



(12) 发明专利申请



(10) 申请公布号 CN 112639099 A

(43) 申请公布日 2021.04.09

(21) 申请号 201980055719.6

(22) 申请日 2019.08.23

(30) 优先权数据

2018-157620 2018.08.24 JP

2019-073529 2019.04.08 JP

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2021.02.24

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/JP2019/033138 2019.08.23

(87) PCT国际申请的公布数据

W02020/040307 JA 2020.02.27

(71) 申请人 JSR株式会社

地址 日本东京都

申请人 JSR微有限公司 JSR微公司

(72) 发明人 芳贺智亮 市居敬 小野木俊介

中村聪 本田俊成 上出伦敬

(74) 专利代理机构 北京集佳知识产权代理有限公司 11227

代理人 金世煜 李书慧

(51) Int.Cl.

C12N 15/31 (2006.01)

C07K 1/22 (2006.01)

C07K 14/315 (2006.01)

C07K 16/00 (2006.01)

C07K 17/00 (2006.01)

C12N 1/15 (2006.01)

C12N 1/19 (2006.01)

C12N 1/21 (2006.01)

C12N 5/10 (2006.01)

C12N 15/10 (2006.01)

C12N 15/63 (2006.01)

C12P 21/02 (2006.01)

G01N 33/53 (2006.01)

G01N 33/566 (2006.01)

权利要求书5页 说明书32页

序列表25页

(54) 发明名称

免疫球蛋白结合蛋白质以及使用其的亲载体

(57) 摘要

本发明提供耐碱性提升的亲载体。一种亲和载体,其包含:含有变异多肽链的免疫球蛋白结合蛋白质,和键合该免疫球蛋白结合蛋白质的固相载体。该变异多肽链是由与序列号1~6和57~62中的任一个所示的氨基酸序列具有至少85%同源性且具有规定的变异的氨基酸序列构成,具有免疫球蛋白结合活性。

1. 一种免疫球蛋白结合蛋白质,其包含多肽链,该多肽链是由与序列号1~6和57~62中的任一氨基酸序列具有至少85%同源性且具有选自以下(a)~(f)中的至少1种变异的氨基酸序列构成:

(a) 选自相当于序列号3的氨基酸序列的3位、6位、11位的位置中的至少一个位置的氨基酸残基替换为其它氨基酸残基或缺失、或在该位置之前或之后的位置插入其它氨基酸残基;

(b) 选自相当于序列号3的氨基酸序列的24位和25位的位置中的至少一个位置的氨基酸残基替换为其它氨基酸残基或缺失、或在该位置之前或之后的位置插入其它氨基酸残基;

(c) 相当于序列号3的氨基酸序列的39位的位置的氨基酸残基替换为其它氨基酸残基或缺失、或在该位置之前或之后的位置插入其它氨基酸残基;

(d) 相当于序列号3的氨基酸序列的46位的位置的氨基酸残基替换为其它氨基酸残基或缺失、或在该位置之前或之后的位置插入其它氨基酸残基;

(e) 选自相当于序列号3的氨基酸序列的4位、49位和58位的位置中的至少一个位置的氨基酸残基替换为其它氨基酸残基或缺失、或在该位置之前或之后的位置插入其它氨基酸残基;以及

(f) 相当于序列号3的氨基酸序列的23位的位置的氨基酸残基替换为其它氨基酸残基或缺失、或在该位置之前或之后的位置插入其它氨基酸残基。

2. 如权利要求1所述的免疫球蛋白结合蛋白质,其中,所述多肽链是由与序列号3的氨基酸序列具有至少85%同源性且具有选自所述(a)~(f)中的至少1种变异的氨基酸序列构成的多肽链。

3. 如权利要求1或2所述的免疫球蛋白结合蛋白质,其中,选自所述(a)~(f)中的至少1种变异是选自下列变异中的至少1种变异:

(a₁) 在相当于序列号3的氨基酸序列的3位的位置由Asn替换为Gln;

(a₂) 在相当于序列号3的氨基酸序列的3位的位置由Asn替换为Ala;

(a₃) 在相当于序列号3的氨基酸序列的3位的位置由Asn替换为Asp;

(a₄) 在相当于序列号3的氨基酸序列的6位的位置由Asn替换为Gln;

(a₅) 在相当于序列号3的氨基酸序列的6位的位置由Asn替换为Ala;

(a₆) 在相当于序列号3的氨基酸序列的6位的位置由Asn替换为Asp;

(a₇) 在相当于序列号3的氨基酸序列的11位的位置由Asn替换为Gln;

(a₈) 在相当于序列号3的氨基酸序列的11位的位置由Asn替换为Ala;

(a₉) 在相当于序列号3的氨基酸序列的11位的位置由Asn替换为Arg;

(a₁₀) 在相当于序列号3的氨基酸序列的11位的位置由Asn替换为Asp;

(a₁₁) 在相当于序列号3的氨基酸序列的11位的位置由Asn替换为Cys;

(a₁₂) 在相当于序列号3的氨基酸序列的11位的位置由Asn替换为Glu;

(a₁₃) 在相当于序列号3的氨基酸序列的11位的位置由Asn替换为His;

(a₁₄) 在相当于序列号3的氨基酸序列的11位的位置由Asn替换为Ile;

(a₁₅) 在相当于序列号3的氨基酸序列的11位的位置由Asn替换为Leu;

(a₁₆) 在相当于序列号3的氨基酸序列的11位的位置由Asn替换为Lys;

- (a₁₇) 在相当于序列号3的氨基酸序列的11位的位置由Asn替换为Met;
- (a₁₈) 在相当于序列号3的氨基酸序列的11位的位置由Asn替换为Phe;
- (a₁₉) 在相当于序列号3的氨基酸序列的11位的位置由Asn替换为Thr;
- (a₂₀) 在相当于序列号3的氨基酸序列的11位的位置由Asn替换为Trp;
- (a₂₁) 在相当于序列号3的氨基酸序列的11位的位置由Asn替换为Tyr;
- (a₂₂) 在相当于序列号3的氨基酸序列的11位的位置由Asn替换为Val;
- (b₁) 在相当于序列号3的氨基酸序列的24位的位置由Glu替换为Asp;
- (b₂) 在相当于序列号3的氨基酸序列的25位的位置由Glu替换为Asp;
- (c₁) 在相当于序列号3的氨基酸序列的39位的位置由Ser替换为Lys;
- (c₂) 在相当于序列号3的氨基酸序列的39位的位置由Ser替换为Arg;
- (d₁) 在相当于序列号3的氨基酸序列的46位的位置由Ala替换为Asp;
- (d₂) 在相当于序列号3的氨基酸序列的46位的位置由Ala替换为Glu;
- (d₃) 在相当于序列号3的氨基酸序列的46位的位置由Ala替换为Lys;
- (d₄) 在相当于序列号3的氨基酸序列的46位的位置由Ala替换为Arg;
- (e₁) 在相当于序列号3的氨基酸序列的4位的位置Lys缺失;
- (e₂) 在相当于序列号3的氨基酸序列的49位的位置由Lys替换为Arg;
- (e₃) 在相当于序列号3的氨基酸序列的58位的位置Lys缺失;
- (e₄) 在相当于序列号3的氨基酸序列的58位的位置由Lys替换为Arg;
- (f₁) 在相当于序列号3的氨基酸序列的23位的位置由Thr替换为Arg;
- (f₂) 在相当于序列号3的氨基酸序列的23位的位置由Thr替换为Leu; 以及
- (f₃) 在相当于序列号3的氨基酸序列的23位的位置由Thr替换为Ser。

4. 如权利要求3所述的免疫球蛋白结合蛋白质, 其中, 选自所述(a) ~ (f) 中的至少1种变异是下列变异中的任1种:

- (a₁) 在相当于序列号3的氨基酸序列的3位的位置由Asn替换为Gln;
- (a₂) 在相当于序列号3的氨基酸序列的3位的位置由Asn替换为Ala;
- (a₃) 在相当于序列号3的氨基酸序列的3位的位置由Asn替换为Asp;
- (a₄) 在相当于序列号3的氨基酸序列的6位的位置由Asn替换为Gln;
- (a₅) 在相当于序列号3的氨基酸序列的6位的位置由Asn替换为Ala;
- (a₆) 在相当于序列号3的氨基酸序列的6位的位置由Asn替换为Asp;
- (a₇) 在相当于序列号3的氨基酸序列的11位的位置由Asn替换为Gln;
- (a₈) 在相当于序列号3的氨基酸序列的11位的位置由Asn替换为Ala;
- (a₉) 在相当于序列号3的氨基酸序列的11位的位置由Asn替换为Arg;
- (a₁₀) 在相当于序列号3的氨基酸序列的11位的位置由Asn替换为Asp;
- (a₁₁) 在相当于序列号3的氨基酸序列的11位的位置由Asn替换为Cys;
- (a₁₂) 在相当于序列号3的氨基酸序列的11位的位置由Asn替换为Glu;
- (a₁₃) 在相当于序列号3的氨基酸序列的11位的位置由Asn替换为His;
- (a₁₄) 在相当于序列号3的氨基酸序列的11位的位置由Asn替换为Ile;
- (a₁₅) 在相当于序列号3的氨基酸序列的11位的位置由Asn替换为Leu;
- (a₁₆) 在相当于序列号3的氨基酸序列的11位的位置由Asn替换为Lys;

- (a₁₇) 在相当于序列号3的氨基酸序列的11位的位置由Asn替换为Met;
- (a₁₈) 在相当于序列号3的氨基酸序列的11位的位置由Asn替换为Phe;
- (a₁₉) 在相当于序列号3的氨基酸序列的11位的位置由Asn替换为Thr;
- (a₂₀) 在相当于序列号3的氨基酸序列的11位的位置由Asn替换为Trp;
- (a₂₁) 在相当于序列号3的氨基酸序列的11位的位置由Asn替换为Tyr;
- (a₂₂) 在相当于序列号3的氨基酸序列的11位的位置由Asn替换为Val;
- (a₂₃) 在相当于序列号3的氨基酸序列的3位、6位和11位的位置由Asn替换为Gln;
- (a₂₄) 在相当于序列号3的氨基酸序列的3位的位置由Asn替换为Ala,以及在相当于11位的位置由Asn替换为Gln;
- (a₂₅) 在相当于序列号3的氨基酸序列的3位的位置由Asn替换为Asp,以及在相当于11位的位置由Asn替换为Gln;
- (a₂₆) 在相当于序列号3的氨基酸序列的6位的位置由Asn替换为Asp,以及在相当于11位的位置由Asn替换为Gln;
- (a₂₇) 在相当于序列号3的氨基酸序列的3位的位置由Asn替换为Asp,在相当于6位的位置由Asn替换为Asp,以及在相当于11位的位置由Asn替换为Gln;
- (a₂₈) 在相当于序列号3的氨基酸序列的3位的位置由Asn替换为Ala,在相当于6位的位置由Asn替换为Asp,以及在相当于11位的位置由Asn替换为Gln;
- (b₁) 在相当于序列号3的氨基酸序列的24位的位置由Glu替换为Asp;
- (b₂) 在相当于序列号3的氨基酸序列的25位的位置由Glu替换为Asp;
- (c₁) 在相当于序列号3的氨基酸序列的39位的位置由Ser替换为Lys;
- (c₂) 在相当于序列号3的氨基酸序列的39位的位置由Ser替换为Arg;
- (d₁) 在相当于序列号3的氨基酸序列的46位的位置由Ala替换为Asp;
- (d₂) 在相当于序列号3的氨基酸序列的46位的位置由Ala替换为Glu;
- (d₃) 在相当于序列号3的氨基酸序列的46位的位置由Ala替换为Lys;
- (d₄) 在相当于序列号3的氨基酸序列的46位的位置由Ala替换为Arg;
- (e₁) 在相当于序列号3的氨基酸序列的4位的位置Lys缺失;
- (e₂) 在相当于序列号3的氨基酸序列的49位的位置由Lys替换为Arg;
- (e₃) 在相当于序列号3的氨基酸序列的58位的位置Lys缺失;
- (e₄) 在相当于序列号3的氨基酸序列的58位的位置由Lys替换为Arg;
- (f₁) 在相当于序列号3的氨基酸序列的23位的位置由Thr替换为Arg;
- (f₂) 在相当于序列号3的氨基酸序列的23位的位置由Thr替换为Leu;
- (f₃) 在相当于序列号3的氨基酸序列的23位的位置由Thr替换为Ser;
- (g₁) (a₇) 与 (f₁) 的组合;
- (g₂) (a₇) 与 (f₂) 的组合;
- (g₃) (a₇) 与 (f₃) 的组合;
- (g₄) (a₇) 与 (e₂) 的组合;
- (g₅) (a₇) 与 (e₄) 的组合;
- (g₆) (a₇) 与 (f₁) 与 (e₂) 的组合;
- (g₇) (a₇) 与 (f₂) 与 (e₂) 的组合;以及

(g₈) (a₇) 与 (f₃) 与 (e₂) 的组合。

5. 如权利要求1~4中任一项所述的免疫球蛋白结合蛋白质, 其中, 选自所述(a)~(f)中的至少1种变异包括相当于序列号3的氨基酸序列的3位、6位、11位、24位、25位、39位、46位、4位、49位、58位以及23位中的至少二个位置的位置的氨基酸残基替换为其它氨基酸残基或缺失、或在该位置之前或之后的位置插入其它氨基酸残基。

6. 如权利要求5所述的免疫球蛋白结合蛋白质, 其中, 所述至少1种变异是所述(a₂₃)~(a₂₈)中的任一个, 或者是所述(a₁)~(a₂₈)中的任一个与所述(b₁)~(f₃)中的任一个以上的组合。

7. 如权利要求1~6中任一项所述的免疫球蛋白结合蛋白质, 其中, 所述氨基酸序列的同源性至少为90%。

8. 如权利要求1~7中任一项所述的免疫球蛋白结合蛋白质, 其中, 所述多肽链进一步包含相当于序列号3的氨基酸序列的1位的位置的氨基酸残基替换为Val, 和/或相当于序列号3的氨基酸序列的29位的位置的氨基酸残基替换为Ala。

9. 如权利要求1~8中任一项所述的免疫球蛋白结合蛋白质, 其中, 包含2个以上的所述多肽链。

10. 一种多核苷酸, 其编码权利要求1~9中任一项所述的免疫球蛋白结合蛋白质。

11. 一种载体, 其包含权利要求10所述的多核苷酸。

12. 一种转化体, 其包含权利要求11所述的载体。

13. 一种亲和载体, 其包含固相载体以及键合于该固相载体的权利要求1~9中任一项所述的免疫球蛋白结合蛋白质。

14. 一种色谱柱, 其包含权利要求13的亲和载体。

15. 一种抗体或其片段的分离方法, 使用权利要求13所述的亲和载体或权利要求14所述的色谱柱。

16. 一种免疫球蛋白结合蛋白质的制造方法, 包括: 在权利要求12所述的转化体或无细胞蛋白质合成系统中使权利要求1~9中任一项所述的免疫球蛋白结合蛋白质进行表达, 或者将该免疫球蛋白结合蛋白质进行化学合成。

17. 一种变异多肽链的制造方法, 包括: 对由序列号1~6和57~62中的任一氨基酸序列或与这些氨基酸序列具有至少85%同源性的氨基酸序列构成且具有免疫球蛋白结合活性的多肽链, 导入选自以下(a)~(f)中的至少1种变异,

(a) 选自相当于序列号3的氨基酸序列的3位、6位、11位的位置中的至少一个位置的氨基酸残基替换为其它氨基酸残基或缺失, 或在该位置之前或之后的位置插入其它氨基酸残基;

(b) 选自相当于序列号3的氨基酸序列的24位和25位的位置中的至少一个位置的氨基酸残基替换为其它氨基酸残基或缺失, 或在该位置之前或之后的位置插入其它氨基酸残基;

(c) 相当于序列号3的氨基酸序列的39位的位置的氨基酸残基替换为其它氨基酸残基或缺失, 或在该位置之前或之后的位置插入其它氨基酸残基;

(d) 相当于序列号3的氨基酸序列的46位的位置的氨基酸残基替换为其它氨基酸残基或缺失, 或在该位置之前或之后的位置插入其它氨基酸残基;

(e) 选自相当于序列号3的氨基酸序列的4位、49位以及58位的位置中的至少一个位置的氨基酸残基替换为其它氨基酸残基或缺失,或在该位置之前或之后的位置插入其它氨基酸残基;以及

(f) 相当于序列号3的氨基酸序列的23位的位置的氨基酸残基替换为其它氨基酸残基或缺失,或在该位置之前或之后的位置插入其它氨基酸残基。

18. 一种亲和载体的制造方法,包括:将权利要求1~9中任一项所述的免疫球蛋白结合蛋白质固定于固相载体。

免疫球蛋白结合蛋白质以及使用其的亲为载体

技术领域

[0001] 本发明涉及免疫球蛋白结合蛋白质、使用其的亲为载体、以及使用该亲和载体的抗体的分离方法。

背景技术

[0002] 抗体在近年来已被广泛用于研究用试剂、抗体医药等。这些试剂或医药用的抗体一般是经过亲和色谱的精制而制造。在抗体的亲和精制中,使用了将属于与免疫球蛋白进行特异性结合的物质配体加以固定化而成的色谱柱,在该配体中,一般使用蛋白A等免疫球蛋白结合蛋白质。

[0003] 蛋白A为来自革兰氏阳性细菌金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*) 的细胞壁蛋白质。蛋白A具有被称为E结构域、D结构域、A结构域、B结构域以及C结构域的5个免疫球蛋白结合结构域,各结构域可单独键合于免疫球蛋白。连同蛋白A的天然型免疫球蛋白结合结构域,对这些施加蛋白质工程学改造而得的改造免疫球蛋白结合结构域也同样已被用作亲和精制用的配体。

[0004] 抗体的亲和精制用色谱柱通常是以碱性溶液清洗并重复使用。但是,由于蛋白A的天然型免疫球蛋白结合结构域耐碱性较低,因而将该天然型结构域加以固定化而得的亲和精制用色谱柱在重复使用期间,抗体结合性会大幅降低。于是,已开发出使耐碱性提升的改造蛋白A结构域。例如,广泛已知蛋白A的免疫球蛋白结合结构域通过将其氨基酸序列的29位的Gly替换成Ala,化学稳定性提升(非专利文献1)。在专利文献1中,已揭示了通过将免疫球蛋白结合结构域的氨基酸序列中的Asn替换成Gln以及Cys以外的氨基酸,或者使其发生缺失,从而使该结构域的耐碱性提升的方法。再者,在专利文献2中,已揭示了通过在蛋白A的C、B或Z结构域中使自N末端起以位置1或2开始的3个以上连续的氨基酸发生缺失,从而使该结构域的耐碱性提升的方法。

