

[19] Patents Registry
The Hong Kong Special Administrative Region
香港特別行政區
專利註冊處

[11] 1251237 B
CN 108368166 B

[12] **STANDARD PATENT (R) SPECIFICATION**
轉錄標準專利說明書

[21] Application no. 申請編號 18110553.8
[51] Int. Cl. C07K 16/00 (2006.01) C07K 1/22 (2006.01)
[22] Date of filing 提交日期 16.08.2018
C12N 15/09 (2006.01)

[54] METHOD FOR PROMOTING EFFICIENCY OF PURIFICATION OF FC REGION-CONTAINING POLYPEPTIDE
提高含 FC 區多肽純化效率的方法

[30] Priority 優先權
28.12.2015 JP 2015-255726
[43] Date of publication of application 申請發表日期
25.01.2019
[45] Date of publication of grant of patent 批予專利的發表日期
12.05.2023
[86] International application no. 國際申請編號
PCT/JP2016/088820
[87] International publication no. and date 國際申請發表編號及日期
WO2017/115773 06.07.2017
CN Application no. & date 中國專利申請編號及日期
CN 201680069093.0 27.12.2016
CN Publication no. & date 中國專利申請發表編號及日期
CN 108368166 03.08.2018
Date of grant in designated patent office 指定專利當局批予專利日期
28.03.2023

[73] Proprietor 專利所有人
Chugai Seiyaku Kabushiki Kaisha
中外製藥株式會社
5-1, Ukima 5-chome
Kita-ku
Tokyo 115-8543
JAPAN
[72] Inventor 發明人
TANAKA, Nobuyuki 田中信幸
MOMOSE, Rumiko 百瀬瑠美子
[74] Agent and / or address for service 代理人及/或送達地址
MARKS & CLERK
Level 9, Cyberport 1
100 Cyberport Road, Pok Fu Lam
HONG KONG



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 108368166 B

(45) 授权公告日 2023.03.28

(21) 申请号 201680069093.0

(22) 申请日 2016.12.27

(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 108368166 A

(43) 申请公布日 2018.08.03

(30) 优先权数据
2015-255726 2015.12.28 JP

(85) PCT国际申请进入国家阶段日
2018.05.25

(86) PCT国际申请的申请数据
PCT/JP2016/088820 2016.12.27

(87) PCT国际申请的公布数据
W02017/115773 JA 2017.07.06

(73) 专利权人 中外制药株式会社
地址 日本国东京都

(72) 发明人 田中信幸 百濑瑠美子

(74) 专利代理机构 中科专利商标代理有限责任
公司 11021
专利代理师 张莹

(51) Int.Cl.
C07K 16/00 (2006.01)
C07K 1/22 (2006.01)
G12N 15/09 (2006.01)

(56) 对比文件
CN 103298937 A, 2013.09.11

审查员 李翠莹

权利要求书1页 说明书12页
序列表5页 附图1页

(54) 发明名称

提高含Fc区多肽纯化效率的方法

(57) 摘要

发现通过制备含Fc区多肽的Fc区(其中Fc区的第一多肽链与蛋白A树脂结合但Fc区的第二多肽链不结合树脂或显示与其弱结合),每体积树脂结合的含Fc区多肽的量增加,并且可以更有效地纯化上述含Fc区的多肽。



1. 一种用于在蛋白A柱层析中增加含Fc区的多肽对蛋白A树脂的动态结合能力的方法, 所述方法包括制备作为Fc区的第一多肽链和第二多肽链的第一多肽链和第二多肽链的步骤, 所述第一多肽链和第二多肽链具有与所述树脂彼此不同的结合活性, 其中所述Fc区是IgG4同种型的Fc区, 其中根据EU编号在Fc区的第一多肽链中的位置435处的氨基酸是His, 并且根据EU编号Fc区的第二多肽链中的位置435处的氨基酸是Arg。

2. 权利要求1所述的方法, 其中所述结合能力的增加为5g/L树脂或更多。

3. 权利要求1所述的方法, 其中所述增加后的所述动态结合能力为45g/L树脂或更多。

4. 权利要求1所述的方法, 其中所述含Fc区的多肽是抗体。

5. 权利要求4所述的方法, 其中所述抗体是双特异性抗体。

6. 一种使用权利要求1至5中任一项所述的方法纯化含Fc区的多肽的方法。

7. 一种使用蛋白A树脂制造含Fc区多肽的方法, 其包括以下步骤:

(a) 制备Fc区的对所述树脂具有彼此不同的结合活性的第一多肽链和第二多肽链, 其中所述Fc区是IgG4同种型的Fc区, 其中根据EU编号在Fc区的第一多肽链中的位置435处的氨基酸是His, 并且根据EU编号Fc区的第二多肽链中的位置435处的氨基酸是Arg;

(b) 比较步骤(a)的含Fc区的多肽在蛋白A柱层析中对蛋白A树脂的动态结合能力与含有对所述树脂相同的结合活性的两条多肽链的含Fc区的多肽在蛋白A柱层析中对蛋白A树脂的动态结合能力;

(c) 使包含含有Fc区的第一多肽链的多肽和含有Fc区的第二多肽链的多肽的样品与所述树脂接触; 和

(d) 收集与树脂结合并包含异源多肽的含Fc区多肽, 所述异源多肽包含含有Fc区的第一多肽链的多肽和含有Fc区的第二多肽链的多肽。

提高含Fc区多肽纯化效率的方法

技术领域

[0001] 本发明涉及用于增加蛋白A柱层析中含Fc区多肽对蛋白A树脂的动态结合能力的方法,使用此类方法的纯化方法等。

背景技术

[0002] 在抗体药物的生产中,使用蛋白A柱,离子交换柱等的纯化步骤极大地影响抗体的生产效率(产量);因此,希望增加这些步骤的效率。达到效率的手段包括以下两种方法:(1)增加每单位体积树脂的结合能力;和(2)通过高流量处理减少纯化所需的时间。

[0003] 近来,蛋白A树脂的改进已经发展,并且更多的抗体可以结合蛋白A树脂,并且因此实现了有效的抗体纯化。例如,作为典型的第一代蛋白A树脂,对于由GE Healthcare制造的rProtein A sepharose Fast Flow,普通抗体结合能力为15~20g/L树脂;而对于同一公司生产的第二代Protein A树脂,Mab Select SuRe,是目前世界上最常用的,通常观察到的结合能力约为30g/L树脂。另外,与前一种树脂相比,后者可以适应大约1.5至2倍高的线性流速,并且抗体分子的更有效的蛋白A纯化已成为可能。

