



(10) 授权公告号 CN 113939533 B

(45) 授权公告日 2022. 12. 06

(21) 申请号 202080039478.9

(22) 申请日 2020.06.18

(65) 同一申请的已公布的文献号  
申请公布号 CN 113939533 A

(43) 申请公布日 2022.01.14

(85) PCT国际申请进入国家阶段日  
2021.11.26

(86) PCT国际申请的申请数据  
PCT/CN2020/096856 2020.06.18

(87) PCT国际申请的公布数据  
W02021/253335 ZH 2021.12.23

(83) 生物保藏信息  
CGMCC No. 18536 2019.10.23  
CGMCC No. 19395 2020.03.26

(73) 专利权人 武汉全景生物技术有限公司

地址 430223 湖北省武汉市武汉东湖新技术开发区高新大道818号武汉高科医疗器械园B区1号楼3层(部分)厂房(自贸区武汉片区)

专利权人 深圳迈瑞生物医疗电子股份有限公司

(72) 发明人 于丽娜 李可 何建文

(74) 专利代理机构 北京磐华捷成知识产权代理有限公司 11851

专利代理师 谢枸

(51) Int.Cl.

C07K 16/28 (2006.01)

G01N 33/68 (2006.01)

G01N 33/543 (2006.01)

审查员 吕丽珊

权利要求书2页 说明书32页  
序列表16页 附图7页

(54) 发明名称

抗可溶性CD14亚型抗体、试剂盒及其应用

(57) 摘要

一种抗可溶性CD14亚型单克隆抗体或其抗原结合性抗体片段,其特异性地识别由SEQ ID No.84的氨基酸序列构成的表位。一种用于检测可溶性CD14亚型的试剂盒、一种用于检测可溶性CD14亚型的方法以及相应的应用。

1. 一种抗可溶性CD14亚型单克隆抗体或其抗原结合性抗体片段,其特异性地识别由SEQ ID No.84的氨基酸序列构成的表位,所述抗可溶性CD14亚型单克隆抗体或其抗原结合性抗体片段包含由序列编号46的氨基酸序列构成的VH CDR1、由序列编号52的氨基酸序列构成的VH CDR2和由序列编号61的氨基酸序列构成的VH CDR3的VH,以及包含由序列编号68的氨基酸序列构成的VL CDR1、由序列编号71的氨基酸序列构成的VL CDR2和由序列编号83的氨基酸序列构成的VL CDR3的VL。

2. 根据权利要求1所述的抗可溶性CD14亚型单克隆抗体或其抗原结合性抗体片段,

其中,所述可溶性CD14单克隆抗体或其抗原结合性抗体片段为由保藏号为CGMCC NO.19395的杂交瘤细胞株分泌产生的抗可溶性CD14亚型单克隆抗体或其抗原结合性抗体片段。

3. 根据权利要求1所述的抗可溶性CD14亚型单克隆抗体或其抗原结合性抗体片段,

其中,所述抗可溶性CD14亚型单克隆抗体或其抗原结合性抗体片段不与高分子量可溶性CD14特异性地结合。

4. 根据权利要求1至3中任一项所述的抗可溶性CD14亚型单克隆抗体或其抗原结合性抗体片段,

其中,所述抗原结合性抗体片段是选自Fab、Fab'、F(ab')<sub>2</sub>、单链抗体(scFv)、二硫键稳定性V区(dsFv)、sc(Fv)<sub>2</sub>组成的组中的抗原结合性抗体片段。

5. 一种用于检测可溶性CD14亚型的试剂盒,其中,所述试剂盒至少包含根据权利要求1至4中任一项所述的抗可溶性CD14亚型单克隆抗体或其抗原结合性抗体片段作为第一单克隆抗体或其抗原结合性抗体片段。

6. 根据权利要求5所述的试剂盒,其中,所述试剂盒还包括第二单克隆抗体或其抗原结合性抗体片段:

所述第二单克隆抗体或其抗原结合性抗体片段特异性地识别由SEQ ID No.42的氨基酸序列构成的表位,

其中,所述第二单克隆抗体或其抗原结合性抗体片段包含由序列编号3的氨基酸序列构成的VH CDR1、由序列编号9的氨基酸序列构成的VH CDR2和由序列编号16的氨基酸序列构成的VH CDR3的VH,以及包含由序列编号21的氨基酸序列构成的VL CDR1、由序列编号29的氨基酸序列构成的VL CDR2和由序列编号38的氨基酸序列构成的VL CDR3的VL。

7. 根据权利要求6所述的试剂盒,其中,

所述第二单克隆抗体或其抗原结合性抗体片段为由保藏号为CGMCC NO.18536的杂交瘤细胞株分泌产生的抗可溶性CD14亚型单克隆抗体或其抗原结合性抗体片段。

8. 根据权利要求6至7中任一项所述的试剂盒,其中,所述第二单克隆抗体或其抗原结合性抗体片段用作捕获抗体并且所述第一单克隆抗体或其抗原结合性抗体片段用作经标记的检测抗体,所述捕获抗体包被在固相载体上并用于捕获待测样本中的可溶性CD14亚型。

9. 根据权利要求8所述的试剂盒,其中,所述捕获抗体包被于磁性磁珠表面。

10. 根据权利要求8所述的试剂盒,其中,所述捕获抗体包被于超顺磁性磁珠表面。

11. 一种检测可溶性CD14亚型的方法,包括:

将待测样本和包被有捕获抗体的固相支持物混合,使得固相支持物上包被的捕获抗体

与待测样本中的可溶性CD14亚型结合；

将获得的上述混合物进行清洗，除去未结合的物质；

在经清洗的所述混合物中加入经标记的检测抗体进行混匀，使得所述检测抗体与所述捕获抗体上结合的可溶性CD14亚型结合，形成夹心复合物；

对所述夹心复合物进行清洗，除去未结合的物质；

在经清洗的所述夹心复合物中加入检测底物，以检测样本中的可溶性CD14亚型的浓度；

其中所述捕获抗体或所述检测抗体为作为第一单克隆抗体或抗原结合性抗体片段的根据权利要求1至4中任一项所述的抗可溶性CD14亚型单克隆抗体或其抗原结合性抗体片段。

12. 根据权利要求11所述的方法，其中，所述检测抗体是作为第一单克隆抗体或其抗原结合性抗体片段的根据权利要求1至4中任一项所述的抗可溶性CD14亚型单克隆抗体或其抗原结合性抗体片段。

13. 根据权利要求12所述的方法，其中，

所述捕获抗体为作为第二单克隆抗体或其抗原结合性抗体片段的以下所述的抗可溶性CD14亚型单克隆抗体或其抗原结合性抗体片段，

所述第二单克隆抗体或其抗原结合性抗体片段特异性地识别由SEQ ID No. 42的氨基酸序列构成的表位，

其中，所述第二单克隆抗体或其抗原结合性抗体片段包含由序列编号3的氨基酸序列构成的VH CDR1、由序列编号9的氨基酸序列构成的VH CDR2和由序列编号16的氨基酸序列构成的VH CDR3的VH，以及包含由序列编号21的氨基酸序列构成的VL CDR1、由序列编号29的氨基酸序列构成的VL CDR2和由序列编号38的氨基酸序列构成的VL CDR3的VL。

14. 根据权利要求13所述的方法，其中所述第二单克隆抗体或其抗原结合性抗体片段为由保藏号为CGMCC NO. 18536的杂交瘤细胞株分泌产生的抗可溶性CD14亚型单克隆抗体或其抗原结合性抗体片段。

15. 根据权利要求11至14中任一项所述的方法，所述待测样本为血液样本。

16. 根据权利要求15所述的方法，所述待测样本为血浆样本。

17. 根据权利要求1至4中任一项所述的抗可溶性CD14亚型单克隆抗体或其抗原结合性抗体片段在制备用于评估患者是否患有脓毒血症的分析试剂中的应用，其中，使用根据权利要求1至4中任一项所述的抗可溶性CD14亚型单克隆抗体或其抗原结合性抗体片段对患者的血液样本中的可溶性CD14亚型的浓度进行检测，所述可溶性CD14亚型的浓度相对于参考值的水平升高与患者患有脓毒血症的可能性增加相关。

18. 根据权利要求17所述的应用，

其中，在对患者产生患有脓毒血症的怀疑后72小时内检测该患者的血液样本中的可溶性CD14亚型的浓度。

19. 一种抗可溶性CD14亚型单克隆抗体或其抗原结合性抗体片段，其特异性地识别由SEQ ID No. 84的氨基酸序列构成的表位，其中，所述可溶性CD14亚型捕获抗体为由保藏号为CGMCC NO. 19395的杂交瘤细胞株分泌产生的抗可溶性CD14亚型单克隆抗体或其抗原结合性抗体片段。

## 抗可溶性CD14亚型抗体、试剂盒及其应用

### 技术领域

[0001] 本申请涉及一种抗可溶性CD14亚型单克隆抗体或其抗原结合性抗体片段。本申请还涉及一种用于检测可溶性CD14亚型的试剂盒、一种用于检测可溶性CD14亚型的方法以及相应的应用。

### 背景技术

[0002] 脓毒血症(sepsis)是感染引起宿主反应失调导致的危及生命的器官功能障碍。文献资料报道脓毒血症发病率逐年上升,且病死率居高不下,已严重威胁到人类的生命健康。根据脓毒血症治疗指南,早期诊断是提高脓毒血症患者存活率的有效途径。在脓毒血症的诊断中,血培养是诊断的“金标准”,但血培养的阳性率低且培养时间长,亟需寻找高度特异性和灵敏的生物标志物对脓毒血症进行早期诊断和准确预测。

[0003] 对于脓毒血症的诊断标准也不断的更新。脓毒血症最新的诊断标准(Sepsis 3.0)强调感染以及其导致的机体的反应失控和器官的功能损伤。虽然对于Sepsis 3.0仍然存在不少争议,但其反应了临床研究和诊断的进步,也反应了脓毒血症的复杂性和临床诊断的重要性。目前在诊断脓毒血症方面,临床广泛的应用的生物标志物有白介素6(Interleukin 6, IL-6)、C反应蛋白(C reactive protein, CRP)和降钙素原(procalcitonin, PCT)。CRP是由肝脏合成的急性期蛋白,对细菌性感染有较强的敏感度,但特异性不高、半衰期长、与脓毒症的病情进展没有明确的相关性。IL-6峰值出现早,可以在临床症状出现之前升高,有利于脓毒症的早期诊断,但是特异性不高。PCT广泛应用于感染以及脓毒血症的诊断。PCT在某些感染类型,如皮肤软组织感染中增高往往不明显。PCT不适用于判断围手术期腹腔感染脓毒性休克感染的预后。此外,在一些非感染性疾病中,也会伴随着PCT的升高。虽然PCT已经证明与感染有明显的相关性,但在如外伤、手术、烧伤等情况下,很容易出现假阳性诊断。因此,PCT并不是感染以及脓毒血症诊断的完美标志物,仅用PCT来诊断感染和脓毒血症是不可靠的。

[0004] CD14是脂多糖-脂多糖结合蛋白复合体的高亲和力受体,以糖基磷脂酰肌醇锚定于细胞表面。CD14主要存在于单核细胞和巨噬细胞膜表面。CD14的存在形式包括膜结合性CD14(mCD14)和可溶性CD14(sCD14)。膜结合性CD14主要表达在单核/巨噬细胞表面。可溶性CD14分布于血浆中,是CD14从细胞膜脱落后释放入血的那部分LPS-LBF-CD14复合物,主要介导内皮细胞和上皮细胞对LPS的应答。

[0005] 可溶性CD14亚型(soluble CD14 subtype, 简称sCD14-ST或Presepsin)是脓毒血症的新生物学指标,在脓毒血症的诊断、预后以及指导抗菌药物的使用方面有着潜在的应用价值,是近几年脓毒血症标志物研究的热点。Shirakawa等通过建立家兔内毒素休克模型和盲肠结扎穿孔模型(CLP模型)发现,前者并未能引起Presepsin浓度升高,而CLP模型显著升高。故认为Presepsin的升高是由细菌感染引起的细胞吞噬引起,而并非生理性抗炎导致。Presepsin是sCD14在血浆中被组织蛋白酶D等蛋白酶切割后N端的片段,其相对分子量约为13kDa。目前Presepsin被认为在评估脓毒症严重程度及预后方面具有高敏感和特异

性,并能准确的指导脓毒症抗菌药的应用。

[0006] 因此,迄今一直在尝试如何对脓毒血症进行高度特异性和灵敏地检测、早期诊断和准确预测。

## 发明内容

[0007] 因此,本申请的一个目的是提供一种抗可溶性CD14亚型单克隆抗体或其抗原结合性抗体片段,其适合用于检测样本中的可溶性CD14亚型。此外,本申请的另一目的是提供一种用于检测可溶性CD14亚型的试剂盒、一种用于检测可溶性CD14亚型的方法以及相应的应用。

[0008] 本申请第一方面涉及一种抗可溶性CD14亚型单克隆抗体或其抗原结合性抗体片段,其特异性地识别由SEQ ID No.84的氨基酸序列构成的表位,该抗可溶性CD14亚型单克隆抗体或其抗原结合性抗体片段包括:

[0009] (i) 重链可变区 (VH) 互补性决定区 (CDR):

[0010] VH CDR1:  $X_1X_2X_3MX_4$ ;

[0011] VH CDR2:  $RIX_5X_6DPX_7$ ; 和

[0012] VH CDR3:  $X_8X_9X_{10}RX_{11}$ ;

[0013] 以及

[0014] (ii) 轻链可变区 (VL) 互补性决定区 (CDR):

[0015] VL CDR1:  $KX_{12}X_{13}X_{14}LA$ ;

[0016] VL CDR2:  $WX_{15}X_{16}$ ; 和

[0017] VL CDR3:  $KQX_{17}X_{18}$ ;

[0018] 其中 $X_1$ 至 $X_{18}$ 是下列作为选择项记载的1个或多个氨基酸序列:

[0019]  $X_1$ =任意一个氨基酸;

[0020]  $X_2$ =T或V;  $X_3$ =A、Y或L;  $X_4$ =Q或G;

[0021]  $X_5$ =TYANG、DPMGG、SPASS、DPANG、或SPANS;

[0022]  $X_6$ =GTKA、TTKS、NTKY、TTKS或TTKA;

[0023]  $X_7$ =KFQA、TKFG、SQFA、MKFG或KFNS;

[0024]  $X_8$ =F或G;  $X_9$ =GG、GQ或CG;  $X_{10}$ =YN、YV或KF;  $X_{11}$ =FDY、FYY、FDC或TDC;

[0025]  $X_{12}$ =SSAS、STAT、SSQS或STSS;

[0026]  $X_{13}$ =LLKS、LLAS、LLSS或KASS;

[0027]  $X_{14}$ =NRNIHL、RTRKHY、NRKHLY或YTNKAL;

[0028]  $X_{15}$ =ATS、AST、QSS或ASK;

[0029]  $X_{16}$ =RAS、LDS、LEA或RES;

[0030]  $X_{17}$ =GYN、YNA、YLN或SYN;

[0031]  $X_{18}$ =LWT、LNT、GNA或TWI。

[0032] 本申请第二方面涉及一种用于检测可溶性CD14亚型的试剂盒,该用于检测可溶性CD14亚型的试剂盒至少包含根据本申请第一方面的抗可溶性CD14亚型单克隆抗体或其抗原结合性抗体片段。

[0033] 本申请第三方面涉及一种用于检测可溶性CD14亚型的方法,所述方法包括:

[0034] 将待测样本和包被有捕获抗体的固相支持物混合,使得固相支持物上包被的捕获抗体与待测样本中的可溶性CD14亚型结合;

[0035] 将获得的上述混合物进行清洗,除去未结合的物质;

[0036] 在上述经清洗的混合物中加入经标记的检测抗体进行混匀,使得所述检测抗体与所述捕获抗体上结合的可溶性CD14亚型结合,形成夹心复合物;

[0037] 对上述夹心复合物进行清洗,除去未结合的物质;

[0038] 在上述经清洗的夹心复合物中加入检测底物,以检测样本中的可溶性CD14亚型的浓度;

[0039] 其中所述捕获抗体或检测抗体可为根据本申请第一方面的抗可溶性CD14亚型单克隆抗体或其抗原结合性抗体片段。

[0040] 本申请第四方面涉及本申请第一方面的抗可溶性CD14亚型单克隆抗体或其抗原结合性抗体片段在制备用于评估患者是否患有脓毒血症的分析试剂中的应用,其中,使用本申请第一方面的抗可溶性CD14亚型单克隆抗体或其抗原结合性抗体片段对患者的血液样本中的可溶性CD14亚型的浓度进行检测,所述可溶性CD14亚型的浓度相对于参考值的水平升高与患者患有脓毒血症的可能性增加相关。

[0041] 本申请实施例还涉及一种抗可溶性CD14亚型单克隆抗体或其抗原结合性抗体片段,其特异性地识别由SEQ ID No.84的氨基酸序列构成的表位,包括:

[0042] (a) 包含由序列编号44的氨基酸序列构成的VH CDR1、由序列编号54的氨基酸序列构成的VH CDR2和由序列编号61的氨基酸序列构成的VH CDR3的VH,以及包含由序列编号66的氨基酸序列构成的VL CDR1、由序列编号75的氨基酸序列构成的VL CDR2和由序列编号82的氨基酸序列构成的VL CDR3的VL;

[0043] (b) 包含由序列编号45的氨基酸序列构成的VH CDR1、由序列编号53的氨基酸序列构成的VH CDR2和由序列编号57的氨基酸序列构成的VH CDR3的VH,以及包含由序列编号65的氨基酸序列构成的VL CDR1、由序列编号71的氨基酸序列构成的VL CDR2和由序列编号77的氨基酸序列构成的VL CDR3的VL;

[0044] (c) 包含由序列编号46的氨基酸序列构成的VH CDR1、由序列编号52的氨基酸序列构成的VH CDR2和由序列编号61的氨基酸序列构成的VH CDR3的VH,以及包含由序列编号68的氨基酸序列构成的VL CDR1、由序列编号71的氨基酸序列构成的VL CDR2和由序列编号83的氨基酸序列构成的VL CDR3的VL;

[0045] (d) 包含由序列编号48的氨基酸序列构成的VH CDR1、由序列编号50的氨基酸序列构成的VH CDR2和由序列编号61的氨基酸序列构成的VH CDR3的VH,以及包含由序列编号66的氨基酸序列构成的VL CDR1、由序列编号70的氨基酸序列构成的VL CDR2和由序列编号80的氨基酸序列构成的VL CDR3的VL;

[0046] (e) 包含由序列编号48的氨基酸序列构成的VH CDR1、由序列编号52的氨基酸序列构成的VH CDR2和由序列编号61的氨基酸序列构成的VH CDR3的VH,以及包含由序列编号67的氨基酸序列构成的VL CDR1、由序列编号72的氨基酸序列构成的VL CDR2和由序列编号79的氨基酸序列构成的VL CDR3的VL;或

[0047] (f) 包含由序列编号49的氨基酸序列构成的VH CDR1、由序列编号51的氨基酸序列构成的VH CDR2和由序列编号62的氨基酸序列构成的VH CDR3的VH,以及包含由序列编号65

的氨基酸序列构成的VL CDR1、由序列编号70的氨基酸序列构成的VL CDR2和由序列编号81的氨基酸序列构成的VL CDR3的VL。

[0048] 本申请实施例还涉及一种抗可溶性CD14亚型单克隆抗体或其抗原结合性抗体片段,其特异性地识别由SEQ ID No.84的氨基酸序列构成的表位,其中所述可溶性CD14亚型捕获抗体为由保藏号为CGMCC NO.19395的杂交瘤细胞株分泌产生的抗可溶性CD14亚型单克隆抗体或其抗原结合性抗体片段。

[0049] 本申请实施例所提供的抗可溶性CD14亚型单克隆抗体及其抗原结合性抗体片段分别具有对可溶性CD14亚型高的亲和性,因此能准确地定量检测样本中的可溶性CD14亚型的浓度。此外,本申请实施例提供的抗可溶性CD14亚型单克隆抗体及其抗原结合性抗体片段对于可溶性CD14亚型的浓度测定分别具有高灵敏度。此外,本申请实施例能够在双抗体夹心法中进行高特异性测定,也就是说,本申请实施例所提供的抗可溶性CD14亚型单克隆抗体及其抗原结合性抗体片段分别仅与人血液中存在的可溶性CD14亚型特异性地结合、而不与其中的高分子量sCD14特异性结合。

