



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 115298213 A

(43) 申请公布日 2022. 11. 04

(21) 申请号 202080088343.1

(74) 专利代理机构 中国贸促会专利商标事务所
有限公司 11038

(22) 申请日 2020.12.18

专利代理师 郑天松

(30) 优先权数据

62/950,397 2019.12.19 US

(51) Int.Cl.

C07K 16/18 (2006.01)

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2022.06.17

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2020/066188 2020.12.18

(87) PCT国际申请的公布数据

WO2021/127547 EN 2021.06.24

(71) 申请人 奎多公司

地址 美国加利福尼亚州

(72) 发明人 J·J·孙 R·L·伊根

J·麦克卢尔 W·克罗尔

权利要求书2页 说明书36页

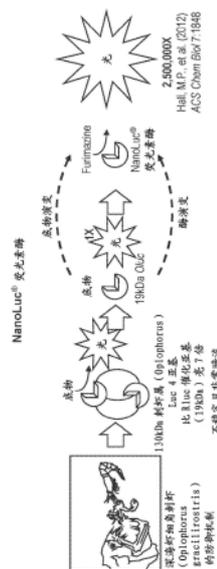
序列表15页 附图23页

(54) 发明名称

单克隆抗体融合

(57) 摘要

本发明提供了包含任何抗体或其片段、可操作地连接并表达为与目的标记的融合物的抗体融合物。本发明还提供了与所述抗体融合物相关的质粒、载体、宿主细胞、方法和试剂盒。所述抗体融合物至少在诊断和试剂设置中是有用的。



1. 产生抗体融合物的方法,其包括:
 - (a) 获得目的抗体或其片段的核酸序列;
 - (b) 将所述目的抗体或其片段的核酸序列可操作地连接到目的标记的核酸序列;
 - (c) 在宿主细胞中将带有目的标记的抗体或其片段表达为抗体融合物;和
 - (d) 分离所述抗体融合物;其中所述目的标记选自:
发光标记,其包含荧光素酶,
荧光标记,其包含下列中的至少一种:GFP(绿色荧光蛋白)、RFP(红色荧光蛋白)、CFP(青色荧光蛋白)或YFP(黄色荧光蛋白),和
磷酸酶标记。
2. 根据权利要求1所述的方法,其中所述目的抗体选自:抗PCT抗体、抗甲状腺TRAb、抗莱姆病V1sE/C6、抗OspC/10、抗DbpA抗体和其片段。
3. 根据权利要求1或2所述的方法,其中所述荧光素酶是下列中的至少一种:NLuc(NanoLuc)、RLuc(RetinaLuc)和FLuc(FireflyLuc)。
4. 根据权利要求1~3之任一项所述的方法,其中所述磷酸酶标记包括SEAP(分泌的胚胎碱性磷酸酶)。
5. 根据权利要求1~4之任一项所述的方法,其中所述荧光标记包括GFP(绿色荧光蛋白)、RFP(红色荧光蛋白)、CFP(青色荧光蛋白)或YFP(黄色荧光蛋白)。
6. 根据权利要求1~5之任一项所述的方法,其中所述目的抗体包括抗PCT抗体或其片段,且所述目的标记包括NanoLuc。
7. 根据权利要求1~5之任一项所述的方法,其中所述目的抗体包括抗PCT抗体或其片段,且所述目的标记包括SEAP。
8. 根据权利要求1~5之任一项所述的方法,其中所述目标抗体包含抗甲状腺TRAb或其片段,且所述目标标记包含NLuc。
9. 根据权利要求1~5之任一项所述的方法,其中所述目的抗体包括莱姆病V1sE/C6抗体、OspC/10抗体或DbpA抗体或其片段。
10. 根据权利要求1~5之任一项所述的方法,其中所述目的抗体包括M22(TSHR-特异性)抗体或其片段,且所述目的标记包括含有绿色荧光蛋白(GFP)的荧光蛋白。
11. 根据权利要求1~5之任一项所述的方法,其中所述目的抗体包括M22(TSHR-特异性)抗体或其片段,且所述目的标记包括含有红色荧光蛋白(RFP)的荧光蛋白。
12. 根据权利要求1~5之任一项所述的方法,其中所述目的抗体包含M22_NLuc或其片段,且其中所述抗体与包含RPE-抗人IgG或其片段的第二抗体配对。
13. 抗体融合物,其包括:

抗体或其片段、和

选自下列的目的标记：

- (a) 荧光素酶；
- (b) 荧光蛋白；和
- (c) SEAP (分泌的胚胎碱性磷酸酶)。

14. 根据权利要求13所述的抗体融合物，其中所述抗体选自：抗PCT抗体、抗甲状腺TRAb、抗莱姆病VlsE/C6、抗OspC/10、抗DbpA抗体和其片段。

15. 根据权利要求13或14所述的抗体融合物，其中所述荧光蛋白是下列中的至少一种：GFP (绿色荧光蛋白)、RFP (红色荧光蛋白)、CFP (青色荧光蛋白) 或YFP (黄色荧光蛋白)。

16. 根据权利要求13~15之任一项所述的抗体融合物，其中所述荧光素酶是下列中的至少一种：NLuc (NanoLuc)、RLuc (RetinaLuc) 和FLuc (FireflyLuc)。

17. 用于诊断和/或检测人类受试者目的疾病或病症的方法，其包括：

- (a) 提供包含根据权利要求13的抗体融合物的免疫测定；
- (b) 将免疫测定与来自受试者的样品接触；和
- (c) 检测抗体融合物是否结合样品中的靶标以确定所述疾病或病症的存在与否。

18. 根据权利要求17所述的方法，其中所述标记是SEAP。

19. 根据权利要求17或18所述的方法，其中所述标记是发光或荧光标记。

20. 根据权利要求19之任一项所述的方法，其中所述发光或荧光标记选自：荧光素酶、GFP (绿色荧光蛋白)、RFP (红色荧光蛋白)、CFP (青色荧光蛋白) 或YFP (黄色荧光蛋白)。

21. 根据权利要求17所述的方法，其中所述检测步骤还包括侧向流检测。

22. 根据权利要求17或21所述的方法，其还包括诊断测试系统，其中所述诊断测试系统包括具有荧光标记抗体的侧向流免疫测定。

23. 根据权利要求22所述的方法，其中所述诊断测试系统还包括用于记录和显示仪器和用户历史数据的装置。

24. 质粒，其包含编码根据权利要求13所述的抗体融合物的核酸序列。

25. 载体，其包含根据权利要求24所述的质粒。

26. 宿主细胞，其包含根据权利要求25所述的载体。

27. 试剂盒，其包含根据权利要求13所述的抗体融合物。

单克隆抗体融合

[0001] 【相关申请的交叉引用】

[0002] 本申请要求于2019年12月19日提交的美国临时申请号62/950,397的权益,该申请通过引用并入本文。

【技术领域】

[0003] 本公开总体上涉及抗体和抗体诊断领域,特别是抗体与目标试剂的融合。

【背景技术】

[0004] 当前的抗体生产和测试技术涉及目的抗体的表达,确保抗体具有适当的折叠、糖基化等。抗体表达后,必须对抗体进行纯化和加工,往往会导致一定量的抗体损失。对于诊断和其他用途,抗体通常与目的蛋白质(例如标签或标记)或固体支持物(例如微珠、硝酸纤维素或塑料,例如聚苯乙烯)缀合,从而使抗体经常暴露于苛刻的结合条件。这对抗体标记产品产生负面影响。本领域需要产生标记的抗体融合物同时避免或避免上述缺点。

[0005] 本公开提供了克服这些技术的缺点的抗体融合,从而导致增加的产量、易于制造和降低生产成本。抗体是用目的蛋白质试剂重组表达的,并且带有与抗体融合的标签。因此,检测试剂不需要在表达后进行“偶联”,从而消除了对抗体损失的后纯化处理或将单克隆抗体暴露于苛刻的偶联条件的需要。

[0006] 【发明概述】

[0007] 在一个方面,描述了用于免疫测定的重组单克隆抗体(Mab),其中的每一个都具有重组表达并融合到目的抗体上的融合蛋白试剂。抗体可以包括任何目的抗体。在一些实施方式中,目的抗体可以包括例如抗降钙素原(PCT)单克隆抗体、TSHR-特异性M22单克隆抗体、莱姆病单克隆抗体、Flu ANP/BNP和RSV ANP单克隆抗体等。可以表达并融合至目的抗体的蛋白质试剂可以包括,例如,包括酶、荧光蛋白、共价样附着试剂、接头试剂等。融合抗体提供改进的功能以及降低的生产成本。这是通过重组表达带有与抗体融合的标签的蛋白质试剂来实现的,这样就不需要额外的步骤或努力来缀合检测试剂,从而无需进行后纯化处理。这避免了通常的抗体损失,也避免了将单克隆抗体暴露在苛刻的偶联条件下的需要。

[0008] 在一个实施方式中,描述了一种具有高亲和力和特异性的单克隆抗体(Mab)融合物,其与一个或多个融合标签缀合(例如,表达)。例如,这些融合物可用作诊断测定中的试剂,例如即时(POC)快速免疫测定和用于体外诊断(IVD)测试的ELISA。在一个实施方式中,基于免疫荧光的侧向流免疫测定包括一种或多种本文所述的抗体融合物。

[0009] 本公开进一步涉及核酸。核酸可以存在于全细胞中、细胞裂解物中或以部分纯化或基本上纯的形式存在。当通过标准技术(包括碱/SDS处理、CsCl带、柱层析、琼脂糖)从其他细胞成分或其他污染物(例如其他细胞核酸或蛋白质)中纯化时,核酸是“分离的”或“呈现基本纯的”凝胶电泳和本领域熟知的其他方法。本公开的核酸组合物,虽然通常在来自cDNA、基因组或其混合物的天然序列(除了修饰的限制性位点等)中,但可以根据标准技术进行突变以提供基因序列。对于编码序列,这些突变,可以根据需要影响氨基酸序列。特别

地,考虑了与天然V、D、J、恒定、开关和本文描述的其他此类序列基本同源或衍生的DNA序列。

[0010] 在又一方面,提供了产生抗体融合物的方法,该方法包括(a)获得目的抗体或其片段的核酸序列,(b)将抗体或其核酸片段的核酸序列可操作地连接至目的标记的核酸序列,(c)将具有目的标记的抗体或其片段作为抗体融合物在宿主细胞中表达,和(d)分离抗体融合物。目的抗体可以包括任何抗体。在一些实施方式中,目的抗体可以选自抗PCT抗体、抗甲状腺TRAb、抗莱姆病VlsE/C6、抗OspC/10和抗DbpA 抗体。应当理解,额外的抗体,例如能够与多种传染病因子结合的那些,可用于毒理学和/或过敏组、过敏组的那些,以及激素抗体(例如,hCG等)都在方法的范围内。目的标记可以是包含荧光素酶的发光标记和/或包含GFP(绿色荧光蛋白)、RFP(红色荧光蛋白)、CFP(青色荧光蛋白)或YFP(黄色荧光蛋白)中的至少一种的荧光标记,和/或磷酸酶标记和/或标签,例如亲和素/生物素或由Promega® Corp.Madison WI出售的HaloTag®系统。

[0011] 应当理解,萤光素酶可以是NLuc(NanoLuc)、RLuc(RetinaLuc)和FLuc(FireflyLuc)中的至少一种。

[0012] 在一个实施方式中,磷酸酶标记包括SEAP(分泌的胚胎碱性磷酸酶)。

[0013] 在另一个实施例中,荧光标记包括GFP(绿色荧光蛋白)、RFP(红色荧光蛋白)、CFP(青色荧光蛋白)或YFP(黄色荧光蛋白)。

[0014] 在另一个实施方式中,目的抗体包括抗PCT抗体或其片段,并且目的标记包括NanoLuc。

[0015] 在又一个实施方式中,目的抗体包括抗PCT抗体或其片段并且目的标记包括SEAP。

[0016] 在又一个实施方式中,目标抗体包含抗甲状腺TRAb或其片段并且目标标记包含NLuc。

[0017] 在又一个实施方式中,目的抗体包括莱姆病VlsE/C6抗体、OspC/10抗体或DbpA 抗体或其片段。

[0018] 在又一个实施方式中,目的抗体包含M22(TSHR-特异性)抗体或其片段,并且目的标记包含包含绿色荧光蛋白(GFP)的荧光蛋白。

[0019] 在另一个实施方式中,目的抗体包括M22(TSHR-特异性)抗体或其片段,并且目的标记包括含有红色荧光蛋白(RFP)的荧光蛋白。

[0020] 在又一个实施方式中,目的抗体包含M22_NLuc或其片段,并且其中所述抗体与包含RPE-抗人IgG或其片段的第二抗体配对。

[0021] 在又一方面,提供抗体融合物,其包含任何抗体或其片段和选自下列的标记:(a)萤光素酶、(b)荧光蛋白和(c)SEAP(分泌的胚胎碱性磷酸酶)。在一些实施方式中,目的抗体选自抗PCT抗体、抗甲状腺TRAb、抗莱姆病VlsE/C6、抗OspC/10 和抗DbpA抗体。

[0022] 在一个实施方式中,目的抗体用融合蛋白标记,例如亲和素或亲和素的一种形式或HaloTag®蛋白,而单克隆抗体将附着的支持物将用生物素或小HaloTag接头标记。一旦单克隆抗体接触,就会形成共价键或新的共价键,确保单克隆抗体牢固连接,而不会暴露于标记试剂。

[0023] 荧光蛋白可以是GFP(绿色荧光蛋白)、RFP(红色荧光蛋白)、CFP(青色荧光蛋白)或

YFP(黄色荧光蛋白)中的至少一种。

[0024] 应当理解,萤光素酶可以是NLuc(NanoLuc)、RLuc(RetinaLuc)和FLuc(FireflyLuc)中的至少一种。

[0025] 在又一方面,提供了用于诊断和/或检测人类受试者中目的疾病或病症的方法。该方法包括:(a)提供包含抗体融合物的免疫测定,其中所述融合物包含标记,(b)使免疫测定与来自受试者的样品接触;(c)检测抗体融合物是否与样品中的靶标结合以确定所述疾病或病症的存在与否。

[0026] 应当理解,标记可以是SEAP,和/或发光和/或荧光标记。发光或荧光标记可选自:萤光素酶、GFP(绿色荧光蛋白)、RFP(红色荧光蛋白)、CFP(青色荧光蛋白)或YFP(黄色荧光蛋白)。

[0027] 在一个实施例中,检测步骤还可以进一步包括侧向流检测。

[0028] 在另一个实施方式中,该方法可以进一步包括诊断测试系统,其中所述诊断测试系统包括具有荧光标记抗体的侧向流免疫测定。

[0029] 应当理解,诊断测试系统可以进一步包括用于记录和显示仪器和用户历史数据的装置。

[0030] 在又一方面,提供了包含编码本文所述抗体融合物的核酸序列的质粒。

[0031] 另一方面,提供了包含这些质粒的载体。

[0032] 在又一方面,提供了包含这些载体的宿主细胞。

[0033] 在又一方面,提供了包含本文所述的抗体融合物的试剂盒。

[0034] 在其他实施方式中,核酸与另一核酸序列有效连接(例如,两种核酸彼此具有功能关系)。例如,如果启动子或增强子影响序列的转录,则它与编码序列可操作地连接。关于转录调控序列,可操作地连接意味着被连接的DNA序列是连续的,并且在需要连接两个蛋白质编码区时,是连续的并且在阅读框中。对于开关序列,可操作地连接表示该序列能够实现开关重组。

[0035] **【发明详述】**

[0036] 应当理解,本公开不限于所描述的特定实施例,并且因此可以变化。在下文中详细描述了本公开的多个不同实施例。这些实施例可以采取许多不同的形式并且不应被解释为限于在此明确阐述的那些实施例。相反,提供这些实施例是为了使本公开彻底和完整,并将本公开的范围充分传达给本领域技术人员。还应理解,本文使用的术语仅用于描述特定实施例的目的,而不是限制性的,因为本发明的范围将仅由所附权利要求限制。

[0037] 本文提及的所有专利、申请、公开的申请和其他出版物均通过引用整体并入。

[0038] 本公开的核酸序列,包括其片段(例如,其编码各种CDR区和/或FR区,如上文提供的),可以使用常规实验室技术和试剂与另一种核酸(例如,空载体)可操作地连接。

[0039] 本发明的核酸分子可以是RNA的形式,例如mRNA、hnRNA、tRNA、pRNA或任何其他形式,或者是DNA的形式,包括但不限于通过克隆获得的cDNA和基因组DNA或合成生产,或其任何组合。DNA可以是三链、双链或单链,或它们的任何组合。DNA或RNA的至少一条链的任何部分可以是编码链,也称为正义链,或者它可以是非编码链,也称为反义链。此外,包含编码抗体的核酸的本发明的核酸分子可以包括但不限于,其本身编码抗体片段的氨基酸序列;整个抗体或其部分的编码序列;抗体、片段或部分的编码序列,以及附加序列,例如至少一

种信号前导肽或融合肽的编码序列,具有或不具有上述附加编码序列,例如至少一个内含子,以及额外的非编码序列,包括但不限于非编码5'和3'序列,例如在转录、mRNA加工(包括剪接和多聚腺苷酸化信号)中起作用的转录的非翻译序列(例如~核糖体结合和mRNA的稳定性);编码额外氨基酸的额外编码序列,例如提供额外功能的氨基酸。因此,可将编码抗体的序列融合至标记序列,例如编码促进包含抗体片段或部分的融合抗体的纯化的肽的序列。

[0040] 本公开提供了包含编码抗体的核酸的载体,优选表达载体,或可用于获得包含各种抗体HC或LC基因或其部分的质粒。如本文所用,术语“载体”是指能够转运与其连接的另一种核酸的核酸分子。一种类型的载体是“质粒”,它是指可以连接额外DNA片段的环状双链DNA环。另一种类型的载体是病毒载体,其中额外的DNA片段可以连接到病毒基因组中。本公开内容还涉及包括本公开内容的分离的核酸分子的载体、用重组载体进行基因工程改造的宿主细胞、以及通过重组技术产生至少一种抗体,如本领域众所周知的。

[0041] 为了表达抗体或其抗体片段,可以将编码部分或全长轻链和重链的DNA插入表达盒或载体中,使得基因可操作地连接到转录和翻译控制序列。可以将编码抗体的盒组装成构建体。可以使用本领域已知的方法制备构建体。该构建体可以作为较大质粒的一部分进行制备。这样的制备允许以有效的方式克隆和选择正确的结构。该构建体可以位于质粒或其他载体上方便的限制性位点之间,以便它们可以很容易地从其余的质粒序列中分离出来。本文所述抗体的轻链和重链可变区可用于产生任何抗体同种型的全长抗体基因,通过将它们插入已经编码所需同种型的重链恒定区和轻链恒定区的表达载体中,使得VH片段可操作地连接到载体内的CH片段,并且VI片段可操作地连接到载体内的CL片段。另外或备选地,重组表达载体可以编码促进抗体链从宿主细胞分泌的信号肽。可以将抗体链基因克隆到载体中,以使信号肽与抗体链基因的氨基末端框内连接。信号肽可以是免疫球蛋白信号肽或异源信号肽(例如,来自非免疫球蛋白的信号肽)。

[0042] 尽管可以在原核或真核宿主细胞中表达本公开的抗体,但在真核细胞,最优选哺乳动物宿主细胞中表达抗体是最优选的,因为这样的真核细胞,特别是哺乳动物细胞,比原核细胞更有可能组装和分泌适当折叠和免疫活性的抗体。

[0043] 通常,哺乳动物表达载体包含(1)调节元件,通常以病毒启动子或增强子序列的形式,并以广泛的宿主和组织范围为特征;(2)“多接头”序列,促进包含抗体编码序列的DNA片段插入质粒载体中;(3)负责mRNA转录本内含子剪接和多腺苷酸化的序列。启动子-多接头-多腺苷酸化位点的这个连续区域通常称为转录单元。该载体可能还包含(4)选择标记基因(例如, β -内酰胺酶基因),通常赋予对抗生素(如氨苄青霉素)的抗性,允许在大肠埃希氏菌(*E. coli*)中选择初始阳性转化体;(5)促进载体在细菌和哺乳动物宿主中复制的序列。

[0044] 或者,编码抗体序列的核酸可以在含有整合到染色体中的基因的的稳定细胞系中表达。与选择标记如DHFR、GPT、新霉素或潮霉素的共转染允许鉴定和分离表达大量编码抗体的转染细胞。

[0045] 合适的诱导型非融合大肠埃希氏菌(*E. coli*)表达载体的例子包括pTrc和pET11d。用于在酿酒酵母中表达的载体的例子包括pYepSec1、pMFa、pJRY88、pYES2和pPicZ(Invitrogen Corp, San Diego, CA, USA)。可用于在培养的昆虫细胞(例如,Sf 9或Hi5细胞)中表达蛋白质的杆状病毒载体的例子包括pOET、pTriEx、pIEx、pBAC、pBacPAK和BD pVL

和pAc载体家族(Expression Systems LLC,Davis,加利福尼亚州,美国)。

[0046] 在又一个实施方式中,本公开的核酸使用哺乳动物表达载体在哺乳动物细胞中表达。哺乳动物表达载体的例子包括pCDM8(Seed等,Nature,329:840,1987)和 pMT2PC(Kaufman等,EMBO J.,6:187-195,1987)。优选地,重组哺乳动物表达载体能够指导核酸的表达,优选在特定细胞类型中,例如淋巴瘤细胞(例如,小鼠骨髓瘤细胞)。在特定细胞类型中,组织特异性调节元件用于表达核酸。组织特异性调节元件是本领域已知的。

[0047] 本公开进一步提供了一种重组表达载体,其包含以反义方向克隆到表达载体中的DNA分子。也就是说,DNA分子以允许表达(通过DNA分子的转录)与编码多肽的mRNA 反义的RNA分子的方式与调节序列有效连接。反义表达载体可以是重组质粒、噬菌粒或减毒病毒的形式,其中反义核酸在高效调控区的控制下产生,其活性可以通过所导入了载体的细胞类型来确定。参见Weintraub等,Reviews-Trends in Genetics, 1,1986。

[0048] 在一些实施方式中,编码本公开内容的结合剂(例如抗体)的核酸被转染到哺乳动物细胞中,例如CHO细胞、骨髓瘤细胞、HEK293细胞、BHK细胞(BHK21、ATCC CRL-10)、小鼠Ltk细胞、COS细胞和NIH3T3细胞已经常用于异源基因的稳定表达。在产生本公开的抗体的取代方法中,非人动物,其中动物的一个或多个,优选基本上所有的细胞含有通过人为干预引入的异源核酸、转基因、编码抗体。转基因可以直接或间接地引入细胞中,通过引入细胞的前体,通过有意的遗传操作,例如通过显微注射或通过重组病毒感染。产生非人类转基因哺乳动物的方法是本领域已知的。参见,例如,但不限于,美国专利第5,827,690;5,849,992;4,873,316;5,849,992; 5,994,616;5,565,362;和5,304,489号。这样的方法可以包括将DNA构建体引入哺乳动物的种系以制备转基因哺乳动物。使用体细胞产生转基因动物的方法描述于美国专利第6,147,276号;Baguisi等Nature Biotech.,17,456-461,1999; Campbell等,Nature,380,64-66,1996;Cibelli等,Science,280,1256-8, 1998;Kato等,Science,282,2095-2098,1998;Schnieke等,Science,278, 2130-2133,1997;Wakayama等,Nature,394,369-374,1998。

[0049] 可以使用在乳腺上皮细胞中优先活化的启动子,包括控制编码乳蛋白例如酪蛋白的基因的启动子,在动物的乳腺中产生抗体(参见,Clark等,Bio Technology,7: 487-492,1989;Gordon等Bio Technology,5:1183-1187,1987)。本公开的结合剂(例如抗体)可以另外使用至少一种抗体编码核酸产生以提供转基因植物和培养的植物细胞(例如烟草、玉米和浮萍)(参见Cramer等,Curr.Top.Microbol. Immun.,240:95-118,1999)。

[0050] 本公开内容的核酸也可以通过已知方法直接化学合成来制备,例如,美国专利No. 5,942,609;6,521,427;6,586,211和6,670,127。

[0051] 一旦制备,抗体融合物可以通过众所周知的方法从重组细胞培养物中回收和纯化,包括但不限于蛋白A纯化、硫酸铵或乙醇沉淀、酸提取、阴离子或阳离子交换层析、磷酸纤维素层析、疏水相互作用层析、亲和层析(例如使用蛋白A柱)、羟基磷灰石层析、凝集素层析、HPLC等。本公开的抗体包括天然纯化的产物、化学合成程序的产物和通过重组技术从真核宿主产生的产物,真核宿主包括例如酵母、高等植物、昆虫和哺乳动物细胞。取决于重组生产程序中使用的宿主,本公开的抗体可以是糖基化的或可以是非糖基化的,优选糖基化的。

[0052] 本公开的抗体中对于功能(例如结合)重要的氨基酸可以通过本领域已知的方法

来鉴定,例如定点诱变或丙氨酸扫描诱变(例如,Ausubel,Current Protocols (2002), Chapter 8,15,supra;Cunningham等,Science 244:1081-1085,1989)。Cunningham的程序在分子中的每个残基处引入了单个丙氨酸突变。然后测试所得突变分子的生物活性,例如结合活性。对抗体结合重要的位点也可以通过结构分析来鉴定,例如结晶、核磁共振或光亲和标记(Smith等,J.Mol.Biol.,224:899-904,1992和Vos等,科学255:306-312,1992)。

[0053] 【抗体融合的产生】

[0054] 本公开的抗体融合物可以任选地通过多种技术产生。抗体本身可以任选地通过杂交瘤技术产生,或例如免疫能够产生如本文所述的人抗体库的转基因动物(例如,小鼠、大鼠、仓鼠、非人灵长类动物等)。

[0055] 使用在其种系构型中携带人免疫球蛋白(Ig)基因座的转基因小鼠提供了针对各种靶标的高亲和力全人源单克隆抗体的分离,这些靶标包括正常人免疫系统耐受的人自身抗原(参见Lonberg等,Nature,368,856-9,1994;Green等,Nature Genet.,7,13-21,1994;Green等,Exp.Med.,188:483-95,1988;Lonberg等,Int.Rev.Immunol.,13:65-93,1995;Bruggemann等,Eur.J.Immunol.,21,1323-1326,1991;Fishwild等,Nat.Biotechnol.,14:845-851,1996;Mendez等,Nat.Genet.,15:146-156,1997;Green等,J.Immunol.Methods 231:11-23,1999;Yang等,Cancer Res.59:1236-1243,1999;Bruggemann等,Curr.Opin.Biotechnol.8:455-458,1997;和美国专利号5,569,825;6,300,129;6,713,610;7,041,870)。这种小鼠中的内源性免疫球蛋白基因座可以被破坏或删除,以消除动物产生由内源性基因编码的抗体的能力。此外,Codexis,Inc.(Redwood City,CA,USA)和Creative Biolabs,Inc.(Shirley,NY,USA)等公司可参与使用上述技术提供针对选定抗原的人抗体。

[0056] 免疫原性抗原的制备和单克隆抗体的生产可以使用任何合适的技术例如重组方法进行。免疫原性抗原可以以纯化形式或合成形式施用于动物。实施例中描述了至少两种形式。

[0057] 用抗原免疫可以任选地伴随着佐剂的添加,例如完全弗氏佐剂。免疫反应可以在免疫方案的过程中监测,血浆样品是通过眶后取血获得的。血浆可通过ELISA筛选(如下所述),具有足够滴度免疫球蛋白的动物,例如兔或小鼠可用于融合。动物可以在处死和摘除脾脏前3天用抗原静脉内加强免疫。在一些实施方式中,可以进行多个(例如,2、3、4或更多个)抗原融合。可以针对每种抗原免疫几只动物。

[0058] 为了产生产生单克隆抗体的杂交瘤,可以将来自免疫动物的脾细胞和淋巴结细胞分离并融合到合适的永生化细胞系,例如小鼠骨髓瘤细胞系。可以筛选得到的杂交瘤以产生抗原特异性抗体。

