[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 01804669.X

[51] Int. Cl[7]
C12N 15/55
C12N 15/56 C12N 15/57
C12N 9/56 C12N 9/54
C12N 9/64 C12N 9/20
C12N 9/42 C12N 9/24
C12N 1/21 C11D 3/386
A23K 1/165 A61K 38/46

[43] 公开日 2003 年 5 月 14 日

[11] 公开号 CN 1418253A

[22] 申请日 2001.1.22 [21] 申请号 01804669.X

[30] 优先权

[32] 2000. 2. 8 [33] US [31] 09/500,135

[86] 国际申请 PCT/US01/02204 2001.1.22

[87] 国际公布 WO01/59130 英 2001.8.16

[85] 进入国家阶段日期 2002.8.7

[71] 申请人 金克克国际有限公司

地址 美国加利福尼亚

[72] 发明人 D·A·埃斯特尔 F·A·哈丁

[74] 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专利商标事务所

代理人 唐伟杰

A61K 38/47 A61K 38/48

权利要求书 3 页 说明书 30 页 附图 24 页

[54] 发明名称 产生改变的免疫原性应答的蛋白质及制备和应用这种蛋白质的方法

[57] 摘要

本发明涉及产生高和低变态反应原性组合物的新方法和组合物。 本发明具体包括中和或减少 T—细胞识别表位的能力，因此防止个体对蛋白质的致敏性。 或者，T—细胞表位被突变以产生增加的免疫原性反应。 而且，提供了天然存在的蛋白质。

ISSN1008-4274

1. 包含 T 细胞表位的目的多肽的变异体，其中所述变异体由于具有改变的 T-细胞表位而不同于所述目的多肽，以致所述变异体和所述多肽在个体中产生不同的免疫原性应答。

2. 权利要求 1 的变异体，其中所述变异体产生的所述免疫原性应答比所述目的多肽产生的所述免疫原性应答弱。

3. 权利要求 1 的变异体，其中所述变异体产生的所述免疫原性应答比所述目的多肽产生的所述免疫原性应答强。

4. 权利要求 1 的变异体，其中所述目的多肽选自酶、激素、因子、疫苗和细胞因子。

5. 权利要求 1 的变异体，其中所述目的多肽不能被所述个体识别为所述个体内源性的。

6. 权利要求 1 的变异体，其中所述目的多肽是选自脂肪酶、纤维素酶、内切葡糖苷酶 H、蛋白酶、糖酶、还原酶、氧化酶、异构酶、转移酶、激酶和磷酸酶的酶。

7. 权利要求 1 的变异体，其中所述 T-细胞表位是经氨基酸置换而被改变的。

8. 权利要求 1 的变异体，其中通过用所述目的多肽的同系物的对应末端部分置换包含所述 T-细胞表位的所述目的多肽的末端部分，改变所述 T-细胞表位，其中所述同系物不包含与所述被置换的 T-细胞表位同样的 T-细胞表位。

9. 权利要求 8 的变异体，其中所述变异体包含至少一个比所述目的多肽和所述结合的同系物弱的 T-细胞表位。

10. 权利要求 8 的变异体，其中所述变异体包含至少两个比所述目的多肽和所述结合的同系物弱的 T-细胞表位。

11. 编码权利要求 1 的变异体的核酸。

12. 包含权利要求 11 的核酸的表达载体。

13. 被权利要求 12 的表达载体转化的宿主细胞。

14. 包含权利要求 6 的变异体的清洁组合物、动物饲料组合物、或处理纺织品的组合物。

15. 权利要求 1 的变异体，进一步包含可药用的载体。

16. 清洁组合物、动物饲料组合物、或处理纺织品的组合物，包含与同类型的另一酶相比，产生降低的免疫原性应答的天然存在的酶。

17. 权利要求 16 的组合物，其中所述类型是蛋白酶。

18. 权利要求 16 的组合物，其中所述酶是蛋白酶 K。

19. 测定蛋白质产生的免疫原性应答的方法，包括:

(a) 从单一血源获得树突细胞的溶液，及原初的 CD4+和/或 CD8+ T-细胞的溶液;

(b) 在所述树突细胞溶液中促进分化;

(c) 将所述分化树突细胞溶液和所述原初的 CD4+和/或 CD8+ T-细胞与所述蛋白质混合; 及

(d) 测定在所述步骤(c)中 T - 细胞的增殖。

20. 权利要求 19 的方法，进一步包括将所述免疫原性应答与另一蛋白质比较。

21. 权利要求 20 的方法，其中所述蛋白质和所述另一蛋白质相互是同系物。

22. 权利要求 20 的方法，其中所述蛋白质和所述另一蛋白质均是蛋白酶。

23. 权利要求 20 的方法，其中所述蛋白质和所述另一蛋白质均是相同蛋白质的不同肽。

24. 改变目的多肽的免疫原性的方法，包括:

a) 测定所述多肽的免疫原性;

b) 鉴定所述多肽中的 T-细胞表位; 和

c) 改变所述 T-细胞表位以改变所述多肽的免疫原性。

25. 权利要求 24 的方法，其中所述 T-细胞表位通过具有至少一个氨基酸置换而被改变。

26. 权利要求 25 的方法，其中所述氨基酸置换是通过改变编码所述

T-细胞表位的核酸进行的。

27. 权利要求 24 的方法，其中所述 T-细胞表位通过用所述目的多肽的同系物的对应部分置换包含所述 T-细胞表位的所述目的多肽的一部分而被改变，其中所述对应部分不包含所述 T-细胞表位。

28. 权利要求 27 的方法，其中所述部分是所述目的多肽的末端部分。

产生改变的免疫原性应答的蛋白质及制备和应用这种蛋白质的方法

发明背景:

用在工业，制药和商业应用中的蛋白质正日益普遍。结果，由于这种普遍的应用引起的日益增加的暴露与一些安全的危害有关，而这些安全危害是某些人对多肽敏感引起的，于是随后的暴露引起了可能是有害的，甚至是致命的极度的变态反应。例如，众所周知，蛋白酶在一些个体中引起危险的超敏反应。因此，尽管蛋白酶在工业中，例如，洗衣洗涤剂，化妆品，纺织品处理中等等的用途，以及例如，提供在去垢性情况下具有更有效的去污的改进的蛋白酶的领域中进行的广泛的研究，但是由于它们能在一些人中产生超敏感性的变态反应原的应答，在工业中蛋白酶的用途一直存在疑问。

已经做了大量的工作以减轻这些问题。在被探索以减少蛋白酶应用的免疫原的可能性的这些策略中，有改进生产过程，这个改进的生产过程通过控制和使车间的携带有空中传播的蛋白酶的尘粒或烟雾剂的浓度最小化来减少可能的接触；改进制粒法，这个改进的制粒法减少了实际上产生于蛋白酶产物的灰尘或烟雾剂的量；和改进回收方法以减少在最终产物中潜在的变态反应性污染物的水平。然而，实质上，减少蛋白酶变态反应原性的努力还相当不成功。此外，已进行尝试掩饰被超敏感个体中免疫球蛋白E(IgE)识别的蛋白酶中的表位(PCT公开号:WO 92/10755)，或通过连接聚合物或肽/蛋白质到有疑问的蛋白酶上以增大抗原决定簇或改变其性质。

当一个适应性免疫应答以一种夸大的或不适合的形式出现时，经历这个反应的个体被称为是超敏感的。超敏感性反应是正常地有益的免疫应答不适合地起作用的结果，而且有时引发炎症反应和组织损伤。它们能被许多抗原引发；而且超敏感性反应从一个个体到另一个个体的原因将

是不同的。超敏感性通常在初次和抗原接触时不出现，而是常在随后接触后出现。当 IgE 应答被引导抗无害的环境的抗原，如花粉、尘埃微粒或动物的毛皮垢屑时，一种形式的超敏感性就出现了。结果，IgE 致敏的肥大细胞释放药理学介体，产生急性发炎反应，伴随着如哮喘或鼻炎的症状。

但是，包括修饰 IgE 位点的策略在阻止初期的致敏反应的产生方面通常不会成功。因此，这样的策略，虽然可能中和或减少随后的超敏感性反应的严重性，但是将不会减少实际致敏的数量或人。例如，当知道一个人对某抗原是超敏感性的时，通常的，而且仅有的处理这种情况的安全的方法是尽可能彻底地把超敏感性的人和抗原隔离。实际上，任何其它的起作用的过程对于超敏感性的个体的健康都将是危险的。因此，尽管减少特定的蛋白对于超敏感性的个体的威胁是重要的，而对于工业的目的而言，使一个蛋白质不能首先引发超敏感性的反应是更有价值的。

T-淋巴细胞（T-细胞）在免疫应答的诱导和调节，及在免疫学的效应物功能的完成中是重要的角色。抗感染因子和肿瘤的特异的免疫已知依赖于这些细胞，而且这些细胞被认为对损伤的愈合起作用。另一方面，不能控制这些应答可能导致自身侵袭。一般而言，抗原以抗原提呈细胞的形式被提呈到 T-细胞，这些抗原提呈细胞通过各种细胞表面机制，以一种适合于被 T-细胞抗原识别的方式捕获和显示抗原或部分抗原。一旦在 T-细胞表面的受体（T-细胞受体）识别了特异性的表位，T-细胞开始了一系列的复杂的相互作用，包括增殖，导致 B－细胞产生抗体。虽然 T-细胞和 B-细胞都被存在于给定的蛋白或肽上的表位激活，但是被这些单核细胞识别的实际的表位通常是不同的。实际上，激活 T-细胞引发免疫多样性发生的表位很少和在免疫应答的过程中被 B-细胞后来识别的表位是相同的。因此，在超敏感性方面，虽然在 T-细胞和抗原间特异性的抗原相互作用在对抗原暴露的免疫应答的引发中是一个至关重要的要素，但是那种相互作用的特异性，即被识别的表位，常常与随后完全的过敏反应的发展是无关的。

PCT 公开号 WO 96/40791 公开了利用聚环氧烷作为一种起始物质产生

具有减少的变态反应原性的聚环氧烷－多肽缀合物的一种方法。

PCT 公开号 WO 97/30148 公开了具有减少的变态反应原性的多肽缀合物，包括含有被共价连接的两个或多个多肽分子的一个聚合载体分子。

PCT 公开号 WO 96/17929 公开了具有减少的变态反应原性的多肽的方法，包括将 1 到 30 个聚合分子缀到一个母本多肽上的步骤。

PCT 公开号 WO 92/10755 公开了生产蛋白质变异体的方法，这些蛋白质变异体在动物中诱发减少的免疫原性应答。在这个申请中，目的蛋白，一系列蛋白酶和变异体被用于免疫大鼠。然后，来源于鼠的血清被用于测定在免疫血清中已产生和存在的多克隆抗体对目的蛋白和其变异体的反应性。从这些结果，可能确定在制备物中的抗体是相对多还是相对少地与蛋白质和其变异体反应，因此允许分析蛋白质中何种改变可能中和或降低免疫球蛋白结合的能力。从对大鼠的试验中，得出的结论是与枯草杆菌蛋白酶 309 各残基中 127、128、129、130、131、151、136、151、152、153、154、161、162、163、167、168、169、170、171、172、173、174、175、176、186、193、194、195、196、197、247、251、261 对应的任何一个改变都将引起免疫潜力的改变。

PCT 公开号 WO 94/10191 公开了低变态反应原性的蛋白，包括母本单体蛋白的寡聚物形式，其中寡聚体实质性地保留了活性。

虽然一些研究已提供了减少某些蛋白变态反应原性及识别在一些个体中引起过敏反应的表位的方法，但是用于鉴定这些表位的检测通常包括预先被暴露于抗原的血清中的 IgE 和 IgG 抗体的测定。然而，一旦免疫球蛋白 Ig 反应被引发，致敏就已经出现了。因此，需要一种测定最先引起致敏的表位的方法，因为这些表位的中和将明显地引起致敏出现的较小的可能性，因此降低了引发致敏的可能性。也需要产生一种产生加强的免疫原性应答（immunogenic response）的蛋白质，而且需要鉴定产生低的免疫原性应答的天然存在的蛋白质。本发明满足了这些和其它的需要。

发明概述

本发明提供了产生期望的免疫原性应答（immunogenic response）的蛋白质，鉴定和制备这种蛋白质的方法，及应用这种蛋白质的方法。例如，从下面的本发明的详细的说明中显而易见，本发明提供的方法和组合物在形成高和低变态反应原性组合物中是有用的。本发明所用的高和低分别表示与没有本发明蛋白的相同的组合物比较，产生较强的或较弱的免疫原性应答的组合物。这样的组合物可以包括清洁组合物，纺织品处理物，隐形眼镜清洗溶液或产品，肽水解产品，废物处理产品，包括用于皮肤、头发及口腔护理的化妆品，药物如除血液凝结块的产品，科研用的产品，如酶，及包括疫苗的治疗剂。

在本发明的一个方面，本发明筛选和提供了目的多肽。优选地，目的多肽有 T-细胞表位，而且随后如下面所说明的被改变。然而，也可以以天然存在的属性为基础筛选目的多肽，而不改变目的多肽。而且，可以筛选没有 T-细胞表位的目的多肽，而且改变它，使它有 T-细胞表位。

在本发明的另一个方面，本发明提供包含 T-细胞表位的目的多肽的变异体。变异体由于具有改变的 T-细胞表位而不同于目的多肽，这样所述的变异体和所述的多肽在个体中产生不同免疫原性应答。可以制备和筛选变异体以产生比所述的目的多肽更强或弱的免疫原性应答。

目的多肽可以是任何目的多肽。在一个方面，该多肽选自酶、激素、因子、疫苗和细胞因子。在一个实施方案中，目的多肽没有被所述的个体识别作为对所述的个体是内源多肽，或没有被识别为“自身的”。如本发明所表明的，目的多肽可以是酶。在一个实施方案中，酶选自脂肪酶、纤维素酶、内切葡糖苷酶 H（endo-glucosidase H）、蛋白酶、糖酶、还原酶、氧化酶、异构酶、转移酶、激酶和磷酸酶。在一个优选的实施方案中，目的多肽和所述的目的多肽的变异体均包括至少一些相同的活性。例如，如果提供了蛋白酶的变异体，所述的变异体将产生改变的免疫原性应答，但仍旧保留有可检测到的，而且优选地可比较的蛋白酶活性。

在提供目的多肽的变异体时，T-细胞表位可以通过许多方式改变，这些方式包括氨基酸的置换、缺失、添加或它们的联合。优选地，通过进

行氨基酸的置换改变 T-细胞表位。在本发明的一个实施方案中，对目的多肽同系物的相应氨基酸进行氨基酸置换，其中的同系物与目的多肽在相应的位置不包括同样的 T-细胞表位。在一方面，包含至少一个 T-细胞表位的目的多肽的末端部分被用目的多肽的同系物的相应末端部分所置换，其中置换产生了所述的不同的免疫原性应答。在本发明提供的另一个实施方案中，提供了编码产生期望免疫原性应答的多肽的核酸。而且，本发明包括含有本发明提供的核酸的表达载体和宿主细胞。而且，一旦本发明的多肽和它的变异体被鉴定，它们的实质上同源的序列或与多肽和变异体杂交的序列可以被鉴定，而且本发明提供了这样的序列。下面同源性被进一步定义，而且可以称为相似性或同一性，优选同一性。优选地，同源的序列是编码具有本发明提供的多肽和变异体的活性的肽的氨基酸序列或核酸。

本发明的另一个方面是测定蛋白质产生的免疫原性应答的方法。在一个实施方案中，该方法包括(a)从单一血源获得树突细胞的溶液，及原初的（naive）CD4+和/或 CD8+ T-细胞的溶液；(b)在所述的树突细胞的溶液中促进分化；(c)将所述的分化的树突细胞的溶液和所述的原初的 CD4+和/或 CD8+ T-细胞与所述的蛋白混合；及(d)测定在所述的步骤(c)中 T-细胞的增殖。

测定蛋白质产生的免疫原性应答的方法也可以用于鉴定蛋白质的类似的免疫原性应答。因此，在一个方面，测定蛋白质免疫原性应答的方法进一步包括比较一个或多个蛋白质的免疫原性应答。蛋白质相互间可能是同系物，相同蛋白质的变异体，相同蛋白质的不同类型，例如，不同的蛋白酶，或相同的蛋白的不同肽。

进一步，本发明提供了改变目的多肽免疫原性的方法，包括测定所述的多肽的免疫原性；鉴定在所述的多肽中的 T-细胞表位；改变所述的 T-细胞表位，以改变所述的多肽的免疫原性。如本发明所说明的，所述的改变可以通过改变单一的氨基酸或用同系物的相应部分替换目的多肽的一部分，其中这种替换产生改变的免疫原性应答。

通过下面的说明，熟练的技术人员将理解本发明的其它方面。

附图的简要说明

图 1 中 A，B1，B2 与 B3 所示是解淀粉芽孢杆菌（Bacillus amyloliquefaciens）的枯草杆菌蛋白酶（BPN′）的 DNA（SEQ ID: NO 1）和氨基酸（SEQ ID: NO 2）序列，及这个基因的部分限制性内切酶图谱。

图 2 显示来源于解淀粉芽孢杆菌（SEQ ID: NO 3）与迟缓芽孢杆菌（Bacillus lentus）（野生型）（SEQ ID: NO 4）的枯草杆菌蛋白酶中的保守的氨基酸残基。

图 3A 和 3B 显示来源于解淀粉芽孢杆菌（BPN′），枯草芽孢杆菌，地衣芽孢杆菌（Bacillus licheniformis）（SEQ ID: NO 5）及迟缓芽孢杆菌的枯草杆菌蛋白酶的氨基酸序列对比。

标记 * 表示与枯草杆菌蛋白酶 BPN′比较，缺少特定的氨基酸残基。

图 4 显示 16 个外周单核血样品对相应于迟缓芽孢杆菌蛋白酶（GG36）的肽的加性的 T-细胞应答（additive T-cell response）。肽 E05 包括含有与解淀粉芽孢杆菌蛋白酶的 170－173 对应的残基的区域。

