

(19) 中华人民共和国国家知识产权局



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102807973 A

(43) 申请公布日 2012. 12. 05

---

(21) 申请号 201210246326. 3

(22) 申请日 2006. 04. 11

(30) 优先权数据

60/670, 541 2005. 04. 11 US

(62) 分案原申请数据

200680020689. 8 2006. 04. 11

(71) 申请人 萨文特医药公司

地址 美国新泽西州

(72) 发明人 J. 哈特曼 S. 门德洛维茨

(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司 72001

代理人 梁谋

(51) Int. Cl.

C12N 9/06 (2006. 01)

C12N 15/53 (2006. 01)

C12N 15/63 (2006. 01)

C12N 1/21 (2006. 01)

A61K 38/44 (2006. 01)

A61K 47/48 (2006. 01)

A61P 19/06 (2006. 01)

权利要求书 1 页 说明书 18 页

序列表 15 页 附图 7 页

---

(54) 发明名称

尿酸氧化酶的变体形式及其用途

(57) 摘要

本发明涉及具有尿酸分解活性的遗传修饰蛋白质。更具体的说，本发明涉及包含截短的尿酸氧化酶的蛋白质及其生产方法，包括包含截短的尿酸氧化酶的 PEG 化蛋白质。

1. 一种分离的尿酸酶,其由 SEQ ID NO. 8 的氨基酸序列组成。
2. 权利要求 1 的尿酸酶,其中所述尿酸酶是 PEG 化尿酸酶。
3. 一种分离的核酸,其由编码权利要求 1 的尿酸酶的核酸序列组成。
4. 权利要求 3 的分离的核酸,其中所述核酸序列有效连接到异源启动子。
5. 权利要求 4 的核酸,其中所述启动子是 osmB 启动子。
6. 一种核酸载体,其包含权利要求 4 的核酸。
7. 一种宿主细胞,其包含权利要求 6 的载体。
8. 一种生产尿酸酶的方法,其包括以下步骤 :在宿主细胞表达所述核酸序列的条件下培养权利要求 7 的宿主细胞 ;以及分离所表达的尿酸酶。
9. 一种药物组合物,其包含 :
  - (a) 一种分离的尿酸酶,其包含 SEQ ID NO. 7 的氨基酸序列 ;和
  - (b) 药学上可接受的载体 ;

其中,所述尿酸酶与聚合物缀合。
10. 一种药物组合物,其包含 :
  - (a) 一种尿酸酶,其包含 SEQ ID NO. 8 的氨基酸序列 ;和
  - (b) 药学上可接受的载体 ;

其中,所述尿酸酶与聚合物缀合。
11. 权利要求 9 的药物组合物,其中所述尿酸酶还包含氨基末端氨基酸,其中所述氨基末端氨基酸是丙氨酸、甘氨酸、脯氨酸、丝氨酸或苏氨酸。
12. 权利要求 9 和 10 任一项的药物组合物,其中所述聚合物选自聚(乙二醇)、葡聚糖、聚丙二醇、羟丙基甲基纤维素、羧甲基纤维素、聚乙烯吡咯烷酮和聚乙烯醇。
13. 权利要求 12 的药物组合物,其在每个尿酸酶亚单位上包含 2-12 个聚乙二醇分子。
14. 权利要求 13 的药物组合物,其在每个尿酸酶亚单位上包含 3-10 个聚乙二醇分子。
15. 权利要求 12 的药物组合物,其中每个聚乙二醇分子的分子量为约 1kD-100kD。
16. 权利要求 15 的药物组合物,其中每个聚乙二醇分子的分子量为约 1kD-50kD。
17. 权利要求 16 的药物组合物,其中每个聚乙二醇分子的分子量为约 5kD-20kD。
18. 权利要求 17 的药物组合物,其中每个聚乙二醇分子的分子量为约 10kD。
19. 权利要求 9-11 任一项的药物组合物,所述药物组合物适于重复给予。
20. 权利要求 12-18 任一项的药物组合物,其适于重复给予。
21. 权利要求 19 的药物组合物在制备用于降低其需要患者的生物体液中的尿酸水平的药物中的用途。
22. 权利要求 20 的药物组合物在制备用于降低其需要患者的生物体液中的尿酸水平的药物中的用途。
23. 权利要求 19 的用途,其中所述生物体液是血液。
24. 权利要求 20 的用途,其中所述生物体液是血液。
25. 权利要求 21 的用途,其中所述聚合物选自聚(乙二醇)、葡聚糖、聚丙二醇、羟丙基甲基纤维素、羧甲基纤维素、聚乙烯吡咯烷酮和聚乙烯醇。
26. 权利要求 22 的用途,其中所述聚合物选自聚(乙二醇)、葡聚糖、聚丙二醇、羟丙基甲基纤维素、羧甲基纤维素、聚乙烯吡咯烷酮和聚乙烯醇。

## 尿酸氧化酶的变体形式及其用途

[0001] 本申请是以下申请的分案申请：申请日：2006年4月11日；申请号：200680020689.8 (PCT/US2006/013502)；发明名称：同上。

[0002] 相关申请的交叉引用

[0003] 本申请要求2005年4月11日提交的美国临时申请系列号60/670,541的优先权和权益，该临时申请的公开内容通过引用结合到本文中。

### 发明领域

[0004] 本发明涉及遗传修饰的具有尿酸分解活性的蛋白质。更具体的说，本发明涉及包含截短的尿酸氧化酶的蛋白质及其生产方法。

[0005] 发明背景

[0006] 术语尿酸氧化酶(urate oxidase)和尿酸酶(uricase)在本文中可互换使用。尿酸氧化酶(尿酸酶；E.C.1.7.3.3)这种酶能催化尿酸氧化成更具可溶性的产物尿囊素，尿囊素是更容易排泄的嘌呤代谢物。人不产生有酶活性的尿酸酶，这是因为在高等灵长类的进化过程中获得的尿酸酶基因的几个突变所致。Wu, X等，(1992)J Mol Evol 13:78-84,该文献通过引用整体结合到本文中。因此，在易感个体中，血液中过量浓度的尿酸(高尿酸血症)会导致疼痛性关节炎(痛风)、毁形性尿酸沉积(结节瘤)和肾衰竭。在一些受侵害个体中，可用的药物如别嘌醇(尿酸合成的抑制剂)会产生治疗限制性副作用，或者不能充分减轻这些病症。Hande, KR等，(1984)Am J Med 76:47-56; Fam, AG, (1990) Bailliere's Clin Rheumatol 4:177-192,每个文献通过引用整体结合到本文中。尿酸酶注射能减少高尿酸血症和高尿酸尿症，至少是短暂地减少。由于尿酸酶在人体中是异种蛋白，在某些百分比的受治疗患者中，即使是第一次注射来自黄曲霉(Aspergillus flavus)的未修饰蛋白质就会引起过敏反应(Pui, C-H等，(1997)Leukemia 11:1813-1816,该文献通过引用整体结合到本文中)，免疫应答限制其用于长期或间歇治疗的效用。Donadio, D等，(1981)Nouv Presse Med 10:711-712; Leaustic, M等，(1983)Rev Rhum Mal Osteoartic 50:553-554,每个文献通过引用整体结合到本文中。

[0007] 本发明涉及发生截短和结构稳定性增强的突变重组尿酸酶蛋白。

[0008] 发明概述

[0009] 本发明的目的是提供新型的重组尿酸酶蛋白。所设想的本发明蛋白质相对于天然尿酸酶蛋白是截短的，且具有突变的氨基酸。

[0010] 本发明提供包含SEQ ID NO.8氨基酸序列的突变重组尿酸酶。还提供包含SEQ ID NO.13氨基酸序列的突变重组尿酸酶。

[0011] 本发明的另一个目的是提供代谢尿酸的方法，所述方法包括给予具有尿酸分解活性的新型重组尿酸酶蛋白。尿酸分解活性在本文中用以指尿酸向尿囊素的酶促转化。

[0012] 在一个实施方案中，尿酸酶包含SEQ ID NO.7或SEQ ID NO.12的8位至287位的氨基酸序列。本发明还提供了包含SEQ ID NO.8或SEQ ID NO.13的氨基酸序列的尿酸酶。在一个实施方案中，尿酸酶包含氨基末端氨基酸，其中氨基末端氨基酸是丙氨酸、甘氨酸、

脯氨酸、丝氨酸或苏氨酸。在一个特别实施方案中，氨基末端氨基酸是甲硫氨酸。

[0013] 本发明还提供分离的核酸，其包含编码本发明尿酸酶的核酸序列。在一个具体实施方案中，编码尿酸酶的核酸有效连接到异源启动子，例如 osmB 启动子。本发明还提供包含尿酸酶编码核酸的核酸载体和包含这种载体的宿主细胞，以及产生尿酸酶的方法，所述方法包括在所述核酸序列得以被宿主细胞表达的条件下培养宿主细胞以及分离表达的尿酸酶的步骤。

[0014] 附图简述

[0015] 图 1 说明质粒 pOUR-P- $\Delta$  N-ks-1 的结构。限制位点旁的数字表示核苷酸位置，该位置相对于指定为 1 的 HaeII 位点而言。在克隆过程中丢失的限制位点在括号中标出。

[0016] 图 2 显示猪 -KS- $\Delta$  N 尿酸酶的 DNA 和推导氨基酸序列（分别为 SEQ ID NO. 9 和 SEQ ID NO. 7）。图 2 中的氨基酸编号是相对于完全猪尿酸酶序列进行的。在起始密码子甲硫氨酸残基之后，苏氨酸置换猪尿酸酶序列中的天冬氨酸 7。指出了用于亚克隆的各个步骤的限制位点。3' 非翻译序列用小写字母显示。翻译终止密码子由星号表示。

[0017] 图 3 显示各种重组猪 (SEQ ID NO. 11)、PBC- $\Delta$  NC (SEQ ID NO. 12) 和猪 -KS- $\Delta$  N (SEQ ID NO. 7) 尿酸酶序列的推导氨基酸序列的相对比对。星号表示与公开的猪尿酸酶序列相比猪 -KS- $\Delta$  N 中氨基酸有差异的位置；圆圈表示与 PBC- $\Delta$  N 相比猪 -KS- $\Delta$  N 中氨基酸有差异的位置。虚线表示氨基酸的缺失。

[0018] 图 4 显示根据实施例 1-3 产生的猪尿酸酶和高度纯化尿酸酶变体的 SDS-PAGE。每个样品的生产日期（月 / 年）和相关泳道号码在下方的图例 (key) 中表示。Y 轴标以分子量标记物的重量标记，图的顶部标以泳道号码。各泳道如下：泳道 1- 分子量标记；泳道 2- 猪 KS- $\Delta$  N(7/98)；泳道 3- 猪 (9/98)；泳道 4- 猪 KS(6/99)；泳道 5- 猪 KS(6/99)；泳道 6- 猪 - $\Delta$  N(6/99)；泳道 7- 猪 KS- $\Delta$  N(7/99)；泳道 8- 猪 KS- $\Delta$  N(8/99)。

[0019] 图 5 描绘 PEG 化 (9x10kD) 猪 -KS- $\Delta$  N 尿酸酶在大鼠中 IM(肌肉内)、SC(皮下) 和 IV(静脉内) 注射后的药物动力学曲线，通过监测血液样品中的酶活性测出。在指定时间点收集的血浆样品中的尿酸酶活性用比色测定法进行测定。活性值 (mAU=毫吸光度单位) 代表每 1  $\mu$  l 血浆样品的酶反应速度。注射的尿酸酶的生物利用度（相对于 IV 注射到达循环的药物量）从图的曲线下面积计算。

[0020] 图 6 描绘 PEG 化 (9x10kD) 猪 -KS- $\Delta$  N 尿酸酶在兔中 IM(肌肉内)、SC(皮下) 和 IV(静脉内) 注射后的药物动力学曲线，通过监测血液样品中的酶活性测出。在指定时间点收集的血浆样品中的尿酸酶活性用比色测定法进行测定。活性值 (mAU=毫吸光度单位) 代表每 1  $\mu$  l 血浆样品的酶反应速度。注射的尿酸酶的生物利用度（相对于 IV 注射到达循环的药物量）从图的曲线下面积计算。

[0021] 图 7 描绘 PEG 化 (9x10kD) 猪 -KS- $\Delta$  N 尿酸酶在犬中 IM(肌肉内)、SC(皮下) 和 IV(静脉内) 注射后的药物动力学曲线，通过监测血液样品中的酶活性测出。在指定时间点收集的血浆样品中的尿酸酶活性用比色测定法进行测定。活性值 (mAU=毫吸光度单位) 代表每 1  $\mu$  l 血浆样品的酶反应速度。注射的尿酸酶的生物利用度（相对于 IV 注射到达循环的药物量）从图的曲线下面积计算。

[0022] 图 8 描绘 PEG 化 (9x10kD) 猪 -KS- $\Delta$  N 尿酸酶在猪中 IM(肌肉内)、SC(皮下) 和 IV(静脉内) 注射后的药物动力学曲线，通过监测血液样品中的酶活性测出。在指定时间点

收集的血浆样品中的尿酸酶活性用比色测定法进行测定。活性值 (mAU= 毫吸光度单位) 代表每 1  $\mu$  l 血浆样品的酶反应速度。注射的尿酸酶的生物利用度 (相对于 IV 注射到达循环的药物量) 从图的曲线下面积计算。

[0023] 发明详述

[0024] 先前的研究教导, 当通过 PEG 化实现尿酸酶免疫原性和 / 或抗原性的显著降低时, 总是伴随着尿酸分解活性的明显损失。生物药物的安全性、方便性和成本效益都受到其功效下降和由此所致的需要增加给药剂量的不利影响。因此, 需要有安全有效的用以降低身体流体 (包括血液) 中高水平尿酸的替代方法。本发明提供突变重组尿酸酶, 其包含氨基酸序列 SEQ ID NO. 7、SEQ ID NO. 8、SEQ ID NO. 12 或 SEQ ID NO. 13。

[0025] 本文所用的尿酸酶包括单个亚单位以及四聚体, 除非另有指明。

[0026] 在一个具体实施方案中, 尿酸酶有氨基末端甲硫氨酸。该甲硫氨酸可通过翻译后修饰除去。在具体实施方案中, 氨基末端甲硫氨酸在尿酸酶产生后除去。在具体的实施方案中, 甲硫氨酸通过内源性细菌氨基肽酶除去。倒数第二个氨基酸可以是允许细菌甲硫氨酸氨基肽酶除去 N- 末端甲硫氨酸的氨基酸。允许 N- 末端甲硫氨酸得以最完全地除去的氨基酸是丙氨酸、甘氨酸、脯氨酸、丝氨酸和苏氨酸。在一个具体的实施方案中, 尿酸酶包含两个氨基末端氨基酸, 其中两个氨基末端氨基酸是甲硫氨酸和紧接其后的选自丙氨酸、甘氨酸、脯氨酸、丝氨酸和苏氨酸的氨基酸。

