



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104769113 A

(43) 申请公布日 2015. 07. 08

(21) 申请号 201280076586. 9

(51) Int. Cl.

(22) 申请日 2012. 08. 22

C12N 15/62(2006. 01)

(85) PCT国际申请进入国家阶段日
2015. 04. 22

C12N 15/63(2006. 01)

(86) PCT国际申请的申请数据
PCT/KR2012/006680 2012. 08. 22

C07K 19/00(2006. 01)

C12N 15/13(2006. 01)

(87) PCT国际申请的公布数据
W02014/030780 EN 2014. 02. 27

C07K 16/28(2006. 01)

G01N 33/53(2006. 01)

(71) 申请人 财团法人牧岩生命工学研究所
地址 韩国京畿道

(72) 发明人 李滢权 金圣根 朴荣燮 南效廷
金董植 朴在燦 尹桦

(74) 专利代理机构 北京律诚同业知识产权代理
有限公司 11006
代理人 徐金国

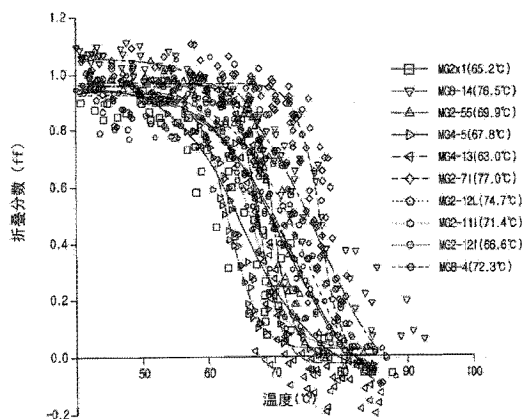
权利要求书16页 说明书66页
序列表79页 附图13页

(54) 发明名称

超稳定免疫球蛋白可变结构域的筛选和改造
方法及其应用

(57) 摘要

本发明涉及被称作 Tat 相关蛋白质改造工程 (TAPE) 的方法, 通过将靶蛋白和抗生素抗性蛋白连接到 Tat 信号序列并在大肠杆菌内表达它, 筛选具有更高的溶解性和优异的热稳定性的靶蛋白, 特别是源自人生殖细胞的免疫球蛋白可变结构域 (VH 或 VL), 以及由 TAPE 法筛选的、具有溶解性和优异的热稳定性的、人或改造的 VH 和 VL 结构域抗体和人或改造的 VH 和 VL 结构域抗体支架。还提供了在由 TAPE 法筛选的人或改造的 VH 或 VL 结构域抗体支架中包括随机 CDR 序列的文库, 及其制备方法。海通了使用该文库筛选的具有靶蛋白质结合能力的 VH 或 VL 结构域抗体, 包括该结构域抗体的药物组合物。



1. 一种编码融合蛋白的基因构建体,其中 Tat 信号序列被连接到靶蛋白的 N 末端并且抗生素抗性蛋白被连接到靶蛋白的 C 末端。

2. 根据权利要求 1 的基因构建体,其中所述靶蛋白是免疫球蛋白可变结构域、抗体片段、受体或受体配体。

3. 根据权利要求 2 的基因构建体,其中所述靶蛋白是免疫球蛋白的重链可变结构域。

4. 根据权利要求 1 的基因构建体,其中所述融合蛋白还包括用于分离、纯化或检测与其连接的氨基酸标签。

5. 根据权利要求 4 的基因构建体,其中所述氨基酸标签选自 6xHis 标签、FLAG 标签和 c-myc 标签。

6. 根据权利要求 1 的基因构建体,其中所述 Tat 信号序列选自 TorA、CuoO、DmsA、FdnG、FdoG、HyaA、NapA、Suf1、WcaM、TagT、YcbK、YcdB、YdhX 和 YnfE 组成的组。

7. 根据权利要求 1 的基因构建体,其中所述抗生素抗性蛋白是 TEM-1 β -内酰胺酶,并且所述 Tat 信号序列是 TorA。

8. 一种载体,包含权利要求 1 至 7 中任一项的基因构建体。

9. 根据权利要求 8 的载体,其中所述载体是选自 pET22b、pAE34、pET9a 和 Δ pMK 的组中的任一种载体,并且所述基因构建体被插入到所选定的载体中。

10. 根据权利要求 8 的载体,其中所述载体是 pET-TAPE。

11. 一种转化有权利要求 8 的载体的宿主细胞。

12. 根据权利要求 11 的载体,其中所述宿主细胞是大肠杆菌。

13. 一种宿主细胞群,包含一种或多种转化有权利要求 1 至 7 中任一项的基因构建体的宿主细胞。

14. 根据权利要求 13 的宿主细胞群,其中在宿主细胞群中包括的宿主细胞转化有分别编码各包括不同的靶蛋白的融合蛋白的基因构建体。

15. 根据权利要求 13 的宿主细胞群,其中所述宿主细胞是革兰氏阴性细菌菌株。

16. 一种筛选可溶性靶蛋白的方法,该方法包括:

(1) 在含有抗生素的液体培养基中培养权利要求 13 的宿主细胞群;

(2) 收集存活的宿主细胞以收集质粒 DNA;

(3) 从收集的质粒 DNA 中收集编码靶蛋白的核酸序列;和

(4) 从收集的核酸序列中确认并筛选靶蛋白的序列。

17. 根据权利要求 16 的方法,还包括,在步骤 (3) 后,选自下组的一个阶段:

(3') 制备基因构建体,其中所收集的核酸序列被再次功能性地连接到编码 Tat-信号序列的基因和抗生素抗性基因,然后再用制备的基因构建体转化该宿主细胞群,

和,

(3'') 直接用含有所收集的核酸序列的质粒转化宿主细胞群,而不制备单独的基因构建体,

其中,阶段 (1) 至 (3') 或阶段 (1) 至 (3'') 被重复两轮或更多轮。

18. 根据权利要求 16 或 17 的方法,其中所述抗生素是氨苄青霉素或羧苄青霉素。

19. 根据权利要求 17 的方法,其中所述抗生素是在重复所述轮时以逐渐增加的浓度加入。

20. 根据权利要求 16 所述的方法,其中所述抗生素在初始轮时具有 0.05 至 0.2 $\mu\text{g/ml}$ 的浓度。

21. 一种可溶性 VH 结构域抗体支架,具有下面的 FR1 至 FR4 的氨基酸序列:

(1)FR1 : X_0 VQLX X_1 X X_2 X X_3 GX X_4 X X_5 X X_6 X X_7 X X_8 PGX X_9 SX X_{10} X X_{11} X X_{12} X X_{13} CX X_{14} X X_{15} X X_{16} GX X_{17} X X_{18} X X_{19}

在 FR1 的氨基酸序列中,

X_0 是 E 或 Q,

X_1 是 V 或 L,

X_2 是 E,或 Q,

X_3 是 S,或 A,

X_4 是 G,或 A,

X_5 是 G, M, N, V, 或 E,

X_6 是 L, V, 或 W,

X_7 是 V, K, A, 或 I,

X_8 是 Q, K, 或 H,

X_9 是 G, T, A, R, E, S, 或 T,

X_{10} 是 L, V, R, 或 M,

X_{11} 是 R, 或 K,

X_{12} 是 L, I, 或 V,

X_{13} 是 S, A, 或 T,

X_{14} 是 A, E, V, R, I, K, T, 或 S,

X_{15} 是 A, G, P, V, 或 T,

X_{16} 是 S, F, 或 Y,

X_{17} 是 F, Y, R, G, 或 L,

X_{18} 是 T, A, S, N, T, P, I, N, H, 或 A,

X_{19} 是 F, L, V, 或 C ;

(2)FR2 :WX X_{20} RX X_{21} X X_{22} PGX X_{23} GX X_{24} X X_{25} X X_{26} X X_{27} X X_{28}

在 FR2 的氨基酸序列中,

X_{20} 是 V, A, 或 L,

X_{21} 是 Q, N, R, I, K, Y, V, M, S, Q, W, F, L, V, 或 C,

X_{22} 是 A, G, K, S, V, M, 或 T,

X_{23} 是 K, Q, E, R, 或 T,

X_{24} 是 L, N, I, P, Y, T, V, W, A, R, M, 或 S,

X_{25} 是 V, 或 E,

X_{26} 是 W, I, V, P, F, H, M, Y, L, C, 或 R,

X_{27} 是 V, M, I, 或 L,

X_{28} 是 S, A, 或 G ;

(3)FR3 :X X_{29} X X_{30} X X_{31} X X_{32} X X_{33} X X_{34} X X_{35} X X_{36} X X_{37} X X_{38} X X_{39} X X_{40} X X_{41} X X_{42} X X_{43} X X_{44} X X_{45} X X_{46} X X_{47} X X_{48} X X_{49} X X_{50} X X_{51} DX X_{52} X X_{53} X X_{54} YX X_{55} CX X_{56} X X_{57}

在 FR3 的氨基酸序列中,

X_{29} 是 R, H, Q, 或 T,

X_{30} 是 F, V, L, 或 I,
 X_{31} 是 T, S, 或 I,
 X_{32} 是 I, L, V, M, 或 R,
 X_{33} 是 S, T, 或 D,
 X_{34} 是 R, A, V, N, 或 I,
 X_{35} 是 D, N, 或 A,
 X_{36} 是 N, T, D, I, R, K, Y, 或 E,
 X_{37} 是 A, S, V, 或 T,
 X_{38} 是 K, R, T, Q, V, E, M, N, 或 I,
 X_{39} 是 N, R, T, K, S, D, 或 V,
 X_{40} 是 T, M, S, V, I, Y, 或 A,
 X_{41} 是 L, V, A, 或 M,
 X_{42} 是 F, Y, N, D, H, 或 S,
 X_{43} 是 L, 或 M,
 X_{44} 是 Q, E, H, 或 N,
 X_{45} 是 M, L, V, I, 或 W,
 X_{46} 是 N, T, K, D, Y, I, 或 S,
 X_{47} 是 S 或 N,
 X_{48} 是 L 或 V,
 X_{49} 是 R, K, 或 T,
 X_{50} 是 D, A, S, P, T, V, I, 或 S,
 X_{51} 是 E, A, D, 或 S,
 X_{52} 是 T, N, 或 S,
 X_{53} 是 S, A, 或 G,
 X_{54} 是 V, I, L, 或 M,
 X_{55} 是 Y 或 F,
 X_{56} 是 A, G, V, 或 S,
 X_{57} 是 R, S, K, T, L, N, 或 F ;和

(4)FR4 : $X_{58}GX_{59}GX_{60}X_{61}VTVSS$

在 FR4 的氨基酸序列中,

X_{58} 是 W, C, Y, G, S, 或 A,
 X_{59} 是 Q, R, 或 L,
 X_{60} 是 A, T, I, 或 V,
 X_{61} 是 L, M, P, V, 或 T。

22. 根据权利要求 21 的 VH 结构域抗体支架,其中所述 FR1 至 FR4 具有下面的氨基酸序列:

(1)FR1 : $X_0VQLX_1X_2SGGX_5X_6X_7X_8PGX_9SX_{10}RX_{12}SCX_{14}X_{15}SGX_{17}X_{18}X_{19}$

在 FR1 的氨基酸序列中,

X_0 是 E 或 Q,

X_1 是 V 或 L,

X_2 是 E 或 Q,

X_5 是 G, N, V, 或 E,

X_6 是 L 或 V,

X_7 是 V 或 K,

X_8 是 Q, K 或 H,

X_9 是 G, T, A, R, E, 或 T,

X_{10} 是 L 或 V,

X_{12} 是 L 或 V,

X_{14} 是 A, E, V, I, K, 或 S,

X_{15} 是 A, G, 或 V,

X_{17} 是 F, Y, R, G, 或 L,

X_{18} 是 T, A, S, N, T, P, I, N, H, 或 A, 和

X_{19} 是 F, L, V, 或 C ;

(2)FR2 :WVRX₂₁X₂₂PGX₂₃GX₂₄X₂₅X₂₆X₂₇X₂₈

在 FR2 的氨基酸序列中,

X_{21} 是 Q, N, R, I, K, Y, V, M, S, Q, W, F, L, V, 或 C,

X_{22} 是 A, G, K, S, 或 M,

X_{23} 是 K, Q, E, R, 或 T,

X_{24} 是 L, N, I, P, Y, T, V, W, A, R, M, 或 S,

X_{25} 是 V 或 E,

X_{26} 是 W, I, V, P, F, H, M, Y, L, C, 或 R,

X_{27} 是 V, M, I, 或 L, 和

X_{28} 是 S, A, 或 G ;

(3)FR3 :RX₃₀TX₃₂SX₃₄DX₃₆X₃₇X₃₈X₃₉X₄₀X₄₁X₄₂X₄₃X₄₄X₄₅X₄₆X₄₇X₄₈X₄₉X₅₀X₅₁DTAX₅₄YX₅₅CX₅₆X₅₇

在 FR3 的氨基酸序列中,

X_{30} 是 F, V, L, 或 I,

X_{32} 是 I, L, V, 或 M,

X_{34} 是 R, A, V, 或 I,

X_{36} 是 N, T, D, I, R, K, Y, 或 E,

X_{37} 是 A, S, V, 或 T,

X_{38} 是 K, R, T, Q, V, E, M, N, 或 I,

X_{39} 是 N, R, T, K, S, D, 或 V,

X_{40} 是 T, M, S, V, I, Y, 或 A,

X_{41} 是 L, V, A, 或 M,

X_{42} 是 F, Y, N, D, H, 或 S,

X_{43} 是 L 或 M,

X_{44} 是 Q, E, H, 或 N,

X_{45} 是 M, L, V, I, 或 W,

X₄₆是 N, T, K, D, Y, I, 或 S,

X₄₇是 S 或 N,

X₄₈是 L 或 V,

X₄₉是 R, K, 或 T,

X₅₀是 D, A, S, P, T, V, I, 或 S,

X₅₁是 E, A, D, 或 S,

X₅₄是 V, I, L, 或 M,

X₅₅是 Y 或 F,

X₅₆是 A, G, V, 或 S, 和

X₅₇是 R, S, K, T, L, N, 或 F 和

(4)FR4 :X₅₈GQGX₆₀X₆₁VTVSS

在 FR4 的氨基酸序列中,

X₅₈是 W, C, Y, G, S, 或 A,

X₆₀是 A, T, I, 或 V, 和

X₆₁是 L, M, V, 或 T。

23. 根据权利要求 21 的 VH 结构域抗体支架,其中所述 VH 结构域抗体支架是选自具有下面的 FR1 至 FR4 的氨基酸序列的支架。

支架名称	FR1	FR2	FR3	FR4
MG1X8	QVQLVESGGGLVQ PGGSLRLSCAASGF TF	WVRQAP GKGLVW VS	RFTISRDNKNTLFL QMNSLRDEDTSVYY CAR	WGQGALV TVSS
MG2X1	EVQLVESGGGLVQP GGSLRLSCAASGFT F	WVRQAP GKGLEW VS	RFTISRDNKNTLYL QMNSLRAEDTAVY YCAS	WGQGTLV TVSS
MG2X1-34	QVQLVESGGNVVQ PGTSLRLSCAASGF TF	WVRQAP GKGLEW VA	RFTISRDNKRNTVFL QMTSLRAEDTAVYY CGR	WGQGILV TVSS
MG2X2-12	QVQLVQSGAEVKK PGASVKISCEASGY AF	WVRQAP GQGLEW MG	RVTLTRDTSTRTVY MELKNLRSADTGVY YCAR	WGQGTLV TVSS
MG2X2-13	EVQLLESGGGVVQP GKSLRLSCVGSF F	WVRQAP GKGLEW LA	RFTISRDNKTMVN LQMNSLRPDDTAVY FCAR	WGQGTLV TVSS
MG3X1	QVQLVESGGGVVQ PGRSLRLSCVASGF NF	WLRQAP GKGLEW VA	RFTISRDNKNTLYL EMNSLRPEDTAVYY CAK	CGQGTLV TVSS
MG3X10	EVQLVESGGGLVKP GGSLRVSCAASGFT F	WVRQAP GKGLEW VG	RFTISRDDSKNMVY LQMNSLKTEDTAVY YCTT	YGQGTLV TVSS
MG4X1-8	EVQLVESGGGLVQP GGSLRLSCAASGFS F	WVRQGP GEGLVW LS	RFTISRDNKNTVY LEMNSVRVDDTAV YYCVS	WGQGALV TVSS
MG4X1-33	QVQLVESGGGLVQ PGGSLRLSCEASGFP F	WVRQAP GKGLEW VS	RFTISRDDSTNTLYL QVNSLRAEDTAVYY CAK	WGRGTLV TVSS
MG4X1-35	EVQLLESGGGLVKP	WVRQAP	RFTVSRDENVQKSLD	WGQGTTV

	GGSLRLSCVGSERS F	GKGLEW VA	LQMDSLRAEDTAVY FCAR	TVSS
MG4X3-27	EVQLLESGGGLAQS GGSLRLSCAASGFT F	WVRQAP GKGLEW S	RFTISRDIAKNSLYL QMNSLRDEDTAVY YCAK	WGQGALV TVSS
MG4X4-2	EVQLVQSGAEVKK PGESLRISCRGSGYR F	WARDKP GKGLEW G	HVTISSDRSVSVAYL QWDSLKASDNGIYY CAL	WGQGTLV TVSS
MG4X4-4	EVQLVESGGGLVQP GGSLRLSCVPSGFT	WVRQAP GKGLVW VS	RFTISRDN AEDTLFL QMNSLRVDDTAVY YCVR	WGQGVLV TVSS
MG4X4-25	QVQLVESGGGLVQ PGSLRLSCIASGFS L	WVRRSP GKGLEW VA	RFTVSRDNAKNSLF LQMNNVRPEDTALY FCAR	WGQGTMV TVSS
MG4X4-44	EVQLVESGGGLVQP GGSLRLSCAASGFT F	WVRQAP GKGLEW VA	RFTISRDN AKNLSLYL QMNSLRAEDTALYY CAR	WGQGTLV TVSS
MG4X5-30	EVQLLESGGGLVQP GGSLRLSCAASGFT F	WVRQAP GKGLEW LS	RFTISRNN AKNLSLYL QMNSLRVDDTAVY YCAR	WGQGTLV TVSS
MG4X6-27	EVQLLESGGGLVQP GGSLRLSCAASGFT F	WVRQGP GKGLEW VA	RFTISRDN AENSLYL QVNSLRAEDTAIYY CAK	WGQGALV TVSS
MG4X6-48	EVQLLESGGGVVQP GRSLRLSCEVFGFT L	WVRQAP GRRLEW VA	RFTISRDIATNRLYL QMRSLRAEDTALYY CAR	WGQGTLV TVSS
MG4X7-15	EVQLLESGGGLVQP GGSLRLSCAASGFS F	WVRQAP GKGLEW VS	RFTISRDN SKNTLYL QMNSLRVEDTAVY YCAV	WGQGTTV TVSS
MG4X8-24	EVQLLESGGGLVQP	WVRQAP	RFTISRDN SNNTLYL	WGQGTLV

	GGSLRLSCAASGFT F	GKGLEW VS	QMNSLRADDTAVY FCAK	TVSS
MG0。5X- 1	QVQLVESGGGLVQ PGGSLRLSCAASGF TF	WVRQVP GKGLEW VA	RFTISRDNKNSLYL QMNSLRAEDTAVY YCAN	WGQGTLV TVSS
MG0。5X- 3	QVQLVESGGGLVQ PGGSLTLSCAASGF TF	WVRQAP GTGLLW LS	RFTISRDNKNTLYL QMNSLRAEDTAVY YCAR	WGXGTMV TVSX
MG0。5X- 4	EVQLLES GGMLVKP GESLRLSCVGSGLIF	WVRHAP GKGLEW VG	RLSISRDDSMNTVY LDIYNLKIDDTGVY YCTF	WGQGTPV TVSS
MG0。5X- 14	EVQLLES GGGLVHA GGSVRLSCAASGFT F	WVRQAP GKGLEW VA	RFTISRDNKNSMY LQMNSLRVEDTAVY YCAR	WGQGTVV TVSS
MG0。75X -4	QVQLVESGGGLVK PGGSLRLSCAASGF TF	WLRQAP GKGPEY VA	RFIISRDDSNMMLYL EMISLKSEDVAVYY CSD	GSQGTLVT VSS
MG2X-5	EVQLLES GGGLVQP GGSLRLSCAASGFT F	WVRQAP GKGLEW VS	RFTISRDNKNTLYL HMNSLRAEDTAVY YCVK	WGQGTLV TVSS
MG2X-15	QVQLVESGGGLVQ PGGSLRLSCAASGF TF	WVRQAP GKGLEW VS	RFTISRDNKNTLYL QMNSLRAEDTAVY YCAK	WGQGTLV TVSS
MG4X-5	QVQLVESGGGLVQ PGGSLRLSCEASGL HF	WVRQAP GKGLEW VA	RFTVSRDNSRNTLY LQMKSLSAEDTAVY YCAK	WGQGTMV TVSS
MG1-4	QVQLVEAGGGLVQ PGGSLRLACAASGF TF	WVRQAP GKGLEW S	RFTISRDNQNSLFL QMNSLRAEDTAVY YCAT	WGQGTMV TVSS
MG1-6	EVQLVQSGAEVKK	WVRQMP	HVTISVDKSIStayL	WGQGTLV

	PGESLRKSCCKGSGY SF	GKGLEW QWSSLKASDSAMY MG YFL	TVSS
MG1-7	QVQLVESGGGLVQ PGGSLRLSCAASGF TF	WVRQAP RFTISRDNKNSLYL GKGLEW QMNSLRDEDTAVY VA YCAR	WGQGTLV TVSS
MG1-8	EVQLVQSGAEVKK PGASVKVSCCKASGY TF	WVRQAP RVTMTRDTSSTAY GQGLEW MELNRLTSDDTAVY MG FCAR	WGQGTLV TVSS
MG1-9	EVQLVEAGGGLVQ PGGSLRLACAASGF TF	WVRQAP RFTISRDNAQNSLFL GKGLEWIQMNSLRAEDTAVY S YCAT	WGQGTMV TVSS
MG1-10	EVQLVQSGAEVKK PGESLKISCKGSGYS F	WVRQMP QVTMSANRSISTAY GRGLEW LQWSSLKASDTGIY LG YCAT	WGQGTTV TVSS
MG5-1	QVQLVESGGGLIQP GESLRLSCEAFGFT V	WVRQAP RFTISR DSTQNTVHL GKGLEW QMNSLTAEDTAVY VS YCAR	WGQGTLV TVSS
MG5-2	EVQLVQSGAELKKP GSSVKVSC TSSGGS F	WVRQAP RLILSVDEPTRTVY GQGLEW MELTSLRSDDTAMY MG YCAR	WGQGTTV TVSS
MG5-4	EVQLLES GGGLVQP GRSLRLSCAASGFT F	WVRQAP RFTISRDNKDSL YL GKGLEW QMNSLRPEDTALYY VS CAR	WGQGTMV TVSS
MG5-5	EVQLLES GGGV VQP GRSLRLSCV ASGFT F	WVRQAP RFTISR DYSNKIVHL GKGLEW EMDSLRAEDTAVYF VS CVR	WGQGTLV TVSS
MG5-6	EVQLLES GGGLVKP GGSLRLSCAASGFT F	WVRQAP RFTISR DDSRDMLY GKGLEC LQMNNLKTEDTAV VA YYCSD	SSQGT LVT VSS
MG5-7	EVQLVESGGGLVQP	WVRQAP RFTISR DDSKSIVYL	WGRGTLV

	GRSLRLSCTTSGFSF	GKGLEW QMSSLQTEDTAVYY VS CSR	TVSS
MG5-9	EVQLLES GGGLV RP GGSLRLSCSASGFA F	WVRQAP TISRDN AKNSVYLQ GKGLEW MNSLRAEDSAVYFC VS AR	WGQGT LV TVSS
MG10-1	QVQLVESGGNVVQ PGTSLRLSCAASGF TF	WVRQAP RFTISRDN SRNTVFL GKGLEW QMTSLRAEDTAVYY VA CGR	WGQGT LV TVSS
MG10-2	EVQLLES GGGLV QP GGSLRLTCVGYGFT F	WVRQAP RFTISRDN AKDSL YL GKGPEW QMDSL RPEDTAVYY VA CAR	APQGT LV TVSS
MG10-4	EVQLLES GGGLV QP GGSLRLSCAASGFIL	WVRQAP QFTISRDN AKNTLYL GKGLVW QMNSLRVEDTAVY VS YCAR	WGQGT MV TVSS
MG10-5	EVQLLES GGGV VHP GRSLRLSCAVSGFS L	WVRQAP RFTVSRDISKNTVYL DKGLEW QMNSLRAEDTALYY VA CAR	WGQGT MV TVSS
MG10-6	EVQLLES GGGLV QP GGSRR LSCAASGFT F	WFRQGP RFTISRDDS KNLSL GKGLEW QMDSLRTEDTAVYY VA CVR	WGQGT VV TVSS
MG10-8	QVQLVES GGGV VQ PGRSLRLSCVASGF AF	WVRQTP RFTISRDN SNNTVYL GRGLEW EMNSLRPEDSAIYY LA CAK	WGLGT VV TVSS
MG10-10	QVQLVES GGGV VVQ PGGSLRLSCAASGF TF	WVRQAP RFTISRDN SKNSLYL GKGLEW QMNSLRTDETALYY VS CV	WGQGT LV TVSS
MG2	EVQLLES GGGLV QP GGSLRLSCAASGFT F	WVRQAP RFTISRDN AKNSLYL GKGLEW QMNSLRTDETAVYY VS CAR	WGQGT TV TVSS
MG5	EVQLLQSGGGWVK	WVRQAP RFTISIDESRNALFLH	WGQGT LV

	PGGSLRLSCAASGFI C	GKGLEW VG	MNSLTDDDTAVYYCTVSS ST	
MG6	EVQLLES GG VVVQP GRSLRLSCAASGFT F	WVRQAP GKGLEW VA	RFTVSRDTSTNTLYL QMNSLRVEDTAVY YCAR	WGQGT LV TVSS
MG7	QMQLVQSEAEVKK PGASMKV SCKASG YTF	WVRQAT GQGLEW MG	RVTMTRNTSISTAY MELSSLTSADTAVY YCAR	WGQGT LV TVSS
MG10	QVQLVQSGAEVKK PGESLKISCKGSGYS F	WVRQMP GKGLEW MG	QVTISADKSISTAFL QWNSLKASDTAMY YCAR	WGLGT LV TVSS

24. 根据权利要求 21 的 VH 结构域抗体支架,其中所述 VH 结构域抗体支架是选自具有下面的 FR1 至 FR4 的氨基酸序列的支架。

支架名称	FR1	FR2	FR3	FR4
MG8-21	EVQLVESGGGLV QPGGSLRLSCAAS GFTF	WVRNAPG KGNEIVS	RFTISRDN SKNTLYL QMNSLRAEDTAVY YCAS	WGQGT LV VSS
MG2-12L	EVQLVESGGGLV QPGGSLRLSCAAS GFTF	WVRRAPG KGIEVVS	RFTISRDN SKNTLYL QMNSLRAEDTAVY YCAS	WGQGT LV VSS
MG2-7I	EVQLVESGGGLV QPGGSLRLSCAAS GFTF	WVRIAPGK GPEPVS	RFTISRDN SKNTLYL QMNSLRAEDTAVY YCAS	WGQGT LV VSS
MG2-9I	EVQLVESGGGLV QPGGSLRLSCAAS GFTF	WVRKAPG KGYEPVS	RFTISRDN SKNTLYL QMNSLRAEDTAVY YCAS	WGQGT LV VSS
MG2-10I	EVQLVESGGGLV QPGGSLRLSCAAS GFTF	WVRNAPG KGYEIVS	RFTISRDN SKNTLYL QMNSLRAEDTAVY YCAS	WGQGT LV VSS

MG2-11I	EVQLVESGGGLV QPGGSLRLSCAAS GFTF	WVRYAPG KGYEFVS	RFTISRDN SKNTLYL QMNSLRAEDTAVY YCAS	WGQGTLVT VSS
MG2-12I	EVQLVESGGGLV QPGGSLRLSCAAS GFTF	WVRVAPG KGIEPVS	RFTISRDN SKNTLYL QMNSLRAEDTAVY YCAS	WGQGTLVT VSS
MG2-32	EVQLVESGGGLV QPGGSLRLSCAAS GFTF	WVRMAPG KGPEHVS	RFTISRDN SKNTLYL QMNSLRAEDTAVY YCAS	WGQGTLVT VSS
MG2-34	EVQLVESGGGLV QPGGSLRLSCAAS GFTF	WVRSAPG KGVEMVS	RFTISRDN SKNTLYL QMNSLRAEDTAVY YCAS	WGQGTLVT VSS
MG2-40	EVQLVESGGGLV QPGGSLRLSCAAS GFTF	WVRTAPG KGTEMVS	RFTISRDN SKNTLYL QMNSLRAEDTAVY YCAS	WGQGTLVT VSS
MG2-46	EVQLVESGGGLV QPGGSLRLSCAAS GFTF	WVRCAPG KGYEFVS	RFTISRDN SKNTLYL QMNSLRAEDTAVY YCAS	WGQGTLVT VSS
MG2-47	EVQLVESGGGLV QPGGSLRLSCAAS GFTF	WVRIAPGK GLEMVS	RFTISRDN SKNTLYL QMNSLRAEDTAVY YCAS	WGQGTLVT VSS
MG2-48	EVQLVESGGGLV QPGGSLRLSCAAS GFTF	WVRMAPG KGLYVVS	RFTISRDN SKNTLYL QMNSLRAEDTAVY YCAS	WGQGTLVT VSS
MG2-51	EVQLVESGGGLV QPGGSLRLSCAAS GFTF	WVRYAPG KGTEFVS	RFTISRDN SKNTLYL QMNSLRAEDTAVY YCAS	WGQGTLVT VSS
MG2-53	EVQLVESGGGLV QPGGSLRLSCAAS GFTF	WVRQAPG KGVEWVS	RFTISRDN SKNTLYL QMNSLRAEDTAVY YCAS	WGQGTLVT VSS

MG2-55	EVQLVESGGGLV QPGGSLRLSCAAS GFTF	WVRWAPG KGPEFVS	RFTISRDN SKNTLYL QMNSLRAEDTAVY YCAS	WGQGTLVT VSS
MG2-57	EVQLVESGGGLV QPGGSLRLSCAAS GFTF	WVRFAPG KGREWVS	RFTISRDN SKNTLYL QMNSLRAEDTAVY YCAS	WGQGTLVT VSS
MG2-58	EVQLVESGGGLV QPGGSLRLSCAAS GFTF	WVRFAPG KGCELVS	RFTISRDN SKNTLYL QMNSLRAEDTAVY YCAS	WGQGTLVT VSS
MG2-59	EVQLVESGGGLV QPGGSLRLSCAAS GFTF	WVRKAPG KGLETVS	RFTISRDN SKNTLYL QMNSLRAEDTAVY YCAS	WGQGTLVT VSS
MG2-60	EVQLVESGGGLV QPGGSLRLSCAAS GFTF	WVRNAPG KGLECVS	RFTISRDN SKNTLYL QMNSLRAEDTAVY YCAS	WGQGTLVT VSS
MG2-64	EVQLVESGGGLV QPGGSLRLSCAAS GFTF	WVRCAPG KGWEVVS	RFTISRDN SKNTLYL QMNSLRAEDTAVY YCAS	WGQGTLVT VSS
MG4-12	EVQLVESGGGLV QPGGSLRLSCAAS GFTF	WVRLAPG KGVELVS	RFTISRDN SKNTLYL QMNSLRAEDTAVY YCAS	WGQGTLVT VSS
MG4-13	EVQLVESGGGLV QPGGSLRLSCAAS GFTF	WVRFAPG KGAEWVS	RFTISRDN SKNTLYL QMNSLRAEDTAVY YCAS	WGQGTLVT VSS
MG4-17	EVQLVESGGGLV QPGGSLRLSCAAS GFTF	WVRLAPG KGREWVS	RFTISRDN SKNTLYL QMNSLRAEDTAVY YCAS	WGQGTLVT VSS
MG4-18	EVQLVESGGGLV QPGGSLRLSCAAS GFTF	WVRYAPG KGVEFVS	RFTISRDN SKNTLYL QMNSLRAEDTAVY YCAS	WGQGTLVT VSS

MG4-20	EVQLVESGGGLV QPGGSLRLSCAAS GFTF	WVRFAPG KGLEMVS	RFTISRDN SKNTLYL QMNSLRAEDTAVY YCAS	WGQGTLVT VSS
MG4-28	EVQLVESGGGLV QPGGSLRLSCAAS GFTF	WVRVAPG KGTERVS	RFTISRDN SKNTLYL QMNSLRAEDTAVY YCAS	WGQGTLVT VSS
MG4-2	EVQLVESGGGLV QPGGSLRLSCAAS GFTF	WVRIAPGK GMEMVS	RFTISRDN SKNTLYL QMNSLRAEDTAVY YCAS	WGQGTLVT VSS
MG4-32	EVQLVESGGGLV QPGGSLRLSCAAS GFTF	WVRAAPG KGPELVS	RFTISRDN SKNTLYL QMNSLRAEDTAVY YCAS	WGQGTLVT VSS
MG4-33	EVQLVESGGGLV QPGGSLRLSCAAS GFTF	WVRVAPG KGYEHVS	RFTISRDN SKNTLYL QMNSLRAEDTAVY YCAS	WGQGTLVT VSS
MG4-34	EVQLVESGGGLV QPGGSLRLSCAAS GFTF	WVRVAPG KGLECVS	RFTISRDN SKNTLYL QMNSLRAEDTAVY YCAS	WGQGTLVT VSS
MG4-5	EVQLVESGGGLV QPGGSLRLSCAAS GFTF	WVRVAPG KGPETVS	RFTISRDN SKNTLYL QMNSLRAEDTAVY YCAS	WGQGTLVT VSS
MG4-6	EVQLVESGGGLV QPGGSLRLSCAAS GFTF	WVRMAPG KGSEVVS	RFTISRDN SKNTLYL QMNSLRAEDTAVY YCAS	WGQGTLVT VSS
MG4-7	EVQLVESGGGLV QPGGSLRLSCAAS GFTF	WVRLAPG KGTEMVS	RFTISRDN SKNTLYL QMNSLRAEDTAVY YCAS	WGQGTLVT VSS
MG8-11	EVQLVESGGGLV QPGGSLRLSCAAS GFTF	WVRTAPG KGAEWVS	RFTISRDN SKNTLYL QMNSLRAEDTAVY YCAS	WGQGTLVT VSS

MG8-12	EVQLVESGGGLV QPGGSLRLS CAASGFTF	WVRWAPG KGKEVVS	RFTISRDN SKNTLYL QMNSLRA EDTAVY YCAS	WGQGT LVT VSS
MG8-13	EVQLVESGGGLV QPGGSLRLS CAASGFTF	WVRQAPG KGIEPVS	RFTISRDN SKNTLYL QMNSLRA EDTAVY YCAS	WGQGT LVT VSS
MG8-14	EVQLVESGGGLV QPGGSLRLS CAASGFTF	WVRQAPG KGPEWVS	RFTISRDN SKNTLYL QMNSLRA EDTAVY YCAS	WGQGT LVT VSS
MG8-4	EVQLVESGGGLV QPGGSLRLS CAASGFTF	WVRQAPG KGPEVVS	RFTISRDN SKNTLYL QMNSLRA EDTAVY YCAS	WGQGT LVT VSS
MG8-5	EVQLVESGGGLV QPGGSLRLS CAASGFTF	WVRTAPG KGIEIVS	RFTISRDN SKNTLYL QMNSLRA EDTAVY YCAS	WGQGT LVT VSS
MG8-6	EVQLVESGGGLV QPGGSLRLS CAASGFTF	WVRIAPGK GVEIVS	RFTISRDN SKNTLYL QMNSLRA EDTAVY YCAS	WGQGT LVT VSS
MG8-8	EVQLVESGGGLV QPGGSLRLS CAASGFTF	WVRAAPG KGLEVVS	RFTISRDN SKNTLYL QMNSLRA EDTAVY YCAS	WGQGT LVT VSS

25. 一种多核苷酸, 编码权利要求 21 至 24 中任一项的 VH 结构域抗体支架。

26. 一种 VH 结构域抗体, 具有权利要求 21 至 24 中任一项的 VH 结构域抗体支架。

27. 一种多核苷酸, 编码权利要求 26 的 VH 结构域抗体。

28. 一种 VH 结构域抗体库, 其中源自人的随机 CDRH1、CDRH2 和 CDRH3 插入到权利要求 21 至 24 中任一项的 VH 结构域抗体支架中。

29. 根据权利要求 28 的 VH 结构域抗体文库, 其中所插入的 CDRH3 具有 5 到 15 个氨基酸残基。

30. 根据权利要求 28 的 VH 结构域抗体文库, 其中所插入的 CDRH3 具有 7 至 13 个氨基酸残基。

31. 根据权利要求 28 的 VH 结构域抗体文库, 其中所述源自人的随机 CDRH1、CDRH2 和 CDRH3 中具有诱发突变。

32. 根据权利要求 31 的 VH 结构域抗体文库, 其中所述突变是根据 Kabat 编号系统, 在

选自 CDRH1 的位置 30 和 31, CDRH2 的位置 53 和 CDRH3 的位置 97、99、100 和 100a 中的一个或多个位置诱导的。

33. 根据权利要求 28 的 VH 结构域抗体文库, 其中所述文库是天然的、合成的或免疫文库。

34. 一种使用根据权利要求 28 的文库, 筛选对所需抗原具有结合能力的 VH 结构域抗体的方法。

35. 根据权利要求 33 的方法, 其中所述筛选 VH 结构域抗体是通过除了被结合到其上的 VH 结构域以外, 洗脱未结合到固定的所需抗原的 VH 结构域抗体来执行的。

36. 根据权利要求 34 的方法, 其中所述洗脱未结合到固定的所需抗原的 VH 结构域抗体被重复两次或更多次。

超稳定免疫球蛋白可变结构域的筛选和改造方法及其应用

技术领域

[0001] 以下公开涉及被称作 Tat 相关蛋白质改造工程 (TAPE) 的方法, 通过将靶蛋白和抗生素抗性蛋白融合到 Tat 信号序列并在大肠杆菌内表达它, 筛选具有更高的溶解性和优异的热稳定性的靶蛋白, 特别是源自人种系的免疫球蛋白可变结构域 (VH 或 VL)。本发明还涉及由 TAPE 法筛选的、具有优异的溶解性和热稳定性的、人重链可变结构域抗体 (下文称为“VH 结构域抗体”) 和轻链可变结构域抗体 (下文称为“VL 结构域抗体”) 和人或改造的 VH 和 VL 结构域抗体支架。此外, 以下公开内容涉及 VH 和 VL 结构域抗体和抗体支架的氨基酸序列, 以及编码所述氨基酸序列的多核苷酸。

[0002] 在含有根据本发明筛选的人或改造的 VH 或 VL 支架的 VH 或 VL 结构域抗体具有相应的人或改造的 VH 或 VL 结构域抗体支架 (不管 CDR 序列) 的情况下, 它仍保留溶解性和热稳定性。

[0003] 此外, 以下公开内容涉及在由 TAPE 法筛选的人或改造的 VH 或 VL 结构域抗体支架中包括随机 CDR 序列的文库, 以及其制备方法。

[0004] 此外, 以下公开内容涉及使用所述文库筛选的、对靶蛋白质具有结合能力的 VH 或 VL 结构域抗体, 所述结构域抗体的氨基酸序列, 编码所述氨基酸序列的多核苷酸。

[0005] 发明背景

[0006] 片段化的小尺寸抗体因为它与全长单克隆抗体 (mAb) 的不同理化性质而是一种能够克服现有抗体疗法的局限性的有前途的抗体。存在单链抗体 (scFv)、Fab (片段抗体结合) 抗体、免疫球蛋白可变结构域抗体, 例如 VH 或 VL 等作为一般抗体片段, 以及串联 scFv、双抗体、微型抗体等作为其修饰形式 (Better et al., Science 1988 240(4855):1041-3; Huston et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. 1988 85(16):5879-83; Bird et al., Science 1988 242(4877):423-6; Pei et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. 1997 94(18):9637-42; Iliades et al., FEBS Lett. 1997 409(3):437-41; Ward et al., Nature 1989 341(6242):544-6)。

[0007] 抗体片段或小尺寸的抗体与全长单克隆抗体相比主要是丧失了 Fc (可结晶片段) 的功能, 因此, 没有由于 Fc 的存在而产生的预期效果, 如, 增加的循环半衰期、效应子功能等。

[0008] 然而, 小尺寸的片段化抗体被放大作为能够克服由于现有完整抗体的大尺寸造成的局限下一代抗体, 所述局限例如对结构上隐藏的表位的可及性、药物渗透和生物分布、形式灵活性、高生产成本等 (Zhao et al., Blood 2007 110(7):2569-77; Holliger et al., Nat. Biotechnol. 2005 23(9):1126-36; Hudson et al., Med. Microbiol. Immunol. 2009 198(3):157-74; Enever et al., Curr. Opin. Biotechnol. 2009 20(4):405-11)。