图 5 显示 10 个外周单核血样品对相应于人枯草杆菌蛋白酶分子的肽的加性的 T-细胞应答。肽 F10、F9、F8 和 F7 都含有相应于这样的区域的氨基酸序列 DQMD，所述区域包含与图 3 的序列对比中解淀粉芽孢杆菌蛋白酶 170－173 位相应的残基。

图 6A 和 6B/6C 分别显示与来源于迟缓芽孢杆菌蛋白酶和人枯草杆菌蛋白酶的序列的肽对应的氨基酸串。

图 7 所示的是人的枯草杆菌蛋白酶的氨基酸序列（SEQ ID: NO 6）。

图 8 显示 BPN′（解淀粉芽孢杆菌）蛋白酶，SAVINASE（迟缓芽孢杆菌）蛋白酶和人的枯草杆菌蛋白酶（S2HSBT）的氨基酸序列对比。

图 9 显示从一个已知的对迟缓芽孢杆菌蛋白酶超敏感的个体提取的样品中，对来源于迟缓芽孢杆菌蛋白酶的肽的 T-细胞应答。肽 E05 代表与解淀粉芽孢杆菌蛋白酶中的 170－173 对应的区域。

图 10 显示从一个已知对迟缓芽孢杆菌蛋白酶超敏感的个体提取的样品中，对在 E05 迟缓芽孢杆菌蛋白酶肽组中的各种丙氨酸置换的 T-细胞

应答。

图 11 显示从一个已知对蛋白酶超敏感的个体提取的一样品中，对在 E05 蛋白酶肽（被命名为非修饰序列的一个 T-细胞表位的实施方案）组中的各种丙氨酸置换的 T-细胞应答；每个肽的序列被示出。

图 12 显示对人的枯草杆菌蛋白酶分子应答者的百分率。

图 13A 显示对源于 Humicola insolens endogluconase(接受号: A23635)的肽的 T-细胞应答。肽 A02 和 F06 代表分别与 Humicola insolens endogluconase 的第 70－84 和 37－51 位残基（T 细胞表位的实施方案）相对应的区域，其中图 13B 中所示是全长序列，以粗体下划线所示的是 A02 和 F06。

图 14A 所示的是对源于 Thermomyces lanuginosa 脂肪酶(接受号: AAC08588 和 PID 号 g2997733)的肽的 T-细胞的应答。肽 B02 和 C06 代表分别与 Thermomyces lanuginosa 脂肪酶的 T-细胞表位实施方案第 83－100 和 108－121 位残基相对应的区域，其中图 14B 中所示的是全长序列，以粗体下划线所示的是 B02 和 C06。

图 15A 所示的是对源于褶皱链霉菌（Strepotomyces plicatus）的内切－β－N－乙酰氨基葡糖苷酶(接受号: P04067)的肽的 T-细胞应答。肽 C06 代表与褶皱链霉菌的内切－β－N－乙酰氨基葡糖苷酶的 T-细胞表位实施方案第 126－140 位残基相对应的区域，其中图 15B 中所示的是全长序列，以粗体下划线所示的是 C06。

图 16 所示的是对 22 个个体搜集的源于 BPN′的肽的 T-细胞应答，其中优选的 T-细胞表位的序列被示出。

图 17 所示的是对 22 个个体搜集的源于 GG36 的肽的 T-细胞应答，其中示出的是 T-细胞表位实施方案的序列，优选的是 GSISYPARYANAMAVGA 和 GAGLDIVAPGVNVQS 序列。

图 18 是本发明提供的杂种蛋白的实施方案，其中 N-末端包括 N-末端的 GG36 序列，C-末端包括 C-末端的 BPN′序列，而且其中这些序列与图 8 中所示那些序列比较表明形成的杂合物缺失了每个蛋白的优选的 T-细胞表位。

本发明的详细说明

根据本发明，提供了鉴定 T-细胞表位的方法。而且，可以根据本发明的方法鉴定具有相对无效的或相对有效的 T-细胞表位，或无 T-细胞表位的包括天然出现蛋白质在内的蛋白质。因此，本发明允许产生期望的免疫原性应答的蛋白质的鉴定和产生，包括天然存在的蛋白质及被突变以产生适合应答的蛋白质。应理解，有时术语蛋白质、多肽和肽可互换使用。其中肽是蛋白质的一部分，熟练的技术人员通过术语应用的上下文能理解这点。

在一个实施方案中，本发明提供了鉴定表位和非表位的检测法，如下：分化的树突细胞与原初的人的 CD4+和/或 CD8+ T-细胞及目的肽混合。更详细地，所提供的识别 T-细胞表位的方法包括如下步骤：(a)从单一血源获得树突细胞的溶液，及原初的 CD4+和/或 CD8+ T－细胞的溶液；(b)在所述的树突细胞的溶液中促进分化；(c)将所述的分化的树突细胞的溶液和所述的原初的 CD4+和/或 CD8+ T－细胞与目的肽混合；(d)测定在所述的步骤(c)中的 T-细胞的增殖。

在一个实施方案中，用于分析的目的肽源于目的多肽。在本发明的实践中，可能精确地鉴定能在个体或个体的采样中引起致敏性的表位的位置。在本发明的一个优选的实施方案中，制备了与目的多肽的全部或部分相对应的一系列肽寡聚物。例如，产生了覆盖了蛋白质的相关的部分或全部的肽文库。在一个实施方案中，产生肽的方法是引入重叠至肽文库中，例如产生与主题蛋白质的氨基酸序列 1－10 对应的第一肽，与主题蛋白质的氨基酸序列 4－14 对应的第二肽，与主题蛋白质的氨基酸序列 7－17 对应的第三肽，与主题蛋白质的氨基酸序列 10－20 对应的第四肽等等，直到与整个分子相对应的代表性的肽都产生为止。通过在本发明提供的检测法中单独分析每个肽，可能精确地鉴定出 T-细胞识别的表位的位置。在上述的实例中，一个特定的肽比它的邻接的肽的较强的反应将有利于表位锚定区域鉴定在三个氨基酸内。测定这些表位的位置后，可能改变每个表位内的氨基酸，直到肽产生了不同于原始蛋白的的

T-细胞应答。作为替代方案，可以用表位的原始的形式以刺激抗感染因子或肿瘤细胞等靶标的免疫应答。而且，可以用本发明鉴定有期望的高或低T-细胞表位效力的蛋白质，它们可以以天然存在的形式被应用。

用在本发明中的“抗原提呈细胞”指的是提呈抗原在其表面以致可被T-细胞表面上的受体识别的免疫系统细胞。抗原提呈细胞的例子是树突细胞、交错突细胞、活化的B细胞和巨噬细胞。

用在本发明中的“T-细胞增殖”指的是在有或无抗原的情况下，T-细胞和抗原提呈细胞温育期间产生的T-细胞的量。

用在本发明中的“基线T-细胞增殖”指的是在缺少肽或蛋白质抗原的情况下，在个体中正常观察到的对抗原提呈细胞暴露应答的T-细胞增值。对于本发明的目的而言，基线T-细胞增值水平在每个个体的每个样品的基础上被测定为缺少抗原的情况下对抗原提呈细胞应答的T-细胞增值。

用在本发明中的“T-细胞表位”指的是在对包括那个抗原的肽的免疫应答的引发中被T-细胞受体识别的肽或蛋白质的特征。T细胞识别T细胞表位通常认为是通过这样的机理，在该机理中，T-细胞识别连接到在抗原提呈细胞上表达的I类或II类主要组织相容性（MHC）分子上的抗原的肽片段(参见,例如Moeller, G.主编，“Antigenic Requirements for Activation of MHC-Restricted Response,” *Immunological Review,* 98卷,187页(Copenhagen; Munksgaard)(1987)。

用在本发明中的“样品”包括原初的单个核细胞，即对于讨论的抗原未致敏的。

用在本发明中的“同系物”指的是与目的蛋白有类似的催化作用，结构和/或用途的蛋白质或酶。对于本发明的目的而言，同系物和目的蛋白不必是进化相关的，例如，不同种属的相同功能的蛋白质。期望发现一种与目的蛋白在三级和/或一级结构上相似的同系物，因为用同系物的类似片段置换目的蛋白中的表位将减少改变的破坏。因此，密切同源的酶将提供最期望的表位置换的来源。或者，如果可能，考虑给定的蛋白质的人的类似物是有益的。例如，用枯草杆菌蛋白酶的人的类似物（即

人的枯草杆菌蛋白酶）的序列置换细菌枯草杆菌蛋白酶中的特定表位将在该细菌蛋白中引起较弱的变态反应原性。

通过确保在表位上或其附近置换的氨基酸显示与目的蛋白中的氨基酸类似的功能，三级结构和/或保守的残基，可以确定“类似的”序列。这样，若表位区域包括，例如，α-螺旋或β-片层结构，则置换氨基酸将保持那种特定的结构。

根据本发明提供的检测法确定的表位随后被修饰以减小或增大目的蛋白的免疫潜能。在一个优选的实施方案中，在一个样品中，将要被修饰的表位产生比基线T-细胞增殖大3倍的T-细胞增殖水平。当被修饰时，在一个样品中，表位产生比基线T-细胞增殖小3倍的，优选比基线T-细胞增殖小2倍的，最优选比基线T-细胞增殖小或实质上相同的T-细胞增值水平。

优选地，通过下面的方式之一修饰表位：(a)用目的蛋白的人同系物的类似序列置换表位的氨基酸序列；(b) 用目的蛋白的非人同系物的类似序列置换表位的氨基酸序列，其中，由于T-细胞表位的识别，类似的序列比目的蛋白质产生较弱的免疫原的，如变态反应原的应答；(c) 用实质上模拟表位的主要三级结构属性的序列置换表位的氨基酸序列，但是，其中，由于T-细胞表位的识别，这个序列比目的蛋白质产生较弱的免疫原的，如变态反应原性的应答；或(d) 由于T-细胞表位的识别，用任何比目的蛋白质产生较弱的免疫原的，如变态反应原性的应答的序列。

然而，本领域技术人员会容易地意识到表位可以以其它方式进行修饰，这取决于期望的结果。例如，如果期望得到T-细胞疫苗，则可考虑用通过增强的MHC结合和/或T-细胞识别增强对肽免疫应答的氨基酸置换表位的氨基酸序列。在另一个具体实例中，如果期望改变抗自身抗原的自身免疫应答，可考虑用在发炎或其它免疫应答中减少或引起转变的氨基酸置换表位的氨基酸序列。

本发明延伸到期望调节其免疫原性应答的所有蛋白质，例如，用做T-细胞疫苗的肽，或用做例如抗癌症，感染性疾病和自身免疫疾病的治疗因子的肽或蛋白质。本领域技术人员将会容易地意识到本发明的蛋白

质和肽不必然是天然的蛋白质和肽。实际上，在本发明的一个实施方案中，本发明说明的检测法被用于测定源于改组基因的蛋白质的免疫应答。基因改组和这样基因的表达的说明参见，Stemmer，*Pro. Nat'l Acad. Sci. USA* 91-10747 (1994)；Patten 等，*Current Opinion in Biotechnol.* 8:724 (1997)；Kuchner & Arnold，*Trends Biotechnol.* 15:523 (1997)；Moore 等，*J. Mol. Biol.* 272:336 (1997)；Zhao 等，*Nature Biotechnol.* 16:258 (1998)；Giver 等，*Pro. Nat'l Acad. Sci. USA* 95-12809(1998)；Harayama，*Trends Biotechnol.* 16:76 (1998)；Lin 等，*Biotechnol., Prog.* 15:467(1999)；和 Sun，*J. Comput. Biol.* 6:77 (1999)。该检测法被用于预测被改组的基因编码的蛋白质的免疫应答。一旦被确定，蛋白质可以改变以调节对该蛋白质的免疫应答。

除了上述的蛋白质和肽外，本发明能被用于减少蛋白质的变态反应原性。这些蛋白质包括，但不限于葡聚糖酶、脂肪酶、纤维素酶、内切葡糖苷酶 H（endo-H）、蛋白酶、糖酶、还原酶、氧化酶、异构酶、转移酶、激酶、磷酸酶、淀粉酶等等。除了减少天然存在的氨基酸序列对动物，如人的变态反应原性外，本发明包含减少突变的人的蛋白质的变态反应原性，如被改变的以改变蛋白质的功能活性的蛋白质。在许多情况下，人蛋白质的突变，例如增加活性，在突变的蛋白质中引起了新的 T-细胞表位的加入。本发明的检测法可以被用于确定新的 T-细胞表位的存在，和确定将减少突变蛋白质的变态反应原性的置换氨基酸。

尽管本发明包含上述的蛋白质和许多其它蛋白质，为简单起见，下面将说明一个特别优选的本发明的实施方案——蛋白酶的修饰。蛋白酶是羰基水解酶，它通常起作用切断蛋白质或肽的肽键。用在本发明中的蛋白酶指的是天然存在的蛋白酶或重组蛋白酶。天然存在的蛋白酶包括 α-氨酰肽水解酶，肽基氨基酸水解酶、酰基氨基水解酶、丝氨酸羧肽酶、金属羧肽酶、巯基蛋白酶、羧基蛋白酶和金属蛋白酶。丝氨酸、金属、巯基和酸性蛋白酶是被包括在内的，也包括内切和外切蛋白酶。

在本发明的另一个实施方案中，提供了杂种多肽。“杂种多肽”是来源于至少两个不同蛋白质的工程蛋白质，优选地，所述至少两个不同

的蛋白质相互是同系物。例如，一个优选的杂种多肽可以有一个蛋白质的 N－末端和该蛋白质的同系物的 C-末端。在一个优选的实施方案中，这两个末端可以被组合成对应全长的活性蛋白。在一个优选的实施方案中，同系物共有实质上的相似性，但是没有同样的 T-细胞表位。因此，在一个实施方案中，例如在 C-末端有一个或多个 T-细胞表位的目的多肽可以被同系物的 C-末端置换其 C-末端，该同系物的 C-末端有较弱的 T-细胞表位，较少的 T-细胞表位，或无 T-细胞表位。因此，本领域技术人员理解，通过能鉴定在同系物中的 T-细胞表位，能形成产生不同免疫原应答的各种变体。而且可以理解，内部和多个同系物能被用于产生本发明的变异体。

更一般地，本发明提供的变异体可以通过前体氨基酸序列一个或多个氨基酸的置换、缺失、插入、或它们的联合来源于前体氨基酸序列。尽管这样的修饰优选地是针对编码前体酶的氨基酸序列的“前体 DNA 序列”，但是这样的修饰可能是通过前体蛋白质的操作。前体 DNA 序列这类操作的适合方法包括本发明公开的方法，也包括对这个领域技术人员共知的方法（参看，例如，EP 0328299，WO89/06279 及这里已经参考引用的美国专利和申请）。

枯草杆菌蛋白酶是细菌或真菌蛋白酶，通常通过切断蛋白质或肽的肽键起作用。用在本发明中的枯草杆菌蛋白酶指的是天然存在的枯草杆菌蛋白酶或重组枯草杆菌蛋白酶。一系列天然存在的枯草杆菌蛋白已知被各种微生物物种产生，并常常被其分泌。这个系列的成员的氨基酸序列不是完全同源的。然而，在这个系列中的枯草杆菌蛋白酶显示出相同或相似类型的蛋白水解活性。这类丝氨酸蛋白酶共有一个定义催化作用三联体的共同氨基酸序列，这将其与糜蛋白酶相关类型丝氨酸蛋白酶区别开。枯草杆菌蛋白酶和糜蛋白酶相关的丝氨酸蛋白酶都有催化作用三联体，这个三联体包含天冬氨酸、组氨酸和丝氨酸。在枯草杆菌蛋白酶相关的蛋白酶中这些氨基酸的相对的顺序，从氨基到羧基末端读是天冬氨酸－组氨酸－丝氨酸。然而，在糜蛋白酶相关的蛋白酶中，相对的顺序是组氨酸－天冬氨酸－丝氨酸。因此，本发明的枯草杆菌蛋白酶指的

是有枯草杆菌蛋白酶相关的蛋白酶的催化作用三联体的丝氨酸蛋白酶。实例包括但不限于本发明图 3 中鉴定的枯草杆菌蛋白酶。一般地，而且对于本发明的目的而言，在蛋白酶中氨基酸的编号是与图 1 所示分配给成熟的解淀粉芽孢杆菌枯草杆菌蛋白酶序列的编号是对应的。

“ 重组体 ”、“ 重组枯草杆菌蛋白酶 ”、“ 重组蛋白酶 ”指的是枯草杆菌蛋白酶或蛋白酶，其中编码枯草杆菌蛋白酶或蛋白酶的 DNA 序列被修饰产生变异体（或突变）DNA 序列，该 DNA 序列编码天然存在的氨基酸序列中一个或多个氨基酸的置换、缺失或插入。产生这样修饰、及可以与本发明公开的方法结合的适合方法包括在美国专利 4,760,025（RE 34,606），美国专利 5,204,015 和美国专利 5,185,258 中公开的方法。

“ 非人枯草杆菌蛋白酶 ”和编码它们的 DNA 可以从许多原核和真核生物中获得。原核生物体适合的例子包括革兰氏阴性生物，如大肠杆菌（*E.coli*）或假单胞菌，及革兰氏阳性菌，如微球菌或芽孢杆菌。可以得到枯草杆菌蛋白酶和它们的基因的真核生物的例子包括酵母，如酿酒酵母，真菌如曲霉属物种。

“ 人枯草杆菌蛋白酶 ”指的是人源的有枯草杆菌蛋白酶类型的催化活性的蛋白质，例如，Kexin 家族人源蛋白酶。这样的蛋白的实例如图 7 中的序列所示。此外，本发明提供了蛋白质的衍生物或同系物，包括来自于非人源如鼠或兔的那些，它们保持着肽的基本活性，如水解肽键的能力等等，同目的多肽有至少 50％，优选至少 65％，而且最优选至少 80％，更优选至少 90％，而且有时多达 95％或 98％的同源性。在一个实施方案中，目的多肽如附图所示。

