

(12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织
国际局

(43) 国际公布日
2021 年 7 月 22 日 (22.07.2021)



(10) 国际公布号
WO 2021/143725 A1

(51) 国际专利分类号:

C12N 9/80 (2006.01) *A23L 33/10* (2016.01)
C12N 9/86 (2006.01) *A23L 33/13* (2016.01)
C12N 15/55 (2006.01) *A23L 33/18* (2016.01)
A61K 38/50 (2006.01) *A23L 33/175* (2016.01)
A61P 19/06 (2006.01)

(21) 国际申请号: PCT/CN2021/071501

(22) 国际申请日: 2021 年 1 月 13 日 (13.01.2021)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(30) 优先权:

202010036500.6 2020 年 1 月 14 日 (14.01.2020) CN
202010036519.0 2020 年 1 月 14 日 (14.01.2020) CN

(71) 申请人: 天津大学 (TIANJIN UNIVERSITY) [CN/
CN]; 中国天津市南开区卫津路 92 号,
Tianjin 300072 (CN)。

(72) 发明人: 张雁 (ZHANG, Yan); 中国天津市南开区卫津路 92 号天津大学 24 楼 417-4, Tianjin 300072 (CN)。 李佩珊 (LI, Peishan); 中国天津市南开区卫津路 92 号天津大学 24 楼 403, Tianjin 300072 (CN)。 仝杨 (TONG, Yang); 中国天津市南开区卫津路 92 号天津大学 24 楼 403, Tianjin 300072 (CN)。 胡逸灵 (HU, Yiling); 中国天津市南开区卫津路 92 号天津大学 24 楼 403, Tianjin 300072 (CN)。 刘大志 (LIU, Dazhi); 中国天津市南开区卫津路 92 号天津大学 24 楼 403, Tianjin 300072 (CN)。

(74) 代理人: 北京英赛嘉华知识产权代理有限公司 (INSIGHT INTELLECTUAL PROPERTY LIMITED); 中国北京市朝阳区建外大街光华东里 8 号中海广场中楼 7 层, Beijing 100020 (CN)。

(81) 指定国 (除另有指明, 要求每一种可提供的国家保护): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, IT, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL,

ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW。

(84) 指定国 (除另有指明, 要求每一种可提供的地区保护): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 欧洲 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG)。

本国际公布:

- 包括国际检索报告 (条约第 21 条 (3))。
- 包括说明书序列表部分 (细则 5.2 (a))。

(54) Title: XANTHINE AMIDE HYDROLASE AND USE THEREOF

(54) 发明名称: 黄嘌呤酰胺水解酶及其用途

(57) Abstract: Provided are a xanthine amide hydrolase and the use thereof, particularly the use thereof for treating gout.

(57) 摘要: 黄嘌呤酰胺水解酶及其用途, 特别是在治疗痛风中的用途。

WO 2021/143725 A1

黄嘌呤酰胺水解酶及其用途

相关申请的交叉引用

本申请要求于 2020 年 1 月 14 日递交的中国专利申请第 202010036500.6 号和第 202010036519.0 号的优先权，其全部内容通过引用整体并入本文。

技术领域

本申请大体涉及生物医药技术领域；具体而言，本申请提供了新的嘌呤降解通路、参与该通路的酶及它们的用途，特别是在治疗痛风中的应用。

背景技术

嘌呤的吸收主要发生在肠道，肠道为无氧环境。痛风是嘌呤代谢异常导致的一种关节炎，其特征是反复发作的红色、触痛、灼热和肿胀的关节。疼痛通常很快发生，在不到 12 小时内达到最大强度。造成痛风的原因是体内尿酸水平的升高，造成了尿酸盐在关节和肾脏部位的沉积，而尿酸是嘌呤代谢的产物。

目前已有的治疗痛风的药物有秋水仙碱、别嘌呤醇、非布司他以及其它非甾体类抗炎药和糖皮质激素等。秋水仙碱通过抑制中性白细胞的趋化、黏附和吞噬作用等，从而达到控制关节局部的疼痛、肿胀及炎症反应。别嘌呤醇和非布司他为选择性黄嘌呤氧化酶抑制剂，可通过降低血尿酸盐浓度而发挥治疗痛风的作用，但以上药物均有较大的副作用。

新的用于预防、干预和/或治疗痛风的药物的开发和应用是本领域所需要的。

发明概述

第一方面，本申请提供了多肽，其包含 SEQ ID NO: 1 所示的氨基酸序列或其功能变体，其中所述功能变体具有黄嘌呤酰胺水解酶活性。

在第一方面的一些实施方案中，其中所述多肽在空间构象上具有如下定义的催化部位：

所述催化部位包含空间构象上相互靠近的、参照 SEQ ID NO: 1 的 H59、H61、K151、H186、H242 和 D316 氨基酸残基。

在第一方面的一些实施方案中，所述催化部位还包含二价金属离子。

在第一方面的一些实施方案中，所述多肽还包含在空间构象上具有如下定义的结合部位：

所述结合部位包含在空间构象上相互靠近的、参照 SEQ ID NO: 1 的 I288、A289、P338 和 G339 氨基酸残基。

在第一方面的一些实施方案中，其中所述催化部位与所述结合部位相距不大于 5 埃(Å)。

在第一方面的一些实施方案中，所述功能变体为 SEQ ID NO: 1 所示的氨基酸序列的天然同工酶。

在第一方面的一些实施方案中，其中所述功能变体为在 SEQ ID NO: 1 所示的氨基酸序列或其天然同工酶的基础上发生一个或多个氨基酸的插入、取代和/或缺失而产生的。

在第一方面的一些实施方案中，其中所述插入、取代和/或缺失不发生在催化部位和/或结合部位。

第二方面，本申请提供了核酸分子，其编码第一方面所述的多肽。

第三方面，本申请提供了表达盒，其包含第二方面所述的核酸分子。

第四方面，本申请提供了表达载体，其包含第二方面所述的核酸分子或第三方面所述的表达盒。

第五方面，本申请提供了宿主细胞，其包含第二方面所述的核酸分子、第三方面所述的表达盒或第四方面所述的表达载体。

在第五方面的一些实施方案中，所述宿主细胞能够表达并产生：多肽，其包含 SEQ ID NO: 1 所示的氨基酸序列或其功能变体，其中所述功能变体具有黄嘌呤酰胺水解酶活性。

在第五方面的一些实施方案中，其中所述多肽在空间构象上具有如下定义的催化部位：

所述催化部位包含空间构象上相互靠近的、参照 SEQ ID NO: 1 的 H59、H61、K151、H186、H242 和 D316 氨基酸残基。

在第五方面的一些实施方案中，所述催化部位还包含二价金属离子。

在第五方面的一些实施方案中，所述宿主细胞为真核细胞或原核细胞。

在第五方面的一些实施方案中，所述真核细胞为酵母细胞。

在第五方面的一些实施方案中，所述原核细胞选自埃希氏菌属、乳酸杆菌属、双歧杆菌属、拟杆菌门和厚壁菌门

第六方面，本申请提供了药物组合物或保健食品，其包含第一方面所述的多肽、第二方面所述的核酸分子、第三方面所述的表达盒、第四方面所述的表达载体或第五方面所述的宿主细胞和药学上可接受的载体或赋形剂。

在第六方面的一些实施方案中，所述药物组合物或保健食品用于预防和/或干预和/或治疗痛风。

第七方面，本申请提供了第一方面所述的多肽、第二方面所述的核酸分子、第三方面所述的表达盒、第四方面所述的表达载体、第五方面所述的宿主细胞或第六方面所述的药物组合物或保健食品在降解嘌呤中的用途。

在第七方面的一些实施方案中，所述降解嘌呤在体外发生。

第八方面，本申请提供了第一方面所述的多肽、第二方面所述的核酸分子、第三方面所述的表达盒、第四方面所述的表达载体、第五方面所述的宿主细胞或第六方面所述的药物组合物或保健食品在制备用于预防、干预和/或治疗痛风的药物中的用途。

第九方面，本申请提供了预防、干预和/或治疗痛风的方法，其

包括向有需要的个体给予第一方面所述的多肽、第二方面所述的核酸分子、第三方面所述的表达盒、第四方面所述的表达载体、第五方面所述的宿主细胞或第六方面所述的药物组合物或保健食品。

附图说明

图 1 为人体降解各种嘌呤的代谢通路及催化每一步反应的酶的 EC 编号。

图 2 为黄嘌呤氧化酶降解黄嘌呤产生尿酸的代谢反应及其涉及复杂含 Mo 辅基的催化机理。

图 3 为别嘌呤醇通过抑制黄嘌呤氧化酶阻止尿酸生成的治疗痛风的机理。

图 4 为黄嘌呤酰胺水解酶在无氧条件下降解黄嘌呤的反应式(1)及整个代谢通路。

图 5 为纯化后的黄嘌呤酰胺水解酶的电泳结果，其中泳道 M 代表分子量标识，泳道 T 为表达黄嘌呤酰胺水解酶的细菌裂解液，泳道 U 代表为经 Co 亲和柱后的细菌裂解液，泳道 E₁、E₂、E₃ 分别代表经钴亲和柱纯化洗脱的 1、2 和 4 μg 黄嘌呤酰胺水解酶。

图 6 为黄嘌呤酰胺水解酶催化黄嘌呤水解开环的酶活性 LC-MS(液质联用)检测结果，其中 A 为不加酶的阴性对照的 LC-MS 检测结果，B 为实验组的 LC-MS 检测结果。

图 7 为经 PHYRE2 服务器(PHYRE2 Protein Fold Recognition Server)进行计算机模拟得到的黄嘌呤酰胺水解酶结构的活性中心的图，其中催化部位包含空间构象上相互靠近的 4 个组氨酸、一个羧基化的赖氨酸、一个天冬氨酸以及两个二价金属离子(例如 Zn²⁺和/或 Mn²⁺)；结合部位包含空间构象上相互靠近的与黄嘌呤相互作用的一个异亮氨酸、一个丙氨酸、一个脯氨酸和一个甘氨酸残基。

图 8 为 UniRef50_Q3AEA1 所有黄嘌呤酰胺水解酶的进化系统树图。灰色标记为在各树状分支中选取菌株代表坚强芽孢杆菌(*Bacillus firmus*)、柱胞梭菌 DSM 605 (*Clostridium cylindrosporium* DSM 605)、*Clostridium purinilyticum*、产氢羧基嗜热菌 (*Carbydothemus*

hydrogenoformans, 菌株 ATCC BAA-161/DSM 6008/Z-2901) 以及 *Paenibacillus donghaensis*, 将它们编码的登录号分别为 A0A366K523、A0A0J8G334、A0A0L0W692、Q3AEA1 和 A0A2Z2KEH1 的黄嘌呤酰胺水解酶的氨基酸序列在图 9 中进行序列对比。

图 9 为五个不同物种坚强芽孢杆菌(*Bacillus firmus*)、柱胞梭菌 DSM 605 (*Clostridium cylindrosporum* DSM 605)、*Clostridium purinilyticum*、产氢羧基嗜热菌(*Carbydotherrmus hydrogenoformans*, 菌株 ATCC BAA-161/DSM 6008/Z-2901) 以及 *Paenibacillus donghaensis*, 编码的登录号分别为 A0A366K523、A0A0J8G334、A0A0L0W692、Q3AEA1 和 A0A2Z2KEH1 的黄嘌呤酰胺水解酶的序列对比结果, 其中催化部位包含两个二价金属(例如 Zn^{2+} 或 Mn^{2+} 等) 及与其配位的背景为灰色的四个组氨酸(H)、一个赖氨酸(K)和一个天冬氨酸(D)残基(实线方框); 结合部位包含与黄嘌呤结合的背景为灰色的一个异亮氨酸(I)、一个丙氨酸(A)、一个脯氨酸(P)和一个甘氨酸残基(G)。

序列说明

SEQ ID NO: 1 显示了坚强芽孢杆菌(*Bacillus firmus*, CGMCC 1.2010)表达的黄嘌呤酰胺水解酶的氨基酸序列。

SEQ ID NO: 2 显示了用于 PCR 扩增编码黄嘌呤酰胺水解酶的核酸分子的上游引物的核苷酸序列。

SEQ ID NO: 3 显示了用于 PCR 扩增编码黄嘌呤酰胺水解酶的核酸分子的下游引物的核苷酸序列。

SEQ ID NO: 4 显示了 *Clostridium purinilytica* 表达的登录号为 A0A0L0W692 的黄嘌呤酰胺水解酶的氨基酸序列。

SEQ ID NO: 5 显示了高温黄色微球菌 FBKL4.011(*Thermoflavimicrobium* sp. FBKL4.011)表达的登录号为 A0A364K317 的黄嘌呤酰胺水解酶的氨基酸序列。

SEQ ID NO: 6 显示了耐盐海洋丝状菌(*Marininema halotolerans*)表达的登录号为 A0A1I6SUY8 的黄嘌呤酰胺水解酶的氨基酸序列。

SEQ ID NO: 7 显示了梭菌科细菌(*Clostridiaceae bacterium*)表达的登录号为 A0A3D2NSM2 的黄嘌呤酰胺水解酶的氨基酸序列。

SEQ ID NO: 8 显示了芽孢杆菌 2_A_57_CT2 (*Bacillus sp.* 2_A_57_CT2)表达的登录号为 E5WNF6 的黄嘌呤酰胺水解酶的氨基酸序列。

SEQ ID NO: 9 显示了类芽孢杆菌 FSL H8-0259(*Paenibacillus sp.* FSL H8-0259)表达的登录号为 A0A1R1CK18 的黄嘌呤酰胺水解酶的氨基酸序列。

SEQ ID NO: 10 显示了双歧高温黄色微球菌 (*Thermoflavimicrobium dichotomicum*)表达的登录号为 A0A1I3U261 的黄嘌呤酰胺水解酶的氨基酸序列。

SEQ ID NO: 11 显示了 *Fictibacillus enclensis* 表达的登录号为 A0A0V8JCN2 的黄嘌呤酰胺水解酶的氨基酸序列。

SEQ ID NO: 12 显示了中温海洋丝状菌(*Marininema mesophilum*)表达的登录号为 A0A1H2QVP9 的黄嘌呤酰胺水解酶的氨基酸序列。

SEQ ID NO: 13 显示了类芽孢杆菌 FSL R5-0912(*Paenibacillus sp.* FSL R5-0912)表达的登录号为 A0A089K5P4 的黄嘌呤酰胺水解酶的氨基酸序列。

SEQ ID NO: 14 显示了香蒲类芽孢杆菌(*Paenibacillus typhae*)表达的登录号为 A0A1G9DGW2 的黄嘌呤酰胺水解酶的氨基酸序列。

SEQ ID NO: 15 显示了极尖组织菌(*Tissierella praeacuta*)DSM 18095 表达的登录号为 A0A1M4UHZ6 的黄嘌呤酰胺水解酶的氨基酸序列。

SEQ ID NO: 16 显示了芽孢杆菌 cl95 (*Bacillus sp.* cl95)表达的登录号为 A0A1I6C7J4 的黄嘌呤酰胺水解酶的氨基酸序列。

SEQ ID NO: 17 显示了慢生型大豆根瘤菌(*Bradyrhizobium japonicum*)表达的登录号为 A0A0A3XEE6 的黄嘌呤酰胺水解酶的氨基酸序列。

SEQ ID NO: 18 显示了坚强芽孢杆菌(*Bacillus firmus*)表达的登录号为 A0A380XTT6 的黄嘌呤酰胺水解酶的氨基酸序列。

SEQ ID NO: 19 显示了产氢氨基酸杆菌 (*Acidaminobacter hydrogenoformans*) DSM 2784 表达的登录号为 A0A1G5S5P6 的黄嘌呤酰胺水解酶的氨基酸序列。

SEQ ID NO: 20 显示了温铁还原细菌 TR13 (*Caloranaerobacter sp.* TR13) 表达的登录号为 A0A0P8Z9T7 的黄嘌呤酰胺水解酶的氨基酸序列。

SEQ ID NO: 21 显示了组织菌 P1 (*Tissierella sp.* P1) 表达的登录号为 A0A265Q2B2 的黄嘌呤酰胺水解酶的氨基酸序列。

SEQ ID NO: 22 显示了芽孢杆菌 3-2-2 (*Bacillus sp.* 3-2-2) 表达的登录号为 A0A429Y566 的黄嘌呤酰胺水解酶的氨基酸序列。

SEQ ID NO: 23 显示了 *Paenibacillus donghaensis* 表达的登录号为 A0A2Z2KEH1 的黄嘌呤酰胺水解酶的氨基酸序列。

SEQ ID NO: 24 显示了 *Gottschalkia acidurici* (菌株 ATCC 7906/DSM 604/BCRC 14475/CIP 104303/NCIMB 10678/9a) 表达的登录号为 K0AWA5 的黄嘌呤酰胺水解酶的氨基酸序列。

