



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104710518 A

(43) 申请公布日 2015. 06. 17

(21) 申请号 201510071238. 8

C12N 15/62(2006. 01)

(22) 申请日 2008. 07. 17

A61K 47/48(2006. 01)

(30) 优先权数据

07113533. 9 2007. 07. 31 EP

60/962, 618 2007. 07. 31 US

(62) 分案原申请数据

200880101168. 4 2008. 07. 17

(71) 申请人 阿菲博迪公司

地址 瑞典布鲁玛

(72) 发明人 L·阿布拉姆森 A·荣森 J·多甘

P-A·尼格伦

(74) 专利代理机构 北京安信方达知识产权代理

有限公司 11262

代理人 高瑜 郑霞

(51) Int. Cl.

C07K 14/315(2006. 01)

C07K 14/31(2006. 01)

C07K 19/00(2006. 01)

C12N 15/31(2006. 01)

权利要求书4页 说明书29页 附图35页

(54) 发明名称

新白蛋白结合组合物、方法及应用

(57) 摘要

本发明涉及一类具有白蛋白结合亲和性的工程化多肽。还涉及新的方法及应用,其在不同背景中采用这些及其它化合物与白蛋白的结合,其中一些具有治疗哺乳动物包括人类的疾病的显著性。

MGSSHHHHHLQVD

ABD 变体

1. 包含白蛋白结合基序的白蛋白结合多肽,所述基序由如下氨基酸序列组成:

GVSDX₅YKX₈X₉I X₁₁X₁₂AX₁₄TVEGVX₂₀ALX₂₃X₂₄X₂₅I

其中各自独立地,

X₅选自 Y 和 F;

X₈选自 N, R 和 S;

X₉选自 V, I, L, M, F 和 Y;

X₁₁选自 N, S, E 和 D;

X₁₂选自 R, K 和 N;

X₁₄选自 K 和 R;

X₂₀选自 D, N, Q, E, H, S, R 和 K;

X₂₃选自 K, I 和 T;

X₂₄选自 A, S, T, G, H, L 和 D;和

X₂₅选自 H, E 和 D;

条件是所述氨基酸序列不是

GVSDYYKNLI NNAKTVEGVK ALIDEI;

所述白蛋白结合多肽结合白蛋白,从而相互作用的 K_d值最大为 1x10⁻⁹M。

2. 权利要求 1 的白蛋白结合多肽其中 X₅是 Y。

3. 前述任一项权利要求的白蛋白结合多肽,其中 X₈选自 N 和 R。

4. 权利要求 3 的白蛋白结合多肽,其中 X₈是 R。

5. 前述任一项权利要求的白蛋白结合多肽,其中 X₉是 L。

6. 前述任一项权利要求的白蛋白结合多肽,其中 X₁₁选自 N 和 S。

7. 权利要求 6 的白蛋白结合多肽,其中 X₁₁是 N。

8. 前述任一项权利要求的白蛋白结合多肽,其中 X₁₂选自 R 和 K。

9. 权利要求 8 的白蛋白结合多肽,其中 X₁₂是 R。

10. 权利要求 8 的白蛋白结合多肽,其中 X₁₂是 K。

11. 前述任一项权利要求的白蛋白结合多肽,其中 X₁₄是 K。

12. 前述任一项权利要求的白蛋白结合多肽,其中 X₂₀选自 D, N, Q, E, H, R 和 S。

13. 权利要求 12 的白蛋白结合多肽,其中 X₂₀是 E。

14. 前述任一项权利要求的白蛋白结合多肽,其中 X₂₃选自 K 和 I。

15. 权利要求 14 的白蛋白结合多肽,其中 X₂₃是 K。

16. 前述任一项权利要求的白蛋白结合多肽,其中 X₂₄选自 A, S, T, G, H 和 L。

17. 权利要求 16 的白蛋白结合多肽,其中 X₂₄是 L。

18. 权利要求 17 的白蛋白结合多肽,其中 X₂₃X₂₄是 KL。

19. 权利要求 17 的白蛋白结合多肽,其中 X₂₃X₂₄是 TL。

20. 权利要求 16 的白蛋白结合多肽,其中 X₂₄选自 A, S, T, G 和 H。

21. 权利要求 20 的白蛋白结合多肽,其中 X₂₃是 I。

22. 前述任一项权利要求的白蛋白结合多肽,其中 X₂₅是 H。

23. 前述任一项权利要求的白蛋白结合多肽,其中所述白蛋白结合基序由选自 SEQ ID NO:1-257 的氨基酸序列组成。

24. 权利要求 23 的白蛋白结合多肽,其中所述白蛋白结合基序由选自 SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:15, SEQ ID NO:25, SEQ ID NO:27, SEQ ID NO:46, SEQ ID NO:49, SEQ ID NO:53, SEQ ID NO:54, SEQ ID NO:55, SEQ ID NO:155, SEQ ID NO:239, SEQ ID NO:240, SEQ ID NO:241, SEQ ID NO:242, SEQ ID NO:243, SEQ ID NO:244 和 SEQ ID NO:245 的氨基酸序列组成。

25. 权利要求 24 的白蛋白结合多肽,其中所述白蛋白结合基序由选自 SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:53 和 SEQ ID NO:239 的氨基酸序列组成。

26. 前述任一项权利要求的白蛋白结合多肽,其中所述白蛋白结合基序形成三螺旋束蛋白结构域的一部分。

27. 权利要求 26 的白蛋白结合多肽,其中所述三螺旋束蛋白结构域选自由细菌受体蛋白的三螺旋结构域组成的组。

28. 权利要求 27 的白蛋白结合多肽,其中所述细菌受体蛋白选自由来自链球菌 (Streptococcus)、消化链球菌 (Peptostreptococcus) 和 Finegoldia 的物种的白蛋白结合受体蛋白组成的组。

29. 权利要求 28 的白蛋白结合多肽,其中所述白蛋白结合受体蛋白选自由 G ;MAG ; ZAG ;PPL ;和 PAB 组成的组。

30. 权利要求 29 的白蛋白结合多肽,其中所述白蛋白结合受体蛋白是蛋白 G。

31. 权利要求 30 的白蛋白结合多肽,其中所述白蛋白结合受体蛋白是来自链球菌菌株 G148 的蛋白 G。

32. 权利要求 31 的白蛋白结合多肽,其中所述三螺旋束蛋白结构域选自由来自链球菌菌株 G148 的蛋白 G 的结构域 GA1、结构域 GA2 和结构域 GA3 组成的组。

33. 权利要求 32 的白蛋白结合多肽,其中所述三螺旋束蛋白结构域是来自链球菌菌株 G148 的蛋白 G 的结构域 GA3。

34. 权利要求 27 的白蛋白结合多肽,其中所述细菌受体蛋白是来自金黄色葡萄球菌的蛋白 A。

35. 权利要求 34 的白蛋白结合多肽,其中所述三螺旋束蛋白结构域选自蛋白 A 结构域 A、B、C、D 和 E 组成的组。

36. 权利要求 34 的白蛋白结合多肽,其中所述三螺旋束蛋白结构域是源自来自金黄色葡萄球菌的蛋白 A 的结构域 B 的蛋白 Z。

37. 权利要求 26 的白蛋白结合多肽,其包含氨基酸序列:

LAEAKX_aX_bAX_cX_d ELX_eKY-[ABM]-LAALP

其中

[ABM] 是权利要求 1-25 任一项定义的白蛋白结合基序,

以及,各自独立地,

X_a选自 V 和 E ;

X_b选自 L, E 和 D ;

X_c选自 N, L 和 I ;

X_d选自 R 和 K ;及

X_e选自 D 和 K。

38. 权利要求 37 的白蛋白结合多肽, 其中 X_a 是 V。
39. 权利要求 37-38 任一项的白蛋白结合多肽, 其中 X_b 是 L。
40. 权利要求 37-39 任一项的白蛋白结合多肽, 其中 X_c 是 N。
41. 权利要求 37-40 任一项的白蛋白结合多肽, 其中 X_d 是 R。
42. 权利要求 37-41 任一项的白蛋白结合多肽, 其中 X_e 是 D。
43. 白蛋白结合多肽, 其氨基酸序列包含满足选自如下的一种定义的序列:
- i) 其选自 SEQ ID NO:258-514;
- ii) 其是与选自 SEQ ID NO:258-514 的序列有 85% 或更高相同性的氨基酸序列。
44. 权利要求 43 的白蛋白结合多肽, 其氨基酸序列包含满足选自如下的一种定义的序列:
- iii) 其选自 SEQ ID NO:259, SEQ ID NO:260, SEQ ID NO:266, SEQ ID NO:272, SEQ ID NO:282, SEQ ID NO:284, SEQ ID NO:303, SEQ ID NO:306, SEQ ID NO:310, SEQ ID NO:311, SEQ ID NO:312, SEQ ID NO:412, SEQ ID NO:496, SEQ ID NO:497, SEQ ID NO:498, SEQ ID NO:499, SEQ ID NO:500, SEQ ID NO:501 和 SEQ ID NO:502;
- iv) 其是与 iii) 的序列有 85% 或更高相同性的氨基酸序列。
45. 权利要求 44 的白蛋白结合多肽, 其氨基酸序列包含满足选自如下的一种定义的序列:
- v) 其选自 SEQ ID NO:260, SEQ ID NO:310 和 SEQ ID NO:496;
- vi) 其是与 v) 的序列有 85% 或更高相同性的氨基酸序列。
46. 前述任一项权利要求的白蛋白结合多肽, 其结合白蛋白, 从而相互作用的 K_D 值最大为 $1 \times 10^{-10} M$ 。
47. 权利要求 46 的白蛋白结合多肽, 其结合白蛋白, 从而相互作用的 K_D 值最大为 $1 \times 10^{-11} M$ 。
48. 权利要求 47 的白蛋白结合多肽, 其结合白蛋白, 从而相互作用的 K_D 值最大为 $1 \times 10^{-12} M$ 。
49. 前述任一项权利要求的白蛋白结合多肽, 其结合人血清白蛋白。
50. 前述任一项权利要求的白蛋白结合多肽, 进一步包含位于白蛋白结合基序一侧或两侧的一或多个额外氨基酸。
51. 权利要求 50 的白蛋白结合多肽, 其中所述额外氨基酸增强白蛋白被多肽的结合。
52. 权利要求 50 的白蛋白结合多肽, 其中所述额外氨基酸改良选自生产、纯化、体内或体外稳定化、多肽的偶联或检测及其任意组合的特征。
53. 前述任一项权利要求的白蛋白结合多肽的片段, 所述片段基本上保留白蛋白结合。
54. 权利要求 53 的片段, 相应于 N- 末端截短的权利要求 1-52 任一项的白蛋白结合多肽。
55. 权利要求 54 的片段, 其中 N- 末端截短是 1-3 个氨基酸截短。
56. 前述任一项权利要求的白蛋白结合多肽或其片段的多聚体, 包含至少二个白蛋白结合多肽或其片段作为单体单位。
57. 权利要求 56 的多聚体, 其中单体单位的氨基酸序列相同。
58. 权利要求 56 的多聚体, 其中单体单位的氨基酸序列不同。

59. 融合蛋白或缀合物, 包含

- i) 第一部分, 由前述任一项权利要求的白蛋白结合多肽、片段或多聚体组成; 及
- ii) 第二部分, 由具有希望的生物学活性的多肽组成。

60. 权利要求 59 的融合蛋白或缀合物, 其中所述希望的生物学活性是治疗活性。

61. 权利要求 59 的融合蛋白或缀合物, 其中所述希望的生物学活性是结合活性。

62. 权利要求 59 的融合蛋白或缀合物, 其中所述希望的生物学活性是酶活性。

63. 权利要求 59 的融合蛋白或缀合物, 其中所述第二部分选自由 GLP-1 ;HGH ;G-CSF ; IL-1 受体激动剂 ;TNF- α ;和凝血因子 VII、VIII、IX 和 X 组成的组。

64. 权利要求 59 的融合蛋白或缀合物, 其中所述第二部分是能与靶分子选择性相互作用的结合部分, 所述结合部分选自如下一组: 抗体及其基本上保留抗体结合活性的片段和结构域; 微体, maxybodies, 高亲合性多聚体及其他小含二硫键蛋白质; 及衍生自选自下组的骨架的结合蛋白: 葡萄球菌蛋白 A 及其结构域; lipocalins, 锚蛋白重复结构域, 纤维素结合结构域, γ 晶体, 绿色荧光蛋白, 人细胞毒性 T 淋巴细胞相关抗原 4, 蛋白酶抑制剂, PDZ 结构域, 肽适体, 葡萄球菌核酸酶, tendamistats, 纤连蛋白 III 型结构域, 锌指, 芋螺毒素和 Kunitz 结构域。

65. 权利要求 64 的融合蛋白或缀合物, 其中所述靶分子选自如下一组: A β 肽; 其他疾病相关淀粉样肽; 毒素, 如细菌毒素和蛇毒; 凝血因子, 如 von Willebrand 因子; 白介素, 如 IL-13; 肌抑素; 促炎因子, 如 TNF- α , TNF- α 受体和 IL-8; 补体因子, 如 C3a 和 C5a; 过敏介质, 如组胺和 IgE; 肿瘤相关抗原, 如 CD19, CD20, CD22, CD30, CD33, CD40, CD52, CD70, cMet, HER1, HER2, HER3, HER4, CA9, CEA, IL-2 受体, MUC1, PSMA, TAG-72。

66. 前述任一项权利要求的多肽, 进一步包含标记。

67. 权利要求 66 的多肽, 其中所述标记选自由荧光染料和荧光金属、生色染料、化学发光化合物及生物发光蛋白、酶、放射性核素和颗粒组成的组。

68. 编码权利要求 1-65 任一项的多肽的多核苷酸。

69. 产生权利要求 1-65 任一项的多肽的方法, 包括表达权利要求 68 的多核苷酸。

70. 包含权利要求 69 的多核苷酸的表达载体。

71. 包含权利要求 70 的表达载体的宿主细胞。

72. 产生权利要求 1-65 任一项的多肽的方法, 包括

在允许多肽从所述表达载体表达的条件下培养权利要求 71 的宿主细胞, 及分离所述多肽。

73. 权利要求 59-65 任一项的融合蛋白或缀合物在制备药物中的应用, 所述药物显示比具有希望的生物学活性的多肽本身的体内半衰期更长的体内半衰期。

74. 权利要求 59-65 任一项的融合蛋白或缀合物在制备药物中的应用, 所述药物与在将具有希望的生物学活性的多肽本身给予哺乳动物引起的免疫应答相比在给予哺乳动物时不引起免疫应答或引起降低的免疫应答。

新白蛋白结合组合物、方法及应用

[0001] 本申请是申请号为“200880101168.4”，申请日为“2008年7月17日”，原发明名称为“新组合物、方法及应用”（2010年7月21日提交主动修改时将其修改为“新白蛋白结合组合物、方法及应用”）的申请的分案申请。

发明领域

[0002] 本发明涉及一类具有白蛋白结合亲和性的工程化多肽。还涉及新的方法及应用，其采用这些及其它化合物与白蛋白在不同环境下的结合，其中一些具有治疗哺乳动物包括人类的疾病的意义。

[0003] 背景

[0004] 血清白蛋白

[0005] 血清白蛋白是哺乳动物血清中最丰富的蛋白质（40g/l；大约0.7mM于人类中），其功能之一是结合诸如脂质和胆红素的分子（Peters T, *Advances in Protein Chemistry* 37:161, 1985）。血清白蛋白的半衰期与动物大小直接成比例，其中例如人血清白蛋白（HSA）半衰期是19天，兔血清白蛋白半衰期是大约5天（McCurdy TR et al, *J Lab Clin Med* 143:115, 2004）。人血清白蛋白在体内广泛分布，特别是在肠道和血液区室内，其中其主要参与维持摩尔渗透压浓度。结构上，白蛋白是单链蛋白，包含3个同源结构域，总共584或585个氨基酸（Dugaiczek L et al, *Proc Natl Acad Sci USA* 79:71, 1982）。白蛋白含有17个二硫桥和一个反应硫醇C34，但是缺少N-连接和O-连接碳水化合物部分（Peters, 1985, *supra*；Nicholson JP et al, *Br J Anaesth* 85:599, 2000）。缺少糖基化简化了白蛋白的重组表达。白蛋白的这一性质与其三维结构是已知的事实（He XM and Carter DC, *Nature* 358:209, 1992）一起使其成为有吸引力的候选物而用于重组融合蛋白。这种融合蛋白通常组合治疗蛋白（其在给予该蛋白本身时会迅速从身体内清除）和血浆蛋白（其显示天然的慢清除）在一个多肽链中（Sheffield WP, *Curr Drug Targets Cardiovasc Haematol Disord* 1:1, 2001）。这种融合蛋白可提供临床益处，注射频率降低，体内治疗蛋白水平更高。

[0006] 与HSA的融合或缔合导致增加的蛋白质体内半衰期

[0007] 血清白蛋白缺少任何酶学或免疫学功能，因此当与生物活性多肽偶联时应该不显示不希望的副作用。另外，HSA是天然载体，参与内源转运和输送各种天然和治疗分子（Sellers EM and Koch-Weser MD, *Albumin Structure, Function and Uses*, eds Rosenoer VM et al, Pergamon, Oxford, p159, 1977）。已报道几种策略以将蛋白质直接共价偶联至血清白蛋白或者偶联至允许体内缔合血清白蛋白的肽或蛋白质。后一途径的例子已在例如W091/01743, W001/45746及Dennis et al, *J Biol Chem* 277:35035-43 (2002)中描述。第一个文件描述了衍生自链球菌蛋白G (SpG) 的白蛋白结合肽或蛋白质的应用，用于增加其它蛋白质的半衰期。其中的观点是将细菌衍生的白蛋白结合肽/蛋白质与已显示在血液中快速清除的治疗感兴趣肽/蛋白质融合。由此产生的融合蛋白结合体内血清白蛋白并从其更长的半衰期获益，其增加了融合的治疗感兴趣肽/蛋白质的净半衰期。W001/45746

及 Dennis et al 涉及同一概念,但是作者利用相对短的肽结合血清白蛋白。所述肽选自噬菌体展示的肽文库。在 Dennis et al 中,早期工作被提及,其中发现了对链球菌蛋白 G 的白蛋白结合结构域与人补体受体 1 型的重组融合体的免疫学应答的增强。US 专利申请 US2004/0001827 (Dennis) 也披露了使用包含肽配体的构建体,其也由肽展示技术鉴别,其结合血清白蛋白及缀合生物化学化合物用于肿瘤靶向。

[0008] 与 HSA 缔合导致降低的免疫原性

[0009] 除了对生物学活性蛋白质的体内半衰期的作用之外,还提示生物学活性蛋白质和白蛋白结合蛋白之间的融合体的与白蛋白的非共价缔合降低对生物学活性蛋白的免疫应答。因此,在 W02005/097202 中,描述了用这一原理降低或消除对生物学活性蛋白的免疫应答。

[0010] 细菌受体蛋白质的白蛋白结合结构域

[0011] 链球菌蛋白 G (SpG) 是存在于一些链球菌菌株的表面上的双功能受体,能结合 IgG 和血清白蛋白 (Björck et al, *Mol Immunol* 24:1113, 1987)。所述结构高度重复,具有几个结构和功能不同的结构域 (Guss et al, *EMBO J* 5:1567, 1986),更精确 3 个 Ig 结合基序和 3 个血清白蛋白结合结构域 (Olsson et al, *Eur J Biochem* 168:319, 1987)。3 个血清白蛋白结合结构域之一的结构已确定,显示三螺旋束结构域 (Kraulis et al, *FEBS Lett* 378:190, 1996)。这一基序命名为 ABD (白蛋白结合结构域),大小为 46 个氨基酸残基。在文献中,其也被称为 G148-GA3。

[0012] 除了来自链球菌的蛋白 G 之外的其它细菌白蛋白结合蛋白也已经鉴别,其含有类似于蛋白 G 的白蛋白结合三螺旋结构域的结构域。这种蛋白的例子是 PAB, PPL, MAG 和 ZAG 蛋白。这种白蛋白结合蛋白的结构和功能研究已经进行和报道,例如 Johansson 和同事 (Johansson et al, *J Mol Biol* 266:859-865, 1997; Johansson et al, *J Biol Chem* 277:8114-8120, 2002),其引入了命名“GA 模块”(蛋白 G 相关白蛋白结合模块),针对负责白蛋白结合的三螺旋蛋白质结构域。另外, Rozak et al 报道了产生 GA 模块的人工变体,其被选择和研究不同物种特异性和稳定性 (Rozak et al, *Biochemistry* 45:3263-3271, 2006)。在本说明书中,使用 Johansson et al 和 Rozak et al 文章中建立的对来自不同细菌物种的 GA 模块的术语。

[0013] 除了上述含有三螺旋的蛋白质之外,存在结合白蛋白的其它细菌蛋白质。例如,命名为“M 蛋白”的链球菌蛋白质家族包含结合白蛋白的成员 (参见 Navarre & Schneewind, *MMBR* 63:174-229, 1999 中的表 2)。非限制性例子是蛋白质 M1/Emm1, M3/Emm3, M12/Emm12, EmmL55/Emm55, Emm49/EmmL49 和 H。

[0014] 新生 Fc 受体 (FcRn) 介导的 HSA 的胞转

[0015] MHC 1 类新生 Fc 受体 (FcRn) 介导白蛋白和 IgG 的细胞运输和再循环 (Brambell et al, *Nature* 203:1352, 1964; Chaudhury et al, *J Exp Med* 197:315, 2003)。FcRn 也称为 Brambell 受体,在低内体 pH 特异结合白蛋白和 IgG,因此通过转运至细胞表面并在中性 pH 释放而保护胞饮蛋白免于溶酶体降解。FcRn 在 pH5-6 对白蛋白和 IgG 有良好亲和性,而在中性 pH 显示差的至无亲和性。以此方式,白蛋白和 IgG 的浓度和半衰期被调节。另外, FcRn 负责主动转运白蛋白和 IgG 穿过细胞屏障,例如气道的表皮和覆盖肠道和胎盘的內皮。

[0016] 如从背景描述不同段落证明的,提供选择具有对白蛋白的高亲和性的多肽是开发

各种生物医学、生物技术和其它应用的关键因素,因此现有技术需要额外的这种多肽分子。

[0017] 发明公开

[0018] 本发明第一方面满足了对具有相当高的白蛋白亲和性的新多肽的需求,其是通过提供包含白蛋白结合基序的白蛋白结合多肽而满足,所述基序由如下氨基酸序列组成:

[0019] GVSDX₅YKX₈X₉I X₁₁X₁₂AX₁₄TVEGVX₂₀ALX₂₃X₂₄X₂₅I

[0020] 其中各自独立地,

[0021] X₅选自 Y 和 F;

[0022] X₈选自 N, R 和 S;

[0023] X₉选自 V, I, L, M, F 和 Y;

[0024] X₁₁选自 N, S, E 和 D;

[0025] X₁₂选自 R, K 和 N;

[0026] X₁₄选自 K 和 R;

[0027] X₂₀选自 D, N, Q, E, H, S, R 和 K;

[0028] X₂₃选自 K, I 和 T;

[0029] X₂₄选自 A, S, T, G, H, L 和 D;和

[0030] X₂₅选自 H, E 和 D;

[0031] 条件是所述氨基酸序列不是

[0032] GVSDYYKNLI NNAKTVEGVK ALIDEI;

[0033] 所述白蛋白结合多肽结合白蛋白,从而相互作用的 K_d值最大为 1x 10⁻⁹M。

[0034] 本发明的序列相关的白蛋白结合多肽种类的上述定义是基于大量如下实验章节详细描述的区别和鉴定的白蛋白结合多肽的统计学分析。变体选自亲代多肽序列或“骨架”的随机变体的大集合,所述选择基于在例如噬菌体展示或其它选择实验中与白蛋白的相互作用。鉴别的白蛋白结合基序或“ABM”相应于亲代骨架的白蛋白结合区,所述区域组成三螺旋束蛋白结构域内的 2 个 α 螺旋。尽管亲代骨架中的 2 个 ABM 螺旋的原始氨基酸残基已经组成结合表面用于与白蛋白相互作用,该结合表面根据本发明通过取代修饰以提供另外的白蛋白结合能力。

[0035] 本领域技术人员会认识到任何多肽的功能,例如本发明多肽的白蛋白结合能力,依赖于多肽的三级结构。因此可以对多肽的氨基酸序列进行小改变而不影响其功能。因此,本发明涵盖了 ABM 的修饰变体,它们使得白蛋白结合特征被保留。例如,可以将属于某一功能组的氨基酸残基(例如疏水性、亲水性、极性)的氨基酸残基用来自相同功能组的另一个氨基酸交换。

[0036] 在本发明这一方面的多肽的一个实施方案中, X₅是 Y。

[0037] 在本发明这一方面的多肽的一个实施方案中, X₈选自 N 和 R, 并且可以特别是 R。

[0038] 在本发明这一方面的多肽的一个实施方案中, X₉是 L。

[0039] 在本发明这一方面的多肽的一个实施方案中, X₁₁选自 N 和 S, 并且可以特别是 N。

[0040] 在本发明这一方面的多肽的一个实施方案中, X₁₂选自 R 和 K, 例如 X₁₂是 R 或 X₁₂是 K。

[0041] 在本发明这一方面的多肽的一个实施方案中, X₁₄是 K。

[0042] 在本发明这一方面的多肽的一个实施方案中, X₂₀选自 D, N, Q, E, H, S 和 R, 并且可以

特别是 E。

[0043] 在本发明这一方面的多肽的一个实施方案中, X_{23} 选自 K 和 I, 并且可以特别是 K。

[0044] 在本发明这一方面的多肽的一个实施方案中, X_{24} 选自 A, S, T, G, H 和 L。

[0045] 在本发明这一方面的多肽的一个更具体的实施方案中, X_{24} 是 L。

[0046] 在本发明这一方面的多肽的一个甚至更具体的实施方案中, $X_{23}X_{24}$ 是 KL。

[0047] 在本发明这一方面的多肽的另一个甚至更具体的实施方案中, $X_{23}X_{24}$ 是 TL。

[0048] 在本发明这一方面的多肽的一个实施方案中, X_{24} 选自 A, S, T, G 和 H。

[0049] 在本发明这一方面的多肽的一个更具体的实施方案中, X_{24} 选自 A, S, T, G 和 H, 以及 X_{23} 是 I。

[0050] 在本发明这一方面的多肽的一个实施方案中, X_{25} 是 H。

[0051] 如以下实验章节详述, 白蛋白结合变体的选择导致鉴别大量的各个白蛋白结合基序 (ABM) 序列。这些序列组成了本发明这一方面的白蛋白结合多肽的定义中的 ABM 序列的各个实施方案。各个白蛋白结合基序的序列如图 1 和 SEQ ID NO:1-257 所示。在本发明的白蛋白结合多肽的一些实施方案中, ABM 由选自 SEQ ID NO:1-257 的氨基酸序列组成。在本发明这一方面的一个更具体的实施方案中, ABM 序列选自 SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:25、SEQ ID NO:27、SEQ ID NO:46、SEQ ID NO:49、SEQ ID NO:53、SEQ ID NO:54、SEQ ID NO:55、SEQ ID NO:155、SEQ ID NO:239、SEQ ID NO:240、SEQ ID NO:241、SEQ ID NO:242、SEQ ID NO:243、SEQ ID NO:244 和 SEQ ID NO:245。在本发明这一方面的更具体的实施方案中, ABM 序列选自 SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:53 和 SEQ ID NO:239。

[0052] 在本发明实施方案中, ABM 可形成三螺旋束蛋白结构域的部分。例如, ABM 可基本上组成或形成所述三螺旋束蛋白结构域内的具有互连环的两个 α 螺旋。

[0053] 在本发明的特定实施方案中, 这种三螺旋束蛋白结构域选自由细菌受体蛋白的三螺旋结构域组成的组。这种细菌受体蛋白的非限制性例子可以选自由来自链球菌、消化链球菌和 *Finnegoldia* 的物种的白蛋白结合受体蛋白组成的组, 例如选自由蛋白 G、MAG、ZAG、PPL 和 PAB 组成的组。在本发明的一个具体的实施方案中, ABM 形成蛋白 G 例如来自链球菌菌株 G148 的蛋白 G 的部分。在这一实施方案的不同变体中, ABM 形成其部分的三螺旋束蛋白结构域选自由来自链球菌菌株 G148 的蛋白 G 的结构域 GA1、结构域 GA2 和结构域 GA3 组成的组, 特别是结构域 GA3。

[0054] 在其它实施方案中, ABM 形成来自金黄色葡萄球菌的细菌受体蛋白蛋白 A 的 5 个三螺旋结构域的一或多个的部分, 即所述三螺旋束蛋白结构域选自由蛋白 A 结构域 A、B、C、D 和 E 组成的组。在其它相似实施方案中, ABM 形成衍生自来自金黄色葡萄球菌的蛋白 A 的结构域 B 的蛋白 Z 的部分。

