



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 101591665 B

(45)授权公告日 2016.08.31

(21)申请号 200910142690.3

C07K 19/00(2006.01)

(22)申请日 2009.05.25

G01N 33/53(2006.01)

(30)优先权数据

C07K 16/00(2006.01)

08009537.5 2008.05.26 EP

A61K 39/00(2006.01)

G01N 33/536(2006.01)

(73)专利权人 霍夫曼-拉罗奇有限公司

C12R 1/125(2006.01)

地址 瑞士巴塞尔

C12R 1/19(2006.01)

(72)发明人 E·法茨 P·沙尔施米特

(56)对比文件

U·施米特 C·肖尔茨

WO 2007077008 A1,2007.07.12,

(74)专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公

WO 03000878 A2,2003.01.03,

司 72001

sandra hottenrott et al..the

代理人 梁谋 黄可峻

escherichia coli slyd is a metal ion-regulated peptidyl-prolylcis/trans-isomerase.《the journal of biological chemistry》.1997,第272卷(第25期),

(51)Int.Cl.

C12N 15/62(2006.01)

C12N 15/63(2006.01)

C12N 1/21(2006.01)

C12P 21/02(2006.01)

审查员 张丽玮

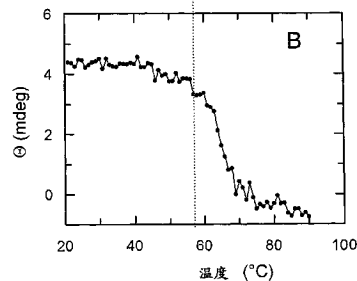
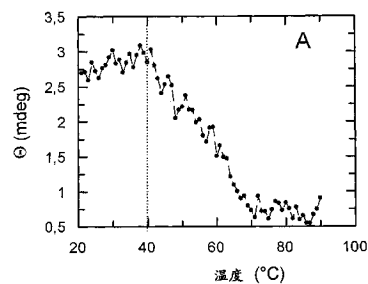
权利要求书1页 说明书38页 附图6页

(54)发明名称

作为重组蛋白和酶技术的工具的SlpA

(57)摘要

本发明涉及作为重组蛋白和酶技术工具的SlpA。具体来说,本发明涉及编码含有SlpA分子伴侣和靶多肽的融合蛋白的重组DNA分子,编码所述融合蛋白的相应表达载体以及用所述表达载体转化的宿主细胞,其中人FK506结合蛋白(FKBP)被排除作为靶多肽;还涉及生产所述融合蛋白的方法;所述融合蛋白作为结合配偶体的用途,或作为在免疫测定中降低干扰的工具的用途;所述融合蛋白用于产生抗体的用途和在疫苗生产中的用途;所述融合蛋白在免疫测定中检测分析物的方法,以及含有所述融合蛋白的试剂盒;SlpA在免疫测定中降低干扰的用途,及其在蛋白制品中作为添加剂和在生物技术应用中作为折叠辅助物的用途。



1. 一种编码融合蛋白的重组DNA分子,所述重组DNA分子含有至少一个编码靶多肽的核苷酸序列以及在所述核苷酸序列上游或下游的至少一个编码大肠杆菌SlpA分子伴侣的核苷酸序列,所述大肠杆菌SlpA分子伴侣包含SEQ ID NO. 2的如下片段:N末端起始于SEQ ID NO. 2的第59—78个氨基酸之间的任何氨基酸和C末端结束于SEQ ID NO. 2的第125—139个氨基酸的任何氨基酸,其中所述靶多肽不包括FK506结合蛋白(FKBP)。

2. 一种含有有效连接的权利要求1的重组DNA分子的表达载体。

3. 一种用权利要求2的表达载体转化的宿主细胞。

4. 一种生产融合蛋白的方法,所述方法包括以下步骤:

a)培养权利要求3的宿主细胞,

b)表达所述融合蛋白,

c)纯化所述融合蛋白,和

d)重折叠成可溶性的免疫反应性的构象。

5. 一种重组产生的融合蛋白,所述融合蛋白含有至少一个对应于大肠杆菌SlpA分子伴侣的多肽序列,所述大肠杆菌SlpA分子伴侣包含SEQ ID NO. 2的如下片段:N末端起始于SEQ ID NO. 2的第59—78个氨基酸之间的任何氨基酸和C末端结束于SEQ ID NO. 2的第125—139个氨基酸的任何氨基酸,和至少一个对应于靶多肽的多肽序列,其中FK506结合蛋白(FKBP)被排除作为靶多肽。

6. 权利要求5的重组产生的融合蛋白在制备用于免疫测定的试剂盒中的用途,其中所述重组产生的融合蛋白作为免疫测定中的结合配偶体。

7. 权利要求5的重组产生的融合蛋白在制备用于免疫测定的试剂盒中的用途,其中所述重组产生的融合蛋白作为降低免疫测定中的干扰的工具。

8. 权利要求5的重组产生的融合蛋白在制备抗靶多肽的抗体中的用途,其中所述重组产生的融合蛋白作为免疫原用于产生抗所述靶多肽的抗体。

9. 权利要求5的重组产生的融合蛋白在生产疫苗中的用途。

10. 一种包含权利要求5的重组产生的融合蛋白和药学上可接受的赋形剂的组合物。

11. 权利要求5的融合蛋白在制备用于检测分离样品中的分析物特异性抗体的试剂盒中的用途,其中所述试剂盒用于包括下述步骤的方法:

a)通过将体液样品与权利要求5的融合蛋白混合形成免疫反应混合物,

b)将所述免疫反应混合物保持一定时间,所述保持时间足以允许体液样品中存在的抗所述分析物的抗体与所述融合蛋白发生免疫反应,形成免疫反应产物;和

c)检测所述免疫反应产物的存在情况。

12. 权利要求5的融合蛋白在制备用于检测分离样品中的抗分析物的抗体的试剂盒中的用途。

13. 一种试剂盒,其用于检测抗分析物的抗体,所述试剂盒包含权利要求5的融合蛋白。

作为重组蛋白和酶技术的工具的SlpA

[0001] 本发明涉及含有SlpA分子伴侣和靶多肽的融合蛋白；重组表达、纯化和重折叠这些融合蛋白的方法；它们在蛋白和酶生物技术中的用途，尤其是它们在诊断中的应用。此外，本发明涉及含有SlpA和靶多肽的任何复合物，所述复合物旨在增加用于生物技术应用的靶多肽或酶的溶解性、活性、稳定性和/或折叠可逆性。

[0002] 发明背景

[0003] 蛋白折叠是一个自发的过程，该过程由天然状态和未折叠状态之间的Gibbs自由能的微小差异驱动。在折叠过程中，基本上未结构化的多肽链采用所谓的蛋白的天然构象或三维结构。不完全折叠的分子的聚集与生产性折叠竞争，这成了一个严重问题，这种竞争在体内和体外均影响折叠收率。在活细胞中，折叠由辅助蛋白帮助。折叠辅助物为辅助其它蛋白折叠并维持其结构完整性的多肽。它们可逆地与其靶相互作用，由此防止有害的副反应，例如聚集过程，从而具有促进多肽链正确折叠的能力。它们在体内和体外均有此能力，这些折叠辅助物在生物技术问题中的应用数量一直在增加。一般而言，折叠辅助物被细分为折叠催化剂和分子伴侣。

[0004] 分子伴侣已知与多肽的变性的、部分变性的或简单地疏水表面可逆地结合，并由此帮助复性蛋白或使它们保持在溶液中。分子伴侣通过可逆地结合和遮蔽疏水表面降低有聚集倾向的折叠中间体和有聚集倾向的折叠蛋白的浓度。它们因此只发挥结合功能。相反，折叠催化剂如二硫化物氧化还原酶和肽基脯氨酰顺/反异构酶加速蛋白折叠的限速步骤，由此缩短折叠中间体的寿命。折叠催化剂因其催化功能而降低有聚集倾向的折叠中间体的浓度。一类重要的折叠催化剂被称为肽基脯氨酰顺/反异构酶(PP1酶)。

[0005] 基于序列相似性、蛋白拓扑学和免疫抑制分子的结合，脯氨酰异构酶被分成3个不同的家族：环孢素、小小菌素(parvulins)和FK506结合蛋白(因此首字母简略词为FKBP)。FKBP结合已用作免疫抑制药物的FK506、雷帕霉素和相关大环内酯衍生物，并被它们抑制。

[0006] 在大肠杆菌(*E. coli*)中属于肽基脯氨酰顺/反异构酶的FKBP家族的推定折叠辅助物为SlpA，SlpA是“SlyD-样蛋白A”的首字母简略词(Hottenrott等, 1997, JBC 272/25, 15697-15701)。一直到现在还缺乏有关SlpA及其在大肠杆菌中的生理作用的信息。尽管已报道了SlpA的脯氨酰异构酶活性较差，但该蛋白迄今仍相当神秘。迄今为止，还没有有关SlpA的物理-化学特性或可能的分子伴侣特性的信息，甚至还没有提到SlpA在大肠杆菌胞质中的功能。

[0007] 在许多诊断应用中，重组产生的蛋白用作结合配偶体，例如在设计用于检测特异性免疫球蛋白分析物的免疫测定中用作抗原。这些抗原可以作为融合蛋白含有的一部分生产，其构成目标部分或抗原性多肽，旨在识别和结合在所研究的样品或测定混合物中存在的特定部分。重组产生的融合蛋白的另一部分为多肽部分，该部分融合至赋予特异性的抗原性部分，以利于其克隆、表达、过度生产、折叠/重折叠和纯化，并利于增加其溶解性、其稳定性或其折叠可逆性。重组产生的融合蛋白的合成在先有技术中已充分描述。还已充分确认的是，使用分子伴侣作为融合蛋白的组成部分是有利的，该部分起辅助分子的作用，用于靶多肽的表达、折叠、纯化、溶解和增加整体稳定性。

[0008] 美国专利号6,207,420公开了用于表达蛋白的融合蛋白系统,其中靶多肽部分的氨基酸序列和融合肽部分来源于不同生物。最近,可以表明FkpA和SlyD适合作为生产重组蛋白的融合组件。两个分子伴侣均增加其客户蛋白在原核宿主中的表达率,支持正确的重折叠,并增加甚至有极度聚集倾向的蛋白(如逆转录病毒跨膜蛋白)的整体溶解性(Scholz等,2005,JMB 345,1229-1241和WO 03/000877)。

[0009] 尽管FkpA和SlyD尤其适用于帮助有难度的或有聚集倾向的蛋白在诊断试剂(更一般地讲,生物技术应用)中采取和保持其天然结构,但仍存在热稳定性的难题。蛋白的天然构象通过范德华接触、氢键、盐桥和疏水作用的细致平衡的网络来稳定。优化这些接触成为相应蛋白的微环境,pH、离子强度或温度的改变确实扰动折叠和去折叠分子之间的平衡。温度的增加尤其适合于变性蛋白,其常常导致完全或部分去折叠的分子聚集。热诱导的蛋白聚集和伴随的功能丧失对任何蛋白制品都构成严重问题。完全可以想到的是,在蛋白试剂或制品的不恰当装运或储存过程中可能发生温度升高,或者更一般地讲,可能发生热应激。

[0010] 例如,分子伴侣融合组件如SlyD显示于约42°C的温度发生热诱导的去折叠,但是例如在用于转运、装运或储存蛋白制品的容器中的冷却系统有缺陷时很容易超过42°C。就靶蛋白X高度疏水并完全依赖于其融合配偶体的分子伴侣活性的情况而言,SlyD组件一去折叠,完整的融合多肽就将聚集,并伴随失去其溶解功能。换句话说,当X为非常疏水并有聚集倾向的客户蛋白时,SlyD的稳定性限制SlyD-X融合多肽的整体稳定性。

[0011] 含有FkpA的融合蛋白显示出稍微增加的稳定性,这可能归因于二聚化FkpA载体组件的较高内在热稳定性。大肠杆菌SlyD的解链温度已被确定为约42°C,而FkpA直至约50°C还相当稳定。然而,由于在以下章节中概述的原因,仍极度需要提供具有高内在稳定性的替代功能分子伴侣变体。

[0012] 在双抗原夹心(DAGS)形式的异质免疫测定中,例如,在测定的任一侧使用抗原的两个变体。这些变体之一携带对固相具有高亲和力的标记,另一个携带发信号部分,以便产生信号输出。这些抗原变体中的每一个均可以融合辅助序列,即载体或融合组件。至少一个分子伴侣(或功能性多肽结合域,即分子伴侣结构域)附着或融合至靶多肽,促进折叠,增加稳定性和溶解性,并将靶多肽保持为适宜构象,以便要测定的抗体分析物可特异性识别并结合靶多肽。优选地,不同的分子伴侣在免疫桥测定的任一侧均用作融合配偶体,以便打破测定的固有对称性。在任一侧(即在捕获侧和检测侧)含有不同载体或融合组件但含有相同或相似的靶多肽的测定形式也可以被称为不对称的DAGS形式。通过在DAGS测定的每一侧使用不同的融合组件,可显著降低由于载体组件而发生免疫交叉反应的风险以及伴随的错误高信号。

[0013] 显然,测定的整体稳定性受限于具有最低固有稳定性的免疫组件。在不对称DAGS中使用FkpA和SlyD作为融合配偶体时,SlyD是限制整体稳定性的融合配偶体。因此,明显需要发现其它分子伴侣,其可在功能上完全替代SlyD,并固有地对热应激更稳定。即便已描述了大量来自嗜热或超嗜热生物的SlyD同源物,但对仅使用这些蛋白作为融合配偶体作一个提示:因为它们已对远超过60°C的温度进行了进化和优化,所以它们具有极高的热动力稳定性。因此,稳定和超稳定的蛋白经常倾向于在环境温度变成相当刚性的,即它们失去了柔韧性,而柔韧性是动态结合靶分子的先决条件。被广泛认可的是,蛋白的稳定性仅可以在损害其柔韧性和功能这二者的情况下增加,这经常阻止高稳定性蛋白于环境温度的应用。因

此,本发明的目标是由嗜温生物鉴定热稳定的折叠辅助物。本发明的又一个目标是提供适于诊断和生物技术应用的多肽,其具有增加的热稳定性,并延长诊断试剂和蛋白制品的保存期限。

[0014] 据最近Kwon等人(BMB reports 2008,41(2),108-111)的报道,大肠杆菌的一些蛋白于远超出49°C的温度是稳定且可溶的。通过SDS聚丙烯酰胺凝胶电泳鉴定在暴露于提升的温度时可溶的蛋白。用大肠杆菌的超声提取物于多个温度温育后进行研究。在已鉴定的17种热稳定蛋白中,6种蛋白原来是推定的折叠辅助物(GroEL、GroES、DnaK、FkpA、触发因子、EF-T)。值得注意的是,该实验采用大肠杆菌的无细胞裂解物,相应蛋白的溶解性被视为稳定性的唯一标准。

[0015] 然而,在蛋白的溶解性和稳定性之间有显著差异。在本领域众所周知,蛋白的溶解性经常在最大稳定性的条件下达到最小值。例如,蛋白的热力学稳定性在缓冲溶液的pH与相应蛋白的pI一致时达到最大值。然而,在这些特别条件下,蛋白溶解性达到最小值。另一个普遍的实例是利用硫酸铵或其它氢键形成剂(cosmotropic agents)的蛋白盐析:蛋白的溶解性在此也随其稳定性增加而降低(硫酸铵是强氢键形成剂,即其稳定蛋白结构)。

[0016] WO 2007/077008公开了重组产生的嵌合融合蛋白,其含有非人分子伴侣如大肠杆菌SlyD的多肽结合区段,以及N-和C-末端融合至该区段的人FKBP型肽基脯氨酰顺/反异构酶。已公开了使用SlpA的分子伴侣区段的类似融合多肽。

[0017] 令人惊奇的是,SlpA,尤其是大肠杆菌SlpA,在用作融合配偶体时能够赋予其它靶多肽热稳定性。如Hottenrott等人(出处同上)所报道,SlpA是肽基脯氨酰顺/反异构酶活性相当差的酶。出乎意料的是,SlpA也表现出显著的分子伴侣特征,更令人惊奇的是,SlpA具有高内在稳定性,并且赋予融合的靶多肽热稳定性,由此使靶多肽对热诱导的聚集不敏感。而密切相关的SlyD仅表现出临界稳定性,于约42°C具有热去折叠中点,SlpA至少到50°C仍保留其天然折叠,于约56°C显示出热去折叠中点(定义为解链温度)。在已知SlyD和SlpA(其代替SlyD样蛋白)之间的密切关系并已知二者均是得自嗜温生物如大肠杆菌的单体蛋白、具有49°C的最大生长温度这一事实的情况下,这确实令人费解。最令人惊奇的是,嗜温生物大肠杆菌具有推定的折叠辅助物,例如SlpA,其组合了突出的热稳定性和分子伴侣特征。

[0018] 发明概述

[0019] 本发明涉及编码含有SlpA分子伴侣和靶多肽的融合蛋白的重组DNA分子、编码所述融合蛋白的相应表达载体以及用所述表达载体转化的宿主细胞。本发明的另一方面是生产所述融合蛋白的方法以及含有SlpA分子伴侣和靶多肽的重组产生的融合蛋白。本发明的又一方面是在重组产生的融合蛋白作为结合配偶体(例如抗原、酶或重组校准物质)或在免疫测定中用作降低干扰的工具的用途。此外,本发明涉及重组产生的融合蛋白作为免疫原用于生产针对所述靶多肽的抗体的用途,并涉及重组产生的融合蛋白在疫苗生产中的用途。又一方面是使用重组产生的融合蛋白以及含有重组产生的融合蛋白的试剂盒在免疫测定中检测分析物的方法,所述重组产生的融合蛋白含有SlpA分子伴侣和靶多肽。又一方面涉及SlpA在免疫测定中作为降低干扰和交叉反应的工具的用途。本发明的又一方面是在含有SlpA和靶蛋白的可溶性功能复合物预期用于生物技术应用用途,由此靶蛋白可具有治疗或诊断价值。

[0020] 附图简述

[0021] 图1:大肠杆菌的S1pA的近-UV CD光谱。用Jasco-720分光偏振计在恒温池架中于20℃记录光谱。在1cm比色皿中的蛋白浓度为417 μ M。缓冲液为50mM磷酸钾pH 7.5、100mM KCl、1mM EDTA。带宽为2nm,分辨率为0.5nm,扫描速度为50nm/分钟,响应为2s。光谱记录9次,并平均,以便改善信噪比。将信号转变为平均残基椭圆率(以deg cm² dmol⁻¹给出)。光谱指向天然样折叠蛋白,信号最大值位于262nm。

[0022] 图2:大肠杆菌的S1yD的近-UV CD光谱。用Jasco-720分光偏振计在恒温池架中于20℃记录光谱。在1cm比色皿中的蛋白浓度为200 μ M。缓冲液为50mM磷酸钾pH 7.5、100mM KCl、1mM EDTA。带宽为2nm,分辨率为0.5nm,扫描速度为50nm/分钟,响应为1s。光谱记录9次,并平均,以便改善信噪比。将信号转变为平均残基椭圆率(以deg cm² dmol⁻¹给出)。S1yD的光谱与S1pA的光谱显著不同。其指向天然样折叠的蛋白,信号最大值位于275nm。

[0023] 图3:据275nm(S1yD)和262nm(S1pA)的近UV CD监测的S1yD和S1pA的热诱导去折叠转换。解链曲线标准化为天然分子的百分率。S1yD和S1pA的去折叠是完全可逆的,当样品被冷却至环境温度时,在热转换后天然分子的近-UV CD信号可被完全恢复。解链温度(即50%的分子折叠和50%去折叠的温度)对S1yD为42℃,对S1pA为56℃。图3清晰揭示了S1pA的优良热稳定性。