[0027] 本发明提供编码尿酸酶的核酸序列。

[0028] 本发明提供包含该核酸序列的载体。

[0029] 在一个具体的实施方案中, 尿酸酶是分离的。在一个具体的实施方案中, 尿酸酶是纯化的。在具体的实施方案中, 尿酸酶是分离且纯化的。

[0030] 本发明提供包含载体的宿主细胞, 该载体包含编码尿酸酶的核酸序列。

[0031] 本发明提供编码尿酸酶的核酸序列的产生方法, 包括通过 PCR (聚合酶链反应) 技术修饰编码尿酸酶的核酸序列。本领域技术人员知道, 所需要的核酸序列籍合成寡核苷酸引物通过 PCR 制备, 这些引物与待扩增的靶 DNA (每条链一个) 的各区域互补。在过量的脱氧核苷酸和 Taq 聚合酶 (一种热稳定 DNA 聚合物) 存在下, 将引物加入到靶 DNA (不需要是纯的) 中。在一系列 (通常 30 个) 温度循环中, 靶 DNA 反复进行变性 (90° C 左右), 与引物退火 (通常在 50–60° C) 和从引物延伸出子链 (72° C)。由于子链本身能充当后续各循环的模板, 与两种引物匹配的 DNA 片断以指数方式而不是线性方式得到扩增。

[0032] 本发明提供产生突变重组尿酸酶的方法, 所述方法包括用该载体转染宿主细胞, 其中所述宿主细胞表达该尿酸酶, 从宿主细胞分离突变重组尿酸酶, 用例如色谱技术分离出纯化的突变重组尿酸酶, 和纯化该突变重组尿酸酶。例如, 可按照国际专利出版物 WO 00/08196 和美国专利申请第 60/095, 489 号 (其通过引用整体结合到本文中) 描述的方法制备该尿酸酶。

[0033] 在一个优选的实施方案中, 处理宿主细胞以导致突变重组尿酸酶的表达。本领域技术人员知道, 用载体转染细胞通常用钙离子沉淀的 DNA 来实现, 不过也可使用各种其它方法 (例如电穿孔)。

[0034] 该尿酸酶可通过本领域技术人员公知的任何方法进行分离和 / 或纯化。本发明的表达多肽通常分离成基本上纯的形式。优选地, 该多肽分离至纯度为至少 80% 重量, 更优选

至纯度为至少 95% 重量, 最优选至纯度为至少 99% 重量。一般来说, 这种纯化可用例如硫酸铵分级分离、SDS-PAGE 电泳和亲和层析的标准技术来实现。该尿酸酶优选按照 2005 年 4 月 11 日提交的共同待审美国专利申请 (申请号为 60/670, 520, 代理人案号为 103864. 146644, 标题为“用阳离子型表面活性剂纯化蛋白质”, 其通过引用整体结合到本文中) 中描述的方法, 用阳离子型表面活性剂例如氯化十六烷基吡啶 (CPC) 来分离。

[0035] 在本发明的一个实施方案中, 载体在渗透压敏感启动子的控制之下。启动子是 DNA 的一个区域, RNA 聚合酶在启动 DNA 向 RNA 的转录之前与它结合。渗透压敏感启动子由于细胞所感受到的渗透压的增加而启动转录。

[0036] 本发明的尿酸酶包含与聚合物缀合的尿酸酶, 例如缀合至聚乙二醇的尿酸酶, 即 PEG 化尿酸酶。

[0037] 在本发明的一个实施方案中, 提供包含该尿酸酶的药物组合物。在一个实施方案中, 该组合物是尿酸酶的溶液。在一个优选的实施方案中, 该溶液是无菌的, 适合于注射。在一个实施方案中, 这种组合物包含作为磷酸缓冲盐水溶液的尿酸酶。在一个实施方案中, 该组合物在小瓶中提供, 该小瓶任选具有橡胶注射塞。在具体的实施方案中, 该组合物包含在溶液中的尿酸酶, 溶液浓度为 2-16 毫克尿酸酶每毫升溶液、4-12 毫克尿酸酶每毫升溶液或 6-10 毫克尿酸酶每毫升溶液。在一个优选的实施方案中, 该组合物包含浓度为 8 毫克每毫升溶液的尿酸酶。优选地, 尿酸酶的质量相对于蛋白质质量来测量。

[0038] 本发明组合物的有效给药方案可由本领域技术人员来确定。评估给定方案的有效性的合适指标是本领域技术人员所熟知的。这种指标的实例包括血浆尿酸水平 (PUA) 的正常化或降低, 和 PUA 降低或维持在 6. 8mg/dL 或以下, 优选 6mg/dL 或以下。在一个优选的实施方案中, 接受本发明组合物处理的受试者在总治疗时间的至少 70%、至少 80% 或至少 90% 中, 其 PUA 为 6mg/dL 或以下。例如, 对于 24 周的治疗时间, 受试者优选在 24 周治疗时间的至少 80% 中, 即在至少等于 134. 4 天 (24 周 × 7 天 / 周 × 0. 8=134. 4 天) 的时间中, 其 PUA 为 6mg/dL 或以下。

[0039] 在具体的实施方案中, 每 2-4 周给予一次 0. 5-24mg 的尿酸酶溶液。尿酸酶可用本领域技术人员公知的任何适当方式给予, 例如静脉内、肌肉内或皮下给予。优选地, 当进行静脉内给予时, 给予 0. 5mg-12mg 的尿酸酶。优选地, 当进行皮下给予时, 给予 4mg-24mg 的尿酸酶。在一个优选的实施方案中, 尿酸酶通过静脉输注在 30-240 分钟时间内给予。在一个实施方案中, 每两周给予一次 8mg 尿酸酶。在具体的实施方案中, 输注可用 100-500mL 的盐水溶液来进行。在一个优选的实施方案中, 每 2 周一次或每 4 周一次在 120 分钟时间里给予 8mg 的尿酸酶溶液; 优选该尿酸酶溶于 250mL 盐水溶液中进行输注。在具体的实施方案中, 尿酸酶给予在 3 个月、6 个月、8 个月或 12 个月的治疗时间里进行。在其它实施方案中, 治疗时间是 12 周、24 周、36 周或 48 周。在一个具体的实施方案中, 治疗时间是长时间治疗, 例如 2 年或更长时间, 直至受治疗的受试者的一生。另外, 可采用穿插不治疗时间的多个治疗周期, 例如 6 个月的治疗后是 3 个月的不治疗, 接着又是 6 个月的治疗, 等等。

[0040] 在某些实施方案中, 可将抗炎化合物进行预防性给予, 以消除或减少因给予尿酸酶引起的输注反应的出现。在一个实施方案中, 如此给予至少一种皮质类固醇、至少一种抗组胺剂、至少一种 NSAID 或它们的组合。可用的皮质类固醇包括倍他米松、布地奈德、可的松、地塞米松、氢化可的松、甲基泼尼松龙、泼尼松龙、泼尼松和曲安西龙。可用的 NSAID 包

括布洛芬、吲哚美辛、萘普生、阿司匹林、乙酰氨基酚、塞来考昔和伐地考昔。可用的抗组胺剂包括阿扎他定、溴苯那敏、西替力嗪、氯苯那敏、氯马斯汀、赛庚啶、地氯雷他定、右氯苯那敏、茶苯海明、苯海拉明、多西拉敏、非索非那定、羟嗪、氯雷他定和苯茚胺。

[0041] 在一个优选的实施方案中，抗组胺剂是非索非那定，NSAID 是对乙酰氨基酚，皮质类固醇是氢化可的松和 / 或泼尼松。优选地，在输注尿酸酶溶液前给予所有三类的组合（不一定伴随在一起）。在一个优选的实施方案中，在尿酸酶输注前 1-4 小时口服给予 NSAID 和抗组胺剂。非索非那定的合适剂量包括约 30 至约 180mg、约 40 至约 150mg、约 50 至约 120mg、约 60 至约 90mg、约 60mg，优选 60mg。对乙酰氨基酚的合适剂量包括约 500 至约 1500mg、约 700 至约 1200mg、约 800 至约 1100mg、约 1000mg，优选 1000mg。氢化可的松的合适剂量包括约 100 至约 500mg、约 150 至约 300mg、约 200mg，优选 200mg。在一个实施方案中，抗组胺剂不是苯海拉明。在另一个实施方案中，NSAID 不是对乙酰氨基酚。在一个优选的实施方案中，在尿酸酶输注前一天晚上口服给予 60mg 非索非那定；在第二天早上口服给予 60mg 非索非那定和 1000mg 对乙酰氨基酚，最后，在就要输注尿酸酶溶液前给予 200mg 氢化可的松。在一个实施方案中，在给予尿酸酶前一天、优选在晚上给予泼尼松。泼尼松的适当剂量包括 5-50mg，优选 20mg。在某些实施方案中，将这些用于消除或减少输注反应出现的预防性治疗应用于接受或将要接受尿酸酶（包括 PEG 化尿酸酶和非 PEG 化尿酸酶）的受试者。在具体的实施方案中，将这些预防性治疗应用于接受或将要接受接受尿酸酶之外的治疗性肽的受试者，其中所述其它治疗性肽是 PEG 化的或非 PEG 化的。

[0042] 在本发明的一个实施方案中，药物组合物包含已与聚合物缀合的尿酸酶，该修饰的尿酸酶保持尿酸分解活性。在一个优选实施方案中，尿酸酶为 PEG 化的尿酸酶。

[0043] 在本发明的一个实施方案中，药物组合物包含已通过与聚合物缀合进行修饰的尿酸酶，该修饰的尿酸酶保持尿酸分解活性。在一个具体的实施方案中，聚合物 - 尿酸酶缀合物按国际专利出版物 WO 01/59078 和美国专利申请第 09/501730 号（它们通过引用整体结合到本文中）的描述进行制备。

[0044] 在本发明的一个实施方案中，聚合物选自聚乙二醇、葡聚糖、聚丙二醇、羟丙基甲基纤维素、羧甲基纤维素、聚乙烯吡咯烷酮和聚乙烯醇。在一个优选实施方案中，聚合物是聚乙二醇，尿酸酶是 PEG 化尿酸酶。

[0045] 在本发明的实施方案中，该组合物在每个尿酸酶亚单位上包含 2-12 个聚合物分子，优选每个尿酸酶亚单位 3-10 个聚合物分子。在本发明的一个实施方案中，每个聚合物分子的分子量在约 1kD 至约 100kD 之间。

[0046] 在本发明的另一个实施方案中，每个聚合物分子的分子量在约 1kD 至约 50kD 之间。在本发明的一个优选实施方案中，每个聚合物分子的分子量在约 5kD 至约 20kD 之间、约 8kD 至约 15kD 之间、约 10kD 至约 12kD 之间，优选约 10kD。在一个优选的实施方案中，每个聚合物分子的分子量为约 5kD 或约 20kD。在本发明一个特别优选的实施方案中，每个聚合物分子的分子量为 10kD。

[0047] 在本发明的一个实施方案中，该组合物适合于反复给予。

[0048] 本发明提供用尿酸酶代谢尿酸的方法。

[0049] 本发明提供尿酸酶的组合物用于减少生物流体中的尿酸水平的用途。

[0050] 在本发明的一个实施方案中，将尿酸酶的组合物用于减少包括血液的生物流体中

的尿酸水平。

[0051] 本发明还提供编码本发明尿酸酶的新型核酸分子。导致这些核酸分子产生的操作是本领域技术人员公知的。例如，尿酸酶核酸序列可通过任何本领域公知的多种策略进行修饰 (Maniatis, T., 1990, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2d ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.)。该序列可在体外用限制性内切核酸酶在适当位点进行切割，然后如有需要进一步进行酶促修饰，分离，连接。在产生编码尿酸酶的基因时，应注意确保修饰的基因保持在适当的翻译阅读框当中，不被翻译终止信号所间断。

[0052] 可将编码尿酸酶蛋白的核苷酸序列插入到适当的表达载体，即含有插入的蛋白质编码序列的转录和翻译必需元件的载体。可利用各种宿主 - 载体系统来表达蛋白质编码序列。这些系统包括但不限于用病毒（例如痘苗病毒、腺病毒等）转染的哺乳动物细胞系统；用病毒（例如杆状病毒）转染的昆虫细胞系统；微生物如含酵母载体的酵母或用噬菌体 DNA、质粒 DNA 或黏粒 DNA 转化的细菌。这些载体的表达元件其强度和特异性各不相同。取决于所采用的宿主 - 载体系统，可使用多种合适的转录和翻译元件中的任何一种。

[0053] 可使用任何公知用以将 DNA 片断插入到载体中的方法，来构建含有由适当转录 / 翻译控制信号和蛋白质编码序列组成的嵌合基因的表达载体。这些方法可包括体外重组 DNA 和合成技术以及体内重组（遗传重组）。编码尿酸酶蛋白的核酸序列的表达可通过第二种核酸序列来调节，使得尿酸酶蛋白在用重组 DNA 分子转化的宿主中得到表达。例如，尿酸酶的表达可通过本领域公知的任何启动子 / 增强子元件来控制。可用来控制尿酸酶表达的启动子包括但不限于 SV40 早期启动子区域 (Bernoist 和 Chambon, 1981, Nature290:304-310)、Rous 肉瘤病毒的 3' 长末端重复序列中所含的启动子 (Yamamoto 等, 1980, Cell 22:787-797)、疱疹胸苷激酶启动子 (Wagner 等, 1981, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 78:144-1445)、金属硫蛋白 (metallothioneine) 基因的调节序列 (Brinster 等, 1982, Nature296:39-42)；原核生物表达载体如  $\beta$ -内酰胺酶启动子 (Villa-Kamaroff 等, 1978, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 75:3727-3731)、tac 启动子 (DeBoer 等, 1983, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 80:21-25) 和 osmB 启动子。在具体的实施方案中，核酸包含有效连接到异源启动子的尿酸酶编码核酸序列。

