

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



## [12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200680050180.8

[51] Int. Cl.

*G12N 9/90 (2006.01)*

*G12N 15/62 (2006.01)*

*G12N 15/61 (2006.01)*

*C07K 19/00 (2006.01)*

*C07K 14/16 (2006.01)*

*A61K 38/00 (2006.01)*

[43] 公开日 2009年1月21日

[11] 公开号 CN 101351550A

[51] Int. Cl. (续)

*G01N 33/53 (2006.01)*

[22] 申请日 2006.12.29

[21] 申请号 200680050180.8

[30] 优先权

[32] 2006. 1. 3 [33] EP [31] 06000056.9

[32] 2006. 5. 3 [33] EP [31] 06009106.3

[86] 国际申请 PCT/EP2006/012599 2006.12.29

[87] 国际公布 WO2007/077008 英 2007.7.12

[85] 进入国家阶段日期 2008.7.1

[71] 申请人 霍夫曼-拉罗奇有限公司

地址 瑞士巴塞尔

[72] 发明人 C·肖尔茨 P·沙尔斯米特

U·斯米特 E·法茨

[74] 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

代理人 权陆军 付磊

权利要求书3页 说明书38页 序列表30页

附图11页

[54] 发明名称

具有卓越的伴侣和折叠活性的嵌合融合蛋白

[57] 摘要

本发明公开了与野生型蛋白伴侣相比具有卓越的伴侣和折叠活性的嵌合融合蛋白的克隆、表达和用途。本发明涉及由含有编码非-人伴侣蛋白多肽结合区段的核苷酸序列和编码FK506结合蛋白(FKBP)或FK506-结合-蛋白-样结构域(FKBP-样结构域)的核苷酸序列的重组DNA分子编码的嵌合融合蛋白。具体地,本发明涉及由含有编码非-人伴侣蛋白多肽结合区段的核苷酸序列和编码人FKBP型肽基脯氨酸顺反异构酶(PPIase)的核苷酸序列的重组DNA分子编码的嵌合融合蛋白,生产这些嵌合融合蛋白的方法以及它们在其它蛋白质的生产以及在疫苗或药物的生产方法中作为折叠辅助物,以及作为进行免疫测定的折叠辅助物的用途。

1. 编码嵌合融合蛋白的重组 DNA 分子, 其包含:
  - a) 至少一个编码非-人伴侣蛋白多肽结合区段的核苷酸序列
  - b) 其上游至少一个编码 FK506 结合蛋白或 FK506-结合-蛋白-样结构域 (FKBP-样结构域) 的核苷酸序列和
  - c) 其下游至少一个编码 FK506-结合-蛋白-样结构域 (FKBP-样结构域) 的核苷酸序列。
2. 根据权利要求 1 的编码嵌合融合蛋白的重组 DNA 分子, 其包含:
  - a) 至少一个编码非-人伴侣蛋白多肽结合区段的核苷酸序列
  - b) 其上游至少一个编码人 FKBP 型肽基脯氨酸顺反异构酶 (PPIase) 的核苷酸序列和
  - c) 其下游至少一个编码人 FKBP 型肽基脯氨酸顺反异构酶 (PPIase) 的核苷酸序列。
3. 根据权利要求 2 的重组 DNA 分子, 其特征还在于它还包含
  - d) 至少一个编码靶多肽的核苷酸序列。
4. 根据权利要求 2 的重组 DNA 分子, 其特征还在于所述至少一个编码所述非-人伴侣蛋白多肽结合区段的核苷酸序列包含编码 FKBP 型大肠杆菌 PPIase 蛋白伴侣的序列。
5. 根据权利要求 2 的重组 DNA 分子, 其特征还在于所述至少一个编码所述非-人伴侣蛋白多肽结合区段的核苷酸序列含有编码大肠杆菌 SlyD 或 SlpA 蛋白伴侣的序列。
6. 根据权利要求 5 的重组 DNA 分子, 其特征还在于所述大肠杆菌 SlyD 核苷酸序列包含编码 N-末端起始于位于 SEQ ID NO. 1 第 56 至 75 位氨基酸之间任一氨基酸和 C-末端终止于位于 SEQ ID NO. 1 第 122 至 136 位氨基酸之间任一氨基酸的多肽的核苷酸序列。
7. 根据权利要求 6 的重组 DNA 分子, 其特征还在于所述大肠杆菌 SlyD 核苷酸序列包含编码 N-末端起始于 SEQ ID NO. 1 第 70 位氨基酸和 C-末端终止于 SEQ ID NO. 1 第 129 位氨基酸的多肽的核苷酸序列。
8. 根据权利要求 2 的重组 DNA 分子, 其特征还在于所述编码人肽基脯氨酸顺反异构酶的上游和/或下游核苷酸序列包含编码 FK506 结合蛋白 (FKBP) 的核苷酸序列。
9. 根据权利要求 8 的重组 DNA 分子, 其特征还在于所述编码人 FK506

结合蛋白的上游和/或下游核苷酸序列包含编码 FKBP12 的核苷酸序列。

10. 根据权利要求 9 的重组 DNA 分子, 其特征在于所述编码 FKBP12 的上游核苷酸序列包含编码 N-末端起始于位于 SEQ ID NO. 2 或 3 第 1 至 20 位氨基酸之间任一氨基酸和 C-末端终止于位于 SEQ ID NO. 2 或 3 第 70 至 89 位氨基酸之间任一氨基酸的多肽的序列。

11. 根据权利要求 9 的重组 DNA 分子, 其特征在于所述编码 FKBP12 的下游核苷酸序列包含编码 N-末端起始于位于 SEQ ID NO. 2 或 3 第 90 至 97 位氨基酸之间任一氨基酸和 C-末端终止于位于 SEQ ID NO. 2 或 3 第 103 至 107 位氨基酸之间任一氨基酸的多肽的序列。

12. 根据前述权利要求之中任一项的重组 DNA 分子, 其特征在于其包含编码根据 SEQ ID NO. 4 或 SEQ ID NO. 5 的多肽的核苷酸序列。

13. 含有可操作地连接的根据权利要求 1~12 任一项的重组 DNA 分子的表达载体。

14. 用根据权利要求 13 的表达载体转化的宿主细胞。

15. 生产嵌合融合蛋白的方法, 所述方法包括以下步骤:

a) 培养根据权利要求 14 的宿主细胞

b) 所述嵌合融合蛋白的表达和

c) 所述嵌合融合蛋白的纯化。

16. 根据权利要求 15 的方法产生的重组产生的嵌合融合蛋白。

17. 重组产生的嵌合融合蛋白, 其含有:

a) 包含非-人伴侣蛋白的多肽结合区段的多肽序列,

b) 与非-人伴侣多肽序列的 N-末端融合的 FK506 结合蛋白 (FKBP) 或 FK506-结合-蛋白-样结构域 (FKBP-样结构域) 的多肽序列, 和

c) 与非-人伴侣多肽序列的 C-末端融合的 FK506 结合蛋白 (FKBP) 或 FK506-结合-蛋白-样结构域 (FKBP-样结构域) 的多肽序列。

18. 根据权利要求 17 的重组产生的嵌合融合蛋白, 其含有:

a) 包含非-人伴侣蛋白的多肽结合区段的多肽序列,

b) 与非-人伴侣多肽序列的 N-末端融合的人 FKBP 型肽基脯氨酸顺反异构酶的多肽序列, 和

c) 与非-人伴侣多肽序列的 C-末端融合的人 FKBP 型肽基脯氨酸顺反异构酶的多肽序列。

19. 根据权利要求 17 或 18 的重组产生的融合蛋白, 其特征在于它

还含有

d) 至少一个靶多肽。

20. 根据权利要求 18 或 19 的重组产生的嵌合融合蛋白,其特征在于所述非-人伴侣蛋白序列是大肠杆菌 SlyD 蛋白伴侣多肽序列且与非-人伴侣序列的 N-和 C-末端融合的人肽基脯氨酸顺反异构酶的多肽序列是 FKBP12 多肽序列。

21. 根据权利要求 18 或 19 的重组产生的嵌合融合蛋白,其特征在于所述非-人伴侣蛋白序列是大肠杆菌 SlpA 蛋白伴侣多肽序列且与非-人伴侣序列的 N-和 C-末端融合的人肽基脯氨酸顺反异构酶的多肽序列是 FKBP12 多肽序列。

22. 根据权利要求 18 或 19 的重组产生的嵌合融合蛋白,其特征在于它包含根据 SEQ ID NO. 4 或 SEQ ID NO. 5 的多肽序列。

23. 根据权利要求 16 至 22 中任一项的重组产生的嵌合融合蛋白作为靶蛋白质的折叠辅助物的用途。

24. 根据权利要求 16 至 22 中任一项的重组产生的嵌合融合蛋白在靶蛋白质的生产方法中作为折叠辅助物的用途。

25. 根据权利要求 16 至 22 中任一项的重组产生的嵌合融合蛋白在靶蛋白质的生产方法中作为融合配偶体的用途。

26. 根据权利要求 16 至 22 中任一项的重组产生的嵌合融合蛋白在免疫测定中的用途。

27. 根据权利要求 16 至 22 中任一项的重组产生的嵌合融合蛋白在疫苗生产中的用途。

28. 根据权利要求 16 至 22 中任一项的重组产生的嵌合融合蛋白在生产药物的方法中的用途。

29. 含有权利要求 16 至 22 中任一项的重组产生的嵌合融合蛋白和药学可接受赋形剂的组合物。

## 具有卓越的伴侣和折叠活性的嵌合融合蛋白

本发明涉及一种与天然存在的对应物相比具有卓越的伴侣和折叠活性的嵌合融合蛋白的克隆、表达和用途。本发明涉及由含有编码非-人伴侣蛋白多肽结合区段的核苷酸序列和编码 FK506 结合蛋白 (FKBP) 或 FK506-结合-蛋白-样结构域 (FKBP-样结构域) 的核苷酸序列的重组 DNA 分子编码的嵌合融合蛋白。具体地, 本发明涉及由含有编码非-人伴侣蛋白多肽结合区段的核苷酸序列和编码人 FKBP 型肽基脯氨酸顺反异构酶 (PPIase) 的核苷酸序列的重组 DNA 分子编码的嵌合融合蛋白, 生产这些嵌合融合蛋白的方法以及它们在其它蛋白质的生产和在免疫实验室动物以及在疫苗或药物的生产方法中作为折叠辅助物 (helper) 的用途, 它们在重组蛋白技术中作为融合模块以及为进行免疫测定作为折叠辅助物的用途。

### 背景

如今分子伴侣在广泛的生物技术应用中起着重要的作用 (Mogk 等人, 2002 *Chembiochem* 3, 807-)。存在许多具有伴侣以及酶特性的折叠辅助物。为此它们可用于蛋白质折叠领域的许多实际应用中。

蛋白伴侣, 其已知为经典的“折叠辅助物”, 是辅助其它蛋白质的折叠并维持其结构完整性的多肽。它们在体内和体外均具备促进多肽折叠的能力。通常, 折叠辅助物被细分为折叠催化剂和蛋白伴侣。折叠催化剂由于其催化功能而加速蛋白质折叠中的限速步骤。催化剂的例子在下文进一步描述。伴侣蛋白已知与多肽的变性的、部分变性的或疏水表面结合并由此帮助蛋白质复性或使它们保持在溶液中。因此, 不同于折叠催化剂, 蛋白伴侣只发挥结合功能 (Buchner, J., *Faseb J* 10(1996)10-19)。蛋白伴侣是与蛋白质成熟、折叠、转运和降解有关的普遍存在的应激-诱导的蛋白 (Gething, M. J. 和 Sambrook, J., *Nature* 355(1992)33-45)。尽管它们在正常的生长条件下也存在, 但它们在应激条件下被大量诱导。这进一步支持了这一观点: 它们的生理功能是应对应激条件。

迄今为止, 已知几个不同的蛋白伴侣家族。所有这些蛋白伴侣的特征都在于它们结合未折叠或部分未折叠蛋白的能力, 且具有与蛋白质的

正确折叠或与变性或聚集蛋白的去除相关联的生理功能。

如 Buchner, J., *Faseb J* 10 (1996) 10-19 和 Beissinger, M. 和 Buchner, J., *Biol. Chem.* 379 (1998) 245-59 所述, 充分表征的蛋白伴侣的例子是所谓的热激蛋白家族的成员, 它们根据其相对分子量被命名, 例如, hsp100、hsp90、hsp70 和 hsp60, 以及所谓的 shsps (小热激蛋白)。

不同于蛋白伴侣, 折叠催化剂通过加速特定的限速步骤、由此降低有聚集倾向的折叠中间体的浓度来辅助折叠。一类催化剂, 蛋白质二硫键异构酶 (或称作巯基二硫键氧化还原酶 (thiol-disulfide-oxido-reductases)), 催化分泌蛋白中二硫键的形成或重排。在革兰氏阴性细菌中, 分泌蛋白在周质中的氧化折叠受称作 DsbA、DsbB、DsbC 和 DsbD 的蛋白质二硫键异构酶级联的调节 (Bardwell, J. C., *Mol Microbiol* 14 (1994) 199-205 和 Missiakas, D., 等人, *Embo J* 14 (1995) 3415-24)。

另一类重要的称作肽基脯氨酸顺反异构酶 (PPIs) 的折叠催化剂包括比如 CypA、PpiD (Dartigalongue, C. 和 Raina, S., *Embo J* 17 (1998) 3968-80、FkpA (Danese, P. N., 等人, *Genes Dev* 9 (1995) 387-98)、引发因子 (Crooke, E. 和 Wickner, W., *Proc Natl Acad Sci U S A* 84 (1987) 5216-20 和 Stoller, G., 等人, *Embo J* 14 (1995) 4939-48) 和 SlyD (Hottenrott, S., 等人, *J Biol Chem* 272 (1997) 15697-701) 这样的不同的成员。

由于序列相似性和蛋白拓扑学, 脯氨酰异构酶被分作三个截然不同的家族: 亲环蛋白、FK506 结合蛋白 (FKBP) 和细小蛋白。亲环蛋白结合免疫抑制剂环孢菌素 A 并受其抑制。细小蛋白是一个脯氨酰异构酶家族, 其既不受环孢菌素 A 的抑制也不受 FK506 的抑制。FKBP 与 FK506 和纳巴霉素结合并受其抑制 (首字母缩写 FKBP 表示“FK506-结合蛋白”; FK506 是一种用作免疫抑制剂药物的大环内酯)。FKBP 在高分辨率下被确定的第一个 X 射线结构是人 FKBP12 的。它是一个以右手扭转环绕包裹短  $\alpha$ -螺旋的五链反平行  $\beta$ -折叠。该五链  $\beta$ -折叠构架包括残基 2 至 8、21 至 30、35 至 38 和 46 至 49、71 至 76 和 97 至 106 (van Duyne 等人, *Science* (1991) 252, 839-842)。之后的研究已经显示, FKBP 以及亲环蛋白和细小蛋白, 形成高度保守的发现于广泛原核和真核生物中的酶

家族（综述参见 John E. Kay, *Biochem. J.* (1996) 314, 361-385）。例如，迄今为止已经在大肠杆菌 (*E. coli*) 中鉴定了 10 种脯氨酰异构酶（2 种细小蛋白、3 种亲环蛋白和 5 种 FKBP）。

通常，FKBP 根据结合标准来定义，也即，它们识别并以纳摩尔范围的高亲和力结合 FK506。然而，存在 FKBP-样结构域，它们并不会更易于共有显著的序列相似性，但是一些介导 FK506 结合的氨基酸残基发生了突变，且亲和力转变为微摩尔范围。例如，SlyD 和引发因子（来自大肠杆菌胞质的两种胞质 PPIase），可被视为 FKBP-样蛋白质。这两种脯氨酰异构酶均包含与 FKBP12 共有显著序列同源性的结构域，但是它们与 FK506 的结合亲和力却相当弱，且处于微摩尔范围（Scholz 等人，*Biochemistry* (2006) 45, 20-33）。然而，在序列相似性和蛋白质拓扑学方面，SlyD 和引发因子都毫无疑问是 FKBP 家族的成员（Wülfing 等人，*J. Biol. Chem.* (1994) 269 (4) 2895-2901; Callebaut & Morion, *FEBS Lett.* (1995) 374 (2) 211-215）。

FKBP 结构域和 FKBP-样结构域可以形成具有复杂拓扑学的更大的分子的部分。在哺乳动物细胞中，FKBP12、FKBP12A 和 FKBP13 仅包含基本 FKBP 结构域，而 FKBP25 和 FKBP52 具有一个或多个作为更大分子之部分的 FKBP 结构域（综述参见 John E. Kay, *Biochem. J.* (1996) 314, 361-385）。

在原核细胞中也发现了模块构建的 FKBP：例如，前述引发因子由三个具有不同功能的充分分离的结构域组成。N-结构域介导与大肠杆菌核糖体 50S 亚单位的结合（Hesterkamp 等人，*J Biol Chem.* (1997) Aug 29; 272 (35) : 21865-71）。M（中间-）结构域包含脯氨酰异构酶活性位点（Stoller 等人，*FEBS Lett.* 1996 Apr 15; 384 (2) : 117-22），以及 C-结构域包括介导伸展的（extended）多肽底物的结合的多肽结合位点（Merz 等人，*J Biol Chem.* 2006 Oct 20; 281 (42) 31963-31971）。模块构建的肽基脯氨酰异构酶的另一个例子是周质 FkpA，其由 N-末端蛋白伴侣和二聚化结构域以及 C-末端 FKBP-结构域组成（Saul 等人，*J. Mol. Biol.* (2004) 335, 595-608）。

一些折叠辅助物同时包含催化活性结构域以及蛋白伴侣（或多肽结合）结构域。例如，脯氨酰异构酶引发因子（Scholz 等人，1997, *Embo J.* 16, 54-58; Zarnt 等人，1997, *JMB* 271, 827-837）、FkpA（Saul 等

人, 2004, JMB 335, 595-608) 和 SlyD 属于这些折叠辅助物。近来可显示, FkpA 和 SlyD 非常适于作为重组蛋白生产的融合模块。这两种蛋白伴侣都提高它们的客户蛋白质的表达率, 支持正确重折叠和提高易于聚集的 (aggregation-prone) 蛋白如逆转录病毒表面蛋白质的溶解度 (Scholz 等人, 2005, JMB 345, 1229-1241 和 WO 03/000877)。

FkpA、SlyD 和 SlpA 是属于 FK506 结合蛋白 (FKBP) 家族的细菌蛋白伴侣。如上述提及的, FK506 是用作免疫抑制剂药物的大环内酯。FK506 的细胞受体仍然处于全世界研究组的焦点。在 20 世纪九十年代开始时, 人 FKBP, 也即 FKBP12 的三维结构可被分辨 (van Duyne 等人, 1991, Science 252, 839-842)。与 FkpA、SlyD 和 SlpA 形成对照, 人 FKBP12 不具有任何伴侣活性且其仅具有中度的脯氨酰异构酶活性。

在许多诊断应用中都使用了重组产生的蛋白质, 例如抗原。这些抗原可作为融合蛋白产生, 其中含有一个构成抗原性部分或靶多肽的部分, 所述抗原性部分或靶多肽必须被存在于样品或测定混合物中的特异性结合配偶体识别。重组产生的融合蛋白中的其它部分是与抗原性部分融合以促进特定抗原的克隆、表达、折叠、增溶或纯化的多肽部分。重组产生的融合蛋白的合成在现有技术中已有充分描述。利用蛋白伴侣作为融合蛋白中作为靶多肽的表达、折叠、纯化和增溶的辅助分子起作用的部分是很常见的。例如, 美国专利号 6,207,420 公开了一种用于表达异源蛋白质, 也即起源于不同的生物的靶多肽部分和融合肽部分的氨基酸序列, 的融合蛋白表达系统。WO 03/000878 描述了 FKBP 蛋白伴侣作为逆转录病毒表面糖蛋白的表达工具的用途。

尽管通常用于融合蛋白的表达、纯化、折叠和增溶的方法看起来运行可靠, 尤其是那些在其中使用了折叠辅助物的方法, 但仍然存在一些问题。例如, 只要在人诊断测试中使用含有非-人氨基酸序列的融合蛋白作为结合配偶体, 都会由于所使用的这些非-人蛋白质而存在干扰问题。经常出现的是, 大量存在于人血液样品中的抗体与存在于测定试剂中的细菌蛋白反应。这样的干扰可能导致高背景噪音或者甚至可能导致错误的测试结果。另一个常见问题在于改变或最优化融合配偶体与各自的客户蛋白质的亲和力。任何融合模块对靶部分的亲和力必须得到很好的平衡。如果亲和力过高, 则融合蛋白会溶解得非常好, 但融合模块与客户蛋白间的复合物将维持一种封闭的构象且由此将在免疫测

定中失活。如果亲和力过低，则客户蛋白将在免疫测定中容易接近并且具有活性，但它将不足以保护免于聚集。

因此，本发明的目的是提供一种适于生产蛋白伴侣-样蛋白质的表达系统，所述蛋白伴侣-样蛋白质可用于广泛的生物技术和尤其是诊断和药学应用中，其不与存在于分离的人样品中的分子和物质产生或仅产生很少的干扰。现有技术未公开主要由人氨基酸序列组成的有效的折叠辅助物，也即发挥高催化和伴侣活性这两种活性的辅助物。

尽管存在几种人和细菌蛋白伴侣的蛋白质序列比对（Wülfing 等人，1994, JBC 269, 2895-2901; Hottenrott 等人，1997, JBC 272, 15697-15701; Suzuki 等人，2003, JMB 328, 1149-1160），也仍然未显示可以如何产生有效的具有双重功能，即催化和伴侣-样功能的人源化折叠辅助物。

### 发明概述

令人惊奇地，我们已经能够显示，通过将非-人伴侣蛋白的多肽结合区段与源自 FK506 结合蛋白（FKBP）或 FKBP-样结构域（FK506-结合-蛋白-样结构域）的序列融合，可以产生具有卓越折叠辅助物活性的分子。

