(19)国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 118792283 A
(43)申请公布日 2024.10.18

(21)申请号 202411127100.0

(22)申请日 2019.07.25

(30)优先权数据
10-2018-0086308 2018.07.25 KR
10-2019-0029758 2019.03.15 KR

(62)分案原申请数据
201980023392.4 2019.07.25

(71)申请人 阿特根公司
地址 韩国大田

(72)发明人 朴淳宰 郑惠信 李承柱 柳善儿 宋炯楠 李昌禹

(74)专利代理机构 北京安信方达知识产权代理有限公司 11262
专利代理师 徐爱文 张奎燕

(51)Int.Cl.
C12N 9/26(2006.01)
C07K 19/00(2006.01)
A61K 38/47(2006.01)
A61K 45/06(2006.01)
A61P 35/00(2006.01)
C12N 15/56(2006.01)
C12N 15/62(2006.01)
C12N 15/85(2006.01)
C12N 5/10(2006.01)

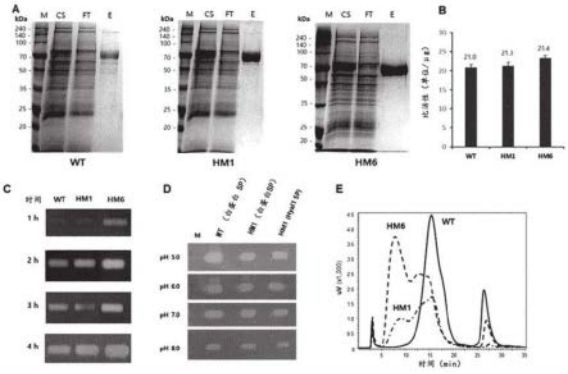
权利要求书3页 说明书47页
序列表（电子公布） 附图15页

(54)发明名称

新型透明质酸水解酶突变体和包含其的药物组合物

(57)摘要

本发明涉及用于增强作为透明质酸水解酶的人透明质酸水解酶的酶活性和热稳定性的蛋白质工程技术领域,并且涉及透明质酸酶PH20突变体或其片段,所述透明质酸酶PH20突变体或其片段包含:在具有SEQ ID NO:1的野生型PH20氨基酸序列中、在α螺旋位点和/或对应于其连接位点的位点处的至少一个氨基酸残基的取代;以及选择性地,N末端氨基酸残基和/或C末端氨基酸残基的另外的缺失。特别地,本发明涉及一种PH20突变体及其片段,具有SEQ ID NO:1的序列的野生型PH20包含:选自T341A、T341C、T341G、S343E、M345T、K349E、L353A、L354I、N356E和I361T的至少一个残基的取代;另外地,位于α螺旋位点8和/或α螺旋位点7与α螺旋位点8的连接位点处的氨基酸的取代;以及N末端位点和C末端位点的一些氨基酸的缺失。



CN 118792283 A

1.一种PH20变体或其片段,所述PH20变体或其片段在具有SEQ ID NO:1的氨基酸序列的野生型PH20中包含选自T341A、T341C、T341G、S343E、M345T、K349E、L353A、L354I、N356E和I361T的一个或多个氨基酸残基取代。

2.根据权利要求1所述的PH20变体或其片段,所述PH20变体或其片段包含选自T341A、T341C、L354I和N356E的一个或多个氨基酸残基取代。

3.根据权利要求1所述的PH20变体或其片段,所述PH20变体或其片段在对应于具有SEQ ID NO:1的氨基酸序列的野生型PH20中的α螺旋区域和/或其接头区域的区域中还包含一个或多个氨基酸残基取代。

4.根据权利要求3所述的PH20变体或其片段,其中所述α螺旋区域是α螺旋8区域(S347至C381),并且其接头区域是α螺旋7与α螺旋8之间的接头区域(A333至R346)。

5.根据权利要求4所述的PH20变体或其片段,其中对应于所述α螺旋区域及其接头区域的区域是T341至N363、T341至I361、L342至I361、S343至I361、I344至I361、M345至I361或M345至N363。

6.根据权利要求4所述的PH20变体或其片段,其中所述α螺旋8区域(S347至C381)和/或α螺旋7与α螺旋8之间的所述接头区域(A333至R346)被Hya11的相应区域的一个或多个氨基酸残基取代。

7.根据权利要求1所述的PH20变体或其片段,所述PH20变体或其片段包含L354I和/或N356E的氨基酸残基取代,并且还包含选自T341、L342、S343、I344、M345、S347、M348、K349、L352、L353、D355、E359、I361和N363的一个或多个位置处的氨基酸残基取代。

8.根据权利要求7所述的PH20变体或其片段,所述PH20变体或其片段包含L354I和/或N356E的氨基酸残基取代,并且还包含选自T341A、T341C、T341D、T341G、T341S、L342W、S343E、I344N、M345T、S347T、M348K、K349E、L352Q、L353A、D355K、E359D、I361T和N363G的一个或多个氨基酸残基取代。

9.根据权利要求7所述的PH20变体或其片段,所述PH20变体或其片段包含M345T、S347T、M348K、K349E、L352Q、L353A、L354I、D355K、N356E、E359D和I361T。

10.根据权利要求9所述的PH20变体或其片段,所述PH20变体或其片段还包含选自T341A、T341C、T341D、T341G、T341S、L342W、S343E、I344N和N363G的一个或多个氨基酸残基取代。

11.根据权利要求10所述的PH20变体或其片段,所述PH20变体或其片段包含选自以下氨基酸残基取代组的任何一个氨基酸残基取代:

(a)T341S、L342W、S343E、I344N、M345T、S347T、M348K、K349E、L352Q、L353A、L354I、D355K、N356E、E359D和I361T;

(b)L342W、S343E、I344N、M345T、S347T、M348K、K349E、L352Q、L353A、L354I、D355K、N356E、E359D和I361T;

(c)M345T、S347T、M348K、K349E、L352Q、L353A、L354I、D355K、N356E、E359D、I361T和N363G;

(d)T341G、L342W、S343E、I344N、M345T、S347T、M348K、K349E、L352Q、L353A、L354I、D355K、N356E、E359D和I361T;

(e)T341A、L342W、S343E、I344N、M345T、S347T、M348K、K349E、L352Q、L353A、L354I、

D355K、N356E、E359D和I361T;

(f)T341C、L342W、S343E、I344N、M345T、S347T、M348K、K349E、L352Q、L353A、L354I、D355K、N356E、E359D和I361T;

(g)T341D、L342W、S343E、I344N、M345T、S347T、M348K、K349E、L352Q、L353A、L354I、D355K、N356E、E359D和I361T;

(h)I344N、M345T、S347T、M348K、K349E、L352Q、L353A、L354I、D355K、N356E、E359D和I361T;以及

(i)S343E、I344N、M345T、S347T、M348K、K349E、L352Q、L353A、L354I、D355K、N356E、E359D和I361T。

12.根据权利要求1至11中任一项所述的PH20变体或其片段,其中还缺失所述N末端或C末端氨基酸残基中的一个或多个。

13.根据权利要求12所述的PH20变体或其片段,其中切割发生在所述N末端处选自M1至P42的氨基酸残基之前,使得缺失所述N末端处的一个或多个氨基酸残基。

14.根据权利要求13所述的PH20变体或其片段,其中切割发生在所述N末端处的氨基酸残基L36、N37、F38、R39、A40、P41或P42之前,使得缺失所述N末端处的一个或多个氨基酸残基。

15.根据权利要求12所述的PH20变体或其片段,其中切割发生在所述C末端处选自V455至L509的氨基酸残基之后,使得缺失所述C末端处的一个或多个氨基酸残基。

16.根据权利要求15所述的PH20变体或其片段,其中切割发生在所述C末端处选自V455至S490的氨基酸残基之后,使得缺失所述C末端处的一个或多个氨基酸残基。

17.根据权利要求16所述的PH20变体或其片段,其中切割发生在所述C末端处的氨基酸残基V455、C458、D461、C464、I465、D466、A467、F468、K470、P471、P472、M473、E474、T475、E476、P478、I480、Y482、A484、P486、T488或S490之后,使得缺失所述C末端处的一个或多个氨基酸残基。

18.根据权利要求1至17中任一项所述的PH20变体或其片段,其中所述N末端包含具有SEQ ID NO:3的氨基酸序列MATGSRTSLLLAFGLLCLPWLQEGSA的人生长激素来源的信号肽、具有SEQ ID NO:4的氨基酸序列MKWVTFISLLFLFSSAYS的人血清白蛋白来源的信号肽、或具有SEQ ID NO:5的氨基酸序列MAAHLLPICALFLTLLDMAQG的人Hyal1来源的信号肽。

19.根据权利要求1至11中任一项所述的PH20变体或其片段,其中所述PH20变体或其片段选自SEQ ID NO:60至115的氨基酸序列。

20.根据权利要求19所述的PH20变体或其片段,所述PH20变体或其片段具有SEQ ID NO:99的氨基酸序列。

21.一种用于治疗癌症的组合物,所述组合物包含根据权利要求1至20中任一项所述的PH20变体或其片段。

22.根据权利要求21所述的用于治疗癌症的组合物,其中所述组合物用于与其他抗癌药物的联合治疗。

23.根据权利要求22所述的用于治疗癌症的组合物,其中所述其他抗癌药物是免疫肿瘤剂。

24.根据权利要求23所述的用于治疗癌症的组合物,其中所述免疫肿瘤剂是免疫检查

点抑制剂。

25.一种核酸,所述核酸编码根据权利要求1至20中任一项所述的PH20变体或其片段。

26.一种重组表达载体,所述重组表达载体包含根据权利要求25所述的核酸。

27.一种用根据权利要求26所述的重组表达载体转化的宿主细胞。

28.根据权利要求27所述的宿主细胞,其中所述宿主细胞选自动物细胞、植物细胞、酵母、大肠杆菌和昆虫细胞。

29.一种用于产生PH20变体或其片段的方法,所述方法包括培养根据权利要求28所述的宿主细胞的步骤。

新型透明质酸水解酶突变体和包含其的药物组合物

[0001] 本申请是申请日为2019年7月25日、申请号为201980023392.4、发明名称为“新型透明质酸水解酶突变体和包含其的药物组合物”的发明专利申请的分案申请。

技术领域

[0002] 本发明涉及新型人透明质酸酶变体,与作为水解透明质酸的酶的人透明质酸酶相比,所述新型人透明质酸酶变体具有增加的酶活性和热稳定性;并且更特别地涉及透明质酸酶PH20变体或其片段,所述透明质酸酶PH20变体或其片段在对应于具有SEQ ID NO:1的氨基酸序列的野生型PH20、优选由氨基酸残基L36至S490组成的成熟野生型PH20中的α螺旋区域和/或其接头区域的区域中包含一个或多个氨基酸残基取代,并且在所述透明质酸酶PH20变体或其片段中,选择性地缺失N末端或C末端氨基酸残基中的一个或多个;产生所述透明质酸酶PH20变体或其片段的方法;以及包含所述透明质酸酶PH20变体或其片段的药物组合物。

背景技术

[0003] 人皮肤由表皮、真皮和皮下脂肪层构成,并且皮肤中存在六种类型的糖胺聚糖。这些糖胺聚糖包括透明质酸、硫酸软骨素、硫酸皮肤素、硫酸乙酰肝素、肝素和硫酸角蛋白。

[0004] 这些糖胺聚糖由重复的二糖糖单元构成。在糖胺聚糖中,二糖糖单元的数目不同,而范围从几百到几千。在糖胺聚糖中,透明质酸在皮肤中的存在超过在人体中的量的一半。透明质酸是由存在于细胞膜中的透明质酸合酶合成的,其单独存在而不与蛋白聚糖结合,并且是唯一不具有硫酸基团的糖胺聚糖。其他糖胺聚糖与蛋白聚糖结合并且具有硫酸基团。透明质酸由通过交替的β-1,4和β-1,3键连接的葡萄糖醛酸和N-乙酰葡糖胺组成,并且由这些二糖的约5,000个重复单元构成。已知每天人体中约三分之一(5g)的透明质酸被转换(turn over)。

[0005] 透明质酸酶是降解存在于细胞外基质中的透明质酸的酶。已知人体中存在六种类型的透明质酸酶:它们是Hyal1、Hyal2、Hyal3、Hyal4、HyalPS1和PH20/SPAM1。人Hyal1和Hyal2在大多数组织中表达。PH20/SPAM1(以下称为PH20)在精子质膜和顶体膜中表达。然而,HyalPS1不表达,因为其是假基因。根据切割透明质酸的方法,透明质酸酶分为三种类型:通过使用H_2O切割N-乙酰葡糖胺与葡萄糖醛酸之间的β-1,4键的酶(EC 3.2.1.35);通过使用H_2O切割N-乙酰葡糖胺与葡萄糖醛酸之间的β-1,3键的酶(EC 3.2.1.36);以及在不使用H_2O的情况下切割β-1,4键的细菌透明质酸酶(EC 4.2.99.1)。

[0006] Hyal1的催化氨基酸是D129和E131,它们通过底物辅助催化来水解透明质酸。Hyal1在3至4的酸性pH下展现出最佳活性,而在4.5或更高的pH下没有酶活性。与Hyal1形成对照,PH20在3至8的宽pH范围内展现出酶活性。

[0007] Arming等人鉴定PH20的催化氨基酸为D111和E113(Arming等人,1997)。Arming等人将Leu标记为成熟蛋白的第一个氨基酸,并且因此带有信号肽的全长PH20的催化氨基酸分别对应于D146和E148。

[0008] 透明质酸酶水解透明质酸,从而降低透明质酸在细胞外基质中的粘度并增加其向组织(皮肤)的渗透性。皮肤的皮下区域具有约7.0至7.5的中性pH。因此,在各种类型的透明质酸酶中,PH20在临床实践中被广泛使用(Bookbinder等人,2006)。在其中PH20用于临床实践的例子中,PH20在眼科手术中用作眼松弛剂和麻醉添加剂,并且还与皮下注射的抗体治疗剂共同给予(Bookbinder等人,2006)。此外,基于透明质酸在肿瘤细胞中过表达的特性,PH20用于水解肿瘤细胞的细胞外基质中的透明质酸,从而增加抗癌治疗剂对肿瘤细胞的接近。此外,其还用于促进组织中过量存在的体液和血液的再吸收。

[0009] PH20由Lathrop等人首先在豚鼠精子中鉴定,并且还已知在不同物种的精子中表达。人PH20基因由Lin等人和Gmachl等人克隆。人PH20具有SEQ ID NO:1的氨基酸序列,其由509个氨基酸残基组成,并且与豚鼠PH20基因展现出60%的氨基酸同一性。人PH20酶由SPAM1(精子粘附分子-1)基因编码,并且PH20的Ser490以与精子质膜表面上和顶体膜中的糖基磷脂酰肌醇(GPI)结合的形式存在。当精子穿过卵母细胞富含透明质酸的卵丘层渗透卵母细胞时,其使用PH20水解透明质酸。精子中PH20以相当于蛋白质量的1%或更少的量存在,并且具有六个N-糖基化位点(N82、N166、N235、N254、N368和N393)。

[0010] 目前可商购的PH20是通过从牛或绵羊的睾丸中提取获得的。其例子包括Amphadase®(牛透明质酸酶)和Vitrase®(绵羊透明质酸酶)。

[0011] 牛睾丸透明质酸酶(BTH)是通过在翻译后修饰过程中从牛野生型PH20移除信号肽和C末端上的56个氨基酸而获得的。BTH也是一种糖蛋白,并且基于包括氨基酸的总组分,其甘露糖含量为5%且葡萄糖胺含量为2.2%。当将动物来源的透明质酸酶以高剂量重复给予至人体时,可以产生中和抗体。由于动物来源的透明质酸酶除PH20之外还含有其他生物材料,因此其在给予至人体时可能引起过敏反应(Bookbinder等人,2006)。特别地,由于担心疯牛病,从牛提取的PH20的生产和使用可能受到限制。为了克服此问题,已对人PH20的重组蛋白进行了研究。

[0012] 据报道,人PH20的重组蛋白在酵母(毕赤酵母(P.pastoris))、DS-2昆虫细胞和动物细胞中表达。在昆虫细胞和酵母中产生的重组PH20蛋白在翻译后修饰过程中的N-糖基化模式方面与人PH20不同。

[0013] 在透明质酸酶中,仅确定了Hyal1(PDB ID:2PE4)(Chao等人,2007)和蜂毒透明质酸酶(PDB ID:1FCQ、1FCU、1FCV)的三维结构。Hyal1由两个结构域构成,一个催化结构域和一个EGF样结构域。催化结构域呈$(\beta/\alpha)_8$形式,其中表征蛋白质二级结构的α螺旋和β链各自重复八次(Chao等人,2007)。EGF样结构域在变体中是完全保守的,在所述变体中Hyal1的C末端被不同地拼接。Hyal1和PH20的氨基酸序列是35.1%相同的,并且尚未发现PH20的蛋白质结构。

[0014] 一种人PH20的重组蛋白是由Halozyme Therapeutic,Inc.开发的,并以商品名Hylenex®出售(Bookbinder等人,2006;Frost,2007)。

[0015] 当PH20的催化氨基酸D146和E148分别突变为天冬酰胺(D146N)和谷氨酰胺(E148Q)时,不存在酶活性(Arming等人,1997)。此外,当PH20的R246被甘氨酸取代时,酶活性降低了90%,并且当E319被谷氨酰胺取代并且R322被苏氨酸取代时,酶活性消失。与野生型PH20相比,其中在PH20的C末端处移除了36个氨基酸(474-509氨基酸截短)的变体显示酶活性降低了75%。此变体不分泌到细胞外,而是保留在HeLa细胞中。当从PH20移除C末端134

个氨基酸时,PH20没有酶活性,也不分泌到细胞外。根据Frost等人,PH20的C末端477-483区域对于可溶性表达是必不可少的(Frost,2007)。全长PH20(1至509)或在位置467处C末端被截短的PH20变体的活性仅为在位置477至483中的一处C末端被截短的PH20变体的10％(Frost,2007)。

[0016] 同时,重组PH20在重组细胞中仍没有足够的热稳定性或表达水平。因此,工业上对具有进一步改善的生物学和物理化学特征的重组透明质酸酶有很大的需求。

发明内容

[0017] 技术问题

[0018] 本发明的一个目的是提供一种透明质酸酶PH20变体或其片段,与野生型PH20、优选成熟野生型PH20相比,所述透明质酸酶PH20变体或其片段的热稳定性、酶活性和表达水平得到改善。

[0019] 本发明的另一个目的是提供一种用于治疗癌症的组合物,所述组合物包含上述透明质酸酶PH20变体或其片段;以及使用所述组合物治疗癌症的方法。

[0020] 技术方案

[0021] 为了实现以上目的,本发明提供了透明质酸酶PH20变体或其片段,所述透明质酸酶PH20变体或其片段在对应于野生型PH20、优选成熟野生型PH20的氨基酸序列中的α螺旋区域和/或其接头区域的区域中包含一个或多个氨基酸残基取代,并且在所述透明质酸酶PH20变体或其片段中,选择性地缺失N末端或C末端氨基酸残基中的一个或多个。

[0022] 本发明还提供了用于治疗癌症的组合物,所述组合物包含上述透明质酸酶PH20变体或其片段;以及使用所述组合物治疗癌症的方法。

附图说明

[0023] 图1示出了PH20的蛋白质三级结构模型。PH20的蛋白质三级结构是使用Hyal1(PDB ID:2PE4)(Chao等人,2007)作为模板建模的,所述Hyal1的蛋白质晶体结构是在Swiss-Model服务器(https://swissmodel.expasy.org/)中发现的。

[0024] 图1A示出了PH20的蛋白质三级结构模型,并指示作为催化氨基酸的D146和E148。PH20的蛋白质三级结构模型由一个β链和一个α螺旋的八个重复序列构成。

[0025] 图1B示出了eta(η)8环,其中PH20的α螺旋8和在α螺旋8的N末端区域中形成接头区域的G340至I344位于其中。G340、T341、L342、S343和I344残基各自示出。

[0026] 图1C示出了在位于PH20的α螺旋8中的氨基酸中,与相邻二级结构相互作用的氨基酸残基(C351、Y357和N363)。C351与位于α螺旋1中的C60形成二硫键,Y357与位于β链7与α螺旋7之间的F315疏水性地相互作用,而N363与位于α螺旋1中的D69残基形成氢键。

[0027] 图2比较了WT(野生型)和在本发明中构建的变体的蛋白质表达水平。通过在ExpiCHO细胞中瞬时转染来表达WT和变体。WT的表达水平为16.1mg/L。基于变体HM1和HM6的变体的蛋白质表达水平高于WT的蛋白质表达水平,并且HM4和HM7的蛋白质表达水平最高。通过将另外的氨基酸取代(Y365F和I367L)引入变体HM6中而获得的HM11的蛋白质表达水平降至6.4mg/mL。

[0028] 图3示出了变体HM1和HM6的实验结果。

[0029] 图3A示出了纯化WT以及变体HM1和HM6之后的SDS-PAGE的结果。使用HisTrap柱和Q Sepharose柱进行纯化。WT以及变体HM1和HM6的分子量为约70kDa(图例:M,分子量标记;CS,上清液;FT,流通量;以及洗脱,洗脱级分)。

[0030] 图3B示出了在pH 7.0下通过浊度测定测量的WT以及变体HM1和HM6的酶活性值。在本发明中,通过浊度测定测量的酶活性值表示为比活性。

[0031] 图3C示出了通过底物-凝胶测定测量的WT以及变体HM1和HM6的酶活性。在4℃下用2.5% Triton X-100(w/v)去除SDS后,在37℃下进行酶促反应1至4h。变体HM6比WT和变体HM1复性更快,因此在聚丙烯酰胺凝胶上更快地水解透明质酸。白色条带示出了被WT和变体蛋白降解的透明质酸。

[0032] 图3D示出了在pH 5至8下通过底物-凝胶测定测量的WT和变体HM1的酶活性。WT和变体HM1在5至8的pH范围内展现出活性,并在pH 5.0下显示出最高的酶活性。变体HM1具有人血清白蛋白或人Hyal1的信号肽。白色条带示出了被WT和变体蛋白降解的透明质酸。

[0033] 图3E示出了通过苯基柱分离WT以及变体HM1和HM6的结果。所述变体比WT更快地从苯基柱洗脱。

[0034] 图4示出了在10min和1h后通过酰胺-80柱分析由WT和变体HM6降解的透明质酸的最终产物的结果。

[0035] 图5示出了PH20的G340至I344氨基酸突变的实验结果。

[0036] 图5A示出了变体HM7、HM8、HM9、HM10和HM21在HisTrap柱纯化后的SDS-PAGE结果。

[0037] 图5B示出了在pH 7.0下通过浊度测定测量WT以及变体HM6、HM8、HM9、HM10、HM21和HM7的酶活性的结果。

[0038] 图5C示出了通过底物-凝胶测定测量WT以及变体HM6、HM8、HM9、HM10、HM21和HM7的酶活性的结果。图5C底部处的条形图示出了在用阿辛蓝对凝胶染色后,通过定量条带而获得的酶活性程度。白色条带示出了被WT和变体蛋白降解的透明质酸。

[0039] 图5D示出了通过苯基柱色谱法分析WT以及变体HM8、HM9、HM10、HM21和HM7的结果。

[0040] 图5E示出了通过IEF凝胶在3至7的pH下根据它们的等电点分离WT以及变体HM6、HM8、HM9、HM10、HM21和HM7的结果。

[0041] 图6示出了变体HM11的实验结果。

[0042] 图6A示出了对于变体HM11,通过HisTrap柱色谱法纯化蛋白质的结果。

[0043] 图6B示出了通过浊度测定测量WT和变体HM11在pH 7.0下的酶活性的结果。

[0044] 图7示出了N末端截短的PH20变体HM40、HM13、HM41、HM24、HM42和HM25的实验结果。

[0045] 图7A示出了对于PH20变体HM40、HM13、HM41、HM24、HM42和HM25,通过HisTrap柱色谱法纯化蛋白质的结果。

[0046] 图7B示出了PH20变体HM40、HM13、HM41、HM24、HM42、HM25、HP61和HP62在ExpiCHO细胞中的表达水平。

[0047] 图7C示出了通过浊度测定在pH 7.0下测量的PH20变体HM40、HM13、HM41、HM24、HM42、HM25、HP61和HP62的酶活性,并将其表示为比活性。

[0048] 图7D示出了通过底物-凝胶测定测量的PH20变体HM40、HM13、HM41、HM24和HM42的酶活性。白色条带示出了被WT和变体蛋白降解的透明质酸。

[0049] 图7E示出了通过苯基柱色谱法分析WT以及变体HM40、HM13、HM41、HM24和HM42的结

果。

[0050] 图7F示出了随着温度升高,PH20变体HM40、HM13、HM41和HM42的粒径的变化。

[0051] 图8示出了使用HM6作为模板构建的C末端截短的变体HM14、HM15和HM16的实验结果。

[0052] 图8A示出了变体HM14、HM15和HM16在HisTrap纯化后的SDS-PAGE结果。作为对照,包括了WT和变体HM6。

[0053] 图8B示出了通过浊度测定测量WT以及变体HM6、HM14、HM15和HM16在pH 7.0下的酶活性的结果。

[0054] 图8C示出了通过底物-凝胶测定测量WT以及变体HM6、HM14、HM15和HM16持续1、2和4h的酶活性的结果。图8C的右图是条形图,其示出了在酶促反应1h后用阿辛蓝染色后测量的酶活性。白色条带示出了被WT和变体蛋白降解的透明质酸。

[0055] 图8D示出了通过苯基柱色谱法分析WT以及变体HM6、HM14、HM15和HM16的结果。

[0056] 图8E示出了通过IEF凝胶在3至7的pH下根据它们的等电点分离变体HM14、HM15和HM16的结果。

[0057] 图9示出了使用HM10作为模板构建的PH20变体HM19和HM20的实验结果。

[0058] 图9A示出了对于PH20变体HM19和HM20,通过HisTrap柱色谱法纯化蛋白质的结果。

[0059] 图9B示出了通过浊度测定比较PH20变体HM19和HM20在pH 7.0下的酶活性的结果。

[0060] 图9C示出了对于WT以及变体HM10、HM19和HM20,通过底物-凝胶测定在37℃下酶促反应1h后用阿辛蓝染料对SDS凝胶进行染色的结果。白色条带示出了被WT和变体蛋白降解的透明质酸。

[0061] 图10示出了通过动态光散射(以下称为DLS)系统测量WT和PH20变体的聚集温度的结果。测量一式三份地进行,并将其表示为平均值±S.E.值。

[0062] 图11示出了在通过添加丙烯酰胺(0至0.5M)测量WT和PH20变体的色氨酸残基的荧光变化之后获得的Stern-Volmer图。在氨基酸中,色氨酸在295nm处激发,并在340nm处发射最大荧光。丙烯酰胺是一种小分子,其可以穿透蛋白质结构并猝灭色氨酸的荧光发射。由于蛋白质结构更具柔韧性,因此丙烯酰胺对荧光的猝灭作用更大。F0是在不存在丙烯酰胺的情况下的荧光值,而F是在存在丙烯酰胺(0至0.5M)的情况下的荧光值。测得的荧光值的变化表示为比率F0/F。

[0063] 图11A是WT以及变体HM1、HM4、HM6和HM7的Stern-Volmer图。

[0064] 图11B是WT以及变体HM14、HM15和HM16的Stern-Volmer图。

[0065] 图12示出了基于HM10的PH20变体在ExpiCHO细胞中的表达水平。

[0066] 图12A以图形示出了各个变体的表达水平。

[0067] 图12B示出了表中各个变体的表达水平。WT和PH20变体在C末端处具有6xHis标签,并且HisTrap柱纯化后的蛋白质表达水平以mg/L表示。HM30至HM33变体未在ExpiCHO细胞中表达。

[0068] 图13示出了变体HM29、HM30、HM31、HM32和HM33的细胞培养的蛋白质印迹结果。基于HM10的变体HM29、HM30、HM31、HM32和HM33的C末端分别在A467、C464、D461、C358或C455后被切割。C末端切割的HM29在ExpiCHO细胞中表达,但具有在C464处被切割的C末端或长度更短的变体未在ExpiCHO细胞中表达。一抗是以1:500稀释的兔抗PH20多克隆抗体(Abcam)。二

抗是以1:2,000稀释的山羊抗兔IgG HRP。

[0069] 图14示出了使用HM10作为模板构建的C末端截短的变体的实验结果。

[0070] 图14A示出了通过浊度测定测量使用HM10作为模板构建的C末端切割变体在pH 7.0下的酶活性的结果。

[0071] 图14B比较了使用HM10作为模板构建的17种PH20变体(HM43、HM44、HM45、HM20、HM19、HM35、HM36、HM37、HM38、HM39、HM47、HM48、HM49、HM50、HM51、HM52和HM10)的取决于C末端切割位点的酶活性。

[0072] 图14C示出了对于使用HM10作为模板构建的PH20变体中的一些(HM29、HM35、HM36、HM37、HM38、HM39、HM43、HM44和HM45),通过底物-凝胶测定在37℃下酶促反应1h后用阿辛蓝染料对SDS凝胶进行染色的结果。白色条带示出了被WT和变体蛋白降解的透明质酸。

