

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.

C12P 21/02 (2006.01)

A61K 38/16 (2006.01)



# [12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200780029612.1

[43] 公开日 2009年8月5日

[11] 公开号 CN 101501209A

[22] 申请日 2007.6.20

[21] 申请号 200780029612.1

[30] 优先权

[32] 2006.6.21 [33] IN [31] 1057/CHE/2006

[86] 国际申请 PCT/IN2007/000241 2007.6.20

[87] 国际公布 WO2007/148345 英 2007.12.27

[85] 进入国家阶段日期 2009.2.9

[71] 申请人 百奥勤有限公司

地址 印度卡纳塔克邦

[72] 发明人 华马奇斯南·米拿高德

亚昆迪·温卡达·斯理南

奇特拿·南祖迪·沙士查利

拉斯米·巴哈·华拉特拉查鲁

斯利古马·素因拿拉因

[74] 专利代理机构 北京三友知识产权代理有限公司

代理人 黄 健

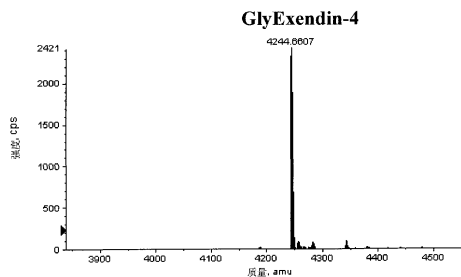
权利要求书 1 页 说明书 18 页 序列表 6 页  
附图 5 页

## [54] 发明名称

具有促胰岛素活性的生物活性多肽的制备方法

## [57] 摘要

本发明涉及制备具有促胰岛素活性的生物活性多肽的方法，所述方法包括下列步骤：(a) 以编码所述多肽的多核苷酸载体转化经遗传修饰的宿主细胞，所述细胞的蛋白酶基因已被敲除；和 (b) 培养所述转化的宿主细胞以制备所述生物活性多肽。本发明还涉及制备具有促胰岛素活性的生物活性多肽的方法，所述多肽具有 N-末端识别位点 His-Gly，所述方法包括下列步骤：(a) 以编码所述多肽的多核苷酸载体转化经遗传修饰的毕赤酵母，所述毕赤酵母的蛋白酶基因 STE13 已被敲除；和 (b) 培养所述转化的毕赤酵母以制备所述生物活性多肽。



1. 一种制备具有促胰岛素活性的生物活性多肽的方法，所述方法包括下列步骤：

a) 以编码所述多肽的多核苷酸载体转化经遗传修饰的宿主细胞，所述细胞的蛋白酶基因已被敲除；和

b) 培养所述转化的宿主细胞以制备所述生物活性多肽。

2. 如权利要求 1 所述的方法，所述方法还包括分离以及随后将所分离的多肽  $\alpha$ -酰胺化的步骤。

3. 如权利要求 1 所述的方法，其中所述宿主细胞是酵母细胞。

4. 如权利要求 3 所述的方法，其中所述酵母细胞是毕赤酵母。

5. 如权利要求 1 所述的方法，其中所述蛋白酶基因是 STE13 基因。

6. 如权利要求 1 所述的方法，其中所述蛋白酶基因是 N-末端二肽酰肽酶基因。

7. 如权利要求 1 所述的方法，其中在诱导所述多肽表达的条件下培养所述转化细胞。

8. 一种制备具有促胰岛素活性的生物活性多肽的方法，所述多肽具有 N-末端识别位点 His-Gly，所述方法包括下列步骤：

a. 以编码所述多肽的多核苷酸载体转化经遗传修饰的毕赤酵母，所述毕赤酵母的蛋白酶基因 STE13 已被敲除；和

b. 培养所述转化的毕赤酵母以制备所述生物活性多肽。

9. 如权利要求 8 所述的方法，其中所述多肽是 SEQ ID NO 4 的 GlyExendin-4。

10. 如权利要求 9 所述的方法，其中所述 GlyExendin-4 具有相应的 SEQ ID NO 5 的多核苷酸序列。

11. 如权利要求 2 所述的方法，其中使所述 glyexendin-4 多肽与 C-末端  $\alpha$ -酰胺化酶接触从而产生  $\alpha$ -酰胺化的 exendin-4 多肽。

12. 如权利要求 11 所述的方法，其中所述  $\alpha$ -酰胺化的 exendin-4 多肽是 HEGTFTSDLSKQMEEEAVRLFIEWLKNGGPSSGAPPPS-NH<sub>2</sub>。

## 具有促胰岛素活性的生物活性多肽的制备方法

### 技术领域

本发明提供了一种体系，该体系通过克隆天然肽或基因工程形式的肽并在遗传修饰的微生物（如酵母）中表达而制备促胰岛素肽（例如 Exendin-4），其中氨基肽酶基因被破坏从而能够有效表达全长的蛋白或多肽。

### 背景技术

Exendin 是降低血糖水平并与 GLP-1 具有部分序列相似性(53%)的一系列肽(Goke 等, 1993 *J. Biol. Chem.* 268; 19650-19655; 以参考方式引入本文)。在大毒蜥(Gila Monster) (希拉毒蜥(*Heloderma suspectum*); Raufman 1996 *Reg. Peptides*, 61; 1-18; 以参考方式引入本文)和墨西哥连珠蜥蜴(Mexican beaded lizard)的毒液中发现了 exendin。在大毒蜥的毒液中发现的 Exendin-4 尤其受关注。Exendin-4 前体是包括信号和前序列(prosequence)的 87 个氨基酸的多肽(Sequence ID No: 1)。对其进行加工以得到酰胺化的 39 个氨基酸的 Exendin-4(Sequence ID No: 2)。公开的 PCT 国际专利申请 WO 98/35033(以参考方式将其内容引入本文)公开了编码 proexendin 肽(包括 exendin 和其它新型肽)的 cDNA、它的分离、以及特异性识别这种肽的抗体(Pohl 等, 1998, *J. Biol. Chem.* 273; 9778-9784; 以参考方式引入本文)。Exendin-4 已经显示出在分离的大鼠胰岛素瘤细胞中是 GLP-1 受体的强激动剂。与 GLP-1 相比其还具有更长的生物半衰期(Young 等 1999 *Diabetes* 48; 1026-1034; 以参考方式引入本文)。这是可以预期的，因为活性 GLP-1((Sequence ID No: 3)中被 DPP-IV 识别的 His-Ala 结构域不存在于 Exendin-4 中，而是以序列 His-Gly 替代。

系统性给予的 Exendin-4 能降低糖尿病 db/db 小鼠的血糖水平 40%(WO 99/07404; 以参考方式引入本文)。Eng 的美国专利 5,424,286(以参考方式将其内容引入本文)公开了 N-末端序列的相当一部分对于保留促胰岛素活性是必需的。

肽序列中的氨基酸残基数目对通过固相合成化学制备多肽的生产成本有显著影响。制备 50 肽(50-mer peptide)的成本比 10 肽的成本高至少 5 倍。固相肽合成还需要使用诸如 TFS 和氢氟酸等腐蚀性溶剂, 需要以许多合成步骤来制备肽, 并且需要后续的肽纯化。因此, 需要一种对用于制备大量具有生物活性的 Exendin-4 和其它促胰岛素肽的高效并节省成本的方法。

在毕赤酵母或其它微生物中表达重组蛋白或多肽并不总是能够成功制备全长多肽。通常, 异源重组多肽/蛋白在细胞内受到蛋白酶的切割/降解。考虑到蛋白的结构和存在于细胞中的蛋白酶的多重性, 在许多情况中被蛋白酶识别或靶向的氨基酸序列的特异性是未确定的并且未被发布。因此本领域的技术人员未必总是可能推测哪种蛋白酶负责切割/降解特定的重组多肽/蛋白。例如, 已有报道在毕赤酵母中表达鼠或人内皮抑素(endostatin)会得到缺失 C-末端赖氨酸的产物(Folkman 等, 1999 May;15(7):563-72)。当酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)的 *KEX-1* 基因的毕赤酵母同源物被破坏时, 毕赤酵母宿主可将全长的内皮抑素分泌到培养基中。在另一项研究中, 有报道在毕赤酵母中 *KEX-2* 而非 *YPS-1* 基因的缺失可制得哺乳动物明胶, 其在蛋白的单精氨酰位点(monoarginylic site)被切割(Werten 和 de Wolf, Applied and Environmental Microbiology, 2005 May;71 (5):2310-7)。

本发明证明: 通过使酿酒酵母 *STE13* 基因的毕赤酵母同源物中断, 可阻止在 N-末端具有氨基酸 HG(His-Gly)的蛋白/多肽的体内蛋白水解切割。非常明确的是, 已经显示通过使酿酒酵母 *STE13* 基因的毕赤酵母同源物中断, 解决了与甘氨酸-延长的 Exendin-4(GlyExendin-4, 具有 C-末端甘氨酸的 Exendin-4 前体)的蛋白水解切割相关的问题。