[0054] 一旦制备和分离出包含尿酸酶编码核酸序列的特定重组 DNA 分子，可用本领域公知的几种方法来使它增殖。一旦确立了合适的宿主系统和生长条件，可大量增殖和制备重组表达载体。如前文所说明，可使用的表达载体包括但不限于以下载体或其衍生物：人或动物病毒如痘苗病毒或腺病毒；昆虫病毒如杆状病毒；酵母载体；噬菌体载体（例如  $\lambda$  噬菌体）、质粒和黏粒 DNA 载体，在此仅举几例。

[0055] 另外，可选择宿主细胞株，其调节插入序列的表达，或者以所需的具体方式修饰或加工基因产物。在某些诱导物的存在下可提高来自某些启动子的表达；由此，遗传工程改造的尿酸酶蛋白的表达可得以控制。此外，不同的宿主细胞对蛋白质翻译以及翻译后加工和修饰（例如糖基化、切割）具有特征性和特异性的机制。可选择适当的细胞系或宿主系统来确保所需的对所表达异种蛋白的修饰和加工。不同的载体 / 宿主表达系统可实现不同程度的加工反应如蛋白水解切割。

[0056] 在本发明的具体实施方案中，尿酸酶在大肠杆菌中的表达优先选用包含 osmB 启动子的载体来进行。

## 实施例

[0057] 实施例 1. 用于尿酸酶表达的基因和表达质粒的构建

[0058] 将重组猪尿酸酶(尿酸氧化酶)、猪- $\Delta$ N(氨基末端截短的猪尿酸酶蛋白,氨基酸 291 和 301 分别用赖氨酸和丝氨酸置换)在大肠杆菌 K-12 株 W3110F- 中表达。构建终止于 pOUR-P- $\Delta$ N-ks-1 的一系列质粒,它们在大肠杆菌宿主细胞的转化时能够指导尿酸酶的有效表达。

[0059] 从猪和狒狒肝脏分离和亚克隆尿酸酶 cDNA

[0060] 通过相关 RNA 的分离和亚克隆从猪和狒狒肝脏制备尿酸酶 cDNA。从猪和狒狒肝脏提取总细胞 RNA(Erlich, H. A. (1989). PCR Technology; Principles and Application for DNA Amplification; Sambrook, J. 等 (1989). Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd edition; Ausubel, F. M. 等 (1998). Current protocols in molecular Biology),然后用首链 cDNA 合成试剂盒 (Pharmacia Biotech) 进行反转录。用 Taq DNA 聚合酶 (Gibco BRL, Life Technologies) 进行 PCR 扩增。

[0061] 用于猪和狒狒尿酸氧化酶(尿酸酶)的 PCR 扩增的合成寡核苷酸引物在表 1 中显示。

[0062] 表 1. 尿酸酶 cDNA 的 PCR 扩增用引物

### 猪肝脏尿酸酶:

正义 5' ggcgcaattccATGGCTCATTACCGTAATGACTACA 3'  
(SEQ ID NO. 1)

反义 5' gcgctctagaagcttccatggTCACAGCCTTGAAGTCAGC 3'  
(SEQ ID NO. 2)

### 狒狒(D3H)肝脏尿酸酶:

正义 5' ggcgcaattccATGGCCCCTTACCAACAACTAT 3'  
(SEQ ID NO. 3)

反义 5' gcgcccatggctagaTCACAGTCTTGAAGACAACTTCCT 3'  
(SEQ ID NO. 4)

[0064] 在各引物的末端引入的、在表 1 中用小写字母显示的限制性内切核酸酶序列为正义 EcoRI 和 NcoI(猪和狒狒)及反义 NcoI、HindIII 和 XbaI(猪)、XbaI 和 NcoI(狒狒)。在狒狒正义引物中,存在于狒狒尿酸酶中的第三密码子 GAC(天冬氨酸)被 CAC(组氨酸)置换, CAC 密码子存在于人尿酸氧化酶假基因的编码序列中的这个位置。用这些引物产生的重组狒狒尿酸酶构建物命名为 D3H 狒狒尿酸酶。

[0065] 将猪尿酸酶 PCR 产物用 EcoRI 和 HindIII 消化并克隆到 pUC18 中,产生 pUC18- 猪尿酸酶。将 D3H 狒狒尿酸酶 PCR 产物用 TA Cloning™(Invitrogen, Carlsbad, CA) 直接克隆到 pCR™II 载体中,产生 pCR™II-D3H 狒狒尿酸。

[0066] 用连接的 cDNA 转化大肠杆菌 XL1-Blue 株 (Stratagene, La Jolla, CA)。制备含

有克隆的尿酸酶 cDNA 的质粒 DNA, 选择并分离出具有公开的尿酸酶 DNA 编码序列 (除表 1 所示的狒狒尿酸酶中的 D3H 置换外) 的克隆。在所选出的 pCR<sup>TM</sup>II-D3H 狒狒尿酸酶克隆中, pCR<sup>TM</sup>II 序列邻接尿酸酶终止密码子, 这由 PCR 引入的序列缺失所致。因此, 3' 非翻译区的 XbaI 和 NcoI 限制位点被消除, 从而使得可以用 PCR 产物 5' 末端的 NcoI 和衍自 pCR<sup>TM</sup>II 载体的 BamHI 进行定向克隆。

[0067] 尿酸酶 cDNA 向 pET 表达载体中的亚克隆

[0068] 狒狒尿酸酶亚克隆

[0069] 将含有全长尿酸酶编码序列的 D3H 狒狒 cDNA 引入到 pET-3d 表达载体 (Novagen, Madison, WI) 中。用 NcoI 和 BamHI 消化 pCR<sup>TM</sup>II-D3H 狒狒尿酸酶, 分离 960bp 片断。用 NcoI 和 BamHI 消化表达质粒 pET-3d, 分离 4600bp 片断。将两个片断连接, 产生 pET-3d-D3H- 狒狒。

[0070] 猪 - 狒狒嵌合尿酸酶亚克隆

[0071] 构建猪 - 狒狒嵌合 (PBC) 尿酸酶, 以获得重组基因的更高表达、稳定性和活性。这样构建 PBC : 从 pET-3d-D3H- 狒狒克隆分离出 4936bp NcoI-ApaI 片断, 将分离的片断与从 pUC18- 猪尿酸酶分离的 624bp NcoI-ApaI 片断连接, 导致 pET-3d-PBC 的形成。PBC 尿酸酶 cDNA 由猪尿酸酶密码子 1-225 和框内连接的狒狒尿酸酶密码子 226-304 组成。

[0072] 猪 -KS 尿酸酶亚克隆

[0073] 构建猪 -KS 尿酸酶, 以加入一个赖氨酸残基, 该残基可提供另外的 PEG 化位点。KS 指猪尿酸酶 291 位处赖氨酸置换精氨酸 (R291K) 的氨基酸插入。另外, 301 位的苏氨酸被丝氨酸置换 (T301S)。如下构建猪 KS 尿酸酶质粒 : 分离 pET-3d-D3H- 狒狒的 4696bp NcoI-NdeI 片断, 然后将其与从 pU18C- 猪尿酸酶分离的 864bp NcoI-NdeI 片断连接, 导致 pET-3d- 猪 KS 的形成。所得的猪 KS 尿酸酶序列由猪尿酸酶密码子 1-288 和框内连接的狒狒尿酸酶密码子 289-304 组成。

[0074] 在 osmB 启动子调节下的尿酸酶序列的亚克隆

[0075] 将尿酸酶基因亚克隆到含有 osmB 启动子的表达载体中 (按照美国专利第 5,795,776 号的教导, 该专利通过引用整体结合到本文中)。这个载体能够响应高渗透压或培养物衰老而诱导蛋白质表达。表达质粒 pMF0A-18 含有 osmB 启动子、核糖体结合位点序列 (rbs) 和转录终止子序列 (ter)。它赋予氨苄青霉素抗性 (AmpR) 和表达重组人乙酰胆碱酯酶 (AChE)。

[0076] D3H- 狒狒尿酸酶的亚克隆

[0077] 用 NcoI 和 BamHI 消化质粒 pMF0A-18, 分离大片断。用 NcoI 和 BamHI 消化构建物 pET-3d-D3H- 狒狒, 分离包括 D3H 狒狒尿酸酶基因的 960bp 片断。将这两个片断连接, 产生 pMF0U18。

[0078] 表达质粒 pMFXT133 含有 osmB 启动子、rbs (大肠杆菌 deo 操纵子)、ter (大肠杆菌 TrypA)、重组因子 Xa 抑制剂多肽 (FxaI), 其赋予四环素抗性基因 (TetR)。将狒狒尿酸酶基因插入到这个质粒中, 以交换抗生素抗性基因。用 NcoI 消化质粒 pMF0U18, 补平, 然后用 XhoI 消化, 分离 1030bp 片断。用 NdeI 消化质粒 pMFXT133, 补平, 然后用 XhoI 消化, 分离大片断。将两个片断连接, 产生狒狒尿酸酶表达载体 pURBA16。

[0079] 猪狒狒嵌合尿酸酶的亚克隆

[0080] 用 ApaI 和 AlwNI 消化质粒 pURBA16, 分离 2320bp 片断。用 NdeI 消化质粒 pMFXT133, 补平, 然后用 AlwNI 消化, 分离 620bp 片断。用 XbaI 消化构建物 pET-3d-PBC, 补平, 然后用 ApaI 消化, 分离 710bp 片断。将三个片断连接产生 pUR-PB, 这个质粒在 osmB 启动子和 rbs 以及 T7rbs(衍自 pET-3d 载体) 的控制下表达 PBC 尿酸酶。

[0081] T7rbs 在另外的步骤中切除。用 NcoI 消化 pUR-PB, 补平, 然后用 AlwNI 消化, 分离 3000bp 片断。用 NdeI 消化质粒 pMFXT133, 补平, 然后用 AlwNI 消化, 分离 620bp 片断。将两个片断连接形成 pDUR-PB, 它在 osmB 启动子的控制下表达 PBC。

[0082] pOUR-PB- $\Delta$  NC 的构建

[0083] 向尿酸酶 cDNA 中引入几个变化, 这些变化导致重组酶稳定性的大大提高。构建质粒 pOUR-PBC- $\Delta$  NC, 其中去除 N 末端六残基成熟肽 (maturation peptide) 和在体内起到过氧化物酶体靶向信号作用的 C 末端三肽。这通过采用质粒 pDUR-PB 中的 PBC 序列和表 2 所列的特异性寡核苷酸引物用 PCR 扩增进行。

[0084] 表 2. 用于 PCR 扩增 PBC- $\Delta$  NC 尿酸酶的引物

**PBC- $\Delta$ NC 尿酸酶:**

正义

5'g~~cgcat~~**ATGACTTACAAAAAGAATGATGAGGTAGAG** 3' (SEQ ID NO. 5)

反义

5'~~ccgtctaga~~**TTAAGACAACTCCTCTTGACTGTACCA**~~GTAATT~~  
~~TCCGTATGG~~ 3' (SEQ ID NO. 6)

[0085] [0086] 在表 2 中, 在引物末端引入的限制性内切核酸酶序列用粗体显示, 非编码区用小写字母显示。NdeI 为正义, XbaI 为反义。反义引物还通过引入不会影响氨基酸序列的点突变 (下划线处) 用来去除内部 NdeI 限制位点, 从而促进用 NdeI 进行的亚克隆。

[0087] pDUR-PB 的 PCR 扩增所产生的 900 碱基对片断用 NdeI 和 XbaI 切割, 分离。然后将所获得的片断插入到 deo 表达质粒 pDBAST-RAT-N 中, 该质粒含有衍自大肠杆菌的 deo-P1P2 启动子和 rbs, 能组成型表达人重组胰岛素前体。用 NdeI 和 XbaI 消化该质粒, 分离 4035bp 片断, 连接到 PBC- 尿酸酶 PCR 产物。用所得的构建物 pDUR-PB- $\Delta$  NC 转化大肠杆菌 K-12 SΦ733(F-cytR strA), 该菌表达高水平的活性截短尿酸酶。

[0088] 双重截短的 PBC- $\Delta$  NC 序列也在 osmB 启动子控制下表达。用 AlwNI-NdeI 消化质粒 pDUR-PB- $\Delta$  NC, 分离 3459bp 片断。用 NdeI-AlwNI 消化上述质粒 pMFXT133, 分离 660bp 片断。然后将各片断连接产生 pOUR-PB- $\Delta$  NC, 将其引入到大肠杆菌 K-12 株 W3110

[0089] F-, 表达高水平的活性截短尿酸酶。

[0090] 尿酸酶表达质粒 pOUR-P- $\Delta$  N-ks-1 的构建

[0091] 构建这个质粒, 以改进重组酶的活性和稳定性。猪 -KS- $\Delta$  N 尿酸酶只在 N 末端截短 ( $\Delta$  N), 此处去除六残基 N 末端成熟肽, 它还含有突变 S46T、R291K 和 T301S。由于 PCR 扩增和克隆过程中出现的保守突变, 在 46 位处是苏氨酸残基而不是丝氨酸。在 291 位, 赖氨酸置换精氨酸, 在 301 位, 插入了丝氨酸置换苏氨酸。两者均衍自狒狒尿酸酶序列。R291K

和 T301S 修饰表示为 KS, 讨论如上。额外的赖氨酸残基提供另外的潜在 PEG 化位点。

[0092] 为构建 pOUR-P- $\Delta$ N-ks-1(图 1), 用 ApaI-XbaI 消化质粒 pOUR-PB- $\Delta$ NC, 分离 3873bp 片断。用 ApaI-SpeI 消化质粒 pET-3d-PKS(构造在图 4 中显示), 分离 270bp 片断。SpeI 切割留下 5' CTAG 突出端, 将其有效地连接到 XbaI 所产生的 DNA 片断。将两个片断连接, 产生 pOUR-P- $\Delta$ N-ks-1。连接后, SpeI 和 XbaI 识别位点丢失(它们的位点在图 9 中用括号显示)。将构建物 pOUR-P- $\Delta$ N-ks-1 引入到大肠杆菌 K-12 株 W3110F-(原养型, ATCC#27325) 中。在 osmB 启动子控制下表达的猪 -KS- $\Delta$ N 尿酸酶产生出具有优越活性和稳定性的高水平重组酶。

[0093] 图 1 说明质粒 pOUR-P- $\Delta$ N-ks-1 的结构。限制位点旁的数字表示核苷酸位置, 该位置相对于指定为 1 的 HaeII 位点而言; 在克隆过程中丢失的限制位点在括号中标出。编码猪 -KS- $\Delta$ N 尿酸酶的质粒 pOUR-P- $\Delta$ N-ks-1 有 4143 碱基对(bp) 长, 由以下元件组成:

[0094] 1. 113bp 长的 DNA 片断, 其从核苷酸号码 1 延伸到 NdeI 位点(113 位), 包括 osmB 启动子和核糖体结合位点(rbs)。

[0095] 2. 932bp 长的 DNA 片断, 其从 NdeI 位点(113 位)延伸到 SpeI/XbaI 连接处(1045 位), 包括 900bp 的猪 -KS- $\Delta$ N(氨基末端截短的猪尿酸酶蛋白的核酸序列, 其中氨基酸 291 和 301 分别被赖氨酸和丝氨酸置换) 编码区和衍自 pCR<sup>TM</sup>II 的 32bp 侧翼序列, 自 SpeI/XbaI 限制位点上游的 TA 克隆位点。

[0096] 3. 从 SpeI/XbaI 连接处(1045 位)到 HindIII(1070 位)的 25bp 多克隆位点序列(MCS)。

[0097] 4. 含有 TrpA 转录终止子(ter)的合成 40bp 寡核苷酸, 其具有 HindIII(1070 位)和 AatII(1110 位)末端。

[0098] 5. 1519bp 长的 DNA 片断, 其从 AatII(1110 位)延伸到包括四环素抗性基因(TetR)的 pBR322 上的 MscI/ScaI(2629 位)位点。

[0099] 6. 1514bp 长的 DNA 片断, 其从 ScaI(2629 位)延伸到包括 DNA 复制原点的 pBR322 上的 HaeII(4143 位)位点。

[0100] 图 2 显示猪 -KS- $\Delta$ N 尿酸酶的 DNA 和推导氨基酸序列。在这个图中, 氨基酸编号按照完全猪尿酸酶序列进行。在起始密码子甲硫氨酸残基之后, 插入苏氨酸置换猪尿酸酶序列中的天冬氨酸。这个苏氨酸残基使得甲硫氨酸能被细菌氨基肽酶除去。氨基酸序列中的缺口说明缺失的 N 末端成熟肽。指出了用于不同尿酸酶序列亚克隆的各个步骤的限制位点(ApaI、NdeI、BamHI、EcoRI 和 SpeI)。小写字母显示的 3' 非翻译序列衍自 pCR<sup>TM</sup>II 序列。翻译终止密码子由星号表示。

[0101] 图 3 显示各种重组尿酸酶序列的氨基酸序列的比对。上面一行代表猪尿酸酶, 其包括全长氨基酸序列。第二行是双重截短的猪 - 猕猴嵌合尿酸酶(PBC- $\Delta$ NC)的序列。第三行显示猪 -KS- $\Delta$ N 尿酸酶的序列, 该酶只在 N 末端截短, 且含有突变 S46T 和氨基酸变化 R291K 和 T301S, 这两个变化都反映尿酸酶编码序列的羧基末端的猕猴起源。星号表示与公开的猪尿酸酶序列相比猪 -KS- $\Delta$ N 中氨基酸有差异的位置; 圆圈表示与猪 - 猕猴嵌合体 PBC- $\Delta$ N 相比猪 -KS- $\Delta$ N 中氨基酸有差异的位置; 虚线表示氨基酸的缺失。

[0102] 构建了具有 Y97H 突变的天然猕猴、猪和兔尿酸酶以及猪 / 猕猴嵌合体(PBC)的 cDNA, 用以克隆到大肠杆菌中。构建并选择表达高水平尿酸酶变体的克隆, 使得所有克隆均

为 W3110F- 大肠杆菌,且表达受 osmB 调节。分离质粒 DNA,通过 DNA 测序和限制性内切核酸酶分析进行验证,培养细胞。

[0103] 截短的尿酸酶(包括猪 -ΔN 和猪 -KS-ΔN) 的构建如下进行:PBC-ΔNC 和猪 -KS 之间交叉连接,然后分别用限制性内切核酸酶 ApaI 和 XbaI 以及 ApaI 加 SpeI 切割。合理的是这些截短突变体会保持活性,因为 N 末端六个残基“成熟肽”(1-2) 和 C 末端三肽“过氧化物酶体靶向信号”(3-5) 不具有显著影响酶活性的功能,有可能这些序列可具有免疫原性。选择出表达高水平尿酸酶变体的克隆。

[0104] 实施例 2. 表达质粒向细菌宿主细胞中的转化

[0105] 将表达质粒 pOUR-P-ΔN-ks-1 引入到大肠杆菌 K-12 株 W3110F- 中。制备转化用细菌细胞,包括在 Luria 肉汤 (LB) 中使细胞生长至对数中期,然后离心收获细胞,在冷水中洗涤,悬浮于 10% 甘油水溶液中,浓度为约  $3 \times 10^{10}$  个细胞 /ml。将细胞分等份保存于 -70° C。在乙醇中沉淀出质粒 DNA,溶于水中。

[0106] 将细菌细胞和质粒 DNA 混合,用 BIO-RAD 的 Gene Pulser II 通过高压电穿孔进行转化 (Trevors et al (1992). Electroporation and Electrofusion (D. C. Chang, B. M. Chassy, J. A. Saunders 和 A. E. Sowers 编) 中, 第 265-290 页, Academic Press Inc., San Diego; Hanahan 等 (1991) Meth. Enzymol., 204, 63-113)。将转化的细胞悬浮在 SOC 培养基 (2% 胰蛋白胨、0.5% 酵母膏、10mM NaCl、2.5mM KC1、10mM MgCl<sub>2</sub>、10mM MgSO<sub>4</sub>、20mM 葡萄糖) 中, 37° C 下温育 1 小时,用四环素抗性进行选择。选出高表达克隆。

[0107] 实施例 3. 重组尿酸酶制品

[0108] 将细菌例如转化的细菌(见上)在含葡萄糖培养基中进行培养;pH 维持在 7.2±0.2,温度大约 37° C。

[0109] 接近培养的最后 5-6 小时时,培养基补加 KC1 至最终浓度为 0.3M。继续进行培养,以让尿酸酶积累。

[0110] 重组尿酸酶在细菌细胞当中积累为类似于内含体 (IB) 的不溶性沉淀。离心洗涤细胞悬浮物,悬浮于 50mM Tris 缓冲液 (pH8.0) 和 10mMEDTA 中,使最终体积达干细胞重量的大约 40 倍。

[0111] 用溶菌酶和高压裂解细菌细胞后,离心分离含重组尿酸酶的内含体 (IB)。溶菌酶 (2000-3000 单位 /ml) 处理在 pH8.0 和 7±3° C 下搅拌进行 16-20 小时。用水洗涤粒状沉淀,-20° C 下保藏备用。

[0112] 富集的 IB 悬浮于 50mM NaHCO<sub>3</sub> 缓冲液 (pH10.3±0.1) 后作进一步的加工。将悬浮液在室温下温育过夜,以让 IB 衍生的尿酸酶溶解,随后进行离心澄清。

[0113] 尿酸酶通过几个色谱步骤作进一步的纯化。首先,在 Q-Sepharose FF 柱上进行色谱。用含 150mM NaCl 的碳酸氢盐缓冲液洗涤已加样的柱,用含 250mM NaCl 的碳酸氢盐缓冲液洗脱尿酸酶。然后,用黄嘌呤 - 琼脂糖树脂 (Sigma) 除去尿酸酶制品中的少量杂质。用 50mM 甘氨酸缓冲液 (pH10.3±0.1) 将 Q-Sepharose FF 洗脱液稀释至蛋白质浓度为大约 0.25mg/ml,加样。用含 100mM NaCl 的碳酸氢盐缓冲液 (pH10.3±0.1) 洗涤柱,用补充有 60 μM 黄嘌呤的同一缓冲液洗脱尿酸酶。在这个阶段,通过 Q-Sepharose 色谱再纯化尿酸酶,以除去聚集体形式。

[0114] 各尿酸酶制品的纯度由大小排阻层析测出大于 95%。用 Superdex200 柱检测出各制品中聚集体形式少于 0.5%。

[0115] 表 3 总结了来自 25L 发酵液的 IB 的猪 -KS $\Delta$ N 尿酸酶的纯化。

[0116] 表 3. 猪 -KS $\Delta$ N 尿酸酶的纯化

[0117]

纯化步骤	蛋白质(mg)	活性(U)	比活性(U/mg)
IB 溶解	12,748	47,226	3.7
澄清溶液	11,045	44,858	4.1
Q-Sepharose I- 主集合体 (main pool)	7,590	32,316	4.3
黄嘌呤-琼脂糖-主集合体	4,860	26,361	5.4
Q-Sepharose II- 主集合体	4,438	22,982	5.2
30 kD UF 截留液	4,262	27,556	6.5

[0118]

[0119] 实施例 4. 重组尿酸酶的特性

[0120] SDS-PAGE

[0121] 高度纯化的尿酸酶变体的 SDS-PAGE 分析 (图 4) 显示了相当独特的模式。样品在碳酸盐缓冲液 (pH10.3) 中 4° C 下保藏直至几个月。全长变体猪、猪 -KS 和 PBC 显示有两种分子量约 20 和 15kD 的主要降解产物积累。这个观察结果提示, 至少有单个切口裂解了尿酸酶亚单位分子。在氨基末端缩短的克隆中以及在兔尿酸酶中检测到不同的降解模式, 但比例较低。兔的氨基末端类似于缩短的克隆的氨基末端。测定了在纯化和保藏过程中产生的尿酸酶片断的氨基末端序列。

[0122] 肽测序

[0123] 用 Edman 降解方法进行主体 (bulk) 尿酸酶制品的 N 末端测序。进行了 10 个循环。与猪 -KS- $\Delta$ N 相比重组猪尿酸酶 (全长克隆) 产生了更为丰富的降解片断。导致降解片断的推导切割位点如下 :

[0124] 1) 168 位处具有以下【序列的主要位点 :

[0125] --QSG ↓ FEGFI--

[0126] 2) 142 位处具有以下序列的次要位点 :

[0127] --IRN ↓ GPPVI--

[0128] 以上序列并不显出任何已知的蛋白酶解切割。不过, 切割可能源于蛋白酶解或一些化学反应。氨基截短的尿酸酶意外地比非氨基截短的尿酸酶更稳定。PBC- $\Delta$ NC 的稳定性还类似于其它  $\Delta$ N 分子, 小于非氨基截短的 PBC。

[0129] 功效

[0130] 用 UV 方法测量尿酸酶的活性。酶促反应速度通过测量由尿酸氧化成尿囊素所致的 292nm 处吸光度减少来测定。一活力单位定义为 25° C 下在指定条件下每分钟氧化一微

摩尔尿酸所需的尿酸酶的量。尿酸酶功效以每 mg 蛋白质的活力单位 (U/mg) 表示。

[0131] 1mM 尿酸在 292nm 处的消光系数为  $12.2 \text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ 。因此,  $1 \mu\text{mol}$  尿酸 / ml 反应混合物的氧化导致吸光度减少  $12.2 \text{mA}_{292}$ 。吸光度随时间的变化 ( $\Delta A_{292}$  每分钟) 从曲线的线性部分导出。

[0132] 蛋白质浓度用改进的 Bradford 方法 (Macart 和 Gerbaut (1982) Clin Chim Acta 122:93-101) 测定。尿酸酶的比活性 (功效) 通过将活性 (U/ml) 除以蛋白质浓度 (mg/ml) 来计算。各种重组尿酸酶的酶活性结果在表 4 中总结。该表中包括市售制品的结果作为参考值。从这些结果显现, 尿酸酶蛋白的截短对其酶活性没有显著影响。

[0133] 表 4. 重组和天然尿酸酶的动力学参数总结

尿酸酶	储备溶液的浓度 (mg/ml) <sup>(1)</sup>	比活性 (U/mg) <sup>(2)</sup>	$K_m^{(4)}$ ( $\mu\text{M}$ 尿酸)	$K_{cat}^{(5)}$ (1/min)
<b>重组的</b>				
猪	0.49	7.41	4.39	905
猪- $\Delta N$	0.54	7.68	4.04	822
猪-KS	0.33	7.16	5.27	1085
猪-KS- $\Delta N$	1.14	6.20	3.98	972
PBC	0.76	3.86	4.87	662
PBC- $\Delta NC$	0.55	3.85	4.3	580
兔	0.44	3.07	4.14	522
<b>天然的</b>				
猪 (Sigma)	2.70	3.26 <sup>(3)</sup>	5.85	901
黄曲霉 (Merck)	1.95	0.97 <sup>(3)</sup>	23.54	671

[0135] 表 4 注释 :

[0136] (1) 蛋白质浓度通过 278nm 处测量的吸光度来测定, 对于 10mg/ml 尿酸酶溶液使用 11.3 的消光系数 (Mahler, 1963)。

[0137] (2) 1 单位的尿酸酶活性定义为 25° C 下每分钟氧化  $1 \mu\text{mol}$  尿酸成尿囊素的酶量。

[0138] (3) 比活性值从 Lineweaver-Burk 图导出, 底物浓度等于  $60 \mu\text{M}$ 。

[0139] (4) 反应混合物由以下储备溶液的各种组合所组成 :

[0140] 100mM 硼酸钠缓冲液, pH9.2

[0141] 300  $\mu\text{M}$  尿酸的 50mM 硼酸钠缓冲液溶液, pH9.2

[0142] 1mg/ml BSA 的 50mM 硼酸钠缓冲液溶液, pH9.2

[0143] (5)  $K_{cat}$  通过将  $V_{max}$  (从各个 Lineweaver-Burk 图求出) 除以尿酸酶在反应混合物

中的浓度（以摩尔当量表示，基于尿酸酶的四聚体分子量）来计算。

[0144] 实施例 5. 尿酸酶与 m-PEG 的缀合 (PEG 化)

[0145] 用 m-PEG-NPC (一甲氧基 - 聚乙二醇 - 硝基苯基碳酸酯) 缀合猪 -KS-ΔN 尿酸酶。确立能导致每尿酸酶亚单位 2-12 个 5、10 或 20kDPEG 链的条件。将 m-PEG-NPC 逐渐加入到蛋白质溶液中。PEG 加入结束后，接着将尿酸酶 /m-PEG-NPC 反应混合物在 2-8° C 下温育 16-18 小时，直到最多的未结合 m-PEG 链缀合到尿酸酶。

[0146] 每个 PEG- 尿酸酶单体的 PEG 链数用 PEG 和尿酸酶标准品通过 Superose 6 大小排阻层析 (SEC) 进行测定。每亚单位的结合 PEG 链数由以下方程式确定：