## 附图说明

[0050] 在下文中,参考附图描述本申请的一些实施方式。根据以下详细描述和附图,将进一步理解本申请的目的和优点。附图示出:

[0051] 图1示出原核表达蛋白SDS-PAGE和Western Blot;

[0052] 图2示出真核表达蛋白SDS-PAGE和Western Blot;

[0053] 图3示出抗可溶性CD14亚型多克隆抗体SDS-PAGE和Western Blot;

[0054] 图4.1示出用于检测可溶性CD14亚型的试剂盒1的标准曲线;

[0055] 图4.2示出用于检测可溶性CD14亚型的试剂盒2的标准曲线;

[0056] 图4.3示出用于检测可溶性CD14亚型的试剂盒3的标准曲线;

[0057] 图4.4示出用于检测可溶性CD14亚型的试剂盒1与用于检测可溶性CD14亚型的试剂盒3的一致性比较图;

[0058] 图4.5示出用于检测可溶性CD14亚型的试剂盒1与用于检测可溶性CD14亚型的试剂盒2的一致性比较图;

[0059] 图5.1示出PCT和用于检测可溶性CD14亚型的试剂盒1用于评估患者是否患有脓毒血症的ROC曲线图;

[0060] 图5.2示出PCT和用于检测可溶性CD14亚型的试剂盒2用于评估患者是否患有脓毒血症的ROC曲线图;

[0061] 图5.3示出用于检测可溶性CD14亚型的试剂盒1、试剂盒2、试剂盒3的诊断效力比较图。

## 具体实施方式

[0062] 在下文中,将通过具体实施例更详细地描述本申请。然而,这些实施例只是代表性的并且本申请将决不被理解为受这些实施例的限制。

[0063] 当在本申请的上下文中这些表述、特征、数值或范围结合例如为“大约、基本上、一般而言、至少、最少”等的表述提及时,本申请同样包括准确的或精确的表述、特征、数值或

范围等。

[0064] 在本申请的范围中,所谓“特异性地识别由序列编号SEQ ID No.84或SEQ ID No.42的氨基酸序列构成的表位”是指本申请要求保护的抗体将相当于可溶性CD14亚型的序列中SEQ ID No.84或SEQ ID No.42的氨基酸序列的序列作为表位而进行特异性识别。

[0065] 在本申请的范围中,抗体有时也指抗体或其抗原结合性抗体片段,而抗原结合性抗体片段是指在对由SEQ ID No.84或SEQ ID No.42的氨基酸序列构成的表位进行特异性识别的抗体的部分片段中,具有与原抗体相同的抗原结合性的片段。

[0066] 在本申请的范围中,除非另作说明,可溶性CD14均指人可溶性CD14。

[0067] 在本申请的范围中,术语检测可以与“测定”、“定量”、“分析”等用语相互变换地使用,意指包含定量的和定性的确定。本申请中的检测优选在体外进行。

[0068] 在本申请的范围中,术语ROC(receiver operating characteristic)曲线是指将诊断试验结果划分为若干临界点,以每个临界点对应的灵敏度为纵坐标,特异度为横坐标,作图得到的曲线。ROC曲线是一种全面、准确评价诊断试验的有效工具。ROC曲线的另一个作用是确定检测的最佳阈值。ROC曲线法确定临界点多数情况下,选择曲线上尽量靠近左上方的点,并结合专业情况,确定临界点为最佳。在应用中,根据ROC曲线,结合各切点的灵敏度和特异度结果,选择曲线上尽量靠近左上方约登指数(Youden index)最大的切点为最佳临界点,从而使试验的灵敏度和特异度均较高,同时误诊率和漏诊率较小。

[0069] 本申请第一方面涉及一种抗可溶性CD14亚型单克隆抗体或其抗原结合性抗体片段(在本文中也可称作第一单克隆抗体或其抗原结合性抗体片段),其特异性地识别由SEQ ID No.84的氨基酸序列构成的表位,该抗可溶性CD14亚型单克隆抗体或其抗原结合性抗体片段包括:

[0070] (i) 重链可变区(VH)互补性决定区(CDR):

[0071] VH CDR1:  $X_1X_2X_3MX_4$ ;

[0072] VH CDR2:  $RIX_5X_6DPX_7$ ; 和

[0073] VH CDR3:  $X_8X_9X_{10}RX_{11}$ ;

[0074] 以及

[0075] (ii) 轻链可变区(VL)互补性决定区(CDR):

[0076] VL CDR1:  $KX_{12}X_{13}X_{14}LA$ ;

[0077] VL CDR2:  $WX_{15}X_{16}$ ; 和

[0078] VL CDR3:  $KQX_{17}X_{18}$ ;

[0079] 其中 $X_1$ 至 $X_{18}$ 是下列作为选择项记载的1个或多个氨基酸序列(见表1至表6)。

[0080] 表1

| VH CDR1     |         |       |         |   |       |
|-------------|---------|-------|---------|---|-------|
| [0081] 共同序列 | $X_1$   | $X_2$ | $X_3$   | M | $X_4$ |
| 选择项         | 任意一个氨基酸 | T 或 V | A、Y 或 L |   | Q 或 G |

[0082] 表2

[0083]

| VH CDR2 |   |   |                |                |   |   |                |
|---------|---|---|----------------|----------------|---|---|----------------|
| 共同序列    | R | I | X <sub>5</sub> | X <sub>6</sub> | D | P | X <sub>7</sub> |

[0084]

|     |  |  |                                                |                                           |  |  |                                           |
|-----|--|--|------------------------------------------------|-------------------------------------------|--|--|-------------------------------------------|
| 选择项 |  |  | TYANG、<br>DPMGG、<br>SPASS、<br>DPANG、或<br>SPANS | GTKA、<br>TTKS、<br>NTKY、<br>TTKS 或<br>TTKA |  |  | KFQA、<br>TKFG、<br>SQFA、<br>MKFG 或<br>KFNS |
|-----|--|--|------------------------------------------------|-------------------------------------------|--|--|-------------------------------------------|

[0085] 表3

[0086]

| VH CDR3 |                |                |                 |   |                      |
|---------|----------------|----------------|-----------------|---|----------------------|
| 共同序列    | X <sub>8</sub> | X <sub>9</sub> | X <sub>10</sub> | R | X <sub>11</sub>      |
| 选择项     | F 或<br>G       | GG、GQ 或<br>CG  | YN、YV 或<br>KF   |   | FDY、FYY、FDC 或<br>TDC |

[0087] 表4

[0088]

|      | VL CDR1 |                              |                           |                                           |   |   |
|------|---------|------------------------------|---------------------------|-------------------------------------------|---|---|
| 共同序列 | K       | X <sub>12</sub>              | X <sub>13</sub>           | X <sub>14</sub>                           | L | A |
| 选择项  |         | SSAS、<br>STAT、SSQS<br>或 STSS | LLKS、LLAS、<br>LLSS 或 KASS | NRNIHL、<br>RTRKHY、<br>NRKHLYL 或<br>YTNKAL |   |   |

[0089] 表5

[0090]

| VL CDR2 |   |                   |                   |
|---------|---|-------------------|-------------------|
| 共同序列    | W | X <sub>15</sub>   | X <sub>16</sub>   |
| 选择项     |   | ATS、AST、QSS 或 ASK | RAS、LDS、LEA 或 RES |

[0091] 表6

|        |         |   |   |                      |                   |
|--------|---------|---|---|----------------------|-------------------|
| [0092] | VL CDR3 |   |   |                      |                   |
|        | 共同序列    | K | Q | X <sub>17</sub>      | X <sub>18</sub>   |
|        | 选择项     |   |   | GYN、YNA、YLN 或<br>SYN | LWT、LNT、GNA 或 TWI |

[0093] 在本申请第一方面的一些实施方式中,该抗可溶性CD14亚型单克隆抗体或其抗原结合性抗体片段包括VH CDR1、VH CDR2和VH CDR3以及VL CDR1、VL CDR2和VL CDR3,其中VH CDR1、VH CDR2和VH CDR3以及VL CDR1、VL CDR2和VL CDR3是选自表7中记载的氨基酸序列(见表7)。

[0094] 表7

[0095]

|         | 序列编号 | 氨基酸序列             |
|---------|------|-------------------|
| VH CDR1 | 44   | DVAMQ             |
|         | 45   | DTLMQ             |
|         | 46   | DVAMG             |
|         | 47   | DTYMG             |
|         | 48   | DTYMQ             |
|         | 49   | DVLMG             |
| VH CDR2 | 50   | RIDPANGNTKYDPKFQA |
|         | 51   | RITYANGGTKADPKFNS |
|         | 52   | RIDPMGGNTKYDPKFQA |
|         | 53   | RIDPANGNTKYDPSQFA |
|         | 54   | RIDPMGGGTKADPKFNS |
|         | 55   | RISPANSTTKADPSQFA |
|         | 56   | RISPANSTTKADPKFQA |
| VH CDR3 | 57   | FGGYVRFDY         |
|         | 58   | GCGYVRFY          |
|         | 59   | FGGYVRFY          |
|         | 60   | GCGYNRFDY         |
|         | 61   | FGGYNRFDC         |
|         | 62   | GCGYNRFDC         |
|         | 63   | GCGKFRTDC         |
| VL CDR1 | 64   | KSTSSLLSSNRNIHLLA |
|         | 65   | KSSQSLLKSRTRKHyla |
|         | 66   | KSSQSLLSSRTRKHyla |
|         | 67   | KSSASLLKSNRNIHLLA |

|        |         |    |                   |
|--------|---------|----|-------------------|
| [0096] |         | 68 | KSSASLLSSRTRKHyla |
|        |         | 69 | KSTSSLLSSNRKHyla  |
|        | VL CDR2 | 70 | WASTRES           |
|        |         | 71 | WATSRAS           |
|        |         | 72 | WQSSRAS           |
|        |         | 73 | WATSLDS           |
|        |         | 74 | WQSSLEA           |
|        |         | 75 | WASKRES           |
|        | VL CDR3 | 76 | KQGYNLWT          |
|        |         | 77 | KQGYNLNT          |
|        |         | 78 | KQYNALWT          |
|        |         | 79 | KQYLNGNA          |
|        |         | 80 | KQSYNLWT          |
|        |         | 81 | KQYLNLT           |
|        |         | 82 | KQSYNGNA          |
|        |         | 83 | KQSYNTWI          |

[0097] 在本申请第一方面的一些实施方式中,该抗可溶性CD14亚型单克隆抗体或其抗原结合性抗体片段包括VH CDR1、VH CDR2和VH CDR3,以及VL CDR1、VL CDR2和VL CDR3是下述1)至50)中的任意一种:

[0098] 1) VH CDR1由序列编号44、VH CDR2由序列编号50、VH CDR3由序列编号61、VL CDR1由序列编号69、VL CDR2由序列编号75、VL CDR3由序列编号76的各氨基酸序列构成;

[0099] 2) VH CDR1由序列编号44、VH CDR2由序列编号51、VH CDR3由序列编号57、VL CDR1由序列编号64、VL CDR2由序列编号73、VL CDR3由序列编号78的各氨基酸序列构成;

[0100] 3) VH CDR1由序列编号44、VH CDR2由序列编号53、VH CDR3由序列编号59、VL CDR1由序列编号67、VL CDR2由序列编号71、VL CDR3由序列编号80的各氨基酸序列构成;

[0101] 4) VH CDR1由序列编号44、VH CDR2由序列编号53、VH CDR3由序列编号57、VL CDR1由序列编号68、VL CDR2由序列编号73、VL CDR3由序列编号79的各氨基酸序列构成;

[0102] 5) VH CDR1由序列编号44、VH CDR2由序列编号54、VH CDR3由序列编号61、VL CDR1由序列编号66、VL CDR2由序列编号75、VL CDR3由序列编号82的各氨基酸序列构成;

[0103] 6) VH CDR1由序列编号44、VH CDR2由序列编号54、VH CDR3由序列编号57、VL CDR1由序列编号64、VL CDR2由序列编号75、VL CDR3由序列编号76的各氨基酸序列构成;

[0104] 7) VH CDR1由序列编号44、VH CDR2由序列编号56、VH CDR3由序列编号58、VL CDR1由序列编号68、VL CDR2由序列编号74、VL CDR3由序列编号80的各氨基酸序列构成;

[0105] 8) VH CDR1由序列编号44、VH CDR2由序列编号56、VH CDR3由序列编号59、VL CDR1

由序列编号66、VL CDR2由序列编号71、VL CDR3由序列编号80的各氨基酸序列构成；

[0106] 9) VH CDR1由序列编号45、VH CDR2由序列编号50、VH CDR3由序列编号59、VL CDR1由序列编号64、VL CDR2由序列编号75、VL CDR3由序列编号76的各氨基酸序列构成；

[0107] 10) VH CDR1由序列编号45、VH CDR2由序列编号51、VH CDR3由序列编号58、VL CDR1由序列编号66、VL CDR2由序列编号71、VL CDR3由序列编号80的各氨基酸序列构成；

[0108] 11) VH CDR1由序列编号45、VH CDR2由序列编号51、VH CDR3由序列编号60、VL CDR1由序列编号67、VL CDR2由序列编号70、VL CDR3由序列编号79的各氨基酸序列构成；

[0109] 12) VH CDR1由序列编号45、VH CDR2由序列编号52、VH CDR3由序列编号60、VL CDR1由序列编号66、VL CDR2由序列编号70、VL CDR3由序列编号76的各氨基酸序列构成；

[0110] 13) VH CDR1由序列编号45、VH CDR2由序列编号53、VH CDR3由序列编号58、VL CDR1由序列编号69、VL CDR2由序列编号73、VL CDR3由序列编号82的各氨基酸序列构成；

[0111] 14) VH CDR1由序列编号45、VH CDR2由序列编号53、VH CDR3由序列编号57、VL CDR1由序列编号65、VL CDR2由序列编号71、VL CDR3由序列编号77的各氨基酸序列构成；

[0112] 15) VH CDR1由序列编号45、VH CDR2由序列编号54、VH CDR3由序列编号59、VL CDR1由序列编号66、VL CDR2由序列编号75、VL CDR3由序列编号81的各氨基酸序列构成；

[0113] 16) VH CDR1由序列编号45、VH CDR2由序列编号55、VH CDR3由序列编号57、VL CDR1由序列编号68、VL CDR2由序列编号73、VL CDR3由序列编号78的各氨基酸序列构成；

[0114] 17) VH CDR1由序列编号45、VH CDR2由序列编号56、VH CDR3由序列编号62、VL CDR1由序列编号69、VL CDR2由序列编号71、VL CDR3由序列编号78的各氨基酸序列构成；

[0115] 18) VH CDR1由序列编号45、VH CDR2由序列编号56、VH CDR3由序列编号59、VL CDR1由序列编号69、VL CDR2由序列编号71、VL CDR3由序列编号83的各氨基酸序列构成；

[0116] 19) VH CDR1由序列编号46、VH CDR2由序列编号50、VH CDR3由序列编号62、VL CDR1由序列编号69、VL CDR2由序列编号70、VL CDR3由序列编号81的各氨基酸序列构成；

[0117] 20) VH CDR1由序列编号46、VH CDR2由序列编号51、VH CDR3由序列编号58、VL CDR1由序列编号67、VL CDR2由序列编号73、VL CDR3由序列编号83的各氨基酸序列构成；

[0118] 21) VH CDR1由序列编号46、VH CDR2由序列编号52、VH CDR3由序列编号61、VL CDR1由序列编号68、VL CDR2由序列编号71、VL CDR3由序列编号83的各氨基酸序列构成；

[0119] 22) VH CDR1由序列编号46、VH CDR2由序列编号52、VH CDR3由序列编号60、VL CDR1由序列编号67、VL CDR2由序列编号74、VL CDR3由序列编号81的各氨基酸序列构成；

[0120] 23) VH CDR1由序列编号46、VH CDR2由序列编号52、VH CDR3由序列编号59、VL CDR1由序列编号69、VL CDR2由序列编号75、VL CDR3由序列编号83的各氨基酸序列构成；

[0121] 24) VH CDR1由序列编号46、VH CDR2由序列编号53、VH CDR3由序列编号60、VL CDR1由序列编号64、VL CDR2由序列编号72、VL CDR3由序列编号76的各氨基酸序列构成；

[0122] 25) VH CDR1由序列编号46、VH CDR2由序列编号54、VH CDR3由序列编号63、VL CDR1由序列编号66、VL CDR2由序列编号71、VL CDR3由序列编号79的各氨基酸序列构成；

[0123] 26) VH CDR1由序列编号46、VH CDR2由序列编号55、VH CDR3由序列编号57、VL CDR1由序列编号64、VL CDR2由序列编号75、VL CDR3由序列编号77的各氨基酸序列构成；

[0124] 27) VH CDR1由序列编号46、VH CDR2由序列编号56、VH CDR3由序列编号63、VL CDR1由序列编号65、VL CDR2由序列编号73、VL CDR3由序列编号79的各氨基酸序列构成；

- [0125] 28) VH CDR1由序列编号46、VH CDR2由序列编号56、VH CDR3由序列编号58、VL CDR1由序列编号65、VL CDR2由序列编号75、VL CDR3由序列编号82的各氨基酸序列构成；
- [0126] 29) VH CDR1由序列编号47、VH CDR2由序列编号51、VH CDR3由序列编号57、VL CDR1由序列编号65、VL CDR2由序列编号72、VL CDR3由序列编号77的各氨基酸序列构成；
- [0127] 30) VH CDR1由序列编号47、VH CDR2由序列编号52、VH CDR3由序列编号62、VL CDR1由序列编号65、VL CDR2由序列编号74、VL CDR3由序列编号77的各氨基酸序列构成；
- [0128] 31) VH CDR1由序列编号47、VH CDR2由序列编号53、VH CDR3由序列编号61、VL CDR1由序列编号68、VL CDR2由序列编号72、VL CDR3由序列编号77的各氨基酸序列构成；
- [0129] 32) VH CDR1由序列编号47、VH CDR2由序列编号53、VH CDR3由序列编号57、VL CDR1由序列编号67、VL CDR2由序列编号71、VL CDR3由序列编号77的各氨基酸序列构成；
- [0130] 33) VH CDR1由序列编号47、VH CDR2由序列编号55、VH CDR3由序列编号60、VL CDR1由序列编号69、VL CDR2由序列编号75、VL CDR3由序列编号83的各氨基酸序列构成；
- [0131] 34) VH CDR1由序列编号47、VH CDR2由序列编号55、VH CDR3由序列编号58、VL CDR1由序列编号64、VL CDR2由序列编号73、VL CDR3由序列编号83的各氨基酸序列构成；
- [0132] 35) VH CDR1由序列编号47、VH CDR2由序列编号56、VH CDR3由序列编号63、VL CDR1由序列编号65、VL CDR2由序列编号70、VL CDR3由序列编号82的各氨基酸序列构成；
- [0133] 36) VH CDR1由序列编号48、VH CDR2由序列编号50、VH CDR3由序列编号61、VL CDR1由序列编号66、VL CDR2由序列编号70、VL CDR3由序列编号80的各氨基酸序列构成；
- [0134] 37) VH CDR1由序列编号48、VH CDR2由序列编号50、VH CDR3由序列编号58、VL CDR1由序列编号66、VL CDR2由序列编号70、VL CDR3由序列编号82的各氨基酸序列构成；
- [0135] 38) VH CDR1由序列编号48、VH CDR2由序列编号51、VH CDR3由序列编号62、VL CDR1由序列编号64、VL CDR2由序列编号75、VL CDR3由序列编号81的各氨基酸序列构成；
- [0136] 39) VH CDR1由序列编号48、VH CDR2由序列编号52、VH CDR3由序列编号61、VL CDR1由序列编号67、VL CDR2由序列编号72、VL CDR3由序列编号79的各氨基酸序列构成；
- [0137] 40) VH CDR1由序列编号48、VH CDR2由序列编号52、VH CDR3由序列编号59、VL CDR1由序列编号67、VL CDR2由序列编号72、VL CDR3由序列编号80的各氨基酸序列构成；
- [0138] 41) VH CDR1由序列编号48、VH CDR2由序列编号53、VH CDR3由序列编号61、VL CDR1由序列编号65、VL CDR2由序列编号71、VL CDR3由序列编号80的各氨基酸序列构成；
- [0139] 42) VH CDR1由序列编号48、VH CDR2由序列编号54、VH CDR3由序列编号58、VL CDR1由序列编号66、VL CDR2由序列编号71、VL CDR3由序列编号82的各氨基酸序列构成；
- [0140] 43) VH CDR1由序列编号48、VH CDR2由序列编号54、VH CDR3由序列编号57、VL CDR1由序列编号64、VL CDR2由序列编号72、VL CDR3由序列编号77的各氨基酸序列构成；
- [0141] 44) VH CDR1由序列编号48、VH CDR2由序列编号55、VH CDR3由序列编号58、VL CDR1由序列编号69、VL CDR2由序列编号75、VL CDR3由序列编号81的各氨基酸序列构成；
- [0142] 45) VH CDR1由序列编号48、VH CDR2由序列编号55、VH CDR3由序列编号63、VL CDR1由序列编号64、VL CDR2由序列编号70、VL CDR3由序列编号76的各氨基酸序列构成；
- [0143] 46) VH CDR1由序列编号49、VH CDR2由序列编号50、VH CDR3由序列编号60、VL CDR1由序列编号66、VL CDR2由序列编号72、VL CDR3由序列编号81的各氨基酸序列构成；
- [0144] 47) VH CDR1由序列编号49、VH CDR2由序列编号51、VH CDR3由序列编号60、VL

