



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102325884 A

(43) 申请公布日 2012. 01. 18

(21) 申请号 201080008284. 9

(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司 72001

(22) 申请日 2010. 02. 19

代理人 熊玉兰 郭文洁

(30) 优先权数据

2009-037750 2009. 02. 20 JP

(51) Int. Cl.

C12N 15/09 (2006. 01)

(85) PCT申请进入国家阶段日

2011. 08. 18

A61K 31/4188 (2006. 01)

A61K 38/00 (2006. 01)

(86) PCT申请的申请数据

PCT/JP2010/001100 2010. 02. 19

A61K 39/395 (2006. 01)

A61P 37/06 (2006. 01)

(87) PCT申请的公布数据

W02010/095455 JA 2010. 08. 26

C07K 14/195 (2006. 01)

C07K 16/00 (2006. 01)

C07K 19/00 (2006. 01)

G01N 33/53 (2006. 01)

(83) 生物保藏信息

FERM BP-10921 2007. 03. 02

(71) 申请人 国立大学法人东京大学

地址 日本东京都

申请人 株式会社英仙蛋白质科学

(72) 发明人 儿玉龙彦 浜洼隆雄 土居洋文

杉山晓 津本浩平

权利要求书 2 页 说明书 14 页

序列表 8 页 附图 8 页

(54) 发明名称

低免疫原性链霉抗生物素蛋白及其应用

(57) 摘要

本发明的课题在于, 提供降低链霉抗生物素蛋白所具有的对于哺乳动物的免疫原性(抗原性)的链霉抗生物素蛋白突变体。根据本发明, 提供了链霉抗生物素蛋白突变体, 其含有如下形成的氨基酸序列, 在序列编号 2 中记载的核心链霉抗生物素蛋白的氨基酸序列中:(a) 第 72 位氨基酸残基的精氨酸置换为其它的氨基酸, 且 (b) 第 10 位氨基酸残基的酪氨酸、第 71 位氨基酸残基的酪氨酸、第 89 位氨基酸残基的谷氨酸、第 91 位氨基酸残基的精氨酸和第 104 位氨基酸残基的谷氨酸中的任意一个以上置换为其它的氨基酸, 与野生型链霉抗生物素蛋白相比, 该突变体的免疫原性降低。

1. 链霉抗生物素蛋白突变体,其含有如下形成的氨基酸序列,在序列编号 2 中记载的核心链霉抗生物素蛋白的氨基酸序列中:(a) 第 72 位氨基酸残基的精氨酸置换为其它的氨基酸,且 (b) 第 10 位氨基酸残基的酪氨酸、第 71 位氨基酸残基的酪氨酸、第 89 位氨基酸残基的谷氨酸、第 91 位氨基酸残基的精氨酸、和第 104 位氨基酸残基的谷氨酸中的任一个以上置换为其它的氨基酸,与野生型链霉抗生物素蛋白相比,该突变体的免疫原性降低。

2. 权利要求 1 所述的链霉抗生物素蛋白突变体,其含有如下形成的氨基酸序列,在序列编号 2 中记载的核心链霉抗生物素蛋白的氨基酸序列中:(a) 第 71 位氨基酸残基的酪氨酸和第 72 位氨基酸残基的精氨酸置换为其它的氨基酸,且 (b) 第 10 位氨基酸残基的酪氨酸、第 89 位氨基酸残基的谷氨酸、第 91 位氨基酸残基的精氨酸、第 104 位氨基酸残基的谷氨酸中的任一个以上置换为其它的氨基酸。

3. 权利要求 1 或 2 所述的链霉抗生物素蛋白突变体,其在序列编号 2 中记载的核心链霉抗生物素蛋白的氨基酸序列中具有以下任意一个以上的突变:

- (1) 第 10 位氨基酸残基的酪氨酸置换为丝氨酸或苏氨酸的突变,
- (2) 第 71 位氨基酸残基的酪氨酸置换为丙氨酸或丝氨酸的突变,
- (3) 第 72 位氨基酸残基的精氨酸置换为赖氨酸的突变,
- (4) 第 89 位氨基酸残基的谷氨酸置换为天冬氨酸的突变,
- (5) 第 91 位氨基酸残基的精氨酸置换为赖氨酸的突变,
- (6) 第 104 位氨基酸残基的谷氨酸置换为谷氨酰胺或天冬酰胺的突变。

4. 链霉抗生物素蛋白突变体,其含有在序列编号 2 中记载的核心链霉抗生物素蛋白的氨基酸序列中具有以下任意一个以上的突变的氨基酸序列,与野生型链霉抗生物素蛋白相比,该突变体的免疫原性降低:

- (1) 第 10 位氨基酸残基的酪氨酸置换为丝氨酸或苏氨酸的突变,
- (2) 第 71 位氨基酸残基的酪氨酸置换为丙氨酸或丝氨酸的突变,
- (3) 第 72 位氨基酸残基的精氨酸置换为赖氨酸的突变,
- (4) 第 89 位氨基酸残基的谷氨酸置换为天冬氨酸的突变,
- (5) 第 91 位氨基酸残基的精氨酸置换为赖氨酸的突变,
- (6) 第 104 位氨基酸残基的谷氨酸置换为谷氨酰胺或天冬酰胺的突变。

5. 链霉抗生物素蛋白突变体,其含有在序列编号 2 中记载的核心链霉抗生物素蛋白的氨基酸序列中具有以下突变的氨基酸序列,与野生型链霉抗生物素蛋白相比,该突变体的免疫原性降低:

- (2) 第 71 位氨基酸残基的酪氨酸置换为丙氨酸或丝氨酸的突变,
- (3) 第 72 位氨基酸残基的精氨酸置换为赖氨酸的突变,
- (4) 第 89 位氨基酸残基的谷氨酸置换为天冬氨酸的突变,
- (6) 第 104 位氨基酸残基的谷氨酸置换为谷氨酰胺或天冬酰胺的突变。

6. 权利要求 5 所述的链霉抗生物素蛋白突变体,其进一步具有以下的突变:

- (1) 第 10 位氨基酸残基的酪氨酸置换为丝氨酸或苏氨酸的突变,
- (5) 第 91 位氨基酸残基的精氨酸置换为赖氨酸的突变。

7. 链霉抗生物素蛋白突变体,其在序列编号 2 中记载的核心链霉抗生物素蛋白的氨基酸序列中具有以下的全部突变:

- (1) 第 10 位氨基酸残基的酪氨酸置换为丝氨酸的突变,
 - (2) 第 71 位氨基酸残基的酪氨酸置换为丝氨酸的突变,
 - (3) 第 72 位氨基酸残基的精氨酸置换为赖氨酸的突变,
 - (4) 第 89 位氨基酸残基的谷氨酸置换为天冬氨酸的突变,
 - (5) 第 91 位氨基酸残基的精氨酸置换为赖氨酸的突变, 以及
 - (6) 第 104 位氨基酸残基的谷氨酸置换为谷氨酰胺或天冬酰胺的突变。
8. DNA, 其编码权利要求 1 至 7 中的任意一项所述的链霉抗生物素蛋白突变体。
9. 链霉抗生物素蛋白突变体 - 抗体结合物, 其通过使抗体与权利要求 1 至 7 中的任意一项所述的链霉抗生物素蛋白突变体结合而得到。
10. 治疗剂或诊断剂, 其含有权利要求 9 所述的链霉抗生物素蛋白突变体 - 抗体结合物。
11. 治疗或诊断试剂盒, 其含有: (a) 权利要求 9 所述的链霉抗生物素蛋白突变体 - 抗体结合物; 和 (b) 用对于链霉抗生物素蛋白具有亲和性的生物素或其衍生物标记的诊断用或治疗用物质。

低免疫原性链霉抗生物素蛋白及其应用

技术领域

[0001] 本发明涉及免疫原性降低的链霉抗生物素蛋白突变体及其应用。更具体地说,本发明涉及通过向氨基酸导入突变来降低免疫原性的链霉抗生物素蛋白突变体及其应用。

背景技术

[0002] 抗生物素蛋白与生物素、或链霉抗生物素蛋白与生物素之间的亲和性非常高 ($K_d=10^{-15} \sim 10^{-14}M$),作为生物体二分子之间的相互作用,其为最强的相互作用之一。现在,抗生物素蛋白/链霉抗生物素蛋白-生物素相互作用广泛应用于生物化学、分子生物学、或医学领域中 (Green, (1975), *Adv. Protein Chem.*, 29: 85-133; Green, (1990), *Methods Enzymol.*, 184: 51-67)。抗生物素蛋白为来源于卵白的碱性糖蛋白,等电点超过 10。另一方面,链霉抗生物素蛋白来源于放线菌(阿维丁氏链霉菌 (*Streptomyces avidinii*)),等电点在中性附近,不含有糖链。这两种蛋白质都形成 4 聚物,每 1 个亚基与 1 分子的生物素结合。分子量为 60kDa 左右。

[0003] 近年,提出了该抗生物素蛋白/链霉抗生物素蛋白与生物素的高结合能力和抗体分子组合而成的药物输送方法:预定位 (Pretargeting) 法 (Hnatowich, (1987), *J. Nucl. Med.*, 28, 1294-1302)。但是,由于来源于鸡的抗生物素蛋白、来源于微生物的链霉抗生物素蛋白对于人体表现出高的免疫原性,在给予人体后,早期产生抗抗生物素蛋白/链霉抗生物素蛋白抗体成为问题,成为阻碍预定位法的实用化的原因之一 (Paganelli, (1991), *Cancer Res.*, 51, 5960-5966)。

[0004] 为了解决上述问题,过去发表了对于链霉抗生物素蛋白的低免疫原性化进行叙述的论文 (Subramanian, (1998), *Bioch. and Mol. Biol. Int.*, 43, 357-82),但链霉抗生物素蛋白对于人体的免疫原性的问题仍然未解决。

[0005] 现有技术文献

专利文献

专利文献 1:美国专利第 5,672,691 号。

[0006] 专利文献 2:美国专利第 6,022,951 号。

[0007] 非专利文献

非专利文献 1:Green, (1975), *Adv. Protein Chem.*, 29: 85-133;

非专利文献 2:Green, (1990), *Methods Enzymol.*, 184: 51-67;

非专利文献 3:Hnatowich, (1987), *J. Nucl. Med.*, 28, 1294-1302;

非专利文献 4:Paganelli, (1991), *Cancer Res.*, 51, 5960-5966)。

[0008] 非专利文献 5:Mapping the common antigenic determinants in avidin and streptavidin. Subramanian, N 等人, *Biochemistry and Molecular Biology International*. 1997, 43, 357-82。

[0009] 非专利文献 6:Reduced antibody response to streptavidin through site-directed mutagenesis Meyer, DL 等人, *Protein Science*. 2001, 10,

491-503。

[0010] 非专利文献 7 :Biotin Reagents for Antibody Pretargeting. 4. Wilbur DS 等人, Bioconjugate Chemistry. 2000, 11(4), 569-583。

发明内容

[0011] 本发明要解决的课题在于,提供作为来源于属于微生物的阿维丁氏链霉菌的蛋白质的链霉抗生物素蛋白所具有的对于哺乳动物的免疫原性(抗原性)得到降低,动物体内的抗链霉抗生物素蛋白抗体产生得到抑制,且维持对于生物素的结合能力的可以用于药物及其它的工业中的各种目的的链霉抗生物素蛋白突变体(低免疫原性链霉抗生物素蛋白)。进一步地,本发明要解决的课题在于,提供使用上述链霉抗生物素蛋白突变体的诊断药物、治疗药物,使用上述链霉抗生物素蛋白突变体的诊断试剂盒、治疗试剂盒。

[0012] 本发明人为了解决上述问题而精心研究,由链霉抗生物素蛋白的立体结构和五肽出现频率分析,选择在人体内形成抗原位点的氨基酸,选出形成低免疫原性化的低免疫原性化候选氨基酸。接着,在以野生型链霉抗生物素蛋白作为模板的基因序列中形成点突变,向低免疫原性化候选氨基酸转换,实施蛋白质表达并实施蛋白纯化。进一步地,对于这些突变体链霉抗生物素蛋白,使用野生型链霉抗生物素蛋白对食蟹猴进行免疫,使用实施了制备的抗链霉抗生物素蛋白抗血清对反应性进行分析后,鉴定出发现与野生型链霉抗生物素蛋白相比抗血清的反应性降低约 40% 以上的突变体链霉抗生物素蛋白,从而完成本发明。

[0013] 即,根据本发明,提供以下的发明。

[0014] [1] 链霉抗生物素蛋白突变体,其含有如下形成的氨基酸序列,在序列编号 2 中记载的核心链霉抗生物素蛋白的氨基酸序列中:(a) 第 72 位氨基酸残基的精氨酸置换为其它的氨基酸,且 (b) 第 10 位氨基酸残基的酪氨酸、第 71 位氨基酸残基的酪氨酸、第 89 位氨基酸残基的谷氨酸、第 91 位氨基酸残基的精氨酸、和第 104 位氨基酸残基的谷氨酸中的任一个以上置换为其它的氨基酸,与野生型链霉抗生物素蛋白相比,该突变体的免疫原性降低。

