



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 113166235 A

(43) 申请公布日 2021.07.23

(21) 申请号 201980076655.8

(74) 专利代理机构 北京市柳沈律师事务所
11105

(22) 申请日 2019.11.21

代理人 张涛

(30) 优先权数据

2018-219558 2018.11.22 JP

(51) Int.Cl.

G07K 16/18 (2006.01)

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2021.05.20

G07K 17/00 (2006.01)

G12N 15/13 (2006.01)

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/JP2019/045589 2019.11.21

G01N 33/53 (2006.01)

(87) PCT国际申请的公布数据

W02020/105700 JA 2020.05.28

(71) 申请人 富士瑞必欧株式会社

地址 日本东京都

(72) 发明人 G.詹尼斯 M.道威 石井雄一

冈田凉

权利要求书1页 说明书12页
序列表3页 附图2页

(54) 发明名称

抗体偶联物

(57) 摘要

本发明提供一种提高tau蛋白质的免疫学的测定中的灵敏度的技术。具体而言,本发明提供使2种以上的抗tau蛋白质抗体与载体结合而得到的抗体偶联物等。

1. 一种抗体偶联物,其通过使2种以上的抗tau蛋白质抗体与载体结合而得到。
2. 根据权利要求1所述的抗体偶联物,其中,所述2种以上的抗tau蛋白质抗体是2种以上的抗人tau蛋白质抗体。
3. 根据权利要求2所述的抗体偶联物,其中,2种以上的抗tau蛋白质抗体包含:第1抗体,其识别存在于序列编号1的氨基酸序列中153位~169位之间的抗原表位;和第2抗体,其识别存在于序列编号1的氨基酸序列中188位~207位之间的抗原表位。
4. 根据权利要求3所述的抗体偶联物,其中,所述第1抗体识别的抗原表位是PPGQK(序列编号2),所述第2抗体识别的抗原表位是DRSGYS(序列编号3)。
5. 根据权利要求1~4中任一项所述的抗体偶联物,其中,载体是标记载体。
6. 一种试剂盒,其包含以下:
 - (i) 使2种以上的抗tau蛋白质抗体与载体结合而得到的抗体偶联物;以及
 - (ii) 与抗体偶联物中所含的抗tau蛋白质抗体相比识别不同的抗原表位的抗tau蛋白质抗体。
7. 根据权利要求6所述的试剂盒,其中,所述不同的抗原表位是存在于序列编号1的氨基酸序列中170位~187位之间或209位~233位之间的抗原表位。
8. 根据权利要求7所述的试剂盒,其中,所述不同的抗原表位是PPAPKTP(序列编号4)或PPTREPK(序列编号5)。
9. 一种tau蛋白质的检出方法,其包括:使用使2种以上的抗tau蛋白质抗体与载体结合而得到的抗体偶联物,检出样品中的tau蛋白质的步骤。
10. 根据权利要求9所述的方法,其中,样品是从人采集的体液样品。
11. 根据权利要求9或10所述的方法,其进一步包括使下述抗tau蛋白质抗体与样品接触的步骤,所述抗tau蛋白质抗体与抗体偶联物中所含的抗tau蛋白质抗体相比识别不同的抗原表位。

抗体偶联物

技术领域

[0001] 本发明涉及抗体偶联物等。

背景技术

[0002] 阿兹海默病(AD)是最一般认知症的一种,其是以遍布大脑皮质、大脑边缘系的神经细胞内的神经原纤维变化,以及细胞外的淀粉样蛋白斑的蓄积为组织学特征的神经变性疾病。神经原纤维变化的超微形态,主要由包含异常磷酸化的tau蛋白质(pTau)的双螺旋细丝(Paired Helical Filaments (PHF))构成。已报告:tau蛋白质(包含磷酸化tau蛋白质)可以用作阿兹海默病等的神经变性疾病的诊断标记物,以及体液中的tau蛋白质的免疫学的测定方法(专利文献1以及2)。

[0003] 现有技术文献

[0004] 专利文献

[0005] [专利文献1]日本特表平8-502898号公报

[0006] [专利文献2]日本特表平9-506771号公报

发明内容

[0007] 本发明所要解决的技术问题

[0008] 体液等样品中的tau蛋白质的免疫学的测定的灵敏度需要进一步提高。

[0009] 解决技术问题的技术手段

[0010] 本发明的发明人进行深入研究的结果,在免疫学的测定中,发现通过使用使2种以上的抗tau蛋白质抗体与载体结合而得到的抗体偶联物,与使用单个的抗tau蛋白质抗体时相比,tau蛋白质的检出灵敏度提高,从而完成了本发明。

[0011] 也就是说,本发明如下。

[0012] (1)、一种抗体偶联物,其通过使2种以上的抗tau蛋白质抗体与载体结合而得到。

[0013] (2)、根据(1)所述的抗体偶联物,其中,

[0014] 所述2种以上的抗tau蛋白质抗体是2种以上的抗人tau蛋白质抗体。

[0015] (3)、根据(2)所述的抗体偶联物,其中,

[0016] 2种以上的抗tau蛋白质抗体包含:第1抗体,其识别存在于序列编号1的氨基酸序列中153位~169位之间的抗原表位;和第2抗体,其识别存在于序列编号1的氨基酸序列中188位~207位之间的抗原表位第2抗体。

[0017] (4)、根据(3)所述的抗体偶联物,其中,

[0018] 所述第1抗体识别的抗原表位是PPGQK(序列编号2),所述第2抗体识别的抗原表位是DRSGYS(序列编号3)。

[0019] (5)、根据(1)~(4)中任一项所述的抗体偶联物,其中,

[0020] 载体是标记载体。

[0021] (6)、一种试剂盒,其包含:

- [0022] (i) 使2种以上的抗tau蛋白质抗体与载体结合而得到的抗体偶联物;以及
- [0023] (ii) 与抗体偶联物中所含的抗tau蛋白质抗体相比识别不同的抗原表位的抗tau蛋白质抗体。
- [0024] (7)、根据(6)所述的试剂盒,其中,
- [0025] 所述不同的抗原表位是存在于序列编号1的氨基酸序列中170位~187位之间或209位~233位之间的抗原表位。
- [0026] (8)、根据(7)所述的试剂盒,其中,
- [0027] 所述不同的抗原表位是PPAPKTP(序列编号4)或PPTREPK(序列编号5)。
- [0028] (9)、一种tau蛋白质的检出方法,其包括:
- [0029] 使用使2种以上的抗tau蛋白质抗体与载体结合而得到的抗体偶联物,检出样品中的tau蛋白质的步骤。
- [0030] (10)、根据(9)所述的方法,其中,
- [0031] 样品是从人采集的体液样品。
- [0032] (11)、根据(9)或(10)所述的方法,其进一步包括使下述抗tau蛋白质抗体与样品接触的步骤,所述抗tau蛋白质抗体与抗体偶联物中所含的抗tau蛋白质抗体相比识别不同的抗原表位。
- [0033] 发明的效果
- [0034] 通过使用本发明的抗体偶联物,在夹心免疫分析等的免疫学的测定中,与使用单个的抗tau蛋白质抗体时相比,tau蛋白质的检出灵敏度提高。使用了本发明的抗体偶联物进行tau蛋白质的检出,可以用于阿兹海默病等的神经变性疾病的高精度诊断。

