



(10) 授权公告号 CN 109476712 B

(45) 授权公告日 2022. 08. 02

(21) 申请号 201780044905.0

乌尔里希·豪普茨 马伦·梅辛

(22) 申请日 2017.08.07

(74) 专利代理机构 北京康信知识产权代理有限公司 11240

(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 109476712 A

专利代理师 沈敬亭 曲在丹

(43) 申请公布日 2019.03.15

(51) Int.Cl.

(30) 优先权数据

C07K 14/31 (2006.01)

16183710.9 2016.08.11 EP

C07K 1/22 (2006.01)

16205707.9 2016.12.21 EP

(85) PCT国际申请进入国家阶段日
2019.01.18

(86) PCT国际申请的申请数据
PCT/EP2017/069976 2017.08.07

(87) PCT国际申请的公布数据
W02018/029157 EN 2018.02.15

(73) 专利权人 纳维格蛋白质有限公司
地址 德国哈雷

审查员 王金辉

(72) 发明人 保罗·克尼克 埃里克·菲德勒

权利要求书1页 说明书20页
序列表30页 附图3页

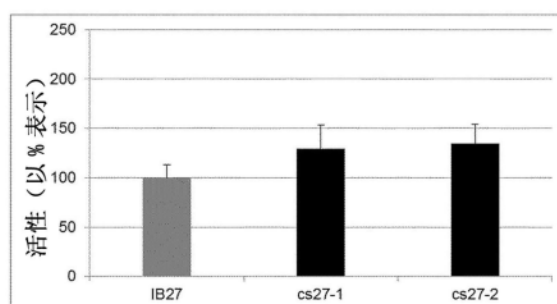
(54) 发明名称

新型对碱稳定的免疫球蛋白结合蛋白

(57) 摘要

本发明涉及免疫球蛋白(Ig)结合蛋白,包括一个或多个Ig结合结构域,Ig结合结构域的氨基酸选自至少由1I、11A、11E、11I、35R、35I及42L组成的组。本发明还涉及包含本发明的Ig结合蛋白的亲基质。本发明也涉及这些Ig结合蛋白或亲和基质用于免疫球蛋白的亲亲和纯化的用途和使用本发明的Ig结合蛋白的亲亲和纯化方法。

具有至少 1I、11A、35R 的 cs27



1. 一种免疫球蛋白结合蛋白,其包含一个或多个免疫球蛋白结合结构域,所述免疫球蛋白结合结构域的氨基酸序列选自SEQ ID NO:20、26、30、42、43、44或45。

2. 根据权利要求1所述的免疫球蛋白结合蛋白,其中2、3、4、5、6、7或8个免疫球蛋白结合结构域是彼此连接的。

3. 根据权利要求1或2所述的免疫球蛋白结合蛋白,其中所述免疫球蛋白结合蛋白与固相支持物缀合。

4. 根据权利要求3所述的免疫球蛋白结合蛋白,其中所述免疫球蛋白结合蛋白还包含用于与固相支持物特异性共价偶联的附着位点。

5. 根据权利要求1或2所述的免疫球蛋白结合蛋白,其中所述免疫球蛋白结合蛋白与包含Fc区的IgG1、IgG2、IgG4、IgM、IgA,包含Fc区的免疫球蛋白片段,包含免疫球蛋白Fc区的融合蛋白,或包含免疫球蛋白Fc区的缀合物结合。

6. 一种亲和分离基质,包含权利要求1-5中任一项所述的免疫球蛋白结合蛋白。

7. 权利要求1-5中任一项所述的免疫球蛋白结合蛋白或权利要求6所述的亲和分离基质用于亲和纯化免疫球蛋白的用途。

8. 一种免疫球蛋白的亲和纯化方法,该方法包括如下步骤:(a) 提供含有免疫球蛋白的液体;(b) 提供亲和分离基质,所述亲和分离基质包含权利要求1-5中任一项所述的免疫球蛋白结合蛋白;(c) 将所述液体和所述亲和分离基质接触,使所述免疫球蛋白与所述免疫球蛋白结合蛋白结合;以及(d) 从所述亲和分离基质中洗脱免疫球蛋白,从而获得含有免疫球蛋白的洗脱液。

9. 根据权利要求8所述的方法,还包括,在步骤(c) 和(d) 之间清洗亲和分离基质的步骤。

新型对碱稳定的免疫球蛋白结合蛋白

技术领域

[0001] 本发明涉及对碱稳定的免疫球蛋白 (Ig) 结合蛋白, 包括一个或多个 Ig 结合结构域, 该 Ig 结合结构域的氨基酸选自至少由 1I、11A、11E、11I、35R、35I 及 42L 组成的组。本发明还涉及包含本发明的对碱稳定的 Ig 结合蛋白的亲基质。本发明也涉及这些 Ig 结合蛋白或亲基质用于免疫球蛋白的亲纯化的用途和使用本发明的 Ig 结合蛋白的亲纯化方法。

背景技术

[0002] 许多生物技术和制药应用需要从含有抗体的样品中去除污染物。用于捕获和纯化抗体的既定方法是使用来自金黄色葡萄球菌的细菌细胞表面蛋白 A 作为免疫球蛋白的选择性配体的亲和层析法 (参见, 例如, 由 Huse 等人审查, J. Biochem. Biophys. Methods 51, 2002:217-231)。野生型蛋白 A 以高亲和力和选择性与 IgG 分子的 Fc 区结合, 并且在高温下和宽的 pH 值范围内稳定。性能 (如对碱稳定性) 得到提升的蛋白质 A 的变异体可用于纯化抗体, 并且可商购获得包含蛋白质 A 配体的各种层析基质。然而, 特别是基于野生型蛋白 A 的层析基质在暴露于碱性条件后, 免疫球蛋白的结合能力出现损失。

[0003] 本发明的技术问题

[0004] 大多数抗体或含 Fc 的融合蛋白的大规模生产过程使用蛋白 A 进行亲和纯化。然而, 由于蛋白 A 在亲和层析法中的应用限制, 本领域中有提供具有改进特性的新型 Ig 结合蛋白的需求, 其特异性结合免疫球蛋白以促进免疫球蛋白的亲纯化。为了最大限度地利用包含 Ig 结合蛋白的层析基质的价值, 多次使用亲和配体基质是可取的。在层析循环间隙, 需要以细致的清洗程序来消毒和去除基质上的残余污染物。在该过程中, 通常的做法是将具有高浓度 NaOH 的碱性溶液应用于亲和配体基质。野生型蛋白 A 结构域不能长时间承受这种苛刻的碱性条件, 并且很快丧失与免疫球蛋白的结合能力。因此, 在本领域中, 获得能够结合免疫球蛋白的新型对碱稳定蛋白的需求持续存在。

[0005] 除了克服了现有技术的缺点外, 本发明还提供特别适用于免疫球蛋白的亲纯化的对碱稳定的免疫球蛋白结合蛋白。具体地, 与亲本蛋白相比, 本发明的对碱稳定的 Ig 结合蛋白的显著优点是它们在高 pH 值下的改善的稳定性。

[0006] 以上概述不一定描述了本发明所解决的所有问题。

发明内容

[0007] 本发明的第一方面提供适用于亲和纯化的 Ig 结合蛋白。这是通过包含一个或多个 Ig 结合结构域的对碱稳定 Ig 结合蛋白实现的, 其中至少一个 Ig 结合结构域包含 SEQ ID NO: 1 或 SEQ ID NO: 2 的亲本氨基酸序列的变异体, SEQ ID NO: 1 或 SEQ ID NO: 2 的亲本氨基酸序列的变异体 (variant) 具有至少 1、2、3 或 4 个取代, 所述取代选自位置 1 或相应位置的氨基酸取代为异亮氨酸; 位置 11 或相应位置的氨基酸取代为丙氨酸、谷氨酸或异亮氨酸; 位置 35 或相应位置的氨基酸取代为精氨酸或异亮氨酸; 及位置 42 或相应位置的氨基酸取代为亮氨酸组成的组。在一些实施方案中, 本发明包含 Ig 结合蛋白, 其中至少一个 Ig 结合结构域包含

SEQ ID NO:52的共有氨基酸序列。

[0008] 第二方面,本发明涉及包含第一方面的对碱稳定的Ig结合蛋白的亲分离基质。

[0009] 第三方面,本发明涉及第一方面的对碱稳定的Ig结合蛋白或第二方面的亲分离基质的利用,用于免疫球蛋白或包含免疫球蛋白Fc部分的蛋白的亲纯化。

[0010] 第四方面,本发明涉及免疫球蛋白或包含免疫球蛋白Fc部分的蛋白的亲纯化方法,包括步骤(a)提供含有免疫球蛋白的液体;(b)提供亲分离基质,其包含与所述亲分离基质偶联的第一方面的固定的对碱稳定的Ig结合蛋白;(c)使所述液体和所述亲分离基质接触,其中所述免疫球蛋白与所述固定的Ig结合蛋白结合;以及(d)从所述基质中洗脱所述免疫球蛋白,从而获得含有所述免疫球蛋白的洗脱液。

[0011] 本发明内容并不一定描述了本发明的所有特征。通过阅读随后的详细说明,其他实施方案将变得显而易见。

附图说明

[0012] 图1.对碱稳定的Ig结合结构域的氨基酸序列。位置1、11、35,及42以灰色显示。顶行中的数字是指Ig结合结构域中相应的氨基酸的位置。

[0013] 图1A.人工对碱稳定的Ig结合结构域的氨基酸序列。

[0014] 图1B.对碱稳定的人工Ig结合结构域的共有氨基酸序列(SEQ ID NO:52)。

[0015] 图2.亲本IB14的点突变变异体的对碱稳定性分析。对在位置1、11、35或42中具有点突变的变异体进行连续的0.5M NaOH处理6小时后,Ig结合的剩余活性(以%表示)与亲本IB14进行比较。

[0016] 图3.分析亲本IB14的不同变异体的对碱稳定性,其在位置1、11,及35和任选地在位置28和42具有取代。对在位置1、11、28、35和/或42(黑色柱)中的取代的组合进行连续的0.5M NaOH处理6小时后,Ig结合的剩余活性(以%表示)与亲本IB14(浅灰色柱)进行比较。cs14-1指SEQ ID NO:18(1I/11A/35R),cs14-2指(1I/11A/35R/42L)SEQ ID NO:19,cs14-3指SEQ ID NO:20(1I/11A/28N/35R/42L)。

[0017] 图4.亲本IB27的不同变异体的对碱稳定性分析,其具有在位置1、11,及35和可选择地在位置42的3个或4个取代的组合。对变异体Ig结合蛋白(黑色柱)进行连续的0.5M NaOH处理6小时后,Ig结合的剩余活性(以%表示)与亲本IB27(浅灰色柱)进行比较。cs27-1指SEQ ID NO:29(1I/11A/35R),cs27-2指SEQ ID NO:30(1I/11A/35R/42L)。

[0018] 图5.碱处理后Ig结合结构域的Ig结合活性。

[0019] 0.5M NaOH处理6小时后环氧树脂上不同Ig结合结构域的对碱稳定性分析。示出的是具有1I、11A、35R,及42L的Ig结合结构域。对碱稳定的Ig结合结构域:cs14-3(SEQ ID NO:20)、cs74h1(SEQ ID NO:42)、cs74h2(SEQ ID NO:43)、cs47h3(SEQ ID NO:44),以及cs47h4(SEQ ID NO:45)、cs25-2(SEQ ID NO:26);亲本结构域:IB14。

具体实施方式

[0020] 定义

[0021] 下面在详细描述本发明之前,应理解本发明不限于本文所述的特定方法、方案及试剂,因为它们可以变化。还应理解,本文使用的术语仅用于描述特定实施方案的目的,并

不意图限制本发明的范围,本发明的范围仅受所附权利要求书的限制。除非另外定义,否则本文使用的所有技术和科学术语具有的含义与本发明所属领域的普通技术人员通常理解的含义相同。

[0022] 优选地,本文使用的术语与“A multilingual glossary of biotechnological terms: (IUPACRecommendations)”,Leuenberger,H.G.W,Nagel,B.and Kolbl,H.eds.(1995),Helvetica Chimica Acta,CH-4010Basel,Switzerland)中提供的定义一致。

[0023] 在整个说明书和随后的权利要求书中,除非上下文另有要求,否则词语“包括(comprise)”及其诸如“包括(comprises)”和“包括(comprising)”的变型将被理解为意指包括所陈述的成员,成员的整数或步骤或组,整数或步骤但不排除任何其他成员,成员的整数或步骤或组,整数或步骤。

[0024] 如在本发明的说明书和所附权利要求书中所使用的,单数形式“一(a)”、“一(an)”和“该(the)”可交换使用并且旨在包括复数形式,而且适用于每个含义,除非上下文清楚地另有说明。此外,如本文所用,“和/或”是指并涵盖所列物项中的一个或多个的任何和所有可能组合,当缺乏组合,以提供替代的选择(“或”)理解时同样如此。如本文所用,术语“约”包括明确列举的量以及其 $\pm 10\%$ 的偏差。更优选地,通过术语“约”涵盖偏差5%。

[0025] 在本说明书的全文中引用了若干文件(例如:专利、专利申请、科学出版物、制造商的规范、说明书、GenBank登录号序列提交(GenBank Accession Number sequence submissions)等)。凭借在先发明,本文中的任何内容均不应被解释为承认本发明无权被认定享有先于此类发明的权利。本文引用的一些文献以“引作参考”为特征。如果这些引作参考的文献的定义或教导与本说明书中引用的定义或教导之间存在冲突,则本说明书的文本优先。

[0026] 本文提及的所有序列均公开于所附序列列表中,其全部内容和披露是本说明书的一部分。在本发明的上下文中,术语“免疫球蛋白结合蛋白”或“Ig结合蛋白”或“免疫球蛋白(Ig)结合蛋白”用于描述能够特异性结合免疫球蛋白Fc区的蛋白质。由于与Fc区的这种特异性结合,本发明的“Ig结合蛋白”能够结合整个免疫球蛋白,包含Fc区的免疫球蛋白片段,包含免疫球蛋白Fc区的融合蛋白,以及包含免疫球蛋白的Fc区的缀合物。虽然本发明的Ig结合蛋白显示出与免疫球蛋白的Fc区的特异性结合,但并不排除Ig结合蛋白可以另外与其它区(例如免疫球蛋白的Fab区)以亲和力降低的方式结合。在本发明的优选实施方案中,Ig结合蛋白包含一个或多个对碱稳定的Ig结合结构域。

[0027] 术语“解离常数”或“ K_D ”定义的是特异性结合亲和力。如本文所用,术语“ K_D ”(通常以“mol/L”测量,有时缩写为“M”)意指第一蛋白质和第二蛋白质之间的特定相互作用的解离平衡常数。在本发明的上下文中,术语 K_D 特别用于描述Ig结合蛋白和免疫球蛋白之间的结合亲和力。

[0028] 如果本发明的Ig结合蛋白与免疫球蛋白的解离常数 K_D 为至少1pM或更低,或优选地为100nM或更低,更优选地为50nM或更低,甚至更优选地为10nM或更低,则认为本发明的Ig结合蛋白与免疫球蛋白结合。

[0029] 根据本发明的术语“结合”优选涉及特异性结合。“特异性结合”是指,相较于与另一种非免疫球蛋白靶标的结合,本发明的Ig结合蛋白与免疫球蛋白的结合更强,因此其为特异的。

[0030] 本文中可互换使用的术语“免疫球蛋白”或“Ig”包括具有四个多肽链结构的蛋白质,四个多肽链结构由两条重链和两条轻链组成,具有特异性结合抗原的能力。此外,其片段或变异体也包括在术语“免疫球蛋白”中。如本文所理解的,与完整的或完全的Ig相比,Ig片段包含更少的氨基酸残基。该术语还包括诸如嵌合的(人恒定区域,非人可变区域),单链的,以及人源化的(除非人CDR外的人源抗体)免疫球蛋白的实施方案。

[0031] 如本文所理解的“免疫球蛋白”可包括但不必定限于哺乳动物IgG,例如人IgG、人IgG₂、人IgG₄、小鼠IgG、小鼠IgG₂A、小鼠IgG₂IgG₁、大鼠IgG₂C、山羊IgG₁、山羊IgG₂、牛IgG₂、豚鼠IgG、兔IgG;人IgM、人IgA;以及包含Fc区的免疫球蛋白片段、包含免疫球蛋白Fc区的融合蛋白,及包含免疫球蛋白Fc区的缀合物。值得注意的是,天然存在的蛋白A结构域和本发明的人工Ig结合蛋白不与人IgG₃结合。

[0032] 术语“蛋白质”和“多肽”是指通过肽键连接的两个或更多个氨基酸的任何线性分子链,并不涉及产物的特定长度。因此,“肽”、“蛋白质”、“氨基酸链”或用于指代两个或更多个氨基酸的链的任何其他术语包括在“多肽”的定义内,并且术语“多肽”可以用于代替这些术语中的任何一个或与这些术语中的任何一个互换。术语“多肽”还意指多肽的翻译后修饰产物,包括但不限于糖基化、乙酰化、磷酸化、酰胺化、溶蛋白性裂解、非天然存在的氨基酸修饰,及在本领域中已知的类似修饰。因此,包含两个或更多个蛋白质结构域的Ig结合蛋白也在术语“蛋白质”或“多肽”的定义之下。

[0033] 术语“对碱稳定的”或“对碱稳定性”或“苛性稳定的”或“苛性稳定性”(本文中缩写为“cs”)是指本发明的Ig结合蛋白在不显著丧失与免疫球蛋白结合的能力的情况下耐受碱性条件的能力。本领域技术人员可以通过用氢氧化钠溶液培养Ig结合蛋白来容易地测试对碱稳定性,例如,如实施例中所描述的,以及随后通过本领域技术人员已知的常规实验对与免疫球蛋白的结合活性的测试,例如,通过层析方法。

[0034] 本发明的Ig结合蛋白以及包含本发明的Ig结合蛋白的基质表现出“增加的”或“改善的”对碱稳定性,这意味着相对于亲本蛋白质,包含所述Ig结合蛋白的分子和基质在碱性条件下长时间稳定,即不会失去与免疫球蛋白结合的能力或相对于亲本蛋白,与免疫球蛋白结合的能力的下降程度较小。

[0035] 术语“结合活性”是指本发明的Ig结合蛋白与免疫球蛋白结合的能力。例如,可以在碱处理之前和/或之后测定结合活性。可以测定Ig结合蛋白或与基质偶联的Ig结合蛋白(即固定的结合蛋白)的结合活性。术语“人工”是指非天然存在的物体,即该术语是指由人产生或修饰过的物体。例如,由人生成的(例如在实验室中通过基因工程、通过改组方法或通过化学反应等)或有意修饰过的多肽或多核苷酸序列是人工的。