[0015] [2] [1] 记载的链霉抗生物素蛋白突变体,其含有如下形成的氨基酸序列,在序列编号 2 中记载的核心链霉抗生物素蛋白的氨基酸序列中:(a) 第 71 位氨基酸残基的酪氨酸和第 72 位氨基酸残基的精氨酸置换为其它的氨基酸,且 (b) 第 10 位氨基酸残基的酪氨酸、第 89 位氨基酸残基的谷氨酸、第 91 位氨基酸残基的精氨酸、第 104 位氨基酸残基的谷氨酸中的任一个置换为其它的氨基酸。

[0016] [3] [1] 或 [2] 记载的链霉抗生物素蛋白突变体,其在序列编号 2 中记载的核心链霉抗生物素蛋白的氨基酸序列中具有以下任意一个以上的突变:

- (1) 第 10 位氨基酸残基的酪氨酸置换为丝氨酸或苏氨酸的突变,
- (2) 第 71 位氨基酸残基的酪氨酸置换为丙氨酸或丝氨酸的突变,
- (3) 第 72 位氨基酸残基的精氨酸置换为赖氨酸的突变,
- (4) 第 89 位氨基酸残基的谷氨酸置换为天冬氨酸的突变,
- (5) 第 91 位氨基酸残基的精氨酸置换为赖氨酸的突变,
- (6) 第 104 位氨基酸残基的谷氨酸置换为谷氨酰胺或天冬酰胺的突变。

[0017] [4] 链霉抗生物素蛋白突变体,其含有在序列编号 2 中记载的核心链霉抗生物素

蛋白的氨基酸序列中具有以下任意一个以上的突变的氨基酸序列,与野生型链霉抗生物素蛋白相比,该突变体的免疫原性降低:

- (1) 第 10 位氨基酸残基的酪氨酸置换为丝氨酸或苏氨酸的突变,
- (2) 第 71 位氨基酸残基的酪氨酸置换为丙氨酸或丝氨酸的突变,
- (3) 第 72 位氨基酸残基的精氨酸置换为赖氨酸的突变,
- (4) 第 89 位氨基酸残基的谷氨酸置换为天冬氨酸的突变,
- (5) 第 91 位氨基酸残基的精氨酸置换为赖氨酸的突变,
- (6) 第 104 位氨基酸残基的谷氨酸置换为谷氨酰胺或天冬酰胺的突变。

[0018] [5] 链霉抗生物素蛋白突变体,其含有在序列编号 2 中记载的核心链霉抗生物素蛋白的氨基酸序列中具有以下突变的氨基酸序列,与野生型链霉抗生物素蛋白相比,该突变体的免疫原性降低:

- (2) 第 71 位氨基酸残基的酪氨酸置换为丙氨酸或丝氨酸的突变,
- (3) 第 72 位氨基酸残基的精氨酸置换为赖氨酸的突变,
- (4) 第 89 位氨基酸残基的谷氨酸置换为天冬氨酸的突变,
- (6) 第 104 位氨基酸残基的谷氨酸置换为谷氨酰胺或天冬酰胺的突变。

[0019] [6] [5] 中记载的链霉抗生物素蛋白突变体,其进一步具有以下的突变:

- (1) 第 10 位氨基酸残基的酪氨酸置换为丝氨酸或苏氨酸的突变,
- (5) 第 91 位氨基酸残基的精氨酸置换为赖氨酸的突变。

[0020] [7] 链霉抗生物素蛋白突变体,其在序列编号 2 中记载的核心链霉抗生物素蛋白的氨基酸序列中具有以下的全部突变:

- (1) 第 10 位氨基酸残基的酪氨酸置换为丝氨酸的突变,
- (2) 第 71 位氨基酸残基的酪氨酸置换为丝氨酸的突变,
- (3) 第 72 位氨基酸残基的精氨酸置换为赖氨酸的突变,
- (4) 第 89 位氨基酸残基的谷氨酸置换为天冬氨酸的突变,
- (5) 第 91 位氨基酸残基的精氨酸置换为赖氨酸的突变,以及
- (6) 第 104 位氨基酸残基的谷氨酸置换为谷氨酰胺或天冬酰胺的突变。

[0021] [8] DNA,其编码 [1] ~ [7] 中的任意一项记载的链霉抗生物素蛋白突变体。

[0022] [9] 用抗体标记的链霉抗生物素蛋白突变体,其通过使抗体与 [1] ~ [7] 中的任意一项记载的链霉抗生物素蛋白突变体结合而得到。

[0023] [10] 治疗剂或诊断剂,其含有 [9] 中记载的用抗体标记的链霉抗生物素蛋白突变体。

[0024] [11] 治疗或诊断试剂盒,其含有 (a) [9] 中记载的用抗体标记的链霉抗生物素蛋白突变体和 (b) 用对于链霉抗生物素蛋白具有亲和性的生物素或其衍生物标记的诊断用或治疗用物质。

[0025] 本发明的突变体链霉抗生物素蛋白的特征在于,在维持对于生物素的结合能力的同时,对于哺乳动物的免疫原性(抗原性)降低,因此动物体内的抗链霉抗生物素蛋白抗体产生得到抑制。本发明的突变体链霉抗生物素蛋白可以用于药物及其它工业中的各种目的中。

附图说明

- [0026] 图 1 表示 Biacore 分析中的传感图。
- [0027] 图 2 表示对于突变体链霉抗生物素蛋白的抗血清的反应性。
- [0028] 图 3 表示天然型链霉抗生物素蛋白、mcSA040、mcSA072、mcSA314、mcSA414 的热变化 (thermal shift) 测定的结果。
- [0029] 图 4 表示 B5209B 小鼠 scFv-mcSA414 (SA) 的表达载体的结构。
- [0030] 图 5 表示 B5209B scFv-mcSA414 通过 Ni²⁺ 亲和柱纯化的结果。
- [0031] 图 6 表示通过尺寸排阻色谱将 B5209B scFv-mcSA414 最终纯化的结果。
- [0032] 图 7 表示 B5209B scFv-mcSA414 和 ROBO1 的等温滴定量热测定 (ITC) 的结果。
- [0033] 图 8 表示 B5209B scFv-mcSA414 和生物素的等温滴定量热测定 (ITC) 的结果。
- [0034] 图 9 表示 B5209B scFv-mcSA414 的差示扫描量热测定 (DSC) 的结果。

具体实施方式

- [0035] 以下对本发明进行更具体的说明。
- [0036] 本发明的链霉抗生物素蛋白突变体的特征在于,在序列编号 2 中记载的核心链霉抗生物素蛋白的氨基酸序列中,具有规定的氨基酸的突变,与野生型链霉抗生物素蛋白相比免疫原性降低。
- [0037] 野生型(天然)的核心链霉抗生物素蛋白的氨基酸序列在序列表的序列编号 2 中示出,编码它的碱基序列在序列表的序列编号 1 中示出。
- [0038] 根据第一方式,本发明的链霉抗生物素蛋白突变体含有如下形成的氨基酸序列,在序列编号 2 中记载的核心链霉抗生物素蛋白的氨基酸序列中:(a) 第 72 位氨基酸残基的精氨酸置换为其它的氨基酸,且 (b) 第 10 位氨基酸残基的酪氨酸、第 71 位氨基酸残基的酪氨酸、第 89 位氨基酸残基的谷氨酸、第 91 位氨基酸残基的精氨酸、和第 104 位氨基酸残基的谷氨酸中的任意一个以上置换为其它的氨基酸。
- [0039] 根据第二方式,本发明的链霉抗生物素蛋白突变体含有在序列编号 2 中记载的核心链霉抗生物素蛋白的氨基酸序列中具有以下任意一个以上的突变的氨基酸序列:
- (1) 第 10 位氨基酸残基的酪氨酸置换为丝氨酸或苏氨酸的突变,
 - (2) 第 71 位氨基酸残基的酪氨酸置换为丙氨酸或丝氨酸的突变,
 - (3) 第 72 位氨基酸残基的精氨酸置换为赖氨酸的突变,
 - (4) 第 89 位氨基酸残基的谷氨酸置换为天冬氨酸的突变,
 - (5) 第 91 位氨基酸残基的精氨酸置换为赖氨酸的突变,
 - (6) 第 104 位氨基酸残基的谷氨酸置换为谷氨酰胺或天冬酰胺的突变。
- [0040] 在第 10 位氨基酸残基的酪氨酸置换为其它的氨基酸的情况下,作为其它的氨基酸的具体例,可以举出甘氨酸、丝氨酸或苏氨酸,特别优选地,可以举出丝氨酸或苏氨酸。
- [0041] 在第 71 位氨基酸残基的酪氨酸置换为其它的氨基酸的情况下,作为其它的氨基酸的具体例,可以举出甘氨酸、丙氨酸或丝氨酸,特别优选地,可以举出丙氨酸或丝氨酸。
- [0042] 在第 72 位氨基酸残基的精氨酸置换为其它的氨基酸的情况下,作为其它的氨基酸的具体例,可以举出甘氨酸或赖氨酸,特别优选地,可以举出赖氨酸。
- [0043] 在第 89 位氨基酸残基的谷氨酸置换为其它的氨基酸的情况下,作为其它的氨基

酸的具体例,可以举出甘氨酸、丙氨酸或天冬氨酸,特别优选地,可以举出天冬氨酸。

[0044] 在第 91 位氨基酸残基的精氨酸替换为其它的氨基酸的情况下,作为其它的氨基酸的具体例,可以举出甘氨酸或赖氨酸,特别优选地,可以举出赖氨酸。

[0045] 在第 104 位氨基酸残基的谷氨酸替换为其它的氨基酸的情况下,作为其它的氨基酸的具体例,可以举出丝氨酸、谷氨酰胺或天冬酰胺,特别优选地,可以举出谷氨酰胺或天冬酰胺。

[0046] 本发明中所称的与野生型链霉抗生物素蛋白相比免疫原性降低指的是,在将链霉抗生物素蛋白突变体给予人等哺乳动物的情况下免疫原性降低。例如,可以用以下的方法确认免疫原性降低。即,对于本发明的突变体链霉抗生物素蛋白,使用野生型链霉抗生物素蛋白免疫食蟹猴,分析对于得到的抗链霉抗生物素蛋白抗血清的反应性,若对于上述抗链霉抗生物素蛋白抗血清的反应性与野生型链霉抗生物素蛋白相比降低,则可以判断与野生型链霉抗生物素蛋白相比免疫原性降低。在用上述方法判断免疫原性降低的情况下,与野生型链霉抗生物素蛋白相比,本发明的链霉抗生物素蛋白突变体的免疫原性优选降低为 80% 以下,进一步优选降低为 60% 以下,进一步优选降低为 20% 以下,进一步优选降低为 15% 以下,进一步优选降低为 10% 以下,特别优选降低为 5% 以下。

[0047] 根据本发明,进一步提供编码上述本发明的链霉抗生物素蛋白突变体的 DNA。本发明的 DNA 可以通过对编码野生型(天然)链霉抗生物素蛋白的 DNA 进行位点定向诱变来制备。

[0048] 编码上述本发明的链霉抗生物素蛋白突变体的 DNA 可以整合到载体中来使用。特别地,为了制备本发明的链霉抗生物素蛋白突变体,将编码本发明的链霉抗生物素蛋白突变体的 DNA 整合到表达载体中,将该表达载体转化到宿主中,由此可以表达本发明的链霉抗生物素蛋白突变体。

[0049] 在以大肠杆菌作为宿主的情况下,作为本发明中使用的载体,优选具有复制起点(ori),进一步具有用于选择所转化的宿主的基因(例如对于氨苄青霉素、四环素、卡那霉素或氯霉素等药物的耐药性基因等)。此外,在表达载体的情况下,优选具有可以在宿主中有效地表达本发明的链霉抗生物素蛋白突变体的启动子,例如 IacZ 启动子或 T7 启动子等。作为这种载体,作为载体的例子,可以举出 M13 系载体、pUC 系载体、pBR322、pBluescript、pCR-Script、pGEX-5X-1(ファルマシア)、“QIAexpress 系统”(キアゲン)、pEGFP、或 pET(此时,宿主优选使用表达 T7 RNA 聚合酶的 BL21)等。此外,在载体中也可以附加用于提高本发明的链霉抗生物素蛋白突变体的产量的信号序列等。

