



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 111848755 A

(43) 申请公布日 2020. 10. 30

(21) 申请号 202010728898.X

(22) 申请日 2014.07.08

(30) 优先权数据

1350860-1 2013.07.10 SE

1350859-3 2013.07.10 SE

(62) 分案原申请数据

201480039292.8 2014.07.08

(71) 申请人 通用电气医疗集团生物工艺研发股份
公司

地址 瑞典乌普萨拉

(72) 发明人 G. 罗德里戈 M. 安德 G. 鲍伦
T. 布杰克曼

(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公
司 72001

代理人 黄希贵

(51) Int. Cl.

C07K 14/31 (2006.01)

C07K 16/00 (2006.01)

C07K 1/22 (2006.01)

C12N 15/31 (2006.01)

B01J 20/32 (2006.01)

B01J 20/286 (2006.01)

B01D 15/38 (2006.01)

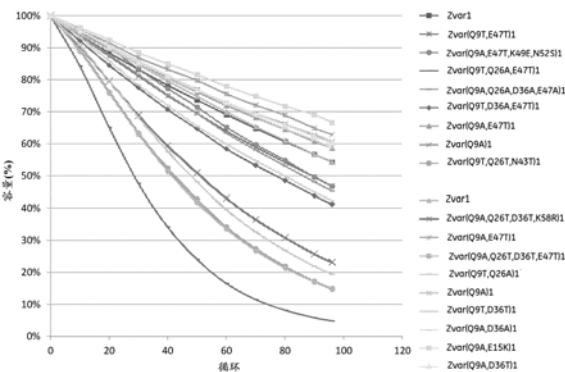
权利要求书2页 说明书12页
序列表12页 附图2页

(54) 发明名称

突变的免疫球蛋白结合多肽

(57) 摘要

本发明公开了碱性稳定性改进的多肽,所述多肽包含由SEQ ID NO 1或SEQ ID NO 2指定的葡萄球菌A蛋白(SpA)的B或C结构域或由SEQ ID NO 3指定的Z蛋白的突变体,其中至少9位的谷氨酰胺残基突变成天冬酰胺以外的氨基酸。本发明还公开了所述多肽的多聚体以及包含所述多聚体或多肽的分离基质。



1. 一种碱性稳定性改进的多肽,所述多肽包含由SEQ ID NO 1或SEQ ID NO 2指定的葡萄球菌A蛋白 (SpA) 的B或C结构域或由SEQ ID NO 3指定的Z蛋白的突变体,其中至少9位的谷氨酰胺残基突变成天冬酰胺以外的氨基酸。

2. 权利要求1的多肽,其中至少9位的谷氨酰胺残基突变成天冬酰胺、脯氨酸或半胱氨酸以外的氨基酸,例如突变成丙氨酸。

3. 前述权利要求中任一项的多肽,其中23位的氨基酸残基是苏氨酸或丙氨酸。

4. 前述权利要求中任一项的多肽,其中3位的氨基酸残基是丙氨酸和/或6位的氨基酸残基是天冬氨酸。

5. 前述权利要求中任一项的多肽,其中3位和6位的氨基酸残基的至少一个例如两个是天冬酰胺。

6. 前述权利要求中任一项的多肽,其中33位的丝氨酸残基突变成天冬酰胺、谷氨酰胺、脯氨酸或半胱氨酸以外的氨基酸,例如突变成赖氨酸,或其中33位的氨基酸残基是丝氨酸。

7. 前述权利要求中任一项的多肽,其中10位的谷氨酰胺残基突变成天冬酰胺、谷氨酰胺、脯氨酸或半胱氨酸以外的氨基酸,例如突变成丙氨酸,或其中10位的氨基酸残基是谷氨酰胺。

8. 前述权利要求中任一项的多肽,其中32位的谷氨酰胺残基突变成天冬酰胺、谷氨酰胺、脯氨酸或半胱氨酸以外的氨基酸,例如突变成丙氨酸,或其中32位的氨基酸残基是谷氨酰胺。

9. 前述权利要求中任一项的多肽,其中40位的谷氨酰胺残基突变成天冬酰胺、谷氨酰胺、脯氨酸或半胱氨酸以外的氨基酸,例如突变成丙氨酸或缬氨酸,或其中40位的氨基酸残基是谷氨酰胺。

10. 前述权利要求中任一项的多肽,其中55位的谷氨酰胺残基突变成天冬酰胺、谷氨酰胺、脯氨酸或半胱氨酸以外的氨基酸,例如突变成丙氨酸、丝氨酸或谷氨酸,或其中55位的氨基酸残基是谷氨酰胺。

11. 前述权利要求中任一项的多肽,其中26位的氨基酸残基是谷氨酰胺,或其中26位的谷氨酰胺残基突变成天冬酰胺、谷氨酰胺、脯氨酸、半胱氨酸、丙氨酸或苏氨酸以外的氨基酸。

12. 前述权利要求中任一项的多肽,其中47位的谷氨酸残基突变成天冬酰胺、谷氨酰胺、脯氨酸或半胱氨酸以外的氨基酸,或其中47位的氨基酸残基是谷氨酸。

13. 权利要求12的多肽,其中47位的谷氨酸残基突变成丙氨酸或苏氨酸。

14. 前述权利要求中任一项的多肽,其中15位的谷氨酸残基突变成天冬酰胺、谷氨酰胺、脯氨酸或半胱氨酸以外的氨基酸,或其中15位的氨基酸残基是谷氨酸。

15. 权利要求14的多肽,其中15位的谷氨酸残基突变成赖氨酸。

16. 前述权利要求中任一项的多肽,其中21位的天冬酰胺残基突变成谷氨酰胺、脯氨酸或半胱氨酸以外的氨基酸,例如突变成天冬氨酸,或其中21位的氨基酸残基是天冬酰胺。

17. 前述权利要求中任一项的多肽,其中36位的天冬氨酸残基突变成谷氨酰胺、脯氨酸或半胱氨酸以外的氨基酸,或其中36位的氨基酸是天冬氨酸。

18. 权利要求17的多肽,其中36位的天冬氨酸残基突变成丙氨酸或苏氨酸。

19. 前述权利要求中任一项的多肽,其中所述突变选自:Q9A、Q9A,E15K、Q9A,E47T、Q9A,

D36T、Q9A, D36A和Q9T, E47T。

20. 前述权利要求中任一项的多肽, 其包含选自以下的序列或基本由选自以下的序列组成: SEQ ID NO 6、SEQ ID NO 7、SEQ ID NO 8、SEQ ID NO 9、SEQ ID NO 10、SEQ ID NO 20、SEQ ID NO 25、SEQ ID NO 26和SEQ ID NO 27。

21. 一种多聚体, 其包含前述权利要求中任一项限定的多个多肽单元或基本由其组成。

22. 权利要求21的多聚体, 其中所述多肽单元通过包含至多15个氨基酸的元件连接。

23. 权利要求21或22的多聚体, 其为二聚体、三聚体、四聚体、五聚体或六聚体。

24. 前述权利要求中任一项的多肽或多聚体, 其在C端或N端还包含选自一个半胱氨酸残基、多个赖氨酸残基和多个组氨酸残基的一个或多个偶联元件。

25. 一种核酸或载体, 其编码前述权利要求中任一项的多肽或多聚体。

26. 一种表达系统, 其包含权利要求25的核酸或载体。

27. 一种分离基质, 其中权利要求1-24中任一项的多个多肽或多聚体与固体支持体偶联。

28. 权利要求27的分离基质, 其中所述多肽或多聚体通过硫醚键与所述固体支持体偶联。

29. 权利要求28或29的分离基质, 其中所述固体支持体是多糖。

30. 一种分离免疫球蛋白的方法, 其中使用权利要求27-29中任一项的分离基质。

31. 权利要求30的方法, 所述方法包括以下步骤:

- a) 使包含免疫球蛋白的液体样品与权利要求27-29中任一项的分离基质接触,
- b) 将所述分离基质用洗液洗涤,
- c) 用洗脱液将所述免疫球蛋白从所述分离基质中洗脱, 和
- d) 将所述分离基质用清洗液清洗。

32. 权利要求31的方法, 其中所述清洗液是碱性的, 例如pH为13-14。

33. 权利要求31或32的方法, 其中所述清洗液包含0.1-1.0 M NaOH或KOH, 例如0.5-1.0 M NaOH或KOH。

34. 权利要求31-33中任一项的方法, 其中步骤a)-d) 重复至少10次, 例如至少50次或50-200次。

突变的免疫球蛋白结合多肽

[0001] 本申请是与母案发明名称相同的分案申请，母案的中国申请号是201480039292.8，国际申请号是PCT/SE2014/050872，申请日是2014年7月8日。

[0002] 发明的技术领域

本发明涉及亲和层析领域，更具体地说涉及A蛋白的突变的免疫球蛋白结合结构域，其可用于免疫球蛋白的亲和层析法。本发明还涉及突变结构域的多聚体和含有突变结构域或多聚体的分离基质。

[0003] 发明背景

免疫球蛋白代表着全球制造和研发中最流行的生物制药产品。对这个特殊治疗市场的高度商业需求和由此带来的价值导致重点放在制药公司上，以最大化其相应mAb生产过程的生产率，同时控制相关成本。

[0004] 在大多数情况下使用亲和层析法作为这些免疫球蛋白分子(例如单克隆或多克隆抗体)纯化中的关键步骤之一。一类特别令人感兴趣的亲和试剂是能够与免疫球蛋白分子的不可变部分特异性结合的蛋白质，所述相互作用不依赖于抗体的抗原结合特异性。所述试剂可广泛用于从不同样品中亲和层析法回收免疫球蛋白，所述样品例如但不限于血清或血浆制品或细胞培养物来源的原料。所述蛋白质的一个实例是葡萄球菌A蛋白，其含有能够与来自不同物种的IgG免疫球蛋白的Fc和Fab部分结合的结构域。