附图说明

- [0035] [图1]图1是表示使用了杂合偶联物的总tau蛋白质的测定中,基于由各标准溶液的平均计数值和浓度作出的标准曲线而算出的各样品(LoQ1~LoQ5)的浓度和,测定各样品(LoQ1~LoQ5)10次(n=10)时的计数值的变动系数(CV)的散点图,以及基于精密度图(precision profile)求出的定量限界值(LoQ(CV20%))的图。
- [0036] [图2]图2是表示在使用了抗体混合物的总tau蛋白质的测定中,基于由各标准溶液的平均计数值和浓度作出的标准曲线而算出的各样品(LoQ1~LoQ5)的浓度,和将各样品(LoQ1~LoQ5)测定10次(n=10)时的计数值的变动系数(CV)的散点图,以及基于精密度图求出的定量限界值(LoQ(CV20%))的图。
- [0037] 本发明的具体实施方式
- [0038] 本发明提供使2种以上的抗tau蛋白质抗体与载体结合而得到的抗体偶联物(也称为“杂合偶联物”)。
- [0039] tau蛋白质优选人tau蛋白质。人tau蛋白质包含多个的同源异构体,已知有4~6种的同源异构体在成人脑中检出,而在胎儿期的脑中只有1种同源异构体被检出。这样的同源异构体的多样性,是通过存在于人第17号染色体的一个基因的选择性mRNA拼接产生的。这些同源异构体相互不同的点在于,有无C末端部分中的3个或4个的重复区域和N末端部分中的29个或58个的氨基酸残基的区域的插入。在本说明书中,将tau蛋白质的氨基酸编号,以与序列编号1所示的最长的同源异构体(441氨基酸)对应的氨基酸编号的形式表示。tau

蛋白质包含修饰tau蛋白质。作为修饰tau蛋白质,例如,可举出磷酸化tau蛋白质。磷酸化tau蛋白质是指,含有羟基的氨基酸残基(丝氨酸残基、苏氨酸残基、酪氨酸残基)被磷酸化的tau蛋白质。

[0040] 抗tau蛋白质抗体是将tau蛋白质的氨基酸序列的至少一部分作为抗原表位而进行识别的抗体。2种以上的抗tau蛋白质抗体是,例如,可以是2~5种,优选2~4种,更优选2~3种,特别优选2种的抗tau蛋白质抗体。优选2种以上的抗tau蛋白质抗体分别识别tau蛋白质中的不重复的抗原表位。

[0041] 2种以上的抗tau蛋白质抗体,包含第1抗体以及第2抗体。第1抗体识别的抗原表位,在序列编号1的氨基酸序列中,可以优选存在于153位~169位之间,更优选155位~167位之间,进一步更优选157位~165位之间,也可以特别优选为PPGQK(159位~163位之间,序列编号2)。第2抗体识别的抗原表位,在序列编号1的氨基酸序列中,可以优选存在于188位~207位之间,更优选190位~204位之间,进一步更优选192位~201位之间,也可以特别优选为DRSGYS(193位~198位之间,序列编号3)。

[0042] 序列编号1的氨基酸序列中第1抗体识别的抗原表位与第2抗体识别的抗原表位之间的氨基酸残基数,例如可以是18个氨基酸以上,优选20个氨基酸以上,更优选22个氨基酸以上,再更优选24个氨基酸以上,特别优选26个氨基酸以上。所述抗原表位间的氨基酸残基数,例如可以是44个氨基酸以下,优选41个氨基酸以下,更优选38个氨基酸以下,再更优选35个氨基酸以下,特别优选33个氨基酸以下。更具体而言,所述抗原表位间的氨基酸残基数,例如可以是18~44个氨基酸,优选20~41个氨基酸,更优选22~38个氨基酸,再更优选24~35个氨基酸,特别优选26~33个氨基酸。

[0043] 2种以上的抗tau蛋白质抗体识别的抗原表位,可以是非修饰肽或修饰肽中的任一种。作为修饰肽,例如,可以举出磷酸化肽。磷酸化tau蛋白质是指,含有羟基的氨基酸残基(丝氨酸残基、苏氨酸残基、酪氨酸残基)被磷酸化的肽。

[0044] 抗tau蛋白质抗体可以是多克隆抗体或单克隆抗体中的任一种。抗tau蛋白质抗体,可以是免疫球蛋白(例如,IgG、IgM、IgA、IgD、IgE、IgY)中的任一种的同种型。抗tau蛋白质抗体可以是全长抗体。全长抗体是指,包含分别含有可变区域以及恒定区域的重链以及轻链的抗体(例如,包含2个Fab部分以及Fc部分的抗体)。抗tau蛋白质抗体可以是来源于这样的全长抗体的抗体片段。抗体片段是全长抗体的一部分,例如,可举出恒定区域缺失抗体(例如,F(ab')₂、Fab'、Fab、Fv)。另外,抗tau蛋白质抗体可以是单链抗体等的变性抗体。

[0045] 抗tau蛋白质抗体,可以用至今公知的方法制作。例如,抗tau蛋白质抗体可以通过将所述的抗原表位作为抗原使用而制作。另外,识别如上所述的抗原表位的多种抗tau蛋白质抗体均有市售,可以使用这样的市售品。

[0046] 载体可以是接头化合物或固相。接头化合物是指,具有与多个的抗体(例如,全长抗体、抗体片段)结合的能力的化合物。接头化合物可以是具有与标记结合的能力的接头化合物、结合有标记的接头化合物或自身是标记的接头化合物。作为接头化合物,例如,可以举出马来酰亚胺、卤代乙酰基、异硫氰酸酯、磺酰氯、N-羟基琥珀酰亚胺、叠氮化物、多糖类(例如,葡聚糖)、肽、多肽、蛋白质(例如,牛血清白蛋白(BSA))、核酸(DNA、RNA)及聚乙二醇。作为固相,例如,可以举出能够在液相中悬浊或分散的固相(例如,粒子、珠等固相载体),以及能够收容或搭载液相的固相(例如,板、膜、试管等支持体,以及孔板、微流路、玻璃毛细

管、纳米柱、整体柱等的容器)。用于载体的固相,优选能在液相中悬浊或分散的固相。作为固相的材料,例如,可以举出玻璃、二氧化硅、高分子化合物(例如,聚苯乙烯、塑料)、金属及碳。另外,作为固相的材料,可以使用非磁性材料或磁性材料。

[0047] 作为抗体与接头化合物的结合方法,可以使用至今公知的方法。作为这样的方法,例如,可以举出物理吸附法、共价结合法、利用亲和性物质(例如,生物素、链霉亲和素)的方法及离子结合法。利用共价结合法时,例如,可以使用高碘酸法、戊二醛法、马来酰亚胺法或N-羟基琥珀酰亚胺法,使抗体与接头化合物共价结合。作为抗体与固相的结合方法,可以利用抗体与接头化合物的结合方法同样的方法。