具体地，通过将非-人伴侣蛋白的多肽结合区段与源自 FKBP 型人肽基脯氨酸顺反异构酶（PPIase）的序列融合，我们能够产生具有优于野生型折叠辅助物的折叠辅助物活性的人源化 PPIase 蛋白伴侣分子。这些嵌合人源化折叠辅助物代表了用于广泛的生物技术应用中产生天然-样折叠蛋白质试剂的极有前景的工具，因为它们在用于诊断测试和药学应用中时不会导致或仅导致很少的干扰，以及由于它们的伴侣特性可以对于各蛋白质进行适应。

还公开了设计编码这样的嵌合融合蛋白的重组 DNA 分子的优选方式以及它们用作表达载体的部分、含有这样的表达载体的宿主细胞以及在生产嵌合融合蛋白中的用途。

表现惊人且优良的特性，尤其是就其催化效率而言，的重组产生的嵌合融合蛋白本身也是本发明的部分。

在进一步的实施方案中，公开了重组产生的融合蛋白作为靶蛋白的折叠辅助物、作为生产靶蛋白的方法中的折叠辅助物、作为免疫测定混合物中的添加物、在疫苗生产方法中、用于免疫实验室动物以及在生产药物的方法中的用途。

此外还公开了含有重组产生的嵌合融合蛋白及药学可接受赋形剂的组合物。

### 附图简述

图 1: 经 SDS-PAGE 证明的 FKBP12-IF1 (具有 SlyD 插入片段) 的纯化。泳道 1, 蛋白质标准 Mark 12 未染色, 来自 Invitrogen; 泳道 3, 超量产生的大肠杆菌菌株 BL21/DE 3 的离液粗裂解物; 泳道 5, IMAC 流通物 (flowthrough); 泳道 7 至 11, 咪唑洗脱级分。在如实施例部分所述的简单的一步规程中可以以高得率纯化和重折叠 FKBP12-IF1。

图 2: 根据本发明的野生型 hFKBP12 (灰线) 和 hFKBP12-IF1 (黑线) 的近紫外圆二色性谱。缓冲液为 50 mM 磷酸钠 (pH 7.5)、100 mM NaCl、1 mM EDTA, 蛋白质浓度为 100  $\mu$ M。250 和 310nm 间的 CD 信号报告芳族氨基酸残基的不对称环境。插入 SlyD IF 环后 hFKBP12 的平均残基重量椭圆度 (ellipticity) 降低。然而, 减小的椭圆度仍然针对 FKBP12-IF1 嵌合体的紧凑的天然-样构象 (黑线)。

图 3: 在 flap 结构域中带和不带插入片段的 SlyD (1-165, SlyD\*) 的近紫外圆二色性谱。缓冲液为 50 mM 磷酸钠 (pH 7.5)、100 mM NaCl、1 mM EDTA, 蛋白质浓度为 200  $\mu$ M SlyD\* 和 250  $\mu$ M SlyD\* ( $\Delta$  IF 环)。SlyD\* 的四个酪氨酸残基导致 278 nm 下的平均残基重量椭圆度为  $\sim 40 \text{ deg cm}^2 \text{ dmol}^{-1}$  (灰线)。当 flap 结构域中的插入片段被除去时, 近紫外 CD 信号的形状基本保持, 但其强度提高 (黑线)。这突出显示, 在缺失 IF 环结构域后, SlyD\* 的结构完整性大大保持。换言之, 它强调了 IF 环的结构域特性。

图 4: 15°C 下, 在存在浓度渐增的大肠杆菌 SlyD\* (1-165) 的情况下, RCM-T1 的重折叠动力学。(A) 根据 320nm 处的荧光变化, 显示了在 0、3、5、8、10、15 和 20 nM 大肠杆菌 SlyD\* 存在下 100 nM RCM-T1 的重折叠动力学。(B) 缓慢折叠速率对 SlyD\* 浓度的依赖性。在 SlyD\* 存在和不存在情况下, 所观察到的速率常数  $k_{\text{app}}$  和  $k_0$  的比率示为 SlyD\* 浓度的函数。从 (B) 中线的斜率获得了  $k_{\text{cat}}/K_M$  的值  $0.68 \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ 。通过在相同的缓冲液中稀释至 2.0 M NaCl 起始 RCM-T1 在 0.1 M Tris-HCl (pH 8.0) 中的重折叠。

图 5: 15°C下, 在浓度渐增的 SlyD 缺失变体 SlyD ( $\Delta$  IF 环) 存在下, RCM-T1 的重折叠动力学。(A) 根据 320nm 处的荧光变化, 显示了在 0、1.0、2.0 和 5.0  $\mu$ M SlyD ( $\Delta$  IF 环) 存在下 100 nM RCM-T1 的重折叠动力学。(B) 缓慢折叠速率对 SlyD ( $\Delta$  IF 环) 浓度的依赖性。在 SlyD ( $\Delta$  IF 环) 存在和不存在情况下, 所观察到的速率常数  $k_{app}$  和  $k_0$  的比率示为 SlyD ( $\Delta$  IF 环) 浓度的函数。从 (B) 中线的斜率获得了值  $\sim 500 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ 。通过在相同的缓冲液中稀释至 2.0 M NaCl 起始 RCM-T1 在 0.1 M Tris-HCl (pH 8.0) 中的重折叠。

图 6: 15°C下, 在浓度渐增的人脯氨酰异构酶 FKBP12 存在下, RCM-T1 的重折叠动力学。(A) 根据 320nm 处的荧光变化, 显示了在 0、0.5、0.8、1.0、1.5 和 2.0  $\mu$ M hFKBP12 存在下 100 nM RCM-T1 的重折叠动力学。(B) 缓慢折叠速率对 hFKBP12 浓度的依赖性。在 hFKBP12 存在和不存在情况下, 所观察到的速率常数  $k_{app}$  和  $k_0$  的比率示为 hFKBP12 浓度的函数。从 (B) 中线的斜率获得了  $k_{cat}/K_M$  的值  $0.014 \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ 。通过在相同的缓冲液中稀释至 2.0 M NaCl 起始 RCM-T1 在 0.1 M Tris-HCl (pH 8.0) 中的重折叠。

图 7: 15°C下, 在浓度渐增的根据本发明的嵌合蛋白 hFKBP12-IF1 存在下, RCM-T1 的重折叠动力学。(A) 根据 320nm 处的荧光变化, 显示了在 0、3、5、8、10 和 20 nM hFKBP12-IF1 存在下 100 nM RCM-T1 的重折叠动力学。(B) 缓慢折叠速率对 hFKBP12-IF1 浓度的依赖性。在 hFKBP12-IF1 存在和不存在情况下, 所观察到的速率常数  $k_{app}$  和  $k_0$  的比率示为 hFKBP12-IF1 浓度的函数。从 (B) 中线的斜率获得了  $k_{cat}/K_M$  的值  $2.5 \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ 。通过在相同的缓冲液中稀释至 2.0 M NaCl 起始 RCM-T1 在 0.1 M Tris-HCl (pH 8.0) 中的重折叠。

图 8 : 融合蛋白 SlyD\*-SlyD\*-gp41 和 hFKBP12-IF1-hFKBP12-IF1-gp41 的示意图。融合模块和 gp41 均以框突出显示。蛋白伴侣模块 SlyD\*和 hFKBP12-IF1 通过富甘氨酸和丝氨酸残基的 23 氨基酸柔性接头与各自的靶分子相连。六组氨酸标记通过间隔区区段与靶分子的 C-末端融合, 其提高可接近性并促进纯化和重折叠。接头由五个重复 GGGs 元件 (G: 甘氨酸, S: 丝氨酸) 组成, 间隔区含有天然存在于 SlyD 未结构化的 C-末端尾部的四个 HD 重复 (H: 组氨酸, D: 天冬氨酸)。

图 9: 根据本发明的嵌合融合蛋白 hFKBP12-IF1-gp41 的 UV 光谱。在基质偶联的重折叠和咪唑洗脱之后, 蛋白质在水性缓冲液中是可溶的。为保持在 Lambert-Beer 线性范围内的吸收, 将蛋白质贮存液在室温稀释 20-倍至 50 mM 磷酸钠 (pH 7.5)、100 mM NaCl、1.5 mM EDTA 中的 5  $\mu$ M。蛋白质聚集体和高分子结合物是轻的杂散颗粒, 它们会导致 310 和 350 nm 之间的波长区域内的倾斜基线。光谱形状证明了不存在任何聚集物并突出显示了 hFKBP12-IF1-gp41 的溶解度。

图 10: 15 $^{\circ}$ C 下, 在浓度渐增的根据本发明的嵌合蛋白 hFKBP12-IF4 (带有 SlpA 插入片段) 存在下, RCM-T1 的重折叠动力学。(A) 根据 320nm 处的荧光变化, 显示了在 0、3、6、10、15 和 20 nM hFKBP12-IF4 存在下 100 nM RCM-T1 的重折叠动力学。(B) 缓慢折叠速率对 hFKBP12-IF4 浓度的依赖性。在 hFKBP12-IF4 存在和不存在情况下, 所观察到的速率常数  $k_{app}$  和  $k_0$  的比率示为 hFKBP12-IF4 浓度的函数。从(B) 中线的斜率获得了  $k_{cat}/K_m$  的值 850000  $M^{-1}s^{-1}$ 。通过在相同的缓冲液中稀释至 2.0 M NaCl 起始 RCM-T1 在 0.1 M Tris-HCl (pH 8.0) 中的重折叠。

图 11: 15 $^{\circ}$ C 下, 在浓度渐增的根据本发明的嵌合蛋白 hFKBP12-IF5 (带有热球菌属 (*Thermococcus*) FKBP18 插入片段) 存在下, RCM-T1 的重折叠动力学。(A) 根据 320nm 处的荧光变化, 显示了在 0、10、25、30、35 和 40 nM hFKBP12-IF5 存在下 100 nM RCM-T1 的重折叠动力学。(B) 缓慢折叠速率对 hFKBP12-IF5 浓度的依赖性。在 hFKBP12-IF5 存在和不存在情况下, 所观察到的速率常数  $k_{app}$  和  $k_0$  的比率示为 hFKBP12-IF5 浓度的函数。从(B) 中线的斜率获得了  $k_{cat}/K_M$  的值 660000  $M^{-1}s^{-1}$ 。通过在相同的缓冲液中稀释至 2.0 M NaCl 起始 RCM-T1 在 0.1 M Tris-HCl (pH 8.0) 中的重折叠。

### 序列表简述

所附序列表包括以下 SEQ ID NO:

SEQ ID NO. 1 代表根据 Suzuki 等人, 2003, JMB 328, 1149-1160 的大肠杆菌 SlyD 氨基酸序列, 其也可从 SwissProt 数据库通过 ID P0A9K9 得到。

MKVAKDLVVS LAYQVRTEDG VLVDESPVSA PLDYLHGHGS LISGLETALE GHEVGDKFDV  
 AVGANDAYGQ YDENLVQRVP KDVFMGVDEL QVGMFLAET DQGPVPVEIT AVEDDHVVVD  
 GNHMLAQNL KFNVEVVAIR EATEEELAAG HVHGAHDHHH DHDHDGCCGG HGHDHGHEHG  
 GEGCCGKGN GCGCH

SEQ ID NO. 2 显示人 FKBP12 氨基酸序列 (Suzuki 等人, 前述), 其也可从 SwissProt 数据库通过 ID P62942 得到。

GVQVETISPG DGRTFPKRGQ TCVVHYTGML EDGKKFDSSR DRNKPFKFML GKQEVIRGWE  
 EGVAQMSVGQ RAKLTISPDY AYGATGHPGI IPPHATLVFD VELLKLE

SEQ ID NO. 3 显示在第 22 位带有突变的如 SEQ ID NO. 2 所示的人 FKBP12 氨基酸序列。为实现更好的溶解性, 已将半胱氨酸 22 改变成丙氨酸 (C22A)。此外, 已添加了 C-末端六组氨酸标记。

GVQVETISPG DGRTFPKRGQ TAVVHYTGML EDGKKFDSSR DRNKPFKFML GKQEVIRGWE  
 EGVAQMSVGQ RAKLTISPDY AYGATGHPGI IPPHATLVFD VELLKLEHHH HHH

SEQ ID NO. 4 显示根据本发明的优选嵌合折叠辅助物蛋白 FKBP12-IF1 的氨基酸序列。SlyD 插入片段用下划线标示。

FKBP12 G1-G83 / SlyD Q70-N129 / FKBP12 L97-E107

GVQVETISPG DGRTFPKRGQ TCVVHYTGML EDGKKFDSSR DRNKPFKFML GKQEVIRGWE  
 EGVAQMSVGQ RAKLTISPDY AYGOYDENLV QRVPKDVFMG VDELQVGMRF LAETDQGPV  
VEITAVEDDH VVVDGNHMLA GQNLVFDVEL LKLE

SEQ ID NO. 5 显示根据本发明的优选嵌合折叠辅助物蛋白 FKBP12-IF1 的氨基酸序列。SlyD 插入片段用下划线标示。该序列对应于 SEQ ID NO. 4, 但半胱氨酸 22 已被置换成丙氨酸。

FKBP12 G1-G83 / SlyD Q70-N129 / FKBP12 L97-E107

GVQVETISPG DGRTFPKRGQ TAVVHYTGML EDGKKFDSSR DRNKPFKFML GKQEVIRGWE  
 EGVAQMSVGQ RAKLTISPDY AYGOYDENLV QRVPKDVFMG VDELQVGMRF LAETDQGPV  
VEITAVEDDH VVVDGNHMLA GQNLVFDVEL LKLE

SEQ ID NO. 6 显示融合蛋白 SlyD\*-SlyD\*-gp41 的氨基酸序列, 其以 HIV-1 gp41 多肽为靶多肽与两个 SlyD\*单位融合 (与现有技术状态相比)。载体-载体-靶类型的融合蛋白的示意图示于图 8; 亦参见实施例 1。

*EcSlyD*-[GGGS]<sub>5</sub>GGG-*EcSlyD*-[GGGS]<sub>5</sub>GGG-gp41(536-681; L555E, L566E, I573T, I580E)- HGHDDHDH-His6, pET24a

```
MKVAKDLVVS LAYQVRTEDG VLVDESPVSA PLDYLHGHGS LISGLETALE
GHEVGDKFDV AVGANDAYGQ YDENLVQRVP KDVFMGVDEL QVGMFLAET
DQGPVPEIT AVEDDHVVVD GNHMLAGQNL KFNVEVVAIR EATEEELAHG
HVHGAHDHHH DHDHDGGGSG GSGGGSGGG SGGSGGGKV AKDLVVS LAY
QVRTEDGVLV DESPVSA PLD YLHGHGSLIS GLETALLEGHE VGDKFDVAVG
ANDAYGQYDE NLVQRVPKDV FMGVDELQVG MRFLAETDQG PVPVEITAVE
DDHVVDGNH MLAGQNLKFN VEVVAIREAT EEELAHGHVH GAHDHHDHD
HDGGSGGGG GSGGGSGGG GSGGGTLTVQ ARQLLSGIVQ QNNELRAIE
AQQHLEQLTV WGTKQLQARE LAVERYLKDQ QLLGIWCSG KLICTTAVPW
NASWSNKSLE QIWNMTWME WDREINNYTS LIHSLIEESQ NQOEKNEQEL
LELDKWASLW NWFNITNLW YHGHDDHDH HHHHH
```

SEQ ID NO. 7 显示嵌合融合蛋白 hFKBP12-IF1-hFKBP12-IF1-gp41 的氨基酸序列, 其以 HIV-1 gp41 多肽作为靶多肽与根据本发明的 hFKBP12-IF1 融合 (串联融合蛋白)。该蛋白质的示意图示于图 8; 亦参见实施例 1。

```
MGVQVETISP GDGRTPFKRG QTAVVHYTGM LEDGKKFDSS RDRNKPFFKM
LGKQEVIRGW EEGVAQMSVG QRAKLTISPD YAYGQYDENL VQRVPKDVFM
GVDELQVGMR FLAETDQGPV PVEITAVEDD HVVVDGNHML AGQNLVFDVE
LLKLEGGGSG GSGGGSGGG SGGSGGGGV QVETISPGDG RTFPKRGQTA
VVHYTGMLD GKKFDSSRDR NKPFFKMLGK QEVIRGWEEG VAQMSVGQRA
KLTISPDYAY GQYDENLVQR VPKDVFMGVD ELQVGMFLA ETDQGPVPE
ITAVEDDHVV VDGNHMLAGQ NLVFDVELLK LEGGGSGGGG GGGSGGGSGG
GSGGGTLTVQ ARQLLSGIVQ QNNELRAIE AQQHLEQLTV WGTKQLQARE
LAVERYLKDQ QLLGIWCSG KLICTTAVPW NASWSNKSLE QIWNMTWME
WDREINNYTS LIHSLIEESQ NQOEKNEQEL LELDKWASLW NWFNITNLW
YLEHHHHHH
```

SEQ ID NO. 8 显示 SlyD\* (SlyD 1-165) 的氨基酸序列——对应于 SEQ ID NO. 1, 但在 C-末端残基 no. D165 (天冬氨酸) 后截短。此外,

SEQ ID NO. 8 在其 C-末端携带六组氨酸标记。

```
MKVAKDLVVS LAYQVRTEDG VLVDSPVSA PLDYLHGHGS LISGLETALE GHEVGDKFDV
AVGANDAYGQ YDENLVQRVP KDVFMGVDEL QVGMFLAET DQGPVPEIT AVEDDHVVVD
GNHMLAGQNL KFNVEVVAIR EATEEELAHG HVHGAHDHHH DHDHDDHHHH H
```

SEQ ID NO. 9 显示不带 IF-环的如 SEQ ID NO. 8 所示的 SlyD\* (1-165) 的氨基酸序列。该变体也称作 SlyD\* ΔIF-环。为进行重折叠和纯化，在其 C-末端携带六组氨酸标记。

```
MKVAKDLVVS LAYQVRTEDG VLVDSPVSA PLDYLHGHGS LISGLETALE GHEVGDKFDV
AVGANDAYGA TGHPGIIPPH ATLFKFNVEV AIREATEEEL AHGHVHGAHD HHDHDDHDDH HHHH
```

SEQ ID NO. 10 显示编码为促进纯化而带有 C-末端六组氨酸标记的蛋白质 FKBP12-IF1 的合成基因的氨基酸序列。翻译后由细菌 N-甲硫氨酰-氨肽酶将 N-末端甲硫氨酸切除，由此成熟多肽实际上从甘氨酸 1 起始。当半胱氨酸 22 被丙氨酸取代时，所得 FKBP12-IF1 氨基酸序列对应于 SEQ ID NO. 5。

```
MGVQVETISP GDGRTPKRG QTCVVHYTGM LEDGKKFDSS RDRNKPFKFM
LGKQEVIRGW EEGVAQMSVG QRAKLTISPD YAYGQYDENL VQRVPKDVFM
GVDELQVGMR FLAETDQGPV PVEITAVEDD HVVVDGNHML AGQNLVFDVE
LLKLEHHHHH H
```

SEQ ID NO. 11 显示 FKBP12-IF1 (C22A) -gp41 融合构建体 (亦参见实施例 1)。

```
MGVQVETISP GDGRTPKRG QTAVVHYTGM LEDGKKFDSS RDRNKPFKFM
LGKQEVIRGW EEGVAQMSVG QRAKLTISPD YAYGQYDENL VQRVPKDVFM
GVDELQVGMR FLAETDQGPV PVEITAVEDD HVVVDGNHML AGQNLVFDVE
LLKLEGGGSG GSGGGSGGG SGGGSGGGTL TVQARQLLSG IVQQQNNELR
AIEAQHLEQ LTVWGTKQLQ ARELAVERYL KDQQLGIWG CSGKLICTTA
VPWNASWSNK SLEQIWNMT WMEWDREINN YTSLIHSLIE ESQNQQEKNE
QELLELDKWA SLWNWFNITN WLWYLEHHHH HH
```

SEQ ID NO. 12 显示根据 Suzuki 等人, 2003, JMB 328, 1149-1160 的大肠杆菌 SlpA 氨基酸序列, 其也可通过 SwissProt 数据库的 ID P0AEM0 获得。存在于未加工蛋白中的 N-末端 Met 残基(SEQ ID NO. 12 中未示出)在翻译后被除去。迄今为止, SlpA 的信息非常少。除了作为具有对于肽底物的相当低活性的脯氨酰异构酶的初步特征外, 事实上至今对于 SlpA 一无所知。

```
SESVQNSAV LVHFTLKLDD GTTAESTRNN GKPALFRLGD ASLSEGLEQH LLGLKVGDKT
TFSLEPDAAF GVPSPDLIQY FSRREFMDAG EPEIGAIMLF TAMDGSEMPG VIREINGDSI
TVDFNHPLAG QTVHFDIEVL EIDPALEA
```

SEQ ID NO. 13 显示根据本发明又一优选嵌合折叠辅助物蛋白 FKBP12-IF4 的氨基酸序列。SlpA 插入片段用下划线标示。此外还添加了 C-末端六组氨酸标记。

FKBP12 G1-G83 / SlpA V72-T132 / FKBP12 L97-E107

```
GVQVETISPG DGRTFPKRGQ TAVVHYTGML EDGKKFDSSR DRNKPFKFML GKQEVIRGWE
EGVAQMSVGQ RAKLTISPDY AYGVPSPDLI QYFSRREFMD AGEPEIGAIM LFTAMDGSEM
PGVIREINGD SITVDFNHPL AGQTLVFDVE LLKLEHHHHH H
```

SEQ ID NO. 14 显示热球菌属 FKBP18 氨基酸序列, 其也可通过 SwissProt 数据库的 ID O93778 获得。

```
MKVEAGDYVL FHYVGRFEDG EVFDTSYEEI ARENGILVEE REYGPWVRI GVGEIIPGLD
EAIIGMEAGE KKTVTVPPEK AYGMPNPELV ISVPREEFTK AGLEPQEGLY VMTDSGI AKI
VSVGESEVSL DFNHPLAGKT LVFEVEVIEV KKAEDSEA
```

SEQ ID NO. 15 显示根据本发明又一优选嵌合折叠辅助物蛋白 FKBP12-IF5 的氨基酸序列。热球菌属 FKBP18 插入片段用下划线表示。此外还添加了 C-末端六组氨酸标记。