[0005] 基于葡萄球菌A蛋白(Staphylococcal protein A, SpA)的试剂由于其高亲和力和选择性，广泛应用于生物技术领域，例如用于检测或量化，以及用于抗体的俘获和纯化的亲和层析法。目前，对于来自包括工业细胞培养上清液在内的不同样品的单克隆抗体及其片段的分离，基于SpA的亲和介质可能是最广泛使用的亲和介质。因此，包含A蛋白-配体的各种基质是市购可获得的，例如，呈天然A蛋白的形式(例如A蛋白SEPHAROSE™, GE Healthcare, Uppsala, Sweden)，还包括重组A蛋白(例如rProtein A-SEPHAROSE™, GE Healthcare)。更具体地说，在市售重组A蛋白产品中进行遗传操作的目的在于促进其与支持物连接。

[0006] 这些应用，像其它亲和层析法应用一样，需要全面注意明确除去污染物。所述污染物可例如为在层析分析程序中吸附于固定相或基质上的非洗脱分子，例如不需要的生物分子或微生物，包括例如蛋白质、碳水化合物、脂质、细菌和病毒。从基质中除去所述污染物通常在所需产物的第一次洗脱之后进行，以在后续使用之前使基质再生。所述除去通常包括称为就地清洗(cleaning-in-place, CIP)的程序，其中使用能够从固定相中洗脱污染物的剂。常用的这样一类剂是通过所述固定相的碱性溶液。目前最广泛使用的清洁剂和消毒剂是NaOH，其浓度的范围可为0.1直到例如1 M，这取决于污染的程度和性质。该策略与将基质暴露于超过13的pH值有关。对于许多含有蛋白质性亲和配体的亲和层析基质，所述碱性环境是非常严酷的条件，并由于配体对所涉及的高pH的不稳定性，因此导致能力降低。

[0007] 因此大量研究集中在开发显示耐受碱性pH值的能力改进的工程改造的蛋白质配体。例如，Gülich等人(Susanne Gülich, Martin Linhult, Per-Åke Nygren, Mathias Uhlén, Sophia Hober, Journal of Biotechnology 80 (2000), 169-178)提出经工程改

造以改进链球菌白蛋白结合结构域 (ABD) 在碱性环境中的稳定性质的蛋白质。Gülich等人制备了ABD的突变体,其中所有4个天冬酰胺残基被亮氨酸(1个残基)、天冬氨酸(2个残基)和赖氨酸(1个残基)置换。此外,Gülich等人报告了他们的突变体显示类似于天然蛋白的靶蛋白结合性质,且在重复暴露于碱性条件后,含有经工程改造的配体的亲和柱显示与使用亲代未工程改造的配体制备的柱相比较高的结合能力。因此,本文得出结论,所有4个天冬酰胺残基可被置换而对结构和功能无任何显著作用。

[0008] 最近的研究展示了也可使A蛋白 (SpA) 发挥类似性质的改变。美国专利申请出版物US 2005/0143566公开了当至少一个天冬酰胺残基突变成为谷氨酰胺或天冬氨酸以外的氨基酸时,该突变赋予在高达约13-14的pH值下与亲代SpA相比提高的化学稳定性,所述亲代SpA例如SpA的B结构域或Z蛋白,一种来自SpA的B结构域的合成构建体(US 5,143,844)。作者表明,当这些突变的蛋白质用作亲和配体时,分离介质如预期一样可更好地耐受使用碱性剂的清洗程序。目的在于提高碱稳定性的A蛋白结构域的其它突变还公开于WO 2008/039141、JP 2006304633A、EP 1992692A1、EP2202310A2、WO 2010/110288、WO 2012/086660和WO 2012/083425。然而,目前可获得的突变仍对碱性pH敏感,并且在清洗期间NaOH浓度通常限于0.1 M,这意味着难以实现完全清洗。可改进清洗的较高NaOH浓度,导致不可接受的能力丧失。

[0009] 因此该领域仍需要获得含有对碱性清洗程序的稳定性进一步改进的蛋白质配体的分离基质。

[0010] 发明概述

本发明的一个方面在于提供碱性稳定性改进的多肽。这使用权利要求1中限定的多肽实现。

[0011] 一个优势是碱性稳定性相对于亲代多肽改进。另一个优势是对免疫球蛋白和其它含Fc的蛋白质的高选择性结合。

[0012] 本发明的第二个方面在于提供碱性稳定性改进的包含多个多肽的多聚体。这使用权利要求中限定的多聚体来实现。

[0013] 本发明的第三个方面在于提供编码碱性稳定性改进的多肽或多聚体的核酸或载体。这使用权利要求限定的核酸或载体来实现。

[0014] 本发明的第四个方面在于提供能够表达碱性稳定性改进的多肽或多聚体的表达系统。这使用权利要求中限定的表达系统来实现。

[0015] 本发明的第五个方面在于提供能够选择性结合免疫球蛋白和其它含Fc的蛋白质并显示碱性稳定性改进的分离基质。这使用权利要求中限定的分离基质来实现。

[0016] 本发明的第六个方面在于提供分离免疫球蛋白或其它含Fc的蛋白质的有效和经济的方法。这使用权利要求中限定的方法实现。

[0017] 在从属权利要求中描述了本发明的其它合适的实施方案。

[0018] 定义

术语“抗体”和“免疫球蛋白”在本文中可互换地使用,要了解还包括抗体的片段,包含抗体或抗体片段的融合蛋白和包含抗体或抗体片段的缀合物。

[0019] 术语“Fc结合多肽”和“Fc结合蛋白”分别是指能够与抗体的可结晶部分 (Fc) 结合的多肽或蛋白质,包括例如A蛋白和G蛋白或其任何保持所述结合性质的片段或融合蛋白。

[0020] 附图简述

图1显示来自实施例1的与SPR生物传感器芯片偶联的突变或非突变的单体Zvar (SEQ ID NO 4) 多肽变体的碱稳定性的结果。

[0021] 图2显示具有最高碱稳定性的多肽变体的图1的放大。

[0022] 实施方案的详细描述

一方面,本发明公开了多肽,所述多肽包含由SEQ ID NO 1或SEQ ID NO 2指定的葡萄球菌A蛋白 (SpA) 的B或C结构域或由SEQ ID NO 3或SEQ ID NO 4指定的Z蛋白的一个或多个突变体或基本由其组成,其中至少9位的谷氨酰胺残基突变成天冬酰胺以外的氨基酸。SEQ ID NO 4表示具有突变N3A,N6D,N23T的Z蛋白的变体,在此称为Zvar。这些结构域中Q9的突变赋予与亲代结构域/多肽相比改进的碱稳定性,而并不削弱免疫球蛋白结合性质。因此,该多肽也可描述为Fc-或免疫球蛋白结合多肽。

SEQ ID NO 1 (SpA B 结构域)

ADNKFNKEQQ NAFYEILHLP NLNEEQRNGF IQSLKDDPSQ SANLLAEAKK
LNDAQAPK

SEQ ID NO 2 (SpA C 结构域)

ADNKFNKEQQ NAFYEILHLP NLTEEQRNGF IQSLKDDPSV SKEILAEAKK
LNDAQAPK

SEQ ID NO 3 (Z 蛋白)

VDNKFNKEQQ NAFYEILHLP NLNEEQRNAF IQSLKDDPSQ SANLLAEAKK
LNDAQAPK

SEQ ID NO 4 (Zvar)

VDAKFDKEQQ NAFYEILHLP NLTEEQRNAF IQSLKDDPSQ SANLLAEAKK
LNDAQAPK

[0023] 在一些实施方案中,SEQ ID NO 1-4的至少9位的谷氨酰胺残基突变成天冬酰胺、脯氨酸或半胱氨酸以外的氨基酸,例如突变成丙氨酸。这具有以下优势:不引入脱酰胺敏感的天冬酰胺、链构象不受脯氨酸的引入干扰和不引入二硫键的位点。Q9突变(例如Q9A突变)可以是唯一的突变或多肽还可包含其它突变,例如在N3、N6、Q10、E15、H18、N21、N23、N28、G/A29、D36、Q/V40、A/K42、N/E43、L/I44、E47、Q55和P57位置的至少一个中。在这些位置的一个或多个中,原始氨基酸残基可被例如不是天冬酰胺、脯氨酸或半胱氨酸的氨基酸取代。原始氨基酸残基可被例如丙氨酸、缬氨酸、苏氨酸、丝氨酸、赖氨酸或天冬氨酸取代。

[0024] 在某些实施方案中,23位的氨基酸残基是苏氨酸或丙氨酸。

[0025] 在一些实施方案中,3位的氨基酸残基是丙氨酸和/或6位的氨基酸残基是天冬氨酸。在某些实施方案中,3位和6位的氨基酸残基的至少一个是天冬酰胺。

[0026] 在某些实施方案中,33位的丝氨酸残基突变成天冬酰胺、谷氨酰胺、脯氨酸或半胱氨酸以外的氨基酸,例如突变成赖氨酸。在备选的实施方案中,33位的氨基酸残基是丝氨酸。

[0027] 在一些实施方案中,10位的谷氨酰胺残基突变成天冬酰胺、谷氨酰胺、脯氨酸或半胱氨酸以外的氨基酸,例如突变成丙氨酸。在备选的实施方案中,10位的氨基酸残基是谷氨酰胺。

[0028] 在某些实施方案中,32位的谷氨酰胺残基突变成天冬酰胺、谷氨酰胺、脯氨酸或半胱氨酸以外的氨基酸,例如突变成丙氨酸。在备选的实施方案中,32位的氨基酸残基是谷氨酰胺。