[0073] 图15示出了在ExpiCHO细胞中表达的HP34(图15A)和HP46(图15B)的蛋白质纯化过程中经过最终柱后的SDS凝胶。HP34经受由Q Sepharose、Butyl HP、肝素和Blue Sepharose柱组成的四步色谱法纯化程序,并且SDS凝胶是在Blue Sepharose柱色谱法后获得的结果。HP46经受由Q Sepharose、Butyl HP和肝素柱组成的三步色谱法纯化程序,并且SDS凝胶是在肝素柱色谱法后获得的结果。

[0074] 图16示出了使用HM21作为模板构建的无6xHis标签的PH20变体HP34和HP46的酶活性。

[0075] 图16A示出了通过浊度测定测量WT以及变体HM21、HP34和HP46在pH7.0下的酶活性的结果。

[0076] 图16B示出了通过Morgan-Elson测定(K_m:Michaelis-Menten常数,k_{cat}:转换数,和k_{cat}/K_m:催化效率)测量WT(HW2)以及变体HM21、HP34和HP46在pH 5.3下的酶活性的结果。

[0077] 图17示出了基于HM21的PH20变体的表征结果。

[0078] 图17A示出了通过DLS测量使用HM21作为模板构建的无6xHis标签PH20变体HP34和HP46的聚集温度的结果。作为对照,示出了HW2和HM21的聚集温度。

[0079] 图17B示出了对于HW2和变体PH20(HP20、HP34和HP46),通过底物-凝胶测定测量1h酶活性的结果。

[0080] 图17C示出了在将变体(HW2和HP46)样品在pH 3.0和pH 7.0下静置14h之后进行底物-凝胶测定的结果。在SDS-PAGE后,用2.5% Triton X-100(w/v)去除SDS,并在37℃下进行酶促反应1h。

[0081] 图17D示出了PH20变体HM21、HM53、HM54、HM55、HM56、HP59和HP60在ExpiCHO细胞中的表达水平。

[0082] 图17E示出了通过浊度测定测量的PH20变体HM21、HM53、HM54、HM55、HM56,HP59和HP60在pH 5.3下的酶活性值作为比活性的表示。

[0083] 图18示出了测量分别用浓度为1.5ng/mL和15ng/mL的PH20和PH20变体处理时CD4+T细胞的刺激指数的结果。

[0084] 图19示出了测量分别用浓度为1.5ng/mL和15ng/mL的PH20和PH20变体处理时CD8+T细胞的刺激指数的结果。

具体实施方式

[0085] 除非另有定义,否则本文中使用的所有技术和科学术语都具有与本发明所属领域的普通技术人员通常所理解的含义相同的含义。通常,本文所使用的命名法和下文将描述的实验方法是本领域熟知的并且是经常使用的那些。

[0086] 本发明提供了透明质酸酶PH20变体或其片段,所述透明质酸酶PH20变体或其片段在对应于野生型PH20、优选成熟野生型PH20的氨基酸序列中的α螺旋区域和/或其接头区域、优选α螺旋8区域(S347至C381)和/或α螺旋7与α螺旋8之间的接头区域(A333至R346)的区域中包含一个或多个氨基酸残基取代,并且在所述透明质酸酶PH20变体或其片段中,选择性地切割或缺失N末端或C末端氨基酸残基中的一个或多个。

[0087] 在本发明中,每个变体中氨基酸残基的位置对应于具有SEQ ID NO:1的序列的野生型PH20的氨基酸位置。

[0088] 此外,在本发明中,“成熟野生型PH20”意指在具有SEQ ID NO:1的序列的野生型PH20的氨基酸序列中由SEQ ID NO:1的氨基酸残基L36至S490组成的蛋白质,所述蛋白质缺少形成信号肽的M1至T35和与PH20的基本酶功能无关的A491至L509。

[0089] 表1.野生型PH20的氨基酸序列(SEQ ID NO:1)

[0090]

MGVLKFKHIFFRSFVKSSGVSQIVFTFLLIPCCLTLNFRAPPVIPNVPFLWAWNAPSE FCLGKFDEPLDMSLFSFIGSPRINATGQGVTIFYVDRLGYYPYIDSITGVTVNGGIPQ KISLQDHLDKAKKDITFYMPVDNLGMAVIDWEEWRPTWARNWKPKDVYKNRSIE LVQQQNVQLSLTEATEKAKQEFEKAGKDFLVETIKLGKLLRPNHLWGYYLFPDCY NHHYKKPGYNGSCFNVEIKRNDDLSWLWNESTALYPSIYLNTQQSPVAATLYVRN RVREAIRVSKIPDAKSPLPVFAYTRIVFTDQVLKFLSQDELVYTFGETVALGASGIVI WGTLSIMRSMKSCLLLDNYMETILNPYIINVTLAAKMCSQVLCQEQGVCIRKNWN SSDYLHLNPDNFAIQLEKGGKFTVRGKPTLEDLEQFSEKFYCSCYSTLSCKEKADV KDTDAVDVCIADGVCIDAFLKPPMETEEPQIFYNASPSTLSATMFIVSILFLIISSVAS L

[0091] 特别地,根据本发明的PH20变体或其片段可以在具有SEQ ID NO:1的氨基酸序列的野生型PH20中包含一个或多个突变,优选选自T341A、T341C、T341G、S343E、M345T、K349E、L353A、L354I、N356E和I361T,更优选选自T341A、T341C、L354I和N356E的氨基酸残基取代。

[0092] 在本发明中,术语“PH20变体”旨在包括野生型PH20的氨基酸序列中一个或多个氨基酸残基的突变、优选一个或多个氨基酸残基的取代、以及N末端或C末端处一个或多个氨基酸残基的缺失和所述氨基酸残基的取代的发生;并且用作与“PH20变体或其片段”的表示基本上相同的含义。

[0093] 在本发明中,通过基于作为人透明质酸酶(其蛋白质三级结构已知)的Hyal1(SEQ ID NO:2)的对人PH20的蛋白结构建模,研究了位于活性位点外的PH20的蛋白质三级结构。作为结果,选择位于PH20的α螺旋8区域中的氨基酸,并将其用Hyal1的α螺旋8的氨基酸序列取代,从而试图在不影响所述酶的催化活性的情况下增强蛋白质结构的热稳定性。特别地,因为α螺旋8位于PH20的蛋白质三级结构的外部,所以与相邻α螺旋或β链的相互作用比PH20的其他α螺旋更小。根据本发明,已发现,当人PH20的α螺旋8区域和α螺旋7与α螺旋8之间的接头区域的氨基酸序列被高亲水性Hyal1的α螺旋8区域和Hyal1的α螺旋7与α螺旋8之间的接头区域的氨基酸序列部分地取代时,在中性pH下的酶活性和蛋白质聚集温度($T_{agg.}$)增加。基于这些实验结果,已发现可以提供新型PH20变体或其片段,所述新型PH20变体或其片

段与野生型PH20相比具有增加的酶活性和热稳定性。

[0094] 因此,根据本发明的PH20变体在野生型PH20(具有SEQ ID NO:1的氨基酸序列)、优选成熟野生型PH20(具有由SEQ ID NO:1的氨基酸序列中的氨基酸残基L36至S490组成的序列)的氨基酸序列中包含选自T341A、T341C、T341G、S343E、M345T、K349E、L353A、L354I、N356E和I361T,优选选自T341A、T341C、L354I和N356E的一个或多个氨基酸残基取代。

[0095] 根据本发明的PH20变体还在对应于具有SEQ ID NO:1的氨基酸序列的野生型PH20中的α螺旋区域和/或其接头区域,优选α螺旋8区域(S347至C381)和/或α螺旋7与α螺旋8之间的接头区域(A333至R346),更优选T341至N363、T341至I361、L342至I361、S343至I361、I344至I361、M345至I361或M345至N363的区域中包含一个或多个氨基酸残基取代。

[0096] 特别地,在根据本发明的PH20变体中,野生型PH20、优选成熟野生型PH20的α螺旋8区域(S347至C381)和/或α螺旋7与α螺旋8之间的接头区域(A333至R346)可以被具有SEQ ID NO:2的序列的Hyal1的相应区域(参见表2和表3)的一个或多个氨基酸残基取代,但不限于此。

[0097] 表2.野生型Hyal1的氨基酸序列(SEQ ID NO:2)

[0098]

MAAHLLPICALFLTLLDMAQGFRGPLLPNRPFTTVWNANTQWCLERHGVDVDVSV FDVVANPGQTFRGPDMTIFYSSQLGTYPYYTPTGEPVFGGLPQNASLIAHLARTFQDI LAAIPAPDFSGLAVIDWEAWRPRWAFNWDTKDIYRQRSRALVQAQHPDWPAPQVE AVAQDQFQGAARAWMAGTLQLGRALRPRGLWGFYGFPDCYNYDFLSPNYTGQCP SGIRAQNDQLGWLWGQSRALYPSIYMPAVLEGTGKSQMYVQHRVAEAFRVAVAA GDPNLPVLPYVQIFYDTTNHFLPLDELEHSLGESAAQGAAGVVLWVSWENTRTKES CQAIKEYMDTTLGPFILNVTSGALLCSQALCSGHGRCVRRTSHPKALLLLNPASFSIQ LTPGGGPLSLRGALSLEDQAQMAVEFKCRCYPGWQAPWCERKSMW

[0099] 表3.PH20与Hyal1之间的α螺旋和氨基酸序列比较

[0100]

[0101]

α螺旋	PH20的氨基酸序列	Hyal1的氨基酸序列
α螺旋1	P56-D65	N39-G48
α螺旋3	S119-M135	S101-I117
α螺旋4'	K161-N176	K144-H159
α螺旋4	S180-R211	P163-R194
α螺旋5	F239-S256	P222-S239
α螺旋6	A274-D293	K257-G277
α螺旋7	S317-G332	P299-G314
α螺旋8	S347-C381	T329-C363

[0102] 更特别地,根据本发明的新型PH20变体或其片段优选地包含野生型PH20、优选成熟野生型PH20的氨基酸序列中的L354I和/或N356E的氨基酸残基取代,

[0103] 并且还至少包含在选自T341至N363的一个或多个位置处,特别是选自T341、L342、S343、I344、M345、S347、M348、K349、L352、L353、D355、E359、I361和N363的一个或多个位置处的氨基酸残基取代,但不限于此。

[0104] 更优选地,在选自T341、L342、S343、I344、M345、S347、M348、K349、L352、L353、

D355、E359、I361和N363的一个或多个位置处的氨基酸残基取代可以是选自T341A、T341C、T341D、T341G、T341S、L342W、S343E、I344N、M345T、S347T、M348K、K349E、L352Q、L353A、D355K、E359D、I361T和N363G的一个或多个氨基酸残基取代,但不限于此。

[0105] 优选地,根据本发明的新型PH20变体或其片段可以包含选自M345T、S347T、M348K、K349E、L352Q、L353A、L354I、D355K、N356E、E359D和I361T的一个或多个氨基酸残基取代,

[0106] 并且还可以包含选自T341A、T341C、T341D、T341G、T341S、L342W、S343E、I344N和N363G的一个或多个氨基酸残基取代,但不限于此。

[0107] 更优选地,根据本发明的新型PH20变体或其片段可以包含选自以下氨基酸残基取代组的任何一个氨基酸残基取代,但不限于此:

[0108] (a)T341S、L342W、S343E、I344N、M345T、S347T、M348K、K349E、L352Q、L353A、L354I、D355K、N356E、E359D和I361T;

[0109] (b)L342W、S343E、I344N、M345T、S347T、M348K、K349E、L352Q、L353A、L354I、D355K、N356E、E359D和I361T;

[0110] (c)M345T、S347T、M348K、K349E、L352Q、L353A、L354I、D355K、N356E、E359D、I361T和N363G;

[0111] (d)T341G、L342W、S343E、I344N、M345T、S347T、M348K、K349E、L352Q、L353A、L354I、D355K、N356E、E359D和I361T;

[0112] (e)T341A、L342W、S343E、I344N、M345T、S347T、M348K、K349E、L352Q、L353A、L354I、D355K、N356E、E359D和I361T;

[0113] (f)T341C、L342W、S343E、I344N、M345T、S347T、M348K、K349E、L352Q、L353A、L354I、D355K、N356E、E359D和I361T;

[0114] (g)T341D、L342W、S343E、I344N、M345T、S347T、M348K、K349E、L352Q、L353A、L354I、D355K、N356E、E359D和I361T;

[0115] (h)I344N、M345T、S347T、M348K、K349E、L352Q、L353A、L354I、D355K、N356E、E359D和I361T;以及

[0116] (i)S343E、I344N、M345T、S347T、M348K、K349E、L352Q、L353A、L354I、D355K、N356E、E359D和I361T。

[0117] 在本发明中,由单字母氨基酸残基代码和数字一起描述的表示(如“S347”)意指在SEQ ID NO:1的氨基酸序列中各位置处的氨基酸残基。

[0118] 例如,“S347”意指SEQ ID NO:1的氨基酸序列中位置347处的氨基酸残基是丝氨酸。

[0119] 此外,“S347T”意指SEQ ID NO:1的位置347处的丝氨酸被苏氨酸取代。

[0120] 根据本发明的PH20变体被解释为包括其变体或片段,其中在特定氨基酸残基位置处的氨基酸残基被保守地取代。

[0121] 如本文所用,术语“保守取代”是指对PH20变体的修饰,其涉及将一个或多个氨基酸取代为具有相似生化特性的氨基酸,所述氨基酸不会导致PH20变体的生物学或生物化学功能的丧失。

[0122] “保守氨基酸取代”是其中用具有相似侧链的氨基酸残基替代氨基酸残基的取代。具有相似侧链的氨基酸残基的家族已被定义,并且在本发明所属领域中是熟知的。这些家

族包括具有碱性侧链的氨基酸(例如,赖氨酸、精氨酸和组氨酸)、具有酸性侧链的氨基酸(例如,天冬氨酸和谷氨酸)、具有不带电荷的极性侧链的氨基酸(例如,甘氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺、丝氨酸、苏氨酸、酪氨酸和半胱氨酸)、具有非极性侧链的氨基酸(例如,丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、脯氨酸、苯丙氨酸、甲硫氨酸和色氨酸)、具有β分支侧链的氨基酸(例如,苏氨酸、缬氨酸和异亮氨酸)、以及具有芳香族侧链的氨基酸(例如,酪氨酸、苯丙氨酸、色氨酸和组氨酸)。

[0123] 可以预见,尽管本发明的PH20变体或其片段具有保守氨基酸取代,但仍可以保持活性。

[0124] 此外,根据本发明的PH20变体或其片段被解释为包括与根据本发明的PH20变体或其片段具有基本上相同的功能和/或效果,并且与根据本发明的PH20变体或其片段具有至少80%或85%、优选至少90%、更优选至少95%、最优选至少99%的氨基酸序列同源性的PH20变体或其片段。

[0125] 与成熟野生型PH20相比,根据本发明的PH20变体具有增加的表达水平和蛋白质重折叠速率,从而增加高热稳定性。此外,尽管热稳定性增加,但PH20变体的酶活性比成熟野生型PH20的酶活性增加更多或相似。

[0126] 同时,即使具有C末端缺失的成熟野生型PH20变体显示出酶活性的降低,但基于本发明,C末端缺失的PH20变体由于更快的蛋白质重折叠和热稳定性而显示出相似或增加的酶活性。此外,当N末端氨基酸缺失多达五个氨基酸残基时,本发明中的PH20变体保持酶活性。这指示对于蛋白质表达和酶活性,N末端的P41是重要的。

[0127] 因此,根据本发明的PH20变体或其片段的特征在于,所述PH20变体或其片段在野生型PH20的氨基酸序列中的α螺旋8区域(S347至C381)和/或α螺旋7与α螺旋8之间的接头区域(A333至R346)中包含一个或多个氨基酸残基取代,并且另外缺失N末端和/或C末端氨基酸残基中的一个或多个,但不限于此。

[0128] 在一方面,根据本发明的PH20变体或其片段可以是这样一种变体或其片段,其中切割发生在选自SEQ ID NO:1的氨基酸序列的M1至P42的氨基酸残基之前,优选发生在N末端处的氨基酸残基L36、N37、F38、R39、A40、P41或P42之前,使得缺失N末端处的一个或多个氨基酸残基,和/或切割发生在C末端处选自V455至L509的氨基酸残基之后,优选在选自V455至S490的氨基酸残基之后,最优选在氨基酸残基V455、C458、D461、C464、I465、D466、A467、F468、K470、P471、P472、M473、E474、T475、E476、P478、I480、Y482、A484、P486、T488或S490之后,使得缺失C末端处的一个或多个氨基酸残基。

[0129] “切割发生在N末端处选自M1至P42的氨基酸残基之前”的表示意指切割并缺失紧接在N末端处选自M1至P42的氨基酸残基之前的氨基酸残基。

[0130] 例如,“切割发生在氨基酸残基L36、N37、F38、R39、A40、P41或P42之前”的表示分别意指切割并去除SEQ ID NO:1的氨基酸序列中紧接在L36之前从M1至T35的所有氨基酸残基、紧接在N37之前从M1至L36的所有氨基酸残基、紧接在F38之前从M1至N37的所有氨基酸残基、紧接在R39之前从M1至F38的所有氨基酸残基、紧接在A40之前从M1至R39的所有氨基酸残基、紧接在P41之前从M1至A40的所有氨基酸残基、或紧接在P42之前从M1至P41的所有氨基酸残基分别。

[0131] 此外,“切割发生在C末端处选自V455至L509的氨基酸残基之后”的表示意指切割

并缺失紧接在C末端处选自V455至L509的氨基酸残基之后的氨基酸残基。

[0132] 例如,“切割发生在C末端处氨基酸残基V455、C458、D461、C464、I465、D466、A467、F468、K470、P471、P472、M473、E474、T475、E476、P478、I480、Y482、A484、P486、T488或S490之后”的表示意指切割并去除SEQ ID NO:1的氨基酸序列中在氨基酸残基V455、C458、D461、C464、I465、D466、A467、F468、K470、P471、P472、M473、E474、T475、E476、P478、I480、Y482、A484、P486、T488或S490之后的氨基酸残基。

[0133] 优选地,根据本发明的新型PH20变体或其片段可以选自SEQ ID NO:60至115的氨基酸序列,但不限于此。

[0134] 最优选地,根据本发明的新型PH20变体或其片段可以具有SEQ ID NO:99的氨基酸序列。具有SEQ ID NO:99的氨基酸序列的新型PH20变体或其片段可以包含T341S、L342W、S343E、I344N、M345T、S347T、M348K、K349E、L352Q、L353A、L354I、D355K、N356E、E359D和I361T的15个氨基酸取代,以及N末端处F38之前的缺失和C末端处F468之后的截短。

[0135] 在根据本发明的特定实施方案中构建的PH20变体中被取代或切割的氨基酸的序列如表11所示。

[0136] 如本发明所公开的,先前没有报道过专注于通过α螺旋及其接头区域的氨基酸取代来增加PH20的酶活性和热稳定性的研究,所述α螺旋及其接头区域是形成蛋白质三级结构的二级结构。先前的研究报道,野生型PH20的酶活性根据位于C末端区域处的氨基酸残基的切割位置而变化。然而,在本发明中,形成PH20二级结构的特定α螺旋被其他人透明质酸酶的α螺旋取代,从而构建了比野生型PH20具有更高稳定性的PH20变体。这些变体可以是这样的变体,其中取代的α螺旋结构域与形成其他PH20二级结构的部分的相互作用显示出与野生型PH20的图案不同的图案,这指示无论C末端切割位置如何,所述变体都具有一致的酶活性。

[0137] 在特定实施方案中,与成熟野生型PH20相比,具有增加的酶活性和热稳定性的根据本发明的新型PH20变体或其片段可以是包含选自以下的一个或多个氨基酸残基取代的变体或其片段:T341A、T341C、T341G、S343E、M345T、K349E、L353A、L354I、N356E和I361T,并且其中位于野生型PH20、优选成熟野生型PH20的氨基酸序列中的α螺旋8区域(S347至C381)和/或α螺旋7与α螺旋8之间的接头区域(A333至R346)中的一个或多个氨基酸被其他氨基酸取代。

[0138] 特别地,α螺旋7与α螺旋8之间的接头区域中的氨基酸取代包括由氨基酸残基T341至N363、T341至I361、L342至I361、L342至I361、S343至I361、I344至I361、M345至I361或M345至N363组成的区域中的一个或多个氨基酸残基的取代。

[0139] 为了检查C末端截短在其中α螺旋8和α螺旋7与α螺旋8之间的接头区域被取代的PH20变体中的影响,选择三种PH20变体(HM6、HM10和HM21)作为模板。

[0140] HM6是这样的变体,其中M345至N363区域中的氨基酸被Hya11的氨基酸序列取代(SEQ ID NO:1中的M345T、S347T、M348K、K349E、L352Q、L353A、L354I、D355K、N356E、E359D和I361T被取代)。此外,HM6是这样的变体,其中α螺旋8和α螺旋7与α螺旋8之间的接头区域的取代是根据本发明的PH20变体中最少取代的变体,其不包含另外的C末端切割(即,其中C末端氨基酸残基为S490的形式,像成熟野生型PH20)。

[0141] HM10是这样的变体,其中L342至I361区域中的氨基酸被Hya11的氨基酸序列取代

(SEQ ID NO:1中的L342W、S343E、I344N、M345T、S347T、M348K、K349E、L352Q、L353A、L354I、D355K、N356E、E359D和I361T被取代),并且在不包含另外的C末端截短的根据本发明的PH20变体中,所述HM10具有最高的热稳定性,同时具有与成熟野生型PH20的酶活性相似的酶活性。

[0142] HM21是这样的变体,其中T341至I361区域中的氨基酸被Hyal1的氨基酸序列取代(SEQ ID NO:1中的T341S、L342W、S343E、I344N、M345T、S347T、M348K、K349E、L352Q、L353A、L354I、D355K、N356E、E359D和I361T被取代),并且在不包含另外的C末端截短的根据本发明的PH20变体中,所述HM21在pH 7.0下具有比野生型PH20的酶活性高约两倍的酶活性。

[0143] 如下表4所示,在本发明中构建的基于HM6的PH20变体具有从L36处开始的N末端和在I465、F468或P471处终止的C末端。

[0144] 表4.使用HM6作为模板构建的C末端氨基酸截短的PH20变体

[0145]

变体	总长度	取代的区域	取代的氨基酸的数量	截短的氨基酸的数量
HM6	36-490	M345-I361	11	0
HM14	36-465		11	25
HM15	36-468		11	22
HM16	36-471		11	19

[0146] 如下表5所示,基于HM10的PH20变体通常具有在F38残基之前切割的N末端,和在V455、C458、D461、C464、I465、D466、A467、F468、K470、P472、M473、E474、T475、E476、P478、I480、Y482、A484、P486或T488残基之后切割的C末端。

[0147] 表5.使用HM10作为模板构建的C末端氨基酸截短的PH20变体

[0148]

变体	总长度	取代的区域	取代的氨基酸的数量	截短的氨基酸的数量
HM10	36-490	L342-I361	14	0
HM52	38-488		14	4
HM51	38-486		14	6
HM50	38-484		14	8
HM49	38-482		14	10
HM48	38-480		14	12
HM47	38-478		14	14
HM39	38-476		14	16
HM38	38-475		14	17
HM37	38-474		14	18
HM36	38-473		14	19
HM35	38-472		14	20
HM19	38-470		14	22
HM20	38-468		14	24
HM45	38-467		14	25
HM29	36-467		14	23
HM44	38-466		14	26
HM43	38-465		14	27
HM30	36-464		14	26
HM31	36-461		14	29
HM32	36-458		14	32
HM33	36-455		14	35

[0149]

HP19	38-470		14	22
HP20	38-468		14	24

[0150] 如在对应于作为模板的HM10的α螺旋8区域和α螺旋7与α螺旋8之间的接头区域的L342至I361区域中包含氨基酸取代,并且其中N末端在F38残基之前被切割,并且C末端在I465、D466、A467、F468、K470、P472、M473、E474、T475、E476、P478、I480、Y482、A484、P486或T488处被切割的变体的例子所示,无论C末端切割位置如何,根据本发明的PH20变体展现出与成熟野生型PH20相似的酶活性。

[0151] 如下表6所示,两种基于HM21的PH20变体通常具有在F38残基之前被切割的N末端和在F468或K470残基之后被切割的C末端。

[0152] 表6.使用HM21作为模板构建的C末端氨基酸截短的PH20变体

[0153]

变体	总长度	取代的区域	取代的氨基酸的数量	截短的氨基酸的数量
HM21	38-490	T341-I361	15	2
HP34	38-470		15	22
HP46	38-468		15	24

[0154] 使用HM21作为模板构建变体,所述HM21具有比成熟野生型PH20的酶活性高约两倍的酶活性。这些变体是如下变体,其在对应于α螺旋8区域和α螺旋7与α螺旋8之间的接头区

域的T341至I361区域中包含氨基酸取代,并且在所述变体中N末端在F38残基之前被切割,且C末端在F468或K470之后被切割。令人惊讶的是,无论C末端切割位置如何,这些变体都保持了HM21的高酶活性。

[0155] 在由Frost等人进行的研究中,当PH20的长度由于在477氨基酸位置之前切割而变短时,所述酶活性降低至具有在位置477之后被切割的C末端的变体的约10%。然而,在本发明中,当PH20的α螺旋8及其接头区域中的一个或多个氨基酸被取代时,无论C末端切割位置如何,酶活性由于蛋白质稳定性的提高而被保持。此结果非常重要,因为它解决了野生型PH20的酶活性由于野生型PH20的C末端截短而降低的问题。

[0156] 此外,在本发明中,研究了PH20的N末端氨基酸的作用,这是先前未知的。

[0157] 为了检查N末端切割位点在HM6变体中的影响,在所述HM6变体中对应于野生型PH20的α螺旋8区域和α螺旋7与α螺旋8之间的接头区域的区域(M345至I361)中的一个或多个氨基酸残基被Hya11的相应α螺旋8区域和α螺旋7与α螺旋8之间的接头区域的氨基酸残基取代(被SEQ ID NO:1中的M345T、S347T、M348K、K349E、L352Q、L353A、L354I、D355K、N356E、E359D或I361T取代并且不包含另外的C末端切割),使用HM6作为模板构建了如下变体,其中SEQ ID NO:1中的氨基酸残基L36至V47被FRGPLLPNR取代或者SEQ ID NO:1中的氨基酸残基L36至A52被FRGPLLPNRPFTTV取代。此外,使用HM6作为模板,构建了变体HM40、HM13、HM41、HM24、HM42和HM25,其中SEQ ID NO:1的氨基酸序列中的N末端在N37、F38、R39、A40、P41或P42残基之前被切割(参见表7)。

[0158] 表7.基于HM6的N末端氨基酸切割的变体

[0159]

变体	总长度	取代的区域	取代的氨基酸的数量	截短的氨基酸的数量
HM6	36-490	M345-I361	11	0
HM40	37-490		11	1
HM13	38-490		11	2
HM41	39-490		11	3
HM24	40-490		11	4
HM42	41-490		11	5
HM25	42-490		11	6
HM17		L36-V47、M345-I361	23	
HM18		L36-A52、M345-I361	28	

[0160] 作为结果,显示出当HM6的N末端在N37、F38、R39、A40或P41残基之前被切割时,酶活性没有受到很大影响;然而,当所述N末端在P42残基之前被切割时,酶活性显著降低,这指示PH20中位于P41之后的N末端区域对于蛋白质表达和酶活性是重要的。此外,当HM6的N末端L36至V47或L36至A52区域中的一个或多个氨基酸被Hya11的氨基酸取代时,变体蛋白质未在ExpiCHO细胞中表达,这指示所述N末端区域对于蛋白质表达是重要的。

[0161] 此外,在本发明中,尝试通过使用其他蛋白质的信号肽代替使用PH20的原始信号肽来增加重组PH20蛋白在动物细胞中的表达。

[0162] 因此,在另一方面,根据本发明的新型PH20变体可以是这样的变体,其中N末端还

包含如下表8所示的具有SEQ ID NO:3的氨基酸序列MATGSRTSLLLAFGLLCLPWLQEGSA的人生长激素信号肽、具有SEQ IDNO:4的氨基酸序列MKWVTFISLLFLFSSAYS的人血清白蛋白信号肽、或具有SEQ ID NO:5的氨基酸序列MAAHLLPICALFLTLLDMAQG的人Hyal1信号肽,代替由M1至T35组成的野生型PH20的信号肽,但不限于此。

[0163] “代替由M1至T35组成的野生型PH20信号肽”的表示意指其中野生型PH20的信号肽部分或完全缺失的情况;因此它不执行其功能。此外,所述表示意在包括其中N末端的一部分进一步缺失的情况,例如,其中切割发生在N37、F38、R39、A40、P41或P42残基发生之前,使得N末端的另外缺失与野生型PH20的信号肽的缺失一起发生的情况。

[0164] 表8.人生长激素、人血清白蛋白或人Hyal1的信号肽的氨基酸序列

[0165]

	氨基酸序列	SEQ NO.
人生长激素	MATGSRTSLLLAFGLLCLPWLQEGSA	3
人血清白蛋白	MKWVTFISLLFLFSSAYS	4
人Hyal1	MAAHLLPICALFLTLLDMAQG	5