本发明的氨基酸位置序号指的是图 1 所示分配给成熟的解淀粉芽孢杆菌枯草杆菌蛋白酶序列的序号。然而，本发明不限于这种特定枯草杆菌蛋白酶的突变，而延伸到含有与解淀粉芽孢杆菌枯草杆菌蛋白酶中特定指定残基 “ 等同的（equivalent）”位置的氨基酸残基的前体蛋白酶。在本发明的一个优选的实施方式中，前体蛋白酶是迟缓芽孢杆菌的枯草杆菌蛋白酶并在与上述列出的氨基酸残基对应的迟缓芽孢杆菌中的等同

氨基酸残基处进行置换、缺失或插入。

如果前体蛋白酶的残基（氨基酸）与解淀粉芽孢杆菌的枯草杆菌蛋白酶的特定残基或残基部分是同源的（即在一级或三级结构中位置是对应的）或类似的（即有相同或相似的化学上结合，反应或相互作用的功能能力），那么前体蛋白酶的残基（氨基酸）与解淀粉芽孢杆菌的枯草杆菌蛋白酶的残基是等同的。

本发明所用的“对应的”通常指的是沿着肽的类似位置。

为了确定与原始结构的同源性，前体蛋白酶的氨基酸序列直接和解淀粉芽孢杆菌的枯草杆菌蛋白酶的原初序列比较，特别是与在已知序列的枯草杆菌蛋白酶中已知不变的一组残基比较。例如，本发明图 2 所示的是解淀粉芽孢杆菌的枯草杆菌蛋白酶和迟缓芽孢杆菌的枯草杆菌蛋白酶间的保守残基。对比保守的残基后，为了保持对比，可以进行必要的插入和缺失（即避免通过任意的缺失和插入消除保守残基），与解淀粉芽孢杆菌枯草杆菌蛋白酶的原初序列中特定的氨基酸等同的残基被限定。保守残基的对比优选地应保守 100％的这样残基。然而，大于 75％或少至 50％保守残基的对比也足够限定等同的残基。催化作用三联体，Asp32/His64/Ser221 的保守性应被保持。

例如，解淀粉芽孢杆菌、枯草芽孢杆菌、地衣芽孢杆菌（carlsbergensis）和迟缓芽孢杆菌的枯草杆菌蛋白酶氨基酸序列可以被对比以提供氨基酸序列间的最大量的同源性。这些序列的比较表明在每个序列中包含有大量的保守的残基。在图 2 中鉴定出了在 BPN′ 和迟缓芽孢杆菌间保守的残基。

因此，这些保守的残基可被用于限定在其它枯草杆菌蛋白酶中解淀粉芽孢杆菌枯草杆菌蛋白酶对应的等同的氨基酸残基，如迟缓芽孢杆菌的枯草杆菌蛋白酶（PCT 公开号: W089/06279, 1989 年 7 月 13 日公开），本发明优选的蛋白酶前体酶，或与优选的迟缓芽孢杆菌枯草杆菌蛋白酶有高度同源性的称为 PB92（EP 0 328 299）的枯草杆菌蛋白酶。这些枯草杆菌蛋白酶的某些氨基酸序列在图 3A 和 3B 中与解淀粉芽孢杆菌的枯草杆菌蛋白酶的序列对比以产生保守残基的最大同源性。如所观察到的，

迟缓芽孢杆菌的枯草杆菌蛋白酶和解淀粉芽孢杆菌的枯草杆菌蛋白酶比较，在序列中存在大量的缺失。因此，例如，在解淀粉芽孢杆菌的枯草杆菌蛋白酶中 Val165 在其它枯草杆菌蛋白酶中的等同氨基酸，对于迟缓芽孢杆菌和地衣芽孢杆菌而言是异亮氨酸。

因此，例如，在解淀粉芽孢杆菌和地衣芽孢杆菌的枯草杆菌蛋白酶中 +170 位置的氨基酸是赖氨酸（K），Savinase 中是精氨酸（R）。然而，在本发明的蛋白酶变异体的一个实施方案中，与解淀粉芽孢杆菌枯草杆菌蛋白酶的 +170 位置等同的氨基酸被天冬氨酸（D）置换了。在本发明中对所有的氨基酸的缩写和一字母代码符合 PatentIn 用户手册（GenBank, Moutain View, CA）1990, 第 101 页。

通过用 “序列比较算法”也可以确定同源序列。可通过如下方式进行用于比较的最优序列对比，如通过局部的同源性算法(Smith & Waterman, *Adv. Appl. Math.* 2:482 (1981))，通过同源性对比算法(Needleman & Wunsch, *J. Mol. Biol.* 48:443(1970))，通过检索相似性的方法(Pearson & Lipman, *Pro. Nat'l Acad. Sci. USA* 85: 2444（1998）)，通过这些算法的计算机化工具（在 Wisconsing Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, W1 中的 GAP, BESTFIT, FASTA, TFASTA），或通过目测。

适合测定序列相似性的算法的一个例子是 BLAST 算法，这在 Altschul 等，*J. Mol. Biol.* 215:403－410 （1990）中说明了。进行 BLAST 分析的软件通过 The National Center for Biotechnology Information (http://www. ncbi. nlm. nih. gov/) 是公共可用的。这种算法包括: 首先，通过在查询序列中鉴定当在数据库序列中对比相同长度的字（word）时，或是匹配或是满足某正的域值分数 T 的长度为 W 的短字，鉴定出高分序列对（HSPs）。这些最初的邻近字命中，作为开始的点去发现包含它们的较长的 HSPs。这些字命中将沿着被比较的两个序列的每个的两个方向尽可能远的延伸，只要积累对比分值增大。当积累对比分值从获得的最大值回落数量 X 时；积累对比分值达到或低于零时；或任一个序列到达末端时，字命中延伸被停止。BLAST 算法的参

数 W，T 和 X 决定了对比的敏感性和速度。BLAST 程序使用默认的字长值（W）为 11，BLOSUM62 分值矩阵（参见 Henikoff & Henikoff *Pro. Nat'l Acad. Sci. USA* 89,10915-10919 (1989)）对比（B）值为 50，期望值（E）为 10，M′ 5，N′ 4 和两条链的对比。

随后 BLAST 算法对两个序列之间的相似性进行一个统计分析（参见例如 Karlin & Altschul *Pro. Nat'l Acad. Sci. USA* 90:5873-5787 (1993)）。BLAST 算法提供的一种相似性量度是最小的总概率（P(N)），这个值提供了两条核苷酸序列或氨基酸序列间偶然出现匹配的可能性的指标。例如一个氨基酸序列与一个蛋白质，如蛋白酶相比较，如果在比较中，最小总概率小于约 0.1，优选小于约 0.01，最优选小于约 0.001，那么认为这个氨基酸序列和该蛋白质是相似的。

也可以通过测定前体蛋白在三级结构水平上的同源性定义“等同的残基”，其中前体蛋白的三级结构已通过 x－射线晶体学被测定。等同的残基被定义为：在对比后，前体蛋白如蛋白酶和解淀粉芽孢杆菌枯草杆菌蛋白酶的特定氨基酸残基两个或多个主链原子（N 对 N，CA 对 CA，C 对 C，O 对 O）的原子坐标在 0.13nm 内，优选 0.1nm 内的残基。在最佳的模型已被定向和定位使得蛋白（如所述蛋白酶）和解淀粉芽孢杆菌的枯草杆菌蛋白酶的非氢蛋白原子的原子坐标有最大的重叠后，达到对比，最佳模型是晶体学模型，这个模型给出了在可用的最高的分辨率时，实验的折射数据的最低的 R 因子。

与解淀粉芽孢杆菌的枯草杆菌蛋白酶特定的残基功能类似的等同的残基被定义为前体蛋白如蛋白酶的这样的氨基酸：其采用一种构型，这样它们以一种限定的和归因于解淀粉芽孢杆菌枯草杆菌蛋白酶特定残基的方式改变、修饰或有助于蛋白结构，底物结合或催化作用。进一步，它们是前体蛋白，例如，蛋白酶（它的三级结构已通过 x－射线晶体学得到）的在一定程度上占有类似位置的那些残基，以致虽然在占有同源位置的基础上，给定残基的主链原子可以不满足等同物的标准，但是残基的侧链原子中至少两个的原子坐标位于解淀粉芽孢杆菌枯草杆菌蛋白酶的对应的侧链原子的 0.13nm 内。解淀粉芽孢杆菌枯草杆菌蛋白酶的三维

结构的坐标描述在 EPO 公开号 0 251 446 （与美国专利 5,182,204 是等同的，这个公开被并入本发明的参考文献中）中，而且能够按以上描述用于测定在三级结构的水平上等同的残基。

被鉴定用来置换、插入或缺失的一些残基是保守的残基，而其它的则不是。在残基不是保守的情况下，一个或多个氨基酸的置换被限于产生这种变异体的置换，该变异体具有与自然界中发现的氨基酸序列不对应的氨基酸序列。在保守残基的情况下，这样的置换不应产生天然存在的序列。本发明的变异体包括蛋白变异体的成熟形式，也包括该蛋白变异体的原（pro）-，前原（prepro）－形式。前原形式是优选的结构，因为这有利于蛋白变异体的表达，分泌和成熟。

“原序列”指的是结合在蛋白质成熟形式的N-末端部分的氨基酸序列，当这个原序列被除去产生了蛋白质的“成熟”的形式。在自然界中发现的许多蛋白水解的酶是翻译的酶原产物，而且在缺乏翻译后加工时以这种方式被表达。虽然其它的原序列也是可用的，一个优选的产生蛋白质变异体，如蛋白酶变异体的原序列是解淀粉芽孢杆菌枯草杆菌蛋白酶的推定的原序列。

“信号序列”或“前序列”指的是可以参与蛋白质的成熟或原形式分泌、结合到蛋白质的N-末端部分或蛋白原的N-末端部分的任何氨基酸序列。这种信号序列的定义是一个功能性的定义，意思是包括被蛋白质基因的N-末端部分编码的，在自然情况下参与蛋白质分泌实现的所有那些氨基酸序列。本发明利用了这样的序列实现本发明所定义的蛋白质变异体的分泌。一个可能的信号序列包含被融合至迟缓芽孢杆菌（ATCC 2153）枯草杆菌蛋白酶的其余信号序列的枯草芽孢杆菌枯草杆菌蛋白酶信号序列的最初7个氨基酸残基。

蛋白质变异体的“前原”形式由具有可操作地连接到蛋白质的氨基末端的原序列，及可操作地连接到原序列的氨基末端的“前”或“信号”序列的蛋白质的成熟形式组成。

“表达载体”指的是包含可操作地连接到适合控制序列的DNA序列的DNA结构，该控制序列能够实现所述的DNA在适合的宿主中表达。这

样的控制序列包括实现转录的启动子，控制这种转录的可选的操纵基因序列，编码适合的 mRNA 核糖体结合位点的序列及控制转录和翻译终止的序列。该载体可以是质粒，噬菌体颗粒，或简单地潜在的基因组插入物。一旦转化进入适合的宿主，载体可以复制和独立于宿主的基因组起作用，或可以，在某些情况下，整合其自身进入基因组。因为质粒是目前最普遍应用的载体形式，所以在本发明的说明书中，“质粒”和“载体”有时相互可互换地使用。然而，本发明旨在包括起等同作用的本领域已知或将已知的这样的其它形式表达载体。

用在本发明中的“宿主细胞”通常是原核或真核宿主，优选地，该宿主通过在美国专利 4,760,025（RE 34,606）中公布的方法操作而使得宿主不能分泌酶活性的内切蛋白酶。表达蛋白质的一个优选的宿主细胞是芽孢杆菌菌株 BG2036，它在酶活性的中性蛋白质和碱性蛋白酶（枯草杆菌蛋白酶）方面是缺陷的。在美国专利 5,264,366 中详细地说明了 BG2036 菌株的构造。表达蛋白质的其它的宿主细胞包括枯草芽孢杆菌 I168（也描述于美国专利 4，760，025（RE 34，606）和美国专利 5，264，366 中，其公布被并入本发明的参考文献中），和任何适合的芽孢杆菌株系，如地衣芽孢杆菌，迟缓芽孢杆菌等等。

宿主细胞被用重组 DNA 技术构建的载体转化或转染。这些技术能在任何分子生物学实践指南中被发现。例如，Sambrook 等，Molecular Cloning－A Laboratory Manual（第 2 版）卷 1－3，Cold Springs Harbor Publishing（1989）（“Sambrook”）；及 Current Protocols in Molecular Biology，Ausubel 等（eds.），Current Protocols，a joint venture between Greene Publishing Associate，Inc. 和 John Wiley & Sons，Inc.，（1997，增补）（“Ausubel”）。这样的转化宿主细胞具有复制编码蛋白质变异体的载体或表达期望的蛋白质变异体的能力。在编码蛋白质变异体的前－或前原－形式的载体的情况下，这样的变异体，当被表达时，通常从宿主细胞被分泌进入宿主细胞介质中。

“可操作地连接”，当说明两个 DNA 区域间的关系时，简单地指它们是功能上相互相关的。例如，一个前序列，如果它做为一信号序列起

作用，参与极可能涉及信号序列切割的蛋白质的成熟形式的分泌，则是可操作地被连接到肽上。如果启动子控制编码序列的转录，则启动子可操作地连接到编码序列上；核糖体结合位点如果被定位以允许翻译，则是可操作地被连接到编码序列上。

编码天然存在的前体蛋白质的基因可以按照本领域技术人员已知的常用方法获得。这些方法一般包括：合成具有编码目的蛋白区域的推定序列的标记探针，从表达蛋白质的生物体中制备基因组文库，通过和探针杂交筛选文库寻找目的基因。随后，阳性的杂交克隆被绘制图谱和测序。

可使用“杂交”分析是否给定的DNA片段或基因与本发明描述的DNA序列是对应的，而且因此在本发明的范围中。用于杂交的样品在琼脂糖凝胶上电泳（例如，0.8%的琼脂糖），这样DNA片段的分离通根据大小能被观察到。DNA片段通常通过溴乙锭染色观察。凝胶简单地在蒸馏水中被冲洗，接着在适合的溶液（如，例如，0.25M HCl）中轻轻振荡脱嘌呤，接着轻轻振荡变性30分钟（例如，在0.4 M NaOH 中）。可以包括一个复性步骤，其中凝胶被放入1.5 M NaCl，1 M Tris，PH 7.0中，同时轻轻振荡30分钟。然后，用转移溶液（例如，6 X SSC（900mM NaCl，90 mM柠檬酸三钠）），DNA被转移到一个适合的带正性电荷膜，例如最大强度的 Nytran Plus 膜（Maximum strength Nytran Plus membrane）(Schleicher & Schuell，Keene，N.H.)上。一旦完成转移，通常约 2个小时后，膜在例如 2 X SSC（2X SSC＝300mM NaCl，30 mM 柠檬酸三钠）中冲洗，室温下，空气中干燥。随后，膜应在一个适合的预杂交溶液（例如，100mL的水溶液含：20－50mL甲酰胺，25mL的20 X SSPE(1 X SSPE=0.18 M NaCl，1mM EDTA，10mM NaH_2PO_4，pH7.7) 20% 的SDS 2.5mL，和10mg/mL剪切的鲱鱼或鲑鱼精子DNA 1mL）中被预杂交（大约2个小时或以上）。正如本领域技术人员所知道的，根据常规的方法，在预杂交溶液中甲酰胺的量取决于获得的反应的属性是可以变化的。因此，在鉴定杂交分子方面，较低量的甲酰胺比用较高量的甲酰胺的同样程序可以引起更完全的杂交。另一方面，通过用较多的甲酰胺，可以更容易地视

觉鉴定强的杂交带。

标记与目的DNA序列互补的或几乎互补的，而且通常长度是在100-1000个碱基之间的DNA探针（例如，根据制造商的说明书，用Megaprime标记系统），以掺入^{32}P至DNA中。标记的探针通过加热到95℃5分钟被变性，而且立刻加到膜和预杂交溶液中。杂交反应应在合适的条件下进行合适的时间，例如，在37℃下18个小时，同时轻轻振荡或旋转。膜被冲洗（例如，在2 X SSC/0.3%SDS中），而且随后在适合的洗涤液中轻轻搅拌洗涤。期望的严谨性将是膜（滤膜）被冲洗的条件的反应。

具体地，一个给定反应的严谨性（即，成功杂交的必要同源性程度）将取决于杂交后滤膜的冲洗条件。本发明定义的“低的严谨性”条件将包括用0.2 X SSC/0.1% SDS的溶液在20℃下洗滤膜15分钟。“高的严谨性”条件包括进一步的洗涤步骤，包括用0.2 X SSC/0.1% SDS的溶液在37℃下第二次洗滤膜30分钟。

洗后，将膜干燥，检测结合的探针。如果^{32}P或其它的放射性同位素被用做标记试剂，可以通过放射自显影检测结合的探针。其它探针的其它观察技术对于本领域技术人员是共知的。结合的探针的检测表明核酸序列有期望的同源性，而且是包括在本发明内的。

为了表达蛋白质，随后克隆的蛋白质被用于转化宿主细胞。然后蛋白质基因被连接到高拷贝数的质粒中。这个质粒在宿主中复制，条件是，宿主包含有共知的质粒复制必需的元件：可操作地连接到所讨论的基因上的启动子（如果基因自己的同源的启动子被宿主识别，即转录，这个启动子可以被作为基因自己的同源的启动子提供），内源的或被蛋白质基因的内源终止子区域提供的转录终止和多聚腺苷酸化的区域（对于某些真核宿主细胞中蛋白质基因被宿主转录而来的mRNA的稳定是必需的），和期望地，筛选基因，如抗生素抗性基因，它能够通过生长在含有抗生素的培养基中使得被质粒感染的宿主细胞连续的培养维持。高拷贝数的质粒也包含宿主的复制原点，因此不受染色体的限制在细胞质中能产生大量的质粒。然而，整合蛋白质基因的多重拷贝进入宿主的基因组中是在本发明的范围内。对同源重组特别敏感的原核和真核生物体使这变得

