



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 119306830 A

(43) 申请公布日 2025.01.14

(21) 申请号 202310851433.7

(22) 申请日 2023.07.11

(71) 申请人 东莞市朋志生物科技有限公司

地址 523000 广东省东莞市松山湖高新技术产业  
开发区台湾高科技园桃园路1  
号莞台生物技术合作育成中心1栋401  
室

(72) 发明人 钟冬梅 孟媛 梁碧 王林聪  
唐丽娜

(51) Int. Cl.

C07K 16/26 (2006.01)

C12N 15/13 (2006.01)

G01N 33/74 (2006.01)

C12N 15/85 (2006.01)

C12N 5/10 (2006.01)

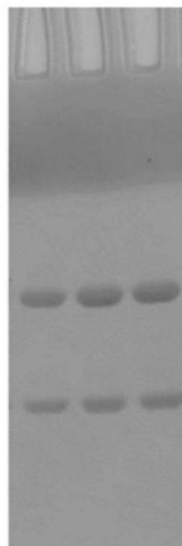
权利要求书2页 说明书12页  
序列表(电子公布) 附图1页

(54) 发明名称

抗皮质醇抗体、检测皮质醇的试剂和试剂盒

(57) 摘要

本发明公开了抗皮质醇的抗体或检测皮质醇的试剂和试剂盒,涉及抗体领域。本发明公开的抗皮质醇抗体包括重链互补决定区和轻链互补决定区,该抗体为皮质醇的检测提供了重要的原料来源,且具有良好的亲和力或活性。



1. 一种抗体或其抗原结合片段,所述抗体或其抗原结合片段包含具有氨基酸序列SEQ ID NO:17所示重链可变区的三个互补决定区和具有氨基酸序列SEQ ID NO:18、19、20任一轻链可变区的三个互补决定区。

2. 根据权利要求1所述的抗体或其抗原结合片段,其特征在于,所述互补决定区由Kabat、Chothia、IMGT、AbM或Contact任意一种系统或多种系统组合定义。

3. 一种抗体或其抗原结合片段,其特征在于,所述抗体或其抗原结合片段包括如下互补决定区:

HCDR1,其包含SEQ ID NO:1所示的氨基酸序列,或由其组成;

HCDR2,其包含SEQ ID NO:2所示的氨基酸序列,或由其组成;

HCDR3,其包含SEQ ID NO:3所示的氨基酸序列,或由其组成;

LCDR1,其包含SEQ ID NO:4所示的氨基酸序列,或由其组成;

LCDR2,其包含SEQ ID NO:5所示的氨基酸序列,或由其组成;

LCDR3,其包含SEQ ID NO:6所示的氨基酸序列,或由其组成;

可选地,所述抗体或其抗原结合片段还具有HFR1、HFR2、HFR3、HFR4、LFR1、LFR2、LFR3和LFR4中的至少之一;

所述HFR1包括SEQ ID NO:7或与其具有至少80%同一性的氨基酸序列;

所述HFR2包括SEQ ID NO:8或与其具有至少80%同一性的氨基酸序列;

所述HFR3包括SEQ ID NO:9或与其具有至少80%同一性的氨基酸序列;

所述HFR4包括SEQ ID NO:10或与其具有至少80%同一性的氨基酸序列;

所述LFR1包括SEQ ID NO:11或与其具有至少80%同一性的氨基酸序列;

所述LFR2包括SEQ ID NO:12或与其具有至少80%同一性的氨基酸序列;

所述LFR3包括SEQ ID NO:13或与其具有至少80%同一性的氨基酸序列;

所述LFR4包括SEQ ID NO:14或与其具有至少80%同一性的氨基酸序列;

可选地,所述抗体或其抗原结合片段以 $KD < 4.31 \times 10^{-9}M$ 的亲合力结合皮质醇。

4. 一种抗体或其抗原结合片段,包含重链可变区和/或轻链可变区,其特征在于,所述重链可变区氨基酸序列如SEQ ID NO:17所示;所述轻链可变区氨基酸序列如SEQ ID NO:18、19、20任一所示。

5. 根据权利要求1至4任一项所述的抗体或其抗原结合片段,其特征在于,所述抗体或其抗原结合片段还包含恒定区;

可选地,所述恒定区包括重链恒定区和/或轻链恒定区;

可选地,所述重链恒定区选自IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA、IgM、IgE或IgD任意一种的重链恒定区或多种重链恒定区的区段的组合;

可选地,所述重链恒定区包括IgG的CH1区、IgG的铰链区、IgM的CH2区、IgM的CH3区和/或IgM的CH4区;

可选地,所述恒定区的种属来源为牛、马、猪、羊、鼠、狗、猫、兔、驴、鹿、貂、鸡、鸭、鹅或人;

可选地,所述恒定区的种属来源为鼠;

可选地,所述重链恒定区序列如SEQ ID NO:15所示或与其具有至少80%同一性;

可选地,所述轻链恒定区序列如SEQ ID NO:16所示或与其具有至少80%同一性;

可选地,所述抗原结合片段选自所述抗体的F(ab')<sub>2</sub>、Fab'、Fab、Fv和scFv中的任意一种。

6. 一种抗体或其抗原结合片段,包括重链和/或轻链,其特征在于,所述重链的氨基酸序列如SEQ ID NO:21任一所示;所述轻链的氨基酸序列如SEQ ID NO:22、23、24任一所示。

7. 一种抗体偶联物,其特征在于,所述抗体偶联物包括权利要求1至6任一项所述的抗体或其抗原结合片段;

可选地,所述抗体偶联物还包括与所述抗体或其抗原结合片段偶联的生物素或生物素衍生物;

可选地,所述抗体偶联物还包括与所述抗体或其抗原结合片段偶联的标记物;

可选地,所述标记物选自荧光染料、酶、放射性同位素、化学发光试剂和纳米颗粒类标记物;

可选地,所述抗体偶联物还包括与所述抗体或其抗原结合片段偶联的固相载体;