[0050] 载体向宿主细胞的导入例如可以使用氯化钙法、电穿孔法来进行。此外,可以附加编码用于提高可溶性的标签,例如谷胱甘肽-S-转移酶、硫氧还蛋白、麦芽糖结合蛋白质的序列。此外,也可以附加编码以容易纯化作为目的而设计的标签,例如多组氨酸标签、Myc 表位、血凝素(HA)表位、T7 表位、Xpress 标签、FLAG 肽标签、其它公知的标签序列的序列。

[0051] 除了大肠杆菌之外,可以举出来源于哺乳动物的表达载体(例如 pcDNA3(インビトロゲン社制)、pEGF-BOS(Nucleic Acids. Res.1990, 18(17), p5322)、pEF、pCDM8)、来源于昆虫细胞的表达载体(例如“Bac-to-BAC 杆状病毒表达系统”(ギブコ BRL 社制)、pBacPAK8)、来源于植物的表达载体(例如 pMH1、pMH2)、来源于动物病毒的表达载体(例如 pHSV、pMV、pAdexLcw)、来源于逆转录病毒的表达载体(例如 pZIPneo)、来源于酵母的表达

载体（例如“毕赤酵母表达试剂盒 (Pichia Expression Kit)”（インビトロゲン社制）、pNV11、SP-Q01）、来源于枯草菌的表达载体（例如 pPL608、pKTH50）。

[0052] 在以 CHO 细胞、COS 细胞、NIH3T3 细胞等动物细胞中的表达为目的的情况下，具有用于细胞内表达所必需的启动子，例如 SV40 启动子 (Mulligan 等人，Nature (1979) 277, 108)、MLLV-LTR 启动子、EF1 α 启动子 (Mizushima 等人，Nucleic Acids Res. (1990) 18, 5322)、CMV 启动子等是不可欠缺的，若具有用于选择向细胞的转化的基因（例如通过药物（新霉素、G418 等）可以判别的耐药性基因）则进一步优选。作为具有这种特性的载体，可以举出例如 pMAM、pDR2、pBK-RSV、pBK-CMV、pOPRSV、pOP13 等。

[0053] 对导入了载体的宿主细胞不作特别限定，其可以为原核生物和真核生物中的任意一种。例如可以使用大肠杆菌、各种动物细胞等。

[0054] 在使用真核细胞的情况下，宿主例如可以使用动物细胞、植物细胞、真菌细胞。作为动物细胞，可以使用诸如 CHO 细胞、COS 细胞、3T3 细胞、HeLa 细胞、Vero 细胞的哺乳类细胞，或诸如 Sf9、Sf21、Tn5 等昆虫细胞。在动物细胞中，在以大量表达为目的的情况下，特别优选 CHO 细胞。载体向宿主细胞的导入例如可以通过磷酸钙法、DEAE 葡聚糖法、使用阳离子脂质体 DOTAP（ベーリンガーマンハイム社制）的方法、电穿孔法、脂转染法等方法来进行。

[0055] 作为植物细胞，例如来源于烟草 (*Nicotiana tabacum*) 的细胞作为蛋白质生产系统是已知的，可以将其进行愈伤组织培养。作为真菌细胞，酵母、例如酵母属 (*Saccharomyces*)、例如酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*)，丝状菌、例如曲霉属 (*Aspergillus*)、例如黑曲霉 (*Aspergillus Niger*) 是已知的。

[0056] 在使用原核细胞的情况下，可以举出大肠杆菌 (*E. coli*)，例如 JM109、DH5 α 、HB101 等，此外枯草杆菌是已知的。

[0057] 通过本发明的 DNA 转化这些细胞，将所转化的细胞在体外培养，由此得到本发明的链霉抗生物素蛋白突变体。培养可以根据公知的方法进行。例如作为动物细胞的培养液，例如可以使用 DMEM、MEM、RPMI 1640、IMDM。此时，也可以并用胎牛血清 (FCS) 等血清补充液，也可以进行无血清培养。培养时的 pH 优选约为 6 ~ 8。培养通常在约 30 ~ 40 $^{\circ}$ C 下进行约 15 ~ 200 小时，根据需要附加培养基的更换、通气、搅拌。此外，可以添加用于促进细胞的增殖的生长因子。

[0058] 进一步地，根据本发明，提供通过将抗体结合于本发明的链霉抗生物素蛋白突变体而得到的链霉抗生物素蛋白突变体 - 抗体结合物、以及含有链霉抗生物素蛋白突变体 - 抗体结合物的治疗剂或诊断剂。进一步地，可以将上述链霉抗生物素蛋白突变体 - 抗体结合物与用对于链霉抗生物素蛋白具有亲和性的生物素或其衍生物标记的诊断用或治疗用物质组合，提供为治疗或诊断试剂盒。

[0059] 即，本发明中，制备癌抗原特异性抗体分子与本发明的链霉抗生物素蛋白突变体的融合体，给予患者，由此可以对于癌细胞特异性地聚集本发明的链霉抗生物素蛋白突变体。接着，将与对于链霉抗生物素蛋白具有亲和性的生物素或其衍生物结合的诊断用或治疗用物质（放射性同位素、低分子化合物、蛋白质等）给予患者，由此可以准确地使物质向癌细胞聚集。本发明中，通过低免疫原性化，抗体产生得到抑制，可以防止由于抗体所导致的早期从体内清除、过敏反应等休克。

[0060] 与链霉抗生物素蛋白突变体结合的抗体可以使用各种分子。可以使用多克隆抗体、单克隆抗体中的任意一种。对抗体的亚型不特别限定,优选使用 IgG,特别适合使用 IgG₁。此外,“抗体”含有全部的改变抗体和抗体片段。可以举出人化抗体、人型抗体、人抗体,来源于小鼠、兔、大鼠、豚鼠、猴等各种动物的抗体,人抗体与来源于各种动物的抗体的嵌合抗体,双抗体、scFv、Fd、Fab、Fab'、F(ab)'₂,但是不限于此。

[0061] 链霉抗生物素蛋白突变体与抗体的结合物可以使用本领域技术人员公知的方法得到。例如,可以通过化学结合方法 (US5,608,060) 得到,也可以通过将编码链霉抗生物素蛋白突变体的 DNA 与编码抗体的 DNA 连接、使用表达载体等在宿主细胞表达而作为融合蛋白得到。编码链霉抗生物素蛋白突变体的 DNA 与编码抗体的 DNA 的连接可以通过编码称为接头的适当的肽的 DNA 进行。期望的是,保留抗体与靶分子的特异结合力来制备链霉抗生物素蛋白突变体-抗体结合物。

[0062] 通过以下的实施例对本发明进行具体的说明,但是本发明不被实施例所限定。

实施例

[0063] 实施例 1:低免疫原性链霉抗生物素蛋白的设计

基于序列编号 1 和 2 中记载的核心链霉抗生物素蛋白的基因序列和氨基酸序列,对具有满足以下条件的突变的突变体链霉抗生物素蛋白的序列进行研究,设计了具有表 1 中记载的突变的突变体链霉抗生物素蛋白。

- [0064] (1) 预测与抗体的融合蛋白在人体内免疫原性尽可能减小的序列,
(2) 尽可能维持对于生物素分子的高亲和力的序列。

[0065] [表 1]

表 1:突变一览表

名称	突变1	突变2	突变3	突变4	突变5	突变6
mcSA010		Y83A	R84K			E116N
mcSA020		Y83A	R84K			E116Q
mcSA030		Y83S	R84K			E116N
mcSA040		Y83S	R84K			E116Q
mcSA114	Y22S	Y83A	R84K	E101D	R103K	E116N
mcSA124	Y22T	Y83A	R84K	E101D	R103K	E116N
mcSA214	Y22S	Y83A	R84K	E101D	R103K	E116Q
mcSA224	Y22T	Y83A	R84K	E101D	R103K	E116Q
mcSA314	Y22S	Y83S	R84K	E101D	R103K	E116N
mcSA324	Y22T	Y83S	R84K	E101D	R103K	E116N
mcSA414	Y22S	Y83S	R84K	E101D	R103K	E116Q
mcSA424	Y22T	Y83S	R84K	E101D	R103K	E116Q
mcSA001			R84K			
mcSA002		Y83A				E116N
mcSA003		Y83A				E116Q
mcSA004		Y83S				E116N
mcSA005		Y83S				E116Q
mcSA083						E116N
mcSA091						E116Q
mcSA101		Y83A	R84K			
mcSA111		Y83S	R84K			

[0066] 表 1 中的 Y22 对应于序列表的序列编号 2 中记载的氨基酸序列中的第 10 位氨基酸残基的酪氨酸。表 1 中的 Y22S 表示由上述酪氨酸置换为丝氨酸,表 1 中的 Y22T 表示由上述酪氨酸置换为苏氨酸。

[0067] 表 1 中的 Y83 对应于序列表的序列编号 2 中记载的氨基酸序列中的第 71 位氨基酸残基的酪氨酸。表 1 中的 Y83A 表示由上述酪氨酸置换为丙氨酸,表 1 中的 Y83S 表示由上述酪氨酸置换为丝氨酸。

[0068] 表 1 中的 R84 对应于序列表的序列编号 2 中记载的氨基酸序列中的第 72 位氨基酸残基的精氨酸。表 1 中的 R84K 表示由上述精氨酸置换为赖氨酸。

[0069] 表 1 中的 E101 对应于序列表的序列编号 2 中记载的氨基酸序列中的第 89 位氨基酸残基的谷氨酸。表 1 中的 E101D 表示由上述谷氨酸置换为天冬氨酸。

[0070] 表 1 中的 R103 对应于序列表的序列编号 2 中记载的氨基酸序列中的第 91 位氨基酸残基的精氨酸。表 1 中的 R103K 表示由上述精氨酸置换为赖氨酸。

[0071] 表 1 中的 E116 对应于序列表的序列编号 2 中记载的氨基酸序列中的第 104 位氨基酸残基的谷氨酸。表 1 中的 E116N 表示由上述谷氨酸置换为天冬酰胺,表 1 中的 E116Q 表示由上述谷氨酸置换为谷氨酰胺。

[0072] 实施例 2:突变体链霉抗生物素蛋白的制备

(1) 野生型核心链霉抗生物素蛋白的碱基序列的合成

利用人工基因合成(Integrated DNA Technologies 公司)的服务产生编码序列表的序列编号 1 所示的核心链霉抗生物素蛋白的基因的碱基序列。

[0073] (2) 表达载体的构建

以上述序列作为模板,使用通过 PCR 在 5' 端侧附加 HindIII 位点、在 3' 端侧附加 EcoRI

位点的下述引物 1 和 2, 进行 PCR 后, 用限制酶 HindIII、EcoRI 进行处理。

[0074] 引物 1 :GCTCTTCAAAGCTTTGGCCGAAGCTGGTATCACTG (序列编号 3)

引物 2 :CTCGAGGAATTCTTAGCTAGCAGCAGAAGGCTTAAC (序列编号 4)

将限制酶处理过的样品在电泳后进行凝胶纯化。同样地, 对于 pPAL7 载体 (BIO-RAD 公司制) 也实施酶处理, 进行凝胶纯化。使用 2× 快速连接缓冲液 (Rapid Ligation Buffer) 和 T4DNA 聚合酶 (都为 Promega 公司), 通过指定的方法, 对纯化了的载体和 PCR 产物实施连接。大肠杆菌的转化通过对于 50 微升的 DH5 α 感受态细胞 (TOYOBO 公司制造) 添加 2 微升的连接产物来实施。使用 Miniprep Kit (QIAGEN 公司制) 实施质粒的提取, 通过对得到的质粒的序列分析实施序列的确认。

[0075] (3) 突变株的制作

以上述野生型链霉抗生物素蛋白表达载体作为模板, 利用位点定向诱变 (Site-Directed Mutagenesis) 法, 通过碱基序列的置换进行密码子序列的变更, 并进行氨基酸序列的变换。即, 使变更的碱基序列大致成为中心来设计长度为 28 ~ 30 个碱基的互补引物, 以野生型链霉抗生物素蛋白表达载体作为模板实施 PCR 法。然后, 用限制酶 DpnI 切断模板质粒, 进行大肠杆菌的转化。

[0076] 引物:

Y22S Fw: CACTGGCACCTGGTCGAACCAACTGGGGTC (序列编号 5)

Y22T Fw: CACTGGCACCTGGACTAACCAACTGGGGTC (序列编号 6)

E101D FW: CGTTGGCGGTGCTGATGCTCGTATCAACAC (序列编号 7)

R103K FW: GGTGCTGATGCTAAGATCAACACTCAGTGG (序列编号 8)

Y83A FW: GGAAAAACAACGCCCGTAATGCGCACAGCG (序列编号 9)

Y83S FW: GGAAAAACAACCTCGCGTAATGCGCACAGCG (序列编号 10)

R84K FW: GAAAAACAACATAAGAATGCGCACAGCG (序列编号 11)

E116N FW: CATCCGGCACTACCAATGCGAATGCATGG (序列编号 12)