[0055] 在本发明的实施方案中, 其中 ABM“形成三螺旋束蛋白结构域的部分”, 是指 ABM 的序列“插入”或“移植”到天然发生的 (或原始的) 三螺旋束结构域的序列之中或之上, 从而 ABM 置换原始结构域中相似的结构基序。例如, 不希望受理论束缚, ABM 被认为组成三螺旋束的三个螺旋中的两个, 因此可以置换任何三螺旋束内的这种两个螺旋基序。如本领域技术人员理解, 由两个 ABM 螺旋置换三螺旋束结构域的两个螺旋应该不影响多肽的基本结构而进行。即, 本发明的这一实施方案的多肽的 $C\alpha$ 骨架的整体折叠与其形成部分的三螺

旋束蛋白结构域的整体折叠基本上相同,例如具有相同顺序的相同二级结构元件等。因此,如果本发明这一实施方案的多肽与原始结构域具有相同折叠,则本发明的 ABM “形成”三螺旋束结构域的“部分”,提示基本结构性质被共享,所述性质例如产生相似的 CD 谱。技术人员了解相关的其它参数。

[0056] 在本发明的一个实施方案中,白蛋白结合多肽是三螺旋束蛋白结构域,其包含上述白蛋白结合基序和构成三螺旋构型的其余部分的额外序列。因此,本发明提供了白蛋白结合多肽,其包含如下氨基酸序列:

[0057] LAEAKX_aX_bAX_cX_d ELX_eKY-[ABM]-LAALP

[0058] 其中

[0059] [ABM] 是上述定义白蛋白结合基序,

[0060] 以及,各自独立地,

[0061] X_a选自 V 和 E;

[0062] X_b选自 L, E 和 D;

[0063] X_c选自 N, L 和 I;

[0064] X_d选自 R 和 K;及

[0065] X_e选自 D 和 K。

[0066] 在这个多肽的一个实施方案中, X_a是 V。

[0067] 在这个多肽的一个实施方案中, X_b是 L。

[0068] 在这个多肽的一个实施方案中, X_c是 N。

[0069] 在这个多肽的一个实施方案中, X_d是 R。

[0070] 在这个多肽的一个实施方案中, X_e是 D。

[0071] 同样,如以下实验章节详述,大量白蛋白结合变体的选择和测序导致鉴别各个白蛋白结合多肽序列。这些序列组成了本发明第一方面的上述实施方案的白蛋白结合多肽的各个实施方案。这些白蛋白结合多肽各自的序列在图 1 和 SEQ ID NO:258-514 中示出。本发明还涵盖具有与选自 SEQ ID NO:258-514 的序列具有 85%或更大相同性的氨基酸序列的白蛋白结合多肽。在具体的实施方案中,白蛋白结合多肽的序列选自 SEQ ID NO:259, SEQ ID NO:260, SEQ ID NO:266, SEQ ID NO:272, SEQ ID NO:282, SEQ ID NO:284, SEQ ID NO:303, SEQ ID NO:306, SEQ ID NO:310, SEQ ID NO:311, SEQ ID NO:312, SEQ ID NO:412, SEQ ID NO:496, SEQ ID NO:497, SEQ ID NO:498, SEQ ID NO:499, SEQ ID NO:500, SEQ ID NO:501 和 SEQ ID NO:502 以及与其有 85%或更大相同性的序列。在本发明这一方面的更具体的实施方案中,白蛋白结合多肽的序列选自 SEQ ID NO:260, SEQ ID NO:310 和 SEQ ID NO:496 以及与其有 85%或更大相同性的序列。

[0072] 如以上证明,除了氨基酸序列选自 SEQ ID NO:258-514 或其亚集的多肽之外,本发明还涵盖其变体。这种涵盖的变体的氨基酸序列与 SEQ ID NO:258-514 相比仅显示小差异。这种变体的一个定义见上述,及具有与选自 SEQ ID NO:258-514 的序列有至少 85%相同性的氨基酸序列的白蛋白结合多肽。在一些实施方案中,本发明多肽可具有与选自 SEQ ID NO:258-514 的序列至少 86%、至少 87%、至少 88%、至少 89%、至少 90%、至少 91%、至少 92%、至少 93%、至少 94%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%或至少 99%相同的序列。比较可以在相应于被比较的序列的最短者的窗口进行,或者在相应于在被比较的

序列的至少一种中的白蛋白结合基序的窗口进行。

[0073] 术语“白蛋白结合”和“对白蛋白的结合亲和性”在本说明书中是指多肽的性质，其可以例如用表面等离子体共振技术如在 Biacore 仪器中被测试。例如如下述实施例所述，白蛋白结合亲和性可以在实验中测试，其中白蛋白或其片段固定化在仪器的传感器芯片上，含有被测多肽的样品通过芯片。或者，被测多肽固定化在仪器的传感器芯片上，含有白蛋白或其片段的样品通过芯片。白蛋白可以是来自哺乳动物的血清白蛋白，如人血清白蛋白。技术人员可以然后解释这种实验获得的结果以建立多肽对白蛋白的结合亲和性的至少一种定性测量。如果希望定性测量，例如确定相互作用的 K_D 值，也可以使用表面等离子体共振方法。结合值可以例如在 Biacore2000 仪器 (Biacore AB) 中限定。白蛋白被适当地固定化在测量的传感器芯片上，待确定亲和性的多肽的样品用系列稀释制备并以随机顺序注射。然后可用例如由仪器厂商提供的 BIAevaluation 4.1 软件的 1:1Langmuir 结合模型从结果计算 K_D 值 (Biacore AB)。

[0074] 根据本发明的第一方面的白蛋白结合多肽结合白蛋白，从而相互作用的 K_D 值是最多 $1 \times 10^{-9} \text{M}$ ，即 1nM。在一些实施方案中，相互作用的 K_D 值是最多 $1 \times 10^{-10} \text{M}$ ，如最多 $1 \times 10^{-11} \text{M}$ ，例如最多 $1 \times 10^{-12} \text{M}$ 。

[0075] 在本发明的一个实施方案中，白蛋白结合多肽结合的白蛋白是人血清白蛋白。

[0076] 本发明也涵盖了上述白蛋白结合多肽，其进一步包含位于白蛋白结合基序的一侧或两侧的一或多个额外氨基酸。这些额外氨基酸残基可起增强多肽对白蛋白的结合的作用，但是可有其它目的，相关于例如生产、纯化、体内或体外稳定化、多肽的偶联或检测及其任意组合。这种额外的氨基酸残基可包含一或多个添加的氨基酸残基，用于化学偶联于例如层析树脂的目的，以获得亲和基质，或者偶联于整合部分以与金属放射核素复合。一个例子是在多肽链的第一个或最后一个位置添加半胱氨酸残基，及在 N 或 C 端。这种额外的氨基酸残基也可以包含“标记 (tag)”用于纯化或检测多肽，如六组氨酸 (His_6) 标记或“myc” (“c-myc”) 标记或“FLAG”标记用于与特异于该标记的抗体相互作用。技术人员了解其它替代方式。

[0077] 上述“额外的氨基酸残基”也可组成具有任何希望功能的一或多个多肽结构域，如与第一个白蛋白结合结构域相同结合功能，或者另一种结合功能，或者治疗功能，或酶功能，或荧光功能，或其混合物。本发明的这种多肽中的连接的多肽“单位”可以用已知有机化学方法共价偶联而连接，或者在多肽的重组表达系统中表达为一或多个融合多肽，或者以任何其它方式连接，直接连接或由包含一些氨基酸的接头介导连接。

[0078] 另外，本发明这一方面还涵盖保留白蛋白结合的白蛋白多肽的片段。产生具有保留的结合特异性的野生型三螺旋结构域的片段的可能性由 Braisted AC et al 在 Proc Natl Acad Sci USA 93:5688-5692(1996) 中示出。在该论文中描述的实验中，使用基于结构的设计及噬菌体展示方法，59 个残基的三螺旋束的结合结构域被降低为 33 个残基的产生的二螺旋衍生物。这通过逐步选择来自不同区域的随机突变而实现，其槽中稳定性和结合亲和性迭代改良。基于相同理由，用本发明的多肽，技术人员能获得“最小化”白蛋白结合多肽，其具有与“亲代”白蛋白结合多肽相同的结合性质。因此，组成本发明的多肽的片段并基本上保留白蛋白结合的多肽属于本发明范围。作为非限制性例子，片段可以相应于上述白蛋白结合多肽，其是 N- 末端截短的。这种截短可例如是 1-3 个氨基酸。

[0079] 如上所述,本发明还涵盖具有对白蛋白的亲和多肽的多聚体,即包含至少二个白蛋白结合多肽或其片段作为单体单位的多肽链。可能感兴趣的是例如在白蛋白的纯化方法中或者在利用白蛋白结合功能的治疗方法中,用本发明的一个多肽获得甚至更强的白蛋白结合是可能的。在这种情况下,提供多聚体如二聚体、三聚体或四聚体多肽可提供必需的亲合力作用。多聚体可由合适数目的本发明多肽组成。本发明的这些多肽结构域在这种多聚体中形成单体,可以全部具有相同的氨基酸序列,但是也可能它们具有不同的氨基酸序列。如上所述,在本发明的多聚体中的连接的多肽“单位”可使用已知的有机化学方法通过共价偶联连接,或者在用于多肽的重组表达的系统中表达为一或多个融合多肽,或者以任何其它方式连接,直接连接或由包含一些氨基酸的接头介导。

[0080] 另外,“异种”融合多肽或蛋白或缀合物也包括在本发明范围内,其中本发明的白蛋白结合多肽或其片段或多聚体组成第一个结构域或第一个部分,第二个和进一步的部分具有非结合白蛋白的其它功能。在这种蛋白质中的融合多肽或缀合物的第二个和进一步的部分合适地具有希望的生物学活性。这种希望的生物学活性的非限制性例子包括治疗活性,结合活性和酶活性。在本发明这个方面的一些实施方案中,第二个部分和任何进一步的部分选自如下一组:GLP-1(胰高血糖素样肽1);HGH(人生长激素);G-CSF(粒细胞集落刺激因子);IL-1受体激动剂(白介素1受体激动剂);TNF- α 肿瘤坏死因子 α);和凝血因子VII、VIII、IX和X。在其他实施方案中,所述第二个和任何进一步的部分选自能与靶分子选择性相互作用(结合)的结合部分,所述靶分子典型地是除白蛋白之外的靶分子,尽管白蛋白不排除。这种结合部分合适地选自如下一组:抗体及其基本上保留抗体结合活性的片段和结构域;微体, maxybodies, 高亲合性多聚体(avimer)及其他小含二硫键蛋白质;及衍生自选自如下一组骨架的结合蛋白,所述的组由如下组成:葡萄球菌蛋白A及其结构域;lipocalins, 锚蛋白重复结构域,纤维素结合结构域, γ 晶体,绿色荧光蛋白,人细胞毒性T淋巴细胞相关抗原4,蛋白酶抑制剂,PDZ结构域,肽适体(apramer),葡萄球菌核酸酶,tendamistats, 纤连蛋白III型结构域,锌指,芋螺毒素和Kunitz结构域。在本发明的一些实施方案中,用于结合所述靶结合部分的靶分子选自如下一组:A β 肽;其他疾病相关淀粉样肽;毒素,如细菌毒素和蛇毒;凝血因子,如 von Willebrand 因子;白介素,如 IL-13;肌抑素(myostatin);促炎因子,如 TNF- α , TNF- α 受体和 IL-8;补体因子,如 C3a和 C5a;过敏介质,如组胺和 IgE;肿瘤相关抗原,如 CD19, CD20, CD22, CD30, CD33, CD40, CD52, CD70, cMet, HER1, HER2, HER3, HER4, CA9, CEA, IL-2受体, MUC1, PSMA, TAG-72。

[0081] 产生融合多肽或缀合物的其它可能性也包括在内。因此,本发明第一方面的白蛋白结合多肽可以共价偶联于第二个或进一步的部分,其除了靶结合之外或代替靶结合展示其它功能。一个例子是一或多个白蛋白结合多肽与作为报道或效应部分的酶学活性多肽的融合。可与白蛋白结合多肽偶联形成然后对报道酶的例子是技术人员已知的并包括酶如 β -半乳糖苷酶,碱性磷酸酶,辣根过氧化物酶,羧基肽酶。本发明的融合多肽或缀合物的第二个和进一步的部分的其它选择还非限制性包括荧光多肽如绿色荧光蛋白,红色荧光蛋白,萤光素酶及其变体。

[0082] 对于掺入本发明的白蛋白结合多肽的融合蛋白或缀合物的以上描述,应注意第一个、第二个和进一步的部分的命名是为清楚起见,以区分本发明的白蛋白结合多肽和具有其它功能的部分。这些命名不是指不同结构域在融合蛋白或缀合物的多肽链中的实际顺

序。因此,例如所述第一个部分不加限制地出现在融合蛋白或缀合物的 N- 末端,在中部或者在 C- 末端。

[0083] 本发明还涵盖这样的多肽,其中上述白蛋白结合多肽已被提供标记,如选自由荧光染料和金属、生色染料、化学发光化合物及生物发光蛋白、酶、放射性核素和颗粒组成的组,例如用于体外或体内检测多肽。

[0084] 本发明的相关方面提供了编码上述多肽的多核苷酸,以及包含所述多核苷酸的表达载体及包含所述表达载体的宿主细胞。本发明的后三个方面是产生本发明多肽的工具,鉴于本文的有关待表达多肽的信息以及蛋白质重组表达领域的当前技术水平,技术人员无需过多负担即能够获得它们并将它们用于实际应用。因此,本发明的其它相关方面是产生本发明第一方面的多肽的方法,包括表达本文所述的多核苷酸,例如通过将本文所述宿主细胞在允许从表达载体表达多肽的条件下培养,以及分离多肽。

[0085] 如背景部分描述以及本领域技术人员熟知,具有对白蛋白的结合亲和性的多肽分子的可能应用有几种。本发明的白蛋白结合多肽及其片段、多聚体和融合蛋白或缀合物可以用于任一或多种这些应用中。

[0086] 作为上述白蛋白结合多肽的应用的非限制性例子,本发明在另一方面提供了本发明第一方面的白蛋白结合多肽与具有希望的生物学活性(如上定义)的多肽的融合蛋白或缀合物在制备药物中的应用,所述药物显示比具有希望的生物学活性的多肽的体内半衰期更长的体内半衰期。换句话说,本发明提供了延长具有希望的生物学活性的多肽的体内半衰期的方法,其通过将这种多肽与本发明第一方面的白蛋白结合多肽融合或缀合进行。对于白蛋白结合分子的这一应用的细节,参见例如 PCT 申请 W091/01743 和 W001/45746,其引入本文作参考。

[0087] 作为另一个应用的非限制性例子,本发明在另一方面提供了本发明第一方面的白蛋白结合多肽与具有希望的生物学活性(如上定义)的多肽的融合蛋白或缀合物在制备药物中的应用,与给予哺乳动物具有希望的生物学活性的多肽本身所引起的免疫应答相比,所述药物在给予哺乳动物时不引起或引起降低的免疫应答。换句话说,本发明提供了降低具有希望的生物学活性的多肽的免疫原性的方法,其通过将这种多肽与本发明第一方面的白蛋白结合多肽融合或缀合进行。对于白蛋白结合分子的这一应用的细节,参见例如 PCT 申请 W02005/097202,其引入本文作参考。

[0088] 本发明另一系列方面设计提供新手段,增加可溶性差的化合物的水溶解度,其通过与白蛋白结合多肽偶联而进行。可溶性差的化合物与白蛋白结合多肽的复合物能够与白蛋白体内或体外缔合,所述缔合增加水溶解度。可用本发明增加水溶解度的化合物的例子可典型地包括用于癌症化疗的可溶性差的细胞毒性剂。使用这一方法,例如在药物组合物的配制中,使得能冻干所得制剂,然后其可以在水溶液中重配。另外,本发明这些方面提供了与化合物本身相比具有降低的聚集倾向的制剂。

[0089] 因此,本发明另一方面提供了组合物,其包含:

[0090] 化合物,其本身在水中溶解度不超过 $100 \mu\text{g/ml}$;该化合物偶联于

[0091] 白蛋白结合多肽,其具有对白蛋白的亲和性,从而所述相互作用的 K_D 不超过 $1 \times 10^{-6}\text{M}$ 。

[0092] 在一个实施方案中,化合物本身具有不超过 $10 \mu\text{g/ml}$ 、如不超过 $1 \mu\text{g/ml}$ 的水中

溶解度。

[0093] 在一个实施方案中,白蛋白结合多肽具有对白蛋白的亲合性,从而所述相互作用的 K_D 不超过 $1 \times 10^{-7}M$, 如不超过 $1 \times 10^{-8}M$, 例如不超过 $1 \times 10^{-9}M$, 如不超过 $1 \times 10^{-10}M$, 如不超过 $1 \times 10^{-11}M$, 例如不超过 $1 \times 10^{-12}M$ 。

[0094] 在一些实施方案中,化合物可以是药物活性化合物,例如细胞毒性剂。细胞毒性剂的非限制性例子是选自 calicheamycin, aurostatin, 阿霉素、maytansinoid、紫杉醇、ecteinascidin、格尔德霉素及其衍生物以及其组合的那些。或者,细胞毒性剂可以是非衍生自天然发生的化合物的合成的化学毒素。

[0095] 化合物和白蛋白结合多肽可以非共价缔合,但是其优选是共价偶联在一起。

[0096] 本发明这个方面的组合物包含白蛋白结合多肽。在一个实施方案中,白蛋白结合多肽是天然发生的多肽或其白蛋白结合片段或衍生物。白蛋白结合多肽可以作为非限制性例子选自自由白蛋白结合蛋白 M1/Emm1、M3/Emm3、M12/Emm12、EmmL55/Emm55、Emm49/EmmL49、H、G、MAG、ZAG、PPL 和 PAB 组成的组。在更具体的实施方案中,白蛋白结合多肽是链球菌蛋白 G 或其白蛋白结合片段或衍生物。在还更具体的实施方案中,能结合白蛋白的多肽选自自由链球菌菌株 G148 的蛋白 G 的结构域 GA1、结构域 GA2 和结构域 GA3 组成的组,因此可例如是 GA3 结构域。

[0097] 在一个实施方案中,白蛋白结合多肽包含大约 5 至大约 214 个氨基酸残基,如大约 5 至大约 46 个氨基酸残基,例如大约 10 至大约 20 个氨基酸残基。

[0098] 在本发明这个方面的另一个实施方案中,白蛋白结合多肽包含选 DIICLPWGLW、DLCLRDWGLW 和 DIICLRWGLW 的氨基酸序列。

[0099] 在本发明这些方面的另一个实施方案中,白蛋白结合多肽包含本发明第一方面的任一白蛋白结合多肽,即通过其白蛋白结合基序定义一类新的白蛋白结合多肽的本发明的方面。

[0100] 在本发明这些方面的另一个实施方案中,白蛋白结合多肽能与人血清白蛋白的至少一个、优选全部残基 F228、A229、A322、V325、F326 和 M329 相互作用,从而增强该分子与白蛋白的结合。例如,白蛋白结合多肽包括形成与人血清白蛋白中的 M329 残基的相互作用的氨基酸残基,从而增强该分子与白蛋白的结合。另外,或者,白蛋白结合多肽可包括一氨基酸残基,其与人血清白蛋白结构域 IIB 中的螺旋 7 形成相互作用,从而增强该分子与白蛋白的结合。另外,或者,白蛋白结合多肽可包括一氨基酸残基,其与人血清白蛋白结构域 IIA 中的残基形成相互作用,从而增强该分子与白蛋白的结合。另外,或者,白蛋白结合多肽可包括一氨基酸残基,其与人血清白蛋白的螺旋 2 或 3 之间的残基形成相互作用,从而增强该分子与白蛋白的结合。

[0101] 除了可溶性差的化合物和白蛋白结合多肽之外,本发明这个方面的组合物在一些实施方案中还可包括具有对临床相关靶的亲合性的结合多肽。这一结合多肽适当地不同于白蛋白结合多肽,并可以非共价或共价偶联于本发明组合物的其它组分。作为非限制性例子,具有对临床相关靶的亲合性的结合多肽可以选自如下一组:抗体及其基本上保留抗体结合活性的片段和结构域;微体, maxybodies, 高亲合性多聚体及其他小含二硫键蛋白质;及衍生自选自如下一组骨架的结合蛋白,所述的组由如下组成:葡萄球菌蛋白 A 及其结构域; lipocalins, 锚蛋白重复结构域, 纤维素结合结构域, γ 晶体, 绿色荧光蛋白, 人细胞毒

性 T 淋巴细胞相关抗原 4, 蛋白酶抑制剂, PDZ 结构域, 肽适体 (aptamer), 葡萄球菌核酸酶, tendamistats, 纤连蛋白 III 型结构域, 锌指, 芋螺毒素和 Kunitz 结构域。

[0102] 本发明上述方面的组合物通过提供在白蛋白结合多肽组合物中而具有与白蛋白体内或体外缔合的能力。在一些情况中, 可能有利的是形成与活生物体外的白蛋白的组合物复合物, 即向组合物中加入外源白蛋白。因此, 本发明还提供了上述组合物, 其进一步包含白蛋白, 如人血清白蛋白。

[0103] 本发明还提供了上述方面的组合物用作药物, 当化合物是治疗活性化合物时。适当地, 提供白蛋白结合多肽和任选地白蛋白不破坏性影响活性化合物的治疗功效, 因此本发明组合物用于化合物本身适用的治疗或预后情况中。

[0104] 本发明的相关方面提供了制备上述组合物的方法。所述方法包括:

[0105] 提供化合物, 所述化合物本身在水中溶解度不超过 $100 \mu\text{g/ml}$; 及

[0106] 将所述化合物与白蛋白结合多肽共价偶联, 所述多肽具有对白蛋白的亲合性, 从而所述相互作用的 K_D 不超过 $1 \times 10^{-6}\text{M}$, 由此形成化合物与白蛋白结合多肽的共价复合物。

[0107] 在白蛋白被包括在组合物中的本发明的实施方案中, 所述方法可有利地包括额外步骤, 将化合物和白蛋白结合多肽的所述复合物与白蛋白混合, 由此形成组合物, 其包含 i) 化合物和白蛋白结合多肽的共价复合物和 ii) 白蛋白的非共价复合物。这一非共价复合物的两种组分的相对比例可以例如是 1:1, 从而一个单位的可溶性差的化合物和白蛋白结合多肽的复合物与一个分子的白蛋白缔合。在一个实施方案中, 所述方法额外包括冻干所述非共价复合物以活动冻干的组合物。

[0108] 在另一个密切相关方面中, 本发明提供了增加化合物的水溶解度的方法, 包括:

[0109] 提供化合物, 所述化合物本身在水中溶解度不超过 $100 \mu\text{g/ml}$; 及

[0110] 将所述化合物与白蛋白结合多肽共价偶联, 所述多肽具有对白蛋白的亲合性, 从而所述相互作用的 K_D 不超过 $1 \times 10^{-6}\text{M}$, 由此形成化合物与白蛋白结合多肽的共价复合物; 及

[0111] 在促进白蛋白结合多肽与白蛋白的非共价缔合的条件下将化合物和白蛋白结合多肽的所述复合物与白蛋白混合;

[0112] 由此所述复合物中的化合物在水中的溶解度大于化合物本身在水中的溶解度。

[0113] 在关于可溶性差的化合物的溶解度的这些方法方面中, 各种组分的任选特征如前述组合物方面所述。

[0114] 如上所述, 本发明这些方面的实施方案特别涉及靶向都统与白蛋白结合多肽的组合, 这一分子与例如化学毒素的缀合, 以及配制和给予具有白蛋白的所得化学毒素缀合物以避免低溶解度问题。

[0115] 化学毒素通常是疏水性化合物。因此, 溶解度差是处理和配制化学毒素缀合物包括与化学毒素缀合的抗体的一个挑战。当试图将毒素分子簇与一个载体蛋白偶联时这一问题加重了。相反, 与白蛋白分子复合的化学毒素缀合的白蛋白结合融合蛋白具有源于白蛋白增溶性质的优异溶解度, 这由白蛋白作为血浆中许多小分子的载体的作用而反映。本发明这些实施方案的一个方面是白蛋白结合结构域与白蛋白的强缔合以防止可能导致非缔合的白蛋白结合蛋白缀合物的沉淀的其它相互作用。

[0116] 单克隆抗体从血液的缓慢外渗已经被认为是限制抗体介导的疗法的生物学屏障

之一 (Wu and Senter, Nature Biotechnology 23:1137-46, 2005)。令人感兴趣地,在平衡时,在人类中大约 60%的血清白蛋白被发现在间隙中,而仅 40%发现在血液中。因此,本发明提供的与白蛋白的缔合被认为是获得血液外广泛分布的优异手段。与血清白蛋白的缔合的亲合性合适地特征在于解离速率(复合物解体)足够慢,从而仅微小部分的复合物在从血液转运到间质过程中解离。但是,相互作用不是必须是共价的,因为在转运期间再结合是可能的。

[0117] 外渗和广泛分布的一个可能贡献机制是在血清白蛋白与 FcRn 受体结合后主动转运。结果,为获得相似分布,对白蛋白结合融合蛋白中的白蛋白结合部分有一定要求。例如,亲和性在受体在细胞中转运过程中遇到的酸性环境中可能在低至 pH 低于 6 的环境中也非常紧密。

[0118] 附图简述

[0119] 图 1 是包含在本发明的白蛋白结合多肽中的白蛋白结合基序例子的氨基酸序列列表 (SEQ ID NO:1-257),本明白蛋白结合多肽例子的氨基酸序列列表 (SEQ ID NO:258-514) 及来自链球菌菌株 G148 的蛋白 G 的 GA3 结构域氨基酸序列列表 (SEQ ID NO:515)。

[0120] 图 2 是是表达载体 pAY1075 中的编码插入序列的主要特征示意图,该表达载体不具有 (A) 和具有 (B) 编码变体 ABD 分子的螺旋 2 和 3 的盒。

[0121] 图 3A 显示了在制备表达载体 pAY1075 的编码插入序列中用于扩增编码虚拟、Zwt 和 GIII 的 DNA 片段的策略。图 3B 示出用于产生完整编码插入序列的这些片段的重叠。

[0122] 图 4 是表达载体 pAY1075 的载体图谱,如实施例 1 所述制备。

[0123] 图 5 是表达载体 pAY1075-ABD 的载体图谱,如实施例 1 所述制备。

[0124] 图 6 是一个表,显示如实施例 1 所述用 AFFI-793 寡核苷酸混合物产生的 ABD 变体亚文库中每个变化位置的氨基酸变化的理论值(阴影栏)和实验(透明栏)值。

[0125] 图 7 是一个表,显示如实施例 1 所述用 AFFI-794 寡核苷酸混合物产生的 ABD 变体亚文库中每个变化位置的氨基酸变化的理论值(阴影栏)和实验(透明栏)值。

[0126] 图 8 是根据实施例 2 的描述在 pAY442 载体中表达的 ABD 变体的氨基酸序列的示意图。

[0127] 图 9A-9C 示出当在用 Z00342 包被的 ELISA 平板上分析时,如实施例 4 所述在 0-45 天从用 Z00342 注射的灵长类动物获得的血清的 ELISA 滴定曲线。

[0128] 图 10A-10C 示出当在用 Z00342-ABD00003 包被的 ELISA 平板上分析时,如实施例 4 所述在 0-45 天从用 Z00342-ABD00003 注射的灵长类动物获得的血清的 ELISA 滴定曲线。

[0129] 图 11 示出特异于如实施例 4 所述在 0-45 天从用 Z00342 及 Z00342-ABD00003 注射的灵长类动物获得的血清中 Z 变体的 IgG 中位浓度。

[0130] 图 12 示出如实施例 4 所述用夹心 ELISA 分析的随时间推移血液循环中 A) Z00342 和 B) Z00342-ABD00003 的量。

[0131] 图 13A-13B 示出当在用 (Z01154)2 包被的 ELISA 平板上分析时,如实施例 5 所述在 0-45 天从用 (Z01154)2 注射的灵长类动物获得的血清的 ELISA 滴定曲线。

[0132] 图 14A-14B 示出当在用 (Z01154)2-ABD00239 包被的 ELISA 平板上分析时,如实施例 5 所述在 0-45 天从用 (Z01154)2-ABD00239 注射的灵长类动物获得的血清的 ELISA 滴定

曲线。

[0133] 图 15 示出分别在图 13 和图 14 中分析的 A) (Z01154)2 和 B) (Z01154)2-ABD00239 样品的标准化值。样品吸光度针对 1600x 稀释度的阳性对照标准化。