[0059] 选择不能产生免疫球蛋白链的合适的永生细胞系作为融合伴侣,例如骨髓瘤细胞系,例如但不限于Sp2/0和衍生细胞系、NS1和衍生物,尤其是NSO工程化的NSO线如GS-NSO、AE-1、L.5、P3X63Ag8.653、U937、MLA 144、ACT IV、MOLT4、DA-1、JURKAT、WEHI、K-562、COS、RAJI、NIH 3T3、HL-60、MLA 144、NAMAIWA、NEURO 2A、CHO、PerC.6、YB2/0等,或异种骨髓瘤、其融合产物,或衍生自其的任何细胞或融合细胞,或如本文中已知的任何其他合适的细胞系(Birch等,Biologics 22:127-133,1994)。融合细胞(杂交瘤)或重组细胞可以使用选择性培养条件或其他合适的已知方法分离,并通过有限稀释或细胞分选或其他已知方法进行克隆。产生具有所需特异性的抗体的细胞可以通过合适的测定法(例如ELISA)检测并选择

用于操作。

[0060] 可以使用产生或分离具有所需特异性的抗体的其他合适方法,包括但不限于,从肽或蛋白库(例如,但不限于,噬菌体,核糖体,寡核苷酸,RNA,cDNA,等展示文库(例如可获自Cambridge antibody Technologies,Cambridgeshire,UK; **Morphosys**[®],Martinsreid, Germany; Biovation, Aberdeen, Scotland, UK; BioInvent, Lund, Sweden; Dyax Corp., Enzon, Affymax/Biosite; Xoma, Berkeley, CA, USA的)(例如,美国专利号5,885,793;5,969,108;5,994,519; 6,017,732;6,248,516)或能产生如本领域已知的和/或如本文所述的人抗体库的随机产生的肽或蛋白(美国专利号5,723,323;5,763,192;5,814,476;5,817,483; 5,824,514;5,976,862)选择重组抗体的方法。此类技术包括但不限于核糖体展示(Hanes等,PNAS USA,94:4937-4942,1997;Hanes等,PNAS USA,95:14130-1413, 1998);单细胞抗体生产技术(例如,选择淋巴细胞抗体法(“SLAM”) (美国专利号 5,627,052;Wen等, J. Immunol.,17:887-892,1987;Babcook等,PNAS USA, 93:7843-7848,1996);凝胶微滴和流式细胞术(Powell et al.,Biotechnol., 8:333-337,1990;One Cell Systems, Cambridge,MA,USA;Gray et al.,J. Imm.Meth.,182:155-163,1995;Kenny等,Bio Technol.,13:787-790,1995); B细胞选择(Steenbakkers等,Molec.Biol.Reports,19:125-134,1994;Jonak 等,Progress Biotech.,Vol.5,Invitro Immunization in Hybridoma Technology,Borrebaeck,ed.,Elsevier,Amsterdam,Netherlands,1988)。

[0061] 还包括试剂盒,其包含如前述或以下段落中提供的抗体或其抗原结合片段和使用该试剂盒的说明,例如用于诊断疾病、病症、感染或病症。

[0062] 还可以使用肽展示文库方便地实现对特异性结合相似蛋白质或片段的抗体的筛选。该方法涉及为具有所需功能或结构的单个成员筛选大量肽。使用肽展示文库进行抗体筛选是本领域众所周知的。展示的肽序列的长度可以是3~5000个或更多氨基酸,通常是5~100个氨基酸长,通常是约8~25个氨基酸长。肽展示文库、载体和筛选试剂盒可从Invitrogen(Carlsbad,CA,USA)和Cambridge Antibody Technologies(Cambridgeshire, UK)等供应商商购。见,美国专利第5,885,793号。还参见,例如,Enzon patents(美国专利号4,704,692;4,939,666;4,946,778; 5,260,203;5,455,030;5,518,889;5,534,621;5,656,730;5,763,733; 5,767,260;和5,856,456);Dyax专利(美国专利号5,223,409;5,403,484;5,571,698;和5,837,500);Affymax专利(美国专利号5,427,908;5,580,717); Genentech专利(美国专利号5,750,373);和Xoma专利(美国专利号5,618,920; 5,595,898;5,576,195;5,698,435;和5,693,493;5,698,417)。

[0063] 【抗体片段】

[0064] 抗体片段可以通过完整抗体的蛋白水解消化获得(参见,例如,Morimoto等,J Biochem Biophys Methods,24:107-117,1992;和Brennan等,Science,229:81, 1985)。然而,这些片段现在可以由重组宿主细胞直接产生。F(ab')₂、Fab、Fv 和ScFv抗体片段都可以在哺乳动物宿主细胞或大肠埃希氏菌(E.coli)中表达和分泌,因此可以轻松生产大量这些片段。抗体片段可以从上述抗体噬菌体文库中分离出来。或者,Fab'-SH片段可以直接从大肠埃希氏菌(E.coli)中回收并化学偶联形成F(ab')₂片段(Carter等,BioTechnology 10:163-167,1992)。

[0065] 优选地,抗体片段的重组生产使用单链表达多核苷酸进行。该表达多核苷酸包含:

(1) 由可操作地连接以编码单链抗体的VH结构域、间隔肽和VL结构域组成的单链抗体盒，(2) 适用于体外转录的启动子(例如，T7启动子、SP6启动子等)可操作地连接以确保单链抗体盒的体外转录形成编码单链抗体的mRNA，和(3) 适合在体外转录反应中起作用的转录终止序列。任选地，表达多核苷酸还可以包含复制起点和/或选择标记。合适的表达多核苷酸的一个例子是pLM166。为了获得用于克隆的VH和VL序列，可以使用通过使用V基因家族特异性引物或V基因特异性引物的PCR扩增产生的VH和VL序列文库(Nicholls等，J.Immunol.Meth.，165:81,1993; WO 1993/12227)或基于可用的序列信息根据本领域已知的标准方法设计。通常，小鼠或人VH和VL序列是分离的。然后将VH和VL序列连接起来，通常带有插入的间隔序列(例如，编码框内柔性肽间隔)，形成编码单链抗体的盒。通常，使用包含多个VH和VL序列的文库(有时还具有代表的多个间隔肽种类)，其中所述文库是用一种或多种VH和VL序列构建的，该序列被突变以增加序列多样性，特别是在CDR残基处，有时在框架残基处。V区序列可以方便地克隆为免疫球蛋白表达细胞的cDNA或PCR扩增产物。例如，来自人杂交瘤或淋巴瘤或合成细胞表面或分泌的免疫球蛋白的其他细胞系的细胞可用于分离多聚A+RNA。然后使用逆转录酶将RNA用于合成寡dT引发的cDNA(参见Goodspeed等，Gene,76:1,1989;Dunn等，J.Biol.Chem.，264:13057,1989)。一旦分离出V区cDNA或PCR产物，将其克隆到载体中以形成单链抗体盒。

[0066] 在一些实施方式中，本公开的抗体或其抗原结合片段可以使用本领域已知的常规方法通过体外(例如，无细胞)合成来制备。可以使用各种合成仪器，例如美国加利福尼亚州福斯特市的Applied Biosystems, Inc.的自动合成仪。通过使用合成器，天然存在的氨基酸可以被非天然氨基酸取代。具体的制备顺序和方式将由便利性、经济性、所需纯度等决定。

[0067] 在一些实施方式中，本公开的工程化抗体分子可以包含肽序列，例如，引导抗体或其片段运输至细胞外环境、质膜(外膜、跨膜或内膜)，或细胞中的特殊区室，例如内体、溶酶体、内质网、高尔基体、液泡、包涵体、核仁、线粒体、叶绿体、周质等的N端信号序列。

[0068] 一旦分离，可以将DNA置于表达载体中，然后将其转染到宿主细胞中，例如大肠埃希氏菌(E.coli)细胞、猿COS细胞、中国仓鼠卵巢(CHO)细胞或不产生抗体的骨髓瘤细胞蛋白质，以获得在重组宿主细胞中合成单克隆抗体。关于在细菌中重组表达编码抗体的DNA的评论文章包括Skerra等，Curr.Opinion in Immunol.，5, 256-262,1993and Plückthun等，Immunol.Revs.，130:151-188,1992。

[0069] DNA或RNA扩增的已知方法包括但不限于聚合酶链式反应(PCR)和相关的扩增过程。PCR和其他体外扩增方法也可以是有用的，例如，克隆编码要表达的蛋白质的核酸序列，制造核酸用作探针以检测样品中所需mRNA的存在，对于核酸排序，或用于其他目的。足以指导本领域技术人员通过体外扩增方法的技术示例见于美国专利第4,683,202号。用于基因组PCR扩增的市售试剂盒是本领域已知的。例如，参见 Advantage-GC Genomic PCR Kit(Clontech)。此外，例如，T4基因32蛋白(Boehringer Mannheim)可用于提高长PCR产物的产量。

[0070] 本公开的分离的核酸组合物，例如RNA、cDNA、基因组DNA或其任何组合，可以使用本领域技术人员已知的任何数量的克隆方法从生物来源获得。在一些实施方式中，在严格条件下与本公开的多核苷酸选择性杂交的寡核苷酸探针用于鉴定cDNA或基因组DNA文库中的所需序列。RNA的分离以及cDNA和基因组文库的构建对于本领域普通技术人员来说是众

所周知的。

[0071] 在一些实施方式中,可以沿抗体编码序列的全部或部分随机引入突变,例如通过饱和诱变或通过重组,并且可以筛选所得修饰抗体的结合活性。

[0072] 已知抗体恒定区的添加、去除或修饰在治疗性施用的抗体的生物利用度、分布和半衰期中起特别重要的作用。由抗体的Fc或恒定区编码的抗体类别和亚类,当存在时,会赋予重要的附加特性。因此,具有重新配置、重新设计或以其他方式改变的恒定结构域的抗体包括在本公开的抗体组合物中。

[0073] 本公开进一步涉及包含至少一种抗体融合物和载体的组合物。优选地,所述组合物是包含至少一种抗体融合物和药学上可接受的载体的药物组合物。组合物还可包含任何合适的助剂中的至少一种,例如但不限于稀释剂、粘合剂、稳定剂、缓冲剂、盐、亲脂性溶剂、防腐剂、佐剂等。优选药学上可接受的助剂。制备此类无菌溶液的非限制性实例和方法是本领域众所周知的,例如但不限于Remington's Pharmaceutical Sciences, Gennaro等, Ed., 18th版, Mack Publishing Co., Easton, PA, USA (1990年)。可以常规选择药学上可接受的载体,其适用于本领域熟知的或如本文所述的抗体、片段或变体组合物的给药方式、溶解度和/或稳定性。

[0074] 本公开进一步涉及含有抗体融合物和缓冲组分以及任选地稳定剂或防腐剂的稳定剂,以及适用于研究、诊断和/或医学用途的多用途制剂。抗体组合物可以包括缓冲剂或pH调节剂;通常,缓冲剂是由有机酸或碱制备的盐。代表性的缓冲剂包括有机酸盐,例如柠檬酸盐、抗坏血酸、葡糖酸、碳酸、酒石酸、琥珀酸、乙酸或邻苯二甲酸盐; TRIS、盐酸氨基丁三醇或磷酸盐缓冲液。用于本发明组合物的优选缓冲剂是氨基酸或有机酸盐如柠檬酸盐。具有缓冲能力的代表性氨基酸/抗体成分包括丙氨酸、甘氨酸、精氨酸、甜菜碱、组氨酸、谷氨酸、天冬氨酸、半胱氨酸、赖氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、缬氨酸、蛋氨酸、苯丙氨酸、阿斯巴甜等。一种优选的氨基酸是甘氨酸。制剂可以覆盖宽范围的pH,例如约pH 4至约pH 10,优选约pH 5至约pH 9,最优选约6.0至约8.0的范围。优选地,本公开的制剂具有约6.8至约7.8的pH。

[0075] 本公开的实施方式进一步提供了包含上述抗体或抗原组合物的表面,其中所述抗体或抗原被定向以允许与配偶体结合。优选地,该表面是固体支持物的表面。本领域技术人员已知许多不同的固体支持物,包括但不限于硝酸纤维素、反应盘的孔壁、多孔板、试管、聚苯乙烯珠、磁珠、膜和微粒(例如乳胶颗粒)。硝酸纤维素、尼龙和其他微孔结构是有用的,在水合状态下具有凝胶结构的材料也是如此。有用的固体支持物的其他例子包括天然聚合碳水化合物及其合成改性、交联或取代的衍生物,例如琼脂、琼脂糖、交联的海藻酸、取代和交联的瓜尔胶、纤维素酯,尤其是与硝酸和羧酸的纤维素酯、混合纤维素酯和纤维素醚;含氮的天然聚合物,例如蛋白质和衍生物,包括交联或改性明胶;天然烃类聚合物,如乳胶和橡胶;可以制备具有适当多孔结构的合成聚合物,例如乙烯基聚合物等。

[0076] 优选地,支持物是阵列板的孔,例如微阵列如蛋白质阵列或抗体阵列。构建此类阵列的方法是本领域已知的。

[0077] 有许多固体支持物可用于本公开的方法和试剂盒。可以使用的众所周知的材料包括玻璃、聚苯乙烯、聚丙烯、葡聚糖、尼龙、琼脂糖、葡聚糖、丙烯酰胺、硝化纤维素、PVDF和其他材料,其形式为由这些材料形成或涂覆的管、珠、膜和微量滴定板等。本公开的分离和纯

化的重组多肽和/或抗体可以通过诸如经由酰胺、酯或二硫键的共价键合或通过吸附的技术共价或物理结合至固体支持物。这种结合或固定可以通过使用例如通过固相支持物和抗体之间的酰胺、酯或二硫键的共价键合来实现(例如,通过Fc结构域)或抗原的表位。活性接头,例如亲和素和/或生物素,或HaloTag®(其包括融合蛋白和小标签(大小与生物素相似的非蛋白分子))也可以根据本发明使用。如果当抗原/抗体与GST融合时,融合多肽优选以这样的方式固定,即它通过在其表面上呈递谷胱甘肽的固相支持物与多肽的GST部分之间的二硫键在固相支持物上对齐。目前优选用作固体支持物的是由聚苯乙烯制成的微量滴定板,其可从各种商业供应商如NUNC、Costar或Greiner获得。

[0078] 在检测和/或定量抗原的方法在固体支持物上进行的情况下,通常,固体支持物用分离和纯化的重组抗体或其抗原结合片段包被。可以通过使用本领域技术人员已知的包被缓冲液如PBS缓冲液或碳酸盐缓冲液来进行包被。这样的包被缓冲液以及已经包被的固体支持物可以作为试剂被包括在本公开的试剂盒中。在用于执行本公开的上述方法的优选模式中,重要的是使用某些“阻断剂”,其也可以作为试剂包括在本公开的试剂盒中。添加“阻断剂”以确保非特异性蛋白质、蛋白酶、与抗原肽特异性结合的抗体或抗体不会交联或破坏固体支持物上的抗原或抗体,或放射性标记的指示抗原或抗体,从而产生假阳性或假阴性结果。可以使用的常用阻断剂是牛血清白蛋白(BSA),这是优选的。阻断剂可以添加到缓冲溶液中,如PBS缓冲液。在使用固体支持物的情况下,通常在涂布固体支持物后添加阻断剂。

[0079] 本公开进一步涉及包含本公开的免疫原的组合物或试剂盒。除了免疫原之外,该组合物可以包含一种或多种:盐;增溶剂;去污剂,例如非离子去污剂,例如TWEEN-20等;蛋白酶抑制剂;甘油;等。

[0080] 包含免疫原的组合物可以包括缓冲剂,其根据肽的所需用途进行选择,并且还可以包括适合于预期用途的其他物质。本领域技术人员可以容易地选择合适的缓冲液,其种类繁多是已知的。

[0081] 在一些实施方式中,包含免疫原的组合物是诊断组合物。根据本公开的诊断组合物可以例如用于通常的免疫测定中,其中组合物的至少一种肽与本公开的抗体(作为对照)反应。如上所述,本公开内容不仅涵盖诊断组合物,而且尤其涵盖其中组合物用作抗原物质的免疫测定方法。对于异源测定,免疫原可以与固体支持物连接。与测定的形式无关,可以使用由至少一种免疫原组成的示踪复合物,该示踪复合物直接或通过接头连接到标记,例如荧光或发光分子。此类试剂在SPR测定中特别有用。

[0082] 示例性接头包括例如甘氨酸接头,例如单一或寡聚甘氨酸(例如,G、GG、GGG等)、甘氨酸聚合物(G)_n(例如,其中n是1至约20的整数);甘氨酸-丝氨酸聚合物(包括例如(GS)_n、(GSGS)_n(SEQ ID NO:1)和(GGGS)_n(SEQ ID NO:2),其中n是1~10之间的整数,例如,1、2、3、4、5、6、7或更多;优选1、2或3)、甘氨酸-丙氨酸聚合物、丙氨酸-丝氨酸聚合物和本领域已知的其他柔性接头。甘氨酸和甘氨酸-丝氨酸聚合物是令人感兴趣的,因为这两种氨基酸都是相对非结构化的,因此可以作为组分之间的中性系链。在一些实施方式中使用甘氨酸聚合物。示例性的柔性接头包括但不限于G、GG、GGG、GGGG(SEQ ID NO:3)、GGGGG(SEQ ID NO:4)、GGS、GGSG(SEQ ID NO:5)、GGSGG(SEQ ID NO:6)、GSGSG(SEQ ID NO:7)、GSGGG(SEQ ID NO:8)、GGGSG(SEQ ID NO:9)、GSSSG(SEQ ID NO:10)等。

[0083] 本公开进一步涉及试剂盒或其他制品,其包含一种或多种免疫原或包含其的组合

物,以及用于配制和/或使用该组合物例如产生抗体的说明。试剂盒或其他制品可包括容器、注射器、小瓶、表面或可用于进行诊断测试(例如,体外或离体)的任何其他制品、装置或设备。诊断测试也可以在体内进行。合适的容器包括,例如,瓶子、小瓶、注射器(例如,预填充注射器)、安瓿、药筒、储液器、泵或冻干给药器。容器可以由多种材料制成,例如玻璃或塑料。

[0084] 用于制造多肽的组合物和/或试剂盒可以包括全细胞和载体,例如缓冲液。本公开的实施方式还提供了包含上述组合物和/或试剂盒的系统,例如诊断系统或免疫单采系统。

[0085] 本公开内容进一步包括编码本公开内容的肽聚糖免疫原的肽组分的核酸,包括包含所述核酸的载体,以及包含此类核酸和/或载体的细胞。

[0086] 本公开尤其涉及检测诊断疾病或病症的抗原。本公开提供了用于诊断此类疾病的特异性和灵敏的测定,从而为患者的临床评估提供了清晰性。

[0087] 本公开的一个方面是一种用于检测和/或诊断受试者中的疾病或病症的方法,该受试者怀疑具有针对疾病或病症的病原体的抗体。该诊断方法可用于诊断表现出或怀疑患有该疾病或病症的临床症状的对象。在本公开的另一个方面,提供了一种用于检测受试者的疾病或病症的方法,其包括使用本公开的一种或多种抗体融合物检测所需抗原。

[0088] 优选地,本公开提供了一种用于诊断受试者的疾病或病症的方法,包括测量受试者的体液中是否存在目的抗原,其中受试者中抗原的水平高于相应的抗体水平在对照(例如已知未受影响的受试者)中的“标记”表示被病原体感染和/或受试者患有疾病或病症。

[0089] 该方法的一个实施方式包括将来自待诊断对象(怀疑患有疾病或病症的对象)的生物流体(例如尿液、血清、全血或CSF)样品与包含本公开的抗体融合物的诊断试剂接触(温育、反应)。在存在对感染的抗体反应的情况下,形成抗原-抗体复合物。随后分析反应混合物以确定该抗原-抗体复合物的存在或不存在。各种常规的测定形式可用于检测,例如ELISA、微阵列分析、基于Luminex珠的测定或侧向流方法。抗体-肽复合物量升高的存在表明受试者暴露于病原体并被病原体感染。在本公开的任何检测测定中,阳性反应定义为1.5、2、3、4或更多的值,例如,比一组健康对照的平均值大5个标准差。出于初步筛选的目的,阳性反应定义为与对照(例如,健康受试者)相比,诊断试剂的平均结合有统计学意义的差异。统计显著性可以使用常规统计测试来确定。

[0090] 本公开的一个实施方式是一种诊断性免疫测定方法,其包括(1)采集可能含有免疫原或其抗体的体液或组织的样品;(2)在有效形成特异性抗体-抗原复合物的条件下,使样品与本公开的抗体或本公开的肽接触,例如,使样品与本公开的抗体反应或温育(或样品和免疫原反应或温育);(3)测定接触(反应)样品中抗体-抗原复合物的存在(例如,确定抗体-肽复合物的量)。

[0091] 使肽和抗体反应以使其特异性反应的条件是本领域技术人员熟知的。参见,例如,Current Protocols in Immunology, Coligan等,Eds., John Wiley&Sons, Inc., NY (2003)或本文的示例。

[0092] 样品优选地容易获得并且可以是源自静脉血样品或甚至源自手指刺破的血清或血浆。已知来自其他身体部位或其他体液的组织,例如脑脊髓液(CSF)、唾液(口腔液)、痰液、痰液、鼻涕、粘液、泪液、分泌物等含有抗原(或其抗体)并且可以用作样品的来源。

[0093] 一旦允许分析物和探针在合适的介质中反应,就进行测定以确定抗体-肽反应的

存在与否。在许多类型的对于熟练的技术人员来说是显而易见的合适的测定是 ELISA、免疫沉淀和凝集测定。

[0094] 使用抗原检测特异性抗体的免疫测定方案是本领域众所周知的。例如,可以使用传统的夹心测定,或者可以使用传统的竞争测定形式。对于一些合适的分析类型的讨论,参见Current Protocols in Immunology,同上)。在优选的测定中,在添加包含或据信含有抗原的样品(例如,或其变体)之前或之后,本公开的抗体通过共价或非共价结合固定在固体或半固体表面或载体上。

[0095] 用于进行特异性结合测定,尤其是免疫测定的装置是已知的并且可以容易地适用于本方法。通常,固相测定比需要分离步骤(例如沉淀、离心、过滤、色谱或磁力)的异相测定方法更容易执行,因为试剂的分离更快更简单。固相测定装置包括微量滴定板、流通测定装置、试纸和免疫毛细管或免疫层析免疫测定装置。

[0096] 在本公开的实施例中,固体或半固体表面或载体是微量滴定孔中的底板或壁;过滤器表面或膜(例如硝酸纤维素膜或PVDF(聚偏二氟乙烯)膜,例如Immobilon膜);中空纤维;珠状色谱介质(例如琼脂糖或聚丙烯酰胺凝胶);磁珠;纤维状纤维素基质;HPLC基质;FPLC基质;分子大小使得与肽结合的分子在溶解或分散在液相中时可以通过过滤器保留的物质;能够形成胶束或参与胶束形成的物质,允许液相改变或交换而不夹带胶束;水溶性聚合物;或任何其他合适的载体、支撑物或表面。

[0097] 在本公开的实施方式中,检测程序包括肉眼检查抗体-肽复合物的颜色变化,或检查抗体-肽复合物的物理-化学变化。氧化反应或其他化学反应可能会发生物理化学变化。它们可以通过肉眼、使用分光光度计等来检测。

[0098] 在该方法的一个实施例中,将探针电印迹或点印迹到硝酸纤维素纸上。随后,将生物流体(例如,血清或血浆)与印迹探针一起温育,并允许生物流体中的分析物与探针结合。然后可以检测结合的复合物,例如通过标准免疫酶方法。在该方法的另一个实施方式中,将胶乳或聚苯乙烯珠结合到探针上并且将生物流体与珠/探针结合物一起温育,从而形成反应混合物。然后分析反应混合物以确定分析物的存在。

[0099] 用于筛选血液制品或其他生理或生物流体的一种测定是ELISA。通常在ELISA中,本公开的探针直接或通过捕获基质吸附到微量滴定孔的表面。然后用适当的试剂封闭表面上残留的非特异性蛋白质结合位点,例如BSA、热灭活的正常山羊血清(NGS)或BLOTTO(脱脂奶粉的缓冲溶液)。然后将孔与怀疑含有致病分析物的生物样品一起温育。样品可以整齐地应用,或者更常见的是可以稀释,通常在含有少量(0.1~5.0%重量)蛋白质(例如BSA、NGS或BLOTTO)的缓冲溶液中。在温育足够长的时间以允许发生特异性结合后,洗涤孔以去除未结合的分析物,然后与最佳浓度的适当的通过标准程序与酶或其他标记结合并溶解在封闭缓冲液中的抗免疫球蛋白抗体(例如,对于人类受试者,来自另一动物如狗、小鼠、牛、等的抗-人免疫球蛋白(ctHuIg))温育。标记可选自多种酶,包括辣根过氧化物酶(HRP)、 β -半乳糖苷酶、碱性磷酸酶、葡萄糖氧化酶等。允许有足够的时间再次发生特异性结合,然后再次洗涤孔以去除未结合的缀合物,并添加适合酶的底物。允许显色并且孔中内容物的光密度通过目测或仪器测定(在适当的波长下测量)。

[0100] 另一种有用的测定形式是侧向流形式。人或动物抗体或葡萄球菌A或G蛋白抗体的抗体用信号发生器或报告分子(即胶体金)标记,将其干燥并放置在玻璃纤维垫(样品应用

垫)上。诊断探针固定在膜上,例如PVDF(聚偏二氟乙烯)膜(例如IMMOBILON膜(Millipore))或硝酸纤维素膜。当将样品溶液(血液、血清等)应用到样品应用垫时,它会溶解胶体金标记的报告分子,并与样品中的所有分析物结合。该混合物通过毛细作用被输送到下一层膜(PVDF或含有诊断探针的硝酸纤维素膜)中。如果样品中存在分析物,它们与膜上条纹的探针结合,产生信号。可使用对胶体金标记的抗体(如山羊抗小鼠IgG)特异的附加抗体来产生对照信号。

【附图说明】

[0101] 图1显示了Nanoluc®萤光素酶标记系统的示意图。

[0102] 图2显示了M22_NLuc_His标签抗体蛋白测试,使用Ni-NTA柱对纯化蛋白进行SDS-PAGE分析。

[0103] 图3A显示了以Furimazine作为底物的M22_NLuc酶滴定和发光活性。

[0104] 图3B显示了基于L1-10的ELISA测定结果,其中M22_NLuc滴定曲线在30分钟测定中。

[0105] 图4显示了在具有M22_NLuc滴定曲线的SA微板上基于L1-10的ELISA测定结果。

[0106] 图5显示了基于L1-10的ELISA测定在SA珠上的结果(M22_NLuc滴定曲线)。

[0107] 图6显示了使用抗-MBP或抗-StrepMab)RAM包被的ELISA对L1-10的M22_NLuc 抗体剂量应答。

[0108] 图7显示了使用 α -MBP作为捕获物的基于L1-10的ELISA测定的结果(M22_NLuc 滴定曲线)。

[0109] 图8显示了M22_Luc在120ng/ml和40ng/ml下的M22剂量应答。结果在RLU 中列出。

[0110] 图9显示了M22_Luc在30ng/ml和10ng/ml下的M22剂量应答。结果在RLU 中列出。

[0111] 图10显示了通过Ni-NTA柱对纯化蛋白质的SDS-PAGE分析。蛋白质表征结果表明,L1-10融合蛋白在还原和非还原SDS-PAGE上均纯化为92kDa,这与预期一致。纯化的蛋白质在HPLC上也显示为一个主要的主峰。

[0112] 图11显示了L110_NLuc酶滴定-发光活性。

[0113] 图12显示了基于M22的ELISA测定-L1-10_NLuc滴定曲线。

[0114] 图13显示了L1-10_NLuc 1步ELISA试验-M22剂量应答曲线。

[0115] 图14A显示了L1-10_NLuc (200ng/ml) ELISA中的M22剂量应答。

[0116] 图14B显示了L1-10_NLuc (100ng/ml) ELISA中的M22剂量应答。

[0117] 图15显示了M22重链(HC)和轻链(LC)的氨基酸序列、G3S接头的氨基酸序列以及GFP蛋白和His标签的氨基酸序列。

[0118] 图16是用于使用M22-GFP_Fab融合物对TSHR进行细胞表面荧光检测的示意图的图解表示。

[0119] 图17显示了M22-GFP Fab蛋白表达和纯化结果,通过使用Ni-NTA柱对纯化蛋白进行SDS-PAGE分析得到。

[0120] 图18给出了M22+二级单克隆抗体结果的直方图(测量为每个细胞的荧光)以及M22抗体的剂量应答曲线。

[0121] 图19显示了M22-GFP融合荧光强度,每个细胞测量。

[0122] 图20A显示了本技术的抗体融合的示意图,其中抗流感A抗体融合至Halo Tag (Promega) 蛋白标签并缀合至偶联至配体的铂珠。图20B阐述了用本技术的抗体融合物进行的侧向流免疫测定。