## GLYEXENDIN-4

HGEGTFTSDLKQMEEEAVRLFIEWLKNGGPSSGAPPPSG (Sequence ID No: 4)

### 发明内容

#### 发明目的:

本发明的主要目的是制备生物活性多肽。

本发明的另一主要目的是制备促胰岛素肽 Exendin-4。

本发明的又一目的是开发促胰岛素肽的制备方法。

本发明的又一目的是开发从毕赤酵母宿主细胞表达全长多肽的方法。

本发明的又一目的是开发使促胰岛素肽酰胺化的方法。

#### 发明陈述

本发明涉及制备具有促胰岛素活性的生物活性多肽的方法，该方法包括下列步骤：(a)以编码多肽的多核苷酸载体转化经遗传修饰的宿主细胞，所述宿主细胞的蛋白酶基因已被敲除；和(b)培养转化的宿主细胞以制备生物活性多肽；本发明还涉及制备具有促胰岛素活性的生物活性多肽的方法，所述多肽具有 N-末端识别位点 His-Gly，该方法包括下列步骤：(a)以编码多肽的多核苷酸载体转化经遗传修饰的毕赤酵母(*Pichia pastoris*)，所述毕赤酵母的蛋白酶基因 STE13 已被敲除；和(b)培养转化的毕赤酵母以制备生物活性多肽。

#### 发明详述

本发明涉及制备具有促胰岛素活性的生物活性多肽的方法，该方法包括下列步骤：

a. 以编码该多肽的多核苷酸载体转化经遗传修饰的宿主细胞，所述细胞的蛋白酶基因已被敲除；和

b. 培养该转化的宿主细胞以制备所述生物活性多肽。

在本发明的另一实施方式中，该方法还包括分离以及随后将所分离的多肽  $\alpha$ -酰胺化的步骤。

在本发明的又一实施方式中，所述宿主细胞是酵母细胞。

在本发明的又一实施方式中，所述酵母细胞是毕赤酵母。

在本发明的又一实施方式中，所述蛋白酶基因是 STE13 基因。

在本发明的又一实施方式中，所述蛋白酶基因是 N-末端二肽酰肽酶基因。

在本发明的又一实施方式中，所述方法涉及在诱导所述多肽表达的条件下培养转化细胞。

本发明还涉及制备具有促胰岛素活性的生物活性多肽的方法，所述多肽具有 N-末端识别位点 His-Gly，该方法包括下列步骤：

a. 以编码所述多肽的多核苷酸载体转化经遗传修饰的毕赤酵母，所述毕赤酵母的蛋白酶基因 STE13 已被敲除；和

b. 培养该转化的毕赤酵母以制备所述生物活性多肽。

在本发明的另一实施方式中，所述多肽是 SEQ ID No 4 的 Glyxendin-4。

在本发明的另一实施方式中，所述 Glyxendin-4 具有相应的 SEQ ID No 5 的多核苷酸序列。

在本发明的另一实施方式中，所述方法涉及使所述 Glyexendin-4 多肽与 C-末端  $\alpha$ -酰胺化酶接触从而产生  $\alpha$ -酰胺化的 exendin-4 多肽。

在本发明的另一实施方式中，所述  $\alpha$ -酰胺化的 exendin-4 多肽是 HEGTFTSDLKQMEEEAVRLFIEWLKNGGPSSGAPPPS-NH<sub>2</sub>。

### 附图说明

图 1. 在毕赤酵母中表达 GlyExendin-4 的框架(construct)。

图 2. 显示 GlyExendin-4-N 和 N-2(即 N-末端经切割的 GlyExendin-4)两个峰的 HPLC 色谱图。

图 3. 将 *Nde*I 限制性位点引入经 PCR 从毕赤酵母基因组扩增的 *STE13* 基因片的策略。

图 4. 使酿酒酵母 *STE13* 基因的毕赤酵母同源物的基因组拷贝缺失的框架。

图 5. 假定缺失菌株的 PCR 分析。从克隆 D2、D4、D6、D8、D10、D12 (泳道 2-泳道 7)和 GS115 (泳道 1)的基因组 DNA 扩增的 PCR 产物。

图 6. 显示源于 *STE13* 基因已缺失的毕赤酵母宿主的全长 GlyExendin-4 的 HPLC 色谱图。

图 7. 显示源于 *DAP2* 已缺失的毕赤酵母宿主的 N-2 杂质的 HPLC 色谱图。

图 8. *STE13* 已缺失的毕赤酵母的培养上清液的 ESI-TOF 分析，显示了 GlyExendin-4 的质量。

图 9. GlyExendin-4 的胰蛋白酶解图谱。

### 具体实施方式

本发明提供了通过在微生物中高效表达异源基因而制备促胰岛素肽的体系。这一体系可用于诸如 GlyExendin-4 等肽前体的大规模重组体的制备。

该体系提供了不采取固相肽合成而制备大量生物活性肽的途径。使用该创造性体系所生产的肽可用于配制药组合物。所述肽及其组合物可以用于治疗糖尿病、降低胃蠕动、延迟胃排空、防止高血糖症以及降低食欲和食物摄取。

通过在微生物中表达异源基因而制备促胰岛素肽时，使优选作为载体的一部分的肽的编码多核苷酸序列转化进入微生物。编码促胰岛素肽的基因的表达受启动子(例如诱导型启动子或组成型启动子)控制。优选的是，所述启动子是强启动子，更优选是强诱导型启动子，这是考虑到促胰岛素肽的大量制备。以该基因转化的细胞可以是真菌的(例如酵母(例如，酿酒酵母、毕赤酵母))。为了在毕赤酵母中表达，用于驱动基因表达的启动子优选是 *AUG1* 启动子、*GAP* 启动子(强组成型启动子)、或者 *AOX1* 或 *AOX2* 启动子(强诱导型启动子); 并且载体可以来源于已知的或者市售的载体，例如 pPIC、pPIC3K、pPIC9K 或 pHIL-D。为了在酿酒酵母中表达，所用的启动子可以是 *CUPI* 启动子、*ADH* 启动子、*TEF1* 启动子或 *GAL* 启动子。为了在特定生物中表达可以对编码被表达的促胰岛素肽的多核苷酸序列优化(例如，为在宿主微生物中使用可以优化密码子的使用)。多核苷酸序列可以选择性地含有前导序列、信号序列、前肽(pre-peptide)序列/前导肽(pro-peptide)序列、加工标签、检测或纯化标签、融合肽等。在某些实施方式中，该基因编码信号肽。信号肽可以指导肽的加工或者分泌。在某些实施方式中，信号肽是 Exendin-4 的信号肽或 Mat  $\alpha$  因子的信号肽。在某些实施方式中，基因编码前导肽，并且该前导肽包括天然的 Exendin-4 前导肽或 Mat  $\alpha$  因子的前导肽(见 WO 98/35033; Pohl 等, *J. Biol. Chem.* 273:9778-9784, 1998; 其中每一个以参考方式引入本文)。

选择存在载体的(例如，抗生素抗性、在不含特定营养的培养基上生长的能力)和/或表达编码促胰岛素肽的外源基因的转化的宿主细胞。经选择的细胞随后在适合编码所述肽的基因的表达的条件下培养。在某些实施方式



中，在其中培养细胞的培养基包括例如甲醇等试剂，其诱导编码所述肽的基因的表达。在其它实施方式中，使用组成型启动子时，诱导外源基因表达的试剂不是必需的。转化的宿主细胞产生肽。优选的是，肽被宿主细胞正确加工。也就是，肽被正确折叠并翻译后修饰。在某些实施方式中，肽被分泌到生长培养基中。重组制得的肽随后从宿主细胞或从培养基（如果肽已被分泌）中分离并纯化。经纯化的肽可以被进一步化学修饰或酶法修饰(例如， $\alpha$ -酰胺化、切割)。

在一个方面中，制得促胰岛素肽 GlyExendin-4。毕赤酵母中的 GlyExendin-4 涉及制备表达框架，所述表达框架包括信号序列、前导肽、前肽和/或标签，其后串联跟随 40 个氨基酸的 GlyExendin-4 序列。在某些实施方式中，信号序列包含天然 Exendin-4 的 23 个氨基酸的信号序列或者  $\alpha$ -因子的 19 个氨基酸的信号序列。前导肽包含天然 GlyExendin-4 的 24 个氨基酸的前导肽或者  $\alpha$ -因子的 66 个氨基酸的前导肽。标签可以辅助肽的加工(Kjeldsen 等 *Biotechnol. Appl. Biochem.* 29:79-86, 1999; 以参考方式引入本文)。在某些实施方式中，标签带有诸如实施例 6 描述的 EAEA 间隔区等带电氨基酸序列。制备了经毕赤酵母密码子优化的编码 GlyExendin-4 的核苷酸序列，可选地带有信号肽或前导肽。随后将合成的核苷酸序列克隆进入携带选择性标记基因的适当载体，例如 pPIC、pPIC3K、pPIC9K 或 pHIL-D。将载体转化进入毕赤酵母细胞，并且选择携带载体的转化细胞。以足够大的规模发酵所选出的克隆以产生所需量的 GlyExendin-4 肽。与在细菌体系中所产生的肽不同，这样产生到培养基中的 GlyExendin-4 肽不需要进一步的加工步骤就使其成为功能完善的肽(EP 978565 Ohsuye 等 Suntory limited; 以参考方式引入本文)。使用本领域已知的蛋白质纯化技术从培养基中纯化肽。GlyExendin-4 肽优选不被毕赤酵母宿主细胞糖基化。未被糖基化也是一项优势，这是因为 GlyExendin-4 是功能完善的并且其可使纯化步骤更简单和更方便，并获得改善的肽产量。纯化的 GlyExendin-4 肽可进