[0009] 此外, 各种抗体片段和小尺寸抗体的优点在于可以通过化学方法或重组蛋白融合的方法进行连接来实现双重或多重特异性。

[0010] 近来, 这种优点已被用来引入多特异性, 使得 Fc 功能被模块化, 从而补充了已被

指出作为缺点的效应子功能和短的循环半衰期。例如,将对人血清白蛋白具有结合特异性的片段或小尺寸抗体引入模块中以实现双特异性抗体,从而提高了循环半衰期,或将对免疫细胞,如自然杀伤或 T 细胞具有特异亲和力的小尺寸抗体引入模块中,从而赋予它细胞杀伤功能 (Els et al., J Biol Chem. 2001 9 ;276(10):7346-50 ;Bargou et al., Science 2008 321(5891):974-7 ;et al., Mol. Cancer Ther. 20087(8):2288-97)。另外,由于单个抗体可以被设计成向预期具有不同作用模式的两个或更多个分子靶标赋予特异性,开启了显著改善抗体的效力和经济可行性的可能性。

[0011] 人抗体结构中具有抗原特异性结合功能的最小单元是重链可变结构域 (VH) 或轻链可变结构域 (VL),这是定位在轻链或重链 N-末端的可变结构域。由于各自两个 N-末端已进化成具有互补结构,在从血浆 B 细胞生产单克隆抗体时组装重链和轻链过程中, VH 和 VL 构成非共价结合型复合体,从而保持其结构的稳定性。人抗体可变结构域 VH 节段根据在框架部分的氨基酸序列的同源性被分为 7 个家族 (VH1、VH2、VH3、VH4、VH5、VH6、VH7),但不包括 CDR(互补决定区)结合表位,每个家族中含有 3 至 22 种不同的氨基酸序列。轻链的 VL 分为 V κ 和 V λ , V κ 分为六个家族而 V λ 分为 10 个家族 (Chothia et al., 1992 J. Mol. Biol. 227, 799-917 ;Tomlinson et al., 1995EMBO J. 14, 4628-4638 ;Williams et al., J. Mol. Biol. 264, 220-232)。人们已经知道,一些 VH 和 VL 根据相互亲和力的程度而具有优选的 VH/VL 配对组合,并且因此,已经知晓基因的这种组合重排在扩大抗体库的多样性中起重要作用 (Ruud et al., J. Mol. Biol. 1999, 285, 895-901)。

[0012] 根据 6 个 CDR 的组合,结合型的 VH/VL 向特定抗原赋予互补结合特异性。轻链的 CDR1、CDR2 和 CDR3 和重链的 CDR1、CDR2 和 CDR3,共有 6 个 CDR,参与抗原的结合。根据人类种系序列的分析,发现各种各自的 CDR 大多依赖于重链可变结构域的 CDR3。因此,这一分析表明抗体的结合特异性主要取决于重链的 CDR3 的可变性 (J. Mol. Recogni. 2000, 13, 167-187)。

[0013] 与此不同,动物如骆驼和美洲驼以及具有软骨骨架的鱼如鲨鱼具有单重链结构而没有轻链结构的抗体。因此,这些抗体的可变结构域仅包括单个重链可变结构域(对于骆驼和鲨鱼分别是 V_{III}和 V_{NAR}),并且公知的是这种抗体在抗原结合和中和功能方面不比 VH 和 VL 同时参与抗原结合的人抗体差。除了在具有重链疾病的人类患者中,VH 或 VL 单独很少存在 (Hendershot et al., J. Cell. Biol. 1987 104(3):761-7 ;Prelli et al., J. Immunol. 1992 148(3):949-52)。其原因是 VH 或 VL 在 VH 或 VL 单独分离时由于其结构互补体而在结构上是不稳定的,并且因此,可能容易发生蛋白质聚集。已知的是这种蛋白质聚集部分地是由主要在 VH 和 VL 界面处分布的疏水性氨基酸残基所造成的疏水性相互作用而引起。不同于人抗体,在骆驼抗体的情况下,具有亲水性的氨基酸残基可以特别地定位在 VH/VL 边界区域的表面上。具体地,在骆驼抗体的四个位点处的氨基酸(它们是特异地与人 VH3 家族的那些不同的)被称为四分体。这些氨基酸位于 Kabat 编号系统的位置 37、44、45 和 47 处 (Kabat et al., 1991 J. Immunol. 147(5), 1709-1719)。在氨基酸序列中这种差异可以解释单可变结构域抗体 (VHH) 的稳定性。有人试图通过将人可变结构域抗体中在四分体位置的氨基酸替换为骆驼抗体 (G44E/L45R/W47G) 的亲水性氨基酸,产生改善的骆驼科抗体。

[0014] 结果是,从理化性质的角度讲它们的溶解性会有所改善 (Coppieters et al., Arthritis Rheum. 2006 54(6):1856-66 ;Dolk et al., Proteins. 2005

59(3):555-64;Ewert et al.,*Biochem.* 200241(11):3628-36;Kortt et al.,*J. Protein Chem.* 199514(3):167-78;Martin et al.,*Protein Eng.* 1997 10(5):607-14)。然而,与骆驼抗体相比难以得到它们的稳定性,例如,降低的蛋白质表达产率和热稳定性(Davies et al.,*FEBS Lett.* 1994Feb 21;339(3):285-90;Aires et al.,*J. Mol. Biol.* 2004 340(3):525-42)。业已发现,其理由是,在 VH/VL 边界区域的氨基酸修饰会导致相应区域的 β -折叠结构的修饰(Riechmann et al.,*J. Mol. Biol.* 1996 259(5):957-69)。与人抗体相比较,骆驼单结构域抗体的 CDR3 具有异常长的环结构。根据结构分析发现,这种环结构折叠成人抗体的 VH/VL 边界区域,并且已经提出,这种独特的结构部分地遮蔽了位于边界区域中的疏水补丁,从而帮助稳定骆驼单结构域抗体(Joost et al., 2010*Drug Discovery Today:Technologies* 7(2), 139-14)。

[0015] 在人类抗体中由于 CDR3 的相对较短的环结构而难以预期该屏蔽作用。总之,与骆驼单结构域抗体相比,人单可变结构域本身有缺陷的理化性质,由此不足以被用作特定抗原的结合配体的支架。作为克服这一点的方法,仅仅替换作为骆驼抗体的结构特征的四分体氨基酸是不够的,进一步需要蛋白质结构设计和 VH 或 VL 的定向进化。

[0016] 存在于自然界的人免疫球蛋白可变结构域(VH 或 VL)是能够维持抗原结合特性的最小尺寸的抗体(单克隆抗体大小的 1/12),因此,预计与常规的单克隆抗体在物理性质和作为治疗性蛋白质的治疗效果方面不同。因此,开发仅具有一个可变结构域的人抗体的需求也增加了。然而,当 VH 或 VL 单独存在时,蛋白质的聚集和不稳定倾向仍然是主要障碍,应该在开发特定抗原的结合支架时被克服。

[0017] 因此,为了使抗体片段和小尺寸抗体提供一般的单克隆抗体不能实现的优点并保持本身的竞争力,确保物质本身的稳健的药物和理化性质是很重要的。

[0018] 在已有技术中也已尝试了一些分子定向进化的方法,以便稳定人重链或轻链可变结构域(Barthelemy et al.,*J. Biol. Chem.* 2008 283(6):3639-54)。他们用 VH 的 CDR- 改造文库构建了噬菌体展示系统,然后筛选在施加热胁迫之后对蛋白 A 具有结合活性的 VH。有报告称通过该方法筛选到了具有增加的溶解性、并在蛋白质的热变性后允许可逆折叠的 CDR 改造的人 VH(Jespersen et al.,*Nat. Biotechnol.* 2004 22(9):1161-5)。此外,有报告称,制备了无热变性处理下在 CDR3 部分和框架部分诱导突变的各种文库并用相同的方法筛选到在噬菌体展示后对蛋白 A 展现高结合活性的 VH,因此,可以得到相比野生型的 VH 为热力学稳定且具有增加的可溶性表达的改造的 VH(Barthelemy et al.,*J Biol Chem.* 2008 283(6):3639-54)。在噬菌体展示系统中,靶蛋白是由融合到靶蛋白的 N-末端的 pe1B 蛋白的 Sec 信号序列诱导至 Sec 途径。然而,在这种情况下,该蛋白(其之前在大肠杆菌的细胞质内折叠)由于蛋白质的固有转位途径的限制而不能通过该途径。原因是,一般的噬菌体展示采用 Sec 途径,这是大肠杆菌的代表性的蛋白质转位途径,并且,由于这条途径的性质,靶蛋白质在穿过细胞膜时在分子伴侣帮助下在细胞质内具有线性结构而不是三维结构。在胞质内,sec 途径特异的蛋白质(不同的线性形式)在被称作 SecB 的分子伴侣的帮助下,蛋白转录后直接天然存在而不折叠。sec 途径靶蛋白通过 Sec B 被移动到由存在于细胞内的 Sec A、SecYEG 和 SecDFYajC 组成的转位复合体,以线性形式而不是三维结构穿过膜,并且已穿过的氨基酸链在到达周质前通过 DsbA 和 DsbB 的氧化和还原形成包括二硫键的完整的三维结构(Baneyx and Mujacic *Nature Biotech.* 2004, 22, 1399 ~ 1408)。因此,

如果由于蛋白质本身的性质而在细胞质中迅速发生一定的蛋白质折叠和三维结构形成,这种蛋白与设计用于 Sec 途径的噬菌体展示筛选系统不具有兼容性。

[0019] 此外,据报道,当基于斑块尺寸的大小直接从遍布菌苔的平板上筛选克隆时,可选择具有改进的理化性质的野生型 VH(To et al., *J. Biol. Chem.* 2005 280(50):41395-403)。但是,通过基于平板的筛选来进行大规模处理是不可能,因此,为了减小文库的大小,制造仅用于进行蛋白质体外筛选步骤的 VH3 家族的初始文库。

[0020] 同时,为了提高重组蛋白的折叠特性,尝试了遗传选择方法(Maxwell et al., *Protein Sci.* 1999 8(9):1908-11; Wigley et al., *Nat. Biotechnol.* 2001 19(2):131-6; Cabantous et al., *Nat. Biotechnol.* 2005 23(1):102-7; Waldo GS. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 2003 7(1):33-8)。一个代表性用于改善重组蛋白的折叠特性的方法是通过测量以重组 DNA 技术融合到目的蛋白质的报告蛋白的活性来间接测定目的蛋白质的折叠程度。然而,当目的蛋白单独存在时,不能准确地反映折叠。

[0021] 另外,为了提高蛋白质的溶解性,已经开发出了分子定向进化方法,其中利用 Tat(双精氨酸转位)途径作为生物过滤器来确定蛋白质是否被折叠,该途径是具有校对蛋白质折叠品质的功能的蛋白质转位途径。具体地,目的蛋白融合到报告基因和 Tat 信号序列并通过大肠杆菌内的 Tat 途径表达,然后根据蛋白质的折叠程度和溶解性通过 Tat ABC 转位酶复合体进行蛋白折叠校对。如果靶蛋白质具有足够的溶解性,由靶蛋白和报告蛋白组成的融合蛋白穿过大肠杆菌的内膜并到达周质。通过诸如抗生素抗性测量等方法检测到达周质的融合蛋白,从而筛选具有所需溶解性程度的蛋白质(Fisher et al., *Protein Sci.* 2006 15(3):449-58)。由此可以看出,当重组蛋白时,不仅是在天然系统中的 Tat 途径底物蛋白质被应用于 Tat 途径时,它也显著通过 Tat 途径,与重组蛋白的溶解性和稳定性成正比(Lim et al., *Protein Sci.* 2009 18(12):2537-49)。另外,已经报道,利用 Tat 途径,有效筛选出允许在大肠杆菌的细胞质内进行蛋白质折叠的单链抗体(scFv)(Fisher AC and DeLisa MP. *J. Mol. Biol.* 2009 385(1):299-311)。根据上述文献,分子定向进化是通过使用在大肠杆菌中不溶的并表达为模板碱基序列的 scFv13 完全在体外实现的。scFv 内的二硫键具有约 4 至 6 kcal/mol 的水平,并有助于蛋白质分子的稳定化。这一键是形成在氧化环境中,如细菌的周质或真核生物的内质网(ER)。细菌的周质通常通过电子在内膜上存在的 DsbA 和 DsbB 之间的流动保持氧化条件。因此,在通过人工穿过 Tat 途径而从 scFv 改造文库中选择的 scFv13 蛋白的情况下,自主自我折叠、在还原条件细胞质而不是氧化条件细胞质中没有形成二硫键的胞内抗体被优先选择。具体而言,当引导蛋白进入 Tat 途径的信号序列融合到靶蛋白的 N-末端并且 TEM-1 β -内酰胺酶融合到靶蛋白的 C-末端(用作报告基因)的基因在大肠杆菌内表达时,表达了三功能融合蛋白(tripartite)。

[0022] 表达的融合蛋白进入 Tat 途径,并且通过存在于内层细胞膜的 Tat ABC 转位酶复合体的机制进行蛋白质折叠检查。一些研究发现,在许多重组蛋白中,只有那些具有溶解性的蛋白保持了与 Tat 途径的特定机制的兼容性(Sanders et al., *Mol. Microbiol.* 2001 41(1):241-6; DeLisa et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 2003 100(10):6115-20; Matos et al., *EMBO J.* 2008 27(15):2055-63; Fisher AC and DeLisa MP. *J. Mol. Biol.* 2009 385(1):299-311; Lim et al., *Protein Sci.* 2009 18(12):2537-49)。

[0023] 但是,上述用于提高蛋白质的折叠特性的方法从未被应用于选择结构域抗体,特

别是, VH 或 VL 结构域抗体等。

[0024] 总之, 目前, 人 VH 结构域抗体的改造修饰和筛选无一例外地是基于噬菌体展示和与蛋白 A 的结合活性来进行 (Kristensen P and Winter G. Fold. Des. 1998 3(5):321-8; Sieber et al., Nat. Biotechnol. 1998 16(10):955-60; Jung et al., J. Mol. Biol. 1999 294(1):163-80; Wörn A and Plückthun A. J. Mol. Biol. 2001 305(5):989-1010)。

[0025] 因此, 迫切需要发展用于选择具有更有效的溶解性和高的热稳定性的 VH 结构域抗体的方法, 并且进一步地, 迫切需要发展通过利用所选择的结构域抗体而具有改善功效的最小单位的下一代抗体。

发明内容

[0026] 技术问题

[0027] 本发明的一个实施方案涉及提供一种命名为 Tat 相关蛋白质改造工程 (TAPE) 的方法, 能够有效地筛选具有溶解性和高的热稳定性的 VH 或 VL 结构域抗体。

[0028] 进一步地, 本发明的一个实施方案涉及提供由 TAPE 法筛选的、具有溶解性和优异的热稳定性的、人 VH 和 VL 结构域抗体和人或改造的 VH 和 VL 结构域抗体支架, 以及提供所述 VH 和 VL 结构域抗体和抗体支架的氨基酸序列, 和编码它的多核苷酸。

[0029] 在含有根据本发明筛选的人或改造的 VH 或 VL 支架的 VH 或 VL 结构域抗体具有相应的人或改造的 VH 或 VL 结构域抗体支架 (不管 CDR 序列) 的情况下, 仍保留着溶解性和热稳定性。

[0030] 进一步地, 本发明的一个实施方案涉及提供一种在由 TAPE 法筛选的人 VH 或 VL 结构域抗体支架中包括随机 CDR 序列的文库, 及其制备方法。

[0031] 进一步地, 本发明的一个实施方案涉及提供对使用所述库筛选的靶蛋白具有结合能力的 VH 或 VL 结构域抗体, 所述结构域抗体的氨基酸序列, 及编码它的多核苷酸。

[0032] 解决技术问题的技术方案

[0033] 在一个总的方面, 本发明提供了一种命名为 Tat 相关蛋白质改造工程 (TAPE) 的方法, 能够有效地从人免疫球蛋白可变结构域文库或组合文库中筛选配体, 尤其是, 具有高溶解性和高的热稳定性的 VH 和 VL 结构域抗体。

[0034] 另外, 本发明提供了用于筛选所述配体的系统、载体和宿主细胞, 并提供了由 TAPE 法筛选的配体, 特别是 VH 和 VL 结构域抗体。

[0035] 令人惊讶地, 我们发现, 由根据本发明的 TAPE 法筛选的 VH 结构域抗体, 只要保留了 VH 结构域抗体支架, 即, FR1 至 FR4 框架, 而不管被插入的 CDR 序列, 即, 序列 CDR1 至 CDR3, 就具有高溶解性和热稳定性, 以及保持高溶解性和热稳定性。

[0036] 从这个观点来看, 本发明提供了由本发明的 TAPE 法筛选的 VH 结构域抗体支架, 其中随机的人源性或组合的 CDR 序列, 也就是, CDR1 至 CDR3 序列, 被插入到 VH 结构域抗体支架, 即, FR1 至 FR4 框架中, 以及构造它的方法。

[0037] 另外, 本发明提供了从所构建的文库中筛选具有靶向与靶蛋白结合能力的 VH 结构域抗体的方法。

[0038] 在本发明提供的具有高的溶解性和热稳定性的 VH 结构域抗体支架, 即, FR1 至 FR4 框架, 具有下面的氨基酸序列:

[0039] FR1 的氨基酸序列：

[0040] $X_0VQLX_1X_2X_3GX_4X_5X_6X_7X_8PGX_9SX_{10}X_{11}X_{12}X_{13}CX_{14}X_{15}X_{16}GX_{17}X_{18}X_{19}$ - 式 1)

[0041] 在式 1) 中，

[0042] X_0 是 E 或 Q，

[0043] X_1 是 V 或 L，

[0044] X_2 是 E 或 Q，

[0045] X_3 是 S 或 A，

[0046] X_4 是 G 或 A，

[0047] X_5 是 G, M, N, V, 或 E，

[0048] X_6 是 L, V, 或 W，

[0049] X_7 是 V, K, A, 或 I，

[0050] X_8 是 Q, K, 或 H，

[0051] X_9 是 G, T, A, R, E, S, 或 T，

[0052] X_{10} 是 L, V, R, 或 M，

[0053] X_{11} 是 R 或 K，

[0054] X_{12} 是 L, I, 或 V，

[0055] X_{13} 是 S, A, 或 T，

[0056] X_{14} 是 A, E, V, R, I, K, T, 或 S，

[0057] X_{15} 是 A, G, P, V, 或 T，

[0058] X_{16} 是 S, F, 或 Y，

[0059] X_{17} 是 F, Y, R, G, 或 L，

[0060] X_{18} 是 T, A, S, N, T, P, I, N, H, 或 A, 和

[0061] X_{19} 是 F, L, V, 或 C；

[0062] FR2 的氨基酸序列：

[0063] $WX_{20}RX_{21}X_{22}PGX_{23}GX_{24}X_{25}X_{26}X_{27}X_{28}$ - 式 2)

[0064] 在式 2) 中，

[0065] X_{20} 是 V, A, 或 L，

[0066] X_{21} 是 Q, N, R, I, K, Y, V, M, S, Q, W, F, L, V, 或 C，

[0067] X_{22} 是 A, G, K, S, V, M, 或 T，

[0068] X_{23} 是 K, Q, E, R, 或 T，

[0069] X_{24} 是 L, N, I, P, Y, T, V, W, A, R, M, 或 S，

[0070] X_{25} 是 V 或 E，

[0071] X_{26} 是 W, I, V, P, F, H, M, Y, L, C, 或 R，

[0072] X_{27} 是 V, M, I, 或 L, 和

[0073] X_{28} 是 S, A, 或 G；

[0074] FR3 的氨基酸序列：

[0075] $X_{29}X_{30}X_{31}X_{32}X_{33}X_{34}X_{35}X_{36}X_{37}X_{38}X_{39}X_{40}X_{41}X_{42}X_{43}X_{44}X_{45}X_{46}X_{47}X_{48}X_{49}X_{50}X_{51}DX_{52}X_{53}X_{54}YX_{55}CX_{56}X_{57}$ - 式 3)

[0076] 在式 3) 中，

- [0077] X_{29} 是 R, H, Q, 或 T,
- [0078] X_{30} 是 F, V, L, 或 I,
- [0079] X_{31} 是 T, S, 或 I,
- [0080] X_{32} 是 I, L, V, M, 或 R,
- [0081] X_{33} 是 S, T, 或 D,
- [0082] X_{34} 是 R, A, V, N, 或 I,
- [0083] X_{35} 是 D, N, 或 A,
- [0084] X_{36} 是 N, T, D, I, R, K, Y, 或 E,
- [0085] X_{37} 是 A, S, V, 或 T,
- [0086] X_{38} 是 K, R, T, Q, V, E, M, N, 或 I,
- [0087] X_{39} 是 N, R, T, K, S, D, 或 V,
- [0088] X_{40} 是 T, M, S, V, I, Y, 或 A,
- [0089] X_{41} 是 L, V, A, 或 M,
- [0090] X_{42} 是 F, Y, N, D, H, 或 S,
- [0091] X_{43} 是 L 或 M,
- [0092] X_{44} 是 Q, E, H, 或 N,
- [0093] X_{45} 是 M, L, V, I, 或 W,
- [0094] X_{46} 是 N, T, K, D, Y, I, 或 S,
- [0095] X_{47} 是 S 或 N,
- [0096] X_{48} 是 L 或 V,
- [0097] X_{49} 是 R, K, 或 T,
- [0098] X_{50} 是 D, A, S, P, T, V, I, 或 S,
- [0099] X_{51} 是 E, A, D, 或 S,
- [0100] X_{52} 是 T, N, 或 S,
- [0101] X_{53} 是 S, A, 或 G,
- [0102] X_{54} 是 V, I, L, 或 M,
- [0103] X_{55} 是 Y 或 F,
- [0104] X_{56} 是 A, G, V, 或 S, 和
- [0105] X_{57} 是 R, S, K, T, L, N, 或 F ;和
- [0106] FR4 的氨基酸序列 :
- [0107] $X_{58}GX_{59}GX_{60}X_{61}VTVSS-$ 式 4)
- [0108] 在式 4) 中,
- [0109] X_{58} 是 W, C, Y, G, S, 或 A,
- [0110] X_{59} 是 Q, R, 或 L,
- [0111] X_{60} 是 A, T, I, 或 V, 和
- [0112] X_{61} 是 L, M, P, V, 或 T。
- [0113] 另外,本发明提供了编码 VH 结构域抗体支架的氨基酸序列(即,FR1 至 FR4 框架的氨基酸序列)的多核苷酸。
- [0114] 更优选地,本发明提供的具有高的溶解性和热稳定性的 VH 结构域抗体支架,即,

FR1 至 FR4 框架,具有下面的氨基酸序列:

[0115] FR1 的氨基酸序列:

[0116] $X_0VQLX_1X_2SGGX_5X_6X_7X_8PGX_9SX_{10}RX_{12}SCX_{14}X_{15}SGX_{17}X_{18}X_{19}$ - 式 5)

[0117] 在式 5) 中,

[0118] X_0 是 E 或 Q,

[0119] X_1 是 V 或 L,

[0120] X_2 是 E 或 Q,

[0121] X_5 是 G, N, V, 或 E,

[0122] X_6 是 L 或 V,

[0123] X_7 是 V 或 K,

[0124] X_8 是 Q, K, 或 H,

[0125] X_9 是 G, T, A, R, E, 或 T,

[0126] X_{10} 是 L 或 V,

[0127] X_{12} 是 L 或 V,

[0128] X_{14} 是 A, E, V, I, K, 或 S,

[0129] X_{15} 是 A, G, 或 V,

[0130] X_{17} 是 F, Y, R, G, 或 L,

[0131] X_{18} 是 T, A, S, N, T, P, I, N, H, 或 A, 和

[0132] X_{19} 是 F, L, V, 或 C;

[0133] FR2 的氨基酸序列:

[0134] $WVRX_{21}X_{22}PGX_{23}GX_{24}X_{25}X_{26}X_{27}X_{28}$ - 式 6)

[0135] 在式 6) 中,

[0136] X_{21} 是 Q, N, R, I, K, Y, V, M, S, Q, W, F, L, V, 或 C,

[0137] X_{22} 是 A, G, K, S, 或 M,

[0138] X_{23} 是 K, Q, E, R, 或 T,

[0139] X_{24} 是 L, N, I, P, Y, T, V, W, A, R, M, 或 S,

[0140] X_{25} 是 V 或 E,

[0141] X_{26} 是 W, I, V, P, F, H, M, Y, L, C, 或 R,

[0142] X_{27} 是 V, M, I, 或 L, 和

[0143] X_{28} 是 S, A, 或 G;

[0144] FR3 的氨基酸序列:

[0145] $RX_{30}TX_{32}SX_{34}DX_{36}X_{37}X_{38}X_{39}X_{40}X_{41}X_{42}X_{43}X_{44}X_{45}X_{46}X_{47}X_{48}X_{49}X_{50}X_{51}DTAX_{54}YX_{55}CX_{56}X_{57}$ - 式 7)

[0146] 在式 7) 中,

[0147] X_{30} 是 F, V, L, 或 I,

[0148] X_{32} 是 I, L, V, 或 M,

[0149] X_{34} 是 R, A, V, 或 I,

[0150] X_{36} 是 N, T, D, I, R, K, Y, 或 E,

[0151] X_{37} 是 A, S, V, 或 T,

[0152] X_{38} 是 K, R, T, Q, V, E, M, N, 或 I,

[0153] X_{39} 是 N, R, T, K, S, D, 或 V,

[0154] X_{40} 是 T, M, S, V, I, Y, 或 A,

[0155] X_{41} 是 L, V, A, 或 M,

[0156] X_{42} 是 F, Y, N, D, H, 或 S

[0157] X_{43} 是 L 或 M,

[0158] X_{44} 是 Q, E, H, 或 N,

[0159] X_{45} 是 M, L, V, I, 或 W,

[0160] X_{46} 是 N, T, K, D, Y, I, 或 S,

[0161] X_{47} 是 S 或 N,

[0162] X_{48} 是 L 或 V,

[0163] X_{49} 是 R, K, 或 T,

[0164] X_{50} 是 D, A, S, P, T, V, I, 或 S,

[0165] X_{51} 是 E, A, D, 或 S,

[0166] X_{54} 是 V, I, L, 或 M,

[0167] X_{55} 是 Y 或 F,

[0168] X_{56} 是 A, G, V, 或 S, 和

[0169] X_{57} 是 R, S, K, T, L, N, 或 F ; 和

[0170] FR4 的氨基酸序列 :

[0171] X_{58} GQGX X_{60} X_{61} VTVSS- 式 8)

[0172] 在式 8) 中,

[0173] X_{58} 是 W, C, Y, G, S, 或 A,

[0174] X_{60} 是 A, T, I, 或 V, 和

[0175] X_{61} 是 L, M, V, 或 T。

[0176] 另外, 本发明提供了编码重链可变结构域 (VH) 抗体支架的氨基酸序列 (即, FR1 至 FR4 框架的氨基酸序列) 的多聚核苷酸。

[0177] 更优选地, 本发明中提供的具有高溶解性和热稳定性的 VH 结构域抗体的支架, 即, FR1 至 FR4 框架, 具有在表 1 中记载的氨基酸序列。

[0178] [表 1] 通过 TAPE 筛选的 VH 抗体支架的 FR1 至 FR4 框架的氨基酸序列 (来自于人种系)

[0179]

支架名称	FR1	FR2	FR3	FR4
MG1X8	QVQLVESGGGLVQ	WVRQAP	RFTISRDN	AKNTLFL
				WGQGALV

[0180]

	PGGSLRLSCAASGF TF	GKGLVW VS	QMNSLRDEDTSVYY CAR	TVSS
MG2X1	EVQLVESGGGLVQ PGGSLRLSCAASGF TF	WVRQAP GKGLEW VS	RFTISRDN SKNTLYL QMNSLRAEDTAVY YCAS	WGQGTLV TVSS
MG2X1-34	QVQLVESGGNVVQ PGTSLRLSCAASGF TF	WVRQAP GKGLEW VA	RFTISRDN SRNTVFL QMTSLRAEDTAVYY CGR	WGQGILV TVSS
MG2X2-12	QVQLVQSGAEVKK PGASVKISCEASGY AF	WVRQAP GQGLEW MG	RVTLTRDTSTRTVY MELKNLRSADTGVY YCAR	WGQGTLV TVSS
MG2X2-13	EVQLLESGGGVVQ PGKSLRLSCVGS GF SF	WVRQAP GKGLEW LA	RFTISRDN SKTMVN LQMNSLRPDDTAVY FCAR	WGQGTLV TVSS
MG3X1	QVQLVESGGGVVQ PGRSLRLSCVASGF NF	WLRQAP GKGLEW VA	RFTISRDN SKNTLYL EMNSLRPEDTAVYY CAK	CGQGTLV TVSS
MG3X10	EVQLVESGGGLVK PGGSLRVSCAASGF TF	WVRQAP GKGLEW VG	RFTISRDD SKNMVY LQMNSLKTEDTAVY YCTT	YGQGTLV TVSS
MG4X1-8	EVQLVESGGGLVQ PGGSLRLSCAASGF SF	WVRQGP GEGLVW LS	RFTISRDN AKNTVY LEMNSVRVDDTAV YYCVS	WGQGALV TVSS
MG4X1-33	QVQLVESGGGLVQ PGGSLRLSCEASGF PF	WVRQAP GKGLEW VS	RFTISRDD STNTLYL QVNSLRAEDTAVYY CAK	WGRGTLV TVSS
MG4X1-35	EVQLLESGGGLVKP GGSLRLSCVGSERS F	WVRQAP GKGLEW VA	RFTVSRDN VQKSLD LQMDSLRAEDTAVY FCAR	WGQGTTV TVSS
MG4X3-27	EVQLLESGGGLAQS	WVRQAP	RFTISRDI AKNSLYL	WGQGALV

[0181]

	GGSLRLSCAASGFT F	GKGLEWI S	QMNSLRDEDTAVY YCAK	TVSS
MG4X4-2	EVQLVQSGAEVKK PGESLRISCRGSGY RF	WARDKP GKGLEWI G	HVTISSDRSVSVAYL QWDSLKASDNGIYY CAL	WGQGTLV TVSS
MG4X4-4	EVQLVESGGGLVQ PGSLRLSCVPSGF TF	WVRQAP GKGLVW VS	RFTISRDN AEDTLFL QMNSLRVDDTAVY YCVR	WGQGVLV TVSS
MG4X4-25	QVQLVESGGGLVQ PGSLRLSCIASGFS L	WVRRSP GKGLEW VA	RFTVSRDNAKNSLF LQMNNVRPEDTALY FCAR	WGQGMTV TVSS
MG4X4-44	EVQLVESGGGLVQ PGSLRLSCAASGF TF	WVRQAP GKGLEW VA	RFTISRDN AKNLSLYL QMNSLRAEDTALYY CAR	WGQGTLV TVSS
MG4X5-30	EVQLLES GGGLVQP GGSLRLSCAASGFT F	WVRQAP GKGLEW LS	RFTISRNN AKNLSLYL QMNSLRVDDTAVY YCAR	WGQGTLV TVSS
MG4X6-27	EVQLLES GGGLVQP GGSLRLSCAASGFT F	WVRQGP GKGLEW VA	RFTISRDN AENSLYL QVNSLRAEDTAIYY CAK	WGQGALV TVSS
MG4X6-48	EVQLLES GGGVVQ PGRSLRLSCEVFGF TL	WVRQAP GRRLEW VA	RFTISRDIATNRLYL QMRS LRAEDTALYY CAR	WGQGTLV TVSS
MG4X7-15	EVQLLES GGGLVQP GGSLRLSCAASGFS F	WVRQAP GKGLEW VS	RFTISRDN SKNTLYL QMNSLRVEDTAVY YCAV	WGQGTTV TVSS
MG4X8-24	EVQLLES GGGLVQP GGSLRLSCAASGFT F	WVRQAP GKGLEW VS	RFTISRDN SNNTLYL QMNSLRADDTAVY FCAK	WGQGTLV TVSS
MG0.5X-1	QVQLVESGGGLVQ	WVRQVP	RFTISRDN AKNLSLYL	WGQGTLV

[0182]

	PGGSLRLSCAASGF TF	GKGLEW VA	QMNSLRAEDTAVY YCAN	TVSS
MG0.5X-3	QVQLVESGGGLVQ PGGSLTLSCAASGF TF	WVRQAP GTGLLW LS	RFTISRDN SKNTLYL QMNSLRAEDTAVY YCAR	WGXGTMV TVSX
MG0.5X-4	EVQLLES GGMLVK PGESLRLSCVGSGLI F	WVRHAP GKGLEW VG	RLSISRDDSMNTVY LDIYNL KIDDTGVY YCTF	WGQGTPV TVSS
MG0.5X-14	EVQLLES GGGLVH AGGSVRLSCAASGF TF	WVRQAP GKGLEW VA	RFTISRDN SKNSMY LQMNSLRVEDTAVY YCAR	WGQGTVV TVSS
MG0.75X-4	QVQLVES GGGLVK PGGSLRLSCAASGF TF	WLRQAP GKGPEY VA	RFIISRDD SNDMLYL EMISLK SEDTAVYY CSD	GSQGTLV TVSS
MG2X-5	EVQLLES GGGLVQP GGSLRLSCAASGFT F	WVRQAP GKGLEW VS	RFTISRDN SKNTLYL HMNSLRAEDTAVY YCVK	WGQGTLV TVSS
MG2X-15	QVQLVES GGGLVQ PGGSLRLSCAASGF TF	WVRQAP GKGLEW VS	RFTISRDN SKNTLYL QMNSLRAEDTAVY YCAK	WGQGTLV TVSS
MG4X-5	QVQLVES GGGLVQ PGGSLRLSCEASGL HF	WVRQAP GKGLEW VA	RFTVSRDN SRNTLY LQMKSL SAEDTAVY YCAK	WGQGTMV TVSS
MG1-4	QVQLVEAG GGLVQ PGGSLRLACAASGF TF	WVRQAP GKGLEWI S	RFTISRDN SQNSLFL QMNSLRAEDTAVY YCAT	WGQGTMV TVSS
MG1-6	EVQLVQSGAEVKK PGESLRK SCKGSGY SF	WVRQMP GKGLEW MG	HVTISVDK SISTAYL QWSSLK ASDSAMY YFL	WGQGTLV TVSS
MG1-7	QVQLVES GGGLVQ	WVRQAP	RFTISRDN AKNSLYL	WGQGTLV

[0183]

MG1-8	PGGSLRLSCAASGF	GKGLEW	QMNSLRDEDTAVY	TVSS
	TF	VA	YCAR	
	EVQLVQSGAEVKK	WVRQAP	RVTMTRDTSSTAY	WGQGLTV
	PGASVKVSCKASG YTF	GQGLEW MG	MELNRLTSDDTAVY FCAR	TVSS
MG1-9	EVQLVEAGGGLVQ	WVRQAP	RFTISRDNANSLFL	WGQGMTV
	PGGSLRLACAASGF TF	GKGLEW S	QMNSLRAEDTAVY YCAT	TVSS
MG1-10	EVQLVQSGAEVKK	WVRQMP	QVTMSANRSISTAY	WGQGTTV
	PGESLKISCKGSGY	GRGLEW	LQWSSLKASDTGIY	TVSS
	SF	LG	YCAT	
MG5-1	QVQLVESGGGLIQP	WVRQAP	RFTISRDNSTQNTVHL	WGQGLTV
	GESLRLSCEAFGFT	GKGLEW	QMNSLTAEDTAVY	TVSS
	V	VS	YCAR	
MG5-2	EVQLVQSGAELKK	WVRQAP	RLILSVDEPTRTVY	WGQGTTV
	PGSSVKVSTSSGG	GQGLEW	MELTSLRSDDTAMY	TVSS
	SF	MG	YCAR	
MG5-4	EVQLLES GGGLVQP	WVRQAP	RFTISRDNANAKDSLVL	WGQGMTV
	GRSLRLSCAASGFT	GKGLEW	QMNSLRPEDTALYY	TVSS
	F	VS	CAR	
MG5-5	EVQLLES GGGVQ	WVRQAP	RFTISRDNYSNKIVHL	WGQGLTV
	PGRSLRLSCVASGF	GKGLEW	EMDSLRAEDTAVYF	TVSS
	TF	VS	CVR	
MG5-6	EVQLLES GGGLVKP	WVRQAP	RFTISRDDSRDMLY	SSQGLVT
	GGSLRLSCAASGFT	GKGLEC	LQMNNLKTEDTAV	VSS
	F	VA	YYCSD	
MG5-7	EVQLVES GGGVLVQ	WVRQAP	RFTISRDDSKSIVYL	WGRGTLV
	PGRSLRLSCTTSGFS	GKGLEW	QMSSLQTEDTAVYY	TVSS
	F	VS	CSR	
MG5-9	EVQLLES GGGVLRP	WVRQAP	TISRDNANAKNSVYLQ	WGQGLTV

[0184]

	GGSLRLSCSASGFA F	GKGLEW VS	MNSLRAEDSAVYFC AR	TVSS
MG10-1	QVQLVESGGNVVQ PGTSLRLSCAASGF TF	WVRQAP GKGLEW VA	RFTISRDNRSRNTVFL QMTSLRAEDTAVYY CGR	WGQGILV TVSS
MG10-2	EVQLLES GGGLVQP GGSLRLTCVGYGFT F	WVRQAP GKGPEW VA	RFTISRDN AKDSL YL QMDSL RPEDTAVYY CAR	APQGTLVT VSS
MG10-4	EVQLLES GGGLVQP GGSLRLSCAASGFI L	WVRQAP GKGLVW VS	QFTISRDN AKNTLYL QMNSLRVEDTAVY YCAR	WGQGT MV TVSS
MG10-5	EVQLLES GGGVVH PGRSLRLSCAVSGF SL	WVRQAP DKGLEW VA	RFTVSRDISKNTVYL QMNSLRAEDTALYY CAR	WGQGT MV TVSS
MG10-6	EVQLLES GGGLVQP GGSRRLSCAASGFT F	WFRQGP GKGLEW VA	RFTISRDDS KNSLSL QMDSLRTEDTAVYY CVR	WGQGT VV TVSS
MG10-8	QVQLVES GGGVVQ PGRSLRLSCVASGF AF	WVRQTP GRGLEW LA	RFTISRDN SNNTVYL EMNSLRPEDSAIYY CAK	WGLGT VV TVSS
MG10-10	QVQLVES GGVVVQ PGGSLRLSCAASGF TF	WVRQAP GKGLEW VS	RFTISRDN SKNSLYL QMNSLRTDETALYY CV	WGQGT LV TVSS
MG2	EVQLLES GGGLVQP GGSLRLSCAASGFT F	WVRQAP GKGLEW VS	RFTISRDN AKNSLYL QMNSLRTDETAVYY CAR	WGQGT TV TVSS
M5G	EVQLLQSGGGWVK PGGSLRLSCAASGFI C	WVRQAP GKGLEW VG	RFTISIDES RNALFLH MNSLTTDDTAVYYC ST	WGQGT LV TVSS
MG6	EVQLLES GGVVVQ	WVRQAP	RFTVSRDTSTNTLYL	WGQGT LV

[0185]

	PGRSLRLSCAASGF TF	GKGLEW VA	QMNSLRVEDTAVY YCAR	TVSS
MG7	QMQLVQSEAEVKK PGASMKVSCKASG YTF	WVRQAT GQGLEW MG	RVTMTRNTSISTAY MELSSLTSADTAVY YCAR	WGQGTLLV TVSS
MG10	QVQLVQSGAEVKK PGESLKISCKGSGY SF	WVRQMP GKGLEW MG	QVTISADKSISTAFL QWNSLKASDTAMY YCAR	WGLGTLLV TVSS

[0186] 另外,本发明提供了编码 VH 结构域抗体支架的氨基酸序列(即,FR1 至 FR4 框架的氨基酸序列)的多聚核苷酸。

[0187] 特别地,通过对框架的一部分氨基酸序列进行修饰而改进的 VH 结构域抗体支架,即,FR1 至 FR4 框架,具有表 2 中记载的氨基酸序列。

[0188] [表 2] 氨基酸修饰的 VH 结构域抗体支架的 FR1 至 FR4 框架的氨基酸序列

[0189]

支架名称	FR1	FR2	FR3	FR4
MG8-21	EVQLVESGGGLV QPGGSLRLSCAAS GFTF	WVRNAPG KGNEIVS	RFTISRDN SKNTLYL QMNSLRAEDTAVY YCAS	WGQGTLLV VSS
MG2-12L	EVQLVESGGGLV QPGGSLRLSCAAS GFTF	WVRRAPG KGIEVVS	RFTISRDN SKNTLYL QMNSLRAEDTAVY YCAS	WGQGTLLV VSS
MG2-7I	EVQLVESGGGLV QPGGSLRLSCAAS GFTF	WVRIAPGK GPEPVS	RFTISRDN SKNTLYL QMNSLRAEDTAVY YCAS	WGQGTLLV VSS
MG2-9I	EVQLVESGGGLV QPGGSLRLSCAAS GFTF	WVRKAPG KGYEPVS	RFTISRDN SKNTLYL QMNSLRAEDTAVY YCAS	WGQGTLLV VSS
MG2-10I	EVQLVESGGGLV QPGGSLRLSCAAS	WVRNAPG KGYEIVS	RFTISRDN SKNTLYL QMNSLRAEDTAVY	WGQGTLLV VSS

