



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102811782 A

(43) 申请公布日 2012. 12. 05

(21) 申请号 201180012844. 2

C07K 14/31 (2006. 01)

(22) 申请日 2011. 03. 07

C07K 16/06 (2006. 01)

(30) 优先权数据

10155835. 1 2010. 03. 08 EP

(85) PCT申请进入国家阶段日

2012. 09. 07

(86) PCT申请的申请数据

PCT/EP2011/053362 2011. 03. 07

(87) PCT申请的公布数据

W02011/110515 EN 2011. 09. 15

(71) 申请人 通用电气健康护理生物科学股份公
司

地址 瑞典乌普萨拉

(72) 发明人 L. 阿布拉姆森

(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公
司 72001

代理人 孔青 林森

(51) Int. Cl.

B01D 15/38 (2006. 01)

权利要求书 3 页 说明书 10 页

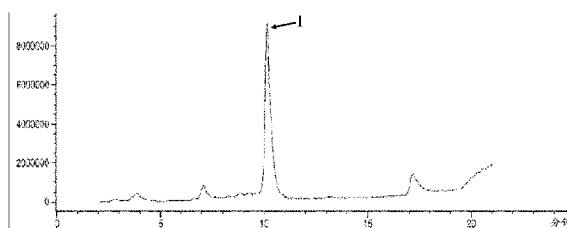
序列表 9 页 附图 4 页

(54) 发明名称

免疫球蛋白 G Fc 区结合多肽

(57) 摘要

本发明提供了一种免疫球蛋白 GFc 区结合多肽,所述多肽由选自 i) 的氨基酸序列和与其具有至少 95% 同一性的氨基酸序列组成。还提供了用于生产所述多肽、包含所述多肽的组合物、编码所述多肽的多核苷酸以及所述多肽的多聚体的方法,以及使用所述多肽的方法。



1. 一种免疫球蛋白 G Fc 区结合多肽,所述多肽包含选自以下的氨基酸序列:

i) X_1 -([间隔基 1]-KFDKEQQN AFYEILX₁₇LPX₂₀ LTEEQRNAFI
QKLKDX₃₆PSQS AELLAEAKQL X₅₁EAQA-[间隔基 2])_n-C_{CTERM-1}X_{CTERM}

其中,彼此独立地,

X_1 为 P 或无;

[间隔基 1] 为由 1-3 个氨基酸残基组成的氨基酸序列;

X_{17} 为任何氨基酸残基;

X_{20} 为任何氨基酸残基;

X_{36} 为除 D 外的任何氨基酸残基;

X_{51} 为任何氨基酸残基;

[间隔基 2] 为由 0-20 个氨基酸残基组成的氨基酸序列;

X_{CTERM} 为 D 或无;

以及

n 为 1-4;

和

ii) 与 i) 中限定的序列具有至少 95% 同一性的氨基酸序列。

2. 权利要求 1 的 IgG Fc- 结合多肽,其中 [间隔基 1] 选自 A、AE 和 AEA。

3. 权利要求 2 的 IgG Fc- 结合多肽,其中 [间隔基 1] 为 A。

4. 前述权利要求中任一项的 IgG Fc- 结合多肽,其中 X_{17} 为 H。

5. 前述权利要求中任一项的 IgG Fc- 结合多肽,其中 X_{20} 为除 N 外的任何氨基酸残基,例如 T。

6. 权利要求 1-4 中任一项的 IgG Fc- 结合多肽,其中 X_{20} 为 N。

7. 前述权利要求中任一项的 IgG Fc- 结合多肽,其中 X_{36} 选自 E 和 A,例如 E。

8. 前述权利要求中任一项的 IgG Fc- 结合多肽,其中 X_{51} 为除 N 外的任何氨基酸残基,例如 D。

9. 权利要求 1-7 中任一项的 IgG Fc- 结合多肽,其中 X_{51} 为 N。

10. 前述权利要求中任一项的 IgG Fc- 结合多肽,其中 [间隔基 2] 的所有氨基酸残基独立地选自 A、E、F、G、I、K、L、P、Q、R、S、T 和 V,特别地选自 A、E、G、K、P、Q、R、S 和 T,例如选自 G、Q 和 S。

11. 前述权利要求中任一项的 IgG Fc- 结合多肽,其中 [间隔基 2] 为 G。

12. 前述权利要求中任一项的 IgG Fc- 结合多肽,其中 n 为 1。

13. 权利要求 1-11 中任一项的 IgG Fc- 结合多肽,其中 n 为 2。

14. 权利要求 1-11 中任一项的 IgG Fc- 结合多肽,其中 n 为 4。

15. 前述权利要求中任一项的 IgG Fc- 结合多肽,所述多肽与 IgG Fc 结合,使得该相互作用的 K_D 值为至多 1×10^{-6} M。

16. 权利要求 15 的 IgG Fc- 结合多肽,所述多肽与 IgG Fc 结合,使得该相互作用的 K_D 值为至多 1×10^{-7} M。

17. 权利要求 16 的 IgG Fc- 结合多肽,所述多肽与 IgG Fc 结合,使得该相互作用的 K_D

值为至多 5×10^{-8} M。

18. 前述权利要求中任一项的 IgG Fc- 结合多肽, 所述多肽能够与人 IgG 分子的 Fc 部分结合。

19. 权利要求 18 的 IgG Fc- 结合多肽, 所述多肽能够与 1、2 和 4 类人 IgG 结合。

20. 前述权利要求中任一项的 IgG Fc- 结合多肽, 所述多肽能够结合到 IgG Fc 的 CH2 和 CH3 结构域之间的界面。

21. 前述权利要求中任一项的 IgG Fc- 结合多肽, 其中所述氨基酸序列 i) 选自 SEQ ID NO:5-6。

22. 权利要求 1-20 中任一项的 IgG Fc- 结合多肽, 其中 X_1 为 P 且 X_{CTERM} 为 D。

23. 权利要求 22 的 IgG Fc- 结合多肽, 其中所述氨基酸序列 i) 选自 SEQ ID NO:1-4。

24. 一种多核苷酸, 所述多核苷酸包含编码权利要求 1-23 中任一项的多肽的核苷酸序列。

25. 一种多聚体多肽, 所述多聚体多肽包含:

至少两个亚单位, 各亚单位为权利要求 22-23 中任一项的多肽; 和

N- 末端前导肽, 所述前导肽包含作为其末端残基的 D 残基。

26. 一种多核苷酸, 所述多核苷酸包含编码权利要求 25 的多聚体多肽的核苷酸序列。

27. 生产权利要求 25 的多聚体多肽的方法, 所述方法包括:

提供含有表达载体的宿主细胞, 所述表达载体包含权利要求 26 的多核苷酸,

在使得能够将所述多核苷酸表达为多聚体多肽的条件下培养所述宿主细胞, 和分离所得的多聚体多肽。

28. 生产权利要求 22-23 中任一项的多肽的方法, 所述方法包括:

使用权利要求 27 的方法生产权利要求 25 的多聚体多肽,

使用酸催化的水解在包含序列 DP 的位点切割所述多聚体多肽, 得到权利要求 22-23 中任一项的多肽和 N- 末端前导肽, 和

分离权利要求 22-23 中任一项的所述多肽。

29. 一种 IgG Fc- 结合组合物, 所述组合物包含至少一种权利要求 1-23 中任一项的多肽, 其通过半胱氨酸残基 $C_{CTERM-1}$ 与非肽、非核酸的接头聚合物共价偶联。

30. 权利要求 29 的 IgG Fc- 结合组合物, 所述组合物包含 1 至 4 种权利要求 1-23 中任一项的多肽, 各多肽通过其半胱氨酸残基 $C_{CTERM-1}$ 与所述接头聚合物共价偶联。

31. 权利要求 29-30 中任一项的 IgG Fc- 结合组合物, 其中所述接头聚合物为聚(乙二醇)。

32. 生产权利要求 29-31 中任一项的组合物方法, 所述方法包括:

提供至少一种权利要求 1-23 中任一项的多肽, 和

通过所述多肽中存在的半胱氨酸残基 $C_{CTERM-1}$ 将所述多肽与非肽、非核酸的接头聚合物偶联。

33. 权利要求 32 的方法, 其中所述多肽为权利要求 22-23 中任一项的多肽, 且所述提供通过实施权利要求 28 的方法进行。

34. 权利要求 32-33 中任一项的方法, 其中所述接头聚合物为聚乙二醇。

35. 从样品中分离包含 IgG Fc 的分子的方法, 所述方法包括以下步骤:

- (i) 提供液体,其含有包含 IgG Fc 的分子;
 - (ii) 使所述液体与权利要求 1-23 和 29-31 中任一项的 IgG Fc 结合多肽或组合物接触,其中所述包含 IgG Fc 的分子与所述多肽或组合物结合;
 - (iii) 从液体中分离结合的包含 IgG Fc 的分子。
36. 权利要求 35 的方法,其中所述液体源自表达包含 IgG Fc 的分子的细胞。
37. 权利要求 35-36 中任一项的方法,其中所述包含 IgG Fc 的分子为 IgG 分子或其片段。
38. 权利要求 37 的方法,其中所述 IgG 为人 IgG。
39. 权利要求 37-38 中任一项的方法,其中所述 IgG 为单克隆 IgG 抗体。
40. 权利要求 35-36 中任一项的方法,其中所述包含 IgG Fc 的分子为 Fc 融合蛋白。
41. 权利要求 35-40 中任一项的方法,其中将所述 IgG Fc- 结合多肽或组合物固定化在色谱介质上。
42. 权利要求 1-23 和 29-31 中任一项的 IgG Fc- 结合多肽或组合物,所述多肽或组合物与不溶性基质共价偶联。
43. 权利要求 42 的多肽或组合物,其中所述基质为色谱基质或膜。
44. 一种色谱介质,所述色谱介质包含权利要求 42 或 43 的 IgG Fc- 结合多肽或组合物。

免疫球蛋白 G Fc 区结合多肽

发明领域

[0001] 本发明涉及结合免疫球蛋白 G Fc (IgG Fc) 的多肽及其生产方法。所述多肽在例如抗体和 / 或 Fc 融合蛋白生产中的分离和 / 或纯化中, 例如在色谱法中具有工业应用。

[0002] 背景

在单克隆抗体和 Fc 融合蛋白的工业生产中, 经常使用色谱法进行纯化。由于蛋白 A 对 IgG 的 Fc 部分的天然亲和力, 来自金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*) 的蛋白 A 早已在所述应用中被用作亲和配体。其后, 蛋白 A 以其整体, 及其五个单独的 Fc- 结合结构域被用于合理设计具有改进性能的经工程改造亲和配体的起始点。

[0003] 例如, 蛋白 A 的 B 结构域被用于产生经工程改造的、IgG Fc- 结合的、单个结构域蛋白 Z 的起始点 (Nilsson B 等, *Protein Eng* 1(2):107-13, 1987)。为了改进该蛋白在碱性条件下, 例如在工业色谱过程期间用于原位清洗程序的条件下的稳定性, Linholt 等 (*Proteins* 55(2):407-16, 2004) 提出包含突变的天冬酰胺残基的蛋白 Z 变体。GE Healthcare、Uppsala、Sweden 将该突变体进一步开发为市售产品 MAbSelect™ SuRe。W02009/146755 公开了另外的具有 IgG Fc 亲和力的 Z 变体。

[0004] W02009/080811 描述了基于蛋白 Z 的突变的结合蛋白, 其中天然的 IgG Fc 结合被修饰。

[0005] 已表明具有五个单独的 IgG Fc- 结合结构域的天然蛋白 A 只结合 2 分子的 IgG 或 3 分子的重组 Fc 片段, 但事实上五个结构域中的每一个都具有结合一个 IgG 的能力 (Birger Jansson, PhD 论文, Stockholm, Sweden, 1996, ISBN 91-7170-656-9)。

[0006] 尽管目前使用的 IgG Fc 亲和配体比较成功, 但仍需要改进, 特别是关于改进化学计量 (stoichiometry) 并同时保持且理想地改进对于酸性和碱性条件的稳定性的联合需求。不断提供具有对于 IgG Fc 的亲和力的试剂仍是一个极为关注的问题。

[0007] 发明概述

根据其第一方面, 本发明提供免疫球蛋白 G Fc (IgG Fc) 结合多肽, 所述多肽包含选自以下的氨基酸序列:



其中, 彼此独立地,

X_1 为 P 或无;

[间隔基 1] 为由 1-3 个氨基酸残基组成的氨基酸序列;

X_{17} 为任何氨基酸残基;

X_{20} 为任何氨基酸残基;

X_{36} 为除 D 外的任何氨基酸残基;

X_{51} 为任何氨基酸残基;

[间隔基 2] 为由 0-20 个氨基酸残基组成的氨基酸序列;

X_{CTERM} 为 D 或无; 以及

n 为 1-4 ;

和

ii) 与 i) 中限定的序列具有至少 95% 同一性的氨基酸序列。

[0008] 在本发明该方面的一个实施方案中,免疫球蛋白 G Fc (IgG Fc) 结合多肽由选自如上限定的 i) 和 ii) 的氨基酸序列组成。

[0009] 本发明人已构想了本发明多肽的氨基酸序列,以便提供优化的 IgG Fc- 结合分子,其以来自葡萄球菌 (*Staphylococcus*) 的蛋白 A 的多个结构域和衍生自蛋白 A 的 B 结构域的蛋白 Z 作为起始点。与天然蛋白 A 或其先前已知的经工程改造变体的模块结构域结构类似,本发明的多肽提供一个或多个具有 IgG Fc- 结合能力的独特结构域。特别地,预测两间隔基序列之间的氨基酸序列折叠成具有 IgG Fc- 结合能力的单个三螺旋束结构域。如上所述,数字 n 可在 1 至 4 之间,表明本发明的多肽可具有 1 至 4 个被间隔基序列分开的独特 IgG Fc- 结合结构域,构成所述结构域的单体、二聚体、三聚体或四聚体。

[0010] 在蛋白 Z 中,对应于上述氨基酸序列 i) 中 17 位的氨基酸位置被组氨酸残基占据。在本发明多肽中, X₁₇ 可为 H,但也可被任何其它氨基酸残基取代。该位置的取代可由对避免化学反应性氨基酸的通常需求引起。

[0011] 在蛋白 Z 中,对应于上述氨基酸序列 i) 中 36 位的氨基酸位置被天冬氨酸残基占据。然而,在氨基酸序列 i) 中,该位置被例如谷氨酸残基或丙氨酸残基取代。不希望被理论束缚,目前认为该差异用于以下两个不同目的:a) 增加所述多肽的酸稳定性,和 b) 去除三螺旋束结构域内的 DP 二肽,否则其将对酸催化的切割敏感。本发明的一个方面(下文进一步详细描述)利用在分子的另一部分中的 DP 二肽基序的敏感性,并且在 36-37 位存在 DP 二肽可降低本发明该方面的实用性。

[0012] 在蛋白 Z 中,对应于上述氨基酸序列 i) 中 49 位的氨基酸位置被赖氨酸残基占据。然而,在氨基酸序列 i) 中,该位置被谷氨酰胺残基占据。

[0013] 如技术人员将认识到的,任何多肽的功能,例如本发明多肽的 IgG Fc- 结合能力,依赖于该多肽的三级结构。改变 α -螺旋多肽的氨基酸序列而不影响其功能是可能的(Taverna 和 Goldstein, J Mol Biol 315(3):479-84, 2002 ;He 等, Proc Natl Acad Sci USA 105(38):14412-17, 2008)。因此,本发明包括 i) 的经修饰变体,这样使得所得序列与属于 i) 限定的类别中的序列具有至少 95% 同一性。例如,有可能属于氨基酸残基的某一功能分组(例如疏水的、亲水的、极性的等)的氨基酸残基可替换为来自同一功能分组的另一氨基酸残基。

[0014] 当本文提及不同多肽的氨基酸序列之间的同一性程度时,给出了与本文公开的序列具有 95% 同一性的下限。在一些实施方案中,本发明多肽可含有与本文所述的序列具有至少 96%、至少 97%、至少 98% 或至少 99% 同一性的序列。术语“% 同一性”,如遍及说明书和所附权利要求书所使用的,可例如按以下计算。使用 CLUSTAL W 算法将查询序列与靶序列进行比对(Thompson, J.D., Higgins, D.G. 和 Gibson, T.J., Nucleic Acids Research, 22: 4673-4680 (1994))。在比对 序列中最短的序列所对应的窗口内进行比较。在一些情况下比对序列中最短的可为靶序列,例如 29 个氨基酸残基的 HER3 结合基序。在其它情况下,查询序列可为比对序列中最短的序列。查询序列可例如由至少 10 个氨基酸残基组成,例如由至少 20 个氨基酸残基组成。比较各个位置的氨基酸残基,并且在查询序列中,与靶