[0036] 本文所用的术语“亲本蛋白质”或“亲本结构域”中的术语“亲本”是指随后被修饰以产生所述亲本蛋白质或结构域的变异体的Ig结合蛋白。所述亲本蛋白质或结构域可以是人工结构域(例如,但不限于,SEQ ID NO:3、4、10、14、21、25、47、48、49、50)、天然产生的金黄色葡萄球菌蛋白质A结构域、或天然产生的金黄色葡萄球菌蛋白质A结构域的变异体或工程版本。

[0037] 如本文所用的术语“变异体”或“变异体Ig结合结构域”或“Ig结合结构域变异体”或“Ig结合蛋白变异体”包括Ig结合蛋白或结构域的氨基酸序列,该氨基酸序列不同于亲本蛋白或结构域氨基酸序列,与亲本相比至少有一个氨基酸取代。此外,它是指通过一个或多

个修饰而不同于亲本分子的人工分子。这些修饰可以通过由人实施的基因工程或化学合成或化学反应产生。例如,结构域Z是天然存在的蛋白A结构域B的变异体。例如,SEQ ID NO:30是亲本蛋白IB27的变异体。

[0038] 如本文所用的术语“缀合物”涉及包含或基本上至少由与其他物质(例如第二蛋白质或非蛋白质性部分)化学连接的第一蛋白质组成的分子。

[0039] 术语“修饰”或“氨基酸修饰”是指通过另一种氨基酸在亲本多肽序列的特定位置处的氨基酸交换、删除或插入。给定已知的基因序列,以及重组和合成DNA技术,技术人员可以容易地构建编码氨基酸变异体的DNA。

[0040] 术语“取代”或“氨基酸取代”是指通过另一种氨基酸在亲本多肽序列的特定位置处的氨基酸交换。例如,取代S11A是指变异体Ig结合蛋白,其中位置11的丝氨酸被丙氨酸取代。对于前述实施例,11A是指位置11处的丙氨酸。为了本文的目的,通常用斜线分开多个取代。例如,A1I/S11A/K35R是指包含A1I、S11A及K35R的取代的组合物。

[0041] 术语“缺失”或“氨基酸缺失”是指去除亲本多肽序列中特定位置的氨基酸。

[0042] 术语“插入”或“氨基酸插入”是指向亲本多肽序列添加氨基酸。

[0043] 在整个说明书中,使用图1中的氨基酸残基位置编号方法,并指定所述位置编号对应于那些(例如SEQ ID NO:1-8中的)位置编号。

[0044] 术语“氨基酸序列一致性”是指两种或更多种蛋白质的氨基酸序列的一致性(或差异)的定量比较。相对于参考多肽序列的“百分比(%)氨基酸序列一致性”或“百分比相同的”或“百分比一致性”定义为:在比对序列,及为实现最大百分比序列一致性引入缺口后(如果需要),在与所述参照多肽序列中氨基酸残基相同的序列中,氨基酸残基的百分比。

[0045] 为了确定序列一致性,比对检索蛋白(query protein)的序列与参考蛋白的序列。比对方法在本领域中是公知的。例如,为了确定任意多肽相对于参考氨基酸序列的氨基酸序列一致性的程度,优选使用SIM局部相似性程序(SIM Local similarity program)(Xiaoquin Huang and Webb Mille(1991),Advances in Applied Mathematics,vol.12:337-357),是可免费获得的(另请参阅:<http://www.expasy.org/tools/sim-prot.html>)。对于多重比对分析(multiple alignment analysis),优选使用ClustalW(Thompson et al.(1994)Nucleic Acids Res.,22(22):4673-4680)。优选地,在计算序列一致性百分比时,使用SIM局部相似性程序或ClustalW的默认参数。

[0046] 在本发明的上下文中,如果没有另外明确说明,修饰后的序列与将其衍生出的序列之间的序列一致性程度通常相对于未修饰序列的总长度计算。

[0047] 在给定位置处,检索序列的每个不同于参考氨基酸序列的氨基酸计为一个差异。然后,将差异的总和与参考序列的长度相关联,以产生非一致性的百分比。一致性的定量百分比计算为100减去非一致性的百分比。

[0048] 如本文所用,在两个多肽序列的背景下,短语“百分比相同”或“百分比(%)氨基酸序列一致性”或“百分比一致性”是指:当使用以下序列比对算法之一或通过目视检查进行测定,比较和比对最大对应性时,分别在一些实施例中具有至少89.5%的核苷酸或氨基酸残基一致性、在一些实施例中具有至少91%的核苷酸或氨基酸残基一致性、在一些实施例中具有至少93%的核苷酸或氨基酸残基一致性、在一些实施例中具有至少94%的核苷酸或氨基酸残基一致性、在一些实施例中具有至少96%的核苷酸或氨基酸残基一致性、在一些

实施例中具有至少98%的核苷酸或氨基酸残基一致性,及在一些实施例中具有100%的核苷酸或氨基酸残基一致性的两个或更多个序列或子序列。在一些实施例中在至少约有50个残基的区域上存在百分比一致性、在一些实施例中在至少约有51个残基的区域上存在百分比一致性、在一些实施例中在至少约有52个残基的区域上存在百分比一致性、在一些实施例中在至少约有53个残基的区域上存在百分比一致性、在一些实施例中在至少约有54个残基的区域上存在百分比一致性、在一些实施例中在至少约有55个残基的区域上存在百分比一致性、在一些实施例中在至少约有56个残基的区域上存在百分比一致性、在一些实施例中在至少约有57个残基的区域上存在百分比一致性,以及在一些实施例中在至少约有58个残基的区域上存在百分比一致性。在一些实施例中,百分比一致性存在于序列的整个长度上。

[0049] 术语“融合”是指组分通过肽键连接,直接连接或经由肽接头连接。

[0050] 术语“融合蛋白”涉及至少包含第一蛋白质的蛋白质,该第一蛋白质至少与第二蛋白质在基因方面连接。通过连接两个或多个最初编码单独蛋白质的基因以产生融合蛋白。因此,融合蛋白可以包含相同或不同蛋白质的多聚体,其被表达为单个线性多肽。如本文所用,术语“接头”在其最广泛的含义中指的是共价连接至少两个其他分子的分子。在本发明的典型实施方案中,“接头”应理解为连接Ig结合结构域与至少一个另外的Ig结合结构域的部分,即将两个蛋白结构域彼此连接以产生多聚体的部分。

[0051] 在优选的实施方案中,“接头”是肽接头,即连接两个蛋白质结构域的部分是一个单一氨基酸或包含两个或多个氨基酸的肽。

[0052] 术语“层析法”是指使用流动相和固定相将一种类型的分子(例如免疫球蛋白)与样品中的其他分子(例如污染物)分离的分离技术。液体流动相含有分子混合物,并输送这些分子通过或穿过固定相(例如固相基质)。

[0053] 由于流动相中不同分子与固定相的不同相互作用,流动相中的分子可以被分离。

[0054] 术语“亲和层析法”是指层析法的特定模式,其中与固定相偶联的配体与流动相(样品)中的分子(即免疫球蛋白)相互作用,即配体对要被纯化的分子具有特异性结合亲和力。如在本发明的上下文中所理解的,亲和层析法涉及将含有免疫球蛋白的样品添加到固定相,所述固定相包含层析配体,例如本发明的Ig结合蛋白。

[0055] 术语“固相支持体”或“固相基质”可互换地用于固定相。本文中互换使用的术语“亲和基质”或“亲和分离基质”或“亲和层析基质”指基质,例如,层析基质,其上附着有亲和配体(例如本发明的Ig结合蛋白)。配体(例如,Ig结合蛋白)能够特异性结合目标分子(例如,如上定义的免疫球蛋白),将其纯化或从混合物中除去。

[0056] 本文所用的术语“亲和纯化”是指,通过使如上定义的免疫球蛋白与固定在基质上的Ig结合蛋白结合,从液体中纯化如上定义的免疫球蛋白的方法。因此,除免疫球蛋白外,混合物的所有其他组分被除去了。在进一步的步骤中,可以将结合的免疫球蛋白以纯化后的形式洗脱。

[0057] 本发明的实施方案

[0058] 现在将进一步描述本发明。在以下段落中,更详细地定义了本发明的不同方面。除非明确地指出不可以,否则以下定义的每个方面可以与任何其他一个或多个方面组合。特别地,任何指明为优选或有利的特征均可以与任何其他一个或多个指明为优选或有利的特

征组合。

[0059] 第一方面,本发明涉及免疫球蛋白(Ig)结合蛋白,其包含一个或多个Ig结合结构域,其中至少一个Ig结合结构域包含亲本氨基酸序列的变异体,基本上由亲本氨基酸序列的变异体组成,或由亲本氨基酸序列的变异体组成,所述亲本氨基酸序列的变异体具有至少1、2、3或4个取代,这些取代选自位置1处的氨基酸取代为异亮氨酸,位置11处的氨基酸取代为丙氨酸、谷氨酸或异亮氨酸,位置35处的氨基酸取代为精氨酸或异亮氨酸,以及位置42处的氨基酸取代为亮氨酸组成的组。在一些实施方案中,所述至少一个变异体Ig结合结构域还包含1、2、3、4、5或6个修饰,其中每个单独的修饰选自单个氨基酸取代、单个氨基酸缺失、单个氨基酸插入组成的组。

[0060] 变异体Ig结合蛋白的优点是它们在碱性条件下长时间稳定。该特征对于清洗过程使用具有高NaOH浓度的碱性溶液以去除基质上的污染物的层析法是重要的,例如,如此基质便可以多次被使用。与亲本多肽相比,碱处理后的变异体Ig结合蛋白更稳定。与亲本蛋白质相比,如上定义的亲本蛋白质中位置1、11、35和/或42处的所述取代改善了对碱稳定性,且不损害与免疫球蛋白结合的特性。

[0061] 亲本SEQ ID NO:1. 在一些实施方案中,免疫球蛋白结合蛋白包含(i)的变异体的或(ii)的变异体的一个或多个Ig结合结构域,(i)为SEQ ID NO:1的氨基酸序列,(ii)为表现出与SEQ ID NO:1的氨基酸序列具有至少89.5%的序列一致性的氨基酸序列。所述Ig结合结构域具有至少1、2、3或4个取代,所述取代选自SEQ ID NO:1的位置1处的氨基酸取代为异亮氨酸,SEQ ID NO:1的位置11处的氨基酸取代为丙氨酸、谷氨酸或异亮氨酸,SEQ ID NO:1的位置35的氨基酸取代为精氨酸或异亮氨酸,以及SEQ ID NO:1的位置42的氨基酸取代为亮氨酸组成的组。所述变异体Ig结合蛋白可包含其他修饰,例如1、2、3、4、5或6个取代或1、2、3、4、5、6个缺失。

[0062] SEQ ID NO:1中所示的Ig结合结构域是亲本结构域;至少在位置1、11、35和/或42处具有取代的Ig结合结构域是SEQ ID NO:1的变异体。SEQ ID NO:1是涵盖本发明变异体的亲本结构域的共有序列,优选地,(i)人工Ig结合结构域,包括SEQ ID NO:3、4、10、14、21、25、47、48、49、50;(ii)天然存在的蛋白A结构域或变异体,包括SEQ ID NO:5-8。SEQ ID NO:1的亲本蛋白具有以下氨基酸序列:

[0063] $X_1X_2X_3X_4X_5X_6X_7X_8QX_{11}AFYX_{15}X_{16}LX_{18}X_{19}PX_{21}LX_{23}X_{24}X_{25}QRX_{28}X_{29}FIQSLKDDPSX_{40}SX_{42}X_{43}X_{44}LX_{46}EAX_{49}KLX_{52}X_{53}X_{54}X_{55}APX_{58}$ 其中位置1(X_1)处的氨基酸选自P、N、A、V或Q,位置2(X_2)处的氨基酸选自A、D或Q,位置3(X_3)处的氨基酸选自A、N、或S,优选A或N,位置4(X_4)处的氨基酸选自K或N,优选K,位置5(X_5)处的氨基酸选自H或F,位置6(X_6)处的氨基酸选自D、N、A、或S,优选D或N,位置7(X_7)处的氨基酸选自K或E,位置8(X_8)处的氨基酸选自D、A或E,位置11(X_{11})处的氨基酸选自S或N,位置15(X_{15})处的氨基酸选自E或Q,位置16(X_{16})处的氨基酸选自I或V,位置18(X_{18})处的氨基酸选自H或N,位置19(X_{19})处的氨基酸选自L或M,位置21(X_{21})处的氨基酸选自N、S或D,优选N,位置23(X_{23})处的氨基酸选自T或N,位置24(X_{24})处的氨基酸选自E或A,位置25(X_{25})处的氨基酸选自D或E,位置28(X_{28})处的氨基酸选自S、N、或A,优选N或S,位置29(X_{29})处的氨基酸选自A或G,位置40(X_{40})处的氨基酸选自V、Q、或T,优选V或Q,位置42(X_{42})处的氨基酸选自K、A或T,位置43(X_{43})处的氨基酸选自E、N或S,优选E或N,位置44(X_{44})处的氨基酸选自I、V或L,位置46(X_{46})处的氨基酸选自G或A,位置49(X_{49})处的氨基酸选自K或Q,位

置52 (X₅₂) 处的氨基酸选自N、D或S, 优选N, 位置53 (X₅₃) 处的氨基酸选自D或E, 位置54 (X₅₄) 处的氨基酸选自A或S, 以及位置58 (X₅₈) 处的氨基酸选自P或K。

[0064] 亲本SEQ ID NO:5-8. 在第一方面的一个实施方案中, 亲本结构域包含或基本上由或由SEQ ID NO:5-8的氨基酸序列组成, 或者包含或基本上由或由与SEQ ID NO:5-8的氨基酸序列表现出至少89.5%序列一致性的氨基酸序列组成。Ig结合结构域包含具有至少1、2、3或4个氨基酸取代的变异体, 所述氨基酸取代选自由位置1处的氨基酸取代为异亮氨酸, 位置11处的氨基酸取代为丙氨酸、谷氨酸或异亮氨酸, 位置35处的氨基酸取代为精氨酸或异亮氨酸, 以及位置42处的氨基酸取代为亮氨酸组成的组。在一些实施方案中, Ig结合结构域还包含1、2、3、4、5或6个修饰, 其中每个单独的修饰选自由单个氨基酸取代、单个氨基酸缺失、单个氨基酸插入组成的组。

[0065] 亲本SEQ ID NO:2. 在第一方面的另一个优选实施方案中, 其中所述至少一个Ig结合结构域包含SEQ ID NO:2的亲本氨基酸序列的变异体, 其中所述变异体具有至少1、2、3或4个取代, 这些取代选自由SEQ ID NO:2的位置1处的氨基酸取代为异亮氨酸, SEQ ID NO:2的位置11处的氨基酸取代为丙氨酸、谷氨酸或异亮氨酸, SEQ ID NO:2的位置35处的氨基酸取代为精氨酸或异亮氨酸, 以及SEQ ID NO:2的位置42的氨基酸取代为亮氨酸组成的组。在一些实施方案中, 所述至少一个Ig结合结构域还包含1、2、3、4、5或6个修饰, 其中每个单独的修饰选自由单个氨基酸取代、单个氨基酸缺失、单个氨基酸插入组成的组。

[0066] SEQ ID NO:2是优选的亲本蛋白的共有序列, 例如, 但不限于, 人工Ig结合结构域IB14、IB25、IB27、IB74及IB47。优选地, 本发明涉及Ig结合蛋白, 其中所述至少一个Ig结合结构域包含、基本上由或由亲本SEQ ID NO:2的氨基酸序列的变异体或与亲本SEQ ID NO:2具有至少89.5%一致性的氨基酸序列的变异体组成。SEQ ID NO:2是SEQ ID NO:1的优选实施方案:

[0067] X₁ A A X₄ X₅ D X₇ X₈ Q Q X₁₁ A F Y E I L H L P N L T E X₂₅ Q R X₂₈ A F I Q S L K D D P S V S K E X₄₄ L X₄₆ E A X₄₉ K L N D X₅₄ Q A P X₅₈ 其中位置1 (X₁) 处的氨基酸选自P、N或A, 位置5 (X₅) 处的氨基酸选自H或F, 位置7 (X₇) 处的氨基酸选自K或E, 位置8 (X₈) 处的氨基酸选自D、A或E, 位置11 (X₁₁) 处的氨基酸选自S或N, 优选S, 位置25 (X₂₅) 处的氨基酸选自D或E, 位置28 (X₂₈) 处的氨基酸选自S或N, 优选N, 位置44 (X₄₄) 处的氨基酸选自I或V, 位置46 (X₄₆) 处的氨基酸选自G或A, 位置49 (X₄₉) 处的氨基酸选自K或Q, 位置54 (X₅₄) 处的氨基酸选自A或S, 以及位置58 (X₅₈) 处的氨基酸选自P或K。

[0068] 示例性亲本蛋白质. 在一些实施方案中, 所述Ig结合结构域包含选自由SEQ ID NO:3、4、10、14、21、25、47-50组成的组的亲本氨基酸序列的变异体, 其中, 变异体具有至少1、2、3或4个氨基酸取代, 所述氨基酸取代选自由位置1处的丙氨酸或脯氨酸取代为异亮氨酸的氨基酸取代, 位置11处的丝氨酸取代为丙氨酸、谷氨酸或异亮氨酸的氨基酸取代, 位置35处的赖氨酸取代为精氨酸或异亮氨酸的氨基酸取代, 以及位置42处的赖氨酸取代为亮氨酸的氨基酸取代组成的组。

[0069] IB14作为亲本蛋白质. 在第一方面的一个优选实施方案中, 亲本蛋白质具有SEQ ID NO:3的氨基酸序列, 或与亲本SEQ ID NO:3具有至少89.5%一致性的蛋白质。与SEQ ID NO:3具有至少89.5%的一致性的亲本蛋白质的实例可以选自由SEQ ID NO:21 (1P/28N)、SEQ ID NO:10 (1A/28S)、SEQ ID NO:14 (1P/28S)、SEQ ID NO:25 (46A/58K)、SEQ ID NO:47

(5F/7E/8A)、SEQ ID NO:48 (5F/7E/8A/25E)、SEQ ID NO:49 (44V/49Q/54S/58K)、SEQ ID NO:50 (25E/44V/49Q/54S/58K)、IB13 (1P/4Q/28S)、IB23 (1P/21S/28A/40T/43S)、IB15 (2D/3N/5F/7E/8A/28A),以及IB16 (2D/3S/5F/7E/8A/28A)组成的组。