[0190]

	GFTF		YCAS	
MG2-11I	EVQLVESGGGLV QPGGSLRLSCAAS GFTF	WVRYAPG KGYEFVS	RFTISRDN SKNTLYL QMNSLRAEDTAVY YCAS	WGQGTLVT VSS
MG2-12I	EVQLVESGGGLV QPGGSLRLSCAAS GFTF	WVRVAPG KGIEPVS	RFTISRDN SKNTLYL QMNSLRAEDTAVY YCAS	WGQGTLVT VSS
MG2-32	EVQLVESGGGLV QPGGSLRLSCAAS GFTF	WVRMAPG KGPEHVS	RFTISRDN SKNTLYL QMNSLRAEDTAVY YCAS	WGQGTLVT VSS
MG2-34	EVQLVESGGGLV QPGGSLRLSCAAS GFTF	WVRSAPG KGVEMVS	RFTISRDN SKNTLYL QMNSLRAEDTAVY YCAS	WGQGTLVT VSS
MG2-40	EVQLVESGGGLV QPGGSLRLSCAAS GFTF	WVRTAPG KGTEMVS	RFTISRDN SKNTLYL QMNSLRAEDTAVY YCAS	WGQGTLVT VSS
MG2-46	EVQLVESGGGLV QPGGSLRLSCAAS GFTF	WVRCAPG KGYEFVS	RFTISRDN SKNTLYL QMNSLRAEDTAVY YCAS	WGQGTLVT VSS
MG2-47	EVQLVESGGGLV QPGGSLRLSCAAS GFTF	WVRIAPGK GLEMVS	RFTISRDN SKNTLYL QMNSLRAEDTAVY YCAS	WGQGTLVT VSS
MG2-48	EVQLVESGGGLV QPGGSLRLSCAAS GFTF	WVRMAPG KGLYVVS	RFTISRDN SKNTLYL QMNSLRAEDTAVY YCAS	WGQGTLVT VSS
MG2-51	EVQLVESGGGLV QPGGSLRLSCAAS GFTF	WVRYAPG KGTEFVS	RFTISRDN SKNTLYL QMNSLRAEDTAVY YCAS	WGQGTLVT VSS
MG2-53	EVQLVESGGGLV QPGGSLRLSCAAS	WVRQAPG KGVEWVS	RFTISRDN SKNTLYL QMNSLRAEDTAVY	WGQGTLVT VSS

[0191]

	GFTF		YCAS	
MG2-55	EVQLVESGGGLV QPGGSLRLSCAAS GFTF	WVRWAPG KGPEFVS	RFTISRDN SKNTLYL QMNSLRAEDTAVY YCAS	WGQGTLVT VSS
MG2-57	EVQLVESGGGLV QPGGSLRLSCAAS GFTF	WVRFAPG KGREWVS	RFTISRDN SKNTLYL QMNSLRAEDTAVY YCAS	WGQGTLVT VSS
MG2-58	EVQLVESGGGLV QPGGSLRLSCAAS GFTF	WVRFAPG KGCELVS	RFTISRDN SKNTLYL QMNSLRAEDTAVY YCAS	WGQGTLVT VSS
MG2-59	EVQLVESGGGLV QPGGSLRLSCAAS GFTF	WVRKAPG KGLETVS	RFTISRDN SKNTLYL QMNSLRAEDTAVY YCAS	WGQGTLVT VSS
MG2-60	EVQLVESGGGLV QPGGSLRLSCAAS GFTF	WVRNAPG KGLECVS	RFTISRDN SKNTLYL QMNSLRAEDTAVY YCAS	WGQGTLVT VSS
MG2-64	EVQLVESGGGLV QPGGSLRLSCAAS GFTF	WVRCAPG KGWEVVS	RFTISRDN SKNTLYL QMNSLRAEDTAVY YCAS	WGQGTLVT VSS
MG4-12	EVQLVESGGGLV QPGGSLRLSCAAS GFTF	WVRLAPG KGVELVS	RFTISRDN SKNTLYL QMNSLRAEDTAVY YCAS	WGQGTLVT VSS
MG4-13	EVQLVESGGGLV QPGGSLRLSCAAS GFTF	WVRFAPG KGAEVVS	RFTISRDN SKNTLYL QMNSLRAEDTAVY YCAS	WGQGTLVT VSS
MG4-17	EVQLVESGGGLV QPGGSLRLSCAAS GFTF	WVRLAPG KGREWVS	RFTISRDN SKNTLYL QMNSLRAEDTAVY YCAS	WGQGTLVT VSS
MG4-18	EVQLVESGGGLV QPGGSLRLSCAAS	WVRYAPG KGVEFVS	RFTISRDN SKNTLYL QMNSLRAEDTAVY	WGQGTLVT VSS

[0192]

	GFTF		YCAS	
MG4-20	EVQLVESGGGLV QPGGSLRLSCAAS GFTF	WVRFAPG KGLEMVS	RFTISRDN SKNTLYL QMNSLRAEDTAVY YCAS	WGQGTLVT VSS
MG4-28	EVQLVESGGGLV QPGGSLRLSCAAS GFTF	WVRVAPG KGTERVS	RFTISRDN SKNTLYL QMNSLRAEDTAVY YCAS	WGQGTLVT VSS
MG4-2	EVQLVESGGGLV QPGGSLRLSCAAS GFTF	WVRIAPGK GMEMVS	RFTISRDN SKNTLYL QMNSLRAEDTAVY YCAS	WGQGTLVT VSS
MG4-32	EVQLVESGGGLV QPGGSLRLSCAAS GFTF	WVRAAPG KGPELVS	RFTISRDN SKNTLYL QMNSLRAEDTAVY YCAS	WGQGTLVT VSS
MG4-33	EVQLVESGGGLV QPGGSLRLSCAAS GFTF	WVRVAPG KGYEHVS	RFTISRDN SKNTLYL QMNSLRAEDTAVY YCAS	WGQGTLVT VSS
MG4-34	EVQLVESGGGLV QPGGSLRLSCAAS GFTF	WVRVAPG KGLECVS	RFTISRDN SKNTLYL QMNSLRAEDTAVY YCAS	WGQGTLVT VSS
MG4-5	EVQLVESGGGLV QPGGSLRLSCAAS GFTF	WVRVAPG KGPETVS	RFTISRDN SKNTLYL QMNSLRAEDTAVY YCAS	WGQGTLVT VSS
MG4-6	EVQLVESGGGLV QPGGSLRLSCAAS GFTF	WVRMAPG KGSEVVS	RFTISRDN SKNTLYL QMNSLRAEDTAVY YCAS	WGQGTLVT VSS
MG4-7	EVQLVESGGGLV QPGGSLRLSCAAS GFTF	WVRLAPG KGTEMVS	RFTISRDN SKNTLYL QMNSLRAEDTAVY YCAS	WGQGTLVT VSS
MG8-11	EVQLVESGGGLV QPGGSLRLSCAAS	WVRTAPG KGAEWVS	RFTISRDN SKNTLYL QMNSLRAEDTAVY	WGQGTLVT VSS

[0193]

	GFTF		YCAS	
MG8-12	EVQLVESGGGLV QPGGSLRLSCAAS GFTF	WVRWAPG KGKEVVS	RFTISRDN SKNTLYL QMNSLRAEDTAVY YCAS	WGQGT LVT VSS
MG8-13	EVQLVESGGGLV QPGGSLRLSCAAS GFTF	WVRQAPG KGIEPVS	RFTISRDN SKNTLYL QMNSLRAEDTAVY YCAS	WGQGT LVT VSS
MG8-14	EVQLVESGGGLV QPGGSLRLSCAAS GFTF	WVRQAPG KGPEVVS	RFTISRDN SKNTLYL QMNSLRAEDTAVY YCAS	WGQGT LVT VSS
MG8-4	EVQLVESGGGLV QPGGSLRLSCAAS GFTF	WVRQAPG KGPEVVS	RFTISRDN SKNTLYL QMNSLRAEDTAVY YCAS	WGQGT LVT VSS
MG8-5	EVQLVESGGGLV QPGGSLRLSCAAS GFTF	WVRTAPG KGIEIVS	RFTISRDN SKNTLYL QMNSLRAEDTAVY YCAS	WGQGT LVT VSS
MG8-6	EVQLVESGGGLV QPGGSLRLSCAAS GFTF	WVRIAPGK GVEIVS	RFTISRDN SKNTLYL QMNSLRAEDTAVY YCAS	WGQGT LVT VSS
MG8-8	EVQLVESGGGLV QPGGSLRLSCAAS GFTF	WVRAAPG KGLEVVS	RFTISRDN SKNTLYL QMNSLRAEDTAVY YCAS	WGQGT LVT VSS

[0194] 根据本发明包括 VH 抗体支架的氨基酸序列（即，FR1 至 FR4 框架的氨基酸序列）的 VH 结构域，具有由下式表示的氨基酸序列

[0195] FR1-X-FR2-X-FR3-X-FR4- 式 9)，

[0196] 在式 9) 中，X 从左到右的顺序是指 CDR1、CDR2 和 CDR3。

[0197] 具体地，根据本发明包括 FR1 至 FR4 框架的氨基酸序列的 VH 结构域具有选自表 3 和 4 所示的 SEQ ID NO :37 至 89，和 SEQ ID NO :90 至 131 的氨基酸序列之一。

[0198] [表 3] 包括由 TAPE 筛选的 VH 结构域抗体支架的 FR1 至 FR4 框架的 VH 结构域的氨基酸序列（来自于人种系）

[0199]

支架名称	SEQ ID NO	VH区的氨基酸序列 (X从左到右的顺序是指CDR1、CDR2和CDR3)
MG1X8	37	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTF-X- WVRQAPGKGLVWVS-X- RFTISRDNKNTLFLQMNSLRDEEDTSVYYCAR-X- WGQGALVTVSS
MG2X1	38	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTF-X- WVRQAPGKGLEWVS-X- RFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAS-X- WGQGTLVTVSS
MG2X1-34	39	QVQLVESGGNVVQPGTSLRLSCAASGFTF-X- WVRQAPGKGLEWVA-X- RFTISRDNKNTVFLQMTSLRAEDTAVYYCGR-X- WGQGILVTVSS
MG2X2-12	40	QVQLVQSGAEVKKPGASVKISCEASGYAF-X- WVRQAPGQGLEWMG-X- RVTLTRDTSTRTVYMEKLNLRSAADTGVYYCAR-X- WGQGTLVTVSS
MG2X2-13	41	EVQLLESGGGVVQP GKSLRLSCVGS GFSF-X- WVRQAPGKGLEWLA-X- RFTISRDNKNTMVNLMNSLRPDDTAVYFCAR-X- WGQGTLVTVSS
MG3X1	42	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCVASGFNF-X- WLRQAPGKGLEWVA-X- RFTISRDNKNTLYLEMNSLRPEDTAVYYCAK-X- CGQGTLVTVSS
MG3X10	43	EVQLVESGGGLVKPGGSLRVSCAASGFTF-X-

[0200]

		WVRQAPGKGLEWVG-X- RFTISRDDSKNMVYLLQMNSLKTEDTAVYYCTT-X- YGQGLVTVSS
MG4X1-8	44	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSF-X- WVRQGPGEGLVWLS-X- RFTISRDNKNTVYLEMNSVRVDDTAVYYCVS-X- WGQGalVTVSS
MG4X1-33	45	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCEASGFPF-X- WVRQAPGKGLEWVS-X- RFTISRDDSTNTLYLQVNSLRAEDTAVYYCAK-X- WGRGTLVTVSS
MG4X1-35	46	EVQLLES GGGLVKPGGSLRLSCVGSERSF-X- WVRQAPGKGLEWVA-X- RFTVSRDNVQKSLDLQMDLRAEDTAVYFCAR-X- WGQGTTVTVSS
MG4X3-27	47	EVQLLES GGGLAQSGGSLRLSCAASGFTF-X- WVRQAPGKGLEWIS-X- RFTISRDIKNSLYLQMNSLRDEDTAVYYCAK-X- WGQGalVTVSS
MG4X4-2	48	EVQLVQSGAEVKKPGESLRISCRGSGYRF-X- WARDKPGKGLEWIG-X- HVTISSDRSVSVAYLQWDSLKASDNGIYYCAL-X- WGQGLVTVSS
MG4X4-4	49	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCVPSGFTF-X- WVRQAPGKGLVWVS-X- RFTISRDNAEDTLFLQMNSLRVDDTAVYYCVR-X- WGQGVVTVSS
MG4X4-25	50	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCIASGFSL-X- WVRRSPGKGLEWVA-X- RFTVSRDNKNSLFLQMNNVRPEDTALYFCAR-X-

[0201]

		WGQGMVTVSS
MG4X4-44	51	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTF-X- WVRQAPGKGLEWVA-X- RFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTALYYCAR-X- WGQGTLVTVSS
MG4X5-30	52	EVQLLES GGGLVQP GGSLRLSCAASGFTF-X- WVRQAPGKGLEWLS-X- RFTISRNNKNSLYLQMNSLRVDDTAVYYCAR-X- WGQGTLVTVSS
MG4X6-27	53	EVQLLES GGGLVQP GGSLRLSCAASGFTF-X- WVRQGP G KGLEWVA-X- RFTISRDN AENSLYLQVNSLRAEDTAIYYCAK-X- WGQGALVTVSS
MG4X6-48	54	EVQLLES GGGV VQPGRSLRLSCEVFGFTL-X- WVRQAPGR RLEWVA-X- RFTISRDIATNRLYLQMRS LRAEDTALYYCAR-X- WGQGTLVTVSS
MG4X7-15	55	EVQLLES GGGLVQP GGSLRLSCAASGFSF-X- WVRQAPGKGLEWVS-X- RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRVEDTAVYYCAV-X- WGQGTTVTVSS
MG4X8-24	56	EVQLLES GGGLVQP GGSLRLSCAASGFTF-X- WVRQAPGKGLEWVS-X- RFTISRDN SNNTLYLQMNSLRADDTAVYFCAK-X- WGQGTLVTVSS
MG0.5X-1	57	QVQLVESGGGLVQP GGSLRLSCAASGFTF-X- WVRQVP G KGLEWVA-X- RFTISRDN KNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAN-X- WGQGTLVTVSS
MG0.5X-3	58	QVQLVESGGGLVQP GGSLTLSCAASGFTF-X-

[0202]

		WVRQAPGTGLLWLS-X- RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR-X- WGXGTMVTVSX
MG0.5X-4	59	EVQLLESGGMLVKPGESLRLSCVGSGLIF-X- WVRHAPGKGLEWVG-X- RLSISRDDSMNTVYLDIYNL KIDDTGVYYCTF-X- WGQGTPVTVSS
MG0.5X-14	60	EVQLLESGGGLVHAGGSVRLS CAASGFTF-X- WVRQAPGKGLEWVA-X- RFTISRDN SKNSMYLQMNSLRVEDTAVYYCAR-X- WGQGTVVTVSS
MG0.75X-4	61	QVQLVESGGGLVKPGGSLRLS CAASGFTF-X- WLRQAPGKGPEYVA-X- RFIISRDDSN DMLYLEMISLKSEDTAVYYCSD-X- GSQGTLVTVSS
MG2X-5	62	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLS CAASGFTF-X- WVRQAPGKGLEWVS-X- RFTISRDN SKNTLYLHMNSLRAEDTAVYYCVK-X- WGQGTLVTVSS
MG2X-15	63	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLS CAASGFTF-X- WVRQAPGKGLEWVS-X- RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAK-X- WGQGTLVTVSS
MG4X-5	64	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLS CEASGLHF-X- WVRQAPGKGLEWVA-X- RFTVSRDN SRNTLYLQMKSLSAEDTAVYYCAK-X- WGQGTMTVTVSS
MG1-4	65	QVQLVEAGGGLVQPGGSLRLA CAASGFTF-X- WVRQAPGKGLEWIS-X- RFTISRDN SQNSLFLQMNSLRAEDTAVYYCAT-X-

[0203]

		WGQGMVTVSS
MG1-6	66	EVQLVQSGAEVKKPGESLRKSCCKGSGYSF-X- WVRQMPGKGLEWMG-X- HVTISVDKSISTAYLQWSSLKASDSAMYYFL-X- WGQGTLVTVSS
MG1-7	67	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTF-X- WVRQAPGKGLEWVA-X- RFTISRDNANKNSLYLQMNSLRDEDTAVYYCAR-X- WGQGTLVTVSS
MG1-8	68	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCCKASGYTF-X- WVRQAPGQGLEWMG-X- RVTMTRDTSSTTAYMELNRLTSDDTAVYFCAR-X- WGQGTLVTVSS
MG1-9	69	EVQLVEAGGGLVQPGGSLRLACAASGFTF-X- WVRQAPGKGLEWIS-X- RFTISRDNAQNSLFLQMNSLRAEDTAVYYCAT-X- WGQGMVTVSS
MG1-10	70	EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSF-X- WVRQMPGRGLEWLG-X- QVTMSANRSISTAYLQWSSLKASDTGIYYCAT-X- WGQGTTVTVSS
MG5-1	71	QVQLVESGGGLIQPGESLRLSCEAFGFTV-X- WVRQAPGKGLEWVS-X- RFTISR DSTQNTVHLQMNSLTAEDTAVYYCAR-X- WGQGTLVTVSS
MG5-2	72	EVQLVQSGAELKKPGSSVKVSC TSSGGSF-X- WVRQAPGQGLEWMG-X- RLILSVDEPTRTVYMELTSLRSDDTAMYYCAR-X- WGQGTTVTVSS
MG5-4	73	EVQLLES GGGLVQPGRSLRLSCAASGFTF-X-

[0204]

		WVRQAPGKGLEWVS-X- RFTISRDNKDSLQMLQMNLSLRPEDTALYYCAR-X- WGQGTMTVTVSS
MG5-5	74	EVQLLESGLGGVVPGRSLRLSCVASGFTF-X- WVRQAPGKGLEWVS-X- RFTISRDNYSNKIVHLEMDSLRAEDTAVYFCVR-X- WGQGTMLTVTVSS
MG5-6	75	EVQLLESGLGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTF-X- WVRQAPGKGLECVA-X- RFTISRDDSRDMLYLQMNNLKTEDTAVYYCSD-X- SSQGTMLTVTVSS
MG5-7	76	EVQLVESGLGGGLVQPGRSLRLSCTTSGFSF-X- WVRQAPGKGLEWVS-X- RFTISRDDSKSIVYLQMSSLQTEDTAVYYCSR-X- WGRGTMLTVTVSS
MG5-9	77	EVQLLESGLGGGLVVRPGGSLRLSCSASGFAF-X- WVRQAPGKGLEWVS-X- TISRDNKNSVYLQMNLSLRAEDSAVYFCAR-X- WGQGTMLTVTVSS
MG10-1	78	QVQLVESGLGGNVVQPGTSLRLSCAASGFTF-X- WVRQAPGKGLEWVA-X- RFTISRDNRSRNTVFLQMTSLRAEDTAVYYCGR-X- WGQGILTVTVSS
MG10-2	79	EVQLLESGLGGGLVQPGGSLRLTCVGYGFTF-X- WVRQAPGKGPWVA-X- RFTISRDNKDSLQMLQMDSLRPEDTAVYYCAR-X- APQGTMLTVTVSS
MG10-4	80	EVQLLESGLGGGLVQPGGSLRLSCAASGFIL-X- WVRQAPGKGLVWVS-X- QFTISRDNKNTLYLQMNLSLRVEDTAVYYCAR-X-

[0205]

		WGQGTMTVTVSS
MG10-5	81	EVQLLESGGGVVHPGRSLRLSCAVSGFSL-X- WVRQAPDKGLEWVA-X- RFTVSRDISKNTVYLMNSLRAEDTALYYCAR-X- WGQGTMTVTVSS
MG10-6	82	EVQLLESGGGLVQPGGSRRRLSCAASGFTF-X- WFRQGPDKGLEWVA-X- RFTISRDDSKNSLSLQMDSLRTEDTAVYYCVR-X- WGQGTMTVTVSS
MG10-8	83	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCVASGFAF-X- WVRQTPGRGLEWLA-X- RFTISRDNNSNTVYLEMNSLRPEDSAIYYCAK-X- WGLGTVVTVSS
MG10-10	84	QVQLVESGGVVVQPGGSLRLSCAASGFTF-X- WVRQAPGKGLEWVS-X- RFTISRDNKNSLYLQMNLSLRTDETALYYCV-X- WGQGTMTVTVSS
MG2	85	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTF-X- WVRQAPGKGLEWVS-X- RFTISRDNKNSLYLQMNLSLRTDETAVYYCAR-X- WGQGTMTVTVSS
MG5	86	EVQLLQSGGGWVKPGGSLRLSCAASGFIC-X- WVRQAPGKGLEWVG-X- RFTISIDESRNALFLHMNSLTTDDTAVYYCST-X- WGQGTMTVTVSS
MG6	87	EVQLLESGGVVVQPGRSLRLSCAASGFTF-X- WVRQAPGKGLEWVA-X- RFTVSRDTSNTLYLQMNLSLRVEDTAVYYCAR-X- WGQGTMTVTVSS
MG7	88	QMQLVQSEAEVKKPGASMKVSCKASGYTF-X-

[0206]

		WVRQATGQGLEWMG-X- RVTMTRNTSISTAYMELSSLTSADTAVYYCAR-X- WGQGTLVTVSS
MG10	89	QVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSF-X- WVRQMPGKGLEWMG-X- QVTISADKSISTAFLQWNSLKASDTAMYVCAR-X- WGLGTLVTVSS

[0207] [表4] 包括氨基酸修饰的 VH 结构域抗体支架的 FR1 至 FR4 框架的 VH 结构域的氨基酸序列

[0208]

支架名称	SEQ ID NO	VH区的氨基酸序列 (X从左到右的顺序是指CDR1、CDR2和CDR3)
MG8-21	90	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTF-X- WVRNAPGKGNEIVS-X- RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAS-X- WGQGTLVTVSS
MG2-12L	91	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTF-X- WVRRAPGKGIEVVS-X- RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAS-X- WGQGTLVTVSS
MG2-7I	92	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTF-X- WVRIAPGKGPEPVS-X- RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAS-X- WGQGTLVTVSS
MG2-9I	93	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTF-X- WVRKAPGKGYPVS-X- RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAS-X- WGQGTLVTVSS
MG2-10I	94	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTF-X- WVRNAPGKGYEIVS-X-

[0209]

		RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAS-X- WGQGTLVTVSS
MG2-11I	95	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLS CAASGFTF-X- WVRYAPGKGYEFVS-X- RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAS-X- WGQGTLVTVSS
MG2-12I	96	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLS CAASGFTF-X- WVRVAPGKGI EPVS-X- RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAS-X- WGQGTLVTVSS
MG2-32	97	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLS CAASGFTF-X- WVRMAPGKGP EHVVS-X- RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAS-X- WGQGTLVTVSS
MG2-34	98	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLS CAASGFTF-X- WVRSAPGKGV EMVS-X- RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAS-X- WGQGTLVTVSS
MG2-40	99	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLS CAASGFTF-X- WVRTAPGKGTE MVS-X- RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAS-X- WGQGTLVTVSS
MG2-46	100	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLS CAASGFTF-X- WVRCAPGKGYEFVS-X- RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAS-X- WGQGTLVTVSS
MG2-47	101	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLS CAASGFTF-X- WVRIAPGKGLE MVS-X- RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAS-X- WGQGTLVTVSS

[0210]

MG2-48	102	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTF-X- WVRMAPGKGGLEYVS-X- RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAS-X- WGQGTLVTVSS
MG2-51	103	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTF-X- WVRYAPGKGTEFVS-X- RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAS-X- WGQGTLVTVSS
MG2-53	104	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTF-X- WVRQAPGKGVEWVS-X- RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAS-X- WGQGTLVTVSS
MG2-55	105	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTF-X- WVRWAPGKGPEFVS-X- RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAS-X- WGQGTLVTVSS
MG2-57	106	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTF-X- WVRFAPGKGREWVS-X- RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAS-X- WGQGTLVTVSS
MG2-58	107	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTF-X- WVRFAPGKGCELVS-X- RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAS-X- WGQGTLVTVSS
MG2-59	108	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTF-X- WVRKAPGKGLETVS-X- RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAS-X- WGQGTLVTVSS
MG2-60	109	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTF-X- WVRNAPGKGLECVS-X-

[0211]

		RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAS-X- WGQGTLVTVSS
MG2-64	110	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLS CAASGFTF-X- WVRCAPGKGWEVVS-X- RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAS-X- WGQGTLVTVSS
MG4-12	111	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLS CAASGFTF-X- WVRLAPGKGVELVS-X- RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAS-X- WGQGTLVTVSS
MG4-13	112	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLS CAASGFTF-X- WVRFAPGKGAEWVS-X- RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAS-X- WGQGTLVTVSS
MG4-17	113	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLS CAASGFTF-X- WVRLAPGKGREWVS-X- RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAS-X- WGQGTLVTVSS
MG4-18	114	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLS CAASGFTF-X- WVRYAPGKGVEFVS-X- RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAS-X- WGQGTLVTVSS
MG4-20	115	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLS CAASGFTF-X- WVRFAPGKGLEMVS-X- RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAS-X- WGQGTLVTVSS
MG4-28	116	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLS CAASGFTF-X- WVRVAPGKGTERVS-X- RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAS-X- WGQGTLVTVSS

[0212]

MG4-2	117	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTF-X- WVRIAPGKGMEMVS-X- RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAS-X- WGQGTLVTVSS
MG4-32	118	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTF-X- WVRAAPGKGPELVS-X- RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAS-X- WGQGTLVTVSS
MG4-33	119	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTF-X- WVRVAPGKGYEHVS-X- RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAS-X- WGQGTLVTVSS
MG4-34	120	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTF-X- WVRVAPGKGLECVS-X- RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAS-X- WGQGTLVTVSS
MG4-5	121	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTF-X- WVRVAPGKGPETVS-X- RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAS-X- WGQGTLVTVSS
MG4-6	122	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTF-X- WVRMAPGKGSEVVS-X- RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAS-X- WGQGTLVTVSS
MG4-7	123	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTF-X- WVRLAPGKGTEMVS-X- RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAS-X- WGQGTLVTVSS
MG8-11	124	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTF-X- WVRTAPGKGAEWVS-X-

[0213]

		RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAS-X- WGQGTLVTVSS
MG8-12	125	EVQLVESGGGLVQP GGSRLS CAASGFTF-X- WVRWAPGKGKEVVS-X- RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAS-X- WGQGTLVTVSS
MG8-13	126	EVQLVESGGGLVQP GGSRLS CAASGFTF-X- WVRQAPGKGIEPVS-X- RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAS-X- WGQGTLVTVSS
MG8-14	127	EVQLVESGGGLVQP GGSRLS CAASGFTF-X- WVRQAPGKGPEVVS-X- RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAS-X- WGQGTLVTVSS
MG8-4	128	EVQLVESGGGLVQP GGSRLS CAASGFTF-X- WVRQAPGKGPEVVS-X- RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAS-X- WGQGTLVTVSS
MG8-5	129	EVQLVESGGGLVQP GGSRLS CAASGFTF-X- WVRTAPGKGIEIVS-X- RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAS-X- WGQGTLVTVSS
MG8-6	130	EVQLVESGGGLVQP GGSRLS CAASGFTF-X- WVRIAPGKGVEIVS-X- RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAS-X- WGQGTLVTVSS
MG8-8	131	EVQLVESGGGLVQP GGSRLS CAASGFTF-X- WVRAAPGKGLEVVS-X- RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAS-X- WGQGTLVTVSS

[0214] 另外,本发明提供了编码 VH 结构域抗体支架的氨基酸序列(即,FR1 至 FR4 框架的氨基酸序列)的多聚核苷酸。

[0215] 为了可以更容易地理解本发明,在详细描述本发明之前首先定义本文所使用的某些术语和缩写。

[0216] 人免疫球蛋白可变结构域:这是指在构成人免疫球蛋白 G 的 12 个结构域 (VH、CH1、CH2、CH3、VL 和 CL 各一对) 中直接参与结合抗原的重链可变结构域 (VH) 或轻链可变结构域 (VL)。VH 或 VL 结构具有这样的结构,其中 9 个 β -折叠链相互交叉。在 VH 的情况下,可变区是存在于第二和第三 β -折叠之间,在第四和第五 β -折叠之间,以及在第八和第九 β -折叠之间,从其 N-末端开始,在此,这些可变区分别被称为 CDR(互补决定区)1、CDR2 和 CDR3。当从 VH 的 N-末端开始时,在第一和第二 β -折叠不含 CDR1 的整个部分被称为框架 1 (FR1),CDR1 和 CDR2 之间包括第三和第四的 β -折叠的部分被称为框架 2 (FR2),CDR2 和 CDR3 之间的部分被称为框架 3 (FR3) 和 CDR3 后的部分被称为框架 4。各框架不直接参与结合抗原,即使它们是抗原可变结构域,并且在这些区域中的大部分氨基酸序列在人免疫球蛋白上是一致的保守的。VH 节段根据框架区的氨基酸序列同源性被分成 7 个家族 (VH1、VH2、VH3、VH4、VH5、VH6 和 VH7)。VL 节段被分成 V_{κ} 和 V_{λ} , V_{κ} 节段被分为六个家族而 V_{λ} 节段被分成 10 个家族 (Chothia et al., 1992 J Mol Biol 227, 799-917; Tomlinson et al., 1995 EMBO J 14, 4628-4638; Williams et al., J Mol Biol 264, 220-232)。

[0217] CDR(互补决定区):这可以被称为超变区,并且是指定位在抗体结构的重链或轻链可变结构域之内并参与直接结合抗原表位的区域。每个可变结构域具有三个 CDR 区,它们由具有不同长度的氨基酸序列组成。

[0218] 抗体支架:这是指抗体结构除了高变区(即,CDR 区)以外的其余部分,其直接结合抗原,并且其氨基酸序列在制备 CDR 改造文库时是保守的。换句话说,这是指所述抗体除了 CDR1、CDR2 和 CDR3(高变区)的氨基酸序列以外的其余部分。在本发明中,这是指整个 FR1 至 FR4 框架的区域,它对应于各人免疫球蛋白可变结构域中除了 CDR1、CDR2 和 CDR3 的区域以外的其余部分。

[0219] 即,本发明中的 VH 结构域的抗体支架是指 FR1 至 FR4 框架的整个区域,但不包括 VH 结构域抗体中的 CDR1 至 CDR3 区。

[0220] 该抗体支架可被用作制备用于筛选结合至靶标的蛋白质(特别是 VH 结构域抗体)的 CDR 改造文库的支架。

[0221] 结构域抗体:在广义上,是指能够结合特定抗原,包括构成人免疫球蛋白结构的一些结构域的修饰蛋白。在狭义上,是指人免疫球蛋白可变结构域 (VH 或 VL) 的修饰形式,其可以合适地用作治疗性抗体。

[0222] 特别地,单个结构域抗体通常是指从仅由重链组成的单重链抗体衍生的可变结构域。源自单峰驼的单结构域抗体被称为 VHH(来自单重链抗体的重链可变结构域),以及 VNAR(来自于软骨鱼纲如鲨鱼的单结构域抗体被称为可变的新抗原受体)。

[0223] 本发明中的单结构域抗体,例如,VH 结构域抗体或 VL 结构域抗体,是指仅由源自人的可变结构域的一个重链或轻链组成的抗体,没有特别限制。

[0224] 靶标蛋白:这是指在 TAPE 法中,为了改善来自文库的蛋白质特性而要选择的目的蛋白质。在本发明中,这是指由在 Tat 信号序列和 pET-TAPE 表达载体的 TEM-1 β 内酰胺酶基因之间功能性地连接的基因所编码的蛋白质。也可以使用要求溶解性的任何蛋白质而没有限制,并且其实例包括源自于人的抗体及其片段、受体、受体配体等,并且特别包括天然

型的来自人种系细胞的人免疫球蛋白可变结构域及其人工突变的蛋白。

[0225] 配体 :这是指具有在从文库中筛选的靶蛋白之中与特异性受体或靶向蛋白的结合能力的蛋白质。

[0226] 多特异性 :这是指能够特异性结合到一个或多个表位的抗体的性质。这也指识别一个目标对象中的两个或更多个表位的抗体的性质,或结合于两个或更多个目标对象的抗体的性质。

[0227] 融合蛋白 :这是指其中由核酸编码的、具有不同功能的至少两个蛋白质或者肽功能性地彼此连接的蛋白质,例如, Tat 信号序列和靶蛋白功能性地彼此连接。这里,可加入报告基因如 TEM-1 β 内酰胺酶,或诸如 6xHis 或 Flag 的标签。功能性地彼此连接的蛋白质的基因的表达是由一个启动子(诱导型、维持型等)在表达载体上调控的。

[0228] 天然型或野生型 :这是指可以在自然系统中获得的基因或其产物(例如,蛋白质)。这是一个与突变体、基因多态性和变体相反的概念,其产物由于基因序列的人工或自然改变而使特性改变。

[0229] 将根据上述术语定义和缩写来描述本发明。

[0230] 如上所述,根据本发明的 TAPE 法和用于它的 TAPE 系统是一种用于筛选具有溶解性和优异的热稳定性的靶蛋白如源自人种系细胞(VH 或 VL)、配体等的免疫球蛋白可变结构域的方法和用于执行该方法的系统,其制备其中靶蛋白和抗生素抗性蛋白被结合到 Tat 信号序列的基因构建体,然后用包括该基因构建体的载体转化宿主细胞,特别是大肠杆菌,在大肠杆菌中表达融合蛋白。

[0231] “Tat 信号序列”是由 Tat(双精氨酸转位)途径识别的序列。它将蛋白质引导到从细菌细胞质传递到细胞内的膜中的途径,以及引导到从基质转移到叶绿体的类囊体的途径。一般地,Tat 信号序列被分为以下三个基序。它是由 n-区(其为具有正电荷的 N-端基序),在中间由疏水性氨基酸组成的 h-区,和在 c-区(其是 C-末端基序)组成。作为分析若干 Tat 信号序列的结果,人们发现,S/T-R-R-x-F-L-K 这个 Tat 信号序列的显著的保守序列是遍布 n-区和 h-区存在的。其中,两个精氨酸(R)被命名为双精氨酸,因为它们在所有 Tat 信号序列中是保守的。

[0232] 该 Tat 信号序列可以选自 TorA、Cuo0、DmsA、FdnG、FdoG、HyaA、NapA、Suf1、WcaM、TagT、YcbK、YcdB、YdhX 和 YnfE,但不限于此。通过在细胞质中与分子伴侣或各种辅因子结合而具有完整三维结构的蛋白质通过 Tat 信号途径移动到细胞膜,但不与 Sec 信号(它是细菌的一般细胞膜运动途径)兼容。换句话说,由于只有在细胞质中被折叠成具有完整三维结构的蛋白质可被 Tat ABC 转位酶复合体识别,它们参与与 Sec 途径具有不同特性的蛋白质转位途径(Baneyx and Mujacic, Nat. Biotech. 2004, 22, 1399 ~ 1408)。

[0233] 根据本发明的 TAPE 法使用 Tat- 信号途径的上述特性。为了使源自文库(例如,人 VH 结构域文库)的靶蛋白经过 TAPE 筛选系统途径,它需要在细胞质内被完全折叠,从而被 Tat ABC 转位酶复合体识别。因此,这种存在于细胞内的膜中的复合体可以用作适合性过滤器(fitness filter)来仅仅过滤适合 Tat 途径的底物。因此,本发明使用这样的事实,即该蛋白质通常只有当它在细胞质中完全折叠时,才通过 Tat 途径,这是依赖于蛋白质的可溶性和快速折叠(DeLisa et al., 2003PNAS 100(10):6115-6120;Snaders et al., 2001Mol Microbiol 41(1):241-246;Matos et al., 2008EMBO J 27(15):2055-2063;

Fisher et al., 2006 *Protein Sci* 15(3):449-458; Lim et al., 2009 *Protein Sci* 18(12):2537-2549), 如由其他研究所发现。在本发明中使用的 Tat 途径的信号序列优选地 TorA、CueO、DmsA、FdnG、FdoG、HyaA、NapA、Suf1、WcaM、YagT、TcbK、YcdB、YdhX、and YnfE 蛋白的信号序列,但并不限于此。

[0234] 换句话说,由于 Tat 途径的性质而发生蛋白质折叠的大肠杆菌的细胞质具有不允许二硫键的还原条件,并且因此,可以从 VH 结构域抗体文库中过滤出在未经二硫键的帮助下快速且准确地自发发生折叠的 VH 结构域。找出在还原性的环境下具有功能且自主折叠的抗体是开发用于存在于还原环境的细胞质中的靶抗原(即,胞内抗体)的特异性抗体的关键点。人 VH 结构域或由本发明的 TAPE 系统筛选的生殖细胞的改造的 VH 结构域的物理化学性质可以通过分析所筛选的 VH 结构域的特征来确定。很难简单地预测细胞质内自主折叠的靶蛋白如何有助于某些物理化学性质(例如,蛋白质的溶解性、蛋白的热稳定性、蛋白质的长期贮存稳定性、蛋白质的结构稳定性等)并进一步作为抗体治疗剂。本发明的目的是引入及开发上述 TAPE 法并将其应用于蛋白质的技术,并且更具体地,应用这一 TAPE 法来筛选改善的人免疫球蛋白可变结构域抗体(VH 或 VL),并应用具有由此获得的改善性能的可变结构域抗体作为开发新的治疗性抗体的支架。

[0235] 与现有技术的方法相比较,根据本发明的 TAPE 法具有以下优点。

[0236] 使用现有技术噬菌体展示技术,通过向结构域抗体文库施加预定的压力(如温度)来执行淘选,然后测量蛋白 A 的结合活性(Jepsers L. et al., *Nat. Biotechnol.* 2004 22(9):1161-5; Barthelemy P. A. et al., *J. Biol. Chem.* 2008 283(6):3639-54), 通过未经特殊筛选步骤的实验,意外地发现了被命名为 M0 的结构域(作为结构域的形式是稳定的)(*J. Biol. Chem.* 2009 May 22; 284(21):14203-14210)。

[0237] 然而,采用 TAPE 法,通过使用大肠杆菌的 Tat 途径可以很容易地筛选根据本发明的具有高溶解性和热稳定性的人免疫球蛋白可变结构域。

[0238] 此外,已经知道通过基于板的筛选从包括 Tat 信号序列的文库中发现可溶性蛋白的方法。但是,这种方法必须按照下面的步骤,即当将用预定比例稀释的表达菌株涂布在含有抗生素的固体培养基(板)上时,获得由于其抗生素抗性而存活各个克隆。(Fisher A. C. et al., *Protein Sci.* 2006 Mar. 15(3):449-58, Fisher A. C. et al., *J. Mol. Biol.* 2009 385(1):299-311)。因此,由于该基于板的筛选方法的限制,难以从一个板中分离 10^5 或更多的单个克隆。鉴于用于选择一般的结合活性的抗体文库为 10^9 至 10^{10} , 使用上述方法来覆盖整个的正常大小的文库在物理上是非常困难的。结果,实质上难以在筛选中实现高通量形式。此外,当使用现有技术的方法(例如,ISELATE)确认了通过抗生素抗性从板中选择的个体菌株的质粒的基因序列时,经常发现靶基因被克隆成片段化形式而表达短蛋白形式的情况或者只有报告基因存在而没有靶蛋白(例如,仅 TEM1-1 β -内酰胺酶)的情况(Fisher A. C. et al., *J. Mol. Biol.* 2009 385(1):299-311)。这些肽的水平(由 10 至 20 个氨基酸组成)的短蛋白不受其二维或三维结构的影响,并且因此,它们本身在大多数情况下具有非常高的溶解性,从而导致假阳性。在现有技术的基于 Tat 的蛋白质折叠筛选方法(例如,ISELATE, Fisher JMB 2009)中,这个假阳性比率趋向于随着使用抗生素抗性的筛选数量的增加而增加,并且这成为实质性的阻碍,使得不能筛选可溶性蛋白质。因此,这些方法中大多数都是用于研究晶体结构而不是检查大型文库,所述研究通过从难以确保可溶性

的靶蛋白的小尺寸突变体文库 (10^5 至 10^6 大小) 的蛋白修饰来确保可溶性表达 (Pédélec et al., Nat Biotechnol. 2002 20(9):927-32; Yang et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 2003 100(2):455-60)。