[0024] 图4:S1pA-gp41融合蛋白的近-UV CD光谱。用Jasco-720分光偏振计在恒温池架中于20℃记录光谱。在1cm比色皿中的蛋白浓度为18.7 μ M。缓冲液为50mM磷酸钾(pH 7.5)、100mM KCl、1mMEDTA。带宽为2.0nm,分辨率为0.5nm,扫描速度为50nm/分钟,响应为2s。光谱记录9次,并平均,以便改善信噪比。将信号转变为平均残基椭圆率(以deg cm² dmol⁻¹给出)。光谱指向天然样折叠的蛋白。于293的信号最小值指示天然样折叠的gp41胞外域片段,该片段富含色氨酸残基,并吸收280nm以上的光。290nm左右的特征明确地指向S1pA-gp41融合多肽中天然样折叠的gp41部分。

[0025] 图5:S1yD-gp41融合蛋白的近-UV CD光谱。用Jasco-720分光偏振计在恒温池架中于20℃记录光谱。在1cm比色皿中的蛋白浓度为14.4 μ M。缓冲液为50mM磷酸钾(pH 7.5)、100mM KCl、1mMEDTA。带宽为2.0nm,分辨率为0.5nm,扫描速度为50nm/分钟,响应为2s。光谱记录9次,并平均,以便改善信噪比。将信号转变为平均残基椭圆率(以deg cm² dmol⁻¹给出)。于293的信号最小值指示天然样折叠的gp41胞外域片段,该片段富含色氨酸残基,并吸收280nm以上的光。290nm左右的特征强烈指向S1yD-gp41融合多肽中天然样折叠的gp41部分。

[0026] 图6A/B:通过270nm的圆二色性信号的降低监测S1yD-gp41(A)和S1pA-gp41(B)的热诱导去折叠。对应的分子伴侣融合配偶体的去折叠伴随着其溶解能力的丧失,并导致极为疏水的gp41部分的自发聚集。对于S1yD-gp41,聚集于约40℃发生,对于S1pA-gp41,聚集于约56℃发生。椭圆率以毫度(mdeg)给出,超过其发生(不可逆)聚集的临界温度限以虚线突出显示。

[0027] 图7:通过280nm的近-UV CD监测的S1yD-gG1(26-189)的热诱导去折叠转换。作为温度函数的融合蛋白的椭圆率以毫度(mdeg)给出。S1yD-gG1(26-189)的去折叠大部分是可逆的,当样品被冷却至环境温度时,天然融合多肽的近-UV CD信号大部分恢复。S1yD-gG1(26-189)的解链温度(即50%的分子折叠和50%去折叠的温度)接近53℃。

[0028] 图8:通过220nm的远-UV CD监测的S1pA-gG1(26-189)的热诱导去折叠转换。作为

温度函数的融合蛋白的椭圆率以毫度(mdeg)给出。S1pA-gG1(26-189)的去折叠大部分是可逆的,当样品被冷却至室温时,天然融合多肽的远-UV CD信号大部分恢复。S1pA-gG1(26-189)的解链温度(即50%的分子折叠和50%去折叠的温度)接近63°C。这清楚阐明了S1pA-gG1(26-189)与S1yD-gG1(26-189)相比时的优良热稳定性。

[0029] 图9:在自动化ElecSys®分析仪中S1pA-gG1(26-189)和S1yD-gG1(26-189)与人抗-HSV-1阳性血清和抗-HSV-1阴性血清的免疫反应性,如在实施例4中所述。表1显示了在苛刻的60°C过夜热处理之前和之后两种抗原变体的效力。实验结果清楚表明了热应激的S1pA-gG1(26-189)以双重方式超越热应激的S1yD-gG1(26-189)的优越性。首先,采用抗-HSV-1阳性血清的信号回收率(表1的上半部分)对于热应激的S1pA融合多肽显著较高。其次,采用抗-HSV-1阴性血清的背景信号增加(表1的下半部分)对于热应激的S1pA融合多肽显著较低。两种作用均改善免疫测定的信号动力学,突显了S1pA作为赋予稳定性和溶解性的融合配偶体对有难度的靶蛋白的优势。因此,免疫测定的灵敏度可通过使用S1pA代替密切相关的S1yD作为融合配偶体来保证。

[0030] 序列表简述

[0031] SEQ ID NO.1显示了大肠杆菌S1pA的完整氨基酸序列(149个氨基酸),由SwissProt数据库登录号P0AEM0得到:

[0032] MSESVQSNSA VLVHFTLKL DGTTAESTRN NGKPALFRLG DASLSEGLEQ HLLGLKVGDK

[0033] TTFSLEPDAA FGVPSDLIQ YFSRREFMDA GEPE1GA1ML FTAMDGSEMP GVIREINGDS

[0034] 1TVDFNHPLA GQTVHFD1EV LE1DPALEA

[0035] SEQ ID NO.2显示了如在实施例章节中使用的大肠杆菌S1pA的氨基酸序列(氨基酸丝氨酸2至谷氨酸148)。在大肠杆菌中协同翻译除去N-末端甲硫氨酸。为利于克隆,C-末端丙氨酸也已被除去。此外,已加入C-末端六组氨酸标签,以利于蛋白的纯化和重折叠:

[0036] SESVQSNSAV LVHFTLKLDD GTTAESTRNN GKPALFRLGD ASLSEGLEQH LLGLKVGDKT

[0037] TFSLEPDAAF GVPSPDLIQY FSRREFMDAG EPE1GA1MLF TAMDGSEMPG VIREINGDS1

[0038] TVDFNHPLAG QTVHFD1EVL E1DPALEHHH HHH

[0039] SEQ ID NO.3显示了大肠杆菌S1pA-gp41的氨基酸序列。gp41部分含有H1V1 gp41的氨基酸536-681,S1pA部分含有氨基酸1-146。该序列带有已加入的C-末端六组氨酸标签,以利于融合蛋白的纯化和重折叠。

[0040] MSESVQSNSA VLVHFTLKL DGTTAESTRN NGKPALFRLG DASLSEGLEQ HLLGLKVGDK

[0041] TTFSLEPDAA FGVPSDLIQ YFSRREFMDA GEPE1GA1ML FTAMDGSEMP GVIREINGDS

[0042] 1TVDFNHPLA GQTVHFD1EV LE1DPAGGGS GGGSGGGSGG GSGGGSGGGT LTVQARQLLS

[0043] G1VQQNNEL RA1EAQQHLE QLTVWGTKQL QARELAVERY LKDQQLLG1W GCSGKLICTT

[0044] AVPWNASWSN KSLEQ1WNNM TWMEWDREIN NYTSLIHSL1 EESQNQQEKN EQELLELDKW

[0045] ASLWNWFNIT NLWYLEHHH HHH

[0046] SEQ ID NO.4显示了大肠杆菌S1pA-S1pA-gp41的氨基酸序列。两个S1pA单元连接至HIV gp41胞外域,构成了有强烈聚集倾向的靶多肽。第一个S1pA单元含有氨基酸1-146,第二个S1pA单元含有氨基酸2-149(就功能性和稳定性而言两个S1pA变体完全等同)。已加入C-末端六组氨酸标签,以利于融合蛋白的纯化和重折叠。

[0047] MSESVQSNSA VLVHFTLKL DGTTAESTRN NGKPALFRLG DASLSEGLEQ HLLGLKVGDK

[0048] TTFSLEPDAA FGVPSPLD1Q YFSRREFMDA GEPE1GA1ML FTAMDGSEMP GVIREINGDS
[0049] 1TVDFNHPLA GQTVHFD1EV LE1DPAGGGS GGGSGGGSGG GSGGGSGGGG ESVQSNSAVL
[0050] VHFTRLKDDG TTAESTRNNG KPALFRLGDA SLSEGLEQHL LGLKVGDKTT FSLEPDAAFG
[0051] VPSPDL1QYF SRREFMDAGE PE1GA1MLFT AMDGSEMPGV IREINGDS1T VDFNHPLAGQ
[0052] TVHFD1EVLE 1DPALEAGGG SGGSGGGSGG GSGGGSGGGG TLTVQARQLL SG1VQQQNE
[0053] LRA1EAQQHL EQLTVWGTKQ LQARELAVER YLKDQQLLGI WGC SGKLICT TAVPWNASWS
[0054] NKSLEQ1WNN MTWMEWDRE1 NNYTSL1HSL 1EESQNQQEK NEQELLELDK WASLWNWFN1
[0055] TNWLWYLEHH HHHH

[0056] SEQ 1D NO.5显示了大肠杆菌S1yD-gp41的氨基酸序列。已加入C-末端六组氨酸标签,以利于蛋白的纯化和体外重折叠。

[0057] MKVAKDLVVS LAYQVRTEDG VLVDESPVSA PLDYLHGHGS LISGLETAL E GHEVGDKFDV
[0058] AVGANDAYGQ YDENLVQRVP KDVFMGVDEL QVGMFLAET DQGPVPVEIT AVEDDHVVVD
[0059] GNHMLAGQNL KFNVEVVA1R EATEEELAHG HVHGAHDHHH DHDHDGGGSG GSGGGSGGG
[0060] SGGSGGGTTL TVQARQLLSG 1VQQQNNELR A1EAQQHLEQ LTVWGTKQLQ ARELAVERYL
[0061] KDQQLLGIWG CSGKLICTTA VPWNASWSNK SLEQ1WNNMT WMEWDREINN YTSL1HSL1E
[0062] ESQNQQEKNE QELLELDKWA SLWNWFN1TN WLWYLEHHHH HH

[0063] SEQ 1D NO.6显示了大肠杆菌S1yD-S1yD-gp41的氨基酸序列。两个S1yD单元融合至靶多肽gp41。已加入C-末端六组氨酸标签,以利于蛋白的纯化和体外重折叠。

[0064] MKVAKDLVVS LAYQVRTEDG VLVDESPVSA PLDYLHGHGS LISGLETAL E GHEVGDKFDV
[0065] AVGANDAYGQ YDENLVQRVP KDVFMGVDEL QVGMFLAET DQGPVPVEIT AVEDDHVVVD
[0066] GNHMLAGQNL KFNVEVVA1R EATEEELAHG HVHGAHDHHH DHDHDGGGSG GSGGGSGGG
[0067] SGGSGGGKV AKDLVVS LAY QVRTEDGV LV DESPVSA PLD YLHGHGSLIS GLETAL E GHE
[0068] VGDKFDVAVG ANDAYGQYDE NLVQRVPKDV FMGVDELQVG MRFLAETDQG PVPVEITAVE
[0069] DDHVVDGNH MLAGQNLKFN VEVVA1REAT EEELAHGHVH GAHDHHDHD HDGGSGGGG
[0070] GGGSGGGSGG GSGGGTLTVQ ARQLLSG1VQ QQNNELRA1E AQQHLEQLTV WGTKQLQARE
[0071] LAVERYLKDQ QLLGIWGCSG KLICTTAVPW NASWSNKSLE Q1WNNMTWME WDRE1NNYTS
[0072] L1HSL1EESQ NQQEKNEQEL LELDKWASLW NWFN1TNWLW YHGHHDHDH HHHHH

[0073] SEQ 1D NO.7显示了融合多肽S1pA-gG1的氨基酸序列。1个S1pA单元融合至靶多肽gG1,该靶多肽gG1含有如在实施例4中使用的人单纯疱疹病毒HSV-1抗原gG1的氨基酸26-189。

[0074] MSESVQSNSA VLVHFTLKL DGTTAESTRN NGKPALFRLG DASLSEGLEQ HLLGLKVGDK
[0075] TTFSLEPDAA FGVPSPLD1Q YFSRREFMDA GEPE1GA1ML FTAMDGSEMP GVIREINGDS
[0076] 1TVDFNHPLA GQTVHFD1EV LE1DPALEGG GSGGGSGGGG GGGSGGGSGG GPTNVSSTTQ
[0077] PQLQTTGRPS HEAPNMTQTG TTDSPTA1SL TTPDHTPPMP SIGLEEEEE E EGAGDGEHLE
[0078] GGDGTRDTLP QSPGPAFPLA EDVEKDKPNR PVPSPDPNN SPARPETS RP KTPPT11GPL
[0079] ATRPTTRLTS KGRPLVPTPQ HTPLFSFLTA SPALDLEHHH HHH

[0080] SEQ 1D NO.8显示了融合多肽S1yD-gG1的氨基酸序列。1个S1yD单元融合至靶多肽gG1,该靶多肽gG1含有如在实施例4中使用的人单纯疱疹病毒HSV-1抗原gG1的氨基酸26-189。

[0081] MKVAKDLVVS LAYQVRTEDG VLVDESPVSA PLDYLHGHGS LISGLETAL E GHEVGDKFDV
 [0082] AVGANDAYGQ YDENLVQRVP KDVFQGVDEL QVGMRF LAET DQGPVPVEIT AVEDDHVVVD
 [0083] GNHMLAGQNL KFNVEVVAIR EATEEELAHG HVHGAHDHHH DHDHDGGGSG GSGGGSGGG
 [0084] SGGGSGGGPT NVSSTTQPQL QTTGRPSHEA PNMTQTGTTD SPTA1SLTTP DHTPPMPSIG
 [0085] LEEEEEEGA GDGEHLEGGD GTRDTLPQSP GPAFPLAEDV EKDKPNRPVV PSPDPNNSPA
 [0086] RPETSRPKTP PT11GPLATR PTTRLTSKGR PLVPTPQHTP LFSFLTASPA LDLEHHHHHH
 [0087] SEQ ID NO.9显示了依据Swiss Prot ID:Q9CKP2的多杀巴斯德杆菌(*Pasteurella multocida*)SlyD(全长)的氨基酸序列。

[0088] MK1AKNVVVS 1AYQVRTEDG VLVDEAPVNQ PLEYLQGHNN LVIGLENALE GKAVGDKFEV
 [0089] RVKPEEAYGE YNENMVQRVP KDVFQGVDEL VVGMRFIADT DIGPLPVVIT EVAENDVVVD
 [0090] GNHMLAGQEL LFSVEVVATR EATLEE1AHG HIHQEGGCCG GHHHDSDEEG HCGCGSHHH
 [0091] HEHEHHAHDG CCGNGGCKH
 [0092] SEQ ID NO.10显示了C-末端截短的、无半胱氨酸的多杀巴斯德杆菌SlyD变体的氨基酸序列,其优选在双抗原夹心免疫测定中用作融合蛋白的分子伴侣单元(PmS SlyD 1-156):

[0093] MK1AKNVVVS 1AYQVRTEDG VLVDEAPVNQ PLEYLQGHNN LVIGLENALE GKAVGDKFEV
 [0094] RVKPEEAYGE YNENMVQRVP KDVFQGVDEL VVGMRFIADT DIGPLPVVIT EVAENDVVVD
 [0095] GNHMLAGQEL LFSVEVVATR EATLEE1AHG HIHQEG
 [0096] SEQ ID NO.11显示了依据Swiss Prot ID:P45523的大肠杆菌FkpA(全长)的氨基酸序列:

[0097] MKSLFKVTLL ATTMAVALHA PITFAAEAAK PATAADSKAA FKNDDQKSAY ALGASLGRYM
 [0098] ENSLKEQEKL G1KLDKQLI AGVQDAFADK SKLSDQE1EQ TLQAFEARVK SSAQAKMEKD
 [0099] AADNEAKGKE YREKFAKEKG VKTSSTGLVY QVVEAGKGEA PKSDTVVVN YKGTLDGKE
 [0100] FDNSYTRGEP LSFRLDGVIP GWTEGLKNIK KGGK1KLVIP PELAYGKAGV PGIPPNSTLV
 [0101] FDVELLDVKP APKADAKPEA DAKAADSACK

[0102] SEQ ID NO.12显示了大肠杆菌FkpA的氨基酸序列部分,其优选在双抗原夹心免疫测定中用作融合蛋白的分子伴侣单元。该序列没有N-末端信号序列(氨基酸残基1-25),并基本上对应于成熟FkpA(FkpA 26-270):

[0103] AEAAPATAA DSKAAFKNDD QKSAYALGAS LGRYMENSLK EQEKLGIKLD KDQLIAGVQD
 [0104] AFADKSKLSD QE1EQTLQAF EARVKSSAQA KMEKDAADNE AKGKEYREKF AKEKGVKTSS
 [0105] TGLVYQVVEA GKGEAPKDS D TVVVNYKGT L IDGKEFDNSY TRGEPLSFRL DGVIPGWTEG
 [0106] LKNIKGGK1 KLV1PELAY GKAGVPG1PP NSTLVFDVEL LDVKPAPKAD AKPEADAKAA
 [0107] DSACK

[0108] SEQ ID NO.13显示了EB病毒核抗原1(EBV核抗原1或EBNA-1)401-641位的氨基酸序列,(EBV=HHV-4=人疱疹病毒4);毒株B95-8。EBNA-1的完整氨基酸序列由641个残基组成,可按照Swiss Prot IDP03211得到。天然半胱氨酸残基对于EBNA-1的抗原性不是必要的,已被改变为丙氨酸(标下划线的),以便简化纯化过程和增加天然样折叠的溶解性蛋白的收率。

[0109] GRRPFHPVG EADYFEYHQE GPGDGE PDVP PGA1EQGPAD DPGEGPSTGP RGQGDGRRK

[0110] KGGWFGKHRG QGGSNPKFEN IAEGLRALLA RSHVERTTDE GTWVAGVFVY GGSKTSLYNL

[0111] RRGTALAIPQ ARLTPLSRLP FGMAPGPGPQ PGPLRESIVA YFMVFLQTHI FAEVLKDAIK

[0112] DLVMTKPAPTANIRVTVASF DDGVDLPPWF PPMVEGAAAE GDDGDDGDEG GDGDEGEEGQ E

[0113] SEQ ID NO.14显示了依据Swiss Prot ID P14348的EB病毒蛋白p18的氨基酸序列的氨基酸1-176(可读框BFRF3,HHV-4/B95-8)。在氨基酸位56的天然半胱氨酸残基对于EBV p18的抗原性不是必要的,已被改变为丙氨酸(标下划线的),以便简化纯化过程和增加天然样折叠的溶解性蛋白的收率。

[0114] MARRLPKPTL QGRLEADFPD SPLLPKFQEL NQNNLPNDVF REAQRSYLVF LTSQFA~~Y~~EEY

[0115] VQRTFGVPRR QRAIDKRQRA SVAGAGAHAAH LGGSSATPVQ QAQAAASAGT GALASSAPST

[0116] AVAQSATPSV SSSISSLRRA TSGATAAASA AA~~A~~VDTGSGG GGQPHDTAPR GARKKQ

[0117] SEQ ID NO.15显示了依据Swiss Prot ID P14348的EB病毒蛋白p18的C-末端部分的氨基酸序列的氨基酸105-176(可读框BFRF3,HHV-4/B95-8)。

[0118] AASAGTGALA SSAPSTAVAQ SATPSVSSSI SSLRAATSGA TAAASAAAAV DTGSGGGGQP

[0119] HDTAPRGARK KQ

[0120] SEQ ID NO.16显示了依据Swiss Prot ID P03197的EB病毒蛋白p23的氨基酸序列的氨基酸1-162(可读框BLRF2,HHV-4/B95-8)。在氨基酸位46的天然半胱氨酸对于EBV p23的抗原性不是必要的,已被改变为丙氨酸(标下划线的),以便简化纯化过程和增加天然样折叠的溶解性蛋白的收率。

[0121] MSAPRKVRLP SVKAVDMSME DMAARLARLE SENKALKQQV LRGGA~~A~~ASST SVPSAPVPPP

[0122] EPLTARQREV MITQATGRLA SQAMKK1EDK VRKSVDGVTT RNEMENILQN LTLRIQVSML

[0123] GAKGQSPGGE GTRPRESNDP NATRRARSRS RGREAKKVQI SD

[0124] SEQ ID NO.17显示了如在实施例1中使用和显示的富含甘氨酸的接头肽序列L=(GGGS)₅GGG,用于克隆含有SlpA和靶多肽的表达盒。

[0125] GGGSGGGSGG GSGGGSGGGS GGG

[0126] 发明详述

[0127] 本发明的一个方面是编码融合蛋白的重组DNA分子,其含有有效连接的至少一个编码靶多肽的核苷酸序列,以及该核苷酸序列上游或下游的至少一个编码SlpA分子伴侣单元的核苷酸序列。