SEQ ID NO: 25 显示了强壮芽孢杆菌 (*Bacillus fortis*) 表达的登录号为 A0A443IKX3 的黄嘌呤酰胺水解酶的氨基酸序列。

SEQ ID NO: 26 显示了海泥芽孢杆菌 (*Bacillus oceanisediminis*) 表达的登录号为 A0A2V2ZNB0 的黄嘌呤酰胺水解酶的氨基酸序列。

SEQ ID NO: 27 显示了 *Virgibacillus profundus* 表达的登录号为 A0A2A2IEE5 的黄嘌呤酰胺水解酶的氨基酸序列。

SEQ ID NO: 28 显示了类芽孢杆菌 FSL R7-0331 (*Paenibacillus sp.* FSL R7-0331) 表达的登录号为 A0A089MDW3 的黄嘌呤酰胺水解酶的氨基酸序列。

SEQ ID NO: 29 显示了芽孢杆菌 FJAT-21945 (*Bacillus sp.* FJAT-21945) 表达的登录号为 A0A0M0X8C9 的黄嘌呤酰胺水解酶的氨基酸序列。

SEQ ID NO: 30 显示了极尖组织菌 (*Tissierella praeacuta*) 表达的登录号为 A0A3F3S6I2 的黄嘌呤酰胺水解酶的氨基酸序列。

SEQ ID NO: 31 显示了海泥芽孢杆菌 (*Bacillus oceanisediminis*) 表

达的登录号为 A0A1S1YDG4 的黄嘌呤酰胺水解酶的氨基酸序列。

SEQ ID NO: 32 显示了芽孢杆菌 OV194(*Bacillus sp.* OV194)表达的登录号为 A0A1I1X526 的黄嘌呤酰胺水解酶的氨基酸序列。

SEQ ID NO: 33 显示了 *Anaeromicrobium sediminis* 表达的登录号为 A0A267MJF0 的黄嘌呤酰胺水解酶的氨基酸序列。

SEQ ID NO: 34 显示了解脂嗜热互营杆菌(*Thermosyntropha lipolytica*) DSM 11003 表达的登录号为 A0A1M5RDL0 的黄嘌呤酰胺水解酶的氨基酸序列。

SEQ ID NO: 35 显示了 *Alkaliphilus peptidifermentans* DSM 18978 表达的登录号为 A0A1G5KXH0 的黄嘌呤酰胺水解酶的氨基酸序列。

SEQ ID NO: 36 显示了米氏解硫胺素芽孢杆菌(*Aneurinibacillus migulanus*)表达的登录号为 A0A1G8Q7H9 的黄嘌呤酰胺水解酶的氨基酸序列。

SEQ ID NO: 37 显示了类芽孢杆菌 IHB B 3415(*Paenibacillus sp.* IHB B 3415)表达的登录号为 A0A0B2F3Z2 的黄嘌呤酰胺水解酶的氨基酸序列。

SEQ ID NO: 38 显示了 *Marinisporobacter balticus* 表达的登录号为 A0A4R2KME8 的黄嘌呤酰胺水解酶的氨基酸序列。

SEQ ID NO: 39 显示了土地芽孢杆菌(*Bacillus terrae*)表达的登录号为 A0A429X0W8 的黄嘌呤酰胺水解酶的氨基酸序列。

SEQ ID NO: 40 显示了加利福尼亚丁达尔氏菌(*Tindallia californiensis*)表达的登录号为 A0A1H3Q6T8 的黄嘌呤酰胺水解酶的氨基酸序列。

SEQ ID NO: 41 显示了 *Clostridium acidurici* (菌株 ATCC 7906/DSM 604/BCRC 14475/CIP 104303/NCIMB 10678/9a)表达的登录号为 K0B360 的黄嘌呤酰胺水解酶的氨基酸序列。

SEQ ID NO: 42 显示了 *Romboutsia lituseburensis* DSM 797 表达的登录号为 A0A1G9M635 的黄嘌呤酰胺水解酶的氨基酸序列。

SEQ ID NO: 43 显示了 *Paraclostridium bifermentans* ATCC 19299 表达的登录号为 T4V5T0 的黄嘌呤酰胺水解酶的氨基酸序列。

SEQ ID NO: 44 显示了 *Bacillus praedii* 表达的登录号为 A0A4R1ATL6 的黄嘌呤酰胺水解酶的氨基酸序列。

SEQ ID NO: 45 显示了 *Carbydotherrmus islandicus* 表达的登录号为 A0A1L8D5S0 的黄嘌呤酰胺水解酶的氨基酸序列。

SEQ ID NO: 46 显示了 *Caloramator australicus* RC3 表达的登录号为 I7KTT3 的黄嘌呤酰胺水解酶的氨基酸序列。

SEQ ID NO: 47 显示了 *Paraclostridium bifermentans* ATCC 638 表达的登录号为 T4VRB8 的黄嘌呤酰胺水解酶的氨基酸序列。

SEQ ID NO: 48 显示了 *Tepidimicrobium xylanilyticum* 表达的登录号为 A0A1H2RLU1 的黄嘌呤酰胺水解酶的氨基酸序列。

SEQ ID NO: 49 显示了米氏解硫胺素芽孢杆菌(*Aneurinibacillus migulanus*)表达的登录号为 A0A0K2WJ73 的黄嘌呤酰胺水解酶的氨基酸序列。

SEQ ID NO: 50 显示了芽孢杆菌属(*Bacillus bacterium*)表达的登录号为 A0A3D0EBN7 的黄嘌呤酰胺水解酶的氨基酸序列。

SEQ ID NO: 51 显示了 *Bacillus notoginsengisoli* 表达的登录号为 A0A417YW08 的黄嘌呤酰胺水解酶的氨基酸序列。

SEQ ID NO: 52 显示了海泥芽孢杆菌 2691(*Bacillus oceanisediminis* 2691)表达的登录号为 A0A160MBB4 的黄嘌呤酰胺水解酶的氨基酸序列。

SEQ ID NO: 53 显示了类芽孢杆菌 FSL R7-0273(*Paenibacillus* sp. FSL R7-0273)表达的登录号为 A0A089LXU3 的黄嘌呤酰胺水解酶的氨基酸序列。

SEQ ID NO: 54 显示了 *[Clostridium] ultunense* Esp 表达的登录号为 M1ZGS5 的黄嘌呤酰胺水解酶的氨基酸序列。

SEQ ID NO: 55 显示了 *Bacillus freudenreichii* 表达的登录号为 A0A448FF64 的黄嘌呤酰胺水解酶的氨基酸序列。

SEQ ID NO: 56 显示了 *Caloramator fervidus* 表达的登录号为 A0A1H5RUL9 的黄嘌呤酰胺水解酶的氨基酸序列。

SEQ ID NO: 57 显示了海泥芽孢杆菌(*Bacillus oceanisediminis*)表

达的登录号为 A0A4R8GVS7 的黄嘌呤酰胺水解酶的氨基酸序列。

SEQ ID NO: 58 显示了非解糖吡啶单胞菌 (*Soehngenia saccharolytica*) 表达的登录号为 A0A4T9ZWH0 的黄嘌呤酰胺水解酶的氨基酸序列。

SEQ ID NO: 59 显示了坚强芽孢杆菌 DS1 (*Bacillus firmus* DS1) 表达的登录号为 W7LB72 的黄嘌呤酰胺水解酶的氨基酸序列。

SEQ ID NO: 60 显示了 *Thermotalea metallivorans* 表达的登录号为 A0A140L3I5 的黄嘌呤酰胺水解酶的氨基酸序列。

SEQ ID NO: 61 显示了 *Ornithinibacillus halophilus* 表达的登录号为 A0A1M5FNK3 的黄嘌呤酰胺水解酶的氨基酸序列。

SEQ ID NO: 62 显示了解脂嗜热互营杆菌 (*Thermosyntropha lipolytica*) DSM 11003 表达的登录号为 A0A1M5LQE8 的黄嘌呤酰胺水解酶的氨基酸序列。

SEQ ID NO: 63 显示了虚构芽孢杆菌 S7 (*Fictibacillus sp.* S7) 表达的登录号为 A0A4Q2HRQ1 的黄嘌呤酰胺水解酶的氨基酸序列。

SEQ ID NO: 64 显示了 *Bacillus mesonae* 表达的登录号为 A0A3Q9QZ31 的黄嘌呤酰胺水解酶的氨基酸序列。

SEQ ID NO: 65 显示了 *Clostridium purinilytica* 表达的登录号为 A0A0L0W688 的黄嘌呤酰胺水解酶的氨基酸序列。

SEQ ID NO: 66 显示了 *Tindallia magadiensis* 表达的登录号为 A0A1I3ETA9 的黄嘌呤酰胺水解酶的氨基酸序列。

SEQ ID NO: 67 显示了北拟杆菌 (*Paenibacillus borealis*) 表达的登录号为 A0A089LHF8 的黄嘌呤酰胺水解酶的氨基酸序列。

SEQ ID NO: 68 显示了 *Paraclostridium benzoelyticum* 表达的登录号为 A0A0M3DN30 的黄嘌呤酰胺水解酶的氨基酸序列。

SEQ ID NO: 69 显示了 *Bacillus solani* 表达的登录号为 A0A0Q3QMR7 的黄嘌呤酰胺水解酶的氨基酸序列。

SEQ ID NO: 70 显示了 *Thermohalobacter berrensensis* 表达的登录号为 A0A419T2I0 的黄嘌呤酰胺水解酶的氨基酸序列。

SEQ ID NO: 71 显示了不动杆菌 RIT592 (*Acinetobacter sp.* RIT592)

表达的登录号为 A0A369PBX6 的黄嘌呤酰胺水解酶的氨基酸序列。

SEQ ID NO: 72 显示了 *Maledivibacter halophilus* 表达的登录号为 A0A1T5JUM9 的黄嘌呤酰胺水解酶的氨基酸序列。

SEQ ID NO: 73 显示了 *Tissierella creatinini* 表达的登录号为 A0A4T9WHZ3 的黄嘌呤酰胺水解酶的氨基酸序列。

SEQ ID NO: 74 显示了堆肥宏基因组(*compost metagenome*)表达的登录号为 A0A3R1HSK2 的黄嘌呤酰胺水解酶的氨基酸序列。

SEQ ID NO: 75 显示了 *Natronincola peptidivorans* 表达的登录号为 A0A1I0F3P2 的黄嘌呤酰胺水解酶的氨基酸序列。

SEQ ID NO: 76 显示了坚强芽孢杆菌(*Bacillus firmus*)表达的登录号为 A0A0J5YTU9 的黄嘌呤酰胺水解酶的氨基酸序列。

SEQ ID NO: 77 显示了 *Anaerovirgula multivorans* 表达的登录号为 A0A239FV01 的黄嘌呤酰胺水解酶的氨基酸序列。

SEQ ID NO: 78 显示了产氢羧基嗜热菌 (*Carbydothermus hydrogenoformans*, 菌株 ATCC BAA-161/DSM 6008/Z-2901)表达的登录号为 Q3AEA1 的黄嘌呤酰胺水解酶的氨基酸序列。

SEQ ID NO: 79 显示了产乙酸互营单胞菌 DSM 13106(*Sporanaerobacter acetigenes*) DSM 13106 表达的登录号为 A0A1M5YST8 的黄嘌呤酰胺水解酶的氨基酸序列。

SEQ ID NO: 80 显示了 *Proteiniborus* sp. DW1 表达的登录号为 A0A1M4MA63 的黄嘌呤酰胺水解酶的氨基酸序列。

SEQ ID NO: 81 显示了芽孢杆菌 7894-2(*Bacillus* sp. 7894-2)表达的登录号为 A0A268IWM5 的黄嘌呤酰胺水解酶的氨基酸序列。

SEQ ID NO: 82 显示了 *[Clostridium] ultunense* Esp 表达的登录号为 A0A1M4PLJ1 的黄嘌呤酰胺水解酶的氨基酸序列。

SEQ ID NO: 83 显示了 *Virgibacillus indicus* 表达的登录号为 A0A265N7L4 的黄嘌呤酰胺水解酶的氨基酸序列。

SEQ ID NO: 84 显示了类芽孢杆菌 NFR01(*Paenibacillus* sp. NFR01)表达的登录号为 A0A1I0KAI3 的黄嘌呤酰胺水解酶的氨基酸序列。

SEQ ID NO: 85 显示了 *Andreesenia angusta* 表达的登录号为 A0A1S1V3Q5 的黄嘌呤酰胺水解酶的氨基酸序列。

SEQ ID NO: 86 显示了类芽孢杆菌 DMB5(*Paenibacillus sp.* DMB5) 表达的登录号为 A0A117T0P2 的黄嘌呤酰胺水解酶的氨基酸序列。

SEQ ID NO: 87 显示了 *Paludifilum halophilum* 表达的登录号为 A0A235B9X8 的黄嘌呤酰胺水解酶的氨基酸序列。

SEQ ID NO: 88 显示了 *Proteiniborus ethanoligenes* 表达的登录号为 A0A1H3NJWT1 的黄嘌呤酰胺水解酶的氨基酸序列。

SEQ ID NO: 89 显示了 *Alkaliphilus metalliredigens*(菌株 QYMF) 表达的登录号为 A6TWT7 的黄嘌呤酰胺水解酶的氨基酸序列。

SEQ ID NO: 90 显示了盐渍土假芽胞杆菌(*Fictibacillus solisalsi*) 表达的登录号为 A0A1G9U6Z5 的黄嘌呤酰胺水解酶的氨基酸序列。

SEQ ID NO: 91 显示了 *Sporosarcina globispora* 表达的登录号为 A0A0M0GGH4 的黄嘌呤酰胺水解酶的氨基酸序列。

SEQ ID NO: 92 显示了坚强芽孢杆菌(*Bacillus firmus*)表达的登录号为 A0A366K523 的黄嘌呤酰胺水解酶的氨基酸序列。

SEQ ID NO: 93 显示了类芽孢杆菌 FSL R5-0490(*Paenibacillus sp.* FSL R5-0490)表达的登录号为 A0A1R1FFH4 的黄嘌呤酰胺水解酶的氨基酸序列。

SEQ ID NO: 94 显示了嗜碱菌(*Alkaliphilus sp.*)表达的登录号为 A0A2G2MLE4 的黄嘌呤酰胺水解酶的氨基酸序列。

SEQ ID NO: 95 显示了厌氧砷还原菌(*Alkaliphilus oremlandii*, 菌株 OhILAs)表达的登录号为 A8MLA7 的黄嘌呤酰胺水解酶的氨基酸序列。

SEQ ID NO: 96 显示了 *Caloramator mitchellensis* 表达的登录号为 A0A0R3JVG6 的黄嘌呤酰胺水解酶的氨基酸序列。

SEQ ID NO: 97 显示了柱胞梭菌 DSM 605(*Clostridium cylindrosporum* DSM 605)表达的登录号为 A0A0J8G334 的黄嘌呤酰胺水解酶的氨基酸序列。

SEQ ID NO: 98 显示了嗜氨菌 CFH 90114 (*Ammoniphilus sp.* CFH

90114)表达的登录号为 A0A4Q1SWC2 的黄嘌呤酰胺水解酶的氨基酸序列。

SEQ ID NO: 99 显示了 *Carbydotherrmus pertinax* 表达的登录号为 A0A1L8CSM0 的黄嘌呤酰胺水解酶的氨基酸序列。

SEQ ID NO: 100 显示了 *Soehngenia* sp. 1933P 表达的登录号为 A0A4Z0D783 的黄嘌呤酰胺水解酶的氨基酸序列。

SEQ ID NO: 101 显示了非解糖卟啉单胞菌 (*Soehngenia saccharolytica*)表达的登录号为 A0A4T9ZOT2 的黄嘌呤酰胺水解酶的氨基酸序列。

SEQ ID NO: 102 显示了 *Natribacillus halophilus* 表达的登录号为 A0A1G8N2H8 的黄嘌呤酰胺水解酶的氨基酸序列。

SEQ ID NO: 103 显示了堆肥宏基因组(*compost metagenome*)表达的登录号为 A0A403WBU6 的黄嘌呤酰胺水解酶的氨基酸序列。

SEQ ID NO: 104 显示了堆肥宏基因组(*compost metagenome*)表达的登录号为 A0A3R4A6V9 的黄嘌呤酰胺水解酶的氨基酸序列。

