



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102597225 B

(45) 授权公告日 2015. 04. 29

(21) 申请号 201080029636. 9

C12N 9/10(2006. 01)

(22) 申请日 2010. 07. 01

C12N 9/88(2006. 01)

(30) 优先权数据

A61K 38/44(2006. 01)

09164430. 2 2009. 07. 02 EP

A61K 38/45(2006. 01)

12/497, 275 2009. 07. 02 US

A61K 38/51(2006. 01)

C12P 21/02(2006. 01)

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

审查员 徐丹

2011. 12. 30

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/EP2010/003864 2010. 07. 01

(87) PCT国际申请的公布数据

W02011/000523 EN 2011. 01. 06

(73) 专利权人 奥克斯泰拉知识产权公司

地址 瑞典斯德哥尔摩

(72) 发明人 哈密特·司杜 李青山

阿隆·布莱克·科里

卡尔－古斯塔夫·格兰德

(74) 专利代理机构 中原信达知识产权代理有限

责任公司 11219

代理人 张颖 樊卫民

(51) Int. Cl.

权利要求书1页 说明书23页

C12N 9/02(2006. 01)

序列表21页 附图2页

(54) 发明名称

重组草酸盐降解酶的纯化和分离以及含有草酸盐降解酶的喷雾干燥粒子

(57) 摘要

本发明包含用于在人类中减少草酸盐的方法和组合物,以及用于纯化和分离重组的减少草酸盐的酶蛋白的方法。本发明提供了用于以粒子组合物递送减少草酸盐的酶的方法和组合物。本发明的组合物适合于治疗或预防草酸盐相关病症的方法。

1. 一种用于分离在宿主细胞的细胞质中不溶并且不作为包含体存在的重组蛋白的方法,所述方法包含:

a) 将不作为包含体存在的不溶性重组蛋白与可溶性宿主细胞蛋白分离开;以及

b) 通过使用选自精氨酸、 Mn^{2+} 、 Mg^{2+} 和 Ca^{2+} 的蛋白结合配体溶解分离的重组蛋白,其中重组蛋白是 SEQ. ID NO. 1 或 SEQ. ID NO. 2 的草酸脱羧酶 (OxDC) 野生型重组蛋白的 C383S 或 C383A 突变体,或者是由选自 SEQ. ID NO. 3、SEQ. ID NO. 4、SEQ. ID NO. 5、SEQ. ID NO. 6、SEQ. ID NO. 7、SEQ. ID NO. 8、SEQ. ID NO. 15、SEQ. ID NO. 16、SEQ. ID NO. 17、SEQ. ID NO. 18 或 SEQ. ID NO. 19 的序列编码的蛋白。

2. 权利要求 1 的方法,其还包含 c) 从溶解溶液分离溶解的重组蛋白。

3. 权利要求 1 或 2 的方法,其中分离重组蛋白包含离心或过滤。

4. 权利要求 1 的方法,其中溶解重组蛋白包含提供使蛋白可溶的 pH。

5. 权利要求 2 的方法,其中分离包含将重组蛋白从溶解溶液中沉淀出来。

6. 权利要求 5 的方法,其还包含清洗沉淀的重组蛋白。

7. 权利要求 1 的方法,其中重组蛋白是 OxDC 野生型重组蛋白的 C383S 突变体,或者是由选自 SEQ. ID NO. 3、SEQ. ID NO. 4、SEQ. ID NO. 5、SEQ. ID NO. 6、SEQ. ID NO. 7 或 SEQ. ID NO. 8 的序列编码的蛋白。

8. 权利要求 1 的方法,其中重组蛋白是 OxDC 野生型重组蛋白的 C383A 突变体,或者是由选自 SEQ. ID NO. 15、SEQ. ID NO. 16、SEQ. ID NO. 17、SEQ. ID NO. 18 或 SEQ. ID NO. 19 的序列编码的蛋白。

重组草酸盐降解酶的纯化和分离以及含有草酸盐降解酶的 喷雾干燥粒子

发明领域

[0001] 本发明涉及包含减少草酸盐的酶的喷雾干燥的粒子,所述粒子用于将活性形式的酶递送至胃,减少草酸盐的酶在那里发挥其作用。因而,本发明提供了用于减少胃中的草酸盐的手段。此外,本发明涉及分离重组蛋白的方法,所述重组蛋白在宿主细胞的细胞质中不溶,并且不作为被视为无活性、错误折叠的蛋白沉淀物的包含体存在,所述方法包含:

[0002] a) 将不作为包含体存在的不溶性重组蛋白与可溶性宿主细胞蛋白分离开;以及

[0003] b) 溶解分离的重组蛋白。

[0004] 发明背景

[0005] 肾/尿路结石疾病(尿石症)是世界范围内的主要健康问题。大多数与尿石症相关的结石由单独的草酸钙组成,或由草酸钙加磷酸钙组成。其他疾病状态也与过量草酸盐有关。他们包括外阴痛、与终末期肾病相关的草酸盐沉着症、心脏传导障碍、克罗恩病(Crohn's disease)以及其他肠道疾病状态。

[0006] 草酸和/或其盐、即草酸盐,发现于各种不同食物中,并因而是人类和动物膳食中许多组分的成分。在食用了含有增加量草酸的食物后可能会发生草酸盐吸收增加。众所周知,诸如菠菜和大黄的食物含有大量草酸盐,但是大量其他食物和饮料也含有草酸盐。因为草酸盐存在于如此多样的食物中,因此草酸盐含量低并且同时也可口的食物难以配制出来。此外,依从低草酸盐的膳食常常也是成问题的。

[0007] 形成肾结石的风险围绕着大量尚未完全理解的因素。在西方国家中,在多达12%的人群中发生肾或尿路结石疾病,并且这些结石中约70%由草酸钙或草酸钙加磷酸钙组成。一些个体(例如患有诸如克罗恩病、炎性肠病或脂肪痢的肠道疾病的患者,以及已经历空肠回肠绕道术的患者)在其膳食中吸收了比其他个体更多的草酸盐。对于这些个体来说,草酸盐尿石症的发病率显著增加。发病率的增加是由于肾脏和尿液中草酸盐水平的提高,并且这种在人类中最常见的高草酸盐尿综合征被称为肠源性高草酸盐尿。在患有终末期肾病的患者中草酸盐也是问题,并且近来有证据表明尿液草酸盐升高也涉及到外阴前庭炎(外阴痛)。

[0008] 已经建议将包含减少草酸盐的细菌的肠溶包衣的或其他组合物,用于在通过肠道期间在被系统吸收之前降低草酸盐浓度。肠溶包衣组合物以完整形式通过胃,即包衣是完整的,因此不在胃中降解草酸盐。更好的方法是在草酸盐在肠道中被吸收之前,在胃中减少草酸盐。因此,对于开发能够减少胃中的草酸盐以便减少例如膳食草酸盐的组合物,存在着需求。此外,这样的组合物适用于治疗肠原性和吸收性高草酸盐尿,例如引起复发性结石病的高草酸盐尿。这种治疗的目的是使患者具有正常或至少降低的尿液草酸盐水平。

[0009] 发明概述

[0010] 本发明涉及包含草酸盐降解酶的喷雾干燥的粒子。喷雾干燥的粒子适用于药物和/或食品组合物,用于将活性形式的酶递送至胃并在胃中降解草酸盐。因此,本发明还提供了通过给药喷雾干燥的粒子或包含它们的组合物来治疗和预防草酸盐相关病症的方法。

[0011] 本发明还提供了用于分离和纯化在宿主细胞的细胞质中不溶或仅仅微溶、并且不作为宿主细胞的包含体存在的重组蛋白的方法。重组蛋白尤其是重组的草酸盐降解酶。

附图说明

[0012] 图 1 是通过分段梯度盐洗脱从苯基-琼脂糖凝胶柱洗脱的野生型 OxDC 的色谱图。峰 1 和峰 2 都含有 OxDC,但是峰 1 含有 80-90% 的 OxDC,具有较高比活性 (50-60U/mg 纯 OxDC),而峰 2 含有 30-70% 的 OxDC,具有较低比活性 (30-50U/mg 纯 OxDC)。峰 2 中的 OxDC 据推理是受损或不正确折叠的。峰 3 是杂质 (峰 1-3 在虚线曲线上标出)。不同曲线用点、三角形、正方形、菱形和十字标出。

[0013] 图 2 是显示喂食 0mg 草酸盐 (基线,无 ox)、2.3% 草酸钾 (HOD) 和联合的本发明的草酸脱羧酶粒子 (Oxazyme) 与 2.3% 草酸钾的大鼠的草酸盐平均尿液排泄的图。尿液草酸盐针对肌酸酐进行归一化,并且其是从第 4 至 9 日收集的累积尿液。Ox/Cr 是草酸盐 / 肌酸酐。发明详述

[0014] 正如上面显示的,本发明提供了:

[0015] i) 用于分离和纯化重组蛋白、尤其是草酸盐降解酶的方法,

[0016] ii) 包含一种或多种草酸盐降解酶的喷雾干燥的粒子,以及

[0017] iii) 包含这样的粒子的组合物。

[0018] 因此,本发明是以前描述的用于治疗草酸盐相关疾病的组合物和方法的进一步发展,以前的组合物和方法参见例如 WO 2007/075447 (属于同一申请人)。此外,本发明人令人吃惊地发现,野生型草酸脱羧酶的特定突变、尤其是用丝氨酸、丙氨酸或精氨酸代替 383 位中的半胱氨酸残基,使酶具有在酶的分离和纯化中特别有利的物理化学性质。因此,本发明的分离和纯化方法包含比正常情况下看到的更少的步骤,并利用了酶在细胞质和纯化介质中的溶解度差异。

[0019] 此外,本发明人发现了将活性草酸盐降解酶递送至胃的更简单的解决方案。在 WO 2007/075447 (属于同一申请人) 中,描述了含有具有一定草酸盐降解酶含量的粒子的组合物。粒子含有各种聚合物的组合,并通过多层聚合物和 / 或通过将聚合物交联来加强对胃中的胃蛋白酶和 pH 的抗性,从而针对胃中的严苛环境进行保护。然而,已经开发了更简单的解决方案,其利用了非常特殊的聚合物组、尤其是聚 (甲基) 丙烯酸酯与一种或多种草酸盐降解酶组合。粒子使用温和方法即喷雾干燥来制备。即使通过将酶掺入到喷雾干燥的粒子中可能不能完全保护酶抵抗胃中的环境,但本文的实施例显示出在喷雾干燥方法后和暴露于模拟胃环境后的显著活性。

[0020] 定义

[0021] 当在本文中使用时,术语“减少草酸盐的酶”旨在表示能够减少草酸盐的任何酶。它本身可以减少草酸盐,和 / 或它可以在减少草酸盐的途径中起作用。在本发明的文本中,术语“草酸盐”涵盖草酸和 / 或其任何盐 (草酸盐)。本发明考虑到了使用任何已知的草酸盐减少或降解酶。

[0022] 在本发明的粒子、组合物和方法中使用的酶包括但不限于草酸氧化酶、草酸脱羧酶 (缩写为 OxDC)、草酰辅酶 A 脱羧酶或甲酰辅酶 A 转移酶或其组合,无论是天然的还是突变的。此外,作为草酸盐降解途径的替代物或参与草酸盐代谢途径、特别是草酸盐减少的其

他酶、辅因子和辅酶,也可以单独涉及或与一种或多种上面提到的酶组合使用。在本发明的情形中,本发明所考虑到的不仅是该定义所涵盖的酶,而且包括编码减少草酸盐的基因和蛋白质的多核苷酸序列。本发明还考虑到这些酶的任何结合配偶体,并包括与所述酶结合或相互作用的抗体和抗体片段。

[0023] 酶可以通过从生物体分离来产生,它们可以被纯化,它们可以通过合成、半合成或通过重组手段制造,或者它们可以作为细胞裂解物使用。通常情况下,酶将作为纯化的重组蛋白使用。当在医学应用(作为药物)或食品(作为食品增补剂、功能食品或作为预防措施)中使用时,优选情况下所使用的一种或多种酶在纯度和活性方面是明确确定的。

[0024] 一般使用来自三种主要草酸盐降解酶类型的突变或野生型的一种或多种酶。草酸氧化酶在高等植物中表达,催化草酸盐向 CO_2 的氧依赖性氧化,并伴有 H_2O_2 形成。该反应形成了当前用于检测尿液草酸盐水平的测定法的基础。已经开发出一种 r0x0x 三步纯化方法,用于从大麦根获得草酸氧化酶。该酶也存在于甜菜的茎和根、苋属植物的叶、高粱和许多其他谷物中。

[0025] 草酸脱羧酶 (EC 4.1.1.2) 是第二种类型的草酸盐代谢酶。主要存在于真菌中。它已在几种真菌中报道和表征,例如疣孢漆斑菌 (*Myrothecium verrucaria*)、黑曲霉 (*Aspergillus niger*) 的某些株白腐真菌、杂色革盖菌 (*Coriolus versicolor*) 和金针菇 (*Collybia velutipes*)。这些酶在氧依赖性反应中将草酸盐转变成甲酸盐和二氧化碳。草酸脱羧酶也已经用于血液和尿液中草酸盐的临床测定,并可用于降低食品和环境中的草酸盐水平。已将 YvrK 蛋白(枯草芽孢杆菌 (*B. subtilis*) 的草酸脱羧酶)在大肠杆菌 (*E. coli*) 表达为有功能的重组蛋白,纯化至均质并充分表征。

[0026] 草酰辅酶 A 脱羧酶作用于辅酶 A-活化底物,并将其转变成甲酰辅酶 A。甲酰辅酶 A 转移酶随后作用以交换辅酶 A 上的甲酸盐和草酸盐。已经在减少草酸盐的细菌、即通常存在于土壤中的草酸假单胞菌 (*Pseudomonas oxalaticus*) 和驻留于脊椎动物和人类 GI 胃肠道中的产甲酸草酸杆菌 (*Oxalobacter formigenes*) 中对这些酶进行了研究。这些酶已经在“草酸盐代谢酶类:出人意料的结构和代谢”(The enzymes of oxalate metabolism: Unexpected structures and metabolism, Svedruzic D. 等, Arch Biochem Biophys. 2005 Jan 1; 433(1): 176-92) 中进行了充分综述,该文献在此以其全文引为参考。不论是天然酶、分离的蛋白质还是通过重组技术制造的酶,都可以通过重组或化学手段修饰,并可以包含侧基或其他悬垂的分子。例如,可以将酶修饰成具有用于附着到其他分子或化学化合物上的连接分子。

[0027] 正如在本文实施例中所显示的,产生 383 位半胱氨酸的替代氨基酸的草酸脱羧酶的特定突变是有利的(例如 C383S、C383A、C383R)。因此,这样的重组酶在本发明的各个方面中是特别重要的。

[0028] 当在本文中使用时,术语“酶”的单数形式是指酶的多拷贝,正如在蛋白质分子的指称中所通常理解的。

[0029] 当在本文中使用时,酶包括重组酶蛋白。

[0030] 当在本文中使用时,术语“一种或多种酶”是指可以存在一种类型的酶,例如甲酰辅酶 A 转移酶是所需的,或者在组合物中存在一种以上类型的酶,例如组合物包含例如草酰辅酶 A 脱羧酶和甲酰辅酶 A 转移酶、草酸脱羧酶和草酸氧化酶、或野生型酶与突变酶的组

合。

[0031] 术语“包含体”(其也可以被称为“蛋白质包含体”或“细胞质包含体”)是指由存在于细胞的细胞质中的不溶性多肽链的聚集所形成的物体。这样的包含体可以在作为宿主用于重组生产外来蛋白的原核细胞中看见。目前相信,包含体中的大部分重组蛋白是错误折叠或无生物活性的,尽管在重组生产的荧光蛋白中已观察到一些活性。从上可以明显看出,本发明不涉及当在宿主例如大肠杆菌中表达时以无活性包含体存在的重组蛋白,因此本发明涉及以能够形成酶活性形式的折叠状态表达和产生的重组酶。

[0032] 术语“粒子”在本发明中用于描述含有与聚合物组合的一种或多种类型的减少草酸盐的酶的组合物。一般来说,术语“粒子”作为最广泛的术语使用,即没有任何特定尺寸或形状归属。

[0033] 术语“喷雾干燥的粒子”是指通过喷雾干燥方法获得的粒子。

[0034] 必须指出,当在本说明书和随附的权利要求书中使用时,不带任何具体数量的指称包括其复数形式,除非上下文明确指出不是如此。

[0035] 分离和纯化重组蛋白、尤其是草酸盐降解酶的方法

[0036] 本发明提供了用于从宿主细胞分离和纯化重组蛋白的方法。方法包含使用有效并且简化的步骤来纯化减少草酸盐的酶,所述步骤导致蛋白收率提高。

[0037] 重组蛋白可以包括突变的减少草酸盐的酶。本发明的方法针对作为活性酶蛋白存在于宿主细胞的细胞质中的重组蛋白,其不溶于细胞质中并表现为沉淀,但是不形成包含体。这样的蛋白被认为在宿主细胞的细胞质中是不溶或仅仅微溶的。本发明的一个方面包含宿主细胞的裂解和重组蛋白与可溶性细胞质蛋白的易化分离。分离可以通过细胞质的离心或过滤容易地实现。在分离后,优选通过包括但不限于添加结合配体或改变 pH 的方法使重组蛋白溶解。一旦溶解后,可以通过例如沉淀将蛋白从溶液中移除,并储存或使用在例如本文公开的粒子中。