[0128] 术语“重组DNA分子”是指通过组合两个分开的序列区段得到的DNA分子,所述组合通过基因工程技术或化学合成人工操作分离的多核苷酸区段来完成。这样做,人们可以将具有所需功能的多核苷酸区段连接在一起,从而产生所需的功能组合。

[0129] 多核苷酸序列在它们彼此处于功能关系时是有效连接的。例如,如果启动子控制编码序列的转录或表达,则启动子有效连接至编码序列。一般而言,有效连接指连接的序列是连续的,在必须连接两个蛋白编码区的情况下,二者是连续的并在可读框内。然而,众所周知的是,某些遗传元件,如增强子,即使相隔一定距离时--即纵使不连续,也可以有效连接。

[0130] 术语“上游”和“下游”是功能上的定义,是指编码核苷酸序列链的方向或极性。“上游”方向意指核苷酸位于给定多核苷酸序列的5'方向,即朝向起始核苷酸。就氨基酸序列而言,术语“上游”释为/指位于N-末端方向的氨基酸,即朝向多肽链的起始处。优选地,编码

S1pA分子伴侣单元的核苷酸序列位于编码靶多肽的核苷酸序列的上游。

[0131] “下游”方向是指核苷酸位于多核苷酸的3'方向,即朝向核苷酸序列的末端。就氨基酸序列而言,术语“下游”解释为位于C-末端方向的氨基酸,即朝向多肽链的末端。

[0132] 多核苷酸被说成“编码”多肽,多核苷酸在其天然状态下或通过本领域已知的方法操作时,可被转录为核苷酸模板和/或被翻译,以产生多肽或其片段。

[0133] 本发明的另一方面是含有有效连接的重组DNA分子的表达载体,该重组DNA分子含有至少一个编码靶多肽的核苷酸序列,以及该核苷酸序列的上游或下游的至少一个编码S1pA分子伴侣的核苷酸序列。

[0134] 制备用于导入到宿主中的DNA构建体通常含有宿主识别的复制系统,包括编码所需靶融合肽的预期DNA片段,优选还包括与多肽编码区段有效连接的转录和翻译起始调节序列。表达系统(表达载体)可以包括例如复制起点或自主复制序列(ARS)和表达控制序列、启动子、增强子和必需的加工信息位点,例如核糖体结合位点、RNA剪接位点、聚腺苷酸化位点、转录终止序列和mRNA稳定序列。

[0135] 选择适宜的启动子和其它必需的载体序列,以便在宿主中有功能。许多在细菌、酵母、哺乳动物、昆虫、植物或其它细胞中有用的表达载体是本领域已知的,并市售可得。另外,可将构建体连接至可扩增的基因,以便可以获得该基因的多个拷贝。

[0136] 表达和克隆载体有可能含有选择标记,其为编码对载体转化的宿主细胞的存活和生长所必需的蛋白的基因,尽管这样的标记基因可在另一个共导入宿主细胞中的多核苷酸序列上携带。在选择性条件下只有表达标记基因的那些宿主细胞才存活和/或生长。典型的选择基因包括但不限于编码以下蛋白的那些基因:(a)赋予对抗生素或其它毒素物质(例如氨基青霉素、四环素等)的抗性的蛋白;(b)补充营养缺陷的蛋白;或(c)提供由复合培养基无法获得的关键营养物的蛋白。适宜的选择标记的选择取决于宿主细胞,用于不同宿主的适宜标记是本领域已知的。

[0137] 可通过本领域已知的任何方法将含有目标多核苷酸的载体导入到宿主细胞中。这些方法随对应宿主系统的类型变化,包括但不限于使用氯化钙、氯化铷、磷酸钙、DEAE-葡聚糖、其它物质转染,以及通过病毒感染。本发明的大量多核苷酸和多肽可通过在相适的宿主细胞中的载体或其它表达载体中表达本发明的多核苷酸来制备。最常用的原核宿主为大肠杆菌菌株,尽管还可以使用其它原核生物,例如枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)。

[0138] 在大肠杆菌中表达代表了实施本发明的优选模式。表达含有至少一个S1pA单元和至少一个靶多肽X单元的融合蛋白,或者,共表达S1pA和X,以产生可溶性S1pA-X复合物,无论S1pA和X是否共价连接,这在原核以及在真核宿主细胞中均是可行的。

[0139] 使用常规的连接技术构建依据本发明的载体。切割、修整分离的质粒或DNA片段,并以产生所需质粒需要的形式再连接。如有需要,以已知方式进行分析,以证实在构建质粒中的正确序列。适用于构建表达载体、制备体外转录物、将DNA导入宿主细胞中以及进行分析来评价表达和功能的方法是本领域技术人员已知的。可直接检测样品中的基因存在情况、扩增和/或表达,例如通过常规的DNA印迹、定量mRNA的转录的RNA印迹、点印迹(DNA或RNA分析)或使用可基于本文提供的序列的适宜标记探针进行的原位杂交。如果需要,本领域的技术人员很容易设想如何修改这些方法。

[0140] 本发明的又一个实施方案为用含有有效连接的重组DNA分子的表达载体转化的宿

主细胞,所述重组DNA分子含有至少一个编码靶多肽的核苷酸序列,以及在该核苷酸序列上游或下游的至少一个编码S1pA分子伴侣的核苷酸序列。

[0141] 本发明的另一个实施方案涉及在原核或真核宿主中共表达S1pA和靶多肽的方法,由此过量生产的S1pA与靶多肽相互作用,并形成可溶性非共价复合物,该复合物有利于制备天然样折叠的且有活性的靶多肽。这意味着编码S1pA的DNA序列和靶多肽可位于同一载体上,并由相同或不同的启动子控制。或者,编码S1pA和靶多肽的DNA分子可位于不同的相适载体上。为了同时表达S1pA和靶多肽,用两种载体转化宿主细胞。优选地,编码靶蛋白和S1pA的基因由响应于不同诱导物的不同启动子控制。因此,可以采用受控或限定的方式同时或连续进行S1pA和靶蛋白的诱导。例如,可首先诱导S1pA表达,以产生基础水平的功能性分子伴侣,随后可进行靶基因的诱导。暂且不谈此随后的方案,同时诱导折叠辅助物和靶多肽是可行的,同样可以产生溶解性和功能性的靶蛋白。编码S1pA和靶蛋白的基因可位于相同或不同载体上。

[0142] 术语“融合蛋白”是指两个分开或独立的多肽功能性地组合在一条多肽链上。融合蛋白的单个元件,即S1pA分子伴侣部分和靶多肽部分(也称为靶多肽X),可彼此直接邻接。可选地,它们被1-100个氨基酸残基、优选5-30个氨基酸残基、最优选约20个氨基酸残基的肽接头分隔。技术人员会认识到,这样的接头多肽被设计为对预期用途最适合的,尤其是就长度、柔性、电荷和亲水性而言。接头多肽序列还可以包含蛋白水解切割位点。可选地,融合蛋白还可以包含信号肽序列,用于将蛋白靶向其中应发生折叠的目标区室。

[0143] 按照本发明,1个以上的靶多肽X,例如2、3或4个拷贝的靶多肽,可以为融合蛋白的组成部分。作为实例,S1pA-X2指1个S1pA单元融合至2个X型的靶多肽单元。单个靶多肽单元可由或可不由接头多肽区段分隔。融合蛋白包含至少一个S1pA分子伴侣单元。串联、三重或更高的组合也可以构成融合蛋白,例如S1pA-S1pA-X或S1pA-S1pA-S1pA-X。其中靶多肽夹在至少两个分子伴侣单元之间的融合蛋白也是本发明的一部分,例如S1pA-X-S1pA或S1pA-S1pA-X-S1pA-S1pA。

[0144] S1pA是FKBP家族的推定肽基脯氨酰顺/反异构酶。按照SwissProt登录号POAEM0公开的大肠杆菌S1pA氨基酸序列示于SEQ ID NO.1。

[0145] 按照本发明,术语“编码S1pA分子伴侣的核苷酸序列”是指编码含有S1pA的多肽结合区段的多肽片段的核苷酸序列。术语分子伴侣的“多肽结合区段”表示分子伴侣的结合感受态部分,即结合并保持客户或底物多肽链并因此与其整合的部分,以降低有聚集倾向的折叠中间体的浓度,并利于以后的折叠。S1pA的“多肽结合区段”还可以被命名为1F结构域(在flap结构域中插入)。定义为自发折叠单元的蛋白结构域能够在适宜的重折叠条件下在水性溶液中采取天然样的稳定折叠。术语“多肽结合区段”、“1F-环”、1F-结构域或分子伴侣结构域可同义使用。

[0146] 依据本发明的“S1pA”或“S1pA分子伴侣”或“S1pA单元”包括S1pA的多肽结合区段或1F结构域。优选地,大肠杆菌S1pA的完整分子用作融合配偶体。或者,S1pA 1F结构域可以用作融合配偶体。其至少含有如下的片段:N-末端起始于SEQ ID NO.2的第59-78个氨基酸之间的任何氨基酸,C-末端终止于SEQ ID NO.2的第125-139个氨基酸之间的任何氨基酸。最优选的是编码N-末端起始于SEQ ID NO.2的第72个氨基酸(缬氨酸72)和C-末端终止于SEQ ID NO.2的第132个氨基酸(苏氨酸132)的多肽的序列。按照本发明,S1pA是指该分子伴

侣的成熟的非人源化形式。这意味着SlpA分子伴侣既不包含FKBP12或任何其它人FKBP的N-末端侧翼序列,也不包含其C-末端侧翼序列。

[0147] 依据本发明,来自其它生物的SlpA分子伴侣同源物可以与具有分子伴侣活性的脯氨酰异构酶组合用作折叠辅助物。这样的SlpA同源物可起源于以下的生物(Swiss Prot数据库1D号在括号中显示):福氏志贺菌(*Shigella flexneri*)(Prot.1D.P0AEM3)、宋内氏志贺菌(*Shigella sonnei*)(Prot.1D Q3Z5Y2)、痢疾志贺菌(*Shigella dysenteriae*)(Prot.1DQ32K69)、柯氏柠檬酸杆菌(*Citrobacter Koseri*)(Prot.1D A8ALT4)、伤寒沙门氏菌(*Salmonella typhi*)(Prot.1D Q8XG79)、鼠伤寒沙门氏菌(*Salmonella typhimurium*)(Prot.1D Q7CR92)、甲型和乙型副伤寒沙门氏菌(*Salmonella paratyphi*)(Prot.1D Q5PK15和A9MYG7)、猪霍乱沙门氏菌(*Salmonella choleraesuis*)(Prot.1D Q57TL3)、肺炎克雷伯菌(*Klebsiella pneumoniae*)(Q9RF46)、亚利桑那沙门氏菌(*Salmonella arizonae*)(Prot.1D A9MR44)、肠杆菌属(*Enterobacter sp.*)(Prot.1DA4W6E3)、阪崎肠杆菌(*Enterobacter sakazakii*)(A7M1M1)、变形斑沙雷氏菌(*Serratia proteamaculans*)(Prot.1D A8G9L6)、鼠疫耶尔森氏菌(*Yersinia pestis*)(Prot.1D Q8CZP4或Q0WJ19)、假结核耶尔森氏菌(*Yersinia pseudotuberculosis*)(Prot.1D A7FMD5)、耶尔森氏肠杆菌(*Yersinia enterocolitica*)(A1JJE3)、胡萝卜软腐欧文氏菌(*Erwinia carotovora*)(Prot.1D Q6D0C5)、发光光杆状菌(*Photobacterium luminescens*)(Prot.1D Q7N8X0)、*Sodalis glossinidius*(Prot.1D Q2NVY4)、*Idiomarina baltica*(Prot.1D A3WMS1)、哈维氏弧菌(*Vibrio harveyi*)(Prot.1D A6ATG3或A7MTD8)、创伤弧菌(*Vibrio vulnificus*)(Prot.1D Q7MNM6或Q8DES9)、坎氏弧菌(*Vibriocampbellii*)(Prot.1D A8T7R0)、*Vibrio shilonii*(Prot.1D A6D8Q3)、灿烂弧菌(*Vibrio splendidus*)(Prot.1D A3UXQ8)、*Idiomarina loihiensis*(Prot.1D Q5QZR6)、溶藻弧菌(*Vibrio alginolyticus*)(Prot.1D Q1V5T9)、杀鲑气单胞菌(*Aeromonas salmonicida*)(Prot.1D A4S1X7)、发光杆菌属(*Photobacterium sp.*)(Q2C7V1)、副溶血弧菌(*Vibrioparahaemolyticus*)(Prot.1D Q87S88或A6B565)、假单胞菌(*Pseudoalteromonas atlantica*)(Prot.1D Q15R06)、霍乱弧菌(*Vibrio cholerae*)(Prot.1D A5F8X4,或Q9KU45,或A6Y5H7,或A6XZU4,或A6ADB4,或A6A5W5,或A3H4C9,或A3GPA9,或A3EG01,或A2PSS5,或A2P8T9,或A1F6Q8)、嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*)(Prot.1D A0KG41)、*Vibrio angustum*(Prot.1D Q1ZMQ4)、南极细菌属(*Moritella sp.*)(Prot.1D A6FG75)、交替假单胞菌(*Pseudoalteromonas haloplanktis*)(Prot.1D Q31EA0)、*Alteromonadales bacterium*(Prot.1D A0Y1B2)、*Psychromonas ingrahamii*(Prot.1DA1SZP1)、费歇尔弧菌(*Vibrio fischeri*)(Prot.1D Q5E7N2或A91PH0)、*Photobacterium profundum*(Prot.1D Q1Z378或Q6LUK9)、*Pseudoalteromonas tunicata*(Prot.1D A4C627)、*Psychromonas sp.*(Prot.1D Q1ZHS3)、*Reineka sp.*(Prot.1D A4BJL0)、*Vibrio psychroerythrus*(Prot.1D Q486T8)、*Shewanella amazonensis*(Prot.1D A1S427)、希瓦氏菌属(*Shewanella sp.*)(Prot.1D Q0HFZ1或Q0HS84或A0KZY9)、*Shewanella pealeana*(Prot.1D A8H1H5)、*Shewanella frigidimarina*(Prot.1D Q07Z37)、*Shewanella denitrificans*(Prot.1D Q12KM6)、*Shewanella loihica*(Prot.1D A3QBX4)和腐败希瓦氏菌(*Shewanella putrefaciens*)(Prot.1D A4Y4A6)。

[0148] 按照本发明,SlpA分子伴侣序列可通过氨基酸取代(优选同源取代)、缺失和插入

来修饰,前提是保持S1pA分子伴侣的整体结构、功能和稳定性。通过确定所研究的含有靶多肽和S1pA分子伴侣序列的融合蛋白的解链温度,可易于测试该S1pA变体的功能保持。解链温度定义为50%的分子折叠和50%去折叠的温度,即解链温度确定了在给定的缓冲体系中于给定的蛋白浓度热诱导去折叠转换的中点。根据芳香族残基的含量,可通过简单的光谱探针如UV吸光度、荧光或圆二色性监测蛋白的解链。具体地说,圆二色性完全适合监测蛋白的二级结构(酰胺CD或远-UV CD)或三级结构(芳香族CD或近-UV CD)的构象变化。

[0149] 通过近-UV CD评价的热诱导S1pA去折叠揭示,去折叠过程是完全可逆的,即在样品由95℃冷却降至环境温度后,即降至15-25℃后,S1pA自发地再采取其天然构象。这种折叠和去折叠的可逆性在生物技术应用中是理想的折叠辅助物的必要前提条件:通常,当重组融合蛋白严重过度生产时,它们在大肠杆菌胞质中作为包涵体累积。在此情况下,必须精心设计强力有效的复性方案,以在7.0M氯化胍或其它离液剂如尿素中裂解的细菌细胞或包涵体开始。不言而喻的是,任何分子伴侣融合配偶体的重折叠必需足够强力、有效和可逆,以便帮助目标客户蛋白的体外重折叠。在先有技术中已知的许多融合配偶体,例如NusA、MBP(麦芽糖结合蛋白)和GST(谷胱甘肽-S-转移酶),在宿主细胞中翻译时表现出非常强的从头折叠,但它们在热诱导或化学诱导的去折叠后不易被重折叠。因此,为了在宿主系统中溶解性表达靶蛋白而使用这些融合配偶体。当它们在宿主细胞中翻译时,如果在从头折叠过程中不能赋予它们的客户蛋白溶解性,就难以通过体外复性试验恢复聚集的融合蛋白。按照本发明,完全可逆的融合配偶体如S1pA具有明显优势,因为其同样可在宿主细胞中从头折叠时导致溶解性蛋白产生。另外,S1pA依靠其折叠可逆性,同样可用于帮助融合多肽的体外重折叠,所述融合多肽在宿主细胞中大量过度生产时以不溶性包涵体累积。去折叠的完全可逆性连同高固有稳定性和显著的分子伴侣特征是本发明的融合配偶体的重要先决条件。S1pA完全满足这些标准。

[0150] 按照本发明,一个或多个、优选2个编码S1pA分子伴侣的核苷酸序列位于编码靶多肽的核苷酸序列的上游,产生含有2个邻接的S1pA单元的串联S1pA分子伴侣。一个或多个编码S1pA分子伴侣的核苷酸序列可被编码(按读框)1-100个氨基酸的肽接头的核苷酸序列分隔。可使用不同的核苷酸序列编码两个S1pA分子伴侣单元。同样,应使用不同的核苷酸序列编码融合多肽中所有其它的高重复性元件,例如接头或间隔区段。应该变性核苷酸序列,以避免由于大肠杆菌宿主中的无意重组事件而导致失去1个S1pA编码序列。通过细心选择相同或重复性氨基酸序列的不同密码子,可保证表达盒的稳定性。

[0151] 本发明的“靶多肽”可以为溶解性或稳定性有限的任何多肽(即任何氨基酸序列),其在不利条件下倾向于聚集,需要得到折叠辅助物支持或帮助,但条件是FK506结合蛋白(FKBP),尤其是人FK506结合蛋白,被排除作为靶多肽。这意味着FK506结合蛋白如人FKBP12被排除作为靶多肽。在优选的实施方案中,显示出聚集倾向性和/或对热应激敏感的多肽可以用作靶多肽。而且,具有酶活性的多肽为依据本发明的优选靶多肽。具体地说,接受并周转疏水底物(并因此具有它们自身的疏水表面模式)的酶是依据本发明的优选靶多肽。在进一步优选的实施方案中,细菌或病毒蛋白或朊蛋白或与类风湿性关节炎相关的蛋白用作靶多肽。

[0152] 哺乳动物病原体的任何结构性的、膜结合的、膜束缚的或分泌性的基因产物均可用作靶多肽。哺乳动物病原体包括可感染或寄居于哺乳动物宿主的病毒、细菌、单细胞或多

细胞寄生物。例如,起源于诸如以下的病毒的多肽可以在本发明的融合蛋白中用作靶多肽:人免疫缺陷病毒(HIV)、痘苗病毒、脊髓灰质炎病毒、腺病毒、流感病毒、甲肝病毒、乙肝病毒、登革病毒、日本乙型脑炎病毒、水痘-带状疱疹病毒、巨细胞病毒、EB病毒、轮状病毒以及引起麻疹、黄热病、腮腺炎、狂犬病、疱疹、流感、副流感等的病毒。例如霍乱弧菌(*Vibrio cholerae*)、伤寒沙门氏菌(*Salmonella typhi*)、梅毒螺旋体(*Treponema pallidum*)、幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*)、百日咳杆菌(*Bordetella pertussis*)、肺炎链球菌(*Streptococcus pneumoniae*)、流感嗜血杆菌(*Haemophilus influenzae*)、破伤风梭菌(*Clostridium tetani*)、白喉杆菌(*Corynebacterium diphtheriae*)、麻风分支杆菌(*Mycobacterium leprae*)、立氏立克次体(*Rickettsia*)、志贺氏菌(*Shigella*)、奈瑟双球菌(*Neisseria gonorrhoeae*)、脑膜炎奈瑟菌(*Neisseria meningitidis*)、灰酪球孢子菌(*Coccidioides immitis*)、博氏疏螺旋体(*Borrelia burgdorferi*)等的细菌蛋白可以用作靶多肽。