[0239] 然而,根据本发明的 TAPE 法,整个文库被接种于含有选择性抗生素(例如,氨基青霉素)的液体培养基中,而不使用基于现有的固体培养基(板)的蛋白质溶解性筛选方法。因此,对于在培养基体积增大的情况下,可适用于同时筛选的文库(大肠杆菌)的大小没有限制,由此实现了高通量筛选。另外,如上所述,在现有技术的方法中,非常有可能的是在从包含抗生素的液体培养基中筛选文库后,文库向表达载体(例如,pET-TAPE)的克隆步骤过程中,其中引入了自体连接的空载体(mock vector)和上述肽水平的基因片段的克隆是作为假阳性存在。为了解决由于肽水平的基因片段造成的假阳性问题(这是这一使用连接酶的克隆方法的固有问题),从收集到的大肠杆菌中收集总的质粒,并且将先前改造的表达靶蛋白和 TEM-1 β -内酰胺酶的融合蛋白的基因的两个末端用限制性内切酶处理。然后,通过凝胶电泳和凝胶洗脱方法分离完整大小的选择基因。结果,只有首先被 TAPE 法筛选到的所有真正的阳性 VH 结构域可以被完全收集。因此,根据本发明的 TAPE 法具有的优点在于,尽管使用抗生素抗性的重复筛选数量增加,但只有仅含有完整靶蛋白的基因构建体的真正阳性克隆可以被筛选到,而不会增加假阳性。

[0240] 具体地,根据本发明的 TAPE 系统使用编码融合蛋白的基因构建体,其中 Tat-信号序列功能性地连接到靶蛋白的 N-末端,特别是重链结构域,以及抗生素抗性蛋白质,特别是赋予抗生素抗性的蛋白质,如成熟的(自身排除 Sec 途径信号序列)TEM-1 β -内酰胺酶或类似物功能性地连接其 C-末端。

[0241] TAPE 系统或使用它的 TAPE 法使用这样的原则,即在基因构建体转化宿主细胞,特别是大肠杆菌后,只有通过 Tat 信号序列表达了可溶型的正确折叠的抗生素抗性蛋白质的大肠杆菌可以在含有抗生素的培养条件下生存。

[0242] 当一个宿主细胞仅由一个基因构建体转化时,包括在存活宿主细胞中的靶蛋白被假定为正确折叠的可溶形式。

[0243] 另外,可以通过根据本发明的 TAPE 法,通过使用转化有编码不同靶蛋白的基因构建体的多个宿主细胞群,特别是大肠杆菌群,以大规模高通量方式分离可溶性靶蛋白。

[0244] TAPE 法包括:

[0245] (1) 在含有抗生素的液体培养基中培养宿主细胞群,该宿主细胞群被转化有编码融合蛋白的基因构建体,其中 Tat-信号序列功能性地连接到靶蛋白的 N-末端,特别是重链可变结构域,并且抗生素抗性蛋白功能性地连接于其 C-末端;

[0246] (2) 从抗生素抗性的大肠杆菌中收集质粒 DNA;

[0247] (3) 从收集的质粒 DNA 中收集编码靶蛋白的核酸序列;和

[0248] (4) 从收集的核酸序列中确认并筛选靶蛋白的序列。

[0249] 特别地,该方法可以进一步包括,在步骤(3)之后,选自下面的一个阶段:

[0250] (3') 制备基因构建体,其中所收集的核酸序列被再次功能性地连接到编码 Tat-信号序列的基因和抗生素抗性基因,然后再用所产生的基因构建体转化该宿主细胞群,

[0251] 或,

[0252] (3'') 直接用含有所收集的核酸序列的质粒转化宿主细胞群,而不制备单独的基因构建体。

[0253] 阶段(3'') 相比于阶段(3') 具有的优点在于更迅速地进行下一个阶段。

[0254] 阶段(1) 至(3') 或阶段(1) 至(3'') 可以重复两轮或更多轮,并且这种重复过程会导致筛选具有溶解性和高水平稳定性的靶蛋白。

[0255] 当阶段(1) 至(3') 或阶段(1) 至(3'') 可以重复两轮或更多轮时,最后靶蛋白质可通过在步骤(3') 或(3'') 之后执行确认和筛选靶蛋白的序列的阶段(4) 而被识别。

[0256] 将对 TAPE 法进行具体说明。

[0257] (1) 在每个宿主细胞(尤其是大肠杆菌)的细胞质中以融合蛋白的形式表达靶蛋白(特别是人可变结构域文库)。这里,在每个宿主细胞,特别是大肠杆菌中,只有一个特定的融合蛋白被表达。在此,在该融合蛋白中,Tat- 信号序列功能性地连接到靶蛋白(例如,人免疫球蛋白可变结构域,特别是 VH) 的 N- 末端,并且赋予抗生素抗性的蛋白质,如成熟的(自身排除了 Sec 途径信号序列)TEM-1 β - 内酰胺酶或类似物功能性地连接到其 C- 末端。

[0258] (2) 将融合蛋白表达文库接种到含有抗生素的液体筛选培养基中并向其施加选择压力。这里,在第一轮,包含在液体筛选培养基中的抗生素的浓度可以基于 0.1mg/ml (1 \times) 是 1 \times 、2 \times 、3 \times 、4 \times 、或 5 \times 、8 \times 或 10 \times 。这里所用的抗生素可以是氨苄青霉素、羧苄青霉素等,但并不限于此。也可以使用根据在阶段(1) 中所用的抗生素抗性蛋白来适当使用的任何抗生素而没有限制。被表达的融合蛋白根据靶蛋白的特性通过 Tat 途径并移动到细胞内的膜。由于靶蛋白的特性(即不具有溶解性)而没有转位的融合蛋白可以形成包涵体或可以由于 Tat 校对机制而在细胞质中降解。只有融合蛋白移动到周质中的大肠杆菌才可以通过功能性地连接到靶蛋白的 C- 末端的赋予抗生素抗性的蛋白(例如 TEM-1 β - 内酰胺酶或类似物)的作用,在含抗生素的液体筛选培养基中获得抗性。

[0259] (3) 从在液体筛选培养基中存活的大肠杆菌中收集质粒 DNA,然后用先前设计的限制性内切酶处理,以通过电泳和凝胶洗脱的方法从整个融合蛋白收集仅编码所述靶蛋白和赋予抗生素抗性的蛋白质如 β - 内酰胺酶的融合部分的核酸。

[0260] 或者,

[0261] (3') 从在液体筛选培养基中存活的大肠杆菌中收集质粒 DNA,然后用所收集的质粒 DNA 直接转化大肠杆菌,如实施例 5 所述,随后进行下一阶段。

[0262] (4) 将收集的核酸克隆到空载体中,以便它再次功能性地连接 Tat 信号序列。

[0263] 此后,可以再次重复阶段 1) 至 3), 以从文库中富集表达具有所需性质的蛋白质的基因的比例。这里,用于下一轮的液体培养基可以被选择为具有比前一轮更高浓度的抗生素。

[0264] 作为本发明中的靶蛋白,特别是可以通过 TAPE 法筛选的靶蛋白,可以使用具有有所期望功能的任何类型的蛋白质。优选地,可以使用与特定靶标(scFv、胞内抗体、结构域抗体、Fab),受体蛋白质,特别是 T 细胞受体(TCR),受体配体等,具有结合能力的蛋白质,但是本发明中的靶蛋白不限于此。更优选地,结构域抗体,例如, VH 结构域抗体或 VL 结构域抗体是适宜的。

[0265] 本发明中的靶蛋白可以具有突变。对于靶蛋白的突变,基于扩增的突变方法,如合成被设计为可在特定位点的氨基酸进行随机修饰的寡聚物,然后采用使用该寡聚物的重

叠聚合酶链反应 (PCR) 的方法,或在 PCR 条件下诱导在随机位点的随机变异 (易错 PCR) 的方法,其中 DNA 聚合酶的错误率是人为增加的,但是突变方法不限于此。

[0266] 包括本发明的靶蛋白的融合蛋白可以包括由在其 C-末端的特定氨基酸序列组成的标签,以便于其分离、纯化或检测。可以使用在本发明所属领域中通常使用的任何标签而不限制为这一标签。例如,该标签可选自 6xHis 标签、FLAG 标签、C-myc 标签等,但不限于此。

[0267] 任何本发明所属的领域中已知的能够在大肠杆菌中表达的载体都可以用作表达所述融合蛋白的载体而没有限制,并且这一载体的非限制性实例可包括 pET22b(Novagen)、pAE34(AthenaES)、pET9a(Novagen)、 Δ pMK 等 (Lim HK et al., Production Characteristics of Interferon- α Using an L-arabinose Promoter System in a High-cell-density Culture. Appl. Microbiol. Biotechnol. 53(2):201-208.)。作为诱导融合蛋白表达的启动子,可以使用 lac 启动子、T7 启动子、阿拉伯糖启动子等。

[0268] 仅从由使用 TAPE 法筛选的文库中收集靶基因,并将其克隆到新的表达载体,使得仅靶蛋白质单独表达而没有已分别定位在 N-末端和 C-末端的 Tat 信号和 TEM-1 β -内酰胺酶,然后,对各命中物执行纯化步骤。这里,纯化步骤可以通过为了便于纯化和分析而在靶蛋白的 C-末端包括标签来容易地进行。如上所述,可以使用在本发明所属领域中通常使用的任何标签而没有限制。例如,标签可选自 6xHis 标签、Flag 标签、C-myc 标签等,但不限于此。此外,可以根据可变结构域的类型 (例如 VH3) 通过使用蛋白 A 亲和柱来执行纯化步骤。

[0269] 可以根据本发明的 TAPE 法所使用的文库的种类,筛选具有所需性质的配体。这种配体的实例可包括免疫球蛋白可变结构域,特别是结构域抗体,受体,受体配体等,但不限于此。特别地,配体可以是野生型,以及可以是由在文库中诱导突变而具有突变的配体等,如上所述。

[0270] 此外,可以相同方式获得基因序列,即用于编码该配体的碱基序列。

[0271] 可以确认,通过本发明的 TAPE 法获得的配体,例如野生型配体,包括受体,受体配体,来自种系碱基序列的 VH 和 VL 或者从其组合文库中筛选的其突变配体展现出优选的理化性质。特别是,可以确认,该配体的溶解性、长期储存稳定性、在还原环境的细胞质中的自我折叠能力和热稳定性改善。

[0272] 更优选的配体可以是,例如,从人免疫细胞 cDNA 文库获得的人免疫球蛋白可变结构域及其突变体。突变体可以通过使用文库来筛选并获得,在该文库中氨基酸使用 NNK 引物等在特定的野生型人免疫球蛋白可变结构域的框架部分的特定位置上被修饰。

[0273] 当通过根据本发明的 TAPE 法筛选的重链或轻链可变结构域,即, VH 或 VL 结构域抗体,具有人 VH 或 VL 结构域的对应该框架序列,仍旧保持其溶解性和热稳定性,而不管 CDR 序列如何。

[0274] 因此,通过本发明筛选的具有优异的物理性质如高溶解性、热稳定性等的 VH 支架可以用作所述文库中的支架用于获得特定配体,即,靶向所需靶标 (即,抗原) 的结构域抗体。具体地讲,在维持筛选到的突变体 VH 结构域抗体的支架的同时,向其中插入随机 CDR 序列来构建文库,然后可使用普通的方法如淘选等从文库中筛选对所需靶标 (即,抗原) 具有结合能力的抗体。

[0275] 具体地讲,与普通的噬菌体展示方法等相似,上述抗体可通过洗脱除了结合到被固定的所需抗原的 VH 结构域抗体以外,所有未结合到被固定的所需抗原的 VH 结构域抗体来进行筛选。重复上述洗脱未结合到被固定的所需抗原的 VH 结构域抗体的步骤两次或更多次,从而筛选与靶向抗原具有更高的结合能力的 VH 结构域抗体。

[0276] 为了使用如上所述在本发明中得到的 VH 结构域抗体的支架来构建 CDR 突变体文库,相应的可变区(例如,在人免疫球蛋白可变结构域的情况下的 CDR)可以具有各种长度,即,氨基酸残基的数目可以改变,或特定氨基酸残基可以被其他随机的氨基酸替换。或者,只有在 CDR 内的超可变区的某些特定位置点可以随机地被修饰。

[0277] 因此,本发明提供了一种在由本发明的 TAPE 法筛选的 VH 或 VL 结构域抗体的支架中包括随机 CDR 序列的文库及其制造方法,并且提供了一种使用所述文库筛选对所需靶蛋白具有结合能力的 VH 或 VL 结构域抗体,和由所述方法筛选到的 VH 或 VL 结构域抗体,并且还提供了所筛选到的结构域抗体的氨基酸序列和编码它的多核苷酸。

[0278] 这些方法可以改善人单可变结构域抗体,特别是 VH 结构域抗体的物理性质,从而得到单可变结构域,特别是具有这种不能在天然的 VH 和 VL 中发现的优异的溶解性和耐热性的 VH 结构域抗体。

[0279] 附图简要说明

[0280] 图 1 是示出由 TAPE 法筛选的蛋白质的溶解性图。

[0281] 图 2 是示出通过 TAPE 法筛选可溶性蛋白的方法的示意图,包括:

[0282] (a) 在含有抗生素的液体培养基中培养宿主细胞群;

[0283] (b) 根据抗生素浓度确认宿主细胞群的生长曲线;

[0284] (c) 收集质粒来检查编码靶蛋白的核酸存在与否;和

[0285] (d) 制备基因构建体,其中所收集的核酸序列被再次功能性地连接到编码 Tat- 信号序列的基因和赋予抗生素抗性的基因,然后再用所制备的基因构建体转化该宿主细胞群。

[0286] 图 3 是示出通过使用 TAPE 法从人免疫球蛋白重链可变结构域基因文库中筛选的人 VH 结构域的氨基酸序列的视图:

[0287] (a) 所筛选的人 VH 结构域的 FR1、CDRH1、FR2 和 CDRH2 的序列,和

[0288] (b) 所筛选的人 VH 结构域的 FR3、CDRH3 和 FR4 的序列。

[0289] 图 4 示出使用 SDS-PAGE 关于使用 TAPE 法从人免疫球蛋白重链可变结构域基因文库中筛选的人 VH 结构域在大肠杆菌中的表达方面的分析结果,其中,so1 表示细胞裂解后的可溶性级分 and Inc1 表示细胞裂解后的不溶性级分,箭头表示在相应 VH 分子量的位置处的条带:

[0290] (a) 现有技术中已知具有良好的溶解性的 VH 结构域的表达方面,以及

[0291] (b) 左框示出从源自人生殖系细胞的人免疫球蛋白重链可变结构域随机选择的 VH 结构域的表达方面和右框示出由 TAPE 法筛选的 VH 结构域的表达方面。

[0292] 图 5 是示出制备首先由 TAPE 法筛选的 VH 结构域抗体支架的改造文库的方法视图。

[0293] 图 6 是示出使用 VH 结构域抗体支架的改造文库通过 TAPE 法筛选的人 VH 结构域的氨基酸序列的视图:

[0294] (a) 筛选的人 VH 结构域的 FR1、CDRH1、FR2 和 CDRH2 的序列,和

[0295] (b) 筛选的人 VH 结构域的 FR3、CDRH3 和 FR4 的序列。

[0296] 图 7 示出使用 SDS-PAGE 关于使用 VH 结构域抗体支架的改造文库用 TAPE 法筛选的人 VH 结构域在大肠杆菌中的表达方面的分析结果,

[0297] 其中, M 表示分子量标记,泳道 1 代表骆驼结构域抗体 VHH 的表达方面,泳道 2 是 CDR 合成的人结构域抗体 HEL4,泳道 3 是 MG2X1,泳道 4 到 32 代表从框架改造文库中筛选的 VH 支架的表达方面,各泳道的框架如下:

[0298] 泳道 5:MG2-47,泳道 6:MG2-55,泳道 7:MG2-57,泳道 8:MG2-59,泳道 9:MG4-2,泳道 10:MG4-5,泳道 11:MG4-6,泳道 12:MG4-7,泳道 13:MG4-12,泳道 14:MG4-13,泳道 15:MG4-17,泳道 16:MG4-20,泳道 17:MG4-28,泳道 18:MG4-32,泳道 19:MG4-33,泳道 20:MG8-4,泳道 21:MG8-5,泳道 22:MG8-6,泳道 23:MG8-8,泳道 24:MG8-11,泳道 25:MG8-12,泳道 26:MG8-13,泳道 27:MG2-7I,泳道 28:MG2-9I,泳道 29:MG2-10I,泳道 30:MG2-11I,泳道 31:MG2-12I,泳道 32:MG2-12L

[0299] 图 8 是示出由 TAPE 法筛选的 VH 结构域的圆二色性 (CD) 比较结果图。

[0300] 图 9 是示出使用 VH 结构域抗体支架的改造文库由 TAPE 法筛选的人 VH 结构域的圆二色性 (CD) 比较结果图。

[0301] 图 10 是示出由 TAPE 法筛选 VH 结构域的长期储存稳定性的曲线图。

[0302] 图 11 是示出制备具有改变的 CDR 长度的改造文库的方法的视图。

[0303] 图 12 是示出为提高结合抗原的能力,理性的文库中突变位置的视图:

[0304] (a)FR1、CDR H1 和 FR2 的序列,

[0305] (b)CDR H2 和 FR3 和序列

[0306] (c)CDR H3 和 FR4 的序列。

[0307] 图 13 是示出制备选择性的 CDR 改造文库的方法的视图。

[0308] 图 14 示出使用 SDS-PAGE 在 CDRH3 修饰时,关于根据 CDRH3 的氨基酸残基数目的 VH 支架在大肠杆菌中表达方面的分析结果:

[0309] (a)CDRH3 氨基酸残基的数目是 7 的情况,

[0310] (b)CDRH3 氨基酸残基的数目是 8 的情况,

[0311] (c)CDRH3 氨基酸残基的数目是 9 的情况,

[0312] (d)CDRH3 氨基酸残基的数目是 10 的情况,

[0313] (e)CDRH3 的氨基酸残基的数目是 11 的情况,

[0314] (f)CDRH3 的氨基酸残基的数目是 12 的情况,

[0315] (g)CDRH3 的氨基酸残基的数目是 13 的情况,和

[0316] (h)CDRH3 氨基酸残基的数量不改变的情况。

具体实施方式

[0317] 以下,参照实施例和附图对本发明进行详细说明。然而,这些是为了更详细地解释本发明,并且本发明的范围不受下述实施例的限制。

[0318] 实施例 1:用于构建 TAPE 系统的 pET-TAPE 的制备

[0319] 为了构建双精氨酸转运体 (Tat) 相关蛋白质改造工程 (TAPE) 系统,使用 pET9a

载体,通过将一种 Tat 底物蛋白 TorA(大肠杆菌三甲胺-N-氧化物还原酶)的途径信号序列,即 ssTorA,连接到靶蛋白的 N 末端并且将 TEM-1 β -内酰胺酶连接到其 C-末端来制备 pET-TAPE。

[0320] 然而,引导蛋白质到 Tat 途径的信号序列并不限于 ssTorA,如上所述,对普通技术人员显而易见的是可以使用所有 Tat 途径蛋白的信号序列。此外,对普通技术人员显而易见的是,作为使用的载体,可以使用任何满足本发明目的的载体,例如 pET9a(New England Biolab)、使用阿拉伯糖诱导启动子的 Δ pMA(韩国专利申请公开 No. 1996-007784)、使用 lac 启动子的 pAE34 等等。

[0321] 在使用 pET9a 作为载体的情况下,当在优化培养条件下通过 IPTG 诱导由 ssTorA、靶蛋白和 TEM-1 β -内酰胺酶组成的融合蛋白表达时,该融合蛋白通过信号序列的指导穿过 Tat 移动通路。这里,仅可溶性的和完全折叠的融合蛋白通过 Tat 机制(Tat A、B、C)穿过细胞内的膜,结果是,连接到靶蛋白的 TEM-1 β -内酰胺酶由于靶蛋白的折叠特性而移动到大肠杆菌的周质中。大肠杆菌的抗生素抗性是根据 TEM-1 β -内酰胺酶的在周质中存在与否来确定的。

[0322] 在本发明中,对于用于筛选人免疫球蛋白重链可变结构域的系统,人免疫球蛋白重链可变结构域文库(其为靶基因)插入到 pET-TAPE 载体的 ssTorA 和 TEM-1 β -内酰胺酶之间。

[0323] 实验步骤将详细描述如下。通过 DNA 寡聚物合成和重叠聚合酶链反应(Genscript USA Inc., US)合成 ssTorA 基因和人免疫球蛋白重链可变结构域的 VH 家族 2 型的代表基因的融合基因(Stefan Ewert et al., Stability improvement of antibodies for extracellular and intracellular applications: CDR grafting to stable frameworks and structure-based framework engineering. *Methods* 34(2004)184-199)。使用合成的 ssTat-VH2 基因作为模板同时使用包括 NdeI 序列的 5' 方向引物(SEQ ID NO:1)和包括 NotI、6xhis 和 BamHI 序列的 3' 方向引物(SEQ ID NO:2)诱导聚合酶链反应(PCR)。

[0324] 使用两种引物,1mM 的 0.5U 的 I-Pfu DNA 聚合酶(iNtRON),各 2.5mM 的四种 dNTP,以及 5 μ l 的 10X 反应缓冲液,并补充蒸馏水至 50 μ l 最终体积进行 PCR 反应。PCR 反应在 95 $^{\circ}$ C 运行 2 分钟,随后为 94 $^{\circ}$ C 15 秒,56 $^{\circ}$ C 15 秒,72 $^{\circ}$ C 30 秒,30 个循环,最后为 72 $^{\circ}$ C 5 分钟。将扩增的 DNA 加载到 1% 琼脂糖凝胶上来执行电泳,然后,使用 QIAquick 凝胶提取试剂盒(QIAGEN, Valencia, CA, USA)分离。

[0325] 将经 PCR 扩增的 NdeI-ssTorA-VH2-NotI-6xHis-BamHI 基因插入 pET9a 载体的多克隆位点(MCS)中存在的 NdeI 和 BamHI 切割位点,以制备 pET9a-ssTorA-VH2 质粒。将 NotI-TEM-1 β -内酰胺酶-BamHI 片段插入 pET9a-ssTorA-VH2 质粒的 NotI 和 BamHI 切割位点之间,并且将其命名为 pET-TAPE,所述 NotI-TEM-1 β -内酰胺酶-BamHI 片段是使用 5' 引物(SEQ ID NO:3)和 3' 引物(SEQ ID NO:4),同时使用 TEM-1 β -内酰胺酶(BLA)基因作为模板运行 PCR 而分离的。此后,从 pET-TAPE 除去 VH2 区并将文库基因插入其内来构建文库。为了检查所构建的 TAPE 系统是否依赖于相应的蛋白质的溶解性,将有代表性的天然型的人免疫球蛋白结构域抗体(Dp47d、VH2、VH3)(其在大肠杆菌中的可溶性表达程度是以前已知的)、阴性对照基因(VH3-B1a,无信号序列)和阳性对照基因(ssTorA-B1a,无靶蛋白)引入 pET-TAPE 中,然后测量 TEM-1 β -内酰胺酶的抗生素抗性的程度。已知

VH 家族 2 型在大肠杆菌中的可溶性表达是非常不利的,然后 VH3 和 DP47d 在大肠杆菌中的可溶性表达相对有利 (Ewert et al., Stability improvement of antibodies for extracellular and intracellular applications: CDR grafting to stable frameworks and structure-based framework engineering. *Methods* 34(2004) 184-199)。

[0326] 具体地,将先前已知其蛋白质溶解性的对照人类免疫球蛋白重链可变结构域、阴性对照(其中 VH 家族 3 型代表基因被插入 pET-TAPE 中并除去 ssTorA,以防止 TEM-1 β -内酰胺酶到达周质的构建体)和阳性对照(pET-TAPE 本身,其中 VH 基因未插入而是连接到 ssTorA 以便只表达 TEM-1 β -内酰胺酶的构建体)被安装在 TAPE 系统上,而将这些接种于含有抗生素剂的培养液中。然后,通过计数总存活细胞测量根据溶解性的抗生素抗性的程度。使用含有 50 μ g/ml 氨苄青霉素的 LB 培养基,并用 IPTG 诱导表达 3 小时,然后计数总存活细胞。

[0327] 结果表明,相应的基因的已知溶解性与 pET-TAPE 系统下抗生素抗性程度成正比(参见,图 1)。在图 1 中,每单位细胞浓度的增加计数意味着更强的抗生素抗性。

[0328] 实施例 2:源自人种系的免疫球蛋白重链可变结构域 (VH) 文库的制备

[0329] 将从人的肝、外周血单核细胞 (PBMC)、脾和甲状腺获得的 mRNA 逆转录来确保 cDNA 文库。

[0330] 为了由此确保人免疫球蛋白重链可变区结构域的 DNA 序列,设计 SEQ ID NO:5 至 13 所示的混合引物,以确保所有的人重链可变结构域基因可用于人生殖细胞系。将各确保的人重链可变结构域基因文库插入 pET-TAPE 的 NdeI 和 BamHI 位点之间,以完成具有约 10^8 大小的文库。

[0331] 具体地,通过逆转录反应由从人的脾脏、外周血单核细胞、肝脏和胸腺提取的 RNA (Clontech, Madison, WI, US) 制备 cDNA。AMV 逆转录酶和 RNase 抑制剂购自 Promega (Madison, WI, USA)。各自的 RNA 与 1 μ l 的 dNTP 混合液 (0.2mM) 和 1 μ l 的 oligo dT 引物混合,并向其中加入无核酸酶水以达到 12 μ l 总体积。对于 RNA 变性,将混合物在 65 $^{\circ}$ C 培养,然后向其中加入 4 μ l 的 5X 链缓冲液,1 μ l 的 RNA 酶抑制剂和 2 μ l 的 0.1M DTT。逆转录反应在 42 $^{\circ}$ C 运行 15 分钟,然后在 70 $^{\circ}$ C 滞留 15 分钟。对于在 PCR 中使用的引物,同时使用几个简并引物,以获得用于各自家族类型的 VH 结构域。

[0332] 使用 SEQ ID NO:5 至 13(见表 5) 示出的并且各包括正向 NcoI 序列的引物和 SEQ ID NO:14 和 15(见表 5) 示出的并且各包括反向 NotI 序列的引物 (Integrated DNA Technologies, Inc., Coralville, Iowa, US)。使用逆转录反应产生的 cDNA 作为模板扩增 DNA,对于每种情况引物 10pmolar, 0.5U 1-pfu DNA 聚合酶 (Interon, 韩国), 四种 dNTP, 每种 2.5mM, 以及 5 μ l 的 10X 缓冲液。PCR 在 95 $^{\circ}$ C 运行 2 分钟,随后为 94 $^{\circ}$ C 20 秒, 56 $^{\circ}$ C 20 秒, 72 $^{\circ}$ C 2 分钟, 30 个循环,最后是 72 $^{\circ}$ C 7 分钟。PCR 后的反应混合物通过 1% 琼脂糖凝胶电泳分离,然后用凝胶提取试剂盒 (QIAGEN, Valencia, CA, USA) 纯化。用 NcoI 和 NotI 限制性酶切割扩增的 PCR 产物和 pET9a-TAPE 质粒,并分别通过 PCR 纯化试剂盒 (QIAGEN) 和凝胶提取试剂盒纯化。将扩增的 VH 基因插入 pET9a-TAPE 的 NcoI 和 NotI 切割位点之间,以制备源自人类生殖细胞的 VH 文库质粒。将制备的文库使用乙醇沉淀法浓缩。

[0333] 通过电穿孔 (BTX ECM630 型号, Holliston, MA, USA) 用 1 μ l 的 DNA 转化 ElectroMAXTMDH5a-ETM (Invitrogen, Carlsbad, CA, US) (其是大肠杆菌)。为了验证该文库

的大小,将转化的大肠杆菌依次稀释到 10^{-4} 至 10^{-8} ,并且在含有卡那霉素的 LB 琼脂培养基中培养。在此之后,对菌落进行计数。

[0334] 结果是,确认了 VH1 家族的文库大小为 9.1×10^6 , VH3 是 1.56×10^9 和 VH5 是 6.05×10^8 。通过从其中随机地选择 50 单菌落得到 VH 基因,然后在含有卡那霉素的 LB 液体培养基中培养,然后使用 DNA 纯化试剂盒 (QIAGEN, Valencia, CA, USA) 分离各质粒。作为分析该 VH 基因的碱基序列的结果,确认了 90% 以上的基因被保持为能转录的形式。

[0335] [表 5] 本发明中使用的引物序列

[0336]

SEQ ID NO	引物序列
1	GCCATATGAACAATAACGATCTCTTTCAGGCATCACGT
2	GCGGATCCATGGTGGTGATGGTGGTGTGCGGCCGCTGAAGAG

[0337]

	ACGGTCACCAACGTGCC
3	GCGCGGCCGCACACCCAGAAACGCTGGTG
4	GCGGATCCTTACCAATGCTTAATCAGTGAGGC
5	GCGCTAGCCAGGTKCAGCTGGTGCAG
6	GCGCTAGCCAGGTCCAGCTTGTGCAG
7	GCGCTAGCSAGGTCCAGCTGGTACAG
8	GCGCTAGCCARATGCAGCTGGTGCAG
9	GCGCTAGCCAGATCACCTTGAAGGAG
10	GCGCTAGCCAGGTCACCTTGARGGAG
11	GCGCTAGCGARGTGCAGCTGGTGGAG
12	GCGCTAGCCAGGTGCAGCTGGTGGAG
13	GCGCTAGCGAGGTGCAGCTGTTGGAG
14	GCGCGGCCGCTGAGGAGACGGTGAC
15	GCGCGGCCGCTGAAGAGACGGTGAC
16	GCGCGGCCGCTGAGGAGACAGTGAC
17	GCCCATGGGAAGTCCAACCTGGTTGAATCTGGTGGCGGTTTAG

[0338]

	TT
18	AGTTGAACCGCCAGAGCCGGAAATMNNTGAGACMNNTTCMN NACCTTTGCCTGGCGCMNNACGCACCCAGCCCATAGCATAAG AAGAAAAGGTAAAGCCACTTGCAGCACAGCT
19	ATTTCCGGCTCTGGCGGTTCAACTNNTKACNNKGATAGCGTT AAAGGTCGTTTCACAATCTCC
20	GCGCGGCCGCACTGCTCACAGTAACCAGGGTACCCTG

[0339] 其中, K 表示 G 或 T, S 表示 C 或 G, R 表示 A 或 G, M 表示 A 或 C, 以及 N 表示 A 或 T 或 G 或 C

[0340] 在本发明中的“抗体序列编号系统”是指免疫球蛋白可变结构域 VH 或 VL 的氨基酸被编号的系统。在抗体的 CDR 中, 在 CDR 中的氨基酸数目因抗体不同而不同。因此, 需要以固定地确定的规则, 从 N- 末端开始, 对许多种类的个体的 VH 或 VL 的保守氨基酸序列 (例如, 框架部分) 以及可变部分进行编号。Kabat、Chothia 和 IMGT 编号系统具有代表性, 它们根据以何种顺序来编号 CDR 部分的氨基酸而彼此不同。在本发明中, 使用 Kabat 编号系统。例如, Kabat 编号系统在编号 CDR1 的氨基酸时遵循以下原则。基本前提是, 抗体的 CDR 可以根据氨基酸修饰程度被分成高变区和结构上支撑所述高变区的典型结构 (canonical structure)。例如, 框架 1, 这是第一保守框架, 在第 30 个氨基酸结束。首先, 第 31 个氨基酸到第 35 个氨基酸, 其对应于所述第一可变区 (CDR1) 的典型结构, 分别被编号为 31 至 35。如果在第 35 个氨基酸之后的氨基酸被确定为与框架 2 不相同的可变氨基酸, 它们按顺序被编号为 35a, 35b, 35c., 直到高变区结束。因此, 根据 Kabat 编号系统, 确保了框架 2 是从氨基酸 36 起始。另外, 使用 Kabat 编号系统编号 CDR2 的氨基酸是相同的。首先, 将对应于必然存在于 CDR2 中的典型结构的第 50 个氨基酸到第 52 个氨基酸编号, 然后将接下来的氨基酸按顺序编号为 52a, 52b, 52c.。然后, 在 CDR2 的后部的典型结构中的氨基酸按顺序编号为 53 至 65。因此, 确保了框架 3 是从氨基酸 66 起始。另外, 编号 CDR3 的氨基酸是相同的。首先, 将 CDR3 起始的典型结构的氨基酸分别编号为 95 至 100, 并将接下来的高变区的氨基酸按顺序编号为 100a, 100b, 100c.。然后, 在 CDR3 的后部的典型结构中的氨基酸按顺序编号为 101 至 102。因此, 与其连接的最后的框架, 框架 4, 肯定起始于氨基酸 103。

[0341] 实施例 3 : 通过 TAPE (Tat 相关蛋白质改造工程) 对源自人种系的 VH 文库的筛选

[0342] (1) 源自人种系的 VH 文库的构建

[0343] 通过电穿孔方法用 pET-TAPE 文库转化大肠杆菌 T7Express LysY/I^q。然后, 将其在 37°C 在 SOC 培养液中培养 1 小时, 然后在含有 50 μg/ml 的羧苄青霉素 (1X) 的 LB 培养

液中接种并培养。当大肠杆菌的 OD 值为 0.6 时,使用离心分离收集大肠杆菌,然后使用质粒 DNA 纯化试剂盒 (QIAGEN, Valencia, CA, USA) 分离质粒,并随后用限制性内切酶 NcoI 和 BamHI 切割。切割基因包括 VH 文库和 β -内酰胺酶基因,这是用于排除可能出现在随后的液体淘选过程中的假阳性。pET-TAPE 质粒也用限制酶 NcoI 和 BamHI 切割。切割后,各 DNA 用凝胶提取试剂盒 (QIAGEN) 纯化。将从在羧苄青霉素的 LB 培养液中筛选的 pET9a-TAPE 文库中获得的 VH 基因插入 pET-TAPE 的 NcoI 和 BamHI 切割位点之间,并用它再次转化大肠杆菌 T7Express LysY/I^q。此后,重复执行上述过程,同时在培养液中的羧苄青霉素浓度增加至 250 μ g/ml (5X) 和 500 μ g/ml (10X),用于液体淘选。用于相应过程的示意图示于图 2。

[0344] 最后,对各浓度的羧苄青霉素进行液体淘选后,从含有氨苄青霉素的 LB 琼脂平板中选择 50 个单菌落,然后在含有氨苄青霉素的液体培养基中培养。然后,从中收集质粒,随后分析碱基序列。用于分析所筛选克隆的 VH 结构域的特性的培养方法如下。大肠杆菌 DH5a 和 T7Express LysY/I^q购自 NEB (New England BioLabs, INC., Beverly, MA, US)。在大肠杆菌包括 pET-TAPE 质粒基的情况下,在含 50 μ g/ml 卡那霉素的 LB 培养液中培养大肠杆菌。在大肠杆菌包括 pET22b 载体的情况下,将 50 μ g/ml 氨苄青霉素或羧苄青霉素加入培养液中。对于种子培养,将从 LB 固体培养基中作为单一菌落形式分离的克隆接种在含有上述抗生素剂的 LB 液体培养基中,然后,在 37°C 以 200rpm 培养 12 小时或更长的时间。将菌落接种在培养基中,以便在种子培养液中的细胞浓度稀释至 1:100。

[0345] (2) 源自人种系的 VH 文库的筛选结果

[0346] 使用 TAPE 系统从按上面所述制备的人免疫球蛋白重链可变结构域基因文库中筛选的天然型的人 VH 结构域抗体的氨基酸序列如图 3 所示。对于每一种情况,所筛选的天然型的人 VH 结构域抗体的支架,即,FR1 至 FR4 框架的序列,示于表 1。

[0347] 当在从最后三次液体淘选分离总共 154 个 VH 序列中的重复的相同的序列被标记一次时,可以得到总共 54 个独特序列。在总共 154 个序列中,对应于其 96% 的 148 个序列被确定为 VH3 家族类型。已知该 VH3 家族是在人免疫球蛋白重链结构域的七个家族中相对高度可溶的,因此,这证明了使用本发明的 TAPE 系统进行筛选显著表明了基于溶解性的统计学上显著的筛选能力。

[0348] 另外,我们发现了个体的 54 个序列中 19 个序列的框架序列是唯一的,并且其中,13 个框架序列被归类为 VH3 家族类型。

[0349] 为了检查所筛选的个体的 VH 基因没有 TEM-1 β -内酰胺酶 (这是报告基因) 而单独在大肠杆菌中表达时,可溶性表达的程度,在诱导 VH 表达后分离可溶性级分和不溶性级分,然后通过 SDS-PAGE 与各种对照 VH 结构域相比较 (参见,图 4)。

[0350] 将相应的基因克隆到 pET-22b(+) 表达载体中,转化作为宿主细胞的大肠杆菌 NEBT7。对于支架的表达,在 37°C,200rpm 的条件下进行培养,然后当 OD 值为 0.6 至 0.8 时用 1mM 的 IPTG 诱导表达。在 25°C,180rpm 持续 3.5 小时的条件后,收集细胞。

[0351] 使用 B-PER 试剂 (Thermo Scientific) 分离蛋白质的可溶性级分和不溶性级分。细胞裂解后,可溶性级分 (上清部分) 可以通过细胞沉降而得到。将沉淀物 (团粒) 用 PBS 洗涤,然后重新悬浮于溶解缓冲液 (pH 7.4, 50mM NaH₂PO₄, 6M UREA, 0.5M NaCl, 4mM DTT), 得到不溶性级分。其表达使用 SDS-PAGE 分析。

[0352] 结果是,可以看出,在从文库中随机选择而未经筛选过程的 VH 结构域 (1,2,3) 的

情况下,在可溶性部分中很少 VH 结构域具有相应尺寸,在诱导蛋白质表达后,可以看出,在由 TAPE 过程筛选的 VH 结构域(MG4x4-44、MG4x4-25、MG10-10、MG2x1)的情况下,可溶性表达显著增加(参见图 4(b))。也可以看出,由 TAPE 系统筛选的 VH 结构域比通常已知具有优异的可溶性表达程度的 VH 结构域(VH2、VH3、VH6、DP47d 和 HEL4)有相对较高的可溶性表达比率。

[0353] 实施例 4:基于 MG2x1VH 支架的框架改造的合成文库的制备

[0354] 为了向基于通过 TAPE 法筛选的最佳天然型的人免疫球蛋白重链可变结构域(VH)候选组中的 MG2X1VH 支架赋予额外的溶解性和稳定性,构建“框架改造的合成文库”,其中在基于 VH 结构分析而合理选择的特定的 7 个氨基酸位点引入突变。

[0355] 根据 Kabat 编号系统,在 MG2X1VH 支架中的氨基酸突变位点在图 6 中由方框(■)表示。

[0356] 具体地讲,基于通过 TAPE 法首先筛选的 MG2X1 支架,在 MG2X1VH 支架的序列处引入突变。如下详细描述用于引入突变的聚合酶链反应(PCR)。

[0357] 将整个基因序列分为两个片段以制备用于聚合酶链反应(PCR)的引物。制备在第一片段的 3' 引物和第二个片段的 5' 引物处引入突变的引物并且通过 PCR 产生各基因片段(参见,表 5 的序列 17 和 18)。然后,通过两个基因片段的重叠 PCR 构建最终的基于 MG2X1 的框架改造的合成文库(见,表 5 中序列 18 和 19 和图 5)。从琼脂糖凝胶分离扩增的 DNA,用限制酶 NcoI 和 NotI 处理,然后插入 pET-TAPE 载体中,由此制备 pET-TAPE 框架改造的重链可变结构域合成文库。

[0358] 实施例 5:通过 TAPE(Tat 相关蛋白质改造工程)系统对基于 MG2X1VH 支架的改造的 VH 结构域的筛选

[0359] 使用本发明的 TAPE 系统按照上述来筛选新合成的具有改善的溶解性和稳定性的 VH 支架。对于 TAPE 的各个阶段,通过增加羧苄青霉素的浓度到 50 $\mu\text{g/ml}$ (以下称为“1X TAPE”)、100 $\mu\text{g/ml}$ (以下称为“2X TAPE”)、200 $\mu\text{g/ml}$ (以下称为“4X TAPE”)和 400 $\mu\text{g/ml}$ (以下称为“8X TAPE”)的量级来执行。

[0360] 作为分析 1X TAPE 后的 20 个单菌落的碱基序列的结果,确认了没有发现仅包括 TEM-1 β -内酰胺酶基因的 pET-TAPE 文库。因此,最终确认可以在由本发明的 TAPE 系统筛选的初始阶段排除假阳性。然后,当进行 2XTAPE, 4X TAPE 和 8X TAPE 时,在 NcoI 和 BamHI 限制性酶反应后仅收集 VH 基因,然后将它们再引入到 TAPE 系统的方法,以及不进行克隆工作而用从细胞培养液分离的 pET-TAPE VH 质粒文库转化大肠杆菌的方法同时进行。在这两种方法中都未发现假阳性菌落。在最终进行了 8X 液体淘选后,从 LB 固体培养基上选择 50 个单菌落,然后液体培养。然后,从中收集质粒,并进行氨基酸序列分析。

[0361] 结果是,发现,根据 Kabat 编号系统,在 7 个修饰位置中,在位置 50 和 58 处偏向地选择了特别的氨基酸。具体地说,发现,在 41 个克隆中,16 个克隆在位置 50 的丙氨酸被修饰为色氨酸,并且在 41 个克隆中,24 个克隆在位置 58 的酪氨酸被修饰为色氨酸。在其余位置没有观察到氨基酸是特别有偏向的。