[0123] 【定义】

[0124] 如本文所用,单数形式“a”、“an”和“the”包括复数指示物,除非上下文另有明确规定。因此,例如,提及“一种蛋白质”包括多种此类蛋白质,提及“制剂”包括提及本领域技术人员已知的一种或多种制剂及其等价物等。

[0125] 在提供数值范围的情况下,应理解,除非上下文另有明确规定,否则每个中间值至下限单位的十分之一也被具体公开,该范围的上限和下限之间。本公开包括在任何规定值或规定范围内的中间值与该规定范围内的任何其他规定或中间值之间的每个较小范围。这些较小范围的上限和下限可以独立地包括或排除在该范围内,并且其中任一限制或两个限制均不包括在较小范围内的每个范围也包括在本公开内容中,但受制于规定的范围中任何明确排除的限制。在所述范围包括限制之一或两者的情况下,排除那些包括的限制之一或两者的范围也在本公开的范围之内。

[0126] 词语“约”是指该值的正负10%的范围,例如,“约5”是指4.5到5.5,“约100”是指90到100等,除非上下文中披露另有说明,或与此类解释不一致。例如,在诸如“约49、约50、约55”的数值列表中,“约50”表示延伸到小于前值和后值之间的间隔的一半的范围,例如,大于49.5低于52.5。此外,应根据术语“约”的定义来理解短语“小于约”一个值或“大于约”一个值。

[0127] “结合剂”是本文所述抗体的结合片段。例如,结合剂可以是全长抗体(例如,具有完整的可变和恒定(Fc)区或抗体结合片段(例如,Fab、Fab'或F(ab')₂、FV 这些抗体或其片段可以是兔、啮齿动物、人等。结合剂可以是单域抗体,例如结合CWPS 的兔、骆驼或人单VH或VL域。应当理解,结合根据本发明的药剂还可以包括蛋白质、多肽等,其包含一种或多种本文所述的CDR。

[0128] 如本文所用,“基本上”是指足以用于预期目的。因此,术语“基本上”允许相对于绝对或完美状态、尺寸、测量、结果等的微小、微不足道的变化,例如本领域普通技术人员所期望的,但不会明显影响整体性能。当用于数值或可表示为数值的参数或特性时,“基本上”是指在10%以内,或在5%以内或更少,例如在2%以内。

[0129] 如本文所用,术语“多个”可以是2、3、4、5、6、7、8、9、10或更多。

[0130] 如本文所用,“分离的”是指与其天然存在的野生或天然序列分离的核酸序列或多肽序列,或与该序列天然存在的环境不同的环境中的核酸序列或多肽序列。

[0131] “蛋白质”、“多肽”、“寡肽”和“肽”可互换使用,表示至少两个氨基酸通过酰胺键共价连接的聚合物,无论长度或翻译后修饰如何(例如,糖基化、磷酸化、脂化、肉豆蔻化、泛素化等)。该定义包括D-和L-氨基酸,以及D-和L-氨基酸的混合物。

[0132] 术语“序列同一性”是指使用序列比对程序比对的两个或更多个比对序列中的核酸或氨基酸序列同一性。套件,例如BLASTN、BLASTX和TBLASTX、BLASTP和TBLASTN,可在互联网(ncbi.nlm.gov/BLAST/)上公共获得。另见Altschul,SF等,1990 和Altschul,SF等,1997。

[0133] “序列同一性百分比”和“同源性百分比”在本文中可互换使用,指多核苷酸和多肽

之间的比较,并且通过在比较窗口内比较两个最佳比对的序列来确定,其中多核苷酸或多肽序列的所述部分与参考序列(不包括添加或缺失)相比,比较窗口中的“空位”可以包括添加或缺失(即,空位),以实现两个序列的最佳比对。百分比可以通过确定相同核酸碱基或氨基酸残基在两个序列中出现的位置的数量来计算,以产生匹配位置的数量,将匹配位置的数量除以比较窗口中的位置总数,然后将结果乘以100,得到序列同一性的百分比。或者,百分比可以通过确定相同的核酸碱基或氨基酸残基在两个序列中出现或核酸碱基或氨基酸残基与缺口对齐以产生匹配位置的数量来计算,将匹配位置的数量除以比较窗口中的位置总数,然后将结果乘以100,得到序列同一性的百分比。本领域技术人员理解有许多已建立的算法可用于比对两个序列。用于比较的序列的最佳比对可以通过如下算法进行,例如,Smith&Waterman, *Adv. Appl. Math.* 2:482 (1981) 的局部同源算法、Needleman&Wunsch, *J. Mol. Biol.* 48:443 (1970) 的同源比对算法、Pearson&Lipman, *Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA* 85:2444 (1988) 的相似性方法搜索、这些算法的计算机化实施(GCG Wisconsin软件包中的GAP、BESTFIT、FASTA和TFASTA)或目视检查(一般参见 *Current Protocols in Molecular Biology*, F.M. Ausubel等, eds., *Current Protocols*, a joint venture between Greene Publishing Associates, Inc. and John Wiley&Sons, Inc., (1995 Supplement) (Ausubel))。适用于确定百分比序列同一性和序列相似性的算法的例子是BLAST和BLAST 2.0算法,它们在 Altschul等(1990) *J. Mol. 生物学*. 215:403-410和 Altschul等(1977) *Nucleic Acids Res.* 分别为3389-3402。用于执行BLAST分析的软件可通过美国生物技术信息中心网站公开获得。BLAST算法参数W、T和X确定对齐的灵敏度和速度。BLASTN 程序(用于核苷酸序列)默认使用11的字长(W)、10的期望(E)、M=5、N=-4,以及两条链的比较。对于氨基酸序列,BLASTP程序默认使用3的字长(W)、10的期望(E) 和BLOSUM62评分矩阵(参见Henikoff&Henikoff, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:10915 (1989))。

[0134] 虽然所有上述算法和程序都适用于确定序列比对和%序列同一性,但为了本文公开的目的,%序列同一性的确定通常将使用GCG中的BESTFIT或GAP程序进行 Wisconsin软件包(Accelrys, Madison Wis.),使用提供的默认参数。

[0135] 短语“%序列同一性”、“百分比同一性”或“同一性百分比”是指当使用序列比对程序进行比对时,两个或多个比对序列之间的核酸或氨基酸序列同一性水平。例如,70%同源性意味着与通过定义的算法确定的70%序列同一性相同,因此给定序列的同源物在给定序列的长度上具有大于70%的序列同一性。序列同一性的示例性水平包括但不限于与给定序列的70%、75%、80%、85%、90%或95%或更多的序列同一性。

[0136] 如本文所用,术语“合成的”是指已通过人工化学合成或生物合成(例如,基于基因工程的生产)制造的分子,例如多肽或多核苷酸。优选地,该术语涉及通过上述方法之一或通过本领域已知的其他合适方法构建的非天然存在的分子。

[0137] “相关”是指与疾病、病症或表型的发展或表现一致。关联可能是由于但不限于负责管家功能的基因,其改变可以为各种疾病和病症提供基础,这些是涉及特定疾病、病症或表型的途径的一部分,以及间接促成疾病、病症或表型表现的那些。

[0138] 如本文所用,术语“氨基酸”包括为蛋白质氨基酸和非蛋白质氨基酸的22个氨基酸。术语“蛋白质氨基酸”用于生物化学领域,是指在翻译过程中掺入真核和/或原核蛋白质中的22种氨基酸,例如:(a) 组氨酸(His;H); (b) 异亮氨酸(Ile;I); (c) 亮氨酸(Leu;L); (d)

赖氨酸(Lys;K);(e)蛋氨酸(Met;M);(f)苯丙氨酸(Phe;F);(g)苏氨酸(Thr;T);(h)色氨酸(Trp;W);(i)缬氨酸(Val;V);(j)精氨酸(Arg;R);(k)半胱氨酸(Cys;C);(l)谷氨酰胺(Gln;Q);(m)甘氨酸(Gly;G);(n)脯氨酸(Pro;P);(o)丝氨酸(Ser;S);(p)酪氨酸(Tyr;Y);(q)丙氨酸(Ala;A);(r)天冬酰胺(Asn;N);(s)天冬氨酸(Asp;D);(t)谷氨酸(Glu;E);(u)硒代半胱氨酸(Sec;U);(v)吡咯赖氨酸(Py1;O)。术语“非蛋白氨基酸”用于生物化学领域,是指非蛋白氨基酸的天然存在和非天然存在的氨基酸,例如(1)瓜氨酸(Cit);(2)胱氨酸;(3) γ -氨基丁酸(GABA);(4)鸟氨酸(Orn);(5)茶氨酸;(6)同型半胱氨酸(Hcy);(7)甲状腺素(Thx);和氨基酸衍生物,例如甜菜碱;肉碱;肌肽肌酸;羟色氨酸;羟脯氨酸(Hyp);N-乙酰半胱氨酸;S-腺苷甲硫氨酸(SAM-e);牛磺酸;酪胺、D-氨基酸,例如D-丙氨酸(D-Ala);正亮氨酸(Nle);4-羟脯氨酸(HYP);3,4-脱氢-L-脯氨酸(DHP);氨基庚酸(AHP);(2R,5S)-5-苯基吡咯烷-2-羧酸(2PP);L- α -甲基丝氨酸(MS);N-甲基缬氨酸(MV);6-氨基己酸(6-AHP);和7-氨基庚酸(7-AHP)。氨基酸残基的缩写用于与IUPAC-IUB Biochem.Nom.,J. Biol.Chem.241:527,1966中描述的标准多肽命名法保持一致。

[0139] 如本文所用,“氨基酸残基”是指并入多肽中的单个氨基酸单元。氨基酸残基通常优选为“L”异构体形式。然而,“D”异构形式的残基可以取代任何L-氨基酸残基,只要多肽保留所需的功能特性(例如,抗体结合)。需要说明的是,本文中所有氨基酸残基序列均由分子式表示,其左右方向为氨基末端至羧基末端的常规方向。此外,应注意,氨基酸残基序列开头或结尾处的破折号表示与一个或多个氨基酸残基的另一序列的肽键。

[0140] 如本文所用,“结构域”是蛋白质的具有三级结构的部分。该结构域可以通过多肽的短柔性区域与完整蛋白质中的其他结构域连接。或者,域可以表示功能部分。例如,免疫球蛋白分子包含重链和轻链,每条链包含一系列相似但不相同的氨基酸序列。这些重复中的每一个都对应于称为蛋白质结构域的蛋白质结构的离散的、紧密折叠的区域。轻链由两个这样的免疫球蛋白结构域组成,而IgG抗体的重链包含四个。而且,重链和轻链的氨基末端序列在不同抗体之间差异很大,并且其余结构域在相同同种型的免疫球蛋白链之间是恒定的。重链和轻链(分别为VH和VL)的氨基末端可变结构域(V)赋予其结合特定抗原的能力,而重链和轻链(分别CH和CL)的恒定结构域(C结构域)构成C区域。多个重链C结构域从氨基末端到羧基末端编号,例如CH1、CH2、CH3等。

[0141] 如本文所用,“保守”氨基酸取代通常是指一个氨基酸残基被来自公认基团内的另一个氨基酸残基取代,这通常通过肽的生物活性而改变肽的结构基本上保留。可以使用多种众所周知的方法来鉴定保守取代的氨基酸,例如块取代矩阵(BLOSUM),例如BLOSUM62矩阵。BLOSUM是用于蛋白质序列比对的替换矩阵,其中比对分数用于绘制进化上不同的蛋白质序列之间的关系。它们基于局部对齐。例如,可以在万维网URL NCBI.NLM.NIH.GOV/class/fieldguide/BLOSUM62.txt中找到BLOSUM62替换矩阵,通过引用将其并入。示例性氨基酸取代可见于表1。

[0142] 【表1:示例性氨基酸取代】

氨基酸	示例性保守取代
Ala	Ser, Gly, Cys
Arg	Lys, Gln, Met, Ile
Asn	Gln, His, Glu, Asp
Asp	Glu, Asn, Gln
Cys	Ser, Met, Thr
Gln	Asn, Lys, Glu, Asp
Glu	Asp, Asn, Gln
Gly	Pro, Ala
[0143] His	Asn, Gln
Ile	Leu, Val, Met
Leu	Ile, Val, Met
Lys	Arg, Gln, Met, Ile
Met	Leu, Ile, Val
Phe	Met, Leu, Tyr, Trp, His
Ser	Thr, Met, Cys
Thr	Ser, Met, Val
Trp	Tyr, Phe
Tyr	Trp, Phe, His
[0144] Val	Ile, Leu, Met

[0145] 如本文所用,关于氨基酸序列或核苷酸序列的“基本相同”是指候选序列在给定的比较窗口(例如,250个氨基酸)上与参考序列具有至少70%的序列同一性。因此,基本上相似的序列包括具有例如至少80%序列同一性、至少85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%或更高,例如,99.5%序列同一性。彼此相同的两个序列也基本相似。比较窗口或比较序列的长度通常至少是候选抗体结合片段的长度。基于参考序列计算序列同一性,并且用于序列分析的算法是本领域已知的。因此,为了确定两个氨基酸序列的百分比序列同一性,为了最佳比较目的比对序列(例如,可以在一个多肽的序列中引入空位以实现与另一多肽的最佳比对)。然后比较相应氨基酸位置的氨基酸残基。当一个序列中的一个位置被与另一个序列中相应位置相同的氨基酸残基占据时,则分子在该位置是相同的。两个序列之间的百分比序列同一性是序列共享的相同位置数的函数(即,百分比序列同一性=相同位置数/位置总数×100)。可以使用Vector NTI软件包(Invitrogen Corp., Carlsbad, CA)确定两个多肽序列之间的百分比序列同一性。使用10的空位开放罚分和0.1的空位延伸罚分来确定两个多肽的同一性百分比。所有其他参数均设置为默认值。

[0146] 如本文所用,术语“衍生物”包括单个氨基酸、抗原肽或抗体的盐、酰胺、酯、烯醇醚、烯醇酯、缩醛、缩酮、酸、碱、溶剂化物、水合物、多晶型物或前药(或其抗原结合片段)。本领域技术人员可以使用用于此类衍生化的已知方法容易地制备衍生物。适用于本文所述方法的衍生物可以施用于动物或人而没有明显的毒性作用并且或者是生物活性的或者是前药。衍生物包括溶剂加成形式,例如溶剂化物或醇化物。衍生物进一步包括氨基酸和/或异构体(例如,互变异构体或立体异构体)的酰胺或酯。

[0147] 如本文所用,“氨基酸类似物”是结构或化学上类似于氨基酸的化合物。许多合适

的氨基酸类似物是本领域已知的,并且代表性实例包括例如对乙酰苯丙氨酸、间乙酰苯丙氨酸、0-烯丙基酪氨酸、苯基硒代半胱氨酸、对丙炔氧基苯丙氨酸、对叠氮苯丙氨酸、对硼酰苯丙氨酸、0-甲基酪氨酸、对-氨基苯丙氨酸、对氰基苯丙氨酸、间氰基苯丙氨酸、对氟苯丙氨酸、对碘苯丙氨酸、对溴苯丙氨酸、对硝基苯丙氨酸、L-DOPA、3-氨基酪氨酸、3-碘酪氨酸、对异丙基苯丙氨酸、3-(2-萘基)丙氨酸、联苯丙氨酸、高谷氨酰胺、D-酪氨酸、对羟基苯乳酸、2-氨基辛酸、联吡啶丙氨酸、HQ-丙氨酸、对苯甲酰苯丙氨酸、邻硝基苄基半胱氨酸、邻硝基苄基丝氨酸、4,5-二甲氧基-2-硝基苄基丝氨酸、邻硝基苄基赖氨酸、邻硝基苄基酪氨酸、2-硝基苯丙氨酸、丹磺酰丙氨酸、对羧甲基苯丙氨酸、3-硝基酪氨酸、磺基酪氨酸、乙酰赖氨酸、甲基组氨酸、2-氨基壬酸、2-氨基癸酸、吡咯赖氨酸、Cbz-赖氨酸、Boc-赖氨酸、烯丙氧基羰基赖氨酸、精氨酸琥珀酸、瓜氨酸、半胱氨酸亚磺酸、3,4-二羟基苯丙氨酸、高半胱氨酸、高丝氨酸、鸟氨酸、3-单碘酪氨酸、3,5-二碘酪氨酸、3,5,5'-三碘甲状腺原氨酸和3,3',5,5'-四碘甲状腺原氨酸。该术语包括修饰的或不常见的氨基酸,例如,D-氨基酸、羟赖氨酸、4-羟脯氨酸、N-Cbz-保护的氨基酸、2,4-二氨基丁酸、高精氨酸、正亮氨酸、N-甲基氨基丁酸、萘丙氨酸、苯基甘氨酸、-苯基脯氨酸、叔亮氨酸、4-氨基环己基丙氨酸、N-甲基-正亮氨酸、3,4-脱氢脯氨酸、N,N-二甲基氨基甘氨酸、N-甲基氨基甘氨酸、4-氨基哌啶-4-羧酸、6-氨基己酸、反式-4-(氨基甲基)-环己烷羧酸、2-,3-和4-(氨基甲基)-苯甲酸、1-氨基环戊烷甲酸、1-氨基环丙烷甲酸和2-苄基-5-氨基戊酸;官能化氨基酸,例如,炔官能化、叠氮官能化、酮官能化、氨基官能化氨基酸等。见Liu等,Ann.Rev.Biochem.79:413,2010;Kim等,Curr.Opin.Chem.Biol.,17:412,2013。

[0148] 如本文所用,术语“类肽”是指含有一个或多个N-取代的甘氨酸残基的多肽。N-取代的氨基酸残基有一个标准的氨基酸侧链侧链来自N,而不是来自 α -碳。拟肽的代表性例子提供于例如美国专利第6,075,121和6,887,845号中。

[0149] 如本文所用,术语“肽聚糖”是指由通过肽交联的绳状线性多糖链构成的刚性网。

[0150] 本文使用的术语“多核苷酸”和“核酸分子”包括任何长度的核苷酸的聚合形式,核糖核苷酸或脱氧核糖核苷酸。该术语仅指分子的一级结构。因此,该术语包括三链、双链和单链DNA,以及三链、双链和单链RNA。它还包括修饰,例如通过甲基化和/或通过加帽,以及多核苷酸的未修饰形式。更具体地,术语“多核苷酸”和“核酸分子”包括聚脱氧核糖核苷酸(包含2-脱氧-D-核糖)、多核糖核苷酸(包含D-核糖)、任何其他类型的多核苷酸,其是嘌呤或嘧啶碱基,以及其他非核苷酸骨架,例如聚酰胺(例如,肽核酸(PNA))和多吗啉聚合物(可从美国俄勒冈州Corvallis的Anti-Virals,Inc.以NEUGENE商购获得),以及其他合成的序列特异性核酸聚合物,条件是聚合物包含的核碱基的构型为允许碱基配对和碱基堆叠,例如在DNA和RNA中发现的。术语“多核苷酸”和“核酸分子”之间没有预期的长度区别。

[0151] 如本文所用,术语“核苷酸”是指当连接时构成核酸RNA和DNA的单独结构单元分子。核苷酸由核碱基(含氮碱基)、五碳糖(核糖或2-脱氧核糖)和一个磷酸基团组成。如本文所用,“核酸”是由核苷酸单体制成的聚合大分子。在DNA中,嘌呤碱基是腺嘌呤(A)和鸟嘌呤(G),而嘧啶是胸腺嘧啶(T)和胞嘧啶(C)。RNA使用尿嘧啶(U)代替胸腺嘧啶(T)。

[0152] 如本文所用,“核酸”、“多核苷酸”或“寡核苷酸”可以是任何长度的核苷酸的聚合形式,可以是DNA或RNA,并且可以是单链或双链的。核酸可以包括启动子或其他调控序列。寡核苷酸可以通过合成方法制备。核酸包括DNA片段,或它们跨越或侧接任一多态性位点的

互补物。区段可以在5到1000个连续碱基之间,范围可以从5、20、50、100、200、300、500、700或1000个核苷酸的下限到500、1000、2000、5000或10000个核苷酸(上限大于下限)。5~20、50~100、50~200、100~200、120~300、150~300、100~500、200~500或200~1000个碱基之间的核酸是常见的。提及双链核酸的一条链的序列定义互补序列,并且除非上下文另有明确说明,提及核酸的一条链还指其互补序列。互补可以以任何方式发生,例如,DNA=DNA; DNA=RNA; RNA=DNA; RNA=RNA,其中,在每种情况下,“=”表示互补。互补可以发生在相同或不同分子的两条链或单链之间。

[0153] 如本文所用,术语“杂交”是指核酸链通过碱基配对与互补链结合的任何过程。例如,在约37°C至42°C的约50%甲酰胺中可发生高严格条件下的杂交。在约35%至25%甲酰胺和约30°C至35°C的严格度降低的条件下,可以发生杂交。特别是,杂交可以在42°C的高度严格条件下在50%甲酰胺、5×SSPE、0.3%SDS和200μg/ml剪切和变性鲑鱼精子DNA中发生。如上所述,杂交可以在降低严格性的条件下发生,但在35%甲酰胺中,在35°C的降低温度下发生。通过计算目的核酸的嘌呤与嘧啶比率并调节温度,可以进一步缩小对应于特定严格程度的温度范围。上述范围和条件的变化是本领域众所周知的。

[0154] 如本文所用,术语“寡核苷酸”是指至少约6个核苷酸至60个核苷酸,优选约15~30个核苷酸,最优选约20~25个核苷酸的核酸序列,其可用于PCR扩增或杂交试验。

[0155] 如本文所用,术语“可操作地连接”是指功能相关的核酸序列。如果启动子控制编码多肽的转录,则启动子与编码序列有效连接。虽然可操作连接的核酸序列可以是连续的并且在阅读框中,但某些元件,例如阻遏基因,可能不是连续连接的,但仍与控制多肽产物表达的操纵基因序列结合。

[0156] 如本文所用,术语“载体”是指能够将核酸序列转移至靶细胞的分子(例如,病毒载体、非病毒载体、微粒载体和脂质体)。通常,“载体构建体”是指能够指导目的核酸表达并且可以将核酸序列转移至靶细胞的任何核酸构建体。因此,该术语包括克隆、表达和病毒载体。

[0157] 如本文所用,术语“报告分子”是指可在任何检测系统中检测到的分子,例如DNA、RNA和/或多肽序列,包括但不限于酶(例如ELISA,以及其他组织化学分析)、荧光和发光系统。示例性的报告分子包括,例如,β-葡糖醛酸酶、绿色荧光蛋白(GFP)、大肠埃希氏菌(*E. coli*)β-半乳糖苷酶(LacZ)、嗜盐杆菌属(*Halobacterium*)β-半乳糖苷酶、链孢霉属(*Neurospora*)酪氨酸酶、人胎盘碱性磷酸酶和氯霉素乙酰转移酶(CAT)、水母发光蛋白(水母生物发光)、来自北美萤火虫(*Photinus pyralis*)的萤火虫萤光素酶(EC 1.13.12.7)、来自肾海鳃(*Renilla reniformis*)的海鳃属(*Renilla*)萤光素酶(EC 1.13.12.5),以及来自费希发光杆菌(*Photobacterium fischeri*)的细菌萤光素酶(EC 1.14.14.3)。优选地,报告分子包含萤光素-萤光素酶系统。如本文所用,术语“萤光素-萤光素酶系统”是指允许萤光素和萤光素酶在存在底物(即,例如,cAMP)的条件下接触的任何过程或方法,使得产生的发光可以是检测到。这样的系统可以包含在转染的宿主细胞中或提供在单独的试剂盒容器中,由此可以将内容物混合在一起。“报告分子”包括术语“标签”和“可检测的标签”,当在本文中使用时,它们是指当连接到本文所述的部分,例如肽、蛋白质或抗体时,使得该部分可使用已知检测检测到的任何部分方法,例如光谱法、光化学法、电化学发光法和电泳法。

[0158] 适用于本公开的各种标记包括通过化学或物理方式产生信号的标记,其中所述信

号可通过视觉或仪器方式检测。示例性标记包括但不限于荧光团和放射性同位素。这样的标记允许通过合适的检测器(例如,荧光计)直接检测标记的化合物。此类标记可包括酶和底物、色原、催化剂、荧光化合物、化学发光化合物和放射性标记。通常,使用视觉可检测的标记,从而提供样品中分析物量的仪器(例如分光光度计)读数。标签包括酶,例如辣根过氧化物酶、B-半乳糖苷酶和碱性磷酸酶。合适的基材包括 3,3',5,5'-四甲基联苯胺(TMB)和 1,2-二氧杂环丁烷。检测方法将取决于所使用的标记,并且对于本领域技术人员来说是显而易见的。如所指出的,合适的直接标记的例子包括放射性标记、荧光团、生色团、螯合剂、颗粒、化学发光剂等。

[0159] 对于这样的实施方式,标记可以是直接标记,即本身可检测或产生可检测信号的标记,或者它可以是间接标记,即可检测或在存在另一种化合物的情况下产生可检测信号的标记。“标记的第二抗体”是指附着在可检测标记上的抗体。该标记允许抗体产生与流体样品中存在的分析物相关的可检测信号。

[0160] 合适的放射性标记包括,例如但不限于,³H、¹⁴C、³²P、³⁵S、³⁶Cl、¹³¹I和¹⁸⁶Re。

[0161] 如本文所用,“共有”氨基酸是选择在通过该方法获得的共有多肽中占据给定位置的氨基酸。如上所述被组织用于选择共有氨基酸的系统可以是计算机程序,或一个或多个计算机程序与“手动”分析和计算的组合。基于以上进行的进化相似性分析,存在于从中制备共有序列的氨基酸序列组中的一组氨基酸序列是指彼此比组的其他成员更相似的一组这样的序列。这种组的一个例子是一个物种,其中该组中的一组将是特定多肽的成员,例如抗原区。

[0162] 如本文所用,术语“融合蛋白”是指肽或其功能片段,其通过键例如肽键(或酰胺键)与非天然结合在母肽中。示例性融合多肽包括本公开的抗体(或其抗原结合片段)与酶(例如碱性磷酸酶;AP)的融合。

[0163] 关于本公开,生物流体可以是固体或半固体样品,包括粪便、活检标本、皮肤、指甲和头发,或液体样品,例如尿液、唾液、痰、粘液、血液、血液成分(如血浆或血清)、羊水、精液、阴道分泌物、眼泪、脊髓液、洗涤液和其他体液。样本中包括来自例如子宫颈、尿道、鼻孔和喉咙的拭子样本。任何此类样品都可以来自活的、死的或垂死的动物或植物。动物包括哺乳动物,例如人类。

[0164] “尿液”是指通过尿道排出或从患者的导管收集的液体排泄物。

[0165] “抗体”是指基本上由一个或多个免疫球蛋白基因或其片段编码的多肽。公认的免疫球蛋白基因包括 κ 、 λ 、 α 、 γ 、 δ 、 ϵ 和 μ 恒定区,以及无数免疫球蛋白可变区基因。轻链分为 κ 或 λ 。重链分为 γ 、 μ 、 α 、 δ 或 ϵ ,它们又分别定义了免疫球蛋白类别IgG、IgM、IgA、IgD和IgE。通常,抗体是一种免疫球蛋白,在其表面或空腔中具有与另一个分子的特定空间和极性组织特异性结合并因此被定义为互补的区域。抗体可以是多克隆或单克隆(缩写为mAb或moAb)。抗体可以包括完整的免疫球蛋白或其片段。其片段可以包括Fab、Fv和F(ab')₂、Fab'等。抗体还可以包括通过重组方法制备的嵌合抗体或其片段。“抗体”包括完整的抗体,包括IgG、IgM和IgA同种型的抗体,及其任何抗原结合片段(即“抗原结合部分”)或单链。“抗体”是指包含通过二硫键相互连接的至少两条重(H)链和两条轻(L)链的糖蛋白或其抗原结合部分。每条重链由重链可变区(本文缩写为VH)和重链恒定区组成。IgG重链恒定区由四个结构域组成:CH1、铰链、CH2和CH3。每条轻链由轻链可变区(本文缩写为VL)和轻链恒定区组