序列具有相同对应性的位置所占的百分比被报告为 % 同一性。

[0015] 在本发明多肽的一个实施方案中, [间隔基 1] 选自 A、AE 和 AEA。[间隔基 1] 可例如为 A。

[0016] 在本发明多肽的一个实施方案中, X_{17} 为 H。

[0017] 在本发明多肽的一个实施方案中, X_{20} 为除 N 之外的任何氨基酸残基。 X_{20} 可例如为 T。

[0018] 在一个备选的实施方案中, X_{20} 为 N。

[0019] 在本发明多肽的一个实施方案中, X_{36} 选自 E 和 A。 X_{36} 可例如为 E。

[0020] 在本发明多肽的一个实施方案中, X_{51} 为除 N 之外的任何氨基酸残基。 X_{51} 可例如为 D。

[0021] 在一个备选的实施方案, X_{51} 为 N。

[0022] 在本发明多肽的一个实施方案中, [间隔基 2] 的所有氨基酸残基均独立地选自 A、E、F、G、I、K、L、P、Q、R、S、T 和 V, 特别地选自 A、E、G、K、P、Q、R、S 和 T, 例如选自 G、Q 和 S。在甚至更具体的实施方案中, [间隔基 2] 为 G。

[0023] 如上所论述的, n 为 1 至 4 之间的数值, 即, 其可为 1、2、3 或 4。

[0024] 在其中 $n > 1$ 的本发明多肽中, 多次出现的 [间隔基 1] 可各自单独由相同的氨基酸序列或不同的氨基酸序列组成。同样地, 在其中 $n > 1$ 的本发明多肽中, 多次出现的 [间隔基 2] 可各自单独由相同的氨基酸序列或不同的氨基酸序列组成。

[0025] 本发明任何方面的 IgG Fc- 结合多肽可与 IgG Fc 结合, 使得该相互作用的 K_D 值为至多 1×10^{-6} M, 例如, 至多 1×10^{-7} M, 例如至多 5×10^{-8} M。

[0026] 所述多肽的有利之处在于其与 IgG Fc 很好地结合。特别地, 所述多肽可能与人 IgG 分子的 Fc 部分结合。在本发明的一些实施方案中, 所述多肽能与人 IgG 的 1、2 和 4 类结合, 但不能与 3 类结合。在一些实施方案中, 所述多肽能结合到 IgG Fc 的 CH2 和 CH3 结构域之间的界面。

[0027] 在本发明的 IgG Fc- 结合多肽的一个实施方案中, X_1 为 P。

[0028] 在本发明的 IgG Fc- 结合多肽的一个实施方案中, X_{CTERM} 为 D。

[0029] 在本发明的 IgG Fc- 结合多肽的一个具体实施方案中, X_1 为 P 且 X_{CTERM} 为 D。

[0030] 在本发明多肽的一个实施方案中, 氨基酸序列 i) 选自附图 1 的 SEQ ID NO:1-6。其可例如为 SEQ ID NO:1。很明显, 序列 SEQ ID NO:1-2 中 $n=1$, 而序列 SEQ ID NO:3-6 中 $n=2$ 。从序列本身来看同样明显的是, SEQ ID NO:1-4 为其中 X_1 为 P 且 X_{CTERM} 为 D 的实施方案的实例, 而 SEQ ID NO:5-6 为另一实施方案的实例。

[0031] 在相关方面, 本发明提供一种多核苷酸, 其包含编码本发明第一方面的任何多肽的核苷酸序列。

[0032] 如上文所说明的, 在本发明第一方面的多肽的一个实施方案中, 其氨基酸序列中 X_1 为 P 且 X_{CTERM} 为 D。N- 和 C- 末端氨基酸残基的这种设计为通过重组 DNA 技术生产 IgG Fc 结合多肽提供了便利的方法, 所述方法通过以下来进行: 首先产生以本发明多肽的数个拷贝作为亚单位的多聚体, 各亚单位经由二肽 DP 彼此分开。氨基酸序列 DP 对酸催化的水解敏感, 因此亚单位之间的二肽位点可用作将多聚体中的亚单位彼此分离的切割位点。作为非限制性实例, 所述多聚体可包含 2-6 个亚单位, 例如 4 个亚单位或 6 个亚单位。在此方面指

出的是,构成多聚体的亚单位本身可包含 1 至 4 个独特的 IgG Fc- 结合结构域,如上文关于序列 i) 中数值 n 所公开的。被 DP 序列分开的亚单位和单个的 IgG Fc- 结合结构域可组成多聚体中相同的结构元件(即,若 $n=1$),但也可组成构建体中不同的结构元件(若 $n=2-4$)。

[0033] 因此,在本发明的第二方面,提供一种多聚体多肽,其包含

至少两个亚单位,各亚单位为第一方面的多肽,其中 X_1 为 P 且 X_{CTERM} 为 D;和

N- 末端前导肽,所述 N- 末端前导肽包含作为其末端残基的 D 残基。

[0034] 因此,为提供适合切割的 DP 二肽,所述 N- 末端前导肽须包含作为其末端残基的 D 残基。在多聚体多肽中,该 D 残基与第一亚单位的 P_1 残基一起形成 DP 二肽。N- 末端前导肽的剩余部分的确切序列对本发明来说不是关键的,只要 D 残基前的任何氨基酸残基不干扰 DP 二肽的切割。前导肽的起始将依赖于用于生产的表达系统。例如,可使用胞内表达以从可溶性蛋白产生 MD 前导肽,随后 M 在体内从其上除去。若驱使该表达形成包涵体,则可使用 MXGD 前导肽,其中 X 可为任何氨基酸或 G 或被除去。

[0035] 本发明还提供一种多核苷酸,所述多核苷酸包含编码如上文刚描述的多聚体多肽的核苷酸序列。

[0036] 在又一个相关方面,本发明提供生产如上文所述的多聚体多肽的方法,所述方法包括:

提供含有表达载体的宿主细胞,所述表达载体包含含有编码如上文所述的多聚体的核苷酸序列的多核苷酸;

在使得能够将所述多核苷酸表达为多聚体多肽的条件下培养所述宿主细胞;和

分离所得的多聚体多肽。

[0037] 一旦所得多聚体多肽被分离,其可用作生产本发明第一方面的 IgG Fc- 结合多肽的起始材料,这是因为这些多肽作为多聚体的亚单位存在。因此,本发明还提供生产第一方面的多肽的方法,所述方法包括:

使用上文刚描述的方法生产多聚体多肽;

使用酸催化的水解在包含序列 DP 的位点切割所述多聚体多肽,产生本发明第一方面的 IgG Fc- 结合多肽和 N- 末端前导肽;和

分离所述 IgG Fc- 结合多肽。

[0038] 无论其是否包含 DP 序列,并且无论其是否根据前面部分所述的便利方法制备,本发明第一方面的任何多肽在次末端位置 $C_{CTERM-1}$ (若 X_{CTERM} 不存在,其实际上为末位) 包含半胱氨酸残基。将该半胱氨酸残基掺入到本发明多肽的氨基酸序列中使多肽能够与其它化合物产生极其多种多样的化学偶联。使用该半胱氨酸残基将多肽直接或间接与基质偶联,使得能够产生可用于包含 IgG Fc 的分子的工业规模分离的分离介质,例如在用于生产单克隆抗体的方法中。分离介质或色谱介质中的亲和配体为本发明第一方面的 IgG Fc- 结合多肽。所述基质可由有机或无机材料制成。在一个实施方案中,基质由天然聚合物制备,例如交联的碳水化合物材料,例如,琼脂糖、琼脂、纤维素、葡聚糖、壳聚糖、魔芋胶 (konjac)、角叉菜胶、胞外多糖 (gellan)、藻酸盐等。天然聚合物基质可根据标准方法容易地制备和任选交联,例如反相悬浮凝胶化 (S Hjertén (1964), Biochim Biophys Acta 79(2):393-398)。在一个备选的实施方案中,所述基质由合成的聚合物或共聚物制备,所述合成的聚合物或共聚物例如交联的合成聚合物,例如苯乙烯或苯乙烯衍生物、二乙烯基苯、丙烯酰胺、丙