[0070] IB27作为亲本蛋白质.在第一方面的另一个优选实施方案中,亲本蛋白质是SEQ ID NO:4,或与亲本SEQ ID NO:4具有至少89.5%一致性的蛋白质。具有至少89.5%的一致性的亲本蛋白质的实例选自由SEQ ID NO:50 (5H/7K/8D),SEQ ID NO:49 (5H/7K/8D/25D);SEQ ID NO:48 (44I/49K/54A/58P),及SEQ ID NO:47 (25D/44I/49K/54A/58P)组成的组。

[0071] 进一步优选的亲本结构域.在第一方面的一个实施方案中,亲本蛋白质是SEQ ID NO:25的氨基酸序列。在第一方面的另一个实施方案中,亲本蛋白质是SEQ ID NO:50或SEQ ID NO:49的氨基酸序列。在第一方面的又一个实施方案中,亲本蛋白质是SEQ ID NO:48或SEQ ID NO:47的氨基酸序列。

[0072] 对碱稳定的蛋白质中优选的氨基酸位置.在一些实施方案中,变异体Ig结合蛋白的所述Ig结合结构域包含一个取代或多个取代。

[0073] 位置1中的取代为异亮氨酸(I)的取代可以是唯一的取代(例如,SEQ ID NO:9)或Ig结合结构域可以包含其他突变,例如,至少在亲本蛋白质中位置11和/或35和/或42处的取代。优选对碱稳定的蛋白质的位置1处的氨基酸不是苏氨酸(T)。优选位置1处的氨基酸是异亮氨酸(I)或丙氨酸(A)。

[0074] 位置11中的取代为丙氨酸(A)、谷氨酸(E)或异亮氨酸(I)的取代可以是唯一的取代(例如,SEQ ID NO:11-13)或Ig结合结构域可以包含其他突变,优选至少在位置1和/或35和/或42处的取代。优选位置11处的氨基酸不是天冬酰胺(N)或赖氨酸(K)。优选位置11处的氨基酸为丙氨酸(A)、异亮氨酸(I)、谷氨酸(E)、组氨酸(H)或脯氨酸(P),更优选A、I或E,最优选A。

[0075] 位置35中的取代为精氨酸(R)或异亮氨酸(I)的取代可以是唯一的取代(例如,SEQ ID NO:15-16)或Ig结合结构域可以包含其他突变,优选至少在位置1和/或11和/或42处的取代。优选位置35中的氨基酸不是脯氨酸(P)、天冬酰胺(N)、甘氨酸(G)、色氨酸(W)、丙氨酸(A)、谷氨酰胺(Q)或蛋氨酸(M)。优选位置35处的氨基酸是R或I。

[0076] 位置42中的取代为亮氨酸(L)的取代可以是唯一的取代(例如,SEQ ID NO:17)或Ig结合域可以包含其他突变,优选至少在位置1和/或11和/或35处的取代。优选位置42处的氨基酸不是酪氨酸(Y)。优选位置42处的氨基酸是L。

[0077] Ig结合结构域中氨基酸的优选组合.令人惊讶的是,如图和实施例中所示,与亲本结构域相比,在位置1、11,及35,和可选择地在位置1、11、35、42,和可选择地在位置1、11、28、35,及42中的氨基酸的特定组合增加了变异体Ig结合结构域的对碱稳定性。除了位置1、11、35、42中的取代之外,对碱稳定的Ig结合结构域可以包含额外的1、2或3个修饰,例如取代、缺失或插入。例如,与亲本序列相比,至少一个的Ig结合结构域包含一个或多个取代,并且其中一个或多个取代至少选自由1I;11A;35R;42L;11E;11I;35I;1I/11A;1I/35R;11A/35R;1I/42L;11A/42L;1I/11E;1I/11I;11I/35R;11E/35R;11I/42L;11E/42L;1I/35I;11A/35I;11I/35I;11E/35I;35R/42L;35I/42L;1I/11A/35R;1I/11E/35R;1I/11I/35R;1I/11A/42L;1I/11E/42L;1I/11I/42L;1I/11A/35I;1I/11E/35I;1I/11I/35I;1I/35R/42L;1I/35I/42L;11I/35R/42L;11I/35I/42L;11A/35R/42L;11A/35I/42L;11E/35R/42L;11E/35I/42L;

1I/11A/35R/42L;1I/11E/35R/42L;1I/11I/35R/42L;1I/11A/35I/42L;1I/11E/35I/42L;1I/11I/35I/42L;1I/11A/28N/35R/42L;1I/11E/28N/35R/42L;1I/11I/28N/35R/42L;1I/11A/28N/35I,42L;1I/11I/28N/35I/42L;及1I/11E/28N/35I/42L组成的组。优选的取代选自自由1I;11A;35R;42L;1I/11A;1I/35R;1I/42L;11A/42L;11A/35R;35R/42L;1I/11A/35R;1I/11A/42L;1I/11A/35R/42L;及1I/11A/28N/35R/42L组成的组。在一些实施方案中,3或4个氨基酸位置选自自由1I、11A、35R及42L组成的组。在其他实施方案中,Ig结合结构域包含选自自由1I/11A/35R;1I/11A/35R/42L;及1I/11A/28N/35R/42L组成的组的取代的组合。

[0078] 在优选的实施方案中,本发明的Ig结合蛋白包含或基本上由一个或多个Ig结合结构域组成,其中位置1处的氨基酸残基是异亮氨酸,并且其中位置11处的氨基酸残基是丙氨酸。本发明的另一优选Ig结合蛋白包含或基本上由一个或多个Ig结合结构域组成,其中位置1处的氨基酸残基是异亮氨酸,其中位置11处的氨基酸残基是丙氨酸,其中位置35处的氨基酸残基是精氨酸。本发明还有一种优选Ig结合蛋白包含或基本上由一个或多个Ig结合结构域组成,其中位置1处的氨基酸残基是异亮氨酸,其中位置11处的氨基酸残基是丙氨酸,其中位置35处的氨基酸残基是精氨酸,其中位置42处的氨基酸残基是亮氨酸。本发明的另一种Ig结合蛋白包含或基本上由一个或多个Ig结合结构域组成,其中位置1处的氨基酸残基是异亮氨酸,并且其中位置11处的氨基酸残基是丙氨酸,其中位置35处的氨基酸残基是精氨酸,其中位置42处的氨基酸残基是亮氨酸,其中位置28处的氨基酸残基是天冬酰胺。本发明还有一种优选Ig结合蛋白包含或基本上由一个或多个Ig结合结构域组成,其中位置11处的氨基酸残基是丙氨酸,其中位置35处的氨基酸残基是精氨酸,其中位置42处的氨基酸残基是亮氨酸。

[0079] 对碱稳定蛋白质的序列.本发明的Ig结合蛋白包含一个或多个Ig结合结构域,其包含或基本上由或由SEQ ID NO:52的氨基酸序列组成。在一些实施方案中,Ig结合结构域包含与SEQ ID NO:52至少有89.5%相同的氨基酸序列。SEQ ID NO:52是优选的人工Ig结合蛋白(比如Ig结合结构域)的共有序列,例如SEQ ID NO:18-20、26、29-30、42-45、56-61。SEQ ID NO:52是以下氨基酸序列(参见图1B):

[0080] IAAKX₅DX₇X₈QQAIFYEILHLPNLTEX₂₅QRX₂₈AFIQSLRDDPSVSX₄₂EX₄₄LX₄₆EAX₄₉KLNDX₅₄QAPX₅₈其中位置5(X₅)处的氨基酸选自H或F,位置7(X₇)处的氨基酸选自K或E,位置8(X₈)处的氨基酸选自D、A或E,位置25(X₂₅)处的氨基酸选自D或E,位置28(X₂₈)处的氨基酸选自S或N,位置42(X₄₂)处的氨基酸选自L或K,优选L,位置44(X₄₄)处的氨基酸选自I或V,位置46(X₄₆)处的氨基酸选自G或A,位置49(X₄₉)处的氨基酸选自K或Q,位置54(X₅₄)处的氨基酸选自A或S,以及位置58(X₅₈)处的氨基酸选自P或K。

[0081] 在Ig结合蛋白中位置1、11、35、42处的3或4个氨基酸的组合使其具有高的对碱稳定性。在一些实施方案中,如实施例和图中所示,选自位置1中的异亮氨酸、位置11中的丙氨酸、位置35中的精氨酸,以及位置42中的亮氨酸的至少3或4个氨基酸的组合提供令人惊讶的特别好的Ig结合蛋白的对碱稳定性。优选位置28是天冬酰胺。如以下实施例所示,本发明的所有Ig结合蛋白被发现甚至在碱处理后也与Ig结合。本发明的Ig结合蛋白在0.5M NaOH中表现出至少6小时的高的对碱稳定性,特别是与相应的亲本蛋白相比,表现出改善了的对碱稳定性。

[0082] 令人惊讶和意外的是,Ig结合蛋白即使在碱处理数小时后也能够与Ig结合,其中

所述Ig结合蛋白具有至少3个或4个氨基酸的组合(在氨基酸位置1处的异亮氨酸,在氨基酸位置11处的丙氨酸、谷氨酸或异亮氨酸,在氨基酸位置35处的精氨酸或异亮氨酸,以及可选地在氨基酸位置42处的亮氨酸)。最令人惊讶和出乎意料的是,甚至在碱处理数小时后,Ig结合蛋白仍能够与Ig结合,其中所述Ig结合蛋白包含氨基酸1I,11A或11E或11I,35R或35I,可选择地42L,优选1I,11A,35R及42L的组合。在0.5M NaOH中培养6小时后,通过比较Ig结合活性的损失来确定Ig结合蛋白的对碱稳定性。在一些实施方案中,将其与相应亲本蛋白的Ig结合活性的损失进行比较。通过比较0.5M NaOH培养6小时前后的结合活性来确定结合活性的损失。如图中的比较数据所示,与亲本蛋白质相比,具有至少3或4个选自1I,11A或11E或11I,35R或35I,及42L的氨基酸的Ig结合结构域的Ig结合活性增加了至少25%。与亲本蛋白相比,这是令人惊讶且有利的特性。

[0083] 优选的对碱稳定的Ig结合蛋白.在具体的实施方案中,Ig结合结构域包含选自自由SEQ ID NO:18-20、26、29-40、42-45,及56-61组成的组的氨基酸序列。在一些实施方案中,所述结构域包含选自自由SEQ ID NO:20、26、30、42-45组成的组的氨基酸序列。对碱稳定的结构域可以包含进一步的修饰,例如插入、缺失或进一步的取代。在一些实施方案中,Ig结合结构域有1、2、3、4、5或6个进一步的取代。在其他实施方案中,Ig结合结构域在其N-末端的前4个氨基酸内具有1、2、3或4个氨基酸缺失和/或在C-末端具有1或2个氨基酸缺失。在一些实施方案中,Ig结合结构域在N-末端具有缺失,例如在位置1、2,及4,或在位置1、2,及3。在一些实施方案中,Ig结合结构域在C-末端具有缺失,例如在位置57和/或58。一些实施方案涉及与选自自由SEQ ID NO:20、26、30、42-45组成的组的氨基酸具有至少89.5%序列一致性的序列,例如,但不限于,SEQ ID NO:9-19、29、53-54、56-61。一些实施方案涉及与任何前述SEQ ID NO氨基酸序列具有至少89.5%序列一致性的氨基酸序列,其中,与任何前述SEQ ID NO氨基酸序列具有至少89.5%序列一致性的氨基酸序列,在位置1、11、35,及42中的至少3或4个位置处或在序列SEQ ID NO:20、26、29、30、42-45中对应于各氨基酸的位置的至少3或4个位置处,具有相同的氨基酸,所述具有至少89.5%序列一致性的氨基酸序列衍生自序列SEQ ID NO:20、26、29、30、42-45。图1示出了优选的对碱稳定的Ig结合蛋白的序列。优选的是位置1I、11A、35R,及42L中至少3或4个是保守的。进一步优选位置4不是Q。

[0084] SEQ ID NO:20(cs14)和变异体.在一个具体实施方案中,对碱稳定的Ig结合结构域包含,或基本上由,或由SEQ ID NO:20氨基酸序列或与其至少有91%一致性的氨基酸序列组成,例如SEQ ID NO:18-19、26、42-45、56。在优选的实施方案中,SEQ ID NO:20的变异体在位置4不含Q。进一步优选的是位置4是K。在一个具体实施方案中,Ig结合结构域包含SEQ ID NO:20的氨基酸序列或与其有至少96%一致性的氨基酸序列。例如,图3和图5显示了在经延长的连续0.5M NaOH处理后Ig结合的剩余活性。

[0085] 表1显示了SEQ ID NO:20和与其有至少91%一致性的优选变异体的氨基酸差异。优选位置5是H或F,位置7是K或E,位置8是D或A,位置25是D或E,位置44是I或V,位置46是G或A,位置49是K或Q,位置54是A或S,以及位置58是P或K。进一步优选位置4是K。人工对碱稳定的SEQ ID NO:20与任何野生型蛋白A结构域的一致性低于78%。

[0086] 表1.cs14和具有至少91%序列一致性的变异体的氨基酸差异

[0087]

SEQ NO	Ig 结合蛋白	位置 5	位置 7	位置 8	位置 25	位置 44	位置 46	位置 49	位置 54	位置 58	差异	一致性 (%)
20	cs14	H	K	D	D	I	G	K	A	P	0	100
26	cs25	H	K	D	D	I	A	K	A	K	2	96.5
42	cs74h1	F	E	A	D	V	G	K	A	P	3	94.8
43	cs74h2	F	E	A	E	V	G	K	A	P	4	93.1
44	cs47h3	H	K	D	D	V	G	Q	S	K	4	93.1
45	cs47h4	H	K	D	E	V	G	Q	S	K	5	91.3

[0088] SEQ ID NO:30 (cs27) 和变异体. 在一个具体实施方案中, Ig结合结构域包含或基本上由或由SEQ ID NO:30的氨基酸序列或与其至少有94%一致性的氨基酸序列组成, 例如SEQ ID NO:29. SEQ ID NO:30与任何野生型蛋白A结构域的一致性低于76%。图4显示了SEQ ID NO:30和29在连续0.5M NaOH处理六小时后的剩余活性。

[0089] SEQ ID NO:26 (cs25) 和变异体. 在一个具体实施方案中, Ig结合结构域包含或基本上由或由SEQ ID NO:26氨基酸序列或与其至少有98%一致性的氨基酸序列组成. SEQ ID NO:26与任何野生型蛋白A结构域的一致性低于81%。图5显示了SEQ ID NO:26在连续0.5M NaOH处理六小时后的剩余Ig结合活性。

[0090] SEQ ID NO:42 (cs74) 和变异体. 在一个具体实施方案中, 对碱稳定的Ig结合结构域包含或基本上由或由SEQ ID NO:42氨基酸序列以及与其至少有98%一致性的氨基酸序列组成, 例如SEQ ID NO:43。

[0091] SEQ ID NO:42与任何野生型蛋白A结构域的一致性低于78%。图5显示了SEQ ID NO:42-43在连续0.5M NaOH处理六小时后的剩余Ig结合。

[0092] SEQ ID NO:44 (cs47) 及其变异体. 在一个具体实施方案中, 对碱稳定的Ig结合结构域包含或基本上由SEQ ID NO:44的氨基酸序列以及与其至少有98%一致性的氨基酸序列组成, 例如SEQ ID NO:45. SEQ ID NO:44与任何野生型蛋白A结构域的一致性低于78%。图5显示了具有至少98%一致性的SEQ ID NO:44-45在连续0.5M NaOH处理六小时后的Ig结合的剩余活性。

[0093] 对免疫球蛋白的亲和力. 本发明的所有Ig结合蛋白与免疫球蛋白结合, 解离常数 K_D 优选低于1 μ M, 或低于100nM, 更为优选10nM或更低. 测定Ig结合蛋白或结构域的结合亲和力的方法, 即用于确定解离常数 K_D 的方法, 为本领域普通技术人员所知, 并且可以选自, 例如, 本领域已知的以下方法: 基于表面等离子体共振 (SPR) 的技术、生物膜层干涉技术 (BLI)、酶联免疫吸附试验 (ELISA)、流式细胞术、滴定量热法 (ITC)、分析性超离心、放射免疫检定法 (RIA或IRMA) 及增强化学发光 (ECL)。

[0094] 在实施例中进一步描述了所述的一些方法. 通常, 解离常数 K_D 是在20℃、25℃或30℃下测定. 如果没有另外明确指出, 则本文所述的 K_D 值是通过表面等离子体共振在22℃ \pm 3℃下测定的. 在第一方面的一个实施方案中, Ig结合蛋白对人IgG₁的解离常数 K_D 为0.1nM至

100nM, 优选0.1nM至10nM。

[0095] 多聚体. 在本发明的一个实施方案中, Ig结合蛋白包含彼此连接的1、2、3、4、5、6、7或8个, 优选2、3、4、5或6个Ig结合结构域, 即Ig结合蛋白可以是, 例如, 单体、二聚体、三聚体、四聚体、五聚体或六聚体。多聚体可包含两个、三个、四个或甚至更多个结合结构域。

[0096] 本发明的多聚体通常是通过技术人员熟知的重组DNA技术人工产生的融合蛋白。本发明的Ig结合蛋白可以通过许多常规和众所周知的技术中的任何一种制备, 例如普通有机合成方法, 固相辅助合成技术或通过市售的自动合成器制备。

[0097] 在一些优选的实施方案中, 多聚体是同源多聚体, 例如, Ig结合蛋白的所有对碱稳定的Ig结合结构域的氨基酸序列是相同的。

[0098] 对碱稳定多聚体可包含两个或更多个Ig结合结构域, 其中所述Ig结合结构域优选包含或基本上由选自SEQ ID NO:18-20、26、29-38、42-45、56-61组成的组的序列或与任何前述SEQ ID NO具有至少89.5%序列一致性的序列组成。在一些实施方案中, 结构域是SEQ ID NO:18-20、26、29-38、42-45、56-61的衍生物, 并且, 相对于SEQ ID NO:18-20、26、29-38、42-45、56-61, 其中每个衍生物在其N-末端的前四个氨基酸中有1、2或3个氨基酸缺失和/或在C-末端有1或2个氨基酸缺失(参见, 例如, SEQ ID NO:23、24、27)。

[0099] 例如, SEQ ID NO:14和SEQ ID NO:20被用于产生本文实施例1中描述的同源多聚体融合结构(二聚体、四聚体、五聚体, 及六聚体)。

[0100] 此外, 产生了SEQ ID NO:30的二聚体、四聚体、五聚体, 及六聚体。参见, 例如, SEQ ID NO:23、24、27、28。

[0101] 在第一方面的一些实施方案中, 多聚体是杂多聚体, 例如, 在与免疫球蛋白结合的蛋白质内部, 至少有一个对碱稳定的Ig结合结构域具有与其他Ig结合结构域不同的氨基酸序列。