[0029] 在一些实施方案中,40位的谷氨酰胺残基突变成天冬酰胺、谷氨酰胺、脯氨酸或半胱氨酸以外的氨基酸,例如突变成丙氨酸或缬氨酸。在备选的实施方案中,40位的氨基酸残基是谷氨酰胺。

[0030] 在某些实施方案中,55位的谷氨酰胺残基突变成天冬酰胺、谷氨酰胺、脯氨酸或半胱氨酸以外的氨基酸,例如突变成丙氨酸、丝氨酸或谷氨酸。在备选的实施方案中,55位的氨基酸残基是谷氨酰胺。

[0031] 在一些实施方案中,26位的氨基酸残基是谷氨酰胺。似乎当Q26不突变成苏氨酸或丙氨酸时,具有Q9突变的多肽的碱稳定性更好。在备选的实施方案中,26位的氨基酸残基可突变成天冬酰胺、谷氨酰胺、脯氨酸、半胱氨酸、苏氨酸或丙氨酸以外的氨基酸。

[0032] 在某些实施方案中,15位的谷氨酸残基突变成天冬酰胺、谷氨酰胺、脯氨酸或半胱氨酸以外的氨基酸。在具体的实施方案中,15位的谷氨酸残基突变成赖氨酸。这种偶然突变进一步改进具有Q9突变的多肽的碱性稳定性。在备选的实施方案中,15位的氨基酸残基是谷氨酸。

[0033] 在一些实施方案中,47位的谷氨酸残基突变成天冬酰胺、谷氨酰胺、脯氨酸或半胱氨酸以外的氨基酸,例如突变成丙氨酸或苏氨酸。在备选的实施方案中,47位的氨基酸残基是谷氨酸。

[0034] 在一些实施方案中,21位的天冬酰胺残基突变成谷氨酰胺、脯氨酸或半胱氨酸以外的氨基酸,例如突变成天冬氨酸。在备选的实施方案中,21位的氨基酸残基是天冬酰胺。

[0035] 在某些实施方案中,36位的天冬氨酸残基突变成谷氨酰胺、脯氨酸或半胱氨酸以外的氨基酸。在具体的实施方案中,36位的天冬氨酸残基突变成丙氨酸或苏氨酸。在备选的实施方案中,36位的氨基酸是天冬氨酸。

[0036] 在一些实施方案中,突变选自Q9A、Q9A,E15K、Q9A,E47T、Q9A,D36T、Q9A,D36A和Q9T,E47T。这些突变提供特别高的碱性稳定性。

[0037] 在某些实施方案中,多肽包含选自以下的序列:SEQ ID NO 6、SEQ ID NO 7、SEQ ID NO 8、SEQ ID NO 9、SEQ ID NO 10、SEQ ID NO 20、SEQ ID NO 21、SEQ ID NO 22和SEQ ID NO 23,另外和SEQ ID NO 25、SEQ ID NO 26和SEQ ID NO 27。它可例如通过选自SEQ ID NO 6-10和20-23的序列限定,但还可包含C端和/或N端的其它氨基酸残基。

SEQ ID NO 6 Zvar(Q9A)

VDAKFDKEAQ NAFYEILHLP NLTEEQRNAF IQSLKDDPSQ SANLLAEAKK
LNDAPK

SEQ ID NO 7 Zvar(Q9A,E15K)

VDAKFDKEAQ NAFYKILHLP NLTEEQRNAF IQSLKDDPSQ SANLLAEAKK
LNDAPK

SEQ ID NO 8 Zvar(Q9A,E47T)

VDAKFDKEAQ NAFYEILHLP NLTEEQRNAF IQSLKDDPSQ SANLLATAKK
LNDAPK

SEQ ID NO 9 Zvar(Q9A,D36T)

VDAKFDKEAQ NAFYEILHLP NLTEEQRNAF IQSLKTDPSQ SANLLAEAKK
LNDAPK

SEQ ID NO 10 Zvar(Q9A,D36A)

VDAKFDKEAQ NAFYEILHLP NLTEEQRNAF IQSLKADPSQ SANLLAEAKK
LNDAPK

SEQ ID NO 20 Zvar(Q9T,E47T)

VDAKFDKETQ NAFYEILHLP NLTEEQRNAF IQSLKDDPSQ SANLLATAKK
LNDAPK

SEQ ID NO 21

VDAKFDKEAQ NAFYKILHLP NLTEEQRNAF IQSLKTDPSV SKNILAAKK
LNDAPK

SEQ ID NO 22

VDNKFNEAQ NAFYKILHLP NLTEEQRNAF IQSLKTDPSV SKNILAAKK
LNDAPK

SEQ ID NO 23

VDNKFNEAQ NAFYKILHLP NLTEEQRAAF IQSLKTDPSV SKNILAAKK
LNDAPK

SEQ ID NO 24 Zvar4

AQ VDAKFDKEQQ NAFYEILHLP NLTEEQRNAF IQSLKDDPSQ SANLLAEAKK
LNDAPK VDAKFDKEQQ NAFYEILHLP NLTEEQRNAF IQSLKDDPSQ
SANLLAEAKK LNDAPK VDAKFDKEQQ NAFYEILHLP NLTEEQRNAF
IQSLKDDPSQ SANLLAEAKK LNDAPK VDAKFDKEQQ NAFYEILHLP
NLTEEQRNAF IQSLKDDPSQ SANLLAEAKK LNDAPKC

SEQ ID NO 25 Zvar(Q9A)4

AQ VDAKFDKEAQ NAFYEILHLP NLTEEQRNAF IQSLKDDPSQ SANLLAEAKK
LNDAPK VDAKFDKEAQ NAFYEILHLP NLTEEQRNAF IQSLKDDPSQ
SANLLAEAKK LNDAPK VDAKFDKEAQ NAFYEILHLP NLTEEQRNAF
IQSLKDDPSQ SANLLAEAKK LNDAPK VDAKFDKEAQ NAFYEILHLP
NLTEEQRNAF IQSLKDDPSQ SANLLAEAKK LNDAPKC

SEQ ID NO 26 Zvar(Q9A,E15K)4

AQ VDAKFDKEAQ NAFYKILHLP NLTEEQRNAF IQSLKDDPSQ SANLLAEAKK
LNDAPK VDAKFDKEAQ NAFYKILHLP NLTEEQRNAF IQSLKDDPSQ
SANLLAEAKK LNDAPK VDAKFDKEAQ NAFYKILHLP NLTEEQRNAF
IQSLKDDPSQ SANLLAEAKK LNDAPK VDAKFDKEAQ NAFYKILHLP
NLTEEQRNAF IQSLKDDPSQ SANLLAEAKK LNDAPKC

SEQ ID NO 27 Zvar(Q9A,E47T)4

AQ VDAKFDKEAQ NAFYEILHLP NLTEEQRNAF IQSLKDDPSQ SANLLATAKK
LNDAQAPK VDAKFDKEAQ NAFYEILHLP NLTEEQRNAF IQSLKDDPSQ
SANLLATAKK LNDAQAPK VDAKFDKEAQ NAFYEILHLP NLTEEQRNAF
IQSLKDDPSQ SANLLATAKK LNDAQAPK VDAKFDKEAQ NAFYEILHLP
NLTEEQRNAF IQSLKDDPSQ SANLLATAKK LNDAQAPKC

[0038] 第二方面,本发明公开了包含上文公开的任何实施方案限定的多个多肽单元的多聚体或基本由其组成。所述多聚体可为例如二聚体、三聚体、四聚体、五聚体或六聚体。它可以是其中多聚体中的全部单元是相同的同多聚体,或它可以是其中至少一个单元不同于其它单元的异多聚体。有利的是,多聚体中的所有单元例如通过包含上文公开的突变而都是碱稳定性的。多肽可通过多肽C端和N端间的肽键各自直接连接。或者,多聚体中的两个或更多个单元可通过包含寡聚或多聚物类的元件,例如包含至多15或30个氨基酸例如1-5、1-10或5-10个氨基酸的元件连接。所述连接的性质可优选不使蛋白质单元的空间构象去稳定。这可通过例如避免在连接中存在脯氨酸来实现。此外,所述连接还应优选在碱性环境中足够稳定以使得突变的蛋白质单元的性质不受损害。为此,如果所述连接不含天冬酰胺,则是有利的。如果所述连接不含谷氨酰胺,则也可能是有利的。多聚体另可在N端包含多个氨基酸残基,其源自克隆过程或构成来自被切下的信号转导序列的残基。其它氨基酸残基的数目可为例如15或更少,例如10或更少,或5或更少。作为具体实例,多聚体可在N端包含AQ序列。

[0039] 在一些实施方案中,上文公开的多肽和/或多聚体还在C端或N端包含一个或多个偶联元件,所述偶联元件选自半胱氨酸残基、多个赖氨酸残基和多个组氨酸残基。偶联元件可为例如C端上的单个半胱氨酸。偶联元件可与C端或N端直接连接,或它或它们可通过包含至多15个氨基酸,例如1-5、1-10或5-10个氨基酸的接头连接。这种序列段(strech)还优选在碱性环境中是足够稳定的以使得突变蛋白质的性质不受损害。为此,如果所述序列段不含天冬酰胺,则是有利的。如果所述序列段不含谷氨酰胺,则也可能是有利的。具有C端半胱氨酸的优势在于蛋白质的端点偶联可通过半胱氨酸硫醇基与支持体上的亲电子基团的反应来实现。这提供对结合能力重要的偶联蛋白质的优异移动性。