烯酸酯、甲基丙烯酸酯、乙烯基酯、乙烯基酰胺等。所述合成聚合物基质可根据标准方法容易地制备和任选交联。作为与基质直接偶联的非限制性实例，IgG Fc 结合多肽可通过 C_{CTERM-1} 与马来酰亚胺琼脂糖、碘代乙酰基琼脂糖凝胶或琼脂糖而连接，例如来自 Pierce 的 SulfoLink®。作为间接偶联的非限制性实例，IgG Fc 结合多肽可通过 C_{CTERM-1} 与接头聚合物连接，形成中间体的、IgG Fc- 结合组合物。随后该中间体组合物继而可通过 IgG Fc- 结合多肽或接头聚合物中的反应性基团与基质偶联。

[0039] 优选的接头聚合物对酸和碱催化的水解以及对蛋白水解性降解都保持稳定。其为亲水的且非核酸和非肽来源的。从调控的角度来看，优选的聚合物为先前已在体内使用过的聚合物，但本发明不局限于此。特别优选的接头聚合物为聚（乙二醇）（PEG）。偶联的 IgG Fc- 结合多肽之间的接头聚合物的长度应足以允许包含 IgG Fc 的分子与各 Fc- 结合结构域之间 1:1 化学计量的相互作用。

[0040] 在本发明的 IgG Fc- 结合组合物中，通过使用化学稳定的接头聚合物连接折叠的结构域确保其对酸或碱催化的水解的稳定性。

[0041] 因此，在其另一个方面，本发明提供 IgG Fc- 结合组合物，所述 IgG Fc- 结合组合物包含至少一种第一方面的 IgG Fc- 结合多肽，其通过半胱氨酸残基 C_{CTERM-1} 与非肽、非核酸的接头聚合物共价偶联。

[0042] 在一个相关方面，本发明提供生产所述 IgG Fc- 结合组合物的方法。所述方法包括：

提供至少一种第一方面的 IgG Fc- 结合多肽，和

通过所述多肽中存在的半胱氨酸残基 C_{CTERM-1} 将所述多肽偶联到非肽、非核酸的接头聚合物。

[0043] 偶联到各聚合物接头分子的 IgG Fc- 结合多肽的数目可通过设计确定，例如通过使用适合缀合不同数目的 IgG Fc- 结合多肽的聚合物分子的预定混合物。例如，具有 1-4 个 IgG Fc- 结合多肽缀合位点的聚合物可用于制备均质 IgG Fc- 结合组合物，或具有 1-4 个缀合位点的聚合物的混合物可用于制备相应的 Fc- 结合组合物。

[0044] 在 IgG Fc- 结合多肽包含 P₁ 和 D_{CTERM} 氨基酸残基的情况下，该生产方法第一步中的供应可根据上文所述的生产所述多肽（作为多聚体的亚单位）的方法进行，所述亚单位被可由酸催化的水解切割的 DP 序列分开。换言之，在本发明的这一实施方案中，可通过以下制备在色谱介质中用作亲和配体的组合物：i) 表达包含单独的 IgG Fc- 结合多肽作为亚单位的多聚体（不论单聚体、二聚体、三聚体还是四聚体），ii) 通过酸催化的水解将该多聚体切割为其组成亚单位，iii) 通过 C_{CTERM-1} 残基将得到的亚单位（即本发明的 IgG Fc- 结合多肽）偶联到接头聚合物。

[0045] 在本发明组合物和上文所述的其生产方法的一些实施方案中，所述接头聚合物为聚（乙二醇）。

[0046] 本发明组合物可适于通过接头聚合物连接到基质或色谱介质。用于将所述组合物连接到基质的基团的化学性质优选不同于用于将 IgG Fc- 结合多肽缀合到接头聚合物的基团的化学性质。由于本发明的 IgG Fc- 结合多肽在酸性和碱性两种条件下的稳定性，反应基团的激活可通过酸或碱进行。基质和最邻近的 IgG Fc- 结合多肽之间的聚合物的长度应不干扰该结构域的 IgG 结合性质。在可用的偶联化学和使其适于本发明之间的选择在技术

人员的能力之内。

[0047] 如本说明书中使用的,术语“IgG Fc-结合”和“对 IgG Fc 的结合亲和力”是指多肽的性质,其可例如通过使用表面等离子共振技术例如在 Biacore 仪器 (GE Healthcare) 中检测。例如,如在下文的实施例中所述的,IgG Fc-结合亲和力可在以下实验中检测,其中将 IgG Fc 或 IgG Fc 的片段固定化在仪器的传感芯片上,使包含待测多肽的样品通过该芯片。或者,将待测多肽固定化在仪器的传感芯片上,并且使包含 IgG Fc 或其片段的样品通过该芯片。技术人员可随后对获自该实验的结果进行解释,以至少建立所述多肽对 IgG Fc 的结合亲和力的定性量度。如需定量量度,例如为了测定该相互作用的 K_D 值,也可使用表面等离子共振方法。结合值可例如在 Biacore 2000 仪器 (GE Healthcare) 中确定。将 IgG Fc 固定化在测量仪器的传感芯片上,通过连续稀释制备其亲和力待测定的多肽样品,并按随机顺序注入。 K_D 值可随后使用例如仪器制造商提供的 BIAevaluation 4.1 软件的 1:1 Langmuir 结合模型,根据结果来计算。

[0048] 当引入氨基酸取代时,其应不影响多肽的基本结构。例如,多肽的 $C\alpha$ 骨架的整体折叠可与蛋白 A 的结构域的 $C\alpha$ 骨架的整体折叠基本相同,即,具有相同顺序的相同的二级结构元件。因此,具有这种基本结构的多肽将具有与野生型蛋白 A 结构域相似的 CD 波谱。技术人员知道其它可能相关的参数。对保守基本结构的需求限制了:氨基酸序列的哪些位置可被取代。例如,优选位于多肽表面的氨基酸残基被取代,而埋入多肽“三螺旋束”核心的氨基酸残基应保持恒定以维持该分子的结构性质。本发明的多肽的片段适用相同的推理。

[0049] 因此,本发明还涵盖这样的多肽和组合物:其中存在上文所述的 IgG Fc-结合多肽作为 IgG Fc-结合结构域,且在任一末端添加了额外的氨基酸残基。这些额外的氨基酸残基可在多肽导致的 IgG Fc 的结合中发挥作用,但同样可用于其它目的,例如关于多肽的体内和/或体外生产、纯化、稳定化、偶联或检测中的一个或多个。所述额外的氨基酸残基可包括一个或多个用于化学偶联目的而添加的氨基酸残基。所述额外的氨基酸残基可提供用于纯化或检测多肽的“标签”,例如用于与对该标签具有特异性的抗体相互作用的 His₆ 标签或“myc”(c-myc) 标签或“FLAG”标签。

[0050] 本发明还涵盖 IgG Fc-结合多肽,其中如上文所述的 IgG Fc-结合多肽作为 IgG Fc-结合结构域存在,且附加的肽或蛋白或其它官能团借助化学缀合(使用已知的有机化学方法)偶联到其 N-或 C-末端或任何其它残基(特异性地或非特异性地)。

[0051] 本发明多肽可用于任何依赖试剂对 IgG Fc 的亲力的方法。因此,所述多肽可在该方法中用作检测试剂、捕获试剂或分离试剂。特别地,如上文已经说明的,所述多肽呈现若干特性,从而使其可在色谱法中用作亲和试剂,其中目的为从异质混合物中分离、纯化和/或生产抗体或 Fc 融合蛋白。所述多肽可与基质结合并例如在工业生产中用于纯化包含 IgG Fc 的治疗性化合物。由于例如高靶亲和力、在酸性和碱性环境中均具有高稳定性以及 IgG Fc 片段相对 IgG Fab 片段的选择性等性质,认为本发明的 IgG Fc 结合多肽提供了一种很有吸引力的亲和试剂。

[0052] 因此,本发明的另一方面为从液体中分离包含 IgG Fc 的分子的方法,所述方法包括以下步骤:

- (i) 提供液体,其含有包含 IgG Fc 的分子;
- (ii) 使所述液体与如本文中所述的 IgG Fc-结合多肽或组合物接触,其中所述包含

IgG Fc 的分子与所述多肽或组合物结合；

(iii) 从液体中分离结合的包含 IgG Fc 的分子。

[0053] 在本发明的分离方法中,所述液体可源自原核或真核例如哺乳动物或植物的培养物,表达包含 IgG Fc 的分子的细胞、或来自在备选表达系统例如囊泡系统 (vesicular system) 中的所述分子表达。或者,所述液体可源自在宿主例如植物或哺乳动物宿主中的转基因表达。

[0054] 在本发明的上下文中,术语“样品”和“液体”可互换使用。两术语均不暗示任何限制,例如关于有关液体的体积或其它特性。所述液体可具有小的体积,例如较大体积的等分试样,例如以供分析目的;或备选地,在大规模纯化过程中使用的进料或液体。

[0055] 在一些实施方案中,所述包含 IgG Fc 的分子为 IgG 分子或其片段。例如,其可为人 IgG 分子或其片段。在一些实施方案中,所述包含 IgG Fc 的分子为单克隆 IgG 抗体。特别地,所述单克隆 IgG 抗体可为人单克隆 IgG 抗体,例如其为来自 1、2 和 / 或 4 类的人单克隆 IgG 抗体。

[0056] 在其它实施方案中,所述包含 IgG Fc 的分子为 Fc 融合蛋白。所述融合蛋白中的 Fc 结构域因此可在该融合蛋白的分离中有利地用作“亲和柄 (affinity handle)”。已产生各种各样的 Fc 融合蛋白。例如,具有治疗应用的 Fc 融合蛋白,包括依那西普 (etanercept) (其为可溶的 TNF- α 受体和 Fc 的融合物) 和 VEGF Trap (其为 VEGF 受体结构域和 Fc 的融合物) (Holash 等, Proc Natl Acad Sci USA (2002) 99(17):11393-11398)。虽然此二者为极受关注的说明性实例,但对其的列举为非限制性的,且将 Fc 结构域与任何所需蛋白融合以修饰其性质,并使其容易使用本文所述的本发明 IgG Fc- 结合多肽或组合物作为亲和配体来亲和纯化,这在原则上是可能的。

[0057] 本发明的又另一方面涉及生产包含 IgG Fc 的分子的方法,所述方法包括以下步骤:

(i) 表达所需包含 IgG Fc 的分子;

(ii) 从所述表达中获得液体,其含有包含 IgG Fc 的分子;

(iii) 使所述液体与如本文所述的 IgG Fc- 结合多肽或组合物接触,其中包含 IgG Fc 的分子与所述多肽或组合物结合;

(iv) 从液体中分离结合的包含 IgG Fc 的分子,和

(v) 通过从 IgG Fc- 结合多肽或组合物中将其洗脱使结合的包含 IgG Fc 的分子回收。

[0058] 步骤 (i) 的表达可使用任何已知的表达系统实施,例如在原核或真核例如哺乳动物或植物的细胞中或在囊泡系统中的重组表达。所述液体也可源自宿主例如植物或哺乳动物宿主中的转基因表达。

[0059] 在一些实施方案中,所述包含 IgG Fc 的分子为 IgG 分子或其片段。例如,其可为人 IgG 分子或其片段。在一些实施方案中,所述包含 IgG Fc 的分子为单克隆 IgG 抗体。特别地,所述单克隆 IgG 抗体可为人单克隆 IgG 抗体。例如,其为来自 1、2 和 / 或 4 类的人单克隆 IgG 抗体。

[0060] 在其它实施方案中,所述包含 IgG Fc 的分子为 Fc 融合蛋白。

[0061] 在本发明的分离和生产方法的一些实施方案中,将 IgG Fc- 结合多肽或组合物固定化于基质上。在一个实施方案中,本发明多肽或组合物已被偶联至呈不溶性载体形式的

基质。所述载体可为一种或多种颗粒,例如珠,例如色谱树脂;或不规则形状;膜;滤器;毛细管;整体柱(monolith);以及任何其它在蛋白质分离和/或纯化中常用的形式。因此,一般而言,体外利用本发明多肽和/或组合物的方法可以以不同的形式实施,例如在滤器或膜、微滴定板上,在蛋白质阵列中,在生物传感器表面,在珠上,在流式细胞仪中,在组织切片上等。在一个具体方面,本发明提供色谱介质,如本文所述的 IgG Fc 结合多肽或组合物固定化于其上。所述介质可基于作为基质的任何已知色谱材料,且可使用若干已知方法中的任何一种实施所述多肽或组合物与基质的偶联。

[0062] 在本发明多肽的序列中,氨基酸残基的编号和术语“位置”的任何使用是相对的。在与特别公开的多肽(即上文所述的多肽)具有一样多的氨基酸残基的本发明多肽中,多肽的氨基酸位置与公开的多肽的氨基酸位置精确对应。在例如与公开的多肽相比存在 N 末端延伸的情况下,延伸肽中的氨基酸残基与非延伸肽中对应的氨基酸残基具有相同的位置编号。例如,如果在延伸的多肽上有六个氨基酸残基延伸,那么从 N 末端数起,修饰的多肽的氨基端编号 7 对应于公开多肽中位置编号 1 的氨基酸。

[0063] 本发明通过下列非限制性实例进一步说明。

[0064] 附图简述

图 1 为展示本文所述的多肽的氨基酸序列信息的表。SEQ ID NO:1-6 为本发明多肽的非限制性实例,而 SEQ ID NO:7-9 的公开用作说明和/或比较目的。

[0065] 图 2 为 His₆-Z05494 样品用 5 M 磷酸处理后进行 HPLC/MSD 分析所得的色谱图。指示为 I 的峰对应切割的 (7052 Da)、未切割的 (9179 Da) 和修饰的 (7268 Da) His₆-Z05494 分子。

[0066] 图 3 为 His₆-Z05494 样品用 2 M 盐酸在 50°C 处理 1 h 后进行 HPLC/MSD 分析所得的色谱图。指示为 I 的峰对应切割的 (7052 Da)、未切割的 (9179 Da) 和修饰的 (7268 Da) His₆-Z05494 分子。指示为 II 的峰对应六组氨酸标签 (2145 Da)。

[0067] 图 4 为 His₆-Z05494 样品用 6 M 磷酸在 50°C 处理 1 h 后进行 HPLC/MSD 分析所得的色谱图。指示为 I 的峰对应切割的 (7052 Da) 和未切割的 (9179 Da) His₆-Z05494 分子。

[0068] 实施例 1:DP 二肽序列的切割

从 Z02891 (图 1 中的 SEQ ID NO:7) 开始,通过将 Z02891 的 37 位天冬氨酸替换为谷氨酸来构建 HER2 结合 Affibody® 分子 Z05494 (图 1 中的 SEQ ID NO:8)。随后在本文所述的用作说明目的的实验中使用 Z05494。将突变的基因插入表达载体中,所述表达载体包含 T7 启动子且编码六组氨酸 (His₆) 尾巴及其之后的使得能够酸切割的 DP 二肽序列。表达的蛋白质具有氨基酸序列 SEQ ID NO:9 (图 1) 并表示为 His₆-Z05494,其收获为去除起始甲硫氨酸的可溶产物。

[0069] 表达后,通过加热裂解细胞,并通过 IMAC 及随后的反相色谱法纯化可溶的 His₆-Z05494 产物。将该蛋白以 1 mg 和 5 mg 每份等分至小瓶中并冻干。

[0070] 对于下列七种酸的每一种,制备 12 M、10 M、8M、6 M、4 M、2 M 和 0.2 M 的稀释系列:磷酸 (H₃PO₄)、乙酸 (CH₃COOH)、甲酸 (HCOOH)、硫酸 (H₂SO₄)、盐酸 (HCl)、硝酸 (HNO₃) 和三氟乙酸 (CF₃CO₂H)。用去离子水将冻干的 His₆-Z05494 稀释到终浓度 4 mg/ml。每种酸准备七个 eppendorf 管,均包含 25 μl His₆-Z05494。向 eppendorf 管中加入 25 μl 酸,并在 37°C 保持孵育 17 小时 30 分钟(过夜)。

[0071] 通过加入不同浓度的 NaOH 和 125 μ l 2 M 的 Tris-HCl (pH 8) 将 pH 增加到 7.5-8.5 来终止酸催化的切割。所有的样品均用 SDS-PAGE 进行分析并装载到 HPLC/MSD 设备。