发明详细描述

图 1 显示了人体中各种嘌呤的代谢通路，其中各种嘌呤代谢的终产物为尿酸盐，而尿酸盐在关节和肾脏等部位的沉积是导致痛风的原因。图 2 显示了需氧型蛋白黄嘌呤氧化酶催化黄嘌呤降解生成尿酸的过程。治疗痛风的药物别嘌呤醇通过抑制黄嘌呤氧化酶来抑制尿酸的产生，从而治疗痛风(图 3)。G. D. VOGELS 等人(Degradation of Purines and Pyrimidines by Microorganisms, *Bacteriological Reviews*, June 1976, Vol. 40, No. 2, p. 403-468)报道了柱胞梭菌(*Clostridium cylindrosporum*)在无氧条件下可以将黄嘌呤降解为亚胺甲基甘氨酸，图 4 显示了黄嘌呤酰胺水解酶在无氧条件下降解黄嘌呤的反应式。本申请的发明人意识到无氧条件下的嘌呤降解具有重要意义，因为人体的肠道为无氧环境，如果能先于肠道对嘌呤的吸收，在肠道内降解嘌呤，这对于预防、干预、缓解和/或治疗痛风是一种新思路。本申请的发明人利用生物信息学

的方法在进行了大量工作后，成功地鉴定出无氧条件下降解黄嘌呤的黄嘌呤酰胺水解酶。

除非另外指明，本申请中所用的术语具有本领域技术人员通常所理解的含义。

定义

除非另有所指，分别地，核酸以 5'至 3'方向从左向右书写；氨基酸序列以氨基至羧基方向从左向右书写。数字范围包括限定该范围的数字。氨基酸在本文可以用其通常所知的三字母符号或 IUPAC-IUB 生物化学命名委员会推荐的一字母符号来表示。同样地，可以用通常接受的单字母码表示核苷酸。参考说明书整体更为充分地定义以上定义的术语。

本申请的“多肽”和“蛋白”在本文可互换使用，指氨基酸残基的聚合物及其变体和合成的和天然存在的类似物。因此，这些术语适用于天然存在的氨基酸聚合物及其天然存在的化学衍生物，以及其中一个或多个氨基酸残基是合成的非天然存在的氨基酸(诸如相应的天然存在的氨基酸的化学类似物)的氨基酸聚合物。此类衍生物包括例如翻译后修饰和降解产物，包括多肽片段的磷酸化的、糖基化的、氧化的、异构化、羧基化的和脱氨基化的变体。

如本文所用的术语“酶活性中心”是指酶分子中能够直接与底物分子结合，并催化底物化学反应的部位，这一部位就成为酶的活性中心。一般认为活性中心主要由两个功能部位组成：第一个是催化部位，底物的键在此被打断或形成新的键从而发生一定的化学变化；第二个是结合部位，酶的底物靠此部位结合到酶分子上。组成功能部位的是酶分子中在三维结构上比较靠近的少数几个氨基酸残基或是这些残基上的某些基团，它们在一级结构上可能相距甚远，甚至位于不同肽链上，而是通过肽链的盘绕、折叠在空间构象上相互靠近；对于需要辅酶的酶来说，辅酶分子(如金属离子 Zn^{2+} 和/或 Mn^{2+})或辅酶分子的某一部分结构也是功能部位的组成部分。

如本文所用的术语“氨基酸”是指羧酸碳原子上的氢原子被氨基取代后的化合物，氨基酸分子中含有氨基和羧基两种官能团。其包括天然存在的和非天然存在的氨基酸以及氨基酸类似物和模拟物。天然存在的氨基酸包括蛋白生物合成中使用的 20 种(L)-氨基酸以及其他氨基酸，例如 4-羟脯氨酸、羟赖氨酸、羧化赖氨酸、锁链素、异锁链素、高半胱氨酸、瓜氨酸和鸟氨酸。非天然存在的氨基酸包括例如(D)-氨基酸、正亮氨酸、正缬氨酸、p-氟苯丙氨酸、乙基硫氨酸等，这些是本领域技术人员已知的。氨基酸类似物包括天然和非天然存在的氨基酸的修饰形式。这种修饰可以包括例如取代氨基酸上的化学基团和部分，或者氨基酸的衍生化。氨基酸模拟物包括例如表现出功能上类似性质的有机结构，所述性质例如氨基酸的电荷和电荷空间特性。例如，模拟精氨酸(Arg 或 R)的有机结构具有位于类似分子空间并且具有与天然存在的 Arg 氨基酸的侧链的 ϵ -氨基相同程度的移动性的正电荷部分。模拟物还包括约束结构以维持氨基酸或氨基酸官能团的最佳空间和电荷相互作用。本领域技术人员可以确定什么结构构成功能上等效的氨基酸类似物和氨基酸模拟物。

如本文所用的术语“同工酶”是指生物体内催化相同反应而分子结构不同的酶。

如本文所用的术语“核酸”是指指 mRNA、RNA、cRNA、cDNA 或 DNA，包括单链和双链形式的 DNA。该术语通常指至少 10 个碱基长度的核苷酸多聚形式，所述核苷酸是核糖核苷酸或脱氧核苷酸或任一类型的核苷酸的修饰形式。

如本文所用的术语“编码”用于特定核酸的上下文时，指该核酸包含指导该核苷酸序列翻译成特定蛋白的必需信息。使用密码子表示编码蛋白的信息。编码蛋白的核酸可以包含位于该核酸翻译区内的非翻译序列(例如，内含子)或者可以缺少这样的居间非翻译序列(例如，如同在 cDNA 中)。

如本文所用的，涉及特定多核苷酸或其所编码的蛋白的“全长序列”指具有天然(非合成)内源序列的整个核酸序列或整个氨基酸

序列。全长多核苷酸编码该特定蛋白的全长、催化活性形式。

如本文所用的术语“分离的”是指多肽或核酸或其生物学活性部分，其基本上或本质上不含如在其天然存在的环境中所发现的通常伴随或反应于该蛋白质或核酸的组分。因而，用重组技术产生分离的多肽或核酸时，分离的多肽或核酸基本上不含其它细胞物质或培养基，或者化学合成分离的多肽或核酸时，基本上不含化学前体或其它化学品。

如本文所用的术语“表达载体”是重组或合成产生的核酸构建体，其具有一系列允许特定的核酸在宿主细胞中转录的特异性核酸元件。

如本文所用的术语“宿主细胞”是指在转化和转导(感染)中接受外源基因的细胞。宿主细胞可以是诸如酵母细胞的真核细胞或诸如大肠杆菌的原核细胞。

具体实施方案

第一方面，本申请提供了多肽，其包含 SEQ ID NO: 1 所示的氨基酸序列或其功能变体，其中所述功能变体具有黄嘌呤酰胺水解酶活性。

在第一方面的一些实施方案中，其在空间构象上具有如下定义的催化部位：

所述催化部位包含空间构象上相互靠近的、参照 SEQ ID NO: 1 的 H59、H61、K151、H186、H242 和 D316 氨基酸残基。

在第一方面的一些实施方案中，所述催化部位还包含二价金属离子。

在第一方面的一些具体实施方案中，所述催化部位还包含 2 个二价金属离子，例如 Zn^{2+} 和/或 Mn^{2+} 。

在第一方面的一些实施方案中，其中所述多肽还包含在空间构象上具有如下定义的结合部位：

所述结合部位包含在空间构象上相互靠近的、参照 SEQ ID NO: 1 的 I288、A289、P338 和 G339 氨基酸残基。

在第一方面的一些实施方案中，所述催化部位与所述结合部

位相距不大于 5 埃(Å)。

在第一方面的一些实施方案中，其中所述功能变体为 SEQ ID NO: 1 所示的氨基酸序列的天然同工酶。

在第一方面的一些实施方案中，所述天然同工酶来自：坚强芽孢杆菌(*Bacillus firmus*)、堆肥宏基因组(*compost metagenome*)、*Clostridium purinilyticum*、高温黄色微球菌(*Thermoflavimicrobium sp.*)、耐盐海洋丝状菌(*Marininema halotolerans*)、梭菌科细菌(*Clostridiaceae bacterium*)、芽孢杆菌(*Bacillus sp.*)、类芽孢杆菌(*Paenibacillus sp.*)、双歧高温黄色微球菌(*Thermoflavimicrobium dichotomicum*)、*Fictibacillus enclensis*、中温海洋丝状菌(*Marininema mesophilum*)、香蒲类芽孢杆菌(*Paenibacillus typhae*)、极尖组织菌(*Tissierella praeacuta*)、慢生型大豆根瘤菌(*Bradyrhizobium japonicum*)、产氢氨基酸杆菌(*Acidaminobacter hydrogenoformans*)、温铁还原细菌(*Caloranaerobacter sp.*)、组织菌(*Tissierella sp.*)、*Paenibacillus donghaensis*、*Gottschalkia acidurici*、*Clostridium acidurici*、强壮芽孢杆菌(*Bacillus fortis*)、海泥芽孢杆菌(*Bacillus oceanisediminis*)、*Virgibacillus profundus*、*Anaeromicrobium sediminis*、解脂嗜热互营杆菌(*Thermosyntropha lipolytica*)、*Alkaliphilus peptidifermentans*、米氏解硫酸素芽孢杆菌(*Aneurinibacillus migulanus*)、芽孢杆菌细菌属(*Bacillus bacterium*)、*Marinisporobacter balticus*、土地芽孢杆菌(*Bacillus terrae*)、加利福尼亚丁达尔氏菌(*Tindallia californiensis*)、*Romboutsia lituseburensis*、*Paraclostridium bifermentans*、*Bacillus praedii*、*Carbydotherrmus islandicus*、*Caloramator australicus*、*Paraclostridium bifermentans*、*Tepidimicrobium xylanilyticum*、*Bacillus notoginsengisoli*、*[Clostridium] ultunense* Esp、*Bacillus freudenreichii*、*Caloramator fervidus*、非解糖卟啉单胞菌(*Soehngenia saccharolytica*)、*Thermotalea metallivorans*、*Ornithinibacillus halophilus*、虚构芽孢杆菌(*Fictibacillus sp.*)、*Bacillus mesonae*、*Tindallia magadiensis*、北拟杆菌(*Paenibacillus borealis*)、*Paraclostridium benzoelyticum*、

Bacillus solani、*Thermohalobacter berrensis*、不动杆菌 (*Acinetobacter sp.*)、*Maledivibacter halophilus*、*Tissierella creatinini*、*Natronincola peptidivorans*、*Anaerovirgula multivorans*、产氢羧基嗜热菌 (*Carbydotherrmus hydrogenoformans*)、产乙酸互营单胞菌 (*Sporanaerobacter acetigenes*)、*Proteiniborus sp.*、*Virgibacillus indicus*、*Andreesenia angusta*、*Paludifilum halophilum*、*Proteiniborus ethanoligenes*、*Alkaliphilus metalliredigens*、盐渍土假芽胞杆菌 (*Fictibacillus solisalsi*)、*Sporosarcina globispora*、嗜碱菌 (*Alkaliphilus sp.*)、厌氧砷还原菌 (*Alkaliphilus oremlandii*)、*Caloramator mitchellensis*、柱胞梭菌 (*Clostridium cylindrosporum*)、嗜氨菌 (*Ammoniphilus sp.*)、*Carbydotherrmus pertinax*、*Soehngenina sp.* 和 *Natribacillus halophilus*。

在第一方面的一些具体实施方案中，所述天然同工酶包含 SEQ ID NO: 4-104 中任一项所示的氨基酸序列。

在第一方面的一些具体实施方案中，其中所述功能变体为在 SEQ ID NO: 1 所示的氨基酸序列或其天然同工酶的基础上发生一个或多个氨基酸的插入、取代和/或缺失而产生的。

在第一方面的一些实施方案中，所述插入、取代和/或缺失不发生在催化部位。

在第一方面的一些实施方案中，所述插入、取代和/或缺失不发生在结合部位。

在第一方面的一些实施方案中，所述插入、取代和/或缺失不发生在催化部位和结合部位。

在第一方面的一些实施方案中，所述氨基酸插入、取代和/或缺失的数目为 1-30 个，优选为 1-20 个，更优选为 1-10 个，其中获得的功能变体基本上保持未改变的黄嘌呤酰胺水解酶活性。

在第一方面的一些实施方案中，所述功能变体与 SEQ ID NO: 1 所示的氨基酸序列相差约 1、2、3、4、5、6、7、8、9、或 10 个氨基酸的插入、取代和/或缺失。

在第一方面的一些实施方案中，所述功能变体与 SEQ ID NO:

1 所示的氨基酸序列相差约 1、2、3、4 或 5 个氨基酸的插入、取代和/或缺失。

在第一方面的一些实施方案中，所述多肽为分离的多肽。

第二方面，本申请提供了核酸分子，其编码第一方面所述的多肽。

在第二方面的一些实施方案中，本申请的核酸分子包含与编码 SEQ ID NO: 1 和 SEQ ID NO: 4-104 中任一项所示多肽的核苷酸序列在严格条件下杂交的核苷酸序列，或者由与编码 SEQ ID NO: 1 和 SEQ ID NO: 4-104 中任一项多肽的核苷酸序列特异性杂交且编码与 SEQ ID NO: 1 和 SEQ ID NO: 4-104 中任一项所示多肽在功能上等等的多肽的核酸序列组成。

本领域技术人员可以常规选择 DNA 杂交的严格条件。通常较长的探针需要较高的温度，以便进行适当的退火，而较短的探针需要较低的温度。杂交通常取决于当互补链处于低于其解链温度的环境时变性 DNA 的重退火能力。探针与可杂交序列之间同源性程度越高，所能采用的相对温度越高。于是，较高的相对温度往往使反应条件更严格，而在较低的温度下，则严格度较低。关于杂交反应严格条件的详细描述，可参阅 Ausubel 等人，Current Protocols in Molecular Biology, Wiley Interscience Publishers, (1995)。

在第二方面的一些实施方案中，DNA 杂交采用的严格条件包括：

1)洗涤时采用低离子强度和高温，例如 50°C 下的 0.015 M 氯化钠/0.0015M 柠檬酸钠/0.1%十二烷基硫酸钠；2)杂交时采用甲酰胺等变性剂，例如 42°C 下 50% (v/v)甲酰胺加 0.1%牛血清白蛋白/0.1% Ficoll/0.1% 聚二烯吡咯烷酮/pH 6.5 的 50 mM 磷酸钠缓冲液以及 750 mM 氯化钠、75 mM 柠檬酸钠；或(3)在 42°C 下过夜杂交，杂交溶液含 50%甲酰胺，5×SSC (0.75 M 氯化钠，0.075 M 柠檬酸钠)、50 mM 磷酸钠(pH 6.8)、0.1%焦磷酸钠、5×Denhardt's 溶液、超声波处理的鲑鱼精子 DNA(50 mg/mL)、0.1% SDS 和 10%硫酸葡聚糖，然后在 0.2×SSC(氯化钠/柠檬酸钠)中于 42°C 洗涤 10 分钟，再以含有 EDTA 的 0.1×SSC 于 55°C 进行高严格度洗涤。中等严格条件可按 Sambrook

等人, *Molecular Cloning : A Laboratory Manual*, New York: Cold Spring Harbor Press, 1989 中的描述加以确定。中等严格条件包括采用严格度低于以上描述的洗涤溶液和杂交条件(如温度、离子强度和 SDS 百分比)。例如, 中等严格条件包括用至少约 16%v/v 到至少约 30%v/v 的甲酰胺和至少约 0.5 M 到至少约 0.9 M 的盐在 42°C 杂交, 以及用至少约 0.1 M 到至少约 0.2 M 盐在 55°C 洗涤。中等严格条件还可以包括用 1% 牛血清白蛋白(BSA)、1 mM EDTA、0.5 M NaHPO₄ (pH 7.2)、7% SDS 在 65°C 杂交, 以及用(i)2×SSC、0.1% SDS; 或(ii)0.5% BSA、1 mM EDTA、40 mM NaHPO₄ (pH 7.2)、5% SDS 在 60-65°C 洗涤。专业人员将会根据探针长度等因素调节温度、离子强度等。杂交核酸时的严格度取决于核酸分子长度和互补程度, 以及其它本领域内众所周知的变量。两个核苷酸序列之间的相似性或同源性越大, 则含有这些序列的核酸杂合体的 T_m 越大。核酸杂交的相对稳定性(对应于较高的 T_m) 以下列顺序递减: RNA:RNA、DNA:RNA、DNA:DNA。优选地, 可杂交核酸的最低长度至少约为 12 个核苷酸, 优选至少约为 16 个、更优选至少约为 24 个、最优选至少约为 36 个核苷酸。

本申请的核酸分子可以与其他 DNA 序列组合, 所述其他 DNA 序列例如启动子、聚腺苷化信号、其他限制性酶切位点、多克隆位点、其他编码节段等, 使得它们的总长度可以显著不同。因此考虑可以利用几乎任意长度的多核苷酸片段; 总长度优选地受预期重组 DNA 方案中制备和使用的便利性的限制。

可以利用本领域内已知的和可获得的多种成熟技术中的任何一种来制备、操控和/或表达多核苷酸及其融合物。例如, 编码本申请的多肽或其功能变体的核酸分子可以用于重组 DNA 分子中以指导多肽在适当的宿主细胞中表达。由于遗传密码子固有的简并性, 编码基本上相同或在功能上等同的氨基酸序列的其他 DNA 序列也可以用于本申请中, 并且这些序列可以用于克隆和表达给定的多肽。