E160Q FW: CATCCGGCACTACCCAAGCGAATGCATGG (序列编号 13)。

[0077] (4) 重组蛋白质的表达

将整合了野生型链霉抗生物素蛋白和突变体链霉抗生物素蛋白的基因序列的 pPAL7 表达载体根据常规方法转染到大肠杆菌 BL21 (BIO-RAD 公司) 中。各蛋白质的表达如下实施。即, 在 37 度下进行培养直至大肠杆菌培养液的细胞密度为 OD(600nm) 0.5 ~ 0.7, 添加 IPTG (异丙基- β -D-硫代吡喃半乳糖苷 (Isopropyl- β -D-Thiogalactopyranoside) 以使其最终浓度为 1mM, 诱导蛋白质表达, 在 20 度下进行 24 小时的培养。培养 24 小时后, 通过对菌体进行离心分离而收集细胞, 在 -20 度下保存直至蛋白质纯化。

[0078] (5) 重组蛋白质的纯化

重组蛋白质的纯化使用 Profinity eXact Protein Purification System (BIO-RAD 公司制) 的方法实施。以培养容量的 1/20 添加 BugBuster (Novagen 公司), 进行细胞的溶解。将离心分离后上清作为总可溶性蛋白质。根据 Profinity eXact Mini Spin Columns (BIO-RAD) 的用法容量处理所回收的可溶性级分。使用 10 ~ 20% レディーゲル J (BIO-RAD 公司制), 对总可溶性蛋白质、柱通过级分、洗涤级分、洗脱级分进行 SDS-PAGE 电泳。电泳后, 将蛋白质用 SimplyBlue SafeStain (Invitrogen 公司制) 染色, 实施纯化纯度

的确认。

[0079] 实施例 3:食蟹猴抗链霉抗生物素蛋白抗血清的制备

对于食蟹猴,每次给予 1 毫克的重组链霉抗生物素蛋白 (PIERCE 公司制),以 2 周为间隔给予 3 次。将给予前采血作为第 1 天 (Day1),在第 8、15、29、36、50、57 天实施给予 (イナリサーチ株式会社)。

[0080] 实施例 4:蛋白质与生物素的结合性的分析

(1) 使用ピアコア生物传感器进行的蛋白质与生物素的相互作用的动力学分析

ピアコア (注册商标) 的生物传感器的配体 (粘贴在传感器芯片上的物质) 为抗小鼠 IgG 抗体 (GE ヘルステアバイオサイエンス社制)。另一方面,作为分析物 (在流路系统中流通的物质),制备生物素化的小鼠抗体和各种链霉抗生物素蛋白突变体,通过 Biacore (注册商标) 3000 (以表面等离子共振为原理的生物传感器、GE ヘルステアバイオサイエンス社制) 进行分子间相互作用的分析。将抗小鼠 IgG 抗体通过胺偶联法固定化在 CM5 传感器芯片的全部流通池 (flow cell) 上。各流通池的固定化量为 8000RU。接着,作为参考用,将非生物素化小鼠抗体捕获到流通池 1 和 3 中,将生物素化小鼠抗体捕获到流通池 2 和 4 中。将各种链霉抗生物素蛋白在 1 和 2 或 3 和 4 中以流速 20 微升/分钟负载到运行缓冲液 (HBS-EP、GE ヘルステアバイオサイエンス社制) 中 2 分钟。然后,监控样品的解离 7 分钟。然后,用 10mM 甘氨酸盐酸缓冲液、pH1.7 (GE ヘルステアバイオサイエンス社制) 进行再生操作,实施重复测定。使用分析软件 BIAevaluation ver. 4.1,使用 1:1 结合模型,由得到的传感图进行反应速度论的分析,计算结合速度常数 (k_a) 和解离速度常数 (k_d)。解离常数 (K_d) 由 k_d/k_a 求出。

[0081] 通过 Biacore (注册商标) 3000 (以表面等离子共振为原理的生物传感器、GE ヘルステアバイオサイエンス社制) 进行的重组链霉抗生物素蛋白与生物素的分子间相互作用的动力学分析结果如表 2 所示。

[0082] [表 2]

表 2:链霉抗生物素蛋白变体与生物素的相互作用动力学

蛋白质	分子量 (kDa)	结合速度常数 k_a ($M^{-1} s^{-1}$)	解离速度常数 k_d (s^{-1})	解离常数 K_d (M)
cSA WT	60	2.81×10^5	6.32×10^{-5}	2.25×10^{-10}
mcSA_W120A	60	2.81×10^5	7.49×10^{-4}	3.53×10^{-9}
mcSA10	60	2.81×10^5	8.96×10^{-5}	2.25×10^{-10}
mcSA114	60	3.61×10^5	9.92×10^{-5}	2.74×10^{-10}
mcSA124	60	3.06×10^5	5.38×10^{-5}	1.76×10^{-10}
mcSA20	60	2.81×10^5	1.60×10^{-4}	4.27×10^{-10}
mcSA214	60	2.64×10^5	1.21×10^{-4}	4.59×10^{-10}
mcSA224	60	2.11×10^5	1.01×10^{-4}	4.81×10^{-10}
mcSA30	60	2.81×10^5	1.55×10^{-4}	3.99×10^{-10}
mcSA314	60	5.99×10^5	1.58×10^{-4}	2.64×10^{-10}
mcSA324	60	3.26×10^5	7.18×10^{-5}	2.20×10^{-10}
mcSA40	60	2.81×10^5	1.69×10^{-4}	2.57×10^{-10}
mcSA414	60	2.31×10^5	5.18×10^{-5}	2.43×10^{-10}
mcSA424	60	1.32×10^5	1.12×10^{-4}	8.45×10^{-10}

[0083] 得到的链霉抗生物素蛋白变体的解离常数为 10^{-10} M 的数量级,与此次我们测定到

的野生型链霉抗生物素蛋白的解离常数为相同的数量级。由该结果可知,链霉抗生物素蛋白变体为与野生型同样地与生物素具有非常高的亲和性的蛋白质。认为可以将其应用于现在广泛应用的链霉抗生物素蛋白·生物素技术中。

[0084] (2) 使用 ピアコア 生物传感器进行的蛋白质与食蟹猴抗血清的相互作用分析

ピアコア(注册商标)的生物传感器的配体(粘贴在传感器芯片上的物质)为 Amine-PEG₃-Biotin(Thermo SCIENTIFIC)和各种链霉抗生物素蛋白变体。另一方面,作为分析物(在流路系统中流通的物质),制备用运行缓冲液(HBS-EP、GE ヘルステアバイオサイエンス社制)稀释 20 倍的食蟹猴抗血清,通过 Biacore(注册商标)3000(以表面等离子共振为原理的生物传感器、GE ヘルステアバイオサイエンス社制)进行分子间相互作用的分析。将 Amine-PEG₃-Biotin(Thermo SCIENTIFIC)通过胺偶联法固定化在 CM5 传感器芯片的全部流通池上。各流通池的固定化量的平均值为 160RU。接着,流通池 2 流通野生型链霉抗生物素蛋白,流通池 3、4 分别流通各种的 2 种链霉抗生物素蛋白变体,通过与生物素的结合反应进行固定化。以流通池 1 作为参考。

[0085] 将稀释的食蟹猴抗血清设定为测定温度 37 度,以 5 微升/分钟负载到运行缓冲液(HBS-EP、GE ヘルステアバイオサイエンス社制)中 2 分钟。然后,监控样品的解离 7 分钟。然后,用 10mM 甘氨酸盐酸缓冲液、pH1.7(GE ヘルステアバイオサイエンス社制)进行再生操作,实施重复测定。使用分析软件 BIAevaluation ver. 4.1,由得到的传感图(图 1)导出链霉抗生物素蛋白变体的结合量、抗血清的反应量,用与各流通池结合的链霉抗生物素蛋白的量进行标准化,比较抗血清的反应。即,通过下式得出数值并制成图(图 2):(抗血清的反应后的值-反应前的值)/链霉抗生物素蛋白的结合量。

[0086] 实施例 5:在计算机芯片上进行的链霉抗生物素蛋白的免疫原性的分析

利用 Epibase T-细胞表位谱分析服务(Algonomics 公司),在计算机芯片上对于野生型链霉抗生物素蛋白、mcSA072、mcSA040、mcSA314、mcSA414 实施免疫原性(immunogenicity)的分析(Desmet, (2005), Proteins, 58, 53-69; ES126528)。预测中使用的同种异型选择在高加索人(Caucasian)、东方人(Oriental)、印欧人(Indo-European)、美国黑人(Afro-American)和西非人(West African)、南太平洋群岛人(Austronesian)、混血人(Mestizo)中出现频率为 30% 以上的那些。对于各同种异型,利用结晶结构或基于结晶结构模型化的最近的结构,使用含有独自侧链的配置方法的方法(Desmet, (2002), Proteins, 48, 31-34)。接着计算受体与靶肽的结合自由能,基于该结合力的强度进行抗原性强度的分类(Kapoerchan, (2009), Mol. Immunol. 47(5), 1091-1097)。

[0087] 对于 37 种 DRB1、8 种 DRB3/4/5、23 种 DQ、10 种 DP、总计 78 种的 HLA II 类受体进行同种异型水平的谱分析,结果在表 3、表 4 中示出。由表示决定性表位的数目的表 3 可知,野生型链霉抗生物素蛋白的 DBR1 表位最少,而 DRB3/4/5 表位最多,另一方面,mcSA314、mcSA414 的 DP 表位消失,而 DQ 表位增加。由总结有影响的同种异型的表 4 可知,与其它的蛋白质相比,mcSA314、mcSA414 的表位的数目减少。由这些结果可知,免疫原性的预测结果为 mcSA314 < mcSA414 < 野生型链霉抗生物素蛋白的顺序(左边的免疫原性低)。

[0088] [表 3]

表 3:在计算机芯片上进行的 T 细胞表位测定(Epibase)的结果

	DRB1	DRB3/4/5	DQ	DP
对照核心链霉抗生物素蛋白	45	12	4	1
mcSA040	48	11	4	1
mcSA072	47	11	4	1
mcSA314	47	10	5	0
mcSA414	46	10	5	0

[0089] [表 4]

表 4:在计算机芯片上进行的 T 细胞表位测定 (Epibase) 的结果

等位基因	血清型	频率	链霉抗生物素蛋白结合体 (critical binders)	mcSA040 临界结合体	mcSA072 临界结合体	mcSA314 临界结合体	mcSA414 临界结合体
DPA1*0103/DPB1*0401	DPw4	65%	1	1	1	0	0
DRB4*0101	DR53	46%	2	2	2	1	1
DRB3*0202	DR52	30%	3	3	3	2	2
DRB1*0701	DR7	25%	6	6	6	6	6
DQA1*0501/DQB1*0201	DQ2	25%	0	0	0	1	1
DPA1*0103/DPB1*0402	DPw4	24%	1	1	1	0	0
DRB1*1501	DR15(2)	23%	7	6	6	5	5
DRB3*0101	DR52	23%	1	1	1	1	1
DRB1*0301	DR17(3)	22%	0	1	0	0	1
DQA1*0501/DQB1*0301	DQ7(3)	21%	1	1	1	1	1
DPA1*0103/DPB1*0201	DPw2	20%	1	1	1	0	0
DRB5*0101	DR51	19%	5	4	4	3	3
DRB1*0101	DR1	15%	11	10	10	9	9
DRB1*0401	DR4	14%	5	7	6	7	7
DRB1*1101	DR11(5)	12%	4	4	4	4	4
DRB1*1301	DR13(6)	11%	4	6	5	6	6
DRB3*0201	DR52	10%	1	1	1	1	1

[0090] 实施例 6:链霉抗生物素蛋白的蛋白质热稳定性评价

对于根据实施例 2 制备的以下 5 种蛋白质实施热变化测定:天然型链霉抗生物素蛋白、mcSA040、mcSA072、mcSA314、mcSA414 (Vedadi, (2006), Proc Natl Sci USA., 103(43), 15835-15840)。在实时 PCR 用管 (PCR Tube Strip, Flat Cap Strip, BIO-RAD 公司制) 中制备样品以使各样品的最终浓度如下所述。将 SYPRO Orange 稀释 5000 倍,使各蛋白质为 10 μM,缓冲液为 1×PBS。此外,以加速蛋白质的热变性为目的,将甘氨酸盐酸溶液的浓度制备成终浓度 0M、0.5M、1M、2M。以反应体积 20 μl 进行。测定装置使用 CFX96 实时 PCR 检测系统 (BIO-RAD 公司制)。CFX96 实时 PCR 检测系统的程序模式使用 FRET 检测用模式,以温度上升为每 10 秒上升 0.5°C 的程序进行反应以及检测。