CDR1由序列编号66、VL CDR2由序列编号74、VL CDR3由序列编号83的各氨基酸序列构成；

[0145] 48) VH CDR1由序列编号49、VH CDR2由序列编号51、VH CDR3由序列编号62、VL CDR1由序列编号65、VL CDR2由序列编号70、VL CDR3由序列编号81的各氨基酸序列构成；

[0146] 49) VH CDR1由序列编号49、VH CDR2由序列编号52、VH CDR3由序列编号59、VL CDR1由序列编号66、VL CDR2由序列编号70、VL CDR3由序列编号79的各氨基酸序列构成；或

[0147] 50) VH CDR1由序列编号49、VH CDR2由序列编号53、VH CDR3由序列编号60、VL CDR1由序列编号68、VL CDR2由序列编号71、VL CDR3由序列编号77的各氨基酸序列构成。

[0148] 在本申请第一方面的一些实施方式中，涉及一种抗可溶性CD14亚型单克隆抗体或其抗原结合性抗体片段，其特异性地识别由SEQ ID No.84的氨基酸序列构成的表位，其包括：

[0149] (a) 包含由序列编号44的氨基酸序列构成的VH CDR1、由序列编号54的氨基酸序列构成的VH CDR2和由序列编号61的氨基酸序列构成的VH CDR3的VH，以及包含由序列编号66的氨基酸序列构成的VL CDR1、由序列编号75的氨基酸序列构成的VL CDR2和由序列编号82的氨基酸序列构成的VL CDR3的VL；

[0150] (b) 包含由序列编号45的氨基酸序列构成的VH CDR1、由序列编号53的氨基酸序列构成的VH CDR2和由序列编号57的氨基酸序列构成的VH CDR3的VH，以及包含由序列编号65的氨基酸序列构成的VL CDR1、由序列编号71的氨基酸序列构成的VL CDR2和由序列编号77的氨基酸序列构成的VL CDR3的VL；

[0151] (c) 包含由序列编号46的氨基酸序列构成的VH CDR1、由序列编号52的氨基酸序列构成的VH CDR2和由序列编号61的氨基酸序列构成的VH CDR3的VH，以及包含由序列编号68的氨基酸序列构成的VL CDR1、由序列编号71的氨基酸序列构成的VL CDR2和由序列编号83的氨基酸序列构成的VL CDR3的VL；

[0152] (d) 包含由序列编号48的氨基酸序列构成的VH CDR1、由序列编号50的氨基酸序列构成的VH CDR2和由序列编号61的氨基酸序列构成的VH CDR3的VH，以及包含由序列编号66的氨基酸序列构成的VL CDR1、由序列编号70的氨基酸序列构成的VL CDR2和由序列编号80的氨基酸序列构成的VL CDR3的VL；

[0153] (e) 包含由序列编号48的氨基酸序列构成的VH CDR1、由序列编号52的氨基酸序列构成的VH CDR2和由序列编号61的氨基酸序列构成的VH CDR3的VH，以及包含由序列编号67的氨基酸序列构成的VL CDR1、由序列编号72的氨基酸序列构成的VL CDR2和由序列编号79的氨基酸序列构成的VL CDR3的VL；或

[0154] (f) 包含由序列编号49的氨基酸序列构成的VH CDR1、由序列编号51的氨基酸序列构成的VH CDR2和由序列编号62的氨基酸序列构成的VH CDR3的VH，以及包含由序列编号65的氨基酸序列构成的VL CDR1、由序列编号70的氨基酸序列构成的VL CDR2和由序列编号81的氨基酸序列构成的VL CDR3的VL。

[0155] 在本申请第一方面的一些实施方式中，该抗可溶性CD14单克隆抗体或其抗原结合性抗体片段为由保藏号为CGMCC NO.19395的杂交瘤细胞株分泌产生的抗可溶性CD14亚型单克隆抗体或其抗原结合性抗体片段。

[0156] 在本申请第一方面的一些实施方式中，该抗可溶性CD14亚型单克隆抗体或其抗原结合性抗体片段不与高分子量可溶性CD14特异性地结合。

[0157] 在本申请第一方面的一些实施方式中,该抗原结合性抗体片段可以选自Fab、Fab'、F(ab')<sub>2</sub>、单链抗体(scFv)、二聚体化V区(二聚抗体)、二硫键稳定性V区(dsFv)、sc(Fv)<sub>2</sub>、包含CDR的多肽、包含重链可变区的多肽以及包含轻链可变区的多肽组成的组中的抗原结合性抗体片段。

[0158] 本申请第二方面请求保护一种用于检测可溶性CD14亚型的试剂盒,该用于检测可溶性CD14亚型的试剂盒至少包含根据本申请的第一单克隆抗体或其抗原结合性抗体片段。

[0159] 优选地,本申请第二方面请求保护的用于检测可溶性CD14亚型的试剂盒还包含另一种抗可溶性CD14亚型单克隆抗体或其抗原结合性抗体片段(在本文中也称作第二单克隆抗体或其抗原结合性抗体片段)。

[0160] 在本申请的第二方面的一些实施方式中,该第二单克隆抗体或其抗原结合性抗体片段特异性地识别由SEQ ID No.42的氨基酸序列构成的表位,该抗可溶性CD14亚型单克隆抗体或其抗原结合性抗体片段包括:

[0161] (i) 重链可变区(VH)互补性决定区(CDR):

[0162] VH CDR1: X<sub>1</sub>X<sub>2</sub>X<sub>3</sub>MX<sub>4</sub>;

[0163] VH CDR2: YIX<sub>5</sub>X<sub>6</sub>ADX<sub>7</sub>;和

[0164] VH CDR3: X<sub>8</sub>X<sub>9</sub>X<sub>10</sub>AX<sub>11</sub>;

[0165] 以及

[0166] (ii) 轻链可变区(VL)互补性决定区(CDR):

[0167] VL CDR1: KX<sub>12</sub>X<sub>13</sub>X<sub>14</sub>N;

[0168] VL CDR2: LX<sub>15</sub>X<sub>16</sub>;和

[0169] VL CDR3: VX<sub>17</sub>X<sub>18</sub>X<sub>19</sub>;

[0170] 其中X<sub>1</sub>至X<sub>19</sub>是下列作为选择项记载的1个或多个氨基酸序列(见表8至表13)。

[0171] 表8

| VH CDR1 |                |                |                |   |                |
|---------|----------------|----------------|----------------|---|----------------|
| 共同序列    | X <sub>1</sub> | X <sub>2</sub> | X <sub>3</sub> | M | X <sub>4</sub> |
| 选择项     | 任意一个氨基酸        | F 或 V          | A、E 或 K        |   | A 或 L          |

[0173] 表9

| VH CDR2 |   |   |                                                |                                           |   |   |                                           |
|---------|---|---|------------------------------------------------|-------------------------------------------|---|---|-------------------------------------------|
| 共同序列    | Y | I | X <sub>5</sub>                                 | X <sub>6</sub>                            | A | D | X <sub>7</sub>                            |
| 选择项     |   |   | SYMGS、<br>SSGSS、<br>AYTMY、<br>TYSGS 或<br>SSKSS | GAYY、<br>TIYY、<br>AKYY、<br>TKAS 或<br>SNLA |   |   | AKLG、<br>TVKG、<br>SYTA、<br>MTKG 或<br>YGNT |

[0175] 表10

|        |         |                |                |                 |   |                 |
|--------|---------|----------------|----------------|-----------------|---|-----------------|
| [0176] | VH CDR3 |                |                |                 |   |                 |
|        | 共同序列    | X <sub>8</sub> | X <sub>9</sub> | X <sub>10</sub> | A | X <sub>11</sub> |
|        | 选择项     | A 或 Q          | G 或 Q          | Q 或 F           |   | M、Y 或 V         |

[0177] 表11

|        |         |   |                              |                           |                                          |   |
|--------|---------|---|------------------------------|---------------------------|------------------------------------------|---|
| [0178] | VL CDR1 |   |                              |                           |                                          |   |
|        | 共同序列    | K | X <sub>12</sub>              | X <sub>13</sub>           | X <sub>14</sub>                          | N |
|        | 选择项     |   | YYAS、<br>SSAT、SSQS<br>或 SGSS | AAKL、LLAT、<br>LLYS 或 KAAS | YRNIKL、<br>TWAKGN、<br>NGKTYL 或<br>YTNGAL |   |

[0179] 表12

|        |         |   |                   |                   |
|--------|---------|---|-------------------|-------------------|
| [0180] | VL CDR2 |   |                   |                   |
|        | 共同序列    | L | X <sub>15</sub>   | X <sub>16</sub>   |
|        | 选择项     |   | VQS、KTS、QTS 或 VSK | LAS、LDS、LTA 或 DSK |

[0181] 表13

[0182]

| VL CDR3 |   |                 |                       |                          |
|---------|---|-----------------|-----------------------|--------------------------|
| 共同序列    | V | X <sub>17</sub> | X <sub>18</sub>       | X <sub>19</sub>          |
| 选择项     |   | G、A、S<br>或 Q    | GTH、GNT、<br>GTA 或 TAI | FITA、FPRT、YGHV 或<br>NYGH |

[0183] 在本申请的第二单克隆抗体或其抗原结合性抗体片段的一些实施方式中,该第二单克隆抗体或其抗原结合性抗体片段包括VH CDR1、VH CDR2和VH CDR3以及VL CDR1、VL CDR2和VL CDR3,其中VH CDR1、VH CDR2和VH CDR3以及VL CDR1、VL CDR2和VL CDR3是选自表14中记载的氨基酸序列(见表14)。

[0184] 表14

[0185]

|         | 序列编号 | 氨基酸序列             |
|---------|------|-------------------|
| VH CDR1 | 1    | SVAML             |
|         | 2    | SVEML             |
|         | 3    | SFAML             |
|         | 4    | SFAMA             |
|         | 5    | SVKML             |
|         | 6    | SFKMA             |
| VH CDR2 | 7    | YISYMGSTIYYADAKLG |
|         | 8    | YISSKSSSNLAADAKLG |
|         | 9    | YISSGSSTIYYADTVKG |
|         | 10   | YISSGSSTIYYADMTKG |
|         | 11   | YITYSGSGAYYADYGNT |
|         | 12   | YISYMGSTIYYADTVKG |
|         | 13   | YISSKSSTIYYADTVKG |
| VH CDR3 | 14   | AGFAY             |

|        |         |    |                  |
|--------|---------|----|------------------|
| [0186] |         | 15 | QQFAY            |
|        |         | 16 | QGFAY            |
|        |         | 17 | QGFAM            |
|        |         | 18 | QQVAY            |
|        |         | 19 | AGFAM            |
|        |         | 20 | AGFAY            |
|        | VL CDR1 | 21 | KSSQSLLYSNGKTYLN |
|        |         | 22 | KYYASAAKLYRNIKLN |
|        |         | 23 | KYYASLLATYRNIKLN |
|        |         | 24 | KYYASLLATTWAKGNN |
|        |         | 25 | KSSQSLLYSTWAKGNN |
|        |         | 26 | KSSQSLLYSYRNIKLN |
|        | VL CDR2 | 27 | LVQSLDS          |
|        |         | 28 | LVSKLTA          |
|        |         | 29 | LVSKLDS          |
|        |         | 30 | LVQSDSK          |
|        |         | 31 | LQTSDSK          |
|        |         | 32 | LVSKLAS          |
|        | VL CDR3 | 33 | VQGTHNYGH        |
|        |         | 34 | VGGTHFPRT        |
|        |         | 35 | VGTAIFPRT        |
|        |         | 36 | VGGTHFITA        |
|        |         | 37 | VSGTHFPRT        |
|        |         | 38 | VQGTHFPRT        |
|        |         | 39 | VQTAIFPRT        |
|        |         | 40 | VQGTHYGHV        |
|        |         | 41 | VQGNTFITA        |

[0187] 在本申请的第二单克隆抗体或其抗原结合性抗体片段的一些实施方式中,该第二单克隆抗体或其抗原结合性抗体片段包括VH CDR1、VH CDR2和VH CDR3以及VL CDR1、VL CDR2和VL CDR3,其中VH CDR1、VH CDR2和VH CDR3以及VL CDR1、VL CDR2和VL CDR3是选自表15中记载的氨基酸序列(见表15)。

[0188] 表15

|        |      |                   |
|--------|------|-------------------|
|        | 序列编号 | 氨基酸序列             |
| [0189] | 1    | SVAML             |
|        | 2    | SVEML             |
|        | 3    | SFAML             |
|        | 4    | SFAMA             |
|        | 5    | SVKML             |
|        | 6    | SFKMA             |
| [0189] | 7    | YISYMGSTIYYADAKLG |
|        | 8    | YISSKSSSNLAADAKLG |
|        | 9    | YISSGSSTIYYADTVKG |
|        | 10   | YISSGSSTIYYADMTKG |
| [0189] | 14   | AGFAY             |
|        | 15   | QQFAY             |
|        | 16   | QGFAY             |
|        | 17   | QGFAM             |
| [0189] | 21   | KSSQSLLYSNGKTYLN  |
|        | 22   | KYYASAAKLYRNIKLN  |
|        | 23   | KYYASLLATYRNIKLN  |
|        | 24   | KYYASLLATTWAKGNN  |
| [0189] | 27   | LVQSLDS           |
|        | 28   | LVSKLTA           |
|        | 29   | LVSKLDS           |
|        | 30   | LVQSDSK           |
| [0189] | 33   | VQGTHNYGH         |
|        | 34   | VGGTHFPRT         |
|        | 35   | VGTAIFPRT         |
|        | 36   | VGGTHFITA         |
| [0190] | 38   | VQGTHFPRT         |

[0191] 在本申请的第二单克隆抗体或其抗原结合性抗体片段的一些实施方式中,该第二单克隆抗体或其抗原结合性抗体片段包括VH CDR1、VH CDR2和VH CDR3,以及VL CDR1、VL CDR2和VL CDR3是下述1)至62)中的任意一种:

[0192] 1) VH CDR1由序列编号1、VH CDR2由序列编号10、VH CDR3由序列编号14、VL CDR1

由序列编号21、VL CDR2由序列编号32、VL CDR3由序列编号34的各氨基酸序列构成；

[0193] 2) VH CDR1由序列编号1、VH CDR2由序列编号11、VH CDR3由序列编号17、VL CDR1由序列编号26、VL CDR2由序列编号28、VL CDR3由序列编号41的各氨基酸序列构成；

[0194] 3) VH CDR1由序列编号1、VH CDR2由序列编号12、VH CDR3由序列编号17、VL CDR1由序列编号21、VL CDR2由序列编号32、VL CDR3由序列编号33的各氨基酸序列构成；

[0195] 4) VH CDR1由序列编号1、VH CDR2由序列编号12、VH CDR3由序列编号14、VL CDR1由序列编号26、VL CDR2由序列编号32、VL CDR3由序列编号39的各氨基酸序列构成；

[0196] 5) VH CDR1由序列编号1、VH CDR2由序列编号13、VH CDR3由序列编号20、VL CDR1由序列编号22、VL CDR2由序列编号30、VL CDR3由序列编号40的各氨基酸序列构成；

[0197] 6) VH CDR1由序列编号2、VH CDR2由序列编号7、VH CDR3由序列编号17、VL CDR1由序列编号23、VL CDR2由序列编号30、VL CDR3由序列编号35的各氨基酸序列构成；

[0198] 7) VH CDR1由序列编号2、VH CDR2由序列编号7、VH CDR3由序列编号14、VL CDR1由序列编号26、VL CDR2由序列编号31、VL CDR3由序列编号38的各氨基酸序列构成；

[0199] 8) VH CDR1由序列编号2、VH CDR2由序列编号8、VH CDR3由序列编号14、VL CDR1由序列编号24、VL CDR2由序列编号30、VL CDR3由序列编号38的各氨基酸序列构成；

[0200] 9) VH CDR1由序列编号2、VH CDR2由序列编号8、VH CDR3由序列编号18、VL CDR1由序列编号23、VL CDR2由序列编号29、VL CDR3由序列编号40的各氨基酸序列构成；

[0201] 10) VH CDR1由序列编号2、VH CDR2由序列编号8、VH CDR3由序列编号17、VL CDR1由序列编号24、VL CDR2由序列编号27、VL CDR3由序列编号38的各氨基酸序列构成；

[0202] 11) VH CDR1由序列编号2、VH CDR2由序列编号9、VH CDR3由序列编号18、VL CDR1由序列编号25、VL CDR2由序列编号27、VL CDR3由序列编号38的各氨基酸序列构成；

[0203] 12) VH CDR1由序列编号2、VH CDR2由序列编号10、VH CDR3由序列编号19、VL CDR1由序列编号24、VL CDR2由序列编号29、VL CDR3由序列编号35的各氨基酸序列构成；

[0204] 13) VH CDR1由序列编号2、VH CDR2由序列编号11、VH CDR3由序列编号18、VL CDR1由序列编号26、VL CDR2由序列编号29、VL CDR3由序列编号36的各氨基酸序列构成；

[0205] 14) VH CDR1由序列编号2、VH CDR2由序列编号11、VH CDR3由序列编号14、VL CDR1由序列编号26、VL CDR2由序列编号32、VL CDR3由序列编号34的各氨基酸序列构成；

[0206] 15) VH CDR1由序列编号2、VH CDR2由序列编号11、VH CDR3由序列编号18、VL CDR1由序列编号26、VL CDR2由序列编号27、VL CDR3由序列编号41的各氨基酸序列构成；

[0207] 16) VH CDR1由序列编号2、VH CDR2由序列编号12、VH CDR3由序列编号20、VL CDR1由序列编号22、VL CDR2由序列编号30、VL CDR3由序列编号37的各氨基酸序列构成；

[0208] 17) VH CDR1由序列编号2、VH CDR2由序列编号12、VH CDR3由序列编号18、VL CDR1由序列编号25、VL CDR2由序列编号29、VL CDR3由序列编号35的各氨基酸序列构成；

[0209] 18) VH CDR1由序列编号2、VH CDR2由序列编号12、VH CDR3由序列编号18、VL CDR1由序列编号25、VL CDR2由序列编号28、VL CDR3由序列编号40的各氨基酸序列构成；

[0210] 19) VH CDR1由序列编号2、VH CDR2由序列编号12、VH CDR3由序列编号16、VL CDR1由序列编号25、VL CDR2由序列编号30、VL CDR3由序列编号34的各氨基酸序列构成；

