



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 101932720 A

(43) 申请公布日 2010. 12. 29

(21) 申请号 200880114660. 5

(51) Int. Cl.

(22) 申请日 2008. 10. 31

C12P 21/04 (2006. 01)

(30) 优先权数据

60/984, 209 2007. 10. 31 US

(85) PCT申请进入国家阶段日

2010. 04. 29

(86) PCT申请的申请数据

PCT/US2008/012398 2008. 10. 31

(87) PCT申请的公布数据

W02009/058379 EN 2009. 05. 07

(71) 申请人 米迪缪尼有限公司

地址 美国马里兰州

(72) 发明人 H·吴 M·巴卡 J·斯维斯

B·查科

(74) 专利代理机构 上海专利商标事务所有限公

司 31100

代理人 陶家蓉 张静

权利要求书 7 页 说明书 112 页 附图 56 页

(54) 发明名称

蛋白质支架

(57) 摘要

本发明提供蛋白质支架和制备、筛选、工程改造和利用这种蛋白质支架的方法。

1. 一种重组多肽支架,包含:

I. 指定为 A、B、C、D、E、F 和 G 的 7 个 β 链;

II. 其连接 6 个环区域,其中环区域连接各 β 链并指定为 AB、BC、CD、DE、EF 和 FG 环;

III. 其中至少一个环区域是 SEQ ID NO:1-32 或 68-88 中任一所示的同源环区域的非天然产生变体;和

IV. 其中至少一个 β 链结构域与 SEQ ID NO:1-32 或 68-88 中任一所示同源 β 链结构域有至少 50%、至少 60%、至少 70%、至少 80%、或至少 90%、至少 95%、或至少 99% 的同源性。

2. 如权利要求 1 所述的支架,其特征在于,所述 β 链结构域包含 SEQ IDNO:1-32 或 68-88 中任一所编码的多肽序列。

3. 如权利要求 1 所述的支架,其特征在于,所述 β 链结构域包含:

a. A β 链 (SEQ ID NO:228)、B β 链 (SEQ ID NO:229)、C β 链 (SEQ IDNO:230)、D β 链 (SEQ ID NO:231)、E β 链 (SEQ ID NO:232)、F β 链 (SEQ IDNO:233) 和 G β 链 (SEQ ID NO:234) 的氨基酸序列;或

b. A β 链 (SEQ ID NO:235)、B β 链 (SEQ ID NO:229)、C β 链 (SEQ IDNO:230)、D β 链 (SEQ ID NO:236)、E β 链 (SEQ ID NO:232)、F β 链 (SEQ IDNO:237) 和 G β 链 (SEQ ID NO:234) 的氨基酸序列。

4. 如权利要求 3 所述的支架,其特征在于,所述 BC 环包含具有 S-X-a-X-b-X-X-X-G 所示序列的 9 个氨基酸,其中 X 表示任何氨基酸,其中 (a) 表示脯氨酸或丙氨酸,其中 (b) 表示丙氨酸或甘氨酸。

5. 如权利要求 3 所述的支架,其特征在于,所述 BC 环包含具有 S-P-c-X-X-X-X-X-X-T-G 所示序列的 11 个氨基酸,其中 X 表示任何氨基酸,其中 (c) 表示脯氨酸、丝氨酸或甘氨酸。

6. 如权利要求 3 所述的支架,其特征在于,所述 BC 环包含具有 A-d-P-X-X-X-e-f-X-I-X-G 所示序列的 12 个氨基酸,其中 X 表示任何氨基酸,其中 (d) 表示脯氨酸、谷氨酸或赖氨酸,其中 (e) 表示天冬酰胺或甘氨酸,其中 (f) 表示丝氨酸或甘氨酸。

7. 如权利要求 3 所述的支架,其特征在于,所述 FG 环包含具有 X-a-X-X-G-X-X-X-S 所示序列的 9 个氨基酸,其中 X 表示任何氨基酸,其中 (a) 表示天冬酰胺、苏氨酸或赖氨酸。

8. 如权利要求 3 所述的支架,其特征在于,所述 FG 环包含具有 X-a-X-X-X-X-b-N-P-A 所示序列的 10 个氨基酸,其中 X 表示任何氨基酸,其中 (a) 表示天冬酰胺、苏氨酸或赖氨酸,其中 (b) 表示丝氨酸或甘氨酸。

9. 如权利要求 3 所述的支架,其特征在于,所述 FG 环包含具有 X-a-X-X-G-X-X-S-N-P-A 所示序列的 11 个氨基酸,其中 X 表示任何氨基酸,其中 (a) 表示天冬酰胺、苏氨酸或赖氨酸。

10. 如权利要求 3 所述的支架,其特征在于,所述 DE 环包含具有 X-X-X-X-X-X 所示序列的 6 个氨基酸,其中 X 表示任何氨基酸。

11. 如权利要求 3 所述的支架,其特征在于,所述 AB 环包含具有 K-X-X-X-X-X-a 所示序列的 7 个残基,其中 X 表示天冬酰胺、天冬氨酸、组氨酸、酪氨酸、异亮氨酸、缬氨酸、亮氨酸、苯丙氨酸、苏氨酸、丙氨酸、脯氨酸或丝氨酸,其中 (a) 表示丝氨酸、苏氨酸、丙氨酸或甘

氨酸。

12. 如权利要求 3 所述的支架,其特征在于,所述 AB 环包含具有 K-X-X-X-X-X-X-a 所示序列的 9 个残基,其中 X 表示天冬酰胺、天冬氨酸、组氨酸、酪氨酸、异亮氨酸、缬氨酸、亮氨酸、苯丙氨酸、苏氨酸、丙氨酸、脯氨酸或丝氨酸,其中 (a) 表示丝氨酸、苏氨酸、丙氨酸或甘氨酸。

13. 如权利要求 3 所述的支架,其特征在于,所述 CD 环包含 7、8 或 9 个残基,其中 CD 环中的各残基经随机化,其中各残基可以是天冬酰胺、天冬氨酸、组氨酸、酪氨酸、异亮氨酸、缬氨酸、亮氨酸、苯丙氨酸、苏氨酸、丙氨酸、脯氨酸或丝氨酸。

14. 如权利要求 3 所述的支架,其特征在于,所述 EF 环包含具有 X-b-L-X-P-X-c-X 所示序列的 8 个残基,其中 X 表示天冬酰胺、天冬氨酸、组氨酸、酪氨酸、异亮氨酸、缬氨酸、亮氨酸、苯丙氨酸、苏氨酸、丙氨酸、脯氨酸或丝氨酸,其中 (b) 表示天冬酰胺、赖氨酸、精氨酸、天冬氨酸、谷氨酸或甘氨酸,其中 (c) 表示异亮氨酸、苏氨酸、丝氨酸、缬氨酸、丙氨酸或甘氨酸。

15. 如权利要求 1 所述的支架,其特征在于,所述支架包含至少一个二硫键来连接所述 7 个 β 链结构域中任意两个。

16. 如权利要求 15 所述的支架,其特征在于,所述二硫键在以下 β 链之间形成连接:

- a. A β 链和 B β 链;
- b. D β 链和 E β 链
- c. F β 链和 G β 链;或
- d. C β 链和 F β 链。

17. 如权利要求 15 所述的支架,其特征在于,所述支架还包含至少两个二硫键来连接所述 7 个 β 链结构域中任一个。

18. 如权利要求 17 所述的支架,其特征在于,所述二硫键在 F β 链和 G β 链之间形成第一连接,在 C β 链和 F β 链之间形成第二连接。

19. 如权利要求 1 所述的支架,其特征在于,所述支架还在环区域中包含至少一个二硫键。

20. 如权利要求 15 所述的支架,其特征在于,所述支架包含对应于 Tn3^{SS1}(SEQ ID NO: 64)、Tn3^{SS2}(SEQ ID NO: 210)、Tn3^{SS3}(SEQ ID NO: 65) 或 Tn3^{SS4}(SEQ ID NO: 66) 的序列。

21. 如权利要求 17 所述的支架,其特征在于,所述支架包含对应于 Tn3^{SS3+4}(SEQ ID NO: 67) 的序列。

22. 如权利要求 1 或 15 所述的支架,其特征在于,所述支架结合靶标。

23. 如权利要求 22 所述的支架,其特征在于,所述靶标是细胞表面抗原、可溶性抗原、固定化抗原、免疫静止抗原、胞内抗原、核内抗原、自体抗原、非自体抗原、癌症抗原、细菌抗原或病毒抗原。

24. 如权利要求 1 或 15 所述的支架,其特征在于,通过示差扫描量热法 (DSC) 检测到所述支架显示至少 40°C 的热解链温度 (Tm)。

25. 如权利要求 15 所述的支架,其特征在于,在相似实验条件下,与二硫键工程改造前的同一支架相比,所述支架显示以下方面的稳定性增加:

- a. 在脲变性实验中检测到 Cm 增加至少 10%;

b. 在胍变性实验中检测到 Cm 增加至少 10% ;

c. 蛋白酶敏感性至少 10%。

26. 如权利要求 1 所述的支架,其特征在于,所述支架偶联于异源物质,其中所述物质选自另一支架、聚乙二醇 (PEG)、人血清白蛋白 (HSA)、抗体的 Fc 区、IgG 分子、结合肽、细胞毒性药物、放射性标记、成像剂、His- 标签、生物素、Flag- 标签、核酸或细胞因子。

27. 一种多聚支架,其包含至少两个权利要求 1 所述的支架。

28. 如权利要求 27 所述的多聚支架,其特征在于,所述多聚支架还包含表位结合结构域。

29. 如权利要求 27 所述的多聚支架,其特征在于,所述表位结合结构域对不同于所述支架的靶标具有特异性。

30. 如权利要求 27 所述的多聚支架,其特征在于,所述表位结合结构域对与所述支架相同的靶标具有特异性。

31. 如权利要求 27 所述的多聚支架,其特征在于,所述支架由另一支架、IgG 分子或其片段、Fc 区、二聚结构域、化学交联、二硫键或氨基酸接头连接。

32. 一种分离的核酸分子,其编码权利要求 1 所述的支架。

33. 一种分离的核酸分子,其编码权利要求 27 所述的支架。

34. 一种表达载体,其操作性连接于权利要求 32 所述的核酸。

35. 一种表达载体,其操作性连接于权利要求 33 所述的核酸。

36. 一种宿主细胞,其包含权利要求 34 所述的载体。

37. 一种宿主细胞,其包含权利要求 35 所述的载体。

38. 一种多肽展示文库,其包含权利要求 1 所述的支架。

39. 如权利要求 38 所述的文库,其特征在于,所述支架包含因天然产生的蛋白质序列中相应环序列的至少一个氨基酸的缺失、取代或添加而改变的至少两个环区域序列。

40. 如权利要求 39 所述的文库,其特征在于,所述两个环区域序列选自 :BC/DE、BC/FG、DE/FG、AB/CD、AB/EF 和 CD/ED 环。

41. 如权利要求 38 所述的文库,其特征在于,所述支架包含因天然产生的蛋白质序列中相应环序列的至少一个氨基酸的缺失、取代或添加而改变的至少三个环区域序列。

42. 如权利要求 38 所述的文库,其特征在于,所述环区域序列包含选自下组的任意三个环 :AB、BC、CD、DE、EF 和 FG 环。

43. 如权利要求 38 所述的多肽展示文库,其中所述支架展示在核糖体、细菌噬菌体、病毒、细菌或酵母菌表面。

44. 如权利要求 38 所述的文库,其特征在于,所述文库的序列多样性为至少 10^6

45. 一种分离核酸分子的集合,所述核酸分子编码权利要求 38 所述的文库。

46. 一种表达载体,其操作性连接于权利要求 45 所述的核酸分子。

47. 一种获得结合靶标的多肽支架的方法,所述方法包括 (a) 在允许支架 :靶配体复合物形成的条件下将靶配体与权利要求 38 所述文库接触,和 (b) 从该复合物获得结合靶配体的支架。

48. 如权利要求 47 所述的方法,其特征在于,还包括使步骤 (b) 中获得的蛋白质的所述支架的至少一个环随机化从而产生进一步随机化的支架和利用所述进一步随机化的支架

重复步骤 (a) 和 (b)。

49. 如权利要求 48 所述的方法,其特征在于,所述方法包括至少两个环。

50. 如权利要求 48 所述的方法,其特征在于,所述方法包括至少三个环。

51. 如权利要求 47 所述的方法,其特征在于,还包括使步骤 (b) 中获得的蛋白质的所述支架的至少一个环随机化从而产生进一步随机化的支架和利用所述进一步随机化的支架重复步骤 (a) 和 (b),其中所述步骤 (a) 和 (b) 的重复还包括接触与步骤 (a) 和 (b) 的所述第一操作的靶标不同的靶标。

52. 如权利要求 47 所述的方法,其特征在于,还包括使步骤 (b) 中获得的蛋白质的所述支架的至少一个环随机化从而产生进一步随机化的支架,其中所述环不在所述文库中随机化,和利用所述进一步随机化的支架重复步骤 (a) 和 (b)。

53. 如权利要求 47 所述的方法,其特征在于,还包括使步骤 (b) 中获得的蛋白质的所述支架的至少一个环随机化从而产生进一步随机化的支架,其中所述环不在所述文库中随机化,和利用所述进一步随机化的支架重复步骤 (a) 和 (b),其中步骤 (a) 和 (b) 的所述重复还包括接触与步骤 (a) 和 (b) 的所述第一操作的靶标不同的靶标。

54. 如权利要求 53 所述的方法,其特征在于,所述方法包括选自 BC、DE 或 FG 环的第一随机化环和未在所述文库中随机化的选自 AB、CD 或 EF 环的第二环。

55. 如权利要求 53 所述的方法,其特征在于,所述方法包括选自 AB、CD、EF 环的第一随机化环和未在所述文库中随机化的选自 BC、DE 或 FG 环的第二环。

56. 如权利要求 53 所述的方法,其特征在于,所述方法还包括使步骤 (b) 中获得的蛋白质的所述支架的至少一个 β 链随机化从而产生进一步随机化的支架和利用所述进一步随机化的支架重复步骤 (a) 和 (b)。

57. 如权利要求 56 所述的方法,其特征在于,所述方法还包括使步骤 (b) 中获得的蛋白质的所述支架的至少两个、三个、四个、五个、六个或七个 β 链随机化从而产生进一步随机化的支架和利用所述进一步随机化的支架重复步骤 (a) 和 (b)。

58. 一种获得结合靶标的至少两种支架的方法,所述方法包括 (a) 在允许支架:靶配体复合物形成的条件下将靶配体与权利要求 38 所述文库接触, (b) 将所述支架与交联剂结合,其中所述支架的交联引发可检测反应,和 (c) 从该复合物获得结合靶配体的所述支架。

59. 如权利要求 58 所述的方法,其特征在于,所述支架识别相同表位。

60. 如权利要求 58 所述的方法,其特征在于,所述支架识别不同表位。

61. 如权利要求 58 所述的方法,其特征在于,所述交联剂选自抗体、抗体片段、二聚化基序、化学交联剂、结合肽或表位标签。

62. 一种检测样品中化合物的方法,所述方法包括在允许化合物:支架复合物形成的条件下将所述样品与权利要求 1 所述支架接触并检测所述复合物,藉此检测所述样品中的所述化合物。

63. 一种捕捉样品中化合物的方法,所述方法包括在允许化合物:支架复合物形成的条件下将所述样品与固定化的权利要求 1 所述支架接触并取出所述固定化支架,藉此捕捉所述样品中的所述化合物。

64. 一种无菌、无热原组合物,其包含权利要求 1 所述支架。

65. 一种药物组合物,其包含权利要求 1 所述支架。

66. 一种预防、治疗、控制或缓解有此需要的患者中疾病的方法,包括给予所述患者有效量的权利要求 64 或 65 所述组合物。

67. 一种利用权利要求 64 或 65 所述组合物诊断有此需要的患者中疾病或使之成像的方法。

68. 如权利要求 66 所述的方法,其特征在于,所述方法还包括其它治疗,其中所述治疗是免疫疗法、生物学疗法、化疗、放疗或小分子药物治疗。

69. 如权利要求 68 所述的方法,其中所述疾病是自身免疫疾病、炎性疾病、增生性疾病、感染性疾病、呼吸道疾病、胃肠疾病、糖尿病、狼疮或肥胖症。

70. 一种纯化权利要求 1 或 15 所述支架的方法,所述方法包括:

a. 将含有所述支架的组合物加热至 70℃,维持至少 15 分钟;或

b. 将含有所述支架的组合物调节至 pH 3.0 或 pH 3.5 或 pH 4.0 或 pH 4.5 或 pH 5.0;将得到的组合物在 50℃、或 55℃、或 60℃、或 65℃、或 70℃加热 1-30 分钟;

随后通过离心除去凝聚的化合物。

71. 一种放大工艺,其中所述工艺导致权利要求 1 或 15 所述支架的生产率为至少 1g/L。

72. 如权利要求 71 所述的工艺,其特征在于,所述工艺包括从该工艺所用培养基纯化支架。

73. 一种产生如权利要求 1 或 15 所述支架的方法,其特征在于,所述支架产生和分泌入培养基。

74. 如权利要求 73 所述的方法,其特征在于,所述方法包括利用包含 oppA 信号肽 (SEQ ID NO:227) 的表达载体。

75. 一种利用权利要求 73 所述方法获得的无细胞材料检验或检测支架结合靶标的方法。

76. 一种纯化权利要求 74 所述方法产生的支架的方法。

77. 如权利要求 1 或 15 所述的支架,其特征在于,所述支架特异性结合 TRAIL-R2。

78. 如权利要求 77 所述的支架,其中所述 TRAIL-R2 是人 TRAIL-R2。

79. 如权利要求 77 所述的支架,其特征在于,所述支架还包含至少一个二硫键来连接所述 7 个 β 链结构域中任意两个。

80. 如权利要求 77 所述的支架,其特征在于,所述支架是包含至少两个支架结构域的多聚支架。

81. 如权利要求 80 所述的支架,其特征在于,所述至少两个支架结构域结合 TRAIL-R2 上的相同表位。

82. 如权利要求 80 所述的支架,其特征在于,所述至少两个支架结构域结合 TRAIL-R2 上的不同表位。

83. 如权利要求 80 所述的支架,其特征在于,所述至少一个支架结构域操作性连接于:

a. 衍生自 IgG 分子的 Fc 区;

b. 衍生自 IgG 分子的 CH1 区;

c. 衍生自 IgG 分子的 CH2 区;

d. 衍生自 IgG 分子的铰链区;或

- e. 衍生自 IgG 分子的 C κ 或 C λ 区。
- 84. 如权利要求 80 所述的支架,其中所述至少一个支架结构域是 2D3 或 1C12。
- 85. 如权利要求 84 所述的支架,其中所述支架包含操作性连接于以下区域的 1C12 :
 - a. 衍生自 IgG 分子的 Fc 区 ;
 - b. 衍生自 IgG 分子的 CH1 区 ;
 - c. 衍生自 IgG 分子的 CH2 区 ;
 - d. 衍生自 IgG 分子的铰链区 ;或
 - e. 衍生自 IgG 分子的 C κ 或 C λ 区。
- 86. 如权利要求 84 所述的支架,其特征在于,所述支架包含操作性连接于以下区域的 2D3 :
 - a. 衍生自 IgG 分子的 Fc 区 ;
 - b. 衍生自 IgG 分子的 CH1 区 ;
 - c. 衍生自 IgG 分子的 CH2 区 ;
 - d. 衍生自 IgG 分子的铰链区 ;或
 - e. 衍生自 IgG 分子的 C κ 或 C λ 区。
- 87. 如权利要求 77 所述的支架,其特征在于,所述支架包含选自下组的 BC 环序列 :SEQ ID NO :126、128、130、132、134、136、138、140、142、144、147、150、153、156、159、162、165、168、171、174、177、180、183、186、189、192、195 和 198。
- 88. 如权利要求 77 所述的支架,其特征在于,所述支架包含选自下组的 DE 环序列 :SEQ ID NO :145、148、151、154、157、160、163、166、169、172、175、178、181、184、187、190、193、196 和 199。
- 89. 如权利要求 77 所述的支架,其特征在于,所述支架包含选自下组的 FG 环序列 :127、129、131、133、135、137、139、141、143、146、149、152、155、158、161、164、167、170、173、176、179、182、185、188、191、194、197 和 200。
- 90. 如权利要求 77 所述的支架,其特征在于,所述支架包含衍生自 TRAIL-R2 结合支架的序列,所述 TRAIL-R2 结合支架选自 2F4、5B10、10D9、6F11、8B3、5E5、2Hb、7G11、6C7、1E03、2B04、1C12、1A03、1C10、1B12、2G03、2D3、1C06、2F08、1B04、3B11、1D8、2A12、1E05、2F02、1H05、2A11、或 1G11。
- 91. 如权利要求 77 所述的支架,其特征在于,所述支架结合 TRAIL-R2 受体和 :
 - a. 激动 TRAIL-R2 受体 ;
 - b. 模拟 TRAIL 与 TRAIL-R2 受体的结合 ;
 - c. 促进 TRAIL-R2 受体二聚化或寡聚化 ;
 - d. 诱导凋亡 ;或
 - e. 降低或抑制细胞活力。
- 92. 一种无菌、无热原组合物,其包含权利要求 77 所述支架。
- 93. 一种药物组合物,其包含权利要求 77 所述支架。
- 94. 一种利用权利要求 77 所述支架结合 TRAIL-R2 和实施以下行为的方法 :
 - a. 激动 TRAIL-R2 受体 ;
 - b. 模拟 TRAIL 与 TRAIL-R2 的结合 ;

- c. 促进 TRAIL-R2 受体二聚化或寡聚化；
- d. 诱导凋亡；或
- e. 降低或抑制细胞活力。

95. 一种预防、治疗、缓解或控制有此需要的患者中癌症的方法，包括给予有效量的权利要求 92 或 93 所述的组合物。

96. 如权利要求 95 所述的方法，其特征在于，所述癌症选自鳞状细胞癌、小细胞肺癌、非小细胞肺癌（NSCLC）、非霍奇金淋巴瘤、母细胞瘤、胃肠道癌症、肾癌、卵巢癌、肝脏癌症、胃癌、膀胱癌、肝癌、乳腺癌、结肠癌、结肠直肠癌、胰腺癌、子宫内膜癌、唾液腺癌、肾脏癌症、肝脏癌症、前列腺癌、阴门癌、甲状腺癌、肝癌、头颈癌、肺癌、腺癌、肾细胞癌或肝细胞癌。

蛋白质支架

[0001] 1. 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求 2007 年 10 月 31 日提交的美国临时申请号 60/984,209 的优先权,该申请通过引用全文纳入本文。

[0003] 2. 发明领域

[0004] 本发明涉及特异性结合靶标的蛋白质支架以及制备、筛选和利用这种支架的方法。

[0005] 3. 发明背景

[0006] 本发明涉及可用于,例如产生具有新型结合特征的产物的蛋白质支架。

[0007] 具有相对确定三维结构的蛋白质通常称为蛋白质支架,其可用作设计工程改造产物的试剂。这些支架通常含有适于特定或随机序列改变的一个或多个区域,常进行这种序列随机化来产生可从中选择所需产物的蛋白质文库。可利用这种支架的一个具体领域是抗体模拟设计领域。

[0008] 虽然市场上已有治疗性抗体的一些成功例子(**HERCEPTIN®**, **AVASTIN®**, **SYNAGIS®**),但制备抗体片段作为治疗性蛋白的兴趣不断高涨。其优势在于便于通过分子生物学技术操作,从而能获得所需结合特性,即在微生物系统中表达这种片段的能力,以及预计抗体片段的组织穿透力优于全长抗体。一个例子是**REOPRO®**。

[0009] 此外,已有人致力于开发小的、非抗体治疗剂,即抗体模拟物,从而能利用抗体和抗体片段的优势,例如结合靶标的亲和力高和免疫原性及毒性低,同时能避免一些缺点,例如需要结构域内的二硫键,这要求正确折叠和抗体片段易于凝聚及稳定性不如全长 IgG。一个例子是通过缺失单克隆抗体重链可变区的三个 β 链设计的“小抗体 (minibody)”支架,其涉及免疫球蛋白折叠 (Tramontano 等, *J. Mol. Recognit.* 7 :9,1994)。该蛋白质包含 61 个残基,可用于提供两个超变环,很像抗体中的互补决定区 (CDR)。这两个环任意排列,并选择了能结合抗原的产物,但迄今为止该框架因溶解性问题而看来应用有限。用于展示环的另一框架是淀粉酶抑制肽,它是 α -淀粉酶的小蛋白抑制剂,含有 74 个残基,通过两个二硫键组合在一起的 6-链 β 片层夹心并形成 3 个 CDR-样环 (McConnell 和 Hoess, *J. Mol. Biol.* 250 :460,1995)。

[0010] 测试了其它蛋白质是否能作为框架,并用于展示 α 螺旋表面上的随机残基 (Nord 等, *Nat. Biotechnol.* 15 :772,1997 ;Nord 等, *Protein Eng.* 8 :601,1995), α 螺旋束中 α 螺旋之间的环 (Ku 和 Schultz, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92 :6552,1995),和由二硫键约束的环,例如小蛋白酶抑制剂的那些 (Markland 等, *Biochemistry* 35 :8045,1996 ;Markland 等, *Biochemistry* 35 :8058,1996 ;Rottgen 和 Collins, *Gene* 164 :243,1995 ;Wang 等, *J. Biol. Chem.* 270 :12250,1995)。

[0011] 因此,需要开发小的、稳定的、人工抗体-样分子以供各种治疗和诊断应用。

[0012] 本文对参考文献的引用或讨论不应理解为承认这种参考文献是本发明的现有技术。

[0013] 4. 发明概述

[0014] 本发明提供能结合任何感兴趣化合物的重组非天然产生的蛋白质支架家族。具体地说,本文所述蛋白质可用于展示与抗体可变区的互补决定区(CDR)类似的确定环。这些环可经随机化或限制性进化而产生结合多种靶化合物所需的多样性。这些蛋白质可装配成能结合不同靶标的多特异性支架。

[0015] 本发明提供重组非天然产生的多肽支架(下文称为“本发明支架”),其包含与衍生自天然产生的蛋白质序列的多个环区域序列相连的多个 β 链结构域,其中通过天然产生的蛋白质序列中相应环序列的至少一个氨基酸的缺失、取代或添加而改变一个或多个所述环区域序列,其中该多肽支架的 β 链结构域与天然产生蛋白质序列的相应结构域序列有至少50%同源性。在一些实施方式中,天然产生的序列是对应于人结合腕蛋白C的蛋白质序列。具体地说,这些支架包括结合腕蛋白C的第三FnIII结构域(也称为“Tn3”结构域)。在具体的实施方式中,本发明支架包含选自下组的氨基酸序列:SEQ ID NO:1、5-32、64-67和210。在其它具体实施方式中,本发明支架可由包含选自下组的序列的核酸编码:SEQ ID NO:33-59。

[0016] 在其它实施方式中,天然产生的序列对应于预测的Tn3结构基序,例如衍生自嗜热生物的那些,例如但不限于:闪烁古生球菌(*Archaeoglobus fulgidus*)、海葡萄嗜热菌(*Staphylothermus marinus*)、嗜酸热硫化叶菌(*Sulfolobus acidocaldarius*)、硫磺矿硫化叶菌(*Sulfolobus solfataricus*)、和硫化叶菌(*Sulfolobus tokodaii*)。

[0017] 在具体的实施方式中,本发明支架包含选自下组的氨基酸序列:SEQ ID NO:2-4、68-88和210。在其它特定实施方式中,本发明支架可由包含选自下组的序列的核酸编码:SEQ ID NO:89-98。

[0018] 在本发明的另一方面,本发明支架还包括二硫键稳定的支架。通过耐热、耐受离液变性作用和蛋白酶处理检测到二硫键稳定的支架显示稳定性增加。

[0019] 本发明的支架经工程改造结合感兴趣靶标,如本文所述。这种结合可以,例如显示至少100 μ M的亲和力。

[0020] 本发明还提供包含至少两个本发明支架的多聚支架(下文称为“本发明的多聚支架”)。在一些实施方式中,本发明的多聚支架包含至少两个相连的支架,例如但不限于二聚结构域、氨基酸接头、二硫键、化学交联和IgG分子或其片段或Fc区域。

[0021] 本发明还提供包含多个本发明支架的多肽展示文库(下文称为“本发明文库”)。本发明文库可用于捕捉和坚定靶标结合支架来构建多聚支架。

[0022] 在另一方面,本发明还提供编码本发明支架和文库的分离核酸分子。

[0023] 本发明还提供制备、利用、筛选、优化和工程改造本发明支架和文库的方法。

[0024] 在还有另一方面,本发明还提供包含本发明支架的药物组合物。

[0025] 本发明还提供通过给予治疗有效量的本发明支架和/或包含本发明支架的药物组合物来治疗、预防、缓解、检测、诊断或监测患者中疾病或其症状的方法,如本文所述。

[0026] 在具体的实施方式中,本发明提供可用于预防、缓解、检测、诊断或监测疾病,例如但不限于癌症的TRAIL-R2特异性结合物。在其它具体的实施方式中,本发明的TRAIL-R2特异性结合支架可用于治疗其中的癌细胞表达TRAIL-R2的癌症。在一些实施方式中,癌症可包括但不限于肺癌、非霍奇金淋巴瘤、胃肠道癌症、肾癌、卵巢癌、肝癌、胃癌、膀胱癌、乳

腺癌、结肠癌、结肠直肠癌、胰腺癌、肝癌、前列腺癌和黑色素瘤。

[0027] 5. 附图简述

[0028] 出于说明本发明的目的,附图描述了本发明的某些实施方式。然而,本发明不限于附图所述实施方式的确切配置和手段。

[0029] 图 1. 支架的重组体总细胞表达。此处显示了表达蛋白质支架的大肠杆菌培养物的各种重组体裂解液的考马斯染色 PAGE 凝胶。高度表达的支架以星号 (*) 表示。

[0030] 图 2. 基于 Tn3 的支架的表达和纯化。此处显示了重组体表达和纯化后描述基于 Tn3 的支架的考马斯染色 PAGE 凝胶。不难将 Tn3 支架纯化至均一。

[0031] 图 3A. 基于 Tn3 的支架的解链温度和测定。该图显示了通过示差扫描量热法检测基于 Tn3 支架的热解链曲线。pH 7.0 时,测定的 T_m 是约 45°C。

[0032] 图 3B. 基于 Tn3 的支架的脲变性特征。该图显示了 pH 7.5 时,基于 Tn3 的支架在各种浓度的脲中的变性特征。利用分子的固有荧光的改变检测分子的解折叠情况。对于 Tn3 支架,解折叠导致荧光强度增加并向较高波长迁移。如该图所显示的,该分子在低浓度脲(小于或等于 1M)中折叠,在较高浓度脲中变性。计算的 50% 分子解折叠的摩尔浓度约为 2M。

[0033] 图 3C. Tn3 支架存在单体状态。该图显示纯化的 Tn3 支架的尺寸排阻层析分析结果,从而测定了污染性片段和 / 或高级结构的相对比例。图上的百分比表示 97% 以上的支架以单体形式洗出(通过在线光扫描检测器测定约为 11kDa),而只有少部分(约 3%)在峰值为 21kDa 处洗出,可能是二聚体。

[0034] 图 4. 显示环长度多样性的支架的 BC 环。该图表示各种 Tn3 相关蛋白质支架的 BC 环的长度多样性。(A) 表示衍生自 PDB 数据库的 Tn3 相关支架亚组的序列(51 条序列)显示的环长度多样性。(B) 表示衍生自瑞士-蛋白质数据库(Swiss-prot database)的序列(397 条序列)显示的环长度多样性。如图所示,各种 Tn3 相关支架显示长度为 7-26 个氨基酸残基。按照本文所用的方案,Tn3 中 BC 环的长度是 9 个残基。

[0035] 图 5. 支架的 FG 环显示环长度多样性。该图表示各种 Tn3 相关支架的 FG 环的长度多样性。该图描述了衍生自 PDB 数据库的 Tn3 相关支架亚组的序列所显示的 FG 环长度多样性。如图所示,Tn3 支架的 FG 环显示长度为 6-18 个氨基酸残基。按照本文所用的方案,Tn3 中 FG 环的长度是 10 个残基。

[0036] 图 6. 支架的 DE 环显示环长度多样性。该图表示各种 Tn3 相关支架的 DE 环的长度多样性。该图描述了衍生自 PDB 数据库的 Tn3 相关支架亚组的序列所显示的 DE 环长度多样性。如图所示,Tn3 支架的 DE 环显示长度为约 4- 约 17 个氨基酸残基。按照本文所用的方案,Tn3 中 DE 环的长度是 6 个残基。

[0037] 图 7A. 支架的 9 氨基酸残基 BC 环显示序列多样性。该图表示瑞士-蛋白质数据库的 9 氨基酸残基 BC 环(73 条序列)显示的序列多样性。利用比对工具,Weblogo,9 氨基酸残基 BC 环中特定位置氨基酸的相对发生率由特定位置上单字母密码的大小表示。例如,所分析的 9 氨基酸残基 BC 环 3 位最常见的氨基酸是脯氨酸(P),然后是丙氨酸(A),再然后是缬氨酸(V)。

[0038] 图 7B. 支架的 12 氨基酸残基 BC 环显示序列多样性。该图表示瑞士-蛋白质数据库的 12 氨基酸残基 BC(99 条序列)环显示的序列多样性。利用比对工具,Weblogo,12 氨基酸残基 BC 环中特定位置氨基酸的相对发生率由特定位置上单字母密码的大小表示。例

如,所分析的 12 氨基酸残基 BC 环 3 位最常见的氨基酸是脯氨酸 (P),然后是甘氨酸 (G),再然后是谷氨酰胺 (Q)。

[0039] 图 8. 支架的 FG 环显示序列多样性. 该图表示瑞士-蛋白质数据库所有长度的 FG 环 (393 条序列) 显示的序列多样性. 利用比对工具, Weblogo, FG 环中特定位置氨基酸的相对发生率由特定位置上单字母密码的大小表示. 例如,所分析的 FG 环 2 位最常见的氨基酸是天冬酰胺 (N),然后是苏氨酸 (T),再然后是赖氨酸 (K)。

[0040] 图 9. **SYNAGIS®** 特异性 Tn3 支架的表达和纯化. 此处显示了重组体表达和纯化后描述 **SYNAGIS®** 特异性 Tn3 支架 (SynBP01) 的考马斯染色 PAGE 凝胶. 不难将 SynBP01 支架纯化至均一。

[0041] 图 9B. 测定 **SYNAGIS®** 特异性结合支架的 K_D . 曲线表示通过 **BIACORE®** 试验表征 SynBP01 支架与 **SYNAGIS®** 的特异性结合亲和力的实验. 利用各种浓度的固定化 **SYNAGIS®** 和流动相 SynBP01 测定到结合亲和力 (K_D) 为约 $16 \mu M$ 。

[0042] 图 9C. **SYNAGIS®** 特异性结合支架显示与基础支架类似的稳定性. 从实施例 3 制备的支架文库鉴定 **SYNAGIS®** 特异性结合支架. 此处显示了通过固有荧光强度检测蛋白质解折叠情况的脲变性实验结果. 在该实验中,随着脲浓度升高, Tn3 支架 (WT) 和 **SYNAGIS®** 特异性结合支架 SynBP01 (A1) 显示非常相似的变性特征。

[0043] 图 9D. 结合支架二价结合靶抗体 **SYNAGIS®**. 曲线表示采用 BIAcore 试验方式表征两个支架结合到固定分子上的实验. 在该实验中,固定的 **SYNAGIS®** 覆盖有 $1 \mu M$ 的 **SYNAGIS®** 特异性蛋白支架溶液 (蓝色曲线) 或 $1 \mu M$ 的 **SYNAGIS®** 特异性蛋白支架 + $0.19 \mu M$ 交联 mAb 溶液 (红色曲线)。

[0044] 图 10A. 含有天然产生的二硫键的 Tn3 结构基序的序列比对. 该序列比对在线显示了 21 个含有天然产生二硫键的 Tn3 相关结构基序中半胱氨酸残基的位置,从而测定稳定性工程改造的候选位置. 各 Tn3 序列内类似着色的 Cys 残基由二硫键相连. 比对包括 Tn3 的序列 (Iten. pro) 以促进鉴定 Tn3 中对应于含二硫键的支架中半胱氨酸残基的残基和位置。

[0045] 图 10B. 靶向二硫键工程改造以增加支架稳定性. 该图描述了支架序列中待工程改造的潜在二硫键位置. 为增加稳定性,分别工程改造支架中描述的 4 个二硫键位置. 得到的重组支架分别称为 $Tn3^{SS1}$ 、 $Tn3^{SS2}$ 、 $Tn3^{SS3}$ 和 $Tn3^{SS4}$ 。

[0046] 图 10C. 所选的纯化二硫键工程改造支架的 RP-HPLC 曲线. 图中描述了纯化、还原和重折叠形成二硫键后 (i) $Tn3^{SS3}$ 和 (ii) $Tn3^{SS4}$ 的反相 HPLC 色谱图. 色谱图显示了支架内所含的半胱氨酸在蛋白质纯化后仅部分氧化 (上曲线),通过 DTT 处理完全还原 (中间曲线) 和重折叠后完全氧化成二硫键 (下曲线)。

[0047] 图 10D. 二硫键工程改造支架的表达和表征. 该图描述了图 10B 所示 4 个二硫键工程改造支架的聚丙烯酰胺凝胶电泳分析结果. 在还原和非还原条件下分析纯化和重折叠构建物 Tn3 (野生型)、 $Tn3^{SS1}$ (1)、 $Tn3^{SS2}$ (2)、 $Tn3^{SS3}$ (3)、 $Tn3^{SS4}$ (4) 样品来评估预计的二硫键形成. 所述 $Tn3^{SS2}$ 形成二硫键连接的二聚体. 其它构建物 ($Tn3$ 、 $Tn3^{SS1}$ 、 $Tn3^{SS3}$ 和 $Tn3^{SS4}$) 不对掺入的半胱氨酸残基起反应而形成二聚体,因为纯化和重折叠的含二硫键支架在还原和非还原条件下作类似迁移。

[0048] 图 10E. 单二硫键工程改造支架的脲变性特征. 该图描述了图 A 中概述的所选的

含二硫键支架, Tn3^{SS1} (SS1)、 Tn3^{SS3} (SS3) 和 Tn3^{SS4} (SS4) 以及 Tn3 (WT) 支架的脲变性研究结果。在该实验中, 各种纯化和重折叠支架接触水平升高的脲。监测相对荧光作为解折叠的检测手段。随着蛋白质解折叠或变得不稳定, 相对荧光增加。如图中所示, 与 Tn3 支架相比, 含有 Tn3^{SS1} 的支架显示对脲的敏感性较高, 因此较不稳定。与 Tn3 相比, 支架 Tn3^{SS3} 和 Tn3^{SS4} 也显示对脲介导变性的耐受性更强, 因此更稳定。在该实验所检验的支架中, 支架 Tn3^{SS4} 显示对脲介导变性的耐受性最强。

[0049] 图 10F. 与 Tn3 支架相比, Tn3^{SS4} 二硫键工程改造支架显示稳定性增加。该图显示了比较 Tn3 支架 (圆圈) 和含二硫键支架 Tn3^{SS4} (正方形) 稳定性的盐酸脲变性试验结果。如该图所示, Tn3^{SS4} 支架显示对脲介导变性的耐受性更强, 因此与 Tn3 支架相比更稳定。

[0050] 图 10G. 与 Tn3 支架相比, Tn3^{SS4} 支架显示高水平的蛋白酶耐受。该图描述了比较 Tn3 支架与含 Tn3^{SS4} 的支架稳定性的蛋白酶敏感性试验结果。在该实验中, 相对蛋白酶耐受性与蛋白质稳定性相关。对于 Tn3 支架, 与嗜热菌蛋白酶温育最低 10 分钟导致降解。与嗜热菌蛋白酶温育 1 小时后, Tn3 支架完全降解。含 Tn3^{SS4} 的支架在完整的 16 小时过程中显示嗜热菌蛋白酶耐受性, 提示稳定性高于 Tn3 支架。

[0051] 图 10H. Tn3^{SS4} 二硫键工程改造支架显示高解链温度 (T_m)。该图描述了比较 Tn3 支架 (虚线) 与含二硫键 Tn3^{SS4} 支架 (实线) 的热稳定性研究结果。如解链曲线所示, Tn3^{SS4} 支架显示解链温度 (约 71°C) 高于 Tn3 支架 (约 45°C , 也参见图 3A)。

[0052] 图 10I. Tn3^{SS4} 二硫键工程改造的支架存在单体状态。该图描述了 Tn3^{SS4} 支架的尺寸排阻层析 / 多角度光散射 (SEC-MALS) 分析曲线。该数据显示纯化的 Tn3^{SS4} 支架存在单体状态, 在线光散射检测器测定到约 11kDa。

[0053] 图 10J. 纯化的 $\text{Tn3}^{\text{SS3+4}}$ 二硫键工程改造支架的 RP-HPLC 色谱。该图描述了纯化后、还原后和重折叠形成二硫键后 $\text{Tn3}^{\text{SS3+4}}$ 的反相 HPLC 色谱图。曲线显示了支架内所含半胱氨酸在蛋白质纯化后仅部分氧化 (上曲线), 通过 DTT 处理完全还原 (中间曲线) 和重折叠后完全氧化成两个二硫键 (下曲线)。

[0054] 图 10K. 含双二硫键的支架 $\text{Tn3}^{\text{SS3+4}}$ 显示高稳定性水平。该图显示比较 Tn3 (野生型) 支架 (圆圈) 与含单二硫键的支架, Tn3^{SS4} (正方形) 与含双二硫键的支架 $\text{Tn3}^{\text{SS3+4}}$ (三角形) 的稳定性的盐酸脲变性实验结果。如图中所示, 与含有单重折叠二硫键的支架 Tn3^{SS4} 以及 Tn3 支架相比, 重折叠的双二硫键支架 $\text{Tn3}^{\text{SS3+4}}$ 显示对脲介导变性的耐受性更强, 因此, 更稳定。

[0055] 图 11A. 超嗜热生物的支架的表达和纯化。此处显示了表达和纯化各种超嗜热细菌的预计支架 (Tn3 结构基序) 的考马斯染色 PAGE 凝胶。将所有预计的支架表达和纯化至均一。在该图中, T 表示总细胞裂解液, S 表示可溶性裂解液部分, P 表示纯化的蛋白质。

[0056] 图 11B. 海葡萄嗜热菌的支架显示高水平的热稳定性。该图描述了海葡萄嗜热菌的支架的热稳定性。重组表达、纯化推定的支架, 并对其进行热稳定性测试。如图中所示, 海葡萄嗜热菌的支架显示高解链温度 (pH 7.0 时约 83°C)。

[0057] 图 11C. 硫化叶菌的支架显示高水平的稳定性。该图描述了硫化叶菌的支架的热稳定性。重组表达、纯化推定的支架, 并利用示差扫描量热器对其进行热稳定性测试。如图中所示, 硫化叶菌的支架显示高解链温度 (pH 3.0 时约 98°C)。该支架还在 pH 7.0 时显示高水平的稳定性, 然而其在高于 75°C 的温度下凝聚并从溶液中沉淀。

[0058] 图 11D. 海葡萄嗜热菌的支架显示高水平的稳定性. 该图描述了盐酸胍变性试验的结果, 证明海葡萄嗜热菌的支架的蛋白质稳定性高. 如图中所示, 支架解折叠需要高浓度盐酸胍 (胍浓度是 5.0M 时 50% 的分子解折叠), 从而证明高稳定性。

[0059] 图 11E. 硫化叶菌的支架显示高水平的稳定性. 该图描述了盐酸胍变性试验的结果, 证明硫化叶菌的支架的蛋白质稳定性高. 蛋白质解折叠与分子的相对荧光增加相关. 如图中所示, pH 7.0 (圆圈) 或 pH 3.0 (正方形) 时解折叠需要高浓度的胍-HCl, 从而证明高稳定性。

[0060] 图 11F. 海葡萄嗜热菌的支架显示高水平的蛋白酶耐受性. 该图描述了检测海葡萄嗜热菌的支架的稳定性蛋白酶敏感性试验结果. 在该实验中, 相对蛋白酶耐受性与蛋白质稳定性相关. 对于该支架, 与嗜热菌蛋白酶温育 10 分钟导致低水平的降解, 其在该时期维持稳定. 海葡萄嗜热菌支架在整个 16 小时过程中显示嗜热菌蛋白酶耐受。

[0061] 图 11G. 硫化叶菌的支架显示高水平的蛋白酶耐受性. 该图描述了检测硫化叶菌的支架的稳定性蛋白酶敏感性试验结果. 在该实验中, 相对蛋白酶耐受性与蛋白质稳定性相关. 硫化叶菌支架在整个 16 小时过程中显示嗜热菌蛋白酶耐受。

[0062] 图 11H. 从宿主细胞纯化海葡萄嗜热菌的支架. 该图描述海葡萄嗜热菌支架纯化中的一步. 由于该支架显示高水平的稳定性, 可能加热含有重组支架的粗制大肠杆菌裂解液以除去主要的宿主细胞蛋白质, 而保留该支架. 泳道 1 表示热处理前的粗制裂解液. 含有粗制裂解液的 PAGE 凝胶的考马斯染色显示存在候选支架. 70°C, 热处理粗制裂解液 15 分钟导致宿主细胞蛋白质大量丧失, 而该支架完好保存 (泳道 2)。

[0063] 图 11I. 从宿主细胞纯化海葡萄嗜热菌的支架. 该图描述海葡萄嗜热菌支架纯化中的一步. 由于该支架显示高水平的稳定性, 可能加热含有重组支架的粗制大肠杆菌裂解液以降解主要的宿主细胞蛋白质, 而保留该支架. 泳道 1 表示蛋白酶处理前的粗制裂解液. 含有粗制裂解液的 PAGE 凝胶的考马斯染色显示存在该支架. 55°C, 蛋白酶处理粗制裂解液 45 分钟导致宿主细胞蛋白质大量丧失, 而该支架完好保存 (泳道 2)。

[0064] 图 11J. 从宿主细胞纯化硫化叶菌的支架. 该图描述了硫化叶菌支架的纯化. 由于该支架显示高水平的稳定性, 可能在 pH 3.0 温育含有重组支架的粗制裂解液并将温度升高至 70°C, 持续 15 分钟以除去主要的宿主细胞蛋白质, 而保留可溶性支架. 泳道 1 表示酸或热处理前的粗制大肠杆菌裂解液. 泳道 2 表示将粗制裂解液的 pH 降低至 3.0 后保留的可溶性蛋白质. 泳道 3 表示将 pH 降低至 3.0 和在 70°C 温育 15 分钟后的可溶性蛋白质. 在这些处理中支架耐受并维持在溶液中。

[0065] 图 12. SynBP01 与 **SYNAGIS®** 结合所需的两个环. 该图描述了 SynBP01 及其变体与结合于平板的 **SYNAGIS®** 的结合情况. 在该实验中, 将 SynBP01 的 BC 和 FG 环转移至野生型支架, 从而产生 SynBP01 的单环变体. 对这些变体 (仅称为 BC 和 FG) 进行基于 ELISA 的试验, 在该试验中它们显示不结合与平板结合的 **SYNAGIS®**. 作为对照, ELISA 试验方式中存在 SynBP01 结合. 此外, SynBP01 上存在 SS4 二硫键突变. 称为 SynBP01SS4 的该变体在 ELISA 中不显示与结合于平板的 **SYNAGIS®** 有任何结合。

[0066] 图 13. 通过 BIAcore 测定 TRAIL-R2 特异性克隆 5E5 的结合亲和力. 该图描述了克隆 5E5 对结合于芯片的 TRAIL-R2 的亲和力测定. 测定的 K_d 约为 700nM。

[0067] 图 14. 多个 TRAIL-R2 特异性克隆显示的竞争性结合. 该图中描述了各种

TRAIL-R2 特异性支架的竞争性结合实验的结果。测试了两个 TRAIL-R2 特异性克隆, 5E5 和 7G11 与展示在噬菌体上的其它 TRAIL-R2 特异性克隆的竞争性结合。5E5 与本身和除 2H6 和 7G11 以外的所有其它克隆竞争。7G11 只与本身和 2H6 竞争。该数据表明有两组克隆识别 TRAIL-R2 上的两个不同表位。

[0068] 图 15. 各种 TRAIL-R2 特异性克隆的竞争. 该图中描述了各种 TRAIL-R2 特异性支架的竞争性结合实验的结果。测试了 5 种 TRAIL-R2 特异性克隆, 1E3、1G11、2B4、1C12 和 2D3 与展示在噬菌体上的其它 TRAIL-R2 特异性克隆的竞争性结合。1E3、1C12 和 2D3 与除 8B3 和 7G11 以外的大多数噬菌体展示克隆竞争。可溶性 1G11 不与噬菌体展示的任何克隆竞争, 2B4 在大多数情况下显示低到中等的抑制作用。该数据提示 1E3、1C12 和 2D3 识别 TRAIL-R2 上的相同表位。

[0069] 图 16. TRAIL-R2 结合剂抑制细胞活力. 该图描述了当与抗 -HIS 标签抗体和抗小鼠 IgG 以 2 : 1 : 0.5 的摩尔比形成复合物时, Colo-205 细胞系对 5E5、7G11、1C12、2D3 和 1E3 处理的敏感性。通过将用 TRAIL-R2 结合克隆处理的试验信号表示为用不结合 TRAIL-R2 的对照 Tn3 处理细胞获得信号的百分比而获得活细胞百分比。

[0070] 图 17A. 表示多价 Tn3- 融合蛋白例子的图. 二价构建物表示融合于抗体 Fc 区的 Tn3, 而四价构建物将 Tn3 与重链恒定区合伙轻链 C κ 区融合。

[0071] 图 17B. 显示多价 Tn3- 融合蛋白中蛋白质模块连接键的图. i) 在 Fc 融合构建物中, N- 末端 Tn3 模块通过肽接头和 IgG1 的绞链区连接于 IgG1 的 Fc 区。接头序列的长度和组成可以不同, 但在实施例 16 中是 -GA- 基序。ii) 在 C κ 融合构建物中, N- 末端 Tn3 模块通过肽接头连接于抗体 κ 轻链的恒定区。接头序列的长度和组成可以不同, 但在实施例 16 中是 -GGTPT- 基序。iii) 在 IGHG1 融合构建物中, N- 末端 Tn3 模块通过肽接头连接于 IgG1 重链的恒定区。接头序列的长度和组成可以不同, 但在实施例 16 中是 -GGTPT- 基序。

[0072] 图 18. 表达多价 Tn3 构建物. 该图代表还原性 SDS-PAGE, 其显示 A 蛋白纯化后二价 Tn3 构建物 (实施例 1-3), 和四价 Tn3 构建物 (实施例 4-7) 的相对大小。样品编号对应于表 10 所示那些。表达的所有构建物通过该分析显示预计的大小。

[0073] 图 19. Tn3 单体和多聚体的结合亲和力. 该图描述了利用单价、二价和四价 1C12 和 D1Tn3 构建物获得的生物传感器结合实验的传感器图。将 TRAIL-R2-Fc 融合蛋白固定在传感器芯片上, 将样品蛋白质注射在该芯片上。“四”指四价 C κ /IGHG1 融合构建物。1C12 构建物显示与 TRAIL-R2 结合改善与化合价呈函数关系, 而对照 D1 构建物不显示结合。

[0074] 图 20. 靶向 TRAIL-R2 的二价 Tn3 构建物的作用. 该图描述了用 (A) 二价形式的 TRAIL-R2 特异性 Tn3 结合物 1C12 或 (B) 加入或未加入交联抗体 (抗 - 人 Fc) 的二价形式非特异性 Tn3 结合物处理的 H2122 细胞的生长抑制曲线。与对照非结合物相比, TRAIL-R2 特异性结合物在试验中显示温和活性, 该活性在第二抗体存在下降低。

[0075] 图 21. 靶向 TRAIL-R2 的四价 Tn3 构建物的作用. 该图描述了用 (A) 单特异性四价形式的 TRAIL-R2 特异性 Tn3 结合物 1C12 或 (B) 加入或未加入交联抗体 (抗 - 人 Fc) 的单特异性四价形式的非特异性 Tn3 结合物处理的 H2122 细胞的生长抑制曲线。与对照非结合物相比, TRAIL-R2 特异性结合物在试验中显示有活性, 该活性在第二抗体存在下略微降低。

[0076] 图 22. 靶向 TRAIL-R2 的多特异性四价 Tn3 构建物的作用. 该图描述了用 (A) 双

特异性四价形式的 TRAIL-R2 特异性 Tn3 结合物 1C12 和 2D3 (1C12 融合于 IgG1 重链的恒定区, 2D3 融合于 C κ 结构域) 或 (B) 加入或未加入交联抗体 (抗-人 Fc) 的双特异性四价形式的 TRAIL-R2 特异性结合物 2D3 和 1C12 (2D3 融合于 IgG1 重链的恒定区, 1C12 融合于 C κ 结构域) 处理的 H2122 细胞的生长抑制曲线。与对照非结合物相比 (如图 21 所示), TRAIL-R2 特异性结合物在试验中显示有活性, 该活性在第二抗体存在下增加。

[0077] 图 23. pSec 构建物的设计。(A) 表示 pSec-oppA-Tn3 的开放读框的氨基酸序列。分泌入周质空间后, oppA 信号肽 (下划线所示) SEQ ID NO:227 被切割。oppA 信号肽内的倒数第二个残基 (斜体字显示) 突变成 pSec-oppA (L25M)-Tn3 衍生物中的甲硫氨酸以引入 NcoI 克隆位点。(B) 描述了 pSec-oppA (L25M)-Tn3 构建物, 显示了该构建物内启动子、信号肽、Tn3 和 His 标签模块的配置。

[0078] 图 24. 制备分泌的 Tn3 构建物。(A) 表示分泌 Tn3 的大肠杆菌粗制培养液和周质组分的 SDS-PAGE 分析。(B) 表示从大肠杆菌培养液纯化的 Tn3 支架的 SDS-PAGE 分析。(C) 表示从大肠杆菌培养液纯化的 Tn3 的 HPLC 分析。DTT 处理后保留时间的漂移与二硫键的存在一致。

[0079] 图 25. **SYNAGIS®**-Fc 二价结合物的 SDS-PAGE. 该图显示了与 Fc 区融合的 SynBP01 支架的还原性 (泳道 1) 和非还原性 (泳道 2) SDS-PAGE 分析。这些结果证明融合的大小正确, 还可能表示二聚化。

[0080] 图 26. **SYNAGIS®**-Fc 二价结合物与 SynBP01 的竞争性结合分析. SynBP01 与 SynBP01-Fc 的竞争性 BIAcore 分析。简言之, 通过胺偶连将 **SYNAGIS®** 固定在 CM5 传感器芯片表面。以 75 微升 / 分钟的流速注射 1 μ M 浓度的 SynBP01 或 SynBP01-Fc。二价 SynBP01-Fc 构建物显示亲和力高于单结构域结合物。

[0081] 图 27. 可将 Tn3 支架偶联于 PEG。(A) 固定化金属亲和柱纯化 STn3(CTC) (泳道 1-4) 和马来酰亚胺衍生 PEG 处理后 (阳离子交换层析之前) 的纯化 STn3(CTC) (泳道 5) 的 SDS-PAGE 分析。泳道 1: 表达 STn3(CTC) 的细胞的总细胞裂解液; 泳道 2: IMAC 柱的流出物; 泳道 3: IMAC 柱的洗涤部分; 泳道 4: STn3(CTC), 未 PEG 化; 泳道 5: PEG 化的 STn3(CTC)。(B) 从 SP XL 阳离子交换柱纯化的 PEG 化 STn3(CTC) 的 SDS-PAGE 分析。柱梯度组分示于泳道 1-5。

[0082] 图 28. AB、CD 和 EF 环显示环长度多样性。获得 103Fn3 序列各自的 AB、CD 和 EF 环的长度, 利用该数据产生所示的环长度频率分布。对于任何给定的环, 所有长度的频率总和等于 103, 所分析序列的数量。

[0083] 图 29. 测定不同 pH 和离子强度下 Tn3 的解链温度。这些图显示通过示差扫描量热器测定 pH 7.0 (20mM 磷酸钠缓冲液) (A)、pH 5.0 (20mM 乙酸钠缓冲液) (B) 和 pH 7.0 的高盐缓冲液中 (含 1.0M 盐的 20mM 磷酸钠缓冲液) (C) Tn3 支架的热解链温度。有高离子强度存在下, 测定的 Tn3 的 T_m 是 pH 7.0 时约 45°C, pH 5.0 时 52°C, pH 7.0 时 55°C。反复扫描 (黄色的) pH 7.0 样品显示在这些条件下热解链可逆。pH 5.0 时 Tn3 的热解链是可逆的。

[0084] 图 30A. 设计 Tn3 的荷电突变体。显示了 Tn3 三维结构的代表性草图 (pdb 代码: 1ten)。显示了 SEQ ID 1 的残基 8-90, 其中所有 Asp 和 Glu 残基的侧链以黄色和白色显示。设计了一组 8 个突变体, 其中用 Asn 或 Gln 替代以黄色显示的 Asp 和 Glu 残基。如 SEQ ID

1 编号残基。

[0085] 图 30B. 纯化的 Tn3 重组荷电突变体的 SDS-PAGE 分析. 各纯化蛋白质的等份试样进行 SDS-PAGE 凝胶电泳。为进行比较,在同一凝胶的不同泳道中对野生型蛋白质进行电泳,显示迁移率与各种荷电突变体相似。

[0086] 图 31A. 稳定 Tn3 突变的加和性。

[0087] 产生一系列 Tn3 点突变,其中各 Asp 或 Glu 残基替代为 Asn 或 Gln。此处显示了利用固有荧光检测蛋白质解折叠的脲变性实验结果。在该实验中,与野生型 Tn3 支架相比,8 种 Tn3 支架荷电突变体中的 5 种 (E33Q、D49N、E52Q、D53N、E86Q) 需要较高浓度的脲来实现解折叠。

[0088] 图 31B. 荷电突变的组合导致 Tn3 稳定性的加和改进。

[0089] 将提高野生型 Tn3 稳定性的 Asp 或 Glu 残基的点突变组合成 Tn3 的双或三突变。组合 Tn3 突变体 (E33Q/D49N、D49N/E86Q 和 E33Q/D49N/E86Q) 各自显示稳定性高于任何相应的点突变体或野生型 Tn3。

[0090] 图 32. 野生型和荷电工程改造 Tn3 支架的解链温度测定. 该图显示通过示差扫描量热法检测 Tn3 支架变体在 pH 7.0 时的热解链曲线。对于野生型 Tn3 (A),测定的 T_m 是约 45°C,对于 E33Q/D49N Tn3 (B) 是 50°C,对于 D49N/E86Q Tn3 (C) 是 52°C,对于 E33Q/D49N/E86Q Tn3 (D) 是 52°C。

[0091] 6. 详述

[0092] 本文所述的蛋白质支架设计成优于抗体衍生的片段和非抗体框架。本发明支架胜过抗体片段的主要优点是结构。这些支架衍生自人体液蛋白质中发现的完整、稳定和可溶性结构模块以及衍生自自然界的其它来源 (量热,但不限于嗜热细菌)。因此,它们显示优于抗体片段的折叠和热稳定特性,而抗体片段的产生包括除去抗体天然折叠的部分,从而通常暴露完整抗体中包埋在疏水环境中的氨基酸残基,例如可变区和恒定区之间的界面。这种疏水性残基暴露于溶剂增加了凝聚的可能性。

[0093] 此外,本发明支架提供抗体分子的功能优点。具体地说,虽然支架不是免疫球蛋白,但它的总体折叠接近 IgG 重链可变区的折叠,从而其可能在相对取向上以抗体 CDR 的类似方式展示其三个环。由于该结构,本发明支架具有类似于天然的抗原结合特性和类似于抗体的亲和力。因此,可在体外采用类似于体内抗体亲和力成熟方法的环境随机化和改组方案。

[0094] 6.1FnIII 结构基序

[0095] 本发明支架依据 III 型纤连蛋白模块 (FnIII),一种在哺乳动物血液和结构蛋白中发现的结构域的结构。该结构域常见于迄今为止测序的蛋白质,包括纤连蛋白、结合腕蛋白、胞内细胞骨架蛋白、细胞因子受体和原核生物酶 (Bork 和 Doolittle, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89 :8990,1992 ;Bork 等, Nature Biotech. 15 :553,1997 ;Meinke 等, J. Bacteriol. 175 :1910,1993 ;Watanabe 等, J. Biol. Chem. 265 :15659,1990)。虽然该结构域在自然界中多次出现,其氨基酸序列差异很大。具体地说,这些支架包括结合腕蛋白 C 的第三 FnIII 结构域 (也称为“Tn3”结构域)。该结构域的总体折叠极其接近最小功能性抗体片段 (即,重链的可变区) 的,其包含骆驼和羊驼 IgG 的完整抗原识别单位。

[0096] 此外,Tn3 结构域具有耐受随机化的暴露环序列,从而有助于产生能以高亲和力结

合特异性靶标的各种蛋白支架库。

[0097] 这些蛋白质支架可用于设计能实质性结合任何感兴趣化合物的蛋白质（例如，任何蛋白质）。具体地说，基于本文所述 Tn3 结构基序的分子可用作支架，其经设计的定向进化（directed evolution）使得类似于抗体可变区的互补决定区（CDR）的一个或多个环随机化。这种定向进化方法产生对感兴趣抗原具有高亲和力的抗体-样分子。此外，本文所述支架可用于展示指定的暴露环（例如，以前依据抗原结合随机化和选择的环）来指导结合这种引入的环的分子的进化。可进行该类选择以鉴定各 CDR-样环或识别组合在非线形表位结合部分中的两个或所有三个 CDR-样环的识别分子。

[0098] 对应于 IgG 重链抗原结合环的一组 Tn3 的三个环从氨基酸残基 23 到 31 (BC)、50 到 56 (DE) 和 75 到 84 (FG)。BC、DE 和 FG 环的长度分别是 9、6 和 10 个残基，落在抗体重链中发现的相应抗原识别环的狭窄范围内，即分别是 7-10、4-8 和 4-28 残基长度。或者，在另一实施方式中，BC、DE 和 FG 环可以分别从氨基酸残基 23 到 31、51 到 56 和 75 到 84。因此，一旦为高抗原亲和力作了随机化和选择，这些环可与抗原接触，等于抗体中相应环的接触。Tn3 结构域的 AB、CD 和 EF 环还可共享该特性，因此，也可用于为高抗原亲和力作随机化和选择。该方法可与 BC、DE 和 FG 环的随机化平行或串联进行。

[0099] 在具体的实施方式中，依据人结合腕蛋白 C 的 Tn3 结构域的支架的一个或多个环区域包含以下氨基酸残基：

[0100] I. AB 环内所含的 12-17；

[0101] II. BC 环内所含的 23-31；

[0102] III. CD 环内所含的 39-45；

[0103] IV. DE 环内所含的 50-56；

[0104] V. EF 环内所含的 60-66；和

[0105] VI. FG 环所含的 75-84。

[0106] 在另一具体实施方式中，本发明支架包含至少 1 个、至少 2 个、至少 3 个、至少 4 个、至少 5 个或至少 6 个环，其中环包含 SEQ ID NO：201、202、203、204、205 或 206 所示氨基酸序列。在一个实施方式中，本发明支架包含具有 SEQ ID NO：201 所示氨基酸序列的 AB 环。在另一实施方式中，本发明支架包含具有 SEQ ID NO：202 所示氨基酸序列的 BC 环。在另一实施方式中，本发明支架包含具有 SEQ ID NO：203 所示氨基酸序列的 CD 环。在另一实施方式中，本发明支架包含具有 SEQ ID NO：204 所示氨基酸序列的 DE 环。在另一实施方式中，本发明支架包含具有 SEQ ID NO：205 所示氨基酸序列的 EF 环。在另一实施方式中，本发明支架包含具有 SEQ ID NO：206 所示氨基酸序列的 FG 环。在一具体实施方式中，本发明支架包含具有 SEQ ID NO：201 所示氨基酸序列的 AB 环，具有 SEQ ID NO：202 所示氨基酸序列的 BC 环，具有 SEQ ID NO：203 所示氨基酸序列的 CD 环，具有 SEQ ID NO：204 所示氨基酸序列的 DE 环，具有 SEQ ID NO：205 所示氨基酸序列的 EF 环，和具有 SEQ ID NO：206 所示氨基酸序列的 FG 环。

[0107] 在另一具体实施方式中，依据人结合腕蛋白 C 的 Tn3 结构域的支架的一个或多个环区域包含以下氨基酸残基：

[0108] I. AB 环内所含的 11-17；

[0109] II. BC 环内所含的 23-31；

[0110] III. CD 环内所含的 39-45 ;

[0111] IV. DE 环内所含的 51-56 ;

[0112] V. EF 环内所含的 60-67 ;和

[0113] VI. FG 环所含的 75-84。

[0114] 在另一具体实施方式中,本发明支架包含至少 1 个、至少 2 个、至少 3 个、至少 4 个、至少 5 个或至少 6 个环,其中环包含 SEQ ID NO :207、202、203、208、209 或 206 所示氨基酸序列。在一个实施方式中,本发明支架包含具有 SEQ ID NO :207 所示氨基酸序列的 AB 环。在另一实施方式中,本发明支架包含具有 SEQ ID NO :202 所示氨基酸序列的 BC 环。在另一实施方式中,本发明支架包含具有 SEQ ID NO :203 所示氨基酸序列的 CD 环。在另一实施方式中,本发明支架包含具有 SEQ ID NO :208 所示氨基酸序列的 DE 环。在另一实施方式中,本发明支架包含具有 SEQ ID NO :209 所示氨基酸序列的 EF 环。在另一实施方式中,本发明支架包含具有 SEQ ID NO :206 所示氨基酸序列的 FG 环。在一具体实施方式中,本发明支架包含具有 SEQ ID NO :207 所示氨基酸序列的 AB 环,具有 SEQ ID NO :202 所示氨基酸序列的 BC 环,具有 SEQ ID NO :203 所示氨基酸序列的 CD 环,具有 SEQ ID NO :208 所示氨基酸序列的 DE 环,具有 SEQ ID NO :209 所示氨基酸序列的 EF 环,和具有 SEQ ID NO :206 所示氨基酸序列的 FG 环。

[0115] 在其它实施方式中,本发明支架包含的环区域是 SEQ ID NO :1-32 或 68-88 中任一所示同源环区域的变体。

[0116] 本发明提供重组的、非天然产生的多肽支架,其包含连接于多个衍生自天然产生蛋白质序列的环区域序列的多个 β 链结构域,其中一个或多个所述环区域序列因天然产生蛋白质序列中相应环序列的至少一个氨基酸的缺失、取代或添加而有所不同,其中所述多肽支架的 β 链结构域与天然产生蛋白质序列的相应结构域序列有至少 50% 同源性。例如,这种氨基酸序列可以是但不限于:SEQ ID NO :1-32、60-88 和 210 中的任一种。在另一具体实施方式中,本发明支架包含人结合腕蛋白 C 的 Tn3 结构域的序列。在另一实施方式中,本发明支架包含与人结合腕蛋白 C 的 Tn3 结构域有至少 50% 同源性的序列。在进一步的实施方式中,与 Tn3 结构域的所述同源性是至少 55%、至少 60%、至少 65%、至少 70%、至少 75%、至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 95%、至少 99% 或更高。在其它实施方式中,所述天然产生的序列是对应于人结合腕蛋白 C 的额外 Tn3 结构基序的蛋白质序列。在其它实施方式中,所述天然产生的序列是对应于另一结合腕蛋白,或者另一生物(例如但不限于,鼠、猪、牛或马结合腕蛋白)的结合腕蛋白的 Tn3 结构基序的蛋白质序列。

[0117] 虽然 Tn3 代表用于产生抗体模拟物的支架,但其它分子可取代本文所述分子中的 Tn3。这些包括但不限于:动物和原核生物的相关 Tn3 结构基序。此外,还可利用其它蛋白质的 Tn3 结构基序。不同生物和母体蛋白质的模块可能最适合于不同应用;例如在设计低 pH 下稳定的支架中,从优选在低 pH 下生长的生物(例如但不限于硫化叶菌)产生蛋白质是最理想的。在另一实施方式中,可从嗜热细菌,例如但不限于闪烁古生球菌和海葡萄嗜热菌鉴定并利用相关 Tn3 结构基序,二者各自显示在大于 70°C 时生长最佳。在其它实施方式中,天然产生的序列对应于嗜热生物的预测 Tn3 结构基序,例如但不限于:闪烁古生球菌、海葡萄嗜热菌、嗜酸热硫化叶菌、硫磺矿硫化叶菌和硫化叶菌。在还有另一实施方式中,本发明支架具有的蛋白质序列与对应于上述嗜热生物的 Tn3 结构基序或预测的 Tn3 结构基序的任

一序列具有至少 30%、至少 35%、至少 40%、至少 45%、至少 50%、至少 55%、至少 60%、至少 65%、至少 70%、至少 75%、至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 95% 或至少 99% 的同源性。在一些实施方式中,可从 SEQ ID NO :2-4 和 68-88 所示氨基酸序列选择嗜热生物的 Tn3 结构基序。

[0118] 本发明还提供含 7 个以上的多个 β 链的本发明支架。在一个实施方式中,本发明支架包含多个,至少 7 个、至少 8 个、至少 9 个、至少 10 个、至少 11 个或更多个 β 链。

[0119] 本发明还提供含 6 个以上的多个环区域的本发明支架。在一个实施方式中,本发明支架包含多个,至少 7 个、至少 8 个、至少 9 个、至少 10 个、至少 11 个或更多个环区域。

[0120] 在一个实施方式中,本发明支架包含至少 7 个 β 链,其中所述 β 链从 N- 末端向 C- 末端称为 A、B、C、D、E、F 和 G 链。在另一实施方式中,本发明支架包含至少 7 个 β 链,各链由环区域隔开,其中所述环区域从 N- 末端向 C- 末端称为 AB、BC、CD、DE、EF 和 FG 环。在另一实施方式中,本发明支架包含少于 7 个 β 链,各链由环区域隔开。在另一实施方式中,本发明支架包含少于 7 个 β 链,各链由环区域隔开。

[0121] 在另一具体实施方式中,本发明支架包含至少 1 个、至少 2 个、至少 3 个、至少 4 个、至少 5 个、至少 6 个或至少 7 个 β 链,其中所述 β 链包含选自 SEQ ID NO :228-234 的氨基酸序列。在另一具体实施方式中,本发明支架包含至少 7 个 β 链,从 N- 末端向 C- 末端称为 A-G,其中所述 A 链包含 SEQ ID NO :228 所示序列。在另一具体实施方式中,本发明支架包含至少 7 个 β 链,从 N- 末端向 C- 末端称为 A-G,其中所述 B 链包含 SEQ ID NO :229 所示序列。在另一具体实施方式中,本发明支架包含至少 7 个 β 链,从 N- 末端向 C- 末端称为 A-G,其中所述 C 链包含 SEQ ID NO :230 所示序列。在另一具体实施方式中,本发明支架包含至少 7 个 β 链,从 N- 末端向 C- 末端称为 A-G,其中所述 D 链包含 SEQ ID NO :231 所示序列。在另一具体实施方式中,本发明支架包含至少 7 个 β 链,从 N- 末端向 C- 末端称为 A-G,其中所述 E 链包含 SEQ ID NO :232 所示序列。在另一具体实施方式中,本发明支架包含至少 7 个 β 链,从 N- 末端向 C- 末端称为 A-G,其中所述 F 链包含 SEQ ID NO :233 所示序列。在另一具体实施方式中,本发明支架包含至少 7 个 β 链,从 N- 末端向 C- 末端称为 A-G,其中所述 G 链包含 SEQ ID NO :234 所示序列。在另一具体实施方式中,本发明支架包含具有 SEQ ID NO :228 所示序列的 A 链、具有 SEQ ID NO :229 所示序列的 B 链、具有 SEQ ID NO :230 所示序列的 C 链、具有 SEQ ID NO :231 所示序列的 D 链、具有 SEQ ID NO :232 所示序列的 E 链、具有 SEQ ID NO :233 所示序列的 F 链和具有 SEQ ID NO :234 所示序列的 G 链。

[0122] 在另一具体实施方式中,本发明支架包含至少 1 个、至少 2 个、至少 3 个、至少 4 个、至少 5 个、至少 6 个或至少 7 个 β 链,其中所述 β 链包含选自 SEQ ID NO :235、229、230、236、232、237 和 234 的氨基酸序列。在另一具体实施方式中,本发明支架包含至少 7 个 β 链,从 N- 末端向 C- 末端称为 A-G,其中所述 A 链包含 SEQ ID NO :235 所示序列。在另一具体实施方式中,本发明支架包含至少 7 个 β 链,从 N- 末端向 C- 末端称为 A-G,其中所述 B 链包含 SEQ ID NO :229 所示序列。在另一具体实施方式中,本发明支架包含至少 7 个 β 链,从 N- 末端向 C- 末端称为 A-G,其中所述 C 链包含 SEQ ID NO :230 所示序列。在另一具体实施方式中,本发明支架包含至少 7 个 β 链,从 N- 末端向 C- 末端称为 A-G,其中所述 D 链包含 SEQ ID NO :236 所示序列。在另一具体实施方式中,本发明支架包含至少 7 个 β 链,

从 N- 末端向 C- 末端称为 A-G, 其中所述 E 链包含 SEQ ID NO :232 所示序列。在另一具体实施方式中, 本发明支架包含至少 7 个 β 链, 从 N- 末端向 C- 末端称为 A-G, 其中所述 F 链包含 SEQ ID NO :237 所示序列。在另一具体实施方式中, 本发明支架包含至少 7 个 β 链, 从 N- 末端向 C- 末端称为 A-G, 其中所述 G 链包含 SEQ ID NO :234 所示序列。在另一具体实施方式中, 本发明支架包含具有 SEQ ID NO :235 所示序列的 A 链、具有 SEQ ID NO :229 所示序列的 B 链、具有 SEQ ID NO :230 所示序列的 C 链、具有 SEQ ID NO :236 所示序列的 D 链、具有 SEQ ID NO :232 所示序列的 E 链、具有 SEQ ID NO :237 所示序列的 F 链和具有 SEQ ID NO :234 所示序列的 G 链。

[0123] 在另一实施方式中, 本发明支架包含与 SEQ ID NO :1-32 或 68-99 中任一所示同源 β 链具有至少 50% 同源性的 β 链序列。在进一步的实施方式中, 所述同源性是至少 55%、至少 60%、至少 65%、至少 70%、至少 75%、至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 95%、至少 99% 或更高。

[0124] 连接蛋白质支架各链的环可作长度和 / 或序列多样性随机化。在一个实施方式中, 本发明支架的至少一个环作长度和 / 或序列多样性随机化。在另一实施方式中, 本发明支架的至少一个环维持恒定, 而至少一个额外的环作长度和 / 或序列多样性随机化。在另一实施方式中, 本发明支架文库中环 AB、CD 和 EF 中至少一个维持恒定, 而环 BC、DE 和 FG 中至少一个作长度和 / 或序列多样性随机化。

[0125] 在一具体实施方式中, 本发明支架包含具有以下共有序列的随机化 BC 环 : S-X-a-X-b-X-X-X-G, 其中 X 表示任何氨基酸, 其中 (a) 表示脯氨酸或丙氨酸, 其中 (b) 表示丙氨酸或甘氨酸。

[0126] 在一具体实施方式中, 本发明支架包含具有以下共有序列的随机化 BC 环 : A-d-P-X-X-X-e-f-X-I-X-G, 其中 X 表示任何氨基酸, 其中 (d) 表示脯氨酸、谷氨酸或赖氨酸, 其中 (e) 表示天冬酰胺或甘氨酸, 和其中 (f) 表示丝氨酸或甘氨酸。

[0127] 在一具体实施方式中, 本发明支架包含 BC 环, 其包含具有以下共有序列的 11 个氨基酸 : S-P-c-X-X-X-X-X-X-T-G, 其中 X 表示任何氨基酸, 其中 (c) 表示脯氨酸、丝氨酸或甘氨酸。

[0128] 在一具体实施方式中, 本发明支架包含具有以下共有序列的随机化 FG 环 : X-a-X-X-G-X-X-X-S, 其中 X 表示任何氨基酸, 其中 (a) 表示天冬酰胺、苏氨酸或赖氨酸。

[0129] 在一具体实施方式中, 本发明支架包含具有以下共有序列的随机化 FG 环 : X-a-X-X-X-X-b-N-P-A, 其中 X 表示任何氨基酸, 其中 (a) 表示天冬酰胺、苏氨酸或赖氨酸, 和其中 (b) 表示丝氨酸或甘氨酸。

[0130] 在一具体实施方式中, 本发明支架包含具有以下共有序列的随机化 FG 环 : X-a-X-X-G-X-X-S-N-P-A, 其中 X 表示任何氨基酸, 其中 (a) 表示天冬酰胺、苏氨酸或赖氨酸。

[0131] 在一具体实施方式中, 本发明文库包含具有 DE 环的支架, 该环包含 6 个残基, 并经随机化而含有以下共有序列 : X-X-X-X-X-X, 其中 X 表示任何氨基酸。

[0132] 在一具体实施方式中, 本发明支架包含含有 7 个残基的 AB 环, 该环经随机化而含有以下共有序列 : K-X-X-X-X-X-a, 其中 X 表示天冬酰胺、天冬氨酸、组氨酸、酪氨酸、异亮氨酸、缬氨酸、亮氨酸、苯丙氨酸、苏氨酸、丙氨酸、脯氨酸或丝氨酸, 其中 (a) 表示丝氨酸、苏

