



(12) 发明专利



(10) 授权公告号 CN 109963864 B

(45) 授权公告日 2024. 01. 02

(21) 申请号 201780050413.2

(22) 申请日 2017.08.07

(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 109963864 A

(43) 申请公布日 2019.07.02

(30) 优先权数据
16183710.9 2016.08.11 EP
16205707.9 2016.12.21 EP

(85) PCT国际申请进入国家阶段日
2019.02.18

(86) PCT国际申请的申请数据
PCT/EP2017/069979 2017.08.07

(87) PCT国际申请的公布数据
W02018/029158 EN 2018.02.15

(73) 专利权人 瑞普利金公司
地址 美国马萨诸塞

(72) 发明人 P·柯尼克 E·菲德勒
U·豪普茨 M·梅兴

(74) 专利代理机构 北京品源专利代理有限公司
11332

专利代理师 刘明海

(51) Int.Cl.
C07K 14/31 (2006.01)
C07K 1/22 (2006.01)

(56) 对比文件
EP 2557157 A1, 2013.02.13
CN 101522278 A, 2009.09.02
WO 2016079034 A1, 2016.05.26
CN 105377880 A, 2016.03.02
US 2014107315 A1, 2014.04.17
孟照辉等.Fc段受体结合蛋白(SPA-SPG)基
因克隆表达及其在IgG纯化中的应用.《生物化学
与生物物理进展》.2004,第31卷(第2期),146-
148.

审查员 杨啸天

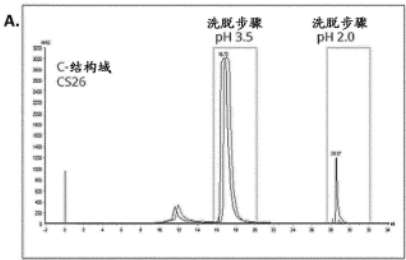
权利要求书1页 说明书13页
序列表12页 附图3页

(54) 发明名称

用于亲和色谱的碱性稳定性Fc结合蛋白

(57) 摘要

本发明涉及包含一个或多个Fc结合结构域的Fc结合蛋白,其中至少一个结构域包含选自SEQ ID NO:1-6或21的氨基酸序列。本发明还涉及包含本发明的Fc结合蛋白的亲基质。本发明还涉及这些Fc结合蛋白或亲基质用于免疫球蛋白的亲纯化的用途和使用本发明的Fc结合蛋白进行亲和纯化的方法。



B.

配基	树脂	在 0.1M 柠檬 酸盐 pH3.5 中洗脱 [%]	在 0.1M 柠檬 酸盐 pH2.0 中洗脱 [%]
cs24	Purolite 45	98,5	1,5
cs24a	Purolite 45	99,5	0,5
cs24b	Purolite 45	99,7	0,2
C-结构域	Purolite 45	89,7	10,3
cs26	Purolite 45	98,4	1,6
cs26a	Purolite 45	99,2	0,8
cs26b	Purolite 45	99,6	0,4
cs26	Purolite 85	99,1	0,9
cs26a	Purolite 85	99,6	0,4
cs24	Purolite 85	99	1
C-结构域	Purolite 85	90,4	9,6

1. 一种Fc结合结构域,其由SEQ ID NO:1的氨基酸序列组成。
2. 一种Fc结合蛋白,其由2、3、4、5或6个彼此连接的权利要求1的Fc结合结构域组成。
3. 权利要求2的Fc结合蛋白,其中所述结构域直接彼此连接或通过一个或多个接头彼此连接。
4. 权利要求3的Fc结合蛋白,其中所述接头是肽接头。
5. 权利要求1的Fc结合结构域或权利要求2-4中任一项的Fc结合蛋白,其中所述Fc结合结构域或所述Fc结合蛋白在22℃在0.5M NaOH中孵育至少5小时后具有小于15%的结合能力降低。
6. 权利要求1的Fc结合结构域或权利要求2-4中任一项的Fc结合蛋白,其中将所述Fc结合结构域或所述Fc结合蛋白与固体支持物缀合。
7. 权利要求1的Fc结合结构域或权利要求2-4中任一项的Fc结合蛋白,其中所述Fc结合结构域或所述Fc结合蛋白还包含用于所述Fc结合结构域或所述Fc结合蛋白与固体支持物的位点特异性共价偶联的衔接位点。
8. 一种亲和分离基质,其包含权利要求1的Fc结合结构域或权利要求2-7中任一项的Fc结合蛋白。
9. 权利要求1的Fc结合结构域或权利要求2-7中任一项的Fc结合蛋白或权利要求8的亲和分离基质用于包含Fc序列的任何蛋白的亲和纯化的用途。
10. 权利要求9的用途,其中在pH 3.5或更高的pH下,所述包含Fc序列的蛋白质的洗脱大于或等于95%。
11. 一种用于亲和纯化包含Fc序列的蛋白质的方法,所述方法包括:
 - (a) 提供含有包含Fc序列的蛋白质的溶液;
 - (b) 提供亲和分离基质,其包含至少一种与其偶联的权利要求1的Fc结合结构域或权利要求2-7中任一项的Fc结合蛋白;
 - (c) 在允许所述至少一种权利要求1的Fc结合结构域或权利要求2-7中任一项的Fc结合蛋白与包含Fc序列的蛋白质特异性结合的条件下,使所述亲和分离基质与所述溶液接触;以及
 - (d) 从所述亲和纯化基质中洗脱包含Fc序列的所述蛋白质。
12. 权利要求11的方法,其还包括在步骤(c)或(d)之间洗涤所述亲和基质。
13. 权利要求11或12的方法,其中所述包含Fc序列的蛋白质包含免疫球蛋白分子。
14. 权利要求11或12的方法,其中在pH 3.5或更高的pH下,所述包含Fc序列的蛋白质的洗脱大于或等于95%。
15. 一种用于亲和纯化包含Fc序列的蛋白质的方法,所述方法包括:
 - (a) 使包含与其偶联的至少一种权利要求1的Fc结合结构域或权利要求2-7中任一项的Fc结合蛋白的亲和分离基质与含有包含Fc序列的蛋白质的溶液在允许所述至少一种Fc结合结构域或Fc结合蛋白与所述包含Fc序列的蛋白质结合的条件下接触;和
 - (b) 从所述亲和纯化基质中洗脱所述包含Fc序列的结合蛋白。

用于亲和色谱的碱性稳定性Fc结合蛋白

发明领域

[0001] 本发明涉及包含一个或多个Fc结合结构域的Fc结合蛋白,其中至少一个结构域包含选自SEQ ID NO:1-6或21的氨基酸序列。本发明还涉及包含本发明的Fc结合蛋白的亲基质。本发明还涉及这些Fc结合蛋白或亲基质用于免疫球蛋白的亲亲和纯化的用途以及使用本发明的Fc结合蛋白进行亲和纯化的方法。

[0002] 发明背景

[0003] 许多生物技术和药物应用需要从含有抗体的样品中去除污染物。用于捕获和纯化抗体的既定方法是使用来自金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)的细菌细胞表面蛋白A作为免疫球蛋白的选择性配体的亲和色谱法(参见,例如,Huse等,J.Biochem.Biophys.Methods 51,2002:217-231)。野生型蛋白A以高亲和力和选择性结合IgG分子的Fc区,并且在高温和宽范围的pH值下稳定。有具有改善的性质诸如碱性稳定性的蛋白A的变体可供用于纯化抗体,并且包含蛋白质A配体的各种色谱基质可商购获得。然而,特别是基于野生型蛋白A的色谱基质显示在暴露于碱性条件后对免疫球蛋白的结合能力丧失。

[0004] 本发明的潜在技术问题

[0005] 抗体或含Fc的融合蛋白的大多数大规模生产方法使用蛋白A进行亲和纯化。然而,由于蛋白A应用在亲和色谱中的限制,本领域需要提供具有改进特性的新型Fc结合蛋白,其特异性结合免疫球蛋白以促进免疫球蛋白的亲亲和纯化。为了最大限度地利用包含Fc结合蛋白的色谱基质的价值,希望多次使用亲和配体基质。在色谱循环之间,需要彻底的清洁程序来消毒和去除基质上的残余污染物。在该程序中,通常的做法是将具有高浓度NaOH的碱性溶液应用于亲和配体基质。野生型蛋白A结构域不能长时间承受这种苛刻的碱性条件,并且很快丧失对免疫球蛋白的结合能力。因此,本领域一直需要获得能够结合免疫球蛋白的新型碱性稳定性蛋白质。

[0006] 本发明提供了碱性稳定性的免疫球蛋白结合蛋白,其特别适用于免疫球蛋白的亲亲和纯化,但克服了现有技术的缺点。特别地,本发明的碱性稳定性Fc结合蛋白的一个显著优点是它们与例如野生型蛋白A或亲本蛋白相比在高pH下的稳定性提高。

[0007] 以上概述不一定描述本发明所解决的所有问题。

[0008] 发明概述

[0009] 本发明的第一方面是提供适用于亲和纯化的Fc结合蛋白。这通过包含一个或多个Fc结合结构域的碱性稳定性免疫球蛋白(Ig)结合蛋白实现,其中至少一个Fc结合结构域包含SEQ ID NO:1-6或21的氨基酸序列,基本上由所述序列组成或由所述序列组成。在一个实施方案中,Fc结合蛋白包含彼此连接的如上定义的2个、3个、4个、5个或6个Fc结合结构域。在一些实施方案中,连接结构域的接头是肽接头。在优选实施方案中,Fc结合蛋白与固体支持物缀合。

[0010] 在一些实施方案中,所述蛋白质是同多聚体(homo-multimer),而在一些实施方案中,所述蛋白质是异多聚体(hetero-multimer)。

[0011] 在一些实施方案中,所述蛋白质的至少一个结构域是SEQ ID NO 1-6或21中任一个的衍生物,其中所述衍生物具有这样的氨基酸序列,所述氨基酸序列除了相对于其所基于的SEQ ID NO:1-6或21之一在其N-末端的前4个氨基酸内(位置1、2、3和/或4)具有1、2、3或4个氨基酸的缺失和/或在C-末端(位置57和/或58)具有1或2个氨基酸的缺失外,与SEQ ID NO:1-6或21之一100%相同。

[0012] 在一些实施方案中,在0.5M NaOH中孵育至少5小时后,所述蛋白质的结合能力降低小于15%。例如,在0.5M NaOH中孵育6小时后,蛋白质的结合能力可能降低不到10%或不到5%。

[0013] 在第二方面,本发明涉及包含第一方面的Fc结合蛋白的亲亲和分离基质。

[0014] 在第三方面,本发明涉及第一方面的Fc结合蛋白或第二方面的亲和分离基质用于亲和纯化免疫球蛋白或包含免疫球蛋白的Fc序列的蛋白质的用途。

[0015] 在第四方面,本发明涉及亲和纯化免疫球蛋白或包含免疫球蛋白的Fc序列的蛋白质的方法,其包括以下步骤:(a)提供含有免疫球蛋白的液体;(b)提供亲和分离基质,其包含与所述亲和分离基质偶联的第一方面的固定的Fc结合蛋白;(c)使所述液体与所述亲和分离基质接触,其中所述免疫球蛋白与所述固定的Fc结合蛋白结合;以及(d)从所述基质中洗脱所述免疫球蛋白,从而获得含有所述免疫球蛋白的洗脱液。在一些实施方案中,可以在所公开方法的步骤(c)与(d)之间引入洗涤步骤。在公开的用途和方法的一些实施方案中,在3.5或更高的pH下,所述包含Fc序列的蛋白质的洗脱大于或等于95%。例如,在为3.5或更高的pH下,所述包含Fc序列的蛋白质的洗脱大于或等于98%。