[0038] 本发明的方法包含用于分离和纯化重组的减少草酸盐的酶、例如突变的重组的减少草酸盐的酶蛋白的方法。重组蛋白在大肠杆菌中的表达常常引起蛋白质离析在包含体中,这是因为包含体中的蛋白质与可溶性重组蛋白相比,为细胞引起的有毒负担小得多。由于不溶形式,包含体中的蛋白质也较不容易被大肠杆菌的蛋白酶降解。然而,从包含体重新折叠蛋白质以产生有活性的酶,相当具有挑战性。如果在表达期间蛋白质能够以活性、但是在大肠杆菌细胞中不溶或仅仅微溶的形式表达,并且不作为包含体存在,那么蛋白质表达可以达到与形成包含体时所观察到的相似的水平。在细胞质中具有有限溶解性、因此在细胞的细胞质中沉淀的蛋白质,将不需要重折叠步骤。

[0039] 例如,草酸脱羧酶 (OxDC) 野生型重组蛋白在大肠杆菌细胞质中具有一定水平的溶解性,小部分 (5%, 表 1) 作为可溶性蛋白存在于细胞裂解物中,大部分 (95%, 表 1) 作为不溶性蛋白存在于破碎的细胞沉淀物中。不溶性部分可以溶解在高盐浓度例如 1M NaCl 或 0.75M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 中,并且溶解的 OxDC 含有两种主要形式,其可以通过疏水相互作用层析 (HIC) 柱分离 (图 1)。两个 OxDC 峰都有活性,但是在较高盐浓度下洗脱的峰 (峰 1, 图 1) 中的 OxDC 显示出高出约 20% 的比活性。看起来,在较低盐浓度下洗脱的峰 (峰 2, 参见图 1) 中的 OxDC 是受损的。该蛋白级份更加疏水并且活性更低。细胞质中的可溶性蛋白更容易受到蛋白酶水解、其他酶催化反应、化学反应和物理修饰的损伤。

[0040] 作为包含体表达的蛋白质已广泛报道,但是关于如何将蛋白表达成不溶或微溶例如沉淀状态和有活性形式,没有报道。使重组蛋白在宿主的细胞质中具有较低溶解性,产生了简化的蛋白质纯化方法。因为重组蛋白不溶或具有较低溶解性,因此一般作为宿主细胞裂解后的第一步,通过离心或过滤容易地分离宿主生物体例如大肠杆菌的可溶性蛋白。存在于离心沉淀物或过滤后的残留物中的不溶或微溶重组蛋白可以进行处理,例如使用选择性缓冲液溶解。通过选择 pH 和 / 或筛选特异性结合配体来发现选择性缓冲液。当 pH 接近 pI 时,许多蛋白质具有非常有限的溶解性,但是当 pH 高于或低于 pI 超过 2 个 pH 单位时具有增加的溶解性。也可以通过将沉淀悬浮在含有结合配体的溶液中来改变蛋白溶解性。例如,对于野生型重组蛋白来说,0xDC 在 pH4.5-7.8 下具有有限溶解性,对于 C383S 突变蛋白来说,该范围为 pH4.0-8.0。C383 表示草酸脱羧酶氨基酸序列中第 383 氨基酸位置处的半胱氨酸。S 表示半胱氨酸已被丝氨酸代替。对于野生型 0xDC 来说,如果 pH 高于 8.5,0xDC 溶解性增加,而对于 C383S 突变体来说,该 pH 为 9.0。Tris 和精氨酸是 0xDC 的选择性结合配体。使用它们中的任一种将增加 0xDC 溶解性。本发明的方法包含纯化步骤,所述纯化步骤包含添加结合配体或改变介质的 pH,以协助溶解存在于离心后的沉淀物或宿主细胞可溶性蛋白过滤后的存留物中的酶或蛋白质。

[0041] 此外,这种用于分离减少草酸盐的酶的突变重组蛋白的方法可以导致回收的蛋白量增加,并高于使用减少草酸盐的酶的重组野生型蛋白时所观察到的量。方法通常也具有较少的步骤,以使更简单的纯化方法成为可能。例如,通过例如离心或过滤,将宿主生物体例如大肠杆菌的可溶性蛋白与在宿主细胞的细胞质中不溶或溶解性比宿主蛋白质低的重组蛋白分离开。突变的减少草酸盐的重组蛋白可能以其他方式有别于野生型重组蛋白,例如突变的蛋白可能不形成引起聚集体形成的蛋白质-蛋白质相互作用。例如,替换草酸脱羧酶中的半胱氨酸氨基酸产生不能形成二硫键的突变蛋白,导致更少至没有蛋白聚集体。

[0042] 本发明方法的实例包含制造减少草酸盐的酶的重组突变蛋白的宿主细胞的裂解。在宿主细胞例如大肠杆菌细胞裂解后,通过例如过滤或离心除去所有可溶性宿主蛋白质。在宿主细胞的细胞质中不溶或仅仅微溶并且不作为包含体存在的重组蛋白,例如减少草酸盐的酶的突变重组蛋白,存在于离心沉淀物中或作为过滤中的存留物。然后溶解突变蛋白,例如通过用选择性缓冲液或结合配体或本领域技术人员已知的其他方法进行溶解。选择性缓冲液可以例如通过 pH 参数来确定。当 pH 接近 pI 时,许多蛋白质具有有限的溶解性,但是当 pH 高于或低于 pI 超过 2 个 pH 单位时具有增加的溶解性。例如,对于野生型重组蛋白来说,0xDC 在 pH 4.5-7.8 下具有有限溶解性,对于 C383S 突变重组蛋白来说,该范围为 pH 4.0-8.0。

[0043] 溶解作用也可能受到蛋白结合配体的影响。当溶液中存在结合配体时,蛋白质溶解性可能改变。这种性质可以应用于通过选择性沉淀和溶解进行的蛋白质纯化。特定蛋白质的结合配体可以通过本领域技术人员已知的方法来发现,所述方法例如差示扫描量热术、UV 光谱术、红外光谱术、荧光光谱术和检测配体与蛋白质相互作用的其他方法。例如,存在大量能够与 0xDC 结合并影响溶解性的化学化合物和离子,例如 Tris、精氨酸、 Mn^{2+} 、 Mg^{2+} 和 Ca^{2+} 。优选情况下使用不抑制酶活性的化合物或离子,或者如果化合物或离子抑制活性,容易地移除所述化合物或离子以回收活性酶蛋白。例如,对于野生型 0xDC 来说,当 pH 高于 8.0 时 Tris 和精氨酸不抑制 0xDC 活性并增加 0xDC 溶解性,而对于 0xDC 的 C383S 突变体来

说,该 pH 为 8.5。

[0044] 本发明的用于分离和纯化减少草酸盐的酶的突变重组蛋白的方法可以包含下列一种或两种,在宿主细胞质中重组突变蛋白的低溶解性,和在改变溶解条件例如添加结合配体和 / 或调整 pH 后减少草酸盐的酶的突变重组蛋白的高溶解性。

[0045] 在目前使用的用于分离和纯化重组蛋白的方法中,在使用大层析柱时常常出现问题,所述大层析柱对于构造和在大规模分离和纯化所需的规模下操作提出挑战。在实施例 1 中证实了这种方法。消除这样的步骤将导致纯化成本降低和更简单的方法,其演示在实施例 4 中。

[0046] 本发明的方法包含从宿主细胞分离或纯化重组蛋白。分离的方法包含分离在宿主生物体的细胞质中微溶至不溶的重组蛋白。分离步骤包含获得宿主细胞裂解物,通过例如重悬浮裂解物并将其离心以形成裂解物沉淀来洗涤裂解物;将裂解物沉淀悬浮在蛋白溶解介质,例如含有结合配体或改变蛋白质的 pH 响应(例如增加蛋白质溶解性)的其他化合物的介质中;将混合物离心,并将对液相而不是不溶性的沉淀物进行作用。从液相移除重组蛋白。例如,调整液相的 pH 并将重组蛋白从溶液中沉淀出来。不溶性沉淀物可以重新提取多次以形成液相,从中通过例如沉淀来移除重组蛋白。移除的蛋白质可以洗涤一次或多次,并储存或在需要时使用。

[0047] 通过本文教导的方法分离到的,在细胞质中不溶或仅仅微溶并且不作为宿主细胞例如大肠杆菌的包含体存在的酶,可以包含非天然的或突变的减少草酸盐的酶的重组蛋白,其包含修饰或突变,包括但不限于使用含有减少草酸盐的酶的减少草酸盐的活性位点的结构域或肽片段、尤其是包含活性位点或由活性位点构成的肽片段所形成的嵌合体;修饰或突变,包括但不限于用于增加活性的缺失、插入、取代、反转、突变、用非天然氨基酸取代天然存在的氨基酸,或本领域技术人员已知的其他修饰。这类修饰过的酶可以具有与天然酶相比更高、更低或相等的活性,或者可以具有与天然或未经修饰的酶相同或不同的特性。本发明考虑到的方法和组合物包含减少草酸盐的酶的整个酶、片段、肽、结合区、活性位点或其他功能区、区段、序列以及启动子和控制序列。

[0048] 本发明包含重组蛋白的使用,并且所述重组蛋白被突变以使蛋白质以与野生型或未突变重组蛋白中所看到的相比更高的比率不溶或仅仅微溶于宿主的细胞质中。此外,这些重组蛋白不作为包含体存在于宿主细胞中。存在几种改变蛋白质溶解性的方法,例如用亲水性更低的残基取代亲水性残基、用不带电荷的氨基酸取代带电荷氨基酸和 / 或在 C- 和 / 或 N- 端添加疏水性肽尾。修饰不应使蛋白质失活,并且具有低溶解性的修饰蛋白应该以活性形式被宿主细胞例如大肠杆菌表达。本发明包含用于突变减少草酸盐的酶的方法,并且突变的酶包括但不限于草酸脱羧酶、草酸氧化酶、草酰辅酶 A 脱羧酶和甲酰辅酶 A 转移酶。突变优选不降低或失活酶的功能性。

[0049] 描述了本发明所设想的突变的实例。OxDC 的 N- 和 C- 端两者都远离催化位点并且相当柔性。正如从 x- 射线晶体学所确定的,两个末端的柔性揭示出 N- 端尾的前 7 个氨基酸和 C- 端的最后 6 个氨基酸由于构象非均质性而不衍射。在 C- 端的 6 个残基中,选择 C383 用于突变,这是因为有许多氨基酸比 Cys 更疏水或亲水,可以被选择用于取代它。C383 表示草酸脱羧酶氨基酸序列中第 383 位的半胱氨酸。此外, C383 是 OxDC 中唯一的 Cys,但是已被显示易于在 OxDC 六聚体之间形成二硫键并进一步产生聚集体。取代 C383 可以消除

这种聚集体的形成,因此增加了 O_xDC 在溶液中的稳定性。将突变引入到 C- 端区域中。

[0050] 从原始的 yvrk 基因序列(野生型 yvrk)草酸脱羧酶产生了多个基因。原始基因来自于枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*),并使用来自于 GenScript Corporation, Piscataway, NJ 的算法为基因序列在大肠杆菌中的表达进行优化。针对密码子使用、平衡 GC 含量、去除重复元件以及确保不含用于克隆的内部限制性位点,对基因进行优化。密码子优化的基因产生了具有与野生型 yvrk 相同的氨基酸序列的蛋白质。

[0051] 然后对野生型 yvrk 基因和优化过的 yvrk 基因两者的单个半胱氨酸密码子进行修饰,产生了其他独特的基因序列。将半胱氨酸密码子用丝氨酸、精氨酸或丙氨酸密码子替换。

[0052] 可以使用相同方法对野生型 yvrk 基因的基因序列进行优化,以用于其他表达系统例如毕赤酵母属(*Pichia*)或酵母菌属(*Saccharomyces*)。此外,可以通过针对最适密码子使用和 GC 含量以及去除重复元件进行基因优化,来改进在芽孢杆菌表达系统中的表达。密码子优化还可用于在已修饰的半胱氨酸密码子之外的位置处、或除了半胱氨酸修饰之外修饰蛋白质的二级结构,作为例如提高聚乙二醇化、微球结合或包胶的方法,或作为提高在低 pH 下的 pH 稳定性的方法,或作为提高蛋白质活性的方法。

[0053] SEQ ID 1

[0054] yvrk 原始序列,其中半胱氨酸密码子用粗体标出。

[0055] AAAAAACAAAATGACATTCCGCAGCCAATTAGAGGAGACAAAGGAGCAACGGTAAAAATCCCGCGCAAT
ATTGAAAGAGACCGGCAAAACCGTGATATGCTCGTTCGGCCTGAAACCGATCATGGCACCGTCAGCAATATGAAGTT
TTCATTCTCTGATACTCATAACCGATTAGAAAAAGGCGGATATGCCCCGGAAGTGACAGTACGTGAATTGCCGATTT
CAGAAAACCTTGCATCCGTAAATATGCGGCTGAAGCCAGGCGCGATTTCGCGAGCTTCACTGGCATAAAGAAGCTGAA
TGGGCTTATATGATTTACGGAAGTGCAAGAGTCACAATTGTAGATGAAAAAGGGCGCAGCTTTATTGACGATGTAGG
TGAAGGAGACCTTTGGTACTTCCCGTCAGGCCTGCCGCACTCCATCCAAGCGCTGGAGGAGGGAGCTGAGTTCCTGC
TCGTGTTTGACGATGGATCATTCTCTGAAAAACAGCACGTTCCAGCTGACAGATTGGCTGGCCCACTCCAAAAGAA
GTCATTGCT

[0056] GCGAACTTCGGCGTGACAAAAGAAGAGATTTCCAATTTGCCTGGCAAAGAAAAATATATATTTGAAAAC
CAACTTCCTGGCAGTTTAAAGATGATATTGTGGAAGGGCCGAATGGCGAAGTGCCTTATCCATTTACTTACCGCCT
TCTTGAACAAGAGCCGATCGAATCTGAGGGAGGA

[0057] AAAGTATACATTGCAGATTCGACAAACTTCAAAGTGTCTAAAACCATCGCATCAGCGCTCGTAACAGTA
GAACCCGGCGCCATGAGAGAACTGCACTGGCACCCGAATACCCACGAATGGCAATACTACATCTCCGGTAAAGCTAG
AATGACCGTTTTTGCATCTGACGGCCATGCCAGAACGTTTAATTACCAAGCCGGTGATGTCGGATATGTACCATTTG
CAATGGGTCATTACGTTGAAAACATCGGGGATGAACCGCTTGTCTTTTTAGAAATCTTCAAAGACGACCATTATGCT
GATGTATCTTTAAACCAATGGCTTGCCATGCTTCCTGAAACATTTGTTCAAGCGCACCTTGACTTGGGCAAAGACTT
TACTGATGTGCTTTCAAAGAAAAGCACCCAGTAGTGAAAAAGAAATGCAGTAAA

[0058] 被优化用于大肠杆菌的 Yvrk 基因序列,其中在 5' 和 3' 末端处具有限制性位点(下划线),并且半胱氨酸密码子用粗体标出。

[0059] SEQ ID 2

[0060] CATATGAAAAAACAGAATGACATTCCACAGCCGATTCGCGGCGATAAAGGCGCGACCGTCAAAATTCCT
CGCAATATCGAACGCGACCGCCAGAATCCGGATATGCTGGTGGCGCCGGAGACGGACCATGGCACGGTGTCTAACAT

GAAATTCTCTTTTAGCGATACCCACAACCGCCTGGAAAAAGGTGGCTACGCGCGAGGTTACCGTCCGTGAACTGC
CAATTAGCGAAAATCTGGCTTCGGTTAACATGCGTCTGAAACCAGGTGCTATCCGTGAGCTGCACTGGCACAAGGAA
GCGGAATGGGCGTATATGATTTACGGTTCAGCACGTGTTACCATCGTAGACGAGAAAGGTCGTAGCTTTATCGATGA
TGTTGGCGAAGGTGATCTGTGGTATTTCCCATCTGGCCTGCCGCATTCCGATTCAGGCGCTGGAAGAAGGCGCTGAAT
TTCTGCTGGTGTTCGATGATGGTTCCTTTTCTGAAAAACAGCACGTTCCAGCTGACGGATTGGCTGGCGCACACGCCG
AAAGAAGTCATTGCGGCCAATTTTGGGGTAACCAAAGAAGAAATTTCCAACCTGCCGGGCAAAGAAAAGTATATTTT
TGAGAATCAGCTGCCGGGCTCTCTGAAGGACGATATTGTAGAAGGCCCTAACGGTGAGGTGCCGTATCCGTTCACCT
ATCGTCTGCTGGAGCAGGAACCGATTGAAAGCGAAGGCGGTAAAGTTTATATCGCAGATTCCTACTAACTTTAAAGTC
TCCAAGACCATTGCCAGCGCCCTGGTCACCGTGGAACCGGGAGCGATGCGCGAGCTGCACTGGCATCCGAACACGCA
CGAATGGCAGTATTATATTTCCGGCAAAGCACGCATGACCGTTTTTGCCTCAGATGGACACGCTCGCACGTTTAATT
ATCAAGCGGGTGATGTTGGCTACGTTCTTTCGCCATGGGCCATTATGTAGAAAATATCGGCGATGAACCACTGGTG
TTTCTGGAGATCTTTAAAGATGACCACTATGCCGATGTTTCACTGAATCAGTGGCTGGCCATGCTGCCGAAACTTT
TGTTTCAGGCGCATCTGGACCTGGGTAAAGACTTTACGGATGTGCTGAGCAAAGAAAAACACCCGGTAGTCAAGAAGA
AATGCAGTAAAGGATCC

[0061] 本发明的其他序列包括含有 SEQ ID 3-16 的第 1142-1152 位碱基的 SEQ ID 1 的 yvrk 基因。NO. 3-8 是丝氨酸, NO. 9-14 是精氨酸, NO. 15-19 是丙氨酸。

[0062]