容易了。

在一个实施方案中，基因可以是天然的基因，如源于迟缓芽孢杆菌和解淀粉芽孢杆菌的天然的基因。作为替代，可以产生编码天然存在的或突变的前体蛋白质的合成基因。在这样的一个方法中，确定前体蛋白质的 DNA 和/或氨基酸序列。此后，多个重叠的合成单链 DNA 片段被合成，它们通过杂交和连接产生编码前体蛋白质的合成 DNA。合成基因构建的一个例子参见美国专利 5，204，015 中的实施例 3，它的公开被并入本发明的参考文献中。

一旦天然存在的或合成的前体蛋白质基因已被克隆，就可以进行大量的修饰以增强基因超出天然存在的前体蛋白质的合成的应用。这样的修饰包括重组蛋白质的产生，如美国专利 4，760，025（RE 34，606）和欧洲专利公开号：0 251 446 公开的，和本发明说明的蛋白质变异体的产生。

尽管其它的方法也是可用的，下面的盒式诱变方法可以被利用来使得本发明蛋白质的变异体的构建变得容易。首先，获得编码蛋白质的天然存在的基因，整个或部分测序。然后，扫描序列寻找期望制造编码的酶的一个或多个氨基酸突变（缺失、插入或置换）的点。评价这个点的侧翼序列中用于用寡核苷酸库置换基因的短片段的限制性位点的存在，这个寡聚核苷酸库当被表达时将表达各种突变体。这样的限制性位点是优选在蛋白质基因内的单一的位点，这样方便基因片段的置换。然而，倘若通过限制性酶切消化产生的基因片段能够以正确的序列被重新组合，那么在蛋白质基因上的不是过度冗余的任何方便的限制性位点都是可用的。如果限制性位点没有在距离被选择的点的方便的距离内位置出现（距离 10-15 个核苷酸），以阅读框和被编码的氨基酸中均不在最终的结构中被改变的一种方式，通过在基因中置换核苷酸产生这样的位点。为了改变基因的序列以符合期望的序列的基因突变是按照通常共知的方法通过 M13 引物延伸完成的。定位适合的侧翼区域和评价得到两个方便的限制性位点的序列的所需的改变的任务是通过遗传密码的冗余，基因的限制性酶图谱和大量的不同的限制性酶常规地完成的。注意如果一个方便的侧翼的限制性位点是可用的，需要用的上述方法仅仅涉及不包含

位点的侧翼区域。

一旦天然存在的DNA或合成DNA被克隆，在将要被突变的这个位置的侧翼的限制性位点用同源限制性酶酶切，同时大量末端互补的末端寡聚核苷酸盒被连接到基因中。通过这个方法使得突变发生简化，因为所有的寡聚核苷酸能被合成有同样的限制性位点，而且对于产生限制性位点，合成的接头不是必需的。

本发明一个方面的目的是取得与前体蛋白质比较，有改变的变态反应原潜能的变异体蛋白，因为减少的这种潜能使得酶的应用更安全。尽管本发明用于降低变态反应原潜能，但是本发明的突变可以和这个领域共知的突变联合应用以产生与前体比较改变的热稳定性和/或改变的底物特异性，修饰的活性或改变的碱稳定性。

因此，本发明涉及改变包括迟缓芽孢杆菌中第170－173位残基的T-细胞表位诱导T-细胞增值的能力。本发明的一个特别优选的实施方案包括：修饰R170D，Y171Q和/或N173D中的一个或全部。相似地，如上述详细讨论的，据信在任何蛋白质中的对应残基的修饰将在那个蛋白质中引起重要的T-细胞表位的中和。因此，联合对应于氨基酸残基170－173的区域中目前公开的突变，在对应于N76D/S103A/V104I/G159D的位置的置换，可选地联合选自对应于解淀粉芽孢杆菌的枯草杆菌蛋白酶的V68A，T213R，A232V，Q236H，Q245R和T260A的一个或多个置换可以被利用，除了减少本发明的变异体的变态反应原性潜能外，也全面调节酶的稳定性和/或蛋白水解活性。相似地，本发明提供的置换可以联合迟缓芽孢杆菌枯草杆菌蛋白酶中等同位置+76处天冬酰胺(N)到天冬氨酸(D)的突变，并联合S103A/V104I/G159D突变，可选地，与选自对应于解淀粉芽孢杆菌的枯草杆菌蛋白酶V68A，T213R，A232V，Q236H，Q245R和T260A的位置的一个或多个置换联合，以产生由此产生的突变酶的加强的稳定性和/或加强的活性。

本发明的最优选的实施方式包括下面与对应于解淀粉芽孢杆菌的枯草杆菌蛋白酶的N76D/S103A/V104I/G159D/K170D/Y171Q/S173D;
V68A/N76D/S103A/V104I/G159D/K170D/Y171Q/S173D/Q236H;

V68A/N76D/S103A/V104I/G159D/K170D/Y171Q/S173D/Q236H/Q245R; V68A/N76D/S103A/V104I/G159D/K170D/Y171Q/S173D/A232V/Q236H/Q245R; 及 V68A/N76D/S103A/V104I/G159D/K170D/Y171Q/S173D/T213R/A232V/Q236H/Q245R/T260A 位置的置换残基的具体联合。尽管置换可以在任何芽孢杆菌蛋白中进行，但是这些置换优选在迟缓芽孢杆菌（重组的或天然类型的）枯草杆菌蛋白酶中进行。

基于用变异体蛋白质获得的筛选的结果，上述述及的在解淀粉芽孢杆菌枯草杆菌蛋白酶中的突变对于这些酶的蛋白水解活性，性能和/或稳定性和这样的变异体酶的清洁或洗涤性能是重要的。

本发明的许多蛋白质变异体在配制各种洗涤剂组合物方面是有用的。大量的共知的化合物是适合的表面活性剂，它们在包括本发明蛋白质突变体的组合物中有用。这些包括非离子的，阴离子的，阳离子的，阴离子或两性离子的洗涤剂，如在美国 4，404，128，Barry J. Anderson 和美国 Jiri Flora 等 4，261，868 中所公开的。一个适合的洗涤剂组合物描述在美国专利 5，204，015（前面被并入参考文献中）中的实施例 7 中。本领域技术人员熟习能被用做洗涤剂组合物的不同的制剂。除了典型的洗涤剂组合物外，本发明的蛋白质变异体可以被用于天然或野生的蛋白质被应用的任何目的是容易理解的。因此，这些变异体可以被用于，例如，固体或液体肥皂应用，洗碗制剂，清洗隐形眼镜的溶液或产品，肽水解作用，废物处理，纺织品应用，做为蛋白质生产中的融合物切割酶等等。除了减少的变态反应原性外，本发明的变异体可以包括，在洗涤剂组合物中增强的性能（同前体比较）。如本发明所用的，在洗涤剂中的增强的性能被定义为增强对某些酶敏感污迹如草或血液的清洗，这是在标准的洗涤循环后，通过常用的评估鉴定测定的。

本发明的蛋白质，尤其是蛋白酶能被制成 pH 在 6.5-12.0 间的共知的粉末的或液体的洗涤剂，它占洗涤剂重量的水平是约.01 到约 5%（优选.1 到.5%）。这些洗涤剂清洁组合物也可以包括其它的酶，如已知的蛋白酶、淀粉酶、纤维素酶、脂肪酶或内切糖苷酶，及助洗剂和稳定剂。

本发明的蛋白质，尤其是蛋白酶添加到传统的清洁组合物中不引起

任何特别的使用限制。换而言之，任何适合于洗涤剂的温度和 pH，只要 pH 是在上述的范围内，温度是在所描述的蛋白质的变性温度以下，也是适合本发明的组合物的。此外，本发明的蛋白质也能单独或和助洗剂和稳定剂联合被用于在没有洗涤剂的清洁组合物中。

本发明的变异体蛋白质能被包括在动物饲料中，作为如动物饲料添加剂的一部分，就如，例如在美国 5,612,055； 美国 5,314,692;美国 5,147,642 中说明的一样。

本发明的一个方面是包括本发明的变异体蛋白质的用于纺织品处理的组合物。这种组合物能被用于处理丝织品或毛织物，就如在出版物，如 RD216,034； EP134,267;US 4,533,359； 和 EP344,259 中说明的一样。

可以根据本领域共知的方法筛选变异体的蛋白水解活性。优选的蛋白酶变异体包括在对应于解淀粉芽孢杆菌枯草杆菌蛋白酶的
N76D/S103A/V104I/G159D/K170D/Y171Q/S173D;
V68A/N76D/S103A/V104I/G159D/K170D/Y171Q/S173D/Q236H;
V68A/N76D/S103A/V104I/G159D/K170D/Y171Q/S173D/Q236H/Q245R;
V68A/N76D/S103A/V104I/G159D/K170D/Y171Q/S173D/A232V/Q236H/Q245R； 及 V68A/N76D/S103A/V104I/G159D/K170D/Y171Q/S173D/T213R/A232V/Q236H/Q245R/T260A 的位置的多个置换。

当和本发明的蛋白质的前体蛋白质比较，本发明的蛋白质显示修饰的免疫原性。在一个优选实施方案中，该蛋白质显示减少的变态反应原性。在另一个实施方案中，蛋白质显示了增强的免疫原性。通过 B-细胞或体液免疫应答的增强，或通过 T-细胞或细胞免疫应答的增强，或通过 B-细胞和 T-细胞免疫应答的增强证明了免疫原性的增强。熟悉的人将容易地意识到本发明的蛋白质的用途很大部分是由蛋白质的免疫学性质所决定的。例如，显示了减少的变态反应原性的酶能被用在清洁组合物中。“ 清洁组合物 ”是能被用于从底料，如织物，盘碟、隐形眼镜，其它的固体底料，头发（洗发液），皮肤（肥皂和面霜）等等中除去不想要的化合物。

具有减少的变态反应原性的蛋白质，特别是纤维素酶，蛋白酶，和

淀粉酶也能被用在纺织品的处理中。“ 纺织品的处理”包括这样的工艺，其中纺织品，能被用于纺织，粘结或编织成纺织品或服装的单独的纱或纤维被处理以实现期望的特性。例如，这样的期望的特性是 “ 石洗”去起球、去毛、退浆、软化和本领域技术人员共知的其它的纺织品处理。

本发明也包括个体对其产生免疫应答的治疗蛋白质。特别地，缺乏该蛋白质内源生产的个体对于形成中和抗体是敏感的，而且变得难于治疗。同样地，蛋白质的修饰可以引入潜在地免疫原性的新的表位。本发明的方法能被用于鉴定和修饰表位，例如在人的因子 VIII 中，以阻止中和应答。

药物组合物可以以各种形式制备，如颗粒剂、片剂、丸剂、栓剂、胶囊剂、悬浮液、软膏、洗剂等等。药物等级的有机或无机载体和/或适合口服和局部应用的稀释剂能被用于组成包含治疗活性化合物的组合物。稀释剂对于这个领域是共知的，包括含水的介质，植物和动物油和脂肪。稳定剂、润湿剂和乳化剂，用于改变渗透压的盐或用于获得适当 pH 值的缓冲液，及皮肤渗透增强剂能被用做辅助剂。药物组合物也可以包括下面的一个或多个：载体蛋白，如血清白蛋白；缓冲液；填料如微晶纤维素、乳糖、谷物和其它淀粉；结合剂；甜味剂和其它的调味剂；着色剂；和聚乙二醇。添加剂在本领域是共知的，而且用于各种制剂中。

本发明参考的所有出版物和专利完整地做为参考文献被并入。下面是通过实施方案例的方式阐述，但是不构成对权利要求书的限制。

实施例

实施例 1

用原初人 T-细胞鉴定肽的 T-细胞表位的实验

从 “ 原初的”人（即已知未被迟缓芽孢杆菌蛋白酶暴露过或致敏的人）中收集新鲜的人的外周血细胞用于迟缓芽孢杆菌蛋白酶和人枯草杆菌蛋白酶中表位的测定。原初的人意指已知过去未曾对蛋白酶暴露或引发对蛋白酶的反应的个体。外周单个核血细胞（储存在室温下，不要超过 24 小时）被制备如下：来源于一个单位的全血的大约 30 mls 白细胞

层制备物用 Dulbeccol 氏磷酸缓冲液(DPBS)调至 50ml，而且分成两个试管。室温下，样品被放在 12.5ml 的 lymphoprep 密度分离介质（Nycomed 密度 1.077g/ml）的上面。试管在 600G 离心 30 分钟。两相的分界面被收集，混合和在 DPBS 中洗涤。所得溶液的细胞密度通过血细胞计数器测量。生活力是通过台酚蓝拒染试验测定的。

从由此产生的溶液中，从外周血单个核细胞样品制备每个 75ml 培养瓶中 10^8 个细胞的密度的分化树突细胞培养物如下:

（1） 50ml 无血清 AIM V 培养基（Gibco）被用 1:100 稀释度的 β－巯基乙醇（Gibco）补充。在 37℃，在 5％的 CO_2 中，培养瓶平放 2 个小时，使单核细胞附着在培养瓶壁上。

（2） 单核细胞分化为树突细胞如下:

除去非附着的细胞，产生的附着细胞（单核细胞）加入 30 ml AIM V，800 单位/ml 的 GM-CSF (Endogen) 和 500 单位/ml 的 IL－4(Endogen)；在 37℃，在 5％的 CO_2 中的条件下，产生的混合物被培养 5 天。5 天后，细胞因子 TNFa (Endogen)被加入达到 0.2 单位/ml，而且细胞因子 IL－1a (Endogen)被加入达到最终的浓度是 50 单位/ml，在 37℃，在 5％的 CO_2 中，混合物被再温育 2 天。

（3） 在第 7 天，丝裂霉素 C 被加入达到浓度为 50mg/ml 以停止现在已分化的树突细胞培养物的生长。在 37℃，在 5％的 CO_2 中，溶液被温育 60 分钟。通过用一个细胞刮刀轻轻从瓶底部刮下附着的细胞收集树突细胞。随后，附着和没有附着的细胞在 600G 离心 5 分钟，在 DPBS 中洗涤和计数。

（4） 制备的树突细胞被放进一个 96 孔圆底阵列中，每孔 100ml 总体积的 AIM V 介质中 2 X 10^4 个细胞。

根据制造商的说明书，同时进行如下的改动，用人 CD4+ Cellect 试剂盒（Biotex）从用于制备树突细胞的冷冻的等份外周血细胞样品中制备 CD4+细胞: 等份的样品被解冻和冲洗，这样每个 Cellect 柱中将被提供大约 10^8 细胞；在 4ml 的 DPBS 和 1ml Cellect 试剂盒中的 Cell 试剂中重悬浮细胞，溶液在室温下被维持 20 分钟。在室温下，产生的溶液

在600G下离心5分钟，而且沉淀在2ml的DPBS中重悬浮，加到Cellect柱中。从柱中流出物被收集在含有2%人血清的DPBS中，产生的CD4+细胞溶液被离心，在AIM V介质中重悬浮和计数密度。

CD4+ T-细胞悬浮液被重悬浮达到在每ml AIM V介质中2 $X10^6$个细胞数，以方便96孔板的有效的操作。

通过1:10的比率在AIM V介质中稀释从DMSO中1M储存溶液制备肽抗原。在96孔板的含有分化树突细胞的每个孔中放10微升的储存溶液。如上制备的稀释的100微升CD4+ T-细胞溶液被进一步加入到每个孔中。有用的对照包括稀释的DMSO空白，和破伤风类毒素阳性对照。

在210微升的总的体积中每个孔的最终的浓度如下:

2 X 10^4 CD4+

2 X 10^5树突细胞（R:S=10: 1）

5mM 肽

实施例2

迟缓芽孢杆菌的蛋白酶和人的枯草杆菌蛋白酶中的T-细胞表位的鉴定

用在实施例1中说明的实验中的肽是以迟缓芽孢杆菌和人的枯草杆菌蛋白酶的氨基酸序列为基础制备的。肽抗原被设计如下: 从图1中提供的人枯草杆菌蛋白酶或迟缓芽孢杆菌蛋白酶的任一个全长氨基酸序列，合成制备15mers（聚体），除了3个残基外，每个15mer与前一个和随后的一个15mer重叠。

所用的肽与如图8中提供的迟缓芽孢杆菌的氨基酸残基是对应的，而且肽与如图7中提供的人枯草杆菌蛋白酶的氨基酸残基是对应的。在图6中提供了所用的对应于蛋白酶的肽。所有的试验被至少进行两次。所有的被报告的试验都对抗原破伤风类毒素显示出了强烈的阳性应答。每个试验中的应答被平均，然后标准化成基线应答。如果应答至少是基线应答3倍，记录这个阳性事件。

记录，而且分别提供在图4，图5中是对从人的枯草杆菌蛋白酶和迟

缓芽孢杆菌中制备的肽的免疫原性应答（即 T-细胞的增殖）。通过掺入氚的方法测定 T-细胞增殖。图 4，图 5 所示的结果是在 10 个个体（图 4）和 16 个个体（图 5）中对不同的肽的免疫原的加性应答的比较。应答被表示为相加的应答，其中 1.0 等于对每个样品的基线应答。因此，在图 4 中，10 或以下的读数是基线应答，而且在图 5 中，16.0 或以下的读数是基线应答。应答越高，T-细胞表位被认为越有效。

如在图 4 和 5 中所示，源于非致敏个体的原初血液样品的免疫原性应答对与解淀粉芽孢杆菌蛋白酶的第 170－173 位残基对应的迟缓芽孢杆菌的肽片段显示了显著的变态反应原性应答。如预期的，人枯草杆菌蛋白酶的对应片段仅引发了基线应答。

图 9 所示的是在从已知对迟缓芽孢杆菌蛋白酶超敏感的一个个体提取的样品中对于迟缓芽孢杆菌蛋白酶的肽的 T-细胞应答。肽 E05 代表与源于解淀粉芽孢杆菌的蛋白酶中 170－173 对应的区域。如在图 9 中所示，超敏感的个体对被肽 E05 代表的 T-细胞表位是高度地应答的。这个结果证实了，通过进行本发明的实验，可能预测被超敏感的个体 T-细胞识别的主要表位。

