9%	0.1614	11.1%
	平均偏差		0.0%		8.1%		-9.1%		-2.5%		9.6%

[0309] 结果表明,鼠IgG2a野生型抗体在45℃7d及冻融5次的平均偏差分别达到24.04%、22.7%,超过了10%,考核不合格。突变组3和突变组5在所有考核条件下的平均偏差均在±

10%以内,考核合格。突变组的稳定性较野生型均有提高。

[0310] 在本说明书的描述中,参考术语“一个实施例”、“一些实施例”、“示例”、“具体示例”、或“一些示例”等的描述意指结合该实施例或示例描述的具体特征、结构、材料或者特点包含于本发明的至少一个实施例或示例中。在本说明书中,对上述术语的示意性表述不必针对的是相同的实施例或示例。而且,描述的具体特征、结构、材料或者特点可以在任一个或多个实施例或示例中以合适的方式结合。此外,在不相互矛盾的情况下,本领域的技术人员可以将本说明书中描述的不同实施例或示例以及不同实施例或示例的特征进行结合和组合。

[0311] 尽管上面已经示出和描述了本发明的实施例,可以理解的是,上述实施例是示例性的,不能理解为对本发明的限制,本领域的普通技术人员在本发明的范围内可以对上述实施例进行变化、修改、替换和变型。