[0040] 第三方面,本发明公开了编码上文公开的任何实施方案的多肽或多聚体的核酸。因此,本发明包括本发明核酸序列的所有形式,例如编码多肽或多聚体的RNA和DNA。本发明包括载体,例如质粒,其除编码序列以外,还包含用于表达本发明的多肽或多聚体所需的信号序列。在一个实施方案中,载体包含编码本发明的多聚体的核酸,其中编码各个单元的单独的核酸可具有同源或异源DNA序列。

[0041] 第四方面,本发明公开了表达系统,其包含上文公开的核酸或载体。表达系统可为例如革兰氏阳性或革兰氏阴性原核宿主细胞系统,例如经修饰以表达本发明的多肽或多聚体的大肠杆菌(*E. coli*)或芽孢杆菌(*Bacillus sp.*)。在一个备选的实施方案中,表达系统是真核宿主细胞系统,例如酵母,例如巴斯德毕赤酵母(*Pichia pastoris*)或酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)。

[0042] 第五方面,本发明公开了分离基质,其中使上文公开的任何实施方案的多种多肽或多聚体与固体支持体偶联。所述基质可用于分离免疫球蛋白或其它含Fc的蛋白质,并且

由于多肽/多聚体的碱稳定性改进,基质在清洗时可承受高碱性条件,这在生物过程分离环境下长期重复使用是必需的。

[0043] 正如技术人员应了解的,表达的多肽或多聚体在固定于支持体之前应纯化到适当程度。所述纯化方法是本领域众所周知的,并且基于蛋白质的配体与支持体的固定容易采用标准方法进行。下面将更详细地讨论合适的方法和支持体。

[0044] 本发明的基质的固体支持体可以是任何合适的众所周知的种类。常规亲和分离基质常常具有有机性质并基于将亲水表面暴露于所使用的含水介质的多聚体,即使羟基(-OH)、羧基(-COOH)、甲酰氨基(-CONH₂、可能呈N-取代的形式)、氨基(-NH₂、可能呈取代的形式)、寡乙烯氧基或多乙烯氧基暴露于其外部,如存在的话,还暴露于内部表面。固体支持体可适当地为多孔的。多孔性可表示为K_{av}或K_d值(特定大小的探针分子可达到的孔容积的分数),所述值,例如按照在凝胶过滤原则和方法(Gel Filtration Principles and Methods), Pharmacia LKB Biotechnology 1991, 第6-13页中描述的方法,通过逆向大小排阻层析法测量。根据定义,K_d和K_{av}值两者总是介于0-1的范围内。K_{av}值可有利地为0.6-0.95,例如0.7-0.90或0.6-0.8,如用M_w为110 kDa的葡聚糖作为探针分子测量。其优势是支持体具有很大一部分的孔能够容纳本发明的多肽/多聚体和与多肽/多聚体结合的免疫球蛋白两者并提供免疫球蛋白往来于结合部位的大量运输(mass transport)。

[0045] 多肽或多聚体可通过利用存在于配体上的例如硫醇基、氨基和/或羧基的常规偶联技术与支持体连接。双环氧化物、表氯醇、CNBr、N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)等是众所周知的偶联试剂。在支持体和多肽/多聚体之间,可引入称为间隔物的分子,其改进多肽/多聚体的可用性,并促进多肽/多聚体与支持体的化学偶联。或者,多肽/多聚体可通过非共价键合(例如物理吸附或生物特异性吸附)与支持体连接。

[0046] 在一些实施方案中,基质包含5-20,例如5-15 mg/ml、5-11 mg/ml或6-11 mg/ml与所述支持体偶联的所述多肽或多聚体。可通过偶联过程中所用的多肽/多聚体的浓度、所用的偶联条件和/或所用支持体的孔结构,来控制偶联的多肽/多聚体的量。一般说来,基质的绝对结合能力随偶联的多肽/多聚体的量增加,至少达到其中孔变得被偶联的多肽/多聚体显著收窄的点。每mg偶联的多肽/多聚体的相对结合能力将在高偶联水平时降低,产生上文规定范围内成本有益最适度。

[0047] 在某些实施方案中,多肽或多聚体通过硫醚键与支持体偶联。用于进行所述偶联的方法是本领域众所周知的,并且通过本领域技术人员采用标准技术和设备容易地进行。硫醚键是柔性和稳定的,并且一般适用于亲和和层析法。特别是当硫醚键是通过多肽或多聚体上的末端或近末端半胱氨酸残基时,偶联的多肽/多聚体的移动性提高,这提供改进的结合能力和结合动力学。在一些实施方案中,多肽/多聚体通过上述蛋白质上提供的C端半胱氨酸偶联。这允许半胱氨酸硫醇基与支持体上的亲电子基团(例如环氧基、卤代醇基等)有效偶联,导致硫醚桥偶联。

[0048] 在某些实施方案中,支持体包含多羟基多聚体,例如多糖。多糖的实例包括例如葡聚糖、淀粉、纤维素、普鲁兰多糖(pululan)、琼脂、琼脂糖等。多糖是固有亲水的,具有低程度的非特异性相互作用,它们提供高含量的反应性(可激活)羟基,并且它们对于用于生物处理中的碱性清洗溶液一般是稳定的。

[0049] 在一些实施方案中,支持体包含琼脂或琼脂糖。可按照标准方法,例如逆向悬浮胶

凝(inverse suspension gelation) (S Hjertén: Biochim Biophys Acta 79(2), 393-398 (1964)), 容易地制备用于本发明中的支持体。或者, 基础基质是市购可获得的产品, 例如SEPHAROSE™ FF (GE Healthcare)。在一个对于大规模分离是特别有利的实施方案中, 采用US6602990或US7396467 (其通过引用以其整体结合到本文中) 中描述的方法使支持体适于增加其刚性, 因此使基质更适于高流速。

[0050] 在某些实施方案中, 使支持体 (例如多糖或琼脂糖支持体) 与例如羟基烷基醚交联键(crosslinks) 交联。产生所述交联的交联试剂可以是例如表卤代醇如表氯醇、二环氧化物如丁二醇二环氧甘油醚、烯丙基化试剂如烯丙基卤化物或烯丙基缩水甘油基醚。交联对支持体的刚性是有利的, 并且改进化学稳定性。羟基烷基醚交联是对碱稳定的, 并且不引起显著的非特异性吸附。

[0051] 或者, 固体支持体基于合成多聚体, 例如聚乙烯醇、多羟基烷基丙烯酸酯、多羟基烷基甲基丙烯酸酯、聚丙烯酰胺、聚甲基丙烯酰胺等。在疏水多聚体的情况下, 例如基于联乙烯和单乙烯取代的苯的基质, 基质的表面常被亲水化以将上文定义的亲水基团暴露于周围的水性液体中。这类多聚体容易按照标准方法生产, 参见例如“通过悬浮聚合开发的基于苯乙烯的多聚体支持体 (Styrene based polymer supports developed by suspension polymerization)” (R Arshady: Chimica e L'Industria 70(9), 70-75 (1988))。或者, 使用市购可获得的产品, 例如SOURCE™ (GE Healthcare)。在另一个备选方法中, 本发明的固体支持体包含无机性质 (例如二氧化硅、氧化锆等) 的支持体。

[0052] 在又一个实施方案中, 固体支持体呈另一种形式, 例如表面、芯片、毛细管或滤器 (例如膜或深度滤器基质 (depth filter matrix))。

[0053] 至于本发明基质的形状, 在一个实施方案中, 基质呈多孔整料的形式。在一个备选的实施方案中, 基质呈可以是多孔或无孔的珠状形式或颗粒形式。呈珠状形式或颗粒形式的基质可作为填充床或以悬浮形式使用。悬浮形式包括称为膨胀床和纯悬浮的那些, 其中颗粒或小珠自由移动。在整料、填充床和膨胀床的情况下, 分离程序通常遵循具有浓度梯度的常规层析法。在纯悬浮的情况下, 将采用分批方式。

[0054] 第六方面, 本发明公开了分离免疫球蛋白的方法, 其中使用上文公开的分离基质。

[0055] 在某些实施方案中, 所述方法包括以下步骤:

- a) 使包含免疫球蛋白的液体样品与上文公开的分离基质接触,
- b) 将所述分离基质用洗液洗涤,
- c) 用洗脱液将免疫球蛋白从分离基质中洗脱, 和
- d) 将分离基质用清洗液清洗。

[0056] 所述方法还可包括在步骤a) 之前的步骤, 其提供上文所述实施方案中任一个的亲分离基质, 并提供包含免疫球蛋白和至少一种其它物质的溶液作为液体样品; 以及步骤c) 之后的步骤, 其回收洗脱物并任选使洗脱物经历进一步的分离步骤, 例如通过阴离子或阳离子交换层析法、多模层析法 (multimodal chromatography) 和/或疏水相互作用层析法。液体样品、洗液和洗脱液的合适组成, 以及进行分离的通用条件是亲和层析领域、特别是A蛋白层析领域众所周知的。包含含Fc的蛋白质和至少一种其它物质的液体样品可包含宿主细胞蛋白质 (HCP), 例如CHO细胞或大肠杆菌蛋白质。CHO细胞和大肠杆菌蛋白质的含量可合宜地通过针对这些蛋白质的免疫测定法测定, 例如来自Cygnus Technologies的CHO

HCP或大肠杆菌HCP ELISA试剂盒。可在步骤b) 期间解吸宿主细胞蛋白质或CHO细胞/大肠杆菌蛋白质。

[0057] 可使用用于自A蛋白介质的洗脱的任何合适的溶液进行洗脱。这可以是例如pH为5或更低、例如pH 2.5-5或3-5的溶液或缓冲液。在某些情况下还可以是pH为11或更高、例如pH 11-14或pH 11-13的溶液或缓冲液。在一些实施方案中,洗脱缓冲液或洗脱缓冲液梯度包含至少一个一官能、二官能或三官能羧酸或所述羧酸的盐。在某些实施方案中,洗脱缓冲液或洗脱缓冲液梯度包含选自以下的至少一种阴离子物类:乙酸根、柠檬酸根、氨基乙酸根、琥珀酸根、磷酸根和甲酸根。