[0134] 本发明将通过所进行的非限制性实验描述进一步描述。除非另外说明,使用常规化学和分子生物学方法。

实施例

[0135] 实施例 1

[0136] 构建白蛋白结合多肽变体的噬菌体展示文库

[0137] 概述

[0138] 在本实施例中,产生了多肽变体的噬菌体展示文库,其通过在链球菌菌株 G148 的白蛋白结合结构域 GA3(以下称为“ABD”)的螺旋 2 和 3 的 16 个位置的变化产生。ABD 的野生型序列(“ABDwt”)在图 1 中的 SEQ ID NO:491 和后附的序列表中示出。基于先前描述的 pAffi1 载体 (Grönwall et al, J Biotechnol 128:162-183, 2007) 的新噬菌体展示载体 (pAY1075) 被构建用于这一新文库。变化的 ABD 片段 (螺旋 2-3) 用限制酶 SacI 和 NheI 克隆进 pAY1075。纯化连接液并电穿孔进大肠杆菌 RR1 Δ M15 细胞 (Rüther, Nucleic Acids Res 10:5765-5772, 1982)。新构建的文库命名为 LibABDmat2005 并由 2 个亚文库组成,取决于哪些寡核苷酸被用于产生螺旋 2 和 3 的变化的序列。一个在 ABD 分子上构建,另一个在 ABD 的位置 17 和 18 之间插入一额外氨基酸,一些与 ABD 同源的蛋白质具有其 (参见例如 Rozak et al, Biochemistry 45:3263-3271, 2006)。LibABDmat2005 的大小是 1×10^9 个成员 (每个亚文库 5×10^8)。新文库的质量是满意的, DNA 测序显示大约 87% 的克隆是功能性的并且氨基酸相对频率的测量值与理论值良好符合。

[0139] 构建噬菌粒载体 pAY1075

[0140] 构建了新噬菌体展示载体 (pAY1075) 用于该新文库。pAY1075 基于噬菌粒载体 pAffi1 (Grönwall et al, supra)。为产生 pAY1075, pAffi1 用 XhoI 和 XmaI (10 单位 / μ l; New England Biolabs) 消化,产生新的插入序列或克隆盒并连接进载体。所述新插入序列含有 DNA, 编码 ABDwt 的螺旋 1、虚拟序列、凝血酶位点、Zwt (基于葡萄球菌蛋白 A 的结构域 B 的工程化 IgG 结合结构域, 参见 Nilsson et al, Prot Eng 1:107-113, 1987)、截短的 GIII (残基 249-406)、终止结构域 TT 和一些额外的限制酶位点。由这一插入序列编码的元件的示意图见图 2A。图 2B 显示了当虚拟序列被编码剩余 ABD 变体多肽的序列置换时表达载体的插入序列 (见下述)。在克隆实验和文库构建中用作引物的各种 DNA 寡核苷酸和模板的序列见下表 1。

[0141] 表 1:寡核苷酸引物和模板

[0142]

Oligo	Sequence
AFFI-21	5' -tgcttccggctcgtatgttgtgtg-3'

AFFI-22	5' -cggaaccagagccaccaccgg-3'
AFFI-40	5' -tccccccgggtaagactccttattacgcag-3'
AFFI-72	5' -biotin-cggaaccagagccaccaccgg-3'
AFFI-772	5' -gaagcctcgagttagctgaagctaaag-3'
AFFI-773	5' -gttagctgaagctaaagtcttagctaacagagagctctgaaagcttggttatgc-3'
AFFI-774	5' -cgcgcgaaagctagccaaacttcggatag-3'
AFFI-775	5' -ctagctttccgcgctagacaacaaattcaac-3'
AFFI-776	5' -cggactatacgtatcttcggcgctgagc-3'
AFFI-777	5' -gaaatacgtatagtcgggtgggtgctc-3'
AFFI-791	5' -acagagagctcgacaaatatggag-3'
AFFI-792	5' -cggaaagctagcagtaatgcagc-3'

[0143] Oligo :寡核苷酸 sequence :引物 biotin :生物素

[0144] 为了产生用于 pAY1075 的新的克隆盒,用图 3A 的引物,从 pAffi1 经 PCR 扩增虚拟片段和 GIII,从质粒 pEZZ18(Löwenadler et al, Gene58 :87-97, 1987) 扩增 Zwt。新产生的片段互相有重叠节段,如图 3B 所示。PCR 片段用 QIAquick 凝胶提取试剂盒 (Qiagen) 根据厂商推荐凝胶纯化,之后在组装 PCR 中用寡核苷酸 AFFI-772(图 3B) 组装在一起。用外部引物 AFFI-772 和 AFFI-40 进行另外的 PCR 反应以扩增完整片段。PCR 产物用 QIAquick PCR 纯化试剂盒 (Qiagen) 根据厂商推荐纯化。

[0145] 质粒 pAffi1 用 QIAgen™ midi-prep 试剂盒 (Qiagen) 根据厂商推荐纯化。之后, pAffi1 和用于克隆盒的扩增的 PCR 片段用 XhoI 和 XmaI (10 单位 / μ l ; New England Biolabs) 在 NEB4 缓冲液 (20mM Tris acetate, 10mM 醋酸镁, 50mM 醋酸钾, 1mM 二硫苏糖醇, pH 7.9 ; New England Biolabs) 中于 37°C 消化 1 小时,载体之后用牛肠碱性磷酸酶 (CIAP ; Fermentas) 去磷酸化。消化液在 1% 琼脂糖凝胶上用 QIAquick 凝胶提取试剂盒根据厂商推荐纯化。新片段在室温用 T4DNA 连接酶 (5 单位 / μ l ; Fermentas) 连接进 XhoI 和 XmaI 裂解的 pAffi1 1 小时。部分连接混合物用 1mm 小池电穿孔进 E. coli TG1 细胞 (Stratagene)。细胞铺板于补加 200 μ g/ml 氨苄青霉素的胰蛋白月示血琼脂基平板 (TBAB 平板 ; 30g/1 TBAB) 上。具有正确插入序列的克隆经 PCR 鉴别,使用 3 种不同引物对 AFFI-21/AFFI-42, AFFI-47/AFFI-40 及 AFFI-21/AFFI-40。PCR 片段在 1% 琼脂糖凝胶上分析,阳性克隆用 QIAprep Miniprep 试剂盒 (Qiagen) 根据厂商推荐质粒纯化,置于用引物 AFFI-38, 40, 71, 72 和 772 使用 ABI PRISM® BigDye™ Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction 试剂盒 3.1 (Applied Biosystems) 测序。测序 PCR 反应在 Magnathx

8000 仪器 (Magnetic Biosolutions) 上纯化,核苷酸序列用 ABI PRISM® 3100Genetic analyzer(Applied Biosystems) 确定。Sequencer™v 4.0.5(Gene Codes Corporation) 用于记录和分析序列数据。测序揭示了新的噬菌粒载体已成功产生。具有虚拟序列的载体 (pAY1075) 或具有编码变化的 ABD 螺旋 2 和 3 的序列的载体 (pAY1075-ABD) 的载体图谱分别示于图 4 和图 5。

[0146] 设计变体 ABD 序列文库

[0147] 如下制备了一组具有针对 ABD 分子的螺旋 2 和 3 的随机序列的寡核苷酸。这些寡核苷酸随后用于置换 pAY1075 中的虚拟序列,以产生 pAY1075-ABD(图 2B 和图 5)。pAY1075-ABD 载体随后用于在噬菌体表面上表达 ABD 变体文库。

[0148] 设计是基于来自 ABD 的丙氨酸突变 (Linhult et al,Protein Science11:206-213,2002)、ALB8-HSA 复合物研究 (Lejon et al,J BiolChem279:42924-42928,2004)、与其它已知白蛋白结合结构域的序列同源性及寡核苷酸制备的容易性的信息。选择了 SEQ ID NO:491 代表的 ABDwt 序列中 16 个氨基酸位置用于一定程度随机化,并基于如下特征分成 4 组:(I) 疏水核心,(II) 保守位置,(III) 静电相互作用和 (IV) 其它:

[0149] (I) 位置 Y20、L24、L27 和 I41 参与产生中心疏水核心,与血清白蛋白相互作用。这些位置在与 ABD 同源的结构域中是高度保守的,这些位置中的随机化测试是否另一个疏水氨基酸残基可以改良疏水相互作用。

[0150] (II) 位置 18'、S18、T30、E32 和 G33 在白蛋白结合结构域中非常保守。位置 S18 和 T30 参与 2 个分子间 H 键,随机化的基本原理是相似的极性氨基酸如苏氨酸 (T) 和天冬酰胺 (N) 也可行。E32 和 G33 不与结合表面相互作用至任何高程度。但是它们可能对于蛋白质结构是重要的,感兴趣的是了解另一个氨基酸是否可行。ABDwt 的序列不包含位置 18' (即 18' 代表在 ABDwt 的位置 17 和 18 之间的添加的氨基酸残基),但是同源结构域在该位置具有苏氨酸或丝氨酸。感兴趣的是了解用这一额外氨基酸是否可改良结合。

[0151] (III) 位置 N23、N27、K29 和 E40 参与或可以参与静电相互作用。在这些位置的随机化基于有兴趣了解是否可以增强或抑制这些氨基酸残基与白蛋白的吸引或排斥相互作用的一些。

[0152] (IV) 位置 A36、K35 和 D39 由于其它类似考虑被随机化。

[0153] 为了在每个位置产生希望的氨基酸残基混合物,根据表 2 变化 ABDwt 序列。变异被分为“随机化的”或“掺杂的”。在“随机化的”位置中,所有选择的氨基酸均比其它更常见,即该位置朝向原始氨基酸偏倚 (biased)。

[0154] 表 2: 变体 ABD 序列的设计策略

[0155] Randomized position: 随机化的位置 position:位置 desired variation:希望的变化 condon combination:密码子组合 codon: 密码子 amino acid:氨基酸

[0156] All except aromatic:除芳香族之外的所有 all:所有 doped position:掺杂的位置 no codon:无密码子

[0157]

<i>Randomized positions</i>				
Position	Desired variation	Codon combinations ¹	# codons	# amino acids
20	F, Y	T(T/A)T	2	2
23	N, S, K, R	A(G/A)(A/C)	4	4
27	N, S, K, R	A(G/A)(A/C)	4	4
33	All except aromatic	(C/A/G)N(G/T)	24	16
35	All	NN(G/T)	32	20
36	S, T, A	(T/A/G)CC	3	3
39	All	NN(G/T)	32	20
40	H, E, D, Q	(G/C)A(G/T)	44	
<i>Doped positions</i>				
Position	Desired variation ²	Codon combinations ¹	# codons	# amino acids
18'	<u>S</u> , S, T	no codon (50 %) + A(C/G)C	3	3
18	<u>S</u> , T, N	AGT (80 %) + A(A/G/C)C	3	3
24	F, <u>L</u> , I, M, V	CTG/T (70 %) + NT(G/T)	8	5
29	R, <u>K</u>	AAG (90 %) + A(G/A)A	2	2
30	<u>T</u> , S, N	ACT (80 %) + A(A/G/C)C	3	3
32	All (<u>E</u>)	GAG (72 %) + NN(G/T)	32	20
37	F, <u>L</u> , I, M, V	CTG/T (70 %) + NT(G/T)	8	5
41	F, L, <u>L</u> , M, V	ATT (84 %) + NT(G/T)	8	5

[0158] ¹N = 任何核苷酸

[0159] ² “掺杂”或偏倚朝向下划线的氨基酸残基

[0160] 从 Scandinavian 5 Gene Synthesis AB 获得寡核苷酸混合物 AFFI-793 和 AFFI-794, 其相应于编码根据表 2 修饰的 ABDwt 的残基 13-46 的 DNA 并包括限制位点。AFFI-794 包括由位置 18' 代表的额外氨基酸。

[0161] AFFI-793 :

[0162]

```

          41 40 39      37 36 35      33 32      30 29      27      24 23
5'-TTGCTAGCAGGTAATGCAGCTAAXXXXXXXXXTATXXXXXXXXTACXXXXXXXXAACXXXXXXXXGGCXXXGTTGATXXXXXXXXCTT
   20      18
GTAXXXGTCXXXTACTCCATATTTGTCGAG-3'      113 bp
    
```

[0163] AFFI-794 :

[0164]

```

          41 40 39      37 36 35      33 32      30 29      27      24 23
5'-TTGCTAGCAGGTAATGCAGCTAAXXXXXXXXXTATXXXXXXXXTACXXXXXXXXAACXXXXXXXXGGCXXXGTTGATXXXXXXXXCTT
   20      18 18'
GTAXXXGTCXXXXXXXXTACTCCATATTTGTCGAG-3'      116 bp
    
```

[0165] 表 3 总结了在实现表 2 所述文库设计所需的寡核苷酸混合物中的所需的核苷酸分布百分比。

[0166] 表 3 :AFFI-793 和 AFFI-794 寡核苷酸混合物中的核苷酸分布

[0167]

Nucleotide	Position																										
	18'			18			20			23			24			27			29			30					
	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3			
T	0	0	100	0	10	100	0	50	0	50	50	100	0	0	10	50	50	100	100	90	100	0	10	100			
C	0	50	0	0	80	0	0	0	0	0	50	0	50	0	10	0	50	0	0	10	0	0	10	0			
A	0	0	0	0	0	0	100	50	100	0	0	0	50	100	10	0	0	0	0	0	0	0	0	0			
G	100	50	0	100	10	0	0	0	0	50	0	0	0	0	70	50	0	0	0	0	0	0	0	0			
	32			33			35			36			37			39			40			41					
	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3			
T	0	79	7	0	25	33	0	25	25	0	0	33	0	0	10	0	25	25	0	100	0	0	0	88			
C	90	7	79	50	25	34	50	25	25	0	0	34	50	0	10	50	25	25	50	0	50	10	0	4			
A	10	7	7	50	25		50	25	25	0	0	33	50	100	10	50	25	25	50	0	0	90	100	4			
G	0	7	7	0	25	33	0	25	25	100	100	0	0	0	70	0	25	25	0	0	50	0	0	4			

[0168] Nucleotide :核苷酸 position :位置

[0169] 文库构建

[0170] 下述程序用于产生编码 ABD 变体的基因文库 LibABDmat2005。在一个组装反应中，寡核苷酸 AFFI-791 和寡核苷酸混合物 AFFI-793 或 AFFI-794 退火并用 Taq DNA 聚合酶延伸。进行使用外部引物 AFFI-791 和 AFFI-792 的 PCR 反应以扩增片段。PCR 产物用 QIAquick PCR 纯化试剂盒 (Qiagen) 根据厂商推荐纯化。

[0171] 用 Qiagen plasmid midi 试剂盒 (Qiagen) 根据厂商推荐从 250ml 过夜培养物 (tryptic soy broth, 2% 葡萄糖, 100 μg/ml 氨苄青霉素) 制备噬菌粒 pAY1075。该噬菌粒用 SacI 和 NheI (10 单位 / μl ;New England Biolabs) 在 NEB4 缓冲液 (20mM Tris acetate, 10mM 醋酸镁, 20mM 醋酸钾, 1mM 二硫苏糖醇, pH 7.9 ;New England Biolabs) 中于 37°C 消化 3 小时。该溶液用酚 / 氯仿纯化和乙醇沉淀, 载体然后从 1% 琼脂糖凝胶用 QIAquick gel extraction 试剂盒 (Qiagen) 根据厂商推荐纯化。

[0172] 来自 AFFI-791 和 AFFI-793 或 AFFI-794 之间的组装反应的 PCR 扩增片段用 SacI 和 NheI 在 NEB4 缓冲液中于 37°C 消化 3 小时。DNA 片段从 1% 琼脂糖凝胶用 QIAquick gel extraction 试剂盒 (Qiagen) 根据厂商推荐纯化。所得的编码两个亚文库 ABD 变体的基因片段在室温用 T4 DNA 连接酶 (5 单位 / μl ;Fermentas) 连接进 SacI 和 NheI 裂解的 pAY1075 中。

[0173] 连接反应然后酚 / 氯仿提取, 乙醇沉淀并溶解于小体积的 10mM Tris 中。电感受态 E. coli RR1 ΔM15 细胞 (Rüther, 1982, supra) 用 60 等份的两个亚文库的每一个的连接材料转化, 使用 0.2cm 间隔大小的小池, 于 ECM630set (BTX) 中, 使用参数 2.5kV, 125 Ω 和 50 μF。细胞在 SOC 培养基 (47ml TSB+YE (30g/l tryptic soy broth, 5g/l 酵母膏), 补加 1% 葡萄糖、10mM MgCl₂、10mM MgSO₄、10mM NaCl 和 2.5mM KCl) 中生长 50 分钟, 转移到 10 个 Erlenmayer 瓶中, 每个瓶含有 1L 补加 2% 葡萄糖和 100 μg/ml 氨苄青霉素的 TSB+YE (30g/l tryptic soy broth, 5g/l 酵母膏), 并在 37°C 生长过夜。细胞然后在 6000g 离心, 重悬于 PBS/ 甘油溶液 (PBS:2.68mM KCl, 1.47mM KH₂PO₄, 137mM NaCl, 8.1mM Na₂HPO₄, pH7.4) 至最终大约浓度为 20% 甘油。细胞然后等份化并储存在 -80°C。电穿孔、扩增和转移至甘油原液后的细胞数在补加 200 μg/ml 氨苄青霉素的 TBAB 平板上滴定。

[0174] 每个亚文库的大小是 5x 10⁸, 即文库 LibABDmat2005 的总大小是 1x10⁹。该文库被扩增大约 50000 次, 甘油原液的密度大约为 1x 10¹¹细胞 /ml。在此, 文库的“大小”是指包

括在文库中的成员总数,不考虑由文库编码的独特的变体的数目。

[0175] 来自两个亚文库各 96 个集落被挑取进行 DNA 测序以核实具有征求读框的克隆的设计和频率。这些随机挑取的集落从甘油原液培养并源自每个文库的集合,其用寡核苷酸 AFFI-21 和 AFFI-22 进行 PCR 扩增。用 ABI PRISM® dGTP, BigDye™ Terminator v3.0 Ready Reaction Cycle Sequencing 试剂盒 (Applied Biosystems) 根据厂商推荐用生物素化寡核苷酸 AFFI-72 进行扩增片段的测序。测序反应通过用 Magnathx 8000 (Magnetic Biosolutions) 结合链霉抗生物素蛋白包被的磁珠而纯化,并在 ABI PRISM®3100 Genetic Analyser (Applied Biosystems) 上分析。

[0176] 在用 AFFI-793 产生的亚文库中,3 个克隆不能读出,11 个是不正确的,7 个克隆是来自其它亚文库的污染。这个亚文库中的氨基酸分布从测序数据推导出,与理论值比较,结果见图 6。

[0177] 关于使用 AFFI-794 产生的亚文库,3 个克隆不能读出,16 个是不正确的。这个亚文库中的氨基酸分布从测序数据推导出,与理论值比较,结果见图 7。

[0178] 每个氨基酸的频率与预期值符合良好,大约 87% 的克隆具有正确读框。

[0179] 实施例 2

[0180] 白蛋白结合多肽变体的噬菌体展示选择和鉴定

[0181] 概述

[0182] 生物素化人血清白蛋白 (HSA) 在使用实施例 1 构建的文库的噬菌体展示选择中用作靶。选择用各种条件进行以最大化获得具有对白蛋白高亲和性的 ABD 变体的可能性。在进化选择的噬菌体后,相应于的表达的蛋白质在 ELISA 中被测试对白蛋白的亲合性。鉴别阳性克隆并测序,相应的多肽及其白蛋白结合基序的预测氨基酸序列被推导,其产生大量本发明的白蛋白结合多肽的序列。推导的白蛋白结合基序的氨基酸序列列于图 1 和序列表中的 SEQ ID NO:1-257,相应的全长 ABD 变体的氨基酸序列列于图 1 和序列表中的 SEQ ID NO:258-514。

[0183] 人血清白蛋白的生物素化

[0184] 冻干的人血清白蛋白 (Sigma, cat. no. A3782-5G) 溶解在 PBS 中 (2.68mM KCl, 1.47mM KH₂PO₄, 137mM NaCl, 8.1mM Na₂HPO₄, pH 7.4) 至终浓度为 10mg/ml。EZ-link Sulfo-NHS-LC-Biotin (Pierce, cat. no. 21335) 溶解在水中至终浓度为 1mg/ml 并且 5 和 10 倍摩尔过量被加入到在总体积 0.5ml 中的 500mg 白蛋白中。混合物在室温保温 30 分钟。未结合的生物素通过用透析盒 (Slide-A-Lyser, 10kDa ;Pierce) 对 PBS 透析除去。

[0185] 噬菌体展示选择

[0186] 总共进行 5 轮选择,使用增加的严格条件。在最初 3 轮主要建立合适选择方案后,从实施例 1 制备的甘油原液制备所得噬菌体原液。然后用表 4 所列选择缓冲液、靶浓度和固体支持物的组合进行 2 轮选择。

[0187] 表 4:HSA 选择的选择条件

[0188]

	样品名称	选择缓冲液	靶浓度 (pM)	珠 (μg)

第 4 轮	A	明胶	1000	100
	B	明胶	200	100
	C	BSA	400	100
	D	BSA	100	100
第 5 轮	A	明胶	500	50
	B	明胶	50	50
	C	BSA	100	50
	D	BSA	10	50

[0189] 选择程序中用的所有试管和珠在 TPBSB(5%) (0.05% Tween 20, 5% 牛血清白蛋白 (BSA), 0.02% 叠氮化钠于 PBS 中) 或明胶 (0.5%) 中在室温温和搅拌下预封闭 30 分钟, 随后不搅拌 4°C 过夜。

[0190] 选择溶液 (1ml) 含有生物素化人血清白蛋白、噬菌体、叠氮化钠 (0.02%)、Tween 20 (0.05%) 和 BSA (3%) 或明胶 (0.1%), 如表 4, 并在 PBS 中制备。噬菌体与生物素化人血清白蛋白靶在第 4 轮的 3 天期间及在第 5 轮的 1 天期间在 4°C 保温, 随后在搅拌下在室温保温 1 小时。选择样品转移至封闭的链霉抗生物素蛋白珠, 在室温搅拌下保温 15 分钟。珠用 1ml 选择缓冲液 (即 TPBSB(3%) (0.05% Tween 20, 3% 牛血清白蛋白 (BSA), 0.02% 叠氮化钠于 PBS 中) 或 GT(0.1%) (0.1% 明胶, 0.1% Tween 20 和 0.02% 叠氮化钠于 PBS 中)) 洗 10 次, 随后用 PBS 洗 10 次, 其中第 2 次至最后一次洗涤用时 2 小时。噬菌体用 1000ml 0.05M 甘油-HCl, pH 2.2 在室温进化 10 分钟, 随后用补加 100ml 1M Tris-HCl, pH 8.0 的 900ml PBS 立即中和, 或者用 1000 μ l 胰蛋白酶 (2mg/ml) 在室温进化 30 分钟, 随后添加 1000 μ l 抑酶肽。每轮选择后, 进化的噬菌体 (3/4 体积) 用于感染 50ml 对数期 E. coli RR1 Δ M15 细胞 (Rüther, 1982, supra)。温和搅拌保温 30 分钟和在 37°C 剧烈搅拌 30 分钟后, 离心细胞, 沉淀溶于小体积并涂布于 TSB+YE 平板 (30g/l tryptic soy broth, 5g/l 酵母膏), 最后在 37°C 保温过夜。

[0191] 选择循环导致满意数目的进化噬菌体。

[0192] 噬菌体原液制备

[0193] 来自平板的细胞重悬于 TSB 培养基中 (30g/l tryptic soy broth), 细胞浓度通过测量 600nm 的光密度确定, 假定 $OD_{600} = 1$ 相应于 5×10^8 细胞/ml。细胞在 100ml 补加 2% 葡萄糖和 100mg/ml 氨苄青霉素的 TSB+YE 培养基中保温 (细胞相比于进化噬菌体大约 100 倍过量), 并在 37°C 生长至大约 $OD_{600} = 0.5-0.7$ 。之后, 10ml 转移至新培养瓶并用 25 倍过量的 M13K07 辅助噬菌体 (1×10^{12} cfu/ml; New England Biolabs, cat. no. N0315S) 感染, 并缓慢搅拌保温 30 分钟。细胞在 2000g 离心 10 分钟并重悬于 100ml 补加 100mM 异丙基- β -D-1- 硫代半乳糖吡喃糖苷 (IPTG)、50mg/ml 卡那霉素和 100mg/ml 氨苄青霉素的 TSB+YE 培养基中, 在 100rpm、25°C 生长过夜。一部分重悬细胞在 -80°C 储存作为甘油原液。

[0194] 诱导的培养物在 2500rpm 离心 10 分钟,通过加入 1/4 体积的沉淀缓冲液 (PEG/NaCl) 沉淀上清中的噬菌体并在冰上保温 1 小时。沉淀的噬菌体在 4°C 10000g 离心 30 分钟而沉淀,重悬于 20ml PBS 中,之后噬菌体溶液过滤经过 0.45 μ m 滤膜。重复沉淀程序,噬菌体最终重悬于 1ml PBS 中。

[0195] 选择溶液在选择后与每一轮选择后的洗涤和进化溶液一起滴定。噬菌体溶液在微滴板中于无菌水中稀释,向每一噬菌体稀释液中加入 100 μ l 对数期 *E. coli* RR1 Δ M15 细胞。在室温保温 20 分钟后,来自每个滴定的 5 μ l 滴加到 TYE 平板 (15g 琼脂、10g 胰胨、5g 酵母膏、3g NaCl,补加 2%葡萄糖和 100 μ g/ml 氨苄青霉素) 上并在 37°C 保温过夜。所得菌落计数并计算效价 (cfu/ml)。

[0196] 白蛋白结合的 ELISA 分析

[0197] 来自每个选择的克隆加上 ABDwt 被表达和筛选 HSA 结合活性,使用使得能检测具有对血清白蛋白的从 10nM 至低 pM 的 K_D 值的结合剂的 ELISA 设置。随机挑取的菌落在 96 孔深孔板中表达,这通过将每个菌落接种于 1ml 补加 100mg/ml 氨苄青霉素和 1mM IPTG 的 TSB+YE 培养基中并在 37°C 生长过夜而进行。细胞在 3000g 离心 15 分钟沉淀,重悬于 400 μ l PBS-T (0.5% Tween 20 于 PBS 中) 并在 -80°C 冷冻。冷冻样品在水浴中解冻,在 3700g 沉淀细胞碎片 40 分钟。收集含有 ABD 变体-Zwt 融合蛋白的上清并 4°C 储存直至用于如下 ELISA 中。

[0198] 微滴定孔 (Costar) 用 100 μ l HSA 在 4°C 包被过夜,及用对照大鼠血清白蛋白 (RSA)、人血清白蛋白 (HSA) 和小鼠血清白蛋白 (MSA) 各在 1 孔中包被,浓度为 0.4 μ g/ml 于 ELISA 包被缓冲液 (0.1M 碳酸钠, pH 9.5) 中。孔用封闭缓冲液 (2%牛奶于 PBS 中) 在室温封闭 2 小时。向每孔中加入 100 μ l 的制备的 ABD 变体-Zwt 融合蛋白,平板在室温保温 1.5 小时。向孔中加入浓度为 0.5mg/ml 于洗涤缓冲液中 (0.5% Tween 20 于 PBS 中) 的生物素化 IgG 并保温 1.5 小时,从而任何白蛋白结合融合蛋白的 Zwt 部分可以结合 IgG。结合的复合物用在洗涤缓冲液中 1:5000 稀释的辣根过氧化物酶缀合的链霉抗生物素蛋白 (Dako, cat. no. P0397) 检测,并在室温保温 1 小时。通过将等体积的 TMB 底物 A 和 B (ImmunoPure TMB, Pierce) 混合制备显色溶液,并将 100 μ l 加入到每孔中。黑暗中保温 30 分钟后,加入 100 μ l 终止溶液 (2M H_2SO_4)。平板在 ELISA 分光光度计 (Basic Sunrise, Tecan) 中在 A_{450} 读数。在加入每种新试剂之前,用洗涤缓冲液洗 4 次。

[0199] 总共 372 个克隆 (表 4 样品 A-D 的每种选择各 93 个克隆) 被随机挑取用于用上述 ELISA 设置分析其 HSA 结合活性。大多数分析的克隆相比于低皮摩尔结合 (70pM; 未公布结果) 的 ABDwt 与小鼠血清白蛋白相互作用给出更高的对 HSA 的信号基于这个实验的结果,挑取克隆如下测序。