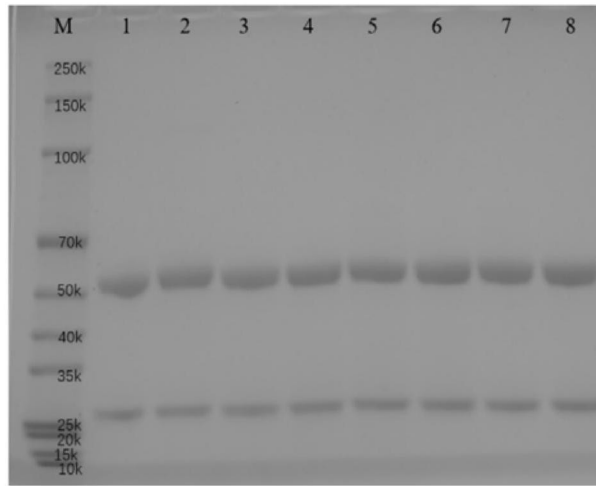


图1

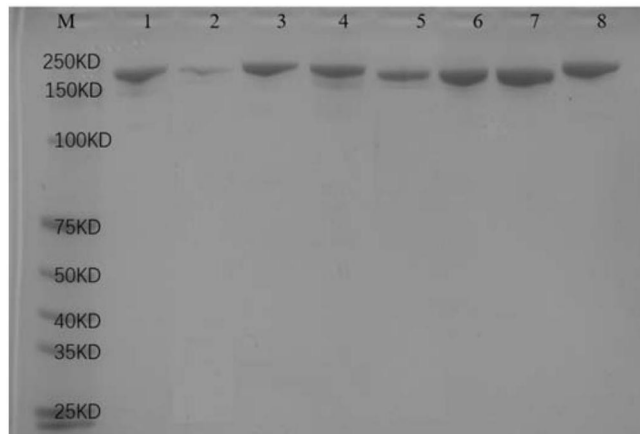


图2

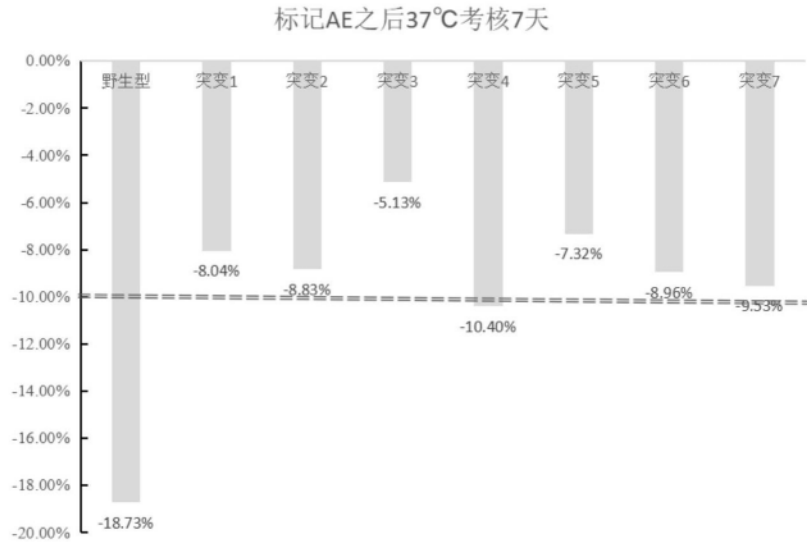


图3

mouse	IGHG1	CH1	AKTTPPSVYPLAP	GSAAQTNSMVTLGCLVKGYFPEPVTVTWNSGSLSSGVHTFPAVLE	-SD-LYTLSSSVTPVSSPRPSETVTCNVAHPASSTKVDKKI	97
mouse	IGHG2C	CH1	AKTTAPSVYPLAP	ICGGTTGSSVTLGCLVKGYFPEPVTLTWNSGSLSSGVHTFPAVLLQ	-SG-LYTLSSSVTVTSNTWPSQITICNVAHPASSTKVDKKI	97
mouse	IGHG2A	CH1	AKTTAPSVYPLAP	ICGGTTGSSVTLGCLVKGYFPEPVTLTWNSGSLSSGVHTFPAVLLQ	-SD-LYTLSSSVTVTSNTWPSQITICNVAHPASSTKVDKKI	97
mouse	IGHG2B	CH1	AKTTPPSVYPLAP	ICGDDTTGSSVTLGCLVKGYFPEPVTVTWNSGSLSSGVHTFPAVLLQ	-SG-LYTMSSSVTVPSSTWPSQITVCSVAHPASSTTVDKKL	97
mouse	IGHG3	CH1	ATTTAPSVYPLVP	ICSDTSGSSVTLGCLVKGYFPEPVTVKWNYGALSSGVHTFPAVLLQ	-SG-FYLSLSSVTVPSSTWPSQITVCSVAHPASSTKTELKRI	97
sheep	IGH1	CH1	ASTTTPKVPPLTS	ICGDTSSSIIVTLGCLVSSYMPPEPVTVTWNSGALTSGVHTFPAVLLQ	-SSGLYLSLSSVTVTPASTSGAQTFICNVAHPASSTKVDKRV	98
sheep	IGH2	CH1	ASTTAPKVPPLTSC	ICGDTSSSIIVTLGCLVSSYMPPEPVTVTWNSGALTSGVHTFPAVLLQ	-SSGLYLSLSSVTVTPASTSGAQTFICNVAHPASSARVDKRV	100
rabbit	IGHG	CH1	PSVFPLAP	ICGDTSPSSTVTLGCLVKGYLPEPVTVTWNSGTLINGVHTFPAVLRQSSG	-LYLSLSSVTVSSTSSQP---VTCNVAHPATNTKVDKTY	95
mouse	IGKC		RADAAPTIVSIFPESSEMLTSGGASVVCFLNDFYPKDINVKWKIDGSRQNGVLS	SWTDQDSKDYSTYSMSSTLTLTKDEYERHNSYTCEATHKTSPIVKS	ENRNEC	107
sheep	IGKC		SDAQPSVFLFKPESSEMLRTGTVSVCFLVNDFYPKDINVKWKVDGVTQNSNFQNS	FTDQDSKDYSTYSLSSTLTLSSSEYQSHNAYACEVSHKSLPTALVKS	ENRNEC	107
rabbit	IGKC2		RDPVAPSVLLFPESKEELTTGTATIVCANKFYPSDITVTKVDGTTQQSGIENS	SKTPQSPEDNTYLSLSTLSTLTAQYNHSHVYTCVQVQG-SASPIVQSE	ENRNGDC	106
sheep	IGLC2		QPKSAPSVLTFPESKEELSTNKATVVCFLNDFYPSGVNVVWKADGSTINQNVKII	QASKQS-NSKYAASSYLTLTGEWKSQSSYTCVTHEGST--VTKTKPSEC		105
rabbit	IGKC1		VAPTVLIFPESSEMLTSGGASVVCFLNDFYPKDINVKWKVDGVTQNSNFQNS	SKTPQNSADCTYNLSSSTLTLTSTQYNHSHKEYTKCVTQGTTS--VVQSE	ENRNGDC	104