[0058] 在一些实施方案中,清洗液是碱性的,例如pH为13-14。所述溶液提供基质、特别是内部上端(at the upper end of the interval)的有效清洗。

[0059] 在某些实施方案中,清洗液包含0.1-2.0 M NaOH或KOH,例如0.5-2.0或0.5-1.0 M NaOH或KOH。

[0060] 在一些实施方案中,步骤a)-d) 重复至少10次,例如至少50次或50-200次。

实施例

[0061] 蛋白质的诱变

使用编码天冬酰胺置换物的寡核苷酸,通过2步骤PCR进行位点定向诱变。将含有Z或C的单一结构域的质粒作为模板使用。使PCR片段连接至大肠杆菌表达载体(pG0)。DNA测序用来证实插入片段的正确序列。

[0062] 为了形成突变体的多聚体,使用位于C或Z结构域的起始密码子(GTA GAC)的Acc I位点,其对应于氨基酸VD。用于单体结构域的pG0用Acc I消化并进行CIP处理。设计了特定针对各个变体的Acc I黏性末端引物,并从各个模板产生2个重叠的PCR产物。将PCR产物纯化,通过比较2%琼脂糖凝胶上的PCR产物来估算浓度。在连接缓冲液中使等量的成对的PCR产物杂交(45分钟内90°C → 25°C)。所得产物大约¼由可能连接至Acc I位点的片段(正确的PCR片段和/或消化的载体)组成。在连接和转化后,对集落进行PCR筛选以鉴定含有所需突变体的构建体。阳性克隆通过DNA测序验证。

[0063] 构建体表达和纯化

通过大肠杆菌K12在标准培养基中发酵,在细菌周质中表达构建体。在发酵后,对细胞进行热处理以将周质内含物释放到培养基中。通过用孔径大小为0.2 μm的膜进行微孔过滤,来回收释放到培养基中的构建体。

[0064] 通过亲和力对现处于来自过滤步骤的透过物中的每个构建体进行纯化。将透过物加载到含有固定化IgG的层析介质中。将加载产物用磷酸缓冲盐水洗涤,并且通过降低pH洗脱。将洗脱合并物调节至中性pH,并通过加入二硫苏糖醇还原。然后将样品加载到阴离子交换剂中。在洗涤步骤后,将构建体在NaCl梯度中洗脱以将其与任何污染物分离。通过超滤使洗脱合并物浓缩至40-50 mg/ml。应注意,固定化IgG介质中构建体成功的亲和纯化表明,所述构建体对IgG具有高亲和力。

[0065] 纯化的配体用LC-MS分析以测定纯度并确定与预期(基于氨基酸序列)相当的分子量。

[0066] 实施例1

使用GE Healthcare的胺偶联试剂盒(用于胺与芯片上的羧基甲基的碳二亚胺偶联),在Biacore仪器(GE Healthcare,Sweden)中以足以得到约1000RU的信号强度的量,将表1中所列的纯化的单体配体固定在Biacore CM5传感器芯片(GE Healthcare,Sweden)上。为了跟踪固定化表面的IgG结合能力,使1mg/ml人多克隆IgG (Gammanorm)从芯片上流过,并记录信号强度。然后对表面进行就地清洗(CIP),即在室温(22 $\pm$ 2 $^{\circ}$ C)下用500mM NaOH冲洗10分钟。这重复90个循环,在每个循环后,跟踪固定化配体碱性稳定性作为IgG结合能力(信号强度)的相对丢失。结果示出于图1和表1,并表明与亲代结构Zvar1相比,至少配体Zvar (Q9A) 1、Zvar (Q9A,E15K) 1、Zvar (Q9A,E47T) 1、Zvar (Q9A,D36T) 1、Zvar (Q9A,D36A) 1和Zvar (Q9T,E47T) 1具有改进的碱稳定性。

[0067] 表1.

配体	SEQ ID NO.	在96个循环后的剩余容量(%)
Zvar1	4	54
Zvar (Q9A) 1	6	61
Zvar (Q9A,E15K) 1	7	67
Zvar (Q9A,E47T) 1	8	63
Zvar (Q9A,D36T) 1	9	60
Zvar (Q9A,D36A) 1	10	65
Zvar (Q9T,Q26A,E47T) 1	11	5
Zvar (Q9A,Q26T,D36T,E47T) 1	12	15
Zvar (Q9T,Q26T,N43T) 1	13	16
Zvar (Q9T,Q26A) 1	14	20
Zvar (Q9A,Q26T,D36T,K58R) 1	15	23
Zvar (Q9T,D36A,E47T) 1	16	41
Zvar (Q9T,D36T) 1	17	42
Zvar (Q9A,Q26A,D36A,E47A) 1	18	45
Zvar (Q9A,E47T,K49E,N52S) 1	19	47
Zvar (Q9T,E47T) 1	20	58

实施例2

采用下述方法,将表2的纯化的四聚体配体(全都有额外的N端半胱氨酸)固定在琼脂糖珠上,并评价容量和稳定性。

[0068] 表2

配体	SEQ ID NO.	配体含量 (mg/ml)	起始IgG容量 Qb10 (mg/ml)	在100个循环后剩余的 IgG容量 (mg/ml)	在100个循环后剩余的 IgG容量 (%)
Zvar4	24	6.4	47.6	34.1	71.7
Zvar (Q9A) 4	25	6.3	46.3	38.8	83.9
Zvar (Q9A,E15K) 4	26	6.2	49.8	41.0	82.3
Zvar (Q9A,E47T) 4	27	7.2	50.5	40.8	80.8

活化

所用的基础基质是直径中值为85微米(体积加权)的刚性交联的琼脂糖珠,其按照US6602990的方法制备,且按照在凝胶过滤原则和方法(Gel Filtration Principles and Methods), Pharmacia LKB Biotechnology 1991, 第6-13页中描述的方法,其孔径相当于Mw为110 kDa的葡聚糖的0.70的逆向凝胶过滤层析Kav值。

[0069] 将25 mL (g) 沥干的基础基质、10.0 mL蒸馏水和2.02 g NaOH在100 mL长颈瓶中在机械搅拌下于25℃混合10分钟。加入4.0 mL表氯醇,使反应进行2小时。将活化的凝胶用10凝胶沉积体积(GV)的水洗涤。

[0070] 偶联

向50 ml Falcon管中的20 mL配体溶液(50 mg/mL)中加入169 mg NaHCO₃、21 mg Na₂CO₃、175 mg NaCl和7 mg EDTA。将Falcon管置于辊式摇床(roller table)上5-10分钟,然后加入77 mg DTE。使还原进行>45分钟。然后使配体溶液在用Sephadex G-25装填的PD10柱上脱盐。通过测量276 nm UV吸收,来测定脱盐溶液中的配体含量。

[0071] 将活化的凝胶用3-5 GV (0.1 M磷酸盐/1 mM EDTA pH 8.6)洗涤,然后按照US6399750中描述的方法,使配体偶联。使用于实验中的所有缓冲液通过氮气脱气至少5-10分钟。可通过改变配体溶液的浓度,来控制凝胶的配体含量。

[0072] 在固定化后,将凝胶用3xGV蒸馏水洗涤。将凝胶+ 1 GV (0.1 M磷酸盐/1 mM EDTA/10%硫代甘油pH 8.6)混合,将管置于摇床中在室温下过夜。然后将凝胶用3xGV (0.1 M TRIS/0.15 M NaCl pH 8.6)和0.5 M HAc轮流洗涤,然后用8-10xGV蒸馏水洗涤。将凝胶样品送往外面的实验室用于氨基酸分析,根据总氨基酸含量计算配体含量(mg/ml凝胶)。

[0073] 将2 ml树脂装填到TRICORN™ 5 100柱中。

[0074] 蛋白质

Gammanorm 165 mg/ml (Octapharma),在平衡缓冲液中稀释至1mg/ml。

[0075] 平衡缓冲液

APB磷酸盐缓冲液20 mM +0.15 M NaCl,pH 7.4 (Elsichrom AB)。

[0076] 吸附缓冲液

APB磷酸盐缓冲液20 mM +0.15 M NaCl,pH 7.4 (Elsichrom AB)。

[0077] 洗脱缓冲液

柠檬酸盐缓冲液0.1 M,pH 6。

[0078] 柠檬酸盐缓冲液0.1 M,pH 3。

[0079] CIP

0.5 M NaOH

用ÄKTAExplorer 10系统以2.4分钟的停留时间测定漏过容量(breakthrough capacity)。使平衡缓冲液流过旁通柱(bypass column)直到获得稳定的基线。这在自动调零之前进行。将样品施加在柱上,直到获得100% UV信号。然后,再次施加平衡缓冲液,直到获得稳定的基线。

[0080] 将样品加载到柱中,直到达到最大吸光度85%的UV信号。然后将柱用平衡缓冲液以0.5ml/分钟的流速洗涤,直到最大吸光度20%的UV信号。以0.5 ml/分钟的流速自pH 6.0开始以pH 3.0结束,用线性梯度洗脱蛋白质超过10柱体积。然后以0.5ml/分钟的流速将柱用

0.1M NaOH清洗,并用平衡缓冲液再次平衡后,用20%乙醇清洗。最后的步骤是通过加载样品通过旁通柱检查样品浓度直到得到100% UV信号。

[0081] 对于计算10%的漏过容量,应用下列方程式。即加载到柱中直到柱洗脱物中IgG的浓度为进料中IgG浓度10%的IgG的量。

$$q_{10\%} = \frac{C_0}{V_c} \left[V_{app} - V_{sys} - \int_{V_{sys}}^{V_{app}} \frac{A(V) - A_{sub}}{A_{100\%} - A_{sub}} * dV \right]$$