[0166] 在另一方面,本发明提供了包含根据本发明的新型PH20变体的用于治疗癌症的组合物,以及使用所述组合物治疗癌症的方法。

[0167] 可以通过根据本发明的新型PH20变体治疗的癌症或癌没有特别限制,但包括实体癌和血液癌两者。所述癌症可以选自肝癌、肝细胞癌、胃癌、乳腺癌、肺癌、卵巢癌、支气管癌、鼻咽癌、喉癌、胰腺癌、膀胱癌、结直肠癌、结肠癌、子宫颈癌、脑癌、前列腺癌、骨癌、甲状腺癌、甲状旁腺癌、肾癌、食道癌、胆道癌、睾丸癌、直肠癌、头颈癌、输尿管癌、骨肉瘤、神经细胞瘤、纤维肉瘤、横纹肌肉瘤、星形细胞瘤、神经母细胞瘤和神经胶质瘤,但不限于此。优选地,可以通过根据本发明的组合物治疗的癌症可以选自结直肠癌、乳腺癌、肺癌和肾癌,但不限于此。

[0168] 本发明的组合物可以是药物组合物。所述药物组合物还可以包含药学上可接受的组分。通常用于药物配制品的组分可以是选自但不限于乳糖、葡萄糖、蔗糖、山梨醇、甘露醇、淀粉、阿拉伯树胶、磷酸钙、海藻酸盐、明胶、硅酸钙、微晶纤维素、聚乙烯吡咯烷酮、纤维素、水、糖浆、甲基纤维素、羟苯甲酸甲酯、羟苯甲酸丙酯、滑石、硬脂酸镁和矿物油中的一种或多种。此外,所述药物组合物还可以包含选自稀释剂、赋形剂、润滑剂、润湿剂、甜味剂、芳族化合物、乳化剂、悬浮液和防腐剂中的一种或多种。

[0169] 本发明的药物组合物可以口服或肠胃外给予。肠胃外给予是通过静脉内注射、皮下注射、肌内注射、腹膜内注射、内皮给予、局部给予、鼻内给予、肺内给予、直肠给予等来进行。对于口服给予,考虑到肽和蛋白质在胃中被消化,需要将组合物中的活性成分配制成包衣剂型或可以保护活性成分不在胃中崩解的剂型。可替代地,可以通过任何装置给予本发明的组合物,通过所述装置活性成分可以移动到目的靶细胞。

[0170] 所述药物组合物可以配制成在油或水性介质中的溶液、悬浮液、糖浆或乳液的形式,或者配制成提取物、微粒(grain)、栓剂、粉末、颗粒、片剂或胶囊的形式,并且出于配制目的可以另外包括分散剂或稳定剂。

[0171] 特别地,根据本发明的用于治疗癌症的组合物可以用于与其他抗癌药物的联合治疗。

[0172] 可以用于与根据本发明的新型PH20变体联合治疗的抗癌药物优选地是化学抗癌

药物、基于抗体的抗癌药物、生物抗癌药物、RNAi或细胞治疗剂,但不限于此。

[0173] 优选地,可以用于与根据本发明的新型PH20变体联合治疗的抗癌药物优选地是免疫肿瘤剂、更优选免疫检查点抑制剂,但不限于此。

[0174] 在另一方面,本发明涉及编码PH20变体或其片段的核酸。

[0175] 如本文所用的核酸可以存在于细胞中、细胞裂解物中或者以部分纯化或基本上纯的形式存在。当提及核酸时,"分离的"或"基本上纯的"是指已通过标准技术(包括碱性/SDS处理、CsCl显带、柱色谱法、琼脂糖凝胶电泳和本领域熟知的其他技术)从其他细胞组分或其他污染物(例如,其他细胞核酸或蛋白质)纯化出来的那些核酸。本发明的核酸可以是DNA或RNA。

[0176] 在仍另一方面,本发明涉及包含所述核酸的重组表达载体。为了表达根据本发明的PH20变体或其片段,可以通过标准分子生物学技术(例如,使用表达PH20变体的杂交瘤进行的PCR扩增或cDNA克隆)获得编码PH20变体的DNA,并且可以将所述DNA插入表达载体中,使得其与转录和翻译控制序列"可操作地连接"。

[0177] 如本文所用,术语"可操作地连接"旨在意指将编码PH20变体或其片段的基因连接到载体中,使得转录和翻译控制序列发挥其调节编码PH20变体或其片段的基因的转录和翻译的预期功能。选择表达载体和表达控制序列以使其与所使用的表达宿主细胞相容。通过标准方法将编码PH20的基因插入表达载体中(例如,连接编码PH20变体或其片段的基因片段和载体上的互补限制酶位点,或者如果不存在限制酶位点,则进行平端连接)。

[0178] 此外,重组表达载体携带调节序列,所述调节序列控制宿主细胞中编码PH20变体的基因的表达。术语"调节序列"旨在包括控制编码PH20变体或其片段的基因的转录或翻译的启动子、增强子和其他表达控制元件(例如,多聚腺苷酸化信号)。本领域技术人员将理解,表达载体的设计(包括调节序列的选择)可能取决于诸如待转化的宿主细胞的选择、所需的蛋白质表达水平等因素。

[0179] 在又另一方面,本发明涉及包含所述核酸或所述载体的宿主细胞。根据本发明的宿主细胞优选地选自动物细胞、植物细胞、酵母、大肠杆菌(E.coli.)和昆虫细胞,但不限于此。

[0180] 特别地,根据本发明的宿主细胞包括原核细胞,如大肠杆菌、枯草芽孢杆菌(Bacillus subtilis)、链霉菌属(Streptomyces sp.)、假单胞菌属(Pseudomonas sp.)、奇异变形杆菌(Proteus mirabilis)或葡萄球菌属(Staphylococcus sp.);真菌,如曲霉属(Aspergillus sp.)、酵母(如毕赤酵母(Pichia pastoris)、酿酒酵母(Saccharomyces cerevisiae)、裂殖酵母属(Schizosaccharomyces sp))和粗糙脉孢菌(Neurospora crassa);以及真核细胞,如低等真核细胞和高等的其他真核细胞(如昆虫细胞)。

[0181] 此外,可以用于本发明的宿主细胞可以源自植物或哺乳动物。优选地,所述宿主细胞的例子包括但不限于猴肾细胞(COS7)、NSO细胞、SP2/0、中国仓鼠卵巢(CHO)细胞、W138、幼仓鼠肾(BHK)细胞、MDCK、骨髓瘤细胞、HuT 78细胞和HEK293细胞。更优选地,可以使用CHO细胞。

[0182] 将所述核酸或所述载体转染到宿主细胞中。可以使用通常用于将外来核酸(DNA或RNA)引入原核或真核细胞的各种技术(例如电泳、磷酸钙沉淀、DEAE-葡聚糖转染或脂质转染)进行转染。为了表达本发明的PH20变体或其片段,可以采用重组表达载体和宿主细胞的

各种组合。真核细胞的优选表达载体包括源自但不限于SV40、牛乳头瘤病毒、腺病毒、腺相关病毒、巨细胞病毒和逆转录病毒的基因表达调节序列。可以用于细菌宿主的表达载体包括细菌质粒,如从大肠杆菌获得的pET、pRSET、pBluescript、pGEX2T、pUC载体、col E1、pCR1、pBR322、pMB9及其衍生物;具有广泛宿主范围的质粒,如RP4;以各种噬菌体λ衍生物为例的噬菌体DNA,如λgt10、λgt11和NM989;以及其他DNA噬菌体,如M13和丝状单链DNA噬菌体。可用于酵母细胞的表达载体可以是2-μm质粒及其衍生物。昆虫细胞的表达载体包括pVL941。

[0183] 在另一方面,本发明涉及产生PH20变体或其片段的方法,所述方法包括培养宿主细胞和表达根据本发明的PH20变体或其片段的步骤。

[0184] 当将能够表达PH20变体或其片段的重组表达载体引入哺乳动物宿主细胞中时,可以通过以下方法产生PH20变体或其片段:将宿主细胞培养一段时间使得PH20变体或其片段在宿主细胞中进行表达,优选培养一段时间使得PH20变体在宿主细胞培养过程中分泌到培养基中。

[0185] 在一些情况下,可以从宿主细胞分离和纯化表达的PH20变体。PH20变体的分离或纯化可以通过用于蛋白质的常规分离/纯化方法(例如,色谱法)来进行。所述色谱法可以包括选自亲和色谱法、离子交换色谱法和疏水色谱法的一种或多种组合,但不限于此。除了色谱法之外,过滤、超滤、盐析、透析等的组合也可以用于分离和纯化抗体。

[0186] 实施例

[0187] 在下文中,将参考实施例进一步详细地描述本发明。对本领域普通技术人员应显而易见的是,这些实施例仅用于说明目的而不应被解释为限制或改变本发明的范围。

[0188] 实施例1.PH20变体的构建

[0189] 为了构建PH20变体,从韩国人类基因库(Korean Human Gene Bank)购买了野生型PH20的cDNA(克隆ID:hMU002604)。野生型PH20编码从L36至S490的氨基酸。通过聚合酶链式反应(以下称为PCR)扩增PH20基因,并将其插入pcDNA3.4-TOPO载体的XhoI和NotI限制酶位点中。为了在ExpiCHO细胞中表达,将人生长激素、人血清激素或人Hyal1的信号肽用作信号肽,代替PH20的原始信号肽。对于使用HisTrap柱的蛋白质纯化,6xHis标签的DNA序列位于PH20 cDNA的3'端处。使用PCR方法进行PH20变体的氨基酸取代,并通过DNA测序确认氨基酸取代。

[0190] 用于克隆PH20变体的引物的列表总结在下表9中,并且所述引物的特异性序列总结在下表10中。

[0191] 表9.用于克隆PH20变体的引物列表

[0192]

克隆	引物		
	1	2	3

cB4202	ALB-SP-Xho	ALB-PH20-MR	SPAM1-6H-Not
cB4203-HM1	ALB-SP-Xho	PH20_M345-364-F	SPAM1-6H-not
cB4203-HM2	ALB-SP-Xho	PH20_Y365-L380-F	SPAM1-7H-not
cB4203-HM3	ALB-SP-Xho	PH20_M345-L380-F	SPAM1-8H-not
cB4203-HM4	ALB-SP-Xho	B4203-HM4-F	SPAM1-9H-not
cB4203-HM5	ALB-SP-Xho	B4203-HM5-F	SPAM1-10H-not
cB4203-HM6	ALB-SP-Xho	PH20-G363N	SPAM1-6H-not
cB4203-HM7	ALB-SP-Xho	PH20-G363N	SPAM1-12H-not
cB4203-HM8	ALB-SP-Xho	cB4203-HM8-M	SPAM1-13H-not
cB4203-HM9	ALB-SP-Xho	cB4203-HM9-M	SPAM1-14H-not
cB4203-HM10	ALB-SP-Xho	cB4203-HM10-M	SPAM1-6H-Not
cB4203-HM11	ALB-SP-Xho	4203-HM11	SPAM1-16H-not
cB4203-HM12	ALB-SP-Xho	4203-HM12	SPAM1-17H-not
cB4203-HM13	ALB-SP-Xho	SASP-LN-del-R	SPAM1-18H-not
cB4203-HM14	ALB-SP-Xho	-	I465-6H-not
cB4203-HM15	ALB-SP-Xho	-	F468-6H-not
cB4203-HM16	ALB-SP-Xho	-	P471-6H-not
cB4203-HM17	ALB-SP-Xho	PH20-HM17	SPAM1-22H-not
cB4203-HM18	ALB-SP-Xho	PH20-HM18	SPAM1-23H-not
cB4203-HM19	ALB-SP-Xho	SASP-LN-del-R	K470-6H-not
cB4003-HP19	ALB-SP-Xho	K470-not	
[0193] cB4203-HM20	ALB-SP-Xho	SASP-LN-del-R	F468-6H-not
cB4003-HP20	ALB-SP-Xho	F468-not	
cB4203-HM21	ALB-SP-Xho	M21-mega-F	SPAM1-6H-Not
cB4203-HM24	ALB-SP-Xho	M24-R	SPAM1-6H-not
cB4203-HM25	ALB-SP-Xho	M25-R	SPAM1-6H-not
cB4203-HM26	ALB-SP-Xho	B4-HM26	SPAM1-6H-not
cB4203-HM27	ALB-SP-Xho	B4-HM27	SPAM1-6H-not
cB4203-HM28	ALB-SP-Xho	B4-HM28	SPAM1-6H-not
cB4203-HM29	ALB-SP-Xho	B4-HM29	
cB4203-HM30	ALB-SP-Xho	B4-HM30	
cB4203-HM31	ALB-SP-Xho	B4-HM31	
cB4203-HM32	ALB-SP-Xho	B4-HM32	
cB4203-HM33	ALB-SP-Xho	B4-m33	
cB4003-HP34	ALB-SP-Xho	M21-mega-F	K470-not
cB4203-HM35	ALB-SP-Xho	SASP-LN-del-R	P472-6H-not
cB4003-HP35	ALB-SP-Xho	P472-not	
cB4203-HM36	ALB-SP-Xho	SASP-LN-del-R	M473-6H-not
cB4003-HP36	ALB-SP-Xho	M473-not	
cB4203-HM37	ALB-SP-Xho	SASP-LN-del-R	E474-6H-not
cB4003-HP37	ALB-SP-Xho	E474-not	
cB4203-HM38	ALB-SP-Xho	SASP-LN-del-R	T475-6H-not
cB4003-HP38	ALB-SP-Xho	T475-not	

cB4203-HM39	ALB-SP-Xho	SASP-LN-del-R	E476-6H-not
cB4003-HP39	ALB-SP-Xho	SASP-LN-del-R	E476-not
cB4203-HM40	ALB-SP-Xho	M40-mega	SPAM1-6H-Not
cB4203-HM41	ALB-SP-Xho	M41-mega	SPAM1-6H-Not
cB4203-HM42	ALB-SP-Xho	m42-mega	SPAM1-6H-not
cB4203-HM43	ALB-SP-Xho	I465-6H-not	
cB4203-HM44	ALB-SP-Xho	D466-6H-not	
cB4203-HM45	ALB-SP-Xho	B4-HM29	
cB4003-HP46	ALB-SP-Xho	F468-Not	
cB4203-HM47	ALB-SP-Xho	P478-H-Not	
cB4203-HM48	ALB-SP-Xho	I480-H-Not	
cB4203-HM49	ALB-SP-Xho	Y482-H-Not	
cB4203-HM50	ALB-SP-Xho	A484-H-not	
cB4203-HM51	ALB-SP-Xho	P486-H-not	
cB4203-HM52	ALB-SP-Xho	SASP-LN-del-R	T488-H-not

[0194]

[0195] 表10.用于克隆PH20变体的引物序列

引物	SEQ NO.	核苷酸序列（5'-> 3'）
ALB-SP-Xho	6	GAA TAT CTC GAG GCC ACC ATG AAG TGG GTT ACA
SPAM1-6H-Not	7	CTA ATT GCG GCC GCT CAT TAG TGG TGA TGG TGA TGA TGG AAG AAA CCA ATT CTG C
ALB-PH20-MR	8	TAA CAG GAG GTG CTC TGA AAT TCA GAG AGT AAG CAG AGG AG
PH20_M345-P364-F	9	ATG GGG AAC CCT CAG TAT AAC AAG AAC CAA GGA ATC ATG TCA GGC CAT CAA GGA GTA TAT GGA CAC TAC ACT GGG GCC CTA CAT AAT CAA CGT CAC AC
PH20_Y365-L380-F	10	ATG GAG ACT ATA CTG AAT CCT TTC ATC CTG AAC GTG ACC AGT GGG GCC CTT CTC TGC AGT CAA GCC CTG TGC CAG GAG CAA GGA GTG TG
PH20_M345-L380-F*	11	ATG GAC ACT ACA CTG GGG CCC TTC ATC CTG AAC GTG ACC AGT GGG GCC CTT CTC TGC AGT CAA GCC CTG TGC CAG GAG CAA GGA GTG TG
B4203-HM4-F	12	ACT GTT GCT CTG GGT GCT TCT GGA ATT GTA ATA TGG GTA AGC TGG GAA AAT ACA AGA ACC AAG GAA TCA TGT CA
B4203-HM5-F	13	AGC AAG GAG TGT GTA TAA GGA AAA CCA GCC ACC CAA AAG ACT ATC TTC ACC TCA ACC CAG A
PH20-G363N	14	AGT ATA TGG ACA CTA CAC TGA ACC CCT ACA TAA TCA ACG TCA C
cB4203-HM8-M	15	ATT GTA ATA TGG GGA ACC CTC AGT AAT ACA AGA ACC AAG GAA TC
cB4203-HM9-M	16	ATT GTA ATA TGG GGA ACC CTC GAA AAT ACA AGA ACC AAG GAA TC
cB4203-	17	ATT GTA ATA TGG GGA ACC TGG GAA AAT ACA

[0196]

[0197]

HM10-M		AGA ACC AAG GAA TC
4203-HM11	18	ACA CTA CAC TGA ACC CCT TCA TAC TCA ACG TCA CCC TAG CAG CCA
4203-HM12	19	ACA CTA CAC TGA ACC CCT TCA TAC TCA ACG TCA CCC TAT CAG GCA AAA TGT GTA GCC AAG TGC
SASP-LN-del-R	20	TAA CAG GAG GTG CTC TGA AAG AGT AAG CAG AGG AG
I465-6H-not	21	CTA ATT GCG GCC GCT CAT TAG TGG TGA TGG TGA TGA TGT ATA CAG ACA CCA TCA GC
F468-6H-not	22	CTA ATT GCG GCC GCT CAT TAG TGG TGA TGG TGA TGA TGA AAA GCA TCT ATA CAG ACA CC
P471-6H-not	23	CTA ATT GCG GCC GCT CAT TAG TGG TGA TGG TGA TGA TGA GGT TTT AGA AAA GCA TCT ATA C
PH20-HM17	24	TCC AGG CCC AGA GGA AAG GCC GGT TGG GTA GCA AGG GGC CCC TAA AAG AGT AAG CAG AGG AG
PH20-HM18	25	TCA CTT GGG GCA TTC CAG ACG GTG GTG AAG GGC CGG TTG GGT AGC AAG GGG CCC CTA AAA GAG TAA GCA GAG GAG
K470-not	26	CTA ATT GCG GCC GCT CAT TAG TGG TGA TGG TGA TGA TGT TTT AGA AAA GCA TCT ATA C
F468-not	27	CTA ATT GCG GCC GCT CAT TAA AAA GCA TCT ATA CAG ACA CC
M21-mega-F	28	AAT TGT AAT ATG GGG AAG CTG GGA AAA TAC AAG AA
M24-R	29	TGG AAT AAC AGG AGG TGC AGA GTA AGC AGA GGA GA
M25-R	30	TTT GGA ATA ACA GGA GAG TAA GCA GAG GAG A
B4-HM26	31	AGT TTT GAA ATT CCT TTC TCT GGA TGA GCT GGA GCA CAG CCT GGG GGA GAG TGC GGC CCA GGG TGC TTC TGG AAT TG
B4-HM27	32	ATG AGC TGG AGC ACA GCT TTG GGG AGA GTG CGG CCC AG
B4-HM28	33	ATT CCT TTC TCA AGA TGA ACT TGA GCA CAG CTT TGG CGA AAC TGT TGC
B4-HM29	34	CTA ATT GCG GCC GCT CAT TAG TGG TGA TGG TGA TGA TGA GCA TCT ATA CAG ACA CC
B4-HM30	35	CTA ATT GCG GCC GCT CAT TAG TGG TGA TGG TGA TGA TGA CAG ACA CCA TCA GCA ATA C
B4-HM31	36	CTA ATT GCG GCC GCT CAT TAG TGG TGA TGG TGA TGA TGA TCA GCA ATA CAC ACA TC
B4-HM32	37	CTA ATT GCG GCC GCT CAT TAG TGG TGA TGG TGA TGA TGA CAC ACA TCA ACA GCA TC
B4- HM33	38	CTA ATT GCG GCC GCT CAT TAG TGG TGA TGG TGA TGA TGA ACA GCA TCA GTG TCT TTT AC
P472-not	39	GTT ATA GCG GCC GCT CAT TAG GGA GGT TTT AGA AAA GCA TC
M473-not	40	GTT ATA GCG GCC GCT CAT TAC ATG GGA GGT

[0198]

		TTT AGA AAA GCA TC
E474-not	41	GTT ATA GCG GCC GCT CAT TAC TCC ATG GGA GGT TTT AGA AAA GC
T475-not	42	GTT ATA GCG GCC GCT CAT TAT GTC TCC ATG GGA GGT TTT AG
M40-mega	43	TAA CAG GAG GTG CTC TGA AAT TAG AGT AAG CAG AGG AG
M41-mega	44	TGG AAT AAC AGG AGG TGC TCT AGA GTA AGC AGA GGA G
M42-mega	45	TTT GGA ATA ACA GGA GGA GAG TAA GCA GAG GAG
D466-6H-not	46	CTA ATT GCG GCC GCT CAT TAG TGG TGA TGG TGA TGA TGA TCT ATA CAG ACA CCA TCA GC
P478-H-Not	47	GAT AAT GCG GCC GCT CAT TAG TGG TGA TGG TGA TGA TGA GGT TCT TCT GTC TCC ATG GG
I480-H-Not	48	GAT AAT GCG GCC GCT CAT TAG TGG TGA TGG TGA TGA TGA ATT TGA GGT TCT TCT GTC TCC
Y482-H-Not	49	GAT AAT GCG GCC GCT CAT TAG TGG TGA TGG TGA TGA TGG TAG AAA ATT TGA GGT TCT TCT G
A484-H-not	50	GAT AAT GCG GCC GCT CAT TAG TGG TGA TGG TGA TGA TGA GCA TTG TAG AAA ATT TGA GGT TC
P486-H-not	51	GAT AAT GCG GCC GCT CAT TAG TGG TGA TGG TGA TGA TGG GGT GAA GCA TTG TAG AAA ATT TGA GG
T488-H-not	52	GAT AAT GCG GCC GCT CAT TAG TGG TGA TGG TGA TGA TGT GTG GAG GGT GAA GCA TTG TAG
K470-6H-not	53	CTA ATT GCG GCC GCT CAT TAG TGG TGA TGG TGA TGA TGT TTT AGA AAA GCA TCT ATA C
P472-6H-not	54	GTT ATA GCG GCC GCT CAT TAG TGG TGA TGG TGA TGA TGG GGA GGT TTT AGA AAA GCA TC
M473-6H-not	55	GTT ATA GCG GCC GCT CAT TAG TGG TGA TGG TGA TGA TGC ATG GGA GGT TTT AGA AAA GCA TC
E474-6H-not	56	GTT ATA GCG GCC GCT CAT TAG TGG TGA TGG TGA TGA TGC TCC ATG GGA GGT TTT AGA AAA GC
T475-6H-not	57	GTT ATA GCG GCC GCT CAT TAG TGG TGA TGG TGA TGA TGT GTC TCC ATG GGA GGT TTT AG
E476-6H-not	58	GTT ATA GCG GCC GCT CAT TAG TGG TGA TGG TGA TGA TGT TCT GTC TCC ATG GGA GG
E476-not	59	GTT ATA GCG GCC GCT CAT TAT TCT GTC TCC ATG GGA GG

[0199] 在发现具有增加的酶活性和热稳定性的PH20变体后,还构建了PH20变体的无6xHis标签cDNA。

[0200] 当ExpiCHO细胞的细胞密度达到6×10^6/mL时,通过ExpiFectamine CHO试剂将包含插入pcDNA3.4-TOPO载体中的野生型或变体PH20 cDNA的质粒转染到ExpiCHO细胞中。作为细胞培养基,使用ExpiCHO表达培养基(100至500mL)。在转染后,以130rpm将ExpiCHO细胞摇动培养总共6天,在此期间将细胞在37℃下培养1天,并在32℃的较低温度下进一步培养5天。在培养完成后,通过以10,000rpm离心30min收集细胞上清液。

[0201] 通过AKTA引物系统,在三个步骤(分别使用HisTrap柱、Q琼脂糖柱和苯基柱进行)中纯化在ExpiCHO细胞中产生的C末端6xHis附接的野生型PH20和变体PH20的重组蛋白。

[0202] 对于使用HisTrap柱的蛋白质纯化,制备了缓冲液A(20mM磷酸钠(pH7.5)、0.5M NaCl)和缓冲液B(20mM磷酸钠(pH 7.5)、0.5M NaCl、0.5M咪唑)。将所述蛋白质与HisTrap柱结合,并用5个柱体积(CV)的缓冲液A冲洗所述柱以去除非特异性结合的蛋白质。证实电导率保持在恒定水平,用5CV的20%缓冲液B冲洗所述柱以洗脱蛋白质。将洗脱的蛋白质用透析缓冲液(20mM磷酸钠(pH 7.5)、50mM NaCl)透析。对于使用Q Sepharose柱的蛋白质纯化,制备了缓冲液A(20mM磷酸钠,pH 7.5)和缓冲液B(20mM磷酸钠(pH 7.5)、0.5M NaCl)。将所述蛋白质与Q Sepharose柱结合,并用5CV缓冲液A冲洗所述柱以去除非特异性结合的蛋白质,然后用5CV缓冲液B以0至100%的浓度梯度冲洗以洗脱蛋白质。

[0203] 对于使用苯基柱的蛋白质纯化,制备了缓冲液A(20mM磷酸钠(pH7.0)、1.5M$(NH_4)_2SO_4$)和缓冲液B(20mM磷酸钠,pH 7.0)。将所述蛋白质与苯基柱结合,并用5CV缓冲液A冲洗所述柱以去除非特异性结合的蛋白质,然后用5CV缓冲液B以0至100%的浓度梯度冲洗以洗脱蛋白质。

[0204] 通过浊度测定、底物-凝胶测定和Morgan-Elson测定来测量野生型PH20和变体PH20的酶活性。

[0205] 浊度测定是一种测量透明质酸与白蛋白(BSA)混合时产生的沉淀物中的吸光度的方法。当透明质酸被PH20水解时,与白蛋白混合时产生的沉淀物的吸光度降低。将透明质酸酶PH20(Sigma)稀释至1、2、5、7.5、10、15、20、30、50和60个单位/mL,并在每个试管中制备。将纯化的蛋白质样品溶于酶稀释缓冲液(20mM Tris HCl(pH 7.0)、77mM NaCl、0.01%(w/v)牛血清白蛋白)中并稀释至100X、300X、600X、1200X和2400X,并在每个试管中制备。在新的试管中,将浓度为3mg/mL的透明质酸溶液稀释10倍至浓度为0.3mg/mL,使得每个试管的体积变为180μL。将60μL酶添加至稀释的透明质酸溶液中并与之混合,并使其在37℃下反应45min。在反应完成后,将50μL反应的酶和250μL酸性白蛋白溶液添加至96孔板的每个孔中并摇动10min,然后通过分光光度计测量在600nm处的吸光度。

[0206] 在底物-凝胶测定中,使蛋白质在10% SDS凝胶(包括0.17mg/mL透明质酸)上电泳1h,并在4℃下用2.5% Triton X-100(w/v)去除SDS,持续2h。此后,在缓冲液(50mM磷酸钠(pH 7.0)、150mM NaCl)中于37℃(其为PH20的最佳温度)下进行1至4h的酶促反应,并将蛋白质用0.5%阿辛蓝试剂染色。使用脱色溶液除去未与透明质酸结合的阿辛蓝试剂。对用阿辛蓝染色的SDS凝胶成像,然后对条带进行定量。

[0207] 通过以下方法测量所述蛋白质的热稳定性:通过动态光散射(DLS)测量聚集温度的方法、在使用Sypro-Orange染料的实时PCR中测量熔融温度(T_m)的方法、在将蛋白质放置在预定温度下持续预定时间后测量酶活性的方法等。在通过DLS测量聚集温度的方法中,使用光散射来测量分子的聚集,因此灵敏度高,并且聚集温度通常低于所述蛋白质的熔融温度。

[0208] 在本发明中构建的PH20变体中被取代或切割的氨基酸的序列在下表11中示出。

[0209] 在根据本发明的变体中,将具有附接至PH20的C末端的6xHis标签的变体命名为HM;将不含6xHis标签的变体命名为HP;将具有附接至C末端的6xHis标签的成熟PH20(L36至S490)命名为WT;并且将具有在Y482之后被切割的C末端同时不含6xHis标签的成熟野生型

PH20(L36至Y482)命名为HW2。

[0210] 表11.根据本发明的PH20变体的氨基酸序列及其取代/切割特征

[0211]

名称	SEQ NO.	取代	氨基酸序列
HM1	60	M345T、S347T、M348K、K349E、L352Q、L353A、L354I、D355K、N356E、E359D、I361T和N363G的12个氨基酸取代。	LNFRAPPVIPNVPFLWAWNAPSEFCLGKFD EPLDMSLFSFIGSPRINATGQGVTIFYVDRL GYYPYIDSITGVTVNGGIPQKISLQDHLDK AKKDITFYMPVDNLGMAVIDWEEWRPTW ARNWKPKDVYKNRSIELVQQQNVQLSLTE ATEKAKQEFEKAGKDFLVETIKLGKLLRP NHLWGYYLFPDCYNHHYKKPGYNGSCFN VEIKRNDDLSWLWNESTALYPSIYLNTQQS PVAATLYVRNRVREAIRVSKIPDAKSPLPV FAYTRIVFTDQVLKFLSQDELVYTFGETVA LGASGIVIWGTLSI**T**R**TKE**SC**QAIKE**YM**D**T **T**L**G**PYIINVTLAAKMCSQVLCQEQGVCIRK NWNSSDYLHLNPDNFAIQLEKGGKFTVRG

[0212]

