

(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103204937 A

(43) 申请公布日 2013. 07. 17

(21) 申请号 201310150957. X

G01N 33/53(2006. 01)

(22) 申请日 2013. 04. 26

(71) 申请人 山西德丰信成生物科技有限公司
地址 030006 山西省太原市高新区长治路
227 号高新国际 1302 室

(72) 发明人 毋森雍 陶勇 许杨 涂追
付金衡

(74) 专利代理机构 南昌新天下专利商标代理有
限公司 36115

代理人 施秀瑾

(51) Int. Cl.

C07K 16/42(2006. 01)

C12N 15/13(2006. 01)

C12N 15/63(2006. 01)

C12N 1/21(2006. 01)

C12N 1/15(2006. 01)

C12N 1/19(2006. 01)

C12N 5/10(2006. 01)

C07K 1/14(2006. 01)

权利要求书1页 说明书6页
序列表5页 附图5页

(54) 发明名称

针对免疫球蛋白 Fc 段的单域重链抗体 T10

(57) 摘要

本发明涉及生物技术领域,一种针对免疫球蛋白 Fc 段的单域重链抗体如(a)或(b)所述:(a)具有 SEQ ID NO. :1 所示的氨基酸序列;或(b)、将(a)中的氨基酸序列经过一个或多个氨基酸残基的取代、缺失或添加且具有针对免疫蛋白 Fc 段单域重链抗体结合活性的由(a)衍生的与(a)具有 90% 以上同源性的氨基酸序列。本发明抗体可用于制备检测或纯化、富集 IgG 的试剂和工具。

1. 一种针对免疫球蛋白 Fc 段的单域重链抗体,其特征如(a)或(b)所述:(a)、具有 SEQ ID NO.:1 所示的氨基酸序列;或(b)、将(a)中的氨基酸序列经过一个或多个氨基酸残基的取代、缺失或添加且具有针对免疫蛋白 Fc 段单域重链抗体结合活性的由(a)衍生的与(a)具有 90% 以上同源性的氨基酸序列。

2. 如权利要求 1 所述的针对免疫球蛋白 Fc 段的单域重链抗体,其特征在于(b)所述氨基酸序列优选为 SEQ ID NO.:2 或 SEQ ID NO.:3 或 SEQ ID NO.:4 序列。

3. 编码权利要求 1 或 2 所述针对免疫球蛋白 Fc 段的单域重链抗体的核苷酸序列。

4. 如权利要求 2 所述的核苷酸序列,其特征在于为 SEQ ID NO:5 所示的核苷酸序列。

5. 包含权利要求 2 或 3 所述核苷酸序列的载体。

6. 一种包含权利要求 5 所述的载体的宿主细胞。

7. 权利要求 1 或 2 所述的针对免疫球蛋白 Fc 段单域重链抗体在建立纯化或检测免疫球蛋白方法中的应用,优选为 ELISA 法、荧光免疫法、免疫芯片法或亲和层析法中的应用。

针对免疫球蛋白 Fc 段的单域重链抗体 T10

技术领域

[0001] 本发明涉及单域重链抗体技术(又称为纳米抗体技术),以及基因工程抗体技术,特别是涉及针对免疫球蛋白 G (immunoglobulin G, IgG)Fc 段(fragment crystalline, Fc)的单域重链抗体或多肽。

技术背景

[0002] 重链抗体(Heavy-chain antibody)是一种天然缺失轻链,仅由重链组成的抗体,存在于骆驼、鲨鱼等动物中。单域重链抗体(又称为纳米抗体, VHH 抗体, variable domain of heavy chain of heavy-chain antibody)是指仅由重链抗体可变区(Variable region)组成的基因工程抗体。与普通抗体相比,单域重链抗体具有分子量小,稳定性高,水溶性好等优点,目前已广泛应用于基础研究、医学诊断和检测、药物研发等领域。

[0003] 免疫球蛋白 G (immunoglobulin G, IgG)由两条相同的轻链和两条相同的重链组成。每条链都含有可变区(variable region, V 区)和恒定区(constant region, C 区),其中可变区提供抗原结合位点和特异性,恒定区构成免疫球蛋白的框架,具有生物效应功能。用木瓜蛋白酶消化 IgG,可将其分成 3 个功能区,即 2 个相同的抗原结合片段(fragment antigen binding, Fab)和一个可结晶片段(fragment crystalline, Fc)。Fc 段位于恒定区,由两条重链羧基端的一半组成。由于 Fc 段远离抗原结合部位,因此提供了一个与抗体结合而不影响抗原抗体反应的区域,是最有效的二抗试剂结合的表位区。

[0004] 目前,已有针对 IgG Fc 段的多克隆抗体、单克隆抗体的公开报道。与单域重链抗体相比,这些抗体存在生产成本较高,制备过程繁琐等缺点。单域抗体具备分子量小、稳定性高、易于表达等性质,具有广阔的应用前景。

发明内容

[0005] 本发明之目的是提供针对免疫球蛋白 G 的 Fc 段的单域重链抗体(包括含有所述单域重链抗体全部或部分功能区域的蛋白质或多肽)及其氨基酸序列,可被用于制备检测或纯化、富集 IgG 的试剂和工具。

[0006] 一种针对免疫球蛋白 Fc 段的单域重链抗体,其特征如(a)或(b)所述:

(a) 具有 SEQ ID NO. :1 所示的氨基酸序列 ;或

(b) 将(a)中的氨基酸序列经过一个或多个氨基酸残基的取代、缺失或添加且具有针对免疫蛋白 Fc 段单域重链抗体结合活性的由(a)衍生的与(a)具有 90% 以上同源性的氨基酸序列。