成。轻链恒定区由一个结构域CL组成。VH和VL区可以进一步细分为高变区,称为互补决定区(CDR),散布着更保守的区域,称为框架区(FR)。

[0166] 如本文所用,术语“互补决定区”或“CDR”是指抗体的负责抗原结合的高变区氨基酸残基。人IgG亚型抗体的高变区或CDR通常包含来自轻链可变结构域中残基24~34(L1)、50~56(L2)和89~97(L3)的氨基酸残基和31~35(如Kabat等(同上)所述的重链可变域中的H1)、50~65(H2)和95~102(H3)和/或来自Chothia所述的重链可变域中的高变环的那些残基等(J.Mol.Biol.196:901-17,1987)。框架或FR残基是那些可变结构域残基,除了高变区并括在其中。

[0167] 每个 V_H 和 V_L 由三个CDR和四个FR组成,从氨基端到羧基端按以下顺序排列:FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4。重链和轻链的可变区包含与抗原相互作用的结合域。抗体的恒定区可以介导免疫球蛋白与宿主组织或因子的结合,包括免疫系统的各种细胞(例如,效应细胞)和经典补体系统的第一组分(C1q)。

[0168] 如本文所用,术语“单域抗体”或“sdAb”是指包含人抗体的重链的可变区(V_{HH})的一类单链抗体。SdAb是由单个单体可变抗体结构域组成的抗体片段。例如,它们来源于人的重链抗体,其仅由两条抗体重链组成,没有轻链。sdAb的分子量仅为12~15kDa,远小于单克隆抗体(mAb),例如IgG抗体(150~160kDa),后者具有两条蛋白质重链和两条轻链。SdAbs可以来源于任何物种,包括但不限于小鼠、人、骆驼、山羊、兔、牛。sdAb可以是天然存在的免疫球蛋白的修饰形式,称为不含轻链的重链抗体。此类免疫球蛋白公开于美国专利第8,293,233和9,371,371号;和美国公开2011-0052565号。为清楚起见,源自天然缺乏轻链的重链抗体的可变结构域在本文中称为 V_{HH} 或sdAb,以将其与四链免疫球蛋白的常规 V_H 区分开来。

[0169] 如本文所用,术语“表位”是指能够特异性结合抗体的蛋白质决定簇。表位通常由诸如氨基酸或糖侧链等分子的化学活性表面基团组成,并且通常具有特定的三维结构特征以及特定的电荷特征。构象和非构象表位的区别在于,在变性溶剂的存在下,与前者的结合而不是后者的结合会丢失。术语“天然构象表位”或“天然蛋白质表位”在本文中可互换使用,并且包括由抗原的构象折叠产生的蛋白质表位,当来自抗原线性序列的不同部分的氨基酸以紧密接近的方式在3维空间聚集在一起时产生。这种构象表位分布在质膜的细胞外侧。

[0170] 如本文所用,“分离的抗体”旨在指基本上不含具有不同抗原特异性的其他抗体的抗体。然而,与表位、同种型或变体特异性结合的分离抗体可能与其他相关抗原具有交叉反应性。此外,分离的抗体可以基本上不含其他细胞材料和/或化学物质。在一些实施方式中,具有不同特异性的“分离的”单克隆抗体的组合组合在明确定义的组合物中。

[0171] 如本文所用,“免疫结合”通常指抗体或其片段与抗体特异性的1型干扰素或受体之间发生的类型的非共价相互作用。免疫结合相互作用的强度或亲和力可以用相互作用的解离常数(K_D)来表示,其中较小的 K_D 代表更大的亲和力。可以使用本领域熟知的方法来量化所选抗体的免疫结合特性。一种这样的方法需要测量抗原结合位点/抗原复合物形成和解离的速率,其中这些速率取决于复合物伴侣的浓度、相互作用的亲和力以及在两个方向上同样影响速率的几何参数。因此,“开启速率常数”(K_{on})和“关闭速率常数”(K_{off})都可以通过计算浓度和实际结合和解离速率来确定。 K_{off}/K_{on} 之比能够消除与亲和力无关的所有参数,

因此等于解离常数K_d。一般参见Davies等, Annual Rev. Biochem. 59:439-473 (1990)。

[0172] “特异性结合”或“特异性结合”是指抗体与预定抗原结合。通常,抗体以10⁻⁷M 或更小的解离常数(K_d)结合,并以比其结合预定抗原或密切相关的抗原以外的非特异性抗原(例如BSA、酪蛋白)的K_d小至少两倍的K_d与预定抗原结合。短语“识别抗原的抗体”和“特异性针对抗原的抗体”在本文中术语“特异性结合抗原的抗体”可互换使用。

[0173] 对IgG抗体的“高亲和力”是指K_d为10⁻⁸M或更小,更优选10⁻⁹M或更小,甚至更优选10⁻¹⁰M或更小的抗体。然而,“高亲和力”结合可能因其他抗体同种型而异。例如,对IgM同种型的“高亲和力”结合是指具有10⁻⁷M或更小、更优选10⁻⁸M或更小的K_d的抗体。

[0174] 如本文所用,术语“单克隆抗体”是指具有单分子组成的抗体分子的制剂。单克隆抗体组合物显示出对特定表位的单一结合特异性和亲和力。因此,术语“人单克隆抗体”是指显示单一结合特异性的抗体,其具有衍生自人种系免疫球蛋白序列的可变区和恒定区。可以使用任何技术来制备针对化合物的单克隆抗体,该技术提供通过培养中的连续细胞系产生抗体分子。这些包括但不限于最初由Kohler&Milstein, 1975, Nature 256:495-497和/或Kaprowski, 美国专利第4,376,110号描述的杂交瘤技术, Kosbor等1983, Immunology Today 4:72和/或Cote等, 1983, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80:2026-2030描述的人类B细胞杂交瘤技术,及Cole等 1985, Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, Inc., pp. 77-96描述的EBV-杂交瘤技术。或者,用于产生单链抗体的描述的技术(参见,例如,美国专利号4,946,778)可以适用于产生化合物特异性单链抗体。

[0175] 如本文所用,术语“杂交瘤”是指通过将两种细胞类型融合在一起产生的细胞。常用的杂交瘤包括由免疫动物分泌抗体的B细胞与能够在体外无限期生长的恶性骨髓瘤细胞系融合而产生的杂交瘤。这些细胞被克隆并用于制备单克隆抗体。

[0176] 可以通过已知技术产生包含特异性结合位点缺失的抗体片段。例如,此类片段包括但不限于F(ab')₂片段,其可通过抗体分子的胃蛋白酶消化产生,以及Fab片段,其可通过还原F(ab')₂的二硫键产生2个片段。或者,可以构建Fab表达文库(Huse等, 1989, Science 246:1275-1281)以允许快速和容易地鉴定对目的肽具有所需特异性的单克隆Fab片段。

[0177] 如本文所用,术语“重组抗体”是指通过重组方式制备、表达、产生或分离的抗体,例如(a)从动物或由其制备的杂交瘤中分离的抗体(下文进一步描述), (b)从经转化以表达抗体的宿主细胞中分离的抗体,例如从转染瘤中分离的抗体, (c)从重组的、组合的人或其他物种抗体文库中分离的抗体,和(d)制备、表达、产生或通过将免疫球蛋白基因序列与其他DNA序列剪接的任何其他方法分离。

[0178] 可以将对所需肽特异的抗体或抗体片段连接到例如琼脂糖上,并且抗体-琼脂糖复合物用于免疫层析以纯化肽。参见, Scopes, 1984, Protein Purification: Principles and Practice, Springer-Verlag New York, Inc., NY, Livingstone, 1974, Methods In Enzymology: Immunoaffinity Chromatography of Proteins 34:723-731。

[0179] 如本文所用,术语“双特异性分子”旨在包括具有两种不同结合特异性的任何试剂,例如蛋白质、肽或蛋白质或肽复合物。例如,该分子可以与(a)细胞表面抗原和(b)效应细胞表面上的Fc受体结合或相互作用。术语“多特异性分子”或“异特异性分子”旨在包括具有多于两种不同结合特异性的任何试剂,例如蛋白质、肽或蛋白质或肽复合物。例如,该分子可以与(a)细胞表面抗原、(b)效应细胞表面上的Fc受体和(c)至少一种其他组分结合或

相互作用。因此,本公开内容包括针对细胞表面抗原例如GAC和其他靶标例如M蛋白的双特异性、三特异性、四特异性和其他多特异性分子。

[0180] 如本文所用,术语“二价”抗体是指其中VH和VL结构域在单个多肽链上表达但使用太短而不允许在同一多肽链上的两个结构域之间配对的接头的抗体链,从而迫使结构域与另一条链的互补结构域配对并产生两个抗原结合位点(参见例如,Holliger等,PNAS USA, 90,6444-8,1993;Poljak等,Structure,2,1121-23,1994)。“多价”抗体包括两个或多个结合域,它们可能都具有相同的特异性或可能具有多种特异性。

[0181] 如本文所用,“嵌合抗体”是那些保留不同结构域的抗体,通常是可变结构域,来自一个物种,其余部分来自另一物种;例如,人鼠嵌合体。如本文所用,术语“人抗体”旨在包括具有衍生自或紧密匹配的人种系免疫球蛋白序列的可变区和恒定区的抗体。本公开的人抗体可以包括不由人种系免疫球蛋白序列编码的氨基酸残基(例如,通过体外随机或定点诱变或通过体内体细胞突变引入的突变,例如在V、D和人重链的 J段)。因此,如本文所用,术语“人抗体”是指其中蛋白质的基本上每个部分(例如,CDR、构架、C_L、C_H结构域(例如,C_H1、C_H2、C_H3)、铰链、(V_L,V_H))与人类种系抗体基因编码的基因基本相似。人抗体已根据其氨基酸序列相似性分类(Nikoloudis等,Peer J.,2,e456,2014;Adolf-Bryfogle等,Nucleic Acids Res.,43,D432-8,2015)。因此,使用序列相似性搜索,可以选择具有相似线性序列的抗体作为模板来选择或产生人或人源化抗体。用于生产嵌合抗体的技术进一步描述于Morrison等,1984,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 81:6851-6855;Neuberger等,1984,Nature 312:604-608;Takeda等,1985,Nature 314:452-454;Boss,U.S.Pat.No.4,816,397;Cabilly,U.S.Pat.No.4,816,567。

[0182] 如本文所用,用于制备人源化抗体(也称为重塑或CDR-移植)的“人源化”包括用于降低来自异种来源(通常为啮齿动物)的单克隆抗体(mAbs)的免疫原性和用于提高亲和力或效应器的既定技术功能(ADCC、补体激活、C1q结合)。工程化的单克隆抗体可以使用分子生物学技术、使用噬菌体展示的随机序列或从头合成来生产。例如,为了人源化整合了来自非人类物种的CDR区的抗体,设计可能包括变化,例如CDR 残基中的保守氨基酸取代,以及将非人类单克隆抗体的残基回取代到人类框架区中(反向突变)。这些位置可以通过序列比较方法、共有序列分析或可变区的3D结构的结构分析来辨别或识别。计算机程序可用于说明和显示选定候选免疫球蛋白序列的可能的三维构象结构。检查这些显示允许分析残基在候选免疫球蛋白序列的功能中的可能作用,即分析影响候选免疫球蛋白结合其抗原的能力的残基。通过这种方式,可以从共有序列和输入序列中选择和组合FR(框架)残基,从而实现所需的抗体特性,例如对靶抗原的亲和力增加。随着抗体结构已知参数数据集的增加,这些技术的复杂性和改进也在增加。人源化的另一种方法是仅用人类单克隆抗体中最常见的残基修饰啮齿动物序列的表面残基,并被称为“表面重修”或“饰面”。已知的人Ig序列公开于例如 IGBLAST(NCBI);Kabat等,Sequences of Proteins of Immunological Interest,DIANE Publishing,1992。本公开的抗体的人源化或工程化可以使用任何已知方法进行,例如但不限于下列文献中描述的那些:Jones等,Nature 321:522(1986);Riechmann等,Nature 332:323(1988);Verhoeyen等,Science 239:1534(1988);Sims等,J.Immunol.151:2296(1993);Chothia等,J.Mol.Biol.,196:901(1987);Carter等,PNAS USA,89:4285(1992);Presta等,J.Immunol.,151:2623(1993);U.S.Pat.Nos.5,723,323;

5,976,862;5,824,514; 5,817,483;5,814,476;5,763,192;5,723,323;5,766,886;5,714,352; 6,204,023;6,180,370;5,693,762;5,530,101;5,585,089;5,225,539; 4,816,567; W0199900683和W01994018219。

[0183] 如本文所用,术语“药学上可接受的”是指在生物学或其他方面不是不合需要的分子或材料,即该分子或材料可以施用于受试者而不引起任何不合需要的生物学效应例如毒性。

[0184] 如本文所用,术语“载体”表示缓冲剂、佐剂、分散剂、稀释剂等。例如,本公开的肽或化合物可以根据已知技术配制用于在药物载体中给药。例如,参见 Remington, The Science&Practice of Pharmacy (第9版,1995)。在根据本公开的药物制剂的制备中,肽或化合物(包括其生理学上可接受的盐)通常与尤其是可接受的载体混合。载体可以是固体或液体,或两者兼有,并且优选与肽或化合物一起配制为单位剂量制剂,例如片剂,其可含有按重量计约0.01或0.5%至约95%或 99%,特别是约1%至约50%,尤其是约2%至约20%的肽或化合物。可以将一种或多种肽或化合物掺入本公开的制剂中,其可以通过任何众所周知的药学技术来制备。

[0185] 如本文所用,术语“培养物”是指怀疑含有一种或多种微生物或细胞的任何样品或标本。“纯培养物”是其中细胞或生物仅属于特定物种或属的培养物。这与“混合培养”形成对比,其中存在多于一种微生物或细胞的属或种。

[0186] “检测”和“检测”具有它们的标准含义,并且旨在涵盖所选蛋白质或蛋白质活性的检测、测量和/或表征。例如,可以在检测、筛选或表征蛋白质的抑制剂、激活剂和调节剂的过程中“检测”酶活性。

[0187] 术语“参考水平”是指可以先前从受试者、从另一受试者获得的参考水平,或者可以指从多个未感染目标病原体的正常受试者获得的数值。可以根据本领域技术人员已知的技术测量和选择适当的参考水平。

[0188] 如本文所用,术语“治疗”、“治疗”或“治疗的”是指降低病症的严重性或至少部分改善或改变病症,例如,通过完全或部分减轻、减轻或降低在疾病、病症或病状的至少一种临床症状中。

[0189] 如本文所用,术语“施用”以最广义使用,即给予或提供需要治疗的受试者、组合物,例如本公开的化合物或肽,或含有肽的药物组合物或化合物。例如,在药学意义上,“给药”是指作为一种补救措施应用,例如通过以一种可以接受这种分子的方式放置肽或抗体,例如,静脉内、口服、局部、口腔(例如,舌下)、阴道、肠胃外(例如,皮下;肌肉内,包括骨骼肌、心肌、膈肌和平滑肌;皮内;静脉内;或腹膜内)、局部(即皮肤和粘膜表面)、鼻内、透皮、关节内、鞘内、吸入、门静脉内递送、器官注射(例如,眼睛或血液等)或离体(例如,通过免疫单采术)。

[0190] 如本文所用,“接触”是指将包含活性成分的组合物引入试管、烧瓶、组织培养物、芯片、阵列、板、微孔板中的含有靶标例如细胞靶标的样品中、毛细管等,并在足以允许抗原(例如,GAC)或测试化合物(例如,NAG)与靶(例如,抗体)结合的温度和时间下温育,反之亦然。在体内上下文中,“接触”是指将诊断或治疗分子引入患者或受试者以诊断或治疗疾病,并且允许分子与患者的靶组织接触,例如,血液组织,体内或离体。

[0191] 如本文所用,术语“治疗有效量”是指为受试者提供一些改善或益处的量。或者说,

“治疗有效”量是在受试者中提供至少一种临床症状的某种缓解、缓解或减少的量。下文描述了用于确定治疗性分子例如抗体的治疗有效量的方法。

[0192] 如本文所用,术语“抑制”是指与病症的病原体相关的量、水平、密度、周转、结合、解离、活性、信号传导或任何其他特征的降低。

[0193] 如本文所用,术语“受试者”是指个体。在一个方面,受试者是哺乳动物,例如人。在一方面,受试者可以是非人灵长类动物。非人类灵长类动物包括狨猴、猴子、黑猩猩、大猩猩、猩猩和长臂猿,仅举几例。术语“受试者”还包括驯养动物,例如猫、狗等、牲畜(例如,美洲驼、马、牛)、野生动物(例如,鹿、麋鹿、驼鹿等)、实验室动物(例如,小鼠、兔子、大鼠、沙鼠、豚鼠等)和鸟类(例如,鸡、火鸡、鸭等)。对象还可以包括但不限于鱼、两栖动物和爬行动物。对象还可以包括无脊椎动物,例如蜚、虱和跳蚤。优选地,受试者是人类受试者。更优选地,受试者是人类患者。

[0194] 如本文所用,术语“检测”是指通过测量样品中的一个或多个参数来确定与样品相关的一个值或一组值的过程,并且可以进一步包括将测试样品与参考样品进行比较。根据本公开,对象中疾病或病症的检测可以包括识别、测定、测量和/或量化对象生物样品中的一种或多种抗原,例如尿液、唾液、痰、痰、鼻分泌物、粘液、眼泪、血液或血清。

[0195] 如本文所用,术语“诊断”是指可以确定受试者是否可能患有给定疾病或病症的方法,其包括但不限于以抗原或病原体为特征的疾病或病症。技术人员通常基于一种或多种诊断指标进行诊断,其存在、不存在、量或量的变化指示疾病或病症的存在、严重性或不存在。其他诊断指标可以包括患者病史;身体症状等。本公开的诊断方法可以独立使用,与其他诊断方法结合使用,以确定病程或结果是否更可能发生在表现出给定特征的患者中。

[0196] 如本文所用,术语“细胞”与术语“生物细胞”可互换使用。生物细胞的非限制性实例包括真核细胞、植物细胞、动物细胞,例如哺乳动物细胞、昆虫细胞、鸟类细胞、鱼细胞等、原核细胞、细菌细胞、真菌细胞、原生动物细胞等,细胞从组织分离,例如肌肉、软骨、脂肪、皮肤、肝脏、肺、神经组织等,免疫细胞,例如T细胞、B细胞、自然杀伤细胞、巨噬细胞等,胚胎(例如,受精卵)、卵母细胞、卵子、精细胞、杂交瘤、培养细胞、来自细胞系的细胞、癌细胞、感染细胞、转染和/或转化细胞、报告细胞等。哺乳动物细胞可以来自例如人、小鼠、大鼠、马、山羊、绵羊、牛、灵长类动物等。

[0197] 如本文所用,术语“样品”是指从目的受试者获得或衍生的组合物,其包含待表征和/或鉴定的细胞和/或其他分子实体,例如基于物理、生化、化学和/或生理特性。

[0198] 如本文所用,“生物样品”是从受试者身体获得的物质。选择的特定“生物样本”将根据患者被怀疑患有的疾病而有所不同,因此,哪种生物样本最有可能含有分析物。组织样本的来源可以是血液或任何血液成分;体液;来自新鲜、冷冻和/或保存的器官或组织样本或活检或抽吸物的实体组织;以及受试者妊娠或发育过程中任何时间的细胞或血浆。样品包括但不限于原代或培养的细胞或细胞系、细胞上清液、细胞裂解物、血小板、血清、血浆、玻璃体液、眼液、淋巴液、滑液、卵泡液、精液、羊水、乳汁、全血、尿液、脑脊液(CSF)、唾液、痰、泪液、汗液、粘液、肿瘤裂解物和组织培养基,以及组织提取物,例如匀浆组织、肿瘤组织和细胞提取物。样品还包括在获得后以任何方式处理过的生物样品,例如通过用试剂处理、溶解或富集某些成分(例如蛋白质或核酸)或嵌入半固体或固体基质中用于切片的生物样品目的,例如,组织学样本中的组织或细胞薄片。优选地,样品获自肺器官,包括例如唾液、

痰、痰、鼻分泌物、粘液、胸膜液、支气管肺泡灌洗液、血液等。

[0199] 如本文所用,术语“易感”或“易感性”描述了处于发生感染、疾病或病症风险的受试者。这些术语可用于表示具有特定基因型和/或单倍型的受试者比不具有这种基因型和/或单倍型的受试者具有更高的发生特定疾病或病症的可能性。

[0200] “改善”是指治疗病理学或病症的任何成功指标,包括任何客观或主观参数,例如症状的减轻、缓解或减少或患者身体或精神健康的改善。症状的改善可以基于客观或主观参数;包括体检和/或精神评估的结果。

[0201] “发色团”是指具有吸收特性的部分,即,能够在被多种光子源中的任一种照射时激发。生色团可以是发荧光的或不发荧光的,并且除其他外包括染料、荧光团、发光分子、化学发光分子和电化学发光分子。

[0202] 合适的间接标记的实例包括能够与底物反应或相互作用以产生可检测信号的酶(例如用于ELISA和EMIT免疫测定的那些)、能够结合标记部分的配体等。可用作间接标记的合适酶包括但不限于碱性磷酸酶、辣根过氧化物酶、溶菌酶、葡萄糖-6-磷酸脱氢酶、乳酸脱氢酶和脲酶。在Engvall,1980,Methods Enzym.70:419-439 和美国专利第4,857,453号中详细描述了这些酶在ELISA和EMIT免疫测定中的使用。

[0203] “基材”、“载体”、“固体载体”、“固体载体”或“树脂”是可互换的术语并且指代任何固相材料。基材还包括诸如“固相”、“表面”和/或“膜”之类的术语。固体支持物可以由有机聚合物如聚苯乙烯、聚乙烯、聚丙烯、聚氟乙烯、聚环氧乙烷和聚丙烯酰胺以及它们的共聚物和接枝物组成。固体支持物也可以是无机的,例如玻璃、二氧化硅、可控孔玻璃(CPG)、反相二氧化硅或金属,例如金或铂。“固体支持物”包括膜(例如硝酸纤维素)、微量滴定板(例如PVC、聚丙烯、聚苯乙烯)、量油尺、试管和玻璃或塑料珠。基材的构型可以是珠、球体、颗粒、颗粒、凝胶、膜或表面。表面可以是平面的、基本平面的或非平面的。固体支持物可以是多孔的或无孔的,并且可以具有溶胀或非溶胀特性。固体支持物可以配置为孔、凹陷或其他容器、器皿、特征或位置的形式。多个支持物可以在不同位置的阵列上配置,可寻址用于试剂的机器人递送,或通过检测方法和/或仪器。用于固定生物分子的方法是本领域众所周知的,并且抗体可以共价或非共价连接。在一个实施方式中,固体支持物是链霉亲和素包被的板,生物素化的抗体非共价连接到该板。

[0204] 在统计和诊断测试中,灵敏度和特异性是二元分类测试性能的统计量度。灵敏度(也称为“召回率”)衡量被正确识别为实际阳性的比例(例如,正确识别为患有该病症的病人的百分比)。特异性衡量正确识别的阴性比例(例如正确识别为没有条件的健康人的百分比)。这两项措施与I型和II型错误的概念密切相关。理论上的最佳预测旨在实现100%的灵敏度(即预测患病组中的所有人都患病)和100%的特异性(即不预测健康组中的任何人患病),但是理论上任何预测器都将具有称为贝叶斯错误率的最小错误界限。

[0205] “特异性”涉及诊断测试识别阴性结果的能力。

$$[0206] \quad \text{特异性} = \frac{\text{真阴性数}}{\text{真阴性数} + \text{假阳性数}}$$

[0207] 如果测试具有高特异性,则测试的阳性结果表明测试正在测试的疾病存在的可能性很高。

[0208] “灵敏度”涉及诊断测试识别阳性结果的能力。

$$[0209] \quad \text{灵敏度} = \frac{\text{真阳性数}}{\text{真阳性数} + \text{假阴性数}}$$

[0210] 如果测试具有高灵敏度,则阴性结果将表明不存在疾病。例如,100%的灵敏度意味着测试识别出所有实际的阳性结果——即所有患病的人都被识别为患病了。因此,与高特异性测试相反,高灵敏度测试中的阴性结果用于排除疾病。

[0211] 对于任何测试,通常在测量之间存在权衡。例如:在机场安全环境中,人们正在测试潜在的安全威胁,扫描仪可能被设置为触发低风险物品,如皮带扣和钥匙(低特异性),以降低丢失物品的风险确实对飞机和机上人员构成威胁(高灵敏度)。这种权衡可以使用接受者操作特征(ROC)曲线以图形方式表示。

[0212] 在一些实施例中,ROC用于生成汇总统计。一些常见的版本是:ROC曲线与无歧视线成90度的线的截距(也称为Youden的J统计量);ROC曲线与无歧视线之间的面积;ROC曲线下的面积,或“AUC”(“曲线下面积”)或A' (发音为“a-prime”); d' (发音为“d-prime”),系统活动分布在仅噪声条件下的平均值与其在仅信号条件下的分布之间的距离除以它们的标准偏差,假设这两者分布是具有相同标准差的正态分布。在这些假设下,可以证明ROC的形状只取决于d'。

[0213] 测试的“阳性预测值(PPV)”或“精确率”是用于描述具有阳性测试结果的受试者被正确诊断的比例的汇总统计量。它是对诊断方法性能的衡量,因为它反映了阳性测试反映了正在测试的潜在状况的概率。然而,它的价值确实取决于目的结果的普遍性,这对于特定的目标人群可能是未知的。

[0214] 可以使用贝叶斯定理导出PPV。PPV定义为:

$$[0215] \quad \text{PPV} = \frac{\text{真阳性数}}{\text{真阳性数} + \text{假阳性数}}$$

[0216] 真阳性数+假阳性数

[0217] 其中“真阳性”是测试做出阳性预测的事件,并且受试者在金标准下具有阳性结果,“假阳性”是测试做出阳性预测的事件,并且受试者有在金本位制下取得积极成果。

[0218] “阴性预测值(NPV)”被定义为被正确诊断的具有阴性测试结果的受试者的比例。高NPV意味着当测试产生阴性结果时,结果应该是阳性的并不常见。在熟悉的医学测试背景下,高NPV意味着测试很少将病人误分类为健康人。请注意,这并没有说明测试错误地将健康人归类为患病的趋势。

[0219] NPV也被定义为:

$$[0220] \quad \text{NPV} = \frac{\text{真阴性数}}{\text{真阴性数} + \text{假阴性数}}$$

[0221] 其中“真阴性”是测试做出否定预测的事件,并且受试者在金标准下的结果为阴性,“假阴性”是测试做出阴性预测的事件,并且受试者有在金本位制下取得积极成果。如果已知患病率、灵敏度和特异性,则可以按如下方式计算任何患病率的阳性和阴性预测值(PPV和NPV):

$$[0222] \quad \text{PPV} = \frac{\text{灵敏度} \times \text{患病率}}{\text{灵敏度} \times \text{患病率} + (1 - \text{特异性}) \times (1 - \text{患病率})}$$

[0223] 如果疾病的患病率非常低,即使灵敏度和特异性都很高,阳性预测值也不会接近1。因此,在对普通人群进行筛查时,不可避免的是许多检测结果呈阳性的人会出现假阳性。

[0224] 异常越少,越能确定阴性结果表明没有异常,越不能确定阳性结果确实表明异常。

患病率可以解释为在进行测试之前受试者患有疾病的概率,称为疾病的先验概率。阳性和阴性预测值是那些在测试中为阳性和阴性的受试者的相同概率的修正估计值,称为后验概率。先验概率和后验概率之间的差异是评估测试有用性的一种方式。

[0225] 对于任何测试结果,如果患者确实具有目的状况,我们可以将获得该结果的概率与如果他或她是健康的对应的概率进行比较。这些概率的比率称为似然比,计算为灵敏度/(1-特异性)。(Altman D G,Bland J M(1994).“Diagnostic tests 2: Predictive values”.BMJ 309(6947):102)。

[0226] “排除标准”、“排除”或“RO”是在疾病或病症的医学鉴别诊断中使用的术语,其中在排除或包含的临床决策过程中评估某些标准。当在考虑标准后确定受试者不符合所有或大量的患有疾病的标准时,受试者被“排除”。

[0227] 【检测和/或诊断方法】

[0228] 因此,在本公开的一个方面,提供了一种用于诊断和/或检测人类受试者的疾病或病症的方法。该方法包括提供包含如本文所述的融合抗体或结合剂的免疫测定,以及使免疫测定与来自受试者的样品接触。