图 10 所示的是从一个已知对迟缓芽孢杆菌蛋白酶超敏感的个体提取的一样品中对源于迟缓芽孢杆菌蛋白酶的 E05 肽中的各种丙氨酸置换的 T-细胞应答。被用作置换的丙氨酸置换是为了测定在该表位内的任何特定残基的作用。图 10 的图例是指丙氨酸被置换的肽的位置，即，在肽 E06（序列 GSISYPARYANAMAV）中，G 到 A=2，S 到 A=3，I 到 A=4，S 到 A=5，Y 到 A=6，P 到 A=7，R 到 A=8，Y 到 A=9，N 到 A=10，M 到 A=11，V 到 A=12。如在图 10 中所示，源于迟缓芽孢杆菌的蛋白酶中的 R170A，Y171A 和/或 N173A 残基的任一个的置换在超敏感个体的血样中都引起了明显地减少的应答。

从这个结果中，明显地源于迟缓芽孢杆菌的蛋白酶内的残基 170，171，173 很大程度对变态过敏原反应的引发负责。

实施例 3

Humicola insolens 的纤维素酶（Carezyme®）中的

T-细胞表位的鉴定

在来自 Humicola insolens 的一个纤维素酶（Carezyme®, Novo Nordisk）的肽中进行上述说明的过程。从图 13 中，可以观察到，发现了 2 个 T-细表位，A01 和 F06。

实施例 4

Thermomyces lanuginosa 的脂肪酶（Lipase®）中的 T-细胞表位的鉴定

在源于 Thermomyces lanuginosa 的脂肪酶（Lipase® from Novo Nordisk）的肽中进行实施例 2 说明的过程。如从图 14 中所观察到的，发现了两个 T-细胞表位，A12 和 C06。在原初的供体中，肽 E03 取得了稍微增加的 T-细胞增殖，然而，这个肽对于 A12 是连续的，而且它们代表了一个表位。在这方面，本领域普通技术人员理解，表位的长度能够变化，而且通过本发明的方法可以测定天然存在的或突变的表位的精确的效力。

实施例 5

褶皱链霉菌的内切葡聚糖酶 H 中的 T-细胞表位的鉴定

对源于褶皱链霉菌内切葡聚糖酶 H 的肽中进行实施例 2 说明的过程。从图 15 中可以观察到，发现了单一的 T-细表位 C06。

实施例 6

蛋白酶杂合物(GG36-BPN')中的 T-细胞表位的鉴定

在测定 T-细胞表位的位置以后，用已建立的蛋白质工程技术构建蛋白酶杂合物。构建杂合物以便于蛋白质的高度地变态过敏源原性的氨基酸序列被源于较低变态过敏源原性的同系物的对应序列置换。在这个例子中，蛋白酶的最初 122 个氨基酸是来源于 GG36 ，其余的氨基酸序列是来源于 BPN'。

该杂合物首先从100ppm样品被试验：在北美条件下，24孔测定中，5ppm，超固定布样，液体（Tide KT）于0.5在24孔测定中使用3K布样，以及在N',N'－二甲基酪蛋白测定中，5g/l DMC在NA去污剂中，TNBS检测法。

实施例7

天然存在的低免疫原性蛋白质的鉴定

利用本发明的方法，鉴定蛋白酶K比其它商业上可得到的蛋白酶产生较低的免疫原性应答。本发明鉴定的蛋白酶K源于Tritirachium Album limber的。蛋白酶和方法学的全面说明参见Mathew, C.G.P. Isolation of high molecular weight eukaryotic DNA. in Methods Biology, 卷2: Nucleic Acids （Walker, J.M.编）,Humana, Clifton, NJ.(1984) 31-34页。

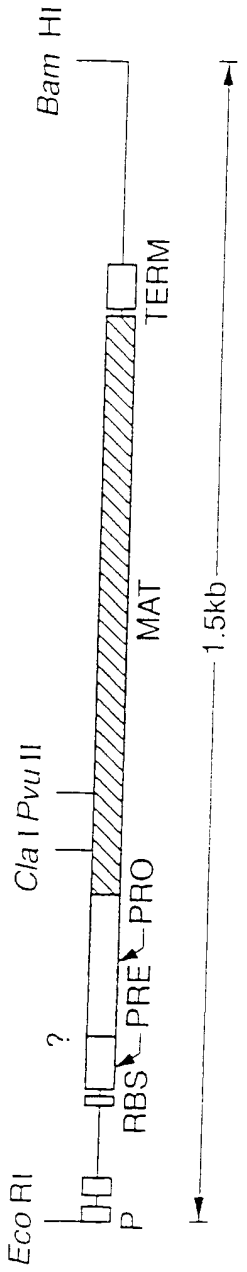

图 1A

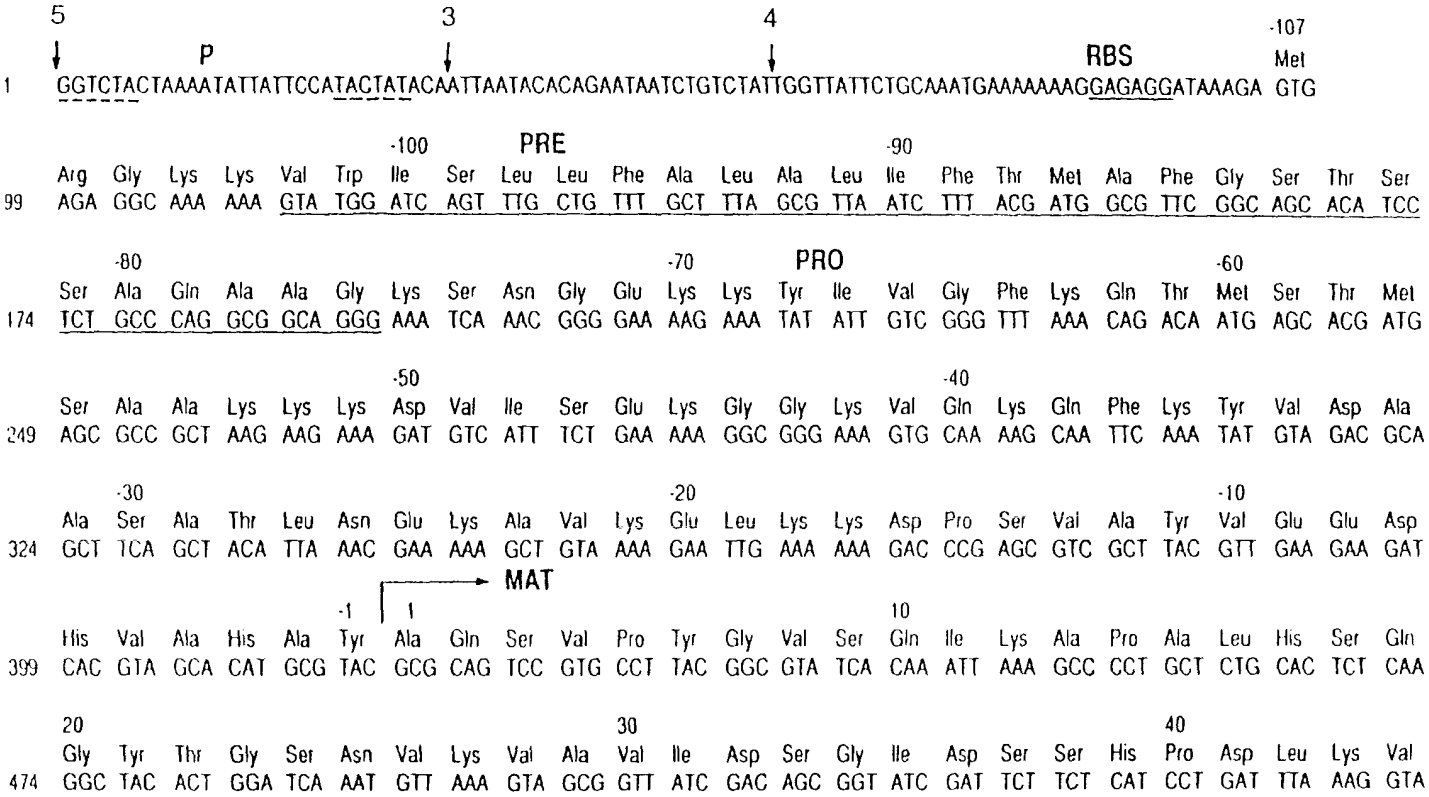
5
3
4
P
RBS
-107
Met
1 GGTCTACTAAAATATTATTCCATACTATACAATTAATACACAGAATAATCTGTCTATTGGTTATTCTGCAAATGAAAAAAAGGAGAGGATAAAGA GTG
PRE
-100
-90
Arg Gly Lys Lys Val Trp Ile Ser Leu Leu Phe Ala Leu Ala Leu Ile Phe Thr Met Ala Phe Gly Ser Thr Ser
99 AGA GGC AAA AAA GTA TGG ATC AGT TTG CTG TTT GCT TTA GCG TTA ATC TTT ACG ATG GCG TTC GGC AGC ACA TCC
-80
-70
PRO
-60
Ser Ala Gln Ala Ala Gly Lys Ser Asn Gly Glu Lys Lys Tyr Ile Val Gly Phe Lys Gln Thr Met Ser Thr Met
174 TCT GCC CAG GCG GCA GGG AAA TCA AAC GGG GAA AAG AAA TAT ATT GTC GGG TTT AAA CAG ACA ATG AGC ACG ATG
-50
-40
Ser Ala Ala Lys Lys Lys Asp Val Ile Ser Glu Lys Gly Gly Lys Val Gln Lys Gln Phe Lys Tyr Val Asp Ala
249 AGC GCC GCT AAG AAG AAA GAT GTC ATT TCT GAA AAA GGC GGG AAA GTG CAA AAG CAA TTC AAA TAT GTA GAC GCA
-30
-20
-10
Ala Ser Ala Thr Leu Asn Glu Lys Ala Val Lys Glu Leu Lys Lys Asp Pro Ser Val Ala Tyr Val Glu Glu Asp
324 GCT TCA GCT ACA TTA AAC GAA AAA GCT GTA AAA GAA TTG AAA AAA GAC CCG AGC GTC GCT TAC GTT GAA GAA GAT
MAT
-1
1
10
His Val Ala His Ala Tyr Ala Gln Ser Val Pro Tyr Gly Val Ser Gln Ile Lys Ala Pro Ala Leu His Ser Gln
399 CAC GTA GCA CAT GCG TAC GCG CAG TCC GTG CCT TAC GGC GTA TCA CAA ATT AAA GCC CCT GCT CTG CAC TCT CAA
20
30
40
Gly Tyr Thr Gly Ser Asn Val Lys Val Ala Val Ile Asp Ser Gly Ile Asp Ser Ser His Pro Asp Leu Lys Val
474 GGC TAC ACT GGA TCA AAT GTT AAA GTA GCG GTT ATC GAC AGC GGT ATC GAT TCT TCT CAT CCT GAT TTA AAG GTA

图 1B-1

```
                                                
```

```
                                 250  Gln                                                  260
     Gln  Val  Arg  Ser  Ser  Leu  Glu  Asn  Thr  Thr  Thr  Lys  Leu  Gly  Asp  Ser  Phe  Tyr  Tyr  Gly  Lys  Gly  Leu  Ile  Asn
1149 CAA  GTC  CGC  AGC  AGT  TTA  GAA  AAC  ACC  ACT  ACA  AAA  CTT  GGT  GAT  TCT  TTC  TAC  TAT  GGA  AAA  GGG  CTG  ATC  AAC

     270                       275
     Val  Gln  Ala  Ala  Ala  Gln  OC                    TERM
1224 GTA  CAG  GCG  GCA  GCT  CAG  TAA  AACATAAAAAACCGGCCTTGGCCCCGCCGGTTTTTTATTTTTCTTCCTCCGCATGTTCAATCCGCTCC

1316 ATAATCGACGGATGGCTCCCTCTGAAAATTTTAACGAGAAACGGCGGGTTGACCCGGCTCAGTCCCGTAACGGCCAAGTCCTGAAACGTCTCAATCGCCG

1416 CTTCCCGGTTTCCGGTCAGCTCAATGCCGTAACGGTCGGCGGCGTTTTCCTGATACCGGGAGACGGCATTCGTAATCGGATC
```

图 1B-3

图 1B

图 1B-1
图 1B-2
图 1B-3

解淀粉芽孢杆菌枯草杆菌
蛋白酶中的保守残基

```
1                   10                  20
A Q S V P . G . . . . . A P A . H . . G

21                  30                  40
. T G S . V K V A V . D . G . . . . H P

41                  50                  60
D L . . . G G A S . V P . . . . . Q D

61                  70                  80
. N . H G T H V A G T . A A L N N S I G

81                  90                  100
V L G V A P S A . L Y A V K V L G A . G

101                 110                 120
S G . . S . L . . G . E W A . N . . . .

121                 130                 140
V . N . S L G . P S . S . . . . . A . .

141                 150                 160
. . . . . G V . V V A A . G N . G . . .

161                 170                 180
. . . . . Y P . . Y . . . . A V G A .

181                 190                 200
D . . N . . A S F S . . G . . L D . . A

201                 210                 220
P G V . . Q S T . P G . . Y . . . N G T

221                 230                 240
S M A . P H V A G A A A L . . . K . . .

241                 250                 260
W . . . Q . R . . L . N T . . . L G . .

261                 270
. . Y G . G L . N . . A A . .
```

图 2

以下生物的枯草杆菌蛋白酶序列的比较：
解淀粉芽孢杆菌
枯草芽孢杆菌
地衣芽孢杆菌
迟缓芽孢杆菌

图 3A

```
01                  10                  20                  30
A Q S V P Y G V S Q I K A P A L H S Q G Y T G S N V K V A V I D S G I D S S H P
A Q S V P Y G I S Q I K A P A L H S Q G Y T G S N V K V A V I D S G I D S S H P
A Q T V P Y G I P L I K A D K V Q A Q G F K G A N V K V A V L D T G I Q A S H P
A Q S V P W G I S R V Q A P A A H N R G L T G S G V K V A V L D T G I S T * H P

41                  50                  60                  70
D L K V A G G A S M V P S E T N P F Q D N N S H G T H V A G T V A A L N N S I G
D L N V R G G A S P V P S E T N P Y Q D G S S H G T H V A G T I A A L N N S I G
D L N V V G G A S P V A G E A Y N * T D G N G H G T H V A G T V A A L D N T T G
D L N I R G G A S P V P G E * P S T Q D G N G H G T H V A G T I A A L N N S I G

81                  90                  100                 110
V L G V A P S A S L Y A V K V L G A D G S G Q Y S W I I N G I E W A I A N N M D
V L G V S P S A S L Y A V K V L D S T G S G Q Y S W I I N G I E W A I S N N M D
V L G V A P S V S L Y A V K V L N S S G S G S Y S G I V S G I E W A T T N G M D
V L G V A P S A E L Y A V K V L G A S G S G S V S S I A Q G L E W A G N N G M H

121                 130                 140                 150
V I N M S L G G P S G S A A L K A A V D K A V A S G V V V V A A A G N E G T S G
V I N M S L G G P T G S T A L K T V V D K A V S S G I V V A A A A G N E G S S G
V I N M S L G G A S G S T A M K Q A V D N A Y A R G V V V V A A A G N S G N S G
V A N L S L G S P S P S A T L E Q A V N S A T S R G V L V V A A S G N S G A G S
```

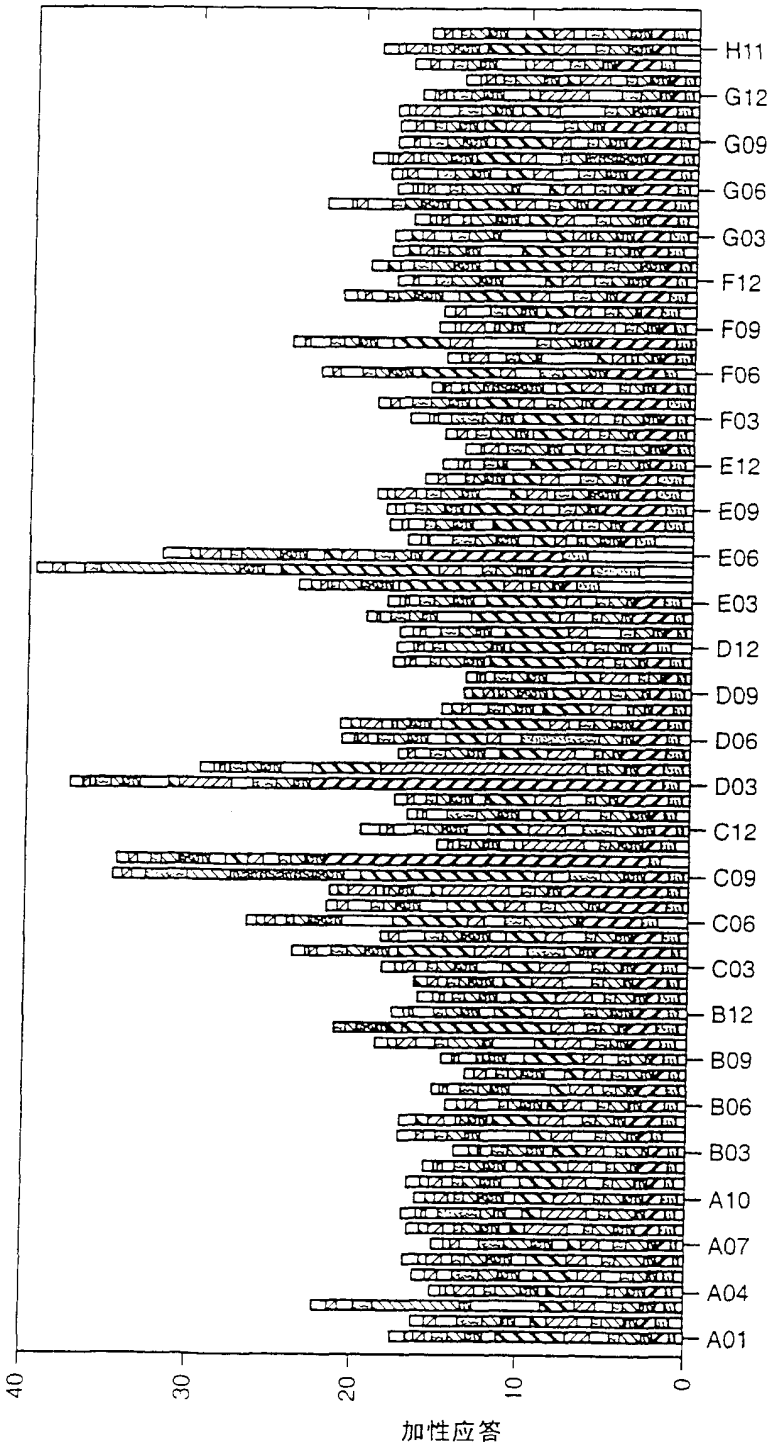
H11
G12
G09
G06
G03
F12
F09
F06
F03
E12
E09
E06
E03
D12
D09
D06
D03
C12
C09
C06
C03
B12
B09
B06
B03
A10
A07
A04
A01
40
30
20
10
0
加性应答