[0153] 优选通过本发明方法生产的靶多肽的进一步实例包括哺乳动物基因产物,例如酶、细胞因子、生长因子、激素、疫苗、抗体等。更具体地说,本发明优选的过表达基因产物包括基因产物,例如促红细胞生成素、胰岛素、生长激素、生长激素释放因子、血小板衍生生长因子、表皮生长因子、转化生长因子 α 、转化生长因子、表皮生长因子、成纤维细胞生长因子、神经生长因子、胰岛素样生长因子1、胰岛素样生长因子11、凝血因子V111、超氧化物歧化酶、干扰素、 γ -干扰素、白介素-1、白介素-2、白介素-3、白介素-4、白介素-5、白介素-6、粒细胞集落刺激因子、多谱系集落刺激因子、粒细胞-巨噬细胞刺激因子、巨噬细胞集落刺激因子、T细胞生长因子、淋巴毒素等。优选的过表达基因产物为人基因产物。

[0154] 对于诊断用途,例如当要测定的分析物为抗体时,靶多肽含有至少一个由待测定的抗体识别的表位。这样的表位也叫做诊断相关表位。本发明的靶多肽还可以含有来自几种不同蛋白的、类似于例如诊断相关表位的序列,其构建用于作为单个重组多肽表达。优选地,靶多肽具有10-500个氨基酸的长度。

[0155] 最优选地,靶多肽为由逆转录病毒蛋白(例如HIV-1的gp41和p17、HIV-2的gp36和p16、HTLV-1/11的gp21)组成的群体的成员,由包膜蛋白(例如风疹病毒的E1和E2)组成的群体的成员或由致淀粉样变蛋白(例如 β -AP42(阿尔茨海默肽))或朊蛋白组成的群体的成员。

[0156] 还优选单纯疱疹病毒1的糖蛋白G1和单纯疱疹病毒2的糖蛋白G2作为靶多肽。更确切地说,没有其信号序列及其跨膜区的相应糖蛋白片段(gG126-189、gG2343-594)为适宜的靶多肽。

[0157] 进一步优选以下的人巨细胞病毒的蛋白和蛋白片段作为靶多肽:pp28(15-179)、pp150(821-1048)、pp150(547-725)、pp150(495-854)、p38(105-308)、p38(105-373)、p38(209-308)、p52(254-293)、p52(295-330)、p52(298-433)、gB(67-84)、pp65(372-549)和pp65(372-458)。

[0158] 还优选以下的梅毒螺旋体(*Treponema pallidum*)的蛋白和蛋白片段:TpN17(23-156)、TpN47(21-434)、TpN15(23-142)、TpmA(23-345)、TpO453(27-287)。所有这些密螺旋体抗原的信号序列均已被略去,以确保在大肠杆菌宿主中表达时的胞质定位。

[0159] 进一步优选的靶多肽为以下的包柔氏螺旋体菌(*Borrelia*)的蛋白和蛋白片段:内部鞭毛片段p41i(137-262)、VlsE(1R6/C6)、DbpA(26-175)、OspB(17-296)和OspC(19-214)。

[0160] 进一步优选的靶多肽为EB病毒(EBV)的蛋白,例如在SEQ 1D NO.13中显示的EBV核抗原1(EBNA-1)、分别在SEQ 1D NO.14和15中显示的p18的多肽和片段以及如在SEQ 1D NO.16中显示的来源于p23的多肽。

[0161] 在融合至S1pA分子伴侣时,这些靶多肽中的任一种均可在免疫测定中作为结合配偶体用于检测分析物,例如针对靶多肽的抗体,或者可以用作用于免疫测定的标准品或校准物质,如下文进一步详述。

[0162] 本发明的又一个实施方案是生产融合蛋白的方法,所述方法包括以下步骤:a)培养宿主细胞,其含有至少一个编码靶多肽的核苷酸序列,以及该序列上游的至少一个编码S1pA分子伴侣的核苷酸序列,b)表达所述融合蛋白,c)纯化所述融合蛋白和d)重折叠成可溶性的和天然样的或免疫反应性的(即抗原性的)构象。通过该方法生产的融合蛋白也是本发明的一个方面。

[0163] 本发明的融合蛋白表现出高溶解性。当以低速率在胞质中过表达时,它们主要以可溶性部分累积。根据细胞生长和诱导的条件,尤其是在大量过表达时,S1pA-X基因产物也可以包涵体累积。通常,技术人员目的在于在大肠杆菌胞质中过量生产溶解性靶多肽。然后通过超声或组合的溶菌酶/EDTA处理裂解细胞,并由溶解性部分中分离推定的天然样的折叠靶蛋白。这对S1pA-X融合蛋白是可行的,在靶多肽X具有足够高的内在溶解性的情况下产生溶解性物质。在靶多肽X非常疏水并强烈倾向于聚集的情况下,可应用替代策略,该策略在基质辅助的复性方法中利用S1pA的有效且坚固的重折叠特性。在适宜的缓冲条件下,如在离液物质中,裂解细胞,所述条件强烈变性和溶解甚至疏水的细胞组分以及包涵体,尽管损害了结构完整性。当融合蛋白在N-末端或C-末端用6组氨酸部分标记时,它们可以去折叠状态特异性结合至含金属的柱子(Ni-NTA或Zn²⁺或Cu²⁺支持体)。固定至固相的分子在适宜的缓冲条件下容易有效地重折叠。这种被称作基质辅助复性已被表明增加许多有难度的蛋白的重折叠收率,得到共价连接的S1pA强有力支持,S1pA利用其分子伴侣特性有可能识别并可逆地遮蔽折叠中间体中的疏水补丁。如在实施例章节中更详细表明的适宜的纯化和重折叠方案是技术人员众所周知的。

[0164] 本发明的又一方面涉及含有S1pA和靶多肽序列的任何复合物,其包括将S1pA加至任何蛋白制品。本发明的又一方面涉及重组产生的融合蛋白,其含有至少一个对应于S1pA的多肽序列和至少一个对应于靶多肽的多肽序列。本发明的又一方面涉及单独的或与重组或合成来源的靶多肽组合的合成产生的S1pA。

[0165] 按照本发明,S1pA分子伴侣在用作融合配偶体时,能够改善有难度的靶多肽的热稳定性。S1pA赋予融合靶多肽热稳定性,由此使靶多肽对热诱导的聚集不敏感,如在实施例章节中所示。当对融合至大肠杆菌S1yD的有强烈聚集倾向的靶蛋白实施热应激时,产生的融合蛋白于约42°C显示出开始热诱导的聚集,这与S1yD的固有稳定性明显一致。当相同的靶蛋白融合至S1pA、优选大肠杆菌S1pA时,它们直到约56°C仍稳定并可溶。例如,含有S1yD和HIV蛋白gp41的片段536-681的融合蛋白(SEQ 1D NO.5)于42°C的温度开始聚集,而依据本发明的融合至大肠杆菌S1pA的相同靶蛋白(SEQ 1D NO.3)在50°C以上的温度是热稳定的。可以表明,S1pA作为融合蛋白的一部分防止有难度的或有聚集倾向的蛋白在热诱导的变性后聚集。

[0166] 还可以表明,S1pA的融合即便对几乎没有聚集倾向的蛋白或蛋白片段也发挥有益

作用。当HSV-1的糖蛋白G1片段gG1(26-189)融合至SlyD时,产生的融合蛋白可以用基本上可逆的方式以53℃的近似解链温度经热力去折叠(图7)。然而,当同一片段融合至S1pA时,产生的融合蛋白于约63℃显示出热诱导去折叠中点(图8)。显然,在S1pA取代SlyD作为融合配偶体时,gG1融合多肽的稳定性移动10℃。该发现清楚表明了S1pA-X融合多肽相比于其SlyD-X对应物的优良稳定性特征。

[0167] 为了阐明在免疫测定中是否也反映出S1pA融合多肽的这些优良稳定性特征,用抗-HSV阳性和阴性的人血清评价热挑战(thermally challenged/heat-challenged)的SlyD-gG1和S1pA-gG1样品(实施例4)在热应激后恢复的免疫反应性。在与未应激样品相比时,观察到清晰的结果(参见实施例4和图9):热处理的SlyD-gG1和S1pA-gG1与抗-HSV阳性血清产生的信号在所有情况下都降低,但采用SlyD融合变体的信号损失更加明显。反过来,热处理的SlyD-gG1和S1pA-gG1和抗-HSV阴性血清产生的背景信号在所有情况下均增加(指示缀合钉的抗原的聚集过程),但采用SlyD融合变体的信号高度的增加又更加显著。就阳性和阴性血清的信号读取结果(即对于信号动力学)而论,S1pA作为用于gG1(26-189)的融合配偶体明显优于SlyD。显然,使用S1pA代替SlyD作为融合配偶体,确保了针对阴性血清的较低信号水平和针对阳性血清的较高信号回收率。简而言之,使用S1pA作为融合配偶体,即便是苛刻处理用于检测免疫球蛋白分析物、含有多肽抗原的免疫测定试剂盒后,也确保了极佳的信号动力学。可充分设想的是,经由足够长和柔性的交联接头(利用标准化学方法)共价连接至其靶分子的S1pA或相关的分子伴侣组件发挥出类似的溶解性作用。在这些情况下,当融合多肽不可行时,应生产分子伴侣和靶分子,并在共价连接前单独重折叠。

[0168] 本发明的又一方面涉及重组或合成产生的、含有S1pA分子伴侣和靶多肽的融合蛋白在免疫测定中作为结合配偶体的用途。免疫测定以及各种均质和异质测试形式对技术人员是众所周知的。它们可在本领域技术人员已知的所有生物液体中进行。优选的样品是体液,如全血、血清、血浆、尿或唾液。

[0169] 依照本发明含有S1pA和至少一种靶多肽的融合多肽也可以用作标准品或校准物质。S1pA对在免疫测定中需要作为校准物的有难度的蛋白也是良好的融合配偶体。例如,我们克隆、表达和纯化了与S1pA融合的肌钙蛋白1变体(含有1-209个残基)。产生的融合多肽S1pA-肌钙蛋白1原来是可溶的和免疫反应性的,非常适合用作用于肌钙蛋白1免疫测定的标准校准物质。由于S1pA融合配偶体,肌钙蛋白1部分的稳定性在与分离的肌钙蛋白1相比时显著增加,分离的肌钙蛋白1仅临界稳定,即便在有利的缓冲条件下也自发聚集。本发明的又一个实施方案是,使用S1pA与有难度的蛋白复合,以产生可溶并且稳定的校准物或标准物质。本发明的又一方面是使用S1pA作为添加剂,以改善溶解性,并防止靶蛋白聚集。

[0170] 本发明的又一个实施方案是用于检测分离样品中分析物的特异性抗体的方法,所述方法包括

[0171] a)通过将体液样品与融合蛋白混合形成免疫反应混合物,所述融合蛋白包含至少一个对应于S1pA分子伴侣的多肽序列和至少一个对应于靶多肽的多肽序列,

[0172] b)将所述免疫反应混合物保持一定时间,该保持时间足以允许体液样品中存在的针对所述分析物的抗体与所述融合蛋白免疫反应,形成免疫反应产物;和

[0173] c)检测所述免疫反应产物的存在情况。

[0174] 在优选的实施方案中,可通过被称作双抗原夹心测试(DAGS;也叫作桥测试)进行

特异性抗体的检测,双抗原夹心测试是一种异质形式,其中要测定的特异性抗体分析物在两种相同或相似的抗原之间形成桥。可容易地使该形式适合于高通量自动化分析仪。更具体地说,要测定的抗体与介导固定至固相的第一抗原和携带标记(即发信号部分,如本领域技术人员已知的发色标记、荧光标记、化学发光标记、电化学发光标记或其它标记)的第二抗原形成免疫复合物或免疫反应产物,由此允许在分离液相和固相后定量或定性检测特异性结合的抗体。因此,只有在所研究的抗体存在于样品中时才形成桥,并可以检测信号。在该测定形式中,本发明的融合蛋白可用作结合配偶体,其中固相结合抗原或标记抗原或这二者为含有大肠杆菌SlpA分子伴侣和靶多肽的融合蛋白。靶多肽构成了融合蛋白的抗原性部分。

[0175] 本发明的优选实施方案是所谓的不对称双抗原夹心测试,其用于检测特异性抗体,其中使用各自含有分子伴侣和靶多肽的第一种融合蛋白和第二种融合蛋白。该形式称为不对称的,因为两种融合蛋白的分子伴侣单元彼此不同。例如,第一种融合蛋白可以含有至少一个SlpA分子伴侣单元和至少一个靶多肽单元,并可以携带介导与固相特异性结合的部分,例如结合包被链霉抗生物素蛋白的固相的生物素。第二种融合蛋白可以包含至少一个不同于SlpA的分子伴侣单元和至少一个与第一种融合蛋白的靶多肽相同或相似的靶多肽单元。另外,后一种融合蛋白可以携带发信号部分或用于信号读出的报告基因。

[0176] 优选地,第二种融合蛋白的分子伴侣单元也是于环境温度具有足够的内在柔性(即高度动力学结合活性)的热稳定分子伴侣。用于第二种融合蛋白的分子伴侣单元的适宜候选物例如FkpA(解链温度约50°C)和来自多杀性巴氏杆菌(*Pasteurella multocida*)的SlyD直系同源物的C-末端截短(无半胱氨酸)变体(解链温度约49°C)。两种分子伴侣的氨基酸序列(优选在融合蛋白中用作分子伴侣单元的完整序列和部分序列)示于SEQ 1D NO.9至12。第一种和第二种融合蛋白的分子伴侣单元可以交换,即SlpA可以为第二种融合蛋白的组成部分,在此情况下,其它热稳定的分子伴侣,例如FkpA或来自多杀性巴氏杆菌的SlyD直系同源物,可以为第一种融合蛋白的组成部分。将第一种和第二种融合蛋白同时或连续加至所研究的特异性抗体分析物的样品。样品中存在抗体时,抗体结合第一种和第二种融合蛋白的靶多肽单元,由此桥接所述第一种融合蛋白和所述第二种融合蛋白的靶多肽部分,产生免疫反应产物或免疫复合物。

[0177] 在形成免疫复合物之前、之后或同时,加入固相,如微珠或ELISA板,使得第一种融合蛋白结合至固相。因而,含有所述第一种融合蛋白、要检测的抗体和所述第二种融合蛋白的完整免疫反应产物(即免疫复合物)与固相结合。在将固相与液相分开后,可以检测免疫反应产物的存在情况。作为替代方案,在第一种融合蛋白中存在的分子伴侣单元可以用作第二种融合蛋白的分子伴侣单元,反之亦然。然而,应优选在两种融合蛋白中的分子伴侣单元不同,因为由于在样品中存在针对这些分子伴侣的抗体,可能(不可预知)产生融合蛋白的非分析物特异性的交联。作为替代,高度特异性的DAGS免疫测定在测定的任一侧采用相同的分子伴侣融合配偶体也应是可行的。在此情况下,测定的开发者必须考虑很可能在血清的实质性部分中存在针对所用融合配偶体的抗体。这些抗体应将发信号多肽桥接至固相,产生信号,由此引起假阳性结果。为了避免这样的干扰,应将融合配偶体(即分子伴侣单元)以高度聚合并未标记的形式作为抗干扰物质加至样品。抗干扰物质设计用于有效捕获针对融合配偶体、接头区段、间隔物和标签序列以及不是真正抗原的组成部分的所有其它

部分的免疫球蛋白。利用其高表位密度,化学聚合的(即交联的)抗干扰物质能够与标记的融合多肽有效竞争抗分子伴侣抗体的结合。这样,可以方便可靠的方式排除归因于具有不需要的特异性的免疫球蛋白的干扰。所有的生物液体如体液都可以用作样品。优选使用血液、血清、血浆、尿或唾液。

[0178] 标记或发信号基团可以选自任何已知的可检测标记基团,例如染料;发光标记基团,如化学发光基团,例如吡啶鎓酯类或二氧杂环丁烷类(dioxetanes);或荧光染料,例如荧光素、香豆素、罗丹明、噁嗪、试卤灵、花青及其衍生物。标记基团的其它实例为发光金属复合物,例如钆或铈复合物;酶,例如用于ELISA的酶;或者放射性同位素。

[0179] 免疫复合物或免疫反应产物与固相的连接可以使用生物亲和结合对(例如生物素和链霉抗生物素蛋白)的一个配偶体进行。优选地,生物素偶合至本发明的融合蛋白。该生物素-融合蛋白-缀合物以高亲和性结合链霉抗生物素蛋白包被的固相。

[0180] 分析物的实例是在“靶多肽”章节下提及的所有病原体和针对这些病原体的抗体。例如,按照本发明,优选地,可特异性检测针对HIV(人免疫缺陷病毒)、HTLV-1/HTLV-11(人T-细胞淋巴细胞白血病病毒1和11)、HCV(丙肝病毒)、HBV(乙肝病毒)、HAV(甲肝病毒)、HCMV(人巨细胞病毒)、HSV-1/-2(单纯疱疹病毒1和2)、EBV(EB病毒)、水痘-带状疱疹病毒、人疱疹病毒6、人疱疹病毒7、人疱疹病毒8、风疹病毒、梅毒螺旋体(*Treponema pallidum*)、幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*)、包柔氏螺旋体菌(*Borrelia*(*burgdorferi*),(*afzelii*),(*garinii*))、克氏锥虫(*Trypanosoma cruzi*)和刚地弓形虫(*Toxoplasma gondii*)的抗体。

[0181] 本发明的又一个实施方案是用于检测针对分析物的抗体的试剂盒,所述分析物含有融合蛋白,所述融合蛋白含有至少一个对应于S1pA的多肽序列和至少一个对应于靶肽的多肽序列。该试剂盒的其它部分是本领域技术人员已知的,包括缓冲液、防腐剂、标记物质和使用说明书。

[0182] 本发明的其它实施方案包括本发明的重组或合成产生的融合蛋白在免疫测定中作为降低干扰的工具的用途,以及其用于免疫实验动物和生产疫苗的用途。

[0183] 本发明的另一个实施方案涉及含有重组或合成产生的融合蛋白和药学上可接受的赋形剂的组合物,所述融合蛋白含有至少一个对应于S1pA的多肽序列和至少一个对应于靶肽的多肽序列。

[0184] 按照本发明,通过将纯化形式的S1pA加至靶多肽,包括将S1pA作为稳定剂或溶解剂加至任何蛋白质制品,S1pA可以用作靶多肽的折叠辅助物。例如,可以在靶多肽的生物技术应用生产过程当中或之后加入S1pA和来自肽基脯氨酰顺/反异构酶的FKBP家族的相关折叠辅助物,由此赋予靶多肽溶解性或热稳定性。这样的生物技术应用包括例如大规模工业化生产酶、肽激素,如胰岛素,或者更一般地,有商业价值的蛋白质。

[0185] 在本发明的又一个实施方案中,S1pA可以在免疫测定中用作添加剂,以降低或抑制引起错误的阳性结果的免疫交叉反应或干扰,尤其是在双抗原夹心免疫测定形式中。

[0186] 更具体地说,在免疫测定中,S1pA-X或S1pA-S1pA-X融合蛋白可以用作检测免疫球蛋白分析物的抗原,其中X为分析物特异性抗体结合的靶多肽。为降低干扰,S1pA或S1pA-S1pA应作为抗干扰物质加入,以通过分子伴侣单元避免免疫交叉反应。优选地,S1pA或S1pA-S1pA应以化学聚合形式加入,以便增加表位密度,促进IgG和IgM分子针对S1pA、接头区段或六组氨酸标签的结合。