FKBP12 G1-G83 / TcFKBP18 M84-T140 / FKBP12 L97-E107

```
GVQVETISPG DGRTFPKRGQ TCVVHYTGML EDGKKFDSSR DRNKPFKFML GKQEVIRGWE
EGVAQMSVGQ RAKLTISPDY AYGMPNPELV ISVPREEFTK AGLEPQEGLY VMTDSGI AKI
VSVGESEVSL DFNHPLAGKT LVFDVELLKL EHHHHHH
```

SEQ ID NO. 16 显示大肠杆菌引发因子氨基酸序列，其也可通过 SwissProt 数据库的 ID P0A850 获得。

```
MQVSVETTQG LGRRVTITIA ADSIETAVKS ELVNVAKKVR IDGFRKGKVP MNIVAQRYGA
SVRQDVLGDL MSRNFIDAI KEKINPAGAP TYVPGEYKLG EDFTYSVEFE VYPEVELQGL
EAIEVEKPIV EVTADVDGM LDTLRKQAT WKEKDGAVEA EDRVTIDFTG SVDGEEFEGG
KASDFVLAMG QGRMIPGFED GIKGHKAGEE FTIDVTFPEE YHAENLKGKA AKFAINLKKV
EERELPELTA EFIKRFQVED GSVEGLRAEV RKNMERELKS AIRNRVKSQA IEGLVKANDI
DVPAALIDSE IDVLRQAAQ RFGGNEKQAL ELPRELFEEQ AKRRVVVGLL LGEVIRTNEL
KADEERVKGL IEEMASAYED PKEVIEFYSK NKELMNMRN VALEEQAVEA VLAKAKVTEK
ETTFNELMNQ QA
```

SEQ ID NO. 17 显示根据 SEQ ID NO. 16 的大肠杆菌引发因子的 FKBP 结构域。甲硫氨酸 140 至谷氨酸 251 的氨基酸属于引发因子的 FKBP 结构域。

```
MLDTLRKQQA TWKEKDGAVE AEDRVTIDFT GSVDGEEFEG GKASDFVLAM GQGRMIPGFE
DGIKGHKAGE EFTIDVTFPE EYHAENLKGK AAKFAINLKK VEERELPELT AE
```

SEQ ID NO. 18 显示本发明又一实施方案的氨基酸序列。在该嵌合折叠辅助物蛋白（引发因子-IF/SlyD）中，源自 SlyD 的 IF 结构域插入到大肠杆菌引发因子的 FKBP 结构域中。该 SlyD 插入片段用下划线标示。

大肠杆菌引发因子 /FKBP-Domäne + IF

TF M140-H222 / SlyD Q70-N129 / TF A231-E251

```
MLDTLRKQQA TWKEKDGAVE AEDRVTIDFT GSVDGEEFEG GKASDFVLAM GQGRMIPGFE
DGIKGHKAGE EFTIDVTFPE EYHQYDENLV QRVPKDVFVG VDELQVGMRF LAETDQGPVP
VEITAVEDDH VVDGNHMLA GQNAKFAINL KKVEERELPE LTAE
```

SEQ ID NO. 19 显示来自大肠杆菌的未加工前体 FkpA 的氨基酸序列。新翻译的 FkpA 携带用于输出到周质的 N-末端信号序列（Met 1-Ala 25）。通过内膜后，信号肽酶特异性除去该信号序列，由此该序列在加工的功能蛋白中缺失。FkpA 含有 N-末端伴侣和二聚化结构域以及 C-末端异构酶结构域（Gly 147 - K249）。在 RNA 酶 T1 测试中，FkpA 显示约  $250,000 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  的催化效率。该 FkpA 序列也可通过 SwissProt ID:

P45523 得到。

```
MKSLFKVTLL ATTMAVALHA PITFAAEAAK PATAADSKAA FKNDDQKSAY ALGASLGRYM
ENSLKEQEKL GIKLKDQQLI AGVQDAFADK SKLSDQEIEQ TLQAFEARVK SSAQAKMEKD
AADNEAKGKE YREKFAKEKG VKTSSTGLVY QVVEAGKGEA PKDSDTVVVN YKGTLDIGKE
FDNSYTRGEP LSFRLDGVIP GWTEGLKNIK KGGKIKLVIP PELAYGKAGV PGIPPNSTLV
FDVELLDVVP APKADAKPEA DAKAADSACK
```

SEQ ID NO. 20 显示如 SEQ ID NO. 19 中所示 FkpA 的 FKBP 结构域的氨基酸序列 (G147-K249)。C-末端序列 LE 因克隆策略被包含在其中。已添加了 C-末端六组氨酸标记以促进纯化。据假定, 该 FKBP 结构域在 RNA 酶 T1 折叠试验中具有弱活性, 该活性介于 SlyD\* ΔIF 环和人 FKBP12 之间 (参见表 1)。

```
GLVYQVVEAG KGEAPKDSDT VVVNYKGTLI DGKEFDNSYT RGEPLSFRLD GVIPGWTEGL
KNIKGGGKIK LVIPPELAYG KAGVPGIPPN STLVFDVELL DVKPAPLEHH HHHH
```

SEQ ID NO. 21 显示根据本发明又一实施方案的氨基酸序列。在该嵌合折叠辅助物蛋白质 FkpA-IF/SlyD 中, 源自 SlyD 的 IF 结构域被插入到 FkpA 的 FKBP 结构域 (如 SEQ ID NO. 20 中所示) 中。已添加了 C-末端六组氨酸标记以促进纯化。预期该嵌合折叠辅助物蛋白在 RNA 酶 T1 折叠试验中显示高活性。

FkpA G147-G226 / SlyD Q70-N129 / FkpA L239-P252

```
GLVYQVVEAG KGEAPKDSDT VVVNYKGTLI DGKEFDNSYT RGEPLSFRLD GVIPGWTEGL
KNIKGGGKIK LVIPPELAYG QYDENLVQRV PKDVFMGVDE LQVGMRF LAE TDQGFVPVEI
TAVEDDHVVV DGNHMLAGQN LVFDVELLDV KPAPLEHHHH HH
```

### 详述

本发明涉及编码嵌合融合蛋白的重组 DNA 分子, 其包含:

- a) 至少一个编码非-人伴侣蛋白多肽结合区段的核苷酸序列
- b) 其上游至少一个编码 FK506 结合蛋白 (FKBP) 或 FK506-结合-蛋白-样结构域 (FKBP-样结构域) 的核苷酸序列和

c) 其下游至少一个编码 FK506 结合蛋白 (FKBP) 或 FK506-结合-蛋白-样结构域 (FKBP-样结构域) 的核苷酸序列。一方面 a) 的核苷酸序列, 和另一方面 b) 和 c) 的核苷酸序列可源自相同的生物, 但是它们必须编码不同的亲本 FKBP 分子。更确切的说, a) 编码一个 FKBP 分子的伴侣结构域 (例如 SlyD 或 SlpA), 且 b) 和 c) 编码另一个分子的 FKBP 结构域或 FKBP-样结构域 (例如人 FKBP12)。编码 FK506 结合蛋白 (FKBP) 或 FK506-结合-蛋白-样结构域 (FKBP-样结构域) 的核苷酸序列, 也即部分 b) 和部分 c) 的那些可源自相同的生物, 但是它们也可以源自不同的生物。优选 b) 和 c) 下所给出的序列源自相同的生物。更优选地, 它们源自相同的亲本 FKBP 分子, 例如, 人 FKBP12。

具体地, 本发明涉及编码嵌合融合蛋白的重组 DNA 分子, 其包含:

a) 至少一个编码非-人伴侣蛋白多肽结合区段的核苷酸序列

b) 其上游至少一个编码 FKBP 型人肽基脯氨酸顺反异构酶 (PPIase) 的核苷酸序列和

c) 其下游至少一个编码 FKBP 型人肽基脯氨酸顺反异构酶 (PPIase) 的核苷酸序列。

术语“重组 DNA 分子”指, 通过基因工程技术或化学合成, 通过人工操作分离的多核苷酸区段来完成的将序列的两个否则分开的区段组合在一起而得到的 DNA 分子。在这样做的时候, 人们可以将具有所需功能的多核苷酸区段连接到一起从而产生所需功能的组合。

术语“嵌合融合蛋白”意指, 多肽结合结构域和 FKBP (或 FKBP-样) 结构域源自不同的亲本分子。我们将 FKBP 或 FKBP-样结构域视作可以将伴侣结构域嫁接于其上从而产生具有优越折叠辅助物活性的优越蛋白伴侣的折叠支架。在本发明中, 非-人多肽与人多肽序列融合。嵌合蛋白还可称作“镶嵌蛋白”。由于本发明的一个目的是将折叠辅助物蛋白人源化由此所得蛋白在诊断应用中更可耐受, 因此非-人氨基酸序列的百分比与完整嵌合融合蛋白的长度相比优选不超过百分之五十的部分。

优选根据 a)、b) 和 c) 的核苷酸序列不被额外的接头序列分隔开, 而是直接彼此相邻。

“上游”方向意指, 核苷酸位于多核苷酸的 5' 方向, 也即朝向第一个核苷酸。在氨基酸序列方面术语“上游”意指, 氨基酸位于 N-末端方向, 也即朝向多肽的起始处。

“下游”方向意指，核苷酸位于多核苷酸的 3' 方向，也即朝向最后一个核苷酸。在氨基酸序列方面术语“下游”意指，氨基酸位于 C-末端方向，也即朝向多肽的末端处。

如果多核苷酸在其天然状态或当用本领域已知的方法进行操作时，可被转录和/或被翻译以产生多肽或其片段，则说该多核苷酸“编码”多肽。

蛋白伴侣的“多肽结合区段”被视为在蛋白质的三维折叠过程中蛋白伴侣中结合和保持多肽链的部分。大肠杆菌蛋白伴侣 SlyD 的“多肽结合区段”，即其伴侣特性，在本申请中已被定位于所谓的 IF 结构域 (insert in flap 结构域，氨基酸 ~ 76-122)。作为自主折叠单位，蛋白质结构域在水溶液中能够采取天然-样的稳定折叠。术语“多肽结合区段”、“IF-环”、IF-结构域或伴侣结构域可同义使用。

优选的非-人蛋白伴侣是大肠杆菌 SlyD 和 SlpA 以及如由 Suzuki 等人，2003，JMB 328，1149-1160 列出的比如来自热自养甲烷球菌 (*Methanococcus thermolithotrophicus*) 的 FKBP17、来自詹氏甲烷球菌 (*Methanococcus jannaschii*) 的 FKBP18、来自热球菌属物种 (*Thermococcus sp.*) KSI 的 FKBP18、来自堀越氏火球菌 (*Pyrococcus horikoshii*) 的 FKBP29、来自詹氏甲烷球菌的 FKBP26 和来自敏捷气热菌 (*Aeropyrum pernix*) 的 FKBP30 这样的古细菌的 FKBP 蛋白伴侣。

在优选的实施方案中，至少一个编码非-人伴侣蛋白多肽结合区段的核苷酸序列包含编码非-人 FK506 结合蛋白 (FKBP) 的序列。更优选的是大肠杆菌、热自养甲烷球菌、詹氏甲烷球菌、热球菌属物种 KSI、堀越氏火球菌或敏捷气热菌的 FKBP 序列，大肠杆菌 SlyD 和 SlpA 序列是最优选的。

在特别优选的实施方案中，大肠杆菌 SlyD 序列包含编码 N-末端起始于位于 SEQ ID NO. 1 第 56 至 75 位氨基酸之间任一氨基酸和 C-末端终止于位于 SEQ ID NO. 1 第 122 至 136 位氨基酸之间任一氨基酸的多肽的核苷酸序列。最优选为编码 N-末端起始于 SEQ ID NO. 1 第 70 位氨基酸和 C-末端终止于 SEQ ID NO. 1 第 129 位氨基酸的多肽的序列。

在进一步优选的实施方案中，大肠杆菌 SlyA 序列包含编码 N-末端起始于位于 SEQ ID NO. 12 第 56 至 75 位氨基酸之间任一氨基酸和 C-末端终止于位于 SEQ ID NO. 12 第 122 至 136 位氨基酸之间任一氨基酸的

多肽的核苷酸序列。最优选为编码 N-末端起始于 SEQ ID NO. 12 第 72 位氨基酸和 C-末端终止于 SEQ ID NO.12 第 132 位氨基酸的多肽的序列。

至于相邻于编码非-人伴侣蛋白多肽结合区段的核苷酸序列的上游和下游序列，这些上游和下游序列起源于 FK506 结合蛋白或 FK506-结合-蛋白-样结构域（也称作 FKBP-样结构域）。

根据本发明，FK506 结合蛋白（FKBP）是能够识别和以纳摩尔范围的高亲和力结合免疫抑制剂 FK506 的蛋白。FKBP-样结构域（“FK506-结合-蛋白-样结构域”）或 FKBP-样蛋白是不再容易受或几乎不受由 FK506 导致的脯氨酰异构酶抑制影响的蛋白或蛋白部分。这些 FKBP-样结构域与象 FKBP12 一样的 FK506 结合蛋白共有相当大的序列和结构相似性，但是一些介导 FK506 结合的氨基酸残基被突变，且亲和力转变为微摩尔范围。例如，SlyD 和引发因子，来自大肠杆菌胞质的两种 PPIase，被视为 FKBP-样蛋白质（Callebaut & Moron, FEBS Lett. (1995) 374 (2)211-215; Wülfing 等人, J. Biol. Chem.(1994)269(4), 2895-2901)。

就相邻于编码象大肠杆菌 SlyD 或 SlpA 一样的非-人伴侣蛋白多肽结合区段的核苷酸序列的上游和下游序列来说，优选编码 FKBP 型人肽基脯氨酸顺反异构酶的上游和/或下游核苷酸序列包含编码 FK506 结合蛋白（FKBP）或 FKBP-样结构域的核苷酸序列，编码人 FKBP12 的序列尤其优选。

进一步在优选的实施方案中，编码 FKBP12 的上游核苷酸序列包含编码 N-末端起始于位于 SEQ ID NO. 3 第 1 至 20 位氨基酸之间任一氨基酸和 C-末端终止于位于 SEQ ID NO. 3 第 70 至 89 位氨基酸之间任一氨基酸的多肽的序列。

同样优选的是其中编码 FKBP12 的下游核苷酸序列包含编码 N-末端起始于位于 SEQ ID NO. 3 第 90 至 97 位氨基酸之间任一氨基酸和 C-末端终止于位于 SEQ ID NO. 3 第 103 至 107 位氨基酸之间任一氨基酸的多肽的序列的实施方案。

最优选的是包含编码根据 SEQ ID NO. 4 的多肽的核苷酸序列的重组 DNA 分子。SEQ ID NO. 4 显示 N-末端起始于 SEQ ID NO. 3 的氨基酸位置甘氨酸/G 1 至甘氨酸/G 83（FKBP12），继以 SEQ ID NO. 1 的氨基酸位置谷氨酰胺/Q 70 至天冬酰胺/N 129（SlyD），并以 SEQ ID NO. 3 的亮氨酸/L 97 至谷氨酸/E 107（FKBP12）结束的氨基酸序列。对应于

SEQ ID NO. 4 所示氨基酸序列的多肽也称作 FKBP12 -IF1。

在本发明的又一种优选实施方案中，重组 DNA 分子包含编码根据 SEQ ID NO. 13 的多肽的核苷酸序列。SEQ ID NO. 13 显示 N-末端起始于 SEQ ID NO. 3 的氨基酸位置甘氨酸/G 1 至甘氨酸/G 83 (FKBP12)，继以 SEQ ID NO. 12 的氨基酸位置缬氨酸/V72 至苏氨酸/T 132 (SlyA)，并以 SEQ ID NO. 3 的亮氨酸/L 97 至谷氨酸/E 107 (FKBP12) 结束的氨基酸序列。对应于 SEQ ID NO. 13 所示氨基酸序列的多肽也称作 FKBP12 -IF4。

在本发明的又一种优选实施方案中，重组 DNA 分子包含编码根据 SEQ ID NO. 15 的多肽的核苷酸序列。

SEQ ID NO. 15 显示 N-末端起始于 SEQ ID NO. 3 的氨基酸位置甘氨酸/G 1 至甘氨酸/G 83 (FKBP12)，继以 SEQ ID NO. 14 的氨基酸位置甲硫氨酸/M84 至苏氨酸/T140 (热球菌属 FKBP18)，并以 SEQ ID NO. 3 的亮氨酸/L 97 至谷氨酸/E 107 (FKBP12) 结束的氨基酸序列。对应于 SEQ ID NO. 15 所示氨基酸序列的多肽也称作 FKBP12 -IF5。

以这样的方式选择插入到编码非-人伴侣蛋白多肽结合区段的序列上游和下游的 DNA 序列是有利的：二维结构元件比如  $\beta$ -折叠不被异源序列元件打断而保持其完整。通常已知的序列比对辅助选择适宜的上游和下游序列，如同例如，Suzuki 等人，2003，JMB 328，1149-1160。

根据本发明，编码非-人伴侣蛋白多肽结合区段的核苷酸序列和上游和下游核苷酸序列，也即编码 FK506 结合蛋白 (FKBP) 或 FK506-结合-蛋白-样结构域 (FKBP-样结构域)，和优选编码 FKBP 型人肽基脯氨酸顺反异构酶 (PPIase) 的核苷酸序列，的选择和安排以这样的方式完成：所得嵌合融合蛋白的总体结构顺序对应于天然存在的蛋白伴侣的结构。换言之，总体结构优选维持如同现有技术状态中所述的象  $\alpha$ -螺旋和  $\beta$ -折叠一样的二级结构元件的安排 (例如 Suzuki 等人，2003，JMB 328，1149-1160)。

本发明具体涉及由这样的重组 DNA 分子表达产生的嵌合融合蛋白。

通过上述鉴定的重组 DNA 分子的表达，我们已经能够提供细菌 PPIase 蛋白伴侣 SlyD、FkpA、引发因子和 SlpA 的对应物，及甚至细菌 PPIase 蛋白伴侣 SlyD、引发因子和 SlpA 的人源化对应物。这些人源化

的肽基脯氨酸顺反异构酶蛋白伴侣可作为生物技术应用中的有益工具以及诊断测试中的添加物起作用。如在本申请实验部分可以看到的，我们已经能够获得比野生型折叠辅助物具有更高催化效率的人源化蛋白伴侣，所述野生型折叠辅助物的氨基酸序列被包含在本发明的人源化蛋白伴侣中。基于在显示蛋白的折叠和重折叠能力的 RNA 酶 T1 重折叠测试系统中的观察，我们已经能够显示分离的人 FKBP12 仅具有约  $14,000 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  的小催化效率。分离的未修饰大肠杆菌 SlyD 的催化效率达到  $680,000 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ 。在 RNA 酶 T1 折叠测定中，SlyD 的缺乏 IF 环结构域的缺失变体显示  $\sim 500 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  的可忽略的催化效率。令人惊奇的是，嵌合分子 FKBP12-IF1（氨基酸序列示于 SEQ ID NO. 4）的催化效率大大超过了该值。FKBP12-IF1 显示约  $2,500,000 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ （亦参见实施例部分表 1）的杰出的催化效率，其超过迄今为止已知的最有效的脯氨酰异构酶的值。该值甚至超过了引发因子的催化效率，后者等于  $1.2 \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ （Stoller 等人（1995）*EMBO J.* 14, 4939-4984; Zarnt 等人（1997）*J. Mol. Biol.* 271, 827-837; Scholz 等人（1997）*EMBO J.* 16, 54-58）。

通过将人 FK506 结合蛋白的脯氨酰异构酶中心的活性位点与非-人伴侣蛋白的多肽结合结构域（即所谓的 IF 环）组合，我们已经产生了具有卓越的伴侣和酶特性的折叠辅助物。我们已经能够提供比分离的野生型蛋白质具有更高催化效率的折叠辅助物。因此根据本发明的折叠辅助物关于其卓越的催化效率也可称作超蛋白伴侣（super chaperone）。

因此部分本发明是重组产生的融合蛋白，其含有 a) 包含非-人伴侣蛋白的多肽结合区段的多肽序列，b) 与非-人伴侣多肽序列 N-末端融合的 FK506 结合蛋白（FKBP）或 FK506-结合-蛋白-样结构域（FKBP-样结构域）的多肽序列，和 c) 与非-人伴侣多肽序列 C-末端融合的 FK506 结合蛋白（FKBP）或 FK506-结合-蛋白-样结构域（FKBP-样结构域）的多肽序列。

由此一种优选实施方案是重组产生的融合物，其含有：a) 包含非-人伴侣蛋白的多肽结合区段的多肽序列，b) 与非-人伴侣多肽序列 N-末端融合的人 FKBP 型肽基脯氨酸顺反异构酶多肽序列，c) 与非-人伴侣多肽序列 C-末端融合的人 FKBP 型肽基脯氨酸顺反异构酶多肽序列。优选实施方案是包含大肠杆菌 SlyD 蛋白伴侣序列多肽结合区段和 N-及 C-末端与 SlyD 序列融合的人 FKBP12 多肽序列的嵌合融合蛋白。本发明

优选实施方案中的一种是包含根据 SEQ ID NO. 4 的氨基酸序列的嵌合融合蛋白。

还优选的是包含大肠杆菌 SlpA 蛋白伴侣序列多肽结合区段和 N-及 C-末端与 SlpA 序列融合的人 FKBP12 多肽序列的嵌合融合蛋白。在实施例部分和表 1 中给出了包含大肠杆菌 SlpA 蛋白伴侣序列多肽结合区段的嵌合融合蛋白的更多细节。