			KPTLEDLEQFSEKFYCSCYSTLSCKEKADV KDTDAVDVCIADGVCIDAFLKPPMETEEP QIFYNASPSTLS
HM2	61	Y365F、I367L、L371S、A372G、K374L、M375L和V379A的7个氨基酸取代	LNFRAPPVIPNVPFLWAWNAPSEFCLGKFD EPLDMSLFSFIGSPRINATGQGVTIFYVDRL GYYPYIDSITGVTVNGGIPQKISLQDHLDK AKKDITFYMPVDNLGMAVIDWEEWRPTW ARNWKPKDVYKNRSIELVQQQNVQLSLTE ATEKAKQEFEKAGKDFLVETIKLGKLLRP NHLWGYYLFPDCYNHHYKKPGYNGSCFN VEIKRNDDLSWLWNESTALYPSIYLNTQQS PVAATLYVRNRVREAIRVSKIPDAKSPLPV FAYTRIVFTDQVLKFLSQDELVYTFGETVA LGASGIVIWGTLSITRTKESCQAIKEYMDT TLNP**F**I**L**NVT**SG**A**LL**CSQ**A**LCQEQGVCIRK NWNSSDYLHLNPDNFAIQLEKGGKFTVRG KPTLEDLEQFSEKFYCSCYSTLSCKEKADV KDTDAVDVCIADGVCIDAFLKPPMETEEP QIFYNASPSTLS
HM3	62	M345T、S347T、M348K、K349E、L352Q、L353A、L354I、D355K、N356E、E359D、I361T、N363G、Y365F、I367L、L371S、A372G、K374L、M375L和V379A的19个氨基酸取代	LNFRAPPVIPNVPFLWAWNAPSEFCLGKFD EPLDMSLFSFIGSPRINATGQGVTIFYVDRL GYYPYIDSITGVTVNGGIPQKISLQDHLDK AKKDITFYMPVDNLGMAVIDWEEWRPTW ARNWKPKDVYKNRSIELVQQQNVQLSLTE ATEKAKQEFEKAGKDFLVETIKLGKLLRP NHLWGYYLFPDCYNHHYKKPGYNGSCFN VEIKRNDDLSWLWNESTALYPSIYLNTQQS PVAATLYVRNRVREAIRVSKIPDAKSPLPV FAYTRIVFTDQVLKFLSQDELVYTFGETVA LGASGIVIWGTLSI**T**R**TKE**SC**QAIKE**YM**D**T **T**L**G**P**F**I**L**NVT**SG**A**LL**CSQ**A**LCQEQGVCIRK NWNSSDYLHLNPDNFAIQLEKGGKFTVRG KPTLEDLEQFSEKFYCSCYSTLSCKEKADV KDTDAVDVCIADGVCIDAFLKPPMETEEP QIFYNASPSTLS
HM4	63	G340V、T341S、L342W、S343E、I344N、M345T、S347T、M348K、K349E、L352Q、L353A、L354I、D355K、N356E、E359D、I361T和N363G的17个氨基酸取代	LNFRAPPVIPNVPFLWAWNAPSEFCLGKFD EPLDMSLFSFIGSPRINATGQGVTIFYVDRL GYYPYIDSITGVTVNGGIPQKISLQDHLDK AKKDITFYMPVDNLGMAVIDWEEWRPTW ARNWKPKDVYKNRSIELVQQQNVQLSLTE ATEKAKQEFEKAGKDFLVETIKLGKLLRP NHLWGYYLFPDCYNHHYKKPGYNGSCFN VEIKRNDDLSWLWNESTALYPSIYLNTQQS PVAATLYVRNRVREAIRVSKIPDAKSPLPV FAYTRIVFTDQVLKFLSQDELVYTFGETVA LGASGIVIW**VSWENT**R**TKE**SC**QAIKE**YM **D**T**T**L**G**PYIINVTLAAKMCSQVLCQEQGVCI RKNWNSSDYLHLNPDNFAIQLEKGGKFTV RGKPTLEDLEQFSEKFYCSCYSTLSCKEKA DVKDTDAVDVCIADGVCIDAFLKPPMETE EPQIFYNASPSTLS
HM6	64	M345T、S347T、	LNFRAPPVIPNVPFLWAWNAPSEFCLGKFD

[0213]

		M348K、K349E、L352Q、L353A、L354I、D355K、N356E、E359D和I361T的11个氨基酸取代	EPLDMSLFSFIGSPRINATGQGVTIFYVDRL GYYPYIDSITGVTVNGGIPQKISLQDHLDK AKKDITFYMPVDNLGMAVIDWEEWRPTW ARNWKPKDVYKNRSIELVQQQNVQLSLTE ATEKAKQEFEKAGKDFLVETIKLGKLLRP NHLWGYYLFPDCYNHHYKKPGYNGSCFN VEIKRNDDLSWLWNESTALYPSIYLNTQQS PVAATLYVRNRVREAIRVSKIPDAKSPLPV FAYTRIVFTDQVLKFLSQDELVYTFGETVA LGASGIVIWGTLSI**T**R**TKE**SC**QAIKE**YM**D**T **T**LNPYIINVTLAAKMCSQVLCQEQGVCIRK NWNSSDYLHLNPDNFAIQLEKGGKFTVRG KPTLEDLEQFSEKFYCSCYSTLSCKEKADV KDTDAVDVCIADGVCIDAFLKPPMETEEP QIFYNASPSTLS
HM7	65	G340V、T341S L342W、S343E、I344N、M345T、S347T、M348K、K349E、L352Q、L353A、L354I、D355K、N356E、E359D和I361T的16个氨基酸取代	LNFRAPPVIPNVPFLWAWNAPSEFCLGKFD EPLDMSLFSFIGSPRINATGQGVTIFYVDRL GYYPYIDSITGVTVNGGIPQKISLQDHLDK AKKDITFYMPVDNLGMAVIDWEEWRPTW ARNWKPKDVYKNRSIELVQQQNVQLSLTE ATEKAKQEFEKAGKDFLVETIKLGKLLRP NHLWGYYLFPDCYNHHYKKPGYNGSCFN VEIKRNDDLSWLWNESTALYPSIYLNTQQS PVAATLYVRNRVREAIRVSKIPDAKSPLPV FAYTRIVFTDQVLKFLSQDELVYTFGETVA LGASGIVIW**VSWENT**R**TKE**SC**QAIKE**YM **D**T**T**LNPYIINVTLAAKMCSQVLCQEQGVCI RKNWNSSDYLHLNPDNFAIQLEKGGKFTV RGKPTLEDLEQFSEKFYCSCYSTLSCKEKA DVKDTDAVDVCIADGVCIDAFLKPPMETE EPQIFYNASPSTLS
HM8	66	I344N、M345T、S347T、M348K、K349E、L352Q、L353A、L354I、D355K、N356E、E359D和I361T的12个氨基酸取代	LNFRAPPVIPNVPFLWAWNAPSEFCLGKFD EPLDMSLFSFIGSPRINATGQGVTIFYVDRL GYYPYIDSITGVTVNGGIPQKISLQDHLDK AKKDITFYMPVDNLGMAVIDWEEWRPTW ARNWKPKDVYKNRSIELVQQQNVQLSLTE ATEKAKQEFEKAGKDFLVETIKLGKLLRP NHLWGYYLFPDCYNHHYKKPGYNGSCFN VEIKRNDDLSWLWNESTALYPSIYLNTQQS PVAATLYVRNRVREAIRVSKIPDAKSPLPV FAYTRIVFTDQVLKFLSQDELVYTFGETVA LGASGIVIWGTLS**NT**R**TKE**SC**QAIKE**YM**D** TT**T**LNPYIINVTLAAKMCSQVLCQEQGVCIR KNWNSSDYLHLNPDNFAIQLEKGGKFTVR GKPTLEDLEQFSEKFYCSCYSTLSCKEKAD VKDTDAVDVCIADGVCIDAFLKPPMETEE PQIFYNASPSTLS
HM9	67	S343E、I344N、M345T、S347T、M348K、K349E、L352Q、L353A、L354I、D355K、N356E、E359D和I361T	LNFRAPPVIPNVPFLWAWNAPSEFCLGKFD EPLDMSLFSFIGSPRINATGQGVTIFYVDRL GYYPYIDSITGVTVNGGIPQKISLQDHLDK AKKDITFYMPVDNLGMAVIDWEEWRPTW ARNWKPKDVYKNRSIELVQQQNVQLSLTE

[0214]

		的13个氨基酸取代	ATEKAKQEFEKAGKDFLVETIKLGKLLRP NHLWGYYLFPDCYNHHYKKPGYNGSCFN VEIKRNDDLSWLWNESTALYPSIYLNTQQS PVAATLYVRNRVREAIRVSKIPDAKSPLPV FAYTRIVFTDQVLKFLSQDELVYTFGETVA LGASGIVIWGTL**ENT**R**TKE**SC**QAIKE**YM**D** T**T**LNPYIINVTLAAKMCSQVLCQEQGVCIR KNWNSSDYLHLNPDNFAIQLEKGGKFTVR GKPTLEDLEQFSEKFYCSCYSTLSCKEKAD VKDTDAVDVCIADGVCIDAFLKPPMETEE PQIFYNASPSTLS
HM10	68	L342W、S343E、I344N、M345T、S347T、M348K、K349E、L352Q、L353A、L354I、D355K、N356E、E359D和I361T的14个氨基酸取代	LNFRAPPVIPNVPFLWAWNAPSEFCLGKFD EPLDMSLFSFIGSPRINATGQGVTIFYVDRL GYYPYIDSITGVTVNGGIPQKISLQDHLDK AKKDITFYMPVDNLGMAVIDWEEWRPTW ARNWKPKDVYKNRSIELVQQQNVQLSLTE ATEKAKQEFEKAGKDFLVETIKLGKLLRP NHLWGYYLFPDCYNHHYKKPGYNGSCFN VEIKRNDDLSWLWNESTALYPSIYLNTQQS PVAATLYVRNRVREAIRVSKIPDAKSPLPV FAYTRIVFTDQVLKFLSQDELVYTFGETVA LGASGIVIWGT**WENT**R**TKE**SC**QAIKE**YM **D**T**T**LNPYIINVTLAAKMCSQVLCQEQGVCI RKNWNSSDYLHLNPDNFAIQLEKGGKFTV RGKPTLEDLEQFSEKFYCSCYSTLSCKEKA DVKDTDAVDVCIADGVCIDAFLKPPMETE EPQIFYNASPSTLS
HM11	69	M345T、S347T、M348K、K349E、L352Q、L353A、L354I、D355K、N356E、E359D、I361T、Y365F和I367L的13个氨基酸取代	LNFRAPPVIPNVPFLWAWNAPSEFCLGKFD EPLDMSLFSFIGSPRINATGQGVTIFYVDRL GYYPYIDSITGVTVNGGIPQKISLQDHLDK AKKDITFYMPVDNLGMAVIDWEEWRPTW ARNWKPKDVYKNRSIELVQQQNVQLSLTE ATEKAKQEFEKAGKDFLVETIKLGKLLRP NHLWGYYLFPDCYNHHYKKPGYNGSCFN VEIKRNDDLSWLWNESTALYPSIYLNTQQS PVAATLYVRNRVREAIRVSKIPDAKSPLPV FAYTRIVFTDQVLKFLSQDELVYTFGETVA LGASGIVIWGTLSI**T**R**TKE**SC**QAIKE**YM**D**T **T**LNP**F**I**L**NVTLAAKMCSQVLCQEQGVCIR KNWNSSDYLHLNPDNFAIQLEKGGKFTVR GKPTLEDLEQFSEKFYCSCYSTLSCKEKAD VKDTDAVDVCIADGVCIDAFLKPPMETEE PQIFYNASPSTLS
HM12	70	M345T、S347T、M348K、K349E、L352Q、L353A、L354I、D355K、N356E、E359D、I361T、Y365F、I367L、L371S和A372G的15个氨基酸取代	LNFRAPPVIPNVPFLWAWNAPSEFCLGKFD EPLDMSLFSFIGSPRINATGQGVTIFYVDRL GYYPYIDSITGVTVNGGIPQKISLQDHLDK AKKDITFYMPVDNLGMAVIDWEEWRPTW ARNWKPKDVYKNRSIELVQQQNVQLSLTE ATEKAKQEFEKAGKDFLVETIKLGKLLRP NHLWGYYLFPDCYNHHYKKPGYNGSCFN VEIKRNDDLSWLWNESTALYPSIYLNTQQS PVAATLYVRNRVREAIRVSKIPDAKSPLPV

[0215]

			FAYTRIVFTDQVLKFLSQDELVYTFGETVA LGASGIVIWGTLSI**T**R**TKE**SC**QAIKE**YM**D**T **T**LNP**F**I**L**NVT**SG**AKMCSQVLCQEQGVCIR KNWNSSDYLHLNPDNFAIQLEKGGKFTVR GKPTLEDLEQFSEKFYCSCYSTLSCKEKAD VKDTDAVDVCIADGVCIDAFLKPPMETEE PQIFYNASPSTLS
	HM13	71	M345T、S347T、M348K、K349E、L352Q、L353A、L354I、D355K、N356E、E359D和I361T的11个氨基酸取代，以及在F38之前在N末端处的截短	FRAPPVIPNVPFLWAWNAPSEFCLGKFDEP LDMSLFSFIGSPRINATGQGVTIFYVDRLGY YPYIDSITGVTVNGGIPQKISLQDHLDKAK KDITFYMPVDNLGMAVIDWEEWRPTWAR NWKPKDVYKNRSIELVQQQNVQLSLTEAT EKAKQEFEKAGKDFLVETIKLGKLLRPNH LWGYYLFPDCYNHHYKKPGYNGSCFNVEI KRNDDLSWLWNESTALYPSIYLNTQQSPV AATLYVRNRVREAIRVSKIPDAKSPLPVFA YTRIVFTDQVLKFLSQDELVYTFGETVALG ASGIVIWGTLSI**T**R**TKE**SC**QAIKE**YM**D**T**T**L NPYIINVTLAAKMCSQVLCQEQGVCIRKN WNSSDYLHLNPDNFAIQLEKGGKFTVRGK PTLEDLEQFSEKFYCSCYSTLSCKEKADVK DTDAVDVCIADGVCIDAFLKPPMETEEPQI FYNASPSTLS
	HM14	72	M345T、S347T、M348K、K349E、L352Q、L353A、L354I、D355K、N356E、E359D和I361T的11个氨基酸取代以及在I465之后在C末端处的截短	LNFRAPPVIPNVPFLWAWNAPSEFCLGKFD EPLDMSLFSFIGSPRINATGQGVTIFYVDRL GYYPYIDSITGVTVNGGIPQKISLQDHLDK AKKDITFYMPVDNLGMAVIDWEEWRPTW ARNWKPKDVYKNRSIELVQQQNVQLSLTE ATEKAKQEFEKAGKDFLVETIKLGKLLRP NHLWGYYLFPDCYNHHYKKPGYNGSCFN VEIKRNDDLSWLWNESTALYPSIYLNTQQS PVAATLYVRNRVREAIRVSKIPDAKSPLPV FAYTRIVFTDQVLKFLSQDELVYTFGETVA LGASGIVIWGTLSI**T**R**TKE**SC**QAIKE**YM**D**T **T**LNPYIINVTLAAKMCSQVLCQEQGVCIRK NWNSSDYLHLNPDNFAIQLEKGGKFTVRG KPTLEDLEQFSEKFYCSCYSTLSCKEKADV KDTDAVDVCIADGVCI
	HM15	73	M345T、S347T、M348K、K349E、L352Q、L353A、L354I、D355K、N356E、E359D和I361T的11个氨基酸取代，以及在F468之后在C末端处的截短	LNFRAPPVIPNVPFLWAWNAPSEFCLGKFD EPLDMSLFSFIGSPRINATGQGVTIFYVDRL GYYPYIDSITGVTVNGGIPQKISLQDHLDK AKKDITFYMPVDNLGMAVIDWEEWRPTW ARNWKPKDVYKNRSIELVQQQNVQLSLTE ATEKAKQEFEKAGKDFLVETIKLGKLLRP NHLWGYYLFPDCYNHHYKKPGYNGSCFN VEIKRNDDLSWLWNESTALYPSIYLNTQQS PVAATLYVRNRVREAIRVSKIPDAKSPLPV FAYTRIVFTDQVLKFLSQDELVYTFGETVA LGASGIVIWGTLSI**T**R**TKE**SC**QAIKE**YM**D**T **T**LNPYIINVTLAAKMCSQVLCQEQGVCIRK NWNSSDYLHLNPDNFAIQLEKGGKFTVRG KPTLEDLEQFSEKFYCSCYSTLSCKEKADV

[0216]

			KDTDAVDVCIADGVCIDAF
HM16	74	M345T、S347T、M348K、K349E、L352Q、L353A、L354I、D355K、N356E、E359D和I361T的11个氨基酸取代，以及在P471之后在C末端处的截短	LNFRAPPVIPNVPFLWAWNAPSEFCLGKFD EPLDMSLFSFIGSPRINATGQGVTIFYVDRL GYYPYIDSITGVTVNGGIPQKISLQDHLDK AKKDITFYMPVDNLGMAVIDWEEWRPTW ARNWKPKDVYKNRSIELVQQQNVQLSLTE ATEKAKQEFEKAGKDFLVETIKLGKLLRP NHLWGYYLFPDCYNHHYKKPGYNGSCFN VEIKRNDDLSWLWNESTALYPSIYLNTQQS PVAATLYVRNRVREAIRVSKIPDAKSPLPV FAYTRIVFTDQVLKFLSQDELVYTFGETVA LGASGIVIWGTLSI**T**R**TKE**SC**QAIKE**YM**D**T **T**LNPYIINVTLAAKMCSQVLCQEQGVCIRK NWNSSDYLHLNPDNFAIQLEKGGKFTVRG KPTLEDLEQFSEKFYCSCYSTLSCKEKADV KDTDAVDVCIADGVCIDAFLKP
HM17	75	L36-V47被FRGPLLPNR取代，以及M345T、S347T、M348K、K349E、L352Q、L353A、L354I、D355K、N356E、E359D和I361T的氨基酸取代	**FRGPLLPNR**PFLWAWNAPSEFCLGKFDEP LDMSLFSFIGSPRINATGQGVTIFYVDRLGY YPYIDSITGVTVNGGIPQKISLQDHLDKAK KDITFYMPVDNLGMAVIDWEEWRPTWAR NWKPKDVYKNRSIELVQQQNVQLSLTEAT EKAKQEFEKAGKDFLVETIKLGKLLRPNH LWGYYLFPDCYNHHYKKPGYNGSCFNVEI KRNDDLSWLWNESTALYPSIYLNTQQSPV AATLYVRNRVREAIRVSKIPDAKSPLPVFA YTRIVFTDQVLKFLSQDELVYTFGETVALG ASGIVIWGTLSI**T**R**TKE**SC**QAIKE**YM**D**T**T**L NPYIINVTLAAKMCSQVLCQEQGVCIRKN WNSSDYLHLNPDNFAIQLEKGGKFTVRGK PTLEDLEQFSEKFYCSCYSTLSCKEKADVK DTDAVDVCIADGVCIDAFLKPPMETEEPQI FYNASPSTLS
HM18	76	L36-A52被FRGPLLPNRPFTTV取代，以及M345T、S347T、M348K、K349E、L352Q、L353A、L354I、D355K、N356E、E359D和I361T的氨基酸取代	**FRGPLLPNRPFTTV**WNAPSEFCLGKFDEP LDMSLFSFIGSPRINATGQGVTIFYVDRLGY YPYIDSITGVTVNGGIPQKISLQDHLDKAK KDITFYMPVDNLGMAVIDWEEWRPTWAR NWKPKDVYKNRSIELVQQQNVQLSLTEAT EKAKQEFEKAGKDFLVETIKLGKLLRPNH LWGYYLFPDCYNHHYKKPGYNGSCFNVEI KRNDDLSWLWNESTALYPSIYLNTQQSPV AATLYVRNRVREAIRVSKIPDAKSPLPVFA YTRIVFTDQVLKFLSQDELVYTFGETVALG ASGIVIWGTLSI**T**R**TKE**SC**QAIKE**YM**D**T**T**L NPYIINVTLAAKMCSQVLCQEQGVCIRKN WNSSDYLHLNPDNFAIQLEKGGKFTVRGK PTLEDLEQFSEKFYCSCYSTLSCKEKADVK DTDAVDVCIADGVCIDAFLKPPMETEEPQI FYNASPSTLS
HM19	77	L342W、S343E、I344N、M345T、S347T、M348K、K349E、L352Q、L353A、L354I、	FRAPPVIPNVPFLWAWNAPSEFCLGKFDEP LDMSLFSFIGSPRINATGQGVTIFYVDRLGY YPYIDSITGVTVNGGIPQKISLQDHLDKAK KDITFYMPVDNLGMAVIDWEEWRPTWAR

[0217]

		D355K、N356E、E359D和I361T的14个氨基酸取代，在F38之前在N末端处的截短，以及在K470之后在C末端处的截短	NWKPKDVYKNRSIELVQQQNVQLSLTEAT EKAKQEFEKAGKDFLVETIKLGKLLRPNH LWGYYLFPDCYNHHYKKPGYNGSCFNVEI KRNDDLSWLWNESTALYPSIYLNTQQSPV AATLYVRNRVREAIRVSKIPDAKSPLPVFA YTRIVFTDQVLKFLSQDELVYTFGETVALG ASGIVIWGT**WENT**R**TKE**SC**QAIKE**YM**D**T **T**LNPYIINVTLAAKMCSQVLCQEQGVCIRK NWNSSDYLHLNPDNFAIQLEKGGKFTVRG KPTLEDLEQFSEKFYCSCYSTLSCKEKADV KDTDAVDVCIADGVCIDAFLK
HM20	78	L342W、S343E、I344N、M345T、S347T、M348K、K349E、L352Q、L353A、L354I、D355K、N356E、E359D和I361T的14个氨基酸取代，在F38之前在N末端处的截短，以及在F468之后在C末端处的截短	FRAPPVIPNVPFLWAWNAPSEFCLGKFDEP LDMSLFSFIGSPRINATGQGVTIFYVDRLGY YPYIDSITGVTVNGGIPQKISLQDHLDKAK KDITFYMPVDNLGMAVIDWEEWRPTWAR NWKPKDVYKNRSIELVQQQNVQLSLTEAT EKAKQEFEKAGKDFLVETIKLGKLLRPNH LWGYYLFPDCYNHHYKKPGYNGSCFNVEI KRNDDLSWLWNESTALYPSIYLNTQQSPV AATLYVRNRVREAIRVSKIPDAKSPLPVFA YTRIVFTDQVLKFLSQDELVYTFGETVALG ASGIVIWGT**WENT**R**TKE**SC**QAIKE**YM**D**T **T**LNPYIINVTLAAKMCSQVLCQEQGVCIRK NWNSSDYLHLNPDNFAIQLEKGGKFTVRG KPTLEDLEQFSEKFYCSCYSTLSCKEKADV KDTDAVDVCIADGVCIDAF
HM21	79	T341S、L342W、S343E、I344N、M345T、S347T、M348K、K349E、L352Q、L353A、L354I、D355K、N356E、E359D和I361T的15个氨基酸取代	LNFRAPPVIPNVPFLWAWNAPSEFCLGKFD EPLDMSLFSFIGSPRINATGQGVTIFYVDRL GYYPYIDSITGVTVNGGIPQKISLQDHLDK AKKDITFYMPVDNLGMAVIDWEEWRPTW ARNWKPKDVYKNRSIELVQQQNVQLSLTE ATEKAKQEFEKAGKDFLVETIKLGKLLRP NHLWGYYLFPDCYNHHYKKPGYNGSCFN VEIKRNDDLSWLWNESTALYPSIYLNTQQS PVAATLYVRNRVREAIRVSKIPDAKSPLPV FAYTRIVFTDQVLKFLSQDELVYTFGETVA LGASGIVIWG**SWENT**R**TKE**SC**QAIKE**YM **D**T**T**LNPYIINVTLAAKMCSQVLCQEQGVCI RKNWNSSDYLHLNPDNFAIQLEKGGKFTV RGKPTLEDLEQFSEKFYCSCYSTLSCKEKA DVKDTDAVDVCIADGVCIDAFLKPPMETE EPQIFYNASPSTLS
HM24	80	M345T、S347T、M348K、K349E、L352Q、L353A、L354I、D355K、N356E、E359D和I361T的11个氨基酸取代，以及在A40之前在N末端处的截短	APPVIPNVPFLWAWNAPSEFCLGKFDEPLD MSLFSFIGSPRINATGQGVTIFYVDRLGYYP YIDSITGVTVNGGIPQKISLQDHLDKAKKDI TFYMPVDNLGMAVIDWEEWRPTWARNW KPKDVYKNRSIELVQQQNVQLSLTEATEK AKQEFEKAGKDFLVETIKLGKLLRPNHLW GYYLFPDCYNHHYKKPGYNGSCFNVEIKR NDDLSWLWNESTALYPSIYLNTQQSPVAA TLYVRNRVREAIRVSKIPDAKSPLPVFAYT RIVFTDQVLKFLSQDELVYTFGETVALGAS

[0218]

			GIVIWGTLSI**T**R**TKE**SC**QAIKE**YM**D**T**T**LNP YIINVTLAAKMCSQVLCQEQGVCIRKNWN SSDYLHLNPDNFAIQLEKGGKFTVRGKPTL EDLEQFSEKFYCSCYSTLSCKEKADVKDT DAVDVCIADGVCIDAFLKPPMETEEPQIFY NASPSTLS
HM25	81	M345T、S347T、M348K、K349E、L352Q、L353A、L354I、D355K、N356E、E359D和I361T的11个氨基酸取代，在P42之前在N末端处的截短	PVIPNVPFLWAWNAPSEFCLGKFDEPLDM SLFSFIGSPRINATGQGVTIFYVDRLGYYPY IDSITGVTVNGGIPQKISLQDHLDKAKKDIT FYMPVDNLGMAVIDWEEWRPTWARNWK PKDVYKNRSIELVQQQNVQLSLTEATEKA KQEFEKAGKDFLVETIKLGKLLRPNHLWG YYLFPDCYNHHYKKPGYNGSCFNVEIKRN DDLSWLWNESTALYPSIYLNTQQSPVAAT LYVRNRVREAIRVSKIPDAKSPLPVFAYTRI VFTDQVLKFLSQDELVYTFGETVALGASGI VIWGTLSI**T**R**TKE**SC**QAIKE**YM**D**T**T**LNPYI INVTLAAKMCSQVLCQEQGVCIRKNWNSS DYLHLNPDNFAIQLEKGGKFTVRGKPTLE DLEQFSEKFYCSCYSTLSCKEKADVKDTD AVDVCIADGVCIDAFLKPPMETEEPQIFYN ASPSTLS
HM29	82	L342W、S343E、I344N、M345T、S347T、M348K、K349E、L352Q、L353A、L354I、D355K、N356E、E359D和I361T的14个氨基酸取代，在L36之前在N末端处的截短，以及在A467之后在C末端处的截短	LNFRAPPVIPNVPFLWAWNAPSEFCLGKFD EPLDMSLFSFIGSPRINATGQGVTIFYVDRL GYYPYIDSITGVTVNGGIPQKISLQDHLDK AKKDITFYMPVDNLGMAVIDWEEWRPTW ARNWKPKDVYKNRSIELVQQQNVQLSLTE ATEKAKQEFEKAGKDFLVETIKLGKLLRP NHLWGYYLFPDCYNHHYKKPGYNGSCFN VEIKRNDDLSWLWNESTALYPSIYLNTQQS PVAATLYVRNRVREAIRVSKIPDAKSPLPV FAYTRIVFTDQVLKFLSQDELVYTFGETVA LGASGIVIWGT**WENT**R**TKE**SC**QAIKE**YM **D**T**T**LNPYIINVTLAAKMCSQVLCQEQGVCI RKNWNSSDYLHLNPDNFAIQLEKGGKFTV RGKPTLEDLEQFSEKFYCSCYSTLSCKEKA DVKDTDAVDVCIADGVCIDA
HM30	83	L342W、S343E、I344N、M345T、S347T、M348K、K349E、L352Q、L353A、L354I、D355K、N356E、E359D和I361T的14个氨基酸取代，在L36之前在N末端处的截短，以及在C464之后在C末端处的截短	LNFRAPPVIPNVPFLWAWNAPSEFCLGKFD EPLDMSLFSFIGSPRINATGQGVTIFYVDRL GYYPYIDSITGVTVNGGIPQKISLQDHLDK AKKDITFYMPVDNLGMAVIDWEEWRPTW ARNWKPKDVYKNRSIELVQQQNVQLSLTE ATEKAKQEFEKAGKDFLVETIKLGKLLRP NHLWGYYLFPDCYNHHYKKPGYNGSCFN VEIKRNDDLSWLWNESTALYPSIYLNTQQS PVAATLYVRNRVREAIRVSKIPDAKSPLPV FAYTRIVFTDQVLKFLSQDELVYTFGETVA LGASGIVIWGT**WENT**R**TKE**SC**QAIKE**YM **D**T**T**LNPYIINVTLAAKMCSQVLCQEQGVCI RKNWNSSDYLHLNPDNFAIQLEKGGKFTV RGKPTLEDLEQFSEKFYCSCYSTLSCKEKA DVKDTDAVDVCIADGVC

[0219]