[0211] 20) VH CDR1由序列编号2、VH CDR2由序列编号13、VH CDR3由序列编号15、VL CDR1由序列编号23、VL CDR2由序列编号32、VL CDR3由序列编号34的各氨基酸序列构成；

- [0212] 21) VH CDR1由序列编号2、VH CDR2由序列编号13、VH CDR3由序列编号16、VL CDR1由序列编号22、VL CDR2由序列编号27、VL CDR3由序列编号34的各氨基酸序列构成；
- [0213] 22) VH CDR1由序列编号2、VH CDR2由序列编号13、VH CDR3由序列编号17、VL CDR1由序列编号22、VL CDR2由序列编号32、VL CDR3由序列编号36的各氨基酸序列构成；
- [0214] 23) VH CDR1由序列编号3、VH CDR2由序列编号7、VH CDR3由序列编号16、VL CDR1由序列编号25、VL CDR2由序列编号28、VL CDR3由序列编号41的各氨基酸序列构成；
- [0215] 24) VH CDR1由序列编号3、VH CDR2由序列编号7、VH CDR3由序列编号19、VL CDR1由序列编号23、VL CDR2由序列编号31、VL CDR3由序列编号34的各氨基酸序列构成；
- [0216] 25) VH CDR1由序列编号3、VH CDR2由序列编号8、VH CDR3由序列编号16、VL CDR1由序列编号22、VL CDR2由序列编号28、VL CDR3由序列编号37的各氨基酸序列构成；
- [0217] 26) VH CDR1由序列编号3、VH CDR2由序列编号8、VH CDR3由序列编号18、VL CDR1由序列编号22、VL CDR2由序列编号31、VL CDR3由序列编号37的各氨基酸序列构成；
- [0218] 27) VH CDR1由序列编号3、VH CDR2由序列编号8、VH CDR3由序列编号19、VL CDR1由序列编号25、VL CDR2由序列编号27、VL CDR3由序列编号37的各氨基酸序列构成；
- [0219] 28) VH CDR1由序列编号3、VH CDR2由序列编号9、VH CDR3由序列编号17、VL CDR1由序列编号23、VL CDR2由序列编号29、VL CDR3由序列编号36的各氨基酸序列构成；
- [0220] 29) VH CDR1由序列编号3、VH CDR2由序列编号9、VH CDR3由序列编号16、VL CDR1由序列编号21、VL CDR2由序列编号29、VL CDR3由序列编号38的各氨基酸序列构成；
- [0221] 30) VH CDR1由序列编号3、VH CDR2由序列编号10、VH CDR3由序列编号19、VL CDR1由序列编号22、VL CDR2由序列编号32、VL CDR3由序列编号41的各氨基酸序列构成；
- [0222] 31) VH CDR1由序列编号3、VH CDR2由序列编号12、VH CDR3由序列编号15、VL CDR1由序列编号24、VL CDR2由序列编号32、VL CDR3由序列编号39的各氨基酸序列构成；
- [0223] 32) VH CDR1由序列编号4、VH CDR2由序列编号7、VH CDR3由序列编号15、VL CDR1由序列编号25、VL CDR2由序列编号28、VL CDR3由序列编号37的各氨基酸序列构成；
- [0224] 33) VH CDR1由序列编号4、VH CDR2由序列编号7、VH CDR3由序列编号18、VL CDR1由序列编号23、VL CDR2由序列编号31、VL CDR3由序列编号33的各氨基酸序列构成；
- [0225] 34) VH CDR1由序列编号4、VH CDR2由序列编号10、VH CDR3由序列编号19、VL CDR1由序列编号21、VL CDR2由序列编号31、VL CDR3由序列编号40的各氨基酸序列构成；
- [0226] 35) VH CDR1由序列编号4、VH CDR2由序列编号10、VH CDR3由序列编号14、VL CDR1由序列编号24、VL CDR2由序列编号27、VL CDR3由序列编号37的各氨基酸序列构成；
- [0227] 36) VH CDR1由序列编号4、VH CDR2由序列编号12、VH CDR3由序列编号16、VL CDR1由序列编号23、VL CDR2由序列编号30、VL CDR3由序列编号33的各氨基酸序列构成；
- [0228] 37) VH CDR1由序列编号4、VH CDR2由序列编号12、VH CDR3由序列编号16、VL CDR1由序列编号24、VL CDR2由序列编号27、VL CDR3由序列编号34的各氨基酸序列构成；
- [0229] 38) VH CDR1由序列编号4、VH CDR2由序列编号13、VH CDR3由序列编号16、VL CDR1由序列编号22、VL CDR2由序列编号32、VL CDR3由序列编号40的各氨基酸序列构成；
- [0230] 39) VH CDR1由序列编号5、VH CDR2由序列编号7、VH CDR3由序列编号14、VL CDR1由序列编号21、VL CDR2由序列编号30、VL CDR3由序列编号40的各氨基酸序列构成；
- [0231] 40) VH CDR1由序列编号5、VH CDR2由序列编号7、VH CDR3由序列编号17、VL CDR1

由序列编号23、VL CDR2由序列编号30、VL CDR3由序列编号34的各氨基酸序列构成；

[0232] 41) VH CDR1由序列编号5、VH CDR2由序列编号7、VH CDR3由序列编号20、VL CDR1由序列编号21、VL CDR2由序列编号30、VL CDR3由序列编号39的各氨基酸序列构成；

[0233] 42) VH CDR1由序列编号5、VH CDR2由序列编号8、VH CDR3由序列编号18、VL CDR1由序列编号21、VL CDR2由序列编号31、VL CDR3由序列编号33的各氨基酸序列构成；

[0234] 43) VH CDR1由序列编号5、VH CDR2由序列编号10、VH CDR3由序列编号18、VL CDR1由序列编号21、VL CDR2由序列编号31、VL CDR3由序列编号33的各氨基酸序列构成；

[0235] 44) VH CDR1由序列编号5、VH CDR2由序列编号10、VH CDR3由序列编号15、VL CDR1由序列编号21、VL CDR2由序列编号28、VL CDR3由序列编号38的各氨基酸序列构成；

[0236] 45) VH CDR1由序列编号5、VH CDR2由序列编号10、VH CDR3由序列编号19、VL CDR1由序列编号26、VL CDR2由序列编号28、VL CDR3由序列编号40的各氨基酸序列构成；

[0237] 46) VH CDR1由序列编号5、VH CDR2由序列编号11、VH CDR3由序列编号14、VL CDR1由序列编号21、VL CDR2由序列编号31、VL CDR3由序列编号33的各氨基酸序列构成；

[0238] 47) VH CDR1由序列编号5、VH CDR2由序列编号11、VH CDR3由序列编号16、VL CDR1由序列编号23、VL CDR2由序列编号31、VL CDR3由序列编号36的各氨基酸序列构成；

[0239] 48) VH CDR1由序列编号5、VH CDR2由序列编号11、VH CDR3由序列编号17、VL CDR1由序列编号23、VL CDR2由序列编号28、VL CDR3由序列编号39的各氨基酸序列构成；

[0240] 49) VH CDR1由序列编号5、VH CDR2由序列编号11、VH CDR3由序列编号16、VL CDR1由序列编号25、VL CDR2由序列编号29、VL CDR3由序列编号38的各氨基酸序列构成；

[0241] 50) VH CDR1由序列编号5、VH CDR2由序列编号12、VH CDR3由序列编号17、VL CDR1由序列编号21、VL CDR2由序列编号27、VL CDR3由序列编号37的各氨基酸序列构成；

[0242] 51) VH CDR1由序列编号5、VH CDR2由序列编号12、VH CDR3由序列编号19、VL CDR1由序列编号26、VL CDR2由序列编号31、VL CDR3由序列编号39的各氨基酸序列构成；

[0243] 52) VH CDR1由序列编号5、VH CDR2由序列编号12、VH CDR3由序列编号16、VL CDR1由序列编号23、VL CDR2由序列编号27、VL CDR3由序列编号34的各氨基酸序列构成；

[0244] 53) VH CDR1由序列编号5、VH CDR2由序列编号12、VH CDR3由序列编号19、VL CDR1由序列编号24、VL CDR2由序列编号31、VL CDR3由序列编号38的各氨基酸序列构成；

[0245] 54) VH CDR1由序列编号5、VH CDR2由序列编号13、VH CDR3由序列编号15、VL CDR1由序列编号26、VL CDR2由序列编号30、VL CDR3由序列编号39的各氨基酸序列构成；

[0246] 55) VH CDR1由序列编号5、VH CDR2由序列编号13、VH CDR3由序列编号15、VL CDR1由序列编号26、VL CDR2由序列编号28、VL CDR3由序列编号33的各氨基酸序列构成；

[0247] 56) VH CDR1由序列编号5、VH CDR2由序列编号13、VH CDR3由序列编号18、VL CDR1由序列编号21、VL CDR2由序列编号30、VL CDR3由序列编号39的各氨基酸序列构成；

[0248] 57) VH CDR1由序列编号5、VH CDR2由序列编号13、VH CDR3由序列编号20、VL CDR1由序列编号25、VL CDR2由序列编号32、VL CDR3由序列编号39的各氨基酸序列构成；

[0249] 58) VH CDR1由序列编号6、VH CDR2由序列编号7、VH CDR3由序列编号18、VL CDR1由序列编号25、VL CDR2由序列编号32、VL CDR3由序列编号39的各氨基酸序列构成；

[0250] 59) VH CDR1由序列编号6、VH CDR2由序列编号10、VH CDR3由序列编号14、VL CDR1由序列编号25、VL CDR2由序列编号32、VL CDR3由序列编号39的各氨基酸序列构成；

[0251] 60) VH CDR1由序列编号6、VH CDR2由序列编号11、VH CDR3由序列编号18、VL CDR1由序列编号22、VL CDR2由序列编号29、VL CDR3由序列编号39的各氨基酸序列构成；

[0252] 61) VH CDR1由序列编号6、VH CDR2由序列编号11、VH CDR3由序列编号14、VL CDR1由序列编号22、VL CDR2由序列编号30、VL CDR3由序列编号39的各氨基酸序列构成；或

[0253] 62) VH CDR1由序列编号6、VH CDR2由序列编号13、VH CDR3由序列编号20、VL CDR1由序列编号22、VL CDR2由序列编号30、VL CDR3由序列编号38的各氨基酸序列构成。

[0254] 在本申请的第二单克隆抗体或其抗原结合性抗体片段的一些实施方式中，该第二单克隆抗体或其抗原结合性抗体片段特异性地识别由SEQ ID No.42的氨基酸序列构成的表位，其包括：

[0255] (a) 包含由序列编号1的氨基酸序列构成的VH CDR1、由序列编号12的氨基酸序列构成的VH CDR2和由序列编号17的氨基酸序列构成的VH CDR3的VH，以及包含由序列编号21的氨基酸序列构成的VL CDR1、由序列编号32的氨基酸序列构成的VL CDR2和由序列编号33的氨基酸序列构成的VL CDR3的VL；

[0256] (b) 包含由序列编号2的氨基酸序列构成的VH CDR1、由序列编号12的氨基酸序列构成的VH CDR2和由序列编号20的氨基酸序列构成的VH CDR3的VH，以及包含由序列编号22的氨基酸序列构成的VL CDR1、由序列编号30的氨基酸序列构成的VL CDR2和由序列编号37的氨基酸序列构成的VL CDR3的VL；

[0257] (c) 包含由序列编号3的氨基酸序列构成的VH CDR1、由序列编号9的氨基酸序列构成的VH CDR2和由序列编号16的氨基酸序列构成的VH CDR3的VH，以及包含由序列编号21的氨基酸序列构成的VL CDR1、由序列编号29的氨基酸序列构成的VL CDR2和由序列编号38的氨基酸序列构成的VL CDR3的VL；

[0258] (d) 包含由序列编号5的氨基酸序列构成的VH CDR1、由序列编号13的氨基酸序列构成的VH CDR2和由序列编号18的氨基酸序列构成的VH CDR3的VH，以及包含由序列编号21的氨基酸序列构成的VL CDR1、由序列编号30的氨基酸序列构成的VL CDR2和由序列编号39的氨基酸序列构成的VL CDR3的VL；

[0259] (e) 包含由序列编号4的氨基酸序列构成的VH CDR1、由序列编号12的氨基酸序列构成的VH CDR2和由序列编号16的氨基酸序列构成的VH CDR3的VH，以及包含由序列编号23的氨基酸序列构成的VL CDR1、由序列编号30的氨基酸序列构成的VL CDR2和由序列编号33的氨基酸序列构成的VL CDR3的VL；或

[0260] (f) 包含由序列编号6的氨基酸序列构成的VH CDR1、由序列编号13的氨基酸序列构成的VH CDR2和由序列编号20的氨基酸序列构成的VH CDR3的VH，以及包含由序列编号22的氨基酸序列构成的VL CDR1、由序列编号30的氨基酸序列构成的VL CDR2和由序列编号38的氨基酸序列构成的VL CDR3的VL。

[0261] 在本申请的第二单克隆抗体或其抗原结合性抗体片段的一些实施方式中，该第二单克隆抗体或其抗原结合性抗体片段为由保藏号为CGMCC NO.18536的杂交瘤细胞株分泌产生的抗可溶性CD14亚型单克隆抗体或其抗原结合性抗体片段。

[0262] 在本申请的第二单克隆抗体或其抗原结合性抗体片段的一些实施方式中，该第二单克隆抗体或其抗原结合性抗体片段不与高分子量可溶性CD14特异性地结合。

[0263] 在本申请的第二单克隆抗体或其抗原结合性抗体片段的一些实施方式中，该抗原

结合性抗体片段可以选自Fab、Fab'、F(ab')<sub>2</sub>、单链抗体(scFv)、二聚体化V区(二聚抗体)、二硫键稳定性V区(dsFv)、sc(Fv)<sub>2</sub>、包含CDR的多肽、包含重链可变区的多肽以及包含轻链可变区的多肽组成的组中的抗原结合性抗体片段。

[0264] 有关本申请的第二单克隆抗体的详细信息记载于申请人的在先专利申请PCT/CN2019/119536中,该专利申请的全部公开内容通过引用并入本文。

[0265] 根据本申请第二方面的试剂盒还可以包括其他试剂成分,包括但不限于一次抗体、二次抗体、标记抗体、标记酶等标记物质;显色底物、荧光底物、化学发光底物、生物素-链霉亲和素等特异性结合物质、不溶性载体、阻断剂、稀释液、洗涤液、标准物质等。

[0266] 例如,应用于化学发光酶免疫测定法(CLEIA)的试剂盒可以包括包被于固相上的抗体、酶标记抗体、化学发光底物、稀释液、洗涤液等。当然,在其他实施例中,本申请实施例的抗体也可应用于制备基于双抗体夹心法或竞争法的酶免疫测定试剂盒、电化学发光免疫测定试剂盒、免疫层析试剂盒等。

[0267] 在本申请第二方面的一些实施方式中,根据本申请的第一单克隆抗体或其抗原结合性抗体片段用作捕获抗体并且根据本申请的第二单克隆抗体或其抗原结合性抗体片段用作检测抗体,或者根据本申请的第二单克隆抗体或其抗原结合性抗体片段用作捕获抗体并且根据的第一单克隆抗体或其抗原结合性抗体片段用作检测抗体,其中所述捕获抗体包被在固相载体上并用于捕获待测样本中的可溶性CD14亚型。

[0268] 在本申请第二方面的一些实施方式中,所述固相载体可以选自磁性微球、芯片、试纸等,优选为磁性微球,更优选为超顺磁性磁珠。

[0269] 在本申请第二方面的一些实施方式中,可溶性CD14亚型检测抗体的信号标记物可以例如是化学发光标记物(例如碱性磷酸酶、鲁米诺、异鲁米诺、吖啶酯、辣根过氧化物酶)、电化学发光标记物(例如三联吡啶钌)、量子点(例如金量子点、CdSe量子点、ZnCdSe量子点等)、荧光微球等,或其组合。

[0270] 本申请第三方面请求保护一种用于检测可溶性CD14亚型的方法,该方法包括使本申请的第一单克隆抗体或其抗原结合性抗体片段与待测样本接触。

[0271] 采用本申请的第一单克隆抗体或其抗原结合性抗体片段对样本中的可溶性CD14亚型进行免疫学测定的方法例如可以为酶联免疫吸附测定法(ELISA)、化学发光酶免疫测定法(CLEIA)、化学发光免疫测定法(CLIA)、荧光抗体法(FAT)、荧光酶免疫测定法(FEIA)、电化学发光免疫测定法(ECLIA)、放射免疫测定法(RIA)、免疫层析法、凝集法、竞争法等等,但并不限于这些方法。本申请实施例尤其是适合应用于化学发光酶免疫测定法。

[0272] ELISA(enzyme-linked immunosorbent assay)是使用酶标记抗体进行的免疫测定法之一,包括直接法、间接法等,例如夹心ELISA。所谓的夹心ELISA是指:使用抗原识别部位不同的抗体,其中一个抗体包被于固相上,并使用另一抗体来夹持要进行检测的抗原,从而形成抗体-抗原-抗体复合体。

[0273] 化学发光酶免疫测定法的原理为:使样本中的抗原与固定于固相上的抗体进行反应后,与酶标记抗体进行反应,并在洗涤后加入化学发光底物进行酶反应,然后测定发光强度。

[0274] 在本申请第三方面的一些实施方式中,所述方法包括:

[0275] 将待测样本和包被有捕获抗体的固相支持物混合,使得固相支持物上包被的捕获

抗体与待测样本中的可溶性CD14亚型结合；

[0276] 将获得的上述混合物进行清洗，除去未结合的物质；

[0277] 在上述经清洗的混合物中加入经标记的检测抗体进行混匀，使得所述检测抗体与所述捕获抗体上结合的可溶性CD14亚型结合，形成夹心复合物；

[0278] 其中，所述捕获抗体或所述检测抗体为根据本申请的第一单克隆抗体或其抗原结合性抗体片段；

[0279] 对上述夹心复合物进行清洗，除去未结合的物质；

[0280] 在上述经清洗的夹心复合物中加入检测底物，以检测样本中的可溶性CD14亚型的浓度。例如，在上述经清洗的夹心复合物中加入化学发光底物，检测反应所产生的光子数，以得到样本的化学发光信号值，该化学发光信号值与可溶性CD14亚型的浓度成正比。

[0281] 优选地，在本申请第三方面的一些实施方式中，检测抗体可以是根据本申请的第一单克隆抗体或其抗原结合性抗体片段。在这些实施方式中，捕获抗体可以根据本申请的第二单克隆抗体或其抗原结合性抗体片段。

[0282] 当然，在本申请第三方面的另一些备选实施方式中，捕获抗体可以是根据本申请的第一单克隆抗体或其抗原结合性抗体片段或其抗原结合性片段。此时，检测抗体可以是根据本申请的第二单克隆抗体或其抗原结合性抗体片段，也可以是其他抗可溶性CD14亚型多克隆抗体。

[0283] 在本申请第三方面的一些实施方式中，待测样本可以是血液、血液组分例如全血、血清或血浆，优选为血浆样本。但本申请的样本不限于此，也可以是尿、组织液、淋巴液、关节液、乳汁、脑脊髓液、脓、唾液、泪液、粘液、鼻水、痰、腹水、用水、精液等体液。

[0284] 本申请第四方面涉及本申请的第一单克隆抗体或其抗原结合性抗体片段在制备用于评估患者是否患有脓毒血症的分析试剂中的应用，其中，使用本申请的第一单克隆抗体或其抗原结合性抗体片段对患者的血液样本中的可溶性CD14亚型的浓度进行检测，所述可溶性CD14亚型的浓度相对于参考值的水平升高与患者患有脓毒血症的可能性增加相关。

[0285] 在本申请第四方面的一些实施方式中，将可溶性CD14亚型的浓度与临界值进行比较，判断可溶性CD14亚型的浓度是否高于临界值，从而评估患者是否患有脓毒血症。所述可溶性CD14亚型的浓度相对于参考值的水平升高与患者患有脓毒血症的可能性增加正相关。