[0016] 另一方面,本发明涉及包含Fc序列的蛋白质的亲和纯化方法,该方法包括:(a)在允许所述至少一种Fc结合蛋白与所述包含Fc序列的蛋白质结合的条件下,使包含与其偶联的至少一种第一方面的Fc结合蛋白的亲亲和分离基质与包含含有Fc序列的蛋白质的溶液接触;以及(b)从所述亲和纯化基质中洗脱所述结合的包含Fc序列的蛋白质。

[0017] 本发明的概述不必描述本发明的所有特征。通过回顾随后的详细描述,其他实施例将变得显而易见。

[0018] 附图简述

[0019] 图1.在6h 0.5M NaOH处理后固定在Sephacrose 6B基质上的不同Fc结合结构域的碱性稳定性的分析。与亲本结构域IB24(SEQ ID NO:17)相比,Fc结合结构域cs24(SEQ ID NO:1)和cs26(SEQ ID NO:2)在高pH下显示出显著改善的稳定性。

[0020] 图2.在0.5M NaOH中孵育6小时后,固定在PierceTMPure 45基质pH 9.5上的Fc结合结构域的活性分析。Fc结合结构域cs24(SEQ ID NO:1)、cs24a(SEQ ID NO:3)、cs24b(SEQ ID NO:5)、cs26(SEQ ID NO:2)、cs26a(SEQ ID NO:4)和cs26b(SEQ ID NO:6)。

[0021] 图3.在0.5M NaOH中孵育6h和24h(图A)以及6h、24h和36h(图B)后,在pH 9.5下固定在PierceTMPure 85基质(图A)和PierceTMPure 45基质(图B)上的Fc结合结构域的活性分析。Fc结合结构域cs24(SEQ ID NO:1)、cs24a(SEQ ID NO:3)、cs24b(SEQ ID NO:5)、cs26(SEQ ID NO:2)、cs26a(SEQ ID NO:4)和cs26b(SEQ ID NO:6)与野生型结构域C相比较。

[0022] 图4.在pH 3.5和2.0下从Fc结合结构域cs24(SEQ ID NO:1)、cs24a(SEQ ID NO:3)、cs24b(SEQ ID NO:5)、cs26(SEQ ID NO:2)、cs26a(SEQ ID NO:4)和cs26b(SEQ ID NO:

6) 洗脱多克隆hlgG的分析。图A显示代表性洗脱测试。所有Fc结构域在3.5pH洗脱下的步骤产率大于98% (图B), 远远超过蛋白A结构域C的洗脱。

[0023] 发明详述

[0024] 定义

[0025] 在下面详细描述本发明之前, 应理解本发明不限于本文所述的特定方法、方案和试剂, 因为它们可以变化。还应理解, 本文使用的术语仅用于描述特定实施方案的目的, 并不意图限制本发明的范围, 本发明的范围仅受所附权利要求的限制。除非另外定义, 否则本文使用的所有技术和科学术语具有与本发明所属领域的普通技术人员通常理解的含义相同的含义。

[0026] 优选地, 本文使用的术语与“A multilingual glossary of biotechnological terms: (IUPAC Recommendations)”, Leuenberger, H.G.W, Nagel, B. 和 Kolbl, H. 编辑 (1995), Helvetica Chimica Acta, CH-4010 Basel, Switzerland) 中提供的定义一致。

[0027] 在整个说明书和随后的权利要求中, 除非上下文另有要求, 否则词语“包含 (comprise)”和变化形式诸如“包括 (comprises)”和“具有 (comprising)”将被理解为暗示包括所述成员、整数或步骤或者成员、整数或步骤的组, 但不排除任何其他成员、整数或步骤或者成员、整数或步骤的组。

[0028] 如在本发明的描述和所附权利要求中所用, 单数形式“一个/种 (a)”、“一个/种 (an)”和“该 (the)”可互换使用并且旨在也包括复数形式并且落入每个含义内, 除非上下文清楚地表明不同此外。此外, 如本文中所用, “和/或”是指并涵盖所列项目中的一或多项的任何和所有可能组合, 以及当在替代方案 (“或”) 中解释时缺乏组合。

[0029] 如本文中所用, 术语“约”涵盖明确引述的量以及与其 $\pm 10\%$ 的偏差。更优选地, 术语“约”包括偏差5%。

[0030] 在本说明书的全文中引用了若干文献 (例如: 专利、专利申请、科学出版物、制造商的说明书、说明书、GenBank登录号序列提交等)。不得将本文任何内容解释为本发明无权依靠在先发明而先于那些公开内容。本文引用的一些文献“通过引用并入”。如果此类并入的参考文献的定义或教导与本说明书中引用的定义或教导之间存在冲突, 则以本说明书的文本为准。

[0031] 本文提及的所有序列在所附序列表中公开, 其全部内容和公开内容是本说明书的一部分。

[0032] 在本发明的说明书中, 术语“免疫球蛋白结合蛋白”用于描述能够特异性结合免疫球蛋白的Fc区的蛋白质。由于与Fc区的这种特异性结合, 本发明的免疫球蛋白结合蛋白能够结合整个免疫球蛋白, 结合包含Fc区的免疫球蛋白片段, 结合包含免疫球蛋白Fc区的融合蛋白, 以及结合包含免疫球蛋白的Fc区的缀合物。虽然本发明的“免疫球蛋白结合蛋白”显示出与免疫球蛋白Fc区的特异性结合, 但并不排除“免疫球蛋白结合蛋白”可以另外地以减小的亲和力与其它区域诸如免疫球蛋白的Fab区域结合。

[0033] 在整个本说明书中, 术语“免疫球蛋白结合蛋白”通常缩写为“Fc结合蛋白 (Fc binding protein)”或“Fc结合性蛋白 (Fc-binding protein)”。

[0034] 在本发明的优选实施方案中, Fc结合蛋白包含一个或多个Fc结合结构域。

[0035] 术语“解离常数”或“ K_D ”定义特异性结合亲和力。如本文中所用, 术语“ K_D ” (通常以

“mol/L”测量,有时缩写为“M”)旨在指第一蛋白质与第二蛋白质之间的特定相互作用的解离平衡常数。在本发明的上下文中,术语 K_D 特别地用于描述免疫球蛋白结合蛋白与免疫球蛋白之间的结合亲和力。

[0036] 如果本发明的蛋白质与免疫球蛋白的解离常数 K_D 为至少1 μ M或更低,或优选100nM或更低,更优选50nM或更低,甚至更优选10nM或更低,则认为本发明的蛋白质与免疫球蛋白结合。例如,SEQ ID No:1-6和21中公开的所有Fc结合结构域以小于1 μ M或更小的 K_D 与IgG1结合。

[0037] 根据本发明的术语“结合”优选是指特异性结合。“特异性结合”意指,与其对另一种非免疫球蛋白靶标的结合相比,本发明的Fc结合蛋白与对其特异的免疫球蛋白(或免疫球蛋白的Fc序列)结合得更强。

[0038] 如本文所理解的免疫球蛋白可包括但不限于哺乳动物IgG,诸如人IgG1、人IgG2、人IgG4、小鼠IgG-1、小鼠IgG2A、小鼠IgG2IgG1、大鼠IgG2C、山羊IgG1、山羊IgG2、牛IgG2、豚鼠IgG、兔IgG;人IgM、人IgA;以及包含Fc区的免疫球蛋白片段、包含免疫球蛋白的Fc区的融合蛋白和包含免疫球蛋白Fc区的缀合物。值得注意的是,本发明的天然存在的蛋白A结构域和人工Fc结合蛋白不结合人IgG3。

[0039] 术语“蛋白质”和“多肽”是指通过肽键连接的两个或更多个氨基酸的任何线性分子链,并不是指产物的特定长度。因此,“肽”、“蛋白质”、“氨基酸链”或用于指代两个或更多个氨基酸的链的任何其他术语包括在“多肽”的定义内,并且术语“多肽”可以用于代替这些术语中的任何一个或与这些术语中的任何一个互换使用。术语“多肽”还旨在指多肽的翻译后修饰(包括但不限于糖基化、乙酰化、磷酸化、酰胺化、蛋白水解切割、通过非天然存在的氨基酸的修饰和本领域公知的类似修饰)的产物。因此,包含两个或更多个蛋白质结构域的Fc结合蛋白也落在术语“蛋白质”或“多肽”的定义下。

[0040] 术语“碱性稳定性的”或“碱性稳定性”或“苛性稳定性的”或“苛性稳定性”(本文中缩写为“cs”)是指本发明的Fc结合蛋白耐受碱性条件而没有显著丧失与免疫球蛋白结合的能力。本领域技术人员可以通过将Fc结合蛋白与氢氧化钠溶液一起孵育(例如,如实施例中所述),以及随后通过本领域技术人员已知的常规实验(例如,通过色谱方法)测试对免疫球蛋白的结合活性来容易地测试碱性稳定性。

[0041] 本发明的Fc结合蛋白以及包含本发明的Fc结合蛋白的基质表现出“增加的”或“改善的”碱性稳定性,这意味着掺入所述Fc结合蛋白的分子和基质在碱性条件下相对于亲本Fc结合蛋白稳定延长的时间段,即不会丧失与免疫球蛋白结合的能力或者丧失与免疫球蛋白结合的能力在程度上低于亲本Fc结合蛋白。

[0042] 术语“结合活性”是指本发明的Fc结合蛋白与免疫球蛋白结合的能力。例如,可以在碱处理之前和/或之后测定结合活性。可以测定Fc结合蛋白或偶联于基质的Fc结合蛋白(即固定的结合蛋白)的结合活性。术语“人工的”是指非天然存在的物体,即该术语是指由人生产或修饰的物体。例如,由人产生(例如,在实验室中通过基因工程,通过改组方法,或通过化学反应等)或有意修饰的多肽或多核苷酸序列是人工的。

[0043] 如本文中所用,术语“亲本Fc结合蛋白”或“亲本Fc结合结构域”中的术语“亲本”是指随后被修饰以产生所述亲本蛋白质或结构域的变体的Fc结合蛋白。此类亲本蛋白质或结构域可以是人工Fc结合结构域,如本文中公开为IB24(SEQ ID NO:17)或IB26(SEQ ID NO:

18)。

[0044] 如本文中所用,术语“缀合物”涉及包含与其它物质诸如与第二蛋白质或非蛋白质性质部分化学连接的至少第一蛋白质或基本上由其组成的分子。

[0045] 术语“取代”或“氨基酸取代”是指亲本多肽序列中特定位置处的氨基酸被另一种氨基酸交换。鉴于已知的遗传密码,以及重组和合成的DNA技术,技术人员可以容易地构建编码氨基酸变体的DNA。

[0046] 术语“氨基酸序列同一性”是指两个或更多个蛋白质的氨基酸序列的同一性(或差异)的定量比较。相对于参考多肽序列的“百分比(%)氨基酸序列同一性”定义为在对齐序列和如有必要引入缺口(以实现最大百分比序列同一性)后,序列中与参考多肽序列中的氨基酸残基相同的氨基酸残基的百分比。

[0047] 为了测定序列同一性,将查询蛋白质的序列与参考蛋白质的序列对齐。比对方法在本领域中是公知的。

[0048] 术语“融合”意指组分直接地或通过肽接头而由肽键连接。

[0049] 术语“融合蛋白”涉及包含与至少第二蛋白质遗传连接的至少第一蛋白质的蛋白质。融合蛋白通过连接两个或多个原来编码单独蛋白质的基因而产生。因此,融合蛋白可包含相同或不同的蛋白质的多聚体,其表达为单个线性多肽。