[0005] 现有技术文献

[0006] 专利文献

[0007] 专利文献1:国际公开公报第2000/023580号

[0008] 专利文献2:国际公开公报第2013/109302号

[0009] 非专利文献

[0010] 非专利文献1:Journal of Chromatography B,2007,848(1):40-47

发明内容

[0011] 需要耐碱性更加提升的亲为载体。本发明提供含有来自免疫球蛋白结合结构域的耐碱性提升的变异多肽链的免疫球蛋白结合蛋白质,以及使用其的亲为载体。此外,本发明是提供使用该亲和载体的抗体的分离方法。

[0012] 本发明提供以下技术方案。

[0013] [1]一种免疫球蛋白结合蛋白质,其包含多肽链,该多肽链是由与序列号1~6和57

～62中的任一氨基酸序列具有至少85%同源性且具有选自以下(a)～(f)中的至少1种变异的氨基酸序列构成：

[0014] (a) 选自相当于序列号3的氨基酸序列的3位、6位、11位的位置中的至少一个位置的氨基酸残基替换为其它氨基酸残基或缺失、或在该位置之前或之后的位置插入其它氨基酸残基；

[0015] (b) 选自相当于序列号3的氨基酸序列的24位和25位的位置中的至少一个位置的氨基酸残基替换为其它氨基酸残基或缺失、或在该位置之前或之后的位置插入其它氨基酸残基；

[0016] (c) 相当于序列号3的氨基酸序列的39位的位置的氨基酸残基替换为其它氨基酸残基或缺失、或在该位置之前或之后的位置插入其它氨基酸残基；

[0017] (d) 相当于序列号3的氨基酸序列的46位的位置的氨基酸残基替换为其它氨基酸残基或缺失、或在该位置之前或之后的位置插入其它氨基酸残基；

[0018] (e) 选自相当于序列号3的氨基酸序列的4位、49位和58位的位置中的至少一个位置的氨基酸残基替换为其它氨基酸残基或缺失、或在该位置之前或之后的位置插入其它氨基酸残基；以及

[0019] (f) 相当于序列号3的氨基酸序列的23位的位置的氨基酸残基替换为其它氨基酸残基或缺失、或在该位置之前或之后的位置插入其它氨基酸残基。

[0020] [2]如[1]所述的免疫球蛋白结合蛋白质，其中，所述多肽链是由与序列号3的氨基酸序列具有至少85%同源性且具有选自所述(a)～(f)中的至少1种变异的氨基酸序列构成的多肽链。

[0021] [3]如[1]或[2]所述的免疫球蛋白结合蛋白质，其中，选自所述(a)～(f)中的至少1种变异是选自下列变异中的至少1种变异：

[0022] (a₁) 在相当于序列号3的氨基酸序列的3位的位置由Asn替换为Gln；

[0023] (a₂) 在相当于序列号3的氨基酸序列的3位的位置由Asn替换为Ala；

[0024] (a₃) 在相当于序列号3的氨基酸序列的3位的位置由Asn替换为Asp；

[0025] (a₄) 在相当于序列号3的氨基酸序列的6位的位置由Asn替换为Gln；

[0026] (a₅) 在相当于序列号3的氨基酸序列的6位的位置由Asn替换为Ala；

[0027] (a₆) 在相当于序列号3的氨基酸序列的6位的位置由Asn替换为Asp；

[0028] (a₇) 在相当于序列号3的氨基酸序列的11位的位置由Asn替换为Gln；

[0029] (a₈) 在相当于序列号3的氨基酸序列的11位的位置由Asn替换为Ala；

[0030] (a₉) 在相当于序列号3的氨基酸序列的11位的位置由Asn替换为Arg；

[0031] (a₁₀) 在相当于序列号3的氨基酸序列的11位的位置由Asn替换为Asp；

[0032] (a₁₁) 在相当于序列号3的氨基酸序列的11位的位置由Asn替换为Cys；

[0033] (a₁₂) 在相当于序列号3的氨基酸序列的11位的位置由Asn替换为Glu；

[0034] (a₁₃) 在相当于序列号3的氨基酸序列的11位的位置由Asn替换为His；

[0035] (a₁₄) 在相当于序列号3的氨基酸序列的11位的位置由Asn替换为Ile；

[0036] (a₁₅) 在相当于序列号3的氨基酸序列的11位的位置由Asn替换为Leu；

[0037] (a₁₆) 在相当于序列号3的氨基酸序列的11位的位置由Asn替换为Lys；

[0038] (a₁₇) 在相当于序列号3的氨基酸序列的11位的位置由Asn替换为Met；

- [0039] (a₁₈) 在相当于序列号3的氨基酸序列的11位的位置由Asn替换为Phe;
- [0040] (a₁₉) 在相当于序列号3的氨基酸序列的11位的位置由Asn替换为Thr;
- [0041] (a₂₀) 在相当于序列号3的氨基酸序列的11位的位置由Asn替换为Trp;
- [0042] (a₂₁) 在相当于序列号3的氨基酸序列的11位的位置由Asn替换为Tyr;
- [0043] (a₂₂) 在相当于序列号3的氨基酸序列的11位的位置由Asn替换为Val;
- [0044] (b₁) 在相当于序列号3的氨基酸序列的24位的位置由Glu替换为Asp;
- [0045] (b₂) 在相当于序列号3的氨基酸序列的25位的位置由Glu替换为Asp;
- [0046] (c₁) 在相当于序列号3的氨基酸序列的39位的位置由Ser替换为Lys;
- [0047] (c₂) 在相当于序列号3的氨基酸序列的39位的位置由Ser替换为Arg;
- [0048] (d₁) 在相当于序列号3的氨基酸序列的46位的位置由Ala替换为Asp;
- [0049] (d₂) 在相当于序列号3的氨基酸序列的46位的位置由Ala替换为Glu;
- [0050] (d₃) 在相当于序列号3的氨基酸序列的46位的位置由Ala替换为Lys;
- [0051] (d₄) 在相当于序列号3的氨基酸序列的46位的位置由Ala替换为Arg;
- [0052] (e₁) 在相当于序列号3的氨基酸序列的4位的位置Lys缺失;
- [0053] (e₂) 在相当于序列号3的氨基酸序列的49位的位置由Lys替换为Arg;
- [0054] (e₃) 在相当于序列号3的氨基酸序列的58位的位置Lys缺失;
- [0055] (e₄) 在相当于序列号3的氨基酸序列的58位的位置由Lys替换为Arg;
- [0056] (f₁) 在相当于序列号3的氨基酸序列的23位的位置由Thr替换为Arg;
- [0057] (f₂) 在相当于序列号3的氨基酸序列的23位的位置由Thr替换为Leu;以及
- [0058] (f₃) 在相当于序列号3的氨基酸序列的23位的位置由Thr替换为Ser。
- [0059] [4]如[3]所述的免疫球蛋白结合蛋白质,其中,选自所述(a)~(f)中的至少1种变异是下列变异中的任1种:
- [0060] (a₁) 在相当于序列号3的氨基酸序列的3位的位置由Asn替换为Gln;
- [0061] (a₂) 在相当于序列号3的氨基酸序列的3位的位置由Asn替换为Ala;
- [0062] (a₃) 在相当于序列号3的氨基酸序列的3位的位置由Asn替换为Asp;
- [0063] (a₄) 在相当于序列号3的氨基酸序列的6位的位置由Asn替换为Gln;
- [0064] (a₅) 在相当于序列号3的氨基酸序列的6位的位置由Asn替换为Ala;
- [0065] (a₆) 在相当于序列号3的氨基酸序列的6位的位置由Asn替换为Asp;
- [0066] (a₇) 在相当于序列号3的氨基酸序列的11位的位置由Asn替换为Gln;
- [0067] (a₈) 在相当于序列号3的氨基酸序列的11位的位置由Asn替换为Ala;
- [0068] (a₉) 在相当于序列号3的氨基酸序列的11位的位置由Asn替换为Arg;
- [0069] (a₁₀) 在相当于序列号3的氨基酸序列的11位的位置由Asn替换为Asp;
- [0070] (a₁₁) 在相当于序列号3的氨基酸序列的11位的位置由Asn替换为Cys;
- [0071] (a₁₂) 在相当于序列号3的氨基酸序列的11位的位置由Asn替换为Glu;
- [0072] (a₁₃) 在相当于序列号3的氨基酸序列的11位的位置由Asn替换为His;
- [0073] (a₁₄) 在相当于序列号3的氨基酸序列的11位的位置由Asn替换为Ile;
- [0074] (a₁₅) 在相当于序列号3的氨基酸序列的11位的位置由Asn替换为Leu;
- [0075] (a₁₆) 在相当于序列号3的氨基酸序列的11位的位置由Asn替换为Lys;
- [0076] (a₁₇) 在相当于序列号3的氨基酸序列的11位的位置由Asn替换为Met;

- [0077] (a₁₈) 在相当于序列号3的氨基酸序列的11位的位置由Asn替换为Phe;
- [0078] (a₁₉) 在相当于序列号3的氨基酸序列的11位的位置由Asn替换为Thr;
- [0079] (a₂₀) 在相当于序列号3的氨基酸序列的11位的位置由Asn替换为Trp;
- [0080] (a₂₁) 在相当于序列号3的氨基酸序列的11位的位置由Asn替换为Tyr;
- [0081] (a₂₂) 在相当于序列号3的氨基酸序列的11位的位置由Asn替换为Val;
- [0082] (a₂₃) 在相当于序列号3的氨基酸序列的3位、6位和11位的位置由Asn替换为Gln;
- [0083] (a₂₄) 在相当于序列号3的氨基酸序列的3位的位置由Asn替换为Ala,以及在相当于11位的位置由Asn替换为Gln;
- [0084] (a₂₅) 在相当于序列号3的氨基酸序列的3位的位置由Asn替换为Asp,以及在相当于11位的位置由Asn替换为Gln;
- [0085] (a₂₆) 在相当于序列号3的氨基酸序列的6位的位置由Asn替换为Asp,以及在相当于11位的位置由Asn替换为Gln;
- [0086] (a₂₇) 在相当于序列号3的氨基酸序列的3位的位置由Asn替换为Asp,在相当于6位的位置由Asn替换为Asp,以及在相当于11位的位置由Asn替换为Gln;
- [0087] (a₂₈) 在相当于序列号3的氨基酸序列的3位的位置由Asn替换为Ala,在相当于6位的位置由Asn替换为Asp,以及在相当于11位的位置由Asn替换为Gln;
- [0088] (b₁) 在相当于序列号3的氨基酸序列的24位的位置由Glu替换为Asp;
- [0089] (b₂) 在相当于序列号3的氨基酸序列的25位的位置由Glu替换为Asp;
- [0090] (c₁) 在相当于序列号3的氨基酸序列的39位的位置由Ser替换为Lys;
- [0091] (c₂) 在相当于序列号3的氨基酸序列的39位的位置由Ser替换为Arg;
- [0092] (d₁) 在相当于序列号3的氨基酸序列的46位的位置由Ala替换为Asp;
- [0093] (d₂) 在相当于序列号3的氨基酸序列的46位的位置由Ala替换为Glu;
- [0094] (d₃) 在相当于序列号3的氨基酸序列的46位的位置由Ala替换为Lys;
- [0095] (d₄) 在相当于序列号3的氨基酸序列的46位的位置由Ala替换为Arg;
- [0096] (e₁) 在相当于序列号3的氨基酸序列的4位的位置Lys缺失;
- [0097] (e₂) 在相当于序列号3的氨基酸序列的49位的位置由Lys替换为Arg;
- [0098] (e₃) 在相当于序列号3的氨基酸序列的58位的位置Lys缺失;
- [0099] (e₄) 在相当于序列号3的氨基酸序列的58位的位置由Lys替换为Arg;
- [0100] (f₁) 在相当于序列号3的氨基酸序列的23位的位置由Thr替换为Arg;
- [0101] (f₂) 在相当于序列号3的氨基酸序列的23位的位置由Thr替换为Leu;
- [0102] (f₃) 在相当于序列号3的氨基酸序列的23位的位置由Thr替换为Ser;
- [0103] (g₁) (a₇) 与 (f₁) 的组合;
- [0104] (g₂) (a₇) 与 (f₂) 的组合;
- [0105] (g₃) (a₇) 与 (f₃) 的组合;
- [0106] (g₄) (a₇) 与 (e₂) 的组合;
- [0107] (g₅) (a₇) 与 (e₄) 的组合;
- [0108] (g₆) (a₇) 与 (f₁) 与 (e₂) 的组合;
- [0109] (g₇) (a₇) 与 (f₂) 与 (e₂) 的组合;以及
- [0110] (g₈) (a₇) 与 (f₃) 与 (e₂) 的组合。

[0111] [5]如[1]～[4]中任一项所述的免疫球蛋白结合蛋白质,其中,选自所述(a)～(f)中的至少1种变异包括相当于序列号3的氨基酸序列的3位、6位、11位、24位、25位、39位、46位、4位、49位、58位以及23位中的至少二个位置的位置的氨基酸残基替换为其它氨基酸残基或缺失、或在该位置之前或之后的位置插入其它氨基酸残基。

[0112] [6]如[5]所述的免疫球蛋白结合蛋白质,其中,所述至少1种变异是所述(a₂₃)～(a₂₈)中的任一个,或者是所述(a₁)～(a₂₈)中的任一个与所述(b₁)～(f₃)中的任一个以上的组合。

[0113] [7]如[1]～[6]中任一项所述的免疫球蛋白结合蛋白质,其中,所述氨基酸序列的同源性至少为90%。

[0114] [8]如[1]～[7]中任一项所述的免疫球蛋白结合蛋白质,其中,所述多肽链进一步包含相当于序列号3的氨基酸序列的1位的位置的氨基酸残基替换为Val,和/或相当于序列号3的氨基酸序列的29位的位置的氨基酸残基替换为Ala。

[0115] [9]如[1]～[8]中任一项所述的免疫球蛋白结合蛋白质,其中,包含2个以上所述多肽链。

[0116] [10]一种多核苷酸,其编码[1]～[9]中任一项所述的免疫球蛋白结合蛋白质。

[0117] [11]一种载体,其包含[10]所述的多核苷酸。

[0118] [12]一种转化体,其包含[11]所述的载体。

[0119] [13]一种亲和载体,其包含固相载体,以及键合于该固相载体的[1]～[9]中任一项所述的免疫球蛋白结合蛋白质。

[0120] [14]一种色谱柱,其包含[13]的亲和载体。

[0121] [15]一种抗体或其片段的分离方法,使用[13]所述的亲和载体或[14]所述的色谱柱。

[0122] [16]一种免疫球蛋白结合蛋白质的制造方法,包括:在[12]所述的转化体或无细胞蛋白质合成系统中使[1]～[9]中任一项所述的免疫球蛋白结合蛋白质进行表达,或者将该免疫球蛋白结合蛋白质进行化学合成。

[0123] [17]一种变异多肽链的制造方法,包括:对由序列号1～6和57～62中的任一氨基酸序列或与这些氨基酸序列具有至少85%同源性的氨基酸序列构成且具有免疫球蛋白结合活性的多肽链,导入选自以下(a)～(f)中的至少1种变异,

[0124] (a)选自相当于序列号3的氨基酸序列的3位、6位、11位的位置中的至少一个位置的氨基酸残基替换为其它氨基酸残基或缺失,或在该位置之前或之后的位置插入其它氨基酸残基;

[0125] (b)选自相当于序列号3的氨基酸序列的24位和25位的位置中的至少一个位置的氨基酸残基替换为其它氨基酸残基或缺失,或在该位置之前或之后的位置插入其它氨基酸残基;

[0126] (c)相当于序列号3的氨基酸序列的39位的位置的氨基酸残基替换为其它氨基酸残基或缺失,或在该位置之前或之后的位置插入其它氨基酸残基;

[0127] (d)相当于序列号3的氨基酸序列的46位的位置的氨基酸残基替换为其它氨基酸残基或缺失,或在该位置之前或之后的位置插入其它氨基酸残基;

[0128] (e)选自相当于序列号3的氨基酸序列的4位、49位以及58位的位置中的至少一个

位置的氨基酸残基替换为其它氨基酸残基或缺失,或在该位置之前或之后的位置插入其它氨基酸残基;以及

[0129] (f) 相当于序列号3的氨基酸序列的23位的位置的氨基酸残基替换为其它氨基酸残基或缺失,或在该位置之前或之后的位置插入其它氨基酸残基。

[0130] [18] 一种亲和载体的制造方法,包括:将[1]~[9]中任一项所述的免疫球蛋白结合蛋白质固定于固相载体。

[0131] 本发明的变异多肽链以及含有其的免疫球蛋白结合蛋白质具有免疫球蛋白结合活性,且耐碱性提升。因此,本发明的免疫球蛋白结合蛋白质作为亲和配体有用。将该免疫球蛋白结合蛋白质加以固定化而得的本发明的亲和载体是即便在实施使用碱性溶液的反复清洗(Cleaning-in-place,以下也称为CIP)后也可维持免疫球蛋白结合活性。

具体实施方式

[0132] 在本说明书中,氨基酸序列或核苷酸序列的同源性可使用Karlin和Altschul的算法BLAST(Pro.Natl.Acad.Sci.USA,1993,90:5873-5877)来决定。已基于此BLAST算法,开发出被称为BLASTN、BLASTX、BLASTP、TBLASTN以及TBLASTX的程序(J.Mol.Biol.,1990,215:403-410)。在使用这些程序时,可使用各程序的默认参数。这些解析方法的具体方法是公知的(参照[www.ncbi.nlm.nih.gov])。

[0133] 在本说明书中,涉及氨基酸序列和核苷酸序列的“至少85%同源性”,是指85%以上的同源性,优选为90%以上的同源性,更优选为95%以上的同源性,进一步优选为97%以上的同源性,进一步优选为98%以上的同源性,更进一步优选为99%以上的同源性。此外,涉及氨基酸序列和核苷酸序列的“至少90%同源性”,是指90%以上的同源性,优选为95%以上的同源性,进一步优选为97%以上的同源性,进一步优选为98%以上的同源性,更进一步优选为99%以上的同源性。

[0134] 在本说明书中,氨基酸序列和核苷酸序列上的“相当的位置”可通过使目标序列与参照序列(例如序列号3的氨基酸序列)以对各氨基酸序列或核苷酸序列中所存在的保守氨基酸残基或核苷酸给予最大的相同性的方式进行排列(比对)而予以决定。比对可使用公知的算法实施,其顺序对熟习该项技术者而言是公知的。例如,比对可通过以默认设定使用Clustal W多重比对程序(Thompson,J.D.et al,1994,Nucleic Acids Res.,22:4673-4680)而进行。Clustal W可例如在欧洲生物信息研究所(European Bioinformatics Institute:EBI[www.ebi.ac.uk/index.html])或日本国立遗传学研究所管理的日本DNA数据库(DDBJ[www.ddbj.nig.ac.jp/index.html])的网站上进行利用。