[0082] $A_{100\%}$ = 100% UV信号;

A_{sub} = 来自非结合IgG亚类的吸光度贡献;

$A(V)$ = 指定施加体积的吸光度;

V_c = 柱体积;

V_{app} = 直到10%漏过所施加的体积;

V_{sys} = 系统死体积;

C_0 = 进料浓度。

[0083] 计算10%漏过时的动态结合能力(DBC),研究曲线的外观。还就结合、洗脱和CIP峰而言,对曲线进行了研究。针对10%和80%漏过计算动态结合能力(DBC)。

[0084] 在重复暴露于碱性清洗溶液之前和之后,测定了10%漏过DBC (Qb10)。每个循环包括以5微升/分钟的速率用泵送通过柱的0.5 M NaOH的CIP步骤,导致每个循环10分钟暴露时间。暴露发生在室温(22 +/- 2℃)下。表2显示在100个循环(即1000分钟累积暴露于0.5 M NaOH的时间)之后呈绝对数值和相对于初始容量两者的剩余容量。

[0085] 本书面描述利用实施例以公开本发明,包括最佳方式,以及也使得本领域的任何技术人员能够实施本发明,包括制备和使用任何装置或系统,并进行任何结合的方法。本发明的可获得专利的范围受权利要求书限定,可包括本领域技术人员想到的其它实施例。如果所述其它实施例具有与权利要求书的文字语言并没有差异的结构要素,或者如果所述其它实施例包括与权利要求书的文字语言无实质差异的等同结构要素,则其意图在权利要求书的范围内。

序列表

<110> 通用电气医疗集团生物工艺研发股份公司

<120> 突变的免疫球蛋白结合多肽

<130> PU1328

<160> 27

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 58

<212> PRT

<213> 金黄葡萄球菌 (Staphylococcus aureus)

<400> 1

```
Ala Asp Asn Lys Phe Asn Lys Glu Gln Gln Asn Ala Phe Tyr Glu Ile
1          5          10          15
Leu His Leu Pro Asn Leu Asn Glu Glu Gln Arg Asn Gly Phe Ile Gln
          20          25          30
Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ala Asn Leu Leu Ala Glu Ala
          35          40          45
Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys
          50          55
```

<210> 2

<211> 58

<212> PRT

<213> 金黄葡萄球菌

<400> 2

```
Ala Asp Asn Lys Phe Asn Lys Glu Gln Gln Asn Ala Phe Tyr Glu Ile
1          5          10          15
Leu His Leu Pro Asn Leu Thr Glu Glu Gln Arg Asn Gly Phe Ile Gln
          20          25          30
Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser Val Ser Lys Glu Ile Leu Ala Glu Ala
          35          40          45
Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys
          50          55
```

<210> 3

<211> 58

<212> PRT

<213> 大肠杆菌

<400> 3

```
Val Asp Asn Lys Phe Asn Lys Glu Gln Gln Asn Ala Phe Tyr Glu Ile
```

1	5	10	15
Leu His Leu Pro Asn Leu Asn Glu Glu Gln Arg Asn Ala Phe Ile Gln			
20	25	30	
Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ala Asn Leu Leu Ala Glu Ala			
35	40	45	
Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys			
50	55		

<210> 4

<211> 58

<212> PRT

<213> 大肠杆菌

<400> 4

Val Asp Ala Lys Phe Asp Lys Glu Gln Gln Asn Ala Phe Tyr Glu Ile
1 5 10 15
Leu His Leu Pro Asn Leu Thr Glu Glu Gln Arg Asn Ala Phe Ile Gln
20 25 30
Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ala Asn Leu Leu Ala Glu Ala
35 40 45
Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys
50 55

<210> 5

<211> 58

<212> PRT

<213> 大肠杆菌

<400> 5

Val Asp Asn Lys Phe Asn Lys Glu Gln Gln Asn Ala Phe Tyr Glu Ile
1 5 10 15
Leu His Leu Pro Asn Leu Thr Glu Glu Gln Arg Asn Ala Phe Ile Gln
20 25 30
Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ala Asn Leu Leu Ala Glu Ala
35 40 45
Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys
50 55

<210> 6

<211> 58

<212> PRT

<213> 大肠杆菌

<400> 6

Val Asp Ala Lys Phe Asp Lys Glu Ala Gln Asn Ala Phe Tyr Glu Ile

1	5	10	15
Leu His Leu Pro Asn Leu Thr Glu Glu Gln Arg Asn Ala Phe Ile Gln			
20	25	30	
Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ala Asn Leu Leu Ala Glu Ala			
35	40	45	
Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys			
50	55		

<210> 7

<211> 58

<212> PRT

<213> 大肠杆菌

<400> 7

Val Asp Ala Lys Phe Asp Lys Glu Ala Gln Asn Ala Phe Tyr Lys Ile
1 5 10 15
Leu His Leu Pro Asn Leu Thr Glu Glu Gln Arg Asn Ala Phe Ile Gln
20 25 30
Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ala Asn Leu Leu Ala Glu Ala
35 40 45
Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys
50 55

<210> 8

<211> 58

<212> PRT

<213> 大肠杆菌

<400> 8

Val Asp Ala Lys Phe Asp Lys Glu Ala Gln Asn Ala Phe Tyr Glu Ile
1 5 10 15
Leu His Leu Pro Asn Leu Thr Glu Glu Gln Arg Asn Ala Phe Ile Gln
20 25 30
Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ala Asn Leu Leu Ala Thr Ala
35 40 45
Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys
50 55

<210> 9

<211> 58

<212> PRT

<213> 大肠杆菌

<400> 9

Val Asp Ala Lys Phe Asp Lys Glu Ala Gln Asn Ala Phe Tyr Glu Ile

1	5	10	15
Leu His Leu Pro Asn Leu Thr Glu Glu Gln Arg Asn Ala Phe Ile Gln			
20	25	30	
Ser Leu Lys Thr Asp Pro Ser Gln Ser Ala Asn Leu Leu Ala Glu Ala			
35	40	45	
Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys			
50	55		

<210> 10

<211> 58

<212> PRT

<213> 大肠杆菌

<400> 10

Val Asp Ala Lys Phe Asp Lys Glu Ala Gln Asn Ala Phe Tyr Glu Ile			
1	5	10	15
Leu His Leu Pro Asn Leu Thr Glu Glu Gln Arg Asn Ala Phe Ile Gln			
20	25	30	
Ser Leu Lys Ala Asp Pro Ser Gln Ser Ala Asn Leu Leu Ala Glu Ala			
35	40	45	
Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys			
50	55		

<210> 11

<211> 58

<212> PRT

<213> 大肠杆菌

<400> 11

Val Asp Ala Lys Phe Asp Lys Glu Thr Gln Asn Ala Phe Tyr Glu Ile			
1	5	10	15
Leu His Leu Pro Asn Leu Thr Glu Glu Ala Arg Asn Ala Phe Ile Gln			
20	25	30	
Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ala Asn Leu Leu Ala Thr Ala			
35	40	45	
Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys			
50	55		

<210> 12

<211> 58

<212> PRT

<213> 大肠杆菌

<400> 12

Val Asp Ala Lys Phe Asp Lys Glu Ala Gln Asn Ala Phe Tyr Glu Ile			
---	--	--	--

1 5 10 15
Leu His Leu Pro Asn Leu Thr Glu Glu Thr Arg Asn Ala Phe Ile Gln
20 25 30
Ser Leu Lys Thr Asp Pro Ser Gln Ser Ala Asn Leu Leu Ala Thr Ala
35 40 45
Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys
50 55

<210> 13

<211> 58

<212> PRT

<213> 大肠杆菌

<400> 13

Val Asp Ala Lys Phe Asp Lys Glu Thr Gln Asn Ala Phe Tyr Glu Ile
1 5 10 15
Leu His Leu Pro Asn Leu Thr Glu Glu Thr Arg Asn Ala Phe Ile Gln
20 25 30
Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ala Thr Leu Leu Ala Glu Ala
35 40 45
Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys
50 55

<210> 14

<211> 58

<212> PRT

<213> 大肠杆菌

<400> 14

Val Asp Ala Lys Phe Asp Lys Glu Thr Gln Asn Ala Phe Tyr Glu Ile
1 5 10 15
Leu His Leu Pro Asn Leu Thr Glu Glu Ala Arg Asn Ala Phe Ile Gln
20 25 30
Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ala Asn Leu Leu Ala Glu Ala
35 40 45
Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys
50 55

<210> 15

<211> 58

<212> PRT

<213> 大肠杆菌

<400> 15

Val Asp Ala Lys Phe Asp Lys Glu Ala Gln Asn Ala Phe Tyr Glu Ile

1 5 10 15
Leu His Leu Pro Asn Leu Thr Glu Glu Thr Arg Asn Ala Phe Ile Gln
 20 25 30
Ser Leu Lys Thr Asp Pro Ser Gln Ser Ala Asn Leu Leu Ala Glu Ala
 35 40 45
Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Arg
 50 55

<210> 16

<211> 58

<212> PRT

<213> 大肠杆菌

<400> 16

Val Asp Ala Lys Phe Asp Lys Glu Thr Gln Asn Ala Phe Tyr Glu Ile
1 5 10 15
Leu His Leu Pro Asn Leu Thr Glu Glu Gln Arg Asn Ala Phe Ile Gln
 20 25 30
Ser Leu Lys Ala Asp Pro Ser Gln Ser Ala Asn Leu Leu Ala Thr Ala
 35 40 45
Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys
 50 55