此外, 可以使用本领域内公知的方法改造本申请的核酸分子, 包括但不限于基因产物的克隆、加工、表达和/或活性的改变。

在第二方面的一些实施方案中，所述核酸分子通过人工合成产生，例如直接的化学合成或酶合成。

在第二方面的一些实施方案中，所述核酸分子通过重组技术产生。

在第二方面的一些实施方案中，所述核酸分子为分离的核酸分子。

第三方面，本申请提供了表达盒，其包含第二方面所述的核酸分子。

在第三方面的一些具体实施方案中，表达盒可以另外包含 5' 前导序列，所述前导序列能发挥增强翻译的作用。

在制备表达盒时，可以操作各种 DNA 片段以提供合适方向的和适当时合适读框的 DNA 序列。为达到这一目的，可以采用接头或连接子来连接 DNA 片段，或者可以涉及其它操作来提供方便的限制性位点、移除多余 DNA、移除限制性位点等等。为了这一目的，可以涉及体外诱变，引物修复，限制性，退火，再取代，例如转换(transition)和颠换(transversion)。

第四方面，本申请提供了表达载体，其包含第二方面所述的核酸分子或第三方面所述的表达盒。

在第四方面的一些实施方案中，任何合适的表达载体都可以用于本申请。例如，所述表达载体可以为 pET28、pET14、HT-1 N-TAG-2691、pRS416 等载体中的任一种。

在第四方面的一些实施方案中，编码 SEQ ID NO: 1 和 SEQ ID NO: 4-104 中任一项所示多肽的核酸分子被克隆到载体中，以构成含有本申请所述核酸分子的重组载体。

在第四方面的一些实施方案中，用于克隆多核苷酸的表达载体为质粒载体。

在第四方面的一些实施方案中，上述表达载体还包含调节核酸分子表达的调控序列，其中所述核酸分子与所述调控序列可操作地连接。

如本文所用的术语“调控序列”是指实现与其连接的编码序列表达所需的多核苷酸序列。这类调控序列的性质随宿主生物而改变。在原核生物中，这类调控序列一般包括启动子、核糖体结合位点和终止

子；在真核生物中，这类调控序列一般包括启动子、终止子以及在某些情况下的增强子。因此，术语“调控序列”包括其存在对目的基因的表达是必需的最低限度的所有序列，也可以包括其存在对目的基因表达是有利的其它序列，例如前导序列。

如本文所用的术语“可操作地连接”是指如下情形：所涉及到的序列处于允许它们以希望的方式起作用的关系之中。因此，例如“可操作地连接”到一编码序列的调控序列使得在与所述调控序列相容的条件下实现该编码序列的表达。

在第四方面的一些实施方案中，利用本领域的技术人员熟知的方法构建包含编码 SEQ ID NO: 1 和 SEQ ID NO: 4-104 中任一项所示多肽的核苷酸序列和合适的转录/翻译调控元件的表达载体。这些方法包括体外重组 DNA 技术、DNA 合成技术、体内重组技术等(Sambrook, et al. *Molecular Cloning, a Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, New York, 1989)。核苷酸序列可操作地连接到表达载体中的适当启动子上，以指导 mRNA 合成。这些启动子的代表性实例包括：大肠杆菌的 lac 或 trp 启动子；λ 噬菌体的 PL 启动子；真核启动子包括 CMV 立即早期启动子、HSV 胸苷激酶启动子、早期和晚期 SV40 启动子、反转录病毒的 LTRs 和其它一些已知的可控制基因在原核细胞或真核细胞或其病毒中表达的启动子。表达载体还包括翻译起始用的核糖体结合位点和转录终止子等。在载体中插入增强子序列将会使其在高等真核细胞中的转录得到增强。增强子是 DNA 表达的顺式作用因子，通常大约有 10 到 300 个碱基对，作用于启动子以增强基因的转录。实例包括在复制起始点晚期一侧的 100 到 270 个碱基对的 SV40 增强子、在复制起始点晚期一侧的多瘤增强子以及腺病毒增强子等。

此外，表达载体优选地包含一个或多个选择性标记基因，以提供用于选择转化的宿主细胞的表型性状，如编码抗硫酸卡那霉素、抗氨基青霉素等的那些基因。

第五方面，本申请提供了宿主细胞，其包含第二方面所述的核酸分子或第三方面所述的表达盒或第四方面所述的表达载体。

在第五方面的一些实施方案中，所述宿主细胞能够表达并产生：多肽，其包含 SEQ ID NO: 1 所示的氨基酸序列或其功能变体，其中所述功能变体具有黄嘌呤酰胺水解酶活性。

在第五方面的一些实施方案中，其中所述多肽在空间构象上具有如下定义的催化部位：

所述催化部位包含空间构象上相互靠近的、参照 SEQ ID NO: 1 的 H59、H61、K151、H186、H242 和 D316 氨基酸残基。

在第五方面的一些实施方案中，所述催化部位还包含二价金属离子。

在第五方面的一些具体实施方案中，所述催化部位还包含 2 个二价金属离子，例如 Zn^{2+} 和/或 Mn^{2+} 。

在第五方面的一些具体实施方案中，其中所述多肽在空间构象上具有如下定义的催化部位和结合部位：

所述催化部位包含空间构象上相互靠近的、参照 SEQ ID NO: 1 的 H59、H61、K151、H186、H242 和 D316 氨基酸残基以及 2 个二价金属离子(例如 Zn^{2+} 和/或 Mn^{2+})；和

所述结合部位包含在空间构象上相互靠近的、参照 SEQ ID NO: 1 的 I288、A289、P338 和 G339 氨基酸残基。

在第五方面的一些实施方案中，可用的宿主细胞为含有上述表达载体的细胞，可以为真核细胞，例如酵母细胞培养系统可用于本申请的多肽的表达。所述宿主细胞也可以为含有上述表达载体的原核细胞，例如可以选自埃希氏菌属(例如大肠杆菌)、乳酸杆菌属、双歧杆菌属、拟杆菌门和厚壁菌门等。

在第五方面的一些具体实施方案中，所述宿主细胞为酵母细胞或大肠杆菌。

在第五方面的一些具体实施方案中，编码本申请的一种或多种酶的核酸分子可以以游离载体的形式存在于宿主细胞中，或者也可以整合至宿主细胞的基因组中。

在上述任一方面的一些实施方案中，所述分离的核酸可操作地连接到调控序列，调控序列可以被用所述表达载体转化过的宿主细胞

识别。

可以利用本领域已知的任何技术将表达载体导入宿主细胞中，包括转化、转导、转染、病毒感染、基因枪或 Ti-介导的基因转移。具体的方法包括磷酸钙转染、DEAE-葡聚糖介导的转染、脂转染或电穿孔等(Davis, L. , Dibner, M. , Battey, I. , Basic Methods in Molecular Biology, (1986))。作为示例，当宿主为原核生物如大肠杆菌时，可在指数生长期后收获感受态细胞，用本领域熟知的 CaCl_2 法进行转化。

第六方面，本申请提供了药物组合物或保健食品，其包含第一方面所述的多肽、第二方面所述的核酸分子、第三方面所述的表达盒、第四方面所述的表达载体或第五方面所述的宿主细胞和药学上可接受的载体或赋形剂。

在第六方面的一些实施方案中，所述药物组合物或保健食品，用于预防、干预和/或治疗痛风。

在第六方面的一些实施方案中，所述药物组合物或保健食品还可包含下述中的一种或多种：润滑剂，如滑石粉、硬脂酸镁和矿物油；润湿剂；乳化剂；悬浮剂；防腐剂，如苯甲酸、山梨酸和丙酸钙；增甜剂和/或调味剂等。

在第六方面的一些实施方案中，可将本申请中的药物组合物或保健食品配制为片剂、丸剂、粉剂、锭剂、酏剂、悬液、乳剂、溶液、糖浆、栓剂或胶囊等形式。

在第六方面的一些实施方案中，可以利用任何能给药至肠道的方式递送本申请的药物组合物或保健食品，优选口服给药。

在第六方面的一些具体实施方案中，将第五发明所述的宿主细胞制备成肠溶胶囊用于口服给药。

在第六方面的一些实施方案中，可以通过混合具有所需纯度的试剂与视情况的药学上可接受的载体、赋形剂等，以冻干制剂或水溶液的形式配制用于治疗用途的药物组合物用于存储。

第七方面，本申请提供了第一方面所述的多肽、第二方面所述的核酸分子、第三方面所述的表达盒、第四方面所述的表达载

体、第五方面所述的宿主细胞或第六方面所述的药物组合物或保健食品在降解嘌呤中的用途。

在第七方面的一些实施方案中，所述降解嘌呤在体外发生。

在第七方面的一些实施方案中，降解嘌呤在无氧的环境下进行，例如肠道中。

第八方面，本申请提供了第一方面所述的多肽、第二方面所述的核酸分子、第三方面所述的表达盒、第四方面所述的表达载体、第五方面所述的宿主细胞或第六方面所述的药物组合物或保健食品在制备用于预防、干预和/或治疗痛风的药物中的用途。

第九方面，本申请提供了预防、干预和/或治疗痛风的方法，其包括向有需要的个体给予第一方面所述的多肽、第二方面所述的核酸分子、第三方面所述的表达盒、第四方面所述的表达载体、第五方面所述的宿主细胞或第六方面所述的药物组合物或保健食品。

作为示例性的实施方案，在黄嘌呤的无氧降解中，SEQ ID NO: 1所示的黄嘌呤酰胺水解酶将黄嘌呤降解为 4-脲基-5-羧基咪唑，从而减少人体细胞获得嘌呤并将其转化为尿酸，可以通过此途径在肠道内降解黄嘌呤从而预防、干预和/或治疗痛风。

实施例

下述实施例仅是说明性的，并不意图限制本申请实施方案的范围或者所附的权利要求的范围。

实施例 1. 编码黄嘌呤酰胺水解酶的基因克隆的制备

以坚强芽孢杆菌(*Bacillus firmus*)(CGMCC 1.2010)的基因组作为模板，使用 SEQ ID NO: 2 和 3 所示的上游引物和下游引物 PCR 扩增编码黄嘌呤酰胺水解酶(SEQ ID NO: 1)的核酸分子，获得编码黄嘌呤酰胺水解酶的基因序列。利用 Gibson 的方法将编码黄嘌呤酰胺水解酶的基因序列插入 HT-1 N-TAG-2691 载体(其含有 His₆ 标签和 TEV 蛋白酶切割位点)的 *Ssp*I 限制性位点，获得含有编码黄嘌呤酰胺水解酶的基因的表达载体。

实施例 2. 黄嘌呤酰胺水解酶的重组表达和纯化

2.1 重组表达

将实施例 1 中构建的含有编码黄嘌呤酰胺水解酶的基因 1 的表达载体转化到大肠杆菌(*Escherichia coli*) BL21 细胞中, 涂布在含有 50 $\mu\text{g/mL}$ 硫酸卡那霉素的 LB 琼脂平板上 37 °C 过夜培养。挑取单克隆菌落在 5 mL 的含硫酸卡那霉素 LB 液体培养基中 37 °C、220 rpm 过夜培养, 次日转移到 800 mL 的 LB 培养液中扩大培养, 当 OD_{600} 值达到 0.8 左右时, 将温度降到 18 °C, 并加入终浓度为 0.3 mM 的 IPTG 诱导蛋白表达。诱导表达 16 小时后在 4 °C 下 $4000\times g$ 离心 10 min 收集菌体。将菌体沉淀用 35 mL 裂解液重悬[50 mM Tris/HCl, pH 8.0, 1 mM 苯甲基磺酰氟(PMSF), 0.2 mg/mL 溶菌酶, 0.03% Triton X-100 和 1 μL 的 DNase I], 并在 -80 °C 下冷冻保藏。

2.2 纯化

将菌体从 -80 °C 中取出, 置于 25 °C 水浴中孵育 40 分钟以裂解细胞。加入 6 mL 的 6% 硫酸链霉素水溶液, 温和混匀, 在 4 °C 下以 $20,000\times g$ 转速离心 5 分钟。将上清用 0.22 μm 的滤膜过滤, 结合到预先用缓冲液 A (20 mM Tris-HCl 7.5, 0.2 M KCl) 平衡过的 5 mL TALON 钴柱上, 用 10 倍柱体积的缓冲液 A 洗涤柱子, 然后用 5 倍柱体积的含有 150 mM 咪唑的缓冲液 B (20 mM Tris-HCl 7.5, 0.2 M KCl, 150 mM 咪唑, 5 mM β -巯基乙醇) 洗脱目的蛋白。向洗脱下来的蛋白溶液中加入硫酸铵至 70% 饱和沉淀蛋白, 在 $10,000\times g$ 下离心 10 分钟, 弃去上清, 沉淀用 5 mL 缓冲液 C (20 mM Tris-HCl 7.5, 0.2 M KCl, 10 % (v/v) 丙三醇) 重悬, 使用 G25 柱, 除去盐。将除去盐后的目的蛋白分装, 用液氮速冻, 置于 -80 °C 中冷冻保存。通过分光光度计检测最终所得到的黄嘌呤酰胺水解酶的浓度。根据蛋白序列, 黄嘌呤酰胺水解酶的消光系数是 $55,810 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ 。每升菌平均大约能纯化 35 mg 蛋白。图 5 显示黄嘌呤酰胺水解酶表达、纯化的过程, 其在凝胶电泳上的迁移速率符合实际的分子量大小 (55.7 kDa)。

实施例 3. 黄嘌呤酰胺水解酶的活性检测

将 1 mL 含有 1 mM 黄嘌呤、4 μ M 实施例 2 中获得的黄嘌呤酰胺水解酶、0.1 mM Mn^{2+} 、200 mM Tris-HCl 7.5 的溶液在 30 $^{\circ}$ C 水浴中孵育 0.5 h，使体系充分反应，然后加入等体积的甲醇溶液混匀，并在 14,000 $\times$ g 下离心 10 分钟，通过 0.22 μ m 滤膜过滤掉蛋白沉淀，记为实验组。对照组为未添加黄嘌呤酰胺水解酶及二价金属离子的反应，对照组与实验组的其它实验条件相同(表 1)。实验在无氧手套箱内进行，所有溶液包括蛋白溶液，反应缓冲液等在进入手套箱前均通过 Schlenk(希莱克)线除氧。

利用 LC-MS 检测黄嘌呤酰胺水解酶催化黄嘌呤水解开环，对照组未检测到产物峰，而实验组检测到了分子量为 169Da 的产物峰，证明了黄嘌呤酰胺水解酶可以降解黄嘌呤(图 6)。

表 1

	黄嘌呤	黄嘌呤酰胺 水解酶	Mn^{2+}	Tris-HCl 7.5	ddH ₂ O
母液	1 mM	4 μ M	0.1 mM	200 mM	
对照组	100 μ L	0 μ L	0 μ L	200 μ L	700 μ L
实验组	100 μ L	100 μ L	10 μ L	200 μ L	590 μ L

实施例 4. 黄嘌呤酰胺水解酶的活性中心鉴定

在体外证实含有 SEQ ID NO: 1 所示的氨基酸序列的多肽具有黄嘌呤酰胺水解酶活性后，利用 PHYRE2 服务器对该酶进行结构模拟(图 7)，显示出了含有 4 个组氨酸、一个赖氨酸和一个天冬氨酸以及两个二价金属离子(Zn^{2+} 和/或 Mn^{2+})构成的催化部位。进一步用计算机软件对模拟的黄嘌呤酰胺水解酶进行底物黄嘌呤的锚定显示，活性中心还包括由一个异亮氨酸、一个丙氨酸、一个脯氨酸和一个甘氨酸在空间构象上相互靠近构成的结合部位与底物黄嘌呤相互作用(图 7)。

实施例 5. 黄嘌呤酰胺水解酶的同工酶鉴定

本申请的发明人进一步从 Uniprot 数据库中找到此黄嘌呤酰胺水解酶同工酶 UniRef50 的序列(涵盖 50%序列相同,同时超过该黄嘌呤酰胺水解酶 80%长度的蛋白序列),上述序列均在 UniRef50_Q3AEA1 的簇中,共包括 101 种蛋白序列,并对这 101 种不同物种来源的蛋白进行进化树分析(图 8)。在每一个进化分支中各选取一个代表性蛋白,共五种蛋白,分别来源于坚强芽孢杆菌(*Bacillus firmus*)、柱胞梭菌 DSM 605 (*Clostridium cylindrosporum* DSM 605)、*Clostridium purinilyticum*、产氢羧基嗜热菌 (*Carbydothermus hydrogenoformans*, 菌株 ATCC BAA-161/DSM 6008/Z-2901)以及 *Paenibacillus donghaensis*,将它们编码的登录号分别为 A0A366K523、A0A0J8G334、A0A0L0W692、Q3AEA1 和 A0A2Z2KEH1 的黄嘌呤酰胺水解酶的氨基酸序列进行序列比对。序列对比结果显示上述催化位点和结合位点的氨基酸残基高度保守,所有五个序列都含有上述氨基酸残基,证明这些酶均为黄嘌呤酰胺水解酶(图 9)。表 2 显示了从 Uniprot 数据库中含有的 101 种黄嘌呤酰胺水解酶的登录号、菌株来源以及氨基酸序列号。