一步化学修饰或酶法修饰(例如, C-末端  $\alpha$ -酰胺化)。GlyExendin-4 肽可用在用于对对象(例如人)给药的药物组合物中。

在毕赤酵母中制备 GlyExendin-4 多肽的过程中遇到了问题。发现所分泌的多肽是全长分子和 N-末端经剪切的分子(缺少头两个氨基酸 HG)的混合物。通过敲除酿酒酵母 *STE13* 基因的毕赤酵母同源物可提高全长 Exendin 的产量, 所述 *STE13* 基因编码二肽酰肽酶。这一研究也首次显示出 *STE13* 毕赤酵母同源物的新奇识别位点; 其还可在 N-末端二肽序列“HG”之后切割。

### 定义

“肽”或者“蛋白质”: 根据本发明, “肽”或者“蛋白质”包含以肽键连接到一起的一串至少三个氨基酸。术语“蛋白质”和“肽”可以互换使用。本发明的肽优选只含有天然氨基酸, 虽然可以选择性使用本领域中已知的非天然氨基酸(即, 非天然存在的但可被引入多肽链的化合物)和/或氨基酸类似物。另外, 可以修饰本发明的肽中的一种或多种氨基酸, 例如, 通过加入诸如糖类基团、磷酸基团、法呢基团、异法呢基团、脂肪酸基团、用于结合的连接体等化学个体、功能化或其它修饰(例如  $\alpha$ -酰胺化)等。在优选的实施方式中, 肽的修饰得到更稳定的肽(例如在体内更长的半衰期)。这些修饰可以包括肽的环化、D-氨基酸的引入等。修饰实质上不应干扰肽的所需生物活性。在某些实施方式中, 肽的修饰得到更具生物活性的肽。

“转化”: 本文所用的术语“转化”是指将含有核酸序列的载体引入宿主细胞。载体可以将自身或自身的一部分整合进入细胞的染色体, 或者载体可以作为可自我复制的染色体外载体存在。在一些实施方式中整合被认为是有利的, 这是由于核酸更可能稳定的保存在宿主细胞中。在其它实施方式中, 染色体外载体是理想的, 这是由于每一宿主细胞可含有载体的多个拷贝。

本发明提供了用于重组生产促胰岛素肽的体系, 并且在制备大量的用

在药物组合物中或用于研究目的的生物活性肽时尤其有用。本发明提供了制备用于生产肽的多核苷酸和重组细胞的方法以及重组生产肽本身的方法。本发明还包括用于实践本发明的方法的多核苷酸序列、载体和细胞，以及使用重组生产的肽的药物组合物和方法。

如上所述，促胰岛素肽在宿主微生物中的重组表达涉及制备带有肽编码序列的多核苷酸、将这一序列引入载体、使用载体转化微生物细胞、和选择带有载体的细胞。随后在适合生产促胰岛素肽的条件下培养这些被选择出的细胞，从细胞或从细胞在其中生长的培养基纯化所述促胰岛素肽。随后将经纯化的肽用于药物组合物中以治疗如糖尿病或肥胖症等疾病。

从发酵物收获肽后，将肽纯化。肽可以从细胞纯化，或者如果肽是被分泌的，则肽可以从培养基纯化。如果从细胞纯化肽，将细胞裂解，然后从细胞裂解物中纯化肽。可以使用任何本领域已知的方法纯化肽，所述方法包括硫酸铵沉淀、柱层析(例如，离子交换层析、体积排阻层析、亲和层析)、FPLC、HPLC(例如反相、正相)等。将肽纯化至所需的纯度水平。在某些实施方式中，最终的肽为大于 90 纯度%、95 纯度%、98 纯度%、或 99 纯度%，优选大于 98 纯度%。

经纯化的肽可以直接使用，或者可以进一步修饰肽。在某些实施方式中，以蛋白酶处理肽以切割肽。在其它实施方式中，肽被磷酸化。在另一些实施方式中，肽被糖基化。肽可以被  $\alpha$ -酰胺化。可以对肽进行其它修饰。可以对肽进行化学修饰或酶法修饰。

#### *在毕赤酵母中生产 GlyExendin-4*

重组 GlyExendin-4 在毕赤酵母中的生产涉及制备表达框架，所述表达框架含有信号序列、可选的前导肽或标签，其后串联有 40 个氨基酸的 GlyExendin-4 序列。信号序列包括天然 Exendin-4 的 23 个氨基酸的信号序列或者  $\alpha$ -因子的 19 个氨基酸的信号序列。前导肽包含天然 Exendin-4 的 24

个氨基酸的前导肽或者  $\alpha$ -因子的 66 个氨基酸的前导肽。

设计合成的、经毕赤酵母密码子优化的 GlyExendin-4 编码序列(CDS), 并且制备该序列的重叠寡核苷酸。将寡核苷酸磷酸化、退火并连接。进行 PCR 以扩增 CDS, 将 CDS 克隆进入携带有选择性标记基因的适当载体的限制性位点。载体选自 pPIC、pPIC3K、pPIC9K 或 pHIL-D。这些载体含有 AOX 启动子以驱动 GlyExendin-4 基因的表达。将携带合成的 GlyExendin-4 cDNA 的载体转化进入毕赤酵母细胞, 并且将转化的细胞涂布在基本培养基上。

将转化的毕赤酵母细胞涂布在含有选择试剂的培养基上从而确定多拷贝整合体并选择阳性克隆。以阳性克隆完成发酵, 并使用层析技术的组合从无毕赤酵母细胞的上清液中纯化 GlyExendin-4 肽, 所述层析技术包括离子交换、疏水、凝胶过滤和/或亲和层析。在某些实施方式中, 由毕赤酵母细胞所生产的 GlyExendin-4 肽是完全未被糖基化的产物。

在表达 GlyExendin-4 的过程中观察到其降解的部分产物作为杂质出现。通过质谱分析确定这些杂质是 GlyExendin-4 在 N-末端被剪切 2、6 或 8 个氨基酸的形式。(N-2)GlyExendin-4 对全长 GlyExendin-4 的比例约为 1: 1。发现其它形式的量很低并且随着发酵进行而积累。这一问题通过使毕赤酵母中编码酿酒酵母 *STE13* 的同源物的基因缺失而得到解决。

#### *GlyExendin-4 的纯化和修饰*

如下所示从培养基分离和纯化重组肽或具有 GlyExendin-4 多肽序列的肽结合物: 将培养基与宿主细胞分离, 或者如果肽产生于细胞内, 则在细胞裂解后分离细胞碎片。随后使用盐或溶剂将肽沉淀并且进行例如离子交换层析、疏水相互作用层析、亲和层析等多种层析步骤, 和/或结晶。

GlyExendin-4 肽具有 40 个氨基酸。可选的是, 第 39 个氨基酸丝氨酸被酰胺化。在体外对 40 个氨基酸的肽酰胺化以产生 C-末端氨基酸酰胺化的 39 个氨基酸的 GlyExendin-4 肽, 也就是, C-末端的甘氨酸被移去并且倒数

第二位的丝氨酸被酰胺化。在某些实施方式中，使用 C-末端  $\alpha$ -酰胺化酶完成酰胺化。

通过其在大鼠胰岛素瘤细胞系中诱导胰岛素分泌的能力而确定 GlyExendin-4 和 39 氨基酸酰胺化变体的生物学活性。

将借助于下列实施例进一步详细阐述本申请的技术。然而，不应将这些实施例理解为是对本发明的范围的限制。

### **实施例 1：经密码子优化的 GlyExendin-4 CDS 的合成**

通过聚合酶链式反应(PCR)使用重叠寡核苷酸合成经密码子优化的编码 GlyExendin-4 的核苷酸序列(Sequence ID No:5)。合成 10 个寡核苷酸以沿两条链覆盖 GlyExendin-4 基因，该基因与相邻引物(successive primers)有 14bp 重叠区域。在含有 10×PNK 缓冲液、T4 多核苷酸激酶和 dATP 的反应混合物中将重叠寡核苷酸磷酸化。将等摩尔量的磷酸化的寡核苷酸退火并且随后使用 T4 DNA 连接酶连接。