<210> 17

<211> 58

<212> PRT

<213> 大肠杆菌

<400> 17

Val Asp Ala Lys Phe Asp Lys Glu Thr Gln Asn Ala Phe Tyr Glu Ile
1 5 10 15
Leu His Leu Pro Asn Leu Thr Glu Glu Gln Arg Asn Ala Phe Ile Gln
 20 25 30
Ser Leu Lys Thr Asp Pro Ser Gln Ser Ala Asn Leu Leu Ala Glu Ala
 35 40 45
Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys
 50 55

<210> 18

<211> 58

<212> PRT

<213> 大肠杆菌

<400> 18

Val Asp Ala Lys Phe Asp Lys Glu Ala Gln Asn Ala Phe Tyr Glu Ile

1 5 10 15
Leu His Leu Pro Asn Leu Thr Glu Glu Ala Arg Asn Ala Phe Ile Gln
 20 25 30
Ser Leu Lys Ala Asp Pro Ser Gln Ser Ala Asn Leu Leu Ala Ala Ala
 35 40 45
Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys
 50 55

<210> 19

<211> 58

<212> PRT

<213> 大肠杆菌

<400> 19

Val Asp Ala Lys Phe Asp Lys Glu Ala Gln Asn Ala Phe Tyr Glu Ile
1 5 10 15
Leu His Leu Pro Asn Leu Thr Glu Glu Gln Arg Asn Ala Phe Ile Gln
 20 25 30
Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ala Asn Leu Leu Ala Thr Ala
 35 40 45
Glu Lys Leu Ser Asp Ala Gln Ala Pro Lys
 50 55

<210> 20

<211> 58

<212> PRT

<213> 大肠杆菌

<400> 20

Val Asp Ala Lys Phe Asp Lys Glu Thr Gln Asn Ala Phe Tyr Glu Ile
1 5 10 15
Leu His Leu Pro Asn Leu Thr Glu Glu Gln Arg Asn Ala Phe Ile Gln
 20 25 30
Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ala Asn Leu Leu Ala Thr Ala
 35 40 45
Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys
 50 55

<210> 21

<211> 58

<212> PRT

<213> 大肠杆菌

<400> 21

Val Asp Ala Lys Phe Asp Lys Glu Ala Gln Asn Ala Phe Tyr Lys Ile

1	5	10	15
Leu His Leu Pro Asn Leu Thr Glu Glu Gln Arg Asn Ala Phe Ile Gln			
20	25	30	
Ser Leu Lys Thr Asp Pro Ser Val Ser Lys Asn Ile Leu Ala Ala Ala			
35	40	45	
Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys			
50	55		

<210> 22

<211> 58

<212> PRT

<213> 大肠杆菌

<400> 22

Val Asp Asn Lys Phe Asn Lys Glu Ala Gln Asn Ala Phe Tyr Lys Ile
1 5 10 15
Leu His Leu Pro Asn Leu Thr Glu Glu Gln Arg Asn Ala Phe Ile Gln
20 25 30
Ser Leu Lys Thr Asp Pro Ser Val Ser Lys Asn Ile Leu Ala Ala Ala
35 40 45
Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys
50 55

<210> 23

<211> 58

<212> PRT

<213> 大肠杆菌

<400> 23

Val Asp Asn Lys Phe Asn Lys Glu Ala Gln Asn Ala Phe Tyr Lys Ile
1 5 10 15
Leu His Leu Pro Asn Leu Thr Glu Glu Gln Arg Ala Ala Phe Ile Gln
20 25 30
Ser Leu Lys Thr Asp Pro Ser Val Ser Lys Asn Ile Leu Ala Ala Ala
35 40 45
Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys
50 55

<210> 24

<211> 235

<212> PRT

<213> 大肠杆菌

<400> 24

Ala Gln Val Asp Ala Lys Phe Asp Lys Glu Gln Gln Asn Ala Phe Tyr

1	5	10	15
Glu Ile Leu His Leu Pro Asn Leu Thr Glu Glu Gln Arg Asn Ala Phe			
	20	25	30
Ile Gln Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ala Asn Leu Leu Ala			
	35	40	45
Glu Ala Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys Val Asp Ala Lys			
	50	55	60
Phe Asp Lys Glu Gln Gln Asn Ala Phe Tyr Glu Ile Leu His Leu Pro			
65	70	75	80
Asn Leu Thr Glu Glu Gln Arg Asn Ala Phe Ile Gln Ser Leu Lys Asp			
	85	90	95
Asp Pro Ser Gln Ser Ala Asn Leu Leu Ala Glu Ala Lys Lys Leu Asn			
	100	105	110
Asp Ala Gln Ala Pro Lys Val Asp Ala Lys Phe Asp Lys Glu Gln Gln			
	115	120	125
Asn Ala Phe Tyr Glu Ile Leu His Leu Pro Asn Leu Thr Glu Glu Gln			
	130	135	140
Arg Asn Ala Phe Ile Gln Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ala			
145	150	155	160
Asn Leu Leu Ala Glu Ala Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys			
	165	170	175
Val Asp Ala Lys Phe Asp Lys Glu Gln Gln Asn Ala Phe Tyr Glu Ile			
	180	185	190
Leu His Leu Pro Asn Leu Thr Glu Glu Gln Arg Asn Ala Phe Ile Gln			
	195	200	205
Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ala Asn Leu Leu Ala Glu Ala			
	210	215	220
Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys Cys			
225	230	235	

<210> 25

<211> 235

<212> PRT

<213> 大肠杆菌

<400> 25

Ala Gln Val Asp Ala Lys Phe Asp Lys Glu Ala Gln Asn Ala Phe Tyr			
1	5	10	15
Glu Ile Leu His Leu Pro Asn Leu Thr Glu Glu Gln Arg Asn Ala Phe			
	20	25	30
Ile Gln Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ala Asn Leu Leu Ala			

35			40			45									
Glu	Ala	Lys	Lys	Leu	Asn	Asp	Ala	Gln	Ala	Pro	Lys	Val	Asp	Ala	Lys
50			55			60									
Phe	Asp	Lys	Glu	Ala	Gln	Asn	Ala	Phe	Tyr	Glu	Ile	Leu	His	Leu	Pro
65			70			75			80						
Asn	Leu	Thr	Glu	Glu	Gln	Arg	Asn	Ala	Phe	Ile	Gln	Ser	Leu	Lys	Asp
85			90			95									
Asp	Pro	Ser	Gln	Ser	Ala	Asn	Leu	Leu	Ala	Glu	Ala	Lys	Lys	Leu	Asn
100			105			110									
Asp	Ala	Gln	Ala	Pro	Lys	Val	Asp	Ala	Lys	Phe	Asp	Lys	Glu	Ala	Gln
115			120			125									
Asn	Ala	Phe	Tyr	Glu	Ile	Leu	His	Leu	Pro	Asn	Leu	Thr	Glu	Glu	Gln
130			135			140									
Arg	Asn	Ala	Phe	Ile	Gln	Ser	Leu	Lys	Asp	Asp	Pro	Ser	Gln	Ser	Ala
145			150			155			160						
Asn	Leu	Leu	Ala	Glu	Ala	Lys	Lys	Leu	Asn	Asp	Ala	Gln	Ala	Pro	Lys
165			170			175									
Val	Asp	Ala	Lys	Phe	Asp	Lys	Glu	Ala	Gln	Asn	Ala	Phe	Tyr	Glu	Ile
180			185			190									
Leu	His	Leu	Pro	Asn	Leu	Thr	Glu	Glu	Gln	Arg	Asn	Ala	Phe	Ile	Gln
195			200			205									
Ser	Leu	Lys	Asp	Asp	Pro	Ser	Gln	Ser	Ala	Asn	Leu	Leu	Ala	Glu	Ala
210			215			220									
Lys	Lys	Leu	Asn	Asp	Ala	Gln	Ala	Pro	Lys	Cys					
225			230			235									
<210>	26														
<211>	235														
<212>	PRT														
<213>	大肠杆菌														
<400>	26														
Ala	Gln	Val	Asp	Ala	Lys	Phe	Asp	Lys	Glu	Ala	Gln	Asn	Ala	Phe	Tyr
1	5			10			15								
Lys	Ile	Leu	His	Leu	Pro	Asn	Leu	Thr	Glu	Glu	Gln	Arg	Asn	Ala	Phe
20			25			30									
Ile	Gln	Ser	Leu	Lys	Asp	Asp	Pro	Ser	Gln	Ser	Ala	Asn	Leu	Leu	Ala
35			40			45									
Glu	Ala	Lys	Lys	Leu	Asn	Asp	Ala	Gln	Ala	Pro	Lys	Val	Asp	Ala	Lys
50			55			60									
Phe	Asp	Lys	Glu	Ala	Gln	Asn	Ala	Phe	Tyr	Lys	Ile	Leu	His	Leu	Pro