SEQ ID 3 ATCTAGTAAA	SEQ ID 12 ACGGAGTAAA
SEQ ID 4 ATCCAGTAAA	SEQ ID 13 AAGAAGTAAA
SEQ ID 5 ATCAAGTAAA	SEQ ID 14 AAGGAGTAAA
SEQ ID 6 ATCGAGTAAA	SEQ ID 15 AGCTAGTAAA
SEQ ID 7 AAGTAGTAAA	SEQ ID 16 AGCCAGTAAA
SEQ ID 8 AAGCAGTAAA	SEQ ID 17 AGCAAGTAAA
SEQ ID 9 ACGTAGTAAA	SEQ ID 18 AGCGAGTAAA
SEQ ID 10 ACGCAGTAAA	SEQ ID 19 AGGAAGTAAA
SEQ ID 11 ACGAAGTAAA	

[0063] 粒子, 包括喷雾干燥的粒子

[0064] 本发明的一个方面涉及包含减少草酸盐的酶和聚合物材料的粒子。减少草酸盐的酶可以是减少草酸盐的酶的突变重组蛋白。

[0065] 粒子应该能够降解人或动物胃中的草酸盐, 即粒子的形成不能引起酶活性的显著损失, 并且粒子的性质必须保护包含在粒子中的酶免于降解和 / 或失活。因此, 酶必须在对应于胃中正常存在的 pH (餐后 pH 2.5-5) 的 pH 下有活性, 或者可选地, 可以将 pH 调节剂原样掺入到粒子中或在给药前与粒子混合。适合的 pH 调节剂包括缓冲物质, 例如专业技术人

员公知的缓冲物质。

[0066] 考虑到了利用粒子形成（与用于制备粒子的特定方法和所使用的特定聚合物或共聚物组合使用）来保护酶蛋白免于胃蛋白酶消化，以确保酶活性。本发明考虑到了从蛋白质和聚合物材料形成粒子。当在本文中使用时，粒子形成是指将蛋白质与聚合物或共聚物溶液缔合以形成包含活性酶和聚合物或共聚物的小粒子。这样的形成活性酶粒子的方法增加了粒子中活性酶的量，并可以增加含有粒子的剂型在用于治疗或预防方案中的效能。粒子形成旨在保护酶免于胃蛋白酶消化。

[0067] 重要的是确保用于粒子形成的方法不包含引起酶失活的风险的试剂、溶剂、温度、装置等。因此，应该注意避免包含例如有机溶剂、高温和高或低 pH 的方法。

[0068] 存在许多粒子形成方法，例如团聚、相分离、聚合、喷雾干燥、静电方法和空气悬浮方法。喷雾干燥是在 20 世纪 30 年代开发的机械微包胶方法。该技术利用与聚合物和 / 或其他赋形剂混合的药物或活性物质形成进料，其可以是溶液、悬液、分散系或乳液。将进料雾化成液滴，并随着干燥热气体引入干燥室。液滴向干燥热气体散失水分并形成干粉。

[0069] 用于制造本发明的活性酶粒子的适合方法是喷雾干燥。在这样的方法中，酶和聚合物分散或溶解在水性介质中，并通过喷嘴装载到适合的喷雾干燥装置中。条件是温和的，即使使用相对高的入口和出口温度，本文中的实施例显示包含在粒子中的酶的活性保持高水平，并已观察到甚至更高的水平。其他方法也可能适合，只要酶活性不受严重破坏（应该维持至少 80% 的活性）即可。对于喷雾干燥来说，本文中的实施例显示了至少 85% 的残余活性，并且至少 90% 和至少 100% 的残余活性也被观察到。

[0070] 在许多粒子形成方法中，蛋白质通常提供在溶液中。一般情况下，蛋白质在粒子中均匀分布，这在获得粒子内的有效酶浓度以提供足够或增加的酶活性水平中引起困难。在喷雾干燥方法中，蛋白质可以提供在溶液或分散系或悬液中，其中酶蛋白处于固体状态，例如作为酶蛋白纳米或微米团块。当粒子被提供到目标递送位点时，粒子中的固体酶纳米或微米团块被溶剂化，并形成有效浓度的酶溶液。酶浓度可以处于使比活性增加的水平上。例如，OxDC 的 C383S 突变体仅仅极少溶解在 pH 4.5-7.8 之间的缓冲液中，并且它可以作为蛋白纳米或微米团块制备在 pH 4.5-7.8 的水悬液中。然后将 C383S 纳米或微米团块悬液与聚合物溶液或悬液进行混合，并通过喷雾干燥或其他干燥技术形成粒子。粒子中 C383S 突变体 OxDC 的浓度显示出 C383S 突变体的比活性高达其原始比活性的 141%。因此，喷雾干燥是用于制造粒子的优选方法。

[0071] 在本文的非限制性实例中，描述了如何将酶掺入聚合物材料的方法。本领域技术人员可以发现适合用于制备本发明的组合物的其他方法。通过将酶掺入聚合物材料，酶获得了一定程度的保护以抵抗在 pH 和胃蛋白酶方面与胃液类似的条件。得到的减少草酸盐的酶的组合物表现为粒子，即微米或纳米尺寸的离散单位。

[0072] 一般情况下，本发明的组合物的粒子具有约 50nm 至约 1mm、例如约 500nm 至约 500 μ m、约 1 μ m 至约 500 μ m、约 2 μ m 至约 100 μ m、约 4 μ m 至约 80 μ m、约 6 μ m 至约 60 μ m、约 8 μ m 至约 40 μ m、约 10 μ m 至约 20 μ m 的平均直径。

[0073] 有许多不同聚合物和共聚物可以适用于粒子形成，例如天然或合成聚合物，包括但不限于藻酸盐、葡聚糖、纤维素、胶原蛋白、壳聚糖、藻酸盐、果胶、透明质酸、PLGA、聚乙烯醇 (PVA)、聚丙烯酸、聚乳酸、聚乙二醇、聚酯等。

[0074] 然而,在本发明的情形中,已发现Eudragit®聚合物产生所需结果,即在胃中存在的胃蛋白酶或其他酶以及胃内含物的低 pH 下维持适合的酶活性和对酶的足够保护作用。

[0075] Eudragit®聚合物是基于聚(甲基)丙烯酸酯的聚合物,并且可以以大量品种获得,例如用于胃抗性和肠胃定向、用于保持水分和/或掩蔽气味/口味、用于时间控制性药物释放的品种。一些Eudragit®聚合物(Eudragit® L、S 和 FS 系列)在酸性和中性/碱性环境中具有不同溶解性,并且 pH 截止值(即聚合物在其下变得可溶的值)从 5.5 至 > 7 的不等。其他Eudragit®聚合物(E 和 EP0 系列)溶于高达 pH 5 的胃液中,并且在更高 pH 值下可膨胀。一些Eudragit®聚合物(RL、RS、NE 和 NM 系列)不溶并且具有 pH 依赖性膨胀。

[0076] 正如从本文的实施例中看到的,上面提到的第一和第三组Eudragit®聚合物适用于本发明的粒子。在包括Eudragit® L100-55、L30-55、L100、L12.5、S100、S12.5 和 FS30D 的第一组中,聚合物是具有羧酸功能团的甲基丙烯酸共聚物,即聚合物是阴离子聚合物。在包括Eudragit® E100、E12.5 和 EP0 的第二组中,聚合物是具有二甲基氨基乙基官能团的甲基丙烯酸氨基烷基酯共聚物。在包括Eudragit® RL30、RL P0、RL100、RL12.5、RS30D、RS P0、RS100、RS12.5、NE 30D、NE40D、NM30D 的最后一组中,聚合物是具有三甲基-铵乙基-甲基丙烯酸官能团的甲基丙烯酸氨基烷基酯共聚物(RL 和 RS 系列),或者聚合物是甲基丙烯酸酯的中性聚合物(NE 和 NM 系列)。聚合物可以从 Evonik Industries 公司获得。

[0077] 粒子中聚合物的浓度为约 5 至约 80% w/w,例如约 5 至约 70% w/w、约 5 至约 60% w/w、约 5 至约 50% w/w、约 10 至约 50% w/w 或约 10 至约 40% w/w。

[0078] 在本文的实施例中,适合的粒子使用Eudragit® L-100、L-100-55、RS、RL,即代表上面的第一和第三组的聚合物形成。

[0079] 除了酶和聚合物材料之外,被喷雾干燥的组合物还可以含有一种或多种赋形剂或添加剂。赋形剂可以是保护酶以抵抗热、脱水和储存的任何分子,例如糖、氨基酸、表面活性剂、盐等。也可以使用可药用赋形剂,例如本文中所描述的那些。

[0080] 粒子可以通过已知方法、优选通过喷雾干燥形成。在形成包含一种或多种酶和聚合物材料的粒子后,可以通过例如干燥、冷冻干燥或冷干法对粒子进行进一步处理。尽管冷冻干燥不产生粒子形成,但它能够干燥已经形成的包含酶和聚合物材料的粒子。粒子可以处于悬浮、分散或乳化状态下,然后对其施加冷冻干燥条件。冷冻干燥避免对酶加热并使干燥过程适合于热敏感蛋白。冷冻干燥或其他方法(例如包衣)可以省略,然后只通过喷雾干燥形成聚合物和减少草酸盐的酶的粒子。然后可以通过例如与增量剂混合和例如填充在小袋中、将粒子添加到胶囊、将粒子压制成片剂、将粒子掺入到咀嚼片剂中、将粒子掺入到快速溶解或口腔溶解片剂中或将粒子添加到液体、糖浆、酏剂或食品中,将这样的粒子配制成口服药物或食品剂型。

[0081] 例如,通过将草酸脱羧酶(OxDC)与聚合物材料 Eudragit L100 组合来制备粒子。为了进行比较,仅使用精氨酸缓冲液将 OxDC 冷冻干燥。不含聚合物材料的冷冻干燥的酶以及通过将 OxDC 与 Eudragit L100 的组合喷雾干燥然后再冷冻干燥所形成的粒子,两者都获得了 100% 的回收率并且没有活性损失。包含 OxDC 和 Eudragit L100 的粒子受到保护,在 pH 3.25 至 pH 5.0 的溶液中抵抗胃蛋白酶降解至少 40 分钟、至少 60 分钟、至少 90 分钟、至少 120 分钟。

[0082] 本发明所包含的粒子含有野生型或突变的减少草酸盐的酶,以及保护酶抵抗胃条

件下（胃蛋白酶）降解的聚合物材料。可以设想，粒子可以包含任何减少草酸盐的酶或辅因子，并且本发明考虑到组合物包含减少草酸盐的酶例如草酸脱羧酶、草酸氧化酶、草酰辅酶 A 脱羧酶或甲酰辅酶 A 转移酶、或草酰辅酶 A 脱羧酶与甲酰辅酶 A 转移酶的组合或任何这些酶的组合，并且这样的酶可以是天然或野生型酶，或者可以是在核酸序列、氨基酸序列、结合基团、糖类或脂类中具有突变、修饰或改变的非天然或突变的酶。这些酶使用草酸盐作为底物，或者在草酸盐代谢或分解代谢的步骤中具有活性。

[0083] 因此，本发明的粒子保护草酸盐降解酶抵抗胃肠环境。此外，本发明的粒子基本上不向胃肠环境释放酶。换句话说，在口服给药后，酶在粒子中保留足够长的时间，以便能够使胃中的草酸盐被降解或减少。取决于用于制造粒子的聚合物类型或对粒子的处理例如包衣或交联，酶可以在胃中时或离开胃后从粒子释放。在粒子中，聚合物材料可以起到酶的保护性载体的作用，并在同时可以允许底物、即草酸盐扩散或被运输到组合物中，以便能够进行草酸盐的原位降解。本发明粒子的特点是它们与使用不采取这种粒子形式的酶所观察到的相比将酶活性保留更长时间的能力，特别是在胃蛋白酶存在的情况下。因此，一方面，本发明涉及包含一种或多种减少草酸盐的酶和聚合物材料的粒子，其中酶在 pH 3.25 的含有 3.2mg/ml 胃蛋白酶的缓冲液中在 37℃ 下温育至少 60 分钟后，与从同一批次获得的一种或多种游离酶（即不采取这种粒子形式的酶）的活性相比保留了至少两倍的活性。重要的是用于本发明的粒子和游离酶的试验条件是相同的，例如在酶的性质和纯度、酶的初始浓度、测试体积、温育介质（例如缓冲液）的组成、温度等。

[0084] 一般来说，包含在粒子中的酶，在 pH 3.25 的含有 3.2mg/ml 胃蛋白酶的缓冲液中在 37℃ 下温育至少 30 分钟、至少 45 分钟、至少 60 分钟、至少 75 分钟、至少 90 分钟、至少 105 分钟或至少 120 分钟后，与从同一批次获得的一种或多种游离酶的活性相比保留了至少三倍的活性、至少四倍的活性或至少五倍的活性。

[0085] 在具体实施方案中，本发明的粒子中的一种或多种减少草酸盐的酶，在 pH 3.25 的含有 3.2mg/ml 胃蛋白酶的缓冲液中在 37℃ 下温育至少 60 分钟后，与从同一批次获得的一种或多种游离酶的活性相比保留了至少两倍、至少 10 倍、至少 50 倍或至少 100 倍的活性。

[0086] 用于提供具有特定 pH 的缓冲溶液的适合的缓冲物质，对于本领域技术人员来说是已知的。实例是甘氨酸缓冲液、乙酸盐缓冲液、磷酸盐缓冲液、硼酸盐缓冲液等。缓冲溶液可以含有其他成分例如无机盐以便调整缓冲溶液的离子强度，或一种或多种蛋白酶例如胃蛋白酶以便确保缓冲溶液中的条件挑战被包埋的酶是否能够抵抗这样的严苛条件。

[0087] 其他聚合物也可以与一种或多种聚（甲基）丙烯酸酯聚合物一起存在于粒子中。这样的聚合物包括但不限于人造或天然聚合物，包括但不限于 i) 多糖：藻酸盐包括藻酸，藻酸盐例如藻酸钠、藻酸钾、藻酸铵、藻酸钙，藻酸 1,2- 丙二醇酯，阿拉伯胶，卡拉胶，壳聚糖及其衍生物，硫酸软骨素，葡聚糖衍生物，肝素，透明质酸，菊粉，纤维素或纤维素衍生物包括甲基纤维素、羧甲基纤维素、羧甲基纤维素钠、羟丙基纤维素、羟丙基甲基纤维素、乙基甲基纤维素等，或其组合；ii) 粘多糖；iii) 胶质包括刺槐豆胶、瓜尔胶、黄蓍胶、琼脂、阿拉伯胶、黄原胶、刺梧桐树胶、他拉胶、结冷胶等或其组合；iv) 胶凝或膨胀剂，包括水凝胶和水胶凝剂例如琼脂、卡拉胶、明胶、聚乙烯吡咯烷酮等，或其组合；v) 其他聚合物，例如蛋白质和聚酰胺：胶原蛋白、白蛋白、鱼精蛋白、精胺，合成聚合物：聚丙烯酸、聚磷酸、三聚

磷酸酯、聚 L- 乳酸、聚乙烯醇、聚 DL- 乳酸 - 乙醇酸共聚物, Eudragit 聚合物包括但不限于 L-100、L-100-55、RS、RL 或共聚物或混合物, 及其组合。在实施方案中, 聚合物材料是 Eudragit 聚合物, 包括但不限于 L-100、L-100-55、RS 或 RL。

[0088] 可以添加到聚(甲基)丙烯酸酯聚合物制剂中的其他聚合物材料可以是生物聚合物或合成聚合物。生物聚合物的实例包括但不限于蛋白质、多糖、粘多糖、肝素、硫酸肝素、类肝素、硫酸皮肤素、聚戊糖多硫酸酯、硫酸软骨素、纤维素、琼脂糖、甲壳质、卡拉胶、亚油酸、以及尿囊素、交联的胶原蛋白、纤连蛋白、层粘连蛋白、弹性蛋白、交联的弹性蛋白、胶原蛋白、明胶、透明质酸、壳聚糖、藻酸盐、葡聚糖、甲基纤维素、聚赖氨酸和天然橡胶。在其中形成聚合基质的本发明的组合物中, 这些基质是多孔的, 使得小的水溶性分子包括但不限于诸如草酸盐、甲酸、甲酸盐、二氧化碳、氧气或草酰辅酶 A 这样的分子能够进出聚合基质。本发明的组合物中聚合物材料的浓度一般在总干物质的 10% 至 90% 的范围内。

[0089] 除了一种或多种酶和聚合物材料之外, 粒子还可以包含一种或多种添加剂, 例如 pH 调节剂、缓冲剂、增溶剂、稳定剂、防腐剂、酶的辅因子, 或一种或多种可药用赋形剂例如填充剂、增量剂、稀释剂、载体等。

[0090] 此外, 当生理条件导致 pH 确实低于酶的合理工作范围时, 在蛋白质周围产生局部酸性 pH 环境可能是有利的。例如, 在较低 pH 的位置中, 在 pH 4 时具有最高活性的降低草酸盐的蛋白将获益于能够将酶附近的局部 pH 增加至 pH 4 左右的递送介质。

[0091] 此外, 可能希望在递送介质中包含采取碱、含碱或产碱材料形式的缓冲剂, 其与体内 pH 或局部 pH 或两者的组合相结合起作用, 用于优化 / 控制酶周围的局部 pH。这些缓冲剂可以包括有机或无机化合物的盐类或大量其他缓冲剂。应该理解, 在缓冲材料的适当选择中, 可以利用与缓冲材料相关 / 产生缓冲材料的共轭酸的 pKa。

[0092] 在一些情况中, 聚合物材料可以应用于粒子(例如作为包衣)以便增加粒子的储存稳定性或抑制酶的降解。这样的聚合物材料如果适合的话还可以被交联。交联可以通过物理或化学交联。物理交联可以包含带有相反电荷的聚合物通过盐键彼此交联(例如: 带有正电荷的壳聚糖与带有负电荷的聚合物三聚磷酸盐或肝素交联)、带正电荷聚合物与带相反电荷的离子交联(例如: 具有 Ca^{2+} 的藻酸盐, 具有 Al^{3+} 的羧甲基纤维素)。在本发明的文本中使用的术语“物理交联”还包括非共价结合和 / 或相互作用。