[0362] [表 2] 氨基酸修饰的 VH 结构域抗体支架的 FR1 至 FR4 框架的氨基酸序列

[0363]

支架名称	FR1	FR2	FR3	FR4
MG8-21	EVQLVESGGGLV QPGGSLRLSCAAS GFTF	WVRNAPG KGNEIVS	RFTISRDN SKNTLYL QMNSLRAEDTAVY YCAS	WGQGTLVT VSS
MG2-12L	EVQLVESGGGLV QPGGSLRLSCAAS GFTF	WVRRAPG KGIEVVS	RFTISRDN SKNTLYL QMNSLRAEDTAVY YCAS	WGQGTLVT VSS
MG2-7I	EVQLVESGGGLV QPGGSLRLSCAAS	WVRIAPGK GPEPVS	RFTISRDN SKNTLYL QMNSLRAEDTAVY	WGQGTLVT VSS

[0364]

	GFTF		YCAS	
MG2-9I	EVQLVESGGGLV QPGGSLRLSCAAS GFTF	WVRKAPG KGYEPVS	RFTISRDN SKNTLYL QMNSLRAEDTAVY YCAS	WGQGTLVT VSS
MG2-10I	EVQLVESGGGLV QPGGSLRLSCAAS GFTF	WVRNAPG KGYEIVS	RFTISRDN SKNTLYL QMNSLRAEDTAVY YCAS	WGQGTLVT VSS
MG2-11I	EVQLVESGGGLV QPGGSLRLSCAAS GFTF	WVRYAPG KGYEFVS	RFTISRDN SKNTLYL QMNSLRAEDTAVY YCAS	WGQGTLVT VSS
MG2-12I	EVQLVESGGGLV QPGGSLRLSCAAS GFTF	WVRVAPG KGIEPVS	RFTISRDN SKNTLYL QMNSLRAEDTAVY YCAS	WGQGTLVT VSS
MG2-32	EVQLVESGGGLV QPGGSLRLSCAAS GFTF	WVRMAPG KGPEHVS	RFTISRDN SKNTLYL QMNSLRAEDTAVY YCAS	WGQGTLVT VSS
MG2-34	EVQLVESGGGLV QPGGSLRLSCAAS GFTF	WVRSAPG KGVEMVS	RFTISRDN SKNTLYL QMNSLRAEDTAVY YCAS	WGQGTLVT VSS
MG2-40	EVQLVESGGGLV QPGGSLRLSCAAS GFTF	WVRTAPG KGTEMVS	RFTISRDN SKNTLYL QMNSLRAEDTAVY YCAS	WGQGTLVT VSS
MG2-46	EVQLVESGGGLV QPGGSLRLSCAAS GFTF	WVRCAPG KGYEFVS	RFTISRDN SKNTLYL QMNSLRAEDTAVY YCAS	WGQGTLVT VSS
MG2-47	EVQLVESGGGLV QPGGSLRLSCAAS GFTF	WVRIAPGK GLEMVS	RFTISRDN SKNTLYL QMNSLRAEDTAVY YCAS	WGQGTLVT VSS
MG2-48	EVQLVESGGGLV QPGGSLRLSCAAS	WVRMAPG KGLEIVS	RFTISRDN SKNTLYL QMNSLRAEDTAVY	WGQGTLVT VSS

[0365]

	GFTF		YCAS	
MG2-51	EVQLVESGGGLV QPGGSLRLSCAAS GFTF	WVRYAPG KGTEFVS	RFTISRDN SKNTLYL QMNSLRAEDTAVY YCAS	WGQGTLVT VSS
MG2-53	EVQLVESGGGLV QPGGSLRLSCAAS GFTF	WVRQAPG KGVEWVS	RFTISRDN SKNTLYL QMNSLRAEDTAVY YCAS	WGQGTLVT VSS
MG2-55	EVQLVESGGGLV QPGGSLRLSCAAS GFTF	WVRWAPG KGPEFVS	RFTISRDN SKNTLYL QMNSLRAEDTAVY YCAS	WGQGTLVT VSS
MG2-57	EVQLVESGGGLV QPGGSLRLSCAAS GFTF	WVRFAPG KGREWVS	RFTISRDN SKNTLYL QMNSLRAEDTAVY YCAS	WGQGTLVT VSS
MG2-58	EVQLVESGGGLV QPGGSLRLSCAAS GFTF	WVRFAPG KGCELVS	RFTISRDN SKNTLYL QMNSLRAEDTAVY YCAS	WGQGTLVT VSS
MG2-59	EVQLVESGGGLV QPGGSLRLSCAAS GFTF	WVRKAPG KGLETVS	RFTISRDN SKNTLYL QMNSLRAEDTAVY YCAS	WGQGTLVT VSS
MG2-60	EVQLVESGGGLV QPGGSLRLSCAAS GFTF	WVRNAPG KGLECVS	RFTISRDN SKNTLYL QMNSLRAEDTAVY YCAS	WGQGTLVT VSS
MG2-64	EVQLVESGGGLV QPGGSLRLSCAAS GFTF	WVRCAPG KGWEVVS	RFTISRDN SKNTLYL QMNSLRAEDTAVY YCAS	WGQGTLVT VSS
MG4-12	EVQLVESGGGLV QPGGSLRLSCAAS GFTF	WVRLAPG KGVELVS	RFTISRDN SKNTLYL QMNSLRAEDTAVY YCAS	WGQGTLVT VSS
MG4-13	EVQLVESGGGLV QPGGSLRLSCAAS	WVRFAPG KGAEWVS	RFTISRDN SKNTLYL QMNSLRAEDTAVY	WGQGTLVT VSS

[0366]

	GFTF		YCAS	
MG4-17	EVQLVESGGGLV QPGGSLRLSCAAS GFTF	WVRLAPG KGREWVS	RFTISRDN SKNTLYL QMNSLRAEDTAVY YCAS	WGQGTLVT VSS
MG4-18	EVQLVESGGGLV QPGGSLRLSCAAS GFTF	WVRYAPG KGVEFVS	RFTISRDN SKNTLYL QMNSLRAEDTAVY YCAS	WGQGTLVT VSS
MG4-20	EVQLVESGGGLV QPGGSLRLSCAAS GFTF	WVRFAPG KGLEMVS	RFTISRDN SKNTLYL QMNSLRAEDTAVY YCAS	WGQGTLVT VSS
MG4-28	EVQLVESGGGLV QPGGSLRLSCAAS GFTF	WVRVAPG KGTERVS	RFTISRDN SKNTLYL QMNSLRAEDTAVY YCAS	WGQGTLVT VSS
MG4-2	EVQLVESGGGLV QPGGSLRLSCAAS GFTF	WVRIAPGK GMEMVS	RFTISRDN SKNTLYL QMNSLRAEDTAVY YCAS	WGQGTLVT VSS
MG4-32	EVQLVESGGGLV QPGGSLRLSCAAS GFTF	WVRAAPG KGPELVS	RFTISRDN SKNTLYL QMNSLRAEDTAVY YCAS	WGQGTLVT VSS
MG4-33	EVQLVESGGGLV QPGGSLRLSCAAS GFTF	WVRVAPG KGYEHVS	RFTISRDN SKNTLYL QMNSLRAEDTAVY YCAS	WGQGTLVT VSS
MG4-34	EVQLVESGGGLV QPGGSLRLSCAAS GFTF	WVRVAPG KGLECVS	RFTISRDN SKNTLYL QMNSLRAEDTAVY YCAS	WGQGTLVT VSS
MG4-5	EVQLVESGGGLV QPGGSLRLSCAAS GFTF	WVRVAPG KGPETVS	RFTISRDN SKNTLYL QMNSLRAEDTAVY YCAS	WGQGTLVT VSS
MG4-6	EVQLVESGGGLV QPGGSLRLSCAAS	WVRMAPG KGSEVVS	RFTISRDN SKNTLYL QMNSLRAEDTAVY	WGQGTLVT VSS

[0367]

	GFTF		YCAS	
MG4-7	EVQLVESGGGLV QPGGSLRLSCAAS GFTF	WVRLAPG KGTEMVS	RFTISRDN SKNTLYL QMNSLRAEDTAVY YCAS	WGQGT LVT VSS
MG8-11	EVQLVESGGGLV QPGGSLRLSCAAS GFTF	WVRTAPG KGAEWVS	RFTISRDN SKNTLYL QMNSLRAEDTAVY YCAS	WGQGT LVT VSS
MG8-12	EVQLVESGGGLV QPGGSLRLSCAAS GFTF	WVRWAPG KGKEVVS	RFTISRDN SKNTLYL QMNSLRAEDTAVY YCAS	WGQGT LVT VSS
MG8-13	EVQLVESGGGLV QPGGSLRLSCAAS GFTF	WVRQAPG KGIEPVS	RFTISRDN SKNTLYL QMNSLRAEDTAVY YCAS	WGQGT LVT VSS
MG8-14	EVQLVESGGGLV QPGGSLRLSCAAS GFTF	WVRQAPG KGPEWVS	RFTISRDN SKNTLYL QMNSLRAEDTAVY YCAS	WGQGT LVT VSS
MG8-4	EVQLVESGGGLV QPGGSLRLSCAAS GFTF	WVRQAPG KGPEVVS	RFTISRDN SKNTLYL QMNSLRAEDTAVY YCAS	WGQGT LVT VSS
MG8-5	EVQLVESGGGLV QPGGSLRLSCAAS GFTF	WVRTAPG KGIEIVS	RFTISRDN SKNTLYL QMNSLRAEDTAVY YCAS	WGQGT LVT VSS
MG8-6	EVQLVESGGGLV QPGGSLRLSCAAS GFTF	WVRIAPGK GVEIVS	RFTISRDN SKNTLYL QMNSLRAEDTAVY YCAS	WGQGT LVT VSS
MG8-8	EVQLVESGGGLV QPGGSLRLSCAAS GFTF	WVRAAPG KGLEVVS	RFTISRDN SKNTLYL QMNSLRAEDTAVY YCAS	WGQGT LVT VSS

[0368] 实施例 6 :筛选的 VH 支架候选物的分离和纯化及其物理化学性质分析

[0369] 为了确定筛选的源自人的 VH 支架候选物 (参照图 3) 和通过合成突变的 VH 结构支架候选物组 (参见图 6) 的物理 - 化学性质, 进行三种分析程序。

[0370] 首先, 检查筛选的 VH 支架的可溶性表达水平的比例, 以确定 VH 支架候选物的溶解

性程度。其次,进行圆二色性 (CD) 法以确定各自的支架候选物组的热稳定性。第三,通过凝胶过滤色谱法的单体比例和长期储存稳定性,确认纯化的支架候选物的蛋白质的无聚集特性。

[0371] (1) 筛选的 VH 支架候选物的分离和纯化

[0372] 将筛选的基因运送到大肠杆菌表达载体中,没有报告蛋白下只表达。使用 pET-TAPE-VH 候选物质粒作为模板并使用包括 Nco I 限制酶碱基序列的 5' 引物 (表 6 的 SEQ ID NO :21),和包括 Xho I 限制性酶碱基序列的 3' 引物 (表 6 的 SEQ ID NO :22) 运行 PCR。通过 PCR 扩增对应于 VH 候选物的 DNA 片段,用 NcoI 和 XhoI 限制酶处理,然后插入到 pET22b(+) 质粒载体的 NcoI 和 XhoI 切割位点之间,从而制备 pET22b-VH 质粒。用制备的质粒转化大肠杆菌 T7Express LysY/I^q。然后,选择单菌落,然后接种于含有 100 μg/mL 氨苄青霉素,20mM MgCl₂和 2% (w/v) 葡萄糖的 SB 培养液中。当培养液的光密度是 0.6 时,向其中加入 1mM 的 IPTG,然后在 25°C 进行培养 4 小时用于蛋白质表达。通过培养液的离心分离收集大肠杆菌,然后重新悬浮在磷酸盐缓冲的盐水 (PBS) 中。漂浮大肠杆菌冷冻和融化 4 次,以裂解其细胞壁,并通过离心分离收集上清液。向收集的上清液中加入 NaCl 以具有 0.5M 的浓度,并且用 5N NaOH 将 pH 值设定为 7.4,随后用 0.22 μm 过滤器过滤。使用 Ni-NTA 亲和层析纯化该蛋白质,这是用 100mM 咪唑洗涤并用 300mM 咪唑洗脱来洗涤的。使用购自 Invitrogen 的 NuPAGE 4-12% 的 Bis-Tris 凝胶电泳证实纯化的蛋白质,随后用考马斯蓝染料染色。相对于洗脱的蛋白,通过 PD-10 脱盐柱 (GE 医疗集团生命科学, Piscataway, NJ, USA) 进行缓冲液交换到磷酸盐缓冲的盐水 (PBS)。

[0373] [表 6] 本发明中使用的引物序列

[0374]

SEQ ID	引物序列
--------	------

[0375]

	GGCGCAGTAATACTGCGGTATCTTCAGCACGCAG
31	GCAGATCTTGAGGAGACAGTGACCAGGGTTCCTGGCCCCAM NNMNNMNNMNNMNNMNNMNNMNNMNNMNNMNNMNNMNN NTCTGGCGCAGTAATACTGCGGTATCTTCAGCACGCAG
32	GCAGATCTTGAGGAGACAGTGACCAGGGTTCCTGGCCCCAM NNMNNMNNMNNMNNMNNMNNMNNMNNMNNMNNMNNMNN GCGGTATCTTCAGCACGCAG
33	GCAGATCTTGAGGAGACAGTGACCAGGGTTCCTGGCCCCAM NNMNNMNNMNNMNNMNNMNNMNNMNNMNNMNNMNNMNN ACTGCGGTATCTTCAGCACGCAG
34	GCAGATCTTGAGGAGACAGTGACCAGGGTTCCTGGCCCCAM NNMNNMNNMNNMNNMNNMNNMNNMNNMNNMNNMNNMNN ATACACTGCGGTATCTTCAGCACGCAG
35	GCAGATCTTGAGGAGACAGTGACCAGGGTTCCTGGCCCCAM NNMNNMNNMNNMNNMNNMNNMNNMNNMNNMNNMNNMNN GTAATACTGCGGTATCTTCAGCACGCAG
36	GCAGATCTTGAGGAGACAGTGACCAGGGTTCCTGGCCCCAM NNMNNMNNMNNMNNMNNMNNMNNMNNMNNMNNMNNMNN GCAGTAATACTGCGGTATCTTCAGCACGCAG
37	GCAGATCTTGAGGAGACAGTGACCAGGGTTCCTGGCCCCAM NNMNNMNNMNNMNNMNNMNNMNNMNNMNNMNNMNNMNN AGGCGCAGTAATACTGCGGTATCTTCAGCACGCAG

[0377]

[0380] 为了证实通过 TAPE 从基于 MG2X1VH 支架的框架改造文库首先筛选的 VH 在大肠杆菌中的可溶性表达方面,只将相应的 VH 以与实施例 3(2) 相同的方式表达,然后分离可溶性级分和不溶性级分,然后通过 SDS-PAGE 分析。

[0381] 结果是,能够得到可溶性表达比从人免疫球蛋白重链可变结构域文库分离的天然型 MG2X1 提高的 VH 支架候选物。如图 7 所示,大多数在大肠杆菌中表达的所选择的 VH 结构域是可溶的。

[0382] 其中, MG8-14、MG2-55、MG4-5、MG4-13 和 MG8-4 支架候选物(图 7 的箭头所示)显示出优异的水溶性 VH 表达,并作为 VH 结构域的分析结果,确认了,表现出优异的可溶性表达的 VH 结构域的不溶性表达比率降低。

[0383] (3) 热稳定性分析

[0384] 为了通过 VH 支架候选物组的二维蛋白质结构分析来测定热稳定性,通过圆二色性(CD)法计算由 TAPE 过程筛选并纯化的 VH 支架候选物的 T_m (解链温度;全部水性蛋白质的 50%热变性的温度)。

[0385] 折叠分数由在一定的温度下的吸光度与加热前的吸光度之比来表示。吸光度是根据温度变化在 235nm 的波长测量的。在由此获得的 S 形曲线中, T_m 是指折叠分数为 50%的温度。

[0386] 纯化从天然型的人免疫球蛋白重链可变结构域文库和基于 MG2x1VH 支架的框架改造的合成文库中筛选的支架候选物,然后稀释至 0.2 至 0.3mg/ml 的浓度。然后,通过使用分光光度计(Jasco J-715 型号, Jascoinc, Easton, MD, USA) 测量其 CD。当温度在 25 至 85°C 的范围内时,同时每 1 分钟增加 1°C,记录并测量在 235nm 的波长时的 CD 信号。

[0387] 一般而言,蛋白聚集发生在大多数存在于水溶液中的天然型的人免疫球蛋白重链可变结构域(VH)中,并且因此,CD 测量是不可能的。

[0388] 然而,由 TAPE 系统筛选的大多数的 VH 在单独存在时都没有聚集。从由 TAPE 系统筛选的 VH 的热稳定性的 CD 分析结果看, MG3-10 具有约 45°C 的 T_m 值(参照表 7),而 MG4x4-44、MG4x4-25、MG10-10 和 MG2x1 具有约 55 至 65°C 的 T_m 值。这意味着它们的热稳定性与天然 VH 的平均 T_m 相比提高了约 10 至 20°C(参见图 8 和表 7)。

[0389] 测量由 TAPE 系统从基于 MG2x1VH 支架的框架改造的合成文库中筛选的 VH 结构域(例如, MG2-12I、MG2-12L、MG4-13、MG8-4, MG8-14 等)的 T_m 值,以具有 65 至 75°C 的平均 T_m ,并且因此,确认了其热稳定性提高了平均 20 至 30°C(参见图 9 和表 7)。

[0390] [表 7] 通过 TAPE 从人免疫球蛋白可变结构域文库筛选的结构域抗体的数值

[0391]

源自人种系的VH结构域	T _m 值(°C)	源自基于MG2X1的改造的框架的VH结构域	T _m 值(°C)
MG4x4-44	55.6	MG4-5	67.8
MG3-10	46.5	MG4-13	65.2
MG4x4-25	61.8	MG8-4	72.3
MG10-10	55.4	MG8-14	76.5
MG2-1	65.2	MG2-55	69.9
		MG2-12I	66.6
		MG2-7I	77.0

[0392] 4) 筛选的VH的聚集度的分析

[0393] 通过测量候选物VH框架根据长期储存而造成的聚集来调查蛋白质的稳定性。将纯化为具有0.2至0.8mg/mL的浓度的VH支架候选物储存在37°C, 60%湿度下。

[0394] 在约20天储存过程中以预定的间隔取样, 然后通过离心分离从中除去聚集的蛋白。然后, 测量保持水性的蛋白质的浓度, 并计算其比率。

[0395] 使用NuPAGE 4-12%的Bis-Tris凝胶经电泳分离剩余的蛋白, 然后通过用考马斯蓝染料染色证实它们的质量。作为结果, 可以看出, 在加速条件(37°C)持续60天或更长时间时, 大部分溶解在磷酸盐缓冲的盐水(PBS)中的蛋白质被稳定保持而没有蛋白质聚集。每个数据点表示当初始蛋白质含量设定为1时, 保留在水性溶液中的蛋白质含量的比例(参照图10)。

[0396] 实施例7: 用于赋予候选物VH支架以抗原结合能力的根据CDRH3长度的改造文库的构建

[0397] 为了向由TAPE法从源自人种系的VH文库筛选的MG2x1支架, 以及由TAPE法从框架改造文库筛选的MG8-4和MG8-14支架赋予抗原结合能力的多样性, 在相应支架的CDRH3部分处, 构建根据氨基酸(7至13个氨基酸)的长度的CDR3合成文库。

[0398] 这是从现有的研究结果中推导的, 具有最合适的稳定性和与靶蛋白结合能力的VH结构域的CDR3长度对应于7至13个氨基酸长度(Christopher J Bond. et al., J. Mol. Biol. 2005348:699 - 709)。另外, 氨基酸由NNK核苷酸三联体编码, 所以, 即使在将终止密码子的比率相比NNN和NNS核苷酸三联体降低时, 也可以编码所有20个氨基酸。此外, 通过上述的方法构建了R94S NNK文库, 其将精氨酸(前述CDR3氨基酸残基)替换为丝氨酸而增强了CDR3的灵活性。

[0399] 为了从PCR减少误差, 通过PCR构建包含框架1到框架3的模板DNA片段。分别以MG2x1、MG8-4和MG8-14的cDNA作为模板, 使用10pmolar的5'引物(表6的SEQ ID NO: 23)和3'引物(表6的SEQ ID NO: 24), 0.5U的I-Pfu DNA聚合酶, 四种dNTP每种2.5mM, 5μL的10X缓冲液执行DNA扩增。PCR重复25个循环, 条件为;

[0400] 暴露于 94℃ 2 分钟,然后 94℃ 20 秒,56℃ 20 秒,72℃ 25 秒,循环 25 次,最后 72℃ 5 分钟。

[0401] 为了赋予模板 DNA 以抗原结合能力的多样性,制备其中引入了具有 7 至 13 个氨基酸长度的组合 CDRH3 文库的引物 (SEQ ID NO :25 至 31)。通过 PCR,使用所构建的 DNA 片段为模板,根据长度而引入了氨基酸多样性的 5' 引物和 3' 引物 (SEQ ID NO :25 至 31),构建“根据长度的 CDR3 改造文库”。在以下条件,PCR 反复进行 25 个循环;

[0402] 暴露于 94℃ 2 分钟,接着 25 个循环的 94℃ 持续 20 秒,56℃ 持续 20 秒,72℃ 40 秒,25 次,最后 72℃ 5 分钟。图 11 示出了关于构建根据赋予抗原结合能力多样性的长度的 CDRH3 改造文库的示意图。

[0403] 实施例 8 :用于赋予候选物 VH 支架以抗原结合能力的多样性的合理的 CDR 改造文库的构建

[0404] 出于与实施例 7 同样的目的,构建为了向基于 MG2x1 或 MG8-4 或 MG8-14 支架赋予抗原结合能力的 VH 多样性的 CDR 改造文库。不同于实施例 7 中的按照 CDRH3 的长度赋予多样性,只合理选择了在引入突变时预计具有抗原结合能力同时保持 CDR 长度的序列,将随机突变引入到相应的基因中。同时保持三个 CDR 的长度,通过结构分析,只将突变选择性地引入到抗原有可能结合 (SDR :特定确定残基) 的位置。这样的优点在于由于 CDR 突变造成的稳定性改变和免疫原性问题可通过将突变仅仅引入到 CDR 的最小位置而被最小化。

[0405] 对于 SDR,首先,参照 SWISS-MODEL 系统的建模数据及其典型结构,或根据核苷酸特性的建模数据和预期的结合能力来选择 SDS。

[0406] 另外,通过引入具有相对增加的酪氨酸和丝氨酸比率的偏向核苷酸来设计氨基酸,这是众所周知的比其他氨基酸具有更高的抗原结合能力,使得即使是相同的文库大小,CDR 结合的概率也是高的 (Akiko Koide et al.,PNAS 2007 104(16):6632-6637)。为了在各 CDR1、CDR2 和 CDR3 中引入突变,将基因分成 3 部分并在该处引入突变 (参照图 12)。各个片段通过 PCR 法进行确认,而框架 MG2x1 或框架 MG8-4、MG8-14 的 cDNA 用作模板,如下所示。

[0407] 通过 PCR,分别使用 5' 引物 (SEQ ID NO :23) 和 3' 引物 (SEQ ID NO :39),5' 引物 (SEQ ID NO :40) 和 3' 引物 (SEQ ID NO :41),以及 5' 引物 (SEQ ID NO :42) 和 3' 引物 (SEQ ID NO :43),合成基于 MG8-4、MG8-14 文库的第一、第二和第三 DNA 片段。

[0408] 而且,通过 PCR,分别使用 5' 引物 (SEQ ID NO :23) 和 3' 引物 (SEQ ID NO :45),5' 引物 (SEQ ID NO :46) 和 3' 引物 (SEQ ID NO :47),以及 5' 引物 (SEQ ID NO :48) 和 3' 引物 (SEQ ID NO :43) 合成基于 MG2x1 文库的第一、第二和第三 DNA 片段。

[0409] 通过 PCR,用 10pmolar 每种引物,0.5U 的 vent DNA 聚合酶,各 10mM 的四种 dNTP 和 5 μ L 的 10X 缓冲液,进行如上所述的 DNA 片段的合成。

[0410] PCR 在 94℃ 运行 2 分钟,随后为 94℃ 15 秒,56℃ 20 秒,72℃ 25 秒,25 个循环,最后 72℃ 5 分钟。

[0411] 通过重叠 PCR,使用因此合成的 3 个模板片段,5' 引物 (SEQ ID NO :23) 和 3' 引物 (SEQ ID NO :44) 完成整个尺寸的合理的 CDR 改造文库。PCR 在 94℃ 运行 2 分钟,随后是 94℃ 20 秒,56℃ 20 秒,72℃ 40 秒,25 个循环,最后 72℃ 5 分钟。图 13 示出关于构建用于赋予抗原能力多样性的合理的 CDR 改造文库的示意图。

[0412] 实施例 9:研究在基于 VH 支架的文库(根据 CDR 长度的改造文库和合理的 CDR 改造文库)中的 CDR 修饰对蛋白质稳定性的影响

[0413] 为了证实 CDR 修饰对 VH 支架结构的稳定性的影响,从具有 7 至 13 个氨基酸的 CDRH3 的合成文库和在 CDRH1、CDRH2 和 CDRH3 的特定位置合理地引入突变的文库中随机选择基因(每个 CDR 改造文库筛选约 8 个基因),并且将它们克隆到专属的表达载体中。作为表达载体,使用 pET-22b(+) 表达载体,并转化作为宿主细胞的大肠杆菌 DH5 α 。随机选择转化的菌落,并且分析其序列。将所有基因都保持良好的质粒进行分离不带终止密码子,并再次转化作为宿主细胞的大肠杆菌 NEBT7,从而诱导相应基因的表达。在 37 $^{\circ}$ C 和 200rpm 的表达条件下进行培养,然后当 OD 值为 0.6 至 0.8 时用 1mM 的 IPTG 诱导表达。在 25 $^{\circ}$ C 180rpm, 3.5 小时的条件后,收获细胞。以与实施例 3 相同的方式分离可溶性蛋白级分和不溶性蛋白级分。

[0414] 将从各 CDR 改造文库中随机选择的 VH 结构单独表达,然后分离可溶性级分和不溶性级分并通过 SDS-PAGE 进行分析。结果是,确认了在 CDRH3 具有七个氨基酸的情况下,所有样品除了一个以外都表达为可溶形式(参见,图 14(a))。

[0415] 确认了,在 CDRH3 具有八个氨基酸的情况下,8 个样品中有 7 个表达为可溶形式(参见,图 14(b))。可以确认的是,在 CDRH3 具有九个氨基酸的情况下,所有样品都表达为可溶形式(参见,图 14(c))。可以确认的是,在 CDRH3 具有十个氨基酸的情况下,9 个样品中有 8 个表达为可溶形式(参见,图 14(d))。可以确认的是,在 CDRH3 具有十一个氨基酸的情况下,所有 9 个样品都表达为可溶形式(参见,图 14(e))。可以确认的是,在 CDRH3 具有十二个氨基酸的情况下,8 个样品中有 6 个表达为可溶形式(参见,图 14(f))。可以确认的是,在 CDRH3 具有十三个氨基酸的情况下,7 个样品中有 6 个表达为可溶形式(见,图 14(g))。可以确认的是,在合理的改造的 CDR 文库的情况下,所有样品都表达为可溶形式。确认了,在基于由 TAPE 法筛选的 VH 结构域的框架的基础上制备的 CDR 改造文库中,可溶性表达是整体稳定地诱导的而不管 CDR 修饰(参见,图 14 和表 8)。

[0416] [表 8] 引入 CDR 修饰后的 VH 可溶性表达的频率

[0417]

文库类型	CDR3长度(a/a)	可溶性表达的频率 (占所检测的克隆的%)
根据CDRH3长度的改造文库	7	88 (7/8)
	8	87 (7/8)
	9	100 (8/8)
	10	89 (8/9)
	11	100 (9/9)
	12	75 (6/8)
	13	86 (6/7)
整体		89 (51/57)
合理的CDR改造文库	11	100 (11/11)

[0418] 实施例 10 :使用具有由 TAPE 法筛选的 VH 结构支架的 VH 结构域抗体文库,基于展示技术的 VH 结构域抗体候选物的筛选

[0419] 在本发明中,噬菌体展示、酵母展示、核糖体展示等,优选作为可用的展示技术,以便使用具有由 TAPE 法筛选的 VH 支架的 VH 结构域抗体文库来筛选 VH 结构域抗体候选物,但并不局限于此。

[0420] 根据噬菌体展示技术,外源肽和蛋白质插入并融合至噬菌体衣壳蛋白,以使外源蛋白质在噬菌体表面上表达 (Smith et al., Science 1985 228(4705):1315 - 1317)。在本发明中,通过将靶抗原结合至在固定噬菌体的表面上的表达的融合蛋白,筛选具有强结合能力的结构域抗体。

[0421] 为了筛选与特定抗原具有结合能力的 VH,使用下面提出的淘选方案 (Carlos F. Barbas III et al. Phage Display-A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press) ;

[0422] 克隆被克隆到噬菌体载体 (pComb3X) 的 VH 文库 (实施例 7 和 8) ;

[0423] 在噬菌体的一端表达 VH 结构域 ;

[0424] 将表达的 VH 结构域与靶蛋白接触 ;

[0425] 选择与靶蛋白具有良好的结合能力的 VH 结构域。

[0426] 将靶蛋白与在噬菌体的端部表达的 VH 结构域接触后,洗出未结合的噬菌体,并仅洗脱 VH 结构域 - 靶蛋白质复合物。因此,只有表达了 VH 结构域的噬菌体被浓缩。

[0427] 通过重复 5-6 轮如上所述的淘选过程,可筛选强烈地结合于靶抗原的 VH 结构域抗体。

[0428] 另外,在本发明中,还使用了酵母展示方法。根据酵母展示方法,在将 VH 文库克隆到酵母表面表达载体中 (实施例 7 和 8) 后,VH 结构域在酵母的表面表达,并结合到靶蛋白,

从而筛选和仅洗脱具有良好的结合能力的结构域 (Ginger Chao. et al., Nature Protocol 2006 1(2):755-768)。将标签附着于靶蛋白或将生物素标记在靶蛋白上,其与所展示的 VH 结构域反应。然后,分别标记靶向所结合的蛋白质的荧光蛋白和靶向所展示的 VH 结构域的荧光蛋白。只有被标记的酵母-靶蛋白复合物(其示于期望的区域)使用荧光激活细胞分选 (FACS) 被洗脱,从而只收集展示特异于靶蛋白的 VH 结构域的酵母细胞。

[0429] 在本发明中,使用核糖体展示方法来筛选对特定抗原具有结合能力的 VH 结构域。根据核糖体展示方法,从编码筛选的 VH 支架的 mRNA 中除去终止密码子,然后进行体外蛋白合成。然后,形成所述蛋白和其对应的 mRNA 相连的核糖体复合物 (Mingyue H. et al., Nature Protocol 2007 4(3):281-288)。在靶抗原上进行淘选以筛选具有所需抗体的复合物,结果是,可以富集期望的复合物。将所筛选的 mRNA 反转录为 DNA,而这个过程重复三次或四次,直到获得期望的结果。当通过上述方法在由实施例 7 和 8 制备的抗原结合文库中进行筛选时,可以筛选出强烈结合于靶抗原并具有稳定的性能,例如高溶解性、热稳定性和长的储存稳定性的 VH 结构域。

[0430] 根据上面提出的 3 种筛选技术,使用 HAS 或 HER3 作为靶抗原,筛选出对人血清白蛋白 (HAS) 和人表皮生长因子受体 3 (HER3) 具有高亲和力的 VH 结构域。

[0431] 所筛选的 VH 结构域保持 VH 支架的性能,并且作为在大肠杆菌中可溶性形式表现出较高的生产力。

[0432] 在所筛选的 VH 结构域中,对 HAS 或 HER3 具有高亲和力的 VH 的氨基酸序列和亲和力在表 9 中示出。

[0433] [表 9] 使用 HAS 和 HER3 作为靶抗原,根据 CDRH3 的长度从文库筛选的氨基酸序列与亲和力

[0434]

靶抗原	克隆	氨基酸序列	亲和力(nM)
HSA	HSA9	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSY AMGWVRQAPGKGPEVVSLISGSGGSTWYDDS VKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVY YCASHQWSRQQWGQGTLVTVSS	1.7
	HSA11	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSY AMGWVRQAPGKGPEVVSLISGSGGSTWYDDS VKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVY YCASHKFRNLKWGQGTLVTVSS	1.2
	HSA50	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSY AMGWVRQAPGKGPEVVSLISGSGGSTWYDDS VKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVY YCASHQFTTTQWGQGTLVTVSS	7.8
HER3	HER3#	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSY	1.8

[0435]

	62	AMGWVRQAPGKGPEVVSLISGSGGSTWYDDS VKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVY YCASHPPRVDTWGQGTLVTVSS	
HER3#	723	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFYNY PMGWVRQAPGKGPEVVSLISGSGGSTWYDDS VKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAENTAVY YCASHPVSLLEFWGQGTLVTVSS	27.4
HER3#	748	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFYSL MMGWVRQAPGKGPEVVSLISGSGGSTWYDD SVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAV YYCASRHPPGLMWGQGTLVTVSS	20.0

[0436] 序列表文本

[0437] SEQ ID NO:1 至 48 引物序列

- [0438] SEQ ID NO:49MG1X8 氨基酸序列
- [0439] SEQ ID NO:50MG2X1 氨基酸序列
- [0440] SEQ ID NO:51MG2X1-34 氨基酸序列
- [0441] SEQ ID NO:52MG2X2-12 氨基酸序列
- [0442] SEQ ID NO:53MG2X2-13 氨基酸序列
- [0443] SEQ ID NO:54MG3X1 氨基酸序列
- [0444] SEQ ID NO:55MG3X10 氨基酸序列
- [0445] SEQ ID NO:56MG4X1-8 氨基酸序列
- [0446] SEQ ID NO:57MG4X1-33 氨基酸序列
- [0447] SEQ ID NO:58MG4X1-35 氨基酸序列
- [0448] SEQ ID NO:59MG4X3-27 氨基酸序列
- [0449] SEQ ID NO:60MG4X4-2 氨基酸序列
- [0450] SEQ ID NO:61MG4X4-4 氨基酸序列
- [0451] SEQ ID NO:62MG4X4-25 氨基酸序列
- [0452] SEQ ID NO:63MG4X4-44 氨基酸序列
- [0453] SEQ ID NO:64MG4X5-30 氨基酸序列
- [0454] SEQ ID NO:65MG4X6-27 氨基酸序列
- [0455] SEQ ID NO:66MG4X6-48 氨基酸序列
- [0456] SEQ ID NO:67MG4X7-15 氨基酸序列
- [0457] SEQ ID NO:68MG4X8-24 氨基酸序列
- [0458] SEQ ID NO:69MG.0 5X-1 氨基酸序列
- [0459] SEQ ID NO:70MG.0 5X-3 氨基酸序列
- [0460] SEQ ID NO:71MG.0 5X-4 氨基酸序列
- [0461] SEQ ID NO:72MG.0 5X-14 氨基酸序列
- [0462] SEQ ID NO:73MG.0 75X-4 氨基酸序列
- [0463] SEQ ID NO:74MG2X-5 氨基酸序列
- [0464] SEQ ID NO:75MG2X-15 氨基酸序列
- [0465] SEQ ID NO:76MG4X-5 氨基酸序列
- [0466] SEQ ID NO:77MG1-4 氨基酸序列
- [0467] SEQ ID NO:78MG1-6 氨基酸序列
- [0468] SEQ ID NO:79MG1-7 氨基酸序列
- [0469] SEQ ID NO:80MG1-8 氨基酸序列
- [0470] SEQ ID NO:81MG1-9 氨基酸序列
- [0471] SEQ ID NO:82MG1-10 氨基酸序列
- [0472] SEQ ID NO:83MG5-1 氨基酸序列
- [0473] SEQ ID NO:84MG5-2 氨基酸序列
- [0474] SEQ ID NO:85MG5-4 氨基酸序列
- [0475] SEQ ID NO:86MG5-5 氨基酸序列
- [0476] SEQ ID NO:87MG5-6 氨基酸序列

- [0477] SEQ ID NO:88MG5-7 氨基酸序列
- [0478] SEQ ID NO:89MG5-9 氨基酸序列
- [0479] SEQ ID NO:90MG10-1 氨基酸序列
- [0480] SEQ ID NO:91MG10-2 氨基酸序列
- [0481] SEQ ID NO:92MG10-4 氨基酸序列
- [0482] SEQ ID NO:93MG10-5 氨基酸序列
- [0483] SEQ ID NO:94MG10-6 氨基酸序列
- [0484] SEQ ID NO:95MG10-8 氨基酸序列
- [0485] SEQ ID NO:96MG10-10 氨基酸序列
- [0486] SEQ ID NO:97MG2 氨基酸序列
- [0487] SEQ ID NO:98MG5 氨基酸序列
- [0488] SEQ ID NO:99MG6 氨基酸序列
- [0489] SEQ ID NO:100MG7 氨基酸序列
- [0490] SEQ ID NO:101MG10 氨基酸序列
- [0491] SEQ ID NO:102MG8-21 氨基酸序列
- [0492] SEQ ID NO:103MG2-12L 氨基酸序列
- [0493] SEQ ID NO:104MG2-7I 氨基酸序列
- [0494] SEQ ID NO:105MG2-9I 氨基酸序列
- [0495] SEQ ID NO:106MG2-10I 氨基酸序列
- [0496] SEQ ID NO:107MG2-11I 氨基酸序列
- [0497] SEQ ID NO:108MG12I 氨基酸序列
- [0498] SEQ ID NO:109MG2-32 氨基酸序列
- [0499] SEQ ID NO:110MG2-34 氨基酸序列
- [0500] SEQ ID NO:111MG2-40 氨基酸序列
- [0501] SEQ ID NO:112MG2-46 氨基酸序列
- [0502] SEQ ID NO:113MG2-47 氨基酸序列
- [0503] SEQ ID NO:114MG2-48 氨基酸序列
- [0504] SEQ ID NO:115MG2-51 氨基酸序列
- [0505] SEQ ID NO:116MG2-53 氨基酸序列
- [0506] SEQ ID NO:117MG2-55 氨基酸序列
- [0507] SEQ ID NO:118MG2-57 氨基酸序列
- [0508] SEQ ID NO:119MG2-58 氨基酸序列
- [0509] SEQ ID NO:120MG2-59 氨基酸序列
- [0510] SEQ ID NO:121MG2-60 氨基酸序列
- [0511] SEQ ID NO:122MG2-64 氨基酸序列
- [0512] SEQ ID NO:123MG4-12 氨基酸序列
- [0513] SEQ ID NO:124MG4-13 氨基酸序列
- [0514] SEQ ID NO:125MG4-17 氨基酸序列
- [0515] SEQ ID NO:126MG4-18 氨基酸序列

- [0516] SEQ ID NO:127MG4-20 氨基酸序列
- [0517] SEQ ID NO:128MG4-28 氨基酸序列
- [0518] SEQ ID NO:129MG4-2 氨基酸序列
- [0519] SEQ ID NO:130MG4-32 氨基酸序列
- [0520] SEQ ID NO:131MG4-33 氨基酸序列
- [0521] SEQ ID NO:132MG3-34 氨基酸序列
- [0522] SEQ ID NO:133MG4-5 氨基酸序列
- [0523] SEQ ID NO:134MG4-6 氨基酸序列
- [0524] SEQ ID NO:135MG4-7 氨基酸序列
- [0525] SEQ ID NO:136MG8-11 氨基酸序列
- [0526] SEQ ID NO:137MG8-12 氨基酸序列
- [0527] SEQ ID NO:138MG8-13 氨基酸序列
- [0528] SEQ ID NO:139MG8-14 氨基酸序列
- [0529] SEQ ID NO:140MG8-4 氨基酸序列
- [0530] SEQ ID NO:141MG8-5 氨基酸序列
- [0531] SEQ ID NO:142MG8-6 氨基酸序列
- [0532] SEQ ID NO:143MG8-8 氨基酸序列

[0001]

序列表

- <110> 财团法人牧岩生命工学研究所
 <120> 超稳定免疫球蛋白可变结构域的筛选和改造方法及其应用
 <130> 1249-146.15P8
 <160> 143
 <170> PatentIn version 3.2
 <210> 1
 <211> 38
 <212> DNA
 <213> 人工
 <220>
 <223> 引物
 <400> 1
 gccatgatgaa caataacgat ctcfttcagg catcacgt 38
 <210> 2
 <211> 59
 <212> DNA
 <213> 人工
 <220>
 <223> 引物
 <400> 2
 gcggtatccat ggtggtgatg gtggtgtgcg gccgctgaag agacggtcac caacgtgcc 59
 <210> 3
 <211> 29
 <212> DNA
 <213> 人工
 <220>
 <223> 引物
 <400> 3
 gcgcggccgc acaccagaa acgctggtg 29
 <210> 4
 <211> 32
 <212> DNA
 <213> 人工
 <220>
 <223> 引物
 <400> 4
 gcggatcett accaatgett aatcagttag gc 32
 <210> 5
 <211> 26
 <212> DNA
 <213> 人工
 <220>
 <223> 引物
 <400> 5
 gcgctagcca ggkacagctg gtgcag 26
 <210> 6
 <211> 26
 <212> DNA