[0187] S1pA赋予靶分子溶解性和稳定性,但其可能由于任何其它部分或基团而与绝对的靶分子不同,引起损害对应免疫测定专属性的免疫交叉反应。为了克服该专属性问题,将S1pA或S1pA-S1pA的未标记变体以聚合形式作为免疫测定试剂。该S1pA或S1pA-S1pA多肽含有所有可能引起交叉反应的元件,例如S1pA单元自身、任何接头或间隔区段、六组氨酸标签或其它标签基序乃至标记部分,即使为失活形式。由于化学交联,这些潜在有干扰倾向的基序以高表位密度被提呈至交叉反应抗体,该交叉反应抗体非常适合于结合并由此中和这些潜在的干扰抗体。除了此抗干扰作用外,S1pA或S1pA-S1pA聚合物甚至可以具有额外的有利作用:与高度聚合的分子伴侣一样,其应当能够吸附至任何固体表面(例如珠、微量滴定板和管或容器壁)的疏水表面区域,由此降低必需的免疫组分的非特异性吸附。此外,其可能依靠其分子伴侣特征促进其它免疫组分的溶解性,所述分子伴侣特征在其聚合形式时甚至有可能更加显著。

[0188] 实施例进一步阐明本发明。

[0189] 实施例1

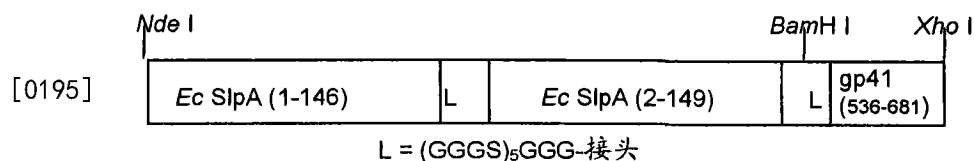
[0190] S1pA和SlyD融合多肽的克隆和纯化

[0191] 表达盒的克隆

[0192] 基于Novagen(Madison,WI,USA)的pET24a表达质粒,获得编码SlyD或S1pA融合多肽的表达盒。由SwissProt数据库取回gp41胞外域的序列。编码具有富含甘氨酸的、按读框与N-末端融合的接头区的gp41(氨基酸536-681)的合成基因购自Medigenomix(Martinsried,Germany)。BamHI和XhoI限制位点分别位于编码区的5'和3'末端。编码经由富含甘氨酸的接头区连接的两个S1pA单元(依据SEQ ID NO.1的残基1-146和2-149,SwissProt登录号POAEM0)并在C末端含有另一接头区的一部分的另一个合成基因同样购自Medigenomix。NdeI和BamHI限制位点分别位于该表达盒的5'和3'末端。所述基因和限制位点设计用于使S1pA-S1pA和gp41胞外域片段能通过简单的连接按读框融合。为了避免无意的重组过程和增加表达盒在大肠杆菌宿主中的遗传稳定性,编码S1pA单元的核苷酸序列以及编码延长的接头区的核苷酸序列是简并的,即,使用不同的密码子组合编码相同的氨基酸序列。

[0193] 用NdeI和XhoI消化pET24a载体,插入含有按读框与HIV-1gp41胞外域片段536-681融合的串联S1pA的表达盒。由此构建含有SlyD或串联的SlyD代替S1pA或串联的S1pA的表达盒,以及含有的靶多肽不同于gp41的表达盒。所有的重组融合多肽变体均含有C-末端六组氨酸标签,以利于Ni-NTA-辅助的纯化和重折叠。使用QuikChange(Stratagene,La Jolla,CA,USA)和标准PCR技术在相应的表达盒中产生点突变、缺失和延伸变体或限制位点。

[0194] 下图显示了产生的HIV-1gp41胞外域片段536-681的图解,该片段携带两个按读框与其N-末端融合的串联S1pA分子伴侣。



[0196] 测序所产生质粒的插入片段,发现其编码目标融合蛋白。完整的氨基酸序列示于SEQ ID NO.4。接头L的氨基酸序列示于SEQ ID NO.17。

[0197] S1pA、SlyD以及含有S1pA、SlyD和FkpA的融合蛋白的纯化

[0198] 使用实际上相同的方案纯化SlyD、SlpA和所有融合蛋白变体。于37°C在LB培养基加卡那霉素(30 μ g/ml)中将具有特定pET24a表达质粒的大肠杆菌BL21(DE3)细胞培养至OD₆₀₀为1.5,通过加入1mM异丙基- β -D-硫代半乳糖苷诱导胞质过表达。在诱导后3小时,通过离心(20分钟,5000g)收获细胞,冷冻,并储存于-20°C。对于细胞裂解,将冷冻的沉淀重悬浮在冷却的50mM磷酸钾pH 8.0、7.0M GdmCl、5mM咪唑中,将悬浮液在冰上搅拌2小时,以完成细胞裂解。在离心和过滤(硝酸纤维素膜,0.45 μ m/0.2 μ m)后,将裂解物加至用包含5.0mM TCEP的裂解缓冲液平衡的Ni-NTA柱上。随后的洗涤步骤针对相应的靶蛋白修改,范围在50mM磷酸钾pH 8.0、7.0M GdmCl、5.0mM TCEP中的5-15mM咪唑。应用至少10-15体积的洗涤缓冲液。然后,通过50mM磷酸钾pH 7.8、100mM KCl、10mM咪唑、5.0mMTCEP替代GdmCl溶液,以诱导基质结合蛋白的构象重折叠。为了避免共纯化的蛋白酶的再活化,将蛋白酶抑制剂混合物(Complete[®],无EDTA,Roche)包含在重折叠缓冲液中。在过夜反应中应用总共15-20个柱体积的重折叠缓冲液。然后,用3-5个柱体积的50mM磷酸钾pH 7.8、100mM KCl、10mM咪唑洗涤除去TCEP和Complete[®]无EDTA的抑制剂混合物。然后通过相同缓冲液中的250mM咪唑洗脱天然蛋白。通过Tricine-SDS-PAGE评价含蛋白部分的纯度,并合并。最后,对蛋白进行大小排阻层析(Superdex HiLoad,AmershamPharmacia),合并含蛋白级分,并在Amicon单元(YM10)中浓缩。

[0199] 在偶合的纯化和重折叠方案之后,根据相应的靶蛋白,可由1g大肠杆菌湿细胞获得约5-20mg的产量。

[0200] 实施例2

[0201] 光谱检测

[0202] 圆二色性光谱(CD)是评价蛋白的二级结构和三级结构的精选方法。芳香区(260-320nm)中的椭圆率报告了蛋白中的三级接触(即有规则折叠的蛋白的球状结构),而酰胺区(190-250nm)中的椭圆率反映出蛋白骨架(即二级结构)中的有规则重复元件。

[0203] 用Uvikon XL双束分光光度计进行蛋白浓度检测。使用Pace(1995),Protein Sci.4,2411-2423描述的程序测定摩尔消光系数(ϵ_{280})。

[0204] 用带有恒温池架的Jasco-720分光偏振计记录近-UV CD光谱,并转换为平均残基椭圆率。缓冲液为50-150mM磷酸钾pH 7.5、100mMKCl、1mM EDTA。通路长度为0.5cm或1.0cm,蛋白浓度为20-500 μ M。带宽为2nm,扫描速度为50nm/分钟,分辨率为0.5nm,响应为1或2s。为了改善信噪比,检测光谱9次,并平均。

[0205] 用带有恒温池架的Jasco-720分光偏振计记录远-UV CD光谱,并转换为平均残基椭圆率。缓冲液为10mM磷酸钾pH 7.5、25mM KCl、0.5mM EDTA。通路长度为0.2cm,蛋白浓度在2.5-20 μ M之间。带宽为2nm,扫描速度为50nm/分钟,分辨率为0.5nm,响应为1或2s。为了改善信噪比,检测光谱9次,并平均。

[0206] 实施例3

[0207] 生物素和钆部分与融合蛋白的偶联

[0208] 于10-20mg/ml的蛋白浓度分别用N-羟基-琥珀酰亚胺活化的生物素和钆标记修饰融合多肽的赖氨酸 ϵ -氨基。标记/蛋白比率由2:1至5:1(mol:mol)变化,取决于相应的融合蛋白。反应缓冲液为150mM磷酸钾pH 8.0、100mM KCl、1mM EDTA。反应于室温进行15分钟,并通过加入缓冲的L-赖氨酸至10mM终浓度终止。为避免标记的水解失活,在无水DMSO(超低含

水量(seccosolv)品质,Merck,Germany)中制备相应母液。在反应缓冲液中直至15%的DMSO浓度被所研究的所有融合蛋白良好耐受。在偶联反应后,通过使粗蛋白缀合物穿过凝胶过滤柱(Superdex 200HiLoad)除去未反应的游离标记。

[0209] 实施例4

[0210] 多肽融合蛋白的免疫反应性

[0211] 在自动化的Elecsys®2010分析仪(Roche Diagnostics GmbH)中评价不同融合蛋白的免疫反应性(即抗原性)。Elecsys®是Roche集团的注册商标。以双抗原夹心形式进行检测。

[0212] 在Elecsys®2010中的单次检测基于电化学发光。将生物素-缀合物(即捕获物-抗原)固定在包被链霉抗生物素蛋白的磁珠表面上,而检测物-抗原携带复合的钆阳离子(在氧化还原态2+和3+之间切换)作为发信号部分。在存在特异性免疫球蛋白分析物的情况下,发色钆复合物与固相桥接,并在激发后于铂电极处发射620nm的光。信号输出为任意光单位。

[0213] 在用于捕获物和检测抗原的测定中使用含有HSV-1抗原gG1的融合多肽(氨基酸26-189,参见SEQ ID NO.7和8)作为HSV-1特异性抗原序列。gG1抗原融合至S1pA或S1yD。在双抗原夹心免疫测定中,将S1pA-gG1(26-189)-生物素缀合物与S1pA-gG1(26-189)-钆复合缀合物(本发明)以各100ng/ml的浓度一起应用。同样,将S1yD-gG1(26-189)-生物素缀合物与S1yD-gG1(26-189)-钆复合缀合物(比较)以各100ng/ml的浓度一起应用。

[0214] 评价gG1(26-189)的融合多肽变体的生物素和钆缀合物以各100ng/ml浓度针对抗HSV-1阳性血清的反应性。在所有检测中,未标记的化学聚合S1yD-S1yD在反应缓冲液中作为干扰物质,以避免经由分子伴侣融合单元发生的免疫交叉反应。11种抗HSV-1阴性人血清用作对照。

[0215] 为评价融合蛋白的热耐受性,如下对S1yD-gG1和S1pA-gG1实施苛刻的温度条件: S1yD-gG1和S1pA-gG1(在50mM磷酸钾pH 7.5,100mM KCl,1mM EDTA中的蛋白)于60°C温育过夜。gG1-生物素缀合物的浓度各自约为1.3mg/ml,gG1-钆缀合物的浓度各自约为0.6mg/ml。随后,在Elecsys®2010自动化分析仪中在上述实验条件下评价热应激样品的残余免疫反应性。S1yD-gG1和S1pA-gG1的未挑战样品(储存于2-8°C)用作参比。

[0216] 实验结果示于表1(图9)。

[0217] 表1显示了在自动化Elecsys®分析仪中S1pA-gG1(26-189)和S1yD-gG1(26-189)与人抗HSV-1阳性血清和抗HSV-1阴性血清的免疫反应性,如在实施例4中所述。显示了在60°C的苛刻过夜热处理之前和之后两种抗原变体的效力。实验结果清楚表明了热应激的S1pA-gG1(26-189)以双重方式超越热应激的S1yD-gG1(26-189)的优越性。首先,采用抗-HSV-1阳性血清的特异性信号回收率(表1的上半部分)对于热挑战的S1pA融合多肽显著较高。其次,采用抗-HSV-1阴性血清的非特异性背景信号增加(表1的下半部分)对于热挑战的S1pA融合多肽显著较低。我们观察到,在热处理S1yD融合多肽之后,背景信号有相当大的增加(参见右列,背景信号增加约100%-900%)。

[0218] 然而,在使用本发明的S1pA融合多肽时,在热应激后的背景信号增加低得可以忽略,即在除一种情况以外的所有情况下都低于20%。在该一种情况下,(血清样品Trina 07/06-533)背景信号增加48%。完全相同的样品(Trina 07/06-533)表明,在使用S1yD融合多

肽代替时,背景信号增加800%以上。这表明,即便采用固有地引起背景信号稍微增加的有难度样品,S1pA融合多肽也可以显著降低背景信号。在免疫测定的开发中高度需要低背景信号,因为它们能使生产者设定低截取值。一般地讲,就灵敏度而言,测定性能增加需要背景信号降低。原因是产生截取值以上的信号的样品被视为阳性(即假定样品含有所研究的分析物);产生截取值以下的信号的样品被视为阴性。因此,易于理解为什么绝对需要低截取值:截取值越低,含低分析物浓度(并伴随着产生低信号)的样品被正确地发现为低阳性的概率就越高。因此,可通过降低固有地源于其免疫组分的背景信号增加免疫测定的灵敏度。因此,S1pA作为折叠辅助物的用途明显有助于改善和保证免疫测定的长期灵敏度。

[0219] 总而言之,含有S1pA的融合多肽增加融合靶多肽的稳定性和溶解性,尤其在临界状态(例如热应激)下,所述临界状态经常会损害天然折叠,并导致聚集过程。简而言之,S1pA是极佳的折叠辅助物,其即便在非常不利的条件下也保护其客户蛋白的完整性,有利于其客户蛋白重折叠为活性构象,并将它们保持在溶液中。因此,与S1pA融合,或者更简单地讲,加入S1pA,是稳定预期用于诊断和其它生物技术用途的蛋白制品中的靶分子的极佳方法。

[0220] 序列表

[0221] <110>Roche Diagnostics GmbH(和Hoffmann La-Roche AG)

[0222] Roche Diagnostics GmbH(和Hoffmann La-Roche AG)

[0223] <120>作为重组蛋白及酶技术的工具的S1pA

[0224] <130>24705EP1-1R

[0225] <150>EP 08009537.5

[0226] <151>2008-05-26

[0227] <160>17

[0228] <170>PatentIn version 3.2

[0229] <210>1

[0230] <211>149

[0231] <212>PRT

[0232] <213>大肠杆菌

[0233] <400>1

[0234] Met Ser Glu Ser Val Gln Ser Asn Ser Ala Val Leu Val His Phe Thr

[0235] 1 5 10 15

[0236] Leu Lys Leu Asp Asp Gly Thr Thr Ala Glu Ser Thr Arg Asn Asn Gly

[0237] 20 25 30

[0238] Lys Pro Ala Leu Phe Arg Leu Gly Asp Ala Ser Leu Ser Glu Gly Leu

[0239] 35 40 45

[0240] Glu Gln His Leu Leu Gly Leu Lys Val Gly Asp Lys Thr Thr Phe Ser

[0241] 50 55 60

[0242] Leu Glu Pro Asp Ala Ala Phe Gly Val Pro Ser Pro Asp Leu Ile Gln

[0243] 65 70 75 80

[0244] Tyr Phe Ser Arg Arg Glu Phe Met Asp Ala Gly Glu Pro Glu Ile Gly

[0245] 85 90 95
 [0246] Ala Ile Met Leu Phe Thr Ala Met Asp Gly Ser Glu Met Pro Gly Val
 [0247] 100 105 110
 [0248] Ile Arg Glu Ile Asn Gly Asp Ser Ile Thr Val Asp Phe Asn His Pro
 [0249] 115 120 125
 [0250] Leu Ala Gly Gln Thr Val His Phe Asp Ile Glu Val Leu Glu Ile Asp
 [0251] 130 135 140
 [0252] Pro Ala Leu Glu Ala
 [0253] 145
 [0254] <210>2
 [0255] <211>153
 [0256] <212>PRT
 [0257] <213>人工的
 [0258] <220>
 [0259] <223>具有His标签的大肠杆菌SlpA 2-148
 [0260] <400>2
 [0261] Ser Glu Ser Val Gln Ser Asn Ser Ala Val Leu Val His Phe Thr Leu
 [0262] 1 5 10 15
 [0263] Lys Leu Asp Asp Gly Thr Thr Ala Glu Ser Thr Arg Asn Asn Gly Lys
 [0264] 20 25 30
 [0265] Pro Ala Leu Phe Arg Leu Gly Asp Ala Ser Leu Ser Glu Gly Leu Glu
 [0266] 35 40 45
 [0267] Gln His Leu Leu Gly Leu Lys Val Gly Asp Lys Thr Thr Phe Ser Leu
 [0268] 50 55 60
 [0269] Glu Pro Asp Ala Ala Phe Gly Val Pro Ser Pro Asp Leu Ile Gln Tyr
 [0270] 65 70 75 80
 [0271] Phe Ser Arg Arg Glu Phe Met Asp Ala Gly Glu Pro Glu Ile Gly Ala
 [0272] 85 90 95
 [0273] Ile Met Leu Phe Thr Ala Met Asp Gly Ser Glu Met Pro Gly Val Ile
 [0274] 100 105 110
 [0275] Arg Glu Ile Asn Gly Asp Ser Ile Thr Val Asp Phe Asn His Pro Leu
 [0276] 115 120 125
 [0277] Ala Gly Gln Thr Val His Phe Asp Ile Glu Val Leu Glu Ile Asp Pro
 [0278] 130 135 140
 [0279] Ala Leu Glu His His His His His His
 [0280] 145 150
 [0281] <210>3
 [0282] <211>323
 [0283] <212>PRT

[0284] <213>人工的
 [0285] <220>
 [0286] <223>融合多肽SlpA-gp41(HIV)
 [0287] <400>3
 [0288] Met Ser Glu Ser Val Gln Ser Asn Ser Ala Val Leu Val His Phe Thr
 [0289] 1 5 10 15
 [0290] Leu Lys Leu Asp Asp Gly Thr Thr Ala Glu Ser Thr Arg Asn Asn Gly
 [0291] 20 25 30
 [0292] Lys Pro Ala Leu Phe Arg Leu Gly Asp Ala Ser Leu Ser Glu Gly Leu
 [0293] 35 40 45
 [0294] Glu Gln His Leu Leu Gly Leu Lys Val Gly Asp Lys Thr Thr Phe Ser
 [0295] 50 55 60
 [0296] Leu Glu Pro Asp Ala Ala Phe Gly Val Pro Ser Pro Asp Leu Ile Gln
 [0297] 65 70 75 80
 [0298] Tyr Phe Ser Arg Arg Glu Phe Met Asp Ala Gly Glu Pro Glu Ile Gly
 [0299] 85 90 95
 [0300] Ala Ile Met Leu Phe Thr Ala Met Asp Gly Ser Glu Met Pro Gly Val
 [0301] 100 105 110
 [0302] Ile Arg Glu Ile Asn Gly Asp Ser Ile Thr Val Asp Phe Asn His Pro
 [0303] 115 120 125
 [0304] Leu Ala Gly Gln Thr Val His Phe Asp Ile Glu Val Leu Glu Ile Asp
 [0305] 130 135 140
 [0306] Pro Ala Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly
 [0307] 145 150 155 160
 [0308] Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Thr Leu Thr Val Gln Ala Arg
 [0309] 165 170 175
 [0310] Gln Leu Leu Ser Gly Ile Val Gln Gln Gln Asn Asn Glu Leu Arg Ala
 [0311] 180 185 190
 [0312] Ile Glu Ala Gln Gln His Leu Glu Gln Leu Thr Val Trp Gly Thr Lys
 [0313] 195 200 205
 [0314] Gln Leu Gln Ala Arg Glu Leu Ala Val Glu Arg Tyr Leu Lys Asp Gln
 [0315] 210 215 220
 [0316] Gln Leu Leu Gly Ile Trp Gly Cys Ser Gly Lys Leu Ile Cys Thr Thr
 [0317] 225 230 235 240
 [0318] Ala Val Pro Trp Asn Ala Ser Trp Ser Asn Lys Ser Leu Glu Gln Ile
 [0319] 245 250 255
 [0320] Trp Asn Asn Met Thr Trp Met Glu Trp Asp Arg Glu Ile Asn Asn Tyr
 [0321] 260 265 270
 [0322] Thr Ser Leu Ile His Ser Leu Ile Glu Glu Ser Gln Asn Gln Gln Glu