[0229] 在另一方面,提供了一种用于排除人类受试者的疾病或病症的方法,在该方法中,从受试者获得体液样品;使样品与根据本发明的融合抗体接触以确定抗体融合物是否检测样品中抗原或靶标的存在;并且,对于那些未检测到存在的人类受试者,排除了疾病或病症。

[0230] 在一些实施例中,取样的体液是尿液。在一些实施例中,取样的体液是尿液。在一些实施例中,取样的体液是血液。在一些实施例中,取样的体液是痰。

[0231] 【试剂盒】

[0232] 还提供了用于检测存在于固体、半固体或液体生物样品中的物质的试剂盒。试剂盒可能包括获取生物样品并将其与样品缓冲液接触、将样品与样品缓冲液混合、在设备上放置标签和记录相关测试数据的说明;用于运输设备等。试剂盒可能包括阅读和解释分析结果的说明。试剂盒还可包括可用于将测试结果与样本样品进行比较的参考样品。

[0233] 应当理解,这种抗体可以潜在地用遗传融合标签(如NanoGlo[®]、NanoLuc[®]、SEAP和GFP)进行工程改造,用于高灵敏度测定检测。发光或荧光标签检测技术为下一代免疫分析开发提供最大灵敏度、高强度信号、低背景、宽动态范围、快速信号产生和分析格式兼容性。

[0234] 目前的抗体融合物适用于以商标名Nano-Glo[®]萤光素酶测定系统出售的系统中。该系统提供了一种简单的单添加试剂,可在NanoLuc[®]萤光素酶存在的情况下产生发光信号;在常用的组织培养基中半衰期约为120分钟。该试剂通过混合Nano-Glo[®]萤光素酶检测底物和Nano-Glo[®]萤光素酶检测缓冲液制备。该试剂含有完整的裂解缓冲液,可直接用于表达NanoLuc[®]萤光素酶的细胞或分泌萤光素酶的培养基。Nano-Glo[®]萤光素酶检测试剂是用于检测NanoLuc[®]萤光素酶的专用产品。

[0235] 在另一个实施方式中,抗体形成用于诊断的试剂盒和/或免疫测定的一部分。在一个实施方式中,免疫测定提供可检测的信号,该信号可以通过仪器视觉或光学读取。在一个实施方式中,可检测信号是荧光信号,例如由连接至抗体的检测颗粒如钨颗粒提供。

【实施例】

[0236] 本文所述的结构、材料、组合物和方法旨在作为本公开的代表性实施例,并且应当理解,本公开的范围不受实施例范围的限制。本领域技术人员将认识到,可以通过对所公开的结构、材料、组合物和方法的变化来实践本公开,并且这些变化被视为在本公开的范围

【实施例1:高灵敏度生物发光免疫分析检测系统】

[0238] **Nanoluc**[®] 萤光素酶和SEAP (分泌的胚胎碱性磷酸酶) 为抗体-抗原检测系统提供了具有广泛的线性检测范围检测 (高达 1.0×10^{10} RLU) 的非常明亮的标记。每种都非常适合生物发光检测,优于比色或荧光检测,同时提供卓越的稳定性和更高的灵敏度。PCT Fab采用基因融合标签进行工程设计,用于开发高灵敏度检测检测。合适的测定系统的例子包括:

[0239] (A) 使用融合**Nanoluc**[®] 萤光素酶重组表达的PCT单克隆抗体进行基于PCT抗体的免疫测定。**Nanoluc**是一种小型高活性工程萤光素酶蛋白,能够在适当的底物下实现极高的周转率。工程化的PCT Fab_Nluc融合显示出广泛的线性范围 (高达 1.0×10^{10} RLU),具有稳定的信号。将底物温育60分钟后未观察到明显的信号下降。在 0.2 pg/ml Fab_Nluc浓度下,观察到 >50 的信噪比。

[0240] (B) 采用工程化SEAP的基于PCT抗体的免疫测定。SEAP (分泌的胚胎碱性磷酸酶) 是一种 50 kDa 的融合标记酶,可以用多种市售底物检测。工程化的PCT Fab_SEAP表现出广泛的线性范围的酶活性 (高达 1.0×10^{10} RLU),具有稳定的信号-底物温育30分钟后未观察到显著的信号下降。在 0.1 pg/ml Fab_SEAP浓度下,观察到信噪比 >65 。

[0241] (C) 使用重组表达的M22_Nluc融合蛋白进行基于甲状腺TRAb的免疫测定。早期的基于珠和ELISA形式的研究表明,发光活性线性范围很广 (高达 1.0×10^9 RLU),信号稳定-底物温育30分钟后未观察到显著的信号下降。在 5 pg/ml 时,观察到 M22_Nluc试剂显示信噪比 >30 。

[0242] (D) 莱姆病VlsE/C6、OspC/10和基于DbpA抗体的检测。其中每个单克隆抗体都使用融合标签进行重组表达。

[0243] 荧光共振能量转移 (FRET) 技术和基因编码的FRET生物传感器蛋白。FRET技术和基因编码的FRET生物传感器蛋白为商业免疫分析开发提供了强大的工具。荧光蛋白 (例如GFP或RFP) 最常用作FRET生物传感器中的供体/受体荧光团,特别是因为FP具有遗传编码和相容性。测量FRET对的方法已经很好地用于免疫测定。

[0244] M22 (TSHR-特异性) 抗体与荧光蛋白即绿色荧光蛋白 (GFP) 重组表达至Fab重链末端。M22_Fab_GFP在基于ELISA的检测系统上运行良好。这在侧向流或具有洗涤步骤的测定 (例如ELISA和流式测定) 中很有用。它也可以应用于流式细胞仪检测,而无需偶联。

[0245] 应当理解,抗体可以用荧光蛋白如GFP或RFP重组表达或用RPE (R-藻红蛋白) 标记。

[0246] 在单独的重组抗原或抗体 (同一测定的一部分) 上,单独的荧光蛋白或荧光团可以通过融合标签表达,该融合标签具有与第一抗原/抗体的荧光蛋白的发射波长匹配的激发波长。所得到的测定系统将支持同质测定系统 (即,基于BRET或FRET)。例如,将TSHR特异性单克隆抗体M22与敏感标记/检测器融合,并作为融合蛋白重组产生,用于免疫分析开发。

[0247] 使用同质形式进行初步研究。例如,M22_Nluc在 460 nm 处发光 (在有底物存在的情

况下), RPE-抗人IgG在480nm处激发并在575nm处发射。当这两者混合以允许发生结合时,紧密接近导致荧光能量转移,其可以通过在575nm处读取作为发射来测量。

[0248] 酶片段互补测定,例如来自Promega的**NanoBIT[®]**也可以适用于本发明。在这里,抗体和抗原充当“诱饵”和“猎物”,每一个都以重组或共价方式连接到充当“报告分子”的第三蛋白质(例如,萤光素酶)的片段。诱饵和猎物蛋白之间的相互作用使报告蛋白的片段非常接近,从而使它们能够形成功能性报告蛋白,然后可以测量其酶活性。萤光素酶衍生的**NanoBIT[®]**(大**BIT[®]**是156aa蛋白质,而小**BIT[®]**是11aa肽)可以根据本发明容易地使用。首先,重组抗体用融合到抗体重链或Fab重链或轻链末端的非功能性发光蛋白部分来表达。接下来,非功能性发光蛋白的第二片段与第二抗原或抗体连接,使得发光蛋白的第二片段能够与第一发光蛋白部分结合。这产生了互补的功能性蛋白质。例如,当第一抗体与第二抗体结合的抗原结合时发生结合,从而使发光蛋白的两个部分彼此紧密接近,从而允许发生结合。这会产生一种与底物反应的活性酶,从而产生信号。

[0249] 【实施例2:用于甲状腺免疫测定的生物发光分析物检测系统】

[0250] 进行检测方法以提供增强的灵敏度和改进的精度以检测抗原/抗体结合事件。这项工作分为两部分:首先探索和研究抗原/抗体表达系统,然后确定分析物检测系统以进行评估。该评估确定了主要由Promega[®]公司开发和制造的不同基于萤光素酶的检测系统,例如萤火虫萤光素酶(**Bright-Glo[®]**)。Promega的**GloSensor[®]**是基于萤火虫萤光素酶的融合和循环排列开发并商业化的,萤火虫萤光素酶是一种改进的细胞内环AMP (cAMP) 均相检测系统。另外合适的是Promega的**NanoLuc[®]**萤光素酶(Nluc) 系统。参见England等, NanoLuc: a small luciferase is brightening up the field of bioluminescence. *Bioconjug. Chem.* 27, 1175-1187 (2016); 和Boute等, **NanoLuc[®]** luciferase - a multifunctional tool for high throughput antibody screening (见 *Front Pharmacol.* 2016;7:27)。这种小的(19kDa)、高度稳定、不依赖于ATP的生物发光蛋白成为用于分析开发的强大的超高灵敏度检测系统。该系统用途广泛,可通过酶的生物工程和/或使用基于BRET的筛选测定进行细胞、固相ELISA和均相测定。**Nluc[®]**蛋白萤光素酶提供改进的即时(POC)测试。

[0251] NanoLuc萤光素酶性质的有益性质包括小尺寸(19kDa)、热稳定性、在宽pH范围内的活性、单体结构、在哺乳动物细胞中不检测PTM、不形成二硫键、在细胞中均匀分布、高亮度和广泛的线性动态范围。此外,NanoLuc是一种独立于ATP的Glow-type Signal,可提供稳定的信号,无斜升率,半衰期>2小时。图1显示了**Nanoluc[®]**萤光素酶系统的概要。

[0252] 【实施例3】

[0253] 包含TSHR胞外域(ECD)的氨基酸20~275的TSHR合成片段的融合蛋白在本文中称为L1-10。在BIAcore筛选试验中L1-10融合蛋白特异性结合甲状腺刺激抗体(M22,公开于US 8,110,664;序列以引用方式并入本文)和甲状腺阻断抗体(K1-70,公开于US 9,073,992,序列以引用方式并入本文)(数据未显示)。在鉴定所需抗原并开发L1-10(TSH受体,THSR)和抗TSHR抗体(TRAb)试剂后,开发了基于ELISA的甲状腺免疫测定法。为了探索生物发光技术,使用L1-10/TRAb M22测定系统进行了初步探索研究。两个重组融合构建体,M22_NLuc抗体和L1-10_NLuc抗原分别用NLuc tag设计和工程化用于哺乳动物表达。下面列出了随后的蛋白质序列用于构建。蛋白质分别通过Ni-NTA和StrepTactin技术(在ATUM)进行亲

和纯化,并交付用于酶促和功能测试。通过SDS-PAGE和SEC-HPLC进行蛋白质表征。

[0254] L1-10融合蛋白具有以下结构:

[0255] Ψ - β - γ_1 - ϵ - γ_2 - π -PEP- ϕ (式I)

[0256] 其中,

[0257] Ψ 是信号肽或不存在;

[0258] β 是结合分子或不存在;

[0259] γ_1 和 γ_2 各自独立地为接头或不存在;

[0260] ϵ 是表达增强子或不存在;

[0261] π 是存在或不存在的可切割位点;

[0262] PEP是包含多个 α TSHR ECD亮氨酸富集区(LRR)的多肽;和

[0263] ϕ 是可检测的标记或不存在。

[0264] 在该研究中,L1-10包含:

[0265] (i) 信号肽(Ψ)MGWSLILLFL VAVATRVLS (SEQ ID NO:11);

[0266] (ii) 结合分子(β)SAWSHPQFEK GGGSGGGSGG SSAWSHPQFE K (SEQ ID NO:12);

[0267] (iii) 接头1(γ_1)GGGS (SEQ ID NO:13);

[0268] (iv) 具有以下序列的麦芽糖结合蛋白的表达增强子(ϵ):

[0269] KIEEGKLVIIW INGDKGYNGL AEVGGKFEKD TGIKVTVEHP DKLEEKFPQV AATGDGPDII
FWAHRDFGGY AQSGLLAEIT PDKAFQDKLY PFTWDAVRYN GKLIAYPIAV EALSLIYNKD
LLPNPPKTWE EIPALDKELK AKGKSALMFN LQEPYFTWPL IAADGGYAFK YENKDYDIKD
VGVDNAGAKA GLTFLIDLIK NKHMNADTDY SIAEAAFNKG ETAMTINGPW AWSNIDTSKV
NYGVTVLPTF KGQPSKPFVG VLSAGINAAS PNKELAKEFL ENYLLTDEGL EAVNKDKPLG
AVALKSYEEE LAKDPRIAAT MENAQKGEIM PNIPQMSAFW YAVRTAVINA ASGRQTVDEA
LKDAQT (SEQ ID NO: 14);

[0270] (v) 接头2(γ_2)包含多肽GGGS (SEQ ID NO:13);

[0271] (vi) 多肽ENLYFQ的可切割位点(π) (SEQ ID NO:15);和

[0272] (vii) 对应于hTSHR的aa20~275的多肽的PEP序列:

[0273] GGMGCSSPPC ECHQEEDFRV TCKDIQRIPS LPPSTQTLKL IETHLRTIPS HAFSNLPNIS
RIYVSIDVTL QQLESHSFYN LSKVTHIEIR NTRNLTYIDP DALKELPLLK FLGIFNTGLK
MFPDLTKVYS TDIFFILEIT DNPYMTSIPV NAFQGLCNET LTLKLYNNGF TSVQGYAFNG
TKLDAVYLNK NKYLTVIDKD AFGGVYSGPS LLDVQSQTSVT ALPSKGLEHL KELIARNTWT
LKKLPLSLSF LHLTRA (SEQ ID NO: 16)

[0274] M22_NLuc_His标签抗体蛋白氨基酸序列如下:

[0275] >mAB NLuc-His_vH-IgG1

[0276] QVQLVQSGAE VKKPGESLKI SCRGSGYRFT SYWINWVRQL PGKGLEWMGR IDPTDSYTNV
SPSFKGHVTV SADKSINTAY LQWSSLKASD TGMYYCARLE PGYSSTWSVN WGQGLTVTVS
SASTKGPSVF PLAPSSKSTS GGTAALGCLV KDYFPEPVTV SWNSGALTSG VHTFPAVLQS
SGLYSLSSVV TVPSSSLGTQ TYICNVNHKP SNTKVDKKEV PKSCDKTHTC PPCPAPELLG
GPSVFLFPPK PKDTLMISRT PEVTCVVVDV SHEDPEVKFN WYVDGVEVHN AKTKPREEQY
NSTYRVVSVL TVLHQDWLNG KEYKCKVSNK ALPAPIEKTI SKAKGQPREP QVYTLPPSRD
ELTKNQVSLT CLVKGFYPSD IAVEWESNGQ PENNYKTTTP VLDSGGSFLL YSKLTVDKSR
WQQGNVFNCS VMHEALHNHY TQKSLSLSPG KGGGSVFTLE DFVGDWRQTA GYNLDQVLEQ
GGVSSLFQNL GSVTPPIQRI VLSGENGLKI DIHVIIPYEG LSGDQMGQIE KIFKVVYPVD
DHHFKVILHY GTLVIDGVTP NMIDYFGRPY EGIAVFDGKK ITVTGTLWNG NKIIDERLIN
PDGSLFRVT INGVTGWRLC ERILAGGGSH HHHHHHGS (SEQ ID NO: 17)。

[0277] >mAB NLuc-His_VL-λ3

LTVLTQPPSV SGAPRQRVTI SCSGNSSNIG NNAVNWYQQL PGKAPKLLIY YDDQLPSGVSDRFSGSRSGT SASLAIRGLQ SEDEADYYCT SWDDSLDSQL FGGGTRLTVL GQPKAAPSVT
[0278] LFPPSSEELQ ANKATLVCLI SDFYPGAVTV AWKADSSPVK AGVETTPSK QSNNKYAASS
YLSLTPEQWK SHKSYSCQVT HEGSTVEKTV APTECS (SEQ ID NO: 18)

[0279] 以ELISA/微孔板测定形式评估系统性能,并测量融合蛋白的荧光素酶活性。

[0280] 【酶发光滴定】

[0281] 纯化的NLuc-融合的M22抗体或L1-10抗原依次在PBS-BSA 0.1%溶液中稀释。将50 μL的每种稀释液分布在96孔白色微孔板中。然后在每个孔中加入50 μL在 PBS中稀释200倍的Furimazine,然后加入0.1%BSA。在短暂的温育时间(<3分钟)后,在Perkin-Elmer VictorX 2030 Luminescence Reader (使用PE Victor 2030 Workstation软件)上读取发光。

[0282] 【ELISA测定程序】

[0283] 表2列出了根据本发明用于分析开发的ELISA试剂。

[0284] 【表2:用于检测开发的ELISA试剂】

试剂	来源/目录#
M22, 未标记	lot#1, 从 HEK 细胞重组表达
L1-10, 未标记	lot#11, 从 HEK 细胞重组表达
M22_NLuc	mAb_NLuc-His, 0.86 mg/mL, JS180124
L1-10_NLuc	Strep-MBP-L1-10-NLuc, 0.20 mg/mL, JS180130
[0285] 96 孔微量滴定板, 白色	Thermo#7417-12, 平底, 高结合
涂层缓冲液	PBS 缓冲液, pH 7.2, #0110800
封闭缓冲液:	StabilBlock (SurModics ST01-1000)
洗涤缓冲液:	1xPBS-0.05%Tween
Furimazine 底物	Promega #N113A, Nano-Glo 检测底物
检测缓冲液	Promega #N112A, Nano-Glo 检测缓冲液
链霉亲和素 (SA)	Sekisui#STRE-70-4803
链霉亲和素磁珠	Thermo#88816
[0286] 兔抗小鼠 IgG (RAM)	GE 医疗保健#29-2152-81
StrepMAB, 小鼠单克隆	IBA# 2-1517-001
抗 MBP, 小鼠单克隆	NEB#8032

[0287] 板包被(使用Microlite 2白板如下进行。在PBS缓冲液中制备稀释的板包被蛋白。在包被缓冲液中加入50 μl或100 μl/孔的10 μg/mL抗原或抗体。将板密封,并在4°C下温育过夜。不进行摇动。然后用PBST 4×, 250 μl/孔, 浸泡5秒, 除非另有说明。然后用200 μl/孔的封闭缓冲液封闭, 将板密封并在室温下温育1小时。然后用PBST 4×洗涤板。

[0288] 温育步骤如下。将适当的稀释标准与对照和样品一起在单独的非粘性板中的测定稀释剂中制备。将50 μl或100 μl的每种抗体或抗原(以指定浓度)移液到板孔中。将板密封并在室温下温育60分钟(除非另有说明)。用PBST 4×洗涤板。移取50 μl/孔的Furimazine底物并在室温下温育3分钟。在Perkin-Elmer VictorX®2030 Luminescence Reader (使用PE Victor 2030 Workstation软件)上读取板。

[0289] 蛋白质表征结果表明, 抗体融合蛋白在还原SDS-PAGE凝胶上纯化为70kDa(重链)

和30kDa (轻链),在非还原凝胶上观察到更高分子量的条带(220kDa条带)。纯化的蛋白质在HPLC上显示为一个主要的主峰(保留时间5.3,对应于人IgG分子量)。结果如图2所示。

[0290] 【实施例4】

[0291] M22_NLuc表现出广泛的线性范围的酶促发光活性(高达 1.0×10^8 RLU)。即使在 $1 \sim 10 \text{ pg/mL}$ 浓度下也观察到良好的信噪比。在底物温育5、10和15分钟后,未观察到RLU信号降低。

[0292] L1-10抗原直接包被在微孔板上过夜。将系列稀释的M22_NLuc添加到每个孔中,并在室温下温育30分钟。在存在 $5 \mu\text{g/mL}$ M22 (未标记)的情况下,将对照孔与M22_Luc一起温育。

[0293] M22_NLuc在30分钟测定中显示出剂量应答抗原结合活性(测定时间显著缩短)。未标记的M22表现出对M22_Luc与涂层L1-10结合的特异性抑制。但灵敏度很差,与以往的研究一致,即直接包被L1-10抗原会导致抗原结合活性失活,从而导致灵敏度丧失。结果示于图3A和3B。

[0294] 【实施例5】

[0295] 包被链霉亲和素作为L1-10捕获的附加步骤。将系列稀释的M22_NLuc添加到每个孔中,并温育1小时。在底物显影后测量上清液(Supte)和结合信号(Bound)。M22_NLuc在SA涂层板上表现出剂量应答。然而,与作为上清液(Supte)添加到每个孔中的整体信号相比,灵敏度似乎非常差。这是由于L1-10上的SA和Strep标签之间的结合亲和力差,从而导致灵敏度丧失。结果如图4所示。

[0296] 【实施例6】

[0297] 链霉亲和素磁珠用作L1-10捕获的附加步骤。 $1:10$ 稀释的链霉亲和素磁珠与L1-10一起温育并旋转1小时。通过离心(3000 rpm 3分钟)洗涤3次。将系列稀释的M22_NLuc添加到每个试管中,并温育1小时。在底物显影后测量上清液(Supte)和结合信号(Bound)。M22_NLuc在SA珠测定中表现出剂量应答。如上所述,与添加到每个孔的上清液(Supte)的整体信号相比,灵敏度看起来很差。这是由于SA珠和L1-10上的Strep标签之间的结合亲和力差,从而导致灵敏度下降。这些结果如图5所示。

[0298] 【实施例7】

[0299] 本研究集中于使用NanoLuc作为检测试剂并开发L1-10测定。使用作为小鼠单克隆StrepMAb (IBA#2-1517-001)和抗MBP (NEB#E8032)的间接捕获包被的兔抗小鼠 (RAM, GE#29-2152-81)测试了间接夹心测定。小鼠单克隆抗体作为L1-10的锚。将系列稀释的M22_NLuc添加到每个孔中,并温育1小时。M22_NLuc在广泛的RLU信号中表现出良好的灵敏度。即使在M22_NLuc浓度低于 $<100 \text{ ng/mL}$ 时也观察到宽范围的S/N。这表明RAM可以很好地结合小鼠单克隆(抗MBP或StrepMAb),捕获L1-10抗原,并通过M22-NLuc检测所需的灵敏度。结果如图6所示。

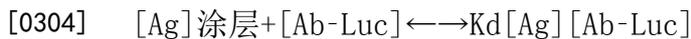
[0300] 【实施例8:L1-10/抗MBP包被ELISA测定的M22_NLuc抗体剂量应答】

[0301] 测试了标准夹心测定法。包被抗MBP单克隆抗体作为L1-10抗原的直接捕获物。将连续稀释的M22_NLuc添加到每个孔中并温育1小时。M22_NLuc在广泛的RLU信号中表现出良好的灵敏度。即使在M22_NLuc浓度远低于 100 ng/mL 时也观察到宽范围的S/N。这表明小鼠抗MBP单克隆很好地结合了L1-10抗原,被M22-NLuc检测到具有很高的灵敏度。结果如图7所

示。

[0302] 【实施例9】

[0303] 在基于L1-10/抗MBP的ELISA测定中用M22_NLuc滴定M22竞争(剂量应答)。使用固定的M22_NLuc浓度(从120ng/mL开始),未标记的M22用于剂量应答滴定。M22在这种检测形式上与M22_NLuc竞争。使用120或40ng/mL的M22_NLuc分别测定M22的 IC_{50} 为3.8IU/L和2.1IU/L(注:10ng/mL=1mIU/mL或1IU/L)。随着检测系统中使用的M22_NLuc越来越少,检测的灵敏度会变得更好。在接下来的实验中使用30或10ng/mL的M22_NLuc也是如此。这与通过Cheng-Prusoff方程 $K_i = IC_{50} / (1 + ([L] / K_d))$ 进行的数据分析一致,其中(L)是配体(在这种情况下为M22-NLuc)浓度。系统中使用的[L]越小, IC_{50} 值将越低。使用最低浓度的抗体或抗原可以达到更好的灵敏度。



[0306] 结果如图8所示。

[0307] 【实施例10】

[0308] 在基于L1-10/抗MBP的ELISA测定中用M22_NLuc滴定M22竞争(剂量应答)。使用固定的M22_NLuc浓度(30或10ng/mL),未标记的M22用于剂量应答竞争滴定。使用30或10ng/mL的M22_NLuc测定M22(未标记)的 IC_{50} 分别为1.5IU/L和1.0IU/L。因此,当使用较少的M22_NLuc(从120ng/mL到10ng/mL)时,M22的 IC_{50} 降低了3.8倍(从38ng/mL到10ng/mL)。将抗MBP/L1-10捕获板在4°C下保存5天,观察到相同的活性。结果如图9所示。

[0309] 【实施例11】

[0310] 进行MBP_L1-10_NLuc抗原蛋白测试。图10显示了通过Ni-NTA柱对纯化蛋白质的SDS-PAGE分析。

[0311] 【实施例12】

[0312] L1-10_NLuc酶滴定与Furimazine底物。L1-10_NLuc表现出广泛的线性范围的酶促发光活性(高达 1.0×10^8 RLU)。即使在1-10pg/mL浓度下也观察到良好的信噪比。底物温育3分钟后观察到一致的RLU信号。结果如图11所示。

[0313] 【实施例13】

[0314] L1-10_NLuc滴定M22包被的ELISA测定。M22直接涂在微孔板上过夜。将系列稀释的L1-10_NLuc添加到每个孔中,并温育50分钟。在50 μ g/mL M22(未标记)存在下,对照孔与L1-10_NLuc一起温育。L1-10_NLuc在广泛的RLU信号(高达 7.0×10^6 RLU)上表现出良好的灵敏度。即使在L1-10_NLuc浓度远低于100ng/mL时也观察到宽范围的S/N。因此,当优化使用较少的L1-10_NLuc时灵敏度会很好。这表明单步L1-10_NLuc测定是可行的,并且在异常广泛的线性范围内观察到特定的剂量应答结合活性。结果如图12所示。

[0315] 【实施例14】

[0316] 基于L1-10_NLuc/M22的ELISA测定的M22剂量应答曲线。M22被涂在微孔板上。将固定浓度的L1-10_NLuc(具有连续稀释的M22)添加到每个孔中,并温育1小时。在L1-10_NLuc浓度固定(从1 μ g/mL开始)的情况下,未标记的M22在该测定中表现出与L1-10_NLuc的良好竞争。M22在广泛的RLU信号中表现出良好的灵敏度。使用1 μ g/mL的L1-10_NLuc测定M22的 IC_{50} 为30ng/mL(3IU/L)。结果如图13所示。

[0317] 【实施例15】

[0318] 基于L1-10_NLuc/M22的ELISA测定的M22剂量应答曲线。M22抗体包被在微孔板上。将固定浓度的L1-10_NLuc (具有连续稀释的M22) 添加到每个孔中,并温育1小时。在L1-10_NLuc浓度固定(0.2 μ g/mL或0.1 μ g/mL)的情况下,未标记的M22在该测定中表现出与L1-10_NLuc的良好竞争。M22在广泛的RLU信号中表现出良好的灵敏度。分别使用0.2 μ g/mL或0.1 μ g/mL的L1-10_NLuc测定M22的 IC_{50} 为12ng/mL(1.2IU/L)和8ng/mL(0.8IU/L)。当使用较少的L1-10_NLuc (从1000ng/mL到100ng/mL)时,M22的 IC_{50} 降低了3.5倍(从30ng/mL到8 ng/mL)。结果如图14A和14B所示。

[0319] 对于M22_NLuc抗体蛋白,由于小蛋白NLuc以化学计量比与重组抗体遗传融合,这提供了直接用于测定开发的直接标记试剂。与化学标记缀合过程相比,该过程导致最大活性而没有抗体失活。NLuc活性的宽发光线性动态范围使L1-10测定具有更高的灵敏度。与本文通过HRP缀合物方法测量的M22剂量应答曲线相比,观察到至少3倍的灵敏度。这种夹心形式,通过M22_NLuc融合检测到L1-10被板上的抗MBP捕获,在可能不到1小时的测定中实现了一个简单的步骤定量ELISA(因为L1-10捕获的板可以干燥并稳定储存)。