HM31	84	L342W、S343E、I344N、M345T、S347T、M348K、K349E、L352Q、L353A、L354I、D355K、N356E、E359D和I361T的14个氨基酸取代，在L36之前在N末端处的截短，以及在D461之后在C末端处的截短	LNFRAPPVIPNVPFLWAWNAPSEFCLGKFDEPLDMSLFSFIGSPRINATGQGVTIFYVDRLGYYPYIDSITGVTVNGGIPQKISLQDHLDKAKKDITFYMPVDNLGMAVIDWEEWRPTWARNWKPKDVYKNRSIELVQQQNVQLSLTEATEKAKQEFEKAGKDFLVETIKLGKLLRPNHLWGYYLFPDCYNHHYKKPGYNGSCFNVEIKRNDDLSWLWNESTALYPSIYLNTQQSPVAATLYVRNRVREAIRVSKIPDAKSPLPVFAYTRIVFTDQVLKFLSQDELVYTFGETVALGASGIVIWGT**WENT**R**TKE**SC**QAIKE**YM**D**T**T**LNPYIINVTLAAKMCSQVLCQEQGVCIRKNWNSSDYLHLNPDNFAIQLEKGGKFTVRGKPTLEDLEQFSEKFYCSCYSTLSCKEKADVKDTDAVDVCIAD
HM32	85	L342W、S343E、I344N、M345T、S347T、M348K、K349E、L352Q、L353A、L354I、D355K、N356E、E359D和I361T的14个氨基酸取代，在L36之前在N末端处的截短，以及在C458之后在C末端处的截短	LNFRAPPVIPNVPFLWAWNAPSEFCLGKFDEPLDMSLFSFIGSPRINATGQGVTIFYVDRLGYYPYIDSITGVTVNGGIPQKISLQDHLDKAKKDITFYMPVDNLGMAVIDWEEWRPTWARNWKPKDVYKNRSIELVQQQNVQLSLTEATEKAKQEFEKAGKDFLVETIKLGKLLRPNHLWGYYLFPDCYNHHYKKPGYNGSCFNVEIKRNDDLSWLWNESTALYPSIYLNTQQSPVAATLYVRNRVREAIRVSKIPDAKSPLPVFAYTRIVFTDQVLKFLSQDELVYTFGETVALGASGIVIWGT**WENT**R**TKE**SC**QAIKE**YM**D**T**T**LNPYIINVTLAAKMCSQVLCQEQGVCIRKNWNSSDYLHLNPDNFAIQLEKGGKFTVRGKPTLEDLEQFSEKFYCSCYSTLSCKEKADVKDTDAVDVC
HM33	86	L342W、S343E、I344N、M345T、S347T、M348K、K349E、L352Q、L353A、L354I、D355K、N356E、E359D和I361T的14个氨基酸取代，在L36之前在N末端处的截短，以及在V455之后在C末端处的截短	LNFRAPPVIPNVPFLWAWNAPSEFCLGKFDEPLDMSLFSFIGSPRINATGQGVTIFYVDRLGYYPYIDSITGVTVNGGIPQKISLQDHLDKAKKDITFYMPVDNLGMAVIDWEEWRPTWARNWKPKDVYKNRSIELVQQQNVQLSLTEATEKAKQEFEKAGKDFLVETIKLGKLLRPNHLWGYYLFPDCYNHHYKKPGYNGSCFNVEIKRNDDLSWLWNESTALYPSIYLNTQQSPVAATLYVRNRVREAIRVSKIPDAKSPLPVFAYTRIVFTDQVLKFLSQDELVYTFGETVALGASGIVIWGT**WENT**R**TKE**SC**QAIKE**YM**D**T**T**LNPYIINVTLAAKMCSQVLCQEQGVCIRKNWNSSDYLHLNPDNFAIQLEKGGKFTVRGKPTLEDLEQFSEKFYCSCYSTLSCKEKADVKDTDAV
HP34	87	T341S、L342W、S343E、I344N、M345T、S347T、M348K、K349E、L352Q、L353A、L354I、D355K、N356E、E359D和I361T的15个氨基酸取代，	FRAPPVIPNVPFLWAWNAPSEFCLGKFDEPLDMSLFSFIGSPRINATGQGVTIFYVDRLGYYPYIDSITGVTVNGGIPQKISLQDHLDKAKKDITFYMPVDNLGMAVIDWEEWRPTWARNWKPKDVYKNRSIELVQQQNVQLSLTEATEKAKQEFEKAGKDFLVETIKLGKLLRPNHLWGYYLFPDCYNHHYKKPGYNGSCFNVEI

[0220]

		在F38之前在N末端处的截短，以及在K470之后在C末端处的截短	KRNDDLSWLWNESTALYPSIYLNTQQSPV AATLYVRNRVREAIRVSKIPDAKSPLPVFA YTRIVFTDQVLKFLSQDELVYTFGETVALG ASGIVIWG**SWENT**R**TKE**SC**QAIKE**YM**D**T **T**LNPYIINVTLAAKMCSQVLCQEQGVCIRK NWNSSDYLHLNPDNFAIQLEKGGKFTVRG KPTLEDLEQFSEKFYCSCYSTLSCKEKADV KDTDAVDVCIADGVCIDAFLK
HM35	88	L342W、S343E、I344N、M345T、S347T、M348K、K349E、L352Q、L353A、L354I、D355K、N356E、E359D和I361T的14个氨基酸取代，在F38之前在N末端处的截短，以及在P472之后在C末端处的截短	FRAPPVIPNVPFLWAWNAPSEFCLGKFDEP LDMSLFSFIGSPRINATGQGVTIFYVDRLGY YPYIDSITGVTVNGGIPQKISLQDHLDKAK KDITFYMPVDNLGMAVIDWEEWRPTWAR NWKPKDVYKNRSIELVQQQNVQLSLTEAT EKAKQEFEKAGKDFLVETIKLGKLLRPNH LWGYYLFPDCYNHHYKKPGYNGSCFNVEI KRNDDLSWLWNESTALYPSIYLNTQQSPV AATLYVRNRVREAIRVSKIPDAKSPLPVFA YTRIVFTDQVLKFLSQDELVYTFGETVALG ASGIVIWGT**WENT**R**TKE**SC**QAIKE**YM**D**T **T**LNPYIINVTLAAKMCSQVLCQEQGVCIRK NWNSSDYLHLNPDNFAIQLEKGGKFTVRG KPTLEDLEQFSEKFYCSCYSTLSCKEKADV KDTDAVDVCIADGVCIDAFLKPP
HM36	89	L342W、S343E、I344N、M345T、S347T、M348K、K349E、L352Q、L353A、L354I、D355K、N356E、E359D和I361T的14个氨基酸取代，在F38之前在N末端处的截短，以及在M473之后在C末端处的截短	FRAPPVIPNVPFLWAWNAPSEFCLGKFDEP LDMSLFSFIGSPRINATGQGVTIFYVDRLGY YPYIDSITGVTVNGGIPQKISLQDHLDKAK KDITFYMPVDNLGMAVIDWEEWRPTWAR NWKPKDVYKNRSIELVQQQNVQLSLTEAT EKAKQEFEKAGKDFLVETIKLGKLLRPNH LWGYYLFPDCYNHHYKKPGYNGSCFNVEI KRNDDLSWLWNESTALYPSIYLNTQQSPV AATLYVRNRVREAIRVSKIPDAKSPLPVFA YTRIVFTDQVLKFLSQDELVYTFGETVALG ASGIVIWGT**WENT**R**TKE**SC**QAIKE**YM**D**T **T**LNPYIINVTLAAKMCSQVLCQEQGVCIRK NWNSSDYLHLNPDNFAIQLEKGGKFTVRG KPTLEDLEQFSEKFYCSCYSTLSCKEKADV KDTDAVDVCIADGVCIDAFLKPPM
HM37	90	L342W、S343E、I344N、M345T、S347T、M348K、K349E、L352Q、L353A、L354I、D355K、N356E、E359D和I361T的14个氨基酸取代， 在F38之前在N末端处的截短，以及在E474之后在C末端处的截短	FRAPPVIPNVPFLWAWNAPSEFCLGKFDEP LDMSLFSFIGSPRINATGQGVTIFYVDRLGY YPYIDSITGVTVNGGIPQKISLQDHLDKAK KDITFYMPVDNLGMAVIDWEEWRPTWAR NWKPKDVYKNRSIELVQQQNVQLSLTEAT EKAKQEFEKAGKDFLVETIKLGKLLRPNH LWGYYLFPDCYNHHYKKPGYNGSCFNVEI KRNDDLSWLWNESTALYPSIYLNTQQSPV AATLYVRNRVREAIRVSKIPDAKSPLPVFA YTRIVFTDQVLKFLSQDELVYTFGETVALG ASGIVIWGT**WENT**R**TKE**SC**QAIKE**YM**D**T **T**LNPYIINVTLAAKMCSQVLCQEQGVCIRK NWNSSDYLHLNPDNFAIQLEKGGKFTVRG KPTLEDLEQFSEKFYCSCYSTLSCKEKADV

[0221]

			KDTDAVDVCIADGVCIDAFLKPPME
HM38	91	L342W、S343E、I344N、M345T、S347T、M348K、K349E、L352Q、L353A、L354I、D355K、N356E、E359D和I361T的14个氨基酸取代，在F38之前在N末端处的截短，以及在T475之后在C末端处的截短	FRAPPVIPNVPFLWAWNAPSEFCLGKFDEP LDMSLFSFIGSPRINATGQGVTIFYVDRLGY YPYIDSITGVTVNGGIPQKISLQDHLDKAK KDITFYMPVDNLGMAVIDWEEWRPTWAR NWKPKDVYKNRSIELVQQQNVQLSLTEAT EKAKQEFEKAGKDFLVETIKLGKLLRPNH LWGYYLFPDCYNHHYKKPGYNGSCFNVEI KRNDDLSWLWNESTALYPSIYLNTQQSPV AATLYVRNRVREAIRVSKIPDAKSPLPVFA YTRIVFTDQVLKFLSQDELVYTFGETVALG ASGIVIWGT**WENT**R**TKE**SC**QAIKE**YM**D**T **T**LNPYIINVTLAAKMCSQVLCQEQGVCIRK NWNSSDYLHLNPDNFAIQLEKGGKFTVRG KPTLEDLEQFSEKFYCSCYSTLSCKEKADV KDTDAVDVCIADGVCIDAFLKPPMET
HM39	92	L342W、S343E、I344N、M345T、S347T、M348K、K349E、L352Q、L353A、L354I、D355K、N356E、E359D和I361T的14个氨基酸取代，在F38之前在N末端处的截短，以及在E476之后在C末端处的截短	FRAPPVIPNVPFLWAWNAPSEFCLGKFDEP LDMSLFSFIGSPRINATGQGVTIFYVDRLGY YPYIDSITGVTVNGGIPQKISLQDHLDKAK KDITFYMPVDNLGMAVIDWEEWRPTWAR NWKPKDVYKNRSIELVQQQNVQLSLTEAT EKAKQEFEKAGKDFLVETIKLGKLLRPNH LWGYYLFPDCYNHHYKKPGYNGSCFNVEI KRNDDLSWLWNESTALYPSIYLNTQQSPV AATLYVRNRVREAIRVSKIPDAKSPLPVFA YTRIVFTDQVLKFLSQDELVYTFGETVALG ASGIVIWGT**WENT**R**TKE**SC**QAIKE**YM**D**T **T**LNPYIINVTLAAKMCSQVLCQEQGVCIRK NWNSSDYLHLNPDNFAIQLEKGGKFTVRG KPTLEDLEQFSEKFYCSCYSTLSCKEKADV KDTDAVDVCIADGVCIDAFLKPPMETE
HM40	93	M345T、S347T、M348K、K349E、L352Q、L353A、L354I、D355K、N356E、E359D和I361T的11个氨基酸取代，以及在N37之前在N末端处的截短	NFRAPPVIPNVPFLWAWNAPSEFCLGKFDE PLDMSLFSFIGSPRINATGQGVTIFYVDRLG YYPYIDSITGVTVNGGIPQKISLQDHLDKA KKDITFYMPVDNLGMAVIDWEEWRPTWA RNWKPKDVYKNRSIELVQQQNVQLSLTEA TEKAKQEFEKAGKDFLVETIKLGKLLRPN HLWGYYLFPDCYNHHYKKPGYNGSCFNV EIKRNDDLSWLWNESTALYPSIYLNTQQSP VAATLYVRNRVREAIRVSKIPDAKSPLPVF AYTRIVFTDQVLKFLSQDELVYTFGETVAL GASGIVIWGTLSI**T**R**TKE**SC**QAIKE**YM**D**T**T** LNPYIINVTLAAKMCSQVLCQEQGVCIRKN WNSSDYLHLNPDNFAIQLEKGGKFTVRGK PTLEDLEQFSEKFYCSCYSTLSCKEKADVK DTDAVDVCIADGVCIDAFLKPPMETEEPQI FYNASPSTLS
HM41	94	M345T、S347T、M348K、K349E、L352Q、L353A、L354I、D355K、N356E、E359D和I361T的11个氨基酸	RAPPVIPNVPFLWAWNAPSEFCLGKFDEPL DMSLFSFIGSPRINATGQGVTIFYVDRLGY YPYIDSITGVTVNGGIPQKISLQDHLDKAK KDITFYMPVDNLGMAVIDWEEWRPTWAR NWKPKDVYKNRSIELVQQQNVQLSLTEAT

[0222]

		取代，以及 在R39之前在N末端处的截短	EKAKQEFEKAGKDFLVETIKLGKLLRPNH LWGYYLFPDCYNHHYKKPGYNGSCFNVEI KRNDDLSWLWNESTALYPSIYLNTQQSPV AATLYVRNRVREAIRVSKIPDAKSPLPVFA YTRIVFTDQVLKFLSQDELVYTFGETVALG ASGIVIWGTLSI**T**R**TKE**SC**QAIKE**YM**D**T**T**L NPYIINVTLAAKMCSQVLCQEQGVCIRKN WNSSDYLHLNPDNFAIQLEKGGKFTVRGK PTLEDLEQFSEKFYCSCYSTLSCKEKADVK DTDAVDVCIADGVCIDAFLKPPMETEEPQI FYNASPSTLS
HM42	95	M345T、S347T、 M348K、K349E、 L352Q、L353A、L354I、 D355K、N356E、E359D 和I361T的11个氨基酸取代，以及 在P41之前在N末端处的截短	PPVIPNVPFLWAWNAPSEFCLGKFDEPLD MSLFSFIGSPRINATGQGVTIFYVDRLGYYP YIDSITGVTVNGGIPQKISLQDHLDKAKKDI TFYMPVDNLGMAVIDWEEWRPTWARNW KPKDVYKNRSIELVQQQNVQLSLTEATEK AKQEFEKAGKDFLVETIKLGKLLRPNHLW GYYLFPDCYNHHYKKPGYNGSCFNVEIKR NDDLSWLWNESTALYPSIYLNTQQSPVAA TLYVRNRVREAIRVSKIPDAKSPLPVFAYT RIVFTDQVLKFLSQDELVYTFGETVALGAS GIVIWGTLSI**T**R**TKE**SC**QAIKE**YM**D**T**T**LNP YIINVTLAAKMCSQVLCQEQGVCIRKNWN SSDYLHLNPDNFAIQLEKGGKFTVRGKPTL EDLEQFSEKFYCSCYSTLSCKEKADVKDT DAVDVCIADGVCIDAFLKPPMETEEPQIFY NASPSTLS
HM43	96	L342W、S343E、 I344N、M345T、S347T、 M348K、K349E、 L352Q、L353A、L354I、 D355K、N356E、E359D 和I361T的14个氨基酸取代， 在F38之前在N末端处的截短，以及在I465之后在C末端处的截短	FRAPPVIPNVPFLWAWNAPSEFCLGKFDEP LDMSLFSFIGSPRINATGQGVTIFYVDRLGY YPYIDSITGVTVNGGIPQKISLQDHLDKAK KDITFYMPVDNLGMAVIDWEEWRPTWAR NWKPKDVYKNRSIELVQQQNVQLSLTEAT EKAKQEFEKAGKDFLVETIKLGKLLRPNH LWGYYLFPDCYNHHYKKPGYNGSCFNVEI KRNDDLSWLWNESTALYPSIYLNTQQSPV AATLYVRNRVREAIRVSKIPDAKSPLPVFA YTRIVFTDQVLKFLSQDELVYTFGETVALG ASGIVIWGS**WENT**R**TKE**SC**QAIKE**YM**D**T **T**LNPYIINVTLAAKMCSQVLCQEQGVCIRK NWNSSDYLHLNPDNFAIQLEKGGKFTVRG KPTLEDLEQFSEKFYCSCYSTLSCKEKADV KDTDAVDVCIADGVCI
HM44	97	L342W、S343E、 I344N、M345T、S347T、 M348K、K349E、 L352Q、L353A、L354I、 D355K、N356E、E359D 和I361T的14个氨基酸取代， 在F38之前在N末端处的截短，以及在D466	FRAPPVIPNVPFLWAWNAPSEFCLGKFDEP LDMSLFSFIGSPRINATGQGVTIFYVDRLGY YPYIDSITGVTVNGGIPQKISLQDHLDKAK KDITFYMPVDNLGMAVIDWEEWRPTWAR NWKPKDVYKNRSIELVQQQNVQLSLTEAT EKAKQEFEKAGKDFLVETIKLGKLLRPNH LWGYYLFPDCYNHHYKKPGYNGSCFNVEI KRNDDLSWLWNESTALYPSIYLNTQQSPV AATLYVRNRVREAIRVSKIPDAKSPLPVFA YTRIVFTDQVLKFLSQDELVYTFGETVALG

[0223]

		之后在C末端处的截短	ASGIVIWGS**WENT**R**TKE**SC**QAIKE**YM**D**T **T**LNPYIINVTLAAKMCSQVLCQEQGVCIRK NWNSSDYLHLNPDNFAIQLEKGGKFTVRG KPTLEDLEQFSEKFYCSCYSTLSCKEKADV KDTDAVDVCIADGVCID
HM45	98	L342W、S343E、I344N、M345T、S347T、M348K、K349E、L352Q、L353A、L354I、D355K、N356E、E359D和I361T的14个氨基酸取代，在F38之前在N末端处的截短，以及在A467之后在C末端处的截短	FRAPPVIPNVPFLWAWNAPSEFCLGKFDEP LDMSLFSFIGSPRINATGQGVTIFYVDRLGY YPYIDSITGVTVNGGIPQKISLQDHLDKAK KDITFYMPVDNLGMAVIDWEEWRPTWAR NWKPKDVYKNRSIELVQQQNVQLSLTEAT EKAKQEFEKAGKDFLVETIKLGKLLRPNH LWGYYLFPDCYNHHYKKPGYNGSCFNVEI KRNDDLSWLWNESTALYPSIYLNTQQSPV AATLYVRNRVREAIRVSKIPDAKSPLPVFA YTRIVFTDQVLKFLSQDELVYTFGETVALG ASGIVIWGS**WENT**R**TKE**SC**QAIKE**YM**D**T **T**LNPYIINVTLAAKMCSQVLCQEQGVCIRK NWNSSDYLHLNPDNFAIQLEKGGKFTVRG KPTLEDLEQFSEKFYCSCYSTLSCKEKADV KDTDAVDVCIADGVCIDA
HP46	99	T341S、L342W、S343E、I344N、M345T、S347T、M348K、K349E、L352Q、L353A、L354I、D355K、N356E、E359D和I361T的15个氨基酸取代，在F38之前在N末端处的截短，以及在F468之后在C末端处的截短	FRAPPVIPNVPFLWAWNAPSEFCLGKFDEP LDMSLFSFIGSPRINATGQGVTIFYVDRLGY YPYIDSITGVTVNGGIPQKISLQDHLDKAK KDITFYMPVDNLGMAVIDWEEWRPTWAR NWKPKDVYKNRSIELVQQQNVQLSLTEAT EKAKQEFEKAGKDFLVETIKLGKLLRPNH LWGYYLFPDCYNHHYKKPGYNGSCFNVEI KRNDDLSWLWNESTALYPSIYLNTQQSPV AATLYVRNRVREAIRVSKIPDAKSPLPVFA YTRIVFTDQVLKFLSQDELVYTFGETVALG ASGIVIWG**SWENT**R**TKE**SC**QAIKE**YM**D**T **T**LNPYIINVTLAAKMCSQVLCQEQGVCIRK NWNSSDYLHLNPDNFAIQLEKGGKFTVRG KPTLEDLEQFSEKFYCSCYSTLSCKEKADV KDTDAVDVCIADGVCIDAF
HM47	100	L342W、S343E、I344N、M345T、S347T、M348K、K349E、L352Q、L353A、L354I、D355K、N356E、E359D和I361T的14个氨基酸取代，在F38之前在N末端处的截短，以及在P478之后在C末端处的截短	FRAPPVIPNVPFLWAWNAPSEFCLGKFDEP LDMSLFSFIGSPRINATGQGVTIFYVDRLGY YPYIDSITGVTVNGGIPQKISLQDHLDKAK KDITFYMPVDNLGMAVIDWEEWRPTWAR NWKPKDVYKNRSIELVQQQNVQLSLTEAT EKAKQEFEKAGKDFLVETIKLGKLLRPNH LWGYYLFPDCYNHHYKKPGYNGSCFNVEI KRNDDLSWLWNESTALYPSIYLNTQQSPV AATLYVRNRVREAIRVSKIPDAKSPLPVFA YTRIVFTDQVLKFLSQDELVYTFGETVALG ASGIVIWGT**WENT**R**TKE**SC**QAIKE**YM**D**T **T**LNPYIINVTLAAKMCSQVLCQEQGVCIRK NWNSSDYLHLNPDNFAIQLEKGGKFTVRG KPTLEDLEQFSEKFYCSCYSTLSCKEKADV KDTDAVDVCIADGVCIDAFLKPPMETEEP
HM48	101	L342W、S343E、I344N、M345T、S347T、	FRAPPVIPNVPFLWAWNAPSEFCLGKFDEP LDMSLFSFIGSPRINATGQGVTIFYVDRLGY

[0224]

		M348K、K349E、L352Q、L353A、L354I、D355K、N356E、E359D和I361T的14个氨基酸取代，在F38之前在N末端处的截短，以及在I480之后在C末端处的截短	YPYIDSITGVTVNGGIPQKISLQDHLDKAK KDITFYMPVDNLGMAVIDWEEWRPTWAR NWKPKDVYKNRSIELVQQQNVQLSLTEAT EKAKQEFEKAGKDFLVETIKLGKLLRPNH LWGYYLFPDCYNHHYKKPGYNGSCFNVEI KRNDDLSWLWNESTALYPSIYLNTQQSPV AATLYVRNRVREAIRVSKIPDAKSPLPVFA YTRIVFTDQVLKFLSQDELVYTFGETVALG ASGIVIWGT**WENT**R**TKE**SC**QAIKE**YM**D**T **T**LNPYIINVTLAAKMCSQVLCQEQGVCIRK NWNSSDYLHLNPDNFAIQLEKGGKFTVRG KPTLEDLEQFSEKFYCSCYSTLSCKEKADV KDTDAVDVCIADGVCIDAFLKPPMETEEP QI
HM49	102	L342W、S343E、I344N、M345T、S347T、M348K、K349E、L352Q、L353A、L354I、D355K、N356E、E359D和I361T的14个氨基酸取代，在F38之前在N末端处的截短，以及在Y482之后在C末端处的截短	FRAPPVIPNVPFLWAWNAPSEFCLGKFDEP LDMSLFSFIGSPRINATGQGVTIFYVDRLGY YPYIDSITGVTVNGGIPQKISLQDHLDKAK KDITFYMPVDNLGMAVIDWEEWRPTWAR NWKPKDVYKNRSIELVQQQNVQLSLTEAT EKAKQEFEKAGKDFLVETIKLGKLLRPNH LWGYYLFPDCYNHHYKKPGYNGSCFNVEI KRNDDLSWLWNESTALYPSIYLNTQQSPV AATLYVRNRVREAIRVSKIPDAKSPLPVFA YTRIVFTDQVLKFLSQDELVYTFGETVALG ASGIVIWGT**WENT**R**TKE**SC**QAIKE**YM**D**T **T**LNPYIINVTLAAKMCSQVLCQEQGVCIRK NWNSSDYLHLNPDNFAIQLEKGGKFTVRG KPTLEDLEQFSEKFYCSCYSTLSCKEKADV KDTDAVDVCIADGVCIDAFLKPPMETEEP QIFY
HM50	103	L342W、S343E、I344N、M345T、S347T、M348K、K349E、L352Q、L353A、L354I、D355K、N356E、E359D和I361T的14个氨基酸取代，在F38之前在N末端处的截短，以及在A484之后在C末端处的截短	FRAPPVIPNVPFLWAWNAPSEFCLGKFDEP LDMSLFSFIGSPRINATGQGVTIFYVDRLGY YPYIDSITGVTVNGGIPQKISLQDHLDKAK KDITFYMPVDNLGMAVIDWEEWRPTWAR NWKPKDVYKNRSIELVQQQNVQLSLTEAT EKAKQEFEKAGKDFLVETIKLGKLLRPNH LWGYYLFPDCYNHHYKKPGYNGSCFNVEI KRNDDLSWLWNESTALYPSIYLNTQQSPV AATLYVRNRVREAIRVSKIPDAKSPLPVFA YTRIVFTDQVLKFLSQDELVYTFGETVALG ASGIVIWGT**WENT**R**TKE**SC**QAIKE**YM**D**T **T**LNPYIINVTLAAKMCSQVLCQEQGVCIRK NWNSSDYLHLNPDNFAIQLEKGGKFTVRG KPTLEDLEQFSEKFYCSCYSTLSCKEKADV KDTDAVDVCIADGVCIDAFLKPPMETEEP QIFYNA
HM51	104	L342W、S343E、I344N、M345T、S347T、M348K、K349E、L352Q、L353A、L354I、D355K、N356E、E359D和I361T的14个氨基酸	FRAPPVIPNVPFLWAWNAPSEFCLGKFDEP LDMSLFSFIGSPRINATGQGVTIFYVDRLGY YPYIDSITGVTVNGGIPQKISLQDHLDKAK KDITFYMPVDNLGMAVIDWEEWRPTWAR NWKPKDVYKNRSIELVQQQNVQLSLTEAT EKAKQEFEKAGKDFLVETIKLGKLLRPNH

[0225]

		取代， 在F38之前在N末端处的截短，以及在P486之后在C末端处的截短	LWGYYLFPDCYNHHYKKPGYNGSCFNVEI KRNDDLSWLWNESTALYPSIYLNTQQSPV AATLYVRNRVREAIRVSKIPDAKSPLPVFA YTRIVFTDQVLKFLSQDELVYTFGETVALG ASGIVIWGT**WENT**R**TKE**SC**QAIKE**YM**D**T **T**LNPYIINVTLAAKMCSQVLCQEQGVCIRK NWNSSDYLHLNPDNFAIQLEKGGKFTVRG KPTLEDLEQFSEKFYCSCYSTLSCKEKADV KDTDAVDVCIADGVCIDAFLKPPMETEEP QIFYNASP
HM52	105	L342W、S343E、I344N、M345T、S347T、M348K、K349E、L352Q、L353A、L354I、D355K、N356E、E359D和I361T的14个氨基酸取代， 在F38之前在N末端处的截短，以及在T488之后在C末端处的截短	FRAPPVIPNVPFLWAWNAPSEFCLGKFDEP LDMSLFSFIGSPRINATGQGVTIFYVDRLGY YPYIDSITGVTVNGGIPQKISLQDHLDKAK KDITFYMPVDNLGMAVIDWEEWRPTWAR NWKPKDVYKNRSIELVQQQNVQLSLTEAT EKAKQEFEKAGKDFLVETIKLGKLLRPNH LWGYYLFPDCYNHHYKKPGYNGSCFNVEI KRNDDLSWLWNESTALYPSIYLNTQQSPV AATLYVRNRVREAIRVSKIPDAKSPLPVFA YTRIVFTDQVLKFLSQDELVYTFGETVALG ASGIVIWGT**WENT**R**TKE**SC**QAIKE**YM**D**T **T**LNPYIINVTLAAKMCSQVLCQEQGVCIRK NWNSSDYLHLNPDNFAIQLEKGGKFTVRG KPTLEDLEQFSEKFYCSCYSTLSCKEKADV KDTDAVDVCIADGVCIDAFLKPPMETEEP QIFYNASPST
HM53	106	T341G、L342W、S343E、I344N、M345T、S347T、M348K、K349E、L352Q、L353A、L354I、D355K、N356E、E359D和I361T的15个氨基酸取代，在L36之前在N末端处的截短，以及在S490之后在C末端处的截短	LNFRAPPVIPNVPFLWAWNAPSEFCLGKFD EPLDMSLFSFIGSPRINATGQGVTIFYVDRL GYYPYIDSITGVTVNGGIPQKISLQDHLDK AKKDITFYMPVDNLGMAVIDWEEWRPTW ARNWKPKDVYKNRSIELVQQQNVQLSLTE ATEKAKQEFEKAGKDFLVETIKLGKLLRP NHLWGYYLFPDCYNHHYKKPGYNGSCFN VEIKRNDDLSWLWNESTALYPSIYLNTQQS PVAATLYVRNRVREAIRVSKIPDAKSPLPV FAYTRIVFTDQVLKFLSQDELVYTFGETVA LGASGIVIWG**GWENT**R**TKE**SC**QAIKE**YM **D**T**T**LNPYIINVTLAAKMCSQVLCQEQGVCI RKNWNSSDYLHLNPDNFAIQLEKGGKFTV RGKPTLEDLEQFSEKFYCSCYSTLSCKEKA DVKDTDAVDVCIADGVCIDAFLKPPMETE EPQIFYNASPSTLS
HM54	107	T341A、L342W、S343E、I344N、M345T、S347T、M348K、K349E、L352Q、L353A、L354I、D355K、N356E、E359D和I361T的15个氨基酸取代，在L36之前在N末端处的截短，以及在S490之后	LNFRAPPVIPNVPFLWAWNAPSEFCLGKFD EPLDMSLFSFIGSPRINATGQGVTIFYVDRL GYYPYIDSITGVTVNGGIPQKISLQDHLDK AKKDITFYMPVDNLGMAVIDWEEWRPTW ARNWKPKDVYKNRSIELVQQQNVQLSLTE ATEKAKQEFEKAGKDFLVETIKLGKLLRP NHLWGYYLFPDCYNHHYKKPGYNGSCFN VEIKRNDDLSWLWNESTALYPSIYLNTQQS PVAATLYVRNRVREAIRVSKIPDAKSPLPV FAYTRIVFTDQVLKFLSQDELVYTFGETVA