表 2

登录号	菌株来源	SEQ ID NO:
A0A0L0W692	<i>Clostridium purinilytica</i>	4
A0A364K317	高温黄色微球菌 FBKL4.011(<i>Thermoﬂavimicrobium</i> sp. FBKL4.011)	5
A0A1I6SUY8	耐盐海洋丝状菌(<i>Marininema halotolerans</i>)	6
A0A3D2NSM2	梭菌科细菌(<i>Clostridiaceae bacterium</i>)	7
E5WNF6	芽孢杆菌 2_A_57_CT2 (<i>Bacillus</i> sp. 2_A_57_CT2)	8
A0A1R1CK18	类芽孢杆菌 FSL H8-0259 (<i>Paenibacillus</i> sp. FSL H8-0259)	9
A0A1I3U261	双歧高温黄色微球菌 (<i>Thermoﬂavimicrobium dichotomicum</i>)	10
A0A0V8JCN2	<i>Fictibacillus enclensis</i>	11
A0A1H2QVP9	中温海洋丝状菌(<i>Marininema mesophilum</i>)	12
A0A089K5P4	类芽孢杆菌 FSL R5-0912(<i>Paenibacillus</i> sp. FSL R5-0912)	13
A0A1G9DGW2	香蒲类芽孢杆菌(<i>Paenibacillus typhae</i>)	14
A0A1M4UHZ6	极尖组织菌(<i>Tissierella praeacuta</i>)DSM 18095	15
A0A1I6C7J4	芽孢杆菌 cl95 (<i>Bacillus</i> sp. cl95)	16
A0A0A3XEE6	慢生型大豆根瘤菌(<i>Bradyrhizobium japonicum</i>)	17

A0A380XTT6	坚强芽孢杆菌(<i>Bacillus firmus</i>)	18
A0A1G5S5P6	产 氢 氨 基 酸 杆 菌 (<i>Acidaminobacter hydrogenoformans</i>)DSM 2784	19
A0A0P8Z9T7	温铁还原细菌 TR13 (<i>Caloranaerobacter sp.</i> TR13)	20
A0A265Q2B2	组织菌 P1 (<i>Tissierella sp.</i> P1)	21
A0A429Y566	芽孢杆菌 3-2-2 (<i>Bacillus sp.</i> 3-2-2)	22
A0A2Z2KEH1	<i>Paenibacillus donghaensis</i>	23
K0AWA5	<i>Gottschalkia acidurici</i> (菌株 ATCC 7906 / DSM 604 / BCRC 14475 / CIP 104303 / NCIMB 10678 / 9a)	24
A0A443IKX3	强壮芽孢杆菌(<i>Bacillus fortis</i>)	25
A0A2V2ZNB0	海泥芽孢杆菌(<i>Bacillus oceanisediminis</i>)	26
A0A2A2IEE5	<i>Virgibacillus profundi</i>	27
A0A089MDW3	类芽孢杆菌 FSL R7-0331(<i>Paenibacillus sp.</i> FSL R7-0331)	28
A0A0M0X8C9	芽孢杆菌 FJAT-21945 (<i>Bacillus sp.</i> FJAT-21945)	29
A0A3F3S6I2	极尖组织菌(<i>Tissierella praeacuta</i>)	30
A0A1S1YDG4	海泥芽孢杆菌(<i>Bacillus oceanisediminis</i>)	31
A0A1I1X526	芽孢杆菌 OV194(<i>Bacillus sp.</i> OV194)	32
A0A267MJF0	<i>Anaeromicrobium sediminis</i>	33
A0A1M5RDL0	解脂嗜热互营杆菌(<i>Thermosyntropho lipolytica</i>) DSM 11003	34
A0A1G5KXH0	<i>Alkaliphilus peptidifermentans</i> DSM 18978	35
A0A1G8Q7H9	米氏解硫酸素芽孢杆菌(<i>Aneurinibacillus migulanus</i>)	36
A0A0B2F3Z2	类芽孢杆菌 IHB B 3415(<i>Paenibacillus sp.</i> IHB B 3415)	37
A0A4R2KME8	<i>Marinisporobacter balticus</i>	38
A0A429X0W8	土地芽孢杆菌(<i>Bacillus terrae</i>)	39
A0A1H3Q6T8	加利福尼亚丁达尔氏菌(<i>Tindallia californiensis</i>)	40
K0B360	<i>Clostridium acidurici</i> (菌株 ATCC 7906 / DSM 604 / BCRC 14475 / CIP 104303 / NCIMB 10678 / 9a)	41
A0A1G9M635	<i>Romboutsia lituseburensis</i> DSM 797	42
T4V5T0	<i>Paraclostridium bifermentans</i> ATCC 19299	43
A0A4R1ATL6	<i>Bacillus praedii</i>	44
A0A1L8D5S0	<i>Carbydotherrmus islandicus</i>	45
I7KTT3	<i>Caloramator australicus</i> RC3	46
T4VRB8	<i>Paraclostridium bifermentans</i> ATCC 638	47
A0A1H2RLU1	<i>Tepidimicrobium xylanilyticum</i>	48
A0A0K2WJ73	米氏解硫酸素芽孢杆菌(<i>Aneurinibacillus migulanus</i>)	49
A0A3D0EBN7	芽孢杆菌属(<i>Bacillus bacterium</i>)	50
A0A417YW08	<i>Bacillus notoginsengisoli</i>	51
A0A160MBB4	海泥芽孢杆菌 2691(<i>Bacillus oceanisediminis</i> 2691)	52
A0A089LXU3	类芽孢杆菌 FSL R7-0273(<i>Paenibacillus sp.</i> FSL R7-0273)	53
M1ZGS5	[<i>Clostridium</i>] <i>ultunense</i> Esp	54

A0A448FF64	<i>Bacillus freudenreichii</i>	55
A0A1H5RUL9	<i>Caloramator fervidus</i>	56
A0A4R8GVS7	海泥芽孢杆菌(<i>Bacillus oceanisediminis</i>)	57
A0A4T9ZWH0	非解糖卟啉单胞菌(<i>Soehngenia saccharolytica</i>)	58
W7LB72	坚强芽孢杆菌 DS1 (<i>Bacillus firmus</i> DS1)	59
A0A140L3I5	<i>Thermotalea metallivorans</i>	60
A0A1M5FNK3	<i>Ornithinibacillus halophilus</i>	61
A0A1M5LQE8	解脂嗜热互营杆菌(<i>Thermosyntropha lipolytica</i>) DSM 11003	62
A0A4Q2HRQ1	虚构芽孢杆菌 S7(<i>Fictibacillus sp.</i> S7)	63
A0A3Q9QZ31	<i>Bacillus mesonae</i>	64
A0A0L0W688	<i>Clostridium purinilytica</i>	65
A0A1I3ETA9	<i>Tindallia magadiensis</i>	66
A0A089LHF8	北拟杆菌(<i>Paenibacillus borealis</i>)	67
A0A0M3DN30	<i>Paraclostridium benzoelyticum</i>	68
A0A0Q3QMR7	<i>Bacillus solani</i>	69
A0A419T2I0	<i>Thermohalobacter berrensis</i>	70
A0A369PBX6	不动杆菌 RIT592(<i>Acinetobacter sp.</i> RIT592)	71
A0A1T5JUM9	<i>Maledivibacter halophilus</i>	72
A0A4T9WHZ3	<i>Tissierella creatinini</i>	73
A0A3R1HSK2	堆肥宏基因组(<i>compost metagenome</i>)	74
A0A1I0F3P2	<i>Natronincola peptidivorans</i>	75
A0A0J5YTU9	坚强芽孢杆菌(<i>Bacillus firmus</i>)	76
A0A239FV01	<i>Anaerovirgula multivorans</i>	77
Q3AEA1	产氢羧基嗜热菌(<i>Carbydotherrnus hydrogenoformans</i> , 菌株 ATCC BAA-161 / DSM 6008 / Z-2901)	78
A0A1M5YST8	产乙酸互营单胞菌 DSM 13106(<i>Sporanaerobacter acetigenes</i>) DSM 13106	79
A0A1M4MA63	<i>Proteiniborus sp.</i> DW1	80
A0A268IWM5	芽孢杆菌 7894-2(<i>Bacillus sp.</i> 7894-2)	81
A0A1M4PLJ1	[<i>Clostridium</i>] <i>ultunense</i> Esp	82
A0A265N7L4	<i>Virgibacillus indicus</i>	83
A0A1I0KAI3	类芽孢杆菌 NFR01(<i>Paenibacillus sp.</i> NFR01)	84
A0A1S1V3Q5	<i>Andreesenia angusta</i>	85
A0A117T0P2	类芽孢杆菌 DMB5(<i>Paenibacillus sp.</i> DMB5)	86
A0A235B9X8	<i>Paludifilum halophilum</i>	87
A0A1H3N JW1	<i>Proteiniborus ethanoligenes</i>	88
A6TWT7	<i>Alkaliphilus metalliredigens</i> (菌株 QYMF)	89
A0A1G9U6Z5	盐渍土假芽孢杆菌(<i>Fictibacillus solisalsi</i>)	90
A0A0M0GGH4	<i>Sporosarcina globispora</i>	91
A0A366K523	坚强芽孢杆菌(<i>Bacillus firmus</i>)	92
A0A1R1FFH4	类芽孢杆菌 FSL R5-0490 (<i>Paenibacillus sp.</i> FSL	93

	R5-0490)	
A0A2G2MLE4	嗜碱菌(<i>Alkaliphilus sp.</i>)	94
A8MLA7	厌氧砷还原菌(<i>Alkaliphilus oremlandii</i> , 菌株 strain OhILAs)	95
A0A0R3JVG6	<i>Caloramator mitchellensis</i>	96
A0A0J8G334	柱胞梭菌 DSM 605(<i>Clostridium cylindrosporum</i> DSM 605)	97
A0A4Q1SWC2	嗜氨菌 CFH 90114 (<i>Ammoniphilus sp.</i> CFH 90114)	98
A0A1L8CSM0	<i>Carbydothermus pertinax</i>	99
A0A4Z0D783	<i>Soehngenina sp.</i> 1933P	100
A0A4T9ZOT2	非解糖卟啉单胞菌(<i>Soehngenina saccharolytica</i>)	101
A0A1G8N2H8	<i>Natribacillus halophilus</i>	102
A0A403WBU6	堆肥宏基因组(<i>compost metagenome</i>)	103
A0A3R4A6V9	堆肥宏基因组(<i>compost metagenome</i>)	104

实施例 6. 表达黄嘌呤酰胺水解酶的大肠杆菌的构建

本实施例构建了能表达黄嘌呤酰胺水解酶(SEQ ID NO: 1)的大肠杆菌。

本实施例的关键操作是把编码黄嘌呤酰胺水解酶的基因整合到大肠杆菌基因组，例如多拷贝 16sRNA 其中一个拷贝处，让其稳定表达，同时把控制鸟嘌呤转运蛋白和鸟嘌呤脱氨酶的启动子置换为 gapA 启动子，让编码黄嘌呤酰胺水解酶的基因持续稳定表达。

本实施例优选用组成型持续稳定表达的启动子 gapA 取代编码鸟嘌呤转运蛋白以及鸟嘌呤脱氨酶的启动子，原启动子通常在环境中氮源缺少，需要利用鸟嘌呤的氮的情况下才表达，在氮源充足的情况下，其控制的基因不表达，为了使食物中的鸟嘌呤能通过本发明的黄嘌呤酰胺水解酶降解，需要取代控制编码鸟嘌呤转运蛋白和鸟嘌呤脱氨酶的基因的启动子，使其在任何时候都获得表达，从而有效的把鸟嘌呤转运进入经上述工程改造的大肠杆菌细胞内，并通过鸟嘌呤脱氨酶和黄嘌呤酰胺水解酶顺序作用降解，从而有效阻止人体肠道对鸟嘌呤的吸收并将其转化成尿酸。

实施例 7. 表达黄嘌呤酰胺水解酶的大肠杆菌用于治疗痛风

将利用氧嗪酸(oxonic acid)诱导的高尿酸大鼠或尿酸酶敲除转基因小鼠作为痛风动物模型,将实施例 6 制备的各种大肠杆菌制成肠溶胶囊。在同等喂食的条件下,检测各种大肠杆菌肠溶胶囊能否降低痛风大鼠、小鼠模型的血液尿酸含量。

实施例 8. 表达黄嘌呤酰胺水解酶的大肠杆菌用于治疗痛风

8.1 大鼠实验

选用 SD 雄性大鼠(体重 120 g-150 g),每组 6 只,在同等喂食的条件下分为实验组、高尿酸血症组和对照组,具体实验过程如下:

1. 动物预适应: ≥ 7 天预适应过程,采用普通饲料和普通饮用水喂养。

2. 抗生素预处理:采用普通饲料喂养,在饮用水中添加 2 mg/mL 链霉素+1 mg/mL 氨卞青霉素喂养大鼠 3 天后,停饮用水 > 6 h 后,给予后续灌胃处理。

3. 实验组:每天饲喂大鼠含 1%(w/w)腺嘌呤的饲料,并用 200 μ L 含有 2×10^{10} 个实施例 6 制备的大肠杆菌混悬液进行灌胃处理,持续两周。

高尿酸血症组:每天饲喂大鼠含 1%(w/w)腺嘌呤饲料,持续两周。

对照组:每天饲喂大鼠普通饲料,持续两周。

两周喂养后,眼眶取血,用尿酸试剂盒检测血清中尿酸含量。

8.2 小鼠实验

选用小鼠 Balb/c(8 周龄),每组 5 只,在同等喂食的条件下分为实验组、高尿酸血症组和对照组,具体实验过程如下:

1. 动物预适应: ≥ 7 天预适应过程,采用普通饲料和普通饮用水喂养。

2. 抗生素预处理:采用普通饲料喂养,在饮用水中添加 2 mg/mL 链霉素+1 mg/mL 氨卞青霉素喂养小鼠 3 天后,停饮用水 > 6h 后,给予后续灌胃处理。

3. 实验组:每天饲喂小鼠 0.1%(w/w)腺嘌呤饲料并给予 200

mg/kg 氧氰酸钾灌胃给药，并用 100 μ L 含有 1×10^{10} 个实施例 6 制备的大肠杆菌混悬液进行灌胃处理，持续两周。

高尿酸血症组：每天饲喂小鼠 0.1%(w/w)腺嘌呤饲料和给予 200 mg/kg 氧氰酸钾灌胃给药，持续两周。

对照组：每天饲喂普通饲料，持续两周。

两周喂养后，眼眶取血，用尿酸试剂盒检测血清中尿酸含量。

上文对本申请的各项发明的示例性实施方案进行了描述，但是，在不脱离本申请的实质和范围的情况下，本领域技术人员能够对本申请描述的示例性实施方案进行修改或改进，由此得到的变形方案或等同方案也属于本申请的范围。

权利要求:

1. 多肽, 其包含 SEQ ID NO: 1 所示的氨基酸序列或其功能变体, 其中所述功能变体具有黄嘌呤酰胺水解酶活性。

2. 如权利要求 1 所述的多肽, 其在空间构象上具有如下定义的催化部位:

所述催化部位包含空间构象上相互靠近的、参照 SEQ ID NO: 1 的 H59、H61、K151、H186、H242 和 D316 氨基酸残基。

3. 如权利要求 2 所述的多肽, 所述催化部位还包含二价金属离子, 任选地 2 个二价金属离子(例如 Zn^{2+} 和/或 Mn^{2+})。

4. 如权利要求 1-3 中任一项所述的多肽, 其还包含在空间构象上具有如下定义的结合部位:

所述结合部位包含在空间构象上相互靠近的、参照 SEQ ID NO: 1 的 I288、A289、P338 和 G339 氨基酸残基。

5. 如权利要求 4 所述的多肽, 其中所述催化部位与所述结合部位相距不大于 5 埃(Å)。

6. 如权利要求 1-5 中任一项所述的多肽, 其中所述功能变体为 SEQ ID NO: 1 所示的氨基酸序列的天然同工酶;

优选地, 所述天然同工酶来自: 坚强芽孢杆菌(*Bacillus firmus*)、堆肥宏基因组(*compost metagenome*)、*Clostridium purinilyticum*、高温黄色微球菌(*Thermoflavimicrobium sp.*)、耐盐海洋丝状菌(*Marininema halotolerans*)、梭菌科细菌(*Clostridiaceae bacterium*)、芽孢杆菌(*Bacillus sp.*)、类芽孢杆菌(*Paenibacillus sp.*)、双岐高温黄色微球菌(*Thermoflavimicrobium dichotomicum*)、*Fictibacillus enclensis*、中温海洋丝状菌(*Marininema mesophilum*)、香蒲类芽孢杆菌(*Paenibacillus typhae*)、极尖组织菌(*Tissierella praeacuta*)、慢