[0320] 对于L1-10_NLuc抗原蛋白,由于小蛋白NLuc以化学计量比与重组抗原遗传融合,这提供了直接用于测定开发的直接标记试剂。与化学标记缀合过程相比,该过程导致最大活性而没有抗原失活。采用工程化L1-10_NLuc的直接免疫测定法在不到1小时的测定中实现了一步定量甲状腺ELISA,并具有优化的灵敏度。优越的广泛的线性动态范围使L1-10分析具有更高的灵敏度。与用降低的L1-10_NLuc浓度确定的M22剂量应答曲线相比,观察到至少3倍的灵敏度。因此,除了工程化的L1-10_NLuc和M22_NLuc之外,基于NanoLuc的技术平台(如BRET)的潜在应用可用于进一步灵敏和定量的POC分析开发。

[0321] 【实施例16:M22_GFP_Fab对细胞表面TSHR的荧光检测】

[0322] CHO细胞用100 μ L体积的 5×10^6 个细胞/mL的TSHR工程化。每个条件的细胞数为 5×10^5 。在反应缓冲液中使用0.95~30.4 μ g/mL的M22 Fabs设计对照,并在冰上放置1小时。然后将它们与小鼠抗人IgG1 Fc抗体-Alexa Fluor 488在反应缓冲液中以42.5 μ g/mL的浓度(即比一抗过量50%)温育,并在冰上放置1小时。M22 Fab-GFP(绿色荧光蛋白)的测试如下进行。

[0323] 获得在反应缓冲液中浓度为0.9~45.5 μ g/mL的M22 Fab-GFP,并在冰上放置1小时。不需要二抗。将M22 Fab-GFP融合物洗涤3次,每次以 $300 \times g$ 离心5分钟。流式细胞术在Apogee Flow Systems细胞仪上进行,单线细胞为FITC/Alexa Fluor 488荧光选通。记录信号并绘制剂量应答曲线。实验的图解表示在图16中。这些实验的结果在图17~19中给出。

[0324] 图17显示了M22Fab_GFP蛋白的表达和纯化,通过Ni-NTA柱对纯化的蛋白进行SDS-PAGE分析。在图18中,可以看出阴性对照(单独的初级抗体或次级抗体)作为非特异性结合背景产生了最小的信号。每个细胞都观察到M22的绿色荧光强度增加。荧光强度在M22约30 μ g/mL左右达到峰值,细胞为 5×10^6 /mL。当使用二抗检测细胞表面的TSHR数时,M22显示出有效的剂量应答。阴性对照产生最小信号作为非特异性结合背景。增加的M22-GFP导致测量每个细胞的绿色荧光强度。荧光强度稳定在M22-GFP约20 μ g/mL,细胞为 5×10^6 /mL。这些结果列于图19中。可以看出,M22-GFP与M22与二抗的组合对于检测细胞表面上的TSHR数同样有效。因此发现二抗不是必需的。结果表明,标记变异减少,细胞和抗体损失减少,从而更准确

地测量每个细胞的受体。

[0325] 【实施例17:抗体融合的侧向流检测】

[0326] 分析本技术的抗体融合物在侧向流免疫测定中的性能。测试的抗体融合物是与 Halo Tag (Promega) 蛋白标签融合并缀合至与配体偶联的钨珠的抗流感A抗体(图 20A)。Halo Tag-配体相互作用是Halo Tag融合抗流感A抗体与配体偶联钨珠结合的基础。然后将该抗体融合偶联物点在硝酸纤维素上(通道5和6);未修饰的流感A抗体被点样在硝酸纤维素上作为阳性对照(通道1);如表3所示,将不含抗体的配体点作为硝酸纤维素条的阴性对照(通道2~4)。

[0327] 【表3:硝酸纤维素条通道图例】

渠道	捕获
1	对照珠:流感A
2	阴性对照:配体1
3	阴性对照:配体2
4	阴性对照:配体3
5	配体流感A抗体 (0.9mg/mL) - 1
6	配体流感A抗体 (0.6mg/mL) - 2

[0329] 每个通道用独特的捕获试剂(根据表3)和大约80~90nL的点样溶液点样。然后将斑点硝酸纤维素卡片在强制通风烘箱中干燥5分钟,然后进行干燥储存。

[0330] 接下来,在添加到硝酸纤维素条之前,将流感A抗原与偶联到流感A对照Ab(对照珠)或流感A融合Ab(Antibody Fusion Beads)的测试珠预混合。在两个水平上测试抗原浓度,100ng/mL和0ng/mL。然后将100μL与珠预混合的样品添加到试纸条,并在成像前运行10分钟。

[0331] 来自侧向流免疫测定的结果显示在通道1、5和6中检测到对照珠和抗体融合珠的荧光信号(图20B)。该结果表明测试的抗体与通道1(对照流感A抗体)、5(0.9 mg/mL流感A抗体融合)和6(0.6mg/mL流感A抗体融合)中的捕获抗体有效结合。阴性对照配体通道2、3和4没有荧光信号。这些通道中没有信号表明捕获抗体的特异性,因为在没有捕获抗体的情况下配体斑点不会产生阳性信号。这些结果表明,包含流感A/Halo Tag融合物的抗体融合蛋白在侧向流免疫测定中表现良好。这进一步证明了当前描述的抗体融合在侧向流形式中的效用。

<220>
<223> 合成的
<400> 6
Gly Gly Ser Gly Gly
1 5
<210> 7
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的
<400> 7
Gly Ser Gly Ser Gly
1 5
<210> 8
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的
<400> 8
Gly Ser Gly Gly Gly
1 5
<210> 9
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的
<400> 9
Gly Gly Gly Ser Gly
1 5
<210> 10
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的
<400> 10

Gly Ser Ser Ser Gly

1 5

<210> 11

<211> 19

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 11

Met Gly Trp Ser Leu Ile Leu Leu Phe Leu Val Ala Val Ala Thr Arg

1 5 10 15

Val Leu Ser

<210> 12

<211> 31

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 12

Ser Ala Trp Ser His Pro Gln Phe Glu Lys Gly Gly Gly Ser Gly Gly

1 5 10 15

Gly Ser Gly Gly Ser Ser Ala Trp Ser His Pro Gln Phe Glu Lys

20 25 30

<210> 13

<211> 4

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 13

Gly Gly Gly Ser

1

<210> 14

<211> 366

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 14

Tyr Ser Thr Asp Ile Phe Phe Ile Leu Glu Ile Thr Asp Asn Pro Tyr
 130 135 140
 Met Thr Ser Ile Pro Val Asn Ala Phe Gln Gly Leu Cys Asn Glu Thr
 145 150 155 160
 Leu Thr Leu Lys Leu Tyr Asn Asn Gly Phe Thr Ser Val Gln Gly Tyr
 165 170 175
 Ala Phe Asn Gly Thr Lys Leu Asp Ala Val Tyr Leu Asn Lys Asn Lys
 180 185 190
 Tyr Leu Thr Val Ile Asp Lys Asp Ala Phe Gly Gly Val Tyr Ser Gly
 195 200 205
 Pro Ser Leu Leu Asp Val Ser Gln Thr Ser Val Thr Ala Leu Pro Ser
 210 215 220
 Lys Gly Leu Glu His Leu Lys Glu Leu Ile Ala Arg Asn Thr Trp Thr
 225 230 235 240
 Leu Lys Lys Leu Pro Leu Ser Leu Ser Phe Leu His Leu Thr Arg Ala
 245 250 255
 <210> 17
 <211> 639
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成的
 <400> 17
 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Glu
 1 5 10 15
 Ser Leu Lys Ile Ser Cys Arg Gly Ser Gly Tyr Arg Phe Thr Ser Tyr
 20 25 30
 Trp Ile Asn Trp Val Arg Gln Leu Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45
 Gly Arg Ile Asp Pro Thr Asp Ser Tyr Thr Asn Tyr Ser Pro Ser Phe
 50 55 60
 Lys Gly His Val Thr Val Ser Ala Asp Lys Ser Ile Asn Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Gly Met Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Leu Glu Pro Gly Tyr Ser Ser Thr Trp Ser Val Asn Trp Gly
 100 105 110
 Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser
 115 120 125

Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala
 130 135 140
 Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val
 145 150 155 160
 Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala
 165 170 175
 Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val
 180 185 190
 Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His
 195 200 205
 Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys
 210 215 220
 Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
 225 230 235 240
 Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
 245 250 255
 Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
 260 265 270
 Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
 275 280 285
 His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
 290 295 300
 Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
 305 310 315 320
 Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
 325 330 335
 Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
 340 345 350
 Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser
 355 360 365
 Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
 370 375 380
 Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
 385 390 395 400
 Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
 405 410 415
 Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
 420 425 430
 His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser

435	440	445
Pro Gly Lys Gly Gly Gly Ser Val Phe Thr Leu Glu Asp Phe Val Gly		
450	455	460
Asp Trp Arg Gln Thr Ala Gly Tyr Asn Leu Asp Gln Val Leu Glu Gln		
465	470	475
Gly Gly Val Ser Ser Leu Phe Gln Asn Leu Gly Val Ser Val Thr Pro		
485	490	495
Ile Gln Arg Ile Val Leu Ser Gly Glu Asn Gly Leu Lys Ile Asp Ile		
500	505	510
His Val Ile Ile Pro Tyr Glu Gly Leu Ser Gly Asp Gln Met Gly Gln		
515	520	525
Ile Glu Lys Ile Phe Lys Val Val Tyr Pro Val Asp Asp His His Phe		
530	535	540
Lys Val Ile Leu His Tyr Gly Thr Leu Val Ile Asp Gly Val Thr Pro		
545	550	555
Asn Met Ile Asp Tyr Phe Gly Arg Pro Tyr Glu Gly Ile Ala Val Phe		
565	570	575
Asp Gly Lys Lys Ile Thr Val Thr Gly Thr Leu Trp Asn Gly Asn Lys		
580	585	590
Ile Ile Asp Glu Arg Leu Ile Asn Pro Asp Gly Ser Leu Leu Phe Arg		
595	600	605
Val Thr Ile Asn Gly Val Thr Gly Trp Arg Leu Cys Glu Arg Ile Leu		
610	615	620
Ala Gly Gly Gly Ser His His His His His His His His Gly Ser		
625	630	635
<210> 18		
<211> 216		
<212> PRT		
<213> 人工序列		
<220>		
<223> 合成的		
<400> 18		
Leu Thr Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Gly Ala Pro Arg Gln		
1	5	10
Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Asn Ser Ser Asn Ile Gly Asn Asn		
20	25	30
Ala Val Asn Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu		
35	40	45
Ile Tyr Tyr Asp Asp Gln Leu Pro Ser Gly Val Ser Asp Arg Phe Ser		

50	55	60
Gly Ser Arg Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Arg Gly Leu Gln		
65	70	75
Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Thr Ser Trp Asp Asp Ser Leu		
	85	90
Asp Ser Gln Leu Phe Gly Gly Gly Thr Arg Leu Thr Val Leu Gly Gln		
	100	105
Pro Lys Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser Glu Glu		
	115	120
Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp Phe Tyr		
130	135	140
Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser Pro Val Lys		
145	150	155
Ala Gly Val Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys Tyr		
	165	170
Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser His		
	180	185
Lys Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val Glu Lys		
195	200	205
Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser		
210	215	
<210> 19		
<211> 224		
<212> PRT		
<213> 人工序列		
<220>		
<223> 合成的		
<400> 19		
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Glu		
1	5	10
Ser Leu Lys Ile Ser Cys Arg Gly Ser Gly Tyr Arg Phe Thr Ser Tyr		
	20	25
Trp Ile Asn Trp Val Arg Gln Leu Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met		
	35	40
Gly Arg Ile Asp Pro Thr Asp Ser Tyr Thr Asn Tyr Ser Pro Ser Phe		
50	55	60
Lys Gly His Val Thr Val Ser Ala Asp Lys Ser Ile Asn Thr Ala Tyr		
65	70	75
Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Gly Met Tyr Tyr Cys		

	85	90	95
Ala Arg Leu Glu Pro Gly Tyr Ser Ser Thr Trp Ser Val Asn Trp Gly			
	100	105	110
Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser			
	115	120	125
Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala			
	130	135	140
Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val			
145	150	155	160
Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala			
	165	170	175
Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val			
	180	185	190
Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His			
	195	200	205
Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys			
	210	215	220
<210>	20		
<211>	239		
<212>	PRT		
<213>	人工序列		
<220>			
<223>	合成的		
<400>	20		
Met Val Ser Lys Gly Glu Glu Leu Phe Thr Gly Val Val Pro Ile Leu			
1	5	10	15
Val Glu Leu Asp Gly Asp Val Asn Gly His Lys Phe Ser Val Ser Gly			
	20	25	30
Glu Gly Glu Gly Asp Ala Thr Tyr Gly Lys Leu Thr Leu Lys Phe Ile			
	35	40	45
Cys Thr Thr Gly Lys Leu Pro Val Pro Trp Pro Thr Leu Val Thr Thr			
	50	55	60
Leu Thr Tyr Gly Val Gln Cys Phe Ser Arg Tyr Pro Asp His Met Lys			
65	70	75	80
Gln His Asp Phe Phe Lys Ser Ala Met Pro Glu Gly Tyr Val Gln Glu			
	85	90	95
Arg Thr Ile Phe Phe Lys Asp Asp Gly Asn Tyr Lys Thr Arg Ala Glu			
	100	105	110
Val Lys Phe Glu Gly Asp Thr Leu Val Asn Arg Ile Glu Leu Lys Gly			

115	120	125
Ile Asp Phe Lys Glu Asp Gly Asn Ile Leu Gly His Lys Leu Glu Tyr		
130	135	140
Asn Tyr Asn Ser His Asn Val Tyr Ile Met Ala Asp Lys Gln Lys Asn		
145	150	155
Gly Ile Lys Val Asn Phe Lys Ile Arg His Asn Ile Glu Asp Gly Ser		
165	170	175
Val Gln Leu Ala Asp His Tyr Gln Gln Asn Thr Pro Ile Gly Asp Gly		
180	185	190
Pro Val Leu Leu Pro Asp Asn His Tyr Leu Ser Thr Gln Ser Ala Leu		
195	200	205
Ser Lys Asp Pro Asn Glu Lys Arg Asp His Met Val Leu Leu Glu Phe		
210	215	220
Val Thr Ala Ala Gly Ile Thr Leu Gly Met Asp Glu Leu Tyr Lys		
225	230	235
<210> 21		
<211> 14		
<212> PRT		
<213> 人工序列		
<220>		
<223> 合成的		
<400> 21		
Gly Gly Gly Ser His His His His His His His His Gly Ser		
1	5	10
<210> 22		
<211> 841		
<212> PRT		
<213> 人工序列		
<220>		
<223> 合成的		
<400> 22		
Ser Ala Trp Ser His Pro Gln Phe Glu Lys Gly Gly Gly Ser Gly Gly		
1	5	10
Gly Ser Gly Gly Ser Ser Ala Trp Ser His Pro Gln Phe Glu Lys Gly		
20	25	30
Gly Gly Ser Lys Ile Glu Glu Gly Lys Leu Val Ile Trp Ile Asn Gly		
35	40	45
Asp Lys Gly Tyr Asn Gly Leu Ala Glu Val Gly Lys Lys Phe Glu Lys		
50	55	60

370	375	380
Ala Ala Ser Gly Arg Gln Thr Val Asp Glu Ala Leu Lys Asp Ala Gln		
385	390	395
Thr Gly Gly Gly Ser Glu Asn Leu Tyr Phe Gln Gly Gly Met Gly Cys		
	405	410
Ser Ser Pro Pro Cys Glu Cys His Gln Glu Glu Asp Phe Arg Val Thr		
	420	425
Cys Lys Asp Ile Gln Arg Ile Pro Ser Leu Pro Pro Ser Thr Gln Thr		
	435	440
Leu Lys Leu Ile Glu Thr His Leu Arg Thr Ile Pro Ser His Ala Phe		
450	455	460
Ser Asn Leu Pro Asn Ile Ser Arg Ile Tyr Val Ser Ile Asp Val Thr		
465	470	475
Leu Gln Gln Leu Glu Ser His Ser Phe Tyr Asn Leu Ser Lys Val Thr		
	485	490
His Ile Glu Ile Arg Asn Thr Arg Asn Leu Thr Tyr Ile Asp Pro Asp		
	500	505
Ala Leu Lys Glu Leu Pro Leu Leu Lys Phe Leu Gly Ile Phe Asn Thr		
	515	520
Gly Leu Lys Met Phe Pro Asp Leu Thr Lys Val Tyr Ser Thr Asp Ile		
530	535	540
Phe Phe Ile Leu Glu Ile Thr Asp Asn Pro Tyr Met Thr Ser Ile Pro		
545	550	555
Val Asn Ala Phe Gln Gly Leu Cys Asn Glu Thr Leu Thr Leu Lys Leu		
	565	570
Tyr Asn Asn Gly Phe Thr Ser Val Gln Gly Tyr Ala Phe Asn Gly Thr		
	580	585
Lys Leu Asp Ala Val Tyr Leu Asn Lys Asn Lys Tyr Leu Thr Val Ile		
	595	600
Asp Lys Asp Ala Phe Gly Gly Val Tyr Ser Gly Pro Ser Leu Leu Asp		
610	615	620
Val Ser Gln Thr Ser Val Thr Ala Leu Pro Ser Lys Gly Leu Glu His		
625	630	635
Leu Lys Glu Leu Ile Ala Arg Asn Thr Trp Thr Leu Lys Lys Leu Pro		
	645	650
Leu Ser Leu Ser Phe Leu His Leu Thr Arg Ala Gly Gly Gly Ser Val		
	660	665
Phe Thr Leu Glu Asp Phe Val Gly Asp Trp Arg Gln Thr Ala Gly Tyr		
675	680	685

Asn Leu Asp Gln Val Leu Glu Gln Gly Gly Val Ser Ser Leu Phe Gln			
690	695	700	
Asn Leu Gly Val Ser Val Thr Pro Ile Gln Arg Ile Val Leu Ser Gly			
705	710	715	720
Glu Asn Gly Leu Lys Ile Asp Ile His Val Ile Ile Pro Tyr Glu Gly			
	725	730	735
Leu Ser Gly Asp Gln Met Gly Gln Ile Glu Lys Ile Phe Lys Val Val			
	740	745	750
Tyr Pro Val Asp Asp His His Phe Lys Val Ile Leu His Tyr Gly Thr			
	755	760	765
Leu Val Ile Asp Gly Val Thr Pro Asn Met Ile Asp Tyr Phe Gly Arg			
	770	775	780
Pro Tyr Glu Gly Ile Ala Val Phe Asp Gly Lys Lys Ile Thr Val Thr			
785	790	795	800
Gly Thr Leu Trp Asn Gly Asn Lys Ile Ile Asp Glu Arg Leu Ile Asn			
	805	810	815
Pro Asp Gly Ser Leu Leu Phe Arg Val Thr Ile Asn Gly Val Thr Gly			
	820	825	830
Trp Arg Leu Cys Glu Arg Ile Leu Ala			
	835	840	