[0050] 如本文中所用,术语“接头”在其最广泛的含义中指的是共价连接至少两个其他分子的分子。在本发明的典型实施方案中,“接头”应理解为连接Fc结合结构域与至少一个另外的Fc结合结构域的部分,即将两个蛋白结构域彼此连接以产生多聚体的部分。在优选实施方案中,“接头”是肽接头,即连接两个蛋白质结构域的部分是一个氨基酸或包含两个或更多个氨基酸的肽。

[0051] 术语“色谱法”是指使用流动相和固定相将样品中的一种类型的分子(例如,免疫球蛋白)与其他分子(例如,污染物)分离的分离技术。液体流动相含有分子混合物,并将这些分子运输穿过或通过固定相(诸如固体基质)。由于流动相中不同分子与固定相的差异相互作用,可以分离流动相中的分子。

[0052] 术语“亲和色谱法”是指一种特定的色谱模式,其中与固定相偶联的配体与流动相(样品)中的分子(即免疫球蛋白)相互作用,即配体对于待纯化的分子具有特异性结合亲和力。如在本发明的上下文中所理解的,亲和色谱法涉及向含有色谱配体(诸如本发明的Fc结合蛋白)的固定相中添加含有免疫球蛋白的样品。

[0053] 术语“固体支持物”或“固体基质”可互换地用于指固定相。

[0054] 如本文中可互换使用的术语“亲和基质”或“亲和分离基质”或“亲和色谱基质”是指这样的基质,例如色谱基质,其上附接有亲和配体,例如本发明的Fc结合蛋白。配体(例如,Fc结合蛋白)能够与待从混合物中纯化出来或除去的目标分子(例如,免疫球蛋白或包含Fc的蛋白质)特异性结合。

[0055] 如本文中所用,术语“亲和纯化”是指通过将免疫球蛋白或包含Fc的蛋白质与固定于基质的Fc结合蛋白结合而从液体中纯化免疫球蛋白或包含Fc的蛋白质的方法。因此,除去混合物中除免疫球蛋白或包含Fc的蛋白质外的所有其他组分。在另外的步骤中,结合的免疫球蛋白或包含Fc的蛋白质可以以纯化形式洗脱。

[0056] 本发明的实施方案

[0057] 现在将进一步描述本发明。在以下段落中,更详细地定义了本发明的不同方面。除非明确地相反指出,否则以下定义的每个方面可以与任何其他方面组合。特别地,任何被指示为优选或有利的特征可以与被指示为优选或有利的任何其他特征组合。

[0058] 在第一方面,本发明涉及Fc结合蛋白,其包含一个或多个Fc结合结构域,其中至少一个Fc结合结构域包含SEQ ID NO:1-6或21的氨基酸序列,基本上由所述序列组成或由所述序列组成。所公开的Fc结合结构域和包含所述结构域的蛋白质的一个有利方面是即使在碱处理后它们也保持稳定,特别是与亲本蛋白质和其他已知的Fc结合蛋白质相比而言。例如,在一些实施方案中,所公开的Fc结合结构域和包含所述结构域的蛋白质在暴露于碱性条件后,可以比蛋白质A的结构域C稳定性更高至少约15%,至少约20%,至少约25%或至少约30%。换句话说,与蛋白A结构域C相比,所公开的Fc结合结构域在用0.5M NaOH孵育 ≥ 5 小时后结合能力降低更小。因此,在一些实施方案中,所公开的Fc蛋白在于0.5M NaOH中孵育至少5小时(例如,6小时)后结合能力的减小少于20%。在一些实施方案中,所公开的Fc蛋白在于0.5M NaOH中孵育至少5小时后结合能力的减小可小于约15%,小于约10%,或小于约5%。

[0059] 本发明的所有Fc结合蛋白与免疫球蛋白结合的解离常数 K_D 低于1 μ M,或优选低于100nM,或甚至更优选10nM或更低。用于测定Fc结合蛋白或结构域的结合亲和力,即用于测定解离常数 K_D 的方法是本领域普通技术人员已知的,并且可以例如选自本领域已知的以下方法:基于表面等离子体共振 (SPR) 的技术、生物层干涉测量 (BLI)、酶联免疫吸附测定 (ELISA)、流式细胞术、等温滴定量热法 (ITC)、分析超速离心、放射免疫测定 (RIA或IRMA) 和增强化学发光 (ECL)。一些方法在实施例中进一步描述。通常,在20 $^{\circ}$ C、25 $^{\circ}$ C或30 $^{\circ}$ C下测定解离常数 K_D 。如果没有另外明确指出,则通过表面等离子体共振在22 $^{\circ}$ C \pm 3 $^{\circ}$ C下测定本文所述的 K_D 值。在第一方面的一个实施方案中,Fc结合蛋白对人IgG1的解离常数 K_D 在0.1nM至100nM,优选0.1nM至10nM的范围内。

[0060] 如以下实施例中所示,令人惊讶和出乎意料地发现,甚至在长时间碱处理后,本发明的Fc结合蛋白仍然与IgG结合。在一些实施方案中,与相应的亲本蛋白质相比,本发明的Fc结合蛋白表现出改善的碱性稳定性。通过比较在0.5M NaOH中孵育6小时后Fc结合蛋白的IgG结合活性的损失(如与在0.5M NaOH中孵育6小时后相应的亲本蛋白的IgG结合活性的损失相比的)来确定Fc结合蛋白的碱性稳定性。通过比较0.5M NaOH孵育6小时之前和之后的结合活性来测定结合活性的丧失。

[0061] 如通过图1中的比较数据所示,与IB24相比,cs24和cs26的IgG结合活性增加至少约30%。与亲本IB24相比,这是cs24和cs26的一个意外和有利特性。图2显示在0.5M NaOH中孵育6小时后,SEQ ID NO:1-6的所有Fc结合蛋白具有至少87.6%的结合活性剩余活性。

[0062] 在本发明的一个实施方案中,Fc结合蛋白包含彼此连接的2、3、4、5或6个Fc结合结构域,即Fc结合蛋白可以是单体、二聚体、三聚体、四聚体、五聚体或六聚体。

[0063] 在一些实施方案中,所述结构域选自SEQ ID NO:1-6和21。在其他实施方案中,所述结构域是SEQ ID NO:1-6或21的衍生物,并且另外地其中除每个衍生物相对于其所基于的SEQ ID NO:1-6或21之一而言在其N末端的前4个氨基酸内具有1、2、3或4个氨基酸的缺失和/或在C末端(位置57和/或58)具有1或2个氨基酸的缺失(参见,例如,SEQ ID NO:7-16)外,每个衍生物具有与SEQ ID NO:1-6之一100%相同的衍生物。

[0064] 本发明的多聚体是通常通过技术人员公知的重组DNA技术人工产生的融合蛋白。本发明的Fc结合蛋白可以通过许多常规和公知的技术(诸如普通有机合成策略、固相辅助合成技术)中的任何一种或通过商购可得的自动合成仪制备。

[0065] 在第一方面的一些实施方案中,多聚体是同多聚体,例如Fc结合蛋白的所有Fc结合结构域的氨基酸序列均相同。

[0066] 在第一方面的一些实施方案中,多聚体是异多聚体,例如,至少一个Fc结合结构域具有与Fc结合蛋白内的其他Fc结合结构域不同的氨基酸序列。

[0067] 在第一方面的一些实施方案中,Fc结合结构域彼此直接连接。在其他实施方案中,所述一个或多个Fc结合结构域通过一个或多个接头彼此连接。这些典型实施方案中优选的是肽接头。这意味着肽接头是连接第一Fc结合结构域与第二Fc结合结构域的氨基酸序列。肽接头通过结构域的C末端与N末端之间的肽键连接至第一Fc结合结构域和第二Fc结合结构域,从而产生单个线性多肽链。接头的长度和组成可在至少一个和至多约30个氨基酸之间变化。更具体地,肽接头具有1至30个氨基酸,例如1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30个氨基酸的长度。优选肽接头的氨基酸序列针对苛性碱条件和蛋白酶是稳定的。接头不应使Fc结合蛋白中结构域的构象去稳定。公知的是包含小氨基酸诸如甘氨酸和丝氨酸的接头。接头可以是富含甘氨酸的(例如,接头中超过50%的残基可以是甘氨酸残基)。还优选的是包含另外的氨基酸的接头。本发明的其他实施方案包括由丙氨酸、脯氨酸和丝氨酸组成的接头。用于蛋白质融合的其他接头是本领域已知的并且可以使用。

[0068] 在本发明的一些实施方案中,将Fc结合蛋白与固体支持物缀合。在本发明的一些实施方案中,Fc结合蛋白还可以在N和/或C末端包含额外的氨基酸残基,诸如例如在N-末端的前导序列和/或在N或C末端处具有或不具有标记的偶联序列(coupling sequence)。在一些实施方案中,Fc结合蛋白还包含用于共价附接至固相(基质)的附接位点。优选地,附接位点特异性地提供Fc结合蛋白与固相的位点特异性附接。特异性的附接位点包含天然氨基酸,诸如半胱氨酸或赖氨酸,其使得能够与固相或固相和蛋白质之间的接头的反应基团(例如选自N-羟基琥珀酰亚胺、碘乙酰胺、马来酰亚胺、环氧树脂或烯炔基团)进行特定的化学反应。附接位点可以直接位于Fc结合蛋白的C末端或N末端,或者在N-或C-末端与偶联位点之间可以存在接头,优选肽接头。在本发明的一些实施方案中,Fc结合蛋白可包含3-20个氨基酸,优选4-10个氨基酸的具有末端半胱氨酸的短N-或C-末端肽序列。用于C末端附接位点的氨基酸可以优选地选自脯氨酸、丙氨酸和丝氨酸,例如ASPAPSAPSAC(SEQ ID NO:19),在C-末端具有单个半胱氨酸用于偶联。在另一个实施方案中,C-末端附接位点的氨基酸可以优选地选自甘氨酸和丝氨酸,例如GGGSC,在C-末端具有单个半胱氨酸用于偶联。

[0069] 具有C-末端半胱氨酸的一个有利方面是Fc结合蛋白的偶联可以通过半胱氨酸硫醇与支持物上的亲电子基团的反应(产生硫醚桥偶联)实现。这提供了偶联蛋白的优异移动性,其提供增加的结合能力。

[0070] 在第二方面,本发明涉及亲和分离基质,其包含第一方面的Fc结合蛋白。

[0071] 在第二方面的优选实施方案中,亲和分离基质是固体支持物。亲和分离基质包含至少一种Fc结合蛋白,其包含至少一个包含SEQ ID NO:1-6或21中任一个的Fc结合结构域。

[0072] 包含本发明的Fc结合蛋白的该基质可用于分离,例如用于色谱分离免疫球蛋白和

其他包含Fc的蛋白质,诸如包含Fc区的免疫球蛋白变体,包含免疫球蛋白的Fc区的融合蛋白和包含免疫球蛋白Fc区的缀合物。亲和基质可用于分离免疫球蛋白,并且甚至在清洁过程中施加的高碱性条件下也应保持Fc结合特性。这种基质的清洁对于基质的长期重复使用是必不可少的。

[0073] 用于亲和色谱的固体支持基质是本领域已知的,包括例如但不限于琼脂糖和稳定化的琼脂糖衍生物(例如,Sephacrose 6B、PraestoTMPure; **Captiva**[®]、**Mabselect**[®]、PROTEIN A Sepharose Fast Flow)、纤维素或纤维素衍生物、可控孔隙玻璃(例如,**ProSep**[®]vA树脂)、整料(例如,**CIM**[®]整料)、二氧化硅、氧化锆(例如,CM氧化锆或**CPG**[®])、氧化钛或合成聚合物(例如,聚苯乙烯诸如Poros 50A或Poros**MabCapture**[®]A树脂、聚乙烯醚、聚乙烯醇、聚羟基烷基丙烯酸酯、聚羟基烷基甲基丙烯酸酯、聚丙烯酰胺、聚甲基丙烯酰胺等)和各种组成的水凝胶。在某些实施方案中,支持物包含多羟基聚合物,诸如多糖。适用于支持物的多糖的实例包括但不限于琼脂、琼脂糖、葡聚糖、淀粉、纤维素、支链淀粉等,以及这些物质的稳定化变体。

