

(12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织
国际局

(43) 国际公布日
2020 年 4 月 16 日 (16.04.2020)



(10) 国际公布号
WO 2020/073553 A1

(51) 国际专利分类号:
C12N 9/50 (2006.01) *C12N 15/62* (2006.01)
C07K 19/00 (2006.01) *C12N 15/70* (2006.01)
C12N 15/57 (2006.01)

(21) 国际申请号: PCT/CN2019/071417

(22) 国际申请日: 2019 年 1 月 11 日 (11.01.2019)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(30) 优先权:
201811177105.9 2018 年 10 月 10 日 (10.10.2018) CN
201811540344.6 2018 年 12 月 17 日 (17.12.2018) CN

(71) 申请人: 上饶市康可得生物科技有限公司(SHANGRAO CONCORD PHARMACEUTICAL CO., LTD.) [CN/CN]; 中国江西省上饶市上

饶经济技术开发区管委会登峰大厦 1802 室, Jiangxi 334000 (CN)。

(72) 发明人: 刘日魁 (LIU, Rikui); 中国江西省上饶市上饶经济技术开发区管委会登峰大厦 1802 室, Jiangxi 334000 (CN)。邹晓龙 (ZOU, Xiaolong); 中国江西省上饶市上饶经济技术开发区管委会登峰大厦 1802 室, Jiangxi 334000 (CN)。万江华 (WAN, Jianghua); 中国江西省上饶市上饶经济技术开发区管委会登峰大厦 1802 室, Jiangxi 334000 (CN)。

(74) 代理人: 北京市柳沈律师事务所 (LIU, SHEN & ASSOCIATES); 中国北京市海淀区彩和坊路 10 号 1 号楼 10 层, Beijing 100080 (CN)。

(81) 指定国 (除另有指明, 要求每一种可提供的国家保护): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB,

(54) Title: METHOD FOR SCREENING PROTEASE VARIANT AND OBTAINED PROTEASE VARIANT

(54) 发明名称: 筛选蛋白酶变体的方法以及获得的蛋白酶变体

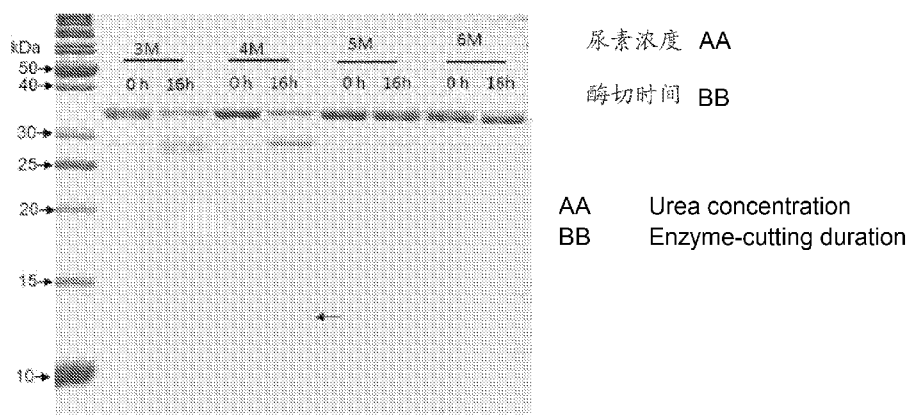


图 1

(57) Abstract: The present invention relates to a method for screening a protease variant and the obtained protease variant, and the protease variant has a special performance. The method for screening the protease variant comprises the following steps: (1) constructing a protease random mutation library, optimizing a protease random mutation virus library, and optimizing a protease random mutation phage library; (2) for the protease random mutation library, optimizing the protease random mutation virus library, and optimizing the protease random mutation phage library and screening a protease variant having weak protease enzyme-cutting activity in a host or a similar condition and having protease enzyme-cutting activity in an in vitro denaturation condition; and (3) the step of optionally characterizing the protease variant, wherein the protease optimizes TEV protease or enterokinase. The protease variant in the present invention facilitates industrial production of protein.

GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW。

(84) 指定国(除另有指明, 要求每一种可提供的地区保护): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 欧洲 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG)。

本国际公布:

- 包括国际检索报告(条约第21条(3))。
- 包括说明书序列表部分(细则5.2(a))。

(57) 摘要: 本发明涉及筛选蛋白酶变体的方法以及获得的蛋白酶变体, 所述蛋白酶变体具有特殊性能。所述筛选蛋白酶变体的方法包括以下步骤: (1) 构建蛋白酶随机突变文库, 优选蛋白酶随机突变病毒文库, 优选蛋白酶随机突变噬菌体文库; (2) 对所述蛋白酶随机突变文库, 优选蛋白酶随机突变病毒文库, 优选蛋白酶随机突变噬菌体文库筛选在宿主内或类似的条件下蛋白酶酶切活性弱且在体外变性条件下有蛋白酶酶切活性的蛋白酶变体; 以及 (3) 任选地表征蛋白酶变体的步骤, 其中所述蛋白酶优选是TEV蛋白酶或肠激酶。本发明的蛋白酶变体有利于蛋白质的工业化生产。

筛选蛋白酶变体的方法以及获得的蛋白酶变体

5 本申请要求 2018 年 10 月 10 日提交的、发明名称“TEV 蛋白酶变体、其融合蛋白及制备方法和用途”的中国发明专利申请 No. 201811177105.9 和 2018 年 12 月 17 日提交的发明名称为“筛选蛋白酶变体的方法以及获得的蛋白酶变体”的中国发明专利申请 No. 201811540344.6 的优先权权益，它们的全部内容通过引用并入。

10 技术领域

本发明涉及蛋白质领域，具体地涉及筛选 TEV 蛋白酶变体的方法以及 TEV 蛋白酶变体。

背景技术

15 TEV 蛋白酶(TEV Protease)是来源于烟草蚀纹病毒(TEV)的 NIa 蛋白酶中 27kDa 的活性结构域，其氨基酸序列如 SEQ ID NO. 1 所示。TEV 蛋白酶具有很强的位点特异性，能够识别 EXXYXQ(G/S)七氨基酸序列，最常用序列的是 Glu-Asn-Leu-Tyr-Phe-Gln-Gly(或 ENLYFQG)，其切割位点在谷氨酰胺 Gln (P1)和甘氨酸 Gly (P1')之间(即 P1 和 P1'之间)，其序列专一性远
20 比凝血酶、因子 Xa、胰激酶等蛋白酶高。

TEV 蛋白酶能够耐受范围广泛的 pH (pH 4-8.5)和温度(4-34°C)，对一些常见的增加蛋白可溶性或稳定性的添加剂(乙二醇、EGTA、去垢剂以及还原剂)也都有不同程度的耐受。有研究证明，TEV 蛋白酶对乙二醇、EGTA 和一些除垢剂(Triton X-100、Tween-20 和 NP-40)不敏感，当 1%
25 CHAPS 存在时活性降低，在低浓度变性剂(2 M 尿素, 1% SDS)和还原剂(0.7 M β -巯基乙醇)中依旧可以保持大部分活性(C. Sun et al., 2012)。

野生型 TEV 酶在表达和溶解性等方面存在一定的缺陷，所以通过基因工程技术改良的突变体有大量报道。例如，天然的 TEV 蛋白酶会发生自我切割，在表达和纯化过程中，它会不断由于其它 TEV 蛋白酶的碰撞而发生构象变

化,在特定位点发生自我切割,从而使完整的蛋白酶被截短,活性大大降低。Lucast等人找到的S219N突变体,稳定性得到很大的提高,但是可溶性并不高,有大约95%的蛋白是以包涵体的形式存在于沉淀中。Kapust等人使用基因工程点突变了天然TEV蛋白酶的基因序列,得到S219V这一稳定性较高并且酶活性也有稍微提高的突变体,其稳定性比S219N要高出约100倍。其次,TEV蛋白酶表达产量不高,溶解度也非常低。大约只有5%的TEV蛋白酶存在于细胞破碎液的上清中,产量为12.5mg/L。Van den Berg等人通过基因改组(DNA shuffling)、易错PCR(error-prone PCR)发现了一种可以将产量提高到54mg/L的突变体TEVSH,其溶解度比S219N有很大提高,并且酶活性变化不大。Cabrita, L.D.等人使用PoPMuSiC软件设计,对TEV蛋白酶单点突变体进行稳定性分析,筛选出了五个突变体,它们的可溶性和酶活性相对于野生型TEV蛋白酶都得到提升,同时还得到一个双突变体,其可溶性及酶活性相对于单突变体有显著提高。针对TEV蛋白酶本身的缺点,研究者一直在寻找改良的突变体。例如,TEV Ser135Gly突变体比WT更稳定,可以耐受对更高的温度(>40℃);还有一些突变(T17S, N68D, N177V)可以显著提高TEV蛋白酶的溶解性。

目前TEV蛋白酶的筛选方法主要关注提高TEV蛋白酶的酶活性、溶解度和产量等性质。尚未报道如本申请的TEV蛋白酶的筛选方法。

20 发明内容

本发明至少部分基于发明人在多肽药物生产过程中的发现:目前常规的TEV蛋白酶会在表达过程中大量切割融合蛋白(自我酶切),导致多肽被提前释放,容易被胞内蛋白酶水解,不利于纯化,不适合工业化生产;常规TEV蛋白酶虽然在低浓度变性剂中(2 M 尿素, 1% SDS)依旧可以保持大部分活性(C. Sun et al., 2012),但是有很多蛋白在2M 尿素等低浓度变性条件下往往是不能完全溶解的,这就限制了TEV蛋白酶的使用。对此,发明人提供了以下新的筛选方法来寻找适合于解决该问题的TEV蛋白酶变体。

本发明提供了筛选蛋白酶变体的方法,其包括以下步骤:

30 (1) 构建蛋白酶随机突变文库,优选蛋白酶随机突变病毒文库,优选

蛋白酶随机突变噬菌体文库；

(2) 对所述蛋白酶随机突变文库，优选蛋白酶随机突变病毒文库，优选蛋白酶随机突变噬菌体文库筛选在宿主内或类似的条件下蛋白酶酶切活性弱且在体外变性条件下有蛋白酶酶切活性的蛋白酶变体；以及

5 (3) 任选地表征蛋白酶变体的步骤，

其中所述蛋白酶优选是TEV蛋白酶或肠激酶。

在一个实施方案中，方法还包括使用随机突变试剂盒产生所述突变文库。

10 在一个实施方案中，在步骤(1)中以合适的蛋白酶模板，例如 TEV 蛋白酶模板，例如具有以 SEQ ID NO.10 所示的氨基酸序列的 S219V TEV 蛋白酶为模板进行随机突变来构建所述文库。

在一个实施方案中，蛋白酶变体与初始蛋白酶相比在宿主内或类似的条件下具有更低的酶切活性且在体外变性条件下保留初始蛋白酶的酶切活性。

15 在一个实施方案中，TEV 蛋白酶变体与具有以 SEQ ID NO.10 所示的氨基酸序列的 S219V 蛋白酶相比在宿主内或类似的条件下具有更低的酶切活性且在体外变性条件下保留以 SEQ ID NO.10 所示的氨基酸序列的 S219V 蛋白酶的酶切活性。

20 在一个实施方案中，以包含蛋白酶-蛋白酶切割序列-Y1，例如 TEVp-sTEV-Y1 的融合蛋白形式展示蛋白酶变体，优选 TEV 蛋白酶变体，优选在噬菌体表面展示蛋白酶变体，优选 TEV 蛋白酶变体，其中 TEVp 是 TEV 蛋白酶，sTEV 为 TEV 蛋白酶切割序列，以及 Y1 是感兴趣的蛋白质；优选地其中所述 TEV 蛋白酶切割序列是 EXXYXQG/S/H，其中 X 为任意氨基酸残基，优选所述 TEV 蛋白酶切割序列选自 SEQ ID NO: 7 和 8。

25 在一个实施方案中，方法包括在宿主内对所述蛋白酶变体，优选 TEV 蛋白酶变体的 N 端直接或通过接头间接添加部分 A。

在一个实施方案中，部分 A 是以下一种：亲和标签、生物素、抗体、抗原、半抗原、聚链霉亲和素、配体、受体、核酸、酶、底物和适体。

30 在一个实施方案中，方法包括将添加有 A 的噬菌体文库在适合于所述蛋白酶的体外条件下与用特异性针对部分 A 的部分 B 固定化的固体支持物孵育一段时间，并且分离支持物与含有目的噬菌体的溶液，任选地对所述

目的噬菌体重复筛选一次或多次。

在一个实施方案中，部分 B 是以下一种：生物素、抗体、抗原、半抗原、聚链霉亲和素、配体、受体、核酸、酶、底物和适体，条件是部分 B 特异性结合部分 A。

- 5 在一个实施方案中，以 Avi-蛋白酶-蛋白酶切割位点-Y1-PIII，优选通过 pHEN1-Avi-TEVp-sTEV-Y1 构建体以 Avi-TEVp-sTEV-Y1-PIII 方式将蛋白酶，优选 TEV 蛋白酶展示于噬菌体 PIII 蛋白末端，其中 Avi 标签是由 15 个氨基酸残基 GLNDIFEAQKIEWHE 组成的短肽标签；优选地其中所述 TEV 蛋白酶切割序列是 EXXYXQG/S/H，其中 X 为任意氨基酸残基，优选
- 10 所述 TEV 蛋白酶切割序列选自 SEQ ID NO: 7 和 8。

在一个实施方案中，酶切活性是对包含所述蛋白酶及其切割序列，例如蛋白酶-蛋白酶切割序列-Y1，优选包含所述 TEV 蛋白酶变体及其切割序列的融合蛋白，优选 TEVp-sTEV-Y1 测定的。

- 15 在一个实施方案中，筛选包括在宿主内将所述蛋白酶，优选 TEV 蛋白酶随机突变噬菌体文库生物素化。

在一个实施方案中，筛选包括用链霉亲和素磁珠处理经生物素化的噬菌体文库，将被磁珠捕获的噬菌体置于中高浓度尿素中孵育一段时间，并且分离磁珠与含有目的噬菌体的溶液，任选地对所述目的噬菌体重复筛选一次或多次，

- 20 在一个实施方案中，通过菌落PCR进行验证所述文库。在一个实施方案中，所述菌落 PCR 使用的引物为：上游引物：5'-CCACCATGGCCGGTCTGAATGATATTTTGAAGC-3'

下游引物：5'-TTGTTCTGCGGCCGCAAATTCCAGC-3'。

- 25 在一个实施方案中，文库容量达到 1×10^9 以上，优选 2×10^9 ；优选整体突变频率为中低程度 1.5-7 个/kb。

在一个实施方案中，Y1 是人或猪 ACTH 或 GLP-1。在一个实施方案中，所述宿主是大肠杆菌。

- 30 在一个实施方案中，体外变性条件是中高程度变性条件，优选在 3M-5M 尿素，优选 3.5M-4.5M 尿素，更优选 4M 尿素或 1M-2M 盐酸胍，优选 1.5M 的盐酸胍的条件。

本发明提供了通过本发明的方法获得的蛋白酶变体。在一个实施方案

中,所述蛋白酶变体在宿主内表达过程中具有低酶切活性,优选所述 TEV 蛋白酶变体与具有以 SEQ ID NO.10 所示的氨基酸序列的 S219V 变体相比更低的酶切活性,所述 TEV 蛋白酶变体的切割序列选自 EXXYXQG/S/H,其中 X 为任意氨基酸残基,优选所述 TEV 蛋白酶切割序列选自 SEQ ID NO: 7 和 8;优选地所述蛋白酶变体或 TEV 蛋白酶变体在中高程度变性条件下,优选在 3M-5M 尿素,优选 3.5M-4.5M 尿素,更优选 4M 尿素或 1M-2M 盐酸胍,优选 1.5M 的盐酸胍的体外环境下保留初始蛋白酶,例如 S219V 蛋白酶的体外酶切活性;优选地所述酶切活性是对包含所述蛋白酶变体及其切割序列,例如蛋白酶-蛋白酶切割序列-Y1,优选包含所述 TEV 蛋白酶变体及其切割序列的融合蛋白测定的,优选所述 TEV 蛋白酶切割序列是 EXXYXQG/S/H,其中 X 为任意氨基酸残基,优选所述 TEV 蛋白酶切割序列选自 SEQ ID NO: 7 和 8。

在一个实施方案中,TEV 蛋白酶变体包含选自下组的一种或多种突变:

15 与 SEQ ID NO: 1 所示序列的第 111 位对应的位置处由亮氨酸(L)变为苯丙氨酸(F)或组氨酸(H)的突变;