[0323]	275	280	285
[0324]	Lys Asn Glu Gln Glu Leu Leu Glu Leu Asp Lys Trp Ala Ser Leu Trp		
[0325]	290	295	300
[0326]	Asn Trp Phe Asn Ile Thr Asn Trp Leu Trp Tyr Leu Glu His His His		
[0327]	305	310	315 320
[0328]	His His His		
[0329]	<210>4		
[0330]	<211>494		
[0331]	<212>PRT		
[0332]	<213>人工的		
[0333]	<220>		
[0334]	<223>融合多肽串联的SlpA和gp41		
[0335]	<400>4		
[0336]	Met Ser Glu Ser Val Gln Ser Asn Ser Ala Val Leu Val His Phe Thr		
[0337]	1	5	10 15
[0338]	Leu Lys Leu Asp Asp Gly Thr Thr Ala Glu Ser Thr Arg Asn Asn Gly		
[0339]	20	25	30
[0340]	Lys Pro Ala Leu Phe Arg Leu Gly Asp Ala Ser Leu Ser Glu Gly Leu		
[0341]	35	40	45
[0342]	Glu Gln His Leu Leu Gly Leu Lys Val Gly Asp Lys Thr Thr Phe Ser		
[0343]	50	55	60
[0344]	Leu Glu Pro Asp Ala Ala Phe Gly Val Pro Ser Pro Asp Leu Ile Gln		
[0345]	65	70	75 80
[0346]	Tyr Phe Ser Arg Arg Glu Phe Met Asp Ala Gly Glu Pro Glu Ile Gly		
[0347]	85	90	95
[0348]	Ala Ile Met Leu Phe Thr Ala Met Asp Gly Ser Glu Met Pro Gly Val		
[0349]	100	105	110
[0350]	Ile Arg Glu Ile Asn Gly Asp Ser Ile Thr Val Asp Phe Asn His Pro		
[0351]	115	120	125
[0352]	Leu Ala Gly Gln Thr Val His Phe Asp Ile Glu Val Leu Glu Ile Asp		
[0353]	130	135	140
[0354]	Pro Ala Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly		
[0355]	145	150	155 160
[0356]	Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Glu Ser Val Gln Ser Asn		
[0357]	165	170	175
[0358]	Ser Ala Val Leu Val His Phe Thr Leu Lys Leu Asp Asp Gly Thr Thr		
[0359]	180	185	190
[0360]	Ala Glu Ser Thr Arg Asn Asn Gly Lys Pro Ala Leu Phe Arg Leu Gly		
[0361]	195	200	205

[0362] Asp Ala Ser Leu Ser Glu Gly Leu Glu Gln His Leu Leu Gly Leu Lys
 [0363] 210 215 220
 [0364] Val Gly Asp Lys Thr Thr Phe Ser Leu Glu Pro Asp Ala Ala Phe Gly
 [0365] 225 230 235 240
 [0366] Val Pro Ser Pro Asp Leu Ile Gln Tyr Phe Ser Arg Arg Glu Phe Met
 [0367] 245 250 255
 [0368] Asp Ala Gly Glu Pro Glu Ile Gly Ala Ile Met Leu Phe Thr Ala Met
 [0369] 260 265 270
 [0370] Asp Gly Ser Glu Met Pro Gly Val Ile Arg Glu Ile Asn Gly Asp Ser
 [0371] 275 280 285
 [0372] Ile Thr Val Asp Phe Asn His Pro Leu Ala Gly Gln Thr Val His Phe
 [0373] 290 295 300
 [0374] Asp Ile Glu Val Leu Glu Ile Asp Pro Ala Leu Glu Ala Gly Gly Gly
 [0375] 305 310 315 320
 [0376] Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
 [0377] 325 330 335
 [0378] Ser Gly Gly Gly Thr Leu Thr Val Gln Ala Arg Gln Leu Leu Ser Gly
 [0379] 340 345 350
 [0380] Ile Val Gln Gln Gln Asn Asn Glu Leu Arg Ala Ile Glu Ala Gln Gln
 [0381] 355 360 365
 [0382] His Leu Glu Gln Leu Thr Val Trp Gly Thr Lys Gln Leu Gln Ala Arg
 [0383] 370 375 380
 [0384] Glu Leu Ala Val Glu Arg Tyr Leu Lys Asp Gln Gln Leu Leu Gly Ile
 [0385] 385 390 395 400
 [0386] Trp Gly Cys Ser Gly Lys Leu Ile Cys Thr Thr Ala Val Pro Trp Asn
 [0387] 405 410 415
 [0388] Ala Ser Trp Ser Asn Lys Ser Leu Glu Gln Ile Trp Asn Asn Met Thr
 [0389] 420 425 430
 [0390] Trp Met Glu Trp Asp Arg Glu Ile Asn Asn Tyr Thr Ser Leu Ile His
 [0391] 435 440 445
 [0392] Ser Leu Ile Glu Glu Ser Gln Asn Gln Gln Glu Lys Asn Glu Gln Glu
 [0393] 450 455 460
 [0394] Leu Leu Glu Leu Asp Lys Trp Ala Ser Leu Trp Asn Trp Phe Asn Ile
 [0395] 465 470 475 480
 [0396] Thr Asn Trp Leu Trp Tyr Leu Glu His His His His His His
 [0397] 485 490
 [0398] <210>5
 [0399] <211>342
 [0400] <212>PRT

[0401] <213>人工的
 [0402] <220>
 [0403] <223>融合多肽SlyD-gp41(HIV)
 [0404] <400>5
 [0405] Met Lys Val Ala Lys Asp Leu Val Val Ser Leu Ala Tyr Gln Val Arg
 [0406] 1 5 10 15
 [0407] Thr Glu Asp Gly Val Leu Val Asp Glu Ser Pro Val Ser Ala Pro Leu
 [0408] 20 25 30
 [0409] Asp Tyr Leu His Gly His Gly Ser Leu Ile Ser Gly Leu Glu Thr Ala
 [0410] 35 40 45
 [0411] Leu Glu Gly His Glu Val Gly Asp Lys Phe Asp Val Ala Val Gly Ala
 [0412] 50 55 60
 [0413] Asn Asp Ala Tyr Gly Gln Tyr Asp Glu Asn Leu Val Gln Arg Val Pro
 [0414] 65 70 75 80
 [0415] Lys Asp Val Phe Met Gly Val Asp Glu Leu Gln Val Gly Met Arg Phe
 [0416] 85 90 95
 [0417] Leu Ala Glu Thr Asp Gln Gly Pro Val Pro Val Glu Ile Thr Ala Val
 [0418] 100 105 110
 [0419] Glu Asp Asp His Val Val Val Asp Gly Asn His Met Leu Ala Gly Gln
 [0420] 115 120 125
 [0421] Asn Leu Lys Phe Asn Val Glu Val Val Ala Ile Arg Glu Ala Thr Glu
 [0422] 130 135 140
 [0423] Glu Glu Leu Ala His Gly His Val His Gly Ala His Asp His His His
 [0424] 145 150 155 160
 [0425] Asp His Asp His Asp Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
 [0426] 165 170 175
 [0427] Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Thr Leu Thr Val
 [0428] 180 185 190
 [0429] Gln Ala Arg Gln Leu Leu Ser Gly Ile Val Gln Gln Gln Asn Asn Glu
 [0430] 195 200 205
 [0431] Leu Arg Ala Ile Glu Ala Gln Gln His Leu Glu Gln Leu Thr Val Trp
 [0432] 210 215 220
 [0433] Gly Thr Lys Gln Leu Gln Ala Arg Glu Leu Ala Val Glu Arg Tyr Leu
 [0434] 225 230 235 240
 [0435] Lys Asp Gln Gln Leu Leu Gly Ile Trp Gly Cys Ser Gly Lys Leu Ile
 [0436] 245 250 255
 [0437] Cys Thr Thr Ala Val Pro Trp Asn Ala Ser Trp Ser Asn Lys Ser Leu
 [0438] 260 265 270
 [0439] Glu Gln Ile Trp Asn Asn Met Thr Trp Met Glu Trp Asp Arg Glu Ile

[0440] 275 280 285
 [0441] Asn Asn Tyr Thr Ser Leu Ile His Ser Leu Ile Glu Glu Ser Gln Asn
 [0442] 290 295 300
 [0443] Gln Gln Glu Lys Asn Glu Gln Glu Leu Leu Glu Leu Asp Lys Trp Ala
 [0444] 305 310 315 320
 [0445] Ser Leu Trp Asn Trp Phe Asn Ile Thr Asn Trp Leu Trp Tyr Leu Glu
 [0446] 325 330 335
 [0447] His His His His His His
 [0448] 340
 [0449] <210>6
 [0450] <211>535
 [0451] <212>PRT
 [0452] <213>人工的
 [0453] <220>
 [0454] <223>融合多肽串联的SlyD-gp41
 [0455] <400>6
 [0456] Met Lys Val Ala Lys Asp Leu Val Val Ser Leu Ala Tyr Gln Val Arg
 [0457] 1 5 10 15
 [0458] Thr Glu Asp Gly Val Leu Val Asp Glu Ser Pro Val Ser Ala Pro Leu
 [0459] 20 25 30
 [0460] Asp Tyr Leu His Gly His Gly Ser Leu Ile Ser Gly Leu Glu Thr Ala
 [0461] 35 40 45
 [0462] Leu Glu Gly His Glu Val Gly Asp Lys Phe Asp Val Ala Val Gly Ala
 [0463] 50 55 60
 [0464] Asn Asp Ala Tyr Gly Gln Tyr Asp Glu Asn Leu Val Gln Arg Val Pro
 [0465] 65 70 75 80
 [0466] Lys Asp Val Phe Met Gly Val Asp Glu Leu Gln Val Gly Met Arg Phe
 [0467] 85 90 95
 [0468] Leu Ala Glu Thr Asp Gln Gly Pro Val Pro Val Glu Ile Thr Ala Val
 [0469] 100 105 110
 [0470] Glu Asp Asp His Val Val Val Asp Gly Asn His Met Leu Ala Gly Gln
 [0471] 115 120 125
 [0472] Asn Leu Lys Phe Asn Val Glu Val Val Ala Ile Arg Glu Ala Thr Glu
 [0473] 130 135 140
 [0474] Glu Glu Leu Ala His Gly His Val His Gly Ala His Asp His His His
 [0475] 145 150 155 160
 [0476] Asp His Asp His Asp Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
 [0477] 165 170 175
 [0478] Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Lys Val Ala Lys

[0479]		180		185		190
[0480]	Asp Leu Val Val Ser Leu Ala Tyr Gln Val Arg Thr Glu Asp Gly Val					
[0481]		195		200		205
[0482]	Leu Val Asp Glu Ser Pro Val Ser Ala Pro Leu Asp Tyr Leu His Gly					
[0483]		210		215		220
[0484]	His Gly Ser Leu Ile Ser Gly Leu Glu Thr Ala Leu Glu Gly His Glu					
[0485]		225		230		240
[0486]	Val Gly Asp Lys Phe Asp Val Ala Val Gly Ala Asn Asp Ala Tyr Gly					
[0487]		245		250		255
[0488]	Gln Tyr Asp Glu Asn Leu Val Gln Arg Val Pro Lys Asp Val Phe Met					
[0489]		260		265		270
[0490]	Gly Val Asp Glu Leu Gln Val Gly Met Arg Phe Leu Ala Glu Thr Asp					
[0491]		275		280		285
[0492]	Gln Gly Pro Val Pro Val Glu Ile Thr Ala Val Glu Asp Asp His Val					
[0493]		290		295		300
[0494]	Val Val Asp Gly Asn His Met Leu Ala Gly Gln Asn Leu Lys Phe Asn					
[0495]		305		310		320
[0496]	Val Glu Val Val Ala Ile Arg Glu Ala Thr Glu Glu Glu Leu Ala His					
[0497]		325		330		335
[0498]	Gly His Val His Gly Ala His Asp His His His Asp His Asp His Asp					
[0499]		340		345		350
[0500]	Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser					
[0501]		355		360		365
[0502]	Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Thr Leu Thr Val Gln Ala Arg Gln Leu					
[0503]		370		375		380
[0504]	Leu Ser Gly Ile Val Gln Gln Gln Asn Asn Glu Leu Arg Ala Ile Glu					
[0505]		385		390		400
[0506]	Ala Gln Gln His Leu Glu Gln Leu Thr Val Trp Gly Thr Lys Gln Leu					
[0507]		405		410		415
[0508]	Gln Ala Arg Glu Leu Ala Val Glu Arg Tyr Leu Lys Asp Gln Gln Leu					
[0509]		420		425		430
[0510]	Leu Gly Ile Trp Gly Cys Ser Gly Lys Leu Ile Cys Thr Thr Ala Val					
[0511]		435		440		445
[0512]	Pro Trp Asn Ala Ser Trp Ser Asn Lys Ser Leu Glu Gln Ile Trp Asn					
[0513]		450		455		460
[0514]	Asn Met Thr Trp Met Glu Trp Asp Arg Glu Ile Asn Asn Tyr Thr Ser					
[0515]		465		470		480
[0516]	Leu Ile His Ser Leu Ile Glu Glu Ser Gln Asn Gln Gln Glu Lys Asn					
[0517]		485		490		495

[0518]	Glu Gln Glu Leu Leu Glu Leu Asp Lys Trp Ala Ser Leu Trp Asn Trp
[0519]	500 505 510
[0520]	Phe Asn Ile Thr Asn Trp Leu Trp Tyr His Gly His Asp His Asp His
[0521]	515 520 525
[0522]	Asp His His His His His His
[0523]	530 535
[0524]	<210>7
[0525]	<211>343
[0526]	<212>PRT
[0527]	<213>人工的
[0528]	<220>
[0529]	<223>融合多肽SlpA-gG1(HSV)
[0530]	<400>7
[0531]	Met Ser Glu Ser Val Gln Ser Asn Ser Ala Val Leu Val His Phe Thr
[0532]	1 5 10 15
[0533]	Leu Lys Leu Asp Asp Gly Thr Thr Ala Glu Ser Thr Arg Asn Asn Gly
[0534]	20 25 30
[0535]	Lys Pro Ala Leu Phe Arg Leu Gly Asp Ala Ser Leu Ser Glu Gly Leu
[0536]	35 40 45
[0537]	Glu Gln His Leu Leu Gly Leu Lys Val Gly Asp Lys Thr Thr Phe Ser
[0538]	50 55 60
[0539]	Leu Glu Pro Asp Ala Ala Phe Gly Val Pro Ser Pro Asp Leu Ile Gln
[0540]	65 70 75 80
[0541]	Tyr Phe Ser Arg Arg Glu Phe Met Asp Ala Gly Glu Pro Glu Ile Gly
[0542]	85 90 95
[0543]	Ala Ile Met Leu Phe Thr Ala Met Asp Gly Ser Glu Met Pro Gly Val
[0544]	100 105 110
[0545]	Ile Arg Glu Ile Asn Gly Asp Ser Ile Thr Val Asp Phe Asn His Pro
[0546]	115 120 125
[0547]	Leu Ala Gly Gln Thr Val His Phe Asp Ile Glu Val Leu Glu Ile Asp
[0548]	130 135 140
[0549]	Pro Ala Leu Glu Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser
[0550]	145 150 155 160
[0551]	Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Pro Thr Asn Val Ser
[0552]	165 170 175
[0553]	Ser Thr Thr Gln Pro Gln Leu Gln Thr Thr Gly Arg Pro Ser His Glu
[0554]	180 185 190
[0555]	Ala Pro Asn Met Thr Gln Thr Gly Thr Thr Asp Ser Pro Thr Ala Ile
[0556]	195 200 205

[0557] Ser Leu Thr Thr Pro Asp His Thr Pro Pro Met Pro Ser Ile Gly Leu
 [0558] 210 215 220
 [0559] Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Gly Ala Gly Asp Gly Glu His Leu Glu
 [0560] 225 230 235 240
 [0561] Gly Gly Asp Gly Thr Arg Asp Thr Leu Pro Gln Ser Pro Gly Pro Ala
 [0562] 245 250 255
 [0563] Phe Pro Leu Ala Glu Asp Val Glu Lys Asp Lys Pro Asn Arg Pro Val
 [0564] 260 265 270
 [0565] Val Pro Ser Pro Asp Pro Asn Asn Ser Pro Ala Arg Pro Glu Thr Ser
 [0566] 275 280 285
 [0567] Arg Pro Lys Thr Pro Pro Thr Ile Ile Gly Pro Leu Ala Thr Arg Pro
 [0568] 290 295 300
 [0569] Thr Thr Arg Leu Thr Ser Lys Gly Arg Pro Leu Val Pro Thr Pro Gln
 [0570] 305 310 315 320
 [0571] His Thr Pro Leu Phe Ser Phe Leu Thr Ala Ser Pro Ala Leu Asp Leu
 [0572] 325 330 335
 [0573] Glu His His His His His His
 [0574] 340
 [0575] <210>8
 [0576] <211>360
 [0577] <212>PRT
 [0578] <213>人工的
 [0579] <220>
 [0580] <223>融合多肽SlyD-gG1(HSV)
 [0581] <400>8
 [0582] Met Lys Val Ala Lys Asp Leu Val Val Ser LeuAla Tyr Gln Val Arg
 [0583] 1 5 10 15
 [0584] Thr Glu Asp Gly Val Leu Val Asp Glu Ser Pro Val Ser Ala Pro Leu
 [0585] 20 25 30
 [0586] Asp Tyr Leu His Gly His Gly Ser Leu Ile Ser Gly Leu Glu Thr Ala
 [0587] 35 40 45
 [0588] Leu Glu Gly His Glu Val Gly Asp Lys Phe Asp Val Ala Val Gly Ala
 [0589] 50 55 60
 [0590] Asn Asp Ala Tyr Gly Gln Tyr Asp Glu Asn Leu Val Gln Arg Val Pro
 [0591] 65 70 75 80
 [0592] Lys Asp Val Phe Met Gly Val Asp Glu Leu Gln Val Gly Met Arg Phe
 [0593] 85 90 95
 [0594] Leu Ala Glu Thr Asp Gln Gly Pro Val Pro Val Glu Ile Thr Ala Val
 [0595] 100 105 110

[0596] Glu Asp Asp His Val Val Val Asp Gly Asn His Met Leu Ala Gly Gln
 [0597] 115 120 125
 [0598] Asn Leu Lys Phe Asn Val Glu Val Val Ala Ile Arg Glu Ala Thr Glu
 [0599] 130 135 140
 [0600] Glu Glu Leu Ala His Gly His Val His Gly Ala His Asp His His His
 [0601] 145 150 155 160
 [0602] Asp His Asp His Asp Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
 [0603] 165 170 175
 [0604] Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Pro Thr Asn Val
 [0605] 180 185 190
 [0606] Ser Ser Thr Thr Gln Pro Gln Leu Gln Thr Thr Gly Arg Pro Ser His
 [0607] 195 200 205
 [0608] Glu Ala Pro Asn Met Thr Gln Thr Gly Thr Thr Asp Ser Pro Thr Ala
 [0609] 210 215 220
 [0610] Ile Ser Leu Thr Thr Pro Asp His Thr Pro Pro Met Pro Ser Ile Gly
 [0611] 225 230 235 240
 [0612] Leu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Gly Ala Gly Asp Gly Glu His Leu
 [0613] 245 250 255
 [0614] Glu Gly Gly Asp Gly Thr Arg Asp Thr Leu Pro Gln Ser Pro Gly Pro
 [0615] 260 265 270
 [0616] Ala Phe Pro Leu Ala Glu Asp Val Glu Lys Asp Lys Pro Asn Arg Pro
 [0617] 275 280 285
 [0618] Val Val Pro Ser Pro Asp Pro Asn Asn Ser Pro Ala Arg Pro Glu Thr
 [0619] 290 295 300
 [0620] Ser Arg Pro Lys Thr Pro Pro Thr Ile Ile Gly Pro Leu Ala Thr Arg
 [0621] 305 310 315 320
 [0622] Pro Thr Thr Arg Leu Thr Ser Lys Gly Arg Pro Leu Val Pro Thr Pro
 [0623] 325 330 335
 [0624] Gln His Thr Pro Leu Phe Ser Phe Leu Thr Ala Ser Pro Ala Leu Asp
 [0625] 340 345 350
 [0626] Leu Glu His His His His His His
 [0627] 355 360
 [0628] <210>9
 [0629] <211>199
 [0630] <212>PRT
 [0631] <213>多杀性巴氏杆菌(Pasteurella multocida)
 [0632] <400>9
 [0633] Met Lys Ile Ala Lys Asn Val Val Val Ser Ile Ala Tyr Gln Val Arg
 [0634] 1 5 10 15