[0074] 固体支持基质的形式可具有任何合适的公知类型。用于偶联本发明的Fc结合蛋白的这种固体支持基质可包括例如以下形式之一:柱、毛细管、颗粒、膜、过滤器、整料(monoliths)、纤维、垫、凝胶、载玻片、平板、盒或常用于色谱法并且本领域技术人员已知的任何其他形式。

[0075] 在一个实施方案中,基质由基本上球形的颗粒(也称为珠粒,例如Sephacrose凝胶或Agarose珠粒)组成。合适的粒度可以在5-500 μm 诸如10-100 μm ,例如20-80 μm 的直径范围内。颗粒形式的基质可用作填充床或呈悬浮形式(包括膨胀床)。

[0076] 在一个替代实施方案中,固体支持基质是膜,例如水凝胶膜。在一些实施方案中,亲和纯化涉及膜作为第一方面的Fc结合蛋白与其共价结合的基质。固体支持物也可以是柱体中的膜形式。

[0077] 在一些实施方案中,亲和纯化涉及含有第一方面的Fc结合蛋白与其共价结合的固体支持基质的色谱柱。

[0078] 可通过常规偶联技术将本发明的Fc结合蛋白附接于合适的固体支持基质,所述偶联技术利用例如本发明的Fc结合蛋白中存在的氨基-、硫羟基-和/或羧基。偶联可以通过Fc结合蛋白的氮、氧或硫原子进行。优选地,包含在N-或C-末端肽接头中的氨基酸包含所述氮、氧或硫原子。

[0079] Fc结合蛋白可以直接或通过间隔元件间接偶联至支持基质上,以在基质表面与本发明的Fc结合蛋白之间提供适当的距离,这提高了Fc结合蛋白的可用性并促进本发明的Fc结合蛋白与支持物的化学偶联。

[0080] 将蛋白质配体固定到固体支持物上的方法在本领域中是公知的,并且可以由本领域技术人员使用标准技术和设备容易地进行。

[0081] 取决于Fc结合蛋白和特定条件,偶联可以是多点偶联,例如通过几个赖氨酸,或单点偶联,例如通过半胱氨酸。

[0082] 在第三方面,本发明涉及第一方面的Fc结合蛋白或第二方面的亲和基质用于免疫球蛋白或其变体的亲和纯化(即本发明的Fc结合蛋白用于亲和色谱)的用途。在一些实施方

案中,如本发明第二方面所述,将本发明的Fc结合蛋白固定在固体支持物上。

[0083] 在第四方面,本发明涉及用于亲和纯化包含Fc序列的蛋白质的方法,所述方法包括:

[0084] (a)提供含有包含Fc序列的蛋白质的溶液;

[0085] (b)向其提供包含至少一种本发明的Fc结合蛋白的亲亲和分离基质;

[0086] (c)在允许本发明的所述至少一种Fc结合蛋白与包含Fc序列的蛋白质特异性结合的条件下,使所述亲和分离基质与所述溶液接触;和(d)从所述亲和纯化基质中洗脱包含Fc序列的所述蛋白质,和

[0087] (e)任选地在步骤(c)与(d)之间包括洗涤亲和基质。

[0088] 出于所公开的用途和方法的目的,所述包含Fc序列的蛋白质是包含Fc序列的免疫球蛋白分子或其片段或衍生物,与本文提供的定义一致。

[0089] 适用于所公开的用途和方法的亲亲和分离基质是根据上述实施方案并且如本领域技术人员已知的那些基质。

[0090] 在第四方面的一些实施方案中,步骤(d)中从基质中洗脱免疫球蛋白是通过pH的变化和/或盐浓度的变化实现的。可以例如通过pH 5或更低的溶液,或通过pH 11或更高的溶液,使用用于从蛋白A介质洗脱的任何合适的溶液。

[0091] 在一些实施方案中,例如,优选地通过使用碱性液体(例如pH为13-14)添加用于高效清洁亲和基质的另外的步骤(f)。在某些实施方案中,清洁液包含0.1-1.0M NaOH或KOH,优选0.25-0.5M NaOH或KOH。由于本发明的Fc结合蛋白的高碱性稳定性,这种强碱性溶液可用于清洁目的。

[0092] 在一些实施方案中,由于步骤(a)至(e),任选地(a)至(f)的重复可以重复至少10次、至少20次、至少30次、至少40次、至少50次、至少60次、至少70次、至少80次、至少90次或至少100次,因此亲和基质可以重复使用至少10次、至少20次、至少30次、至少40次、至少50次、至少60次、至少70次、至少80次、至少90次或至少100次。

[0093] 通常,用于进行亲和纯化方法的合适条件是本领域技术人员公知的。在一些实施方案中,包含公开的Fc结合结构域的亲亲和纯化的所公开的用途或方法在大于或等于3.5(例如,约4.0、约4.5、约5.0、约5.5、约6.0或约6.5)的pH下可提供包含Fc的蛋白质的至少约95%,至少约96%,至少约97%,至少约98%,至少约99%或至少约100%的洗脱。在一些实施方案中,所公开的Fc结合结构域的洗脱谱优于蛋白A结构域C。

[0094] 在第五方面,本发明涉及核酸分子,优选分离的核酸分子,其编码上文公开的任何实施方案的Fc结合蛋白或Fc结合结构域。在一个实施方案中,本发明涉及包含所述核酸分子的载体。载体意指可用于将蛋白质编码信息转移到宿主细胞中的任何分子或实体(例如,核酸、质粒、噬菌体或病毒)。在一个实施方案中,载体是表达载体。

[0095] 在第六方面,本发明涉及表达系统,其包含如上公开的核酸或载体,例如原核宿主细胞,例如大肠杆菌,或真核宿主,例如酵母(酿酒酵母或巴斯德毕赤酵母)或哺乳动物细胞诸如CHO细胞。

[0096] 在第七方面,本发明涉及用于第一方面的Fc结合蛋白的产生的方法,其包括以下步骤:(a)在合适的条件下培养第六方面的宿主细胞用于表达结合蛋白以获得所述Fc结合蛋白;(b)任选地分离所述Fc结合蛋白。

[0097] 用于培养原核或真核宿主的合适条件是本领域技术人员公知的。

[0098] 本发明的Fc结合分子可以通过许多常规和公知的技术(诸如普通有机合成策略、固相辅助合成技术)中的任何一种或通过商购可得的自动合成仪来制备。另一方面,它们还可以通过单独的或与常规合成技术组合的常规重组技术制备。

[0099] 本发明的一个实施方案涉及用于制备碱性稳定性Fc结合蛋白的方法,所述Fc结合蛋白包含含有SEQ ID NO:1-6或21中的任一个的序列的至少一个Fc结合结构域,所述方法包括以下步骤:(a)制备编码如上定义的Fc结合蛋白的核酸;(b)将所述核酸引入表达载体中;(c)将所述表达载体引入宿主细胞;(d)培养所述宿主细胞;(e)使所述宿主细胞经受在其下表达Fc结合蛋白的培养条件,从而(e)产生如上所述的Fc结合蛋白;任选地(f)分离步骤(e)中产生的蛋白质;以及(g)任选地将蛋白质与如上所述的固体基质缀合。

[0100] 在本发明的另外的实施方案中,Fc结合蛋白的产生通过无细胞体外转录/翻译进行。

实施例

[0101] 提供以下实施例用于进一步说明本发明。然而,本发明不限于此,并且以下实施例仅基于以上描述显示了本发明的实用性。

[0102] 实施例1.本发明的亲本Fc结合蛋白的产生

[0103] 最初通过天然存在的蛋白A结构域的改组过程产生亲本蛋白SEQ ID NO:17或SEQ ID NO:18。更具体地,如本文所理解的改组方法是组装过程,其从一组不相同的已知氨基酸序列开始产生人工氨基酸序列。改组过程包括以下步骤:a)提供五个天然存在的蛋白A结构域E、B、D、A和C以及蛋白A变体结构域Z的序列;b)比对所述序列;c)经计算机统计片段化以鉴定被重组的子序列,然后d)组装各种片段的新的人工序列以产生嵌合体产物,即新型氨基酸序列。步骤c)中产生的片段具有任何长度,例如,如果片段化的亲本序列具有n的长度,则片段的长度为1至n-1。

[0104] 相对于起始氨基酸序列保持了嵌合体产物中的氨基酸的相对位置。至少90%的位置Q9、Q10、A12、F13、Y14、L17、P20、L22、Q26、R27、F30、I31、Q32、S33、L34、K35、D36、D37、P38、S39、S41、L45、E47、A48、K50、L51、Q55、A56、P57在亲本“改组”蛋白IB24和IB26的人工氨基酸序列与天然存在的蛋白A结构域或蛋白A结构域变体之间是相同的,条件是IB24和IB26的位置4是Q。亲本蛋白IB24或IB26的总氨基酸序列是人工的,因为其与任何天然存在的蛋白A结构域或结构域Z的总体氨基酸序列具有不超过约85%的同一性(例如,IB24或IB26与结构域B仅具有77%的同一性。在产生初始人工蛋白质后,通过氨基酸序列的位点特异性随机化进一步修饰蛋白质,以进一步改变结合特性。通过单个氨基酸残基的位点饱和诱变引入进一步的修饰。

[0105] 合成IB24和IB26的基因,并使用技术人员已知的标准方法将其克隆到大肠杆菌表达载体中。将DNA测序用于验证插入片段的正确序列。

[0106] 为了产生包含不止一个结合结构域的多聚体Fc结合蛋白,将2、3、4、5或6个Fc结合结构域进行基因融合。

[0107] 对于特定的膜附着和纯化,将具有C末端Cys(SEQ ID NO:19)和任选地链霉素标记(SEQ ID NO:20)的短肽氨基酸序列添加至Fc结合蛋白的C末端。

[0108] 实施例2.Fc结合蛋白的诱变

[0109] 对于定点诱变,根据制造商的说明书使用 **Q5[®]** site-directed Mutagenesis试剂盒(NEB;目录号E0554S)。通过GeneArt[™]Strings[™]合成(Thermo Fisher Scientific)产生几种点突变的组合。Strings DNA片段对应于纯化的PCR产物,并被克隆到pET28a载体的衍生物中。通过电穿孔将连接产物转化到大肠杆菌XL2-blue细胞中。通过PCR筛选单个集落以鉴定含有正确大小的插入物的构建体。将DNA测序用于验证正确的序列。

[0110] 实施例3.Fc结合蛋白的表达

[0111] 用编码Fc结合蛋白的表达质粒转化BL21 (DE3)感受态细胞。将细胞涂布在选择琼脂平板(卡那霉素)上,并在37℃孵育过夜。将预培养物从单个菌落接种于100ml 2xYT培养基中,并在常规轨道振荡器中在补充有150μg/ml卡那霉素但不含乳糖和消泡剂的带有挡板的1L Erlenmeyer烧瓶中于37℃,160rpm下培养16小时。 OD_{600} 读数应在6-12的范围内。在补充有150μg/ml卡那霉素的1L厚壁锥形瓶中从先前的过夜培养物(在400ml超富集培养基(改良的H15培养基2%葡萄糖,5%酵母提取物,0.89%甘油,0.76%乳糖,250mM MOPS,202mM TRIS,pH 7.4,消泡剂SE15)中调整的起始 OD_{600} 为0.5)接种主培养物。将培养物转移至共振声混合器(RAMbio)并在37℃下以20x g孵育。通过氧气泵塞子(Oxy-Pump stopper)促进通气。通过代谢葡萄糖,随后使乳糖进入细胞来诱导重组蛋白表达。在预定时间点测量 OD_{600} ,将调整至5/ OD_{600} 的样品取出,沉淀并在-20℃冷冻。使细胞过夜生长约24小时达到约45-60的最终 OD_{600} 。为了收集生物质,将细胞在20℃下以16000x g离心10分钟。将沉淀称重(湿重)并在上清液中测量pH。在处理之前将细胞在-20℃下储存。