与 SEQ ID NO: 1 所示序列的第 138 位对应的位置处由异亮氨酸(I)变为赖氨酸(K)的突变;

20 与 SEQ ID NO: 1 所示序列的第 28 位对应的位置处由组氨酸(H)变为亮氨酸(L)的突变;

与 SEQ ID NO: 1 所示序列的第 196 位对应的位置处由谷氨酸(Q)变为组氨酸(H)的突变;

与 SEQ ID NO: 1 所示序列的第 135 位对应的位置处由丝氨酸(S)变为甘氨酸(G)的突变; 和

25 与 SEQ ID NO: 1 所示序列的第 187 位对应的位置处蛋氨酸(M)变为异亮氨酸(I)的突变;

优选地,其中所述 TEV 蛋白酶变体包含选自以下的突变组合:

与 SEQ ID NO: 1 所示序列的第 111 位对应的位置处由亮氨酸(L)变为苯丙氨酸(F)的突变和与 SEQ ID NO: 1 所示序列的第 138 位对应的位置处
30 由异亮氨酸(I)变为赖氨酸(K)的突变;

与 SEQ ID NO: 1 所示序列的第 28 位对应的位置处由组氨酸(H)变为亮

氨酸(L)的突变、与 SEQ ID NO: 1 所示序列的第 111 位对应的位置处由亮氨酸(L)变为苯丙氨酸(F)的突变和与 SEQ ID NO: 1 所示序列的第 196 位对应的位置处由谷氨酸(Q)变为组氨酸(H)的突变；和

与 SEQ ID NO: 1 所示序列的第 111 位对应的位置处由亮氨酸(L)变为组氨酸(H)的突变、与 SEQ ID NO: 1 所示序列的第 135 位对应的位置处由丝氨酸(S)变为甘氨酸(G)的突变和与 SEQ ID NO: 1 所示序列的第 187 位对应的位置处蛋氨酸(M)变为异亮氨酸(I)的突变；优选地，所述 TEV 蛋白酶变体包含与 SEQ ID NO: 1 所示序列的第 219 位对应的位置处由丝氨酸(S)变为缬氨酸(V)的突变；优选其中所述 TEV 蛋白酶进一步包含一个或多个除上述突变以外的突变，条件是所述 TEV 蛋白酶变体在宿主内表达过程中具有低酶切活性，优选地与具有以 SEQ ID NO.10 所示的氨基酸序列的 S219V 变体相比更低的酶切活性和/或所述 TEV 蛋白酶变体在中高程度变性条件下，优选在 3M-5M 尿素，优选 3.5M-4.5M 尿素，更优选 4M 尿素或 1M-2M 盐酸胍，优选 1.5M 的盐酸胍的体外环境下具有高酶切活性，优选保留 S219V 变体的体外酶切活性。

在一个实施方案中，同源物包含与 SEQ ID NO: 4、5 或 6 具有至少 90%，优选至少 95%，更优选至少 98%，最优选至少 99% 序列同一性的氨基酸序列；优选地，其中所述同源物包含与 SEQ ID NO: 4、5 或 6 具有至少 1 个，优选至少 2 个，更优选至少 3 个，最优选至少 4 个氨基酸位点的取代、缺失或添加的氨基酸序列；优选地其中所述同源物在宿主内表达过程中具有低酶切活性，优选与具有以 SEQ ID NO.10 所示的氨基酸序列的 S219V 变体相比更低的酶切活性和/或所述 TEV 蛋白酶变体在中高程度变性条件下，优选在 3M-5M 尿素，优选 3.5M-4.5M 尿素，更优选 4M 尿素或 1M-2M 盐酸胍，优选 1.5M 的盐酸胍的体外环境下保留 S219V 变体的体外酶切活性。

本发明提供了融合蛋白。融合蛋白包含根据本发明的蛋白酶变体；优选地所述融合蛋白包含结构蛋白酶-蛋白酶切割序列-Y1，优选 TEVp-sTEV-Y1，其中 Y1 为感兴趣的多肽；TEVp 为根据本发明的 TEV 蛋白酶变体；sTEV 为 TEV 蛋白酶切割序列，其是 EXXYXQG/S/H，其中 X 为任意氨基酸残基，优选所述切割序列选自 SEQ ID NO: 7 和 8；优选地其中感兴趣的多肽选自 ACTH、GLP-1/GLP-2、IFN- α 、IFN- γ 、Histatin、CCL5、SDF-1 α 、IGF-1、Leptin、BNP、Ex-4，优选 ACTH，优选人 ACTH，更优

选 SEQ ID NO.2 所示的氨基酸序列的人 ACTH; 优选其中蛋白酶变体与蛋白酶变体切割序列, 例如 TEVp 与 sTEV 是直接连接的或者相隔一个或多个氨基酸残基, 条件是蛋白酶变体, 例如 TEVp 能识别并切割蛋白酶变体切割序列, 例如 sTEV; 优选其中蛋白酶变体切割序列, 例如 sTEV 与 Y1 是直接连接的或者相隔一个或多个氨基酸残基, 条件是蛋白酶变体, 例如 TEVp 能识别并切割蛋白酶变体切割序列, 例如 sTEV, 优选地蛋白酶变体切割序列, 例如 sTEV 与 Y1 是直接连接的; 优选所述融合蛋白还包含标签, 优选其中所述标签为纯化标签; 优选所述标签选自下组: His 标签、麦芽糖结合蛋白(MBP)标签、谷胱甘肽转移酶(GST)标签、NusA 标签、SUMO 标签、Avi 标签、T7 标签、S 标签、Flag 标签、HA 标签、c-myc 标签、或 Strep II 标签; 优选其中所述标签在融合蛋白的 N 端和/或 C 端, 或者 TEVp 的 N 端无标签。

本发明提供了蛋白酶变体或融合蛋白的多核苷酸序列, 优选选自 SEQ ID NO. 14-16。

15 本发明提供了多核苷酸构建体, 其包含本发明的多核苷酸序列。

本发明提供了表达载体, 其包含根据本发明的多核苷酸序列或本发明的多核苷酸构建体。优选地, 所述表达载体为真核生物表达载体或原核生物表达载体; 优选地选自下组: pRS314、pYES2、杆状病毒-S2 表达系统和 pcDNA3.1 或优选选自下组: pET 系列表达载体、pQE 系列表达载体和 pBAD 系列表达载体。

20 本发明提供了细胞, 其包含根据本发明的多核苷酸序列、根据本发明的多核苷酸构建体或根据本发明的表达载体; 优选为真核细胞或原核细胞; 优选所述真核细胞选自下组: 酿酒酵母、昆虫细胞表达系统; 优选所述原核细胞选自下组: BL21、BL21(DE3)、BL21(DE3) pLysS、Rosetta2、Rosetta2 pLysS、Tuner(DE3)、或 Origami 2。

25 本发明提供了制备根据本发明的蛋白酶变体, 优选 TEV 蛋白酶变体的方法, 其包括:

- (1) 在适合于培养本发明的细胞的条件下在培养基中培养所述细胞;
- (2) 收获培养基, 或裂解细胞以收获裂解物;
- 30 (3) 纯化获得蛋白酶变体, 优选所述 TEV 蛋白酶变体。

本发明提供了根据本发明的蛋白酶变体, 优选 TEV 蛋白酶变体用于制

备感兴趣的多肽的用途，其中蛋白酶变体，优选所述 TEV 蛋白酶变体与所述感兴趣的多肽以融合蛋白形式表达，优选地，所述融合蛋白为本发明的融合蛋白。

本发明提供了制备感兴趣的多肽的方法，其包括：

- 5 (1) 在合适的条件下在培养基中培养本发明的融合蛋白；
- (2) 获得融合蛋白的包涵体；
- (3) 在高变性条件下，例如约 8M 尿素或约 6M 盐酸胍溶解包涵体；
- (4) 在中高程度变性条件下，优选在 3M-5M 尿素，优选 3.5M-4.5M 尿素，更优选 4M 尿素或 1M-2M 盐酸胍，优选 1.5M 的盐酸胍的条件下在一定的温度，例如 20-40℃，优选 25℃温育一段时间，例如 10-24 小时，例如 12 小时；
- 10 (5) 用缓冲液例如 Tris-HCl，优选 50mM Tris-HCl 稀释后沉淀蛋白酶变体，优选 TEV 蛋白酶；
- (6) 离心除去蛋白酶变体，优选 TEV 蛋白酶沉淀物，获得所述感兴趣的多肽；并且
- 15 (7) 纯化所述感兴趣的多肽，优选其中所述纯化用选自下组的技术进行：盐析、超滤、有机溶剂沉淀、凝胶过滤、离子交换层析柱、反相高效液相色谱。

通过本发明的筛选方法，发明人获得了新的 TEV 蛋白酶变体 4D、12D 和 32C，表明使用本发明的方法可以获得在宿主内 TEV 蛋白酶酶切活性弱且在体外变性条件下有 TEV 蛋白酶酶切活性的 TEV 蛋白酶变体。另外，当使用 TEV 蛋白酶识别序列 EXXYXQH 进行筛选时，还可以获得高效切割 ENLYFQ↓H 的 TEV 蛋白酶突变体。对于许多 N 端以组氨酸开头的多肽来说是期望的。

25 1. 本发明的 TEV 蛋白酶变体可以广泛用于生产各种具有天然 N 端的多肽或蛋白。

2. 本发明的 TEV 蛋白酶变体是通过筛选获得的，但是直接获得的突变体无法满足要求或部分满足要求。通过一系列的突变点组合，能获得具有独特的获得性能进一步提高的改良型突变体，例如 L111F 与其他位点组合，其特点是体内无或极低活性，但是体外中等变性条件下有较高活性。

30 3. 本发明的方法采用 DNA 重组技术和原核表达系统表达目的蛋白，

具有广泛的适用性。

4. 相比于猪脑垂体提取ACTH的方法，采用本发明的方法制备人源或猪源ACTH的生产成本比传统猪脑提取生产技术降低能达上百倍，极大地缩短了生产周期，节省了生产时间和成本，且不再依赖于大量生猪屠宰获得猪脑垂体，避免了使用猪源ACTH产生的免疫原性过敏反应等风险，大大提升药物安全性。而且本方法制备的ACTH与人体自身分泌的ACTH完全一样，具有极高氨基酸序列精准度和产品纯度，优异的生物活性，提高了药物疗效，降低了不良反应的发生。相比于化学有机合成的方法，本方法制备全长人源ACTH的难度和成本都显著降低，操作简单，不需要昂贵的催化剂和高压设备，产率高，适合大规模生产。总体而言，本方法生产工艺明确、简单，具有较好的可重复性，易于实现规模化生产，且降低了对环境的污染。

附图说明

- 图1: TEVP突变体12D在不同浓度尿素中酶切效率的SDS-PAGE凝胶考马斯亮蓝染色图。箭头表示目标蛋白。

图2: TEVP突变体4D在不同浓度尿素中酶切效率的SDS-PAGE凝胶考马斯亮蓝染色图。箭头表示目标蛋白。

图3: TEVP突变体32C在不同浓度尿素中酶切效率的SDS-PAGE凝胶考马斯亮蓝染色图。箭头表示目标蛋白。

- 图4A: TEVP突变体4D在不同浓度尿素中酶切效率的SDS-PAGE凝胶考马斯亮蓝染色图。图4B: 电泳条带灰度值比较。

图5: TEVP突变体4D、12D和32C的体内酶切活性、体外酶切活性与S219V的比较。箭头表示目标蛋白。

- 图6: TEVP突变体4D、12D、32C和S219V的融合蛋白在0.5M尿素中的溶解度检测。

图7: 质粒pET-28b-PD1-Avi图谱。

图8: 质粒pET-28b-ACTH图谱。

图9: 质粒Avi-TEV-sTEV-ACTH基因结构图。

图10: 质谱仪测定纯化后的ACTH的分子量。

图11: 体外法测定ACTH活性。

具体实施方式

为使本发明的目的、技术方案和优点更加清楚，下面将对本发明实施方式作进一步地详细描述，但本发明的实施方式不限于此。

如本文中使用时，术语“宿主”可以是任何适合表达蛋白质的真核或原核细胞。在一个实施方案中，宿主细胞是大肠杆菌细胞。

如本文中使用时，术语“体外变性条件”是指使含有 TEV 蛋白酶的融合蛋白溶解而具有酶切活性的条件，例如在 3M-5M 尿素，优选 3.5M-4.5M 尿素，更优选 4M 尿素或 1M-2M 盐酸胍，优选 1.5M 的盐酸胍的条件。

如本文中使用时，TEV 蛋白酶是来源于烟草蚀纹病毒(TEV)的 NIa 蛋白酶中 27kDa 的活性结构域。本文中使用以 SEQ ID NO. 10 所示的氨基酸序列的 S219V TEV 蛋白酶作为起始 TEV 蛋白酶。然而，本领域技术人员应当理解各种其它 TEV 蛋白酶可以用作本发明方法的起始 TEV 蛋白酶。TEV 蛋白酶具有很强的位点特异性，能够识别 EXXYXQ(G/S)七氨基酸序列，最常用序列的是 Glu-Asn-Leu-Tyr-Phe-Gln-Gly(或 ENLYFQG)，其切割位点在谷氨酰胺 Gln (P1)和甘氨酸 Gly (P1')之间(即 P1 和 P1'之间)，其序列专一性远比凝血酶、因子 Xa、胰激酶等蛋白酶高。

如本文中使用时，“TEV 蛋白酶变体”是指与筛选所用的起始 TEV 蛋白酶相比具有氨基酸残基差异的 TEV 蛋白酶，其中变体并不暗示 TEV 蛋白酶具有特定的序列和/或结构。

如本文中使用时，“TEV 蛋白酶酶切活性”是指 TEV 蛋白酶自身切割包含 TEV 蛋白酶及其切割位点的融合蛋白的酶切活性。在一个实施方案中，本发明的 TEV 蛋白酶酶切活性是对含有 EXXYXQ(G/S/H)的融合蛋白的切割活性。

在本文中使用噬菌体展示技术展示融合蛋白。噬菌体展示技术是将外源蛋白或多肽的 DNA 序列插入到噬菌体外壳蛋白结构基因的适当位置，使外源基因随外壳蛋白的表达而表达，同时，外源蛋白随噬菌体的重新组装而展示到噬菌体表面的生物技术。本领域技术人员应当理解使用其它 TEV 蛋白酶随机突变文库的选择对于本领域技术人员来进行本发明的方

法。

噬菌体展示系统可以是单链丝状噬菌体展示系统、 λ 噬菌体展示系统和 T4 噬菌体展示系统。在单链丝状噬菌体展示系统的情况下，可以是 PIII 展示系统和 PVIII 展示系统。在 λ 噬菌体展示系统的情况下，可以是 PV 展示系统和 D 蛋白展示系统。优选地，在一个实施方案中，噬菌体展示系统是 PIII 展示系统。

如本文中使用的，“部分 A”和“部分 B”指一对结合配偶体，例如选自生物素、抗体、抗原、半抗原、聚链霉亲和素、配体、受体、核酸、酶、底物和适体，条件是“部分 A”和“部分 B”彼此特异性结合。

在一个实施方案中，将含有部分 B 的固体支持物用于捕获含有部分 A 的融合蛋白。在一个实施方案中，当标签为生物素部分时，固体支持物可以是经过链霉亲和素涂覆的珠或树脂，诸如 Dynabeads M-280 链霉亲和素、Dynabeads MyOne 链霉亲和素、Dynabeads M-270 链霉亲和素 (Invitrogen)、链霉亲和素琼脂糖树脂 (Pierce)、链霉亲和素超联树脂、MagnaBind 链霉亲和素珠 (ThermoFisher Scientific)、BioMag 链霉亲和素、ProMag 链霉亲和素、二氧化硅链霉亲和素 (Bangs Laboratories)、高效链霉亲和素琼脂糖 (Streptavidin Sepharose High Performance) (GE Healthcare)、链霉亲和素聚苯乙烯微球体 (Microspheres- Nanospheres)、经过链霉亲和素涂覆的聚苯乙烯颗粒 (Spherotech) 或本领域技术人员常用于捕获生物素标记的分子的任何其它经过链霉亲和素涂覆的珠或树脂。

在一个实施方案中，可以以 Avi-TEVp-sTEV-Y1-PIII 方式将 TEV 蛋白酶展示于噬菌体 PIII 蛋白末端 (N 端)，其中 Avi 标签是由 15 个氨基酸残基 GLNDIFEAQKIEWHE 组成的短肽标签。通过在宿主表达过程中，通过 Avi 标签将 Avi-TEVp-sTEV-Y1-PIII 生物素化。