[0135] 在本说明书中,氨基酸残基也以下列简写符号记载:丙氨酸(Ala或A),精氨酸(Arg或R),天冬酰胺(Asn或N),天冬氨酸(Asp或D),半胱氨酸(Cys或C),谷氨酰胺(Gln或Q),谷氨酸(Glu或E),甘氨酸(Gly或G),组氨酸(His或H),异亮氨酸(Ile或I),亮氨酸(Leu或L),赖氨酸(Lys或K),甲硫氨酸(Met或M),苯丙氨酸(Phe或F),脯氨酸(Pro或P),丝氨酸(Ser或S),苏氨酸(Thr或T),色氨酸(Trp或W),酪氨酸(Tyr或Y),缬氨酸(Val或V),以及任意的氨基酸残基(Xaa或X)。此外,在本说明书中,肽的氨基酸序列是依常法以氨基末端(以下称为N末端)位于左侧,羧基末端(以下称为C末端)位于右侧的方式加以记载。

[0136] 在本说明书中,相对于氨基酸序列的特定位置的“前”和“后”的位置,是分别指邻

接于该特定位置的N末端侧以及C末端侧的位置。例如,在特定位置的“前”和“后”的位置插入氨基酸残基的情况下,插入后的氨基酸残基配置于邻接于该特定位置的N末端侧以及C末端侧的位置。

[0137] 在本说明书中,“免疫球蛋白结合蛋白质”是指对抗体或其片段具有结合活性的蛋白质。本说明书中的“抗体”可包含例如IgG、IgA、IgD、IgE、IgM以及这些的次类别等任意类别的免疫球蛋白、其片段、它们的变异体。此外,本说明书中的“抗体”也可为人源化抗体等嵌合抗体、抗体复合体、以及包含抗原识别部位的其它的免疫球蛋白修饰体等。此外,本说明书中的“抗体的片段”可为包含抗原识别部位的抗体的片段,也可为不包含抗原识别部位的抗体的片段。作为不包含抗原识别部位的抗体的片段,可列举例如仅由免疫球蛋白的Fc区域构成的蛋白质、Fc融合蛋白质、以及它们的变异体或修饰体等。

[0138] 在本说明书中,“免疫球蛋白结合结构域”是指免疫球蛋白结合蛋白质中所包含的单独具有免疫球蛋白(或者抗体或抗体的片段)结合活性的多肽的功能单元。作为该“免疫球蛋白结合结构域”的优选例,可列举蛋白A的免疫球蛋白结合结构域,以及具有免疫球蛋白结合活性的其变异体。

[0139] 1. 免疫球蛋白结合蛋白质

[0140] 本发明的免疫球蛋白结合蛋白质包含至少一个来自于金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)的蛋白A(以下,也称为SpA)的免疫球蛋白结合结构域的变异多肽链。本发明的免疫球蛋白结合蛋白质中所包含的该变异多肽链为具有免疫球蛋白结合活性的多肽链,在以下本说明书中,也称为“本发明的变异免疫球蛋白结合结构域”。该本发明的变异免疫球蛋白结合结构域可通过在属于亲结构域的来自SpA的免疫球蛋白结合结构域或其变异体中加入规定的变异而获得。该本发明的变异免疫球蛋白结合结构域具有免疫球蛋白结合活性,且与亲结构域相比,耐碱性提升。含有该本发明的变异免疫球蛋白结合结构域的本发明的免疫球蛋白结合蛋白质可作为亲和载体的配体使用。

[0141] 作为本发明的变异免疫球蛋白结合结构域的亲结构域,可列举SpA的免疫球蛋白结合结构域,例如A结构域、B结构域、C结构域、D结构域、E结构域或属于B结构域的改造型结构域的Z结构域以及它们的变异体。这些中,优选为B结构域、Z结构域、C结构域以及其变异体,更优选为C结构域以及其变异体。

[0142] SpA的B结构域、Z结构域、C结构域、D结构域、A结构域以及E结构域以及它们的变异体可作为本发明的变异免疫球蛋白结合结构域的亲结构域使用。SpA的B结构域为由序列号1的氨基酸序列构成的多肽链。作为该B结构域的变异体,可列举由与序列号1的氨基酸序列具有至少85%的同源性的氨基酸序列构成,且具有免疫球蛋白结合活性的多肽链。SpA的Z结构域为由序列号2的氨基酸序列构成的多肽链。作为该Z结构域的变异体,可列举由与序列号2的氨基酸序列具有至少85%的同源性的氨基酸序列构成,且具有免疫球蛋白结合活性的多肽链。SpA的C结构域为由序列号3的氨基酸序列构成的多肽链。作为该C结构域的变异体,可列举由与序列号3的氨基酸序列具有至少85%的同源性的氨基酸序列构成,且具有免疫球蛋白结合活性的多肽链。SpA的D结构域为由序列号4的氨基酸序列构成的多肽链。作为该D结构域的变异体,可列举由与序列号4的氨基酸序列具有至少85%的同源性的氨基酸序列构成,且具有免疫球蛋白结合活性的多肽链。SpA的A结构域为由序列号5的氨基酸序列构成的多肽链。作为该A结构域的变异体,可列举由与序列号5的氨基酸序列具有至少85%

的同源性的氨基酸序列构成,且具有免疫球蛋白结合活性的多肽链。SpA的E结构域为由序列号6的氨基酸序列构成的多肽链。作为该E结构域的变异体,可列举由与序列号6的氨基酸序列具有至少85%的同源性的氨基酸序列构成,且具有免疫球蛋白结合活性的多肽链。

[0143] 因此,作为本发明中的优选的亲结构域的例子,可列举由序列号1~6中的任一氨基酸序列构成的多肽链,以及由与序列号1~6中的任一氨基酸序列具有至少85%的同源性的氨基酸序列构成且具有免疫球蛋白结合活性的多肽链。作为更优选的亲结构域的例子,可列举由序列号1~3中的任一氨基酸序列构成的多肽链,以及由与序列号1~3中的任一氨基酸序列具有至少85%的同源性的氨基酸序列构成且具有免疫球蛋白结合活性的多肽链。作为进一步优选的亲结构域的例子,可列举由序列号3的氨基酸序列构成的多肽链,以及由与序列号3的氨基酸序列具有至少85%的同源性的氨基酸序列构成且具有免疫球蛋白结合活性的多肽链。

[0144] 从转化体中的蛋白质的表达量增加的观点(PNAS,1989,86:8247-8251, Fig.2)、编码连接多个结构域而得的免疫球蛋白结合蛋白质的多核苷酸的制作变得容易的观点(WO2010/110288)而言,该亲结构域也可包含在相当于序列号3的氨基酸序列的1位的位置由Ala替换为Val。此外,从免疫球蛋白结合蛋白质的化学稳定性提升且耐碱性增大的观点而言,该亲结构域也可进一步包含在相当于序列号3的氨基酸序列的29位的位置由Gly替换为Ala(非专利文献1)。

[0145] 已报导了天然免疫球蛋白结合结构域的N末端区域发生缺失的具有相比于该天然免疫球蛋白结合结构域而言稳定性更高的蛋白质结构的免疫球蛋白结合结构域变异体(WO2013/109302、WO2017/194596等)。因此,该亲结构域在具有免疫球蛋白结合活性的前提下,也可为使相当于序列号1~6中的任一氨基酸序列的N末端起至少2个残基(例如2个残基、4个残基、6个残基或7个残基)的氨基酸残基发生缺失而得的免疫球蛋白结合结构域变异体。作为这种亲结构域的例子,可列举由序列号57~62的氨基酸序列构成的多肽链,它们分别为使序列号1~6的氨基酸序列的N末端2~7个残基发生缺失而得的变异免疫球蛋白结合结构域。

[0146] 因此,针对上述亲结构域的与序列号1~6中的任一氨基酸序列具有至少85%的同源性的氨基酸序列也可序列号57~62中的任一氨基酸序列,或与这些具有至少85%的同源性的氨基酸序列。再者,与该序列号1~6中的任一氨基酸序列具有至少85%的同源性的氨基酸序列也可在相当于序列号3的氨基酸序列的1位的位置包含Val,和/或在相当于序列号3的氨基酸序列的29位的位置包含Ala。

[0147] 该SpA的免疫球蛋白结合结构域的变异体可通过对SpA的免疫球蛋白结合结构域的氨基酸序列实施氨基酸残基的插入、删除、替换或缺失,或氨基酸残基的化学修饰等改造而予以制作。作为氨基酸残基的插入、删除、替换或缺失的方法,可列举对编码该结构域的多核苷酸实施部位特异突变(Site-specific mutation)等公知的方法。

[0148] 本发明的变异免疫球蛋白结合结构域为对上述的亲结构域导入选自以下(a)~(f)中的至少1种变异所获得的多肽链:

[0149] (a) 选自相当于序列号3的氨基酸序列的3位、6位、11位的位置中的至少一个位置的氨基酸残基替换为其它氨基酸残基或缺失、或在该位置之前或之后的位置插入其它氨基酸残基;

[0150] (b) 选自相当于序列号3的氨基酸序列的24位和25位的位置中的至少一个位置的氨基酸残基替换为其它氨基酸残基或缺失、或在该位置之前或之后的位置插入其它氨基酸残基；

[0151] (c) 相当于序列号3的氨基酸序列的39位的位置的氨基酸残基替换为其它氨基酸残基或缺失、或在该位置之前或之后的位置插入其它氨基酸残基；

[0152] (d) 相当于序列号3的氨基酸序列的46位的位置的氨基酸残基替换为其它氨基酸残基或缺失、或在该位置之前或之后的位置插入其它氨基酸残基；

[0153] (e) 选自相当于序列号3的氨基酸序列的4位、49位和58位的位置中的至少一个位置的氨基酸残基替换为其它氨基酸残基或缺失、或在该位置之前或之后的位置插入其它氨基酸残基；以及

[0154] (f) 相当于序列号3的氨基酸序列的23位的位置的氨基酸残基替换为其它氨基酸残基或缺失、或在该位置之前或之后的位置插入其它氨基酸残基。

[0155] 该(a)的变异为选自相当于序列号3的氨基酸序列的3位、6位和11位的位置中的至少一个位置的氨基酸残基替换为其它氨基酸残基或缺失,或在该位置之前或之后的位置插入其它氨基酸残基。在该相当于3位、6位和11位的位置,该替换前的氨基酸残基优选为Asn,与它们进行替换的该其它氨基酸残基优选为Ser以外的氨基酸残基,更优选为Ala、Arg、Asp、Cys、Gln、Glu、His、Ile、Leu、Lys、Met、Phe、Thr、Trp、Tyr或Val,进一步优选为Gln。该(a)的变异可为相当于序列号3的氨基酸序列的3位、6位或11位的位置的氨基酸残基的单独变异,也可为该相当于3位、6位和11位的位置的氨基酸残基中的2个或3个发生变异而得的多重变异。例如,该(a)的变异可以为相当于序列号3的氨基酸序列的3位、6位或11位的位置的氨基酸残基的单独替换,也可为将该相当于3位、6位和11位的位置的氨基酸残基中的2个或3个进行替换而得的多重替换。优选该(a)的变异为(a₁)在相当于序列号3的氨基酸序列的3位的位置由Asn替换为Gln,(a₂)在相当于序列号3的氨基酸序列的3位的位置由Asn替换为Ala,(a₃)在相当于序列号3的氨基酸序列的3位的位置由Asn替换为Asp,(a₄)在相当于序列号3的氨基酸序列的6位的位置由Asn替换为Gln,(a₅)在相当于序列号3的氨基酸序列的6位的位置由Asn替换为Ala,(a₆)在相当于序列号3的氨基酸序列的6位的位置由Asn替换为Asp,(a₇)在相当于序列号3的氨基酸序列的11位的位置由Asn替换为Gln,(a₈)在相当于序列号3的氨基酸序列的11位的位置由Asn替换为Ala,(a₉)在相当于序列号3的氨基酸序列的11位的位置由Asn替换为Arg,(a₁₀) 在相当于序列号3的氨基酸序列的11位的位置由Asn替换为Asp,(a₁₁) 在相当于序列号3的氨基酸序列的11位的位置由Asn替换为Cys,(a₁₂) 在相当于序列号3的氨基酸序列的11位的位置由Asn替换为Glu,(a₁₃) 在相当于序列号3的氨基酸序列的11位的位置由Asn替换为His,(a₁₄) 在相当于序列号3的氨基酸序列的11位的位置由Asn替换为Ile,(a₁₅) 在相当于序列号3的氨基酸序列的11位的位置由Asn替换为Leu,(a₁₆) 在相当于序列号3的氨基酸序列的11位的位置由Asn替换为Lys,(a₁₇) 在相当于序列号3的氨基酸序列的11位的位置由Asn替换为Met,(a₁₈) 在相当于序列号3的氨基酸序列的11位的位置由Asn替换为Phe,(a₁₉) 在相当于序列号3的氨基酸序列的11位的位置由Asn替换为Thr,(a₂₀) 在相当于序列号3的氨基酸序列的11位的位置由Asn替换为Trp,(a₂₁) 在相当于序列号3的氨基酸序列的11位的位置由Asn替换为Tyr,(a₂₂) 在相当于序列号3的氨基酸序列的11位的位置由Asn替换为Val,(a₂₃) 在相当于序列号3的氨基酸序列的3位、6位和11位的位置由Asn替换为Gln,

(a₂₄) 在相当于序列号3的氨基酸序列的3位的位置由Asn替换为Ala,以及在相当于11位的位置由Asn替换为Gln, (a₂₅) 在相当于序列号3的氨基酸序列的3位的位置由Asn替换为Asp,以及在相当于11位的位置由Asn替换为Gln, (a₂₆) 在相当于序列号3的氨基酸序列的6位的位置由Asn替换为Asp,以及在相当于11位的位置由Asn替换为Gln, (a₂₇) 在相当于序列号3的氨基酸序列的3位的位置由Asn替换为Asp,在相当于6位的位置由Asn替换为Asp,以及在相当于11位的位置由Asn替换为Gln,或者(a₂₈) 在相当于序列号3的氨基酸序列的3位的位置由Asn替换为Ala,在相当于6位的位置由Asn替换为Asp,以及在相当于11位的位置由Asn替换为Gln。

[0156] 该(b)的变异为选自相当于序列号3的氨基酸序列的24位和25位的位置中的至少一个位置的氨基酸残基替换为其它氨基酸残基或缺失,或在该位置之前或之后的位置插入其它氨基酸残基。在该相当于24位和25位的位置,该替换前的氨基酸残基优选为Glu,与它们进行替换的该其它氨基酸残基优选为Asp。该(b)的变异可以为相当于序列号3的氨基酸序列的24位或25位的位置的氨基酸残基的单独变异,也可为该相当于24位和25位的位置的氨基酸残基两者发生变异而得的二重变异。例如,该(b)的变异可以为相当于序列号3的氨基酸序列的24位或25位的位置的氨基酸残基的单独替换,也可为将该相当于24位和25位的位置的氨基酸残基两者进行替换而得的二重替换。优选该(b)的变异为(b₁) 在相当于序列号3的氨基酸序列的24位的位置由Glu替换为Asp,或(b₂) 在相当于序列号3的氨基酸序列的25位的位置由Glu替换为Asp。

[0157] 该(c)的变异为相当于序列号3的氨基酸序列的39位的位置的氨基酸残基替换为其它氨基酸残基或缺失,或在该位置之前或之后的位置插入其它氨基酸残基。在该相当于39位的位置,该替换前的氨基酸残基优选为Ser,与其进行替换的该其它氨基酸残基优选为Lys或Arg。优选该(c)的变异为(c₁) 在相当于序列号3的氨基酸序列的39位的位置由Ser替换为Lys,或(c₂) 在相当于序列号3的氨基酸序列的39位的位置由Ser替换为Arg。

[0158] 该(d)的变异为相当于序列号3的氨基酸序列的46位的位置的氨基酸残基替换为其它氨基酸残基或缺失,或在该位置之前或之后的位置插入其它氨基酸残基。在该相当于46位的位置,该替换前的氨基酸残基优选为Ala,与其进行替换的该其它氨基酸残基优选为Asp、Glu、Lys或Arg,更优选为Asp、Glu或Arg。优选该(d)的变异为(d₁) 在相当于序列号3的氨基酸序列的46位的位置由Ala替换为Asp, (d₂) 在相当于序列号3的氨基酸序列的46位的位置由Ala替换为Glu, (d₃) 在相当于序列号3的氨基酸序列的46位的位置由Ala替换为Lys,或(d₄) 在相当于序列号3的氨基酸序列的46位的位置由Ala替换为Arg。

[0159] 该(e)的变异为选自相当于序列号3的氨基酸序列的4位、49位和58位的位置中的至少一个位置的氨基酸残基替换为其它氨基酸残基或缺失,或在该位置之前或之后的位置插入其它氨基酸残基。在该相当于4位、49位和58位的位置的缺失氨基酸残基优选为Lys。在该相当于4位、49位和58位的位置,该替换前的氨基酸残基优选为Lys,与它们进行替换的该其它氨基酸残基优选为Arg。该(e)的变异可以为相当于序列号3的氨基酸序列的4位、49位或58位的位置的氨基酸残基的单独变异,也可以为该相当于4位、49位和58位的位置的氨基酸残基中的2个或3个发生变异而得的多重变异。例如,该(e)的变异可以为相当于序列号3的氨基酸序列的4位、49位或58位的位置的氨基酸残基单独的缺失或替换,也可以为使该相当于4位、49位或58位的位置的氨基酸残基中的2个或3个发生缺失或替换而得的多重变异。

优选该(e)的变异为(e₁)在相当于序列号3的氨基酸序列的4位的位置Lys缺失,(e₂)在相当于序列号3的氨基酸序列的49位的位置由Lys替换为Arg,(e₃)在相当于序列号3的氨基酸序列的58位的位置Lys缺失,或(e₄)在相当于序列号3的氨基酸序列的58位的位置由Lys替换为Arg。

[0160] 该(f)的变异为相当于序列号3的氨基酸序列的23位的位置的氨基酸残基替换为其它氨基酸残基或缺失,或在该位置之前或之后的位置插入其它氨基酸残基。在该相当于23位的位置,该替换前的氨基酸残基优选为Thr,与其进行替换的该其它氨基酸残基优选为Arg、Leu或Ser。优选该(f)的变异为(f₁) 在相当于序列号3的氨基酸序列的23位的位置由Thr替换为Arg,(f₂) 在相当于序列号3的氨基酸序列的23位的位置由Thr替换为Leu,或(f₃) 在相当于序列号3的氨基酸序列的23位的位置由Thr替换为Ser。

[0161] 在优选的实施方式中,本发明的变异免疫球蛋白结合结构域是通过由序列号1~6中的任一氨基酸序列构成的多肽链,导入该选自(a)~(f)中的至少1种变异而制造的。在另一优选实施方式中,本发明的变异免疫球蛋白结合结构域是通过由与序列号1~6中的任一氨基酸序列具有至少85%的同源性的氨基酸序列构成且具有免疫球蛋白结合活性的多肽链,导入该选自(a)~(f)中的至少1种变异而制造的。

[0162] 在更优选的实施方式中,本发明的变异免疫球蛋白结合结构域是通过由序列号1~3中的任一氨基酸序列构成的多肽链,导入该选自(a)~(f)中的至少1种变异而制造的。

