



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110446499 A

(43)申请公布日 2019.11.12

(21)申请号 201880019358.5

(74)专利代理机构 北京市中咨律师事务所
11247

(22)申请日 2018.03.16

代理人 陈迎春 黄革生

(30)优先权数据

17161883.8 2017.03.20 EP

(51)Int.Cl.

A61K 38/18(2006.01)

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2019.09.19

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/EP2018/056725 2018.03.16

(87)PCT国际申请的公布数据

W02018/172219 EN 2018.09.27

(71)申请人 豪夫迈·罗氏有限公司

地址 瑞士巴塞尔

(72)发明人 M·迈尔 M·托曼

权利要求书1页 说明书17页

序列表10页 附图2页

(54)发明名称

一种体外糖基工程化红细胞生成刺激蛋白
的方法

(57)摘要

本发明涉及一种体外生产糖基工程化的红细胞生成刺激蛋白的方法,包括以下步骤:提供不含唾液酸的红细胞生成刺激蛋白、用N-乙酰基-葡萄糖胺转移酶B3GNT2处理红细胞生成刺激蛋白、用半乳糖基转移酶处理红细胞生成刺激蛋白、和用唾液酸转移酶处理红细胞生成刺激蛋白。

1. 一种体外生产糖基工程化的红细胞生成刺激蛋白的方法,包括以下步骤:
 - a) 提供不含唾液酸的红细胞生成刺激蛋白,
 - b) 用N-乙酰基-葡萄糖胺转移酶B3GNT2处理红细胞生成刺激蛋白,
 - c) 用半乳糖基转移酶处理红细胞生成刺激蛋白,
 - d) 用唾液酸转移酶处理红细胞生成刺激蛋白。
2. 根据权利要求1所述的方法,其特征在于步骤b)在锰离子和钙离子存在下进行。
3. 根据权利要求1或2所述的方法,步骤b)中红细胞生成刺激蛋白和N-乙酰基-葡萄糖胺转移酶B3GNT2之间的重量比为 $>1:1$ 。
4. 根据前述权利要求中任一项所述的方法,其特征在于该方法包括在步骤b)之后和用半乳糖基转移酶处理之前纯化获得的红细胞生成刺激蛋白的步骤。
5. 根据前述权利要求中任一项所述的方法,其特征在于步骤c)在UDP-半乳糖存在下使用半乳糖基转移酶GalT1进行。
6. 根据前述权利要求中任一项所述的方法,其特征在于该方法包括在步骤c)之后和用唾液酸转移酶处理之前纯化获得的红细胞生成刺激蛋白的步骤。
7. 根据前述权利要求中任一项所述的方法,其特征在于步骤d)使用唾液酸转移酶ST3进行。
8. 根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中不含唾液酸的红细胞生成刺激蛋白包含相对频率的N-连接聚糖,其包括2%-0%的唾液酸。
9. 前述权利要求中任一项所述的方法用于增加红细胞生成刺激蛋白的N-聚糖上聚-N-乙酰基乳糖胺重复的数量的用途。
10. 权利要求1至8之一所述的方法用于提供红细胞生成刺激蛋白的用途,所述红细胞生成刺激蛋白的每个N-糖基化位点具有2个或更多个聚-N-乙酰基乳糖胺重复。
11. 通过权利要求1至8中任一项所述的方法产生的体外糖基工程化的红细胞生成刺激蛋白,其中每个红细胞生成刺激蛋白的聚-N-乙酰基乳糖胺重复的平均数量大于10。
12. 一种红细胞生成刺激蛋白群,其特征在于每个N-糖基化位点上包含多于两个聚-N-乙酰基乳糖胺重复的N-连接聚糖的相对频率大于90%,并且其特征在于每个红细胞生成刺激蛋白的聚-N-乙酰基乳糖胺重复的平均数量大于10。
13. 根据权利要求12所述的红细胞生成刺激蛋白群,其中所述红细胞生成刺激蛋白群不含具有零个或一个聚-N-乙酰基乳糖胺重复的红细胞生成刺激蛋白。
14. 根据权利要求1至8之一所述的方法、根据权利要求9或10所述的用途、根据权利要求11所述的体外糖基工程化的红细胞生成刺激蛋白、或根据权利要求12或13之一所述的红细胞生成刺激蛋白群,其中所述红细胞生成刺激蛋白是红细胞生成素。
15. 权利要求1至8之一所述的方法用于改善红细胞生成刺激蛋白的比活性的用途。

一种体外糖基工程化红细胞生成刺激蛋白的方法

技术领域

[0001] 本发明涉及体外糖基工程化 (glycoengineered) 的红细胞生成刺激蛋白、产生所述红细胞生成刺激蛋白的方法及其用途。

背景技术

[0002] 红细胞生成刺激蛋白是包含几个N-糖基化位点的糖蛋白。蛋白质上聚糖模式的变异对蛋白质功能具有重要意义。例如,蛋白质上N-连接的聚糖结构可影响各种特征,包括蛋白酶易感性、细胞内运输、分泌、组织靶向、生物半衰期和细胞或生物体中蛋白质的抗原性。这些特征中的一种或多种的改变极大地影响蛋白质在其天然环境中的功效,并且在为治疗剂的目的生产肽的情况下,其还影响蛋白质作为治疗剂的功效。

[0003] 红细胞生成素 (EPO) 是具有三个N-糖基化位点和一个O-糖基化位点的糖蛋白。已经使用重组DNA技术生物合成制备红细胞生成素 (Egrie, J C, Strickland, T W, Lane, J 等人 (1986) Immunobiol. 72:213-224), 其是插入中国仓鼠的卵巢组织细胞 (CHO细胞) 中并在其中表达的克隆人EPO基因的产物。人红细胞生成素 (hEPO) 的主要、完全加工形式的一级结构如图1所示。有两个二硫键;在Cys7-Cys161和Cys29-Cys33之间。不含糖部分的EPO多肽链的分子量为18,236Da。在完整的EPO糖蛋白中,大约40%的分子量由碳水化合物基团所占,所述碳水化合物基团在蛋白质糖基化位点上的糖基化蛋白质 (Sasaki, H, Bothner, B, Dell, A and Fukuda, M (1987) J. Biol. Chem. 262:12059)。

[0004] EPO的典型N-聚糖包括具有一个或两个N-乙酰基乳糖胺重复的双、三和四触角结构 (参见例如Postnikov等人2016Russ. Chem. Rev. 85 99)。

[0005] 已知与较少唾液酸化的EPO糖蛋白相比,EPO的N-聚糖上更多数量的末端唾液酸部分与更高的EPO比活性相关 (参见例如Imai等人, Eur. J. Biochem. 194 (1990), 第457-462页)。EPO的去唾液酸化降低了EPO在循环中的半衰期 (Ridley等人 J Natl Med Assoc. 1994Feb; 86 (2):129-35)。

[0006] 据报道,更多数量的聚-N-乙酰基乳糖胺重复或更多数量的EPO的N-聚糖分支都分别与EPO更高的比生物学活性相关 (参见例如WO 99/28346)。

[0007] 已知使用基因工程化的宿主细胞修饰EPO的聚糖模式以产生EPO,例如WO 99/28346。

[0008] 提出了在体外修饰糖蛋白聚糖模式的方法,即生产后修饰聚糖模式。EP 2661492公开了一种改善 α -2,6-唾液酸化聚糖的含量的方法。EP 2664192公开了通过增加聚-N-乙酰基乳糖胺的数量可以增加糖蛋白的循环时间,其建议使用 β 3-N-乙酰基-葡萄糖胺转移酶家族成员 (B3GNT1、2、3、4) 来实现聚-N-乙酰基乳糖胺的数量增加。

[0009] WO 2008/57683公开了一种纯化EPO的方法。其建议在体外使用N-乙酰基-葡萄糖胺转移酶和半乳糖基转移酶重构EPO的聚糖模式,以形成糖基化的EPO多肽,其具有至少一个具有末端-GlcNAc-Gal部分的聚糖残基,优选在单触角分支上。