如本文中使用的，“肠激酶”是存在于哺乳动物十二指肠内的一种异源二聚体丝氨酸蛋白酶。肠激酶的酶切位点是公知的例如 DDDDK，肠激酶的核苷酸序列和氨基酸序列也是本领域技术人员可获得的，例如 GenBank: AAC50138.1, AAB40026.1 等等。

TEV 蛋白酶

TEV 蛋白酶虽然经常被用于高效切割融合蛋白，但是仅限于在二者都可溶状态下切割。目前大部分多肽药物是溶解性较差的，通常以包涵体形式表达，这与 TEV 蛋白酶的酶切条件不匹配。包涵体需要用高浓度尿素或盐酸胍溶解，但在这种条件下酶切是极具挑战性的，常规 TEV 蛋白酶与底物很难在同一条件下既有高效切割活性又同时溶解。

包涵体有利于纯化，通过简单处理即可得到相对较纯的目的蛋白。但是包涵体蛋白需要用高浓度尿素或盐酸胍才能溶解，野生型 TEV 蛋白酶在这种条件下是无活性或活性极低，无法高效切割融合蛋白。目前，改良型 TEV 蛋白酶有大量报道，但是其最佳酶切条件都是生理条件或非变性条件，通常对低浓度的变性剂（尿素或盐酸胍）具有一定程度的耐受性，但是绝大多数包涵体蛋白在低浓度变性条件下是不溶解的，因此，常规 TEV 蛋白酶不适用于这种场合。

发明人发现 TEV 蛋白酶与多肽融合制备多肽药物的理想生产条件是：（1）该融合蛋白以包涵体形式表达，利于纯化；（2）该融合蛋白在胞内不发生自我切割，否则不利于纯化；（3）该融合蛋白在高浓度变性剂中溶解后，稀释到含中高等浓度变性剂的酶切反应体系中，此时 TEV 蛋白酶恢复活性，高效地自我切割，释放多肽；（4）从高容量的 TEV 蛋白酶文库中筛选进化得到的 TEV 蛋白酶变体对其酶切位点的 P1' 位置的氨基酸要具有广谱性，这样就可以广泛用于生产各种具有天然 N 端的多肽或蛋白。

US2010035300A1 中提供了通常制备的具有自我切割的融合蛋白的结构。在融合蛋白的制备中，均需要 His 标签与要表达的目标蛋白（例如 EGFP）紧密相连。这样的原因在于，当融合蛋白体内表达时，传统的野生型 TEVp 或突变体 TEVp 在胞内具有一定的酶切活性，会发生自我切割。切割后的 EGFP 可以通过与其紧密相连的 His 标签回收。若没有该 His 标签，则由于在胞内提前发生自我切割而难以回收，无法高效生产 EGFP。但这样同样带来一个问题，即可能根据具体需要会进一步除去 EGFP 的 His 标签。这样做显然较为费时费力。

在本发明中，融合蛋白中的目标蛋白可以不含标签，例如 His。在一个实施方案中，融合蛋白包含 Avi-TEVp-sTEV-ACTH 的结构，其中，Avi 为 Avi 标签蛋白，sTEV 为 TEV 蛋白酶酶切位点。由于 TEVp 变体（如 12D 变体）在胞内的酶活性极低，因此可以所表达的融合蛋白基本上不会在胞内

发生裂解的情况。在收集包涵体，用 8M 尿素溶解，并调整到 4M 尿素的环境下时，12D 发挥其酶活性，进而切割其识别位点为 sTEV。酶切结束后，通过简单的稀释，使尿素或盐酸胍终浓度降至 0.5M，TEV 蛋白酶因溶解性很差，容易沉淀下来，而释放的具有生物活性的多肽往往易于溶于缓冲液，因此通过离心就可以得到高纯度的多肽，巧妙克服了原本需要增加的蛋白酶去除环节，大幅精简后期的纯化工艺。

形成包涵体较有利于纯化：1) 容易通过离心收获浓度高而相对纯净的蛋白；2) 包涵体保护蛋白免受蛋白酶水解。另外，毒性蛋白以无活性的包涵体形式表达，不会影响宿主菌的生长。例如，本方法中涉及的 TEV-ACTH 融合蛋白是以包涵体的形式表达，大大地简化了其纯化步骤，能够达到较高浓度和纯度，且不会受到蛋白酶的水解，因此容易获得稳定的高的产量。

本发明的筛选方法

在本发明中，构建了一个大容量的 TEV 随机突变噬菌体文库，其关键基因结构为 Avi-TEV-sTEV-Y1-P_{III}，即通过这个方式展示于噬菌体 P_{III} 蛋白末端。其中 Avi tag 是一个由 15 个氨基酸残基组成的短肽标签 (GLNDIFEAQKIEWHE)，在体内或体外都能被生物素连接酶在赖氨酸残基 (K) 连接上一个生物素，从而实现蛋白的生物素化，而生物素化的蛋白可以专一地被链霉亲和素结合，基于这两个反应，本发明中的 TEV 噬菌体可在体内被生物素化，生物素化的噬菌体文库可用链霉亲和素磁珠固定。理想条件下，在细胞内表达时有酶切活性的 TEV 变体会在表达过程中自我酶切，导致最终组装的噬菌体 P_{III} 蛋白末端只有多肽 Y1，无 Avi tag，无法被磁珠捕获；而在细胞内表达时无酶切活性的 TEV 变体在表达过程中不发生自我酶切，最终组装的噬菌体 P_{III} 蛋白的末端是 Avi-TEV-sTEV-Y1，N 端的 Avi tag 被生物素化，可被含有链霉亲和素磁珠捕获。被磁珠捕获的噬菌体置于中高浓度尿素中孵育，在此条件下发生酶切的噬菌体会因自我切割从磁珠上掉下来，进入溶液。收集该溶液即获得初始目的噬菌体，经扩增后就可进入下一轮筛选。经过数轮的筛选，体内酶切活性弱同时在体外变性条件下有酶切活性的 TEV 蛋白酶变种会被富集。通过基因测序分析，得到富集的序列，克隆到表达载体即可逐一验证，从而筛选到本发明的 TEV 变种。

酶切活性或效率的测定

酶切活性可以根据SDS-PAGE胶的结果计算，具体过程是：将TEV蛋白酶变体的包涵体稀释10倍后加含10% β -巯基乙醇的5xSDS上样缓冲液，100℃煮样5min，上样跑胶，结束后将胶放入考马斯亮蓝染色液中染色30min，随后放入考马斯亮蓝脱色液中，加热脱色20min左右，至背景无色为止。然后，
5 将胶放入凝胶成像系统拍照。获取的图片用Image J软件处理，将条带灰度值量化，体内酶切活性=1-融合蛋白条带灰度值/（融合蛋白条带灰度值+Avi-TEV条带灰度值*融合蛋白分子量/Avi-TEV分子量）。

在本文中，用Image J软件分析电泳条带灰度值的方法为目前的通用方法。

10 在本文中，体外酶切效率的计算方法如下：

体外酶切效率=1-酶切后融合蛋白的条带灰度值/酶切前融合蛋白的条带灰度值。

在本文中，8M以上尿素或6M以上盐酸胍视为高浓度的变性剂，而4M尿素为中等浓度的变性剂。中高程度变性条件是指4M尿素或1.5M盐酸胍、
15 50mM Tris-HCl (pH8.0)、1mM EDTA, 2mM DTT，反应温度4℃~37℃，优选25℃。

提供以下实施例以例示本发明。

实施例

20 实施例 1: TEV 蛋白酶变体的获得

1. 大容量TEV蛋白酶随机突变文库构建

1.1 实验材料:

大肠杆菌TG1: supE hsd Δ 5thi Δ (lac-proAB) F' [traD36proAB +lacIq lacZ Δ M15]，购买自北京宝科食维安公司。噬菌粒载体pHEN1 (购自BioVector
25 NTCC质粒载体菌种细胞基因保藏中心，货号Biovector786623)。DNA聚合酶、T4 DNA连接酶、限制性内切酶购自英潍捷基贸易有限公司。质粒抽提试剂盒及琼脂糖凝胶DNA回收试剂盒购自天根(北京)生物科技有限公司。随机突变试剂盒(GeneMorph II Random Mutagenesis Kit)购自Agilent Technologies。引

物合成和基因测序在南京金斯瑞生物科技有限公司完成。

1.2. TEVP随机突变文库构建

1.2.1 随机突变PCR制备TEVP DNA片段

以pQE30-TEV(S219V)(此27kDa TEV NIa蛋白酶变体基因由南京金斯瑞合成,克隆到pQE30载体的BamH1和HindIII之间,S219V氨基酸序列见SEQ ID NO.10,核苷酸序列见SEQ ID NO.3)为模板,用随机突变试剂盒(GeneMorph II Random Mutagenesis Kit)对TEVP S219V基因进行大范围随机突变。PCR引物为:

TEV-F: 5-

10 AATCTCGAGGGATCTAAAGGTCCTGGAGAAAGCTTGTTTAAGGGACCA
C -3

TEV-R: 5- AATGGATCCTTGCGAGTACACCAATTC -3

具体步骤依据说明书操作,控制好PCR循环数及模板用量,将PCR条件设置为产生中等程度突变的条件。50ul的反应体系配制如下:在PCR管中依次加入,41.5 μ l ddH₂O, 5 μ l 10 $\times$ Mutazyme II反应缓冲液, 1 μ l 40 mM dNTP混合物(终浓度各200 μ M), 0.5 μ l引物混合物(每种引物250 ng/ μ l), 1 μ l Mutazyme II DNA聚合酶(2.5 U/ μ l), 1 μ l TEVP模板(模板量10ng), PCR扩增条件: 95 $^{\circ}$ C预变性3min; 95 $^{\circ}$ C, 30s; 60 $^{\circ}$ C, 30s; 72 $^{\circ}$ C, 50s, 共32个循环,最后72 $^{\circ}$ C延伸10min。PCR结束后,取5ul产物跑1%琼脂糖凝胶电泳检测,分子量标准用试剂盒里的1.1-kb凝胶标准品,染色后比较目的条带与标准品的亮度,计算PCR产量,除以模板量得出扩增倍数,以此计算PCR过程中的d值(计算公式: $2^d = \text{PCR 产量} / \text{初始模板量}$)。本发明的TEVP随机突变PCR最后的d值=7.5,对应的突变频率约为9个突变/kb(参考说明书),符合预期要求。PCR产物用酚氯仿抽提纯化,然后用XhoI和BamHI进行双酶切,利用琼脂糖凝胶DNA回收试剂盒回收酶切产物, -20 $^{\circ}$ C保存。

1.2.2线性化载体的制备

在线性化噬菌粒载体pHEN1(购自BioVector NTCC质粒载体菌种细胞基因保藏中心,货号Biovector786623)之前,先对它进行改造。首先,要将一个Avi tag序列GLNDIFEAQKIEWHE插入到信号肽下游,如此产生的融合蛋白能被生物素化,进而被链霉亲和素磁珠固定。PCR扩增Avi标签的模板用

pET28b-PD1-Avi(在南京金斯瑞合成, 基因结构为Nco1-PD1基因-Not1-BamHI-GGGS接头-avi标签-Xho1, PD1基因的Genebank登录号NM_005018, 质粒图谱见图7), PCR引物如下:

Avi-F: 5- ACTCCATGGCCGGTCTGAATGATATTTTGAAGC -3

5 Avi-R: 5- AATCTCGAGCTCGTGCCACTCGATTTTCTG -3

产物经过酚氯仿纯化, 用Nco1和Xho1进行双酶切, 胶回收后与同样酶切过的pHEN1载体连接, 得到pHEN1-Avi。然后, 将一段包含sTEV (核苷酸序列为: GAAAATCTGTATTTTCAGAGC, 氨基酸序列ENLYFQS)与人ACTH基因的串联序列插入到Avi tag后面(克隆位点Xho1+Not1), PCR扩增sTEV-ACTH串联序列的模板为pET28b-ACTH(在南京金斯瑞合成, 质粒图谱见图8, 氨基酸序列见SEQ ID NO.2; 核苷酸序列见SEQ ID NO. 13), PCR引物如下:

ACTH-F:

AATCTCGAGGGATCTGGATCCGGAGGTGGCGGTAGCGAAAATCTGTAT
15 TTTCAGAGCTATAGCATGGAAC -3

ACTH-R: 5- AATGCGGCCGCAAATTCCAGCGGAAATGC -3

引物上游额外引入BamHI位点, PCR产物经过酚氯仿纯化, 用Not1和Xho1进行双酶切, 然后与同样酶切的pHEN1-Avi载体连接, 得到pHEN1-Avi-sTEV-ACTH。载体线性化: 用Xho1和BamHI进行双酶切pHEN1-Avi-sTEV-ACTH, 胶回收酶切产物中的大片段, -20℃保存。

1.2.3连接及连接产物的回收处理

对酶切回收的载体(pHEN1-Avi-sTEV-ACTH)与插入片段(随机突变的TEVP基因)按1:3, 1:5, 1:10进行连接, 具体过程: 先准备载体pHEN1-Avi-sTEV-ACTH(见1.2.2线性化载体的制备), 再准备插入片段(见1.2.1随机突变PCR制备TEVP DNA片段), 二者通过T4 DNA 连接酶(Thermo Fisher Scientific)连接, 得到pHEN1-Avi-TEVP-sTEV-ACTH。连接体系参考说明书, 以20ul反应体系为例: 在PCR管中依次加入线性化的载体150ng, 对应量的插入片段(与载体的摩尔比为1:3或1:5或1:10), 10 × T4 DNA Ligase buffer 2ul, T4 DNA Ligase 1ul, 最后用ddH2O补足体积至20ul。通过计算转化产生的克隆数, 确定最佳连接比例为1:5。质粒图谱见图9。确定最佳连接比例为1:5。

用不同浓度的连接产物进行转化以确定最佳转化产物量为0.2 μ g(10 μ l)。连接产物经过酚氯仿抽提法纯化，除去蛋白和盐离子，溶于ddH₂O中。

1.2.4电转化

连接产物通过电穿孔法，转到宿主菌TG1中。电转化感受态细胞的制备方法依照分子克隆实验指南(第三版)。取10 μ l连接产物与200 μ l电转感受态细胞轻柔混匀，冰浴2min，转入预冷的孔隙为0.2cm的电转杯，进行电转。电转仪(Bio-Rad Gene-Pulser)参数为2.5KV，25 μ F，200 Ω 。电击后，立即加入1ml SOC培养基，吸出后再用1ml SOC培养基漂洗电击杯2次，合并3ml菌液，于37 $^{\circ}$ C，200rpm振摇45~60min。将菌液梯度稀释：10⁻²，10⁻³，10⁻⁴，每个梯度取100 μ l菌体涂布SOC(含25 μ g/ml 羧苄青霉素)小平板，其余5000xg离心5min收集菌体，重悬后涂布SOC(含25 μ g/ml 羧苄青霉素)方形大平板(25x25cm)，37 $^{\circ}$ C倒置培养12~16h，以小平板进行计数，大平板上的菌落用2YT培养基冲洗，轻轻用涂布棒均匀刮下来，加甘油至终浓度50%，分装成小管，-80 $^{\circ}$ C冻存。文库容量计算方法：容量板上的克隆数*稀释倍数*稀释前菌液总体积。重复多次电转，直到文库容量达到1x10⁹以上。

1.2.5序列测定及分析

随机挑取若干原始细菌克隆，通过做菌落PCR对重组质粒进行验证，PCR验证引物：

上游引物：5- CCACCATGGCCGGTCTGAATGATATTTTTGAAGC -3

下游引物：5- TTGTTCTGCGGCCGCAAATTCCAGC -3

PCR阳性的重组质粒，将其送去测序(金斯瑞生物科技有限公司)，并对构建的文库的随机性、库容及丰度进行评价。

1.2.6文库的库容及多样性评价

载体与插入片段摩尔比为1：5，取10 μ l的连接产物进行电转，转化效率为9x10⁸cfu/ μ g DNA。将多次转化合并后，库容为2.02x10⁹，满足用于筛选的需要。从文库中随机挑取20个克隆，进行序列测定。结果显示(表1)，整体突变频率为中低程度(1.5~7个/kb)。实际值与理论值存在一定的偏差，可能原因一是同义突变未统计，二是由于样本较小的缘故，随着测序样本的增加，这种差异将逐渐减小。上述结果表明，所构建的TEVP随机噬菌体文库不论从基本框架，还是从库容及多样性方面均满足设计要求。