图 4

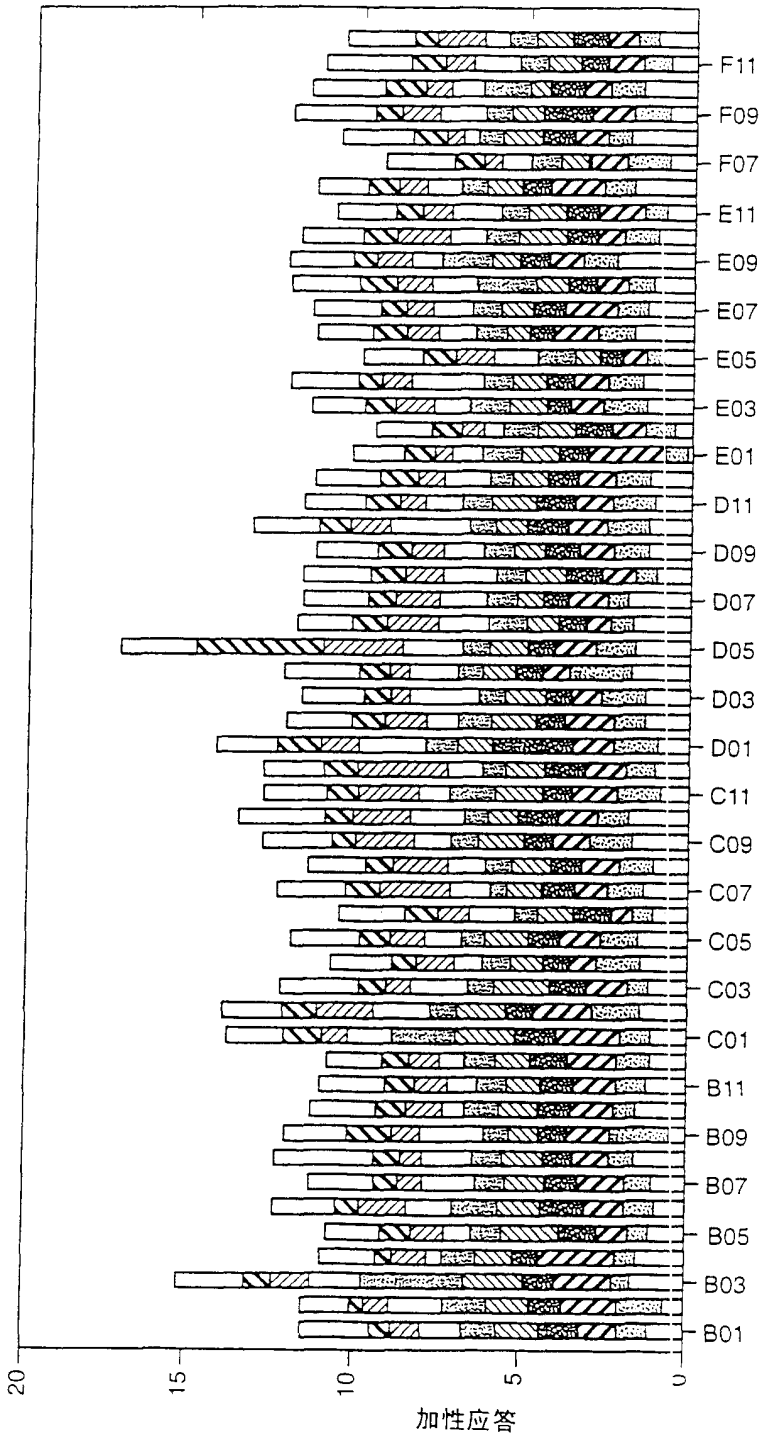
F11
F09
F07
E11
E09
E07
E05
E03
E01
D11
D09
D07
D05
D03
D01
C11
C09
C07
C05
C03
C01
B11
B09
B07
B05
B03
B01
20
15
10
5
0
加性应答

图 5

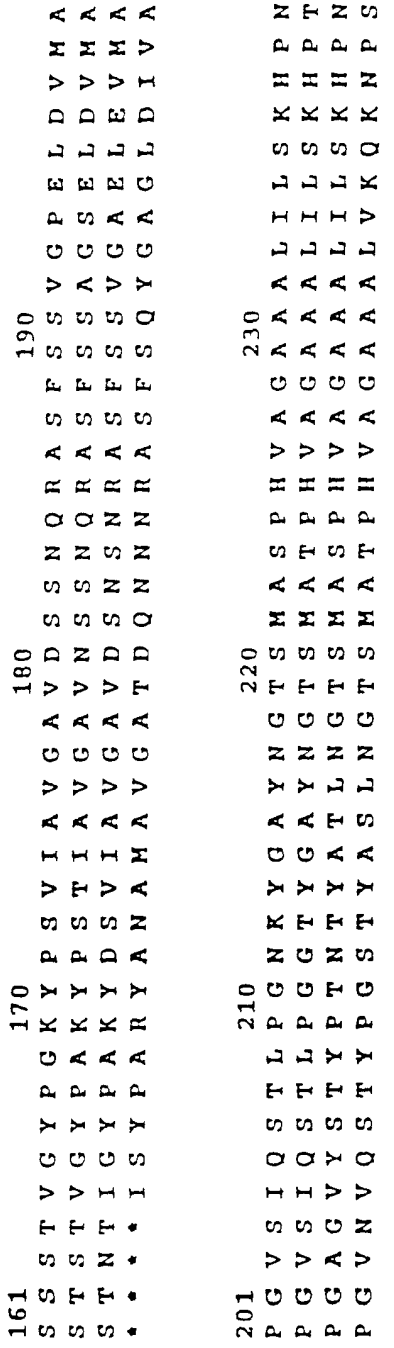

图 3B

图 3A 图 3B

图 3

1	A12	IKDFHVYFRESRDAG	49	E12	SATSRGVLVVAASGN
2	A11	LEQAVNSATSRGVLV	50	E11	SRGVLVVAASGNSGA
3	A10	AQSVPWGISRVQAPA	51	E10	VLVVAASGNSGAGSI
4	A9	VPWGISRVQAPAAHN	52	E9	VAASGNSGAGSISYP
5	A8	GISRVQAPAAHNRGL	53	E8	SGNSGAGSISYPARY
6	A7	RVQAPAAHNRGLTGS	54	E7	SGAGSISYPARYANA
7	A6	APAAHNRGLTGSGVK	55	E6	GSISYPARYANAMAV
8	A5	AHNRGLTGSGVKVAV	56	E5	SYPARYANAMAVGAT
9	A4	RGLTGSGVKVAVLDT	57	E4	ARYANAMAVGATDQN
10	A3	TGSGVKVAVLDTGIS	58	E3	ANAMAVGATDQNNNR
11	A2	GVKVAVLDTGISTHP	59	E2	MAVGATDQNNNRASF
12	A1	VAVLDTGISTHPDLN	60	E1	GATDQNNNRASFSQY
13	B12	LDTGISTHPDLNIRG	61	F12	DQNNNRASFSQYGAG
14	B11	GISTHPDLNIRGGAS	62	F11	NNRASFSQYGAGLDI
15	B10	THPDLNIRGGASFVP	63	F10	ASFSQYGAGLDIVAP
16	B9	DLNIRGGASFVPGEP	64	F9	SQYGAGLDIVAPGVN
17	B8	IRGGASFVPGEPSTQ	65	F8	GAGLDIVAPGVNVQS
18	B7	GASFVPGEPSTQDGN	66	F7	LDIVAPGVNVQSTYP
19	B6	FVPGEPSTQDGNGHG	67	F6	VAPGVNVQSTYPGST
20	B5	GEPSTQDGNGHGTHV	68	F5	GVNVQSTYPGSTYAS
21	B4	STQDGNGHGTHVAGT	69	F4	VQSTYPGSTYASLNG
22	B3	DGNGHGTHVAGTIAA	70	F3	TYPGSTYASLNGTSM
23	B2	GHGTHVAGTIAALNN	71	F2	GSTYASLNGTSMATP
24	B1	THVAGTIAALNNSIG	72	F1	YASLNGTSMATPHVA
25	C12	AGTIAALNNSIGVLG	73	G12	LNGTSMATPHVAGAA
26	C11	IAALNNSIGVLGVAP	74	G11	TSMATPHVAGAAALV
27	C10	LNNSIGVLGVAPSAE	75	G10	ATPHVAGAAALVKQK
28	C9	SIGVLGVAPSAELYA	76	G9	HVAGAAALVKQKNPS
29	C8	VLGVAPSAELYAVKV	77	G8	GAAALVKQKNPSWSN
30	C7	VAPSAELYAVKVLGA	78	G7	ALVKQKNPSWSNVQI
31	C6	SAELYAVKVLGASGS	79	G6	KQKNPSWSNVQIRNH
32	C5	LYAVKVLGASGSGSV	80	G5	NPSWSNVQIRNHLKN
33	C4	VKVLGASGSGSVSSI	81	G4	WSNVQIRNHLKNTAT
34	C3	LGASGSGSVSSIAQG	82	G3	VQIRNHLKNTATSLG
35	C2	SGSGSVSSIAQGLEW	83	G2	RNHLKNTATSLGSTN
36	C1	GSVSSIAQGLEWAGN	84	G1	LKNTATSLGSTNLYG
37	D12	SSIAQGLEWAGNNGM	85	H12	TATSLGSTNLYGSGL
38	D11	AQGLEWAGNNGMHVA	86	H11	SLGSTNLYGSGLVNA
39	D10	LEWAGNNGMHVANLS	87	H10	STNLYGSGLVNAEAA
40	D9	AGNNGMHVANLSLGS	88	H9	NLYGSGLVNAEAATR
41	D8	NGMHVANLSLGSPSP			
42	D7	HVANLSLGSPSPSAT			
43	D6	NLSLGSPSPSATLEQ			
44	D5	LGSPSPSATLEQAVN			
45	D4	PSPSATLEQAVNSAT			
46	D3	SATLEQAVNSATSRG			
47	D2	LEQAVNSATSRGVLV			
48	D1	AVNSATSRGVLVVAA			

图 6A

1	A12	IKDFHVYFRESRDAG	49	E12	KKIDVLNLSIGGPDF
2	A11	DAELHIFRVFTNNQV	50	E11	DVLNLSIGGPDFMDH
3	A10	PLRRASLSLGSGFWH	51	E10	NLSIGGPDFMDHPFV
4	A9	RASLSLGSGFWHATG	52	E9	IGGPDFMDHPFVDKV
5	A8	LSLGSGFWHATGRHS	53	E8	PDFMDHPFVDKVWEL
6	A7	GSGFWHATGRHSSRR	54	E7	MDHPFVDKVWELTAN
7	A6	FWHATGRHSSRRLLR	55	E6	PFVDKVWELTANNVI
8	A5	ATGRHSSRRLLRAIP	56	E5	DKVWELTANNVIMVS
9	A4	RHSSRRLLRAIPRQV	57	E4	WELTANNVIMVSAIG
10	A3	SRRLLRAIPRQVAQT	58	E3	TANNVIMVSAIGNDG
11	A2	LLRAIPRQVAQTLQA	59	E2	NVIMVSAIGNDGPLY
12	A1	AIPRQVAQTLQADVL	60	E1	MVSAIGNDGPLYGTJ
13	B12	RQVAQTLQADVLWQM	61	F12	AIGNDGPLYGTLNNP
14	B11	AQTLQADVLWQMGYT	62	F11	NDGPLYGTLNNPADQ
15	B10	LQADVLWQMGYTGAN	63	F10	PLYGTLNNPADQMDV
16	B9	DVLWQMGYTGANVRV	64	F9	GTLNNPADQMDVIGV
17	B8	WQMGYTGANVRVAVF	65	F8	NNPADQMDVIGVGGI
18	B7	GYTGANVRVAVFDTG	66	F7	ADQMDVIGVGGIDFE
19	B6	GANVRVAVFDTGLSE	67	F6	MDVIGVGGIDFEDNI
20	B5	VRVAVFDTGLSEKHP	68	F5	IGVGGIDFEDNIARF
21	B4	AVFDTGLSEKHPHFK	69	F4	GGIDFEDNIARFSSR
22	B3	DTGLSEKHPHFKNVK	70	F3	DFEDNIARFSSRGMT
23	B2	LSEKHPHFKNVKERT	71	F2	DNIARFSSRGMTTWE
24	B1	KHPHFKNVKERTNWT	72	F1	ARFSSRGMTTWELPG
25	C12	HFKNVKERTNWTNER	73	G12	SSRGMTTWELPGGYG
26	C11	NVKERTNWTNERTLD	74	G11	GMTTWELPGGYGRMK
27	C10	ERTNWTNERTLDDGL	75	G10	TWELPGGYGRMKPDI
28	C9	NWTNERTLDDGLGHG	76	G9	LPGGYGRMKPDIVTY
29	C8	NERTLDDGLGHGTFV	77	G8	GYGRMKPDIVTYGAG
30	C7	TLDDGLGHGTFVAGV	78	G7	RMKPDIVTYGAGVRG
31	C6	DGLGHGTFVAGVIAS	79	G6	PDIVTYGAGVRGSGV
32	C5	GHGTFVAGVIASMRE	80	G5	VTYGAGVRGSGVKGG
33	C4	TFVAGVIASMRECQG	81	G4	GAGVRGSGVKGGCRA
34	C3	AGVIASMRECQGFAP	82	G3	VRGSGVKGGCRALSG
35	C2	IASMRECQGFAPDAE	83	G2	SGVKGGCRALSGTSV
36	C1	MRECQGFAPDAELHI	84	G1	KGGCRALSGTSVASP
37	D12	CQGFAPDAELHIFRV	85	H12	CRALSGTSVASPVVA
38	D11	FAPDAELHIFRVFTN	86	H11	LSGTSVASPVVAGAV
39	D10	DAELHIFRVFTNNQV	87	H10	TSVASPVVAGAVTLL
40	D9	LHIFRVFTNNQVSYT	88	H9	ASPVVAGAVTLLVST
41	D8	FRVFTNNQVSYTSWF	89	H8	VVAGAVTLLVSTVQK
42	D7	FTNNQVSYTSWFLDA	90	H7	GAVTLLVSTVQKREL
43	D6	NQVSYTSWFLDAFNY	91	H6	TLLVSTVQKRELVNP
44	D5	SYTSWFLDAFNYAIL	92	H5	VSTVQKRELVNPASM
45	D4	SWFLDAFNYAILKKI	93	H4	VQKRELVNPASMKQA
46	D3	LDAFNYAILKKIDVL	94	H3	RELVNPASMKQALIA
47	D2	FNYAILKKIDVLNLS	95	H2	VNPASMKQALIASAR
48	D1	AILKKIDVLNLSIGG	96	H1	ASMKQALIASARRLP

图 6B

97	I12	IKDFHVYFRESRDAG
98	I11	DAELHIFRVFTNNQV
99	I10	KQALIASARRLPGVN
100	I9	LIASARRLPGVNMFE
101	I8	SARRLPGVNMFEQGH
102	I7	RLPGVNMFEQGHGKL
103	I6	GVNMFEQGHGKLDLL
104	I5	MFEQGHGKLDLLRAY
105	I4	QGHGKLDLLRAYQIL
106	I3	GKLDLLRAYQILNSY
107	I2	DLLRAYQILNSYKPQ
108	I1	RAYQILNSYKPQASL
109	J12	QILNSYKPQASLSPS
110	J11	NSYKPQASLSPSYID
111	J10	KPQASLSPSYIDLTE
112	J9	ASLSPSYIDLTECPY
113	J8	SPSYIDLTECPYMWP
114	J7	YIDLTECPYMWPYCS
115	J6	LTECPYMWPYCSQPI
116	J5	CPYMWPYCSQPIYYG

图 6C

MKLVNIWLLLLVVLLCGKKHLGDRLEKKSFEKAPCPGCSHLTLKVEFSSTVVEYEYIVAFNGYFT
AKARNSFISSALKSSEVDNWRIIPRNNPSSDYPSDFEVIQIKEKQKAGLLTLEDHPNIKRVTPQR
KVFRSLKYAESDPTVPCNETRWSQKWQSSRPLRRASLSLGSGFWHATGRHSSRRLLRAIPRQVAQ
TLQADVLWQMGYTGANVRVAVFDTGLSEKHPHFKNVKERTNWTNERTLDDGLGHGTFVAGVIASM
RECQGFAPDAELHIFRVFTNNQVSYTSWFLDAFNYAILKKIDVLNLSIGGPDFMDHPFVDKVWEL
TANNVIMVSAIGNDGPLYGTLNNPADQMDVIGVGGIDFEDNIARFSSRGMTTWELPGGYGRMKPD
IVTYGAGVRGSGVKGGCRALSGTSVASPVVAGAVTLLVSTVQKRELVNPASMKQALIASARRLPG
VNMFEQGHGKLDLLRAYQILNSYKPQASLSPSYIDLTECPYMWPYCSQPIYYGGMPTVVNVTILN
GMGVTGRIVDKPDWQPYLPQNGDNIEVAFSYSSVLWPWSGYLAISISVTKKAASWEGIAQGHVMI
TVASPAETESKNGAEQTSTVKLPIKVKIIPTPPRSKRVLWDQYHNLRYPPGYFPRDNLRMKNDPL
DWNGDHIHTNFRDMYQHLRSMGYFVEVLGAPFTCFDASQYGTLLMVDSEEEYFPEEIAKLRRDVD
NGLSLVIFSDWYNTSVMRKVKFYDENTRQWWMPDTGGANIPALNELLSVWNMGFSDGLYEGEFTL
ANHDMYYASGCSIAKFPEDGVVITQTFKDQGLEVLKQETAVVENVPILGLYQIPAEGGGRIVLYG
DSNCLDDSHRQKDCFWLLDALLQYTSYGVTPPSLSHSGNRQRPPSGAGSVTPERMEGNHLHRYSK
VLEAHLGDPKPRPLPACPRLSWAKPQPLNETAPSNLWKHQKLLSIDLDKVVLPNFRSNRPQVRPL
SPGESGAWDIPGGIMPGRYNQEVGQTIPVFAFLGAMVVLAFFVVQINKAKSRPKRRKPRVKRPQL
MQQVHPPKTPSV