[0226]

		在C末端处的截短	LGASGIVIWG**AWENT**R**TKE**SC**QAIKE**YM **D**T**T**LNPYIINVTLAAKMCSQVLCQEQGVCI RKNWNSSDYLHLNPDNFAIQLEKGGKFTV RGKPTLEDLEQFSEKFYCSCYSTLSCKEKA DVKDTDAVDVCIADGVCIDAFLKPPMETE EPQIFYNASPSTLS
HM55	108	T341C、L342W、S343E、I344N、M345T、S347T、M348K、K349E、L352Q、L353A、L354I、D355K、N356E、E359D和I361T的15个氨基酸取代，在L36之前在N末端处的截短，以及在S490之后在C末端处的截短	LNFRAPPVIPNVPFLWAWNAPSEFCLGKFD EPLDMSLFSFIGSPRINATGQGVTIFYVDRL GYYPYIDSITGVTVNGGIPQKISLQDHLDK AKKDITFYMPVDNLGMAVIDWEEWRPTW ARNWKPKDVYKNRSIELVQQQNVQLSLTE ATEKAKQEFEKAGKDFLVETIKLGKLLRP NHLWGYYLFPDCYNHHYKKPGYNGSCFN VEIKRNDDLSWLWNESTALYPSIYLNTQQS PVAATLYVRNRVREAIRVSKIPDAKSPLPV FAYTRIVFTDQVLKFLSQDELVYTFGETVA LGASGIVIWG**CWENT**R**TKE**SC**QAIKE**YM **D**T**T**LNPYIINVTLAAKMCSQVLCQEQGVCI RKNWNSSDYLHLNPDNFAIQLEKGGKFTV RGKPTLEDLEQFSEKFYCSCYSTLSCKEKA DVKDTDAVDVCIADGVCIDAFLKPPMETE EPQ109IFYNASPSTLS
HM56	109	T341D、L342W、S343E、I344N、M345T、S347T、M348K、K349E、L352Q、L353A、L354I、D355K、N356E、E359D和I361T的15个氨基酸取代，在L36之前在N末端处的截短，以及在S490之后在C末端处的截短	LNFRAPPVIPNVPFLWAWNAPSEFCLGKFD EPLDMSLFSFIGSPRINATGQGVTIFYVDRL GYYPYIDSITGVTVNGGIPQKISLQDHLDK AKKDITFYMPVDNLGMAVIDWEEWRPTW ARNWKPKDVYKNRSIELVQQQNVQLSLTE ATEKAKQEFEKAGKDFLVETIKLGKLLRP NHLWGYYLFPDCYNHHYKKPGYNGSCFN VEIKRNDDLSWLWNESTALYPSIYLNTQQS PVAATLYVRNRVREAIRVSKIPDAKSPLPV FAYTRIVFTDQVLKFLSQDELVYTFGETVA LGASGIVIWG**DWENT**R**TKE**SC**QAIKE**YM **D**T**T**LNPYIINVTLAAKMCSQVLCQEQGVCI RKNWNSSDYLHLNPDNFAIQLEKGGKFTV RGKPTLEDLEQFSEKFYCSCYSTLSCKEKA DVKDTDAVDVCIADGVCIDAFLKPPMETE EPQIFYNASPSTLS
HP57	110	I344N、M345T、S347T、M348K、K349E、L352Q、L353A、L354I、D355K、N356E、E359D和I361T的12个氨基酸取代，在F38之前在N末端处的截短，以及在F468之后在C末端处的截短	FRAPPVIPNVPFLWAWNAPSEFCLGKFDEP LDMSLFSFIGSPRINATGQGVTIFYVDRLGY YPYIDSITGVTVNGGIPQKISLQDHLDKAK KDITFYMPVDNLGMAVIDWEEWRPTWAR NWKPKDVYKNRSIELVQQQNVQLSLTEAT EKAKQEFEKAGKDFLVETIKLGKLLRPNH LWGYYLFPDCYNHHYKKPGYNGSCFNVEI KRNDDLSWLWNESTALYPSIYLNTQQSPV AATLYVRNRVREAIRVSKIPDAKSPLPVFA YTRIVFTDQVLKFLSQDELVYTFGETVALG ASGIVIWGTLS**NT**R**TKE**SC**QAIKE**YM**D**T**T** LNPYIINVTLAAKMCSQVLCQEQGVCIRKN WNSSDYLHLNPDNFAIQLEKGGKFTVRGK PTLEDLEQFSEKFYCSCYSTLSCKEKADVK

[0227]

			DTDAVDVCIADGVCIDAF
HP58	111	S343E、I344N、M345T、S347T、M348K、K349E、L352Q、L353A、L354I、D355K、N356E、E359D和I361T的13个氨基酸取代，在F38之前在N末端处的截短，以及在F468之后在C末端处的截短	FRAPPVIPNVPFLWAWNAPSEFCLGKFDEP LDMSLFSFIGSPRINATGQGVTIFYVDRLGY YPYIDSITGVTVNGGIPQKISLQDHLDKAK KDITFYMPVDNLGMAVIDWEEWRPTWAR NWKPKDVYKNRSIELVQQQNVQLSLTEAT EKAKQEFEKAGKDFLVETIKLGKLLRPNH LWGYYLFPDCYNHHYKKPGYNGSCFNVEI KRNDDLSWLWNESTALYPSIYLNTQQSPV AATLYVRNRVREAIRVSKIPDAKSPLPVFA YTRIVFTDQVLKFLSQDELVYTFGETVALG ASGIVIWGTL**ENT**R**TKE**SC**QAIKE**YM**D**T**T** LNPYIINVTLAAKMCSQVLCQEQGVCIRKN WNSSDYLHLNPDNFAIQLEKGGKFTVRGK PTLEDLEQFSEKFYCSCYSTLSCKEKADVK DTDAVDVCIADGVCIDAF
HP59	112	T341A、L342W、S343E、I344N、M345T、S347T、M348K、K349E、L352Q、L353A、L354I、D355K、N356E、E359D和I361T的15个氨基酸取代，在F38之前在N末端处的截短，以及在F468之后在C末端处的截短	FRAPPVIPNVPFLWAWNAPSEFCLGKFDEP LDMSLFSFIGSPRINATGQGVTIFYVDRLGY YPYIDSITGVTVNGGIPQKISLQDHLDKAK KDITFYMPVDNLGMAVIDWEEWRPTWAR NWKPKDVYKNRSIELVQQQNVQLSLTEAT EKAKQEFEKAGKDFLVETIKLGKLLRPNH LWGYYLFPDCYNHHYKKPGYNGSCFNVEI KRNDDLSWLWNESTALYPSIYLNTQQSPV AATLYVRNRVREAIRVSKIPDAKSPLPVFA YTRIVFTDQVLKFLSQDELVYTFGETVALG ASGIVIWG**AWENT**R**TKE**SC**QAIKE**YM**D**T **T**LNPYIINVTLAAKMCSQVLCQEQGVCIRK NWNSSDYLHLNPDNFAIQLEKGGKFTVRG KPTLEDLEQFSEKFYCSCYSTLSCKEKADV KDTDAVDVCIADGVCIDAF
HP60	113	T341G、L342W、S343E、I344N、M345T、S347T、M348K、K349E、L352Q、L353A、L354I、D355K、N356E、E359D和I361T的15个氨基酸取代，在F38之前在N末端处的截短，以及在F468之后在C末端处的截短	FRAPPVIPNVPFLWAWNAPSEFCLGKFDEP LDMSLFSFIGSPRINATGQGVTIFYVDRLGY YPYIDSITGVTVNGGIPQKISLQDHLDKAK KDITFYMPVDNLGMAVIDWEEWRPTWAR NWKPKDVYKNRSIELVQQQNVQLSLTEAT EKAKQEFEKAGKDFLVETIKLGKLLRPNH LWGYYLFPDCYNHHYKKPGYNGSCFNVEI KRNDDLSWLWNESTALYPSIYLNTQQSPV AATLYVRNRVREAIRVSKIPDAKSPLPVFA YTRIVFTDQVLKFLSQDELVYTFGETVALG ASGIVIWG**GWENT**R**TKE**SC**QAIKE**YM**D**T **T**LNPYIINVTLAAKMCSQVLCQEQGVCIRK NWNSSDYLHLNPDNFAIQLEKGGKFTVRG KPTLEDLEQFSEKFYCSCYSTLSCKEKADV KDTDAVDVCIADGVCIDAF
HP61	114	A40G、T341S、L342W、S343E、I344N、M345T、S347T、M348K、K349E、L352Q、L353A、L354I、D355K、N356E、E359D和I361T	FR**G**PPVIPNVPFLWAWNAPSEFCLGKFDEP LDMSLFSFIGSPRINATGQGVTIFYVDRLGY YPYIDSITGVTVNGGIPQKISLQDHLDKAK KDITFYMPVDNLGMAVIDWEEWRPTWAR NWKPKDVYKNRSIELVQQQNVQLSLTEAT EKAKQEFEKAGKDFLVETIKLGKLLRPNH

[0228]

		的16个氨基酸取代，在F38之前在N末端处的截短，以及在F468之后在C末端处的截短	LWGYYLFPDCYNHHYKKPGYNGSCFNVEI KRNDDLSWLWNESTALYPSIYLNTQQSPV AATLYVRNRVREAIRVSKIPDAKSPLPVFA YTRIVFTDQVLKFLSQDELVYTFGETVALG ASGIVIWG**SWENT**R**TKE**SC**QAIKE**YM**D**T **T**LNPYIINVTLAAKMCSQVLCQEQGVCIRK NWNSSDYLHLNPDNFAIQLEKGGKFTVRG KPTLEDLEQFSEKFYCSCYSTLSCKEKADV KDTDAVDVCIADGVCIDAF
HP62	115	P42的移除，T341S、L342W、S343E、I344N、M345T、S347T、M348K、K349E、L352Q、L353A、L354I、D355K、N356E、E359D和I361T的15个氨基酸取代，在F38之前在N末端处的截短，以及在F468之后在C末端处的截短	FRGP**P**VIPNVPFLWAWNAPSEFCLGKFDEP LDMSLFSFIGSPRINATGQGVTIFYVDRLGY YPYIDSITGVTVNGGIPQKISLQDHLDKAK KDITFYMPVDNLGMAVIDWEEWRPTWAR NWKPKDVYKNRSIELVQQQNVQLSLTEAT EKAKQEFEKAGKDFLVETIKLGKLLRPNH LWGYYLFPDCYNHHYKKPGYNGSCFNVEI KRNDDLSWLWNESTALYPSIYLNTQQSPV AATLYVRNRVREAIRVSKIPDAKSPLPVFA YTRIVFTDQVLKFLSQDELVYTFGETVALG ASGIVIWG**SWENT**R**TKE**SC**QAIKE**YM**D**T **T**LNPYIINVTLAAKMCSQVLCQEQGVCIRK NWNSSDYLHLNPDNFAIQLEKGGKFTVRG KPTLEDLEQFSEKFYCSCYSTLSCKEKADV KDTDAVDVCIADGVCIDAF

[0229] 实施例2.PH20变体HM1和HM6的构建

[0230] 如图1B所示,PH20的氨基酸残基M345至N363对应于蛋白质三级结构模型中的α螺旋8区域和α螺旋7与α螺旋8之间的接头区域。在α螺旋8的氨基酸中,C351与α螺旋1的C60形成二硫键;Y357与α螺旋7的F315形成疏水相互作用;并且N363与α螺旋1的D69形成氢键,从而使临近α螺旋8的二级结构稳定(图1C)。

[0231] 为了通过取代位于PH20的α螺旋8区域和α螺旋7与α螺旋8之间的接头区域中的氨基酸来构建比WT具有更高酶活性和热稳定性的变体,构建了以下变体:变体HM1,其中M345至N363区域中的12个氨基酸被取代;变体HM2,其中Y365至V379区域中的7个氨基酸被取代;以及变体HM3,其中M345至V379区域中的19个氨基酸被取代。在位于PH20的α螺旋8中的氨基酸中,参与二硫键键合的C351和参与疏水性相互作用的Y357未被取代。变体HM1、HM2和HM3中的取代的氨基酸序列在上表11中示出。当用包含变体HM1,HM2或HM3的基因的pcDNA3.4-TOPO质粒转染ExpiCHO细胞时,变体HM1在ExpiCHO细胞中表达(图3A),而变体HM2和HM3未在细胞中表达。不仅通过测量酶活性,而且通过使用针对人PH20的抗体(Abcam、ab193009)的蛋白质印迹分析来证实蛋白质是否将被表达。所述抗体的表位是Q173至P222区域。这些实验结果表明,用于构建变体HM2和HM3的α螺旋8的氨基酸序列的Y365至V379区域的氨基酸取代对蛋白质结构造成严重影响;因此,变体HM2和HM3的蛋白质没有被表达。变体HM1的表达水平比野生型WT的表达水平高3.4倍(图2)。变体HM1是其中通过用甘氨酸取代N363而除去α螺旋8的N363与α螺旋1的D69之间的氢键的变体(图1C)。为了恢复N363与D69之间的氢键,用天冬酰胺取代HM1中的G363,从而构建了变体HM6。变体HM6中的取代的氨基酸在上表11中示出。

[0232] 变体HM6在ExpiCHO细胞中表达,并且其表达水平与变体HM1相似(所述表达水平比WT的表达水平高3.4倍)(图2)。当通过浊度测定测量酶活性时,显示变体HM6的酶活性比WT

的酶活性高1.3倍(图3B)。在底物-凝胶测定中,通常在SDS-PAGE后用2.5% Triton X-100(w/v)去除SDS,并在37℃下进行酶促反应1至4h,在此期间使用阿辛蓝染料测量透明质酸酶水解透明质酸的程度。已知当从底物凝胶除去SDS时,立即发生蛋白质折叠,并且底物不影响蛋白质折叠。当在37℃下通过底物-凝胶测定测量WT以及变体HM1和HM6的酶活性持续1至4h时,HM6展现出比WT和变体HM1的酶活性更高的酶活性(图3C)。此结果表明,变体HM1和HM6的蛋白质折叠和所得复性比WT的那些更快,并且所构建的变体展现出比WT更高的酶活性。当使用PH20本身的信号肽时,所述蛋白质在ExpiCHO细胞中的表达水平低,并且为了解决此问题,使用了人血清白蛋白或人Hyal1的信号肽序列。如图3C所示,当将人血清白蛋白和人Hyal1的信号肽中的每一个用作变体HM1的信号肽时,所述蛋白质的表达增加,并且两个信号肽之间没有显著差异。当通过底物-凝胶测定测量酶活性时,具有人血清白蛋白信号肽的WT和具有人血清白蛋白或Hyal1信号肽的变体HM1在5至8的pH范围内展现出酶活性(图3D)。在本发明中,将人血清白蛋白的信号肽用作在HM1之后构建的变体的信号肽。

[0233] 当基于聚集温度比较WT以及变体HM1和HM6的热稳定性时,聚集温度分别为46.5℃、53.0℃和50.5℃,这指示变体HM1和HM6的聚集温度分别比WT高6.5℃和4.0℃(图10)。测量聚集温度的结果与底物-凝胶测定中显示的蛋白质重折叠结果一致。这些结果首次表明,由α螺旋8的N363残基形成的氢键在PH20的热稳定性和酶活性方面起重要作用。

[0234] 此外,当使用苯基柱色谱法比较WT以及HM1和HM6变体的亲水/疏水性质时,HM1和HM6均比WT更早洗脱。这表明由于氨基酸的取代,变体HM1和HM6具有比WT更亲水的性质。然而,与WT不同,从苯基柱洗脱的变体HM1和HM6显示两个峰,并且在用PNGase F处理时展现出相同的分子量。这显现出由N糖基化引起的差异(图3E)。

[0235] 实施例3.PH20变体HM4、HM7、HM8、HM9、HM10、HM11和HM12的构建

[0236] 据信,通过实施例2中变体HM1和HM6的构建,M345至N363和M345至I361区域的氨基酸取代导致PH20的酶活性和热稳定性两者的增加,在蛋白质工程方面取得了巨大进步。因此,基于变体HM1和HM6,在N末端和C末端方向上的其他氨基酸被另外地取代。

[0237] 首先,构建了变体HM4和HM7,所述变体HM4和HM7包含变体HM1和HM6中的取代的氨基酸,并且其中G340与I344之间的氨基酸另外被G340V、T341S、L342W、S343E和I344N取代。变体HM4和HM7中的取代的氨基酸序列的序列在上表11中示出。变体HM4和HM7在ExpiCHO细胞中表达。HM7的蛋白质纯化结果在图5A中示出。HM4和HM7显示出与WT相比,蛋白质表达增加了6.3倍,并且显示出与WT相比,聚集温度分别增加了10℃和11.5℃。然而,通过浊度测定测量的HM4和HM7的酶活性为WT的约15%(图5B)。酶活性和热稳定性通常具有权衡关系,但在本发明中,显现出在变体HM1和HM6中引入的取代增加了变体的热稳定性,同时保持了酶活性,并且变体HM4和HM7的酶活性由于热稳定性的过度增加而降低。就蛋白质工程而言,在变体HM4和HM7中显现出的聚集温度升高11.5℃是非常重要的结果。当通过Stern-Volmer图分析蛋白质的结构柔性时,显示通过取代α螺旋8及其接头区域获得的HM1、HM6、HM4和HM7的结构柔性都高于WT的结构柔性(图11A)。此结果表明局部热稳定性的增加导致整个蛋白质结构的柔性的增加。

[0238] 变体HM6与HM7之间的差异是G340与I344之间的氨基酸。为了鉴定参与变体HM7热稳定性提高的氨基酸,基于变体HM6构建了以下变体:HM8,其中I344N被取代;HM9,其中S343和I344N被取代;HM10,其中L342W、S343E和I344N被取代;以及HM21,其中T341S、L342W、

S343E和I344N被取代。变体HM8、HM9、HM10和HM21中的取代的氨基酸的序列在上表11中示出。变体HM8、HM9、HM10和HM21在ExpiCHO细胞中表达(图5A)。当将I344N、S343E和L342W引入基于变体HM6的α螺旋8的N末端方向环中时,变体HM8、HM9和HM10的聚集温度分别升高至52.5℃、53℃和55.5℃(图10)。然而,变体HM8、HM9和HM10保持与WT的酶活性相似的酶活性(图5B)。此结果表明,在变体HM8、HM9和HM10中引入的氨基酸取代对酶的热稳定性具有局部作用,但对酶活性没有显著影响。然而,在pH 7.0下,与HM10相比,HM21显示出降低的热稳定性,但与WT相比,HM21显示出高大约2倍的酶活性。当在底物-凝胶测定中使WT和每种变体与底物反应1h时,酶活性以HM21>HM10>HM9>HM8>HM6>WT的顺序降低(图5C)。

[0239] 当使用苯基柱色谱法检查变体HM7、HM8、HM9、HM10和HM21的物理特性时,这些PH20变体比WT更早洗脱,表明这些变体均具有亲水性质。然而,氨基酸取代位置处的主峰的图案显现出不同(图5D)。

[0240] 变体HM7在苯基柱色谱法中也显示出两个峰,就像变体HM1和HM6一样,表明存在两种不同的类型。

[0241] 为了根据它们的等电点来检查WT和变体的迁移模式,进行了等电点聚焦(以下称为IEF)分析(图5E)。在IEF凝胶上,WT以及变体HM6和HM8显示出相似的迁移模式,并且包含S343E突变的变体HM9、HM10、HM21和HM7迁移到更酸性的区域。此结果表明,由于G340与I344之间氨基酸的S343E取代引入了谷氨酸,蛋白质的等电点发生了变化。

[0242] 此外,基于变体HM6,α螺旋8的C末端区域中的其他氨基酸被取代,从而构建了变体HM11和HM12。变体HM11和HM12中的取代的氨基酸的序列在上表11中示出。变体HM11在ExpiCHO细胞中表达,但其表达水平低于WT的表达水平(图2),并且变体HM12未在ExpiCHO细胞中表达。变体HM11展现出相当于WT的32%的活性(图6B)。

[0243] 实施例4.基于HM6的N末端氨基酸截短的PH20变体的构建

[0244] 已熟知PH20的C末端区域在PH20的表达和酶活性方面起重要作用,但PH20的N末端区域的作用并不是熟知的。为了检查在PH20的N末端区域处切割氨基酸对酶活性的影响,基于变体HM6构建了具有在N37、F38、R39、A40、P41或P42处被切割的N末端的变体HM40、HM13、HM41、HM24、HM42和HM25(表11)。此外,另外构建了在N末端氨基酸处具有修饰的HP61和HP62。

[0245] 变体HM40、HM13、HM41、HM24、HM42、HP61和HP62在ExpiCHO细胞中表达,但HM25未表达(图7A和图7B)。N末端截短的PH20变体显示出取决于N末端起始位置的酶活性差异。变体HM40、HM13和HM41(其中一至三个氨基酸被切割)显示出与模板HM6相似的酶活性,但HM24和HM42(其中四至五个氨基酸被切割)显示出比HM6稍低的活性(图7C)。然而,其中六个氨基酸被切割的HM25在ExpiCHO细胞中很少表达,并且酶活性也显著低(3.5U/μg)。显现出在N末端氨基酸处具有修饰的HP61和HP62的酶活性的变化并不显著。

[0246] 关于通过底物-凝胶测定(反应1h)测量的N末端切割的PH20变体的酶活性,HM40、HM13和HM41的酶活性与HM6变体的酶活性相似,但HM24和HM42的酶活性低于HM6的酶活性(图7D)。由于产生的蛋白质的量很少,因此无法分析其中六个氨基酸被切割的HM25。

[0247] 当使用苯基柱色谱法分析变体HM40、HM13、HM41、HM24和HM42的物理特性时,这些变体比WT更早地从柱上洗脱,表明这些变体具有亲水性质(图7E)。此结果表明,当考虑L36至A40残基的特征时,基于变体HM6构建的变体HM40、HM13、HM41、HM24和HM42保持了HM6的亲

水性质。

[0248] 取决于氨基酸起始的位置,通过DLS测量的N末端切割的PH20变体的聚集温度在变体之间是不同的(图7F)。尽管变体HM40、HM13、HM41和HM42的N末端氨基酸残基被切割,但它们显示出50℃或更高的聚集温度,这指示模板HM6的特征保持完整。在这些变体中,变体HM40和HM42展现出的聚集温度比HM6高3℃至4℃,这指示这些变体的热稳定性提高。此外,为了检查PH20的N末端氨基酸的取代对蛋白质表达和酶活性的影响,构建了以下变体:变体HM17,其中PH20的N末端氨基酸残基36至47(LNFRAPPVIPNV)被FRGPLLPNR取代;和变体HM18,其中PH20的N末端氨基酸残基36至52(LNFRAPPVIPNVPFLWA)被FRGPLLPNRPFTTV取代。变体HM17和HM18中的取代氨基酸的序列在上表11中示出。变体HM17和HM18未在ExpiCHO细胞中表达。这表明,即使位于N末端处的多达五个氨基酸被切割,变体也显示出蛋白质表达和酶活性;然而,更多氨基酸残基(如36至47个残基或36至52个残基)的取代对蛋白质折叠是有影响的。

[0249] 实施例5.PH20的C末端氨基酸截短的基于HM6的变体HM14、HM15和HM16的构建

[0250] 已知PH20的C末端区域在蛋白质表达和酶活性方面起重要作用。在本发明中,基于变体HM6构建了变体HM14、HM15和HM16,其中C末端氨基酸分别在I465、F468和K471处被切割。这些变体HM14、HM15和HM16中的取代的氨基酸的序列在上表11中示出。这些变体HM14、HM15和HM16在ExpiCHO细胞中表达(图8A),并且其蛋白质表达水平为HM16>HM15>HM14的顺序,这指示蛋白质表达水平随着被切割的C末端氨基酸数量的增加而降低(图8A)。然而,变体HM14、HM15和HM16的酶活性为HM16>HM14(≈WT)>HM15的顺序(图8B)。根据Frost等人,PH20的C末端477-483区域是可溶性表达所必需的,并且当C末端在467处被切割时,变体的酶活性仅是其C末端在残基477至483处被切割的PH20变体的10%,并且当C末端在残基467之前被切割时,变体没有酶活性。然而,在本发明中基于变体HM6构建的C末端切割的变体HM14、HM15和HM16由于M345至I361区域的氨基酸取代而显示出增加的蛋白质折叠,并且因此其热稳定性增加。为此,即使当C末端在I465、F468或P471之后被切割时,所述变体也显示出与WT的酶活性相似的酶活性,并且其酶活性没有显著降低。

[0251] 通过使用丙烯酰胺的荧光猝灭检查了WT以及变体HM14、HM15和HM16的结构柔性(图11B)。变体HM14、HM15和HM16在结构上都比WT更具柔性。此结果表明,使用变体HM6构建的C末端切割的变体也保持了其结构柔性。

[0252] 通过浊度测定测量的变体HM14、HM15和HM16的酶活性也在底物-凝胶测定中得到证实(图8C)。

[0253] 当使用苯基柱色谱法分析C末端切割的变体的物理特性时,变体HM14、HM15和HM16均比WT更早洗脱,这指示它们具有亲水性质。此外,这些变体的疏水性为HM16>HM14>HM15的顺序(图8D)。

[0254] 实施例6.包含N末端和C末端氨基酸切割的基于HM10的变体HM19和HM20的构建

[0255] 在本发明中构建的PH20变体是基于HM6,并且HM8、HM9和HM10(其中氨基酸残基G340至I344被另外地取代)在蛋白质表达水平、酶活性和热稳定性方面展现出比WT更好的性能。基于在变体HM8、HM9和HM10中具有高酶活性和热稳定性的HM10,构建了变体HM19和HM20,其具有在F38处被切割的N末端和在F468处被切割的C末端。HM19和HM20均在ExpiCHO细胞中表达,并使用HisTrap柱色谱法纯化(图9A)。当通过浊度测定测量这些变体的酶活性

时,HM19和HM20展现出比WT的酶活性高10％的酶活性(图9B)。在底物-凝胶测定中,HM19和HM20还展现出比WT更高的酶活性(图9C)。

[0256] 实施例7.基于HM10的PH20变体的表征

[0257] 基于HM10的C末端截短的变体在ExpiCHO细胞中的表达水平显示出随着C末端区域长度变短而降低的趋势,并且当C末端在C464处被截短或更短时,这些变体不表达(图12)。C464是必需的,因为它与C437形成二硫键,并且对于保持蛋白质结构是重要的。

[0258] 为了检查当C末端在残基464处被切割或更短时,变体是否在ExpiCHO细胞中不表达,进行了蛋白质印迹分析。如图13所示,在蛋白质印迹中未检测到HM30、HM31、HM32和HM33变体。

[0259] 通过浊度测定测量的基于HM10的C末端截短的变体的酶活性在图14A和图14B中示出。与WT相比,C末端截短的PH20变体展现出±20％的酶活性。当C末端在I480之后被切割时,酶活性总体上增加。此外,与存在6xHis标签时相比,通过从HM19和HM20除去6xHis标签获得的变体HP19和HP20分别显示出23％和9.6％的酶活性降低。这表明6xHis标签对酶活性有影响。

[0260] 当通过底物-凝胶测定测量基于HM10的C末端截短变体的酶活性时,这些变体展现出比WT更高的酶活性,并且显示出与模板HM10的酶活性相似的酶活性,这指示取决于C末端区域长度的酶活性差异并不显著(图14C)。

[0261] 实施例8.基于HM21的PH20变体的表征

[0262] 将变体HP34通过四步柱色谱法进行纯化(图15A),并且将变体HP46通过三步柱色谱法进行纯化(图15B)。产生的HP34和HP46的量分别为1.73mg/L和25.6mg/L。HP34和HP46是不含6xHis标签的变体,并且纯化这些变体的过程与纯化具有6xHis标签的变体的过程不同,因此难以比较所述蛋白质的表达水平。

[0263] 在浊度测定中,HP34和HP46的活性分别为45.6U/μg和47.2U/μg,这比WT的活性高约2倍,并且比模板HM21的活性高约10％(图16A)。