[0093] 化学交联一般包含通过具有两种反应性官能团的交联剂进行交联, 例如带有胺基的聚合物例如蛋白质、聚酰胺、壳聚糖及其衍生物, 可以通过戊二醛或京尼平(genipin)交联。UV 辐照可用于诱导带有光敏感性基团的聚合物形成共价交联。

[0094] 粒子的性质例如微环境缓冲能力、机械强度、粒径、草酸盐扩散速率、与酶的相互作用, 主要取决于所选的聚合物、聚合物组成和比例、任选的交联方法和制备程序。

[0095] 粒子也可以提供有包衣。这样的包衣通常具有与聚合物材料相同的功能, 即避免包埋在聚合物中的酶在储存期间和 / 或口服给药后酶活性的显著降低。

[0096] 适合的包衣材料是允许含草酸盐的水性组合物扩散到或通过其他方式进入到本发明的粒子中的材料。正如上面所提到的, 物质(即含草酸盐介质)进入到本发明的粒子组合物中, 使得草酸盐的酶降解能够发生。因此, 可以使用产生扩散包衣或其他可透过包衣(例如含有基本上水溶性的成孔物质的包衣)的包衣材料。

[0097] 适合的包衣材料的实例包括但不限于被考虑作为聚合物材料的材料。可以选择与

用作聚合物材料的材料不同的包衣材料,但是聚合物材料和包衣材料也可以相同。包衣材料的具体实例是成膜剂例如聚乙烯吡咯烷酮、羟丙基甲基纤维素 (HPMC)、羟乙基纤维素、羟丙基纤维素、聚葡萄糖、麦芽糖糊精,或其他多糖,包括壳聚糖、藻酸盐和透明质酸。如果存在,包衣材料一般以使粒子增重至多约 40% 的量使用。

[0098] 聚合物

[0099] 为了将本文描述的粒子递送至人类或动物的胃,可以将粒子配制成适用于口服给药的剂型。

[0100] 口服制剂包括但不限于胶囊、片剂、咀嚼片剂、速溶片剂、口溶片剂、液体和适合于药物或食品使用的其他已知口服制剂。

[0101] 本发明的组合物适用于口服给药于对象。组合物作为口服药物制剂提供,其可以在摄入食物之前或在摄入食物后立即,以缓慢释放液体剂、口或胃中的快速释放片剂、包被食管、伴随食物的液体或固体形式递送至口腔、口、颊贴片、胃、附着到胃粘膜上。

[0102] 本发明的组合物在胃中的条件、例如在消费食品后存在的条件、例如在蛋白酶存在下减少饮食草酸盐。本发明的组合物在人类和其他动物的胃中减少草酸盐。组合物减少草酸盐,例如胃肠道、尤其是胃中的草酸盐,并阻止至少一部分外源草酸盐(例如来自于食物)进入系统循环。

[0103] 本发明的组合物包含如上所述的粒子。粒子包含一种或多种减少草酸盐的酶和聚合物材料,或者粒子包含与草酸盐降解途径相关的其他酶、辅因子和辅酶与聚合物材料的组合,或两种粒子分别或一起提供在口服剂型中。

[0104] 这样的包含单独含有其他酶、辅因子或辅酶的粒子的组合物,可以与包含减少草酸盐的酶的粒子的组合物的给药同时、相继或在其之前或之后给药。包含单独含有其他酶、辅因子或辅酶的粒子的组合物可以与包括含有减少草酸盐的酶的粒子的组合物相组合,以形成在胃道中提供有效的草酸盐减少量的单一给药药剂。

[0105] 组合物包含的减少草酸盐的酶可以是具有天然序列、即具有自然界中存在的减少草酸盐的酶的基因和蛋白质序列的重组蛋白,或者可以是非天然的、突变的减少草酸盐的酶,其具有核酸或蛋白质突变或以某些方式被改变。例如,非天然的减少草酸盐的酶例如草酸脱羧酶,可以具有一个或多个氨基酸取代。所述酶在本文中详细描述。

[0106] 本发明的组合物包括含有减少草酸盐的酶的突变重组蛋白和聚合物材料的粒子,其中粒子中突变重组的减少草酸盐的酶的比活性高于溶液中游离蛋白质的比活性。这样的粒子可以在组合物例如口服制剂如药物或食品制剂中给药。

[0107] 制剂包括但不限于小袋、片剂、胶囊、速溶片剂、口溶片剂、咀嚼片剂、粉剂、颗粒剂、球粒、液体、糖浆、酏剂或制药技术领域的专业人员已知的其他口服剂型。口服制剂任选可以包含缓冲能力。例如,组合物可以包含在组合物被摄入后,将组合物、因此将周围环境例如胃的 pH 调整至约 pH 4 的缓冲化合物。在酶的环境处于 pH 4 时,本发明的酶有活性并减少草酸盐。这样的缓冲化合物可以是乙酸盐、柠檬酸盐、磷酸盐或其他缓冲化合物。本发明组合物的特点是粒子保护草酸盐降解酶以抵抗被例如胃环境中存在的条件降解、包括但不限于被蛋白酶例如胃蛋白酶降解的能力。

[0108] 本发明的组合物也可以包含一种或多种可以提高酶活性的其他因子。这些其他因子可以是例如草酰辅酶 A、 $MgCl_2$ 和 / 或二磷酸硫胺素(维生素 B_1 的活性形式)或 pH 缓冲

化合物。

[0109] 给药的组合物一般采取固体形式例如粉剂形式,或采取固体剂型例如采取小袋、胶囊或片剂的形式(例如通过本领域技术人员公知的方法将粒子进一步加工成适合的剂型)。为此,可以加入适合的可药用赋形剂,例如填充剂、黏合剂、崩解剂、着色剂、调味剂、pH 调节剂、稳定剂等。此外,可以添加一种或多种其他治疗和/或预防性物质,和/或有助于减少草酸盐的其他酶、辅因子、底物、辅酶、矿物质和其他药剂。

[0110] 适合的可药用赋形剂的实例包括:糊精、麦芽糖糊精、右旋糖、果糖、葡萄糖、乳糖、纤维素衍生物包括羧甲基纤维素钙、羧甲基纤维素钠、羟丙基纤维素、羟丙基甲基纤维素(HPMC)、微晶体纤维素(例如各种级别的Avicel®)、淀粉或改性淀粉(例如土豆淀粉、玉米淀粉、水稻淀粉、预明胶化淀粉)、聚乙酸乙烯酯、聚乙烯吡咯烷酮、琼脂、藻酸钠、交联羧甲基纤维素钠、磷酸氢钙、磷酸钙(例如碱式磷酸钙、磷酸氢钙)、硫酸钙、羧基烷基纤维素、dextrate、磷酸氢二钙、明胶、阿拉伯胶、羟丙基纤维素、羟丙基甲基纤维素、甲基纤维素、聚乙二醇、聚氧化乙烯,以及作为润滑剂包括:滑石粉、硬脂酸镁、硬脂酸钙、硬脂酸、氢化植物油等。

[0111] 本发明的组合物适用于在人类或动物中降低草酸盐水平。它们也适用于治疗或预防草酸盐相关病症,包括但不限于高草酸盐尿、吸收性高草酸盐尿、肠源性高草酸盐尿、原发性高草酸盐尿、特发性草酸盐钙肾结石病(尿石症)、外阴痛、与终末期肾病相关的草酸盐沉着症、心脏传导障碍、炎性肠病、克罗恩病、溃疡性结肠炎以及经历过胃肠手术和减肥手术(用于肥胖症的手术)和/或经历过抗生素治疗的患者。本发明考虑了在人类和动物中治疗和预防草酸盐相关病症。

[0112] 本发明的草酸盐降解粒子或组合物以需要的量、例如足以降解标准餐食中通常存在的基本上所有草酸盐的量给药。取决于食品的选择,平均的西方饮食可以含有 100 至 300mg 草酸盐/天。一般来说,约 0.2g 含有减少草酸盐的酶的粒子(等于在 1mL 粒子悬液中 50mg OxDc)能够在少于 30 分钟内在模拟的胃条件下降解约 300mg 草酸盐。典型的模拟胃条件被产生为:将 100ml USP 模拟胃液与 400 克平衡的西式餐食(打成小碎片)和 500 克水混合,产生 3.5-4.5 范围内的 pH。草酸盐吸收的降低可以通过血液、血浆或尿液或其他体液中存在的草酸盐水平的降低来显示。

[0113] 有效量包含能够减少一部分存在的草酸盐的减少草酸盐的酶活性的活力单位量,或与给药组合物前存在的草酸盐量相比,开始减少草酸盐量或维持个体中降低的草酸盐量的减少草酸盐的酶活性的活力单位水平。可以在单剂组合物中使用的减少草酸盐的酶活性的活力单位数,一般在约 0.001 单位至约 20,000 单位、0.01 至 15,000 单位、0.1 至 10,000 单位、1 至 5000 单位、10 至 4000 单位、50 至 3,000 单位或 100 至 2,500 单位的范围内。在需要低剂量的情形中,范围可以是约 5 单位至 100 单位、0.05 至 50 单位、0.5 至 500、约 0.01 单位至约 50 单位、约 0.01 单位至约 5 单位、约 1 单位至约 100 单位、约 25 单位至约 50 单位、约 30 单位至约 100 单位、约 40 单位至约 120 单位、约 60 单位至约 15 单位、约 50 单位至约 100 单位、约 100 单位至约 500 单位、约 100 单位至约 300 单位、约 100 单位至约 400 单位、约 100 单位至约 5,000 单位、约 1,000 单位至约 5,000 单位、约 2,500 单位至约 5,000 单位、约 0.001 单位至约 2,000 单位以及其中涵盖的所有范围。一个酶单位是在 37°C 下每分钟降解 1 微摩尔草酸盐的酶量。

[0114] 粒子和组合物的应用——用于治疗的方法

[0115] 本发明的方法包含向人类或动物的胃提供粒子、优选为喷雾干燥的粒子、组合物，例如提供能够减少胃中的草酸盐以降低从胃肠道吸收的草酸盐的组合物。粒子组合物可以保护减少草酸盐的酶以抵抗胃中的破坏酶的环境，并允许酶在这样的严苛环境中维持酶活性。

[0116] 治疗和预防方法包含提供本文中教导的组合物，其中减少草酸盐的酶与聚合物材料一起包含在粒子中。

[0117] 本发明的粒子和组合物适合于减少身体中草酸盐吸收的方法，并用于治疗或预防草酸盐相关病症，其包括但不限于高草酸盐尿、吸收性高草酸盐尿、肠源性高草酸盐尿、原发性高草酸盐尿、特发性草酸盐钙肾结石病（尿石症）、外阴痛、与终末期肾病相关的草酸盐沉着症、心脏传导障碍、炎性肠病、克罗恩病、溃疡性结肠炎以及经历过胃肠手术和减肥手术（用于肥胖症的手术）和 / 或经历过抗生素治疗的患者。

[0118] 本发明的方法包含给药能够减少胃中的草酸盐的组合物，以便例如通过减少来自食物来源的草酸盐来避免草酸盐被人类或动物身体吸收。向胃提供减少草酸盐的酶的方法是在口服药物制剂中在聚合物材料中提供减少草酸盐的酶。

[0119] 草酸盐吸收的降低可以通过向胃肠道、特别是胃提供草酸盐降解酶，从而降低可用于吸收的草酸盐的浓度来实现。胃中草酸盐的减少也将减少进入肠道用于在胃肠道的该区域中吸收的草酸盐的量。除了吸收途径之外，最近已在人类胃中鉴定到草酸盐分泌途径。本发明的组合物也可用于降解从循环系统分泌到胃中的草酸盐，因此本发明的方法考虑到了个体中草酸盐载荷的整体减少。

[0120] 在人类或动物中减少草酸盐的方法，包含向人类或动物对象给药有效量在本发明的粒子组合物中包含一种或多种减少草酸盐的酶或具有降低草酸盐活性的片段的组合物，以及减少存在的草酸盐。减少可以在对象的任何组织或体液环境中测量。体液包括身体分泌物例如鼻或胃分泌物、唾液、血液、血清、尿液、食糜或消化物质、组织液和由人类或动物产生的其他流体或半固体材料。例如，减少草酸盐的酶粒子组合物可以口服给药于人类或动物，并且减少草酸盐的酶活性减少人类或动物的胃中存在的草酸盐。本发明的粒子组合物可以混合在液体、食品或其他饮食材料中并提供给人类或动物，以便粒子的降低草酸盐的酶活性在胃环境中有效。本发明的粒子组合物还可以与其中存在草酸盐的食品或其他材料混合，并且粒子的减少草酸盐的酶活性减少了食品或其他材料中存在的草酸盐。

[0121] 减少草酸盐被人类或动物的吸收以及治疗和预防草酸盐相关病症的方法，包含给药含有粒子的组合物，所述粒子包含有效量的减少草酸盐的酶。有效量包含能够减少一部分存在的草酸盐的减少草酸盐的酶活性的活力单位量，或与给药组合物前存在的草酸盐量相比，开始减少餐食中存在的或对象的组织或体液中存在的草酸盐量或维持对象中降低的草酸盐量的减少草酸盐的酶活性的活力单位水平。

[0122] 在治疗方法中，至少每日一次、至少每日两次、至少每日三次、至少每日四次或如果需要的话更多次口服给药有效量的本文教导的粒子组合物以便被对象摄入，并且这样的给药可以持续一日、两日、三日、四日、五日或一周、两周、三周或一个月、两个月、三个月、四个月、五个月、六个月、六个月以上、一年、两年或多年，或在患者一生中持续给药。这样的治疗可以持续以维持对象中的所需草酸盐水平。

[0123] 本文中包括的所有专利、专利申请和参考文献特意地以其全文引为参考。

[0124] 当然,应该理解,上面的描述仅仅涉及本发明的示例性实施方案,并且可以在其中做出大量修改或改变而不背离在本公开中提出的本发明的精神和范围。

[0125] 尽管在本文中提供了本发明的示例性实施方案,但本发明不限于这些实施方案。大量的修改或改变可能暗示给本领域技术人员。

[0126] 通过本文中包含的实施例对本发明进行进一步说明,提供这些实施例是为了清楚理解。示例性实施方案不应以任何方式解释为对本发明的范围强加限制。相反,应该清楚地理解,可以对各种其他实施方案、修改及其等效物做出改变而不背离本发明的精神和 / 或随附的权利要求书的范围,所述改变在阅读了本文的描述后,可能自然而然地暗示给本领域技术人员。

实施例

[0127] 方法

[0128] 酶活性测定法

[0129] 通过测定甲酸盐形成速率来定量草酸脱羧酶活性。将在 pH 4.0 的 40mM 柠檬酸中含有 40mM 草酸盐的活性混合物 (390 μ l) 在 37°C 下温育 5 分钟,并通过加入 10 μ l 含 0.2-1mg/ml OxDC 的 OxDC 溶液开始反应。在 10 分钟的反应时间后,加 100 μ l 0.5M H₂SO₄ 以淬灭反应。在以 14000g 离心 10 分钟后,通过 HPLC 分析上清液。

[0130] 所有 HPLC 分析使用 Agilent 1100 系列系统来进行。分离在 40°C 下,在 Aminex HPX-87H(Bio-Rad) 强离子交换柱 (300x7.8mm ID) 上进行,所述柱用置于柱温箱外的 Aminex 阳离子 H 型微型保护预柱 (Bio-Rad) 进行保护。用于所有分析的流动相是 5mM H₂SO₄ (试剂级 (Sigma)),流速为 0.6ml/min。进样注射体积为 40 μ l。检测在 210nm 处进行,并通过甲酸盐峰面积进行定量。

[0131] 一个活力单位被定义为在上述条件下,在 1 分钟内从草酸盐产生 1 微摩尔甲酸盐的 OxDC 的量,或者酶的单位为在 37°C 下每分钟降解 1 微摩尔草酸盐的酶量。

[0132] 稳定性试验

[0133] 在将 OxDc 游离酶或所讨论的含有包埋在聚合物材料中的 OxDc 酶的组合物在含有 3.2mg/ml 胃蛋白酶的 pH 3.25 的 100mM 甘氨酸缓冲液中温育后,分析残留的 OxDc 活性。

[0134] 实施例 1

[0135] 通过大肠杆菌生产来自枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*) 的草酸脱羧酶的方法

[0136] YvrK 基因的克隆和为更高表达进行的基因密码子优化

[0137] 来自枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*) 的 OxDC 是均六聚体酶。每个单体含有 385 个氨基酸,分子量约为 44kDa。从枯草芽孢杆菌基因组 DNA 通过 PCR 扩增被称为 YvrK 的 OxDC 基因,并利用 NdeI 和 BamHI 限制性位点将其插入到 pET9a 质粒 (Novagen, 目录号 69431-3) 中。

[0138] 由 Genscript Corp (Boston, MA) 对 YvrK 基因进行密码子优化。将原始基因序列中的一些密码子改变成大肠杆菌的优选密码子,以便增加蛋白质表达。将大肠杆菌优化过的基因通过 NdeI 和 BamHI 限制性位点插回到 pET-9a 载体中以产生 pET-9a :YvrK,并通过 DNA 测序证实大肠杆菌密码子优化过的基因的序列。然后将具有密码子优化过的基因的质

粒转化到大肠杆菌 BL21 (DE3) 中,用于通过使用异丙基 β -D-1- 硫代吡喃半乳糖苷 (IPTG) 诱导进行 OxDC 生产。

[0139] 草酸脱羧酶 (OxDC) 在大肠杆菌中的表达 (发酵)