一种本发明的优选实施方案是包含根据 SEQ ID NO. 13 的氨基酸序列的嵌合融合蛋白。该蛋白称作 FKBP12-IF4。

还优选的是包含热球菌属 FKBP18 蛋白伴侣序列多肽结合区段和 N-及 C-末端与热球菌属 FKBP18 序列融合的人 FKBP12 多肽序列的融合蛋白。热球菌属 FKBP18 是 SlyD 的热稳定同源物，其在脯氨酰异构酶活性位点附近的 flap 区域带有 IF 结构域。热球菌属 FKBP18 的氨基酸序列示于 SEQ ID NO. 14。所得嵌合融合蛋白的氨基酸序列示于 SEQ ID NO. 15，其中推定的热球菌属 FKBP18 的 IF 环结构域嫁接于 hFKBP12 的折叠支架上。实施例部分和表 1 中给出了有关该嵌合融合蛋白的更多细节。

在本发明的另一实施方案中，起源于 SlyD 的 IF 结构域被插入到大肠杆菌引发因子的 FKBP 结构域中。SEQ ID NO. 18 显示该嵌合折叠辅助物蛋白质（引发因子-IF/SlyD）的氨基酸序列。起源于 SlyD 的 IF 结构域被插入到大肠杆菌引发因子的 FKBP 结构域。SlyD 插入片段用下划线标示。

在又一种实施方案中，起源于 SlyD 的 IF 结构域被插入到 FkpA 的 FKBP 结构域中（如 SEQ ID NO. 20 所示）。所得嵌合折叠辅助物蛋白称作 FkpA-IF/SlyD。预期该嵌合折叠辅助物蛋白在 RNA 酶 T1 折叠试验中显示高活性。SEQ ID NO. 21 显示根据本发明的嵌合折叠辅助物蛋白的氨基酸序列。

从我们的实验，我们推断 SlyD、SlpA 和 TcFKBP18 的伴侣功能被限制于所谓的 IF (insert in flap) 结构域。我们得出结论认为，不同 FKBP-蛋白伴侣的 IF 结构域在结构上相关且功能等同。因此，来自于不同 FKBP-蛋白伴侣的 IF 结构域应当能够互换。我们假定 SlyD 内的 IF 结构域可被例如 SlpA 或 TcFKBP18 中的推定 IF 结构域取代，而不危及 SlyD 的真实折叠辅助物特性。这一伴侣结构域的互换应当可能是相互的，也即推定的 IF 结构域可以被嫁接到 SlpA 或 TcFKBP18 的 FKBP-样结构域

上以产生功能性蛋白伴侣模块。伴侣结构域的互换可以为具有适合于各自靶蛋白的底物亲和力的定制折叠辅助物铺平道路。

在 FKBP-X 融合蛋白中，FKBP 作为载体模块起作用，且 X 意指客或靶蛋白，载体模块和客蛋白以封闭和开放形式的动态平衡存在。在封闭形式中，疏水区域被遮蔽，且由此融合蛋白保持可溶而不聚集。在开放形式，抗原位点被暴露，这使得客蛋白例如在免疫测定中成为有功能的。因此亲和力必须在融合蛋白中得到很好地平衡，而且它可以通过来自不同 FKBP-蛋白伴侣的 IF-结构域的互换根据靶模块的需要进行适应。

任选地所有嵌合融合蛋白可进一步与靶多肽序列融合。根据本发明的靶多肽可以是从小量需要的任何多肽，且因此难于从其它非重组来源分离或纯化。

优选通过本发明方法产生的靶蛋白的例子包括哺乳动物基因产物，比如酶、细胞因子、生长因子、激素、疫苗、抗体等。更具体地，本发明的优选的超表达基因产物包括比如促红细胞生成素、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  $\alpha$ 、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 I、胰岛素-样生长因子 II、凝血因子 VIII、超氧化物歧化酶、干扰素、 $\gamma$ -干扰素、白细胞介素-1、白细胞介素-2、白细胞介素-3、白细胞介素-4、白细胞介素-5、白细胞介素-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、淋巴毒素等这样的基因产物。优选的超表达基因产物是人基因产物。

此外，本方法可容易地适应以增强可用作疫苗的任何超表达基因产物的分泌。可用作疫苗的超表达基因产物包括哺乳动物病原体的任何结构的、膜相关、膜结合或分泌的基因产物。哺乳动物病原体包括可影响或攻击哺乳动物的病毒、细菌、单细胞或多细胞寄生物。例如，病毒疫苗可包括对抗比如人免疫缺陷病毒 (HIV)、痘苗、脊髓灰质炎病毒、腺病毒、流感、甲型肝炎、乙型肝炎、登革病毒、日本 B 脑炎、水痘带状疱疹、巨细胞病毒、甲型肝炎、轮状病毒的病毒的疫苗，以及对抗比如麻疹、黄热、腮腺炎、狂犬病、疱疹、流感、副流感等这样的病毒病的疫苗。细菌疫苗可包括对抗比如霍乱弧菌 (*Vibrio cholerae*)、伤寒沙门氏菌 (*Salmonella typhi*)、百日咳博德特氏菌 (*Bordetella pertussis*)、

肺炎链球菌 (*Streptococcus pneumoniae*)、流感嗜血菌 (*Haemophilus influenzae*)、破伤风梭菌 (*Clostridium tetani*)、白喉棒杆菌 (*Corynebacterium diphtheriae*)、麻风分枝杆菌 (*Mycobacterium leprae*)、立氏立克次氏体 (*R. rickettsii*)、志贺氏菌属 (*Shigella*)、淋病奈瑟氏球菌 (*Neisseria gonorrhoeae*)、脑膜炎奈瑟氏球菌 (*Neisseria meningitidis*)、粗球孢菌 (*Coccidioides immitis*)、布氏疏螺旋体 (*Borrelia burgdorferi*) 等这样的细菌的疫苗。优选地, 靶蛋白是由比如来自 HIV-1 的 gp41 和 p17、来自 HIV-2 的 gp36 和 p16、来自 HTLV-I/II 的 gp21 这样的逆转录病毒蛋白组成的组, 由比如来自风疹病毒的 E1 和 E2 这样的病毒包膜蛋白组成的组, 或由比如  $\beta$ -AP42 (Alzheimer 肽) 这样的促淀粉样变蛋白组成的组的成员或朊病毒蛋白。

根据本发明的靶多肽还可含有被构建为作为单个重组多肽表达的来自几种不同蛋白质的序列, 例如诊断相关表位。

编码嵌合融合蛋白的重组 DNA 分子, 其含有 a) 至少一个编码非-人伴侣蛋白多肽结合区段的核苷酸序列, b) 其上游至少一个编码 FK506 结合蛋白或 FK506-结合-蛋白-样结构域 (FKBP-样结构域) 的核苷酸序列和 c) 其下游至少一个编码 FK506-结合-蛋白-样结构域 (FKBP-样结构域) 的核苷酸序列和 d) 至少一个编码靶多肽的核苷酸序列, 也是本发明的目的。

优选地, 编码嵌合融合蛋白的重组 DNA 分子, 其含有 a) 至少一个编码非-人伴侣蛋白多肽结合区段的核苷酸序列, b) 其上游至少一个编码 FKBP 型人肽基脯氨酸顺反异构酶 (PPIase) 的核苷酸序列和, c) 其下游至少一个编码 FKBP 型人肽基脯氨酸顺反异构酶 (PPIase) 的核苷酸序列和 d) 至少一个编码靶多肽的核苷酸序列, 也是本发明的目的。

编码靶多肽的核苷酸序列以这样的方式插入是重要的: 根据步骤 a)、b) 和 c) 编码嵌合超蛋白伴侣的序列保持完整以便使其维持其催化和伴侣功能。这意味着编码靶多肽的核苷酸序列被符合读框地插入到编码嵌合融合蛋白的序列的上游或下游。它可以被插入到上游和下游, 且也可以插入多于一个的拷贝。

根据本发明的编码嵌合融合蛋白和靶多肽的重组 DNA 还可含有在完整蛋白表达后导致产生接头多肽的接头序列。如同本领域技术人员将理解的, 这样的接头多肽被设计为最适于预期的应用, 尤其在长度、柔

性、电荷和溶解度方面。

带有一个或几个氨基酸取代或缺失的嵌合融合蛋白的变体也可用于获得本发明的重组 DNA 或嵌合融合蛋白。本领域技术人员可以容易地断言通过实施例部分所描述的程序这样的变体是否适于本发明的方法。

通过在适宜的宿主细胞中复制，可以产生大量的多核苷酸。编码蛋白质或其片段的天然或合成 DNA 片段将被整合进能够导入原核或真核细胞并在其中复制的重组多核苷酸构建体，通常为 DNA 构建体中。

多核苷酸也可以通过化学合成产生，包括但不限于 Beaucage, S. L. 和 Caruthers, M. H., *Tetrahedron Letters* 22 (1981) 1859-1862 中所述的亚磷酰胺法以及根据 Matteucci, M. D 和 Caruthers, M. H., *J. Am. Chem. Soc.* 103 (1981) 3185-3191 的三酯法。通过合成互补链并在适宜条件下使链一起退火或者通过用 DNA 聚合酶和适宜的引物序列添加互补链，可以从化学合成的单链产物获得双链片段。

当多核苷酸序列被置于与另一多核苷酸序列具有功能上的关系时，核苷酸序列是可操作地连接的。例如，启动子与编码序列可操作地连接，如果该启动子影响编码序列的转录或表达的话。通常，可操作连接的意指连接的序列是连续的，且在必须连接两个蛋白编码区时，不仅连续而且符合读框。然而，人们熟知的是，比如增强子这样的某些遗传元件可以以一定的距离可操作地连接，即使是不连续的。

为导入宿主制备的 DNA 构建体通常含有被宿主识别的复制系统，包括预期的编码所需嵌合融合肽的 DNA 片段和任选地附加靶多肽，且还优选将包括与多肽编码区段可操作相连的转录和翻译起始调节序列。表达系统（表达载体）可包括，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，比如核糖体结合位点、RNA 剪接位点、聚腺苷酸化位点、转录终止序列和 mRNA 稳定序列。

选择适宜的启动子和其它必需的载体序列以使得在宿主中有功能。能够工作的细胞系与表达载体组合的例子包括但不限于 Sambrook, J. 等人在“*Molecular Cloning: A Laboratory Manual*” (1989) -, Eds. J. Sambrook, E. F. Fritsch 和 T. Maniatis, Cold Spring Harbour Laboratory Press, Cold Spring Harbour 中，或 Ausubel, F. 等人在“*Current protocols in*

molecular biology” (1987 和定期更新), Eds. F. Ausubel, R. Brent 和 K. R.E., Wiley & Sons Verlag, 纽约; 和 Metzger, D., 等人, Nature 334 (1988) 31-6 中描述的那些。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, 且可获自包括但不限于 Stratagene、New England Biolabs、Promega Biotech 等供应商。此外, 构建体可以与可扩增基因 (例如, DHFE) 连接从而可获得基因的多拷贝。

表达和克隆载体将可能包含选择标记, 编码用该载体转化的宿主细胞存活或生长所必需的蛋白的基因, 尽管这样的标记基因可携带在共导入该宿主细胞的另一多核苷酸序列中。只有那些表达标记基因的宿主细胞将在选择条件下存活和/或生长。一般的选择基因包括但不限于编码蛋白的那些, 所述蛋白 (a) 赋予对抗生素或其它毒性物质, 例如氨基青霉素、四环素等, 的抗性; (b) 补偿营养缺陷; 或 (c) 供应不能从复合培养基中获得的关键营养物。正确的选择标记的选择将依赖于宿主细胞, 且不同宿主的适宜的标记是本领域已知的。

根据本发明, 已证明含有可操作连接的根据本发明的重组 DNA 分子的表达载体是非常有利的, 即包含 a) 至少一个编码非-人伴侣蛋白多肽结合区段的核苷酸序列, b) 其上游至少一个编码 FK506 结合蛋白或 FK506-结合-蛋白-样结构域 (FKBP-样结构域) 的核苷酸序列和 c) 其下游至少一个编码 FK506-结合-蛋白-样结构域 (FKBP-样结构域) 的核苷酸序列和任选地 d) 至少一个编码靶多肽的核苷酸序列。

含有可操作连接的根据本发明的重组 DNA 分子的表达载体, 即含有 a) 至少一个编码非-人伴侣蛋白多肽结合区段的核苷酸序列 b) 其上游至少一个编码人 FKBP 型肽基脯氨酸顺反异构酶 (PPIase) 的核苷酸序列和, c) 其下游至少一个编码人 FKBP 型肽基脯氨酸顺反异构酶 (PPIase) 的核苷酸序列, 和任选地 d) 至少一个编码靶多肽的核苷酸序列, 也是本发明的部分。

可通过本领域已知的任何方法将包含目的多核苷酸的载体导入宿主细胞。这些方法可依赖于细胞宿主的类型变化, 包括但不限于用氯化钙、氯化铷、磷酸钙、DEAE-葡聚糖、其它物质转染和用病毒感染。可通过在相容的宿主细胞中表达载体或其它表达媒介物中的本发明多核苷酸制备大量本发明的多核苷酸和多肽。最常用的原核宿主是大肠杆菌

菌株，尽管其它原核生物，比如枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*) 也可以使用。大肠杆菌的表达代表实施本发明的优选模式。

根据本发明的载体的构建使用了常规的连接技术。分离的质粒或 DNA 片段被切割、裁剪和再连接成产生所需质粒所需的形式。如果需要的话，以已知的方式进行证实所构建质粒中的正确序列的分析。构建表达载体、制备体外转录物、将 DNA 导入宿主细胞以及进行评估表达和功能的分析的适宜方法是本领域技术人员已知的。可利用可基于本文所提供的序列的适宜标记的探针，通过，例如常规 DNA 印迹、定量 mRNA 转录的 RNA 印迹、斑点印迹 (DNA 或 RNA 分析) 或原位杂交在样品中直接测量基因存在、扩增和/或表达。本领域技术人员将易于想象如果需要的话可以如何修改这些方法。

含有根据本发明的重组 DNA 的表达载体可用于在无细胞翻译系统中表达融合蛋白或可用于转化宿主细胞。在优选实施方案中，本发明涉及用根据本发明的表达载体转化的宿主细胞。

在进一步优选实施方案中，本发明涉及产生嵌合融合蛋白的方法。所述方法包括培养用根据本发明的表达载体转化的宿主细胞，在各自的宿主细胞中表达该嵌合融合蛋白并纯化所述嵌合融合蛋白的步骤。

根据本发明的嵌合融合蛋白显示高溶解性。当在胞质中超表达时，它们主要积累在可溶级分中。在更低程度上，它们还表达在内含体中。通常在象例如在离液物质中这样的适宜缓冲条件下细胞被裂解。当嵌合融合蛋白被标记有六组氨酸部分时，未折叠蛋白质可结合于含镍柱 (Ni-NTA)，在此它们在适宜的缓冲条件下也重折叠。如实施例部分更详细显示的这样的纯化和重折叠规程是本领域技术人员熟知的。由于其卓越的折叠辅助物特性，根据本发明的嵌合融合蛋白可用作任何否则不能采取其正确三维结构，也即其天然样构象的靶蛋白的折叠辅助物。根据本发明，嵌合融合蛋白还可用作靶蛋白生产方法中的折叠辅助物。例如，在超量生产的宿主细胞的初次溶解之后，由于离液物质或由于去污剂的存在或其它缓冲条件——它们威胁靶蛋白的天然构象状态，超表达的靶蛋白通常不采取其天然结构。之后在靶蛋白的纯化和溶解过程中，可加入嵌合融合蛋白，且它们可在重折叠和复性过程中有所帮助。

就在偶联的转录/翻译系统中的应用来说，可以将含有超表达的嵌合折叠辅助物的细胞裂解物加入到小瓶中，在其中实施体外翻译，从而促

进所翻译蛋白的正确构象折叠。

根据本发明的嵌合融合蛋白可应用于免疫测定中以及在抗原和抗体与其结合配偶体的免疫结合过程中有所帮助而不干扰免疫测定及其结果。有利的是根据本发明的嵌合融合蛋白是人源化的，也即它们主要包含人氨基酸序列，从而由于人样品中天然存在的对抗非-人蛋白序列的抗体而产生干扰的可能性被最小化。优选源自人序列的氨基酸的百分比与嵌合融合蛋白完整氨基酸序列相比为至少 60%。

免疫测定是本领域技术人员熟知的。实施这样的测定的方法以及实际应用和程序在相关教科书中总结。相关教科书的例子有 Tijssen, P., *Preparation of enzyme-antibody or other enzyme-macromolecule conjugates in "Practice and theory of enzyme immunoassays"* (1990) 221-278, Eds. R. H. Burdon 和 v. P. H. Knippenberg, Elsevier, Amsterdam) 和 Tijssen, "Methods in Enzymology" (1980), Eds. S. P. Colowick, N. O. Caplan 和 S. P., Academic Press) 中的各卷，其涉及免疫检测方法，尤其是第 70、73、74、84、92 和 121 卷。

在本发明的又一实施方案中，嵌合融合蛋白可分别用作靶蛋白生产方法中、疫苗生产中或生产药物方法中的融合配偶体。

对于预期该新嵌合融合蛋白用于治疗应用的情况，优选配制含有根据本发明的重组产生的嵌合融合蛋白和药学可接受赋形剂的组合物。

提供以下实施例、参考文献、序列表和附图以帮助理解本发明，所附权利要求书中列出了其真实范围。可以理解，可以在不背离本发明的精神的情况下对所述程序做出修改。

## 实施例

### 材料和试剂

氯化胍 (GdmCl, A 级) 购自 NIGU (Waldkraiburg, 德国)。Complete<sup>®</sup> 无 EDTA-蛋白酶抑制剂片剂、咪唑和 EDTA 获自 Roche Diagnostics GmbH (Mannheim, 德国)，所有其它化学药品均为获自 Merck (Darmstadt, 德国) 的分析纯级。(S54G, P55N)-RNA 酶 T1 根据 Mücke, M. 和 Schmid, F. X. (1994) *J. Mol. Biol.* 239, 713-725 所述进行纯化、还原和羧甲基化。超滤膜 (YM10, YM30) 购自 Amicon (Danvers, MA, USA)，微量透析膜 (VS/0.025  $\mu\text{m}$ ) 和超滤单元 (biomax ultrafree filter

devices) 获自 Millipore (Bedford, MA, USA)。用于过滤粗酶解物的硝酸纤维素和乙酸纤维素膜 (1.2  $\mu\text{m}$ /0.45  $\mu\text{m}$ /0.2  $\mu\text{m}$ ) 获自 Sartorius (Göttingen, 德国)。

### 实施例 1

生产包含大肠杆菌 SlyD 和人 FKBP12 序列的嵌合融合蛋白 hFKBP12-IF1

#### 表达盒的克隆

从 SwissProt 数据库检索 hFKBP12 和 SlyD 序列。从 Medigenomix (Martinsried, 德国) 购得编码 hFKBP12 及其插入变体的合成基因并将其克隆进 pET24 表达载体 (Novagen, Madison, Wisconsin, USA)。对于在大肠杆菌宿主细胞中的表达作了密码子选择的最优化。从大肠杆菌菌株 BL21 (DE3) 中 PCR 扩增 SlyD 基因, 限制酶切并连接入 pET24a 表达载体。按照如同 Scholz 等人 (2005) in J. Mol. Biol. 345, 1229-1241 所描述的对大肠杆菌 SlyD\*融合模块所述的设计融合蛋白的表达盒。

编码蛋白质 FKBP12-IF1 (亦示于带有六个组氨酸标记的 SEQ ID NO. 10)

```
MGVQVETISP GDGRTFPKRG QTCVVHYTGM LEDGKKFDSS RDRNKPFKFM
LGKQEVIRGW EEGVAQMSVG QRAKLTISPD YAYGQYDENL VQRVPKDVFM
GVDELQVGMR FLAETDQGPV PVEITAVEDD HVVVDGNHML AGQNLVFDVE
LLKLE
```

的合成基因购自 Medigenomix (Martinsried, 德国) 并被克隆进 pET24a 表达载体 (Novagen, Madison, WI)。对于在大肠杆菌宿主细胞中的表达作了密码子选择的最优化。利用 QuikChange (Stratagene, La Jolla, CA) 产生无半胱氨酸变体 (C22A)。翻译后用细菌 N-甲硫氨酰-氨肽酶切除了 N-末端甲硫氨酸, 由此成熟多肽实际上起始于甘氨酸 1。

为获得 FKBP12-IF1 (C22A) -gp41 融合构建体 (亦示于 SEQ ID NO. 11),

```

MGVQVETISP GDGRTPPKRG QTAVVHYTGM LEDGKKFDSS RDRNKPFKFM
LGKQEVIRGW EEGVAQMSVG QRAKLTISPD YAYGQYDENL VQRVPKDVFM
GVDELQVGMR FLAETDQGPV PVEITAVEDD HVVVDGNHML AGQNLVFDVE
LLKLEGGGSG GSGGGGSGGG SGGGSGGGTL TVQARQLLSG IVQQNNELR
AIEAQHLEQ LTVWGTKQLQ ARELAVERYL KDQQLLGIWG CSGKLICTTA
VPWNASWSNK SLEQIWNMT WMEWDREINN YTSLIHSLIE ESQNQEKNE
QELLELDKWA SLWNWFNITN WLWYLEHHHH HH

```

通过 PCR 扩增编码 NdeI/BamHI-侧接的 FKBP12-IF1- (GGGS)<sub>2</sub>GG 和 BamHI/XhoI-侧接的 (GGGS)<sub>2</sub>GG-gp41 (残基 536 至 681) 的 DNA 片段并用 NdeI 和 XhoI 插入到 pET24a 中。编码 FKBP12-IF1 (C22A) 的合成基因或纯化的 HIV-1 分离物 RNA 用作 PCR- (RT-PCR) -模板。用 QuikChange 向 gp41 盒中导入点突变 L555E、L566E、I573T 和 I580E。