[0286] 在本申请第四方面的一些实施方式中，在对患者产生患有脓毒血症的怀疑后72小时内检测该患者的血液样本中的可溶性CD14亚型的浓度。

[0287] 以下描述本申请的一些实施例，这些实施例不是为了限制本申请，而是为了更好地说明本申请。

[0288] 实施例1：抗可溶性CD14亚型抗体的制备

[0289] 步骤1.1可溶性CD14亚型免疫原的表达

[0290] 可溶性CD14亚型免疫原分别采用原核表达系统和真核表达系统进行表达，下面详细描述相应的过程：

[0291] (1) 采用原核表达系统来表达可溶性CD14亚型免疫原

[0292] 在合成目标DNA序列后，选择pET30a表达载体来构建质粒，并且将其转化为大肠杆菌BL21star (DE3)，从而获得原核表达工程菌株。通过IPTG (异丙基硫代半乳糖苷) 法诱导该重组质粒在大肠杆菌表达体系中高效表达。目标蛋白主要存在于包涵体中，采用 $\text{Ni}^{2+}$ NTA亲

和柱纯化,获得目标蛋白,该目标蛋白序列为Thr Thr Pro Glu Pro Cys Glu Leu Asp Asp Glu Asp Phe Arg Cys Val Cys Asn Phe Ser Glu Pro Gln Pro Asp Trp Ser Glu Ala Phe Gln Cys Val Ser Ala Val Glu Val Glu Ile His Ala Gly Gly Leu Asn Leu Glu Pro Phe Leu Lys Arg Val Asp Ala Asp Ala Asp Pro Arg Gln Tyr Ala (SEQ ID No.43)。如图1所示,采用Bradford法测定目标蛋白的浓度为5.42mg/mL,采用SDS-PAGE和Western Blot确定目标蛋白的纯度和分子量。

[0293] (2) 采用真核表达系统来表达可溶性CD14亚型免疫原

[0294] 在合成目标DNA序列后,选择pcDNA3.4表达载体来构建质粒。采用HEK293-6E表达体系,其培养条件为:在serum-free FreeStyle™ 293Expression Medium (Thermo Fisher Scientific) 基质中在37℃,5%CO<sub>2</sub>下进行培养。采用瞬时转染的方法将构建的质粒在293-6E表达体系转染。培养6天后,收集细胞培养上清。将上清液过滤并进亲和纯化。将纯化后的蛋白采用优化后的实验条件进行酶切,并纯化后获得目标蛋白。如图2所示,采用Bradford法测定目标蛋白的浓度为1.55mg/mL,采用SDS-PAGE和Western Blot确定目标蛋白的纯度和分子量。

[0295] 步骤1.2抗可溶性CD14亚型多克隆抗体的制备

[0296] 将步骤1.1所获得的原核系统和真核系统表达纯化的蛋白、即抗原按一定比例混合,并且与载体蛋白钥孔血蓝蛋白(简称KLH)进行偶联,从而作为免疫原对新西兰大白兔按如下步骤进行免疫:用生理盐水稀释免疫原,然后与佐剂例如弗氏不完全佐剂(Sigma-Aldrich)进行1:1混合。抗原和佐剂完全混合形成稳定的乳剂,将该乳剂在新西兰大白兔双肩周围的皮肤下进行皮下注射以及在后大腿进行肌肉注射。每个区域大约用1/4的免疫原,每次免疫的抗原量约100μg至500μg,一共免疫四次,每次免疫间隔为2周。完成第四次免疫后,收集新西兰大白兔的抗血清,并进行抗原亲和纯化,获得可溶性CD14亚型多克隆抗体。在图3中示出抗可溶性CD14亚型多克隆抗体SDS-PAGE和Western Blot的结果。在图3左侧SDS-PAGE中,泳道M为Protein marker,第一泳道为多克隆抗体,第二泳道为兔IgG;在图3右侧Western Blot中,泳道M为Protein marker,第一泳道为免疫原(100ng)+纯化抗体(1μg/mL)+山羊抗兔IgG[IRDye800cw](0.125μg/mL),第二泳道为免疫原(50ng)+纯化抗体(1μg/mL)+山羊抗兔IgG[IRDye800cw](0.125μg/mL),第三泳道为免疫原(100ng)+未免疫血清+山羊抗兔IgG[IRDye800cw](0.125μg/mL),第四泳道为免疫原(100ng)+山羊抗兔IgG[IRDye800cw](0.125μg/mL)。

[0297] 步骤1.3作为本申请的第二单克隆抗体的抗可溶性CD14亚型单克隆抗

[0298] 体的制备

[0299] 将步骤1.1所获得的原核系统和真核系统表达纯化的蛋白、即抗原按一定比例混合,并与载体蛋白钥孔血蓝蛋白(简称KLH)进行偶联,从而作为免疫原对小鼠按如下步骤进行免疫:在初次免疫时将抗原(10μg至50μg)与佐剂例如弗氏完全佐剂(Sigma-Aldrich)按1:1混合,然后进行皮下多点注射。3周后进行第二次免疫,第二次免疫剂量与初次免疫剂量相同,添加弗氏不完全佐剂(Sigma-Aldrich)进行皮下注射。又3周后进行第三次免疫,第三次免疫剂量与初次免疫剂量相同,但不添加佐剂。经3周后,采用剂量为100μg至500μg来进行加强免疫。在加强免疫3天后,取脾进行融合。在第三次免疫之后,采用ELISA的方法评估小鼠的抗血清的价效,选择效价最好的动物的脾细胞与骨髓瘤细胞进行融合,获得母克隆

细胞株。在本申请的范围中,骨髓瘤细胞可以使用公知的各种细胞,例如,来源于小鼠的P3、NS-1、P3U1、SP2/0、来源于大鼠的YB2/0、Y3-Ag1、来源于人的SK0-007、人鼠杂交骨髓瘤细胞SHM-D33等。在本申请中优选使用小鼠的SP2/0。

[0300] 然后,通过ELISA方法对母克隆进行正筛和反筛(正筛和反筛实验均采用间接ELISA的方法)。

[0301] 对于正筛实验,用包被缓冲液(PBS缓冲液,pH=7.4)稀释抗原,配置成浓度为1 $\mu$ g/mL的待包被抗原。将100 $\mu$ L的待包被抗原加入到96孔板内,在室温下孵育1小时。采用PBS缓冲液(pH=7.4)作为清洗液,去除未反应的抗原。将100 $\mu$ L的封闭液加入到96孔板内,室温孵育1小时,封闭未反应的固相表面。再次用清洗液(PBS缓冲液,pH=7.4)去除过量的封闭液。然后,加入100 $\mu$ L的待筛选细胞上清,室温孵育30分钟。在采用清洗液洗(PBS缓冲液,pH=7.4)去除未与固相包被抗原结合的抗体后,添加100 $\mu$ L的标记有过氧化物酶的山羊抗鼠抗体。标记有过氧化物酶的山羊抗鼠抗体与识别固相抗原的鼠抗体结合,并且催化底物液发光。通过发光的强度,判断细胞上清中是否存在可与抗原结合的抗体。

[0302] 在抗体筛选过程中,通过采用sCD14进行反筛,确定被筛选的克隆与sCD14无交叉反应。对于反筛实验,将包被缓冲液(PBS缓冲液,pH=7.4)分别稀释His-tag蛋白和sCD14蛋白,配置成浓度为1 $\mu$ g/mL的待包被物。之后的实验步骤与正筛实验相同。通过最终发光值的强度,判断细胞上清抗体是否与反筛物质有反应性。

[0303] 在筛选母克隆之后进行后续的亚克隆。对亚克隆进行亲和力排序和表位归类。将亚克隆上清与通过步骤1.2制备的多克隆抗体配对检测抗原。在表16-18中总结了抗可溶性CD14亚型单克隆抗体亲和力排序、表位归类以及配对抗体筛选结果。根据亲和力排序和抗体配对结果,筛选出克隆号为16D5B2的抗体(保藏号为CGMCC NO.18536)来进行后续的生产 and 纯化,从而获得鼠单克隆抗体。

[0304] 表16

[0305]

| 亲和力排序 |         |              |
|-------|---------|--------------|
|       | 克隆号     | EC50 (ng/ml) |
| 1     | 16D5B2  | 1.163        |
| 2     | 16D5B12 | 1.194        |
| 3     | 16D5D6  | 1.284        |
| 4     | 3D5D9   | 1.404        |
| 5     | 3D5A2   | 1.512        |
| 6     | 3D5D8   | 1.680        |
| 7     | 11H1E11 | 1.998        |

[0306]

|    |         |       |
|----|---------|-------|
| 8  | 11H1B9  | 2.356 |
| 9  | 11H1G11 | 2.661 |
| 10 | 17C7A6  | 5.493 |
| 11 | 17C7H7  | 9.137 |
| 12 | 20A10F7 | /     |
| 13 | 20A10E6 | /     |

[0307] 表17

| 表位归类    |        |
|---------|--------|
| 表位 1    | 表位 2   |
| 3D5A2   | 17C7A6 |
| 3D5D8   | 17C7H7 |
| 3D5D9   |        |
| 16D5B2  |        |
| 16D5B12 |        |
| 16D5D6  |        |
| 11H1B9  |        |
| 11H1E11 |        |
| 11H1G11 |        |

[0308]

[0309] 表18

| 配对抗体的筛选 |               |       |           |          |
|---------|---------------|-------|-----------|----------|
|         | 克隆号           | 抗原浓度  | 多克隆抗体包被浓度 | 相应值 (RU) |
| [0310]  | 0 阴性对照 (培养上清) | 100nM | 5μg/mL    | -0.9     |
|         | 1 16D5B2      |       |           | 21.2     |
|         | 2 16D5B12     |       |           | 10.11    |
|         | 3 16D5D6      |       |           | 8.9      |
|         | 4 3D5D9       |       |           | 6.9      |
|         | 5 3D5A2       |       |           | 6.5      |
|         | 6 3D5D8       |       |           | 4.2      |
|         | 7 11H1E11     |       |           | -1.1     |

|        |    |         |  |  |      |
|--------|----|---------|--|--|------|
| [0311] | 8  | 11H1B9  |  |  | 7.2  |
|        | 9  | 11H1G11 |  |  | -1.3 |
|        | 10 | 17C7A6  |  |  | 0.9  |
|        | 11 | 17C7H7  |  |  | 1.4  |

[0312] 步骤1.4:作为本申请的第二单克隆抗体的抗可溶性CD14亚型单克隆抗体氨基酸序列测定

[0313] 对通过步骤1.3筛选所得到的作为本申请的第二单克隆抗体的抗可溶性CD14亚型单克隆抗体的可变区进行测序。首先,按照 **TRIzol®**试剂盒操作手册将杂交瘤细胞的总RNA提取出来,然后按照PrimeScript™ 1st Strand cDNA Synthesis Kit的操作手册,用表位特异的反义引物或通用引物将总RNA逆转录成cDNA。通过逆转录合成的cDNA序列可得其对应抗可溶性CD14亚型单克隆抗体氨基酸序列,该抗可溶性CD14亚型单克隆抗体例如包括包含由序列编号3的氨基酸序列构成的VH CDR1、由序列编号9的氨基酸序列构成的VH CDR2和由序列编号16的氨基酸序列构成的VH CDR3的VH,以及包含由序列编号21的氨基酸序列构成的VL CDR1、由序列编号29的氨基酸序列构成的VL CDR2和由序列编号38的氨基酸序列构成的VL CDR3的VL,其中该抗可溶性CD14亚型单克隆抗体特异性地识别由SEQ ID No.42的氨基酸序列构成的表位。

[0314] 步骤1.5作为本申请的第一单克隆抗体的抗可溶性CD14亚型单克隆抗体的制备

[0315] 以与步骤1.3类似的步骤,获得母克隆细胞株。然后,采用Biacore X100 (GE Healthcare),筛选16D5B2配对抗体的母克隆上清。具体实验方法包括:

[0316] (1) 16D5B2抗体偶联:将16D5B2抗体用Acetate 4.0缓冲液 (GE Healthcare, BR-1003-49) 稀释至1μg/ml-20μg/ml。打开Biacore X100中的“Immobilization”程序,按照仪器提示将氨基偶联试剂盒 (GE Healthcare, BR-1000-50) 中的溶液、稀释后的抗体溶液、NaOH溶液放入样品盘,目标偶联量10000RU-3000RU。

[0317] (2) 配对上清的筛选:将步骤1.1获得的Presepsin抗原用1×HBS-EP+Buffer (GE Healthcare, BR-1006-69) 稀释至200nM。抗200nM Presepsin抗原与CM5-16D5B2芯片结合后;将用HBS-EP Buffer稀释一倍的母克隆上清进样,观测各母克隆上清的响应值 (RU)。

[0318] 测试结果如表19所示,筛选出母克隆上清编号为3G8、27F7、1B11响应值 (RU) 较高,配对可能大。

[0319] 表19

[0320]

| 母克隆上清编号           | 母克隆上清与芯片特异性结合响应值 (RU) | 母克隆上清编号 | 母克隆上清与芯片特异性结合响应值 (RU) |
|-------------------|-----------------------|---------|-----------------------|
| 1A10              | -0.9                  | 10E2    | -4.4                  |
| 1B11              | 14.1                  | 10H4    | 2                     |
| 1E4               | 0                     | 15A8    | 0.1                   |
| 1F1               | -0.2                  | 8E3     | 0.8                   |
| 3E2               | 1.1                   | 11H1    | -0.3                  |
| 1H3               | -0.9                  | 11H3    | 0.2                   |
| 2A11              | -1.7                  | 11H11   | 2.6                   |
| 3A2               | -2.4                  | 15C2    | 3                     |
| 3B7               | -0.8                  | 16D5    | 6.8                   |
| 3B3               | -1.4                  | 17C7    | 0.9                   |
| 3D5               | -0.5                  | 30C2    | 1.2                   |
| 3D9               | 0.5                   | 26F12   | 2.2                   |
| 3E12              | -3.8                  | 28D7    | 2.6                   |
| 8A2               | -0.5                  | 20A10   | 0.8                   |
| 3G8               | 34.7                  | 26G7    | 0.5                   |
| 4H6               | -1.1                  | 27A7    | 2                     |
| 5G7               | -1.9                  | 17H10   | -1.5                  |
| 3G10              | -0.3                  | 27F17   | 24.2                  |
| 8D6               | -0.7                  | 17F8    | 1.1                   |
| 6H7               | 0.2                   | 20H11   | 0.3                   |
| 抗 Presepsin 多克隆抗体 | 29.1                  | 阴性对照    | 0.3                   |

[0321] 在筛选出母克隆(编号为3G8、27F7、1B11)之后进行后续的亚克隆并且进行定株,获得共6株单克隆抗体,其克隆号分别为3G8-1、3G8-2、27F7-1、27F7-2、1B11-1、1B11-2。

[0322] 将步骤1.3所获得的克隆号为16D5B2的单克隆抗体(即本申请的第二单克隆抗体)用作捕获抗体并且包被于超顺磁性磁珠(Merck, Estapor®超顺磁性磁珠)表面。超顺磁性磁珠表面修饰有羧基,超顺磁性磁珠表面的羧基在EDC/NHS催化下与克隆号为16D5B2的单克隆抗体的氨基偶联,从而制备得到磁珠包被物。将该磁珠包被物在50mM的MES(2-吗啉乙磺酸)缓冲液(0.5M NaCl, 0.5%BSA, 0.05%吐温20, pH=6.0)中稀释,磁珠包被物浓度为1.0mg/mL。

[0323] 分别将3G8-1、3G8-2、27F7-1、27F7-2、1B11-1、1B11-2、多克隆抗体作为检测抗体,

该检测抗体标记有碱性磷酸酶 (Roche Life Science)。将酶标标记物稀释于50mM的MES缓冲液 (0.5M NaCl, 0.5%BSA, 0.05%吐温20, pH=6.0), 酶标标记物浓度为1 $\mu$ g/mL。对试剂的信噪比进行对比。从下面表20可看出, 在选用克隆号3G8-2时信噪比最高。因此, 筛选出克隆号为3G8-2的抗体 (保藏号为CGMCC NO.19395) 来进行后续的生产 and 纯化, 从而获得鼠单克隆抗体 (即本申请的第一单克隆抗体)。

[0324] 表20

| 不同抗体组合信噪比 |        |       |        |        |        |        |                   |
|-----------|--------|-------|--------|--------|--------|--------|-------------------|
| 磁珠抗体      | 16D5B2 |       |        |        |        |        |                   |
| 酶标抗体      | 3G8-1  | 3G8-2 | 27F7-1 | 27F7-2 | 1B11-1 | 1B11-2 | 抗 Presepsin 多克隆抗体 |
| 样本 1      | 1.37   | 1.79  | 1.16   | 1.13   | 1.05   | 1.05   | 1.42              |
| 样本 2      | 3.31   | 4.30  | 3.00   | 2.32   | 1.17   | 1.29   | 3.30              |
| 样本 3      | 7.09   | 9.00  | 6.43   | 5.59   | 2.32   | 2.21   | 7.80              |
| 样本 4      | 13.36  | 17.15 | 12.00  | 10.61  | 5.20   | 5.71   | 13.63             |
| 样本 5      | 68.12  | 86.77 | 60.57  | 48.81  | 19.79  | 17.26  | 69.91             |

[0326] 步骤1.6: 作为本申请的第一单克隆抗体的抗可溶性CD14亚型单克隆抗体氨基酸序列测定

[0327] 对通过步骤1.5筛选所得到的作为本申请的第一单克隆抗体的抗可溶性CD14亚型单克隆抗体的可变区进行测序。首先, 按照 TRIzol® 试剂盒操作手册将杂交瘤细胞的总RNA提取出来, 然后按照PrimeScript™ 1st Strand cDNA Synthesis Kit的操作手册, 用表位特异的反义引物或通用引物将总RNA逆转录成cDNA。通过逆转录合成的cDNA序列可得其对应抗可溶性CD14亚型单克隆抗体氨基酸序列, 该抗可溶性CD14亚型单克隆抗体例如包括包含由序列编号46的氨基酸序列构成的VH CDR1、由序列编号52的氨基酸序列构成的VH CDR2和由序列编号61的氨基酸序列构成的VH CDR3的VH, 以及包含由序列编号68的氨基酸序列构成的VL CDR1、由序列编号71的氨基酸序列构成的VL CDR2和由序列编号83的氨基酸序列构成的VL CDR3的VL, 其中该抗可溶性CD14亚型单克隆抗体特异性地识别由SEQ ID No.84的氨基酸序列构成的表位。

[0328] 实施例2: 抗可溶性CD14亚型单克隆抗体的特异性表位确定

[0329] 在本申请中, 对表位的确定方法没有特别的限定, 例如可以通过下方式进行: 首先, 由目标蛋白序列N端依次向C端移动3个氨基酸合成多肽, 每条肽链由15个氨基酸组成; 然后, 将多肽分别标记有生物素, 并且通过生物素-链霉亲和素结合包被于含有链霉亲和素的96孔板上; 接着分别将待测抗体以及过氧化物酶标记的山羊抗鼠IgG加入到96孔板中; 通过最终反应的信号值确定待测抗体的识别的氨基酸序列。

[0330] 实施例3: 用于检测可溶性CD14亚型的试剂盒的制备

[0331] 实施例3.1: 用于检测可溶性CD14亚型的试剂盒的制备, 该试剂盒包含作为捕获抗体的本申请第二单克隆抗体 (16D5B2) 和作为检测抗体的步骤1.2中所制备的抗可溶性CD14亚型多克隆抗体 (在本文中也简称用于检测可溶性CD14亚型的试剂盒1)

[0332] 将通过实施例1筛选出的克隆号为16D5B2的单克隆抗体用作捕获抗体,包被于超顺磁性磁珠(Merck, Estapor®超顺磁性磁珠)表面。超顺磁性磁珠表面修饰有羧基,超顺磁性磁珠表面的羧基在EDC/NHS催化下与克隆号为16D5B2的单克隆抗体的氨基偶联,从而制备得到磁珠包被物。将磁珠包被物在50mM的MES(2-吗啉乙磺酸)缓冲液(0.5M NaCl,0.5% BSA,0.05%吐温20,pH=6.0)中稀释,磁珠包被物浓度为1.0mg/mL。将通过实施例1中步骤1.2中所制备的抗可溶性CD14亚型多克隆抗体作为检测抗体,该检测抗体标记有碱性磷酸酶(Roche Life Science)。将酶标标记物稀释于50mM的MES缓冲液(0.5M NaCl,0.5%BSA,0.05%吐温20,pH=6.0),酶标标记物浓度为1 $\mu$ g/mL。