[0007] 这些改造的序列可以通过常规的易错 PCR 法对(a)序列进行改造,并通过固相淘选和鉴定获得,优选(b)所述氨基酸序列为 SEQ ID NO. :3 或 SEQ ID NO. :3 或 SEQ ID NO. :4 序列。

[0008] 本发明还涉及编码(a)或(b)所述针对免疫球蛋白 Fc 段的单域重链抗体的核苷酸序列 ;编码(a)氨基酸序列的核苷酸序列优选为 SEQ ID NO:5 所示的核苷酸序列。

[0009] 本发明所提供的核苷酸序列或部分序列可以通过合适的表达系统进行表达以得到相应的蛋白质或多肽。这些表达系统包括细菌,酵母菌,丝状真菌,动物细胞,昆虫细胞,植物细胞,或无细胞表达系统。本发明还提供一种载体,包含所述核酸序列。由于遗传密码子具有简并性,该核酸序列可以根据不同的应用目的而不同。

[0010] 本发明涉及包含前述核苷酸序列的载体。以及包括所述载体的宿主细胞。

[0011] 前述针对免疫球蛋白 Fc 段单域重链抗体在建立纯化或检测免疫球蛋白方法中的应用。

[0012] 本发明还提供了一种纯化或检测免疫球蛋白 G 的方法,其特征是含有上述蛋白质或多肽。基于本发明提供的蛋白质或多肽与免疫球蛋白 G 特异性结合的能力,建立免疫球蛋白 G 的纯化或检测方法。其中,优选的方法包括酶联免疫吸附法(Enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA),荧光免疫法(Fluoroimmunoassay, FIA),免疫芯片法和亲和层析法。

[0013] 本发明所提供的氨基酸序列可以作为前体,通过随机或定点突变技术进行改造,能够获得性质(水溶性、稳定性、亲和力以及特异性等)更好的突变体,用来发展进一步用于医药、工业、农业的蛋白质或多肽。

[0014] 本发明提供一种针对免疫球蛋白 G 的 Fc 段的单域重链抗体,具有 SEQ ID NO. :1 所示的氨基酸序列,其氨基酸序列的 IMGT 编号和结构域的划分如图 1 所示。

[0015] 图 1 所提供的单域重链抗体包括 4 个框架区(Framework region, FR)和三个互补决定区(Complementarity-determining region, CDR)。其中,框架区(FR1-FR4),互补决定区(CDR1-CDR3)。互补决定区主要负责抗原的识别,框架区结构相对稳定,主要起着维持蛋白质结构的作用。

[0016] 本发明中所叙述的一些术语具有如下含义:

同源性:描述两个或更多氨基酸序列的相似程度,第一个氨基酸序列和第二个氨基酸序列之间同源性的百分比可以通过【第一氨基酸序列中与第二氨基酸序列中相应位置处的氨基酸残基相同的氨基酸残基的数量】除以【第一个氨基酸序列中氨基酸总数】再乘以【100%】来计算,其中第二氨基酸序列中的某个氨基酸的缺失、插入、替换或添加(与第一氨基酸相比)被认为是有所差别。备选地,同源性百分比也可以利用已知的用于序列匹配的计算机运算程序如 NCBI Blast 获得。

[0017] 结构域:蛋白质三级结构的基本结构单位,通常具有一定的功能。

[0018] IMGT 编号:IMGT 数据库(The International ImMunoGeneTics Database)中的一种已经标准化的抗体氨基酸序列编号方法。具体编号方法可以参考文献(Ehrenmann, F., Q. Kaas, et al. (2010). "IMGT/3Dstructure-DB and IMGT/DomainGapAlign: a database and a tool for immunoglobulins or antibodies, T cell receptors, MHC, IgSF and MhcSF." Nucleic Acids Res 38(Database issue): D301-307. Lefranc, M. P., C. Pommie, et al. (2003). "IMGT unique numbering for immunoglobulin and T cell receptor variable domains and Ig superfamily V-like domains." Dev Comp Immunol 27(1): 55-77.) 中的描述。

[0019] 密码子(codon):又称为三联体密码(triplet code),指对应于某种氨基酸的核苷酸三联体。在转译过程中决定该种氨基酸插入生长中多肽链的位置。

[0020] 聚合酶链式反应(Polymerase Chain Reaction, PCR):是一种常用的分子生物学实验技术,可用于扩增特定的 DNA 片段。

附图说明

[0021] 图 1 氨基酸编号及结构域示意图。

[0022] 图 2 间接 phage-ELISA 法测定噬菌体结合活性。纵坐标表示 ELISA 读数计测定 450nm 处吸光度值,横坐标表示按照表 1 加样,其中 mIgG 表示实验组,包被抗原为小鼠 IgG,2 表示背景对照,3 表示空白对照 a,4 表示空白对照 b。

[0023] 图 3 间接 phage-ELISA 鉴定结合特异性。纵坐标表示 ELISA 读数计测定 450nm 处吸光度值,横坐标从左至右分别为包被小鼠 IgG1、小鼠 IgG2a、小鼠 IgG2b、小鼠血清、人 IgG 的 Fc 片段,空白对照 a、空白对照 b 和背景对照。

[0024] 图 4 噬菌粒 pHEN-T10 结构图。

[0025] 图 5 表达质粒 pRXS-T10 结构图。

[0026] 图 6 融合表达质粒 pAP-T10。

具体实施方式

[0027] 下面通过单域中链抗体的制备、分析以及应用,对本发明作进一步说明,这些具体实施例不应以任何方式被解释为限制本发明的应用范围。

[0028] 实施例 1:

抗 IgG Fc 段单域重链抗体的淘选与鉴定。

[0029] 采用固相亲和淘选的方法从驼源天然单域重链抗体噬菌体展示文库 R_1+R_2 中淘选针对 IgG Fc 段的单域重链抗体。采用亲和层析法纯化小鼠血清,得到 mIgG 溶液。用 PBS 稀释 mIgG 溶液至 $50\sim 100 \mu\text{g/mL}$,每孔加入 $100 \mu\text{L}$, $4 \text{ }^\circ\text{C}$,包被过夜;吸出包被液,PBS 洗板 3 次,每孔加入 $300 \mu\text{L}$ 3% BSA-PBS, $37 \text{ }^\circ\text{C}$,封闭 2 h;PBS 洗板 6 次,加入 $100 \mu\text{L}$ 噬菌体抗体库(约含 2×10^{11} CFU), $37 \text{ }^\circ\text{C}$,孵育 1.5 h;吸出未结合的噬菌体,用 PBST (含 0.5 % Tween-20)洗板 5 次(逐轮增加 1 次),再用 PBS 洗板 10 次(洗板次数逐轮增加 5 次);以 $100 \mu\text{L}$ 洗脱液(甘氨酸-盐酸,pH 2.2)洗脱吸附在酶标孔中的噬菌体,用 $50 \mu\text{L}$ Tris-HCl(1 mol/L ,pH 8.0)中和洗脱物,取 $10 \mu\text{L}$ 用于滴度测定,其余洗脱物扩增后用于下一轮淘选。

[0030] 经三轮淘选后,采用辅助噬菌体 KM13 对随机挑取的单克隆进行救援,分别得到展示抗体可变区的噬菌体颗粒,再用间接 ELISA 测定噬菌体颗粒的结合活性(图 2),实验设定阴性对照及背景对照,具体加样步骤见表 1。

[0031] 表 1 间接 phage-ELISA 加样表

	实验组	背景对照	空白对照 a	空白对照 b
包被	mIgG	BSA	mIgG Fc	BSA
封闭	1×Blocking buffer (3%脱脂牛奶 W/V)			
结合	噬菌体	噬菌体	PBS	PBS
二抗	HRP/anti-M13			

将 ELISA 阳性克隆 T10 送生物技术服务公司进行序列测定,得到插入片段的 DNA 序列如下:

>T10

GGCCAGCCGGCCATGGCCAGTTGCAGCTCGTGGAGTCCGGGGAGGATTGGTGCAGGCTGGGGGCTCTCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCGGGACGCACTTTCACTACTTATGCAATGGGCTGGTTCCGTCAGGCTCCAGGGAACGAGCGTGAGTTTGTAGCAGCTATTAGCCAGAGTGGTCGTTTCGCAAACAGTGCAGACTCCGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGAGAACGCCAAGAATACGGTGTATCTGCAGATGAACAGCCTGAAACCTGAGGACACGGCCGTCTATTA
CTGTTCTGCCCGTACTTTCTTCCGTGACTACTGGGGCCAGGGGACCCAGGTCACCGTCTCCTCAGAACCCAAGACAC
CAAAACCACAAGCGGCCGC。

[0032] (下划线表示限制性内切酶识别位点)。

[0033] 实施例 2:

抗 IgG Fc 段单域重链抗体特异性鉴定

间接 ELISA 测定噬菌体颗粒 T10 的结合特异性(图 3),结果表明 T10 可以与不同类型的 IgG 结合。实验设定背景对照及空白对照,具体加样步骤见表 2。实验组包被的 IgG 种类包括三种小鼠 IgG 亚型(IgG1、IgG2a 和 IgG2b),小鼠血清和人 IgG 的 Fc 片段(hFc)。

[0034] 表 2 间接 phage-ELISA 特异性鉴定加样表

	实验组	背景对照	空白对照 a	空白对照 b
包被	不同类型 IgG	BSA	mIgG Fc	BSA
封闭	1×Blocking buffer (3%脱脂牛奶 W/V)			
结合	噬菌体	噬菌体	PBS	PBS
二抗	HRP/anti-M13			

实施例 3:

抗 IgG Fc 段单域重链抗体在大肠杆菌中表达与纯化。

[0035] 编码抗 IgG Fc 段单域重链抗体的 DNA 片段的获取:1. 采用限制性内切酶 *SfiI*/

NotI, 双酶切噬菌粒 pHEN-T10(图 4), 琼脂糖凝胶电泳回收抗 IgG Fc 段单域重链抗体基因; 2. 直接将抗 IgG Fc 段单域重链抗体编码序列送生物技术服务公司进行化学合成; 3. 设计特异性引物, 通过 PCR 技术从羊驼 (*Lama pacos*) 来源的 cDNA 库中扩增。

[0036] 将得到的抗 IgG Fc 段单域重链抗体基因片段克隆至表达载体 pRXS, 经 PCR 和酶切鉴定, 构建完成抗 IgG Fc 段单域重链抗体的大肠杆菌表达质粒, 命名为 pRXS-T10 (图 5)。

[0037] 将表达质粒 pRXS-T10 转化至大肠杆菌 BL21, 挑取单菌落进行诱导表达。将单菌落接入 4 mL LBA (Luria-Bertani broth with 100 μ g/mL ampicillin) 液体培养基中, 37 $^{\circ}$ C、250 r/min 振荡培养 12 h; 以 1% 培养基体积的接种量将其转接到 50 mL LBA 液体培养基中, 37 $^{\circ}$ C、250 r/min 振荡培养至 OD600 达到 0.5 (约需 2.5 ~ 3 h), 加入终浓度 0.1 mM 的 IPTG, 30 $^{\circ}$ C、200 r/min 诱导培养。