[0010] EP 2042196公开了一种使用经由聚糖键的修饰基团 (例如PEG) 缀合糖蛋白 (例如

EPO)的方法。为了提供用于添加修饰基团的最佳聚糖模式,可以使用糖苷化和(再)糖基化的不同步骤重构糖蛋白上的聚糖模式。在所公开的方法中,使用相应的糖特异性糖基转移酶将糖偶联的修饰基团与糖蛋白连接。为了偶联唾液酸偶联的修饰基团,建议通过以下修饰EPO的聚糖模式,例如通过(a)唾液酸化(sialidation)和随后用唾液酸偶联的修饰基团进行唾液酸化;(b)用N-乙酰基-葡萄糖胺转移酶、半乳糖基转移酶和唾液酸转移酶ST3处理;或(c)用唾液酸酶、半乳糖基转移酶和唾液酸转移酶ST3处理。

[0011] 由于聚糖模式的变异影响蛋白质功能,因此需要一种通常可应用的生产红细胞生成刺激蛋白的方法,该红细胞生成刺激蛋白具有所需的和可再现的(即定制的)聚糖模式,例如,用于确保红细胞生成刺激蛋白恒定的质量和/或改善的生物学功能和/或稳定性。

发明内容

[0012] 本发明涉及一种体外生产糖基工程化的红细胞生成刺激蛋白的方法,包括以下步骤:

[0013] a) 提供不含唾液酸的红细胞生成刺激蛋白,

[0014] b) 用N-乙酰基-葡萄糖胺转移酶B3GNT2处理红细胞生成刺激蛋白,

[0015] c) 用半乳糖基转移酶处理红细胞生成刺激蛋白,

[0016] d) 用唾液酸转移酶处理红细胞生成刺激蛋白。

[0017] 本发明的一个方面涉及根据本发明的方法用于增加红细胞生成刺激蛋白的N-聚糖上的聚-N-乙酰基乳糖胺重复的数量的用途。

[0018] 本发明的另一方面是根据本发明的方法用于提供红细胞生成刺激蛋白的用途,所述红细胞生成刺激蛋白在其N-聚糖上具有受控数量的聚-N-乙酰基乳糖胺重复。

[0019] 本发明的另一方面是根据本发明的方法用于改善红细胞生成刺激蛋白的比活性的用途。

[0020] 本发明的另一方面是通过本发明的方法生产的体外糖基工程化的红细胞生成刺激蛋白。

[0021] 在本发明所有方面的一个实施方案中,红细胞生成刺激蛋白是红细胞生成素。

[0022] 本发明提供了一种体外生成糖基工程化的红细胞生成刺激蛋白的方法,所述红细胞生成刺激蛋白具有受控数量的聚-N-乙酰基乳糖胺重复。根据本发明,红细胞生成刺激蛋白可以在体外被糖基工程化,从而产生定制的聚糖模式,其可以确保该红细胞生成刺激蛋白恒定的产品质量和/或改善其生物功能,如比生物学活性。利用本发明,可以增加红细胞生成刺激蛋白的N-聚糖上的聚-N-乙酰基乳糖胺重复的数量。

附图说明

[0023] 图1:EPO的结构及其糖基化位点(改编自Postnikov等人2016Russ.Chem.Rev.85 99)。

[0024] 图2A-E:EPO的典型糖基化模式。

[0025] 图2A:具有两个分支的N-聚糖。图2B:具有三个分支的N-聚糖。图2C:具有四个分支的N-聚糖。图2D:具有四个分支和一个聚N-乙酰基乳糖胺重复的N-聚糖。图2E:具有四个分支和三个聚N-乙酰基乳糖胺重复的N-聚糖。

具体实施方式

[0026] 1. 定义

[0027] 除非本文另有定义,否则结合本发明使用的科学和技术术语应具有本领域普通技术人员通常理解的含义。此外,除非上下文另有要求,否则单数术语应包括复数,复数术语应包括单数。通常根据本领域熟知的常规方法进行本公开的方法和技术。通常,与本文所述的生物化学、酶学、分子和细胞生物学、微生物学、遗传学和蛋白质和核酸化学和杂交相关的命名法和技术是本领域公知和常用的那些。

[0028] 除非本文另有定义,否则术语“包含”应包括术语“由……组成”。

[0029] 本文所用的与特定值(例如温度、浓度、时间等)相关的术语“约”应指术语“约”所指的特定值 $\pm 1\%$ 的变化。

[0030] 如本文所用,“红细胞生成刺激蛋白”是指直接或间接引起红细胞生成素受体激活的蛋白质,例如,通过结合并引起受体的二聚化。红细胞生成刺激蛋白包括结合并激活红细胞生成素受体的红细胞生成素及其变体、类似物或衍生物;与红细胞生成素受体结合并激活该受体的抗体;或结合并激活红细胞生成素受体的肽。本文所指的红细胞生成素的变体、类似物或衍生物包含至少三个N-糖基化位点,在一个实施方案中,N-糖基化位点是Asn24、Asn38和Asn83。红细胞生成刺激蛋白包括但不限于epoetin alfa、epoetin beta、epoetin delta、epoetin omega、epoetin iota、epoetin zeta及其类似物,聚乙二醇化红细胞生成素、氨基甲酰化红细胞生成素、模拟肽(包括EMP1/hematide)和模拟抗体。示例性红细胞生成刺激蛋白包括红细胞生成素、达贝泊汀(darbedoetin)、红细胞生成素激动剂变体、以及结合并激活红细胞生成素受体的肽或抗体(包括在美国专利申请公开号2003/0215444和2006/0040858中报道的化合物,其中每个公开内容通过引用整体并入本文)以及如以下专利或专利申请中公开的红细胞生成素分子或其变体或类似物,其各自通过引用整体并入本文:美国专利号4,703,008;5,441,868;5,547,933;5,618,698;5,621,080;5,756,349;5,767,078;5,773,569;5,955,422;5,830,851;5,856,298;5,986,047;6,030,086;6,310,078;6,391,633;6,583,272;6,586,398;6,900,292;6,750,369;7,030,226;7,084,245;7,217,689;PCT公开号WO 91/05867;WO 95/05465;WO 99/66054;WO 00/24893;WO 01/81405;WO 00/61637;WO 01/36489;WO 02/014356;WO 02/19963;WO 02/20034;WO 02/49673;WO 02/085940;WO 03/029291;WO 2003/055526;WO 2003/084477;WO 2003/094858;WO 2004/002417;WO 2004/002424;WO 2004/009627;WO 2004/024761;WO 2004/033651;WO 2004/035603;WO 2004/043382;WO 2004/101600;WO 2004/101606;WO 2004/101611;WO 2004/106373;WO 2004/018667;WO 2005/001025;WO 2005/001136;WO 2005/021579;WO 2005/025606;WO 2005/032460;WO 2005/051327;WO 2005/063808;WO 2005/063809;WO 2005/070451;WO 2005/081687;WO 2005/084711;WO 2005/103076;WO 2005/100403;WO 2005/092369;WO 2006/50959;WO 2006/02646;WO 2006/29094;和美国专利号US 2002/0155998;US 2003/0077753;US 2003/0082749;US 2003/0143202;US 2004/0009902;US 2004/0071694;US 2004/0091961;US 2004/0143857;US 2004/0157293;US 2004/0175379;US 2004/0175824;US 2004/0229318;US 2004/0248815;US 2004/0266690;US 2005/0019914;US 2005/0026834;US 2005/0096461;US 2005/0107297;US 2005/0107591;US 2005/0124045;US 2005/0124564;US 2005/0137329;US 2005/0142642;US2005/0143292;US

2005/0153879;US 2005/0158822;US 2005/0158832;US 2005/0170457;US 2005/0181359;US 2005/0181482;US 2005/0192211;US 2005/0202538;US 2005/0227289;US 2005/0244409;US 2006/0088906;US 2006/0111279。

[0031] 如本文所用,当与多肽一起使用时,术语“类似物”是指相对于亲本序列具有插入、缺失或取代的氨基酸序列,同时仍然基本上保持亲本序列的生物学活性,如使用本领域技术人员已知的生物学测定法测定。如本文所用,术语天然存在的或类似物多肽的“衍生物”是指已被化学修饰的多肽,例如,连接水溶性聚合物(例如聚乙二醇化的)、标记物(例如放射性核素或各种酶)、或其他诊断或靶向或治疗部分、或通过化学方法的非天然氨基酸的插入或取代。这些衍生物将保留本发明的非衍生化分子的结合特性。