[0140] 在 3 种不同的发酵规模下进行了 OxDC 在大肠杆菌 BL21 (DE3) 中的表达:0.4、50 和 1000L (升) 培养基。总的来说,通过在 37℃ 和振摇或搅拌下用细菌接种培养物 (0.1% 接种物) 接种培养基来启动发酵过程。当 $OD_{600} = 1.0-2.0$ 时,向培养物加入 IPTG 以诱导 OxDC 表达。在诱导后,通过离心 (小于 1000L 规模) 或在诱导后约 8-10 小时使用中空纤维滤器过滤 (1000L) 来收获大肠杆菌细胞。

[0141] 从大肠杆菌细胞纯化草酸脱羧酶 (OxDC)

[0142] 裂解大肠杆菌细胞并收集含有 OxDC 的不溶性细胞碎片。将收集到的大肠杆菌细胞通过匀浆进行裂解,并通过离心收集含有 OxDC 的细胞碎片。首先将细胞碎片沉淀物以 3 : 1 的 H_2O 与沉淀物重量比悬浮在去离子 (DI) H_2O 中,以除去任何残留的水溶性蛋白和其他大肠杆菌细胞组分。再次通过离心收集洗过的细胞碎片。从 1.0L 培养物获得约 10 克细胞碎片沉淀物,其含有 40-200mg OxDC。

[0143] 通过高浓度 $(NH_4)_2SO_4$ 提取 OxDC。将洗过的细胞碎片重悬浮在 3 倍重量的含 0.75M $(NH_4)_2SO_4$ 的 pH 8.0 的 50mM Tris HCl 缓冲液中,用于提取 OxDC。将悬液在 20-25℃ 下搅拌 30 分钟,并通过离心收集提取的 OxDC。通过该方法通常从沉淀物中提取到约 60% 的表达的 OxDC。

[0144] 阴离子交换层析柱。将提取物用 pH 8.0 的 50mM Tris HCl 稀释 3 倍,然后将其通过用含 0.25M $(NH_4)_2SO_4$ 的 pH 8.0 的 50mM Tris HCl 缓冲液预平衡的 Q-sepharose 柱。DNA 和其他杂质与柱结合,而 OxDC 穿过柱并将其收集。

[0145] 具有梯度演变的疏水相互作用层析柱。通过添加固体 $(NH_4)_2SO_4$ 将从 Q-sepharose 柱收集的 OxDC 溶液中的 $(NH_4)_2SO_4$ 浓度调整至 2.0M,并将其上样到预平衡的苯基-sepharose 柱中。利用 $(NH_4)_2SO_4$ 梯度洗脱 OxDC。ODC 被洗脱在分别位于 1.3M 和 0.9M $(NH_4)_2SO_4$ 的两个峰中 (图 1)。1.3M $(NH_4)_2SO_4$ 处的峰含有约 70% 的总 OxDC,并具有较高纯度 (> 95%)。通常选择来自该峰的 OxDC 用于下一步骤。

[0146] 用于脱盐的 G-25 柱。将从 1.3M $(NH_4)_2SO_4$ 处的峰收集的 OxDC 上样到含有 G-25 sepharose 的柱上进行脱盐。一般从 10 克细胞碎片获得约 30mg 纯化的 OxDC。

[0147] 实施例 2

[0148] 改变 OxDC 的溶解性以增加表达水平

[0149] OxDC 在 pH 4.5-7.8 下具有有限溶解度。大肠杆菌细胞质的 pH 接近 7.6;因此 OxDC 在大肠杆菌细胞质中的溶解性非常有限。事实上,观察到大肠杆菌表达的大多数 OxDC 存在于裂解的沉淀物而不是上清液中。

[0150] 在 OxDC 的 C- 端尾处的最后 6 个氨基酸残基 (380-385 位残基) 中,有 4 个带正电荷的赖氨酸和两个极性氨基酸丝氨酸和半胱氨酸 (Cys383)。存在大量侧链具有或多或少极性的氨基酸可供选择,以选择性取代半胱氨酸或丝氨酸。然而,选择了 OxDC 中存在的唯一半胱氨酸残基 Cys383。选择了三种氨基酸用来替代半胱氨酸:精氨酸 (R)、丝氨酸 (S) 和丙氨酸 (A)。通过标准的定点突变方法产生了 C383R、C383S 和 C383A 突变体,并通过 DNA 测序验证每个基因的序列。如实施例 1 中所述,将 C383R、C383S 和 C383A 突变体在 0.4L 规模

摇瓶中进行表达。通过离心收集大肠杆菌细胞,并通过标准流程进行裂解:将大肠杆菌细胞悬浮在溶菌酶溶液中并进行两个冷冻/融化循环。通过显微镜分析证实大肠杆菌细胞的完全裂解。通过离心分离这些突变酶的可溶和不溶部分。按照实施例 1 中描述的方法对不溶沉淀物中的突变酶进行提取。通过活性测定和蛋白浓度确定可溶部分和不溶部分(提取的酶)中的总突变酶量。从 SDS-PAGE 估计提取到的突变酶的纯度。3 种突变体和野生型酶的结果显示在表 1 中。

[0151] 野生型 OxDC (C383C)、OxDC 的 C383R、C383S 和 C383A 突变体的表达水平及其在裂解物(可溶形式)和细胞碎片沉淀物(不溶形式,但是提取过)中的分布显示如下。数据从 6 克大肠杆菌细胞糊状物获得,其等同于约 4 克裂解的细胞碎片或 0.4L 培养物。

[0152] 表 1、野生型 OxDC (C383)、OxDC 的 C383R、C383S 和 C383A 突变体的表达水平及其在裂解物(可溶形式)和细胞碎片沉淀物(不溶形式,但是提取过)中的分布。

[0153]		裂解物中的 OxDC (mg)	沉淀物中的 OxDC (mg)	可溶物与不溶 物的比率	总 OxDC (mg)	比活性 (U/mg)	相对比活 性
	C383R	12	62	0.19	74	72	1.06
	C383 (野生 型)	6.3	108	0.05	114	68	1
	C383S	3.2	510	0.006	513	61	0.90
	C383A	0	530	0	530	28	0.41

[0154] 如表 1 中所示,对 C383 进行突变改变了 OxDC 在可溶和不溶级份之间的分布,其中使用极性更高的侧链产生在裂解物中具有更高可溶性蛋白比率的突变体。裂解物中较高的可溶性蛋白比率与较低表达水平但与较高比活性相关。C383R 突变体显示出比野生型高 6% 的比活性,但是表达水平低得多。尽管 C383A 突变体 OxDC 与 C383S 突变体相比显示出略微更高的表达水平,但比活性不到 C383S 突变体的一半。C383S 突变体的表达水平比野生型 OxDC 表达水平高大约 5 倍,并且其比活性与野生型相比为 90%。对 C383S 突变酶的其他性质进行了进一步表征,并与野生型进行比较。OxDC 的野生型和 C383S 突变体二者在 pH 3.5 至 5.5 之间都有活性,在 pH 4.0 下具有最适活性。两种酶在 pH 3.5 至 9.5 之间以及在高达 60℃ 的温度下至少稳定 1 小时。此外,野生型在苯基-sepharose 柱上显示出至少两个主要峰,表明存在一个以上 OxDC 同工型,而 C383S 突变体在相同柱上和一致条件下只显示一个峰(图 1)。由于两种相似同工型的分离,野生型 OxDC 的两种同工型在纯化方面引入了更多障碍。例如,在疏水相互作用层析柱上可能需要梯度洗脱来分离两种同工型。因为需要更多的纯化步骤并且每个附加纯化步骤引起得率的损失,因此两种同工型也可能降低纯化酶的最终得率。此外,两种同工型之一可能是无用的。

[0155] 实施例 3

[0156] 用于 C383S 突变体的可选表达系统

[0157] 表达载体的构建。使用整合有相应启动子的 Lybradyn 专有载体,对 IPTG 诱导与两种其他诱导方法、即鼠李糖和温度进行了比较。来自小规模发酵实验的结果表明,所有方

法都有效表达 OxDC。

[0158] 载体通过标准的分子生物学技术来构建。将带有大肠杆菌优化过的 YvrK 基因的 NdeI/BamHI 片段插入到 Labradyn 载体 No. 101 的 NdeI/BamHI 位点中鼠李糖诱导型启动子的控制之下,以产生质粒 pOTrhamC383S,将其转化到大肠杆菌 BW25113 中用于 OxDC 生产。通过 MunI 和 AflIII 限制性位点,将来自 pOTrhamC383S 的鼠李糖诱导型启动子用 Lybradyn 载体 No. 102 所携带的来自 λ 噬菌体的温度诱导型启动子 λ_{pr} (lpr) 替换,产生了温度诱导型载体 pOTlprC383S。随后将表达载体转化到大肠杆菌 BW25113 中,用于 OxDC 生产。载体中存在的其他元件包括启动子和调控序列、核糖体结合位点、卡那霉素 / 新霉素抗性、cer 分离稳定性元件和 Rop 质粒拷贝数控制序列。

[0159] 三种表达载体的表达水平的比较。在 200mL 摇瓶中进行发酵。由鼠李糖诱导的 OxDC 的发酵与实施例 1 中所描述的 IPTG 诱导一致,只是在诱导时加入 0.2% 鼠李糖代替 1.0mM IPTG。由温度诱导的 OxDC 的发酵除了两个差异之外与 IPTG 和鼠李糖诱导相同:将大肠杆菌在 30℃ 而不是 37℃ 下培养,以及通过将培养温度增加至 42℃ 来进行诱导。

[0160] 收获大肠杆菌细胞并裂解,按照实施例中描述的方法从细胞碎片提取 OxDC。鼠李糖和温度诱导的表达系统每升培养物产生 400–600mg 活性 C383S OxDC,水平与 IPTG 表达(每升培养物 500mg OxDC)接近。因此,选择了温度诱导型表达系统。

[0161] 实施例 4

[0162] 通过 pH 调节溶解性的简单纯化方法

[0163] 背景。对于野生型来说,OxDC 在 pH 4.5–7.8 下具有有限溶解性,对于 C383S 突变体来说该范围为 pH 4.0–8.0。对于野生型 OxDC 来说,如果 pH 高于 8.5,OxDC 溶解性增加,而对于 C383S 突变体来说,该值为 pH 9.0。Tris 和精氨酸是 OxDC 的选择性结合配体;因此二者都能极大增加 OxDC 溶解性。所述纯化方法适用于野生型和 C383S 突变体;然而只使用了 C383S 突变体来说明纯化方法。

[0164] 步骤 1:从细胞碎片沉淀物提取 C383S。所有纯化步骤都在室温下进行。在提取 C383S 之前,按照实施例 1 中描述的方法将大肠杆菌裂解,收集细胞碎片并将其用水清洗以除去任何可溶性细胞组分。然而,在这里,从细胞碎片提取 OxDC 与实施例 1 中不同。在实施例 1 中,将 0.75M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 添加到 50mM Tris 缓冲液 (pH 8.0) 中以从沉淀物提取 OxDC。在本方法中,提取缓冲液是不添加 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 的 50mM 精氨酸或 Tris HCl (pH 9.5)。与实施例 1 中描述的方法(表达的总 C383S 突变体的 75%)相比,该方法能够提取更多的 C383S(沉淀物中的总 C383S 的 90%以上),并具有少得多的宿主细胞 DNA 和其他杂质。C383S 的纯度通常高于 99%(表 2)。此外,提取物中 C383S 突变体 OxDC 的浓度达到 120g/L,其减少了水的使用并减小了后续步骤(步骤 2)的规模。

[0165] 步骤 2:过滤。提取物中存在的大部分杂质是内毒素,其可以在添加 0.6M NaCl 后通过两到三个深床过滤器来移除:第一个过滤器等级为 3 微米,第二个为 1.2 微米,最后的第三个深床过滤器为 0.2 或 0.1 微米。在过滤后,提取物含有降低的内毒素水平(表 2)并可随时用于沉淀。如果需要更高纯度,在沉淀之前引入一个疏水相互作用层析(HIC)柱进行进一步处理。

[0166] 步骤 3(任选):HIC 柱。将过滤后的 C383S 突变体 OxDC 溶液上样到用含有 0.6M NaCl 的 pH 9.5 的 50mM Arg 或 Tris 缓冲液预平衡的 HIC 柱上。ODC 流过柱子,而杂质与

柱子结合,这从 C383S 溶液中移除了杂质。收集流过的 C383S 突变体用于沉淀。

[0167] 步骤 3:通过 pH 调整进行沉淀。为了进行 pH 调整,在搅拌下向 C383S 溶液逐滴加入 pH 3.0 的 0.2M 柠檬酸盐缓冲液直至 pH 达到 7.0。C383S 突变体的溶解度在 pH 7.0 时降低至小于 1g/L;因此,99%的 C383S(如果 C383S 突变体的起始浓度为 100g/L)沉淀,并通过离心进行收集。可以将收集到的 C383S 突变体沉淀物用 pH 6.0 的 50mM 柠檬酸盐缓冲液清洗 2-3 次,以除去残留的 NaCl、精氨酸或 Tris。清洗过的 C383S 沉淀物处于非常纯的形式(表 2)。

[0168] 表 2、从 5kg 裂解的细胞沉淀物开始的典型纯化过程的概述。该表中的数据是在每个步骤结束时获得的 OxDC 材料的分析结果。

	蛋白浓度 (g/L)	比活性 (U/mg 蛋白)	蛋白总量 (g)	纯度 (SDS-PA GE)	DNA (ng/mg 蛋 白)	内毒素 (EU/mg 蛋 白)
[0169] 提取	99	45.4	440	100	3.4	22000
过滤	90	44.0	420	100	4.0	4000
HIC	60	44.3	360	100	4.1	< 0.5
沉淀	50-100	44.6	350	100	3.7	< 0.5

[0170] 实施例 5

[0171] 喷雾干燥药物制剂(粒子形成)

[0172] 方法。所有喷雾干燥实验使用 Niro Mobile Minor 来进行。典型的喷雾干燥操作条件如下:入口温度:180-220℃,出口温度:85-95℃,干燥空气流速:60-90kg/h,雾化空气流:8-15kg/h,喷嘴孔径:1-2mm,进料流速:1-4kg/h。表 3 概述了本发明的不同粒子制剂的组成。

[0173] 结果。表 4 概述了在不同喷雾干燥粒子制剂中,以及将粒子重新溶解于 pH 7.5 的磷酸盐缓冲液中之后在溶液中的 C383S 突变体的比活性。当 pH 高于 5.5 时聚合物 L 100-55 溶解在水中。对照是悬浮在 50mM 柠檬酸盐缓冲液中没有任何来自于聚合物的保护的 C383S 突变体,其由于喷雾干燥过程中经历的高温和脱水而损失 39%的活性。制剂 1 和 2 中的 C383S 突变体处于溶液中并均匀分布。分布在喷雾干燥微滴外层中的 C383S 突变体可能已在喷雾干燥过程中失活,因此分别导致 13%和 7%的活性损失。相反制剂 3 至 8 中的 C383S 突变体的比活性高于制剂 1。当这些粒子的结构被破坏,例如将制剂 4-7 溶解在 pH 7.5 的 50mM 磷酸盐缓冲液中时,与游离 C383S 相比,比活性回归正常,或者由于喷雾干燥期间的部分失活而甚至水平降低。

[0174] 表 5 概述了从这些干燥粒子产生的稳定性数据。在 45℃下温育特定时间段后,制剂 1、4 和 5 显示出出色的稳定性。

[0175] 表 6 概述了来自体外胃蛋白酶保护试验的结果。在 37℃并在 1100rpm 搅拌下,将粒子在胃蛋白酶(3.2g/L)/pH 3.25 的乙酸盐缓冲液中悬浮 40 分钟。通过活性测定法测量处理后的残余活性。制剂 1 不提供显著的保护作用,因为它溶解在水中并破坏了粒子结构。制剂 2 至 8 都显示出针对胃蛋白酶的保护作用。

[0176] 表 3、通过喷雾干燥进行测试的制剂

[0177]

	制剂
1	0.6% OxDC、6%海藻糖、1.2% PVA 和 1.2% Eudragit L100 在 pH 8.5 的 12 mM 精氨酸中
2	2% OxDC、2%海藻糖、2%精氨酸和 3.9% Eudragit L100-55, pH 9.0
3	3% OxDC、2%海藻糖、2.6%精氨酸和 4.5% Eudragit L100-55, pH 5.4
4	除了添加 0.3% TEC 之外, 与 2 相同
5	除了不添加精氨酸之外, 与 3 相同
6	3% OxDC、2%海藻糖、2.6%精氨酸、0.3% TEC 和 4.5% Eudragit FS30D, pH 5.4
7	3% OxDC、2%海藻糖、2.6%精氨酸、0.3% TEC 和 4.5% Eudragit RS, pH 5.4
8	3% OxDC、2%海藻糖、2.6%精氨酸、0.3% TEC 和 2.25% Eudragit RL 以及 2.25% Eudragit RS, pH 5.4

[0178] 表 4、在喷雾干燥粒子中以及在通过溶解在 pH 7.5 的磷酸盐缓冲液中破坏这些粒子后的溶液中, C383S 的比活性。

[0179]

试验	粒子中的 C383S 比活性 (U/mg 蛋白) ^B	C383S 比活性变化 (%)	粒子溶解后的 C383S 比活性 (U/mg 蛋白)
游离 C383S	45	100	--
对照 ^A	27.5	61	27.0
1	39.2	87	39.4
2	48.9	93	48.5
3	57.2	127	--
4	63.5	141	44.3
5	55.8	124	42.6
6	46.8	104	41.7
7	57.2	127	43.0
8	57.2	127	--

[0180] ^A 对照: 将 C383S 悬浮在 pH 6.0 的 50mM 柠檬酸盐缓冲液中, 并在相同条件下喷雾干燥。

[0181] ^B 383S 比活性的计算: B/A。其中 A = 1 克进料固形物中的 C383S 的量 (mg); B =

从喷雾干燥获得的 1 克干燥粒子中的总活性 (U)。

[0182] 表 5、在 45℃ 下温育一定时间段后残留的活性。

[0183]