可选地,所述固相载体选自微球、板和膜。

8. 一种试剂或试剂盒,其特征在于,所述试剂或试剂盒包括权利要求1至6任一项所述的抗体或其抗原结合片段或权利要求7所述的抗体偶联物。

9. 一种检测皮质醇的方法,其特征在于,包括:

a) 在足以发生抗体/抗原结合反应条件下,使权利要求1至6任一项所述的抗体或其抗原结合片段、权利要求7所述的抗体偶联物,或者权利要求8所述的试剂或试剂盒与待检测样品中的皮质醇接触形成免疫复合物;和

b) 检测所述免疫复合物的存在,所述复合物的存在指示所述测试样品中所述抗原的存在。

10. 一种核酸,其特征在于,其编码权利要求1至6任一项所述的抗体或其抗原结合片段。

11. 一种载体,其特征在于,其含有权利要求10所述的核酸。

12. 一种细胞,其特征在于,其含有权利要求10所述的核酸或权利要求11所述的载体。

13. 一种制备权利要求1-6任一项所述的抗体或其抗原结合片段的方法,其特征在于,其包括:培养权利要求12所述的细胞。

14. 权利要求1-6任一项所述的抗体或其抗原结合片段、权利要求7所述的抗体偶联物,或者权利要求8所述的试剂或试剂盒在制备检测皮质醇产品中的用途。

## 抗皮质醇抗体、检测皮质醇的试剂和试剂盒

### 技术领域

[0001] 本发明涉及抗体技术领域,具体而言,涉及一种抗皮质醇抗体、检测皮质醇的试剂和试剂盒。

### 背景技术

[0002] 皮质醇(Cortisol),也称为氢化可的松、氢皮质素或化合物F。人体皮质醇分泌的调节途径为下丘脑-垂体-肾上腺轴,当人大脑感受压力时垂体会分泌促肾上腺皮质激素(ACTH),促进肾上腺皮质组织增生以及皮质激素的生成和分泌。人体分泌皮质醇具有规律性,一天中皮质醇的水平在每天清晨起床后30分钟内急剧升高,起床后30~45分钟左右达到最高值,随后在一天内逐渐下降,直到睡觉前达到最低值。

[0003] 正常情况下,皮质醇可以减少钠流失,短暂提高记忆力,帮助清除肝脏中的毒素。在压力状态下,皮质醇有助于维持血压稳定、控制过度发炎。但过量的皮质醇分泌给人体带来负面影响。特别是当人反复承受重压、生活节奏紧张、长期节食、长期睡眠不足,造成皮质醇长期过量分泌。此时,皮质醇可引起血糖升高、食欲增加、体重上升、性欲减退以及极度疲劳。此外,皮质醇异常分泌还可以造成人体出现病症。库欣氏综合征是典型的皮质醇分泌过多而导致病症,表征包括体重迅速增加、多汗、容易瘀伤、心理障碍。此外,广泛性焦虑障碍(Generalized anxiety disorder,GAD)也与人体内的皮质醇分泌异常有密切的关系。该病在成人中的终身患病率估计为4.1%~6.6%,女性患者是男性的2倍。它不仅严重影响患者的生活质量、心理健康、社会功能,同时还会和其他疾病共病,增加自杀风险。通过检测皮质醇的含量,有助于分析判断人体的健康状态,包括:诊断肾上腺的功能状态、间接观察垂体的功能状态、库欣综合征、心血管疾病、压力和精神疾病等。由此可见,及时有效的检测人体中的皮质醇,对于我们了解当时自己的身体状况有很重要的意义。

[0004] 皮质醇测定多采用免疫法或LC-MS法。LC-MS法虽然准确、灵敏,但需要昂贵的仪器,故一般实验室难以普及。免疫法具有灵敏度高、检测成本低、可行性高等特点,适宜推广应用。免疫学检测方法都需要针对于皮质醇的抗体。因此,本领域对于有效结合皮质醇并对其进行检测的抗体存在着强烈需求。

### 发明内容

[0005] 本申请提供一种抗体或其抗原结合片段,为皮质醇的检测提供重要的原料来源,且有良好的活性或亲和力。

[0006] 为了实现上述目的,根据本发明的一个方面,提供了一种抗体或其抗原结合片段,所述抗体或其抗原结合片段包含具有氨基酸序列SEQ ID NO:17所示重链可变区的三个互补决定区和具有氨基酸序列SEQ ID NO:18、19、20任一轻链可变区的三个互补决定区。

[0007] 为了实现上述目的,根据本发明的第二个方面,提供了一种抗体或其抗原结合片段,所述抗体或其抗原结合片段包括如下互补决定区:

[0008] HCDR1,其包含SEQ ID NO:1所示的氨基酸序列,或由其组成;

[0009] HCDR2,其包含SEQ ID NO:2所示的氨基酸序列,或由其组成;

[0010] HCDR3,其包含SEQ ID NO:3所示的氨基酸序列,或由其组成;

[0011] LCDR1,其包含SEQ ID NO:4所示的氨基酸序列,或由其组成;

[0012] LCDR2,其包含SEQ ID NO:5所示的氨基酸序列,或由其组成;

[0013] LCDR3,其包含SEQ ID NO:6所示的氨基酸序列,或由其组成。

[0014] 为了实现上述目的,根据本发明的第三个方面,提供了一种抗体或其抗原结合片段,包括重链可变区和/或轻链可变区,所述重链可变区氨基酸序列如SEQ ID NO:17所示;所述轻链可变区氨基酸序列如SEQ ID NO:18、19、20任一所示。

[0015] 为了实现上述目的,根据本发明的第四个方面,提供了一种抗体或其抗原结合片段,包括重链和/或轻链,所述重链的氨基酸序列如SEQ ID NO:21任一所示;所述轻链的氨基酸序列如SEQ ID NO:22、23、24任一所示。

[0016] 为了实现上述目的,根据本发明的第五个方面,提供了一种抗体偶联物,所述抗体偶联物包括上述的抗体或其抗原结合片段。

[0017] 为了实现上述目的,根据本发明的第六个方面,提供了一种试剂或试剂盒,所述试剂或试剂盒包括上述的抗体或其抗原结合片段或上述的抗体偶联物。

[0018] 为了实现上述目的,根据本发明的第七个方面,提供了一种检测皮质醇的方法,包括:a)在足以发生抗体/抗原结合反应的条件下,使上述的抗体或其抗原结合片段、抗体偶联物,或者试剂或试剂盒与待检测样品中的皮质醇接触形成免疫复合物;和b)检测所述免疫复合物的存在,所述复合物的存在指示所述测试样品中所述抗原的存在。

[0019] 为了实现上述目的,根据本发明的第八个方面,提供了一种核酸,所述核酸编码上述的抗体或其抗原结合片段。

[0020] 为了实现上述目的,根据本发明的第九个方面,提供了一种载体,所述载体包括上述的核酸。

[0021] 为了实现上述目的,根据本发明的第十个方面,提供了细胞,所述细胞包括上述的核酸、载体或表达上述的抗体或其抗原结合片段。

[0022] 为了实现上述目的,根据本发明的第十一个方面,提供了一种制备上述抗体或其抗原结合片段的方法,所述方法包括培养上述的细胞。

[0023] 为了实现上述目的,根据本发明的第十二个方面,提供了一种上述的抗体或其抗原结合片段、抗体偶联物、试剂或试剂盒在检测或制备检测皮质醇产品中的用途。

## 附图说明

[0024] 为了更清楚地说明本发明实施例的技术方案,下面将对实施例中所需要使用的附图作简单地介绍,应当理解,以下附图仅示出了本发明的某些实施例,因此不应被看作是对范围的限定,对于本领域普通技术人员来讲,在不付出创造性劳动的前提下,还可以根据这些附图获得其他相关的附图。