[0091] 对热变化分析的结果进行分析,分析结果是,改变了的链霉抗生物素蛋白、mcSA040、mcSA072、mcSA314、mcSA414 在 100°C 下表现出与天然型链霉抗生物素蛋白同等的热稳定性 (图 3)。由此暗示上述突变使免疫原性降低,但是对热稳定性无影响。

[0092] 实施例 7:改变单克隆抗体的制备

(1) 由杂交瘤细胞制备总 RNA

作为产生单克隆抗体 B5209B (IgG2b) 的杂交瘤细胞,使用日本特开 2008-290996 号公报中记载的产生单克隆抗体 B5209B 的杂交瘤。该产生单克隆抗体 B5209B 的杂交瘤以保藏号 FERM P-21238 于 2007 年 (平成 19 年) 3 月 2 日保藏于独立行政法人产业技术综合研究所 专利生物保藏中心 (日本国茨城县筑波市东 1-1-1 中央第 6 号 (邮政编码 305-8566)),

进而以保藏号 FERM BP-10921 于 2007 年（平成 19 年）10 月 16 日移交国际保藏。

[0093] 将 1×10^7 个上述产生单克隆抗体 B5209B (IgG2b) 的杂交瘤细胞用磷酸缓冲盐水 (PBS) 洗涤一次后, 向细胞沉淀中加入 Trizol 液 (Invitrogen 公司制) 1ml, 进行可溶化。使提取液通过 20G 注射针 2 次切断 DNA 后, 根据 Trizol 液附属的说明书通过氯仿抽提、异丙醇沉淀、80% 乙醇洗涤来纯化总 RNA, 将其溶解在含有焦碳酸二乙酯的灭菌蒸馏水中。通过琼脂糖凝胶电泳确认得到的总 RNA 未分解。

[0094] (2) IgG 重链 V 区 (VH) cDNA 的合成和克隆

以 5 μ g B5209B 总 RNA 作为模板, 作为 3'-引物, 基于小鼠 IgG2b 重链 C 区 5' 端的 cDNA 序列使用引物 (5'-ccaagcttaggggccagtggatagactg-3') (序列编号 14), 使用 SuperScript cDNA 合成试剂盒 (Invitrogen 公司制), 根据试剂盒的说明书, 合成第一链 cDNA。向得到的第一链 cDNA 中加入 Novagen 公司小鼠 Ig-引物组 (Mouse Ig-Primer Set) 的 MuIgVH5'-A 引物, 使用高保真 PCR 体系 (Expand High Fidelity PCR System) (Roche Diagnostics 公司制) 扩增双链 cDNA。将得到的双链 cDNA 通过 TA 克隆法亚克隆到 pGEM-T 载体 (Promega 公司制) 中, 导入到大肠杆菌 DH5 α 中, 得到含有质粒的载体。将与 6 个克隆有关的质粒 DNA 用 Qiagen Plasmid Midi Kit (Qiagen 公司制) 纯化, 根据常规方法确定 DNA 碱基序列。鉴定出抗体的重链可变区 (VH) 的氨基酸序列为序列编号 16 记载的氨基酸序列中从第 1 位到第 122 位的氨基酸序列。

[0095] (3) 抗 ROBO1 单克隆抗体 B5209B 的 IgG 轻链 N 末端氨基酸序列的确定

使用蛋白 G 柱 (GE Healthcare 公司制), 根据所附的说明书, 由含有单克隆抗体 B5209B (IgG2b) 的杂交瘤无血清培养上清进行抗体的纯化。

[0096] 使用 SDS-PAGE 对纯化的单克隆抗体 B5209B 进行电泳。将电泳凝胶转移到 PVDF 膜后, 进行考马斯染色。切出所染色的 IgG 轻链的带, 通过 Edman 降解法确定 N 末端氨基酸序列 (DIQMT)。

[0097] (4) B5209B 小鼠 -scFv-mcSA414 的表达载体的构建 (图 4)

构建具有图 4 记载的结构 B5209B 小鼠 -scFv-mcSA414 的表达载体。该表达载体中的 B5209B 小鼠 -scFv-SA 的碱基序列在序列编号 15 中记载, 氨基酸序列在序列编号 16 中记载。抗体的重链可变区 (VH) 的氨基酸序列对应于序列编号 16 中第 1 位到第 122 位的氨基酸序列, 抗体的轻链可变区 (VL) 的氨基酸序列对应于序列编号 16 中记载的氨基酸序列中第 142 位到第 248 位的氨基酸序列,

(5) B5209B 小鼠 -scFv-mcSA414 的培养方法

转化大肠杆菌 BL21 (DE3), 用含有 50 μ g/ml 氨苄青霉素的 LB 平板培养基, 在 28 $^{\circ}$ C 条件下培养 20 小时左右。从平板挑取单个菌落, 将其接种到含有 50 μ g/ml 氨苄青霉素的 LB 实验培养基 (3mL) 中之后, 在 28 $^{\circ}$ C 下振荡培养 (140rpm 左右) 18 小时左右。然后, 在含有 50 μ g/ml 氨苄青霉素的 2 \times YT 培养基 (1L) 中对前培养液的全部量进行传代培养, 在 28 $^{\circ}$ C 下振荡培养 (125rpm)。在 OD₆₀₀=0.8 的时点添加终浓度 0.5mM 的 IPTG, 由此进行表达诱导, 接着培养一夜。

[0098] (6) B5209B 小鼠 -scFv-mcSA414 的制备法

从菌体内可用性级分回收目的蛋白质, 通过 Ni²⁺ 亲和柱 HisTrap HP (GE Healthcare 公司制) 进行粗纯化。此时, 流动相使用 50mM Tris-HCl、200mM NaCl、pH 8.0 缓冲液, 使用

50mM Tris-HCl、200mM NaCl、500mM 咪唑、pH 8.0 缓冲液阶段性地进行洗脱（图 5）。回收目的蛋白质洗脱级分，用 50mM Tris-HCl、200 mM NaCl、pH 8.0 缓冲液透析后，通过尺寸排阻色谱进行最终纯化。所使用的柱是 HiLoad 26/60 Superdex 200 (GE Healthcare)，流动相使用 50mM Tris-HCl、200 mM NaCl、pH 8.0 缓冲液。通过 SDS-PAGE 确认最终纯化产物。通过尺寸排阻色谱进行的最终纯化和 SDS-PAGE 的结果在图 6 中示出。

[0099] 实施例 8 :B5209B 小鼠 -scFv-mcSA414 的活性评价

(1) 与 ROBO1 的结合性

通过等温滴定量热测定 (ITC)，进行有关 B5209B 小鼠 -scFv-mcSA414 与 ROBO1 的相互作用的热力学分析。图 7 表示使用 PBS 为溶剂，在 25℃ 条件下，对于 B5209B 小鼠 -scFv-mcSA414 (3.7μM)，每次滴加一定量 ROBO1 时的测定结果。

[0100] 由此算出的解离常数为 3.3×10^{-8} (1/M)，焓变化量 (ΔH) 为 -16.1kJ/mol，此外熵变化量 (ΔS) 为 -22 J/mol·K。若与 scFv 相比，则 ΔH 未发现显著变化。另一方面， ΔS 降低 1/40 左右，亲和性方面发现大致一位数左右的降低。进一步地，在结合比方面，暗示对于 B5209B 小鼠 -scFv-mcSA414 4 聚物结合 2 分子的 ROBO1，认为有可能 4 聚物中邻接的 2 个抗原结合部位由于位阻而只有 1 个能够识别 ROBO1。

[0101] (2) 小鼠 -scFv-mcSA414 与生物素的结合性评价

通过等温滴定量热测定 (ITC)，对 B5209B 小鼠 -scFv-mcSA414 与生物素的结合活性进行评价。图 8 表示使用 PBS 为溶剂，在 25℃ 条件下，对于 B5209B 小鼠 -scFv-SA (9μM)，每次滴加一定量生物素 (90μM) 时的测定结果。

[0102] 由此算出的解离常数为 5.6×10^{-8} (1/M)，焓变化量 (ΔH) 为 -25.5kJ/mol，此外熵变化量 (ΔS) 为检测限以下。

[0103] (3) 小鼠 -scFv-mcSA414 的热稳定性评价

通过差示扫描量热测定 (DSC)，对 B5209B 小鼠 -scFv-mcSA414 的热稳定性进行评价。此时的结果在图 9 中示出。溶剂使用 PBS。B5209B 小鼠 -scFv 的热稳定性为 50℃ 附近，因此推测，B5209B 小鼠 -scFv-SA 的 scFv 结构域的变性温度为 T_m 51.4℃，1 分子的完全变性温度为 T_m 108℃。此外，未检出链霉抗生物素蛋白结构域 4 聚物解离温度，因此推测，中途 4 聚物未解离而完全变性。

序列表

<110> Perseus Proteomics Inc.

<120> 低免疫原性链霉抗生物素蛋白及其应用

<130> 101018A

<160> 16

<210> 1

<211> 381

<212> DNA

<213> 阿维丁氏链霉菌

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(381)

<400> 1

gcc gaa gct ggt atc act ggc acc tgg tat aac caa ctg ggg tcg act 48

Ala Glu Ala Gly Ile Thr Gly Thr Trp Tyr Asn Gln Leu Gly Ser Thr

1 5 10 15

ttc att gtg acc gct ggt gcg gac gga gct ctg act ggc acc tac gaa 96

Phe Ile Val Thr Ala Gly Ala Asp Gly Ala Leu Thr Gly Thr Tyr Glu

20 25 30

tct gcg gtt ggt aac gca gaa tcc cgc tac gta ctg act ggc cgt tat 144

Ser Ala Val Gly Asn Ala Glu Ser Arg Tyr Val Leu Thr Gly Arg Tyr

35 40 45

gac tct gca cct gcc acc gat ggc tct ggt acc gct ctg ggc tgg act 192

Asp Ser Ala Pro Ala Thr Asp Gly Ser Gly Thr Ala Leu Gly Trp Thr

50 55 60

gtg gct tgg aaa aac aac tat cgt aat gcg cac agc gcc act acg tgg 240

Val Ala Trp Lys Asn Asn Tyr Arg Asn Ala His Ser Ala Thr Thr Trp

65 70 75 80

tct ggc caa tac gtt ggc ggt gct gag gct cgt atc aac act cag tgg 288

Ser Gly Gln Tyr Val Gly Gly Ala Glu Ala Arg Ile Asn Thr Gln Trp

85 90 95

ctg tta aca tcc ggc act acc gaa gcg aat gca tgg aaa tcg aca cta 336

Leu Leu Thr Ser Gly Thr Thr Glu Ala Asn Ala Trp Lys Ser Thr Leu

100 105 110

gta ggt cat gac acc ttt acc aaa gtt aag cct tct gct gct agc 381

Val Gly His Asp Thr Phe Thr Lys Val Lys Pro Ser Ala Ala Ser

115 120 125

<210> 2

<211> 127
 <212> PRT
 <213> 阿维丁氏链霉菌
 <400> 2
 Ala Glu Ala Gly Ile Thr Gly Thr Trp Tyr Asn Gln Leu Gly Ser Thr
 1 5 10 15
 Phe Ile Val Thr Ala Gly Ala Asp Gly Ala Leu Thr Gly Thr Tyr Glu
 20 25 30
 Ser Ala Val Gly Asn Ala Glu Ser Arg Tyr Val Leu Thr Gly Arg Tyr
 35 40 45
 Asp Ser Ala Pro Ala Thr Asp Gly Ser Gly Thr Ala Leu Gly Trp Thr
 50 55 60
 Val Ala Trp Lys Asn Asn Tyr Arg Asn Ala His Ser Ala Thr Thr Trp
 65 70 75 80
 Ser Gly Gln Tyr Val Gly Gly Ala Glu Ala Arg Ile Asn Thr Gln Trp
 85 90 95
 Leu Leu Thr Ser Gly Thr Thr Glu Ala Asn Ala Trp Lys Ser Thr Leu
 100 105 110
 Val Gly His Asp Thr Phe Thr Lys Val Lys Pro Ser Ala Ala Ser
 115 120 125
 <210> 3
 <211> 35
 <212> DNA
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 人工序列描述:合成 DNA
 <400> 3
 gctcttcaaa gctttggccg aagctggtat cactg 35
 <210> 4
 <211> 36
 <212> DNA
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 人工序列描述:合成 DNA
 <400> 4
 ctcgaggaat tcttagctag cagcagaagg cttaac 36
 <210> 5
 <211> 30
 <212> DNA

<213> 人工序列	
<220>	
<223> 人工序列描述 :合成 DNA	
<400> 5	
cactggcacc tggtcgaacc aactggggtc	30
<210> 6	
<211> 30	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 人工序列描述 :合成 DNA	
<400> 6	
cactggcacc tggactaacc aactggggtc	30
<210> 7	
<211> 30	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 人工序列描述 :合成 DNA	
<400> 7	
cgttggcggt gctgatgctc gtatcaacac	30
<210> 8	
<211> 30	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 人工序列描述 :合成 DNA	
<400> 8	
ggtgctgatg ctaagatcaa cactcagtgg	30
<210> 9	
<211> 30	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 人工序列描述 :合成 DNA	
<400> 9	
ggaaaaacaa cgcccgtaat gcgcacagcg	30
<210> 10	
<211> 30	