[0048] 本发明的抗体偶联物可以包含标记。本发明的抗体偶联物包含标记时,载体可以是标记载体,可以是抗体与标记结合,或者,有时可以同时具有这两者。标记载体是指,与标记结合的载体,或其自身是标记的载体。作为标记,例如,可以举出酶(例如,过氧化物酶、碱性磷酸酶、虫萤光素酶(luciferin)、 β -半乳糖苷酶)、亲和性物质(例如,链霉亲和素和生物素中的一者,相互互补的正义链和反义链的核酸中的一者)、荧光物质(例如,荧光素、异硫氰酸荧光素、罗丹明、绿色荧光蛋白质、红色荧光蛋白质)、发光物质(例如,虫萤光素、水母发光蛋白(Aequorin)、吡啶酯、三(2,2'-联吡啶)钐、鲁米诺),放射性物质(例如, ^3H 、 ^{14}C 、 ^{32}P 、 ^{35}S 、 ^{125}I)以及金胶体。与标记结合的载体,例如,可以是内部包含荧光物质的粒子或珠(例如,荧光珠)。作为粒子以及珠的材料,可以使用与用于载体的固相同样的材料。作为其自身是标记的载体,例如,可以举出酶(例如,过氧化物酶、碱性磷酸酶、虫萤光素酶、 β -半乳糖苷酶)、亲和性物质(例如,链霉亲和素及生物素中的一者,相互互补的正义链以及反义链的核酸中的一者),荧光物质(例如,荧光素、异硫氰酸荧光素、罗丹明、绿色荧光蛋白质、红色荧光蛋白质),以及金胶体。包含标记的抗体偶联物,可以通过将标记与抗体偶联物结合而制作,也可以通过将抗体与标记载体结合而制作。作为这些的结合方法,可以利用至今公知的方法。

[0049] 本发明的抗体偶联物,可用于通过免疫测定进行的tau蛋白质的检出。作为这样的免疫测定,例如,可以举出直接竞争法、间接竞争法、夹心法、Western印迹法,以及免疫组织化学染色法。这样的免疫测定,可以优选夹心法。另外,作为这样的免疫测定,可以举出化学发光免疫测定(CLIA)(例如,化学发光酶免疫测定法(CLEIA))、免疫比浊法(TIA)、酶免疫测定法(EIA)(例如,直接竞争ELISA、间接竞争ELISA、以及夹心ELISA)、放射免疫测定(RIA)、乳胶凝集反应法、荧光免疫测定(FIA)、免疫层析法。在夹心法中,本发明的抗体偶联物可以作为检出抗体或捕捉抗体使用,可以优选作为检出抗体使用。将本发明的抗体偶联物作为检出抗体使用时,使标记与抗体偶联物结合,通过检出与抗体偶联物结合的标记,可以检出tau蛋白质。或者,将载体为标记载体的抗体偶联物作为检出抗体使用时,可以通过检出与tau蛋白质结合的抗体偶联物中的标记来检出tau蛋白质。

[0050] 可以根据标记的种类,基于从公知的手法中适宜选择的手法进行标记的检出。标记是酶时,可以通过使用信号产生基质(例如,荧光基质、发光基质、发色基质)检出酶活性,检出标记。标记为亲和性物质时,可以使用具有和亲和性物质结合的能力的酶或信号发生物质,通过检出与亲和性物质结合的酶或信号发生物质,而检出标记。这样的具有和亲和性物质结合的能力的酶或信号发生物质,可以是与具有和亲和性物质结合的能力的物质结合的酶或信号产生物质。标记为荧光物质、发光物质或放射性物质时,可以通过检出这些的

标记发出的信号,检出标记。

[0051] 本发明的抗体偶联物,可以以组成物的形态(例如,溶液)提供。或者,本发明的抗体偶联物,可以以装置的形态(例如,抗体偶联物为收容于装置中的形态)提供。

[0052] 本发明可以提供试剂盒,其包含:

[0053] (i) 使2种以上的抗tau蛋白质抗体与载体结合而得到的抗体偶联物;以及

[0054] (ii) 与抗体偶联物中所含的抗tau蛋白质抗体相比识别不同的抗原表位的抗tau蛋白质抗体。

[0055] “使2种以上的抗tau蛋白质抗体与载体结合而得到的抗体偶联物”如上所述。

[0056] “与抗体偶联物中所含的抗tau蛋白质抗体相比识别不同的抗原表位的抗tau蛋白质抗体”(以下,也称为“其他抗tau蛋白质抗体”)识别的抗原表位(以下,也称为“其他抗原表位”),例如,可以是与抗体偶联物中所含的抗tau蛋白质抗体所识别的抗原表位不重复的抗原表位,在序列编号1的氨基酸序列中可以优选170位~187位之间或209位~233位之间,更优选172位~185位之间或212位~230位之间,更优选174位~183位之间或215位~227位之间存在的抗原表位,也可以特别优选PPAPKTP(176位~182位之间,优选T是磷酸化苏氨酸残基,序列编号4)或PPTREPK(218位~224位之间,序列编号5)。其他抗原表位可以是非修饰肽或修饰肽中的任一种。作为修饰肽,例如可以举出,上述肽。作为其他抗原表位中的修饰氨基酸残基,例如,可以举出序列编号1的氨基酸序列中181位的磷酸化苏氨酸。其他抗原表位为修饰肽时,本发明的试剂盒,可以用于修饰tau蛋白质的检出。

[0057] 其他抗tau蛋白质抗体,可以固定于固相。作为抗体固定化(结合)到固相上的方法,可以利用与上述的抗体与接头化合物的结合方法同样的方法。

[0058] 本发明的试剂盒,可以在对于tau蛋白质的免疫测定中利用。作为这样的免疫测定,例如,可以举出上述的方法,可以优选夹心法。在夹心法中,可以优选,抗体偶联物以及其他抗tau蛋白质抗体分别作为检出抗体以及捕捉抗体使用。

[0059] 本发明的试剂盒优选以相互隔离的形态包含:(i) 使2种以上的抗tau蛋白质抗体与载体结合而得到的抗体偶联物(抗体偶联物);以及(ii) 与抗体偶联物中所含的抗tau蛋白质抗体相比识别不同的抗原表位的抗tau蛋白质抗体(其他抗tau蛋白质抗体)。具体而言,抗体偶联物和其他抗tau蛋白质抗体可以分别收容于不同容器(例如,离心管、盘)。或者,抗体偶联物以及其他抗tau蛋白质抗体可以以组成物的形态(例如,溶液)提供。或者,本发明的试剂盒可以以装置的形态提供。具体而言,可以是包含抗体偶联物和其他抗tau蛋白质抗体,而其构成成分的全部收容于装置中。或者,构成成分的一部分收容于装置中,其余可以不必收容于装置中(例如,收容于不同的容器的形态)。此时,未收容于装置中的构成成分,可以在进行tau蛋白质检出时,注入装置中。

[0060] 在优选实施形态中,本发明的试剂盒,可以根据待采用的免疫测定的种类而具有相应的构成。例如,采用夹心法时,本发明的试剂盒,作为任意的构成成分,可以包含标记、稀释液(缓冲液)、与标记反应的基质以及tau蛋白质标准品。可以优选,抗体偶联物或其他抗tau蛋白质抗体固相化至磁性粒子上。本发明的试剂盒的构成的具体例包含标记载体的抗体偶联物、固定化至固相(例如,磁性粒子、支持体、容器)的其他抗tau蛋白质抗体、和标记反应的基质以及tau蛋白质标准品。