[0163] 在另一更优选的实施方式中,本发明的变异免疫球蛋白结合结构域是通过由与序列号1~3中的任一氨基酸序列具有至少85%的同源性的氨基酸序列构成且具有免疫球蛋白结合活性的多肽链,导入该选自(a)~(f)中的至少1种变异而制造的。

[0164] 在进一步优选的实施方式中,本发明的变异免疫球蛋白结合结构域是通过由序列号3的氨基酸序列构成的多肽链,或由与其具有至少85%的同源性的氨基酸序列构成且具有免疫球蛋白结合活性的多肽链,导入该选自(a)~(f)中的至少1种变异而制造的。

[0165] 该导入的变异可以为该(a)~(f)中的任1种,也可以为2种以上的组合(即,相当于序列号3的氨基酸序列的3位、6位、11位、24位、25位、39位、46位、4位、49位、58位和23位中的至少二个位置的位置的氨基酸残基的变异),优选选自上述(a₁)、(a₂)、(a₃)、(a₄)、(a₅)、(a₆)、(a₇)、(a₈)、(a₉)、(a₁₀)、(a₁₁)、(a₁₂)、(a₁₃)、(a₁₄)、(a₁₅)、(a₁₆)、(a₁₇)、(a₁₈)、(a₁₉)、(a₂₀)、(a₂₁)、(a₂₂)、(b₁)、(b₂)、(c₁)、(c₂)、(d₁)、(d₂)、(d₃)、(d₄)、(e₁)、(e₂)、(e₃)、(e₄)、(f₁)、(f₂)和(f₃)中的至少1种,或2种以上变异的组合。作为该2种以上变异的组合的例子,可列举上述(a₂₃)~(a₂₈)。作为该2种以上变异的组合的另一例,可列举上述(a₁)~(a₂₈)中的任一个与上述(b₁)~(f₃)中的任一个以上的组合,优选可列举上述(a₁)~(a₂₂)中的任一个与上述(e₁)~(f₃)中的任一个以上的组合,更优选可列举上述(a₇)~(a₂₂)中的任一个与上述(e₂)、(e₄)、(f₁)、(f₂)和(f₃)中的任一个以上的组合,进一步优选可列举上述(a₇)与上述(e₂)、(e₄)、(f₁)、(f₂)和(f₃)中的任一个以上的组合,进一步优选可列举以下:

[0166] (g1) 上述(a₇)与(f₁)的组合;

[0167] (g2) 上述(a₇)与(f₂)的组合;

[0168] (g3) 上述(a₇)与(f₃)的组合;

[0169] (g4) 上述(a₇)与(e₂)的组合;

[0170] (g5) 上述(a₇)与(e₄)的组合;

[0171] (g₆) 上述 (a₇) 与 (f₁) 与 (e₂) 的组合;

[0172] (g₇) 上述 (a₇) 与 (f₂) 与 (e₂) 的组合;以及

[0173] (g₈) 上述 (a₇) 与 (f₃) 与 (e₂) 的组合。

[0174] 在优选实施方式中,该选自 (a) ~ (f) 中的至少1种变异为上述 (a₁)、(a₂)、(a₃)、(a₄)、(a₅)、(a₆)、(a₇)、(a₈)、(a₉)、(a₁₀)、(a₁₁)、(a₁₂)、(a₁₃)、(a₁₄)、(a₁₅)、(a₁₆)、(a₁₇)、(a₁₈)、(a₁₉)、(a₂₀)、(a₂₁)、(a₂₂)、(a₂₃)、(a₂₄)、(a₂₅)、(a₂₆)、(a₂₇)、(a₂₈)、(b₁)、(b₂)、(c₁)、(c₂)、(d₁)、(d₂)、(d₃)、(d₄)、(e₁)、(e₂)、(e₃)、(e₄)、(f₁)、(f₂)、(f₃)、(g₁)、(g₂)、(g₃)、(g₄)、(g₅)、(g₆)、(g₇) 或 (g₈)。在另一例中,该选自 (a) ~ (f) 中的至少1种变异包含该 (a₁) ~ (g₈) 的变异中的任1种,但不包含该 (a₁) ~ (g₈) 的变异中的其它变异。在再一例中,该选自 (a) ~ (f) 中的至少1种变异有时不包含仅该 (e₂)、(e₃) 或 (e₄) 的单独变异的情况或者仅 (e₂) 与 (e₃) 或 (e₂) 与 (e₄) 的二重变异的情况。

[0175] 作为使亲结构域发生变异的方法,可列举对编码该亲结构域的多核苷酸,以产生所期望的氨基酸残基的替换、缺失、插入等方式进行变异导入的方法。作为用于对多核苷酸的变异导入的具体方法,可列举部位特异突变、同源重组法、S0E(splicing by overlap extension)-PCR法 (Gene, 1989, 77:61-68) 等,这些的详细顺序是熟习该项技术者所周知的。

[0176] 所制造的本发明的变异免疫球蛋白结合结构域具有免疫球蛋白结合活性,作为免疫球蛋白结合结构域发挥功能。此外,本发明的变异免疫球蛋白结合结构域与变异前的结构域(亲结构域)相比,耐碱性提升。因此,这些本发明的变异免疫球蛋白结合结构域可适合作为亲和配体使用。

[0177] 作为以上述顺序所获得的本发明的变异免疫球蛋白结合结构域的优选例,可列举由与序列号1~6中的任一氨基酸序列具有至少85%的同源性且具有选自上述 (a) ~ (f) 中的至少1种变异的氨基酸序列构成,具有免疫球蛋白结合活性的多肽链。

[0178] 作为本发明的变异免疫球蛋白结合结构域的更优选例,可列举由与序列号1~3中的任一氨基酸序列具有至少85%的同源性且具有选自上述 (a) ~ (f) 中的至少1种变异的氨基酸序列构成,具有免疫球蛋白结合活性的多肽链。

[0179] 作为本发明的变异免疫球蛋白结合结构域的进一步优选例,可列举由与序列号3的氨基酸序列具有至少85%的同源性且具有选自上述 (a) ~ (f) 中的至少1种变异的氨基酸序列构成,具有免疫球蛋白结合活性的多肽链。

[0180] 该选自 (a) ~ (f) 中的至少1种变异优选为选自上述 (a₁)、(a₂)、(a₃)、(a₄)、(a₅)、(a₆)、(a₇)、(a₈)、(a₉)、(a₁₀)、(a₁₁)、(a₁₂)、(a₁₃)、(a₁₄)、(a₁₅)、(a₁₆)、(a₁₇)、(a₁₈)、(a₁₉)、(a₂₀)、(a₂₁)、(a₂₂)、(b₁)、(b₂)、(c₁)、(c₂)、(d₁)、(d₂)、(d₃)、(d₄)、(e₁)、(e₂)、(e₃)、(e₄)、(f₁)、(f₂) 以及 (f₃) 中的至少1种,更优选为上述 (a₁)、(a₂)、(a₃)、(a₄)、(a₅)、(a₆)、(a₇)、(a₈)、(a₉)、(a₁₀)、(a₁₁)、(a₁₂)、(a₁₃)、(a₁₄)、(a₁₅)、(a₁₆)、(a₁₇)、(a₁₈)、(a₁₉)、(a₂₀)、(a₂₁)、(a₂₂)、(a₂₃)、(a₂₄)、(a₂₅)、(a₂₆)、(a₂₇)、(a₂₈)、(b₁)、(b₂)、(c₁)、(c₂)、(d₁)、(d₂)、(d₃)、(d₄)、(e₁)、(e₂)、(e₃)、(e₄)、(f₁)、(f₂)、(f₃)、(g₁)、(g₂)、(g₃)、(g₄)、(g₅)、(g₆)、(g₇) 或 (g₈)。在另一例中,该选自 (a) ~ (f) 中的至少1种变异包含该 (a₁) ~ (g₈) 的变异中的任1种,但不包含该 (a₁) ~ (g₈) 的变异中的其它变异。在再一例中,该选自 (a) ~ (f) 中的至少1种变异有时不包含仅该 (e₂)、(e₃) 或 (e₄) 的单独变异的情况或者仅 (e₂) 与 (e₃) 或 (e₂) 与 (e₄) 的二重变异的情况。

[0181] 或者,作为本发明的变异免疫球蛋白结合结构域的优选例,可列举由与序列号1~6中的任一氨基酸序列具有至少85%的同源性,且具有选自下述(A₁)~(F₃)中的至少一个氨基酸残基或这些氨基酸残基中的2种以上的组合的氨基酸序列构成的多肽链。

- [0182] (A₁) 相当于序列号3的氨基酸序列的3位的位置的Gln;
- [0183] (A₂) 相当于序列号3的氨基酸序列的3位的位置的Ala;
- [0184] (A₃) 相当于序列号3的氨基酸序列的3位的位置的Asp;
- [0185] (A₄) 相当于序列号3的氨基酸序列的6位的位置的Gln;
- [0186] (A₅) 相当于序列号3的氨基酸序列的6位的位置的Ala;
- [0187] (A₆) 相当于序列号3的氨基酸序列的6位的位置的Asp;
- [0188] (A₇) 相当于序列号3的氨基酸序列的11位的位置的Gln;
- [0189] (A₈) 相当于序列号3的氨基酸序列的11位的位置的Ala;
- [0190] (A₉) 相当于序列号3的氨基酸序列的11位的位置的Arg;
- [0191] (A₁₀) 相当于序列号3的氨基酸序列的11位的位置的Asp;
- [0192] (A₁₁) 相当于序列号3的氨基酸序列的11位的位置的Cys;
- [0193] (A₁₂) 相当于序列号3的氨基酸序列的11位的位置的Glu;
- [0194] (A₁₃) 相当于序列号3的氨基酸序列的11位的位置的His;
- [0195] (A₁₄) 相当于序列号3的氨基酸序列的11位的位置的Ile;
- [0196] (A₁₅) 相当于序列号3的氨基酸序列的11位的位置的Leu;
- [0197] (A₁₆) 相当于序列号3的氨基酸序列的11位的位置的Lys;
- [0198] (A₁₇) 相当于序列号3的氨基酸序列的11位的位置的Met;
- [0199] (A₁₈) 相当于序列号3的氨基酸序列的11位的位置的Phe;
- [0200] (A₁₉) 相当于序列号3的氨基酸序列的11位的位置的Thr;
- [0201] (A₂₀) 相当于序列号3的氨基酸序列的11位的位置的Trp;
- [0202] (A₂₁) 相当于序列号3的氨基酸序列的11位的位置的Tyr;
- [0203] (A₂₂) 相当于序列号3的氨基酸序列的11位的位置的Val;
- [0204] (B₁) 相当于序列号3的氨基酸序列的24位的位置的Asp;
- [0205] (B₂) 相当于序列号3的氨基酸序列的25位的位置的Asp;
- [0206] (C₁) 相当于序列号3的氨基酸序列的39位的位置的Lys;
- [0207] (C₂) 相当于序列号3的氨基酸序列的39位的位置的Arg;
- [0208] (D₁) 相当于序列号3的氨基酸序列的46位的位置的Asp;
- [0209] (D₂) 相当于序列号3的氨基酸序列的46位的位置的Glu;
- [0210] (D₃) 相当于序列号3的氨基酸序列的46位的位置的Lys;
- [0211] (D₄) 相当于序列号3的氨基酸序列的46位的位置的Arg;
- [0212] (E₁) 相当于序列号3的氨基酸序列的4位的位置的Lys的缺失;
- [0213] (E₂) 相当于序列号3的氨基酸序列的49位的位置的Arg;
- [0214] (E₃) 相当于序列号3的氨基酸序列的58位的位置的Lys的缺失;
- [0215] (E₄) 相当于序列号3的氨基酸序列的58位的位置的Arg;
- [0216] (F₁) 相当于序列号3的氨基酸序列的23位的位置的Arg;
- [0217] (F₂) 相当于序列号3的氨基酸序列的23位的位置的Leu;以及

[0218] (F₃) 相当于序列号3的氨基酸序列的23位的位置的Ser。

[0219] 该与序列号1~6中的任一氨基酸序列具有至少85%的同源性的氨基酸序列优选为与序列号1~3中的任一氨基酸序列具有至少85%的同源性的氨基酸序列,更优选为与序列号3的氨基酸序列具有至少85%的同源性的氨基酸序列。

[0220] 作为该2种以上氨基酸残基的组合的例子,可列举下述(A₂₃)~(A₂₈):

[0221] (A₂₃) 相当于序列号3的氨基酸序列的3位、6位和11位的位置的Gln;

[0222] (A₂₄) 相当于序列号3的氨基酸序列的3位的位置的Ala,相当于6位的位置的Asp,以及相当于11位的位置的Gln;

[0223] (A₂₅) 相当于序列号3的氨基酸序列的3位的位置的Asp,以及相当于11位的位置的Gln;

[0224] (A₂₆) 相当于序列号3的氨基酸序列的6位的位置的Asp,以及相当于11位的位置的Gln;

[0225] (A₂₇) 相当于序列号3的氨基酸序列的3位的位置的Asp,相当于6位的位置的Asp,以及相当于11位的位置的Gln;

[0226] (A₂₈) 相当于序列号3的氨基酸序列的3位的位置的Ala,相当于6位的位置的Asp,以及相当于11位的位置的Gln。

[0227] 作为该2种以上氨基酸残基的组合的另一例,可列举上述(A₁)~(A₂₈)中的任一个与上述(B₁)~(F₃)中的任一个以上的组合,优选可列举上述(A₁)~(A₂₂)中的任一个与上述(E₁)~(F₃)中的任一个以上的组合,更优选可列举上述(A₇)~(A₂₂)中的任一个与上述(E₂)、(E₄)、(F₁)、(F₂)以及(F₃)中的任一个以上的组合,进一步优选可列举上述(A₇)与上述(E₂)、(E₄)、(F₁)、(F₂)以及(F₃)中的任一个以上的组合,进一步优选可列举以下:

[0228] (G₁) 上述(A₇)与(F₁);

[0229] (G₂) 上述(A₇)与(F₂);

[0230] (G₃) 上述(A₇)与(F₃);

[0231] (G₄) 上述(A₇)与(E₂);

[0232] (G₅) 上述(A₇)与(E₄);

[0233] (G₆) 上述(A₇)、(F₁)与(E₂);

[0234] (G₇) 上述(A₇)、(F₂)与(E₂);或

[0235] (G₈) 上述(A₇)、(F₃)与(E₂)。

[0236] 或者,作为本发明的变异免疫球蛋白结合结构域的更优选例,可列举由与序列号1~6中的任一氨基酸序列具有至少85%的同源性且包含下述选项的氨基酸序列构成的多肽链。

[0237] (A₁) 相当于序列号3的氨基酸序列的3位的位置的Gln;

[0238] (A₂) 相当于序列号3的氨基酸序列的3位的位置的Ala;

[0239] (A₃) 相当于序列号3的氨基酸序列的3位的位置的Asp;

[0240] (A₄) 相当于序列号3的氨基酸序列的6位的位置的Gln;

[0241] (A₅) 相当于序列号3的氨基酸序列的6位的位置的Ala;

[0242] (A₆) 相当于序列号3的氨基酸序列的6位的位置的Asp;

[0243] (A₇) 相当于序列号3的氨基酸序列的11位的位置的Gln;

- [0244] (A₈) 相当于序列号3的氨基酸序列的11位的位置的Ala;
- [0245] (A₉) 相当于序列号3的氨基酸序列的11位的位置的Arg;
- [0246] (A₁₀) 相当于序列号3的氨基酸序列的11位的位置的Asp;
- [0247] (A₁₁) 相当于序列号3的氨基酸序列的11位的位置的Cys;
- [0248] (A₁₂) 相当于序列号3的氨基酸序列的11位的位置的Glu;
- [0249] (A₁₃) 相当于序列号3的氨基酸序列的11位的位置的His;
- [0250] (A₁₄) 相当于序列号3的氨基酸序列的11位的位置的Ile;
- [0251] (A₁₅) 相当于序列号3的氨基酸序列的11位的位置的Leu;
- [0252] (A₁₆) 相当于序列号3的氨基酸序列的11位的位置的Lys;
- [0253] (A₁₇) 相当于序列号3的氨基酸序列的11位的位置的Met;
- [0254] (A₁₈) 相当于序列号3的氨基酸序列的11位的位置的Phe;
- [0255] (A₁₉) 相当于序列号3的氨基酸序列的11位的位置的Thr;
- [0256] (A₂₀) 相当于序列号3的氨基酸序列的11位的位置的Trp;
- [0257] (A₂₁) 相当于序列号3的氨基酸序列的11位的位置的Tyr;
- [0258] (A₂₂) 相当于序列号3的氨基酸序列的11位的位置的Val;
- [0259] (A₂₃) 相当于序列号3的氨基酸序列的3位、6位和11位的位置的Gln;
- [0260] (A₂₄) 相当于序列号3的氨基酸序列的3位的位置的Ala,以及相当于11位的位置的Gln;
- [0261] (A₂₅) 相当于序列号3的氨基酸序列的3位的位置的Asp,以及相当于11位的位置的Gln;
- [0262] (A₂₆) 相当于序列号3的氨基酸序列的6位的位置的Asp,以及相当于11位的位置的Gln;
- [0263] (A₂₇) 相当于序列号3的氨基酸序列的3位的位置的Asp,相当于6位的位置的Asp,以及相当于11位的位置的Gln;
- [0264] (A₂₈) 相当于序列号3的氨基酸序列的3位的位置的Ala,相当于6位的位置的Asp,以及相当于11位的位置的Gln;
- [0265] (B₁) 相当于序列号3的氨基酸序列的24位的位置的Asp;
- [0266] (B₂) 相当于序列号3的氨基酸序列的25位的位置的Asp;
- [0267] (C₁) 相当于序列号3的氨基酸序列的39位的位置的Lys;
- [0268] (C₂) 相当于序列号3的氨基酸序列的39位的位置的Arg;
- [0269] (D₁) 相当于序列号3的氨基酸序列的46位的位置的Asp;
- [0270] (D₂) 相当于序列号3的氨基酸序列的46位的位置的Glu;
- [0271] (D₃) 相当于序列号3的氨基酸序列的46位的位置的Lys;
- [0272] (D₄) 相当于序列号3的氨基酸序列的46位的位置的Arg;
- [0273] (E₁) 相当于序列号3的氨基酸序列的4位的位置的Lys的缺失;
- [0274] (E₂) 相当于序列号3的氨基酸序列的49位的位置的Arg;
- [0275] (E₃) 相当于序列号3的氨基酸序列的58位的位置的Lys的缺失;
- [0276] (E₄) 相当于序列号3的氨基酸序列的58位的位置的Arg;
- [0277] (F₁) 相当于序列号3的氨基酸序列的23位的位置的Arg;

[0278] (F₂) 相当于序列号3的氨基酸序列的23位的位置的Leu;

[0279] (F₃) 相当于序列号3的氨基酸序列的23位的位置的Ser;

[0280] (G₁) 上述 (A₇) 与 (F₁);

[0281] (G₂) 上述 (A₇) 与 (F₂);

[0282] (G₃) 上述 (A₇) 与 (F₃);

[0283] (G₄) 上述 (A₇) 与 (E₂);