<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 人工序列描述 :合成 DNA	
<400> 10	
ggaaaaacaa ctcgcgtaat gcgcacagcg	30
<210> 11	
<211> 29	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 人工序列描述 :合成 DNA	
<400> 11	
gaaaaacaac tataagaatg cgcacagcg	29
<210> 12	
<211> 29	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 人工序列描述 :合成 DNA	
<400> 12	
catccggcac taccaatgcg aatgcatgg	29
<210> 13	
<211> 29	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 人工序列描述 :合成 DNA	
<400> 13	
catccggcac tacccaagcg aatgcatgg	29
<210> 14	
<211> 28	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 人工序列描述 :合成 DNA	
<400> 14	
ccaagcttag gggccagtgg atagactg	28
<210> 15	

<211> 1191
 <212> DNA
 <213> 小鼠
 <220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(1191)
 <400> 15

atg gcc gag gtg caa ttg gtg gag tct ggg gga ggc gta gtg cag cct 48
 Met Ala Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro
 1 5 10 15
 gga ggg tcc ctg aaa ctc tcc tgt gca gcc tct gga ttc act ttc agt 96
 Gly Gly Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser
 20 25 30
 acc tat gac atg tct tgg gtt cgc cag act cca gac aag agg ctg gag 144
 Thr Tyr Asp Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Asp Lys Arg Leu Glu
 35 40 45
 ttg gtc gca acc att aat agt aat ggt ggt agt acc tat tat cca gac 192
 Leu Val Ala Thr Ile Asn Ser Asn Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Pro Asp
 50 55 60
 agt gtg aag ggc cga ttc acc agt tcc aga gac aat gcc aag aac atc 240
 Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ser Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ile
 65 70 75 80
 ctg tac ctg caa atg agc agt ctg aag tct gag gac aca gcc atg tat 288
 Leu Tyr Leu Gln Met Ser Ser Leu Lys Ser Glu Asp Thr Ala Met Tyr
 85 90 95
 tac tgt gca aga gag gca tta cta cgg ccc cct tac tat gct ttg gac 336
 Tyr Cys Ala Arg Glu Ala Leu Leu Arg Pro Pro Tyr Tyr Ala Leu Asp
 100 105 110
 tac tgg ggt cag gga acc tca gtc acc gtc tcc tcg gcc ggc ggg ggc 384
 Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Ala Gly Gly Gly
 115 120 125
 ggt agc ggc ggt ggc ggg tcg ggc ggt ggc gga tcg gat atc ctc gat 432
 Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Leu Asp
 130 135 140
 att cag atg acc cag tct cca gct tca ctg tct gca tct gtg gga gaa 480
 Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Glu
 145 150 155 160
 act gtc acc atc aca tgt gga gca agt gag aat att tac ggt gct tta 528
 Thr Val Thr Ile Thr Cys Gly Ala Ser Glu Asn Ile Tyr Gly Ala Leu

act tgg tat cag cgg aaa cag gga aaa tct cct cag ctc ctg atc tat	165	170	175	576
Thr Trp Tyr Gln Arg Lys Gln Gly Lys Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr				
	180	185	190	
ggt gca atc aat ttg gca gat gac aag tca tcg agg ttc agt ggc agt				624
Gly Ala Ile Asn Leu Ala Asp Asp Lys Ser Ser Arg Phe Ser Gly Ser				
	195	200	205	
gga tct ggt aga cag tat tct ctc aag atc agt agc ctg cat cct gac				672
Gly Ser Gly Arg Gln Tyr Ser Leu Lys Ile Ser Ser Leu His Pro Asp				
	210	215	220	
gat gtt gca acg tat tac tgt caa aat gtg tta agt act cca ttc acg				720
Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Asn Val Leu Ser Thr Pro Phe Thr				
	225	230	235	240
ttc ggc tcg ggg aca aag ttg gaa ata aaa gcc gcg ggt tct tct ggt				768
Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Ala Ala Gly Ser Ser Gly				
	245	250	255	
tct ggt tct gcg gcg gaa gct ggt atc act ggc acc tgg tcg aac caa				816
Ser Gly Ser Ala Ala Glu Ala Gly Ile Thr Gly Thr Trp Ser Asn Gln				
	260	265	270	
ctg ggg tcg act ttc att gtg acc gct ggt gcg gac gga gct ctg act				864
Leu Gly Ser Thr Phe Ile Val Thr Ala Gly Ala Asp Gly Ala Leu Thr				
	275	280	285	
ggc acc tac gaa tct gcg gtt ggt aac gca gaa tcc cgc tac gta ctg				912
Gly Thr Tyr Glu Ser Ala Val Gly Asn Ala Glu Ser Arg Tyr Val Leu				
	290	295	300	
act ggc cgt tat gac tct gca cct gcc acc gat ggc tct ggt acc gct				960
Thr Gly Arg Tyr Asp Ser Ala Pro Ala Thr Asp Gly Ser Gly Thr Ala				
	305	310	315	320
ctg ggc tgg act gtg gct tgg aaa aac aac tcc aag aat gcg cac agc				1008
Leu Gly Trp Thr Val Ala Trp Lys Asn Asn Ser Lys Asn Ala His Ser				
	325	330	335	
gcc act acg tgg tct ggc caa tac gtt ggc ggt gct gat gct aag atc				1056
Ala Thr Thr Trp Ser Gly Gln Tyr Val Gly Gly Ala Asp Ala Lys Ile				
	340	345	350	
aac act cag tgg ctg tta aca tcc ggc act acc cag gcg aat gca tgg				1104
Asn Thr Gln Trp Leu Leu Thr Ser Gly Thr Thr Gln Ala Asn Ala Trp				
	355	360	365	
aaa tcg aca cta gta ggt cat gac acc ttt acc aaa gtt aag cct tct				1152
Lys Ser Thr Leu Val Gly His Asp Thr Phe Thr Lys Val Lys Pro Ser				

370	375	380	
gct gct agc ggg gcc cgt cac cat cat cac cac cat taa			1191
Ala Ala Ser Gly Ala Arg His His His His His His			
385	390	395	
<210>	16		
<211>	396		
<212>	PRT		
<213>	小鼠		
<400>	16		
Met Ala Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro			
1	5	10	15
Gly Gly Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser			
	20	25	30
Thr Tyr Asp Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Asp Lys Arg Leu Glu			
	35	40	45
Leu Val Ala Thr Ile Asn Ser Asn Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Pro Asp			
	50	55	60
Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ser Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ile			
65	70	75	80
Leu Tyr Leu Gln Met Ser Ser Leu Lys Ser Glu Asp Thr Ala Met Tyr			
	85	90	95
Tyr Cys Ala Arg Glu Ala Leu Leu Arg Pro Pro Tyr Tyr Ala Leu Asp			
	100	105	110
Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Ala Gly Gly Gly			
	115	120	125
Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Leu Asp			
	130	135	140
Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Glu			
145	150	155	160
Thr Val Thr Ile Thr Cys Gly Ala Ser Glu Asn Ile Tyr Gly Ala Leu			
	165	170	175
Thr Trp Tyr Gln Arg Lys Gln Gly Lys Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr			
	180	185	190
Gly Ala Ile Asn Leu Ala Asp Asp Lys Ser Ser Arg Phe Ser Gly Ser			
	195	200	205
Gly Ser Gly Arg Gln Tyr Ser Leu Lys Ile Ser Ser Leu His Pro Asp			
	210	215	220
Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Asn Val Leu Ser Thr Pro Phe Thr			
225	230	235	240

Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Ala Ala Gly Ser Ser Gly
 245 250 255
 Ser Gly Ser Ala Ala Glu Ala Gly Ile Thr Gly Thr Trp Ser Asn Gln
 260 265 270
 Leu Gly Ser Thr Phe Ile Val Thr Ala Gly Ala Asp Gly Ala Leu Thr
 275 280 285
 Gly Thr Tyr Glu Ser Ala Val Gly Asn Ala Glu Ser Arg Tyr Val Leu
 290 295 300
 Thr Gly Arg Tyr Asp Ser Ala Pro Ala Thr Asp Gly Ser Gly Thr Ala
 305 310 315 320
 Leu Gly Trp Thr Val Ala Trp Lys Asn Asn Ser Lys Asn Ala His Ser
 325 330 335
 Ala Thr Thr Trp Ser Gly Gln Tyr Val Gly Gly Ala Asp Ala Lys Ile
 340 345 350
 Asn Thr Gln Trp Leu Leu Thr Ser Gly Thr Thr Gln Ala Asn Ala Trp
 355 360 365
 Lys Ser Thr Leu Val Gly His Asp Thr Phe Thr Lys Val Lys Pro Ser
 370 375 380
 Ala Ala Ser Gly Ala Arg His His His His His His
 385 390 395