[0032] 在一个实施方案中,“红细胞生成刺激蛋白”包含3个或更多个N-糖基化位点。

[0033] 在一个实施方案中,红细胞生成刺激蛋白是红细胞生成素。

[0034] 术语“红细胞生成素”或“EPO”是指具有SEQ ID NO:1中所示氨基酸序列的糖蛋白。在一个实施方案中,该术语包括与SEQ ID NO:1的序列基本上同源的氨基酸序列,其生物学特性涉及刺激红细胞生成和刺激骨髓中定向(committed)红细胞祖细胞的分裂和分化。如本文所用,这些术语包括故意修饰的此类蛋白质(例如通过定点诱变)或偶然通过突变修饰。在一个实施方案中,术语红细胞生成素或EPO类似物包括具有1至6个额外糖基化位点的类似物、在糖蛋白的羧基末端具有至少一个另外的氨基酸的类似物(其中另外的氨基酸包括至少一个糖基化位点)、和具有氨基酸序列的类似物(所述氨基酸序列包括至少一个糖基化位点上的重排)。如本文所用,糖基化位点的“重排”是指天然存在的EPO中一个或多个糖基化位点的缺失和一个或多个非天然存在的糖基化位点的添加。这些术语包括天然和重组产生的人红细胞生成素。

[0035] 如本文所用,术语“N-聚糖”是指N-连接的寡糖,例如通过天冬酰胺N-乙酰基葡萄糖胺键与多肽的天冬酰胺残基连接的寡糖。N-聚糖具有Man3GlcNAc2的共同五糖核心(“Man”指甘露糖;“Glc”指葡萄糖;“NAc”指N-乙酰基;“GlcNAc”指N-乙酰基葡萄糖胺)。五糖核心可以被岩藻糖基化。关于N-聚糖使用的术语“三甘露糖核心”也指结构Man3GlcNAc2(“Man3”)。N-聚糖在包含添加到Man3核心结构中的外周糖(例如,岩藻糖[本文缩写为“Fuc”]和唾液酸)的分支(触角)数量方面不同。N-聚糖根据其分支成分分类(例如,高甘露糖,复合或杂合)。

[0036] 本文使用的缩写,包括糖的缩写,是本领域常用的。其他常见缩写包括“PNGase”,其是指肽N-糖苷酶F(EC 3.2.2.18)。底物UDP-GlcNAc是UDP-N-乙酰基葡萄糖胺的缩写。中间体ManNAc是N-乙酰基甘露糖胺的缩写。中间体ManNAc-6-P是N-乙酰基甘露糖胺-6-磷酸的缩写。中间体Sia-9-P是唾液酸-9-磷酸的缩写。中间体胞苷单磷酸-唾液酸缩写为“CMP-Sia”。唾液酸在本文中缩写为“Sia”、“Neu5Ac”、“NeuAc”或“NANA”。

[0037] 红细胞生成刺激蛋白(例如红细胞生成素)的N-聚糖,包括一个或多个与N-连接的寡糖的五糖核心结构结合的N-乙酰基乳糖胺单元。如本文所用,寡糖“分支”的数量是指与五糖核心结构结合的单独的寡糖链的数量。例如,如图2A所示,两个单独的寡糖链与五糖核心结构结合,因此,N-聚糖包含两个分支并且是双触角的。例如,如图2B所示,三个单独的寡糖链与五糖核心结构结合,因此,N-聚糖包含三个分支并且是三触角的。例如,如图2C所示,四个单独的寡糖链与五糖核心结构结合,因此,N-聚糖包含四个分支并且是四触角的。

[0038] 红细胞生成刺激蛋白(例如红细胞生成素)的N-聚糖,包括与N-连接的寡糖的五糖核心结构结合的聚N-乙酰基乳糖胺单元。本文所用的术语聚N-乙酰基乳糖胺“重复”是指一个寡糖分支内N-乙酰基乳糖胺单元的数量减去一(该“一”针对第一个N-乙酰基乳糖胺单元)。例如,如图2D所示,在一个寡糖分支内存在两个N-乙酰基乳糖胺单元,这意味着寡糖包含一个聚N-乙酰基乳糖胺重复。例如,如图2E所示,在一个寡糖分支内存在四个N-乙酰基乳糖胺单元,这意味着寡糖包含三个聚N-乙酰基乳糖胺重复。

[0039] 如本文所用,术语“唾液酸”是指一组分子,其中共同分子包括N-乙酰基-5-神经氨酸(Neu5Ac),其具有在5-碳位置上被连接的乙酰基修饰的碱性9-碳神经氨酸核心。Neu5Ac在5-碳位置的常见衍生物包括:2-酮-3-脱氧-d-甘油基-d-半乳糖醛酸(KDN),其具有代替乙酰基的羟基;5-N-乙酰基的去-N-乙酰化产生神经氨酸(Neu);S-N-乙酰基的羟基化产生N-羟乙酰基神经氨酸(Neu5Gc)。这四种分子(Neu5Ac、KDN、Neu和Neu5Gc)的4-、7-、8-和9-位的羟基可进一步被O-乙酰基、O-甲基、O-硫酸和磷酸基团取代,以扩大这组化合物。此外,已知存在不饱和的和脱氢形式的唾液酸。

[0040] 本文所用的术语“不含唾液酸”是指红细胞生成刺激蛋白的群,其基本上不含包含末端唾液酸部分的N-聚糖。在一个实施方案中,如本文所用的术语“不含唾液酸”是指红细胞生成刺激蛋白群,其包含相对频率的N-连接聚糖,其包括5%或更少的唾液酸部分。在一个实施方案中,不含唾液酸的红细胞生成刺激蛋白包含相对频率的N-连接聚糖,其包括约0%的唾液酸部分。

[0041] 如本文所提及的“相对频率的N-连接聚糖”是指与红细胞生成刺激蛋白群内的所有糖结构相关的红细胞生成刺激蛋白群内的不同聚糖模式的百分比。在一个实施方案中,相对频率的红细胞生成刺激蛋白群是指通过整个蛋白质的质量分析鉴定的与所有糖结构相关的红细胞生成刺激蛋白群内不同聚糖模式的百分比(在一个实施方案中如实施例2所述)。在一个实施方案中,相对频率的红细胞生成刺激蛋白群是指在用内切蛋白酶Glu-C酶消化后通过质量分析鉴定的与所有糖结构相关的红细胞生成刺激蛋白群中的不同聚糖模式的百分比(LCMS肽谱,在一个实施方案中,如实施例1中所述)。

[0042] 本文提及的术语“体外糖基工程化”是指在红细胞生成刺激蛋白在重组表达系统中表达后在体外进行红细胞生成刺激蛋白的N-连接聚糖结构的酶促改变,并且在一个优选实施方案中,红细胞生成刺激蛋白被纯化。本发明术语内的体外糖基工程化可包括至少一个糖残基从在体外经历糖基工程化的红细胞生成刺激蛋白群内包含的至少一部分红细胞生成刺激蛋白的N-连接聚糖结构中裂解。本发明术语内的体外糖基工程化总是还包括至少一个糖残基添加至在体外经历糖基工程化的红细胞生成刺激蛋白群内包含的至少一部分糖蛋白的N-连接聚糖结构中。

[0043] 本发明术语内的体外糖基工程化包括一系列酶处理红细胞生成刺激蛋白的步骤,所述红细胞生成刺激蛋白在重组表达系统中表达,并且在一个优选实施方案中,所述红细胞生成刺激蛋白被纯化。在一个实施方案中,所述酶处理包括用能够从红细胞生成刺激蛋白的N-连接寡糖结构中裂解末端糖残基的酶进行酶处理的至少一个步骤。在一个实施方案中,所述酶选自唾液酸酶。在一个实施方案中,所述酶处理包括用糖基转移酶处理红细胞生成刺激蛋白,在一个优选实施方案中,糖基转移酶能够将末端糖残基添加到红细胞生成刺激蛋白的N-连接寡糖结构中。在一个实施方案中,所述酶处理包括用N-乙酰基-葡萄糖胺转