[0147]

$$\text{PEG 链数/亚单位} = \frac{3.42 \times \text{注射样品中 PEG 的量}(\mu\text{g})}{\text{注射样品中蛋白质的量}(\mu\text{g})}$$

[0148] PEG- 尿酸酶样品中 PEG 和蛋白质部分的浓度用串联排列的紫外 (UV) 检测器和折光指数 (RI) 检测器 (Kunitani 等, 1991 所开发) 通过大小排阻层析 (SEC) 测定。产生三个校准曲线：蛋白质曲线（在 220nm 处测量吸收）；蛋白质曲线（通过 RI 测量）和 PEG 曲线（通过 RI 测量）。然后，用相同的系统分析 PEG- 尿酸酶样品。用实验样品的所得 UV 和 RI 峰面积值计算 PEG 和蛋白质相对于校准曲线的浓度。3.42 的指数是尿酸酶单体的分子量 (34,192 道尔顿) 与 10kD PEG 的分子量之间的比。

[0149] 连接的 PEG 改进了尿酸酶在具有生理 pH 值的溶液中的溶解度。表 5 指出了各批 PEG 化猪 -KS-ΔN 尿酸酶产物之间的差异。一般来说，所连接的 PEG 链数和所保留的酶比活性 (SA) 之间存在反比关系。

[0150] 表 5. PEG 化猪 -KS-ΔN 尿酸酶缀合物的酶活性

缀合物批次	PEG MW (kD)	每尿酸酶亚单位的 PEG 链数	尿酸酶 SA (U/mg)	对照的 SA 百分比
猪-KS-ΔN	-	-	8.2	100
1-17#	5	9.7	5.8	70.4
LP-17	10	2.3	7.8	94.6
1-15#	10	5.1	6.4	77.9
13#	10	6.4	6.3	76.9
14#	10	6.5	6.4	77.5
5-15#	10	8.8	5.4	65.3
5-17#	10	11.3	4.5	55.3
4-17#	10	11.8	4.4	53.9
1-18#	20	11.5	4.5	54.4

[0151] [0152] 实施例 6. 用 1000D 和 100,000D PEG 对尿酸酶的 PEG 化

[0153] 用 1000D 和 100,000D m-PEG-NPC 按实施例 5 的描述缀合猪 -KS-ΔN 尿酸酶。使用

能导致每尿酸酶亚单位 2-11 个 PEG 链的条件。PEG 加入结束后,接着将尿酸酶 /m-PEG-NPC 反应混合物在 2-8° C 下温育 16-18 小时,直到最多的未结合 m-PEG 链缀合到尿酸酶。

[0154] 每 PEG- 尿酸酶单体的 PEG 链数如上所述测定。

[0155] 连接的 PEG 改进了尿酸酶在具有生理 pH 值的溶液中的溶解度。实施例 7. 与 PEG 缀合的猪 -KS-Δ N 尿酸酶的药物动力学

[0156] 进行生物学实验,以确定为提供疗效所需 PEG 化的最佳程度和数量。

[0157] 在大鼠药物动力学研究中,在第 1 天和第 8 天静脉内注射给予 0.4mg(2U)/kg 体重的未修饰尿酸酶,产生约 10 分钟的循环半寿期。但是,每周一次注射共 9 次后,用 2-11x10kD PEG- 猪 -KS-Δ N 尿酸酶进行的大鼠清除速度研究表明,清除不取决于 PEG 链数(在这个范围内),在整个研究期间保持相对恒定(见表 6; 半寿期约 30 小时)。周与周的差异在实验误差范围内。9 次注射 10x5kD PEG 和 10x20kD PEG- 尿酸酶缀合物后,也显现相同的模式。此结果表明,不管尿酸酶 PEG 化的程度如何,在这个范围内在大鼠模型中观察到相似的生物效应。

[0158] 表 6. PEG 化猪 -KS-Δ N 尿酸酶制品在大鼠中的半寿期

[0159]

	修饰程度(每个尿酸酶亚单位的 PEG 链数)							
	5kDPEG		10kD PEG				20kD PEG	
周	10x	2x	5x	7x	9x	11x	10x	
1	25.7±1.7 (5)	29.4±3.4 (5)	37.7±3.1 (5)	37.6±3.9 (5)	36.9±4.3 (5)	31.4±4.3 (5)	21.6±1.5 (5)	
2	-	-	-	26.7±3.0 (5)	28.4±1.6 (5)	-	-	
3	27.5±3.8 (5)	29.0±2.6 (5)	29.9±11.7 (5)	32.7±11.1 (5)	26.3±4.7 (5)	11.8±3.3 (5)	14.5±2.7 (5)	
4	-	-	27.1±5.3 (5)	18.4±2.2 (4)	19.7±5.6 (4)	-	-	
5	28.6±1.7 (5)	22.5±2.7 (5)	34.3±3.9 (4)	37.3±3.0 (5)	30.4±3.6 (5)	30.5±1.3 (5)	19.3±2.5 (5)	
6	-	-	35.4±3.1 (14)	27.1±3.6 (13)	30.7±2.9 (13)	-	-	
7	16.5±4.9 (5)	32.5±4.3 (5)	-	-	-	16.12±2.7 (5)	25.8±2.5 (5)	
8	-	-	-	-	-	-	-	
9	36.8±4.0 (15)	28.7±2.7 (15)	34.0±2.4 (13)	24.2±3.4 (13)	31.0±2.6 (13)	29.3±1.4 (15)	26.7±0.5 (15)	

[0160] 表 6 注释: 结果作为平均值 ± 标准误差以小时表示。括号中的数字表示试验的动物数量。

[0161] 如表中所示大鼠每周一次接受静脉内注射 0.4mg/kg 体重的修饰猪 -KS-Δ N 尿酸

酶。每组一开始包括 15 只大鼠,以 5 只为亚组轮流放血。有几只大鼠在研究过程中因麻醉致死。通过测量注射后 5 分钟及 6、24 和 48 小时收集的血浆样品中的尿酸酶活性(比色测定)来测定半寿期。

[0162] 表 5 描述研究中所用的各批 PEG 化尿酸酶。

[0163] 用 6x5kD PEG- 猪 -KS- $\Delta$ N 尿酸酶在兔中进行的生物利用度研究表明,首次注射后,循环半寿期为 98.2±1.8 小时(静脉内),肌肉内和皮下注射后的生物利用度分别为 71% 和 52%。但是,在第二次肌肉内和皮下注射后,在所有兔中检测出显著的抗尿酸酶抗体滴度,随后各次注射后清除加速。用相同的缀合物注射大鼠,导致的半寿期为 26±1.6 小时(静脉内),肌肉内和皮下注射后的生物利用度分别为 33% 和 22%。

[0164] 用 9x10kD PEG- 猪 -KS- $\Delta$ N 尿酸酶在大鼠中进行的研究表明,首次注射后的循环半寿期为 42.4 小时(静脉内),肌肉内和皮下注射后的生物利用度分别为 28.9% 和 14.5%(见图 5 和表 7)。在第四次注射后,循环半寿期为 32.1±2.4 小时,肌肉内和皮下注射后的生物利用度分别为 26.1% 和 14.9%。

[0165] 用 9x10kD PEG- 猪 -KS- $\Delta$ N 尿酸酶在兔中进行的类似药物动力学研究表明,在注射此缀合物(每两周注射一次共 4 次)后没有观察到加速清除。在这些动物中,第一次注射后的循环半寿期为 88.5 小时(静脉内),肌肉内和皮下注射后的生物利用度分别为 98.3% 和 84.4%(见图 6 和表 7)。在第四次注射后,循环半寿期为 141.1±15.4 小时,肌肉内和皮下注射后的生物利用度分别为 85% 和 83%。

[0166] 用 9x10kD PEG- 猪 -KS- $\Delta$ N 进行了类似的研究,以评估在小猎犬(每组两雄两雌)中的生物利用度。第一次静脉内注射后记录到的循环半寿期为 70±11.7 小时,肌肉内和皮下注射后的生物利用度分别为 69.5% 和 50.4%(见图 7 和表 7)。

[0167] 用猪进行 9x10kD PEG- 猪 -KS- $\Delta$ N 制品的研究。每组三只动物用于通过静脉内、皮下和肌肉内途径给予。第一次静脉内注射后记录到的循环半寿期为 178±24 小时,肌肉内和皮下注射后的生物利用度分别为 71.6% 和 76.8%(见图 8 和表 7)。

[0168] 表 7. 9x10kD PEG- 猪 -KS- $\Delta$ N 尿酸酶的药物动力学研究

[0169]

注射#	半寿期(小时)	生物利用度	
	静脉内	肌肉内	皮下
大鼠			
1	42.4 ± 4.3	28.9%	14.5%
2	24.1 ± 5.0	28.9%	14.5%
4	32.1 ± 2.4	26.1%	14.9%
兔			
1	88.5 ± 8.9	98.3%	84.4%
2	45.7 ± 40.6	100%	100%
4	141.1 ± 15.4	85%	83%
犬			
1	70.0 ± 11.7	69.5%	50.4%
猪			
1	178 ± 24	71.6%	76.8%

[0170] 用<sup>125</sup>I 按 Bolton & Hunter 方法碘化 9x10kD PEG- 猪 -KS-ΔN 尿酸酶后, 进行吸收、分布、代谢和排泄 (ADME) 研究。将标记的缀合物注射到 7 组的每组 4 只大鼠 (2 雄 2 雌) 中。在 1 小时后和每 24 小时分析放射性的分布, 持续 7 天 (除第 5 天外)。将每组依次处死, 切除不同器官进行分析。将第 7 组保持在代谢笼中, 由其收集尿液和粪便。通过测量可获自 TCA 沉淀 (即结合的蛋白质, 归一化到器官大小) 的每个器官 (肾、肝、肺和脾) 中的总放射性和计数分数, 评估 (放射性) 材料在动物全部身体内的分布。在所切除的器官中, 没有器官的比放射性高于其它器官, 因此例如在肝脏或肾脏中未见显著积累。到第 7 天为止, 有 70% 的放射性被排泄。

#### [0171] 实施例 8. 临床试验结果

[0172] 进行了随机化、非盲、多中心、平行组研究, 以评估在对常规疗法无响应或不耐受的高尿酸血症和严重痛风人患者中 PEG- 尿酸酶 (**Puricase®**, Savient Pharmaceuticals) 的尿酸响应以及药物动力学和安全曲线。疾病的平均持续时间是 14 年, 70% 的研究群体有一个或多个结节瘤。

[0173] 在本研究中, 将 41 名患者 (平均年龄 58.1 岁) 随机至采取以下四种给药方案之一的 12 周静脉内 PEG- 尿酸酶治疗: 每两周 4mg (7 名患者); 每两周 8mg (8 名患者); 每四周 8mg (13 名患者) 或每四周 12mg (13 名患者)。在确定的时间间隔测量血浆尿酸酶活性和尿酸水平。药物动力学参数、平均血浆尿酸浓度和血浆尿酸小于或等于 6mg/dL 的时间百分比从尿酸酶活性和尿酸水平的分析结果得出。

[0174] 每两周接受 8mg 的 PEG- 尿酸酶的患者其 PUA 降低最大, 92% 的治疗时间其水平低于 6mg/dL (处理前血浆尿酸为 9.1mg/dL, 与此对比, 12 周期间的平均血浆尿酸为 1.4mg/dL)。

[0175] 在其它 PEG- 尿酸酶治疗剂量组中也观察到显著和持续的较低血浆尿酸水平 : 在每四周 8mg 的组中 86% 的治疗时间 PUA 低于 6mg/ml ( 处理前血浆尿酸为 9.1mg/dL , 与此对比 , 12 周期间的平均血浆尿酸为 2.6mg/dL) ; 在每四周 12mg 的组中 84% 的治疗时间 PUA 低于 6mg/ml ( 处理前血浆尿酸为 8.5mg/dL , 与此对比 , 12 周期间的平均血浆尿酸为 2.6mg/dL) ; 在每两周 4mg 的组中 73% 的治疗时间 PUA 低于 6mg/ml ( 处理前血浆尿酸为 7.6mg/dL , 与此对比 , 12 周期间的平均血浆尿酸为 4.2mg/dL) 。

[0176] 在给予 PEG- 尿酸酶的第一个 24 小时内血浆尿酸从基线的最大降低百分比 , 对于接受 4mg/2 周的受试者为 72%(p=0.0002) ; 对于接受 8mg/2 周的受试者为 94%(p 小于 0.0001) ; 对于接受 8mg/4 周的受试者为 87%(p 小于 0.0001) ; 对于接受 12mg/4 周的受试者为 93%(p 小于 0.0001) 。

[0177] 在 12 周治疗周期内血浆尿酸从基线的降低百分比 , 对于接受 4mg/2 周的受试者为 38%(p=0.0002) ; 对于接受 8mg/2 周的受试者为 86%(p 小于 0.0001) ; 对于接受 8mg/4 周的受试者为 58%(p=0.0003) ; 对于接受 12mg/4 周的受试者为 67%(p 小于 0.0001) 。

[0178] 意外地 , 一些接受 PEG- 尿酸酶的受试者经历了输注相关的不利事件 , 即输注反应。这些反应在总输注中出现 14% 。

[0179] 本文引述的所有参考文献对于所有目的通过引用整体结合到本文中 , 引用的程度如同每个单独的出版物或专利或专利申请具体地和个别地被指明对于所有目的通过引用整体结合到本文中。

[0180] 本领域技术人员知道 , 可对本发明作出许多修改和变化而不偏离本发明的精神和范围。本文描述的具体实施方案只是通过举例方式提供 , 本发明只受到所附权利要求的条款以及这些权利要求享有的等效要求全部范围的限定。

[0001]

## CPCH1262128D 序 列 表

&lt;110&gt; Savient Pharmaceuticals, Inc.