[0072] HPLC/MSD 分析显示弱酸乙酸和甲酸在浓度为 5-6 M 时切割很少量的蛋白,在较低浓度时无任何切割。5 M 的磷酸是弱酸整体结果的例外,其切割了大量的 His₆-Z05494 分子。图 2 为样品用 5 M 磷酸处理后进行 HPLC/MSD 分析所得的图,观察到主要的组分为切割的分子。然而,样品中也检测到了少量的未切割分子和修饰的切割分子。

[0073] 硝酸对于切割实验过于强有力,对蛋白进行了无规则切割。三氟乙酸不在切割位点切割蛋白,导致结果难以解释。硫酸和盐酸显示相似的结果。在较低浓度时,即约 1-3 M 的酸,多数蛋白被切割。HPLC/MSD 分析的结果证实 His₆-Z05494 分子被切割,但结果远远不够完美,表明该切割实验不是最佳的。在几乎每种情况下,均能检测到显著量的切割分子,其具有 +216 Da 的额外质量。

[0074] 磷酸和盐酸的结果是最有利的,用这两种酸进行了进一步的实验。制备以下稀释系列:对于 HCl 浓度为 7 M、6 M 和 4 M,对于 H₃PO₄ 浓度为 12 M、10 M 和 8 M。使用不同的缓冲液 (2 M NaH₂PO₄, pH 7.4) 以测定 Tris 缓冲液是否可导致 His₆-Z05494 分子的修饰。在 100°C、80°C 和 50°C 下实施切割,并且在 1 h、2 h、4 h、6 h 和 8 h 后通过加入适当浓度的 NaOH 和 125 μ l 2 M 的 NaH₂PO₄ (pH 7.4) 增加 pH 来终止。在 SDS-PAGE 凝胶上分析样品,并将其装载到 HPLC/MSD 设备。

[0075] 质谱分析证实 100°C 和 80°C 的温度对于化学切割显然太高,导致用该两种酸均产生完全片段化的蛋白。在 50°C 进行的切割产生较好的结果,但证实当使用高浓度的 NaH₂PO₄ 作为缓冲液时,磷酸盐的沉淀使质谱的结果受到影响。样品中高浓度的磷酸盐导致切割的 His₆-Z05494 分子的高度修饰,该分子具有 +79 Da 的额外质量。还检测到质量为 7269 Da 的切割的 His₆-Z05494 分子,即具有 +216 Da 的额外质量。在浓度为 2 M 和 3 M 下,使用盐酸切割 1-3 h 得到最好切割效果。对于磷酸,使用 5-6 M 酸切割 1-4 h 得到最好切割效果。图 3 和 4 分别显示使用盐酸和磷酸的最好效果的图。

[0076] 总之,上文所述的实验显示当二肽序列存在于三螺旋束蛋白结构域 (例如本发明多肽中存在的三螺旋束 IgG Fc- 结合结构域) 之前的间隔基中时,该 DP 二肽可使用酸催化的水解被成功地切割。

[0077] 实施例 2:制备本发明的 IgG Fc- 结合组合物的设计考虑

进行试验性实验以评估本发明的 IgG Fc- 结合组合物中的聚合物接头的最佳长度,目的在于将两个单克隆抗体 (mAb) 与两个 IgG Fc- 结合多肽 (其中 n=1,即两个单独结构域) 结合,所述 IgG Fc- 结合多肽通过其各自的 C_{CTERM-1} 残基“尾对尾”偶联到聚 (乙二醇) (PEG) 接头上。最佳的接头为长度足以使得能够结合两个 mAb 而没有立体干扰,但不足以允许两个 IgG Fc- 结合结构域结合到同一个 mAb。可自 Quanta Biodesign Ltd 购买同基双功能 (homobifunctional) 的、硫醇反应性 PEG (双-马来酰亚胺-dPEG)。产品目录包括具有 3 或 11 个乙二醇单元的变体,但可根据要求使用其它备选。已发现当通过 PEG 连接两个 IgG Fc- 结合结构域时,合适长度的接头不优选结合同一抗体,而结合两个不同的抗体。因此,启动了抗体和 PEG 缀合的 IgG Fc- 结合结构域的网络。

[0078] 优化实验优选从对两个可市售获得的接头长度的评估开始,然后继续评估中间长

度的接头或长度大于 11 个乙二醇单元的接头。两个 IgG Fc- 结合多肽的尾对尾取向通过环绕同一“轴”旋转分离而使该结构域分开,因此与使用相同长度间隔基而具有“头对尾”取向的情况相比,其提供较大的结合面之间的距离。“头对尾”取向通常作为被肽间隔基分开的多聚融合蛋白,由若干 IgG Fc 结合结构域的连续重组表达导致。

[0079] 使用人 IgG1 抗体 (或人 IgG1 抗体的混合物) 实施旨在评估获得结合多肽和 mAb 的网络的实验。将 IgG Fc- 结合组合物与 mAb 在合适条件下孵育后,使用尺寸排阻色谱法 (SEC) 分析形成的任何复合物,并通过高分子量质谱分析确认结果。在 SEC 实验中,通过与尺寸参考标准物比较来确定所形成复合物的大小。从主要产生大于 1:1 的网络和复合物 (是指一个 PEG 连接的 IgG- 结合结构域二聚体和一个 IgG 分子的复合物) 的接头长度开始,研究用连续减小的接头长度形成的 1:1 复合物的量。最佳长度 PEG 包含一个或两个乙二醇单元,这比显示明显增加的 1:1 复合物存在量的长度中的乙二醇单元少。优选地,使用具有少两个单元的 PEG 分子,如果这与具有少一个乙二醇单元分子相比不引起 1:1 复合物含量的增加。低于某一长度,接头将太短,而不能形成网络。

[0080] 随后实施第二个优化实验以评估允许得到三聚体 (即三个单体 IgG Fc- 结合多肽结构域等距偶联在同一 PEG 链上) 以结合三个不同 mAb 的最佳长度。然后对于四聚体也一样,研究四个 mAb 的结合。

[0081] 如上文通用部分所述的,本发明组合物适合与基质或色谱介质连接。为了找出将组合物连接到基质的聚合物接头的最佳长度,起始点是研究这样的接头,其至少与 IgG Fc 结合结构域之间的接头一样长。此外,用于连接到基质的基团的化学性质优选与用于缀合 IgG Fc 结合结构域与接头聚合物的马来酰亚胺的化学性质不同。反应基团的激活可通过碱或酸进行,这是因为多肽结构域在这两种条件下的稳定性。作为可能适合的化学的非限制性实例,Quanta Biodesign Ltd 制备了具有叔丁酯和甲苯磺酸酯衍生物 (tosylate-derivative) 的 PEG (其可被激活并用于专有化学 (proprietary chemistry)) 和可在点击化学反应中使用的叠氨基-PEG。额外的备选方案为本领域众所周知。

[0001]

<110> AFFIBODY AB

L. 阿布拉姆森

<120> 多肽

<130> 21051179

<150> EP10155835

<151> 2010-03-08

<160> 9

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 58

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 经工程改造的

<400> 1

Pro Ala Lys Phe Asp Lys Glu Gln Gln Asn Ala Phe Tyr Glu Ile Leu

1 5 10 15

His Leu Pro Asn Leu Thr Glu Glu Gln Arg Asn Ala Phe Ile Gln Lys

20 25 30

Leu Lys Asp Glu Pro Ser Gln Ser Ala Glu Leu Leu Ala Glu Ala Lys

35 40 45

[0002]

Gln Leu Asn Glu Ala Gln Ala Gly Cys Asp
50 55

<210> 2

<211> 58

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 经工程改造的

<400> 2

Pro Ala Lys Phe Asp Lys Glu Gln Gln Asn Ala Phe Tyr Glu Ile Leu
1 5 10 15

His Leu Pro Thr Leu Thr Glu Glu Gln Arg Asn Ala Phe Ile Gln Lys
20 25 30

Leu Lys Asp Glu Pro Ser Gln Ser Ala Glu Leu Leu Ala Glu Ala Lys
35 40 45

Gln Leu Asp Glu Ala Gln Ala Gly Cys Asp
50 55

<210> 3

<211> 116

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

[0003]