[0264] 通过Morgan-Elson测定测量每种变体的动力学,并且测量结果在图16B中示出。HP34和HP46的催化效率(k_{cat}/K_m)比野生型HW2的催化效率高1.7至2倍。此结果与比活性高于WT的比活性的结果是一致的。这些变体中的米氏常数(K_m)低于HW2,这指示这些变体的底物亲和力增加。从这些结果可以得出结论:HM21、HP34和HP46变体与底物牢固地结合,并具有将底物高效转化为产物的特性。此特性归因于用丝氨酸取代T341的影响。当位于位置341处的苏氨酸被氨基酸(如丙氨酸、甘氨酸、天冬氨酸等)取代时,可以预测所述取代对酶活性的影响。

[0265] 通过DLS测量的HP34和HP46的聚集温度分别为51.5℃和51.0℃,其与模板HM21的聚集温度相似,并且比HW2的聚集温度高约5℃,这指示这些变体是热稳定的(图17A)。通过底物-凝胶测定测量的HP20的酶活性与HP20的酶活性相似,而HP46展现出比HP20更高的酶活性,这指示作为模板的HM21的蛋白质折叠比HM10的蛋白质折叠更好(图17B)。

[0266] 将野生型HW2和变体HP46在pH 7.0和pH 3.0下放置过夜,然后通过底物-凝胶测定比较其酶活性。作为结果,显示出HP46不仅在pH 7.0下而且在pH3.0下都展现出高活性,这指示其具有优异的稳定性(图17C)。

[0267] HM53、HM54、HM55、HM56、HP59和HP60是基于HM21的变体中在位置341处的氨基酸处

具有突变的变体。证实了位置341处的氨基酸的突变对变体的表达水平和活性具有多种影响(图17D和图17E)。

[0268] 实施例9.PH20变体的体外免疫原性测定

[0269] 分子量高于低分子量合成化学品的分子量的生物医药在进入人体时具有触发非预期免疫应答的风险。通过折叠或与大分子量生物材料的二级结构或三级结构中的相邻结构域相互作用而产生的外部接触表面可以通过向人体的免疫系统提供表位来促进对生物材料的免疫应答。这种免疫应答可以产生抗药物抗体(ADA),并且该应答可以抑制所述药物的有效性,或引起对所述药物的超敏反应,或促进所述药物在人体中的清除。因此,对所述药物的免疫应答可能会影响临床试验的结果,并且在长期使用后可能引起严重的异常反应。该免疫应答可能受各种因素影响,并可能由对药物本身或疾病的特异性应答触发,或者可能由取决于药物给予方法或个体患者的因素触发。由药物本身引起的因素包括生物医药与人肽的相似性或不相似性、翻译后修饰、杂质、聚集体形成和配制品的特征。个体患者之间变化的因素包括性别、与所服用其他药物的反应性,以及取决于人白细胞抗原(HLA)类型的遗传因素。

[0270] 该免疫原性应答是由识别表位的CD4+T细胞或CD8+T细胞触发的,而与免疫应答的原因无关。由于个体中HLA II类基因的多样性,因此CD4+T细胞的表位在个体之间是不同的,并且因此由健康供体提供的每种血液中CD4+T细胞中对生物医药的反应性可能是评估临床过程中可能出现的免疫应答的非常重要的标准。CD4+T细胞被抗原呈递细胞(APC)激活,所述抗原呈递细胞识别通过其II型MHC(主要组织相容性复合体)呈递的抗原。激活的CD4+T细胞释放激活巨噬细胞、细胞毒性T细胞和B细胞的细胞因子,从而导致高水平的抗体产生。相反,CD8+T细胞具有直接的细胞毒性并且直接除去被抗原感染的细胞、受损的细胞或丧失其功能的细胞。CD8+T细胞具有T细胞受体,所述受体可以识别与位于每个细胞表面上的I型MHC分子结合的特异性抗原肽。CD8+T细胞还可以通过识别由抗原呈递细胞呈递的抗原而被激活,并且这种激活可以通过CD4+T细胞的细胞因子进一步增强。因此,当在体外测量新生物材料对CD4+T细胞和CD8+T细胞的激活水平时,可以预测在临床过程中可诱导的免疫原性应答。在此实施例中,为了预测PH20变体与对照相比的免疫原性,从PBMC分离CD4+T细胞和CD8+T细胞,然后用1.5ng/mL和15ng/mL的对照PH20和PH20变体(HP46)处理,然后测量激活的CD4+T细胞和CD8+T细胞的分布。使用刺激指数测量每种T细胞类型的激活水平,并且刺激指数(SI)定义如下:

[0271] 刺激指数(SI)=(用测试样品处理后的T细胞激活水平)/(用媒介物处理后的T细胞激活水平)

[0272] 如果细胞的SI值为2或更大,则可以确定所述细胞以显著水平被激活。免疫原性应答可能因HLA类型而改变。因此,使用从10个健康供体提供的PBMC分离的T细胞进行了测量更多不同HLA类型的应答的实验。所使用的10种PBMC的HLA类型在下表12中示出。

[0273] 表12.所测试的PBMC的HLA类型

[0274]

编号	HLA A	HLA B	HLA C1	DRB1	DQB1	DPB1

[0275]

1	0206	3303	3501	5801	0302	0801	1405	1501	0303	0602	0201	0301
2	0201	0207	4601	5101	0102	1502	0803	1101	0301	0601	0201	0202
3	0206	3101	1501	3501	0304	0401	0803	0901	0303	0601	0201	0501
4	0101	3101	1501	1517	0303	0701	1302	1501	0602	0604	0401	0501
5	0201	3101	5101	6701	0702	1402	0401	0403	0301	0302	0201	0401
6	0201	1101	1501	3901	0401	0702	0102	0901	0402	0501	0101	1401
7	0201	0206	4002	5502	0102	0304	0802	1454	0302	0502	0402	0501
8	0201	0201	1501	4001	0303	0304	0802	1406	0301	0302	0501	1301
9	1101	2402	4006	5101	0801	1502	0701	0901	0202	0303	0201	1301
10	2602	3101	4002	5101	0304	1502	0405	1501	0401	0602	0201	0501

[0276] 测量用PH20和PH20变体各自处理的CD4+和CD8+T细胞的激活水平的结果总结在下表13中。当查看测量CD4+和CD8+T细胞激活水平的结果时，显现出PH20和PH20变体都显示出相对低的激活水平。在PH20的情况下，在两个实验中测得的CD4+T细胞的激活水平为2或更高，而在PH20变体的情况下，未检测到CD4+T细胞的激活。在PH20的情况下，在一个实验中检测到CD8+T细胞的激活，而在PH20变体的情况下，也在一个实验中检测到CD8+T细胞的激活。然而，在PH20的情况下，在1.5ng/mL和15ng/mL下，SI值均被测量为2或更大；但在PH20变体的情况下，在1.5ng/mL下SI值为2或更小，并且在15ng/mL下SI值为2或更大(参见图18和图19)。

[0277] 因此，在较低浓度下，在PH20变体的情况下观察到CD8+T细胞的激活水平低，并且确定PH20对CD8+T细胞的激活水平高于PH20变体对CD8+细胞的激活水平。由以上结果得出的结论如下：

[0278] 1)通过PH20和PH20变体得到的CD4+T细胞和CD8+T细胞的激活水平相对较低；并且

[0279] 2)通过PH20变体得到的CD4+T细胞和CD8+T细胞激活的可能性低于通过PH20得到的所述可能性。

[0280] 根据这些结果，预期PH20变体在临床过程中触发免疫原性应答的可能性比PH20低。

[0281] 表13.从体外免疫原性测定结果测得的刺激指数(SI)

[0282]

PBMC编号	CD4		CD8	
	PH20（ng/mL）	PH20变体（ng/mL）	PH20（ng/mL）	PH20变体（ng/mL）

[0283]

	1.5	15	1.5	15	1.5	15	1.5	15
1	1.03	0.859	0.728	1.176	1.38	1.42	1.22	1.60
2	1.05	0.09	0.596	0.922	1.20	1.11	1.00	1.07
3	1.90	1.44	1.56	1.12	1.43	1.31	1.59	1.35
4	**2.51**	**2.79**	0.788	1.82	1.28	1.90	0.579	0.974
5	1.27	1.47	1.09	1.14	0.987	0.932	0.972	1.02
6	0.825	0.834	0.998	0.946	0.904	1.13	1.09	0.986
7	**2.07**	**2.07**	1.43	1.90	**2.08**	**2.34**	1.30	**2.46**
8	0.898	1.079	0.967	0.822	0.926	1.06	0.896	0.813
9	0.882	0.957	0.895	0.941	0.853	0.993	0.950	1.09
10	0.983	0.970	1.12	1.13	1.15	1.08	1.15	1.24

[0284] 有益效果

[0285] 当在CHO(ExpiCHO)细胞中表达时,与成熟野生型PH20相比,根据本发明的PH20变体或其片段具有增加的蛋白质表达水平并且显示出蛋白质聚集温度增加大约4℃-11.5℃,使得它们可以有效地产生,同时具有高热稳定性。

[0286] 此外,作为测量透明质酸酶活性的测试之一的底物-凝胶测定的结果,根据本发明的PH20变体或其片段具有改善的蛋白质重折叠,使得它们比成熟野生型PH20更快地复性,并且无论C末端切割位置如何,维持原始酶活性。

[0287] 此外,根据本发明的PH20变体或其片段具有低免疫原性,使得它们可以被重复地给予至人体。

[0288] 参考文献

[0289] Arming,S.,Strobl,B.,Wechselberger,C.,and Kreil,G.(1997).In vitro mutagenesis of PH-20hyaluronidase from human sperm.Eur J Biochem 247,810-814.

[0290] Bookbinder,L.H.,Hofer,A.,Haller,M.F.,Zepeda,M.L.,Keller,G.A.,Lim,J.E.,Edgington,T.S.,Shepard,H.M.,Patton,J.S.,and Frost,G.I.(2006).Arecombinant human enzyme for enhanced interstitial transport of therapeutics.JControl Release 114,230-241.

[0291] Chao,K.L.,Muthukumar,L.,and Herzberg,O.(2007).Structure of human hyaluronidase-1,a hyaluronan hydrolyzing enzyme involved in tumor growth and angiogenesis.Biochemistry 46,6911-6920.

[0292] Frost,G.I.(2007).Recombinant human hyaluronidase(rHuPH20):an enabling platform for subcutaneous drug and fluid administration.Expert Opin Drug Deliv 4,427-440.序列表(自由文本)

[0293] 附加电子文件。

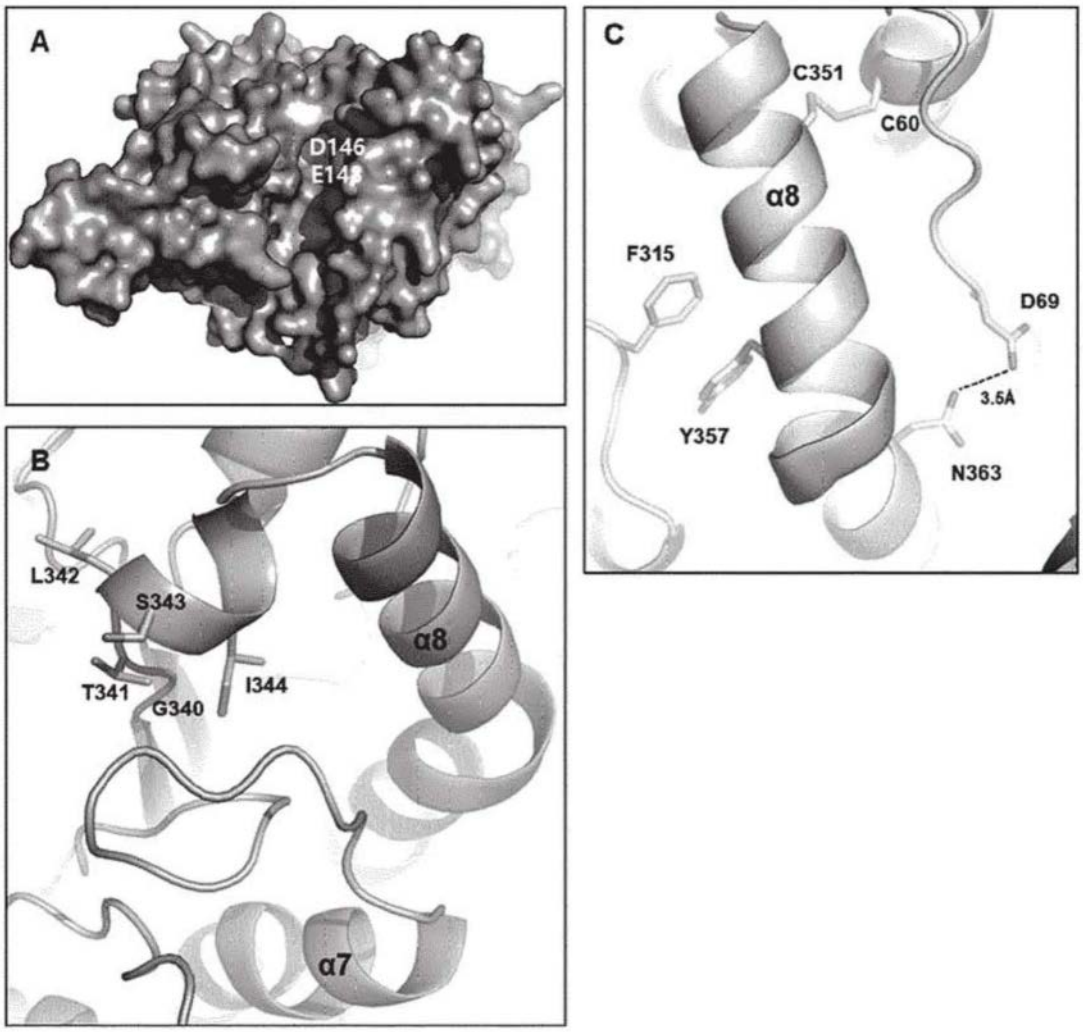

A
D146
E148
B
L342
S343
T341
G340
I344
α8
α7
C
C351
C60
α8
F315
D69
3.5Å
Y357
N363

图1

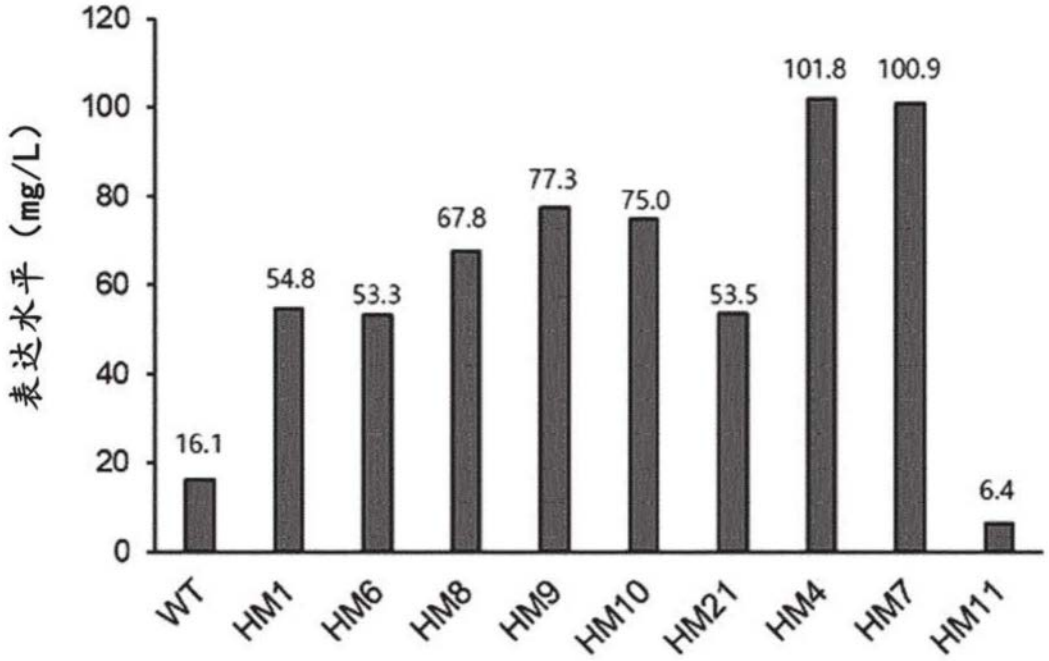

表达水平（mg/L）
120
100
80
60
40
20
0
16.1
54.8
53.3
67.8
77.3
75.0
53.5
101.8
100.9
6.4
WT
HM1
HM6
HM8
HM9
HM10
HM21
HM4
HM7
HM11

图2

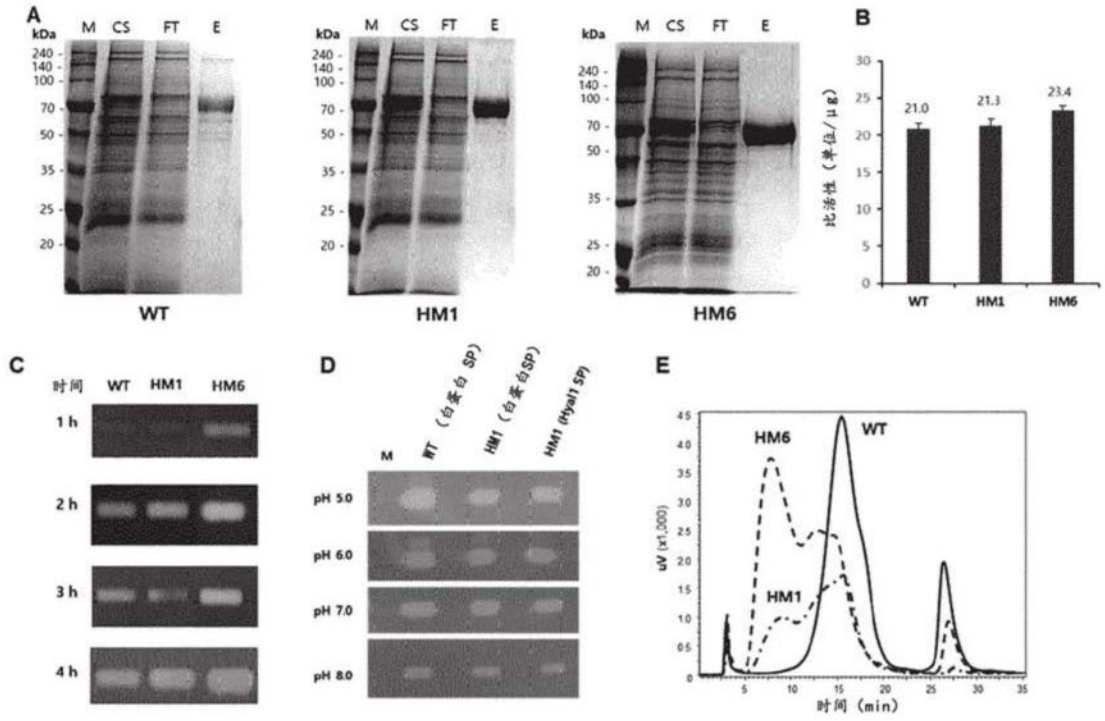

A
kDa
M CS FT E
240
140
100
70
50
35
25
20
WT
HM1
HM6
B
比活性（单位/μg）
21.0
21.3
23.4
WT
HM1
HM6
C
时间
WT HM1 HM6
1 h
2 h
3 h
4 h
D
M
WT（白柔白 SP）
HM1（白柔白SP）
HM1 (Hyal1 SP)
pH 5.0
pH 6.0
pH 7.0
pH 8.0
E
HM6
WT
HM1
uV (x1,000)
时间（min）

图3

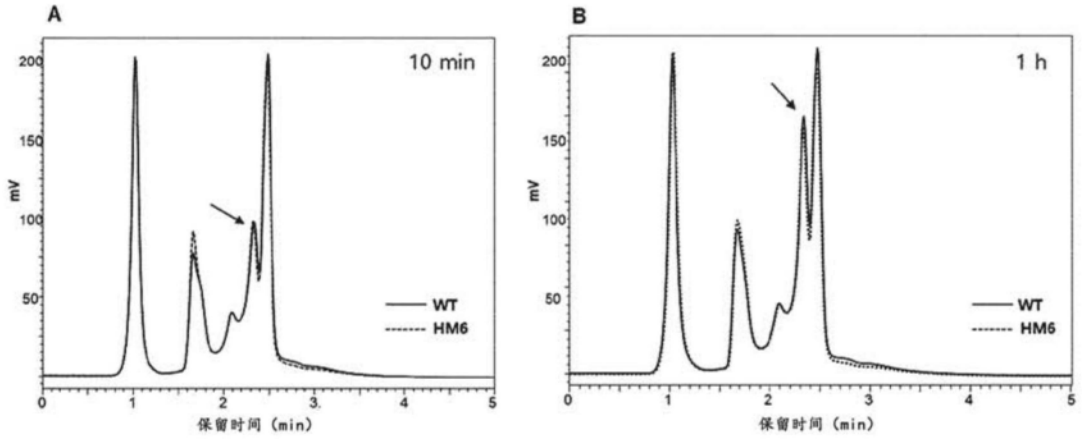

A
10 min
mV
200
150
100
50
0
1
2
3
4
5
保留时间（min）
WT
HM6
B
1 h
mV
200
150
100
50
0
1
2
3
4
5
保留时间（min）
WT
HM6

图4

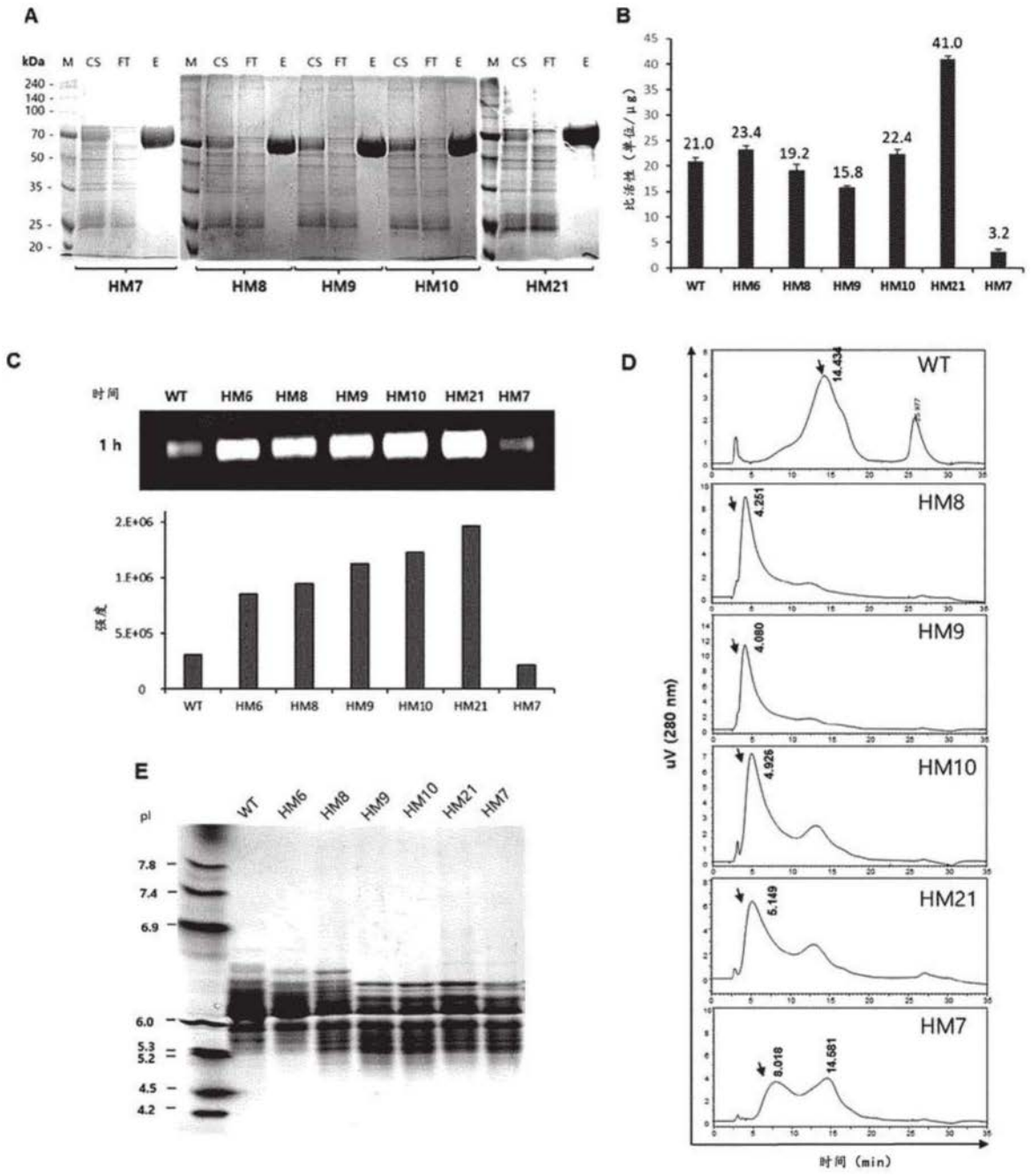

A
kDa M CS FT E M CS FT E CS FT E CS FT E M CS FT E
240 -
140 -
100 -
70 -
50 -
35 -
25 -
20 -
HM7
HM8
HM9
HM10
HM21
B
比活性（单位/μg）
45
40
35
30
25
20
15
10
5
0
21.0
23.4
19.2
15.8
22.4
41.0
3.2
WT
HM6
HM8
HM9
HM10
HM21
HM7
C
时间
WT HM6 HM8 HM9 HM10 HM21 HM7
1 h
2.E+06
1.E+06
5.E+05
0
强度
WT HM6 HM8 HM9 HM10 HM21 HM7
D
WT
14.434
HM8
4.251
HM9
4.080
HM10
4.926
HM21
5.149
HM7
8.018
14.681
uV (280 nm)
时间 (min)
E
pI
WT HM6 HM8 HM9 HM10 HM21 HM7
7.8
7.4
6.9
6.0
5.3
5.2
4.5
4.2

图5

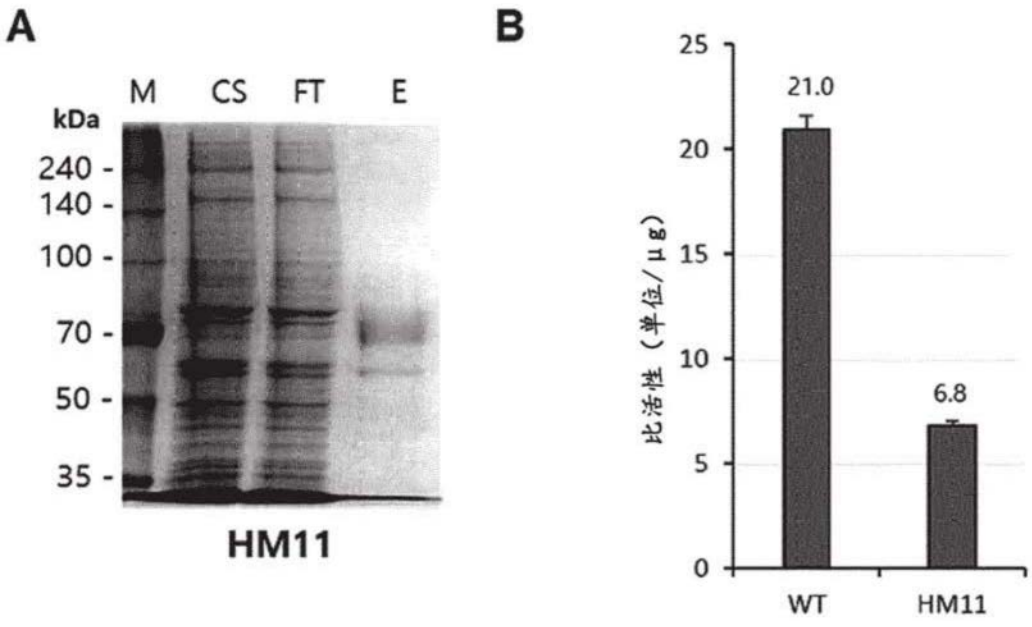
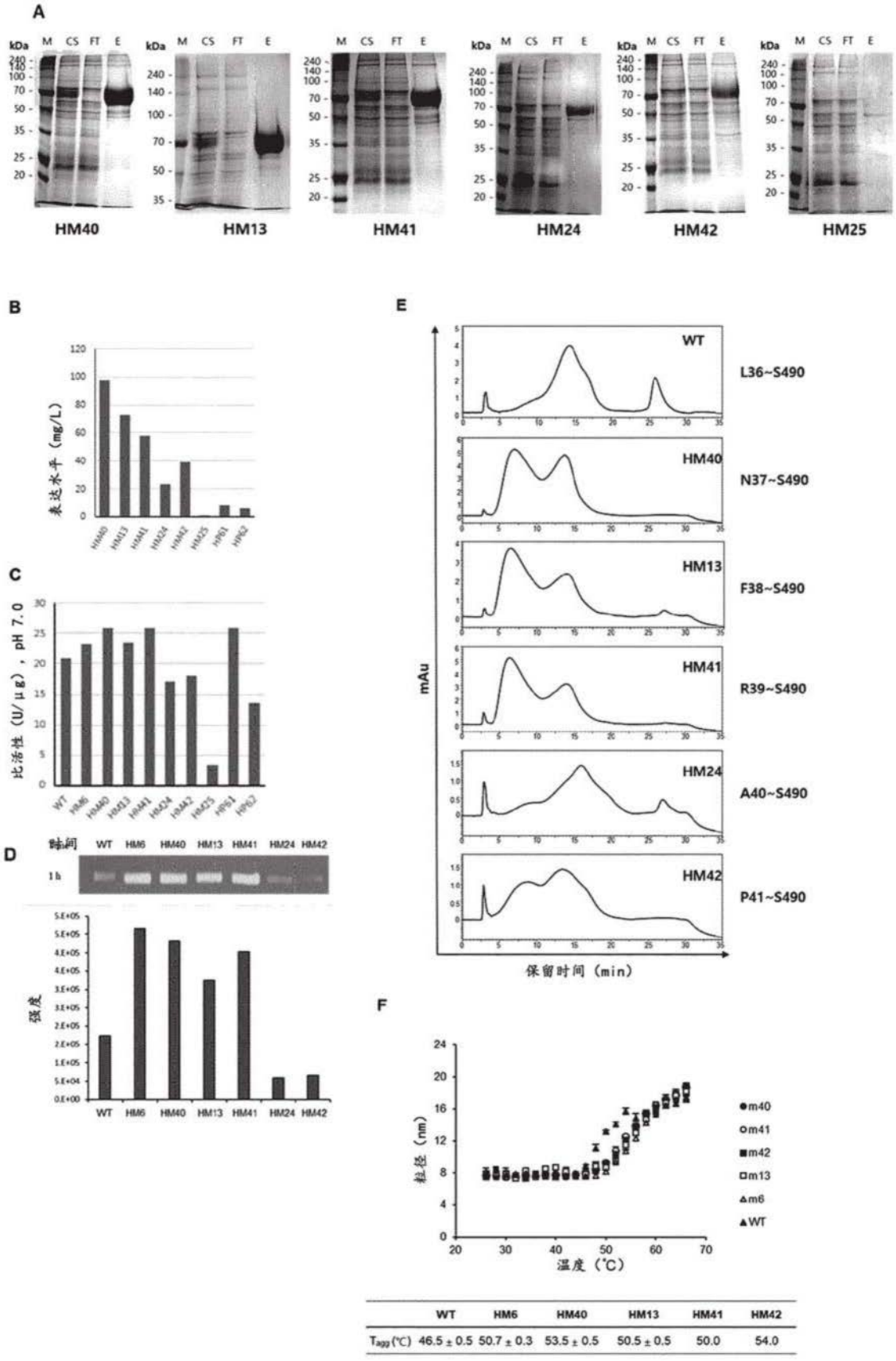