试验	0 周	1 周	2 周	4 周	8 周	12 周
对照						
1	36.1	--	37.6	40.0	--	41.6
2	42	35.9				
3	57.2	44.2				
4	63.5	52.2	--	65.3		
5	54.9	--	51.4	47.2		
6	46.8	29.1				
7	57.1	3.2				
8	57.1	42.5				

[0184] 表 6、用 pH 3.25 的 3.2mg/ml 胃蛋白酶溶液处理 40 分钟后的活性。

试验	残留的 C383S 活性 (%)
对照	22
1	30
2	72
3	75
4	82
5	80
6	89
7	77
8	79

[0185]

[0186] 实施例 6

[0187] 减少草酸盐的粒子的体内药剂

[0188] 在雄性 Sprague-Dawley 大鼠中进行了 10 天研究。本研究的目的是评估给药表 2 中的制剂 5 对雄性 Sprague-Dawley 大鼠中尿液对草酸盐载量的响应的影响。

[0189] 研究使用了 18 只 Sprague-Dawley 大鼠,它们如表 7 中所示被分成 3 组,给药制剂

5(第3组)或介质(第2组,对照,50mM 柠檬酸钠,pH 4.49)的口服药剂以及高草酸盐饮食。第1组是另一个对照组,该组中的6只大鼠不给予高草酸盐饮食,也不给药制剂5。每日两次(BID)对大鼠进行经口管饲。第3组中的大鼠接受500U 制剂5。在上午(7:00-9:00AM)和下午(3:30-5:30PM),在开始喂食后30分钟对大鼠给药后,允许大鼠继续取用食物1.5小时。在上午喂食前和上午和下午喂食后对食物称重。在第1、4和9天,将大鼠在它们的正常笼子中喂食,并在给药后立即转移到代谢笼子中,以便捕集尿和粪排泄物。

[0190] 草酸盐测定

[0191] 来自尿液的草酸盐定量测定,通过从 Trinity Biotech USA(St.Louis, MO)购买的比色法试剂盒来测定。测定法由如下两个酶反应构成:(1)草酸盐被草酸氧化酶氧化成 CO_2 和 H_2O_2 ,以及(2) H_2O_2 与3-甲基-2-苯并噻唑啉酮脘(MBTH)和3-(二甲基氨基)苯甲酸(DMAB)在过氧化物酶存在下进行反应,以产生可以在590nm处检测的吲达胺染料。从标准曲线计算尿液草酸盐。

[0192] 肌酸酐测定

[0193] 通过LiquiColor®方法 No. 0420 进行肌酸酐测定。用于定量测定尿液中肌酸酐的肌酸酐比色试剂盒从 StanBio Laboratory(Bocrne, Texas)购买。测试法基于Fabinay和Eringshausen方法的自动反应速率改良,其中肌酸酐与苦味酸在碱性条件下反应,形成510nm处有色的络合物。显色与肌酸酐浓度成正比。从标准曲线计算尿液肌酸酐。

[0194] 表7、研究设计

[0195]

组	饮食	药剂	大鼠数量	给药天数	尿液草酸盐排泄 (Ox/Cr)
1	无 Ox	50 mM 柠檬酸盐	6	10	
2	HOD	50 mM 柠檬酸盐	6	10	
3	HOD	制剂 5	6	10	

[0196] HOD = 高草酸盐饮食 (Harlan Teklad TD04493)

[0197] 无 Ox = Harlan Teklad TD89222

[0198] 第1和2组:50mM 柠檬酸钠,pH 4.49

[0199] 第3组:制剂5

[0200] 结果

[0201] 伴随高草酸盐饮食给药制剂5显著降低了第3组中所有6只大鼠的尿液草酸盐排泄。发现与饮食草酸盐一起喂食平均500U的制剂5,使尿液草酸盐减少49-59%(图2)。

[0001]

序列表

<110> 奥克斯泰拉知识产权公司

<120> 重组草酸盐降解酶的纯化和分离以及含有草酸盐降解酶的喷雾干燥粒子

<130> P14151PC / P13530

<140> PCT/EP2010/003864

<141> 2010-07-01

<160> 19

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 1152

<212> DNA

<213> Bacillus subtilis

<400> 1

```
aaaaaacaaa atgacattcc gcagccaatt agaggagaca aaggagcaac ggtaaaaatc      60
ccgcgcaata ttgaaagaga ccggcaaaac cctgatatgc tcgttcgcc tgaaaccgat      120
catggcaccg tcagcaatat gaagttttca ttctctgata ctcataaccg attagaaaaa      180
ggcggatatg cccgggaagt gacagtacgt gaattgccga tttcagaaaa ccttgcatcc      240
gtaaatatgc ggctgaagcc aggcgcgatt cgcgagcttc actggcataa agaagctgaa      300
tgggcttata tgatttacgg aagtgaaga gtcacaattg tagatgaaaa agggcgcagc      360
tttattgacg atgtaggtga aggagacctt tggctacttc cgtcaggect gccgcactcc      420
atccaagcgc tggaggaggg agctgagttc ctgctcgtgt ttgacgatgg atcattctct      480
gaaaacagca cgttccagct gacagattgg ctggcccaca ctccaaaaga agtcattgct      540
gcgaacttcg gcgtgacaaa agaagagatt tccaatttgc ctggcaaaga aaaatatata      600
tttgaaaacc aacttcctgg cagtttaaaa gatgatattg tggaagggcc gaatggcgaa      660
```

[0002]

gtgccttata catttactta ccgccttctt gaacaagage cgategaate tgagggagga	720
aaagtataca ttgcagattc gacaaaacttc aaagtgteta aaaccatcgc atcagcgctc	780
gtaacagtag aacccggcgc catgagagaa ctgcactggc acccgaatac ccacgaatgg	840
caatactaca tctccggtaa agctagaatg accgtttttg catctgacgg ccatgccaga	900
acgtttaatt accaagecgg tgatgtcgga tatgtaccat ttgcaatggg tcattacgtt	960
gaaaacatcg gggatgaacc gcttgtcttt ttagaaatct tcaaagacga ccattatgct	1020
gatgtatctt taaaccaatg gcttgccatg ctctctgaaa catttgttca agcgacactt	1080
gacttgggca aagactttac tgatgtgctt tcaaaagaaa agcaccacgt agtgaaaaag	1140
aatgcagta aa	1152
<210> 2	
<211> 1164	
<212> DNA	
<213> Bacillus subtilis	
<400> 2	
catatgaaaa aacagaatga cattccacag ccgattcgcg gcgataaagg cgcgaccgtc	60
aaaattcttc gcaatatcga acgcgaccgc cagaatccgg atatgctggg gccgcggag	120
acggaccatg gcacggtgtc taacatgaaa ttctctttta gcgataccca caaccgctg	180
gaaaaaggtg gctacgcgcg cgaggttacc gtccgtgaac tgccaattag cgaaaatctg	240
gcttcggtta acatgcgtct gaaaccaggt gctatccgtg agctgcactg gcacaaggaa	300
gcggaatggg cgtatatgat ttacggttca gcacgtgtta ccatcgtaga cgagaaaggt	360
cgtagcttta tcgatgatgt tggcgaaggt gatctgtggg atttccate tggcctgccg	420
cattcgattc aggcgctgga agaaggcgt gaatttctgc tgggtgttca tgatggttcc	480
ttttctgaaa acagcacgtt ccagctgacg gattggctgg cgcacacgcc gaaagaagtc	540
attgcggcca attttggggg aaccaaagaa gaaatttcca acctgccggg caaagaaaag	600

[0003]

tatatTTTTg agaatacagct gccgggctct ctgaaggacg atattgtaga aggccctaac	660
ggtgagggtgc cgtatccgtt cacctatcgt ctgctggagc aggaaccgat tgaaagcgaa	720
ggcggtaaag tttatatcgc agattccact aactttaaag tctccaagac cattgccagc	780
gccctggtca ccgtggaacc gggagcgatg cgcgagctgc actggcatec gaacacgcac	840
gaatggcagt attatatTtc cggcaaagca cgcatacccg tttttgcctc agatggacac	900
gctcgcacgt ttaattatca agcgggtgat gttggctacg ttcctttcgc catgggccat	960
tatgtagaaa atatacggcga tgaaccactg gtgtttctgg agatctttaa agatgaccac	1020
tatgccgatg tttactgaa tcagtggctg gccatgctgc cggaaacttt tgttcaggcg	1080
catctggacc tgggtaaaga ctttacggat gtgctgagca aagaaaaaca cccggtagtc	1140
aagaagaaat gcagtaaagg atcc	1164

<210> 3

<211> 1152

<212> DNA

<213> Bacillus subtilis

<400> 3

aaaaaacaaa atgacattcc gcagccaatt agaggagaca aaggagcaac ggtaaaaatc	60
ccgcgcaata ttgaaagaga ccggcaaaac cctgatatgc tcgttcgcc tgaaaccgat	120
catggcaccg tcagcaatat gaagttttca ttctctgata ctcataaccg attagaaaaa	180
ggcggatatg cccgggaagt gacagtacgt gaattgccga tttcagaaaa ccttgcatec	240
gtaaatatgc ggetgaagcc aggcgcgatt cgcgagcttc actggcataa agaagctgaa	300
tgggcttata tgatttacgg aagtgaaga gtcacaattg tagatgaaaa agggcgcagc	360
tttattgacg atgtaggtga aggagacctt tggtacttcc cgtcaggcct gccgcactcc	420
atccaagcgc tggaggaggg agctgagttc ctgctcgtgt ttgacgatgg atcattctct	480

[0004]

gaaaacagca cgttcagct gacagattgg ctggcccaca ctccaaaaga agtcattgct	540
gcgaacttcg gcgtgacaaa agaagagatt tccaatttgc ctggcaaaga aaaatatata	600
tttgaaaacc aacttcttgg cagtttaaaa gatgatattg tggaagggcc gaatggcgaa	660
gtgccttata catttaetta cgccttctt gaacaagagc cgategaatc tgaggaggga	720
aaagtataca ttgcagattc gacaaacttc aaagtgteta aaaccatgc atcagcgtc	780
gtaacagtag aacccggcgc catgagagaa ctgcactggc acccgaatac ccacgaatgg	840
caatactaca tctccggtaa agctagaatg accgtttttg catctgacgg ccattgccaga	900
acgtttaatt accaagccgg tgatgtcgga tatgtaccat ttgcaatggg tcattacgtt	960
gaaaacatcg gggatgaacc gcttgtcttt ttagaaatct tcaaagacga ccattatgct	1020
gatgtatctt taaaccaatg gcttgccatg cttcctgaaa catttgitca agcgcacctt	1080
gacttgggca aagactttac tgatgtgctt tcaaaagaaa agcaccagc agtgaanaag	1140
aaatctagta aa	1152

<210> 4

<211> 1152

<212> DNA

<213> Bacillus subtilis

<400> 4

aaaaaacaaa atgacattcc gcagccaatt agaggagaca aaggagcaac ggtaaaaatc	60
ccgcgcaata ttgaaagaga ccggcaaaac cctgatatgc tcgttccgcc tgaaaccgat	120
catggcacccg tcagcaatat gaagttttca ttctctgata ctcataaccg attagaaaaa	180
ggcggatatg cccgggaagt gacagtacgt gaattgccga ttccagaaaa ccttgcatec	240
gtaaatatgc ggctgaagcc aggcgcgatt cgcgagcttc actggcataa agaagctgaa	300
tgggcttata tgatttacgg aagtgcaaga gtcacaattg tagatgaaaa agggcgcagc	360
tttattgacg atgtaggtga aggagacctt tggtacttcc cgtcaggcct gccgcactcc	420

[0005]

atccaagcgc tggaggaggg agctgagttc ctgctcgtgt ttgacgatgg atcattctct	480
gaaaacagca cgttcagct gacagattgg ctggcccaca ctccaaaaga agtcattgct	540
gcgaacttcg gcgtgacaaa agaagagatt tccaatttgc ctggcaaaga aaaatatata	600
tttgaaaacc aacttcctgg cagtttataa gatgatattg tggaagggcc gaatggcgaa	660
gtgccttata catttactta ccgccttctt gaacaagage cgatecgaatc tgagggagga	720
aaagtataca ttgcagattc gacaaacttc aaagtgtcta aaaccatcgc atcagcgctc	780
gtaacagtag aacccggcgc catgagagaa ctgcactggc acccgaatac ccacgaatgg	840
caatactaca tctccggtaa agctagaatg accgtttttg catctgacgg ccatgccaga	900
acgtttaatt accaagccgg tgatgtcgga tatgtaccat ttgcaatggg tcattacgtt	960
gaaaacatcg gggatgaacc gcttgtcttt ttagaaatct tcaaagacga ccattatgct	1020
gatgtatctt taaaccaatg gcttgccatg ctctctgaaa catttgttca agcgcacctt	1080
gacttgggca aagactttac tgatgtgctt tcaaaagaaa agcaccacgt agtgaaaaag	1140
aatccagta aa	1152

<210> 5

<211> 1152

<212> DNA

<213> *Bacillus subtilis*

<400> 5

aaaaaaca aa atgacattcc gcagccaatt agaggagaca aaggagcaac ggtaaaaatc	60
ccgcgcaata ttgaaagaga ccggcaaaac cctgatatgc tcgttccgcc tgaaccgat	120
catggcacccg tcagcaatat gaagttttca ttctctgata ctcataaccg attagaaaaa	180
ggcggatatg cccgggaagt gacagtacgt gaattgccga tttcagaaaa ccttgcaccc	240
gtaaatatgc ggtgaagcc aggcgcgatt cgcgagcttc actggcataa agaagctgaa	300

[0006]

tgggcttata tgatttacgg aagtgaaga gtcacaattg tagatgaaaa agggcgcagc	360
tttattgacg atgtaggtga aggagacctt tggtaacttc cgtcaggcct gccgcactcc	420
atccaagcgc tggaggaggg agctgagttc ctgctcgtgt ttgacgatgg atcattctct	480
gaaaacagca cgttccagct gacagattgg ctggcccaca ctccaaaaga agtcattgct	540
gcgaacttcg gcgtgacaaa agaagagatt tccaatttgc ctggcaaaga aaaatatata	600
tttgaaaacc aacttcctgg cagtttaaaa gatgatattg tggaagggcc gaatggcgaa	660
gtgccttata catttactta ccgccttctt gaacaagagc cgategaate tgaggaggga	720
aaagtataca ttgcagattc gacaaacttc aaagtgteta aaaccatcgc atcagcgctc	780
gtaacagtag aacccggcgc catgagagaa ctgcaactgg acccgaatac ccacgaatgg	840
caatactaca tctccggtta agctagaatg accgtttttg catctgacgg ccattgccaga	900
acgtttaatt accaagecgg tgatgtcgga tatgtaccat ttgcaatggg tcattacgtt	960
gaaaacatcg gggatgaacc gcttgtcttt ttagaaatct tcaaagacga ccattatget	1020
gatgtatctt taaaccaatg gcttgccatg ctctctgaaa catttgttca agcgcacctt	1080
gacttgggca aagactttac tgatgtgctt tcaaaagaaa agcacccagt agtgaaaaag	1140
aatcaagta aa	1152

<210> 6

<211> 1152

<212> DNA

<213> Bacillus subtilis

<400> 6

aaaaa caaa atgacattcc gcagccaatt agaggagaca aaggagcaac ggtaaaaatc	60
ccgcgcaata ttgaaagaga ccggcaaaac cctgatatgc tcgttccgcc tgaaaccgat	120
catggcaccg tcagcaatat gaagttttca ttctctgata ctcataaccg attagaaaaa	180
ggcggatatg cccgggaagt gacagtacgt gaattgccga tttcagaaaa ccttgcattc	240

[0007]

gtaaatatgc ggtgaagcc aggcgcgatt cgcgagcttc actggcataa agaagctgaa	300
tgggcttata tgatttacgg aagtgaaga gtcacaattg tagatgaaaa agggcgcagc	360
tttattgacg atgtaggtga aggagacctt tggctacttc cgtcaggcct gccgcactcc	420
atccaagcgc tggaggaggg agctgagttc ctgctcgtgt ttgacgatgg atcattctct	480
gaaaacagca cgttcagct gacagattgg ctggcccaca ctccaaaaga agtcattgct	540
gcgaacttcg gcgtgacaaa agaagagatt tccaatttgc ctggcaaaga aaaatatata	600
tttgaaaacc aacttcctgg cagtttaaaa gatgatattg tggaagggcc gaatggcgaa	660
gtgccttate catttactta ccgccttctt gaacaagagc cgatcgaatc tgaggaggga	720
aaagtataca ttgcagattc gacaaacttc aaagtgtcta aaaccatcgc atcagcctc	780
gtaacagtag aaccgcgcgc catgagagaa ctgcactggc acccgaatac ccaagaatgg	840
caatactaca tctccggtaa agctagaatg accgtttttg catctgacgg ccatgccaga	900
acgtttaatt accaagccgg tgatgtcgga tatgtaccat ttgcaatggg tcattacgtt	960
gaaaacatcg gggatgaacc gcttgtcttt ttagaaatct tcaaagacga ccattatgct	1020
gatgtatctt taaaccaatg gcttgccatg ctctctgaaa catttgttca agcgcacctt	1080
gacttgggca aagactttac tgatgtgctt tcaaaagaaa agcaccacgt agtgaaaaag	1140
aatcgagta aa	1152