<223> 经工程改造的

<400> 3

Pro Ala Lys Phe Asp Lys Glu Gln Gln Asn Ala Phe Tyr Glu Ile Leu
1 5 10 15

His Leu Pro Asn Leu Thr Glu Glu Gln Arg Asn Ala Phe Ile Gln Lys
20 25 30

Leu Lys Asp Glu Pro Ser Gln Ser Ala Glu Leu Leu Ala Glu Ala Lys
35 40 45

Gln Leu Asn Glu Ala Gln Ala Pro Lys Ala Glu Ala Lys Phe Asp Lys
50 55 60

Glu Gln Gln Asn Ala Phe Tyr Glu Ile Leu His Leu Pro Asn Leu Thr
65 70 75 80

Glu Glu Gln Arg Asn Ala Phe Ile Gln Lys Leu Lys Asp Glu Pro Ser
85 90 95

Gln Ser Ala Glu Leu Leu Ala Glu Ala Lys Gln Leu Asn Glu Ala Gln
100 105 110

Ala Gly Cys Asp
115

<210> 4

[0004]

<211> 116

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 经工程改造的

<400> 4

Pro Ala Lys Phe Asp Lys Glu Gln Gln Asn Ala Phe Tyr Glu Ile Leu

1 5 10 15

His Leu Pro Thr Leu Thr Glu Glu Gln Arg Asn Ala Phe Ile Gln Lys

20 25 30

Leu Lys Asp Glu Pro Ser Gln Ser Ala Glu Leu Leu Ala Glu Ala Lys

35 40 45

Gln Leu Asp Glu Ala Gln Ala Pro Lys Ala Glu Ala Lys Phe Asp Lys

50 55 60

Glu Gln Gln Asn Ala Phe Tyr Glu Ile Leu His Leu Pro Thr Leu Thr

65 70 75 80

Glu Glu Gln Arg Asn Ala Phe Ile Gln Lys Leu Lys Asp Glu Pro Ser

85 90 95

Gln Ser Ala Glu Leu Leu Ala Glu Ala Lys Gln Leu Asp Glu Ala Gln

100 105 110

[0005]

Ala Gly Cys Asp

115

<210> 5

<211> 116

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 经工程改造的

<400> 5

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

1 5 10 15

Leu His Leu Pro Asn Leu Thr Glu Glu Gln Arg Asn Ala Phe Ile Gln

20 25 30

Lys Leu Lys Asp Glu Pro Ser Gln Ser Ala Glu Leu Leu Ala Glu Ala

35 40 45

Lys Gln Leu Asn Glu Ala Gln Ala Pro Lys Ala Glu Ala Lys Phe Asp

50 55 60

Lys Glu Gln Gln Asn Ala Phe Tyr Glu Ile Leu His Leu Pro Asn Leu

65 70 75 80

Thr Glu Glu Gln Arg Asn Ala Phe Ile Gln Lys Leu Lys Asp Glu Pro

85 90 95

[0006]

Ser Gln Ser Ala Glu Leu Leu Ala Glu Ala Lys Gln Leu Asn Glu Ala
100 105 110

Gln Ala Gly Cys
115

<210> 6

<211> 116

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 经工程改造的

<400> 6

Ala Glu Ala Lys Phe Asp Lys Glu Gln Gln Asn Ala Phe Tyr Glu Ile
1 5 10 15

Leu His Leu Pro Thr Leu Thr Glu Glu Gln Arg Asn Ala Phe Ile Gln
20 25 30

Lys Leu Lys Asp Glu Pro Ser Gln Ser Ala Glu Leu Leu Ala Glu Ala
35 40 45

Lys Gln Leu Asp Glu Ala Gln Ala Pro Lys Ala Glu Ala Lys Phe Asp
50 55 60

Lys Glu Gln Gln Asn Ala Phe Tyr Glu Ile Leu His Leu Pro Thr Leu
65 70 75 80

[0007]

Thr Glu Glu Gln Arg Asn Ala Phe Ile Gln Lys Leu Lys Asp Glu Pro
85 90 95

Ser Gln Ser Ala Glu Leu Leu Ala Glu Ala Lys Gln Leu Asp Glu Ala
100 105 110

Gln Ala Gly Cys
115

<210> 7

<211> 58

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 经工程改造的

<400> 7

Val Asp Ala Lys Tyr Ala Lys Glu Met Arg Asn Ala Tyr Trp Glu Ile
1 5 10 15

Ala Leu Leu Pro Asn Leu Thr Asn Gln Gln Lys Arg Ala Phe Ile Arg
20 25 30

Lys Leu Tyr Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ser Glu Leu Leu Ser Glu Ala
35 40 45

Lys Lys Leu Asn Asp Ser Gln Ala Pro Lys

[0008]

50 55

<210> 8

<211> 58

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 经工程改造的

<400> 8

Val Asp Ala Lys Tyr Ala Lys Glu Met Arg Asn Ala Tyr Trp Glu Ile

1 5 10 15

Ala Leu Leu Pro Asn Leu Thr Asn Gln Gln Lys Arg Ala Phe Ile Arg

20 25 30

Lys Leu Tyr Asp Glu Pro Ser Gln Ser Ser Glu Leu Leu Ser Glu Ala

35 40 45

Lys Lys Leu Asn Asp Ser Gln Ala Pro Lys

50 55

<210> 9

<211> 81

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 经工程改造的

[0009]

<400> 9

Gly Ser Ser His His His His His His Leu Gln Ser Ser Gly Val Asp
1 5 10 15

Leu Gly Thr Asp Pro Val Asp Ala Lys Tyr Ala Lys Glu Met Arg Asn
20 25 30

Ala Tyr Trp Glu Ile Ala Leu Leu Pro Asn Leu Thr Asn Gln Gln Lys
35 40 45

Arg Ala Phe Ile Arg Lys Leu Tyr Asp Glu Pro Ser Gln Ser Ser Glu
50 55 60

Leu Leu Ser Glu Ala Lys Lys Leu Asn Asp Ser Gln Ala Pro Lys Val
65 70 75 80

Asp

SEQ ID NO:	氨基酸序列
1	PAKFDKEQQ NAFYEILHLP NLTEEQRNAF IQCLKDEPSQ SAELLAEAKQ LNEAQAGCD
2	PAKFDKEQQ NAFYEILHLP TLTEEQRNAF IQCLKDEPSQ SAELLAEAKQ LDEAQAGCD
3	PAKFDKEQQ NAFYEILHLP NLTEEQRNAF IQCLKDEPSQ SAELLAEAKQ LNEAQAPK AEAKFDKEQQ NAFYEILHLP NLTEEQRNAF IQCLKDEPSQ SAELLAEAKQ LNEAQAGCD
4	PAKFDKEQQ NAFYEILHLP TLTEEQRNAF IQCLKDEPSQ SAELLAEAKQ LDEAQAPK AEAKFDKEQQ NAFYEILHLP TLTEEQRNAF IQCLKDEPSQ SAELLAEAKQ LDEAQAGCD
5	AEAKFDKEQQ NAFYEILHLP NLTEEQRNAF IQCLKDEPSQ SAELLAEAKQ LNEAQAPK AEAKFDKEQQ NAFYEILHLP NLTEEQRNAF IQCLKDEPSQ SAELLAEAKQ LNEAQAGC
6	AEAKFDKEQQ NAFYEILHLP TLTEEQRNAF IQCLKDEPSQ SAELLAEAKQ LDEAQAPK AEAKFDKEQQ NAFYEILHLP TLTEEQRNAF IQCLKDEPSQ SAELLAEAKQ LDEAQAGC
7	VDAKYAKEMR NAYWEIALLP NLTNQOKRAF IRKLYDDPSQ SSELLSEAKK LNSQAPK
8	VDAKYAKEMR NAYWEIALLP NLTNQOKRAF IRKLYDEPSQ SSELLSEAKK LNSQAPK
9	GSSHHHHHL QSSGVDLGTD P VDAKYAKEMR NAYWEIALLP NLTNQOKRAF IRKLYDEPSQ SSELLSEAKK LNSQAPKVD