[0004] 双特异性抗体具有识别两种不同类型抗原的性质,因此它们携带两种类型的H链。因此,含有双特异性抗体的培养上清液不仅含有2种H链的双特异性抗体,还含有仅含有1种H链的抗体。为了从双特异性抗体中分离这些抗体,已经使用了对蛋白A树脂具有修饰的结合活性的Fc区变体(专利文献1和2)。担心这种分子修饰可能会具有降低蛋白A纯化双特异性抗体的效率的作用。

[0005] 在这种情况下,需要使用蛋白A树脂柱进行更有效的双特异性抗体纯化的新方法。

[0006] 引文列表

[0007] [专利文献]

[0008] [专利文献1]US20100331527

[0009] [专利文献2]US20130018174

发明内容

[0010] [本发明要解决的问题]

[0011] 本发明的目的是提供使用蛋白A树脂柱有效纯化含Fc区多肽,特别是双特异性抗体的方法。

[0012] [解决问题的手段]

[0013] 作为解决上述问题的专心研究的结果,本发明人发现,通过制备其第一多肽链和第二多肽链对蛋白A树脂具有彼此不同的结合活性的Fc区,抗体的动态结合能力提高,抗体纯化效率提高,从而完成了本发明。

[0014] 具体而言,本发明提供以下内容:

[0015] [1]在蛋白A柱层析中增加蛋白A树脂的含Fc区的多肽的动态结合能力的方法;

[0016] [2]如[1]所述的方法,其包括以下步骤:制备对树脂具有彼此不同的结合活性的

第一多肽链和第二多肽链,作为Fc区的第一多肽链和第二多肽链的步骤;

[0017] [3] [1]或[2]所述的方法,其包括以下步骤:制备与树脂结合的第一多肽链作为Fc区的第一多肽链,制备第二条多肽链,其不与树脂结合,或者与第一条多肽链相比,表现出较弱的与树脂的结合,作为Fc区的第二条多肽链;

[0018] [4]如[1]~[3]中任一项所述的方法,其包括修饰含Fc区的多肽的Fc区使得Fc区的第一多肽链与树脂结合,并且Fc区的第二多肽链不与树脂结合或与树脂显示与第一多肽链相比较弱结合的步骤;

[0019] [5]如[1]至[4]中任一项所述的方法,其中所述Fc区的第一多肽链包含IgG1, IgG2或IgG4的CH3,并且所述Fc区的第二多肽链包含IgG3的CH3;

[0020] [6] [1]~[5]中任一项所述的方法,其中Fc区的第一多肽链中EU编号435位的氨基酸为His, Fc区第二条多肽链中EU编号435位氨基酸是Arg;

[0021] [7]如[1]~[6]中任一项所述的方法,其中所述结合能力的增加为5g/L树脂以上;

[0022] [8]如[1]至[7]中任一项所述的方法,其中增加后的动态结合能力为45g/L树脂或更多;

[0023] [9]如[1]~[8]中任一项所述的方法,其中所述含Fc区的多肽为抗体;

[0024] [10] [9]的方法,其中抗体是双特异性抗体;

[0025] [11]使用[1]~[10]中任一项所述的方法纯化含Fc区的多肽的方法;

[0026] [12]通过[11]的方法纯化的含Fc区多肽;

[0027] [13]一种被含Fc区的多肽结合的蛋白A树脂,其中蛋白A柱层析中含Fc区的多肽对蛋白A树脂的动态结合能力为45g/L树脂或更多;

[0028] [14]含Fc区的多肽,其中蛋白A柱层析中蛋白A树脂的动态结合能力增加;

[0029] [15]一种使用蛋白A树脂制造含Fc区多肽的方法,其包括以下步骤:

[0030] (a) 制备Fc区的对所述树脂具有彼此不同的结合活性的第一多肽链和第二多肽链;

[0031] (b) 比较步骤(a)的含Fc区的多肽在蛋白A柱层析中蛋白A树脂的动态结合能力与含有对所述树脂基本上相同的结合活性的两条多肽链的含Fc区的多肽在蛋白A柱层析中对蛋白A树脂的动态结合能力;

[0032] (c) 使包含含有Fc区的第一多肽链的多肽和含有Fc区的第二多肽链的多肽的样品与所述树脂接触;和

[0033] (d) 收集与树脂结合并包含异源多肽的含Fc区多肽,所述异源多肽包含含有Fc区的第一多肽链的多肽和含有Fc区的第二多肽链的多肽;

[0034] [16] [15]的方法,其中所述步骤(a)是制备与树脂结合的第一多肽链作为Fc区的第一多肽链,并制备不结合树脂或显示与第一多肽链相比较弱的与树脂的结合的第二多肽链,作为Fc区的第二多肽链;

[0035] [17] [15]或[16]的方法,其中所述步骤(a)是为了纯化而修饰含Fc区多肽的Fc区,使得Fc区的第一多肽链结合树脂,并且Fc区的第二多肽链不与树脂结合或与第一多肽链相比,显示与树脂较弱结合;

[0036] [18] [15]至[17]中任一项的方法,其中步骤(c)中的样品包含能够提供对包含Fc区的第一多肽链的多肽和包含含有Fc区的第二多肽链的多肽二者的结合能力的共同L链的多

肽；

[0037] [19][11]所述的纯化方法,其中所述含Fc区的多肽为抗体；

[0038] [20][19]的纯化方法,其中所述抗体是双特异性抗体；

[0039] [21]通过[19]的方法纯化的抗体；

[0040] [22]通过[20]的方法纯化的双特异性抗体；和

[0041] [23]含有[13]的树脂的柱子。

[0042] [发明的效果]

[0043] 本发明提供了使用蛋白A树脂更有效地纯化含Fc区的多肽,特别是双特异性抗体的方法。

[0044] 附图的简要说明

[0045] 图1显示了当BiAb溶液连续加载到蛋白A树脂柱上时检测从柱中排出的蛋白质的穿透曲线层析图。

[0046] 实施本发明的方式

[0047] 以下将详细描述本发明。

[0048] 本发明中使用的含Fc区的多肽可以含有抗体Fc区,它们包括通过将Fc区与另一种多肽(例如抗体)融合而形成的多肽。

[0049] 本发明的“多肽”通常是指约10个氨基酸或更长的肽和蛋白质。此外,它们通常是来自生物体的多肽,但没有特别限制,例如,它们可以是包含人工设计序列的多肽。此外,它们可以是天然存在的多肽,合成多肽,重组多肽等中的任何一种。