移酶处理红细胞生成刺激蛋白,在一个优选的实施方案中,用 β -1,3-N-乙酰基葡萄糖胺基转移酶2 (B3GNT2) 处理。在一个实施方案中,B3GNT2包含SEQ ID NO:2的氨基酸序列。在一个实施方案中,B3GNT2由SEQ ID NO:2的氨基酸序列组成。在一个实施方案中,所述酶处理包括用半乳糖基转移酶处理红细胞生成刺激蛋白,在一个优选的实施方案中,用 β 1,4-半乳糖基转移酶1 (GalT1) 处理。在一个实施方案中,GalT1包含SEQ ID NO:3的氨基酸序列。在一个实施方案中,所述酶处理包括用N-唾液酸转移酶处理红细胞生成刺激蛋白,在一个优选实施方案中,用 α 2,3-唾液酸转移酶 (ST3) 或 α 2,6-唾液酸转移酶 (ST6) 处理。在一个实施方案中,N-唾液酸转移酶是ST3。

[0044] 术语酶促“处理”或酶“处理”是指将红细胞生成刺激蛋白在水溶液与相应的酶接触,优选在缓冲液中接触。

[0045] 2. 本发明实施方案的详细描述

[0046] 本发明涉及一种体外生产糖基工程化的红细胞生成刺激蛋白的方法,包括以下步骤:

[0047] a) 提供不含唾液酸的红细胞生成刺激蛋白,

[0048] b) 用N-乙酰基-葡萄糖胺转移酶B3GNT2处理红细胞生成刺激蛋白,

[0049] c) 用半乳糖基转移酶处理红细胞生成刺激蛋白,

[0050] d) 用唾液酸转移酶处理红细胞生成刺激蛋白。

[0051] 利用本发明,对重组生产的红细胞生成刺激蛋白进行一系列酶处理,以提供具有N-连接聚糖的红细胞生成刺激蛋白,其包含可控且可重复数量的聚-N-乙酰基乳糖胺重复,其可确保红细胞生成刺激蛋白的恒定产品质量和/或改善其生物学功能。利用本发明,与最初的红细胞生成刺激蛋白相比,可以增加聚-N-乙酰基乳糖胺重复的数量。以与上述相同的顺序进行一系列酶处理。

[0052] 在本发明的一个实施方案中,步骤a) 中提供的不含唾液酸的红细胞生成刺激蛋白包含相对频率的N-连接聚糖,其包括5%-0%的唾液酸。在本发明的一个实施方案中,步骤a) 中提供的不含唾液酸的红细胞生成刺激蛋白包含相对频率的N-连接聚糖,其包括2%至0%的唾液酸。在本发明的一个实施方案中,步骤a) 中提供的不含唾液酸的红细胞生成刺激蛋白包含相对频率的N-连接聚糖,其包括1%至0%的唾液酸。在本发明的一个实施方案中,步骤a) 中提供的不含唾液酸的红细胞生成刺激蛋白包含相对频率的N-连接聚糖,其包括约0%的唾液酸。

[0053] 在本发明的一个实施方案中,通过用唾液酸酶处理红细胞生成刺激蛋白来提供不含唾液酸的红细胞生成刺激蛋白。在一个实施方案中,通过在约37℃的水溶液中用唾液酸酶处理红细胞生成刺激蛋白来提供不含唾液酸的红细胞生成刺激蛋白。在一个实施方案中,通过在约37℃的水溶液中用唾液酸酶处理红细胞生成刺激蛋白10至24小时来提供不含唾液酸的红细胞生成刺激蛋白。在一个实施方案中,唾液酸酶是神经氨酸酶。在一个实施方案中,神经氨酸酶是SEQ ID NO:6。在一个实施方案中,通过在35-38℃的水溶液中用神经氨酸酶处理红细胞生成刺激蛋白来提供不含唾液酸的红细胞生成刺激蛋白。在一个实施方案中,通过在约37℃的水溶液中用神经氨酸酶处理红细胞生成刺激蛋白来提供不含唾液酸的红细胞生成刺激蛋白。在一个实施方案中,通过在约37℃的水溶液中用神经氨酸酶处理红细胞生成刺激蛋白10至24小时来提供不含唾液酸的红细胞生成刺激蛋白。在本发明的一个

实施方案中,在步骤b)的处理之前纯化唾液酸酶处理的红细胞生成刺激蛋白。

[0054] 在一个实施方案中,本发明的方法包括在酶处理之前提供重组生产的红细胞生成刺激蛋白的步骤。在一个优选的实施方案中,该方法包括在酶处理之前提供在CHO细胞中生产的红细胞生成刺激蛋白的步骤。在CHO细胞中生产红细胞生成刺激蛋白的方法是本领域熟知的(示例性地在CHO细胞中生产参见EP0205564;EP0148605;Egrie, J C, Strickland, T W, Lane, J等人(1986) *Immunobiol.* 72:213-224;Inoue N, Takeuchi M, Ohashi H, Suzuki T (1995) *Biotech Ann Rev.* 1:297-313)。

[0055] 在本发明方法的步骤b)中,将GlcNAc加入到步骤a)中提供的不含唾液酸的红细胞生成刺激蛋白的N-连接聚糖中。

[0056] 在本发明方法的一个实施方案中,步骤b)在UDP-N-乙酰基葡萄糖胺存在下在水溶液中进行。在本发明方法的一个实施方案中,步骤b)在pH 7-8下进行,在一个实施方案中在约pH 7.5下进行。在本发明方法的一个实施方案中,步骤b)在锰离子和钙离子存在下进行,在一个优选的实施方案中,在MnCl₂和CaCl₂存在下进行。在本发明方法的一个实施方案中,步骤b)在pH7-8的Tris缓冲液中、在NaCl、锰离子和钙离子存在下进行。在本发明方法的一个实施方案中,步骤b)在约pH 7.5的Tris缓冲液中进行,所述缓冲液包含约20至25mM Tris、约100至150mM NaCl、和约5至10mM MnCl₂和约5至10mM CaCl₂。在本发明方法的一个实施方案中,步骤b)的处理进行约10至30小时,在一个优选的实施方案中进行约16至约24小时。在本发明方法的一个实施方案中,步骤b)的处理在约37℃下进行约10至30小时。

[0057] 在本发明方法的一个实施方案中,步骤b)中红细胞生成刺激蛋白和N-乙酰基-葡萄糖胺转移酶B3GNT2之间的重量比>1:1。在本发明方法的一个实施方案中,步骤b)中红细胞生成刺激蛋白和N-乙酰基-葡萄糖胺转移酶B3GNT2之间的重量比小于100:1且大于1:1。在本发明方法的一个实施方案中,步骤b)中红细胞生成刺激蛋白和N-乙酰基-葡萄糖胺转移酶B3GNT2之间的重量比在2:1和1:1之间。在本发明方法的一个实施方案中,步骤b)中红细胞生成刺激蛋白和N-乙酰基-葡萄糖胺转移酶B3GNT2之间的重量比为约3:2。

[0058] 在一个实施方案中,本发明的方法包括在步骤b)之后和用半乳糖基转移酶处理之前纯化获得的红细胞生成刺激蛋白的步骤。由此,除去步骤b)中使用的糖基转移酶的活化糖底物。因此,避免了进一步不受控制地将GlcNAc部分添加到红细胞生成刺激蛋白中。这允许受控地增加聚-N-乙酰基乳糖胺重复的数量。

[0059] 在本发明方法的一个实施方案中,通过缓冲液交换到约pH6-7的水溶液中进行纯化获得的红细胞生成刺激蛋白的步骤,在一个优选的实施方案中,缓冲液交换到约pH6.5的水溶液中。在一个实施方案中,水溶液包含UDP-半乳糖。

[0060] 在本发明方法的一个实施方案中,通过在最大20kDa的分子量截止过滤器上缓冲液交换到约pH6.5的水性缓冲液中进行纯化获得的红细胞生成刺激蛋白的步骤,其中缓冲液包含约20mM锰离子。在一个实施方案中,缓冲液包含约20mM的MnCl₂。在一个实施方案中,水溶液包含约20mM锰离子和UDP-半乳糖。

[0061] 在本发明方法的步骤c)中,将Gal加入到步骤b)中加入到N-连接聚糖中的GlcNAc部分中。

[0062] 在本发明的一个实施方案中,用半乳糖基转移酶GalT1进行步骤c)中的红细胞生成刺激蛋白的处理。在一个优选的实施方案中,用SEQ ID NO.4的半乳糖基转移酶GalT1进