[0102] 接头. 在第一方面的一些实施方案中, 一个或多个Ig结合结构域彼此直接连接。在其他实施方案中, 一个或多个Ig结合结构域通过一个或多个接头彼此连接。这些典型实施方案中优选的是肽接头。这意味着肽接头是连接第一Ig结合结构域和第二Ig结合结构域的氨基酸序列。肽接头通过结构域的C-末端和N-末端之间的肽键连接至第一Ig结合结构域和第二Ig结合结构域, 从而产生单个线性多肽链。接头的长度和组成可在至少一个和最多约30个氨基酸的范围内变化。更具体地, 肽接头具有1至30个氨基酸之间的长度; 例如, 1、2、3、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、30个氨基酸。优选肽接头的氨基酸序列对于苛性条件和蛋白酶是稳定的。接头不应破坏Ig结合蛋白中结构域的构象。众所周知的是包含小氨基酸如甘氨酸和丝氨酸的接头。接头可以富含甘氨酸(例如, 接头中超过50%的残基可以是甘氨酸残基)。还优选的是包含其他氨基酸的接头。本发明的其他实施方案包含由丙氨酸、脯氨酸和丝氨酸组成的接头。用于蛋白质融合的其他接头在本领域是已知的并且可以使用。

[0103] 与固相支持物缀合. 在本发明的一些实施方案中, Ig结合蛋白与固相支持物缀合。在本发明的一些实施方案中, Ig结合结构域包含用于Ig结合蛋白与固相支持物的位点特异性共价交联的附着位点。在本发明的一些实施方案中, 在N-和/或C-末端, Ig结合蛋白还可以包含额外的氨基酸残基, 例如, N-末端的前导序列和/或在N-或C-末端有或没有标记的偶联序列(参见, 例如, SEQ ID NO:39和40)。在一些实施方案中, 对碱稳定的Ig结合蛋白包含

用于共价连接至固相(基质)的附着位点。优选地,附着位点特异性地提供与固相的位点特异性附着。特异性附着位点包括天然氨基酸,例如半胱氨酸或赖氨酸,其能够与固相的反应基团或固相与蛋白质之间的接头进行特定的化学反应,例如选自N-羟基琥珀酰亚胺、碘乙酰胺、马来酰亚胺、环氧树脂或烯烃。附着位点可以直接位于Ig结合蛋白的C-末端或N-末端,或者在N-或C-末端和偶联位点之间可以有接头,优选肽接头。在本发明的一些实施方案中,Ig结合蛋白可包含3-20个氨基酸的短N-或C-末端肽序列,优选4-10个氨基酸,末端为半胱氨酸。C-末端附着位点的氨基酸可优选地选自脯氨酸、丙氨酸,及丝氨酸,例如ASPAPSAPSAC (SEQ ID NO:41),在C-末端具有单个用于偶联的半胱氨酸。在另一个实施方案中,C-末端附着位点的氨基酸可优选地选自甘氨酸和丝氨酸,例如GGGSC,在C-末端具有单个用于偶联的半胱氨酸。

[0104] 具有C-末端半胱氨酸的优点是Ig结合蛋白的偶联可以通过半胱氨酸的硫醇与支持物上的亲电子基团的反应实现,产生硫醚桥偶联(thioether bridge coupling)。这赋予偶联蛋白优异的移动性,偶联蛋白提供增强的结合能力。

[0105] 在替代实施方案中,Ig结合蛋白与固相支持物的偶联可以通过位于对碱稳定的Ig结合结构域的位置43、46或47中的半胱氨酸实现。如果半胱氨酸位于位置43、46或47中,则位置50或58中的氨基酸不是半胱氨酸(参见,例如,SEQ ID NO:53或54)。优选位置50中的氨基酸是赖氨酸,且位置58中的氨基酸选自脯氨酸或赖氨酸。

[0106] 亲和分离基质. 另一方面,本发明涉及包含第一方面的Ig结合蛋白的亲和分离基质。

[0107] 在第二方面的优选实施方案中,亲和分离基质是固相支持物。亲和分离基质包含至少一种本发明的Ig结合蛋白。

[0108] 包含本发明的对碱稳定的Ig结合蛋白的该基质可用于如上定义的免疫球蛋白的分离,例如用于色谱法分离,如上定义的免疫球蛋白,即Ig、包含Fc区的Ig变体、包含Ig的Fc区的融合蛋白,以及包含Ig的Fc区的缀合物。亲和基质可用于分离免疫球蛋白,并且即使在清洗过程中施加高碱性条件后也应保持Ig结合特性。这种基质的清洗对于长期重复使用基质是必要的。

[0109] 用于亲和层析的固相支持基质在本领域是已知的,包括但不限于,例如,琼脂糖和稳定的琼脂糖衍生物(例如Sepharose 6B,PraestoTMPure; **Captiva**[®], rPROTEIN A Sepharose Fast Flow, Mabselect等),纤维素或纤维素衍生物,可控多孔玻璃(controlled pore glass)(如**ProSep**[®]vA树脂),整体柱(如**CIM**[®]整体柱),二氧化硅,氧化锆(如CM氧化锆或**CPG**[®]),氧化钛,或合成聚合物(例如,诸如Poros 50A或Poros **MabCapture**[®]A树脂的聚苯乙烯,聚乙烯醚,聚乙烯醇,聚羟基烷基丙烯酸酯,聚羟基烷基甲基丙烯酸酯,聚丙烯酰胺,聚甲基丙烯酰胺等),以及各种组合物的水凝胶。在某些实施方案中,支持物包含多羟基聚合物,例如多糖。适用于支持物的多糖的实例包括但不限于琼脂、琼脂糖,葡萄糖聚糖、淀粉、纤维素、支链淀粉等,以及它们的稳定变体。

[0110] 固相支持基质的形式可以是任何合适的公知类型。用于偶联本发明的Ig结合蛋白的这种固相支持基质可包括,例如,以下之一:柱,毛细管,颗粒,膜,过滤器,整体柱,纤维,垫,凝胶,载玻片,板,盒或任何其他形式的通常用于层析并且是本领域技术人员已知的物

品。

[0111] 在一个实施方案中,基质由基本上是球形的颗粒组成,也被称为珠粒,例如琼脂糖(Sephacrose)或琼脂糖珠(Agarose bead)。合适的粒度可以在5-500 μm 的直径范围内,比如10-100 μm ,例如20-80 μm 。颗粒形式的基质可用作填充床或处于悬浮状态用于扩张床。

[0112] 在一个替代实施方案中,固相支持基质是膜,例如水凝胶膜。在一些实施方案中,亲和纯化涉及膜作为基质,第一方面的对碱稳定的Ig结合蛋白与其共价结合。固相支持物也可以是膜位于小柱中的形式。

[0113] 在一些实施方案中,亲和纯化涉及含有固相支持基质的层析柱,第一方面的对碱稳定的Ig结合蛋白与其共价结合。

[0114] 本发明的对碱稳定的Ig结合蛋白可以通过常规偶联技术,例如利用存在于本发明的Ig结合蛋白中的氨基、硫代羟基和/或羧基,连接到合适的固相支持基质上。可以通过Ig结合蛋白的氮、氧或硫原子进行偶联。优选包含在N-或C-末端肽接头中的氨基酸包含所述氮、氧或硫原子。

[0115] Ig结合蛋白可以直接偶联到支持基质上,或通过间隔成分间接偶联到支持基质上,以在基质表面和本发明的Ig结合蛋白之间提供适当的距离,这提高了Ig结合蛋白的可用性并促进了本发明的Ig结合蛋白与支持物的化学偶联。

[0116] 将蛋白质配体固定到固相支持物上的方法在本领域中是公知的,并且易于本领域技术人员使用标准技术和设备实施。

[0117] 取决于Ig结合蛋白和特定条件,偶联可以是多点偶联,例如通过几个赖氨酸,或单点偶联,例如通过半胱氨酸。

[0118] 对碱稳定的Ig结合蛋白的用途. 第三方面,本发明涉及第一方面的对碱稳定的Ig结合蛋白或第二方面的用于免疫球蛋白或其变异体的亲和纯化的亲和基质,即本发明的Ig结合蛋白用于亲和层析。在一些实施方案中,如本发明第二方面所述,本发明的Ig结合蛋白被固定在固相支持物上。

[0119] 免疫球蛋白的亲和纯化方法. 第四方面,本发明涉及免疫球蛋白的亲和纯化方法,该方法包括(a)提供含有免疫球蛋白的液体;(b)提供亲和分离基质,其包含与所述亲和分离基质偶联的第一方面的固定的对碱稳定的Ig结合蛋白;(c)使所述液体与所述亲和分离基质接触,其中所述免疫球蛋白与所述固定的Ig结合蛋白结合;以及(d)从所述基质中洗脱所述免疫球蛋白,从而获得含有所述免疫球蛋白的洗脱液。

[0120] 在一些实施方案中,亲和纯化方法可以进一步包括在步骤(c)和(d)之间进行的一个或多个清洗步骤,所述清洗步骤是在足以从亲和分离基质中除去与其非特异性结合的一些或所有分子的条件下去进行的。非特异性结合是指不涉及本公开主题的至少一个结合结构域与免疫球蛋白之间相互作用的任何结合。

[0121] 适用于所公开的用途和方法的亲和分离基质是那些根据上述实施方案并且本领域技术人员已知的基质。

[0122] 在第四方面的一些实施方案中,步骤(d)中免疫球蛋白从基质中的洗脱是通过pH的变化和/或盐浓度的变化实现的。可以使用任何合适的用于从蛋白A介质洗脱的溶液,例如pH为5或更低的溶液,或pH为11或更高的溶液。

[0123] 在一些实施方案中,添加了用于有效清洗亲和基质的另外的步骤(f),优选使用碱

性液体,例如其pH为13-14。在某些实施方案中,清洗液包含0.1-1.0M NaOH或KOH,优选0.25-0.5M NaOH或KOH。

[0124] 由于本发明的Ig结合蛋白的高对碱稳定性,这种强碱性溶液可用于清洗目的。

[0125] 在一些实施方案中,亲和基质可以重复使用至少10次、至少20次、至少30次、至少40次、至少50次、至少60次、至少70次、至少80次、至少90次或至少100次,取决于步骤(a)至(e)的重复,可选择地(a)至(f)可重复至少10次、至少20次、至少至少30次、至少40次、至少50次、至少60次、至少70次、至少80次、至少90次或至少100次。

[0126] 通常,用于进行亲和纯化方法的合适条件对于本领域技术人员,特别是对于蛋白A层析领域的技术人员,是公知的。

[0127] 核酸分子. 第五方面,本发明涉及核酸分子,优选分离的核酸分子,所述核酸分子编码上文公开的任何实施方案的对碱稳定的Ig结合蛋白。在一个实施方案中,本发明涉及包含所述核酸分子的载体。载体是指可用于将蛋白质编码信息转移到宿主细胞中的任何分子或实体(例如,核酸,质粒,噬菌体或病毒)。在一个实施方案中,载体是表达载体。

[0128] 第六方面,本发明涉及一种表达系统,其包含上述核酸或载体,例如原核宿主细胞,例如大肠杆菌,或真核宿主,例如酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)或毕赤酵母(*Pichia pastoris*)或诸如CHO细胞的哺乳动物细胞。

[0129] 产生对碱稳定的Ig结合蛋白的方法. 第七方面,本发明涉及产生本发明的对碱稳定的Ig结合蛋白的方法,包括步骤:(a)在适合结合蛋白表达的条件下培养第六方面的宿主细胞以获得所述对碱稳定的Ig结合蛋白;及(b)可选择地分离所述对碱稳定的Ig结合蛋白。

[0130] 用于培养原核或真核宿主的合适条件是本领域技术人员公知的。

[0131] 本发明的Ig结合分子可以通过许多常规和众所周知的技术中的任何一种制备,例如普通有机合成方法,固相辅助合成技术或通过市售的自动合成器制备。另一方面,它们也可以通过常规重组技术单独或与常规合成技术组合进行制备。

[0132] 本发明的一个实施方案涉及如上详述的根据本发明制备对碱稳定Ig结合蛋白的方法,所述方法包括以下步骤:(a)按上述定义制备编码Ig结合蛋白的核酸;(b)将所述核酸导入表达载体中;(c)将所述表达载体导入宿主细胞;(d)培养宿主细胞;(e)将宿主细胞置于使Ig结合蛋白表达的培养条件下,从而(e)产生如上所述的Ig结合蛋白;可选择地(f)分离步骤(e)中产生的蛋白质;及(g)可选择地将该蛋白质与上述固相基质缀合。

[0133] 在本发明的另一个实施方案中,对碱稳定的Ig结合蛋白是通过无细胞体外转录/翻译产生的。

[0134] 实施例

[0135] 以下提供的实施例用于进一步说明本发明。然而,本发明不限于此,并且以下实施例基于以上描述仅说明了本发明的实用性。

[0136] 实施例1.通过改组产生亲本蛋白

[0137] 亲本蛋白(例如SEQ ID NO:3、4、10、14、21、22、25、47-50)最初通过天然存在的蛋白质A结构域和蛋白质A结构域变体(例如Z结构域或其他与任何天然存在的结构域具有至少89.5%一致性的结构域,例如Z/2结构域)的改组过程产生。更详细地,如本文所理解的,改组过程是发生于人工氨基酸序列中的始于一组不同的已知氨基酸序列的组装过程。

改组过程包括以下步骤:a) 提供五个天然存在的蛋白A结构域E、B、D、A,以及C,和蛋白A变异体结构域Z或Z/2的序列;b) 比对所述序列;c) 在计算机中统计碎裂以识别重组的子序列,及d) 组装各种片段的新的人工序列以产生嵌合体产物,即新的氨基酸序列。步骤c) 中产生的片段可以是任何长度,例如,如果被片段化的亲本序列的长度为n,则片段长度为1至n-1。

[0138] 相对于起始氨基酸序列,嵌合体产物中氨基酸的相对位置得以保持。在例如IB14、IB25、IB74h1、IB74h2、IB47h3、IB47h4或/和IB27的人工氨基酸序列与天然存在的蛋白A结构域或蛋白A结构域变异体之间,至少90%的位置Q9、Q10、A12、F13、Y14、L17、P20、L22、Q26、R27、F30、I31、Q32、S33、L34、K35、D36、D37、P38、S39、S41、L45、E47、A48、K50、L51、Q55、A56、P57是相同的。Ig结合蛋白IB14、IB25、IB74h1、IB74h2、IB47h3、IB48h4,及IB27的总氨基酸序列是人工的,因为它与任何天然存在的蛋白A结构域或结构域Z的总氨基酸序列一致性不超过85%。在最初的人工Ig结合蛋白产生后,通过氨基酸序列的位点特异性随机化(site-specific randomization)进一步修饰所述蛋白,以进一步调整结合特性。通过单个氨基酸残基的定点饱和突变进行进一步的修饰。

[0139] 合成Ig结合蛋白IB14、IB25、IB47、IB74或/和IB27,以及SEQ ID NO:5-8的基因,并使用技术人员已知的标准方法将其克隆到大肠杆菌表达载体中。使用DNA测序验证插入的片段的正确序列。

[0140] 为了产生多聚体Ig结合蛋白,通过氨基酸接头从基因方面融合2、3、4、5或6个相同的Ig结合结构域(例如,SEQ ID NO:14、20、30的Ig结合结构域)。

[0141] 对于特定的膜附着和纯化,将具有C-末端半胱氨酸(Cys)(ASPAPSAPSAC;SEQ ID NO:41)的短肽接头和任选的strep-标签(WSHPQFEK;SEQ ID NO:46)添加至Ig的C-末端(例如,参见SEQ ID NO:39-40)。

[0142] 在其他实施方案中,对于特定的膜附着和纯化,用半胱氨酸取代位置43、46或47(参见,例如,SEQ ID NO:53-54)。

[0143] 实施例2. 诱变产生变异体

[0144] 对于定点诱变,根据制造商的说明书使用Q5[®] 定点诱变试剂盒(NEB; Cat.No.E0554S)。分别用寡核苷酸编码每个特定取代并用含有SEQ ID NO:14的质粒作为模板进行PCR。将产物连接并通过电穿孔导入大肠杆菌XL2-blue细胞(Stratagene)中。分离单菌落,并将DNA测序用于含有克隆物的插入物以验证正确的序列。结果显示在图2中。

[0145] 通过GeneArt[™] Strings[™]合成(Thermo Fisher Scientific)产生几个点的突变组合。Strings DNA片段与经纯化的PCR产物对应,并被克隆到pET28a载体的衍生物中。通过电穿孔,将连接产物导入到大肠杆菌XL2-blue细胞中。通过PCR筛选单菌落以识别含有正确大小的插入物的构建体。使用DNA测序验证正确的序列。例如SEQ ID NO:9-13、15-17,及21中显示了具有点突变的变异体。

[0146] 实施例3. Ig结合蛋白的表达

[0147] 用编码Ig结合蛋白的表达质粒转化BL21(DE3)感受态细胞。将细胞涂布在选择性琼脂板(卡那霉素)上并在37℃过夜培养。将预培养物从单个菌落接种于100ml 2xYT培养基中,并在补充有150μg/ml不含乳糖和消泡剂的卡那霉素的带挡板的1L Erlenmeyer烧瓶中,在常规轨道振荡器中在37℃,160rpm下培养16小时。OD₆₀₀读数应在6-12范围内。从先前的过夜培养物接种主培养物,经调整的起始OD₆₀₀为0.5,将主培养物接种至1L厚壁Erlenmeyer锥

形瓶中的400ml超级加富培养基中(经改良的H15培养基2%葡萄糖、5%酵母提取物、0.89%甘油、0.76%乳糖,250mM MOPS,202mM TRIS,pH7.4,消泡剂SE15),所述锥形瓶中补充有150 μ g/ml卡那霉素。将培养物转移至共振声混合器(resonant acoustic mixer)(RAMbio)并在37℃下以20xg培养。使用Oxy-Pump塞子促进通气。通过代谢葡萄糖及随后允许乳糖进入细胞诱导重组蛋白表达。在预定时间点测量OD₆₀₀,取出调节至5/OD₆₀₀的样品,沉淀并在-20℃冷冻。使细胞过夜生长约24小时以使OD₆₀₀最终达到约45-60。为了收集生物质,在20℃下以16000xg离心细胞10分钟。称量沉淀物(湿重)并测量上清液中的pH。细胞处理前在-20℃下保存。