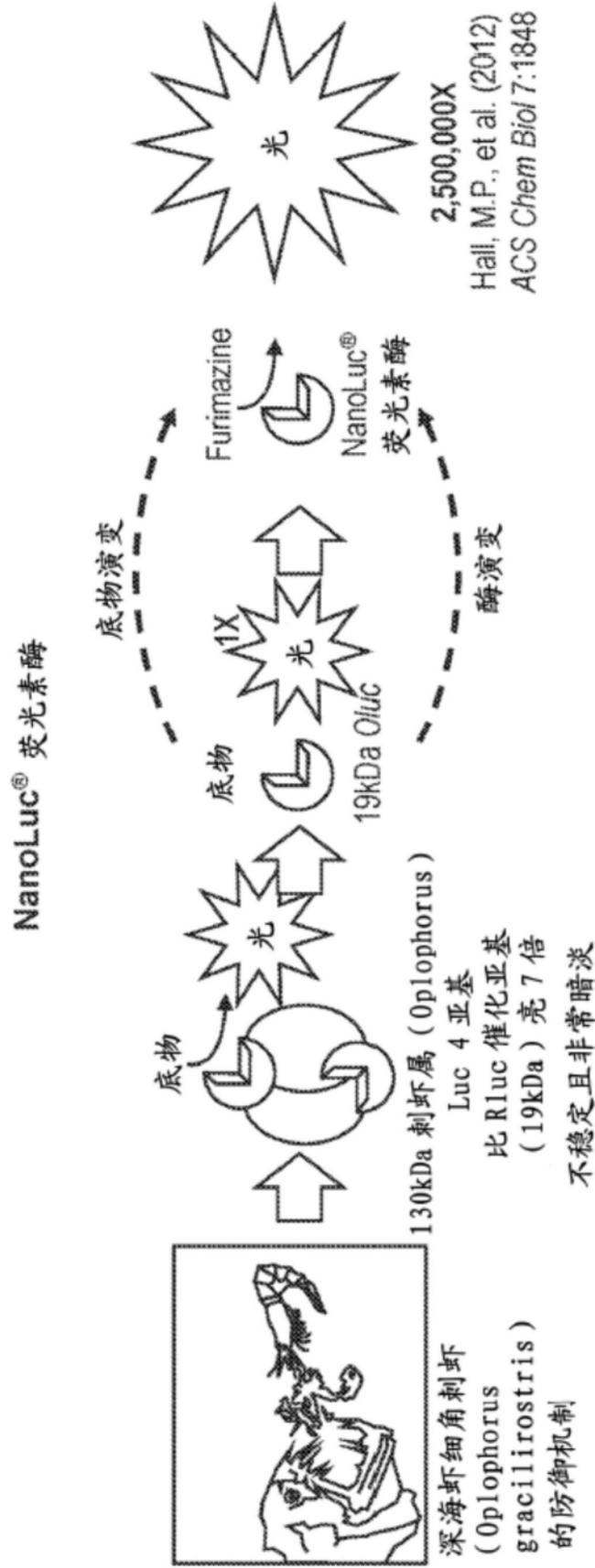


图1

M22_NLuc_HisTag 抗体蛋白测试
Ni-NTA 柱对纯化蛋白进行 SDS-PAGE 分析

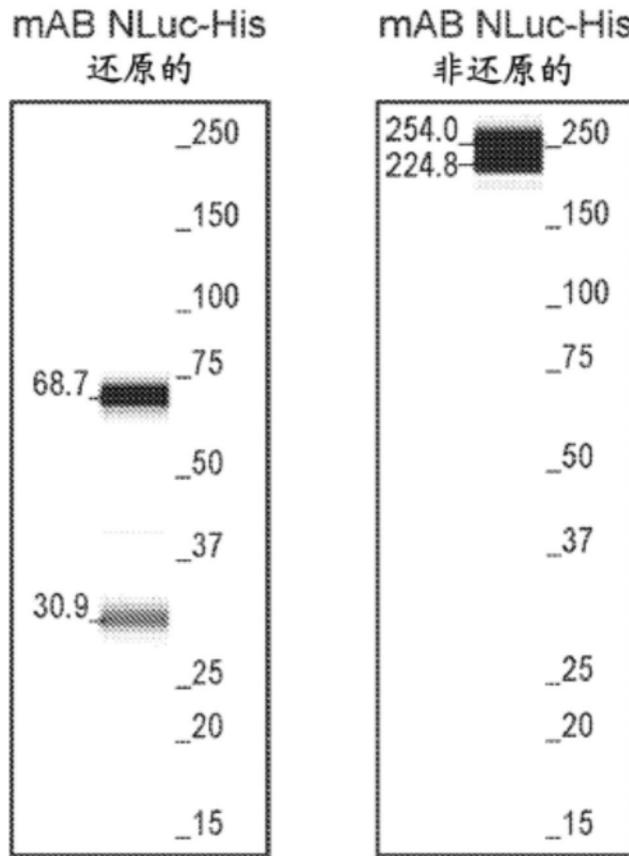


图2

以 Furimazine 为底物的 M22_NLuc 酶滴定

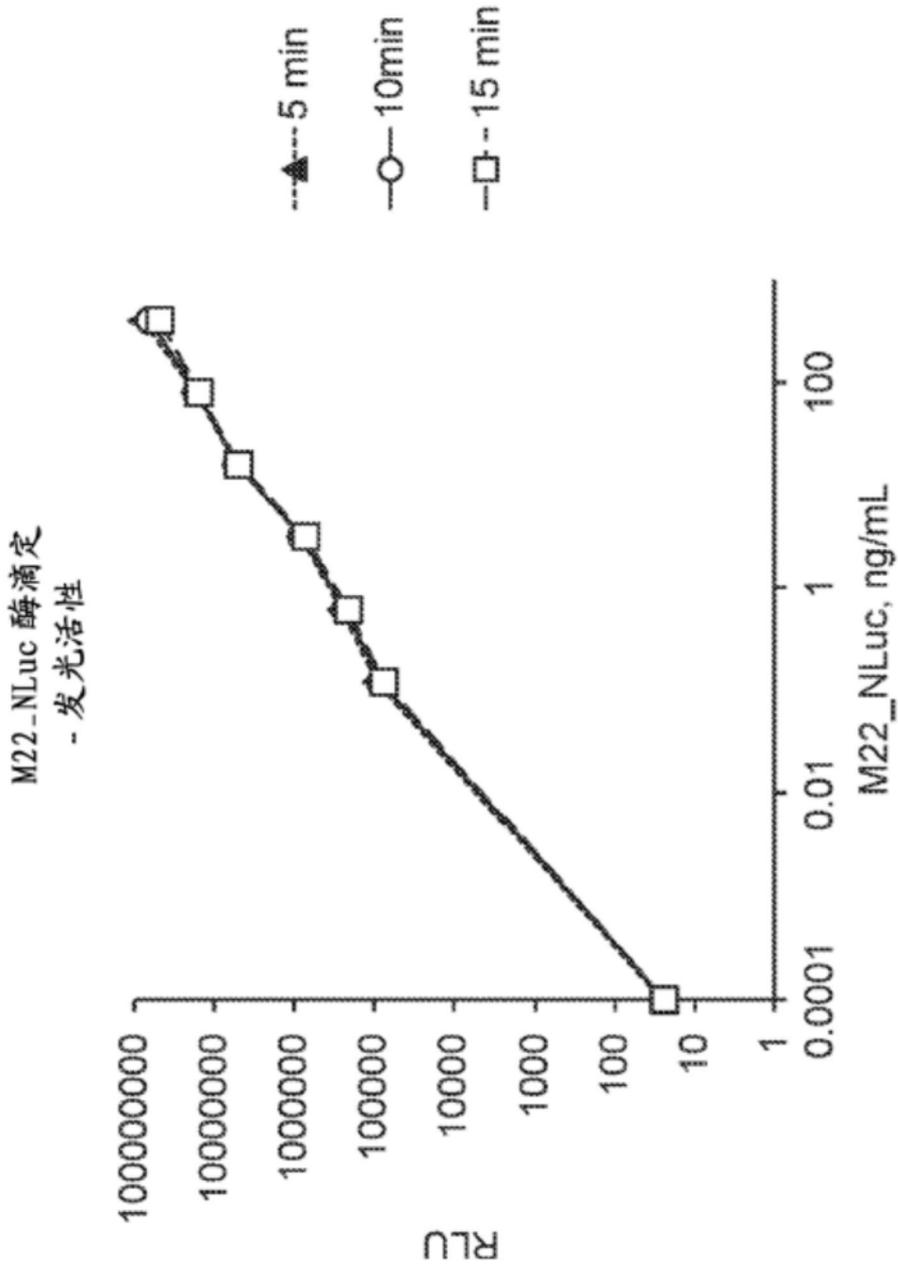


图3A

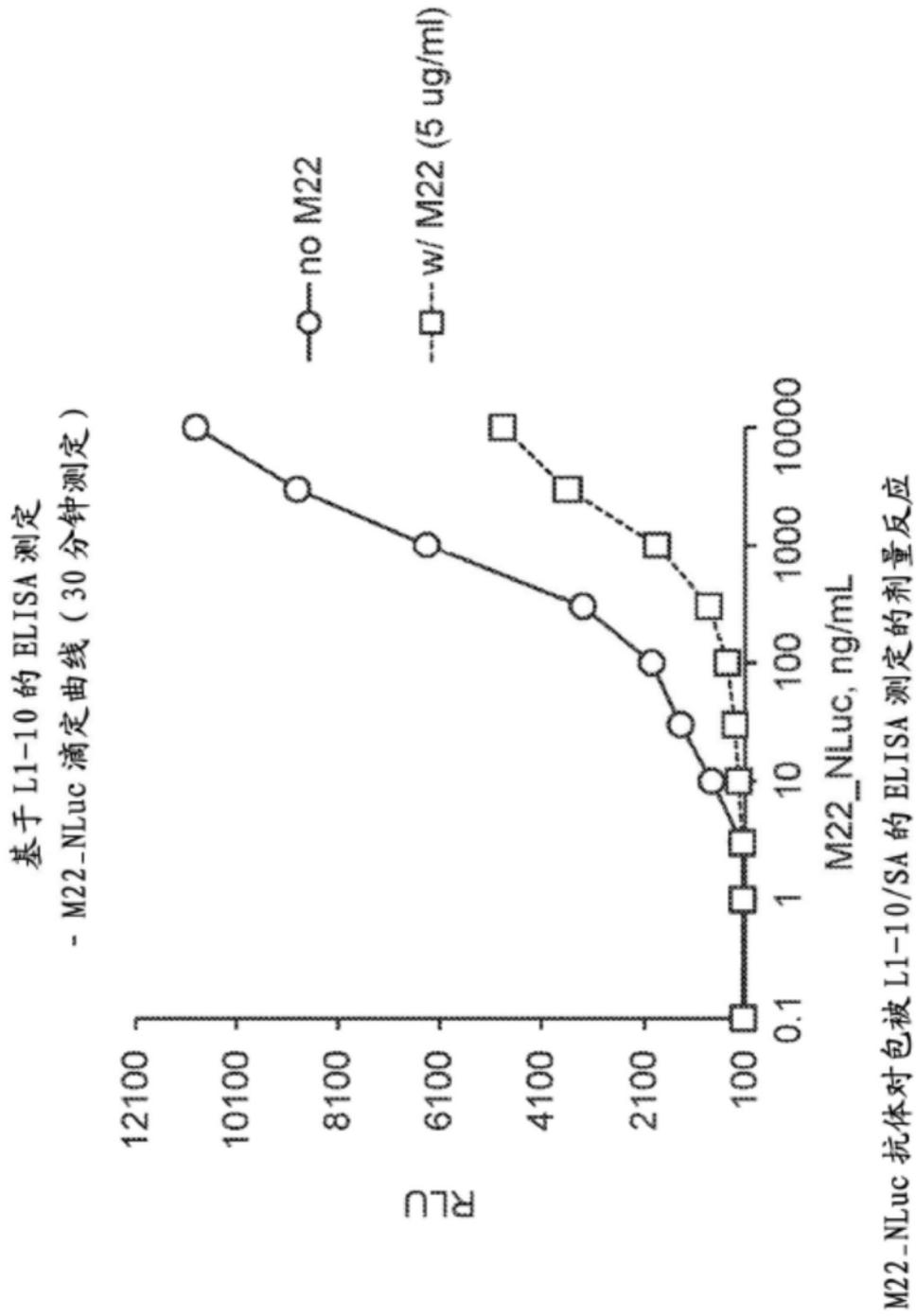


图3B

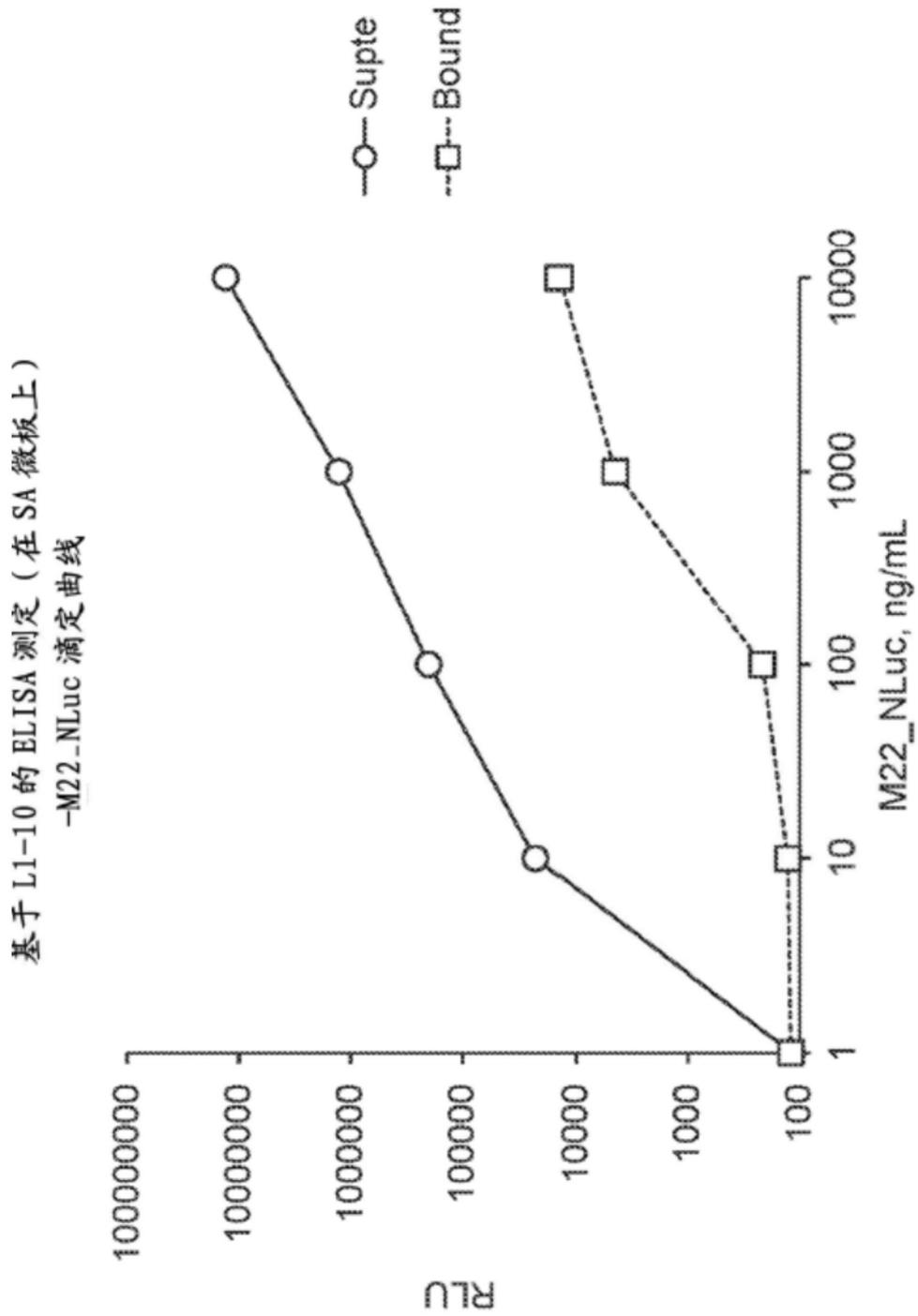


图4

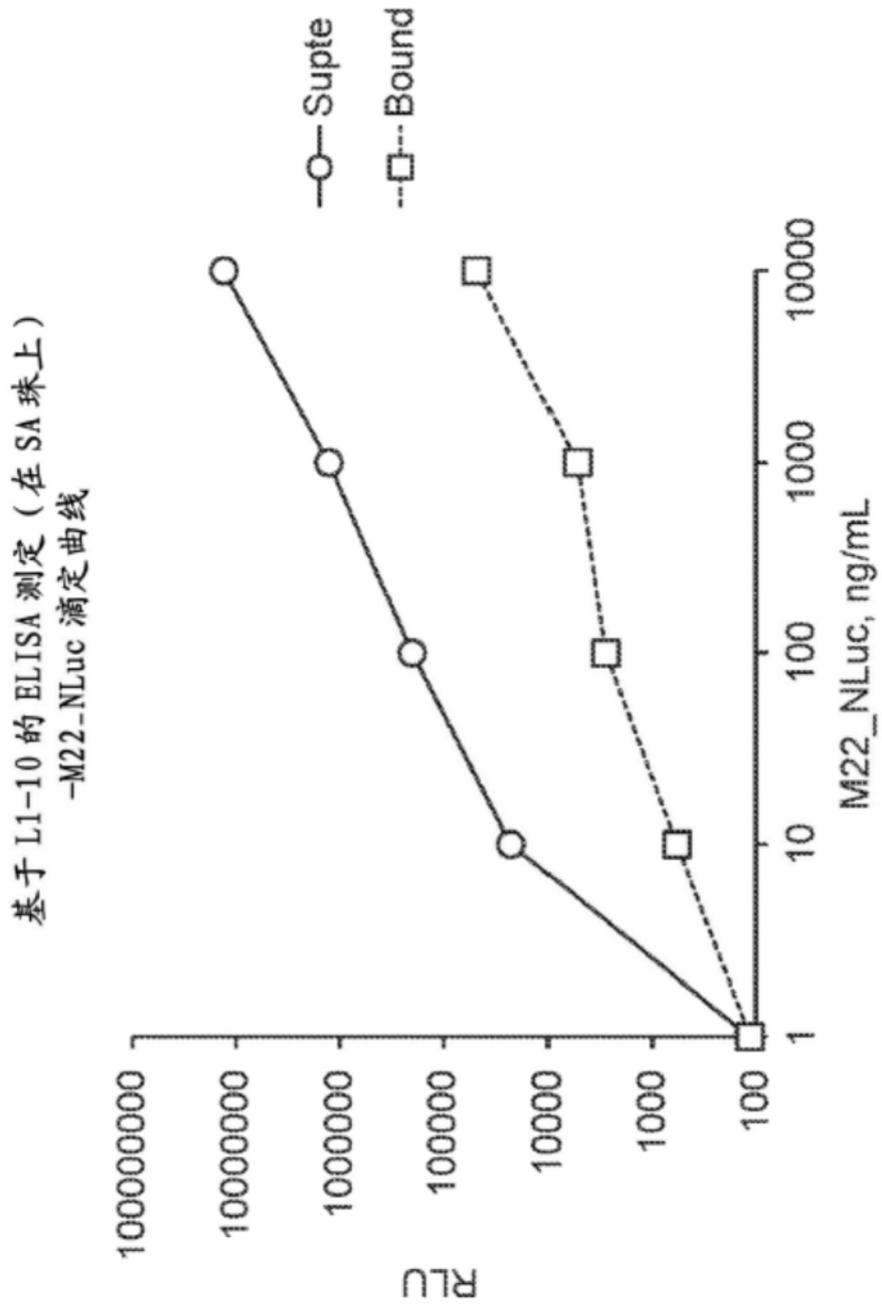


图5

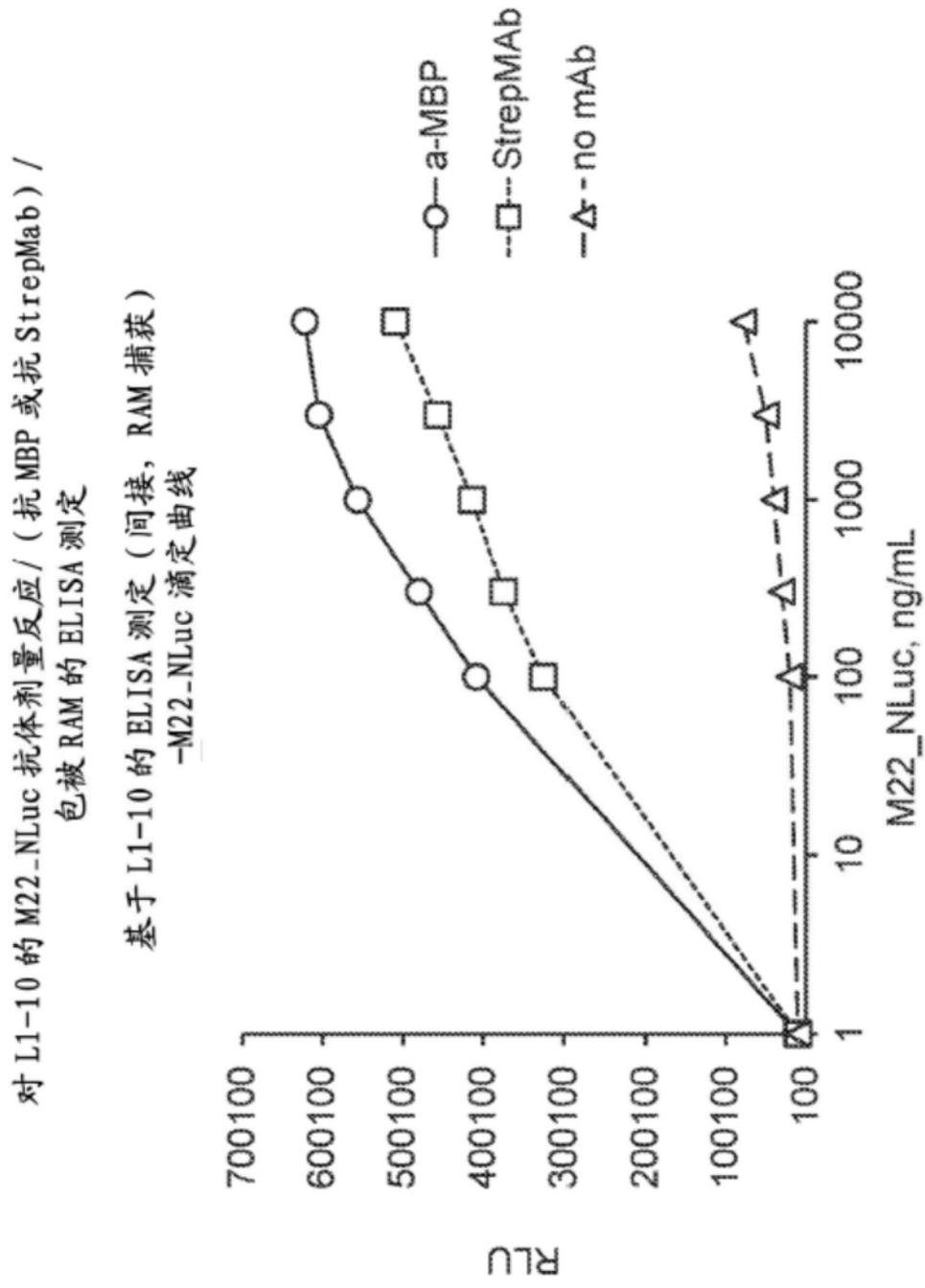


图6

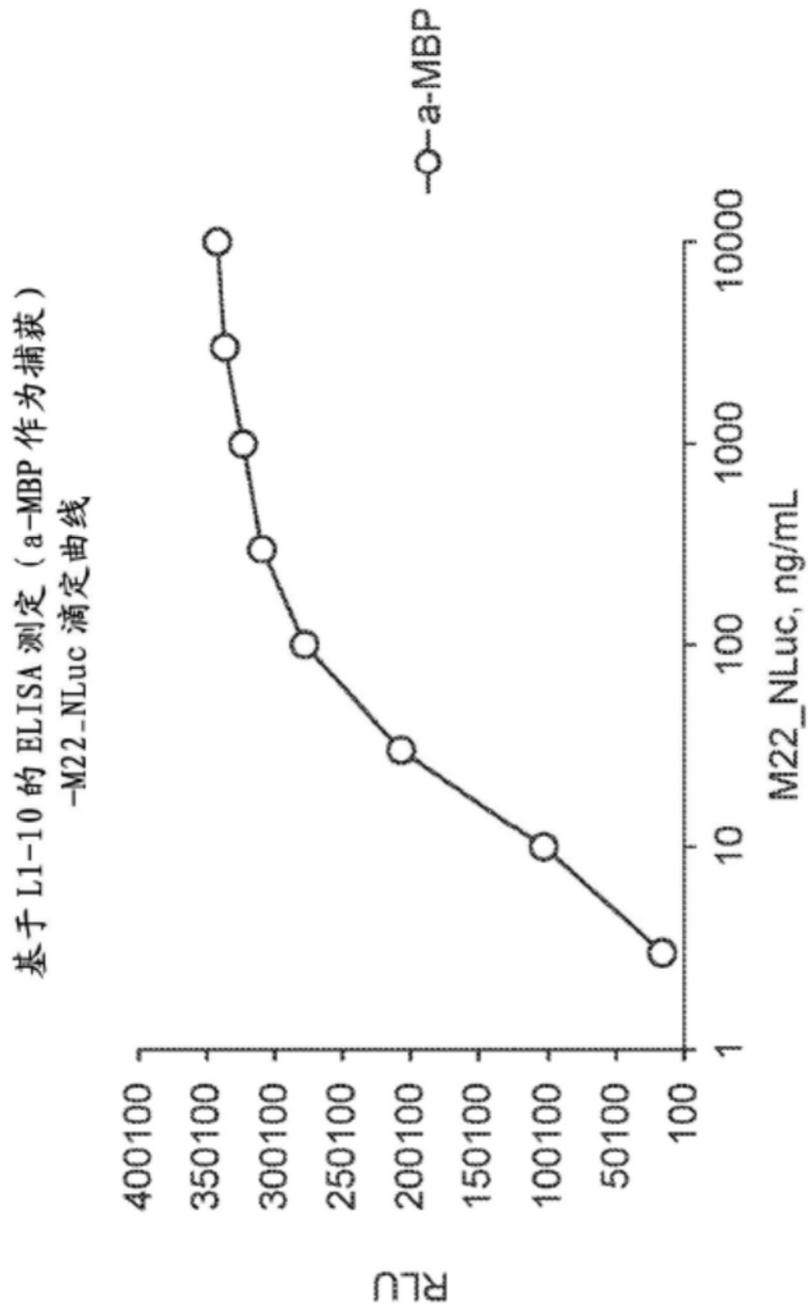


图7

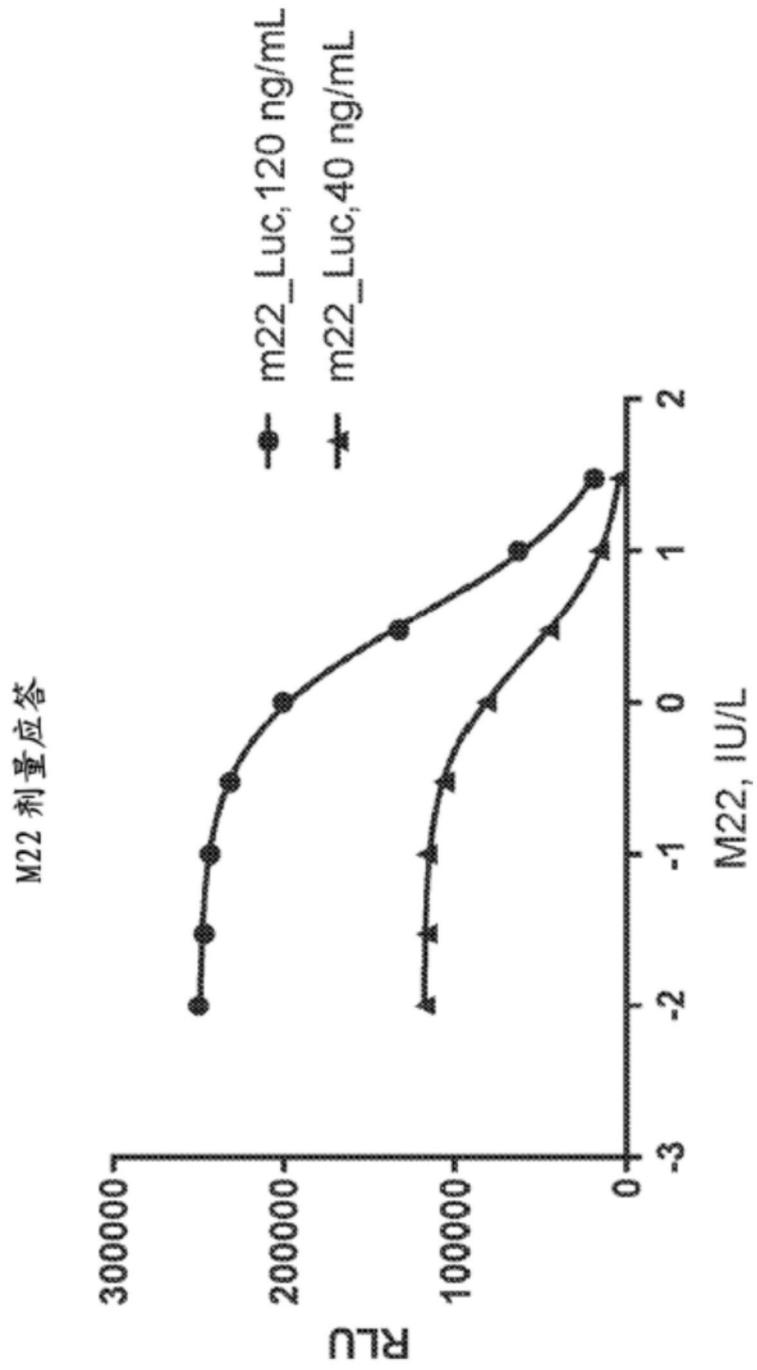


图8

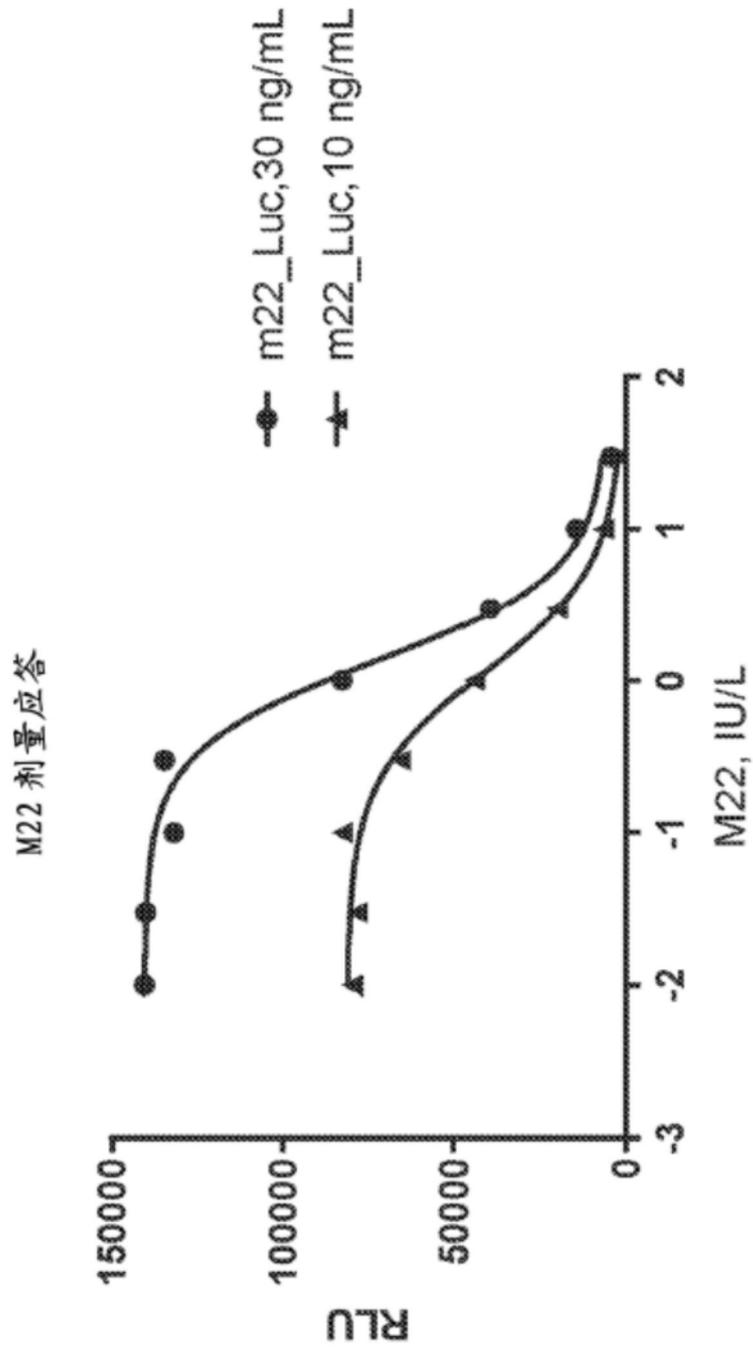
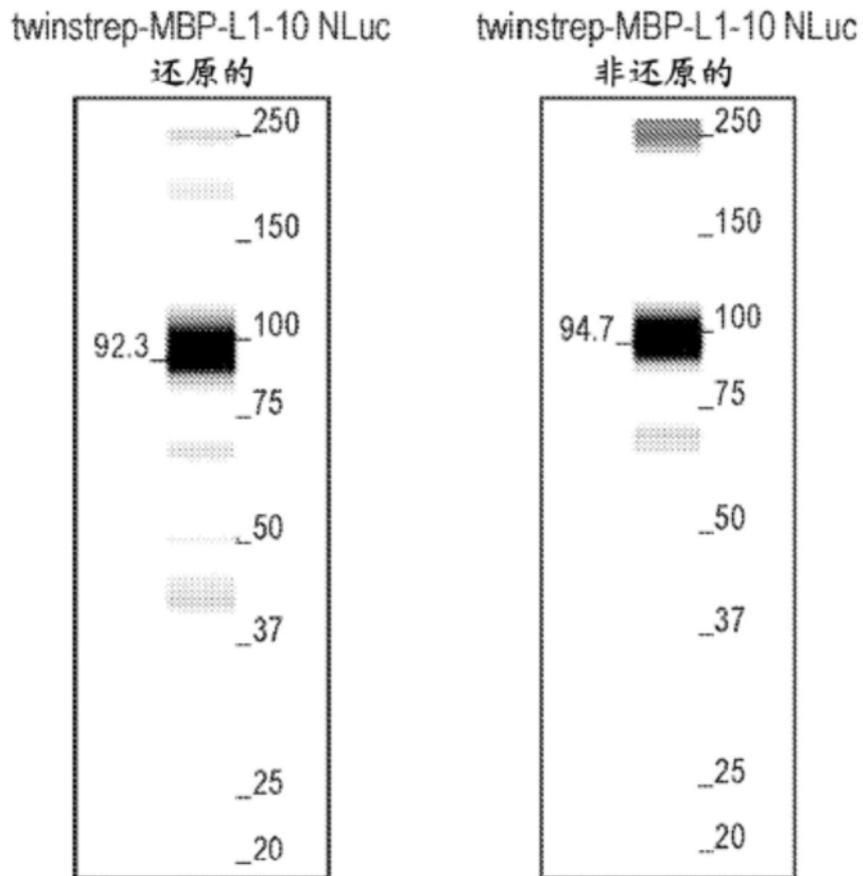


图9

Ni-NTA 柱对纯化蛋白进行 SDS-PAGE 分析



蛋白质表征结果表明，L1-10 融合蛋白在还原和非还原 SDS-PAGE 上均纯化为 92kDa，这与预期一致。纯化的蛋白质在 HPLC 上也显示为一个主要的主峰。