[0038] 诱导培养物 8000 r/min 离心, 在细胞沉淀中加入 20 mL 磷酸缓冲液 (pH 7.4) 混匀, 8000 r/min 离心, 去上清, 保留细胞沉淀; 在细胞沉淀中加入 10 mL 相同缓冲液, 混匀, 冰上超声波细胞破碎处理, 超声破碎条件为 200 W, 破碎 2 s, 间歇 3 s, 共 240 个循环, 在 4 $^{\circ}$ C 下对细胞破碎物 12000 r/min 离心 20 min, 取上清进行亲和层析纯化和 SDS-PAGE 电泳分析, 或在上清中加入终浓度 30% 的甘油, 混匀, 保存于 -20 $^{\circ}$ C 冰柜待用。

[0039] 通过优化诱导表达条件 (如宿主菌、表达载体、诱导培养时间、温度以及 IPTG 浓度等), 可以进一步提高目的蛋白 (单域抗体) 表达量, 为大量制备抗 DON 单域抗体提供了途径。

[0040] 实施例 4:

抗 IgG Fc 段单域重链抗体的融合表达。

[0041] 将抗 IgG Fc 段单域重链抗体基因克隆至融合表达载体 pAP, 经 PCR 和酶切鉴定, 构建完成抗 IgG Fc 段单域重链抗体的碱性磷酸酶融合表达质粒, 命名为 pAP-T10 (图 6)。

[0042] 碱性磷酸酶可以非特异性催化磷酸单酯水解生成无机磷酸和相应的醇、酚或糖类化合物。该酶常作为信号标签用于 ELISA、免疫印迹、组织化学等检测方法。融合表达质粒 pAP-T10 将抗 IgG Fc 段单域重链抗体融合于碱性磷酸酶的 N 端, 参考应用实例 2 中的表达方法, 可以在大肠杆菌中表达、纯化出融合蛋白 AP-T10。

[0043] 实施例 5:

基于抗 IgG Fc 段单域重链抗体的 IgG 检测方法。

[0044] 基于直接酶联免疫吸附试验的原理, 建立检测 IgG 的方法。采用亲和层析纯化血清或腹水得到 IgG 溶液, 或者购买商业化 IgG 产品; 融合蛋白 AP-T10 的制备参照应用实例 4, 显色试剂为分析纯对硝基苯磷酸二钠 (pNPP \cdot 2Na)。

[0045] 检测步骤包括, (1) 抗原包被: 用 10mM 磷酸缓冲液 (pH 7.4) 将 IgG 稀释至 5 μ g/mL, 100 μ L/孔, 包被于酶标板, 4 $^{\circ}$ C 过夜, 含 0.5% Tween-20 (W/V) 的磷酸缓冲液洗板 5 次, 拍干板条, 加入 3% 脱脂牛奶 (W/V), 300 μ L/孔, 37 $^{\circ}$ C 封闭 2h。(2) 结合: 磷酸缓冲液洗板 3 次后, 加入倍比稀释的融合蛋白 AP-T10, 100 μ L/孔, 水平方向轻轻混匀, 37 $^{\circ}$ C 温育 30min。(3) 取出温育后板条, 磷酸缓冲液洗板 5 次, 拍干, 加入 100 μ L/孔 pNPP 显色液, 37 $^{\circ}$ C 避光显色 5min。(4) 加入 50 μ L/孔 终止液 (2M H₂SO₄), 酶标仪读数。

[0046] 实施例 6:

易错 PCR 法对抗 IgG Fc 段单域重链抗体进行改造

以噬菌粒 pHEN-T10 作为模板, 易错 PCR 向 T10 序列片段中随机引入突变, 上游引物 F:

5'-CCC GGG CCG GCCCAG CCG GCC ATG GCC CAG TTG CAG -3', 下游引物 R:5'- GCG GCC GCT TGT GGT TTT G -3'。 50 μ L 易错 PCR 体系如下:5 μ L 10 \times 易错 PCR 缓冲液(500 mmol/L KCl, 70 mmol/L MgCl₂, 100 mmol/L Tris-HCl pH 8.3, 0.1% (W/V, 明胶));0.5 mmol/L dATP/dGTP, 2.5 mmol/L dCTP/dTTP; 引物 F/R 各 40 pmol;MgCl₂ 7 mmol/L;MnCl₂ 0.3 mmol/L;Taq DNA 聚合酶 2.5 U, ddH₂O 补至 50 μ L。

[0047] PCR 扩增条件:94 $^{\circ}$ C,3 min;94 $^{\circ}$ C 1 min,59 $^{\circ}$ C 1 min,72 $^{\circ}$ C 2 min,30 个循环;72 $^{\circ}$ C 10 min。

[0048] 易错 PCR 扩增产物经 DNA 纯化试剂盒纯化后,用限制性内切酶 SfiI 和 NotI 对扩增产物和噬菌粒 pHEN1 进行酶切,酶切产物经凝胶纯化试剂盒纯化后进行连接,转化至大肠杆菌 TG1 感受态细胞,涂布 LBA 平板,37 $^{\circ}$ C 过夜培养。将获得的转化子用辅助噬菌体 KM13 进行救援,得到展示突变的 T10 片段的噬菌体展示突变文库。

[0049] 采用应用实例 1 中的固相淘选和鉴定的方法,获取具有与原始单域重链抗体同样性质(即 Fc 结合活性)的突变体 T10m01、T10m02 和 T10m03 (氨基酸序列如下,突变的氨基酸以斜体标出),这些突变体的氨基酸序列具有针对免疫蛋白 Fc 段单域重链抗体结合活性,由(a)衍生与(a)具有 90% 以上同源性。