[0148] 实施例4:Ig结合蛋白的表达和溶解度的SDS-PAGE分析

[0149] 将在发酵过程中取得的样品重悬于300 μ l提取缓冲液(补充有0.2mg/ml溶菌酶,0.5x BugBuster,7.5mM MgSO₄,40U Benzonase的PBS)中,并在室温下在恒温混匀仪中以700rpm搅拌溶解15分钟。通过离心(16000xg,2分钟,室温)将可溶性蛋白质与不溶性蛋白质分离。取出上清液(可溶性部分),将沉淀(不溶性部分)重悬于等量的尿素缓冲液(8M尿素,0.2M Tris,2mM EDTA,pH8.5)中。分别从可溶性和不溶性部分中取50 μ l,并加入12 μ l 5x样品缓冲液以及5 μ l 0.5M DTT。将样品在95℃下煮沸5分钟。最后,根据制造商的推荐将8 μ l的那些样品应用于NuPage Novex4-12%Bis-Tris SDS凝胶,并用考马斯染色。在选择的时间段内,在优化条件下发现了所有Ig结合蛋白的高水平表达(数据未显示)。根据SDS-PAGE,所有被表达的Ig结合蛋白可溶解至超过95%。

[0150] 实施例5:Ig结合蛋白的纯化

[0151] 具有C-末端StrepTag11(WSHPQFEK;SEQ ID NO:46)的Ig结合蛋白在大肠杆菌的可溶性部分中被表达。通过两次冷冻/解冻循环溶解细胞,并根据制造商的说明书(IBA, Goettingen,Germany)使用Strep-Tactin[®]-树脂进行纯化步骤。为避免二硫化物形成,缓冲液补充有1mM DTT。

[0152] 或者,具有C-末端StrepTag11(SEQ ID NO:46)的Ig结合蛋白在大肠杆菌的可溶性部分中被表达。将细胞重悬于细胞破碎缓冲液中,并使用恒定细胞破碎系统(constant cell disruption)(Unit F8B,Holly Farm Business Park)在1kbar下裂解两个循环。根据制造商的说明书,使用AKTApurify系统(GE Healthcare),用Strep-Tactin-树脂(IBA, Goettingen,Germany)和另外的凝胶过滤(Superdex7516/60;GE Healthcare)进行纯化步骤。为了避免二硫化物形成,用于Strep-Tactin-纯化的缓冲液补充有1mM DTT,且柠檬酸盐缓冲液(20mM Citrat,150mM NaCl,pH6.0)被用作凝胶过滤的电泳缓冲液。

[0153] 实施例6:Ig结合蛋白以高亲和力与IgG结合(通过ELISA测定)

[0154] 使用酶联免疫吸附测定(ELISA)测定Ig结合蛋白对IgG₁或IgG₂或IgG₄的亲和力。将含有抗体的IgG₁或IgG₂或IgG₄(例如IgG₁的西妥昔单抗,IgG₂的帕尼单抗或IgG₄的那他珠单抗)固定在96孔Nunc MaxiSorb ELISA板(2 μ g/ml)上。在4℃培养16小时后,用PBST(PBS+0.1%吐温20)清洗孔三次,并在PBS中(在室温下2小时)用3%BSA封闭孔。阴性对照是仅用BSA封闭的孔。封闭后,将孔用PBST清洗三次,并在室温下用Ig结合蛋白(在PBST中)培养1小时。培养后,将孔用PBST清洗三次,随后在室温下用Strep-Tactin-HRP(1:10000)(IBA, Goettingen,Germany)培养1小时。然后将孔用PBST清洗三次,并用PBS清洗三次。通过添加TMB-Plus底物显现辣根过氧化物酶的活性。30分钟后,通过加入0.2M H₂SO₄终止反应,并在

450nm处测量吸光度。通过ELISA测定,对于SEQ ID NO:14,人IgG₁的K_D为4.9nM;对于结构域Z为3.4nM;对于结构域B为3.1nM;以及对于结构域C为2.8nM。

[0155] 实施例7. Ig结合蛋白以高亲和力结合IgG (通过表面等离子共振实验确定)

[0156] 用SPR电泳缓冲液平衡CM5传感芯片 (GE Healthcare)。使表面暴露的羧基通过EDC和NHS的混合物而得以活化,得到活性酯基。将700-1500RU的on-配体 (on-ligand) 固定在流动池上,将off-配体 (off-ligand) 固定在另一个流动池上。配体固定后注射乙醇胺除去非共价结合的Ig结合蛋白。基于配体结合,蛋白质分析物积聚在表面上,增加了折射率。对折射率的这种变化进行实时测量并绘制为响应值或共振单位 (RU) 对时间的关系图。在连续稀释中将分析物以合适的流速 (μl/min) 施加到芯片上。每次运行后,用再生缓冲液再生芯片表面并用电泳缓冲液平衡。将对照样品应用于基质。如前所述进行再生和再平衡。通过使用Biacore® 3000 (GE Healthcare) 在25℃进行结合研究;通过制造商提供的BIAevaluation3.0软件,使用Langmuir1:1模型 (RI=0) 进行数据评估。针对脱靶,标准化经评估的解离常数 (K_D), 并且表2中示出了对于人IgG₁-Fc、西妥昔单抗 (IgG₁)、那他珠单抗 (IgG₄) 或帕尼单抗 (Panitumomab) (IgG₂) 的不同人工对碱稳定的Ig结合蛋白的K_D值。

[0157] 表2. Ig结合蛋白对于Ig的K_D值

[0158]	SEQ ID NO:	Ig 结合蛋白	IgG1(nM)	IgG4(nM)	IgG2(nM)
	20	cs14	2.9	2.51	7.42
[0159]	30	cs27	3.64	2.54	21.6
	26	cs25	4.24	3.27	11.6
	45	cs47h4	4.1	3.11	25.2
	44	cs47h3	4.78	4.05	20.3
	43	cs74h2	3.48	2.72	17.2
	42	cs74h1	1.64	1.2	12.8

[0160] 实施例8. 与环氧活化基质偶联的Ig结合蛋白的对碱稳定性

[0161] 根据制造商的说明书将纯化的Ig结合蛋白与环氧活化基质 (Sephacrose6B, GE; Cat.No.17-0480-01) 偶联 (偶联条件:pH9.0过夜,用乙醇胺封闭5小时)。西妥昔单抗用作IgG样品 (5mg;1mg/ml基质)。将西妥昔单抗以饱和量施用于包含固定化的Ig结合蛋白的基质。用pH2.5的100mM甘氨酸缓冲液清洗基质以洗脱与固定的IgG结合蛋白结合的西妥昔单抗。通过BLI (用蛋白A Octet-传感器和西妥昔单抗作为标准进行定量) 测量洗脱的IgG的浓度,以确定Ig结合蛋白的结合活性。将柱用0.5M NaOH在室温 (22℃+/-3℃) 下培养6小时。在用0.5M NaOH培养6小时之前和之后分析固定化蛋白质的Ig结合活性。在NaOH处理之前固定化蛋白质的Ig结合活性被定义为100%。

[0162] 图2示出了IB14 (SEQ ID NO:14) 的点突变变异体的对碱稳定性分析。将IB14的位置1、11、35,及42中的点突变进行连续0.5M NaOH处理6小时后,Ig结合剩余活性 (以%表示) 与亲本IB14比较。

[0163] 取代P1I、S11E、S11I、S11A、K35I、K35R或K42L将Ig结合活性提高至少约25%。

[0164] 图3显示,与亲本蛋白质IB14 (SEQ ID NO:14) 的活性相比,例如,在位置1、11、28、35和/或42中具有3、4或5个取代的组合的变异体蛋白质的活性更高。与IB14相比,在0.5M NaOH培养6小时后,Ig结合蛋白cs14-1 (SEQ ID NO:18) 显示约至少50%、cs14-2 (SEQ ID NO:19) 显示约至少70%、cs14-3 (SEQ ID NO:20) 显示约至少80%的更高Ig结合活性。

[0165] 图4显示,与亲本蛋白IB327的活性相比,在位置1、11、35和/或42中具有3、4或5个取代的组合的变异体Ig结合蛋白的活性更高。与亲本蛋白相比,在0.5M NaOH培养6小时后,cs27-1 (SEQ ID NO:29) 显示约至少30%以及cs27-2 (SEQ ID NO:30) 显示约至少40%的更高Ig结合活性。

[0166] 图5显示,与亲本蛋白的活性相比,具有1I、11A、35R,及42L的组合的变异体Ig结合蛋白的活性更高,此处示出的是IB14 (其他亲本蛋白与IB14相当;数据未显示)。与IB14相比,在0.5M NaOH培养6小时后,Ig结合蛋白cs74h1 (SEQ ID NO:42)、cs74h2 (SEQ ID NO:43)、cs47h3 (SEQ ID NO:44)、cs47h4 (SEQ ID NO:45),及cs25 (SEQ ID NO:26) 显示出明显更高的Ig结合活性。

- [0001] 序列表
- [0002] <110> 纳维格蛋白质有限公司(Navigo Proteins GmbH)
- [0003] <120> 新型对碱稳定的免疫球蛋白结合蛋白
- [0004] <130> PW101239
- [0005] <160> 55
- [0006] <170> PatentIn version 3.5
- [0007] <210> 1
- [0008] <211> 58
- [0009] <212> PRT
- [0010] <213> 人工序列
- [0011] <220>
- [0012] <223> 通用序列1
- [0013] <220>
- [0014] <221> 变异体
- [0015] <222> (1) .. (1)
- [0016] <223> 可以用V, N, Q或P代替
- [0017] <220>
- [0018] <221> 变异体
- [0019] <222> (2) .. (2)
- [0020] <223> 可以用D或Q代替
- [0021] <220>
- [0022] <221> 变异体
- [0023] <222> (3) .. (3)
- [0024] <223> 可以用N或S代替
- [0025] <220>
- [0026] <221> 变异体
- [0027] <222> (4) .. (4)
- [0028] <223> 可以用 N代替
- [0029] <220>
- [0030] <221> 变异体
- [0031] <222> (5) .. (5)
- [0032] <223> 可以用F代替
- [0033] <220>
- [0034] <221> 变异体
- [0035] <222> (6) .. (6)
- [0036] <223> 可以用N, A或S代替
- [0037] <220>
- [0038] <221> 变异体

[0039]	<222> (7) .. (7)
[0040]	<223> 可以用E代替
[0041]	<220>
[0042]	<221> 变异体
[0043]	<222> (8) .. (8)
[0044]	<223> 可以用E或A代替
[0045]	<220>
[0046]	<221> 变异体
[0047]	<222> (11) .. (11)
[0048]	<223> 可以用N代替
[0049]	<220>
[0050]	<221> 变异体
[0051]	<222> (15) .. (15)
[0052]	<223> 可以用Q代替
[0053]	<220>
[0054]	<221> 变异体
[0055]	<222> (16) .. (16)
[0056]	<223> 可以用V代替
[0057]	<220>
[0058]	<221> 变异体
[0059]	<222> (18) .. (18)
[0060]	<223> 可以用N代替
[0061]	<220>
[0062]	<221> 变异体
[0063]	<222> (19) .. (19)
[0064]	<223> 可以用M代替
[0065]	<220>
[0066]	<221> 变异体
[0067]	<222> (21) .. (21)
[0068]	<223> 可以用S或D代替
[0069]	<220>
[0070]	<221> 变异体
[0071]	<222> (23) .. (23)
[0072]	<223> 可以用N代替
[0073]	<220>
[0074]	<221> 变异体
[0075]	<222> (24) .. (24)
[0076]	<223> 可以用A代替
[0077]	<220>

[0078]	<221> 变异体
[0079]	<222> (25) .. (25)
[0080]	<223> 可以用E
[0081]	<220>
[0082]	<221> 变异体
[0083]	<222> (28) .. (28)
[0084]	<223> 可以用S或A代替
[0085]	<220>
[0086]	<221> 变异体
[0087]	<222> (29) .. (29)
[0088]	<223> 可以用G代替
[0089]	<220>
[0090]	<221> 变异体
[0091]	<222> (40) .. (40)
[0092]	<223> 可以用Q或T代替
[0093]	<220>
[0094]	<221> 变异体
[0095]	<222> (42) .. (42)
[0096]	<223> 可以用A或T代替
[0097]	<220>
[0098]	<221> 变异体
[0099]	<222> (43) .. (43)
[0100]	<223> 可以用N或S代替
[0101]	<220>
[0102]	<221> 变异体
[0103]	<222> (44) .. (44)
[0104]	<223> 可以用V或L代替
[0105]	<220>
[0106]	<221> 变异体
[0107]	<222> (46) .. (46)
[0108]	<223> 可以用A代替
[0109]	<220>
[0110]	<221> 变异体
[0111]	<222> (49) .. (49)
[0112]	<223> 可以用Q代替
[0113]	<220>
[0114]	<221> 变异体
[0115]	<222> (52) .. (52)
[0116]	<223> 可以用D或S代替

[0156]	<220>
[0157]	<221> 变异体
[0158]	<222> (8) .. (8)
[0159]	<223> 可以用E或A代替
[0160]	<220>
[0161]	<221> 变异体
[0162]	<222> (11) .. (11)
[0163]	<223> 可以用N代替
[0164]	<220>
[0165]	<221> 变异体
[0166]	<222> (25) .. (25)
[0167]	<223> 可以用E代替
[0168]	<220>
[0169]	<221> 变异体
[0170]	<222> (28) .. (28)
[0171]	<223> 可以用S代替
[0172]	<220>
[0173]	<221> 变异体
[0174]	<222> (44) .. (44)
[0175]	<223> 可以用V代替
[0176]	<220>
[0177]	<221> 变异体
[0178]	<222> (46) .. (46)
[0179]	<223> 可以用A代替
[0180]	<220>
[0181]	<221> 变异体
[0182]	<222> (49) .. (49)
[0183]	<223> 可以用Q代替
[0184]	<220>
[0185]	<221> 变异体
[0186]	<222> (54) .. (54)
[0187]	<223> 可以用S代替
[0188]	<220>
[0189]	<221> 变异体
[0190]	<222> (58) .. (58)
[0191]	<223> 可以用K代替
[0192]	<400> 2
[0193]	Ala Ala Ala Lys His Asp Lys Asp Gln Gln Ser Ala Phe Tyr Glu Ile
[0194]	1 5 10 15

[0195]	Leu His Leu Pro Asn Leu Thr Glu Asp Gln Arg Asn Ala Phe Ile Gln
[0196]	20 25 30
[0197]	Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser Val Ser Lys Glu Ile Leu Gly Glu Ala
[0198]	35 40 45
[0199]	Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Pro
[0200]	50 55
[0201]	<210> 3
[0202]	<211> 58
[0203]	<212> PRT
[0204]	<213> 人工序列
[0205]	<220>
[0206]	<223> 亲本蛋白IB14 1A/28N (IB14a)
[0207]	<400> 3
[0208]	Ala Ala Ala Lys His Asp Lys Asp Gln Gln Ser Ala Phe Tyr Glu Ile
[0209]	1 5 10 15
[0210]	Leu His Leu Pro Asn Leu Thr Glu Asp Gln Arg Asn Ala Phe Ile Gln
[0211]	20 25 30
[0212]	Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser Val Ser Lys Glu Ile Leu Gly Glu Ala
[0213]	35 40 45
[0214]	Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Pro
[0215]	50 55
[0216]	<210> 4
[0217]	<211> 58
[0218]	<212> PRT
[0219]	<213> 人工序列
[0220]	<220>
[0221]	<223> 亲本蛋白IB27 1A
[0222]	<400> 4
[0223]	Ala Ala Ala Lys Phe Asp Glu Ala Gln Gln Ser Ala Phe Tyr Glu Ile
[0224]	1 5 10 15
[0225]	Leu His Leu Pro Asn Leu Thr Glu Glu Gln Arg Asn Ala Phe Ile Gln
[0226]	20 25 30
[0227]	Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser Val Ser Lys Glu Val Leu Gly Glu Ala
[0228]	35 40 45
[0229]	Gln Lys Leu Asn Asp Ser Gln Ala Pro Lys
[0230]	50 55
[0231]	<210> 5
[0232]	<211> 58
[0233]	<212> PRT

[0234]	<213>	人工序列
[0235]	<220>	
[0236]	<223>	结构域C
[0237]	<400>	5
[0238]	Ala Asp Asn Lys Phe Asn Lys Glu Gln Gln Asn Ala Phe Tyr Glu Ile	
[0239]	1	5 10 15
[0240]	Leu His Leu Pro Asn Leu Thr Glu Glu Gln Arg Asn Gly Phe Ile Gln	
[0241]		20 25 30
[0242]	Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser Val Ser Lys Glu Ile Leu Ala Glu Ala	
[0243]		35 40 45
[0244]	Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys	
[0245]		50 55
[0246]	<210>	6
[0247]	<211>	58
[0248]	<212>	PRT
[0249]	<213>	人工序列
[0250]	<220>	
[0251]	<223>	结构域B
[0252]	<400>	6
[0253]	Ala Asp Asn Lys Phe Asn Lys Glu Gln Gln Asn Ala Phe Tyr Glu Ile	
[0254]	1	5 10 15
[0255]	Leu His Leu Pro Asn Leu Asn Glu Glu Gln Arg Asn Gly Phe Ile Gln	
[0256]		20 25 30
[0257]	Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ala Asn Leu Leu Ala Glu Ala	
[0258]		35 40 45
[0259]	Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys	
[0260]		50 55
[0261]	<210>	7
[0262]	<211>	58
[0263]	<212>	PRT
[0264]	<213>	人工序列
[0265]	<220>	
[0266]	<223>	结构域Z
[0267]	<400>	7
[0268]	Val Asp Asn Lys Phe Asn Lys Glu Gln Gln Asn Ala Phe Tyr Glu Ile	
[0269]	1	5 10 15
[0270]	Leu His Leu Pro Asn Leu Asn Glu Glu Gln Arg Asn Ala Phe Ile Gln	
[0271]		20 25 30
[0272]	Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ala Asn Leu Leu Ala Glu Ala	