连接混合物用作模板以通过 PCR 使用寡核苷酸扩增 GlyExendin-4 CDS，所述寡核苷酸为 5'-CTC GAG AAA AGA CAT GGA GAA GGA ACA TTT ACA TC-3' (Sequence ID No: 6) (正向引物)和 5'-GAA TTC TTA TCC AGA TGG TGG-3' (Sequence ID No: 7) (反向引物)。依照标准方案进行 PCR 反应，使用 Pfu Turbo 聚合酶(Stratagene)在 50  $\mu$ L 终体积中进行扩增。扩增条件包括：在 Perkin-Elmer 热循环仪中，于 94°C 起始变性 4 分钟的 1 个循环，随后 30 个循环(于 94°C 变性 30 秒；于 60°C 退火 30 秒；于 72°C 延伸 60 秒)以及最终延伸 10 分钟的一个循环。

### **实施例 2：将经密码子优化的 GlyExendin-4 克隆进测序载体中**

使用 TA 克隆试剂盒(Fermentas)在反应混合物中将扩增后获得的 140 bp 的 PCR 片段克隆进入载体 pTZ57RT/A 中，所述反应混合物含有 3  $\mu$ l 载体、2  $\mu$ l PEG4000 PCR 缓冲液和 1  $\mu$ l T4 DNA 连接酶。转化 DH5 $\alpha$  感受态细胞，

并通过限制性消化筛选含有 GlyExendin-4 基因片段的阳性克隆。对 1 个阳性克隆的两条链测序。

### 实施例 3: 将 GlyExendin-4 CDS 亚克隆进入表达载体

使用 *EcoRI* 和 *XhoI* 将 GlyExendin-4 片段从 TA 克隆(见实施例 2)切离并亚克隆到毕赤酵母表达载体 pPIC9K (Invitrogen, San Diego, CA)的相同位点。这将 GlyExendin-4 核苷酸序列置于具有酿酒酵母的 Mat  $\alpha$  信号肽的框架中并且处于甲醇可诱导的醇氧化酶(*AOX1*)启动子的控制下(图 1)。如 invitrogen 手册中所描述的, 通过电穿孔将表达载体转化进入毕赤酵母。

### 实施例 4: GlyExendin-4 在毕赤酵母宿主中的表达

#### 转化

如 Invitrogen 手册中所描述, 通过电穿孔将表达质粒引入毕赤酵母菌株 GS115(*his4. Mut*<sup>+</sup>), 所述质粒具有毕赤酵母密码子优化的核苷酸插入片段。用于电穿孔的条件是充电电压 1.5 kV、电容 25  $\mu$ F 和电阻 200  $\Omega$ 。将转化细胞涂布在缺乏组氨酸的基本培养基(YNBD)上并于 30°C 温育 3 天。

#### 多拷贝整合体的筛选

选取转化体的单菌落并在含有 YPD(1%酵母提取物、2%细菌蛋白胨(Baco-Peptide)、2%右旋葡萄糖)的微量滴定板(microtiter plate)中于 30°C 培养过夜。将预培养的培养物再次涂布在含遗传霉素(Geneticin) (2 mg/ml)的 YPD 琼脂平板上并于 30°C 温育。选择在 YPD-遗传霉素 (2 mg/ml)平板上生长的克隆以进行表达研究。

#### GlyExendin-4 的小规模诱导

使用下列方案诱导 GlyExendin-4 表达:

将在琼脂平板(YEPD)上生长的培养物接种于 250 ml 烧瓶中的 YNBG(酵母氮源甘油 Yeast Nitrogen Base Glycerol)培养基-50 ml 中

YNBG 成分(用于 100 ml)

不含氨基酸的酵母氮源(Yeast Nitrogen Base, YNB): 90 ml 中 1.34 g

甘油: 20% 10 ml

在 YNBG 培养基中过夜生长。转入 BYYG(50 ml 于 250 ml 中)以使起始 OD 为 0.3。

BYYG 成分(用于 100 ml)

细菌蛋白胨(Bactopeptone) : 1 g

酵母提取物 : 2 g

不含 aa 的 YNB : 1.34 g

甘油 : 20% 10 ml

1 M  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , pH 6 : 10 ml

培养 2 天。离心, 称重沉淀并在诱导培养基(BYYM)中重悬。

3 g 沉淀于 6 ml 培养基中并转入 100 ml 烧瓶。

诱导培养基成分(用于 100 ml)

细菌蛋白胨(Bactopeptone) : 1 g

酵母提取物 : 2 g

不含 aa 的 YNB : 1.34 g

甲醇 : 3 ml

1 M  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , pH 6 : 10 ml

每天投入甲醇和氮(连续 2 天)并在第三天收集。

氮: 120  $\mu\text{l}$  的 5 $\times$ YP (0.1 $\times$ YP)

甲醇: 180  $\mu\text{l}$  的 100%甲醇(3%)

5 $\times$ YP 成分(用于 50 ml)

酵母提取物: 2.5 g

细菌蛋白胨(Bactopeptone): 5 g

通过离心沉淀经诱导的细胞并通过 tricine (*N*-[Tris(hydroxymethyl)methyl]glycine, *N*-[三(羟甲基)甲基]甘氨酸)凝胶电泳和 HPLC 分析无细胞上清液中的 GlyExendin-4。虽然在凝胶上观察到预期大小的单一条带, 但通过 HPLC 可分辨出 GlyExendin-4 的两个峰(图 2)。通过质量分析对这两个峰进行分析并发现这两个峰对应于 GlyExendin-4 的全长形式和 *N*-末端剪切(无 *N*-末端氨基酸 HG; (N-2))的形式。

#### 实施例 5: 使用间隔区序列在毕赤酵母中克隆 GlyExendin-4

将经密码子优化的编码 GlyExendin-4 的核苷酸序列与在其 *N*-末端编码 EAEA 的间隔区序列串联克隆进毕赤酵母载体 pPIC9K。将携带插入片段的表达载体转化进入毕赤酵母。多肽一经表达, 以 Lys-Arg 结尾的 Mat- $\alpha$  通过 KEX2 蛋白酶的作用被从该肽切离, 同时间隔区肽被 STE13 蛋白酶切离, 从而释放 GlyExendin-4。使用这一框架所表达的 GlyExendin-4 的分析无助于消除或减少(N-2) GlyExendin-4 的比例。

#### 实施例 6: 在生产 GlyExendin-4 的毕赤酵母克隆中使酿酒酵母 STE13 基因的毕赤酵母同源物缺失

两个氨基酸从 GlyExendin-4 的 *N*-末端移除表明二肽酰肽酶的活性。处理两种二肽酰肽酶 DAP2 和 STE13 的毕赤酵母同源物以试图消除(N-2)杂质。

通过插入失活在毕赤酵母中使酿酒酵母的二肽酰肽酶基因同源物 (STE13) 缺失。使用 BLASTP 确定酿酒酵母 STE13 基因(其编码反式高尔基体二肽酰肽酶)的假定毕赤酵母同源物。毕赤酵母 STE13 核苷酸序列由 James Cregg 教授提供。预计破坏该酶催化结构域的 ~450 bp 区域被选取并通过 PCR 从毕赤酵母菌株 GS115 的基因组 DNA 中扩增。该片段随后被克隆进合适的载体, 在同源区内线性化并转化进入生产 GlyExendin-4 的毕赤酵母菌株中以实现缺失。在含有 100  $\mu$ g/ml Zeocin 的 YEPD/1M 山梨糖醇平板上进行选择。将大约 900 个这些转化体接种于 96 孔板中的 YEPD。过夜培养



后将其再次涂布于 YEPD 平板并通过平板测定的方法筛选 *STE13* 的缺失。由测定确定的假定缺失菌株通过 PCR 筛选以验证基因座是否被破坏。确认 *STE13* 基因座被破坏的克隆被用来进行进一步分析。