[0112] 实施例4:Fc结合蛋白的表达和溶解度的SDS-PAGE分析

[0113] 将在发酵过程中获取的样品重悬于300μl提取缓冲液(补充有0.2mg/ml溶菌酶,0.5x BugBuster,7.5mM MgSO₄,40U Benzonase的PBS)中并通过在热混合器中在室温下以700rpm搅拌溶解15min。通过离心(16000x g,2min,室温)将可溶性蛋白质与不溶性蛋白质分离。取出上清液(可溶性级分),将沉淀(不溶性级分)重悬于等量的尿素缓冲液(8M尿素,0.2M Tris,2mM EDTA,pH 8.5)中。从可溶性和不溶性级分中取出50μl,并加入12μl 5x样品缓冲液以及5μl 0.5M DTT。将样品在95℃下煮沸5分钟。最后,将8μl的那些样品应用于NuPage Novex 4-12%Bis-Tris SDS凝胶,其根据制造商的推荐运行并用考马斯染色。发现在所选择的时间段内在优化条件下Fc结合蛋白的高水平表达(数据未显示)。根据SDS-PAGE,所有表达的Fc结合蛋白可溶解至超过95%。

[0114] 实施例5:Fc结合蛋白的纯化

[0115] 具有C末端StrepTagII的Fc结合蛋白(SEQ ID NO:20)在大肠杆菌的可溶性级分中表达。通过两个冷冻/解冻循环裂解细胞,并按照制造商的说明书(IBA,Goettingen,Germany)用Strep-**Tactin[®]**树脂进行纯化步骤。为避免二硫键形成,给缓冲液补充1mM DTT。

[0116] 或者,具有C末端StrepTagII的Fc结合蛋白在大肠杆菌的可溶性级分中表达。将细胞重悬于细胞破碎缓冲液中,并通过恒定细胞破碎系统(Unit F8B,Holly Farm Business Park)在1kbar下裂解,进行两个循环。按照制造商的说明书,使用AKTExpress系统(Ge Healthcare),用Strep-TactinYesin(IBA,Goettingen,Germany)和另外的凝胶过滤(Superdex 75 16/60;GE Healthcare)进行纯化步骤。为了避免二硫化物形成,给用于

Strep-Tactin纯化的缓冲液补充1mM DTT,并使用柠檬酸盐缓冲液(20mM柠檬酸盐,150mM NaCl,pH 6.0)作为用于凝胶过滤的运行缓冲液。

[0117] 实施例6.Fc结合蛋白以高亲和力(如通过表面等离子体共振实验测定的)结合IgG

[0118] 用SPR运行缓冲液平衡CM5传感器芯片(GE Healthcare)。通过使EDC和NHS的混合物通过而活化表面暴露的羧基,得到反应性酯基。将700-1500RU的结合配体(on-ligand)固定在流动池上,将解离配体(off-ligand)固定在另一个流动池上。配体固定后乙醇胺的注射,注射乙醇胺和10nM甘氨酸pH 2.0,以除去非共价结合的Fc结合蛋白。配体结合后,蛋白质分析物在表面积累,增加了折射率。实时测量折射率的这种变化并绘制为响应或共振单位(RU)对时间的曲线。将分析物以连续稀释度以合适的流速($\mu\text{l}/\text{min}$)施加到芯片上。每次运行后,用再生缓冲液再生芯片表面并用运行缓冲液进行平衡。将对照样品应用于基质。如前所述进行再生和再平衡。通过使用Biacore® 3000(GE Healthcare)在25°C进行结合研究;数据评估通过制造商提供的BIAevaluation 3.0软件,通过使用Langmuir 1:1模型($R_1=0$)进行操作。将评估的解离常数(KD)针对脱靶进行标准化。SEQ ID NO:1和SEQ ID NO:2对人IgG1(西妥昔单抗)、人IgG2(帕尼单抗)和人IgG4(那他珠单抗)的结合亲和力示于表1中。

[0119] 表1.本发明的Fc结合蛋白的 K_D 值

CID	交换	SE-HPLC [%]	rp-HPLC [%]	KD vs. IgG 1 [nM]	KD vs. IgG 2 [nM]	KD vs. IgG 4 [nM]
Wt C-结构域		100	100	7.2	129	8.0
CS24		100	100	17.2	101	12.4
[0120] CS24	Q9H	100	100	617	6720	403
CS24	D36H	100	100	16.1	169	10.6
CS26		100	100	18.4	193	10.9
CS26	Q9H	100	100	668	3320	265
CS26	D36H	100	100	14.4	153	11.2

[0121] 实施例7.与Sepharose 6B基质偶联的Fc结合蛋白的碱性稳定性按照制造商的说明书(偶联条件:pH 9.0过夜,用乙醇胺封闭5h)将纯化的Fc结合蛋白偶联至环氧活化的基质(Sepharose 6B,GE;目录号17-0480-01)。将西妥昔单抗用作IgG1样品(5mg;1mg/ml基质)。将西妥昔单抗以饱和量施用于包含固定的Fc结合蛋白的基质。用pH 2.5的100mM甘氨酸缓冲液洗涤基质以洗脱与固定的IgG结合蛋白结合的西妥昔单抗。通过BLI(用蛋白A Octet-传感器定量,西妥昔单抗作为标准)测量洗脱的IgG的浓度,以测定Fc结合蛋白的结合活性。将柱与0.5M NaOH在室温(22°C \pm 3°C)下孵育6h。在用0.5M NaOH孵育6小时之前和之后分析固定的蛋白质的IgG结合活性。将在NaOH处理之前固定的蛋白质的IgG结合活性定义为100%。

[0122] 图1显示Fc结合蛋白SEQ ID NO:1和SEQ ID NO:2的活性与亲本蛋白IB24的活性相比更高(亲本IB26与亲本IB24相当;数据未显示)。与在0.5M NaOH中孵育6小时后的亲本蛋白IB24相比,Fc结合蛋白SEQ ID NO:1和SEQ ID NO:2均显示出至少高30%的IgG结合活性。因此,与亲本蛋白质相比,本发明的Fc结合蛋白在高pH下显示出显著改善的稳定性。

[0123] 实施例8.与基于琼脂糖的色谱珠Praesto™Pure45偶联的Fc结合蛋白的碱性稳定

性

[0124] 按照制造商的说明书(偶联条件:pH 9.5,3小时,35℃,用乙醇胺封闭过夜)将纯化的Fc结合蛋白偶联至基于琼脂糖的色谱珠(Praesto™Pure45,Purolite;目录号PR01262-166)。使用多克隆人IgG **Gammanorm**® (Ocatpharm) 作为IgG样品(浓度为2,2mg/ml)。将多克隆hIgG样品以饱和量施用于包含固定的Fc结合蛋白的基质。用pH 2.0的100mM柠檬酸盐缓冲液洗涤基质以洗脱与固定的Fc结合蛋白结合的hIgG。动态结合能力由在6分钟停留时间下10%穿透时注射的hIgG的量确定。将柱与0.5M NaOH在室温(22℃+/-3℃)下孵育6h。在用0.5M NaOH孵育6h之前和之后分析固定的蛋白质的IgG结合活性。将在NaOH处理之前固定的蛋白质的IgG结合活性定义为100%。

[0125] 图2显示,甚至在0.5M NaOH中孵育6h后Fc结合蛋白SEQ ID NO:1-6的活性也非常高(在0.5M NaOH下孵育6h后,对于所有Fc结合蛋白SEQ ID NO:1-6,剩余活性至少为87.6%)。本发明的所有Fc结合蛋白在高pH下显示出显著高的稳定性。图3进一步显示来自Praesto™Pure45基质和Praesto™Pure85基质的结果。

[0126] 实施例9. 从与基于琼脂糖的色谱珠Praesto™Pure45和/或Pure85偶联的Fc结合蛋白洗脱hIgG

[0127] 按照制造商的说明书将纯化的Fc结合蛋白偶联至基于琼脂糖的色谱珠(Praesto™Pure45或Pure 5)。使用多克隆人IgG **Gammanorm**® 作为IgG样品(浓度2.2mg/ml),加载至DBC10%。将多克隆hIgG样品以饱和量施用于包含固定的Fc结合蛋白的基质。在两步法中,首先用100mM柠檬酸盐缓冲液(pH 3.5)洗涤基质,然后用100mM柠檬酸盐缓冲液(pH 2.0)洗涤基质以洗脱与固定的Fc结合蛋白结合的hIgG。

[0128] 如图4所示,大于98%的结合的多克隆人IgG在pH 3.5下被洗脱,这显著高于从野生型蛋白A结构域C的洗脱。

[0039] <212> PRT
 [0040] <213> 人工序列
 [0041] <220>
 [0042] <223> cs24a
 [0043] <400> 3
 [0044] Ile Ala Ala Gln His Asp Lys Glu His Gln Ala Ala Phe Tyr Glu Ile
 [0045] 1 5 10 15
 [0046] Leu His Leu Pro Asn Leu Thr Glu Asp Gln Arg Asn Ala Phe Ile Gln
 [0047] 20 25 30
 [0048] Ser Leu Arg Asp Asp Pro Ser Val Ser Leu Glu Ile Leu Gly Glu Ala
 [0049] 35 40 45
 [0050] Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys
 [0051] 50 55
 [0052] <210> 4
 [0053] <211> 58
 [0054] <212> PRT
 [0055] <213> 人工序列
 [0056] <220>
 [0057] <223> cs26a
 [0058] <400> 4
 [0059] Ile Ala Ala Gln His Asp Lys Asp His Gln Ala Ala Phe Tyr Glu Ile
 [0060] 1 5 10 15
 [0061] Leu His Leu Pro Asn Leu Thr Glu Glu Gln Arg Asn Ala Phe Ile Gln
 [0062] 20 25 30
 [0063] Ser Leu Arg Asp Asp Pro Ser Val Ser Leu Glu Ile Leu Ala Glu Ala
 [0064] 35 40 45
 [0065] Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys
 [0066] 50 55
 [0067] <210> 5
 [0068] <211> 58
 [0069] <212> PRT
 [0070] <213> 人工序列
 [0071] <220>
 [0072] <223> cs24b
 [0073] <400> 5
 [0074] Ile Ala Ala Gln His Asp Lys Glu Gln Gln Ala Ala Phe Tyr Glu Ile
 [0075] 1 5 10 15
 [0076] Leu His Leu Pro Asn Leu Thr Glu Asp Gln Arg Asn Ala Phe Ile Gln
 [0077] 20 25 30