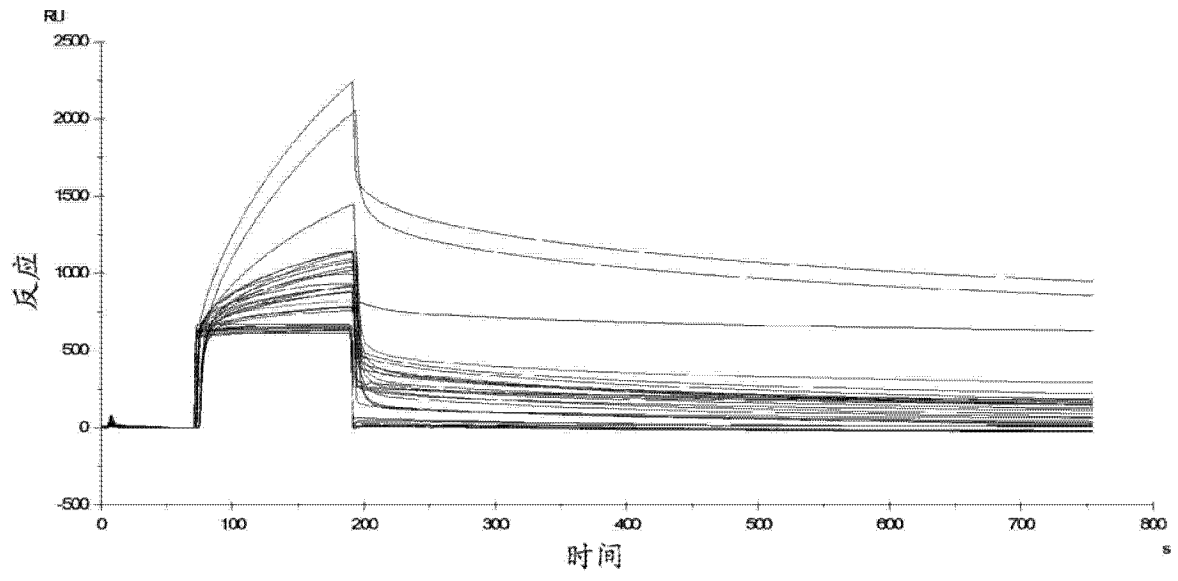


图 1

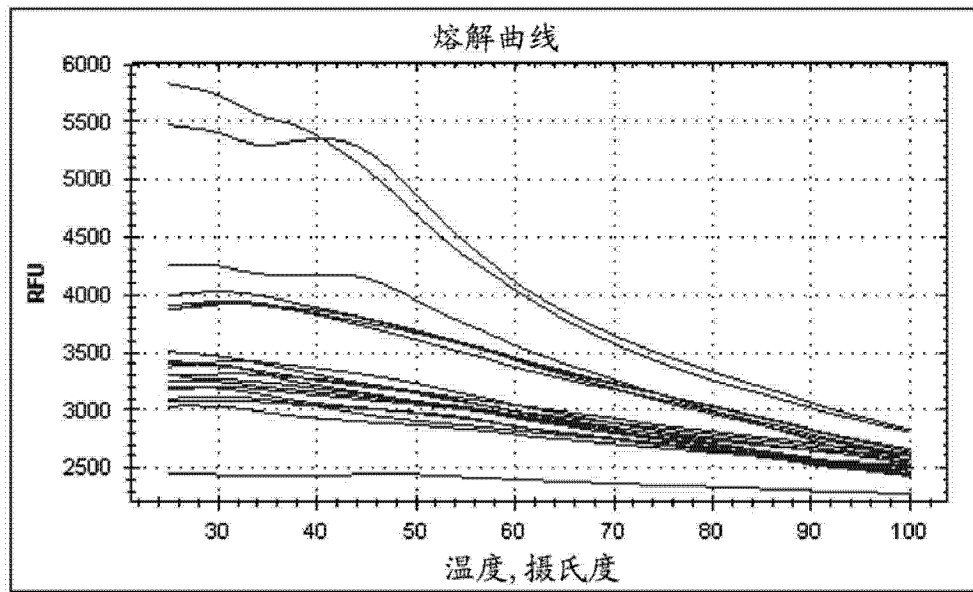


图 3

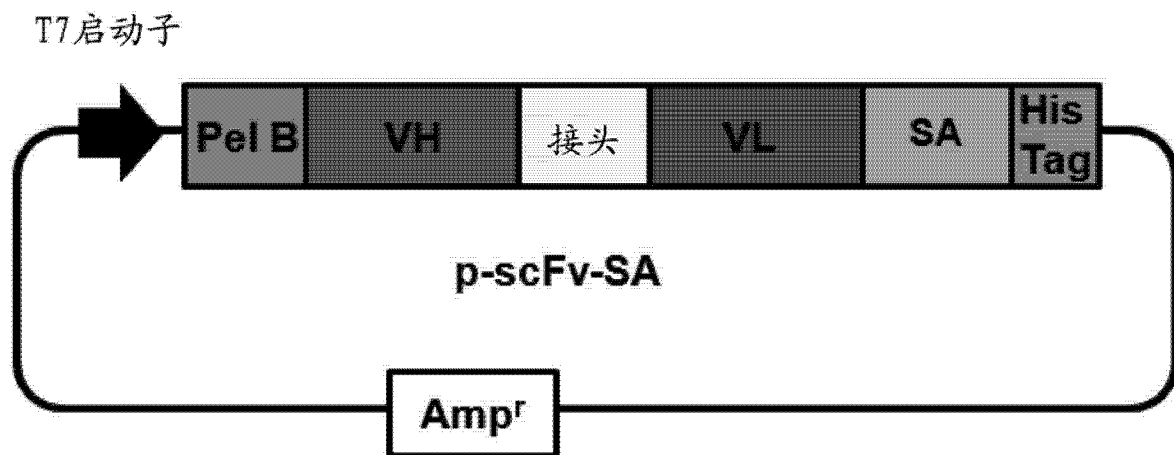


图 4

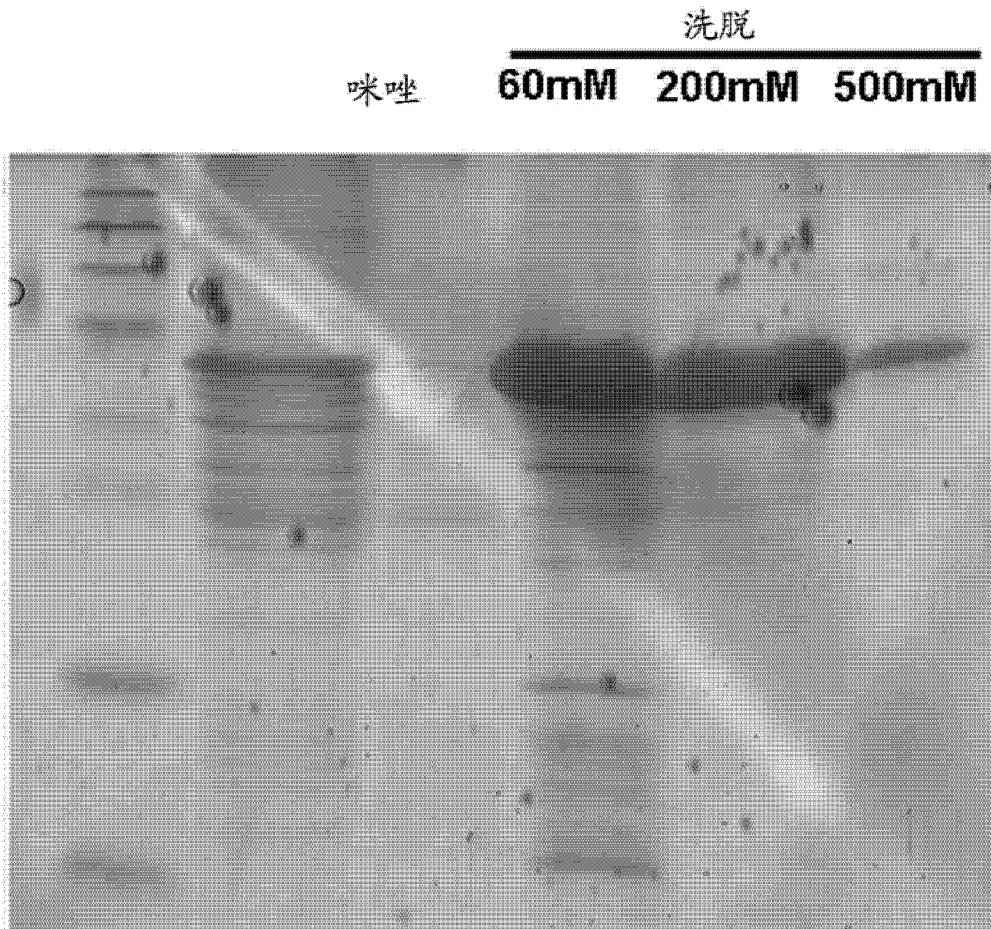


图 5

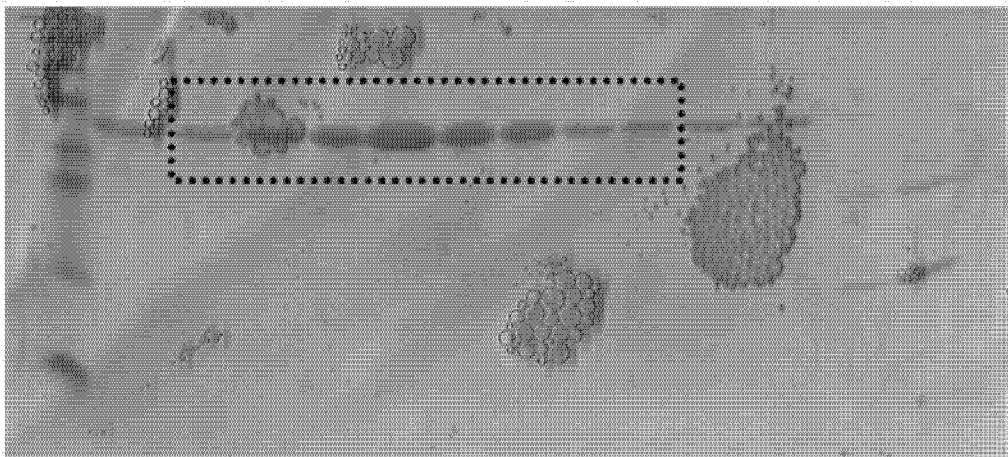
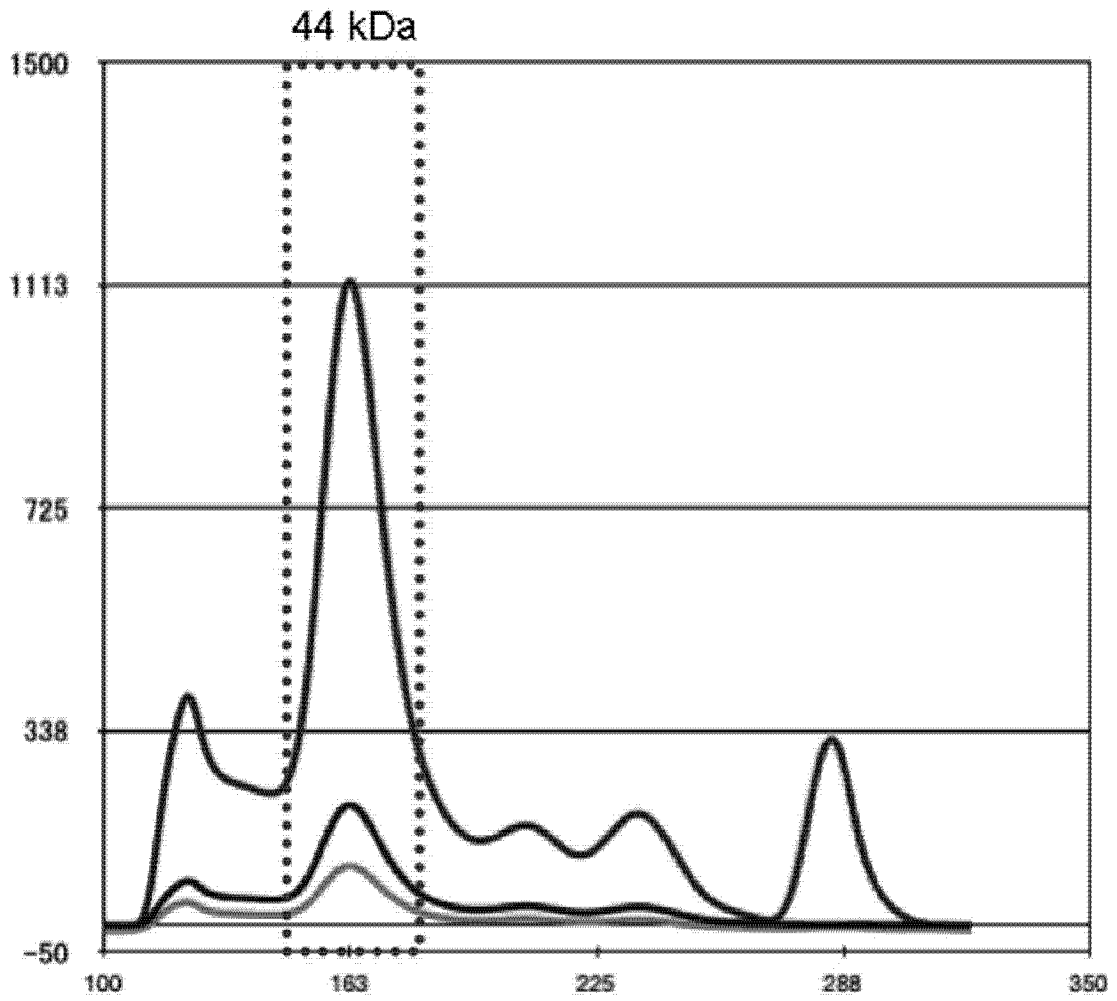