行步骤c)中的红细胞生成刺激蛋白的处理。

[0063] 在本发明方法的一个实施方案中,在UDP-半乳糖存在下使用半乳糖基转移酶GalT1进行步骤c)。在本发明方法的一个实施方案中,在pH6-7的水性缓冲液中进行步骤c),在一个优选的实施方案中,约pH6.5,其中缓冲液包含约20mM的锰离子,在一个优选的实施方案中为MnCl₂。在本发明方法的一个实施方案中,在约32至37℃下进行步骤c)。在本发明方法的一个实施方案中,步骤c)在约32至37℃下进行4至10小时。

[0064] 在本发明方法的一个实施方案中,步骤c)的处理进行约2至10小时,在一个优选的实施方案中进行约3至约5小时。

[0065] 在本发明方法的一个实施方案中,步骤c)中红细胞生成刺激蛋白和半乳糖基转移酶(在一个实施方案中为GalT1)之间的重量比>1:1。在本发明方法的一个实施方案中,步骤c)中红细胞生成刺激蛋白和半乳糖基转移酶(在一个实施方案中为GalT1)之间的重量比在15:1和1:1之间。在本发明方法的一个实施方案中,步骤c)中红细胞生成刺激蛋白和半乳糖基转移酶(在一个实施方案中为GalT1)之间的重量比在15:1和2:1之间。

[0066] 在一个实施方案中,本发明的方法包括在步骤c)之后和用唾液酸转移酶处理之前纯化获得的红细胞生成刺激蛋白的步骤。由此,除去步骤c)中使用的糖基转移酶的活化糖底物。因此,避免了进一步不受控制地将Gal部分添加到红细胞生成刺激蛋白中。这允许受控地增加聚-N-乙酰基乳糖胺重复的数量。

[0067] 在一个实施方案中,本发明的方法包括在步骤c)之后和用唾液酸转移酶处理之前纯化获得的红细胞生成刺激蛋白的步骤,包括除去半乳糖基转移酶(在一个实施方案中为GalT1)的步骤。在一个实施方案中,通过离子交换色谱法除去半乳糖基转移酶(在一个实施方案中为GalT1)。这允许在随后的唾液酸化步骤中受控地增加聚-N-乙酰基乳糖胺重复的数量和更好的底物转化。

[0068] 在本发明方法的一个实施方案中,通过缓冲液交换至约pH6-7的水溶液中进行步骤c)之后纯化获得的红细胞生成刺激蛋白的步骤,在一个优选实施方案中约pH6.5。在一个实施方案中,水溶液包含CMP-N-乙酰基神经氨酸。

[0069] 在本发明方法的一个实施方案中,通过在最大20kDa的分子量截止过滤器上缓冲液交换至约pH6.5的水性缓冲液中进行在步骤c)之后纯化获得的红细胞生成刺激蛋白的步骤。在本发明方法的一个实施方案中,通过在最大20kDa的分子量截止过滤器上缓冲液交换至约pH6.5的水性缓冲液中进行在步骤c)之后纯化获得的红细胞生成刺激蛋白的步骤,所述水性缓冲液包含CMP-N-乙酰基神经氨酸。

[0070] 在本发明方法的步骤d)中,将唾液酸加入到步骤c)中加入到N-连接聚糖中的Gal部分中。

[0071] 在本发明方法的一个实施方案中,用唾液酸转移酶ST3处理步骤d)中的红细胞生成刺激蛋白。在一个优选的实施方案中,用SEQ ID NO:4的唾液酸转移酶ST3处理步骤d)中的红细胞生成刺激蛋白。这允许产生具有高相对频率的 α -2,3-唾液酸化的N-聚糖的红细胞生成刺激蛋白。高相对频率的唾液酸化的N-聚糖另外可有助于红细胞生成刺激蛋白的更高的比生物学活性和更高的血清半衰期。

[0072] 在本发明方法的一个实施方案中,在一个实施方案中,如上所述的使用唾液酸转移酶ST3的方法,在CMP-N-乙酰基神经氨酸存在下进行步骤d)。在本发明方法的一个实施方

案中,在pH6-7的水性缓冲液中进行步骤d),在一个优选的实施方案中,pH为约6.5。在本发明方法的一个实施方案中,步骤d)进行10至20小时,在一个优选的实施方案中进行约16至约18小时。在本发明方法的一个实施方案中,步骤d)进行10至20小时,在一个优选实施方案中,在约37℃下进行约16小时至约18小时。

[0073] 在本发明方法的一个实施方案中,步骤d)中红细胞生成刺激蛋白和唾液酸转移酶(在一个实施方案中为ST3)之间的重量比为>1:1。在本发明方法的一个实施方案中,步骤d)中红细胞生成刺激蛋白和唾液酸转移酶(在一个实施方案中为ST3)之间的重量比在>1:1和50:1之间。在本发明方法的一个实施方案中,步骤d)中红细胞生成刺激蛋白和唾液酸转移酶(在一个实施方案中为ST3)之间的重量比在2:1和50:1之间。

[0074] 在本发明的一个实施方案中,用唾液酸转移酶ST6处理步骤d)中红细胞生成刺激蛋白。在一个优选的实施方案中,用SEQ ID NO:5的唾液酸转移酶ST6处理步骤d)中的红细胞生成刺激蛋白。

[0075] 本发明还涉及本发明的方法用于增加红细胞生成刺激蛋白的N-聚糖上的聚-N-乙酰基乳糖胺重复数量的用途。

[0076] 本发明的另一方面是本发明的方法,用于增加红细胞生成刺激蛋白的N-聚糖上的聚-N-乙酰基乳糖胺重复数量。

[0077] 本发明的另一方面是本发明的方法用于提供红细胞生成刺激蛋白的用途,所述红细胞生成刺激蛋白在红细胞生成刺激蛋白的N-聚糖上具有受控数量的聚-N-乙酰基乳糖胺重复。在一个实施方案中,该方法用于提供红细胞生成刺激蛋白,所述红细胞生成刺激蛋白的每个N-糖基化位点具有多达15个聚-N-乙酰基乳糖胺重复。在一个实施方案中,该方法用于提供红细胞生成刺激蛋白,所述红细胞生成刺激蛋白的每个N-糖基化位点具有2-15个聚-N-乙酰基乳糖胺重复。在一个实施方案中,该方法用于提供红细胞生成刺激蛋白,所述红细胞生成刺激蛋白的每个N-糖基化位点具有2-12个聚-N-乙酰基乳糖胺重复。在一个实施方案中,该方法用于提供红细胞生成刺激蛋白,所述红细胞生成刺激蛋白的每个N-糖基化位点具有4-10个聚-N-乙酰基乳糖胺重复。

[0078] 在一个实施方案中,该方法用于提供红细胞生成刺激蛋白,每个红细胞生成刺激蛋白具有多达15个聚-N-乙酰基乳糖胺重复。在一个实施方案中,该方法用于提供红细胞生成刺激蛋白,每个红细胞生成刺激蛋白具有2-15个聚-N-乙酰基乳糖胺重复。

[0079] 本发明的另一方面是本发明的方法用于改善红细胞生成刺激蛋白的比活性的用途。

[0080] 本发明的另一方面是通过本发明的方法生产的体外糖基工程化的红细胞生成刺激蛋白。

[0081] 本发明的另一方面是红细胞生成刺激蛋白群,其特征在于在每个N-糖基化位点上包含多于两个聚-N-乙酰基乳糖胺重复的N-连接聚糖的相对频率大于90%,在一个实施方案中,大于99%,在一个实施方案中为约100%,在一个实施方案中为100%。

[0082] 在本发明的红细胞生成刺激蛋白群中,所有红细胞生成刺激蛋白包含2个或更多个聚-N-乙酰基乳糖胺重复。因此,本发明的红细胞生成刺激蛋白群不含具有零个或一个聚-N-乙酰基乳糖胺重复的红细胞生成刺激蛋白。在这方面,“不含”(具有零个或一个聚-N-乙酰基乳糖胺重复的红细胞生成刺激蛋白)是指0.1%和更低的分数,在一个实施方案中是

0%的分数。这里的术语“分数”是指样品中分子的数量,例如1%的分数意味着在100个红细胞生成刺激蛋白分子中的一个红细胞生成刺激蛋白。

[0083] 本发明的另一方面是红细胞生成刺激蛋白群,其特征在于每个单独的红细胞生成刺激蛋白的平均聚-N-乙酰基乳糖胺重复的数量为至少10。在一个实施方案中,每个红细胞生成刺激蛋白的平均聚-N-乙酰基乳糖胺重复的数量为10至40。