[0284] (G₅) 上述 (A₇) 与 (E₄);

[0285] (G₆) 上述 (A₇)、(F₁) 与 (E₂);

[0286] (G₇) 上述 (A₇)、(F₂) 与 (E₂);或

[0287] (G₈) 上述 (A₇)、(F₃) 与 (E₂)。

[0288] 该与序列号1~6中的任一氨基酸序列具有至少85%的同源性的氨基酸序列优选为与序列号1~3中的任一氨基酸序列具有至少85%的同源性的氨基酸序列,更优选为与序列号3的氨基酸序列具有至少85%的同源性的氨基酸序列。在另一例中,本发明的变异免疫球蛋白结合结构域包含上述 (A₁) ~ (G₈) 的氨基酸残基或其缺失中的任1种,但不包含该 (A₁) ~ (G₈) 的氨基酸残基或缺失中的其它氨基酸残基或缺失。在再一例中,本发明的变异免疫球蛋白结合结构域所具有的选自 (A₁) ~ (F₃) 中的至少一个氨基酸残基或其缺失有时不包含 (E₂) K49R、(E₃) Δ K58或 (E₄) K58R的单独变异或者K49R Δ K58或K49RK58R的二重变异。

[0289] 在本发明的变异免疫球蛋白结合结构域中,该与序列号1~6中的任一氨基酸序列具有至少85%的同源性的氨基酸序列可以为与序列号57~62中的任一氨基酸序列具有至少85%的同源性的氨基酸序列。此外,在本发明的变异免疫球蛋白结合结构域中,该与序列号1~3中的任一氨基酸序列具有至少85%的同源性的氨基酸序列可以为与序列号57~59中的任一氨基酸序列具有至少85%的同源性的氨基酸序列。其中,这些由与序列号57~62的氨基酸序列具有至少85%的同源性的氨基酸序列构成的本发明的变异免疫球蛋白结合结构域有时不包含上述的 (a) ~ (f) 的变异中相当于序列号3的氨基酸序列的3位和4位的位置的氨基酸残基的变异。

[0290] 优选本发明的变异免疫球蛋白结合结构域包含相当于序列号3的氨基酸序列的1位的位置的Val,和/或相当于序列号3的氨基酸序列的29位的位置的Ala。

[0291] 作为本发明的变异免疫球蛋白结合结构域的进一步优选例,可列举由序列号7~53中的任一氨基酸序列构成的多肽链。

[0292] 本发明的免疫球蛋白结合蛋白质只要包含上述的本发明的变异免疫球蛋白结合结构域1个以上即可。优选本发明的免疫球蛋白结合蛋白质包含本发明的变异免疫球蛋白结合结构域2个以上,更优选为3个以上,进一步优选为4个以上,进一步优选为5个以上,进一步优选为6个以上。另一方面,本发明的免疫球蛋白结合蛋白质包含本发明的变异免疫球蛋白结合结构域优选为12个以下,更优选为8个以下,进一步优选为7个以下。例如,本发明的免疫球蛋白结合蛋白质包含本发明的变异免疫球蛋白结合结构域优选为2~12个,更优选为3~8个,进一步优选为4~7个。在本发明的免疫球蛋白结合蛋白质包含2个以上本发明的变异免疫球蛋白结合结构域的情况下,这些变异免疫球蛋白结合结构域可以为相同种类,也可以为不同种类,优选为相同种类。

[0293] 本发明的免疫球蛋白结合蛋白质也可以包含上述的本发明的变异免疫球蛋白结

合结构域以外的其它免疫球蛋白结合结构域。作为该其它结构域的例子,可列举天然型SpA免疫球蛋白结合结构域(例如SpA的B结构域、Z结构域、C结构域或D结构域),或本发明的变异免疫球蛋白结合结构域以外的它们的变异体。

[0294] 作为本发明的免疫球蛋白结合蛋白质的优选例,可列举2个以上本发明的变异免疫球蛋白结合结构域的氨基酸序列直链状地连结而得的多肽。本发明的免疫球蛋白结合蛋白质中所包含的该变异免疫球蛋白结合结构域的数量优选为2~12个,更优选为3~8个,进一步优选为4~7个。作为本发明的免疫球蛋白结合蛋白质的更优选例,可列举由各自选自序列号7~53的氨基酸序列的2个以上氨基酸序列直链状地连结而得的氨基酸序列构成的多肽。作为本发明的免疫球蛋白结合蛋白质的进一步优选例,可列举由各自选自序列号7~53的氨基酸序列的2~12个、进一步优选为3~8个、再进一步优选为4~7个氨基酸序列直链状地连结而得的氨基酸序列构成的多肽。作为进一步优选例,可列举由序列号7~53中的任一氨基酸序列2~12个、进一步优选为3~8个、更进一步优选为4~7个直链状地连结而得的氨基酸序列构成的多肽。然而,本发明的蛋白质的优选例并不限定于这些。应予说明,在本发明中,氨基酸序列“直链状地连结”,是指2个以上氨基酸序列经由连结子或未经由连结子串联地连结而得的结构。例如,在经由连结子的情况下,“直链状地连结”是指1个氨基酸序列的C末端与另一氨基酸序列的N末端经由连结子串联地连结而得的结构,另一方面,在未经由连结子的情况下,“直链状地连结”是指1个氨基酸序列的C末端与另一氨基酸序列的N末端通过肽键串联地连结而得的结构。

[0295] 从本发明的免疫球蛋白结合蛋白质对载体的固定量增大、对载体的结合点增加、抗体结合容量增大等的观点而言,也可以在本发明的免疫球蛋白结合蛋白质中所包含的免疫球蛋白结合结构域的N末端、C末端以及结构域间的任1处以上,附加或插入任意的氨基酸残基或肽。作为该所附加或插入的氨基酸残基或肽的优选例,可列举Cys、Lys、Pro、 $(\text{Pro})_m$ 、 $(\text{Ala-Pro})_n$ 以及 $(\text{Glu-Ala-Ala-Ala-Lys})_p$ (m 为2~300,优选为12~24的整数, n 为4以上的整数,优选为4~10的整数, p 为2以上的整数,优选为2~6的整数)。

[0296] 2. 免疫球蛋白结合蛋白质的制造

[0297] 本发明的免疫球蛋白结合蛋白质可通过该领域中所公知的方法例如基于氨基酸序列的化学合成法或重组法等来制造。例如,本发明的免疫球蛋白结合蛋白质可利用Frederick M. Ausbel等人的Current Protocols In Molecular Biology或Sambrook等人编辑的Molecular Cloning (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 3rd edition, 2001)等所记载的公知的基因重组技术来制造。即,提高将含有编码本发明的免疫球蛋白结合蛋白质的多核苷酸的表达载体转化至大肠杆菌等宿主中,将所获得的重组体以适当的液体培养基进行培养,从而可从培养后的细胞中大量且经济地取得目标蛋白质。作为优选的表达载体,可使用能够在宿主细胞内进行复制的已知载体中的任一种,可列举例如美国专利第5151350号说明书中所述的质粒,或Sambrook等人编辑的Molecular Cloning (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 3rd edition, 2001)等中所述的质粒。此外,作为用于转化的宿主,并无特别限定,可使用大肠杆菌等细菌、真菌类、昆虫细胞、哺乳类细胞等用于使重组蛋白质进行表达的公知宿主。为了将核酸导入至宿主中而由此使宿主转化,可根据各宿主而使用该技术领域中所知的任何方法,例如可利用Sambrook等人编辑的Molecular Cloning (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 3rd edition, 2001)等中所记载的公知方法。将

所获得的转化体(优选为细菌等细胞)进行培养并将所表达出的蛋白质加以回收的方法是本领域技术人员所熟知的。或者,本发明的免疫球蛋白结合蛋白质也可使用无细胞蛋白质合成系统使其进行表达。

[0298] 因此,本发明还提供编码本发明的免疫球蛋白结合蛋白质的多核苷酸(DNA等),包含其的载体,以及包含它们的转化体。

[0299] 3.亲和载体

[0300] 本发明的免疫球蛋白结合蛋白质可作为亲和配体使用。通过将本发明的免疫球蛋白结合蛋白质固定化至固相载体,可制造以该本发明的免疫球蛋白结合蛋白质作为配体的亲和载体。该亲和载体是以本发明的免疫球蛋白结合蛋白质作为配体的载体,具有免疫球蛋白结合活性。此外,该亲和载体与以野生型蛋白A或其结构域作为配体的载体相比,耐碱性提升。

[0301] 作为本发明的亲和载体中所包含的固相载体的形状,可以为粒子、膜、板、管、针状、纤维状等任意的形态。该载体可以为多孔性,也可以为非多孔性。这些载体也可作为填充床使用,或者也可以悬浮形态使用。在悬浮形态中包含已知作为流动层(expanded bed)以及纯悬浮物的形态,在该形态中,粒子可自由地运动。在单块(monolith)、填充床以及流动层的情况下,分离顺序一般是依照浓度梯度的以往的色谱法。在纯悬浮物的情况下,是使用批次法。优选该载体为填充剂。或者,载体也可以为诸如芯片、毛细管或过滤器的形态。

[0302] 在一实施方式中,在该固相载体为粒子的情况下,粒径优选为20 μ m以上且200 μ m以下。例如,在载体为合成聚合物的情况下,粒径优选为20 μ m以上,更优选为30 μ m以上,且优选为100 μ m以下,更优选为80 μ m以下,例如,优选为20~100 μ m,更优选为30~80 μ m。例如,在载体为多糖的情况下,粒径优选为50 μ m以上,更优选为60 μ m以上,且优选为200 μ m以下,更优选为150 μ m以下,例如,优选为50~200 μ m,更优选为60~150 μ m。若粒径小于20 μ m,则在高流速下色谱柱压力变高,不耐实用。若粒径超过200 μ m,则会有免疫球蛋白键合于亲和载体的量(结合容量)较差的情形。另外,本说明书中的“粒径”是指以按照ISO 13320和JIS Z 8825-1的激光衍射法进行测定而得的体积平均粒径。具体而言,是指通过激光散射衍射法粒度分布测定装置(例如LS 13320(Beckman Coulter(株)等)测定粒径分布,使用Fluid R.I.Real 1.333、Sample R.I.Real 1.54Imaginary 0等作为光学模型,测定体积基准的粒度分布所求出的平均粒径。

[0303] 在一实施方式中,该固相载体为多孔质,具有优选为50m²/g以上、更优选为80m²/g以上、且优选为150m²/g以下、更优选为130m²/g以下、例如优选为50~150m²/g、更优选为80~130m²/g的比表面积。在此,若比表面积小于50m²/g,则会有结合容量较差的情形,另一方面,若超过150m²/g,则由于载体的强度较差,因而会有在高流速下载体被破坏而色谱柱压力上升的情形。应予说明,本说明书中的“比表面积”是将由水银孔隙度计所获得的细孔径10~5000nm的细孔所具有的表面积除以粒子的干燥重量而得的值。

[0304] 在一实施方式中,该固相载体的体积平均细孔径优选为100nm以上且1500nm以下。例如,在载体为合成聚合物的情况下,体积平均细孔径优选为100nm以上,更优选为200nm以上,且优选为400nm以下,更优选为300nm以下,例如,优选为100~400nm,进一步优选为200~300nm。例如,在载体为多糖的情况下,体积平均细孔径优选为500nm以上,更优选为800nm以上,且优选为1500nm以下,更优选为1400nm以下,例如,优选为500~1500nm,进一步优选

为800~1400nm。在此,若体积平均细孔径小于100nm,则会有高流速下的结合容量降低变得显著的情形,另一方面,若超过1500nm,则会有无论流速为何,结合容量都降低的情形。应予说明,本说明书中的“体积平均细孔径”是由水银孔隙度计所获得的细孔径10~5000nm的细孔的体积平均细孔径。

[0305] 在该固相载体满足上述范围的粒径、比表面积以及细孔径分布的情况下,成为精制对象溶液的流路的粒子间的间隙以及粒子内的比较大的细孔径与精制对象分子的结合表面积的平衡获得最适化,高流速下的结合容量维持于高水平。

[0306] 作为该固相载体的材质,例如是具有亲水性表面的聚合物,例如是通过亲水化处理而在外表面(以及在存在的情况下也在内表面)具有羟基(-OH)、羧基(-COOH)、氨基羰基(-CONH₂,或N取代型)、氨基(-NH₂,或取代型)或寡乙烯氧基或聚乙烯氧基的聚合物。在一实施方式中,该聚合物可以为聚甲基丙烯酸酯、聚丙烯酰胺、聚苯乙烯、聚乙烯醇系等合成聚合物,优选为诸如由多官能(甲基)丙烯酸酯、二乙烯基苯等多官能单体进行交联而得的共聚物的合成聚合物。这种合成聚合物可通过公知的方法轻易地制造(请参照例如J.MATER.CHEM 1991,1(3):371-374中所述的方法)。或者,也可使用诸如Toyopearl(东曹公司)的市售品。其它实施方式中的聚合物为葡聚糖、淀粉、纤维素、普鲁兰多糖(pullulan)、琼脂糖等多糖类。这种多糖类可通过公知的方法轻易地制造(请参照例如日本专利第4081143号中所述的方法)。或者,也可使用诸如Sepharose(GE Healthcare Biosciences公司)的市售品。在其它实施方式中,也可作为氧化硅、氧化铝等无机载体。

[0307] 在一实施方式中,作为被用作该固相载体的多孔性粒子的一具体例,可列举例如含有20~50质量%的交联性乙烯基单体与3~80质量%的含环氧基的乙烯基单体、20~80质量%的含二醇基的乙烯基单体的共聚物,粒径为20~80μm,比表面积为50~150m²/g,体积平均细孔径为100~400nm的多孔性有机聚合物粒子。

[0308] 应予说明,在以水银孔隙度计测定该固相载体的情况下的细孔径10~5000nm的细孔的浸入体积(细孔体积)优选为1.3mL/g以上且7.0mL/g以下。例如,在载体为合成聚合物的情况下,细孔体积优选为1.3mL/g以上,且优选为7.0mL/g以下,更优选为5.0mL/g以下,进一步优选为2.5mL/g以下,例如,优选为1.3~7.0mL/g,更优选为1.3~5.0mL/g,进一步优选为1.3~2.5mL/g。此外,例如,在载体为多糖的情况下,细孔体积优选为3.0~6.0mL/g。

[0309] 作为配体(即,本发明的免疫球蛋白结合蛋白质)键合于该固相载体的方法,可使用将蛋白质固定化至载体的一般方法来施行。可列举例如使用具有羧基的载体,通过N-羧基琥珀酰亚胺使此羧基活化,使其与配体的氨基进行反应的方法;使用具有氨基或羧基的载体,在水溶性碳二亚胺等脱水缩合剂存在下使其与配体的羧基或氨基进行反应,形成酰胺键的方法;使用具有羟基的载体,以溴化氰等卤化氰使其活化并使其与配体的氨基进行反应的方法;将载体的羟基进行对甲苯磺酰化或三氟乙磺酰化,使其与配体的氨基进行反应的方法;利用双环氧化物、表氯醇等将环氧基导入至载体中,使其与配体的氨基、羟基或硫醇基进行反应的方法;使用具有环氧基的载体,使其与配体的氨基、羟基或硫醇基进行反应的方法等。上述中,从在实施反应的水溶液中的稳定性的观点而言,较理想为经由环氧基使配体进行结合的方法。

[0310] 环氧基进行开环所生成的开环环氧基即羟基发挥下列作用:将载体表面亲水化,防止蛋白质等的非特异吸附,而且在水中使载体的韧性提升,防止高流速下的载体的破坏。

因此,在未与配体进行结合的剩余的环氧基存在于使配体进行固定化后的载体中的情况下,优选使该剩余的环氧基进行开环。作为载体中的环氧基的开环方法,可列举例如在水溶剂中,利用酸或碱于加热或室温将该载体进行搅拌的方法。此外,也可用巯基乙醇、硫代甘油等具有巯基的封闭剂(blocking agent)或单乙醇胺等具有氨基的封闭剂使环氧基进行开环。更优选的开环环氧基为通过硫代甘油使载体中所包含的环氧基进行开环所获得的开环环氧基。硫代甘油作为原料相比于巯基乙醇等而言毒性较低,此外,加成硫代甘油而得的环氧开环基相比于通过具有氨基的封闭剂所得的开环基而言具有非特异吸附较低,而且动态结合量变高的优点。

[0311] 根据需要也可在固相载体与配体间导入任意长度的分子(间隔子)。作为间隔子的例子,可列举聚亚甲基链、聚乙二醇链、糖类等。

[0312] 由于本发明的亲和载体具有耐碱性提升的配体,因而即便面对例如亲和精制中的为了重复利用该载体而在碱性条件下的清洗(例如使用0.01~1.0M氢氧化钠等碱性溶液的清洗),也不会性能明显降低。

[0313] 4. 抗体或其片段的分离方法

[0314] 对本发明的一实施方式所涉及的抗体或其片段(以下,仅记为抗体)的分离方法进行说明。本实施方式所涉及的抗体的分离方法优选包含将含有抗体的试料通液至将本发明的免疫球蛋白结合蛋白质加以固定化而得的亲和载体中,使该抗体吸附于该载体的工序(第一工序),以及使该抗体从该载体中溶出的工序(第二工序),优选在该第二工序后,进一步包含将该载体以碱性液清洗的工序(第三工序)。

[0315] 在该第一工序中,以抗体吸附于配体(本发明的免疫球蛋白结合蛋白质)的条件将含有抗体的试料流至已填充本发明的亲和载体的色谱柱等中。在该第一工序中,试料中的抗体以外的物质几乎未吸附于配体而通过色谱柱。然后,根据需要也可将载体以包含NaCl等盐的中性缓冲液清洗,以便去除微弱地保持在配体的一部分物质。

[0316] 在第二工序中,流入pH 2~5的适当的缓冲液,使吸附于配体的抗体溶出。通过将此溶出液加以回收,可从试料中分离抗体。

[0317] 为了提高抗体的纯度,也可进一步将上述第二工序中所获得的溶出液中所包含的抗体进行精制。抗体的精制可单独或适当组合使用例如阳离子交换色谱、阴离子交换色谱、混合模式色谱、亲水性相互作用色谱、疏水性相互作用色谱、尺寸排阻色谱等而施行。例如,通过对该第二工序中所获得的溶出液施加阳离子交换色谱、继而阴离子交换色谱,可将抗体进行精制。阳离子交换色谱可使用SP-Sepharose FF(GE Healthcare Biosciences公司制)、BioPro IEX S(YMC公司制)、BioPro IEX SmartSep S(YMC公司制)等施行。阴离子交换色谱可使用Q-Sepharose FF(GE Healthcare Biosciences公司制)、BioPro IEX Q(YMC公司制)、BioPro IEX SmartSep Q(YMC公司制)等施行。