[0273]	35	40	45
[0274]	Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys		
[0275]	50	55	
[0276]	<210> 8		
[0277]	<211> 58		
[0278]	<212> PRT		
[0279]	<213> 人工序列		
[0280]	<220>		
[0281]	<223> 结构域Z/2		
[0282]	<400> 8		
[0283]	Val Asp Ala Lys Phe Asp Lys Glu Gln Gln Asn Ala Phe Tyr Glu Ile		
[0284]	1	5	10 15
[0285]	Leu His Leu Pro Asn Leu Thr Glu Glu Gln Arg Asn Ala Phe Ile Gln		
[0286]	20	25	30
[0287]	Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ala Asn Leu Leu Ala Glu Ala		
[0288]	35	40	45
[0289]	Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys		
[0290]	50	55	
[0291]	<210> 9		
[0292]	<211> 58		
[0293]	<212> PRT		
[0294]	<213> 人工序列		
[0295]	<220>		
[0296]	<223> IB14 1I		
[0297]	<400> 9		
[0298]	Ile Ala Ala Lys His Asp Lys Asp Gln Gln Ser Ala Phe Tyr Glu Ile		
[0299]	1	5	10 15
[0300]	Leu His Leu Pro Asn Leu Thr Glu Asp Gln Arg Ser Ala Phe Ile Gln		
[0301]	20	25	30
[0302]	Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser Val Ser Lys Glu Ile Leu Gly Glu Ala		
[0303]	35	40	45
[0304]	Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Pro		
[0305]	50	55	
[0306]	<210> 10		
[0307]	<211> 58		
[0308]	<212> PRT		
[0309]	<213> 人工序列		
[0310]	<220>		
[0311]	<223> IB14 1A/28S (IB14b)		

[0312]	<400> 10
[0313]	Ala Ala Ala Lys His Asp Lys Asp Gln Gln Ser Ala Phe Tyr Glu Ile
[0314]	1 5 10 15
[0315]	Leu His Leu Pro Asn Leu Thr Glu Asp Gln Arg Ser Ala Phe Ile Gln
[0316]	20 25 30
[0317]	Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser Val Ser Lys Glu Ile Leu Gly Glu Ala
[0318]	35 40 45
[0319]	Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Pro
[0320]	50 55
[0321]	<210> 11
[0322]	<211> 58
[0323]	<212> PRT
[0324]	<213> 人工序列
[0325]	<220>
[0326]	<223> IB14 11A
[0327]	<400> 11
[0328]	Pro Ala Ala Lys His Asp Lys Asp Gln Gln Ala Ala Phe Tyr Glu Ile
[0329]	1 5 10 15
[0330]	Leu His Leu Pro Asn Leu Thr Glu Asp Gln Arg Ser Ala Phe Ile Gln
[0331]	20 25 30
[0332]	Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser Val Ser Lys Glu Ile Leu Gly Glu Ala
[0333]	35 40 45
[0334]	Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Pro
[0335]	50 55
[0336]	<210> 12
[0337]	<211> 58
[0338]	<212> PRT
[0339]	<213> 人工序列
[0340]	<220>
[0341]	<223> IB14 11E
[0342]	<400> 12
[0343]	Pro Ala Ala Lys His Asp Lys Asp Gln Gln Glu Ala Phe Tyr Glu Ile
[0344]	1 5 10 15
[0345]	Leu His Leu Pro Asn Leu Thr Glu Asp Gln Arg Ser Ala Phe Ile Gln
[0346]	20 25 30
[0347]	Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser Val Ser Lys Glu Ile Leu Gly Glu Ala
[0348]	35 40 45
[0349]	Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Pro
[0350]	50 55

[0351] <210> 13
[0352] <211> 58
[0353] <212> PRT
[0354] <213> 人工序列
[0355] <220>
[0356] <223> IB14 11I
[0357] <400> 13
[0358] Pro Ala Ala Lys His Asp Lys Asp Gln Gln Ile Ala Phe Tyr Glu Ile
[0359] 1 5 10 15
[0360] Leu His Leu Pro Asn Leu Thr Glu Asp Gln Arg Ser Ala Phe Ile Gln
[0361] 20 25 30
[0362] Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser Val Ser Lys Glu Ile Leu Gly Glu Ala
[0363] 35 40 45
[0364] Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Pro
[0365] 50 55
[0366] <210> 14
[0367] <211> 58
[0368] <212> PRT
[0369] <213> 人工序列
[0370] <220>
[0371] <223> IB14 1P 28S (IB14d)
[0372] <400> 14
[0373] Pro Ala Ala Lys His Asp Lys Asp Gln Gln Ser Ala Phe Tyr Glu Ile
[0374] 1 5 10 15
[0375] Leu His Leu Pro Asn Leu Thr Glu Asp Gln Arg Ser Ala Phe Ile Gln
[0376] 20 25 30
[0377] Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser Val Ser Lys Glu Ile Leu Gly Glu Ala
[0378] 35 40 45
[0379] Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Pro
[0380] 50 55
[0381] <210> 15
[0382] <211> 58
[0383] <212> PRT
[0384] <213> 人工序列
[0385] <220>
[0386] <223> IB14 35R
[0387] <400> 15
[0388] Pro Ala Ala Lys His Asp Lys Asp Gln Gln Ser Ala Phe Tyr Glu Ile
[0389] 1 5 10 15

[0390]	Leu His Leu Pro Asn Leu Thr Glu Asp Gln Arg Ser Ala Phe Ile Gln
[0391]	20 25 30
[0392]	Ser Leu Arg Asp Asp Pro Ser Val Ser Lys Glu Ile Leu Gly Glu Ala
[0393]	35 40 45
[0394]	Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Pro
[0395]	50 55
[0396]	<210> 16
[0397]	<211> 58
[0398]	<212> PRT
[0399]	<213> 人工序列
[0400]	<220>
[0401]	<223> IB14 35I
[0402]	<400> 16
[0403]	Pro Ala Ala Lys His Asp Lys Asp Gln Gln Ser Ala Phe Tyr Glu Ile
[0404]	1 5 10 15
[0405]	Leu His Leu Pro Asn Leu Thr Glu Asp Gln Arg Ser Ala Phe Ile Gln
[0406]	20 25 30
[0407]	Ser Leu Ile Asp Asp Pro Ser Val Ser Lys Glu Ile Leu Gly Glu Ala
[0408]	35 40 45
[0409]	Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Pro
[0410]	50 55
[0411]	<210> 17
[0412]	<211> 58
[0413]	<212> PRT
[0414]	<213> 人工序列
[0415]	<220>
[0416]	<223> IB14 42L
[0417]	<400> 17
[0418]	Pro Ala Ala Lys His Asp Lys Asp Gln Gln Ser Ala Phe Tyr Glu Ile
[0419]	1 5 10 15
[0420]	Leu His Leu Pro Asn Leu Thr Glu Asp Gln Arg Ser Ala Phe Ile Gln
[0421]	20 25 30
[0422]	Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser Val Ser Leu Glu Ile Leu Gly Glu Ala
[0423]	35 40 45
[0424]	Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Pro
[0425]	50 55
[0426]	<210> 18
[0427]	<211> 58
[0428]	<212> PRT

[0429]	<213>	人工序列
[0430]	<220>	
[0431]	<223>	对碱稳定的Ig结合结构域cs14-1 (IB14 1I/11A/35R)
[0432]	<400>	18
[0433]	Ile Ala Ala Lys His Asp Lys Asp Gln Gln Ala Ala Phe Tyr Glu Ile	
[0434]	1 5 10 15	
[0435]	Leu His Leu Pro Asn Leu Thr Glu Asp Gln Arg Ser Ala Phe Ile Gln	
[0436]	20 25 30	
[0437]	Ser Leu Arg Asp Asp Pro Ser Val Ser Lys Glu Ile Leu Gly Glu Ala	
[0438]	35 40 45	
[0439]	Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Pro	
[0440]	50 55	
[0441]	<210>	19
[0442]	<211>	58
[0443]	<212>	PRT
[0444]	<213>	人工序列
[0445]	<220>	
[0446]	<223>	对碱稳定的Ig结合结构域cs14-2 (IB14 1I/11A/35R/42L)
[0447]	<400>	19
[0448]	Ile Ala Ala Lys His Asp Lys Asp Gln Gln Ala Ala Phe Tyr Glu Ile	
[0449]	1 5 10 15	
[0450]	Leu His Leu Pro Asn Leu Thr Glu Asp Gln Arg Ser Ala Phe Ile Gln	
[0451]	20 25 30	
[0452]	Ser Leu Arg Asp Asp Pro Ser Val Ser Leu Glu Ile Leu Gly Glu Ala	
[0453]	35 40 45	
[0454]	Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Pro	
[0455]	50 55	
[0456]	<210>	20
[0457]	<211>	58
[0458]	<212>	PRT
[0459]	<213>	人工序列
[0460]	<220>	
[0461]	<223>	对碱稳定的Ig结合结构域cs14-3 1I/11A/28N/35R/42L
[0462]	<400>	20
[0463]	Ile Ala Ala Lys His Asp Lys Asp Gln Gln Ala Ala Phe Tyr Glu Ile	
[0464]	1 5 10 15	
[0465]	Leu His Leu Pro Asn Leu Thr Glu Asp Gln Arg Asn Ala Phe Ile Gln	
[0466]	20 25 30	
[0467]	Ser Leu Arg Asp Asp Pro Ser Val Ser Leu Glu Ile Leu Gly Glu Ala	

[0468]	35	40	45
[0469]	Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Pro		
[0470]	50	55	
[0471]	<210> 21		
[0472]	<211> 58		
[0473]	<212> PRT		
[0474]	<213> 人工序列		
[0475]	<220>		
[0476]	<223> IB14 1P/28N (IB14c)		
[0477]	<400> 21		
[0478]	Pro Ala Ala Lys His Asp Lys Asp Gln Gln Ser Ala Phe Tyr Glu Ile		
[0479]	1 5 10 15		
[0480]	Leu His Leu Pro Asn Leu Thr Glu Asp Gln Arg Asn Ala Phe Ile Gln		
[0481]	20 25 30		
[0482]	Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser Val Ser Lys Glu Ile Leu Gly Glu Ala		
[0483]	35 40 45		
[0484]	Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Pro		
[0485]	50 55		
[0486]	<210> 22		
[0487]	<211> 58		
[0488]	<212> PRT		
[0489]	<213> 人工序列		
[0490]	<220>		
[0491]	<223> IB27 1N		
[0492]	<400> 22		
[0493]	Asn Ala Ala Lys Phe Asp Glu Ala Gln Gln Ser Ala Phe Tyr Glu Ile		
[0494]	1 5 10 15		
[0495]	Leu His Leu Pro Asn Leu Thr Glu Glu Gln Arg Asn Ala Phe Ile Gln		
[0496]	20 25 30		
[0497]	Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser Val Ser Lys Glu Val Leu Gly Glu Ala		
[0498]	35 40 45		
[0499]	Gln Lys Leu Asn Asp Ser Gln Ala Pro Lys		
[0500]	50 55		
[0501]	<210> 23		
[0502]	<211> 53		
[0503]	<212> PRT		
[0504]	<213> 人工序列		
[0505]	<220>		
[0506]	<223> cs27 delNC		

[0507]	<400> 23
[0508]	Lys Phe Asp Glu Ala Gln Gln Ala Ala Phe Tyr Glu Ile Leu His Leu
[0509]	1 5 10 15
[0510]	Pro Asn Leu Thr Glu Glu Gln Arg Asn Ala Phe Ile Gln Ser Leu Arg
[0511]	20 25 30
[0512]	Asp Asp Pro Ser Val Ser Leu Glu Val Leu Gly Glu Ala Gln Lys Leu
[0513]	35 40 45
[0514]	Asn Asp Ser Gln Ala
[0515]	50
[0516]	<210> 24
[0517]	<211> 55
[0518]	<212> PRT
[0519]	<213> 人工序列
[0520]	<220>
[0521]	<223> cs27 delN
[0522]	<400> 24
[0523]	Ala Phe Asp Glu Ala Gln Gln Ala Ala Phe Tyr Glu Ile Leu His Leu
[0524]	1 5 10 15
[0525]	Pro Asn Leu Thr Glu Glu Gln Arg Asn Ala Phe Ile Gln Ser Leu Arg
[0526]	20 25 30
[0527]	Asp Asp Pro Ser Val Ser Leu Glu Val Leu Gly Glu Ala Gln Lys Leu
[0528]	35 40 45
[0529]	Asn Asp Ser Gln Ala Pro Lys
[0530]	50 55
[0531]	<210> 25
[0532]	<211> 58
[0533]	<212> PRT
[0534]	<213> 人工序列
[0535]	<220>
[0536]	<223> 亲本蛋白IB25 1A
[0537]	<400> 25
[0538]	Ala Ala Ala Lys His Asp Lys Asp Gln Gln Ser Ala Phe Tyr Glu Ile
[0539]	1 5 10 15
[0540]	Leu His Leu Pro Asn Leu Thr Glu Asp Gln Arg Asn Ala Phe Ile Gln
[0541]	20 25 30
[0542]	Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser Val Ser Lys Glu Ile Leu Ala Glu Ala
[0543]	35 40 45
[0544]	Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys
[0545]	50 55

[0546]	<210>	26
[0547]	<211>	58
[0548]	<212>	PRT
[0549]	<213>	人工序列
[0550]	<220>	
[0551]	<223>	对碱稳定的Ig结合结构域cs25 (IB25 1I/11A/35R/42L)
[0552]	<400>	26
[0553]	Ile Ala Ala Lys His Asp Lys Asp Gln Gln Ala Ala Phe Tyr Glu Ile	
[0554]	1	5 10 15
[0555]	Leu His Leu Pro Asn Leu Thr Glu Asp Gln Arg Asn Ala Phe Ile Gln	
[0556]	20	25 30
[0557]	Ser Leu Arg Asp Asp Pro Ser Val Ser Leu Glu Ile Leu Ala Glu Ala	
[0558]	35	40 45
[0559]	Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys	
[0560]	50	55
[0561]	<210>	27
[0562]	<211>	318
[0563]	<212>	PRT
[0564]	<213>	人工序列
[0565]	<220>	
[0566]	<223>	cs17 delNC六聚体
[0567]	<400>	27
[0568]	Lys Phe Asp Glu Ala Gln Gln Ala Ala Phe Tyr Glu Ile Leu His Leu	
[0569]	1	5 10 15
[0570]	Pro Asn Leu Thr Glu Glu Gln Arg Asn Ala Phe Ile Gln Ser Leu Arg	
[0571]	20	25 30
[0572]	Asp Asp Pro Ser Val Ser Leu Glu Val Leu Gly Glu Ala Gln Lys Leu	
[0573]	35	40 45
[0574]	Asn Asp Ser Gln Ala Lys Phe Asp Glu Ala Gln Gln Ala Ala Phe Tyr	
[0575]	50	55 60
[0576]	Glu Ile Leu His Leu Pro Asn Leu Thr Glu Glu Gln Arg Asn Ala Phe	
[0577]	65	70 75 80
[0578]	Ile Gln Ser Leu Arg Asp Asp Pro Ser Val Ser Leu Glu Val Leu Gly	
[0579]	85	90 95
[0580]	Glu Ala Gln Lys Leu Asn Asp Ser Gln Ala Lys Phe Asp Glu Ala Gln	
[0581]	100	105 110
[0582]	Gln Ala Ala Phe Tyr Glu Ile Leu His Leu Pro Asn Leu Thr Glu Glu	
[0583]	115	120 125
[0584]	Gln Arg Asn Ala Phe Ile Gln Ser Leu Arg Asp Asp Pro Ser Val Ser	

[0585]	130	135	140
[0586]	Leu Glu Val Leu Gly Glu Ala Gln Lys Leu Asn Asp Ser Gln Ala Lys		
[0587]	145	150	155
[0588]	Phe Asp Glu Ala Gln Gln Ala Ala Phe Tyr Glu Ile Leu His Leu Pro		
[0589]	165	170	175
[0590]	Asn Leu Thr Glu Glu Gln Arg Asn Ala Phe Ile Gln Ser Leu Arg Asp		
[0591]	180	185	190
[0592]	Asp Pro Ser Val Ser Leu Glu Val Leu Gly Glu Ala Gln Lys Leu Asn		
[0593]	195	200	205
[0594]	Asp Ser Gln Ala Lys Phe Asp Glu Ala Gln Gln Ala Ala Phe Tyr Glu		
[0595]	210	215	220
[0596]	Ile Leu His Leu Pro Asn Leu Thr Glu Glu Gln Arg Asn Ala Phe Ile		
[0597]	225	230	235
[0598]	Gln Ser Leu Arg Asp Asp Pro Ser Val Ser Leu Glu Val Leu Gly Glu		
[0599]	245	250	255
[0600]	Ala Gln Lys Leu Asn Asp Ser Gln Ala Lys Phe Asp Glu Ala Gln Gln		
[0601]	260	265	270
[0602]	Ala Ala Phe Tyr Glu Ile Leu His Leu Pro Asn Leu Thr Glu Glu Gln		
[0603]	275	280	285
[0604]	Arg Asn Ala Phe Ile Gln Ser Leu Arg Asp Asp Pro Ser Val Ser Leu		
[0605]	290	295	300
[0606]	Glu Val Leu Gly Glu Ala Gln Lys Leu Asn Asp Ser Gln Ala		
[0607]	305	310	315
[0608]	<210> 28		
[0609]	<211> 290		
[0610]	<212> PRT		
[0611]	<213> 人工序列		
[0612]	<220>		
[0613]	<223> cs27五聚体		
[0614]	<400> 28		
[0615]	Ile Ala Ala Lys Phe Asp Glu Ala Gln Gln Ala Ala Phe Tyr Glu Ile		
[0616]	1	5	10
[0617]	Leu His Leu Pro Asn Leu Thr Glu Glu Gln Arg Asn Ala Phe Ile Gln		
[0618]	20	25	30
[0619]	Ser Leu Arg Asp Asp Pro Ser Val Ser Leu Glu Val Leu Gly Glu Ala		
[0620]	35	40	45
[0621]	Gln Lys Leu Asn Asp Ser Gln Ala Pro Lys Ile Ala Ala Lys Phe Asp		
[0622]	50	55	60
[0623]	Glu Ala Gln Gln Ala Ala Phe Tyr Glu Ile Leu His Leu Pro Asn Leu		