[0061] 本发明可以提供tau蛋白质的检测方法。本发明的方法包含:使用使2种以上的抗

tau蛋白质抗体与载体结合而得到的抗体偶联物,检出样品中的tau蛋白质的步骤。“使2种以上的抗tau蛋白质抗体与载体结合而得到的抗体偶联物”,如上所述。

[0062] 样品中的tau蛋白质的检出可以通过免疫测定进行。作为这样的免疫测定,例如,可以举出上述的免疫测定,可以优选夹心法。在本发明的方法中,抗体偶联物可以作为检出抗体或捕捉抗体使用,可以优选作为检出抗体使用。

[0063] tau蛋白质的检出,可以如下步骤进行,例如,将样品用抗体偶联物处理,使抗体偶联物与样品中的tau蛋白质结合的步骤(例如,使样品和抗体偶联物接触的步骤),以及检出与tau蛋白质结合的抗体偶联物的步骤。tau蛋白质的检出,可以进一步包含:除去未与tau蛋白质结合的抗体偶联物的步骤(例如,清洗步骤)。与tau蛋白质结合的抗体偶联物的检出,可以通过下述步骤进行:使标记与抗体偶联物结合的步骤,以及检出与抗体偶联物结合的标记的步骤进行。抗体偶联物包含标记时,与tau蛋白质结合的抗体偶联物的检出,可以通过检出抗体偶联物中的标记的步骤而进行。

[0064] 本发明的方法,可以进一步包括:使与抗体偶联物中所含的抗tau蛋白质抗体相比识别不同的抗原表位的抗tau蛋白质抗体(“其他抗tau蛋白质抗体”)与样品接触的步骤。“其他抗tau蛋白质抗体”,如上所述。此时,tau蛋白质的检出,例如,可以通过:将样品用其他抗tau蛋白质抗体处理使样品中的tau蛋白质与其他抗tau蛋白质抗体结合(捕捉)的步骤(例如,使样品和其他抗tau蛋白质抗体接触的步骤),将与其他抗tau蛋白质抗体结合的tau蛋白质用抗体偶联物处理,使抗体偶联物与其他抗tau蛋白质抗体结合的tau蛋白质结合的步骤(例如,使与其他抗tau蛋白质抗体结合的tau蛋白质与抗体偶联物接触的步骤),以及检出与tau蛋白质结合的抗体偶联物的步骤进行。tau蛋白质的检出,可以进一步包含:除去游离的tau蛋白质或其他抗tau蛋白质抗体的步骤(B/F分离或清洗步骤)、或除去未与tau蛋白质结合的抗体偶联物的步骤(例如,清洗步骤)、或这两个步骤。与tau蛋白质结合的抗体偶联物的检出,如上所述。

[0065] 样品,例如,可以是液体样品(例如,体液、标准品)、组织样品、印迹法的样品。特别是,样品可以是从小人采集的体液样品。作为体液样品,例如,可以举出血液样品(例、全血、血浆、血清)、脑脊髓液、尿及唾液,可以优选脑脊髓液、血浆或血清。

[0066] 作为tau蛋白质的检出,例如,可以举出tau蛋白质的存在或非存在或量的评价、修饰tau蛋白质(例如,磷酸化tau蛋白质)的存在或非存在或量的评价、tau蛋白质的修饰(例如,磷酸化)的程度的评价。基于这些tau蛋白质的评价,可以诊断阿兹海默病等的神经变性疾病。基于tau蛋白质的评价的阿兹海默病等的神经变性疾病的诊断,可以基于已知的手法(例如,日本特表平8-502898号公报,日本特表平9-506771号公报)进行。

实施例

[0067] 以下,将参照实施例对本发明进行说明,但是本发明不限于这些实施例。

[0068] 实施例1:碱性磷酸酶标记杂合偶联物的制作

[0069] 将特异性识别tau蛋白质的单克隆抗体BT2(抗原表位:DRSGYS(序列编号3), Fujirebio Europ株式会社制造)和胃蛋白酶混合到柠檬酸缓冲液(pH3.5)中,37°C下孵育1小时,进行了胃蛋白酶消化。反应停止后,使用Superdex200柱(GE Healthcare bioscience公司制造)进行凝胶过滤纯化,得到了F(ab')₂片段。然后,确定纯化了的F(ab')₂片段的浓

度,根据需要,将浓度调整至2.5mg/mL。

[0070] 将特异性识别tau蛋白质的单克隆抗体HT7(抗原表位:PPGQK(序列编号2), Fujirebio Europe公司制造)和菠萝蛋白酶混合,37℃孵育1小时,进行了菠萝蛋白酶消化。反应停止后,进行凝胶过滤纯化,得到F(ab')₂片段。然后,确定纯化了了的F(ab')₂片段的浓度,根据需要,将浓度调整至2.5mg/mL。

[0071] 将得到的BT2的F(ab')₂片段以及HT7的F(ab')₂片段以重量比1:1混合,添加2-巯基乙胺(2-MEA)盐酸盐,37℃下孵育90分钟,将两片段还原(硫醇化)。进一步进行脱盐处理,得到了BT2的Fab'片段和HT7的Fab'片段的混合物。

[0072] 另一方面,将脱盐后的碱性磷酸酶(ALP)和N-(4-马来酰亚胺丁氧基)-琥珀酰亚胺(GMBS)以摩尔比1:10混合,30℃下孵育1小时,进行了ALP的马来酰亚胺化。脱盐后,将BT2的Fab'片段和HT7的Fab'片段的混合物,与马来酰亚胺化ALP,以摩尔比2:1混合,25℃下孵育1小时,进行了偶联。偶联反应通过添加2-MEA盐酸盐而停止,进一步25℃下孵育了30分钟。接着,通过添加0.5M碘乙酰胺,在25℃下孵育30分钟,进行淬灭反应,得到了偶联物反应混合物。

[0073] 将得到的偶联物反应混合物脱盐、纯化后,添加至HiLoad Superdex200柱(GE Healthcare bioscience公司制造),进行了抗体的凝胶过滤纯化。在得到的级分在吸光度280nm处的多个的峰中,合并对于1个ALP结合2个以上的Fab'的级分,以作为杂合偶联物。纯化杂合偶联物后,在0.1M MES缓冲液(1mM MgCl₂、0.1mM ZnCl₂、0.1%NaN₃、0.1%BSA、pH6.8)中,调整至0.1mg/mL的浓度。

[0074] 比较例1:碱性磷酸酶标记单一单克隆抗体的制作

[0075] 将单克隆抗体BT2和胃蛋白酶在柠檬酸缓冲液(pH3.5)中混合,37℃孵育1小时进行了胃蛋白酶消化。反应停止后,使用Superdex200柱(GE Healthcare bioscience公司制造)进行凝胶过滤纯化,得到了F(ab')₂片段。然后,确定纯化了了的F(ab')₂片段的浓度,根据需要,将浓度调整至2.5mg/mL。

[0076] 将得到的BT2的F(ab')₂片段,使用2-MEA盐酸盐,在37℃下孵育90分钟,进行还原,得到了BT2的Fab'片段。

[0077] 另一方面,将脱盐了的碱性磷酸酶(ALP)和N-(4-马来酰亚胺丁氧基)-琥珀酰亚胺(GMBS)以摩尔比1:10混合,30℃下孵育1小时,进行了ALP的马来酰亚胺化。脱盐后,将BT2的Fab'片段和马来酰亚胺化ALP,以摩尔比1:1的比例混合,在25℃下孵育1小时,进行了偶联。偶联反应,通过添加2-MEA盐酸盐,25℃下孵育30分钟而停止,得到了ALP标记BT2 Fab'片段。