[0025] 图1为Anti-CORT 20D9 Rmb1至Rmb3的还原性SDS-PAGE的结果。

## 具体实施方式

[0026] 第一方面,本发明提供一种抗体或其抗原结合片段,所述抗体或其抗原结合片段

包含具有氨基酸序列SEQ ID NO:17所示重链可变区的三个互补决定区和具有氨基酸序列SEQ ID NO:18、19、20任一轻链可变区的三个互补决定区。

[0027] 需要说明的是,HCDR1、HCDR2和HCDR3为与第一方面所述的抗体或其抗原结合片段中所限定的同一条重链可变区的HCDR1、HCDR2、HCDR3一致的氨基酸序列,LCDR1、LCDR2和LCDR3为与第一方面所述的抗体或其抗原结合片段中所限定的同一条轻链可变区的LCDR1、LCDR2、LCDR3一致的氨基酸序列。

[0028] 例如所述HCDR1、HCDR2、HCDR3为与SEQ ID NO:17所示重链可变区的HCDR1、HCDR2、HCDR3一致的氨基酸序列;所述LCDR1、LCDR2、LCDR3为与SEQ ID NO:18所示轻链可变区的LCDR1、LCDR2、LCDR3一致的氨基酸序列。

[0029] 在本发明中,术语“抗体”在最广义上使用,其可以包括全长单克隆抗体,双特异性或多特异性抗体,以及嵌合抗体,只要它们展示所需的生物学活性。

[0030] 在本发明中,术语“互补性决定区”、“CDR”或“CDRs”是指免疫球蛋白的重链和轻链的高度可变区,指包含一种或多种或者甚至全部的对抗体或抗原结合片段与其识别的抗原或表位的结合起作用的主要氨基酸残基的区域。在本发明具体实施方式中,CDRs是指所述抗体的重链和轻链的高度可变区。

[0031] 在本发明中,重链互补决定区用HCDR表示,其包括HCDR1、HCDR2和HCDR3;轻链互补决定区用LCDR表示,其包括LCDR1、LCDR2和LCDR3。

[0032] CDR的定义方法是本领域公知的,CDR定义方法包括:Kabat定义、Chothia定义、IMGT定义、Contact定义和AbM定义。如本文所述,“Kabat定义”是指Kabat等,U.S.Dept.of Health and Human Services,“Sequence of Proteins of Immunological Interest”(1983)所述的定义系统。“Chothia定义”参见Chothia等,J Mol Biol 196:901-917(1987)。还有其他CDR定义方法可能不严格遵循上述方案之一,但仍会与Kabat定义的CDR区的至少一部分重叠,尽管根据特定残基或残基组的预测或实验结果可能会缩短或延长它们。示例性的定义的CDR列于下表1中,不同文献中的定义略有不同。在给定抗体的可变区氨基酸序列的情况下,本领域技术人员可以常规地确定哪些残基包含特定CDR。需要说明的是,不限于表1中的其他方法定义的CDR也属于本公开的保护范围。

[0033] 表1:CDR定义<sup>1</sup>

CDR	Kabat	AbM <sup>2</sup>	IMGT	Chothia
[0034] HCDR1	H31~H35 <sup>3</sup>	H26~H35 <sup>3</sup>	H26~H33..5 <sup>5</sup>	H26~H32..34 <sup>4</sup>
HCDR2	H50~H65	H50~H58	H51~H57	H52~H56
HCDR3	H95~H102	H95~H102	H93~H102	H95~H102
[0035] LCDR1	L24~L34	L24~L34	L27~L32	L24~L34
LCDR2	L50~L56	L50~L56	L50~L51	L50~L56
LCDR3	L89~L97	L89~L97	L89~L97	L89~L97

[0036] <sup>1</sup>表1中所有CDR定义的编号是依据Kabat编号系统(参见下文),重链上的氨基酸编号用“H+数字”表示,轻链上的氨基酸编号用“L+数字”表示。本领域普通技术人员可以明确地将该Kabat编号系统对应到任何可变区序列,而不依赖于序列本身之外的任何实验数据。如本文所述,“Kabat编号”是指Kabat等,U.S.Dept.of Health and Human Services,“Sequence of Proteins of Immunological Interest”(1983)所述的编号系统。

[0037] <sup>2</sup>如表1中使用的“AbM”具有小写“b”，是指通过Oxford Molecular的“AbM”抗体建模软件定义的CDR。

[0038] <sup>3</sup>如果H35A和H35B都不存在时，那么CDR-H1结束在35位；如果只有H35A存在时，那么CDR-H1结束在35A位；如果H35A和H35B同时存在，那么CDR-H1结束在35B位。

[0039] <sup>4</sup>如果H35A和H35B都不存在时，那么CDR-H1结束在32位；如果只有H35A存在时，那么CDR-H1结束在33位；如果H35A和H35B同时存在，那么CDR-H1结束在34位。

[0040] <sup>5</sup>如果H35A和H35B都不存在时，那么CDR-H1结束在33位；如果只有H35A存在时，那么CDR-H1结束在34位；如果H35A和H35B都存在时，那么CDR-H1结束在35位。

[0041] 根据本发明的实施例，所述HCDR1，HCDR2，HCDR3，LCDR1，LCDR2或LCDR3由Kabat、Chothia、IMGT、AbM或Contact任意一种系统或多种系统组合定义。

[0042] 在本发明的一些可选实施例中，所述HCDR1，HCDR2，HCDR3，LCDR1，LCDR2和LCDR3由Kabat系统定义。

[0043] 在本发明的一些可选实施例中，所述HCDR1，HCDR2，HCDR3，LCDR1，LCDR2和LCDR3由Chothia系统定义。

[0044] 在本发明的一些可选实施例中，所述HCDR1，HCDR2，HCDR3，LCDR1，LCDR2和LCDR3由IMGT系统定义。

[0045] 在本发明的一些可选实施例中，所述HCDR1，HCDR2，HCDR3，LCDR1，LCDR2和LCDR3由AbM系统定义。

[0046] 在本发明的一些可选实施例中，所述HCDR1，HCDR2，HCDR3，LCDR1，LCDR2和LCDR3由Contact系统定义。

[0047] 在本发明的一些可选实施例中，所述HCDR1，HCDR2，HCDR3，LCDR1，LCDR2和LCDR3由Kabat、Chothia、IMGT、AbM或Contact系统组合定义。