[0078]	Ser Leu Arg His Asp Pro Ser Val Ser Leu Glu Ile Leu Gly Glu Ala
[0079]	35 40 45
[0080]	Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys
[0081]	50 55
[0082]	<210> 6
[0083]	<211> 58
[0084]	<212> PRT
[0085]	<213> 人工序列
[0086]	<220>
[0087]	<223> cs26b
[0088]	<400> 6
[0089]	Ile Ala Ala Gln His Asp Lys Asp Gln Gln Ala Ala Phe Tyr Glu Ile
[0090]	1 5 10 15
[0091]	Leu His Leu Pro Asn Leu Thr Glu Glu Gln Arg Asn Ala Phe Ile Gln
[0092]	20 25 30
[0093]	Ser Leu Arg His Asp Pro Ser Val Ser Leu Glu Ile Leu Ala Glu Ala
[0094]	35 40 45
[0095]	Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys
[0096]	50 55
[0097]	<210> 7
[0098]	<211> 53
[0099]	<212> PRT
[0100]	<213> 人工序列
[0101]	<220>
[0102]	<223> cs24 delNC
[0103]	<400> 7
[0104]	Gln His Asp Lys Glu Gln Gln Ala Ala Phe Tyr Glu Ile Leu His Leu
[0105]	1 5 10 15
[0106]	Pro Asn Leu Thr Glu Asp Gln Arg Asn Ala Phe Ile Gln Ser Leu Arg
[0107]	20 25 30
[0108]	Asp Asp Pro Ser Val Ser Leu Glu Ile Leu Gly Glu Ala Lys Lys Leu
[0109]	35 40 45
[0110]	Asn Asp Ala Gln Ala
[0111]	50
[0112]	<210> 8
[0113]	<211> 53
[0114]	<212> PRT
[0115]	<213> 人工序列
[0116]	<220>

[0117] <223> cs26 delNC
 [0118] <400> 8
 [0119] Gln His Asp Lys Asp Gln Gln Ala Ala Phe Tyr Glu Ile Leu His Leu
 [0120] 1 5 10 15
 [0121] Pro Asn Leu Thr Glu Glu Gln Arg Asn Ala Phe Ile Gln Ser Leu Arg
 [0122] 20 25 30
 [0123] Asp Asp Pro Ser Val Ser Leu Glu Ile Leu Ala Glu Ala Lys Lys Leu
 [0124] 35 40 45
 [0125] Asn Asp Ala Gln Ala
 [0126] 50
 [0127] <210> 9
 [0128] <211> 55
 [0129] <212> PRT
 [0130] <213> 人工序列
 [0131] <220>
 [0132] <223> cs24 delN
 [0133] <400> 9
 [0134] Ala His Asp Lys Glu Gln Gln Ala Ala Phe Tyr Glu Ile Leu His Leu
 [0135] 1 5 10 15
 [0136] Pro Asn Leu Thr Glu Asp Gln Arg Asn Ala Phe Ile Gln Ser Leu Arg
 [0137] 20 25 30
 [0138] Asp Asp Pro Ser Val Ser Leu Glu Ile Leu Gly Glu Ala Lys Lys Leu
 [0139] 35 40 45
 [0140] Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys
 [0141] 50 55
 [0142] <210> 10
 [0143] <211> 55
 [0144] <212> PRT
 [0145] <213> 人工序列
 [0146] <220>
 [0147] <223> cs26 delN
 [0148] <400> 10
 [0149] Ala His Asp Lys Asp Gln Gln Ala Ala Phe Tyr Glu Ile Leu His Leu
 [0150] 1 5 10 15
 [0151] Pro Asn Leu Thr Glu Glu Gln Arg Asn Ala Phe Ile Gln Ser Leu Arg
 [0152] 20 25 30
 [0153] Asp Asp Pro Ser Val Ser Leu Glu Ile Leu Ala Glu Ala Lys Lys Leu
 [0154] 35 40 45
 [0155] Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys

[0156]	50	55
[0157]	<210> 11	
[0158]	<211> 318	
[0159]	<212> PRT	
[0160]	<213> 人工序列	
[0161]	<220>	
[0162]	<223> cs24 delNC六聚体	
[0163]	<400> 11	
[0164]	Gln His Asp Lys Glu Gln Gln Ala Ala Phe Tyr Glu Ile Leu His Leu	
[0165]	1 5 10 15	
[0166]	Pro Asn Leu Thr Glu Asp Gln Arg Asn Ala Phe Ile Gln Ser Leu Arg	
[0167]	20 25 30	
[0168]	Asp Asp Pro Ser Val Ser Leu Glu Ile Leu Gly Glu Ala Lys Lys Leu	
[0169]	35 40 45	
[0170]	Asn Asp Ala Gln Ala Gln His Asp Lys Glu Gln Gln Ala Ala Phe Tyr	
[0171]	50 55 60	
[0172]	Glu Ile Leu His Leu Pro Asn Leu Thr Glu Asp Gln Arg Asn Ala Phe	
[0173]	65 70 75 80	
[0174]	Ile Gln Ser Leu Arg Asp Asp Pro Ser Val Ser Leu Glu Ile Leu Gly	
[0175]	85 90 95	
[0176]	Glu Ala Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Gln His Asp Lys Glu Gln	
[0177]	100 105 110	
[0178]	Gln Ala Ala Phe Tyr Glu Ile Leu His Leu Pro Asn Leu Thr Glu Asp	
[0179]	115 120 125	
[0180]	Gln Arg Asn Ala Phe Ile Gln Ser Leu Arg Asp Asp Pro Ser Val Ser	
[0181]	130 135 140	
[0182]	Leu Glu Ile Leu Gly Glu Ala Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Gln	
[0183]	145 150 155 160	
[0184]	His Asp Lys Glu Gln Gln Ala Ala Phe Tyr Glu Ile Leu His Leu Pro	
[0185]	165 170 175	
[0186]	Asn Leu Thr Glu Asp Gln Arg Asn Ala Phe Ile Gln Ser Leu Arg Asp	
[0187]	180 185 190	
[0188]	Asp Pro Ser Val Ser Leu Glu Ile Leu Gly Glu Ala Lys Lys Leu Asn	
[0189]	195 200 205	
[0190]	Asp Ala Gln Ala Gln His Asp Lys Glu Gln Gln Ala Ala Phe Tyr Glu	
[0191]	210 215 220	
[0192]	Ile Leu His Leu Pro Asn Leu Thr Glu Asp Gln Arg Asn Ala Phe Ile	
[0193]	225 230 235 240	
[0194]	Gln Ser Leu Arg Asp Asp Pro Ser Val Ser Leu Glu Ile Leu Gly Glu	

[0195]		245		250		255
[0196]	Ala Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Gln His Asp Lys Glu Gln Gln					
[0197]		260		265		270
[0198]	Ala Ala Phe Tyr Glu Ile Leu His Leu Pro Asn Leu Thr Glu Asp Gln					
[0199]		275		280		285
[0200]	Arg Asn Ala Phe Ile Gln Ser Leu Arg Asp Asp Pro Ser Val Ser Leu					
[0201]		290		295		300
[0202]	Glu Ile Leu Gly Glu Ala Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala					
[0203]	305		310		315	
[0204]	<210> 12					
[0205]	<211> 318					
[0206]	<212> PRT					
[0207]	<213> 人工序列					
[0208]	<220>					
[0209]	<223> cs26 delNC 六聚体					
[0210]	<400> 12					
[0211]	Gln His Asp Lys Asp Gln Gln Ala Ala Phe Tyr Glu Ile Leu His Leu					
[0212]	1	5		10		15
[0213]	Pro Asn Leu Thr Glu Glu Gln Arg Asn Ala Phe Ile Gln Ser Leu Arg					
[0214]		20		25		30
[0215]	Asp Asp Pro Ser Val Ser Leu Glu Ile Leu Ala Glu Ala Lys Lys Leu					
[0216]		35		40		45
[0217]	Asn Asp Ala Gln Ala Gln His Asp Lys Asp Gln Gln Ala Ala Phe Tyr					
[0218]		50		55		60
[0219]	Glu Ile Leu His Leu Pro Asn Leu Thr Glu Glu Gln Arg Asn Ala Phe					
[0220]	65		70		75	80
[0221]	Ile Gln Ser Leu Arg Asp Asp Pro Ser Val Ser Leu Glu Ile Leu Ala					
[0222]		85		90		95
[0223]	Glu Ala Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Gln His Asp Lys Asp Gln					
[0224]		100		105		110
[0225]	Gln Ala Ala Phe Tyr Glu Ile Leu His Leu Pro Asn Leu Thr Glu Glu					
[0226]		115		120		125
[0227]	Gln Arg Asn Ala Phe Ile Gln Ser Leu Arg Asp Asp Pro Ser Val Ser					
[0228]		130		135		140
[0229]	Leu Glu Ile Leu Ala Glu Ala Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Gln					
[0230]	145		150		155	160
[0231]	His Asp Lys Asp Gln Gln Ala Ala Phe Tyr Glu Ile Leu His Leu Pro					
[0232]		165		170		175
[0233]	Asn Leu Thr Glu Glu Gln Arg Asn Ala Phe Ile Gln Ser Leu Arg Asp					

[0234]	180	185	190
[0235]	Asp Pro Ser Val Ser Leu Glu Ile Leu Ala Glu Ala Lys Lys Leu Asn		
[0236]	195	200	205
[0237]	Asp Ala Gln Ala Gln His Asp Lys Asp Gln Gln Ala Ala Phe Tyr Glu		
[0238]	210	215	220
[0239]	Ile Leu His Leu Pro Asn Leu Thr Glu Glu Gln Arg Asn Ala Phe Ile		
[0240]	225	230	235
[0241]	Gln Ser Leu Arg Asp Asp Pro Ser Val Ser Leu Glu Ile Leu Ala Glu		
[0242]	245	250	255
[0243]	Ala Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Gln His Asp Lys Asp Gln Gln		
[0244]	260	265	270
[0245]	Ala Ala Phe Tyr Glu Ile Leu His Leu Pro Asn Leu Thr Glu Glu Gln		
[0246]	275	280	285
[0247]	Arg Asn Ala Phe Ile Gln Ser Leu Arg Asp Asp Pro Ser Val Ser Leu		
[0248]	290	295	300
[0249]	Glu Ile Leu Ala Glu Ala Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala		
[0250]	305	310	315
[0251]	<210> 13		
[0252]	<211> 290		
[0253]	<212> PRT		
[0254]	<213> 人工序列		
[0255]	<220>		
[0256]	<223> cs24 五聚体		
[0257]	<400> 13		
[0258]	Ile Ala Ala Gln His Asp Lys Glu Gln Gln Ala Ala Phe Tyr Glu Ile		
[0259]	1	5	10
[0260]	Leu His Leu Pro Asn Leu Thr Glu Asp Gln Arg Asn Ala Phe Ile Gln		
[0261]	20	25	30
[0262]	Ser Leu Arg Asp Asp Pro Ser Val Ser Leu Glu Ile Leu Gly Glu Ala		
[0263]	35	40	45
[0264]	Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys Ile Ala Ala Gln His Asp		
[0265]	50	55	60
[0266]	Lys Glu Gln Gln Ala Ala Phe Tyr Glu Ile Leu His Leu Pro Asn Leu		
[0267]	65	70	75
[0268]	Thr Glu Asp Gln Arg Asn Ala Phe Ile Gln Ser Leu Arg Asp Asp Pro		
[0269]	85	90	95
[0270]	Ser Val Ser Leu Glu Ile Leu Gly Glu Ala Lys Lys Leu Asn Asp Ala		
[0271]	100	105	110
[0272]	Gln Ala Pro Lys Ile Ala Ala Gln His Asp Lys Glu Gln Gln Ala Ala		