[0200] 测序 ELISA 阳性克隆

[0201] 来自选择的菌落的 PCR 片段用寡核苷酸 AFFI-69 (5'-gtgagcggataacaattccctc-3') 和 AFFI-70 (5'-cagcaaaaaaccctcaagacc-3') 扩增。用 ABI PRISM® dGTP, BigDye™ Terminator v3.0 Ready Reaction Cycle Sequencing 试剂盒 (Applied Biosystems) 根据厂商推荐用生物素化寡核苷酸 AFFI-202 (5'-生物素-gtgagcggataacaattccctc-3') 进行扩增片段的测序。测序反应通过用 Magnathx 8000 仪器 (Magnetic Biosolutions) 结合链霉抗生物素蛋白包被的磁珠纯化,最后在

ABI PRISM® 3100Genetic Analyser(Applied Biosystems) 上分析。

[0202] 对在 ELISA 筛选中显示最高 A_{450} 值的克隆测序它们的 ABD 变体插入序列。257 个不同的鉴别的 ABD 变体命名为 ABD#####, 其中 ##### 是针对讨论的变体的 5 位独特标记。这些鉴别的 ABD 变体的序列列于图 1 作为 SEQ ID NO :258-514。基因野生型或“亲代”ABD 的白蛋白结合性质的现有知识, 鉴别的 ABD 变体的白蛋白结合基序被降低至位于螺旋 2 和 3 中, 相应于从氨基酸位置 G16 至 I41 的序列段。鉴别的 ABD 变体的白蛋白结合基序以 ABM##### 命名, 其中 ##### 是针对讨论的基序的 5 位独特标记。鉴别的白蛋白结合基序的序列列于图 1 作为 SEQ ID NO :1-257。令人感兴趣地, 鉴别的序列的一个亚集合包含在相应于 ABDwt 的位置 38 的自发突变, 尽管这一位置在产生变体文库时未被随机化。

[0203] ABD 变体亚克隆进 pAY442

[0204] 编码 ABDwt 的 DNA (SEQ ID NO :515) 和来自选择的 12 个克隆被选择用于亚克隆进表达载体 pAY442 (Grönwall et al, supra) 中。参照图 1, 选择的 ABD 变体克隆是 ABD00002, ABD00003, ABD00009, ABD00015, ABD00025, ABD00027, ABD00046, ABD00049, ABD00053, ABD00054, ABD00055 和 ABD00245。含有编码这些 ABD 变体分子的插入序列的质粒使用 Qiagen Mini 试剂盒 (Qiagen) 根据厂商推荐从 2ml E. coli RR1 Δ M15 细胞 (Rüther, 1982, supra) 的过夜培养物 (tryptic soy broth 培养基 (30g/l), 补加 2% 葡萄糖和 100 μ g/ml 氨苄青霉素) 中纯化。

[0205] 编码 ABDwt 和 ABD 变体分子的 DNA 通过 AccI-NotI PCR 粘末端克隆 (10 单位 / μ l 每种酶; New England Biolabs) 被亚克隆进表达载体 pAY442, 使用表 5 所列引物对 AFFI-780, -898 和 AFFI-782, -899 :

[0206] 表 5 :寡核苷酸引物

[0207]

Oligo	Sequence
AFFI-780	5' -P-agacttagctgaagctaaagtcttagc-3'
AFFI-782	5' -acttagctgaagctaaagtcttagc-3'
AFFI-898	5' -gctttaaggtaatgcagctaaaat-3'
AFFI-899	5' -P-ggccgctttaaggtaatgcagctaaaat-3'

[0208] Oligo :寡核苷酸 sequence :序列

[0209] 从文库载体 pAY1075 针对每个 ABD 变体分子产生 2 个重叠 PCR 产物, 导致大约 25% 的具有 AccI-NotI 位点的正确片段。表达载体 pAY442 在二步中在 37°C 消化 4 小时, 使用分别在 NEB4 缓冲液 (20mM Tris acetate, 10mM 醋酸镁, 50mM 醋酸钾, 1mM 二硫苏糖醇, pH 7.9 ;New England Biolabs) 和 NEB3 缓冲液 (50mM Tris-HCl, 10mM MgCl₂, 100mM NaCl, 1mM 二硫苏糖醇, pH 7.9 ;New England Biolabs) 中的 AccI 和 NotI, 并且用牛肠碱性磷酸酶 (CIAP ;Fermentas) 在 37°C 去磷酸化 1 小时。裂解的质粒和片段用 QIAquick PCR 纯化试剂盒 (Qiagen) 根据厂商推荐纯化。

[0210] PCR 产物杂交并连接进 AccI-NotI 消化和去磷酸化的 pAY442, 反应实验 T4DNA 连接酶 (5 单位 / μ l ; Fermentas) 在室温进行 1 小时。部分连接液电穿孔进 E. coli BL21 (DE3) 细胞 (F-ompT hsdS_B (r_B-m_B-) gal dcm(DE3)), 电穿孔用 1mm 小池和 ECM 630 装置 (BTX), 使用参数 1700V, 200 Ω 和 25 μ F。细胞在补加 50 μ g/ml 卡那霉素的胰蛋白月示血琼脂基平板 (TBAB) 铺板并在 37°C 保温过夜。阳性克隆首先在细菌 PCR 产物的琼脂糖凝胶上核实, 最后用 DNA 序列分析核实。

[0211] 含有亚克隆的 ABD 变体的 pAY442 克隆编码图 8 所述构建体, 即基本上是 His₆ 标记的 ABD 变体。

[0212] His₆ 标记的 ABD 变体的变体和纯化

[0213] ABDwt 和 12 个 ABD 变体均亚克隆在上述 pAY442 中, 在 E. coli BL21 (DE3) 中表达为与 N- 末端 His₆ 标记的融合体, 并用 IMAC 纯化。每个 ABD 变体的菌落用于接种 5ml 补加 50 μ g/ml 卡那霉素的 TSB 培养基。培养物在 37°C 生长过夜。第二天, 将 50 μ l 每种培养物单独接种在 1 升培养瓶中的 100ml 补加 50 μ g/ml 卡那霉素的 TSB+YE 培养基。培养物在 100rpm 于 37°C 生长至 OD₆₀₀ 为 0.7-1, 之后加入 IPTG 至终浓度为 0.5mM, 细胞在 100rpm 于室温保温过夜。在 8000g 离心 5 分钟收集培养物, 沉淀储存在冰箱中直至蛋白质制备。

[0214] 在变性条件下用 Ni-NTA Superflow 柱和 QIAsoft 4.1, protein/Ni-NTA Superflow 96denaturing large scale 2Vac4-24 样品在 Biorobot 3000 (Qiagen) 上 IMAC 纯化 His₆ 标记的蛋白质。通过用透析盒 (Slide-A-Lyser, 3.5kDa ; Pierce cat.no. 66330) 对 5 升 PBS 透析 2 小时将缓冲液置换为 PBS, 随后进一步过夜透析。

[0215] 蛋白质浓度用 A₂₈₀ 和 BCA Protein Assay Reagent 试剂盒 (Pierce) 如厂商推荐确定。蛋白质纯度在 4-12% Novex 凝胶上经 SDS-PAGE 分析并用考马斯蓝 R 染色, 这一分析显示仅少量杂质存在。

[0216] 生物传感器分析 ABD 变体对 HSA 和 MSA 的亲和性

[0217] 在 Biacore2000 仪器 (Biacore) 上的生物传感器分析用经胺偶联到 CM-5 芯片 (研究级 ; Biacore) 表面上的羧基化葡聚糖层固定化的 MSA、HSA 和 RSA 根据厂商推荐进行。芯片上的表面 1 被活化和失活并用作注射期间的参考细胞 (cell), 而表面 2 包含用 350RU (共振单位) 固定化的 MSA, 表面 3 包含用 360RU 固定化的 HSA, 表面 4 包含用 340RU 固定化的 RSA。如上所述表达和纯化的 ABD 变体和 ABDwt 在 HBS-EP (Biacore) 中稀释至 25nM 并以恒定流速 25 μ l/min 注射 10 分钟, 随后注射 HBS-EP 30 分钟。表面用两次注射 20 μ l 15mM HCl 随后 0.05% SDS 和一次注射 20 μ l HCl 而再生。

[0218] Biacore 研究的进行不是为了确定变体对人和小鼠血清白蛋白的亲和性的精确参数, 而是结果提供了这些分子对白蛋白的相对亲和性的定性测量。结合 MSA 和 HSA 的结果见表 6。

[0219] 表 6 : ABD 变体结合来自小鼠和人的血清白蛋白的生物传感器分析

[0220]

	MSA	HSA
	K _D (M)	K _D (M)

ABDwt	4.9×10^{-9}	1.5×10^{-9}
ABD00025	2.2×10^{-9}	2.7×10^{-11}
ABD00049	7.9×10^{-10}	2.2×10^{-11}
ABD00245	6.5×10^{-10}	6.0×10^{-11}
ABD00003	3.3×10^{-9}	1.6×10^{-11}
ABD00009	1.9×10^{-9}	5.4×10^{-11}
ABD00053	5.9×10^{-9}	1.1×10^{-11}
ABD00054	1.3×10^{-9}	2.0×10^{-11}
ABD00015	3.2×10^{-9}	4.5×10^{-11}
ABD00027	1.5×10^{-9}	4.1×10^{-11}
ABD00046	8.9×10^{-9}	1.2×10^{-10}
ABD00055	1.1×10^{-9}	5.4×10^{-11}

[0221] 如表所证明,所有测试的 ABD 变体均具有比野生型 ABD 分子高得多的对人血清白蛋白的亲性和, K_D 值至少低一个数量级,经常接近低二个数量级。另外,对小鼠血清白蛋白的相当的和 / 或更高的亲性和也由全部变体显示。

[0222] 实施例 3

[0223] 选择的 ABD 变体的额外的生物传感器鉴定

[0224] 概述

[0225] 在本实施例中,选择的 ABD 变体 ABD00003, ABD00053 和 ABD00239 加上 ABDwt 全部如实施例 2 所述亚克隆进 pAY442,并以更大规模表达及用 His Gravitrap™试剂盒纯化。表达的分子用 Biacore 仪器鉴定对 HSA 的亲性和。

[0226] His₆标记的 ABD 变体的蛋白质表达和纯化

[0227] 用实施例 2 所述构建体将 ABD00003, ABD00053, ABD00239 和 ABDwt 在 E. coli BL21 (DE3) 细胞中表达为与 N-末端 His₆标记的融合体并经 IMAC 纯化。每个 ABD 变体的一个菌落用于接种 10ml 补加 50 μg/ml 卡那霉素的 TSB 培养基。培养物在 37°C 生长过夜。第二天,500 μl 每种培养物分别接种在 5 升培养瓶中的 500ml 补加 50 μg/ml 卡那霉素的 TSB+YE 培养基。培养物在 37°C 在 100rpm 生长至 OD₆₀₀ 为 0.7-1,随后加入 IPTG 至终浓度为 0.5mM 并在室温保温过夜。在 8000g 离心 5 分钟收集培养物,沉淀储存于 -20°C 直至蛋白质制备。

[0228] His₆标记的蛋白质在变性条件下用 His-Gravitrap™试剂盒 (GE Healthcare) 经 IMAC 纯化。沉淀 (涡旋) 重悬于 20ml 变性缓冲液 B-7M (100mM NaH₂PO₄, 10mM Tris-Cl, 7M

脲, pH 8), 加入 $8 \mu\text{l}$ benzonase。溶液在室温以 200rpm 保温 30 分钟。加入另外 20ml 缓冲液 B-7M, 溶液转移至 50ml Falcon 试管并在冰上如下超声化: 在 3 分钟期间 3 秒开 / 关, 并具有 40% 振幅。细胞碎片通过在 25000g 离心 40 分钟除去。Gravitrapp™ 柱用缓冲液 B-7M 平衡并加入样品。柱然后用 10ml 缓冲液 B-7M, 20ml 结合缓冲液 (20mM NaPO_4 , 500mM NaCl, 20mM 咪唑) 及最后用 10ml 洗涤缓冲液 (20mM NaPO_4 , 500mM NaCl, 60mM 咪唑) 洗涤。ABD 分子用 3ml 洗脱缓冲液 (20mM NaPO_4 , 500mM NaCl, 500mM 咪唑) 洗脱。

[0229] 用 Slide-A-Lyser 透析盒 (3.5kDa ;Pierce, cat. no. 66330) 进行的缓冲液交换为 PBS pH 7.2 是如下进行: 对 5 升 PBS pH7.2 透析 2 小时, 随后过夜透析, 最终根据厂商推荐用 PD10 柱 (GE Healthcare) 交换缓冲液为 PBS pH 5。蛋白质浓度用 Abs_{280} 确定, 蛋白质纯度在 4-12% Novex 凝胶上用 SDS-PAGE 分析并用考马斯蓝 R 染色。

[0230] 蛋白质以可接受收率被成功表达和纯化。凝胶电泳分析显示不存在杂质 (未示出)。

[0231] 对人血清白蛋白的结合动力学的生物传感器分析

[0232] 在 Biacore2000 仪器 (Biacore) 上的生物传感器分析用经胺偶联到 CM-5 芯片 (研究级 ;Biacore) 表面上的羧基化葡聚糖层固定化的 HSA 根据厂商推荐进行。HSA 的固定化产生 450 共振单位的信号。芯片上的一个细胞 (cell) 表面被活化和失活并在注射期间用作参考细胞。纯化的 His₆-ABD 样品在 HBS-EP (Biacore) 中稀释至 4, 10, 40, 100 和 400nM (针对 ABDwt), 及 0.2, 0.8, 2, 5 和 20nM (针对选择的 ABD 变体)。样品以恒定流速 $25 \mu\text{l}/\text{min}$ 注射 10 分钟, 随后注射 HBS-EP 3 小时。表面用两次注射 $20 \mu\text{l}$ 5 和 10mM HCl 再生。估计并在表 7 中给出, 证实实施例 2 的结果, 即获得了显示非常高的对 HSA 的亲亲和性的分子。

[0233] 表 7: 纯化的 ABD 分子对 HSA 的动力学参数 (k_a 、 k_d 和 K_D)

[0234]

	k_a ($\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$)	k_d (s^{-1})	K_D (M)
ABDwt	5.5×10^5	6.5×10^{-4}	1.2×10^{-9}
ABD00003	8.0×10^6	3.0×10^{-5}	3.8×10^{-12}
ABD00053	3.0×10^6	1.5×10^{-5}	5.0×10^{-12}
ABD00239	3.0×10^7	1.5×10^{-5}	5.0×10^{-13}

[0235] 实施例 4

[0236] 与第一个 ABD 变体融合的 Z 变体多肽的灵长类免疫原性和药理学

[0237] 概述

[0238] 先前在小鼠和大鼠中的研究表明与 ABDwt 融合的各种 Z 变体产生与仅 Z 变体相比更低的抗体应答。本研究目的在于 1) 在灵长类中证实这些结果并将其扩展到显示相比 ABDwt 高 10^3 倍的对白蛋白的结合亲和性的 ABD 的突变变体, 和 2) 比较 ABD 融合的和裸的 Z 变体的血清半衰期。将具有对 HER2 受体的亲和性的 Z 变体给予灵长类, 有或没有 ABD 变体作为融合配偶体。在 45 天期间重复免疫和放血过程。用 ELISA 测定分析对 Z 变体分子的特异抗体应答及 Z 变体分子的血清半衰期。

[0239] 研究的分子

[0240] Z00342:Z 蛋白的变体,依次衍生自葡萄球菌蛋白 A 的 B 结构域,具有对 HER2 受体的亲和性。这个变体经重组 DNA 技术产生。用阳离子交换和反向层析方法进行纯化,随后在 Detoxi-Gel™AffinityPak™Pre-packed 柱 (Pierce, cat no 2034) 根据厂商推荐除去内毒素。Z00342 分子的详细描述见 Orlova et al, Cancer Res 66:8, 4339-48 (2006), 在该文章中其被称为 Z_{Her2:342}。

[0241] Z00342-ABD00003:Z 变体 Z00342 与实施例 2 中选择的变体 ABD 分子 ABD00003 的融合蛋白。这个融合蛋白用重组 DNA 技术产生。用在 HSA-sepharose 上的亲和性捕获和反向层析纯化并如上除去内毒素。

[0242] 方法

[0243] 给予及取样方案: 在 SMI (Smittskyddsinsitutet), Solna, Sweden 进行动物研究,当地道德动物委员会准许 (N196/06)。在给予测试分子和取血样前灵长类给予镇静剂,肌肉内给予氯胺酮 (Ketalar®)。10 个短尾猴灵长类 (cynomolgus primates) Macaca fascicularis 分成 2 组,根据表 8 方案静脉内注射测试分子。

[0244] 表 8: 测试分子的给予

[0245]

组	动物编号	分子	给予途径	mg/kg/注射	ml/动物/注射
1	9023, 9039, 10025, 10105, 11019	Z00342	i.v.	0.5	1
2	12031, 12041, 12047, 12061, 12065	Z00342- ABD00003	i.v.	0.5	1

[0246] 给予和放血时间点见表 9。PK 是指用于药动学研究的样品。血液储存在 4℃ 过夜,血清随后在 -20℃ 保持。

[0247] 表 9: 给予测试分子和取血样的时间点

[0248]

天	活动
0	在 0、30、60 分钟、4 小时 (PK) 放血 & 注射 1
1	放血 (PK)
2	放血 (PK)
3	放血 (PK)
7	放血 (PK) & 注射 2
14	放血 & 注射 3
21	放血 & 注射 4

28	放血 & 注射 5
35	放血 & 注射 6
45	放血

[0249] 一般 ELISA 方法：一般地，对于所有保温步骤使用每孔 50 μ l 体积，除了封闭时使用 100 μ l 体积。平板在 4°C 在包被缓冲液 (15mM Na_2CO_3 , 35mM NaHCO_3 , pH 9.6) 中包被过夜，并用自来水洗涤。封闭和稀释在具有 0.5% 酪蛋白的 PBS 中进行。室温的保温时间对于封闭和血清是 1-2 小时，对于第二抗体是 1 小时，对于底物溶液 (ImmunoPure® TMB, Pierce, cat no34021) 是 10 分钟。在所有步骤之间用自动化 ELISA SkanWasher 300 (Skatron) 用每孔 4x250 μ l PBS-T (具有 0.05% Tween 20 的 PBS) 洗涤。颜色反应通过加入 50 μ l 2M H_2SO_4 终止，平板在 450nm 用配有 Magellan 软件 v3.11 (Tecan) 的 Ultra384 读板器 (Tecan) 读出。

[0250] 抗 Z00342 IgG 特异性 ELISA：平板用在包被缓冲液中稀释的 0.3 μ g/ml Z00342 包被并在 4°C 保温过夜。洗涤后，平板如上所述封闭。来自灵长类的血清以起自 1/100 的 2 倍系列稀释液加入。来此超免疫的灵长类的纯化血清用作阳性对照并以起自 8 μ g/ml 的 2 倍系列稀释液加入。保温后，洗涤平板，加入 HRP 缀合的抗人 IgG 二抗 (Southern Biotech cat. no. 2040-05) (1/10000 稀释)。最终保温后，洗涤平板并如上所述显色。

[0251] 用于 PK 分析的血清 -Z 特异性 ELISA：平板用 2 μ g/ml 亲和性纯化的山羊抗 Z Ig (in-house 生产，特异于所有 Z 变体共有的表位) 并 4°C 保温过夜。洗涤后，如上所述封闭平板。来自用 Z00342 或 Z00342-ABD00003 注射的灵长类的血清以起自 1/40 (对于 Z00342) 或 1/80 (对于 Z00342-ABD00003) 的二倍系列稀释液加入。以起自 20ng/ml 的二倍系列稀释液加入每种分子的标准。保温后，洗涤平板，加入第二步抗体 (对 Z00342, 2 μ g/ml 兔抗 Z IgG (in-house 生产)；对于 Z00342-ABD00003, 1/5000 兔抗 Z-ABD IgG (in-house 生产))。保温后，洗涤平板，加入 1:5000 稀释的 HRP 缀合的抗兔 Ig (Dako cat. no. 0448)。最终保温后，洗涤平板并如上所述显色。

[0252] 结果

[0253] 在用 Z00342 注射的灵长类中的特异于 Z 的 IgG：经 ELISA 分析来自每次放血的血清中特异于 Z 变体的 IgG 的存在 (图 9A-9C)。在第 0 天除了一个具有中等水平预形成抗体的灵长类 (9039) 之外均检测到低水平 IgG。在第 14 天后，在三个动物 (9039, 10025, 11019) 中抗体效价稳定增加并在第 28-35 天达到最大，而两个动物显示在 45 天期间低抗体应答 (9023 和 10105)。

[0254] 在用 Z00342-ABD00003 注射的灵长类中的特异于 Z 的 IgG：经 ELISA 分析来自每次放血的血清中特异于 Z-ABD00003 分子的 IgG 的存在 (图 10A-10C)。在两个灵长类 (12047 和 12065) 中未观测到抗体应答，而两个灵长类 (12041 和 12061) 显示高应答。第 5 个灵长类 (12031) 具有高血清前水平抗体，其在 45 天期间几乎不改变。

[0255] 特异于 Z 变体的抗体浓度：血清中特异于 Z 变体的 IgG 的浓度用阳性对照作为标准用线性回归计算 (图 11)。在每组灵长类中有个体差异。在第 45 天，组 1 和组 2 中特异性 IgG 的中位浓度分别是 2 和 0.1 单位 /ml，表示与 ABD00003 的融合降低了抗 Z00342 的抗

体应答。

[0256] Z00342 在血清中的药动学: 在药动学分析中比较了 Z00342 和 Z00342-ABD00003 的循环时间。从标准曲线计算分子随时间推移的浓度, 标准曲线分别从已知量的 Z00342 和 Z00342-ABD00003 的系列稀释液产生。结果显示融合于 ABD00003 的 ABD 融合的 Z00342 与仅 Z00342 相比在血液循环中保持更长 (图 12)。Z00342 在 4 小时内从循环消失, 而 ABD00003 融合分子在 7 天后仍可检测。

[0257] 概述

[0258] 这个研究的结果表明 ABD 融合的 Z 变体分子与不含白蛋白结合融合配偶体的 Z 变体分子相比产生更低的免疫应答及显示延长的消失半衰期。

[0259] 实施例 5

[0260] 与第二个 ABD 变体融合的 Z 变体多肽的灵长类免疫原性

[0261] 研究的分子

[0262] 在实施例 4 的这个延伸中, 具有更高的对白蛋白的亲合性 ($K_D = 10^{-13}M$) 的第二个 ABD 变体与二聚体 Z 变体融合并用于灵长类免疫原性研究。

[0263] $(Z01154)_2$: 蛋白 Z 的二聚体变体, 依次衍生自葡萄球菌蛋白 A 的 B 结构域。这个二聚体变体由重组 DNA 技术产生。用阳离子交换、反向层析和阴离子交换方法纯化, 之后在 Detoxi-Gel™ AffinityPak™ Pre-packed 柱 (Pierce cat no 2034) 上除去内毒素。单体 Z01154 分子的详述见 Gunneriusson E et al, Protein Eng 12:10, 873-878 (1999), 在那里其被称为 $Z_{Taq4:1}$ 。

[0264] $(Z01154)_2$ -ABD00239: $(Z01154)_2$ 二聚体和实施例 2 选择的变体 ABD 分子 ABD00239 的融合蛋白。这个融合蛋白由重组 DNA 技术产生。用在 HSA-sepharose 上的亲和性捕获和反向层析纯化随后如上除去内毒素。

[0265] 方法

[0266] 给予及取样方案: 在 SMI (Smittskyddsinsitutet), Solna, Sweden 进行动物研究, 当地道德动物委员会准许 (N196/06)。在给予测试分子和取血样前灵长类给予镇静剂, 肌肉内给予氯胺酮 (Ketalar®)。7 个短尾猴灵长类 *Macaca fascicularis* 分成 2 组, 分别为 3 个和 4 个, 根据表 10 静脉内注射测试分子。

[0267] 表 10: 测试分子的给予

[0268]

组	动物编号	分子	给予途径	mg/kg/注射	ml/动物/注射
1	E74, E78, E89	$(Z01154)_2$	i.v.	0.5	1
2	E75, E87, E88, E91	$(Z01154)_2$ - ABD00003	i.v.	0.5	1

[0269] 给予和放血时间点见表 11。

[0270] 表 11: 给予测试分子和取血样的时间点

[0271]

天	活动
---	----

0	放血 1& 注射 1
7	放血 2
14	放血 3& 注射 2
21	放血 4
28	放血 5& 注射 3
35	放血 6
45	放血 7

[0272] 特异性 ELISA 分析血浆样品: 用在包被缓冲液 (15mM Na_2CO_3 , 35mM NaHCO_3 , pH 9.6) 中稀释至终浓度为 $2 \mu\text{g/ml}$ 的 $(\text{Z01154})_2$ 或 $(\text{Z01154})_2$ -ABD00239 包被平板。每孔使用 $50 \mu\text{l}$ 溶液, 平板在 4°C 保温过夜。在室温用 PBS+0.5% 酪蛋白进行 1-2 小时。加入起自在封闭缓冲液中 1/100 稀释的 2 倍系列稀释血清。来自超免疫灵长类的纯化的血清用作阳性对照。保温在室温进行 1-2 小时, 用自动化 ELISA SkanWasher 300 (Skatron) 用每孔 $4 \times 175 \mu\text{l}$ PBS-T (具有 0.05% Tween 20 的 PBS) 洗涤。在室温进行与二抗在封闭缓冲液中 1:5000 稀释的 HRP 缀合的山羊抗人 IgG (Fab) $_2$ (Jackson cat. no. 109-035-097) 的保温 1-2 小时。进行如上所述的自动化洗涤。检测用 ImmunoPure[®] TMB (Pierce cat. no. 34021) 进行, 其中反应在 12 分钟后通过加入 2M H_2SO_4 猝灭。平板在 450nm 用配有 Magellan 软件 v3.11 (Tecan) 的 Ultra384 读板器 (Tecan) 读出。

[0273] 结果

[0274] 用 $(\text{Z01154})_2$ 和 $(\text{Z01154})_2$ -ABD00239 免疫: 来自用裸或 ABD00239-融合的 $(\text{Z01154})_2$ 免疫的灵长类的血清分别在 were titrated on $(\text{Z01154})_2$ and $(\text{Z01154})_2$ -ABD00239 包被的板上滴定, 滴定曲线示于图 13A-13B 和图 14A-14B。来自超免疫猴的血清包括在滴定中作为阳性对照。1600x 稀释的阳性对照的吸光度设为 100% 并用于标准化。图 15 示出个体应答的标准化值。结果显示所有 3 个动物均应答 $(\text{Z01154})_2$, 尽管一个灵长类 (E89) 的数量级较低。相反, 4 个动物中仅 1 个应答 $(\text{Z01154})_2$ -ABD00239。

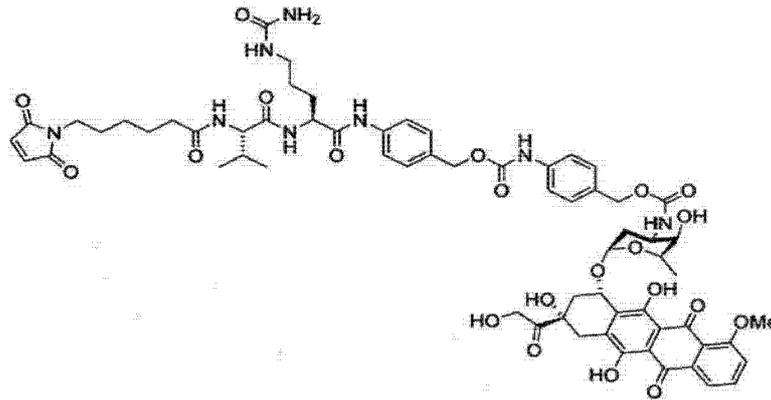
[0275] 实施例 6

[0276] 与白蛋白复合后阿霉素缀合物的增加的溶解度

[0277] 概述

[0278] 产生融合蛋白 ABDwt- $(\text{Z00342})_2$ -Cys (重组产生的融合蛋白, 包含野生型 ABD 结构域和 Z 变体 Z00342 的二聚体, 具有对 HER2 受体的亲和性) 与结构式如下的非极性分子马来酰亚胺-间隔接头-阿霉素之间的缀合物:

[0279]