[0318] 在本实施方式所涉及的抗体的分离方法中,优选接续上述第二工序而施行第三工序。在第三工序中,以碱性溶液将该亲和载体清洗(CIP清洗)。作为第三工序中所使用的碱性溶液,可列举例如氢氧化钠水溶液、氢氧化钾水溶液、三乙基胺、氢氧化四丁基铵等。此外,第三工序中所使用的该碱性溶液中的碱盐的摩尔浓度,下限值为0.001M以上,优选为0.01M以上,更优选为0.1M以上,上限值为6.0M以下,优选为4.0M以下,更优选为2.0M以下。作为所使用的该碱性溶液的pH,下限值为pH 11.0以上,优选为pH 12.0以上,更优选为pH

12.5以上,上限值为pH 16.0以下,优选为pH 15.5以下,更优选为pH 15.0以下。

[0319] 本发明的亲和载体由于蛋白质配体的耐碱性提升,即便在上述第三工序中的清洗后也稳定地保持抗体结合活性,因而可重复用于抗体分离。

[0320] 在本发明的抗体的分离方法的一实施方式中,所分离出的抗体可作为抗体医药使用。因此,在一实施方式中,本发明提供使用本发明的亲和载体的抗体医药的制造方法。该方法的顺序是除了使用含有目标抗体医药的试料以外,基本上与上述的抗体的分离方法的顺序相同。

[0321] 实施例

[0322] 以下,列举实施例来进一步具体地说明本发明。此外,以下记载是概括性地示出本发明的样式,如无特别说明,本发明并不受到这些记载所限定。

[0323] 参考例1:多孔质粒子的合成

[0324] (1) 在360g的纯水中添加聚乙烯醇(Kuraray公司制PVA-217) 3.58g,加热搅拌而使聚乙烯醇溶解,冷却后,添加十二烷基硫酸钠(和光纯药工业制) 0.36g、硫酸钠(和光纯药工业制) 0.36g以及亚硝酸钠(和光纯药工业制) 0.18g,进行搅拌而制备水溶液S。

[0325] (2) 使由甲基丙烯酸缩水甘油酯(三菱化学株式会社制) 12.00g和二乙烯基苯(新日铁化学公司制) 1.33g构成的单体组合物溶解于二异丁基酮(三井化学公司制) 24.43g中,制备单体溶液。

[0326] (3) 将(1)中所获得的水溶液S全量投入至可分离式烧瓶内,安装温度计、搅拌翼以及冷却管,设置于温水浴中,于氮环境下开始进行搅拌。将(2)中所获得的单体溶液全量投入至可分离式烧瓶内,通过温水浴进行加温。在内温到达85℃时添加2,2'-偶氮异丁腈(和光纯药工业公司制) 0.53g。

[0327] (4) 一边将(3)中所获得的反应液维持温度于86℃,一边搅拌3小时。接着,将反应液冷却后,进行过滤,以纯水和乙醇清洗。使经清洗的粒子分散于纯水中并施行倾析3次,除去小粒子。接着,以粒子的浓度成为10质量%的方式使粒子分散于纯水中,获得多孔质粒子(PB)分散液。

[0328] 实施例1:免疫球蛋白结合蛋白质(PrAt-0~32)的制作

[0329] 取得免疫球蛋白结合蛋白质PrAt-0~32。PrAt-0是包含蛋白A的C结构域(序列号3)的A1V/G29A变异体(耐碱性提升变异体;非专利文献1)通过肽键串联地连结而得的同源四聚体的免疫球蛋白结合蛋白质。PrAt-1~32是对PrAt-0的各免疫球蛋白结合结构域导入表1所述的变异而得的变异体。

[0330] [表1]

[0331]

免疫球蛋白 结合蛋白质	亲结构域	导入变异	变异 结构域	结构域 数
PrAt-0	序列号 3 (A1V/G29A)	-	-	4
PrAt-1		N3Q	序列号 7	4
PrAt-2		Δ K4	序列号 8	4
PrAt-3		N6Q	序列号 9	4
PrAt-4		N11Q	序列号 10	4
PrAt-5		N3Q, N6Q, N11Q	序列号 11	4
PrAt-6		E24D	序列号 12	4
PrAt-7		E25D	序列号 13	4
PrAt-8		S39K	序列号 14	4
PrAt-9		S39R	序列号 15	4
PrAt-10		A46D	序列号 16	4
PrAt-11		A46E	序列号 17	4
PrAt-12		A46K	序列号 18	4
PrAt-13		A46R	序列号 19	4
PrAt-14		K49R	序列号 20	4
PrAt-15		K58R	序列号 21	4
PrAt-16		Δ K58	序列号 22	4
PrAt-17		N3A, N11Q	序列号 23	4
PrAt-18		N3D, N11Q	序列号 24	4
PrAt-19		N6D, N11Q	序列号 25	4
PrAt-20		N3D, N6D, N11Q	序列号 26	4
PrAt-21		N3A, N6D, N11Q	序列号 27	4
PrAt-22		N11Q, T23R	序列号 28	4
PrAt-23		N11Q, T23L	序列号 29	4
PrAt-24		N11Q, T23S	序列号 30	4
PrAt-25		N11Q, K49R	序列号 31	4
PrAt-26		N11Q, T23R, K49R	序列号 32	4
PrAt-27		N11Q, T23L, K49R	序列号 33	4
PrAt-28		N11Q, T23S, K49R	序列号 34	4
PrAt-29		N11Q, K58R	序列号 35	4
PrAt-30		T23R	序列号 36	4
PrAt-31		T23L	序列号 37	4
PrAt-32		T23S	序列号 38	4

[0332] PrAt-0~32的表达和精制是各自依以下的方式施行。使用编码PrAt-0~32的质粒将大肠杆菌BL21 (DE3) (NEW ENGLAND BIOLABS公司制) 进行转化,将所获得的转化体在富营养培养基中于37℃进行培养至对数增殖期。然后,通过在培养基中添加终浓度1mM异丙基- β -硫代半乳糖苷(和光纯药工业公司制),并进一步于37℃培养4小时,使目标蛋白质进行表达。继而,将培养液进行离心分离并除去上清液,在所获得的菌体中添加包含来自蛋清的溶菌酶(和光纯药工业公司制)以及聚氧乙烯(10) 辛基苯基醚(和光纯药工业公司制)的pH 9.5的30mM Tris缓冲液并将菌体打碎。从所获得的细胞打碎液中,通过阳离子交换色谱

(SP-Sepharose FF, GE Healthcare Biosciences公司制)以及阴离子交换色谱(Q-Sepharose FF, GE Healthcare Biosciences公司制)将重组免疫球蛋白结合蛋白质进行精制。将经精制的免疫球蛋白结合蛋白质对10mM柠檬酸缓冲液pH 6.0进行透析。经SDS-PAGE确认的重组型免疫球蛋白结合蛋白质的纯度为95%以上。

[0333] 实施例2:免疫球蛋白结合蛋白质(PrAp-0~41)的制作

[0334] 取得免疫球蛋白结合蛋白质PrAp-0~39。PrAp-0是包含蛋白A的C结构域(序列号3)的A1V/G29A变异体通过肽键串联地连结而得的同源五聚体的免疫球蛋白结合蛋白质, PrAp-21是将半胱氨酸(C)连结至蛋白A的C结构域(序列号3)的A1V/G29A变异体通过肽键串联地连结而得的同源五聚体的C末端而得的免疫球蛋白结合蛋白质。PrAp-1~20是对PrAp-0的各免疫球蛋白结合结构域导入表2所述的变异而得的变异体, PrAp-22~41是对PrAp-21的各免疫球蛋白结合结构域导入表3所述的变异而得的变异体。

[0335] [表2]

免疫球蛋白结合蛋白质	亲结构域	导入变异	变异结构域	结构域数	C末端标签
PrAp-0	序列号 3 (A1V/G29A)	-	-	5	-
PrAp-1		N11Q	序列号 10	5	-
PrAp-2		N3Q, N6Q, N11Q	序列号 11	5	-
PrAp-3		K49R	序列号 20	5	-
PrAp-4		K58R	序列号 21	5	-
PrAp-5		N3A, N11Q	序列号 23	5	-
PrAp-6		N3D, N11Q	序列号 24	5	-
PrAp-7		N6D, N11Q	序列号 25	5	-
PrAp-8		N3D, N6D, N11Q	序列号 26	5	-
PrAp-9		N3A, N6D, N11Q	序列号 27	5	-
PrAp-10		N11Q, T23R	序列号 28	5	-
PrAp-11		N11Q, T23L	序列号 29	5	-
PrAp-12		N11Q, T23S	序列号 30	5	-
PrAp-13		N11Q, K49R	序列号 31	5	-
PrAp-14		N11Q, T23R, K49R	序列号 32	5	-
PrAp-15		N11Q, T23L, K49R	序列号 33	5	-
PrAp-16		N11Q, T23S, K49R	序列号 34	5	-
PrAp-17		N11Q, K58R	序列号 35	5	-
PrAp-18		T23R	序列号 36	5	-
PrAp-19		T23L	序列号 37	5	-
PrAp-20		T23S	序列号 38	5	-

[0337] [表3]

[0338]	免疫球蛋白结合蛋白质	亲结构域	导入变异	变异结构域	结构域数	C末端标签
	PrAp-21	序列号 3 (A1V/G29A)	-	-	5	C
	PrAp-22		N11Q	序列号 10	5	C
	PrAp-23		N3Q, N6Q, N11Q	序列号 11	5	C
	PrAp-24		K49R	序列号 20	5	C
	PrAp-25		K58R	序列号 21	5	C
	PrAp-26		N3A, N11Q	序列号 23	5	C
	PrAp-27		N3D, N11Q	序列号 24	5	C
	PrAp-28		N6D, N11Q	序列号 25	5	C
	PrAp-29		N3D, N6D, N11Q	序列号 26	5	C
	PrAp-30		N3A, N6D, N11Q	序列号 27	5	C
	PrAp-31		N11Q, T23R	序列号 28	5	C
	PrAp-32		N11Q, T23L	序列号 29	5	C
	PrAp-33		N11Q, T23S	序列号 30	5	C
	PrAp-34		N11Q, K49R	序列号 31	5	C
	PrAp-35		N11Q, T23R, K49R	序列号 32	5	C
	PrAp-36		N11Q, T23L, K49R	序列号 33	5	C
	PrAp-37		N11Q, T23S, K49R	序列号 34	5	C
	PrAp-38		N11Q, K58R	序列号 35	5	C
	PrAp-39		T23R	序列号 36	5	C
	PrAp-40		T23L	序列号 37	5	C
	PrAp-41		T23S	序列号 38	5	C

[0339] PrAp-0~41的表达和精制与PrAt-0~32同样地施行。经SDS-PAGE确认的重组型免疫球蛋白结合蛋白质的纯度为95%以上。

[0340] 实施例3:免疫球蛋白结合蛋白质(PrAh-0~41)的制作

[0341] 取得免疫球蛋白结合蛋白质PrAh-0~41。PrAh-0是包含蛋白A的C结构域(序列号3)的A1V/G29A变异体通过肽键串联地连结而得的同源六聚体的免疫球蛋白结合蛋白质, PrAh-21是将半胱氨酸(C)连结至蛋白A的C结构域(序列号3)的A1V/G29A变异体通过肽键串联地连结而得的同源六聚体的C末端而得的免疫球蛋白结合蛋白质。PrAh-1~20是对PrAh-0的各免疫球蛋白结合结构域导入表4所述的变异而得的变异体, PrAh-22~41是对PrAh-21的各免疫球蛋白结合结构域导入表5所述的变异而得的变异体。

[0342] [表4]

[0343]

免疫球蛋白 结合蛋白质	亲结构域	导入变异	变异 结构域	结构域 数	C 末端 标签
PrAh-0	序列号 3 (A1V/G29A)	-	-	6	-
PrAh-1		N11Q	序列号 10	6	-
PrAh-2		N3Q, N6Q, N11Q	序列号 11	6	-
PrAh-3		K49R	序列号 20	6	-
PrAh-4		K58R	序列号 21	6	-
PrAh-5		N3A, N11Q	序列号 23	6	-
PrAh-6		N3D, N11Q	序列号 24	6	-
PrAh-7		N6D, N11Q	序列号 25	6	-
PrAh-8		N3D, N6D, N11Q	序列号 26	6	-
PrAh-9		N3A, N6D, N11Q	序列号 27	6	-
PrAh-10		N11Q, T23R	序列号 28	6	-
PrAh-11		N11Q, T23L	序列号 29	6	-
PrAh-12		N11Q, T23S	序列号 30	6	-
PrAh-13		N11Q, K49R	序列号 31	6	-
PrAh-14		N11Q, T23R, K49R	序列号 32	6	-
PrAh-15		N11Q, T23L, K49R	序列号 33	6	-
PrAh-16		N11Q, T23S, K49R	序列号 34	6	-
PrAh-17		N11Q, K58R	序列号 35	6	-
PrAh-18		T23R	序列号 36	6	-
PrAh-19		T23L	序列号 37	6	-
PrAh-20		T23S	序列号 38	6	-

[0344] [表5]

[0345]

免疫球蛋白 结合蛋白质	亲结构域	导入变异	变异 结构域	结构域 数	C 末端 标签
PrAh-21	序列号 3 (A1V/G29A)	-	-	6	C
PrAh-22		N11Q	序列号 10	6	C
PrAh-23		N3Q, N6Q, N11Q	序列号 11	6	C
PrAh-24		K49R	序列号 20	6	C
PrAh-25		K58R	序列号 21	6	C
PrAh-26		N3A, N11Q	序列号 23	6	C
PrAh-27		N3D, N11Q	序列号 24	6	C
PrAh-28		N6D, N11Q	序列号 25	6	C
PrAh-29		N3D, N6D, N11Q	序列号 26	6	C
PrAh-30		N3A, N6D, N11Q	序列号 27	6	C
PrAh-31		N11Q, T23R	序列号 28	6	C
PrAh-32		N11Q, T23L	序列号 29	6	C
PrAh-33		N11Q, T23S	序列号 30	6	C
PrAh-34		N11Q, K49R	序列号 31	6	C
PrAh-35		N11Q, T23R, K49R	序列号 32	6	C
PrAh-36		N11Q, T23L, K49R	序列号 33	6	C
PrAh-37		N11Q, T23S, K49R	序列号 34	6	C
PrAh-38		N11Q, K58R	序列号 35	6	C
PrAh-39		T23R	序列号 36	6	C
PrAh-40		T23L	序列号 37	6	C
PrAh-41		T23S	序列号 38	6	C

[0346] PrAh-0~41的表达和精制与PrAt-0~32同样地施行。经SDS-PAGE确认的重组型免疫球蛋白结合蛋白质的纯度为95%以上。

[0347] 实施例4:配体固定化粒子的制备

[0348] 对参考例1中所取得的多孔质粒子(PB) 8mg,加入溶解有实施例1中所制备出的PrAt-0 1.16mg的包含1.1M硫酸钠的0.1M碳酸缓冲液(pH 8.8) 450μL,将混合液于25℃振荡5小时,使PrAt-0键合于PB。使用硫代甘油将残存于粒子中的环氧基进行封闭后,使用0.5M NaOH以及0.1M柠檬酸缓冲液(pH 3.2)将粒子清洗,获得配体固定化粒子(PrAt-0/PB)。以同样的顺序,获得PrAt-1~32中的任一个进行结合而得的配体固定化粒子(PrAt-1/PB~PrAt-32/PB)。此外,以同样的顺序,获得PrAp-0~41中的任一个进行结合而得的配体固定化粒子(PrAp-0/PB~PrAp-41/PB)。再者,以同样的顺序,获得PrAh-0~41中的任一个进行结合而得的配体固定化粒子(PrAh-0/PB~PrAh-41/PB)。

[0349] 实施例5:免疫球蛋白结合蛋白质(PrAs-0~22)的制作

[0350] 取得免疫球蛋白结合蛋白质PrAs-0~22。PrAs-0是将6次重复组氨酸标签(HHHHHH序列)连结至蛋白A的C结构域(序列号3)的A1V/G29A变异体的N末端而得的免疫球蛋白结合蛋白质。PrAs-1~22是对PrAs-0的各免疫球蛋白结合结构域导入表6所述的变异而得的变异体。

[0351] [表6]

[0352]	免疫球蛋白 结合蛋白质	亲结构域	导入 变异	变异 结构域	结构域 数	N 末端 标签
	PrAs-0	序列号 3 (A1V/G29A)	-	-	1	HHHHHH
	PrAs-1		N11A	序列号 39	1	
	PrAs-2		N11R	序列号 40	1	
	PrAs-3		N11D	序列号 41	1	
	PrAs-4		N11C	序列号 42	1	
	PrAs-5		N11Q	序列号 10	1	
	PrAs-6		N11E	序列号 43	1	
	PrAs-7		N11H	序列号 44	1	
	PrAs-8		N11I	序列号 45	1	
	PrAs-9		N11L	序列号 46	1	
	PrAs-10		N11K	序列号 47	1	
	PrAs-11		N11M	序列号 48	1	
	PrAs-12		N11F	序列号 49	1	
	PrAs-13		N11T	序列号 50	1	
	PrAs-14		N11W	序列号 51	1	
	PrAs-15		N11Y	序列号 52	1	
	PrAs-16		N11V	序列号 53	1	
	PrAs-17		N11G	序列号 54	1	
	PrAs-18		N11P	序列号 55	1	
	PrAs-19		N11S	序列号 56	1	
	PrAs-20		T23R	序列号 36	1	
	PrAs-21		T23L	序列号 37	1	
	PrAs-22		T23S	序列号 38	1	

[0353] PrAs-0~22的表达和精制是除了通过亲和色谱 (HisTrap FF, GE Healthcare Biosciences公司制) 将重组免疫球蛋白结合蛋白质进行精制以外, 与PrAt-0~32同样地施行。经SDS-PAGE确认的重组型免疫球蛋白结合蛋白质的纯度为95%以上。

[0354] 试验例1

[0355] 针对实施例4中所制作出的包含变异结构域的配体固定化粒子PrAt-1/PB~PrAt-29/PB, 评价相对于包含亲结构域的配体固定化粒子PrAt-0的相对耐碱性。

[0356] (1) 静态结合容量 (SBC) 的测定

[0357] 在2mg的配体固定化粒子 (PrAt-0/PB) 中添加包含2.0mg的IgG的20mM磷酸缓冲液 (pH 7.5) 400μL, 保温培养30分钟。接着以20mM磷酸缓冲液 (pH 7.5) 400μL清洗后, 添加50mM柠檬酸钠缓冲液 (pH 2.5) 400μL, 将包含IgG的溶出液加以回收。通过吸光度测定算出溶出液中的IgG量, 由溶出IgG量和载体体积求出PrAt-0/PB的静态结合容量 (SBC)。以同样的顺序, 求出PrAt-1/PB~PrAt-29/PB的SBC。此外, 以同样的顺序, 求出PrAh-21/PB~PrAh-41/PB的SBC。

[0358] (2) 耐碱性的评价: PrAt-1~29

[0359] 使2mg的配体固定化粒子 (PrAt-0/PB) 以1.0M NaOH进行平衡化后, 保温培养24小时。接着以20mM磷酸缓冲液 (pH 7.5) 使粒子进行平衡化后, 添加包含2.0mg的IgG的20mM磷酸缓冲液 (pH 7.5) 400μL, 保温培养30分钟。接着以20mM磷酸缓冲液 (pH 7.5) 400μL清洗后,