[0078] 将得到的ALP标记BT2 Fab'片段,使用Superdex200柱(GE Healthcarebioscience公司制造)进行了凝胶过滤纯化。得到的级分的吸光度280nm中多个峰中,将对于1个ALP结合了2个以上的Fab'的组分分为低分子侧和高分子侧的二组而合并。将低分子侧的组分作为第1ALP标记BT2 Fab'片段(1:X),将高分子侧的组分作为第2ALP标记BT2 Fab'片段(1:XX)。纯化各ALP标记BT2 Fab'片段后,分别在0.1M MES缓冲液(1mM MgCl₂,0.1mM ZnCl₂,0.1%NaN₃,0.1%BSA,pH6.8)中,调整至浓度为0.05mg/mL。

[0079] 第1以及第2ALP标记HT7 Fab'片段,与第1以及第2ALP标记BT2 Fab'片段同样地制备。

[0080] 将所述制备的第1ALP标记BT2 Fab' 片段溶液和第1ALP标记HT7 Fab' 片段溶液以容量比1:1混合,得到了第1ALP标记Fab' 片段混合物。另外,将所述制备的第2ALP标记BT2 Fab' 片段溶液和第2ALP标记HT7 Fab' 片段溶液以容量比1:1混合,得到了第2ALP标记Fab' 片段混合物。

[0081] 实施例2:抗体结合磁性粒子的制作

[0082] 作为固相结合抗体,分别将特异性识别第181号的苏氨酸被磷酸化而得到的tau蛋白质的小鼠单克隆抗体AT270 (抗原表位:PPAPKT (p) P (序列编号4), T (p) 表示磷酸化苏氨酸残基),以及特异性识别tau蛋白质的小鼠单克隆抗体AT120 (抗原表位:PPTREPK (序列编号5)) 结合至磁性铁氧体粒子。

[0083] 具体而言,向羧基化的磁性铁氧体粒子 (Fujirebio株式会社制造) 中添加乙基 (二甲基氨基丙基) 碳二亚胺 (EDC) 及N-羟基琥珀酰亚胺 (NHS), 在25°C下一边缓慢搅拌一边孵育30分钟。清洗后,添加小鼠单克隆抗体AT270, 在25°C下一边缓慢搅拌一边孵育1小时。反应后,添加三羟甲基氨基甲烷, 在25°C下30分钟一边缓慢搅拌一边孵育以停止反应。反应停止后,以磁石收集磁性铁氧体粒子,将其从反应液中分离,粒子以50mM Tris缓冲液 (包含0.15M NaCl、3%BSA, pH7.2) 清洗,得到了AT270结合磁性粒子。将得到的AT270结合磁性粒子悬浊至50mM MOPS缓冲液以达到0.25mg/mL的浓度,得到了AT270结合磁性粒子液。

[0084] AT120结合磁性粒子,以与AT270结合磁性粒子同样的方法制作。

[0085] 实施例3:磷酸化Tau肽的测定

[0086] 将tau蛋白质的第181号的苏氨酸被磷酸化的磷酸化Tau肽抗原,用100mM Tris缓冲液稀释,制备各浓度为0、4.5、9、18、36、72、150pM的磷酸化Tau标准溶液。

[0087] 将实施例2中制作的AT270结合磁性粒子液150μL和,稀释的磷酸化Tau标准溶液100μL分注至反应槽,搅拌后37°C下孵育10分钟。然后,进行了B/F分离以及清洗。清洗使用了“Lumipulse G (注册商标)”专用清洗液 (Lumipulse G Wash Solution, Fujirebio株式会社制造)。清洗后,向反应槽中,分注将实施例1中制作的杂合偶联物以50mM MOPS缓冲液 (包含1%BSA, pH 6.8) 稀释至0.2μg/mL的溶液250μL, 37°C下孵育10分钟。然后,进行了B/F分离以及清洗。清洗后,向反应槽中,分注包含作为化学发光基质的3- (2'-螺旋金刚烷) -4-甲氧基-4- (3"-磷酸氧基) 苯-1,2-二氧杂环丁烷二钠盐 (AMPPD) 的基质液 (Lumipulse G底物液, 富士瑞必欧株式会社制造) 200μL, 搅拌后, 37°C下反应5分钟, 发光量用光度计测定, 得到了计数值。实际的测定使用全自动化学发光酶免疫测定系统“Lumipulse G” (富士瑞必欧株式会社制造) 进行。

[0088] 作为对照,作为杂合偶联物溶液的替代,使用比较例1中制作的ALP标记单一抗体 (第1ALP标记Fab' 片段混合物以及第2ALP标记Fab' 片段混合物), 同样地测定标准溶液, 求出了计数值。

[0089] 结果如表1所示。各磷酸化Tau标准溶液的计数值以二重测定的计数值的平均值表示。另外,分别求出4.5pM中的计数值与0pM中的计数值的比率 (S/N比)。其结果,第1ALP标记Fab' 片段混合物显示低计数值。第2ALP标记Fab' 片段混合物只在高浓度的标准溶液下显示与杂合偶联物同样的计数值。另一方面,只有杂合偶联物对低浓度的标准溶液也显示非常高的计数值。作为结果,发现最低的标准溶液 (4.5pM) 的计数值与空白 (0pM) 的计数值的比 (S/N比), 在使用了杂合偶联物时,比使用ALP标记Fab' 片段混合物 (ALP标记单一抗体) 时高

约6倍。

[0090] 高的S/N比是为了得到稳定的测定系统且得到高的灵敏度的重要要素,其显示了通过使用杂合偶联物,能够构建高灵敏度且稳定的测定系统。

[0091] [表1]

[0092] 使用杂合偶联物和ALP标记单一抗体的磷酸化Tau的测定

[0093]

标准溶液抗原 浓度(pM)	计数值		
	杂合偶联物	ALP标记单一抗体	
		第1ALP标记Fab' 片段混合物	第2ALP标记Fab' 片段混合物
0	595	323	725
4.5	42613	4176	9271
9	73769	9206	21273
18	152858	22904	51744
36	297171	61908	143370
72	576113	175976	398130
150	1346270	527862	1225542
S/N (4.5/0)	71.7	12.9	12.8

[0094] 实施例4:总tau蛋白质的测定

[0095] 将实施例2中制作的AT120结合磁性粒子液150 μ L和总tau蛋白质测定用的校准试剂(“LUMIPULSE G Total Tau Calibrators set”,富士瑞必欧株式会社制造)或将该校准试剂以50mM Tris缓冲液稀释而制备的tau蛋白质标准溶液75 μ L和将实施例1中制作的杂合偶联物以50mM Tris缓冲液稀释至0.2 μ g/mL的溶液50 μ L分注至反应槽,搅拌后37 $^{\circ}$ C下孵育20分钟。然后,进行了B/F分离以及清洗。清洗后,向反应槽中,分注含有AMPPD的基质液(Lumipulse G底物液,富士瑞必欧株式会社制造)200 μ L,搅拌后,37 $^{\circ}$ C下反应5分钟,发光量用光度计测定,得到了计数值。实际的测定使用全自动化学发光酶免疫测定系统“Lumipulse G”(富士瑞必欧株式会社制造)进行。

[0096] 作为对照,作为杂合偶联物溶液的替代,使用生物素化单克隆抗体BT2(Fujirebio Europe株式会社制造)、生物素化单克隆抗体HT7(Fujirebio Europe株式会社制造)以及链霉亲和素标记ALP,如下所述,测定了标准溶液。