[0002]

<213>	人工	
<220>		
<223>	引物	
<400>	6	
	gcgctagcca ggtccagctt glgcag	26
<210>	7	
<211>	26	
<212>	DNA	
<213>	人工	
<220>		
<223>	引物	
<400>	7	
	gcgctagesa ggtccagctg gfacag	26
<210>	8	
<211>	26	
<212>	DNA	
<213>	人工	
<220>		
<223>	引物	
<400>	8	
	gcgctagcca ratgcagctg gtgcag	26
<210>	9	
<211>	26	
<212>	DNA	
<213>	人工	
<220>		
<223>	引物	
<400>	9	
	gcgctagcca gatcaccttg aaggag	26
<210>	10	
<211>	26	
<212>	DNA	
<213>	人工	
<220>		
<223>	引物	
<400>	10	
	gcgctagcca ggtcaccttg arggag	26
<210>	11	
<211>	26	
<212>	DNA	
<213>	人工	
<220>		
<223>	引物	
<400>	11	
	gcgctagcga rgtgcagctg gtggag	26
<210>	12	
<211>	26	
<212>	DNA	
<213>	人工	
<220>		

[0003]

<223> 引物	
<400> 12	
gcgctagcca ggtgcagctg gtggag	26
<210> 13	
<211> 26	
<212> DNA	
<213> 人工	
<220>	
<223> 引物	
<400> 13	
gcgctagcga ggtgcagctg ttggag	26
<210> 14	
<211> 25	
<212> DNA	
<213> 人工	
<220>	
<223> 引物	
<400> 14	
gcgcggccgc tgaggagacg gtgac	25
<210> 15	
<211> 25	
<212> DNA	
<213> 人工	
<220>	
<223> 引物	
<400> 15	
gcgcggcccgc tgaagagacg gtgac	25
<210> 16	
<211> 25	
<212> DNA	
<213> 人工	
<220>	
<223> 引物	
<400> 16	
gcgcggcccgc tgaggagaca gtgac	25
<210> 17	
<211> 44	
<212> DNA	
<213> 人工	
<220>	
<223> 引物	
<400> 17	
gcccatggga agtccaactg gttgaatctg gtggcggttt agtt	44
<210> 18	
<211> 114	
<212> DNA	
<213> 人工	
<220>	
<223> 引物	

[0004]

<220>			
<221>	misc_feature		
<222>	(26)..(27)		
<223>	n是a, c, g或t		
<220>			
<221>	misc_feature		
<222>	(35)..(36)		
<223>	n是a, c, g或t		
<220>			
<221>	misc_feature		
<222>	(41)..(42)		
<223>	n是a, c, g或t		
<220>			
<221>	misc_feature		
<222>	(59)..(60)		
<223>	n是a, c, g或t		
<400>	18		
	agttgaaccg ecagagccgg aaaimnntga gacmnnntem nnacetttgc ctggcgcmnn	60	
	acgcaccag cccatagcat aagaagaaaa ggtaaageca ettgcagcac agct	114	
<210>	19		
<211>	63		
<212>	DNA		
<213>	人工		
<220>			
<223>	引物		
<220>			
<221>	misc_feature		
<222>	(25)..(26)		
<223>	n是a, c, g或t		
<220>			
<221>	misc_feature		
<222>	(31)..(32)		
<223>	n是a, c, g或t		
<400>	19		
	atttccggct ctggcggttc aactnnktac nnkgatagcg ttaaaggteg tticacaatc	60	
	tcc	63	
<210>	20		
<211>	37		
<212>	DNA		
<213>	人工		
<220>			
<223>	引物		
<400>	20		
	ggcgggccgc actgctcaca gtaaccaggg taccctg	37	
<210>	21		
<211>	35		
<212>	DNA		
<213>	人工		
<220>			
<223>	引物		
<400>	21		
	gcccattggga agtccaactg gttgaatctg gtggc	35	

[0005]

<210>	22	
<211>	34	
<212>	DNA	
<213>	人工	
<220>		
<223>	引物	
<400>	22	
	gccctcgagac tgetcacagt aaccagggtg ccct	34
<210>	23	
<211>	35	
<212>	DNA	
<213>	人工	
<220>		
<223>	引物	
<400>	23	
	gcgctagcga agtccaactg gttgaatctg gtggc	35
<210>	24	
<211>	27	
<212>	DNA	
<213>	人工	
<220>		
<223>	引物	
<400>	24	
	actggcgcag taatacactg cggatc	27
<210>	25	
<211>	101	
<212>	DNA	
<213>	人工	
<220>		
<223>	引物	
<220>		
<221>	misc_feature	
<222>	(43)..(44)	
<223>	n是a, c, g或t	
<220>		
<221>	misc_feature	
<222>	(46)..(47)	
<223>	n是a, c, g或t	
<220>		
<221>	misc_feature	
<222>	(49)..(50)	
<223>	n是a, c, g或t	
<220>		
<221>	misc_feature	
<222>	(52)..(53)	
<223>	n是a, c, g或t	
<220>		
<221>	misc_feature	
<222>	(55)..(56)	
<223>	n是a, c, g或t	
<220>		
<221>	misc_feature	
<222>	(58)..(59)	
<223>	n是a, c, g或t	

[0006]

<220>		
<221>	misc_feature	
<222>	(61)..(62)	
<223>	n是a, c, g或t	
<400>	25	
	gcagatcttg aggagacagt gaccagggtt ccctggccce amnnnnnnnnn mnnnnnnnnnn	60
	mntctggcgc agtaatacac tgcggtatct tcagcacgca g	101
<210>	26	
<211>	104	
<212>	DNA	
<213>	人工	
<220>		
<223>	引物	
<220>		
<221>	misc_feature	
<222>	(43)..(44)	
<223>	n是a, c, g或t	
<220>		
<221>	misc_feature	
<222>	(46)..(47)	
<223>	n是a, c, g或t	
<220>		
<221>	misc_feature	
<222>	(49)..(50)	
<223>	n是a, c, g或t	
<220>		
<221>	misc_feature	
<222>	(52)..(53)	
<223>	n是a, c, g或t	
<220>		
<221>	misc_feature	
<222>	(55)..(56)	
<223>	n是a, c, g或t	
<220>		
<221>	misc_feature	
<222>	(58)..(59)	
<223>	n是a, c, g或t	
<220>		
<221>	misc_feature	
<222>	(61)..(62)	
<223>	n是a, c, g或t	
<220>		
<221>	misc_feature	
<222>	(64)..(65)	
<223>	n是a, c, g或t	
<400>	26	
	gcagatcttg aggagacagt gaccagggtt ccctggccce amnnnnnnnnn mnnnnnnnnnn	60
	mnnnnnctgg cgcagtaata cactggcgta tcttcagcac gcag	104
<210>	27	
<211>	107	
<212>	DNA	
<213>	人工	
<220>		
<223>	引物	

[0007]

<220>		
<221>	misc feature	
<222>	(43)..(44)	
<223>	n是a, c, g或t	
<220>		
<221>	misc feature	
<222>	(46)..(47)	
<223>	n是a, c, g或t	
<220>		
<221>	misc feature	
<222>	(49)..(50)	
<223>	n是a, c, g或t	
<220>		
<221>	misc feature	
<222>	(52)..(53)	
<223>	n是a, c, g或t	
<220>		
<221>	misc feature	
<222>	(55)..(56)	
<223>	n是a, c, g或t	
<220>		
<221>	misc feature	
<222>	(58)..(59)	
<223>	n是a, c, g或t	
<220>		
<221>	misc feature	
<222>	(61)..(62)	
<223>	n是a, c, g或t	
<220>		
<221>	misc feature	
<222>	(64)..(65)	
<223>	n是a, c, g或t	
<220>		
<221>	misc feature	
<222>	(67)..(68)	
<223>	n是a, c, g或t	
<400>	27	
	gcagatcttg aggagacagt gaccagggtt ccctggccec amnnnnnnnn mnnnnnnnnnn	60
	nnnnnnmtc tggegcagta atacaactgcg gtatcttcag cacgcag	107
<210>	28	
<211>	110	
<212>	DNA	
<213>	人工	
<220>		
<223>	引物	
<220>		
<221>	misc feature	
<222>	(43)..(44)	
<223>	n是a, c, g或t	
<220>		
<221>	misc feature	
<222>	(46)..(47)	
<223>	n是a, c, g或t	
<220>		
<221>	misc feature	
<222>	(49)..(50)	
<223>	n是a, c, g或t	

[0008]

```

<220>
<221> misc_feature
<222> (52)..(53)
<223> n是a, c, g或t

<220>
<221> misc_feature
<222> (55)..(56)
<223> n是a, c, g或t

<220>
<221> misc_feature
<222> (58)..(59)
<223> n是a, c, g或t

<220>
<221> misc_feature
<222> (61)..(62)
<223> n是a, c, g或t

<220>
<221> misc_feature
<222> (64)..(65)
<223> n是a, c, g或t

<220>
<221> misc_feature
<222> (67)..(68)
<223> n是a, c, g或t

<220>
<221> misc_feature
<222> (70)..(71)
<223> n是a, c, g或t

<400> 28
gcagatctttg aggagacagt gaccagggtt cctggcccc amnnnnnnnnn mnnnnnnnnn 60
mnnnnnnnnn nctggcgca gtaatacact gcggtatctt cagcagcag 110

<210> 29
<211> 113
<212> DNA
<213> 人工

<220>
<223> 引物

<220>
<221> misc_feature
<222> (43)..(44)
<223> n是a, c, g或t

<220>
<221> misc_feature
<222> (46)..(47)
<223> n是a, c, g或t

<220>
<221> misc_feature
<222> (49)..(50)
<223> n是a, c, g或t

<220>
<221> misc_feature
<222> (52)..(53)
<223> n是a, c, g或t

<220>
<221> misc_feature
<222> (55)..(56)
<223> n是a, c, g或t

```

[0009]

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (58)..(59)
 <223> n是a, c, g或t

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (61)..(62)
 <223> n是a, c, g或t

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (64)..(65)
 <223> n是a, c, g或t

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (67)..(68)
 <223> n是a, c, g或t

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (70)..(71)
 <223> n是a, c, g或t

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (73)..(74)
 <223> n是a, c, g或t

 <400> 29
 gcagatcttg aggagacagt gaccagggtt ccctgccc amnnnnnnn mnnnnnnnn 60

 nnnnnnnn nmantctg gcagtaatac actgcggtat cttcagcaag cag 113

 <210> 30
 <211> 116
 <212> DNA
 <213> 人工

 <220>
 <223> 引物

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (43)..(44)
 <223> n是a, c, g或t

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (46)..(47)
 <223> n是a, c, g或t

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (49)..(50)
 <223> n是a, c, g或t

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (52)..(53)
 <223> n是a, c, g或t

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (55)..(56)
 <223> n是a, c, g或t

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (58)..(59)
 <223> n是a, c, g或t

[0010]

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (61)..(62)
 <223> n是a, c, g或t

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (64)..(65)
 <223> n是a, c, g或t

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (67)..(68)
 <223> n是a, c, g或t

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (70)..(71)
 <223> n是a, c, g或t

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (73)..(74)
 <223> n是a, c, g或t

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (76)..(77)
 <223> n是a, c, g或t

 <400> 30
 gcagatcttg aggagacagt gaccagggtt ccttgcccc amnnnnnnnnn mnnnnnnnnnn 60

 nnnnnnnnnn mnnnnmntct ggccgcagtaa tacactgegg tatcttcagc acgcag. 116

 <210> 31
 <211> 119
 <212> DNA
 <213> 人工

 <220>
 <223> 引物

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (43)..(44)
 <223> n是a, c, g或t

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (46)..(47)
 <223> n是a, c, g或t

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (49)..(50)
 <223> n是a, c, g或t

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (52)..(53)
 <223> n是a, c, g或t

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (55)..(56)
 <223> n是a, c, g或t

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (58)..(59)
 <223> n是a, c, g或t

[0011]

```

<220>
<221> misc_feature
<222> (61)..(62)
<223> n是a, c, g或t

<220>
<221> misc_feature
<222> (64)..(65)
<223> n是a, c, g或t

<220>
<221> misc feature
<222> (67)..(68)
<223> n是a, c, g或t

<220>
<221> misc_feature
<222> (70)..(71)
<223> n是a, c, g或t

<220>
<221> misc_feature
<222> (73)..(74)
<223> n是a, c, g或t

<220>
<221> misc_feature
<222> (76)..(77)
<223> n是a, c, g或t

<220>
<221> misc_feature
<222> (79)..(80)
<223> n是a, c, g或t

<400> 31
gcagatcttg aggagacagt gaccagggtt ccctgcccce amnnnnnnnnn mnnnnnnnnnn 60
nnnnnnnnnn mnnnnnnnnn ictggcgcag taatacaactg cggatcttcc agcacgcag 119

<210> 32
<211> 101
<212> DNA
<213> 人工

<220>
<223> 引物

<220>
<221> misc_feature
<222> (43)..(44)
<223> n是a, c, g或t

<220>
<221> misc_feature
<222> (46)..(47)
<223> n是a, c, g或t

<220>
<221> misc_feature
<222> (49)..(50)
<223> n是a, c, g或t

<220>
<221> misc_feature
<222> (52)..(53)
<223> n是a, c, g或t

<220>
<221> misc_feature
<222> (55)..(56)
<223> n是a, c, g或t

```

[0012]

<220>		
<221>	misc_feature	
<222>	(58)..(59)	
<223>	n是a, c, g或t	
<220>		
<221>	misc_feature	
<222>	(61)..(62)	
<223>	n是a, c, g或t	
<400>	32	
	gcagatcttg aggagacagt gaccagggtt cctggcccc amnnnnnnnn mnnnnnnnnm	60
	mnggaggcgc agtaatacac tgcggtatct tcagcagca g	101
<210>	33	
<211>	104	
<212>	DNA	
<213>	人工	
<220>		
<223>	引物	
<220>		
<221>	misc_feature	
<222>	(43)..(44)	
<223>	n是a, c, g或t	
<220>		
<221>	misc_feature	
<222>	(46)..(47)	
<223>	n是a, c, g或t	
<220>		
<221>	misc_feature	
<222>	(49)..(50)	
<223>	n是a, c, g或t	
<220>		
<221>	misc_feature	
<222>	(52)..(53)	
<223>	n是a, c, g或t	
<220>		
<221>	misc_feature	
<222>	(55)..(56)	
<223>	n是a, c, g或t	
<220>		
<221>	misc_feature	
<222>	(58)..(59)	
<223>	n是a, c, g或t	
<220>		
<221>	misc_feature	
<222>	(61)..(62)	
<223>	n是a, c, g或t	
<220>		
<221>	misc_feature	
<222>	(64)..(65)	
<223>	n是a, c, g或t	
<400>	33	
	gcagatcttg aggagacagt gaccagggtt cctggcccc amnnnnnnnn mnnnnnnnnm	60
	mnnnnggagg cgcagtaata cactgcggtt tcttcagcac gcag	104
<210>	34	
<211>	107	
<212>	DNA	
<213>	人工	

[0013]

- <220>
 <223> 引物
- <220>
 <221> misc_feature
 <222> (43)..(44)
 <223> n是a, c, g或t
- <220>
 <221> misc_feature
 <222> (46)..(47)
 <223> n是a, c, g或t
- <220>
 <221> misc_feature
 <222> (49)..(50)
 <223> n是a, c, g或t
- <220>
 <221> misc_feature
 <222> (52)..(53)
 <223> n是a, c, g或t
- <220>
 <221> misc_feature
 <222> (55)..(56)
 <223> n是a, c, g或t
- <220>
 <221> misc_feature
 <222> (58)..(59)
 <223> n是a, c, g或t
- <220>
 <221> misc_feature
 <222> (61)..(62)
 <223> n是a, c, g或t
- <220>
 <221> misc_feature
 <222> (64)..(65)
 <223> n是a, c, g或t
- <220>
 <221> misc_feature
 <222> (67)..(68)
 <223> n是a, c, g或t
- <400> 34
 gcagatcttg aggagacagt gaccagggtt ccttgcccc amnnnnnnnnn mnnnnnnnnm 60
 nnnnnmngg aggcgcagta atacactgcg gtatcttcag cagcag 107
- <210> 35
 <211> I10
 <212> DNA
 <213> 人工
- <220>
 <223> 引物
- <220>
 <221> misc_feature
 <222> (43)..(44)
 <223> n是a, c, g或t
- <220>
 <221> misc_feature
 <222> (46)..(47)
 <223> n是a, c, g或t

[0014]

<220>			
<221>	misc_feature		
<222>	(49)..(50)		
<223>	n是a, c, g或t		
<220>			
<221>	misc_feature		
<222>	(52)..(53)		
<223>	n是a, c, g或t		
<220>			
<221>	misc_feature		
<222>	(55)..(56)		
<223>	n是a, c, g或t		
<220>			
<221>	misc_feature		
<222>	(58)..(59)		
<223>	n是a, c, g或t		
<220>			
<221>	misc_feature		
<222>	(61)..(62)		
<223>	n是a, c, g或t		
<220>			
<221>	misc_feature		
<222>	(64)..(65)		
<223>	n是a, c, g或t		
<220>			
<221>	misc_feature		
<222>	(67)..(68)		
<223>	n是a, c, g或t		
<220>			
<221>	misc_feature		
<222>	(70)..(71)		
<223>	n是a, c, g或t		
<400>	35		
	gcagatcttg aggagacagt gaccagggtt cctggcccc amnnnnnnnn mnnnnnnnn	60	
	mnnnnnnnn nggaggcgca gtaatacact gcggtatctt cagcagcgag	110	
<210>	36		
<211>	113		
<212>	DNA		
<213>	人工		
<220>			
<223>	引物		
<220>			
<221>	misc_feature		
<222>	(43)..(44)		
<223>	n是a, c, g或t		
<220>			
<221>	misc_feature		
<222>	(46)..(47)		
<223>	n是a, c, g或t		
<220>			
<221>	misc_feature		
<222>	(49)..(50)		
<223>	n是a, c, g或t		
<220>			
<221>	misc_feature		
<222>	(52)..(53)		
<223>	n是a, c, g或t		

[0015]

<220>			
<221>	misc feature		
<222>	(55)..(56)		
<223>	n是a, c, g或t		
<220>			
<221>	misc feature		
<222>	(58)..(59)		
<223>	n是a, c, g或t		
<220>			
<221>	misc feature		
<222>	(61)..(62)		
<223>	n是a, c, g或t		
<220>			
<221>	misc feature		
<222>	(64)..(65)		
<223>	n是a, c, g或t		
<220>			
<221>	misc feature		
<222>	(67)..(68)		
<223>	n是a, c, g或t		
<220>			
<221>	misc feature		
<222>	(70)..(71)		
<223>	n是a, c, g或t		
<220>			
<221>	misc feature		
<222>	(73)..(74)		
<223>	n是a, c, g或t		
<400>	36		
	gcagatcttg aggagacagt gaccagggtt ccctggccc amnnnnnnnnn mnnnnnnnnn	60	
	mnnnnnnnnn mnnnggaggc gcagtaatac actgcggtat cttcagcaag cag	113	
<210>	37		
<211>	H16		
<212>	DNA		
<213>	人工		
<220>			
<223>	引物		
<220>			
<221>	misc feature		
<222>	(43)..(44)		
<223>	n是a, c, g或t		
<220>			
<221>	misc feature		
<222>	(46)..(47)		
<223>	n是a, c, g或t		
<220>			
<221>	misc feature		
<222>	(49)..(50)		
<223>	n是a, c, g或t		
<220>			
<221>	misc feature		
<222>	(52)..(53)		
<223>	n是a, c, g或t		
<220>			
<221>	misc feature		
<222>	(55)..(56)		
<223>	n是a, c, g或t		

[0016]

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (58)..(59)
 <223> n是a, c, g或t

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (61)..(62)
 <223> n是a, c, g或t

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (64)..(65)
 <223> n是a, c, g或t

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (67)..(68)
 <223> n是a, c, g或t

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (70)..(71)
 <223> n是a, c, g或t

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (73)..(74)
 <223> n是a, c, g或t

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (76)..(77)
 <223> n是a, c, g或t

 <400> 37
 gcagatcttg aggagacagt gaccagggtt ccttggecc amnnnnnnnn mnnnnnnnnn 60

 nnnnnnnnnn nnnnnnngga ggcgagtaa tacactgcgg tatctcagc acgcag 116

 <210> 38
 <211> 119
 <212> DNA
 <213> 人工

 <220>
 <223> 引物

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (43)..(44)
 <223> n是a, c, g或t

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (46)..(47)
 <223> n是a, c, g或t

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (49)..(50)
 <223> n是a, c, g或t

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (52)..(53)
 <223> n是a, c, g或t

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (55)..(56)
 <223> n是a, c, g或t

[0017]

<220>			
<221>	misc_feature		
<222>	(58)..(59)		
<223>	n是a, c, g或t		
<220>			
<221>	misc_feature		
<222>	(61)..(62)		
<223>	n是a, c, g或t		
<220>			
<221>	misc_feature		
<222>	(64)..(65)		
<223>	n是a, c, g或t		
<220>			
<221>	misc_feature		
<222>	(67)..(68)		
<223>	n是a, c, g或t		
<220>			
<221>	misc_feature		
<222>	(70)..(71)		
<223>	n是a, c, g或t		
<220>			
<221>	misc_feature		
<222>	(73)..(74)		
<223>	n是a, c, g或t		
<220>			
<221>	misc_feature		
<222>	(76)..(77)		
<223>	n是a, c, g或t		
<220>			
<221>	misc_feature		
<222>	(79)..(80)		
<223>	n是a, c, g或t		
<400>	38		
	gcagatcttg aggagacagt gaccagggtt ccctggcccc amnnnnnnnn mnnnnnnnnm	60	
	mnnnnnnnnn mnnnnnnnnn ggagcgcag taatacactg cggtatcttc agcaecgag	119	
<210>	39		
<211>	63		
<212>	DNA		
<213>	人工		
<220>			
<223>	引物		
<220>			
<221>	misc_feature		
<222>	(25)..(30)		
<223>	n是a, c, g或t		
<220>			
<221>	misc_feature		
<222>	(34)..(36)		
<223>	n是a, c, g或t		
<400>	39		
	ctgacgcacc cagccatag catannnnn aaannnaaag ccaactgcag cacagcttaa	60	
	gcg	63	
<210>	40		
<211>	21		
<212>	DNA		
<213>	人工		

[0018]

<220>		
<223>	引物	
<400>	40	
	tatgctatgg gctgggtgcg t	21
<210>	41	
<211>	48	
<212>	DNA	
<213>	人工	
<220>		
<223>	引物	
<220>		
<221>	misc_feature	
<222>	(28)..(30)	
<223>	n是a, c, g或t	
<400>	41	
	gctatcatcg taccaagttg aaccgccnm gccggaatc aatgagac	48
<210>	42	
<211>	27	
<212>	DNA	
<213>	人工	
<220>		
<223>	引物	
<400>	42	
	ggcggttcaa cttggtacga tgatagc	27
<210>	43	
<211>	69	
<212>	DNA	
<213>	人工	
<220>		
<223>	引物	
<220>		
<221>	misc_feature	
<222>	(25)..(27)	
<223>	n是a, c, g或t	
<220>		
<221>	misc_feature	
<222>	(31)..(33)	
<223>	n是a, c, g或t	
<220>		
<221>	misc_feature	
<222>	(37)..(39)	
<223>	n是a, c, g或t	
<400>	43	
	tccttgccc cagtagtcag gaccnnagt nncggmna tgtctggcgc agtaatacac	60
	tgggtatc	69
<210>	44	
<211>	53	
<212>	DNA	
<213>	人工	
<220>		
<223>	引物	

[0019]

<400> 44		
gcggatcctg aggagacagt gaccagggtt ccctggcccc agtagtcagg agc		53
<210> 45		
<211> 60		
<212> DNA		
<213> 人工		
<220>		
<223> 引物		
<220>		
<221> misc_feature		
<222> (22)..(27)		
<223> n是a, c, g或t		
<220>		
<221> misc_feature		
<222> (31)..(33)		
<223> n是a, c, g或t		
<400> 45		
acgcacccaa gacatagcat amnnnnnaaa nnnaaagcca cttgcagcac agettaagcg		60
<210> 46		
<211> 21		
<212> DNA		
<213> 人工		
<220>		
<223> 引物		
<400> 46		
tatgctatgt cttgggtgcg t		21
<210> 47		
<211> 51		
<212> DNA		
<213> 人工		
<220>		
<223> 引物		
<220>		
<221> misc_feature		
<222> (31)..(33)		
<223> n是a, c, g或t		
<400> 47		
aacgctatca gcgtaafaag ttgaaccgcc nnngecggaa atagetgaga c		51
<210> 48		
<211> 30		
<212> DNA		
<213> 人工		
<220>		
<223> 引物		
<400> 48		
ggcggttcaa cttattacgc tgatagcgtt		30
<210> 49		
<211> 89		
<212> PRT		
<213> MG1X8		

[0020]

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (30)..(30)
 <223> Xaa可以是任何天然发生的氨基酸

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (45)..(45)
 <223> Xaa可以是任何天然发生的氨基酸

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (78)..(78)
 <223> Xaa可以是任何天然发生的氨基酸

 <400> 49
 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 Xaa Trp Val
 20 25 30

 Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Val Trp Val Ser Xaa Arg Phe Thr
 35 40 45

 Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Phe Leu Gln Met Asn Ser
 50 55 60

 Leu Arg Asp Glu Asp Thr Ser Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Xaa Trp Gly
 65 70 75 80

 Gln Gly Ala Leu Val Thr Val Ser Ser
 85

 <210> 50
 <211> 89
 <212> PRT
 <213> MG2X1

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (30)..(30)
 <223> Xaa可以是任何天然发生的氨基酸

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (45)..(45)
 <223> Xaa可以是任何天然发生的氨基酸

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (78)..(78)
 <223> Xaa可以是任何天然发生的氨基酸

 <400> 50
 Glu 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 Xaa Trp Val
 20 25 30

 Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser Xaa Arg Phe Thr
 35 40 45

[0021]

Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser
50 55 60

Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Ser Xaa Trp Gly
65 70 75 80

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
85

<210> 51
<211> 89
<212> PRT
<213> MG2X1-34

<220>
<221> misc_feature
<222> (30)..(30)
<223> Xaa可以是任何天然发生的氨基酸

<220>
<221> misc_feature
<222> (45)..(45)
<223> Xaa可以是任何天然发生的氨基酸

<220>
<221> misc_feature
<222> (78)..(78)
<223> Xaa可以是任何天然发生的氨基酸

<400> 51

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Xaa Trp Val
20 25 30

Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala Xaa Arg Phe Thr
35 40 45

Ile Ser Arg Asp Asn Ser Arg Asn Thr Val Phe Leu Gln Met Thr Ser
50 55 60

Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Gly Arg Xaa Trp Gly
65 70 75 80

Gln Gly Ile Leu Val Thr Val Ser Ser
85

<210> 52
<211> 89
<212> PRT
<213> MG2X2-12

<220>
<221> misc_feature
<222> (30)..(30)
<223> Xaa可以是任何天然发生的氨基酸

<220>
<221> misc_feature
<222> (45)..(45)

[0022]

<223> Xaa可以是任何天然发生的氨基酸
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (78)..(78)
 <223> Xaa可以是任何天然发生的氨基酸
 <400> 52
 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Ile Ser Cys Glu Ala Ser Gly Tyr Ala Phe Xaa Trp Val
 20 25 30
 Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met Gly Xaa Arg Val Thr
 35 40 45
 Leu Thr Arg Asp Thr Ser Thr Arg Thr Val Tyr Met Glu Leu Lys Asn
 50 55 60
 Leu Arg Ser Ala Asp Thr Gly Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Xaa Trp Gly
 65 70 75 80
 Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 85
 <210> 53
 <211> 89
 <212> PRT
 <213> MG2X2-13
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (30)..(30)
 <223> Xaa可以是任何天然发生的氨基酸
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (45)..(45)
 <223> Xaa可以是任何天然发生的氨基酸
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (78)..(78)
 <223> Xaa可以是任何天然发生的氨基酸
 <400> 53
 Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Lys
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Val Gly Ser Gly Phe Ser Phe Xaa Trp Val
 20 25 30
 Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu Ala Xaa Arg Phe Thr
 35 40 45
 Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Thr Met Val Asn Leu Gln Met Asn Ser
 50 55 60
 Leu Arg Pro Asp Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys Ala Arg Xaa Trp Gly
 65 70 75 80

[0023]

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
85

<210> 54
<211> 89
<212> PRT
<213> MG3X1

<220>
<221> misc_feature
<222> (30)..(30)
<223> Xaa可以是任何天然发生的氨基酸

<220>
<221> misc_feature
<222> (45)..(45)
<223> Xaa可以是任何天然发生的氨基酸

<220>
<221> misc_feature
<222> (78)..(78)
<223> Xaa可以是任何天然发生的氨基酸

<400> 54

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Val Ala Ser Gly Phe Asn Phe Xaa Trp Leu
20 25 30

Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala Xaa Arg Phe Thr
35 40 45

Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Glu Met Asn Ser
50 55 60

Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Lys Xaa Cys Gly
65 70 75 80

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
85

<210> 55
<211> 89
<212> PRT
<213> MG3X10

<220>
<221> misc_feature
<222> (30)..(30)
<223> Xaa可以是任何天然发生的氨基酸

<220>
<221> misc_feature
<222> (45)..(45)
<223> Xaa可以是任何天然发生的氨基酸

<220>
<221> misc_feature
<222> (78)..(78)
<223> Xaa可以是任何天然发生的氨基酸

<400> 55

[0024]

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

Ser Leu Arg Val Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Xaa Trp Val
20 25 30

Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Gly Xaa Arg Phe Thr
35 40 45

Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Met Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser
50 55 60

Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Thr Thr Xaa Tyr Gly
65 70 75 80

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
85

<210> 56
<211> 89
<212> PRT
<213> MG4X1-8

<220>
<221> misc_feature
<222> (30)..(30)
<223> Xaa可以是任何天然发生的氨基酸

<220>
<221> misc_feature
<222> (45)..(45)
<223> Xaa可以是任何天然发生的氨基酸

<220>
<221> misc_feature
<222> (78)..(78)
<223> Xaa可以是任何天然发生的氨基酸

<400> 56

Glu 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 Ser Phe Xaa Trp Val
20 25 30

Arg Gln Gly Pro Gly Glu Gly Leu Val Trp Leu Ser Xaa Arg Phe Thr
35 40 45

Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Val Tyr Leu Glu Met Asn Ser
50 55 60

Val Arg Val Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Val Ser Xaa Trp Gly
65 70 75 80

Gln Gly Ala Leu Val Thr Val Ser Ser
85

<210> 57
<211> 89
<212> PRT
<213> MG4X1-33

[0025]

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (30)..(30)
 <223> Xaa可以是任何天然发生的氨基酸

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (45)..(45)
 <223> Xaa可以是任何天然发生的氨基酸

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (78)..(78)
 <223> Xaa可以是任何天然发生的氨基酸

<400> 57
 Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Val Gly Ser Glu Arg Ser Phe Xaa Trp Val
 20 25 30
 Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala Xaa Arg Phe Thr
 35 40 45
 Val Ser Arg Asp Asn Val Gln Lys Ser Leu Asp Leu Gln Met Asp Ser
 50 55 60
 Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys Ala Arg Xaa Trp Gly
 65 70 75 80
 Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 85

<210> 58
 <211> 89
 <212> PRT
 <213> MG4X1-35

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (30)..(30)
 <223> Xaa可以是任何天然发生的氨基酸

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (45)..(45)
 <223> Xaa可以是任何天然发生的氨基酸

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (78)..(78)
 <223> Xaa可以是任何天然发生的氨基酸

<400> 58
 Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Val Gly Ser Glu Arg Ser Phe Xaa Trp Val
 20 25 30
 Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala Xaa Arg Phe Thr

[0026]

```

          35              40              45
Val Ser Arg Asp Asn Val Gln Lys Ser Leu Asp Leu Gln Met Asp Ser
  50              55              60

Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys Ala Arg Xaa Trp Gly
  65              70              75              80

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
      85

<210> 59
<211> 89
<212> PRT
<213> MG4X3-27

<220>
<221> misc_feature
<222> (30)..(30)
<223> Xaa可以是任何天然发生的氨基酸

<220>
<221> misc_feature
<222> (45)..(45)
<223> Xaa可以是任何天然发生的氨基酸

<220>
<221> misc_feature
<222> (78)..(78)
<223> Xaa可以是任何天然发生的氨基酸

<400> 59
Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Ala Gln Ser Gly Gly
  1              5              10              15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Xaa Trp Val
      20              25              30

Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Ser Xaa Arg Phe Thr
      35              40              45

Ile Ser Arg Asp Ile Ala Lys Asn Ser Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser
  50              55              60

Leu Arg Asp Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Lys Xaa Trp Gly
  65              70              75              80

Gln Gly Ala Leu Val Thr Val Ser Ser
      85

<210> 60
<211> 89
<212> PRT
<213> MG4X4-2

<220>
<221> misc_feature
<222> (30)..(30)
<223> Xaa可以是任何天然发生的氨基酸

<220>
<221> misc_feature

```

[0027]

<222> (45)..(45)
 <223> Xaa可以是任何天然发生的氨基酸

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (78)..(78)
 <223> Xaa可以是任何天然发生的氨基酸

 <400> 60

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

 Ser Leu Arg Ile Ser Cys Arg Gly Ser Gly Tyr Arg Phe Xaa Trp Ala
 20 25 30

 Arg Asp Lys Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Gly Xaa His Val Thr
 35 40 45

 Ile Ser Ser Asp Arg Ser Val Ser Val Ala Tyr Leu Gln Trp Asp Ser
 50 55 60

 Leu Lys Ala Ser Asp Asn Gly Ile Tyr Tyr Cys Ala Leu Xaa Trp Gly
 65 70 75 80

 Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 85

 <210> 61
 <211> 89
 <212> PRT
 <213> MG4X4-4

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (30)..(30)
 <223> Xaa可以是任何天然发生的氨基酸

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (45)..(45)
 <223> Xaa可以是任何天然发生的氨基酸

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (78)..(78)
 <223> Xaa可以是任何天然发生的氨基酸

 <400> 61

 Glu 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 Val Pro Ser Gly Phe Thr Phe Xaa Trp Val
 20 25 30

 Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Val Trp Val Ser Xaa Arg Phe Thr
 35 40 45

 Ile Ser Arg Asp Asn Ala Glu Asp Thr Leu Phe Leu Gln Met Asn Ser
 50 55 60

 Leu Arg Val Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Val Arg Xaa Trp Gly
 65 70 75 80

[0028]

Gln Gly Val Leu Val Thr Val Ser Ser
85

<210> 62
<211> 89
<212> PRT
<213> MG4X4-25

<220>
<221> misc_feature
<222> (30)..(30)
<223> Xaa可以是任何天然发生的氨基酸

<220>
<221> misc_feature
<222> (45)..(45)
<223> Xaa可以是任何天然发生的氨基酸

<220>
<221> misc_feature
<222> (78)..(78)
<223> Xaa可以是任何天然发生的氨基酸

<400> 62

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 Ile Ala Ser Gly Phe Ser Leu Xaa Trp Val
20 25 30

Arg Arg Ser Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala Xaa Arg Phe Thr
35 40 45

Val Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Phe Leu Gln Met Asn Asn
50 55 60

Val Arg Pro Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Phe Cys Ala Arg Xaa Trp Gly
65 70 75 80

Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
85

<210> 63
<211> 89
<212> PRT
<213> MG4X4-44

<220>
<221> misc_feature
<222> (30)..(30)
<223> Xaa可以是任何天然发生的氨基酸

<220>
<221> misc_feature
<222> (45)..(45)
<223> Xaa可以是任何天然发生的氨基酸

<220>
<221> misc_feature
<222> (78)..(78)
<223> Xaa可以是任何天然发生的氨基酸

<400> 63

[0029]

Glu 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 Xaa Trp Val
 20 25 30
 Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala Xaa Arg Phe Thr
 35 40 45
 Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser
 50 55 60
 Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys Ala Arg Xaa Trp Gly
 65 70 75 80
 Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 85

<210> 64
 <211> 89
 <212> PRT
 <213> MG4X5-30

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (30)..(30)
 <223> Xaa可以是任何天然发生的氨基酸

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (45)..(45)
 <223> Xaa可以是任何天然发生的氨基酸

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (78)..(78)
 <223> Xaa可以是任何天然发生的氨基酸

<400> 64

Glu Val Gln Leu Leu 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 Xaa Trp Val
 20 25 30
 Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu Ser Xaa Arg Phe Thr
 35 40 45
 Ile Ser Arg Asn Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser
 50 55 60
 Leu Arg Val Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Xaa Trp Gly
 65 70 75 80
 Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 85

<210> 65
 <211> 89
 <212> PRT

[0030]

<213> MG4X6-27

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (30)..(30)
 <223> Xaa可以是任何天然发生的氨基酸

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (45)..(45)
 <223> Xaa可以是任何天然发生的氨基酸

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (78)..(78)
 <223> Xaa可以是任何天然发生的氨基酸

 <400> 65

 Glu Val Gln Leu Leu 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 Xaa Trp Val
 20 25 30

 Arg Gln Gly Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala Xaa Arg Phe Thr
 35 40 45

 Ile Ser Arg Asp Asn Ala Glu Asn Ser Leu Tyr Leu Gln Val Asn Ser
 50 55 60

 Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys Ala Lys Xaa Trp Gly
 65 70 75 80

 Gln Gly Ala Leu Val Thr Val Ser Ser
 85

 <210> 66
 <211> 89
 <212> PRT
 <213> MG4X6-48

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (30)..(30)
 <223> Xaa可以是任何天然发生的氨基酸

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (45)..(45)
 <223> Xaa可以是任何天然发生的氨基酸

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (78)..(78)
 <223> Xaa可以是任何天然发生的氨基酸

 <400> 66

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

 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Glu Val Phe Gly Phe Thr Leu Xaa Trp Val
 20 25 30

[0031]

Arg Gln Ala Pro Gly Arg Arg Leu Glu Trp Val Ala Xaa Arg Phe Thr
35 40 45

Ile Ser Arg Asp Ile Ala Thr Asn Arg Leu Tyr Leu Gln Met Arg Ser
50 55 60

Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys Ala Arg Xaa Trp Gly
65 70 75 80

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
85

<210> 67
<211> 89
<212> PRT
<213> MG4X7-15

<220>
<221> misc_feature
<222> (30)..(30)
<223> Xaa可以是任何天然发生的氨基酸

<220>
<221> misc_feature
<222> (45)..(45)
<223> Xaa可以是任何天然发生的氨基酸

<220>
<221> misc_feature
<222> (78)..(78)
<223> Xaa可以是任何天然发生的氨基酸

<400> 67

Glu Val Gln Leu Leu 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 Ser Phe Xaa Trp Val
20 25 30

Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser Xaa Arg Phe Thr
35 40 45

Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser
50 55 60

Leu Arg Val Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Val Xaa Trp Gly
65 70 75 80

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
85

<210> 68
<211> 89
<212> PRT
<213> MG4X8-24

<220>
<221> misc_feature
<222> (30)..(30)
<223> Xaa可以是任何天然发生的氨基酸

<220>

[0032]

<221> misc_feature
 <222> (45)..(45)
 <223> Xaa可以是任何天然发生的氨基酸

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (78)..(78)
 <223> Xaa可以是任何天然发生的氨基酸

 <400> 68
 Glu Val Gln Leu Leu 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 Xaa Trp Val
 20 25 30
 Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser Xaa Arg Phe Thr
 35 40 45
 Ile Ser Arg Asp Asn Ser Asn Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser
 50 55 60
 Leu Arg Ala Asp Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys Ala Lys Xaa Trp Gly
 65 70 75 80
 Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 85

 <210> 69
 <211> 89
 <212> PRT
 <213> MG0.5X-1

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (30)..(30)
 <223> Xaa可以是任何天然发生的氨基酸

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (45)..(45)
 <223> Xaa可以是任何天然发生的氨基酸

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (78)..(78)
 <223> Xaa可以是任何天然发生的氨基酸

 <400> 69
 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 Xaa Trp Val
 20 25 30
 Arg Gln Val Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala Xaa Arg Phe Thr
 35 40 45
 Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser
 50 55 60
 Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Asn Xaa Trp Gly

[0033]

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (45)..(45)
 <223> Xaa可以是任何天然发生的氨基酸

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (78)..(78)
 <223> Xaa可以是任何天然发生的氨基酸