[0048] 在本发明的一些可选实施例中，所述Kabat、Chothia、AbM或IMGT系统定义的HCDR1，HCDR2，HCDR3，LCDR1，LCDR2或LCDR3的氨基酸序列对应的Kabat编号位置如下：

[0049]

CDR	Kabat	AbM	IMGT	Chothia
HCDR1	H31~H35	H26~H35	H26~H33	H26~H32
HCDR2	H50~H65	H50~H58	H51~H57	H52~H56
HCDR3	H95~H102	H95~H102	H93~H102	H95~H102
LCDR1	L24~L34	L24~L34	L27~L32	L24~L34
LCDR2	L50~L56	L50~L56	L50~L51	L50~L56
LCDR3	L89~L97	L89~L97	L89~L97	L89~L97

[0050] 第二方面，本发明提供一种抗体或其抗原结合片段，所述抗体或其抗原结合片段包括如下互补决定区：

[0051] HCDR1，其包含SEQ ID NO:1所示的氨基酸序列，或由其组成；

[0052] HCDR2，其包含SEQ ID NO:2所示的氨基酸序列，或由其组成；

[0053] HCDR3，其包含SEQ ID NO:3所示的氨基酸序列，或由其组成；

[0054] LCDR1，其包含SEQ ID NO:4所示的氨基酸序列，或由其组成；

[0055] LCDR2，其包含SEQ ID NO:5所示的氨基酸序列，或由其组成；

[0056] LCDR3，其包含SEQ ID NO:6所示的氨基酸序列，或由其组成。

[0057] 在可选的实施例中,所述HCDR1,HCDR2,HCDR3,LCDR1,LCDR2和LCDR3由Kabat系统定义。

[0058] 在本发明中,“框架区”或“FR”区包括重链框架区和轻链框架区,是指抗体重链可变区和轻链可变区中除CDR之外的区域;其中,重链框架区可以被进一步细分成被CDR分隔开的毗邻区域,包含HFR1、HFR2、HFR3和HFR4框架区;轻链框架区可以被进一步细分成被CDR分隔开的毗邻区域,包含LFR1、LFR2、LFR3和LFR4框架区。

[0059] 在本发明中,重链可变区由以下编号的CDR与FR按如下组合排列连接获得:HFR1-HCDR1-HFR2-HCDR2-HFR3-HCDR3-HFR4;轻链可变区由以下编号的CDR与FR按如下组合排列连接获得:LFR1-LCDR1-LFR2-LCDR2-LFR3-LCDR3-LFR4。

[0060] 在本发明的一些可选实施例中,第一方面或第二方面所述抗体或其抗原结合片段还具有HFR1、HFR2、HFR3、HFR4、LFR1、LFR2、LFR3和LFR4中的至少之一;

[0061] 所述HFR1包括/如SEQ ID NO:7或与其具有至少80%同一性的氨基酸序列;

[0062] 所述HFR2包括/如SEQ ID NO:8或与其具有至少80%同一性的氨基酸序列;

[0063] 所述HFR3包括/如SEQ ID NO:9或与其具有至少80%同一性的氨基酸序列;

[0064] 所述HFR4包括/如SEQ ID NO:10或与其具有至少80%同一性的氨基酸序列;

[0065] 所述LFR1包括/如SEQ ID NO:11或与其具有至少80%同一性的氨基酸序列;

[0066] 所述LFR2包括/如SEQ ID NO:12或与其具有至少80%同一性的氨基酸序列;

[0067] 所述LFR3包括/如SEQ ID NO:13或与其具有至少80%同一性的氨基酸序列;

[0068] 所述LFR4包括/如SEQ ID NO:14或与其具有至少80%同一性的氨基酸序列。

[0069] 需要说明的是,在其他的实施例中,本发明提供的抗体或其抗原结合片段的各框架区氨基酸序列可以与上述对应框架区(SEQ ID NO:7、8、9、10、11、12、13或14)具有至少80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%的同一性。

[0070] 在本发明的一些可选实施例中,所述LFR2包括/如SEQ ID NO:25所示。

[0071] 在本发明的一些可选实施例中,所述LFR3包括/如SEQ ID NO:26所示。

[0072] 在本发明的一些可选实施例中,所述抗体或其抗原结合片段以 $KD < 4.31 \times 10^{-9}M$ 的亲和力结合皮质醇。

[0073] 在本发明的一些可选实施例中,所述抗体或其抗原结合片段以 $KD \leq 10^{-9}M$ 、 $KD \leq 10^{-10}M$ 、 $KD \leq 10^{-11}M$ 、 $KD \leq 10^{-12}M$ 、 $KD \leq 10^{-13}$ 的亲和力结合皮质醇。

[0074] 在本发明的一些可选实施例中,所述抗体或其抗原结合片段以 $KD \leq 9.90 \times 10^{-13}M$ 的亲和力结合皮质醇。

[0075] 抗体亲和力(KD)测定方法有很多种,根据检测原理可分为热力学检测方法、动力学检测方法和动态平衡检测方法。其中,热力学检测方法常见如等温滴定量热法(ITC);动力学检测方法常见如表面等离子共振(SPR)及生物膜光干涉法(BLI);动态平衡检测方法常见如酶联免疫吸附(ELISA)等。

[0076] 在本发明的一些可选实施例中,KD的测定采用参照下文实施例中的方法进行测定。

[0077] 第三方面,本发明实施例提供一种抗体或其抗原结合片段,包含重链可变区和/或轻链可变区,所述重链可变区氨基酸序列如SEQ ID NO:17所示;所述轻链可变区氨基酸序

列如SEQ ID NO:18、19、20任一所示。

[0078] 在本发明的一些可选实施例中,上述第一方面或第三方面所述的重链可变区和轻链可变区选自如下任一组合:

组合	重链可变区	轻链可变区
1	SEQ ID NO:17	SEQ ID NO:18
2	SEQ ID NO:17	SEQ ID NO:19
3	SEQ ID NO:17	SEQ ID NO:20