图4

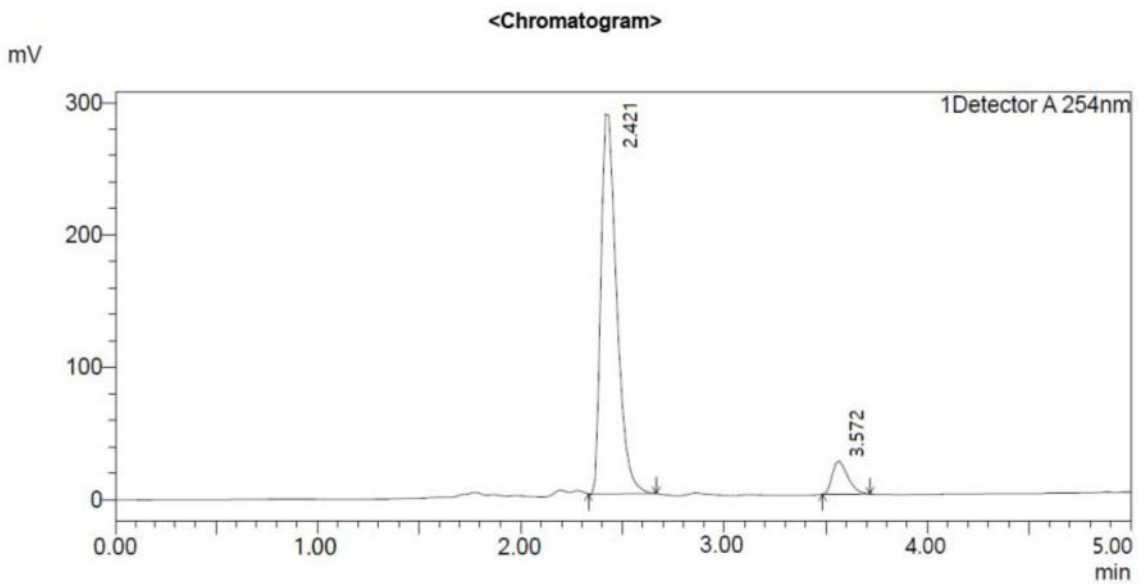


图5

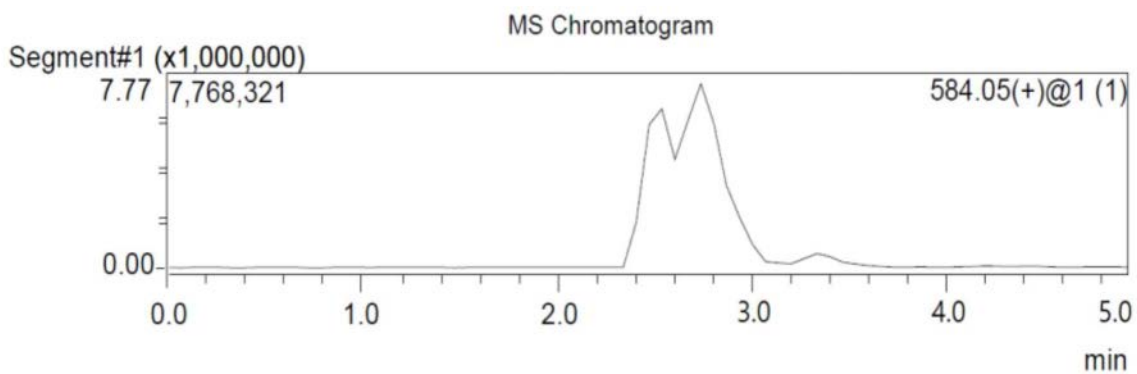


图6