图 7

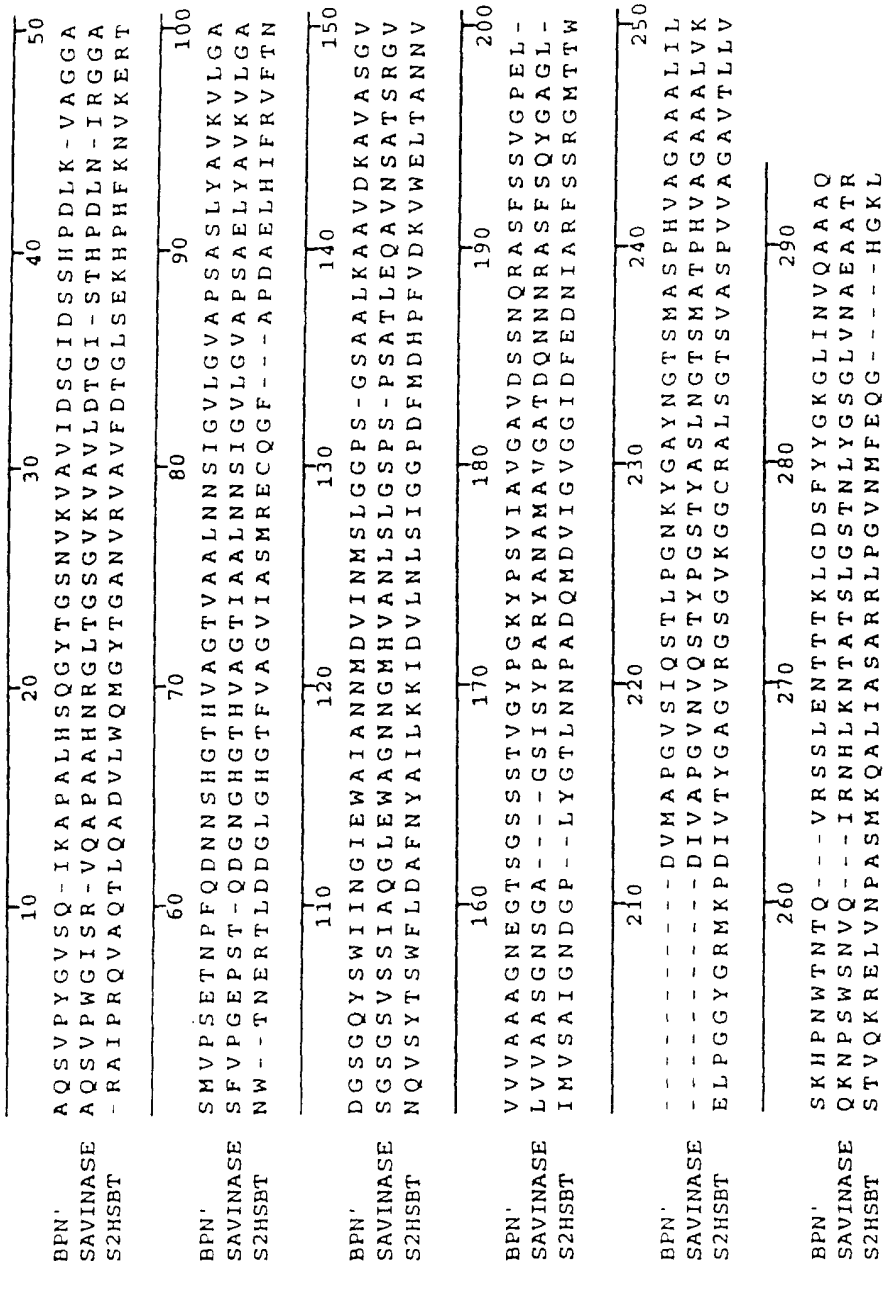
10 20 30 40 50
BPN' AQSVPYGVSQ-IKAPALHSQGYTGSNVKVAVIDSGIDSSHPDLK-VAGGA 48
SAVINASE AQSVPWGISR-VQAPAAHNRGLTGSGVKVAVLDTGI-STHPDLN-IRGGA 47
S2HSBT -RAIPRQVAQTLQADVLWQMGYTGANVRVAVFDTGLSEKHPHFKNVKERT 49
60 70 80 90 100
BPN' SMVPSETNPFQDNNSHGTHVAGTVAALNNSIGVLGVAPSASLYAVKVLGA 98
SAVINASE SFVPGEPST-QDGNGHGTHVAGTIAALNNSIGVLGVAPSAELYAVKVLGA 96
S2HSBT NW--TNERTLDDGLGHGTFVAGVIASMRECQGF---APDAELHIFRVFTN 94
110 120 130 140 150
BPN' DGSGQYSWIINGIEWAIANNMDVINMSLGGPS-GSAALKAAVDKAVASGV 147
SAVINASE SGSGSVSSIAQGLEWAGNNGMHVANLSLGSPS-PSATLEQAVNSATSRGV 145
S2HSBT NQVSYTSWFLDAFNYAILKKIDVLNLSIGGPDFMDHPFVDKVWELTANNV 144
160 170 180 190 200
BPN' VVVAAAGNEGTSGSSSTVGYPGKYPSVIAVGAVDSSNQRASFSSVGPEL- 197
SAVINASE LVVAASGNSGA----GSISYPARYANAMAVGATDQNNNRASFSQYGAGL- 191
S2HSBT IMVSAIGNDGP--LYGTLNNPADQMDVIGVGGIDFEDNIARFSSRGMTTW 192
210 220 230 240 250
BPN' ---------DVMAPGVSIQSTLPGNKYGAYNGTSMASPHVAGAAALIL 235
SAVINASE ---------DIVAPGVNVQSTYPGSTYASLNGTSMATPHVAGAAALVK 229
S2HSBT ELPGGYGRMKPDIVTYGAGVRGSGVKGGCRALSGTSVASPVVAGAVTLLV 242
260 270 280 290
BPN' SKHPNWTNTQ---VRSSLENTTTKLGDSFYYGKGLINVQAAAQ 275
SAVINASE QKNPSWSNVQ---IRNHLKNTATSLGSTNLYGSGLVNAEAATR 269
S2HSBT STVQKRELVNPASMKQALIASARRLPGVNMFEQG-----HGKL 280

图 8

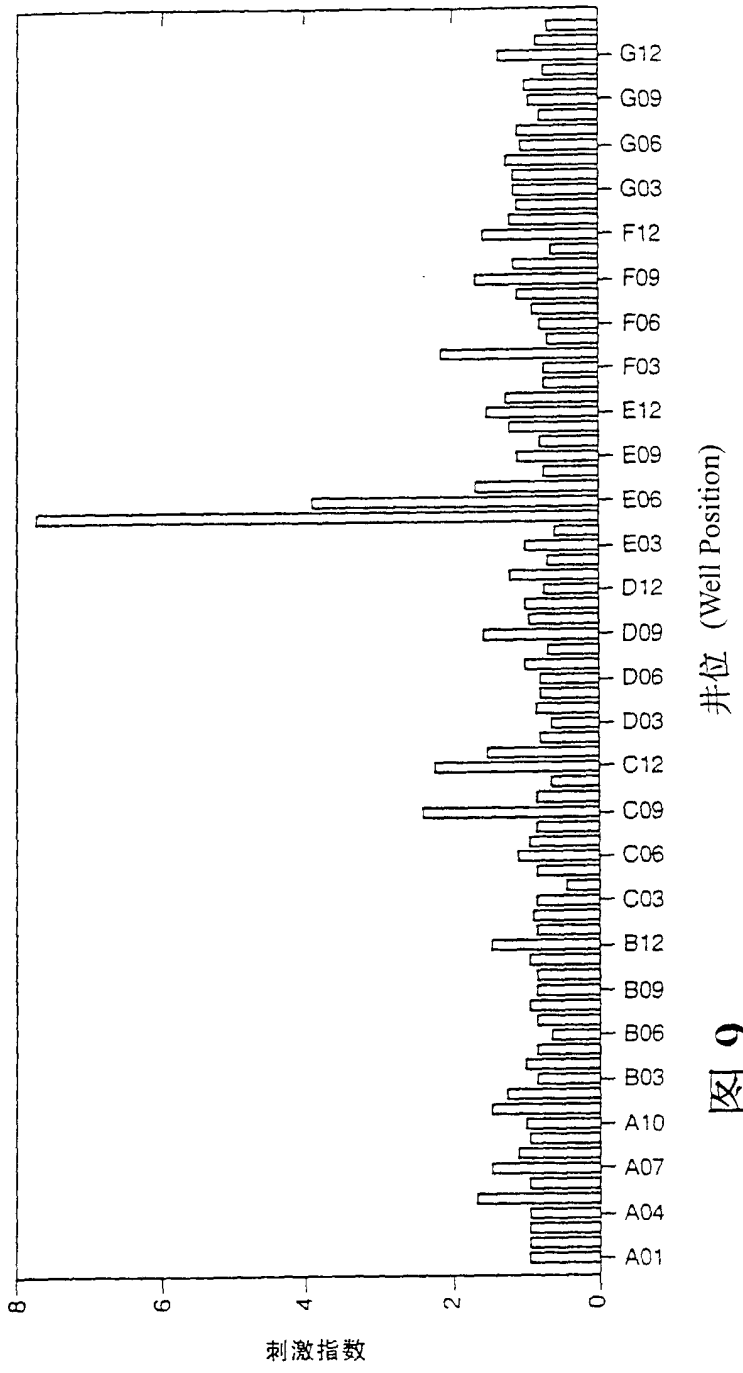
G12
G09
G06
G03
F12
F09
F06
F03
E12
E09
E06
E03
D12
D09
D06
D03
C12
C09
C06
C03
B12
B09
B06
B03
A10
A07
A04
A01
0
2
4
6
8
刺激指数
井位 (Well Position)

图 9

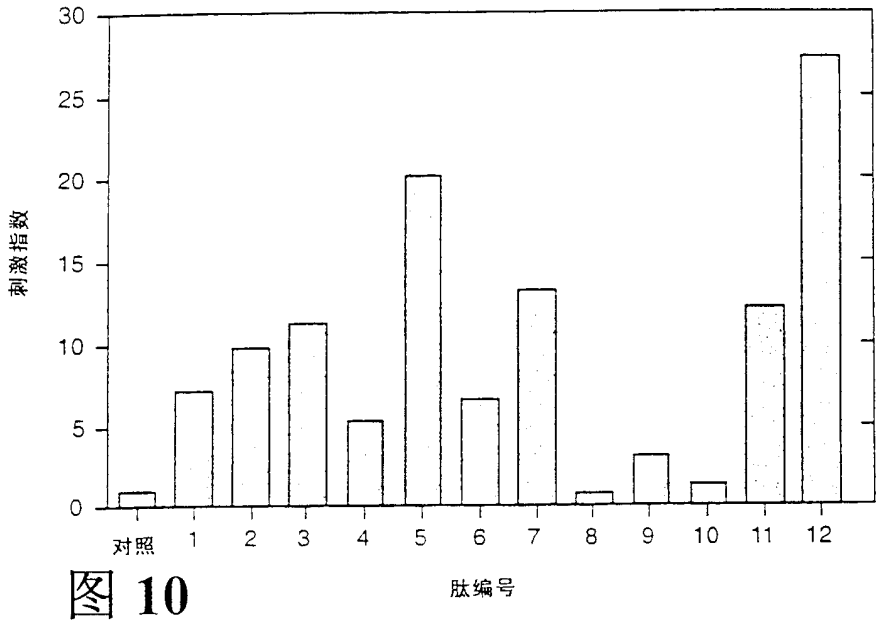

图 10

图 11

	肽编号	序列
1	（未修饰序列）	GSISYPARYANAMAV
	2	**A**SISYPARYANAMAV
	3	G**A**ISYPARYANAMAV
	4	GS**A**SYPARYANAMAV
	5	GSI**A**YPARYANAMAV
	6	GSIS**A**PARYANAMAV
	7	GSISY**A**ARYANAMAV
	8	GSISYPA**A**YANAMAV
	9	GSISYPAR**A**ANAMAV
	10	GSISYPARYA**A**AMAV
	11	GSISYPARYANA**A**AV
	12	GSISYPARYANAMA**A**

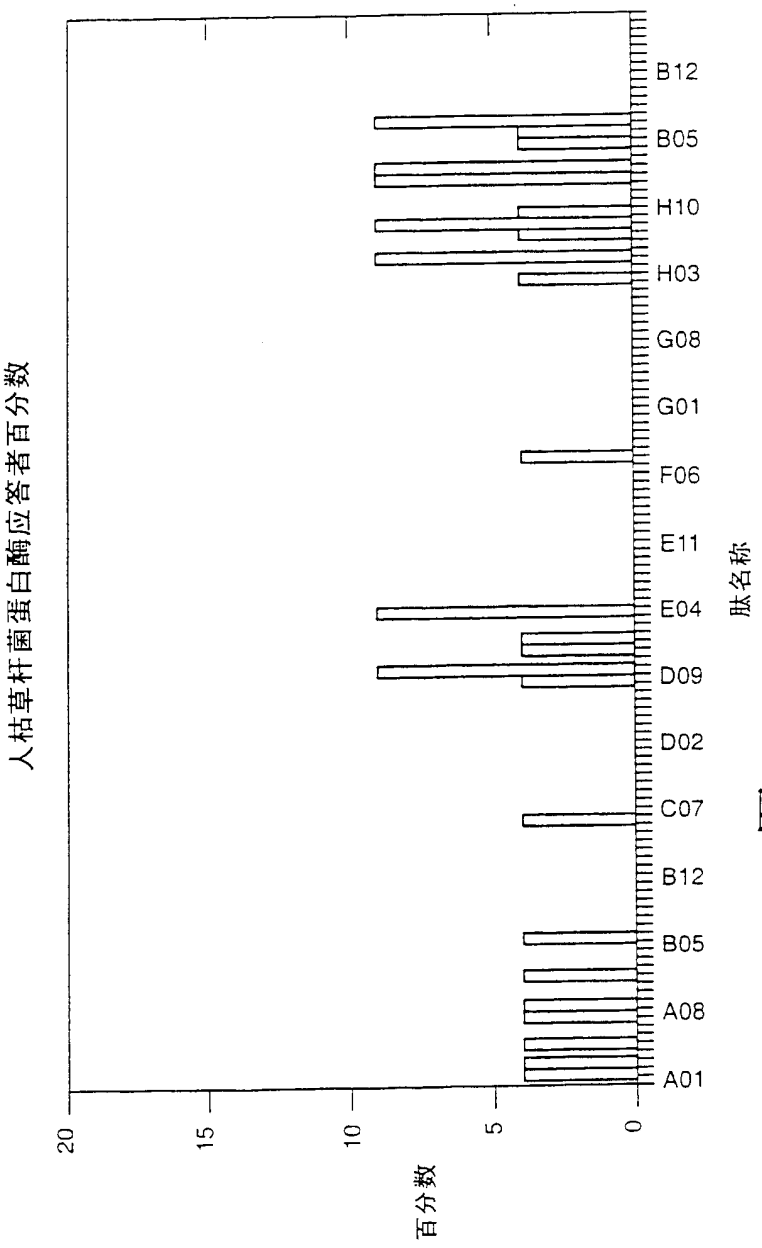
人枯草杆菌蛋白酶应答者百分数
百分数
0
5
10
15
20
肽名称
A01
A08
B05
B12
C07
D02
D09
E04
E11
F06
G01
G08
H03
H10
B05
B12