[0280] 游离接头及缀合物均具有在水性溶剂中的低溶解度。例如,需要 30% 的有机溶剂以保持缀合物在溶液中。但是向水溶液中添加人血清白蛋白大大改善溶解度。

[0281] 缀合

[0282] 马来酰亚胺-间隔接头-阿霉素 (Syntarga B. V., Netherlands) 溶于 N,N-二甲基甲酰胺 (Sigma, cat. no. D-4551) 至终浓度为 $4 \mu\text{mol/ml}$, 并储存在 -80°C 备用。将 4ml 以 1.9mg/ml 于 PBS 中的融合蛋白 ABDwt-(Z00342)₂-Cys 用 20mM DTT (Acros Organics, cat. no. 165680250) 在 40°C 还原 30 分钟。过量 DTT 通过在 PD-10 柱上缓冲液交换至 PBS (2.68mM KCl , $1.47\text{mM KH}_2\text{PO}_4$, 137mM NaCl , $8.1\text{mM Na}_2\text{HPO}_4$, pH 7.4)。蛋白质样品通过加入 3ml 乙腈 (AcN, Merck, cat. no. 1.14291.2500) 调整至 30% (v/v) 有机溶剂。198 μl 或 2 倍摩尔过量的马来酰亚胺-间隔接头-阿霉素加入到蛋白质溶液中。混合 30 分钟后,溶液在 4°C 保温过夜。反应混合物最终在用去离子水/AcN (70:30, v/v) 平衡的 HiPrep 26/10 脱盐柱 (GE, cat. no. 17-5087-01) 上纯化。通过测量在 280nm 的 UV 吸收确定蛋白质浓度为 0.44mg/ml 。

[0283] 1.1mg 蛋白质等份在 Alpha 2-4LSC 冻干仪 (Martin Christ GmbH, Germany) 中冻干。小瓶在冻干后充氮气,加盖并在 4°C 储存。

[0284] 溶解度研究

[0285] 三种溶液用于溶解度测试:

[0286] 1. DMEM, Dulbecco 改良的 Eagle's 培养基 (Cambrex Bio Science, cat. no. BE12-917F),

[0287] 2. 如 1 中的 DMEM, 但是补加人血清白蛋白 (HSA), 6mg/ml (Sigma, cat. no. A1887-5G), 及

[0288] 3. 如 1 中的 DMEM, 但是补加 10% 胎牛血清 (FCS)。

[0289] 溶液 1 和 2 过滤通过 $0.22 \mu\text{m}$ Millex-GV 无菌滤膜 (Millipore, cat. no. SLGV033RB)。

[0290] 冻干的缀合重溶于分别含有 0.5ml 每种溶液的小瓶中。在 37°C 保温 30 分钟后,样品经肉眼观察评价。在具有溶液 1 和 3 的小瓶中可见大部分不溶材料,而在具有溶液 2 的小瓶中未观察到可见沉淀。

[0291] 重配的缀合物的 LC-MS 分析

[0292] 来自每小瓶 (溶液 1-3) 的 30 μl 在 eppendorf 离心机中以 13000rpm 离心 10 分钟。用在线质谱检测 (Agilent 1100, LC-MS) 经液相层析分析 20 μl 所得上清。柱 Zorbax 300SB-C18 ($4.6 \times 150\text{mm}$, 3.5 μm) 用 65% 溶剂 A (0.1% TFA 于去离子水中) 和 35% 溶剂 B (0.1%

TFA 于 can 中) 以流速 0.5ml/min 平衡。记录在 220, 280, 254 和 495nm 的 UV 吸收。样品组分用 50–60% 溶剂 B 的浅 (shallow) 线性梯度在 35 分钟期间洗脱。比较样品间的相应于溶液中缀合物分子的量的峰面积。

[0293] 结果示于表 12。溶于补加 HSA 的 DMEM (溶液 2) 的缀合物示出比溶于仅 DMEM (溶液 1) 的样品大 10 倍的面积, 及比溶于补加 10% FCS 的 DMEM (溶液 3) 的样品大 4 倍的面积。

[0294] 表 12: 重配的缀合物的 LC-MS 分析

[0295]

溶剂	峰面积 (mAU*s)	与 DMEM 之比
DMEM	2347.4	1.00
DMEM+HSA	22659.6	9.65
DMEM+FCS	5872.0	2.50

多肽	氨基酸序列	SEQ ID NO:
ABM00001	GVSDFYKNLI NRAKTVEGVH ALIGHI	1
ABM00002	GVSDFYKNVI NRAKTVEGVH ALIDHI	2
ABM00003	GVSDYYKNI NRAKTVEGVR ALKLIHI	3
ABM00004	GVSDFYKNVI NRAKTVEGVS ALIHEI	4
ABM00005	GVSDFYKRLI NRAKTVEGVN TLIADI	5
ABM00006	GVSDFYKNLI NRAKTVEGVN TLIADI	6
ABM00007	GVSDYYKNLI NRAKTVEGVN SLISHI	7
ABM00008	GVSDFYKRLI NRAKTIVGGVQ SLISEI	8
ABM00009	GVSDFYKNLI NRAKTVEGVS SLKGHI	9
ABM00010	GVSDFYKNVI NRAKTVEGVD SLIAEI	10
ABM00011	GVSDFYKNLI NRARTVEGVQ TLI SDI	11
ABM00012	GVSDFYKRFI NKAKTVEGVE TLI SEI	12
ABM00013	GVSDFYKSLI NRAKTVEGVH SLTDEI	13
ABM00014	GVSDYYKNVI NKAKTVEGVS SLTAEI	14
ABM00015	GVSDFYKSLI NRAKTVEGVD ALTSHI	15
ABM00016	GVSDFYKNLI NKAKTVEGVS TLIHDI	16
ABM00017	GVSDFYKNLI NRAKTVEGVS TLIHDI	17
ABM00018	GVSDFYKNLI NRAKTVEGVQ ALISEI	18
ABM00019	GVSDYYKSLI NKAKTVEGVD SLIVHI	19
ABM00020	GVSDFYKNLI NRAKTVEGVQ SLITEI	20
ABM00021	GVSDYYKNLI NRAKTVEGVD ALITHI	21
ABM00022	GVSDFYKSMI NRAKTVEGVD SLITHI	22
ABM00023	GVSDFYKNLI NRAKTVEGVT TLTIDI	23
ABM00024	GVSDFYKNLI NRAKTVEGVE SLIDHI	24
ABM00025	GVSDFYKSYI NRAKTVEGVH TLI GHI	25
ABM00026	GVSDFYKNLI NRAKTVEGVQ TLI SDI	26
ABM00027	GVSDFYKNLI NRAKTVEGVN SLTSHI	27
ABM00028	GVSDFYKNLI NRAKTVEGVN TLIHDI	28
ABM00029	GVSDFYKNLI NRAKTVEGVE SLIGEI	29
ABM00030	GVSDFYKNLI NKAKTVEGVH TLIHDI	30
ABM00031	GVSDYYKNLI NKAKTVEGVS ALKMH I	31

图 1

多肽	氨基酸序列	SEQ ID NO:
ABM00032	GVSDFYKNLI NKAKTVEGVD ALIVHI	32
ABM00033	GVSDYYKRLI NRAKTVEGVH ALIAEI	33
ABM00034	GVSDYYKNLI NRARTVEGVD TLIHDI	34
ABM00035	GVSDFYKVI NRARTVEGVQ ALIADI	35
ABM00036	GVSDFYKNLI NRAKTVEGVE SLIADI	36
ABM00037	GVSDYYKNLI NKAKTVEGVD ALIAHI	37
ABM00038	GVSDYYKNLI NRAKTVEGVE SLITHI	38
ABM00039	GVSDFYKNLI NRARTVEGVD SLIVEI	39
ABM00040	GVSDFYKNVI NRAKTVEGVS ALIREI	40
ABM00041	GVSDFYKNLI NRAKTVEGVN ALISDI	41
ABM00042	GVSDFYKNLI NRAKTVEGVS ALIQEI	42
ABM00043	GVSDFYKNLI NRAKTVEGVQ SLIDHI	43
ABM00044	GVSDFYKNLI NRAKTVEGVD ALICHI	44
ABM00045	GVSDYYKRLI NKAKTVEGVN ALITHI	45
ABM00046	GVSDFYKNVI NKAKTVEGVE ALIADI	46
ABM00047	GVSDFYKNLI NRAKTVEGVE TLIRDI	47
ABM00048	GVSDFYKNLI NRARTVEGVQ TLITDI	48
ABM00049	GVSDFYKRLI NKAKTVEGVN ALTHHI	49
ABM00050	GVSDYYKNLI NRAKTVEGVQ ALIAHI	50
ABM00051	GVSDFYKNVI NRAKTVEGVN SLINHI	51
ABM00052	GVSDFYKSLI NRARTVEGVD SLIRHI	52
ABM00053	GVSDYYKNLI NKAKTVEGVE ALILHI	53
ABM00054	GVSDFYKNLI NRAKTVEGVD ALIAHI	54
ABM00055	GVSDYYKNLI NKAKTVEGVQ ALIAHI	55
ABM00056	GVSDFYKRLI NRAKTVEGVH ALIGHI	56
ABM00057	GVSDFYKRV I NRAKTVEGVH ALIDHI	57
ABM00058	GVSDYYKR I I NRAKTVEGVR ALKLHI	58
ABM00059	GVSDFYKRV I NRAKTVEGVS ALIHEI	59
ABM00060	GVSDFYKRLI NRAKTVEGVN TLIADI	60
ABM00061	GVSDYYKRLI NRAKTVEGVN SLISHI	61
ABM00062	GVSDFYKRLI NRAKTVEGVS SLKGHI	62

图1(续)

多肽	氨基酸序列	SEQ ID NO:
ABM00063	GVSDFYKRVI NRAKTVEGVD SLIAEI	63
ABM00064	GVSDFYKRLLI NRARTVEGVQ TLI SDI	64
ABM00065	GVSDFYKRFI NKAKTVEGVE TLI SEI	65
ABM00066	GVSDFYKRLLI NRAKTVEGVH SLT DEI	66
ABM00067	GVSDYYKRVI NKAKTVEGVS SLT AEI	67
ABM00068	GVSDFYKRLLI NRAKTVEGVD ALT SHI	68
ABM00069	GVSDFYKRLLI NKAKTVEGVS TLI HDI	69
ABM00070	GVSDFYKRLLI NRAKTVEGVS TLI HDI	70
ABM00071	GVSDFYKRLLI NRAKTVEGVQ ALI SEI	71
ABM00072	GVSDYYKRLLI NKAKTVEGVD SLI VHI	72
ABM00073	GVSDFYKRLLI NRAKTVEGVQ SLI TEI	73
ABM00074	GVSDYYKRLLI NRAKTVEGVD ALI THI	74
ABM00075	GVSDFYKRMI NRAKTVEGVD SLI THI	75
ABM00076	GVSDFYKRLLI NRAKTVEGVT TLI TDI	76
ABM00077	GVSDFYKRLLI NRAKTVEGVE SLI DHI	77
ABM00078	GVSDFYKRYI NRAKTVEGVH TLI GHI	78
ABM00079	GVSDFYKRLLI NRAKTVEGVQ TLI SDI	79
ABM00080	GVSDFYKRLLI NRAKTVEGVN SLI SHI	80
ABM00081	GVSDFYKRLLI NRAKTVEGVN TLI HDI	81
ABM00082	GVSDFYKRLLI NRAKTVEGVE SLI GEI	82
ABM00083	GVSDFYKRLLI NKAKTVEGVH TLI HDI	83
ABM00084	GVSDYYKRLLI NKAKTVEGVS ALK MI	84
ABM00085	GVSDFYKRLLI NKAKTVEGVD ALI VHI	85
ABM00086	GVSDYYKRLLI NRARTVEGVD TLI HDI	86
ABM00087	GVSDFYKRVI NRARTVEGVQ ALI ADI	87
ABM00088	GVSDFYKRLLI NRAKTVEGVE SLI ADI	88
ABM00089	GVSDYYKRLLI NKAKTVEGVD ALI AHI	89
ABM00090	GVSDYYKRLLI NRAKTVEGVE SLI THI	90
ABM00091	GVSDFYKRLLI NRARTVEGVD SLI VEI	91
ABM00092	GVSDFYKRVI NRAKTVEGVS ALI REI	92
ABM00093	GVSDFYKRLLI NRAKTVEGVN ALI SDI	93

图1(续)

多肽	氨基酸序列	SEQ ID NO:
ABM00094	GVSDFYKRLI NRAKTVEGVS ALIQEI	94
ABM00095	GVSDFYKRLI NRAKTVEGVQ SLIDHI	95
ABM00096	GVSDFYKRLI NRAKTVEGVD ALICHI	96
ABM00097	GVSDFYKRLI NRAKTVEGVE ALIADI	97
ABM00098	GVSDFYKRLI NRAKTVEGVE TLIRDI	98
ABM00099	GVSDFYKRLI NRAKTVEGVQ TLITDI	99
ABM00100	GVSDYKRLI NRAKTVEGVQ ALIAHI	100
ABM00101	GVSDFYKRLI NRAKTVEGVN SLINHI	101
ABM00102	GVSDFYKRLI NRAKTVEGVD SLIRHI	102
ABM00103	GVSDYKRLI NRAKTVEGVE ALTLHI	103
ABM00104	GVSDFYKRLI NRAKTVEGVD ALIAHI	104
ABM00105	GVSDYKRLI NRAKTVEGVQ ALIAHI	105
ABM00106	GVSDFYKRLI NRAKTVEGVH ALKQHI	106
ABM00107	GVSDFYKRLI NRAKTVEGVH ALKDHI	107
ABM00108	GVSDFYKRLI NRAKTVEGVS ALKHEI	108
ABM00109	GVSDFYKRLI NRAKTVEGVN TLKADI	109
ABM00110	GVSDFYKRLI NRAKTVEGVN TLKADI	110
ABM00111	GVSDYKRLI NRAKTVEGVN SLKSHI	111
ABM00112	GVSDFYKRLI NRAKTVEGVQ SLKSEI	112
ABM00113	GVSDFYKRLI NRAKTVEGVD SLKAEI	113
ABM00114	GVSDFYKRLI NRAKTVEGVQ TLKSDI	114
ABM00115	GVSDFYKRLI NRAKTVEGVE TLKSEI	115
ABM00116	GVSDFYKRLI NRAKTVEGVH SLKDEI	116
ABM00117	GVSDYKRLI NRAKTVEGVS SLKAEI	117
ABM00118	GVSDFYKRLI NRAKTVEGVD ALKSHI	118
ABM00119	GVSDFYKRLI NRAKTVEGVS TLKHDI	119
ABM00120	GVSDFYKRLI NRAKTVEGVS TLKHDI	120
ABM00121	GVSDFYKRLI NRAKTVEGVQ ALKSEI	121
ABM00122	GVSDYKRLI NRAKTVEGVD SLKVHI	122
ABM00123	GVSDFYKRLI NRAKTVEGVQ SLKTEI	123
ABM00124	GVSDYKRLI NRAKTVEGVD ALKTHI	124

图 1(续)

多肽	氨基酸序列	SEQ ID NO:
ABM00125	GVSDFYKSMI NRAKTVEGVD SLKTHI	125
ABM00126	GVSDFYKNLI NRAKTVEGVI TLKIDI	126
ABM00127	GVSDFYKNLI NRAKTVEGVE SLKDHI	127
ABM00128	GVSDFYKSYI NRAKTVEGVH TLKGHI	128
ABM00129	GVSDFYKNLI NRAKTVEGVQ TLKSDI	129
ABM00130	GVSDFYKNLI NRAKTVEGVN SLKSHI	130
ABM00131	GVSDFYKNLI NRAKTVEGVN TLKHDI	131
ABM00132	GVSDFYKNLI NRAKTVEGVE SLKGEI	132
ABM00133	GVSDFYKNLI NAKTVEGVH TLKHDI	133
ABM00134	GVSDFYKNLI NAKTVEGVD ALKVHI	134
ABM00135	GVSDYYKRLI NRAKTVEGVH ALKAEI	135
ABM00136	GVSDYYKNLI NRARTVEGVD TLKHDI	136
ABM00137	GVSDFYKQVI NRARTVEGVQ ALKADI	137
ABM00138	GVSDFYKNLI NRAKTVEGVE SLKADI	138
ABM00139	GVSDYYKNLI NAKTVEGVD ALKAHI	139
ABM00140	GVSDYYKNLI NRAKTVEGVE SLKTHI	140
ABM00141	GVSDFYKNLI NRARTVEGVD SLKVEI	141
ABM00142	GVSDFYKNVI NRAKTVEGVS ALKREI	142
ABM00143	GVSDFYKNLI NRAKTVEGVN ALKSDI	143
ABM00144	GVSDFYKNLI NRAKTVEGVS ALKQEI	144
ABM00145	GVSDFYKNLI NRAKTVEGVQ SLKDHI	145
ABM00146	GVSDFYKNLI NRAKTVEGVD ALKCHI	146
ABM00147	GVSDYYKRLI NAKTVEGVN ALKTHI	147
ABM00148	GVSDFYKNVI NAKTVEGVE ALKADI	148
ABM00149	GVSDFYKNLI NRAKTVEGVE TLKRDI	149
ABM00150	GVSDFYKNLI NRARTVEGVQ TLKTDI	150
ABM00151	GVSDFYKRLI NAKTVEGVN ALKHHI	151
ABM00152	GVSDYYKNLI NRAKTVEGVQ ALKAHI	152
ABM00153	GVSDFYKNVI NRAKTVEGVN SLKNHI	153
ABM00154	GVSDFYKSLI NRARTVEGVD SLKRHI	154
ABM00155	GVSDYYKNLI NAKTVEGVE ALKLHI	155

图1(续)

多肽	氨基酸序列	SEQ ID NO:
ABM00156	GVSDFYKNLI NRAKTVEGVD ALKAHI	156
ABM00157	GVSDYYKNLI NKAKTVEGVQ ALKAHI	157
ABM00158	GVSDFYKRLI NRAKTVEGVH ALKGHI	158
ABM00159	GVSDFYKRVI NRAKTVEGVH ALKDHI	159
ABM00160	GVSDYYKRII NRAKTVEGVR ALKLIHI	160
ABM00161	GVSDFYKRVI NRAKTVEGVS ALKHEI	161
ABM00162	GVSDYYKRLI NRAKTVEGVN SLKSHI	162
ABM00163	GVSDFYKRLI NRAKTVEGVQ SLKSEI	163
ABM00164	GVSDFYKRLI NRAKTVEGVS SLKGGHI	164
ABM00165	GVSDFYKRVI NRAKTVEGVD SLKAEI	165
ABM00166	GVSDFYKRLI NRAKTVEGVQ TLKSDI	166
ABM00167	GVSDFYKRFI NKAKTVEGVE TLKSEI	167
ABM00168	GVSDFYKRLI NRAKTVEGVH SLKDEI	168
ABM00169	GVSDYYKRVI NKAKTVEGVS SLKAEI	169
ABM00170	GVSDFYKRLI NRAKTVEGVD ALKSHI	170
ABM00171	GVSDFYKRLI NKAKTVEGVS TLKHHI	171
ABM00172	GVSDFYKRLI NRAKTVEGVS TLKHHI	172
ABM00173	GVSDFYKRLI NRAKTVEGVQ ALKSEI	173
ABM00174	GVSDYYKRLI NKAKTVEGVD SLKVHI	174
ABM00175	GVSDFYKRLI NRAKTVEGVQ SLKTEI	175
ABM00176	GVSDYYKRLI NRAKTVEGVD ALKTHI	176
ABM00177	GVSDFYKRMI NRAKTVEGVD SLKTHI	177
ABM00178	GVSDFYKRLI NRAKTVEGVT TLKTDI	178
ABM00179	GVSDFYKRLI NRAKTVEGVE SLKDHI	179
ABM00180	GVSDFYKRYI NRAKTVEGVH TLKGHI	180
ABM00181	GVSDFYKRLI NRAKTVEGVQ TLKSDI	181
ABM00182	GVSDFYKRLI NRAKTVEGVN SLKSHI	182
ABM00183	GVSDFYKRLI NRAKTVEGVN TLKHHI	183
ABM00184	GVSDFYKRLI NRAKTVEGVE SLKGEI	184
ABM00185	GVSDFYKRLI NKAKTVEGVH TLKHHI	185
ABM00186	GVSDYYKRLI NKAKTVEGVS ALKMHI	186

图1(续)

多肽	氨基酸序列	SEQ ID NO:
ABM00187	GVSDFYKRLI NKAKTVEGVD ALKVHI	187
ABM00188	GVSDYYKRLI NRAKTVEGVH ALKAEI	188
ABM00189	GVSDYYKRLI NRARTVEGVD TLKHHI	189
ABM00190	GVSDFYKRLI NRARTVEGVQ ALKADI	190
ABM00191	GVSDFYKRLI NRAKTVEGVE SLKADI	191
ABM00192	GVSDYYKRLI NKAKTVEGVD ALKAHI	192
ABM00193	GVSDYYKRLI NRAKTVEGVE SLKTHI	193
ABM00194	GVSDFYKRLI NRARTVEGVD SLKVEI	194
ABM00195	GVSDFYKRLI NRAKTVEGVS ALKREI	195
ABM00196	GVSDFYKRLI NRAKTVEGVN ALKSDI	196
ABM00197	GVSDFYKRLI NRAKTVEGVS ALKQEI	197
ABM00198	GVSDFYKRLI NRAKTVEGVQ SLKDDI	198
ABM00199	GVSDFYKRLI NRAKTVEGVD ALKCHI	199
ABM00200	GVSDYYKRLI NKAKTVEGVN ALKTHI	200
ABM00201	GVSDFYKRLI NKAKTVEGVE ALKADI	201
ABM00202	GVSDFYKRLI NRAKTVEGVE TLKDDI	202
ABM00203	GVSDFYKRLI NRARTVEGVQ TLKTDI	203
ABM00204	GVSDFYKRLI NKAKTVEGVN ALKHHI	204
ABM00205	GVSDYYKRLI NRAKTVEGVQ ALKAHI	205
ABM00206	GVSDFYKRLI NRAKTVEGVN SLKNHI	206
ABM00207	GVSDFYKRLI NRARTVEGVD SLKRHI	207
ABM00208	GVSDYYKRLI NKAKTVEGVE ALKLHI	208
ABM00209	GVSDFYKRLI NRAKTVEGVD ALKAHI	209
ABM00210	GVSDYYKRLI NKAKTVEGVQ ALKAHI	210
ABM00211	GVSDFYKRLI NRAKTVEGVS ALKHHI	211
ABM00212	GVSDFYKRLI NRAKTVEGVN TLKAHI	212
ABM00213	GVSDFYKRLI NRAKTVEGVQ SLKSHI	213
ABM00214	GVSDFYKRLI NRAKTVEGVD SLKAHI	214
ABM00215	GVSDFYKRLI NRARTVEGVQ TLKSHI	215
ABM00216	GVSDFYKRFI NKAKTVEGVE TLKSHI	216
ABM00217	GVSDFYKRLI NRAKTVEGVH SLKDDI	217

图1(续)

多肽	氨基酸序列	SEQ ID NO:
ABM00218	GVSDYYKRV I NKAKTVEGVS SLKAHI	218
ABM00219	GVSDFYKRLI NKAKTVEGVS TLKHHI	219
ABM00220	GVSDFYKRLI NRAKTVEGVS TLKHHI	220
ABM00221	GVSDFYKRLI NRAKTVEGVQ ALKSHI	221
ABM00222	GVSDFYKRLI NRAKTVEGVQ SLKTHI	222
ABM00223	GVSDFYKRLI NRAKTVEGVT TLKTHI	223
ABM00224	GVSDFYKRLI NRAKTVEGVQ TLKSHI	224
ABM00225	GVSDFYKRLI NRAKTVEGVN TLKHHI	225
ABM00226	GVSDFYKRLI NRAKTVEGVE SLKGIH	226
ABM00227	GVSDFYKRLI NKAKTVEGVH TLKHHI	227
ABM00228	GVSDYYKRLI NRAKTVEGVH ALKAHI	228
ABM00229	GVSDYYKRLI NRARTVEGVD TLKHHI	229
ABM00230	GVSDFYKRV I NRARTVEGVQ ALKAHI	230
ABM00231	GVSDFYKRLI NRAKTVEGVE SLKAHI	231
ABM00232	GVSDFYKRLI NRARTVEGVD SLKVHI	232
ABM00233	GVSDFYKRV I NRAKTVEGVS ALKRHI	233
ABM00234	GVSDFYKRLI NRAKTVEGVN ALKSHI	234
ABM00235	GVSDFYKRLI NRAKTVEGVS ALKQHI	235
ABM00236	GVSDFYKRV I NKAKTVEGVE ALKAHI	236
ABM00237	GVSDFYKRLI NRAKTVEGVE TLKRHI	237
ABM00238	GVSDFYKRLI NRARTVEGVQ TLKTHI	238
ABM00239	GVSDFYKRLI NKAKTVEGVE ALKLHI	239
ABM00240	GVSDYYKNLI NRARTVEGVE ALKLHI	240
ABM00241	GVSDYYKNI NRAKTVEGVE ALKLHI	241
ABM00242	GVSDFYKNLI NRAKTVEGVE ALKLHI	242
ABM00243	GVSDFYKNVI NKAKTVEGVE ALKLHI	243
ABM00244	GVSDYYKNLI NRAKTVEGVE ALKLHI	244
ABM00245	GVSDYYKNLI NRARTVEGVH ALIDHI	245
ABM00246	GVSDFYKRLI NKAKTVEGVE ALKLHI	246
ABM00247	GVSDYYKRLI SKAKTVEGVK ALISEI	247
ABM00248	GVSDFYKRLI NKAKTVEGVE ALKLHI	248

图1(续)

多肽	氨基酸序列	SEQ ID NO:
ABM00249	GVSDYYKRRLI SKAKTVEGVK ALISEI	249
ABM00250	GVSDYYKRRLI SKAKTVEGVK ALISEI	250
ABM00251	GVSDYYKRRLI SKAKTVEGVK ALISEI	251
ABM00252	GVSDYYKRRLI SKAKTVEGVK ALISEI	252
ABM00253	GVSDYYKRRLI SKAKTVEGVK ALISEI	253
ABM00254	GVSDYYKRRLI SKAKTVEGVK ALISEI	254
ABM00255	GVSDYYKRRLI SKAKTVEGVK ALISEI	255
ABM00256	GVSDYYKRRLI SKAKTVEGVK ALISEI	256
ABM00257	GVSDYYKRRLI SKAKTVEGVK ALISEI	257
ABD00001	LAEAKVLANR ELDKYGVSDF YKNLINRAKT VEGVHALIGH ILAALP	258
ABD00002	LAEAKVLANR ELDKYGVSDF YKNVINRAKT VEGVHALIDH ILAALP	259
ABD00003	LAEAKVLANR ELDKYGVSDY YKNIINRAKT VEGVRAKLH ILAALP	260
ABD00004	LAEAKVLANR ELDKYGVSDF YKNVINRAKT VEGVSALIHE ILAALP	261
ABD00005	LAEAKVLANR ELDKYGVSDF YKRLINRAKT VEGVNTLIAD ILAALP	262
ABD00006	LAEAKVLANR ELDKYGVSDF YKNLINRAKT VEGVNTLIAD ILAALP	263
ABD00007	LAEAKVLANR ELDKYGVSDY YKNLINRAKT VEGVNSLISH ILAALP	264
ABD00008	LAEAKVLANR ELDKYGVSDF YKRLINRAKT VGGVQSLISE ILAALP	265
ABD00009	LAEAKVLANR ELDKYGVSDF YKNLINRAKT VEGVSSLKGH ILAALP	266
ABD00010	LAEAKVLANR ELDKYGVSDF YKNVINRAKT VEGVDSLIAE ILAALP	267
ABD00011	LAEAKVLANR ELDKYGVSDF YKNLINRAKT VEGVQTLISD ILAALP	268
ABD00012	LAEAKVLANR ELDKYGVSDF YKKFINKAKT VEGVETLISE ILAALP	269
ABD00013	LAEAKVLANR ELDKYGVSDF YKSLINRAKT VEGVHSLTDE ILAALP	270
ABD00014	LAEAKVLANR ELDKYGVSDY YKNVINKAKT VEGVSSLTAE ILAALP	271
ABD00015	LAEAKVLANR ELDKYGVSDF YKSLINRAKT VEGVDALTSH ILAALP	272
ABD00016	LAEAKVLANR ELDKYGVSDF YKNLINKAKT VEGVSTLIHD ILAALP	273
ABD00017	LAEAKVLANR ELDKYGVSDF YKNLINRAKT VEGVSTLIHD ILAALP	274
ABD00018	LAEAKVLANR ELDKYGVSDF YKNLINRAKT VEGVQALISE ILAALP	275
ABD00019	LAEAKVLANR ELDKYGVSDY YKSLINKAKT VEGVDSLIVH ILAALP	276
ABD00020	LAEAKVLANR ELDKYGVSDF YKNLINRAKT VEGVQSLITE ILAALP	277
ABD00021	LAEAKVLANR ELDKYGVSDY YKNLINRAKT VEGVDALITH ILAALP	278
ABD00022	LAEAKVLANR ELDKYGVSDF YKSMINRAKT VEGVDSLITH ILAALP	279

图1(续)