添加50mM柠檬酸钠缓冲液(pH 2.5) 400 μ L,将包含IgG的溶出液加以回收。通过吸光度测定算出溶出液中的IgG量,由溶出IgG量和载体体积求出暴露于碱的PrAt-0/PB的SBC。以同样的顺序,求出暴露于碱的PrAt-1~29/PB的SBC。针对各配体固定化粒子,算出碱暴露后的SBC相对于(1)中所求出的SBC的相对值(SBC维持率),接着依照以下式算出各配体固定化粒子(PrAt-1~29)相对于PrAt-0的相对耐碱性(%)。

[0360] 相对耐碱性(%) = (PrAt-N(N=1~29)的SBC维持率) / (PrAt-0的SBC维持率) $\times$ 100

[0361] (3)耐碱性的评价:PrAh-22~38

[0362] 以与(2)同样的顺序求出暴露于碱的PrAh-21~38/PB的SBC,算出PrAh-22~38相对于PrAh-21的相对耐碱性(%)。

[0363] (4)耐碱性的评价:PrAh-39~41

[0364] 使配体固定化粒子(PrAh-21/PB和PrAh-39~41/PB)以与(2)同样的顺序,只是以0.5M NaOH代替1.0M NaOH进行平衡化后,保温培养24小时。然后,以与(2)同样的方法,求出暴露于碱的PrAh-21以及39~41/PB的SBC,算出PrAh-39~41相对于PrAh-21的相对耐碱性(%)。

[0365] 将(1)中所测定出的SBC以及(2)~(4)中所测定出的相对耐碱性的测定结果示于表7~9。PrAt-1~29/PB的SBC相较于PrAt-0/PB而言并未见到较大差异。另一方面,PrAt-1~29/PB的相对耐碱性相较于PrAt-0/PB而言提升14~64%。此外,PrAh-22~38/PB的SBC相较于PrAh-21/PB而言并未见到较大差异,另一方面,相对耐碱性相较于PrAh-21/PB而言提升28~69%。再者,PrAh-39~41/PB的SBC相较于PrAh-21/PB而言并未见到较大差异,另一方面,相对耐碱性相较于PrAh-21/PB而言提升22~26%。由这些结果,显示出包含变异结构域的实施例1~3的免疫球蛋白结合蛋白质与变异导入前相比,耐碱性较高,即便置于暴露于1.0M或0.5M氢氧化钠24小时的比较严酷的条件后也可维持抗体结合活性。

[0366] [表7]

[0367]

配体固定化 粒子	SBC (mg/mL-粒子)	相对耐碱性 (%)
PrAt-0/PB	65.9	(100)
PrAt-1/PB	69.6	114
PrAt-2/PB	52.7	155
PrAt-3/PB	65.7	118
PrAt-4/PB	69.3	144
PrAt-5/PB	75.8	154
PrAt-6/PB	67.8	125
PrAt-7/PB	76.7	124
PrAt-8/PB	67.2	131
PrAt-9/PB	64.4	135
PrAt-10/PB	69.5	134
PrAt-11/PB	68.0	125
PrAt-12/PB	63.2	164
PrAt-13/PB	70.3	156
PrAt-14/PB	68.7	130
PrAt-15/PB	75.1	127
PrAt-16/PB	68.6	128
PrAt-17/PB	67.2	153
PrAt-18/PB	69.9	152
PrAt-19/PB	66.4	148
PrAt-20/PB	68.1	158
PrAt-21/PB	67.4	160
PrAt-22/PB	67.3	151
PrAt-23/PB	68.2	154
PrAt-24/PB	64.6	147
PrAt-25/PB	69.7	149
PrAt-26/PB	69.5	160
PrAt-27/PB	70.0	161
PrAt-28/PB	65.3	153
PrAt-29/PB	72.1	150

[0368] [表8]

[0369]

配体固定化 粒子	SBC (mg/mL-粒子)	相对耐碱性 (%)
PrAh-21/PB	77.8	(100)
PrAh-22/PB	76.2	147
PrAh-23/PB	79.1	157
PrAh-24/PB	71.5	136
PrAh-25/PB	80.2	128
PrAh-26/PB	76.9	156
PrAh-27/PB	77.8	153
PrAh-28/PB	77.3	152
PrAh-29/PB	80.7	156
PrAh-30/PB	78.9	169
PrAh-31/PB	75.5	156
PrAh-32/PB	79.0	157
PrAh-33/PB	76.2	150
PrAh-34/PB	78.4	155
PrAh-35/PB	78.1	163
PrAh-36/PB	77.6	166
PrAh-37/PB	75.0	157
PrAh-38/PB	79.4	151

[0370] [表9]

[0371]

配体固定化 粒子	SBC (mg/mL-粒子)	相对耐碱性 (%)
PrAh-21/PB	77.8	(100)
PrAh-39/PB	75.7	122
PrAh-40/PB	77.6	122
PrAh-41/PB	83.1	126

[0372] 试验例2

[0373] 针对实施例5中所制作出的包含变异结构域的免疫球蛋白结合蛋白质PrAs-1~PrAs-19,评价相对于包含亲结构域的免疫球蛋白结合蛋白质PrAs-0的相对耐碱性。

[0374] (1) 试料溶液的制备

[0375] 将0.13mg的免疫球蛋白结合蛋白质(PrAs-0和PrAs-1~19)在1.0M氢氧化钠水溶液中进行保温培养。在紧接于保温培养开始后或保温培养开始24小时后,将该液以1.0M柠檬酸进行中和。接着将中和溶液使用包含0.1%来自牛血清的白蛋白(和光纯药工业公司制)以及0.02%Triton X-100(和光纯药工业公司制)的D-PBS缓冲液稀释成蛋白质浓度10μg/mL,制备试料溶液。针对这些试料溶液,将PrAs-N(N=0~19)在氢氧化钠中在紧接于保温培养开始后进行中而得的试料溶液定为PrAs-Na,将在保温培养开始24小时后进行中而得的试料溶液定为PrAs-Nb。

[0376] (2) IgG结合生物传感器的制备

[0377] 使1.0mg的IgG与3.9μg的EZ-Link NHS-PEG4-Biotin(Thermo Fisher Scientific公司制)进行反应,将IgG进行生物素化。使用Octet RED 96e系统(Pall ForteBio公司制)使其与链霉亲和素生物传感器(Pall ForteBio公司制)接触,将IgG固定化至传感器上。

[0378] (3)耐碱性的评价

[0379] 使用Octet RED 96e系统使IgG结合生物传感器与试料溶液接触,使免疫球蛋白结合蛋白质键合于传感器上的IgG。由传感图谱决定结合速度,算出PrAs-Nb的结合速度相对于PrAs-Na的结合速度的相对值(结合速度维持率)。接着,依照以下式算出各免疫球蛋白结合蛋白质(PrAs-0~19)相对于PrAs-0的相对耐碱性(%)。

[0380] 相对耐碱性(%) = { (PrAs-N (N=1~19) 的结合速度维持率) / (PrAs-0的结合速度维持率) } × 100

[0381] PrAs-N (N=0~19) 的结合速度维持率 = (PrAs-N (N=0~19) b的结合速度) / (PrAs-N (N=0~19) a的结合速度)

[0382] 将相对耐碱性的测定结果示于表10。PrAs-17~19的相对耐碱性相较于PrAs-0而言降低,另一方面,PrAs-1~16的相对耐碱性相较于PrAs-0而言提升60~338%。由这些结果,显示出包含变异结构域的免疫球蛋白结合蛋白质PrAs-1~16与变异导入前相比耐碱性较高,即便置于暴露于1.0M氢氧化钠24小时的比较严酷的条件后也可维持抗体结合活性。

[0383] [表10]

免疫球蛋白 结合蛋白质	相对耐碱性 (%)
PrAs-0	(100)
PrAs-1	368
PrAs-2	331
PrAs-3	176
PrAs-4	160
PrAs-5	375
PrAs-6	342
PrAs-7	362
PrAs-8	438
PrAs-9	348
PrAs-10	370
PrAs-11	429
PrAs-12	306
PrAs-13	170
PrAs-14	281
PrAs-15	368
PrAs-16	409
PrAs-17	94
PrAs-18	19
PrAs-19	84

[0384]

[0385] 试验例3

[0386] 针对实施例5中所制作出的免疫球蛋白结合蛋白质 (PrAs-0和PrAs-20~22),除了在0.5M氢氧化钠水溶液中进行保温培养以外,以与试验例2同样的顺序,算出耐碱性。将相对耐碱性的测定结果示于表11。由于PrAs-20~22的相对耐碱性相较于PrAs-0而言提升21~31%,所以显示出与变异导入前相比耐碱性较高。

[0387] [表11]

[0388]

免疫球蛋白 结合蛋白质	相对耐碱性 (%)
PrAs-0	(100)
PrAs-20	121
PrAs-21	125
PrAs-22	131

序列表

<110> JSR株式会社
 <110> JSR微有限公司
 <110> JSR微公司
 <120> 免疫球蛋白结合蛋白质, 及以及使用其之的亲体和亲和载体
 <130> JSR0092
 <150> JP 2018-157620
 <151> 2018-08-24
 <150> JP 2019-073529
 <151> 2019-04-08
 <160> 62
 <170> PatentIn version 3.5
 <210> 1
 <211> 58
 <212> PRT
 <213> 金黄色葡萄球菌
 <220>
 <223> 蛋白 A, B 结构域
 <400> 1

Ala	Asp	Asn	Lys	Phe	Asn	Lys	Glu	Gln	Gln	Asn	Ala	Phe	Tyr	Glu	Ile
1			5					10					15		
Leu	His	Leu	Pro	Asn	Leu	Asn	Glu	Glu	Gln	Arg	Asn	Gly	Phe	Ile	Gln
			20					25					30		
Ser	Leu	Lys	Asp	Asp	Pro	Ser	Gln	Ser	Ala	Asn	Leu	Leu	Ala	Glu	Ala
			35				40						45		
Lys	Lys	Leu	Asn	Asp	Ala	Gln	Ala	Pro	Lys						
			50				55								

<210> 2
 <211> 58
 <212> PRT
 <213> 金黄色葡萄球菌
 <220>
 <223> 蛋白 A, Z 结构域
 <400> 2

Val	Asp	Asn	Lys	Phe	Asn	Lys	Glu	Gln	Gln	Asn	Ala	Phe	Tyr	Glu	Ile
1			5					10					15		
Leu	His	Leu	Pro	Asn	Leu	Asn	Glu	Glu	Gln	Arg	Asn	Ala	Phe	Ile	Gln
			20					25					30		

Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ala Asn Leu Leu Ala Glu Ala
35 40 45

Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys
50 55

<210> 3
<211> 58
<212> PRT
<213> 金黄色葡萄球菌
<220>
<223> 蛋白 A, C 结构域
<400> 3

Ala Asp Asn Lys Phe Asn Lys Glu Gln Gln Asn Ala Phe Tyr Glu Ile
1 5 10 15
Leu His Leu Pro Asn Leu Thr Glu Glu Gln Arg Asn Gly Phe Ile Gln
20 25 30
Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser Val Ser Lys Glu Ile Leu Ala Glu Ala
35 40 45

Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys
50 55

<210> 4
<211> 61
<212> PRT
<213> 金黄色葡萄球菌
<220>
<223> 蛋白 A, D 结构域
<400> 4

Ala Asp Ala Gln Gln Asn Asn Phe Asn Lys Asp Gln Gln Ser Ala Phe
1 5 10 15
Tyr Glu Ile Leu Asn Met Pro Asn Leu Asn Glu Ala Gln Arg Asn Gly
20 25 30
Phe Ile Gln Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser Gln Ser Thr Asn Val Leu
35 40 45

Gly Glu Ala Lys Lys Leu Asn Glu Ser Gln Ala Pro Lys
50 55 60

<210> 5
<211> 58
<212> PRT
<213> 金黄色葡萄球菌
<220>

<223> 蛋白 A, A 结构域

<400> 5

Ala Asp Asn Asn Phe Asn Lys Glu Gln Gln Asn Ala Phe Tyr Glu Ile

1 5 10 15

Leu Asn Met Pro Asn Leu Asn Glu Glu Gln Arg Asn Gly Phe Ile Gln

20 25 30

Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ala Asn Leu Leu Ser Glu Ala

35 40 45

Lys Lys Leu Asn Glu Ser Gln Ala Pro Lys

50 55

<210> 6

<211> 56

<212> PRT

<213> 金黄色葡萄球菌

<220>

<223> 蛋白 A, E 结构域

<400> 6

Ala Gln His Asp Glu Ala Gln Gln Asn Ala Phe Tyr Gln Val Leu Asn

1 5 10 15

Met Pro Asn Leu Asn Ala Asp Gln Arg Asn Gly Phe Ile Gln Ser Leu

20 25 30

Lys Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ala Asn Val Leu Gly Glu Ala Gln Lys

35 40 45

Leu Asn Asp Ser Gln Ala Pro Lys

50 55

<210> 7

<211> 58

<212> PRT

<213> 金黄色葡萄球菌

<220>

<223> N3Q 变异 结构域

<400> 7

Val Asp Gln Lys Phe Asn Lys Glu Gln Gln Asn Ala Phe Tyr Glu Ile

1 5 10 15

Leu His Leu Pro Asn Leu Thr Glu Glu Gln Arg Asn Ala Phe Ile Gln

20 25 30

Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser Val Ser Lys Glu Ile Leu Ala Glu Ala

35 40 45

Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys

50 55
 <210> 8
 <211> 57
 <212> PRT
 <213> 金黄色葡萄球菌
 <220>
 <223> Δ-K4 变异 结构域
 <400> 8
 Val Asp Asn Phe Asn Lys Glu Gln Gln Asn Ala Phe Tyr Glu Ile Leu
 1 5 10 15
 His Leu Pro Asn Leu Thr Glu Glu Gln Arg Asn Ala Phe Ile Gln Ser
 20 25 30
 Leu Lys Asp Asp Pro Ser Val Ser Lys Glu Ile Leu Ala Glu Ala Lys
 35 40 45
 Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys
 50 55
 <210> 9
 <211> 58
 <212> PRT
 <213> 金黄色葡萄球菌
 <220>
 <223> N6Q 变异 结构域
 <400> 9
 Val Asp Asn Lys Phe Gln Lys Glu Gln Gln Asn Ala Phe Tyr Glu Ile
 1 5 10 15
 Leu His Leu Pro Asn Leu Thr Glu Glu Gln Arg Asn Ala Phe Ile Gln
 20 25 30
 Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser Val Ser Lys Glu Ile Leu Ala Glu Ala
 35 40 45
 Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys
 50 55
 <210> 10
 <211> 58
 <212> PRT
 <213> 金黄色葡萄球菌
 <220>
 <223> N11Q 变异 结构域
 <400> 10
 Val Asp Asn Lys Phe Asn Lys Glu Gln Gln Gln Ala Phe Tyr Glu Ile

1	5	10	15
Leu His Leu Pro Asn Leu Thr Glu Glu Gln Arg Asn Ala Phe Ile Gln			
	20	25	30
Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser Val Ser Lys Glu Ile Leu Ala Glu Ala			
	35	40	45
Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys			

50	55
----	----

<210> 11

<211> 58

<212> PRT

<213> 金黄色葡萄球菌

<220>

<223> N3Q, N6Q, N11Q 变异 结构域

<400> 11

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

<210> 12

<211> 58

<212> PRT

<213> 金黄色葡萄球菌

<220>

<223> E24D 变异 结构域

<400> 12

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

<210> 13

<211> 58

<212> PRT

<213> 金黄色葡萄球菌

<220>

<223> E25D 变异 结构域

<400> 13

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

<210> 14

<211> 58

<212> PRT

<213> 金黄色葡萄球菌

<220>

<223> S39K 变异 结构域

<400> 14

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

<210> 15

<211> 58

<212> PRT

<213> 金黄色葡萄球菌

<220>

<223> S39R 变异 结构域

<400> 15

Val Asp Asn Lys Phe Asn Lys Glu Gln Gln Asn Ala Phe Tyr Glu Ile
1 5 10 15
Leu His Leu Pro Asn Leu Thr Glu Glu Gln Arg Asn Ala Phe Ile Gln
 20 25 30

Ser Leu Lys Asp Asp Pro Arg Val Ser Lys Glu Ile Leu Ala Glu Ala
35 40 45

Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys
50 55

<210> 16

<211> 58

<212> PRT

<213> 金黄色葡萄球菌

<220>

<223> A46D 变异 结构域

<400> 16

Val Asp Asn Lys Phe Asn Lys Glu Gln Gln Asn Ala Phe Tyr Glu Ile
1 5 10 15

Leu His Leu Pro Asn Leu Thr Glu Glu Gln Arg Asn Ala Phe Ile Gln
20 25 30

Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser Val Ser Lys Glu Ile Leu Asp Glu Ala
35 40 45

Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys
50 55

<210> 17

<211> 58

<212> PRT

<213> 金黄色葡萄球菌

<220>

<223> A46E 变异 结构域

<400> 17

Val Asp Asn Lys Phe Asn Lys Glu Gln Gln Asn Ala Phe Tyr Glu Ile
1 5 10 15

Leu His Leu Pro Asn Leu Thr Glu Glu Gln Arg Asn Ala Phe Ile Gln
20 25 30

Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser Val Ser Lys Glu Ile Leu Glu Glu Ala
35 40 45

Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys
50 55

<210> 18

<211> 58

<212> PRT

<213> 金黄色葡萄球菌

<220>

<223> A46K 变异 结构域

<400> 18

Val Asp Asn Lys Phe Asn Lys Glu Gln Gln Asn Ala Phe Tyr Glu Ile

1 5 10 15

Leu His Leu Pro Asn Leu Thr Glu Glu Gln Arg Asn Ala Phe Ile Gln

20 25 30

Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser Val Ser Lys Glu Ile Leu Lys Glu Ala

35 40 45

Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys

50 55

<210> 19

<211> 58

<212> PRT

<213> 金黄色葡萄球菌

<220>

<223> A46R 变异 结构域

<400> 19

Val Asp Asn Lys Phe Asn Lys Glu Gln Gln Asn Ala Phe Tyr Glu Ile

1 5 10 15

Leu His Leu Pro Asn Leu Thr Glu Glu Gln Arg Asn Ala Phe Ile Gln

20 25 30

Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser Val Ser Lys Glu Ile Leu Arg Glu Ala

35 40 45

Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys

50 55

<210> 20

<211> 58

<212> PRT

<213> 金黄色葡萄球菌

<220>

<223> K49R 变异 结构域

<400> 20

Val Asp Asn Lys Phe Asn Lys Glu Gln Gln Asn Ala Phe Tyr Glu Ile

1 5 10 15

Leu His Leu Pro Asn Leu Thr Glu Glu Gln Arg Asn Ala Phe Ile Gln

20 25 30

Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser Val Ser Lys Glu Ile Leu Ala Glu Ala