氨酸、丙氨酸或甘氨酸。

[0133] 在一具体实施方式中,本发明支架包含含有 9 个残基的 AB 环,该环经随机化而含有以下共有序列:K-X-X-X-X-X-X-a,其中 X 表示天冬酰胺、天冬氨酸、组氨酸、酪氨酸、异亮氨酸、缬氨酸、亮氨酸、苯丙氨酸、苏氨酸、丙氨酸、脯氨酸或丝氨酸,其中 (a) 表示丝氨酸、苏氨酸、丙氨酸或甘氨酸。

[0134] 在一具体实施方式中,本发明支架包含含有 7、8 或 9 个残基的 CD 环,其中 CD 环中各残基经随机化,其中 X 表示天冬酰胺、天冬氨酸、组氨酸、酪氨酸、异亮氨酸、缬氨酸、亮氨酸、苯丙氨酸、苏氨酸、丙氨酸、脯氨酸或丝氨酸。

[0135] 在一具体实施方式中,本发明支架包含含有 8 个残基的 EF 环,该环经随机化而含有以下共有序列:X-b-L-X-P-X-c-X,其中 X 表示天冬酰胺、天冬氨酸、组氨酸、酪氨酸、异亮氨酸、缬氨酸、亮氨酸、苯丙氨酸、苏氨酸、丙氨酸、脯氨酸或丝氨酸,其中 (b) 表示天冬酰胺、赖氨酸、精氨酸、天冬氨酸、谷氨酸或甘氨酸,和其中 (c) 表示异亮氨酸、苏氨酸、丝氨酸、缬氨酸、丙氨酸或甘氨酸。

[0136] 在一些实施方式中,本发明支架可包含约 75-约 500、约 75-约 200、约 75-约 100、约 75-约 250 或约 75-约 150 个氨基酸。

[0137] 6.2 基于二硫键工程改造的支架的蛋白质

[0138] 为增加本发明支架的稳定性,采用生物信息学方法鉴定适于二硫键工程改造的候选位置。然而,通过手工检查蛋白质结构来鉴定毗邻的候选残基对进行二硫键设计常因该类键所要求的严格几何约束性而没有效果(参见 Dombkowski, Bioinformatics(生物信息学)第 19 卷第 14 号,2003 1852-1853)。因此,本发明提供在通过热耐受性,对离液变性作用和蛋白酶处理检测到稳定性增加的位置具有工程改造的二硫键的支架。

[0139] 在一个实施方式中,本发明支架包含至少一个、至少两个、至少三个、至少四个或至少五个非天然产生的二硫键。在一个实施方式中,本发明支架包含至少一个非天然产生的二硫键,其中所述至少一个非天然产生的二硫键稳定该支架。在另一实施方式中,本发明支架在两个 β 链之间包含至少一个非天然产生的二硫键。例如,所述至少一个非天然产生的二硫键可在 A 链和 B 链之间,或在 D 链和 E 链之间,或在 F 链和 G 链之间,或在 C 链和 F 链之间形成连接。在另一实施方式中,所述至少一个非天然产生的二硫键在 F 链和 G 链之间形成第一键,在 C 链和 F 链之间形成第二连接。在另一实施方式中,本发明支架在两个环区域之间包含至少一个非天然产生的二硫键。在另一实施方式中,本发明支架在环区域和 β 链之间包含至少一个非天然产生的二硫键。在另一实施方式中,本发明支架在同一 β 链内包含至少一个非天然产生的二硫键。在另一实施方式中,本发明支架在同一环区域内包含至少一个非天然产生的二硫键。在另一实施方式中,本发明支架包含至少一个非天然产生的二硫键,其中该键位于两个不同支架间。

[0140] 在另一实施方式中,本发明支架包含形成至少二个、至少三个、至少四个或更多个支架的多聚支架(术语“多聚”定义为有至少二个或更多个支架结合)的二硫键。

[0141] 不难通过本领域熟知的技术检测工程改造二硫键所致的稳定性增加,例如热(T_m)和离液变性作用(例如,脲或胍)、蛋白酶处理(例如,嗜热菌蛋白酶)或本领域接受的另一稳定性参数。用于检测蛋白质稳定性的技术的综述可见,例如“Current Protocols in Molecular Biology(最新分子生物学方法)”和“Current Protocols in Protein

Science(最新蛋白质科学方法)”，约翰威利父子公司(JohnWiley and Sons) 出版，2007。

[0142] 在一个实施方式中，与二硫键工程改造前的同一支架相比，通过热耐受性、对离液变性作用、蛋白酶处理的耐受性或本领域熟知的另一稳定性参数检测到本发明的含二硫键支架显示稳定性增加至少 5%、至少 10%、至少 15%、至少 20%、至少 25%、至少 30%、至少 35%、至少 40%、至少 45%、至少 50%、至少 55%、至少 60%、至少 65%、至少 70%、至少 75%、至少 80%、至少 85%、至少 90%或至少 95%或更多。

[0143] 可通过不同条件下蛋白质所显示的荧光水平检测蛋白质的稳定性。应激下蛋白质的相对解折叠程度和蛋白质显示的固有荧光之间正相关。检测热特征的合适蛋白质稳定性试验包括示差扫描量热法(DSC)和圆二色性(CD)。当蛋白质显示通过 DSC 或 CD 检测的参数有相当大漂移时，其与解折叠结构相关，产生该漂移的温度称为解链温度(T_m)。在一个实施方式中，与相同实验条件下工程改造前的同一支架所显示的相比，本发明的二硫键工程改造支架显示解链温度(T_m) 升高，至少高于 45℃、至少高于 50℃、至少高于 55℃、至少高于 60℃、至少高于 65℃、至少高于 70℃、至少高于 71℃、至少高于 72℃、至少高于 73℃、至少高于 74℃、至少高于 75℃、至少高于 76℃、至少高于 77℃、至少高于 78℃、至少高于 79℃、至少高于 80℃、至少高于 81℃、至少高于 82℃、至少高于 83℃、至少高于 84℃、至少高于 85℃、至少高于 85℃、至少高于 86℃、至少高于 87℃、至少高于 88℃、至少高于 89℃、至少高于 90℃、至少高于 91℃、至少高于 92℃、至少高于 93℃、至少高于 94℃、至少高于 94℃、至少高于 95℃、至少高于 96℃、至少高于 97℃或至少高于 98℃、或至少高于 100℃、或至少高于 105° 或至少高于 110° 、或至少高于 120° 。

[0144] 在另一实施方式中，与相同实验条件下二硫键工程改造前的同一支架相比，本发明的二硫键工程改造支架显示解链温度(T_m) 升高至少 5%、至少 10%、至少 15%、至少 20%、至少 25%、至少 30%、至少 35%、至少 40%、至少 45%、至少 50%、至少 55%、至少 60%、至少 65%、至少 70%、至少 75%、至少 80%、至少 85%、至少 90%、或至少 95%或更高。

[0145] 蛋白质稳定性的另一试验包括将蛋白质接触用于使蛋白质内相互作用失稳定的离液剂，量热脲或胍（例如，胍-HCl 或异硫氰酸胍）。蛋白质接触水平升高的脲或胍后，检测相对固有荧光来评估 50%蛋白质分子解折叠时的数值。该值称为 C_m 值，表示蛋白质稳定性的基准值。 C_m 值越高，蛋白质越稳定。在一个实施方式中，与相似实验条件下在脲变性实验中检测的二硫键工程改造前的同一支架相比，本发明的二硫键工程改造支架显示 C_m 升高至少 5%、至少 10%、至少 15%、至少 20%、至少 25%、至少 30%、至少 35%、至少 40%、至少 45%、至少 50%、至少 55%、至少 60%、至少 65%、至少 70%、至少 75%、至少 80%、至少 85%、至少 90%、或至少 95%或更高。

[0146] 在另一实施方式中，与相似实验条件下在胍变性实验中检测的二硫键工程改造前的同一支架相比，本发明的二硫键工程改造支架显示 C_m 升高至少 5%、至少 10%、至少 15%、至少 20%、至少 25%、至少 30%、至少 35%、至少 40%、至少 45%、至少 50%、至少 55%、至少 60%、至少 65%、至少 70%、至少 75%、至少 80%、至少 85%、至少 90%、或至少 95%或更高。

[0147] 用于测试蛋白质稳定性的另一试验是蛋白酶耐受性试验。在该试验中，蛋白质稳定性的相对水平与一定时期内对蛋白酶降解作用的耐受性相关。越耐受蛋白酶处理，蛋白

质越稳定。在一个实施方式中,与相似实验条件下在蛋白酶耐受性实验中检测的二硫键工程改造前的同一支架相比,本发明的二硫键工程改造支架显示稳定性升高至少 5%、至少 10%、至少 15%、至少 20%、至少 25%、至少 30%、至少 35%、至少 40%、至少 45%、至少 50%、至少 55%、至少 60%、至少 65%、至少 70%、至少 75%、至少 80%、至少 85%、至少 90%、或至少 95%或更高。

[0148] 在一些例子中,优选利用稳定性降低的本发明支架,例如但不限于偶联于细胞毒素或放射性核素的支架。这种支架可能要求非特异性毒性相关的更快清楚速度。在一个实施方式中,本发明支架包含二硫键,与工程改造前的支架相比,该二硫键使得该支架去稳定。在一个实施方式中,与相似实验条件下通过热耐受、对离液变性作用、蛋白酶处理的耐受性或本领域熟知的另一稳定性参数检测的二硫键工程改造前的同一支架相比,含有二硫键的本发明支架显示稳定性降低至少 5%、至少 10%、至少 15%、至少 20%、至少 25%、至少 30%、至少 35%、至少 40%、至少 45%、至少 50%、至少 55%、至少 60%、至少 65%、至少 70%、至少 75%、至少 80%、至少 85%、至少 90%、或至少 95%或更多。

[0149] 6.3 支架动力学

[0150] 本发明提供特异性结合靶标(例如,蛋白质)的支架。在一些实施方式中,所述靶标可以是,例如但不限于:细胞表面抗原、可溶性抗原、固定抗原、免疫静止抗原、胞内抗原、核内抗原、自体抗原、非自体抗原、癌症抗原、细菌抗原或病毒抗原。

[0151] 在一些实施方式中,本发明支架以特定的动力学特异性结合靶标。在一些实施方式中,通过BIAcore®试验或本领域已知的其它试验检测到本发明支架的结合率常数或 k_{on} 比率(支架(Sc)+抗原(Ag) ($k_{on} \rightarrow Sc-Ag$))为至少 $10^5 M^{-1}s^{-1}$ 、至少 $1.5 \times 10^5 M^{-1}s^{-1}$ 、至少 $2 \times 10^5 M^{-1}s^{-1}$ 、至少 $2.5 \times 10^5 M^{-1}s^{-1}$ 、至少 $5 \times 10^5 M^{-1}s^{-1}$ 、至少 $10^6 M^{-1}s^{-1}$ 、至少 $5 \times 10^6 M^{-1}s^{-1}$ 、至少 $10^7 M^{-1}s^{-1}$ 、至少 $5 \times 10^7 M^{-1}s^{-1}$ 、或至少 $10^8 M^{-1}s^{-1}$ 、或者 k_{on} 比率为约 10^5 –约 $10^8 M^{-1}s^{-1}$ 、 k_{on} 比率为约 $1.5 \times 10^5 M^{-1}s^{-1}$ –约 $1 \times 10^7 M^{-1}s^{-1}$ 、 k_{on} 比率为约 2×10^5 –约 $1 \times 10^6 M^{-1}s^{-1}$ 、 k_{on} 比率为约 4.5×10^5 –约 $5 \times 10^7 M^{-1}s^{-1}$ 。

[0152] 在一些实施方式中,通过BIAcore®试验或本领域已知的其它试验检测到本发明支架的 k_{off} 比率(支架(Sc)+抗原(Ag) ($k_{off} \leftarrow Sc-Ag$))为小于 $10^{-3} s^{-1}$ 、小于 $5 \times 10^{-3} s^{-1}$ 、小于 $10^{-4} s^{-1}$ 、小于 $2 \times 10^{-4} s^{-1}$ 、小于 $5 \times 10^{-4} s^{-1}$ 、小于 $10^{-5} s^{-1}$ 、小于 $5 \times 10^{-5} s^{-1}$ 、小于 $10^{-6} s^{-1}$ 、小于 $5 \times 10^{-6} s^{-1}$ 、小于 $10^{-7} s^{-1}$ 、小于 $5 \times 10^{-7} s^{-1}$ 、小于 $10^{-8} s^{-1}$ 、小于 $5 \times 10^{-8} s^{-1}$ 、小于 $10^{-9} s^{-1}$ 、小于 $5 \times 10^{-9} s^{-1}$ 、或小于 $10^{-10} s^{-1}$ 、或 10^{-3} – $10^{-10} s^{-1}$ 、 10^{-4} – $10^{-8} s^{-1}$ 、或 10^{-5} – $10^{-8} s^{-1}$ 。

[0153] 在一些实施方式中,本发明支架的亲和力常数或 K_a (k_{on}/k_{off}) 为至少 $10^2 M^{-1}$ 、至少 $5 \times 10^2 M^{-1}$ 、至少 $10^3 M^{-1}$ 、至少 $5 \times 10^3 M^{-1}$ 、至少 $10^4 M^{-1}$ 、至少 $5 \times 10^4 M^{-1}$ 、至少 $10^5 M^{-1}$ 、至少 $5 \times 10^5 M^{-1}$ 、至少 $10^6 M^{-1}$ 、至少 $5 \times 10^6 M^{-1}$ 、至少 $10^7 M^{-1}$ 、至少 $5 \times 10^7 M^{-1}$ 、至少 $10^8 M^{-1}$ 、至少 $5 \times 10^8 M^{-1}$ 、至少 $10^9 M^{-1}$ 、至少 $5 \times 10^9 M^{-1}$ 、至少 $10^{10} M^{-1}$ 、至少 $5 \times 10^{10} M^{-1}$ 、至少 $10^{11} M^{-1}$ 、至少 $5 \times 10^{11} M^{-1}$ 、至少 $10^{12} M^{-1}$ 、至少 $5 \times 10^{12} M^{-1}$ 、至少 $10^{13} M^{-1}$ 、至少 $5 \times 10^{13} M^{-1}$ 、至少 $10^{14} M^{-1}$ 、至少 $5 \times 10^{14} M^{-1}$ 、至少 $10^{15} M^{-1}$ 、或至少 $5 \times 10^{15} M^{-1}$ 、或 10^2 – $5 \times 10^5 M^{-1}$ 、 10^4 – $1 \times 10^{10} M^{-1}$ 、或 10^5 – $1 \times 10^8 M^{-1}$ 。通过BIAcore®试验或本领域已知的其它试验检测到本发明支架的 K_a 可以是最多 $10^{11} M^{-1}$ 、最多 $5 \times 10^{11} M^{-1}$ 、最多 $10^{12} M^{-1}$ 、最多 $5 \times 10^{12} M^{-1}$ 、最多 $10^{13} M^{-1}$ 、最多 $5 \times 10^{13} M^{-1}$ 、最多 $10^{14} M^{-1}$ 、或最多 $5 \times 10^{14} M^{-1}$ 。

[0154] 在一些实施方式中,通过BIAcore®试验或本领域已知的其它试验检测到本发

明支架的解离常数或 $K_d(k_{off}/k_{on})$ 为小于 $10^{-5}M$ 、小于 $5 \times 10^{-5}M$ 、小于 $10^{-6}M$ 、小于 $5 \times 10^{-6}M$ 、小于 $10^{-7}M$ 、小于 $5 \times 10^{-7}M$ 、小于 $10^{-8}M$ 、小于 $5 \times 10^{-8}M$ 、小于 $10^{-9}M$ 、小于 $5 \times 10^{-9}M$ 、小于 $10^{-10}M$ 、小于 $5 \times 10^{-10}M$ 、小于 $10^{-11}M$ 、小于 $5 \times 10^{-11}M$ 、小于 $10^{-12}M$ 、小于 $5 \times 10^{-12}M$ 、小于 $10^{-13}M$ 、小于 $5 \times 10^{-13}M$ 、小于 $10^{-14}M$ 、小于 $5 \times 10^{-14}M$ 、小于 $10^{-15}M$ 、或小于 $5 \times 10^{-15}M$ 。

[0155] 6.4 基于支架的结合蛋白的定向进化

[0156] 本文所述的支架可用于开发新型或改善的靶标结合蛋白的任何技术。在一个具体实施例中,所述靶标固定在固体支持物,例如柱树脂或微量滴定板孔中,并且靶标与基于支架的候选结合蛋白文库接触。这种文库可通过 CDR-样环的序列和/或长度随机化,由基于 Tn3 基序的支架构建的克隆构成。在一个实施方式中,该文库可以是噬菌体、噬菌粒、病毒、细菌或酵母展示或核糖体展示文库。如果需要,该文库可以通过,例如 Szostak 等,美国专利号 6,258,558B1,美国专利号 6,261,804B1;美国专利号 5,643,768 和美国专利号 5,658,754 所述的技术产生的 RNA-蛋白质融合文库。或者,其可以是 DNA-蛋白质文库(例如, Lohse 于 1998 年 12 月 2 日提交的 DNA-Protein Fusions and Uses Thereof(DNA-蛋白质融合及其应用),美国系列号 60/110,549,目前放弃;和 1999 年 12 月 2 日提交的美国系列号 09/453,190 所述)。

[0157] 在这点上,细菌噬菌体(噬菌体)展示是能筛选大寡肽文库来鉴定那些文库中能特异性结合靶标的成员的熟知技术。噬菌体展示是将变体多肽作为外壳蛋白的融合蛋白展示在噬菌体颗粒表面上的技术(Scott, J. K. 和 Smith, G. P. (1990) Science 249 :386)。应用噬菌体展示是基于以下事实,可快速而有效地保存选择性随机化蛋白质变体(或随机克隆的 cDNA)的大文库中以高亲和力结合靶分子的那些序列。现已采用在噬菌体上展示肽(Cwirla, S. E. 等, (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87 :6378)或蛋白质(Lowman, H. B. 等, (1991) Biochemistry, 30 :10832; Clackson, T. 等 (1991) Nature, 352 :624; Marks, J. D. 等 (1991), J. Mol. Biol., 222 :581; Kang, A. S. 等 (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88 :8363)文库来筛选数百万的多肽或寡肽中具有特异性结合特性的那些(Smith, G. P. (1991) Current Opin. Biotechnol., 2 :668)。分选随机突变体的噬菌体文库需要构建和扩增大量变体的方案,这是利用靶标受体的亲和力纯化方法和评估结合富集结果的手段(参见,例如美国专利号 5,223,409, 5,403,484, 5,571,689 和 5,663,143)。

[0158] 虽然大多数噬菌体展示方法利用丝状噬菌体,但 λ 形噬菌体展示系统(WO 95/34683;美国专利号 5,627,024)、T4 噬菌体展示系统(Ren 等, Gene, 215 :439(1998); Zhu 等, Cancer Research, 58(15) :3209-3214(1998); Jiang 等, Infection & Immunity, 65(11) :4770-4777(1997); Ren 等, Gene, 195(2) :303-311(1997); Ren, Protein Sci., 5 :1833(1996); Efimov 等, Virus Genes, 10 :173(1995))和 T7 噬菌体展示系统(Smith 和 Scott, Methods in Enzymology, 217 :228-257(1993);美国专利号 5,766,905)也是已知的。

[0159] 现已开发可基础噬菌体展示概念的许多其它改进和改变形式。这些改进形式增强了展示系统筛选肽文库以便结合所选靶分子和展示功能性蛋白质的能力,所述功能性蛋白质可能筛选具有所需特性的这些蛋白质。现已开发了噬菌体展示反应的组合反应装置(WO 98/14277),噬菌体展示文库已用于分析和控制生物分子相互作用(WO 98/20169; WO 98/20159)和受约束螺旋肽的特性(WO 98/20036)。WO 97/35196 描述了分离亲和配体的方

法,其中将噬菌体展示文库与其中的配体会结合靶分子的一种溶液和其中的亲和配体不会结合该靶分子的第二种溶液接触来选择性分离结合配体。WO 97/46251 描述的方法用亲和纯化的抗体生物淘选随机噬菌体展示文库,然后分离结合噬菌体,然后利用微量滴定板孔通过微量淘选方法分离高亲和力结合噬菌体。利用金黄色葡萄球菌 A 蛋白作为亲和力标签也已有报道 (Li 等. (1998) Mol Biotech., 9 :187)。WO97/47314 描述了利用底物扣除文库区分酶特异性,该方法利用组合文库,所述文库可以是噬菌体展示文库。WO 97/09446 描述了采用噬菌体展示选择适用于洗涤剂中酶的方法。选择特异性结合蛋白质的其它方法描述于美国专利号 5,498,538,5,432,018 和 WO 98/15833。

[0160] 美国专利号 5,723,286,5,432,018,5,580,717,5,427,908,5,498,530,5,770,434,5,734,018,5,698,426,5,763,192 和 5,723,323 也描述了产生肽文库和筛选这些文库的方法。

[0161] 对于本发明的文库,采用生物信息学方法测定天然产生的 Tn3 结构基序的环长度和多样性偏好 (参见实施例 2)。在该分析中,利用环长度和序列多样性的偏好开发“限制性随机化 (restricted randomization)”方法。在该限制性随机化方法中,将相对环长度和序列偏好引入文库开发方案。例如,测定到 BC 环的一种环长度偏好是 9 个残基。对含有 9 个残基的 BC 环作进一步分析后,测定在该位置是否有特定氨基酸,或氨基酸组的偏好,或者该位置是否完全随机。将环长度和序列多样性分析整合入文库开发产生了限制性随机化 (即,随机环内氨基酸可处于的某些位置是有限的)。实施例中描述了限制性随机化方法的例子 (参见实施例 2)。

[0162] 本发明还提供包含本文所述本发明支架的文库 (下文称为“本发明文库”)。在一个实施方式中,本发明文库包含非天然产生的多肽支架,其包含与衍生自天然产生的蛋白质序列的多个环区域序列相连的多个 β 链结构域,其中通过天然产生的蛋白质序列中相应环序列的至少一个氨基酸的缺失、取代或添加而改变一个或多个所述环区域序列,其中该多肽支架的 β 链结构域与天然产生蛋白质序列的相应结构域序列有至少 50% 同源性。在一些实施方式中,天然产生的序列是对应于人结合腕蛋白 C 的蛋白质序列。在其它实施方式中,天然产生的序列是对应于人结合腕蛋白 C 的额外 Tn3 结构基序的蛋白质序列。在其它实施方式中,所述天然产生的序列是对应于另一结合腕蛋白,或者另一生物 (例如但不限于,鼠、猪、牛或马结合腕蛋白) 的结合腕蛋白的 Tn3 结构基序的蛋白质序列。在还有另一实施方式中,所述天然产生的序列是对应于任何生物的 Tn3 结构基序的蛋白质序列。在其它实施方式中,所述天然产生的序列对应于嗜热生物的预测 Tn3 结构基序,例如但不限于: 闪烁古生球菌、海葡萄嗜热菌、嗜酸热硫化叶菌、硫磺矿硫化叶菌和硫化叶菌。在还有另一实施方式中,本发明支架具有的蛋白质序列与对应于上述 Tn3 结构基序或预测的 Tn3 结构基序的任一序列具有至少 30%、至少 35%、至少 40%、至少 45%、至少 50%、至少 55%、至少 60%、至少 65%、至少 70%、至少 75%、至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 95% 或至少 99% 的同源性。

[0163] 将文库与固定的靶标温育,洗涤支持物以除去非特异性结合的物质,在非常严格的条件下洗脱最紧密的结合物并进行 PCR 以回收序列信息或产生新的结合物文库,从而可用于重复该选择过程,可进一步诱变或不诱变该序列。可进行多轮选择直至获得对抗原具有足够亲和力的结合物。

[0164] 在另一实施方式中,本发明文库包含本文所述支架。在一个实施方式中,本发明文库包含的支架还包含至少 7 个 β 链,其中所述 β 链从 N-末端向 C-末端称为 A、B、C、D、E、F 和 G 链。在另一实施方式中,本发明文库包含的支架还包含至少 7 个 β 链,各链由环区域隔开,其中所述环区域从 N-末端向 C-末端称为 AB、BC、CD、DE、EF 和 FG 环。在另一实施方式中,本发明文库包含的支架还包含至少 7 个 β 链,从 N-末端向 C-末端称为 A、B、C、D、E、F 和 G 链,各链由环区域相连,其中所述环区域从 N-末端向 C-末端称为 AB、BC、CD、DE、EF 和 FG 环。

[0165] 在具体的实施方式中,本发明文库包含的支架还包含依据人结合腕蛋白 C 的 Tn3 结构域的支架的一个或多个环区域,其包含以下氨基酸残基:

[0166] I. AB 环内所含的 12-17;

[0167] II. BC 环内所含的 23-31;

[0168] III. CD 环内所含的 39-45;

[0169] IV. DE 环内所含的 50-56;

[0170] V. EF 环内所含的 60-66;和

[0171] VI. FG 环内所含的 75-84。

[0172] 在另一具体实施方式中,本发明文库包含的支架还包含依据人结合腕蛋白 C 的 Tn3 结构域的支架的一个或多个环区域,其包含以下氨基酸残基:

[0173] I. AB 环内所含的 11-17;

[0174] II. BC 环内所含的 23-31;

[0175] III. CD 环内所含的 39-45;

[0176] IV. DE 环内所含的 51-56;

[0177] V. EF 环内所含的 60-67;和

[0178] VI. FG 环内所含的 75-84。

[0179] 本发明还提供包含支架的文库,所述支架包含环序列多样性。在一个实施方式中,本发明文库包含具有至少一个环的支架,该环含有至少一个随机化的位置。在另一实施方式中,本发明文库包含具有至少一个环的支架,该环含有至少一个随机化的位置,还含有至少一个维持恒定的位置。在另一实施方式中,本发明文库包含具有环的支架,该环含有至少一个经限制性随机化的位置。在另一实施方式中,本发明文库包含具有至少一个环的支架,该环含有至少一个经限制性随机化的位置,还含有至少一个维持恒定的位置。在另一实施方式中,本发明文库包含具有至少一个环的支架,该环含有至少一个经限制性随机化的位置,还含有至少一个维持恒定的位置。

[0180] 连接蛋白质支架各链的环可作长度和/或序列多样性随机化。在一个实施方式中,本发明文库具有含至少一个环的支架,该环作长度和/或序列多样性随机化。在另一实施方式中,本发明文库具有的支架中至少一个环维持恒定,而至少一个额外的环作长度和/或序列多样性随机化。在另一实施方式中,本发明文库具有的支架中环 AB、CD 和 EF 中至少一个、至少两个或所有三个维持恒定,而环 BC、DE 和 FG 中至少一个、至少两个或所有三个作长度和/或序列多样性随机化。在另一实施方式中,本发明文库具有的支架中环 AB、CD 和 EF 中至少一个、至少两个或所有三个作随机化,而环 BC、DE 和 FG 中至少一个、至少两个或所有三个作长度和/或序列多样性随机化。

[0181] 在一具体实施方式中,本发明文库所包含的支架包含具有以下共有序列的随机化 BC 环: S-X-a-X-b-X-X-X-G, 其中 X 表示任何氨基酸, 其中 (a) 表示脯氨酸或丙氨酸, 其中 (b) 表示丙氨酸或甘氨酸。

[0182] 在另一具体实施方式中,本发明支架包含具有以下共有序列的随机化 BC 环: A-d-P-X-X-X-e-f-X-I-X-G, 其中 X 表示任何氨基酸, 其中 (d) 表示脯氨酸、谷氨酸或赖氨酸, 其中 (e) 表示天冬酰胺或甘氨酸, 和其中 (f) 表示丝氨酸或甘氨酸。

[0183] 在另一实施方式中,本发明文库具有 BC 环,其包含具有以下共有序列的 11 个氨基酸: S-P-c-X-X-X-X-X-X-T-G, 其中 X 表示任何氨基酸, 其中 (c) 表示脯氨酸、丝氨酸或甘氨酸。

[0184] 在一具体实施方式中,本发明文库所包含的支架包含具有以下共有序列的随机化 FG 环: X-a-X-X-G-X-X-X-S, 其中 X 表示任何氨基酸, 其中 (a) 表示天冬酰胺、苏氨酸或赖氨酸。

[0185] 在另一具体实施方式中,本发明文库所包含的支架包含具有以下共有序列的随机化 FG 环: X-a-X-X-X-X-b-N-P-A, 其中 X 表示任何氨基酸, 其中 (a) 表示天冬酰胺、苏氨酸或赖氨酸, 和其中 (b) 表示丝氨酸或甘氨酸。

[0186] 在一具体实施方式中,本发明文库所包含的支架包含具有以下共有序列的随机化 FG 环: X-a-X-X-G-X-X-S-N-P-A, 其中 X 表示任何氨基酸, 其中 (a) 表示天冬酰胺、苏氨酸或赖氨酸。

[0187] 在一具体实施方式中,本发明文库所包含的支架包含含有 7 个残基的 AB 环,该环经随机化而含有以下共有序列: K-X-X-X-X-X-a, 其中 X 表示天冬酰胺、天冬氨酸、组氨酸、酪氨酸、异亮氨酸、缬氨酸、亮氨酸、苯丙氨酸、苏氨酸、丙氨酸、脯氨酸或丝氨酸, 其中 (a) 表示丝氨酸、苏氨酸、丙氨酸或甘氨酸。

[0188] 在一具体实施方式中,本发明文库所包含的支架包含含有 9 个残基的 AB 环,该环经随机化而含有以下共有序列: K-X-X-X-X-X-X-X-a, 其中 X 表示天冬酰胺、天冬氨酸、组氨酸、酪氨酸、异亮氨酸、缬氨酸、亮氨酸、苯丙氨酸、苏氨酸、丙氨酸、脯氨酸或丝氨酸, 其中 (a) 表示丝氨酸、苏氨酸、丙氨酸或甘氨酸。

[0189] 在一具体实施方式中,本发明文库所包含的支架包含含有 7、8 或 9 个残基的 CD 环,其中 CD 环中各残基经随机化,其中 X 表示天冬酰胺、天冬氨酸、组氨酸、酪氨酸、异亮氨酸、缬氨酸、亮氨酸、苯丙氨酸、苏氨酸、丙氨酸、脯氨酸或丝氨酸。

[0190] 在一具体实施方式中,本发明文库所包含的支架包含含有 8 个残基的 EF 环,该环经随机化而含有以下共有序列: X-b-L-X-P-X-c-X, 其中 X 表示天冬酰胺、天冬氨酸、组氨酸、酪氨酸、异亮氨酸、缬氨酸、亮氨酸、苯丙氨酸、苏氨酸、丙氨酸、脯氨酸或丝氨酸, 其中 (b) 表示天冬酰胺、赖氨酸、丝氨酸、精氨酸、天冬氨酸、谷氨酸或甘氨酸, 和其中 (c) 表示异亮氨酸、苏氨酸、丝氨酸、缬氨酸、丙氨酸或甘氨酸。

[0191] 本发明的进一步实施方式是编码文库的分离核酸分子的集合,所述文库包含本发明和上述的支架。

[0192] 设计这些 Tn3 文库的另一实际考虑是鉴定通常用于简并寡核苷酸中以编码任何氨基酸的“NNK”(N = A, G, T, C; K = G, T) 混合密码子方案的替代方案。虽然“NNK”混合产生能编码所有 20 种氨基酸的 32 种不同密码子,但它们不是等同编码的(表 11)。例如,“NNK”

方案中 3/32 密码子编码 Leu (CTG, CTT, TTG), 但只有 1/32 编码 Asp (GAT)。此外, “NNK”混合编码一个终止密码子 (TAG) 和 Cys 密码子 (TGT), 当产生天然文库时, 二者均不需要。考虑替代方案时, 我们注意到以下事实, 即有人描述合成的抗体文库编码由小亚组的氨基酸构成的 CDR 序列。其中 CDR 仅由 4 种氨基酸 (Tyr, Ala, Asp, Ser), 或者甚至二元配对 (Tyr, Ser) 构成的抗体文库显示能产生针对蛋白质抗原的特定高亲和力 mAb (Fellouse 等, Proc Natl Acad Sci, 2004, 101:12467-72, Fellouse 等. J. Mol. Biol., 2005, 348:1153-62)。类似地, 仅包含 Tyr 和 Ser 的含随机化环序列的 10Fn3 支架蛋白的文库也产生针对靶蛋白的特异性结合物 (Koide 等. Proc Natl Acad Sci, 2007, 104:66-32-7)。虽然含有高度局限性氨基酸组的文库能产生特异性结合蛋白, 但从文库获得的结合物的多样性可能有限。因此, 我们设计了替代的“NHT”混合密码子方案以便在 Tn3 文库中引入多样性 (H = A, T, C)。“NHT”混合物编码 20 种氨基酸的合理亚组, 但规避了“NNK”混合密码子所述的不足 (表 12)。该方案产生编码 12/20 氨基酸的 12 种密码子, 即, 各密码子编码独特的氨基酸。此外, 其中没有终止或 Cys 密码子。因此, 在一些实施方式中, 本发明支架包含 NHT 密码子方案编码的密码子。在其它实施方式中, 本发明支架包含 NNK 混合密码子方案所编码的密码子。

[0193] 在其它实施方式中, 可对本发明支架进行亲和力成熟。在该本领域接受的方法中, 对特异性结合蛋白进行选择对特定靶标的亲和力是否增加的方案 (参见 Wu 等. Proc Natl Aca Sci USA. 1998 年 5 月 26 日; 95(11):6037-42)。得到的本发明支架可显示至少与亲和力成熟前的支架一样高的结合特征。

[0194] 在其它实施方式中, 可对本发明支架进行类似于抗体 CDR 嫁接的“环嫁接”。在该本领域接受方法中, 抗体的一个或多个 CDR 被“嫁接”到受者抗体上, 或者, 在此例中是本发明支架 (参见 Ewert 等. Methods: 2004 年 10 月; 34(2):184-99)。在另一实施方式中, 可将另一支架的至少一个环嫁接到本发明支架上。

[0195] 本发明还提供鉴定能结合靶标从而形成支架: 靶标复合物的蛋白质支架的氨基酸序列的方法。在一个实施方式中, 该方法包括以下步骤: a) 提供本发明的多肽展示文库; b) 将 (a) 的多肽展示文库与固定或可分离的靶标接触; c) 将支架: 靶标复合物与游离支架相分离; d) 复制 (c) 的分离支架从而产生因多样性降低和富集了能结合靶标的所展示支架而不同于 (a) 中的新多肽展示文库; e) 任选用 (d) 的新文库重复步骤 (b)、(c) 和 (d); 和 f) 测定编码 (d) 物质的所展示支架的区域的核酸序列, 从而推测能结合靶标的肽序列。

[0196] 在另一实施方式中, 文库筛选鉴定后, 本发明支架可进一步随机化。在一个实施方式中, 本发明方法包括采用本文所述方法使得从文库鉴定的支架的至少一个、至少两个、至少三个、至少四个、至少五个或至少六个环进一步随机化。在另一实施方式中, 对进一步随机化的支架进行后续方法以鉴定能结合靶标的支架, 所述方法包括 a) 将所述进一步随机化的支架与固定或可分离的靶标接触; b) 将进一步随机化的支架: 靶标复合物与游离支架相分离; c) 复制 (b) 的分离支架, 任选重复步骤 (a)-(c); 和 d) 测定编码所述进一步随机化的支架的区域的核酸序列, 从而推测能结合靶标的肽序列。在进一步的实施方式中, 进一步随机化的支架包含以前在第一文库中进行随机化的至少一个、至少两个、至少三个、至少四个、至少五个或至少六个随机化的环。在其它进一步的实施方式中, 所述进一步随机化的支架包含以前未在第一文库中进行随机化的至少一个、至少两个、至少三个、至少四个、至少五个或至少六个随机化的环。

[0197] 在另一实施方式中,文库筛选鉴定后,本发明支架可进一步随机化。在一个实施方式中,本发明方法包括采用本文所述方法使得从文库鉴定的支架的至少一个、至少两个、至少三个、至少四个、至少五个、至少六个或至少七个链环进一步随机化。在另一实施方式中,对进一步随机化的支架进行后续方法以鉴定能结合靶标的支架,所述方法包括 a) 将所述进一步随机化的支架与固定或可分离的靶标接触;b) 将进一步随机化的支架:靶标复合物与游离支架相分离;c) 复制(b)的分离支架,任选重复步骤(a)-(c);和d)测定编码所述进一步随机化的支架的区域的核酸序列,从而推测能结合靶标的肽序列。在进一步的实施方式中,进一步随机化的支架包含以前在第一文库中进行随机化的至少一个、至少两个、至少三个、至少四个、至少五个、至少六个或至少七个随机化的链。在其它进一步的实施方式中,所述进一步随机化的支架包含以前未在第一文库中进行随机化的至少一个、至少两个、至少三个、至少四个、至少五个、至少六个或至少七个随机化的链。

[0198] 在另一实施方式中,文库筛选鉴定后,本发明支架可进一步随机化。在一个实施方式中,本发明方法包括采用本文所述方法使得从文库鉴定的支架的至少一个、至少两个、至少三个、至少四个、至少五个或至少六个和至少一个、至少两个、至少三个、至少四个、至少五个、至少六个或至少七个链环进一步随机化。在另一实施方式中,对进一步随机化的支架进行后续方法以鉴定能结合靶标的支架,所述方法包括 a) 将所述进一步随机化的支架与固定或可分离的靶标接触;b) 将进一步随机化的支架:靶标复合物与游离支架相分离;c) 复制(b)的分离支架,任选重复步骤(a)-(c);和d)测定编码所述进一步随机化的支架的区域的核酸序列,从而推测能结合靶标的肽序列。在进一步的实施方式中,进一步随机化的支架包含以前在第一文库中进行随机化的至少一个、至少两个、至少三个、至少四个、至少五个或至少六个随机化的环和至少一个、至少两个、至少三个、至少四个、至少五个、至少六个或至少七个链。在其它进一步的实施方式中,所述进一步随机化的支架包含以前未在第一文库中进行随机化的至少一个、至少两个、至少三个、至少四个、至少五个或至少六个随机化的环和至少一个、至少两个、至少三个、至少四个、至少五个、至少六个或至少七个链。

[0199] 在另一实施方式中,获得本发明支架的一种方法包括选自BC、DE或FG环的第一随机化环和未在所述文库中作随机化的选自AB、CD或EF环的第二环。在还有另一实施方式中,获得本发明支架的另一方法包括选自AB、CD或EF环的第一随机化环和未在所述文库中作随机化的选自BC、DE或FG环的第二环。

[0200] 本发明还提供获得结合至少一种或更多种靶标的至少两种支架的方法。该方法能筛选共同起作用而引发特定反应的试剂。当需要激动活性,而激动活性需要多种支架协作用时(例如但不限于,受体酪氨酸激酶的激动作用),优选采用这种筛选。该方法能筛选协作性试剂而无需重新设计文库来形成多聚复合物。在一个实施方式中,本发明方法包括在允许支架:靶配体复合物形成的条件下将靶配体与本发明文库接触,将所述支架与交联剂(定义为将至少两个相同或不同的支架紧密结合在一起的试剂)结合,其中所述支架的交联引发可检测的反应,以及从该复合物获得结合靶标的所述支架。在进一步的实施方式中,所述交联剂是支架特异性抗体,或其片段,表位标签特异性抗体或其片段,二聚体化功能域,例如Fc区,亮氨酸拉链基序,化学交联剂或本领域已知的另一二聚体化功能域。

[0201] 本发明还提供利用本发明支架检测化合物的方法。依据通过文库筛选所得支架的结合特异性,可能在试验中利用这种支架检测样品中的特异性靶标,例如用于诊断方法。在

一个实施方式中,检测化合物的方法包括在允许化合物:支架复合物形成的条件下将样品中的所述化合物与本发明支架接触并检测所述支架,从而检测样品中的所述化合物。在进一步的实施方式中,对支架作标记(即,放射性标记、荧光、酶联或比色标记)以促进检测所述化合物。

[0202] 本发明还提供利用本发明支架捕捉化合物的方法。依据通过文库筛选所得支架的结合特异性,可能在试验中利用这种支架捕捉样品中的特异性靶标,例如用于纯化方法。在一个实施方式中,捕捉样品中化合物的方法包括在允许化合物:支架复合物形成的条件下将样品中的所述化合物与本发明支架接触并从样品中除去所述复合物,从而捕捉所述样品中的所述化合物。在进一步的实施方式中,所述支架固定以促进除去化合物:支架复合物。

[0203] 在一些实施方式中,从本发明文库分离的支架包含至少一个、至少两个、至少四个、至少五个、至少六个或更多个随机化的环区域。在一些实施方式中,分离的支架环序列可从供者支架交换至受者支架的任何环(例如,供者支架的AB环序列可转移至受者支架中的任何环区域)。在具体的实施方式中,可将分离的环序列转移至受者支架中的同源环(例如,供者支架的AB环序列可转移至受者支架中的AB环位置)。在一些实施方式中,分离的环序列可以与各种受者支架随机“混合和匹配”。

[0204] 在其它实施方式中,可通过环序列鉴定分离的支架序列。例如,利用文库对特定靶标进行淘选,分离特异性结合物的集合。随机化环序列的特征在于不依赖支架背景的特定序列(即,结合靶标X的支架,其中所述支架包含SEQ ID NO:x所示的AB环序列)。在支架显示结合靶标X的两个环序列的其它实施方式中,所述环序列的特征在于没有支架序列存在下结合靶标X。换言之,考虑到可将结合特定靶标的文库分离的支架表达为不依赖支架主链而结合该靶标的可变环序列。该方法类似于抗体可变区中CDR的概念。

[0205] 在一些实施方式中,本发明提供包含特异性结合**SYNAGIS®**的序列的支架。在这种实施方式中,特异性结合**SYNAGIS®**的本发明支架可包含选自SEQ ID NO:100、102、105、107或109的BC环序列。在其它实施方式中,特异性结合**SYNAGIS®**的本发明支架可包含选自SEQ ID NO:101、103、104、106、108、或110的FG环序列。在进一步的实施方式中,特异性结合**SYNAGIS®**的本发明支架可包含选自SEQ ID NO:100、102、105、107、或109的至少一个BC环序列;还可包含选自SEQ ID NO:101、103、104、106、108、或110的至少一个FG环序列。在其它实施方式中,本发明还可包含与特异性结合**SYNAGIS®**的支架竞争结合的支架,所述**SYNAGIS®**结合物包含选自SEQ ID

[0206] NO:100、102、105、107、或109的一个BC环序列;还包含选自SEQ ID NO:101、103、104、106、108、或110的FG环序列。可如本文在实施例11和/或14中所示,或通过本领域已知的其它试验进行竞争性试验。

[0207] 在一些实施方式中,本发明提供包含特异性结合溶菌酶的序列的支架。在这种实施方式中,特异性结合溶菌酶的本发明支架可包含选自SEQ ID NO:111、114、102、120或124的至少一个BC环序列。在其它实施方式中,特异性结合溶菌酶的本发明支架可包含选自SEQ ID NO:112、113、115、116、117、118、119、121、122、或125的至少一个FG环序列。在进一步的实施方式中,特异性结合溶菌酶的本发明支架可包含选自SEQ ID NO:111、114、102、120、或124的至少一个BC环序列;还可包含选自SEQ ID NO:112、113、115、116、117、118、119、121、122、或125的至少一个FG环序列。在其它实施方式中,本发明还可包含与特

异性结合溶菌酶的支架竞争结合的支架,所述溶菌酶结合物包含选自 SED ID NO:111、114、102、120、或 124 的至少一个 BC 环序列;还包含选自 SEQ ID NO:112、113、115、116、117、118、119、121、122、或 125 的至少一个 FG 环序列。可如本文在实施例 11 和 / 或 14 中所示,或通过本领域已知的其它试验进行竞争性试验。

[0208] 6.5 多聚支架

[0209] 除了支架单体,可将本文所述的任何支架构建物制备成支架二聚体或多聚体,作为增加化合价和由此导致的抗原结合亲合力的手段。还可本文所述的任何支架构建物制备成支架的二聚体或多聚体,从而作为增加抗原结合特异性的手段(例如,可制备结合不同抗原的支架)。可通过各支架模块之间的共价结合,例如通过包含入氨基酸接头来产生这种多聚体(多聚支架或者本文也称为多价支架)。在其它方法中,可利用本领域已知的二聚体化功能域装配多聚支架。在具体实例中,可通过构建编码单体支架的融合基因,或者通过工程改造密码子将半胱氨酸残基掺入单体序列并在表达产物之间形成二硫键来产生共价结合的支架。

[0210] 还可通过各种技术产生非共价结合的多聚支架。这些技术包括在单体序列中引入对应于荷正电和 / 或负电残基的密码子并使得表达产物中这些残基之间(和由此的单体之间)相互作用。利用单体亚单位中天然存在的荷电残基可简化该方法。产生非共价结合支架的另一方法是在单体支架基因中(例如,在氨基或羧基末端)引入已知相互作用的蛋白质或蛋白质结构域的编码序列。这种蛋白质或蛋白质结构域包括卷曲螺旋基序、亮氨酸拉链基序和已知指导二聚体或高级多聚体形成的许多蛋白质亚单位(或其片段)中的任一种。

[0211] 在一些实施方式中,本发明的多聚支架包含融合于抗体的任何结构域(或片段)的至少一个支架。在一些实施方式中,至少一个支架融合于抗体可变区、CH1 结构域、C κ 结构域、C λ 结构域、CH2 或 CH3 结构域。在其它实施方式中,至少一个支架融合于抗体 Fc 的 CH2 结构域。在这种实施方式中,表达时,通过抗体 Fc 片段的 CH2 和 CH3 区二聚化而得到的蛋白质对于特定靶标是二价的。在进一步实施方式中,本发明支架替代与 Fc 片段相连的抗体可变区。在其它实施方式中,本发明支架不替代与 CH1-Fc 片段、C κ 结构域或 C λ 结构域相连的抗体可变区。

[0212] 在进一步的实施方式中,通过将支架融合于抗体的 CH1 和 C κ 或 C λ 区来构建多聚支架。在一些实施方式中,本发明支架替代融合于抗体的 CH1 和 C κ 或 C λ 区的抗体可变区。在进一步的实施方式中,本发明支架可融合于抗体轻链或重链的 C- 末端。在其它实施方式中,本发明支架可融合于抗体轻链或重链的 N- 末端。

[0213] 在一些实施方式中,本发明的多聚支架包含对同一表位具有特异性的多个支架。在其它实施方式中,本发明的多聚支架包含对不同表位具有特异性的多个支架,或称为表位结合结构域。可如出于所有目的通过引用全文纳入本文的 2008 年 7 月 30 日提交的美国申请系列号 12/182,975 " Multispecific epitope binding proteins and uses thereof (多特异性表位结合蛋白及其应用)" 所示装配和使用本发明的多聚支架。可从抗体、抗体片段、双抗体、scFv、Fab、Fv 或结合肽选择这种表位结合结构域。

[0214] 在其它实施方式中,与本发明支架的一样,表位结合结构域对相同靶标具有特异性。

[0215] 在另一实施方式中,与本发明支架的一样,表位结合结构域对不同靶标具有特异性。

[0216] 为连接两个或更多个支架的具体情况选择合适的接头取决于各种参数,包括,例如单体结构域的性质和/或肽接头对蛋白水解和氧化的稳定性。

[0217] 接头多肽可主要包含选自 Gly、Ser、Ala 或 Thr 的氨基酸残基。例如,肽接头含有的至少 75% (根据肽接头中存在的残基总数计算),例如至少 80%,如至少 85%或至少 90% 的氨基酸残基可选自 Gly、Ser、Ala 或 Thr。肽接头还可仅由 Gly、Ser、Ala 和/或 Thr 残基构成。接头多肽应具有足以连接两个或更多个本发明单体结构域或两个或更多个本发明多聚支架的长度,如此它们彼此能采取正确的构象,从而保留所需活性。

[0218] 为该目的,合适的长度是至少一个,通常少于约 50 个氨基酸残基,例如 2-25 氨基酸残基、5-20 氨基酸残基、5-15 氨基酸残基、8-12 氨基酸残基或 11 个残基。类似地,多肽编码接头大小可以是,例如约 2-约 15 氨基酸、约 3-约 15、约 4-约 12、约 10、约 8 或约 6 氨基酸。在涉及核酸,例如 DNA、RNA 或二者的组合的方法和组合物中,含有接头序列的多核苷酸可以是,例如约 6 个核苷酸-约 45 个核苷酸、约 9 个核苷酸-约 45 个核苷酸、约 12 个核苷酸-约 36 个核苷酸、约 30 个核苷酸、约 24 个核苷酸或约 18 个核苷酸。类似地,选择包含入接头多肽的氨基酸残基应显示不明显干扰多肽多聚体的活性或功能的特性。因此,肽接头整体上应不显示电荷,电荷与多肽多聚体的活性或功能不一致,会干扰内部折叠,或与一个或多个单体结构域中的氨基酸残基形成键或其它相互作用从而严重阻碍多肽多聚体结合特异性靶标。

[0219] 还可从文库选择肽接头,其中该肽接头中的氨基酸残基为特定多肽多聚体中特定组的单体结构域作随机化。可利用柔性接头发现单体结构域的合适组合,然后利用可变接头的这种随机文库优化以获得具有最佳长度和几何特征的接头。最佳接头可含有参与结合靶标并在不结合特定靶标时约束单体结构域在多肽多聚体中相对彼此运动的类型正确的最低数量氨基酸残基。

[0220] 利用天然产生以及人工肽接头将多肽连接入新型连接的融合多肽是参考文献中熟知的 (Hallewell 等. (1989), J. Biol. Chem. 264, 5260-5268; Alfthan 等. (1995), Protein Eng. 8, 725-731; Robinson 和 Sauer (1996), Biochemistry 35, 109-116; Khandekar 等. (1997), J. Biol. Chem. 272, 32190-32197; Fares 等. (1998), Endocrinology 139, 2459-2464; Smallshaw 等. (1999), Protein Eng. 12, 623-630; 美国专利号 5, 856, 456)。

[0221] 如上所述,通常优选肽接头具有至少一定的柔韧性。因此,在一些实施方式中,肽接头含有 1-25 个甘氨酸残基、5-20 个甘氨酸残基、5-15 个甘氨酸残基或 8-12 个甘氨酸残基。肽接头通常含有至少 50% 甘氨酸残基,例如至少 75% 甘氨酸残基。在本发明的一些实施方式中,肽接头只包含甘氨酸残基。在具体的实施方式中,接头序列可包含 (G-G-G-G-S)_x 所示序列,其中 x 是正整数。在另一具体实施方式中,接头序列可包含 (G-A)_x 所示序列,其中 x 是正整数。在另一具体实施方式中,接头序列可包含 (G-G-G-T-P-T)_x 所示序列,其中 x 是正整数。

[0222] 在一些情况中,优选或需要在肽接头中提供一定的刚性。这可通过在肽接头的氨基酸序列中包含脯氨酸残基来实现。因此,在本发明的另一实施方式中,肽接头在其氨基酸序列中可包含至少一个脯氨酸残基。例如,肽接头的氨基酸序列中至少 25%,例如至少

50%、如至少 75% 的氨基酸残基是脯氨酸残基。在本发明的一个特定实施方式中，肽接头只包含脯氨酸残基。

[0223] 在本发明的一些实施方式中，修饰肽接头从而引入包含用于非多肽部分的连接基团的氨基酸残基。这种氨基酸残基的例子可以是半胱氨酸残基（随后连接非多肽部分）或者该氨基酸序列可在体内包含 N-糖基化位点（从而将糖部分连接（体内）于肽接头）。其它选择是利用设计的 tRNA 和 tRNA 合成酶将非天然氨基酸遗传学掺入（参见，例如美国申请公布系列号 2003/0082575）多肽结构域或接头。例如，插入酮基-酪氨酸能位点特异性地偶连于表达的单体结构域或多聚体。

[0224] 多肽多聚体中存在的所有肽接头的氨基酸序列有时相同。或者，多肽多聚体中存在的所有肽接头的氨基酸序列可以不同。

[0225] 6.6 融合

[0226] 本文所述支架可融合于其它蛋白质结构域。例如，可经 N 或 C-末端融合 IgG 的恒定区 (Fc) 与支架而整合这些支架与人免疫反应。Fc 融合分子活化免疫反应的补体组分并提高蛋白质支架的治疗价值。类似地，支架和补体蛋白，例如 C1q 之间融合可用于靶向细胞，支架和毒素之间的融合可用于特异性破坏携带特定抗原的细胞。

[0227] 此外，各种出版物描述了获得生理活性分子的方法，其半衰期通过在该分子中引入 FcRn-结合多肽 (WO 97/43316；美国专利号 5,869,046；美国专利号 5,747,035；WO 96/32478；WO 91/14438) 或通过融合分子与保留 FcRn-结合亲和力但对其它 Fc 受体的亲和力极大降低的抗体 (WO 99/43713) 或与抗体的 FcRn 结合结构域融合 (WO 00/09560；美国专利号 4,703,039) 而得到修饰。增加生理活性分子半衰期的具体技术和方法还可见于 2006 年 8 月 1 日授权的美国专利号 7,083,784，名为 "Antibodies with Increased Half-lives (半衰期增加的抗体)"，该篇专利出于所有目的通过引用纳入本文。具体地说，考虑到本发明支架可融合于 IgG 的 Fc 区，其中所述 Fc 区包含氨基酸残基突变（如 Kabat 的 EU 指数编号）：M252Y/S254T/T256E 或 H433K/N434F/Y436H。

[0228] 此外，本发明支架可与增加或延长体内或血清半衰期的分子融合。在一些实施方式中，本发明支架与白蛋白，例如人血清白蛋白 (HSA)、聚乙二醇 (PEG)、多糖、免疫球蛋白分子 (IgG)、补体、血红蛋白、结合肽、脂蛋白和其它因子缔合以增加其在血流中的半衰期或其组织穿透性。可通过标准技术，例如从利用公众可得的基因序列构建的重组融合基因表达融合蛋白来制备这些融合体。

[0229] 本发明支架还可与增加或延长体内或血清半衰期的分子结合或缔合。在一些实施方式中，本发明支架与白蛋白、聚乙二醇 (PEG)、多糖、免疫球蛋白分子或具有增加血清半衰期的 Fc 突变的免疫球蛋白分子、补体、血红蛋白、脂蛋白和其它因子缔合以增加血清半衰期。可通过标准技术，例如从利用公众可得的基因序列构建的重组融合基因表达融合蛋白来制备这些融合体。

[0230] 术语“聚乙二醇”或“PEG”表示含或不含偶联剂、偶连或活化部分（例如，含巯基、三氟甲磺酸根、三氟乙基磺酸根 (tresylate)、氮丙啶、环氧乙烷、N-羟基琥珀酰亚胺或马来酰亚胺部分）的聚乙二醇化合物或其衍生物。术语“PEG”应表示分子量介于 500-150,000Da 之间的聚乙二醇，包括其类似物，其中例如末端 OH-基团被甲氧基取代（称为 mPEG）。

[0231] 在一个实施方式中,用聚乙二醇(PEG)衍生支架。PEG是含有两个末端羟基的环氧乙烷重复单位的线形、水溶性聚合物。PEG根据其分子量分类,其分子量通常为约500道尔顿到约40,000道尔顿。在目前优选的实施方式中,所用的PEG的分子量是5,000道尔顿到约20,000道尔顿。偶连于本发明支架的PEG可以是支化或非支化的(参见,例如Monfardini, C. 等. 1995Bioconjugate Chem 6:62-69)。PEG可从耐卡塔公司(Nektar Inc.)、西格玛化学品公司(Sigma Chemical Co.)和其它公司商品化购得。这种PEG包括但不限于:单甲氧基聚乙二醇(MePEG-OH)、单甲氧基聚乙二醇-琥珀酸酯(MePEG-S)、单甲氧基聚乙二醇-琥珀酰亚胺琥珀酸酯(MePEG-S--NHS)、单甲氧基聚乙二醇-胺(MePEG-NH₂)、单甲氧基聚乙二醇-三氟乙基磺酸酯(monomethoxypolyethyleneglycol-tresylate)(MePEG-TRES)和单甲氧基聚乙二醇-咪唑基-羰基(MePEG-IM)。

[0232] 简言之,在一个实施方式中,通过无反应活性的基团,例如甲氧基或乙氧基对所用亲水性聚合物,例如PEG的一端封端。随后,通过与合适的活化剂反应而活化该聚合物的另一端,所述活化剂是例如三聚氰酰卤(例如,三聚氰酰氯、溴或氟)、二咪唑(diimadozle)、酞试剂(例如,二卤代琥珀酸酐,如二溴代琥珀酸酐)、酰叠氮、对二唑鎓苄基醚(p-diazoiumbenzyl ether)、3-(对二唑鎓苯氧基(p-diazoniumphenoxy))-2-羟基丙基醚等。然后活化的聚合物与本文所述多肽反应产生用聚合物衍生的多肽。或者,可活化本发明支架中的官能团以便与聚合物反应,或者可采用已知的偶连方法在协调偶连反应中连接两个基团。不难知道可采用本领域技术人员已知和使用的多种其它反应方案以PEG衍生本发明多肽。

[0233] 在一些实施方式中,工程改造本发明支架以提供用于偶连的反应活性基团。在这种支架中,N-末端和/或C-末端还可用于提供用于偶连的反应活性基团。在其它实施方式中,N-末端可偶连于一个部分(例如但不限于PEG),而C-末端偶连于另一部分(例如但不限于生物素),反之亦然。

[0234] 术语“体内半衰期”以其常规意义使用,即,身体/靶器官中存在多肽的50%生物学活性的时间,或者多肽活性是其初始值的50%的时间。作为测定功能性体内半衰期的替代方案,可测定“血清半衰期”,即,清除前50%多肽分子在血浆或血流中循环的时间。测定血清半衰期常比测定功能半衰期简单,血清半衰期的幅度常是功能性体内半衰期幅度的良好指示。血清半衰期的其它术语包括血浆半衰期、循环半衰期、循环性半衰期、血清清除率、血浆清除率和清除半衰期。待保留的功能通常选自促凝血、蛋白水解、辅因子结合、受体结合活性或特定蛋白质相关的其它类型生物学活性。

[0235] 与功能性体内半衰期或血浆半衰期有关的术语“增加”用于表示与参比分子(例如,未修饰的多肽)相比,在可比条件下测得多肽的相关半衰期统计学显著地增加。例如,与未修饰的参比分子相比,相关半衰期可增加至少约25%,例如至少约50%,如至少约100%、至少约150%、至少约200%、至少约250%或至少约500%。在其它实施方式中,与未修饰的参比分子相比,半衰期可增加约至少1倍、至少2倍、至少3倍、至少4倍、至少5倍、至少10倍、至少20倍、或至少50倍。

[0236] 6.7 随机化实施方式

[0237] 在一方面,本发明提供随机化支架。在另一实施方式中,本发明还提供多聚随机化支架。在另一实施方式中,本发明还提供二硫键工程改造的随机化支架。在还有另一实施

方式中,本发明提供包含随机化支架的文库。下文提供了本发明支架和包含所述支架的展示文库的随机化方案,在本节中统称为“本发明”。

[0238] 在一个实施方式中,本发明支架包含至少 1、至少 2、至少 3、至少 4、至少 5 或至少 6 个随机化环。在另一实施方式中,本发明包含至少一个随机化环,其中至少 AB、或至少 BC、或至少 CD、或至少 DE、或至少 EF、或至少 FG 环随机化。

[0239] 在一个实施方式中,本发明包含一个随机化的环。例如,本发明包含随机化的 AB 环。在另一实施方式中,本发明包含随机化的 BC 环。在另一实施方式中,本发明包含随机化的 CD 环。在另一实施方式中,本发明包含随机化的 DE 环。在另一实施方式中,本发明包含随机化的 EF 环。在另一实施方式中,本发明包含随机化的 FG 环。

[0240] 在一个实施方式中,本发明包含两个随机化的环。例如,本发明包含随机化的 AB 和 BC 环。在另一实施方式中,本发明包含随机化的 AB 和 CD 环。在另一实施方式中,本发明包含随机化的 AB 和 DE 环。在另一实施方式中,本发明包含随机化的 AB 和 EF 环。在另一实施方式中,本发明包含随机化的 AB 和 FG 环。在另一实施方式中,本发明包含随机化的 BC 和 CD 环。在另一实施方式中,本发明包含随机化的 BC 和 DE 环。在另一实施方式中,本发明包含随机化的 BC 和 EF 环。在另一实施方式中,本发明包含随机化的 BC 和 FG 环。在另一实施方式中,本发明包含随机化的 CD 和 DE 环。在另一实施方式中,本发明包含随机化的 CD 和 EF 环。在另一实施方式中,本发明包含随机化的 CD 和 FG 环。在另一实施方式中,本发明包含随机化的 DE 和 EF 环。在另一实施方式中,本发明包含随机化的 DE 和 FG 环。在另一实施方式中,本发明包含随机化的 EF 和 FG 环。

[0241] 在另一实施方式中,本发明包含三个随机化的环。例如,在一个实施方式中,本发明包含随机化的 AB、BC 和 CD 环。在另一实施方式中,本发明包含随机化的 AB、BC 和 DE 环。在另一实施方式中,本发明包含随机化的 AB、BC 和 EF 环。在另一实施方式中,本发明包含随机化的 AB、BC 和 FG 环。在另一实施方式中,本发明包含随机化的 AB、CD 和 DE 环。在另一实施方式中,本发明包含随机化的 AB、CD 和 EF 环。在另一实施方式中,本发明包含随机化的 AB、CD 和 FG 环。在另一实施方式中,本发明包含随机化的 AB、DE 和 EF 环。在另一实施方式中,本发明包含随机化的 AB、DE 和 FG 环。在另一实施方式中,本发明包含随机化的 AB、EF 和 FG 环。在另一实施方式中,本发明包含随机化的 BC、CD 和 DE 环。在另一实施方式中,本发明包含随机化的 BC、CD 和 EF 环。在另一实施方式中,本发明包含随机化的 BC、CD 和 FG 环。在另一实施方式中,本发明包含随机化的 BC、DE 和 EF 环。在另一实施方式中,本发明包含随机化的 BC、DE 和 FG 环。在另一实施方式中,本发明包含随机化的 BC、EF 和 FG 环。在另一实施方式中,本发明包含随机化的 CD、DE 和 EF 环。在另一实施方式中,本发明包含随机化的 CD、DE 和 FG 环。在另一实施方式中,本发明包含随机化的 CD、EF 和 FG 环。在另一实施方式中,本发明包含随机化的 DE、EF 和 FG 环。

[0242] 在另一实施方式中,本发明包含四个随机化的环。在另一实施方式中,本发明包含随机化的 AB、BC、CD 和 DE 环。在另一实施方式中,本发明包含随机化的 AB、BC、CD 和 EF 环。在另一实施方式中,本发明包含随机化的 AB、BC、CD 和 FG 环。在另一实施方式中,本发明包含随机化的 AB、CD、DE 和 EF 环。在另一实施方式中,本发明包含随机化的 AB、CD、DE 和 FG 环。在另一实施方式中,本发明包含随机化的 AB、CD、EF 和 FG 环。在另一实施方式中,本发明包含随机化的 AB、DE、EF 和 FG 环。在另一实施方式中,本发明包含随机化的 BC、CD、

DE 和 EF 环。在另一实施方式中,本发明包含随机化的 BC、CD、DE 和 FG 环。在另一实施方式中,本发明包含随机化的 BC、DE、EF 和 FG 环。在另一实施方式中,本发明包含随机化的 CD、DE、EF 和 FG 环。

[0243] 在另一实施方式中,本发明包含五个随机化的环。在另一实施方式中,本发明包含随机化的 AB、BC、CD、DE, 和 EF 环。在另一实施方式中,本发明包含随机化的 AB、BC、CD、DE, 和 FG 环。在另一实施方式中,本发明包含随机化的 AB、CD、DE、EF 和 FG 环。在另一实施方式中,本发明包含随机化的 AB、BC、DE、EF 和 FG 环。在另一实施方式中,本发明包含随机化的 AB、BC、CD、EF, 和 FG 环。在另一实施方式中,本发明包含随机化的 BC、CD、DE、EF 和 FG 环。

[0244] 在另一实施方式中,本发明包含六个随机化的环。在一个实施方式中,本发明包含随机化 AB、BC、CD、DE、EF 和 FG 环。

[0245] 在一具体实施方式中,本发明包含三个随机化的环,其中 BC、DE、和 FG 环均随机化。在另一实施方式中,本发明包含至少一个随机化的环,其中至少 AB、至少 CD、至少 EF 环随机化。在一具体实施方式中,本发明包含三个随机化的环,其中 AB、CD、和 EF 环均随机化。在另一具体实施方式中,本发明包含随机化的环,其中 AB、BC、CD、DE、EF、和 FG 环均随机化。

[0246] 在另一实施方式中,本发明包含随机化的环,其中至少一个、或至少两个、或至少三个、或至少四个、或至少五个、或至少六个环未随机化。

[0247] 在一个实施方式中,本发明包含至少一个随机化的环,其中一个环未随机化。在一个实施方式中,本发明包含至少一个随机化的环,其中 AB 环未随机化。在另一实施方式中,本发明包含至少一个随机化的环,其中 BC 环未随机化。在另一实施方式中,本发明包含至少一个随机化的环,其中 CD 环未随机化。在另一实施方式中,本发明包含至少一个随机化的环,其中 DE 环未随机化。在另一实施方式中,本发明包含至少一个随机化的环,其中 EF 环未随机化。在另一实施方式中,本发明包含至少一个随机化的环,其中 FG 环未随机化。

[0248] 在另一实施方式中,本发明包含至少一个随机化的环,其中两个环未随机化。在一个实施方式中,本发明包含至少一个随机化的环,其中至少 AB 和 BC 环未随机化。在另一实施方式中,本发明包含至少一个随机化的环,其中至少 AB 和 CD 环未随机化。在另一实施方式中,本发明包含至少一个随机化的环,其中至少 AB 和 DE 环未随机化。在另一实施方式中,本发明包含至少一个随机化的环,其中至少 AB 和 EF 环未随机化。在另一实施方式中,本发明包含至少一个随机化的环,其中至少 AB 和 FG 环未随机化。在另一实施方式中,本发明包含至少一个随机化的环,其中至少 BC 和 CD 环未随机化。在另一实施方式中,本发明包含至少一个随机化的环,其中至少 BC 和 DE 环未随机化。在另一实施方式中,本发明包含至少一个随机化的环,其中至少 BC 和 EF 环未随机化。在另一实施方式中,本发明包含至少一个随机化的环,其中至少 BC 和 FG 环未随机化。在另一实施方式中,本发明包含至少一个随机化的环,其中至少 CD 和 DE 环未随机化。在另一实施方式中,本发明包含至少一个随机化的环,其中至少 CD 和 EF 环未随机化。在另一实施方式中,本发明包含至少一个随机化的环,其中至少 CD 和 FG 环未随机化。在另一实施方式中,本发明包含至少一个随机化的环,其中至少 DE 和 EF 环未随机化。在另一实施方式中,本发明包含至少一个随机化的环,其中至少 DE 和 FG 环未随机化。在另一实施方式中,本发明包含至少一个随机化的环,其中至少 EF 和 FG 环未随机化。

中至少 BC、CD、DE、EF 和 FG 环未随机化。

[0252] 在另一实施方式中,本发明包含至少一个随机化的环,其中六个环未随机化。在另一实施方式中,本发明包含至少一个随机化的环,其中至少 AB、BC、CD、DE、EF 和 FG 环未随机化。

[0253] 本发明还提供其中 β 链区域随机化的支架,其中在相似条件下检测到所述 β 链随机化支架显示至少与 β 链随机化之前的同一支架一样高的稳定性和特异性靶标亲和力。在一个实施方式中,本发明包含至少一个、至少两个、至少三个、至少四个、至少五个或至少六个 β 链随机化。在另一实施方式中,本发明包含至少 A 链、或至少 B 链、或至少 C 链、或至少 D 链、或至少 E 链、或至少 F 链随机化。

[0254] 在另一实施方式中,本发明包含两个随机化的 β 链。在另一实施方式中,本发明包含随机化的 A 链和 B 链。在另一实施方式中,本发明包含随机化的 A 链和 C 链。在另一实施方式中,本发明包含随机化的 A 链和 D 链。在另一实施方式中,本发明包含随机化的 A 链和 E 链。在另一实施方式中,本发明包含随机化的 A 链和 F 链。在另一实施方式中,本发明包含随机化的 A 链和 G 链。在另一实施方式中,本发明包含随机化的 B 链和 C 链。在另一实施方式中,本发明包含随机化的 B 链和 D 链。在另一实施方式中,本发明包含随机化的 B 链和 E 链。在另一实施方式中,本发明包含随机化的 B 链和 F 链。在另一实施方式中,本发明包含随机化的 B 链和 G 链。在另一实施方式中,本发明包含随机化的 C 链和 D 链。在另一实施方式中,本发明包含随机化的 C 链和 E 链。在另一实施方式中,本发明包含随机化的 C 链和 F 链。在另一实施方式中,本发明包含随机化的 C 链和 G 链。在另一实施方式中,本发明包含随机化的 D 链和 E 链。在另一实施方式中,本发明包含随机化的 D 链和 F 链。在另一实施方式中,本发明包含随机化的 D 链和 G 链。在另一实施方式中,本发明包含随机化的 E 链和 F 链。在另一实施方式中,本发明包含随机化的 E 链和 G 链。在另一实施方式中,本发明包含随机化的 F 链和 G 链。

[0255] 在另一实施方式中,本发明包含三个随机化的 β 链。在一个实施方式中,本发明包含随机化的 A、B、和 C 链。在另一实施方式中,本发明包含随机化的 A、B、和 D 链。在另一实施方式中,本发明包含随机化的 A、B、和 E 链。在另一实施方式中,本发明包含随机化的 A、B、和 F 链。在另一实施方式中,本发明包含随机化的 A、B、和 G 链。在另一实施方式中,本发明包含随机化的 A、C、和 D 链。在另一实施方式中,本发明包含随机化的 A、C、和 E 链。在另一实施方式中,本发明包含随机化的 A、C、和 F 链。在另一实施方式中,本发明包含随机化的 A、C、和 G 链。在另一实施方式中,本发明包含随机化的 A、D、和 E 链。在另一实施方式中,本发明包含随机化的 A、D、和 F 链。在另一实施方式中,本发明包含随机化的 A、D、和 G 链。在另一实施方式中,本发明包含随机化的 B、C、和 D 链。在另一实施方式中,本发明包含随机化的 B、C、和 E 链。在另一实施方式中,本发明包含随机化的 B、C、和 F 链。在另一实施方式中,本发明包含随机化的 B、C、和 G 链。在另一实施方式中,本发明包含随机化的 B、D、和 E 链。在另一实施方式中,本发明包含随机化的 B、D、和 F 链。在另一实施方式中,本发明包含随机化的 B、D、和 G 链。在另一实施方式中,本发明包含随机化的 C、D、和 E 链。在另一实施方式中,本发明包含随机化的 C、D、和 F 链。在另一实施方式中,本发明包含随机化的 C、D、和 G 链。在另一实施方式中,本发明包含随机化的 C、E、和 F 链。在另一实施方式中,本发明包含随机化的 C、E、和 G 链。在另一实施方式中,本发明包含随机化的 C、F、和

G 链。在另一实施方式中,本发明包含随机化的 D、E、和 F 链。在另一实施方式中,本发明包含随机化的 D、F、和 G 链。在另一实施方式中,本发明包含随机化的 E、F、和 G 链。

[0256] 在一个实施方式中,本发明包含四个随机化的 β 链。在另一实施方式中,本发明包含随机化的 A、B、C、和 D 链。在另一实施方式中,本发明包含随机化的 A、B、C、和 E 链。在另一实施方式中,本发明包含随机化的 A、B、C、和 F 链。在另一实施方式中,本发明包含随机化的 A、B、C、和 G 链。在另一实施方式中,本发明包含随机化的 A、C、D、和 E 链。在另一实施方式中,本发明包含随机化的 A、C、D、和 F 链。在另一实施方式中,本发明包含随机化的 A、C、D、和 G 链。在另一实施方式中,本发明包含随机化的 A、D、E、和 F 链。在另一实施方式中,本发明包含随机化的 A、D、E、和 G 链。在另一实施方式中,本发明包含随机化的 A、E、F、和 G 链。在另一实施方式中,本发明包含随机化的 B、C、D、和 E 链。在另一实施方式中,本发明包含随机化的 B、C、D、和 F 链。在另一实施方式中,本发明包含随机化的 B、C、D、和 G 链。在另一实施方式中,本发明包含随机化的 B、D、E、和 F 链。在另一实施方式中,本发明包含随机化的 B、D、E、和 G 链。在另一实施方式中,本发明包含随机化的 B、E、F、和 G 链。在另一实施方式中,本发明包含随机化的 C、D、E 和 F 链。在另一实施方式中,本发明包含随机化的 C、D、E、和 G 链。在另一实施方式中,本发明包含随机化的 D、E、F、和 G 链。

[0257] 在一个实施方式中,本发明包含五个随机化的 β 链。在另一实施方式中,本发明包含随机化的 A、B、C、D、和 E 链。在另一实施方式中,本发明包含随机化的 A、B、C、D、和 F 链。在另一实施方式中,本发明包含随机化的 A、B、C、D、和 G 链。在另一实施方式中,本发明包含随机化的 A、C、D、E 和 F 链。在另一实施方式中,本发明包含随机化的 A、C、D、E 和 G 链。在另一实施方式中,本发明包含随机化的 A、C、D、E 和 F 链。在另一实施方式中,本发明包含随机化的 A、C、D、E 和 G 链。在另一实施方式中,本发明包含随机化的 A、B、C、E 和 F 链。在另一实施方式中,本发明包含随机化的 A、B、C、E 和 G 链。在另一实施方式中,本发明包含随机化的 A、B、C、D 和 F 链。在另一实施方式中,本发明包含随机化的 A、B、C、D 和 G 链。在另一实施方式中,本发明包含随机化的 B、C、D、E、和 F 链。在另一实施方式中,本发明包含随机化的 B、C、D、E、和 G 链。在另一实施方式中,本发明包含随机化的 B、D、E、F 和 G 链。在另一实施方式中,本发明包含随机化的 B、C、E、F 和 G 链。在另一实施方式中,本发明包含随机化的 B、C、D、F 和 G 链。在另一实施方式中,本发明包含随机化的 C、D、E、F、和 G 链。

[0258] 在一个实施方式中,本发明包含六个随机化的 β 链。在一个实施方式中,本发明包含随机化的 A、B、C、D、E、和 F 链。在另一实施方式中,本发明包含随机化的 A、B、C、D、E、和 G 链。在另一实施方式中,本发明包含随机化的 A、C、D、E、F 和 G 链。在另一实施方式中,本发明包含随机化的 A、B、D、E、F 和 G 链。在另一实施方式中,本发明包含随机化的 A、B、C、E、F 和 G 链。在另一实施方式中,本发明包含随机化的 A、B、C、D、F 和 G 链。在另一实施方式中,本发明包含随机化的 A、B、C、D、E 和 G 链。在另一实施方式中,本发明包含随机化的 B、C、D、E、F 和 G 链。

[0259] 在一个实施方式中,本发明包含六个随机化的 β 链。在一个实施方式中,本发明包含随机化的 A、B、C、D、E、F 和 G 链。

[0260] 本发明还提供聚环长度多样性的蛋白质支架。在一个实施方式中,本发明包含至少一个环,其包含至少 1、至少 2、至少 3、至少 4、至少 5、至少 6、至少 7、至少 8、至少 9、至少

10、至少 11、至少 12、至少 13、至少 14、至少 15、至少 16、至少 17、至少 18、至少 19、至少 20、至少 21、至少 22、至少 23、至少 24、至少 25、至少 26、至少 27、至少 28、至少 29 或至少 30 个氨基酸残基。在另一实施方式中,本发明可包含至少一个环,其包含 1、2、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、或 30 个氨基酸残基。在另一实施方式中,本发明可包含至少两个、至少三个、至少四个、至少五个或至少六个相同长度的环。在另一实施方式中,本发明可包含至少两个环、至少三个、至少四个、至少五个或至少六个不同长度的环。

[0261] 在另一实施方式中,本发明因天然产生蛋白质序列中相应环序列的至少一个氨基酸的缺失、取代或添加而不同于天然产生的蛋白质序列。在一个实施方式中,本发明在相应天然产生的蛋白质序列的至少一个、或至少两个、或至少四个、或至少四个、或至少五个、或至少六个环序列中包含至少一个氨基酸的缺失、取代或添加。在一个实施方式中,本发明在相应天然产生的蛋白质序列的至少一个、或至少两个、或至少三个、或至少四个、或至少五个、或至少六个环序列中包含至少 1、或至少 2、或至少 3、或至少 4、或至少 5、或至少 6、或至少 7、或至少 8、或至少 9、或至少 10、或至少 11、或至少 12、或至少 13、或至少 14、或至少 15、或至少 16、或至少 17、或至少 18、或至少 19、或至少 20、或至少 21、或至少 22、或至少 23、或至少 24、或至少 25、或至少 26、或至少 27、或至少 28、或至少 29、或至少 30 个氨基酸的缺失、取代或添加。在另一实施方式中,本发明在相应天然产生的蛋白质序列的至少一个、或至少两个、或至少三个、或至少四个、或至少五个、或至少六个环序列中包含至少 1、至少 2、至少 3、至少 4 到约至少 8、至少 9、或至少 10、或至少 11、或至少 12、或至少 13、或至少 14、或至少 15、或至少 16、或至少 17、或至少 18、或至少 19、或至少 20、或至少 21、或至少 22、或至少 23、或至少 24、或至少 25、或至少 26、或至少 27、或至少 28、或至少 29、或至少 30 个氨基酸的缺失、取代或添加。