[0080] 在本发明的一些可选实施例中,上述第一方面、第二方面或第三方面所述的抗体或其抗原结合片段还包含恒定区。

[0081] 在本发明的一些可选实施例中,所述恒定区包括重链恒定区和/或轻链恒定区。

[0082] 在本发明的一些可选实施例中,所述重链恒定区选自IgG、IgA、IgM、IgE或IgD任意一种的重链恒定区或多种重链恒定区的区段的组合。

[0083] 在本发明的一些可选实施例中,所述重链恒定区包括IgG的CH1区、IgG的铰链区、IgM的CH2区、IgM的CH3区和/或IgM的CH4区。

[0084] 在本发明的一些可选实施例中,所述IgG选自IgG1、IgG2、IgG3或IgG4。

[0085] 在本发明的一些可选实施例中,所述轻链恒定区选自κ型或λ型轻链恒定区。

[0086] 在本发明的一些可选实施例中,所述恒定区的种属来源为牛、马、乳牛、猪、羊、鼠、狗、猫、兔、驴、鹿、貂、鸡、鸭、鹅、火鸡、斗鸡或人。

[0087] 在本发明的一些可选实施例中,所述恒定区的种属来源为鼠。

[0088] 在本发明的一些可选实施例中,所述重链恒定区序列(CH)如SEQ ID NO:15所示,所述轻链恒定区(CL)序列如SEQ ID NO:16所示。

[0089] 需要说明的是,在其他的实施例中,所述恒定区序列可以与上述恒定区(SEQ ID NO:15或16)具有至少80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%的同一性。

[0090] 在本发明的一些可选实施例中,所述抗原结合片段选自所述抗体的F(ab')<sub>2</sub>、Fab'、Fab、Fv和scFv中的任意一种。

[0091] 上述抗体的抗原结合片段通常具有与其来源抗体相同的结合特异性。本领域技术人员根据本发明记载的内容容易理解到,上述抗体的抗原结合片段可以通过比如酶消化的方法(包括胃蛋白酶或木瓜蛋白酶)和/或通过化学还原分裂二硫键的方法获得。在本发明公开了完整抗体的结构基础上,本领域技术人员容易获得上述的抗原结合片段。

[0092] 上述抗体的抗原结合片段还可以通过也是本领域技术人员所知的重组遗传学技术或通过例如自动肽合成仪,比如Applied BioSystems等销售的自动肽合成仪合成获得。

[0093] 第四方面,本发明提供一种抗体或其抗原结合片段,包括重链和/或轻链,所述重链的氨基酸序列如SEQ ID NO:21任一所示;所述轻链的氨基酸序列如SEQ ID NO:22、23、24任一所示。

[0094] 在本发明的一些可选实施例中,上述第一方面、第二方面、第三方面或第四方面所述的抗体或其抗原结合片段,包括下列任一组合的重链和轻链:

组合	重链	轻链

1	SEQ ID NO:21	SEQ ID NO:22
2	SEQ ID NO:21	SEQ ID NO:23
3	SEQ ID NO:21	SEQ ID NO:24

[0096] 第五方面,本发明提供一种抗体偶联物,所述抗体偶联物包括上述的抗体或其抗原结合片段。

[0097] 在本发明的一些可选实施例中,上述抗体偶联物还包括与上述抗体或其抗原结合片段偶联的生物素或生物素衍生物。

[0098] 在本发明的一些可选实施例中,所述抗体偶联物还包括与上述抗体或其抗原结合片段偶联的标记物。

[0099] 在本发明的一些可选实施例中,上述标记物是指具有能够被肉眼直接观察或被仪器检测或探测到的特性例如发光、显色、放射性等特性的一类物质,通过该特性可以实现对相应目标物的定性或定量检测。

[0100] 在本发明的一些可选实施例中,所述标记物包括但不限于荧光染料、酶、放射性同位素、化学发光试剂和纳米颗粒类标记物。

[0101] 在实际的使用过程中,本领域技术人员可以根据检测条件或实际需要选择合适的标记物,无论使用何种标记物,其均属于本发明的保护范围。

[0102] 在本发明的一些可选实施例中,所述荧光染料包括但不限于荧光素类染料及其衍生物(例如包括但不限于异硫氰酸荧光素(FITC)羟基光素(FAM)、四氯光素(TET)等或其类似物)、罗丹明类染料及其衍生物(例如包括但不限于红色罗丹明(RBITC)、四甲基罗丹明(TAMRA)、罗丹明B(TRITC)等或其类似物)、Cy系列染料及其衍生物(例如包括但不限于Cy2、Cy3、Cy3B、Cy3.5、Cy5、Cy5.5、Cy3等或其类似物)、Alexa系列染料及其衍生物(例如包括但不限于AlexaFluor350、405、430、488、532、546、555、568、594、610、33、647、680、700、750等或其类似物)和蛋白类染料及其衍生物(例如包括但不限于藻红蛋白(PE)、藻蓝蛋白(PC)、别藻蓝蛋白(APC)、多甲藻黄素-叶绿素蛋白(preCP)等)。

[0103] 在本发明的一些可选实施例中,所述酶包括但不限于辣根过氧化物酶、碱性磷酸酶、 $\beta$ -半乳糖苷酶、葡萄糖氧化酶、碳酸酐酶、乙酰胆碱酯酶以及6-磷酸葡萄糖脱氢酶。

[0104] 在本发明的一些可选实施例中,所述放射性同位素包括但不限于 $^{212}\text{Bi}$ 、 $^{131}\text{I}$ 、 $^{111}\text{In}$ 、 $^{90}\text{Y}$ 、 $^{186}\text{Re}$ 、 $^{211}\text{At}$ 、 $^{125}\text{I}$ 、 $^{188}\text{Re}$ 、 $^{153}\text{Sm}$ 、 $^{213}\text{Bi}$ 、 $^{32}\text{P}$ 、 $^{94}\text{mTc}$ 、 $^{99}\text{mTc}$ 、 $^{203}\text{Pb}$ 、 $^{67}\text{Ga}$ 、 $^{68}\text{Ga}$ 、 $^{43}\text{Sc}$ 、 $^{47}\text{Sc}$ 、 $^{110}\text{mIn}$ 、 $^{97}\text{Ru}$ 、 $^{62}\text{Cu}$ 、 $^{64}\text{Cu}$ 、 $^{67}\text{Cu}$ 、 $^{68}\text{Cu}$ 、 $^{86}\text{Y}$ 、 $^{88}\text{Y}$ 、 $^{121}\text{Sn}$ 、 $^{161}\text{Tb}$ 、 $^{166}\text{Ho}$ 、 $^{105}\text{Rh}$ 、 $^{177}\text{Lu}$ 、 $^{172}\text{Lu}$ 和 $^{18}\text{F}$ 。