[0333] 在当前的实施例中,检测反应基于夹心法模式:将待测样本(40 $\mu$ L)、捕获抗体(50 $\mu$ L)和检测抗体(50 $\mu$ L)加入到反应管中孵育,其中待测样本为血浆。待测样本内的抗原、即可溶性CD14亚型与捕获抗体和检测抗体结合,形成夹心复合物。在反应管内孵育反应后,磁场吸附磁珠,从而洗去未结合的物质。

[0334] 将化学发光底物添加到反应管内,发光底物(3-(2-螺旋金刚烷)-4-甲氧基-4-(3-磷氧酰)-苯基-1,2-二氧化环乙烷,AMPPD)被碱性磷酸酶所分解,脱去一个磷酸基,生成不稳定的中间产物,该中间产物通过分子内电子转移产生间氧苯甲酸甲酯阴离子,处于激发态的间氧苯甲酸甲酯阴离子从激发态返回基态时,产生化学发光。接着,通过光电倍增管对中间反应所产生的光子数进行测量,所产生的光子数与样本中的可溶性CD14亚型的浓度成正比。最后,将一系列含不同浓度的可溶性CD14亚型的样本进行测试,可得到其相应的发光值,进而建立标准曲线,如图4.1所示。

[0335] 实施例3.2:用于检测可溶性CD14亚型的试剂盒的制备,该试剂盒包含本申请第一单克隆抗体(3G8-2)和本申请第二单克隆抗体(16D5B2)(在本文中也简称用于检测可溶性CD14亚型的试剂盒2)

[0336] 在现有的用于检测Presepsin的试剂盒中,通常将单克隆抗体用作捕获抗体,而将兔多克隆抗体用作检测抗体,例如,本申请实施例3.1的试剂盒,或者可以利用本申请的第一单克隆抗体(3G8-2)作为捕获抗体并且将兔多克隆抗体用作检测抗体;其中兔多克隆抗体是收集接受Presepsin抗原免疫后的新西兰兔子的抗血清并且将抗血清抗原亲和纯化后获得。然而,由于兔子个体之间的免疫应答差异大,因此兔多克隆抗体的批间差难于控制。此外,兔子为小型动物,其抗血清的产量少,这也不利于试剂持续稳定的生产。

[0337] 因此,在本申请的用于检测可溶性CD14亚型的试剂盒2中优选包含本申请的第一单克隆抗体(3G8-2)和本申请的第二单克隆抗体(16D5B2)。将通过实施例1的步骤1.3筛选出的克隆号为16D5B2的单克隆抗体用作捕获抗体,包被于超顺磁性磁珠(Merck, Estapor®超顺磁性磁珠)表面。超顺磁性磁珠表面修饰有羧基,超顺磁性磁珠表面的羧基在EDC/NHS催化下与克隆号为16D5B2的单克隆抗体的氨基偶联,从而制备得到磁珠包被物。将磁珠包被物在50mM的MES(2-吗啉乙磺酸)缓冲液(0.5M NaCl,0.5%BSA,0.05%吐温20,pH=6.0)中稀释,磁珠包被物浓度为1.0mg/mL。将通过实施例1中步骤1.5中筛选出的克隆号为3G8-2的单克隆抗体作为检测抗体,该检测抗体标记有碱性磷酸酶(Roche Life Science)。将酶标标记物稀释于50mM的MES缓冲液(0.5M NaCl,0.5%BSA,0.05%吐温20,pH=6.0),酶标标记物浓度为1 $\mu$ g/mL。

[0338] 在当前的实施例中,检测反应基于夹心法模式:将待测样本(40 $\mu$ L)、捕获抗体(50 $\mu$ L)和检测抗体(50 $\mu$ L)加入到反应管中孵育,其中待测样本为血浆。待测样本内的抗原、即可溶性CD14亚型与捕获抗体和检测抗体结合,形成夹心复合物。在反应管内孵育反应后,磁场吸附磁珠,从而洗去未结合的物质。

[0339] 将化学发光底物添加到反应管内,发光底物(3-(2-螺旋金刚烷)-4-甲氧基-4-(3-磷氧酰)-苯基-1,2-二氧环乙烷,AMPPD)被碱性磷酸酶所分解,脱去一个磷酸基,生成不稳定的中间产物,该中间产物通过分子内电子转移产生间氧苯甲酸甲酯阴离子,处于激发态的间氧苯甲酸甲酯阴离子从激发态返回基态时,产生化学发光。接着,通过光电倍增管对中间反应所产生的光子数进行测量,所产生的光子数与样本中的可溶性CD14亚型的浓度成正比。最后,将一系列含不同浓度的可溶性CD14亚型的样本进行测试,可得到其相应的发光值,进而建立标准曲线,如图4.2所示。

[0340] 根据本申请,由于克隆号为16D5B2的单克隆抗体与克隆号为3G8-2的单克隆抗体配对,因此,在本申请的用于检测可溶性CD14亚型的试剂盒2中,也可以将克隆号为3G8-2的单克隆抗体用作捕获抗体,并且克隆号为16D5B2的单克隆抗体用作检测抗体。

[0341] 实施例3.3:用于检测可溶性CD14亚型的试剂盒的制备,该试剂盒包含本申请第一单克隆抗体(3G8-2)和作为检测抗体的步骤1.2中所制备的抗可溶性CD14亚型多克隆抗体(在本文中也简称用于检测可溶性CD14亚型的试剂盒3)

[0342] 将通过实施例1筛选出的克隆号为3G8-2的单克隆抗体用作捕获抗体,包被于超顺磁性磁珠(Merck, Estapor<sup>®</sup>超顺磁性磁珠)表面。超顺磁性磁珠表面修饰有羧基,超顺磁性磁珠表面的羧基在EDC/NHS催化下与克隆号为3G8-2的单克隆抗体的氨基偶联,从而制备得到磁珠包被物。将磁珠包被物在50mM的MES(2-吗啉乙磺酸)缓冲液(0.5M NaCl, 0.5% BSA, 0.05%吐温20, pH=6.0)中稀释,磁珠包被物浓度为1.0mg/mL。将通过实施例1中步骤1.2中所制备的抗可溶性CD14亚型多克隆抗体作为检测抗体,该检测抗体标记有碱性磷酸酶(Roche Life Science)。将酶标标记物稀释于50mM的MES缓冲液(0.5M NaCl, 0.5% BSA, 0.05%吐温20, pH=6.0),酶标标记物浓度为1 $\mu$ g/mL。

[0343] 在当前的实施例中,检测反应基于夹心法模式:将待测样本(40 $\mu$ L)、捕获抗体(50 $\mu$ L)和检测抗体(50 $\mu$ L)加入到反应管中孵育,其中待测样本为血浆。待测样本内的抗原、即可溶性CD14亚型与捕获抗体和检测抗体结合,形成夹心复合物。在反应管内孵育反应后,磁场吸附磁珠,从而洗去未结合的物质。

[0344] 将化学发光底物添加到反应管内,发光底物(3-(2-螺旋金刚烷)-4-甲氧基-4-(3-磷氧酰)-苯基-1,2-二氧环乙烷,AMPPD)被碱性磷酸酶所分解,脱去一个磷酸基,生成不稳定的中间产物,该中间产物通过分子内电子转移产生间氧苯甲酸甲酯阴离子,处于激发态的间氧苯甲酸甲酯阴离子从激发态返回基态时,产生化学发光。接着,通过光电倍增管对中间反应所产生的光子数进行测量,所产生的光子数与样本中的可溶性CD14亚型的浓度成正比。最后,将一系列含不同浓度的可溶性CD14亚型的样本进行测试,可得到其相应的发光值,进而建立标准曲线,如图4.3所示。

[0345] 实施例3.4:上述试剂盒1、试剂盒2、试剂盒3的一致性比较试验

[0346] 采用通过实施例3.1至3.3制备的试剂盒1、试剂盒2、试剂盒3分别对50例样本进行测试,测试结果如图4.4和图4.5所示:其中试剂盒1和试剂盒2的相关系数 $r=0.99$ ;试剂盒1

与试剂盒3的相关系数 $r=0.95$ 。在方法学对比中,相关系数 $r$ 反映两种方法的测值一致性, $r>0.90$ ,则认为两种方法一致性较好。相关系数 $r$ 越高,一致性越好。因此,三个试剂盒测值一致性好,但试剂盒2与试剂盒1一致性高于试剂盒3与试剂盒1的一致性。

[0347] 实施例4:抗可溶性CD14亚型单克隆抗体或其抗原结合性抗体片段在制备用于评估患者是否患有脓毒血症的分析试剂中的应用

[0348] 用通过实施例3.1制备的试剂盒对141名疑似患有脓毒血症的患者样本的可溶性CD14亚型进行检测。同时检测患者的PCT浓度水平,并对比可溶性CD14亚型和PCT对脓毒血症的诊断效力。如图5.1所示,可溶性CD14亚型和PCT的ROC曲线的AUC面积分别为0.91和0.84。

[0349] 用通过实施例3.2制备的用于检测可溶性CD14亚型的试剂盒对200名疑似患有脓毒血症的患者入院72小时以内的血浆样本的可溶性CD14亚型进行检测。同时检测患者的PCT浓度水平,并对比可溶性CD14亚型和PCT对脓毒血症的诊断效力。如图5.2所示,可溶性CD14亚型和PCT的ROC曲线的AUC面积分别为0.94和0.86。由此得出可溶性CD14亚型具有更高的诊断效力。

[0350] 对通过实施例3.1至实施例3.3制备的试剂盒1、试剂盒2、试剂盒3的诊断效力进行对比。采用试剂盒1、试剂盒2、试剂盒3分别对200名疑似患有脓毒血症的患者入院72小时以内的血浆样本的可溶性CD14亚型进行检测,试剂盒1、试剂盒2、试剂盒3的诊断效力如图5.3所示,其中试剂盒1、试剂盒2、试剂盒3的ROC曲线的AUC面积分别为:0.93、0.94、0.91。

[0351] 用通过实施例3.2制备的用于检测可溶性CD14亚型的试剂盒对200例样本进行测试,其中健康人群60例、局部感染人群52例、脓毒血症患者51例、脓毒性休克人群37例。诊断标准依据Sepsis 3.0 (Singer M, Deutschman CS, Seymour CW, et al. The Third international consensus definitions for sepsis and septic shock (Sepsis-3) [J]), 其中对不同分组人群的测试结果(见表21)显示出:随着感染的发展,Presepsin浓度值不断升高。

[0352] 表21

| 分组      | 样本例数 | Presepsin (pg/mL) |         |             |
|---------|------|-------------------|---------|-------------|
|         |      | 第 2.5 百分位数        | 中位值     | 第 97.5 百分位数 |
| 健康人群    | 60   | 87.21             | 155.67  | 367.20      |
| 局部感染人群  | 52   | 301.35            | 443.17  | 622.73      |
| 脓毒血症患者  | 51   | 767.12            | 915.23  | 1354.22     |
| 脓毒性休克人群 | 37   | 932.24            | 1500.47 | 5931.81     |

[0354] 从上面描述的各个实施例可以得出:本申请实施例的抗可溶性CD14亚型单克隆抗体或其抗原结合性抗体片段或本申请实施例的试剂盒具有高度特异性和灵敏度并且适用于检测待测样本中的可溶性CD14亚型,从而提高可溶性CD14亚型检测的质量和精度。

- [0001] 序列表
- [0002] <110> 深圳迈瑞生物医疗电子股份有限公司
- [0003] <120> 抗可溶性CD14亚型抗体、试剂盒及其应用
- [0004] <130> JC2060303P-CN
- [0005] <160> 84
- [0006] <170> SIP0SequenceListing 1.0
- [0007] <210> 1
- [0008] <211> 5
- [0009] <212> PRT
- [0010] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
- [0011] <400> 1
- [0012] Ser Val Ala Met Leu
- [0013] 1 5
- [0014] <210> 2
- [0015] <211> 5
- [0016] <212> PRT
- [0017] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
- [0018] <400> 2
- [0019] Ser Val Glu Met Leu
- [0020] 1 5
- [0021] <210> 3
- [0022] <211> 5
- [0023] <212> PRT
- [0024] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
- [0025] <400> 3
- [0026] Ser Phe Ala Met Leu
- [0027] 1 5
- [0028] <210> 4
- [0029] <211> 5
- [0030] <212> PRT
- [0031] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
- [0032] <400> 4
- [0033] Ser Phe Ala Met Ala
- [0034] 1 5
- [0035] <210> 5
- [0036] <211> 5
- [0037] <212> PRT
- [0038] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

|        |                                                                 |
|--------|-----------------------------------------------------------------|
| [0039] | <400> 5                                                         |
| [0040] | Ser Val Lys Met Leu                                             |
| [0041] | 1 5                                                             |
| [0042] | <210> 6                                                         |
| [0043] | <211> 5                                                         |
| [0044] | <212> PRT                                                       |
| [0045] | <213> 人工序列(Artificial Sequence)                                 |
| [0046] | <400> 6                                                         |
| [0047] | Ser Phe Lys Met Ala                                             |
| [0048] | 1 5                                                             |
| [0049] | <210> 7                                                         |
| [0050] | <211> 17                                                        |
| [0051] | <212> PRT                                                       |
| [0052] | <213> 人工序列(Artificial Sequence)                                 |
| [0053] | <400> 7                                                         |
| [0054] | Tyr Ile Ser Tyr Met Gly Ser Thr Ile Tyr Tyr Ala Asp Ala Lys Leu |
| [0055] | 1 5 10 15                                                       |
| [0056] | Gly                                                             |
| [0057] | <210> 8                                                         |
| [0058] | <211> 17                                                        |
| [0059] | <212> PRT                                                       |
| [0060] | <213> 人工序列(Artificial Sequence)                                 |
| [0061] | <400> 8                                                         |
| [0062] | Tyr Ile Ser Ser Lys Ser Ser Ser Asn Leu Ala Ala Asp Ala Lys Leu |
| [0063] | 1 5 10 15                                                       |
| [0064] | Gly                                                             |
| [0065] | <210> 9                                                         |
| [0066] | <211> 17                                                        |
| [0067] | <212> PRT                                                       |
| [0068] | <213> 人工序列(Artificial Sequence)                                 |
| [0069] | <400> 9                                                         |
| [0070] | Tyr Ile Ser Ser Gly Ser Ser Thr Ile Tyr Tyr Ala Asp Thr Val Lys |
| [0071] | 1 5 10 15                                                       |
| [0072] | Gly                                                             |
| [0073] | <210> 10                                                        |
| [0074] | <211> 17                                                        |
| [0075] | <212> PRT                                                       |
| [0076] | <213> 人工序列(Artificial Sequence)                                 |
| [0077] | <400> 10                                                        |

|        |                                                                 |
|--------|-----------------------------------------------------------------|
| [0078] | Tyr Ile Ser Ser Gly Ser Ser Thr Ile Tyr Tyr Ala Asp Met Thr Lys |
| [0079] | 1 5 10 15                                                       |
| [0080] | Gly                                                             |
| [0081] | <210> 11                                                        |
| [0082] | <211> 17                                                        |
| [0083] | <212> PRT                                                       |
| [0084] | <213> 人工序列(Artificial Sequence)                                 |
| [0085] | <400> 11                                                        |
| [0086] | Tyr Ile Thr Tyr Ser Gly Ser Gly Ala Tyr Tyr Ala Asp Tyr Gly Asn |
| [0087] | 1 5 10 15                                                       |
| [0088] | Thr                                                             |
| [0089] | <210> 12                                                        |
| [0090] | <211> 34                                                        |
| [0091] | <212> PRT                                                       |
| [0092] | <213> 人工序列(Artificial Sequence)                                 |
| [0093] | <400> 12                                                        |
| [0094] | Tyr Ile Ser Tyr Met Gly Ser Thr Ile Tyr Tyr Ala Asp Thr Val Lys |
| [0095] | 1 5 10 15                                                       |
| [0096] | Gly Tyr Ile Ser Tyr Met Gly Ser Thr Ile Tyr Tyr Ala Asp Thr Val |
| [0097] | 20 25 30                                                        |
| [0098] | Lys Gly                                                         |
| [0099] | <210> 13                                                        |
| [0100] | <211> 17                                                        |
| [0101] | <212> PRT                                                       |
| [0102] | <213> 人工序列(Artificial Sequence)                                 |
| [0103] | <400> 13                                                        |
| [0104] | Tyr Ile Ser Ser Lys Ser Ser Thr Ile Tyr Tyr Ala Asp Thr Val Lys |
| [0105] | 1 5 10 15                                                       |
| [0106] | Gly                                                             |
| [0107] | <210> 14                                                        |
| [0108] | <211> 5                                                         |
| [0109] | <212> PRT                                                       |
| [0110] | <213> 人工序列(Artificial Sequence)                                 |
| [0111] | <400> 14                                                        |
| [0112] | Ala Gly Phe Ala Tyr                                             |
| [0113] | 1 5                                                             |
| [0114] | <210> 15                                                        |
| [0115] | <211> 5                                                         |
| [0116] | <212> PRT                                                       |

[0117] <213> 人工序列(Artificial Sequence)  
[0118] <400> 15  
[0119] Gln Gln Phe Ala Tyr  
[0120] 1 5  
[0121] <210> 16  
[0122] <211> 5  
[0123] <212> PRT  
[0124] <213> 人工序列(Artificial Sequence)  
[0125] <400> 16  
[0126] Gln Gly Phe Ala Met  
[0127] 1 5  
[0128] <210> 17  
[0129] <211> 5  
[0130] <212> PRT  
[0131] <213> 人工序列(Artificial Sequence)  
[0132] <400> 17  
[0133] Gln Gly Phe Ala Met  
[0134] 1 5  
[0135] <210> 18  
[0136] <211> 5  
[0137] <212> PRT  
[0138] <213> 人工序列(Artificial Sequence)  
[0139] <400> 18  
[0140] Gln Gln Val Ala Tyr  
[0141] 1 5  
[0142] <210> 19  
[0143] <211> 5  
[0144] <212> PRT  
[0145] <213> 人工序列(Artificial Sequence)  
[0146] <400> 19  
[0147] Ala Gly Phe Ala Met  
[0148] 1 5  
[0149] <210> 20  
[0150] <211> 5  
[0151] <212> PRT  
[0152] <213> 人工序列(Artificial Sequence)  
[0153] <400> 20  
[0154] Ala Gly Phe Ala Tyr  
[0155] 1 5