生型大豆根瘤菌(*Bradyrhizobium japonicum*)、产氢氨基酸杆菌(*Acidaminobacter hydrogenoformans*)、温铁还原细菌(*Caloranaerobacter sp.*)、组织菌(*Tissierella sp.*)、*Paenibacillus donghaensis*、*Gottschalkia acidurici*、*Clostridium acidurici*、强壮芽孢杆菌(*Bacillus fortis*)、海泥芽孢杆菌(*Bacillus oceanisediminis*)、*Virgibacillus profundus*、*Anaeromicrobium sediminis*、解脂嗜热互营杆菌(*Thermosyntrophus lipolytica*)、*Alkaliphilus peptidifermentans*、米氏解硫胺素芽孢杆菌(*Aneurinibacillus migulanus*)、芽孢杆菌属(*Bacillus bacterium*)、*Marinisporobacter balticus*、土地芽孢杆菌(*Bacillus terrae*)、加利福尼亚丁达尔氏菌(*Tindallia californiensis*)、*Romboutsia lituseburensis*、*Paraclostridium bifermentans*、*Bacillus praedii*、*Carbydotherrmus islandicus*、*Caloramator australicus*、*Paraclostridium bifermentans*、*Tepidimicrobium xylanilyticum*、*Bacillus notoginsengisoli*、*[Clostridium] ultunense Esp*、*Bacillus freudenreichii*、*Caloramator fervidus*、非解糖卟啉单胞菌(*Soehngenella saccharolytica*)、*Thermotalea metallivorans*、*Ornithinibacillus halophilus*、虚构芽孢杆菌(*Fictibacillus sp.*)、*Bacillus mesonae*、*Tindallia magadiensis*、北拟杆菌(*Paenibacillus borealis*)、*Paraclostridium benzoelyticum*、*Bacillus solani*、*Thermohalobacter berrensis*、不动杆菌(*Acinetobacter sp.*)、*Maledivibacter halophilus*、*Tissierella creatinini*、*Natronincola peptidivorans*、*Anaerovirgula multivorans*、产氢羧基嗜热菌(*Carbydotherrmus hydrogenoformans*)、产乙酸互营单胞菌(*Sporanaerobacter acetigenes*)、*Proteiniborus sp.*、*Virgibacillus indicus*、*Andreesenia angusta*、*Paludifilum halophilum*、*Proteiniborus ethanoligenes*、*Alkaliphilus metalliredigens*、盐渍土假芽胞杆菌(*Fictibacillus solisalsi*)、*Sporosarcina globispora*、嗜碱菌(*Alkaliphilus sp.*)、厌氧砷还原菌(*Alkaliphilus oremlandii*)、*Caloramator mitchellensis*、柱胞梭菌(*Clostridium cylindrosporum*)、嗜氨菌(*Ammoniphilus sp.*)、*Carbydotherrmus pertinax*、*Soehngenella sp.*

和 *Natribacillus halophilus*;

更优选地, 所述天然同工酶包含 SEQ ID NO: 4-104 中任一项所示的氨基酸序列。

7. 如权利要求 1-6 中任一项所述的多肽, 其中所述功能变体为在 SEQ ID NO: 1 所示的氨基酸序列或其天然同工酶的基础上发生一个或多个氨基酸的插入、取代和/或缺失而产生的, 可选择地, 所述插入、取代和/或缺失不发生在催化部位和/或结合部位。

8. 核酸分子, 其编码权利要求 1-7 中任一项所述的多肽。

9. 表达盒, 其包含权利要求 8 所述的核酸分子。

10. 表达载体, 其包含权利要求 8 所述的核酸分子、或权利要求 9 所述的表达盒。

11. 宿主细胞, 其包含权利要求 8 所述的核酸分子、权利要求 9 所述的表达盒、或权利要求 10 所述的表达载体。

12. 如权利要求 11 所述的宿主细胞, 所述细胞为真核细胞或原核细胞;

优选地, 所述真核细胞为酵母细胞;

优选地, 所述原核细胞选自埃希氏菌属、乳酸杆菌属、双歧杆菌属、拟杆菌门和厚壁菌门; 更优选地所述埃希氏菌属为大肠杆菌。

13. 药物组合物或保健食品, 其包含权利要求 1-7 中任一项所述的多肽、权利要求 8 所述的核酸分子、权利要求 9 所述的表达盒、权利要求 10 所述的表达载体、或者权利要求 11 或 12 所述的宿主细胞和药学上可接受的载体或赋形剂。

14. 如权利要求 13 所述的药物组合物或保健食品，其用于预防、干预和/或治疗痛风。

15. 权利要求 1-7 中任一项所述的多肽、权利要求 8 所述的核酸分子、权利要求 9 所述的表达盒、权利要求 10 所述的表达载体、权利要求 11 或 12 所述的宿主细胞、或者权利要求 13 或 14 所述的药物组合物或保健食品在降解嘌呤中的用途。

16. 如权利要求 15 所述的用途，其中所述降解嘌呤在体外发生。

17. 权利要求 1-7 中任一项所述的多肽、权利要求 8 所述的核酸分子、权利要求 9 所述的表达盒、权利要求 10 所述的表达载体、权利要求 11 或 12 所述的宿主细胞、或者权利要求 13 或 14 所述的药物组合物或保健食品在制备用于预防、干预和/或治疗痛风的药物中的用途。

18. 预防、干预和/或治疗痛风的方法，包括向有需要的个体给予权利要求 1-7 中任一项所述的多肽、权利要求 8 所述的核酸分子、权利要求 9 所述的表达盒、权利要求 10 所述的表达载体、权利要求 11 或 12 所述的宿主细胞、或者权利要求 13 或 14 所述的药物组合物或保健食品。

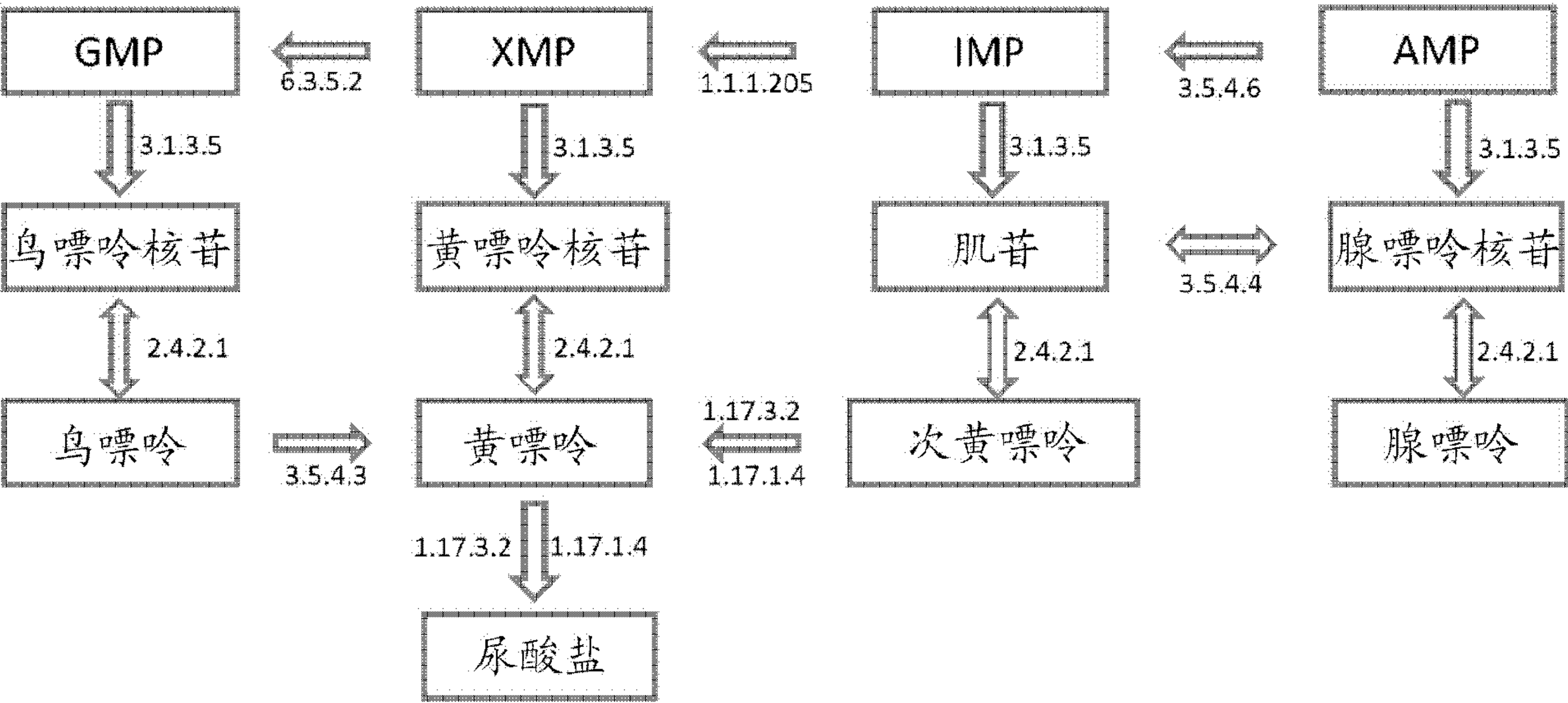
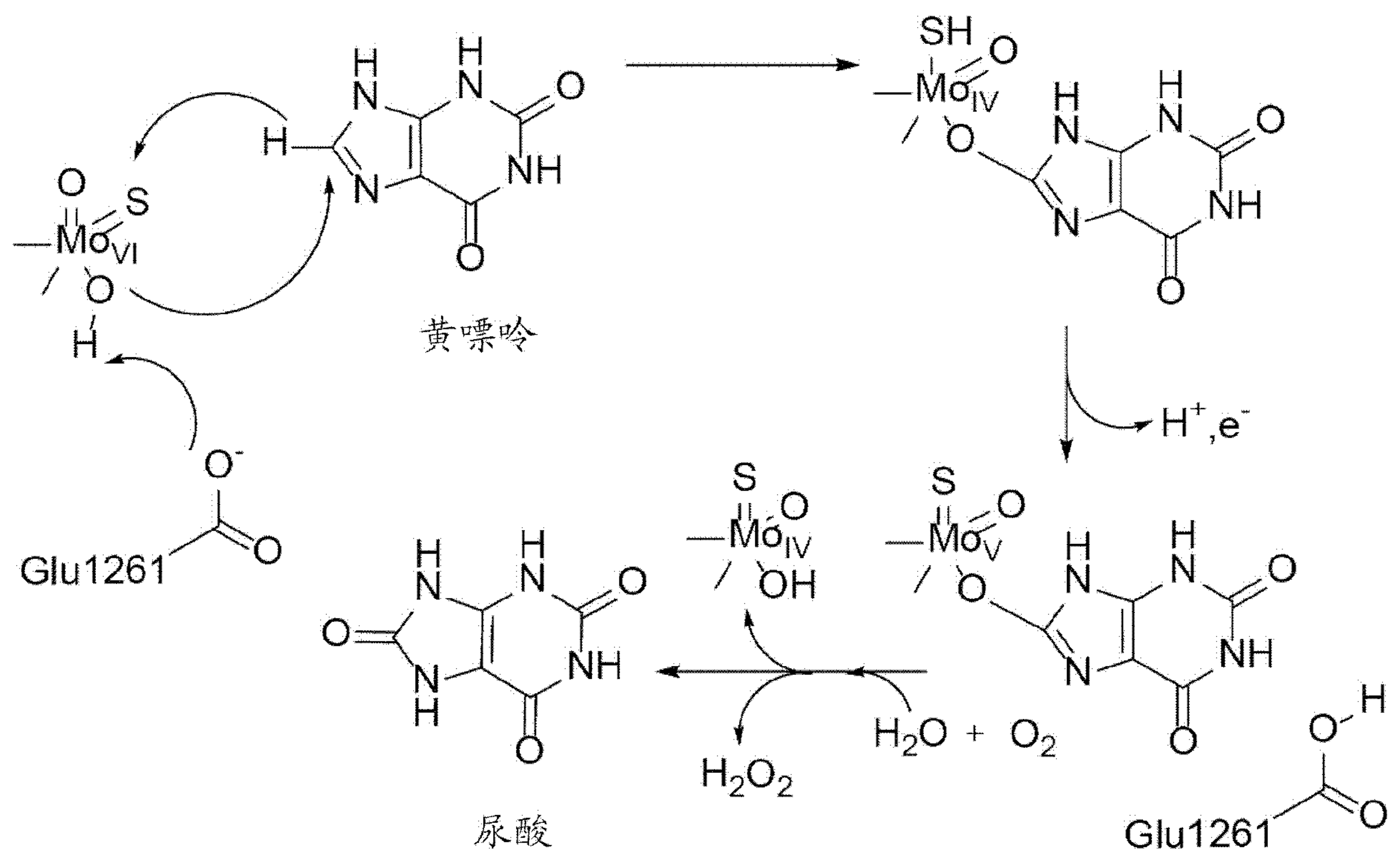