[0105] 在本发明的一些可选实施例中,所述化学发光试剂包括但不限于鲁米诺及其衍生物、光泽精、甲壳动物荧光素及其衍生物、联吡啶钌及其衍生物、吖啶酯及其衍生物、二氧环乙烷及其衍生物、洛粉碱及其衍生物和过氧草酸盐及其衍生物。

[0106] 在本发明的一些可选实施例中,所述纳米颗粒类标记物包括但不限于纳米颗粒、胶体、有机纳米颗粒、磁性纳米颗粒、量子点纳米颗粒和稀土络合物纳米颗粒。

[0107] 在本发明的一些可选实施例中,所述胶体包括但不限于胶体金属、分散型染料、染料标记的微球和乳胶。

[0108] 在本发明的一些可选实施例中,所述胶体金属包括但不限于胶体金、胶体银和胶体硒。

[0109] 在本发明的一些可选实施例中,所述胶体金属为胶体金。

[0110] 在本发明的一些可选实施例中,上述抗体偶联物还包括与上述抗体或其抗原结合片段偶联的固相载体。

[0111] 在本发明的一些可选实施例中,所述固相载体选自微球、板和膜。

[0112] 在本发明的一些可选实施例中,所述固相载体包括但不限于磁性微球、塑料微球、塑胶微粒、微孔板、玻璃、毛细管、尼龙和硝酸纤维素膜。

[0113] 第六方面,本发明提供一种试剂或试剂盒,所述试剂或试剂盒包括上述的抗体或其抗原结合片段或上述的抗体偶联物。

[0114] 如前所述,本发明一些实施方式或实施例中的抗体或其抗原结合片段能够有效与皮质醇进行结合,因此,包含所述皮质醇抗体或其抗原结合片段的试剂或试剂盒能够有效地对皮质醇进行定性或定量检测。应用本发明提供的试剂或试剂盒,例如可以用于免疫印迹、免疫沉淀等涉及到利用皮质醇和其抗体特异性结合性能的检测。如前所述,本发明一些实施方式或实施例中的抗体或其抗原结合片段具有与皮质醇更高的结合活性或亲和力,因此包含所述抗体或其抗原结合片段的试剂或试剂盒具有更高的检测灵敏度或特异性。

[0115] 第七方面,本发明提供一种检测皮质醇的方法,包括:a)在足以发生抗体/抗原结合反应条件下,使上述的抗体或其抗原结合片段、抗体偶联物,试剂或试剂盒与待检测样品中的皮质醇接触形成免疫复合物;和b)检测所述免疫复合物的存在,所述复合物的存在指示所述测试样品中所述抗原的存在。

[0116] 第八方面,本发明提供一种编码上述抗体或其抗原结合片段的核酸分子。

[0117] 第九方面,本发明提供含有上述核酸分子的载体。

[0118] 第十方面,本发明提供含有上述载体的细胞。

[0119] 第十一方面,本发明提供一种制备抗体或其抗原结合片段的方法,其包括:培养如上所述的细胞。

[0120] 第十二方面,本发明提供上述抗体或其抗原结合片段、抗体偶联物或上述的试剂或试剂盒在检测皮质醇或制备检测皮质醇的产品中的用途。

[0121] 在本发明公开了抗体或其抗原结合片段的氨基酸序列的基础上,本领域技术人员容易想到采用基因工程技术或其他技术(化学合成、重组表达)制备得到该抗体或其抗原结合片段,例如从能够重组表达如上任一项所述的抗体或其抗原结合片段的重组细胞的培养产物中分离纯化得到该抗体或其抗原结合片段,这对本领域技术人员来说是容易实现的,基于此,无论采用何种技术制备本发明的抗体或其抗原结合片段,其均属于本发明的保护范围。

[0122] 为使本发明实施例的目的、技术方案和优点更加清楚,下面将对本发明实施例中的技术方案进行清楚、完整地描述。实施例中未注明具体条件者,按照常规条件或制造商建议的条件进行。所用试剂或仪器未注明生产厂商者,均为可以通过市售购买获得的常规产品。

[0123] 除非另有定义,否则本文使用的所有技术和科学术语具有与本公开内容所属领域的普通技术人员通常理解的含义相同的含义。尽管与本文描述的那些方法和材料类似或等同的任何方法和材料都可用于本文的制剂或单位剂量的实践或测试,但现在描述一些方法和材料。除非另有说明,否则本文采用或考虑的技术是标准方法。材料、方法和实例仅是说

明性而非限制性的。

[0124] 除非另外指明,否则实践本发明将采用细胞生物学、分子生物学(包含重组技术)、微生物学、生物化学和免疫学的常规技术,所述常规技术在本领域技术人员的能力范围内。文献中充分解释了这种技术,如《分子克隆:实验室手册(Molecular Cloning: A Laboratory Manual)》,第二版(Sambrook等人,1989);《寡核苷酸合成(Oligonucleotide Synthesis)》(M.J.Gait编,1984);《动物细胞培养(Animal Cell Culture)》(R.I.Freshney编,1987);《酶学方法(Methods in Enzymology)》(学术出版社有限公司(Academic Press, Inc.));《实验免疫学手册(Handbook of Experimental Immunology)》(D.M.Weir和C.C.Blackwell编);《哺乳动物细胞用基因转移载体(Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells)》(J.M.Miller和M.P.Calos编,1987);《当代分子生物学方法(Current Protocols in Molecular Biology)》(F.M.Ausubel等人编,1987);《PCR:聚合酶链反应(PCR: The Polymerase Chain Reaction)》(Mullis等人编,1994);以及《当代免疫学方法(Current Protocols in Immunology)》(J.E.Coligan等人编,1991),所述文献中的每个文献均通过引用明确并入本文中。

[0125] 以下结合实施例对本发明的特征和性能作进一步的详细描述。

[0126] 实施例1 Anti-CORT 20D9单克隆抗体的制备

[0127] 本实施例中限制性内切酶、Prime Star DNA聚合酶购自Takara公司。MagExtractor-RNA提取试剂盒购自TOYOBO公司。BD SMART<sup>TM</sup> RACE cDNA Amplification Kit试剂盒购自Takara公司。pMD-18T载体购自Takara公司。质粒提取试剂盒购自天根公司。引物合成和基因测序由Invitrogen公司完成。分泌Anti-CORT 20D9单克隆抗体的杂交瘤细胞株为本实验室制备的杂交瘤细胞株,复苏备用。