[0273]	115	120	125
[0274]	Phe Tyr Glu Ile Leu His Leu Pro Asn Leu Thr Glu Asp Gln Arg Asn		
[0275]	130	135	140
[0276]	Ala Phe Ile Gln Ser Leu Arg Asp Asp Pro Ser Val Ser Leu Glu Ile		
[0277]	145	150	155
[0278]	Leu Gly Glu Ala Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys Ile Ala		
[0279]	165	170	175
[0280]	Ala Gln His Asp Lys Glu Gln Gln Ala Ala Phe Tyr Glu Ile Leu His		
[0281]	180	185	190
[0282]	Leu Pro Asn Leu Thr Glu Asp Gln Arg Asn Ala Phe Ile Gln Ser Leu		
[0283]	195	200	205
[0284]	Arg Asp Asp Pro Ser Val Ser Leu Glu Ile Leu Gly Glu Ala Lys Lys		
[0285]	210	215	220
[0286]	Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys Ile Ala Ala Gln His Asp Lys Glu		
[0287]	225	230	235
[0288]	Gln Gln Ala Ala Phe Tyr Glu Ile Leu His Leu Pro Asn Leu Thr Glu		
[0289]	245	250	255
[0290]	Asp Gln Arg Asn Ala Phe Ile Gln Ser Leu Arg Asp Asp Pro Ser Val		
[0291]	260	265	270
[0292]	Ser Leu Glu Ile Leu Gly Glu Ala Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala		
[0293]	275	280	285
[0294]	Pro Lys		
[0295]	290		
[0296]	<210> 14		
[0297]	<211> 290		
[0298]	<212> PRT		
[0299]	<213> 人工序列		
[0300]	<220>		
[0301]	<223> cs26 五聚体		
[0302]	<400> 14		
[0303]	Ile Ala Ala Gln His Asp Lys Asp Gln Gln Ala Ala Phe Tyr Glu Ile		
[0304]	1	5	10
[0305]	Leu His Leu Pro Asn Leu Thr Glu Glu Gln Arg Asn Ala Phe Ile Gln		
[0306]	20	25	30
[0307]	Ser Leu Arg Asp Asp Pro Ser Val Ser Leu Glu Ile Leu Ala Glu Ala		
[0308]	35	40	45
[0309]	Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys Ile Ala Ala Gln His Asp		
[0310]	50	55	60
[0311]	Lys Asp Gln Gln Ala Ala Phe Tyr Glu Ile Leu His Leu Pro Asn Leu		

[0312]	65	70	75	80
[0313]	Thr Glu Glu Gln Arg Asn Ala Phe Ile Gln Ser Leu Arg Asp Asp Pro			
[0314]		85	90	95
[0315]	Ser Val Ser Leu Glu Ile Leu Ala Glu Ala Lys Lys Leu Asn Asp Ala			
[0316]		100	105	110
[0317]	Gln Ala Pro Lys Ile Ala Ala Gln His Asp Lys Asp Gln Gln Ala Ala			
[0318]		115	120	125
[0319]	Phe Tyr Glu Ile Leu His Leu Pro Asn Leu Thr Glu Glu Gln Arg Asn			
[0320]		130	135	140
[0321]	Ala Phe Ile Gln Ser Leu Arg Asp Asp Pro Ser Val Ser Leu Glu Ile			
[0322]	145	150	155	160
[0323]	Leu Ala Glu Ala Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys Ile Ala			
[0324]		165	170	175
[0325]	Ala Gln His Asp Lys Asp Gln Gln Ala Ala Phe Tyr Glu Ile Leu His			
[0326]		180	185	190
[0327]	Leu Pro Asn Leu Thr Glu Glu Gln Arg Asn Ala Phe Ile Gln Ser Leu			
[0328]		195	200	205
[0329]	Arg Asp Asp Pro Ser Val Ser Leu Glu Ile Leu Ala Glu Ala Lys Lys			
[0330]		210	215	220
[0331]	Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys Ile Ala Ala Gln His Asp Lys Asp			
[0332]	225	230	235	240
[0333]	Gln Gln Ala Ala Phe Tyr Glu Ile Leu His Leu Pro Asn Leu Thr Glu			
[0334]		245	250	255
[0335]	Glu Gln Arg Asn Ala Phe Ile Gln Ser Leu Arg Asp Asp Pro Ser Val			
[0336]		260	265	270
[0337]	Ser Leu Glu Ile Leu Ala Glu Ala Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala			
[0338]		275	280	285
[0339]	Pro Lys			
[0340]	290			
[0341]	<210> 15			
[0342]	<211> 174			
[0343]	<212> PRT			
[0344]	<213> 人工序列			
[0345]	<220>			
[0346]	<223> cs24 四聚体			
[0347]	<400> 15			
[0348]	Ile Ala Ala Gln His Asp Lys Glu Gln Gln Ala Ala Phe Tyr Glu Ile			
[0349]	1	5	10	15
[0350]	Leu His Leu Pro Asn Leu Thr Glu Asp Gln Arg Asn Ala Phe Ile Gln			

[0351]	20	25	30
[0352]	Ser Leu Arg Asp Asp Pro Ser Val Ser Leu Glu Ile Leu Gly Glu Ala		
[0353]	35	40	45
[0354]	Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys Ile Ala Ala Gln His Asp		
[0355]	50	55	60
[0356]	Lys Glu Gln Gln Ala Ala Phe Tyr Glu Ile Leu His Leu Pro Asn Leu		
[0357]	65	70	75
[0358]	Thr Glu Asp Gln Arg Asn Ala Phe Ile Gln Ser Leu Arg Asp Asp Pro		
[0359]	85	90	95
[0360]	Ser Val Ser Leu Glu Ile Leu Gly Glu Ala Lys Lys Leu Asn Asp Ala		
[0361]	100	105	110
[0362]	Gln Ala Pro Lys Ile Ala Ala Gln His Asp Lys Glu Gln Gln Ala Ala		
[0363]	115	120	125
[0364]	Phe Tyr Glu Ile Leu His Leu Pro Asn Leu Thr Glu Asp Gln Arg Asn		
[0365]	130	135	140
[0366]	Ala Phe Ile Gln Ser Leu Arg Asp Asp Pro Ser Val Ser Leu Glu Ile		
[0367]	145	150	155
[0368]	Leu Gly Glu Ala Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys		
[0369]	165	170	
[0370]	<210> 16		
[0371]	<211> 174		
[0372]	<212> PRT		
[0373]	<213> 人工序列		
[0374]	<220>		
[0375]	<223> cs26 四聚体		
[0376]	<400> 16		
[0377]	Ile Ala Ala Gln His Asp Lys Asp Gln Gln Ala Ala Phe Tyr Glu Ile		
[0378]	1	5	10
[0379]	Leu His Leu Pro Asn Leu Thr Glu Glu Gln Arg Asn Ala Phe Ile Gln		
[0380]	20	25	30
[0381]	Ser Leu Arg Asp Asp Pro Ser Val Ser Leu Glu Ile Leu Ala Glu Ala		
[0382]	35	40	45
[0383]	Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys Ile Ala Ala Gln His Asp		
[0384]	50	55	60
[0385]	Lys Asp Gln Gln Ala Ala Phe Tyr Glu Ile Leu His Leu Pro Asn Leu		
[0386]	65	70	75
[0387]	Thr Glu Glu Gln Arg Asn Ala Phe Ile Gln Ser Leu Arg Asp Asp Pro		
[0388]	85	90	95
[0389]	Ser Val Ser Leu Glu Ile Leu Ala Glu Ala Lys Lys Leu Asn Asp Ala		

[0390]	100	105	110
[0391]	Gln Ala Pro Lys Ile Ala Ala Gln His Asp Lys Asp Gln Gln Ala Ala		
[0392]	115	120	125
[0393]	Phe Tyr Glu Ile Leu His Leu Pro Asn Leu Thr Glu Glu Gln Arg Asn		
[0394]	130	135	140
[0395]	Ala Phe Ile Gln Ser Leu Arg Asp Asp Pro Ser Val Ser Leu Glu Ile		
[0396]	145	150	155
[0397]	Leu Ala Glu Ala Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys		
[0398]	165	170	
[0399]	<210> 17		
[0400]	<211> 58		
[0401]	<212> PRT		
[0402]	<213> 人工序列		
[0403]	<220>		
[0404]	<223> IB24 亲本		
[0405]	<400> 17		
[0406]	Ala Ala Ala Gln His Asp Lys Glu Gln Gln Ser Ala Phe Tyr Glu Ile		
[0407]	1	5	10
[0408]	Leu His Leu Pro Asn Leu Thr Glu Asp Gln Arg Asn Ala Phe Ile Gln		
[0409]	20	25	30
[0410]	Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser Val Ser Lys Glu Ile Leu Gly Glu Ala		
[0411]	35	40	45
[0412]	Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys		
[0413]	50	55	
[0414]	<210> 18		
[0415]	<211> 58		
[0416]	<212> PRT		
[0417]	<213> 人工序列		
[0418]	<220>		
[0419]	<223> IB26 亲本		
[0420]	<400> 18		
[0421]	Ala Ala Ala Gln His Asp Lys Asp Gln Gln Ser Ala Phe Tyr Glu Ile		
[0422]	1	5	10
[0423]	Leu His Leu Pro Asn Leu Thr Glu Glu Gln Arg Asn Ala Phe Ile Gln		
[0424]	20	25	30
[0425]	Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser Val Ser Lys Glu Ile Leu Ala Glu Ala		
[0426]	35	40	45
[0427]	Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys		
[0428]	50	55	