图 6

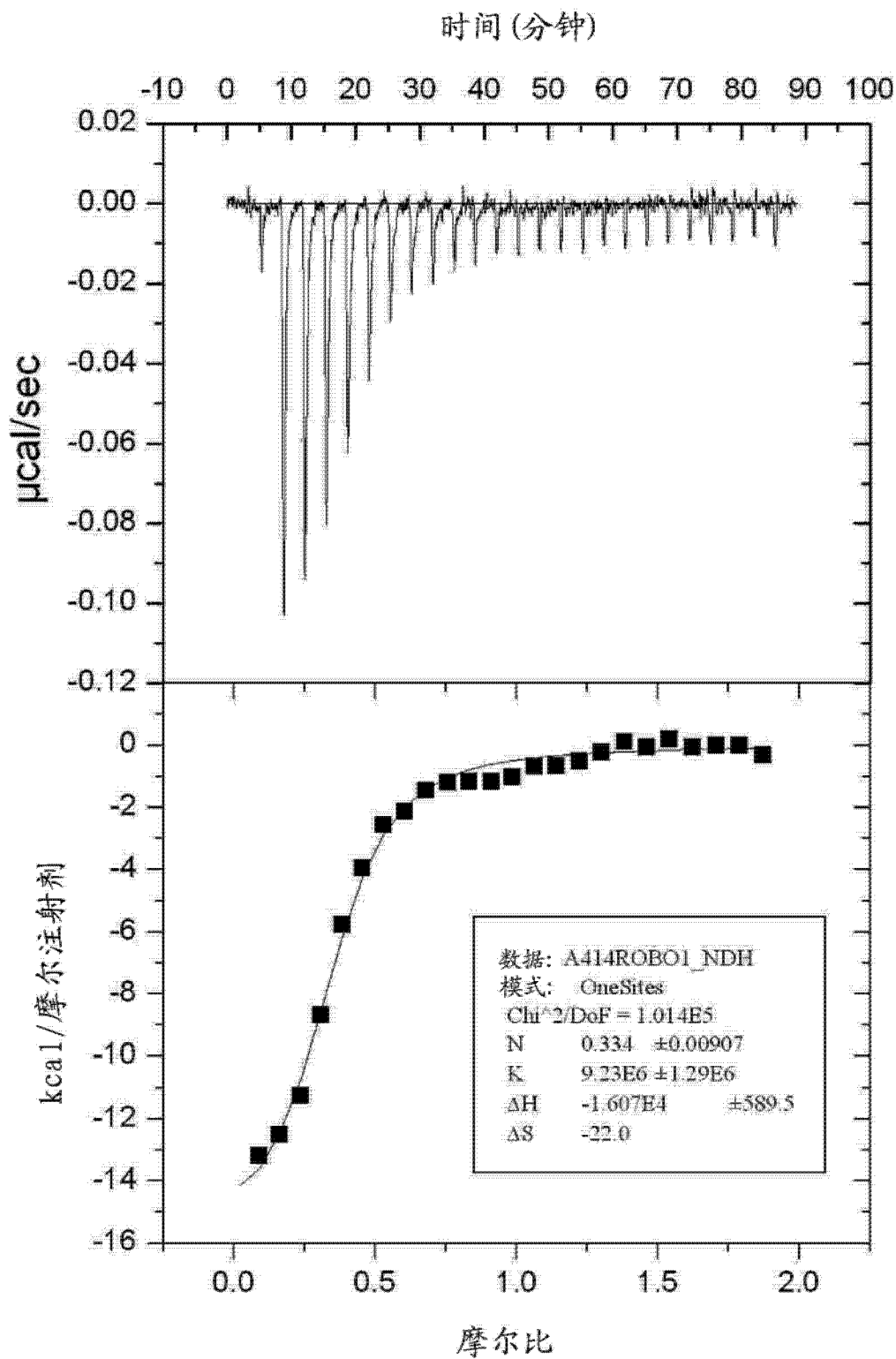


图 7

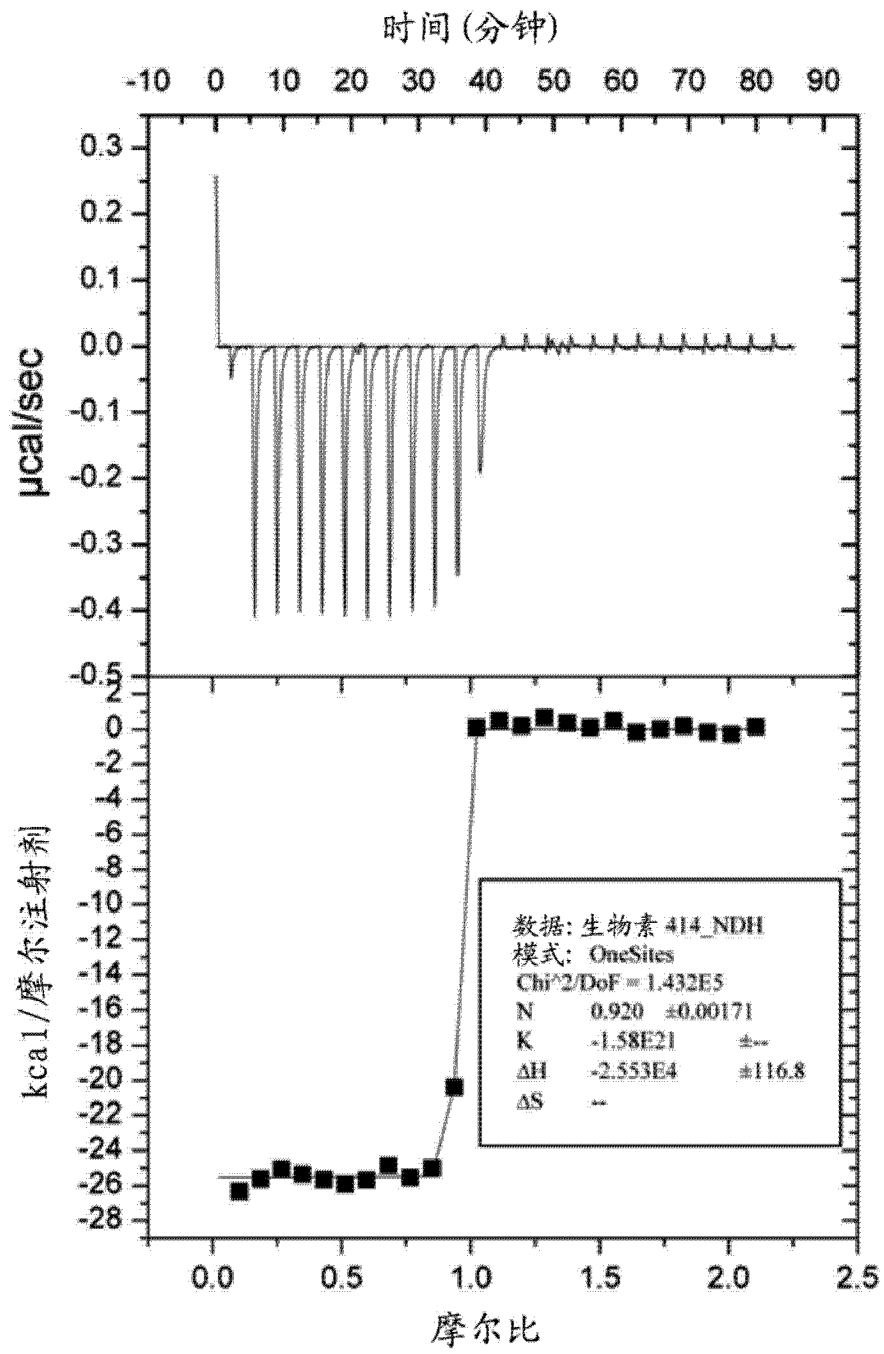


图 8

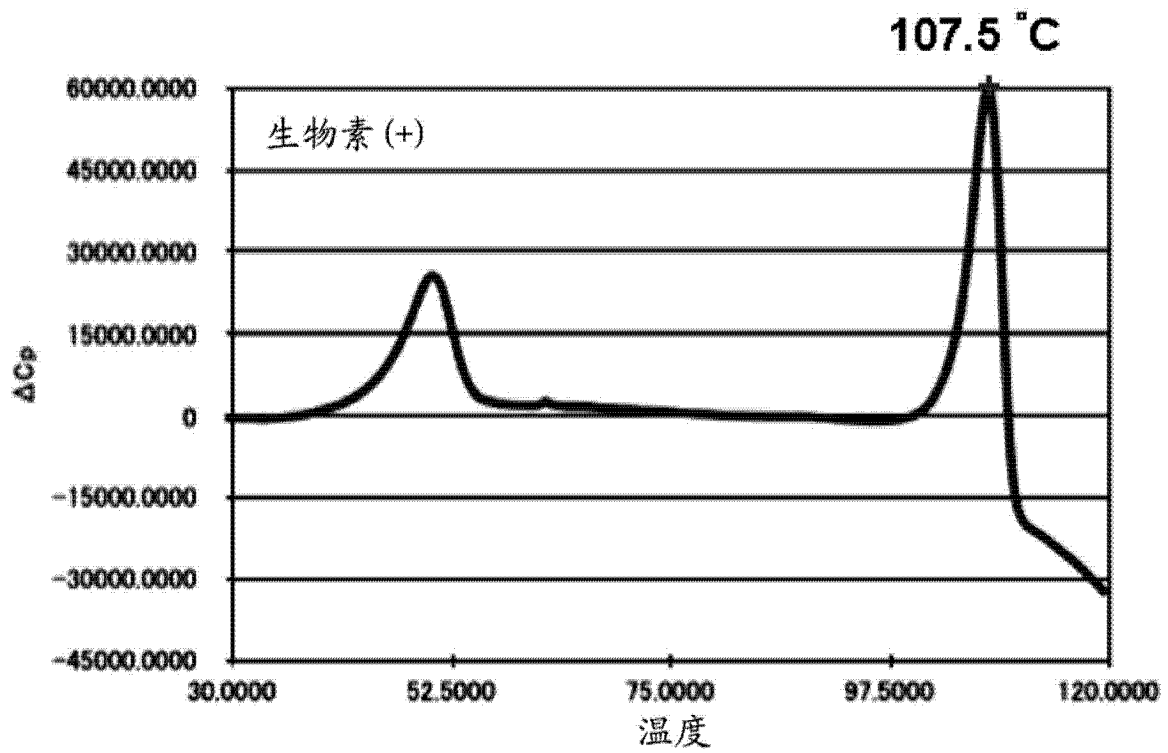
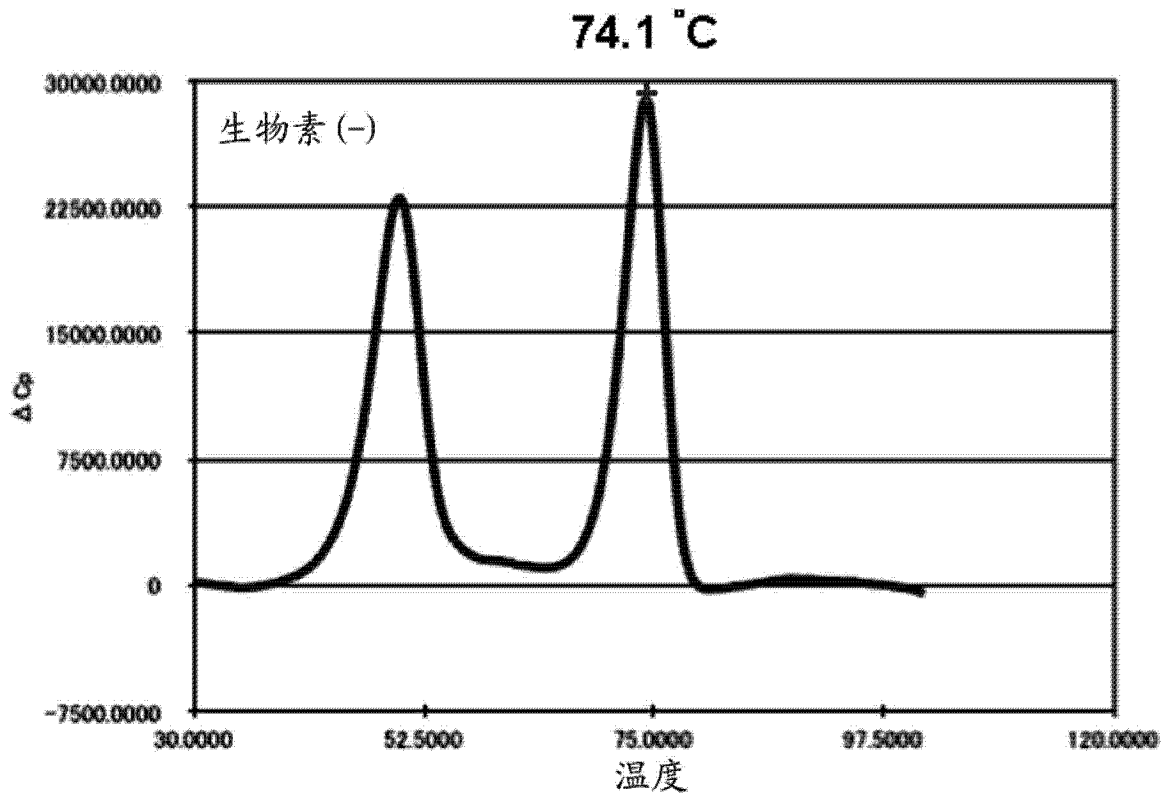


图 9

专利名称(译)	低免疫原性链霉抗生物素蛋白及其应用		
公开(公告)号	CN102325884A	公开(公告)日	2012-01-18
申请号	CN201080008284.9	申请日	2010-02-19
[标]申请(专利权)人(译)	国立大学法人 东京大学 株式会社英仙蛋白质科学		
申请(专利权)人(译)	国立大学法人东京大学 株式会社英仙蛋白质科学		
当前申请(专利权)人(译)	国立大学法人东京大学 株式会社英仙蛋白质科学		
[标]发明人	儿玉龙彦 浜洼隆雄 土居洋文 杉山晓 津本浩平		
发明人	儿玉龙彦 浜洼隆雄 土居洋文 杉山晓 津本浩平		
IPC分类号	C12N15/09 A61K31/4188 A61K38/00 A61K39/395 A61P37/06 C07K14/195 C07K16/00 C07K19/00 G01N33/53		
CPC分类号	C07K2317/622 B82Y5/00 C07K2317/92 C07K2317/56 C07K14/36 C07K16/14 A61K47/48753 A61K47/6898		
代理人(译)	郭文洁		
优先权	2009037750 2009-02-20 JP		
其他公开文献	CN102325884B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明的课题在于，提供降低链霉抗生物素蛋白所具有的对于哺乳动物的免疫原性(抗原性)的链霉抗生物素蛋白突变体。根据本发明，提供了链霉抗生物素蛋白突变体，其含有如下形成的氨基酸序列，在序列编号2中记载的核心链霉抗生物素蛋白的氨基酸序列中：(a)第72位氨基酸残基的精氨酸替换为其它的氨基酸，且(b)第10位氨基酸残基的酪氨酸、第71位氨基酸残基的酪氨酸、第89位氨基酸残基的谷氨酸、第91位氨基酸残基的精氨酸和第104位氨基酸残基的谷氨酸中的任意一个以上替换为其它的氨基酸，与野生型链霉抗生物素蛋白相比，该突变体的免疫原性降低。