多肽	氨基酸序列	SEQ ID NO:
ABD00023	LAEAKVLANR ELDKYGVSDF YKNLINRAKT VEGVTLTLD ILAALP	280
ABD00024	LAEAKVLANR ELDKYGVSDF YKNLINRAKT VEGVESLIDH ILAALP	281
ABD00025	LAEAKVLANR ELDKYGVSDF YKSYINRAKT VEGVHTLIGH ILAALP	282
ABD00026	LAEAKVLANR ELDKYGVSDF YKNLINRAKT VEGVQTLISD ILAALP	283
ABD00027	LAEAKVLANR ELDKYGVSDF YKNLINRAKT VEGVNSLTSH ILAALP	284
ABD00028	LAEAKVLANR ELDKYGVSDF YKNLINRAKT VEGVNTLIHD ILAALP	285
ABD00029	LAEAKVLANR ELDKYGVSDF YKNLINRAKT VEGVESLIGE ILAALP	286
ABD00030	LAEAKVLANR ELDKYGVSDF YKNLINKAKT VEGVHTLIHD ILAALP	287
ABD00031	LAEAKVLANR ELDKYGVSDF YKNLINKAKT VEGVSALKMH ILAALP	288
ABD00032	LAEAKVLANR ELDKYGVSDF YKNLINKAKT VEGVDALIVH ILAALP	289
ABD00033	LAEAKVLANR ELDKYGVSDF YKRLINRAKT VEGVHALIAE ILAALP	290
ABD00034	LAEAKVLANR ELDKYGVSDF YKNLINRART VEGVDTLIHD ILAALP	291
ABD00035	LAEAKVLANR ELDKYGVSDF YKKVINRART VEGVQALIAD ILAALP	292
ABD00036	LAEAKVLANR ELDKYGVSDF YKNLINRAKT VEGVESLIAD ILAALP	293
ABD00037	LAEAKVLANR ELDKYGVSDF YKNLINKAKT VEGVDALIAH ILAALP	294
ABD00038	LAEAKVLANR ELDKYGVSDF YKNLINRAKT VEGVESLITH ILAALP	295
ABD00039	LAEAKVLANR ELDKYGVSDF YKNLINRART VEGVDSLIVE ILAALP	296
ABD00040	LAEAKVLANR ELDKYGVSDF YKNVINRAKT VEGVSALIRE ILAALP	297
ABD00041	LAEAKVLANR ELDKYGVSDF YKNLINRAKT VEGVNALISD ILAALP	298
ABD00042	LAEAKVLANR ELDKYGVSDF YKNLINRAKT VEGVSALIQE ILAALP	299
ABD00043	LAEAKVLANR ELDKYGVSDF YKNLINRAKT VEGVQSLIDH ILAALP	300
ABD00044	LAEAKVLANR ELDKYGVSDF YKNLINRAKT VEGVDALICH ILAALP	301
ABD00045	LAEAKVLANR ELDKYGVSDF YKRLINKAKT VEGVNALITH ILAALP	302
ABD00046	LAEAKVLANR ELDKYGVSDF YKNVINKAKT VEGVEALIAD ILAALP	303
ABD00047	LAEAKVLANR ELDKYGVSDF YKNLINRAKT VEGVETLIRD ILAALP	304
ABD00048	LAEAKVLANR ELDKYGVSDF YKNLINRART VEGVQTLITD ILAALP	305
ABD00049	LAEAKVLANR ELDKYGVSDF YKRLINKAKT VEGVNALTHH ILAALP	306
ABD00050	LAEAKVLANR ELDKYGVSDF YKNLINRAKT VEGVQALIAH ILAALP	307
ABD00051	LAEAKVLANR ELDKYGVSDF YKNVINRAKT VEGVNSLINH ILAALP	308
ABD00052	LAEAKVLANR ELDKYGVSDF YKSLINRART VEGVDSLIRH ILAALP	309
ABD00053	LAEAKVLANR ELDKYGVSDF YKNLINKAKT VEGVEALTLH ILAALP	310

图1(续)

多肽	氨基酸序列	SEQ ID NO:
ABD00054	LAEAKVLANR ELDKYGVSDF YKNLINRAKT VEGVDALIAH ILAALP	311
ABD00055	LAEAKVLANR ELDKYGVSDF YKNLINKAKT VEGVQALIAH ILAALP	312
ABD00056	LAEAKVLANR ELDKYGVSDF YKRLINRAKT VEGVHALIGH ILAALP	313
ABD00057	LAEAKVLANR ELDKYGVSDF YKRVINRAKT VEGVHALIDH ILAALP	314
ABD00058	LAEAKVLANR ELDKYGVSDF YKRIINRAKT VEGVRALKLH ILAALP	315
ABD00059	LAEAKVLANR ELDKYGVSDF YKRVINRAKT VEGVSALIHE ILAALP	316
ABD00060	LAEAKVLANR ELDKYGVSDF YKRLINRAKT VEGVNTLIAD ILAALP	317
ABD00061	LAEAKVLANR ELDKYGVSDF YKRLINRAKT VEGVNSLISH ILAALP	318
ABD00062	LAEAKVLANR ELDKYGVSDF YKRLINRAKT VEGVSSLKGH ILAALP	319
ABD00063	LAEAKVLANR ELDKYGVSDF YKRVINRAKT VEGVDSLIAE ILAALP	320
ABD00064	LAEAKVLANR ELDKYGVSDF YKRLINRAKT VEGVQTLISD ILAALP	321
ABD00065	LAEAKVLANR ELDKYGVSDF YKRFINKAKT VEGVETLISE ILAALP	322
ABD00066	LAEAKVLANR ELDKYGVSDF YKRLINRAKT VEGVHSLTDE ILAALP	323
ABD00067	LAEAKVLANR ELDKYGVSDF YKRVINRAKT VEGVSSLTAE ILAALP	324
ABD00068	LAEAKVLANR ELDKYGVSDF YKRLINRAKT VEGVDALTSH ILAALP	325
ABD00069	LAEAKVLANR ELDKYGVSDF YKRLINRAKT VEGVSTLIHD ILAALP	326
ABD00070	LAEAKVLANR ELDKYGVSDF YKRLINRAKT VEGVSTLIHD ILAALP	327
ABD00071	LAEAKVLANR ELDKYGVSDF YKRLINRAKT VEGVQALISE ILAALP	328
ABD00072	LAEAKVLANR ELDKYGVSDF YKRLINRAKT VEGVDSLIVH ILAALP	329
ABD00073	LAEAKVLANR ELDKYGVSDF YKRLINRAKT VEGVQSLITE ILAALP	330
ABD00074	LAEAKVLANR ELDKYGVSDF YKRLINRAKT VEGVDALITH ILAALP	331
ABD00075	LAEAKVLANR ELDKYGVSDF YKRMINRAKT VEGVDSLITH ILAALP	332
ABD00076	LAEAKVLANR ELDKYGVSDF YKRLINRAKT VEGVTLTITD ILAALP	333
ABD00077	LAEAKVLANR ELDKYGVSDF YKRLINRAKT VEGVESLIDH ILAALP	334
ABD00078	LAEAKVLANR ELDKYGVSDF YKRYINRAKT VEGVHTLIGH ILAALP	335
ABD00079	LAEAKVLANR ELDKYGVSDF YKRLINRAKT VEGVQTLISD ILAALP	336
ABD00080	LAEAKVLANR ELDKYGVSDF YKRLINRAKT VEGVNSLTSH ILAALP	337
ABD00081	LAEAKVLANR ELDKYGVSDF YKRLINRAKT VEGVNTLIHD ILAALP	338
ABD00082	LAEAKVLANR ELDKYGVSDF YKRLINRAKT VEGVESLIGE ILAALP	339
ABD00083	LAEAKVLANR ELDKYGVSDF YKRLINKAKT VEGVHTLIHD ILAALP	340
ABD00084	LAEAKVLANR ELDKYGVSDF YKRLINKAKT VEGVSALKMH ILAALP	341

图1(续)

多肽	氨基酸序列	SEQ ID NO:
ABD00085	LAEAKVLANR ELDKYGVSDF YKRLINKAKT VEGVDALIVH ILAALP	342
ABD00086	LAEAKVLANR ELDKYGVSDF YKRLINRART VEGVDTLIHD ILAALP	343
ABD00087	LAEAKVLANR ELDKYGVSDF YKRVINRART VEGVQALIAD ILAALP	344
ABD00088	LAEAKVLANR ELDKYGVSDF YKRLINRART VEGVESLIAD ILAALP	345
ABD00089	LAEAKVLANR ELDKYGVSDF YKRLINKAKT VEGVDALIAH ILAALP	346
ABD00090	LAEAKVLANR ELDKYGVSDF YKRLINRART VEGVESLITH ILAALP	347
ABD00091	LAEAKVLANR ELDKYGVSDF YKRLINRART VEGVDSLIVE ILAALP	348
ABD00092	LAEAKVLANR ELDKYGVSDF YKRVINRART VEGVSALIRE ILAALP	349
ABD00093	LAEAKVLANR ELDKYGVSDF YKRLINRART VEGVNALISD ILAALP	350
ABD00094	LAEAKVLANR ELDKYGVSDF YKRLINRART VEGVSALIQE ILAALP	351
ABD00095	LAEAKVLANR ELDKYGVSDF YKRLINRART VEGVQSLIDH ILAALP	352
ABD00096	LAEAKVLANR ELDKYGVSDF YKRLINRART VEGVDALICH ILAALP	353
ABD00097	LAEAKVLANR ELDKYGVSDF YKRVINRART VEGVEALIAD ILAALP	354
ABD00098	LAEAKVLANR ELDKYGVSDF YKRLINRART VEGVETLIRD ILAALP	355
ABD00099	LAEAKVLANR ELDKYGVSDF YKRLINRART VEGVQTLIID ILAALP	356
ABD00100	LAEAKVLANR ELDKYGVSDF YKRLINRART VEGVQALIAH ILAALP	357
ABD00101	LAEAKVLANR ELDKYGVSDF YKRVINRART VEGVNSLINH ILAALP	358
ABD00102	LAEAKVLANR ELDKYGVSDF YKRLINRART VEGVDSLIRH ILAALP	359
ABD00103	LAEAKVLANR ELDKYGVSDF YKRLINKAKT VEGVEALTIH ILAALP	360
ABD00104	LAEAKVLANR ELDKYGVSDF YKRLINRART VEGVDALIAH ILAALP	361
ABD00105	LAEAKVLANR ELDKYGVSDF YKRLINKAKT VEGVQALIAH ILAALP	362
ABD00106	LAEAKVLANR ELDKYGVSDF YKNLINRART VEGVHALKGH ILAALP	363
ABD00107	LAEAKVLANR ELDKYGVSDF YKNVINRART VEGVHALKDH ILAALP	364
ABD00108	LAEAKVLANR ELDKYGVSDF YKNVINRART VEGVSALKHE ILAALP	365
ABD00109	LAEAKVLANR ELDKYGVSDF YKRLINRART VEGVNTLKAD ILAALP	366
ABD00110	LAEAKVLANR ELDKYGVSDF YKNLINRART VEGVNTLKAD ILAALP	367
ABD00111	LAEAKVLANR ELDKYGVSDF YKNLINRART VEGVNSLKSH ILAALP	368
ABD00112	LAEAKVLANR ELDKYGVSDF YKRLINRART VEGVQSLKSE ILAALP	369
ABD00113	LAEAKVLANR ELDKYGVSDF YKNVINRART VEGVDSLKAE ILAALP	370
ABD00114	LAEAKVLANR ELDKYGVSDF YKNLINRART VEGVQTLKSD ILAALP	371
ABD00115	LAEAKVLANR ELDKYGVSDF YKFFINKAKT VEGVETLKSE ILAALP	372

图1(续)

多肽	氨基酸序列	SEQ ID NO:
ABD00116	LAEAKVLANR ELDKYGVSDF YKSLINRAKT VEGVHSLKDE ILAALP	373
ABD00117	LAEAKVLANR ELDKYGVSDF YKNVINKAKI VEGVSSLKAE ILAALP	374
ABD00118	LAEAKVLANR ELDKYGVSDF YKSLINRAKT VEGDALKSH ILAALP	375
ABD00119	LAEAKVLANR ELDKYGVSDF YKNLINKAKT VEGVSTLKH ILAALP	376
ABD00120	LAEAKVLANR ELDKYGVSDF YKNLINKAKT VEGVSTLKH ILAALP	377
ABD00121	LAEAKVLANR ELDKYGVSDF YKNLINKAKT VEGVQALKSE ILAALP	378
ABD00122	LAEAKVLANR ELDKYGVSDF YKSLINKAKI VEGVDSLKVH ILAALP	379
ABD00123	LAEAKVLANR ELDKYGVSDF YKNLINKAKT VEGVQSLKTE ILAALP	380
ABD00124	LAEAKVLANR ELDKYGVSDF YKNLINKAKT VEGVDALKTH ILAALP	381
ABD00125	LAEAKVLANR ELDKYGVSDF YKSMINRAKI VEGVDSLKTH ILAALP	382
ABD00126	LAEAKVLANR ELDKYGVSDF YKNLINKAKT VEGVITLKT ILAALP	383
ABD00127	LAEAKVLANR ELDKYGVSDF YKNLINKAKT VEGVESLKD ILAALP	384
ABD00128	LAEAKVLANR ELDKYGVSDF YKSYINRAKT VEGVHTLKGH ILAALP	385
ABD00129	LAEAKVLANR ELDKYGVSDF YKNLINKAKT VEGVQTLKSD ILAALP	386
ABD00130	LAEAKVLANR ELDKYGVSDF YKNLINKAKT VEGVNSLKSH ILAALP	387
ABD00131	LAEAKVLANR ELDKYGVSDF YKNLINKAKT VEGVNTLKH ILAALP	388
ABD00132	LAEAKVLANR ELDKYGVSDF YKNLINKAKT VEGVESLKGE ILAALP	389
ABD00133	LAEAKVLANR ELDKYGVSDF YKNLINKAKT VEGVHTLKH ILAALP	390
ABD00134	LAEAKVLANR ELDKYGVSDF YKNLINKAKT VEGVDALKVH ILAALP	391
ABD00135	LAEAKVLANR ELDKYGVSDF YKRLINRAKT VEGVHALKAE ILAALP	392
ABD00136	LAEAKVLANR ELDKYGVSDF YKNLINKAKT VEGVHTLKH ILAALP	393
ABD00137	LAEAKVLANR ELDKYGVSDF YKVINRART VEGVQALKAD ILAALP	394
ABD00138	LAEAKVLANR ELDKYGVSDF YKNLINKAKT VEGVESLKAD ILAALP	395
ABD00139	LAEAKVLANR ELDKYGVSDF YKNLINKAKT VEGVDALKAH ILAALP	396
ABD00140	LAEAKVLANR ELDKYGVSDF YKNLINKAKT VEGVESLKTH ILAALP	397
ABD00141	LAEAKVLANR ELDKYGVSDF YKNLINKAKT VEGVDSLKVE ILAALP	398
ABD00142	LAEAKVLANR ELDKYGVSDF YKNVINRAKT VEGVSLKRE ILAALP	399
ABD00143	LAEAKVLANR ELDKYGVSDF YKNLINKAKT VEGVNSLKSD ILAALP	400
ABD00144	LAEAKVLANR ELDKYGVSDF YKNLINKAKT VEGVNSLKQE ILAALP	401
ABD00145	LAEAKVLANR ELDKYGVSDF YKNLINKAKT VEGVQSLKDH ILAALP	402
ABD00146	LAEAKVLANR ELDKYGVSDF YKNLINKAKT VEGVDALKCH ILAALP	403

图 1(续)

多肽	氨基酸序列	SEQ ID NO:
ABD00147	LAEAKVLANR ELDKYGVSDF YKRLINKAKT VEGNALKTH ILAALP	404
ABD00148	LAEAKVLANR ELDKYGVSDF YKNVINAKT VEGVEALKAD ILAALP	405
ABD00149	LAEAKVLANR ELDKYGVSDF YKNLINRAKT VEGVETLKR ILAALP	406
ABD00150	LAEAKVLANR ELDKYGVSDF YKNLINRART VEGVQTLKTD ILAALP	407
ABD00151	LAEAKVLANR ELDKYGVSDF YKRLINKAKT VEGNALKHH ILAALP	408
ABD00152	LAEAKVLANR ELDKYGVSDF YKNLINRAKT VEGVQALKAH ILAALP	409
ABD00153	LAEAKVLANR ELDKYGVSDF YKNVINRAKT VEGVNSLKNH ILAALP	410
ABD00154	LAEAKVLANR ELDKYGVSDF YKSLINRART VEGVDSLKRH ILAALP	411
ABD00155	LAEAKVLANR ELDKYGVSDF YKNLINKAKT VEGVEALKLH ILAALP	412
ABD00156	LAEAKVLANR ELDKYGVSDF YKNLINRAKT VEGVDALKAH ILAALP	413
ABD00157	LAEAKVLANR ELDKYGVSDF YKNLINKAKT VEGVQALKAH ILAALP	414
ABD00158	LAEAKVLANR ELDKYGVSDF YKRLINRAKT VEGVHALKGH ILAALP	415
ABD00159	LAEAKVLANR ELDKYGVSDF YKRVINRAKT VEGVHALKDH ILAALP	416
ABD00160	LAEAKVLANR ELDKYGVSDF YKRIINRAKT VEGVRAALKLH ILAALP	417
ABD00161	LAEAKVLANR ELDKYGVSDF YKRVINRAKT VEGVSALKHE ILAALP	418
ABD00162	LAEAKVLANR ELDKYGVSDF YKRLINRAKT VEGVNSLKSH ILAALP	419
ABD00163	LAEAKVLANR ELDKYGVSDF YKRLINRAKT VGGVQSLKSE ILAALP	420
ABD00164	LAEAKVLANR ELDKYGVSDF YKRLINRAKT VEGVSSLKGH ILAALP	421
ABD00165	LAEAKVLANR ELDKYGVSDF YKRVINRAKT VEGVDSLKAE ILAALP	422
ABD00166	LAEAKVLANR ELDKYGVSDF YKRLINRART VEGVQTLKSD ILAALP	423
ABD00167	LAEAKVLANR ELDKYGVSDF YKRFINKAKT VEGVETLKSE ILAALP	424
ABD00168	LAEAKVLANR ELDKYGVSDF YKRLINRAKT VEGVHSLKDE ILAALP	425
ABD00169	LAEAKVLANR ELDKYGVSDF YKRVINAKT VEGVSSLKAE ILAALP	426
ABD00170	LAEAKVLANR ELDKYGVSDF YKRLINRAKT VEGVDALKSH ILAALP	427
ABD00171	LAEAKVLANR ELDKYGVSDF YKRLINKAKT VEGVSTLKH ILAALP	428
ABD00172	LAEAKVLANR ELDKYGVSDF YKRLINRAKT VEGVSTLKH ILAALP	429
ABD00173	LAEAKVLANR ELDKYGVSDF YKRLINRAKT VEGVQALKSE ILAALP	430
ABD00174	LAEAKVLANR ELDKYGVSDF YKRLINKAKT VEGVDSLKVH ILAALP	431
ABD00175	LAEAKVLANR ELDKYGVSDF YKRLINRAKT VEGVQSLKTE ILAALP	432
ABD00176	LAEAKVLANR ELDKYGVSDF YKRLINRAKT VEGVDALKTH ILAALP	433
ABD00177	LAEAKVLANR ELDKYGVSDF YKRMINRAKT VEGVDSLKTH ILAALP	434

图 1(续)

多肽	氨基酸序列	SEQ ID NO:
ABD00178	LAEAKVLANR ELDKYGVSDF YKRLINRAKT VEGVTLLKTD ILAALP	435
ABD00179	LAEAKVLANR ELDKYGVSDF YKRLINRAKT VEGVESLKD H ILAALP	436
ABD00180	LAEAKVLANR ELDKYGVSDF YKRYINRAKT VEGVHTLKGH ILAALP	437
ABD00181	LAEAKVLANR ELDKYGVSDF YKRLINRAKT VEGVQTLKSD ILAALP	438
ABD00182	LAEAKVLANR ELDKYGVSDF YKRLINRAKT VEGVNSLKSH ILAALP	439
ABD00183	LAEAKVLANR ELDKYGVSDF YKRLINRAKT VEGVNTLKH D ILAALP	440
ABD00184	LAEAKVLANR ELDKYGVSDF YKRLINRAKT VEGVESLKGE ILAALP	441
ABD00185	LAEAKVLANR ELDKYGVSDF YKRLINKAKT VEGVHTLKHD ILAALP	442
ABD00186	LAEAKVLANR ELDKYGVSDY YKRLINKAKT VEGVSALKMH ILAALP	443
ABD00187	LAEAKVLANR ELDKYGVSDF YKRLINKAKT VEGVDALKVH ILAALP	444
ABD00188	LAEAKVLANR ELDKYGVSDY YKRLINRAKT VEGVHALKAE ILAALP	445
ABD00189	LAEAKVLANR ELDKYGVSDY YKRLINRART VEGVDTLKH D ILAALP	446
ABD00190	LAEAKVLANR ELDKYGVSDF YKRVINRART VEGVQALKAD ILAALP	447
ABD00191	LAEAKVLANR ELDKYGVSDF YKRLINRAKT VEGVESLKD AD ILAALP	448
ABD00192	LAEAKVLANR ELDKYGVSDY YKRLINKAKT VEGVDALKAH ILAALP	449
ABD00193	LAEAKVLANR ELDKYGVSDY YKRLINRAKT VEGVESLKTH ILAALP	450
ABD00194	LAEAKVLANR ELDKYGVSDF YKRLINRART VEGVDSLKVE ILAALP	451
ABD00195	LAEAKVLANR ELDKYGVSDF YKRVINRAKT VEGVSALKRE ILAALP	452
ABD00196	LAEAKVLANR ELDKYGVSDF YKRLINRAKT VEGNALKSD ILAALP	453
ABD00197	LAEAKVLANR ELDKYGVSDF YKRLINRAKT VEGVSALKQE ILAALP	454
ABD00198	LAEAKVLANR ELDKYGVSDF YKRLINRAKT VEGVQSLKDH ILAALP	455
ABD00199	LAEAKVLANR ELDKYGVSDF YKRLINRAKT VEGVDALKCH ILAALP	456
ABD00200	LAEAKVLANR ELDKYGVSDY YKRLINKAKT VEGNALKTH ILAALP	457
ABD00201	LAEAKVLANR ELDKYGVSDF YKRVINKAKT VEGVEALKAD ILAALP	458
ABD00202	LAEAKVLANR ELDKYGVSDF YKRLINRAKT VEGVETLKR D ILAALP	459
ABD00203	LAEAKVLANR ELDKYGVSDF YKRLINRART VEGVQTLKTD ILAALP	460
ABD00204	LAEAKVLANR ELDKYGVSDF YKRLINKAKT VEGNALKHH ILAALP	461
ABD00205	LAEAKVLANR ELDKYGVSDY YKRLINRAKT VEGVQALKAH ILAALP	462
ABD00206	LAEAKVLANR ELDKYGVSDF YKRVINRAKT VEGVNSLKNH ILAALP	463
ABD00207	LAEAKVLANR ELDKYGVSDF YKRLINRART VEGVDSLKRH ILAALP	464
ABD00208	LAEAKVLANR ELDKYGVSDY YKRLINKAKT VEGVEALKLH ILAALP	465

图1(续)

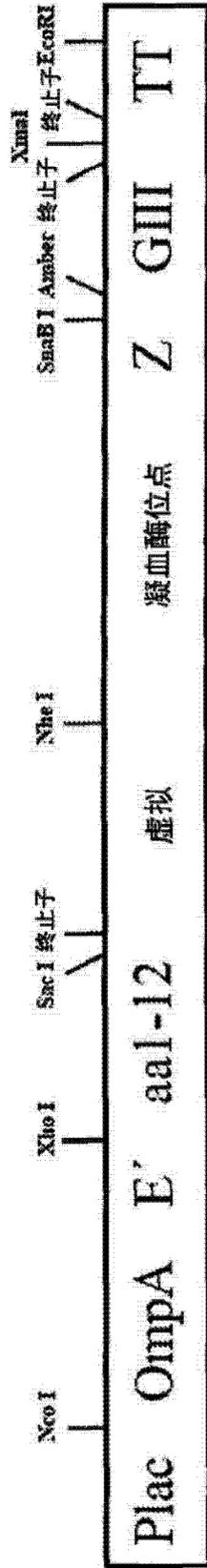
多肽	氨基酸序列	SEQ ID NO:
ABD00209	LAEAKVLANR ELDKYGVSDF YKRLINRAKT VEGVDALKAH ILAALP	466
ABD00210	LAEAKVLANR ELDKYGVSDY YKRLINKAKT VEGVQALKAH ILAALP	467
ABD00211	LAEAKVLANR ELDKYGVSDF YKRVINRAKT VEGSALKKH ILAALP	468
ABD00212	LAEAKVLANR ELDKYGVSDF YKRLINRAKT VEGVNTLKAH ILAALP	469
ABD00213	LAEAKVLANR ELDKYGVSDF YKRLINRAKT VGVQSLKSH ILAALP	470
ABD00214	LAEAKVLANR ELDKYGVSDF YKRVINRAKT VEGVDSLKAH ILAALP	471
ABD00215	LAEAKVLANR ELDKYGVSDF YKRLINRART VEGVQTLKSH ILAALP	472
ABD00216	LAEAKVLANR ELDKYGVSDF YKRFINKAKT VEGVETLKSH ILAALP	473
ABD00217	LAEAKVLANR ELDKYGVSDF YKRLINRAKT VEGVHSLKDH ILAALP	474
ABD00218	LAEAKVLANR ELDKYGVSDY YKRVINKAKT VEGVSSLKAH ILAALP	475
ABD00219	LAEAKVLANR ELDKYGVSDF YKRLINKAKT VEGVSTLKH ILAALP	476
ABD00220	LAEAKVLANR ELDKYGVSDF YKRLINRAKT VEGVSTLKH ILAALP	477
ABD00221	LAEAKVLANR ELDKYGVSDF YKRLINRAKT VEGVQALKSH ILAALP	478
ABD00222	LAEAKVLANR ELDKYGVSDF YKRLINRAKT VEGVQSLKTH ILAALP	479
ABD00223	LAEAKVLANR ELDKYGVSDF YKRLINRAKT VEGVTLKTH ILAALP	480
ABD00224	LAEAKVLANR ELDKYGVSDF YKRLINRAKT VEGVQTLKSH ILAALP	481
ABD00225	LAEAKVLANR ELDKYGVSDF YKRLINRAKT VEGVTLKHH ILAALP	482
ABD00226	LAEAKVLANR ELDKYGVSDF YKRLINRAKT VEGVESLKGH ILAALP	483
ABD00227	LAEAKVLANR ELDKYGVSDF YKRLINKAKT VEGVHTLKH ILAALP	484
ABD00228	LAEAKVLANR ELDKYGVSDY YKRLINRAKT VEGVHALKAH ILAALP	485
ABD00229	LAEAKVLANR ELDKYGVSDY YKRLINRART VEGVDTLKH ILAALP	486
ABD00230	LAEAKVLANR ELDKYGVSDF YKRVINRART VEGVQALKAH ILAALP	487
ABD00231	LAEAKVLANR ELDKYGVSDF YKRLINRAKT VEGVESLKAH ILAALP	488
ABD00232	LAEAKVLANR ELDKYGVSDF YKRLINRART VEGVDSLKVH ILAALP	489
ABD00233	LAEAKVLANR ELDKYGVSDF YKRVINRAKT VEGVSALKRH ILAALP	490
ABD00234	LAEAKVLANR ELDKYGVSDF YKRLINRAKT VEGVNALKSH ILAALP	491
ABD00235	LAEAKVLANR ELDKYGVSDF YKRLINRAKT VEGSALKQH ILAALP	492
ABD00236	LAEAKVLANR ELDKYGVSDF YKRVINKAKT VEGVEALKAH ILAALP	493
ABD00237	LAEAKVLANR ELDKYGVSDF YKRLINRAKT VEGVETLKRH ILAALP	494
ABD00238	LAEAKVLANR ELDKYGVSDF YKRLINRART VEGVQTLKTH ILAALP	495
ABD00239	LAEAKVLANR ELDKYGVSDF YKRLINKAKT VEGVEALKIH ILAALP	496

图1(续)