35 40 45

Arg Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys

50	55
<210> 21	
<211> 58	
<212> PRT	
<213> 金黄色葡萄球菌	
<220>	
<223> K58R 变异 结构域	
<400> 21	
Val Asp Asn Lys Phe Asn Lys Glu Gln Gln Asn Ala Phe Tyr Glu Ile	
1 5 10 15	
Leu His Leu Pro Asn Leu Thr Glu Glu Gln Arg Asn Ala Phe Ile Gln	
20 25 30	
Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser Val Ser Lys Glu Ile Leu Ala Glu Ala	
35 40 45	
Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Arg	
50 55	
<210> 22	
<211> 57	
<212> PRT	
<213> 金黄色葡萄球菌	
<220>	
<223> Δ-K58 变异 结构域	
<400> 22	
Val Asp Asn Lys Phe Asn Lys Glu Gln Gln Asn Ala Phe Tyr Glu Ile	
1 5 10 15	
Leu His Leu Pro Asn Leu Thr Glu Glu Gln Arg Asn Ala Phe Ile Gln	
20 25 30	
Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser Val Ser Lys Glu Ile Leu Ala Glu Ala	
35 40 45	
Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro	
50 55	
<210> 23	
<211> 58	
<212> PRT	
<213> 金黄色葡萄球菌	
<220>	
<223> N3A, N11Q 变异 结构域	
<400> 23	
Val Asp Ala Lys Phe Asn Lys Glu Gln Gln Gln Ala Phe Tyr Glu Ile	

1	5	10	15												
Leu	His	Leu	Pro	Asn	Leu	Thr	Glu	Glu	Gln	Arg	Asn	Ala	Phe	Ile	Gln
		20					25					30			
Ser	Leu	Lys	Asp	Asp	Pro	Ser	Val	Ser	Lys	Glu	Ile	Leu	Ala	Glu	Ala
		35					40					45			
Lys	Lys	Leu	Asn	Asp	Ala	Gln	Ala	Pro	Lys						
	50						55								

<210> 24

<211> 58

<212> PRT

<213> 金黄色葡萄球菌

<220>

<223> N3D, N11Q 变异 结构域

<400> 24

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

<210> 25

<211> 58

<212> PRT

<213> 金黄色葡萄球菌

<220>

<223> N6D, N11Q 变异 结构域

<400> 25

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

<210> 26

<211> 58

<212> PRT

<213> 金黄色葡萄球菌

<220>

<223> N3D, N6D, N11Q 变异 结构域

<400> 26

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

<210> 27

<211> 58

<212> PRT

<213> 金黄色葡萄球菌

<220>

<223> N3A, N6D, N11Q 变异 结构域

<400> 27

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

<210> 28

<211> 58

<212> PRT

<213> 金黄色葡萄球菌

<220>

<223> N11Q, T23R 变异 结构域

<400> 28

```
Val Asp Asn Lys Phe Asn Lys Glu Gln Gln Gln Ala Phe Tyr Glu Ile
1           5           10           15
Leu His Leu Pro Asn Leu Arg Glu Glu Gln Arg Asn Ala Phe Ile Gln
           20           25           30
```

Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser Val Ser Lys Glu Ile Leu Ala Glu Ala
35 40 45

Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys
50 55

<210> 29

<211> 58

<212> PRT

<213> 金黄色葡萄球菌

<220>

<223> N11Q, T23L 变异 结构域

<400> 29

Val Asp Asn Lys Phe Asn Lys Glu Gln Gln Gln Ala Phe Tyr Glu Ile
1 5 10 15

Leu His Leu Pro Asn Leu Leu Glu Glu Gln Arg Asn Ala Phe Ile Gln
20 25 30

Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser Val Ser Lys Glu Ile Leu Ala Glu Ala
35 40 45

Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys
50 55

<210> 30

<211> 58

<212> PRT

<213> 金黄色葡萄球菌

<220>

<223> N11Q, T23S 变异 结构域

<400> 30

Val Asp Asn Lys Phe Asn Lys Glu Gln Gln Gln Ala Phe Tyr Glu Ile
1 5 10 15

Leu His Leu Pro Asn Leu Ser Glu Glu Gln Arg Asn Ala Phe Ile Gln
20 25 30

Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser Val Ser Lys Glu Ile Leu Ala Glu Ala
35 40 45

Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys
50 55

<210> 31

<211> 58

<212> PRT

<213> 金黄色葡萄球菌

<220>

<223> N11Q, K49R 变异 结构域

<400> 31

Val Asp Asn Lys Phe Asn Lys Glu Gln Gln Gln Ala Phe Tyr Glu Ile

1 5 10 15

Leu His Leu Pro Asn Leu Thr Glu Glu Gln Arg Asn Ala Phe Ile Gln

20 25 30

Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser Val Ser Lys Glu Ile Leu Ala Glu Ala

35 40 45

Arg Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys

50 55

<210> 32

<211> 58

<212> PRT

<213> 金黄色葡萄球菌

<220>

<223> N11Q, T23R, K49R 变异 结构域

<400> 32

Val Asp Asn Lys Phe Asn Lys Glu Gln Gln Gln Ala Phe Tyr Glu Ile

1 5 10 15

Leu His Leu Pro Asn Leu Arg Glu Glu Gln Arg Asn Ala Phe Ile Gln

20 25 30

Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser Val Ser Lys Glu Ile Leu Ala Glu Ala

35 40 45

Arg Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys

50 55

<210> 33

<211> 58

<212> PRT

<213> 金黄色葡萄球菌

<220>

<223> N11Q, T23L, K49R 变异 结构域

<400> 33

Val Asp Asn Lys Phe Asn Lys Glu Gln Gln Gln Ala Phe Tyr Glu Ile

1 5 10 15

Leu His Leu Pro Asn Leu Leu Glu Glu Gln Arg Asn Ala Phe Ile Gln

20 25 30

Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser Val Ser Lys Glu Ile Leu Ala Glu Ala

35 40 45

Arg Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys

50 55
 <210> 34
 <211> 58
 <212> PRT
 <213> 金黄色葡萄球菌
 <220>
 <223> N11Q, T23S, K49R 变异 结构域
 <400> 34
 Val Asp Asn Lys Phe Asn Lys Glu Gln Gln Gln Ala Phe Tyr Glu Ile
 1 5 10 15
 Leu His Leu Pro Asn Leu Ser Glu Glu Gln Arg Asn Ala Phe Ile Gln
 20 25 30
 Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser Val Ser Lys Glu Ile Leu Ala Glu Ala
 35 40 45
 Arg Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys
 50 55
 <210> 35
 <211> 58
 <212> PRT
 <213> 金黄色葡萄球菌
 <220>
 <223> N11Q, K58R 变异 结构域
 <400> 35
 Val Asp Asn Lys Phe Asn Lys Glu Gln Gln Gln Ala Phe Tyr Glu Ile
 1 5 10 15
 Leu His Leu Pro Asn Leu Thr Glu Glu Gln Arg Asn Ala Phe Ile Gln
 20 25 30
 Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser Val Ser Lys Glu Ile Leu Ala Glu Ala
 35 40 45
 Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Arg
 50 55
 <210> 36
 <211> 58
 <212> PRT
 <213> 金黄色葡萄球菌
 <220>
 <223> T23R 变异 结构域
 <400> 36
 Val Asp Asn Lys Phe Asn Lys Glu Gln Gln Asn Ala Phe Tyr Glu Ile

1	5	10	15
Leu His Leu Pro Asn Leu Arg Glu Glu Gln Arg Asn Ala Phe Ile Gln			
	20	25	30
Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser Val Ser Lys Glu Ile Leu Ala Glu Ala			
	35	40	45
Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys			
50	55		

<210> 37

<211> 58

<212> PRT

<213> 金黄色葡萄球菌

<220>

<223> T23L 变异 结构域

<400> 37

Val Asp Asn Lys Phe Asn Lys Glu Gln Gln Asn Ala Phe Tyr Glu Ile
1 5 10 15
Leu His Leu Pro Asn Leu Leu Glu Glu Gln Arg Asn Ala Phe Ile Gln
20 25 30
Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser Val Ser Lys Glu Ile Leu Ala Glu Ala
35 40 45
Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys
50 55

<210> 38

<211> 58

<212> PRT

<213> 金黄色葡萄球菌

<220>

<223> T23S 变异 结构域

<400> 38

Val Asp Asn Lys Phe Asn Lys Glu Gln Gln Asn Ala Phe Tyr Glu Ile
1 5 10 15
Leu His Leu Pro Asn Leu Ser Glu Glu Gln Arg Asn Ala Phe Ile Gln
20 25 30
Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser Val Ser Lys Glu Ile Leu Ala Glu Ala
35 40 45
Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys
50 55

<210> 39

<211> 58

<212> PRT

<213> 金黄色葡萄球菌

<220>

<223> N11A 变异 结构域

<400> 39

```

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

```

<210> 40

<211> 58

<212> PRT

<213> 金黄色葡萄球菌

<220>

<223> N11R 变异 结构域

<400> 40

```

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

```

<210> 41

<211> 58

<212> PRT

<213> 金黄色葡萄球菌

<220>

<223> N11D 变异 结构域

<400> 41

```

Val Asp Asn Lys Phe Asn Lys Glu Gln Gln Asp Ala Phe Tyr Glu Ile
1           5           10           15
Leu His Leu Pro Asn Leu Thr Glu Glu Gln Arg Asn Ala Phe Ile Gln
           20           25           30

```

Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser Val Ser Lys Glu Ile Leu Ala Glu Ala
35 40 45

Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys
50 55

<210> 42

<211> 58

<212> PRT

<213> 金黄色葡萄球菌

<220>

<223> N11C 变异 结构域

<400> 42

Val Asp Asn Lys Phe Asn Lys Glu Gln Gln Cys Ala Phe Tyr Glu Ile
1 5 10 15

Leu His Leu Pro Asn Leu Thr Glu Glu Gln Arg Asn Ala Phe Ile Gln
20 25 30

Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser Val Ser Lys Glu Ile Leu Ala Glu Ala
35 40 45

Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys
50 55

<210> 43

<211> 58

<212> PRT

<213> 金黄色葡萄球菌

<220>

<223> N11E 变异 结构域

<400> 43

Val Asp Asn Lys Phe Asn Lys Glu Gln Gln Glu Ala Phe Tyr Glu Ile
1 5 10 15

Leu His Leu Pro Asn Leu Thr Glu Glu Gln Arg Asn Ala Phe Ile Gln
20 25 30

Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser Val Ser Lys Glu Ile Leu Ala Glu Ala
35 40 45

Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys
50 55

<210> 44

<211> 58

<212> PRT

<213> 金黄色葡萄球菌

<220>

<223> N11H 变异 结构域

<400> 44

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

<210> 45

<211> 58

<212> PRT

<213> 金黄色葡萄球菌

<220>

<223> N11I 变异 结构域

<400> 45

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

<210> 46

<211> 58

<212> PRT

<213> 金黄色葡萄球菌

<220>

<223> N11L 变异 结构域

<400> 46

```
Val Asp Asn Lys Phe Asn Lys Glu Gln Gln Leu Ala Phe Tyr Glu Ile
1           5           10           15
Leu His Leu Pro Asn Leu Thr Glu Glu Gln Arg Asn Ala Phe Ile Gln
           20           25           30
Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser Val Ser Lys Glu Ile Leu Ala Glu Ala
           35           40           45
Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys
```

50 55
<210> 47
<211> 58
<212> PRT
<213> 金黄色葡萄球菌
<220>
<223> N11K 变异 结构域
<400> 47
Val Asp Asn Lys Phe Asn Lys Glu Gln Gln Lys Ala Phe Tyr Glu Ile
1 5 10 15
Leu His Leu Pro Asn Leu Thr Glu Glu Gln Arg Asn Ala Phe Ile Gln
20 25 30
Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser Val Ser Lys Glu Ile Leu Ala Glu Ala
35 40 45
Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys
50 55
<210> 48
<211> 58
<212> PRT
<213> 金黄色葡萄球菌
<220>
<223> N11M 变异 结构域
<400> 48
Val Asp Asn Lys Phe Asn Lys Glu Gln Gln Met Ala Phe Tyr Glu Ile
1 5 10 15
Leu His Leu Pro Asn Leu Thr Glu Glu Gln Arg Asn Ala Phe Ile Gln
20 25 30
Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser Val Ser Lys Glu Ile Leu Ala Glu Ala
35 40 45
Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys
50 55
<210> 49
<211> 58
<212> PRT
<213> 金黄色葡萄球菌
<220>
<223> N11F 变异 结构域
<400> 49
Val Asp Asn Lys Phe Asn Lys Glu Gln Gln Phe Ala Phe Tyr Glu Ile

1	5	10	15												
Leu	His	Leu	Pro	Asn	Leu	Thr	Glu	Glu	Gln	Arg	Asn	Ala	Phe	Ile	Gln
		20					25					30			
Ser	Leu	Lys	Asp	Asp	Pro	Ser	Val	Ser	Lys	Glu	Ile	Leu	Ala	Glu	Ala
		35					40					45			
Lys	Lys	Leu	Asn	Asp	Ala	Gln	Ala	Pro	Lys						
	50						55								

<210> 50

<211> 58

<212> PRT

<213> 金黄色葡萄球菌

<220>

<223> N11T 变异 结构域

<400> 50

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

<210> 51

<211> 58

<212> PRT

<213> 金黄色葡萄球菌

<220>

<223> N11W 变异 结构域

<400> 51

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

<210> 52

<211> 58

<212> PRT

<213> 金黄色葡萄球菌

<220>

<223> N11Y 变异 结构域

<400> 52

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

<210> 53

<211> 58

<212> PRT

<213> 金黄色葡萄球菌

<220>

<223> N11V 变异 结构域

<400> 53

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

<210> 54

<211> 58

<212> PRT

<213> 金黄色葡萄球菌

<220>

<223> N11G 变异 结构域

<400> 54

```
Val Asp Asn Lys Phe Asn Lys Glu Gln Gln Gly Ala Phe Tyr Glu Ile
1           5           10           15
Leu His Leu Pro Asn Leu Thr Glu Glu Gln Arg Asn Ala Phe Ile Gln
           20           25           30
```

Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser Val Ser Lys Glu Ile Leu Ala Glu Ala
35 40 45

Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys
50 55

<210> 55

<211> 58

<212> PRT

<213> 金黄色葡萄球菌

<220>

<223> N11P 变异 结构域

<400> 55

Val Asp Asn Lys Phe Asn Lys Glu Gln Gln Pro Ala Phe Tyr Glu Ile
1 5 10 15

Leu His Leu Pro Asn Leu Thr Glu Glu Gln Arg Asn Ala Phe Ile Gln
20 25 30

Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser Val Ser Lys Glu Ile Leu Ala Glu Ala
35 40 45

Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys
50 55

<210> 56

<211> 58

<212> PRT

<213> 金黄色葡萄球菌

<220>

<223> N11S 变异 结构域

<400> 56

Val Asp Asn Lys Phe Asn Lys Glu Gln Gln Ser Ala Phe Tyr Glu Ile
1 5 10 15

Leu His Leu Pro Asn Leu Thr Glu Glu Gln Arg Asn Ala Phe Ile Gln
20 25 30

Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser Val Ser Lys Glu Ile Leu Ala Glu Ala
35 40 45

Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys
50 55

<210> 57

<211> 54

<212> PRT

<213> 金黄色葡萄球菌

<220>

<223> 蛋白 A, B 结构域 变异

<400> 57

Phe Asn Lys Glu Gln Gln Asn Ala Phe Tyr Glu Ile Leu His Leu Pro
1 5 10 15
Asn Leu Asn Glu Glu Gln Arg Asn Gly Phe Ile Gln Ser Leu Lys Asp
 20 25 30
Asp Pro Ser Gln Ser Ala Asn Leu Leu Ala Glu Ala Lys Lys Leu Asn
 35 40 45
Asp Ala Gln Ala Pro Lys
 50

<210> 58

<211> 54

<212> PRT

<213> 金黄色葡萄球菌

<220>

<223> 蛋白 A, Z 结构域 变异

<400> 58

Phe Asn Lys Glu Gln Gln Asn Ala Phe Tyr Glu Ile Leu His Leu Pro
1 5 10 15
Asn Leu Asn Glu Glu Gln Arg Asn Ala Phe Ile Gln Ser Leu Lys Asp
 20 25 30
Asp Pro Ser Gln Ser Ala Asn Leu Leu Ala Glu Ala Lys Lys Leu Asn
 35 40 45
Asp Ala Gln Ala Pro Lys
 50

<210> 59

<211> 54

<212> PRT

<213> 金黄色葡萄球菌

<220>

<223> 蛋白 A, C 结构域 变异

<400> 59

Phe Asn Lys Glu Gln Gln Asn Ala Phe Tyr Glu Ile Leu His Leu Pro
1 5 10 15
Asn Leu Thr Glu Glu Gln Arg Asn Gly Phe Ile Gln Ser Leu Lys Asp
 20 25 30
Asp Pro Ser Val Ser Lys Glu Ile Leu Ala Glu Ala Lys Lys Leu Asn
 35 40 45
Asp Ala Gln Ala Pro Lys

50
<210> 60
<211> 54
<212> PRT
<213> 金黄色葡萄球菌
<220>
<223> 蛋白 A, D 结构域 变异
<400> 60
Phe Asn Lys Asp Gln Gln Ser Ala Phe Tyr Glu Ile Leu Asn Met Pro
1 5 10 15
Asn Leu Asn Glu Ala Gln Arg Asn Gly Phe Ile Gln Ser Leu Lys Asp
20 25 30
Asp Pro Ser Gln Ser Thr Asn Val Leu Gly Glu Ala Lys Lys Leu Asn
35 40 45
Glu Ser Gln Ala Pro Lys

50
<210> 61
<211> 54
<212> PRT
<213> 金黄色葡萄球菌
<220>
<223> 蛋白 A, A 结构域 变异
<400> 61
Phe Asn Lys Glu Gln Gln Asn Ala Phe Tyr Glu Ile Leu Asn Met Pro
1 5 10 15
Asn Leu Asn Glu Glu Gln Arg Asn Gly Phe Ile Gln Ser Leu Lys Asp
20 25 30
Asp Pro Ser Gln Ser Ala Asn Leu Leu Ser Glu Ala Lys Lys Leu Asn
35 40 45
Glu Ser Gln Ala Pro Lys

50
<210> 62
<211> 54
<212> PRT
<213> 金黄色葡萄球菌
<220>
<223> 蛋白 A, E 结构域 变异
<400> 62
His Asp Glu Ala Gln Gln Asn Ala Phe Tyr Gln Val Leu Asn Met Pro

1	5	10	15												
Asn	Leu	Asn	Ala	Asp	Gln	Arg	Asn	Gly	Phe	Ile	Gln	Ser	Leu	Lys	Asp
	20		25		30										
Asp	Pro	Ser	Gln	Ser	Ala	Asn	Val	Leu	Gly	Glu	Ala	Gln	Lys	Leu	Asn
	35						40						45		
Asp	Ser	Gln	Ala	Pro	Lys										
50															