65	70	75	80
Asn Leu Thr Glu Glu Gln Arg Asn Ala Phe Ile Gln Ser Leu Lys Asp			
	85	90	95
Asp Pro Ser Gln Ser Ala Asn Leu Leu Ala Glu Ala Lys Lys Leu Asn			
	100	105	110
Asp Ala Gln Ala Pro Lys Val Asp Ala Lys Phe Asp Lys Glu Ala Gln			
	115	120	125
Asn Ala Phe Tyr Lys Ile Leu His Leu Pro Asn Leu Thr Glu Glu Gln			
	130	135	140
Arg Asn Ala Phe Ile Gln Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ala			
145	150	155	160
Asn Leu Leu Ala Glu Ala Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys			
	165	170	175
Val Asp Ala Lys Phe Asp Lys Glu Ala Gln Asn Ala Phe Tyr Lys Ile			
	180	185	190
Leu His Leu Pro Asn Leu Thr Glu Glu Gln Arg Asn Ala Phe Ile Gln			
	195	200	205
Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ala Asn Leu Leu Ala Glu Ala			
	210	215	220
Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys Cys			
225	230	235	
<210> 27			
<211> 235			
<212> PRT			
<213> 大肠杆菌			
<400> 27			
Ala Gln Val Asp Ala Lys Phe Asp Lys Glu Ala Gln Asn Ala Phe Tyr			
1	5	10	15
Glu Ile Leu His Leu Pro Asn Leu Thr Glu Glu Gln Arg Asn Ala Phe			
	20	25	30
Ile Gln Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ala Asn Leu Leu Ala			
	35	40	45
Thr Ala Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys Val Asp Ala Lys			
	50	55	60
Phe Asp Lys Glu Ala Gln Asn Ala Phe Tyr Glu Ile Leu His Leu Pro			
65	70	75	80
Asn Leu Thr Glu Glu Gln Arg Asn Ala Phe Ile Gln Ser Leu Lys Asp			
	85	90	95
Asp Pro Ser Gln Ser Ala Asn Leu Leu Ala Thr Ala Lys Lys Leu Asn			

100	105	110
Asp Ala Gln Ala Pro Lys Val	Asp Ala Lys Phe Asp Lys Glu Ala Gln	
115	120	125
Asn Ala Phe Tyr Glu Ile Leu His	Leu Pro Asn Leu Thr Glu Glu Gln	
130	135	140
Arg Asn Ala Phe Ile Gln Ser Leu Lys	Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ala	
145	150	155
Asn Leu Leu Ala Thr Ala Lys Lys	Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys	
165	170	175
Val Asp Ala Lys Phe Asp Lys Glu Ala	Gln Asn Ala Phe Tyr Glu Ile	
180	185	190
Leu His Leu Pro Asn Leu Thr Glu Glu	Gln Arg Asn Ala Phe Ile Gln	
195	200	205
Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser Gln Ser	Ala Asn Leu Leu Ala Thr Ala	
210	215	220
Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala	Pro Lys Cys	
225	230	235

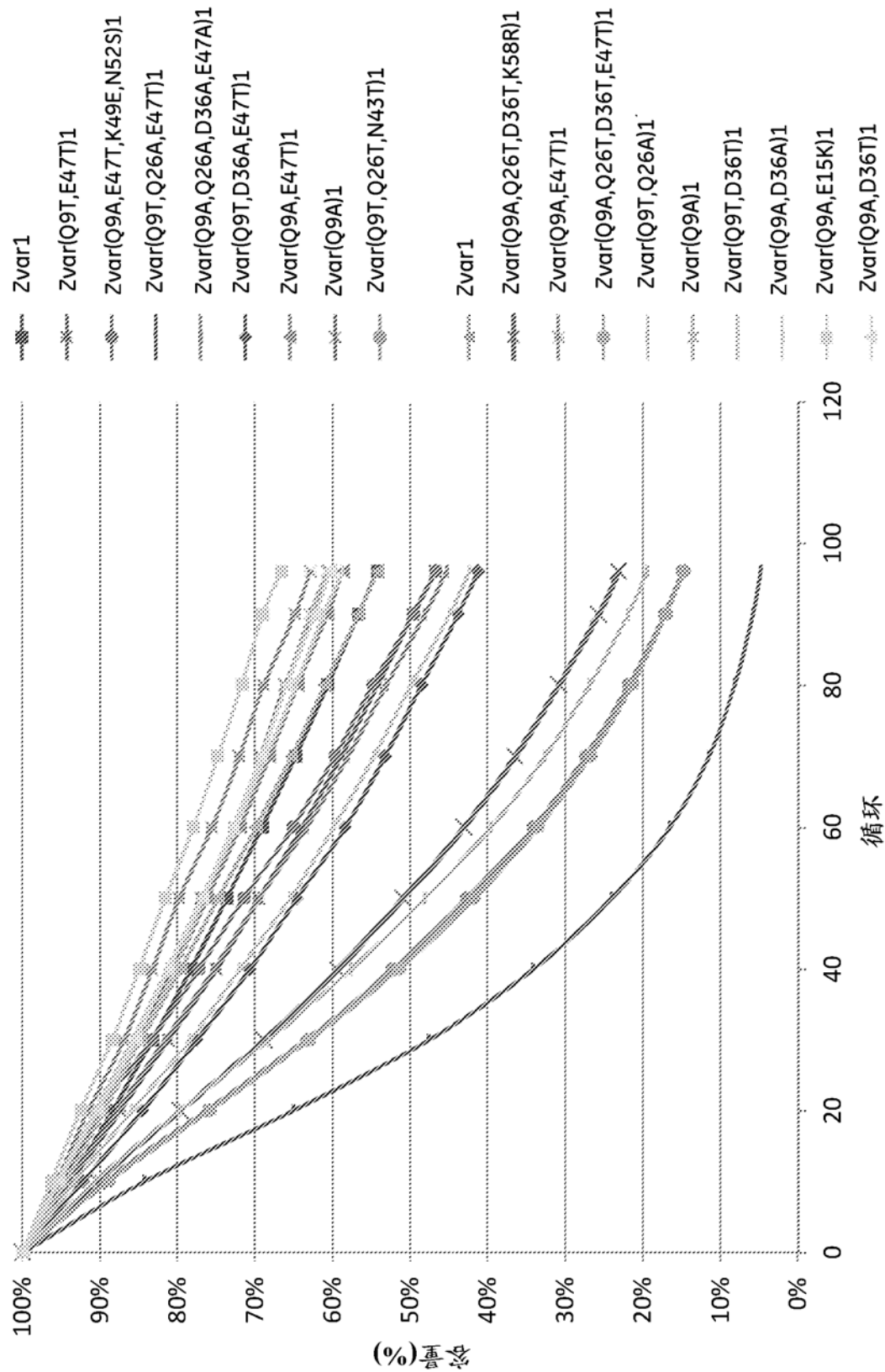


图 1

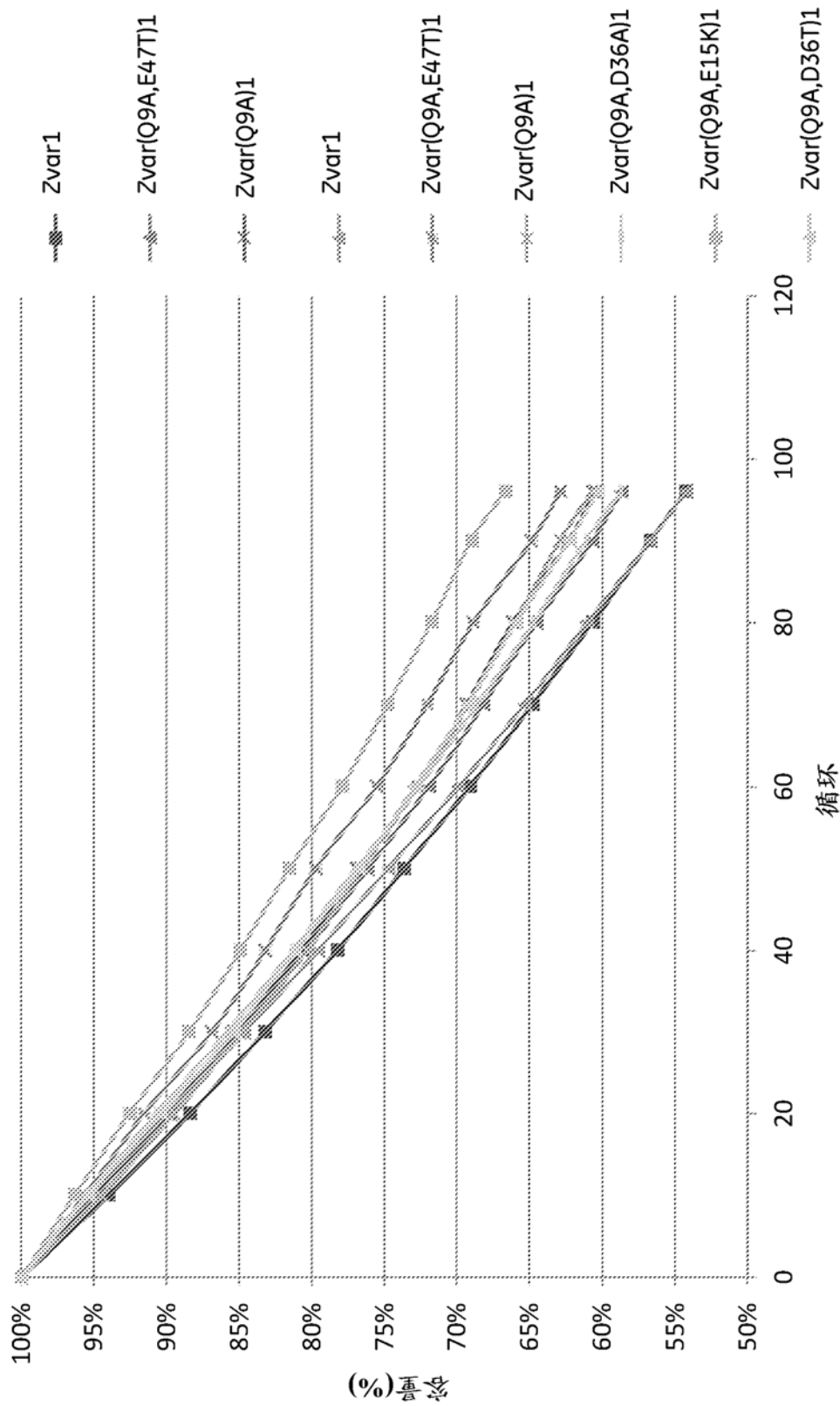


图 2