[0050] “Fc区”一般是指包含两条多肽链的区域,所述多肽链由抗体分子中的铰链部分或其部分,CH2结构域和CH3结构域组成,但不特别限于此,也有不包括铰链部分或其部分的情况。按照Kabat的EU编号,人IgG类Fc区是指,例如,从半胱氨酸位置226到C末端,或从位置230的脯氨酸至C末端的区域,但并不限于此。此外,人CH2结构域是指根据Kabat的EU编号的位置231至340,并且人CH3结构域是指根据Kabat的EU编号的位置341至447,但并不限于此。

[0051] Fc区可以优选通过使用蛋白酶如胃蛋白酶部分消化IgG1, IgG2, IgG3, 含Fc区的单克隆抗体等,然后再次洗脱吸附在蛋白A树脂上的级分来获得。蛋白酶没有特别限制,只要其能够消化全长抗体,从而通过适当设定pH等酶反应条件来以受限方式生成Fab和F(ab')₂即可,例子包括胃蛋白酶和木瓜蛋白酶。

[0052] Fc区的实例包括人IgG型Fc,并且例如它们可以是IgG1, IgG2, IgG3和IgG4同种型中的任何一种。

[0053] 本发明的Fc区包含上述的第一多肽链和第二多肽链。

[0054] 本发明的一个实施方案是增加蛋白A柱层析中含Fc区多肽对蛋白A树脂的动态结合能力的方法。包含在Fc区中的第一多肽链和第二多肽链优选具有对蛋白A树脂的彼此不同的结合活性。例如,当使用与蛋白A树脂结合的多肽链作为第一多肽链时,可以使用不与蛋白A结合或与第一多肽链相比,与第一多肽链的结合较弱的多肽链作为第二多肽链。作为第一多肽链,可以使用包含IgG1, IgG2或IgG4的CH3的多肽链,作为第二多肽链,可以使用包含IgG3的CH3的多肽链。在这种情况下, IgG1, IgG2, IgG3和IgG4可以是天然存在的,或者它们可以在允许实现本发明的目的的范围包括突变。此外,作为第一多肽链,可以使用根据EU编号的位置435是His (H) 的多肽链。作为第二多肽链,可以使用根据EU编号的位置435为

Arg (R) 的多肽链。此外,根据EU编号的位置435和436分别是His (H) 和Tyr (Y) 的多肽链可以用作第一多肽链。其中根据EU编号的位置435和436分别是Arg (R) 和Phe (F) 的多肽链可以用作第二多肽链。根据EU编号的位置435或436以外的位置可以与天然存在的IgG的那些位置相同或不同。

[0055] 在该实施方案中,增加蛋白A柱层析中含Fc区多肽对树脂的动态结合能力可以通过修饰与树脂结合的含Fc区多肽的Fc区来完成,从而Fc区的第一多肽链和Fc区的第二多肽链与树脂的结合活性将彼此不同。

[0056] 在本发明的另一个实施方案中,在蛋白A柱层析中提高含Fc区的多肽对树脂的动态结合能力可以通过修饰与树脂结合的含Fc区的多肽的Fc区来完成,从而Fc区的第一多肽链与树脂结合,但Fc区的第二条多肽链不与树脂结合或与第一多肽链相比,显示与树脂的结合较弱。

[0057] 修饰的实例包括但不限于进行修饰以使得Fc区的第一和第二多肽链将包含如上所述的CH3区,例如,进行修饰使得包含在指定的位置上的上述特定氨基酸。

[0058] 另一方面,本发明中使用的含Fc区的多肽中的Fc区以外的区域可以是同源形式或异源形式。

[0059] 同源形式具有1个或2个以上均一或相同的抗原结合活性(即,含Fc区的多肽为抗原结合分子时,是指具有1个或2个以上均一或相同的抗原结合活性的抗原结合分子,其为例如具有两个相同抗原结合位点的IgG型抗体)。

[0060] 异源形式优选具有不同的抗原结合活性(即,含Fc区的多肽是双特异性抗原结合分子,例如双特异性抗体)。当用于本发明的含Fc区的多肽是双特异性抗体时,尽管H链可以是异源的,但L链可以是共同的L链,并且共同的L链优选为两条H链提供结合能力。当双特异性抗体是IgG型抗体时,它由两条异源H链和两条相同的共同L链组成。

[0061] 结合能力包括静态结合能力(SBC)和动态结合能力(DBC)。静态结合能力是指树脂可以吸附的多肽的量的上限,动态结合能力是指当含多肽的溶液流过柱子时可以收集多肽的程度。具有大动态结合能力的树脂即使在高线性流速下也能够有效地吸附多肽,并且可以在短时间内完成多肽纯化。

[0062] 例如,动态结合能力(DBC)可以通过以下方法确定。首先,将装载有树脂的柱置于层析装置中,使含有多肽的样品溶液以规定的线性流速流过柱子。然后,测量洗脱液的吸光度,并且当测量添加的样品溶液的吸光度的特定比例(例如,5%)的穿透(BT)时,通过鉴定添加的多肽的质量来确定DBC。

[0063] 以下装置等可用于DBC计算:

[0064] • LC装置:由GE Healthcare制造的AKTA AVANT25

[0065] • 软件:由GE Healthcare制造的Unicorn版本6.1

[0066] • 蛋白A树脂:由GE Healthcare制造的Mab Select SuRe (Cat No.17-5438-05) 或 Hitrap Mab Select SuRe (Cat No.11-0034-93)

[0067] • 缓冲液:

[0068] 平衡/初步洗涤-20mmol/L磷酸钠,pH7.5

[0069] 洗脱-50mmol/L乙酸

[0070] 再生-0.1mol/L NaOH

[0071] 计算DBC的方法可以如下进行。

[0072] 使用上述设备,软件和树脂,并通过以下程序进行层析操作,计算DBC。以5%BT为指标的计算方法如下所示。

[0073] (1) 使装载级分(IgG浓度:P g/L)流过LC装置而不通过层析柱,确认100%泄漏(=100%BT)的 OD_{280nm} 的值。该值表示为a。

[0074] (2) 将0.05乘以a得到的值定义为5%BT时的 OD_{280nm} 。该值表示为 $b_{5\%}$ 。

[0075] (3) 允许装载级分连续流过一定量的平衡树脂(r L),当 OD_{280nm} 值达到 $b_{5\%}$ 时,从层析图中读取装载级分的体积。该值表示为 $c_{5\%}$ L。

[0076] (4) 通过等式 $(P \times c_{5\%})/r$ 获得的值被计算为 $DBC_{5\%}$,其是在5%BT处的动态结合能力。

[0077] $DBC_{5\%} = (P \times c_{5\%})/r$ (单位:g/L树脂)