[0084] 在一个实施方案中,本发明的红细胞生成刺激蛋白群的特征在于在每个N-糖基化位点上包含多于两个聚-N-乙酰基乳糖胺重复的N-连接聚糖的相对频率大于99%,在一个实施方案中约为100%,在一个实施方案中为100%;并且每个红细胞生成刺激蛋白的平均聚-N-乙酰基乳糖胺重复的数量大于10,在一个实施方案中为10-40。在一个实施方案中,每个N-糖基化位点的聚-N-乙酰基乳糖胺重复的平均数量为至少2。在一个实施方案中,每个N-糖基化位点的聚-N-乙酰基乳糖胺重复的平均数量为至少3。

[0085] 在一个实施方案中,通过本发明的方法生产红细胞生成刺激蛋白群。

[0086] 3. 本发明的具体实施方案

[0087] 在下文中列出了本发明的具体实施方案。

[0088] 1. 一种体外生产糖基工程化的红细胞生成刺激蛋白的方法,包括以下步骤:

[0089] a) 提供不含唾液酸的红细胞生成刺激蛋白,

[0090] b) 用N-乙酰基-葡萄糖胺转移酶B3GNT2处理红细胞生成刺激蛋白,

[0091] c) 用半乳糖基转移酶处理红细胞生成刺激蛋白,

[0092] d) 用唾液酸转移酶处理红细胞生成刺激蛋白。

[0093] 2. 根据实施方案1所述的方法,其中所述红细胞生成刺激蛋白是红细胞生成素。

[0094] 3. 根据前述实施方案中任一项所述的方法,其特征不在于步骤b) 在UDP-N-乙酰基葡萄糖胺存在的水溶液中进行。

[0095] 4. 根据前述实施方案中任一项所述的方法,其特征不在于步骤b) 在pH7-8下进行。

[0096] 5. 根据前述实施方案中任一项所述的方法,其特征不在于步骤b) 在约pH7.5下进行。

[0097] 6. 根据前述实施方案中任一项所述的方法,其特征不在于步骤b) 在锰离子和钙离子存在下进行。

[0098] 7. 根据前述实施方案中任一项所述的方法,其特征不在于步骤b) 在MnCl₂和CaCl₂存在下进行。

[0099] 8. 根据实施方案1至4之一所述的方法,其特征不在于步骤b) 在pH7-8的Tris缓冲液中,在NaCl、锰离子和钙离子存在下进行。

[0100] 9. 根据前述实施方案中任一项所述的方法,其特征不在于步骤b) 在约pH7.5的Tris缓冲液中进行,所述缓冲液包含约25mM Tris、约150mM NaCl和约10mM MnCl₂和约10mM CaCl₂。

[0101] 10. 根据前述实施方案中任一项所述的方法,其中步骤b) 的处理进行约10至30小时。

[0102] 11. 根据前述实施方案中任一项所述的方法,其中步骤b) 的处理进行约16至约24小时。

[0103] 12. 根据前述实施方案中任一项所述的方法,其中步骤b) 的处理在约37℃下进行。

[0104] 13. 根据前述实施方案中任一项所述的方法,步骤b) 中红细胞生成刺激蛋白和N-

乙酰基-葡萄糖胺转移酶B3GNT2之间的重量比为>1:1。

[0105] 14. 根据前述实施方案中任一项所述的方法,其特征在於该方法包括在步骤b)之后和用半乳糖基转移酶处理之前纯化获得的红细胞生成刺激蛋白的步骤。

[0106] 15. 根据实施方案14所述的方法,其中通过缓冲液交换到约pH6-7的水溶液中进行纯化获得的红细胞生成刺激蛋白的步骤。

[0107] 16. 根据实施方案14所述的方法,其中通过缓冲液交换到约pH6.5的水溶液中进行纯化获得的红细胞生成刺激蛋白的步骤。

[0108] 17. 根据实施方案14-16之一所述的方法,其中通过在最大20kDa的分子量截止滤器上缓冲液交换到约pH6.5的水性缓冲液中进行纯化获得的红细胞生成刺激蛋白的步骤,其中缓冲液包含约20mM的锰离子。

[0109] 18. 根据实施方案17所述的方法,其中缓冲液包含约20mM MnCl_2 。

[0110] 19. 根据实施方案17或18所述的方法,其中缓冲液包含UDP-半乳糖。

[0111] 20. 根据前述实施方案中任一项所述的方法,其特征在於步骤c)在UDP-半乳糖存在下使用半乳糖基转移酶GalT1进行。

[0112] 21. 根据实施方案20所述的方法,其特征在於步骤c)在pH6-7的水性缓冲液中进行,其中缓冲液包含锰离子。

[0113] 22. 根据实施方案21所述的方法,其中缓冲液的pH为约6.5。

[0114] 23. 根据实施方案21或22所述的方法,其中缓冲液包含20mM锰离子。

[0115] 24. 根据实施方案21至23之一所述的方法,其中缓冲液包含 MnCl_2 。

[0116] 25. 根据实施方案20至24之一所述的方法,其中步骤c)的处理进行约2至10小时。

[0117] 26. 根据实施方案20至24之一所述的方法,其中步骤c)的处理进行约3至约5小时。

[0118] 27. 根据实施方案20至26之一所述的方法,其中步骤c)中红细胞生成刺激蛋白和半乳糖基转移酶之间的重量比>1:1。

[0119] 28. 根据前述实施方案中任一项所述的方法,其特征在於该方法包括在步骤c)之后和用唾液酸转移酶处理之前纯化获得的红细胞生成刺激蛋白的步骤。

[0120] 29. 根据实施方案28所述的方法,其中通过缓冲液交换到约pH6-7的水溶液中进行纯化获得的红细胞生成刺激蛋白的步骤。

[0121] 30. 根据实施方案28所述的方法,其中通过缓冲液交换到约pH6.5的水溶液中进行纯化获得的红细胞生成刺激蛋白的步骤。

[0122] 31. 根据实施方案28至30之一所述的方法,其中通过在最大20kDa的分子量截止滤器上缓冲液交换到约pH6.5的水性缓冲液中进行纯化获得的红细胞生成刺激蛋白的步骤。

[0123] 32. 根据实施方案29至31之一所述的方法,其中所述水溶液包含CMP-N-乙酰基神经氨酸。

[0124] 33. 根据前述实施方案中任一项所述的方法,其特征在於步骤d)使用唾液酸转移酶ST3进行。

[0125] 34. 根据实施方案33所述的方法,其特征在於步骤d)在CMP-N-乙酰基神经氨酸存在下进行。

[0126] 35. 根据实施方案33或34所述的方法,其中步骤d)在pH6-7的水性缓冲液中进行。

[0127] 36. 根据实施方案33或34所述的方法,其中步骤d)在约pH6.5的水性缓冲液中进行。

行。

[0128] 37. 根据实施方案33至36之一所述的方法, 其中步骤d) 进行10至20小时。

[0129] 38. 根据实施方案33至36之一所述的方法, 其中步骤d) 进行约16至约18小时。

[0130] 39. 根据实施方案33至38之一所述的方法, 其中步骤d) 在约37℃下进行。

[0131] 40. 根据实施方案33至39之一所述的方法, 其中步骤d) 中红细胞生成刺激蛋白和唾液酸转移酶之间的重量比为>1:1。

[0132] 41. 根据前述实施方案中任一项所述的方法, 其中不含唾液酸的红细胞生成刺激蛋白包含相对频率的N-连接聚糖, 其包括5%-0%的唾液酸。

[0133] 42. 根据前述实施方案中任一项所述的方法, 其中不含唾液酸的红细胞生成刺激蛋白包含相对频率的N-连接聚糖, 其包括2%-0%的唾液酸。

[0134] 43. 根据前述实施方案中任一项所述的方法, 其中不含唾液酸的红细胞生成刺激蛋白包含相对频率的N-连接聚糖, 其包括1%-0%的唾液酸。

[0135] 44. 根据前述实施方案中任一项所述的方法, 其中不含唾液酸的红细胞生成刺激蛋白包含相对频率的N-连接聚糖, 其包括约0%的唾液酸。

[0136] 45. 根据前述实施方案中任一项所述的方法, 其特征在于通过用唾液酸酶处理红细胞生成刺激蛋白来提供不含唾液酸的红细胞生成刺激蛋白。

[0137] 46. 根据前述实施方案中任一项所述的方法, 其包括在酶处理之前提供在CHO细胞中生产的红细胞生成刺激蛋白的步骤。

[0138] 47. 根据前述实施方案中任一项所述的方法用于增加红细胞生成刺激蛋白的N-聚糖上聚-N-乙酰基乳糖胺重复的数量的用途。

[0139] 48. 根据实施方案1至46之一的方法用于提供红细胞生成刺激蛋白的用途, 所述红细胞生成刺激蛋白在其N-聚糖上具有受控的聚-N-乙酰基乳糖胺重复的数量。