[0097] 将含有实施例2中制作的AT120结合磁性粒子液150 μ L、所述tau蛋白质标准溶液75 μ L、生物素化单克隆抗体BT2以及生物素化单克隆抗体HT7的溶液(抗体混合物)50 μ L(总抗体8 μ g/mL)分注至反应槽,搅拌后37 $^{\circ}$ C下孵育10分钟。然后,进行了B/F分离以及清洗。清洗后,向反应槽中,分注0.08 μ g/mL链霉亲和素标记ALP(SA-ALP)溶液250 μ L,37 $^{\circ}$ C下孵育10分钟。然后,进行了B/F分离以及清洗。清洗后,向反应槽中,分注含有AMPPD的基质液(Lumipulse G底物液,富士瑞必欧株式会社制造)200 μ L,搅拌后,37 $^{\circ}$ C下反应5分钟,发光量用光度计测定,得到了计数值。

[0098] 另外,对于将脑脊髓液检体以缓冲液稀释的样品(LoB,LoQ1~LoQ5)也进行同样的测定,得到了计数值。

[0099] 结果如表2所示。表2中,确定了两个测定系,并表示测定计数值、S/N比、LoQ(定量限界值)。各标准溶液(CAL)的计数值以二重测定得到的标准溶液计数值的平均值表示。样品的计数值,以n=10时测定样品得到的计数值的平均值表示。S/N比是以600pg/mL的计数

值与空白 (0pg/mL) 的计数值的比而求出的。需要说明的是,600pg/mL的计数值是从标准溶液的计数值中算出的。

[0100] 图1(杂合偶联物)以及图2(抗体混合物)绘制了基于以各标准溶液的平均计数值和浓度作成的标准曲线而算出的各样品(LoQ1~LoQ5)的浓度和对各样品(LoQ1~LoQ5)以n=10时测定的计数值的变动系数(CV)。在图1及图2中,基于精确曲线(precision profile),求出了对于两个测定系的LoQ(CV20%)。

[0101] 其结果,关于总tau蛋白质,杂合偶联物的使用,与各标记抗体的混合物相比,表现出非常高的计数值,S/N比也是杂合偶联物的组比各标记抗体的混合物增加了约6倍。进一步而言,使用了杂合偶联物时的LoQ,与使用各标记抗体的混合物时的LoQ相比,为约1/10。由此可知,通过使用杂合偶联物,能够定量低浓度的总tau蛋白质。

[0102] 以上的结果显示了,在总tau蛋白质测定系中,能够通过使用杂合偶联物,构建高灵敏度且稳定的测定系。

[0103] [表2]

[0104] 使用杂合偶联物和抗体混合物的总Tau蛋白质的测定

[0105]

杂合偶联物			抗体混合物(2阶段偶联物) (偶联物1: BT2-bio+HT7-bio) (偶联物2: SA-ALP)		
	pg/mL	计数值		pg/mL	计数值
CAL	0	744	CAL	0	409
	101	9281		60	514
	213	17613		150	817
	667	50422		420	2672
	1037	83604		900	7069
	2639	211131		2250	38069
	样品名	计数值		样品名	计数值
样品	LoB	728	样品	LoB	408
	LoQ 1	982		LoQ 1	455
	LoQ 2	1159		LoQ 2	585
	LoQ 3	1602		LoQ 3	641
	LoQ 4	1966		LoQ 4	694
	LoQ 5	2385		LoQ 5	858
S/N	600/0	60.6	S/N	600/0	10
LoQ (20%CV)		5.1	LoQ (20%CV)		69.1

[0106] 实施例5:牛血清白蛋白(BSA)连结杂合偶联物的制作1

[0107] 将牛血清白蛋白(BSA)和GMBS以摩尔比1:10混合,30℃下孵育1小时,进行BSA的马来酰亚胺化。脱盐后,将实施例1中得到的BT2的Fab'片段和HT7的Fab'片段的混合物和马来酰亚胺化BSA,以摩尔比2:1混合,25℃下孵育1小时,进行了偶联。偶联反应通过添加2-MEA盐酸盐而停止,进一步在25℃下孵育了30分钟。接着,通过添加0.5M碘乙酰胺,25℃下孵育30分钟,淬灭反应,得到了偶联物反应混合物。

[0108] 将得到的偶联物反应混合物,添加至以磷酸缓冲液(pH6.8)进行了平衡化的HiLoad Superdex200柱(GE Healthcare bioscience公司制造)中,进行了抗体的凝胶过滤纯化。在得到的级分的吸光度280nm处的多个的峰中,合并对于1个BSA结合2个以上的Fab'

的级分,得到了BSA连结杂合偶联物。

[0109] 将得到的BSA连结杂合偶联物和NHS-PEG4-Biotin(Thermo Fisher公司制造)以摩尔比1:30混合,在25℃下孵育45分钟进行了BSA连结杂合偶联物的生物素化。进一步进行脱盐处理,得到了生物素化BSA连结杂合偶联物1。进一步,在50mM MOPS缓冲液(150mM氯化钠、1.0%BSA、pH6.8)中稀释至0.4μg/mL,将碱性磷酸酶标记链霉亲和素(ALP-SA)(链霉亲和素酶联接体(Streptavidin,Alkaline Phosphatase Conjugate),Invitrogen公司制造)以0.4μg/mL的浓度添加,得到了含有以ALP标记的BSA连结杂合偶联物1的反应溶液(杂合偶联物反应溶液1)。

[0110] 实施例6:BSA连结杂合偶联物的制作2

[0111] 向BSA中添加2-MEA盐酸盐,37℃下孵育60分钟,进行了还原(硫醇化)。进一步进行脱盐处理,得到了硫醇化BSA。进一步,将硫醇化BSA和NHS-PEG4-Biotin(Thermo Fisher公司制造)以摩尔比1:25,硫醇化BSA和1,2-双(马来酰亚胺)乙烷(东京化成工业社制)以摩尔比1:350混合,在30℃下孵育1小时,同时进行BSA的生物素化、马来酰亚胺化。脱盐后,将实施例1中得到的BT2的Fab'片段和HT7的Fab'片段的混合物与生物素化马来酰亚胺化BSA,以摩尔比2:1混合,在25℃下孵育1小时,进行了偶联。偶联反应通过添加2-MEA盐酸盐而停止,进一步25℃下孵育了30分钟。接着,通过添加0.5M碘乙酰胺,25℃下孵育30分钟,淬灭反应,得到了生物素化BSA连结杂合偶联物2。

[0112] 将得到的生物素化BSA连结杂合偶联物2在50mM MOPS缓冲液(150mM氯化钠、1.0%BSA、pH6.8)中稀释至0.2μg/mL,将ALP-SA(链霉亲和素酶联接体(Streptavidin,Alkaline Phosphatase Conjugate),Invitrogen公司制造)以0.4μg/mL的浓度添加,得到了包含以ALP标记的BSA连结杂合偶联物2的反应溶液(杂合偶联物反应溶液2)。