[0078] 在确定 $DBC_{10\%}$ 时,可以通过类似的方式确定 $c_{10\%}$ 来进行计算。

[0079] 在本发明的一个实施方案中,当以5%BT作为标准时,蛋白A柱层析中蛋白A树脂的含Fc区的多肽的动态结合能力的增加为至少5g/L树脂,优选10g/L树脂或更多,15g/L树脂或更多,20g/L树脂或更多,和25g/L树脂或更多。

[0080] 在本发明的一个具体实施方式中,当以5%BT作为标准时,在3.4分钟的接触时间下,蛋白A柱层析中蛋白A树脂的含Fc区的多肽的动态结合能力的增加为至少5g/L树脂,优选10g/L树脂或更多,15g/L树脂或更多,20g/L树脂或更多以及25g/L树脂或更多。

[0081] 在本发明的一个实施方式中,根据本发明的方法,当以5%BT作为标准时,蛋白A柱层析中含Fc区的多肽用于蛋白A树脂的动态结合能力为至少45g/L树脂或更多,优选50g/L树脂或更多,55g/L树脂或更多,和60g/L树脂或更多。

[0082] 在本发明的一个具体实施方式中,根据本发明的方法,以5%的BT作为标准时,在3.4分钟的接触时间下,蛋白A柱层析中蛋白A树脂的含Fc区多肽的动态结合能力为至少50g/L树脂或更多,优选为51g/L树脂或更多,52g/L树脂或更多,53g/L树脂或更多,54g/L树脂或更多和55g/L树脂或更多。

[0083] 在本发明的一个实施方案中,含Fc区的多肽可以是其中Fc区与另一种蛋白质,生物活性肽等连接的多肽。其他蛋白质和生物活性肽的实例包括受体,粘附分子,配体(细胞因子,趋化因子等)和酶,但不限于此。它们可能是凝血因子,例如FIX, FIXa和FX。

[0084] 在本发明的一个实施方案中,含Fc区的多肽可以是免疫粘附素。

[0085] 在本发明的另一个实施方案中,含Fc区的多肽可以是抗体。本发明的抗体不受特别限制,只要它们结合感兴趣的抗原,并且它们可以是多克隆或单克隆抗体。单克隆抗体是优选的,因为它们可以稳定地产生为均质抗体。

[0086] 用于本发明的单克隆抗体不仅包括来源于动物如人,小鼠,大鼠,仓鼠,兔,绵羊,骆驼和猴的那些,而且还包括人工修饰的基因重组抗体,例如嵌合抗体,人源化抗体(也称为重构人抗体)和双特异性抗体。此外,它们还包括通过人工修饰抗体恒定区等产生的基因重组抗体,以改变抗体分子的物理性质,特别是改变等电点(pI),修饰对Fc受体的亲和力等,用于改善血液中的滞留和体内动力学的目的。

[0087] 本发明中使用的抗体的免疫球蛋白类别没有特别限定,并且该类别可以是任何类别,包括IgG,例如IgG1, IgG2, IgG3和IgG4, IgA, IgD, IgE和IgM。但是, IgG是优选的。

[0088] 本发明中使用的抗体不仅包括完整抗体,还包括抗体片段如Fv,Fab和F(ab)2以及微型抗体(低分子量抗体),例如一价或二价或更高价单链Fv,其通过接头如肽接头(scFv,sc(Fv)2,双抗体如scFv二聚体等)连接抗体可变区而形成。

[0089] 用于本发明的上述抗体可以通过本领域技术人员熟知的方法制备。

[0090] 基本上,可以使用如下所述的已知技术来制备产生单克隆抗体的杂交瘤。具体而言,根据常规免疫方法使用所需抗原的表达所需抗原的细胞作为敏化抗原进行免疫。产生的免疫细胞通过常规的细胞融合方法与已知的亲代细胞融合。通过常规筛选方法从融合细胞筛选单克隆抗体产生细胞(杂交瘤)以产生杂交瘤。可以例如根据Milstein et al.(Kohler,G.and Milstein,C.,Methods Enzymol.(1981)73:3-46)的方法产生杂交瘤。

[0091] 如下所述,可以通过修饰编码多肽的DNA中的一个或多个碱基并在宿主细胞中表达DNA来修饰氨基酸残基。本领域技术人员可以根据修饰后的氨基酸残基的类型容易地确定应该修饰的核苷酸的数量,位置和类型。

[0092] 在本发明中,“修饰”是指取代,缺失,添加,插入或其组合。

[0093] 除了上述氨基酸序列修饰之外,用于本发明的抗体还可以包括另外的改变。额外的修饰可以选自任何氨基酸取代,缺失和修饰,或其组合。具体而言,在其氨基酸序列中含有以下修饰的多肽都包括在本发明中:

[0094] • 用于提高双特异性抗体的两种H链的异源结合率的氨基酸修饰;

[0095] • 用于稳定在具有抗原结合活性的第一多肽和具有或不具有抗原结合活性的第二多肽之间形成的二硫键的氨基酸修饰;

[0096] • 用于改善血浆中抗体保留的氨基酸修饰;

[0097] • 改善酸性条件下的稳定性的修饰;

[0098] • 降低异质性的修饰;

[0099] • 抑制脱酰胺反应的修饰;

[0100] • 引入两种多肽之间等电点的差异的修饰;和

[0101] • 改变对Fc γ 受体的亲和力的修饰。

[0102] 获得人抗体的方法也是已知的。例如,具有抗原结合活性的所需人抗体可通过用目标抗原或表达目的抗原的细胞在体外敏化人淋巴细胞;并将致敏的淋巴细胞与人骨髓瘤细胞融合而获得。或者,也可通过用抗原免疫具有完整人抗体基因库的转基因动物来获得所需的人抗体。此外,通过使用人抗体文库淘选来获得人抗体的技术是已知的。例如,可以使用噬菌体展示法将人抗体的可变区表达为噬菌体表面上的单链抗体(scFv),然后可以选择结合抗原的噬菌体以获得人抗体。用于本发明的抗体还包括这样的人抗体。

[0103] 当分离抗体基因并将其引入合适的宿主中产生抗体时,可以适当组合使用宿主和表达载体。当真核细胞用作宿主时,可以使用动物细胞,植物细胞和真菌细胞。动物细胞包括哺乳动物细胞如CHO,COS,骨髓瘤,幼仓鼠肾(BHK),HeLa和Vero细胞。通过转化将感兴趣的抗体基因导入这些细胞中,然后在体外培养转化的细胞可以获得抗体。