通过用 BamHI 切割 FKBP12-IF1 (C22A) -gp41 并插入从编码 FKBP12-IF1 (C22A) 的合成基因 PCR-扩增得到的编码 BamHI/BamHI-侧接的 (GGGS)<sub>2</sub>GGG-F12IF1- (GGGS)<sub>2</sub>GG 的 DNA 片段, 产生了串联 FKBP12-IF1 (C22A) -FKBP12-IF1 (C22A) -gp41 融合构建体 (SEQ ID NO.7)。

```

MGVQVETISP GDGRTPPKRG QTAVVHYTGM LEDGKKFDSS RDRNKPFKFM
LGKQEVIRGW EEGVAQMSVG QRAKLTISPD YAYGQYDENL VQRVPKDVFM
GVDELQVGMR FLAETDQGPV PVEITAVEDD HVVVDGNHML AGQNLVFDVE
LLKLEGGGSG GSGGGGSGGG SGGGSGGGGV QVETISPGDG RTFPKRGQTA
VVHYTGMLD GKKFDSSRDR NKPFKFM LGK QEVIRGWEEG VAQMSVGQRA
KLTISPDYAY GQYDENLVQR VPKDVFMGVD ELQVGMFLA ETDQGPVPE
ITAVEDDHVV VDGHNMLAGQ NLVFDVELLK LEGGGSGGGG GGGSGGGSGG
GSGGGTLTVQ ARQLLSGIVQ QNNELRAIE AQHLEQLTV WGTKQLQARE
LAVERYLKDQ QLLGIWGCSG KLICTTAVPW NASWSNKSLE QIWNMTWME
WDREINNYTS LIHSLIEESQ NQQEKNEQEL LELDKWASLW NWFNITNLW
YLEHHHHHH

```

*EcSlyD*-[GGGS]<sub>5</sub>GGG-*EcSlyD*-[GGGS]<sub>5</sub>GGG-gp41(536-681; L555E, L566E, I573T, I580E)-HGHDHDHD-His<sub>6</sub>, pET24a

MKVAKDLVVS LAYQVRTEDG VLVDESPVSA PLDYLHGHGS LISGLETALE  
 GHEVGDKFDV AVGANDAYGQ YDENLVQRVP KDVFMGVDEL QVGMFLAET  
 DQGPVPVEIT AVEDDHVVVD GNHMLAGQNL KFNVEVVAIR EATEEELAHG  
 HVHGAHDHHH DHDHDGGGSG GSGGGGSGGG SGGGSGGGKV AKDLVVS LAY  
 QVRTEDGVLV DESPVSAFLD YLHGHGSLIS GLETALEGHE VGDKFDVAVG  
 ANDAYGQYDE NLVQRVPKDV FMGVDELQVG MRFLAETDQG PVPVEITAVE  
 DDHVVDGNH MLAGQNLKFN VEVVAIREAT EEELAHGHVH GAHDHHDHD  
 HDGGGSGGGG GGGSGGGSGG GSGGGTLTVQ ARQLLSGIVQ QQNNELRAIE  
 AQQHLEQLTV WGTKQLQARE LAVERYLKDQ QLLGIWGCSG KLICTTAVPW  
 NASWSNKSLE QIWNMTWME WDREINNYTS LIHSLIEESQ NQEKNEQEL  
 LELDKWASLW NWFNITNWLW YHGHHDHDH HHHHH

利用 QuikChange (Stratagene, La Jolla, USA) 和标准 PCR 技术产生点突变、缺失和插入变体或限制位点。所有重组 hFKBP12 变体均包含 C-末端六组氨酸标记以促进 Ni-NTA-辅助的纯化和重折叠。

#### hFKBP12 变体的表达、纯化和重折叠

用基本上相同的规程纯化所有 hFKBP12、SlyD 和 SlpA 变体以及融合蛋白。含有特定 pET24a 表达质粒的大肠杆菌 BL21(DE3) 细胞于 37°C 在添加了卡那霉素 (30 µg/ml) 的 LB 培养基上生长至 OD<sub>600</sub> 1.5, 并通过加入 1 mM 异丙基-β-D-硫代半乳糖苷诱导胞质的超表达。诱导后三小时, 通过离心收获细胞 (5000 g 下 20 分钟), 冷冻且保存于 -20°C。为进行细胞裂解, 将冷冻沉淀重悬于冷的 50 mM 磷酸钠 (pH 8.0)、7.0 M GdmCl、5 mM 咪唑中, 并在冰上搅拌悬浮液 2 小时直至完全细胞裂解。离心和过滤 (硝酸纤维素膜, 0.45 µm/0.2 µm) 后, 将裂解物加入到用含有 5.0 mM TCEP 的裂解缓冲液平衡过的 Ni-NTA 柱上。随后的洗涤步骤对于各靶蛋白进行调整, 且范围为溶于 50 mM 磷酸钠 (pH 8.0)、7.0 M GdmCl、5.0 mM TCEP 中的 5-15 mM 咪唑。使用至少 10-15 体积的洗涤缓冲液。然后, 用 50 mM 磷酸钠 (pH 7.8)、100 mM NaCl、10 mM 咪唑、5.0 mM TCEP 替换 GdmCl 溶液以诱导基质结合的蛋白的构象重折叠。为避免共纯化的蛋白酶再活化, 重折叠缓冲液中包括了蛋白酶抑制剂混合物 (Complete<sup>®</sup> 无 EDTA, Roche)。过夜反应中应用总量为 15-20

柱体积的重折叠缓冲液。然后，通过用 3-5 柱体积的 50 mM 磷酸钠 (pH 7.8)、100 mM NaCl、10 mM 咪唑洗涤除去 TCEP 和 Complete<sup>®</sup>无 EDTA 抑制剂混合物。之后用相同缓冲液中的 250 mM 咪唑洗脱天然蛋白。通过 *N*-[2-羟-1,1-二羟甲基乙基]甘氨酸 (Tricine) -SDS-PAGE 估计含蛋白质的级分的纯度并汇集。最后，将蛋白质作大小排阻层析 (Superdex HiLoad, Amersham Pharmacia)，并汇集含蛋白质的级分并在 Amicon 室 (YM10) 中浓缩。

偶联的纯化和重折叠规程后，可以从 1 g 大肠杆菌湿细胞中得到大于 20 mg 的靶蛋白。我们还通过将半胱氨酸 22 变为丙氨酸提高各种 hFKBP12 变体的总体溶解度。这一单个半胱氨酸的取代取消了 hFKBP12 形成共价二硫键加合物的倾向。这既不影响蛋白质的折叠也不影响其脯氨酰异构酶活性。半胱氨酸 22 取代丙氨酸对于嵌合蛋白质 FKBP12-IF1 来说也显示是有益的。经 SDS-PAGE 证明的 hFKBP12-IF1 (C22A) 的纯化示于图 1。

## 实施例 2

### 光谱测量

用 Uvikon XL 双光束分光光度计进行蛋白质浓度测量。用 Pace (1995), Protein Sci. 4, 2411-2423 所述的程序测定摩尔消光系数 ( $\epsilon_{280}$ )。

用带有恒温的细胞固定器 (cell holder) 的 Jasco-720 旋光分光计记录近紫外圆二色性谱并转变成平均残基椭圆度 (mean residue ellipticity)。缓冲液为 50 mM 磷酸钠 (pH 7.5)、100 mM NaCl、1 mM EDTA。光程长度为 0.5 cm 或 1.0 cm，蛋白质浓度为 20-500  $\mu$ M。带宽为 1 nm，扫描速度为 20 nm/分钟，分辨率为 0.5 nm，且应答为 2 秒。为提高信噪比，测量光谱九次并取平均值。

### 通过近紫外 CD 评估天然-样折叠

为检查本发明的嵌合融合蛋白在偶联的纯化和重折叠规程后是否采取折叠构象，我们测量了近紫外区域的圆二色性谱。近紫外 CD 报告蛋白质中芳族残基的不对称环境，并因此是有序三级结构的灵敏测试。将比如 SlyD IF 环这样的结构域嫁接到 hFKBP12 flap 区段中可能严重危及 hFKBP12 支架蛋白的总体结构。天然人 FKBP12 在近紫外区具有典型

的 CD 特征 (图 2)。因此, 由于 IF-环-插入导致的结构变形或碰撞在近紫外圆二色性谱中应当是可见的。图 2 分别显示 hFKBP12 和 hFKBP12-IF1 的光谱覆盖图。令人惊奇的是, IF 结构域在 hFKBP12 的 flap 区域中的插入, 使支架蛋白总体结构基本保持完整。光谱特征是相似的, 即使由于环插入, 转变的椭圆度事实上显著降低。由于总体解折叠将取消任何近紫外 CD 信号, 所述结果强烈表明, 基本保持了嵌合构建体 hFKBP12-IF1 的天然-样折叠。

类似的, 我们记录了 SlyD\* (SlyD 1-165) 及其缺失变体 SlyD\*  $\Delta$ IF-环 (SlyD\* 缺乏氨基酸残基 70-129) 的近紫外圆二色性谱。这些结果示于图 3。如同根据近紫外圆二色性谱判断的, 当除去大的“insert in flap” (IF) 结构域时, SlyD\* 的总体结构保持完整。在除去 IF 环后, 平均残基转变的椭圆度甚至稍有上升。因此, 存在有力的证据证明缺乏其 IF 结构域的 SlyD 仍然是天然-样折叠的蛋白质。

### 实施例 3

#### 折叠实验

为进行折叠研究, 使用了还原和羧甲基化的 RNA 酶 T1 (RCM-T1)。通过 15°C 下在 0.1 M Tris-HCl pH 8.0 中温育蛋白至少 1 小时使 RCM-T1 解折叠。15°C 下, 通过 40-倍稀释解折叠的蛋白至终条件为相同缓冲液中 2.0 M NaCl 和所需浓度的 SlyD、FKBP12 变体和 RCM-T1 起始重折叠。折叠反应后, 在 268 nm (1.5nm 带宽) 激发后提高 320 nm 处 (10 nm 带宽) 的蛋白荧光 (即色氨酸荧光)。2.0 M NaCl 处, RCM-T1 的缓慢折叠是单指数过程, 且其速率常数是用程序 GraFit 3.0 (Erithacus Software, Staines, UK) 确定的。

#### 嵌合融合蛋白的折叠活性

我们调查了根据本发明的嵌合融合蛋白在催化脯氨酸-限制的蛋白折叠反应中的效率。使用了还原和羧甲基化的 RNA 酶 T1 (RCM-T1) 作为模型底物。其重折叠反应伴随有色氨酸荧光的强烈上升, 且可根据 Schmid, F. X. (1991) *Curr. Opin. Struct. Biol.* 1, 36-41, Mayr 等人 (1996) *Biochemistry* 35, 5550-5561 和 Mücke, M. 和 Schmid, F. X. (1994) *Biochemistry* 33, 14608-14619 所述通过提高 NaCl 的浓度来诱导。

来自大肠杆菌的 SlyD\* (1-165) 非常好地催化 RCM-T1 的重折叠。在低至 2 nM 的 SlyD\* 存在下, RCM-T1 的重折叠已经加速了两倍 (图 4A)。表观一级折叠速率常数  $k_{app}$  随 SlyD\* 浓度线性提高 (图 4B)。从该图的斜率, 确定了特异性常数  $k_{cat}/K_M$  为  $0.68 \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ 。这是格外高的值, 它几乎达到了迄今为止已知最有效的折叠复制物引发因子的催化效率 (参见 Stoller 等人 (1995) *EMBO J.* 14, 4939-4948, Scholz 等人 (1997) *EMBO J.* 16, 54-58 和 Scholz 等人 (1998) *J. Mol. Biol.* 277, 723-732)。

相反, 缺乏 IF 结构域的 SlyD 突变体是非常弱的 RCM-T1 重折叠催化剂。SlyD  $\Delta$ IF 代表 SlyD 的 FKBP-结构域。其特异性常数范围在  $0.0005 \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  左右且由此等于 SlyD\* 的仅 0.07% (图 5A/B)。这强烈指示, “insert in flap” 结构域对于结合未折叠蛋白底物的重要作用。由于近紫外圆二色性谱指向缺失变体的天然-样总体折叠 (图 3), insert in flap 结构域可能代表多肽-结合结构域, 也即 SlyD 的伴侣结构域。

删除推定的 IF 结构域事实上取消 SlyD\* 的折叠活性。缺乏 IF 结构域的 SlyD 突变体代表 SlyD 的 FKBP 或 FKBP-样结构域。相反, 通过将恰好该 IF 元件插入到 flap 区域中是如何影响 hFKBP12 的折叠活性的呢? 与已经公开的数据一致 (Scholz 等人 (1997) *EMBO J.* 16, 54-58), hFKBP12 对 RCM-T1 重折叠的催化相当温和 (图 6A)。对表观一级重折叠速率常数的分析得到了  $0.014 \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  的特异性常数 (图 6B)。相反根据本发明的 IF-环插入变体 FKBP12-IF1 极好地催化 RCM-T1 重折叠 (图 7A)。低于 1 nM 的 FKBP12-IF1 足以使 RCM-T1 的折叠速率加倍。该特异性常数高于  $2.5 \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  (图 7B 和表 1)。这一突出的值甚至超过了引发因子的催化效率, 后者等于  $1.2 \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  (Stoller 等人 (1995) *EMBO J.* 14, 4939-4984; Zarnt 等人 (1997) *J. Mol. Biol.* 271, 827-837; Scholz 等人 (1997) *EMBO J.* 16, 54-58)。因此, 通过构建本发明的嵌合融合蛋白, 我们将温和的非-人脯氨酰异构酶和弱的人蛋白伴侣转变成具有异常的良好脯氨酰异构酶和伴侣特性的出众的折叠辅助物。

根据本发明, 将非-人蛋白伴侣的多肽结合结构域与人 PPIase 结构域组合的原理可延伸至其它例子。与 FKBP12-IF1 的构建模式类似, 我们将推定的 SlpA IF 环结构域嫁接到 hFKBP12 折叠支架上。SlpA (首字

母缩写代表 SlyD-样蛋白 A) 与 SlyD 密切相关。有关 SlpA 的信息很少, 但是由于它与 SlyD 的同源性, 推测它在大肠杆菌胞质中作为 PPIase 蛋白伴侣的作用。我们从大肠杆菌纯化并表征了六组氨酸标记的 SlpA 变体。然而, 该推定的 PPIase 在 RCM-T1 重折叠测定中表现非常弱的活性 (表 1)。将包含来自 hFKBP12 和 SlpA 的元件的嵌合体称作 hFKBP12-IF4。它含有来自 hFKBP12 的模块 G1-G83、来自 SlpA 的 V72-T132 和来自 hFKBP12 的 L97-E107(序列信息参见 SEQ ID NO. 13)。基本按照对 FKBP12-IF1 所述的, 完成对六组氨酸标记的蛋白的表达、纯化至同质以及重折叠。通过近紫外 CD 评估得到清楚指向所设计蛋白质的紧凑折叠的光谱 (光谱未示出)。

在 RCM-T1 重折叠测定中进行评估时, hFKBP12-IF4 表现惊人高的折叠活性 (图 10 A)。其特异性常数 ( $k_{cat}/K_M$ ) 是  $800,000 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  (参见表 1) 且事实上等于 SlyD 的催化效率, 后者是非常有效的折叠辅助物 (Scholz 等人, Biochemistry 2006, 45, 20-33)。再次, 推定的多肽结合结构域 (来自 SlpA) 与行动迟缓的脯氨酰异构酶 (hFKBP12) 组合产生具备高酶和伴侣活性的出众的折叠辅助物。我们可以得出结论, 通过将 hFKBP12 与来自不同 SlyD 同源物的 IP 环结构域组合可以得到具有异常的折叠活性的人源化折叠辅助物。

组合非-人蛋白伴侣的多肽结合结构域与人 PPIase 结构域的原理的另一个例子是称作 hFKBP12-IF5 的嵌合融合蛋白。根据 FKBP12-IF1 和 FKBP12-IF4 的构建模式, 我们将热球菌属 FKBP18 的推定的 IF 环结构域嫁接到 hFKBP12 的折叠支架上。热球菌属 FKBP18 是 SlyD 的热稳定同源物, 其在 flap 区中脯氨酰异构酶活性位点附近带有推定的 IF 结构域。

所得嵌合体称作 hFKBP12-IF5。它含有来自 hFKBP12 的模块 G1-G83、来自热球菌属 FKBP18 的 M84-T140 和来自 hFKBP12 的 L97-E107 (热球菌属 FKBP18 的序列信息参见 SEQ ID NO. 14, 且 hFKBP12-IF5 的序列信息参见 SEQ ID NO. 15)。基本按照对 FKBP12-IF1 所述的, 完成对六组氨酸标记的蛋白的表达、纯化至同质以及重折叠。

在 RCM-T1 重折叠测定中进行评估时, hFKBP12-IF5 表现惊人高的折叠活性 (图 11)。其特异性常数 ( $k_{cat}/K_M$ ) 是  $660,000 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  且事实上等于 SlyD 的催化效率, 根据近来的文献数据后者是一种非常有效的折

叠辅助物 (Scholz 等人, *Biochemistry* 2006, 45, 20-33)。再次, 推定的多肽结合结构域 (来自热稳定的 TcFKBP18) 与行动迟缓的脯氨酰异构酶 (hFKBP12) 组合产生具备高酶和伴侣活性的出众的折叠辅助物。我们的研究清楚的显示, hFKBP12 与来自不同 SlyD 同源物的 IP 环结构域的组合产生具有异常的折叠活性的人源化折叠辅助物。

正是该相同的原理也适用于存在于许多原核和真核脯氨酰异构酶中的 FKBP-样结构域。例如, FkpA 和引发因子是两种含有 FKBP-样结构域的大肠杆菌蛋白质。以前已经显示, 这些 FKBP-样结构域, 当与剩余的分子分离时, 表现非常温和的折叠活性 (Scholz 等人, *EMBO J.* (1997) 16 (1) 54-58; Saul 等人, *J. Mol. Biol.* (2004) 335, 595-608)。这与人 FKBP12 达成完美的一致, 后者是缺乏任何伴侣活性的温和的脯氨酰异构酶。通过将任何 SlyD IF 结构域 (也称作多肽结合区段) 嫁接到作为折叠支架的 FKBP-样结构域上可以得到卓越的折叠辅助物。这些嵌合体可在重组蛋白生物技术中用作折叠辅助物, 例如作为融合蛋白、重折叠缓冲液中的添加物等。

结构域嫁接原理也适用于 SlyD 本身。缺乏 IF 结构域的 SlyD 缺失变体 (SlyD  $\Delta$ IF) 代表真正的 FKBP 结构域, 它可与来自其它的 FKBP 蛋白伴侣的 IF 结构域组合以产生具有杰出催化效率的折叠辅助物。本发明因此包括 SlyD, 尤其是缺乏 IF 结构域的 SlyD 变体, 用于生产具有超过用于制备所得嵌合折叠辅助物的天然存在的野生型分子的催化效率的折叠辅助物的用途。

表 1 概括了在 RCM-T1 测定中所测量的所有蛋白质得到的结果。

表 1

PPIase变体	特异性常数 $k_{cat}/K_M$ ( $M^{-1}s^{-1}$ )
hFKBP12	14,000
hFKBP12 (C22A)	14,000
SlyD* (SlyD 1-165)	680,000
SlyD* $\Delta$ IF环	500
hFKBP12-IF1 (C22A) /发明	2,500,000
SlpA	< 1000
hFKBP12-IF4 /发明	850,000
TcFKBP18	600,000
hFKBP12-IF5 /发明	660,000

#### 实施例 4

##### FKBP12-IF1/HIVgp41 融合蛋白的免疫反应性

这个实施例显示，向本发明的嵌合融合蛋白 FKBP12-IF1 添加 HIV 蛋白，也即包膜蛋白 gp41 作为靶蛋白。如对 SlyD 和 FKBP12 蛋白变体所述，纯化和重折叠串联 FKBP12-IF1-gp41 融合模块。用其探测大量存在于 HIV-1 阳性血清中的抗-gp41 抗体。利用双抗原夹心形式在自动 Elecsys<sup>®</sup> 2010 分析仪 (Roche Diagnostics GmbH, 德国) 中质询免疫反应性。

在 Elecsys<sup>®</sup> 免疫测定中的信号检测基于电化学发光。将生物素缀合物 (即捕获抗原) 固定到链霉抗生物素蛋白包被的磁珠上，而信号传导抗原带有络合钆阳离子作为发光部分。在抗-gp41 抗体存在下，产色钆络合物架桥到固相并在用铂电极激发后发射出 620 nm 的光。信号输出是任意光单位。

对于它们作为 Elecsys<sup>®</sup> 抗原的用途，浓缩正在研究的可溶 gp41 融合蛋白并如 Scholz 等人 (2005) *J. Mol. Biol.* 345, 1229-1241 所述用 N-羧基-琥珀酰亚胺活化的生物素和钆部分修饰。gp41 变体在免疫测定测量中的浓度约为 500 ng/ml。使用至少五个阴性血清作为对照。为了进一步将假阳性结果减至最少，向样品中加入了聚合的未标记大肠杆菌 SlyD\* 作为抗干扰物质。

结果显示，根据本发明的嵌合融合 FKBP12-IF1 非常适于作为具有

聚集倾向的蛋白质的融合配偶体。当野生型 hFKBP12 与 gp41 胞外结构域片段融合时，所得融合蛋白在基质偶联的重折叠和咪唑洗脱之后定量聚集。显然，hFKBP12 不能赋予比如 gp41 胞外结构域片段这样的极端疏水的靶以溶解性。相反，我们发现根据本发明的含有 FKBP12-IF1 和 HIV-1 gp41 胞外结构域片段 536-681 的嵌合融合蛋白（示意图 8）极可溶，且如根据 UV 光谱学所判断的不倾向于聚集（图 9）。当在自动 Elecsys®分析仪中评估时，结果证明它们很适用于在 HIV-1 血清学中的诊断应用（数据未显示）。这进一步突出显示了根据本发明的嵌合融合蛋白的杰出特性。