[0113] 比较例2:BSA连结单一单克隆抗体的制作

[0114] 将单克隆抗体BT2和胃蛋白酶在柠檬酸缓冲液(pH3.5)中混合,37℃孵育1小时进行了胃蛋白酶消化。反应停止后,使用Superdex 200柱(GE Healthcare bioscience公司制造)进行凝胶过滤纯化,得到了F(ab')₂片段。然后,确定经过纯化的F(ab')₂片段的浓度,根据需要,将浓度调整至2.5mg/mL。

[0115] 将得到的BT2的F(ab')₂片段,用2-MEA盐酸盐,37℃下孵育90分钟,进行还原,得到了BT2的Fab'片段。

[0116] 另一方面,将脱盐了的BSA和GMBS以摩尔比1:10混合,30℃下孵育1小时,进行BSA的马来酰亚胺化。脱盐后,将BT2的Fab'片段和马来酰亚胺化BSA,以摩尔比2:1的比例混合,25℃下孵育1小时,进行了偶联。偶联反应通过添加2-MEA盐酸盐而停止,进一步25℃下孵育了30分钟。接着,通过添加0.5M碘乙酰胺,25℃下孵育30分钟,淬灭反应,得到了BSA连结BT2 Fab'片段。

[0117] 将得到的BSA连结BT2 Fab'片段,用磷酸缓冲液(pH6.8)进行了平衡化的Superdex 200柱(GE Healthcare bioscience公司制造)进行了凝胶过滤纯化。在得到的组分的吸光度280nm处的多个峰中,合并了对于1个ALP结合了2个以上的Fab'片段的级分。

[0118] BSA连结HT7 Fab'片段与BSA连结BT2 Fab'片段同样地制备。

[0119] 将得到的BSA连结BT2 Fab'片段以及BSA连结HT7 Fab'片段在50mM MOPS缓冲液(150mM氯化钠,1.0%BSA,pH6.8)中分别稀释至0.2μg/mL,将ALP-SA(链霉亲和素酶联接体

(Streptavidin, Alkaline Phosphatase Conjugate), Invitrogen公司制造)以0.4 μ g/mL的浓度添加,得到了ALP标记BSA连结BT2 Fab'片段和ALP标记BSA连结BT2 Fab'片段的混合物(混合偶联物反应溶液)。

[0120] 实施例7:磷酸化Tau肽的测定

[0121] 将tau蛋白质的第181号的苏氨酸被磷酸化的磷酸化Tau肽抗原,用100mM Tris缓冲液稀释,制备各浓度为0、40、100、200、400pg/mL的磷酸化Tau标准溶液。

[0122] 实施例2中制作的AT270结合磁性粒子液150 μ L和经过稀释的磷酸化Tau标准溶液30 μ L分注至反应槽,搅拌后37 $^{\circ}$ C下孵育10分钟。然后,进行了B/F分离以及清洗。清洗使用了“Lumipulse G(注册商标)”专用清洗液(Lumipulse G Wash Solution, Fujirebio株式会社制造)。清洗后,向反应槽中,分注250 μ L实施例5中制作的杂合偶联物反应溶液1或实施例6中制作的杂合偶联物反应溶液2,37 $^{\circ}$ C下孵育10分钟。然后,进行了B/F分离以及清洗。清洗后,向反应槽中,分注含有AMPPD的基质液(Lumipulse G底物液, Fujirebio株式会社制造)200 μ L,搅拌后,37 $^{\circ}$ C下反应5分钟,发光量用光度计测定,得到了计数值。实际的测定使用全自动化学发光酶免疫测定系统“Lumipulse G”(Fujirebio株式会社制造)进行。

[0123] 作为对照,作为杂合偶联物反应溶液的替代,使用比较例2中制作的混合偶联物反应溶液,同样地测定标准溶液,求出了计数值。

[0124] 结果如表3所示。各磷酸化Tau标准溶液的计数值以二重测定得到的计数值的平均值表示。另外,分别求出40pg/mL中的计数值与0pg/mL中的计数值的比率(S/N比)。其结果,使用混合偶联物反应溶液时显示低计数值。另一方面,使用杂合偶联物反应溶液1以及杂合偶联物反应溶液2时,对于低浓度的标准溶液也显示非常高的计数值。作为结果,确认了最低的标准溶液(40pg/mL)的计数值与空白(0pg/mL)的计数值的比(S/N比),使用杂合偶联物反应溶液1时,与使用混合偶联物反应溶液(ALP标记单一抗体的混合物)时相比高约9倍,另外,使用杂合偶联物反应溶液2时,比使用混合偶联物反应溶液时高约13倍。

[0125] 高的S/N比是为了得到稳定的测定系统且得到高的灵敏度的重要要素,其显示了通过使用杂合偶联物,能够构建高灵敏度且稳定的测定系统。

[0126] [表3]

[0127] 使用杂合偶联物和单一抗体的混合偶联物的磷酸化Tau的测定

[0128]

标准溶液抗原浓度 (pg/mL)	计数值		
	杂合偶联物		混合偶联物 (单一抗体2种)
	杂合偶联物1	杂合偶联物2	
0	312	278	205
40	3114	3966	226
100	7394	10057	259
200	14380	19254	317
400	28700	37283	447
S/N (40/0)	10.0	14.3	1.1

SEQUENCE LISTING

<110> 富士瑞必欧株式会社

<120> 抗体偶联物

<130> RB-R011871

<150> JP2018-219558

<151> 2018-11-22

<160> 5

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 441

<212> PRT

<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 1

```

Met Ala Glu Pro Arg Gln Glu Phe Glu Val Met Glu Asp His Ala Gly
1           5           10           15
Thr Tyr Gly Leu Gly Asp Arg Lys Asp Gln Gly Gly Tyr Thr Met His
           20           25           30
Gln Asp Gln Glu Gly Asp Thr Asp Ala Gly Leu Lys Glu Ser Pro Leu
           35           40           45
Gln Thr Pro Thr Glu Asp Gly Ser Glu Glu Pro Gly Ser Glu Thr Ser
           50           55           60
Asp Ala Lys Ser Thr Pro Thr Ala Glu Asp Val Thr Ala Pro Leu Val
65           70           75           80
Asp Glu Gly Ala Pro Gly Lys Gln Ala Ala Ala Gln Pro His Thr Glu
           85           90           95
Ile Pro Glu Gly Thr Thr Ala Glu Glu Ala Gly Ile Gly Asp Thr Pro
           100          105          110
Ser Leu Glu Asp Glu Ala Ala Gly His Val Thr Gln Ala Arg Met Val
           115          120          125
Ser Lys Ser Lys Asp Gly Thr Gly Ser Asp Asp Lys Lys Ala Lys Gly
           130          135          140
Ala Asp Gly Lys Thr Lys Ile Ala Thr Pro Arg Gly Ala Ala Pro Pro
145          150          155          160
Gly Gln Lys Gly Gln Ala Asn Ala Thr Arg Ile Pro Ala Lys Thr Pro
           165          170          175
Pro Ala Pro Lys Thr Pro Pro Ser Ser Gly Glu Pro Pro Lys Ser Gly
           180          185          190
Asp Arg Ser Gly Tyr Ser Ser Pro Gly Ser Pro Gly Thr Pro Gly Ser