[0104] 用于本发明的抗体的抗原不受特别限制,并且其可以是任何抗原。抗原的例子优选包括配体(细胞因子,趋化因子等),受体,癌抗原,MHC抗原,分化抗原,免疫球蛋白和部分含有免疫球蛋白的免疫复合物。例子包括凝血因子如FIX,FIXa和FX。

[0105] 为了收集表达产物,当多肽分泌到培养基中时收集培养基。当多肽在细胞内产生

时,细胞溶解,然后收集多肽。

[0106] 通过使用已知的方法,包括硫酸铵或乙醇沉淀,酸提取,阴离子或阳离子交换层析,磷酸纤维素层析,疏水相互作用层析,亲和层析,羟基磷灰石层析和凝集素层析,可以从重组细胞培养物中收集和纯化多肽。在本发明中,蛋白A亲和层析是优选的。在此,使用柱的纯化方法,使用柱的分离方法和层析可以同义地使用。使用蛋白A树脂的柱的实例包括POROS A(由Applied Biosystems制造),rProtein A Sepharose F.F(由GE制造),ProSep vA(由Millipore制造),但不限于此。

[0107] 此外,通过修饰完整蛋白A的氨基酸序列等产生的配体结合的树脂可以用于蛋白A亲和层析。当使用这种修饰的蛋白A树脂时,本发明的氨基酸修饰产生结合活性的差异,并且感兴趣的多肽多聚体可以被分离和纯化。修饰的蛋白A结合的树脂的实例包括mabSelect SuRE(由GE Healthcare制造)和Hitrap MabSelect Sure(由GE Healthcare制造),但不限于此。这里,填充有蛋白A树脂的柱子,使用蛋白A树脂的柱子,蛋白A树脂柱子和蛋白A柱子是同义的。此外,使用蛋白A树脂的纯化方法和使用蛋白A柱的纯化方法也可以同义地使用。

[0108] 本发明的一个实施方式是一种纯化含Fc区的多肽的方法,该方法使用蛋白A柱层析中的提高含Fc区的多肽对蛋白A树脂的动态结合能力的方法。更具体而言,一个实施方式是用于纯化抗体的方法,并且另一个实施方式是用于纯化双特异性抗体的方法。

[0109] 本发明的另一个实施方式是通过上述纯化方法纯化的含Fc区的多肽。更具体地,一个实施方式是通过上述纯化方法纯化的抗体,并且另一个实施方式是通过上述纯化方法纯化的双特异性抗体。

[0110] 此外,本发明的另一实施方式是以5%BT为标准,含Fc区的多肽以45g/L树脂或以上结合的蛋白A树脂,和含有该树脂的柱子。以5%BT为标准时,含Fc区的多肽对树脂和含树脂的柱的动态结合能力优选为50g/L树脂或更多,55g/L树脂或更多,60g/L树脂或更多和65g/L树脂或更多。

[0111] 此外,本发明的具体实施方式是含Fc区的多肽结合的蛋白A树脂,其中以5%BT为标准时,在接触时间为3.4分钟时,蛋白A柱层析中含Fc区的多肽对蛋白A树脂和含有树脂的柱子的动态结合能力为50g/L树脂或以上。接触时间为3.4分钟时,以5%BT作为标准,含Fc区的多肽对于树脂和含树脂的柱的动态结合能力优选为51g/L树脂或更多,52g/L树脂或更多,53g/L树脂或更多,54g/L树脂或更多,以及55g/L树脂或更多。

[0112] 本发明的一个实施方案是含Fc区的多肽,其在蛋白A柱层析中对蛋白A树脂具有增加的动态结合能力。更具体地,在一个实施方案中,含Fc区的多肽是抗体,并且在另一个实施方案中,含Fc区的多肽是双特异性抗体。

[0113] 在本发明的一个实施方案中,在以5%BT作为标准时,蛋白A柱层析中含蛋白A树脂的含Fc区多肽的动态结合能力的增加为至少5g/L树脂,优选10g/L树脂或更多,15g/L树脂或更多,20g/L树脂或更多和25g/L树脂或更多。

[0114] 在本发明的一个具体实施方式中,在以5%BT作为标准时,在3.4分钟的接触时间下,蛋白A柱层析中蛋白A树脂的含Fc区多肽的动态结合能力的增加为至少5g/L,优选10g/L树脂或更多,15g/L树脂或更多,20g/L树脂或更多,和25g/L树脂或更多。

[0115] 在蛋白A柱层析中对蛋白A树脂的动态结合能力增加的含Fc区的多肽中,优选Fc区中包含的第一多肽链和第二多肽链对蛋白A树脂具有不同的结合活性。例如,当使用与蛋白

A树脂结合的多肽链作为第一多肽链时,与第一多肽相比,不与蛋白A树脂结合或与蛋白A树脂弱结合的多肽链可以用作第二多肽链。作为第一多肽链,可以使用包含IgG1,IgG2或IgG4的CH3的多肽链。作为第二多肽链,可以使用包含IgG3的CH3的多肽链。在这种情况下,可以使用天然存在的IgG1,IgG2,IgG3和IgG4,或者它们可以在允许实现本发明的目的范围内包含突变。此外,作为第一多肽链,可以使用根据EU编号的位置435是His (H) 的多肽链。作为第二多肽链,可以使用根据EU编号的位置435为Arg (R) 的多肽链。此外,根据EU编号的位置435和436分别是His (H) 和Tyr (Y) 的多肽链可以用作第一多肽链。其中根据EU编号的位置435和436分别是Arg (R) 和Phe (F) 的多肽链可以用作第二多肽链。根据EU编号的位置435或436以外的位置可以与天然存在的IgG的那些位置相同,也可以不同于天然存在的IgG的那些位置。

[0116] 本发明的一个实施方式是使用蛋白A树脂制造含Fc区多肽的方法,其包括以下步骤:

[0117] (a) 制备Fc区的第一多肽链和第二多肽链,所述第一多肽链和第二多肽链对树脂具有彼此不同的结合活性;

[0118] (b) 比较步骤(a)的含Fc区的多肽对蛋白A柱层析中的蛋白A树脂的动态结合能力与含有对蛋白A柱层析中的蛋白A树脂基本上相同的结合活性的两条多肽链的含Fc区的多肽的动态结合能力;