[0635] Thr Glu Asp Gly Val Leu Val Asp Glu Ala Pro Val Asn Gln Pro Leu
 [0636] 20 25 30
 [0637] Glu Tyr Leu Gln Gly His Asn Asn Leu Val Ile Gly Leu Glu Asn Ala
 [0638] 35 40 45
 [0639] Leu Glu Gly Lys Ala Val Gly Asp Lys Phe Glu Val Arg Val Lys Pro
 [0640] 50 55 60
 [0641] Glu Glu Ala Tyr Gly Glu TyrAsn Glu Asn Met Val Gln Arg Val Pro
 [0642] 65 70 75 80
 [0643] Lys Asp Val Phe Gln Gly Val Asp Glu Leu Val Val Gly Met Arg Phe
 [0644] 85 90 95
 [0645] Ile Ala Asp Thr Asp Ile Gly Pro Leu Pro Val Val Ile Thr Glu Val
 [0646] 100 105 110
 [0647] Ala Glu Asn Asp Val Val Val Asp Gly Asn His Met Leu Ala Gly Gln
 [0648] 115 120 125
 [0649] Glu Leu Leu Phe Ser Val Glu Val Val Ala Thr Arg Glu Ala Thr Leu
 [0650] 130 135 140
 [0651] Glu Glu Ile Ala His Gly His Ile His Gln Glu Gly Gly Cys Cys Gly
 [0652] 145 150 155 160
 [0653] Gly His His His Asp Ser Asp Glu Glu Gly His Gly Cys Gly Cys Gly
 [0654] 165 170 175
 [0655] Ser His His His His Glu His Glu His His Ala His Asp Gly Cys Cys
 [0656] 180 185 190
 [0657] Gly Asn Gly Gly Cys Lys His
 [0658] 195
 [0659] <210>10
 [0660] <211>156
 [0661] <212>PRT
 [0662] <213>多杀性巴氏杆菌
 [0663] <400>10
 [0664] Met Lys Ile Ala Lys Asn Val Val Val Ser Ile Ala Tyr Gln Val Arg
 [0665] 1 5 10 15
 [0666] Thr Glu Asp Gly Val Leu Val Asp Glu Ala Pro Val Asn Gln Pro Leu
 [0667] 20 25 30
 [0668] Glu Tyr Leu Gln Gly His Asn Asn Leu Val Ile Gly Leu Glu Asn Ala
 [0669] 35 40 45
 [0670] Leu Glu Gly Lys Ala Val Gly Asp Lys Phe Glu Val Arg Val Lys Pro
 [0671] 50 55 60
 [0672] Glu Glu Ala Tyr Gly Glu Tyr Asn Glu Asn Met Val Gln Arg Val Pro
 [0673] 65 70 75 80

[0674] Lys Asp Val Phe Gln Gly Val Asp Glu Leu Val Val Gly Met Arg Phe
 [0675] 85 90 95
 [0676] Ile Ala Asp Thr Asp Ile Gly Pro Leu Pro Val Val Ile Thr Glu Val
 [0677] 100 105 110
 [0678] Ala Glu Asn Asp Val Val Val Asp Gly Asn His Met Leu Ala Gly Gln
 [0679] 115 120 125
 [0680] Glu Leu Leu Phe Ser Val Glu Val Val Ala Thr Arg Glu Ala Thr Leu
 [0681] 130 135 140
 [0682] Glu Glu Ile Ala His Gly His Ile His Gln Glu Gly
 [0683] 145 150 155
 [0684] <210>11
 [0685] <211>270
 [0686] <212>PRT
 [0687] <213>大肠杆菌
 [0688] <400>11
 [0689] Met Lys Ser Leu Phe Lys Val Thr Leu Leu Ala Thr Thr Met Ala Val
 [0690] 1 5 10 15
 [0691] Ala Leu His Ala Pro Ile Thr Phe Ala Ala Glu Ala Ala Lys Pro Ala
 [0692] 20 25 30
 [0693] Thr Ala Ala Asp Ser Lys Ala Ala Phe Lys Asn Asp Asp Gln Lys Ser
 [0694] 35 40 45
 [0695] Ala Tyr Ala Leu Gly Ala Ser Leu Gly Arg Tyr Met Glu Asn Ser Leu
 [0696] 50 55 60
 [0697] Lys Glu Gln Glu Lys Leu Gly Ile Lys Leu Asp Lys Asp Gln Leu Ile
 [0698] 65 70 75 80
 [0699] Ala Gly Val Gln Asp Ala Phe Ala Asp Lys Ser Lys Leu Ser Asp Gln
 [0700] 85 90 95
 [0701] Glu Ile Glu Gln Thr Leu Gln Ala Phe Glu Ala Arg Val Lys Ser Ser
 [0702] 100 105 110
 [0703] Ala Gln Ala Lys Met Glu Lys Asp Ala Ala Asp Asn Glu Ala Lys Gly
 [0704] 115 120 125
 [0705] Lys Glu Tyr Arg Glu Lys Phe Ala Lys Glu Lys Gly Val Lys Thr Ser
 [0706] 130 135 140
 [0707] Ser Thr Gly Leu Val Tyr Gln Val Val Glu Ala Gly Lys Gly Glu Ala
 [0708] 145 150 155 160
 [0709] Pro Lys Asp Ser Asp Thr Val Val Val Asn Tyr Lys Gly Thr Leu Ile
 [0710] 165 170 175
 [0711] Asp Gly Lys Glu Phe Asp Asn Ser Tyr Thr Arg Gly Glu Pro Leu Ser
 [0712] 180 185 190

[0713]	Phe Arg Leu Asp Gly Val Ile Pro Gly Trp Thr Glu Gly Leu Lys Asn
[0714]	195 200 205
[0715]	Ile Lys Lys Gly Gly Lys Ile Lys Leu Val Ile Pro Pro Glu Leu Ala
[0716]	210 215 220
[0717]	Tyr Gly Lys Ala Gly Val Pro Gly Ile Pro Pro Asn Ser Thr Leu Val
[0718]	225 230 235 240
[0719]	Phe Asp Val Glu Leu Leu Asp Val Lys Pro Ala Pro Lys Ala Asp Ala
[0720]	245 250 255
[0721]	Lys Pro Glu Ala Asp Ala Lys Ala Ala Asp Ser Ala Lys Lys
[0722]	260 265 270
[0723]	<210>12
[0724]	<211>245
[0725]	<212>PRT
[0726]	<213>大肠杆菌
[0727]	<400>12
[0728]	Ala Glu Ala Ala Lys Pro Ala Thr Ala Ala Asp Ser Lys Ala Ala Phe
[0729]	1 5 10 15
[0730]	Lys Asn Asp Asp Gln Lys Ser Ala Tyr Ala Leu Gly Ala Ser Leu Gly
[0731]	20 25 30
[0732]	Arg Tyr Met Glu Asn Ser Leu Lys Glu Gln Glu Lys Leu Gly Ile Lys
[0733]	35 40 45
[0734]	Leu Asp Lys Asp Gln Leu Ile Ala Gly Val Gln Asp Ala Phe Ala Asp
[0735]	50 55 60
[0736]	Lys Ser Lys Leu Ser Asp Gln Glu Ile Glu Gln Thr Leu Gln Ala Phe
[0737]	65 70 75 80
[0738]	Glu Ala Arg Val Lys Ser Ser Ala Gln Ala Lys Met Glu Lys Asp Ala
[0739]	85 90 95
[0740]	Ala Asp Asn Glu Ala Lys Gly Lys Glu Tyr Arg Glu Lys Phe Ala Lys
[0741]	100 105 110
[0742]	Glu Lys Gly Val Lys Thr Ser Ser Thr Gly Leu Val Tyr Gln Val Val
[0743]	115 120 125
[0744]	Glu Ala Gly Lys Gly Glu Ala Pro Lys Asp Ser Asp Thr Val Val Val
[0745]	130 135 140
[0746]	Asn Tyr Lys Gly Thr Leu Ile Asp Gly Lys Glu Phe Asp Asn Ser Tyr
[0747]	145 150 155 160
[0748]	Thr Arg Gly Glu Pro Leu Ser Phe Arg Leu Asp Gly Val Ile Pro Gly
[0749]	165 170 175
[0750]	Trp Thr Glu Gly Leu Lys Asn Ile Lys Lys Gly Gly Lys Ile Lys Leu
[0751]	180 185 190

[0752] Val Ile Pro Pro Glu Leu Ala Tyr Gly Lys Ala Gly Val Pro Gly Ile
 [0753] 195 200 205
 [0754] Pro Pro Asn Ser Thr Leu Val Phe Asp Val Glu Leu Leu Asp Val Lys
 [0755] 210 215 220
 [0756] Pro Ala Pro Lys Ala Asp Ala Lys Pro Glu Ala Asp Ala Lys Ala Ala
 [0757] 225 230 235 240
 [0758] Asp Ser Ala Lys Lys
 [0759] 245
 [0760] <210>13
 [0761] <211>241
 [0762] <212>PRT
 [0763] <213>人工的
 [0764] <220>
 [0765] <223>EBVNA-1401-641,半胱氨酸变为丙氨酸
 [0766] <400>13
 [0767] Gly Arg Arg Pro Phe Phe His Pro Val Gly Glu Ala Asp Tyr Phe Glu
 [0768] 1 5 10 15
 [0769] Tyr His Gln Glu Gly Gly Pro Asp Gly Glu Pro Asp Val Pro Pro Gly
 [0770] 20 25 30
 [0771] Ala Ile Glu Gln Gly Pro Ala Asp Asp Pro Gly Glu Gly Pro Ser Thr
 [0772] 35 40 45
 [0773] Gly Pro Arg Gly Gln Gly Asp Gly Gly Arg Arg Lys Lys Gly Gly Trp
 [0774] 50 55 60
 [0775] Phe Gly Lys His Arg Gly Gln Gly Gly Ser Asn Pro Lys Phe Glu Asn
 [0776] 65 70 75 80
 [0777] Ile Ala Glu Gly Leu Arg Ala Leu Leu Ala Arg Ser His Val Glu Arg
 [0778] 85 90 95
 [0779] Thr Thr Asp Glu Gly Thr Trp Val Ala Gly Val Phe Val Tyr Gly Gly
 [0780] 100 105 110
 [0781] Ser Lys Thr Ser Leu Tyr Asn Leu Arg Arg Gly Thr Ala Leu Ala Ile
 [0782] 115 120 125
 [0783] Pro Gln Ala Arg Leu Thr Pro Leu Ser Arg Leu Pro Phe Gly Met Ala
 [0784] 130 135 140
 [0785] Pro Gly Pro Gly Pro Gln Pro Gly Pro Leu Arg Glu Ser Ile Val Ala
 [0786] 145 150 155 160
 [0787] Tyr Phe Met Val Phe Leu Gln Thr His Ile Phe Ala Glu Val Leu Lys
 [0788] 165 170 175
 [0789] Asp Ala Ile Lys Asp Leu Val Met Thr Lys Pro Ala Pro Thr Ala Asn
 [0790] 180 185 190

[0791] Ile Arg Val Thr Val Ala Ser Phe Asp Asp Gly Val Asp Leu Pro Pro
 [0792] 195 200 205
 [0793] Trp Phe Pro Pro Met Val Glu Gly Ala Ala Ala Glu Gly Asp Asp Gly
 [0794] 210 215 220
 [0795] Asp Asp Gly Asp Glu Gly Gly Asp Gly Asp Glu Gly Glu Glu Gly Gln
 [0796] 225 230 235 240
 [0797] Glu
 [0798] <210>14
 [0799] <211>176
 [0800] <212>PRT
 [0801] <213>人工的
 [0802] <220>
 [0803] <223>EBV p18,1-176,半胱氨酸变为丙氨酸
 [0804] <400>14
 [0805] Met Ala Arg Arg Leu Pro Lys Pro Thr Leu Gln Gly Arg Leu Glu Ala
 [0806] 1 5 10 15
 [0807] Asp Phe Pro Asp Ser Pro Leu Leu Pro Lys Phe Gln Glu Leu Asn Gln
 [0808] 20 25 30
 [0809] Asn Asn Leu Pro Asn Asp Val Phe Arg Glu Ala Gln Arg Ser Tyr Leu
 [0810] 35 40 45
 [0811] Val Phe Leu Thr Ser Gln Phe Ala Tyr Glu Glu Tyr Val Gln Arg Thr
 [0812] 50 55 60
 [0813] Phe Gly Val Pro Arg Arg Gln Arg Ala Ile Asp Lys Arg Gln Arg Ala
 [0814] 65 70 75 80
 [0815] Ser Val Ala Gly Ala Gly Ala His Ala His Leu Gly Gly Ser Ser Ala
 [0816] 85 90 95
 [0817] Thr Pro Val Gln Gln Ala Gln Ala Ala Ala Ser Ala Gly Thr Gly Ala
 [0818] 100 105 110
 [0819] Leu Ala Ser Ser Ala Pro Ser Thr Ala Val Ala Gln Ser Ala Thr Pro
 [0820] 115 120 125
 [0821] Ser Val Ser Ser Ser Ile Ser Ser Leu Arg Ala Ala Thr Ser Gly Ala
 [0822] 130 135 140
 [0823] Thr Ala Ala Ala Ser Ala Ala Ala Ala Val Asp Thr Gly Ser Gly Gly
 [0824] 145 150 155 160
 [0825] Gly Gly Gln Pro His Asp Thr Ala Pro Arg Gly Ala Arg Lys Lys Gln
 [0826] 165 170 175
 [0827] <210>15
 [0828] <211>72
 [0829] <212>PRT

[0830] <213>人疱疹病毒4
 [0831] <400>15
 [0832] Ala Ala Ser Ala Gly Thr Gly Ala Leu Ala Ser Ser Ala Pro Ser Thr
 [0833] 1 5 10 15
 [0834] Ala Val Ala Gln Ser Ala Thr Pro Ser Val Ser Ser Ser Ile Ser Ser
 [0835] 20 25 30
 [0836] Leu Arg Ala Ala Thr Ser Gly Ala Thr Ala Ala Ala Ser Ala Ala Ala
 [0837] 35 40 45
 [0838] Ala Val Asp Thr Gly Ser Gly Gly Gly Gly Gln Pro His Asp Thr Ala
 [0839] 50 55 60
 [0840] Pro Arg Gly Ala Arg Lys Lys Gln
 [0841] 65 70
 [0842] <210>16
 [0843] <211>162
 [0844] <212>PRT
 [0845] <213>人工的
 [0846] <220>
 [0847] <223>EBV p23,1-162,半胱氨酸变为丙氨酸
 [0848] <400>16
 [0849] Met Ser Ala Pro Arg Lys Val Arg Leu Pro Ser Val Lys Ala Val Asp
 [0850] 1 5 10 15
 [0851] Met Ser Met Glu Asp Met Ala Ala Arg Leu Ala Arg Leu Glu Ser Glu
 [0852] 20 25 30
 [0853] Asn Lys Ala Leu Lys Gln Gln Val Leu Arg Gly Gly Ala Ala Ala Ser
 [0854] 35 40 45
 [0855] Ser Thr Ser Val Pro Ser Ala Pro Val Pro Pro Pro Glu Pro Leu Thr
 [0856] 50 55 60
 [0857] Ala Arg Gln Arg Glu Val Met Ile Thr Gln Ala Thr Gly Arg Leu Ala
 [0858] 65 70 75 80
 [0859] Ser Gln Ala Met Lys Lys Ile Glu Asp Lys Val Arg Lys Ser Val Asp
 [0860] 85 90 95
 [0861] Gly Val Thr Thr Arg Asn Glu Met Glu Asn Ile Leu Gln Asn Leu Thr
 [0862] 100 105 110
 [0863] Leu Arg Ile Gln Val Ser Met Leu Gly Ala Lys Gly Gln Pro Ser Pro
 [0864] 115 120 125
 [0865] Gly Glu Gly Thr Arg Pro Arg Glu Ser Asn Asp Pro Asn Ala Thr Arg
 [0866] 130 135 140
 [0867] Arg Ala Arg Ser Arg Ser Arg Gly Arg Glu Ala Lys Lys Val Gln Ile
 [0868] 145 150 155 160