[0128] (1) 抗体基因制备

[0129] 从分泌Anti-CORT 20D9单克隆抗体的杂交瘤细胞株中提取mRNA,通过RT-PCR方法获得DNA产物,该产物用rTaq DNA聚合酶进行加A反应后插入到pMD-18T载体中,转化到DH5 $\alpha$ 感受态细胞中,长出菌落后分别取Heavy Chain及Light Chain基因克隆,各4个克隆送基因测序公司进行测序。

[0130] (2) Anti-CORT 20D9抗体可变区基因的序列分析

[0131] 将上述测序得到的基因序列放在kabat抗体数据库中进行分析,并利用VNTI11.5软件进行分析确定重链和轻链引物对扩增出的基因都是正确的,其中Light Chain扩增出的基因片段中,VL基因序列为321bp,其前方有57bp的前导肽序列;Heavy Chain引物对扩增出的基因片段中,VH基因序列为357bp,属于VH1基因家族,其前方有57bp的前导肽序列。

[0132] (3) 重组抗体表达质粒的构建

[0133] pcDNA<sup>TM</sup> 3.4 TOPO<sup>®</sup> vector为构建的重组抗体真核表达载体,该表达载体已经引入HindIII、BamHI、EcoRI等多克隆酶切位点,并命名为pcDNA3.4A表达载体,后续简称3.4A表达载体;根据上述pMD-18T中抗体可变区基因测序结果,设计该抗体的VL和VH基因特异性引物,两端分别带有HindIII、EcoRI酶切位点和保护碱基,通过PCR扩增方法扩出0.70kb的Light Chain基因片段和1.40kb的Heavy Chain基因片段。

[0134] Heavy Chain和Light Chain基因片段分别采用HindIII/EcoRI双酶切,3.4A载体采用HindIII/EcoRI双酶切,将片段和载体纯化回收后Heavy Chain基因和Light Chain基

因分别连接3.4A表达载体中,分别得到Heavy Chain和Light Chain的重组表达质粒。

[0135] 2. 重组抗体生产

[0136] 提前复苏HEK293细胞,传代培养到200ml体系,使细胞密度达到 $3\sim 5\times 10^6$ cells/ml细胞密度达到挑选抗体浓度及细胞,细胞活力 $>95\%$ ;离心清洗细胞,用培养基复溶,同时将细胞密度调整到 $2.9\times 10^6$ cells/ml洗细胞,用培养基复溶,同时,作为细胞稀释液。用培养基分别配制质粒DNA和转染试剂稀释液。将转染试剂稀释液加入到质粒DNA稀释液中,混匀后室温静置放置15min;将该混合物在1min内缓慢加入细胞稀释液中,混匀后取样计数,记录并观察细胞转染后的活力,并将其放置于 $35^{\circ}\text{C}$ 恒温培养箱中培养,转速120rpm,CO<sub>2</sub>含量8%,13天后离心收样。将离心上清用proteinA亲和和层析柱进行亲和纯化。取6ug层纯化的抗体进行还原性SDS-PAGE,电泳图如图所示。在还原性SDS-PAGE后显示两条带,1条Mr为50KD(重链),另一条Mr为28KD(轻链)。

[0137] 所得抗体命名为Anti-CORT 20D9Rmb1,对Anti-CORT 20D9Rmb1进行突变,得到突变抗体,上述抗体的重链(H)和轻链(L)的序列如下表所示:

[0138] 表2抗体序列

抗体名称	重链	轻链
Anti-CORT 20D9Rmb1	SEQ ID NO:21	SEQ ID NO:22
Anti-CORT 20D9Rmb2	SEQ ID NO:21	SEQ ID NO:23
Anti-CORT 20D9Rmb3	SEQ ID NO:21	SEQ ID NO:24

[0140] 实施例2抗体的性能检测

[0141] 1. 亲和力分析

[0142] 利用AMC传感器,纯化出来的抗体用PBST稀释到10ug/ml,皮质醇-BSA(获自菲鹏生物)用PBST进行梯度稀释。

[0143] 运行流程:缓冲液1(PBST)中平衡60s,抗体溶液中固化抗体300s,缓冲液2(PBST)中孵育180s,抗原溶液中结合420s,缓冲液2中解离1200s,用10mM pH 1.69GLY溶液及缓冲液3(PBST)进行传感器再生,输出数据。(KD表示平衡解离常数即亲和力;kon表示结合速率;kdis表示解离速率。PBST主要成分Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>+NaCl+TW-20)。

[0144] 表3亲和力数据

样品名称	KD	Kon	kdis
对照	4.31E-9	1.72E+04	7.42E-05
Anti-CORT 20D9Rmb1	3.03E-14	3.30E+06	1.00E-07
Anti-CORT 20D9Rmb2	9.30E-13	3.04E+06	2.83E-06
Anti-CORT 20D9Rmb3	9.90E-13	3.20E+06	3.17E-06

[0146] 2. 活性鉴定

[0147] 包被液(主要成分NaHCO<sub>3</sub>)稀释皮质醇-BSA(来自菲鹏生物)至3ug/ml,每孔100uL,4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜;次日,洗涤液(主要成份Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>+NaCl)清洗2次,拍干;加入封闭液(20%BSA+80%PBS),每孔120uL,37 $^{\circ}\text{C}$ ,1h,拍干;加入稀释后的纯化抗体和对照抗体,100uL/孔,37 $^{\circ}\text{C}$ ,30min;洗涤液清洗5次,拍干;加入羊抗鼠IgG-HRP,每孔100uL,37 $^{\circ}\text{C}$ ,30min;洗涤液清洗5次,拍干;加入显色液A液(50uL/孔),加入显色液B液(50uL/孔),10min;加入终止液,50uL/孔;酶标仪上450nm(参考630nm)处读OD值。

[0148] 备注:A液(主要成份柠檬酸+醋酸钠+乙酰苯胺+过氧化脲);B液(主要成份柠檬酸+EDTA·2Na+TMB+浓HCL);终止液(EDTA·2Na+浓H2SO4)

[0149] 表4活性数据

[0150]	浓度 (ng/ml)	123.457	41.152	13.717	4.572	1.524	0.000
	对照	1.190	0.762	0.391	0.200	0.097	0.016
	Anti-CORT 20D9Rmb1	1.896	0.977	0.486	0.250	0.132	0.019
	Anti-CORT 20D9Rmb2	1.891	0.979	0.488	0.253	0.136	0.016
	Anti-CORT 20D9Rmb3	1.888	0.984	0.479	0.257	0.139	0.023

[0151] 3. 稳定性考核

[0152] 将上述抗体置于4℃(冰箱)、-80℃(冰箱)、37℃(恒温箱)放置21天,取7天、14天、21天样品进行状态观察,并对21天样品进行活性检测,结果显示三种考核条件下抗体放置21天均未见明显蛋白状态变化,活性也未随考核温度的升高呈下降趋势,说明上述抗体稳定。下表5为抗体Anti-CORT 20D9Rmb3考核21天的酶免活性检测OD结果。