图 1



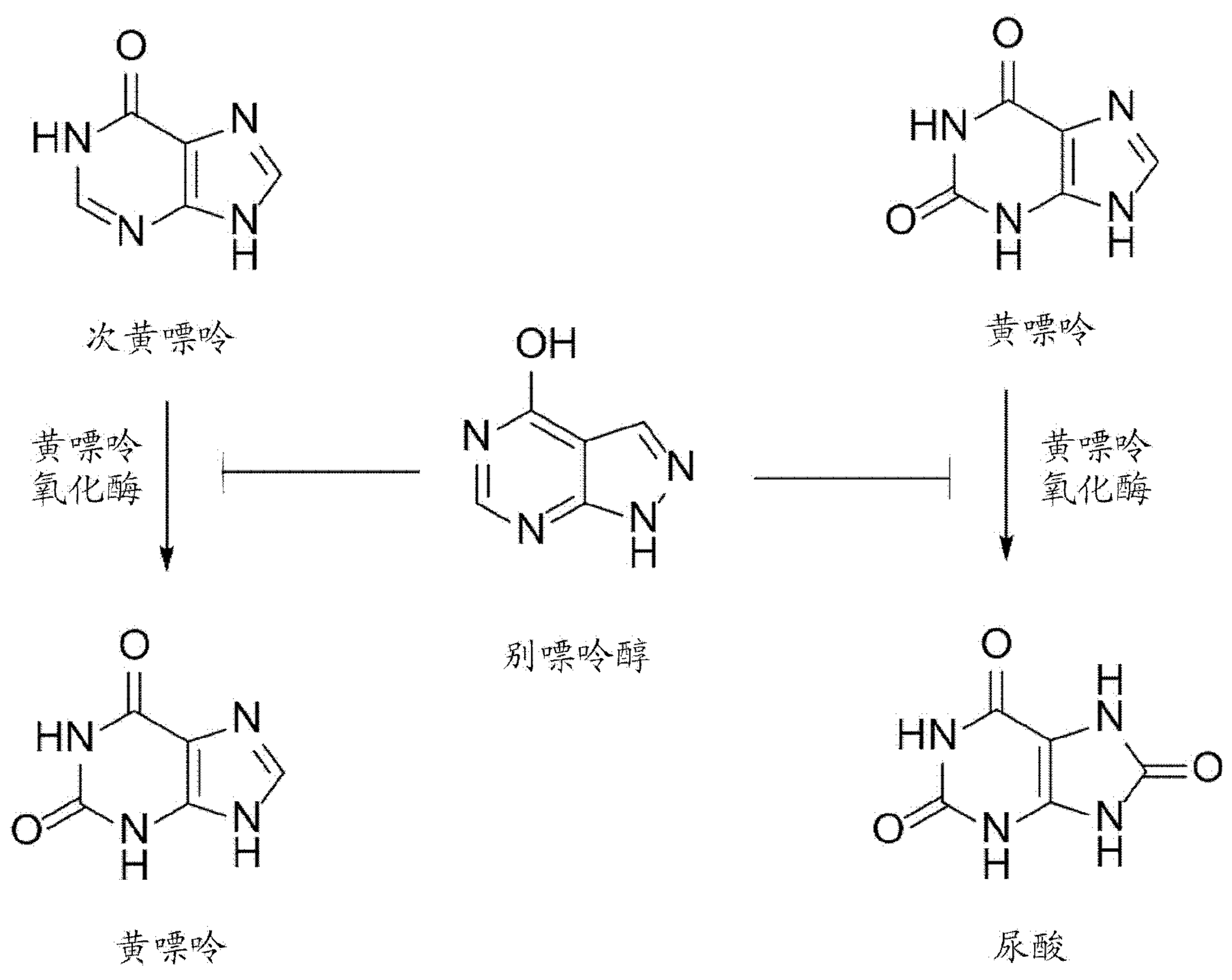


图 3

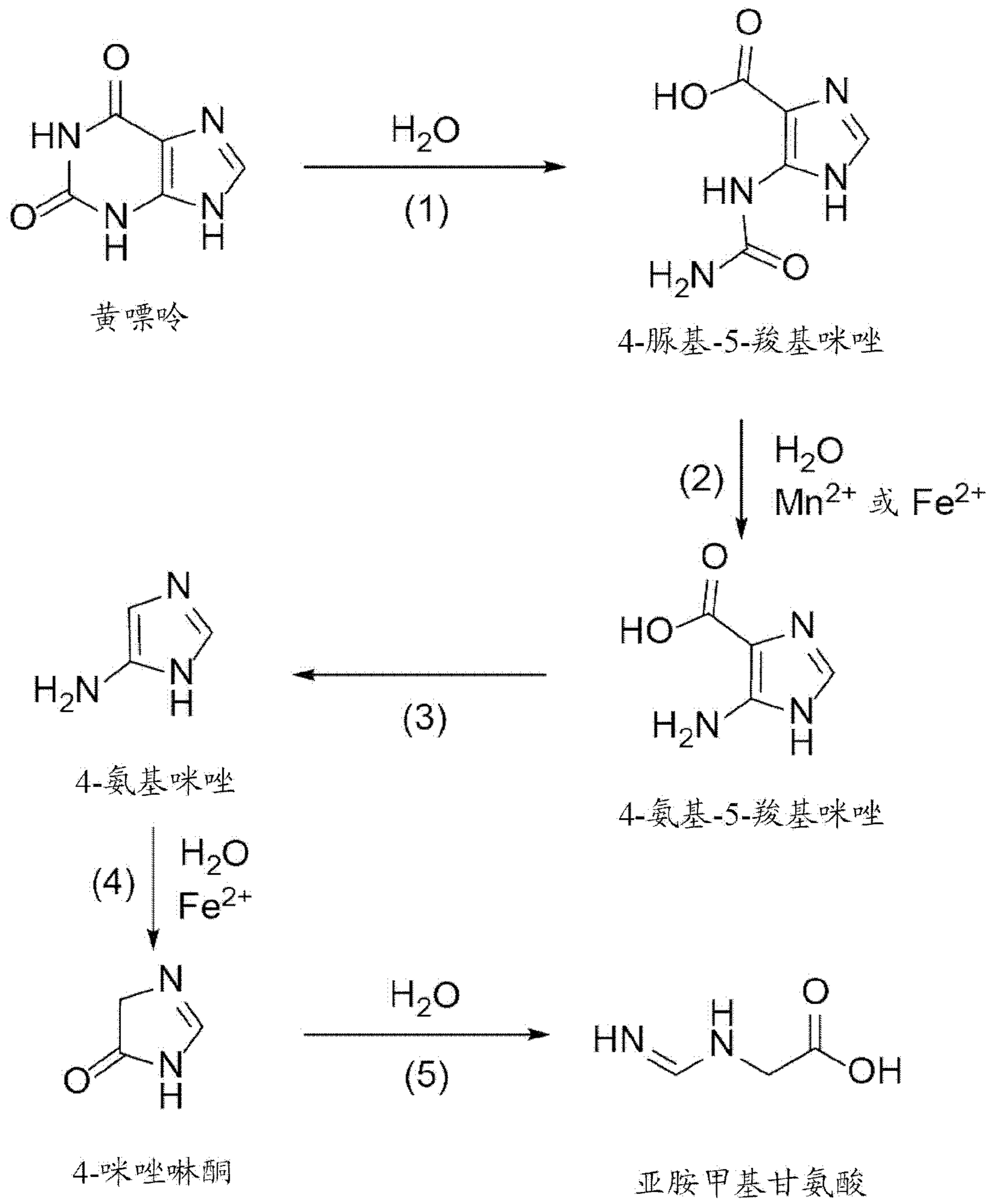


图 4

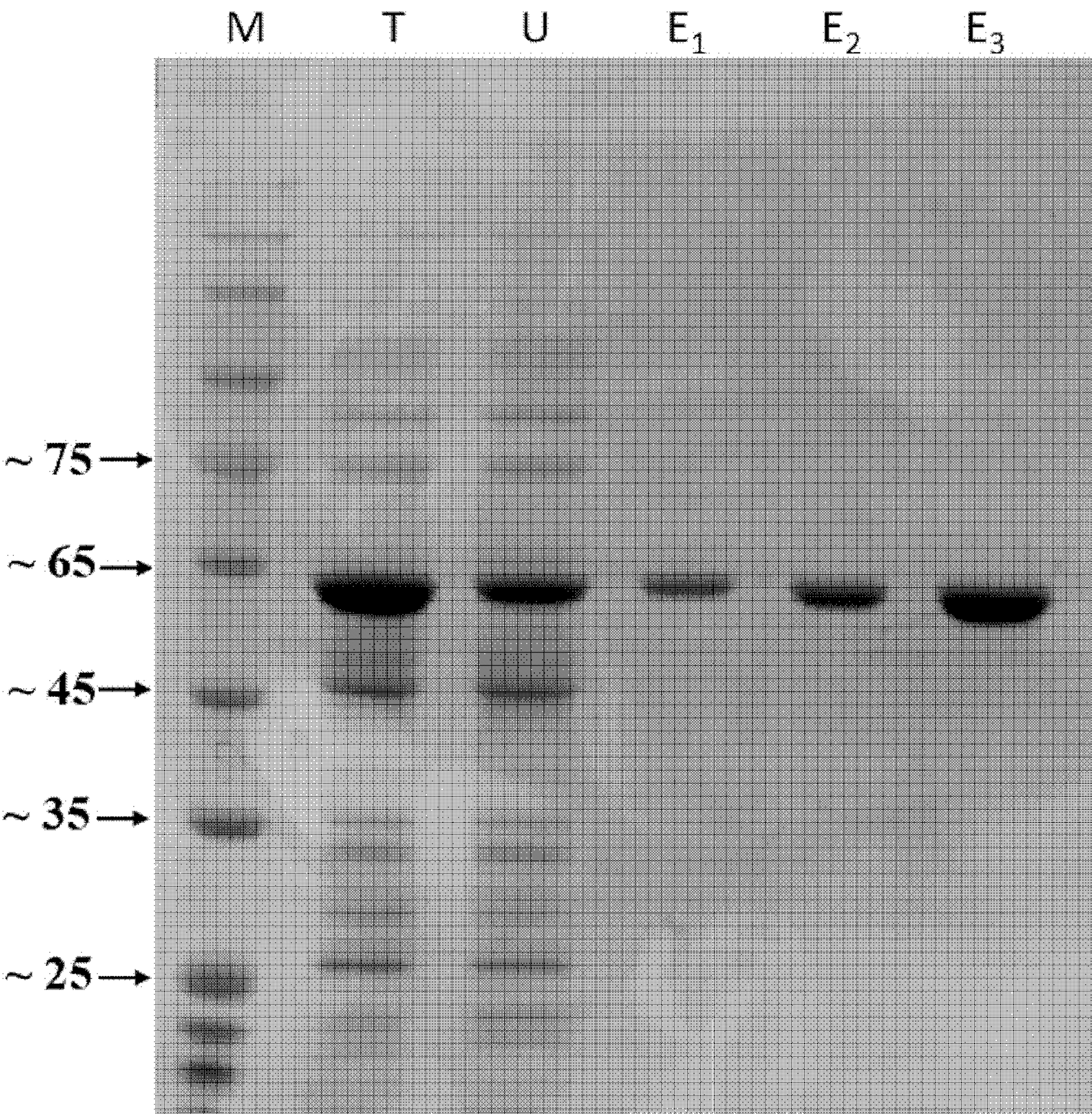


图 5

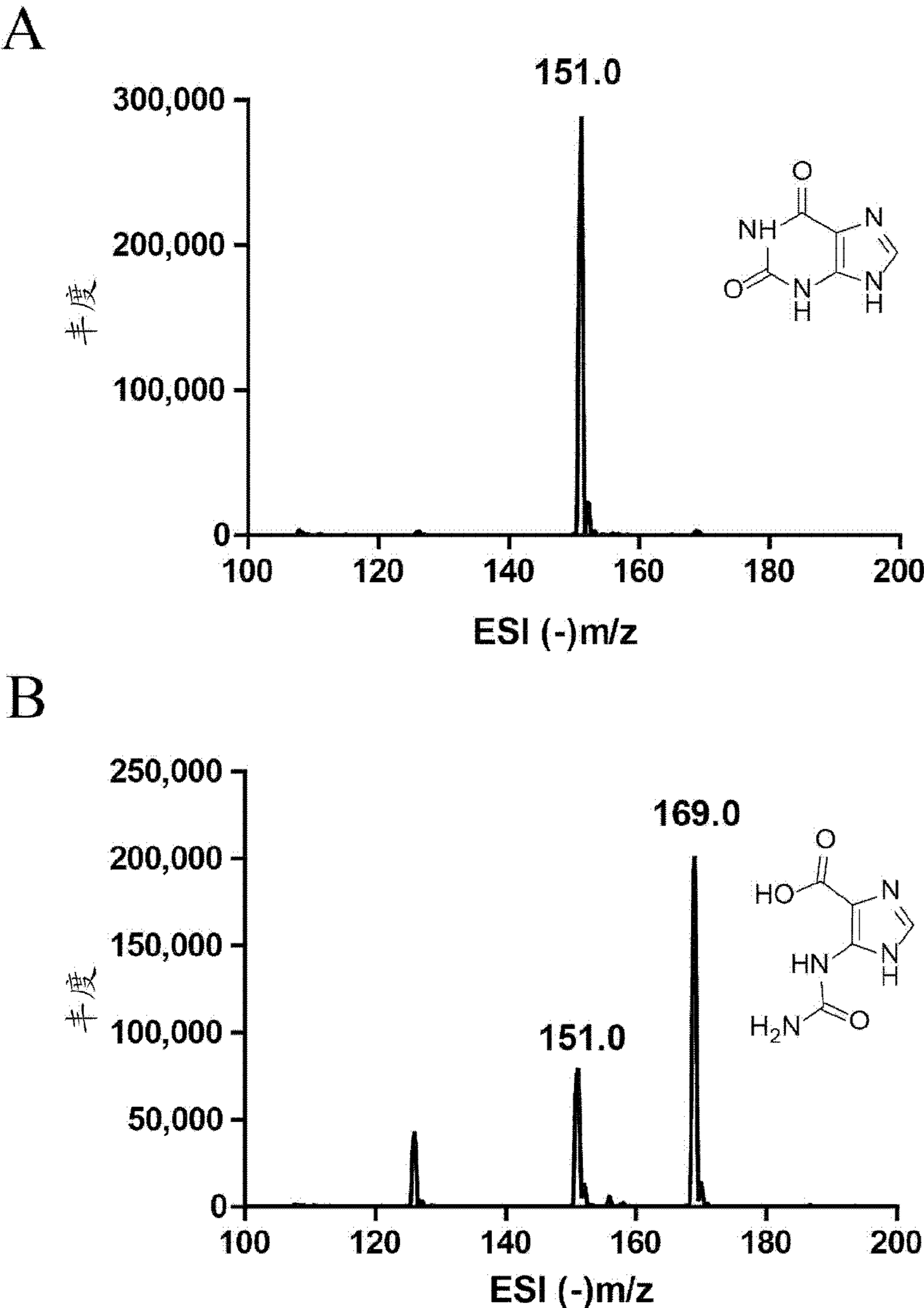


图 6

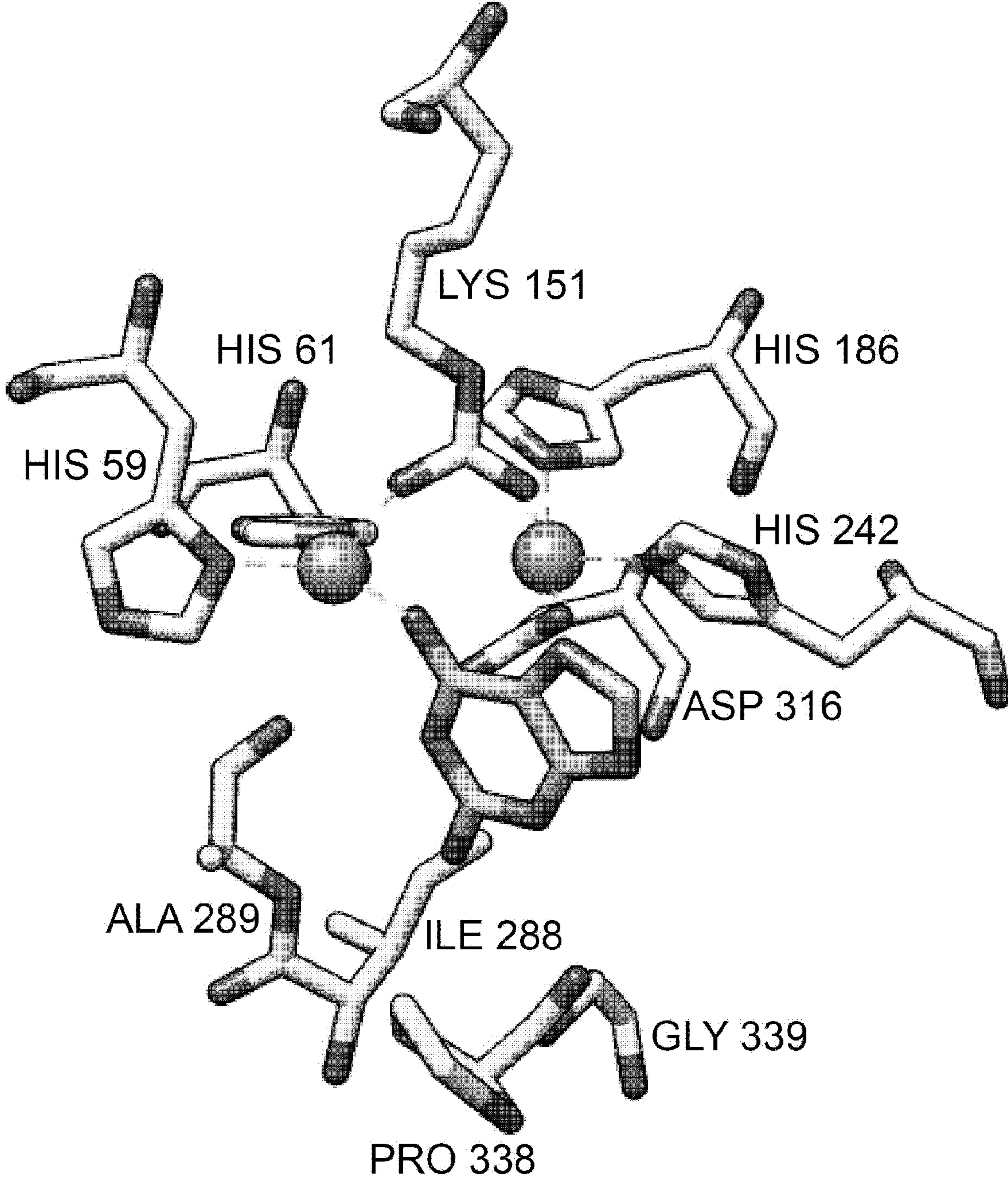


图 7

坚强芽孢杆菌	M--DLILKNANIPQG--DRQVLTNILVNKGKIVGYTNDISFLNAAARVIDIKGKLVVPGCIDPHTTFMDPGF
C. purinilyticum	M-YDLILKNARIPQG--DDTIVTNILVRDEKIAGFTDCIEEVQAKEIIDIEGQLTLPGCIDSHTFMYQGF
产氢羧基嗜热菌	MGFDLVLKNAKIPQG--NRTVDTHILVKDGKIAGFTNDLTGIEVAEVIDAENNLVLPGCIDSHTFNDPGF
P. donghaensis	MSYELVIRNASIPQG--DRQVLTDILVDKGVIVGFARDFEPGDA-EVIDAKGMLVLPGVIDSHTTFNDPGF
柱胞梭菌	MKFDVIVKNARIPQGHANETVVTNILIKDEQIAGFVNCIDGIDAVNVIDAAGNLVLPGCIDSHTFMDPGF
	* : : : : ** **** : : * . * * : . * . * . : : . : ** . * . ** ** . **** **
	59 61
坚强芽孢杆菌	THRETFATGSRSAAGGLTTIIDMPCCSKPSVRDGESFNKKIGPIRDQAYIDYCFWGGMTGEDAREGWIDN
C. purinilyticum	PHRENFLTGTAAAAATGGITTVIDMPCCSVPSARSVEQLQLKIDLCQPQSLVDFAMWGGVTGEDVREDWMHN
产氢羧基嗜热菌	THRENFATGTQAAAAGGVTTIIDMPCCSIPSVRSVDNLEAKLEVIKDKAYVDYAMWGGATGEDVRNNALYN
P. donghaensis	THREDFVTGTSSAAAGGVTMIVDMPCCSVPSVRSVDNLHSLNALEGKGIIDYAMWGGVTGEDVRNDVLNI
柱胞梭菌	SHRETVESGSQQAARGGITTVIDMPCTVPSARNVDQFNWKKEYWSEHCHVDFALWGGVTGEDVRLKQLHV
	. *** . : * : ** * * * : : **** : . * . : . * : : * . : * . : *** **** . * : :
坚强芽孢杆菌	IYPQIDQGVVAHVVYMTPSVPTFPKVSDAEMLEIFSNVAKTGLPIGVIAENYDICTFYSKKLEKEGRLDGP
C. purinilyticum	VKEQADYGVVAHVVYMTPSVPTYPRVTDPEMLECFRAVAETGLPIGIIAENFAMCDFYVKKFQKEGRMDGP
产氢羧基嗜热菌	IKEQADYGVVAHVVYMTPSVPTYPPASDAEMLEIFREVAKTGLPVGIIAENLDLCTYHVNKLNRNEGRFDGP
P. donghaensis	VKEQAAEGVVAHVVYMTPSVPTYPRVTDPEMLEAFYAVAETGMPIGIIAENFAICDFYTNKLKKEGRTDYP
柱胞梭菌	VKDQADAGAVAHVVYMTPSVPTYPRVTDPELLEIAKAVAETGLSMGVIIAENFAMCDFYVKNLKEEGRLDGP
	* * . **** * * * * * * . : * . * . * * * * * * : : * . : * . : *** * *
	151 186
坚强芽孢杆菌	AWAEARSSLAEKVAIELILSFAEATDARVHVVMSTKEGVELVKAACKRGVKVTAETCPHYLVLNKDSMS
C. purinilyticum	AWAEARMELA EKVAIELGISFAEDTGARLHIVVMSTGIGAKLVGEAKKRGINVTSETCPHYLT LNYQDAMS
产氢羧基嗜热菌	AWAEARLELA EKVAIQMAISFAEETGARLHIVVMSTGIGGVLVGEAKKRGLDVTAETCPHYLVLNAYESMT
P. donghaensis	AWAEARKILA EKAAIQLGISFSEESGARLHIVVMSTAAGNGLIKAALKGVKVTAECPHYLT LNAV DAMT
柱胞梭菌	AWADARLELA EKVAIELGISISEATGVRYHVVMSTSIGAKLIRQGKMRGLDVTSETCPHYLT INAQ DAMT
	*** : * * **** . * * : : * : * : . * * : * * * * * * * * * * : * : : * :
	242
坚强芽孢杆菌	ERGSYAKIAPPLRGKEDNESHWQALADGTIDFVGTTHAPYEIATEKDYPGATIWNTPGIPGVETMVPILV
C. purinilyticum	EYGAFAKIAPPLRTKRDNEELWEGLNNGSVDFIATTHAPYEIESEKAKEGMNIWTAFFGIPGVETMVPVLV
产氢羧基嗜热菌	KWRQFAKIAPPLRTTRDNEMLWEQLADGRVDFIATTHAPYEIATEKEAEGMDIWTAFPGIPGVETMVPILV
P. donghaensis	EFEAFAKIAPPLRRPEDNESLWQGLVDGTIDFMATTHAPYEIATEKDAPGMDVWTSFPGIPGVETLVPIMI
柱胞梭菌	EYHACAKIAPPLRTKKDNAELWEGLANGSVDFIATTHAPYNIELEKT--GRDIWTAFFGIPGIETMVEIIV
	: **** * * * * * * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * :
	288 289 316 338 339
坚强芽孢杆菌	SEGLNKGRLSLSRFVEVTSRNAAIHYGIYPKKGSMEIGSDADFTVIDLEKEYVIDEQ--KTESMAKYNPLH
C. purinilyticum	SEGYNKGRLSLSKLVDILSTNAAKHYGLYPKKGALNIGSDADFTVIDLDREWTITKD--MVTMCGYNPLE
产氢羧基嗜热菌	SEGYNKGRLSLSRLVDVLSRNAAIHYGLYPKKGALEIGSDADFTVIDLDYEWITDKD--KMYTMAKYTPFH
P. donghaensis	SEGYNKGRLSLSRLVELLCTNPAVHYGLYPKKGAIEIGTDADFTVIDLEKEWTLDKD--QMHCKPKYTPFH
柱胞梭菌	N-GFNDGKTITLEKMVEILSKNAAIHYGLYPKKGSMQVGSADLTIIDLDKEWTIDKDDKDSYMQNKYTPLQ
	. * * * . : * : * : . * . * **** : * * * * : : * : * : * : * : * : * : * : * : *
坚强芽孢杆菌	GMKLKGPVQTIIRGNVIYDED-----
C. purinilyticum	GLKLKGPVKTIVRGHIVYQDGEEGALPSLTDEELKTIVHEYPAGVEEKYSGVFEGFPHLSAEYERSYRK
产氢羧基嗜热菌	GMKLKGPVKTIVRGKLVDYDDK-----
P. donghaensis	GMKLKGVDKTIVRGTVVYDDE-----
柱胞梭菌	GIKLKGRVNKTIVRGHLVYEEG-----
	: * * * : : * * * : : * : :
坚强芽孢杆菌	-----KGIVGEAGYGEYVPRQSIQRLERTLKYEKYEA VKAKTKDPVAQQ
C. purinilyticum	EHPEVIDEHIRGIKGIMVKPGFGQFVKRQSIQVLPKTITY-----
产氢羧基嗜热菌	-----NGIVGKPGYGGQFVKRQTISKLERWIKF-----
P. donghaensis	-----LGVVGKPGYGEFVKRQTISELPRLLY-----
柱胞梭菌	-----TGIISEAGFGNFI PRQNEDKLERKLR FIEYKPTTF-----
	* : : . * : * : : * * . * : : :

图 9

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2021/071501

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N 9/80(2006.01)i; C12N 9/86(2006.01)i; C12N 15/55(2006.01)i; A61K 38/50(2006.01)i; A61P 19/06(2006.01)i; A23L 33/10(2016.01)i; A23L 33/13(2016.01)i; A23L 33/18(2016.01)i; A23L 33/175(2016.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12N; A61K; A61P; A23L

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

VEN, TWTXT, USTXT, WOTXT, SpringerLink, ISI Web of Knowledge, Elsevier Science Direct, Wiley InterScience, BIO-SEQUENCE Database of chinese Patent, Embase, NCBI, EBI, Nature, Science, Unipro, PUBMED, CNKI, WANFANG, Chinese Patent Biological Sequence Retrieval System, inventor, applicant, 黄嘌呤, 尿酸, 嘌呤, 痛风, 4-脲基-5-羧基咪唑, 甲基甘氨酸, 序列, Amidohydrolase, xanthine, 4-ureido-5-imidazole carboxylic acid, formiminoglycine

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	UNIPROKB. "UniProtKB - A0A160MBB4" <i>UniProtKB</i> , 13 July 2016 (2016-07-13), Family & Domains and Sequence	1-12
X	NCBI. "Allantoinase AIIB [Cytobacillus Oceanisediminis]" <i>GenBank ID: WP_019379981.1</i> , 02 June 2016 (2016-06-02), parts Features and Origin	1-12
X	UNIPROKB. "UniProtKB-A0A0L0W692" <i>UniProtKB</i> , 11 November 2015 (2015-11-11), Family and Domain Databases and Sequence	1-12
X	UNIPROKB. "UniProtKB - A0A364K317" <i>UniProtKB</i> , 07 November 2018 (2018-11-07), Family & Domains and Sequence	1-12
X	UNIPROKB. "UniProtKB - A0A1I6SUY8" <i>UniProtKB</i> , 18 January 2017 (2017-01-18), Family & Domains and Sequence	1-12

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search 26 March 2021	Date of mailing of the international search report 21 April 2021
Name and mailing address of the ISA/CN China National Intellectual Property Administration (ISA/CN) No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao, Haidian District, Beijing 100088 China Facsimile No. (86-10)62019451	Authorized officer Telephone No.

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	UNIPROKB. "UniProtKB - A0A160MBB4" <i>UniProtKB</i> , 13 July 2016 (2016-07-13), Family & Domains and Sequence	13-18
Y	NCBI. "Allantoinase AIIB [Cytobacillus Oceanisediminis]" <i>GenBank ID: WP_019379981.1</i> , 02 June 2016 (2016-06-02), parts Features and Origin	13-18