图 1

24

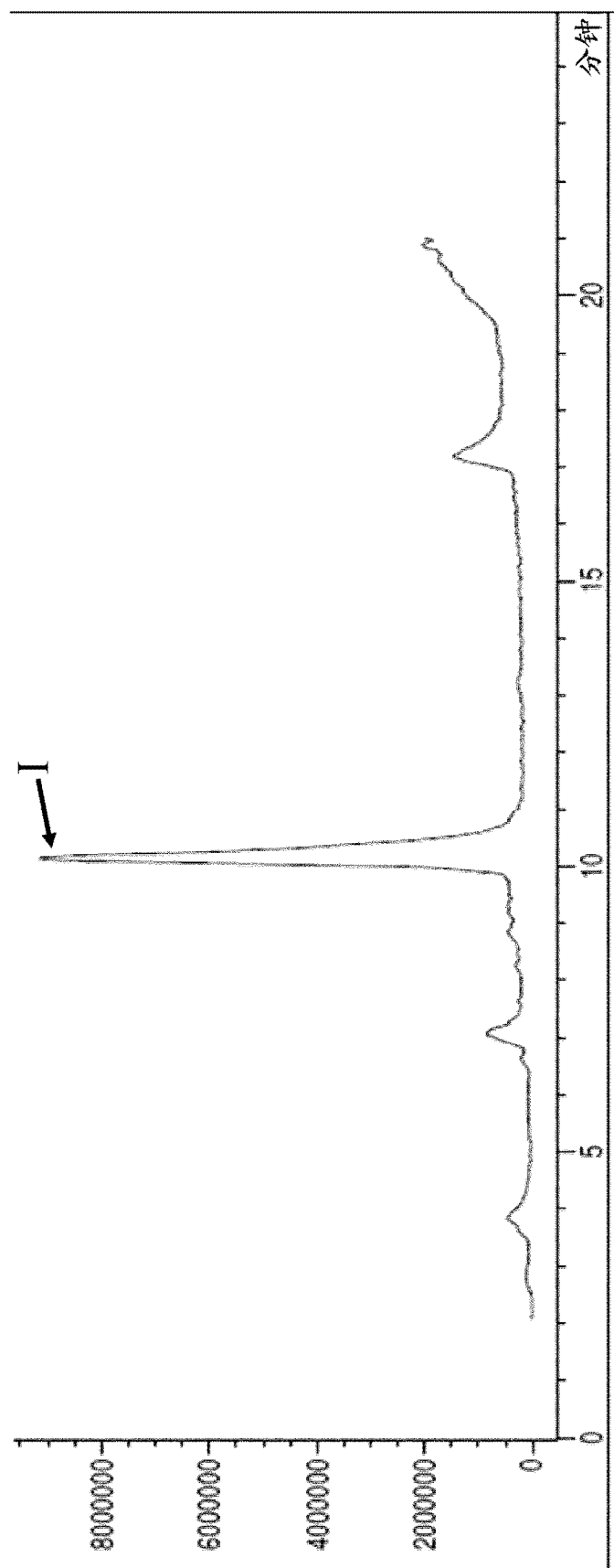


图 2

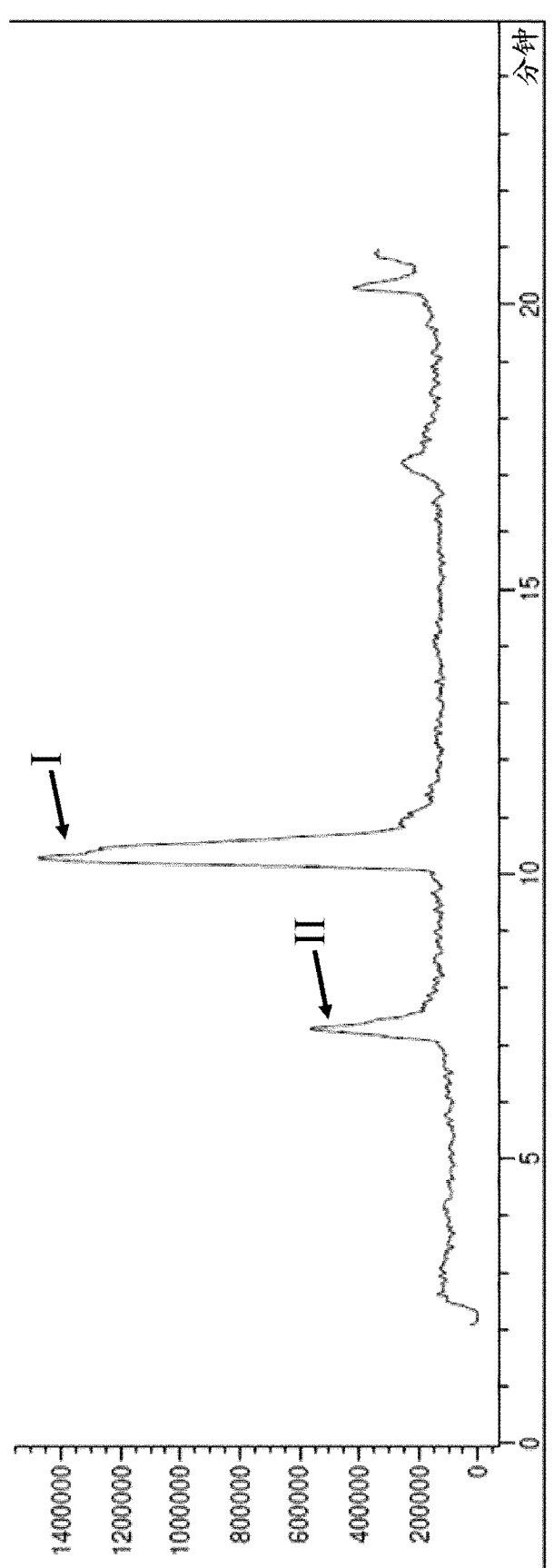


图 3

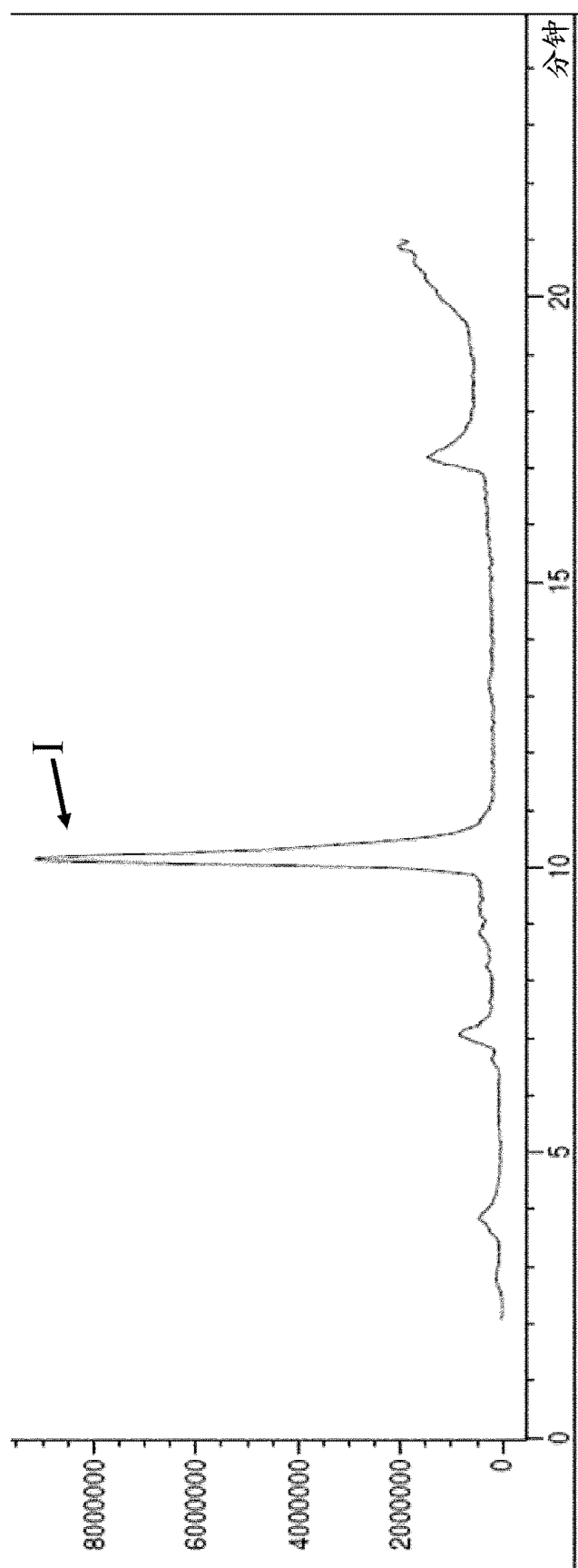


图 4