[0119] (c) 使包含含有Fc区第一多肽链的多肽和含Fc区第二多肽的多肽的样品与树脂接触;和

[0120] (d) 收集包含异源多肽的含Fc区的多肽,所述异源多肽包含含有Fc区的第一多肽链的多肽和包含Fc区的第二多肽的多肽。

[0121] 上述步骤(a)可以是制备与树脂结合的第一多肽链作为Fc区的第一多肽链,并制备第二多肽链作为Fc区的第二多肽链的步骤,该第二多肽链不结合树脂或显示与树脂的较弱结合(与上述第一多肽链与树脂的结合相比)。此外,上述步骤(a)可以是对作为纯化目标的包含Fc区的多肽的Fc区进行修饰以使Fc区的第一多肽链结合至树脂的步骤,但是Fc区的第二多肽链不与树脂结合或显示与树脂的较弱结合(与上述第一多肽链与树脂的结合相比)。修饰没有特别限定,只要其是用于得到具有上述特征的Fc区的修饰即可,实例包括将第一多肽链修饰为包含IgG1,IgG2或IgG4的CH3的多肽链,将第二多肽链修饰成包含IgG3的CH3的多肽链。这种修饰的实例包括根据EU编号将第一多肽链中的位置435修饰为His,并且根据EU编号将第二多肽链中的位置435修饰为Arg。其他修饰的实例包括根据EU编号将第一多肽链的位置435和436分别修饰为His (H) 和Tyr (Y),并且根据EU编号将第二多肽链的位置435和436修饰为Arg (R) 和Phe (F)。根据EU编号的位置435或436以外的位置可以与天然存在的IgG的那些位置相同或不同。

[0122] 在上述步骤(b)中,两条多肽链可以是任何多肽链,只要它们对树脂的结合活性基本相同,并且两条多肽链之间的同源性可以高或低。例如,“含有对该树脂具有基本上相同的结合活性的两条多肽链的含Fc区的多肽”是包含两条第一多肽链的含Fc区的多肽或包含两条第二多肽链的含Fc区的多肽。此外,对蛋白A树脂具有基本上相同的结合活性的两条多肽链的实例包括:两条多肽链,其是各自包含IgG1,IgG2或IgG4的任何CH3的多肽链;两条多肽链,其是各自包含IgG3的CH3的多肽链;两条多肽链,其中多肽链中根据EU编号的位置435

都是His (H) 或都是Arg (R) ;两条多肽链,其都是这样的多肽链,其中根据EU编号的位置435和436分别是His (H) 和Tyr (Y) ;两条多肽链,其都是这样的多肽链,其中根据EU编号的位置435和436分别是Arg (R) 和Phe (F) 。

[0123] “基本上相同”意味着不一定完全相同,只要这在可以实现本发明的目的的范围内,并且意思包括是“相同的”。

[0124] 在本发明的一个实施方案中,上述步骤(b)中的“比较”可以是与在蛋白A柱层析中包含对树脂具有基本相同的结合活性的两条多肽链的含Fc区的多肽对蛋白A树脂的动态结合能力相比较,“确认步骤(a)的含Fc区的多肽对蛋白A柱层析中蛋白A树脂的升高”的动态结合能力的步骤。

[0125] 通过比较或确认动态结合能力,可以知道当生产抗体时可以加载到蛋白A树脂柱上的抗体的最大量,并且这使得能够有效地产生抗体。

[0126] 在上述步骤(c)中描述的样品可以包含两种不同的L链多肽或共同的L链多肽,其可以提供对包含Fc区的第一多肽链的多肽的H链和包含有Fc区的第二多肽链的多肽的H链的结合能力。

[0127] 在本发明的一个实施方式中,上述含Fc区的多肽的纯化方法中,含Fc区的多肽为抗体,在另一实施方式中,含Fc区的多肽为双特异性抗体。

[0128] 上述步骤(a)至(d)不必按照该顺序执行,并且每个步骤可以被包括多次。

[0129] 本发明的一个实施方式是使用蛋白A树脂纯化含Fc区多肽的方法,其包括以上步骤(a)至(d)。

[0130] 本文明确引用的所有专利和参考文献全部引入本说明书中作为参考。

[0131] 本发明将通过以下实施例进一步说明,但是本发明的技术范围不应被解释为限于此。

实施例

[0132] [实施例1]抗体基因表达载体的制备和各抗体的表达

[0133] 在实施例中,使用W02012/067176中记载的具有置换FVIII功能活性的抗FIXa/FX双特异性抗体(H1链/H2链/L链:SEQ ID NO:1/2/3)(在下文中,这被称为“BiAb”,其是所谓的异源抗体)。BiAb包含由三种链组成的四条链。四条链由H1链和H2链(这两条链是两种类型的H链),和两条相同的L链(其是一种类型的L链)组成。该抗体通过W02012/067176中所述的方法获得。将抗体基因插入动物细胞表达载体中。通过用载体转染CHO细胞,表达双特异性抗体。此外,通过上述方法获得了包含两条L链和两条H1链的“Q homo”,以及包含两条L链和两条H 2链的“J homo”。

[0134] 该抗体是IgG4型的,H1链的Fc区中根据EU编号的位置435的His被Arg取代。该取代减弱或消除了Fc区对蛋白A树脂的结合活性。

[0135] [实施例2]评估动态结合能力(DBC)的方法

[0136] 一般来说,通过使用连接到UV检测器的纯化装置通过UV监测描绘连续加载的蛋白质从层析柱中排出作为层析图中的穿透曲线(下文称为“BTC”)的行为来描述DBC。作为示例,使用BiAb时的BTC层析图如图1所示。

[0137] 通过比较抗体分子和它们的混合物中5%穿透点(BT点)的负载量来评价DBC。

[0138] 以下装置等用于DBC计算：

[0139] • LC装置：由GE Healthcare制造的AKTA AVANT25

[0140] • 软件：由GE Healthcare制造的Unicorn版本6.1

[0141] • 蛋白A树脂：由GE Healthcare制造的Mab Select SuRe (Cat No.17-5438-05) 或 Hitrap Mab Select SuRe (Cat No.11-0034-93)

[0142] • 缓冲液：

[0143] 平衡/初步洗涤-20mmol/L磷酸钠,pH7.5

[0144] 洗脱-50mmol/L乙酸

[0145] 再生-0.1mol/L NaOH

[0146] 计算DBC的方法如下进行。

[0147] 使用上述装置,软件和树脂,并且通过如下进行层析操作来计算DBC。

[0148] (1) 一次允许装载级分(IgG浓度:Pg/L) 流过LC设备而不通过柱,并确认100%渗漏(=100%BT)的 OD_{280nm} 的值。该值表示为a。

[0149] (2) 将0.05和a相乘得到的值定义为5%BT时的 OD_{280nm} 。该值被表示为 $b_{5\%}$ 。

[0150] (3) 使装载级分连续流过设定量的平衡树脂(r L),当 OD_{280nm} 值达到 $b_{5\%}$ 时,从层析图读取装载级分的体积。该值表示为 $c_{5\%}$ L。