图 12

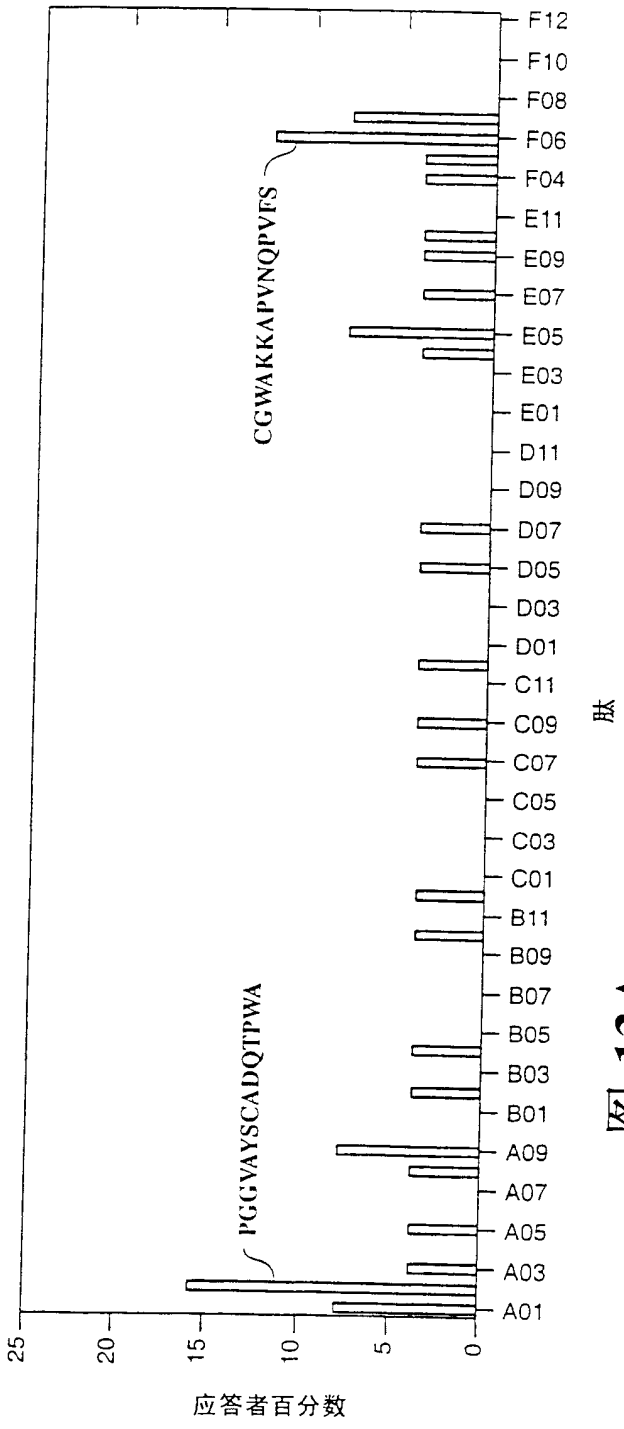
F12
F10
F08
F06
F04
E11
E09
E07
E05
E03
E01
D11
D09
D07
D05
D03
D01
C11
C09
C07
C05
C03
C01
B11
B09
B07
B05
B03
B01
A09
A07
A05
A03
A01
CGWAKKAPVNQPVFS
PGGVAYSCADQTPWA
25
20
15
10
5
0
应答者百分数
肽

图 13A

```
          1          2          3          4          5
1234567890 1234567890 1234567890 1234567890 1234567890
MRSSPLLPSA VVAALPVLAL AADGRSTRYW DCCKPSCGWA KKAPVNQPVF
SCNANFQRIT DFDAKSGCEP GGVAYSCADQ TPWAVNDDFA LGFAATSIAG
SNEAGWCCAC YELTFTSGPV AGKKMVVQST STGGDLGSNH FDLNIPGGGV
GIFDGCTPQF GGLPGQRYGG ISSRNECDRF PDALKPGCYW RFDWFKNADN
PSFSFRQVQC PAELVARTGC RRNDDGNFPA VQIPSSSTSS PVNQPTSTST
TSTSTTSSPP VQPTTPSGCT AERWAQ
```

图 13B

```
  1 mrsslvlffv sawtalaspi rrevsqdlfn qfnlfaqysa aaycgknnda
 51 pagtnitctg nacpevekad atflysfeds gvgdvtqfla ldntnklivl
101 sfrgsrsien wignlnfdlk eindicsgcr ghdgftsswr svadtlrqkv
151 edavrehpdy rvvftghslg galatvagad lrgngydidv fsygaprvgn
201 rafaefltvq tggtlyrith tndivprlpp refgyshssp eywiksgtlv
251 pvtrndivki egidatggnn qpnipdipah lwyfgligtc l
```

图 14B

```
  1 mftpvrrrvr taalalsaaa alvlgstaas gasatpspap apapapvkqg
 51 ptsvayvevn nnsmlnvgky tladgggnaf dvavifaani nydtgtktay
101 lhfnenvqrv ldnavtqirp lqqqgikvll svlqnhqgaq fanfpsqqaa
151 safakqlsda vakygldgvd fddeyaeygn ngtaqpndss fvhlvtalra
201 nmpdkiisly nigpaasrls yggvdvsdkf dyawnpyygt wqvpgialpk
251 aqlspaavei grtsrstvad larrtvdegy gvyltynldg gdrtadvsaf
301 trelygseav rtp
```

图 15B

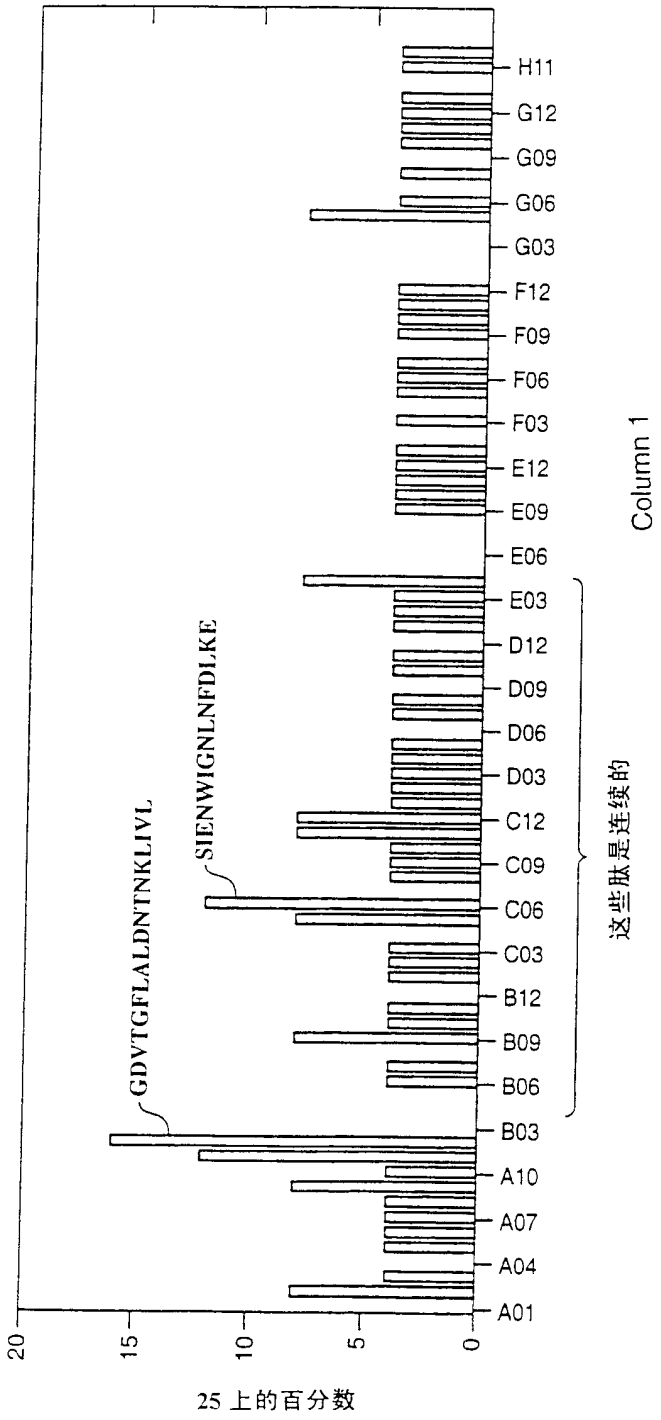
H11
G12
G09
G06
G03
F12
F09
F06
F03
E12
E09
E06
E03
D12
D09
D06
D03
C12
C09
C06
C03
B12
B09
B06
B03
A10
A07
A04
A01
SIENWIGNLNFDLKE
GDVTGFLALDNTNKLIVL
这些肽是连续的
Column 1
20
15
10
5
0
25 上的百分数

图 14A

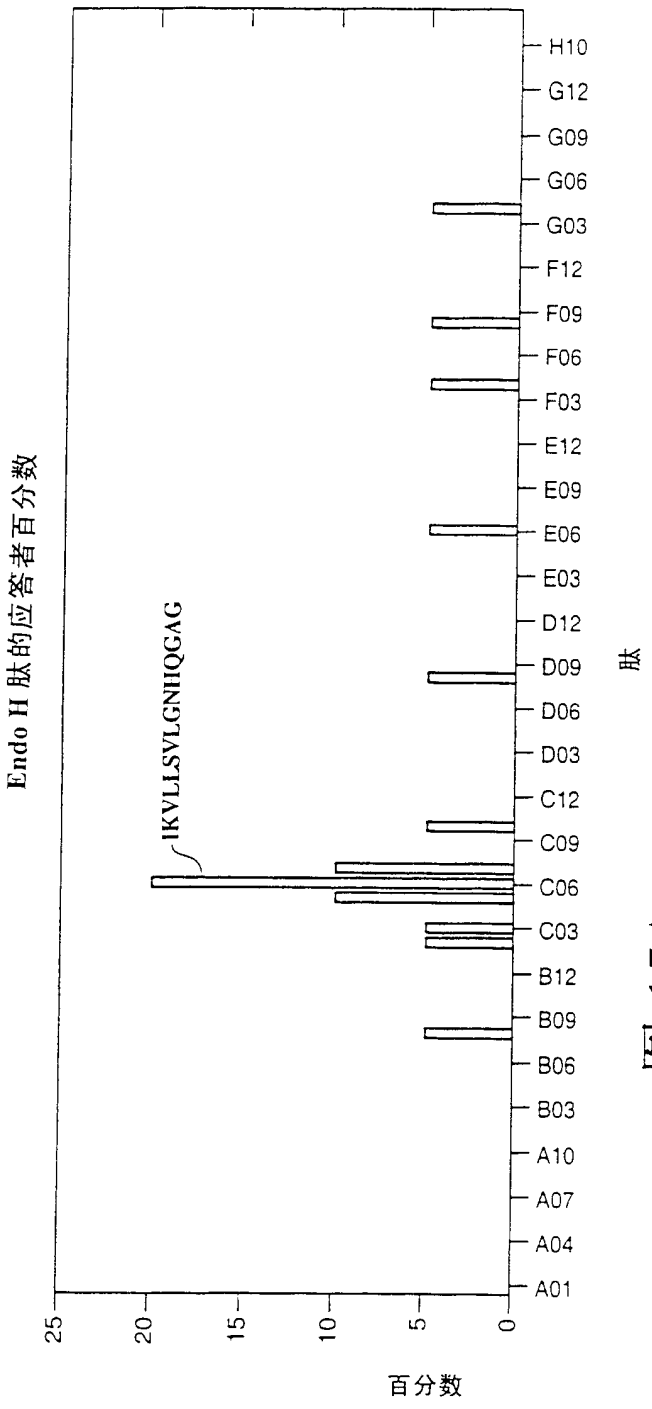
Endo H 肽的应答者百分数
IKVLLSVLGNHQGAG
H10
G12
G09
G06
G03
F12
F09
F06
F03
E12
E09
E06
E03
D12
D09
D06
D03
C12
C09
C06
C03
B12
B09
B06
B03
A10
A07
A04
A01
肽
25
20
15
10
5
0
百分数

图 15A

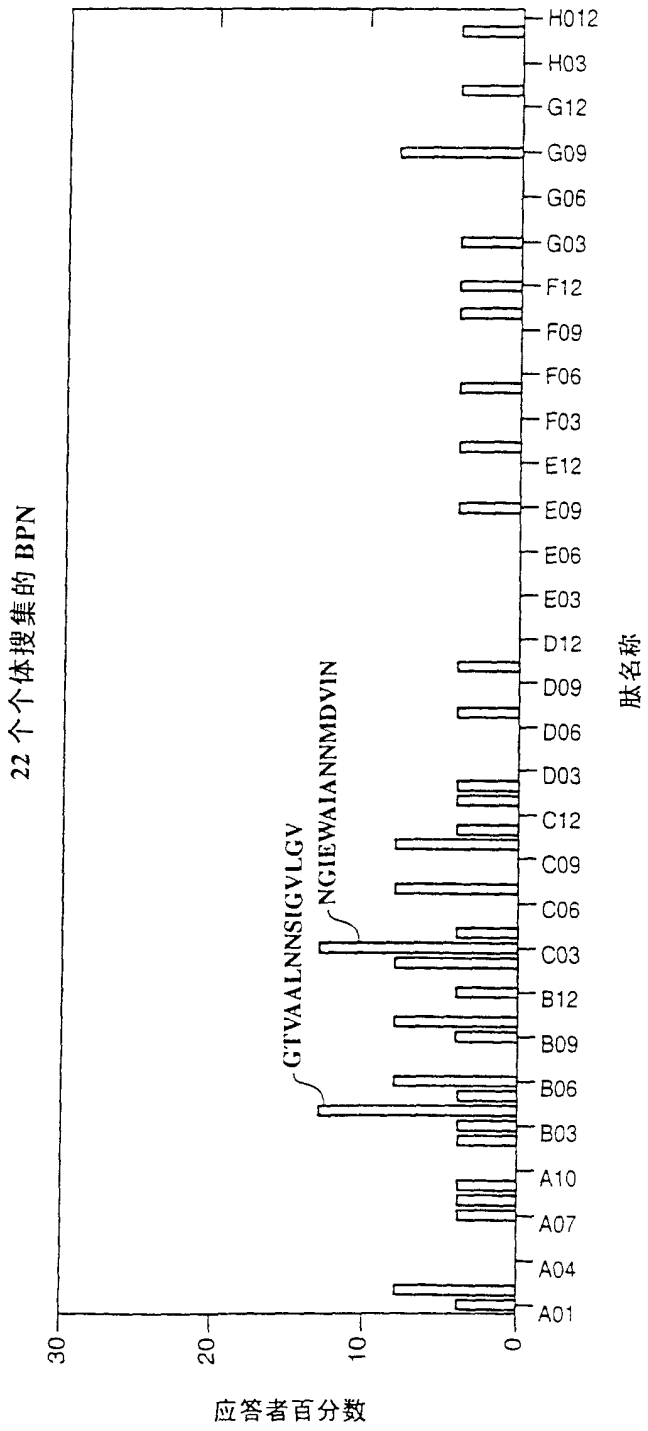
22 个个体搜集的 BPN
应答者百分数
肽名称
0
10
20
30
H012
H03
G12
G09
G06
G03
F12
F09
F06
F03
E12
E09
E06
E03
D12
D09
D06
D03
C12
C09
C06
C03
B12
B09
B06
B03
A10
A07
A04
A01
GTVAALNNSIGVLGV
NGIEWAIANNMDVIN

图 16

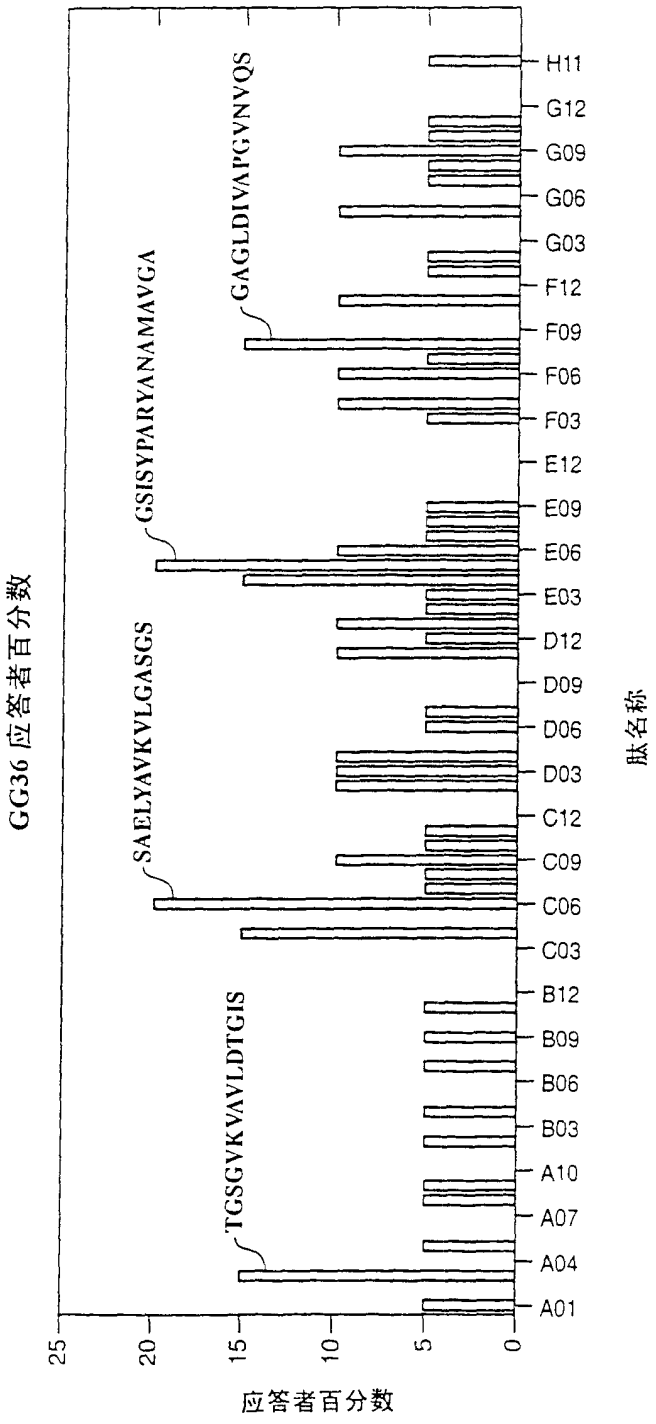
GG36 应答者百分数
25
20
15
10
5
0
应答者百分数
TGSGVKVAVLDTGIS
SAELYAVKVLGASGS
GSISYPARYANAMAVGA
GAGLDIVAPGVNVQS
H11
G12
G09
G06
G03
F12
F09
F06
F03
E12
E09
E06
E03
D12
D09
D06
D03
C12
C09
C06
C03
B12
B09
B06
B03
A10
A07
A04
A01
肽名称

图 17

杂种酶序列（GG36－BPN）

GG36
AQSVPWGISRVQAPAAHNRGLTGSGVKVAVLDTGISTHPDLNIRGGASFVPGEPSTQDGNGH

BPN

GTHVAGTIAALNNSIGVLGVAPSAELYAVKVLGASGSGSVSSIAQGLEWAGNNGMHVINMSLGGS

△

GSAALKAAVDKAVASGVVVVAAAGNEGTSGSSTVGYPGKYPSVIAVGAVDSSNQRASFSSVGP

ELDVMAPGVSIQSTLPGNKYGAYNGTSMASPHVAGAAALILSKHPNWTNTQVRSSLENTTTKLGD

SFYY GKGLINVQAAAQ

图 18