A
M
CS
FT
E
kDa
240 -
140 -
100 -
70 -
50 -
35 -
HM11
B
25
20
15
10
5
0
比活性（单位/μg）
21.0
6.8
WT
HM11

图6



	WT	HM6	HM40	HM13	HM41	HM42
T_{agg}(℃)	46.5 ± 0.5	50.7 ± 0.3	53.5 ± 0.5	50.5 ± 0.5	50.0	54.0

图7

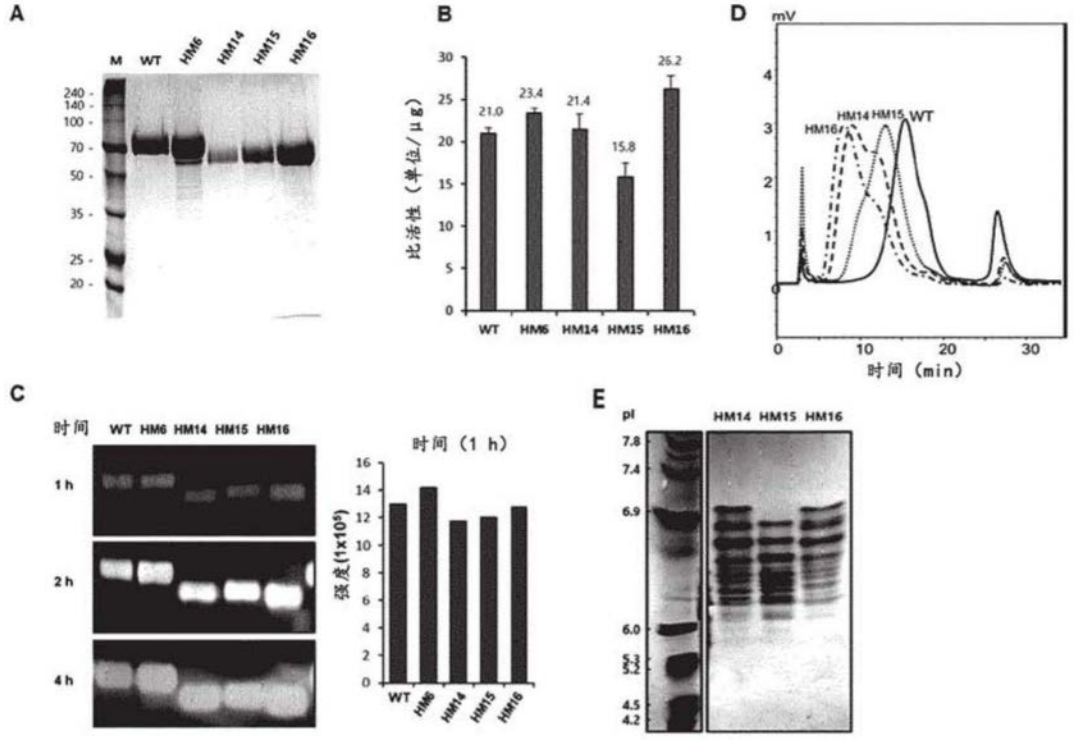

A
M
WT
HM6
HM14
HM15
HM16
240
140
100
70
50
35
25
20
B
比活性（单位/μg）
21.0
23.4
21.4
15.8
26.2
WT
HM6
HM14
HM15
HM16
D
mV
HM14
HM15
WT
HM16
时间（min）
C
时间
WT
HM6
HM14
HM15
HM16
1 h
2 h
4 h
时间（1 h）
强度(1x10⁵)
E
pI
HM14
HM15
HM16
7.8
7.4
6.9
6.0
5.2
4.5
4.2

图8

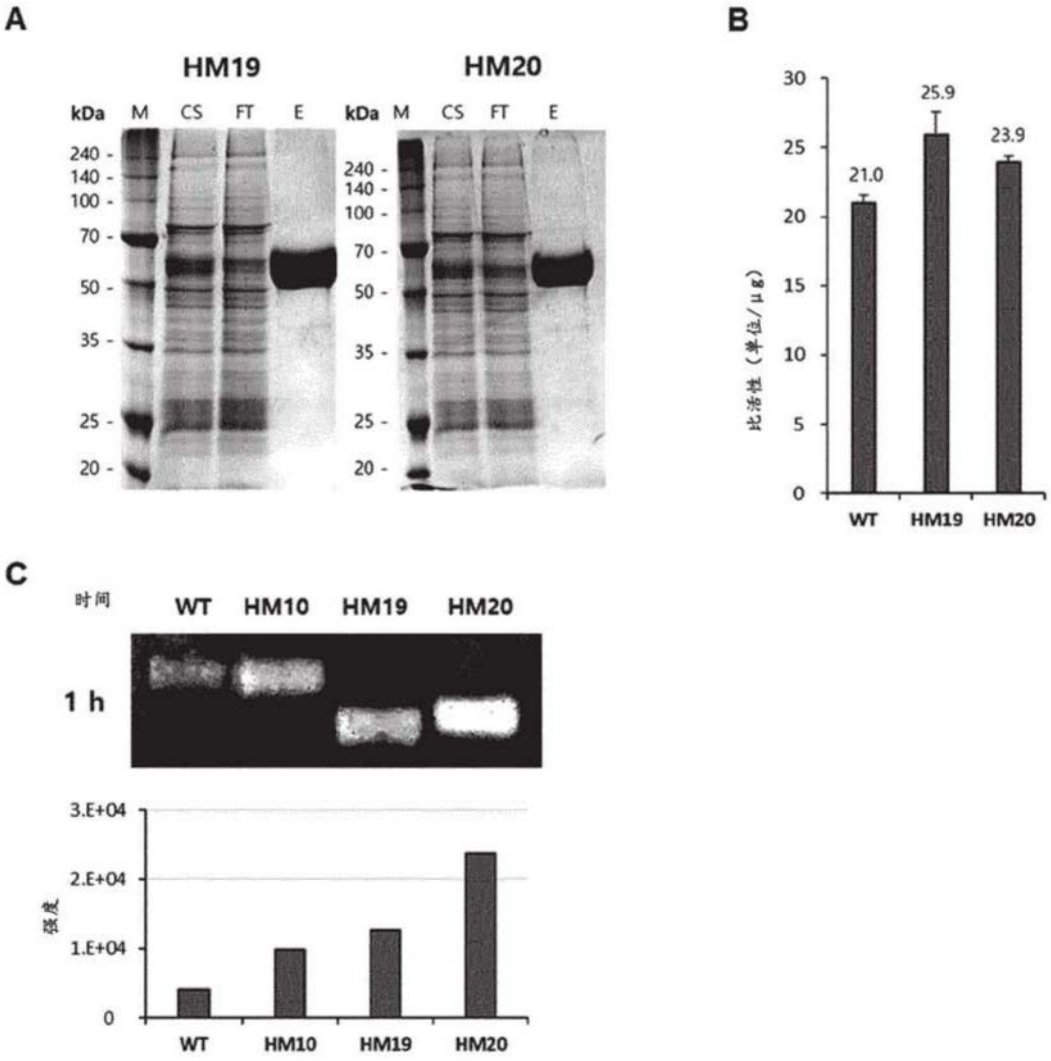

A
HM19
HM20
kDa M CS FT E
240 -
140 -
100 -
70 -
50 -
35 -
25 -
20 -
B
比活性（单位/μg）
30
25
20
15
10
5
0
21.0
25.9
23.9
WT
HM19
HM20
C
时间
WT HM10 HM19 HM20
1 h
强度
3.E+04
2.E+04
1.E+04
0
WT
HM10
HM19
HM20

图9

	응집온도 (°C)
WT	46.5± 0.5
HM1	53.0± 1.2
HM4	56.5± 1.5
HM6	50.5± 0.5
HM7	58.0± 1.0
HM8	52.5± 0.5
HM9	53.0± 1.0
HM10	55.5± 0.5
HM13	50.5± 0.5
HM14	51.0± 1.0
HM15	49.0± 1.0
HM16	51.0± 1.0
HM19	53.0± 1.0
HM20	51.0± 1.0
HM21	51.7± 0.7

图10

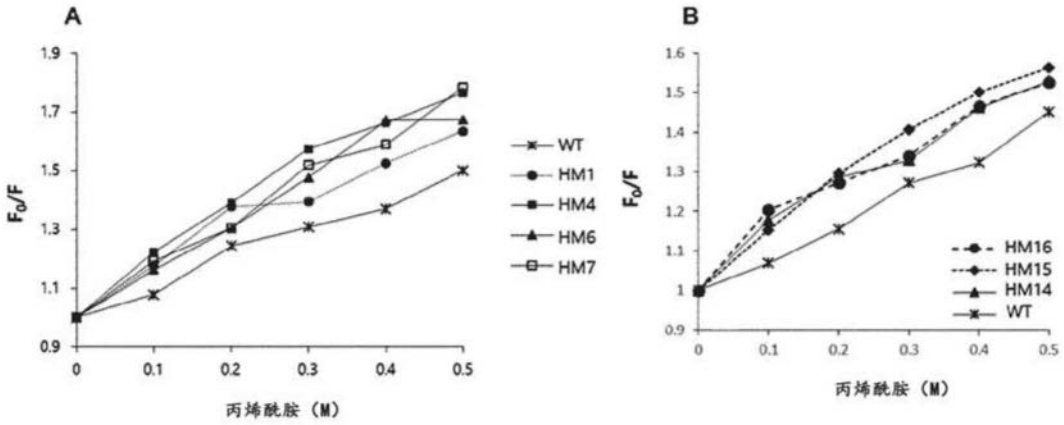
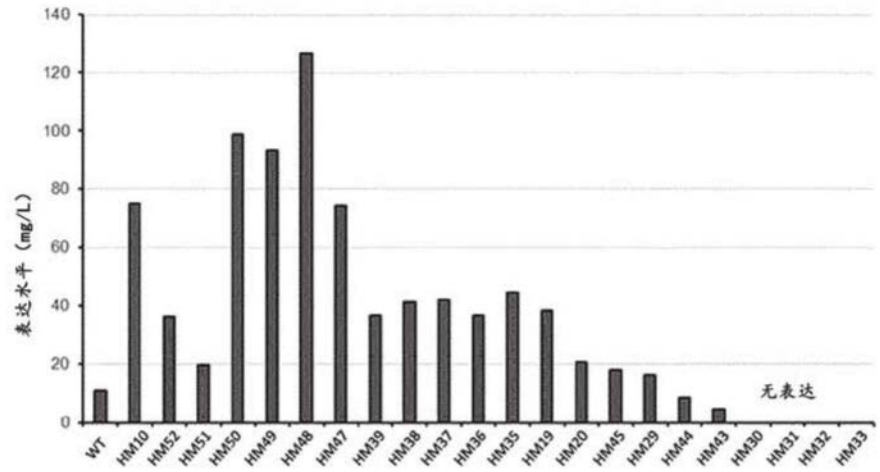


图11

A



B

	总长度	表达水平（mg/L）		总长度	表达水平（mg/L）		总长度	表达水平（mg/L）
WT	L36~S490	16.1	**HM39**	F38~E476	36.7	**HM29**	L36~A467	16.3
HM10	L36~S490	75.0	**HM38**	F38~T475	41.4	**HM44**	F38~D466	8.5
HM52	F38~T488	36.2	**HM37**	F38~E474	41.9	**HM43**	F38~I465	4.7
HM51	F38~P486	19.7	**HM36**	F38~M473	36.6	**HM30**	L36~C464	No
HM50	F38~A484	98.9	**HM35**	F38~P472	44.8	**HM31**	L36~D461	No
HM49	F38~Y482	93.4	**HM19**	F38~K470	38.3	**HM32**	L36~C458	No
HM48	F38~I480	126.5	**HM20**	F38~F468	20.8	**HM33**	L36~V455	No
HM47	F38~P478	74.4	**HM45**	F38~A467	17.9			

图12

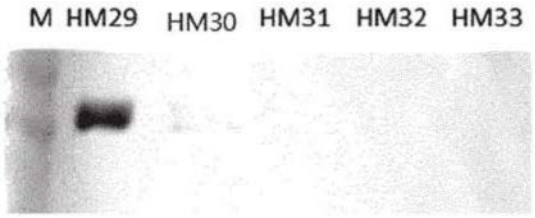
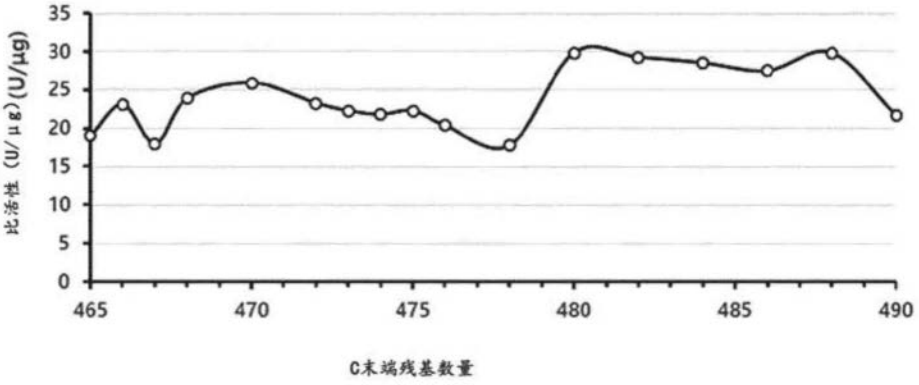


图13

A

	C末端残基数量	比活性（U/μg），pH 7.0		C末端残基数量	比活性（U/μg）(U/μg), pH 7.0
WT	490	22.3 ± 0.4	HM36	473	22.0 ± 0.3
HM10	490	21.7 ± 0.6	HM35	472	23.3 ± 0.2
HM52	488	29.5 ± 1.9	HM19	470	25.9 ± 1.6
HM51	486	27.5 ± 1.8	HP19	470	19.9 ± 0.6
HM50	484	28.5 ± 2.4	HM20	468	23.9 ± 0.5
HM49	482	29.3 ± 1.7	HP20	468	21.6 ± 0.6
HM48	480	29.9 ± 0.7	HM45	467	18.0 ± 2.5
HM47	478	17.8 ± 0.3	HM29	467	18.2 ± 0.2
HM39	476	20.4 ± 0.2	HM44	466	23.2 ± 0.2
HM38	475	22.3 ± 0.4	HM43	465	19.1
HM37	474	21.8 ± 0.5			

B



C

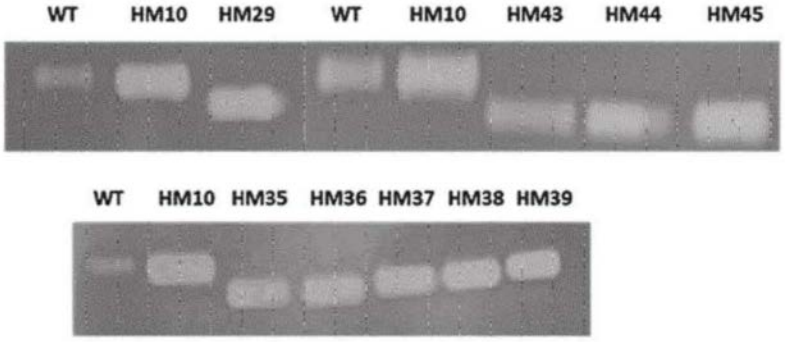
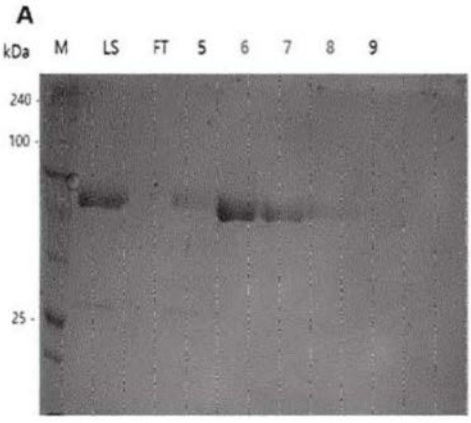


图14

A



B

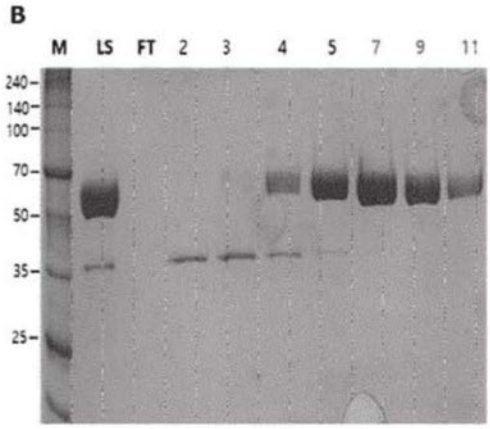
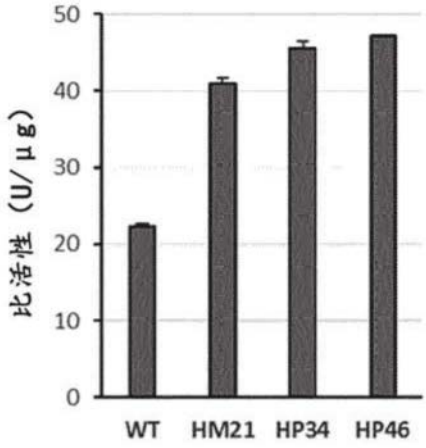


图15

A

	比活性（U/μg），pH 7.0
WT	22.3 ± 0.4
HM21	41.0 ± 0.6
HP34	45.6 ± 0.9
HP46	47.2



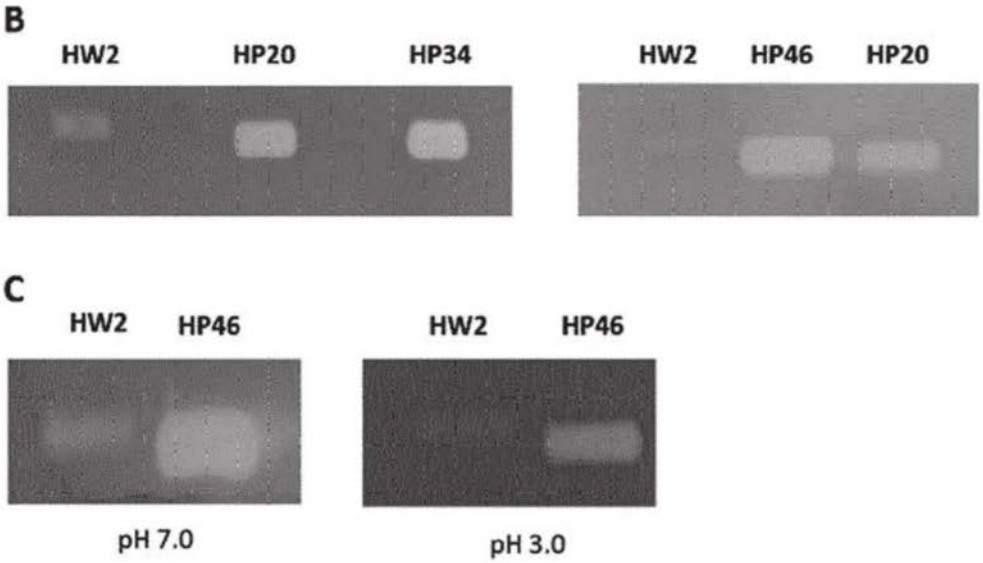
B

	K_m (mg/mL)	k_{cat} (1/min)	k_{cat}/K_m (1/min/mg/mL)
HW2	2.29±0.20	0.72±0.01	0.32±0.03
HM21	1.65±0.10	0.88±0.12	0.53±0.06
HP34	1.94±0.18	1.03±0.13	0.54±0.08
HP46	1.78±0.04	1.31±0.10	0.73±0.04

图16

A

	T_{agg} (℃)
HW2	46.5
HM21	51.7
HP34	51.5
HP46	51.0



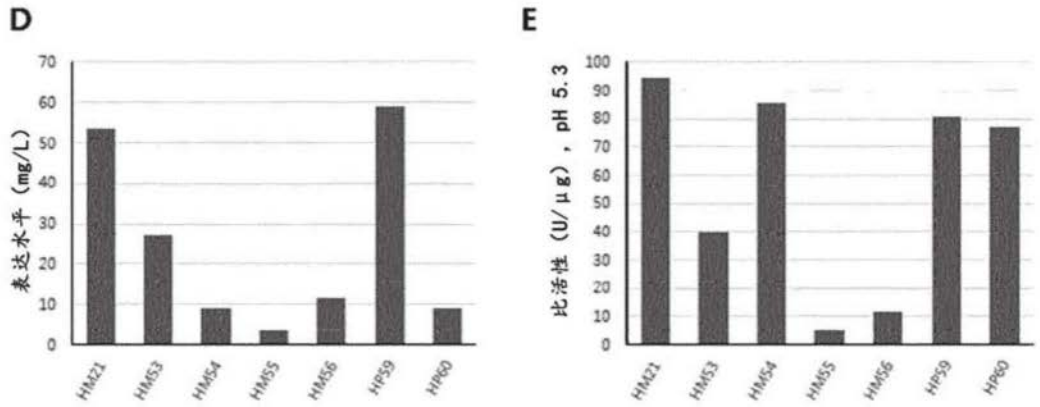


图17

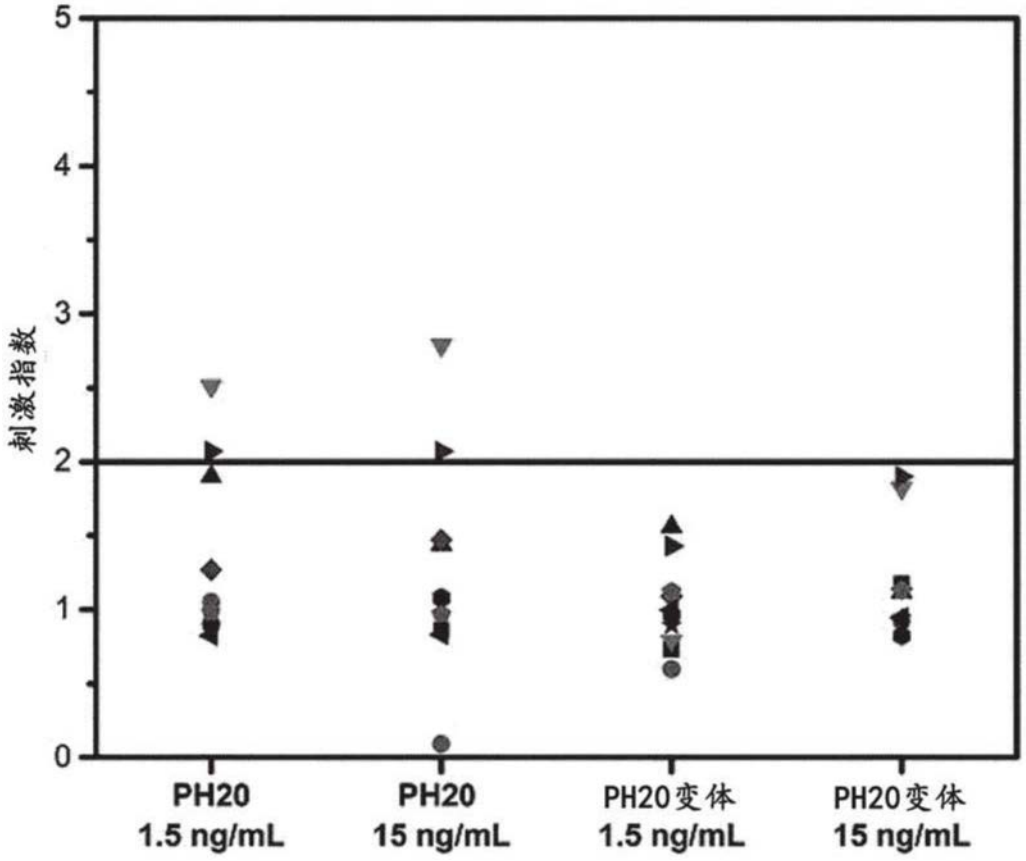

刺激指数
5
4
3
2
1
0
PH20
1.5 ng/mL
PH20
15 ng/mL
PH20变体
1.5 ng/mL
PH20变体
15 ng/mL

图18

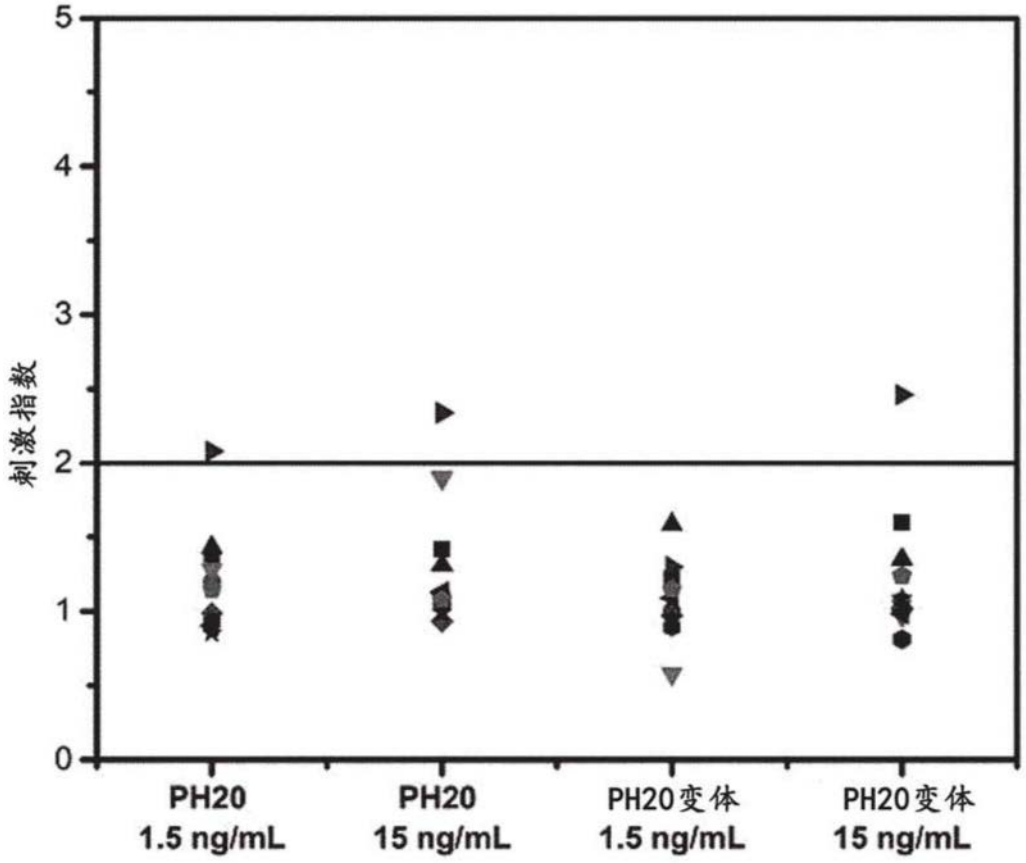

刺激指数
5
4
3
2
1
0
PH20
1.5 ng/mL
PH20
15 ng/mL
PH20变体
1.5 ng/mL
PH20变体
15 ng/mL

图19