图10

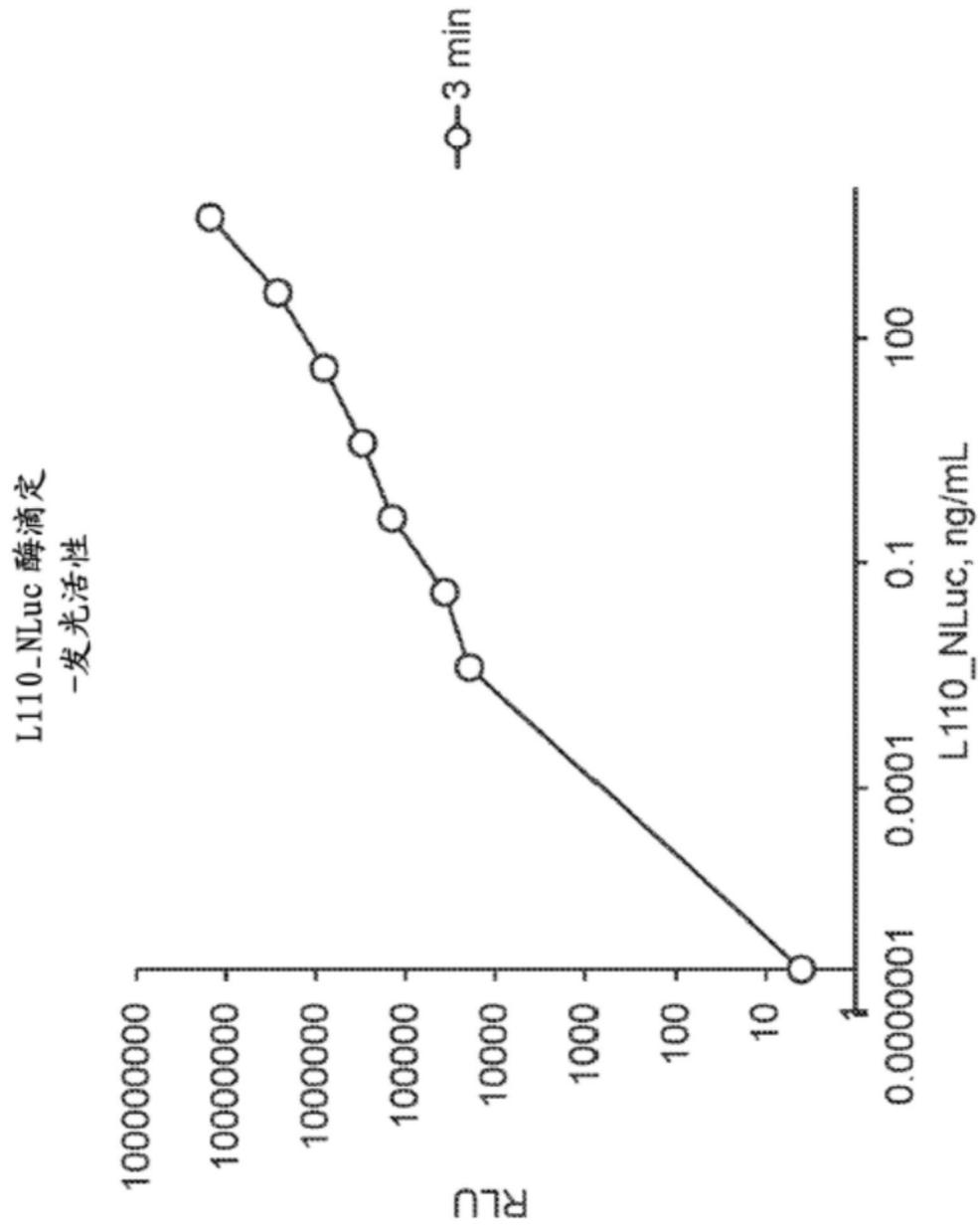


图11

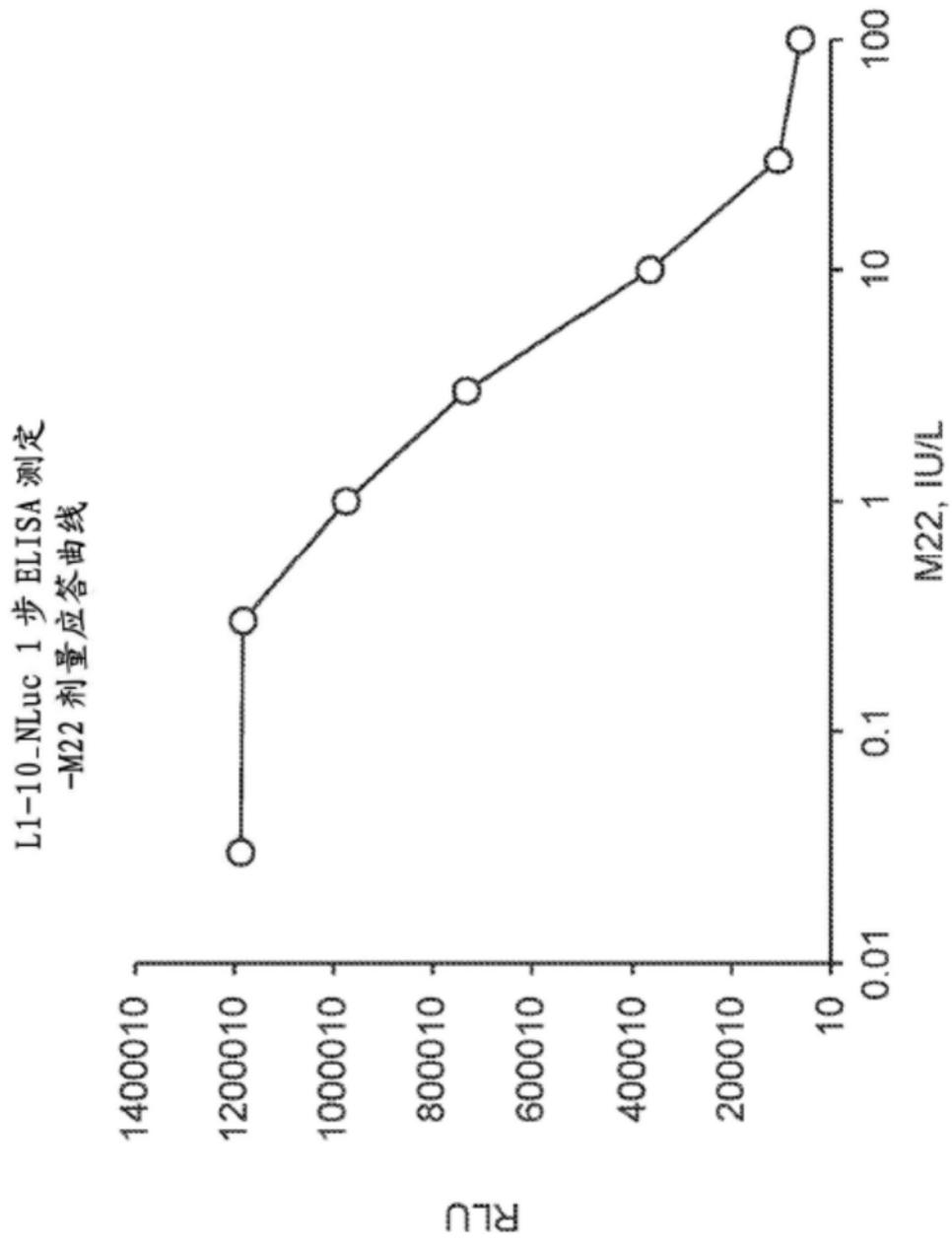


图13

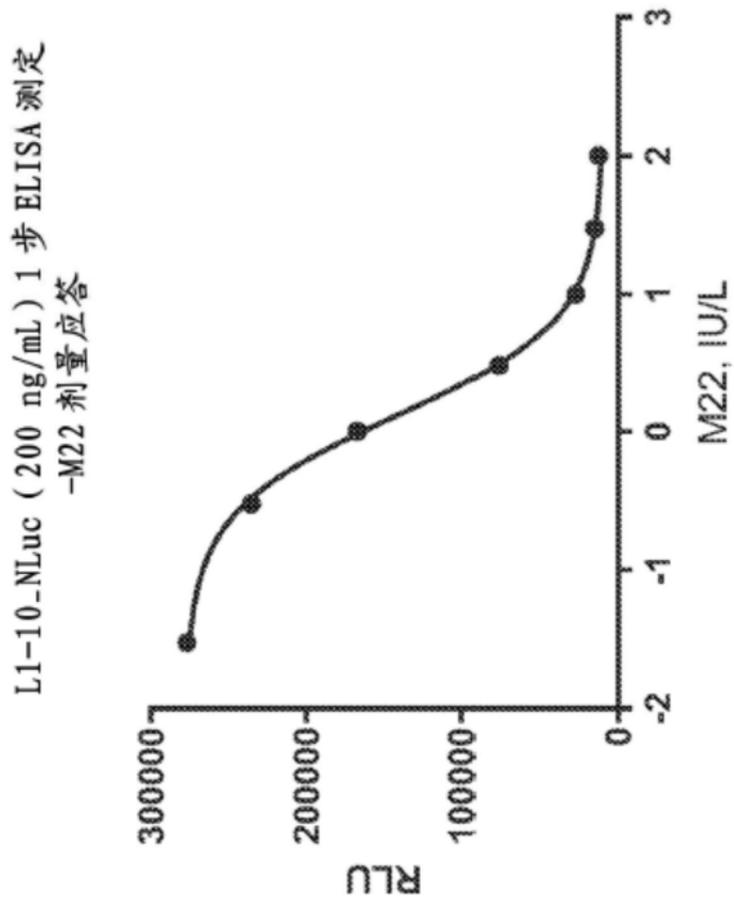


图14A

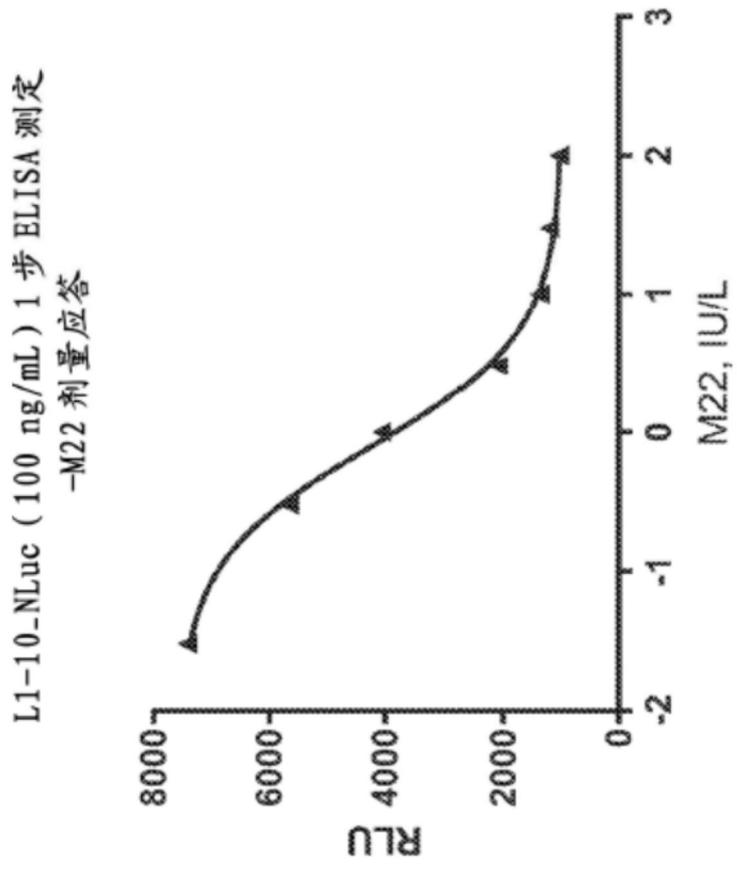


图14B

**M22 重链 (HC) 和轻链 (LC) 的氨基酸序列、G3S 接头和 GFP 蛋白的
氨基酸序列和 His 标签序列**

M22_GFP_Fab**>M22_HC_Fab (重链) (Seq Id No. 19)**

QVQLVQSGAEVKKPGESLKISCRGSGYRFTSYWINWVRQLPGKGLEWMGRIDPTDSYTNYSFSFKGHVTVS
ADKSINTAYLQWSSLKASDTGMYCARLEPGYSSTWSVNWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGG
TAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTK
VDKKEPKSC

>接头 (Seq Id No. 2)

GGGS

>GFP (Seq Id No. 20)

MVSKGEELFTGVVPIVELDGDVNGHKFSVSGEGEGDATYGKLTCLKICTTGKLPVPWPTLVTTLTYGVQ
CFSRYPDHMKQHDFFKSAMPEGYVQERTIFFKDDGNYKTRAEVKFEGDTLVNRIELKGIDFKEDGNILGH
KLEYNYNSHNVYIMADKQKNGIKVNFKIRHNIEDGSVQLADHYQNTPIGDGPVLLPDNHYLSTQSALSK
DPNEKRDHMLLEFVTAAGITLGMDELYK

>His 标签 (Seq Id No. 21)

GGGSHHHHHHHHGS**

>M22_LC (轻链) (Seq Id No. 18)

LTVLTQPPSVSGAPRQRVTISCSGNSSNIGNNAVNWYQQLPGKAPKLLIYDDQLPSGVSDRFSGSRSGTSA
SLAIRGLQSEDEADYYCTSWDDSLDSQLFGGGTRTLVLGQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYP
GAVTVAWKADSSPVKAGVETTTPSKQSNKYAASSYLSLTPEQWQSHKSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS

MBP_L1-10_NLuc 抗原蛋白 (Seq Id No. 22)

>twinstrep-MBP-L1-10-NLuc

SAWSHPQFEKGGGSGGGSSAWWSHPQFEKGGGSKIEEGKLVWINGDKGYNGLAEVGGKFEKDT
GIKVTVEHPDKLEEKFPQVAATGDGPDIIFFWAHDRFGGYAQSGLLAEITPDKAFQDKLYPFTWDAVRYN
GKLIAYPIAVEALSLIYNKDLLPNPPKTWEEIPALDKELKAKGKSALMFNLQEPYFTWPLIAADGGYAFKYE
NGKYDIKDVGVNDAGAKAGLTFLLIDLIKNNHMNADTDYSIAEAAFNKGETAMTINGPWAWSNIDTSKVNY
GVTVLPFTKQPSKPFVGVLSAGINAASPNKELAKEFLENYLLTDEGLEAVNKDKPLGAVALKSYEEELA
KDPRIAATMENAQKGEIMPNIQMSAFWYAVRTAVINAASGRQTVDEALKDAQTGGGSENLYFQGGMG
CSSPPCECHQEEDFRVTCKDIQRIPSLPPSTQTLKLIETHLRTIPSHAFSNLPNISRIYVSIDVTLQQLESHS
FYNLSKVTHIEIRNTRNLTYIDPDALKELPLLKFLGIFNTGLKMFPLTKVYSTDIFFILEITDNPYMTSIPVN
AFQGLCNETLTLKLYNNGFTSVQGYAFNGTKLDAVYLNKNKYLTVIDKDAFGGVYSGPSLLDVSQTSVT
ALPSKGLEHLKELIARNTWTLKPLSLSFLHLTRAGGGSVFTLEDFVGDWRQTAGYNLDQVLEQGGVS
SLFQNLGVSVTPIQRIVLSGENGLKIDIHVPIPYEGLSGDQMGQIEKIFKVYPVDDHHFKVILHYGTLVIDG
VTPNMIDYFGRPYEGIAVFDGKKITVTGTLWNGNKIIDERLINPDGSLFRVTINGVTGWRLCERILA*

图15

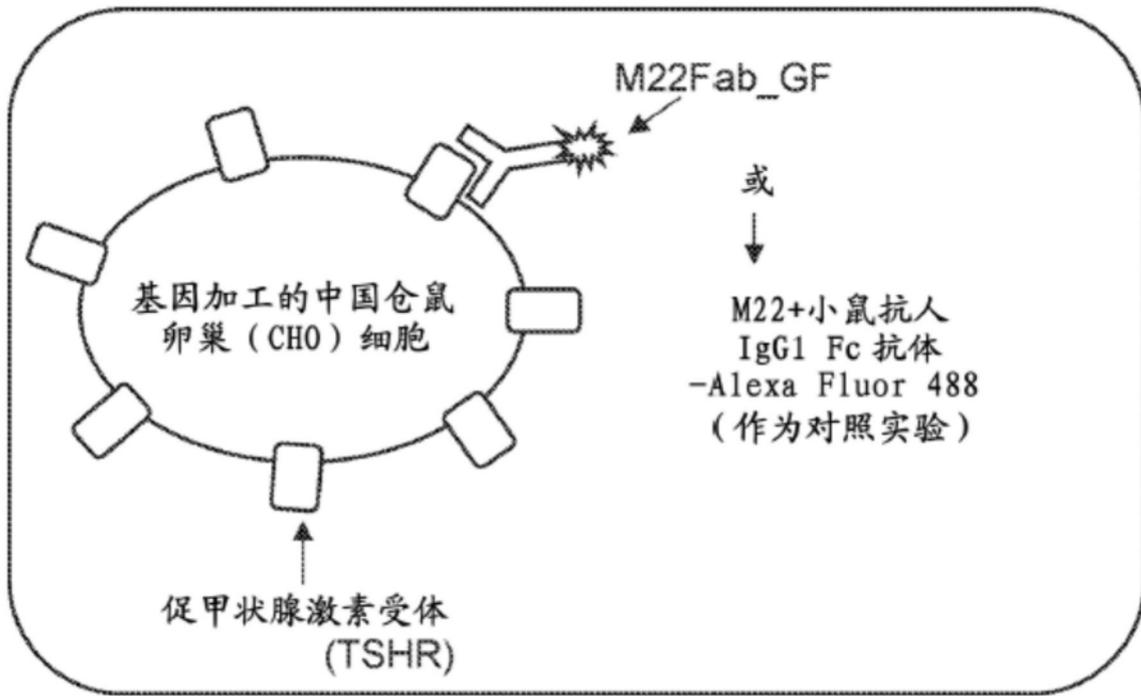


图16

M22Fab-GFP 蛋白表达和纯化
Ni-NTA 柱对纯化蛋白进行 SDS-PAGE 分析

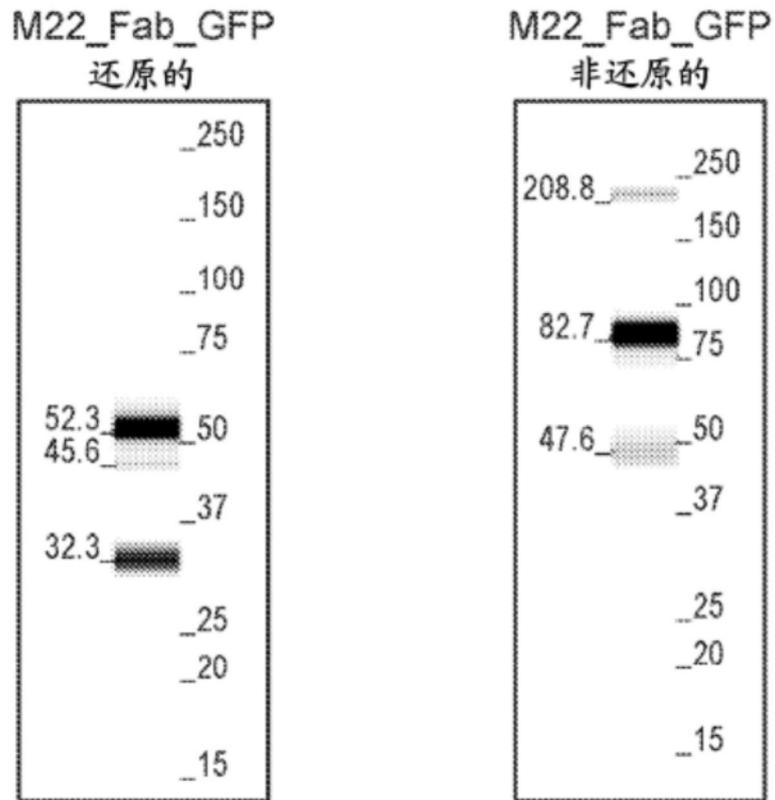


图17

M22 + 第二 Ab 结果

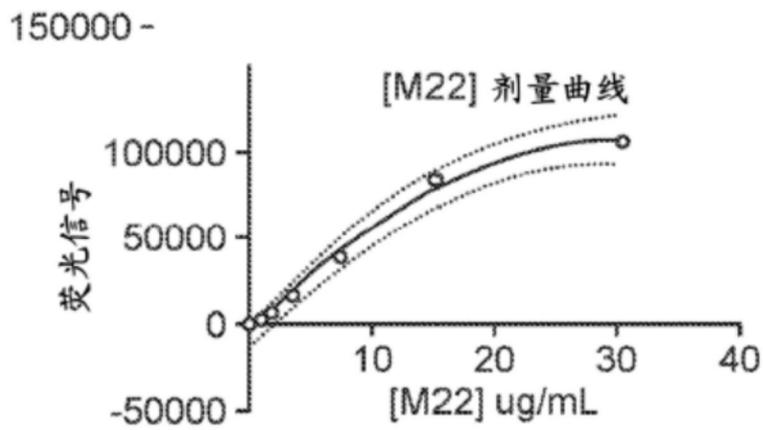
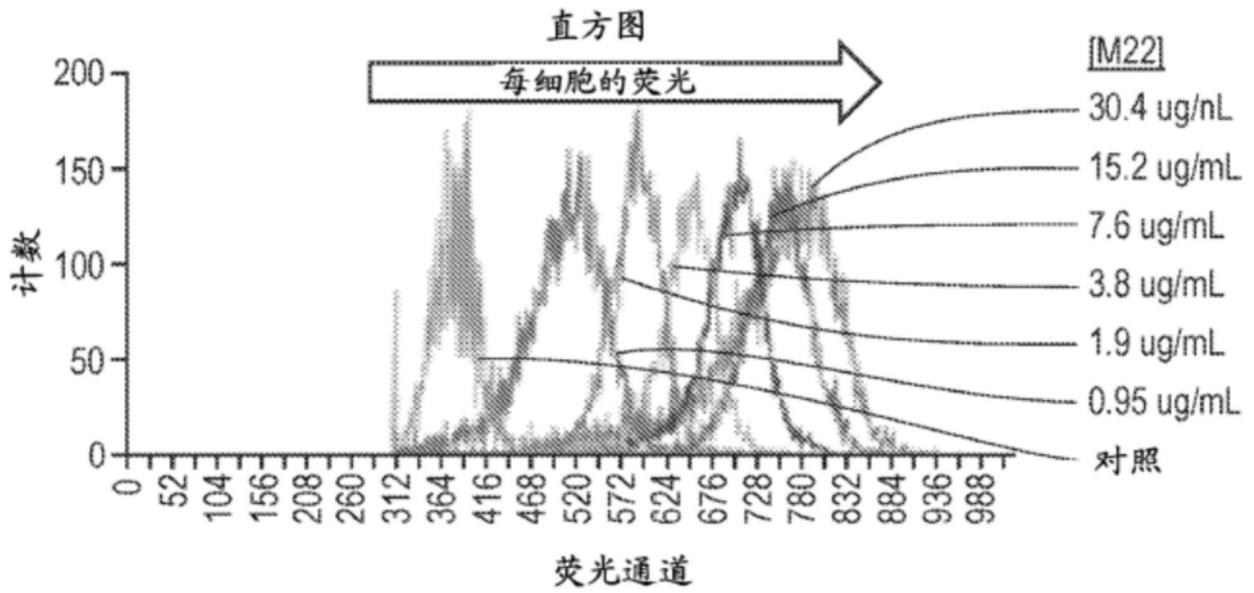


图18

M22-GFP 结果

M22-GFP Stock conc [ug/mL]	M22-GFP vol [mL]	最终[M22-GFP] [ug/mL]	[M22-GFP] [nM]	平均值	中位值	平均值	中位值
500	0.01	45.5	232.5	604517	553460	604517	553460
300	0.01	27.3	151.5	570934	493671	570934	493671
200	0.01	13.2	101.0	536578	462839	536578	462839
100	0.01	9.1	50.5	364565	314284	354565	314284
50	0.01	4.5	25.1	133249	121172	133249	121172
25	0.01	2.3	12.0	82609	75239	82609	75239
10	0.01	0.9	5.1	47911	43365	47911	43365
0	0.01	0.0	0.0	1035	1035	1035	1035

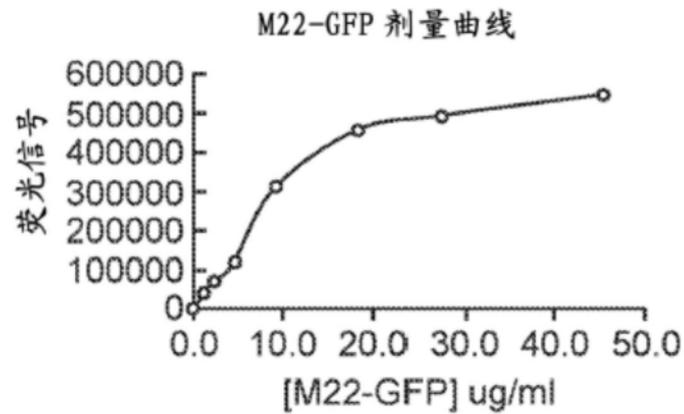


图19

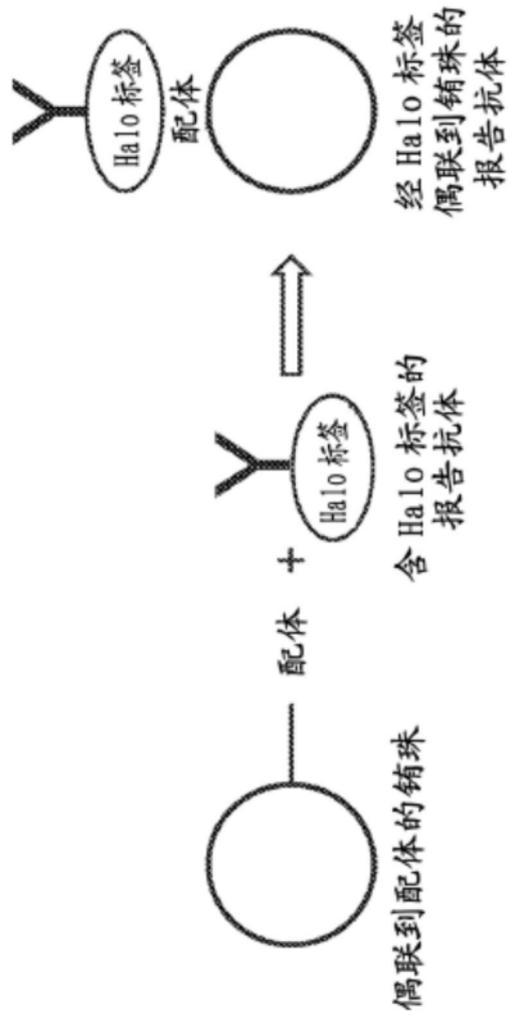


图20A

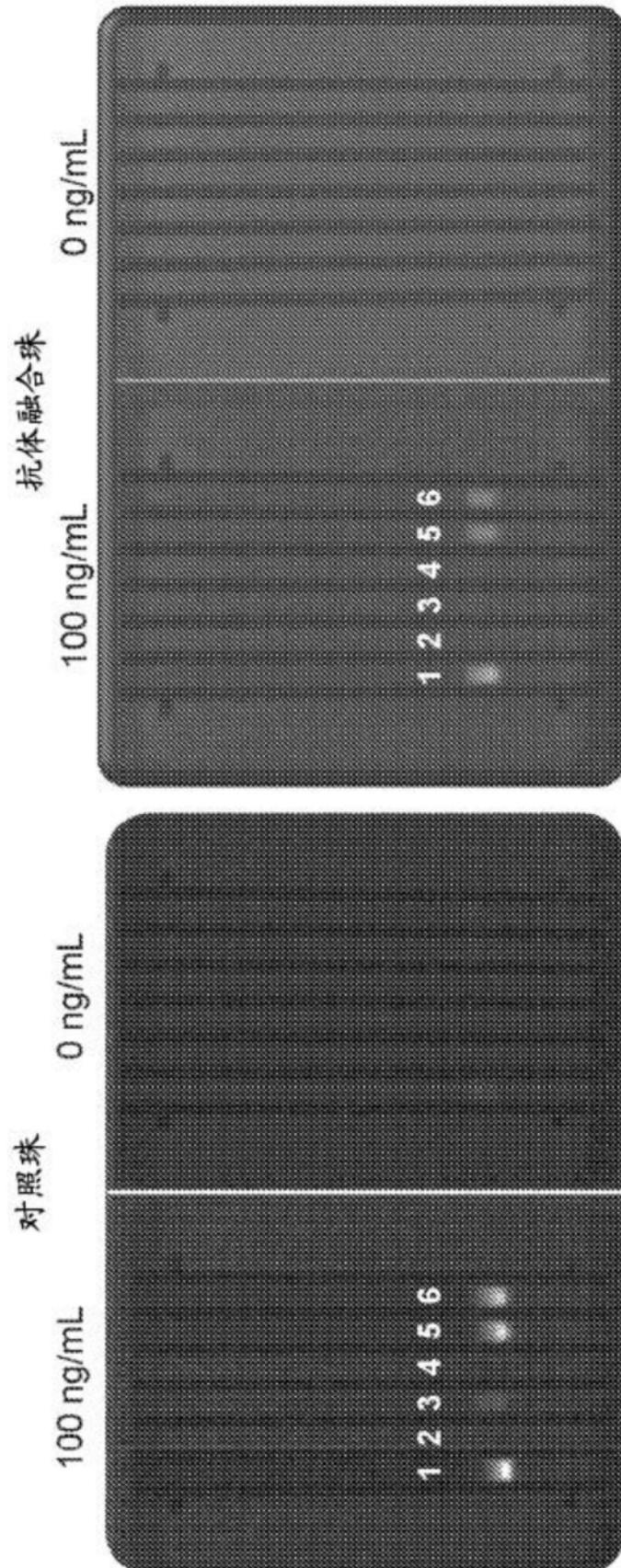


图20B