[0262] 在一个实施方式中,本发明在环 AB 中包含至少一个氨基酸的缺失、取代或添加。在另一实施方式中,本发明在环 AB 中包含至少 1、或至少 2、或至少 3、或至少 4、或至少 5、或至少 6、或至少 7、或至少 8、或至少 9、或至少 10、或至少 11、或至少 12、或至少 13、或至少 14、或至少 15、或至少 16、或至少 17、或至少 18、或至少 19、或至少 20、或至少 21、或至少 22、或至少 23、或至少 24、或至少 25、或至少 26、或至少 27、或至少 28、或至少 29、或至少 30 个氨基酸的缺失、取代或添加。在另一实施方式中,本发明在环 AB 中包含至少 1、至少 2、至少 3、至少 4 到约至少 8、至少 9、或至少 10、或至少 11、或至少 12、或至少 13、或至少 14、或至少 15、或至少 16、或至少 17、或至少 18、或至少 19、或至少 20、或至少 21、或至少 22、或至少 23、或至少 24、或至少 25、或至少 26、或至少 27、或至少 28、或至少 29、或至少 30 个氨基酸的缺失、取代或添加。

[0263] 在一个实施方式中,本发明在环 BC 中包含至少一个氨基酸的缺失、取代或添加。在另一实施方式中,本发明在环 BC 中包含至少 1、或至少 2、或至少 3、或至少 4、或至少 5、或至少 6、或至少 7、或至少 8、或至少 9、或至少 10、或至少 11、或至少 12、或至少 13、或至少 14、或至少 15、或至少 16、或至少 17、或至少 18、或至少 19、或至少 20、或至少 21、或至少 22、或至少 23、或至少 24、或至少 25、或至少 26、或至少 27、或至少 28、或至少 29、或至少 30 个氨基酸的缺失、取代或添加。在另一实施方式中,本发明在环 BC 中包含至少 1、至少 2、至少 3、至少 4 到约至少 8、至少 9、或至少 10、或至少 11、或至少 12、或至少 13、或至少 14、或

3、至少 4 到约至少 8、、至少 9、或至少 10、或至少 11、或至少 12、或至少 13、或至少 14、或至少 15、或至少 16、或至少 17、或至少 18、或至少 19、或至少 20、或至少 21、或至少 22、或至少 23、或至少 24、或至少 25、或至少 26、或至少 27、或至少 28、或至少 29、或至少 30 个氨基酸的缺失、取代或添加。

[illegible]

少 17、至少 18、至少 19、至少 20、至少 21、至少 22、至少 23、至少 24、至少 25、至少 26、至少 27、至少 28、至少 29 或至少 30 个维持恒定的位置。

[0269] 本发明还提供包含环序列多样性的支架。在一个实施方式中,本发明包含至少一个环,其含有至少一个随机化的位置。在另一实施方式中,本发明包含至少一个环,其含有至少一个随机化的位置,还包含至少一个维持恒定的位置。在另一实施方式中,本发明包含环,其包含至少一个经历限制性随机化的位置。在另一实施方式中,本发明包含至少一个环,其包含至少一个经历限制性随机化的位置,还包含至少一个维持恒定的位置。在另一实施方式中,本发明包含至少一个环,其包含至少一个经历限制性随机化的位置,还包含至少一个随机化的位置和至少一个维持恒定的位置。

[0270] 在一个实施方式中,本发明包含至少一个、至少两个、至少三个、至少四个、至少五个或至少六个序列长度和多样性随机化的环。在一个实施方式中,本发明包含序列长度和多样性随机化的 AB 环。在另一实施方式中,本发明包含序列长度和多样性随机化的 BC 环。本发明包含序列长度和多样性随机化的 CD 环。本发明包含序列长度和多样性随机化的 DE 环。本发明包含序列长度和多样性随机化的 EF 环。本发明包含序列长度和多样性随机化的 FG 环。

[0271] 在另一实施方式中,本发明包含序列长度和多样性随机化的 AB 和 BC 环。在另一实施方式中,本发明包含序列长度和多样性随机化的 AB 和 CD 环。在另一实施方式中,本发明包含序列长度和多样性随机化的 AB 和 DE 环。在另一实施方式中,本发明包含序列长度和多样性随机化的 AB 和 EF 环。在另一实施方式中,本发明包含序列长度和多样性随机化的 AB 和 FG 环。在另一实施方式中,本发明包含序列长度和多样性随机化的 BC 和 CD 环。在另一实施方式中,本发明包含序列长度和多样性随机化的 BC 和 DE 环。在另一实施方式中,本发明包含序列长度和多样性随机化的 BC 和 EF 环。在另一实施方式中,本发明包含序列长度和多样性随机化的 BC 和 FG 环。在另一实施方式中,本发明包含序列长度和多样性随机化的 CD 和 DE 环。在另一实施方式中,本发明包含序列长度和多样性随机化的 CD 和 EF 环。在另一实施方式中,本发明包含序列长度和多样性随机化的 CD 和 FG 环。在另一实施方式中,本发明包含序列长度和多样性随机化的 DE 和 EF 环。在另一实施方式中,本发明包含序列长度和多样性随机化的 DE 和 FG 环。在另一实施方式中,本发明包含序列长度和多样性随机化的 EF 和 FG 环。

[0272] 在另一实施方式中,本发明包含序列长度和多样性随机化的 AB、BC 和 CD 环。在另一实施方式中,本发明包含序列长度和多样性随机化的 AB、BC 和 DE 环。在另一实施方式中,本发明包含序列长度和多样性随机化的 AB、BC 和 EF 环。在另一实施方式中,本发明包含序列长度和多样性随机化的 AB、BC 和 FG 环。在另一实施方式中,本发明包含序列长度和多样性随机化的 AB、CD 和 DE 环。在另一实施方式中,本发明包含序列长度和多样性随机化的 AB、CD 和 EF 环。在另一实施方式中,本发明包含序列长度和多样性随机化的 AB、CD 和 FG 环。在另一实施方式中,本发明包含序列长度和多样性随机化的 AB、DE 和 EF 环。在另一实施方式中,本发明包含序列长度和多样性随机化的 AB、DE 和 FG 环。在另一实施方式中,本发明包含序列长度和多样性随机化的 AB、EF 和 FG 环。在另一实施方式中,本发明包含序列长度和多样性随机化的 BC、CD 和 DE 环。在另一实施方式中,本发明包含序列长度和多样性随机化的 BC、CD 和 EF 环。在另一实施方式中,本发明包含序列长度和多样性随机化的 BC、CD

和 FG 环。在另一实施方式中,本发明包含序列长度和多样性随机化的 BC、DE 和 EF 环。在另一实施方式中,本发明包含序列长度和多样性随机化的 BC、DE 和 FG 环。在另一实施方式中,本发明包含序列长度和多样性随机化的 BC、EF 和 FG 环。在另一实施方式中,本发明包含序列长度和多样性随机化的 CD、DE 和 EF 环。在另一实施方式中,本发明包含序列长度和多样性随机化的 CD、DE 和 FG 环。在另一实施方式中,本发明包含序列长度和多样性随机化的 CD、EF 和 FG 环。在另一实施方式中,本发明包含序列长度和多样性随机化的 DE、EF 和 FG 环。

[0273] 在另一实施方式中,本发明包含序列长度和多样性随机化的 AB、BC、CD 和 DE 环。在另一实施方式中,本发明包含序列长度和多样性随机化的 AB、BC、CD 和 EF 环。在另一实施方式中,本发明包含序列长度和多样性随机化的 AB、BC、CD 和 FG 环。在另一实施方式中,本发明包含序列长度和多样性随机化的 AB、CD、DE 和 EF 环。在另一实施方式中,本发明包含序列长度和多样性随机化的 AB、CD、DE 和 FG 环。在另一实施方式中,本发明包含序列长度和多样性随机化的 AB、CD、EF 和 FG 环。在另一实施方式中,本发明包含序列长度和多样性随机化的 AB、DE、EF 和 FG 环。在另一实施方式中,本发明包含序列长度和多样性随机化的 BC、CD、DE 和 EF 环。在另一实施方式中,本发明包含序列长度和多样性随机化的 BC、CD、DE 和 FG 环。在另一实施方式中,本发明包含序列长度和多样性随机化的 BC、CD、EF 和 FG 环。在另一实施方式中,本发明包含序列长度和多样性随机化的 BC、DE、EF 和 FG 环。在另一实施方式中,本发明包含序列长度和多样性随机化的 CD、DE、EF 和 FG 环。

[0274] 在另一实施方式中,本发明包含序列长度和多样性随机化的含 AB、BC、CD、DE、和 EF 环。在另一实施方式中,本发明包含序列长度和多样性随机化的 AB、BC、CD、DE、和 FG 环。在另一实施方式中,本发明包含序列长度和多样性随机化的 AB、CD、DE、EF 和 FG 环。在另一实施方式中,本发明包含序列长度和多样性随机化的 AB、BC、DE、EF 和 FG 环。在另一实施方式中,本发明包含序列长度和多样性随机化的 AB、BC、CD、EF 和 FG 环。在另一实施方式中,本发明包含序列长度和多样性随机化的 AB、BC、CD、EF、和 FG 环。在另一实施方式中,本发明包含序列长度和多样性随机化的 AB、BC、CD、DE、和 EF 环。在另一实施方式中,本发明包含序列长度和多样性随机化的 BC、CD、DE、EF 和 FG 环。

[0275] 6.8 支架偶联物

[0276] 本发明包括利用偶连或融合于一个或多个部分支架,所述部分包括但不限于:肽、多肽、蛋白质、融合蛋白、核酸分子、小分子、模拟试剂、合成药物、无机分子和有机分子。本发明包括利用重组融合或化学偶连(包括共价和非共价偶连)于异源蛋白质或多肽(或其片段,至少 10 个、至少 20 个、至少 30 个、至少 40 个、至少 50 个、至少 60 个、至少 70 个、至少 80 个、至少 90 或至少 100 个氨基酸的多肽)的支架,从而产生融合蛋白。这种融合无需直接进行,而可以通过本文所述的接头序列发生。例如,可通过将支架融合或偶连于特定细胞表面受体的特异性抗体,在体外或体内利用支架将异源靶多肽靶向特定细胞类型。还可将融合或偶连于异源多肽的支架用于采用本领域已知方法的体外免疫测定和纯化方法中,参见,例如国际公布号 W0 93/21232;欧洲专利号 EP439,095;Naramura 等,1994, Immunol. Lett. 39:91-99;美国专利号 5,474,981;Gillies 等,1992, PNAS 89:1428-1432;和 Fell 等,1991, J. Immunol. 146:2446-2452,它们通过引用全文纳入本文。

[0277] 可通过基因改组、基序改组、外显子改组和/或密码子改组(统称为“DNA 改

组”)的技术产生包含本发明支架的其它融合蛋白。可采用 DNA 改组来改变本发明支架的活性(例如,具有较高亲和力和较低解离速率的支架)。一般可参见,美国专利号 5,605,793;5,811,238;5,830,721;5,834,252 和 5,837,458;Patten 等,1997, Curr. Opinion Biotechnol. 8:724-33;Harayama,1998, Trends Biotechnol. 16(2):76-82;Hansson 等,1999, J. Mol. Biol. 287:265-76;Lorenzo 和 Blasco,1998, BioTechniques 24(2):308-313(各份专利和出版物通过引用全文纳入本文)。先通过易错 PCR、随机核苷酸插入或其它方法进行随机诱变,再重组来改变支架,或者其编码的支架。可将编码特异性结合靶标的支架的多核苷酸的一个或多个部分与一种或多种异源分子的一个或多个组分、基序、区段、部分、结构域、片段等重组(recombine)。

[0278] 此外,可将本发明支架与标记序列,例如肽融合以促进纯化。在某些实施方式中,标记氨基酸序列是六-组氨酸肽(his-标签),例如,加利福尼亚州查塔沃斯市恰根公司(QIAGEN, Inc., 9259 Eton Avenue, Chatsworth, Calif., 91311)的 pQE 载体中提供的标签等,其中许多标记可商品化购得。如 Gentz 等(1989, PNAS, 86:821-824)中所述,六-组氨酸为纯化融合蛋白提供了便利。可用于纯化的其它肽标签包括但不限于:对应于衍生自流感血凝素蛋白某表位的血凝素“HA”标签(Wilson 等, Cell, 37:767)和“flag”标签。

[0279] 在其它实施方式中,可将本发明支架、其类似物或衍生物与诊断或可检测试剂偶连。可利用这种支架作为临床检验方法的一部分来监测或预后疾病的发生或进展,例如测定具体疗法的效力。可将支架与可检测物质偶联来实现这种诊断和检测,所述可检测物质包括但不限于:各种酶,例如但不限于辣根过氧化物酶、碱性磷酸酶、 β -半乳糖苷酶或乙酰胆碱酯酶;辅基,例如但不限于链霉亲和素/生物素及亲和素/生物素;荧光材料,例如但不限于伞形酮、荧光素、异硫氰酸荧光素、罗丹明、二氯三嗪基胺荧光素(dichlorotriazinylaminefluorescein)、丹磺酰氯或藻红蛋白;发光材料,例如但不限于鲁米诺;生物发光物质,例如但不限于萤光素酶、萤光素和水母蛋白;放射性物质,例如但不限于碘(^{131}I 、 ^{125}I 、 ^{123}I 、 ^{121}I)、碳(^{14}C)、硫(^{35}S)、氚(^3H)、铟(^{115}In 、 ^{113}In 、 ^{112}In 、 ^{111}In)、锝(^{99}Tc)、钽(^{201}Ti)、镓(^{68}Ga 、 ^{67}Ga)、钯(^{103}Pd)、钼(^{99}Mo)、氙(^{133}Xe)、氟(^{18}F)、 ^{153}Sm 、 ^{177}Lu 、 ^{159}Gd 、 ^{149}Pm 、 ^{140}La 、 ^{175}Yb 、 ^{166}Ho 、 ^{90}Y 、 ^{47}Sc 、 ^{186}Re 、 ^{188}Re 、 ^{142}Pr 、 ^{105}Rh 、 ^{97}Ru 、 ^{68}Ge 、 ^{57}Co 、 ^{65}Zn 、 ^{85}Sr 、 ^{32}P 、 ^{153}Gd 、 ^{169}Yb 、 ^{51}Cr 、 ^{54}Mn 、 ^{75}Se 、 ^{113}Sn 、和 ^{117}Tm ;用于各种正电子发射断层显像的正电子发射金属和非放射性顺磁金属离子,以及作放射性标记或偶连于特定放射性同位素的分子。

[0280] 本发明还包括利用与治疗性部分偶连的支架。可将支架与治疗性部分,例如细胞毒素,如抑制细胞或杀细胞药物,治疗性药物或放射性金属离子,如 α -(射线)发射体偶连。细胞毒素或细胞毒性药物可以是对细胞有害的任何药物。治疗性部分包括但不限于:抗代谢剂(如甲氨蝶呤、6-巯基嘌呤、6-巯鸟嘌呤、阿糖胞苷、5-氟尿嘧啶、达卡巴嗪)、烷化剂(如双氯乙基甲胺、塞替派(thioepa)、苯丁酸氮芥、美法仑、卡莫司汀(BCNU)和洛莫司汀(CCNU)、环磷酰胺、白消安、二溴甘露醇、链脲霉素、丝裂霉素 C 和顺二氯二胺铂(II)(DDP)顺铂)、蒽环霉素类(如道诺比星(以前称为道诺霉素)和多柔比星)、抗生素(如放线菌素 d(以前称为放线菌素)、博来霉素、光神霉素和氨基霉素(AMC))、耳他汀分子(如耳他汀 PHE、苔藓抑素 1 和索拉他汀 10(solastatin 10);参见 Woyke 等, Antimicrob. Agents Chemother. 46:3802-8(2002), Woyke 等, Antimicrob. Agents Chemother. 45:3580-4(2001), Mohammad 等, AntiCancer Drugs 12:735-40(2001),

Wall 等, Biochem. Biophys. Res. Commun. 266 :76-80 (1999), Mohammad 等, Int. J. Oncol. 15 : 367-72 (1999), 所有通过引用纳入本文)、激素 (如糖皮质激素类、孕激素、雄激素和雌激素)、DNA 修复酶抑制剂 (如依托泊甙或拓扑替康)、激酶抑制剂 (如化合物 T1571、甲磺酸伊马替尼 (Kantaijian 等, Clin Cancer Res. 8(7) :2167-76 (2002))、细胞毒剂 (如紫杉醇、松胞菌素 B、短杆菌肽 D、溴乙锭、吐根碱、丝裂霉素、依托泊甙、替尼泊甙、长春新碱、长春碱、秋水仙素、多柔比星、道诺霉素、二羟基炭疽菌素二酮、米托蒽醌、光神霉素、放线菌素 D、1- 去氢睾酮、普鲁卡因、丁卡因、利多卡因、普萘洛尔和嘌呤霉素和它们的类似物或同源物) 以及美国专利号 6, 245, 759、6, 399, 633、6, 383, 790、6, 335, 156、6, 271, 242、6, 242, 196、6, 218, 410、6, 218, 372、6, 057, 300、6, 034, 053、5, 985, 877、5, 958, 769、5, 925, 376、5, 922, 844、5, 911, 995、5, 872, 223、5, 863, 904、5, 840, 745、5, 728, 868、5, 648, 239、5, 587, 459 中公开的化合物)、法呢基转移酶抑制剂 (如 R115777、BMS-214662 和美国专利号 6, 458, 935、6, 451, 812、6, 440, 974、6, 436, 960、6, 432, 959、6, 420, 387、6, 414, 145、6, 410, 541、6, 410, 539、6, 403, 581、6, 399, 615、6, 387, 905、6, 372, 747、6, 369, 034、6, 362, 188、6, 342, 765、6, 342, 487、6, 300, 501、6, 268, 363、6, 265, 422、6, 248, 756、6, 239, 140、6, 232, 338、6, 228, 865、6, 228, 856、6, 225, 322、6, 218, 406、6, 211, 193、6, 187, 786、6, 169, 096、6, 159, 984、6, 143, 766、6, 133, 303、6, 127, 366、6, 124, 465、6, 124, 295、6, 103, 723、6, 093, 737、6, 090, 948、6, 080, 870、6, 077, 853、6, 071, 935、6, 066, 738、6, 063, 930、6, 054, 466、6, 051, 582、6, 051, 574 和 6, 040, 305 中公开的化合物)、拓扑异构酶抑制剂 (如喜树碱;伊立替康;SN-38;拓扑替康;9- 氨基喜树碱;GG-211 (GI 147211);DX-8951f;IST-622;卢比替康;吡唑啉吡啶;XR-5000;赛托品 (saintopin);UCE6;UCE1022;TAN-1518A;TAN-1518B;KT6006;KT6528;ED-110;NB-506;ED-110;NB-506;和罗贝霉素 (rebeccamycin));布各雷 (bulgarein);DNA 小沟结合剂如 Hoescht 染料 33342 和 Hoechst 染料 33258;两面针碱;花椒宁碱;表小檗碱;甲氧槲因; β - 拉帕醌;BC-4-1;二膦酸盐 (如阿仑膦酸盐、西马膦酸盐 (cimadronte)、氯屈膦酸盐、替鲁膦酸盐、依替膦酸盐、伊班膦酸盐、奈立膦酸盐、奥帕膦酸盐 (olpandronate)、利塞膦酸盐、吡膦酸盐、帕米膦酸盐、唑来膦酸盐 (zoledronate))、HMG-CoA 还原酶抑制剂 (如洛伐他汀、辛伐他汀、阿托伐他汀、普伐他汀、氟伐他汀、他汀、西立伐他汀、来适可、鲁匹妥 (lupitor)、罗苏伐他汀和阿托伐他汀) 和其药学上可接受的盐、溶剂化物、包合物和前药 (参见例如 Rothenberg, M. L., Annals of Oncology 8 :837-855 (1997);和 Moreau, P. 等, J. Med. Chem. 41 :1631-1640 (1998)), 反义寡核苷酸 (如美国专利号 6, 277, 832、5, 998, 596、5, 885, 834、5, 734, 033 和 5, 618, 709 公开的物质), 免疫调节剂 (如抗体和细胞因子)、抗体和腺苷脱氨酶抑制剂 (如磷酸氟达拉滨和 2- 氯脱氧腺苷)。例子包括紫杉醇、松胞菌素 B、短杆菌肽 D、溴乙锭、吐根碱、丝裂霉素、依托泊甙、替尼泊甙、长春新碱、长春碱、秋水仙素、多柔比星、道诺霉素、二羟基炭疽菌素二酮、米托蒽醌、光神霉素、放线菌素 D、1- 去氢睾酮、糖皮质激素、普鲁卡因、丁卡因、利多卡因、普萘洛尔和嘌呤霉素和它们的类似物或同源物。治疗剂包括但不限于抗代谢剂 (如甲氨蝶呤、6- 巯基嘌呤、6- 硫鸟嘌呤、阿糖胞苷、5- 氟尿嘧啶、达卡巴嗪)、烷化剂 (如双氯乙基甲胺、塞替派 (thioepa)、苯丁酸氮芥、美法仑、卡莫司汀 (BCNU) 和洛莫司汀 (CCNU)、环磷酰胺、白消安、二溴甘露醇、链脲霉素、丝裂霉素 C 和顺二氯二胺铂 (II) (DDP) 顺铂)、蒽环霉素类 (如道诺比星 (以前称为道诺霉素) 和

多柔比星)、抗生素(如放线菌素 d(以前称为放线菌素)、博来霉素、光神霉素和氨基霉素(AMC))、耳他汀分子(如耳他汀 PHE、苔藓抑素 1 和索拉他汀 10;参见 Woyke 等, *Antimicrob. Agents Chemother.* 46:3802-8(2002), Woyke 等, *Antimicrob. Agents Chemother.* 45:3580-4(2001), Mohammad 等, *AntiCancer Drugs* 12:735-40(2001), Wall 等, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 266:76-80(1999), Mohammad 等, *Int. J. Oncol.* 15:367-72(1999), 所有通过引用纳入本文)、抗有丝分裂剂(例如,长春新碱和长春碱)、激素(如糖皮质激素类、孕激素、雄激素和雌激素)、DNA 修复酶抑制剂(如依托泊甙或拓扑替康)、激酶抑制剂(如化合物 T1571、甲磺酸伊马替尼(Kantaijian 等, *Clin Cancer Res.* 8(7):2167-76(2002))以及美国专利号 6,245,759、6,399,633、6,383,790、6,335,156、6,271,242、6,242,196、6,218,410、6,218,372、6,057,300、6,034,053、5,985,877、5,958,769、5,925,376、5,922,844、5,911,995、5,872,223、5,863,904、5,840,745、5,728,868、5,648,239、5,587,459 中公开的化合物)、法呢基转移酶抑制剂(如 R115777、BMS-214662 和美国专利号 6,458,935、6,451,812、6,440,974、6,436,960、6,432,959、6,420,387、6,414,145、6,410,541、6,410,539、6,403,581、6,399,615、6,387,905、6,372,747、6,369,034、6,362,188、6,342,765、6,342,487、6,300,501、6,268,363、6,265,422、6,248,756、6,239,140、6,232,338、6,228,865、6,228,856、6,225,322、6,218,406、6,211,193、6,187,786、6,169,096、6,159,984、6,143,766、6,133,303、6,127,366、6,124,465、6,124,295、6,103,723、6,093,737、6,090,948、6,080,870、6,077,853、6,071,935、6,066,738、6,063,930、6,054,466、6,051,582、6,051,574 和 6,040,305 中公开的化合物)、拓扑异构酶抑制剂(如喜树碱;伊立替康;SN-38;拓扑替康;9-氨基喜树碱;GG-211(GI 147211);DX-8951f;IST-622;卢比替康;吡唑啉吡啶;XR-5000;赛托品(saintopin);UCE6;UCE1022;TAN-1518A;TAN-1518B;KT6006;KT6528;ED-110;NB-506;ED-110;NB-506;和罗贝霉素(rebeccamycin));布各雷(bulgarein);DNA 小沟结合剂如 Hoechst 染料 33342 和 Hoechst 染料 33258;两面针碱;花椒宁碱;表小檗碱;甲氧槲因; β -拉帕醌;BC-4-1;和它们药学上可接受的盐、溶剂化物、包合物和前药(参见例如 Rothenberg, M. L., *Annals of Oncology* 8:837-855(1997)和 Moreau, P. 等, *J. Med. Chem.* 41:1631-1640(1998)),反义寡核苷酸(如美国专利号 6,277,832、5,998,596、5,885,834、5,734,033 和 5,618,709 公开的物质),免疫调节剂(如抗体和细胞因子)、抗体(例如,利妥昔单抗(Rituxan®)、刺孢霉素(Mylotarg®、伊利图莫单抗(ibrutinomab)图西坦(tiuxetan)(Zevalin®)和托西莫单抗(Bexxar®))和腺苷脱氨酶抑制剂(如磷酸氟达拉滨和 2-氯脱氧腺苷)。

[0281] 此外,可将支架与能改进给定的生物学反应的治疗性部分或药物部分偶联。治疗性部分或药物部分不应理解为仅限于典型的化疗药物。例如,药物部分可以是具有所需生物学活性的蛋白质或多肽。这种蛋白质可包括,例如毒素,如相思豆毒蛋白、蓖麻毒蛋白 A、假单胞菌外毒素、霍乱毒素或白喉毒素;蛋白质,如肿瘤坏死因子、 α -干扰素、 β -干扰素、神经生长因子、血小板衍生生长因子、组织纤溶酶原激活物、凋亡物质(如 TNF- α 、TNF- β)、AIM I(参见国际公布号 WO 97/33899)、AIM II(参见国际公布号 WO 97/34911)、Fas 配体(Takahashi 等,1994, *J. Immunol.*, 6:1567-1574)和 VEGI(参见国际公布号 W099/23105);血栓形成剂或抗血管新生药物,例如血管抑制素、内皮抑制素或凝血途径(coagulation pathway)的组分(如组织因子);或生物反应修饰剂,如淋巴因子(如白介

素-1(“IL-1”)、白介素-2(“IL-2”)、白介素-6(“IL-6”)、粒细胞巨噬细胞集落刺激因子(“GM-CSF”)和粒细胞集落刺激因子(“G-CSF”)、生长因子(如生长激素(“GH”))、或凝血药物(如钙、维生素K、组织因子,例如但不限于Hageman因子(因子XII)、高分子量激肽原(HMWK)、前激肽释放酶(PK)、凝血蛋白因子II(凝血酶原)、因子V、XIIa、VIII、XIIIa、XI、XIa、IX、IXa、X、血纤蛋白原的 α 和 β 链的磷脂血纤肽A和B、血纤蛋白单体)。

[0282] 还可将支架偶联于治疗性部分如放射性金属离子,如 α -发射体(如 ^{213}Bi)或用于将放射性金属离子,包括但不限于 ^{131}In 、 ^{131}Lu 、 ^{131}Y 、 ^{131}Ho 、 ^{131}Sm 与多肽偶联的大环螯合剂。在某些实施方式中,所述大环螯合剂是可经接头分子与支架相连的1,4,7,10-四氮杂环十二烷-N,N',N'',N'''-四乙酸(DOTA)。本领域公知这种接头分子,参见Denardo等,1998, Clin Cancer Res. 4(10):2483-90;Peterson等,1999, Bioconjug. Chem. 10(4):553-7; Zimmerman等,1999, Nucl. Med. Biol. 26(8):943-50,各篇文献通过引用全文纳入本文。

[0283] 将治疗性部分偶联于抗体的技术是熟知的,参见例如Arnon等,“Monoclonal Antibodies For Immunotargeting Of Drugs In Cancer Therapy”(癌症治疗中用于药物的免疫靶向的单克隆抗体),刊于Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy(《单克隆抗体和癌症治疗》),Reisfeld等编,第243-56页,(奥兰李斯公司(Alan R. Liss, Inc.)1985);Hellstrom等,“Antibodies For Drug Delivery”(用于药物递送的抗体),刊于Controlled Drug Delivery(《受控药物递送》),(第二版),Robinson等编,第623-53页,(马赛尔戴克公司(Marcel Dekker, Inc.)1987);Thorpe,“Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review”(癌症治疗中的细胞毒性药物的抗体运载体:综述),刊于Monoclonal Antibodies '84: Biological And Clinical Applications(《单克隆抗体'84:生物学和临床应用》),Pinchera等编,第475-506页,(1985);“Analysis, Results, And Future Prospective Of The Therapeutic Use Of Radiolabeled Antibody In Cancer Therapy”(癌症治疗中放射性标记抗体的治疗性应用),刊于Monoclonal Antibodies For Cancer Detection And Therapy(《用于癌症检测和治疗的单克隆抗体》),Baldwin等编,第303-16页,(学术出版社(Academic Press)1985)和Thorpe等,1982, Immunol. Rev. 62:119-58。

[0284] 应选择偶联于支架的治疗性部分或药物,从而在对象中实现对具体疾病的所需预防或治疗作用。决定将哪种治疗性部分或药物偶联于支架时,医生或其他医务人员应考虑以下情况:疾病的性质、疾病的严重程度和对象的情况。

[0285] 本发明支架也可连接于固体支持物,该固体支持物尤其可用于靶抗原的免疫测得或纯化。这种固体支持物包括但不限于:玻璃、纤维素、聚丙烯酰胺、尼龙、聚苯乙烯、聚氯乙烯或聚丙烯。

[0286] 6.9 制备

[0287] 重组表达本发明支架需要构建含有编码该支架的多核苷酸的表达载体。一旦获得编码支架的多核苷酸,可采用本领域熟知的技术通过重组DNA技术制备用于产生支架的载体。因此,本文描述了通过表达含有支架编码核苷酸序列的多核苷酸来制备蛋白的方法。可采用本领域技术人员熟知的方法构建含有支架多肽编码序列及合适的转录和翻译控制信号的表达载体。这些方法包括,例如体外重组DNA技术、合成技术和体内基因重组。因此,本发明提供了包含编码本发明支架的操作性连接于启动子的核苷酸序列的可复制载体。

[0288] 通过常规技术将表达载体转入宿主细胞,并通过常规技术培养转染细胞以产生本发明支架。因此,本发明包括含有编码本发明支架的操作性连接于异源启动子的多核苷酸的宿主细胞。合适的宿主细胞包括但不限于微生物,例如细菌(如大肠杆菌(*E. coli*)和枯草芽胞杆菌(*B. subtilis*))。

[0289] 可利用各种宿主表达载体系统来表达本发明支架。这种宿主表达系统提供产生感兴趣编码序列,随后将其纯化的运载体,但也提供了用合适的核苷酸编码序列转化或转染时能原位表达本发明支架的细胞。这些系统包括但不限于:微生物,例如用含有支架编码序列的重组细菌噬菌体 DNA、质粒 DNA 或粘粒 DNA 表达载体转化的细菌(如大肠杆菌和枯草芽胞杆菌);用含有支架编码序列的重组酵母菌表达载体转化的酵母菌(如酵母(*Saccharomyces*),毕赤酵母(*Pichia*));用含有支架编码序列的重组病毒表达载体(例如,杆状病毒)感染的昆虫细胞系统;用含支架编码序列的重组病毒表达载体(例如,花椰菜花叶病毒, CaMV;烟草花叶病毒, TMV)感染或用含支架编码序列的重组质粒表达载体(例如, Ti 质粒)转化的植物细胞系统;或包含含有源自哺乳动物细胞基因组的启动子(如金属硫蛋白启动子)或源自哺乳动物病毒的启动子(如腺病毒晚期启动子;牛痘病毒 7.5K 启动子)的重组表达构建物的哺乳动物细胞系统(如 COS、CHO、BHK、293、NS0 和 3T3 细胞)。

[0290] 可通过三种通用方法鉴定含有编码本发明支架的基因插入物的表达载体:(a) 核酸杂交,(b) “标记”基因功能的存在或不存在,和(c) 所插入序列的表达。在第一方法中,可分别利用包含的序列与编码肽、多肽、蛋白质或融合蛋白的插入基因同源的探针,通过核酸杂交检测表达载体中是否存在编码肽、多肽、蛋白质或融合蛋白的基因。在第二方法中,可根据载体中编码抗体或融合蛋白的核苷酸序列插入所致某些“标记”基因功能(例如,胸苷激酶活性、对抗生素的耐受性、转化表型、杆状病毒中形成包含体等)是否存在来鉴定和选择重组载体/宿主系统。例如,如果编码支架的核苷酸序列插入载体的标记基因序列内,可通过标记基因功能不存在来鉴定含有编码支架的插入基因的重组体。在第三方法中,可通过检验该重组体表达的基因产物(例如,支架或其多聚体)鉴定重组表达载体。这种使用可以基于,例如蛋白质在体外试验系统中的物理和功能特性,如该支架的结合、激动或拮抗特性。

[0291] 在一些实施方式中,至少可部分化学合成本发明支架。在其它实施方式中,可半合成制备本发明支架。

[0292] 6.10 支架纯化

[0293] 一旦通过重组表达产生了本发明支架,可通过蛋白质纯化领域已知的任何方法来纯化,例如层析(如,金属螯合层析、离子交换、亲和力和分子大小柱层析)、离心、差别溶解性或蛋白质纯化的任何其它标准技术。

[0294] 本发明支架的高度稳定性质能允许改变纯化方案。例如,本发明支架所显示的热稳定性允许加热包含支架的粗制裂解液,从而通过变性除去主要的宿主细胞蛋白。在另一实施方式中,本发明支架显示的高度蛋白酶耐受性允许在任何纯化步骤之前快速降解粗制裂解液中的宿主细胞蛋白。本发明支架显示的 pH 耐受性还允许在任何纯化步骤之前通过降低或升高 pH 来选择性沉淀粗制裂解液中的宿主细胞蛋白。在一些实施方式中,通过高温转变、蛋白酶处理、pH 上调或下调或以上任意的组合以图除去粗制裂解液中主要的宿主细胞蛋白来促进纯化本发明支架。在一些实施方式中,热变性、蛋白酶处理或 pH 改变后剩余

的蛋白质是至少 50%、至少 55%、至少 60%、至少 65%、至少 70%、至少 75%、至少 80%、至少 85%、至少 90%、或至少 95% 的特异性支架蛋白。

[0295] 在一些实施方式中,纯化支架的方法包括将含有所述支架的粗制裂解液的 pH 降低至约 6.5、或约 6.0、或约 5.5、或约 5.0、或约 4.5、或约 4.0、或约 3.5、或约 3.0、或约 2.5、或约 2.0 以图沉淀宿主细胞蛋白。在其它实施方式中,纯化方法包括将含有所述支架的粗制裂解液的 pH 升高至约 8.0、或约 8.5、或约 9.0、或约 9.5、或约 10.0、或约 10.5、或约 11.0、或约 11.5、或约 12.0、或约 12.5 以图沉淀宿主细胞蛋白。

[0296] 6.11 支架的放大生产

[0297] 为大量获得,可通过放大工艺(下文称为“本发明的放大工艺”)制备本发明支架。在一些实施方式中,可通过本发明的放大工艺在研究实验室中产生支架,该工艺可放大从而在分析级生物反应器中(例如但不限于:5L、10L、15L、30L 或 50L 生物反应器)产生本发明支架。在其它实施方式中,可通过本发明的放大工艺在研究实验室中产生支架,该工艺可放大从而在生产规模的生物反应器中(例如但不限于:75L、100L、150L、300L 或 500L 生物反应器)产生本发明支架。在一些实施方式中,与在研究实验室中进行的生产工艺相比,本发明的放大工艺不导致或几乎不导致生产率降低。

[0298] 在一些实施方式中,本发明的放大工艺以约 1g/L、约 2g/L、约 3g/L、约 5g/L、约 7.5g/L、约 10g/L、约 12.5g/L、约 15.0g/L、约 17.5g/L、约 20g/L、约 25g/L、约 30g/L 或更高的生产率产生支架。

[0299] 在其它实施方式中,本发明的放大工艺以约 10g/L-约 300g/L、约 10g/L-约 250g/L、约 10g/L-约 200g/L、约 10g/L-约 175g/L、约 10g/L-约 150g/L、约 10g/L-约 100g/L、约 20g/L-约 300g/L、约 20g/L-约 250g/L、约 20g/L-约 200g/L, from 20g/L-约 175g/L、约 20g/L-约 150g/L、约 20g/L-约 125g/L、约 20g/L-约 100g/L、约 30g/L-约 300g/L、约 30g/L-约 250g/L、约 30g/L-约 200g/L、约 30g/L-约 175g/L、约 30g/L-约 150g/L、约 30g/L-约 125g/L、约 30g/L-约 100g/L、约 50g/L-约 300g/L、约 50g/L-约 250g/L、约 50g/L-约 200g/L、50g/L-约 175g/L、约 50g/L-约 150g/L、约 50g/L-约 125g/L 或约 50g/L-约 100g/L 的生产率产生支架。

[0300] 在一些实施方式中,本发明的放大工艺以约 10mg/L、约 20mg/L、约 30mg/L、约 50mg/L、约 75mg/L、约 100mg/L、约 125mg/L、约 150mg/L、约 175mg/L、约 200mg/L、约 250mg/L、约 300mg/L 或更高的生产率产生多聚支架。

[0301] 在其它实施方式中,本发明的放大工艺以至少约 10mg/L、至少约 20mg/L、至少约 30mg/L、至少约 50mg/L、至少约 75mg/L、至少约 100mg/L、至少约 125mg/L、至少约 150mg/L、至少约 175mg/L、至少约 200mg/L、至少约 250mg/L、至少约 300mg/L 或更高的生产率产生多聚支架。

[0302] 在其它实施方式中,本发明的放大工艺以约 10mg/L-约 300mg/L、约 10mg/L-约 250mg/L、约 10mg/L-约 200mg/L、约 10mg/L-约 175mg/L、约 10mg/L-约 150mg/L、约 10mg/L-约 100mg/L、约 20mg/L-约 300mg/L、约 20mg/L-约 250mg/L、约 20mg/L-约 200mg/L、20mg/L-约 175mg/L、约 20mg/L-约 150mg/L、约 20mg/L-约 125mg/L、约 20mg/L-约 100mg/L、约 30mg/L-约 300mg/L、约 30mg/L-约 250mg/L、约 30mg/L-约 200mg/L、约 30mg/L-约 175mg/L、约 30mg/L-约 150mg/L、约 30mg/L-约 125mg/L、约 30mg/L-约 100mg/L、约 50mg/L-约

300mg/L、约 50mg/L- 约 250mg/L、约 50mg/L- 约 200mg/L、50mg/L- 约 175mg/L、约 50mg/L- 约 150mg/L、约 50mg/L- 约 125mg/L 或约 50mg/L- 约 100mg/L 的生产率产生多聚支架。

[0303] 6.12 产生分泌型支架

[0304] 本发明还提供胞内产生支架或以分泌形式产生支架的方法。在一些实施方式中,分泌型支架的产生水平如本文所述。在其它实施方式中,分泌型支架适当折叠并完全功能化。在其它实施方式中,分泌型支架的产生包括利用 Ptac 启动子。在其它实施方式中,分泌型支架的产生包括利用 oppA 信号。在还有其它实施方式中,分泌型支架在原核宿主细胞中表达。在进一步的实施方式中,支架分泌入原核宿主细胞的周质空间。在还有其它实施方式中,支架直接分泌入培养基。在还有进一步的实施方式中,可从粗制细胞培养液或周质提取物筛选支架。

[0305] 本发明还提供利用蛋白质支架分泌串联蛋白质或融合物的方法。在一些实施方式中,本发明支架可用作将肽和 / 或蛋白质分泌入细胞培养基或原核细胞周质空间中的运载体分子。

[0306] 在另一实施方式中,纯化本发明支架的方法包括将包含所述支架的粗制裂解液加热至 70℃,15 分钟,随后通过离心除去凝聚的化合物。在其它实施方式中,纯化本发明支架的方法包括将包含所述支架的粗制裂解液加热至约 50℃、约 55℃、约 60℃、约 65℃、约 70℃、约 75℃、约 80℃、约 85℃或约 90℃,随后通过离心除去凝聚的化合物。在其它实施方式中,纯化本发明支架的方法包括将粗制裂解液加热至少约 1 分钟、约 2 分钟、约 3 分钟、约 4 分钟、约 5 分钟、约 6 分钟、约 7 分钟、约 8 分钟、约 9 分钟、约 10 分钟、约 11 分钟、约 12 分钟、约 13 分钟、约 14 分钟、约 15 分钟、约 20 分钟或约 30 分钟,随后通过离心除去凝聚的化合物。

[0307] 在另一具体实施方式中,纯化本发明支架的方法包括将粗制裂解液的 pH 改变至 3.0,将包含所述支架的粗制裂解液在 70℃加热 15 分钟,然后通过离心除去凝聚的化合物。

[0308] 6.13 检验支架

[0309] 可通过本领域已知的任何方法检验本发明支架与靶标的特异性结合。可采用的代表性试验包括但不限于采用例如以下技术的竞争性和非竞争性试验系统:蛋白质印迹、放射性免疫测定、ELISA(酶联免疫吸附测定)、“夹心”免疫测定、免疫沉淀试验、沉淀反应、凝胶扩散沉淀毒反应、免疫扩散试验、凝集试验、补体结合试验、免疫放射测定、荧光免疫测定,等等。这些试验是本领域已知的常规试验(参见,例如 Ausubel 等编,1994,最新分子生物学方法,第 1 卷,约翰威利父子公司,纽约)。

[0310] ELISA 包括制备抗原(例如,支架)、用抗原包被 96 孔微量滴定板的孔、将偶连于可检测化合物,例如酶底物(如辣根过氧化物酶或碱性磷酸酶)的感兴趣表位结合蛋白(例如,支架特异性抗体)加入孔中、温育一定时期并检测抗原是否存在。在 ELISA 中,感兴趣的表位结合蛋白不偶连于可检测化合物,而可向孔中加入偶连于可检测化合物的第二抗体(识别感兴趣的蛋白质)。此外,可将感兴趣的蛋白质包被孔,而不是用抗原包被孔。在该情况中,可加入偶联于可检测化合物的第二抗体,然后向包被的孔中加入感兴趣抗原。本领域技术人员应知道可作出改变以增加所检测信号参数以及本领域已知的 ELISA 的其它改进形式。ELISA 的其它讨论参见,例如 Ausubel 等编,1994,最新分子生物学方法,第 1 卷,约翰威利父子公司,纽约,11.2.1。

[0311] 可通过本领域已知的各种体外试验方法测得支架对抗原的结合亲和力和其它结合特性,包括例如平衡方法(如酶联免疫吸附测定(ELISA);或放射性免疫测定(RIA))、或动力学方法(如**BIACORE®**分析)和其它方法,例如间接结合试验、竞争性结合试验、荧光共振能量转移(FRET)、凝胶电泳和色谱(如凝胶过滤)。这些和其它方法可采用检测一个或多个组分上的标记和/或采用各种检测方法,例如但不限于生色、荧光、发光或同位素标记。结合亲和力和动力学的详述见 Paul, W.E. 编, *Fundamental Immunology* (基础免疫学), 第4版, L&R 公司 (Lippincott-Raven), 费城 (1999)。

[0312] 可通过许多不同方法增加本发明支架的稳定性。在一个实施方式中,本发明支架包含非天然产生的二硫键,如本文所述。在另一实施方式中,本发明支架包含N和/或C末端区域的延伸段。在另一实施方式中,本发明支架包含至少一个氨基酸残基的添加、缺失或取代以便调节支架的表面电荷。在另一实施方式中,本发明支架包含改变以增加血清半衰期,如本文所述。在还有另一实施方式中,本发明支架包含至少一个氨基酸残基的添加、缺失或取代以便稳定支架的疏水核。

[0313] 可通过许多不同技术评估本发明支架的稳定性。选择本领域已知的技术包括解链温度、示差扫描量热法(DSC)、圆二色性(CD)、聚丙烯酰胺凝胶电泳(PAGE)、蛋白酶耐受性、等温量热法(ITC)、核磁共振(NMR)、固有荧光和生物学活性。在一个实施方式中,与工程改造前的同一支架相比,本发明的工程改造支架显示稳定性增加。

[0314] 6.14 药物组合物

[0315] 在另一方面,本发明通过组合物,例如但不限于含有本发明支架或靶标结合蛋白中的一种或组合,用药学上可接受的运载体配制在一起的药物组合物。这种组合物可包含本发明不同支架中的一种或组合,例如但不限于两种或更多种。例如,本发明的药物组合物可包含结合靶抗原上不同表位或具有互补活性的支架组合。

[0316] 本发明的药物组合物还可在组合治疗中,例如与其它药剂组合给予。例如,组合治疗可包括本发明支架与至少一种其它治疗相组合,其中所述治疗可以是免疫治疗、化疗、放疗或药物治疗。

[0317] 本发明的药物组合物可包含一种或多种药学上可接受的盐。此类盐的例子包括酸加成盐和碱加成盐。酸加成盐包括那些源自无毒性无机酸,如盐酸、硝酸、磷酸、硫酸、氢溴酸、氢碘酸和亚磷酸等的盐,以及源自无毒性有机酸,如脂族单和二羧酸、苯基取代的链烷酸、羟基链烷酸、芳香酸、脂族和芳族磺酸等的盐。碱加成盐包括衍生自碱土金属,例如钠、钾、镁、钙等的盐,以及衍生自无毒有机胺,如N,N'-二苄基乙二胺、N-甲基葡糖胺、氯普鲁卡因、胆碱、二乙醇胺、乙二胺和普鲁卡因等的盐。

[0318] 本发明的药物组合物也可包含药学上可接受的抗氧化剂。药学上可接受的抗氧化剂包括:(1) 水溶性抗氧化剂,如抗坏血酸、盐酸半胱氨酸、硫酸氢钠、偏亚硫酸氢钠、亚硫酸钠等;(2) 油溶性抗氧化剂,如抗坏血酸棕榈酸酯、丁基化羟基茴香醚(BHA)、丁基化羟基甲苯(BHT)、卵磷脂、没食子酸丙酯、 α -生育酚等;和(3) 金属螯合剂,如柠檬酸、乙二胺四乙酸(EDTA)、山梨糖醇、酒石酸、磷酸等。

[0319] 用于本发明药物组合物中的水性和非水性运载体的例子包括水、乙醇、多元醇(如甘油、丙二醇、聚乙二醇等)和它们的合适混合物,植物油如橄榄油,以及可注射的有机酯,如油酸乙酯。可利用涂覆材料如卵磷脂,在分散体的情况中通过保持所需粒度,和使用

表面活性剂来维持合适的流动性。

[0320] 这些组合物还可包含辅料,如防腐剂、湿润剂、乳化剂和分散剂。可通过灭菌方法和加入各种抗细菌和抗真菌剂,例如对羟基苯甲酸酯、氯代丁醇和苯酚山梨酸等确保防止存在微生物。组合物中包含等渗剂,如糖、氯化钠等也是理想的。此外,可通过加入能延缓吸收的物质,例如单硬脂酸铝和明胶实现可注射药物形式的长期吸收。

[0321] 在制备和储存条件下,药物组合物通常必须无菌和稳定。可将组合物制成适合高药物浓度的溶液、微乳剂、脂质体或其它有序结构。运载体可以是含有,例如水、乙醇、多元醇(例如甘油、丙二醇和液体聚乙二醇等)及它们的合适混合物的溶剂或分散介质。可利用涂覆材料如卵磷脂,在分散体的情况中通过保持所需粒度和使用表面活性剂来维持合适的流动性。在许多情况中,组合物中包含等渗剂,例如糖、多元醇如甘露醇、山梨醇或氯化钠的合适的。组合物中包含延迟吸收的试剂如单硬脂酸盐和明胶可延长可注射组合物的吸收。

[0322] 可视需要将所需量的活性化合物和上述组分中的一种或组合掺入合适溶剂,随后灭菌和微过滤来制备无菌注射液。通常将活性化合物掺入含有基础分散介质和上述其它所需成分的无菌载体中来制备分散剂。在用于无菌注射液制备的无菌粉末情况中,优选的制备方法是真空干燥和冷冻干燥(冻干),从之前无菌过滤的溶液得到活性组分和任何其它所需组分的粉末。

[0323] 在一个实施方式中,本发明组合物(例如,液体制剂)是基本不含内毒素和/或相关热原物质的无热原制剂。内毒素包括局限在微生物内并且在微生物破坏或死亡时释放的毒素。热原也包括来自细菌和其它微生物外膜的诱导发热的热稳定性物质(糖蛋白)。如果给予人,这些物质均可引起发热、低血压和休克。因为有潜在的有害作用,优选的做法是从静脉内给予的药物溶液中去除即使含量很低的内毒素。食品药品监督管理局("FDA")规定在静脉内药物应用的一小时期间,上限是5内毒素单位(EU)/剂量/千克体重(The United States Pharmacopeial Convention, Pharmacopeial Forum(美国药典大会,药典论坛)26(1):223(2000))。当以数百或数千毫克每千克体重的剂量给予治疗性蛋白时,最好去除即使痕量的内毒素。在一个实施方式中,组合物中内毒素和热原水平低于10EU/mg、或低于5EU/mg、或低于1EU/mg、或低于0.1EU/mg、或低于0.01EU/mg、或低于0.001EU/mg。在另一实施方式中,组合物中内毒素和热原水平低于约10EU/mg、或低于约5EU/mg、或低于约1EU/mg、或低于约0.1EU/mg、或低于约0.01EU/mg、或低于约0.001EU/mg。

[0324] 6.15 剂量/给药

[0325] 为了制备包含本发明支架的药物或无菌组合物,将支架与药学上可接受的运载体或赋形剂混合。可通过与冻干粉末、浆液、水性溶液、洗剂或悬浮液形式的生理上可接受的运载体、赋形剂或稳定剂混合制备治疗和诊断物质的制剂(参见例如Hardman等(2001) Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics(古德曼和吉尔曼治疗药理学基础),纽约州纽约的MGH公司(McGraw-Hill, New York, N.Y.); Gennaro(2000) Remington: The Science and Practice of Pharmacy(雷明顿:药物科学和实践); Lippincott, Williams 和 Wilkins, 纽约州纽约; Avis等(编)(1993) Pharmaceutical Dosage Forms: Parenteral Medications(药物剂型:胃肠外药物); 纽约州MD公司(Marcel Dekker, NY); Lieberman等(编)(1990) Pharmaceutical Dosage Forms: Tablets(药物剂型:片剂), 纽约州MD公司; Lieberman等(编)(1990) Pharmaceutical Dosage Forms:

Disperse Systems(药物剂型:分散体系),纽约州 MD 公司;Weiner 和 Kotkoskie(2000) Excipient Toxicity and Safety(赋形剂毒性和安全性),纽约州纽约的 MD 公司)。

[0326] 治疗剂给药方案的选择依据多种因素,包括实体的血清或组织周转速率、症状的水平、实体的免疫原性和生物基质中靶细胞的可接近性。在某些实施方式中,在与可接受的副作用水平相一致的情况下,给药方案尽可能增大递送给患者的治疗剂用量。因此,生物递送量部分取决于特定实体和所治疗症状的严重程度。选择抗体、细胞因子和小分子的合适剂量有指南可用(参见例如 Wawrzynczak(1996)Antibody Therapy(抗体治疗),英国牛津郡生物科学出版公司(Bios Scientific Pub.Ltd,Oxfordshire,UK);Kresina(编)(1991) MonoclonalAntibodies, Cytokines and Arthritis(单克隆抗体,细胞因子和关节炎),纽约 MD 公司(Marcel Dekker,New York,N.Y.);Bach(编)(1993)Monoclonal Antibodiesand Peptide Therapy in Autoimmune Diseases(自身免疫病中的单克隆抗体和多肽治疗),纽约 MD 公司(Marcel Dekker,New York,N.Y.);Baert 等(2003)NewEngl. J. Med. 348: 601-608;Milgrom 等(1999)New Engl. J. Med. 341:1966-1973;Slamon 等(2001)New Engl. J. Med. 344:783-792;Beniaminovitz, 等(2000)NewEngl. J. Med. 342:613-619;Ghosh 等(2003)New Engl. J. Med. 348:24-32;Lipsky 等(2000)New Engl. J. Med. 343:1594-1602)。

[0327] 临床医生使用本领域已知或怀疑会影响治疗或估计会影响治疗的参数或因素来确定合适的剂量。通常,以稍低于最佳剂量的用量开始,然后少量递增直至相对任何不良副作用达到所需或最优效果。重要的诊断手段包括检测如炎症症状或炎性细胞因子产生水平。

[0328] 可改变本发明药物组合中活性成分的实际剂量水平,从而获得有效实现特定患者、组成与给药方式的所需治疗应答而对患者无毒的活性成分用量。所选剂量水平取决于各种药代动力学因素,包括所用的本发明特定组合物或其脂、盐、酰胺的活性,给药途径,给药时间,所用特定化合物的排出率,治疗持续时间,与所用特定组合物联用的其他药物、化合物和/或材料,年龄、性别、体重、病症、整体健康状况、所治疗病人的既往医疗史以及医学领域熟知的类似因素。

[0329] 本发明支架可通过连续输注提供,或以如1天、1周或每周1-7次的间隔提供。可通过静脉内、皮下、局部、口服、鼻部、直肠、肌肉内、脑内或吸入的方式提供剂量。具体的给药方案涉及避免显著不良副作用的最大剂量或给药频率。每周总剂量可以是至少0.05 μ g/kg 体重、至少0.2 μ g/kg、至少0.5 μ g/kg、至少1 μ g/kg、至少10 μ g/kg、至少100 μ g/kg、至少0.2mg/kg、至少1.0mg/kg、至少2.0mg/kg、至少10mg/kg、至少25mg/kg或至少50mg/kg(参见如Yang等(2003)New Engl. J. Med. 349:427-434;Herold等(2002)New Engl. J. Med. 346:1692-1698;Liu等(1999)J. Neurol. Neurosurg. Psych. 67:451-456;Portielji等(2003)Cancer Immunol. Immunother. 52:133-144)。以摩尔/千克体重计,小分子治疗剂,例如肽模拟物、蛋白质支架、天然产物或有机化学物质的所需剂量大致与抗体或多肽的相同。以摩尔/千克体重计,小分子或支架治疗剂的所需血浆浓度大致与抗体相同。该剂量可以是至少15 μ g、至少20 μ g、至少25 μ g、至少30 μ g、至少35 μ g、至少40 μ g、至少45 μ g、至少50 μ g、至少55 μ g、至少60 μ g、至少65 μ g、至少70 μ g、至少75 μ g、至少80 μ g、至少85 μ g、至少90 μ g、至少95 μ g或至少100 μ g。给予对象的剂量可以是至少1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12或更多次。

[0330] 对于本发明支架, 给予患者的剂量可以是 0.0001mg/kg-100mg/kg 患者体重。该剂量可以是 0.0001mg/kg-20mg/kg、0.0001mg/kg-10mg/kg、0.0001mg/kg-5mg/kg、0.0001-2mg/kg、0.0001-1mg/kg、0.0001mg/kg-0.75mg/kg、0.0001mg/kg-0.5mg/kg、0.0001mg/kg-0.25mg/kg、0.0001-0.15mg/kg、0.0001-0.10mg/kg、0.001-0.5mg/kg、0.01-0.25mg/kg 或 0.01-0.10mg/kg 患者体重。

[0331] 可以用以千克 (kg) 计的患者体重乘以以 mg/kg 计的待给予剂量来计算本发明支架的剂量。本发明支架的剂量可以是 150 μ g/kg 患者体重或更少、125 μ g/kg 或更少、100 μ g/kg 或更少、95 μ g/kg 或更少、90 μ g/kg 或更少、85 μ g/kg 或更少、80 μ g/kg 或更少、75 μ g/kg 或更少、70 μ g/kg 或更少、65 μ g/kg 或更少、60 μ g/kg 或更少、55 μ g/kg 或更少、50 μ g/kg 或更少、45 μ g/kg 或更少、40 μ g/kg 或更少、35 μ g/kg 或更少、30 μ g/kg 或更少、25 μ g/kg 或更少、20 μ g/kg 或更少、15 μ g/kg 或更少、10 μ g/kg 或更少、5 μ g/kg 或更少、2.5 μ g/kg 或更少、2 μ g/kg 或更少、1.5 μ g/kg 或更少、1 μ g/kg 或更少、0.5 μ g/kg 或更少或 0.5 μ g/kg 或更少。

[0332] 本发明支架的单位剂量可以是 0.1mg-20mg、0.1mg-15mg、0.1mg-12mg、0.1mg-10mg、0.1mg-8mg、0.1mg-7mg、0.1mg-5mg、0.1-2.5mg、0.25mg-20mg、0.25-15mg、0.25-12mg、0.25-10mg、0.25-8mg、0.25mg-7mg、0.25mg-5mg、0.5mg-2.5mg、1mg-20mg、1mg-15mg、1mg-12mg、1mg-10mg、1mg-8mg、1mg-7mg、1mg-5mg 或 1mg-2.5mg。

[0333] 本发明支架的剂量在对象中可达到的血清滴度为至少 0.1 μ g/ml、至少 0.5 μ g/ml、至少 1 μ g/ml、至少 2 μ g/ml、至少 5 μ g/ml、至少 6 μ g/ml、至少 10 μ g/ml、至少 15 μ g/ml、至少 20 μ g/ml、至少 25 μ g/ml、至少 50 μ g/ml、至少 100 μ g/ml、至少 125 μ g/ml、至少 150 μ g/ml、至少 175 μ g/ml、至少 200 μ g/ml、至少 225 μ g/ml、至少 250 μ g/ml、至少 275 μ g/ml、至少 300 μ g/ml、至少 325 μ g/ml、至少 350 μ g/ml、至少 375 μ g/ml 或至少 400 μ g/ml。或者, 本发明支架的剂量在对象中可达到的血清滴度为至少 0.1 μ g/ml、至少 0.5 μ g/ml、至少 1 μ g/ml、至少 2 μ g/ml、至少 5 μ g/ml、至少 6 μ g/ml、至少 10 μ g/ml、至少 15 μ g/ml、至少 20 μ g/ml、至少 25 μ g/ml、至少 50 μ g/ml、至少 100 μ g/ml、至少 125 μ g/ml、至少 150 μ g/ml、至少 175 μ g/ml、至少 200 μ g/ml、至少 225 μ g/ml、至少 250 μ g/ml、至少 275 μ g/ml、至少 300 μ g/ml、至少 325 μ g/ml、至少 350 μ g/ml、至少 375 μ g/ml 或至少 400 μ g/ml。

[0334] 可重复给予本发明支架的剂量, 给药间隔至少 1 天、2 天、3 天、5 天、10 天、15 天、30 天、45 天、2 个月、75 天、3 个月或至少 6 个月。

[0335] 特定病人有效量可以根据诸如所治疗的病症、病人总体健康、给药方法途径和剂量以及副作用严重性等因素而有所不同 (参见如 Maynard 等 (1996) A Handbook of SOPs for Good Clinical Practice (药物临床试验质量管理规范 SOP 手册), 佛罗里达州伯克莱屯英特法姆出版社 (Interpharm Press, Boca Raton, Fla.); Dent (2001) Good Laboratory and Good Clinical Practice (药物实验室和临床试验质量管理规范), 英国伦敦 UP 公司 (Urch Publ., London, UK)。

[0336] 给药途径可以通过, 例如局部或皮肤应用、静脉内注射或输液、腹膜内、脑内、肌肉内、眼内、动脉内、脑脊髓内、病损内或缓释系统或植入物 (参见例如 Sidman 等 (1983) Biopolymers 22:547-556; Langer 等 (1981) J. Biomed. Mater. Res. 15:167-277;

Langer (1982) Chem. Tech. 12 :98-105 ;Epstein 等 (1985) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82 : 3688-3692 ;Hwang 等 (1980) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77 :4030-4034 ; 美国专利号 6, 350466 和 6, 316, 024)。如果需要, 组合物也可含有增溶剂和局部麻醉剂, 例如利多卡因来减轻注射部位的疼痛。此外, 也可采用肺部给药, 例如利用吸入器或喷雾器, 和用雾化剂配制。参见例如美国专利号 6, 019, 968、5, 985, 320、5, 985, 309、5, 934, 272、5, 874, 064、5, 855, 913、5, 290, 540 和 4, 880, 078 ; 以及 PCT 公开号 WO 92/19244、WO 97/32572、WO97/44013、WO 98/31346 以及 WO 99/66903, 各自通过引用全文纳入本文。在一个实施方式中, 使用马萨诸塞州剑桥爱而克默公司 (Alkermes, Inc., Cambridge, Mass.) 的 Alkermes AIRTM 肺部药物递送技术给予本发明的抗体、组合治疗或组合物。

[0337] 本发明组合物还可采用一种或多种本领域已知方法, 通过一种或多种途径给予。技术人员应当理解, 给药的途径和 / 或方式会根据所需结果而有所不同。本发明支架的所选给予途径包括静脉内、肌肉内、皮内、腹膜内、皮下、脊椎或其它胃肠外给药途径, 例如通过注射或输注。胃肠外给药可代表除肠道和局部给药外的给药形式, 通常通过注射, 包括但不限于静脉内、肌肉内、动脉内、鞘内、囊内、眼内、心脏内、皮内、腹膜内、经气管、皮下、表皮下、关节内、囊下、蛛网膜下、脊柱内、硬膜外和胸骨内注射和输注。或者, 本发明组合物可以通过非胃肠外途径给药, 如局部、表皮或粘膜给药途径, 例如鼻内、经口、阴道、直肠、舌下或局部。

[0338] 如果采用控释或者缓释系统给予本发明支架, 可用泵实现控释或者缓释目的 (参见 Langer, 同上 ;Sefton, 1987, CRC Crit. Ref. Biomed. Eng. 14 :20 ;Buchwald 等, 1980, Surgery 88 :507 ;Saudek 等, 1989, N. Engl. J. Med. 321 :574)。可用聚合物材料实现本发明治疗剂的控释或者缓释 (参见如 Medical Applications of Controlled Release (控释的医学应用), Langer 和 Wise (编), 佛罗里达州伯克莱屯 CRC 出版社 (CRC Pres., Boca Raton, Fla.) (1974) ;Controlled Drug Bioavailability, Drug Product Design and Performance (受控的药物生物利用度, 药物产品的设计和性能), Smolen 和 Ball (编), 纽约韦利公司 (Wiley, NY) (1984) ;Ranger 和 Peppas, 1983, J., Macromol. Sci. Rev. Macromol. Chem. 23 :61 ;还可参见 Levy 等, 1985, Science 228 :190 ;During 等, 1989, Ann. Neurol. 25 :351 ;Howard 等, 1989, J. Neurosurg. 71 :105) ;美国专利号 5, 679, 377 ;美国专利号 5, 916, 597 ;美国专利号 5, 912, 015 ;美国专利号 5, 989, 463 ;美国专利号 5, 128, 326 ;PCT 公开号 WO 99/15154 ;以及 PCT 公开号 WO 99/20253。缓释制剂中所用聚合物的例子包括但不限于 :聚 (2-羟基甲基丙烯酸乙酯)、聚 (甲基丙烯酸甲酯)、聚 (丙烯酸)、乙烯-乙酸乙酯共聚物、聚 (甲基丙烯酸)、聚乙交酯 (PLG)、聚酯、聚 (N-乙烯基吡咯烷酮)、聚 (乙醇醇)、聚丙烯酰胺、聚乙二醇、聚丙交酯 (PLA)、丙交酯-乙交酯共聚物 (PLGA) 和聚原酸酯。在一个实施方式中, 缓释制剂中所使用的聚合物为惰性、不含可浸提杂质、稳定储存、无菌且可生物降解的。可将控释或缓释系统置于预防或治疗靶点附近, 因此仅需要全身剂量的一部分 (参见如前述 Goodson, Medical Applications of Controlled Release (控释的医学应用), 第 2 卷, 115-138 (1984))。

[0339] Langer 的综述 (1990, Science 249 :1527-1533) 讨论了控释系统。本领域技术人员已知的任何技术可用于生产包含一种或多种本发明支架的缓释制剂。参见例如美国专利号 4, 526, 938, PCT 公开号 WO 91/05548, PCT 公开号 WO96/20698, Ning 等,

1996, " Intratumoral Radioimmunotherapy of a Human ColonCancer Xenograft Using a Sustained-Release Gel" (用缓释凝胶对人结肠癌异种移植瘤进行肿瘤内放射性免疫治疗)Radiotherapy & Oncology 39:179-189, Song 等,1995, " Antibody Mediated Lung Targeting of Long-Circulating Emulsions" (抗体介导的长期循环乳剂的肺靶向)PDA Journal of Pharmaceutical Science &Technology 50:372-397, Cleek 等, 1997, " Biodegradable Polymeric Carriers for abFGF Antibody for Cardiovascular Application" (在心血管应用中用于 bFGF 抗体的生物可降解聚合物载体)Pro. Int' l. Symp. Control. Rel. Bioact. Mater. 24:853-854, 以及 Lam 等,1997, " Microencapsulation of Recombinant Humanized Monoclonal Antibody for Local Delivery" (用于局部递送的重组人源化单克隆抗体的微囊化)Proc. Int' l. Symp. Control Rel. Bioact. Mater. 24:759-760, 各自通过引用全文纳入本文。

[0340] 如果将本发明支架局部给予,可将其制成油膏剂、乳膏剂、透皮贴剂、洗剂、凝胶剂、洗剂、喷雾剂、气雾剂、溶液、乳剂或本领域技术人员熟知的其它形式。参见例如 Remington' s Pharmaceutical Sciences and Introduction toPharmaceutical Dosage Forms(雷明顿药物科学和药物剂型导论),第 19 版,宾夕法尼亚州伊斯顿马克出版公司(Mack Pub. Co., Easton, Pa. (1995))。对于非喷雾局部剂型,通常使用含有与局部应用相容的运载体或一种或多种赋形剂的粘稠至半固体或固体形式,所述运载体或赋形剂具有动态粘度,在一些情况下粘度大于水。合适的制剂包括但不限于溶液、混悬剂、乳剂、乳膏剂、油膏剂、粉末剂、搽剂、软膏剂等,需要的话它们可以是无菌的并与辅料(如防腐剂、稳定剂、湿润剂、缓冲剂或盐)混合以影响多种特性,例如渗透压。其它合适的局部剂型包括喷雾气溶胶制剂,其中在一些情况下,将活性成分和固体或液体惰性载体包装在包含加压挥发物(如气体推进剂,如氟利昂)的混合物中或挤压瓶中。需要的话可以在药物组合物中加入保湿剂或增湿剂。本领域熟知这种额外成分的例子。

[0341] 如果鼻内给予本发明支架,可将其制成气雾剂、喷雾剂、雾剂或滴剂的形式。具体说,可以使用合适推进剂(如二氯二氟甲烷、三氯氟甲烷、二氯四氟乙烷、二氧化碳或其它合适的气体)的加压包装或喷雾器中气溶胶喷雾的形式常规递送本发明所用的预防剂或治疗剂。在加压气溶胶的情况下,可通过阀门确定剂量单位以便递送计量用量。可将用于吸入器或吹入器的胶囊和药囊(由,例如明胶构成)制成含有化合物和合适粉末基料如乳糖或淀粉的粉末混合物。

[0342] 本领域熟知与第二种治疗剂如细胞因子、类固醇、化疗剂、抗生素或射线共同给予或治疗的方法(参见例如 Hardman 等(编)(2001)Goodman and Gilman' sThe Pharmacological Basis of Therapeutics(古德曼和吉尔曼治疗的药理学基础),第 10 版增刊,纽约 MGH 公司(McGraw-Hill, New York, N. Y.);Poole 和 Peterson(编)(2001)Pharmacotherapeutics for Advanced Practice :A PracticalApproach(药物治疗高级实践:实践方法),宾夕法尼州费城 LWW 公司(Lippincott, Williams & Wilkins, Phila., Pa.);Chabner 和 Longo(编)(2001)CancerChemotherapy and Biotherapy(癌症化疗和生物治疗),宾夕法尼州费城 LWW 公司。有效量的治疗剂可使症状减轻至少 10%、至少 20%、至少约 30%、至少 40%或至少 50%。

[0343] 与本发明支架组合给予的其它剂(如预防剂或治疗剂)可与本发明支架间隔小

于 5 分钟、小于 30 分钟、1 小时、约 1 小时、约 1-2 小时、约 2 小时 - 约 3 小时、约 3 小时 - 约 4 小时、约 4 小时 - 约 5 小时、约 5 小时 - 约 6 小时、约 6 小时 - 约 7 小时、约 7 小时 - 约 8 小时、约 8 小时 - 约 9 小时、约 9 小时 - 约 10 小时、约 10 小时 - 约 11 小时、约 11 小时 - 约 12 小时、约 12 小时 - 18 小时、18 小时 - 24 小时、24 小时 - 36 小时、36 小时 - 48 小时、48 小时 - 52 小时、52 小时 - 60 小时、60 小时 - 72 小时、72 小时 - 84 小时、84 小时 - 96 小时、或 96 小时 - 120 小时给予。可在患者的同一次就诊期间给予两种或更多种剂。

[0344] 本发明支架和其它剂可周期性给予。周期性治疗包括给予第一治疗（如，第一种预防剂或治疗剂）一段时间，然后给予第二治疗（如，第二种预防剂或治疗剂）一段时间，任选地，随后给予第三治疗（如，预防剂或治疗剂）一段时间等等，并重复此种顺次给药，即该周期，以降低对治疗中的一种产生耐受的概率，避免或减轻治疗中一种的副作用和 / 或提高治疗的效力。

[0345] 在某些实施方式中，可将本发明支架配制成确保体内分布合适。例如，血脑屏障 (BBB) 排除许多高亲水性化合物。为确保本发明的治疗性化合物穿过 BBB (需要的话)，可将其制成，如脂质体。制备脂质体的方法可参见例如美国专利 4,522,811、5,374,548、和 5,399,331。脂质体可包含一个或多个选择性转运入特定细胞或器官的部分，从而增强靶向药物递送（参见例如 V. V. Ranade (1989) J. Clin. Pharmacol. 29 :685）。示例性的靶向部分包括叶酸或生物素（参见例如 Low 等的美国专利号 5,416,016）；甘露糖苷 (Umezawa 等, (1988) Biochem. Biophys. Res. Commun. 153 :1038)；抗生素 (P. G. Bloeman 等, (1995) FEBS Lett. 357 :140 ; M. Owais 等, (1995) Antimicrob. Agents Chemother. 39 :180)；表面活性剂 A 蛋白受体 (Briscoe 等, (1995) Am. J. Physiol. 1233 :134) ; p120 (Schreier 等, (1994) J. Biol. Chem. 269 :9090)；还可参见 K. Keinänen ; M. L. Laukkanen (1994) FEBS Lett. 346 : 123 ; J. J. Killian ; I. J. Fidler (1994) Immunomethods 4 :273。

[0346] 本发明提供将含本发明支架的药物组合物单独给予或与其它治疗组合给予有此需要的对象的方法。本发明组合治疗中的治疗（如预防剂或治疗剂）可同时或依次给予对象。本发明组合治疗中的治疗（如预防剂或治疗剂）也可周期性给予。周期性治疗包括给予第一治疗（如，第一种预防剂或治疗剂）一段时间，然后给予第二治疗（如，第二种预防剂或治疗剂）一段时间，并重复该顺次给药，即该周期，以降低对治疗中的一种（如药剂）产生耐受的概率，避免或减轻治疗中的一种（如药剂）的副作用和 / 或提高这些治疗的效力。

[0347] 本发明组合治疗中的治疗（如预防剂或治疗剂）可同时给予对象。术语“同时”并不将治疗（如预防剂或治疗剂）的给予限制在完全相同的时间，而意味着在一定时间间隔内将含本发明支架的药物组合物依次给予对象，从而本发明支架能与其它治疗共同起作用以提供胜过其它给药方法的优势。例如，可同时或在不同时间点以任何顺序依次将各治疗给予对象；然而，如果没有在同一时间给药，应将它们在足够接近的时间内给予以提供所需治疗或者预防效果。可将各治疗以任何合适形式，通过任何合适途径分别给予对象。在各种实施方式中，给予对象的治疗（如预防剂或治疗剂）间隔小于 15 分钟、小于 30 分钟、小于 1 小时、约 1 小时、约 1 小时 - 约 2 小时、约 2 小时 - 约 3 小时、约 3 小时 - 约 4 小时、约 4 小时 - 约 5 小时、约 5 小时 - 约 6 小时、约 6 小时 - 约 7 小时、约 7 小时 - 约 8 小时、约 8 小时 - 约 9 小时、约 9 小时 - 约 10 小时、约 10 小时 - 约 11 小时、约 11 小时 - 约 12 小时、

24 小时、48 小时、72 小时、或 1 周。在其它实施方式中,可在患者的同一次就诊期间给予两种或更多种治疗(如预防剂或治疗剂)。

[0348] 可在同一药物组合物中给予对象组合治疗的预防剂或治疗剂。或者,可以用不同的药物组合物将组合治疗的预防剂或治疗剂同时给予对象。可通过相同或不同给药途径将预防剂或治疗剂给予对象。

[0349] 6.16 支架的使用方法

[0350] 本发明支架具有体外和体内诊断和治疗应用。例如,可将这些分子给予培养的细胞(例如,体外或离体),或给予对象(例如,体内)来治疗、预防或诊断各种疾病。

[0351] 本发明还提供本发明支架的利用方法。本发明还包括单用或与其它治疗联用本发明支架来预防、诊断、控制、治疗或缓解一种或多种疾病或病症相关症状,包括但不限于癌症、炎性和自身免疫疾病、感染性疾病。本发明还包括单用或与其它治疗联用偶连或融合于某部分(例如,治疗剂或药物)的本发明支架来预防、控制、治疗或缓解一种或多种疾病、病症或感染相关症状,包括但不限于癌症、炎性和自身免疫疾病、感染性疾病。

[0352] 许多细胞表面受体还因与亚基交联而活化或去活化。本发明蛋白质可通过交联细胞表面受体而用于刺激或抑制靶细胞中的反应。在另一实施方式中,本发明支架可用于阻断多种细胞表面受体与抗原的相互作用。在另一实施方式中,本发明支架可用于增强多种细胞表面受体与抗原的相互作用。在另一实施方式中,可能利用含有多个结合结构域的本发明支架交联细胞表面受体的同源或异源二聚体,所述结合结构域对同一抗原具有特异性,或结合两个不同抗原。在另一实施方式中,本发明蛋白质可用于将配体、或配体类似物递送至特定细胞表面受体。

[0353] 本发明还提供靶向传统抗体不易靶向的表位的方法。例如,在一个实施方式中,可利用本发明支架首先靶向毗邻抗原,而另一结合结构域可结合隐蔽抗原。

[0354] 本发明还提供利用支架将不同细胞类型集合在一起的方法。在一个实施方式中,本发明蛋白可利用一个结合结构域结合靶细胞,而通过另一结合结构域募集另一种细胞。在另一实施方式中,第一种细胞可以是癌细胞,第二种细胞是免疫效应细胞,例如 NK 细胞。在另一实施方式中,本发明支架可用于增强两种不同细胞,例如抗原呈递细胞和 T 细胞之间的相互作用,从而可能加强免疫反应。

[0355] 本发明还提供利用支架蛋白质缓解、治疗或预防癌症或其症状的方法。在一个实施方式中,本发明方法可用于治疗头、颈、眼、口、喉、食道、胸、皮肤、骨、肺、结肠、直肠、结肠直肠、胃、脾、肾、骨骼肌、皮下组织、转移性黑色素瘤、子宫内膜、前列腺、乳腺、卵巢、睾丸、甲状腺、血液、淋巴结、肾、肝、胰腺、脑或中枢神经系统的癌症。

[0356] 本发明还提供利用支架消除细胞群的方法。在一个实施方式中,本发明方法可用于消除以下细胞类型:嗜曙红细胞、嗜碱细胞、嗜中性粒细胞、T 细胞、B 细胞、肥大细胞、单核细胞和肿瘤细胞。

[0357] 6.17 TRAIL-R2 特异性支架

[0358] TRAIL-R2 蛋白由 TNF- 受体超家族基因的成员编码,该蛋白含有胞内死亡结构域。在一些情况中,其也可称为 TNFRSF10B、CD262、DR5、KILLER < KILLER/DR5、TRAILR2、TRICK2、TRICK2A、TRICK2B、TRICKB 或 ZTNFR9。该受体可由肿瘤坏死因子-相关凋亡诱导配体(TNFSF10/TRAIL/APO-2L)活化并转导凋亡信号。此外,TRAIL-R2 诱导凋亡涉及胱冬

酶和胞内衔接分子 FADD/MORT1 (Walczak 等 . EMBOJ, (1997), 16, 5386-97)。

[0359] 在一些实施方式中,本发明还提供特异性结合 TRAIL-R2 的支架。在特定的实施方式中,本发明支架特异性结合人 TRAIL-R2。在其它特异性实施方式中,本发明支架结合小鼠、鸡、恒河猴、猕猴、大鼠或家兔的 TRAIL-R2 同源物。在一些实施方式中,本发明支架结合 TRAIL-R2 的暴露表位。这种实施方式包括在细胞上内源性表达的 TRAIL-R2 和 / 或细胞经转染而异位表达受体。在其它实施方式中,本发明支架识别展示在单体 TRAIL-R2 上的表位。在其它实施方式中,本发明支架识别展示在 TRAIL-R2 的同源二聚形式上的表位。在还有其它实施方式中,本发明支架结合单体 TRAIL-R2 并促进 2 个或更多个 TRAIL-R2 分子的二聚化或寡聚化 (例如但不限于多聚支架)。在还有其它实施方式中,本发明支架降低或抑制 TRAIL-R2 与 TRAIL-R1 配体的相互作用。在其它实施方式中,本发明支架模拟 TRAIL 配体与 TRAIL-R2 的相互作用。在进一步的实施方式中,本发明支架激动 TRAIL-R2 所致的细胞信号转导。