<400> 71

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Met Leu Val Lys Pro Gly Glu
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Val Gly Ser Gly Leu Ile Phe Xaa Trp Val
 20 25 30
 Arg His Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Gly Xaa Arg Leu Ser
 35 40 45
 Ile Ser Arg Asp Asp Ser Met Asn Thr Val Tyr Leu Asp Ile Tyr Asn
 50 55 60
 Leu Lys Ile Asp Asp Thr Gly Val Tyr Tyr Cys Thr Phe Xaa Trp Gly
 65 70 75 80
 Gln Gly Thr Pro Val Thr Val Ser Ser
 85

<210> 72
 <211> 89
 <212> PRT
 <213> MG0.5X-14

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (30)..(30)
 <223> Xaa可以是任何天然发生的氨基酸

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (45)..(45)
 <223> Xaa可以是任何天然发生的氨基酸

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (78)..(78)
 <223> Xaa可以是任何天然发生的氨基酸

<400> 72

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val His Ala Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Val Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Xaa Trp Val
 20 25 30
 Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala Xaa Arg Phe Thr
 35 40 45
 Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Ser Met Tyr Leu Gln Met Asn Ser
 50 55 60

[0035]

Leu Arg Val Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Xaa Trp Gly
65 70 75 80

Gln Gly Thr Val Val Thr Val Ser Ser
85

<210> 73
<211> 89
<212> PRT
<213> MG0.75X-4

<220>
<221> misc_feature
<222> (30)..(30)
<223> Xaa可以是任何天然发生的氨基酸

<220>
<221> misc_feature
<222> (45)..(45)
<223> Xaa可以是任何天然发生的氨基酸

<220>
<221> misc_feature
<222> (78)..(78)
<223> Xaa可以是任何天然发生的氨基酸

<400> 73

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Xaa Trp Leu
20 25 30

Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Pro Glu Tyr Val Ala Xaa Arg Phe Ile
35 40 45

Ile Ser Arg Asp Asp Ser Asn Asp Met Leu Tyr Leu Glu Met Ile Ser
50 55 60

Leu Lys Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ser Asp Xaa Gly Ser
65 70 75 80

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
85

<210> 74
<211> 89
<212> PRT
<213> MG2X-5

<220>
<221> misc_feature
<222> (30)..(30)
<223> Xaa可以是任何天然发生的氨基酸

<220>
<221> misc_feature
<222> (45)..(45)
<223> Xaa可以是任何天然发生的氨基酸

<220>
<221> misc_feature
<222> (78)..(78)
<223> Xaa可以是任何天然发生的氨基酸

[0036]

<400> 74

Glu Val Gln Leu Leu 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 Xaa Trp Val
 20 25 30

Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser Xaa Arg Phe Thr
 35 40 45

Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu His Met Asn Ser
 50 55 60

Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Val Lys Xaa Trp Gly
 65 70 75 80

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 85

<210> 75

<211> 89

<212> PRT

<213> MG2X-15

<220>

<221> misc_feature

<222> (30)..(30)

<223> Xaa可以是任何天然发生的氨基酸

<220>

<221> misc_feature

<222> (45)..(45)

<223> Xaa可以是任何天然发生的氨基酸

<220>

<221> misc_feature

<222> (78)..(78)

<223> Xaa可以是任何天然发生的氨基酸

<400> 75

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 Xaa Trp Val
 20 25 30

Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser Xaa Arg Phe Thr
 35 40 45

Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser
 50 55 60

Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Lys Xaa Trp Gly
 65 70 75 80

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 85

<210> 76

[0037]

<211> 89
 <212> PRT
 <213> MG4X-5

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (30)..(30)
 <223> Xaa可以是任何天然发生的氨基酸

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (45)..(45)
 <223> Xaa可以是任何天然发生的氨基酸

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (78)..(78)
 <223> Xaa可以是任何天然发生的氨基酸

<400> 76

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 Glu Ala Ser Gly Leu His Phe Xaa Trp Val
 20 25 30

Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala Xaa Arg Phe Thr
 35 40 45

Val Ser Arg Asp Asn Ser Arg Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Lys Ser
 50 55 60

Leu Ser Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Lys Xaa Trp Gly
 65 70 75 80

Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
 85

<210> 77
 <211> 89
 <212> PRT
 <213> MG1-4

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (30)..(30)
 <223> Xaa可以是任何天然发生的氨基酸

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (45)..(45)
 <223> Xaa可以是任何天然发生的氨基酸

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (78)..(78)
 <223> Xaa可以是任何天然发生的氨基酸

<400> 77

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

Ser Leu Arg Leu Ala Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Xaa Trp Val
 20 25 30

[0038]

Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Ser Xaa Arg Phe Thr
35 40 45

Ile Ser Arg Asp Asn Ser Gln Asn Ser Leu Phe Leu Gln Met Asn Ser
50 55 60

Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Thr Xaa Trp Gly
65 70 75 80

Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
85

<210> 78
<211> 88
<212> PRT
<213> MG1-6

<220>
<221> misc_feature
<222> (30)..(30)
<223> Xaa可以是任何天然发生的氨基酸

<220>
<221> misc_feature
<222> (45)..(45)
<223> Xaa可以是任何天然发生的氨基酸

<220>
<221> misc_feature
<222> (77)..(77)
<223> Xaa可以是任何天然发生的氨基酸

<400> 78

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

Ser Leu Arg Lys Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Ser Phe Xaa Trp Val
20 25 30

Arg Gln Met Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met Gly Xaa His Val Thr
35 40 45

Ile Ser Val Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr Leu Gln Trp Ser Ser
50 55 60

Leu Lys Ala Ser Asp Ser Ala Met Tyr Tyr Phe Leu Xaa Trp Gly Gln
65 70 75 80

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
85

<210> 79
<211> 89
<212> PRT
<213> MG1-7

<220>
<221> misc_feature
<222> (30)..(30)
<223> Xaa可以是任何天然发生的氨基酸

[0039]

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (45)..(45)
 <223> Xaa可以是任何天然发生的氨基酸

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (78)..(78)
 <223> Xaa可以是任何天然发生的氨基酸

<400> 79
 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 Xaa Trp Val
 20 25 30
 Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala Xaa Arg Phe Thr
 35 40 45
 Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser
 50 55 60
 Leu Arg Asp Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Xaa Trp Gly
 65 70 75 80
 Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 85

<210> 80
 <211> 89
 <212> PRT
 <213> MGI-8

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (30)..(30)
 <223> Xaa可以是任何天然发生的氨基酸

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (45)..(45)
 <223> Xaa可以是任何天然发生的氨基酸

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (78)..(78)
 <223> Xaa可以是任何天然发生的氨基酸

<400> 80
 Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Xaa Trp Val
 20 25 30
 Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met Gly Xaa Arg Val Thr
 35 40 45
 Met Thr Arg Asp Thr Ser Ser Thr Thr Ala Tyr Met Glu Leu Asn Arg
 50 55 60

[0040]

Leu Thr Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys Ala Arg Xaa Trp Gly
65 70 75 80

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
85

<210> 81
<211> 89
<212> PRT
<213> MGI-9

<220>
<221> misc_feature
<222> (30)..(30)
<223> Xaa可以是任何天然发生的氨基酸

<220>
<221> misc_feature
<222> (45)..(45)
<223> Xaa可以是任何天然发生的氨基酸

<220>
<221> misc_feature
<222> (78)..(78)
<223> Xaa可以是任何天然发生的氨基酸

<400> 81

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

Ser Leu Arg Leu Ala Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Xaa Trp Val
20 25 30

Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Ser Xaa Arg Phe Thr
35 40 45

Ile Ser Arg Asp Asn Ala Gln Asn Ser Leu Phe Leu Gln Met Asn Ser
50 55 60

Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Thr Xaa Trp Gly
65 70 75 80

Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
85

<210> 82
<211> 89
<212> PRT
<213> MGI-10

<220>
<221> misc_feature
<222> (30)..(30)
<223> Xaa可以是任何天然发生的氨基酸

<220>
<221> misc_feature
<222> (45)..(45)
<223> Xaa可以是任何天然发生的氨基酸

<220>
<221> misc_feature
<222> (78)..(78)

[0041]

<223> Xaa可以是任何天然发生的氨基酸
 <400> 82
 Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Glu
 1 5 10 15
 Ser Leu Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Ser Phe Xaa Trp Val
 20 25 30
 Arg Gln Met Pro Gly Arg Gly Leu Glu Trp Leu Gly Xaa Gln Val Thr
 35 40 45
 Met Ser Ala Asn Arg Ser Ile Ser Thr Ala Tyr Leu Gln Trp Ser Ser
 50 55 60
 Leu Lys Ala Ser Asp Thr Gly Ile Tyr Tyr Cys Ala Thr Xaa Trp Gly
 65 70 75 80
 Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 85
 <210> 83
 <211> 89
 <212> PRT
 <213> MG5-I
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (30)..(30)
 <223> Xaa可以是任何天然发生的氨基酸
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (45)..(45)
 <223> Xaa可以是任何天然发生的氨基酸
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (78)..(78)
 <223> Xaa可以是任何天然发生的氨基酸
 <400> 83
 Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Ile Gln Pro Gly Glu
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Glu Ala Phe Gly Phe Thr Val Xaa Trp Val
 20 25 30
 Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser Xaa Arg Phe Thr
 35 40 45
 Ile Ser Arg Asp Ser Thr Gln Asn Thr Val His Leu Gln Met Asn Ser
 50 55 60
 Leu Thr Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Xaa Trp Gly
 65 70 75 80
 Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 85

[0042]

<210> 84
 <211> 89
 <212> PRT
 <213> MG5-2

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (30)..(30)
 <223> Xaa可以是任何天然发生的氨基酸

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (45)..(45)
 <223> Xaa可以是任何天然发生的氨基酸

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (78)..(78)
 <223> Xaa可以是任何天然发生的氨基酸

 <400> 84

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

 Ser Val Lys Val Ser Cys Thr Ser Ser Gly Gly Ser Phe Xaa Trp Val
 20 25 30

 Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met Gly Xaa Arg Leu Ile
 35 40 45

 Leu Ser Val Asp Glu Pro Thr Arg Thr Val Tyr Met Glu Leu Thr Ser
 50 55 60

 Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys Ala Arg Xaa Trp Gly
 65 70 75 80

 Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 85

 <210> 85
 <211> 89
 <212> PRT
 <213> MG5-4

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (30)..(30)
 <223> Xaa可以是任何天然发生的氨基酸

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (45)..(45)
 <223> Xaa可以是任何天然发生的氨基酸

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (78)..(78)
 <223> Xaa可以是任何天然发生的氨基酸

 <400> 85

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

 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Xaa Trp Val

[0043]

	20	25	30
Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser Xaa Arg Phe Thr	35	40	45
Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asp Ser Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser	50	55	60
Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys Ala Arg Xaa Trp Gly	65	70	75
Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser	85		
<210>	86		
<211>	89		
<212>	PRT		
<213>	MG5-5		
<220>			
<221>	misc_feature		
<222>	(30)..(30)		
<223>	Xaa可以是任何天然发生的氨基酸		
<220>			
<221>	misc_feature		
<222>	(45)..(45)		
<223>	Xaa可以是任何天然发生的氨基酸		
<220>			
<221>	misc_feature		
<222>	(78)..(78)		
<223>	Xaa可以是任何天然发生的氨基酸		
<400>	86		
Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg	1	5	10
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Val Ala Ser Gly Phe Thr Phe Xaa Trp Val	20	25	30
Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser Xaa Arg Phe Thr	35	40	45
Ile Ser Arg Asp Tyr Ser Asn Lys Ile Val His Leu Glu Met Asp Ser	50	55	60
Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys Val Arg Xaa Trp Gly	65	70	75
Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser	85		
<210>	87		
<211>	89		
<212>	PRT		
<213>	MG5-6		
<220>			
<221>	misc_feature		
<222>	(30)..(30)		

[0044]

<223> Xaa可以是任何天然发生的氨基酸
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (45)..(45)
 <223> Xaa可以是任何天然发生的氨基酸
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (78)..(78)
 <223> Xaa可以是任何天然发生的氨基酸
 <400> 87
 Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Xaa Trp Val
 20 25 30
 Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Cys Val Ala Xaa Arg Phe Thr
 35 40 45
 Ile Ser Arg Asp Asp Ser Arg Asp Met Leu Tyr Leu Gln Met Asn Asn
 50 55 60
 Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ser Asp Xaa Ser Ser
 65 70 75 80
 Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 85
 <210> 88
 <211> 89
 <212> PRT
 <213> M65-7
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (30)..(30)
 <223> Xaa可以是任何天然发生的氨基酸
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (45)..(45)
 <223> Xaa可以是任何天然发生的氨基酸
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (78)..(78)
 <223> Xaa可以是任何天然发生的氨基酸
 <400> 88
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Arg
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Thr Thr Ser Gly Phe Ser Phe Xaa Trp Val
 20 25 30
 Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser Xaa Arg Phe Thr
 35 40 45
 Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Ser Ile Val Tyr Leu Gln Met Ser Ser
 50 55 60

[0045]

Leu Gln Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ser Arg Xaa Trp Gly
65 70 75 80

Arg Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
85

<210> 89
<211> 87
<212> PRT
<213> MG5-9

<220>
<221> misc_feature
<222> (30)..(30)
<223> Xaa可以是任何天然发生的氨基酸

<220>
<221> misc_feature
<222> (45)..(45)
<223> Xaa可以是任何天然发生的氨基酸

<220>
<221> misc_feature
<222> (76)..(76)
<223> Xaa可以是任何天然发生的氨基酸

<400> 89

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ser Ala Ser Gly Phe Ala Phe Xaa Trp Val
20 25 30

Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser Xaa Thr Ile Ser
35 40 45

Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg
50 55 60

Ala Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys Ala Arg Xaa Trp Gly Gln Gly
65 70 75 80

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
85

<210> 90
<211> 89
<212> PRT
<213> MG10-1

<220>
<221> misc_feature
<222> (30)..(30)
<223> Xaa可以是任何天然发生的氨基酸

<220>
<221> misc_feature
<222> (45)..(45)
<223> Xaa可以是任何天然发生的氨基酸

<220>
<221> misc_feature

[0046]

<222> (78)..(78)
 <223> Xaa可以是任何天然发生的氨基酸

 <400> 90
 Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Asn Val Val Gln Pro Gly Thr
 1 5 10 15

 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Xaa Trp Val
 20 25 30

 Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala Xaa Arg Phe Thr
 35 40 45

 Ile Ser Arg Asp Asn Ser Arg Asn Thr Val Phe Leu Gln Met Thr Ser
 50 55 60

 Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Gly Arg Xaa Trp Gly
 65 70 75 80

 Gln Gly Ile Leu Val Thr Val Ser Ser
 85

 <210> 91
 <211> 89
 <212> PRT
 <213> MG10-2

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (30)..(30)
 <223> Xaa可以是任何天然发生的氨基酸

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (45)..(45)
 <223> Xaa可以是任何天然发生的氨基酸

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (78)..(78)
 <223> Xaa可以是任何天然发生的氨基酸

 <400> 91
 Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15

 Ser Leu Arg Leu Thr Cys Val Gly Tyr Gly Phe Thr Phe Xaa Trp Val
 20 25 30

 Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Pro Glu Trp Val Ala Xaa Arg Phe Thr
 35 40 45

 Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asp Ser Leu Tyr Leu Gln Met Asp Ser
 50 55 60

 Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Xaa Ala Pro
 65 70 75 80

 Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 85

[0047]

<210> 92
 <211> 89
 <212> PRT
 <213> MG10-4

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (30)..(30)
 <223> Xaa可以是任何天然发生的氨基酸

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (45)..(45)
 <223> Xaa可以是任何天然发生的氨基酸

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (78)..(78)
 <223> Xaa可以是任何天然发生的氨基酸

<400> 92

Glu Val Gln Leu Leu 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 Ile Leu Xaa Trp Val
 20 25 30

Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Val Trp Val Ser Xaa Gln Phe Thr
 35 40 45

Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser
 50 55 60

Leu Arg Val Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Xaa Trp Gly
 65 70 75 80

Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
 85

<210> 93
 <211> 89
 <212> PRT
 <213> MG10-5

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (30)..(30)
 <223> Xaa可以是任何天然发生的氨基酸

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (45)..(45)
 <223> Xaa可以是任何天然发生的氨基酸

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (78)..(78)
 <223> Xaa可以是任何天然发生的氨基酸

<400> 93

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

[0048]

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Val Ser Gly Phe Ser Leu Xaa Trp Val
20 25 30

Arg Gln Ala Pro Asp Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala Xaa Arg Phe Thr
35 40 45

Val Ser Arg Asp Ile Ser Lys Asn Thr Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser
50 55 60

Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys Ala Arg Xaa Trp Gly
65 70 75 80

Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
85

<210> 94

<211> 89

<212> PRT

<213> MG10-6

<220>

<221> misc_feature

<222> (30)..(30)

<223> Xaa可以是任何天然发生的氨基酸

<220>

<221> misc_feature

<222> (45)..(45)

<223> Xaa可以是任何天然发生的氨基酸

<220>

<221> misc_feature

<222> (78)..(78)

<223> Xaa可以是任何天然发生的氨基酸

<400> 94

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

Ser Arg Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Xaa Trp Phe
20 25 30

Arg Gln Gly Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala Xaa Arg Phe Thr
35 40 45

Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Ser Leu Ser Leu Gln Met Asp Ser
50 55 60

Leu Arg Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Val Arg Xaa Trp Gly
65 70 75 80

Gln Gly Thr Val Val Thr Val Ser Ser
85

<210> 95

<211> 89

<212> PRT

<213> MG10-8

<220>

<221> misc_feature

[0049]

<222> (30)..(30)
 <223> Xaa可以是任何天然发生的氨基酸

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (45)..(45)
 <223> Xaa可以是任何天然发生的氨基酸

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (78)..(78)
 <223> Xaa可以是任何天然发生的氨基酸

 <400> 95

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

 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Val Ala Ser Gly Phe Ala Phe Xaa Trp Val
 20 25 30

 Arg Gln Thr Pro Gly Arg Gly Leu Glu Trp Leu Ala Xaa Arg Phe Thr
 35 40 45

 Ile Ser Arg Asp Asn Ser Asn Asn Thr Val Tyr Leu Glu Met Asn Ser
 50 55 60

 Leu Arg Pro Glu Asp Ser Ala Ile Tyr Tyr Cys Ala Lys Xaa Trp Gly
 65 70 75 80

 Leu Gly Thr Val Val Thr Val Ser Ser
 85

 <210> 96
 <211> 88
 <212> PRT
 <213> MG10-10

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (30)..(30)
 <223> Xaa可以是任何天然发生的氨基酸

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (45)..(45)
 <223> Xaa可以是任何天然发生的氨基酸

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (77)..(77)
 <223> Xaa可以是任何天然发生的氨基酸

 <400> 96

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

 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Xaa Trp Val
 20 25 30

 Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser Xaa Arg Phe Thr
 35 40 45

 Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Ser Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser

[0050]

<221> misc_feature
 <222> (78)..(78)
 <223> Xaa可以是任何天然发生的氨基酸

 <400> 98
 Glu Val Gln Leu Leu Gln Ser Gly Gly Gly Trp Val Lys Pro Gly Gly
 1 5 10 15

 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ile Cys Xaa Trp Val
 20 25 30

 Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Gly Xaa Arg Phe Thr
 35 40 45

 Ile Ser Ile Asp Glu Ser Arg Asn Ala Leu Phe Leu His Met Asn Ser
 50 55 60

 Leu Thr Thr Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ser Thr Xaa Trp Gly
 65 70 75 80

 Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 85

 <210> 99
 <211> 89
 <212> PRT
 <213> MG6

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (30)..(30)
 <223> Xaa可以是任何天然发生的氨基酸

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (45)..(45)
 <223> Xaa可以是任何天然发生的氨基酸

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (78)..(78)
 <223> Xaa可以是任何天然发生的氨基酸

 <400> 99
 Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Val Val Val Gln Pro Gly Arg
 1 5 10 15

 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Xaa Trp Val
 20 25 30

 Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala Xaa Arg Phe Thr
 35 40 45

 Val Ser Arg Asp Thr Ser Thr Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser
 50 55 60

 Leu Arg Val Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Xaa Trp Gly
 65 70 75 80

 Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 85

[0052]

<210> 100
 <211> 89
 <212> PRT
 <213> MG7

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (30)..(30)
 <223> Xaa可以是任何天然发生的氨基酸

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (45)..(45)
 <223> Xaa可以是任何天然发生的氨基酸

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (78)..(78)
 <223> Xaa可以是任何天然发生的氨基酸

<400> 100
 Gln Met Gln Leu Val Gln Ser Glu Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Met Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Xaa Trp Val
 20 25 30
 Arg Gln Ala Thr Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met Gly Xaa Arg Val Thr
 35 40 45
 Met Thr Arg Asn Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser
 50 55 60
 Leu Thr Ser Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Xaa Trp Gly
 65 70 75 80
 Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 85

<210> 101
 <211> 89
 <212> PRT
 <213> MG10

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (30)..(30)
 <223> Xaa可以是任何天然发生的氨基酸

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (45)..(45)
 <223> Xaa可以是任何天然发生的氨基酸

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (78)..(78)
 <223> Xaa可以是任何天然发生的氨基酸

<400> 101
 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Glu
 1 5 10 15

[0053]

Ser Leu Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Ser Phe Xaa Trp Val
 20 25 30

Arg Gln Met Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met Gly Xaa Gln Val Thr
 35 40 45

Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Phe Leu Gln Trp Asn Ser
 50 55 60

Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys Ala Arg Xaa Trp Gly
 65 70 75 80

Leu Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 85

<210> 102
 <211> 89
 <212> PRT
 <213> MG8-21

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (30)..(30)
 <223> Xaa可以是任何天然发生的氨基酸

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (45)..(45)
 <223> Xaa可以是任何天然发生的氨基酸

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (78)..(78)
 <223> Xaa可以是任何天然发生的氨基酸

<400> 102

Glu 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 Xaa Trp Val
 20 25 30

Arg Asn Ala Pro Gly Lys Gly Asn Glu Ile Val Ser Xaa Arg Phe Thr
 35 40 45

Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser
 50 55 60

Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Ser Xaa Trp Gly
 65 70 75 80

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 85

<210> 103
 <211> 89
 <212> PRT
 <213> MG2-12L

<220>

[0054]

<221> misc_feature
 <222> (30)..(30)
 <223> Xaa可以是任何天然发生的氨基酸

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (45)..(45)
 <223> Xaa可以是任何天然发生的氨基酸

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (78)..(78)
 <223> Xaa可以是任何天然发生的氨基酸

<400> 103

Glu 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 Xaa Trp Val
 20 25 30
 Arg Arg Ala Pro Gly Lys Gly Ile Glu Val Val Ser Xaa Arg Phe Thr
 35 40 45
 Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser
 50 55 60
 Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Ser Xaa Trp Gly
 65 70 75 80
 Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 85

<210> 104
 <211> 89
 <212> PRT
 <213> MG2-7I

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (30)..(30)
 <223> Xaa可以是任何天然发生的氨基酸

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (45)..(45)
 <223> Xaa可以是任何天然发生的氨基酸

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (78)..(78)
 <223> Xaa可以是任何天然发生的氨基酸

<400> 104

Glu 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 Xaa Trp Val
 20 25 30
 Arg Ile Ala Pro Gly Lys Gly Pro Glu Pro Val Ser Xaa Arg Phe Thr
 35 40 45

[0055]

Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser
50 55 60

Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Ser Xaa Trp Gly
65 70 75 80

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
85

<210> 105
<211> 89
<212> PRT
<213> MG2-9I

<220>
<221> misc_feature
<222> (30)..(30)
<223> Xaa可以是任何天然发生的氨基酸

<220>
<221> misc_feature
<222> (45)..(45)
<223> Xaa可以是任何天然发生的氨基酸

<220>
<221> misc_fcature
<222> (78)..(78)
<223> Xaa可以是任何天然发生的氨基酸

<400> 105

Glu 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 Xaa Trp Val
20 25 30

Arg Lys Ala Pro Gly Lys Gly Tyr Glu Pro Val Ser Xaa Arg Phe Thr
35 40 45

Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser
50 55 60

Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Ser Xaa Trp Gly
65 70 75 80

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
85

<210> 106
<211> 89
<212> PRT
<213> MG2-10I

<220>
<221> misc_feature
<222> (30)..(30)
<223> Xaa可以是任何天然发生的氨基酸

<220>
<221> misc_feature
<222> (45)..(45)
<223> Xaa可以是任何天然发生的氨基酸

[0056]

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (78)..(78)
 <223> Xaa可以是任何天然发生的氨基酸

 <400> 106
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 I 5 10 15

 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Xaa Trp Val
 20 25 30

 Arg Asn Ala Pro Gly Lys Gly Tyr Glu Ile Val Ser Xaa Arg Phe Thr
 35 40 45

 Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser
 50 55 60

 Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Ser Xaa Trp Gly
 65 70 75 80

 Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 85

<210> 107
 <211> 89
 <212> PRT
 <213> MG2-11I

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (30)..(30)
 <223> Xaa可以是任何天然发生的氨基酸

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (45)..(45)
 <223> Xaa可以是任何天然发生的氨基酸

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (78)..(78)
 <223> Xaa可以是任何天然发生的氨基酸

<400> 107
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 I 5 10 15

 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Xaa Trp Val
 20 25 30

 Arg Tyr Ala Pro Gly Lys Gly Tyr Glu Phe Val Ser Xaa Arg Phe Thr
 35 40 45

 Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser
 50 55 60

 Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Ser Xaa Trp Gly
 65 70 75 80

 Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

[0057]

85

<210> I08
 <211> 89
 <212> PRT
 <213> MG2-12I

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (30)..(30)
 <223> Xaa可以是任何天然发生的氨基酸

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (45)..(45)
 <223> Xaa可以是任何天然发生的氨基酸

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (78)..(78)
 <223> Xaa可以是任何天然发生的氨基酸

<400> I08

Glu 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 Xaa Trp Val
 20 25 30

Arg Val Ala Pro Gly Lys Gly Ile Glu Pro Val Ser Xaa Arg Phe Thr
 35 40 45

Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser
 50 55 60

Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Ser Xaa Trp Gly
 65 70 75 80

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 85

<210> I09
 <211> 89
 <212> PRT
 <213> MG2-32

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (30)..(30)
 <223> Xaa可以是任何天然发生的氨基酸

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (45)..(45)
 <223> Xaa可以是任何天然发生的氨基酸

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (78)..(78)
 <223> Xaa可以是任何天然发生的氨基酸

<400> I09

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

[0058]

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Xaa Trp Val
 20 25 30

Arg Met Ala Pro Gly Lys Gly Pro Glu His Val Ser Xaa Arg Phe Thr
 35 40 45

Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser
 50 55 60

Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Ser Xaa Trp Gly
 65 70 75 80

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 85

<210> 110
 <211> 89
 <212> PRT
 <213> MG2-34

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (30)..(30)
 <223> Xaa可以是任何天然发生的氨基酸

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (45)..(45)
 <223> Xaa可以是任何天然发生的氨基酸

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (78)..(78)
 <223> Xaa可以是任何天然发生的氨基酸

<400> 110

Glu 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 Xaa Trp Val
 20 25 30

Arg Ser Ala Pro Gly Lys Gly Val Glu Met Val Ser Xaa Arg Phe Thr
 35 40 45

Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser
 50 55 60

Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Ser Xaa Trp Gly
 65 70 75 80

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 85

<210> 111
 <211> 89
 <212> PRT
 <213> MG2-40

[0059]

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (30)..(30)
 <223> Xaa可以是任何天然发生的氨基酸

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (45)..(45)
 <223> Xaa可以是任何天然发生的氨基酸

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (78)..(78)
 <223> Xaa可以是任何天然发生的氨基酸

<400> I11
 Glu 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 Xaa Trp Val
 20 25 30
 Arg Thr Ala Pro Gly Lys Gly Thr Glu Met Val Ser Xaa Arg Phe Thr
 35 40 45
 Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser
 50 55 60
 Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Ser Xaa Trp Gly
 65 70 75 80
 Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 85

<210> I12
 <211> 89
 <212> PRT
 <213> MG2-46

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (30)..(30)
 <223> Xaa可以是任何天然发生的氨基酸

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (45)..(45)
 <223> Xaa可以是任何天然发生的氨基酸

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (78)..(78)
 <223> Xaa可以是任何天然发生的氨基酸

<400> I12
 Glu 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 Xaa Trp Val
 20 25 30
 Arg Cys Ala Pro Gly Lys Gly Tyr Glu Phe Val Ser Xaa Arg Phe Thr
 35 40 45

[0060]

Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser
50 55 60

Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Ser Xaa Trp Gly
65 70 75 80

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
85

<210> 113
<211> 89
<212> PRT
<213> MG2-47

<220>
<221> misc_feature
<222> (30)..(30)
<223> Xaa可以是任何天然发生的氨基酸

<220>
<221> misc_feature
<222> (45)..(45)
<223> Xaa可以是任何天然发生的氨基酸

<220>
<221> misc_feature
<222> (78)..(78)
<223> Xaa可以是任何天然发生的氨基酸

<400> 113

Glu 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 Xaa Trp Val
20 25 30

Arg Ile Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Met Val Ser Xaa Arg Phe Thr
35 40 45

Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser
50 55 60

Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Ser Xaa Trp Gly
65 70 75 80

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
85

<210> 114
<211> 89
<212> PRT
<213> MG2-48

<220>
<221> misc_feature
<222> (30)..(30)
<223> Xaa可以是任何天然发生的氨基酸

<220>
<221> misc_feature
<222> (45)..(45)
<223> Xaa可以是任何天然发生的氨基酸

[0061]

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (78)..(78)
 <223> Xaa可以是任何天然发生的氨基酸

 <400> I14
 Glu 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 Xaa Trp Val
 20 25 30

 Arg Met Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Tyr Val Ser Xaa Arg Phe Thr
 35 40 45

 Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser
 50 55 60

 Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Ser Xaa Trp Gly
 65 70 75 80

 Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 85

 <210> I15
 <211> 89
 <212> PRT
 <213> MG2-51

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (30)..(30)
 <223> Xaa可以是任何天然发生的氨基酸

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (45)..(45)
 <223> Xaa可以是任何天然发生的氨基酸

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (78)..(78)
 <223> Xaa可以是任何天然发生的氨基酸

 <400> I15
 Glu 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 Xaa Trp Val
 20 25 30

 Arg Tyr Ala Pro Gly Lys Gly Thr Glu Phe Val Ser Xaa Arg Phe Thr
 35 40 45

 Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser
 50 55 60

 Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Ser Xaa Trp Gly
 65 70 75 80

[0062]

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
85

<210> 116
<211> 89
<212> PRT
<213> MG2-53

<220>
<221> misc_feature
<222> (30)..(30)
<223> Xaa可以是任何天然发生的氨基酸

<220>
<221> misc_feature
<222> (45)..(45)
<223> Xaa可以是任何天然发生的氨基酸

<220>
<221> misc_feature
<222> (78)..(78)
<223> Xaa可以是任何天然发生的氨基酸

<400> 116

Glu 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 Xaa Trp Val
20 25 30

Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Val Glu Trp Val Ser Xaa Arg Phe Thr
35 40 45

Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser
50 55 60

Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Ser Xaa Trp Gly
65 70 75 80

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
85

<210> 117
<211> 89
<212> PRT
<213> MG2-55

<220>
<221> misc_feature
<222> (30)..(30)
<223> Xaa可以是任何天然发生的氨基酸

<220>
<221> misc_feature
<222> (45)..(45)
<223> Xaa可以是任何天然发生的氨基酸

<220>
<221> misc_feature
<222> (78)..(78)
<223> Xaa可以是任何天然发生的氨基酸

<400> 117

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly

[0063]

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (30)..(30)
 <223> Xaa可以是任何天然发生的氨基酸

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (45)..(45)
 <223> Xaa可以是任何天然发生的氨基酸

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (78)..(78)
 <223> Xaa可以是任何天然发生的氨基酸

<400> 119

Glu 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 Xaa Trp Val
 20 25 30

Arg Phe Ala Pro Gly Lys Gly Cys Glu Leu Val Ser Xaa Arg Phe Thr
 35 40 45

Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser
 50 55 60

Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Ser Xaa Trp Gly
 65 70 75 80

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 85

<210> 120
 <211> 89
 <212> PRT
 <213> MG2-59

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (30)..(30)
 <223> Xaa可以是任何天然发生的氨基酸

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (45)..(45)
 <223> Xaa可以是任何天然发生的氨基酸

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (78)..(78)
 <223> Xaa可以是任何天然发生的氨基酸

<400> 120

Glu 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 Xaa Trp Val
 20 25 30

Arg Lys Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Thr Val Ser Xaa Arg Phe Thr
 35 40 45

[0065]

Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser
50 55 60

Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Ser Xaa Trp Gly
65 70 75 80

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
85

<210> 121
<211> 89
<212> PRT
<213> MG2-60

<220>
<221> misc_feature
<222> (30)..(30)
<223> Xaa可以是任何天然发生的氨基酸

<220>
<221> misc_feature
<222> (45)..(45)
<223> Xaa可以是任何天然发生的氨基酸

<220>
<221> misc_feature
<222> (78)..(78)
<223> Xaa可以是任何天然发生的氨基酸

<400> 121

Glu 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 Xaa Trp Val
20 25 30

Arg Asn Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Cys Val Ser Xaa Arg Phe Thr
35 40 45

Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser
50 55 60

Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Ser Xaa Trp Gly
65 70 75 80

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
85

<210> 122
<211> 89
<212> PRT
<213> MG2-64

<220>
<221> misc_feature
<222> (30)..(30)
<223> Xaa可以是任何天然发生的氨基酸

<220>
<221> misc_feature
<222> (45)..(45)

[0066]

<223> Xaa可以是任何天然发生的氨基酸
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (78)..(78)
 <223> Xaa可以是任何天然发生的氨基酸
 <400> 122
 Glu 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 Xaa Trp Val
 20 25 30
 Arg Lys Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Thr Val Ser Xaa Arg Phe Thr
 35 40 45
 Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser
 50 55 60
 Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Ser Xaa Trp Gly
 65 70 75 80
 Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 85
 <210> 123
 <211> 89
 <212> PRT
 <213> MG4-12
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (30)..(30)
 <223> Xaa可以是任何天然发生的氨基酸
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (45)..(45)
 <223> Xaa可以是任何天然发生的氨基酸
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (78)..(78)
 <223> Xaa可以是任何天然发生的氨基酸
 <400> 123
 Glu 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 Xaa Trp Val
 20 25 30
 Arg Leu Ala Pro Gly Lys Gly Val Glu Leu Val Ser Xaa Arg Phe Thr
 35 40 45
 Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser
 50 55 60
 Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Ser Xaa Trp Gly
 65 70 75 80

[0067]

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
85

<210> 124
<211> 89
<212> PRT
<213> MG4-13

<220>
<221> misc_feature
<222> (30)..(30)
<223> Xaa可以是任何天然发生的氨基酸

<220>
<221> misc_feature
<222> (45)..(45)
<223> Xaa可以是任何天然发生的氨基酸

<220>
<221> misc_feature
<222> (78)..(78)
<223> Xaa可以是任何天然发生的氨基酸

<400> 124

Glu 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 Xaa Trp Val
20 25 30

Arg Phe Ala Pro Gly Lys Gly Ala Glu Trp Val Ser Xaa Arg Phe Thr
35 40 45

Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser
50 55 60

Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Ser Xaa Trp Gly
65 70 75 80

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
85

<210> 125
<211> 89
<212> PRT
<213> MG4-17

<220>
<221> misc_feature
<222> (30)..(30)
<223> Xaa可以是任何天然发生的氨基酸

<220>
<221> misc_feature
<222> (45)..(45)
<223> Xaa可以是任何天然发生的氨基酸

<220>
<221> misc_feature
<222> (78)..(78)
<223> Xaa可以是任何天然发生的氨基酸

<400> 125

[0068]

Glu 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 Xaa Trp Val
 20 25 30
 Arg Leu Ala Pro Gly Lys Gly Arg Glu Trp Val Ser Xaa Arg Phe Thr
 35 40 45
 Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser
 50 55 60
 Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Ser Xaa Trp Gly
 65 70 75 80
 Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 85

<210> 126
 <211> 89
 <212> PRT
 <213> MG4-18

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (30)..(30)
 <223> Xaa可以是任何天然发生的氨基酸

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (45)..(45)
 <223> Xaa可以是任何天然发生的氨基酸

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (78)..(78)
 <223> Xaa可以是任何天然发生的氨基酸

<400> 126

Glu 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 Xaa Trp Val
 20 25 30
 Arg Tyr Ala Pro Gly Lys Gly Val Glu Phe Val Ser Xaa Arg Phe Thr
 35 40 45
 Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser
 50 55 60
 Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Ser Xaa Trp Gly
 65 70 75 80
 Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 85

<210> 127
 <211> 89
 <212> PRT
 <213> MG4-20

[0069]

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (30)..(30)
 <223> Xaa可以是任何天然发生的氨基酸

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (45)..(45)
 <223> Xaa可以是任何天然发生的氨基酸

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (78)..(78)
 <223> Xaa可以是任何天然发生的氨基酸

<400> 127

Glu 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 Xaa Trp Val
 20 25 30
 Arg Phe Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Met Val Ser Xaa Arg Phe Thr
 35 40 45
 Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser
 50 55 60
 Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Ser Xaa Trp Gly
 65 70 75 80
 Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 85

<210> 128
 <211> 89
 <212> PRT
 <213> MG4-28

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (30)..(30)
 <223> Xaa可以是任何天然发生的氨基酸

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (45)..(45)
 <223> Xaa可以是任何天然发生的氨基酸

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (78)..(78)
 <223> Xaa可以是任何天然发生的氨基酸

<400> 128

Glu 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 Xaa Trp Val
 20 25 30
 Arg Val Ala Pro Gly Lys Gly Thr Glu Arg Val Ser Xaa Arg Phe Thr

[0070]

```

                35                40                45
Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser
 50                55                60

Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Ser Xaa Trp Gly
65                70                75                80

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
                85

<210> 129
<211> 89
<212> PRT
<213> MG4-2

<220>
<221> misc_feature
<222> (30)..(30)
<223> Xaa可以是任何天然发生的氨基酸

<220>
<221> misc_feature
<222> (45)..(45)
<223> Xaa可以是任何天然发生的氨基酸

<220>
<221> misc_feature
<222> (78)..(78)
<223> Xaa可以是任何天然发生的氨基酸

<400> 129

Glu 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 Xaa Trp Val
                20                25                30

Arg Ile Ala Pro Gly Lys Gly Met Glu Met Val Ser Xaa Arg Phe Thr
                35                40                45

Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser
 50                55                60

Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Ser Xaa Trp Gly
65                70                75                80

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
                85

<210> 130
<211> 89
<212> PRT
<213> MG4-32

<220>
<221> misc_feature
<222> (30)..(30)
<223> Xaa可以是任何天然发生的氨基酸

<220>
<221> misc_feature

```

[0071]

<222> (45)..(45)
 <223> Xaa可以是任何天然发生的氨基酸
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (78)..(78)
 <223> Xaa可以是任何天然发生的氨基酸
 <400> 130
 Glu 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 Xaa Trp Val
 20 25 30
 Arg Ala Ala Pro Gly Lys Gly Pro Glu Leu Val Ser Xaa Arg Phe Thr
 35 40 45
 Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser
 50 55 60
 Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Ser Xaa Trp Gly
 65 70 75 80
 Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 85
 <210> 131
 <211> 89
 <212> PRT
 <213> MG4-33
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (30)..(30)
 <223> Xaa可以是任何天然发生的氨基酸
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (45)..(45)
 <223> Xaa可以是任何天然发生的氨基酸
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (78)..(78)
 <223> Xaa可以是任何天然发生的氨基酸
 <400> 131
 Glu 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 Xaa Trp Val
 20 25 30
 Arg Val Ala Pro Gly Lys Gly Tyr Glu His Val Ser Xaa Arg Phe Thr
 35 40 45
 Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser
 50 55 60
 Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Ser Xaa Trp Gly
 65 70 75 80

[0072]

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
85

<210> 132
<211> 89
<212> PRT
<213> MG4-34

<220>
<221> misc_feature
<222> (30)..(30)
<223> Xaa可以是任何天然发生的氨基酸

<220>
<221> misc_feature
<222> (45)..(45)
<223> Xaa可以是任何天然发生的氨基酸

<220>
<221> misc_feature
<222> (78)..(78)
<223> Xaa可以是任何天然发生的氨基酸

<400> 132

Glu 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 Xaa Trp Val
20 25 30

Arg Val Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Cys Val Ser Xaa Arg Phe Thr
35 40 45

Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser
50 55 60

Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Ser Xaa Trp Gly
65 70 75 80

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
85

<210> 133
<211> 89
<212> PRT
<213> MG4-5

<220>
<221> misc_feature
<222> (30)..(30)
<223> Xaa可以是任何天然发生的氨基酸

<220>
<221> misc_feature
<222> (45)..(45)
<223> Xaa可以是任何天然发生的氨基酸

<220>
<221> misc_feature
<222> (78)..(78)
<223> Xaa可以是任何天然发生的氨基酸

<400> 133

[0073]

Glu 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 Xaa Trp Val
 20 25 30
 Arg Val Ala Pro Gly Lys Gly Pro Glu Thr Val Ser Xaa Arg Phe Thr
 35 40 45
 Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser
 50 55 60
 Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Ser Xaa Trp Gly
 65 70 75 80
 Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 85