表1随机挑选克隆氨基酸突变的分布

克隆#	位点1	位点2	位点3	位点4	位点5
1	H46Q	I189M	S122T	N174Y	E188K
2	Y11H	T29A			
3	D10Y				
4	移码突变				
5	C130Y	Q197R	G213S		
6	T29A	T43S	R50S	K229E	
7	I18F	F48S	Q58stop		
8	G7E	S153G			
9	移码突变				
10	不发生突变				
11	G53V	D148G	T175R		
12	M87V	F186Y	V219A		
13	H28Y	Q73stop	I138T	W198C	
14	E188A				
15	S168T				
16	F172S	M218L			
17	N176I				
18	不发生突变				
19	不发生突变				
20	G62S				

2. 从TEVP随机突变噬菌体文库中筛选目标克隆

2.1 实验材料

HRP-M13抗体购自北京义翘神州公司，96孔酶标板和ELISA试剂购自上海生工。链霉亲和素磁珠购自NEB。D-biotin，IPTG等试剂均购自上海生工。

2.2 噬菌体文库培养

取至少一个文库容量的菌加到含2xYT-CG (2xYT+100 微克/毫升羧苄青霉素及2%葡萄糖) 的2 L锥形瓶中，使初始OD600值=0.1左右，于37℃，200rpm

振摇,直到OD600达到0.5左右,加入辅助噬菌体M130K07(购自北京宝科食为安公司))侵染(MOI=20),在100 转/分的缓慢转动中继续37℃培养一小时。随后,离心收菌(2000xg离心20 分钟),尽量去除并丢弃上清液,菌体重新用1L 2xYT-CK(2xYT+100 微克/毫升羧苄青霉素和50 微克/毫升卡那霉素+200uM D-biotin)重悬,在25℃中用 250转/分钟培养过夜。第二天,收获并纯化包装的噬菌体。把细胞培养物转移到一个750 毫升离心瓶中并在冰中稍微冷却,用大型台式离心机以4500转/分钟在4℃离心30分钟,如果上清液是混浊的,把它转入另一个干净瓶子里并重复这一步骤。把上层80%的上清液(不要搅动细胞沉淀物)转入到另一个新的750毫升离心瓶里,加1/6体积的PEG/NaCl溶液(20%[w/v]PEG-8000, 2.5MNaCl),混合,然后在冰中静止至少两小时,在4℃下用4500转/分钟离心30分钟,小心地去除所有的上清液,加10毫升PBS,用移液器重新溶解沉淀物,然后转入2 ml Ep管中。4℃下用15000xg离心20分钟,以去掉残留的菌体或碎片。小心吸取上清液到新的Ep管,加入于加1/6体积的PEG/NaCl溶液,在冰中放置1小时再次沉淀噬菌体,然后4℃下15000xg离心20分钟收集噬菌体沉淀,小心吸去并丢弃所有的上清液。随后,用适量PBS重新溶解噬菌体沉淀,彻底溶解后,4℃下15000xg离心10分钟以去掉剩余的不溶杂质。把上清液分装到新的EP管子里,同时加入50%甘油,放-80℃长期保存。

2.3 测定文库滴度

参考Carol M Y Lee等(M Y Lee, Carol & Iorno, Niccoló & Sierro, Frederic & Christ, Daniel. (2007). Selection of human antibody fragments by phage display. Nature protocols. 2. 3001-8. 10.1038/nprot.2007.448.)的方法,用2×YT梯度稀释噬菌体文库,取 10^{-9} , 10^{-10} , 10^{-11} 的稀释液各10ul,加入到已经培养到对数期的新鲜TG1菌液200ul,混匀,37℃温育30min,全部涂含2×YT-CG平板。30℃温箱培养过夜,次日计单菌落数,计算滴度。

2.4 文库淘选

本发明淘选TEVP变体的原理: Avi tag是一个由15个氨基酸残基组成的短肽标签(GLNDIFEAQKIEWHE),在体内或体外都能被生物素连接酶在赖氨酸残基连接上一个生物素,从而实现蛋白的生物素化,而生物素化的蛋白可以专一地被链霉亲和素结合,基于这两个反应,本发明中的TEVp噬菌体可在

体内被生物素化，生物素化的噬菌体文库可用链霉亲和素磁珠固定。理想条件下，胞内有酶切活性的TEVP变体会在表达过程中自我酶切，导致最终组装的噬菌体PⅢ蛋白末端只有ACTH，无Avi tag，无法被磁珠捕获；而在细胞内表达时无酶切活性的TEVP变体在表达过程中不发生自我酶切，最终组装的噬菌体PⅢ蛋白末端是Avi-TEVP-sTEV-ACTH，N端的Avi tag被生物素化，可被含有streptavidin磁珠捕获。被磁珠捕获的噬菌体置于中高浓度尿素中孵育，本来在生理条件下不溶解的TEVP变种，在此条件下能溶解并恢复活性，进行酶切，在此条件下发生酶切的噬菌体会因自我切割从磁珠上掉下来，进入溶液。收集该溶液即获得初始目的噬菌体，经扩增后就可进入下一轮筛选。

5 经过数轮的筛选，体内酶切活性弱同时在体外变性条件下有酶切活性的TEV蛋白酶变种会被富集。通过基因测序分析，得到富集的序列，克隆到表达载体即可逐一验证。各轮的淘选情况如下表2所示。

表2. 各轮淘选数据

轮次投入噬菌体(cfu)	回收噬菌体(cfu)	回收率	
1	2.8×10^{11}	6.2×10^6	2.2×10^{-5}
2	2.0×10^{11}	2.8×10^7	1.1×10^{-4}
3	1.4×10^{11}	5.9×10^7	4.2×10^{-4}

噬菌体淘选具体流程如下：

- 15 (1) 噬菌体固定：在一个干净的2ml EP管中，将100倍文库容量的噬菌体稀释到TBST缓冲液(50mM Tris-HCl PH7.5，150mM NaCl，0.1%[v/v]Tween-20)，加入适量链霉亲和素磁珠混合，4℃旋转孵育20min，用磁铁沉淀磁珠，然后用TBST清洗磁珠5次，去掉未结合的噬菌体。
- (2) 酶切筛选：在磁珠中加入含3M尿素的TBS缓冲液，室温孵育1-2h，
- 20 用磁铁沉淀磁珠，尽量收集全部上清。
- (3) 噬菌体扩增：将洗脱下来的噬菌体加入50ml OD600 = 0.5的TG1宿主菌中，37℃缓慢摇晃1小时，加入100微克/毫升羧苄青霉素及2%葡萄糖，继续培养2小时，加入辅助噬菌体(M130K07(购自北京宝科食为安公司))侵染(MOI=20)，低转速继续37℃培养1小时。随后离心收菌，尽量去除并丢弃上清液，菌体重新用100ml 2xYT-CK (2xYT+100微克/毫升羧苄青霉素和50微克/毫升卡那霉素+200uM D-biotin)重悬，在25℃中用250转/分钟培养过夜。第

二天，收获及纯化包装好的噬菌体。将培养物转入干净的50ml离心管中，4℃13,000g离心20min。将上清的上部80%转入新鲜离心管中，加入1/6体积的PEG/NaCl溶液，4℃沉淀1小时以上。然后再次离心收集沉淀，加适量PBS重悬噬菌体沉淀，再离心一次去除细菌碎片等杂质，收集上清，加入1/6体积的PEG/NaCl溶液，冰上静置1小时，然后再次离心收集沉淀，将其溶于适量PBS，随后13,000g离心10分钟，去除不溶解的杂质，将上清转移至另一新鲜Ep管中，即为扩增后的洗脱物。

(4) 取出1μl纯化好的噬菌体用于滴度测定，其他用来进行下一轮淘选或保存。

(5) 测序分析筛选序列富集情况：3轮淘选后，将最后一轮洗脱下来的噬菌体感染宿主菌后铺在2xYT-CG板上，30℃培养过夜。次日挑取单克隆菌落，先进行菌落PCR鉴定是否属于文库序列，阳性克隆再送测序分析。通过分析测序结果，统计突变位点出现的频率，最终挑选出其中最佳的7个突变体，作为候选克隆。

3.候选克隆表征

上述7个候选序列经酶切(Nco1/Not1)克隆到表达载体pET28b (购自Novagen)，并转入Rosetta2(DE3)(购自湖南优宝生物)表达。表达条件：在LB培养基中，37℃培养，至OD₆₀₀=0.6左右。诱导条件：37℃下250rpm摇，2mM IPTG，诱导4小时。菌处理：离心收菌，重悬后用超声波破碎，离心收集包涵体沉淀，洗涤包涵体，最后用8M尿素(50mM Tris-HCl, 1mM EDTA, 2mM DTT, 8M尿素, pH8.0)溶解包涵体。

包涵体蛋白稀释及酶切测试：用TEVP酶切缓冲液(50mM Tris-HCl, 1mM EDTA, 2mM DTT, pH8.0)稀释各候选克隆的包涵体蛋白，使尿素终浓度为3M或4M，然后在25℃酶切过夜。次日，跑SDS-PAGE胶检测酶切情况。蛋白电泳条带用Image J软件处理，计算条带灰度值。

酶切条件优化：通过上面的酶切试验得到的阳性克隆，要进一步测试在不同条件下的酶切效率，这些条件包括：不同尿素浓度，不同温度，不同盐酸胍浓度，反应液中DTT及EDTA浓度。

本发明通过上述筛选，最终获取体内酶切活性弱但是体外活性正常的突变体3个。测试结果见图1、2、3、4A-B。

具体过程：将各个已溶解到8M尿素缓冲液中的TEV蛋白酶变体-ACTH融合蛋白分别以1:10比例加到稀释液中，稀释液为含不同浓度的尿素的50mM Tris-HCl pH8.0，1mM EDTA，2mMDTT。对于尿素终浓度4M时，稀释液为3.56M Urea，50mM Tris-HCl pH8.0，1mM EDTA，2mMDTT。每个样品混匀后立即等分到两支EP管中，一支立即加入5×SDS-上样缓冲液，100℃煮样5min，此为酶切0h的样品。另一支放25℃自我酶切16h，然后加入5×SDS-上样缓冲液，100℃煮样5min，此为酶切16h的样品。随后，跑SDS-PAGE变性胶检测各个变体的酶切0h、16h的样品。电泳结束后，凝胶经过考马斯亮蓝染色，脱色，拍照。图片用Image J软件处理，计算电泳条带灰度值。计算方法如下：

体内酶切活性=1-酶切前融合蛋白条带灰度值/(酶切前融合蛋白条带灰度值+Avi-TEVP条带灰度值×融合蛋白分子量/Avi-TEVP分子量)。

体外酶切效率=1-酶切后融合蛋白的条带灰度值/酶切前融合蛋白的条带灰度值。

如表3所示，4D，12D和32C蛋白酶变种体内酶切活性显著下降，体外4M尿素中切割效率都在30%以上。本发明制备ACTH多肽所用的TEV蛋白酶变种为表3中任一种。本发明筛选到的TEV蛋白酶变种可用于其他重组多肽和蛋白的制备。

表3：几种蛋白酶变种与ACTH的融合蛋白产量(计算方法：将融合蛋白样品与BSA标准品一起跑SDS-PAGE变性凝胶，跑胶结束后放入考马斯亮蓝染色液染色，然后转入脱色液中脱去背景，拍照。比较图片中BSA标准品条带的灰度值和样品灰度值即可估算样品的浓度，进而计算出融合蛋白浓度和产量)、体内活性及在体外对4M尿素的耐受能力(以S219V为对照)，基于蛋白条带灰度值比较。数据为3个不同批次表达的TEVP变体的融合蛋白的产量和体内、外酶切比例统计结果。

克隆名	融合蛋白产量 (mg/L)	体内酶切比例(%)	体外酶切比例(%)
4D	220.92±6.93	10.75±4.40	52.93±11.27
12D	185.73±9.26	1.49±1.10	61.07±14.65

32C	237.78±11.02	2.48±0.51	26.89±2.95
S219V	88.39±6.89	71.97±8.08	70.96±6.23

注：此处的融合蛋白产量是指未发生酶切的融合蛋白，体内已酶切的部分因无利用价值故不计算进去。S219V为野生型TEVP的第219个氨基酸由丝氨酸(S)突变为缬氨酸(V)；

4D：为S219V的第111位氨基酸由亮氨酸(L)突变为苯丙氨酸(F)，第138位氨基酸由异亮氨酸(I)突变为赖氨酸(K)；

12D：S219V的第28位氨基酸由组氨酸(H)突变为亮氨酸(L)，第111位氨基酸由亮氨酸(L)突变为苯丙氨酸(F)，第196位氨基酸由谷氨酸(Q)突变为组氨酸(H)；

32C：为S219V的第111位氨基酸由亮氨酸(L)突变为组氨酸(H)，第135位氨基酸由丝氨酸(S)突变为甘氨酸(G)；第187位氨基酸由蛋氨酸(M)突变为异亮氨酸(I)。

图1表明TEVp突变体12D在4M尿素溶液中酶切效率最高；图2表明TEVp突变体4D在4M尿素中酶切效率最高；图3表明TEVp突变体32C在4M尿素中酶切效率最高；图4A和图4B表明TEVp突变体4D在4M尿素、25℃条件下的酶切效率最高。当尿素浓度超出4M时，各种突变体的酶切效率逐渐下降。

图5表明本发明筛选到的TEVp突变体4D、12D和32C的体内酶切活性显著低于S219V对照(根据0小时的条带比较)，体外酶切活性略小于或等于S219V。

图6表明各TEVp突变体的融合蛋白在0.5M尿素中的溶解度都较低(稀释后的上清中只有少量蛋白，大部分都在稀释后的沉淀中)，证明了TEVP突变体融合蛋白在稀释到0.5M尿素后以沉淀形式存在。

本发明制备ACTH多肽所用的TEV蛋白酶突变体为表1中任一种。本发明筛选到的TEV蛋白酶突变体可用于其他重组多肽和蛋白的制备。

25 实施例 2：以 TEVP-ACTH 融合蛋白制备 ACTH 多肽

1. TEVP-ACTH融合蛋白表达载体构建

在实施例1中,融合蛋白酶切释放的ACTH的羧基端带有His标签,在实际生产中要求去掉该标签。因此,需要通过PCR在ACTH基因下游引入终止密码子。具体过程是:以在实施例1步骤3中效果最佳的带TEV蛋白酶变体12D的质粒为模板,通过PCR将该载体开放阅读框中的Avi-TEVP-sTEV-ACTH区域一起扩增出来的(TEVP变体12D序列SEQ ID NO.5, ACTH基因序列SEQ ID NO.13)。用KOD-plus DNA高保真聚合酶(东洋纺)进行扩增,扩增程序为:95℃预变性2min,98℃变性10s,60℃退火30s,68℃延伸1min 12s,扩增30个循环),基因下游引入终止密码子。引物如下:

TEV-ACTH-F: 5- CCACCATGGCCGGTCTGAATGATATTTTGAAGC

10 -3

TEV-ACTH -R: 5-
AGAGCGGCCGCTTATTAAAATTCCAGCGGAAATGCTTCTGC -3

其中下划线部分分别为酶切位点Nco1和Not1。PCR产物和载体pET-28b (Novagen)用Nco1和Not1在37℃酶切3h之后,胶回收酶切片段,然后用T4 DNA连接酶在20℃连接2h。将连接产物转化进入DH5α感受态细胞,然后将转化产物涂布在卡那霉素抗性(50μg/ml) LB平板上培养直至单菌落长出,挑取单菌落,提取质粒进行酶切验证,将重组质粒送金斯瑞测序,得到质粒 pET-28b-Avi-TEVP-sTEV-ACTH (其中的sTEV序列在TEVP-ACTH质粒中)。

2. TEVP-ACTH融合蛋白的诱导表达、纯化、酶切及验证

20 将构建的表达载体转化。具体过程:取50ng质粒 pET-28b-TEVP-sTEV-ACTH加到相应的化学感受态细胞Rosetta2(DE3)中,冰浴30分钟,42℃热激45秒,冰浴2分钟,加入1毫升无抗生素的LB培养基,37℃培养1小时,取100ul菌液涂布在含卡那霉素(50μg/ml)+氯霉素(34μg/ml)的LB平板上,37℃培养直至单菌落长出。