[0360] 本发明还提供利用本文所述支架调节 TRAIL-R2 活性的方法。在一些实施方式中,本发明方法包括将表达 TRAIL-R2 的细胞与 TRAIL-R2 特异性支架接触并阻断与 TRAIL 配体的相互作用。在其它实施方式中,本发明方法包括将表达 TRAIL-R2 的细胞与 TRAIL-R2 特异性支架接触并模拟 TRAIL 配体与 TRAIL-R2 的相互作用。在其它实施方式中,本发明方法包括通过与 TRAIL-R2 特异性支架接触来激动 TRAIL-R2。在其它实施方式中,本发明方法包括通过将表达在细胞上的 TRAIL-R2 单体与 TRAIL-R2 特异性支架接触并促进二聚化或寡聚化而将 TRAIL-R2 二聚化或寡聚化。在进一步的实施方式中,可利用,例如但不限于多聚支架、模拟 TRAIL-R2 二聚体的支架、稳定 TRAIL-R2 二聚体形成的支架、使 TRAIL-R2 单体不稳定的支架或只识别展示在细胞上的 TRAIL-R2 二聚体的支架实现 TRAIL-R2 二聚化。

[0361] 在其它实施方式中,可利用与支架二聚化或寡聚化试剂偶连的单体支架来实现 TRAIL-R2 的二聚化或寡聚化。这种支架二聚化或寡聚化试剂可包括,例如但不限于抗 - 支架抗体,利用与表位标签的抗体相偶连的含表位标签支架,或掺入本文所述和本领域已知的各种蛋白质二聚化或寡聚化基序。在进一步的实施方式中,可通过给予单体支架,然后给予支架二聚化或寡聚化试剂来诱导 TRAIL-R2 二聚体或寡聚体。

[0362] 在一些实施方式中,本发明方法包括给予降低细胞活力的 TRAIL-R2 特异性支架,如通过本领域已知的常规试验所检测的。在进一步的实施方式中,细胞活力降低意味着凋亡的激活,如本领域已知试验所检测的。在其它实施方式中,细胞活力降低意味着细胞分裂的抑制,如本领域接受的方法所检测的。在一些实施方式中,与相没有治疗存在下的细胞活力比,细胞活力降低至少 10%、至少 20%、至少 30%、至少 40%、至少 50%、至少 60%、至少 70%、至少 80%、至少 90% 或更多。在一些实施方式中,采用本文实施例 15 和 / 或 17 或本领域的其它已知方法检测细胞活力。

[0363] 在一些实施方式中,本发明的 TRAIL-R2 结合支架以与 TRAIL-R2 的配体,称为 TRAIL (Apo-2 配体) 相似的活性激动 TRAIL-R2。在其它实施方式中,本发明的 TRAIL-R2 结合支架能有效活化 TRAIL-R2,从而活化一条或多条胞内信号转导途径,包括活化胱冬酶 3、胱冬酶 8、胱冬酶 10 或 FADD。在其它实施方式中,本发明的 TRAIL-R2 结合支架激活至少一种癌细胞类型的凋亡。在进一步的实施方式中,与 TRAIL 相比,本发明的 TRAIL-R2 结合支架显示在至少一种细胞类型中凋亡的激活增强。在其它实施方式中,与 TRAIL (配体) 相比,

本发明的 TRAIL-R2 结合支架可结合 TRAIL-R2 上的相同表位或竞争结合 TRAIL-R2 上的相同表位。在这种实施方式中,通过利用可溶性 TRAIL 配体(例如,TRAIL 配体的 114-281 片段)的体外竞争性试验、晶体学研究或其它已知的体内或体外研究测定到 TRAIL-R2 结合支架能阻断或抑制 TRAIL-R2 与 TRAIL 的相互作用至少 50%、至少 60%、至少 70%、至少 80%、至少 90%或更多。

[0364] 6.17.1 利用 TRAIL-R2 结合物治疗的方法

[0365] 已知 TRAIL-R2 介导凋亡信号转导。虽然几类正常细胞表达 TRAIL-R2,但通过该受体的凋亡信号转导看来主要局限于肿瘤细胞,就通过癌基因,例如 Myc 或 Ras 转化它们而言,可能对死亡受体介导的凋亡更敏感(Wang 等, CancerCell 5:501-12(2004);Nesterov 等, Cancer Res. 64:3922-7(2004))。人癌症细胞系以及原发性肿瘤常表达 TRAIL-R2。

[0366] 本发明的 TRAIL-R2 特异性支架可用于预防、治疗、维持或缓解癌症。在一些实施方式中,癌症可涉及表达 TRAIL-R2 的癌细胞。在其它实施方式中,与非癌细胞相比,癌细胞过表达 TRAIL-R2。在一些实施方式中,癌症是,例如癌、淋巴瘤、母细胞瘤、肉瘤或白血病。在其它实施方式中,癌症可以包括鳞状细胞癌、小细胞肺癌、非小细胞肺癌(NSCLC)、非霍奇金淋巴瘤、母细胞瘤、胃肠道癌症、肾癌、卵巢癌、肝脏癌症、胃癌、膀胱癌、肝癌、乳腺癌、结肠癌、结肠直肠癌、胰腺癌、子宫内膜癌、唾液腺癌、肾脏癌症、肝脏癌症、前列腺癌、阴门癌(vulval cancer)、甲状腺癌、肝癌、头颈癌、肺癌、腺癌、肾细胞癌、肝细胞癌或本文所述的其它癌症。

[0367] 在一些实施方式中,将本发明的 TRAIL-R2 特异性支架给予有此需要的对象(即,癌症患者)。在这种实施方式中,将包含 TRAIL-R2 特异性支架的无菌、无热原组合物给予有此需要的对象。可采用本领域熟知的体外和体内试验检测治疗效力,例如但不限于凋亡活性,利用膜联蛋白 V 结合的胱冬酶活化以及肿瘤负荷或体积的降低。

[0368] 在其它实施方式中,本发明的 TRAIL-R2 特异性支架可用于诊断和检测癌症或其它 TRAIL-R2 相关疾病。在这种实施方式中,本发明的 TRAIL-R2 特异性支架连接于检测试剂,例如但不限于放射性同位素、荧光或化学发光标记。这种连接的结合物可用于检测或诊断对象或取自所述对象的样品中癌症或 TRAIL-R2 相关疾病的方法。此外,TRAIL-R2 特异性支架可用于诊断和治疗包括人在内的哺乳动物的其它 TRAIL-R2 相关病理状态,例如免疫相关疾病。

[0369] 6.17.2 特异性 TRAIL-R2 结合序列

[0370] 为鉴定 TRAIL-R2 特异性支架,筛选了双-环文库和三环文库。许多克隆鉴定为特异性结合 TRAIL-R2。

[0371] 在一些实施方式中,本发明的 TRAIL-R2 特异性支架包含至少一个、至少两个、至少三个、至少四个、至少五个或至少六个结合 TRAIL-R2 的环序列。在一些实施方式中,TRAIL-R2 特异性支架包含至少一个、至少两个、至少三个、至少四个、至少五个或至少六个 TRAIL-R2 结合支架克隆的环序列,所述克隆选自 2F4、5B10、10D9、6F11、8B3、5E5、2H6、7G11 或 6C7。在其它实施方式中,TRAIL-R2 特异性支架包含至少一个选自 SEQ ID NO:126-143 的环序列。在其它实施方式中,TRAIL-R2 特异性支架包含至少一个选自 SEQ ID NO:126、128、130、132、134、136、138、140、或 142 的 BC 环序列。在其它实施方式中,TRAIL-R2 特异性支架包含至少一个选自 SEQ ID NO:127、129、131、133、135、137、139、141、或 143 的 FG 环序列。

在其它实施方式中, TRAIL-R2 特异性支架包含选自 SEQ ID NO :126、128、130、132、134、136、138、140、或 142 的 BC 环序列 ;和选自 SEQ ID NO :127、129、131、133、135、137、139、141、或 143 的 FG 环序列。在具体实施方式中, TRAIL-R2 特异性支架包含 SEQ ID NO :126 所示 BC 环序列和 127 所示 FG 环序列。在具体实施方式中, TRAIL-R2 特异性支架包含 SEQ ID NO :128 所示 BC 环序列和 SEQ IDNO :129 所示 FG 环序列。在具体实施方式中, TRAIL-R2 特异性支架包含 SEQID NO :130 所示 BC 环序列和 SEQ ID NO :131 所示 FG 环序列。在具体实施方式中, TRAIL-R2 特异性支架包含 SEQ ID NO :132 所示 BC 环序列和 SEQ IDNO :133 所示 FG 环序列。在具体实施方式中, TRAIL-R2 特异性支架包含 SEQID NO :134 所示 BC 环序列和 SEQ ID NO :135 所示 FG 环序列。在具体实施方式中, TRAIL-R2 特异性支架包含 SEQ ID NO :136 所示 BC 环序列和 SEQ IDNO :137 所示 FG 环序列。在另一具体实施方式中, TRAIL-R2 特异性支架包含 SEQ ID NO :140 所示 BC 环序列和 SEQ ID NO :141 所示 FG 环序列。在还有另一具体实施方式中, TRAIL-R2 特异性支架包含 SEQ ID NO :138 所示 BC 环序列和 SEQ ID NO :139 所示 FG 环序列。

[0372] 在其它实施方式中, 本发明还包括与特异性结合 TRAIL-R2 的支架竞争结合的支架, 所述 TRAIL-R2 结合物选自 2F4、5B10、10D9、6F11、8B3、5E5、2Hb、7G11、或 6C7。在其它实施方式中, 本发明还包括与特异性结合 TRAIL-R2 的支架竞争结合的支架, 所述 TRAIL-R2 结合物包含选自 SEQ ID NO :126、128、130、132、134、136、138、140、或 142 的一个 BC 环序列 ;和选自 SEQ ID NO :127、129、131、133、135、137、139、141、或 143 的一个 FG 环序列。可如本文在实施例 11 和 / 或 14 中所述或通过本领域已知的其它试验进行竞争试验。

[0373] 在其它实施方式中, TRAIL-R2 特异性支架包含至少一个、至少两个、至少三个、至少四个、至少五个或至少六个 TRAIL-R2 结合支架克隆的环序列, 所述克隆选自 1E03、2B04、1C12、1A03、1C10、1B12、2G03、2D3、1C06、2F08、1B04、3B11、1D8、2A12、1E05、2F02、1H05、2A11、或 1G11。在其它实施方式中, TRAIL-R2 特异性支架包含至少一个 SEQ ID NO :144-200 所示的环。在其它实施方式中, TRAIL-R2 特异性支架包含至少一个选自 SEQIDNO :144、147、150、153、156、159、162、165、168、171、174、177、180、183、186、189、192、195、或 198 的 BC 环序列。在其它实施方式中, TRAIL-R2 特异性支架包含至少一个选自 SEQ ID NO :145、148、151、154、157、160、163、166、169、172、175、178、181、194、187、190、193、196、或 199 的 DE 环序列。在其它实施方式中, TRAIL-R2 特异性支架包含至少一个选自 SEQID NO :146、149、152、155、158、161、164、167、170、173、179、182、185、188、191、194、197、或 200 的 FG 环序列。在进一步的实施方式中, TRAIL-R2 特异性支架包含至少一个选自 SEQ ID NO :144、147、150、153、156、159、162、165、168、171、174、177、180、183、186、189、192、195、或 198 的 BC 环序列 ;至少一个选自 SEQ ID NO :145、148、151、154、157、160、163、166、169、172、175、178、181、194、187、190、193、196、或 199 的 DE 环序列 ;和至少一个选自 SEQ ID NO :146、149、152、155、158、161、164、167、170、173、179、182、185、188、191、194、197、或 200 的 FG 环序列。

[0374] 在具体实施方式中, TRAIL-R2 特异性支架包含 SEQ ID NO :144 所示 BC 环序列、SEQ ID NO :145 所示 DE 环序列、和 SEQ ID NO :146 所示 FG 环序列。在具体实施方式中, TRAIL-R2 特异性支架包含 SEQ ID NO :147 所示 BC 环序列、SEQ ID NO :148 所示 DE 环序列、和 SEQ ID NO :149 所示 FG 环序列。在具体实施方式中, TRAIL-R2 特异性支架包含 SEQ ID NO :150 所示 BC 环序列、SEQ ID NO :151 所示 DE 环序列、和 SEQ ID NO :152 所示 FG 环序

列。在具体实施方式中, TRAIL-R2 特异性支架包含 SEQ ID NO :153 所示 BC 环序列、SEQ ID NO :154 所示 DE 环序列、和 SEQ ID NO :155 所示 FG 环序列。在具体实施方式中, TRAIL-R2 特异性支架包含 SEQ ID NO :165 所示 BC 环序列、SEQ ID NO :166 所示 DE 环序列、和 SEQ ID NO :167 所示 FG 环序列。在具体实施方式中, TRAIL-R2 特异性支架包含 SEQ ID NO :198 所示 BC 环序列、SEQ ID NO :199 所示 DE 环序列、和 SEQ ID NO :200 所示 FG 环序列。

[0375] 在其它实施方式中, 本发明还包括与特异性结合 TRAIL-R2 的支架竞争结合的支架, 所述 TRAIL-R2 结合物选自 1E03、2B04、1C12、1A03、1C10、1B12、2G03、2D3、1C06、2F08、1B04、3B11、1D8、2A12、1E05、2F02、1H05、2A11、或 1G11。在其它实施方式中, 本发明还包括与特异性结合 TRAIL-R2 的支架竞争结合的支架, 所述 TRAIL-R2 结合物包含选自 SEQ ID NO :144、147、150、153、156、159、162、165、168、171、174、177、180、183、186、189、192、195、或 198 的一个 BC 环序列 ; 选自 SEQ ID NO :145、148、151、154、157、160、163、166、169、172、175、178、181、194、187、190、193、196、或 199 的至少一个 DE 环序列 ; 和选自 SEQ ID NO :146、149、152、155、158、161、164、167、170、173、179、182、185、188、191、194、197、或 200 的至少一个 FG 环序列。可如本文在实施例 11 和 / 或 14 中所述或通过本领域已知的其它试验进行竞争试验。

[0376] 6.18 支架的使用方法

[0377] 本发明还提供利用支架灭活、抑制或消除细胞因子的方法。在一个实施方式中, 本发明方法可用于灭活、抑制或消除以下细胞因子中的至少一种 : TNF- α 、TGF- β 、C5a、fMLP、干扰素 α (包括亚型 1、2a、2b、4、4b、5、6、7、8、10、14、16、17 和 21)、干扰素 β 、干扰素 ω 、干扰素 γ 、白介素 IL-1-33、CCL1-28、CXCL 1-17、和 CX3CL1。

[0378] 本发明还提供利用支架使各种感染因子, 例如病毒、真菌、真核微生物和细菌失活的方法。在一些实施方式中, 本发明支架可用于使 RSV、hMPV、PIV 或流感病毒失活。在其它实施方式中, 本发明支架可用于使真菌病原体, 例如但不限于耐格里原虫 (Naegleria)、曲霉 (Aspergillus)、芽生菌 (Blastomyces)、组织胞浆菌 (Histoplasma)、假丝酵母 (Candida) 或癣菌 (Tinea) 属的成员失活。在其它实施方式中, 本发明支架可用于使真核微生物, 例如但不限于贾第鞭毛虫 (Giardia)、弓形虫 (Toxoplasma)、疟原虫 (Plasmodium)、锥虫 (Trypanosoma) 和阿米巴虫 (Entamoeba) 属的成员失活。在其它实施方式中, 本发明支架可用于使细菌病原体, 例如但不限于葡萄球菌 (Staphylococcus)、链球菌 (Streptococcus)、假单胞菌 (Pseudomonas)、梭菌 (Clostridium)、疏螺旋体 (Borrelia)、弧菌 (Vibro) 和奈瑟球菌 (Neisseria) 属的成员失活。

[0379] 本发明还提供利用支架蛋白作为诊断试剂的方法。本发明蛋白质可用于需要同时有效捕捉不同抗原的试剂盒或试剂中。

[0380] 本发明蛋白和包含本发明蛋白的组合物可用于许多目的, 例如作为各种慢性和急性疾病和病症, 包括但不限于癌症的治疗剂。可根据本发明方法预防、控制、治疗或缓解的癌症的例子包括但不限于 : 头、颈、眼、口、喉、食道、胸、骨、肺、结肠、直肠、胃、前列腺、乳腺、卵巢、肾、肝、胰腺和脑的癌症。其它癌症包括但不限于 : 白血病, 例如但不限于急性白血病, 急性淋巴细胞白血病、急性髓细胞白血病如成髓细胞性白血病、早幼粒细胞性白血病、粒单细胞性白血病、单核细胞性白血病、红白血病性白血病和骨髓增生异常综合征 ; 慢性白血病, 例如但不限于慢性髓细胞 (粒细胞) 性白血病、慢性淋巴细胞白血病、毛细胞白血病、真

性红细胞增多症；淋巴瘤，例如但不限于霍奇金病、非霍奇金病；多发性骨髓瘤，例如但不限于冒烟型多发性骨髓瘤、非分泌型骨髓瘤、骨硬化骨髓瘤、浆细胞白血病、孤立性浆细胞瘤和髓外浆细胞瘤；瓦尔登斯特伦巨球蛋白血症；意义不明的单克隆丙种球蛋白病；良性单克隆丙种球蛋白病，重链病，骨癌和结缔组织肉瘤，包括但不限于骨肉瘤、骨髓瘤骨病、多发性骨髓瘤、胆脂瘤诱导的骨肉瘤、佩吉特骨病、骨肉瘤、软骨肉瘤、尤因肉瘤、恶性巨细胞瘤、骨纤维肉瘤、脊索瘤、骨膜肉瘤、软组织肉瘤、脉管肉瘤（血管肉瘤）、纤维肉瘤、卡波西肉瘤、平滑肌肉瘤、脂肪肉瘤、淋巴管肉瘤、神经鞘瘤、横纹肌肉瘤和滑膜肉瘤；脑肿瘤，例如但不限于，胶质瘤、星形细胞瘤、脑干胶质瘤、室管膜瘤、少突神经胶质瘤、非胶质细胞肿瘤、听神经瘤、颅咽管瘤、髓母细胞瘤、脑膜瘤、松果体细胞瘤、松果体母细胞瘤和原发性脑淋巴瘤；乳腺癌包括但不限于腺癌、小叶（小细胞）癌、导管内癌、髓样乳腺癌、粘液性乳腺癌、管状乳腺癌、乳头状乳腺癌、佩吉特病（包括青少年佩吉特病）及炎性乳腺癌；肾上腺癌，例如但不限于嗜铬细胞瘤及肾上腺皮质癌；甲状腺癌，例如但不限于乳头状或滤泡状甲状腺癌、髓样甲状腺癌和未分化甲状腺癌；胰腺癌，例如但不限于，胰岛素瘤、胃泌素瘤、胰高血糖素、活性肠肽瘤、生长抑素分泌瘤、类癌瘤或胰岛细胞瘤；垂体肿瘤例如但不限于欣氏症、泌乳素分泌瘤、肢端肥大症和尿崩症；眼癌例如但不仅限于，如虹膜黑色素瘤、脉络膜黑色素瘤、脉络膜黑色素瘤、睫状体黑色素瘤和视网膜母细胞瘤；阴道癌，如鳞状细胞癌、腺癌和黑色素瘤；阴门癌如鳞状细胞癌、黑色素瘤、腺癌、基底细胞癌、肉瘤以及佩吉特病；子宫颈癌例如但不限于鳞状细胞癌和腺癌；子宫癌，例如但不限于子宫内膜癌和子宫肉瘤；卵巢癌例如但不仅限于卵巢表皮癌、交界性肿瘤、生殖细胞瘤和间质肿瘤；食道癌例如但不仅限于鳞状细胞癌、腺癌、腺样囊性癌、粘液表皮样癌、腺鳞癌、肉瘤、黑色素瘤、浆细胞瘤、疣状癌和燕麦细胞（小细胞）癌；胃癌例如但不限于腺癌、蕈伞型癌（息肉）、溃疡、表面扩散、弥漫扩散、恶性淋巴瘤、脂肪肉瘤、纤维肉瘤和肉瘤；结肠癌；直肠癌；肝癌，例如但不限于如肝细胞癌和肝母细胞瘤；胆囊癌，例如腺癌；胆管癌，例如但不限于乳头状，结节状和播散的；肺癌，如非小细胞肺癌、鳞状细胞癌（上皮细胞癌）、腺癌、大细胞癌和小细胞肺癌；睾丸癌，例如但不限于生发瘤、精原细胞瘤、未分化、经典（典型）、精母细胞性、非精细胞瘤、胚胎瘤、畸胎瘤、绒毛膜癌（卵黄囊瘤）；前列腺癌，例如但不限于腺癌、平滑肌肉瘤、横纹肌肉瘤；阴茎癌；口腔癌，例如但不限于鳞状细胞癌；基底癌；唾液腺癌包括但不限于腺癌、粘液表皮样癌和腺样囊性癌；咽癌，例如但不限于鳞状细胞癌和疣状；皮肤癌包括但不限于基底细胞癌、鳞状细胞癌和黑色素瘤、表面扩散性黑色素瘤、结节性黑色素瘤，恶性黑色素瘤痣、肢端多雀斑黑色素瘤；肾脏癌包括但不限于肾细胞癌、腺癌、肾上腺样瘤、纤维肉瘤癌症、移行细胞癌（肾盂和/或输尿管）；肾母细胞瘤；膀胱癌，例如但不限于移行细胞癌、鳞状细胞癌、腺癌、癌肉瘤。此外，癌症包括粘液肉瘤、骨源性肉瘤、内皮肉瘤、淋巴管内皮肉瘤、间皮瘤、滑膜瘤、血管母细胞瘤、表皮肉瘤、囊腺癌、支气管源性癌、汗腺癌、皮脂腺癌、乳头状癌和乳头状腺癌（此类疾病的综述参见Fishman等,1985,Medicine(医学),第二版,费城JBL公司(J.B.Lippincott Co., Philadelphia);Murphy等,1997, Informed Decisions: The Complete Book of Cancer Diagnosis, Treatment, and Recovery(知情决定:癌症诊断、治疗和康复全书),维金皮金,皮金图书美国公司,美国(Viking Penguin, Penguin Books U.S.A., inc., United States of America)。还考虑到,也可利用本发明方法和组合物治疗凋亡异常所致癌症。这类癌症可包括但不限于:滤泡淋巴瘤,含 p53 突变的癌症,激素依赖

性的乳腺肿瘤、前列腺肿瘤和卵巢肿瘤,以及癌前病变,如家族性腺瘤性息肉病和骨髓发育异常综合征。

[0381] 本发明蛋白和包含本发明蛋白的组合物可用于多种目的,例如,作为治疗各种慢性和急性疾病和病症的治疗剂,这些疾病和病症包括但不限于:自身免疫疾病和/或炎症性疾病。本文所述的本发明组合物和方法可用于预防或治疗自身免疫病症和/或炎症病症,包括但不限于:斑秃、强直性脊柱炎、抗磷脂综合征、自身免疫性阿狄森氏病、肾上腺的自身免疫性疾病、自身免疫性溶血性贫血、自身免疫性肝炎、自身免疫性卵巢炎和睾丸炎、舍格伦综合征、银屑病、动脉粥样硬化、糖尿病性和其它视网膜病变、晶状体后纤维组织增生、老年性黄斑变性、新生血管性青光眼、血管瘤、甲状腺增生(包括格拉夫斯病)、角膜和其它组织移植、慢性炎症、败血症、类风湿关节炎、腹膜炎、克罗恩病、再灌注损伤、败血症、内毒素休克、囊肿性纤维化、心内膜炎、银屑病、关节炎(如银屑病性关节炎)、过敏性休克、器官缺血、再灌注损伤、脊髓损伤和同种异体移植排斥反应、自身免疫性血小板减少症、贝切特病、大疱性类天疱疮、心肌病、乳糜泻-皮炎、慢性疲劳免疫功能障碍综合征(CFIDS)、慢性炎症性脱髓鞘性多发性神经病、丘-施二氏综合征、瘢痕性类天疱疮、CREST 综合征、冷凝集素病、克罗恩病、盘状狼疮、原发性混合型冷球蛋白血症、纤维肌痛-纤维肌炎、肾小球肾炎、格拉夫斯病、格林巴利综合征、桥本甲状腺炎、特发性肺纤维化、特发性血小板减少性紫癜(ITP)、IgA 神经病、青少年关节炎、扁平苔藓、红斑狼疮、美尼尔氏症、混合型结缔组织病、多发性硬化症、I 型或免疫介导糖尿病、重症肌无力、寻常性天疱疮、恶性贫血、多动脉炎、多软骨炎、多腺性综合征、风湿性多肌痛、多发性肌炎和皮肌炎、原发性丙种球蛋白血症、原发性胆汁性肝硬化、银屑病、银屑病性关节炎、雷诺现象、赖特尔综合征、类风湿关节炎、结节病、硬皮病、舍格伦综合征、僵人综合征、全身性红斑狼疮、红斑狼疮、多发性大动脉炎、颞动脉炎/巨细胞动脉炎、溃疡性结肠炎、葡萄膜炎、血管炎如皮炎疱疹样血管炎、白癜风和韦格纳肉芽肿。炎症性疾病的例子包括但不限于:哮喘、脑炎、炎性肠病、慢性阻塞性肺病(COPD)、变应性疾病、感染性休克、肺纤维化、未分化脊椎关节病变、未分化关节病、关节炎、炎性骨溶解和慢性病毒或细菌感染引起的慢性炎症。本发明组合物和方法可与用于预防、控制或治疗上述疾病的一种或多种常规疗法联用。

[0382] 本发明蛋白和包含本发明蛋白的组合物可用于多种目的,例如,作为治疗各种慢性和急性疾病和病症的治疗剂,所述疾病和病症包括但不限于:感染性疾病,包括病毒、细菌和真菌疾病。病毒病原体的例子包括但不限于:腺病毒科(如哺乳动物腺病毒属和禽腺病毒属)、疱疹病毒科(如单纯疱疹病毒 1、单纯疱疹病毒 2、单纯疱疹病毒 5 和单纯疱疹病毒 6)、光滑病毒科(如光滑病毒属、肠细菌 MS2、异轻小噬菌体属)、痘病毒科(如脊椎动物痘病毒亚科、副痘病毒属、禽痘病毒属、山羊痘病毒属、兔痘病毒属、猪痘病毒属、软疣痘病毒属和昆虫痘病毒亚科)、乳多空病毒科(如多瘤病毒属和乳头瘤病毒属)、副粘病毒科(如副粘病毒属、副流感病毒 1、麻疹病毒属(如麻疹病毒)、腮腺炎病毒属(如腮腺炎病毒)、肺病毒亚科(如肺病毒属、人呼吸道合胞病毒)和肺炎后病毒属(如禽肺病毒和人肺炎后病毒))、小核糖核酸病毒科(如肠道病毒属、鼻病毒属、肝病毒属(如人甲肝病毒)、心病毒属和口蹄疫病毒属)、呼肠孤病毒科(如正呼肠孤病毒属、环状病毒属、轮状病毒属、质型多角体病毒属、斐济病毒属、植物呼肠孤病毒属和水稻病毒属)、逆转录病毒科(如哺乳动物 B 型逆转录病毒属、哺乳动物 C 型逆转

录病毒属、禽 C 型逆转录病毒属、D 型逆转录病毒类群、BLV-HTLV 逆转录病毒属、慢病毒属（如人体免疫缺陷病毒 1 和人体免疫缺陷病毒 2）、泡沫病毒属）、黄病毒科（如丙型肝炎病毒）、肝 DNA 病毒科（如乙型肝炎病毒属）、披膜病毒科（例如 α 病毒属（如辛德毕斯病毒属）和风疹病毒属（如风疹病毒）、弹状病毒科（如水疱病毒属、狂犬病病毒属、短暂热病毒属、质型弹状病毒属和核型弹状病毒属）、沙粒病毒科（如沙粒病毒、淋巴细胞性脉络丛脑膜炎病毒、伊派病毒和拉沙病毒）和冠状病毒科（如冠状病毒属和环状病毒属）。细菌病原体的例子包括但不限于：水螺菌科 (*Aquaspirillum*)、固氮螺菌科 (*Azospirillum*)、固氮菌科 (*Azotobacteraceae*)、类杆菌科 (*Bacteroidaceae*)、巴尔通体 (*Bartonella*)、蛭弧菌科 (*Bdellovibrio*)、弯曲杆菌 (*Campylobacter*)、衣原体 (*Chlamydia*)（如肺炎衣原体 (*Chlamydia pneumoniae*)）、梭状芽胞杆菌 (*Clostridium*)、肠杆菌科 (*Enterobacteriaceae*)（如柠檬酸菌 (*Citrobacter*)、爱德华菌 (*Edwardsiella*)、产气肠杆菌 (*Enterobacter aerogenes*)、欧文菌 (*Erwinia*)、大肠杆菌 (*Escherichia coli*)、哈夫尼菌 (*Hafnia*)、克雷伯杆菌 (*Klebsiella*)、摩根菌 (*Morganella*)、普通变形杆菌 (*Proteus vulgaris*)、普罗威登斯菌 (*Providencia*)、沙门菌 (*Salmonella*)、粘质沙雷菌 (*Serratia marcescens*) 和弗氏志贺菌 (*Shigella flexneri*)）、加特纳菌科 (*Gardinerella*)、流感嗜血杆菌 (*Haemophilus influenzae*)、盐杆菌科 (*Halobacteriaceae*)、螺杆菌科 (*Helicobacter*)、军团菌科 (*Legionellaceae*)、李斯特菌 (*Listeria*)、甲基球菌科 (*Methylococcaceae*)、分枝杆菌 (*Mycobacteria*)（如结核分支杆菌 (*Mycobacterium tuberculosis*)）、奈瑟球菌科 (*Neisseriaceae*)、海洋螺菌科 (*Oceanospirillum*)、巴斯德菌科 (*Pasteurellaceae*)、肺炎球菌 (*Pneumococcus*)、假单胞菌 (*Pseudomonas*)、根瘤菌科 (*Rhizobiaceae*)、螺菌科 (*Spirillum*)、螺状菌科 (*Spirosomaceae*)、葡萄球菌属 (*Staphylococcus*)（如甲氧西林抗性金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*) 和化脓性葡萄球菌 (*Staphylococcus pyrogenes*)）、链球菌属 (*Streptococcus*)（如肠炎链球菌 (*Streptococcus enteritidis*)、粪链球菌 (*Streptococcus faeciae*) 和肺炎链球菌 (*Streptococcus pneumoniae*)）、蝙蝠弧菌螺杆菌科 (*Vampirovibr Helicobacter*) 和蝙蝠弧菌科 (*Vampirovibrio*)。真菌病原体的例子包括但不限于：犁头霉 (*Absidia*)（如伞状犁头霉 (*Absidia corymbifera*) 和分支犁头霉 (*Absidia ramosa*)）、曲霉 (*Aspergillus*)（如黄曲霉 (*Aspergillus flavus*)、烟曲霉 (*Aspergillus fumigatus*)、构巢曲霉 (*Aspergillus nidulans*)、黑曲霉 (*Aspergillus niger*) 和土曲霉 (*Aspergillus terreus*)）、蛙粪霉 (*Basidiobolus ranarum*)、皮炎芽生菌 (*Blastomyces dermatitidis*)、念珠菌 (*Candida*)（如白念珠菌 (*Candida albicans*)、光滑念珠菌 (*Candida glabrata*)、克氏念珠菌 (*Candida kerr*)、克鲁斯念珠菌 (*Candida krusei*)、近平滑念珠菌 (*Candida parapsilosis*)、假热带念珠菌 (*Candida pseudotropicalis*)、季也蒙假丝酵母 (*Candida quillermondii*)、皱褶念珠菌 (*Candida rugosa*)、星状念珠菌 (*Candida stellatoidea*) 和热带念珠菌 (*Candida tropicalis*)）、粗球孢子菌 (*Coccidioides immitis*)、耳霉 (*Conidiobolus*)、新形隐球菌 (*Cryptococcus neoforms*)、小克银汉霉 (*Cunninghamella*)、皮肤癣菌、荚膜组织胞浆菌 (*Histoplasma capsulatum*)、石膏样小孢子菌 (*Microsporum gypsum*)、渺小毛霉菌 (*Mucor pusillus*)、巴西副球孢子菌 (*Paracoccidioides brasiliensis*)、波氏假性阿利什利菌 (*Pseudallescheria boydii*)、西伯鼻孢子菌 (*Rhinosporidium seeberi*)、卡氏肺囊虫

(*Pneumocystis carinii*)、根霉 (*Rhizopus*) (如无根根霉菌 (*Rhizopus arrhizus*)、稻根霉菌 (*Rhizopus oryzae*) 和小孢根霉 (*Rhizopus microsporus*))、酵母菌 (*Saccharomyces*)、申克孢子丝菌 (*Sporothrix schenckii*)、接合菌、以及诸如接合菌纲 (*Zygomycetes*)、子囊菌纲 (*Ascomycetes*)、担子菌纲 (*Basidiomycetes*)、半知菌纲 (*Deuteromycetes*) 和卵菌纲 (*Oomycetes*) 等真菌纲。

[0383] 在另一实施方式中,本发明提供用于预防、控制、治疗或缓解癌症、自身免疫疾病、炎性或感染性疾病或其一种或多种症状的方法,所述方法包括将一剂预防或治疗有效量的一种或多种本发明支架单独与外科手术组合给予、或进一步与标准或实验性化疗、激素疗法、生物疗法/免疫疗法和/或放疗组合给予有此需要的对象。根据这些实施方式,用于预防、控制、治疗或缓解癌症、自身免疫疾病、炎性或感染性疾病或其一种或多种症状的本发明支架可与或不与某部分(如治疗剂或药物)偶联或融合。

[0384] 本发明提供用于预防、控制、治疗或缓解癌症、自身免疫疾病、炎性或感染性疾病或其一种或多种症状的方法,所述方法包括联合给予有此需要的对象一种或多种本发明支架和一种或多种非癌症治疗剂(也称为非癌症疗法)。此类药剂的例子包括但不限于:止吐剂、抗真菌剂、抗细菌剂如抗生素、抗炎剂和抗病毒剂。止吐剂的非限制性例子包括美托哌丙嗪和甲氧氯普胺。抗真菌剂的非限制性例子包括唑类药物、咪唑、三唑、多烯、两性霉素和嘧啶(ryrimidine)。抗细菌剂的非限制性例子包括更生霉素、博莱霉素、红霉素、青霉素、光神霉素、头孢菌素、亚胺培南、氨曲南、万古霉素、环丝氨酸、杆菌肽、氯霉素、克林霉素、四环素、链霉素、妥布霉素、庆大霉素、丁胺卡那霉素、卡那霉素、新霉素、壮观霉素、甲氧苄啶、诺氟沙星、利福平、多粘菌素、两性霉素B、制霉菌素、酮康唑、异烟肼、甲硝唑和喷他脒。抗病毒剂的非限制性例子包括核苷类似物(如齐多夫定、阿昔洛韦、更昔洛韦、阿糖腺苷、碘苷、三氟尿苷和利巴韦林)、麟甲酸、金刚烷胺、金刚乙胺、沙奎那韦、茚地那韦、利托那韦、干扰素(“IFN”)- α 、 β 或 γ 以及 AZT。抗炎剂的非限制性例子包括非甾体抗炎药(“NSAID”)、类固醇消炎药、 β -激动剂、抗胆碱能药剂和甲基黄嘌呤。

[0385] 在另一实施方式中,本发明包含能够抑制癌细胞表型的组合物。在一个实施方式中,癌细胞的表型是细胞生长、细胞粘着、细胞粘着丧失、受体(例如但不限于 Eph)表达降低、受体(例如但不限于 Eph)表达升高、转移潜能、细胞周期抑制、受体酪氨酸激酶活化/抑制或其它。

[0386] 在一个实施方式中,本发明包括能治疗慢性炎症的组合物。在一个实施方式中,本发明组合物可用于靶向免疫细胞以便破坏或使其失活。在一个实施方式中,该组合物可用于靶向活化的 T 细胞、休眠的 T 细胞、B 细胞、嗜中性粒细胞、嗜酸性粒细胞、嗜碱性粒细胞、肥大细胞或树突细胞。在另一实施方式中,本发明包括能够降低免疫细胞功能的组合物。在另一实施方式中,该组合物能够消除免疫细胞的功能。

[0387] 在另一实施方式中,本发明包括能够抑制或降低血管生成的组合物。在另一实施方式中,血管生成与肿瘤生长、类风湿性关节炎、SLE、舍格伦综合征等相关。

[0388] 在另一实施方式中,本发明包括可用于治疗胃肠道疾病的组合物。本发明支架在低 pH 条件下显示高水平的稳定性。低 pH 下的稳定性提示该组合物适于口服给予以供各种胃肠病症,例如肠易激综合征、胃食管反流、肠假性梗阻、倾倒综合征、难治性恶心、消化性溃疡、阑尾炎、缺血性结肠炎、溃疡性结肠炎、胃炎、幽门螺杆菌 (*Helico pylori*) 疾病、克罗

恩病、惠普尔病、口炎性腹泻、憩室炎、憩室病、吞咽困难、食管裂孔疝、感染性食道疾病、呃逆、反刍等。

[0389] 本发明还提供组合物和利用这种组合物预防、治疗、减轻或缓解疾病及其症状的方法。本发明支架可与适于预防、治疗、减轻或缓解疾病或其症状的常规治疗联用。示范性常规治疗可见 Physician's Desk Reference (医师案头参考) (第 56 版, 2002 和第 57 版, 2003)。在一些实施方式中, 本发明支架可以与利用生物物质 (抗体或肽)、小分子的化疗、放疗、免疫疗法或本领域抑制的另一中治疗联用。在一些实施方式中, 组合治疗一起给予。在其它实施方式中, 组合治疗分别给予。

[0390] 本发明还提供诊断疾病的方法。结合疾病相关特定靶标的本发明支架可用于诊断所述疾病的方法中。在一个实施方式中, 本发明支架用于诊断对象中疾病的方法, 所述方法包括获得该对象的样品, 在允许靶标: 支架形成相互作用的条件下将所述样品中的靶标与支架接触, 鉴定靶标: 支架复合物, 藉此检测该样品中的所述靶标。在一些实施方式中, 所述靶标是疾病相关抗原。在另一实施方式中, 所述靶标是细胞因子、炎症介质和胞内抗原、自体抗原、非自体抗原、核内抗原、细胞表面抗原、细菌抗原、病毒抗原或真菌抗原。在其它实施方式中, 待诊断的疾病如本文所述。

[0391] 本发明还提供使特定靶标成像的方法。在一个实施方式中, 本发明支架偶联于成像剂, 例如绿色荧光蛋白、其它荧光标签 (Cy3、Cy5、罗丹明等)、生物素, 或者方法中可用放射性核素使特定靶标的存在、位置或进展成像。在一些实施方式中, 使包含本发明支架的靶标成像的方法在体外进行。在其它实施方式中, 使包含本发明支架的靶标成像的方法在体内进行。在其它实施方式中, 使包含本发明支架的靶标成像的方法通过 MRI、PET 扫描、X-射线、荧光检测或通过本领域已知的其它检测方法进行。

[0392] 本发明还提供利用本发明支架监测疾病进展、复发、治疗或缓解的方法。在一个实施方式中, 通过本文所述利用本发明支架来成像、诊断或接触化合物 / 靶标的方法来实施监测疾病进展、复发、治疗或缓解的方法。

[0393] 6.19 试剂盒

[0394] 本发明还包括装有本发明组合物 (例如支架) 和使用说明书的试剂盒。该试剂盒还可装有至少一种其它试剂, 或者一种或多种本发明其它支架。试剂盒通常包括表示该试剂盒内含物的预期应用的标签。术语“标签”包括在试剂盒上或随试剂盒提供的任何书面或记录材料, 或者与试剂盒相伴。

[0395] 6.20 等价方式

[0396] 仅采用常规实验, 本领域技术人员即可知道或能确定本文所述的本发明特定实施方式的许多等价方式。这种等价方式应包括在以下权利要求中。

[0397] 如同各份出版物、专利或专利申请专门且单独表示通过引用纳入本文的程度一样, 本说明书述及的所有出版物、专利和专利申请通过引用纳入本文。此外, 2007 年 10 月 31 日提交的美国临时申请号 60/984, 209 出于所有目的通过引用全文纳入本文。

[0398] 6.21 示范性实施方式:

[0399] 1. 一种重组、非天然产生的多肽支架, 其包含:

[0400] I. 与衍生自天然产生的蛋白质序列的多个环区域序列相连的多个 β 链结构域,

[0401] II. 其中一个或多个所述环区域序列因天然产生的蛋白质序列中相应环序列的至

少一个氨基酸的缺失、取代或添加而改变;和

[0402] III. 其中该多肽支架的 β 链结构域与 SEQ ID NO:1 所示天然产生蛋白质序列的相应结构域序列有至少 50%、至少 60%、至少 70%、至少 80%或至少 90%同源性。

[0403] 2. 如实施方式 1 所述的支架,其中,所述多个 β 链是至少 7 个链。

[0404] 3. 如实施方式 1 所述的支架,其中,所述多个环区域是至少 6 个区域。

[0405] 4. 如实施方式 1 所述的支架,其中,所述支架包含各自指定为 A、B、C、D、E 和 F 的 7 个 β 链,和连接各 β 链并指定为 AB、BC、CD、DE、EF 和 FG 环的 6 个环区域。

[0406] 5. 如实施方式 4 所述的支架,其中,所述支架包含 SEQ ID NO:201 所示 AB 环序列, SEQ ID NO:202 所示 BC 环序列, SEQ ID NO:203 所示 CD 环序列, SEQ ID NO:204 所示 DE 环序列, SEQ ID NO:205 所示 EF 环序列,和 SEQ IDNO:206 所示 FG 环序列。

[0407] 6. 如实施方式 4 所述的支架,其中,所述支架包含 SEQ ID NO:207 所示 AB 环序列, SEQ ID NO:202 所示 BC 环序列, SEQ ID NO:203 所示 CD 环序列, SEQ ID NO:208 所示 DE 环序列, SEQ ID NO:209 所示 EF 环序列,和 SEQ IDNO:206 所示 FG 环序列。

[0408] 7. 如实施方式 1 所述的支架,其中,所述 β 链结构域包含 SEQ ID NO:1 编码的多肽序列。

[0409] 8. 如实施方式 5 或 6 所述的支架,其中,所述环区域序列包含 BC 和 FG 环。

[0410] 9. 如实施方式 8 所述的支架,其中,所述 BC 环包含具有 S-X-a-X-b-X-X-X-G 所示共有序列的 9 个氨基酸,其中,X 表示任何氨基酸,其中,(a) 表示脯氨酸或丙氨酸,其中,(b) 表示丙氨酸或甘氨酸。

[0411] 10. 如实施方式 8 所述的支架,其中,所述 BC 环包含具有 S-P-c-X-X-X-X-X-X-T-G 所示共有序列的 11 个氨基酸,其中,X 表示任何氨基酸,其中,(c) 表示脯氨酸、丝氨酸或甘氨酸。

[0412] 11. 如实施方式 8 所述的支架,其中,所述 BC 环包含具有 A-d-P-X-X-X-e-f-X-I-X-G 所示共有序列的 12 个氨基酸,其中,X 表示任何氨基酸,其中,(d) 表示脯氨酸、谷氨酸或赖氨酸,其中,(e) 表示天冬酰胺或甘氨酸,其中,(f) 表示丝氨酸或甘氨酸。

[0413] 12. 如实施方式 8 所述的支架,其中,所述 FG 环包含具有 X-a-X-X-G-X-X-X-S 所示共有序列的 9 个氨基酸,其中,X 表示任何氨基酸,其中,(a) 表示天冬酰胺、苏氨酸或赖氨酸。

[0414] 13. 如实施方式 8 所述的支架,其中,所述 FG 环包含具有 X-a-X-X-X-X-b-N-P-A 所示共有序列的 10 个氨基酸,其中,X 表示任何氨基酸,其中,(a) 表示天冬酰胺、苏氨酸或赖氨酸,其中,(b) 表示丝氨酸或甘氨酸。

[0415] 14. 如实施方式 8 所述的支架,其中,所述 FG 环包含具有 X-a-X-X-G-X-X-S-N-P-A 所示共有序列的 11 个氨基酸,其中,X 表示任何氨基酸,其中,(a) 表示天冬酰胺、苏氨酸或赖氨酸。

[0416] 15. 如实施方式 4-14 中任一项所述的支架,其中,所述环区域序列还包含 DE 环。

[0417] 16. 如实施方式 15 所述的支架,其中,所述 DE 环包含具有 X-X-X-X-X-X 所示共有序列的 6 个氨基酸,其中,X 表示任何氨基酸。

[0418] 17. 如实施方式 4-14 中任一项所述的支架,其中,所述环区域序列还包含 AB 环。

[0419] 18. 如实施方式 7 所述的支架,其中,所述 AB 环包含具有 K-X-X-X-X-a 所示共有序列的 7 个氨基酸,其中,X 表示天冬酰胺、天冬氨酸、组氨酸、酪氨酸、异亮氨酸、缬氨酸、亮氨酸、苯丙氨酸、苏氨酸、丙氨酸、脯氨酸或丝氨酸,其中,(a) 表示丝氨酸、苏氨酸、丙氨酸或甘氨酸。

[0420] 19. 如实施方式 18 所述的支架,其中,所述 AB 环包含具有 K-X-X-X-X-X-X-a 所示共有序列的 9 个残基,其中,X 表示天冬酰胺、天冬氨酸、组氨酸、酪氨酸、异亮氨酸、缬氨酸、亮氨酸、苯丙氨酸、苏氨酸、丙氨酸、脯氨酸或丝氨酸,其中,(a) 表示丝氨酸、苏氨酸、丙氨酸或甘氨酸。

[0421] 20. 如实施方式 4-14 中任一项所述的支架,其中,所述环区域序列还包含 CD 环。

[0422] 21. 如实施方式 20 所述的支架,其中,所述 CD 环包含 7、8 或 9 个残基,其中,CD 环中的各残基经随机化,其中,各残基可以是天冬酰胺、天冬氨酸、组氨酸、酪氨酸、异亮氨酸、缬氨酸、亮氨酸、苯丙氨酸、苏氨酸、丙氨酸、脯氨酸或丝氨酸。

[0423] 22. 如实施方式 4-14 中任一项所述的支架,其中,所述环区域序列还包含 EF 环。

[0424] 23. 如实施方式 22 所述的支架,其中,所述 EF 环包含具有 X-b-L-X-P-X-c-X 所示共有序列的 8 个残基,其中,X 表示天冬酰胺、天冬氨酸、组氨酸、酪氨酸、异亮氨酸、缬氨酸、亮氨酸、苯丙氨酸、苏氨酸、丙氨酸、脯氨酸或丝氨酸,其中,(b) 表示天冬酰胺、赖氨酸、精氨酸、天冬氨酸、谷氨酸或甘氨酸,其中,(c) 表示异亮氨酸、苏氨酸、丝氨酸、缬氨酸、丙氨酸或甘氨酸。

[0425] 24. 如实施方式 1-14 中任一项所述的支架,其中,所述支架还包含至少一个二硫键。

[0426] 25. 如实施方式 24 所述的支架,其中,所述二硫键在 A 链和 B 链之间形成连接。

[0427] 26. 如实施方式 24 所述的支架,其中,所述二硫键在 D 链和 E 链之间形成连接。

[0428] 27. 如实施方式 24 所述的支架,其中,所述二硫键在 F 链和 G 链之间形成连接。

[0429] 28. 如实施方式 24 所述的支架,其中,所述二硫键在 C 链和 F 链之间形成连接。

[0430] 29. 如实施方式 1-28 中任一项所述的支架,其中,所述支架还包含至少两个二硫键。

[0431] 30. 如实施方式 29 所述的支架,其中,所述二硫键在 F 链和 G 链之间形成第一连接,在 C 链和 F 链之间形成第二连接。

[0432] 31. 如实施方式 24 或 29 所述的支架,其中,所述至少一个二硫键在 β 链结构域中。

[0433] 32. 如实施方式 24 或 29 所述的支架,其中,所述至少一个二硫键在环区域中。

[0434] 33. 如实施方式 15 所述的支架,其中,所述支架包含对应于 Tn3^{SS1}(SEQ ID NO:64)、Tn3^{SS2}(SEQ ID NO:210)、Tn3^{SS3}(SEQ ID NO:65) 或 Tn3^{SS4}(SEQ ID NO:66) 的序列。

[0435] 34. 如实施方式 17 所述的支架,其中,所述支架包含对应于 Tn3^{SS3+4}(SEQ ID NO:67) 的序列。

[0436] 35. 如实施方式 1-34 中任一项所述的支架,其中,所述支架结合靶标。

[0437] 36. 如实施方式 35 所述的支架,其中,所述支架结合所述靶标的亲和力 (K_D) 是至少 100 μ M。

[0438] 37. 如实施方式 36 所述的支架,其中,所述靶标是细胞表面抗原、可溶性抗原、固

定化抗原、免疫静止抗原、胞内抗原、核内抗原、自体抗原、非自体抗原、癌症抗原、细菌抗原或病毒抗原。

[0439] 38. 如实施方式 36 所述的支架,其中,在 pH 7.0 的 20mM 磷酸钠中,通过示差扫描量热法 (DSC) 检测到所述支架显示至少 40°C 的热解链温度 (T_m)。

[0440] 39. 如实施方式 36 所述的支架,其中,在相似实验条件下,与工程改造前的同一支架相比,在脲变性实验中检测到所述支架显示 C_m 增加至少 10%。

[0441] 40. 如实施方式 36 所述的支架,其中,在相似实验条件下,与工程改造前的同一支架相比,在脲变性实验中检测到所述支架显示 C_m 增加至少 10%。

[0442] 41. 如实施方式 36 所述的支架,其中,在相似实验条件下,与工程改造前的同一支架相比,所述支架显示对蛋白酶降解的耐受性增加至少 10%。

[0443] 42. 如实施方式 36 所述的支架,其中,所述支架偶联于异源物质,其中,所述物质选自另一支架、聚乙二醇 (PEG)、人血清白蛋白 (HSA)、抗体的 Fc 区、IgG 分子、结合肽、细胞毒性药物、放射性标记、成像剂、His- 标签、生物素、Flag- 标签、核酸或细胞因子。

[0444] 43. 一种多聚支架,其包含至少两个实施方式 36 所述的支架。

[0445] 44. 如实施方式 43 所述的多聚支架,其中,所述多聚支架还包含表位结合结构域,其中,所述表位结合结构域选自抗体、抗体片段、双抗体、scFv、Fab、Fv、结合肽。

[0446] 45. 如实施方式 43 所述的多聚支架,其中,所述表位结合结构域对不同于所述支架的靶标具有特异性。

[0447] 46. 如实施方式 43 所述的多聚支架,其中,所述表位结合结构域对与所述支架相同的靶标具有特异性。

[0448] 47. 如实施方式 43-46 中任一项所述的多聚支架,其中,所述支架由另一支架、IgG 分子或其片段、Fc 区、二聚结构域、化学交联、二硫键或氨基酸接头连接。

[0449] 48. 一种分离的核酸分子,其编码实施方式 1-47 中任一项所述的多聚支架。

[0450] 49. 一种表达载体,其操作性连接于实施方式 48 所述的核酸。

[0451] 50. 一种宿主细胞,其包含实施方式 49 所述的载体。

[0452] 51. 一种多肽展示文库,其包含实施方式 36 所述的支架,各支架包含与衍生自天然产生的蛋白质序列的多个环区域序列相连的多个 β 链结构域,其中,一个或多个所述环区域序列因天然产生的蛋白质序列中相应环序列的至少一个氨基酸的缺失、取代或添加而改变;和其中,该多肽支架的 β 链结构域与 SEQ ID NO:1 所示天然产生蛋白质序列的相应结构域序列有至少 50% 同源性。

[0453] 52. 如实施方式 51 所述的文库,其中,所述支架包含因天然产生的蛋白质序列中相应环序列的至少一个氨基酸的缺失、取代或添加而改变的至少两个环区域序列。

[0454] 53. 如实施方式 52 所述的文库,其中,所述两个环区域序列选自 BC/DE、BC/FG、DE/FG、AB/CD、AB/EF 或 CD/ED 环。

[0455] 54. 如实施方式 53 所述的文库,其中,所述环区域序列包含 BC 和 FG 环。

[0456] 55. 如实施方式 53 所述的文库,其中,所述 BC 环包含具有 S-X-a-X-b-X-X-X-G 所示共有序列的 9 个氨基酸,其中,X 表示任何氨基酸,其中,(a) 表示脯氨酸或丙氨酸,其中,(b) 表示丙氨酸或甘氨酸。

[0457] 56. 如实施方式 53 所述的文库,其中,所述 BC 环包含具有 S-P-c-X-X-X-X-X-X-T-G

所示共有序列的 11 个氨基酸,其中,X 表示任何氨基酸,其中,(c) 表示脯氨酸、丝氨酸或甘氨酸。

[0458] 57. 如实施方式 53 所述的文库,其中,所述 BC 环包含具有 A-d-P-X-X-X-e-f-X-I-X-G 所示共有序列的 12 个氨基酸,其中,X 表示任何氨基酸,其中,(d) 表示脯氨酸、谷氨酸或赖氨酸,其中,(e) 表示天冬酰胺或甘氨酸,其中,(f) 表示丝氨酸或甘氨酸。

[0459] 58. 如实施方式 53 所述的文库,其中,所述 FG 环包含具有 X-a-X-X-G-X-X-X-S 所示共有序列的 9 个氨基酸,其中,X 表示任何氨基酸,其中,(a) 表示天冬酰胺、苏氨酸或赖氨酸。

[0460] 59. 如实施方式 53 所述的文库,其中,所述 FG 环包含具有 X-a-X-X-X-X-b-N-P-A 所示共有序列的 10 个氨基酸,其中,X 表示任何氨基酸,其中,(a) 表示天冬酰胺、苏氨酸或赖氨酸,其中,(b) 表示丝氨酸或甘氨酸。

[0461] 60. 如实施方式 53 所述的文库,其中,所述 FG 环包含具有 X-a-X-X-G-X-X-S-N-P-A 所示共有序列的 11 个氨基酸,其中,X 表示任何氨基酸,其中,(a) 表示天冬酰胺、苏氨酸或赖氨酸。

[0462] 61. 如实施方式 52 所述的文库,其中,所述环区域序列还包含 DE 环。

[0463] 62. 如实施方式 61 所述的文库,其中,所述 DE 环包含具有 X-X-X-X-X-X 所示共有序列的 6 个氨基酸,其中,X 表示任何氨基酸。

[0464] 63. 如实施方式 52 所述的文库,其中,所述环区域序列还包含 AB 环。

[0465] 64. 如实施方式 63 所述的文库,其中,所述 AB 环包含具有 K-X-X-X-X-X-a 所示共有序列的 7 个氨基酸,其中,X 表示天冬酰胺、天冬氨酸、组氨酸、酪氨酸、异亮氨酸、缬氨酸、亮氨酸、苯丙氨酸、苏氨酸、丙氨酸、脯氨酸或丝氨酸,其中,(a) 表示丝氨酸、苏氨酸、丙氨酸或甘氨酸。

[0466] 65. 如实施方式 63 所述的文库,其中,所述 AB 环包含具有 K-X-X-X-X-X-X-a 所示共有序列的 9 个残基,其中,X 表示天冬酰胺、天冬氨酸、组氨酸、酪氨酸、异亮氨酸、缬氨酸、亮氨酸、苯丙氨酸、苏氨酸、丙氨酸、脯氨酸或丝氨酸,其中,(a) 表示丝氨酸、苏氨酸、丙氨酸或甘氨酸。

[0467] 66. 如实施方式 52 所述的文库,其中,所述环区域序列还包含 CD 环。

[0468] 67. 如实施方式 66 所述的文库,其中,所述 CD 环包含 7、8 或 9 个残基,其中,CD 环中的各残基经随机化,其中,各残基可以是天冬酰胺、天冬氨酸、组氨酸、酪氨酸、异亮氨酸、缬氨酸、亮氨酸、苯丙氨酸、苏氨酸、丙氨酸、脯氨酸或丝氨酸。

[0469] 68. 如实施方式 52 所述的文库,其中,所述环区域序列还包含 EF 环。

[0470] 69. 如实施方式 68 所述的文库,其中,所述 EF 环包含具有 X-b-L-X-P-X-c-X 所示共有序列的 8 个残基,其中,X 表示天冬酰胺、天冬氨酸、组氨酸、酪氨酸、异亮氨酸、缬氨酸、亮氨酸、苯丙氨酸、苏氨酸、丙氨酸、脯氨酸或丝氨酸,其中,(b) 表示天冬酰胺、赖氨酸、精氨酸、天冬氨酸、谷氨酸或甘氨酸,其中,(c) 表示异亮氨酸、苏氨酸、丝氨酸、缬氨酸、丙氨酸或甘氨酸。

[0471] 70. 如实施方式 51 所述的文库,其中,所述支架包含因天然产生的蛋白质序列中相应环序列的至少一个氨基酸的缺失、取代或添加而改变的至少三个环区域序列。

- [0472] 71. 如实施方式 70 所述的文库,其中,所述环区域序列包含 BC、DE 和 FG 环。
- [0473] 72. 如实施方式 70 所述的文库,其中,所述环区域序列包含 AB、CD 和 EF 环。
- [0474] 73. 如实施方式 70 所述的文库,其中,所述环区域序列包含选自下组的任意三个环:AB、BC、CD、DE、EF 和 FG 环。
- [0475] 74. 如实施方式 38 所述的多肽展示文库,其中,所述多肽展示在核糖体、细菌噬菌体、病毒、细菌或酵母菌表面。
- [0476] 75. 一种分离核酸分子的集合,所述核酸分子编码实施方式 51-74 中任一项所述文库。
- [0477] 76. 一种表达载体,其操作性连接于实施方式 75 所述的核酸分子。
- [0478] 77. 一种获得结合靶标的多肽支架的方法,所述方法包括 (a) 在允许支架:靶配体复合物形成的条件下将靶配体与实施方式 38 所述文库接触,和 (b) 从该复合物获得结合靶配体的支架。
- [0479] 78. 如实施方式 77 所述的方法,还包括使步骤 (b) 中获得的蛋白质的所述支架的至少一个环随机化从而产生进一步随机化的支架和利用所述进一步随机化的支架重复步骤 (a) 和 (b)。
- [0480] 79. 如实施方式 78 所述的方法,其中,所述方法包括至少两个环。
- [0481] 80. 如实施方式 78 所述的方法,其中,所述方法包括至少三个环。
- [0482] 81. 如实施方式 78 所述的方法,还包括使步骤 (b) 中获得的蛋白质的所述支架的至少一个环随机化从而产生进一步随机化的支架和利用所述进一步随机化的支架重复步骤 (a) 和 (b),其中,所述步骤 (a) 和 (b) 的重复还包括接触与步骤 (a) 和 (b) 的所述第一操作的靶标不同的靶标。
- [0483] 82. 如实施方式 78 所述的方法,还包括使步骤 (b) 中获得的蛋白质的所述支架的至少一个环随机化从而产生进一步随机化的支架,其中,所述环不在所述文库中随机化,和利用所述进一步随机化的支架重复步骤 (a) 和 (b)。
- [0484] 83. 如实施方式 78 所述的方法,还包括使步骤 (b) 中获得的蛋白质的所述支架的至少一个环随机化从而产生进一步随机化的支架,其中,所述环不在所述文库中随机化,和利用所述进一步随机化的支架重复步骤 (a) 和 (b),其中,步骤 (a) 和 (b) 的所述重复还包括接触与步骤 (a) 和 (b) 的所述第一操作的靶标不同的靶标。
- [0485] 84. 如实施方式 77-83 中任一项所述的方法,其中,所述方法包括选自 BC、DE 或 FG 环的第一随机化环和未在所述文库中随机化的选自 AB、CD 或 EF 环的第二环。
- [0486] 85. 如实施方式 77-83 中任一项所述的方法,其中,所述方法包括选自 AB、CD、EF 环的第一随机化环和未在所述文库中随机化的选自 BC、DE 或 FG 环的第二环。
- [0487] 86. 如实施方式 77-83 中任一项所述的方法,其中,所述方法还包括使步骤 (b) 中获得的蛋白质的所述支架的至少一个 β 链随机化从而产生进一步随机化的支架和利用所述进一步随机化的支架重复步骤 (a) 和 (b)。
- [0488] 87. 如实施方式 86 所述的方法,其中,所述方法还包括使步骤 (b) 中获得的蛋白质的所述支架的至少两个、三个、四个、五个、六个或七个 β 链随机化从而产生进一步随机化的支架和利用所述进一步随机化的支架重复步骤 (a) 和 (b)。
- [0489] 88. 一种获得结合靶标的至少两种支架的方法,所述方法包括 (a) 在允许支架:靶

配体复合物形成的条件下将靶配体与实施方式 38 所述文库接触, (b) 将所述支架与交联剂结合, 其中, 所述支架的交联引发可检测反应, 和 (c) 从该复合物获得结合靶配体的所述支架。

[0490] 89. 如实施方式 88 所述的方法, 其中, 所述支架识别相同表位。

[0491] 90. 如实施方式 88 所述的方法, 其中, 所述支架识别不同表位。

[0492] 91. 如实施方式 88 所述的方法, 其中, 所述交联剂选自抗体、抗体片段、二聚化基序、化学交联剂、结合肽或表位标签。

[0493] 92. 一种检测样品中化合物的方法, 所述方法包括在允许化合物: 支架复合物形成的条件下将所述样品与实施方式 1-47 中任一项所述支架接触并检测所述复合物, 藉此检测所述样品中的所述化合物。

[0494] 93. 一种捕捉样品中化合物的方法, 所述方法包括在允许化合物: 支架复合物形成的条件下将所述样品与固定化的实施方式 1-47 中任一项所述支架接触并除去所述固定化支架, 藉此捕捉所述样品中的所述化合物。

[0495] 94. 一种无菌、无热原组合物, 其包含实施方式 1-47 中任一项所述多肽。

[0496] 95. 一种药物组合物, 其包含实施方式 1-47 中任一项所述多肽。

[0497] 96. 一种利用实施方式 95 所述组合物预防、治疗、控制或缓解患者中疾病的方法。

[0498] 97. 一种利用实施方式 95 或所述组合物诊断患者中疾病或使之成像的方法。

[0499] 98. 如实施方式 96 所述的方法, 其中, 所述方法还包括其它治疗, 其中, 所述治疗是免疫疗法、生物学疗法、化疗、放疗或小分子药物治疗。

[0500] 99. 如实施方式 96-98 中任一项所述的方法, 其中, 所述疾病是自身免疫疾病、炎症性疾病、增生性疾病、感染性疾病、呼吸道疾病、胃肠疾病、糖尿病、狼疮或肥胖症。

[0501] 100. 一种重组、非天然产生的多肽支架, 其包含:

[0502] I. 与衍生自天然产生的蛋白质序列的多个预测的环区域序列相连的多个预测的 β 链结构域,

[0503] II. 其中, 一个或多个所述环区域序列因天然产生的蛋白质序列中相应环序列的至少一个氨基酸的缺失、取代或添加而改变; 和

[0504] III. 其中, 该多肽支架的 β 链结构域与 SEQ ID NO:2 所示天然产生蛋白质序列的相应结构域序列有至少 50%、至少 60%、至少 70%、至少 80% 或至少 90% 同源性。

[0505] 101. 如实施方式 100 所述的支架, 其中, 所述 β 链结构域包含 SEQ ID NO.2 编码的多肽序列。

[0506] 102. 一种重组、非天然产生的多肽支架, 其包含:

[0507] I. 与衍生自天然产生的蛋白质序列的多个预测的环区域序列相连的多个预测的 β 链结构域,

[0508] II. 其中, 一个或多个所述环区域序列因天然产生的蛋白质序列中相应环序列的至少一个氨基酸的缺失、取代或添加而改变; 和

[0509] III. 其中, 该多肽支架的 β 链结构域与 SEQ ID NO:3 或 4 所示天然产生蛋白质序列的相应结构域序列有至少 50%、至少 60%、至少 70%、至少 80% 或至少 90% 同源性。

[0510] 103. 如实施方式 102 所述的支架, 其中, 所述 β 链结构域包含 SEQ ID NO.3 或 4 编码的蛋白质序列。

- [0511] 104. 一种重组、非天然产生的多肽支架,其包含:
- [0512] I. 与衍生自天然产生的蛋白质序列的多个预测的环区域序列相连的多个预测的 β 链结构域,
- [0513] II. 其中,一个或多个所述环区域序列因天然产生的蛋白质序列中相应环序列的至少一个氨基酸的缺失、取代或添加而改变;和
- [0514] III. 其中,该多肽支架的 β 链结构域与该天然产生蛋白质序列的相应结构域序列有至少 50% 同源性,其中,所述天然产生的蛋白质序列选自 SEQ IDNO:5-32、68-88。
- [0515] 105. 如实施方式 100-104 中任一项所述的支架,其中,所述多个 β 链是至少 7 个链。
- [0516] 106. 如实施方式 100-104 中任一项所述的支架,其中,所述多个环区域是至少 6 个区域。
- [0517] 107. 如实施方式 100-104 中任一项所述的支架,其中,所述支架包含各自指定为 A、B、C、D、E 和 F 的 7 个 β 链,和连接各 β 链并指定为 AB、BC、CD、DE、EF 和 FG 环的 6 个环区域。
- [0518] 108. 如实施方式 100-107 中任一项所述的支架,其中,所述支架还包含至少一个二硫键。
- [0519] 109. 如实施方式 100-107 中任一项所述的支架,其中,所述支架还包含至少两个、三个、四个或更多个二硫键。
- [0520] 110. 如实施方式 108 或 109 所述的支架,其中,所述至少一个二硫键在 β 链结构域中。
- [0521] 111. 如实施方式 108 或 109 所述的支架,其中,所述至少一个二硫键在环区域中。
- [0522] 112. 如实施方式 100-111 中任一项所述的支架,其中,所述支架结合靶标。
- [0523] 113. 如实施方式 112 所述的支架,其中,所述靶标是细胞表面抗原、可溶性抗原、固定化抗原、免疫静止抗原、胞内抗原、核内抗原、自体抗原、非自体抗原、癌症抗原、细菌抗原或病毒抗原。
- [0524] 114. 如实施方式 112 所述的支架,其中,所述支架结合的亲和力是至少 100 μ M 的 Kd。
- [0525] 115. 如实施方式 112 所述的支架,其中,在 pH 7.0 的 20mM 磷酸钠中,通过示差扫描量热法 (DSC) 检测到所述支架显示至少 40°C 的热解链温度 (T_m)。
- [0526] 116. 如实施方式 112 所述的支架,其中,在相似实验条件下,与工程改造前的同一支架相比,在脲变性实验中检测到所述支架显示 C_m 增加至少 10%。
- [0527] 117. 如实施方式 112 所述的支架,其中,在相似实验条件下,与工程改造前的同一支架相比,在胍变性实验中检测到所述支架显示 C_m 增加至少 10%。
- [0528] 118. 如实施方式 112 所述的支架,其中,在相似实验条件下,与工程改造前的同一支架相比,所述支架显示对蛋白酶降解的耐受性增加至少 10%。
- [0529] 119. 如实施方式 112 所述的支架,其中,所述支架偶联于异源物质,其中,所述物质选自另一支架、聚乙二醇 (PEG)、人血清白蛋白 (HSA)、抗体的 Fc 区、IgG 分子、二聚结构域、结合肽、细胞毒性药物、放射性标记、成像剂、His- 标签、生物素、Flag- 标签、核酸或细胞因子。

- [0530] 120. 一种多聚支架,其包含至少两个实施方式 100-119 中任一项所述的支架。
- [0531] 121. 如实施方式 120 所述的多聚支架,其中,所述多聚支架还包含表位结合结构域,其中,所述表位结合结构域选自抗体、抗体片段、双抗体、scFv、Fab、Fv 或结合肽。
- [0532] 122. 如实施方式 121 所述的多聚支架,其中,所述表位结合结构域对不同于所述支架的靶标具有特异性。
- [0533] 123. 如实施方式 121 所述的多聚支架,其中,所述表位结合结构域对与所述支架相同的靶标具有特异性。
- [0534] 124. 如实施方式 120-123 中任一项所述的多聚支架,其中,所述支架由另一支架、IgG 分子或其片段、Fc 区、二聚结构域、化学交联、二硫键或氨基酸接头连接。
- [0535] 125. 一种分离的核酸分子,其编码实施方式 100-124 中任一项所述的多聚支架。
- [0536] 126. 一种表达载体,其操作性连接于实施方式 125 所述的核酸。
- [0537] 127. 一种宿主细胞,其包含实施方式 126 所述的载体。
- [0538] 128. 一种多肽展示文库,其包含实施方式 100-119 中任一项所述的支架,各支架包含与衍生自天然产生的蛋白质序列的多个环区域序列相连的多个 β 链结构域,其中,一个或多个所述环区域序列因天然产生的蛋白质序列中相应环序列的至少一个氨基酸的缺失、取代或添加而改变;和其中,该多肽支架的 β 链结构域与该天然产生蛋白质序列的相应结构域序列有至少 50% 同源性。
- [0539] 129. 如实施方式 128 所述的文库,其中,所述支架包含因天然产生的蛋白质序列中相应环序列的至少一个氨基酸的缺失、取代或添加而改变的至少两个环区域序列。
- [0540] 130. 如实施方式 128 所述的文库,其中,所述两个环区域序列选自 BC/DE、BC/FG、DE/FG、AB/CD、AB/EF 或 CD/ED 环的环序列。
- [0541] 131. 如实施方式 128 所述的文库,其中,所述支架包含因天然产生的蛋白质序列中相应环序列的至少一个氨基酸的缺失、取代或添加而改变的至少三个环区域序列。
- [0542] 132. 如实施方式 131 所述的文库,其中,所述环区域序列包含 BC、DE 和 FG 环。
- [0543] 133. 如实施方式 131 所述的文库,其中,所述环区域序列包含 AB、CD 和 EF 环。
- [0544] 134. 如实施方式 128 所述的文库,其中,所述多肽展示在核糖体、细菌噬菌体、病毒、细菌或酵母菌表面。
- [0545] 135. 如实施方式 134 所述的文库,其中,所述文库的序列多样性为至少 106。
- [0546] 136. 一种获得结合靶标的支架的方法,所述方法包括 (a) 在允许支架:靶配体复合物形成的条件下将靶配体与实施方式 128 所述文库接触,和 (b) 从该复合物获得结合靶配体的支架。
- [0547] 137. 如实施方式 136 所述的方法,还包括使步骤 (b) 中获得的蛋白质的所述支架的至少一个环随机化从而产生进一步随机化的支架和利用所述进一步随机化的支架重复步骤 (a) 和 (b)。
- [0548] 138. 如实施方式 137 所述的方法,其中,所述方法包括使至少两个环随机化。
- [0549] 139. 如实施方式 137 所述的方法,其中,所述方法包括使至少三个环随机化。
- [0550] 140. 如实施方式 137 所述的方法,还包括使步骤 (b) 中获得的蛋白质的所述支架的至少一个环随机化从而产生进一步随机化的支架和利用所述进一步随机化的支架重复步骤 (a) 和 (b),其中,所述步骤 (a) 和 (b) 的重复还包括接触与步骤 (a) 和 (b) 的所述第

一操作的靶标不同的靶标。

[0551] 141. 如实施方式 137 所述的方法,还包括使步骤 (b) 中获得的蛋白质的所述支架的至少一个环随机化从而产生进一步随机化的支架,其中,所述环不在所述文库中随机化,和利用所述进一步随机化的支架重复步骤 (a) 和 (b)。

[0552] 142. 如实施方式 137 所述的方法,还包括使步骤 (b) 中获得的蛋白质的所述支架的至少一个环随机化从而产生进一步随机化的支架,其中,所述环不在所述文库中随机化,和利用所述进一步随机化的支架重复步骤 (a) 和 (b),其中,步骤 (a) 和 (b) 的所述重复还包括接触与步骤 (a) 和 (b) 的所述第一操作的靶标不同的靶标。

[0553] 143. 如实施方式 136-142 中任一项所述的方法,其中,所述方法包括选自 BC、DE 或 FG 环的第一随机化环和未在所述文库中随机化的选自 AB、CD 或 EF 环的第二环。

[0554] 144. 如实施方式 140-142 中任一项所述的方法,其中,所述方法包括选自 AB、CD、EF 环的第一随机化环和未在所述文库中随机化的选自 BC、DE 或 FG 环的第二环。

[0555] 145. 如实施方式 128-144 中任一项所述的方法,其中,所述方法还包括使步骤 (b) 中获得的蛋白质的所述支架的至少一个 β 链随机化从而产生进一步随机化的支架和利用所述进一步随机化的支架重复步骤 (a) 和 (b)。

[0556] 146. 如实施方式 145 所述的方法,其中,所述方法还包括使步骤 (b) 中获得的蛋白质的所述支架的至少两个、三个、四个、五个、六个或七个 β 链随机化从而产生进一步随机化的支架和利用所述进一步随机化的支架重复步骤 (a) 和 (b)。

[0557] 147. 一种获得结合靶标的至少两种支架的方法,所述方法包括 (a) 在允许支架:靶配体复合物形成的条件下将靶配体与实施方式 38 所述文库接触,(b) 将所述支架与交联剂结合,其中,所述支架的交联引发可检测反应,和 (c) 从该复合物获得结合靶配体的所述支架。

[0558] 148. 如实施方式 147 所述的方法,其中,所述支架识别相同表位。

[0559] 149. 如实施方式 147 所述的方法,其中,所述支架识别不同表位。

[0560] 150. 如实施方式 147 所述的方法,其中,所述交联剂选自抗体、抗体片段、二聚化基序、化学交联剂、结合肽或表位标签。

[0561] 151. 一种检测样品中化合物的方法,所述方法包括在允许化合物:支架复合物形成的条件下将所述样品与实施方式 112 所述支架接触并检测所述复合物,藉此检测所述样品中的所述化合物。

[0562] 152. 一种捕捉样品中化合物的方法,所述方法包括在允许化合物:支架复合物形成的条件下将所述样品与固定化的实施方式 112 所述支架接触并除去所述固定化支架,藉此捕捉所述样品中的所述化合物。

[0563] 153. 一种纯化实施方式中 101 或 102 所述支架的方法,所述方法包括将含有所述支架的组合物加热至 70℃,维持至少 15 分钟,通过离心除去凝聚的化合物。

[0564] 154. 一种纯化实施方式中 101 或 102 所述支架的方法,所述方法包括将含有所述支架的组合物调节至 pH 3.0 或 pH 3.5 或 pH 4.0 或 pH 4.5 或 pH 5.0;将得到的组合物在 50℃、或 55℃、或 60℃、或 65℃、或 70℃加热 1-30 分钟;随后通过离心除去凝聚的化合物。

[0565] 155. 一种无菌、无热原组合物,其包含实施方式 100-124 中任一项所述支架。

[0566] 156. 一种药物组合物,其包含实施方式 100-124 中任一项所述支架。

[0567] 157. 一种预防、治疗或缓解患者中疾病的方法,包括给予患者有效量的实施方式 156 所述组合物。

[0568] 158. 一种监测患者中疾病进展的方法,包括:给予需要所述监测的患者实施方式 156 所述组合物;使该组合物在患者成像;和评估所述患者。

[0569] 159. 如实施方式 157 或 158 所述的方法,其中,所述疾病是自身免疫疾病、炎性疾病、增生性疾病、感染性疾病、呼吸道疾病、胃肠疾病、糖尿病、狼疮或肥胖症。

[0570] 160. 本发明的放大工艺,其中,所述工艺导致实施方式 1-47 中任一项所述支架的生产率为至少 1g/L。

[0571] 161. 如实施方式 160 所述的工艺,其中,所述工艺包括从该工艺所用培养基纯化支架。

[0572] 162. 一种产生如实施方式 1-47 或 100-124 中任一项所述支架的方法,其中,所述支架产生和分泌入培养基。

[0573] 163. 如实施方式 162 所述的方法,其中,所述方法包括利用包含 oppA 信号肽 (SEQ ID NO:227) 的表达载体。

[0574] 164. 一种利用实施方式 162 所述方法获得的无细胞材料检验或检测支架结合靶标的方法。

[0575] 165. 一种纯化实施方式 162 所述方法产生的支架的方法。

[0576] 166. 如实施方式 1 所述的支架,其中,所述支架特异性结合 TRAIL-R2。

[0577] 167. 如实施方式 166 所述的支架,其中,所述 TRAIL-R2 是人 (TRAIL-R2)。

[0578] 168. 如实施方式 166 所述的支架,其中,所述支架包含衍生自 TRAIL-R2 结合支架的序列,所述 TRAIL-R2 结合支架选自 2F4、5B10、10D9、6F11、8B3、5E5、2Hb、7G11、6C7、1E03、2B04、1C12、1A03、1C10、1B12、2G03、2D3、1C06、2F08、1B04、3B11、1D8、2A12、1E05、2F02、1H05、2A11、或 1G11。