```

195	200	205
Arg Ser Arg Thr Pro Ser Leu Pro Thr Pro Pro Thr Arg Glu Pro Lys		
210	215	220
Lys Val Ala Val Val Arg Thr Pro Pro Lys Ser Pro Ser Ser Ala Lys		
225	230	235
Ser Arg Leu Gln Thr Ala Pro Val Pro Met Pro Asp Leu Lys Asn Val		
245	250	255
Lys Ser Lys Ile Gly Ser Thr Glu Asn Leu Lys His Gln Pro Gly Gly		
260	265	270
Gly Lys Val Gln Ile Ile Asn Lys Lys Leu Asp Leu Ser Asn Val Gln		
275	280	285
Ser Lys Cys Gly Ser Lys Asp Asn Ile Lys His Val Pro Gly Gly Gly		
290	295	300
Ser Val Gln Ile Val Tyr Lys Pro Val Asp Leu Ser Lys Val Thr Ser		
305	310	315
Lys Cys Gly Ser Leu Gly Asn Ile His His Lys Pro Gly Gly Gly Gln		
325	330	335
Val Glu Val Lys Ser Glu Lys Leu Asp Phe Lys Asp Arg Val Gln Ser		
340	345	350
Lys Ile Gly Ser Leu Asp Asn Ile Thr His Val Pro Gly Gly Gly Asn		
355	360	365
Lys Lys Ile Glu Thr His Lys Leu Thr Phe Arg Glu Asn Ala Lys Ala		
370	375	380
Lys Thr Asp His Gly Ala Glu Ile Val Tyr Lys Ser Pro Val Val Ser		
385	390	395
Gly Asp Thr Ser Pro Arg His Leu Ser Asn Val Ser Ser Thr Gly Ser		
405	410	415
Ile Asp Met Val Asp Ser Pro Gln Leu Ala Thr Leu Ala Asp Glu Val		
420	425	430
Ser Ala Ser Leu Ala Lys Gln Gly Leu		
435	440	

<210> 2

<211> 5

<212> PRT

<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 2

Pro Pro Gly Gln Lys

1 5

<210> 3

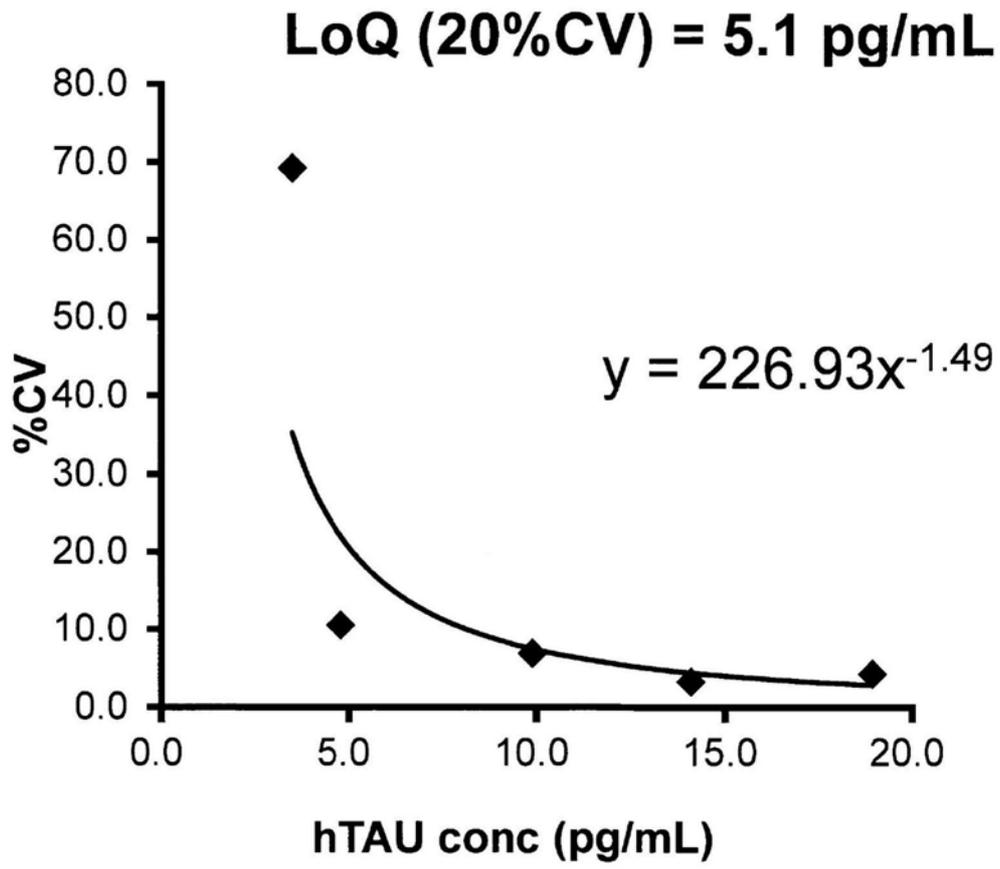


图1

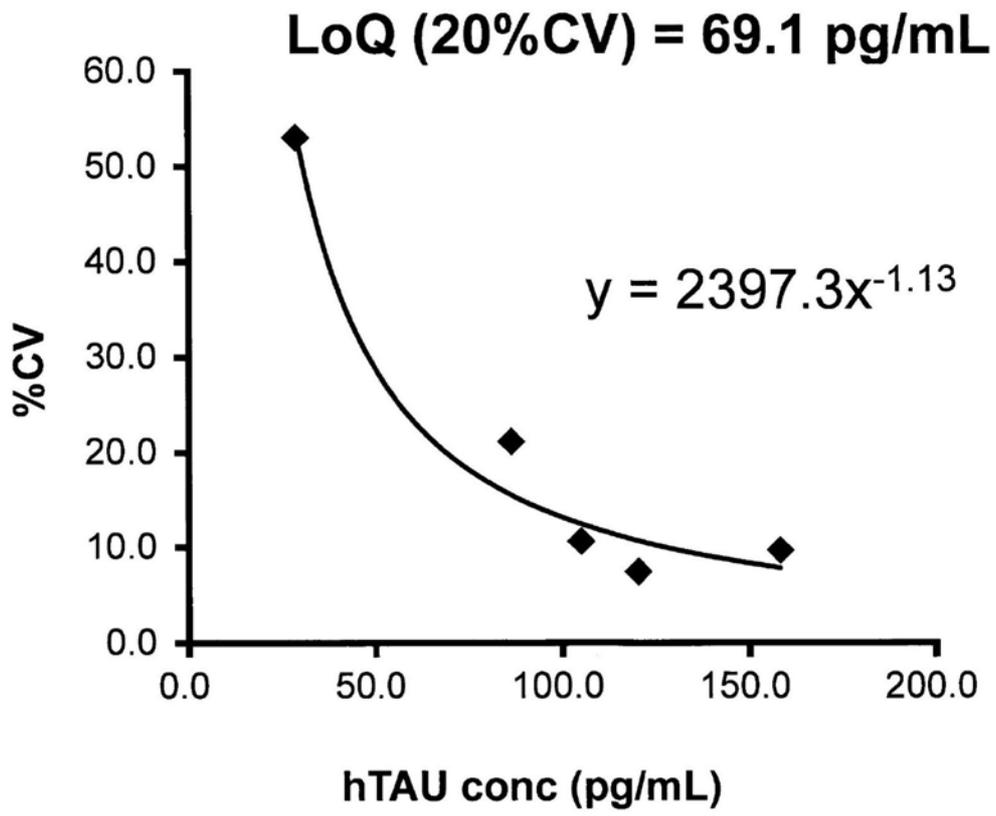


图2