[0624]	65	70	75	80
[0625]	Thr Glu Glu Gln Arg Asn Ala Phe Ile Gln Ser Leu Arg Asp Asp Pro			
[0626]		85	90	95
[0627]	Ser Val Ser Leu Glu Val Leu Gly Glu Ala Gln Lys Leu Asn Asp Ser			
[0628]		100	105	110
[0629]	Gln Ala Pro Lys Ile Ala Ala Lys Phe Asp Glu Ala Gln Gln Ala Ala			
[0630]		115	120	125
[0631]	Phe Tyr Glu Ile Leu His Leu Pro Asn Leu Thr Glu Glu Gln Arg Asn			
[0632]		130	135	140
[0633]	Ala Phe Ile Gln Ser Leu Arg Asp Asp Pro Ser Val Ser Leu Glu Val			
[0634]	145	150	155	160
[0635]	Leu Gly Glu Ala Gln Lys Leu Asn Asp Ser Gln Ala Pro Lys Ile Ala			
[0636]		165	170	175
[0637]	Ala Lys Phe Asp Glu Ala Gln Gln Ala Ala Phe Tyr Glu Ile Leu His			
[0638]		180	185	190
[0639]	Leu Pro Asn Leu Thr Glu Glu Gln Arg Asn Ala Phe Ile Gln Ser Leu			
[0640]		195	200	205
[0641]	Arg Asp Asp Pro Ser Val Ser Leu Glu Val Leu Gly Glu Ala Gln Lys			
[0642]		210	215	220
[0643]	Leu Asn Asp Ser Gln Ala Pro Lys Ile Ala Ala Lys Phe Asp Glu Ala			
[0644]	225	230	235	240
[0645]	Gln Gln Ala Ala Phe Tyr Glu Ile Leu His Leu Pro Asn Leu Thr Glu			
[0646]		245	250	255
[0647]	Glu Gln Arg Asn Ala Phe Ile Gln Ser Leu Arg Asp Asp Pro Ser Val			
[0648]		260	265	270
[0649]	Ser Leu Glu Val Leu Gly Glu Ala Gln Lys Leu Asn Asp Ser Gln Ala			
[0650]		275	280	285
[0651]	Pro Lys			
[0652]	290			
[0653]	<210> 29			
[0654]	<211> 58			
[0655]	<212> PRT			
[0656]	<213> 人工序列			
[0657]	<220>			
[0658]	<223> 对碱稳定的Ig结合结构域cs27-1 (IB27 1I/11A/35R)			
[0659]	<400> 29			
[0660]	Ile Ala Ala Lys Phe Asp Glu Ala Gln Gln Ala Ala Phe Tyr Glu Ile			
[0661]	1	5	10	15
[0662]	Leu His Leu Pro Asn Leu Thr Glu Glu Gln Arg Asn Ala Phe Ile Gln			

[0663]	20	25	30
[0664]	Ser Leu Arg Asp Asp Pro Ser Val Ser Lys Glu Val Leu Gly Glu Ala		
[0665]	35	40	45
[0666]	Gln Lys Leu Asn Asp Ser Gln Ala Pro Lys		
[0667]	50	55	
[0668]	<210> 30		
[0669]	<211> 58		
[0670]	<212> PRT		
[0671]	<213> 人工序列		
[0672]	<220>		
[0673]	<223> 对碱稳定的Ig结合结构域cs27-2 (IB27 I/11A/35R/42L)		
[0674]	<400> 30		
[0675]	Ile Ala Ala Lys Phe Asp Glu Ala Gln Gln Ala Ala Phe Tyr Glu Ile		
[0676]	1	5	10
[0677]	Leu His Leu Pro Asn Leu Thr Glu Glu Gln Arg Asn Ala Phe Ile Gln		
[0678]	20	25	30
[0679]	Ser Leu Arg Asp Asp Pro Ser Val Ser Leu Glu Val Leu Gly Glu Ala		
[0680]	35	40	45
[0681]	Gln Lys Leu Asn Asp Ser Gln Ala Pro Lys		
[0682]	50	55	
[0683]	<210> 31		
[0684]	<211> 58		
[0685]	<212> PRT		
[0686]	<213> 人工序列		
[0687]	<220>		
[0688]	<223> 对碱稳定的Ig结合结构域C 1I/11A/35R		
[0689]	<400> 31		
[0690]	Ile Asp Asn Lys Phe Asn Lys Glu Gln Gln Ala Ala Phe Tyr Glu Ile		
[0691]	1	5	10
[0692]	Leu His Leu Pro Asn Leu Thr Glu Glu Gln Arg Asn Gly Phe Ile Gln		
[0693]	20	25	30
[0694]	Ser Leu Arg Asp Asp Pro Ser Val Ser Lys Glu Ile Leu Ala Glu Ala		
[0695]	35	40	45
[0696]	Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys		
[0697]	50	55	
[0698]	<210> 32		
[0699]	<211> 58		
[0700]	<212> PRT		
[0701]	<213> 人工序列		

[0702]	<220>
[0703]	<223> 对碱稳定的Ig结合结构域C 1I/11A/35R/42L
[0704]	<400> 32
[0705]	Ile Asp Asn Lys Phe Asn Lys Glu Gln Gln Ala Ala Phe Tyr Glu Ile
[0706]	1 5 10 15
[0707]	Leu His Leu Pro Asn Leu Thr Glu Glu Gln Arg Asn Gly Phe Ile Gln
[0708]	20 25 30
[0709]	Ser Leu Arg Asp Asp Pro Ser Val Ser Leu Glu Ile Leu Ala Glu Ala
[0710]	35 40 45
[0711]	Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys
[0712]	50 55
[0713]	<210> 33
[0714]	<211> 58
[0715]	<212> PRT
[0716]	<213> 人工序列
[0717]	<220>
[0718]	<223> 对碱稳定的Ig结合结构域B 1I/11A/35R
[0719]	<400> 33
[0720]	Ile Asp Asn Lys Phe Asn Lys Glu Gln Gln Ala Ala Phe Tyr Glu Ile
[0721]	1 5 10 15
[0722]	Leu His Leu Pro Asn Leu Asn Glu Glu Gln Arg Asn Gly Phe Ile Gln
[0723]	20 25 30
[0724]	Ser Leu Arg Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ala Asn Leu Leu Ala Glu Ala
[0725]	35 40 45
[0726]	Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys
[0727]	50 55
[0728]	<210> 34
[0729]	<211> 58
[0730]	<212> PRT
[0731]	<213> 人工序列
[0732]	<220>
[0733]	<223> 对碱稳定的Ig结合结构域B 1I/11A/35R/42L
[0734]	<400> 34
[0735]	Ile Asp Asn Lys Phe Asn Lys Glu Gln Gln Ala Ala Phe Tyr Glu Ile
[0736]	1 5 10 15
[0737]	Leu His Leu Pro Asn Leu Asn Glu Glu Gln Arg Asn Gly Phe Ile Gln
[0738]	20 25 30
[0739]	Ser Leu Arg Asp Asp Pro Ser Gln Ser Leu Asn Leu Leu Ala Glu Ala
[0740]	35 40 45

[0741]	Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys
[0742]	50 55
[0743]	<210> 35
[0744]	<211> 58
[0745]	<212> PRT
[0746]	<213> 人工序列
[0747]	<220>
[0748]	<223> 对碱稳定的Ig结合结构域 Z 1I/11A/35R
[0749]	<400> 35
[0750]	Ile Asp Asn Lys Phe Asn Lys Glu Gln Gln Ala Ala Phe Tyr Glu Ile
[0751]	1 5 10 15
[0752]	Leu His Leu Pro Asn Leu Asn Glu Glu Gln Arg Asn Ala Phe Ile Gln
[0753]	20 25 30
[0754]	Ser Leu Arg Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ala Asn Leu Leu Ala Glu Ala
[0755]	35 40 45
[0756]	Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys
[0757]	50 55
[0758]	<210> 36
[0759]	<211> 58
[0760]	<212> PRT
[0761]	<213> 人工序列
[0762]	<220>
[0763]	<223> 对碱稳定的Ig结合结构域 Z 1I/11A/35R/42L
[0764]	<400> 36
[0765]	Ile Asp Asn Lys Phe Asn Lys Glu Gln Gln Ala Ala Phe Tyr Glu Ile
[0766]	1 5 10 15
[0767]	Leu His Leu Pro Asn Leu Asn Glu Glu Gln Arg Asn Ala Phe Ile Gln
[0768]	20 25 30
[0769]	Ser Leu Arg Asp Asp Pro Ser Gln Ser Leu Asn Leu Leu Ala Glu Ala
[0770]	35 40 45
[0771]	Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys
[0772]	50 55
[0773]	<210> 37
[0774]	<211> 58
[0775]	<212> PRT
[0776]	<213> 人工序列
[0777]	<220>
[0778]	<223> 对碱稳定的Ig结合结构域结构域Z/2 1I/11A/35R
[0779]	<400> 37

[0780]	Ile Asp Ala Lys Phe Asp Lys Glu Gln Gln Ala Ala Phe Tyr Glu Ile
[0781]	1 5 10 15
[0782]	Leu His Leu Pro Asn Leu Thr Glu Glu Gln Arg Asn Ala Phe Ile Gln
[0783]	20 25 30
[0784]	Ser Leu Arg Asp Asp Pro Ser Gln Ser Leu Ala Leu Leu Ala Glu Ala
[0785]	35 40 45
[0786]	Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys
[0787]	50 55
[0788]	<210> 38
[0789]	<211> 58
[0790]	<212> PRT
[0791]	<213> 人工序列
[0792]	<220>
[0793]	<223> 对碱稳定的Ig结合结构域Z/2 1I/11A/35R/42L
[0794]	<400> 38
[0795]	Ile Asp Ala Lys Phe Asp Lys Glu Gln Gln Ala Ala Phe Tyr Glu Ile
[0796]	1 5 10 15
[0797]	Leu His Leu Pro Asn Leu Thr Glu Glu Gln Arg Asn Ala Phe Ile Gln
[0798]	20 25 30
[0799]	Ser Leu Arg Asp Asp Pro Ser Gln Ser Leu Asn Leu Leu Ala Glu Ala
[0800]	35 40 45
[0801]	Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys
[0802]	50 55
[0803]	<210> 39
[0804]	<211> 79
[0805]	<212> PRT
[0806]	<213> 人工序列
[0807]	<220>
[0808]	<223> 具有连接序列和strep tag的对碱稳定的Ig结合结构域cs14-3
[0809]	<400> 39
[0810]	Ile Ala Ala Lys His Asp Lys Asp Gln Gln Ala Ala Phe Tyr Glu Ile
[0811]	1 5 10 15
[0812]	Leu His Leu Pro Asn Leu Thr Glu Asp Gln Arg Asn Ala Phe Ile Gln
[0813]	20 25 30
[0814]	Ser Leu Arg Asp Asp Pro Ser Val Ser Leu Glu Ile Leu Gly Glu Ala
[0815]	35 40 45
[0816]	Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Pro Ala Ser Pro Ala Pro Ser
[0817]	50 55 60
[0818]	Ala Pro Ser Ala Cys Ala Ser Trp Ser His Pro Gln Phe Glu Lys

[0819]	65	70	75
[0820]	<210> 40		
[0821]	<211> 79		
[0822]	<212> PRT		
[0823]	<213> 人工序列		
[0824]	<220>		
[0825]	<223> 具有连接序列和strep tag的对碱稳定的Ig结合结构域cs27-2		
[0826]	<400> 40		
[0827]	Ile Ala Ala Lys Phe Asp Glu Ala Gln Gln Ala Ala Phe Tyr Glu Ile		
[0828]	1	5	10 15
[0829]	Leu His Leu Pro Asn Leu Thr Glu Glu Gln Arg Asn Ala Phe Ile Gln		
[0830]	20	25	30
[0831]	Ser Leu Arg Asp Asp Pro Ser Val Ser Leu Glu Val Leu Gly Glu Ala		
[0832]	35	40	45
[0833]	Gln Lys Leu Asn Asp Ser Gln Ala Pro Lys Ala Ser Pro Ala Pro Ser		
[0834]	50	55	60
[0835]	Ala Pro Ser Ala Cys Ala Ser Trp Ser His Pro Gln Phe Glu Lys		
[0836]	65	70	75
[0837]	<210> 41		
[0838]	<211> 13		
[0839]	<212> PRT		
[0840]	<213> 人工序列		
[0841]	<220>		
[0842]	<223> 连接序列		
[0843]	<400> 41		
[0844]	Ala Ser Pro Ala Pro Ser Ala Pro Ser Ala Cys Ala Ser		
[0845]	1	5	10
[0846]	<210> 42		
[0847]	<211> 58		
[0848]	<212> PRT		
[0849]	<213> 人工序列		
[0850]	<220>		
[0851]	<223> 对碱稳定的Ig结合结构域cs74h1		
[0852]	<400> 42		
[0853]	Ile Ala Ala Lys Phe Asp Glu Ala Gln Gln Ala Ala Phe Tyr Glu Ile		
[0854]	1	5	10 15
[0855]	Leu His Leu Pro Asn Leu Thr Glu Asp Gln Arg Asn Ala Phe Ile Gln		
[0856]	20	25	30
[0857]	Ser Leu Arg Asp Asp Pro Ser Val Ser Leu Glu Ile Leu Gly Glu Ala		

[0858]	35	40	45
[0859]	Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Pro		
[0860]	50	55	
[0861]	<210> 43		
[0862]	<211> 58		
[0863]	<212> PRT		
[0864]	<213> 人工序列		
[0865]	<220>		
[0866]	<223> 对碱稳定的Ig结合结构域cs74h2		
[0867]	<400> 43		
[0868]	Ile Ala Ala Lys Phe Asp Glu Ala Gln Gln Ala Ala Phe Tyr Glu Ile		
[0869]	1 5 10 15		
[0870]	Leu His Leu Pro Asn Leu Thr Glu Glu Gln Arg Asn Ala Phe Ile Gln		
[0871]	20 25 30		
[0872]	Ser Leu Arg Asp Asp Pro Ser Val Ser Leu Glu Ile Leu Gly Glu Ala		
[0873]	35 40 45		
[0874]	Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Pro		
[0875]	50 55		
[0876]	<210> 44		
[0877]	<211> 58		
[0878]	<212> PRT		
[0879]	<213> 人工序列		
[0880]	<220>		
[0881]	<223> 对碱稳定的Ig结合结构域cs47h3		
[0882]	<400> 44		
[0883]	Ile Ala Ala Lys His Asp Lys Asp Gln Gln Ala Ala Phe Tyr Glu Ile		
[0884]	1 5 10 15		
[0885]	Leu His Leu Pro Asn Leu Thr Glu Asp Gln Arg Asn Ala Phe Ile Gln		
[0886]	20 25 30		
[0887]	Ser Leu Arg Asp Asp Pro Ser Val Ser Leu Glu Val Leu Gly Glu Ala		
[0888]	35 40 45		
[0889]	Gln Lys Leu Asn Asp Ser Gln Ala Pro Lys		
[0890]	50 55		
[0891]	<210> 45		
[0892]	<211> 58		
[0893]	<212> PRT		
[0894]	<213> 人工序列		
[0895]	<220>		
[0896]	<223> 对碱稳定的Ig结合结构域cs47h4		

[0897] <400> 45
 [0898] Ile Ala Ala Lys His Asp Lys Asp Gln Gln Ala Ala Phe Tyr Glu Ile
 [0899] 1 5 10 15
 [0900] Leu His Leu Pro Asn Leu Thr Glu Glu Gln Arg Asn Ala Phe Ile Gln
 [0901] 20 25 30
 [0902] Ser Leu Arg Asp Asp Pro Ser Val Ser Leu Glu Val Leu Gly Glu Ala
 [0903] 35 40 45
 [0904] Gln Lys Leu Asn Asp Ser Gln Ala Pro Lys
 [0905] 50 55
 [0906] <210> 46
 [0907] <211> 8
 [0908] <212> PRT
 [0909] <213> 人工序列
 [0910] <220>
 [0911] <223> StrepTag
 [0912] <400> 46
 [0913] Trp Ser His Pro Gln Phe Glu Lys
 [0914] 1 5
 [0915] <210> 47
 [0916] <211> 58
 [0917] <212> PRT
 [0918] <213> 人工序列
 [0919] <220>
 [0920] <223> 亲本蛋白IB74h1
 [0921] <400> 47
 [0922] Ala Ala Ala Lys Phe Asp Glu Ala Gln Gln Ser Ala Phe Tyr Glu Ile
 [0923] 1 5 10 15
 [0924] Leu His Leu Pro Asn Leu Thr Glu Asp Gln Arg Asn Ala Phe Ile Gln
 [0925] 20 25 30
 [0926] Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser Val Ser Lys Glu Ile Leu Gly Glu Ala
 [0927] 35 40 45
 [0928] Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Pro
 [0929] 50 55
 [0930] <210> 48
 [0931] <211> 58
 [0932] <212> PRT
 [0933] <213> 人工序列
 [0934] <220>
 [0935] <223> 亲本蛋白IB74h2

[0936]	<400> 48
[0937]	Ala Ala Ala Lys Phe Asp Glu Ala Gln Gln Ser Ala Phe Tyr Glu Ile
[0938]	1 5 10 15
[0939]	Leu His Leu Pro Asn Leu Thr Glu Glu Gln Arg Asn Ala Phe Ile Gln
[0940]	20 25 30
[0941]	Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser Val Ser Lys Glu Ile Leu Gly Glu Ala
[0942]	35 40 45
[0943]	Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Pro
[0944]	50 55
[0945]	<210> 49
[0946]	<211> 58
[0947]	<212> PRT
[0948]	<213> 人工序列
[0949]	<220>
[0950]	<223> 亲本蛋白IB47h3
[0951]	<400> 49
[0952]	Ala Ala Ala Lys His Asp Lys Asp Gln Gln Ser Ala Phe Tyr Glu Ile
[0953]	1 5 10 15
[0954]	Leu His Leu Pro Asn Leu Thr Glu Asp Gln Arg Asn Ala Phe Ile Gln
[0955]	20 25 30
[0956]	Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser Val Ser Lys Glu Val Leu Gly Glu Ala
[0957]	35 40 45
[0958]	Gln Lys Leu Asn Asp Ser Gln Ala Pro Lys
[0959]	50 55
[0960]	<210> 50
[0961]	<211> 58
[0962]	<212> PRT
[0963]	<213> 人工序列
[0964]	<220>
[0965]	<223> 亲本蛋白IB47h4
[0966]	<400> 50
[0967]	Ala Ala Ala Lys His Asp Lys Asp Gln Gln Ser Ala Phe Tyr Glu Ile
[0968]	1 5 10 15
[0969]	Leu His Leu Pro Asn Leu Thr Glu Glu Gln Arg Asn Ala Phe Ile Gln
[0970]	20 25 30
[0971]	Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser Val Ser Lys Glu Val Leu Gly Glu Ala
[0972]	35 40 45
[0973]	Gln Lys Leu Asn Asp Ser Gln Ala Pro Lys
[0974]	50 55