[0153] 表5稳定性数据

[0154]	样品浓度 (ng/ml)	123.457	41.152	0.000
	4℃,21天样品	1.846	0.972	0.019
	-80℃,21天样品	1.851	0.981	0.017
	37℃,21天样品	1.844	0.983	0.021

[0155] 以上所述仅为本发明的优选实施例而已,并不用于限制本发明,对于本领域的技术人员来说,本发明可以有各种更改和变化。凡在本发明的精神和原则之内,所作的任何修改、等同替换、改进等,均应包含在本发明的保护范围之内。

[0156] 本申请涉及的部分氨基酸序列如表6所示:

[0157] 表6氨基酸序列

SEQ ID NO:	氨基酸序列
1	RFYLY
2	EIHPRDGGTIFNEKFKN
3	WGDYRDDVSY
4	KASQNVRTAVA
5	LTSNRHT
6	LQHWNPWT
[0158]	RVQLQQSGAELVKPGASVKLSCKASGYTFT
	WVKERPGQGLEWIG
	KATLTVDSSSTAYMHLSSLTSEDSAVYYCVR
	WGQGLVTVSA
	DIVMTQSQKFLSTSVGDRVSITC
	WLQKPGQSPEALYI
	GVPDRFTGTGSGTDFTLITINVQSEDLADYFC
	FGGGTKLEIR

[0159]

15	AKTTAPSVYPLAPVCGDTTGSSVTLGCLVKGYFPEPVTLTWNSGSLSSGVHTFPAVLQSDLYTLSSS VTVTSSTWPSQSITCNVAHPASSTKVDDKIEPRGPTIKPCPPCKCPAPNLLGGPSVFIFPPKIKDVLMS LSPIVTCVVVDVSEDDPDVQISWVFNVEVHTAQTQTHREDYDSTLRVVSALPIQHQDWMMSGKEFK CKVNNKDLPAPIERTISKPKGSRAPQVYVLPPEEEMTKKQVTLTCMVTDFMPEDIYVEWTNNGK TELNYKNTEPVLDSDGYSYFMYSKLRVEKKNWVERNSYSCSVVHEGLHNHHTTKSFSRTPGK
16	RADAAPTVISIFPPSSEQLTSGGASVVCFLNNFYPKDINVKWKIDGSRQNGVLNSWTDQDSKDYSTYS MSSTLTLTKDEYERHNSYTCEATHKTSTSPIVKSFNRECE
17	RVQLQSGAELVKPGASVKLSCKASGYTFTRFYLYWVKERPGQGLEWIGEIHPRDGGTIFNEKFKN KATLTVDDSSSTAYMHLSSLTSEDSAVYYCVRWGDYRDDVSYWGQGLTVTVSA
18	DIVMTQSQKFLSTSVGDRVSITCKASQNVRTAVAWLQKPGQSPEALYLYLTSNRHTGVPDRFTGTGS GTDFTLTLITNVQSEDLADYFCLQHWNPWTFGGGKLEIR
19	DIVMTQSQKFLSTSVGDRVSITCKASQNVRTAVAWLQKPGQSPEALLYLTSNRHTGVPDRFTGTG SGTDFTLTLITNVQSEDLADYFCLQHWNPWTFGGGKLEIR
20	DIVMTQSQKFLSTSVGDRVSITCKASQNVRTAVAWLQKPGQSPEALYLYLTSNRHTGVPDRFTGTGS GTDFTLTLITNVQSEDLADYFCLQHWNPWTFGGGKLEIR
21	RVQLQSGAELVKPGASVKLSCKASGYTFTRFYLYWVKERPGQGLEWIGEIHPRDGGTIFNEKFKN KATLTVDDSSSTAYMHLSSLTSEDSAVYYCVRWGDYRDDVSYWGQGLTVTVSAAKTTAPSVYPL APVCGDTTGSSVTLGCLVKGYFPEPVTLTWNSGSLSSGVHTFPAVLQSDLYTLSSSVTVTSSTWPSQ SITCNVAHPASSTKVDDKIEPRGPTIKPCPPCKCPAPNLLGGPSVFIFPPKIKDVLMSLSPIVTCVVVD VSEDDPDVQISWVFNVEVHTAQTQTHREDYDSTLRVVSALPIQHQDWMMSGKEFKCKVNNKDLPA PIERTISKPKGSRAPQVYVLPPEEEMTKKQVTLTCMVTDFMPEDIYVEWTNNGKTELNYKNTEP VLSDGYSYFMYSKLRVEKKNWVERNSYSCSVVHEGLHNHHTTKSFSRTPGK
22	DIVMTQSQKFLSTSVGDRVSITCKASQNVRTAVAWLQKPGQSPEALYLYLTSNRHTGVPDRFTGTGS GTDFTLTLITNVQSEDLADYFCLQHWNPWTFGGGKLEIRRADAAPTVISIFPPSSEQLTSGGASVVC FLNNFYPKDINVKWKIDGSRQNGVLNSWTDQDSKDYSTYSMSSTLTLTKDEYERHNSYTCEATHKT STSPIVKSFNRECE
23	DIVMTQSQKFLSTSVGDRVSITCKASQNVRTAVAWLQKPGQSPEALLYLTSNRHTGVPDRFTGTG SGTDFTLTLITNVQSEDLADYFCLQHWNPWTFGGGKLEIRRADAAPTVISIFPPSSEQLTSGGASVV CFLNNFYPKDINVKWKIDGSRQNGVLNSWTDQDSKDYSTYSMSSTLTLTKDEYERHNSYTCEATHK TSTSPIVKSFNRECE
24	DIVMTQSQKFLSTSVGDRVSITCKASQNVRTAVAWLQKPGQSPEALYLYLTSNRHTGVPDRFTGTGS GTDFTLTLITNVQSEDLADYFCLQHWNPWTFGGGKLEIRRADAAPTVISIFPPSSEQLTSGGASVVC FLNNFYPKDINVKWKIDGSRQNGVLNSWTDQDSKDYSTYSMSSTLTLTKDEYERHNSYTCEATHKT STSPIVKSFNRECE
25	WLQKPGQSPEALLY
26	GVPDRFTGTSGTDFTLTLITNVQSEDLADYFC

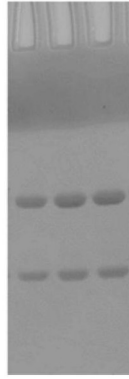


图1