25 TEVP-ACTH融合蛋白的诱导表达:挑取单菌落于含卡那霉素(50μg/ml)和氯霉素(34μg/ml)的LB液体培养基中培养至OD600 = 0.5 ~ 0.8。将培养物以体积比1:50的比例接种于LB液体培养基,37℃剧烈震荡培养至OD600 = 0.5 ~ 0.8,加入终浓度为2mM的IPTG于37℃诱导4h。在表达过程中,TEVP-ACTH融合蛋白以不可溶的包涵体存在。发酵完成后,收集菌体超声破碎后,经洗涤缓冲液(组成:50mM Tris-HCl, 200mM NaCl, 10mM EDTA, 10mM β

30

-Mercaptoethanol, 0.5% Triton X-100)多次洗涤后, 得到TEVP-ACTH融合蛋白粗提物, 加入含变性剂盐酸胍或尿素(组成: 50mM Tris-HCl pH8.0, 1mM EDTA, 2mM DTT, 8M Urea或6M GuHCl)的缓冲液溶解TEVP-ACTH融合蛋白, 制备成变性溶液。

- 5 将融合蛋白变性溶液用TEVP酶切缓冲液(3.556M Urea, 50mM Tris-HCl, 1mM EDTA, 2mM DTT, pH8.0)稀释十倍, 使尿素终浓度为4M, 放25℃自我酶切过夜, 酶切产物经过8倍稀释(稀释液为50mM Tris-HCl pH8.0)后, TEV蛋白酶和未酶切的融合蛋白因溶解性差, 会沉淀出来(见图6), 而ACTH多肽可以溶解到溶液中, 因此经4℃, 13000 g低温高速离心30分钟后收集上清液, 10 即获得ACTH原液。

3. ACTH的纯化与保存

- ACTH原液用0.22um滤膜过滤杂质, 用1k的超滤离心管(Millipore)超滤浓缩同时脱盐, 然后用50%硫酸铵沉淀, ACTH会形成悬浮物在溶液上层, 小心收集, 用PBS溶解, 超滤浓缩脱盐, 即可获得高纯度的重组人源或猪源 15 ACTH溶液, 再经冻干后保存。

4. ACTH的结构鉴定

采用质谱仪测定纯化后的ACTH的分子量, 测定的分子量值与理论值一致。结果见图10。

5. ACTH的活性测定

- 20 取健康2周龄的SD大鼠, 用1%戊巴比妥钠(40mg/kg)麻醉, 在无菌条件下取出肾上腺, 去除被膜和髓质, 放入Hanks平衡盐溶液中, 剪成1mm³大小的碎块, 转入含I型胶原酶和DNA酶的消化液中消化1小时, 间隔5分钟振摇混匀, 用吸管吹吸数次机械离散细胞形成悬液, 用细胞筛过滤到50ml离心管中, 1000xg离心10分钟, 小心吸掉上清, 沉淀的细胞用Hanks液洗涤2次, 最后用 25 含20%胎牛血清的DMEM/F12培养基(Gibco)重悬, 调整浓度为2x10⁵个/ml, 接种到90mm培养皿, 在37℃、5%CO₂条件下培养。倒置相差显微镜下观察肾上腺细胞的生长过程及其形态变化, 培养48小时后, 在显微镜下可见肾上腺细胞贴壁生长, 细胞体积增大, 胞体呈圆形或多角形, 胞体大, 胞浆透亮, 胞浆内有许多大小较为规则的颗粒, 从而获得大鼠肾上腺皮质细胞。

- 30 将纯化后的ACTH与离体的大鼠肾上腺皮质细胞孵育。具体地, 分别在

各组肾上腺细胞中加入不同浓度(0.1 μ U、0.2 μ U、2 μ U、20 μ U、200 μ U, 1U=10 μ g 蛋白)的ACTH (细胞与ACTH的体积比400:1), 37 $^{\circ}$ C孵育24小时后取培养液, 离心去掉细胞碎片后用酶联免疫分析法测定其中皮质酮浓度(酶联免疫分析法可以参见何上进等, "PCNA在大鼠肾上腺细胞培养中的表达及其意义." 临床泌尿外科杂志 21.8(2006):625-626.), 结果显示随着ACTH浓度的增加, 皮质酮浓度也逐步增加。ACTH刺激细胞分泌甾体类激素, 通过测定生成的皮质酮的浓度来定量ACTH的活性(ELISA法)。结果显示, 纯化后的多个批次的ACTH具有很高的生物活性和活性稳定性。结果见图11。

以上所述, 仅是本发明的较佳实施例而已, 并非对本发明做任何形式上的限制, 故凡未脱离本发明技术方案的内容, 依据本发明的技术实质对以上实施例所做的任何简单修改、等同变化与修饰, 均仍属于本发明技术方案的范围内。

序列表

15 SEQ ID NO.1 (野生型 TEVP)

GESLFKGPRDYNPISSTICHLTNESDGHTTSLYGIGFGPFIITNKHLFRRNNGTLL
VQSLHGVFKVKNTTTLQQHLIDGRDMIIRMPKDFPPFPQKLKFREPQREERICLVTT
NFQTKSMSSMVSDTSCTFPSSDGIFWKHWIQTGDGQCSPLVSTRDGFIVGIHSASN
TNTNNYFTSVPKNFMELLTNQEAQQWVSGWGLNADSVLWGGHKVFMSKPEEPFQP
20 VKEATQLMNELVYSQ

SEQ ID NO.2(人 ACTH 氨基酸序列)

SYSMEHFRWGKPVGKKRRPVKVYPNGAEDESAEAFPLEF

> SEQ ID NO.3: TEVP(219V)核苷酸序列

GGAGAAAGCTTGTTTAAGGGACCACGTGATTACAACCCGATATCGAGCACC
25 ATTTGTCATTTGACGAATGAATCTGATGGGCACACAACATCGTTGTATGGTATTGG
ATTTGGTCCCTTCATCATTACAAACAAGCACTTGTTTAGAAGAAATAATGGAACAC
TGTTGGTCCAATCACTACATGGTGTATTCAAGGTCAAGAACACCACGACTTTGCA
ACAACACCTCATTGATGGGAGGGACATGATAATTATTCGCATGCCTAAGGATTTC
CACCATTTCTCCTCAAAAGCTGAAATTTAGAGAGCCACAAAGGGAAGAGCGCATAT
30 GTCTTGTGACAACCAACTTCCAACTAAGAGCATGTCTAGCATGGTGTCTCAGACAC

TAGTTGCACATTCCCTTCATCTGATGGCATATTCTGGAAGCATTGGATTCAAACCA
AGGATGGGCAGTGTGGCAGTCCATTAGTATCAACTAGAGATGGGTTCATTGTTGG
TATACACTCAGCATCGAATTTACCAACACAAACAATTATTTTACAAGCGTGCCG
AAAAACTTCATGGAATTGTTGACAAATCAGGAGGCGCAGCAGTGGGTTAGTGGT
5 TGGGGATTAAATGCTGACTCAGTATTGTGGGGGGGCCATAAAGTTTTTCATGGTTAA
ACCTGAAGAGCCTTTTCAGCCAGTTAAGGAAGCGACTCAACTCATGAATGAATTG
GTGTACTCGCAA

SEQ ID NO.4 (4D TEVP)

GESLFKGPRDYNPISSSTICHLTNESDGHTTSLYGIGFGPFIITNKHLFRRNNGTLL
10 VQSLHGVFKVKNTTTLQQHLIDGRDMMIIRMPKDFPPFPQKLKFREPQREERICFVTT
NFQTKSMSSMVSDTSCTFPSSDGKFWKHWIQTKDGQCGSPLVSTRDGFIVGIHSASN
FTNTNNYFTSVPKNFMELLTNQEAQQWVSGWGLNADSVLWGGHKVFMVKPEEPF
QPVKEATQLMNELVYSQ

SEQ ID NO.5 (12D TEVP)

15 GESLFKGPRDYNPISSSTICHLTNESDGLTTSLYGIGFGPFIITNKHLFRRNNGTLL
VQSLHGVFKVKNTTTLQQHLIDGRDMMIIRMPKDFPPFPQKLKFREPQREERICFVTT
NFQTKSMSSMVSDTSCTFPSSDGIFWKHWIQTKDGQCGSPLVSTRDGFIVGIHSASN
TNTNNYFTSVPKNFMELLTNQEAHQWVSGWGLNADSVLWGGHKVFMVKPEEPFQ
PVKEATQLMNELVYSQ

20 SEQ ID NO.6 (32C TEVP)

GESLFKGPRDYNPISSSTICHLTNESDGHTTSLYGIGFGPFIITNKHLFRRNNGTLL
VQSLHGVFKVKNTTTLQQHLIDGRDMMIIRMPKDFPPFPQKLKFREPQREERICHVTT
NFQTKSMSSMVSDTSCTFPSSGDGIFWKHWIQTKDGQCGSPLVSTRDGFIVGIHSASN
FTNTNNYFTSVPKNFIELLTNQEAQQWVSGWGLNADSVLWGGHKVFMVKPEEPFQ
25 PVKEATQLMNELVYSQ

SEQ ID NO.7

ENLYFQS

SEQ ID NO.8

ENLYFQH

30 SEQ ID NO.9

EXXYXQ(G/S)

SEQ ID NO.10 (S219V)

GESLFKGPRDYNPISSTICHLTNESDGHTTSLYGIGFGPFIITNKHLFRRNNGTLL
VQSLHGVFKVKNTTTLQQHLIDGRDMIIRMPKDFPPFPQKLKFREPQREERICLVTT
5 NFQTKSMSSMVSDTSCTFPSSDGIFWKHWIQTKDGQCGSPLVSTRDGFIVGIHSASNF
TNTNNYFTSVPKNFMELLTNQEAQQWVSGWGLNADSVLWGGHKVFMVYKPEEPFQ
PVKEATQLMNELVYSQ

SEQ ID NO.11: EXXYXQS

SEQ ID NO. 12: sTEV (实施例 中使用的 TEV_p 酶切位点的核苷酸序列)

10 GAAAATCTGTATTTTCAGAGC

SEQ ID NO. 13:ACTH DNA 核苷酸序列

AGCTATAGCATGGAACATTTTCGTTGGGGTAAACCGGTTGGTAAAAAACGT
CGTCCGGTTAAAGTTTATCCGAATGGTGCAGAAGATGAATCGGCAGAAGCATTTC
CGCTGGAATTT

15 SEQ ID NO. 14:TEV(4D)

GGAGAAAGCTTGTTTAAGGGACCACGTGATTACAACCCGATATCGAGCACC
ATTTGTCATTTGACGAATGAATCTGATGGGCACACAACATCGTTGTATGGTATTGG
ATTTGGTCCCTTCATCATTACAAACAAGCACTTGTTTAGAAGAAATAATGGAACAC
TGTTGGTCCAATCACTACATGGTGTATTCAAGGTCAAGAACACCACGACTTTGCA
20 ACAACACCTCATTGATGGGAGGGACATGATAATTATTCGCATGCCTAAGGATTTC
CACCATTTCTCATAAAGCTGAAATTTAGAGAGCCACAAAGGGAAGAGCGCATAT
GTTTTGTGACAACCAACTTCCAAACTAAGAGCATGTCTAGCATGGTGTGACAGACAC
TAGTTGCACATTCCCCTCATCTGATGGCAAATTCTGGAAGCATTGGATTCAAACCA
AGGATGGGCAGTGTGGCAGTCCATTAGTATCAACTAGAGATGGGTTCATTGTTGG
25 TATACACTCAGCATCGAATTTACCAACACAAACAATTATTTACAAAGCGTGCCG
AAAAACTTCATGGAATTGTTGACAAATCAGGAGGCGCAGCAGTGGGTAGTGGT
TGGGGATTAAATGCTGACTCAGTATTGTGGGGGGGCCATAAAGTTTTTCATGGTTAA
ACCTGAAGAGCCTTTTCAGCCAGTTAAGGAAGCGACTCAACTCATGAATGAATTG
GTGTACTCGCAA

30 SEQ ID NO. 15:TEV(12D)

GGAGAAAGCTTGTTTAAGGGACCACGTGATTACAACCCGATATCGAGCACC
ATTTGTCATTTGACGAATGAATCTGATGGGCTCACAACATCGTTGTATGGTATTGG
ATTTGGTCCCTTCATCATTACAAACAAGCACTTGTTTAGAAGAAATAATGGAACAC
TGTTGGTCCAATCACTACATGGTGTATTCAAGGTCAAGAACACCACGACTTTGCA
5 ACAACACCTCATTGATGGGAGGGACATGATAATTATTCGCATGCCTAAGGATTTC
CACCATTTCTCATAAAAGCTGAAATTTAGAGAGCCACAAAGGGAAGAGCGCATAT
GTTTTGTGACAACCAACTTCCAAACTAAGAGCATGTCTAGCATGGTGTGACACAC
TAGTTGCACATTCCCTTCATCTGATGGCATATTCTGGAAGCATTGGATTCAAACCA
AGGATGGGCAGTGTGGCAGTCCATTAGTATCAACTAGAGATGGGTTCATTGTTGG
10 TATACTCAGCATCGAATTTACCAACACAAACAATTATTTACAAGCGTGCCG
AAAACTTCATGGAATTGTTGACAAATCAGGAGGCGCATCAGTGGGTAGTGGTT
GGGGATTAAATGCTGACTCAGTATTGTGGGGGGGCCATAAAGTTTTCATGGTTAA
ACCTGAAGAGCCTTTTCAGCCAGTTAAGGAAGCGACTCAACTCATGAATGAATTG
GTGTACTCGCAA

15 SEQ ID NO. 16:TEV(32C)

GGAGAAAGCTTGTTTAAGGGACCACGTGATTACAACCCGATATCGAGCACCA
TTTGTCATTTGACGAATGAATCTGATGGGCACACAACATCGTTGTATGGTATTGGA
TTTGGTCCCTTCATCATTACAAACAAGCACTTGTTTAGAAGAAATAATGGAACACT
GTTGGTCCAATCACTACATGGTGTATTCAAGGTCAAGAACACCACGACTTTGCAA
20 CAACACCTCATTGATGGGAGGGACATGATAATTATTCGCATGCCTAAGGATTTC
ACCATTTCTCATAAAAGCTGAAATTTAGAGAGCCACAAAGGGAAGAGCGCATATG
TCATGTGACAACCAACTTCCAAACTAAGAGCATGTCTAGCATGGTGTGACACACT
AGTTGCACATTCCCTTCAGGTGATGGCATATTCTGGAAGCATTGGATTCAAACCAA
GGATGGGCAGTGTGGCAGTCCATTAGTATCAACTAGAGATGGGTTCATTGTTGGTA
25 TAACTCAGCATCGAATTTACCAACACAAACAATTATTTCACTAGCGTGCCGAA
AACTTCATTGAATTGTTGACAAATCAGGAGGCGCAGCAGTGGGTAGTGGTTGG
GGATTAAATGCTGACTCAGTATTGTGGGGGGGCCATAAAGTTTTCATGGTTAAACC
TGAAGAGCCTTTTCAGCCAGTTAAGGAAGCCACTCAACTCATGAATGAATTGGTG
TACTCGCAA

权利要求书

1. 筛选蛋白酶变体的方法，其包括以下步骤：

5 (1) 构建蛋白酶随机突变文库，优选蛋白酶随机突变病毒文库，优选蛋白酶随机突变噬菌体文库；

(2) 对所述蛋白酶随机突变文库，优选蛋白酶随机突变病毒文库，优选蛋白酶随机突变噬菌体文库筛选在宿主内或类似的条件下蛋白酶酶切活性弱且在体外变性条件下有蛋白酶酶切活性的蛋白酶变体；以及

10 (3) 任选地表征蛋白酶变体的步骤，
其中所述蛋白酶优选是TEV蛋白酶或肠激酶。

2. 根据权利要求1所述的方法，所述方法还包括使用随机突变试剂盒产生所述突变文库。

3. 根据权利要求1或2所述的方法，其中在步骤(1)中以合适的蛋白酶模板，例如 TEV 蛋白酶模板，例如具有以 SEQ ID NO.10 所示的氨基酸序列的 S219V TEV 蛋白酶为模板进行随机突变来构建所述文库，

优选地其中蛋白酶变体与初始蛋白酶相比在宿主内或类似的条件下具有更低的酶切活性且在体外变性条件下保留初始蛋白酶的酶切活性；

20 优选地，所述 TEV 蛋白酶变体与具有以 SEQ ID NO.10 所示的氨基酸序列的 S219V 蛋白酶相比在宿主内或类似的条件下具有更低的酶切活性且在体外变性条件下保留以 SEQ ID NO.10 所示的氨基酸序列的 S219V 蛋白酶的酶切活性。