Hartman, Jacob

Mendelovitz, Simona

&lt;120&gt; 尿酸氧化酶的变体形式及其用途

&lt;130&gt; 103864-156066

&lt;150&gt; US 60/670, 541

&lt;151&gt; 2005-04-11

&lt;160&gt; 16

&lt;170&gt; PatentIn version 3.3

&lt;210&gt; 1

&lt;211&gt; 36

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; 猪肝脏尿酸酶(正义)

&lt;400&gt; 1

gcgcaattc catggctcat taccgtaatg actaca

36

&lt;210&gt; 2

&lt;211&gt; 40

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; 猪肝脏尿酸酶(反义)

&lt;400&gt; 2

gcgcctctaga agttccatg gtcacagcct tgaagtccgc

40

&lt;210&gt; 3

&lt;211&gt; 35

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

[0002]

&lt;223&gt; 猕猴(D3H)肝脏尿酸酶(正义)

&lt;400&gt; 3

gegegaattc catggccac taccataaca actat

35

&lt;210&gt; 4

&lt;211&gt; 40

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; 猕猴(D3H)肝脏尿酸酶(反义)

&lt;400&gt; 4

gegeccatgg tctagatcac agtcttgaag acaacttcct

40

&lt;210&gt; 5

&lt;211&gt; 36

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; PBC-ΔNC 尿酸酶(正义)

&lt;400&gt; 5

gcgcatatga cttacaaaaaa gaatgtatgag gtagag

36

&lt;210&gt; 6

&lt;211&gt; 54

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; PBC-ΔNC 尿酸酶(反义)

&lt;400&gt; 6

cgctctatgt taagacaact tcctcttgac tgtaccatgt attttccgt atgg

54

&lt;210&gt; 7

&lt;211&gt; 299

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; 猪-KS-ΔN

[0003]

&lt;400&gt; 7

Met	Thr	Tyr	Lys	Lys	Asn	Asp	Glu	Val	Glu	Phe	Val	Arg	Thr	Gly	Tyr
1															
					5				10						15

Gly	Lys	Asp	Met	Ile	Lys	Val	Leu	His	Ile	Gln	Arg	Asp	Gly	Lys	Tyr
					20				25						30

His	Ser	Ile	Lys	Glu	Val	Ala	Thr	Thr	Val	Gln	Leu	Thr	Leu	Ser	Ser
										35					40

Lys	Lys	Asp	Tyr	Leu	His	Gly	Asp	Asn	Ser	Asp	Val	Ile	Pro	Thr	Asp
										50					55

Thr	Ile	Lys	Asn	Thr	Val	Asn	Val	Leu	Ala	Lys	Phe	Lys	Gly	Ile	Lys
										65					70

Ser	Ile	Glu	Thr	Phe	Ala	Val	Thr	Ile	Cys	Glu	His	Phe	Leu	Ser	Ser
										85					90

Phe	Lys	His	Val	Ile	Arg	Ala	Gln	Val	Tyr	Val	Glu	Glu	Val	Pro	Trp
										100					105

Lys	Arg	Phe	Glu	Lys	Asn	Gly	Val	Lys	His	Val	His	Ala	Phe	Ile	Tyr
										115					120

Thr	Pro	Thr	Gly	Thr	His	Phe	Cys	Glu	Val	Glu	Gln	Ile	Arg	Asn	Gly
										130					135

Pro	Pro	Val	Ile	His	Ser	Gly	Ile	Lys	Asp	Leu	Lys	Val	Leu	Lys	Thr
										145					150

Thr	Gln	Ser	Gly	Phe	Glu	Gly	Phe	Ile	Lys	Asp	Gln	Phe	Thr	Thr	Leu
										165					170

Pro	Glu	Val	Lys	Asp	Arg	Cys	Phe	Ala	Thr	Gln	Val	Tyr	Cys	Lys	Trp
										180					185

[0004]

Arg Tyr His Gln Gly Arg Asp Val Asp Phe Glu Ala Thr Trp Asp Thr  
 195 200 205

Val Arg Ser Ile Val Leu Gln Lys Phe Ala Gly Pro Tyr Asp Lys Gly  
 210 215 220

Glu Tyr Ser Pro Ser Val Gln Lys Thr Leu Tyr Asp Ile Gln Val Leu  
 225 230 235 240

Thr Leu Gly Gln Val Pro Glu Ile Glu Asp Met Glu Ile Ser Leu Pro  
 245 250 255

Asn Ile His Tyr Leu Asn Ile Asp Met Ser Lys Met Gly Leu Ile Asn  
 260 265 270

Lys Glu Glu Val Leu Leu Pro Leu Asp Asn Pro Tyr Gly Lys Ile Thr  
 275 280 285

Gly Thr Val Lys Arg Lys Leu Ser Ser Arg Leu  
 290 295

<210> 8

<211> 298

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 没有起始 Met 的猪-KS-ΔN

<400> 8

Thr Tyr Lys Lys Asn Asp Glu Val Glu Phe Val Arg Thr Gly Tyr Gly  
 1 5 10 15

Lys Asp Met Ile Lys Val Leu His Ile Gln Arg Asp Gly Lys Tyr His  
 20 25 30

Ser Ile Lys Glu Val Ala Thr Thr Val Gln Leu Thr Leu Ser Ser Lys

[0005]

35	40	45
----	----	----

Lys Asp Tyr Leu His Gly Asp Asn Ser Asp Val Ile Pro Thr Asp Thr		
50	55	60

Ile Lys Asn Thr Val Asn Val Leu Ala Lys Phe Lys Gly Ile Lys Ser		
65	70	75
		80

Ile Glu Thr Phe Ala Val Thr Ile Cys Glu His Phe Leu Ser Ser Phe		
85	90	95

Lys His Val Ile Arg Ala Gln Val Tyr Val Glu Glu Val Pro Trp Lys		
100	105	110

Arg Phe Glu Lys Asn Gly Val Lys His Val His Ala Phe Ile Tyr Thr		
115	120	125

Pro Thr Gly Thr His Phe Cys Glu Val Glu Gln Ile Arg Asn Gly Pro		
130	135	140

Pro Val Ile His Ser Gly Ile Lys Asp Leu Lys Val Leu Lys Thr Thr		
145	150	155
		160

Gln Ser Gly Phe Glu Gly Phe Ile Lys Asp Gln Phe Thr Thr Leu Pro		
165	170	175

Glu Val Lys Asp Arg Cys Phe Ala Thr Gln Val Tyr Cys Lys Trp Arg		
180	185	190

Tyr His Gln Gly Arg Asp Val Asp Phe Glu Ala Thr Trp Asp Thr Val		
195	200	205

Arg Ser Ile Val Leu Gln Lys Phe Ala Gly Pro Tyr Asp Lys Gly Glu		
210	215	220

Tyr Ser Pro Ser Val Gln Lys Thr Leu Tyr Asp Ile Gln Val Leu Thr		
225	230	235
		240

[0006]

Leu Gly Gln Val Pro Glu Ile Glu Asp Met Glu Ile Ser Leu Pro Asn  
 245 250 255

Ile His Tyr Leu Asn Ile Asp Met Ser Lys Met Gly Leu Ile Asn Lys  
 260 265 270

Glu Glu Val Leu Leu Pro Leu Asp Asn Pro Tyr Gly Lys Ile Thr Gly  
 275 280 285

Thr Val Lys Arg Lys Leu Ser Ser Arg Leu  
 290 295

<210> 9

<211> 897

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 猪-KS-DNA

<400> 9

atgacttaca aaaagaatga tgaggttagag tttgtcccaa ctggctatgg gaaggatatg 60

ataaaaagttc tccatattca gcgagatgga aaatatcaca gcataaaaaa ggtggcaact 120

acagtgcac acgttttgcg ctccaaaaaaaaa gattacctgc atggagacaa ttccatgttc 180

atccctacag acaccatcaa gaacacagtt aatgtccctgg cgaaggtaaa aggcatcaaa 240

agcatagaaaa cttttgttgt gactatctgt gagcatttcc ttcttcctt caagcatgtc 300

atcagagctc aagtctatgt ggaagaagtt ctttggaaage gttttgaaaa gaatggagtt 360

aagcatgtcc atgcatttat ttatactctt actggAACGc acttctgtga gggtgaacag 420

ataaggaatg gacccatcgat cattcattctt ggaatcaaag acctaaaaatg ctggaaaaaca 480

acccatgtcg gctttggaaagg attccatcaag gaccatgtca ccaccctcccc tgagggtgaag 540

gaccgggtgtt ttgccaccca agtgtactgc aaatggcgctt accaccaggc cagagatgtg 600

gactttgggg ccacccggaa cactgttagg agcattgtcc tgcagaaatt tgcggggccc 660

[0007]

tatgacaaaag	gcgaggtactc	gcccctgtc	cagaagacac	tctatgacat	ccagggtctc	720
accctggcc	aggttccctga	gatagaagat	atggaaatca	gcctgccaaa	tattcactac	780
ttaaacatag	acatgtccaa	aatgggactg	atcaacaagg	aagaggctt	gctaccit	840
gacaatccat	atggaaaaat	tactggtaca	gtcaagagga	agttgtcttc	aagactg	897
<210>	10					
<211>	894					
<212>	DNA					
<213>	人工序列					
<220>						
<223>	没有起始 ATG 的猪-KS-ΔN					
<400>	10					
acttacaaaaa	agaatgatga	ggtagagttt	gtccgaactg	getatggaa	ggatatgata	60
aaagttctcc	atattcageg	agatggaaaaa	tatcacagca	ttaaagaggt	ggcaactaca	120
gtgcaactga	ctttgagctc	caaaaaagat	tacetgeatg	gagacaattc	agatgtcate	180
cctacagaca	ccatcaagaa	cacagttaat	gtctggcga	agttcaaagg	catcaaaagc	240
atagaaaactt	ttgctgtgac	tatctgtgag	catttccttt	cttccttcaa	geatgtcatc	300
agagetcaag	tctatgtgga	agaagttctt	tggaaagcgtt	ttgaaaagaa	tggagtttaag	360
catgtccatg	catttattta	tactectact	ggaacgcaet	tetgtgaggt	tgaacagata	420
aggaatggac	ctccagtcat	tcattctgga	atcaaagacc	taaaagtett	gaaaacaacc	480
cagtcggct	ttgaaggatt	catcaaggac	cagttcacca	ccctccctga	ggtgaaggac	540
cggtgttttgc	ccacccaagt	gtactgcaaa	tggcgctacc	accaggcag	agatgtggac	600
tttggggcca	cctgggacac	tgttaggagc	attgtccitgc	agaaaatttgc	tggggccstat	660
gacaaaggcg	agtactcgcc	ctctgtccag	aagacactct	atgacatcca	ggtgtccacc	720
ctggggcagg	ttcctgagat	agaagatatg	gaaatcagcc	tgcacaaatat	tcactactta	780
aacatagaca	tgtccaaaat	gggactgatc	aacaaggaag	aggcttgct	accttttagac	840
aatccatatg	gaaaaattac	tggtacagtc	aagaggaagt	tgtcttcaag	actg	894

[0008]

<210> 11  
 <211> 304  
 <212> PRT  
 <213> 野猪(Sus scrofa)

<400> 11

Met Ala His Tyr Arg Asn Asp Tyr Lys Lys Asn Asp Glu Val Glu Phe  
 1 5 10 15

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

Arg Asp Gly Lys Tyr His Ser Ile Lys Glu Val Ala Thr Ser Val Gln  
 35 40 45

Leu Thr Leu Ser Ser Lys Lys Asp Tyr Leu His Gly Asp Asn Ser Asp  
 50 55 60

Val Ile Pro Thr Asp Thr Ile Lys Asn Thr Val Asn Val Leu Ala Lys  
 65 70 75 80

Phe Lys Gly Ile Lys Ser Ile Glu Thr Phe Ala Val Thr Ile Cys Glu  
 85 90 95

His Phe Leu Ser Ser Phe Lys His Val Ile Arg Ala Gln Val Tyr Val  
 100 105 110

Glu Glu Val Pro Trp Lys Arg Phe Glu Lys Asn Gly Val Lys His Val  
 115 120 125

His Ala Phe Ile Tyr Thr Pro Thr Gly Thr His Phe Cys Glu Val Glu  
 130 135 140

Gln Ile Arg Asn Gly Pro Pro Val Ile His Ser Gly Ile Lys Asp Leu  
 145 150 155 160

Lys Val Leu Lys Thr Thr Gln Ser Gly Phe Glu Gly Phe Ile Lys Asp  
 165 170 175

[0009]

Gln Phe Thr Thr Leu Pro Glu Val Lys Asp Arg Cys Phe Ala Thr Gln  
 180 185 190

Val Tyr Cys Lys Trp Arg Tyr His Gln Gly Arg Asp Val Asp Phe Glu  
 195 200 205

Ala Thr Trp Asp Thr Val Arg Ser Ile Val Leu Gln Lys Phe Ala Gly  
 210 215 220

Pro Tyr Asp Lys Gly Glu Tyr Ser Pro Ser Val Gln Lys Thr Leu Tyr  
 225 230 235 240

Asp Ile Gln Val Leu Thr Leu Gly Gln Val Pro Glu Ile Glu Asp Met  
 245 250 255

Glu Ile Ser Leu Pro Asn Ile His Tyr Leu Asn Ile Asp Met Ser Lys  
 260 265 270

Met Gly Leu Ile Asn Lys Glu Glu Val Leu Leu Pro Leu Asp Asn Pro  
 275 280 285

Tyr Gly Arg Ile Thr Gly Thr Val Lys Arg Lys Leu Thr Ser Arg Leu  
 290 295 300

<210> 12

<211> 296

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> PBC-ΔNC

<400> 12

Met Thr Tyr Lys Lys Asn Asp Glu Val Glu Phe Val Arg Thr Gly Tyr  
 1 5 10 15

Gly Lys Asp Met Ile Lys Val Leu His Ile Gln Arg Asp Gly Lys Tyr

[0010]

20	25	30
----	----	----

His Ser Ile Lys Glu Val Ala Thr Thr Val Gln Leu Thr Leu Ser Ser  
 35                          40                          45

Lys Lys Asp Tyr Leu His Gly Asp Asn Ser Asp Val Ile Pro Thr Asp  
 50                          55                          60

Thr Ile Lys Asn Thr Val Asn Val Leu Ala Lys Phe Lys Gly Ile Lys  
 65                          70                          75                          80

Ser Ile Glu Thr Phe Ala Val Thr Ile Cys Glu His Phe Leu Ser Ser  
 85                          90                          95

Phe Lys His Val Ile Arg Ala Gln Val Tyr Val Glu Glu Val Pro Trp  
 100                        105                        110

Lys Arg Phe Glu Lys Asn Gly Val Lys His Val His Ala Phe Ile Tyr  
 115                        120                        125

Thr Pro Thr Gly Thr His Phe Cys Glu Val Glu Gln Ile Arg Asn Gly  
 130                        135                        140

Pro Pro Val Ile His Ser Gly Ile Lys Asp Leu Lys Val Leu Lys Thr  
 145                        150                        155                        160

Thr Gln Ser Gly Phe Glu Gly Phe Ile Lys Asp Gln Phe Thr Thr Leu  
 165                        170                        175