<210> 134
 <211> 89
 <212> PRT
 <213> MG4-6

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (30)..(30)
 <223> Xaa可以是任何天然发生的氨基酸

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (45)..(45)
 <223> Xaa可以是任何天然发生的氨基酸

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (78)..(78)
 <223> Xaa可以是任何天然发生的氨基酸

<400> 134

Glu 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 Xaa Trp Val
 20 25 30
 Arg Met Ala Pro Gly Lys Gly Ser Glu Val Val Ser Xaa Arg Phe Thr
 35 40 45
 Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser
 50 55 60
 Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Ser Xaa Trp Gly
 65 70 75 80
 Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 85

<210> 135
 <211> 89
 <212> PRT

[0074]

<213> MG4-7

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (30)..(30)
 <223> Xaa可以是任何天然发生的氨基酸

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (45)..(45)
 <223> Xaa可以是任何天然发生的氨基酸

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (78)..(78)
 <223> Xaa可以是任何天然发生的氨基酸

 <400> 135

 Glu 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 Xaa Trp Val
 20 25 30

 Arg Leu Ala Pro Gly Lys Gly Thr Glu Met Val Ser Xaa Arg Phe Thr
 35 40 45

 Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser
 50 55 60

 Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Ser Xaa Trp Gly
 65 70 75 80

 Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 85

 <210> 136
 <211> 89
 <212> PRT
 <213> MG8-11

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (30)..(30)
 <223> Xaa可以是任何天然发生的氨基酸

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (45)..(45)
 <223> Xaa可以是任何天然发生的氨基酸

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (78)..(78)
 <223> Xaa可以是任何天然发生的氨基酸

 <400> 136

 Glu 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 Xaa Trp Val
 20 25 30

[0075]

Arg Thr Ala Pro Gly Lys Gly Ala Glu Trp Val Ser Xaa Arg Phe Thr
35 40 45

Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser
50 55 60

Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Ser Xaa Trp Gly
65 70 75 80

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
85

<210> 137
<211> 89
<212> PRT
<213> MG8-12

<220>
<221> misc_feature
<222> (30)..(30)
<223> Xaa可以是任何天然发生的氨基酸

<220>
<221> misc_feature
<222> (45)..(45)
<223> Xaa可以是任何天然发生的氨基酸

<220>
<221> misc_feature
<222> (78)..(78)
<223> Xaa可以是任何天然发生的氨基酸

<400> 137

Glu 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 Xaa Trp Val
20 25 30

Arg Trp Ala Pro Gly Lys Gly Lys Glu Val Val Ser Xaa Arg Phe Thr
35 40 45

Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser
50 55 60

Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Ser Xaa Trp Gly
65 70 75 80

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
85

<210> 138
<211> 89
<212> PRT
<213> MG8-13

<220>
<221> misc_feature
<222> (30)..(30)
<223> Xaa可以是任何天然发生的氨基酸

<220>

[0076]

<221> misc_feature
 <222> (45)..(45)
 <223> Xaa可以是任何天然发生的氨基酸

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (78)..(78)
 <223> Xaa可以是任何天然发生的氨基酸

 <400> I38

 Glu 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 Xaa Trp Val
 20 25 30

 Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Ile Glu Pro Val Ser Xaa Arg Phe Thr
 35 40 45

 Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser
 50 55 60

 Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Ser Xaa Trp Gly
 65 70 75 80

 Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 85

 <210> I39
 <211> 89
 <212> PRT
 <213> MG8-14

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (30)..(30)
 <223> Xaa可以是任何天然发生的氨基酸

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (45)..(45)
 <223> Xaa可以是任何天然发生的氨基酸

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (78)..(78)
 <223> Xaa可以是任何天然发生的氨基酸

 <400> I39

 Glu 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 Xaa Trp Val
 20 25 30

 Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Pro Glu Trp Val Ser Xaa Arg Phe Thr
 35 40 45

 Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser
 50 55 60

 Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Ser Xaa Trp Gly

[0077]

<400> 141
 Glu 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 Xaa Trp Val
 20 25 30
 Arg Thr Ala Pro Gly Lys Gly Ile Glu Ile Val Ser Xaa Arg Phe Thr
 35 40 45
 Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser
 50 55 60
 Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Ser Xaa Trp Gly
 65 70 75 80
 Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 85

<210> 142
 <211> 89
 <212> PRT
 <213> MG8-6

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (30)..(30)
 <223> Xaa可以是任何天然发生的氨基酸

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (45)..(45)
 <223> Xaa可以是任何天然发生的氨基酸

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (78)..(78)
 <223> Xaa可以是任何天然发生的氨基酸

<400> 142
 Glu 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 Xaa Trp Val
 20 25 30
 Arg Ile Ala Pro Gly Lys Gly Val Glu Ile Val Ser Xaa Arg Phe Thr
 35 40 45
 Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser
 50 55 60
 Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Ser Xaa Trp Gly
 65 70 75 80
 Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 85

<210> 143
 <211> 89

[0079]

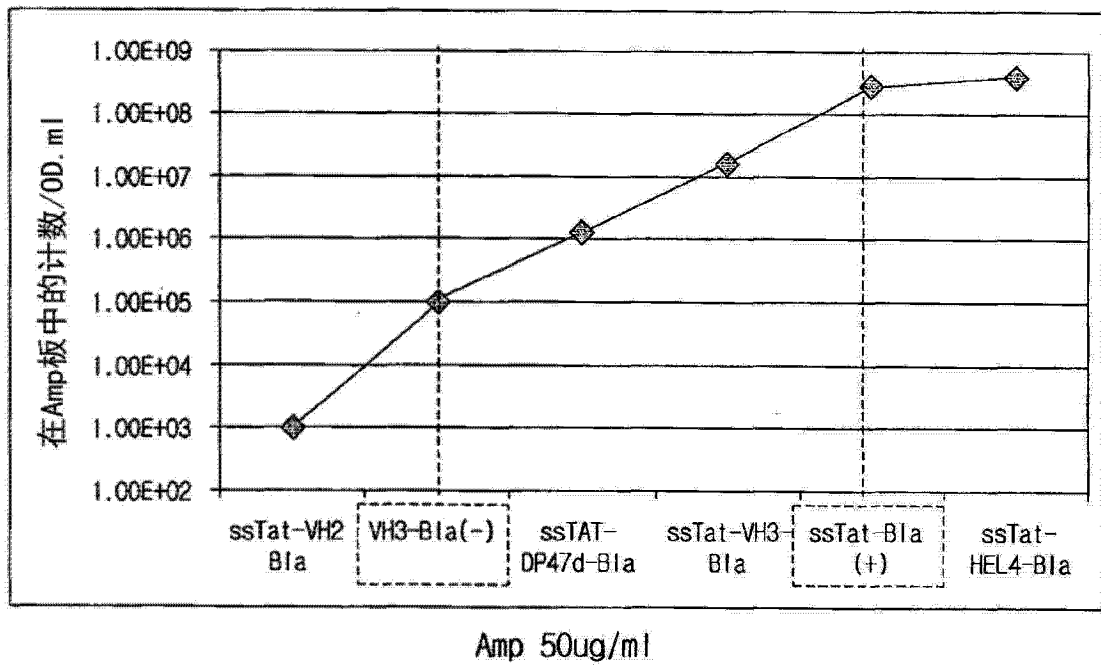


图 1

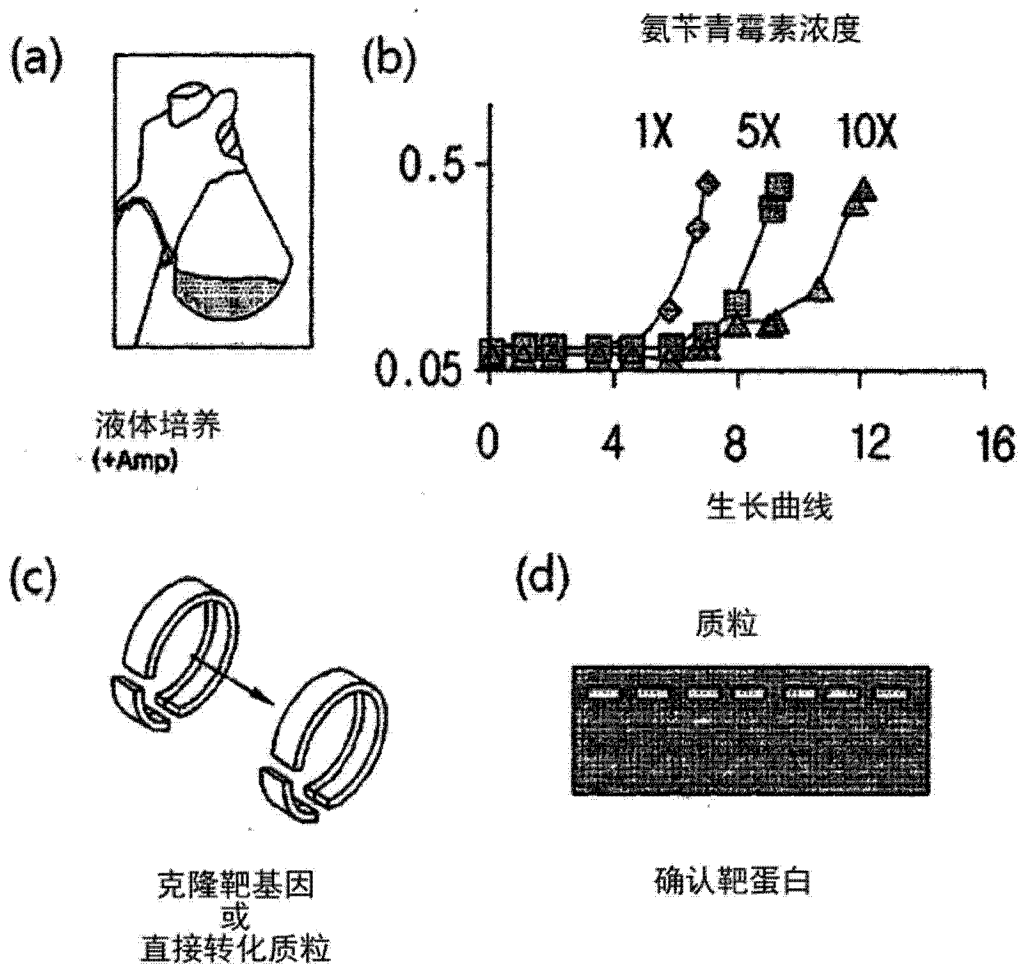


图 2

(a)

No.	FR1	CDR H1	FR2	CDR H2
Kabat
MG1x8	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAA...	FTFSSWMY	WVRQAPGKGLVWVSTI...	DGIGTTYADSVK...
MG2x1	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAA...	FTFSSYAMS	WVRQAPGKGLVWVSA...	SGGTTYADSVK...
MG2x1-34	EVQLVESGGRVVQPGTSLRLSCAA...	FTFSDHAMH	WVRQAPGKGLVWVALI...	DASNHYADSVK...
MG2x2-17	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCEA...	YAFITFLH	WVRQAPGKGLVWVGI...	SAGSTIYANKFQ...
MG2x2-19	EVQLLESGGGVVQPGKSLRLSCV...	FSFATYPMH	WVRQAPGKGLVWLAAL...	DGSNHYSDSVR...
MG3x1	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSVA...	FNFROYGMH	WLRQAPGKGLVWVAGM...	DEITKWIYADSV...
MG3x10	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAA...	FTFINAWMS	WVRQAPGKGLVWVGRIQ...	DGGATDYAAPVK...
MG4x1-8	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAA...	FSFSYFWMH	WVRQCPGKGLVWLSQI...	DGTTTTYADSV...
MG4x1-33	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCEA...	FPFSYAMH	WVRQAPGKGLVWVSGI...	SGVLTYYADSV...
MG4x1-35	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCV...	RSPSYGMS	WVRQAPGKGLVWVASI...	SSVLTYYADSV...
MG4x1-37	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAA...	FTFDSYMS	WVRQAPGKGLVWVSI...	SGSTIYYADSV...
MG4x1-2	EVQLVQS...	GAELKPPGESLRLS...	WARDKPKGLEWIGI...	DGSGTYSPSFQ...
MG4x1-4	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSVA...	FTFSSWMY	WVRQAPGKGLVWVSR...	DENEINYAESV...
MG4x1-25	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSIA...	FSLSYWMH	WVRRSPKGLEWVANIR...	DGSMVNYVDSV...
MG4x1-44	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAA...	FTFSYWMH	WVRQAPGKGLVWVNI...	DGSEKYYVDSV...
MG4x1-30	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAA...	FTFSYEMH	WVRQAPGKGLVWVSI...	SAGTYYADSVK...
MG4x1-27	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAA...	FTFTYWMH	WVRQCPGKGLVWVANIQ...	DGSKYYVDSV...
MG4x1-48	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCEV...	FTLSTYGMH	WVRQAPGRRLVWVAGV...	SGNHEFYADSV...
MG4x1-15	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAA...	FTFSYAMH	WVRQAPGKGLVWVSG...	SGGTTYADSVK...
MG4x1-24	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAA...	FTFSYVMS	WVRQAPGKGLVWVSI...	SGGTTYADSVK...
MG5x1-1	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAA...	FTFSYWMH	WVRQVPGKGLVWVANI...	DGSEKYYVDSV...
MG5x1-3	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAA...	FTFSYWMH	WVRQAPGTGLLWLSR...	DGSTIYYADSV...
MG5x1-4	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAA...	LIFSHAWMH	WVRNAPGKGLVWVGRIA...	DGSAETAEYNEA...
MG5x1-14	EVQLLESGGGLVQAGGSLRLSCAA...	FTFSDYWMH	WVRQAPGKGLVWVANI...	YGSEENHYVDS...
MG7x1-4	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAA...	FTFSDYWMH	WLRQAPGKGLVWVARI...	DGATKDYAGPV...
MG7x1-5	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAA...	FTFSYAMS	WVRQAPGKGLVWVSA...	SGGTTYADSVK...
MG7x1-15	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAA...	FTFSYWMH	WVRQAPGKGLVWVSA...	SGGTTYADSVK...
MG8x1	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSVA...	FNFROYGMH	WLRQAPGKGLVWVAGM...	DEITKWIYADSV...
MG8x1-5	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCEA...	LHFRNYAMH	WVRQAPGKGLVWVAFI...	SGEITPLYADSV...
MG11-4	EVQLVEAGGGLVQPGGSLRLACA...	FTFTSEMS	WVRQAPGKGLVWVSI...	SGSMIYYADSV...
MG11-6	EVQLVQS...	GAELKPPGESLRLS...	YSPHYWIS	WVRQMPGKGLVWVGRIDP
MG11-7	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAA...	FTFSYWMH	WVRQAPGKGLVWVSI...	DGSDKYYVDSV...
MG11-9	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLACA...	FTFTSEMS	WVRQAPGKGLVWVSI...	RSGDTDSAQKF...
MG11-10	EVQLVQS...	GAELKPPGESLRLS...	YSPHYWIG	WVRQMPGKGLVWVGRIDP
MG5-1	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCEA...	FTVSNHMS	WVRQAPGKGLVWVSV...	YGGRTYYADSV...
MG5-2	EVQLVQS...	GAELKPPGESLRLS...	DSFTPYAIS	WVRQAPGKGLVWVSGV...
MG5-4	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAA...	FTFDDYAMH	WVRQAPGKGLVWVSGI...	SGGTTYADSVK...
MG5-5	EVQLLESGGGVVQPGGSLRLSVA...	FTFSYAMI	WVRQAPGKGLVWVSGI...	SGGTTYADSVK...
MG5-6	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAA...	FTFSYWMH	WVRQAPGKGLVWVSGI...	SGGTTYADSVK...
MG5-7	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTT...	FSFGDSVMS	WVRQAPGKGLVWVSI...	DGSDKYYVDSV...
MG5-9	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAA...	FTFSYTMH	WVRQAPGKGLVWVSI...	SGGTTYADSVK...
MG10-1	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAA...	FTFSYWMH	WVRQAPGKGLVWVSI...	DASNHYADSVK...
MG10-2	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLTCA...	FTFSRDMH	WVRQAPGKGLVWVSI...	DGSEKYYVDSV...
MG10-4	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAA...	FTFSYWMH	WVRQAPGKGLVWVSI...	DGSEKYYVDSV...
MG10-5	EVQLLESGGGVVQPGGSLRLSVA...	FTFTYGMH	WVRQAPGKGLVWVSI...	DGSDKYYVDSV...
MG10-6	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAA...	FTFSYWMH	WVRQAPGKGLVWVSI...	DGSDKYYVDSV...
MG10-8	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSVA...	FTFSYGMH	WVRQAPGKGLVWVSI...	DGSDKYYVDSV...
MG10-10	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAA...	FTFDDYTMH	WVRQAPGKGLVWVSI...	DGSDKYYVDSV...
MG2	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAA...	FTFSYEMH	WVRQAPGKGLVWVSI...	SGNTIHYADSV...
MG5	EVQLVQS...	GAELKPPGESLRLS...	FTFSQAWMT	WVRQAPGKGLVWVGRISIT
MG6	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAA...	FTFSYGMH	WVRQAPGKGLVWVSI...	DGRTKYADSVK...
MG7	EVQLVQS...	EAELKPPGASMKVSC...	YTFANFEIH	WVRQATGGLEWVGMN...
MG10	EVQLVQS...	GAELKPPGESLRLS...	YFSYWIWIG	WVRQMPGKGLVWVGI...

图 3

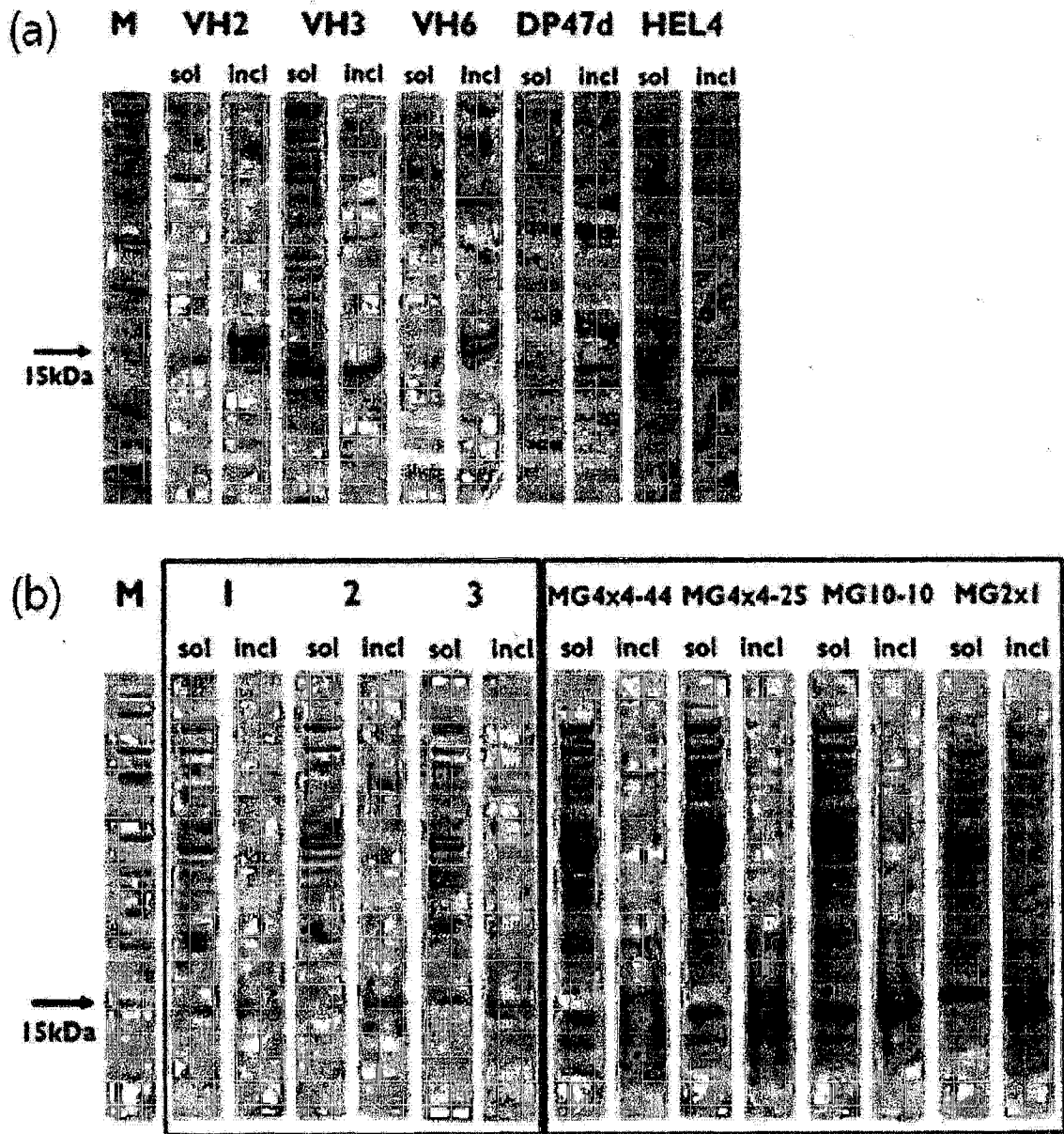


图 4

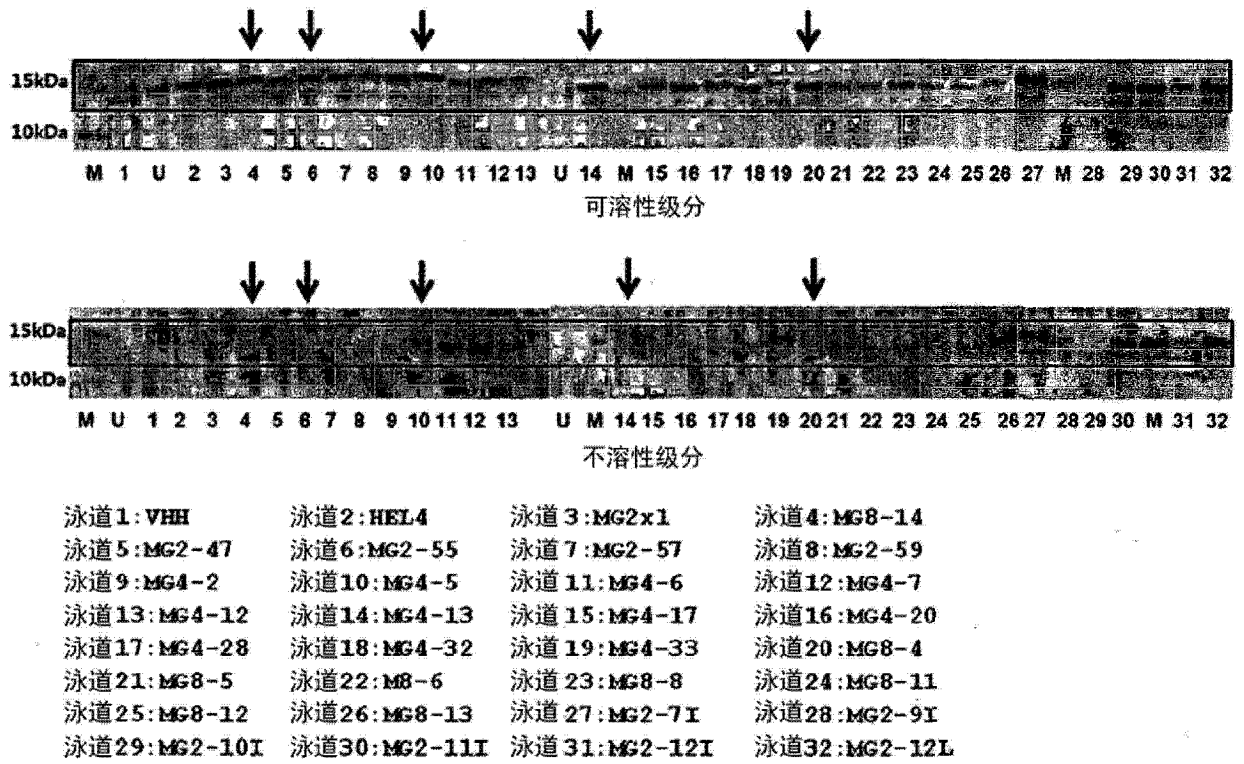


图 7

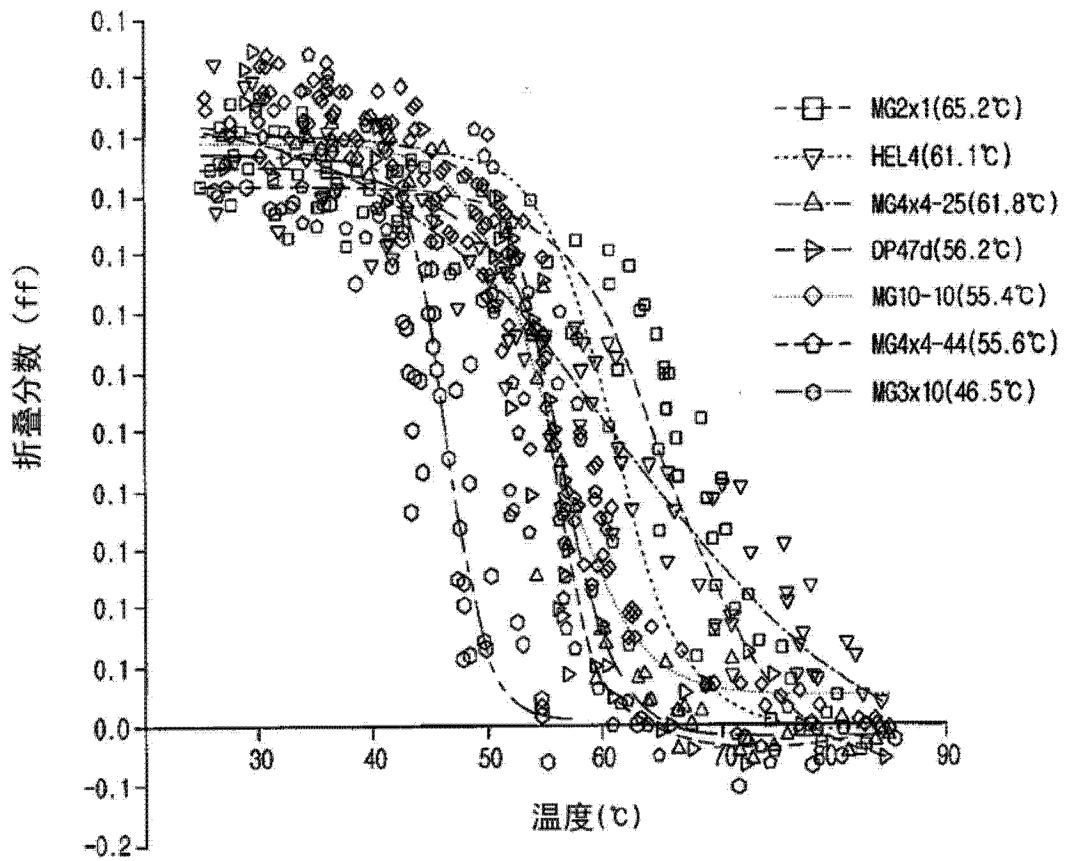


图 8

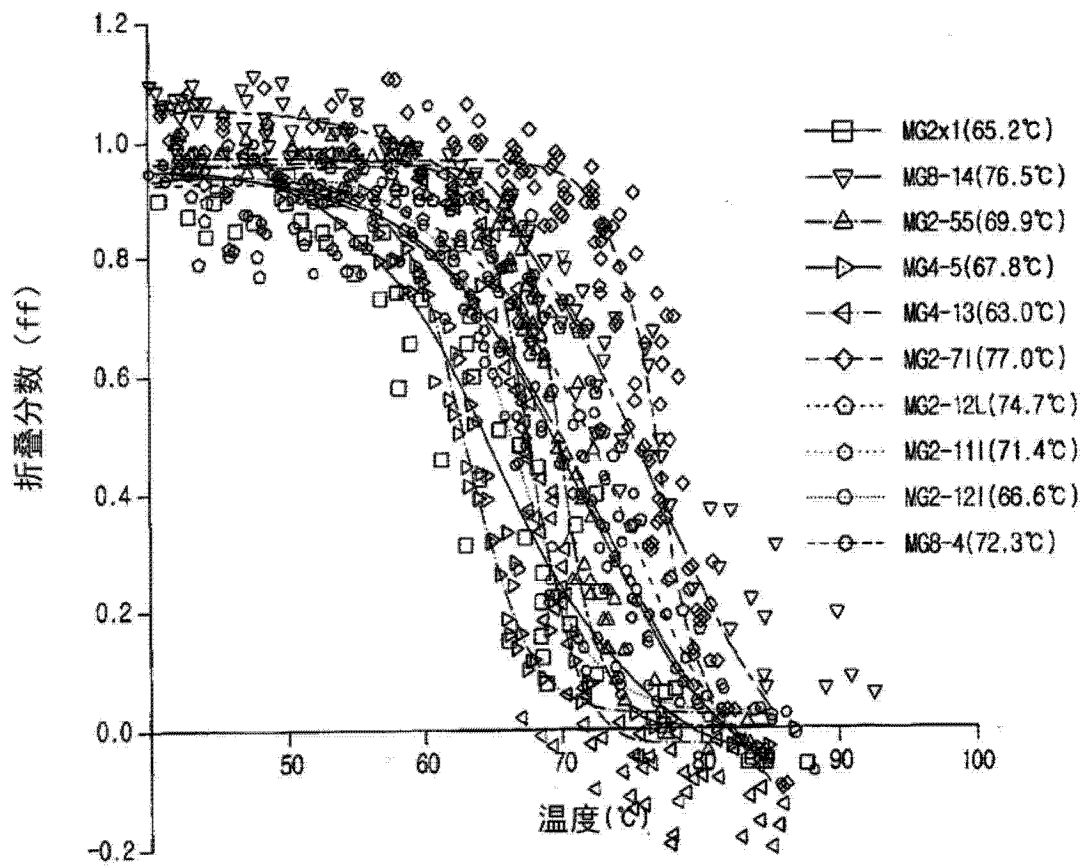


图 9

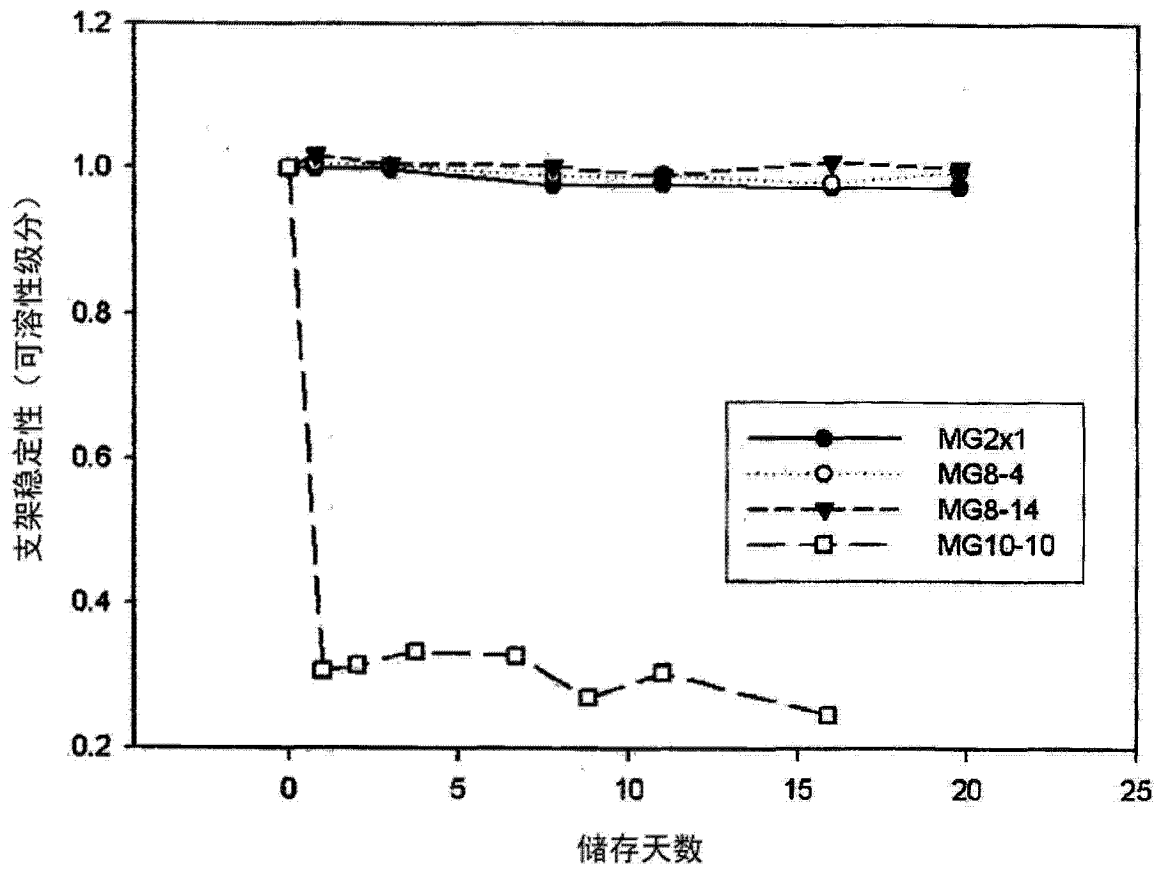


图 10

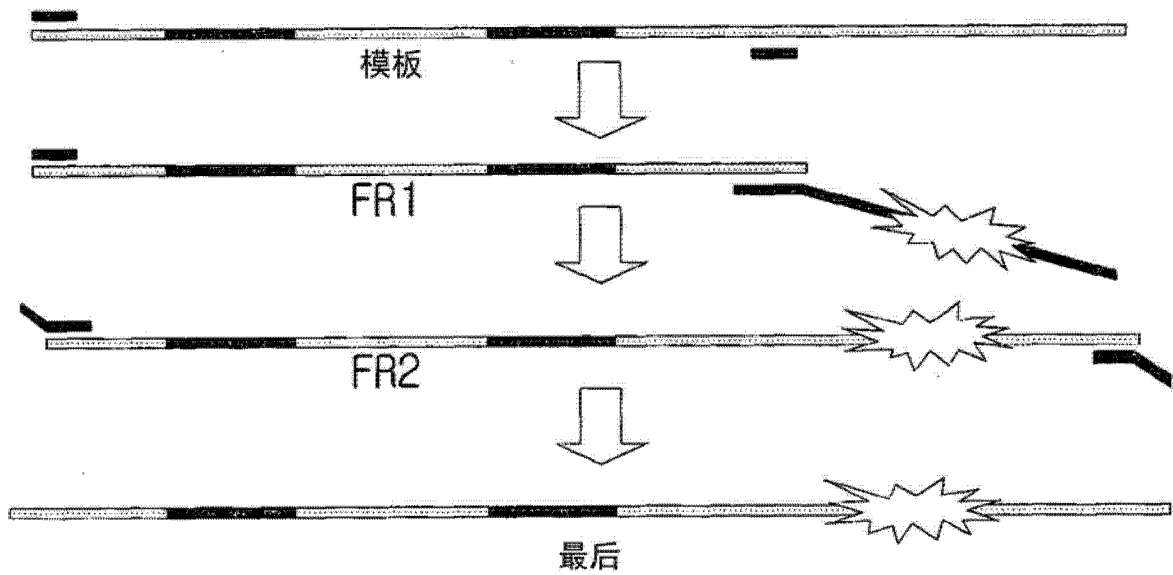


图 11

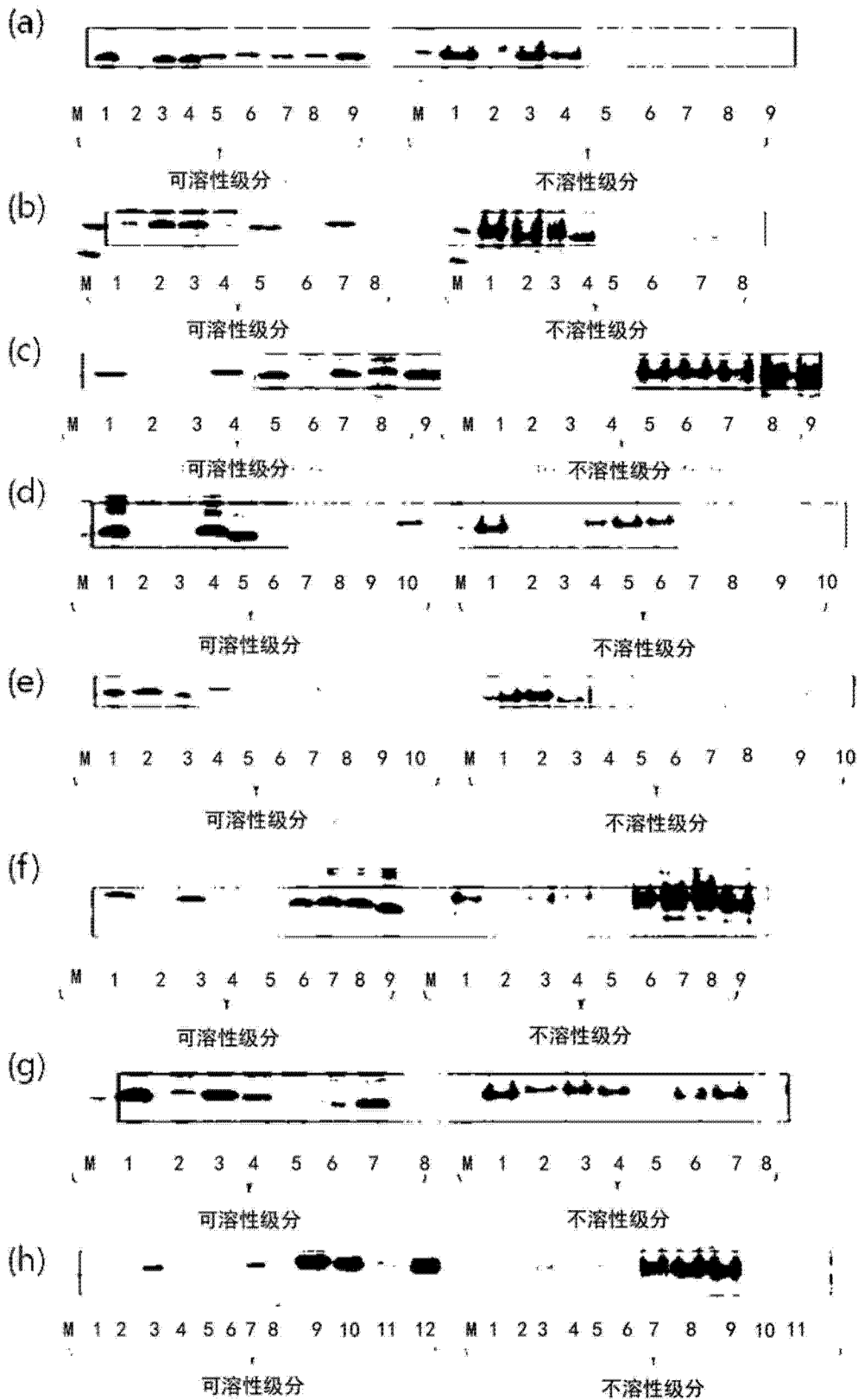


图 14

专利名称(译)	超稳定免疫球蛋白可变结构域的筛选和改造方法及其应用		
公开(公告)号	CN104769113A	公开(公告)日	2015-07-08
申请号	CN201280076586.9	申请日	2012-08-22
[标]申请(专利权)人(译)	财团法人牧岩生命工学研究所		
申请(专利权)人(译)	财团法人牧岩生命工学研究所		
当前申请(专利权)人(译)	财团法人牧岩生命工学研究所		
[标]发明人	李滢权 金圣根 朴荣燮 南效廷 金董植 朴在燦 尹粹		
发明人	李滢权 金圣根 朴荣燮 南效廷 金董植 朴在燦 尹粹		
IPC分类号	C12N15/62 C12N15/63 C07K19/00 C12N15/13 C07K16/28 G01N33/53		
CPC分类号	C07K2317/21 C07K16/00 G01N2500/00 C07K2319/00 C07K16/18 C07K2319/10 C07K2317/94 C07K16/32 G01N33/6857 C07K2317/56 C07K2317/565 C07K2317/569 C40B40/10		
代理人(译)	徐金国		
其他公开文献	CN104769113B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及被称作Tat相关蛋白质改造工程(TAPE)的方法，通过将靶蛋白和抗生素抗性蛋白连接到Tat信号序列并在大肠杆菌内表达它，筛选具有更高的溶解性和优异的热稳定性的靶蛋白，特别是源自人生殖细胞的免疫球蛋白可变结构域(VH或VL)，以及由TAPE法筛选的、具有溶解性和优异的热稳定性的、人或改造的VH和VL结构域抗体和人或改造的VH和VL结构域抗体支架。还提供了在由TAPE法筛选的人或改造的VH或VL结构域抗体支架中包括随机CDR序列的文库，以及其制备方法。海通使用了该文库筛选的具有靶蛋白质结合能力的VH或VL结构域抗体，包括该结构域抗体的药物组合物。