多肽	氨基酸序列	SEQ ID NO:
ABD00240	LAEAKVLANR ELDKYGVS DY YKNLINRART VEGVEALKLH ILAALP	497
ABD00241	LAEAKVLANR ELDKYGVS DY YKNIINRAKT VEGVEALKLH ILAALP	498
ABD00242	LAEAKVLANR ELDKYGVS DF YKNLINRAKT VEGVEALKLH ILAALP	499
ABD00243	LAEAKVLANR ELDKYGVS DF YKNVINKAKT VEGVEALKLH ILAALP	500
ABD00244	LAEAKVLANR ELDKYGVS DY YKNLINRAKT VEGVEALKLH ILAALP	501
ABD00245	LAEAKVLANR ELDKYGVS DY YKNLINRART VEGVHALIDH ILAALP	502
ABD00246	LAEAKVLANR ELDKYGVS DF YKRLINKAKT VEGVEALKLH ILAALP	503
ABD00247	LAEAKVLANR ELDKYGVS DY YKRLISKAKT VEGVKALISE ILAALP	504
ABD00248	LAEAKVLAIR ELDKYGVS DF YKRLINKAKT VEGVEALKLH ILAALP	505
ABD00249	LAEAKVLAIR ELDKYGVS DY YKRLISKAKT VEGVKALISE ILAALP	506
ABD00250	LAEAKVLAIK ELDKYGVS DY YKRLISKAKT VEGVKALISE ILAALP	507
ABD00251	LAEAKELANR ELDKYGVS DY YKRLISKAKT VEGVKALISE ILAALP	508
ABD00252	LAEAKVDANR ELDKYGVS DY YKRLISKAKT VEGVKALISE ILAALP	509
ABD00253	LAEAKEDANR ELDKYGVS DY YKRLISKAKT VEGVKALISE ILAALP	510
ABD00254	LAEAKEDAIAK ELDKYGVS DY YKRLISKAKT VEGVKALISE ILAALP	511
ABD00255	LAEAKVLAIAK ELDKYGVS DY YKRLISKAKT VEGVKALISE ILAALP	512
ABD00256	LAEAKELAIAK ELDKYGVS DY YKRLISKAKT VEGVKALISE ILAALP	513
ABD00257	LAEAKVDAIAK ELDKYGVS DY YKRLISKAKT VEGVKALISE ILAALP	514
ABDwt	LAEAKVLANR ELDKYGVS DY YKNLINNAKT VEGVKALIDE ILAALP	515

图 1(续)

A:



B:

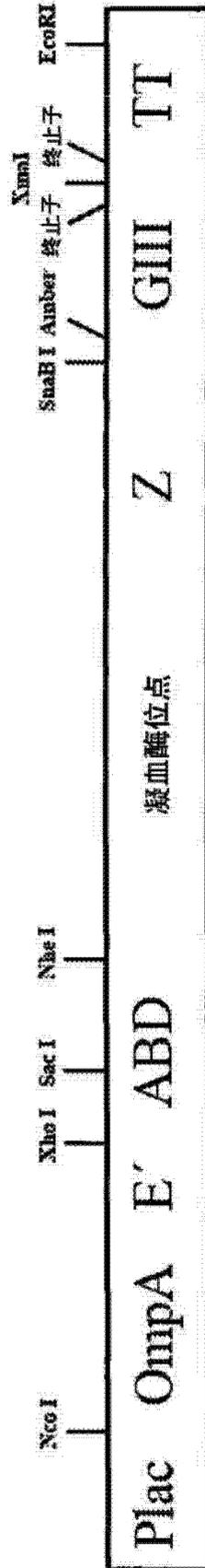


图 2

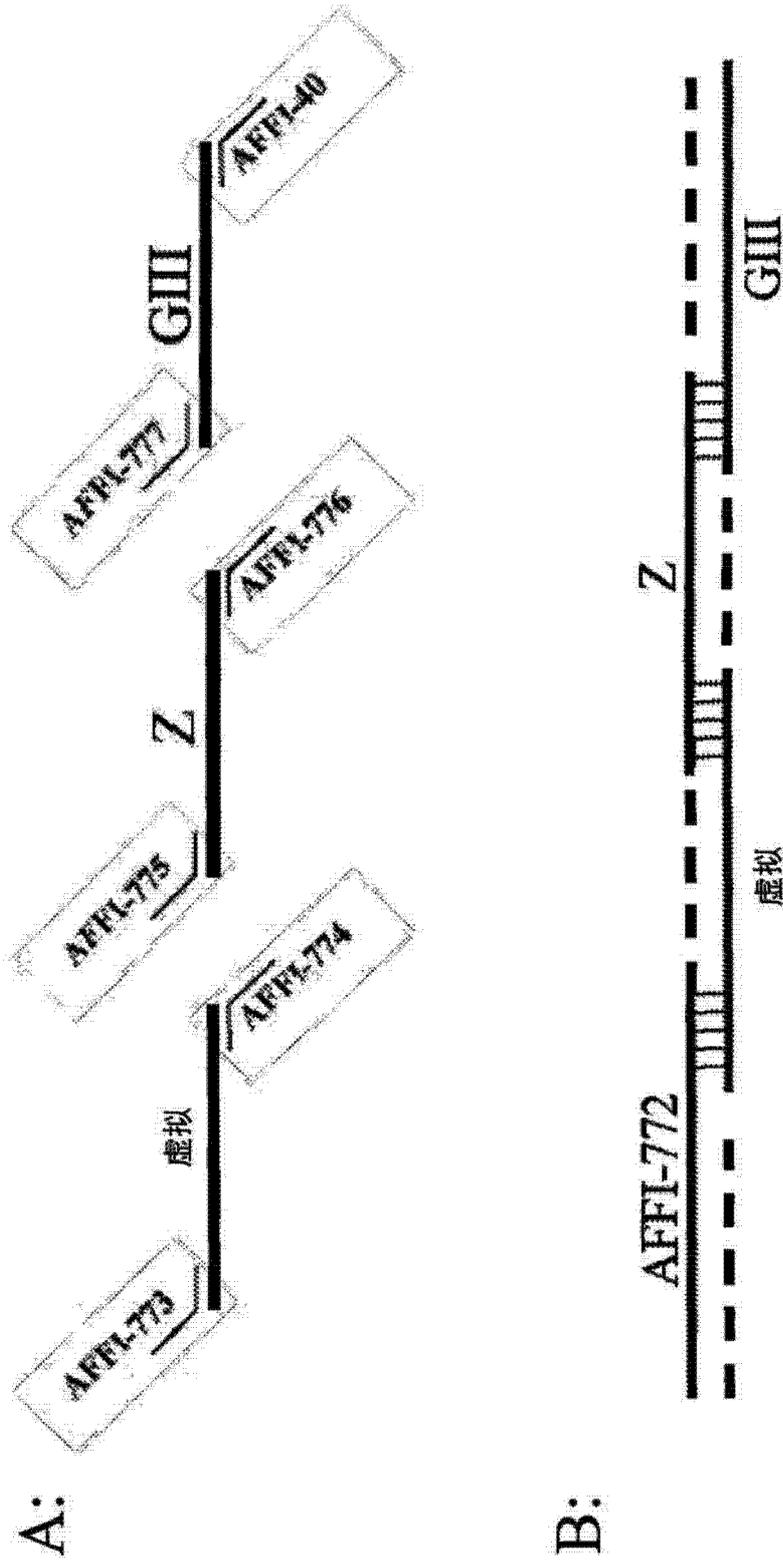


图 3

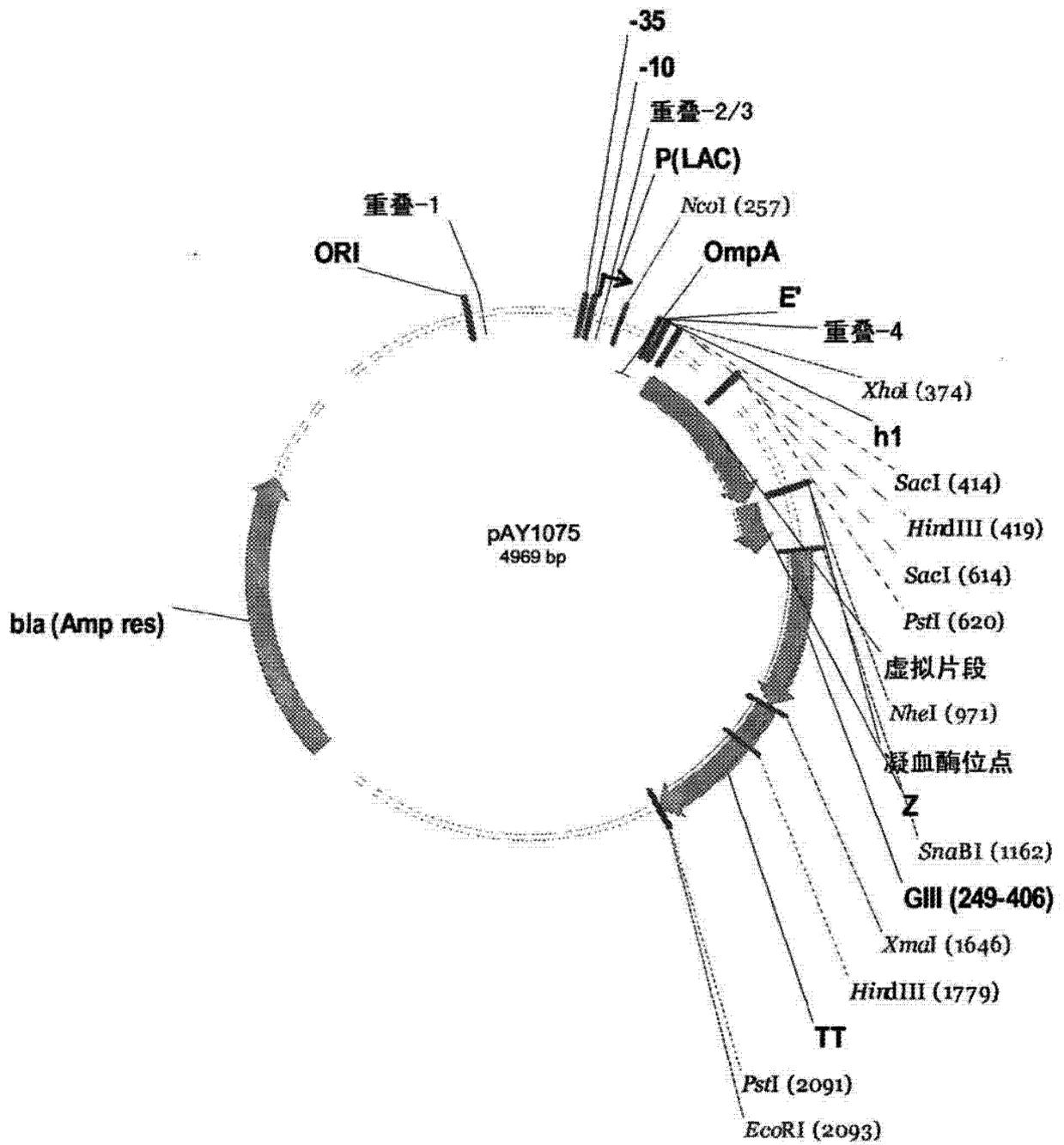


图 4

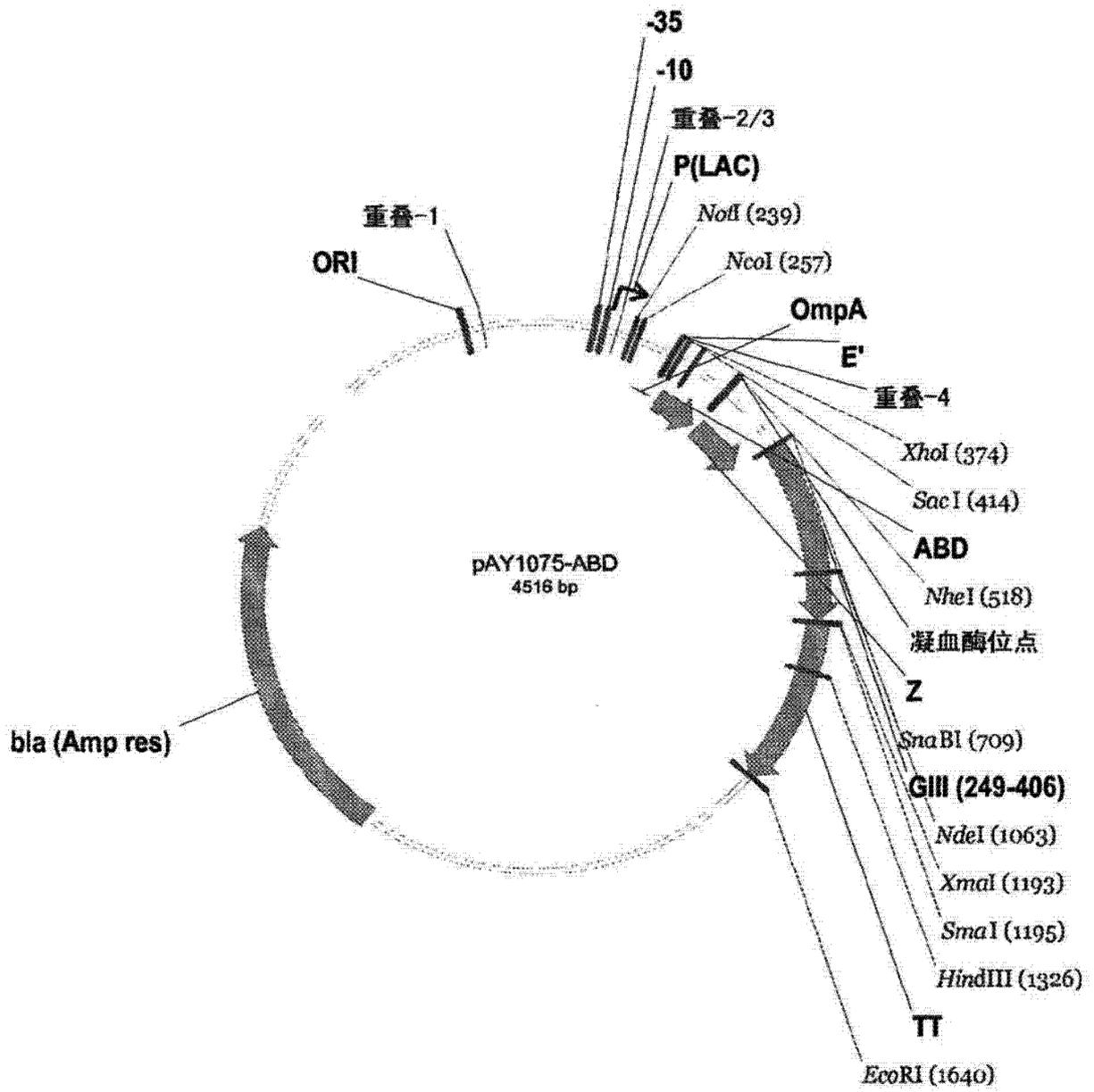


图 5

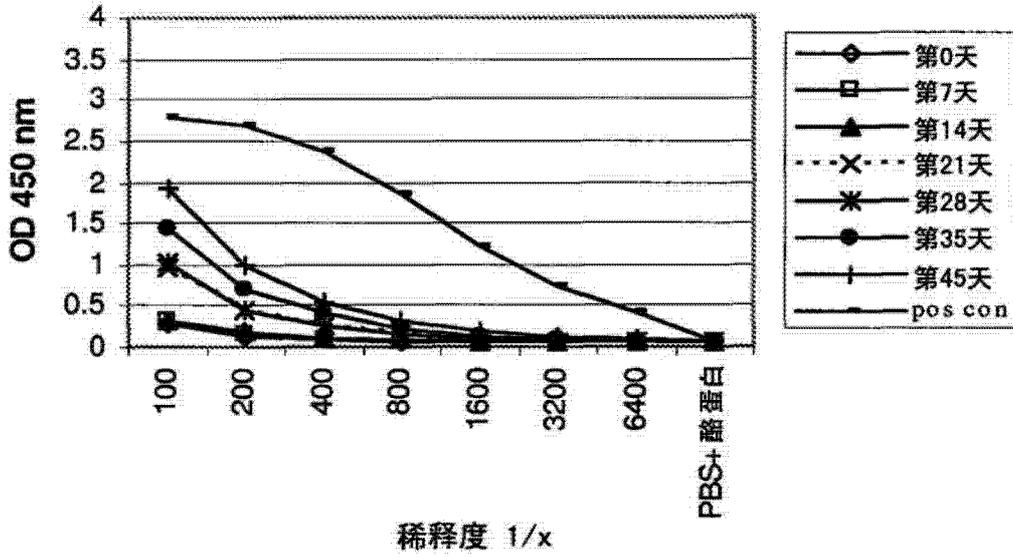
	Pos16 ^a	Pos16 ^b	Pos18	Pos18	Pos20	Pos20	Pos23	Pos23	Pos24	Pos24	Pos27	Pos27	Pos29	Pos29	Pos30	Pos30	Pos32	Pos32	Pos33	Pos33	Pos35	Pos35	Pos36	Pos36	Pos37	Pos37	Pos39	Pos39	Pos40	Pos40	Pos41	Pos41
Ala (A)																	5.53	3.9	8.5	7.8	6.25	11.7	34	32.5			6.25	6.5				
Arg (R)							25	12			25	16	10	14			0.93	0	12.38	10	9.38	11.7					9.38	16				
Asn (N)			10	11.7			25	42			25	39			10	10	0.55	1.3	4.125	1.3	3.13	0					3.13	2.6				
Asp (D)																	6.24	7.79	4.25	1.3	3.13	3.9					3.13	1.3	25	18		
Cys (C)																	0.05	0			3.13	0					3.13	2.6				
Gln (Q)																	5	5.19	4.125	1.3	3.13	3.9					3.13	2.6				
Glu (E)																	56.17	57.1	4.24	2.6	3.13	1.3					3.13	2.6	21			
Gly (G)																	5.53	6.49	8.5	6.5	6.25	1.3					6.25	3.9				
His (H)																	0.55	0	4.125	3.9	3.13	2.6					3.13	1.3	25	17		
Ile (I)									5	9.1							0.05	0	4.125	7.8	3.13	0					3.13	0				
Leu (L)									75	78							0.93	0	8.25	12	9.38	23.4					9.38	9.1				
Lys (K)							25	16			25	7.8	90	86			5	5.19	4.125	0	3.13	1.3					3.13	0				
Met (M)									5	3.9							0.44	1.3	4.125	3.9	3.13	1.3					3.13	3.9				
Phe (F)									5	5.2							0.05	0			3.13	6.49					3.13	2.6				
Pro (P)																	0.49	0	8.25	22	6.25	13					6.25	7.8				
Ser (S)	50	45	80	72.7			25	31			25	38			10	7.8	0.54	0	4.125	2.6	9.38	6.49	33	40.3			9.38	13				
Thr (T)	50	55	10	15.6											80	82	0.49	1.3	6.25	6.5	6.25	2.6	33	27.3			6.25	7.8				
Trp (W)																	0.44	0			3.13	1.3					3.13	3.9				
Tyr (Y)																	0.55	0			3.13	0					3.13	2.6				
Val (V)									10	3.9							5.53	5.19	8.5	7.8	6.25	6.49					6.25	7.8				
Stop (*)																	5	5.19			3.13	1.3					3.13	3.9				

图 7

MGSSHHHHHHHLQVD ABD 变体

图 8

组 1-9023



组 1-9039

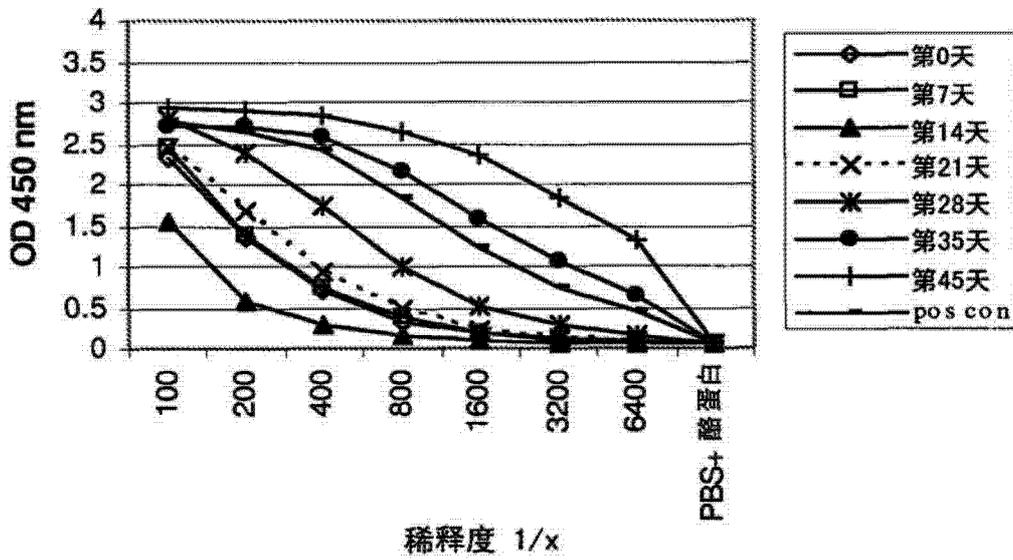


图 9A

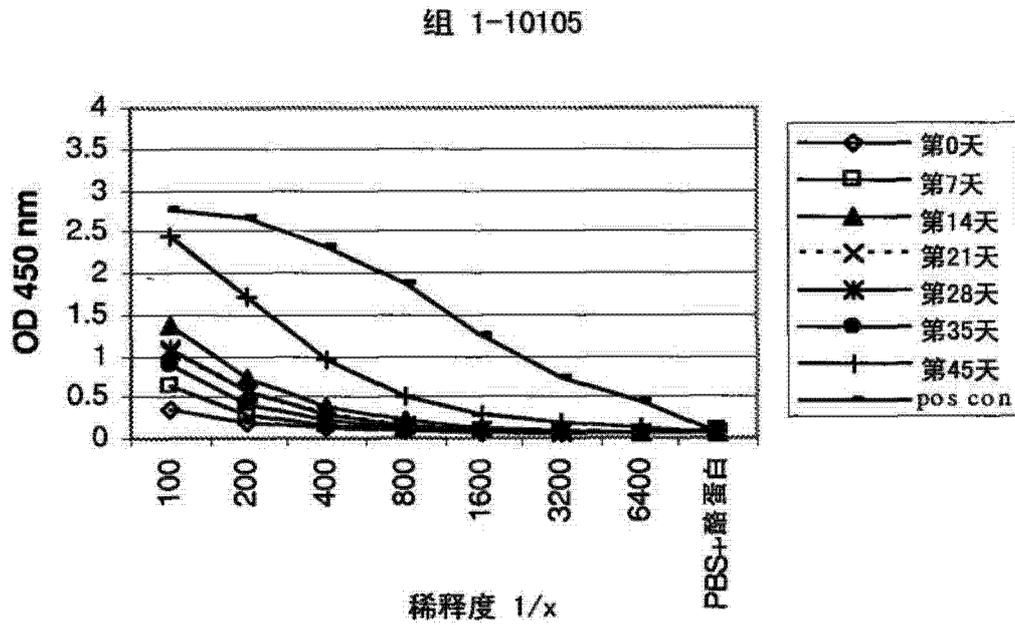
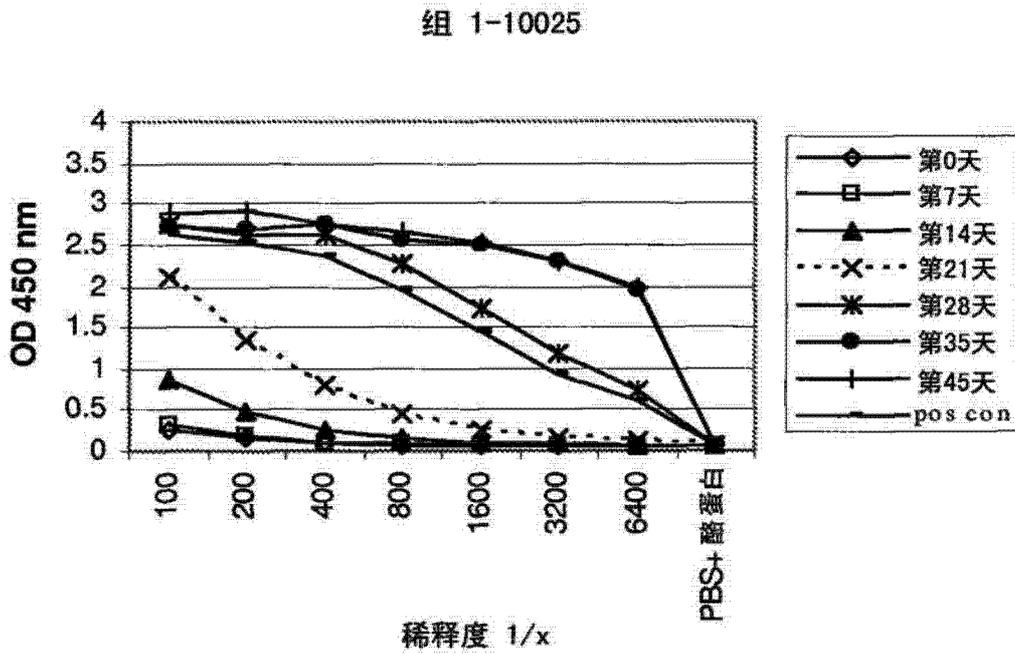


图 9B

组 1-11019

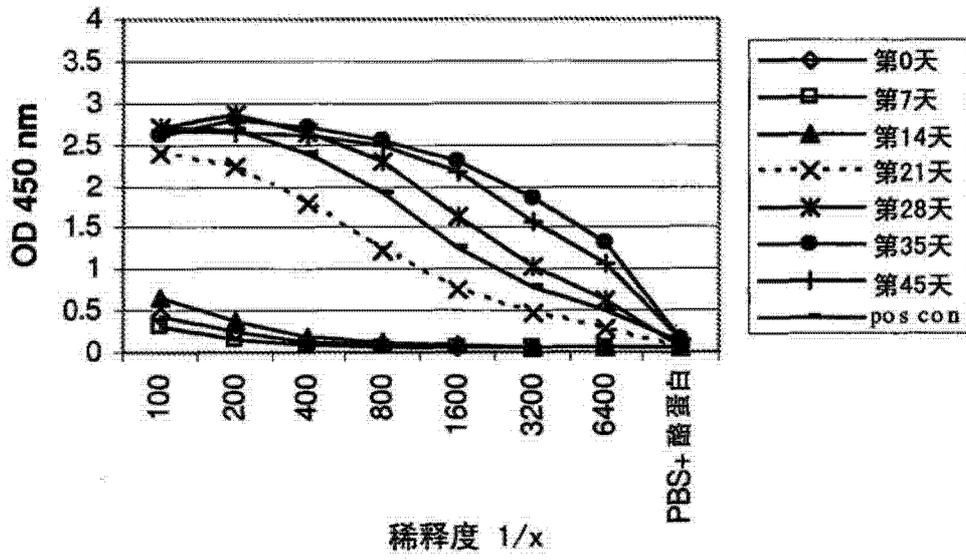


图 9C

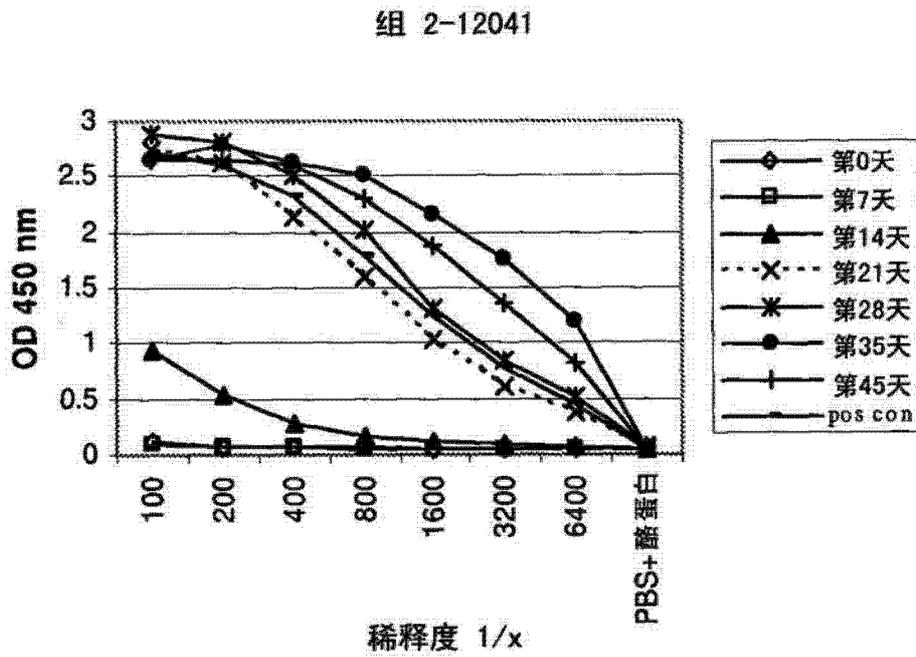
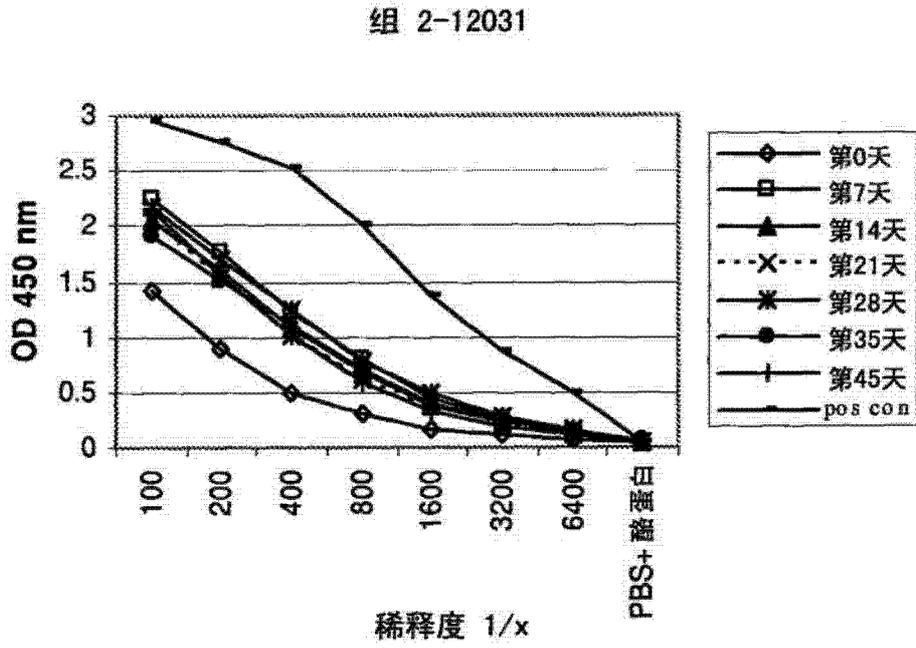
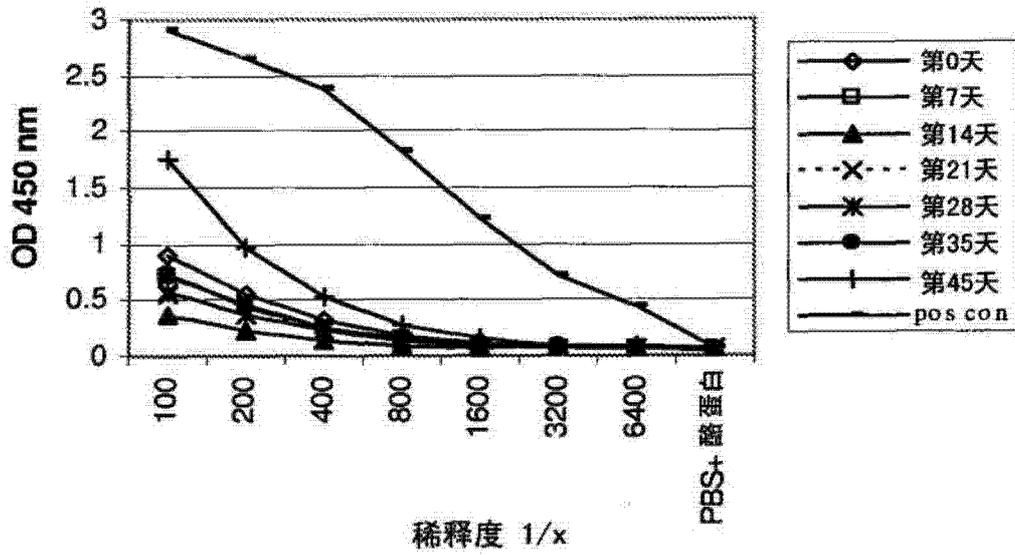