### *STE13* 缺失载体的构建

Sequence ID No:8 中给出了 *STE13* CDS 的编码序列和被选取以提供靶向同源性的片段。在两步 PCR 步骤中组装 *STE13* 片段(图 3)。第一步 PCR 使用下列引物对以 Taq 聚合酶(Bangalore Genei, India)进行: IISTEFP1 /IISTERP1 (PCR1; Sequence ID No: 9、10)和 IISTEFP2 /IISTERP2 (PCR2; Sequence ID No: 11、12)。PCR 循环参数: 于 94°C 进行起始变性 4 分钟, 随后进行于 94°C 变性 30 秒、于 60°C 退火 30 秒并于 72°C 延伸 30 秒的 30 个循环; 于 72°C 进行最终延伸 10 分钟。GS115 的基因组 DNA 用作用于该 PCR 的模板。引物在片段的近似中心引入限制性位点(*NdeI*)。这为在同源区域内将框架线性化提供了限制性位点。第二步 PCR 是使用 XT Taq 聚合酶(Bangalore Genei, India)进行的重叠 PCR, 通过将两个扩增出的片段作为模板从而产生 450 bp 片段。重叠 PCR 所用的引物: IISTEFP1 /IISTERP2。PCR 循环参数: 与 PCR1 相同, 但修改为在起始变性步骤之后包括于 94°C 变性 45 秒、于 37°C 退火 45 秒并于 72°C 延伸 30 秒的 3 个循环, 从而促进重叠。还在片段的 5'端和 3'端引入限制性位点从而有利于克隆。450 bp 片段首先被克隆进入 pTZ57R-TA 载体(Fermentas, Canada)并通过测序鉴定。随后将其在 *BamHI/BglII* 位点亚克隆到 pPICZA (Invitrogen, USA) 从而得到 Stefrg/pPICZA (图 4)。在以 *NdeI* 将 Stefrg/pPICZA 线性化后, 通过电穿孔将框架转化进入生产 GlyExendin-4 的毕赤酵母菌株(此前在实施例 4 中对方法已有描述)。

### 平板测定

该测定此前对酿酒酵母已有描述(Rendueles 和 Wolf, (1987) J. Bacteriol., 169 (9): 4041-4048)。简单而言, 通过以氯仿淹覆平板首先裂解菌落。在氯

仿彻底挥发后,将在 1% Tris 琼脂中的底物、Ala-Pro-4MBNA 和快速石榴子石 GBC(Fast garnet GBC)的混合物倾倒以形成覆盖物。将其于室温温育约 10 分钟~15 分钟。选取未染红的菌落作为 *STE13* 缺失菌株。将有完整 *STE13* 的 GS115 包括进来作为对照以检验染色进程。

### PCR 分析

从那些在平板测定中选取为阳性的转化体分离基因组 DNA,并通过 PCR 确认 *STE13* 基因座的缺失。设计同源区域上游的正向引物和来自载体序列的反向引物从而可在缺失菌株中观察到~800 bp 的扩增。未被破坏的基因座将不显示任何扩增。在以 PCR 分析获得的阳性中(图 5),选取克隆 D2 以进行进一步分析。

以甲醇诱导(如实施例 4 中所描述的方法)克隆 D2,以 HPLC 和 LCMS 检验时被表达的 GlyExendin-4 在 N-末端未被剪切。这清楚地表明 *STE13* 二肽酰肽酶的活性是造成 GlyExendin-4 的 N-末端剪切的原因(图 6)。

以相同方式在表达 GlyExendin-4 的毕赤酵母克隆中进行酿酒酵母二肽酰肽酶基因 *DAP2* 的毕赤酵母同源物的缺失(数据未给出)。这继续显示(N-2)杂质,表明其不是产生这一杂质的原因(见图 7)。

### 实施例 7: 发酵毕赤酵母以表达 GlyExendin-4

将从于-70℃储存的小管中刚解冻的毕赤酵母细胞接种于 50 ml 生长培养基(1%酵母提取物、2%蛋白胍、10% 1M 磷酸盐缓冲液 pH 6.0、0.67% 酵母氮源和 0.1%甘油)并于 28℃~32℃和 220 rpm~260 rpm 培养。将种子细胞在含有 1 L 发酵培养基的 2 L 发酵罐中培养,所述发酵培养基由 4%甘油、0.01%硫酸钙、2%硫酸钾、1.4%硫酸镁和 0.4%氢氧化钾组成。在下列条件下以上述培养基进行发酵罐实验:于 20℃~30℃的不同温度、pH 5.0、通气速率 0.5 vvm~2.0 vvm。将搅拌速度从 350 rpm 逐渐增加至 1200 rpm 以保持溶解氧水平为高于 30%。通过 50%甘油的投料使生物量增长至 300 g/L。

无菌地收集 1L 培养基流体并在 12 个 250 ml 烧瓶中的每一个烧瓶中分装 50ml。将所有的烧瓶于 220 rpm~260 rpm 以 20°C~30°C 的不同温度培育。每天加入 100  $\mu$ L 甲醇，并在 5 天后进行 GlyExendin-4 表达的分析。

甲醇投料后每隔 24 小时留取样本，并使用 HPLC 确定 GlyExendin-4 的水平。下面给出了于不同生长温度下发酵 5 天后获得的 GlyExendin-4 的产量。

表 1

生长温度(°C)	GlyExendin-4 产量(g/L)
20	0.0443
22	0.0467
24	0.0567
26	0.0867
28	0.0905
30	0.0685

#### 实施例 8：发酵重组毕赤酵母以生产 GlyExendin-4

将从于-70°C 储存的小管中刚解冻的毕赤酵母细胞接种到于 28°C~32°C 和 220 rpm~260 rpm 的 50 ml 生长培养基(1%酵母提取物、2%蛋白胨、10% 1M 磷酸盐缓冲液(pH 6.0)、0.67% 酵母氮源和 0.1%甘油)。将种子细胞在含有 1 L 发酵培养基(3.5%甘油、0.01%硫酸钙、1%硫酸钾、1%硫酸镁和 0.25% 氢氧化钾)的 2 L 发酵罐中培养。在下列条件下以上述培养基进行发酵罐实验：于 20°C~30°C 的不同温度、pH 5.0、通气速率 0.5 vvm~2.0 vvm。将搅拌速度从 350 rpm 逐渐增加至 1200 rpm 以使溶解氧水平保持 30%以上。通过 50%甘油的投料使生物量增长至 285 g/L，随后进行甲醇投料。

甲醇投料后每隔 24 小时留取样本，并使用 HPLC 确定 GlyExendin-4 的水平。下面给出了于不同生长温度下发酵 5 天后获得的 GlyExendin-4 的产量。

表 2

生长温度(°C)	GlyExendin-4 产量(g/L)
20	0.23
22	0.37
24	0.67
26	0.72
28	0.75
30	0.67

### 实施例 9：表征在毕赤酵母中表达的 GlyExendin-4

发酵后使用标准的层析技术从无细胞上清液纯化 GlyExendin-4。通过 ESI-TOF(图 8)表征的纯化的肽具有与全长 GlyExendin-4 对应的 4.2 kDa 的质量，强烈提示不存在 N-末端剪切和糖基化种类。N-末端测序(Sequence ID No:13)进一步确认不存在 N-末端降解。通过胰蛋白酶消化(图 9)和随后的单独片段(Sequence ID No:14~ No:17)测序确认了被表达的肽的序列。这进一步确认不存在糖基化种类。

### 其它实施方式

上述的是对本发明的某些非限制性的优选实施方式的描述。如所附权利要求书中所定义的，本领域的技术人员将意识到可以对这一描述做出各种变化和修改，而不背离本发明的实质和范围。



<213> 希拉毒蜥 (*Heloderma suspectum*)

<223> Exendin-4 的氨基酸序列

<400> 2

His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys Gln Met Glu Glu  
1                   5                   10                   15

Glu Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Leu Lys Asn Gly Gly Pro Ser  
                  20                   25                   30

Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser -NH<sub>2</sub>  
                  35

<210> 3

<211> 31

<212> PRT

<213> 智人 (*Homo sapiens*)

<223> 活性 GLP-1 (7-37) 的氨基酸序列

<400> 3

His Ala Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Gly  
1                   5                   10                   15

Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Gly Arg Gly  
                  20                   25                   30

<210> 4

<211> 40

<212> PRT

<213> 希拉毒蜥 (*Heloderma suspectum*)

<223> GlyExendin-4 的氨基酸序列

<400> 4

His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys Gln Met Glu Glu  
1                   5                   10                   15

Glu Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Leu Lys Asn Gly Gly Pro Ser  
                  20                   25                   30

Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser Gly  
                  35                   40

- <210> 5  
 <211> 141  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列
- <220>  
 <223> 编码 Exendin-4 的核苷酸序列，为在毕赤酵母中表达而优化
- <400> 5  
 ctcgagaaaa gacatggaga aggaacattt acatctgatt tgtctaaaca aatggaagaa 60  
 gaagctgtta gattgtttat tgaatggttg aaaaacggag gaccatcttc tggagctcca 120  
 ccacatctg gataagaatt c 141
- <210> 6  
 <211> 35  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列
- <220>  
 <223> 用于扩增 Exendin-4 CDS 的 PCR 引物（正向）
- <400> 6  
 ctcgagaaaa gacatggaga aggaacattt acatc 35
- <210> 7  
 <211> 21  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列
- <220>  
 <223> 用于扩增 Exendin-4 CDS 的 PCR 引物（反向）
- <400> 7  
 gaattcttat ccagatggtg g 21
- <210> 8  
 <211> 2553  
 <212> DNA  
 <213> 毕赤酵母 (*Pichia pastoris*)  
 <223> STE13 CDS 的核苷酸序列。靶标序列以加粗字体标示。
- <400> 8