[0579] 169. 如实施方式 166 所述的支架,其中,所述支架是多聚支架。

[0580] 170. 如实施方式 168 所述的支架,其中,所述多聚支架包含至少两个支架结构域。

[0581] 171. 如实施方式 170 所述的支架,其中,所述至少两个支架结构域结合同一表位。

[0582] 172. 如实施方式 170 所述的支架,其中,所述至少两个支架结构域结合同一表位。

[0583] 173. 如实施方式 170 所述的支架,其中,至少一个支架结构域连接于衍生自 IgG 分子的 Fc 区。

[0584] 174. 如实施方式 170 所述的支架,其中,至少一个支架结构域连接于衍生自 IgG 分子的 CH1 区。

[0585] 175. 如实施方式 170 所述的支架,其中,至少一个支架结构域连接于衍生自 IgG 分子的 CH2 区。

[0586] 176. 如实施方式 170 所述的支架,其中,至少一个支架结构域连接于衍生自 IgG 分子的铰链区。

[0587] 177. 如实施方式 170 所述的支架,其中,至少一个支架结构域连接于衍生自 IgG 分子的 C_κ 或 C_λ 区。

[0588] 178. 如实施方式 170 所述的支架,其中,至少一个支架结构域是 2D3 或 1C12。

[0589] 179. 如实施方式 170 所述的支架,其中,所述支架包含连接于衍生自 IgG 分子的铰

链区的 1C12。

[0590] 180. 如实施方式 170 所述的支架,其中,所述支架包含连接于衍生自 IgG 分子的铰链区的 2D3。

[0591] 181. 如实施方式 170 所述的支架,其中,所述支架包含连接于衍生自 IgG 分子的 CH1 区的 1C12。

[0592] 182. 如实施方式 170 所述的支架,其中,所述支架包含连接于衍生自 IgG 分子的 CH1 区的 2D3。

[0593] 183. 如实施方式 170 所述的支架,其中,所述支架包含连接于 IgG 分子的 C κ 区的 1C12。

[0594] 184. 如实施方式 170 所述的支架,其中,所述支架包含连接于 IgG 分子的 C κ 区的 2D3。

[0595] 185. 如实施方式 166-184 中任一项所述的支架,其中,所述支架包含选自下组的 BC 环序列:SEQ ID NO:126、128、130、132、134、136、138、140、142、144、147、150、153、156、159、162、165、168、171、174、177、180、183、186、189、192、195、和 198。

[0596] 186. 如实施方式 166-184 中任一项所述的支架,其中,所述支架包含选自下组的 DE 环序列:SEQ ID NO:145、148、151、154、157、160、163、166、169、172、175、178、181、184、187、190、193、196、和 199。

[0597] 187. 如实施方式 166-184 中任一项所述的支架,其中,所述支架包含选自下组的 FG 环序列:127、129、131、133、135、137、139、141、143、146、149、152、155、158、161、164、167、170、173、176、179、182、185、188、191、194、197、和 200。

[0598] 188. 如实施方式 166-188 中任一项所述的支架,其中,所述支架结合后识别 TRAIL-R2 受体。

[0599] 189. 如实施方式 166-189 中任一项所述的支架,其中,所述支架结合后模拟 TRAIL 与 TRAIL-R2 受体的结合。

[0600] 190. 如实施方式 166-190 中任一项所述的支架,其中,所述支架结合后起到使得 TRAIL-R2 受体二聚化的作用。

[0601] 191. 一种激动 TRAIL-R2 受体的方法,包括使 TRAIL-R2 受体与实施方式 166-190 中任一项所述支架接触。

[0602] 192. 如实施方式 191 所述的方法,其中,所述支架模拟 TRAIL 与 TRAIL-R2 受体的结合。

[0603] 193. 如实施方式 192 所述的方法,其中,所述支架起到使得 TRAIL-R2 受体二聚化的作用。

[0604] 194. 一种降低或抑制细胞活力的方法,包括使得细胞上的 TRAIL-R2 受体与实施方式 166-190 中任一项所述的支架接触。

[0605] 195. 一种活化或促进细胞凋亡的方法,包括使得细胞上的 TRAIL-R2 受体与实施方式 166-190 中任一项所述的支架接触。

[0606] 196. 一种预防、治疗、减轻或控制有此需要的患者癌症的方法,包括给予实施方式 166-190 中任一项所述的支架或其组合物。

[0607] 197. 如实施方式 196 所述的方法,其中,所述癌症选自鳞状细胞癌、小细胞肺癌、

非小细胞肺癌 (NSCLC)、非霍奇金淋巴瘤、母细胞瘤、胃肠道癌症、肾癌、卵巢癌、肝脏癌症、胃癌、膀胱癌、肝癌、乳腺癌、结肠癌、结肠直肠癌、胰腺癌、子宫内膜癌、唾液腺癌、肾脏癌症、肝脏癌症、前列腺癌、阴门癌、甲状腺癌、肝癌、头颈癌、肺癌、腺癌、肾细胞癌或肝细胞癌。

[0608] 198. 一种重组多肽支架, 包含:

[0609] I. 指定为 A、B、C、D、E、F 和 G 的 7 个 β 链结构域;

[0610] II. 相连的 6 个环区域, 其中, 环区域连接各 β 链并指定为 AB、BC、CD、DE、EF 和 FG 环;

[0611] III. 其中, 至少一个环区域是 SEQ ID NO:1-32 或 68-88 中任一所示同源环区域的非天然产生的变体; 和

[0612] IV. 其中, 至少一个 β 链结构域与 SEQ ID NO:1-32 或 68-88 中任一所示同源 β 链结构域有至少 50%、至少 60%、至少 70%、至少 80%、或至少 90%、至少 95%、或至少 99% 的同源性。

[0613] 199. 如实施方式 198 所述的支架, 其中, 所述 β 链结构域包含 SEQ ID NO:1-32 或 68-88 中任一所编码的多肽序列。

[0614] 200. 如实施方式 199 所述的支架, 其中, 所述 β 链结构域包含:

[0615] a. A β 链 (SEQ ID NO:228)、B β 链 (SEQ ID NO:229)、C β 链 (SEQ IDNO:230)、D β 链 (SEQ ID NO:231)、E β 链 (SEQ ID NO:232)、F β 链 (SEQ IDNO:233) 和 G β 链 (SEQ ID NO:234) 的氨基酸序列; 或

[0616] b. A β 链 (SEQ ID NO:235)、B β 链 (SEQ ID NO:229)、C β 链 (SEQ IDNO:230)、D β 链 (SEQ ID NO:236)、E β 链 (SEQ ID NO:232)、F β 链 (SEQ IDNO:237) 和 G β 链 (SEQ ID NO:234) 的氨基酸序列。

[0617] 7. 序列

[0618] Tn3 野生型环 (第一实施方式):

[0619] AB(SEQ ID NO:201) = DVTDTT

[0620] BC(SEQ ID NO:202) = FKPLAEIDG

[0621] CD(SEQ ID NO:203) = KDVPGDR

[0622] DE(SEQ ID NO:204) = LTEDENQ

[0623] EF(SEQ ID NO:205) = GNLKPD

[0624] FG(SEQ ID NO:206) = RRGDMSSNPA

[0625] Tn3 野生型 β 链 (第一实施方式)

[0626] A(SEQ ID NO:228) = RLDAPSQIEVK

[0627] B(SEQ ID NO:229) = ALITW

[0628] C(SEQ ID NO:230) = IELTYGI

[0629] D(SEQ ID NO:231) = TTID

[0630] E(SEQ ID NO:232) = YSI

[0631] F(SEQ ID NO:233) = TEYEVSLIS

[0632] G(SEQ ID NO:234) = KETFTT

[0633] Tn3 野生型环 (第二实施方式):

- [0634] AB(SEQ ID NO :207) = KDVTDTT
- [0635] BC(SEQ ID NO :202) = FKPLAEIDG
- [0636] CD(SEQ ID NO :203) = KDVPGDR
- [0637] DE(SEQ ID NO :208) = TEDENQ
- [0638] EF(SEQ ID NO :209) = GNLKPDTE
- [0639] FG(SEQ ID NO :206) = RRGDMSSNPA
- [0640] Tn3 野生型 β 链 (第二实施方式)
- [0641] A(SEQ ID NO :235) = RLDAPSQIEV
- [0642] B(SEQ ID NO :229) = ALITW
- [0643] C(SEQ ID NO :230) = IELTYGI
- [0644] D(SEQ ID NO :236) = TTIDL
- [0645] E(SEQ ID NO :232) = YSI
- [0646] F(SEQ ID NO :237) = YEVS LIS
- [0647] G(SEQ ID NO :234) = KETFTT
- [0648] 蛋白质序列
- [0649] 大写字母对应于 Tn3 结构基序, 而小写字母是衍生自合成 cDNA 和表达载体的侧翼附属序列。
- [0650] 1P :
- [0651] SEQ ID NO :5
- [0652] aaLEVVAATPTSLLISWDAPAVTVRYRITYGETGGNSPVQEFTVPGSKSTATISGLKPGVDYTITVYA
VTGRGDSPASSKPISINYRTgggtlehhhhh
- [0653] SEQ ID NO :6
- [0654] LEVVAATPTSLLISWDAPAVTVRYRITYGETGGNSPVQEFTVPGSKSTATISGLKPGVDYTITVYAVT
GRGDSPASSKPISINYRT
- [0655] 2P :
- [0656] SEQ ID NO :7
- [0657] aaPTVDQVDDTSIVVRWSRPQAPITGYRIVYSPSVEGSSTELNLPETANSVTLSDLQPGVQYNITIYAV
EENQESTPVVIQQETgggtlehhhhh
- [0658] SEQ ID NO :8
- [0659] PTVDQVDDTSIVVRWSRPQAPITGYRIVYSPSVEGSSTELNLPETANSVTLSDLQPGVQYNITIYAVEE
NQESTPVVIQQET
- [0660] 3P :
- [0661] SEQ ID NO :9
- [0662] aaPYNTEVTETTIVITWTPAPRIGFKLGV RPSQGGEAPREVTSDSGSIVVSGLTPGVEYVYTIQVLRDG
QERDAPIVNKVV Tgggtlehhhhh
- [0663] SEQ ID NO :10
- [0664] PYNTEVTETTIVITWTPAPRIGFKLGV RPSQGGEAPREVTSDSGSIVVSGLTPGVEYVYTIQVLRDGQE
RDAPIVNKVV T
- [0665] 4P :

[0666] SEQ ID NO :11

[0667] aaPPIALNWTLLNVSLTGIHADIQVRWEAPRNADIQKGWMVLEYELQYKEVNETKWKMMDPILTTSPVPV
YSLKVDKEYEVRVRSKQRNSGNYGEFSEVLYVTLPgggtlehhhhh

[0668] SEQ ID NO :12

[0669] PPIALNWTLLNVSLTGIHADIQVRWEAPRNADIQKGWMVLEYELQYKEVNETKWKMMDPILTTSPVVS
LKVDKEYEVRVRSKQRNSGNYGEFSEVLYVTLP

[0670] 5P :

[0671] SEQ ID NO :13

[0672] aaPPSLNVTKDGDSSYSLRWETMKMRYEHIDHTFEIQYRKDTATWKDSKTETLQNAHSMALPALEPSTRY
WARVRVRTSRTGYNGIWSEWSEARSWDTEgggtlehhhhh

[0673] SEQ ID NO :14

[0674] PPSLNVTKDGDSSYSLRWETMKMRYEHIDHTFEIQYRKDTATWKDSKTETLQNAHSMALPALEPSTRYWA
RVRVRTSRTGYNGIWSEWSEARSWDTE

[0675] 6P :

[0676] SEQ ID NO :15

[0677] aaPPVNFTIKVTGLAQVLLQWKPNPDQEQRNVNLEYQVKINAPKEDDYETRITESKI VTILHKGFSASV
RTILQNDHSLASSWASAELHAgggtlehhhhh

[0678] SEQ ID NO :16

[0679] PPVNFTIKVTGLAQVLLQWKPNPDQEQRNVNLEYQVKINAPKEDDYETRITESKI VTILHKGFSASVRT
ILQNDHSLASSWASAELHA

[0680] 7P :

[0681] SEQ ID NO :17

[0682] aaLSVTDVTTSSLRLNWEAPPGAFDSFLLRFGVPSPSTLEPHRPLLQRELMVPGTRHSAVLRDLRSGT
LYSLTLYGLRGPHKADSIQGTARTgggtlehhhhh

[0683] SEQ ID NO :18

[0684] LSVTDVTTSSLRLNWEAPPGAFDSFLLRFGVPSPSTLEPHRPLLQRELMVPGTRHSAVLRDLRSGTLY
SLTLYGLRGPHKADSIQGTART

[0685] 8P :

[0686] SEQ ID NO :19

[0687] aaLRALNLTEGFAVLHWKPPQNPVDTYDIQVTAPGAPPLQAETPGSAVDYPLHDLVLHTNYTATVRGLR
GPNLTSPASITFTTgggtlehhhhh

[0688] SEQ ID NO :20

[0689] LRALNLTEGFAVLHWKPPQNPVDTYDIQVTAPGAPPLQAETPGSAVDYPLHDLVLHTNYTATVRGLRGP
NLTSPASITFTT

[0690] 9P :

[0691] SEQ ID NO :21

[0692] aaLEAKEVTPRTALLTWTEPPVRPAGYLLSFHTPGGQTQEILLPGGITSHQLLGLFPSTSYNARLQAMW
GQSLPPVSTSTFTTgggtlehhhhh

[0693] SEQ ID NO :22

[0694] LEAKEVTPRTALLTWTEPPVRPAGYLLSFHTPGGQTQEILLPGGITSHQLLGLFPSTSYNARLQAMWGQ
SLLPPVSTSFTT

[0695] 10P :

[0696] SEQ ID NO :23

[0697] aaIEVKDVTDTTALITWFKPLAEIDGIELTYGIKDVPGDRTTIDLTEDENQYSIGNLKPDTEYEVSLIS
RRGDMSSNPAKETFTTgggtlehhhhh

[0698] SEQ ID NO :24

[0699] IEVKDVTDTTALITWFKPLAEIDGIELTYGIKDVPGDRTTIDLTEDENQYSIGNLKPDTEYEVSLISRR
GDMSSNPAKETFTT

[0700] 11P :

[0701] SEQ ID NO :25

[0702] aaPKFTKCRSPERETFCHWTDEVHHGTKNLGPIQLFYTRRNTQEWQEWKECPDYVSAGENSCYFNSS
FTSIWIPYCIKLTSNGGTVDEKCFVgggtlehhhhh

[0703] SEQ ID NO :26

[0704] PKFTKCRSPERETFCHWTDEVHHGTKNLGPIQLFYTRRNTQEWQEWKECPDYVSAGENSCYFNSSFT
SIWIPYCIKLTSNGGTVDEKCFV

[0705] 12P :

[0706] SEQ ID NO :27

[0707] aaPSGFPQNLHVTGLTTSTTELAWDPPVLAERNGRIISYTVVFRDINSQQELQNITTDTRFTLTGLKPD
TTYDIKVRWATSKGSGPLSPSIQSRTMPVEgggtlehhhhh

[0708] SEQ ID NO :28

[0709] PSGFPQNLHVTGLTTSTTELAWDPPVLAERNGRIISYTVVFRDINSQQELQNITTDTRFTLTGLKPD
TTYDIKVRWATSKGSGPLSPSIQSRTMPVE

[0710] 13P :

[0711] SEQ ID NO :29

[0712] aaPKPPIDLVTETTATSVTLTWDSGNSEPVYYGIQYRAAGTEGPFQEVDGVATTRYSIGGLSPFSEY
AFRVLAVNSIGRGPPSEAVRARTGEQAgggtlehhhhh

[0713] SEQ ID NO :30

[0714] PKPPIDLVTETTATSVTLTWDSGNSEPVYYGIQYRAAGTEGPFQEVDGVATTRYSIGGLSPFSEYAF
RVLAVNSIGRGPPSEAVRARTGE

[0715] 14P :

[0716] SEQ ID NO :31

[0717] aaLSPPRNLRI SNVGSNSARLTWDPTSRQINGYRIVYNNADGTEINEVEVDPITTFPLKGLTPLTEYTI
AIFSIYDEGQSEPLTGVFTTgggtlehhhhh

[0718] SEQ ID NO :32

[0719] LSPPRNLRI SNVGSNSARLTWDPTSRQINGYRIVYNNADGTEINEVEVDPITTFPLKGLTPLTEYTI
AIFSIYDEGQSEPLTGVFTT

[0720] DNA 序列

[0721] 大写字母对应于 Tn3 结构基序,而小写字母是侧翼附属序列。

[0722] 1D :

[0723] SEQ ID NO :33

[0724] gccatggcggccCTGGAAGTGGTGGCGGCGACCCCGACCAGCCTGCTGATTAGCTGGGATGCGCCGGCG
GTGACCGTGCGCTATTATCGTATTACCTATGGCGAAACCGGCGGCAATAGCCCGGTGCAGGAATTTACCGTGCCGGG
CAGCAAAAGCACCGCGACCATTAGCGGCCTGAAACCGGGCGTGGATTATACCATTACCGTGTATGCGGTGACCGGCC
GTGGCGATAGCCCGGCGAGCA

[0725] GCAAACCGATTAGCATTAACCTATCGTACCggtggcggtacc

[0726] SEQ ID NO :34

[0727] CTGGAAGTGGTGGCGGCGACCCCGACCAGCCTGCTGATTAGCTGGGATGCGCCGGCGGTGACCGTGCGC
TATTATCGTATTACCTATGGCGAAACCGGCGGCAATAGCCCGGTGCAGGAATTTACCGTGCCGGGCAGCAAAAGCAC
CGCGACCATTAGCGGCCTGAAACCGGGCGTGGATTATACCATTACCGTGTATGCGGTGACCGGCCGTGGCGATAGCC
CGGCGAGCAGCAAAACCGATTAGCATTAACCTATCGTACC

[0728] 2D :

[0729] SEQ ID NO :35

[0730] gccatggcggccCCGACCGTGGATCAGGTGGATGATACCAGCATTGTGGTGGCTGGAGCCGTCCGCAG
GCGCCGATTACCGGTATCGTATTGTGTATAGCCCGAGCGTGGAAGGCAGCAGCACCCTGAACCTGCCGGAAAC
CGCGAATAGCGTGACCCTGAGCGATCTGCAGCCGGGCGTGCAGTATAACATTACCATTTATGCGGTGGAAGAAAACC
AGGAAAGCACCCCGGTGGTGATTTCAGCAGGAAACCggtggcggtacc

[0731] SEQ ID NO :36

[0732] CCGACCGTGGATCAGGTGGATGATACCAGCATTGTGGTGGCTGGAGCCGTCCGCAGGCGCCGATTACC
GGCTATCGTATTGTGTATAGCCCGAGCGTGGAAGGCAGCAGCACCCTGAACCTGCCGGAAACCGCGAATAGCGT
GACCCTGAGCGATCTGCAGCCGGGCGTGCAGTATAACATTACCATTTATGCGGTGGAAGAAAACCAGGAAAGCACCC
CGGTGGTGATTTCAGCAGGAAACC

[0733] 3D :

[0734] SEQ ID NO :37

[0735] gccatggcggccCCGTATAACACCGAAGTGACCGAAACCACCATTTGTGATTACCTGGACCCCGGCGCCG
CGTATTGGCTTTAAACTGGGCGTGCTCCGAGCCAGGGCGGTGAAGCGCCGCGCGAAGTGACCAGCGATAGCGGCAG
CATTGTGGTGAGCGGCCTGACCCCGGGCGTGGAAATATGTGTATACCATTTCAGGTGCTGCGTGATGGCCAGGAACGTG
ATGCGCCGATTGTGAACAAAGTGGTGACCggtggcggtacc

[0736] SEQ ID NO :38

[0737] CCGTATAACACCGAAGTGACCGAAACCACCATTTGTGATTACCTGGACCCCGGCGCCGCGTATTGGCTTT
AAACTGGGCGTGCTCCGAGCCAGGGCGGTGAAGCGCCGCGCGAAGTGACCAGCGATAGCGGCAGCATTGTGGTGAG
CGGCCTGACCCCGGGCGTGGAAATATGTGTATACCATTTCAGGTGCTGCGTGATGGCCAGGAACGTGATGCGCCGATTG
TGAACAAAGTGGTGACC

[0738] 4D :

[0739] SEQ ID NO :39

[0740] gccatggcggccCCGCCGATCGCTCTGAATTGGACCCTGCTGAATGTTTCGCTGACCGGTATTCATGCC
GATATTCAGGTGCGTTGGGAAGCGCCGCGTAACGCCGATATTCAGAAAGGCTGGATGGTGCTGGAATATGAACTGCA
GTATAAAGAAGTGAATGAAACCAATGGAAAAATGATGGACCCGATTCTGACCACCAGCGTGCCGGTGTACAGCCTGA

AAGTGGATAAAGAATACGAAGTCCGTGTGCGTTCTAAACAGCGTAATAGCGGCAATTATGGTGAATTTAGTGAAGTC
CTGTATGTTACCCTGCCGggtggtggtacc

[0741] SEQ ID NO :40

[0742] CCGCCGATCGCTCTGAATTGGACCCTGCTGAATGTTTCGCTGACCGGTATTCATGCCGATATTCAGGT
GCGTTGGGAAGCGCCGCGTAACGCCGATATTCAGAAAGGCTGGATGGTGTGGAATATGAACTGCAGTATAAAGAA
GTGAATGAAACCAATGGAATATGATGGACCCGATTCTGACCACCAGCGTGCCGGTGTACAGCCTGAAAGTGGAT
AAAGAATACGAAGTCCGTGTGCGTTCTAAACAGCGTAATAGCGGCAATTATGGTGAATTTAGTGAAGTCCTGTAT
GTTACCCTGCCG

[0743] 5D :

[0744] SEQ ID NO :41

[0745] gccatggcgcccCGCCGAGCCTGAACGTGACCAAAGATGGCGATAGCTATAGCCTGCGCTGGGAAAC
CATGAAAATGCGCTATGAACATATTGATCATACTTTGAAATTCAGTATCGCAAAGATACCGCGACCTGGAAAGAT
AGCAAAACCGAAACCTGCAGAACGCGCATAGCATGGCGCTGCCGGCGCTGGAACCGAGCACCCGTTATTGGGCG
CGTGTGCGTGTGCGTACCAGCCGTACCGGTATAATGGCATTGAGCGAATGGAGCGAAGCGCGTAGCTGGGAT
ACCGAAggtggtggtacc

[0746] CCGCCGAGCCTGAACGTGACCAAAGATGGCGATAGCTATAGCCTGCGCTGGGAAACCATGAAAATGCGC
TATGAACATATTGATCATACTTTGAAATTCAGTATCGCAAAGATACCGCGACCTGGAAAGATAGCAAAACCGAAAC
CCTGCAGAACGCGCATAGCATGGCGCTGCCGGCGCTGGAACCGAGCACCCGTTATTGGGCGCGTGTGCGTGTGCGTA
CCAGCCGTACCGGTATAATGGCATTGAGCGAATGGAGCGAAGCGCGTAGCTGGGATACCGAA

[0747] 6D :

[0748] SEQ ID NO :42

[0749] gccatggcgcccCGCCGGTGAACCTTACCATTAAAGTGACCGGCCTGGCGCAGGTGCTGCTGCAGTGG
AAACCGAACCCGATCAGGAACAGCGTAACGTGAACCTGGAATATCAGGTGAAAATTAACGCGCCGAAAGAAGATGA
TTATGAAACCCGATTACCGAAAGCAAACCTGGTGACCATTCTGCATAAAGGCTTTAGCGCGAGCGTGCGTACCATTCT
TGCAGAACGATCATAGCCTGCTGGCGAGCAGCTGGGCGAGCGCGGAACTGCATGCGggtggtggtacc

[0750] SEQ ID NO :43

[0751] CCGCCGGTGAACCTTACCATTAAAGTGACCGGCCTGGCGCAGGTGCTGCTGCAGTGGAAACCGAACCCG
GATCAGGAACAGCGTAACGTGAACCTGGAATATCAGGTGAAAATTAACGCGCCGAAAGAAGATGATTATGAAACCCG
CATTACCGAAAGCAAACCTGGTGACCATTCTGCATAAAGGCTTTAGCGCGAGCGTGCGTACCATTCTGCAGAACGATC
ATAGCCTGCTGGCGAGCAGCTGGGCGAGCGCGGAACTGCATGCG

[0752] 7D :

[0753] SEQ ID NO :44

[0754] gccatggcgcccCTGAGCGTGACCGATGTGACCACCAGCAGCCTGCGTCTGAACTGGGAAGCGCCGCCG
GGCGCGTTTGATAGCTTTCTGCTGCGTTTTGGCGTGCCGAGCCCGAGCACCCCTGGAACCGCATCCGCGTCCGCTGCT
GCAGCGTGAACGTATGGTGCCGGGACCCGTCATAGCGCGGTGCTGCGTGATCTGCGTAGCGGCACCCTGTATAGCC
TGACCCTGTATGGCCTGCGTGGCCCGCATAAAGCGGATAGCATTACAGGGCACCGCGGTACCGgtggtggtacc

[0755] SEQ ID NO :45

[0756] CTGAGCGTGACCGATGTGACCACCAGCAGCCTGCGTCTGAACTGGGAAGCGCCGCCGGGCGCGTTTTGAT
AGCTTTCTGCTGCGTTTTGGCGTGCCGAGCCCGAGCACCCCTGGAACCGCATCCGCGTCCGCTGCTGCAGCGTGAAC

GATGGTGCCGGGCACCCGTCATAGCGCGGTGCTGCGTGATCTGCGTAGCGGCACCCTGTATAGCCTGACCCTGTATG
GCCTGCGTGCCCCGCATAAAGCGGATAGCATTACAGGGCACCGCGCGTACC

[0757] 8D :

[0758] SEQ ID NO :46

[0759] gccatggcggccCTGCGCGGCTGAACCTGACCGAAGGCTTTGCGGTGCTGCATTGGAAACCGCCGCAG
AACCCGGTGGATACCTATGATATTACAGGTGACCGCGCCGGGCGCGCCGCCGCTGCAGGCGGAAACCCCGGGCAGCGC
GGTGGATTATCCGCTGCATGATCTGGTGTGCATACCAACTATACCGCGACCGTGCGTGGCCTGCGCGGCCCGAATC
TGACCAGCCCGGCGAGCATTACCTTTACCACCggtggcggtacc

[0760] SEQ ID NO :47

[0761] CTGCGCGGCTGAACCTGACCGAAGGCTTTGCGGTGCTGCATTGGAAACCGCCGCAGAACCCGGTGGAT
ACCTATGATATTACAGGTGACCGCGCCGGGCGCGCCGCCGCTGCAGGCGGAAACCCCGGGCAGCGCGGTGGATTATCC
GCTGCATGATCTGGTGTGCATACCAACTATACCGCGACCGTGCGTGGCCTGCGCGGCCCGAATCTGACCAGCCCGG
CGAGCATTACCTTTACCACC

[0762] 9D :

[0763] SEQ ID NO :48

[0764] gccatggcggccCTGGAAGCGAAAGAAGTGACCCCGGTACCGCGCTGCTGACCTGGACCGAACCGCCG
GTGCGCCCGGGGTTATCTGCTGAGCTTTTCATACCCCGGGCGGCCAGACCCAGGAAATTCTGCTGCCGGGCGGCAT
TACCAGCCATCAGCTGCTGGGCTGTTTCCGAGCACCAGCTATAACGCGCGTCTGCAGGCGATGTGGGGCCAGAGCC
TGCTGCCGCCGGTGAGCACCAGCTTTACCACCggtggcggtacc

[0765] SEQ ID NO :49

[0766] CTGGAAGCGAAAGAAGTGACCCCGGTACCGCGCTGCTGACCTGGACCGAACCGCCGGTGCGCCCGGGC
GGTTATCTGCTGAGCTTTTCATACCCCGGGCGGCCAGACCCAGGAAATTCTGCTGCCGGGCGGCATTACCAGCCATCA
GCTGCTGGGCTGTTTCCGAGCACCAGCTATAACGCGCGTCTGCAGGCGATGTGGGGCCAGAGCCTGCTGCCGCCGG
TGAGCACCAGCTTTACCACC

[0767] 10D :

[0768] SEQ ID NO :50

[0769] gccatggcggccATTGAAGTGAAAGATGTGACCGATACCACCGCGCTGATTACCTGGTTTAAACCGCTG
GCGGAAATTGATGGCATTGAACTGACCTATGGCATTAAAGATGTGCCGGGCGATCGCACCACCATTGATCTGACCGA
AGATGAAAACAGTATAGCATTGGCAACCTGAAACCGGATACCGAATATGAAGTGAGCCTGATTAGCCGTCGTGGCG
ATATGAGCAGCAACCCGGCGAAAGAAACCTTTACCACCggtggcggtacc

[0770] SEQ ID NO :51

[0771] ATTGAAGTGAAAGATGTGACCGATACCACCGCGCTGATTACCTGGTTTAAACCGCTGGCGGAAATTGAT
GGCATTGAACTGACCTATGGCATTAAAGATGTGCCGGGCGATCGCACCACCATTGATCTGACCGAAGATGAAAACCA
GTATAGCATTGGCAACCTGAAACCGGATACCGAATATGAAGTGAGCCTGATTAGCCGTCGTGGCGATATGAGCAGCA
ACCCGGCGAAAGAAACCTTTACCACC

[0772] 11D :

[0773] SEQ ID NO :52

[0774] gccatggcggccCCGAAATTTACCAAATGCCGTAGCCCGGAACGCGAAACCTTTAGCTGCCATTGGAC
CGATGAAGTTCATCATGGCACCAAAAATCTGGGCCCGATTACAGCTGTTTTATACCCGCCGTAATACCCAGGAATGG

ACCCAGGAATGGAAAGAATGCCCGGATTATGTTAGCGCGGGCGAAAACAGCTGCTATTTTAACAGCAGCTTTACC
AGCATTTGGATTCCGTATTGCATTAACTGACCAGCAACGGTGGCACC GTT GATGAAAAATGCTTTAGCGTGggt
ggcggtacc

[0775] SEQ ID NO :53

[0776] CCGAAATTTACCAAATGCCGTAGCCCGGAACGCGAAACCTTTAGCTGCCATTGGACCGATGAAGTTCAT
CATGGCACCAAAAATCTGGGCCCATTGAGCTGTTTTATACCCGCCGTAATACCCAGGAATGGACCCAGGAATGGAA
AGAATGCCCGGATTATGTTAGCGCGGGCGAAAACAGCTGCTATTTTAACAGCAGCTTTACCAGCATTTGGATTCCGT
ATTGCATTAACTGACCAGCAACGGTGGCACC GTT GATGAAAAATGCTTTAGCGTG

[0777] 12D :

[0778] SEQ ID NO :54

[0779] gccatggcagccCGTCTGGTTTTCCGCAGAATCTGCATGTGACCGGCCTGACCACCAGCACCACCGA
ACTGGCGTGGGATCCGCCGGTGCTGGCGGAACGCAACGGCCGTATTATTAGCTATACCGTGGTGTTCGTGATATT
AACAGCCAGCAGGAACTGCAGAACATTACCACCGATACCCGCTTTACCCTGACCGGTCTGAAACCGGATACCACC
TATGATATTAAAGTGC GCGCCTGGACCAGCAAAGGCAGCGGCCCGCTGAGCCCAGCATTCAGAGCCGCACCATG
CCGGTGGAAggtggcggtacc

[0780] SEQ ID NO :55

[0781] CCGTCTGGTTTTCCGCAGAATCTGCATGTGACCGGCCTGACCACCAGCACCACCGAACTGGCGTGGGAT
CCGCCGGTGCTGGCGGAACGCAACGGCCGTATTATTAGCTATACCGTGGTGTTCGTGATATTAAACAGCCAGCAGGA
ACTGCAGAACATTACCACCGATACCCGCTTTACCCTGACCGGTCTGAAACCGGATACCACCTATGATATTAAAGTGC
GCGCCTGGACCAGCAAAGGCAGCGGCCCGCTGAGCCCAGCATTCAGAGCCGCACCATGCCGGTGGA

[0782] 13D :

[0783] SEQ ID NO :56

[0784] gccatggcggccCGGAAACCGCCGATTGATCTGGTGGTTACCGAAACCACCGCGACCAGCGTGACCCT
GACCTGGGATAGCGGCAATAGCGAACCGGTGACCTATTATGGTATTCAGTATCGCGCGGCGGGCACCGAAGGTCCG
TTTCAGGAAGTGATGGCGTGGCGACCACCCGTTATAGCATTGGCGGTCTGAGCCCGTTAGCGAATATGCGTTT
CGCGTGCTGGCGTTAATAGCATTGGCCGCGGTCCGCCGAGCGAAGCGGTGCGTGCGCGCACCGGCGAACAGGCG
ggtggcggtacc

[0785] SEQ ID NO :57

[0786] CCGAAACCGCCGATTGATCTGGTGGTTACCGAAACCACCGCGACCAGCGTGACCCTGACCTGGGATAGC
GGCAATAGCGAACCGGTGACCTATTATGGTATTCAGTATCGCGCGGCGGGCACCGAAGGTCCGTTTCAGGAAGTGGA
TGGCGTGGCGACCACCCGTTATAGCATTGGCGGTCTGAGCCCGTTAGCGAATATGCGTTTCGCGTGCTGGCGTTA
ATAGCATTGGCCGCGGTCCGCCGAGCGAAGCGGTGCGTGCGCGCACCGGCGAACAGGCG

[0787] 14D :

[0788] SEQ ID NO :58

[0789] gccatggcggccCTGAGCCCGCCGCGTAACCTGCGCATTAGCAACGTGGGTAGCAATAGCGCGCGCCTG
ACCTGGGATCCGACCAGCCGCCAGATTAATGGCTATCGCATTGTGTATAACAACGCCGATGGCACCGAAATTAACGA
AGTGGAAGTGATCCGATTACCACCTTTCCGCTGAAAAGCCTGACCCCGCTGACCGAATATACCATTGCGATTTTA
GCATTTATGATGAAGGTCAGAGCGAACCGCTGACCGGTGTGTTTACCACCggtggcggtacc

[0790] SEQ ID NO :59

[0791] CTGAGCCCGCCGCGTAACCTGCGCATTAGCAACGTGGGTAGCAATAGCGCGCGCCTGACCTGGGATCCG
ACCAGCCGCCAGATTAATGGCTATCGCATTGTGTATAACAACGCCGATGGCACCAGAAATTAACGAAGTGGAAGTGGA
TCCGATTACCACCTTTCCGCTGAAAAGGCGCTGACCCCGCTGACCGAATATACCATTGCGATTTTATGATG
AAGGTCAGAGCGAACCGCTGACCGGTGTGTTTACCACC

[0792] 野生型 Tn3 结构域 SRQ ID NO :1

[0793] RLDAPSQIEVKDVTDTTALITWFKPLAEIDGIELTYGIKDVPGDRTTIDLTEDENQYSIGNLKPDTEYE
VSLISRRGDMSSNPAKETFTT

[0794] 结合腕蛋白 Tn3 支架蛋白质序列

[0795] SEQ ID NO :60

[0796] AAIEVKDVTDTTALITWFKPLAEIDGIELTYGIKDVPGDRTTIDLTEDENQYSIGNLKPDTEYEVSLIS
RRGDMSSNPAKETFTTGGGTLEHHHHHH

[0797] SEQ ID NO :61

[0798] IEVKDVTDTTALITWFKPLAEIDGIELTYGIKDVPGDRTTIDLTEDENQYSIGNLKPDTEYEVSLISRR
GDMSSNPAKETFTT

[0799] Synagis 结合 Tn3 变体 SynBP01

[0800] 蛋白质序列

[0801] SEQ ID NO :62

[0802] AAIEVKDVTDTTALITWSPPSVLVGYTIELTYGIKDVPGDRTTIDLTEDENQYSIGNLKPDTEYEVSLI
SVTEFGRRRSKETFTTGGGTLEHHHHHH

[0803] SEQ ID NO :63

[0804] IEVKDVTDTTALITWSPPSVLVGYTIELTYGIKDVPGDRTTIDLTEDENQYSIGNLKPDTEYEVSLISV
TEFGRRRSKETFTT

[0805] 二硫键稳定的 Tn3 (SS1-4) :

[0806] SEQ ID NO :64

[0807] (SS1) :IECKDVTDTTALCTWFKPLAEIDGIELTYGIKDVPGDRTTIDLTEDENQYSIGNLKPDTEYEV
SLISRRGDMSSNPAKETFTT

[0808] SEQ ID NO :210

[0809] (SS2) :IEVKDVTDTTALITWFKPLAEIDGIELTYGIKDVPGDRTTCDLTGEDEGNQCSIGNLKPDTEY
EVSLISRRGDMSSNPAKETFTT

[0810] SEQ ID NO :65

[0811] (SS3) :IEVKDVTDTTALITWFKPLAEIDGIELTYGIKDVPGDRTTIDLTEDENQYSIGNLKPDTEYCV
SLISRRGDMSSNPAKECFTT

[0812] SEQ ID NO :66

[0813] (SS4) :IEVKDVTDTTALITWFKPLAEIDGCELTGYIKDVPGDRTTIDLTEDENQYSIGNLKPDTEYEV
SLICRRGDMSSNPAKETFTT

[0814] SEQ ID NO :67

[0815] (SS3+4) :IEVKDVTDTTALITWFKPLAEIDGCELTGYIKDVPGDRTTIDLTEDENQYSIGNLKPDTEY
CVSLICRRGDMSSNPAKECFTT

[0816] 从古细菌鉴定的支架

- [0817] 闪烁古生球菌 DSM 4304
- [0818] NCBI 登录号 :NC_000917
- [0819] 蛋白质序列 :
- [0820] SEQ ID NO :68
- [0821] PAISNVRVSDVTNSSATIRWDVSLAANNRVLFSTNSDLSSPQWSAWDNSTDSPMITLSGLSAGTAYYFS
VYSFRPDNASLYSNSSIMSFTT
- [0822] 海葡萄嗜热菌 F1
- [0823] NCBI accession :NC_009033
- [0824] 蛋白质序列 :
- [0825] Seq ID No :2
- [0826] SEPQNLKATAGNNITLTWDPPIDDGGCRIVEYRIYRGTTNNNNLEYYASVNGSTTTTFIDKNIVYSQTTY
YKVSANNIVEGPKSNTASATPTSS
- [0827] 嗜酸热硫化叶菌 DSM 639
- [0828] NCBI 登录号 :NC_007181
- [0829] 蛋白质序列 :
- [0830] 第一 Tn3 结构基序, SEQ ID NO :69
- [0831] PPPKPVIRFAQAGNSISLSWYDTNTSGYYIQWSSIDNNKSTINVGNVSSYLFINLTNGVTYYFRIIP
YNQAGNGTSSDIISLTPGAV
- [0832] 第二 Tn3 结构基序, SEQ ID NO :70
- [0833] PDSPSVKVIIVGDRNATVIWSKPYNGGFPILGYLTVKTDNSSYTINVGNVSKYTLTNLTPEVLYEVMV
AYNKLGNSSPGIVNFVALTT
- [0834] 第三 Tn3 结构基序, SEQ ID NO :71
- [0835] LTTASISVSVKVNGVLISWNKTENTTYNLLISDKKGKIIIVNITTTNTSYFAYIPYGIYNTIRATNQ
VGTNSTSFPIVFYIPPI
- [0836] 第四 Tn3 结构基序, SEQ ID NO :72
- [0837] PLVKFSIGNNSILNLKWNVTGATFYLVYVNTTLIANVTDSYSLNLTPGFHVIRVVAANPIYNSSPAS
LGILIQHSTSSIT
- [0838] 硫磺矿硫化叶菌 P2
- [0839] NCBI 登录号 :NC_002754
- [0840] 蛋白质序列 :
- [0841] 第一 Tn3 结构基序, SEQ ID NO :73
- [0842] PLPPKITSYSAGNESVTLGWNPVRLSSGYEIIYWNMGNSSINVGNVTSYTVTGLKDGITYYFEVLAY
NSIGYSSPSSIIALTPASV
- [0843] 第二 Tn3 结构基序, SEQ ID NO :74
- [0844] PNPPQLVSVKYGNDNVTNLNWLPTFSGGYLLLGYYVIVKNENSMVSSHFNSTSLTISNLTPNVTYNVF
IYAVNKLGNSSPLVLTVPITKA
- [0845] 第三 Tn3 结构基序, SEQ ID NO :75
- [0846] PITKASVFAFITKLGNGILVNWTTSFPANITLLELYNPNGNLISQIAAIKGNSSYLFRVPQGNYTLVIA
SNSAGVSKYVYQVYYL

[0847] 第四 Tn3 结构基序, SEQ ID NO :76

[0848] PPASPQVSLIGFGNNLYISWNNEANVITYLVYVNNSLVYEGPSNSIVTNISNGTYLVKVIQVNPAGSSS
PGIAVIHYTG DYVT

[0849] 硫化叶菌 str. 7

[0850] NCBI 登录号 :NC_003106

[0851] 蛋白质序列 :

[0852] 第一 Tn3 结构基序, SEQ ID NO :3

[0853] PPKPQIASIASGNETITVKWYDTNASGYIITYWSNFSQKVTINVGNTSYTIKHLKDGVTYYIQIVPYN
SLGNGTPSDIISATPSSV

[0854] 第二 Tn3 结构基序, SEQ ID NO :4

[0855] PNPPIIKVKIGNLNATLTWYDTFNGGYPIEGYYLYVNGKGINVGNTSYVLTNLTAGELYTIELIAYNK
IGNSSISSVSFIAASKA

[0856] 第三 Tn3 结构基序, SEQ ID NO :77

[0857] ASKANLTVTVYK KINGFLVSWNSTSKAKYILTVSKENVLLNVSTTNTSYFVKVPFGVYNISLEAVNIV
GITKYAFILIIYYIQ

[0858] 第四 Tn3 结构基序, SEQ ID NO :78

[0859] PASPTVNWSITLNTVSLNWSKVSGAEYYLIYDNGKLITNTNTAFTFNLTIGQNEIEVYAANAYYKSAP
YIINDVRNYIVV

[0860] 实施例 5 的蛋白质序列

[0861] 大写字母对应于 Tn3 结构基序, 而小写字母是衍生自合成 cDNA 和表达载体的侧翼
附属序列。

[0862] >古细菌

[0863] SEQ ID NO :79

[0864] aaPAISNVRVSDVTNSSATIRWDVSLAANNRVLFSTNSDLSSPQWSAWDNSTDSPMITLSGLSAGTAYY
FSVYSFRPDNASLYSNSSIMSFTTgggtlehhhhh

[0865] SEQ ID NO :80

[0866] PAISNVRVSDVTNSSATIRWDVSLAANNRVLFSTNSDLSSPQWSAWDNSTDSPMITLSGLSAGTAYYFS
VYSFRPDNASLYSNSSIMSFTT

[0867] >海葡萄嗜热菌

[0868] SEQ ID NO :81

[0869] aaSEPQNLKATAGNNITLTWDPPIDDGGCRIVEYRIYRGTTNNNNLEYYASVNGSTTTTFIDKNIVYSQT
YYYKVS AVNNIVEGPKSNTASATPTSSgggtlehhhhh

[0870] SEQ ID NO :82

[0871] SEPQNLKATAGNNITLTWDPPIDDGGCRIVEYRIYRGTTNNNNLEYYASVNGSTTTTFIDKNIVYSQTYT
YKVS AVNNIVEGPKSNTASATPTSS

[0872] >嗜酸热硫化叶菌

[0873] SEQ ID NO :83

[0874] aaPLPPKITSYSAGNESVTLGWNPVRLSSGYEIIYWNMGNSSINVGNTSYTVTGLKDGITYYFEVL
AYNSIGYSSPSSIIALTPASVgggtlehhhhh

[0875] SEQ ID NO :84

[0876] PLPPKITSYSAGNESVTLGWNVPRLSSGYEIIYWNMGNSSINVGNTSYT VTGLKDGITYYFEVLAY
NSIGYSSPSSIIALTPASV

[0877] >硫化叶菌 1

[0878] SEQ ID NO :85

[0879] aaPPKPQIASIASGNETITVKWYDTNASGYIITYWSNFSQKVTINVGNTSYTIKHLKDGVTYYIQIVP
YNSLGNGTPSDIISATPSSVgggtlehhhhh

[0880] SEQ ID NO :86

[0881] PPKPQIASIASGNETITVKWYDTNASGYIITYWSNFSQKVTINVGNTSYTIKHLKDGVTYYIQIVPYN
SLGNGTPSDIISATPSSV

[0882] >硫化叶菌 2

[0883] SEQ ID NO :87

[0884] aaPNPPIIKVKIGNLNATLTWYDTFNNGGYPIEGYYLYVNGKINVGNTSYVLTNLTAGELYTIELIAY
NKIGNSSISSVSFIAASKAgggtlehhhhh

[0885] SEQ ID NO :88

[0886] PNPPIIKVKIGNLNATLTWYDTFNNGGYPIEGYYLYVNGKINVGNTSYVLTNLTAGELYTIELIAYNK
IGNSSISSVSFIAASKA

[0887] cDNA 序列

[0888] >古细菌

[0889] SEQ ID NO :89

[0890] gccatggcagccCCGGCGATTAGCAATGTGCGCGTTAGCGATGTGACCAACAGCAGCGCCACCATTCTG
TTGGGATGTGAGCCTGGCGGCGAATAAT°C GCGTGCTGTTTAGCACCAACAGCGATCTGAGCAGCCCGCAGTGGAGC
GCGTGGGATAACAGCACCGATAGCCCGATGATTACCTGAGCGGTCTGAGCGCGGGCACCGCGTATTATTTTAGCGT
GTATAGCTTTCGTCCGATAATGCGAGCCTGTATAGCAACAGCAGCATTATGAGCTTTACCACCggtggcggtacc

[0891] SEQ ID NO :90

[0892] CCGGCGATTAGCAATGTGCGCGTTAGCGATGTGACCAACAGCAGCGCCACCATTCTGTTGGGATGTGAGC
CTGGCGGCGAATAATCGCGTGCTGTTTAGCACCAACAGCGATCTGAGCAGCCCGCAGTGGAGCGCGTGGGATAACAG
CACCGATAGCCCGATGATTACCTGAGCGGTCTGAGCGCGGGCACCGCGTATTATTTTAGCGTGTATAGCTTTCGTC
CGGATAATGCGAGCCTGTATAGCAACAGCAGCATTATGAGCTTTACCACC

[0893] >海葡萄嗜热菌

[0894] SEQ ID NO :91

[0895] gccatggcggccAGCGAACCGCAGAACCTGAAAGCGACCGCGGGTAATAACAATATTACCCTGACCTG
GGATCCGCCGATTGATGATGGTGGCTGCCGCATTGTGGAATATCGTATTTATCGTGGCACCAATAATAACAACCTG
GAATATTATGCGAGCGTTAACGGCAGCACCACCACCTTTATTGATAAAAAATATTGTGTATAGCCAGACCTATTAT
TATAAAGTGAGCGCGGTGAACAATATTGTGGAAGGCCCCGAAAAGCAACACCGCGAGCGCGACCCCGACCAGCAGC
ggtggcggtacc

[0896] SEQ ID NO :92

[0897] AGCGAACCGCAGAACCTGAAAGCGACCGCGGGTAATAACAATATTACCCTGACCTGGGATCCGCCGATT
GATGATGGTGGCTGCCGCATTGTGGAATATCGTATTTATCGTGGCACCAATAATAACAACCTGGAATATTATGCGAG

CGTTAACGGCAGCACCACCACCTTTATTGATAAAAAATATTGTGTATAGCCAGACCTATTATTATAAAAGTGAGCGCGG
TGAACAATATTGTGGAAGGCCCGAAAAGCAACACCGCGAGCGCGACCCCGACCAGCAGC

[0898] >嗜酸热硫化叶菌_1

[0899] SEQ ID NO :93

[0900] gccatggcgcgccCGCTCCCACCGAAAAATTACCAGCTATAGCGCGGGCAACGAAAGCGTGACCCTGGGC
TGGAACCCGGTGCGTCTGAGCAGCGGCTATGAAATTATTTATTGGAACAATATGGGCTTTAACAGCAGCATTAAATGT
GGGTAATGTGACCAGCTATACCGTGACCGGCCTGAAAGATGGCATTACCTATTATTTTGAAGTGCTGGCCTATAACA
GCATTGGTTATAGCAGCCCGAGCAGCATTATCGCGCTGACCCCGGCGAGCGTGggtggcggtacc

[0901] SEQ ID NO :94

[0902] CCGCTCCCACCGAAAAATTACCAGCTATAGCGCGGGCAACGAAAGCGTGACCCTGGGCTGGAACCCGGTG
CGTCTGAGCAGCGGCTATGAAATTATTTATTGGAACAATATGGGCTTTAACAGCAGCATTAAATGTGGGTAATGTGAC
CAGCTATACCGTGACCGGCCTGAAAGATGGCATTACCTATTATTTTGAAGTGCTGGCCTATAACAGCATTGGTTATA
GCAGCCCGAGCAGCATTATCGCGCTGACCCCGGCGAGCGTG

[0903] >硫化叶菌_1

[0904] SEQ ID NO :95

[0905] gccatggcgcgccCGCCGAAACCGCAGATTGCCAGCATTGCCAGCGGTAATGAAACCATTACCGTGAAA
TGGTATGATACCAATGCGAGCGGCTATTATATTACCTATTGGAGCAATTTTAGCCAGAAAGTGACCATTAATGTGGG
TAACGTGACCAGCTATACCATTAAACATCTGAAAGATGGCGTGACCTATTATATTCAGATTGTGCCGTATAACAGCC
TGGGCAATGGCACCCCGAGCGATATTATTAGCGCGACCCCGAGCAGCGTTggtggcggtacc

[0906] SEQ ID NO :96

[0907] CCGCCGAAACCGCAGATTGCCAGCATTGCCAGCGGTAATGAAACCATTACCGTGAAATGGTATGATACC
AATGCGAGCGGCTATTATATTACCTATTGGAGCAATTTTAGCCAGAAAGTGACCATTAATGTGGGTAACGTGACCAG
CTATACCATTAAACATCTGAAAGATGGCGTGACCTATTATATTCAGATTGTGCCGTATAACAGCCTGGGCAATGGCA
CCCCGAGCGATATTATTAGCGCGACCCCGAGCAGCGTT

[0908] >硫化叶菌_2

[0909] SEQ ID NO :97

[0910] gccatggcgcgccCCGAATCCGCCGATTATTAAGTGAAAAATTGGCAATCTGAATGCGACCCTGACCTGG
TATGATACCTTTAATGGTGGTTATCCGATTGAAGGCTATTATCTGTATGTGAACGGTAAAGGTATTAACGTGGGCAA
CATTACCAGCTATGTGCTGACCAATCTGACCGCCGGTGAACGTATACCATTTGAACGTATTGCGTATAACAAAATCG
GCAACAGCAGCATTAGCAGCGTGAGCTTTATTGCGGCGAGCAAAGCGggtggcggtacc

[0911] SEQ ID NO :98

[0912] CCGAATCCGCCGATTATTAAGTGAAAAATTGGCAATCTGAATGCGACCCTGACCTGGTATGATACCTTT
AATGGTGGTTATCCGATTGAAGGCTATTATCTGTATGTGAACGGTAAAGGTATTAACGTGGGCAACATTACCAGCTA
TGTGCTGACCAATCTGACCGCCGGTGAACGTATACCATTTGAACGTATTGCGTATAACAAAATCGGCAACAGCAGCA
TTAGCAGCGTGAGCTTTATTGCGGCGAGCAAAGCG

[0913] 载体序列

[0914] SEQ ID NO :99

[0915] GACGAAAGGGCCTCGTGATACGCCTATTTTATAGGTTAATGTCATGATAATAATGGTTTCTTAGACGT
CAGGTGGCACTTTTCGGGGAAATGTGCGCGGAACCCCTATTTGTTTATTTTCTAAATACATTCAAATATGTATCCG

CTCATGAGACAATAACCCTGATAAATGCTTCAATAATATTGAAAAAGGAAGAGTATGAGTATTCAACATTTCCGTGT
CGCCCTTATTCCCTTTTTTGC GGCAATTTTGCCTTCCTGTTTTTGCTCACCCAGAAACGCTGGTGAAAGTAAAAGATG
CTGAAGATCAGTTGGGTGCTCGAGTGGGTACATCGAACTGGATCTCAACAGCGGTAAGATCCTTGAGAGTTTTCGC
CCCGAAGAACGTTTTCCAATGATGAGCACTTTTAAAGTTCTGCTATGTGGCGCGGTATTATCCCGTATTGACGCCGG
GCAAGAGCAACTCGGTGCGGCATACACTATTCTCAGAATGACTTGGTTGAGTACTCACCAGTCACAGAAAAGCATC
TTACGGATGGCATGACAGTAAGAGAATTATGCAGTGTGCCATAACCATGAGTGATAACACTGCGGCCAACTTACTT
CTGACAACGATCGGAGGACCGAAGGAGCTAACCGCTTTTTTG CACAACATGGGGGATCATGTAACCTCGCCTTGATCG
TTGGGAACCGGAGCTGAATGAAGCCATACCAACGACGAGCGTGACACCACGATGCCTGTAGCAATGGCAACAACGT
TGCGCAAACCTATTAACCTGGCGAACTACTTACTCTAGCTTCCCGGCAACAATTAATAGACTGGATGGAGGCGGATAAA
GTTG CAGGACCACTTCTGCGCTCGGCCCTTCCGGCTGGCTGGTTTATTGCTGATAAATCTGGAGCCGGTGAGCGTGG
GTCTCGCGGTATCATTGCAGCACTGGGGCCAGATGGTAAGCCCTCCCGTATCGTAGTTATCTACACGACGGGGAGTC
AGGCAACTATGGATGAACGAAATAGACAGATCGCTGAGATAGGTGCCCTCACTGATTAAGCATTGGTAACCTGTCAGAC
CAAGTTTACTCATATATACTTTAGATTGATTTAAAACCTTCATTTTTTAATTTAAAAGGATCTAGGTGAAGATCCTTTT
TGATAATCTCATGACCAAAATCCCTTAACGTGAGTTTTCGTTCCACTGAGCGTCAGACCCCGTAGAAAAGATCAAAG
GATCTTCTTGAGATCCTTTTTTTCTGCGCTAATCTGCTGCTTGCAAACAAAAAACCCCGCTACCAGCGGTGGTT
TGTTTGCCGGATCAAGAGCTACCAACTCTTTTCCGAAGGTAACCTGGCTTCAGCAGAGCGCAGATACCAAATACTGT
CCTTCTAGTG TAGCCGTAGTTAGGCCACCACTTCAAGAACTCTGTAGCACCGCCTACATACCTCGCTCTGCTAATCC
TGTTACCAGTGGCTGCTGCCAGTGGCGATAAGTCGTGTCTTACCGGGTTGGACTCAAGACGATAGTTACCGGATAAG
GCGCAGCGGTGCGGCTGAACGGGGGGTTCTGTGCATACAGCCCAGCTTGGAGCGAACGACCTACACCGAACTGAGATA
CCTACAGCGTGAGCTATGAGAAAGCGCCACGCTTCCCGAAGGGAGAAAGGCGGACAGGTATCCGTAAGCGGCAGGG
TCGGAACAGGAGAGCGCACGAGGGAGCTTCCAGGGGAAACGCCTGGTATCTTTATAGTCCTGTGCGGTTTTCGCCAC
CTCTGACTTGAGCGTCGATTTTTGTGATGCTCGTCAGGGGGCGGAGCCTATGGAAAAACGCCAGCAACGCGGCCTT
TTTACGGTTCCTGGCCTTTTGCTGGCCTTTTGCTCACATGTTCTTTCCCTGCGTTATCCCGTGATTCTGTGGATAACC
GTATTACCGCCTTTGAGTGAGCTGATACCGCTCGCCG CAGCCGAACGACCGAGCGCAGCGAGTCAGTGAGCGAGGAA
GCGGAAGAGCGCCAATACGCAAACCGCTCTCCCGCGCGTTGGCCGATTCAATTAATGCAGCTGGCAGCAGAGTT
TCCCGACTGGAAAGCGGGCAGTGAGCGCAACGCAATTAATGTGAGTTAGCTCACTCATTAGGCACCCCAGGCTTTAC
ACTTTATGCTTCCGGCTCGTATGTTGTGTGGAATTGTGAGCGGATAACAATTTACACAGGAAACAGCTATGACCAT
GATTACGCCAAGCTTTGGAGCCTTTTTTTTGGAGATTTTCAACGTGAAAAAATTATTATTCGCAATTCCTTTAGTTG
TTCCTTTCTATGCGGCCAGCCGGCCATGGCCGCCATTGAAGTGAAAGATGTGACCGATACCACCGCGCTGATTACC
TGGTTTAAACCGCTGGCGGAAATTGATGGCTGTGAACTGACCTATGGCATTAAAGATGTGCCGGGCGATCGCACCAC
CATAGATCTGACCGAAGATGAAAACCAGTATAGCATTGGTAACCTGAAACCGGATACCGAATATGAAGTGAGCCTGA
TTTGCCGTCTGTCGATATGAGCGGCGCGCCGGCGAAAAGAAACCTTTACCACCGGTGGCGGTACCCCAACCGACCCG
CCAACCACTCCACCAACTGATAGCCAGGCGGTACTGGTGGCTCTGGTTCCGGTGATTTTGATTATGAAAAGATGGC
AAACGCTAATAAGGGGGCTATGACCGAAAAATGCCGATGAAAACGCGCTACAGTCTGACGCTAAAGGCAAACCTTGATT
CTGTGCTACTGATTACGGTGCTGCTATCGATGGTTTCATTGGTGACGTTTCCGGCCTTGCTAATGGTAATGGTGCT
ACTGGTGATTTTGCTGGCTCTAATTCCCAAATGGCTCAAGTCGGTGACGGTGATAATTCACCTTTAATGAATAATTT
CCGTCAATATTTACCTTCCCTCCCTCAATCGGTTGAATGTGCGCCTTTTGCTTTAGCGCTGGTAAACCATATGAA
TTTTCTATTGATTGTGACAAAAATAAACTTATCCGTGGTGTCTTTGCGTTTCTTTTATATGTTGCCACCTTTATGTA
TGTATTTTCTACGTTTGCTAACATACTGCGTAATAAGGAGTCTTAAGAATTCGACGGTCACAGCTTGTCTGTAAGCG

GATGCCGGGAGCAGACAAGCCCGTCAGGGCGCGTCAGCGGGTGTGGCGGGTGTGCGGGCTGGCTTAACTATGCGGC
 ATCAGAGCAGATTGTACTGAGACTGCACCATAAAATTGTAAACGTTAATATTTTGTAAATTCGCGTTAAATTTTT
 GTTAAATCAGCTCATTTTTTAAACCAATAGGCCGAAATCGGCAAAATCCCTTATAAATCAAAGAATAGCCCGAGATA
 GGGTTGAGTGTTGTTCCAGTTTGAACAAGAGTCCACTATTAAAGAACGTGGACTCCAACGTCAAAGGGCGAAAAAC
 CGTCTATCAGGGCGATGGCCCACTACGTGAACCATCACCCAAATCAAGTTTTTTGGGGTTCGAGGTGCCGTAAAGCAC
 TAAATCGGAACCCTAAAGGGAGCCCCCGATTAGAGCTTGACGGGGAAGCCGGCGAACGTGGCGAGAAAGGAAGGG
 AAGAAAGCGAAAGGAGCGGGCGCTAGGGCGCTGGCAAGTGTAGCGGTCACGCTGCGCGTAACCACCACACCCGCCGC
 GCTTAATGCGCCGCTACAGGGCGCTACTATGGTTGCTTTGACGTATGCGGTGTGAAATACCGCACAGATGCGTAAG
 GAGAAAATACCGCATCAGGCGCCATTGCCATTAGGCTGCGCAACTGTTGGGAAGGGCGATCGGTGCGGGCCTCTT
 CGCTATTACGCCAGCTGGCGAAAGGGGGATGTGCTGCAAGGCGATTAAAGTTGGGTAACGCCAGGGTTTTCCAGTCA
 CGACGTTGTAAACGACGGCCAGTTCGGGAGCTGCATGTGTCAGAGGTTTTACCGTCATCACCGAAACGCGCGA

[0916]

克隆	BC 环	Seq ID NO:	FG 环	Seq ID NO:
SYNAGIS®特异性结合支架				
SynBP01	SPPSVLVGYTG	100	VTEFGRRRS	101
2	FKPLAEIDG	102	RKIIIGLLSNPA	103
3	FKPLAEIDG	102	GTVVVGQKSNPA	104
4	SPGERIWMFTG	105	PNYERISNPA	106
5	SPSGRVILWTG	107	DNLYGRISNPA	108
6	ATPGCRNGKIVG	109	TTSVGATSNPA	110
溶菌酶特异性结合支架				
1	FKPLAEIDG	111	YNRYGLCPS	112
2	FKPLAEIDG	111	SNRIGMCPS	113
3	AQPTSPNGSIXG	114	RRGDMSSNPA	115
4	FKPLAEIDG	102	DTVHGRLSNPA	116
5	FKPLAEIDG	102	RKVLGRLSNPA	117
6	FKPLAEIDG	102	RKLVGALRS	118
7	FKPLAEIDG	102	RKVLRYSNPA	119
8	SPCNGGKRCTG	120	RRGDMSSNPA	121
9	FKPLAEIDG	102	FKWLGAIRS	122
10	FKPLAEIDG	102	GNCVGNLWS	123
11	SPAWITWHRTG	124	HTPLGHLRS	125

[0917] TRAIL-R2 双 - 环结合物

[0918]

克隆名称	BC 环	SEQ ID NO.	FG 环	SEQ ID NO.
2F4	SPCIMVCLRTG	126	RRGDMSGAPA	127

5B10	SPCLFVCLRTG	128	RRGDMSGAPA	129
10D9	SPPLFCCQKTG	130	FKLTGFLYS	131
6F11	SPSVARMLTG	132	ITLCGRGVS	133
8B3	SPPEYAFYYTG	134	VKNCGLFSNPA	135
5E5	SLAPGYRLG	136	VKLCMRGNPA	137
2H6	ATPSVFDHIEG	138	WKHHGDAWS	139
7G11	AKPSIVNGFISG	140	DKCFGAMKS	141
6C7	AKPMSCSGYIQG	142	AKLTGWLCS	143

[0919] TRAIL-R2 三 - 环结合物

[0920]

克隆	BC 环	SeqId.	DE 环	SeqId.	FG 环	SeqId.
1E03	AAPFFGSSYISG	144	HYYVTR	145	VNLSGHMPS	146
2B04	APPMLTDSEING	147	TSSYWS	148	STLRRNAIS	149
1C12	AKPEKWDGSIYG	150	NSRHTA	151	FTPYGAKSNPA	152
1A03	APPPFSNSCIIG	153	RPGRAS	154	STGTGLPSNPA	155
1C10	SPCCPYDRYTG	156	QSSRSH	157	ITTFGHVSNPA	158
1B12	AKPRQGSNISG	159	YHKGLH	160	PKMTGYTYS	161
2G03	SPGPLLRHTTG	162	RPIPra	163	RNRPQQSNPA	164
2D3	SPGGFQKITTG	165	VNRRNH	166	LTYKARAIIS	167
1C06	SPRMYTWIQTG	168	THLSGS	169	LKLTRTHIS	170
2F08	SHAGGIRIG	171	HVWQVY	172	MTPYLLGNPA	173
1B04	SPSHGVESSTG	174	HGLQRV	175	AKICGHLVS	176
3B11	SPCQLLALITG	177	NSRHYH	178	YTSTGQRSNPA	179
1D8	SPCQMLSSLTG	180	NIERPK	181	FTMTGYRSNPA	182

2A12	SPCCQEFTLTG	183	HNHHHH	184	ITDAGNKSnpA	185
1E05	SPCSPQLVTG	186	SCTRAK	187	INKLGDTSNpA	188
2F02	SPSRGGTSLTG	189	DQVRAT	190	HTNSGQPSnpA	191
1H05	SPGMFDQVRTG	192	GKYWER	193	RNQYQGHS	194
2A11	SPPFRAGHVTG	195	VTARCQ	196	TTGNGLRSnpA	197
1G11	SWAQANPGG	198	WHSITF	199	KTKVQSSnpA	200

[0921] 8. 实施例

[0922] 现在参考以下实施方式描述本发明。提供这些实施例只是为了说明的目的，本发明不应理解成局限于这些实施例，而应理解成包括因本文提供的指导而明白的任何和所有改变形式。

[0923] 8.1 实施例 1. 候选支架的重组表达

[0924] 本实施例证明可以在大肠杆菌中重组表达候选支架，其表达量足以根据考马斯染色的聚丙烯酰胺凝胶上的宿主蛋白背景作目测（图 1）。图 1 显示了表达候选支架的粗制大肠杆菌裂解液的 PAGE 分析。一些候选支架显示较高的表达水平（如泳道 3、4、5 和 10 所示），选择它们作进一步开发。具体地说，泳道 3 代表纤连蛋白 III 的第 6 个结构域，泳道 4 代表 β -共同受体（common receptor）的支架，泳道 5 代表生长激素受体的候选支架，泳道 10 代表 Tn3 结构基序。

[0925] 重组表达

[0926] 选择一组人衍生的 Tn3 结构基序序列以供在大肠杆菌中异源表达（表 1）。根据所示序列，由基因录公司（GenScript Corporation）提供编码这些蛋白中每一种并为大肠杆菌中的密码子选择作优化的合成 cDNA。各 cDNA 含有侧翼 NcoI 和 Kpn I 限制性位点，用这些酶消化后，将插入物克隆入含有相应 Nco I/KpnI 位点的修饰 pET22b 载体（诺瓦金公司（Novagen））。

[0927] 在其它实施方式中，载体可包含任何数量的限制性位点以促进本发明支架的工程改造。在一些实施方式中，本发明载体包含至少一个限制性位点。在其它实施方式中，本发明载体包含侧接至少一个环序列的至少一个限制性位点。在其它实施方式中，本发明载体包含选自下组的至少一个限制性位点：NcoI、BglIII、BstEII、AscI 和 KpnI。在进一步的实施方式中，载体包含前导序列。在其它实施方式中，载体包含接头序列。在具体的实施方式中，本发明载体包含 SEQ ID NO:99 所示的多核苷酸序列。

[0928] 37℃，将含有 Tn3 结构基序表达质粒的 BL21DE3 大肠杆菌转化体在含有 50 μ g/mL 羧苄青霉素的 Luria 肉汤中培养过夜。用含有 50 μ g/mL 羧苄青霉素和 2% w/v 葡萄糖的超级肉汤培养基（Super Broth media）对过夜培养液作 1 : 20 稀释，37℃ 震荡温育直至 600nm 光密度达到 0.6。此时，加入 IPTG 至 200 μ M 诱导蛋白质表达，将培养液转移至 30℃ 震荡温育箱中。30℃ 温育 5 小时后，取出少量的等份培养液以供 SDS-PAGE 分析，离心沉淀其余细胞，-20℃ 冷冻过夜。全细胞裂解液的 SDS-PAGE 分析提示 Tn3 结构基序 3、4、5、10 在

大肠杆菌中高度过表达, 如约 10kDa 凝胶条带所测定的 (图 1)。不同的实验也显示 Tn3 结构基序 12 过表达。

[0929] 纯化

[0930] 将冷冻的细胞沉淀物重悬在含有 1mg/mL 溶菌酶 (西格玛公司 (Sigma)) 和 200 单位 / 毫升 DNA 酶 (英杰公司 (Invitrogen)) 的裂解缓冲液中 (50mMNaH₂PO₄, 300mM NaCl, 10mM 咪唑, pH 8.0), 通过离心, 然后经 0.8 μm 滤器过滤将澄清的连接于与细胞碎片分开。将裂解液加载于带有 Ni²⁺ 的 HiTrap 螯合柱上, 用 15 个柱体积的洗涤缓冲液 (50mM NaH₂PO₄, 300mM NaCl, 20mM 咪唑, pH 8.0) 洗涤, 用 4 个柱体积的洗脱缓冲液 (50mM NaH₂PO₄, 300mM NaCl, 250mM 咪唑, pH 8.0) 洗脱。按照 Gill 和 von Hippel 方法 (Anal. Biochem. 182 :319, 1989) 通过 280nm 的 UV 吸光度测定纯化蛋白质的浓度。表 1 报道了各种 Tn3 蛋白质的纯化后产量。衍生自人结合腕蛋白 C 的 Tn3 结构基序 (Tn3) 产量最高, 从 400 毫升培养液中获得 110 毫克纯化的 Tn3。纯化 Tn3 样品的 SDS-PAGE 分析见图 2。

[0931] 表 1

[0932]

蛋白质编号	母体蛋白	表达水平 (mg/L)	蛋白质序列	DNA 序列
1	纤连蛋白	2mg/ml	1P	1D
2	纤连蛋白	—	2P	2D
3	纤连蛋白	83	3P	3D
4	生长激素 R	48	4P	4D
5	β - 共同 R	9	5P	5D
6	IL-5R	—	6P	6D
7	结合腕蛋白 XB	—	7P	7D
8	结合腕蛋白 XB	—	8P	8D
9	结合腕蛋白 XB	—	9P	9D
10	结合腕蛋白 C (Tn3)	265	10P	10D
11	生长激素 R	—	11P	11D
12	PTPR-F	105	12P	12D
13	PTPR-F	3	13P	13D

14	XIV 型胶原	1	14P	14D
----	---------	---	-----	-----

[0933] 表征

[0934] 由于大肠杆菌中可溶性 Tn3 的产量较高,分析该蛋白的稳定性和溶液特性。

[0935] 稳定性

[0936] 通过示差扫描量热法 (DSC) 评估 Tn3 的热解折叠。pH 7.0, 20mM 磷酸钠中的 1 毫克 / 毫升 Tn3 样品显示解链温度 (T_m) 为 45°C (图 3A), 此外, 当相同样品冷却和再加热时, 可重叠热分析图证明热解折叠可逆。较低 pH 或高盐下, Tn3 对热解折叠更稳定。在 pH 5.0 的 20mM 乙酸钠中 T_m 是 56°C, 在 pH 7.0 的含 1M NaCl 的 20mM 磷酸钠中是 55°C。

[0937] 通过固有荧光监测离液剂对 Tn3 的解折叠。在 20mM 磷酸钠 pH 7.0、或 20mM Tris pH 7.5 中制备含有不同浓度脲或盐酸胍的 0.1mg/mL Tn3 样品。用光子技术公司的量子大师荧光分光光度计 (Photon Technology QuantaMasterspectrofluorometer) 获得 280nm 激发波长的荧光发射光谱。没有离液剂存在下, 折叠的 Tn3 样品显示 319nm 的最大发射。除增加荧光强度外, 脲或 GuHCl 使 Tn3 解折叠造成最大到 348nm 的红移。pH 7.0 或 7.5 的解折叠中点发生在约 2M 脲 (图 3B) 或 0.8M GuHCl。

[0938] 通过与嗜热菌蛋白酶温育检验 Tn3 对蛋白水解降解的稳定性。室温下, 将 Tn3 (45 μ M) 与嗜热菌蛋白酶 (0.45 μ M) 在消化缓冲液 (含 10mM CaCl_2 的 20mM Tris pH 7.5) 中温育。在不同时间点取出等份消化产物, 加入过量 EDTA 猝灭反应。然后通过 SDS-PAGE 分析样品 (参见图 10G 中的野生型泳道)。如图 10G 所示, 与嗜热菌蛋白酶温育时野生型 Tn3 结构域快速降解。

[0939] 采用具有多角度光散射的尺寸排阻色谱 (SEC-MALS) 测定 Tn3 在溶液中是否是单体。利用 Bio-Rad Bio-Sil SEC 125-5 柱 (7.8×300mm) 以 0.75 毫升 / 分钟的流速进行尺寸排阻分离。流动相是 pH 7.2 的磷酸缓冲盐水 (PBS)。利用连接有怀特技术公司光学实验室 rEX 示差折射率检测器 (Wyatt Technologies OptilabrEX differential refractive index detector) 和安捷仑公司 1100 系列可变波长 UV 检测器 (Agilent 1100Series variable wavelength UV detector) 的怀特技术公司 DAWN EOS 多角度光散射检测器进行三重检测。SEC-MALS 分析显示 4°C 保存 2 个月的 4.5mg/mL Tn3 中单体含量为 97% (图 3C)。实验获得的单体质量为 10.6kDa, 与 10.8kDa 的计算质量非常一致。即使延长保存时间 Tn3 支架依旧维持单体。

[0940] 8.2 实施例 2. 鉴定环长度和序列多样性

[0941] 理想的支架是高度可溶和稳定的。其应足够小以便进行结构分析, 还应足够大从而能允许大幅度的改变以便结合靶标。在鉴定和工程改造非抗体蛋白质支架以及设计支架的组合文库的研究中, 对支架序列进行生物信息学分析。

[0942] Tn3 结构基序小、单体性、可溶而稳定。此外, Tn3 结构基序存在于许多不同的人蛋白质中, 提供对于稳定性和折叠至关重要的保守性残基以及可研究以引入新型结合功能的多样性区域的重要信息。序列分析在 BC 和 FG 环中发现大量变化, 提示这些环对于稳定性不重要。利用该特性开发了一种方案来鉴定候选蛋白支架并分析环长度和序列多样性以图表征这两个参数中发生改变的天然程度。

[0943] 根据 Tn3 结构基序检索可用的蛋白质数据库鉴定到许多蛋白支架。候选支架含有

与 Tn3 结构基序相似的预计结构,即,各自被环区域隔开的 7 个 β 链。分析 β 链和环区域的位置显示可能有助于预测结构未知候选支架的环长度和序列组成的多样性模式。在可用蛋白质数据库中对候选支架的 BC、DE 和 FG 环进行长度多样性分析。

[0944] 编辑鉴定的支架序列开发了图 4、5 和 6 所示的环长度多样性图。图 4A 显示了从分析蛋白质数据库 (PDB) 的 51 条序列获得的 BC 环长度多样性。从图中可以看出该序列集合中 BC 环长度从约 8 个氨基酸残基到约 26 个氨基酸残基,其中 9 个氨基酸残基环最普遍。图 4B 显示了从分析瑞士-蛋白质数据库中鉴定的 397 条序列获得的环长度多样性。从图中可以看出该序列集合中 BC 环长度从约 7 个氨基酸残基到约 19 个氨基酸残基,其中 12 个氨基酸残基环最普遍。图 5 显示了从分析 PDB 数据库中鉴定的 51 条序列获得的 FG 环长度多样性。从图中可以看出该序列集合中 FG 环长度从约 6 个氨基酸残基到约 18 个氨基酸残基,其中 10 个氨基酸残基环最普遍。对 DE 环序列进行本文所述相似的分析。图 6 显示了 DE 环长度多样性,显示 DE 环长度从约 4 个氨基酸残基到约 17 个氨基酸残基,其中 6 个氨基酸残基环最普遍。

[0945] 除了长度多样性,对更丰富的环长度进行了序列多样性分析以图指导共有序列的建立。图 7A 中显示了 9 氨基酸残基 BC 环的序列多样性图。在各位置含有特定氨基酸的框的相对大小表示各位置处该残基的普遍性。例如,9 氨基酸残基环的 3 位主要是脯氨酸或丙氨酸。而在 5 位主要是甘氨酸和丙氨酸。7 位主要是缬氨酸、异亮氨酸和苯丙氨酸。该环中其它位置显示较大的序列多样性提示这些位置在构建 Tn3 支架文库时可能适于完全随机化。图 7B 显示 12 氨基酸残基 BC 环的序列多样性图。在该分析中,例如 3 位优选脯氨酸残基。1、4、5 和 12 位看来也适于完全随机化,因为它们对氨基酸残基不显示选择性。图 8 显示所有长度 FG 环的序列多样性图。从该分析可以看出,2 位常是天冬酰胺,5 位优选甘氨酸,7 位常是甘氨酸或丝氨酸。1、3、4、6、8、9、11、12 和 13 位也代表了文库构建中完全随机化的候选位置,因为它们对氨基酸残基不显示选择性。该分析的数据提示在显示序列保守性的位置限制环多样性可能有优势,从而文库中更大比例的分子可保持野生型-样稳定性、表达和溶解性。

[0946] 8.3 实施例 3. 构建噬菌体展示的 Tn3 文库和选择特定结合物

[0947] 鉴于以上建立的环和序列多样性,实施开发文库的定向方法。更具体地说,环 BC 和 FG 以限制性方式随机化。BC 和 FG 环采用以下方案。

[0948] 文库设计和构建

[0949] 将编码 Tn3,对应于 seq. ID 10D 的 Nco I-Kpn I 片段(序列见章节 6)的合成 cDNA 克隆入能在 M13 噬菌体表面展示与基因 III 外壳蛋白的片段融合的 Tn3 蛋白的噬菌体展示载体。该构建物编码 Tn3 的 C-末端与 M13 基因 III 的密码子 251-406 之间的 20 氨基酸富含 Thr/Pro 的接头序列。

[0950] 利用简并寡核苷酸,通过 Kunkel 诱变(Kunkel TA 等, Methods Enzym. 204, 125, 1991) 制备随机突变 Tn3 的文库。利用三种简并寡核苷酸随机化 BC 环的编码序列,三种用于 FG 环(表 2)。该方案在 Tn3 文库中引入表征的序列和环长度多样性,与天然 Tn3 结构域所述多样性模式一致。

[0951] 表 2: Tn3 文库构建的简并寡核苷酸

[0952]