<210> 7

<211> 1152

<212> DNA

<213> Bacillus subtilis

<400> 7

aaaaaaca	atgacattcc	gcagccaatt	agaggagaca	aaggagcaac	ggtaaaaatc	60
----------	------------	------------	------------	------------	------------	----

ccgcgcaata	ttgaaagaga	ccggcaaaac	cctgatatgc	tcgttcgcgc	tgaaccgat	120
------------	------------	------------	------------	------------	-----------	-----

[0008]

catggcacccg tcagcaatat gaagttttca ttctctgata ctcataaccg attagaaaaa	180
ggcggatatg cccgggaagt gacagtacgt gaattgccga tttcagaaaa ccttgcatcc	240
gtaaatatgc ggctgaagcc aggcgcgatt cgcgagcttc actggcataa agaagctgaa	300
tgggcttata tgatttacgg aagtgaaga gtcacaattg tagatgaaaa agggcgcagc	360
tttattgacg atgtaggtga aggagacctt tggtaacttc cgtcaggcct gccgcactcc	420
atccaagcgc tggaggaggg agctgagttc ctgctcgtgt ttgacgatgg atcattctct	480
gaaaacagca cgttccagct gacagattgg ctggcccaca ctccaaaaga agtcattgct	540
gcgaacttcg gcgtgacaaa agaagagatt tccaatttgc ctggcaaaga aaaatatata	600
tttgaaaacc aacttcttgg cagtttaaaa gatgatattg tggaagggcc gaatggcgaa	660
gtgccttate catttactta ccgccttctt gaacaagagc cgategaatc tgaggaggga	720
aaagtataca ttgcagatc gacaaacttc aaagtgtcta aaaccatcgc atcagcgtc	780
gtaacagtag aacccggcgc catgagagaa ctgcaactgc acccgaatac ccacgaatgg	840
caatactaca tctccggtta agctagaatg accgtttttg catctgacgg ccattgccaga	900
acgtttaatt accaagccgg tgatgtcgga tatgtacat ttgcaatggg tcattacgtt	960
gaaaacatcg gggatgaacc gcttgtcttt ttagaaatct tcaaagacga ccattatgct	1020
gatgtatctt taaaccaatg gcttgccatg ctctctgaaa catttgttca agcgcacctt	1080
gacttgggca aagactttac tgatgtgctt tcaaaagaaa agcacccagt agtgaaaaag	1140
aaaagtagta aa	1152

<210> 8

<211> 1152

<212> DNA

<213> Bacillus subtilis

<400> 8

aaaaa caaa atgacattcc gcagccaatt agaggagaca aaggagcaac ggtaaaaatc	60
---	----

[0009]

ccgcgcaata ttgaaagaga ccggcaaaac cctgatatgc tcgttcgcc tgaaaccgat	120
catggcacccg tcagcaatat gaagttttca ttctctgata ctcataaccg attagaaaaa	180
ggcggatatg cccgggaagt gacagtagct gaattgccga tttcagaaaa ccttgcatcc	240
gtaaatatgc ggctgaagcc aggcgcgatt cgcgagcttc actggcataa agaagctgaa	300
tgggcttata tgatttacgg aagtgaaga gtcacaattg tagatgaaaa agggcgcagc	360
tttattgacg atgtaggtga aggagacctt tggtagcttc cgtcaggcct gccgcactcc	420
atccaagcgc tggaggaggg agctgagttc ctgctcgtgt ttgacgatgg atcattctct	480
gaaaacagca cgttcagct gacagattgg ctggcccaca ctccaaaaga agtcattgct	540
gcgaacttcg gcgtgacaaa agaagagatt tccaatttgc ctggcaaaga aaaatatata	600
tttgaaaacc aacttcctgg cagtttaaaa gatgatattg tggaagggcc gaatggcgaa	660
gtgccttate catttactta ccgccttctt gaacaagagc cgatcgaatc tgagggagga	720
aaagtataca ttgcagattc gacaaacttc aaagtgtcta aaaccatcgc atcagcgtc	780
gtaacagtag aacccggcgc catgagagaa ctgcactggc acccgaatac ccacgaatgg	840
caatactaca tctccggtaa agctagaatg accgtttttg catctgacgg ccatgccaga	900
acgtttaatt accaagccgg tgatgtcgga tatgtaccat ttgcaatggg tcattacgtt	960
gaaaacatcg gggatgaacc gcttgtcttt ttagaaatct tcaaagacga ccattatgct	1020
gatgtatctt taaaccaatg gcttgccatg ctctctgaaa catttggtca agcgcacctt	1080
gacttgggca aagactttac tgatgtgctt tcaaaagaaa agcaccagct agtgaaaaag	1140
aaaagcagta aa	1152

<210> 9

<211> 1152

<212> DNA

<213> Bacillus subtilis

[0010]

<400> 9	
aaaaa caaa atgacattcc gcagccaatt agaggagaca aaggagcaac ggtaaaaatc	60
ccgcgcaata ttgaaagaga ccggcaaaac cctgatatgc tcgttcgcc tgaaaccgat	120
catggcacccg tcagcaatat gaagttttca ttctctgata ctcataaccg attagaaaaa	180
ggcggatatg cccgggaagt gacagtacgt gaattgccga tttcagaaaa ccttgcatcc	240
gtaaatatgc ggctgaagcc aggcgcgatt cgcgagcttc actggcataa agaagctgaa	300
tgggcttata tgatttacgg aagtgcaga gtcacaattg tagatgaaaa agggcgcagc	360
tttattgacg atgtaggtga aggagacctt tggctacttc cgtcaggcct gccgcactcc	420
atccaagcgc tggaggaggg agctgagttc ctgctcgtgt ttgacgatgg atcattctct	480
gaaaacagca cgttcagct gacagattgg ctgcccaca ctccaaaaga agtcattgct	540
gcgaacttcg gcgtgacaaa agaagagatt tccaatttgc ctggcaaaga aaaatatata	600
tttgaaaacc aacttcctgg cagtttaaaa gatgatattg tggaagggcc gaatggcgaa	660
gtgccttate catttactta ccgccttctt gaacaagagc cgategaatc tgagggagga	720
aaagtataca ttgcagattc gacaaacttc aaagtgctta aaaccatcgc atcagcgtc	780
gtaacagtag aaccgcgcgc catgagagaa ctgcactggc accgaatac ccacgaatgg	840
caatactaca tctccggtaa agctagaatg accgtttttg catctgacgg ccatgccaga	900
acgtttaatt accaagccgg tgatgtcgga tatgtaccat ttgcaatggg tcattacgtt	960
gaaaacatcg gggatgaacc gcttgtcttt ttagaaatct tcaaagacga ccattatgct	1020
gatgtatctt taaaccaatg gcttgccatg ctctctgaaa catttgttca agegcacctt	1080
gacttgggca aagactttac tgatgtgctt tcaaaagaaa agcaccacgt agtgaaaaag	1140
aaacgtagta aa	1152

<210> 10

[0011]

<211>	1152	
<212>	DNA	
<213>	Bacillus subtilis	
<400>	10	
aaaaaacaaa atgacattcc gcagccaatt agaggagaca aaggagcaac ggtaaaaatc	60	
ccgcgcaata ttgaaagaga ccggcaaaac cctgatatgc tcgttccgcc tgaaaccgat	120	
catggcaccg tcagcaatat gaagttttca ttctctgata ctcataaccg attagaaaaa	180	
ggcggatatg cccgggaagt gacagtacgt gaattgccga tttcagaaaa cttgcatcc	240	
gtaaatatgc ggctgaagcc aggcgcgatt cgcgagcttc actggcataa agaagctgaa	300	
tgggcttata tgatttacgg aagtgcaga gtcacaattg tagatgaaaa agggcgcagc	360	
tttattgacg atgtaggtga aggagacctt tggctacttc cgtcaggcct gccgcactcc	420	
atccaagcgc tggaggaggg agctgagttc ctgctcgtgt ttgacgatgg atcattctct	480	
gaaaacagca cgttccagct gacagattgg ctggcccaca ctccaaaaga agtcattgct	540	
gcgaacttcg gcgtgacaaa agaagagatt tccaatttgc ctggcaaaga aaaatatata	600	
tttgaaaacc aacttcttgg cagtttaaaa gatgatattg tggaagggcc gaatggcgaa	660	
gtgccttata catttactta ccgccttctt gaacaagagc cgatcgaaac tgagggagga	720	
aaagtataca ttgcagattc gacaaacttc aaagtgctta aaaccatcgc atcagcgcct	780	
gtaacagtag aaccgcgcgc catgagagaa ctgcactggc acccgaaatac ccacgaatgg	840	
caatactaca tctccggtta agctagaatg accgtttttg catctgacgg ccatgccaga	900	
acgtttaatt accaagccgg tgatgtcgga tatgtaccat ttgcaatggg tcattacgtt	960	
gaaaacatcg gggatgaacc gcttgtcttt ttagaaatct tcaaagacga ccattatgct	1020	
gatgtatctt taaaccaatg gcttgccatg ctctctgaaa catttggtta agcgcacctt	1080	
gacttgggca aagactttac tgatgtgctt tcaaaagaaa agcaccagct agtgaaaaag	1140	
aaacgcagta aa	1152	

[0012]

<210>	11	
<211>	1152	
<212>	DNA	
<213>	Bacillus subtilis	
<400>	11	
aaaaa	acaaa atgacattcc gcagccaatt agaggagaca aaggagcaac ggtaaaaatc	60
ccgcg	caata ttgaaagaga ccggcaaaac cctgatatgc tcgttccgcc tgaacecgat	120
catgg	caccg tcagcaatat gaagttttca ttctctgata ctcataaccg attagaaaaa	180
ggcgg	atatg cccgggaagt gacagtacgt gaattgccga tticagaaaa ccttgcattc	240
gtaaa	atatgc ggtgaagcc aggcgcgatt cgcgagcttc actggcataa agaagctgaa	300
tgggt	cttata tgatttacgg aagtgcaga gtcacaattg tagatgaaaa agggcgcagc	360
tttat	tgacg atgtaggtga aggagacctt tggtaacttc cgtcaggcct gccgcactcc	420
atcca	agcgc tggaggaggg agctgagttc ctgctcgtgt ttgacgatgg atcattctct	480
gaaa	acagca cgttcagct gacagattgg ctggcccaca ctccaaaaga agtcattgct	540
gcgaa	cttcg gcgtgacaaa agaagagatt tccaatttgc ctggcaaaga aaaatatata	600
tttgaa	aacc aacttcctgg cagtttaaaa gatgatattg tggaagggcc gaatggcgaa	660
gtgc	cttata catttactta ccgccttctt gaacaagagc cgatcgaatc tgagggagga	720
aaagt	ataca ttgcagattc gacaaacttc aaagtgtcta aaaccatcgc atcagcgctc	780
gtaac	agtag aaccgcgcgc catgagagaa ctgcactggc acccgaatac ccacgaatgg	840
caata	ctaca tctccggtaa agctagaatg accgtttttg catctgacgg ccattgccaga	900
acgtt	taatt accaagccgg tgatgtcgga tatgtaccat ttgcaatggg tcattacgtt	960
gaaa	acatcg gggatgaacc gcttgtcttt ttagaaatct tcaaagacga ccattatgct	1020
gatgt	atctt taaaccaatg gcttgccatg ctctctgaaa catttggtca agcgcacctt	1080

[0013]

gacttgggca aagactttac tgatgtgctt tcaaaagaaa agcaccacagt agtgaaaaag	1140
aaacgaagta aa	1152
<210> 12	
<211> 1152	
<212> DNA	
<213> Bacillus subtilis	
<400> 12	
aaaaaacaaa atgacattcc gcagccaatt agaggagaca aaggagcaac ggtaaaaatc	60
ccgcgcaata ttgaaagaga ccggcaaaac cctgatatgc tcgttcgcgc tgaaaccgat	120
catggcaccg tcagcaatat gaagttttca ttctctgata ctcataaccg attagaaaaa	180
ggcggatatg cccgggaagt gacagtacgt gaattgccga tttcagaaaa ccttgcaccc	240
gtaaatatgc ggctgaagcc aggcgcgatt cgcgagcttc actggcataa agaagctgaa	300
tgggcttata tgatttacgg aagtgcaga gtcacaattg tagatgaaaa agggcgcagc	360
tttattgacg atgtaggtga aggagacctt tggctacttc cgtcaggcct gccgcactcc	420
atccaagcgc tggaggaggg agctgagttc ctgctcgtgt ttgacgatgg atcattctct	480
gaaaacagca cgttccagct gacagattgg ctggcccaca ctccaaaaga agtcattgct	540
gcgaacttcg gcgtgacaaa agaagagatt tccaatttgc ctggcaaaga aaaatatata	600
tttgaaaacc aacttcctgg cagtttaaaa gatgatattg tggaagggcc gaatggcgaa	660
gtgccttata catttactta ccgccttctt gaacaagagc cgategaatc tgaggaggga	720
aaagtataca ttgcagattc gacaaacttc aaagtgtcta aaaccatcgc atcagcgcct	780
gtaacagtag aaccgggcgc catgagagaa ctgcactggc accgaatac ccacgaatgg	840
caatactaca tctccggtaa agctagaatg accgtttttg catctgacgg ccattgccaga	900
acgtttaatt accaagccgg tgatgtcgga tatgtacat ttgcaatggg tcattacgtt	960
gaaaacatcg gggatgaacc gcttgtcttt ttagaaatct tcaaagacga ccattatgct	1020

[0014]

gatgtatctt taaaccaatg gcttgccatg ctctctgaaa catttggtca agcgcacctt	1080
gacttgggca aagactttac tgatgtgctt tcaaaagaaa agcaccacgt agtgaaaaag	1140
aaacggagta aa	1152
<210> 13	
<211> 1152	
<212> DNA	
<213> Bacillus subtilis	
<400> 13	
aaaaaaca aa atgacattcc gcagccaatt agaggagaca aaggagcaac ggtaaaaate	60
ccgcgcaata ttgaaagaga ccggcaaaac cctgatatgc tcgttccgcc tgaaccgat	120
catggcaccg tcagcaatat gaagttttca ttctctgata ctcataaccg attagaaaaa	180
ggcggatatg cccgggaagt gacagtacgt gaattgccga ttccagaaaa ccttgcattc	240
gtaaatatgc ggctgaagcc aggcgcgatt cgcgagcttc actggcataa agaagctgaa	300
tgggcttata tgatttacgg aagtgcaga gtcacaattg tagatgaaaa agggcgcagc	360
tttattgacg atgtaggtga aggagacctt tggacttcc cgtcaggcct gccgcactcc	420
atccaagcgc tggaggaggg agctgagttc ctgctcgtgt ttgacgatgg atcattctct	480
gaaaacagca cgttccagct gacagattgg ctggcccaca ctccaaaaga agtcattgct	540
gcgaacttcg gcgtgacaaa agaagagatt tccaatttgc ctggcaaaga aaaatatata	600
tttgaaaacc aacttcttgg cagtttaaaa gatgatattg tggaagggcc gaatggcgaa	660
gtgccttate catttactta ccgccttctt gaacaagage cgategaatc tgaggaggga	720
aaagtataca ttgcagattc gacaaacttc aaagtgtcta aaaccatcgc atcagcgtc	780
gtaacagtag aaccgcgcgc catgagagaa ctgcaactgg acccgaatac ccacgaatgg	840
caatactaca tctccggtaa agctagaatg accgtttttg catctgacgg ccattgccaga	900

[0015]

acgtttaatt accaagecgg tgatgtcgga tatgtaccat ttgcaatggg tcattacgtt	960
gaaaacatcg gggatgaacc gcttgtcttt ttagaaatct tcaaagacga ccattatgct	1020
gatgtatctt taaaccaatg gcttgccatg ctctctgaaa catttgttca agcgcacctt	1080
gacttgggca aagactttac tgatgtgctt tcaaaagaaa agcaccacgt agtgaaaaag	1140
aaaagaagta aa	1152
<210> 14	
<211> 1152	
<212> DNA	
<213> <i>Bacillus subtilis</i>	
<400> 14	
aaaaaacaaa atgacattcc gcagccaatt agaggagaca aaggagcaac ggtaaaaatc	60
ccgcgcaata ttgaaagaga ccggcaaaac cctgatatgc tegtccgcc tgaaaccgat	120
catggcaccg tcagcaatat gaagttttca ttctctgata ctcataaccg attagaaaaa	180
ggcggatatg cccgggaagt gacagtacgt gaattgccga tttcagaaaa ccttgcattc	240
gtaaatatgc ggctgaagcc aggcgcgatt cgcgagcttc actggcataa agaagctgaa	300
tgggcttata tgatttacgg aagtgcaga gtcacaattg tagatgaaaa agggcgcagc	360
tttatgacg atgtaggtga aggagacctt tggtaactcc cgtcaggcct gccgcactcc	420
atccaagcgc tggaggaggg agctgagttc ctgctcgtgt ttgacgatgg atcattctct	480
gaaaacagca cgttccagct gacagattgg ctggcccaca ctccaaaaga agtcattgct	540
gcgaacttcg gcgtgacaaa agaagagatt tccaatttgc ctggcaaaga aaaatatata	600
tttgaaaacc aacttcctgg cagtttaaaa gatgatattg tggaagggcc gaatggcgaa	660
gtgccttata catttactta ccgccttctt gaacaagagc cgatcgaatc tgaggaggga	720
aaagtataca ttgcagattc gacaaacttc aaagtgctta aaaccatcgc atcagcgcctc	780
gtaacagtag aaccgcgcgc catgagagaa ctgcactggc acccgaatac ccacgaatgg	840

[0016]

caatactaca tctccggtaa agctagaatg accgtttttg catctgacgg ccatgccaga	900
acgtttaatt accaagccgg tgatgtcgga tatgtaccat ttgcaatggg tcattacgtt	960
gaaaacatcg gggatgaacc gcttgtcttt ttagaaatct tcaaagacga ccattatgct	1020
gatgtatctt taaaccaatg gcttgccatg ctctctgaaa catttgttca agcgcacctt	1080
gacttgggca aagactttac tgatgtgctt tcaaaagaaa agcaccacgt agtgaaaaag	1140
aaaaggagta aa	1152