ATGACATCTCGGACAGCTGAGAACCCGTTTCGATATAGAGCTTCAAGAGAATCTAAGTCCACGTTCTTCCA  
 ATTCGTCCATATTGGAAAACATTAATGAGTATGCTAGAAGACATCGCAATGATTCGCTTTCCCAAGAATG  
 TGATAATGAAGATGAGAACGAAAATCTCAATTAATACTGATAACTTGGCCAAGTTTTCAAAGTCTGGAGTA  
 TCAAGAAAGAGCTGTATGCTAATATTTGGTATTTGCTTTGTTATCTGGCTGTTTCTCTTTGCCTTGTATG  
 CGAGGGACAATCGATTTTCCAATTTGAACGAGTACGTTCCAGATTCAAACAGCCACGGAACCTGCTTCTGC  
 CACCACGTCTATCGTTGAACCAAAAACAGACTGAATTACCTGAAAGCAAAGATTCTAACACTGATTATCAA  
 AAAGGAGCTAAATGAGCCTTAGCGGCTGGAGATCAGGCTGTACAAIGTCTATCCAAAACCTGATCTCTC  
 GTGGTGAAGATGACATATACTATGAACACAGTTTTCTATCGTATAGATGAAAAGAGGATTACAGACTCTCA  
 ACACGGTCGAACTGTATTTAACTATGAGAAAATTGAAGTAAATGGAATCACGTATACAGTGTCAATTTGTC  
 ACCATTTCTCCTTACGATTCTGCCAAATTTCTTAGTCGCATGCGACTATGAAAACACTGGAGACATTTCTA  
 CGTTTGCAAAATATTTTCATATATGATAAGGAAAGCGACCAAGAGGATAGCTTTGTACCTGTCTACGATGA  
 CAAGGCATTGAGCTTCGTTGAATGGTCGCCCTCAGGTGATCATGTAGTATTCGTTTTTGAAAACAATGTA  
 TACCTCAAACAACCTCAACTTTAGAGGTTAAGCAGGTAACTTTTGATGGTGTGAGAGTATTTACAATG  
 GTAAGCCTGACTGGATCTATGAAGAGGAAGTTTTAAGTAGCGACAGAGCCATATGGTGGAATGACGATGG  
 ATCGTACTTTACGTTCTTGAGACTTGATGACAGCAATGTCCCAACCTTCAACTTGCAGCATTTTTTTGAA  
 GAAACAGGCTCTGTGTCGAAATATCCGGTCATTGATCGATTGAAATATCCAAAACCAGGATTTGACAACC  
 CCCTGGTTTTCTTTGTTTAGTTACAACGTTGCCAAGCAAAGTTAGAAAAGCTAAATATTGGAGCAGCAGT  
 TTCTTTGGGAGAAGACTTCGTGCTTTACAGTTTAAAATGGATAGACAATTCTTTTTTCTGTGCGAAGTTC  
 ACAGACCCGACTTCGAAAAAATGGAAGTTACTCTAGTGGACATTGAAGCCAATTCTGCTTCGGTGGTGA  
 GAAAACATGATGCAACTGAGTATAACGGCTGGTTCACCTGGAGAATTTTCTGTTTATCCTGTGCTGGAGA  
 TACCATTGGTTACATTGATGTAATCTATTATGAGGACTACGATCACTTGGCTTATTATCCAGACTGACACA  
 TCCGATAAGTATATTGTGCTTACAGATGGTTCATGGAATGTTGTTGGACCTGGAGTTTTAGAAGTGCTTG  
 AAGATAGAGTCTACTTTATCGGCACCAAAGAATCATCAATGGAACATCACTTGTATTATACATCATTAAC  
 GGGACCCRAAGGTTAAGGCTGTTATGGATATCAAGAACCCTGGGTACTTTGATGTAAACATTAAGGGAAAA  
 TATGCTTTACTATCTTACAGAGGCCCAAACCTCCATACCAGAAATTTATTGATCTTTCTGACCCTAGTA  
 CAACAAGTCTTGATGACATTTTATCGTCTAATAGAGGAATGTGCGAGGACGGCGTCACACTGAACATGAT  
 TGAAGTGTTGCCTGCCAATTTAATCCTAGCAAGAAGTACCCACTGTTGGTCAACATTTATGGTGGACCG  
 GGCTCCCAGAAGTTAGATGTGCAGTTCAACATTTGGGTTGAGCATATTATTTCTTCGTCACTGGATGCAA  
 TAGTGCTTTACATAGATCCGAGAGGTACTGGAGGTAAAAGCTGGGCTTTTAAATCTTACGCTACAGAGAA  
 AATAGGCTACTGGGAACCCAGAGACATCACTGCAGTAGTTTCCAAGTGGATTTTCCAGATCACTCATTGTG  
 AATCCTGACAAAACCTGCGATATGGGGTGGTCTTACGGTGGGTTCACTACGCTTAAGACATTGGAATATG  
 ATTCTGGAGAGGTTTTCAAATATGGTATGGCTGTTGCTCCAGTAACTAATTGGCTTTTGTATGACTCCAT  
 CTACACTGAAAGATACATGAACCTTCCAAAGGACAATGTTGAAGGCTACAGTGAACACAGCGTCAATTAAG  
 AAGGTTTTCAAATTTAAGAAATGTAAACCGATTCTTGGTTTGTACGGGACTACTGATGATAACGTGCATT  
 TTCAGAACACACTAACCTTACTGGACCAGTTCAATATTAATGGTGTGTGAATTACGATCTTCAGGTGTA  
 TCCCGACAGTGAACATAGCATTGCCCATCACAACGCAATAAAGTGATCTACGAGAGGTTATCAAGTGG  
 TTAGAGCGGGCATTAAACGATAGATTTTTGTAA

- <210> 9  
 <211> 30  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列



<220>		
<223>	用于扩增来自毕赤酵母的 STE 13 靶向序列的引物(正向) - PCR1	
<400>	9	
	ggatccgcag ttcaacattg ggtttgagca	30
<210>	10	
<211>	28	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	用于扩增来自毕赤酵母的 STE 13 靶向序列的引物(反向) - PCR1	
<400>	10	
	ccagaatcat atgccaatgt cttaagcg	28
<210>	11	
<211>	28	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	用于扩增来自毕赤酵母的 STE 13 靶向序列的引物(正向) - PCR2	
<400>	11	
	cgcttaagac attggcatat gattctgg	28
<210>	12	
<211>	30	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	用于扩增来自毕赤酵母的 STE 13 靶向序列的引物(反向) - PCR2	
<400>	12	
	agatctgtcc cgtgacaaac caagaatcgg	30
<210>	13	
<211>	10	
<212>	PRT	
<213>	希拉毒蜥 ( <i>Heloderma suspectum</i> )	
<223>	N-末端测序结果	
<400>	13	

His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu  
1 5 10

<210> 14

<211> 12

<212> PRT

<213> 希拉毒蜥 (Heloderma suspectum)

<223> 胰蛋白酶消化 GlyExendin-4 获得的片段 - 对应于图 9 中的 T1 峰

<400> 14

His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys  
1 5 10

<210> 15

<211> 8

<212> PRT

<213> 希拉毒蜥 (Heloderma suspectum)

<223> 胰蛋白酶消化 GlyExendin-4 获得的片段 - 对应于图 9 中的 T2 峰

<400> 15

Gln Met Glu Glu Glu Ala Val Arg  
1 5

<210> 16

<211> 7

<212> PRT

<213> 希拉毒蜥 (Heloderma suspectum)

<223> 胰蛋白酶消化 GlyExendin-4 获得的片段 - 对应于图 9 中的 T3 峰

<400> 16

Leu Phe Ile Glu Trp Leu Lys  
1 5

<210> 17

<211> 13

<212> PRT

<213> 希拉毒蜥 (Heloderma suspectum)

<223> 胰蛋白酶消化 GlyExendin-4 获得的片段 - 对应于图 9 中的 T4 峰

<400> 17

Asn Gly Gly Pro Ser Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser Gly  
1 5 10