寡聚物名称	随机化的环	序列	Seq ID
BC9	BC	ACCGCGCTGATTACCTGGTCTNNKSCGNNKGSTNNK NNKNNKGGCATTGAACTGACCTATGGC	211
BC11	BC	ACCGCGCTGATTACCTGGTCTCCGBSTNNKNNKNNK NNKNNKNNKACCGGCATTGAACTGACCTATGGC	212
BC12	BC	ACCGCGCTGATTACCTGGGCGVMACCGNNKNNKNNK RRCRGCNKATTNNKGGTATTGAACTGACCTATGGC	213
FG9	FG	TATGAAGTGAGCCTGATTAGCNNKAMSNNKNNKGGT NNKNNKNNKAGCAAAGAAACCTTTACCACC	214
FG10	FG	TATGAAGTGAGCCTGATTAGCNNKAMSNNKNNKNNK NNKRGCAACCCGGCGAAAGAAACCTTTACCACC	215
FG11	FG	TATGAAGTGAGCCTGATTAGCNNKAMSNNKNNKGGT NNKNNKAGCAACCCGGCGAAAGAAACCTTTACCACC	216

[0953] 用随机化突变的噬菌粒构建物转化电感受态 (electrocompetent) 大肠杆菌后, 加入 M13K07 辅助噬菌体, 37℃, 将培养物在 500mL 含有羧苄青霉素的 2YT 培养基中生长过夜。然后通过用盐水聚乙二醇溶液沉淀从培养上清液分离噬菌体并重悬于少量 PBS 中。

[0954] 淘选特异性 **SYNAGIS®** 结合支架的文库

[0955] **SYNAGIS®** 被动吸附在微量滴定板孔上, 用含 10mg/mL BSA 或酪蛋白的 PBS 阻断游离位点。用含 2mg/mL BSA 或酪蛋白和 0.1% v/v 吐温-20 的 PBS 稀释噬菌体储备液。将稀释的噬菌体样品 (100 μL; 约 10¹² 个噬菌体) 加入 **SYNAGIS®**-包被的孔, 室温下温育 2 小时并小心振荡。然后用含 0.1% v/v 吐温 20 的 PBS 洗涤平板 10-15 次, 用 100 微升/孔的 0.1M HCl 洗脱结合的噬菌体, 然后加入 1.0M Tris-HCl, pH 8.0 中和。通过感染 XL-1 蓝大肠杆菌再次增殖洗脱的噬菌体, 从含 50 μg/mL 羧苄青霉素的 50mL 2YT 培养基中共同感染了 M13K07 辅助噬菌体的过夜培养物收集。以此方式用 **SYNAGIS®** 淘选文库共 4 轮, 在第一和第三轮中用封闭和稀释缓冲液配制的 BSA, 在第二和第四轮中用酪蛋白。

[0956] 筛选 **SYNAGIS®** 结合克隆

[0957] 最后一轮淘选后, 连续稀释洗脱的噬菌体, 并用于感染 XL-1 蓝大肠杆菌 1 小时, 然后接种在含 50 μg/mL 羧苄青霉素的 LB 琼脂上过夜。挑取各菌落, 在 2YT/ 羧苄青霉素中生长过夜。然后用 2YT/ 羧苄青霉素 1 : 100 稀释培养液, 生长至光密度 (600nm) 为 0.4, 加入 M13K07 辅助噬菌体, 然后 37℃ 温育过夜并振荡。离心后, 用含 0.1% v/v 吐温 20 和 2% w/v 脱脂奶粉的等体积 PBS 稀释 50 微升培养上清液并用于 ELISA 分析。然后选择对结合 **SYNAGIS®** 而不是 BSA/ 酪蛋白包被 ELISA 平板反应最高的克隆进行测序。为测定所选克隆展示的 Tn3 变体的序列, 将 1 微升培养上清液用于 PCR 来扩增包含编码的 Tn3 序列的片段。然后用除了俄亥俄州克里夫兰 USB 公司 (USB Corp., Cleveland, OH) 的 ExoSAPit 处理

该 PCR 产物来降解未消耗的脱氧核苷酸和引物,直接测序。

[0958] 鉴定 **SYNAGIS®** – 结合 Tn3 变体 SynBP01

[0959] **SYNAGIS®** – 结合 Tn3 变体的 DNA 测序鉴定了 3 个独特克隆。**SYNAGIS®**结合 ELISA 中信号最高的克隆含有新型 BC 和 FG 环序列,如表 3 所示。为表达可溶性 SynBP01,从噬菌体展示载体切下 NcoI-KpnI cDNA 片段,克隆入以前描述的大肠杆菌表达载体的相应位点。然后在大肠杆菌中表达重组 SynBP01,如以前野生型 Tn3 所述纯化。400ml 大肠杆菌培养液中纯化 SynBP01 的产量是 18mg,SDS-PAGE 分析判断纯度大于 95% (图 9A)。由于该回收率接近所用的 1mL 镍螯合亲和柱的能力,可能该产量低估了 SynBP01 的实际表达水平。

[0960] 测定 SynBP01 显示的 **SYNAGIS®** 结合亲和力

[0961] 利用 BIAcore 3000 仪器通过表面等离子共振检测 SynBP01 结合**SYNAGIS®**的平衡解离常数 (K_D)。**SYNAGIS®**通过伯胺基团共价固定于生物传感器芯片。将 HBS-EP 缓冲液 (10mM HEPES, 150mM NaCl, 3mM EDTA, pH7.5, 0.005% v/v 吐温 20) 配制的 SynBP01 样品以 10 微升 / 分钟的流速注射流过芯片来检测 SynBP01 的平衡结合 (图 9B)。各平衡结合检测后,将 HBS-EP 缓冲液流过该芯片至少 25 分钟以使 SynBP01 完全解离,然后注射下一 SynBP01 样品。利用瑞典乌普萨拉拜科公司 (Biacore AB, Uppsala, Sweden) 的 BIA 评估软件分析结合概括, SynBP01 结合**SYNAGIS®**的 K_D 计算为 16 μ M。

[0962] 检测 SynBP01 的稳定性

[0963] 如前对 Tn3 所述 (参见实施例 1),检测 SynBP01 对 pH 7.0 脲解折叠的稳定性。为方便比较 Tn3 和 SynBP01 的离液剂诱导解折叠,将 360nm 的相对荧光发射强度绘制成各蛋白的离液剂浓度的函数关系。

[0964] pH 7.0, Tn3 和 SynBP01 的脲诱导解折叠比较显示两种蛋白质达到 50%解折叠的脲浓度类似。这表明 SynBP01 的稳定性类似于野生型 Tn3。

[0965] 在其它文库筛选中,鉴定到其它**SYNAGIS®**和溶菌酶特异性结合支架。特异性 BC 和 FG 环序列如下所示:

[0966] 表 3. **SYNAGIS®**和溶菌酶特异性结合支架的 BC 和 FG 环序列

[0967]

克隆	BC 环	Seq ID NO:	FG 环	Seq ID NO:
SYNAGIS®特异性结合支架				
SynBP01	SPPSVLVGYTG	100	VTEFGRRRS	101
2	FKPLAEIDG	102	RKIIGLLSNPA	103
3	FKPLAEIDG	102	GTVVGQKSNPA	104
溶菌酶特异性结合支架				
1	FKPLAEIDG	102	YNRYGLCPS	112
2	FKPLAEIDG	102	SNRIGMCPS	113
3	AQPTSPNGSIXG	114	RRGDMSSNPA	115
4	FKPLAEIDG	102	DTVHGRLSNPA	116
5	FKPLAEIDG	102	RKVLGRLSNPA	117
6	FKPLAEIDG	102	RKLVGALRS	118
7	FKPLAEIDG	102	RKVLRYSNPA	119
8	SPCNGGKRCTG	120	RRGDMSSNPA	121
9	FKPLAEIDG	102	FKWLGAI RS	122
10	FKPLAEIDG	102	GNCVGNLWS	123
11	SPAWITWHRTG	124	HTPLGHLRS	125

[0968] 成对支架的 mAb 捕捉

[0969] 由于能同时结合两个靶标蛋白, 含有两个相同或两个不同支架的二价或双特异性支架可以是有用的治疗分子。直接筛选具有所需二价或双特异性活性的支架配对, 而无需重排和表达串联或融合支架的方法将极大简化鉴定有用支架配对的方法。只有在筛选中鉴定的那些配对需要重排成适于制备二价或双特异性支架的形式 (例如, 多聚支架)。

[0970] 全长 IgG 抗体分子含有两个抗原结合位点, 因此可同时结合两个靶标抗原。因此, 非共价单克隆抗体捕捉支架可在抗体的各抗原结合臂上提供两个支架。如果以此方式捕捉的支架定向成 BC、DE 和 FG 环形成的结合表面可用于结合其它蛋白, 这可形成筛选支架配对的基础。出于该原因, 利用识别涉及支架 C-末端的表位或者 AB、CD、EF 环的任一 / 全部的抗体捕捉是最适合的。抗体捕捉两个相同支架会形成能模拟二价支架活性的同源二聚 mAb- 支架复合物。捕捉 2 个不同支架会获得同源和异源 mAb- 支架复合物的混合物, 其中所述异源二聚复合物能模拟双特异性支架的活性。

[0971] 为证明该试验方案的可行性, 不同浓度的五 His (一种抗-组氨酸标签单克隆抗体 (恰根公司 (Qiagen))) 与 $1\mu\text{M}$ SynBP01 在 HBS-EP 缓冲液温育 2 小时。鉴于 C-末端六组氨酸标签应在该分子中 BC、DE 和 FG 环形成的结合表面的对侧, 预计 SynBP01 的五 His 捕捉不会影响其结合 SYNAGIS® 的能力 (图 9D)。然后将五 His-SynBP01 样品注射到 BIAcore® 芯片上, 该芯片上如前所述固定了 SYNAGIS®。通过扣除没有 SynBP01 存在下, 注射五 His 的相应传感器图对传感器图作背景校正, 然后与没有五 His 存在下, 注射 $1\mu\text{M}$ SynBP01 获得的传感器图作比较。

[0972] 如对应于 $0.19\mu\text{M}$ 五 His 与 $1\mu\text{M}$ SynBP01 的复合物的传感器图所示 (图 9D), 五 His-SynBP01 复合物与 SYNAGIS® 的结合显著强于游离 SynBP01 的结合。具体地说, 五 His- 与 SynBP01 形成的复合物离开 SYNAGIS® 表面的解离速率远慢于游离的 SynBP01, 表明二价结合。对照实验证实单独注射时, 五 His 不显示与 SynBP01 有任何可检测的结合, 注射 SynBP01/ 无关小鼠 mAb 混合物 (五 His 匹配的同种型) 也不显示与单用 SynBP01 相比, 结合有任何增强的证据。

[0973] 8.4 实施例 4. 二硫键稳定的 Tn3 变体的设计、表达和表征

[0974] 设计含二硫键的 Tn3 变体

[0975] 虽然许多天然产生的 Tn3 结构基序缺乏二硫键,其它确实含有一个或多个二硫键。因此,我们将半胱氨酸引入 Tn3 支架中类似于含有天然产生二硫键的 Tn3 结构域的位置,而不试图通过检测氨基酸侧链之间的距离和角度来从头设计 Tn3 中的二硫键。

[0976] 将天然含有二硫键的 21 个 Tn3 结构基序的三维结构重叠。这些结构的 PDB 密码和序列见图 10A。在这 21 个结构中,二硫键在支架内的各位置,然而许多这些支架中类似,即,重叠结构家族内的二硫键重叠。发现在 21 种结构中出现两次以上的二硫键有三个例子。这三个中的两个对应于以前描述的细胞因子受体内通常保守的二硫键配对 (Bazan 等, PNAS, 87, 6934, 1990)。在 21 种结构中注意到这两个二硫键的总共 8 和 12 个例子。第三二硫键出现频率较低 (21 种结构中 5 例),并导致 F- 和 G- 之间交联。

[0977] 设计三种含半胱氨酸的 Tn3 突变体,以图在对应于这 3 种天然产生二硫键的位置引入二硫键。还设计了第四种含半胱氨酸的突变体,从而引入在小鼠 G-CSF 受体的 Tn3 结构基序之一中天然产生的二硫键 (PDB 密码 1pgr)。虽然在 21 种结构种该二硫键仅有 1 例,但其在 C- 和 F- 链之间产生包埋在蛋白质核心内并接近 BC 和 FG 环的二硫键交联。对于各种 Tn3 突变体 (称为 Tn3^{SS1-4}),将 2 个半胱氨酸引入 Tn3 与那些含二硫键的 Tn3 蛋白质的基于结构序列比对测定的位置 (图 10A)。由于二硫键 2 贯穿 DE 环常比 Tn3 长的 Tn3 结构基序中 DE 环的基面,还在对应于 Tn3^{SS2} 的突变体中插入两个甘氨酸残基。二硫键工程改造方案图示于图 10B 中。

[0978] 二硫键突变体产生和重组表达

[0979] 通过实施例 1 所述野生型表达构建物的定点诱变产生 Tn3^{SS1-4} 的表达构建物。重组蛋白在大肠杆菌中表达,通过固定化镍螯合剂亲和层析纯化,如实施例 1 所述。所有 Tn3 突变体的表达水平超过 50mg/L。

[0980] Tn3^{SS1-4} 的重折叠

[0981] 蛋白质在大肠杆菌中的胞质表达通常导致分离的含半胱氨酸蛋白质为还原状态,或者具有一定程度的不适当二硫键形成。为测定重组 Tn3^{SS1-4} 蛋白是氧化 (即,含二硫键) 还是还原 (即,缺乏二硫键),通过反相 HPLC 分析纯化的物质,并与首先在有盐酸胍存在下,在强还原剂 DTT 中预温育的物质比较。在所有情况中,DTT- 处理的物质经层析产生单峰,而未处理的样品显示存在第二次要峰,表明含二硫键形式的部分氧化 (Tn^{SS3} 和 Tn^{SS4} 的代表性 HPLC 分析描述于图 10C)。

[0982] 为将还原的 Tn3^{SS1-4} 完全转化成相应的含二硫键蛋白质,用含 10mM DTT 并缓冲至 pH 8 的 6M 盐酸胍将样品稀释至 1mg/mL。室温下温育 10 分钟后,用 0.5M 盐酸胍 (用 20mM Tris-HCl 缓冲至 pH 8.5) 透析样品过夜。HPLC- 分析以此方式重折叠的物质显示 30-70% 转化成含二硫键的种类 (图 10C)。37°C 温育过夜或将样品在 4°C 储存 2 周以上进一步实现 90-100% 转化成含二硫键的种类。或者,可在含 0.5M 盐酸胍、4mM 还原型谷胱甘肽、0.8mM 氧化型谷胱甘肽并用 20mM Tris-HCl 缓冲至 pH 8.5 的缓冲液中将还原和变性蛋白质透析过夜来实现含二硫键产物的近似定量重折叠。

[0983] 表征

[0984] 为测定纯度和重折叠的 Tn3^{SS1-4} 样品内二硫键是分子间还是分子内,在还原和非还

原条件下通过 SDS-PAGE 分析样品 (图 10D)。有还原剂存在下,所有重折叠的 $Tn3^{SS1-4}$ 样品迁移至与 $Tn3$ 相似的位置。没有还原剂存在下, $Tn3^{SS1}$ 、 $Tn3^{SS3}$ 和 $Tn3^{SS4}$ 与 $Tn3$ 类似迁移,因此,预计含有设计的分子内二硫键。相比之下, $Tn3^{SS2}$ 主要作为二聚体迁移,少量的蛋白质作为单体迁移。因此, $Tn3^{SS2}$ 看来形成分子间二硫键连接的二聚体,因而不作进一步研究。

[0985] 稳定性

[0986] 如前对野生型 $Tn3$ 所述,通过固有荧光监测离液剂导致的 $Tn3^{SS1,3,4}$ 解折叠。为方便比较野生型和含有二硫键的 $Tn3$ 的离液剂诱导解折叠,将 360nm 的相对荧光发射强度绘制成各蛋白的离液剂浓度的函数关系。

[0987] 比较 pH 7.0 时脲诱导 $Tn3$ 和 $Tn3^{SS1,3,4}$ 解折叠 (图 10E) 显示 $Tn3^{SS1}$ 不如野生型蛋白稳定,但 $Tn3^{SS3}$ 和 $Tn3^{SS4}$ 非常稳定。pH 7.0 时,实现 50% 野生型 $Tn3$ 解折叠所需的脲浓度 (Cm) 是 2M。相比之下, $Tn3^{SS3}$ 解折叠的 Cm 是 4M 脲,而 $Tn3^{SS4}$ 的 Cm 是至少 6M,但不能精确测定,因为该蛋白在这些实验所用的最高脲浓度下 (8M) 未完全解折叠。

[0988] 还通过荧光测定了 pH 5.0 时,盐酸胍 (GuHCl) 导致的 $Tn3^{SS4}$ 解折叠,并与野生型 $Tn3$ 的解折叠比较。鉴于 GuHCl 是强于脲的变性剂,通过分析 0-5.5M GuHCl 浓度中蛋白质样品的荧光获得完全解折叠转换 (图 10F)。pH 5.0 时野生型 $Tn3$ 解折叠的 Cm 是 1M GuHCl,对于 $Tn3^{SS4}$ 约为 3.2M。

[0989] 如实施例 1 对于野生型蛋白所述,通过与嗜热菌蛋白酶温育来检验 $Tn3^{SS4}$ 对蛋白水解降解的稳定性。相比于野生型蛋白, $Tn3^{SS4}$ 耐受蛋白水解,即使室温下温育过夜后 (图 10G)。

[0990] 如前所述,通过示差扫描量热法 (DSC) 评估 $Tn3^{SS4}$ 的热解折叠。1mg/mL $Tn3^{SS4}$ 样品在 pH 7.0 的 20mM 磷酸钠中显示解链温度 (T_m) 是 71°C,比相同条件下野生型蛋白的 T_m 高 26°C (图 10H)。 $Tn3^{SS4}$ 在 pH 5.0 的 20mM 乙酸钠中的 T_m 略高。该 pH 下, $Tn3^{SS4}$ 的 T_m 是 74°C,比野生型蛋白的高 18°C。与野生型蛋白一样, $Tn3^{SS4}$ 的热解折叠在 pH 7.0 时看来是完全可逆的,但在 pH 5.0 时导致沉淀。

[0991] 采用以前对野生型蛋白所述的相同条件,利用具有多角度光散射的尺寸排阻色谱 (SEC-MALS) 测定 $Tn3^{SS4}$ 在溶液中是否是单体。SEC-MALS 分析 2.0mg/mL $Tn3^{SS4}$ 样品显示该蛋白完全是单体状态 (图 10I)。实验获得的单体质量为 10.7kDa,与 10.8kDa 的计算质量非常一致。

[0992] 制备含双二硫键的 $Tn3$ 变体

[0993] 鉴于 $Tn3^{SS3}$ 和 $Tn3^{SS4}$ 变体相对于野生型蛋白稳定性增加,制备新的 $Tn3$ 变体来测定各二硫键的稳定作用在组合突变体中是否是加和性的。

[0994] 通过以前所述方法制备重组表达该四半胱氨酸变体 (称为 $Tn3^{SS3+4}$) 的构建物,在对应于二硫键 3 和 4 的位置含有 4 个半胱氨酸 (参见图 10B)。如前实施例 1 所述表达和纯化蛋白质。该变体的纯化蛋白质产量是从 200ml 大肠杆菌培养液中获得 22mg。由于这是纯化用柱的最高结合比例,实际表达水平至少为 110mg/L。

[0995] $Tn3^{SS3+4}$ 的重折叠

[0996] 通过反相 HPLC 分析纯化的 $Tn3^{SS3+4}$,并与首先在有盐酸胍存在下,在强还原剂 DTT 中预温育的物质比较。虽然 DTT- 处理的物质经层析产生单峰,但未处理的 $Tn3^{SS3+4}$ 显示存在 3 个额外的较早洗脱峰,最有可能是因为一个或两个潜在二硫键的部分氧化 (图 10J)。

[0997] 为将 $Tn3^{SS3+4}$ 重折叠成正确的含双二硫键蛋白质,用含 10mM DTT 并缓冲至 pH 8 的 6M 盐酸胍将样品稀释至 1mg/mL。室温下温育 10 分钟后,用 0.5M 盐酸胍(用 20mM Tris-HCl 缓冲至 pH 8.5 并含有 4mM 还原型谷胱甘肽)透析样品过夜。HPLC- 分析重折叠的物质显示 95% 以上的还原蛋白质转化成对应于解折叠制品中最早洗脱峰的单峰。由于该产物的洗脱时间分布,估计其含有两个正确形成的二硫键(图 10J)。

[0998] 表征 $Tn3^{SS3+4}$

[0999] 通过荧光测定 pH 5.0 时盐酸胍(GuHCl)导致的 $Tn3^{SS3+4}$ 解折叠,并与 $Tn3$ 和 $Tn3^{SS4}$ 的以前数据比较。pH 5.0 时 $Tn3^{SS3+4}$ 解折叠的 C_m 为 5.0-5.5M GuHCl(图 10K),远高于野生型或 $Tn3^{SS4}$ 的 C_m 。对 GuHCl- 诱导变性的稳定性显著升高提示当两组突变组合在一个支架中时,二硫键 3 和 4 的稳定作用是加和性的。

[1000] 实施例 5. 衍生自嗜嗜热生物的 $Tn3$ 结构基序的鉴定、表达和表征

[1001] $Tn3$ 结构基序鉴定

[1002] 在 NCBI 数据库中进行 BLAST 检索以鉴定 48 个古细菌基因组中编码的推定的 $Tn3$ 结构基序序列。该检索进一步局限于嗜嗜热生物的基因组,我们在本文中将其定义为在 70°C 或更高温度下最适生长的生物。 $Tn3$ 用作查询序列,从而在闪烁古生球菌的假定蛋白质中鉴定到 $Tn3$ 结构基序。该 $Tn3$ 结构基序进而用作查询序列来假定其它 $Tn3$ 结构基序,那些基序再用作查询序列。在 5 种嗜嗜热生物的假定蛋白质中总共鉴定到 14 条可能的 $Tn3$ - 编码序列。所得序列见本文第 6 章。

[1003] 嗜嗜热 $Tn3$ 表达和纯化

[1004] 选择 5 种预计的嗜嗜热衍生 $Tn3$ 蛋白在大肠杆菌中表达。根据所示序列,由基因录公司提供编码这些蛋白中每一种并为大肠杆菌中的密码子选择作优化的合成 cDNA。各 cDNA 含有侧翼 Nco I 和 Kpn I 限制性位点,用这些酶消化后,将插入物克隆入含有相应 Nco I/Kpn I 位点的修饰 pET22b 载体(诺瓦金公司)。按照以前对人衍生 $Tn3$ 结构基序所述的方法进行所编码 C- 末端六组氨酸- 标签蛋白质的重组表达和从大肠杆菌裂解液中纯化。海葡萄嗜热菌的 $Tn3$ 结构基序,硫化叶菌的两种 $Tn3$ 结构基序表达良好,而硫磺矿硫化叶菌和闪烁古生球菌的 $Tn3$ 结构基序表达水平低(图 11A)。

[1005] 表征

[1006] 除硫磺矿硫化叶菌的 $Tn3$ 外,如前所述通过 DSC、荧光和嗜嗜热菌蛋白酶处理分析各 $Tn3$ 结构基序的稳定性(参见实施例 1)。

[1007] pH 7.0 时硫化叶菌的 $Tn3$ 结构基序热分析图未显示对应于热解折叠的确定峰。反而数据显示硫化叶菌 1 $Tn3$ 在 70°C 以上沉淀,而硫化叶菌 1 $Tn3$ 在 50°C 以上沉淀(图 11C)。闪烁古生球菌的 $Tn3$ 结构基序的热分析图显示解折叠 T_m 为 77°C 的特征峰,海葡萄嗜热菌的 $Tn3$ 结构基序的 T_m 为 83°C(图 11B)。这两个蛋白质的热解折叠均不可逆,在 T_m 以上的温度沉淀。

[1008] 通过荧光分析 pH 7.0 时盐酸胍(GuHCl)导致的 $Tn3$ 结构基序的解折叠。所有 $Tn3$ 结构基序要求高浓度的 GuHCl 以实现解折叠,解折叠中点为 4.5M-6M GuHCl,如海葡萄嗜热菌的 $Tn3$ 所示(图 11D)。

[1009] 采用上述相同条件(参见实施例 1)分析对嗜嗜热菌蛋白酶的蛋白水解作用的稳定性,其中 45 μ M $Tn3$ 样品与 0.45 μ M 的嗜嗜热菌蛋白酶温育。所有 $Tn3$ 结构基序耐受蛋白水

解,虽然观察到闪烁古生球菌、海葡萄嗜热菌和硫化叶菌 2Tn3 的 Tn3 蛋白的 1-2kDa 小片段快速切割,我们估计它们是不形成 Tn3 结构基序的核心部分的 N- 和 / 或 C- 末端片段。嗜热菌蛋白酶处理 16 小时后,显著比例的所有 4 种核心 Tn3 结构基序维持未消化,如海葡萄嗜热菌和硫化叶菌的 Tn3(2Tn3) 所示(图 11F+G)。

[1010] 鉴于硫化叶菌除超嗜热外也嗜酸,还评估了硫化叶菌的 Tn3 结构基序在 pH 3.0 的 20mM 柠檬酸钠缓冲液中的稳定性。与 pH 7.0 时相比, pH 3.0 时硫化叶菌 1Tn3 和 2Tn3 均对 GuHCl- 诱导解折叠更稳定,其中 1Tn3 比 2Tn3 更稳定。还通过 DSC 评估 pH 3.0 时硫化叶菌 1Tn3 在 20mM 柠檬酸钠中的热解折叠。与 pH 7.0 时的热解折叠相比, pH 3.0 时的热分析图显示 T_m 为 98°C 的特征峰,此外,该 pH 时的解折叠部分可逆。硫化叶菌 1Tn3 的热和 GuHCl- 介导解折叠的比较见图 11C 和 11E。

[1011] 利用 Tn3 结构基序的稳定性进行纯化

[1012] 利用超嗜热菌衍生的 Tn3 结构基序对极端温度、pH 和蛋白水解的稳定性来纯化粗制大肠杆菌裂解液中的这些蛋白质。海葡萄嗜热菌和硫化叶菌的 Tn3 蛋白(1Tn3) 在大肠杆菌中表达,并如前所述制备可溶性裂解液。含有海葡萄嗜热菌 Tn3 的裂解液在 70°C 加热 15 分钟,离心除去沉淀的蛋白质,然后通过 SDS-PAGE 分析上清液并与未经加热的裂解液比较(图 11H)。如凝胶上所示,热处理除去大量的大肠杆菌污染物,从而明显纯化 Tn3 蛋白。类似地,在 55°C 用嗜热菌蛋白酶处理可溶性大肠杆菌裂解液 45 分钟也明显除去源自大肠杆菌的蛋白质,同时纯化了海葡萄嗜热菌 Tn3(图 11I)。

[1013] 利用硫化叶菌 1Tn3 蛋白的 pH 和高温稳定性除去粗制裂解液中的大肠杆菌蛋白。用 4 体积 pH 3.0 的 200mM 柠檬酸钠稀释裂解液(缓冲至 pH 7.0) 导致源自大肠杆菌的蛋白显著沉淀。离心除去沉淀物后,在 70°C 加热上清液 15 分钟,再次离心除去新沉淀的蛋白。未处理、pH 3- 处理的和 pH 3/ 加热处理的样品的 SDS-PAGE 显示该两步骤极大去除了背景大肠杆菌蛋白(图 11J)。

[1014] 8.6 实施例 6. SynBP01 的环交换分析

[1015] 概述

[1016] 构建 SynBP01 的三种不同变体以检验 BC 和 FG 环中一个或二者是否产生 Tn3 的结合界面(图 12)。此外,加入 Tn3^{SS4} 突变以检验其对结合 **SYNAGIS®** 的影响。这些变体的氨基酸序列与 SynBP01 的差异如下所示:

[1017] “单有 SynBP01-BC”-FG 环序列被 RRGDMSSNPA 替代

[1018] “单有 SynBP01-FG”-BC 环序列被 FKPLAEIDG 替代

[1019] “SynBP-1SS4”-Ile 和 Ser 被 Cys 取代,如图 10B 中第 4 行所示

[1020] 实验过程

[1021] 将编码 SynBP01 及其 3 种变体的基因 3 片段融合体的噬菌体展示载体转化入大肠杆菌,然后利用这些细菌制备展示这些 Tn3 蛋白质中每一种的噬菌体,如实施例 3 所述。4°C,用 PBS pH 7.2 配制的 10 μg/ml **SYNAGIS®** 靶标平板过夜。用含 0.1% v/v 吐温 -20+4% w/v 脱脂奶粉的 PBS(PBST 4% 牛奶) 封闭平板。将稀释的噬菌体储备液加入第 1 栏,利用 PBST 1% 牛奶作为稀释剂在平板中进行 3- 倍连续稀释。室温下温育平板 2 小时并轻柔振荡。洗涤后,用新泽西州皮斯卡塔韦 GE 保健公司 (GE Healthcare, Piscataway, NJ) 的抗-M13 HRP 偶连抗体标记结合的噬菌体,加入马里兰州盖瑟斯堡 KPL 实

验室 (KPL Laboratories, Gaithersburg, MD) 的 TMB 底物通过比色法检测。加入 2.5M 磷酸使产色猝灭后读取 450nm 的吸光度。

[1022] 结果:图 12 所示数据证明 BC 和 FG 环是 Tn3 支架结合 **SYNAGIS®** 所需。用野生型 Tn3 序列取代该两环之一的 SynBP01 变体显示不结合与平板结合的 **SYNAGIS®**。这些结果证明 Tn3 支架的至少两个环共同起作用来提供功能性结合表面。

[1023] 此外,将 SS4 二硫键引入 SynBP01 支架消除了与 **SYNAGIS®** 的结合(图 12)。SynBP01 的含 SS4 变体的活性丧失可能是因为给予该二硫键的微妙构象效应预计不会导致 Tn3 支架蛋白的结构有大变化。这进一步提示 **SYNAGIS®** 的结合极其依赖于 SynBP01 的三维结构。

[1024] 8.7 实施例 7. 在 Tn3^{SS4} 支架上构建两环文库

[1025] 依据图 10B 所示的 Tn3^{SS4} 支架构建新文库。采用 PCR 引入 BC 环多样性,采用 Kunkel 诱变引入 FG 环多样性(表 5)。构建约 1.12×10^{10} 个成员的文库。

[1026] 表 5. Tn3^{SS4} 文库构建的简并寡核苷酸

[1027]

寡聚物	环	序列	Seq ID
BC9	BC	ACCGCGCTGATTACCTGGTCTNNKSCGNNKGSTNNKNNKNN KGGCTGTGAAGTACCTATGGC	217
BC11	BC	ACCGCGCTGATTACCTGGTCTCCGBSTNNKNNKNNKNNKNN KNNKACCGGCTGTGAAGTACCTATGGC	218
BC12	BC	ACCGCGCTGATTACCTGGGCGVMACCGNNKNNKNNKRRCR GCNNKATTNNKGGTTGTGAAGTACCTATGGC	219
FG9	FG	TATGAAGTGAGCCTGATTTGCNNKAMSNNKNNKGGTNNKN NKNNKAGCAAAGAAACCTTTACCACC	220
FG10	FG	TAGAAGTGAGCCTGATTTGCNNKAMSNNKNNKNNKNNKR GCAACCCGGCGAAAGAAACCTTTACCACC	221
FG11	FG	TATGAAGTGAGCCTGATTTGCNNKAMSNNKNNKGGTNNKN NKAGCAACCCGGCGAAAGAAACCTTTACCACC	222

[1028] 实验过程

[1029] 利用表 5 中的 BC9、11 或 12 引物制作 BC 环多样性。这些引物在其 3' 端与 Tn3DNA 退火,PCR 完成后简并性形成文库。用侧翼引物扩增这些 PCR 产物以制备完整的 Tn3 基因,然后用 NcoI 和 KpnI 消化并连接入噬菌体展示载体。通过电穿孔将 DNA 转化入大肠杆菌。BC 文库的最终多样性预计约 3.4×10^9 个成员。

[1030] 电穿孔后,37℃温育 BC 文库 1 小时并振荡。加入 M13K07 辅助噬菌体,1 小时后,将细胞稀释至较大体积,37℃振荡生长过夜。随后一天,通过 PEG8000 沉淀从上清液中取出并浓缩噬菌体。

[1031] 利用 BC 文库噬菌体感染 CJ236 大肠杆菌。感染 1 小时后,用含 100 μ g/mL 羧苄青霉素的 2xYT 稀释细胞并在 37℃ 振荡生长过夜。随后一天,通过 PEG8000 沉淀从上清液中取出并浓缩噬菌体。利用加利福尼亚州巴伦西亚恰根公司 (Valencia, CA) 的 QIAprep 自旋 M13 试剂盒回收单链 DNA。该 DNA 用作利用表 5 中 FG 引物进行 Kunkel 诱变的模板。

[1032] 实施例 8. 淘选两环 Tn3^{SS4} 文库以得到 **SYNAGIS®** 特异性支架

[1033] 用 15 摩尔当量的 EZ 连接磺基 -NHS-SS- 生物素 (伊利诺斯州洛克福特皮尔斯公司 (Pierce, Rockford, IL)) 使 **SYNAGIS®** 生物素化。室温下温育 1 小时后,将样品在 PBS 中透析过夜以除去未偶连的生物素。第二天,在含 10mg/ml BSA 的 PBS 中封闭 M280 链霉亲和素珠 (加利福尼亚州卡尔斯巴德市戴纳公司 (Dynal, Carlsbad, CA)) 和该两环文库 1 小时。向封闭的噬菌体中加入 10 μ g 生物素化 **SYNAGIS®**, 室温下在头尾相接旋转混合仪 (end-over-end rotating mixer) 上温育两小时。室温下,在旋转混合仪上用封闭的链霉亲和素珠捕捉 **SYNAGIS®**, 30 分钟。用 PBST 洗涤三次以除去未结合的噬菌体后,用 75mMDTT 洗脱结合的噬菌体。用洗脱的噬菌体感染 XL-1 蓝大肠杆菌,用 M13K07 辅助噬菌体共同感染并再增殖过夜,如实施例 3 所述。随后一天,从过夜培养液中收集噬菌体,如实施例 3 所述。

[1034] 第二轮淘选与第一轮一样,其中利用 10mg/ml 的酪蛋白作为封闭试剂。第二轮所用的珠是 Spherotech (莱克·福里斯特 (Lake Forest), 伊利诺斯州) 亲和素包被磁珠。对于第三轮,酪蛋白用作封闭试剂, M280 链霉亲和素珠用于捕捉 **SYNAGIS®**。对于第四轮, BSA 用作封闭试剂, Spherotech 亲和素磁珠用于捕捉 **SYNAGIS®**。4 轮淘选后,用洗脱的噬菌体感染大肠杆菌并接种。在 96 孔板中培养各菌落,用 M13K07 感染,培养上清液用于噬菌体 ELISA 中以鉴定 **SYNAGIS®** 结合克隆。鉴定了 3 个新的 SS4 稳定克隆,其序列示于表 6。

[1035] 表 6. **SYNAGIS®** 特异性结合支架的 BC 和 FG 环序列

克隆	BC 环	Seq ID NO:	FG 环	Seq ID NO:
SYNAGIS® 特异性结合支架				
[1036] 4	SPGERIWMFTG	105	PNYERISNPA	106
5	SPSGRVILWTG	107	DNLYGRISNPA	108
6	ATPGCRNGKIVG	109	TTSVGATSNPA	110

[1037] 8.9 淘选两环 Tn3^{SS4} 文库以得到 TRAIL-R2 特异性支架

[1038] 用 PBST 洗涤 M280 链霉亲和素珠,加入生物素化山羊抗 - 人 IgG Fc 片段特异性抗体 (宾夕法尼亚州西格罗夫市杰克逊免疫研究公司 (JacksonImmunoResearch, West Grove, PA))。4℃ 温育过夜后,加入对照 IgG1 抗体或 TRAIL-R2/Fc 融合蛋白 (明尼苏达州明尼阿波利斯研发系统公司 (R&D Systems, Minneapolis, MN)), 再于 4℃ 温育过夜。用 PBST 洗涤珠,在 PBST 2% 牛奶中封闭,然后使用。

[1039] 4℃, 两环 Tn3^{SS4} 噬菌体文库与对照 IgG1 抗体 - 包被的珠温育过夜以消除文库中珠或人 IgG1Fc 的结合物。然后将消除的文库加入 TRAIL-R2 包被的珠,室温下在摇动平台上温育 2 小时。用 PBST 洗涤珠,加入 XL-1 蓝大肠杆菌以增殖结合的噬菌体,如实施例 8 所述。该淘选过程再重复 4 轮,除了为消除背景与对照抗体珠温育 1 小时而非过夜。第四和第五轮淘选后通过噬菌体 ELISA 分析各克隆以鉴定 TRAIL-R2 结合变体。

[1040] 对 TRAIL-R2 噬菌体 ELISA 的阳性克隆测序后,鉴定到 9 个独特结合克隆 (表 7)。

小写的 q 表示 TAG 终止密码子在该位置。阻遏型菌株,例如 XL-1 蓝通过在该位置插入谷氨酰胺而允许含 TAG 终止密码子的基因表达。

[1041] 表 7 :TRAIL-R2 特异性结合支架的 BC 和 FG 环序列

[1042]

克隆名称	BC 环	SEQ IDNO.	FG 环	SEQ IDNO.
2F4	SPCIMVCLRTG	126	RRGDMSGAPA	127
5B10	SPCLFVCLRTG	128	RRGDMSGAPA	129
10D9	SPPLFCCqKTG	130	FKLTGFLYS	131
6F11	SPSVARMLETG	132	ITLCGRGVS	133
8B3	SPPEYAFYYTG	134	VKNCGLFSNPA	135
5E5	SLAPGYRLG	136	VKLCMRGNPA	137
2H6	ATPSVFDSHIEG	138	WKHHGDAWS	139
7G11	AKPSIVNGFISG	140	DKCFGAMKS	141
6C7	AKPMSCSGYIqG	142	AKLTGWLCS	143

[1043] 8. 10 实施例 10. TRAIL-R2 特异性支架的结合亲和力测定

[1044] 采用标准氨基偶连方案(拜科公司),将山羊抗-人-Fc IgG 以约 7700RU 的密度固定到 CM5 拜科传感器芯片表面的流动小室。采用相同的方案在同一芯片上制备无蛋白质的空白表面。该空白表面在实验中用作参比小室,用于校正非特异性结合和某些持家假象(housekeeping artifact)。

[1045] 在仪器缓冲液中(HBS-EP 缓冲液,拜科公司,由以下组分构成:10mMHEPES 缓冲液, pH7.4,150mM NaCl,3mM EDTA,和 0.005% P20.) 制备 100nM 的 TRAIL-R2/Fc 蛋白,然后以 75 微升/分钟的流速注射到 Fc- 捕捉和对照表面。配体的捕捉水平约为 800RU。

[1046] 基线稳定后,将 Tn3 克隆 5E5(表 7) 的溶液注射到捕捉配体和对照平面上。每次注射之间,注射 10mM Gly, pH 2,1 分钟(两次)再生 Fc- 捕捉表面。

[1047] 在整个注射系列中,还交替进行几次缓冲液和对照蛋白注射。随后,通过通常称为“双参比”的技术,利用这些缓冲液注射液连同参比细胞数据校正注射假象和/或非特异性“结合”的原始数据(Myszka, D. G. (1999) J. Mol. Recognit. 12, pp. 279-284)。利用瑞典乌普萨拉拜科公司的 BIA 评估 4.1 软件产生完全校正数据的传感器图重叠。利用 BIA 评估软件检测图 13 所示传感器图的 k_{on} 和 k_{off} 值来计算 5E5 结合 TRAIL-R2 的亲和力。该分析获得 5E5 结合 TRAIL-R2 的估计 K_d 为 700nM。

[1048] 8. 11 实施例 11. 与克隆 5E5 和 7G11 竞争结合 TRAIL-R2

[1049] 表达可溶性 5E5 和 7G11(实施例 9 中分离的 TRAIL-R2 特异性克隆),并用于竞争性

噬菌体 ELISA 测定来评估它们是否特异性结合 TRAIL-R2。在有或没有可溶性 Tn3 克隆 7G11 或 5E5 存在下,将 TRAIL-R2 包被平板与展示 TRAIL-R2 特异性 Tn3' 的噬菌体温育。如图 14 所示,可溶性 5E5 与除 2H6 和 7G11 外的噬菌体展示的 5E5 和所有其它噬菌体展示的克隆竞争。可溶性 7G11 只与噬菌体展示的 7G11 和 2H6 竞争。本实验表明所有克隆对 TRAIL-R2 具有特异性,该组 Tn3 蛋白识别 TRAIL-R2 上两个不同的表位。

[1050] 8.12 实施例 12. 构建三环 Tn3^{SS4} 文库

[1051] 利用表 8 所示引物,通过使 BC、DE 和 FG 环随机化制备基于 Tn3^{SS4} 支架的噬菌体展示三环文库。简言之,Tn3^{SS4} 的两环 Tn3BC 环文库的单链 DNA (实施例 7 所得) 用作 PCR 的模板,DE 反向引物见表 8。该 PCR 产生含有 Tn3 基因一部分的产物,其中 BC 和 DE 随机化。第二 PCR 利用该 BC、DE 随机化 PCR 产物作为用表 8 所列 FG 引物进行扩增的模板。用侧翼引物扩增得到的 PCR 产物以制备完整的 Tn3 基因,然后用切割 NcoI 到 KpnI 并连接入噬菌体展示载体。通过电穿孔将 DNA 转化入大肠杆菌。

[1052] 电穿孔后,37℃振荡温育文库 1 小时。加入 M13K07 辅助噬菌体,1 小时后,将细胞稀释至较大体积,37℃振荡生长过夜。随后一天,利用盐水 PEG8000 溶液沉淀从培养上清液中纯化噬菌体。根据大肠杆菌转化体的数量,文库大小估计含有约 1.5×10^9 个成员。

[1053] 表 8 :用于三环 Tn3^{SS4} 文库构建的简并寡核苷酸

[1054]

序列名称	序列	SEQ ID :
DE rev	CCGGTTTCAGGTTACCAATGCTATAMNNMNNMNNMNN MNNCAGATCTATGGTGGTGCGATCGCC	223
FG9 rev	CCGCCACCGGTGGTAAAGGTTTCTTTGCTMNNMNNMNNAC	224
	CMNNMNNSKTMNNGCAAATCAGGCTCACTTCATATTCGG	
FG10rev	CCGCCACCGGTGGTAAAGGTTTCTTTGCCGGGTTGCMNN MNNMNNMNNSKTMNNGCAAATCAGGCTCACTTCATATTCGG	225
FG11rev	CCGCCACCGGTGGTAAAGGTTTCTTTGCCGGGTTGCTMNN MNNACCMNNMNNSKTMNNGCAAATCAGGCTCACTTCATATT CGG	226

[1055]

[1056] 8.13 淘选三环 Tn3^{SS4} 文库以得到 TRAIL-R2 特异性支架

[1057] 针对 TRAIL-R2 和如实施例 9 所述通过噬菌体 ELISA 鉴定的特异性克隆淘选实施例 12 中构建的三环 Tn3^{SS4} 文库。总共鉴定到 19 个结合 TRAIL-R2 的新 Tn3 (表 9)。

[1058] 表 9 :TRAIL-R2 特异性结合支架的 BC、DE 和 FG 环序列

[1059]

克隆	BC 环	Seq Id.	DE 环	Seq Id.	FG 环	Seq Id.

1E03	AAPFFGSSYISG	144	HYYVTR	145	VNLSGHMPS	146
2B04	APPMLTDSEING	147	TSSYWS	148	STLRRNAIS	149
1C12	AKPEKWDGSIYG	150	NSRHTA	151	FTPYGAKSNPA	152
1A03	APPPFSNSCIIG	153	RPGRAS	154	STGTGLPSNPA	155
1C10	SPCCPYDRYTG	156	QSSRSH	157	ITTFGHVSNPA	158
1B12	AKPRqGGSNISG	159	YHKGLH	160	PKMTGYTYS	161
2G03	SPGPLLRHTTG	162	RPIpra	163	RNRpQqSNPA	164
2D3	SPGGFqKITTG	165	VNRRNH	166	LTYKARA IS	167
1C06	SPRMYTWIqTG	168	THLSGS	169	LKLTRTHIS	170
2F08	SHAGGIRIG	171	HVWqVY	172	MTPYLLGNPA	173
1B04	SPSHGVESSTG	174	HGLqRV	175	AKICGHLVS	176
3B11	SPCqLLALITG	177	NSRHYY	178	YTSTGQRSNPA	179
1D8	SPCqMLSSLTG	180	NIERPK	181	FTMTGYRSNPA	182
2A12	SPCCqEFTLTG	183	HNHHHH	184	ITDAGNKSNA	185
1E05	SPCSPCqLVTG	186	SCTRAK	187	INKLGDTSNPA	188
2F02	SPSRGGTSLTG	189	DqVRAT	190	HTNSGqPSNPA	191
1H05	SPGMFDqVRTG	192	GKYWER	193	RNQGqHqS	194
2A11	SPPFRAGHVTG	195	VTARCq	196	TTGNGLRSNPA	197
1G11	SWAqANPGG	198	WHSITF	199	KTKVqSSNPA	200

[1060] 通过定点诱变用谷氨酰胺密码子替代克隆 2D3 和 1G11 的核苷酸序列中的琥珀终止密码子。这些 Tn3 克隆连同 1E3、1C12 和 2B4 克隆入大肠杆菌表达载体（实施例 1 所述）并转化入 BL21DE3 细胞。用 IPTG 诱导后，转化的细菌在 30℃ 生长 5 小时。沉淀细胞，通过超声波裂解，用 HiTrap 螯合 HP 柱（GE 背景公司，皮斯卡塔韦，新泽西州）纯化可溶性部分。Tn3 克隆 2B4 和 1C12 得率良好，但过表达造成蛋白质累积入包涵体从而导致其余 3 种克隆回收不佳。在此情况中，随后在变性条件下将包涵体溶解于缓冲的 6M 盐酸胍（GuHCl），然后用 HiTrap 螯合柱纯化获得高产量的 Tn3。然后在有半胱氨酸/半胱氨酸氧化还原配对存在

下,通过还原和变性的样品在天然缓冲液中透析而使所有 Tn3 重折叠。

[1061] 8.14 实施例 14. 测定表位多样性

[1062] 在噬菌体 ELISA 中检验从表 9 选择的噬菌体展示克隆来看可溶性形式的 Tn31E3、1G11、2B4、1C12 和 2D3 是否竞争结合 TRAIL-R2。该测定以与实施例 11 的竞争结合的类似方式进行,结果示于图 15A、B 和 C。可溶性 Tn3 克隆 1E3、1C12 和 2D3 明显抑制大多数噬菌体连接的 Tn3 结合 TRAIL R2,除了克隆 8B3 和 7G11。可溶性 1G11 不与任何噬菌体结合的克隆显著竞争。在大多数情况中,可溶性 2B4 显示少许到适度的抑制作用。1E3、1C12 和 2D3 与同一组的噬菌体连接 Tn3 竞争这一事实表明这三种可溶性 Tn3 和噬菌体连接的 Tn3 可能结合 TRAIL-R2 上的相同表位。

[1063] 8.15 实施例 15. 利用连接于抗 -His 单克隆抗体的 Tn3 单体的细胞活力试验

[1064] Colo 205 是对 TRAIL- 诱导的杀伤作用高度敏感的细胞系。检测当通过与小鼠抗 -His 标签抗体和抗 - 小鼠 IgG 的复合物结合而多聚化时, TRAIL-R2 结合 Tn3 诱导 Colo205 细胞杀伤的能力。将 100ul 含 10% FBS 的 RPMI 1640 培养基中的 Colo205 细胞接种入平底 96 孔培养皿的各孔,37℃温育过夜。Tn3 蛋白 7G11 和 5E5(表 7)、1C12、2D3 和 1E3(表 9) 和 Tn3^{SS4}(实施例 4) 与小鼠抗 -His 标签抗体(五 -His ;恰根公司) 和家兔抗小鼠 IgG 以 2 : 1 : 0.5 的摩尔比温育。根据 Tn3 含量,用含 10% FBS 的 RPMI 1640 培养基将各 Tn3 复合物连续稀释至终浓度为 5 μ M、1.66 μ M、0.55 μ M、0.185 μ M 和 0 μ M。除去培养过夜的细胞的培养基后,加入 100 μ l Tn3- 抗体复合物。各试验点一式三份进行。

[1065] 加入 Tn3 复合物后,37℃温育细胞 3 天,然后按照生产商的使用说明书采用 CellTiter- **Glo®** 发光细胞活力试验(威斯康星州麦迪逊市普罗迈格公司(Promega Corp., Madison, WI)) 检测细胞活力。通过将 CellTiter- **Glo®** 试验中获得的发光信号除以用相同浓度的非 TRAIL-R2 结合对照 Tn 处理的细胞获得的相应信号计算用 TRAIL-R2 结合 Tn3 处理的细胞的活力百分比。

[1066] 细胞活力试验(图 16) 显示与用非 TRAIL-R2 结合 Tn3 处理细胞相比,当 Tn3 克隆 5E5、1C12 和 2D3 通过抗体络合而多聚化时能以剂量依赖性方式抑制 Colo205 活力。对细胞活力的抑制估计是因为 TRAIL-R2 连接触发的细胞凋亡,虽然尚需要途径特异性试验来证实。克隆 7G11 和 1E3 在该试验的所用浓度不显示可检测的活性。当不用抗 -His 标签捕捉抗体进行检验时,其它细胞试验显示活性 Tn3 蛋白无一影响细胞活力。这证明活性依赖于多聚化 TRAIL-R2 结合部分的呈递。如果抗 -IgG 抗体不存在,克隆 5E5 也缺乏活性,然而,克隆 1C12 和 2D3 在没有抗 -IgG 存在下有活性,提示通过抗 His- 标签抗体捕捉的二聚体呈递足以触发 TRAIL-R2 信号转导。

[1067] 8.16 实施例 16. 构建多价抗 TRAIL R2Tn3 抗体融合物

[1068] 鉴于实现 TRAIL-R2- 依赖性细胞杀伤需要呈递寡聚 Tn3 复合物,设计 Tn3 融合寡聚物以便产生二价和四价含 Tn3 的蛋白质(图 17)。通过融合 Tn3 与人 IgG1 的 Fc 区来设计二价 Tn3 构建物,而根据 Tn3-Cκ 与 Tn3-IGHG1 融合体的共表达,即, Tn3 融合于人 C-κ 区和人 IgG1 的重链恒定区来设计双链四价 Tn3 构建物。后一构建物在性质上类似于抗体,除了用 Tn3 部分替代轻链和重链可变区。

[1069] 在瞬时转染了编码各蛋白的内部 pOE 表达载体的 293F 细胞中表达图 17A 和 B 所示构建物。培养 10 天后,收集培养液(250mL),通过 A 蛋白亲和层析纯化蛋白质。表 10 显示

了选择的多价 Tn3 构建物的表达水平。1C12 和称为 D1 的对照**SYNAGIS®**结合性 Tn3(实施例 8 的 Seq ID NO :105 和 Seq ID NO 106) 与各 Fc 融合体,或双链 Tn3-C κ /Tn3-IGHG1 融合体一样表达良好。1C12 和 2D3(1C12 连接于 IGHG1,2D3 连接于 C κ ,反之亦然) 连同 2D3Fc 融合体的杂交四价融合体产生较少量的物质,而双链 2D3-C κ /2D3-IGHG1 融合体不表达。SDS-PAGE 分析 A 蛋白纯化的蛋白示于图 18。

[1070] 表 10. 不同 Fc 融合体和四价抗体融合构建物的产量

[1071]

编号	名称	最终
1	D1-Fc	15mg
2	1C12-Fc	15mg
3	2D3-Fc	3. 5mg
4	D1-C κ /D1-IGHG1	13mg
5	1C12-C κ /1C12-IGHG1	10mg
6	2D3-C κ /1C12-IGHG1	4mg
7	1C12-C κ /2D3-IGHG1	4mg

[1072]

[1073] 1C12、1C12Fc 和 1C12 四价体的生物传感器试验

[1074] 将各蛋白的样品注射到 Attana 生物传感器仪器的 TRAIL-R2 芯片上来进行单体 1C12、1C12-Fc 和 1C12-C κ /1C12-IGHG1 蛋白结合的定性比较。如图 19 所示,与单体 1C12 相比, TRAIL-R2 与寡聚形式 1C12 的复合物显示亲和力实质性提高。通过注射不与固定化 TRAIL-R2 相互作用的 D1-Fc 和 D1-C κ /D1-IGHG1 蛋白证明结合特异性。不同 1C12 构建物解离速率的顺序是 1C12 > 1C12-Fc > 1C12-C κ /1C12-IGHG1,与二价和四价构建物在与 TrailR2 相互作用中显示的亲和力一致。

[1075] 8. 17 实施例 17. 利用多价抗 TRAIL-R2Tn3 融合蛋白的细胞活力试验

[1076] 将 50ul 完全培养基(补加了 10% FBS 的 RPMI 1640 培养基) 中的 H2122 细胞以 10000 个细胞 / 孔的密度接种于 96 孔板。37℃温育细胞过夜。随后一天,单独将多价 Tn3 融合蛋白(Fc 融合体或双链四价构建物) 或与山羊抗 - 人 Fc 组合在完全培养基中连续稀释。为获得剂量曲线。采用 3- 倍稀释方案(最高终浓度是 3. 6uM)。以 1 : 2(即,含 Tn3 分子的一半浓度) 的摩尔比加入山羊抗 - 人 Fc。单独和组合制备 2X 浓度(每孔加入 50ul 各处理物) 的 Tn3 和抗 - 人 Fc。所有处理在三复孔中进行。可商品化购得的 TRAIL 配体(卡米康(Chemicon) 目录号 GF092) 用作 Trail- 诱导细胞死亡的阳性对照。Trail 的终浓度是 1、0. 1 和 0. 01nM。48 小时后,利用普罗迈格公司的 CellTiter-Glo 试剂盒测定细胞活力。简言之,室温下使细胞平衡约 10 分钟。混合 CellTiter-Glo 缓冲液和底物以制备生产商所示的 CellTiter-Glo 试剂。各孔接受 100ul CellTiter-Glo 试剂,平板先在室温下

温育 10 分钟,然后用华莱士平板读数计 (Wallac Plate reader) 读取发光值。结果示于图 20-22。含有多价构建物的 1C12 和 2D3 各自能抑制 H2122 细胞的活力,推测是通过活化 TRAIL-R2 依赖性凋亡,此外,该活性不依赖于通过与抗 -Fc 抗体配位的高级交联。在细胞试验中,四价形式的 1C12 强于其二聚体形式 (比较图 20 和 21),与杀伤活性与化合价有函数关系一致。Fc- 交联不增加杀伤潜力,看来能降低当单特异性 1C12 构建物的活性。不结合 TRAIL-R2 的 D1-Fc 或 D1-C κ /D1-IGHG1 对照蛋白均不影响细胞活力。双特异性四价构建物 (图 22) 抑制 H2122 细胞活力的效力最高,如果与抗 -Fc 抗体共同温育该效力还略有增加。与单特异性 1C12-C κ /1C12-IGHG1 相比,2D3/1C12 双特异性构建物活性的升高可能是因为 2D3 相对于 1C12 Tn3 单位的优秀效力,或者因为 2D3 和 1C12 识别 TRAIL-R2 上可能导致细胞表面 TRAIL-R2 更高级凝聚的不同表位。

[1077] 8.18Tn3 支架的细菌分泌

[1078] 将细菌表达载体设计成能分泌在大肠杆菌中正确折叠的 Tn3 支架。该系统能在 Tn3 内形成正确的二硫键,因此,避免实施例 4 所述胞外表达物质所需的重折叠过程。为产生分泌载体,通过插入大肠杆菌寡肽结合蛋白 (oppA) 的信号肽序列修饰类似于实施例所述但含有 Ptac 启动子而非 T7 的胞内 Tn3 表达载体。选择紧接 Tn3 上游克隆的该信号序列是因为 oppA 是高度表达的大肠杆菌蛋白质。延伸的 8xHis 标签在 Tn3 下游编码以促进纯化。为简化 Tn3 盒在该质粒和其它质粒之间的转移,还通过在 oppA 信号序列 3' 端引入 Nco I 位点而产生修饰形式的该载体。这种修饰导致 oppA 信号序列的倒数第二个位置的单氨基酸取代 (L25M) (图 23)。这些载体称为 pSec-oppA-Tn3 和 pSec-oppA (L25M)-Tn3。

[1079] 给含有羧苄青霉素的超级肉汤培养基 (100ug/mL, 1% 葡萄糖) 接种转化了 pSec-oppA-Tn3 或 pSec-oppA (L25M)-Tn3 的大肠杆菌 BL21DE3 培养物。37°C, 培养液生长至 OD 为 0.5-0.8, 然后用 0.2mM IPTG 诱导。37°C, 振荡 5 小时后, 离心分离细胞与培养基。将细胞沉淀物重悬在 1/10 体积的冰冷却提取缓冲液中 (10mM Tris, pH 8 和 1mM EDTA), 在冰上温育 10 分钟, 然后离心除去细胞来制备周质提取物。通过 SDS-PAGE 分析周质提取物的样品和培养基。Tn3 在培养基和周质组分中均能检测到, 含有野生型或 L25M oppA 信号肽的构建物的表达水平相似 (图 24A)。由于 pSec-oppA (L25M)-Tn3 含有便利的 5' Tn3 克隆位点, 表达衍生自展示文库的 Tn3 克隆优选该构建物。

[1080] 用 65% w/v 硫酸铵沉淀分泌的蛋白质, 将沉淀物重悬在 50mM Tris pH 8 缓冲液中, 然后用带有 Ni²⁺ 的 HiTrap 螯合柱纯化实现从培养液中纯化 Tn3, 如前所述。纯化样品的 SDS-PAGE 分析见图 24B。用或不用 DTT 预处理来还原任何二硫键, 通过反相 HPLC 分析纯化的 Tn3 (如本文所述)。Tn3 以单峰洗脱, 用 DTT 还原后洗脱时间漂移表明纯化样品如预计的含有二硫键 (图 23C)。该物质的非还原 SDS-PAGE 和尺寸排阻层析与单一单体物质的一致, 质谱分析得到的分子量为 10,896Da, 在图 28A 所示成熟的、含二硫键序列的预计分子量的 3Da 内。

[1081] 最后, 在生物传感器试验中测定培养液中分泌的 Tn3 的表达水平。通过标准胺偶连将抗 -His 标签抗体 (五 -His, 恰根公司) 固定在 Attana A100 羧基传感器芯片上。用 pSec-oppA (L25M)-Tn3 转化大肠杆菌 BL21DE3, 如上所述诱导蛋白质表达。将澄清培养基的稀释液注射到芯片上, 将含有 Tn3 的结合 His- 标签水平与注射纯化 Tn3 标准品所产生的比较。通过该技术在粗制培养液中检测的 Tn3 水平是 250mg/L。

[1082] 8. 19 实施例 19. 产生 SynBP01-Fc 从融合体

[1083] 概述 :产生**SYNAGIS®** - 结合性 Tn3 和 IgG1 的 Fc 区的嵌合型融合体。

[1084] 方法 :表达 SynBP01-Fc

[1085] 如上所述, SynBP01 是从 BC 环和 FG 环 - 随机化 Tn3 变体文库中针对**SYNAGIS®** 进行淘选鉴定到的 Tn3 变体。通过沉默诱变引入侧翼 NheI 和 KasI 位点, 并用于将该构建物亚克隆入 pOE-Fc 载体。pOE-Fc 载体含有对着 KasI 限制性位点的 3' 的 IgG1 Fc 的 CH2 和 CH3 结构域。通过将 SynBP01 亚克隆入 pOE-Fc 产生的载体称为 pOE-SynBP01。

[1086] 采用标准方法, 通过脂质转染胺 (Lipofectamine)2000 (英杰公司) 用 pOE-SynBP01 转染 293EBNA 细胞 (120mL 培养体积)。转染后 10 天收集上清液, 通过 A 蛋白亲和和层析 (GE 保健公司) 纯化 SynBP01-Fc, 用 0. 1M 甘氨酸、0. 15M NaCl、pH 3. 08 洗脱, 用 pH 8 的 Tris-HCl 缓冲液中和。然后用缓冲至 7. 2 的 PBS 透析纯化的样品。纯化 SynBP01-Fc 的产量是 4mg, 表明表达水平是 33mg/L。

[1087] SynBP01-Fc 的 BIAcore 分析

[1088] 用 BIAcore 3000 (GE 保健公司) 进行该分子的 BIAcore 分析, 如实施例 3 所述。将该实验设计成测定 SynBP01-Fc 是否能结合 SYNAGIS 以及定量检测原始 SynBP01 结合物和 Fc 融合体之间的表观亲和力差异。

[1089] 结果 :当以 1 μ M 浓度注射时, 与 SynBP01 相比, SynBP01-Fc 产生的总反应单位增加约 6- 倍 (图 26)。此外, 与 SynBP01 相比, SynBP01-Fc 的解离速率有实质性降低, 主要是因为二价 Fc 融合体的亲合力增加。虽然该实验中未测定 SynBP01-Fc/ **SYNAGIS®** 相互作用的解离常数 (K_D), 因为未将结合表面制备成用于动力学分析, 但 K_D 明显从实施例 3 中 SynBP01/ **SYNAGIS®** 相互作用观察到 16 μ M 的 K_D 有所提高。

[1090] 8. 20 实施例 20. STn3 支架的位点特异性 PEG 化

[1091] 通过 PEG 化修饰蛋白质常用于提高其治疗特性, 例如降低免疫原性、通过增加小蛋白质的有效体积以避免肾脏清除而提高药代动力学和生物利用度。用连接蛋白质的一个或多个特定残基的 PEG 进行位点特异性修饰可避免靶标蛋白质活性失活, 或者可将 PEG 连接在蛋白质内的功能性位点或其附近。为证明 Tn3- 样支架蛋白的位点特异性 PEG 化, 工程改造 STn3 (实施例 5 的硫化叶菌 1Tn3) 的 C- 末端的半胱氨酸残基。由于 STn3 的野生型序列不含有半胱氨酸, 用 Cys- 特异性 PEG 化反应处理工程改造的支架会导致 PEG 的位点特异性连接。以前在 pET-22b 载体的变体中 (诺瓦金公司) 将 STn3 表达成与 C- 末端 6xHis 标签融合。该载体在该蛋白质和 His 标签之间含有接头序列 GGGLE。采用斯特拉塔基因公司 (Stratagene) 的快速改变 (QuikChange) 诱变方法的改进形式使接头序列中的亮氨酸残基突变成半胱氨酸, 其可用马来酰亚胺试剂修饰。该蛋白称为 STn3 (CTC), 如实施例 1 所述利用 IMAC 柱从 BL21 (DE3) 细胞表达和纯化。

[1092] 将 PEG 化试剂, Sunbright ME-200MA (NOF) 以 4 : 1 的摩尔过量 (PEG 试剂 : 蛋白质) 加入 STn3 (CTC), 室温下温育 72 小时。通过 SDS-PAGE 监测蛋白质 PEG 化 (图 27A, 泳道 5), 其显示大多数蛋白质被一种 PEG 部分 PEG 化。由于 PEG 化通常具有掩蔽蛋白质的表面电荷的作用, 将阳离子交换层析的 pH 从 6. 0 (野生型纯化) 降低至 4. 5 以确保蛋白质看有效结合柱。利用 50mM 乙酸, pH 4. 5, 在 1mL SP XL 柱 (GE 保健公司) 上纯化蛋白质。采用氯化钠梯度洗脱蛋白质, 蛋白质峰出现在约 120mM NaCl。阳离子结合纯化获得的组分的

SDS-PAGE 分析证明想 PEG 化产物中成功除去残留的未 PEG 化的 STn3(CTC), 诸组分见图 27B, 泳道 1-5。

[1093] 8. 21 实施例 21. AB、CD 和 EF 环的分析和随机化文库的设计

[1094] 为设计在 AB、CD 和 EF 环中随机化的 Tn3 文库, 进行生物信息学分析以获得关于这些环在天然产生 Fn3 结构域中的长度和序列多样性的信息。由于难以单独依据序列信息预测 AB、CD 和 EF 环区域, 将 pdb 数据库的 103 种不同 Fn 结构域的三维结构重叠, 将其用于比对相应的氨基酸序列 (数据未显示)。利用环区域的位置提取各环的长度和序列多样性信息。AB、CD 和 EF 环的长度变化图示于图 28。

[1095] 由于环在 Tn3 分子的相对侧, 不同 Fn3 结构域的 AB、CD 和 EF 环在长度和序列组成上不同。AB 和 CD 环通常有 5-9 个氨基酸长, 虽然一些 Fn3 结构域有例外, 它们的 AB 和 / 或 CD 环比这长或短。

[1096] 该数据库中最常见的 CD 环 (31% 的序列) 长度是 6 个残基, AB 环是 7 个残基 (61% 的序列)。EF 环的长度变化不频繁, 8 残基的环最多观察到 (80% 的序列)。AB 和 CD 环显示显著的序列多样性, 在特定位置对特定氨基酸没有明显的偏好。例外之处是 AB 环的最末位置, 该处常是 Ser 或 Thr (103 条序列中有 58 条)。EF 环的序列显示在特定位置有强烈的氨基酸偏好, 但局限于 8 残基长的那些环序列。这些环中 3 位的 Leu 是强烈保守性的 (82 条序列中有 76 条), 鉴于该残基的侧链包埋在各结构中, 可能对于支架结构完整性是至关重要的。Pro 残基还常见于 5 位 (82 条序列中有 44 条), 而 Gly、Asn、Asp 和 Ser 常见于 2 位 (82 条序列中有 71 条), Thr 常见于 7 位 (82 条序列中有 40 条)。

[1097] 设计这些 Tn3 文库中的另一实际考虑是鉴定通常用于简并寡核苷酸中的“NNK” (N = A, G, T, C; K = G, T) 混合密码子方案的替代方案来编码任何氨基酸。虽然“NNK”混合产生能编码所有 20 种氨基酸的 32 种不同密码子, 但它们不是等同编码的 (表 11)。例如, “NNK”方案中 3/32 密码子编码 Leu (CTG, CTT, TTG), 但只有 1/32 编码 Asp (GAT)。此外, “NNK”混合编码一个终止密码子 (TAG) 和 Cys 密码子 (TGT), 当产生天然文库时, 二者均不需要。考虑替代方案时, 我们注意到以下事实, 即有人描述合成的抗体文库编码由小亚组的氨基酸构成的 CDR 序列。其中 CDR 仅由 4 种氨基酸 (Tyr, Ala, Asp, Ser), 或者甚至二元配对 (Tyr, Ser) 构成的抗体文库显示能产生针对蛋白质抗原的特定高亲和力 mAb (Fellouse 等, Proc Natl Acad Sci, 2004, 101 : 12467-72, Fellouse 等, J. Mol. Biol., 2005, 348 : 1153-62)。类似地, 仅包含 Tyr 和 Ser 的含随机化环序列的支架蛋白的文库也产生靶蛋白的特异性结合物 (Koide 等, Proc Natl Acad, Sci, 2007, 104 : 6632-7)。虽然含有高度局限性氨基酸组的文库能产生特异性结合蛋白, 但从这种文库获得的结合物的多样性可能有限。因此, 我们设计了替代的“NHT”混合密码子方案以便在 Tn3 文库中引入多样性 (H = A, T, C)。“NHT”混合物编码 20 种氨基酸的合理亚组, 但规避了“NNK”混合密码子所述的不足 (表 12)。该方案产生编码 12/20 氨基酸的 12 种密码子, 即, 各密码子编码独特的氨基酸。此外, 其中没有终止或 Cys 密码子。

[1098] 表 11. “NNK”密码子混合物编码的氨基酸

[1099]		AAG = Lys	ATG = Met	ACG = Thr	AGG = Arg	G
[1100]	A	AAT = Asn	ATT = Ile	ACT = Thr	AGT = Ser	T
[1101]		GAG = Glu	GTG = Val	GCG = Ala	GGG = Gly	G

[1102]	G	GAT = Asp	GTT = Val	GCT = Ala	GGT = Gly	T
[1103]		CAG = Gln	CTG = Leu	CCG = Pro	CGG = Arg	G
[1104]	C	CAT = His	CTT = Leu	CCT = Pro	CGT = Arg	T
[1105]		TAG = 终止	TTG = Leu	TCG = Ser	TGG = Trp	G
[1106]	T	TAT = Tyr	TTT = Phe	TCT = Ser	TGT = Cys	T
[1107]	A	T	C	G		

表 12. “NHT” 密码子混合物编码的氨基酸

[1109]

A	AAT = Asn	ATT = Ile	ACT = Thr
G	GAT = Asp	GTT = Val	GCT = Ala
C	CAT = His	CTT = Leu	CCT = Pro
T	TAT = Tyr	TTT = Phe	TCT = Ser
	A	T	C

[1110] 含有随机化 AB、CD 和 EF 环的 Tn3 文库的最终设计如下所示。该设计包含天然 Fn3 序列中观察到的多样性，AB 和 CD 环的两种不同长度并利用“NHT”密码子混合物。

[1111] AB 环（7 和 9 个残基）：

[1112] Tn3 野生型氨基酸序列：KDVTDDT

[1113] 文库氨基酸序列（7aa）：Kxxxxxxa

[1114] DNA 序列：AAA-NHT-NHT-NHT-NHT-NHT-RST

[1115] 文库氨基酸序列（9aa）：Kxxxxxxxxa

[1116] DNA 序列：AAA-NHT-NHT-NHT-NHT-NHT-NHT-NHT-RST

[1117] CD 环（7 和 9 残基）：

[1118] Tn3 野生型氨基酸序列：KDVPGR

[1119] 文库氨基酸序列（7aa）：xxxxxxx

[1120] DNA 序列：NHT-NHT-NHT-NHT-NHT-NHT-NHT

[1121] 文库氨基酸序列（9aa）：xxxxxxxxx

[1122] DNA 序列：NHT-NHT-NHT-NHT-NHT-NHT-NHT-NHT

[1123] EF 环（8 残基）：

[1124] Tn3 野生型氨基酸序列：GNLKPDE

[1125] 文库氨基酸序列：xbLxPxcx

[1126] DNA 序列：NHT-RRB-CTG-NHT-CCG-NHT-RBT-NHT

[1127] 氨基酸密码：x = N/D/H/Y/I/V/L/F/T/A/P/S；a = S/T/A/G；b = N/K/S/R/D/E/G；
c = I/T/S/V/A/G

[1128] 核苷酸密码：N = G/A/T/C；H = A/T/C；R = A/G；S = G/C；B = T/C/G

[1129] 8.22 稳定性提高的荷电工程改造 Tn3 变体的设计、表达和表征

[1130] 荷电工程改造 Tn3 变体的设计

[1131] 与 pH 7 相比, pH 5 时 Tn3 对热解折叠的稳定性较高, 在含有 1M 盐的 pH 7 缓冲液中高于在不含盐的相同缓冲液中 (图 29)。由于高盐浓度能掩盖表面蛋白质电荷, 虽然缓冲液酸化能中和带负电的 Asp 和 Glu 侧链, 这些观察结果提示 Tn3 的表面负电荷具有去稳定作用。

[1132] 为研究通过工程改造表面电荷提高 Tn3 稳定性的可能性, 对 Tn3 三维结构上的 Asp 和 Glu 侧链位置作图。在 Tn3 中 (SEQ ID 1) 所含的总共 18 个 Asp 和 Glu 残基中, 设计一组 8 个突变体, 其中各 Asp 或 Glu 残基被中性等排 (isoteric) 残基 Asn 或 Gln 替代 (图 30A)。8 个取代位置的选择偏向接近另一 Asp 或 Glu 的 Asp 和 Glu 残基, 因为相似电荷接近可通过静电排斥而导致去稳定。

[1133] 荷电突变体产生和重组表达

[1134] 通过定点诱变野生型表达构建物来产生 Tn3 突变体的表达构建物, 如前所述。在大肠杆菌中表达重组蛋白, 通过固定的镍整合剂亲和力层析纯化, 如前所述。所有 Tn3 突变体以高水平表达, 不难纯化, 虽然 SDS-PAGE 分析证明制备的 E54Q 突变体确实含有某些杂质 (图 30B)。

[1135] 稳定性的表征

[1136] 如以前对野生型 Tn3 所述, 通过固有荧光监测脲导致的荷电突变体解折叠。为方便比较 Tn3 的野生型和荷电突变体的脲诱导解折叠, 将 360nm 的相对荧光发射强度绘制成各蛋白的脲浓度的函数关系。

[1137] 比较野生型 Tn3 和各种荷电突变体在 pH 7.0 的脲诱导解折叠 (图 31A) 显示与野生型蛋白相比, 3 个突变体 (D40N、E54Q 和 E67Q) 的稳定性相同或略低。5 个突变体 (E33Q, D49N, E52Q, D53N, E86Q) 显示脲诱导解折叠的中点有小但明确的增加, 提示蛋白质稳定性增加。对于最佳的 3 个突变体 (E33Q, D49N 和 E86Q), 诱导 50% 解折叠所需脲浓度约比野生型 Tn3 高 0.5M。

[1138] 含有多个荷电突变的 Tn3 变体的制备和分析

[1139] 鉴于许多 Tn3 荷电变体的稳定性增加, 制备含有组合荷电突变的新型 Tn3 变体来研究是否能获得稳定性的加和提高。为此目的, 制备含有配对突变 (D49N/E86Q 和 E33Q/D49N) 或三重突变 (E33Q/D49N/E86Q) 的 3 种新变体。重组表达和纯化这些突变体, 通过荧光表征它们的脲变性特征。

[1140] 当与 Tn3 的单荷电突变体比较时, 解折叠所需脲浓度的增加可确定组合突变体各显示稳定性进一步提高 (图 31B)。各荷电突变体 E33Q、D49N 和 E86Q 的脲诱导解折叠的中点约为 2.5M 脲, 而 D49N/E86Q、E33Q/D49N 和 E33Q/D49N/E86Q 突变体各自的解折叠中点对应于约 3.0M 脲。这表明多个去稳定 Asp 或 Glu 残基的组合替代导致 Tn3 稳定性的加和提高, 虽然在本文研究的实例中, 三重突变体不如双重突变体稳定。

[1141] 为进一步表征组合荷电突变体相对于野生型 Tn3 的稳定性, 如前所述 pH 7 时通过 DSC 分析这些蛋白质。该分析进一步证实荷电突变体导致 Tn3 支架的稳定性提高。野生型蛋白的热解折叠中点 (T_m) 为 45°C, E33Q/D49N Tn3 突变体的 T_m 为 50°C, D49N/E86Q 和 E33Q/D49N/E86Q 突变体的 T_m 为 52°C (图 32)。

[1142] 虽然出于清楚和理解的目的描述了本发明的一些细节, 但本领域技术人员阅读本文内容后应明白可在形式和细节中作出各种改变而不脱离本发明的真正范围。例如, 上述

所有技术和设备可组合使用。与各份出版物、专利、专利申请或其它文件单独表明出于所有目的通过引用纳入本文的程度一样,本申请引用的所有出版物、专利、专利申请或其它文件出于所有目的通过引用全文纳入本文。