Pro Glu Val Lys Asp Arg Cys Phe Ala Thr Gln Val Tyr Cys Lys Trp  
 180                        185                        190

Arg Tyr His Gln Gly Arg Asp Val Asp Phe Glu Ala Thr Trp Asp Thr  
 195                        200                        205

Val Arg Ser Ile Val Leu Gln Lys Phe Ala Gly Pro Tyr Asp Lys Gly  
 210                        215                        220

[0011]

Glu Tyr Ser Pro Ser Val Gln Lys Thr Leu Tyr Asp Ile Gln Val Leu  
 225                    230                    235                    240

Ser Leu Ser Arg Val Pro Glu Ile Glu Asp Met Glu Ile Ser Leu Pro  
 245                    250                    255

Asn Ile His Tyr Phe Asn Ile Asp Met Ser Lys Met Gly Leu Ile Asn  
 260                    265                    270

Lys Glu Glu Val Leu Leu Pro Leu Asp Asn Pro Tyr Gly Lys Ile Thr  
 275                    280                    285

Gly Thr Val Lys Arg Lys Leu Ser  
 290                    295

<210> 13

<211> 295

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 没有起始 Met 的 PBC-ΔNC

<400> 13

Thr Tyr Lys Lys Asn Asp Glu Val Glu Phe Val Arg Thr Gly Tyr Gly  
 1                    5                    10                    15

Lys Asp Met Ile Lys Val Leu His Ile Gln Arg Asp Gly Lys Tyr His  
 20                    25                    30

Ser Ile Lys Glu Val Ala Thr Thr Val Gln Leu Thr Leu Ser Ser Lys  
 35                    40                    45

Lys Asp Tyr Leu His Gly Asp Asn Ser Asp Val Ile Pro Thr Asp Thr  
 50                    55                    60

Ile Lys Asn Thr Val Asn Val Leu Ala Lys Phe Lys Gly Ile Lys Ser

[0012]

65	70	75	80
Ile Glu Thr Phe Ala Val Thr Ile Cys Glu His Phe Leu Ser Ser Phe			
85	90	95	
Lys His Val Ile Arg Ala Gln Val Tyr Val Glu Glu Val Pro Trp Lys			
100	105	110	
Arg Phe Glu Lys Asn Gly Val Lys His Val His Ala Phe Ile Tyr Thr			
115	120	125	
Pro Thr Gly Thr His Phe Cys Glu Val Glu Gln Ile Arg Asn Gly Pro			
130	135	140	
Pro Val Ile His Ser Gly Ile Lys Asp Leu Lys Val Leu Lys Thr Thr			
145	150	155	160
Gln Ser Gly Phe Glu Gly Phe Ile Lys Asp Gln Phe Thr Thr Leu Pro			
165	170	175	
Glu Val Lys Asp Arg Cys Phe Ala Thr Gln Val Tyr Cys Lys Trp Arg			
180	185	190	
Tyr His Gln Gly Arg Asp Val Asp Phe Glu Ala Thr Trp Asp Thr Val			
195	200	205	
Arg Ser Ile Val Leu Gln Lys Phe Ala Gly Pro Tyr Asp Lys Gly Glu			
210	215	220	
Tyr Ser Pro Ser Val Gln Lys Thr Leu Tyr Asp Ile Gln Val Leu Ser			
225	230	235	240
Leu Ser Arg Val Pro Glu Ile Glu Asp Met Glu Ile Ser Leu Pro Asn			
245	250	255	
Ile His Tyr Phe Asn Ile Asp Met Ser Lys Met Gly Leu Ile Asn Lys			
260	265	270	

[0013]

Glu Glu Val Leu Leu Pro Leu Asp Asn Pro Tyr Gly Lys Ile Thr Gly  
 275 280 285

Thr Val Lys Arg Lys Leu Ser  
 290 295

<210> 14  
 <211> 13  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> PBC-ΔNC (PBC-ΔNC 的片段 44-56)

<400> 14

Ala Thr Thr Val Gln Leu Thr Leu Ser Ser Lys Lys Asp  
 1 5 10

<210> 15  
 <211> 936  
 <212> DNA  
 <213> 阿拉伯狒狒(Papio hamadryas, hamadryas baboon)

<400> 15  
 ccagaagaaa atggccgact accataacaa ctataaaaag aatgatgaat tggagttgt 60  
 ccgaaactgge tatggaaagg atatggtaaa agtttccat attcagcgag atggaaaata 120  
 tcacagcatt aaagaggtgg caacttcagt gcaacttact ctgagttcca aaaaagattt 180  
 cctgcatttgc gataatttag atatcatccc tacagacacc atcaagaaca cagttcatgt 240  
 cttggcaaag tttaaggaa tcaaaagcat agaagecattt ggtgtgaata tttgtgagta 300  
 tttttttct tccttttacc atgtaatccg agtcaagtc tacgtggaaag aaatcccttg 360  
 gaagegtttt gaaaagaatg gagttaaagca tgtccatgca tttattcaca ctccttgc 420  
 aacacacttc tgtgaagttg aacaactgag aagtggaccc cccgtcatta cttctggaaat 480  
 caaagacctc aaggcttga aaacaacaca gtctggattt gaaggttca tcaaggacca 540  
 gttcaccacc ctccctgagg tgaaggaccc atgctttgcc acccaagtgt actgcaagt 600

[0014]

gcgctaccac cagtgcaggg atgtggactt cgaggetacc tggggcacca ttccggacct	660
tgtcctggag aaatttgcgt ggccttatga caaaggcgag tactcaccct ctgtgcagaa	720
gaccctctat gatatccagg tgctctccct gagccgagtt cctgagatag aagatatgga	780
aatcagcctg ccaaacattc actactcaa tatagacatg tccaaaatgg gtctgatcaa	840
caaggaagag gtcttgcgc cattagacaa tecatatgga aaaattactg gtacagtcaa	900
gaggaagttt tcttcaagac tgtgacattt tggeca	936

&lt;210&gt; 16

&lt;211&gt; 304

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 阿拉伯狒狒 (Papio hamadryas, hamadryas baboon)

&lt;400&gt; 16

Met Ala Asp Tyr His Asn Asn Tyr Lys Lys Asn Asp Glu Leu Glu Phe			
1	5	10	15

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

Arg Asp Gly Lys Tyr His Ser Ile Lys Glu Val Ala Thr Ser Val Gln		
35	40	45

Leu Thr Leu Ser Ser Lys Lys Asp Tyr Leu His Gly Asp Asn Ser Asp		
50	55	60

Ile Ile Pro Thr Asp Thr Ile Lys Asn Thr Val His Val Leu Ala Lys			
65	70	75	80

Phe Lys Gly Ile Lys Ser Ile Glu Ala Phe Gly Val Asn Ile Cys Glu		
85	90	95

Tyr Phe Leu Ser Ser Phe Asn His Val Ile Arg Ala Gln Val Tyr Val		
100	105	110

[0015]

Glu Glu Ile Pro Trp Lys Arg Leu Glu Lys Asn Gly Val Lys His Val  
115 120 125

His Ala Phe Ile His Thr Pro Thr Gly Thr His Phe Cys Glu Val Glu  
130 135 140

Gln Leu Arg Ser Gly Pro Pro Val Ile Thr Ser Gly Ile Lys Asp Leu  
145 150 155 160

Lys Val Leu Lys Thr Thr Gln Ser Gly Phe Glu Gly Phe Ile Lys Asp  
165 170 175

Gln Phe Thr Thr Leu Pro Glu Val Lys Asp Arg Cys Phe Ala Thr Gln  
180 185 190

Val Tyr Cys Lys Trp Arg Tyr His Gln Cys Arg Asp Val Asp Phe Glu  
195 200 205

Ala Thr Trp Gly Thr Ile Arg Asp Leu Val Leu Glu Lys Phe Ala Gly  
210 215 220

Pro Tyr Asp Lys Gly Glu Tyr Ser Pro Ser Val Gln Lys Thr Leu Tyr  
225 230 235 240

Asp Ile Gln Val Leu Ser Leu Ser Arg Val Pro Glu Ile Glu Asp Met  
245 250 255

Glu Ile Ser Leu Pro Asn Ile His Tyr Phe Asn Ile Asp Met Ser Lys  
260 265 270

Met Gly Leu Ile Asn Lys Glu Glu Val Leu Leu Pro Leu Asp Asn Pro  
275 280 285

Tyr Gly Lys Ile Thr Gly Thr Val Lys Arg Lys Leu Ser Ser Arg Leu  
290 295 300

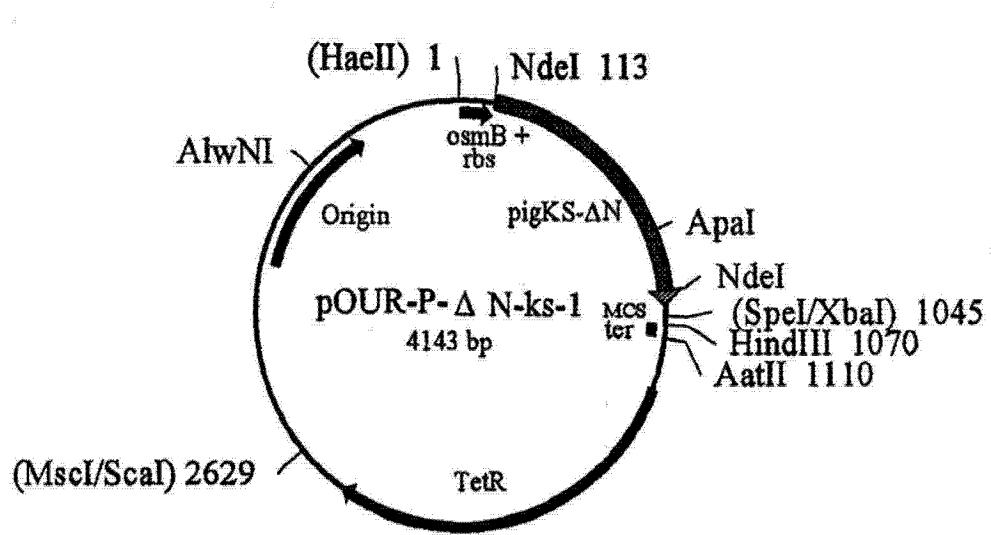


图 1

1 ATG-----ACTTACAAAAAGAATGATGAGGTAGAGTTGTCCGAACGGC  
 1 M - - - T Y K K N D E V E F V R T G  
 61 TATGGGAAGGATATGATAAAAGTTCTCCATATTCAAGCGAGATGAAAATATCACAGCATT  
 21 Y G K D M I K V L H I Q R D G K Y H S I  
 121 AAAGAGGTGGCAACTACAGTCAACTGACTTTGAGCTCCAAAAAGATTACCTGCATGGA  
 41 K E V A T T V Q L T L S S K K D Y L H G  
 181 GACAATTCAAGATGTCATCCCTACAGACACCATCAAGAACACAGTTAATGTCTGGCGAAG  
 61 D N S D V I P T D T I K N T V N V L A K  
 241 TTCAAAGGCATCAAAACCATAGAAACTTTGCTGTGACTATCTGTGAGCATTCTCTTCT  
 81 F K G I K S I E T F A V T I C E H F L S  
 301 TCCTTCAGCATGTCATCAGAGCTCAAGTCTATGTGGAAGAAGTTCTTGGAAAGCGTTT  
 101 S F K H V I R A Q V Y V E E V P W K R F  
 361 GAAAAGAATGGAGTTAACATGTCCATGCATTTATTTACTCCTACTGGAACGCCTTC  
 121 E K N G V K H V H A F I Y T P T G T H F  
 421 TGTGAGGTTAACAGATAAGGAATGGACCTCCAGTCATTCTGGAAATCAAAGACCTA  
 141 C E V E Q I R N G P P V I H S G I K D L  
 481 AAAGTCTGAAAACAACCCAGTCTGGCTTGAGGATTCAAGGACCAAGTCACCCACC  
 161 K V L K T T Q S G F E G F I K D Q F T T  
 541 CTCCCTGAGGTGAAGGCCGGTCTTGCACCCAAAGTGTACTGCAAATGGCGCTACCA  
 181 C L P E V K D R C F A T Q V Y C K W R Y H  
 601 CAGGGCAGAGATGTGGACTTTGAGGCCACCTGGGACACTGTTAGGAGCATTGTCTGCAG  
 201 Q G R D V D F E A T W D T V R S I V L Q  
 Apal  
 |  
 661 AAATTTGCTGGGCCCTATGACAAAGGCGAGTACTCGCCCTGTCCAGAAGACACTCTAT  
 221 K F A G P Y D K G E Y S P S V Q K T L Y  
 721 GACATCCAGGTGCTCACCTGGGCCAGGTTCTGAGATAGAAGATATGGAAATCAGCCTG  
 241 D I Q V L T L G Q V P E I E D M E I S L  
 781 CCAAATATTCACTACTAACATAGACATGTCCAAAATGGGACTGATCAACAAGGAAGAG  
 261 P N I H Y L N I D M S K M G L I N K E E  
 NdeI  
 |  
 841 GTCTTGCTACCTTTAGACAAATCCATATGGAAAAATTACTGGTACAGTCAGAGGAAGTTG  
 281 V L L P L D N P Y G K I T G T V K R K L  
 EcoRI SpeI BamHI  
 | | | |  
 901 TCTTCAAGACTGTGAaagccgaattccagcacactggccgttactagtggatcc  
 301 S S R L \*