[0151] (4) 通过等式 $(P \times c_{5\%})/r$ 获得的值计算为 $DBC_{5\%}$,其是在5%BT下的动态结合能力。

[0152] $DBC_{5\%} = (P \times c_{5\%})/r$ (单位:g/L树脂)

[0153] 当确定 $DBC_{10\%}$ 时,通过以相同方式确定 $c_{10\%}$ 来进行计算。

[0154] [实施例3]单独每种抗体分子的DBC

[0155] Q homo,J homo和BiAb各自的DBC在以下条件下测定：

[0156] 柱:Hitrap MabSelect Sure (以下称作MSS) (GE Healthcare),

[0157] 0.7×2.5厘米

[0158] 装载材料:使用每种纯化的抗体标准品,模拟实际负载CM的IgG浓度,pH和电导率的材料。

[0159] IgG浓度:约2g/L;pH7.5;电导率:1.2S/m。

[0160] 纯度约为80%的J homo,纯度约为85%的Q homo和纯度约为95%的BiAb。

[0161] 接触时间:3.4分钟(43.75厘米/小时)

[0162] 结果如表1所示。

[0163] [表1]

IgG	5% BT g/L 树脂
BiAb	58.0
J Homo	32.8
Q Homo	31.2

[0165] 结果表明,BiAb的DBC显著高于J homo和Q homo的DBC。

[0166] [实施例4]为BiAb的DBC验证pH和接触时间

[0167] 接着,确认了改变装载溶液的pH值和树脂上的接触时间时BiAb单独的DBC,确认了两个参数的效果。条件如下所示:

[0168] • 柱:MabSelect Sure (GE Healthcare), 1.0x 20厘米

[0169] • 装载材料:纯化的模拟CM的BiAb标准品 (BiAb:95%)的稀释制剂:2g/L;pH 6.5-8.0 (验证);电导率:1.2S/m

[0170] • 接触时间:3-8分钟 (验证)

[0171] 结果显示在表2中。

[0172] [表2]

[0173]	5% BT	150 cm/h	350 cm/h	400 cm/h
	g/L 树脂	8 min	3.4 min	3 min
	pH 6.5	未测试	55.5	未测试
[0174]	pH 7.0	未测试	54.2	未测试
	pH 7.5	63.2	52.3	49.2
	pH 8.0	未测试	51.7	未测试

[0175] [实施例5]BiAb和Homo的混合物中的DBC

[0176] 在实际上装载到蛋白A树脂 (以下称为“HCCF”) 上的培养上清液中,BiAb,J homo和Q homo作为混合物存在。更具体地说,从回收作为感兴趣物质的BiAb的观点来看,J homo和Q homo可以被认为是与BiAb竞争的物质。因此,在考虑实际生产时,在HCCF中存在一定量的J homo和Q homo的条件下验证BiAb的DBC是有意义的。为了验证,在以下条件下进行实验:

[0177] • 柱:Hitrap MabSelect Sure (MSS) (GE Healthcare), 0.7x 2.5cm

[0178] • 装载材料:纯化的BiAb和模拟CM的Homo标准品的混合物:

[0179] 2g/L;pH 7.5;Cond:1.2S/m

[0180] 对照BiAb (95%) J homo:BiAb:Q homo=5:95:0

[0181] Mimic A J homo:BiAb:Q homo=10:83:7

[0182] Mimic B J homo:BiAb:Q homo=10:68:22

[0183] • 接触时间:3.4分钟 (43.75厘米/小时)

[0184] • BTC的装载被分割,并且每个BT点的BiAb/Homo比率由AnalyticalCIEC确认。

[0185] 分析CIEC的条件如下:

[0186] • HPLC装置:由Waters制造的Alliance 2695/2487

[0187] • 软件:Waters制造的Empower3

[0188] • CIEC柱:Thermo scientific制造的ProPac WCX-10,产品号No.054993

[0189] • 柱温:30℃

[0190] • 注射量:30g/注射

[0191] • 缓冲液:

[0192] 流动相A-9.6mmol/L Tris,6.0mmol/L哌嗪,11.0mmol/L咪唑,pH6.0

[0193] 流动相B-9.6mmol/L Tris,6.0mmol/L哌嗪,11.0mmol/L咪唑,150mmol/L NaCl,pH 10.1

[0194] • 梯度条件:

	时间 (min)	流速 (mL/min)	%A	%B
	0.0	1.0	100	0
[0195]	1.0	1.0	100	0
	20.0	1.0	0	100
	35.0	1.0	0	100

[0196] 结果如表3所示

[0197] [表3]

样品		5% BT	10% BT	15% BT	20% BT
对照	g/L 树脂	58.0	-	-	-
	BiAb 95% J : BiAb : Q	4 : 96 : 0			
Mimic A	g/L 树脂	51.0	58.2	63.1	65.5
	J : BiAb : Q	5 : 55 : 40	5 : 55 : 40	5 : 57 : 38	6 : 59 : 36
Mimic B	g/L 树脂	38.8	42.8	45.9	-
	J : BiAb : Q	0 : 3 : 97	0 : 3 : 97	0 : 2 : 98	

[0199] 从以上结果中发现以下内容。

[0200] • DBC: J homo \approx Q homo < BiAb

[0201] • 与MSS的亲合力: Q homo < BiAb < J homo

[0202] • 参数对BiAb DBC的影响:

[0203] pH: 在pH6.5-8.0的范围内, 虽然较低的pH倾向于产生较高的DBC, 但影响很小。

[0204] 接触时间: 在3到8分钟的范围内, 尽管较长接触时间趋于产生更高的DBC, 但即使在3分钟时, DBC也不低于Q homo和J homo的DBC。

[0205] 关于对MSS的亲合力, 结果反映了本发明的特征, 并且在实施例5中通过泄漏的顺序表现出来

[0206] 另一方面, 关于DBC, 推测与MSS树脂的亲合力差异和配体的可用性产生了所述结果。更具体地说, 因为J homo具有两个与MSS配体强结合的序列, 所以它在两个位点与MSS树脂结合。也就是说, 存在于被J homo占据的区域中的MSS配体不能被使用。另一方面, 由于BiAb仅具有一个具有与MSS强结合的序列的位点, 其空间自由度高于J homo, 并且通过有效利用更多MSS配体可实现高DBC。Q homo具有低DBC的原因仅仅在于分子整体的结合活性低。此外, 认为Q homo和J homo竞争性地抑制BiAb与MSS的结合。