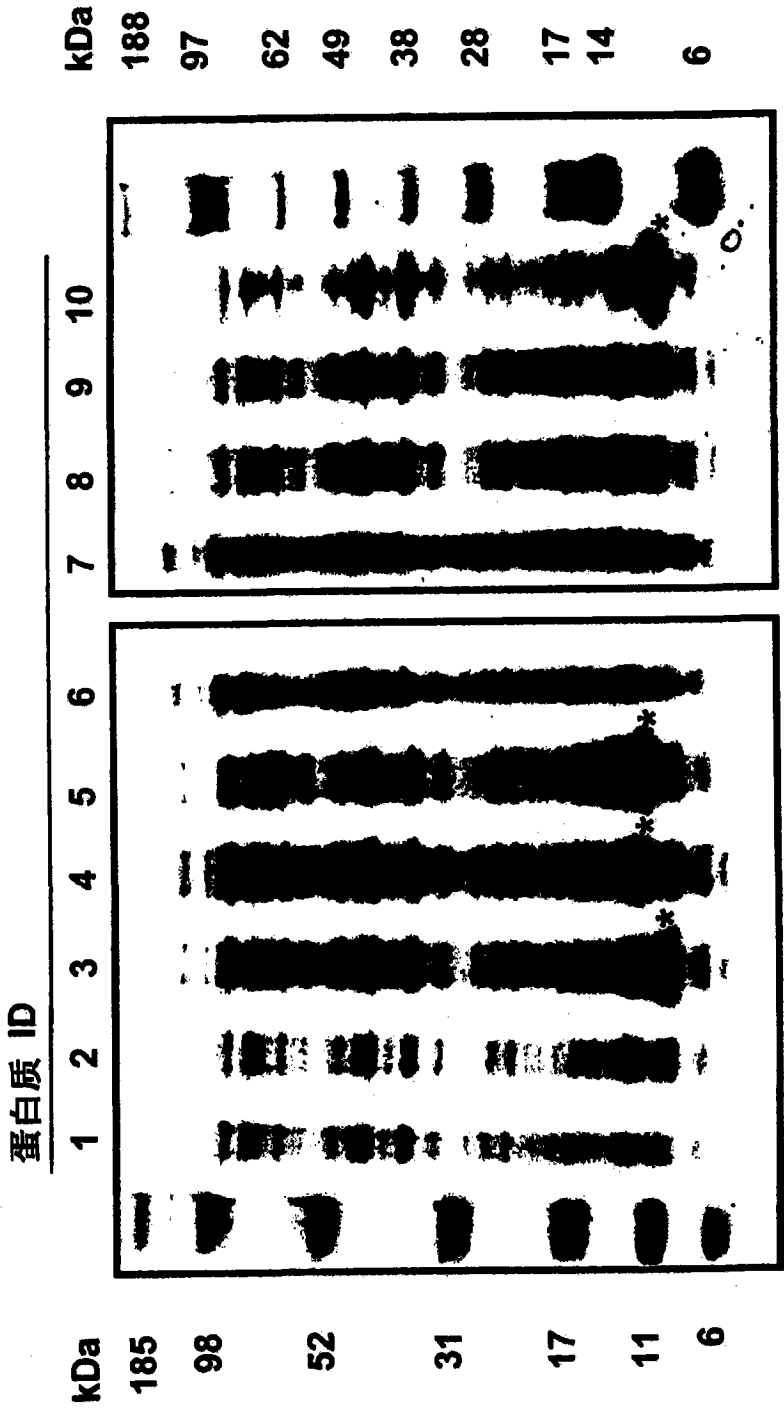


图 1

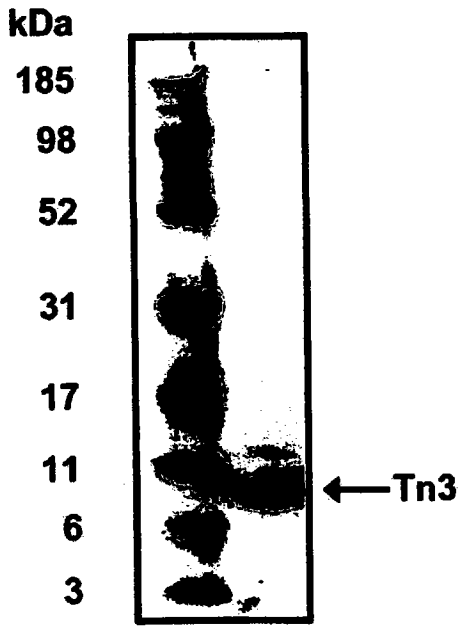


图 2

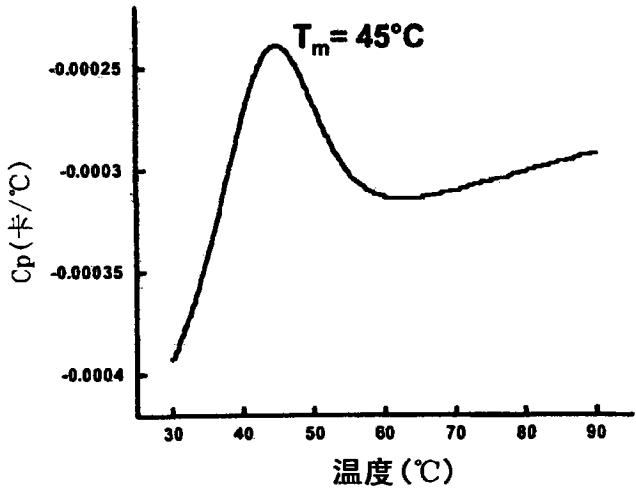


图 3A

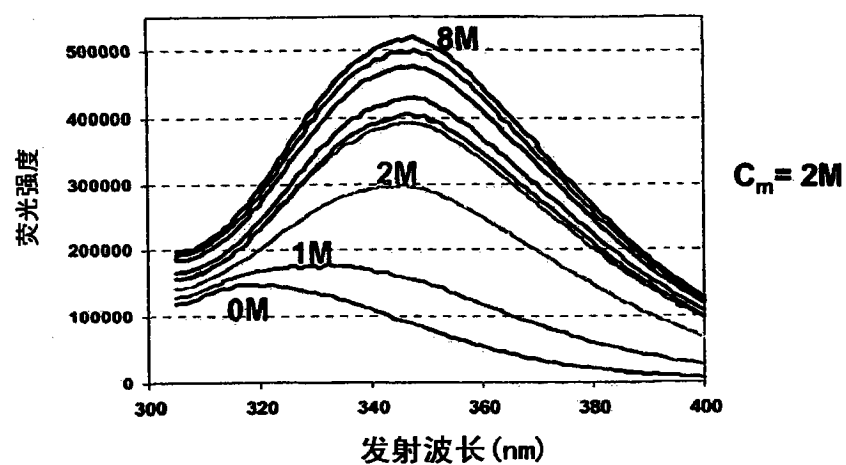


图 3B

凝聚状态

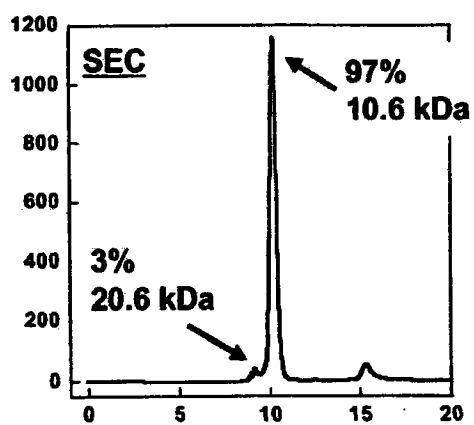


图 3C

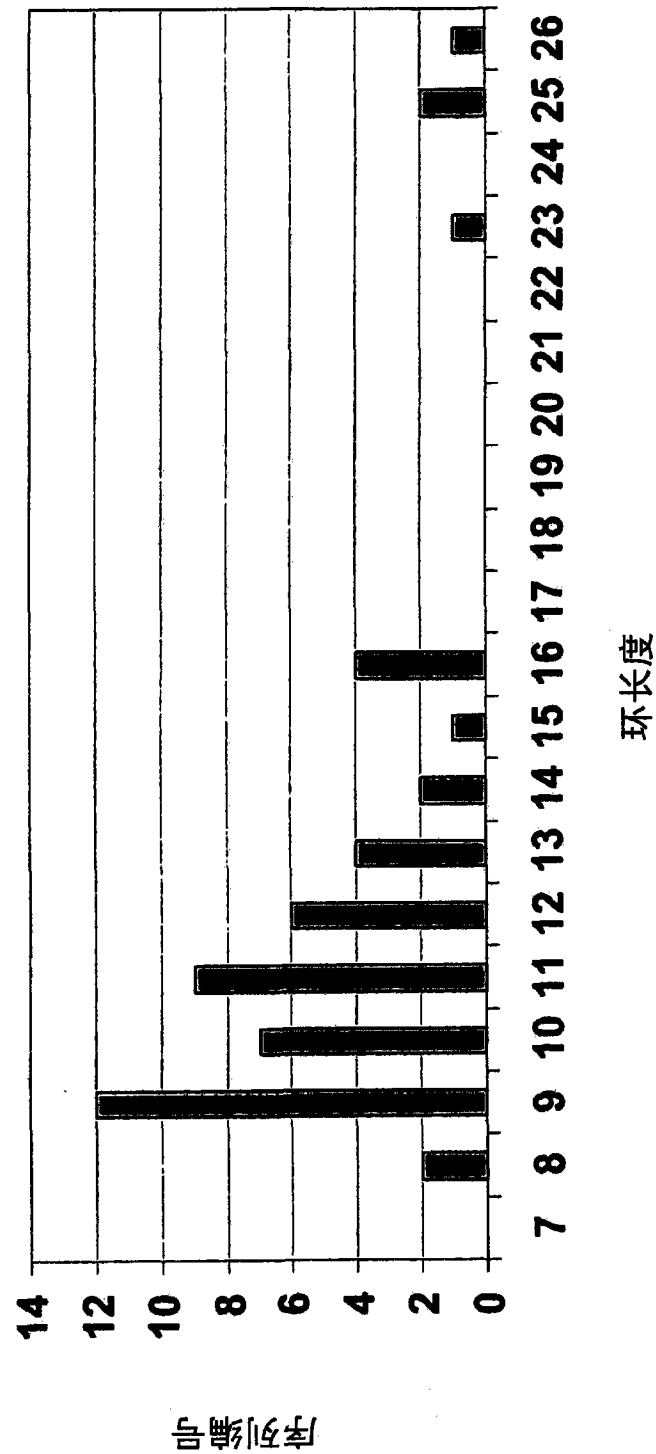


图 4A

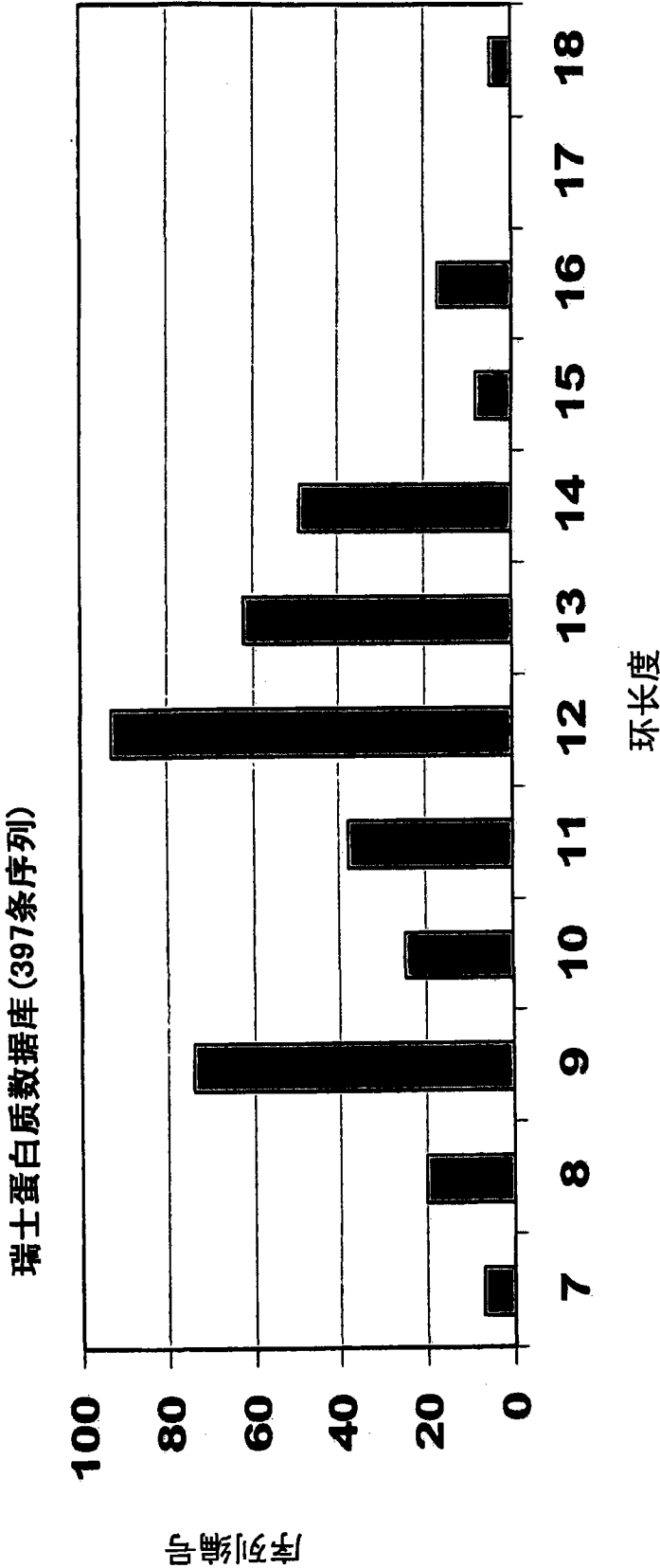


图 4B

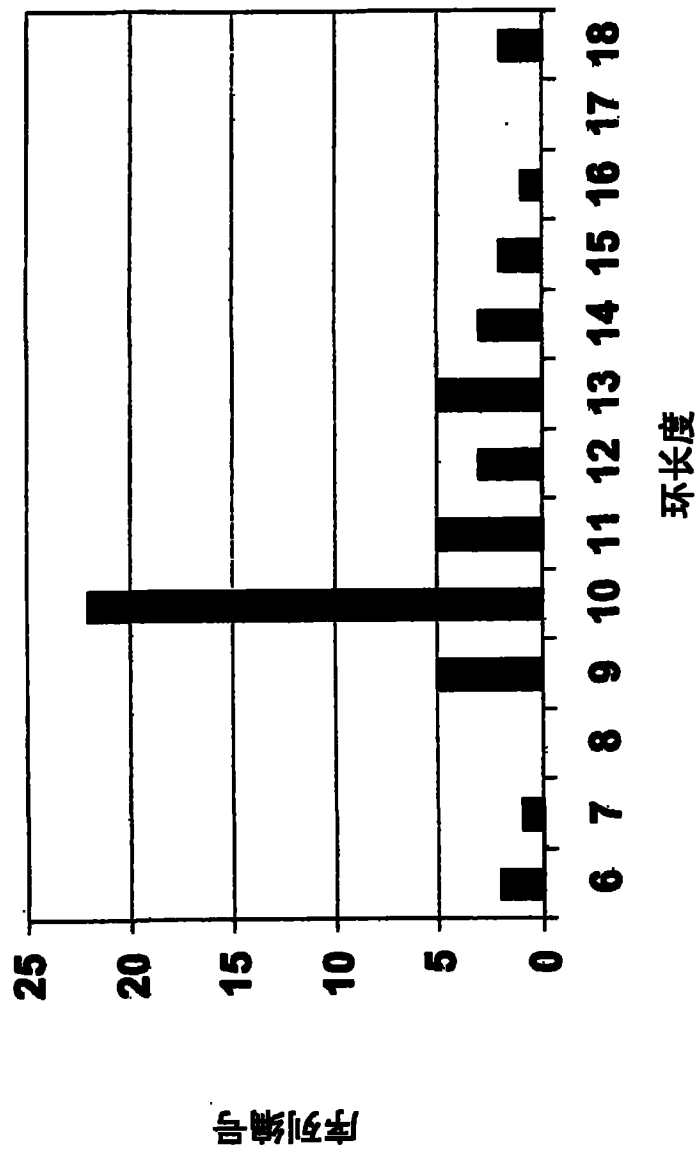


图 5

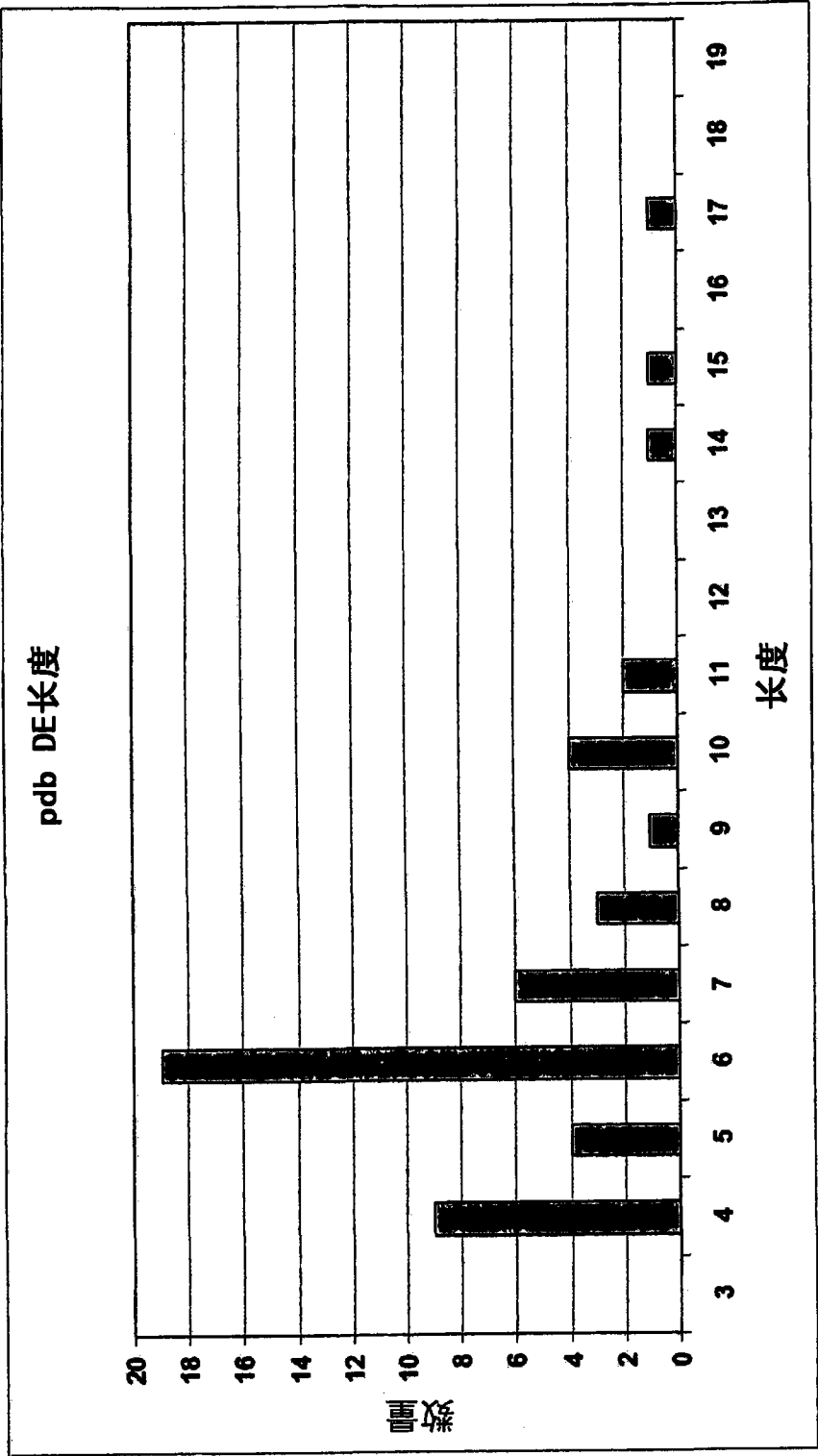


图 6

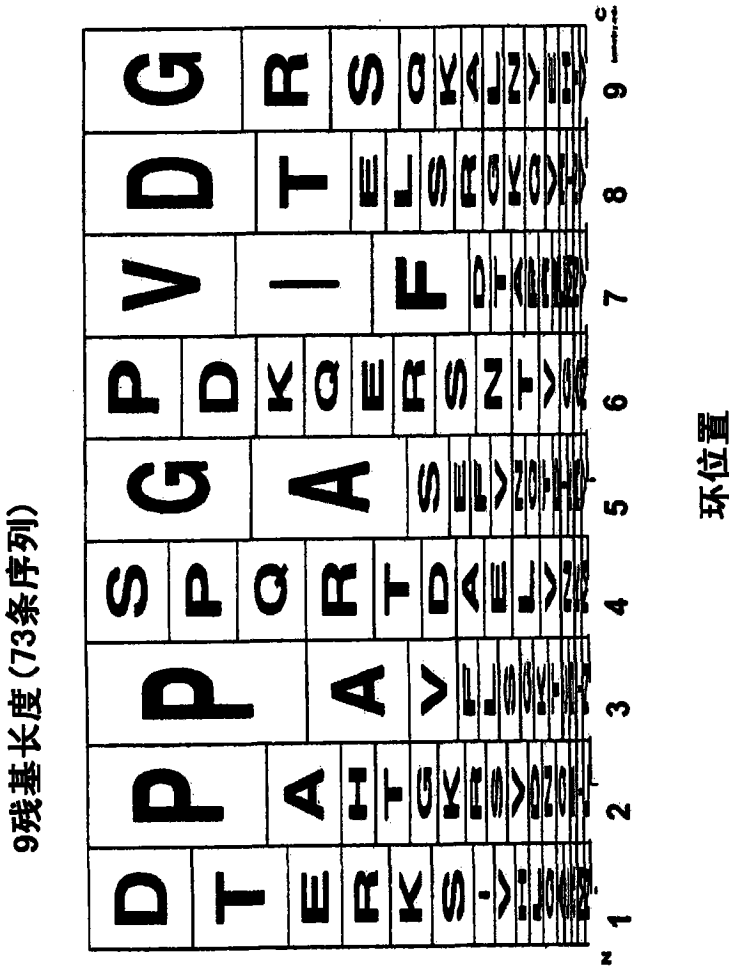
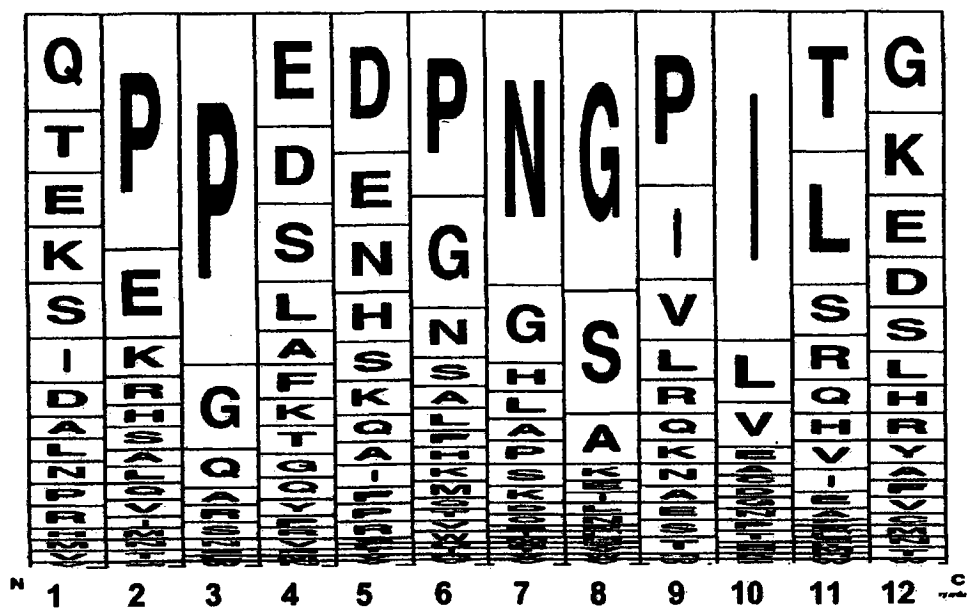


图 7A

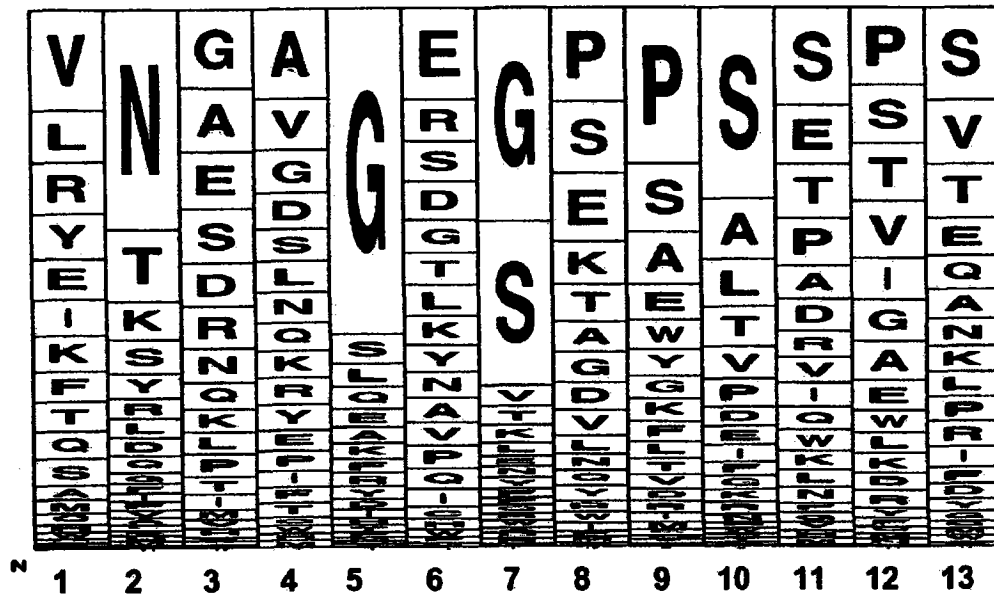
12残基长度 (99条序列)



环位置

图 7B

所有长度 (393条序列)



环位置

图 8

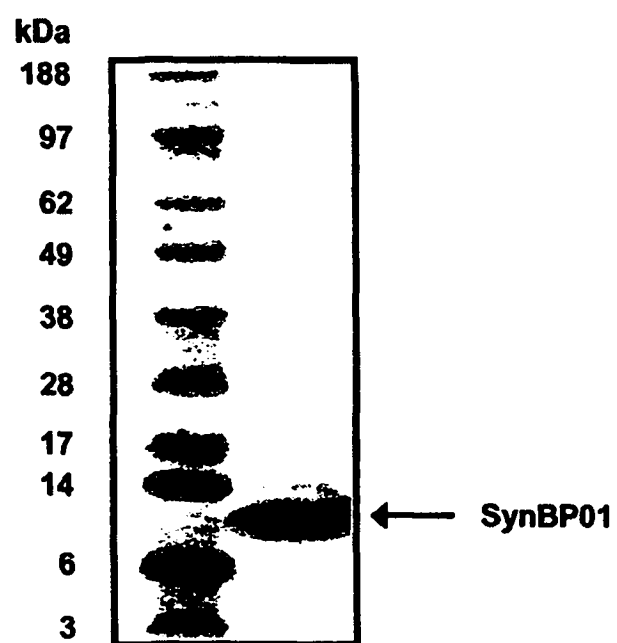


图 9A

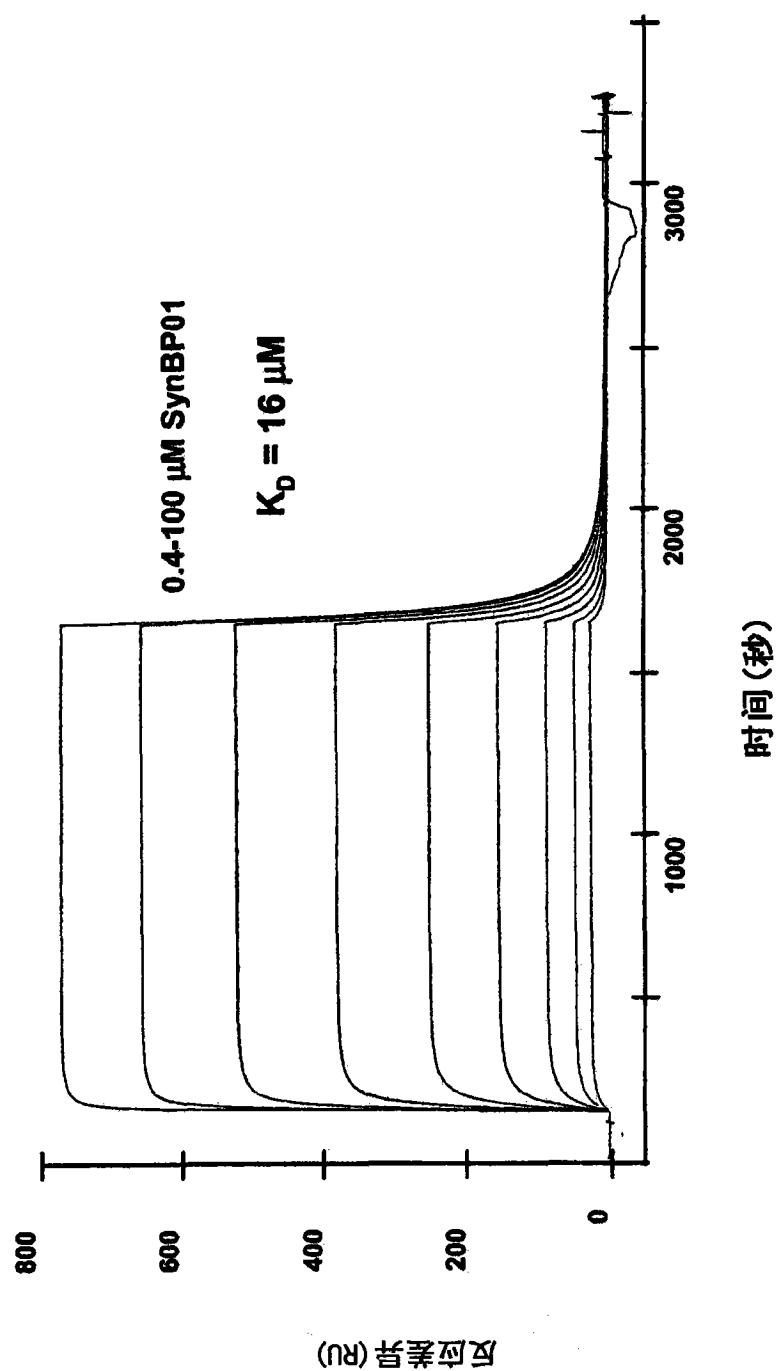


图 9B

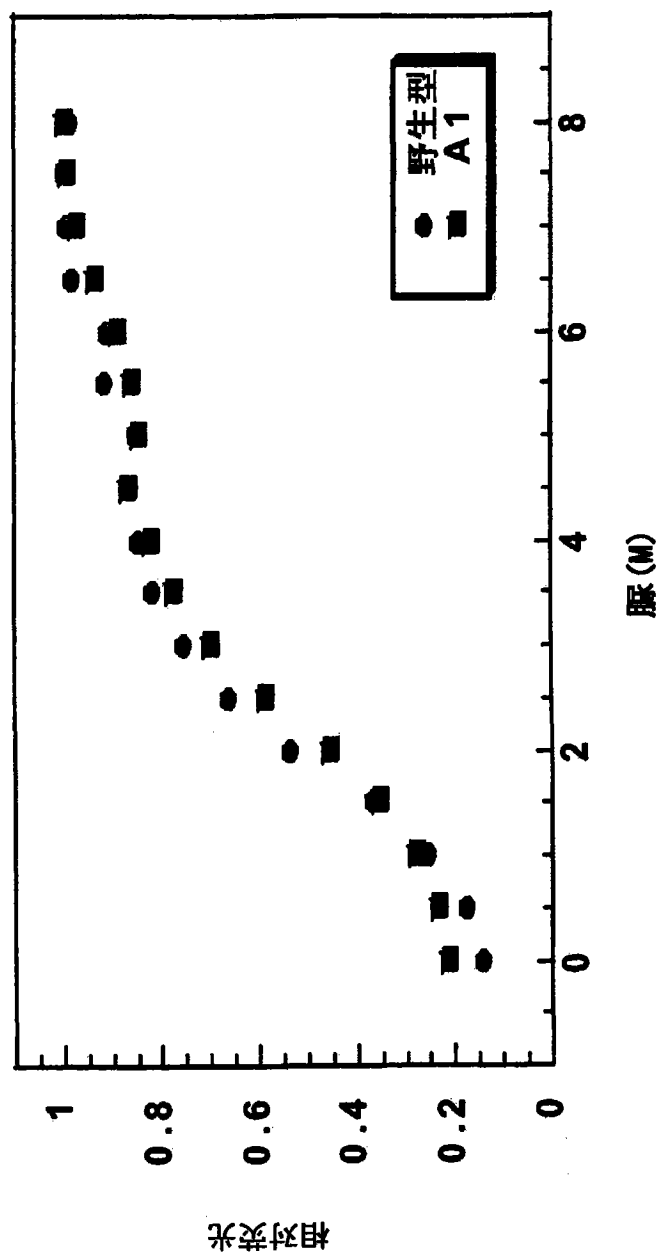


图 9C

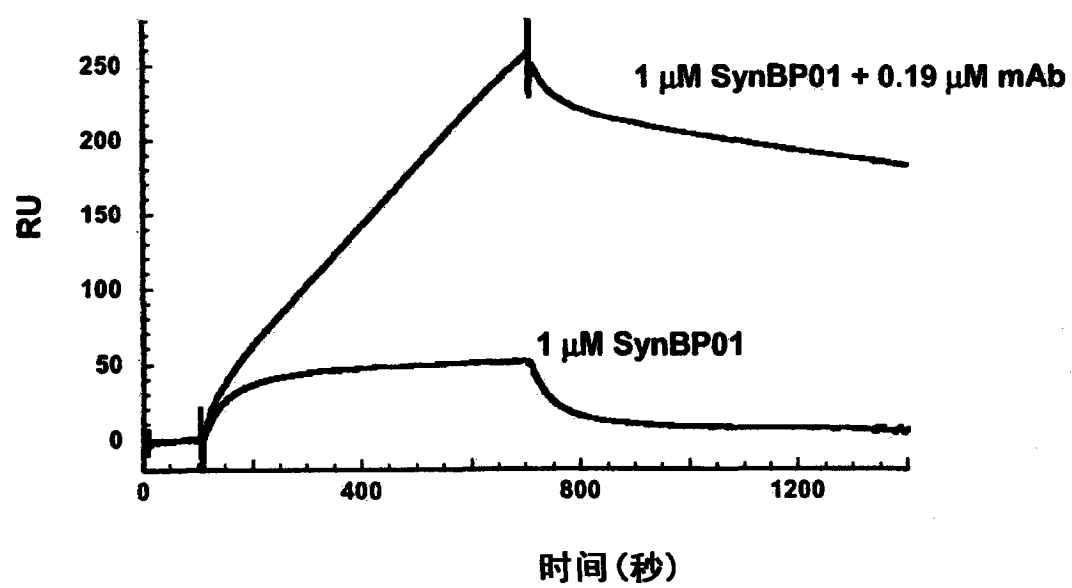


图 9D

```

LDAPSQ-IEVK--DVTDTT--ALITWFKKPLAEIDG--1ten.pro
--TV-AAYN--LTWKSTNFK-TILEWEPKPVNQV--1boy.pro
-ADTTG-RAYN--LTWKSTNFK-TILEWEPKSIDHV--1a21B_D1.pro
VPTPTN-VTIE--SYNMN--PIVYWEYQIMPPQVPV--1fg9.pro
PEKPKN-LSI--VNEGK--KMRREWDGGRETHLETN--1l1rA.pro
--GPEE-LLCF--TERLE--DLVCFWEAAASAGVGPGQ--1cn4_D1.pro
FKVLQE-PTCV--SDYMS--ISTCEWKMGPTNSSTE--1lar_D1.pro
PEEPQ--LSCFR--KSPLSN--VVCWEWRRPGTDPGGLPTN--1n26_D2.pro
PGKPEI-FKCR--MHLTTN--SLVCQWEPGPETHLPTS--1bp3_D1.pro
PASPSN-LSCL--SPDKKE--TFTCWNNPGTDGGGLPTN--1pgrF_D2.pro
PGKPEI-HKCR--SPDKKE--TFTCWNNPGTDGGGLPTN--1f6f_D1.pro
--PKF-TKCR--SPDKKE--TFTCHWTDVHHGTLKGP--1kf9_D1.pro
LGQPTI-QSFE--QVGTK--VNVTVEDERTLVRRNNTFFLSLRDVFGKDLI-1boy_D2.pro
LGQPTI-QSFE--QVGTK--LNVTVQDARTLVRRNNTFFLSLRDVFGKDLN-1a21B.pro
IGPPK--LDIR--KEEKQ--FILGKIQLPRPKMPPSEYMEQE--1fg9_D2.pro
VLTVGSVNLE--IHN-G--FILGKIQLPRPKMPPSEYMEQE--1lqs_D2.pro
LEPPML-QALDIGPDDVSSHQPGGLWLSWKPKPSEYMEQE--1pgrF.pro
PNAPKL-TGIT--QADK--AEIHWEEQQGDNRSPILH--1cfb.pro
PDPPKN-LQLK--PLKNSR--QVEVSWEEYPTDTWSTPHSYFSLT--1f42.pro
PSPPSVWFEAE--FFH--HILHWTPPIPPQSQSEST[C]-1lqsR.pro
QKEPKNKTFLLR--EAKNYSGRFTWWLTTISTDLT--1f42_D2.pro
PWAPEN-LTLH--KLSSESQ--LELNNWNNRFLNHC[C]LE--2erjG_D2.pro

```

图 10A-1

```

I E L T Y G I K D V P G D R T T - - - - - I D L T E D E N Q - - - - - Y S I G N - - - - - lten.pro
Y T V Q I S T K S G D W K S K - - - - - C F Y T T D T E - - - - - C D L T D E - - - - - lboy.pro
Y T V Q I S T R L E N W K S K - - - - - C F L T A E T E - - - - - C D L T D E - - - - - la21B_D1.pro
F T V E V K N Y G V K N S E W I D A - - - - - C I N I S H H Y - - - - - C N I S D H - - - - - lfg9.pro
F T L K S E W A T H K F A D - - - - - C K A K R D T P T S - - - - - C T V D Y S - - - - - l1irA.pro
Y S F S Y Q L E D E P W K L - - - - - C R L H Q A P T A R G A V R F W - - - - - C S L P T A D - - - - - lcn4_D1.pro
L R L L Y Q L V F L L S E A H T - - - - - C I P E N N G G A G V - - - - - C H L L M D D - - - - - l1ar_D1.pro
A V L L V R K F Q N S P A E D F Q E P - - - - - C Q Y S Q E S Q K F S - - - - - C Q L A - - - - - ln26_D2.pro
Y S L T Y H R E G E T L M H E - - - - - C P D Y I T G G P N S - - - - - C H F G K Q Y - - - - - lbp3_D1.pro
F I L K S F R S R A D Q Y Q G D T I P D C V A K K R Q N N - - - - - C S I P R K N - - - - - lpgrF_D2.pro
Y S L T Y S K E G E K T T Y E - - - - - C P D Y K T S G P N S - - - - - C F F S K Q Y - - - - - lf6f_D1.pro
I Q L F Y T R R N T Q E W T Q E W K E - - - - - C P D Y V S A G E N S - - - - - C Y F N S S F - - - - - lkf9_D1.pro
Y T L Y Y W K S S S S G K K T A K - - - - - T N T N E - - - - - F L I D - - - - - lboy_D2.pro
Y T L Y Y W R A S S T G K K T A T - - - - - T N T N E - - - - - F L I D - - - - - la21B.pro
Y N V Y V R M N G S E I Q Y K - - - - - I L T Q K E D D Q D E I Q Q - - - - - lf99_D2.pro
Y E I A I R K V P G Q F T F T H K K - - - - - V K H E Q - - - - - F S L L - - - - - llqs_D2.pro
E L R Y Q P Q L K G A N W T L V F H - - - - - L P S S K D Q - - - - - F E L G - - - - - lpgrF.pro
Y T I Q F N T S F T P A S W D A A Y E K - - - - - V P N T D S S - - - - - F V V Q - - - - - lcfb.pro
F C V Q V Q G K S K R E K K D R V F - - - - - T D K T S - - - - - A T V I - - - - - lf42.pro
Y E V A L L R Y G I E S W N S I S Q C - - - - - S Q T L S - - - - - Y D L T A - - - - - llqsR.pro
F S V K S S R G S S D P Q G V T T G A - - - - - A T L S A E R V R G D N K E Y E Y S V E Q Q E D S A - - - - - lf42_D2.pro
H L V Q Y R T D W D H S W T E Q S - - - - - V D Y R H K - - - - - F S L P S - - - - - 2erjG_D2.pro

```

图 10A-2

[illegible]

图 10A-3

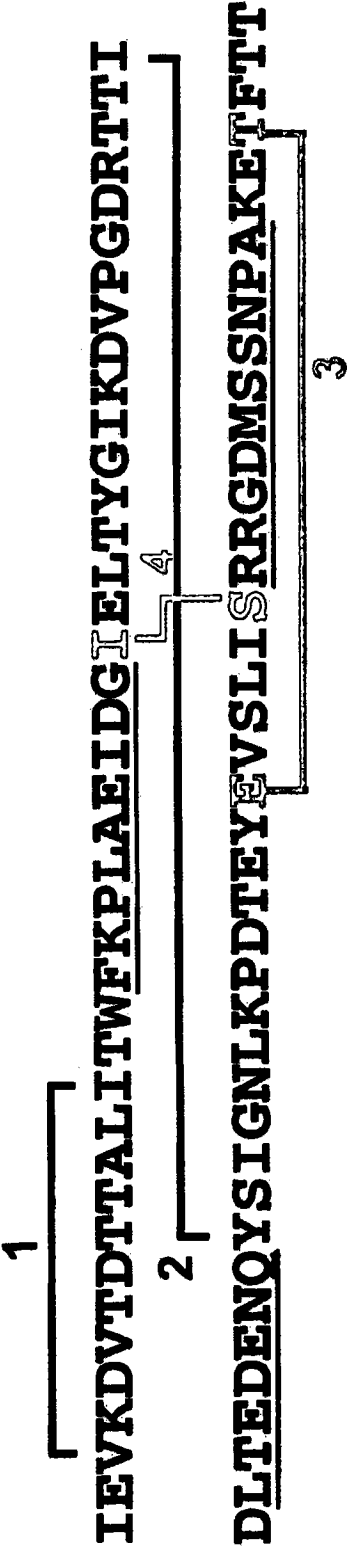


图 10B

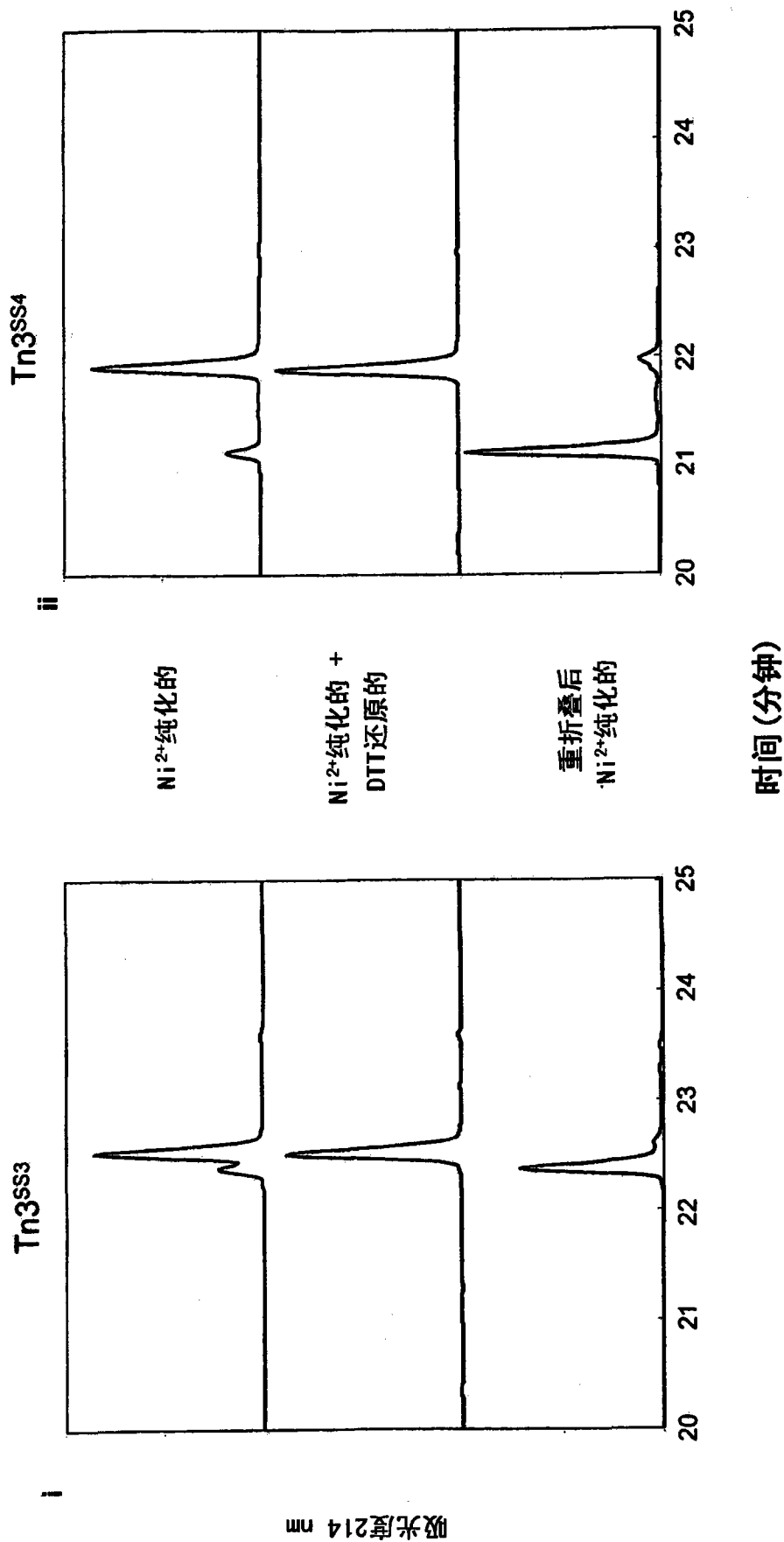


图 10C

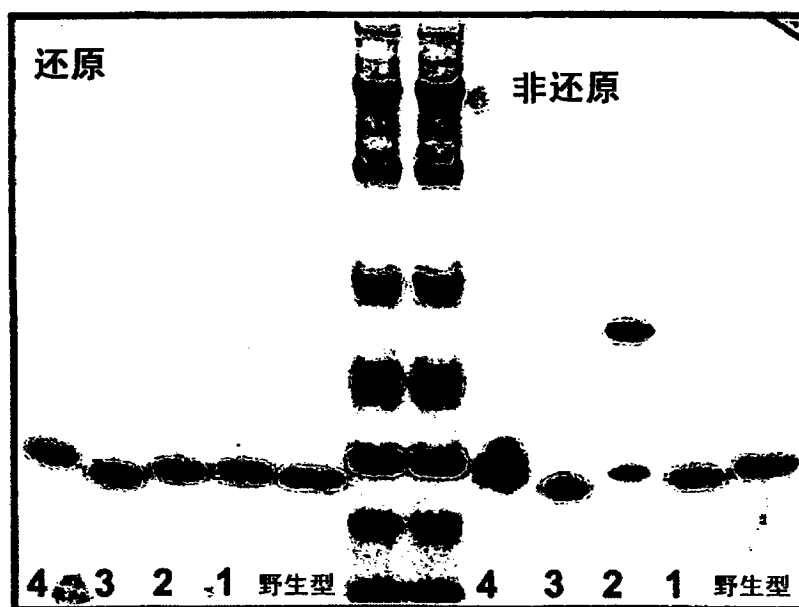


图 10D

荧光与脲浓度

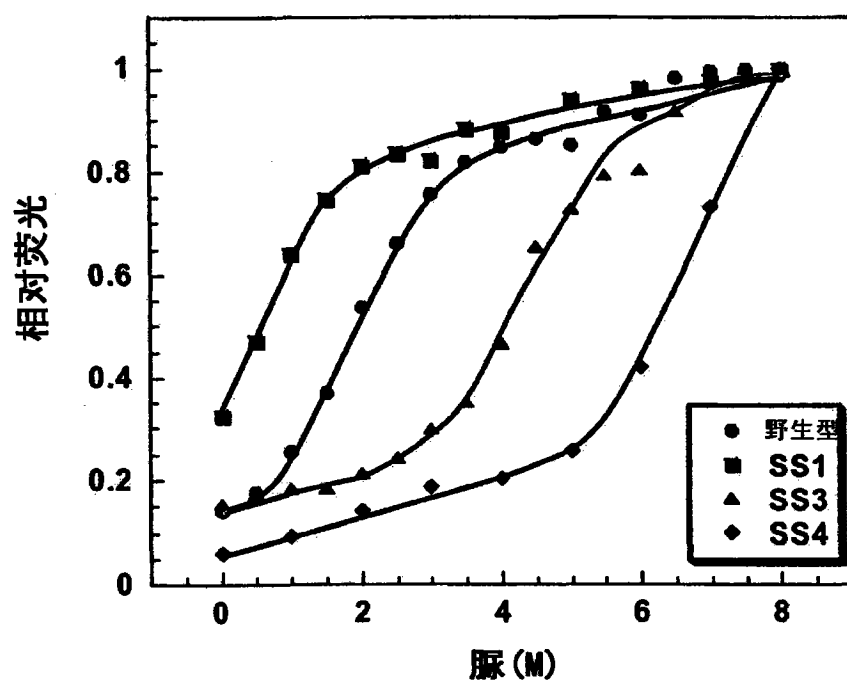


图 10E

对胍·HCl 的稳定性

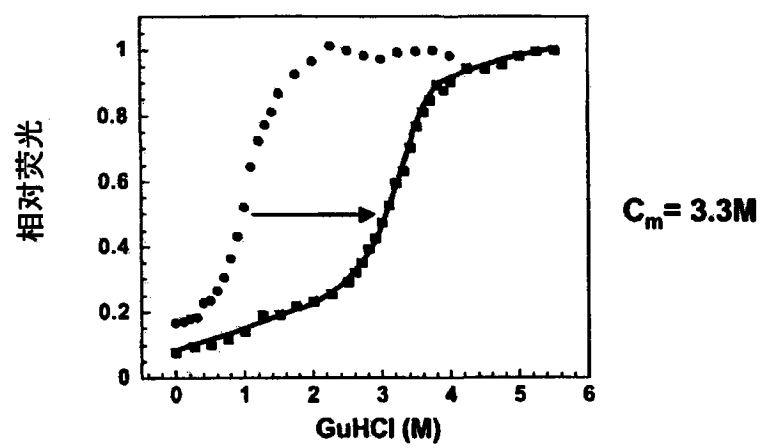


图 10F

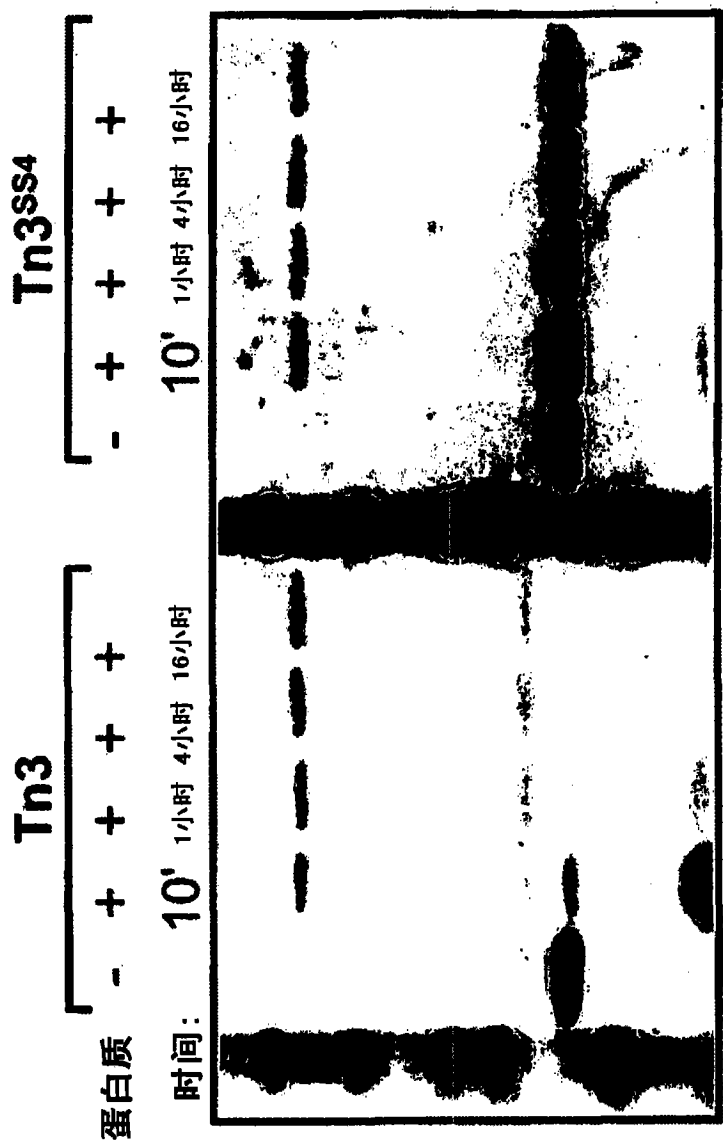


图 10G

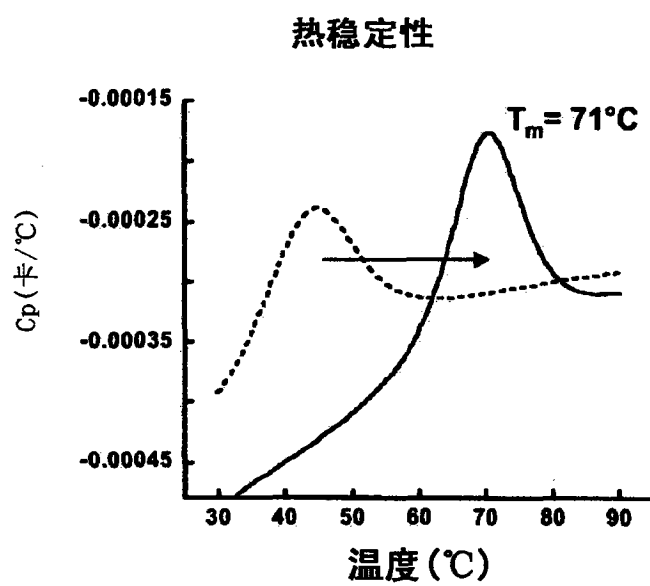


图 10H

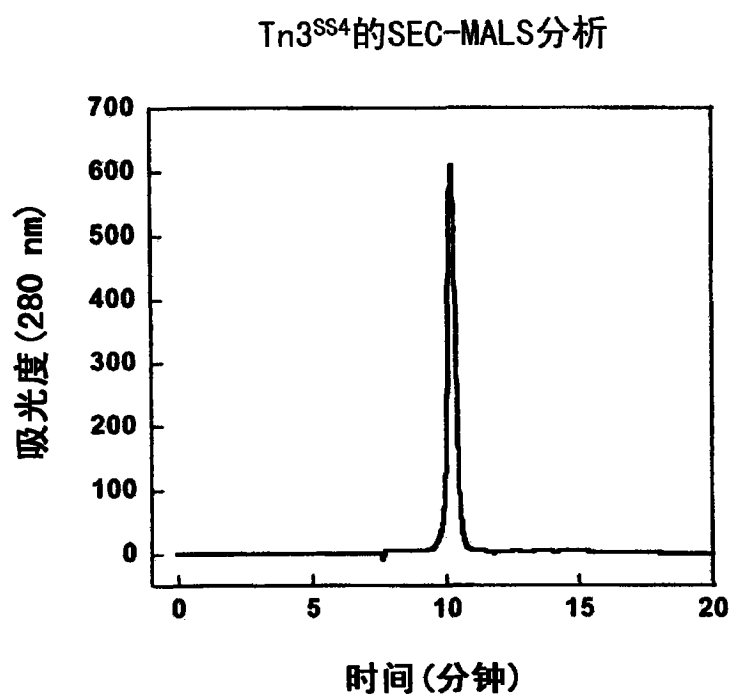


图 10I

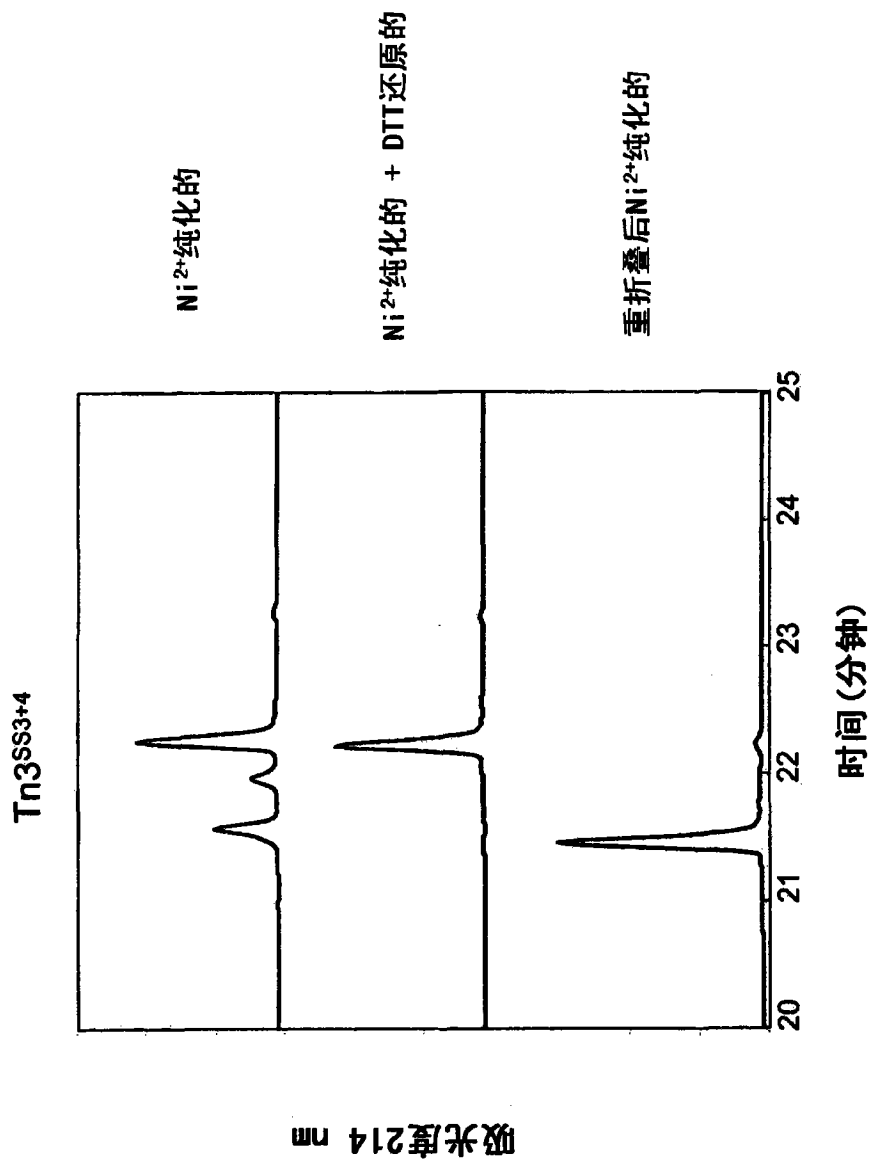


图 10J

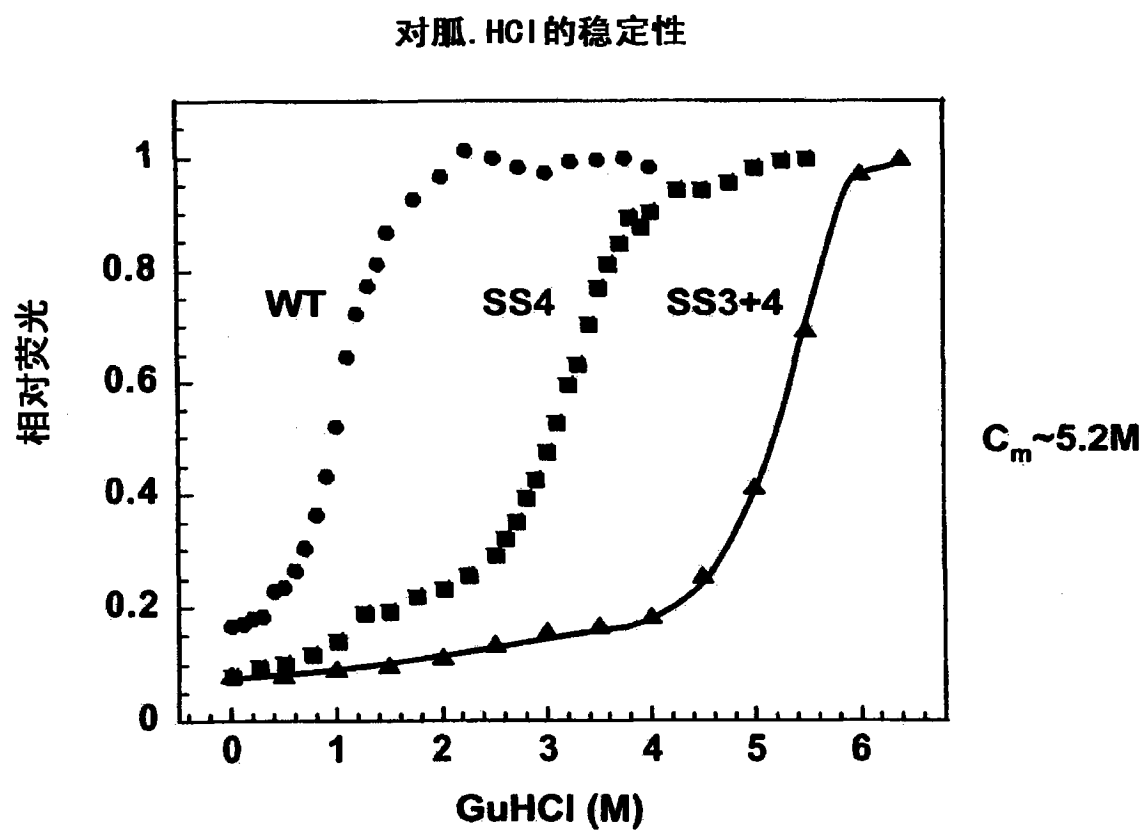


图 10K

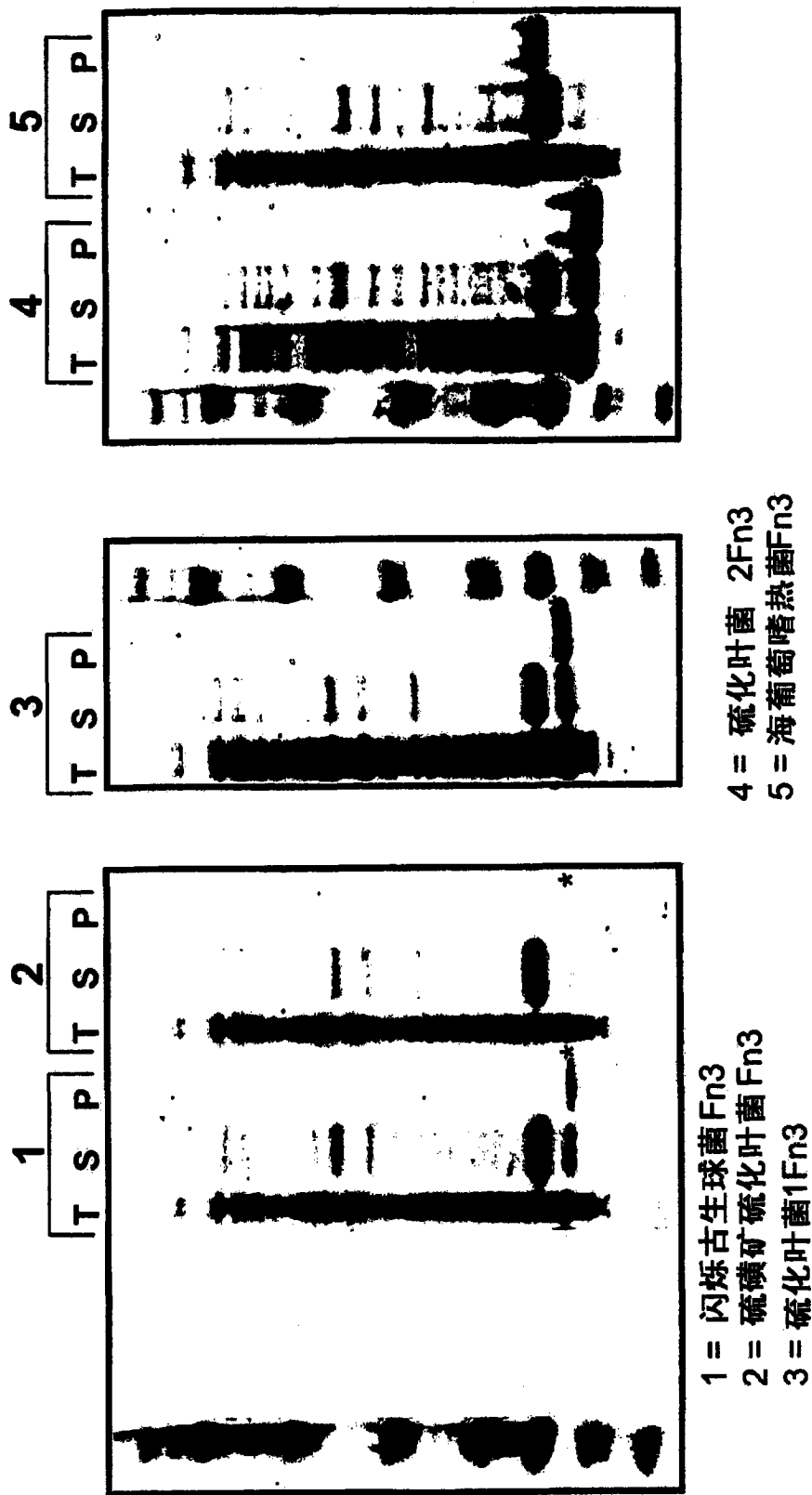


图 11A

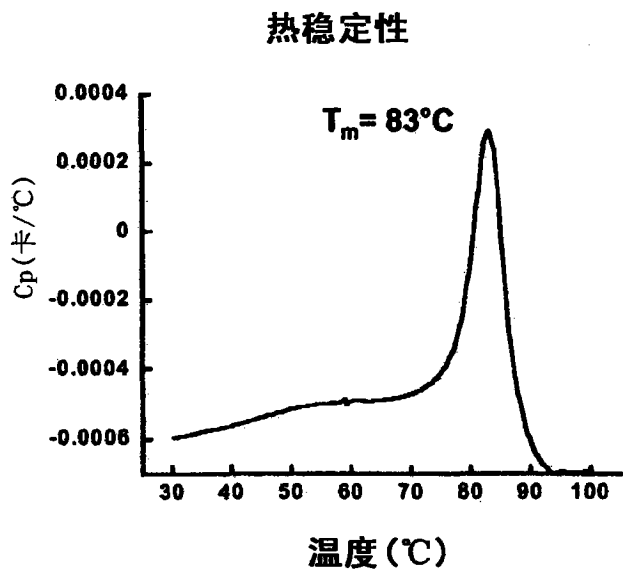


图 11B

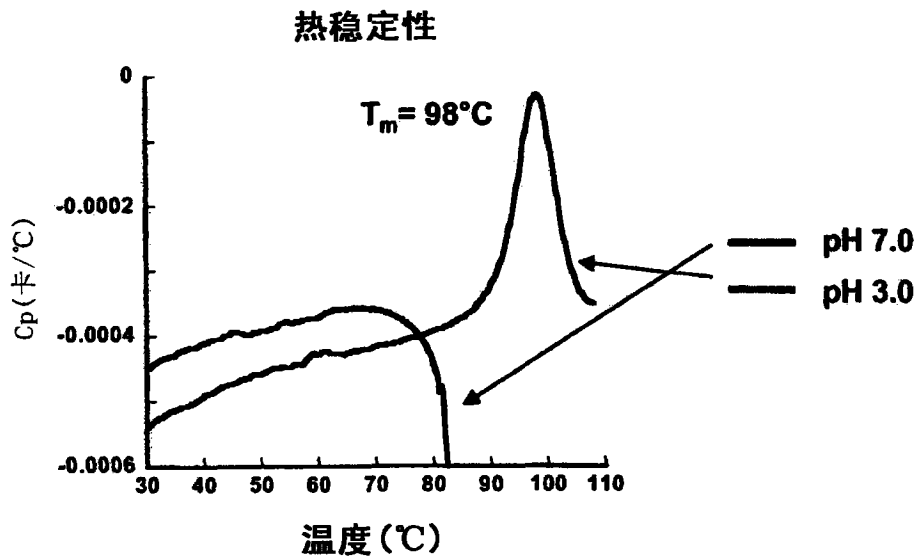


图 11C

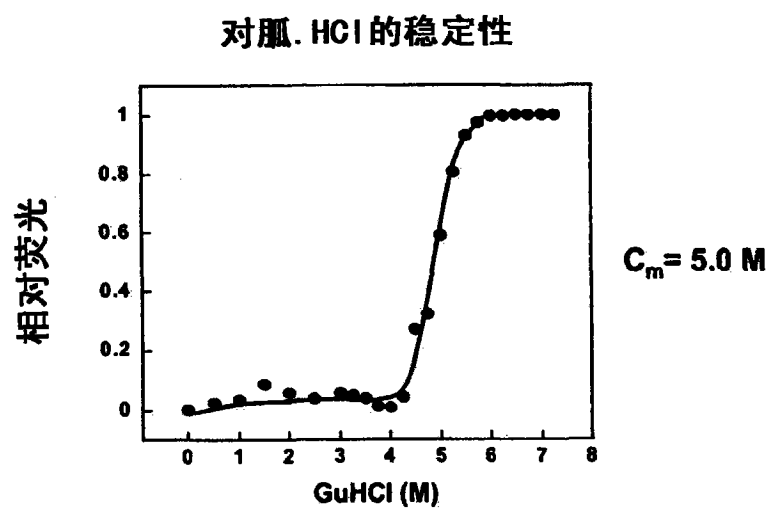


图 11D

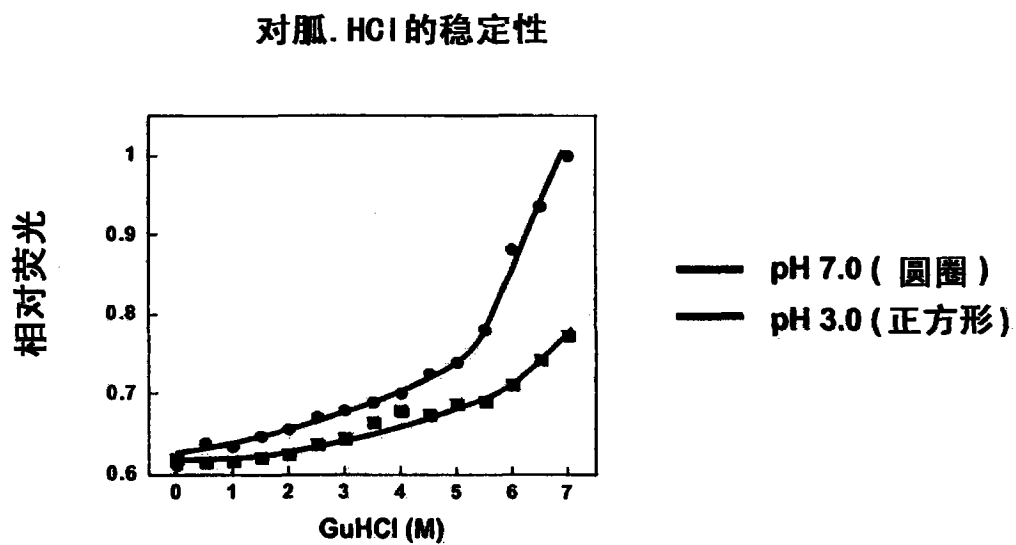


图 11E

蛋白质 - + + + +
时间: 10' 1小时 4小时 16小时

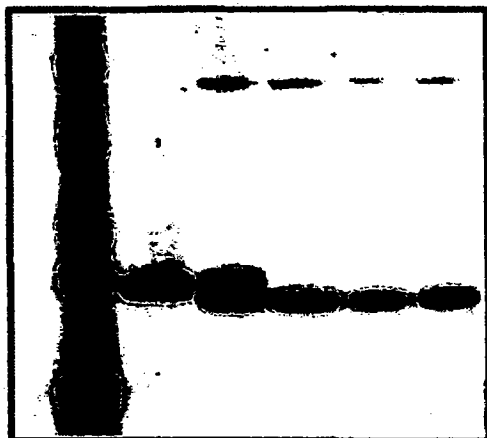


图 11F

蛋白质 - + + + +
时间: 10' 1小时 4小时 16小时

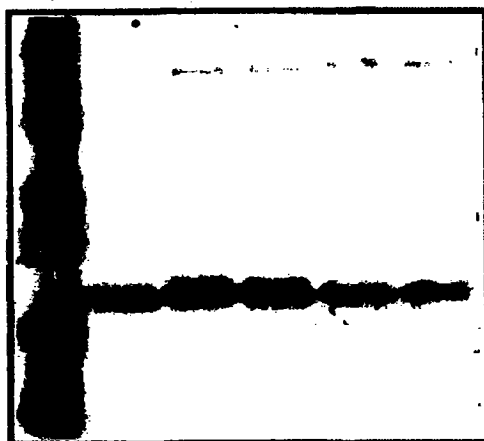
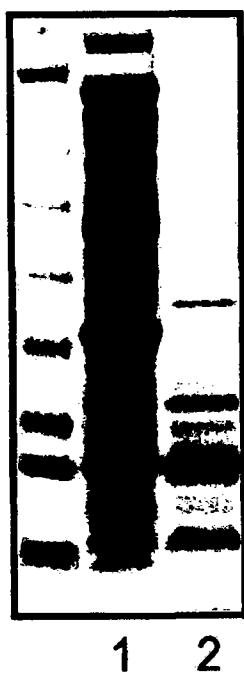