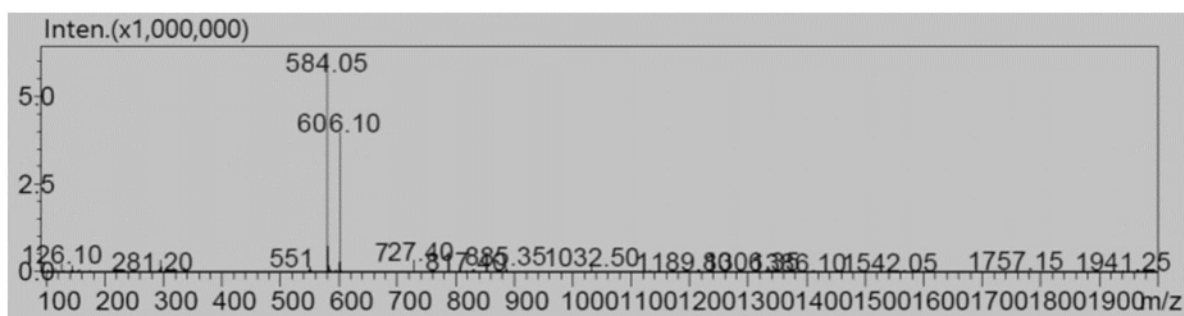


图7

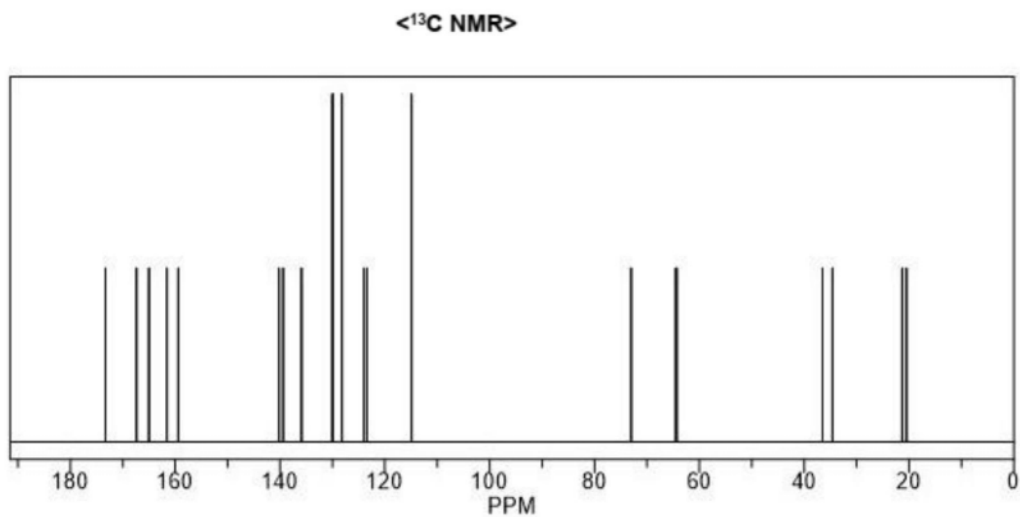


图8

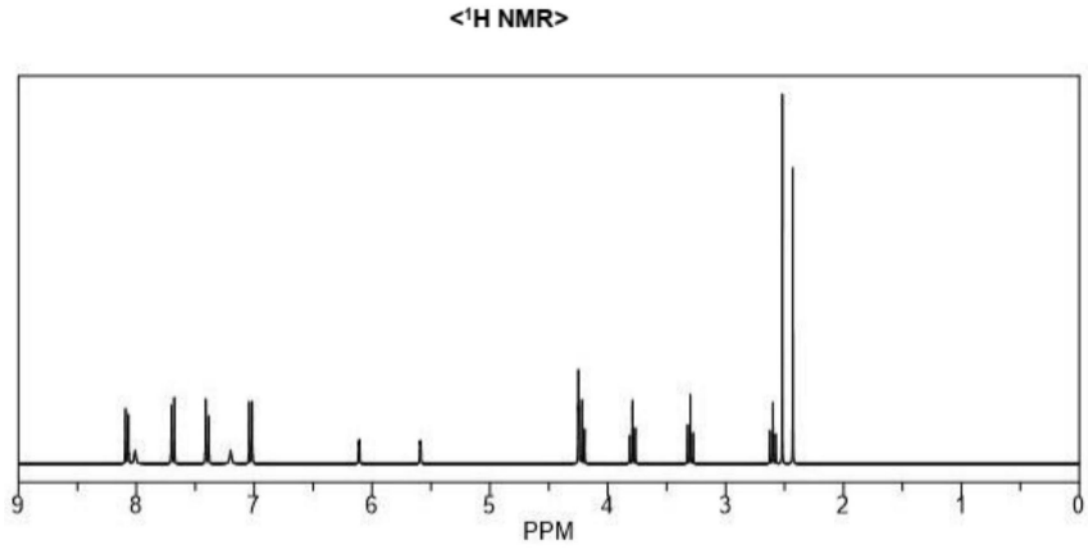


图9