<210> 15

<211> 1152

<212> DNA

<213> Bacillus subtilis

<400> 15

aaaaaacaaa atgacattcc gcagccaatt agaggagaca aaggagcaac ggtaaaaatc	60
ccgcgcaata ttgaaagaga ccggcaaaac cctgatatgc tcgttccgcc tgaaccgat	120
catggcacccg tcagcaatat gaagttttca ttctctgata ctcataaccg attagaaaaa	180
ggcggatatg cccgggaagt gacagtacgt gaattgccga tttcagaaaa ccttgcattc	240
gtaaatatgc ggctgaagcc aggcgcgatt cgcgagcttc actggcataa agaagctgaa	300
tgggcttata tgatttacgg aagtgaaga gtcacaattg tagatgaaaa agggcgcagc	360
tttattgacg atgtaggtga aggagacctt tggctacttc cgtcaggcct gccgcactcc	420
atccaagcgc tggaggaggg agctgagttc ctgctcgtgt ttgacgatgg atcattctct	480
gaaaacagca cgttccagct gacagattgg ctggcccaca ctccaaaaga agtcattgct	540
gcgaacttcg gcgtgacaaa agaagagatt tccaatttgc ctggcaaaga aaaatatata	600
tttgaaaacc aacttctcgg cagtttaaaa gatgatattg tggaagggcc gaatggcgaa	660
gtgccttate catttactta ccgccttctt gaacaagagc cgatcgaatc tgaggaggaga	720

[0017]

aaagtataca ttgcagattc gacaaaacttc aaagtgcteta aaaccatcgc atcagcgcgc	780
gtaacagtag aacccggcgc catgagagaa ctgcactggc accegaatac ccacgaatgg	840
caatactaca tctccggtaa agctagaatg accgtttttg catctgacgg ccatgccaga	900
acgtttaatt accaagecgg tgatgtcgga tatgtaccat ttgcaatggg tcattacgtt	960
gaaaacatcg gggatgaacc gcttgtcttt ttagaaatct tcaaagacga ccattatgct	1020
gatgtatctt taaaccaatg gcttgccatg ctctctgaaa catctgttca agcgcacctt	1080
gacttgggca aagactttac tgatgtgctt tcaaaagaaa agcaccacgt agtgaaaaag	1140
aaagctagta aa	1152
<210> 16	
<211> 1152	
<212> DNA	
<213> Bacillus subtilis	
<400> 16	
aaaaaacaaa atgacattcc gcagccaatt agaggagaca aaggagcaac ggtaaaaatc	60
ccgcgcaata ttgaaagaga ccggcaaaac cctgatatgc tcgttccgcc tgaaaccgat	120
catggcaccg tcagcaatat gaagttttca ttctctgata ctcataaccg attagaaaaa	180
ggcggatatg cccgggaagt gacagtacgt gaattgccga tttcagaaaa ccttgcattc	240
gtaaatatgc ggctgaagcc aggcgcgatt cgcgagcttc actggcataa agaagctgaa	300
tgggcttata tgatttacgg aagtgcaaga gtcacaattg tagatgaaaa agggcgcagc	360
tttattgacg atgtaggtga aggagacctt tgggtacttc cgtcaggcct gccgcactcc	420
atccaagcgc tggaggaggg agctgagttc ctgctcgtgt ttgacgatgg atcattctct	480
gaaaacagca cgttccagct gacagattgg ctggcccaca ctccaaaaga agtcattgct	540
gcgaacttcg gcgtgacaaa agaagagatt tccaatttgc ctggcaaaga aaaatatata	600
tttgaaaacc aacttcctgg cagtttaaaa gatgatattg tggaagggcc gaatggcgaa	660

[0018]

gtgccttata catttactta ccgccttctt gaacaagagc cgcacgaatc tgaggaggagga	720
aaagtataca ttgcagattc gacaaacttc aaagtgtcta aaaccatcgc atcagcgctc	780
gtaacagtag aacccggcgc catgagagaa ctgcactggc acccgaatac ccacgaatgg	840
caatactaca tctccggtta agctagaatg accgtttttg catctgacgg ccatgccaga	900
acgtttaatt accaagecgg tgatgtcgga tatgtaccat ttgcaatggg tcattacgtt	960
gaaaacatcg gggatgaacc gcttgtcttt ttagaaatct tcaaagacga ccattatgct	1020
gatgtatctt taaaccaatg gcttgccatg ctctctgaaa catttgttca agcgcacctt	1080
gacttgggca aagactttac tgatgtgctt tcaaaagaaa agcaccacgt agtgaaaaag	1140
aaagccagta aa	1152

<210> 17

<211> 1152

<212> DNA

<213> *Bacillus subtilis*

<400> 17

aaaaaacaat atgacattcc gcagccaatt agaggagaca aaggagcaac ggtaaaaatc	60
ccgcgcaata ttgaaagaga ccggcaaaac cctgatatgc tcgttccgcc tgaaccgat	120
catggcaccg tcagcaatat gaagttttca ttctctgata ctcataaccg attagaaaaa	180
ggcggatatg cccgggaagt gacagtacgt gaattgccga tttcagaaaa ccttgcaccc	240
gtaaatatgc ggetgaagcc aggcgcgatt cgcgagcttc actggcataa agaagctgaa	300
tgggtttata tgatttacgg aagtgaaga gtcacaattg tagatgaaaa agggcgcagc	360
tttattgacg atgtaggtga aggagacctt tggtaacttc cgtcaggcct gccgcactcc	420
atccaagegc tggaggaggg agctgagttc ctgctcgtgt ttgacgatgg atcattctct	480
gaaaacagca cgttccagct gacagattgg ctggcccaca ctccaaaaga agtcattgct	540

[0019]

gcgaacttcg gcgtgacaaa agaagagatt tccaatttgc ctggcaaaga aaaatatata	600
tttgaaaacc aacttcctgg cagtttaaaa gatgatattg tggaagggcc gaatggcgaa	660
gtgccttata catttactta ccgccttctt gaacaagage cgategaate tgagggagga	720
aaagtataca ttgcagattc gacaaaacttc aaagtgteta aaaccatcgc atcagcgctc	780
gtaacagtag aacccggcgc catgagagaa ctgcactggc acccgaatac ccacgaatgg	840
caatactaca tctccggtta agctagaatg accgtttttg catctgacgg ccatgccaga	900
acgtttaatt accaagecgg tgatgtcgga tatgtaccat ttgcaatggg tcattacgtt	960
gaaaacatcg gggatgaacc gcttgtcttt ttagaaatct tcaaagacga ccattatget	1020
gatgtatctt taaaccaatg gcttgccatg ctctctgaaa catttgttca agcgcacctt	1080
gacttgggca aagaactttac tgatgtgett tcaaaagaaa agcaccacgt agtgaaaaag	1140
aaagcaagta aa	1152

<210> 18

<211> 1152

<212> DNA

<213> Bacillus subtilis

<400> 18

aaaaaacaaa atgacattcc gcagccaatt agaggagaca aaggagcaac ggtaaaaatc	60
ccgcgcaata ttgaaagaga ccggcaaaac cctgatatgc tcgttccgcc tgaaaccgat	120
catggcaccg tcagcaatat gaagttttca ttctctgata ctcataaccg attagaaaaa	180
ggcggatatg cccgggaagt gacagtacgt gaattgccga tttcagaaaa ccttgcatec	240
gtaaatatgc ggctgaagcc aggcgcgatt cgcgagcttc actggcataa agaagctgaa	300
tgggcttata tgatttacgg aagtgcaga gtcacaattg tagatgaaaa agggcgcagc	360
tttattgacg atgtaggtga aggagacctt tggctacttc cgtcaggcct gccgcactcc	420
atccaagcgc tggaggaggg agctgagttc ctgctcgtgt ttgacgatgg atcattctct	480

[0020]

gaaaacagca cgttcagct gacagattgg ctggcccaca ctccaaaaga agtcattgct	540
gcgaacttcg gcgtgacaaa agaagagatt tccaatttgc ctggcaaaga aaaatatata	600
tttgaaaacc aacttcctgg cagtttaaaa gatgatattg tggaagggcc gaatggcgaa	660
gtgcettatc catttactta ccgccttctt gaacaagagc cgatcgaatc tgagggagga	720
aaagtataca ttgcagattc gacaaacttc aaagtgtcta aaaccatcgc atcagcgctc	780
gtaacagtag aacccggcgc catgagagaa ctgcactggc acccgaatac ccacgaatgg	840
caatactaca tctccggtaa agctagaatg accgtttttg catctgacgg ccatgccaga	900
acgtttaatt accaagccgg tgatgtcgga tatgtaccat ttgcaatggg tcattacgtt	960
gaaaacatcg gggatgaacc gcttgtcttt ttagaaatct tcaaagacga ccattatgct	1020
gatgtatctt taaaccaatg gcttgccatg ctctctgaaa catttgttca agcgacctt	1080
gacttgggca aagactttac tgatgtgctt tcaaaagaaa agcaccagc agtgaaaaag	1140
aaagcgagta aa	1152

<210> 19

<211> 1152

<212> DNA

<213> *Bacillus subtilis*

<400> 19

aaaaaaciaa atgacattcc gcagccaatt agaggagaca aaggagcaac ggtaaaaatc	60
ccgcgcaata ttgaaagaga ccggcaaaac cctgatatgc tcgttcgcgc tgaaaccgat	120
catggcacgc tcagcaatat gaagttttca ttctctgata ctcataaccg attagaaaaa	180
ggcggatatg cccgggaagt gacagtacgt gaattgccga tttcagaaaa ccttgcattc	240
gtaaatatgc ggctgaagcc aggcgcgatt cgcgagcttc actggcataa agaagctgaa	300
tgggcttata tgatttacgg aagtgaaga gtcacaattg tagatgaaaa agggcgcagc	360

[0021]

tttattgacg atgtaggtga aggagacett tggtaacttcc cgtcaggcct gccgcactcc	420
atccaagcgc tggaggaggg agctgagttc ctgctcgtgt ttgacgatgg atcattctct	480
gaaaacagca cgttcagct gacagattgg ctggcccaca ctccaaaaga agtcattgct	540
gcgaacttcg gcgtgacaaa agaagagatt tccaatttgc ctggcaaaga aaaatatata	600
tttgaaaacc aacttcctgg cagtttaaaa gatgatattg tggaagggcc gaatggcgaa	660
gtgccttata catttactta ccgccttctt gaacaagagc cgatecgaatc tgagggagga	720
aaagtataca ttgcagattc gacaaacttc aaagtgtcta aaaccatcgc atcagcgctc	780
gtaacagtag aaccggcgc catgagagaa ctgcactggc acccgaatac ccacgaatgg	840
caatactaca tctccggtaa agctagaatg accgtttttg catctgacgg ccatgccaga	900
acgtttaatt accaagecgg tgatgtcgga tatgtaccat ttgcaatggg tcattacgtt	960
gaaaacatcg gggatgaacc gcttgtcttt ttagaaatct tcaaagacga ccattatgct	1020
gatgtatctt taaaccaatg gcttgccatg ctctctgaaa catttgttca agcgcacctt	1080
gacttgggca aagactttac tgatgtgctt tcaaaagaaa agcacccagt agtgaaaaag	1140
aaaggaagta aa	1152

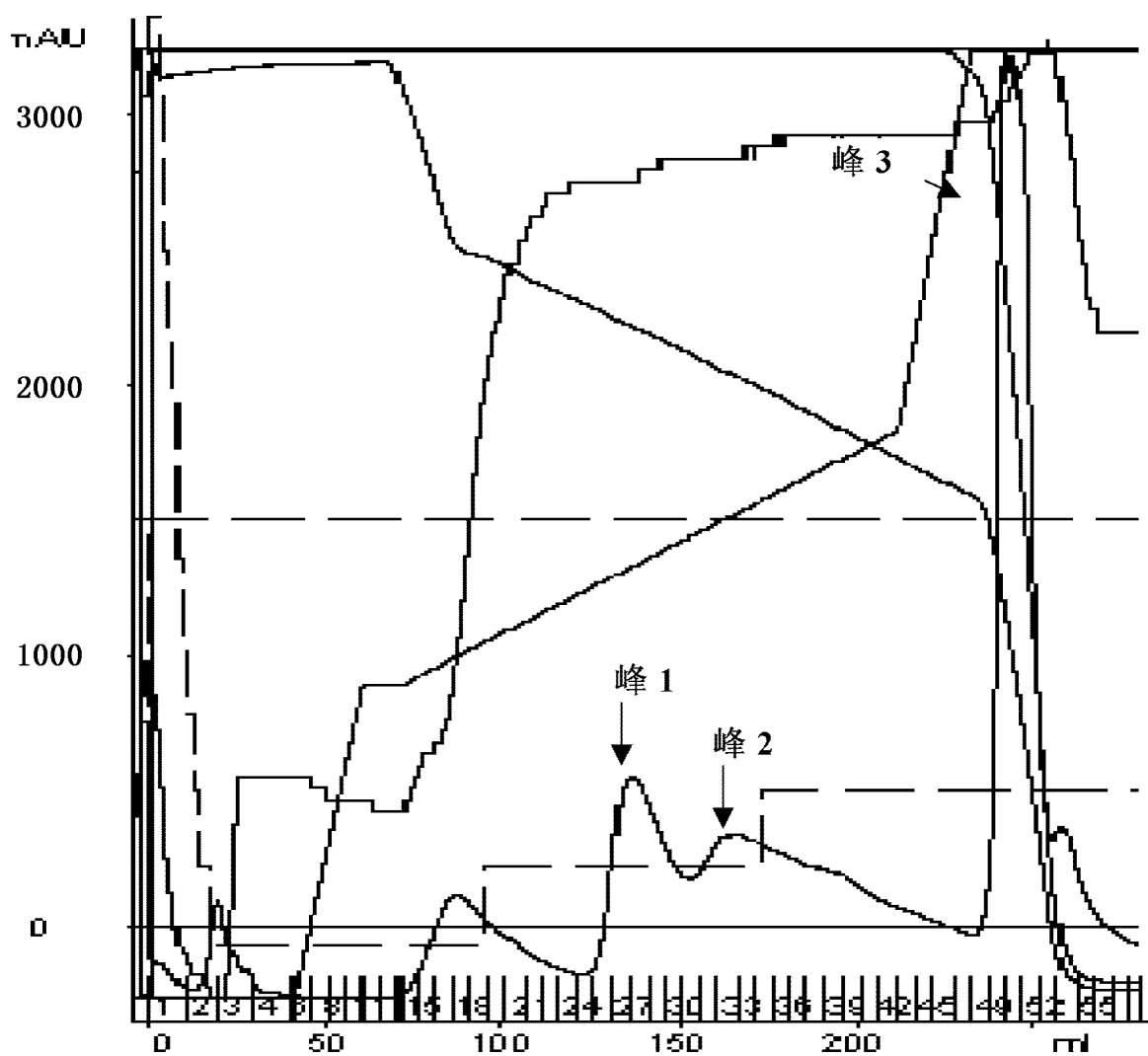


图 1

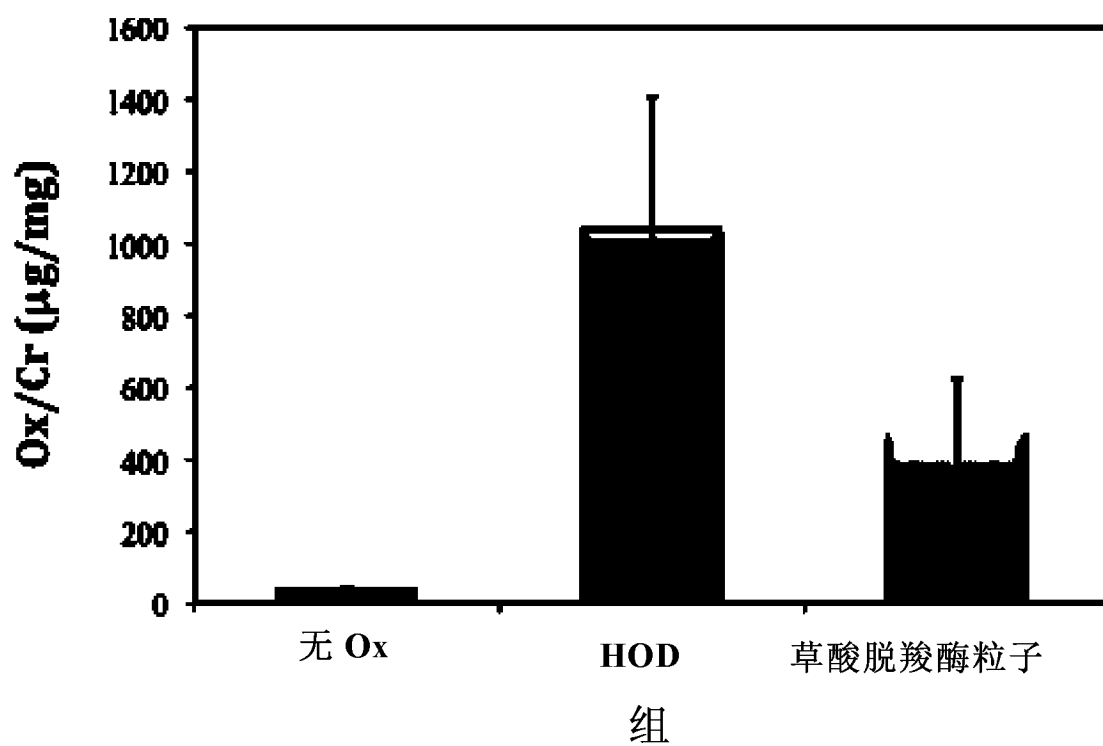


图 2