[0156] <210> 21  
 [0157] <211> 16  
 [0158] <212> PRT  
 [0159] <213> 人工序列(Artificial Sequence)  
 [0160] <400> 21  
 [0161] Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Tyr Ser Asn Gly Lys Thr Tyr Leu Asn  
 [0162] 1 5 10 15  
 [0163] <210> 22  
 [0164] <211> 16  
 [0165] <212> PRT  
 [0166] <213> 人工序列(Artificial Sequence)  
 [0167] <400> 22  
 [0168] Lys Tyr Tyr Ala Ser Ala Ala Lys Leu Tyr Arg Asn Ile Lys Leu Asn  
 [0169] 1 5 10 15  
 [0170] <210> 23  
 [0171] <211> 16  
 [0172] <212> PRT  
 [0173] <213> 人工序列(Artificial Sequence)  
 [0174] <400> 23  
 [0175] Lys Tyr Tyr Ala Ser Leu Leu Ala Thr Tyr Arg Asn Ile Lys Leu Asn  
 [0176] 1 5 10 15  
 [0177] <210> 24  
 [0178] <211> 16  
 [0179] <212> PRT  
 [0180] <213> 人工序列(Artificial Sequence)  
 [0181] <400> 24  
 [0182] Lys Tyr Tyr Ala Ser Leu Leu Ala Thr Thr Trp Ala Lys Gly Asn Asn  
 [0183] 1 5 10 15  
 [0184] <210> 25  
 [0185] <211> 16  
 [0186] <212> PRT  
 [0187] <213> 人工序列(Artificial Sequence)  
 [0188] <400> 25  
 [0189] Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Tyr Ser Thr Trp Ala Lys Gly Asn Asn  
 [0190] 1 5 10 15  
 [0191] <210> 26  
 [0192] <211> 16  
 [0193] <212> PRT  
 [0194] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

|        |                                                                 |
|--------|-----------------------------------------------------------------|
| [0195] | <400> 26                                                        |
| [0196] | Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Tyr Ser Tyr Arg Asn Ile Lys Leu Asn |
| [0197] | 1 5 10 15                                                       |
| [0198] | <210> 27                                                        |
| [0199] | <211> 7                                                         |
| [0200] | <212> PRT                                                       |
| [0201] | <213> 人工序列(Artificial Sequence)                                 |
| [0202] | <400> 27                                                        |
| [0203] | Leu Val Gln Ser Leu Asp Ser                                     |
| [0204] | 1 5                                                             |
| [0205] | <210> 28                                                        |
| [0206] | <211> 7                                                         |
| [0207] | <212> PRT                                                       |
| [0208] | <213> 人工序列(Artificial Sequence)                                 |
| [0209] | <400> 28                                                        |
| [0210] | Leu Val Ser Lys Leu Thr Ala                                     |
| [0211] | 1 5                                                             |
| [0212] | <210> 29                                                        |
| [0213] | <211> 7                                                         |
| [0214] | <212> PRT                                                       |
| [0215] | <213> 人工序列(Artificial Sequence)                                 |
| [0216] | <400> 29                                                        |
| [0217] | Leu Val Ser Lys Leu Asp Ser                                     |
| [0218] | 1 5                                                             |
| [0219] | <210> 30                                                        |
| [0220] | <211> 7                                                         |
| [0221] | <212> PRT                                                       |
| [0222] | <213> 人工序列(Artificial Sequence)                                 |
| [0223] | <400> 30                                                        |
| [0224] | Leu Val Gln Ser Asp Ser Lys                                     |
| [0225] | 1 5                                                             |
| [0226] | <210> 31                                                        |
| [0227] | <211> 7                                                         |
| [0228] | <212> PRT                                                       |
| [0229] | <213> 人工序列(Artificial Sequence)                                 |
| [0230] | <400> 31                                                        |
| [0231] | Leu Gln Thr Ser Asp Ser Lys                                     |
| [0232] | 1 5                                                             |
| [0233] | <210> 32                                                        |

[0234] <211> 7  
[0235] <212> PRT  
[0236] <213> 人工序列(Artificial Sequence)  
[0237] <400> 32  
[0238] Leu Val Ser Lys Leu Ala Ser  
[0239] 1 5  
[0240] <210> 33  
[0241] <211> 9  
[0242] <212> PRT  
[0243] <213> 人工序列(Artificial Sequence)  
[0244] <400> 33  
[0245] Val Gln Gly Thr His Asn Tyr Gly His  
[0246] 1 5  
[0247] <210> 34  
[0248] <211> 9  
[0249] <212> PRT  
[0250] <213> 人工序列(Artificial Sequence)  
[0251] <400> 34  
[0252] Val Gly Gly Thr His Phe Pro Arg Thr  
[0253] 1 5  
[0254] <210> 35  
[0255] <211> 9  
[0256] <212> PRT  
[0257] <213> 人工序列(Artificial Sequence)  
[0258] <400> 35  
[0259] Val Gly Thr Ala Ile Phe Pro Arg Thr  
[0260] 1 5  
[0261] <210> 36  
[0262] <211> 9  
[0263] <212> PRT  
[0264] <213> 人工序列(Artificial Sequence)  
[0265] <400> 36  
[0266] Val Gly Gly Thr His Phe Ile Thr Ala  
[0267] 1 5  
[0268] <210> 37  
[0269] <211> 9  
[0270] <212> PRT  
[0271] <213> 人工序列(Artificial Sequence)  
[0272] <400> 37

|        |                                                 |
|--------|-------------------------------------------------|
| [0273] | Val Ser Gly Thr His Phe Pro Arg Thr             |
| [0274] | 1 5                                             |
| [0275] | <210> 38                                        |
| [0276] | <211> 9                                         |
| [0277] | <212> PRT                                       |
| [0278] | <213> 人工序列(Artificial Sequence)                 |
| [0279] | <400> 38                                        |
| [0280] | Val Gln Gly Thr His Phe Pro Arg Thr             |
| [0281] | 1 5                                             |
| [0282] | <210> 39                                        |
| [0283] | <211> 9                                         |
| [0284] | <212> PRT                                       |
| [0285] | <213> 人工序列(Artificial Sequence)                 |
| [0286] | <400> 39                                        |
| [0287] | Val Gln Thr Ala Ile Phe Pro Arg Thr             |
| [0288] | 1 5                                             |
| [0289] | <210> 40                                        |
| [0290] | <211> 9                                         |
| [0291] | <212> PRT                                       |
| [0292] | <213> 人工序列(Artificial Sequence)                 |
| [0293] | <400> 40                                        |
| [0294] | Val Gln Gly Thr His Tyr Gly His Val             |
| [0295] | 1 5                                             |
| [0296] | <210> 41                                        |
| [0297] | <211> 9                                         |
| [0298] | <212> PRT                                       |
| [0299] | <213> 人工序列(Artificial Sequence)                 |
| [0300] | <400> 41                                        |
| [0301] | Val Gln Gly Asn Thr Phe Ile Thr Ala             |
| [0302] | 1 5                                             |
| [0303] | <210> 42                                        |
| [0304] | <211> 12                                        |
| [0305] | <212> PRT                                       |
| [0306] | <213> 人工序列(Artificial Sequence)                 |
| [0307] | <400> 42                                        |
| [0308] | Pro Cys Glu Leu Asp Asp Glu Asp Phe Arg Cys Val |
| [0309] | 1 5 10                                          |
| [0310] | <210> 43                                        |
| [0311] | <211> 64                                        |

[0312] <212> PRT  
[0313] <213> 人工序列(Artificial Sequence)  
[0314] <400> 43  
[0315] Thr Thr Pro Glu Pro Cys Glu Leu Asp Asp Glu Asp Phe Arg Cys Val  
[0316] 1 5 10 15  
[0317] Cys Asn Phe Ser Glu Pro Gln Pro Asp Tyr Ser Glu Ala Phe Gln Cys  
[0318] 20 25 30  
[0319] Val Ser Ala Val Glu Val Glu Ile His Ala Gly Gly Leu Asn Leu Glu  
[0320] 35 40 45  
[0321] Pro Phe Leu Lys Arg Val Asp Ala Asp Ala Asp Pro Arg Gln Tyr Ala  
[0322] 50 55 60  
[0323] <210> 44  
[0324] <211> 5  
[0325] <212> PRT  
[0326] <213> 人工序列(Artificial Sequence)  
[0327] <400> 44  
[0328] Asp Val Ala Met Gln  
[0329] 1 5  
[0330] <210> 45  
[0331] <211> 5  
[0332] <212> PRT  
[0333] <213> 人工序列(Artificial Sequence)  
[0334] <400> 45  
[0335] Asp Thr Leu Met Gln  
[0336] 1 5  
[0337] <210> 46  
[0338] <211> 5  
[0339] <212> PRT  
[0340] <213> 人工序列(Artificial Sequence)  
[0341] <400> 46  
[0342] Asp Val Ala Met Gly  
[0343] 1 5  
[0344] <210> 47  
[0345] <211> 5  
[0346] <212> PRT  
[0347] <213> 人工序列(Artificial Sequence)  
[0348] <400> 47  
[0349] Asp Thr Tyr Met Gly  
[0350] 1 5

|        |                                                                 |                           |
|--------|-----------------------------------------------------------------|---------------------------|
| [0351] | <210>                                                           | 48                        |
| [0352] | <211>                                                           | 5                         |
| [0353] | <212>                                                           | PRT                       |
| [0354] | <213>                                                           | 人工序列(Artificial Sequence) |
| [0355] | <400>                                                           | 48                        |
| [0356] | Asp Thr Tyr Met Gln                                             |                           |
| [0357] | 1                                                               | 5                         |
| [0358] | <210>                                                           | 49                        |
| [0359] | <211>                                                           | 5                         |
| [0360] | <212>                                                           | PRT                       |
| [0361] | <213>                                                           | 人工序列(Artificial Sequence) |
| [0362] | <400>                                                           | 49                        |
| [0363] | Asp Val Leu Met Gly                                             |                           |
| [0364] | 1                                                               | 5                         |
| [0365] | <210>                                                           | 50                        |
| [0366] | <211>                                                           | 17                        |
| [0367] | <212>                                                           | PRT                       |
| [0368] | <213>                                                           | 人工序列(Artificial Sequence) |
| [0369] | <400>                                                           | 50                        |
| [0370] | Arg Ile Asp Pro Ala Asn Gly Asn Thr Lys Tyr Asp Pro Lys Phe Gln |                           |
| [0371] | 1                                                               | 5 10 15                   |
| [0372] | Ala                                                             |                           |
| [0373] | <210>                                                           | 51                        |
| [0374] | <211>                                                           | 17                        |
| [0375] | <212>                                                           | PRT                       |
| [0376] | <213>                                                           | 人工序列(Artificial Sequence) |
| [0377] | <400>                                                           | 51                        |
| [0378] | Arg Ile Thr Tyr Ala Asn Gly Gly Thr Lys Ala Asp Pro Lys Phe Asn |                           |
| [0379] | 1                                                               | 5 10 15                   |
| [0380] | Ser                                                             |                           |
| [0381] | <210>                                                           | 52                        |
| [0382] | <211>                                                           | 17                        |
| [0383] | <212>                                                           | PRT                       |
| [0384] | <213>                                                           | 人工序列(Artificial Sequence) |
| [0385] | <400>                                                           | 52                        |
| [0386] | Arg Ile Asp Pro Met Gly Gly Asn Thr Lys Tyr Asp Pro Lys Phe Gln |                           |
| [0387] | 1                                                               | 5 10 15                   |
| [0388] | Ala                                                             |                           |
| [0389] | <210>                                                           | 53                        |

|        |                                                                 |
|--------|-----------------------------------------------------------------|
| [0390] | <211> 17                                                        |
| [0391] | <212> PRT                                                       |
| [0392] | <213> 人工序列(Artificial Sequence)                                 |
| [0393] | <400> 53                                                        |
| [0394] | Arg Ile Asp Pro Ala Asn Gly Asn Thr Lys Tyr Asp Pro Ser Gln Phe |
| [0395] | 1 5 10 15                                                       |
| [0396] | Ala                                                             |
| [0397] | <210> 54                                                        |
| [0398] | <211> 17                                                        |
| [0399] | <212> PRT                                                       |
| [0400] | <213> 人工序列(Artificial Sequence)                                 |
| [0401] | <400> 54                                                        |
| [0402] | Arg Ile Asp Pro Met Gly Gly Gly Thr Lys Ala Asp Pro Lys Phe Asn |
| [0403] | 1 5 10 15                                                       |
| [0404] | Ser                                                             |
| [0405] | <210> 55                                                        |
| [0406] | <211> 17                                                        |
| [0407] | <212> PRT                                                       |
| [0408] | <213> 人工序列(Artificial Sequence)                                 |
| [0409] | <400> 55                                                        |
| [0410] | Arg Ile Ser Pro Ala Asn Ser Thr Thr Lys Ala Asp Pro Ser Gln Phe |
| [0411] | 1 5 10 15                                                       |
| [0412] | Ala                                                             |
| [0413] | <210> 56                                                        |
| [0414] | <211> 17                                                        |
| [0415] | <212> PRT                                                       |
| [0416] | <213> 人工序列(Artificial Sequence)                                 |
| [0417] | <400> 56                                                        |
| [0418] | Arg Ile Ser Pro Ala Asn Ser Thr Thr Lys Ala Asp Pro Lys Phe Gln |
| [0419] | 1 5 10 15                                                       |
| [0420] | Ala                                                             |
| [0421] | <210> 57                                                        |
| [0422] | <211> 9                                                         |
| [0423] | <212> PRT                                                       |
| [0424] | <213> 人工序列(Artificial Sequence)                                 |
| [0425] | <400> 57                                                        |
| [0426] | Phe Gly Gly Tyr Val Arg Phe Asp Tyr                             |
| [0427] | 1 5                                                             |
| [0428] | <210> 58                                                        |

[0429] <211> 9  
[0430] <212> PRT  
[0431] <213> 人工序列(Artificial Sequence)  
[0432] <400> 58  
[0433] Gly Cys Gly Tyr Val Arg Phe Tyr Tyr  
[0434] 1 5  
[0435] <210> 59  
[0436] <211> 9  
[0437] <212> PRT  
[0438] <213> 人工序列(Artificial Sequence)  
[0439] <400> 59  
[0440] Phe Gly Gly Tyr Val Arg Phe Tyr Tyr  
[0441] 1 5  
[0442] <210> 60  
[0443] <211> 9  
[0444] <212> PRT  
[0445] <213> 人工序列(Artificial Sequence)  
[0446] <400> 60  
[0447] Gly Cys Gly Tyr Asn Arg Phe Asp Tyr  
[0448] 1 5  
[0449] <210> 61  
[0450] <211> 9  
[0451] <212> PRT  
[0452] <213> 人工序列(Artificial Sequence)  
[0453] <400> 61  
[0454] Phe Gly Gly Tyr Asn Arg Phe Asp Cys  
[0455] 1 5  
[0456] <210> 62  
[0457] <211> 9  
[0458] <212> PRT  
[0459] <213> 人工序列(Artificial Sequence)  
[0460] <400> 62  
[0461] Gly Cys Gly Tyr Asn Arg Phe Asp Cys  
[0462] 1 5  
[0463] <210> 63  
[0464] <211> 9  
[0465] <212> PRT  
[0466] <213> 人工序列(Artificial Sequence)  
[0467] <400> 63

|        |                                                                 |
|--------|-----------------------------------------------------------------|
| [0468] | Gly Cys Gly Lys Phe Arg Thr Asp Cys                             |
| [0469] | 1 5                                                             |
| [0470] | <210> 64                                                        |
| [0471] | <211> 17                                                        |
| [0472] | <212> PRT                                                       |
| [0473] | <213> 人工序列(Artificial Sequence)                                 |
| [0474] | <400> 64                                                        |
| [0475] | Lys Ser Thr Ser Ser Leu Leu Ser Ser Asn Arg Asn Ile His Leu Leu |
| [0476] | 1 5 10 15                                                       |
| [0477] | Ala                                                             |
| [0478] | <210> 65                                                        |
| [0479] | <211> 17                                                        |
| [0480] | <212> PRT                                                       |
| [0481] | <213> 人工序列(Artificial Sequence)                                 |
| [0482] | <400> 65                                                        |
| [0483] | Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Lys Ser Arg Thr Arg Lys His Tyr Leu |
| [0484] | 1 5 10 15                                                       |
| [0485] | Ala                                                             |
| [0486] | <210> 66                                                        |
| [0487] | <211> 17                                                        |
| [0488] | <212> PRT                                                       |
| [0489] | <213> 人工序列(Artificial Sequence)                                 |
| [0490] | <400> 66                                                        |
| [0491] | Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Ser Ser Arg Thr Arg Lys His Tyr Leu |
| [0492] | 1 5 10 15                                                       |
| [0493] | Ala                                                             |
| [0494] | <210> 67                                                        |
| [0495] | <211> 17                                                        |
| [0496] | <212> PRT                                                       |
| [0497] | <213> 人工序列(Artificial Sequence)                                 |
| [0498] | <400> 67                                                        |
| [0499] | Lys Ser Ser Ala Ser Leu Leu Lys Ser Asn Arg Asn Ile His Leu Leu |
| [0500] | 1 5 10 15                                                       |
| [0501] | Ala                                                             |
| [0502] | <210> 68                                                        |
| [0503] | <211> 17                                                        |
| [0504] | <212> PRT                                                       |
| [0505] | <213> 人工序列(Artificial Sequence)                                 |
| [0506] | <400> 68                                                        |

|        |                                                                 |
|--------|-----------------------------------------------------------------|
| [0507] | Lys Ser Ser Ala Ser Leu Leu Ser Ser Arg Thr Arg Lys His Tyr Leu |
| [0508] | 1 5 10 15                                                       |
| [0509] | Ala                                                             |
| [0510] | <210> 69                                                        |
| [0511] | <211> 17                                                        |
| [0512] | <212> PRT                                                       |
| [0513] | <213> 人工序列(Artificial Sequence)                                 |
| [0514] | <400> 69                                                        |
| [0515] | Lys Ser Thr Ser Ser Leu Leu Ser Ser Asn Arg Lys His Tyr Leu Leu |
| [0516] | 1 5 10 15                                                       |
| [0517] | Ala                                                             |
| [0518] | <210> 70                                                        |
| [0519] | <211> 7                                                         |
| [0520] | <212> PRT                                                       |
| [0521] | <213> 人工序列(Artificial Sequence)                                 |
| [0522] | <400> 70                                                        |
| [0523] | Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser                                     |
| [0524] | 1 5                                                             |
| [0525] | <210> 71                                                        |
| [0526] | <211> 7                                                         |
| [0527] | <212> PRT                                                       |
| [0528] | <213> 人工序列(Artificial Sequence)                                 |
| [0529] | <400> 71                                                        |
| [0530] | Trp Ala Thr Ser Arg Ala Ser                                     |
| [0531] | 1 5                                                             |
| [0532] | <210> 72                                                        |
| [0533] | <211> 7                                                         |
| [0534] | <212> PRT                                                       |
| [0535] | <213> 人工序列(Artificial Sequence)                                 |
| [0536] | <400> 72                                                        |
| [0537] | Trp Gln Ser Ser Arg Ala Ser                                     |
| [0538] | 1 5                                                             |
| [0539] | <210> 73                                                        |
| [0540] | <211> 7                                                         |
| [0541] | <212> PRT                                                       |
| [0542] | <213> 人工序列(Artificial Sequence)                                 |
| [0543] | <400> 73                                                        |
| [0544] | Trp Ala Thr Ser Leu Asp Ser                                     |
| [0545] | 1 5                                                             |

[0546] <210> 74  
[0547] <211> 7  
[0548] <212> PRT  
[0549] <213> 人工序列(Artificial Sequence)  
[0550] <400> 74  
[0551] Trp Gln Ser Ser Leu Glu Ala  
[0552] 1 5  
[0553] <210> 75  
[0554] <211> 7  
[0555] <212> PRT  
[0556] <213> 人工序列(Artificial Sequence)  
[0557] <400> 75  
[0558] Trp Ala Ser Lys Arg Glu Ser  
[0559] 1 5  
[0560] <210> 76  
[0561] <211> 8  
[0562] <212> PRT  
[0563] <213> 人工序列(Artificial Sequence)  
[0564] <400> 76  
[0565] Lys Gln Gly Tyr Asn Leu Trp Thr  
[0566] 1 5  
[0567] <210> 77  
[0568] <211> 8  
[0569] <212> PRT  
[0570] <213> 人工序列(Artificial Sequence)  
[0571] <400> 77  
[0572] Lys Gln Gly Tyr Asn Leu Asn Thr  
[0573] 1 5  
[0574] <210> 78  
[0575] <211> 8  
[0576] <212> PRT  
[0577] <213> 人工序列(Artificial Sequence)  
[0578] <400> 78  
[0579] Lys Gln Tyr Asn Ala Leu Trp Thr  
[0580] 1 5  
[0581] <210> 79  
[0582] <211> 8  
[0583] <212> PRT  
[0584] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

|        |                                                         |
|--------|---------------------------------------------------------|
| [0585] | <400> 79                                                |
| [0586] | Lys Gln Tyr Leu Asn Gly Asn Ala                         |
| [0587] | 1 5                                                     |
| [0588] | <210> 80                                                |
| [0589] | <211> 8                                                 |
| [0590] | <212> PRT                                               |
| [0591] | <213> 人工序列(Artificial Sequence)                         |
| [0592] | <400> 80                                                |
| [0593] | Lys Gln Ser Tyr Asn Leu Trp Thr                         |
| [0594] | 1 5                                                     |
| [0595] | <210> 81                                                |
| [0596] | <211> 8                                                 |
| [0597] | <212> PRT                                               |
| [0598] | <213> 人工序列(Artificial Sequence)                         |
| [0599] | <400> 81                                                |
| [0600] | Lys Gln Tyr Leu Asn Leu Trp Thr                         |
| [0601] | 1 5                                                     |
| [0602] | <210> 82                                                |
| [0603] | <211> 8                                                 |
| [0604] | <212> PRT                                               |
| [0605] | <213> 人工序列(Artificial Sequence)                         |
| [0606] | <400> 82                                                |
| [0607] | Lys Gln Ser Tyr Asn Gly Asn Ala                         |
| [0608] | 1 5                                                     |
| [0609] | <210> 83                                                |
| [0610] | <211> 8                                                 |
| [0611] | <212> PRT                                               |
| [0612] | <213> 人工序列(Artificial Sequence)                         |
| [0613] | <400> 83                                                |
| [0614] | Lys Gln Ser Tyr Asn Thr Trp Ile                         |
| [0615] | 1 5                                                     |
| [0616] | <210> 84                                                |
| [0617] | <211> 14                                                |
| [0618] | <212> PRT                                               |
| [0619] | <213> 人工序列(Artificial Sequence)                         |
| [0620] | <400> 84                                                |
| [0621] | Gly Gly Leu Asn Leu Glu Pro Phe Leu Lys Arg Val Asp Ala |
| [0622] | 1 5 10                                                  |