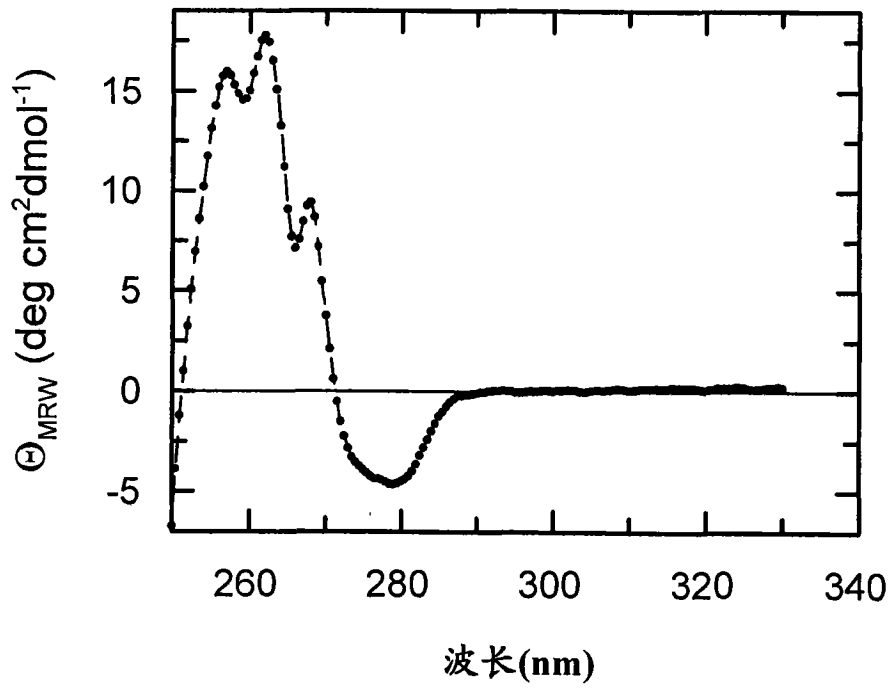


图1

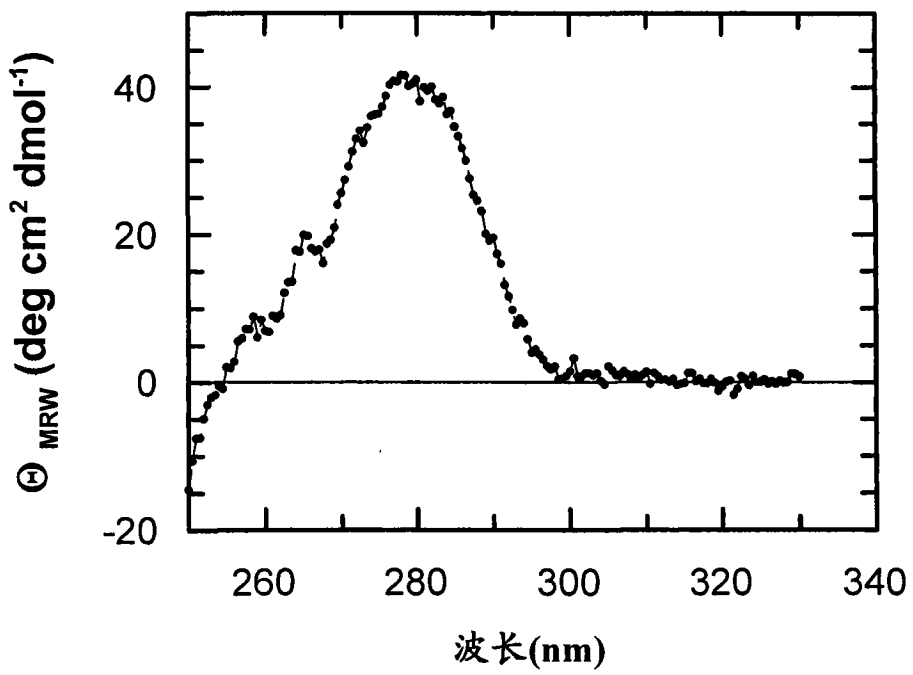


图2

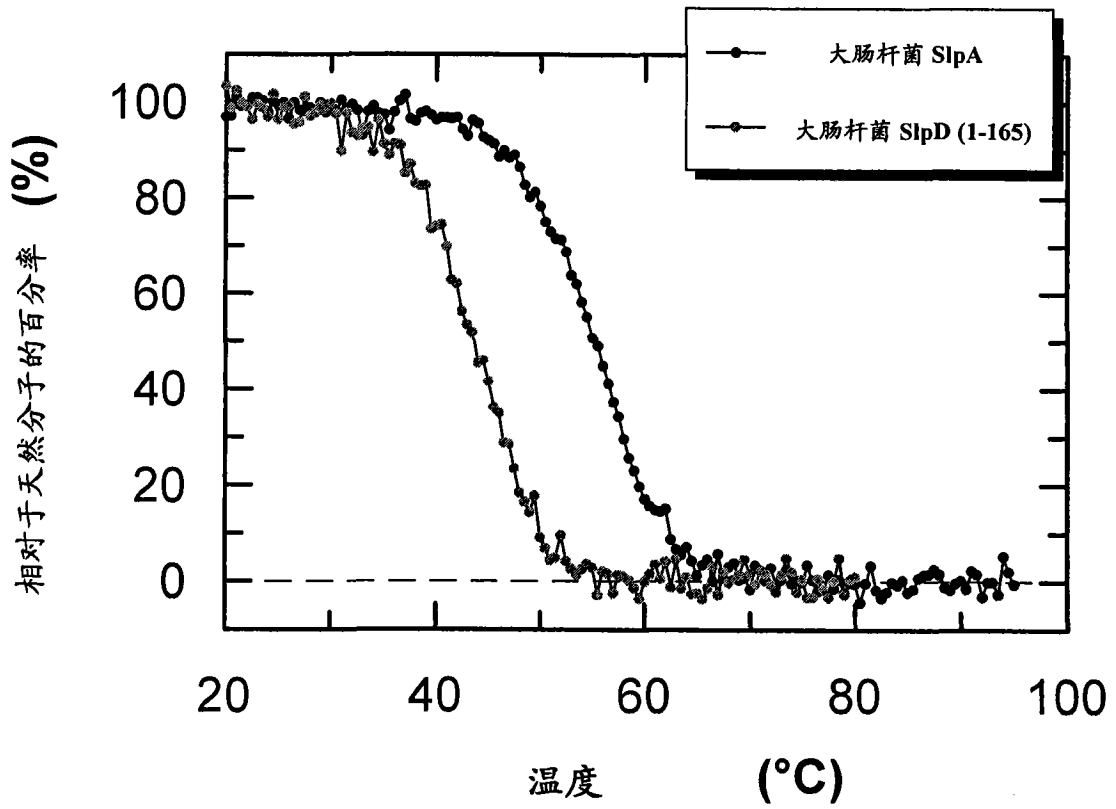


图3

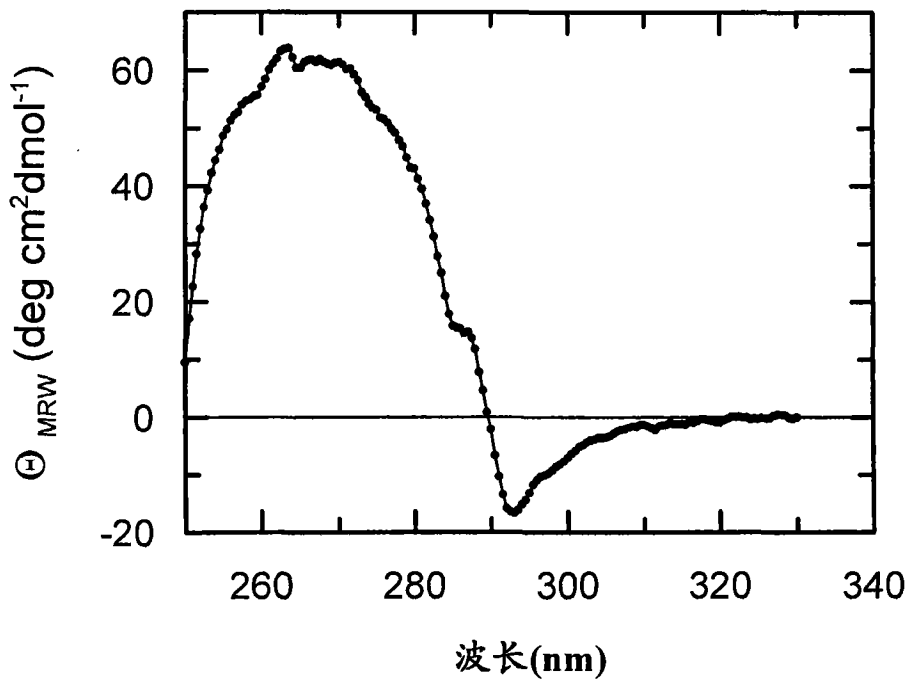


图4

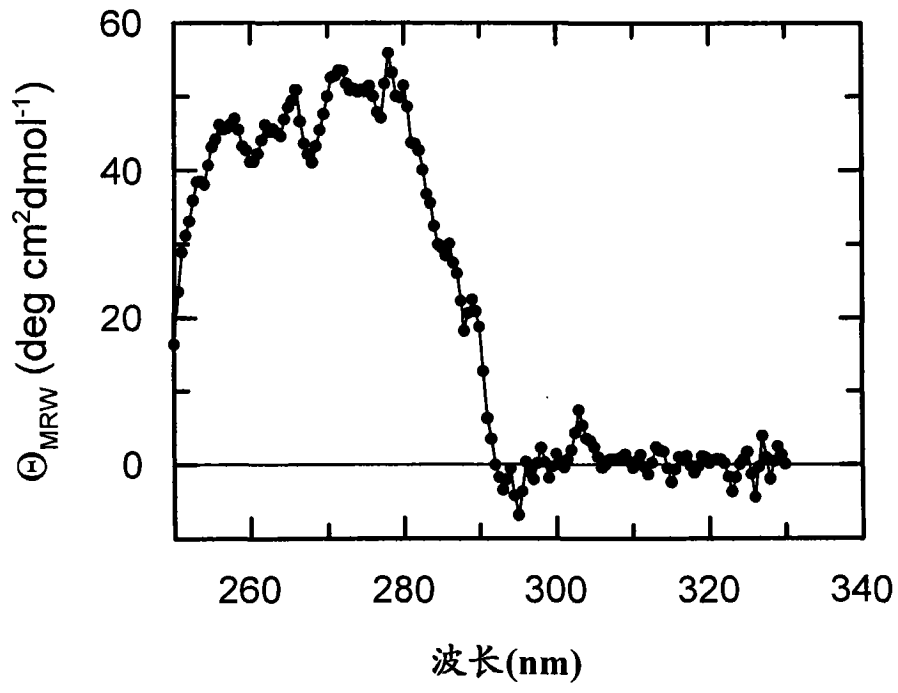


图5

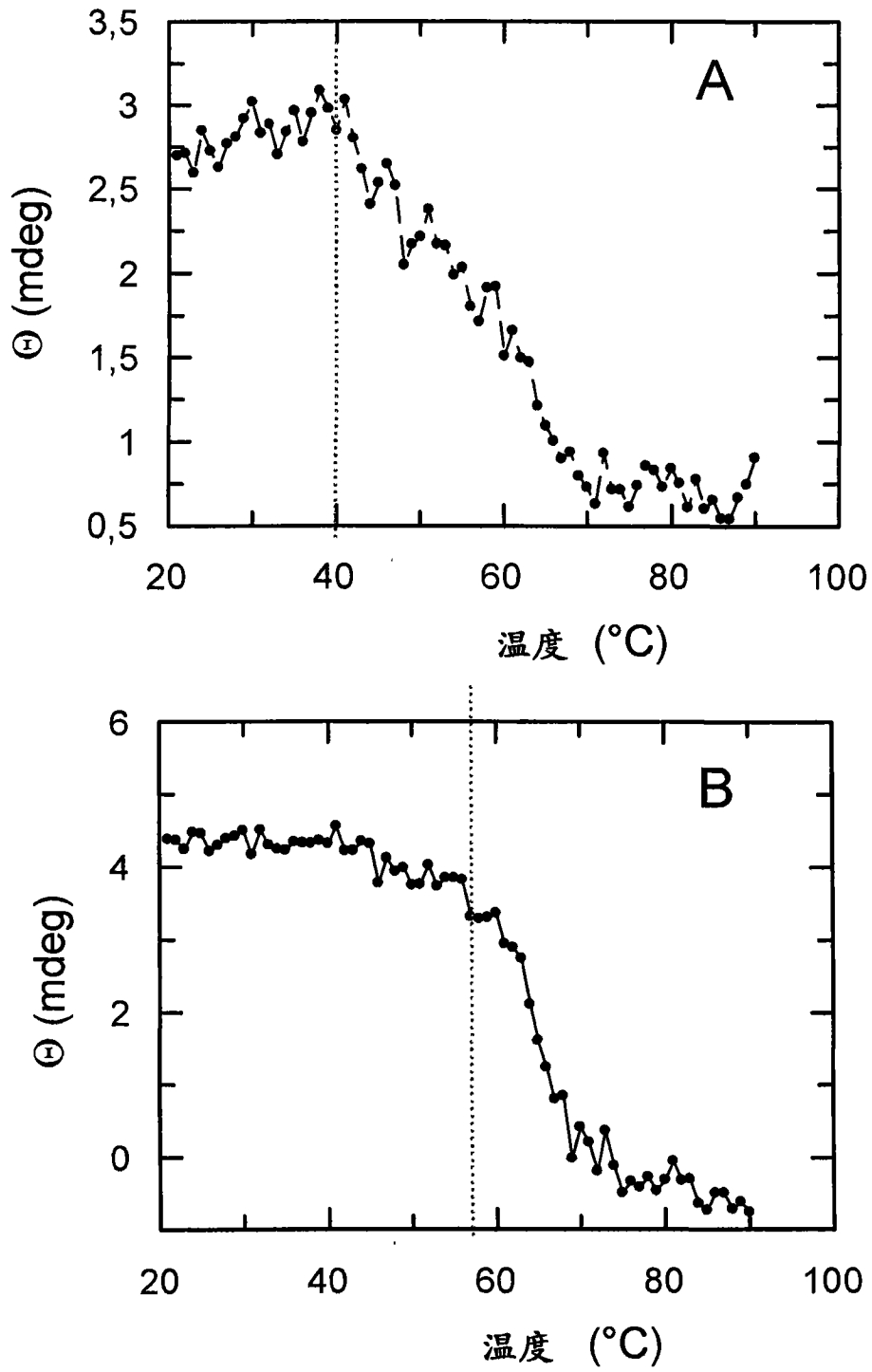


图6

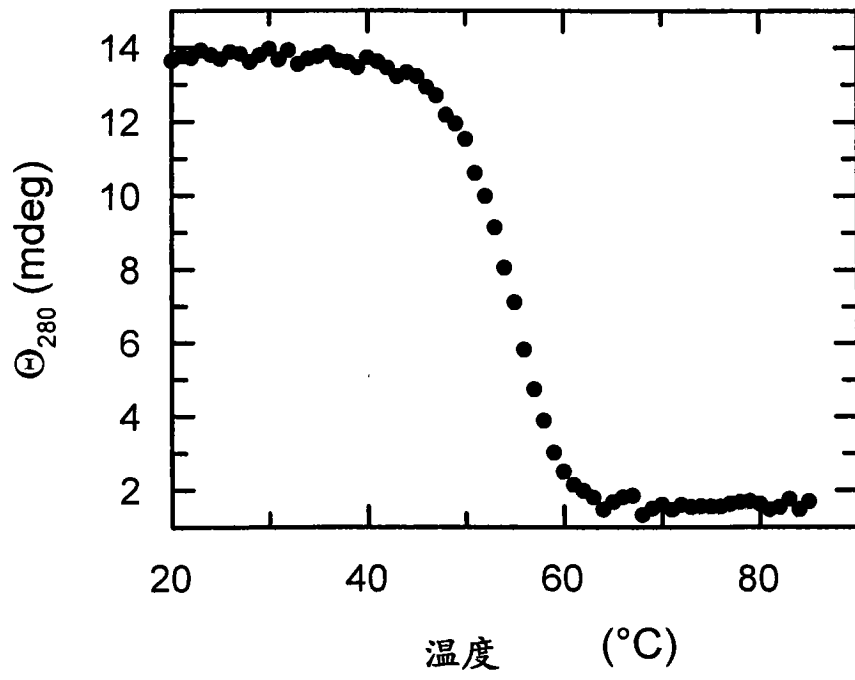


图7

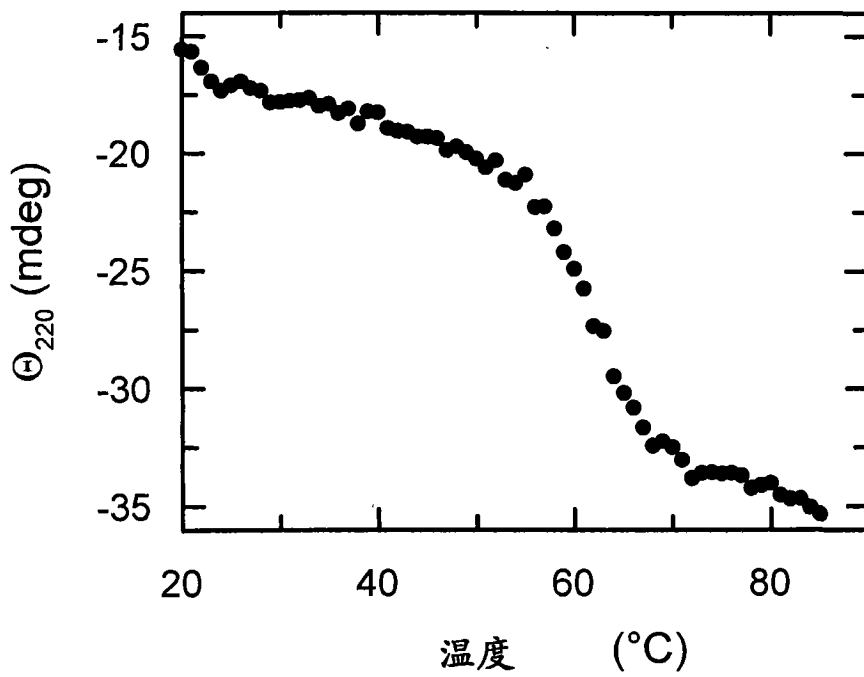


图8

	SipA-gG1(26-189)		SipA-gG1(26-189) 热应激抗原 (60°C)		信号回收率 热应激后 (%)		SlyD-gG1(26-189)		SlyD-gG1(26-189) 热应激抗原 (60°C)		信号回收率 热应激后 (%)	
	参比抗原 信号(计数)	参比抗原 信号(计数)	参比抗原 信号(计数)	参比抗原 信号(计数)	参比抗原 信号(计数)	参比抗原 信号(计数)	参比抗原 信号(计数)	参比抗原 信号(计数)	参比抗原 信号(计数)	参比抗原 信号(计数)	参比抗原 信号(计数)	参比抗原 信号(计数)
抗-HSV-1阳性血清												
SB neg109	241954	180593	75	152719	100019	66						
Trina 1115128	181472	130598	72	119166	74423	62						
Trina 4444479	1176920	806119	68	636858	293919	46						
Trina LQ12733	1139220	917258	81	782170	455511	58						
Trina 07/06-531	35549	34581	97	24915	22257	89						
Trina1115128	183623	129815	71	122962	56036	46						
IBS-4414	709157	531756	75	508355	256149	50						
IBS-4528	199456	144827	73	135291	70244	52						
IBS-4451	110236	76853	70	71378	34602	48						
IBS-4450	312373	235076	75	219408	123093	56						
IBS-4532	392030	292690	75	286622	155743	54						
IBS-4531	409398	287665	70	294428	141952	48						
IBS-4530	713555	521780	73	469525	290578	62						
SB109	247457	189436	77	158065	96283	61						
抗-HSV-1阴性血清												
Trina 07/06-512	606	680	12	1146	2619	128						
Trina 07/06-514	608	685	13	1340	4783	257						
Trina 07/06-518	604	697	15	1426	4014	181						
Trina 07/06-524	642	714	11	1403	5995	327						
Trina 07/06-526	636	732	15	1432	6050	322						
Trina 07/06-533	669	990	48	1429	13566	849						
Trina 07/06-537	631	707	12	1402	3323	137						
Trina 07/06-542	623	719	15	1448	2899	100						
705 2197	644	749	16	1428	7027	392						
IBS-4452	629	742	18	1421	4598	224						
IBS-1092	657	731	11	1422	7227	408						

表 I

专利名称(译)	作为重组蛋白和酶技术的工具的SlpA		
公开(公告)号	CN101591665B	公开(公告)日	2016-08-31
申请号	CN200910142690.3	申请日	2009-05-25
申请(专利权)人(译)	霍夫曼-拉罗奇有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	霍夫曼-拉罗奇有限公司		
[标]发明人	E法茨 P沙尔施米特 U施米特 C肖尔茨		
发明人	E·法茨 P·沙尔施米特 U·施米特 C·肖尔茨		
IPC分类号	C12N15/62 C12N15/63 C12N1/21 C12P21/02 C07K19/00 G01N33/53 C07K16/00 A61K39/00 G01N33/536 C12R1/125 C12R1/19		
CPC分类号	A61P19/02 A61P25/28 A61P29/00 A61P31/04 A61P31/12 A61P37/04 C12N9/90 C12N15/62 G01N33/536 G01N33/54393 Y02A50/57		
代理人(译)	梁谋		
优先权	2008009537 2008-05-26 EP		
其他公开文献	CN101591665A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及作为重组蛋白和酶技术工具的SlpA。具体来说，本发明涉及编码含有SlpA分子伴侣和靶多肽的融合蛋白的重组DNA分子，编码所述融合蛋白的相应表达载体以及用所述表达载体转化的宿主细胞，其中人FK506结合蛋白(FKBP)被排除作为靶多肽；还涉及生产所述融合蛋白的方法；所述融合蛋白作为结合配偶体的用途，或作为在免疫测定中降低干扰的工具的用途；所述融合蛋白用于产生抗体的用途和在疫苗生产中的用途；所述融合蛋白在免疫测定中检测分析物的方法，以及含有所述融合蛋白的试剂盒；SlpA在免疫测定中降低干扰的用途，及其在蛋白制品中作为添加剂和在生物技术应用中作为折叠辅助物的用途。