[0050] >T10m01

QLQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRTFTTYAMGWFRQAPGGEREFVAAISQSGRFANSADSVKGRFTISRE
NAKNTVYLLQMNSLKPEDTAVYYCSARTFFRDYWGQGTQVTVSS。

[0051] >T10m02

QLQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRTFTTYAMGWFRQAPGNEREFVAAISQSGRFANSADSVKGRFTISRE
NAKNTVYLLQMNSLKPEDTAVYYCAARTFFRDYWGQGTQVTVSS。

[0052] >T10m03

QLQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRTFTTYAMGWFRQAPGNEREFVAAISQSGRFANSADSVKGRFTISRE
FAKNAVYLLQMNSLKPEDTAVYYCSARTFFRDYWGQGTQVTVSS。

100

105

110

Thr Val Ser Ser

115

<210> 2

<211> 116

<212> PRT

<213> Lama pacos

<400> 2

Gln Leu Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Gly

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Thr Phe Thr Thr Tyr

20 25 30

Ala Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val

35 40 45

Ala Ala Ile Ser Gln Ser Gly Arg Phe Ala Asn Ser Ala Asp Ser Val

50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Glu Asn Ala Lys Asn Thr Val Tyr

65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95

Ser Ala Arg Thr Phe Phe Arg Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val

100 105 110

Thr Val Ser Ser

115

[0003]

<213> Lama pacos

<400> 4

Gln Leu Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Thr Phe Thr Thr Tyr
20 25 30

Ala Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Asn Glu Arg Glu Phe Val
35 40 45

Ala Ala Ile Ser Gln Ser Gly Arg Phe Ala Asn Ser Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Glu Phe Ala Lys Asn Ala Val Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ser Ala Arg Thr Phe Phe Arg Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val
100 105 110

Thr Val Ser Ser
115

<210> 5

<211> 378

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 5

atggcccagt tgcagctcgt ggagtcgggg ggaggattgg tgcaggctgg gggctcctg 60

[0005]

agactctct gtgcagcctc gggacgcact ttactactt atgcaatggg ctggttcct	120
caggctccag ggaacgagcg tgagtttga gcagctatta gccagagtg tegtfcga	180
aacagtgcag actccgtgaa gggccgattc accatctcca gagagaacgc caagaatag	240
gtgtatctgc agatgaacag cctgaaacct gaggacacgg ccgtctatta ctgtctgce	300
cgtactttct tccgtgacta ctggggccag gggaccagg tcaccgtctc ctcagaacce	360
aagacaccaa aaccacaa	378