4. 根据前述权利要求中任一项的方法，其中以包含蛋白酶-蛋白酶切割序列-Y1，例如 TEVp-sTEV-Y1 的融合蛋白形式展示蛋白酶变体，优选 TEV 蛋白酶变体，优选在噬菌体表面展示蛋白酶变体，优选 TEV 蛋白酶变体，其中 TEVp 是 TEV 蛋白酶，sTEV 为 TEV 蛋白酶切割序列，以及 Y1 是感兴趣的蛋白质；优选地其中所述 TEV 蛋白酶切割序列是 EXXYXQG/S/H，其中 X 为任意氨基酸残基，优选所述 TEV 蛋白酶切割序列选自 SEQ ID NO: 7 和 8。

5. 根据前述权利要求中任一项的方法，所述方法包括在宿主内对所述蛋白酶变体，优选 TEV 蛋白酶变体的 N 端直接或通过接头间接添加部分 A，

其中优选地所述部分 A 是以下一种：亲和标签、生物素、抗体、抗原、半抗原、聚链霉亲和素、配体、受体、核酸、酶、底物和适体。

6. 根据前述权利要求中任一项的方法，所述方法包括将添加有 A 的噬菌体文库在适合于所述蛋白酶的体外条件下与用特异性针对部分 A 的部分 B 固定化的固体支持物孵育一段时间，并且分离支持物与含有目的噬菌体的溶液，任选地对所述目的噬菌体重复筛选一次或多次，

其中优选地所述部分 B 是以下一种：生物素、抗体、抗原、半抗原、聚链霉亲和素、配体、受体、核酸、酶、底物和适体，条件是部分 B 特异性结合部分 A。

7. 根据前述权利要求中任一项的方法，其中以 Avi-蛋白酶-蛋白酶切割位点 -Y1-P111，优选通过 pHEN1-Avi-TEVp-sTEV-Y1 构建体以 Avi-TEVp-sTEV-Y1-P111 方式将蛋白酶，优选 TEV 蛋白酶展示于噬菌体 P111 蛋白末端，其中 Avi 标签是由 15 个氨基酸残基 GLNDIFEAQKIEWHE 组成的短肽标签；优选地其中所述 TEV 蛋白酶切割序列是 EXXYXQG/S/H，其中 X 为任意氨基酸残基，优选所述 TEV 蛋白酶切割序列选自 SEQ ID NO: 7 和 8；

优选地其中所述酶切活性是对包含所述蛋白酶及其切割序列，例如蛋白酶-蛋白酶切割序列-Y1，优选包含所述 TEV 蛋白酶变体及其切割序列的融合蛋白，优选 TEVp-sTEV-Y1 测定的；

- 优选地其中所述筛选包括在宿主内将所述蛋白酶，优选 TEV 蛋白酶随机突变噬菌体文库生物素化；

- 优选地其中所述筛选包括用链霉亲和素磁珠处理经生物素化的噬菌体文库，将被磁珠捕获的噬菌体置于中高浓度尿素中孵育一段时间，并且分离磁珠与含有目的噬菌体的溶液，任选地对所述目的噬菌体重复筛选一次或多次，

优选地其中通过菌落PCR进行验证所述文库，优选地其中所述菌落PCR使用的引物为：上游引物：5'-CCACCATGGCCGGTCTGAATGATATTTTGAAGC-3'

下游引物：5'-TTGTTCTGCGGCCGCAAATTCCAGC-3'；

- 优选地其中文库容量达到 1×10^9 以上，优选 2×10^9 ；优选整体突变频率为中低程度 1.5-7 个/kb。

8. 根据前述权利要求中任一项的方法，其中 Y1 是人或猪 ACTH 或 GLP-1，优选地其中所述宿主是大肠杆菌。

9. 根据前述权利要求中任一项的方法，其中所述体外变性条件是中高程度变性条件，优选在 3M-5M 尿素，优选 3.5M-4.5M 尿素，更优选 4M 尿素或 1M-2M 盐酸胍，优选 1.5M 的盐酸胍的条件。

10. 通过前述权利要求中任一项的方法获得的蛋白酶变体，其中所述蛋白酶变体在宿主内表达过程中具有低酶切活性，优选所述 TEV 蛋白酶变体与具有以 SEQ ID NO.10 所示的氨基酸序列的 S219V 变体相比更低的酶切活性，所述 TEV 蛋白酶变体的切割序列选自 EXXYXQG/S/H，其中 X 为任意氨基酸残基，优选所述 TEV 蛋白酶切割序列选自 SEQ ID NO: 7 和 8；优选地所述蛋白酶变体或 TEV 蛋白酶变体在中高程度变性条件下，优选在 3M-5M 尿素，优选 3.5M-4.5M 尿素，更优选 4M 尿素或 1M-2M 盐酸胍，优选 1.5M 的盐酸胍的体外环境下保留初始蛋白酶，例如 S219V 蛋白酶的体外酶切活性；优选地所述酶切活性是对包含所述蛋白酶变体及其切割序列，例如蛋白酶-蛋白酶切割序列-Y1，优选包含所述 TEV 蛋白酶变体及其切割序列的融合蛋白测定的，优选所述 TEV 蛋白酶切割序列是 EXXYXQG/S/H，其中 X 为任意氨基酸残基，优选所述 TEV 蛋白酶切割序列选自 SEQ ID NO: 7 和 8。

11. 根据权利要求 10 所述的蛋白酶变体，其中所述 TEV 蛋白酶变体包含选自下组的一种或多种突变：

与 SEQ ID NO: 1 所示序列的第 111 位对应的位置处由亮氨酸(L)变为苯丙氨酸(F)或组氨酸(H)的突变；

与 SEQ ID NO: 1 所示序列的第 138 位对应的位置处由异亮氨酸(I)变为赖氨酸(K)的突变；

与 SEQ ID NO: 1 所示序列的第 28 位对应的位置处由组氨酸(H)变为亮氨酸(L)的突变；

与 SEQ ID NO: 1 所示序列的第 196 位对应的位置处由谷氨酸(Q)变为组氨酸(H)的突变；

与 SEQ ID NO: 1 所示序列的第 135 位对应的位置处由丝氨酸(S)变为甘氨酸(G)的突变；和

与 SEQ ID NO: 1 所示序列的第 187 位对应的位置处蛋氨酸(M)变为异

亮氨酸(I)的突变;

优选地, 其中所述 TEV 蛋白酶变体包含选自以下的突变组合:

与 SEQ ID NO: 1 所示序列的第 111 位对应的位置处由亮氨酸(L)变为苯丙氨酸(F)的突变和与 SEQ ID NO: 1 所示序列的第 138 位对应的位置处
5 由异亮氨酸(I)变为赖氨酸(K)的突变;

与 SEQ ID NO: 1 所示序列的第 28 位对应的位置处由组氨酸(H)变为亮氨酸(L)的突变、与 SEQ ID NO: 1 所示序列的第 111 位对应的位置处由亮氨酸(L)变为苯丙氨酸(F)的突变和与 SEQ ID NO: 1 所示序列的第 196 位对应的位置处由谷氨酸(Q)变为组氨酸(H)的突变; 和

10 与 SEQ ID NO: 1 所示序列的第 111 位对应的位置处由亮氨酸(L)变为组氨酸(H)的突变、与 SEQ ID NO: 1 所示序列的第 135 位对应的位置处由丝氨酸(S)变为甘氨酸(G)的突变和与 SEQ ID NO: 1 所示序列的第 187 位对应的位置处蛋氨酸(M)变为异亮氨酸(I)的突变; 优选地, 所述 TEV 蛋白酶变体包含与 SEQ ID NO: 1 所示序列的第 219 位对应的位置处由丝氨酸(S)
15 变为缬氨酸(V)的突变; 优选其中所述 TEV 蛋白酶进一步包含一个或多个除上述突变以外的突变, 条件是所述 TEV 蛋白酶变体在宿主内表达过程中具有低酶切活性, 优选地与具有以 SEQ ID NO.10 所示的氨基酸序列的 S219V 变体相比更低的酶切活性和/或所述 TEV 蛋白酶变体在中高程度变性条件下, 优选在 3M-5M 尿素, 优选 3.5M-4.5M 尿素, 更优选 4M 尿素
20 或 1M-2M 盐酸胍, 优选 1.5M 的盐酸胍的体外环境下具有高酶切活性, 优选保留 S219V 变体的体外酶切活性。

12. 根据权利要求 10 或 11 所述的蛋白酶变体, 其中所述同源物包含与 SEQ ID NO: 4、5 或 6 具有至少 90%, 优选至少 95%, 更优选至少 98%, 最优选至少 99% 序列同一性的氨基酸序列; 优选地, 其中所述同源物包含
25 与 SEQ ID NO: 4、5 或 6 具有至少 1 个, 优选至少 2 个, 更优选至少 3 个, 最优选至少 4 个氨基酸位点的取代、缺失或添加的氨基酸序列; 优选地其中所述同源物在宿主内表达过程中具有低酶切活性, 优选与具有以 SEQ ID NO.10 所示的氨基酸序列的 S219V 变体相比更低的酶切活性和/或所述 TEV 蛋白酶变体在中高程度变性条件下, 优选在 3M-5M 尿素, 优选
30 3.5M-4.5M 尿素, 更优选 4M 尿素或 1M-2M 盐酸胍, 优选 1.5M 的盐酸胍的体外环境下保留 S219V 变体的体外酶切活性。

13. 融合蛋白，其包含根据权利要求 10-12 中任一项所述的蛋白酶变体；优选地所述融合蛋白包含结构蛋白酶-蛋白酶切割序列-Y1，优选 TEVp-sTEV-Y1，其中 Y1 为感兴趣的多肽；TEVp 为根据权利要求 10-12 中任一项所述的 TEV 蛋白酶变体；sTEV 为 TEV 蛋白酶切割序列，其是 EXXYXQG/S/H，其中 X 为任意氨基酸残基，优选所述切割序列选自 SEQ ID NO: 7 和 8；优选地其中感兴趣的多肽选自 ACTH、GLP-1/GLP-2、IFN- α 、IFN- γ 、Histatin、CCL5、SDF-1 α 、IGF-1、Leptin、BNP、Ex-4，优选 ACTH，优选人 ACTH，更优选 SEQ ID NO.2 所示的氨基酸序列的人 ACTH；优选其中蛋白酶变体与蛋白酶变体切割序列，例如 TEVp 与 sTEV 是直接连接的或者相隔一个或多个氨基酸残基，条件是蛋白酶变体，例如 TEVp 能识别并切割蛋白酶变体切割序列，例如 sTEV；优选其中蛋白酶变体切割序列，例如 sTEV 与 Y1 是直接连接的或者相隔一个或多个氨基酸残基，条件是蛋白酶变体，例如 TEVp 能识别并切割蛋白酶变体切割序列，例如 sTEV，优选地蛋白酶变体切割序列，例如 sTEV 与 Y1 是直接连接的；优选所述融合蛋白还包含标签，优选其中所述标签为纯化标签；优选所述标签选自下组：His 标签、麦芽糖结合蛋白(MBP)标签、谷胱甘肽转移酶(GST)标签、NusA 标签、SUMO 标签、Avi 标签、T7 标签、S 标签、Flag 标签、HA 标签、c-myc 标签、或 Strep II 标签；优选其中所述标签在融合蛋白的 N 端和/或 C 端，或者 TEVp 的 N 端无标签。

14. 编码根据权利要求 10-12 中任一项所述的蛋白酶变体或根据权利要求 13 所述的融合蛋白的多核苷酸序列，优选选自 SEQ ID NO. 14-16。

15. 多核苷酸构建体，其包含根据权利要求 14 所述的多核苷酸序列。

16. 表达载体，其包含根据权利要求 14 所述的多核苷酸序列或权利要求 15 所述的多核苷酸构建体；优选其中所述表达载体为真核生物表达载体或原核生物表达载体；优选选自下组：pRS314、pYES2、杆状病毒-S2 表达系统和 pcDNA3.1 或优选选自下组：pET 系列表达载体、pQE 系列表达载体和 pBAD 系列表达载体。

17. 细胞，其包含根据权利要求 14 所述的多核苷酸序列、根据权利要求 15 所述的多核苷酸构建体或根据权利要求 16 所述的表达载体；优选为真核细胞或原核细胞；优选所述真核细胞选自下组：酿酒酵母、昆虫细胞表达系统；优选所述原核细胞选自下组：BL21、BL21(DE3)、BL21(DE3)

pLysS、Rosetta2、Rosetta2 pLysS、Tuner(DE3)、或 Origami 2。

18. 制备根据权利要求 10-12 中任一项所述的蛋白酶变体，优选 TEV 蛋白酶变体的方法，其包括：

5 述细胞；
(1) 在适合于培养权利要求 17 所述的细胞的条件下在培养基中培养所

(2) 收获培养基，或裂解细胞以收获裂解物；

(3) 纯化获得蛋白酶变体，优选所述 TEV 蛋白酶变体。

19. 根据权利要求 10-12 中任一项所述的蛋白酶变体，优选 TEV 蛋白酶变体用于制备感兴趣的多肽的用途，其中蛋白酶变体，优选所述 TEV 蛋白酶变体与所述感兴趣的多肽以融合蛋白形式表达，优选地，所述融合蛋白为根据权利要求 13 所述的融合蛋白。

20. 制备感兴趣的多肽的方法，其包括：

(1) 在合适的条件下在培养基中培养根据权利要求 13 所述的融合蛋白；

15 (2) 获得融合蛋白的包涵体；

(3) 在高变性条件下，例如约 8M 尿素或约 6M 盐酸胍溶解包涵体；

(4) 在中高程度变性条件下，优选在 3M-5M 尿素，优选 3.5M-4.5M 尿素，更优选 4M 尿素或 1M-2M 盐酸胍，优选 1.5M 的盐酸胍的条件下在一定的温度，例如 20-40℃，优选 25℃温育一段时间，例如 10-24 小时，例如 12 小时；