Y	UNIPROKB. "UniProtKB-A0A0L0W692" <i>UniProtKB</i> , 11 November 2015 (2015-11-11), Family and Domain Databases and Sequence	13-18
Y	UNIPROKB. "UniProtKB - A0A364K317" <i>UniProtKB</i> , 07 November 2018 (2018-11-07), Family & Domains and Sequence	13-18
Y	UNIPROKB. "UniProtKB - A0A1I6SUY8" <i>UniProtKB</i> , 18 January 2017 (2017-01-18), Family & Domains and Sequence	13-18
Y	HARTWICH, K. et al. "The Purine-Utilizing Bacterium Clostridium Acidurici 9a: A Genome-Guided Metabolic Reconsideration" <i>PLOS ONE</i> , 11 December 2012 (2012-12-11), Article no. e51662	13-18
Y	VOGELS, G.D. et al. "Degradation of Purines and Pyrimidines by Microorganisms" <i>BacmrzowoGlcAL Rzvows</i> , Vol. 2, No. 40, 30 June 1997 (1997-06-30), pp. 431-433	13-18
A	金建强 等 (JIN, Jianqiang et al.). "酰胺酶催化机制研究进展 (Progress on the Catalytic Mechanism of Amidase)" <i>发酵科技通讯 (Bulletin of Fermentation Science and Technology)</i> , Vol. 3, No. 46, 31 August 2017 (2017-08-31), pp. 170-176	1-18

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:

a. ☒ forming part of the international application as filed:

☒ in the form of an Annex C/ST.25 text file.
☐ on paper or in the form of an image file.

b. ☐ furnished together with the international application under PCT Rule 13^{ter}.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.

c. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:

☐ in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13^{ter}.1(a)).
☐ on paper or in the form of an image file (Rule 13^{ter}.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).

2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

3. Additional comments:

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: **18**
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
[1] Claim 18 relates to a method for preventing, intervening and/or treating gout, which does not meet the requirements of PCT R39.1(iv), and a search is conducted on the basis of the corresponding pharmaceutical use.
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

国际检索报告		国际申请号 PCT/CN2021/071501
A. 主题的分类 C12N 9/80(2006.01)i; C12N 9/86(2006.01)i; C12N 15/55(2006.01)i; A61K 38/50(2006.01)i; A61P 19/06(2006.01)i; A23L 33/10(2016.01)i; A23L 33/13(2016.01)i; A23L 33/18(2016.01)i; A23L 33/175(2016.01)i 按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和IPC两种分类		
B. 检索领域 检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号) C12N; A61K; A61P; A23L 包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献 在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称, 和使用的检索词(如使用)) VEN, TWTXT, USTXT, WOTXT, SpringerLink, ISI Web of Knowledge, Elsevier Science Direct, Wiley InterScience, BIO-SEQUENCE Database of chinese Patent, Embase, NCBI, EBI, Nature, Science, Unipro, PUBMED, CNKI, 万方, 中国专利生物序列检索系统, 发明人, 申请人, 黄嘌呤, 尿酸, 嘌呤, 痛风, 4-脲基-5-羧基咪唑, 甲基甘氨酸, 序列, Amidohydrolase, xanthine, 4-ureido-5-imidazole carboxylic acid, formiminoglycine.		
C. 相关文件		
类 型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求
X	UNIPROKB. "UniProtKB - A0A160MBB4" 《UniProtKB》, 2016年 7月 13日 (2016 - 07 - 13), Family & domains和Sequence	1-12
X	NCBI. "Allantoinase AIIB[Cytobacillus oceanisediminis]" 《GenBank ID:WP_019379981.1》, 2016年 6月 2日 (2016 - 06 - 02), FEATURES 和 ORIGIN部分	1-12
X	UNIPROKB. "UniProtKB-A0A0LOW692" 《UniProtKB》, 2015年 11月 11日 (2015 - 11 - 11), Family and domain databases 和Sequence	1-12
X	UNIPROKB. "UniProtKB - A0A364K317" 《UniProtKB》, 2018年 11月 7日 (2018 - 11 - 07), Family & domains和Sequence	1-12
☒ 其余文件在C栏的续页中列出。 ☐ 见同族专利附件。		
* 引用文件的具体类型: “A” 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件 “E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利 “L” 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件(如具体说明的) “O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件 “P” 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件 “T” 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了解发明之理论或原理的在后文件 “X” 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性 “Y” 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性 “&” 同族专利的文件		
国际检索实际完成的日期 2021年 3月 26日		国际检索报告邮寄日期 2021年 4月 21日
ISA/CN的名称和邮寄地址 中国国家知识产权局(ISA/CN) 中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088 传真号 (86-10)62019451		受权官员 张丽玮 电话号码 86-(10)-53962036

C. 相关文件		
类 型*	引用文件，必要时，指明相关段落	相关的权利要求
X	UNIPROKB. "UniProtKB - A0A1I6SUY8" 《UniProtKB》，2017年 1月 18日 (2017 - 01 - 18)， Family & domains和Sequence	1-12
Y	UNIPROKB. "UniProtKB - A0A160MBB4" 《UniProtKB》，2016年 7月 13日 (2016 - 07 - 13)， Family & domains和Sequence	13-18
Y	NCBI. "Allantoinase AIIB[Cytobacillus oceanisediminis]" 《GenBank ID:WP_019379981.1》，2016年 6月 2日 (2016 - 06 - 02)， FEATURES 和 ORIGIN部分	13-18
Y	UNIPROKB. "UniProtKB-A0A0LOW692" 《UniProtKB》，2015年 11月 11日 (2015 - 11 - 11)， Family and domain databases 和Sequence	13-18
Y	UNIPROKB. "UniProtKB - A0A364K317" 《UniProtKB》，2018年 11月 7日 (2018 - 11 - 07)， Family & domains和Sequence	13-18
Y	UNIPROKB. "UniProtKB - A0A1I6SUY8" 《UniProtKB》，2017年 1月 18日 (2017 - 01 - 18)， Family & domains和Sequence	13-18
Y	HARTWICH, K. 等. "The Purine-Utilizing Bacterium Clostridium acidurici 9a:A Genome-Guided Metabolic Reconsideration" 《PLOS ONE》，2012年 12月 11日 (2012 - 12 - 11)， 第e51662篇	13-18
Y	VOGELS, G.D. 等. "Degradation of Purines and Pyrimidines by Microorganisms" 《BacmrzowoGicAL Rzvows》，第2卷，第40期，1997年 6月 30日 (1997 - 06 - 30)， 第431页-433页	13-18
A	金建强等. "酰胺酶催化机制研究进展" 《发酵科技通讯》，第3卷，第46期，2017年 8月 31日 (2017 - 08 - 31)， 第170-176页	1-18

第I栏 核苷酸和/或氨基酸序列(续第1页第1.c项)

1. 关于国际申请中所公开的任何核苷酸和/或氨基酸序列, 国际检索是基于下列序列表进行的:
- a. ☒ 作为国际申请的一部分提交的:

☒ 附件C/ST. 25文本文件形式

☐ 纸件或图形文件形式
- b. ☐ 根据细则13之三. 1(a) 仅为国际检索目的以附件C/ST. 25文本文件形式与国际申请同时提交的:
- c. ☐ 仅为国际检索目的在国际申请日之后提交的:

☐ 附件C/ST. 25文本文件形式 (细则13之三. 1(a))

☐ 纸件或图形文件形式 (细则13之三. 1(b) 和行政规程第713段)
2. ☐ 另外, 在提交/提供了多个版本或副本的序列表的情况下, 提供了关于随后提交的或附加的副本中的信息与申请时提交的作为申请一部分的序列表的信息相同或未超出申请时提交的申请中的信息范围 (如适用) 的所需声明。
3. 补充意见:

第II栏

某些权利要求被认为是不能检索的意见 (续第1页第2项)

根据条约第17条(2)(a)，对某些权利要求未做国际检索报告的理由如下：

1. ☒ 权利要求： 18
因为它们涉及不要求本单位进行检索的主题，即：
[1] 权利要求18涉及预防、干预和/或治疗痛风的方法，不符合R39.1(iv)的规定，基于其相应的制
药用途进行检索。
2. ☐ 权利要求：
因为它们涉及国际申请中不符合规定的要求的部分，以致不能进行任何有意义的国际检索， 具体地说：
3. ☐ 权利要求：
因为它们是从属权利要求，并且没有按照细则6.4(a)第2句和第3句的要求撰写。