### 参考文献列表

- Ausubel, F., et al., in "Current protocols in molecular biology" (1987 and periodic updates), Eds. F. Ausubel, R. Brent and K. R.E., Wiley & Sons Verlag, New York
- Bardwell, J. C., Mol Microbiol 14 (1994) 199-205
- Beaucage, S. L. and Caruthers, M. H., Tetrahedron Letters 22 (1981) 1859-1862
- Beissinger, M. and Buchner, J. Biol. Chem. (1998) 379, 245-59
- Buchner, J., Faseb J 10 (1996) 10-19
- Callebaut & Mornon, FEBS Lett. (1995) 374 (2), 211-215
- Crooke, E. and Wickner, W., Proc Natl Acad Sci U S A 84 (1987) 5216-20
- Danese, P. N., et al. Genes Dev 9(1995) 387-98
- Dartigalongue, C. and Raina, S., EMBO J 17 (1998) 3968-80
- Gething, M. J. and Sambrook, J., Nature 355 (1992) 33-45
- Hesterkamp et al., J Biol Chem. (1997) Aug 29;272(35):21865-71
- Hottenrott, S., et al., J Biol Chem 272 (1997) 15697-701
- Kay, Biochem. J. (1996) 314, 361-385
- Matteucci, M. D. and Caruthers, M. H., J. Am. Chem. Soc. 103 (1981) 3185-3191
- Mayr et al., Biochemistry 35 (1996) 5550-5561
- Merz et al., J Biol Chem. 2006 Oct 20; 281 (42) 31963-31971
- Metzger, D., et al., Nature 334 (1988) 31-6
- Missiakas, D., et al., EMBO J 14 (1995) 3415-24
- Mogk et al., Chembiochem 3 (2002) 807
- Mücke, M., and Schmid, F. X. Biochemistry 33 (1994) 14608-14619
- Pace, Protein Sci. 4 (1995), 2411-2423
- Sambrook, J., et al. in "Molecular Cloning: A Laboratory Manual" (1989) -, Eds. J. Sambrook, E. F. Fritsch and T. Maniatis, Cold Spring Harbour Laboratory Press, Cold Spring Harbour
- Saul et al., J. Mol. Biol. 335 (2004) 595-608
- Schmid, F. X., Curr. Opin. Struct. Biol. 1 (1991) 36-41
- Scholz et al. EMBO J. 16 (1997) 54-58
- Scholz et al., J. Mol. Biol. 277 (1998) 723-732

- 
- Scholz et al., J. Mol. Biol. 345 (2005) 1229-1241
  - Scholz et al., Biochemistry 45 (2006) 20-33
  - Stoller, G., et al., EMBO J 14 (1995) 4939-48
  - Suzuki et al., J. Mol. Biol. 328( 2003) 1149-1160
  - Tijssen, in "Methods in Enzymology" (1980), Eds. S. P. Colowick, N. O. Caplan and S. P., Academic Press), dealing with immunological detection methods, especially volumes 70, 73, 74, 84, 92 and 121.
  - Tijssen, P., Preparation of enzym-antibody or other enzyme-macromolecule conjugates in "Practice and theory of enzyme immunoassays" (1990) 221-278, Eds. R. H. Burdon and v. P. H. Knippenberg, Elsevier, Amsterdam
  - van Duyne et al. 1991, Science 252, 839-842
  - Wülfing et al 1994, J Biol Chem 269, 2895-2901
  - Zarnt et al. (1997) J. Mol. Biol. 271, 827-837
  
  - WO 03/000877
  - WO 03/000878
  - US patent no. 6,207,420

<110> Roche-Diagnostics GmbH; F. Hoffmann-La Roche AG

<120> 具有卓越的伴侣和折叠活性的嵌合融合蛋白

<130> 23529 WO-IR

<160> 21

<170> PatentIn version 3.2

<210> 1

<211> 196

<212> PRT

<213> 大肠杆菌 (Escherichia coli)

<400> 1

Met Lys Val Ala Lys Asp Leu Val Val Ser Leu Ala Tyr Gln Val Arg  
1                    5                    10                    15

Thr Glu Asp Gly Val Leu Val Asp Glu Ser Pro Val Ser Ala Pro Leu  
                  20                    25                    30

Asp Tyr Leu His Gly His Gly Ser Leu Ile Ser Gly Leu Glu Thr Ala  
                  35                    40                    45

Leu Glu Gly His Glu Val Gly Asp Lys Phe Asp Val Ala Val Gly Ala  
                  50                    55                    60

Asn Asp Ala Tyr Gly Gln Tyr Asp Glu Asn Leu Val Gln Arg Val Pro  
65                    70                    75                    80

Lys Asp Val Phe Met Gly Val Asp Glu Leu Gln Val Gly Met Arg Phe  
                  85                    90                    95

Leu Ala Glu Thr Asp Gln Gly Pro Val Pro Val Glu Ile Thr Ala Val  
 100 105 110

Glu Asp Asp His Val Val Val Asp Gly Asn His Met Leu Ala Gly Gln  
 115 120 125

Asn Leu Lys Phe Asn Val Glu Val Val Ala Ile Arg Glu Ala Thr Glu  
 130 135 140

Glu Glu Leu Ala His Gly His Val His Gly Ala His Asp His His His  
 145 150 155 160

Asp His Asp His Asp Gly Cys Cys Gly Gly His Gly His Asp His Gly  
 165 170 175

His Glu His Gly Gly Glu Gly Cys Cys Gly Gly Lys Gly Asn Gly Gly  
 180 185 190

Cys Gly Cys His  
 195

<210> 2

<211> 107

<212> PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 2

Gly Val Gln Val Glu Thr Ile Ser Pro Gly Asp Gly Arg Thr Phe Pro  
 1 5 10 15

Lys Arg Gly Gln Thr Cys Val Val His Tyr Thr Gly Met Leu Glu Asp  
 20 25 30

Gly Lys Lys Phe Asp Ser Ser Arg Asp Arg Asn Lys Pro Phe Lys Phe





Ala Tyr Gly Gln Tyr Asp Glu Asn Leu Val Gln Arg Val Pro Lys Asp  
85 90 95

Val Phe Met Gly Val Asp Glu Leu Gln Val Gly Met Arg Phe Leu Ala  
100 105 110

Glu Thr Asp Gln Gly Pro Val Pro Val Glu Ile Thr Ala Val Glu Asp  
115 120 125

Asp His Val Val Val Asp Gly Asn His Met Leu Ala Gly Gln Asn Leu  
130 135 140

Val Phe Asp Val Glu Leu Leu Lys Leu Glu  
145 150

<210> 5

<211> 154

<212> PRT

<213> 人工的; 具有 S1yD C22A 突变的 hFKBP12-IF1

<400> 5

Gly Val Gln Val Glu Thr Ile Ser Pro Gly Asp Gly Arg Thr Phe Pro  
1 5 10 15

Lys Arg Gly Gln Thr Ala Val Val His Tyr Thr Gly Met Leu Glu Asp  
20 25 30

Gly Lys Lys Phe Asp Ser Ser Arg Asp Arg Asn Lys Pro Phe Lys Phe  
35 40 45

Met Leu Gly Lys Gln Glu Val Ile Arg Gly Trp Glu Glu Gly Val Ala  
50 55 60

Gln Met Ser Val Gly Gln Arg Ala Lys Leu Thr Ile Ser Pro Asp Tyr





Val Gly Asp Lys Phe Asp Val Ala Val Gly Ala Asn Asp Ala Tyr Gly  
 245 250 255

Gln Tyr Asp Glu Asn Leu Val Gln Arg Val Pro Lys Asp Val Phe Met  
 260 265 270

Gly Val Asp Glu Leu Gln Val Gly Met Arg Phe Leu Ala Glu Thr Asp  
 275 280 285

Gln Gly Pro Val Pro Val Glu Ile Thr Ala Val Glu Asp Asp His Val  
 290 295 300

Val Val Asp Gly Asn His Met Leu Ala Gly Gln Asn Leu Lys Phe Asn  
 305 310 315 320

Val Glu Val Val Ala Ile Arg Glu Ala Thr Glu Glu Glu Leu Ala His  
 325 330 335

Gly His Val His Gly Ala His Asp His His His Asp His Asp His Asp  
 340 345 350

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser  
 355 360 365

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Thr Leu Thr Val Gln Ala Arg Gln Leu  
 370 375 380

Leu Ser Gly Ile Val Gln Gln Gln Asn Asn Glu Leu Arg Ala Ile Glu  
 385 390 395 400

Ala Gln Gln His Leu Glu Gln Leu Thr Val Trp Gly Thr Lys Gln Leu  
 405 410 415

Gln Ala Arg Glu Leu Ala Val Glu Arg Tyr Leu Lys Asp Gln Gln Leu  
 420 425 430

Leu Gly Ile Trp Gly Cys Ser Gly Lys Leu Ile Cys Thr Thr Ala Val  
 435 440 445

Pro Trp Asn Ala Ser Trp Ser Asn Lys Ser Leu Glu Gln Ile Trp Asn  
 450 455 460

Asn Met Thr Trp Met Glu Trp Asp Arg Glu Ile Asn Asn Tyr Thr Ser  
 465 470 475 480

Leu Ile His Ser Leu Ile Glu Glu Ser Gln Asn Gln Gln Glu Lys Asn  
 485 490 495

Glu Gln Glu Leu Leu Glu Leu Asp Lys Trp Ala Ser Leu Trp Asn Trp  
 500 505 510

Phe Asn Ile Thr Asn Trp Leu Trp Tyr His Gly His Asp His Asp His  
 515 520 525

Asp His His His His His His  
 530 535

<210> 7

<211> 509

<212> PRT

<213> 人工的; hFKBP12-1F1-hFKBP12-1F1-gp41 融合蛋白

<400> 7

Met Gly Val Gln Val Glu Thr Ile Ser Pro Gly Asp Gly Arg Thr Phe  
 1 5 10 15

Pro Lys Arg Gly Gln Thr Ala Val Val His Tyr Thr Gly Met Leu Glu  
 20 25 30

Asp Gly Lys Lys Phe Asp Ser Ser Arg Asp Arg Asn Lys Pro Phe Lys  
 35 40 45

Phe Met Leu Gly Lys Gln Glu Val Ile Arg Gly Trp Glu Glu Gly Val  
 50 55 60

Ala Gln Met Ser Val Gly Gln Arg Ala Lys Leu Thr Ile Ser Pro Asp  
 65 70 75 80

Tyr Ala Tyr Gly Gln Tyr Asp Glu Asn Leu Val Gln Arg Val Pro Lys  
 85 90 95

Asp Val Phe Met Gly Val Asp Glu Leu Gln Val Gly Met Arg Phe Leu  
 100 105 110

Ala Glu Thr Asp Gln Gly Pro Val Pro Val Glu Ile Thr Ala Val Glu  
 115 120 125

Asp Asp His Val Val Val Asp Gly Asn His Met Leu Ala Gly Gln Asn  
 130 135 140

Leu Val Phe Asp Val Glu Leu Leu Lys Leu Glu Gly Gly Gly Ser Gly  
 145 150 155 160

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly  
 165 170 175

Gly Gly Gly Val Gln Val Glu Thr Ile Ser Pro Gly Asp Gly Arg Thr  
 180 185 190

Phe Pro Lys Arg Gly Gln Thr Ala Val Val His Tyr Thr Gly Met Leu  
 195 200 205

Glu Asp Gly Lys Lys Phe Asp Ser Ser Arg Asp Arg Asn Lys Pro Phe  
 210 215 220

Lys Phe Met Leu Gly Lys Gln Glu Val Ile Arg Gly Trp Glu Glu Gly  
 225 230 235 240

Val Ala Gln Met Ser Val Gly Gln Arg Ala Lys Leu Thr Ile Ser Pro  
 245 250 255

Asp Tyr Ala Tyr Gly Gln Tyr Asp Glu Asn Leu Val Gln Arg Val Pro  
 260 265 270

Lys Asp Val Phe Met Gly Val Asp Glu Leu Gln Val Gly Met Arg Phe  
 275 280 285

Leu Ala Glu Thr Asp Gln Gly Pro Val Pro Val Glu Ile Thr Ala Val  
 290 295 300

Glu Asp Asp His Val Val Val Asp Gly Asn His Met Leu Ala Gly Gln  
 305 310 315 320

Asn Leu Val Phe Asp Val Glu Leu Leu Lys Leu Glu Gly Gly Gly Ser  
 325 330 335

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser  
 340 345 350

Gly Gly Gly Thr Leu Thr Val Gln Ala Arg Gln Leu Leu Ser Gly Ile  
 355 360 365

Val Gln Gln Gln Asn Asn Glu Leu Arg Ala Ile Glu Ala Gln Gln His  
370 375 380

Leu Glu Gln Leu Thr Val Trp Gly Thr Lys Gln Leu Gln Ala Arg Glu  
385 390 395 400

Leu Ala Val Glu Arg Tyr Leu Lys Asp Gln Gln Leu Leu Gly Ile Trp  
405 410 415

Gly Cys Ser Gly Lys Leu Ile Cys Thr Thr Ala Val Pro Trp Asn Ala  
420 425 430

Ser Trp Ser Asn Lys Ser Leu Glu Gln Ile Trp Asn Asn Met Thr Trp  
435 440 445

Met Glu Trp Asp Arg Glu Ile Asn Asn Tyr Thr Ser Leu Ile His Ser  
450 455 460

Leu Ile Glu Glu Ser Gln Asn Gln Gln Glu Lys Asn Glu Gln Glu Leu  
465 470 475 480

Leu Glu Leu Asp Lys Trp Ala Ser Leu Trp Asn Trp Phe Asn Ile Thr  
485 490 495

Asn Trp Leu Trp Tyr Leu Glu His His His His His His  
500 505

<210> 8

<211> 171

<212> PRT

<213> 人工的; 具有六-His 标记的 SlyD\* (SlyD 1-165)

<400> 8

Met Lys Val Ala Lys Asp Leu Val Val Ser Leu Ala Tyr Gln Val Arg  
1 5 10 15

Thr Glu Asp Gly Val Leu Val Asp Glu Ser Pro Val Ser Ala Pro Leu  
20 25 30

Asp Tyr Leu His Gly His Gly Ser Leu Ile Ser Gly Leu Glu Thr Ala  
35 40 45

Leu Glu Gly His Glu Val Gly Asp Lys Phe Asp Val Ala Val Gly Ala  
50 55 60

Asn Asp Ala Tyr Gly Gln Tyr Asp Glu Asn Leu Val Gln Arg Val Pro  
65 70 75 80

Lys Asp Val Phe Met Gly Val Asp Glu Leu Gln Val Gly Met Arg Phe  
85 90 95

Leu Ala Glu Thr Asp Gln Gly Pro Val Pro Val Glu Ile Thr Ala Val  
100 105 110

Glu Asp Asp His Val Val Val Asp Gly Asn His Met Leu Ala Gly Gln  
115 120 125

Asn Leu Lys Phe Asn Val Glu Val Val Ala Ile Arg Glu Ala Thr Glu  
130 135 140

Glu Glu Leu Ala His Gly His Val His Gly Ala His Asp His His His  
145 150 155 160

Asp His Asp His Asp His His His His His His  
165 170

<210> 9  
 <211> 124  
 <212> PRT  
 <213> 人工的; 无 IF-环的 SlyD\* (SlyD 1-165)

<400> 9

Met Lys Val Ala Lys Asp Leu Val Val Ser Leu Ala Tyr Gln Val Arg  
 1                   5                   10                   15

Thr Glu Asp Gly Val Leu Val Asp Glu Ser Pro Val Ser Ala Pro Leu  
                   20                   25                   30

Asp Tyr Leu His Gly His Gly Ser Leu Ile Ser Gly Leu Glu Thr Ala  
           35                   40                   45

Leu Glu Gly His Glu Val Gly Asp Lys Phe Asp Val Ala Val Gly Ala  
       50                   55                   60

Asn Asp Ala Tyr Gly Ala Thr Gly His Pro Gly Ile Ile Pro Pro His  
 65                   70                   75                   80

Ala Thr Leu Lys Phe Asn Val Glu Val Val Ala Ile Arg Glu Ala Thr  
                   85                   90                   95

Glu Glu Glu Leu Ala His Gly His Val His Gly Ala His Asp His His  
           100                   105                   110

His Asp His Asp His Asp His His His His His His  
           115                   120

<210> 10  
 <211> 161  
 <212> PRT  
 <213> 人工的; 具有六-His 标记的 hFKBP12-IF1

<400> 10

Met Gly Val Gln Val Glu Thr Ile Ser Pro Gly Asp Gly Arg Thr Phe  
1                   5                   10                   15

Pro Lys Arg Gly Gln Thr Cys Val Val His Tyr Thr Gly Met Leu Glu  
                  20                   25                   30

Asp Gly Lys Lys Phe Asp Ser Ser Arg Asp Arg Asn Lys Pro Phe Lys  
          35                   40                   45

Phe Met Leu Gly Lys Gln Glu Val Ile Arg Gly Trp Glu Glu Gly Val  
          50                   55                   60

Ala Gln Met Ser Val Gly Gln Arg Ala Lys Leu Thr Ile Ser Pro Asp  
65                   70                   75                   80

Tyr Ala Tyr Gly Gln Tyr Asp Glu Asn Leu Val Gln Arg Val Pro Lys  
                  85                   90                   95

Asp Val Phe Met Gly Val Asp Glu Leu Gln Val Gly Met Arg Phe Leu  
                  100                   105                   110

Ala Glu Thr Asp Gln Gly Pro Val Pro Val Glu Ile Thr Ala Val Glu  
          115                   120                   125

Asp Asp His Val Val Val Asp Gly Asn His Met Leu Ala Gly Gln Asn  
          130                   135                   140

Leu Val Phe Asp Val Glu Leu Leu Lys Leu Glu His His His His His  
145                   150                   155                   160

His

<210> 11  
 <211> 332  
 <212> PRT  
 <213> 人工的; hFKBP12-IF1 (C22A)-gp41 融合蛋白

<400> 11

Met Gly Val Gln Val Glu Thr Ile Ser Pro Gly Asp Gly Arg Thr Phe  
 1                   5                   10                   15

Pro Lys Arg Gly Gln Thr Ala Val Val His Tyr Thr Gly Met Leu Glu  
                   20                   25                   30

Asp Gly Lys Lys Phe Asp Ser Ser Arg Asp Arg Asn Lys Pro Phe Lys  
           35                   40                   45

Phe Met Leu Gly Lys Gln Glu Val Ile Arg Gly Trp Glu Glu Gly Val  
       50                   55                   60

Ala Gln Met Ser Val Gly Gln Arg Ala Lys Leu Thr Ile Ser Pro Asp  
 65                   70                   75                   80

Tyr Ala Tyr Gly Gln Tyr Asp Glu Asn Leu Val Gln Arg Val Pro Lys  
                   85                   90                   95

Asp Val Phe Met Gly Val Asp Glu Leu Gln Val Gly Met Arg Phe Leu  
           100                   105                   110

Ala Glu Thr Asp Gln Gly Pro Val Pro Val Glu Ile Thr Ala Val Glu  
           115                   120                   125

Asp Asp His Val Val Val Asp Gly Asn His Met Leu Ala Gly Gln Asn  
 130                   135                   140

Leu Val Phe Asp Val Glu Leu Leu Lys Leu Glu Gly Gly Gly Ser Gly  
145 150 155 160

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly  
165 170 175

Gly Gly Thr Leu Thr Val Gln Ala Arg Gln Leu Leu Ser Gly Ile Val  
180 185 190

Gln Gln Gln Asn Asn Glu Leu Arg Ala Ile Glu Ala Gln Gln His Leu  
195 200 205

Glu Gln Leu Thr Val Trp Gly Thr Lys Gln Leu Gln Ala Arg Glu Leu  
210 215 220

Ala Val Glu Arg Tyr Leu Lys Asp Gln Gln Leu Leu Gly Ile Trp Gly  
225 230 235 240

Cys Ser Gly Lys Leu Ile Cys Thr Thr Ala Val Pro Trp Asn Ala Ser  
245 250 255

Trp Ser Asn Lys Ser Leu Glu Gln Ile Trp Asn Asn Met Thr Trp Met  
260 265 270

Glu Trp Asp Arg Glu Ile Asn Asn Tyr Thr Ser Leu Ile His Ser Leu  
275 280 285

Ile Glu Glu Ser Gln Asn Gln Gln Glu Lys Asn Glu Gln Glu Leu Leu  
290 295 300

Glu Leu Asp Lys Trp Ala Ser Leu Trp Asn Trp Phe Asn Ile Thr Asn  
305 310 315 320

Trp Leu Trp Tyr Leu Glu His His His His His His  
 325 330

<210> 12

<211> 148

<212> PRT

<213> 大肠杆菌 (Escherichia coli)

<400> 12

Ser Glu Ser Val Gln Ser Asn Ser Ala Val Leu Val His Phe Thr Leu  
 1 5 10 15

Lys Leu Asp Asp Gly Thr Thr Ala Glu Ser Thr Arg Asn Asn Gly Lys  
 20 25 30

Pro Ala Leu Phe Arg Leu Gly Asp Ala Ser Leu Ser Glu Gly Leu Glu  
 35 40 45

Gln His Leu Leu Gly Leu Lys Val Gly Asp Lys Thr Thr Phe Ser Leu  
 50 55 60

Glu Pro Asp Ala Ala Phe Gly Val Pro Ser Pro Asp Leu Ile Gln Tyr  
 65 70 75 80

Phe Ser Arg Arg Glu Phe Met Asp Ala Gly Glu Pro Glu Ile Gly Ala  
 85 90 95

Ile Met Leu Phe Thr Ala Met Asp Gly Ser Glu Met Pro Gly Val Ile  
 100 105 110

Arg Glu Ile Asn Gly Asp Ser Ile Thr Val Asp Phe Asn His Pro Leu  
 115 120 125

Ala Gly Gln Thr Val His Phe Asp Ile Glu Val Leu Glu Ile Asp Pro  
 130 135 140

Ala Leu Glu Ala  
 145

<210> 13

<211> 161

<212> PRT

<213> 人工的; 具有六-His 标记的 hFKBP12-IF4 (S1pA 插入片段)