图 10A

组 2-12047



组 2-12061

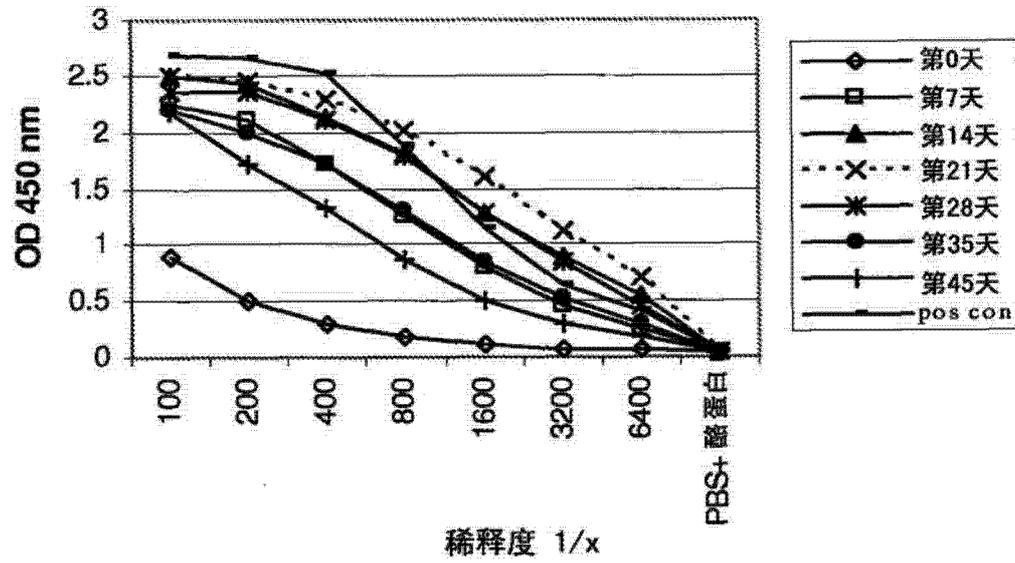


图 10B

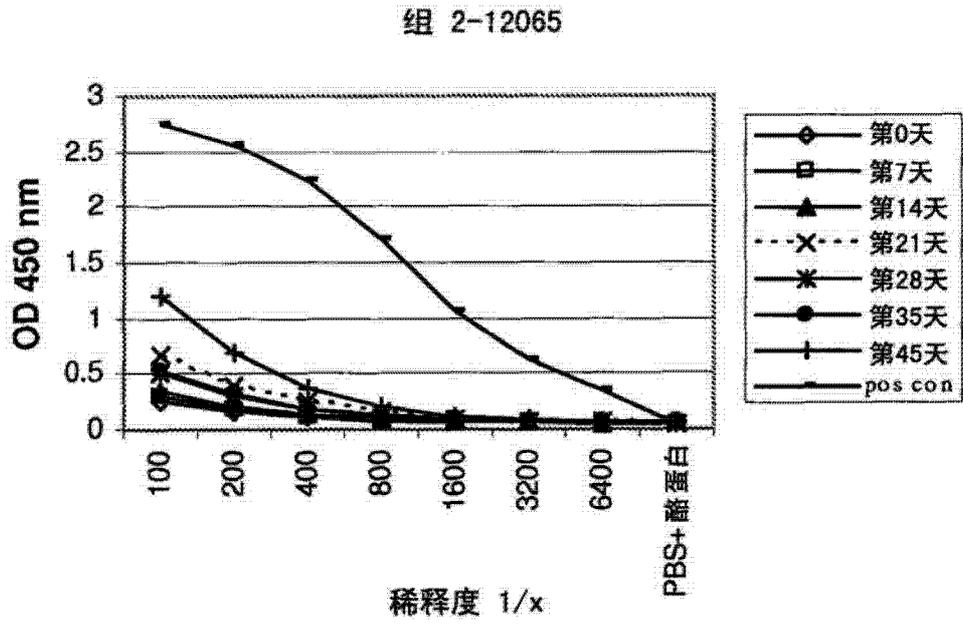


图 10C

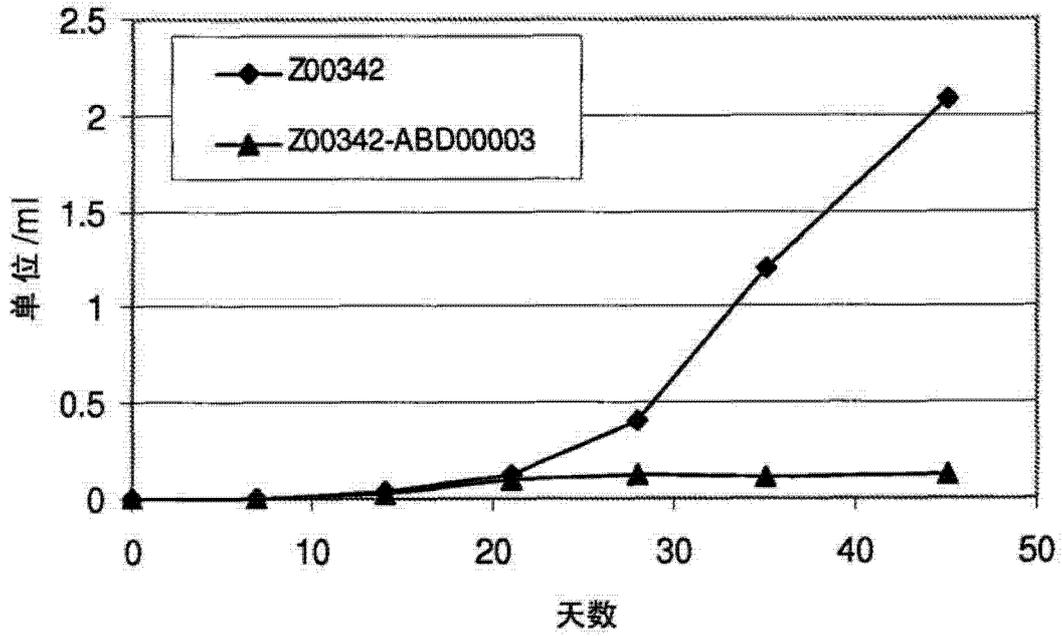


图 11

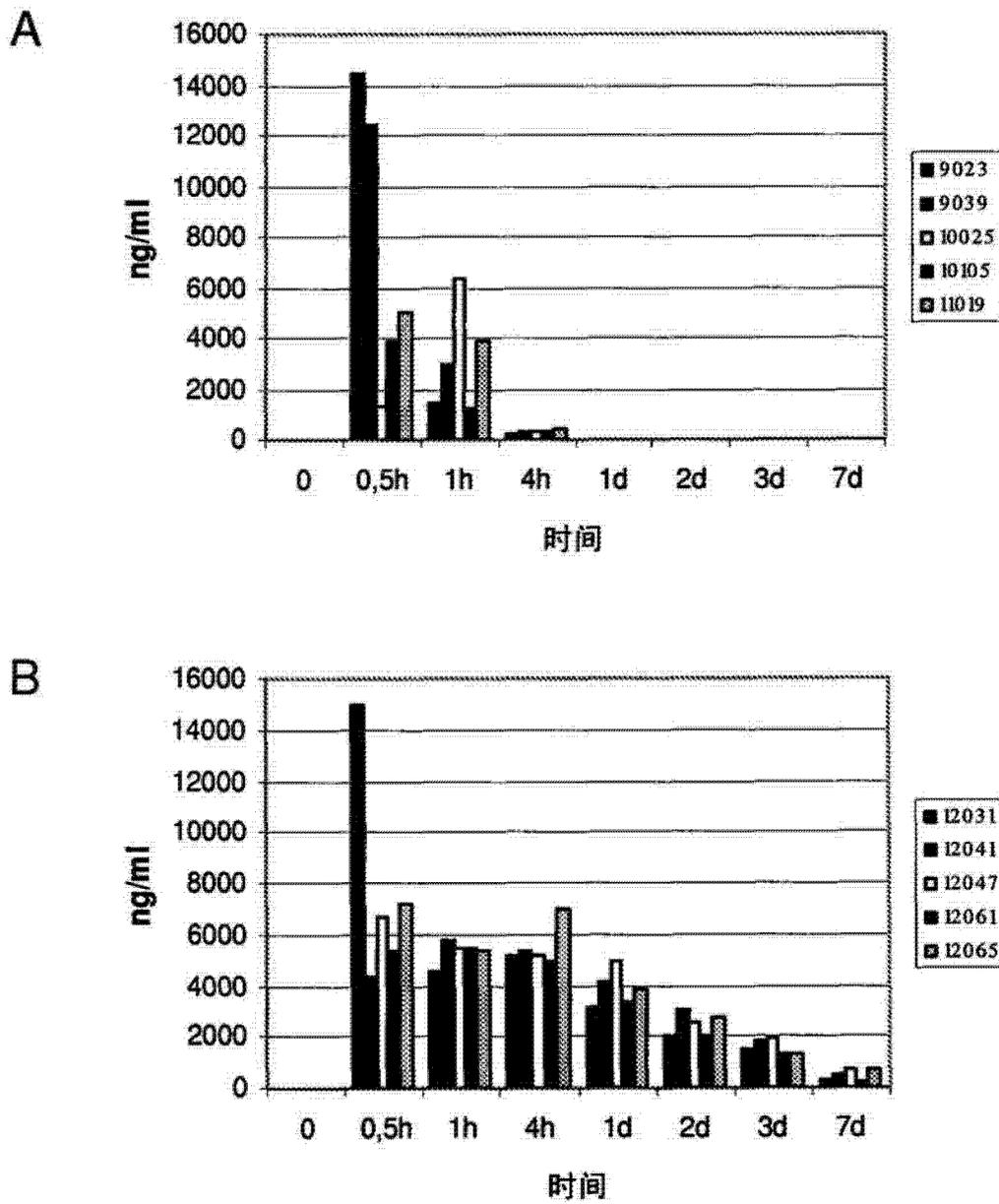
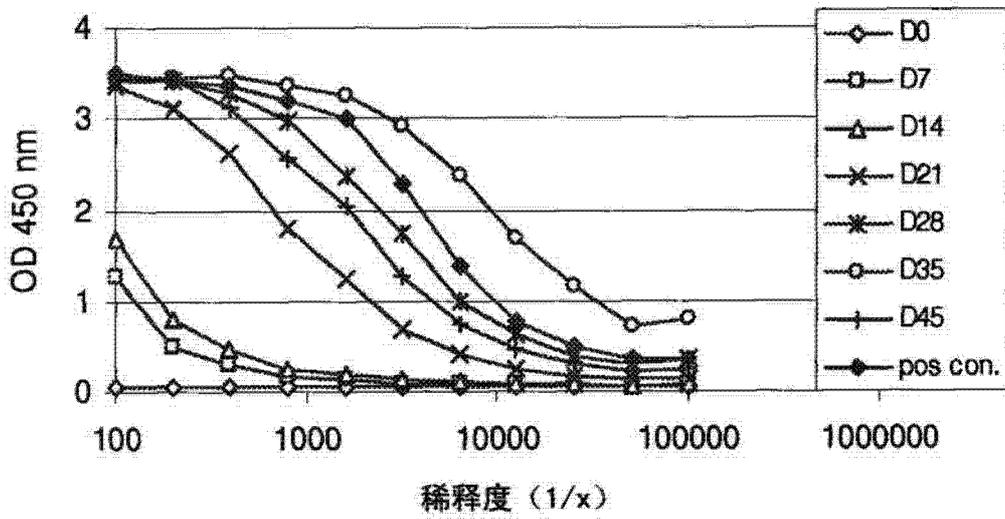


图 12

组 1 E74



组 1 E78

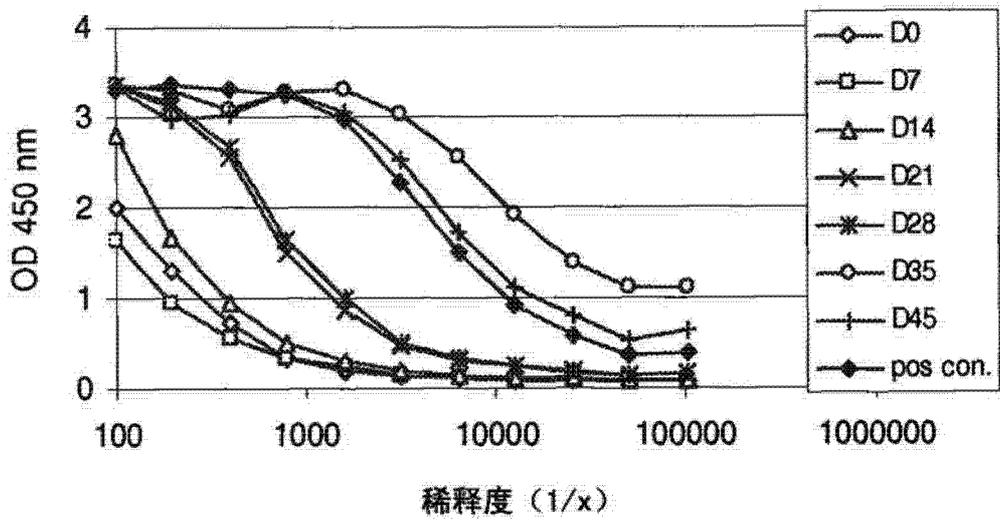


图 13A

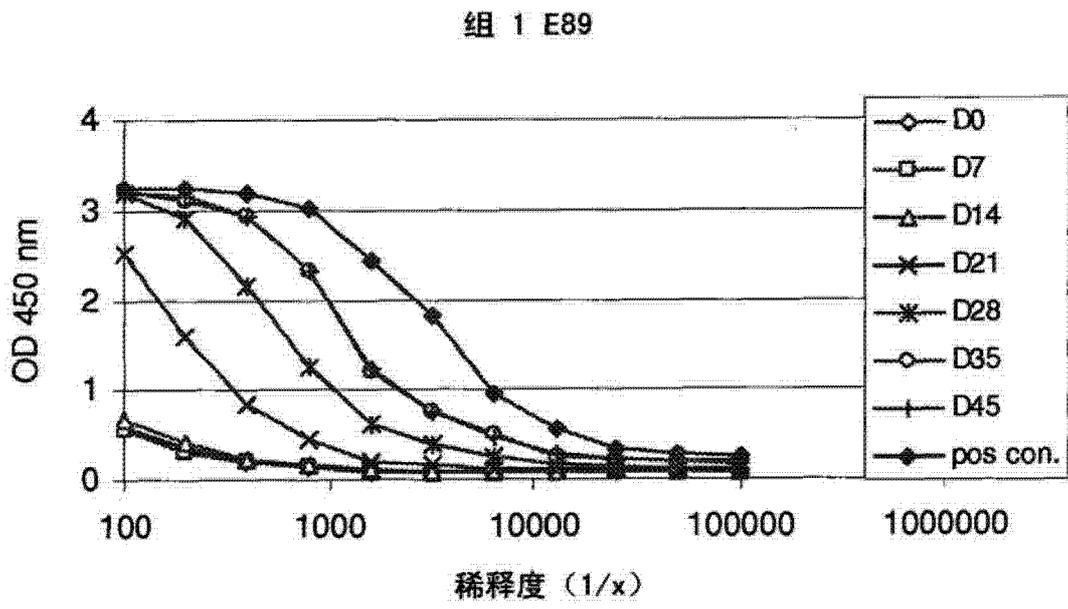


图 13B

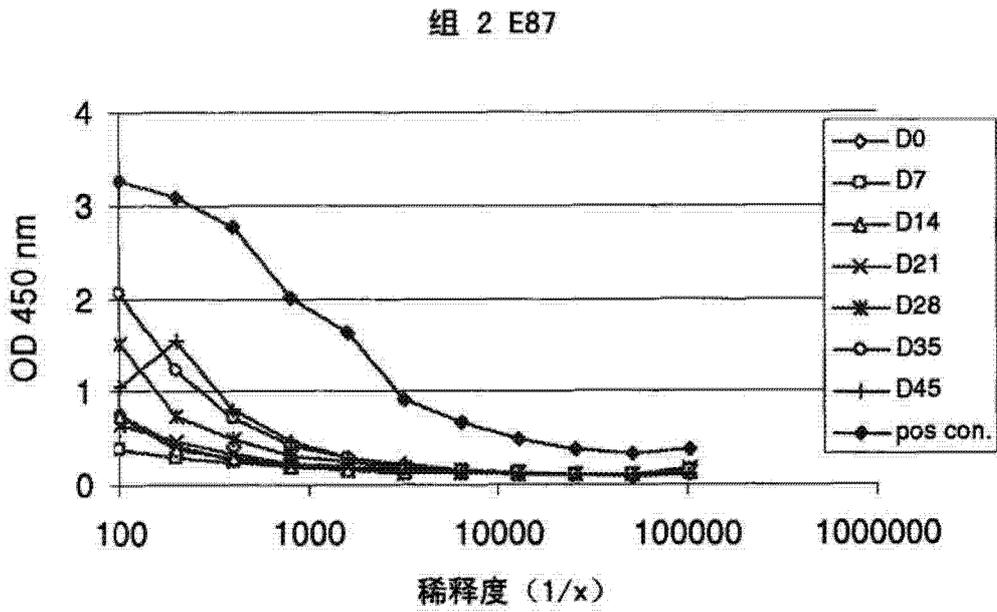
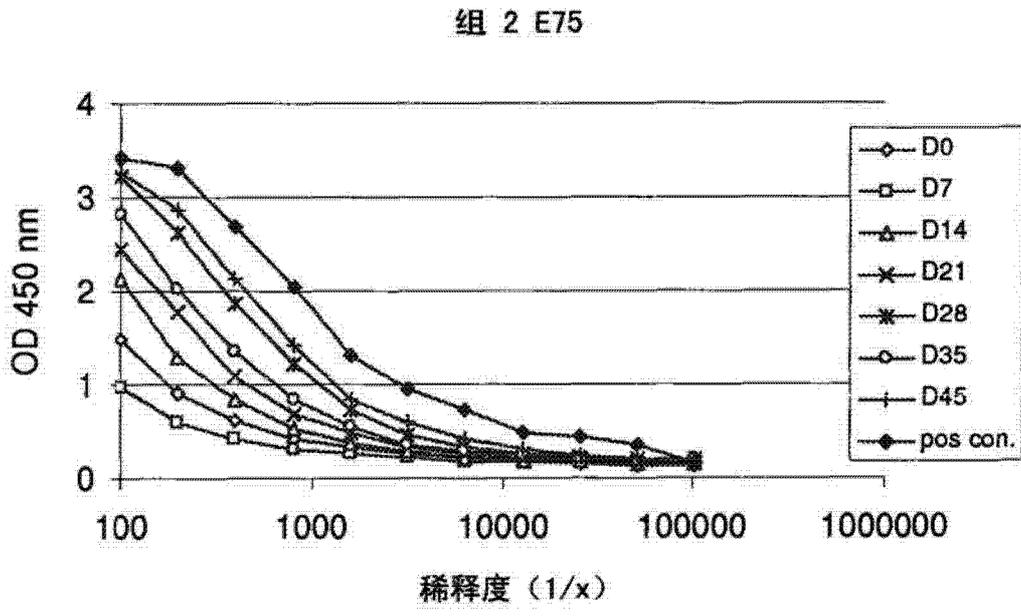


图 14A

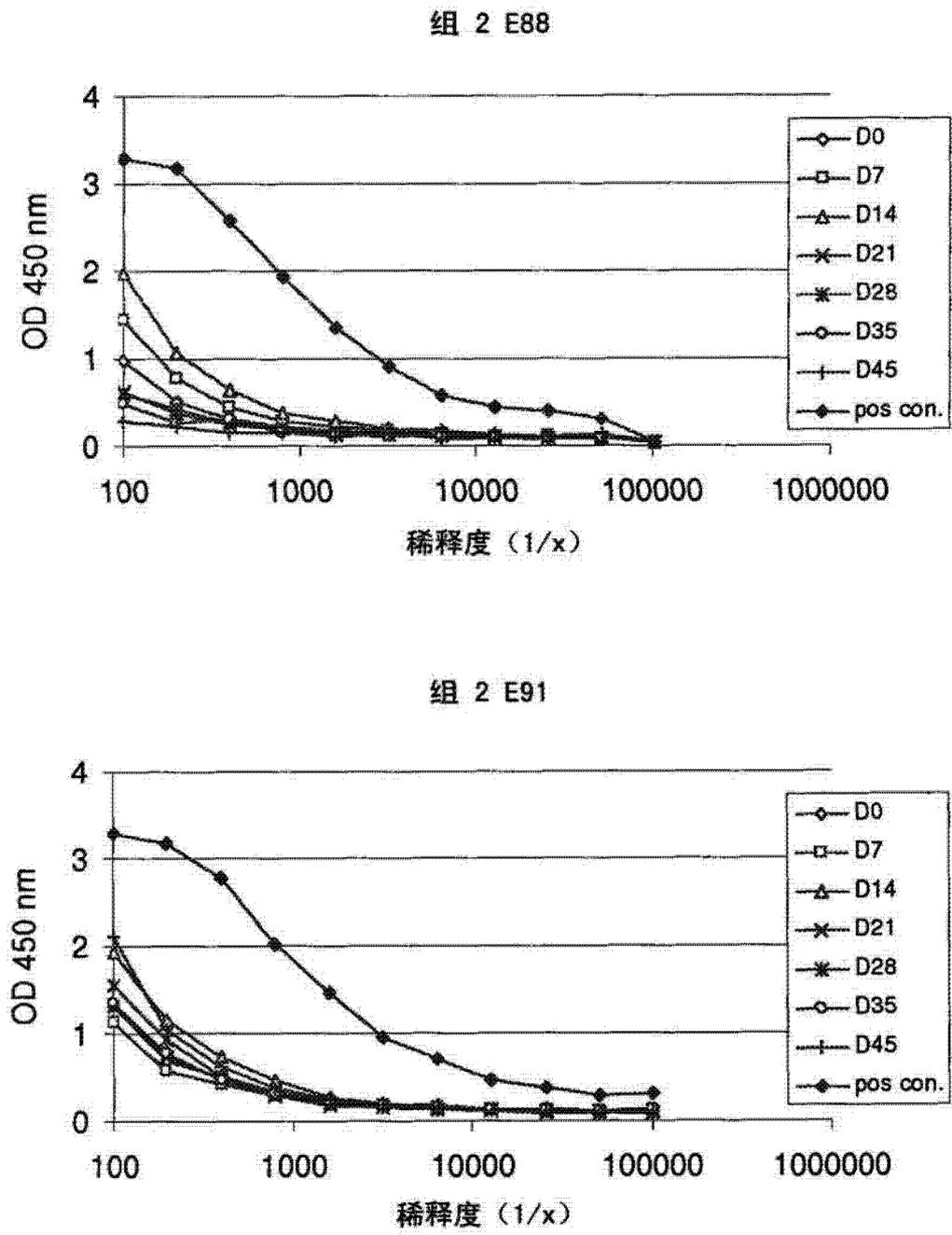
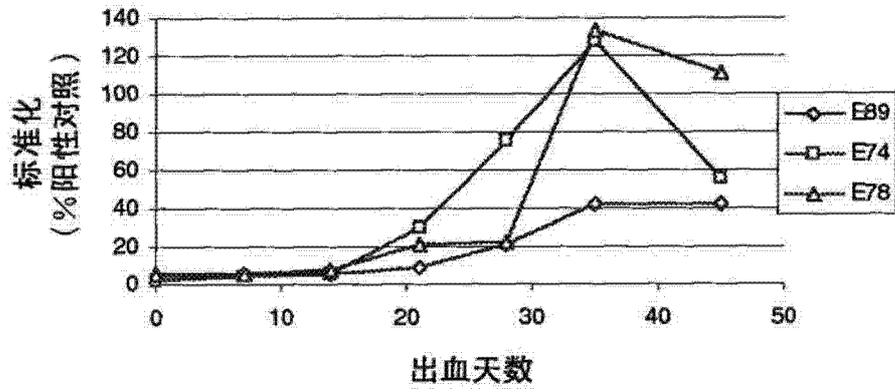


图 14B

A



B

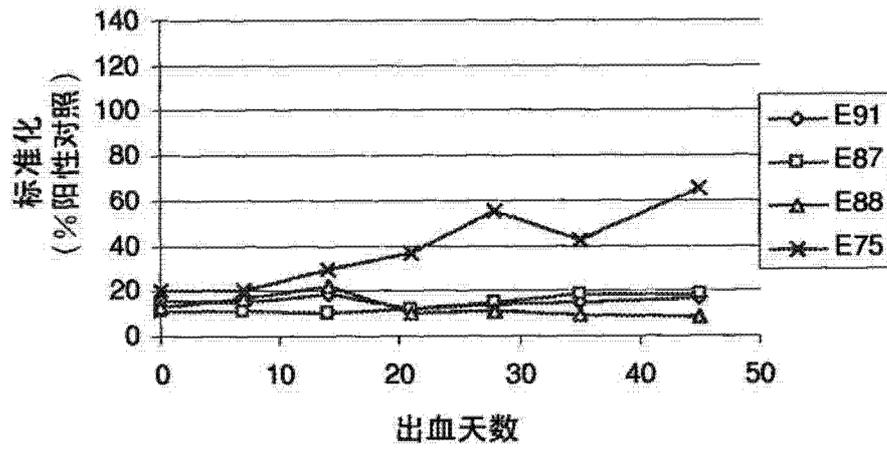


图 15