图 11G

热处理

粗制裂解液, 70℃, 15分钟



← 预计的Tn3结构基序

图 11H

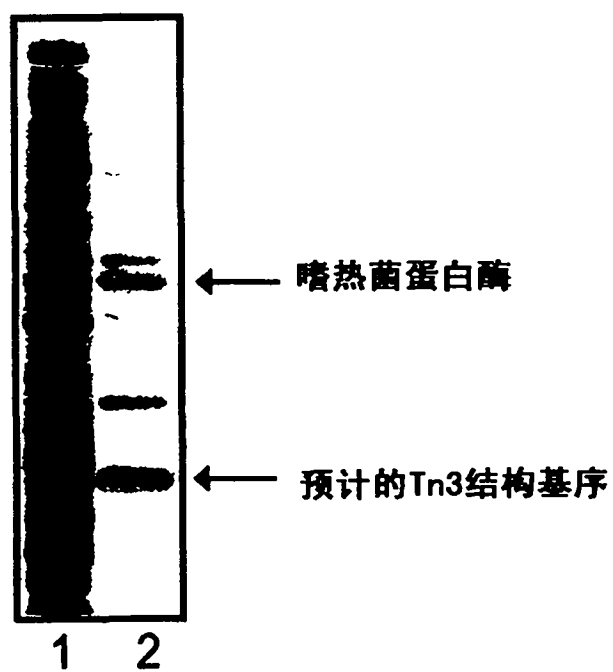
蛋白水解处理**粗制裂解液+嗜热菌蛋白酶，55℃，45分钟**

图 11I

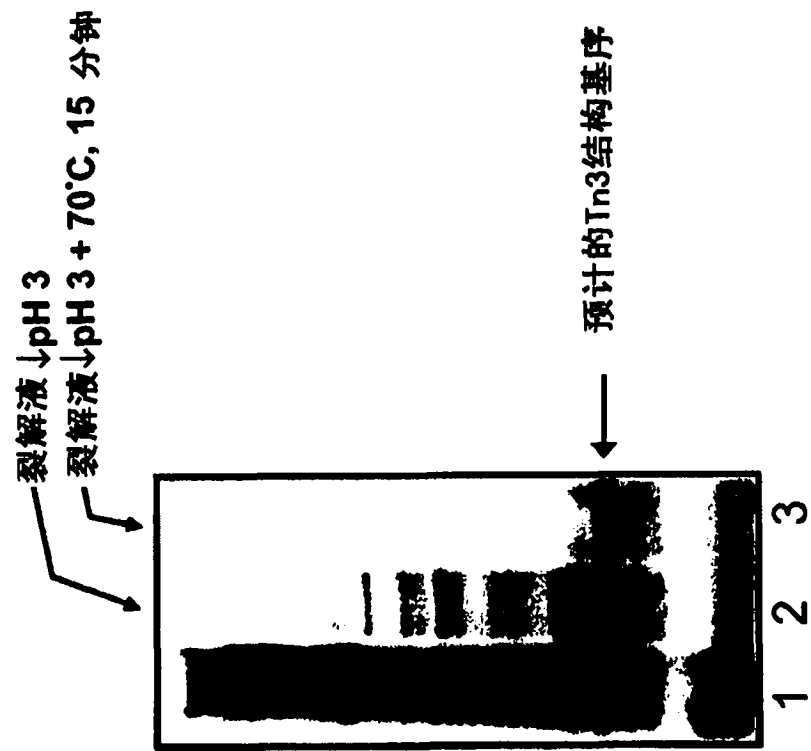


图 11J

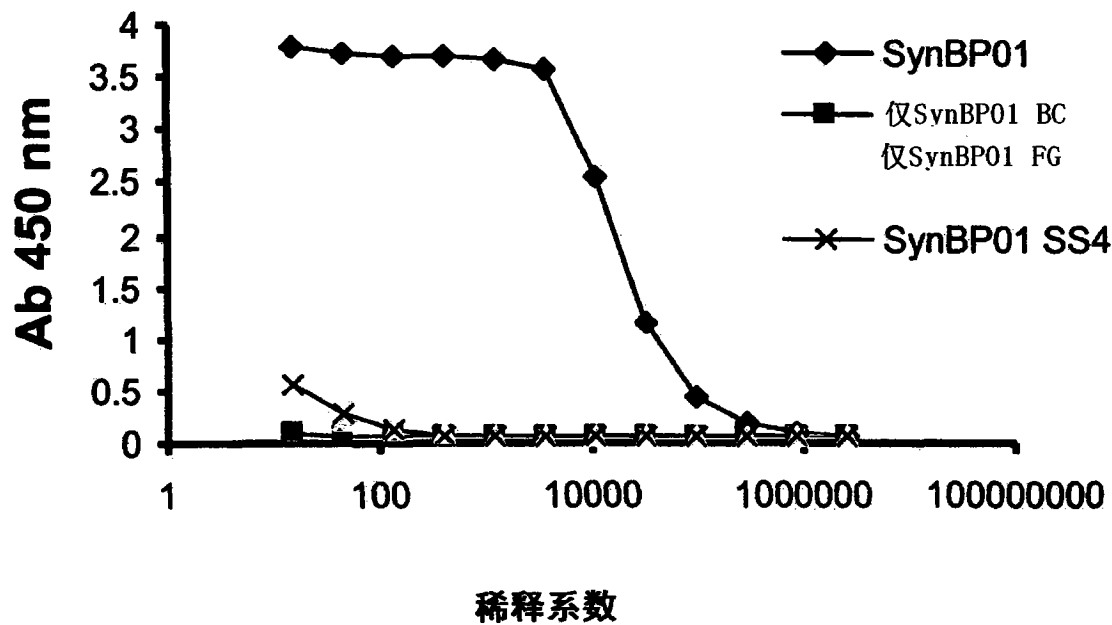


图 12

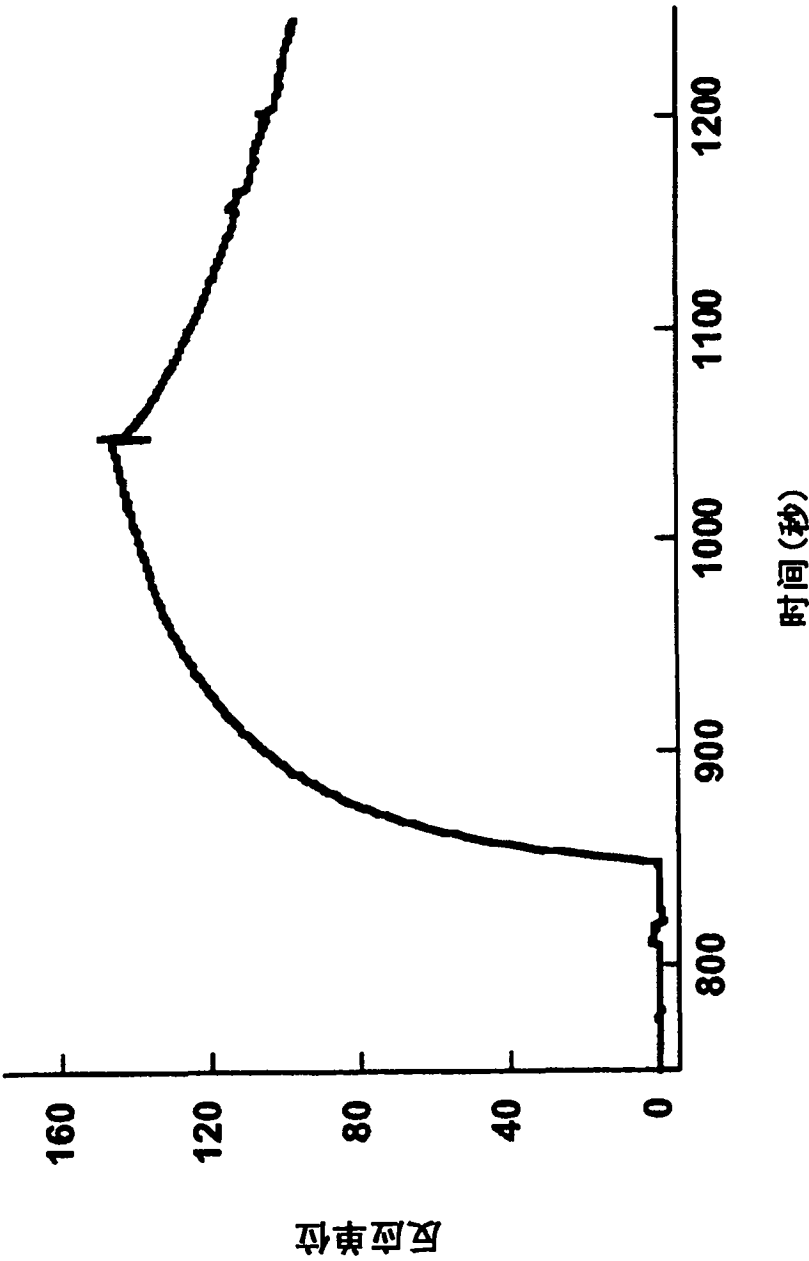


图 13

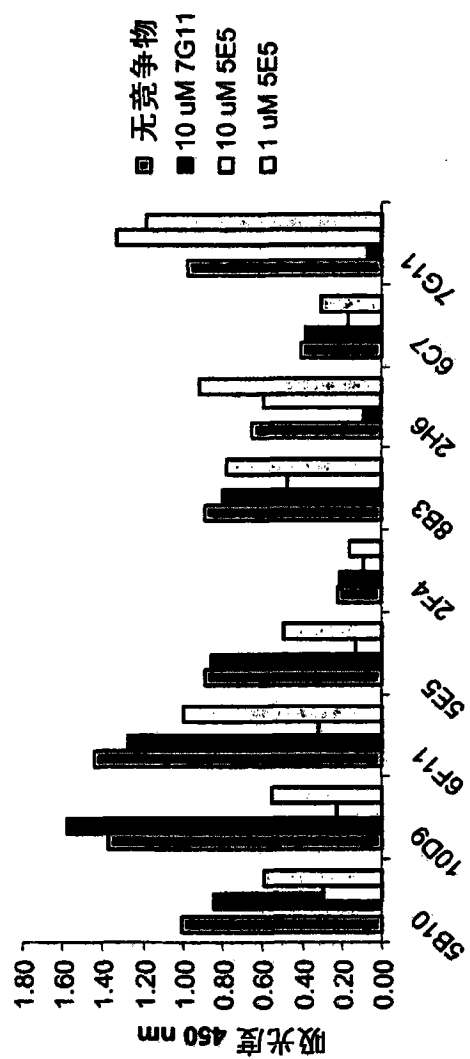
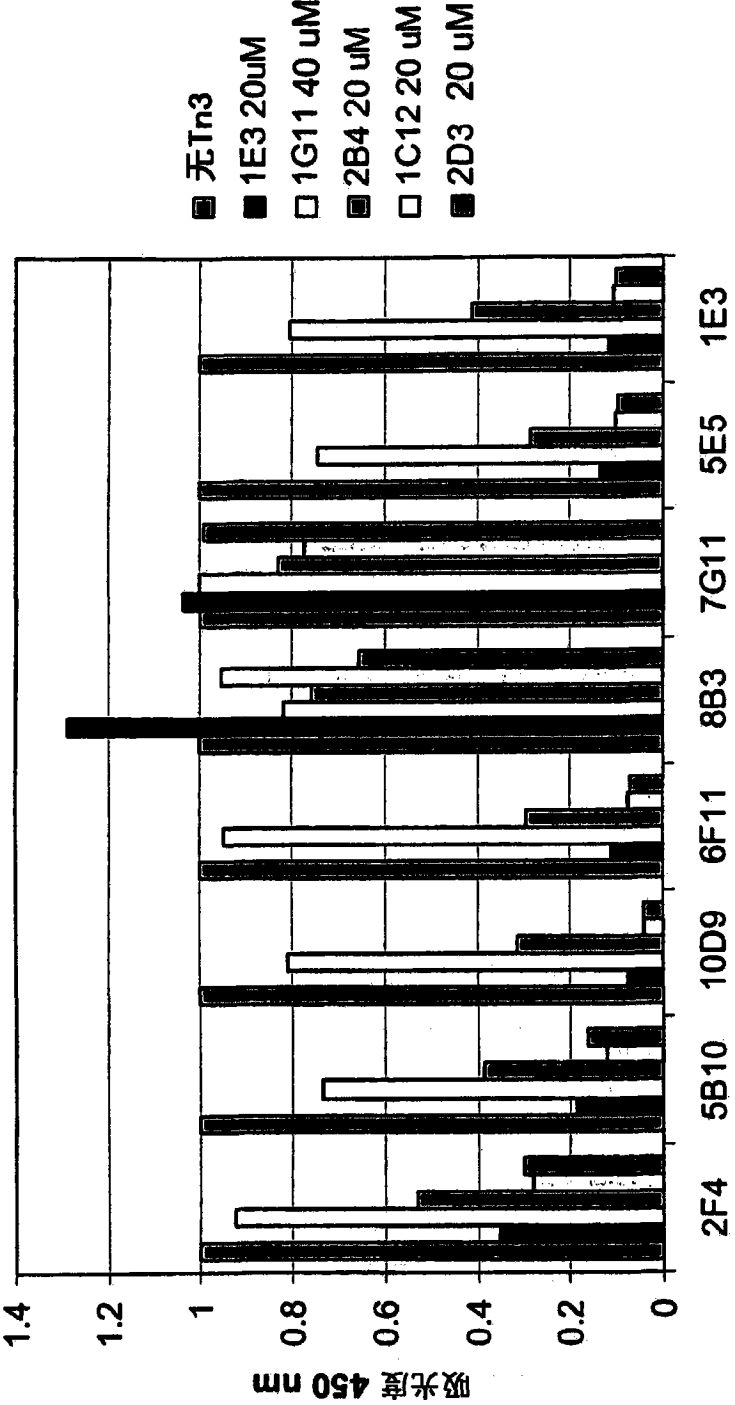


图 14



A

图 15(续)

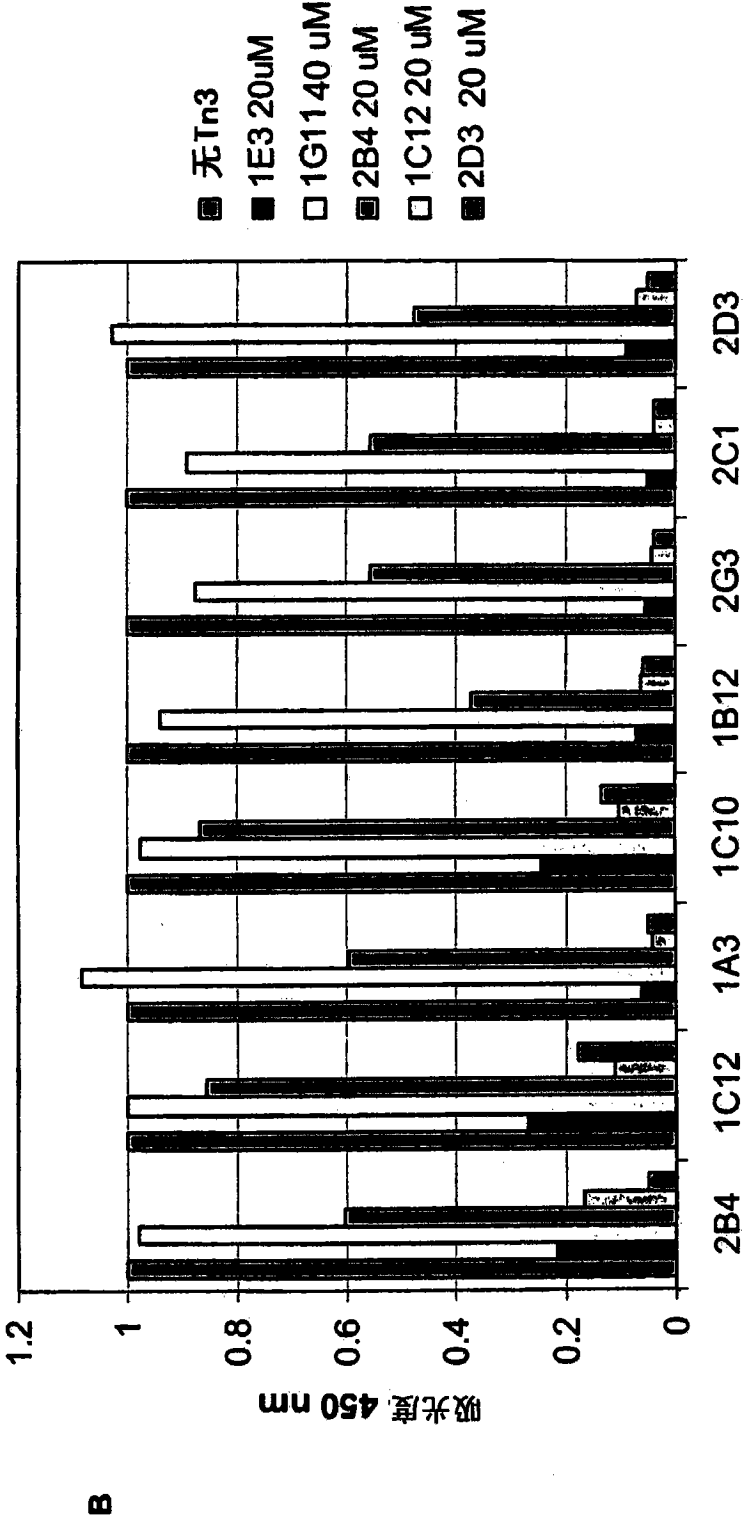


图 15(续)

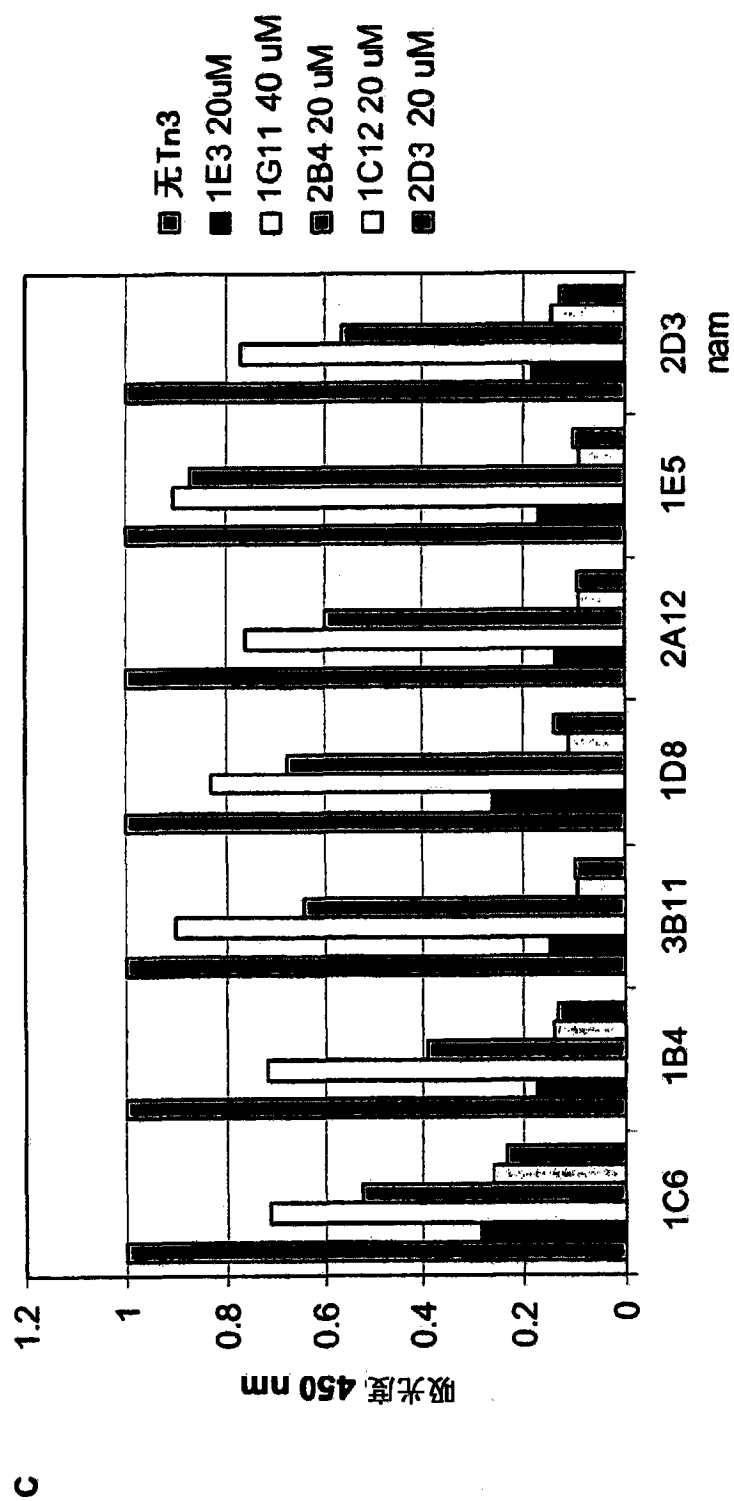


图 15(续)

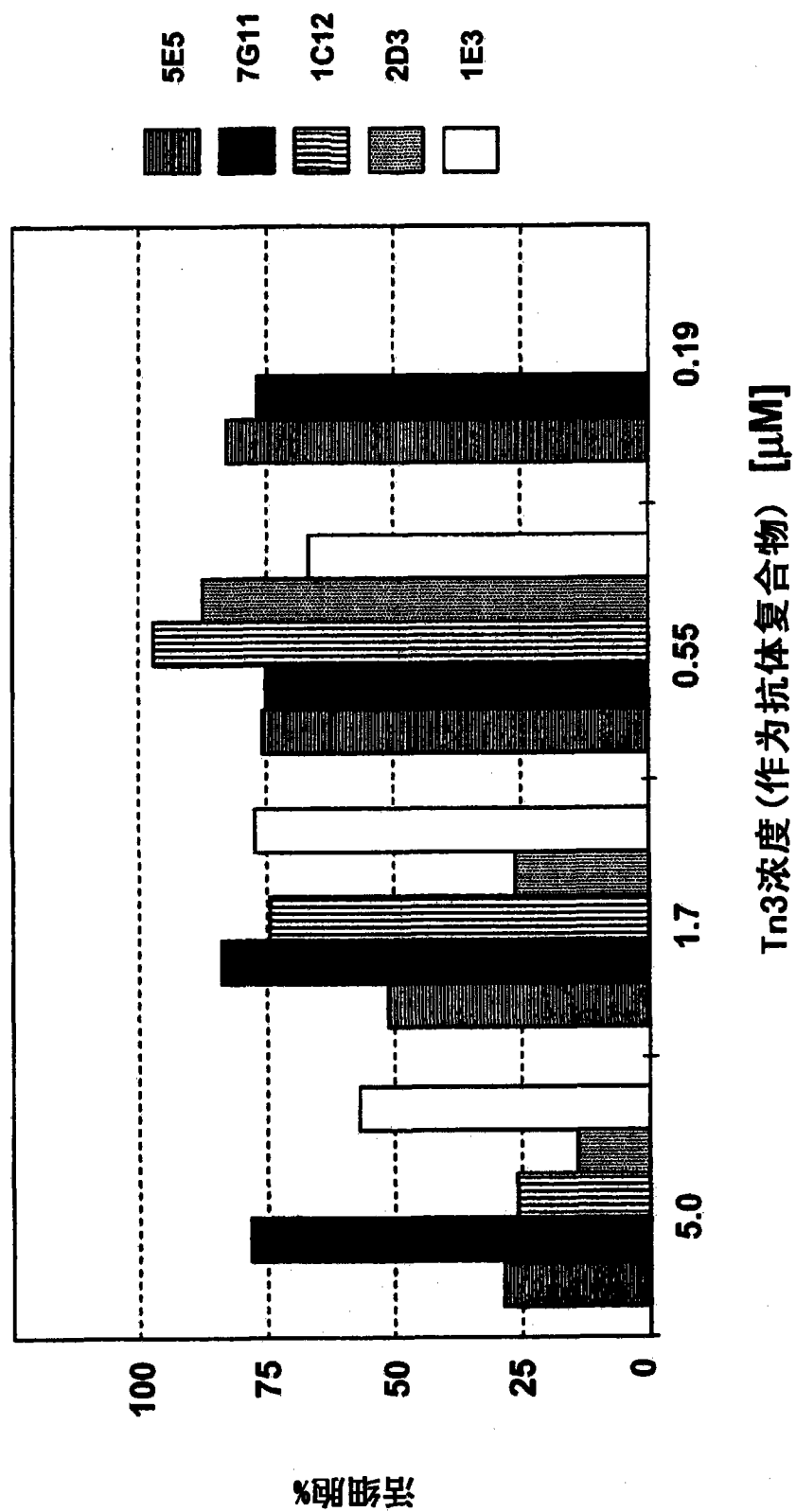


图 16

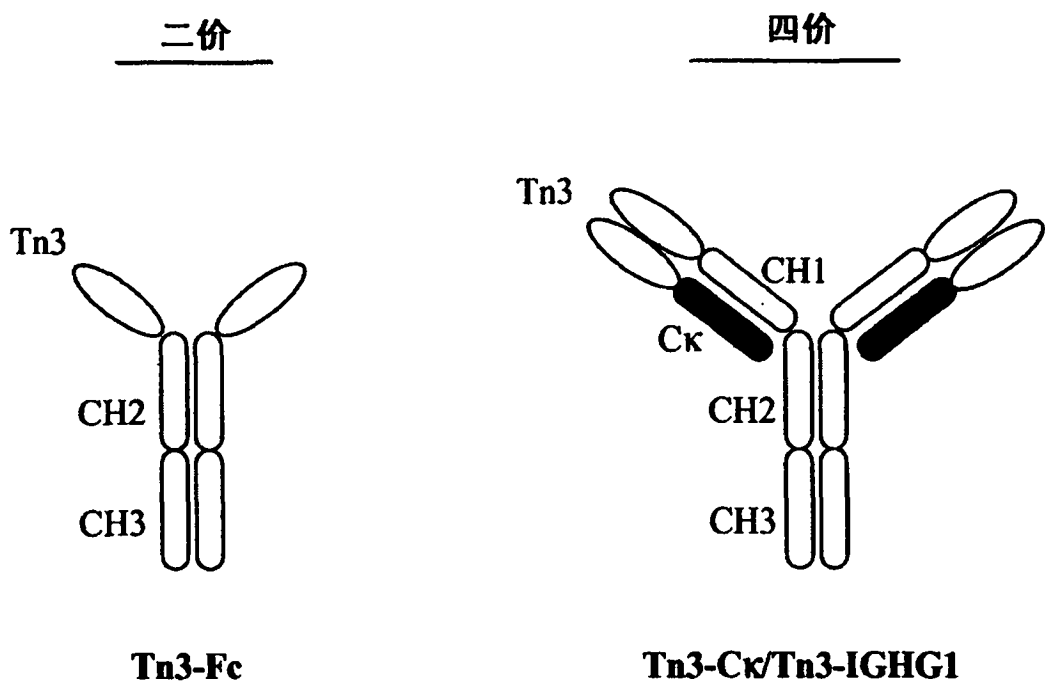


图 17

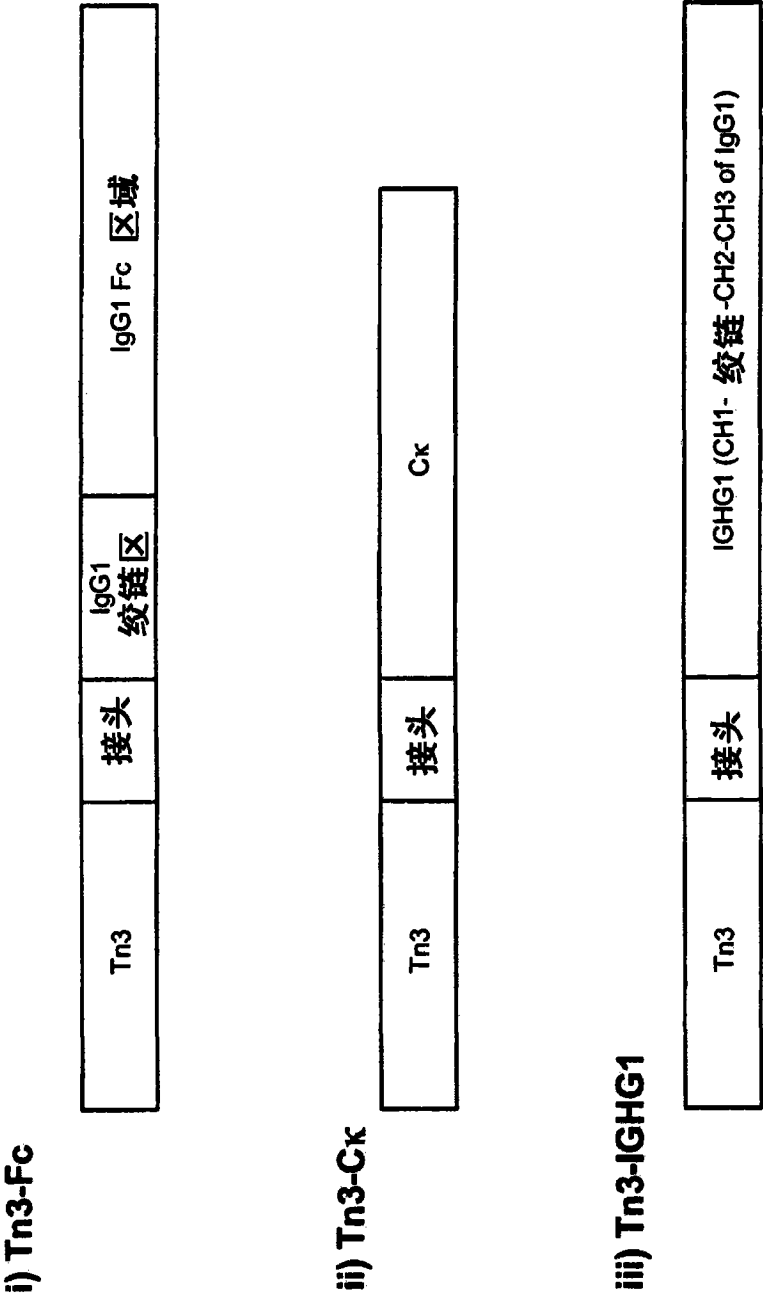


图 17B

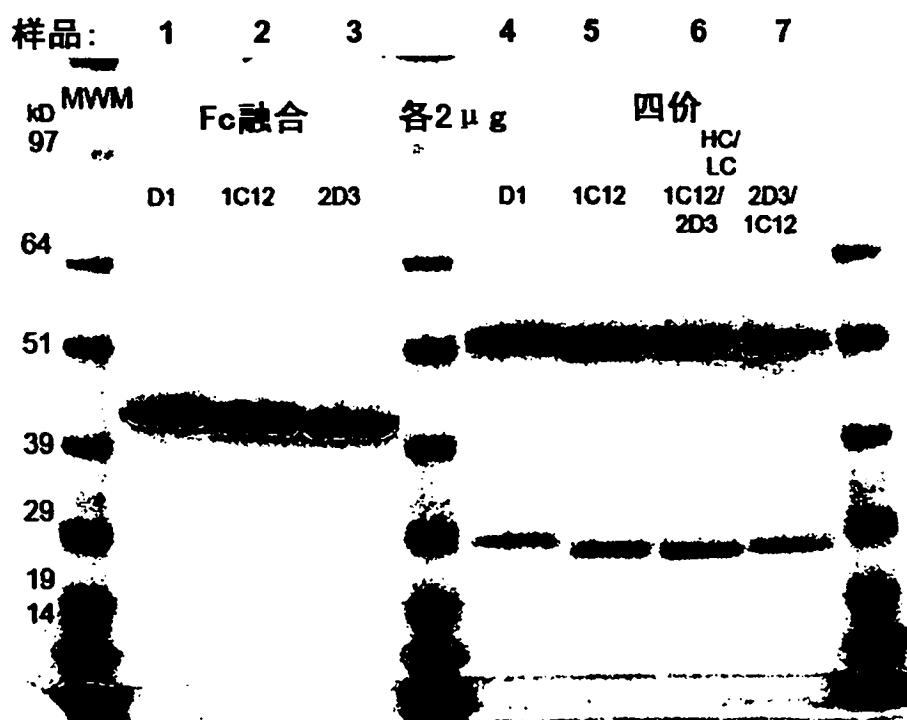


图 18

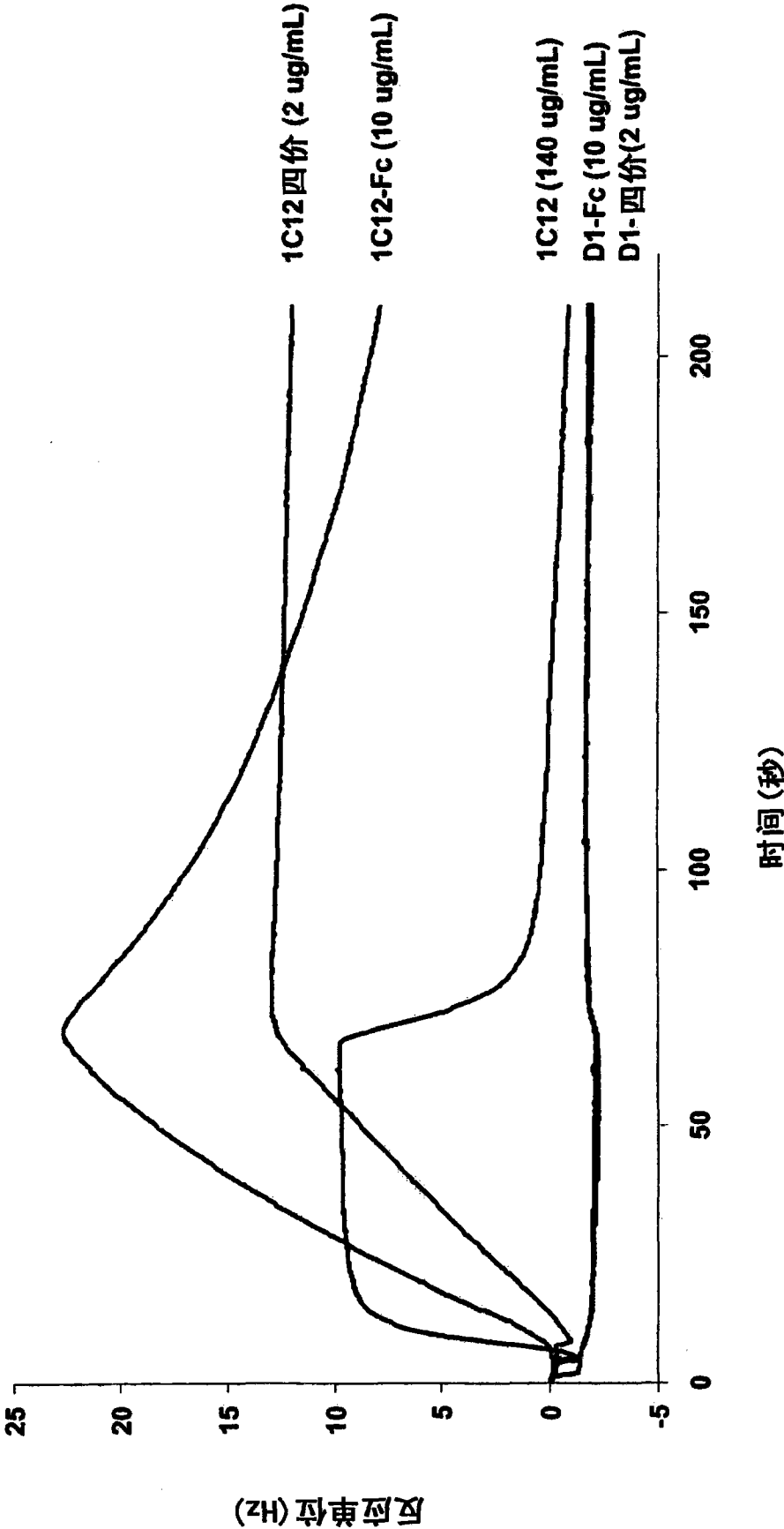


图 19

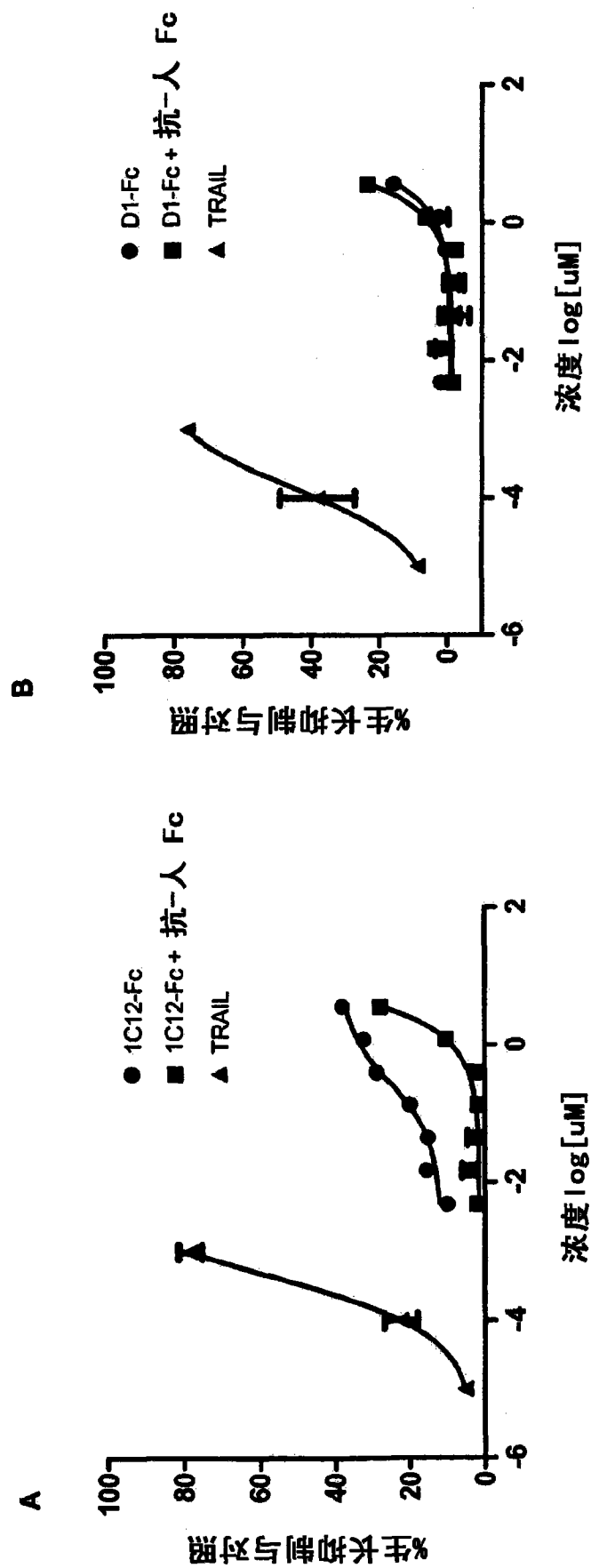


图 20

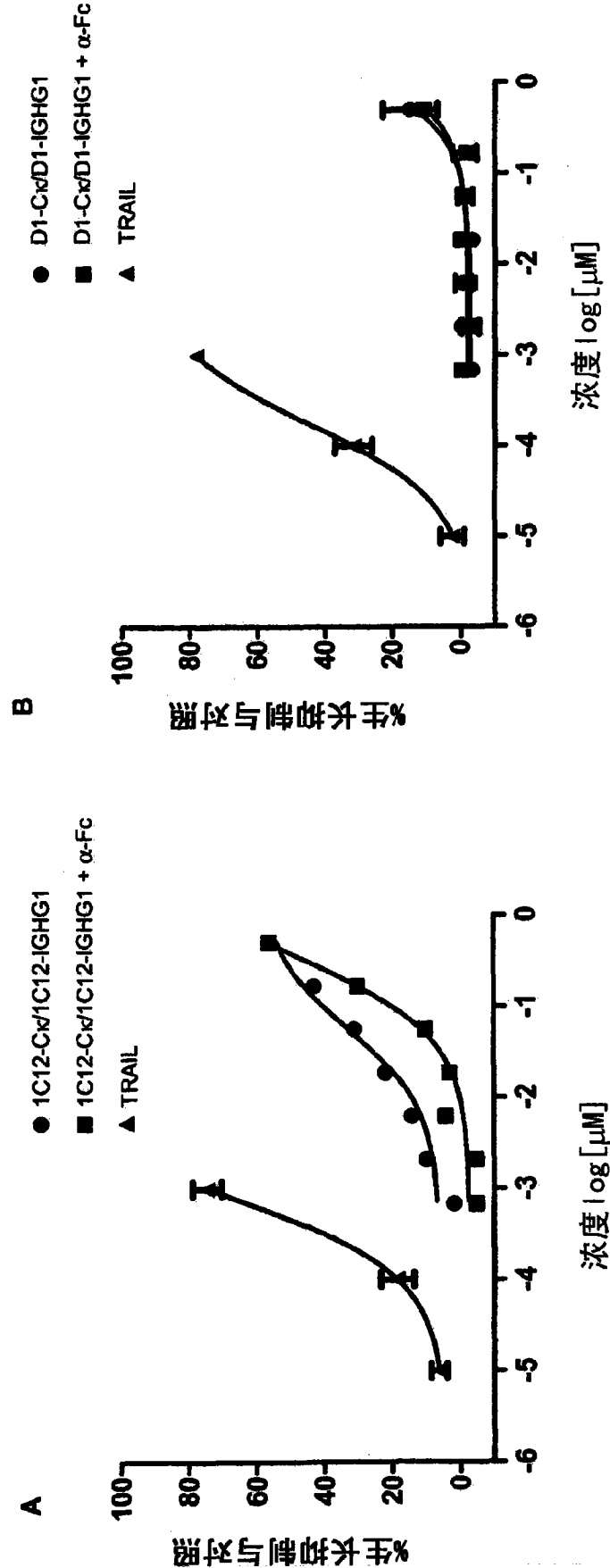


图 21

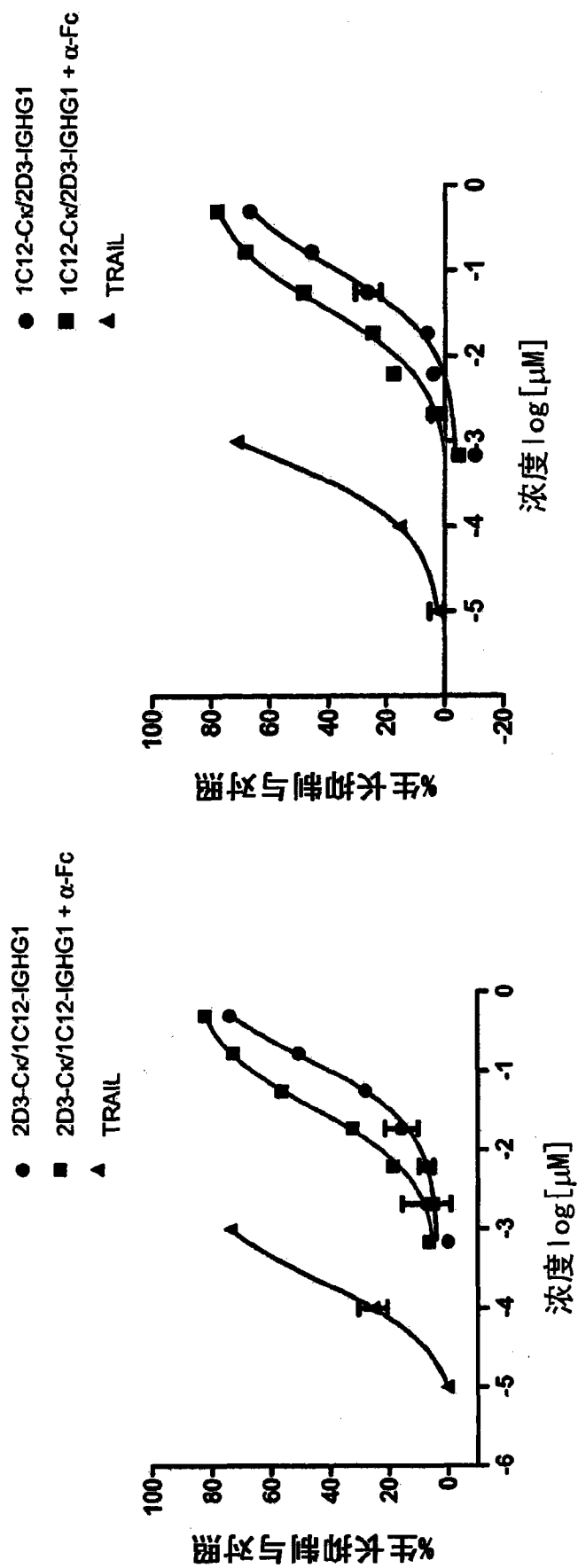


图 22

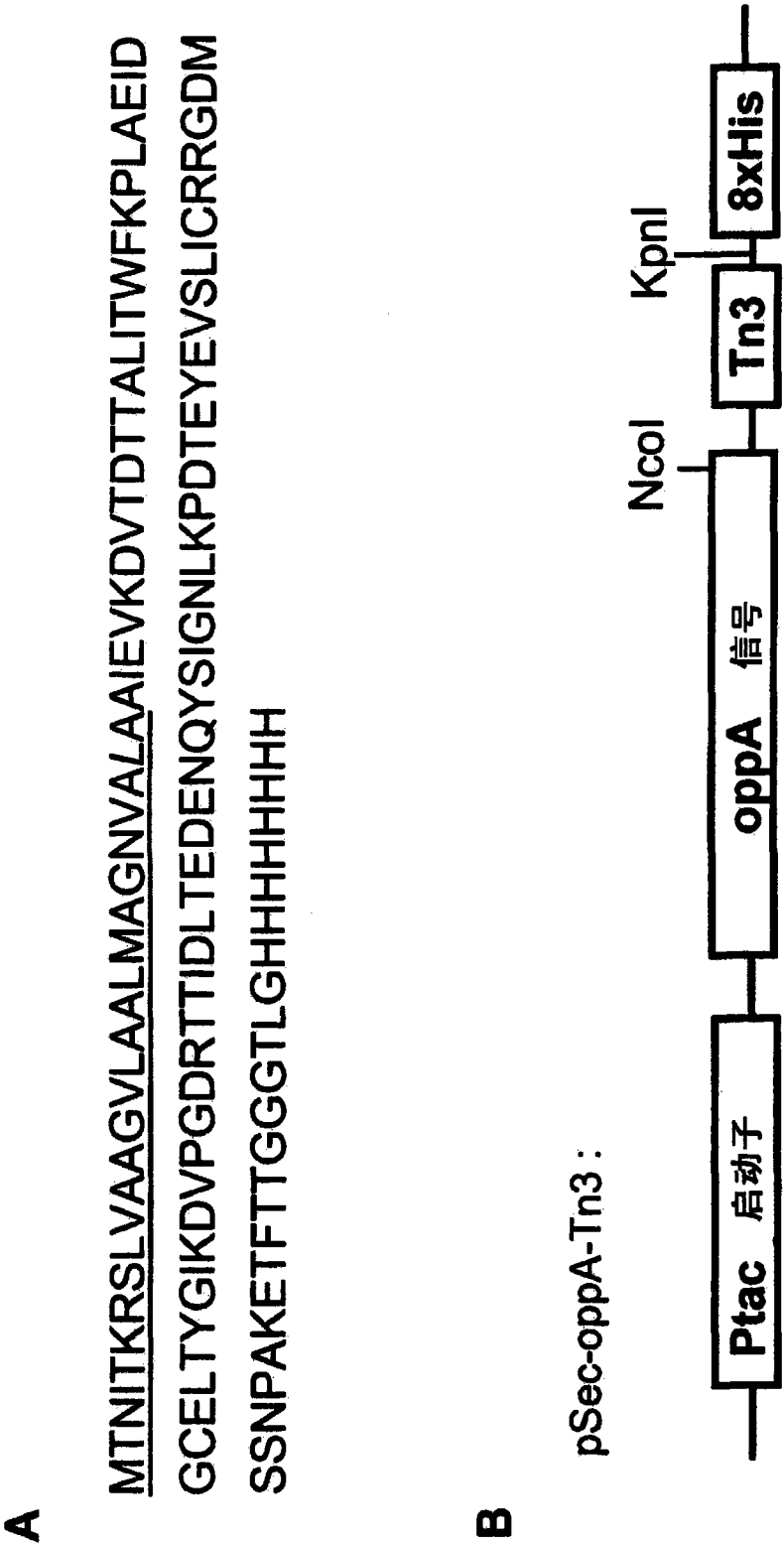


图 23

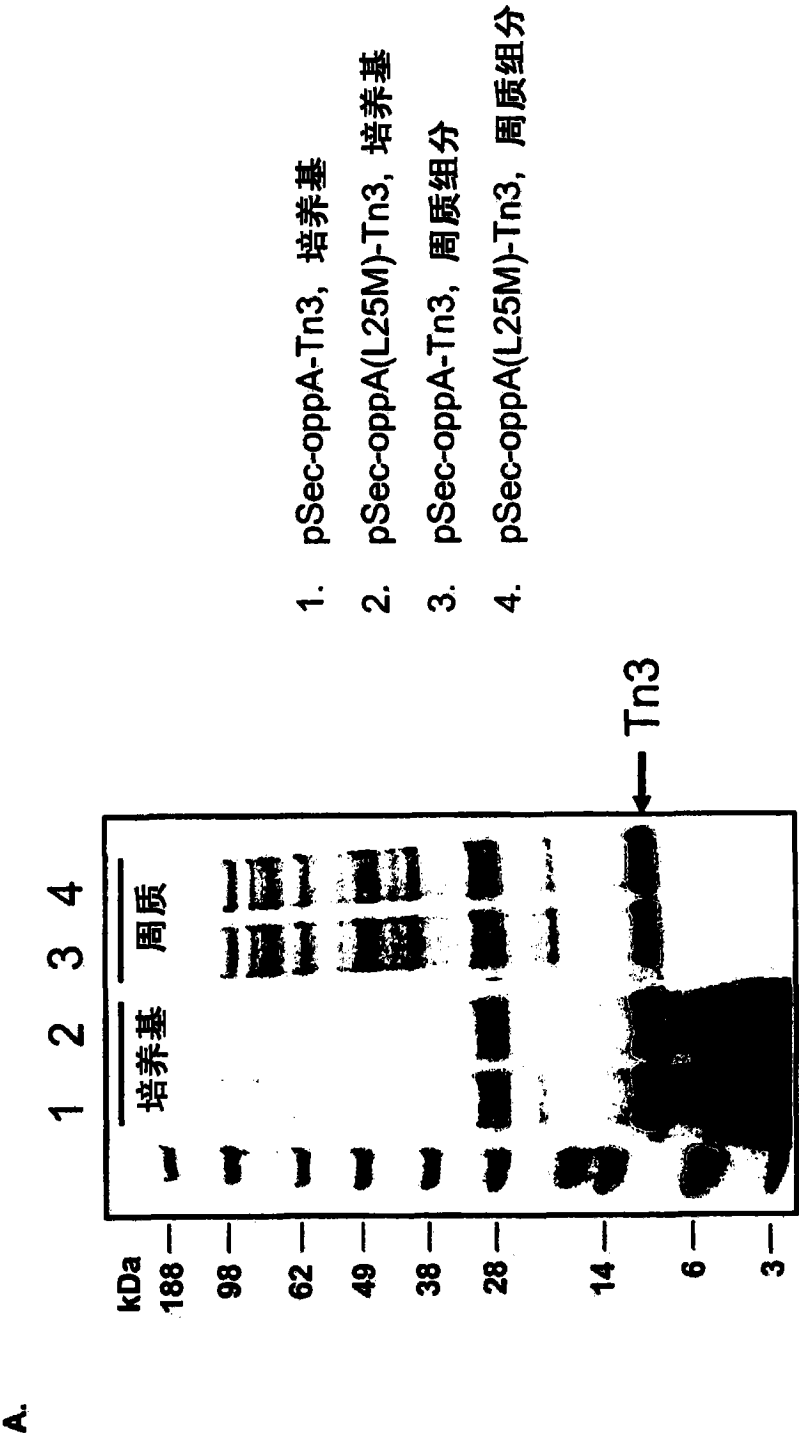


图 24

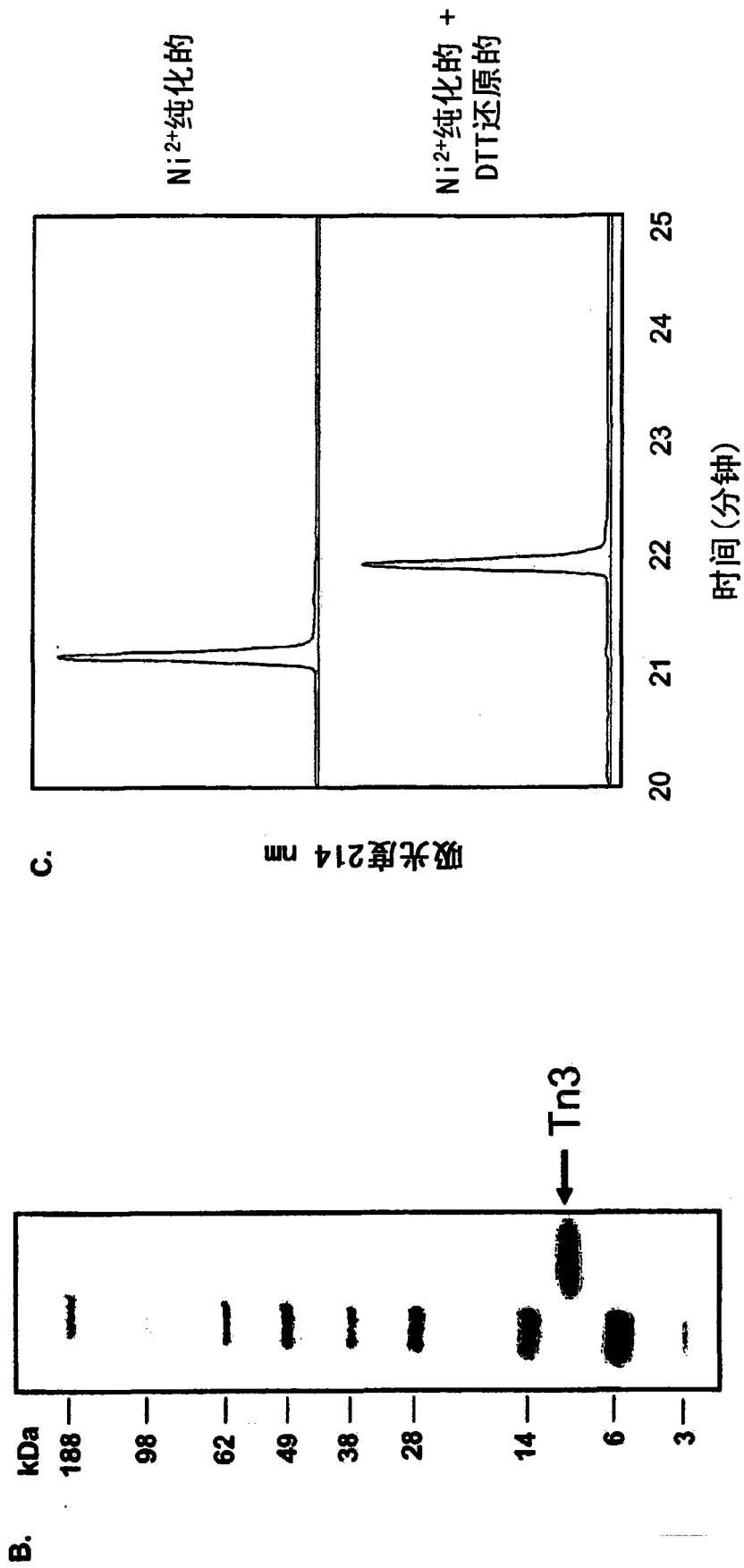


图 24

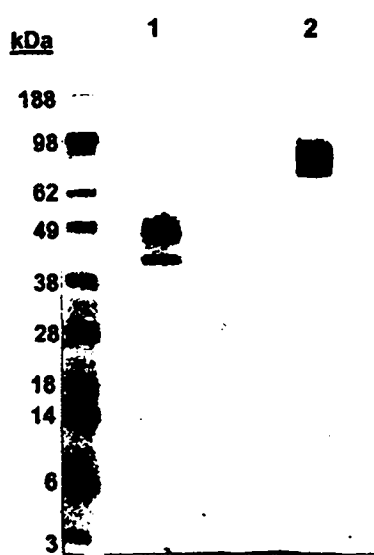


图 25

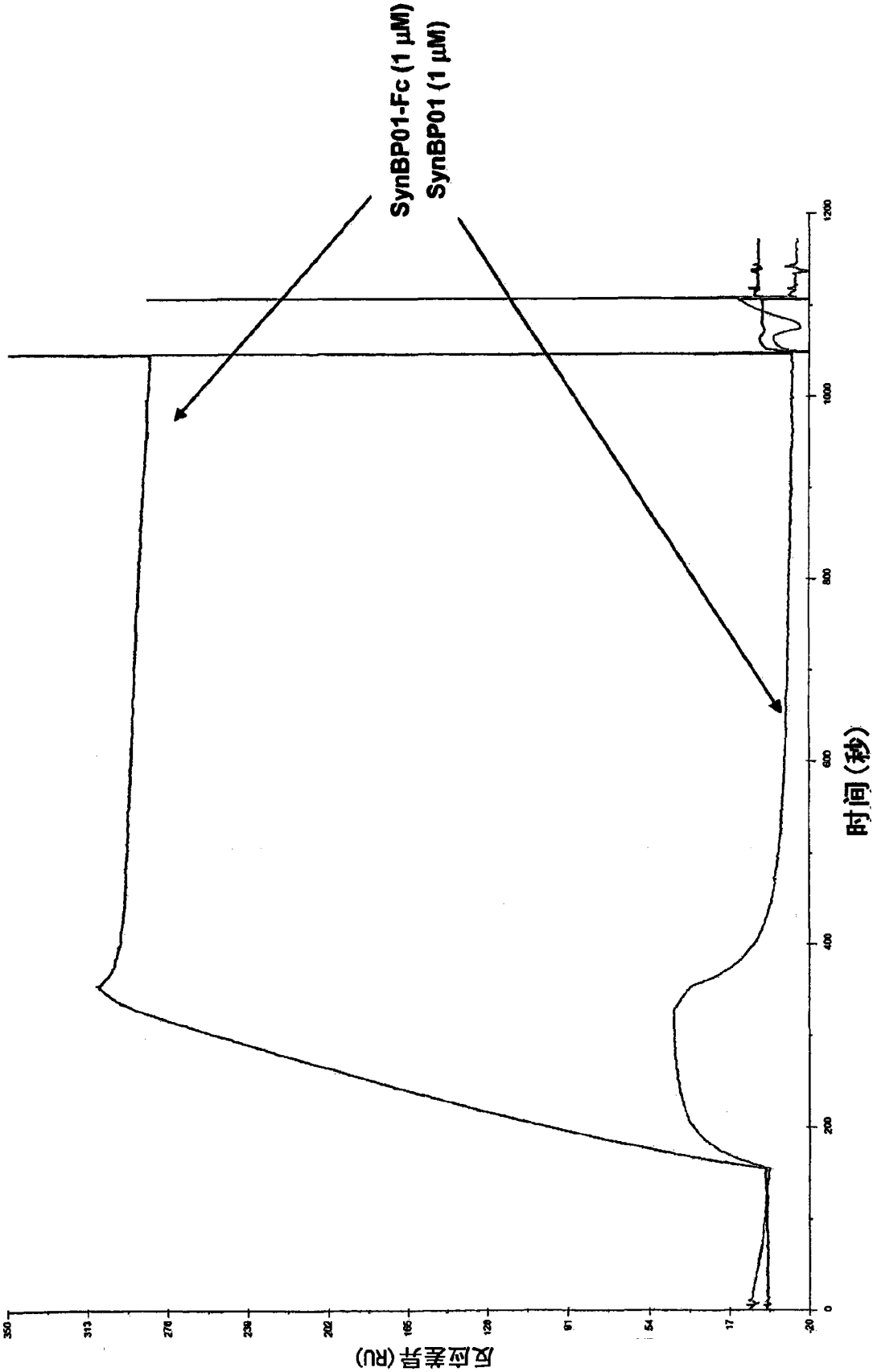


图 26

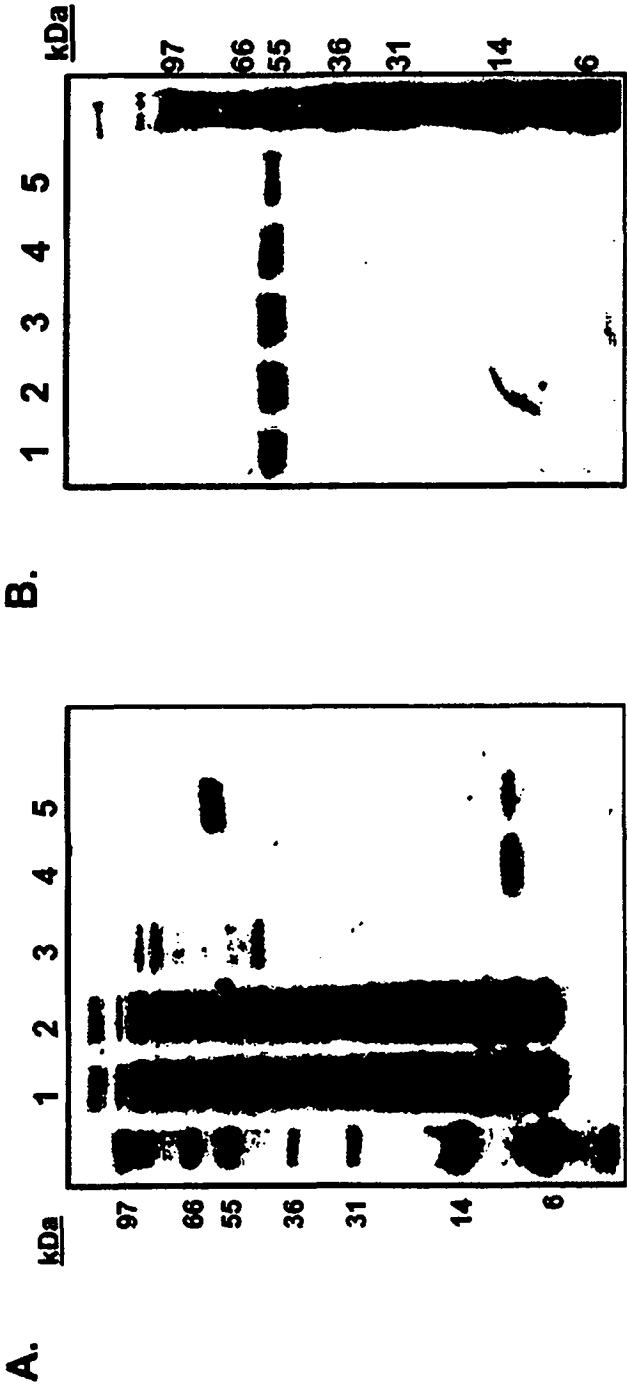


图 27

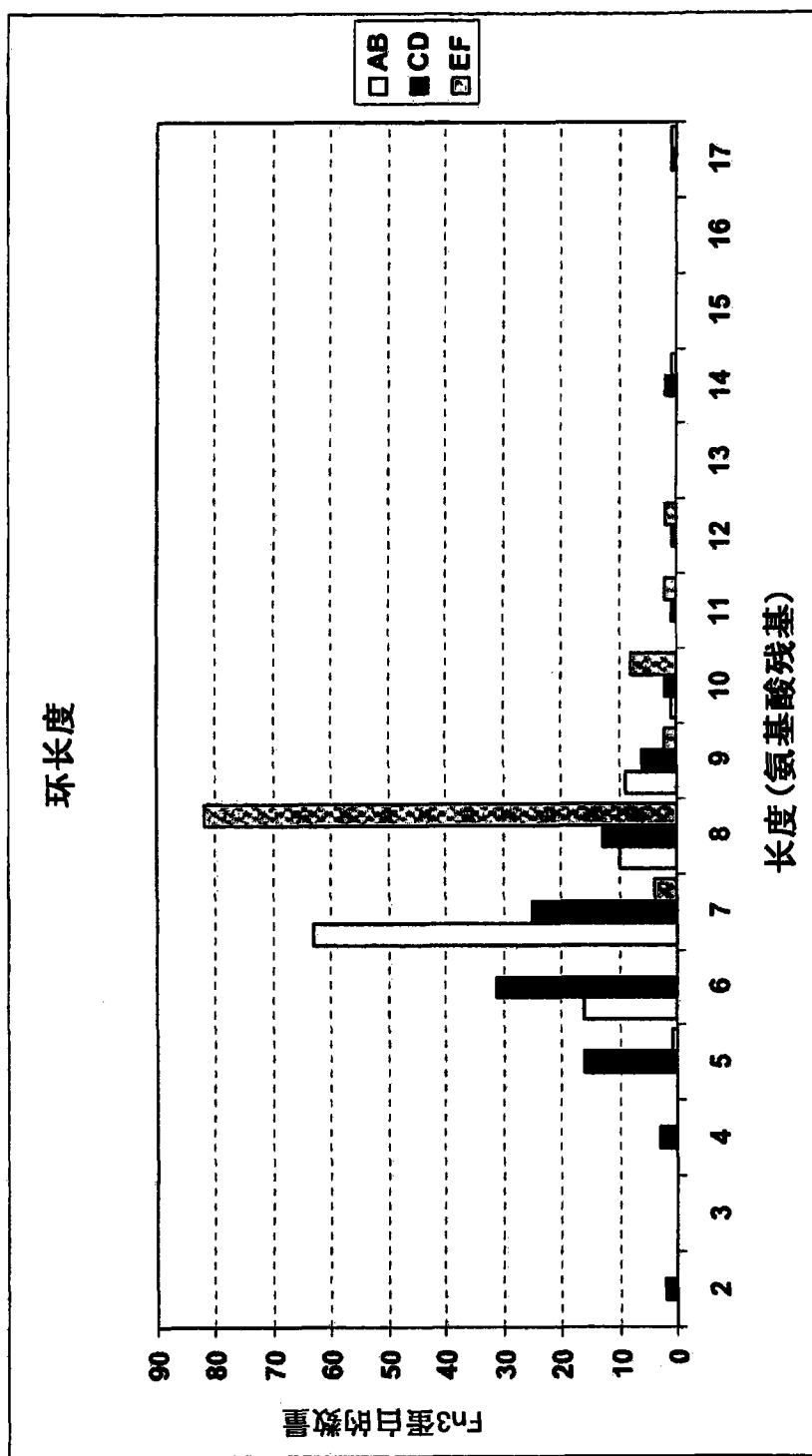


图 28

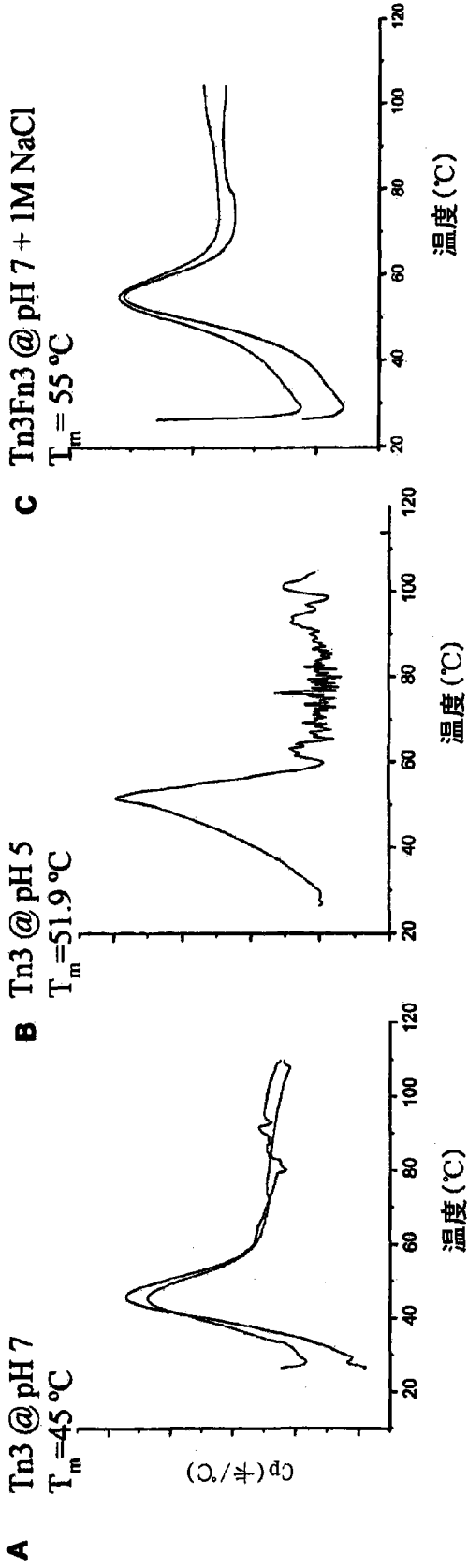


图 29

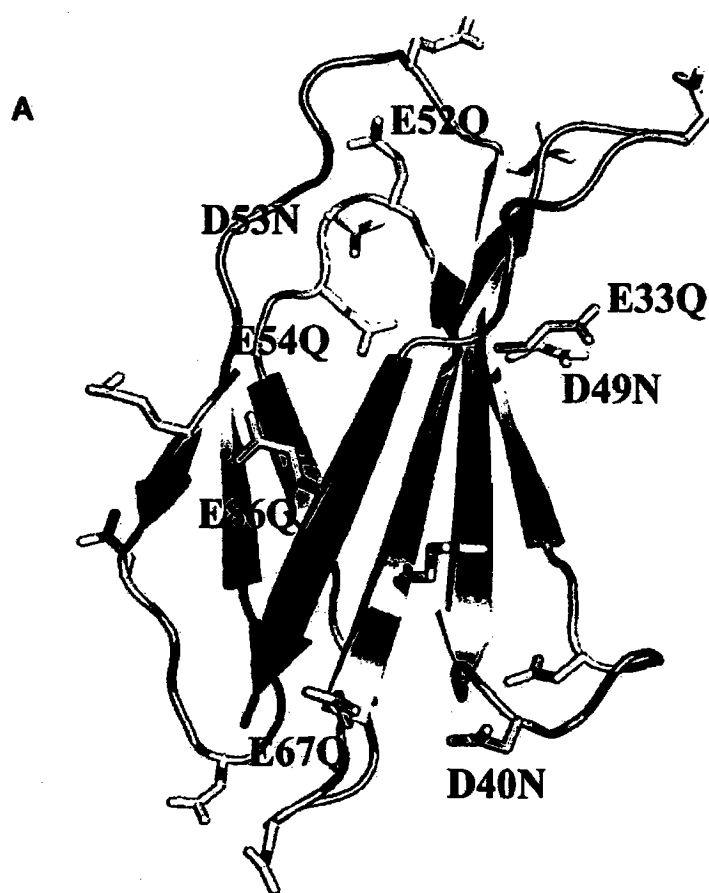


图 30

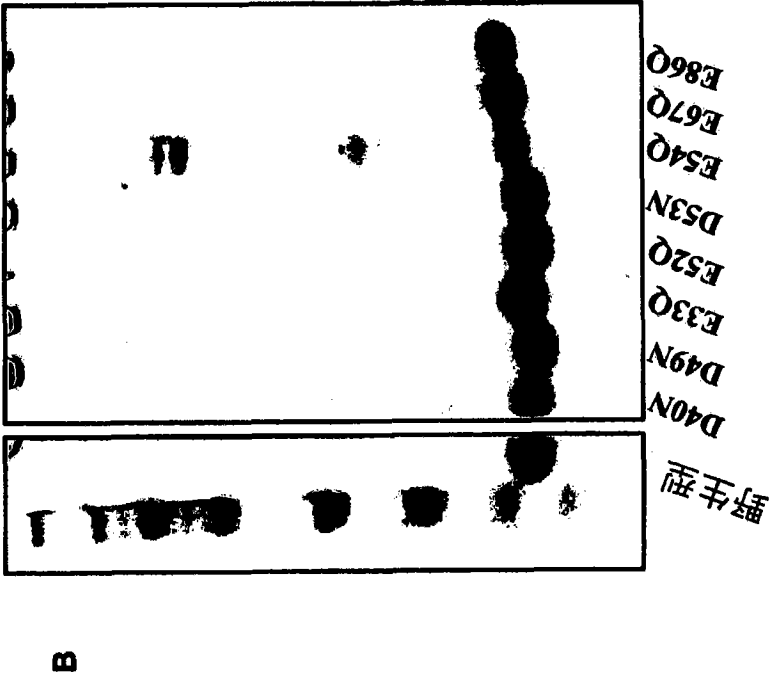


图 30(续)

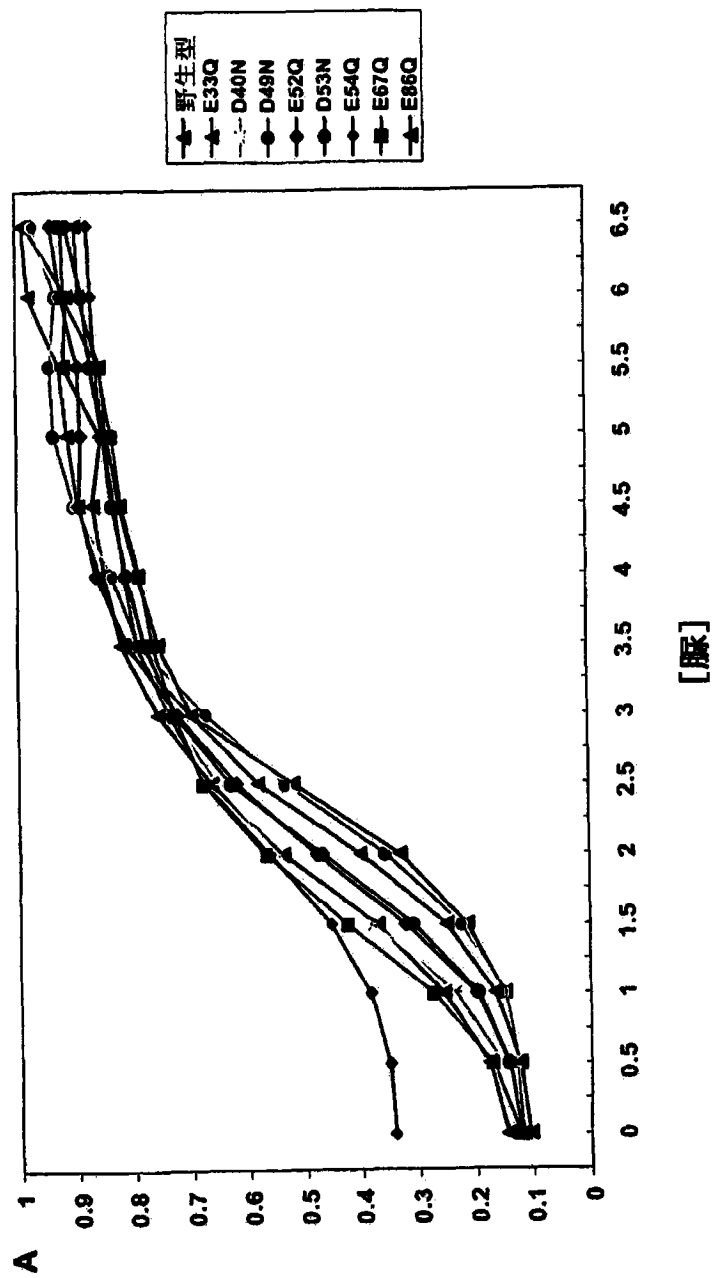


图 31

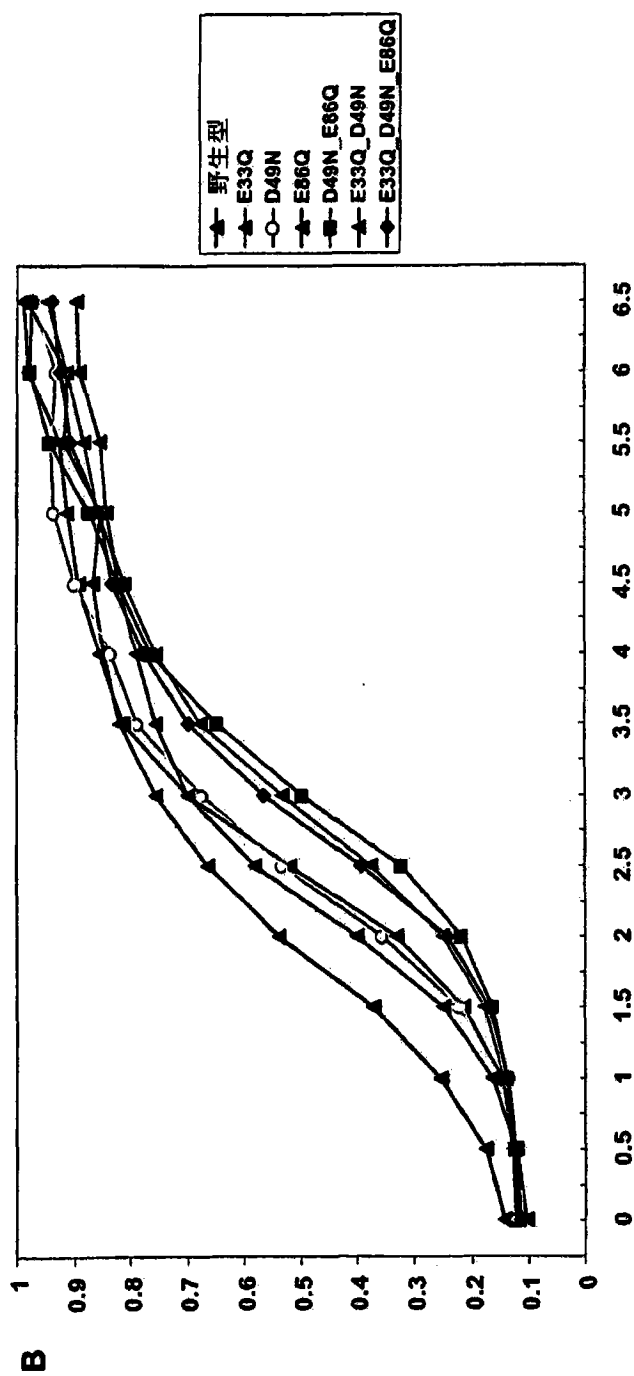


图 31(续)

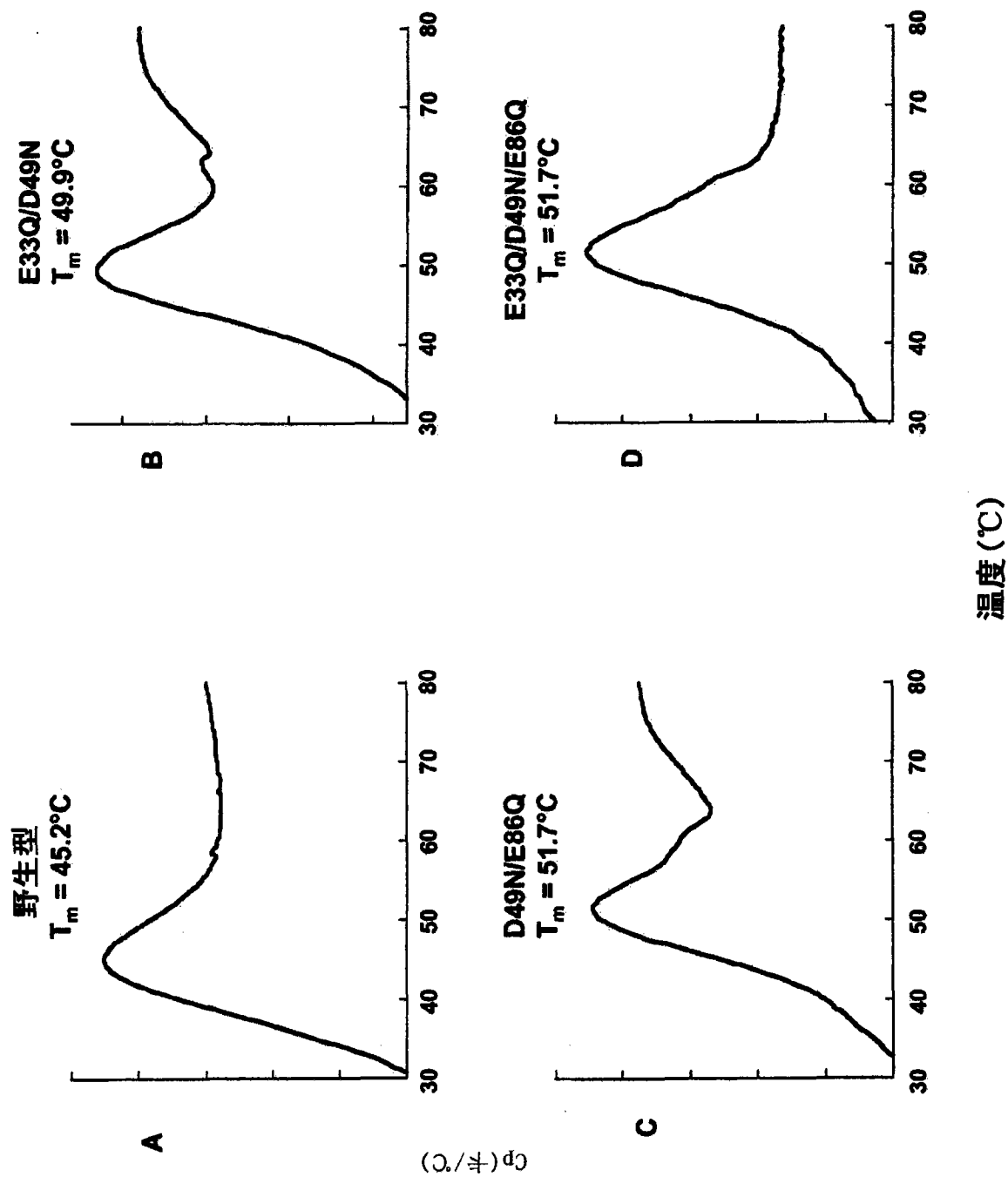


图 32