<400> 13

Gly Val Gln Val Glu Thr Ile Ser Pro Gly Asp Gly Arg Thr Phe Pro  
 1 5 10 15

Lys Arg Gly Gln Thr Ala Val Val His Tyr Thr Gly Met Leu Glu Asp  
 20 25 30

Gly Lys Lys Phe Asp Ser Ser Arg Asp Arg Asn Lys Pro Phe Lys Phe  
 35 40 45

Met Leu Gly Lys Gln Glu Val Ile Arg Gly Trp Glu Glu Gly Val Ala  
 50 55 60

Gln Met Ser Val Gly Gln Arg Ala Lys Leu Thr Ile Ser Pro Asp Tyr  
 65 70 75 80

Ala Tyr Gly Val Pro Ser Pro Asp Leu Ile Gln Tyr Phe Ser Arg Arg  
 85 90 95

Glu Phe Met Asp Ala Gly Glu Pro Glu Ile Gly Ala Ile Met Leu Phe  
 100 105 110

Thr Ala Met Asp Gly Ser Glu Met Pro Gly Val Ile Arg Glu Ile Asn



Glu Phe Thr Lys Ala Gly Leu Glu Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Val Met  
 100 105 110

Thr Asp Ser Gly Ile Ala Lys Ile Val Ser Val Gly Glu Ser Glu Val  
 115 120 125

Ser Leu Asp Phe Asn His Pro Leu Ala Gly Lys Thr Leu Val Phe Glu  
 130 135 140

Val Glu Val Ile Glu Val Lys Lys Ala Glu Glu Asp Ser Glu Ala  
 145 150 155

<210> 15

<211> 157

<212> PRT

<213> 人工的; hFKBP12-IF5 热球菌属插入片段

<400> 15

Gly Val Gln Val Glu Thr Ile Ser Pro Gly Asp Gly Arg Thr Phe Pro  
 1 5 10 15

Lys Arg Gly Gln Thr Cys Val Val His Tyr Thr Gly Met Leu Glu Asp  
 20 25 30

Gly Lys Lys Phe Asp Ser Ser Arg Asp Arg Asn Lys Pro Phe Lys Phe  
 35 40 45

Met Leu Gly Lys Gln Glu Val Ile Arg Gly Trp Glu Glu Gly Val Ala  
 50 55 60

Gln Met Ser Val Gly Gln Arg Ala Lys Leu Thr Ile Ser Pro Asp Tyr  
 65 70 75 80

Ala Tyr Gly Met Pro Asn Pro Glu Leu Val Ile Ser Val Pro Arg Glu  
85 90 95

Glu Phe Thr Lys Ala Gly Leu Glu Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Val Met  
100 105 110

Thr Asp Ser Gly Ile Ala Lys Ile Val Ser Val Gly Glu Ser Glu Val  
115 120 125

Ser Leu Asp Phe Asn His Pro Leu Ala Gly Lys Thr Leu Val Phe Asp  
130 135 140

Val Glu Leu Leu Lys Leu Glu His His His His His His  
145 150 155

<210> 16

<211> 432

<212> PRT

<213> 大肠杆菌 (Escherichia coli)

<400> 16

Met Gln Val Ser Val Glu Thr Thr Gln Gly Leu Gly Arg Arg Val Thr  
1 5 10 15

Ile Thr Ile Ala Ala Asp Ser Ile Glu Thr Ala Val Lys Ser Glu Leu  
20 25 30

Val Asn Val Ala Lys Lys Val Arg Ile Asp Gly Phe Arg Lys Gly Lys  
35 40 45

Val Pro Met Asn Ile Val Ala Gln Arg Tyr Gly Ala Ser Val Arg Gln  
50 55 60

Asp Val Leu Gly Asp Leu Met Ser Arg Asn Phe Ile Asp Ala Ile Ile  
65 70 75 80

Lys Glu Lys Ile Asn Pro Ala Gly Ala Pro Thr Tyr Val Pro Gly Glu  
85 90 95

Tyr Lys Leu Gly Glu Asp Phe Thr Tyr Ser Val Glu Phe Glu Val Tyr  
100 105 110

Pro Glu Val Glu Leu Gln Gly Leu Glu Ala Ile Glu Val Glu Lys Pro  
115 120 125

Ile Val Glu Val Thr Asp Ala Asp Val Asp Gly Met Leu Asp Thr Leu  
130 135 140

Arg Lys Gln Gln Ala Thr Trp Lys Glu Lys Asp Gly Ala Val Glu Ala  
145 150 155 160

Glu Asp Arg Val Thr Ile Asp Phe Thr Gly Ser Val Asp Gly Glu Glu  
165 170 175

Phe Glu Gly Gly Lys Ala Ser Asp Phe Val Leu Ala Met Gly Gln Gly  
180 185 190

Arg Met Ile Pro Gly Phe Glu Asp Gly Ile Lys Gly His Lys Ala Gly  
195 200 205

Glu Glu Phe Thr Ile Asp Val Thr Phe Pro Glu Glu Tyr His Ala Glu  
210 215 220

Asn Leu Lys Gly Lys Ala Ala Lys Phe Ala Ile Asn Leu Lys Lys Val  
225 230 235 240

Glu Glu Arg Glu Leu Pro Glu Leu Thr Ala Glu Phe Ile Lys Arg Phe  
 245 250 255

Gly Val Glu Asp Gly Ser Val Glu Gly Leu Arg Ala Glu Val Arg Lys  
 260 265 270

Asn Met Glu Arg Glu Leu Lys Ser Ala Ile Arg Asn Arg Val Lys Ser  
 275 280 285

Gln Ala Ile Glu Gly Leu Val Lys Ala Asn Asp Ile Asp Val Pro Ala  
 290 295 300

Ala Leu Ile Asp Ser Glu Ile Asp Val Leu Arg Arg Gln Ala Ala Gln  
 305 310 315 320

Arg Phe Gly Gly Asn Glu Lys Gln Ala Leu Glu Leu Pro Arg Glu Leu  
 325 330 335

Phe Glu Glu Gln Ala Lys Arg Arg Val Val Val Gly Leu Leu Leu Gly  
 340 345 350

Glu Val Ile Arg Thr Asn Glu Leu Lys Ala Asp Glu Glu Arg Val Lys  
 355 360 365

Gly Leu Ile Glu Glu Met Ala Ser Ala Tyr Glu Asp Pro Lys Glu Val  
 370 375 380

Ile Glu Phe Tyr Ser Lys Asn Lys Glu Leu Met Asp Asn Met Arg Asn  
 385 390 395 400

Val Ala Leu Glu Glu Gln Ala Val Glu Ala Val Leu Ala Lys Ala Lys  
 405 410 415

Val Thr Glu Lys Glu Thr Thr Phe Asn Glu Leu Met Asn Gln Gln Ala  
 420 425 430

<210> 17

<211> 112

<212> PRT

<213> 大肠杆菌 (Escherichia coli)

<400> 17

Met Leu Asp Thr Leu Arg Lys Gln Gln Ala Thr Trp Lys Glu Lys Asp  
 1 5 10 15

Gly Ala Val Glu Ala Glu Asp Arg Val Thr Ile Asp Phe Thr Gly Ser  
 20 25 30

Val Asp Gly Glu Glu Phe Glu Gly Gly Lys Ala Ser Asp Phe Val Leu  
 35 40 45

Ala Met Gly Gln Gly Arg Met Ile Pro Gly Phe Glu Asp Gly Ile Lys  
 50 55 60

Gly His Lys Ala Gly Glu Glu Phe Thr Ile Asp Val Thr Phe Pro Glu  
 65 70 75 80

Glu Tyr His Ala Glu Asn Leu Lys Gly Lys Ala Ala Lys Phe Ala Ile  
 85 90 95

Asn Leu Lys Lys Val Glu Glu Arg Glu Leu Pro Glu Leu Thr Ala Glu  
 100 105 110

<210> 18

<211> 164

<212> PRT

<213> 人工的; 具有 S1yD 的 IF 插入片段的引发因子



<210> 19  
 <211> 270  
 <212> PRT  
 <213> 大肠杆菌 (Escherichia coli)

<400> 19

Met Lys Ser Leu Phe Lys Val Thr Leu Leu Ala Thr Thr Met Ala Val  
 1                   5                   10                   15

Ala Leu His Ala Pro Ile Thr Phe Ala Ala Glu Ala Ala Lys Pro Ala  
                   20                   25                   30

Thr Ala Ala Asp Ser Lys Ala Ala Phe Lys Asn Asp Asp Gln Lys Ser  
           35                   40                   45

Ala Tyr Ala Leu Gly Ala Ser Leu Gly Arg Tyr Met Glu Asn Ser Leu  
       50                   55                   60

Lys Glu Gln Glu Lys Leu Gly Ile Lys Leu Asp Lys Asp Gln Leu Ile  
 65                   70                   75                   80

Ala Gly Val Gln Asp Ala Phe Ala Asp Lys Ser Lys Leu Ser Asp Gln  
                   85                   90                   95

Glu Ile Glu Gln Thr Leu Gln Ala Phe Glu Ala Arg Val Lys Ser Ser  
           100                   105                   110

Ala Gln Ala Lys Met Glu Lys Asp Ala Ala Asp Asn Glu Ala Lys Gly  
           115                   120                   125

Lys Glu Tyr Arg Glu Lys Phe Ala Lys Glu Lys Gly Val Lys Thr Ser  
       130                   135                   140

Ser Thr Gly Leu Val Tyr Gln Val Val Glu Ala Gly Lys Gly Glu Ala  
145 150 155 160

Pro Lys Asp Ser Asp Thr Val Val Val Asn Tyr Lys Gly Thr Leu Ile  
165 170 175

Asp Gly Lys Glu Phe Asp Asn Ser Tyr Thr Arg Gly Glu Pro Leu Ser  
180 185 190

Phe Arg Leu Asp Gly Val Ile Pro Gly Trp Thr Glu Gly Leu Lys Asn  
195 200 205

Ile Lys Lys Gly Gly Lys Ile Lys Leu Val Ile Pro Pro Glu Leu Ala  
210 215 220

Tyr Gly Lys Ala Gly Val Pro Gly Ile Pro Pro Asn Ser Thr Leu Val  
225 230 235 240

Phe Asp Val Glu Leu Leu Asp Val Lys Pro Ala Pro Lys Ala Asp Ala  
245 250 255

Lys Pro Glu Ala Asp Ala Lys Ala Ala Asp Ser Ala Lys Lys  
260 265 270

<210> 20

<211> 114

<212> PRT

<213> 大肠杆菌 (Escherichia coli)

<400> 20

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

Asp Ser Asp Thr Val Val Val Asn Tyr Lys Gly Thr Leu Ile Asp Gly  
 20 25 30

Lys Glu Phe Asp Asn Ser Tyr Thr Arg Gly Glu Pro Leu Ser Phe Arg  
 35 40 45

Leu Asp Gly Val Ile Pro Gly Trp Thr Glu Gly Leu Lys Asn Ile Lys  
 50 55 60

Lys Gly Gly Lys Ile Lys Leu Val Ile Pro Pro Glu Leu Ala Tyr Gly  
 65 70 75 80

Lys Ala Gly Val Pro Gly Ile Pro Pro Asn Ser Thr Leu Val Phe Asp  
 85 90 95

Val Glu Leu Leu Asp Val Lys Pro Ala Pro Leu Glu His His His His  
 100 105 110

His His

<210> 21

<211> 162

<212> PRT

<213> 人工的; 具有 SlyD 的 IF-插入片段的 FkpA

<400> 21

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

Asp Ser Asp Thr Val Val Val Asn Tyr Lys Gly Thr Leu Ile Asp Gly  
 20 25 30

Lys Glu Phe Asp Asn Ser Tyr Thr Arg Gly Glu Pro Leu Ser Phe Arg



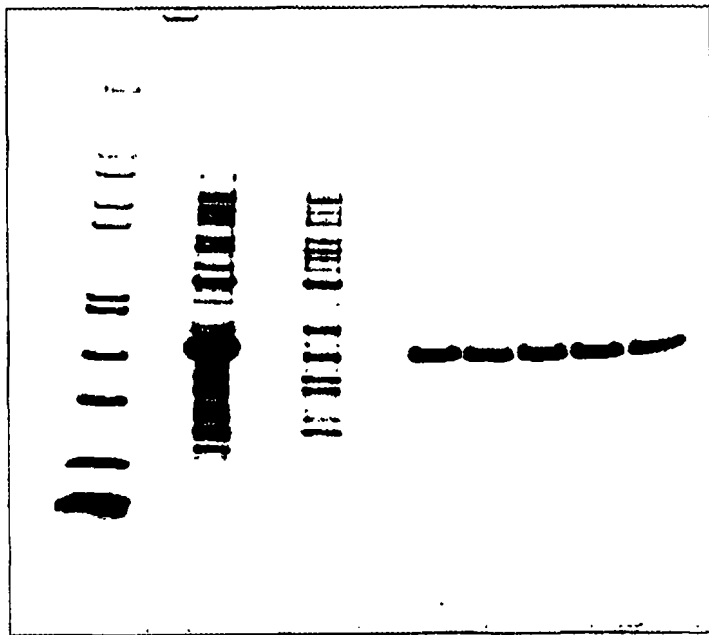


图 1/11

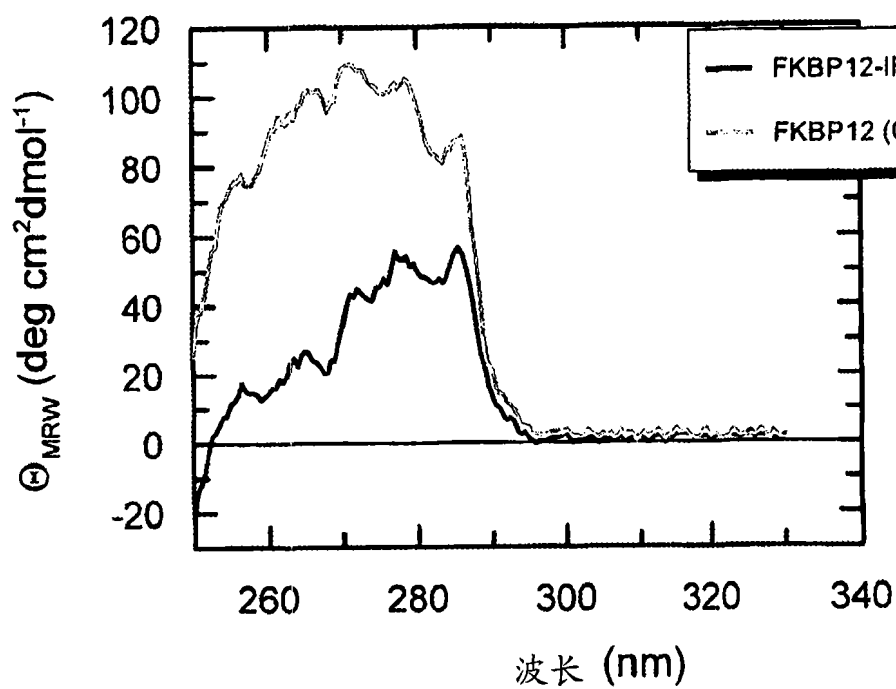


图 2/11

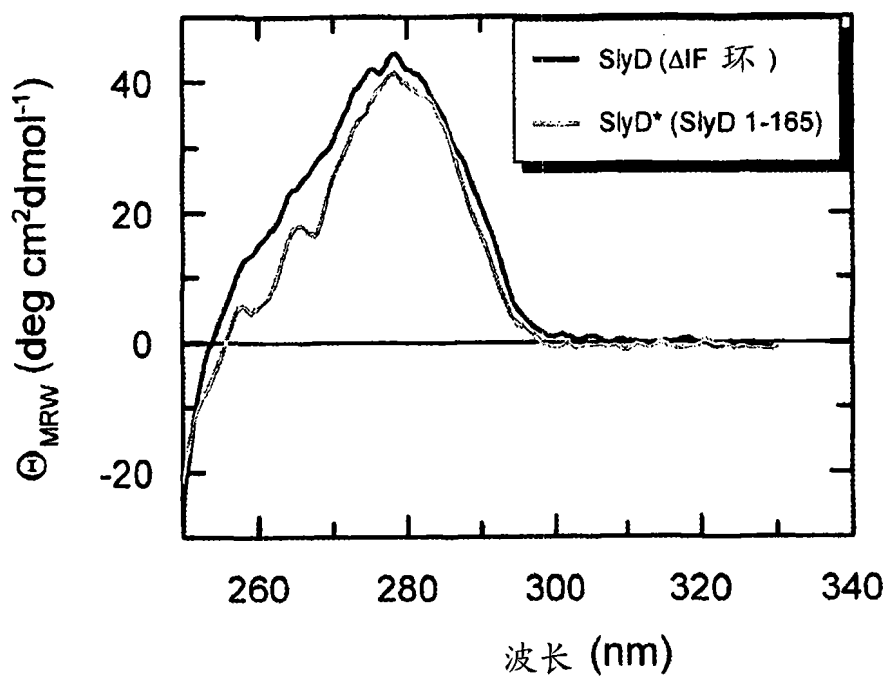
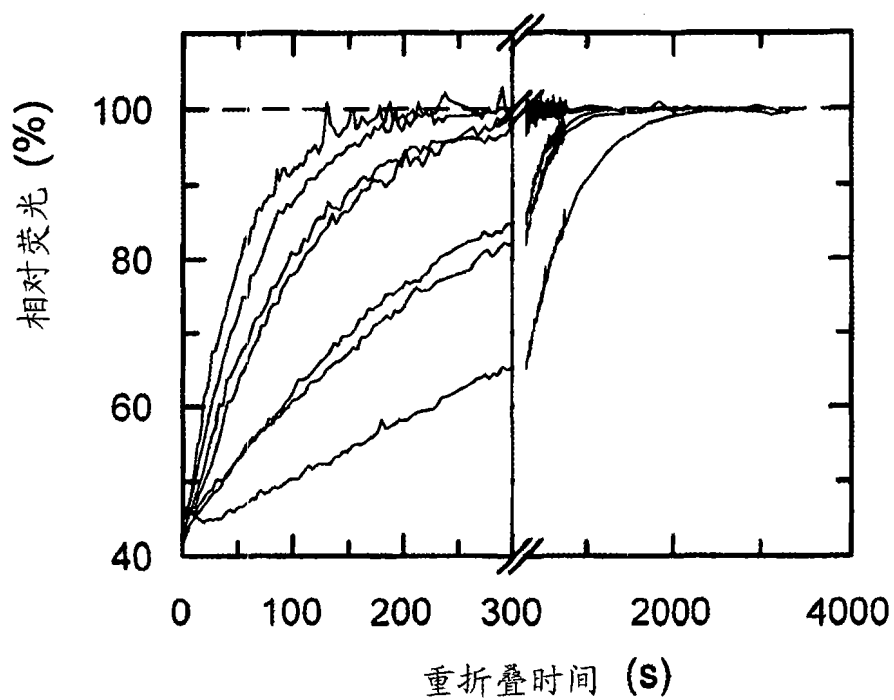
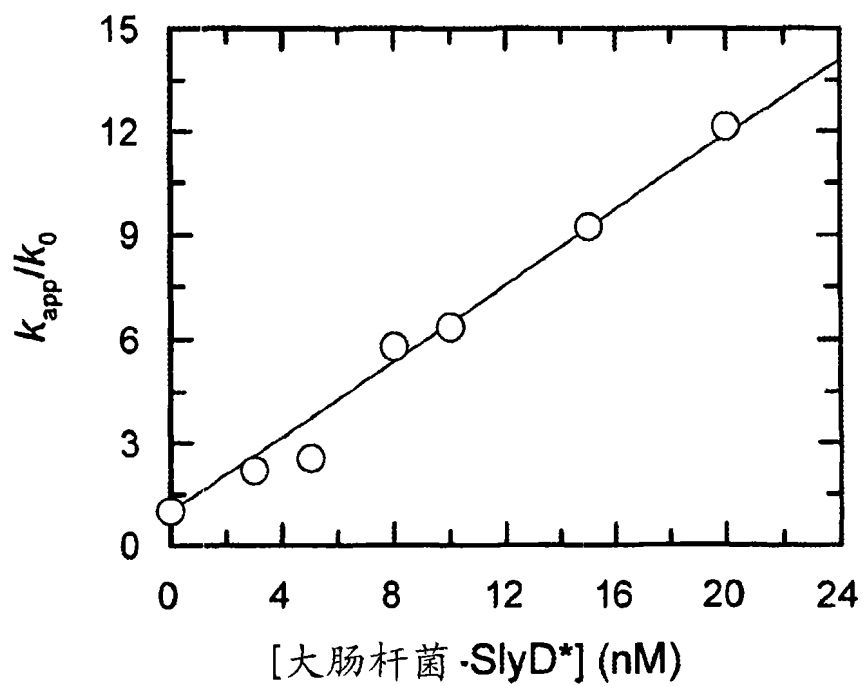