27

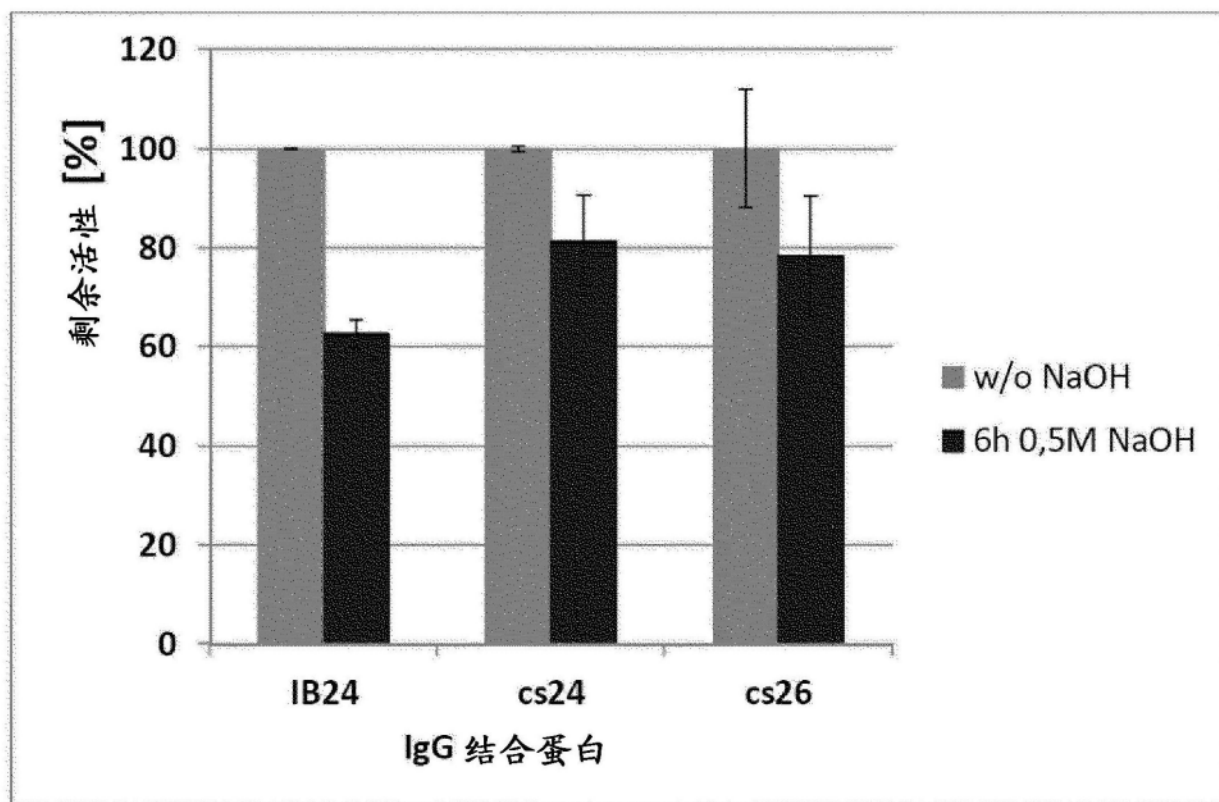


图1

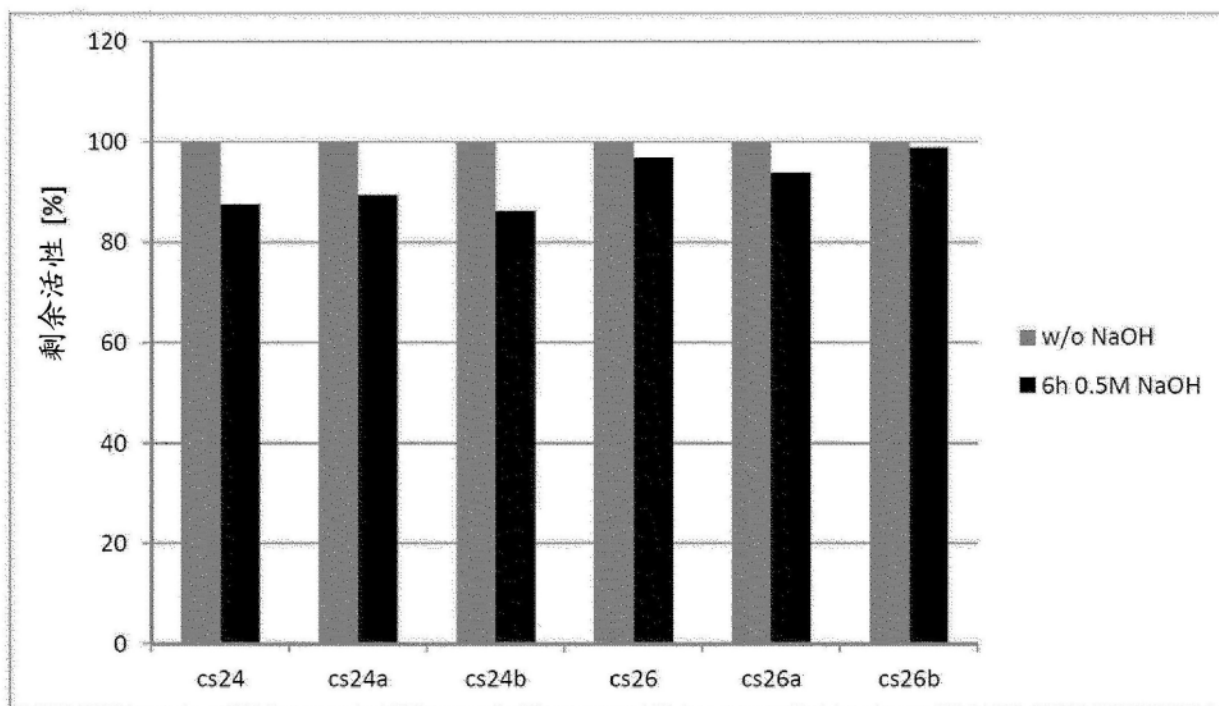
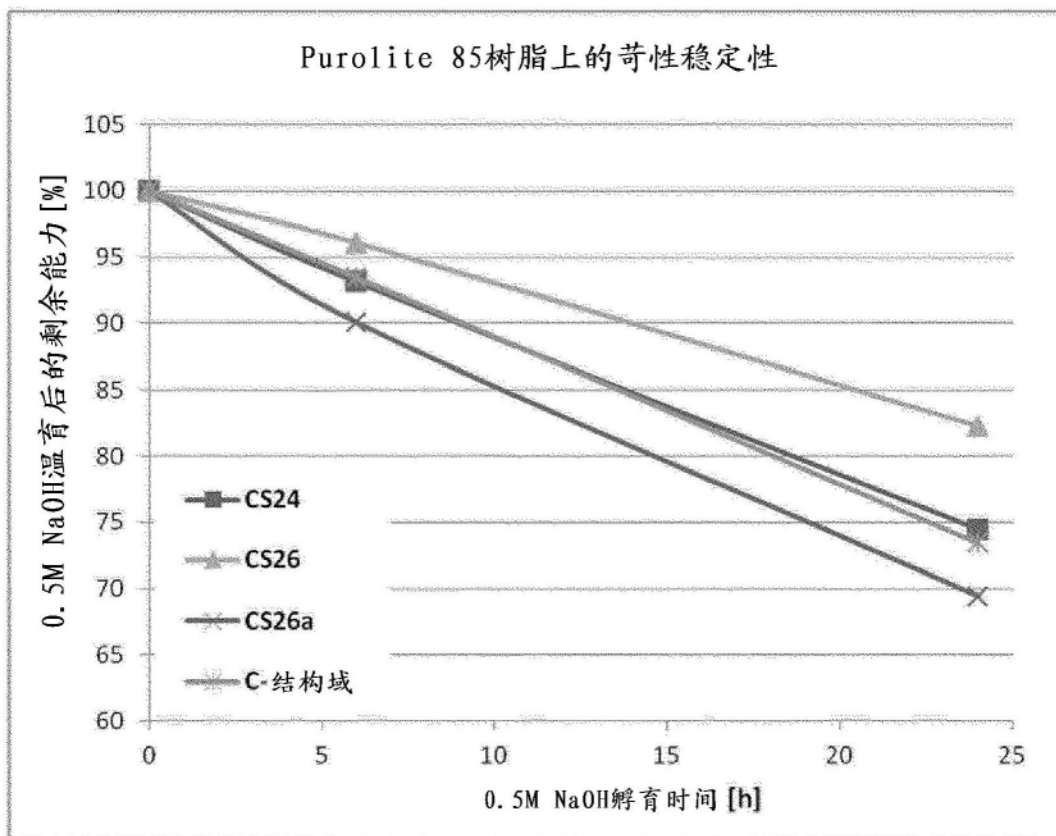


图2

A.



B.

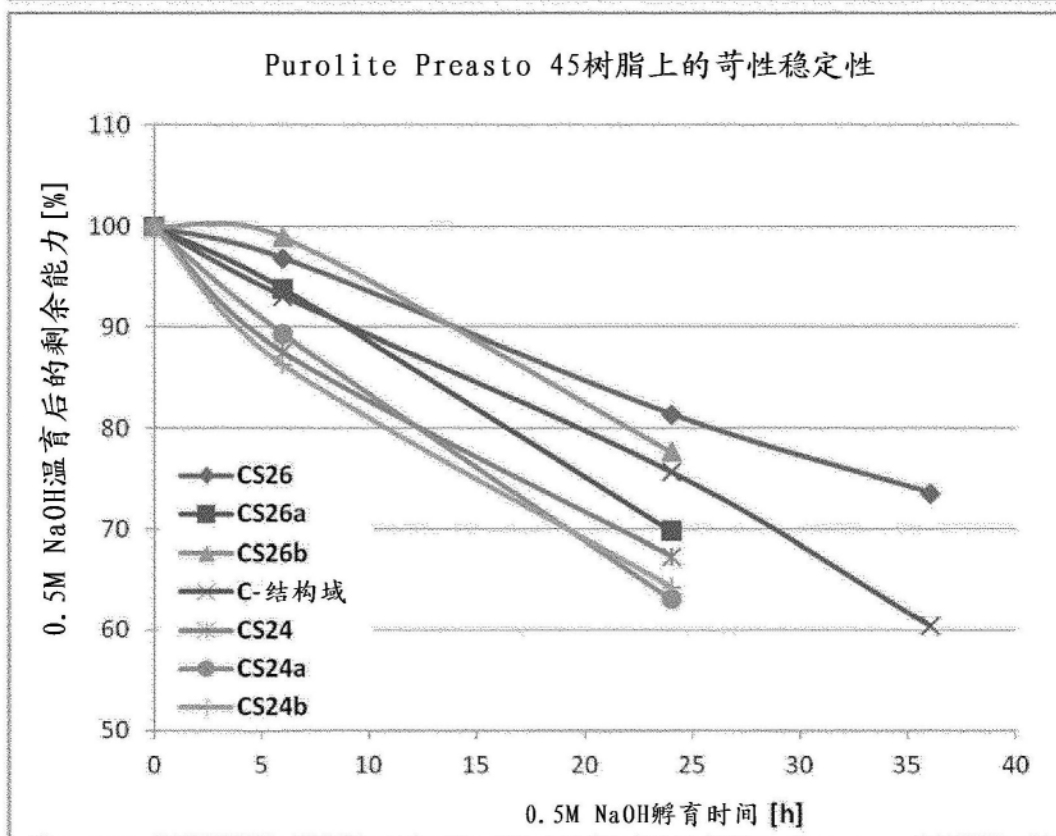
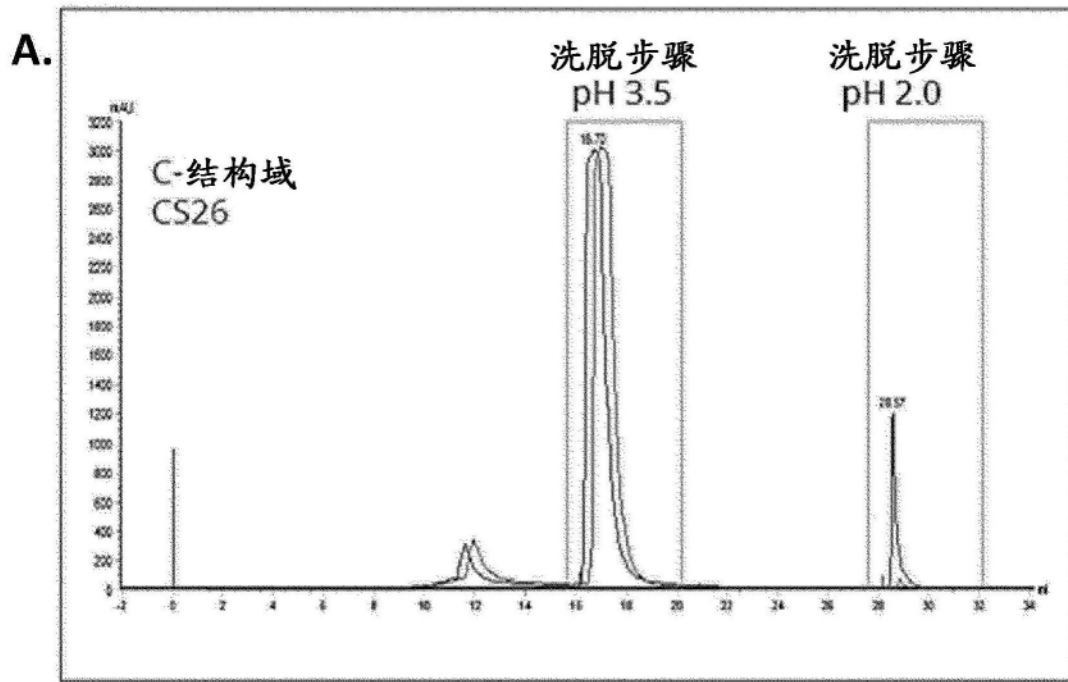


图3



B.

配基	树脂	在 0.1M 柠檬酸盐 pH3.5 中洗脱 [%]	在 0.1M 柠檬酸盐 pH2.0 中洗脱 [%]
cs24	Purolite 45	98,5	1,5
cs24a	Purolite 45	99,5	0,5
cs24b	Purolite 45	99,7	0,2
C-结构域	Purolite 45	89,7	10,3
cs26	Purolite 45	98,4	1,6
cs26a	Purolite 45	99,2	0,8
cs26b	Purolite 45	99,6	0,4
cs26	Purolite 85	99,1	0,9
cs26a	Purolite 85	99,6	0,4
cs24	Purolite 85	99	1
C-结构域	Purolite 85	90,4	9,6

图4