[0975]	<210> 51
[0976]	<211> 58
[0977]	<212> PRT
[0978]	<213> 人工序列
[0979]	<220>
[0980]	<223> 包括IB14和IB27的通用序列
[0981]	<220>
[0982]	<221> 变异体
[0983]	<222> (1) .. (1)
[0984]	<223> 可以用N或P代替
[0985]	<220>
[0986]	<221> 变异体
[0987]	<222> (5) .. (5)
[0988]	<223> 可以用F代替
[0989]	<220>
[0990]	<221> 变异体
[0991]	<222> (7) .. (7)
[0992]	<223> 可以用E代替
[0993]	<220>
[0994]	<221> 变异体
[0995]	<222> (8) .. (8)
[0996]	<223> 可以用A代替
[0997]	<220>
[0998]	<221> 变异体
[0999]	<222> (25) .. (25)
[1000]	<223> 可以用E代替
[1001]	<220>
[1002]	<221> 变异体
[1003]	<222> (28) .. (28)
[1004]	<223> 可以用S代替
[1005]	<220>
[1006]	<221> 变异体
[1007]	<222> (44) .. (44)
[1008]	<223> 可以用V代替
[1009]	<220>
[1010]	<221> 变异体
[1011]	<222> (49) .. (49)
[1012]	<223> 可以用Q代替
[1013]	<220>

- [1014] <221> 变异体
- [1015] <222> (54) .. (54)
- [1016] <223> 可以用S代替
- [1017] <220>
- [1018] <221> 变异体
- [1019] <222> (58) .. (58)
- [1020] <223> 可以用K代替
- [1021] <400> 51
- [1022] Ala Ala Ala Lys His Asp Lys Asp Gln Gln Ser Ala Phe Tyr Glu Ile
- [1023] 1 5 10 15
- [1024] Leu His Leu Pro Asn Leu Thr Glu Asp Gln Arg Asn Ala Phe Ile Gln
- [1025] 20 25 30
- [1026] Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser Val Ser Lys Glu Ile Leu Gly Glu Ala
- [1027] 35 40 45
- [1028] Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Pro
- [1029] 50 55
- [1030] <210> 52
- [1031] <211> 58
- [1032] <212> PRT
- [1033] <213> 人工序列
- [1034] <220>
- [1035] <223> 优选对碱稳定的人工Ig结合蛋白的通用序列
- [1036] <220>
- [1037] <221> 变异体
- [1038] <222> (5) .. (5)
- [1039] <223> 可以用F代替
- [1040] <220>
- [1041] <221> 变异体
- [1042] <222> (7) .. (7)
- [1043] <223> 可以用E代替
- [1044] <220>
- [1045] <221> 变异体
- [1046] <222> (8) .. (8)
- [1047] <223> 可以用A或E代替
- [1048] <220>
- [1049] <221> 变异体
- [1050] <222> (25) .. (25)
- [1051] <223> 可以用E代替
- [1052] <220>

[1053]	<221>	变异体															
[1054]	<222>	(28) .. (28)															
[1055]	<223>	可以用S代替															
[1056]	<220>																
[1057]	<221>	变异体															
[1058]	<222>	(42) .. (42)															
[1059]	<223>	可以用L代替															
[1060]	<220>																
[1061]	<221>	变异体															
[1062]	<222>	(44) .. (44)															
[1063]	<223>	可以用V代替															
[1064]	<220>																
[1065]	<221>	变异体															
[1066]	<222>	(46) .. (46)															
[1067]	<223>	可以用A代替															
[1068]	<220>																
[1069]	<221>	变异体															
[1070]	<222>	(49) .. (49)															
[1071]	<223>	可以用Q代替															
[1072]	<220>																
[1073]	<221>	变异体															
[1074]	<222>	(54) .. (54)															
[1075]	<223>	可以用S代替															
[1076]	<220>																
[1077]	<221>	变异体															
[1078]	<222>	(58) .. (58)															
[1079]	<223>	可以用K代替															
[1080]	<400>	52															
[1081]	Ile Ala Ala Lys His Asp Lys Asp Gln Gln Ala Ala Phe Tyr Glu Ile																
[1082]	1			5					10							15	
[1083]	Leu His Leu Pro Asn Leu Thr Glu Asp Gln Arg Asn Ala Phe Ile Gln																
[1084]				20					25							30	
[1085]	Ser Leu Arg Asp Asp Pro Ser Val Ser Lys Glu Ile Leu Gly Glu Ala																
[1086]				35					40							45	
[1087]	Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Pro																
[1088]				50					55								
[1089]	<210>	53															
[1090]	<211>	58															
[1091]	<212>	PRT															

[1092]	<213>	人工序列
[1093]	<220>	
[1094]	<223>	cs27 46C
[1095]	<400>	53
[1096]	Ile Ala Ala Lys Phe Asp Glu Ala Gln Gln Ala Ala Phe Tyr Glu Ile	
[1097]	1 5 10 15	
[1098]	Leu His Leu Pro Asn Leu Thr Glu Glu Gln Arg Asn Ala Phe Ile Gln	
[1099]	20 25 30	
[1100]	Ser Leu Arg Asp Asp Pro Ser Val Ser Leu Glu Val Leu Cys Glu Ala	
[1101]	35 40 45	
[1102]	Gln Lys Leu Asn Asp Ser Gln Ala Pro Lys	
[1103]	50 55	
[1104]	<210>	54
[1105]	<211>	58
[1106]	<212>	PRT
[1107]	<213>	人工序列
[1108]	<220>	
[1109]	<223>	cs14 43C
[1110]	<400>	54
[1111]	Ile Ala Ala Lys His Asp Lys Asp Gln Gln Ala Ala Phe Tyr Glu Ile	
[1112]	1 5 10 15	
[1113]	Leu His Leu Pro Asn Leu Thr Glu Asp Gln Arg Asn Ala Phe Ile Gln	
[1114]	20 25 30	
[1115]	Ser Leu Arg Asp Asp Pro Ser Val Ser Leu Cys Ile Leu Gly Glu Ala	
[1116]	35 40 45	
[1117]	Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Pro	
[1118]	50 55	
[1119]	<210>	55
[1120]	<211>	174
[1121]	<212>	PRT
[1122]	<213>	人工序列
[1123]	<220>	
[1124]	<223>	cs27四聚体
[1125]	<400>	55
[1126]	Ile Ala Ala Lys Phe Asp Glu Ala Gln Gln Ala Ala Phe Tyr Glu Ile	
[1127]	1 5 10 15	
[1128]	Leu His Leu Pro Asn Leu Thr Glu Glu Gln Arg Asn Ala Phe Ile Gln	
[1129]	20 25 30	
[1130]	Ser Leu Arg Asp Asp Pro Ser Val Ser Leu Glu Val Leu Gly Glu Ala	

[1131]	35	40	45
[1132]	Gln Lys Leu Asn Asp Ser Gln Ala Pro Lys Ile Ala Ala Lys Phe Asp		
[1133]	50	55	60
[1134]	Glu Ala Gln Gln Ala Ala Phe Tyr Glu Ile Leu His Leu Pro Asn Leu		
[1135]	65	70	75
[1136]	Thr Glu Glu Gln Arg Asn Ala Phe Ile Gln Ser Leu Arg Asp Asp Pro		
[1137]	85	90	95
[1138]	Ser Val Ser Leu Glu Val Leu Gly Glu Ala Gln Lys Leu Asn Asp Ser		
[1139]	100	105	110
[1140]	Gln Ala Pro Lys Ile Ala Ala Lys Phe Asp Glu Ala Gln Gln Ala Ala		
[1141]	115	120	125
[1142]	Phe Tyr Glu Ile Leu His Leu Pro Asn Leu Thr Glu Glu Gln Arg Asn		
[1143]	130	135	140
[1144]	Ala Phe Ile Gln Ser Leu Arg Asp Asp Pro Ser Val Ser Leu Glu Val		
[1145]	145	150	155
[1146]	Leu Gly Glu Ala Gln Lys Leu Asn Asp Ser Gln Ala Pro Lys		
[1147]	165	170	

图 1. 对碱稳定的 Ig 结合蛋白
优选的对碱稳定的 Ig 结合蛋白

	1	2	3	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	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	
cs14-1	A	A	K	H	D	K	D	K	D	Q	Q	A	A	F	Y	E	I	L	H	L	P	N	L	T	E	D	Q	R	N	A	F	I	Q	S	L	R	D	D	P	S	V	S	K	E	I	L	G	E	A	K	K	L	N	D	A	Q	A	P	P
cs14-2	A	A	K	H	D	K	D	K	D	Q	Q	A	A	F	Y	E	I	L	H	L	P	N	L	T	E	D	Q	R	N	A	F	I	Q	S	L	R	D	D	P	S	V	S	K	E	I	L	G	E	A	K	K	L	N	D	A	Q	A	P	P
cs14-4	A	A	K	H	D	K	D	K	D	Q	Q	A	A	F	Y	E	I	L	H	L	P	N	L	T	E	D	Q	R	N	A	F	I	Q	S	L	R	D	D	P	S	V	S	K	E	I	L	G	E	A	K	K	L	N	D	A	Q	A	P	P
cs14-3	A	A	K	H	D	K	D	K	D	Q	Q	A	A	F	Y	E	I	L	H	L	P	N	L	T	E	D	Q	R	N	A	F	I	Q	S	L	R	D	D	P	S	V	S	K	E	I	L	G	E	A	K	K	L	N	D	A	Q	A	P	P
cs25-1	A	A	K	H	D	K	D	K	D	Q	Q	A	A	F	Y	E	I	L	H	L	P	N	L	T	E	D	Q	R	N	A	F	I	Q	S	L	R	D	D	P	S	V	S	K	E	I	L	A	E	A	K	K	L	N	D	A	Q	A	P	K
cs25-2	A	A	K	H	D	K	D	K	D	Q	Q	A	A	F	Y	E	I	L	H	L	P	N	L	T	E	D	Q	R	N	A	F	I	Q	S	L	R	D	D	P	S	V	S	K	E	I	L	A	E	A	K	K	L	N	D	A	Q	A	P	K
cs74h1-1	A	A	K	F	D	E	A	Q	Q	A	A	F	Y	E	I	L	H	L	P	N	L	T	E	D	Q	R	N	A	F	I	Q	S	L	R	D	D	P	S	V	S	K	E	I	L	G	E	A	K	K	L	N	D	A	Q	A	P	P		
cs74h1-2	A	A	K	F	D	E	A	Q	Q	A	A	F	Y	E	I	L	H	L	P	N	L	T	E	D	Q	R	N	A	F	I	Q	S	L	R	D	D	P	S	V	S	K	E	I	L	G	E	A	K	K	L	N	D	A	Q	A	P	P		
cs74h2-1	A	A	K	F	D	E	A	Q	Q	A	A	F	Y	E	I	L	H	L	P	N	L	T	E	E	Q	R	N	A	F	I	Q	S	L	R	D	D	P	S	V	S	K	E	I	L	G	E	A	K	K	L	N	D	A	Q	A	P	P		
cs74h2-2	A	A	K	F	D	E	A	Q	Q	A	A	F	Y	E	I	L	H	L	P	N	L	T	E	E	Q	R	N	A	F	I	Q	S	L	R	D	D	P	S	V	S	K	E	I	L	G	E	A	K	K	L	N	D	A	Q	A	P	P		
cs47h3-1	A	A	K	H	D	K	D	K	D	Q	Q	A	A	F	Y	E	I	L	H	L	P	N	L	T	E	D	Q	R	N	A	F	I	Q	S	L	R	D	D	P	S	V	S	K	E	V	L	G	E	A	Q	K	L	N	D	S	Q	A	P	K
cs47h3-2	A	A	K	H	D	K	D	K	D	Q	Q	A	A	F	Y	E	I	L	H	L	P	N	L	T	E	D	Q	R	N	A	F	I	Q	S	L	R	D	D	P	S	V	S	K	E	V	L	G	E	A	Q	K	L	N	D	S	Q	A	P	K
cs47h4-1	A	A	K	H	D	K	D	K	D	Q	Q	A	A	F	Y	E	I	L	H	L	P	N	L	T	E	E	Q	R	N	A	F	I	Q	S	L	R	D	D	P	S	V	S	K	E	V	L	G	E	A	Q	K	L	N	D	S	Q	A	P	K
cs47h4-2	A	A	K	H	D	K	D	K	D	Q	Q	A	A	F	Y	E	I	L	H	L	P	N	L	T	E	E	Q	R	N	A	F	I	Q	S	L	R	D	D	P	S	V	S	K	E	V	L	G	E	A	Q	K	L	N	D	S	Q	A	P	K
cs27-1	A	A	K	F	D	E	A	Q	Q	A	A	F	Y	E	I	L	H	L	P	N	L	T	E	E	Q	R	N	A	F	I	Q	S	L	R	D	D	P	S	V	S	K	E	V	L	G	E	A	Q	K	L	N	D	S	Q	A	P	K		
cs27-2	A	A	K	F	D	E	A	Q	Q	A	A	F	Y	E	I	L	H	L	P	N	L	T	E	E	Q	R	N	A	F	I	Q	S	L	R	D	D	P	S	V	S	K	E	V	L	G	E	A	Q	K	L	N	D	S	Q	A	P	K		

图1A

优选的对碱稳定的人工 Ig 结合蛋白的通用序列

1	2	3	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	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58															
I	A	A	K	X	D	X	X	Q	Q	A	A	F	Y	E	I	L	H	L	P	N	L	T	E	X	Q	R	X	A	F	I	Q	S	L	R	D	D	P	S	V	S	X	E	X	L	X	E	A	X	K	L	N	D	X	Q	A	P	X															
				F		E	A																E		N														L	V	G		Q			S				K			A			P																
			H		K	D																	D		S																																															
						E																																																																		

图1B

IB14 变异体的对碱稳定性

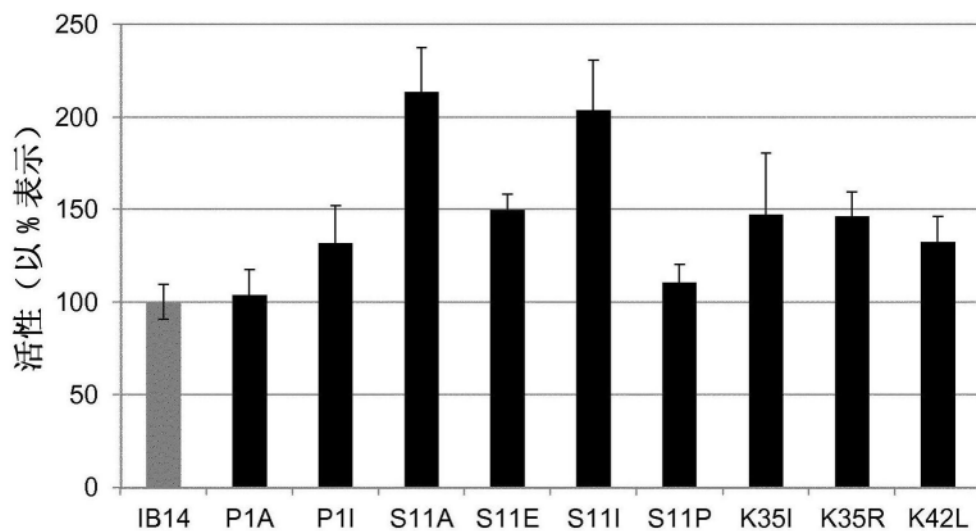


图2

具有至少 1I、11A、35R 的 cs14

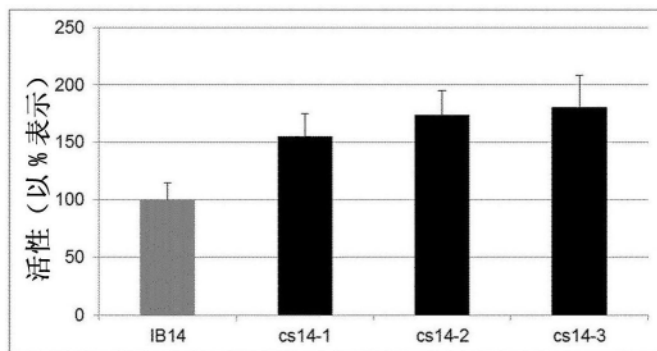


图3

具有至少 1I、11A、35R 的 cs27

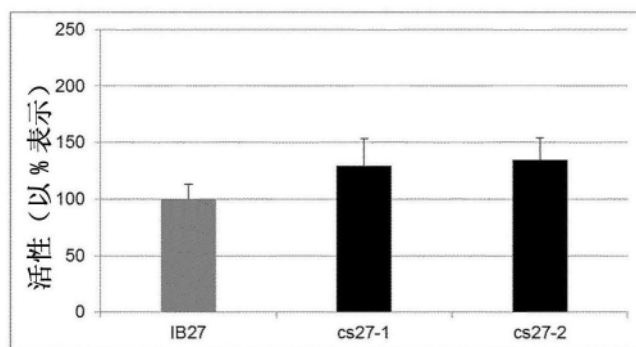


图4

cs14、cs25、cs74 及 cs47 的 Ig 结合

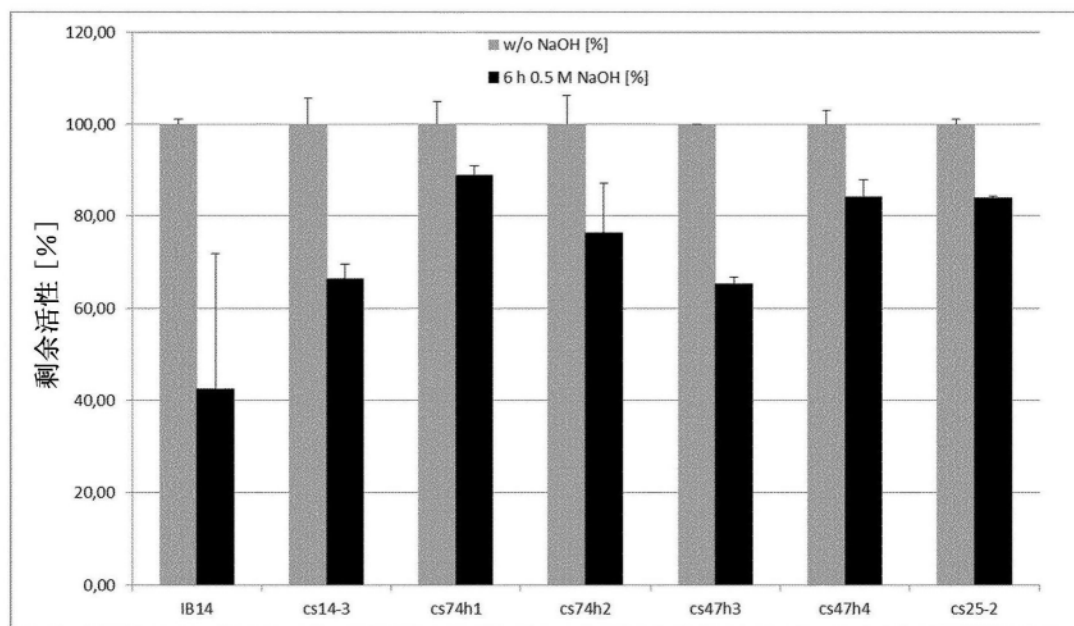


图5