图 3/11

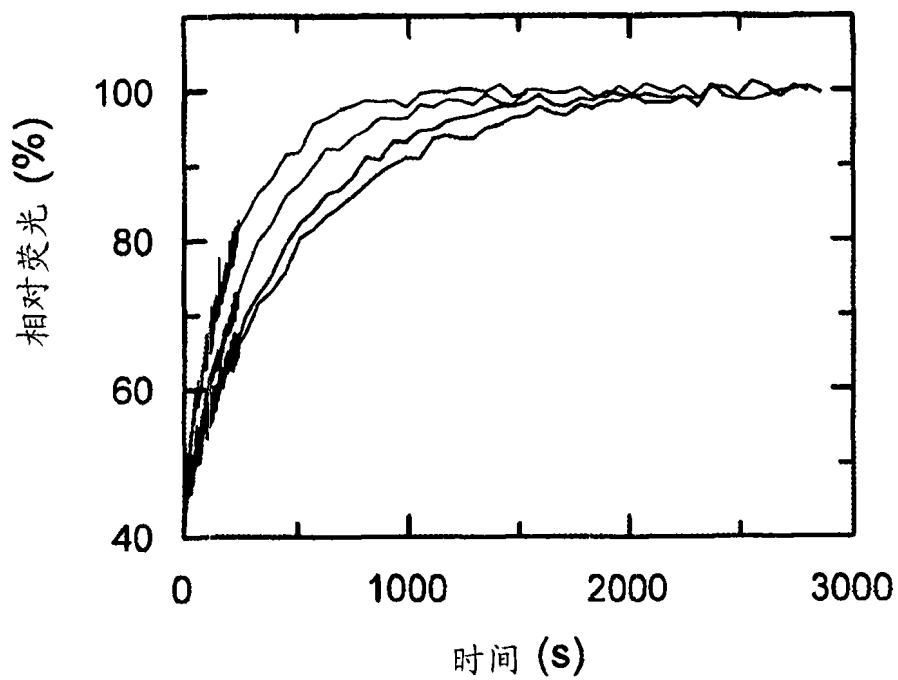


A

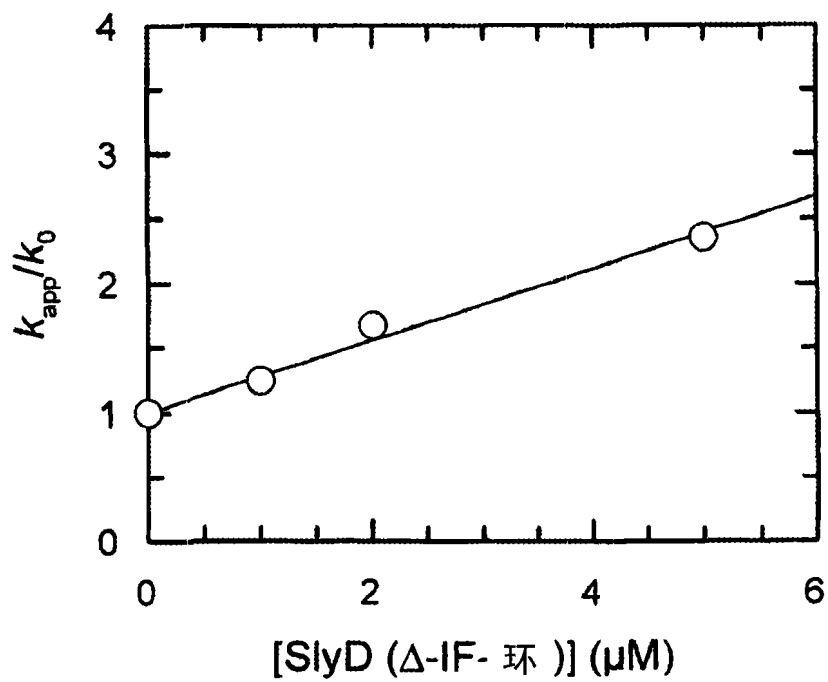


B

图 4/11

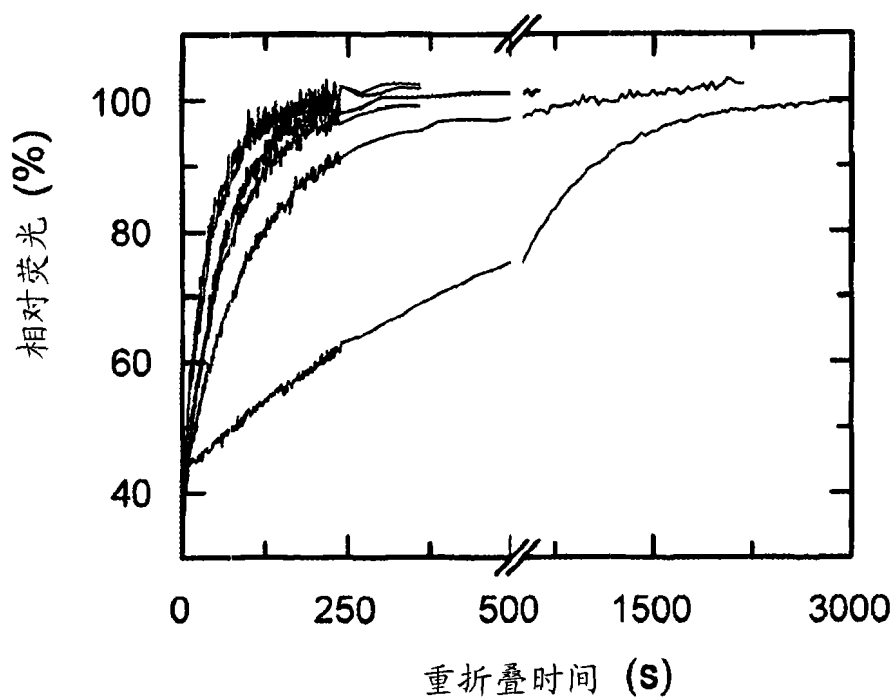


A

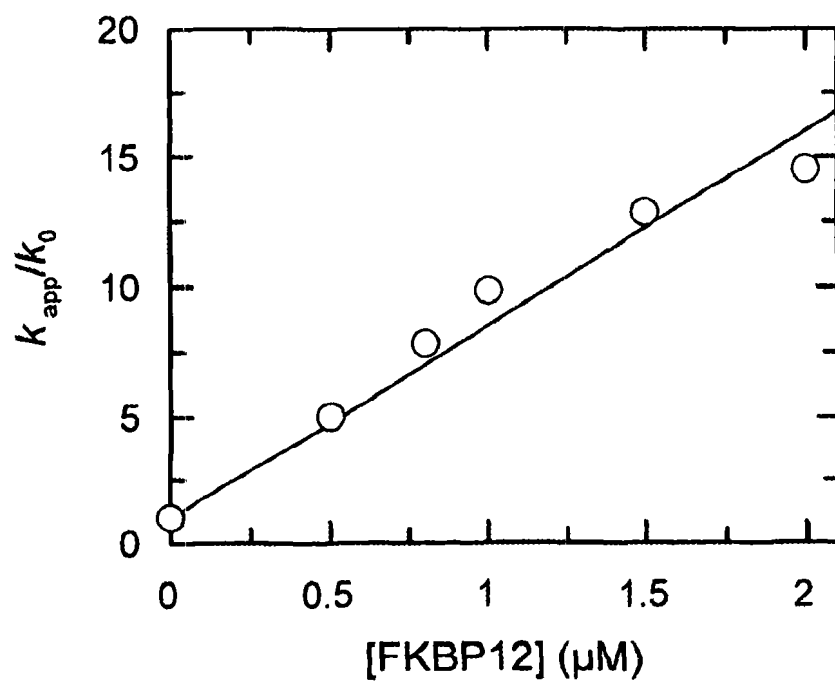


B

图 5/11

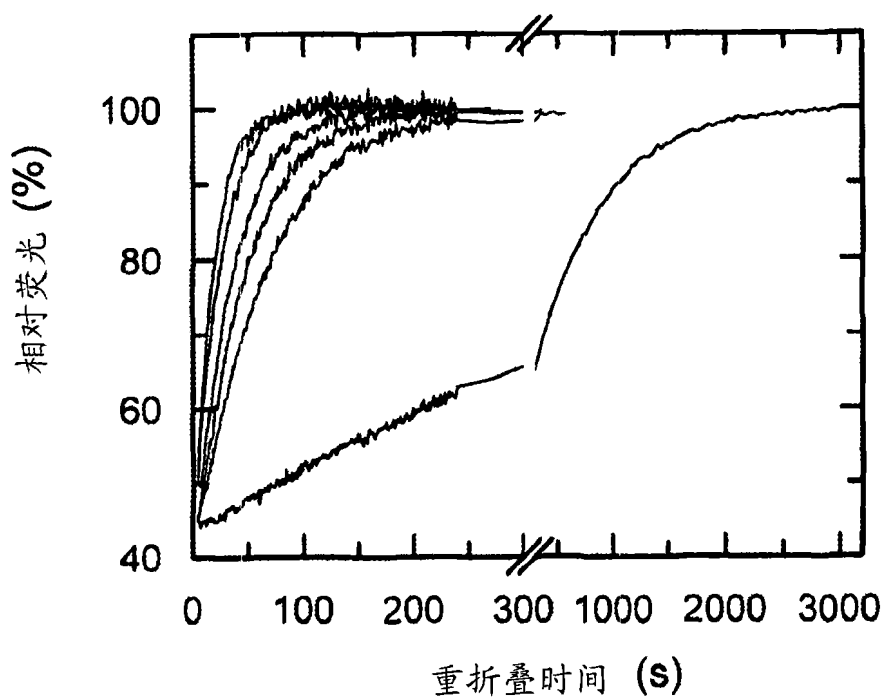


A

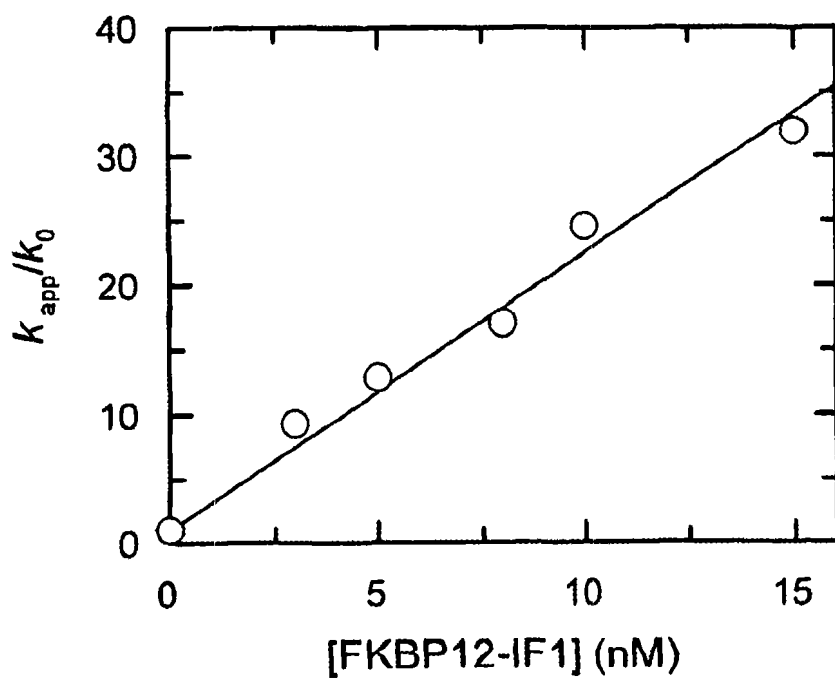


B

图 6/11



A



B

图 7/11

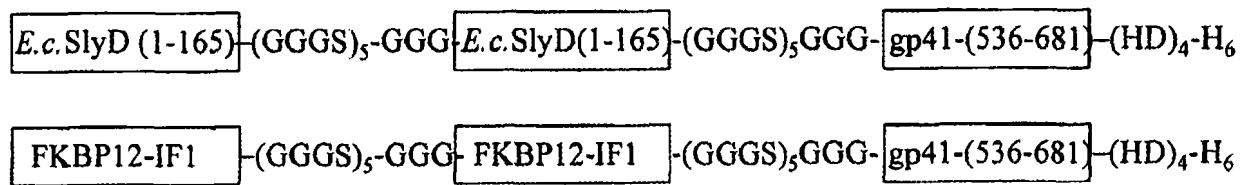


图 8/11

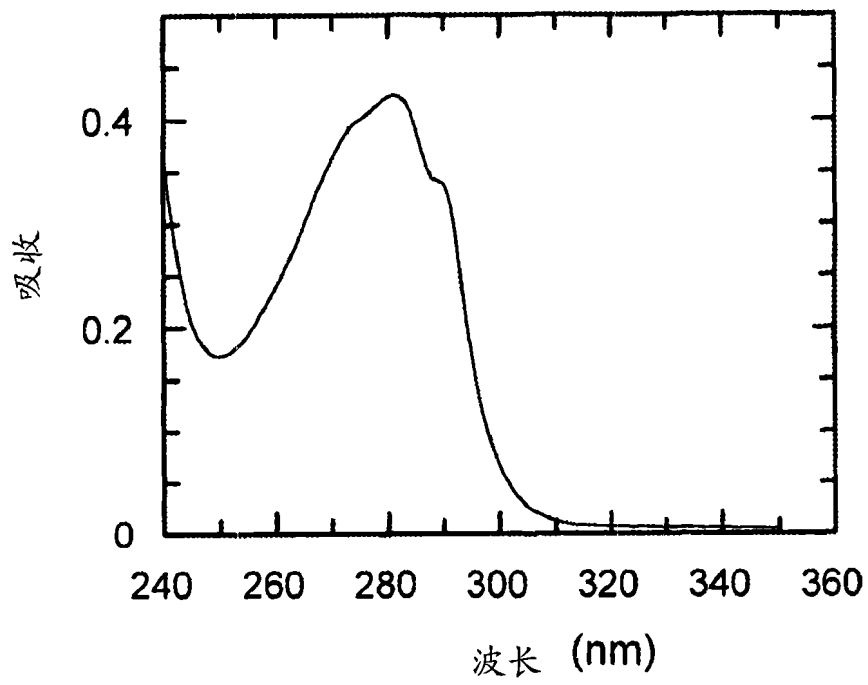
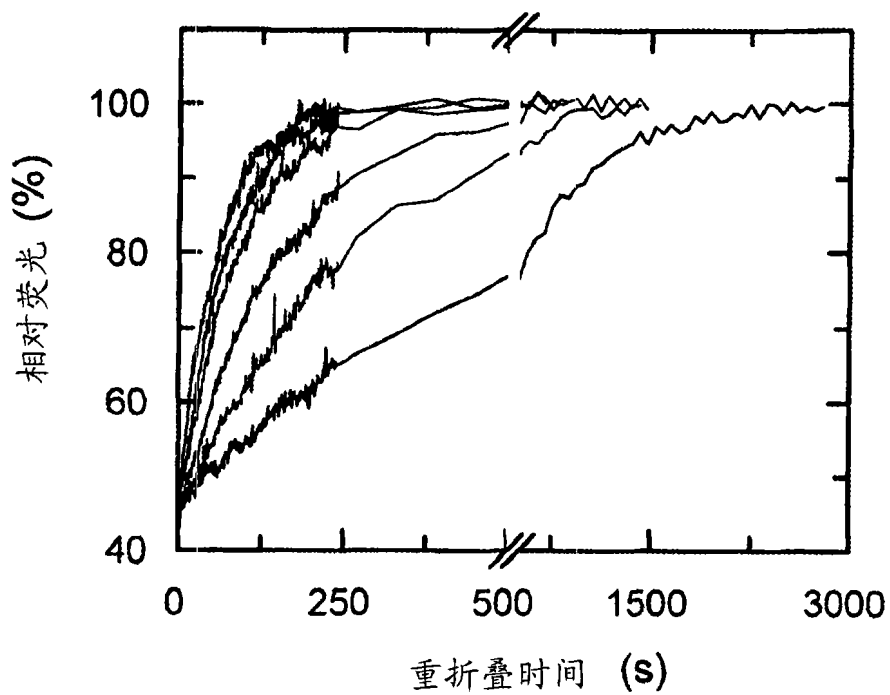
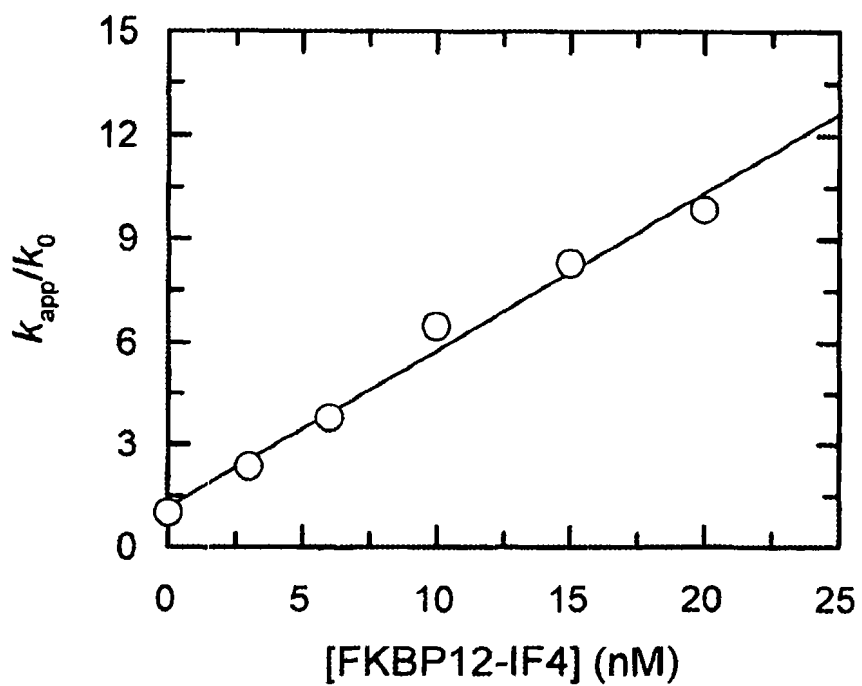


图 9



A



B

图 10/11

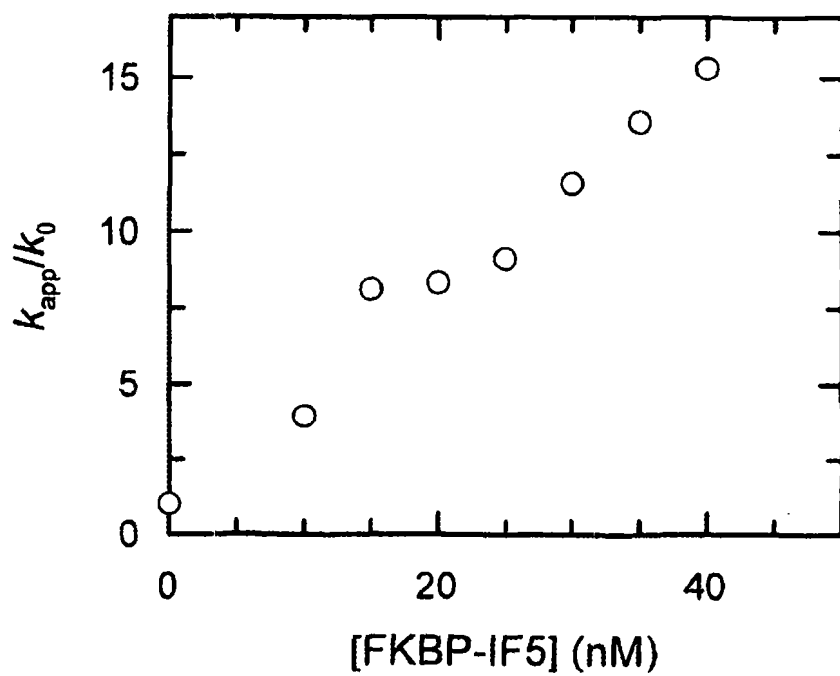
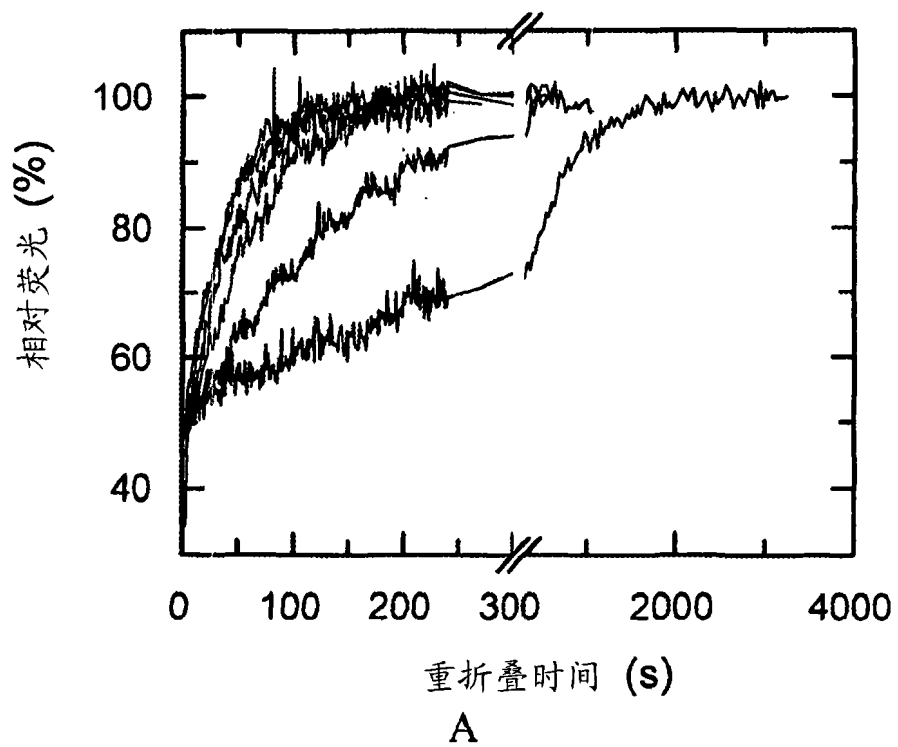


图 11/11

专利名称(译)	具有卓越的伴侣和折叠活性的嵌合融合蛋白		
公开(公告)号	<a href="#">CN101351550A</a>	公开(公告)日	2009-01-21
申请号	CN200680050180.8	申请日	2006-12-29
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	C肖尔茨 P沙尔斯米特 U斯米特 E法茨		
发明人	C·肖尔茨 P·沙尔斯米特 U·斯米特 E·法茨		
IPC分类号	C12N9/90 C12N15/62 C12N15/61 C07K19/00 C07K14/16 A61K38/00 G01N33/53		
CPC分类号	C12N9/90 C07K2319/35		
代理人(译)	付磊		
优先权	2006009106 2006-05-03 EP 2006000056 2006-01-03 EP		
其他公开文献	CN101351550B		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明公开了与野生型蛋白伴侣相比具有卓越的伴侣和折叠活性的嵌合融合蛋白的克隆、表达和用途。本发明涉及由含有编码非 - 人伴侣蛋白多肽结合区段的核苷酸序列和编码FK506结合蛋白(FKBP)或FK506 - 结合 - 蛋白 - 样结构域(FKBP - 样结构域)的核苷酸序列的重组DNA分子编码的嵌合融合蛋白。具体地, 本发明涉及由含有编码非 - 人伴侣蛋白多肽结合区段的核苷酸序列和编码人FKBP型肽基脯氨酸顺反异构酶(PPlase)的核苷酸序列的重组DNA分子编码的嵌合融合蛋白, 生产这些嵌合融合蛋白的方法以及它们在其它蛋白质的生产以及在疫苗或药物的生产方法中作为折叠辅助物, 以及作为进行免疫测定的折叠辅助物的用途。