[0140] 49. 根据实施方案1至46之一所述的方法用于提供红细胞生成刺激蛋白的用途, 所述红细胞生成刺激蛋白的每个N-糖基化位点具有多达15个聚-N-乙酰基乳糖胺重复。

[0141] 50. 根据实施方案49所述的用于提供红细胞生成刺激蛋白的用途, 所述红细胞生成刺激蛋白的每个N-糖基化位点具有2个或更多个聚-N-乙酰基乳糖胺重复。

[0142] 51. 根据实施方案1至46之一所述的方法用于改善红细胞生成刺激蛋白的比活性的用途。

[0143] 52. 通过实施方案1至46中任一项所述的方法生产的体外糖基工程化的红细胞生成刺激蛋白。

[0144] 53. 通过实施方案1至46中任一项所述的方法生产的体外糖基工程化的红细胞生成素。

[0145] 54. 一种红细胞生成刺激蛋白群, 其特征在于在每个N-糖基化位点上包含多于两个聚-N-乙酰基乳糖胺重复的N-连接聚糖的相对频率大于90%。

[0146] 55. 根据实施方案54所述的红细胞生成刺激蛋白群, 其中在每个N-糖基化位点上包含多于两个聚-N-乙酰基乳糖胺重复的N-连接聚糖的相对频率大于99%。

[0147] 56. 根据实施方案54所述的红细胞生成刺激蛋白群, 其中在每个N-糖基化位点上包含多于两个聚-N-乙酰基乳糖胺重复的N-连接聚糖的相对频率为约100%。

[0148] 57. 根据实施方案54所述的红细胞生成刺激蛋白群, 其中在每个N-糖基化位点上

包含多于两个聚-N-乙酰基乳糖胺重复的N-连接聚糖的相对频率为100%。

[0149] 58. 根据实施方案54至57之一所述的红细胞生成刺激蛋白群, 其中所述红细胞生成刺激蛋白群不含具有零个或一个聚-N-乙酰基乳糖胺重复的红细胞生成刺激蛋白。

[0150] 59. 根据实施方案54至57之一所述的红细胞生成刺激蛋白群, 其中所述红细胞生成刺激蛋白群包含0.1%和更少的具有零个或一个聚-N-乙酰基乳糖胺重复的红细胞生成刺激蛋白的分数。

[0151] 60. 根据实施方案54至57之一所述的红细胞生成刺激蛋白群, 其中所述红细胞生成刺激蛋白群包含0%的具有零个或一个聚-N-乙酰基乳糖胺重复的红细胞生成刺激蛋白的分数。

[0152] 61. 根据实施方案54至60之一所述的红细胞生成刺激蛋白群, 其中每个单独的红细胞生成刺激蛋白的聚-N-乙酰基乳糖胺重复的平均数量为至少4。

[0153] 62. 根据实施方案54至60之一所述的红细胞生成刺激蛋白群, 其中每个单独的红细胞生成刺激蛋白的聚-N-乙酰基乳糖胺重复的平均数量为至少10。

[0154] 63. 根据实施方案54至62之一所述的红细胞生成刺激蛋白群, 其中每个单独的红细胞生成刺激蛋白的聚-N-乙酰基乳糖胺重复的平均数量高达40。

[0155] 64. 根据实施方案54至63之一所述的红细胞生成刺激蛋白群, 其中所述红细胞生成刺激蛋白是红细胞生成素。

[0156] 氨基酸序列的描述

[0157] SEQ ID NO:1红细胞生成素165aa

[0158] APPRLICDSRVLERYLLEAKEAENITTGCAEHCSLNENITVPDTKVNIFYAW
KRMEVGQQAVEVWQGLALLSEAVLRGQALLVNSSQPWEPLQLHVDKAVSGL
RSLTTLLRALGAQKEAISPDAASAAPLRTITADTFRKLFRVYSNFLRGKL
KLYTGEACRTGD

[0159] SEQ ID NO:2N-乙酰基-葡萄糖胺转移酶B3GNT2

[0160] MVSRSVLGILMMANVFIYFIMEVSKSSSQEKNKGGEV IIPKEKFWKISTPP
EAYWNREQEKLNRQYNPILSMLTNQTGEAGRLSNISHLNYCEPDLRVTSV
TGFNNLPDRFKDFLLYLRCRNYSLLIDQPKCAKKPFLLLAIKSLTPHFAR
RQAIRESWGQESNAGNQTVVRVFLLGQTPPEDNHPDLSDMLKFESEKHQDI
LMWNYRDTFFNLSLKEVLFWRVSTSCPDTEFVFKGDDDVFNTHILNYL
NSLSKTKAKDLFIGDVIHNAGPHRDKKLYYIPEVVYSGLYPPYAGGGGFL
YSGHLALRLYHITDQVHLYPIDDVYTMCLQKGLVPEKHKGFRFTDIEEK
NKNNICSYVDLMLVHSRKPQEMIDIWSQLQSAHLKC

[0161] SEQ ID NO:3半乳糖基转移酶GalT1

[0162] MGVHECPAWLWLLLSLLSLPLGLPVLGAPRDL SRLPQLVG VSTPLQGGSNS
AAAIGQSSGELRTGGARPPPPLGASSQPRPGGDSSPVVDSGPGPASNLTSV
PVPHTTALSPLACPEESPLLVGPM LIEFNMPVDLELVAKQNPV KMGGRYA
PRDCVSPHKVAIIIPFRNRQEHLYWLYLHPVLQRQQLDYG IYVINQAGD
TIFNRAKLLNVGFQEAL KDYDYTCFVFSVDVLI PMNDHNAYRCFSQPRHIS
VAMDKFGFSLPYVQYFGGVSA LSKQQLTINGFPNNYWG WGGEDDDIFNRL
VFRGMSISRPNAVVGRCRMIRHSRDKKNEPNPQRFDRIAHTKETMLS DGLN
SLTYQVLDVQRYPLYTQITVDIGTPS

[0163] SEQ ID NO:4人 α 2,3-唾液酸转移酶(ST3)