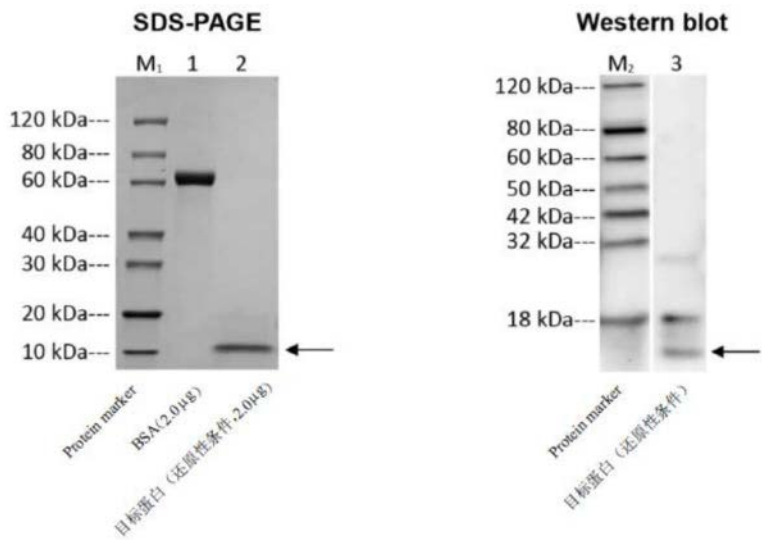


图1

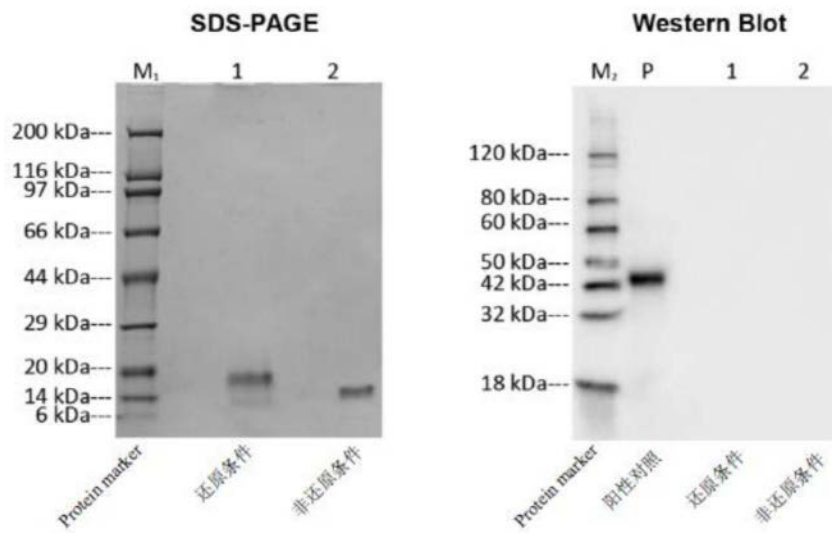


图2

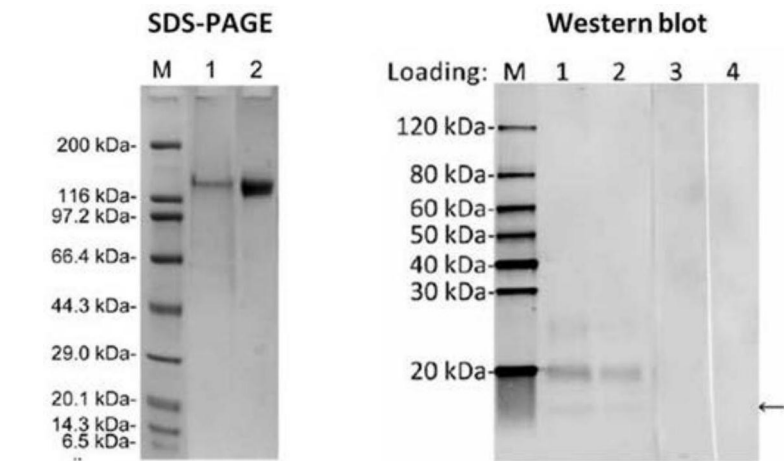


图3

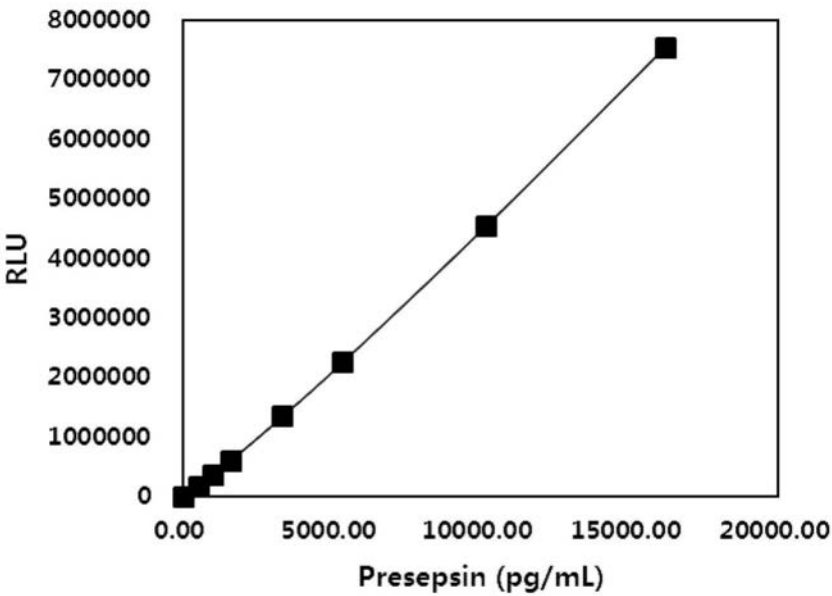


图4.1

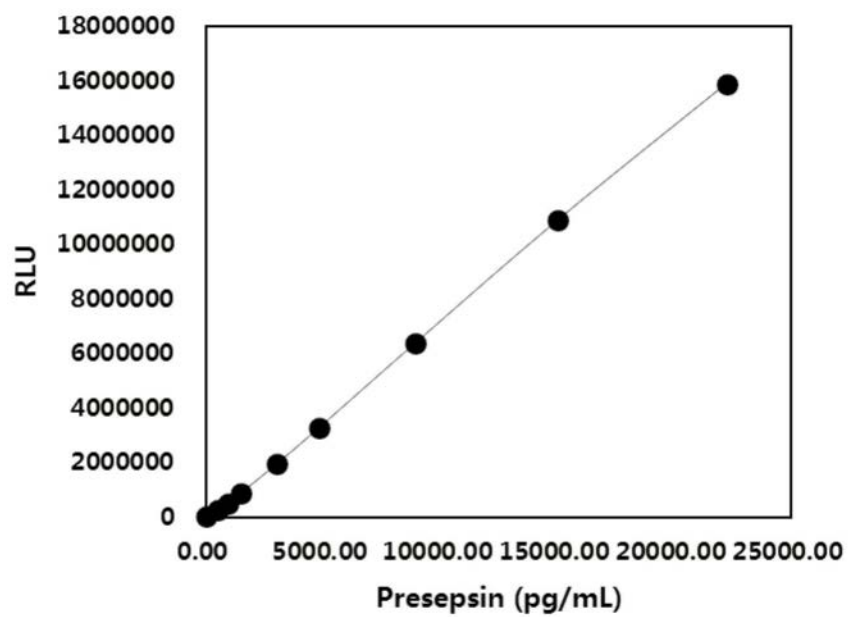


图4.2

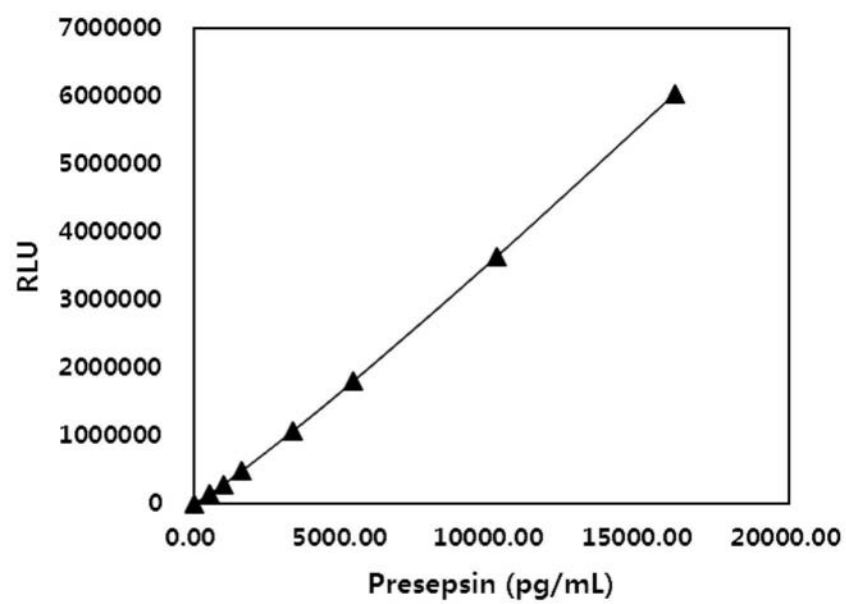


图4.3

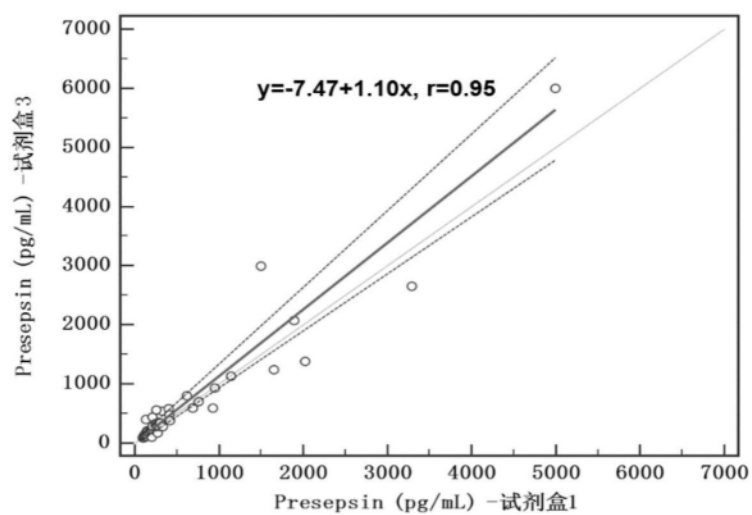


图4.4

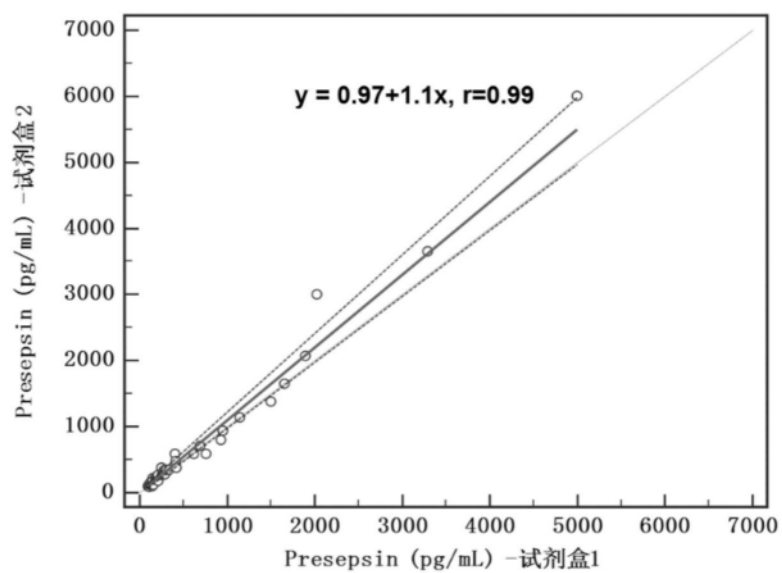


图4.5

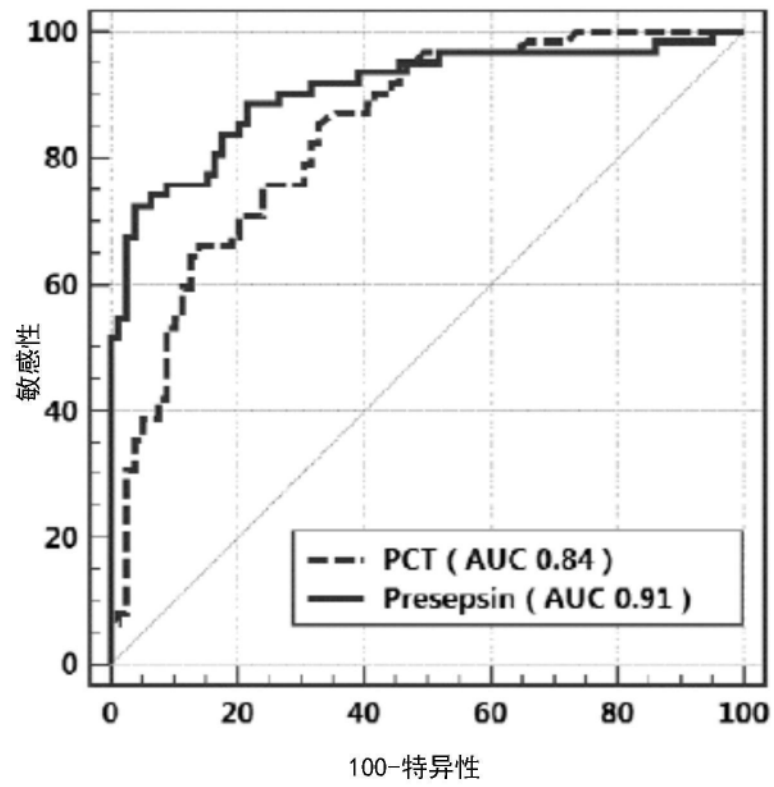


图5.1

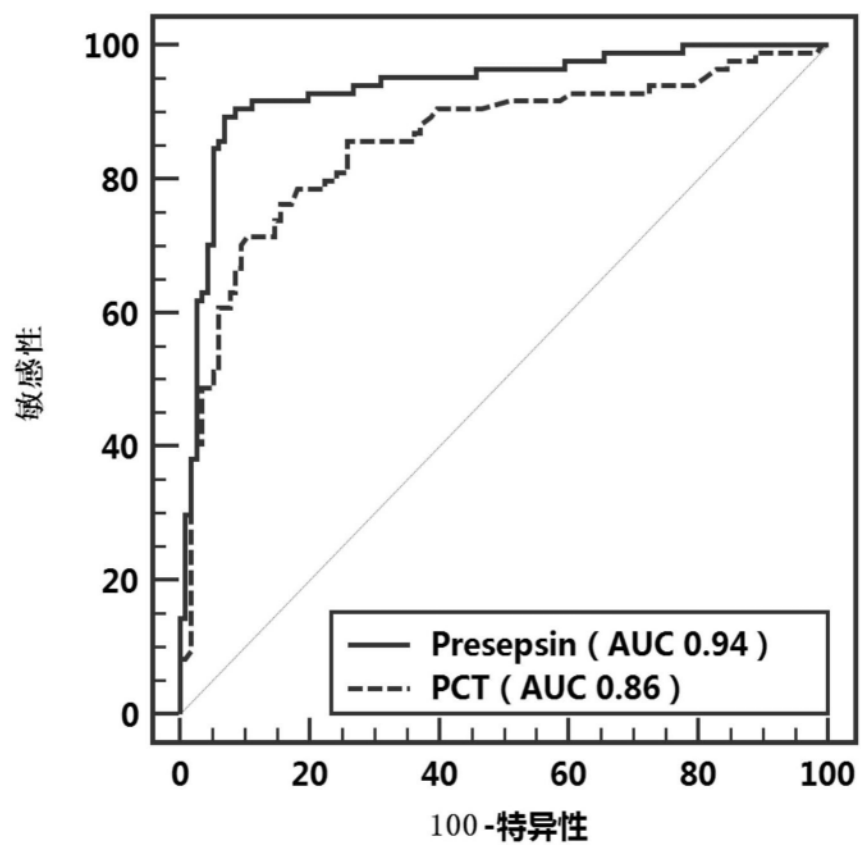


图5.2

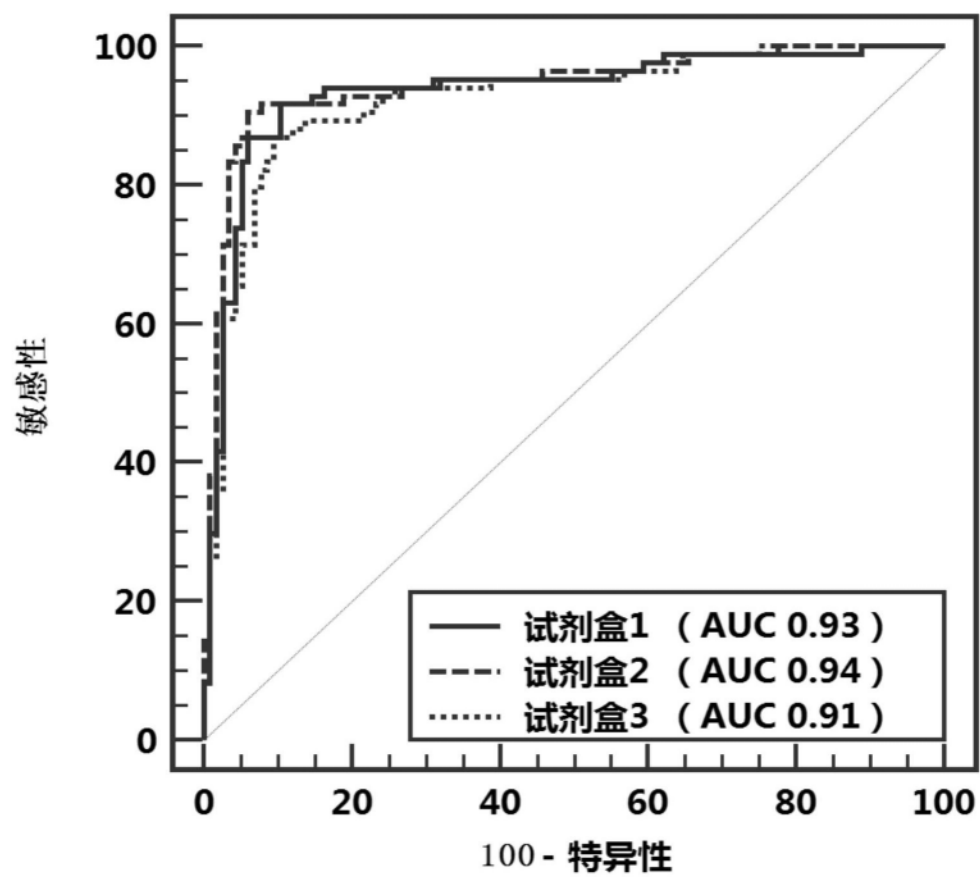


图5.3