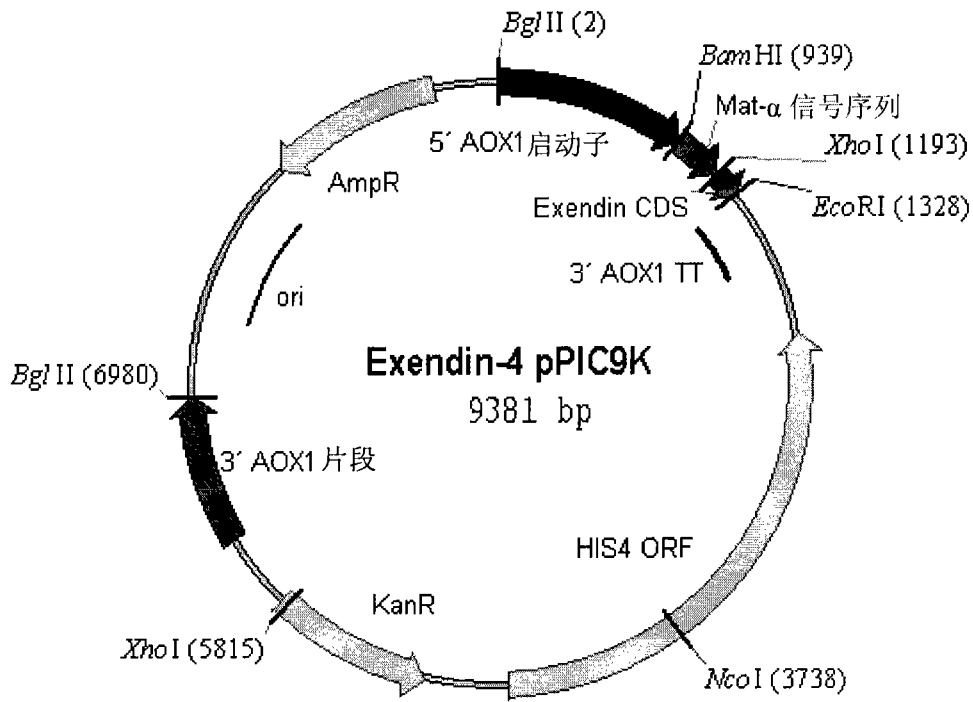


图 1

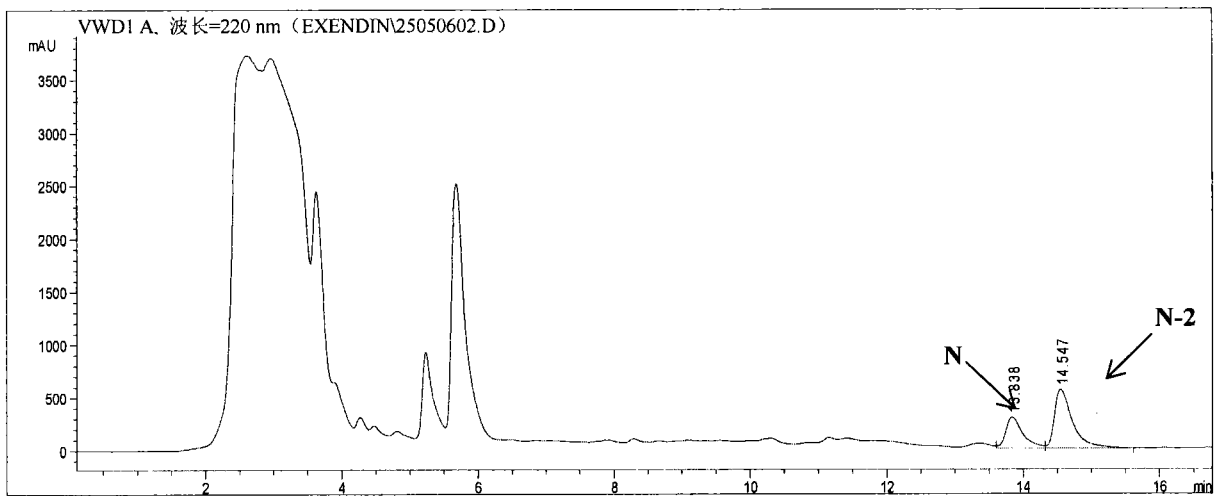


图 2

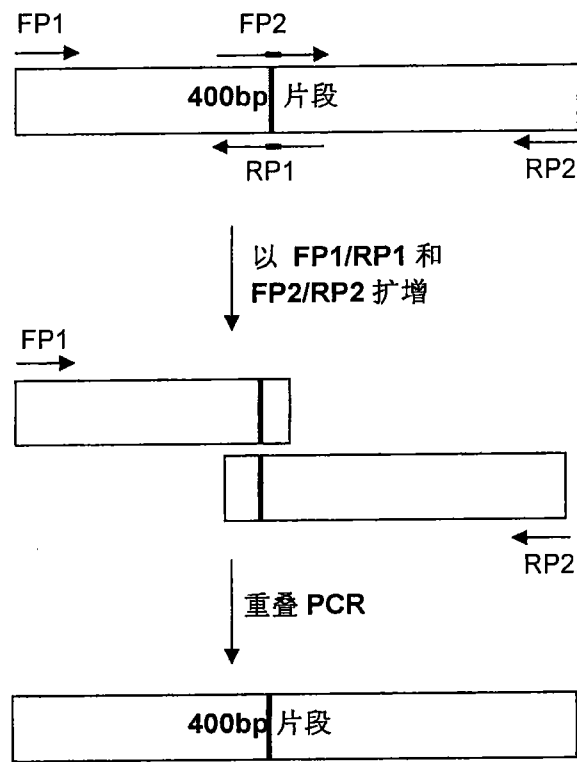


图 3

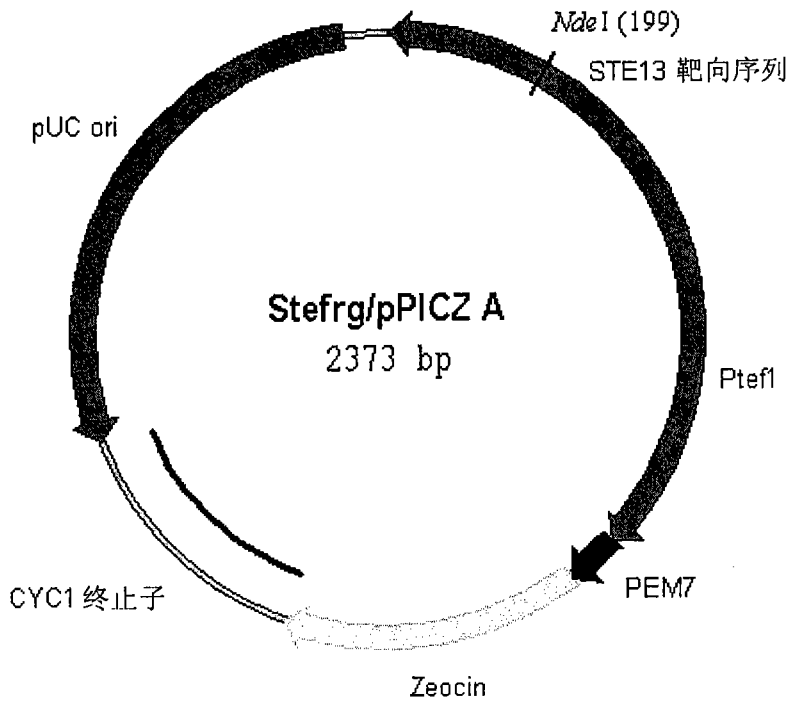


图 4

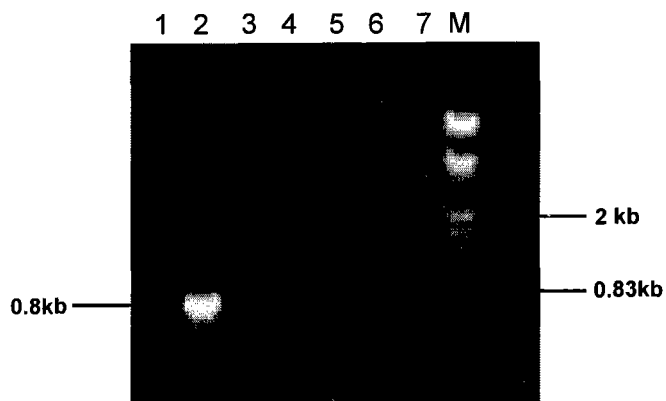