图 2

Pig	MAHYRNDYKKNDEVEFVRTGYGKDMIKVLIHQRDGKYHSIKEVATSVQLTLSSKKDYLHG	20	40	60
PBC-ΔNC	M-----TYKKNDEVEFVRTGYGKDMIKVLIHQRDGKYHSIKEVATTQQLTLSSKKDYLHG			
Pig-KS-ΔN	M-----TYKKNDEVEFVRTGYGKDMIKVLIHQRDGKYHSIKEVATTQQLTLSSKKDYLHG	*	*	
Pig	DNSDVIPTDTIKNTVNVLAKFKGKIKSIETFAVTICEHFLSSFKHVIRAQVYVEEVPKRF	80	100	120
PBC-ΔNC	DNSDVIPTDTIKNTVNVLAKFKGKIKSIETFAVTICEHFLSSFKHVIRAQVYVEEVPKRF			
Pig-KS-ΔN	DNSDVIPTDTIKNTVNVLAKFKGKIKSIETFAVTICEHFLSSFKHVIRAQVYVEEVPKRF			
Pig	EKNGVKHVHAFIYTPTGTHFCEVEQIRNGPPVIHSGIKDLKVLKTTQSGFEGFIKDQFTT	140	160	180
PBC-ΔNC	EKNGVKHVHAFIYTPTGTHFCEVEQIRNGPPVIHSGIKDLKVLKTTQSGFEGFIKDQFTT			
Pig-KS-ΔN	EKNGVKHVHAFIYTPTGTHFCEVEQIRNGPPVIHSGIKDLKVLKTTQSGFEGFIKDQFTT			
Pig	LPEVKDRCFATQVYCKWRYHQGRDVDFEATWDTVRISIVLQKFAGPYDKGEYSPSVQKTL	200	220	240
PBC-ΔNC	LPEVKDRCFATQVYCKWRYHQGRDVDFEATWDTVRISIVLQKFAGPYDKGEYSPSVQKTL			
Pig-KS-ΔN	LPEVKDRCFATQVYCKWRYHQGRDVDFEATWDTVRISIVLQKFAGPYDKGEYSPSVQKTL			
Pig	DIQVLTIGQVPEIEDMEISLPNIHYLNIDMSKMLINKEEVLLPLDNPYGRITGTVKRKL	260	280	300
PBC-ΔNC	DIQVLSLSRVPEIEDMEISLPNIHYFNIDMSKMLINKEEVLLPLDNPYGKITGTVKRKL			
Pig-KS-ΔN	DIQVLTIGQVPEIEDMEISLPNIHYLNIDMSKMLINKEEVLLPLDNPYGKITGTVKRKL	*	*	
Pig	TSRL			
PBC-ΔNC	S---			
Pig-KS-ΔN	SSRL			
	*			

图 3

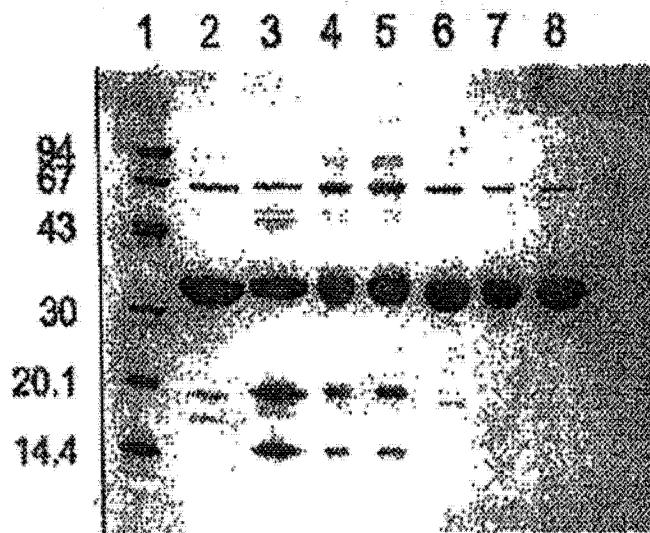


图 4

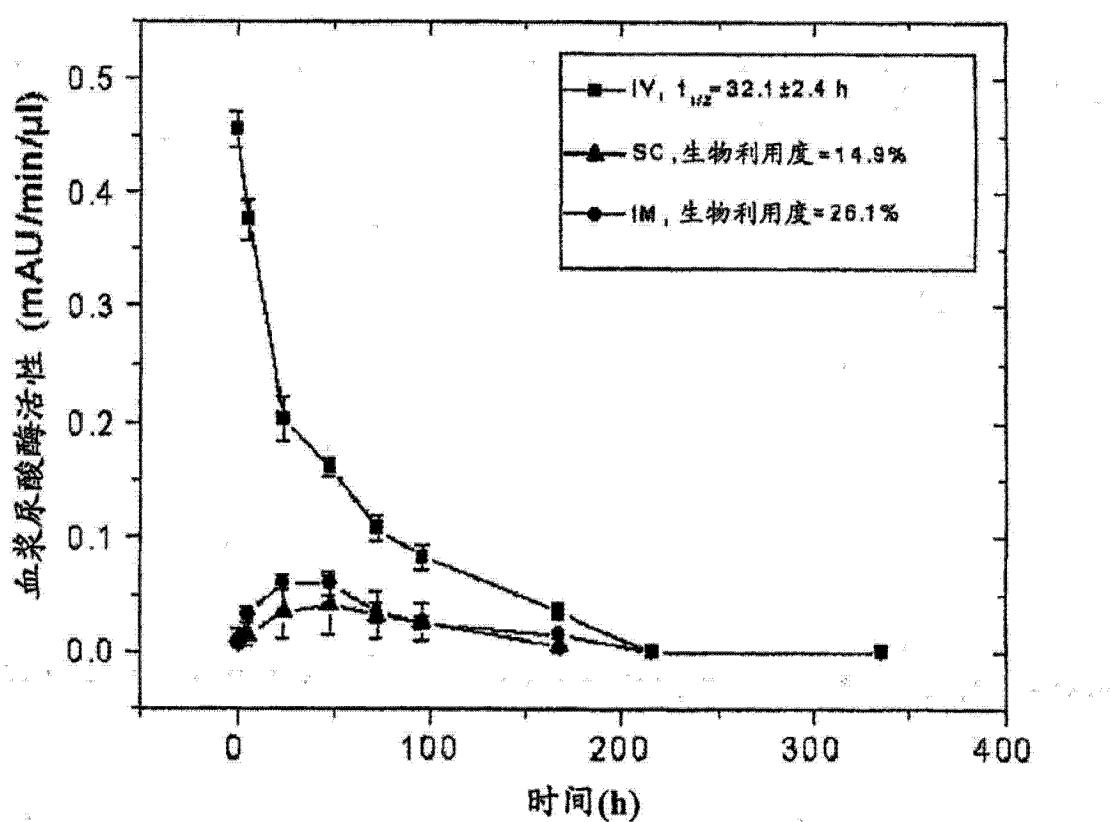


图 5

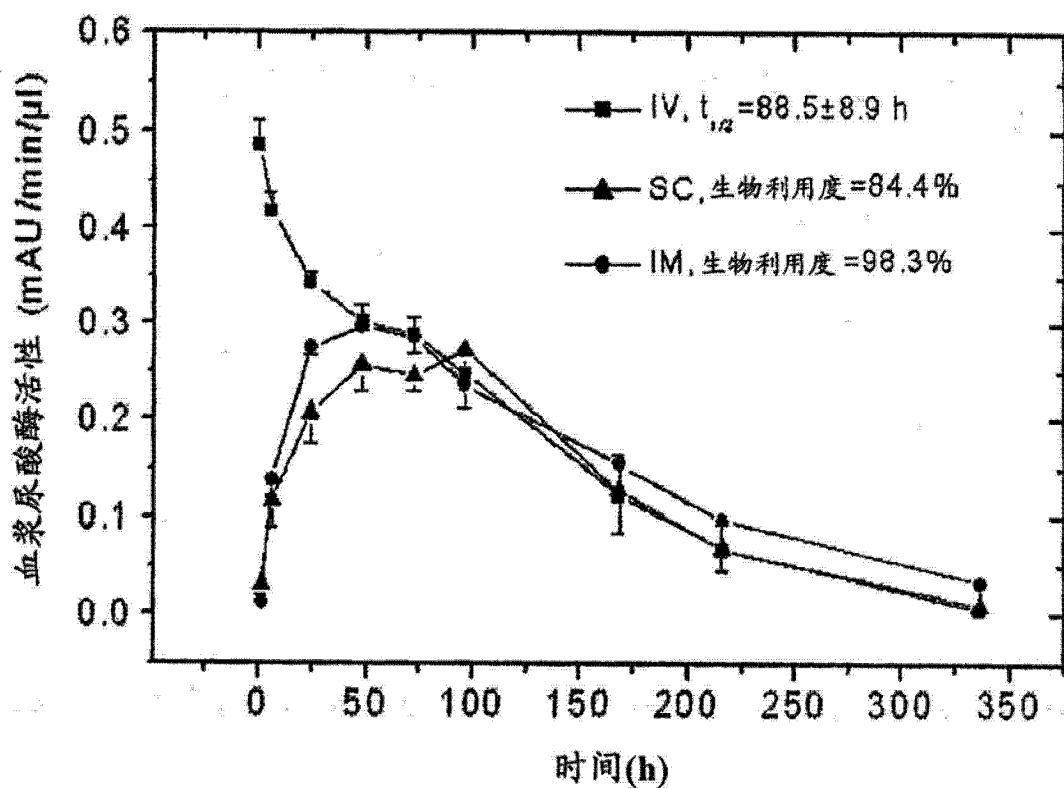


图 6

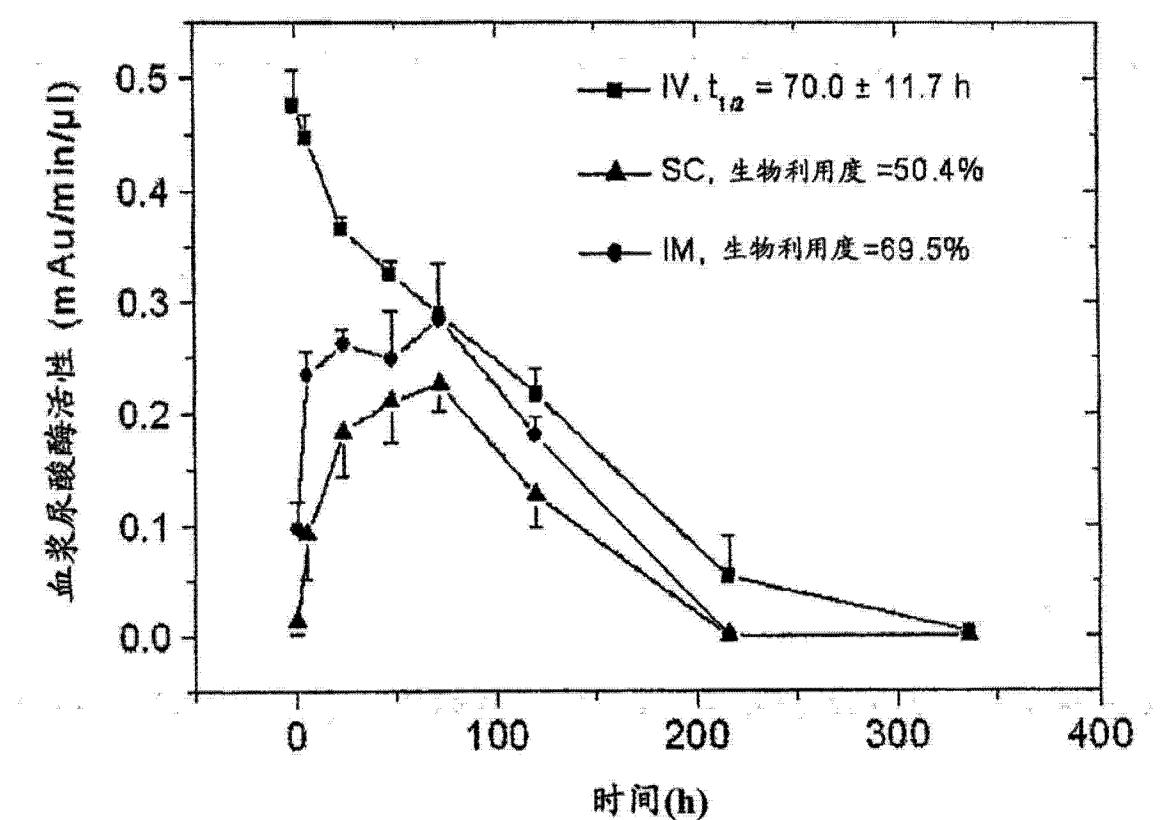


图 7

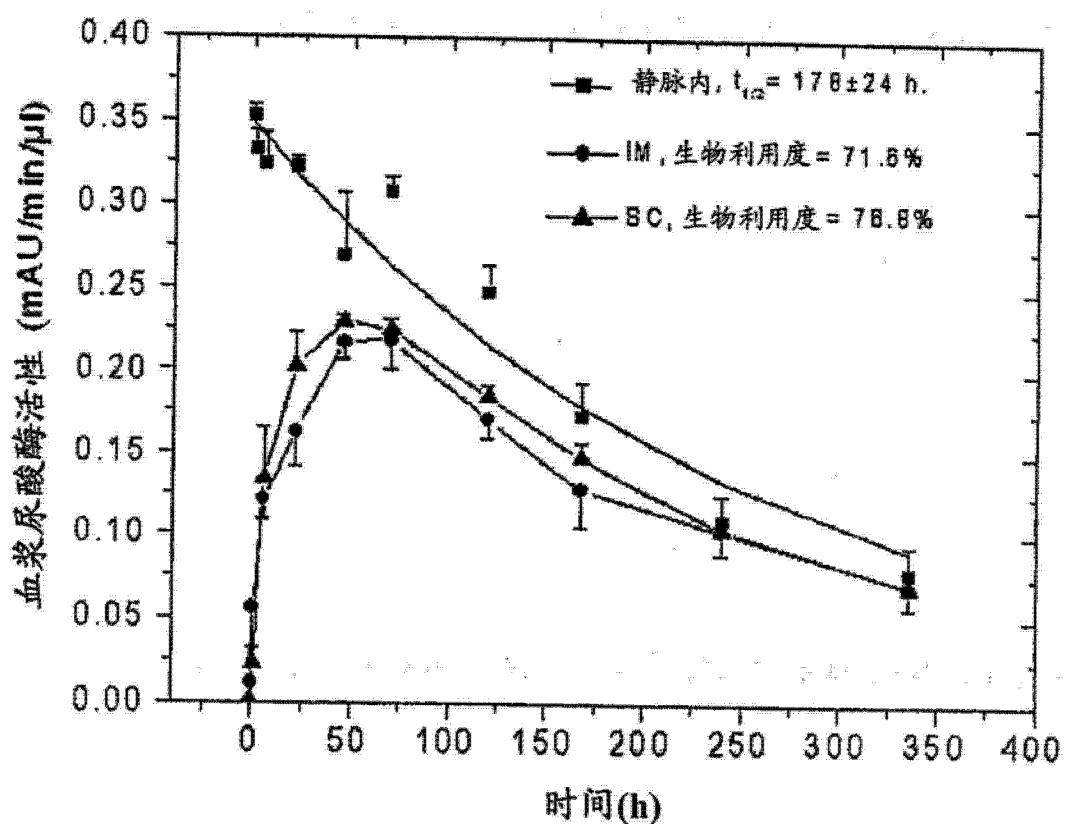


图 8