(5) 用缓冲液例如 Tris-HCl，优选 50mM Tris-HCl 稀释后沉淀蛋白酶变体，优选 TEV 蛋白酶；

(6) 离心除去蛋白酶变体，优选 TEV 蛋白酶沉淀物，获得所述感兴趣的多肽；并且

25 (7) 纯化所述感兴趣的多肽，优选其中所述纯化用选自下组的技术进行：盐析、超滤、有机溶剂沉淀、凝胶过滤、离子交换层析柱、反相高效液相色谱。

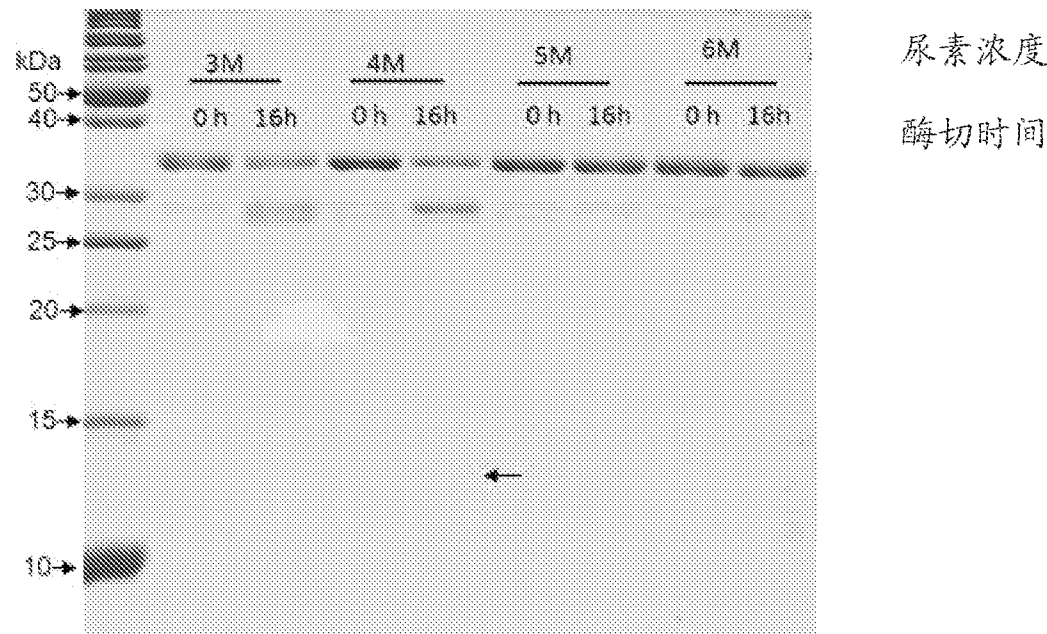


图 1

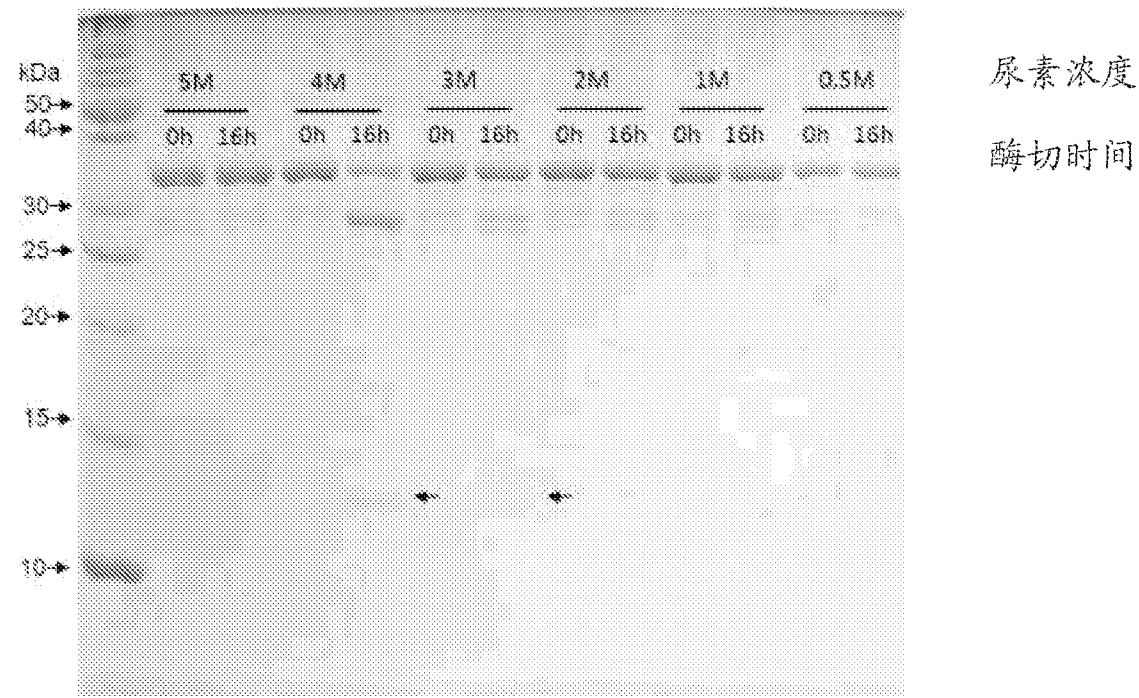


图 2

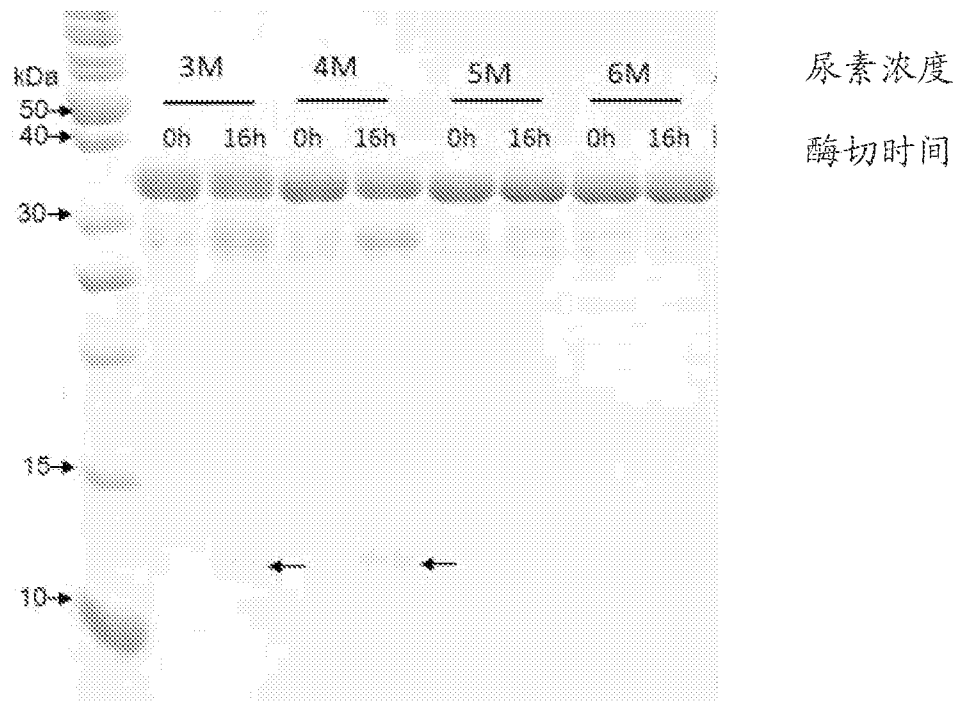


图 3

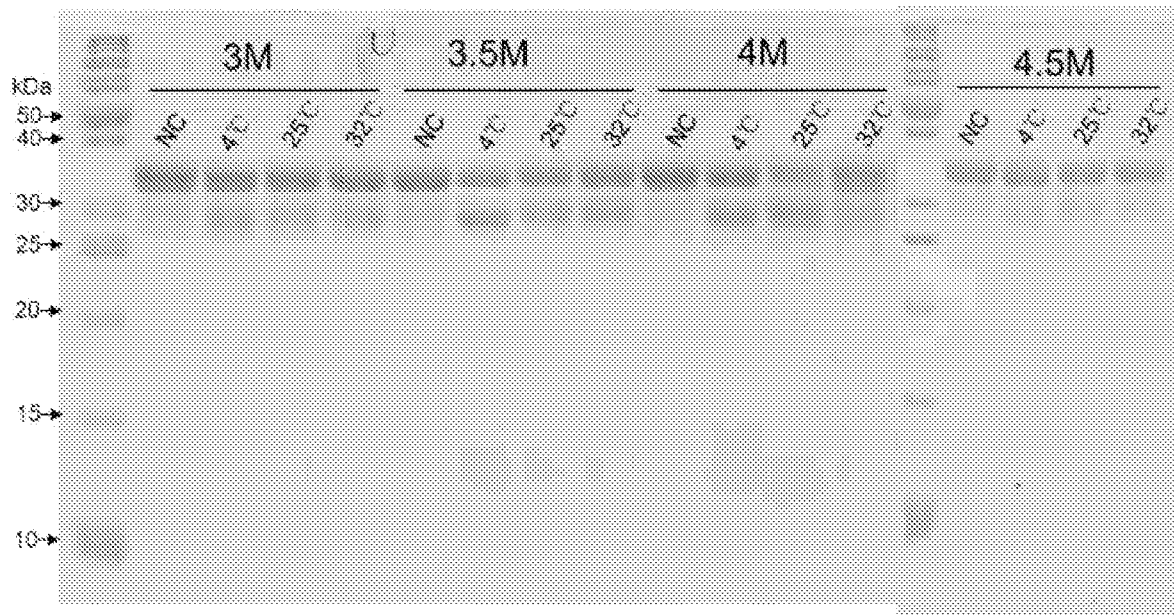


图 4A

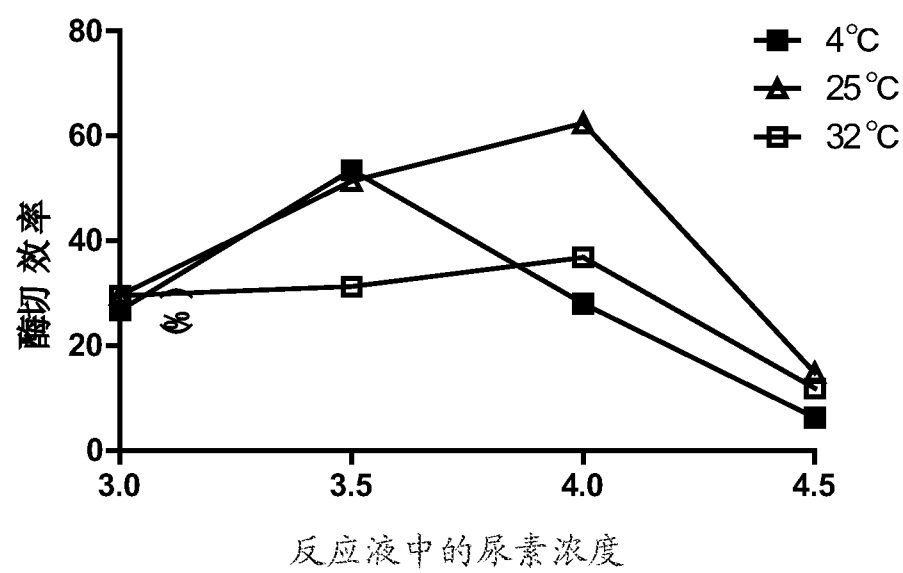


图 4B

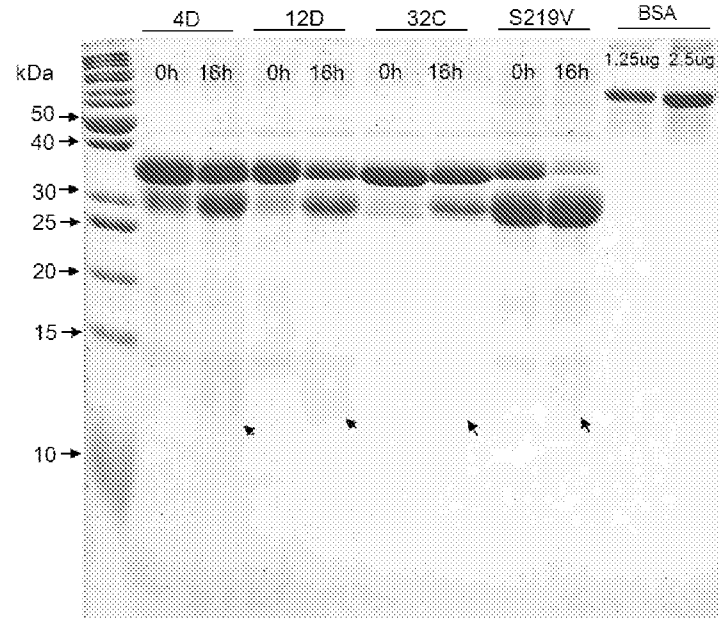


图 5

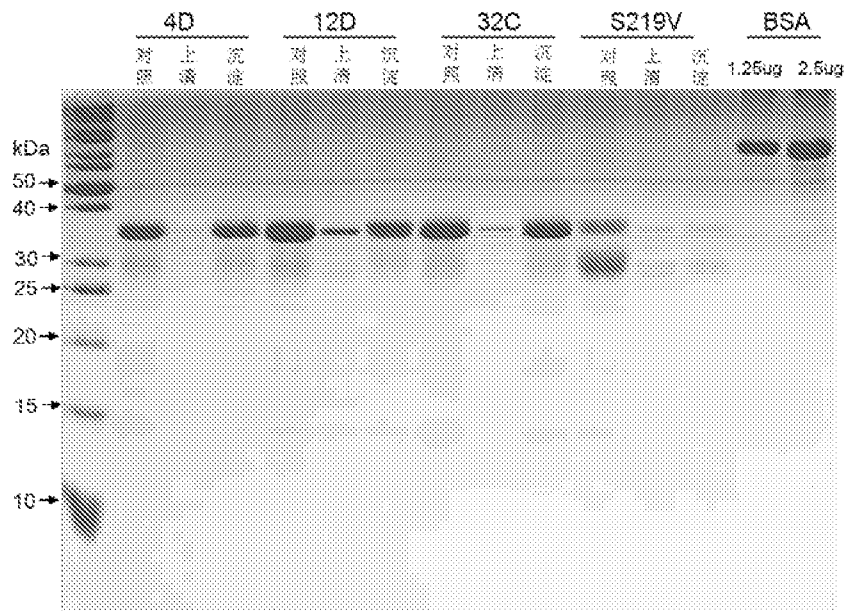


图 6

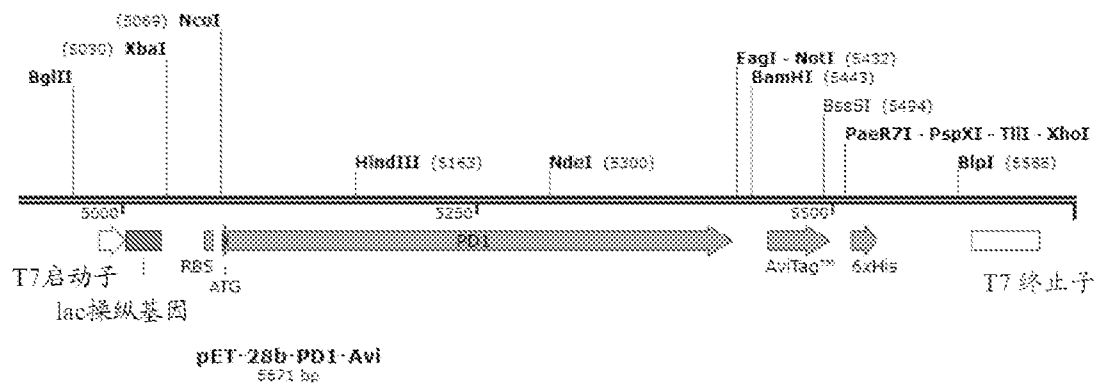


图 7

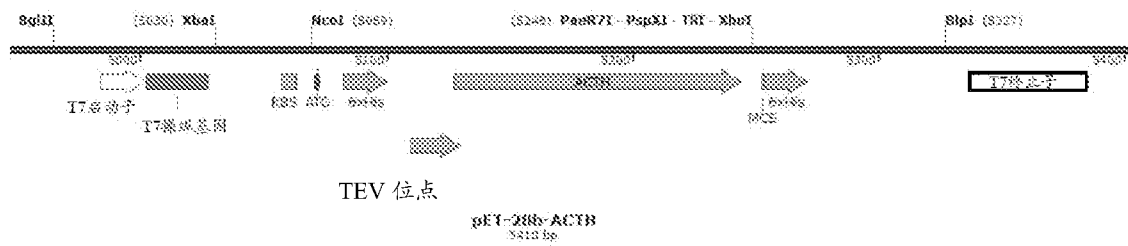


图 8

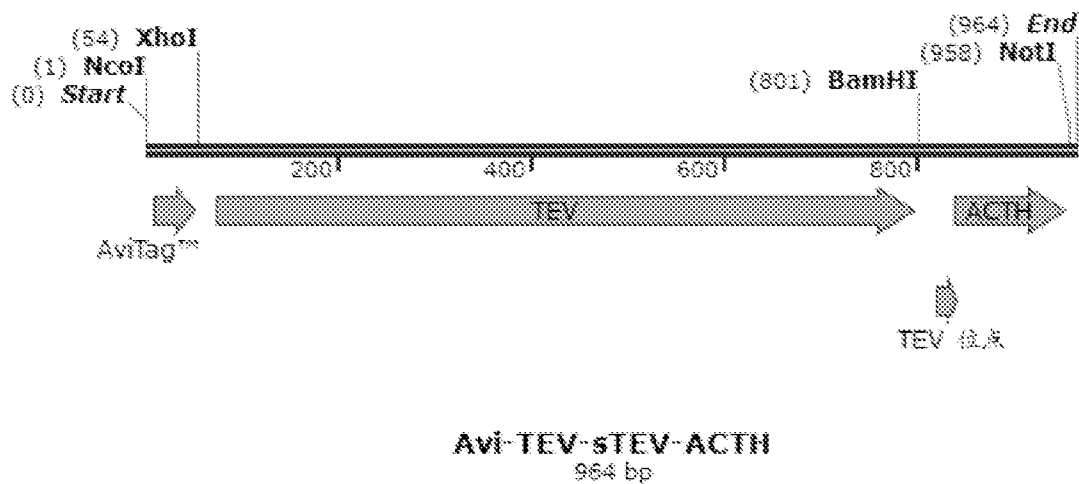


图 9

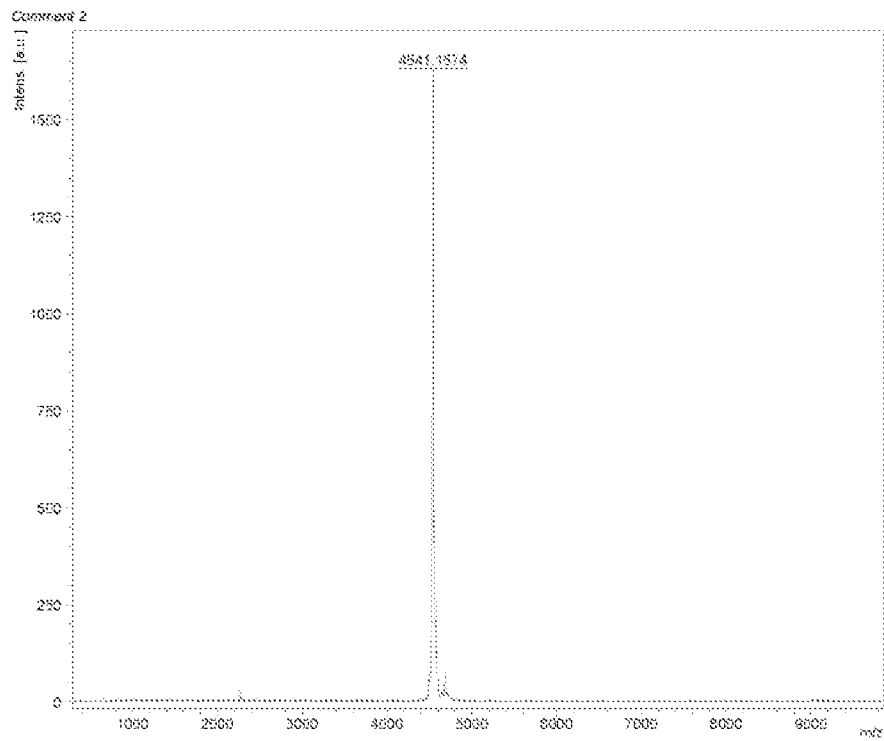


图 10

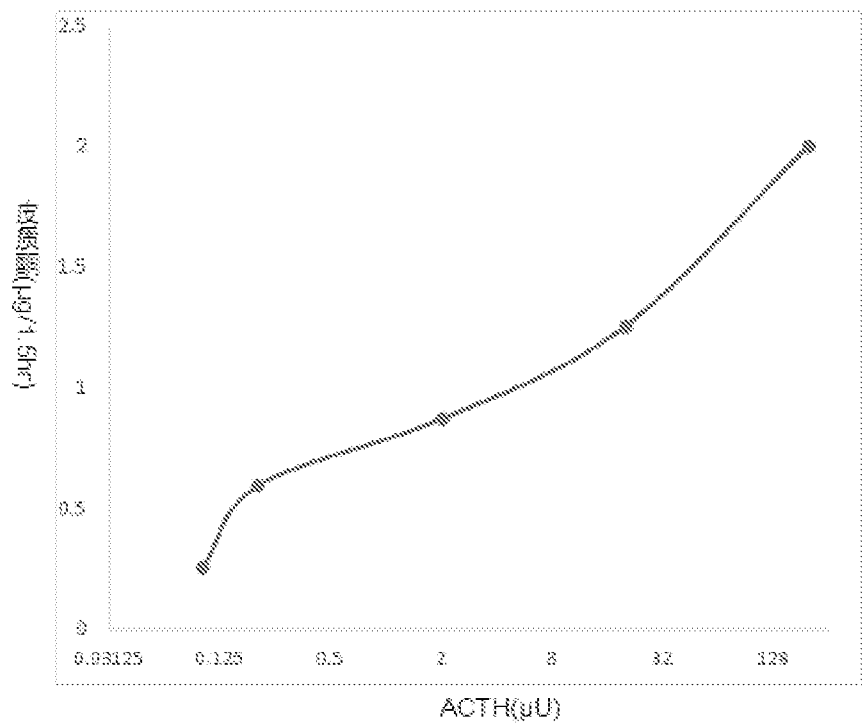


图 11

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2019/071417

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N 9/50(2006.01)i; C07K 19/00(2006.01)i; C12N 15/57(2006.01)i; C12N 15/62(2006.01)i; C12N 15/70(2006.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12N C07K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CNABS; DWPI; CNTXT; USTXT; WOTXT; EPTXT; TWTXT; JPTXT; CNKI; NCBI; EMBL; DDBJ; ISI WEB OF SCIENCE; 中国专利生物序列检索系统, CHINA PATENT BIOLOGICAL SEQUENCE SEARCH SYSTEM: 上饶市康可得生物科技有限公司, 刘日魁, 邹晓龙, 万江华, 噬菌体, 文库, 展示技术, S219V, H28L, L111F, L111H, S135G, I138K, M187I, Q196H, Avi-TEVp-sTEV-Y1, 突变, 变体, 烟草蚀纹病毒, 烟草蚀刻病毒, 烟草蚀斑病毒, TEV蛋白酶, 融合蛋白, 宿主内, 体内, 胞内, 烟草蚀纹病毒蛋白酶, 变性, 尿素, 盐酸胍, 活性, 酶活, search based on SEQ ID NOs: 1-16, TEVP, TEV protease, Tobacco Erosion, Etch Virus Protease, fusion protein, mutation, mutants, In-host, in-vivo, intracellular, Denaturation, urea, guanidine hydrochloride, Aminoformamidinium hydrochloride, Enzyme activity, activity, phage display technology

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	方杰 (FANG, Jie). "TEV蛋白酶突变体构建及性质分析 (Construction and Characterization of TEV Protease Mutants)" 中国优秀硕士学位论文全文数据库基础科学辑 (Basic Sciences, China Master's Theses Full-Text Database), No. no. 04, 15 April 2016 (2016-04-15), abstract, and section 3.3.2	10-18
X	CN 102822196 A (ALLERGAN, INC.) 12 December 2012 (2012-12-12) description, paragraphs [0182]- [0183]	10-17
Y	方杰 (FANG, Jie). "TEV蛋白酶突变体构建及性质分析 (Construction and Characterization of TEV Protease Mutants)" 中国优秀硕士学位论文全文数据库基础科学辑 (Basic Sciences, China Master's Theses Full-Text Database), No. no. 04, 15 April 2016 (2016-04-15), abstract, and section 3.3.2	19



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

28 April 2019

Date of mailing of the international search report

24 May 2019

Name and mailing address of the ISA/CN

China National Intellectual Property Administration
No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao Haidian District, Beijing
100088
China

Facsimile No. (86-10)62019451

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2019/071417

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	CN 102822196 A (ALLERGAN, INC.) 12 December 2012 (2012-12-12) description, paragraphs [0182]-[0183]	19
Y	US 2010035300 A1 (WANG, A.H.J. ET AL.) 11 February 2010 (2010-02-11) claim 14, and embodiment 1	19
A	方杰 (FANG, Jie). "TEV蛋白酶突变体构建及性质分析 (Construction and Characterization of TEV Protease Mutants)" 中国优秀硕士学位论文全文数据库基础科学辑 (<i>Basic Sciences, China Master's Theses Full-Text Database</i>), No. no. 04, 15 April 2016 (2016-04-15), abstract, and section 3.3.2	1-9, 20
A	CN 102822196 A (ALLERGAN, INC.) 12 December 2012 (2012-12-12) description, paragraphs [0182]-[0183]	1-9, 18, 20

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2019/071417

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
CN	102822196	A	12 December 2012	JP	2016164205	A	08 September 2016
				US	8546108	B2	01 October 2013
				RU	2569185	C2	20 November 2015
				AU	2016204285	B2	29 March 2018
				EP	2684890	A1	15 January 2014
				IL	221095	A	29 June 2017
				NZ	601472	A	30 August 2013
				US	2012295330	A1	22 November 2012
				MX	2012008650	A	23 November 2012
				HK	1179634	A1	24 October 2014
				CA	2788074	A1	28 July 2011
				EP	2528940	A1	05 December 2012
				CA	2788074	C	12 July 2016
				JP	2013517797	A	20 May 2013
				IL	246310	A	29 November 2018
				JP	6312745	B2	18 April 2018
				EP	3034511	A1	22 June 2016
				CN	102822196	B	17 December 2014
				RU	2012136227	A	10 March 2014
				KR	101930962	B1	19 December 2018
				JP	5956350	B2	27 July 2016
				KR	20120134117	A	11 December 2012
				ES	2592856	T3	01 December 2016
				WO	2011091370	A1	28 July 2011
				US	9340813	B2	17 May 2016
				AU	2011207445	A1	30 August 2012
				SG	182691	A1	30 August 2012
				EP	2684890	B1	20 April 2016
				SI	2528940	T1	31 July 2014
				US	9938514	B2	10 April 2018
				EP	2528940	B1	14 May 2014
				AU	2016204285	A1	14 July 2016
				US	2016319265	A1	03 November 2016
				US	2014030759	A1	30 January 2014
				ES	2488217	T3	26 August 2014
				ZA	201205793	A	29 May 2013
				MX	326825	B	08 January 2015
				SG	182691	B	18 February 2015
				HK	1179634	A0	04 October 2013
				IN	201207253	P1	18 December 2015
				AU	2011207445	B2	31 March 2016
US	2010035300	A1	11 February 2010	None			

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2019/071417