<110> 中外制药株式会社
 <120> 提高含FC区多肽纯化效率的方法
 <130> C1-A1520P
 <150> JP 2015-255726
 <151> 2015-12-28
 <160> 3
 <170> PatentIn version 3.5
 <210> 1
 <211> 448
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 人工合成的肽序列
 <400> 1

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Tyr Tyr
 20 25 30

[0001] Asp Ile Gln Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Ser Ser Ile Ser Pro Ser Gly Gln Ser Thr Tyr Tyr Arg Arg Glu Val
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg Arg Thr Gly Arg Glu Tyr Gly Gly Gly Trp Tyr Phe Asp Tyr
 100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly
 115 120 125

Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser
 130 135 140

Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val
 145 150 155 160

Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe

	165	170	175
	Pro Ala Val 180	Leu Gln Ser Ser Gly 185	Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val 190
	Thr Val Pro 195	Ser Ser Ser Leu Gly 200	Thr Gln Thr Tyr Thr Cys Asn Val 205
	Asp His Lys 210	Pro Ser Asn Thr Lys 215	Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys 220
	Tyr Gly Pro 225	Pro Pro Cys Pro Pro Cys 230	Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly 235 240
	Pro Ser Val 245	Phe Leu Phe Pro Pro Lys 250	Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile 255
	Ser Arg Thr 260	Pro Glu Val Thr Cys 265	Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu 270
	Asp Pro Glu 275	Val Gln Phe Asn Trp 280	Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His 285
[0002]	Asn Ala Lys 290	Thr Lys Pro Arg Glu 295	Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg 300
	Val Val Ser 305	Val Leu Thr Val Leu His 310	Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys 315 320
	Glu Tyr Lys 325	Cys Lys Val Ser Asn Lys 330	Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu 335
	Lys Thr Ile 340	Ser Lys Ala Lys Gly 345	Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr 350
	Thr Leu Pro 355	Pro Ser Gln Lys Glu 360	Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu 365
	Thr Cys Leu 370	Val Lys Gly Phe Tyr 375	Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp 380
	Glu Ser Asn 385	Gly Gln Pro Glu Asn Asn 390	Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val 395 400
	Leu Asp Ser 405	Asp Gly Ser Phe Phe 410	Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp 415
	Lys Ser Arg 420	Trp Gln Glu Gly Asn 425	Val Phe Ser Cys Ser Val Met His 430

Glu Ala Leu His Asn Arg Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
 435 440 445

<210> 2
 <211> 444
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 人工合成的肽序列

<400> 2

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ser Glu Leu Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Asn
 20 25 30

Asn Met Asp Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45

Gly Asp Ile Asn Thr Arg Ser Gly Gly Ser Ile Tyr Asn Glu Glu Phe
 50 55 60

[0003] Gln Asp Arg Val Ile Met Thr Val Asp Lys Ser Thr Asp Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Thr Tyr His Cys
 85 90 95

Ala Arg Arg Lys Ser Tyr Gly Tyr Tyr Leu Asp Glu Trp Gly Glu Gly
 100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe
 115 120 125

Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu
 130 135 140

Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp
 145 150 155 160

Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu
 165 170 175

Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser
 180 185 190

Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro
 195 200 205

Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro
210 215 220

Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe
225 230 235 240

Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro
245 250 255

Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val
260 265 270

Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr
275 280 285

Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val
290 295 300

Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys
305 310 315 320

Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser
325 330 335

[0004]

Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro
340 345 350

Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val
355 360 365

Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly
370 375 380

Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp
385 390 395 400

Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp
405 410 415

Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His
420 425 430

Asn His Tyr Thr Gln Glu Ser Leu Ser Leu Ser Pro
435 440

<210> 3
<211> 214
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>

<223> 人工合成的肽序列

<400> 3

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Arg Asn Ile Glu Arg Gln
 20 25 30

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

Tyr Gln Ala Ser Arg Lys Glu Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

Ser Arg Tyr Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Ser Asp Pro Pro Leu
 85 90 95

[0005] Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
 100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
 115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
 130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
 145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
 165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
 180 185 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
 195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210

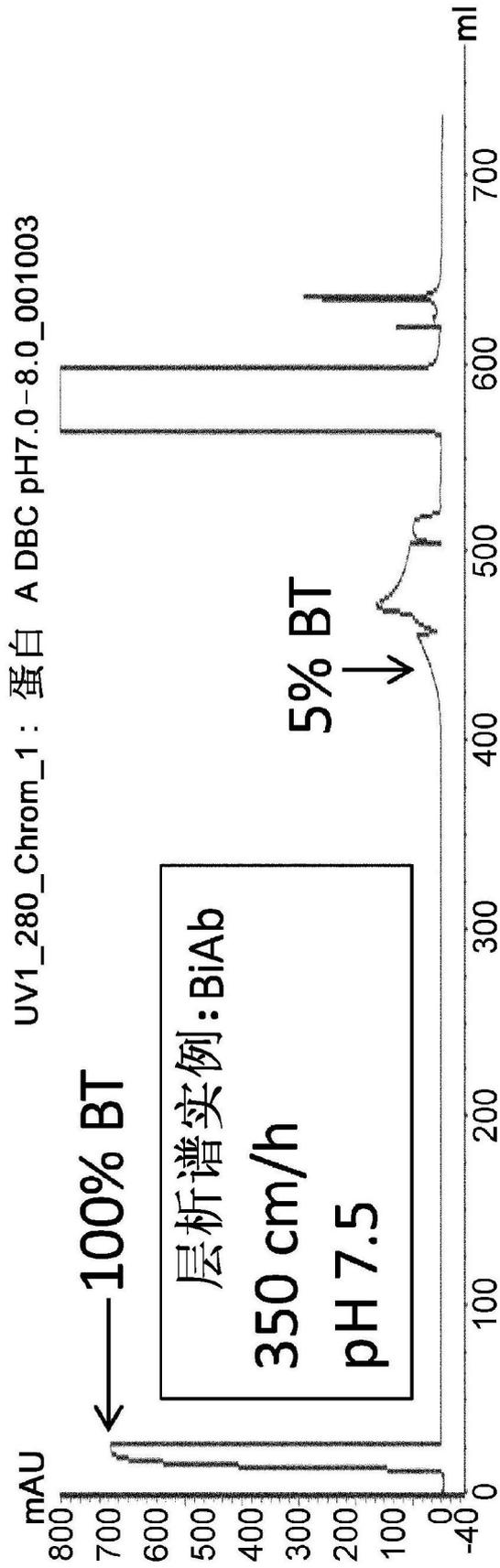


图1