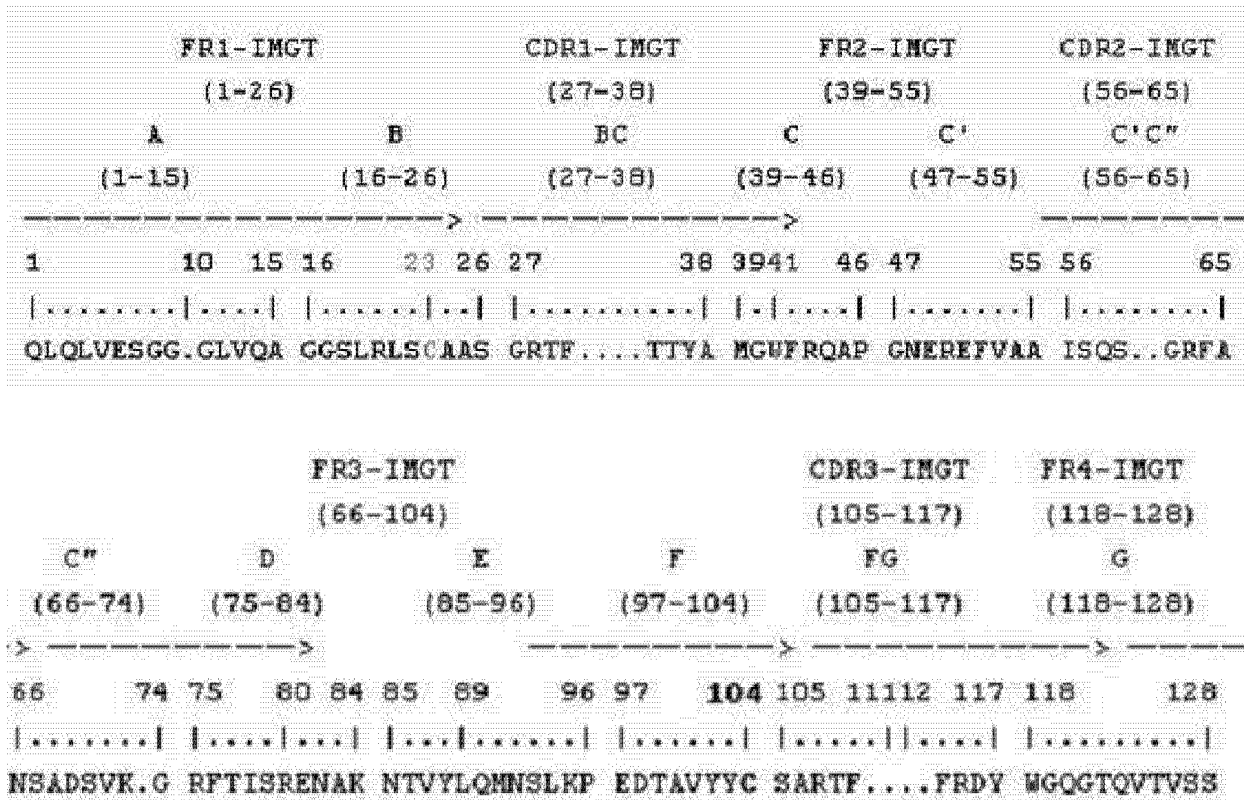


图 1

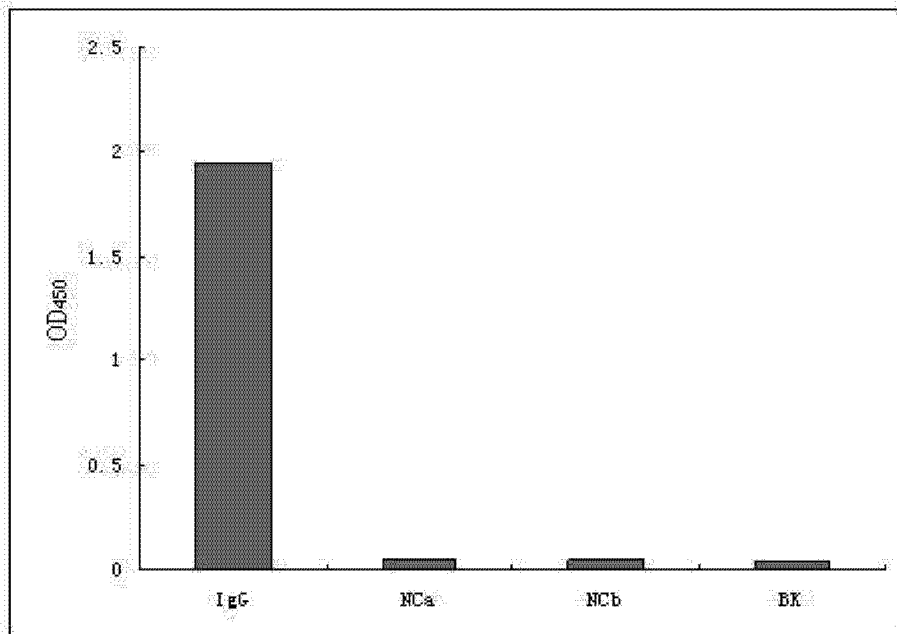


图 2

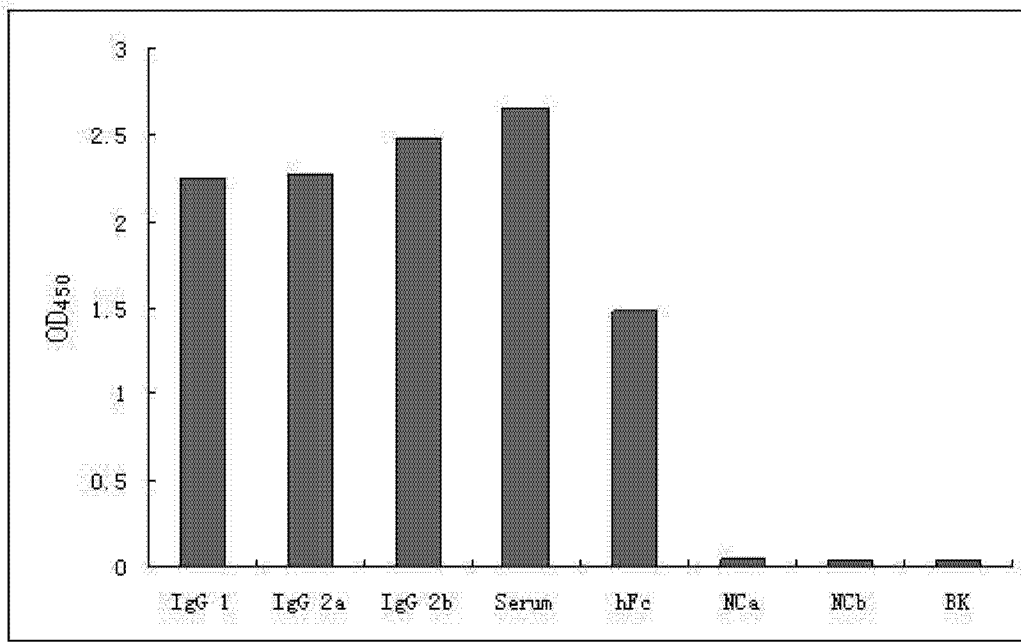


图 3

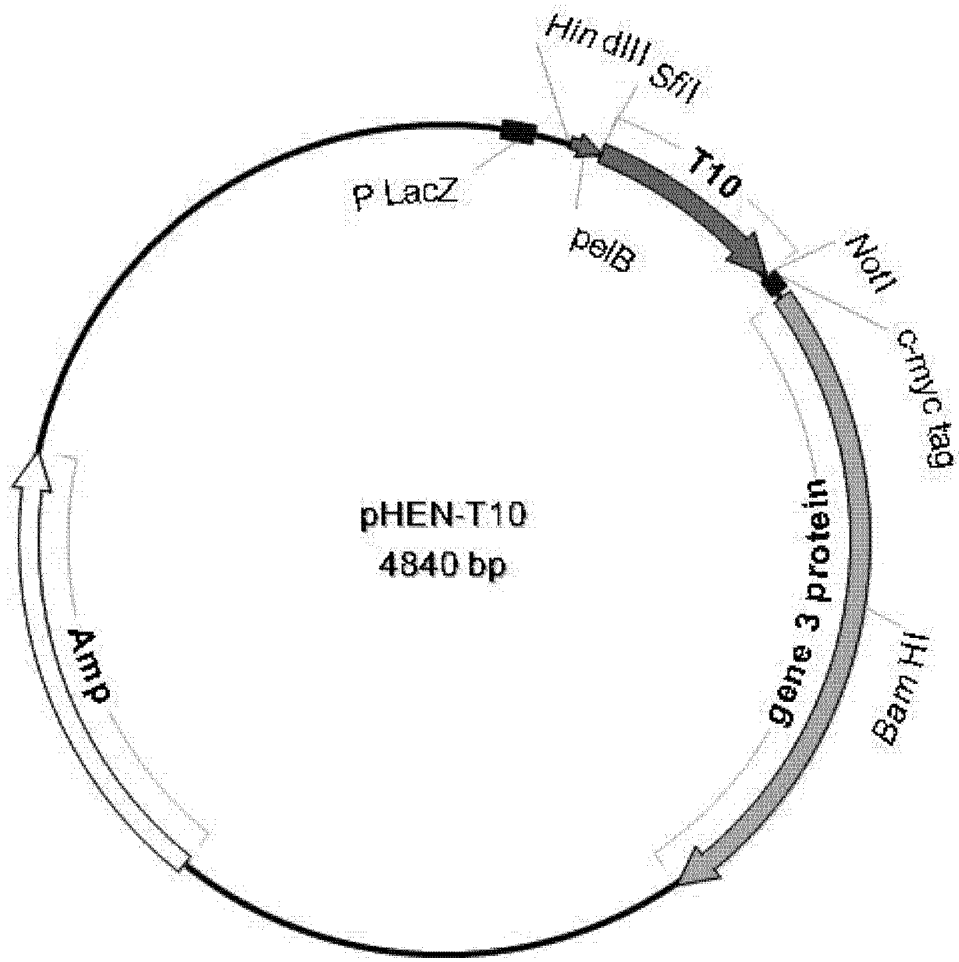


图 4

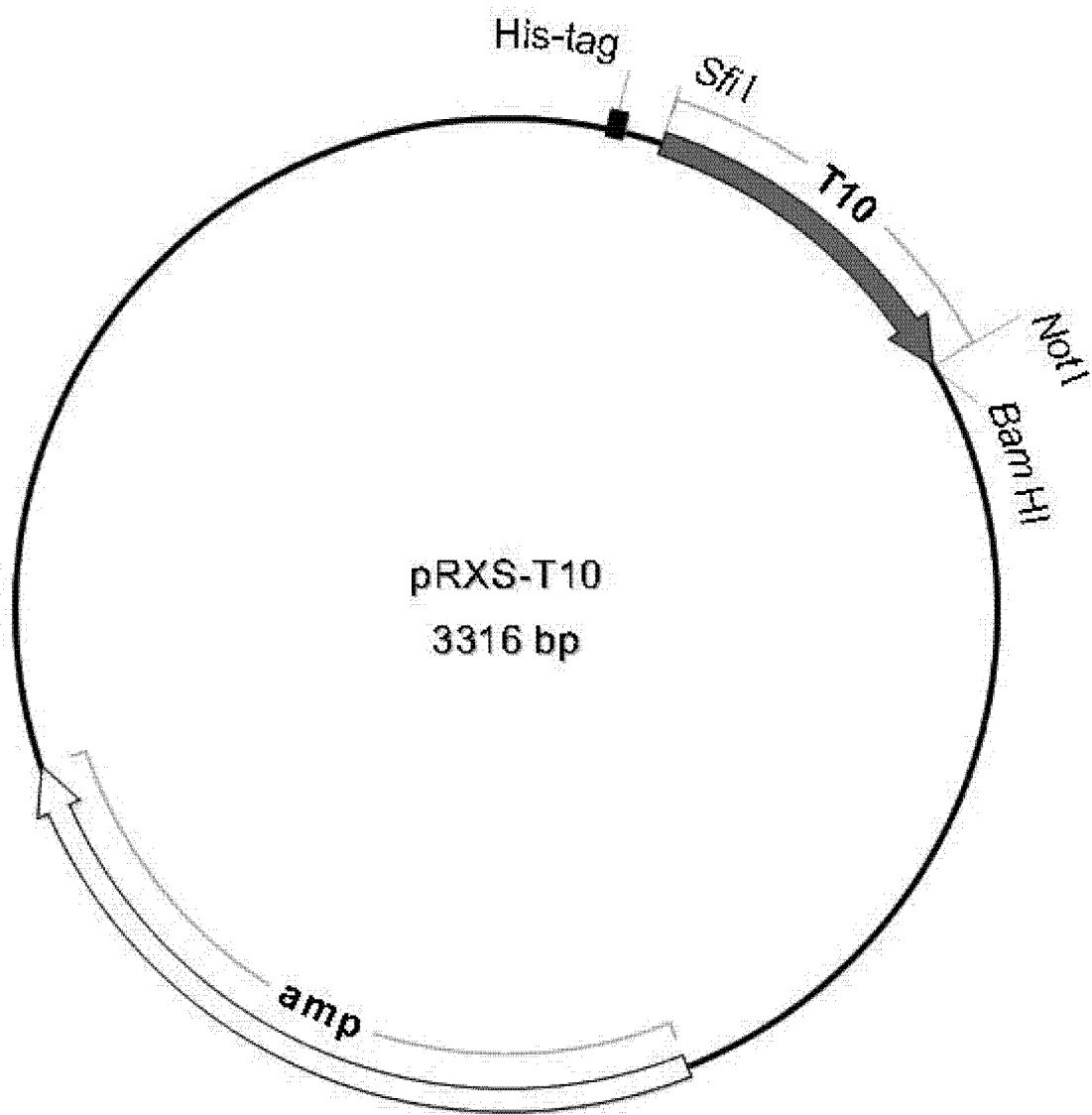


图 5

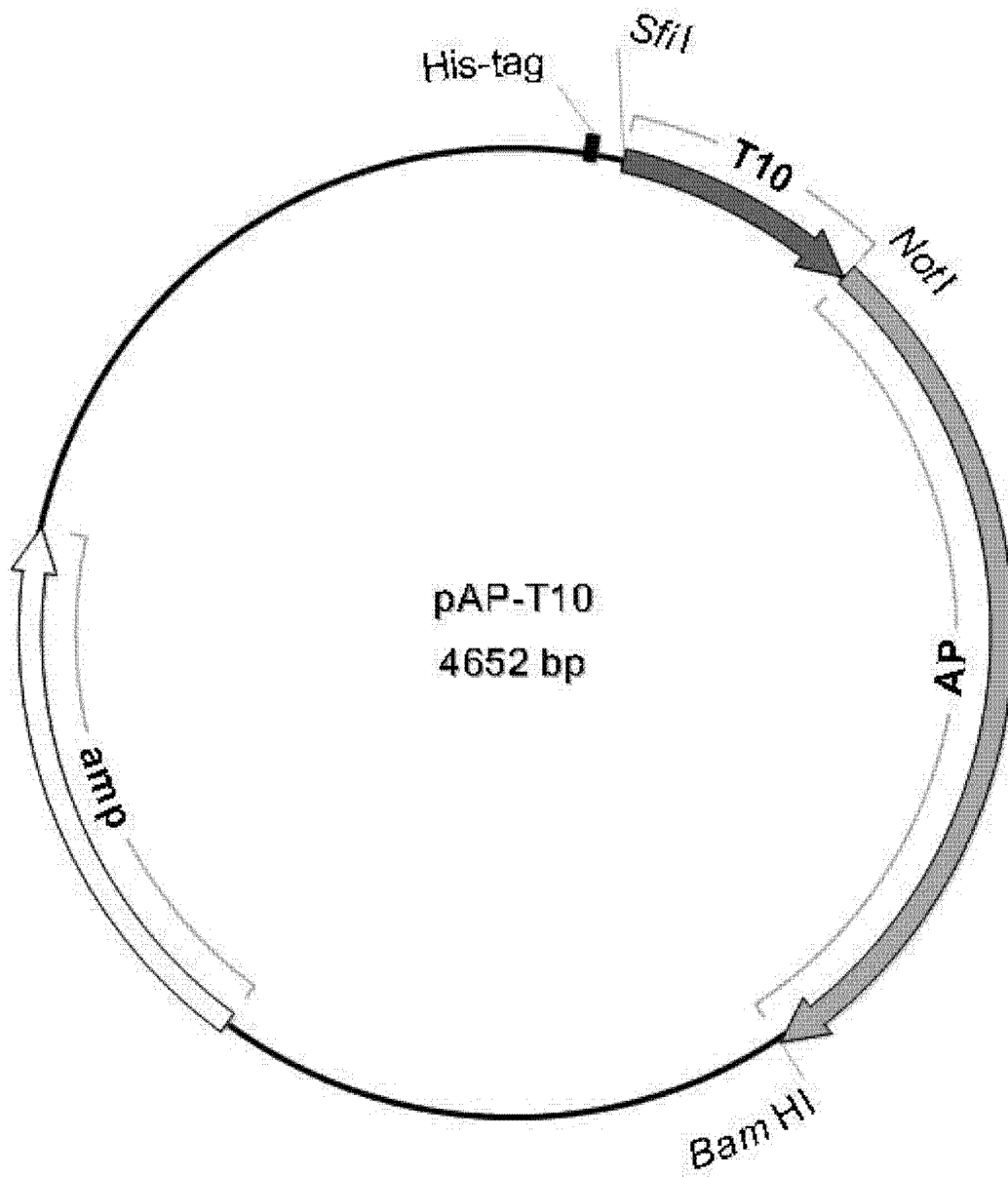


图 6

专利名称(译)	针对免疫球蛋白Fc段的单域重链抗体T10		
公开(公告)号	CN103204937A	公开(公告)日	2013-07-17
申请号	CN201310150957.X	申请日	2013-04-26
[标]发明人	母森雍 陶勇 许杨 涂追 付金衡		
发明人	母森雍 陶勇 许杨 涂追 付金衡		