A. 主题的分类 C12N 9/50(2006.01)i; C07K 19/00(2006.01)i; C12N 15/57(2006.01)i; C12N 15/62(2006.01)i; C12N 15/70(2006.01)i 按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和IPC两种分类																	
B. 检索领域 检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号) C12N C07K 包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献 在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称,和使用的检索词(如使用)) CNABS;DWPI;CNTXT;USTXT;WOTXT;EPTXT;TWXT;JPTXT;CNKI;NCBI;EMBL;DDBJ;ISI Web of Science;中国专利生物序列检索系统: 上饶市康可得生物科技有限公司, 刘日魁, 邹晓龙, 万江华, 噬菌体, 文库, 展示技术, S219V, H28L, L111F, L111H, S135G, I138K, M187I, Q196H, Avi-TEVp-sTEV-Y1, 突变, 变体, 烟草蚀纹病毒, 烟草蚀刻病毒, 烟草蚀斑病毒, TEV蛋白酶, 融合蛋白, 宿主内, 体内, 胞内, 烟草蚀纹病毒蛋白酶, 变性, 尿素, 盐酸胍, 活性, 酶活, 基于序列1-16检索, TEVP, TEV protease, Tobacco Erosion, Etch Virus Protease, fusion protein, mutation, mutants, In-host, in-vivo, intracellular, Denaturation, urea, guanidine hydrochloride, Aminoformamide hydrochloride, Enzyme activity, activity, phage display technology																	
C. 相关文件 <table border="1"> <thead> <tr> <th>类 型*</th> <th>引用文件, 必要时, 指明相关段落</th> <th>相关的权利要求</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>X</td> <td>方杰. "TEV蛋白酶突变体构建及性质分析" 中国优秀硕士学位论文全文数据库基础科学辑, 第04期, 2016年 4月 15日 (2016 - 04 - 15), 摘要, 第3.3.2节</td> <td>10-18</td> </tr> <tr> <td>X</td> <td>CN 102822196 A (阿勒根公司) 2012年 12月 12日 (2012 - 12 - 12) 说明书第[0182]- [0183]段</td> <td>10-17</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>方杰. "TEV蛋白酶突变体构建及性质分析" 中国优秀硕士学位论文全文数据库基础科学辑, 第04期, 2016年 4月 15日 (2016 - 04 - 15), 摘要, 第3.3.2节</td> <td>19</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>CN 102822196 A (阿勒根公司) 2012年 12月 12日 (2012 - 12 - 12) 说明书第[0182]- [0183]段</td> <td>19</td> </tr> </tbody> </table>			类 型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求	X	方杰. "TEV蛋白酶突变体构建及性质分析" 中国优秀硕士学位论文全文数据库基础科学辑, 第04期, 2016年 4月 15日 (2016 - 04 - 15), 摘要, 第3.3.2节	10-18	X	CN 102822196 A (阿勒根公司) 2012年 12月 12日 (2012 - 12 - 12) 说明书第[0182]- [0183]段	10-17	Y	方杰. "TEV蛋白酶突变体构建及性质分析" 中国优秀硕士学位论文全文数据库基础科学辑, 第04期, 2016年 4月 15日 (2016 - 04 - 15), 摘要, 第3.3.2节	19	Y	CN 102822196 A (阿勒根公司) 2012年 12月 12日 (2012 - 12 - 12) 说明书第[0182]- [0183]段	19
类 型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求															
X	方杰. "TEV蛋白酶突变体构建及性质分析" 中国优秀硕士学位论文全文数据库基础科学辑, 第04期, 2016年 4月 15日 (2016 - 04 - 15), 摘要, 第3.3.2节	10-18															
X	CN 102822196 A (阿勒根公司) 2012年 12月 12日 (2012 - 12 - 12) 说明书第[0182]- [0183]段	10-17															
Y	方杰. "TEV蛋白酶突变体构建及性质分析" 中国优秀硕士学位论文全文数据库基础科学辑, 第04期, 2016年 4月 15日 (2016 - 04 - 15), 摘要, 第3.3.2节	19															
Y	CN 102822196 A (阿勒根公司) 2012年 12月 12日 (2012 - 12 - 12) 说明书第[0182]- [0183]段	19															
☒ 其余文件在C栏的续页中列出。 ☒ 见同族专利附件。																	
* 引用文件的具体类型: "A" 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件 "E" 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利 "L" 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件(如具体说明的) "O" 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件 "P" 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件 "T" 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了理解发明之理论或原理的在后文件 "X" 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性 "Y" 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性 "&" 同族专利的文件																	
国际检索实际完成的日期 2019年 4月 28日		国际检索报告邮寄日期 2019年 5月 24日															
ISA/CN的名称和邮寄地址 中国国家知识产权局(ISA/CN) 中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088 传真号 (86-10)62019451		受权官员 何华山 电话号码 (86-512)88996498															

C. 相关文件		
类 型*	引用文件，必要时，指明相关段落	相关的权利要求
Y	US 2010035300 A1 (WANG ANDREW H-J等) 2010年 2月 11日 (2010 - 02 - 11) 权利要求14、说明书实施例1	19
A	方杰: “TEV蛋白酶突变体构建及性质分析” 中国优秀硕士学位论文全文数据库基础科学辑, 第04期, 2016年 4月 15日 (2016 - 04 - 15), 摘要, 第3. 3. 2节	1-9, 20
A	CN 102822196 A (阿勒根公司) 2012年 12月 12日 (2012 - 12 - 12) 说明书第[0182]- [0183]段	1-9, 18, 20

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2019/071417

检索报告引用的专利文件			公布日 (年/月/日)	同族专利			公布日 (年/月/日)
CN	102822196	A	2012年 12月 12日	JP	2016164205	A	2016年 9月 8日
				US	8546108	B2	2013年 10月 1日
				RU	2569185	C2	2015年 11月 20日
				AU	2016204285	B2	2018年 3月 29日
				EP	2684890	A1	2014年 1月 15日
				IL	221095	A	2017年 6月 29日
				NZ	601472	A	2013年 8月 30日
				US	2012295330	A1	2012年 11月 22日
				MX	2012008650	A	2012年 11月 23日
				HK	1179634	A1	2014年 10月 24日
				CA	2788074	A1	2011年 7月 28日
				EP	2528940	A1	2012年 12月 5日
				CA	2788074	C	2016年 7月 12日
				JP	2013517797	A	2013年 5月 20日
				IL	246310	A	2018年 11月 29日
				JP	6312745	B2	2018年 4月 18日
				EP	3034511	A1	2016年 6月 22日
				CN	102822196	B	2014年 12月 17日
				RU	2012136227	A	2014年 3月 10日
				KR	101930962	B1	2018年 12月 19日
				JP	5956350	B2	2016年 7月 27日
				KR	20120134117	A	2012年 12月 11日
				ES	2592856	T3	2016年 12月 1日
				WO	2011091370	A1	2011年 7月 28日
				US	9340813	B2	2016年 5月 17日
				AU	2011207445	A1	2012年 8月 30日
				SG	182691	A1	2012年 8月 30日
				EP	2684890	B1	2016年 4月 20日
				SI	2528940	T1	2014年 7月 31日
				US	9938514	B2	2018年 4月 10日
				EP	2528940	B1	2014年 5月 14日
				AU	2016204285	A1	2016年 7月 14日
				US	2016319265	A1	2016年 11月 3日
				US	2014030759	A1	2014年 1月 30日
				ES	2488217	T3	2014年 8月 26日
				ZA	201205793	A	2013年 5月 29日
				MX	326825	B	2015年 1月 8日
				SG	182691	B	2015年 2月 18日
				HK	1179634	A0	2013年 10月 4日
				IN	201207253	P1	2015年 12月 18日
				AU	2011207445	B2	2016年 3月 31日
US	2010035300	A1	2010年 2月 11日	无			

表 PCT/ISA/210 (同族专利附件) (2015年1月)