图 5

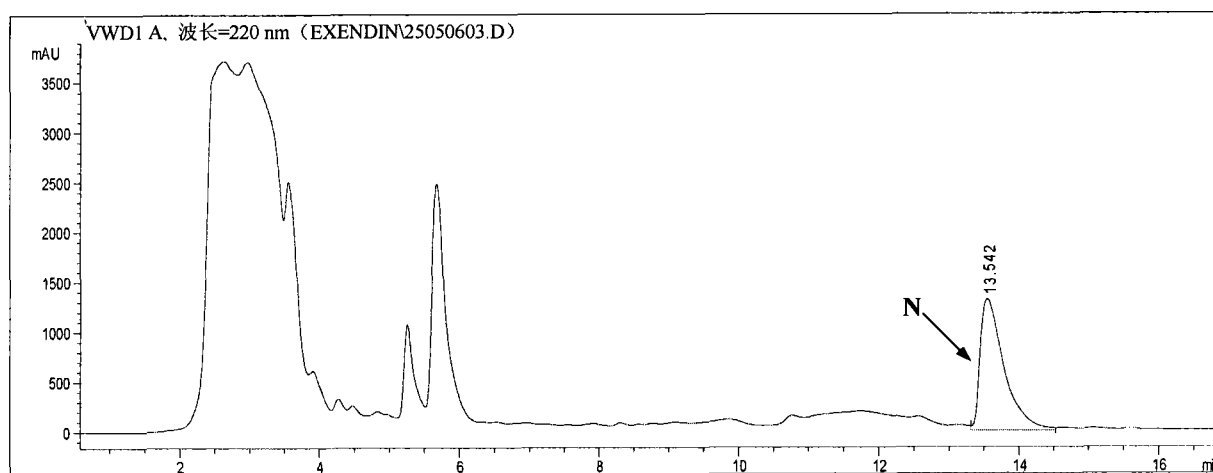


图 6

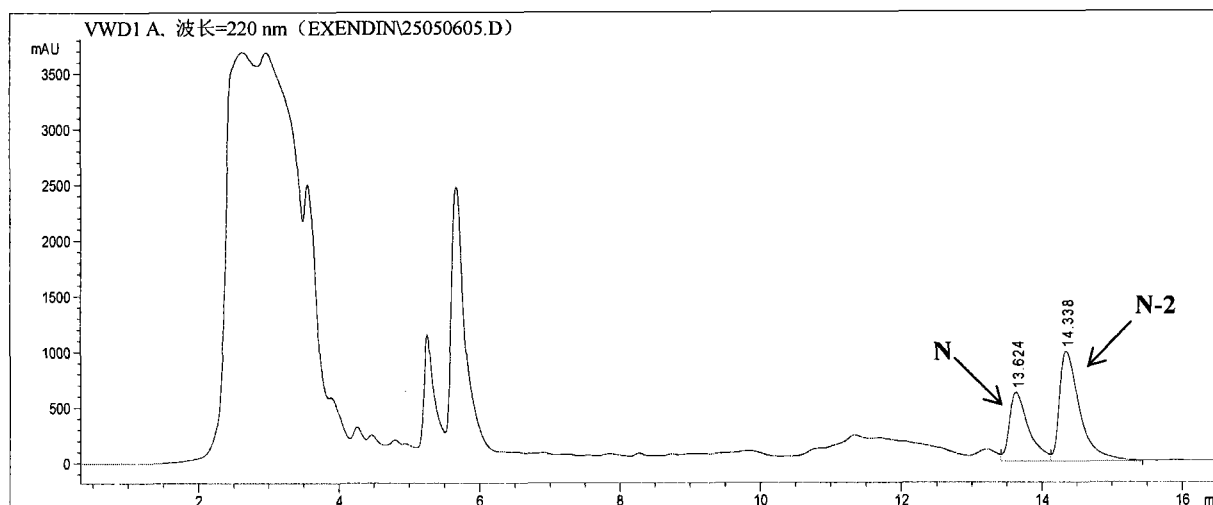


图 7

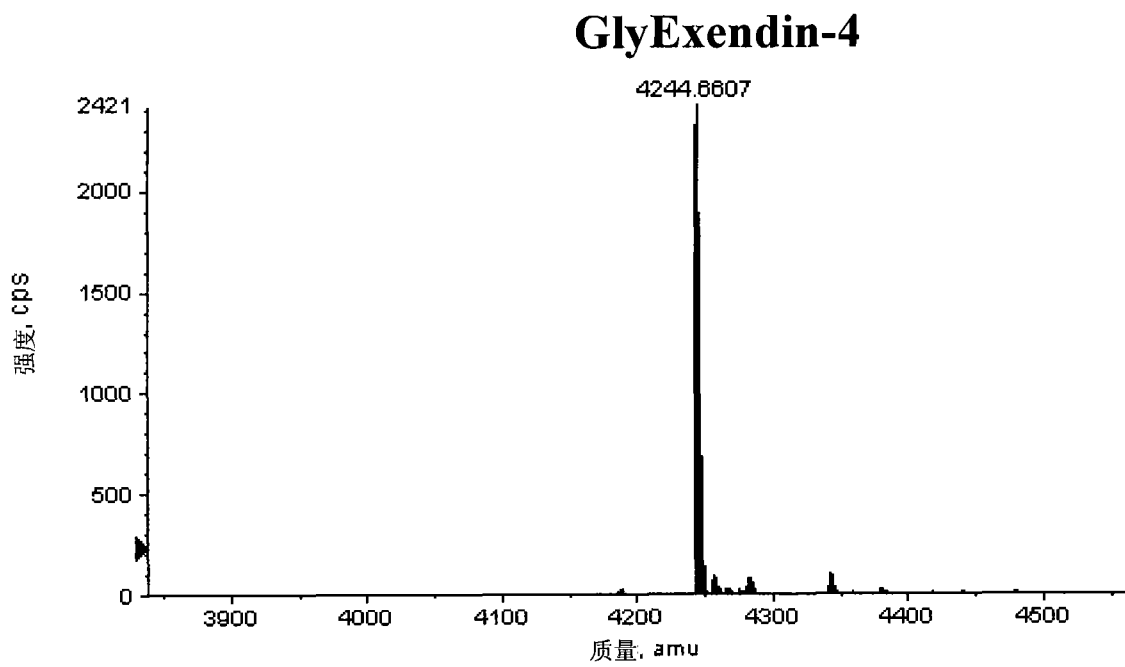


图 8

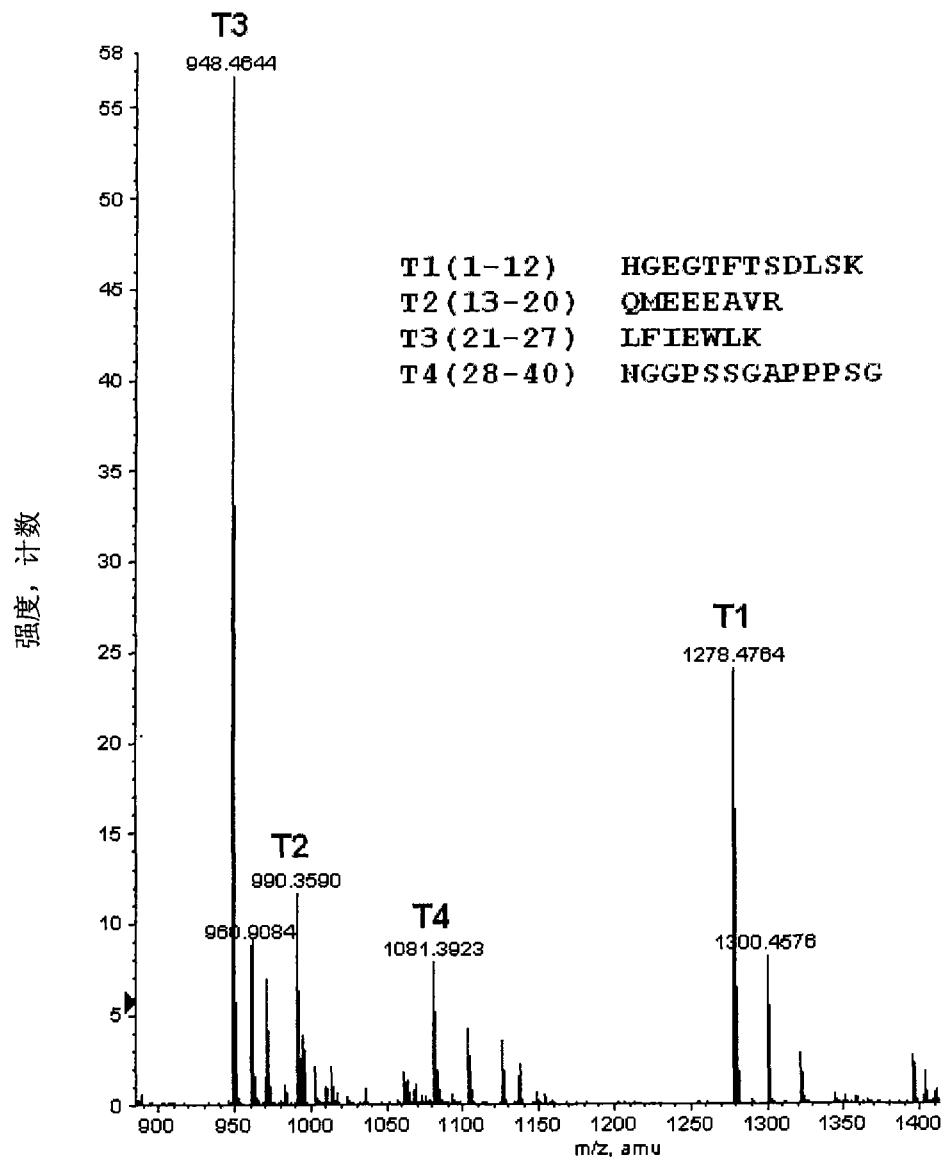


图 9