IPC分类号	C07K16/42 C12N15/13 C12N15/63 C12N1/21 C12N1/15 C12N1/19 C12N5/10 C07K1/14 G01N33/53		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及生物技术领域，一种针对免疫球蛋白Fc段的单域重链抗体如(a)或(b)所述：(a)具有SEQ ID NO.:1所示的氨基酸序列；或(b)、将(a)中的氨基酸序列经过一个或多个氨基酸残基的取代、缺失或添加且具有针对免疫蛋白Fc段单域重链抗体结合活性的由(a)衍生的与(a)具有90%以上同源性的氨基酸序列。本发明抗体可被用于制备检测或纯化、富集IgG的试剂和工具。

FR1-IMGT (1-26)		CDR1-IMGT (27-38)		FR2-IMGT (39-55)		CDR2-IMGT (56-65)	
A (1-15)	B (16-26)	BC (27-38)	C (39-46)	C' (47-55)	C'' (56-65)		
1	10 15 16	23 26 27	38 39 41	46 47	55 56	65	
.....							
QLQLVESGG.GLVQA GGSRLRLSCAAS GRTF.....TTYA MGUFRQAP GNREFVAA ISQS..GRFA							
FR3-IMGT (66-104)		CDR3-IMGT (105-117)		FR4-IMGT (118-128)			
C'' (66-74)	D (75-84)	E (85-96)	F (97-104)	FG (105-117)	G (118-128)		
66	74 75	80 84 85 89	96 97	104 105 111 112 117 118	128		
.....							
NSADSVK.G RPTISRENAK NTVYLQNNLKP EDTAVVYC SARTP....FRDY WGGGTQTVSS							