- [0164] MGVEHCPAWLWLLLSLLSLPLGLPVLGVAPVEMKRRNKIQPCLSKPAFASL
LRFHQFHPFLCAADFRKIASLYGSDKFDLPYGMRTSAEYFRLALSKLQSCD
LFDEFDNI PCKKCVVVGNGGVLKNKTLGEKIDSVDV IIRMNNGPVLGHEEE
VGRRTTFRFLFYPESVFSDFIHNDPNTTVILTAFKPHDLRWLLELLMGDKIN
TNGFWKKPALNLIYKPYQIRILDFFIIRTAAYELLHFVKVPKNQKPKHPT
TGI IAITLAFYICHEVHLAGFKYNFSDLKSPLHYGNATMSLMNKNAYHNV
TAEQLFLKDI IEKNLVINLTQD
- [0165] SEQ ID NO:5人 α 2,6-唾液酸转移酶 (ST6)
MGVEHCPAWLWLLLSLLSLPLGLPVLGAPEASFQVWNKDSSSKNLI PRLQK
IWKNYLSMNKYKVS YKGGPGIKFSAEALRCHLRDHVNVSMVEVTDFFPNT
SEWEGYLPKESIRTKAGPWGRCAVVSSAGSLKSSQLGREIDDHDAVLRFG
[0166] APTANFQQDVGTKT TIRLMNSQLVTTEKRFLKDSLYNEGILIVWDP SVYHS
DIPKQYQNP DYNNFFNNTYRKLHPNQPFYILKPQMPWELWDILQEISPEE
IQPNPSSGMLGIIIMMTLCDQVDIYEFLPSKRKTDVCYYYQKFFDSACTM
GAYHPLLIEKNLVKHLNQGTDEDIYLLGKATLPGFRTIHC
- [0167] SEQ ID NO:6来自产气荚膜杆菌 (*Clostridium perfringens*) 的神经氨酸酶
MCNKNNTFEKNLDISHKPEPLILFNKDNNIWNskyFRIPNIQLLNDGTILT
FSDIRYNGPDDHAYIDIASARSTDFGKTWSYNIAMKNNRIDSTYSRVMDST
TVITNTGRIIL IAGSWNTNGNWAMTTSTRSDWSVQMIYSDDNGLTWSNKI
[0168] DLTKDSSKVKNQPSNTIGWLGGVSGIVMDDGTIVMPAQISLRENNENNY
SLIIYSKDNGETWTMGNKVPNSNTSENMVIELDGALIMSTRYDYSGYRAAY
ISHDLGTTWEIYEPLNGKILTGKGSGCQGSFIKATTSNHGRIGLISAPKNT
KGEYIRDNI AVYMIDFDDL SKGVQEICIPYPEDGNKLGGSCLSFKNHNL
GIVYEANGNIEYQDLTPYYS LINKQ
- [0169] 实施例
- [0170] 提供以下实施例以帮助理解本发明,本发明的真实范围在所附权利要求中阐述。
应理解,可以在不脱离本发明精神的情况下对所述步骤进行修改。
- [0171] 实施例1:
- [0172] 通过体外EPO糖基工程化增加聚-N-乙酰基乳糖胺重复的数量(在B3Gnt2和GalT1
处理之间无纯化)
- [0173] 通过在CHO细胞中的重组生产提供红细胞生成素(EPO)(也参见EP0205564;
EP0148605)。
- [0174] 重组EPO的体外糖基工程化(IVGE)处理如下进行:
- [0175] 通过与神经氨酸酶(Roche)在pH7.5的水性缓冲液中于37℃孵育18小时使EPO去唾
液酸化。
- [0176] 为了将GlcNAc部分加入N-连接的聚糖中,将1.5mg去唾液酸化的红细胞生成素与
1.0mg N-乙酰基葡萄糖胺转移酶B3Gnt2(溶于25mM Tris,150mM NaCl,pH7.5)混合。将
8.8mg UDP-N-乙酰基葡萄糖胺、2.5mg MnCl₂和2.2mg CaCl₂(各自溶于水中)加入到该溶液
中。将样品在37℃下孵育24小时。
- [0177] 随后,为了将Gal部分加入到N-连接的聚糖,加入149μg半乳糖基转移酶GalT1和
3mg UDP-半乳糖,然后在37℃孵育5小时。
- [0178] 最后,加入54μg唾液酸转移酶ST3、70mg CMP-N-乙酰基-神经氨酸、17μg碱性磷酸
酶和20μl 10mM ZnCl₂溶液,并在37℃下孵育18小时。
- [0179] 在内切蛋白酶Glu-C消化后通过LCMS肽谱分析获得的体外糖基工程化红细胞生成
素的N-连接聚糖上存在的糖结构。为此,将250μg样品变性(使用盐酸胍)、还原(使用二硫苏
糖醇)、羧甲基化(使用碘乙酸)、最后用内切蛋白酶Glu-C消化。通过在线连接质谱仪的RP-

UHPLC分析消化物。评估所得数据集的具有N-糖基化位点(天冬酰胺24、38和83)的肽的特定聚糖信号。

[0180] 结果显示在下表中,比较重组产生的未用任何糖苷酶或糖基转移酶处理的红细胞生成素(“IVGE之前的EP0”)和由前述本发明方法得到的红细胞生成素(“IVGE后的EP0”)。术语“重复”是指如上定义的聚N-乙酰基乳糖胺重复。

[0181] 表1:IVGE之前的EP0(比较数据)

[0182] 表示在指定的N-糖基化位点处存在的相应N-聚糖上包含0、1、2或多于2个聚N-乙酰基乳糖胺重复的红细胞生成素糖蛋白的分数。

[0183]

	0个重复[%]	1个重复[%]	2个重复[%]	>2个重复[%]
Asn 24	76	18	6	0
Asn 38	66	27	7	0
Asn 83	64	28	8	0

[0184] 表2:IVGE之前的EP0(比较数据)

[0185]

每个EP0分子重复的平均数量:	~1
具有1个和更少重复的EP0分子的分数:	79%
具有2个和更多个重复的EP0分子的分数:	21%

[0186] 表3:IVGE后的EP0

[0187] 表示在指定的N-糖基化位点处存在的相应N-聚糖上包含0、1、2或多于2个聚N-乙酰基乳糖胺重复的红细胞生成素糖蛋白的分数。

[0188]

	0个重复[%]	1个重复[%]	2个重复[%]	>2个重复[%]
Asn 24	0	0	0	100
Asn 38	0	0	0	100
Asn 83	0	0	0	100

[0189] 表4:IVGE后的EP0

[0190] 表示在指定的N-糖基化位点处存在的相应N-聚糖上的聚N-乙酰基乳糖胺重复数量的最小数量和范围。

[0191]

	最小重复数量	重复数量的范围
Asn 24	4	4-12
Asn 38	8	8-13
Asn 83	8	8-12

[0192] 表5:IVGE后的EP0

[0193]

每个EP0分子重复的平均数量:	≥ 20
具有1个和更少重复的EP0分子的分数:	0%
具有2个和更多个重复的EP0分子的分数:	100%

[0194] 结果表明IVGE步骤产生EP0分子群,其中所有单独的EP0分子在每个N-糖基化位点上包含几个聚N-乙酰基乳糖胺重复。所有EP0分子包含每个分子至少20个聚N-乙酰基乳糖胺重复。

[0195] CHO产生的未处理的EP0包含分数为79%的具有每个EP0分子零个或一个聚N-乙酰基乳糖胺重复的单独分子。

[0196] 实施例2:

[0197] 通过EP0的体外糖基工程化受控的聚-N-乙酰基乳糖胺重复的数量(B3Gnt2和GalT1处理之间以及GalT1和ST3处理之间的纯化步骤)

[0198] 如实施例1中那样,通过在CHO细胞中重组生产提供红细胞生成素(EP0)。

[0199] 重组EP0的体外糖基工程化(IVGE)处理如下进行:

[0200] 如实施例1中所述,将EP0去唾液酸化。

[0201] 为了将GlcNAc部分加入N-连接的聚糖,将90 μ g去唾液酸化的红细胞生成素糖蛋白与60 μ g N-乙酰基葡萄糖胺转移酶B3Gnt2(溶于25mM Tris,150mM NaCl,pH7.5)和525 μ g UDP-N-乙酰基葡萄糖胺在pH7.5的25mM Tris缓冲液(包含10mM CaCl₂和10mM MnCl₂)中混合。将样品在37 $^{\circ}$ C下孵育16小时。含有EP0糖蛋白的样品的三分之一用于分析目的。

[0202] 使用Vivaspin离心柱(10kD滤器),通过缓冲液交换至100mM MES缓冲液(含有20mM MnCl₂和20mM UDP-半乳糖,pH 6.5)纯化EP0糖蛋白的残余物质。

[0203] 为了将Gal部分加入到N-连接的聚糖,将27 μ g半乳糖基转移酶GalT1加入到EP0糖蛋白样品中,随后在32 $^{\circ}$ C孵育4小时。随后,将一半材料用于分析目的。

[0204] 通过缓冲液交换至100mM MES,pH6.5(包含150mg/ml CMP-N-乙酰基-神经氨酸)纯化EP0糖蛋白的残余物质。加入27 μ g唾液酸转移酶ST3,然后在37 $^{\circ}$ C孵育16小时。

[0205] 通过质谱法进行所获得的体外糖基工程化红细胞生成素的N-连接聚糖上存在的糖结构的分析。为此,将样品注入UHPLC系统,无进一步的样品制备。UHPLC系统与质谱仪连接。评估数据集(解卷积的和光谱)的聚糖特异性信号。

[0206] 结果显示在以下数据集中,比较重组产生的未用任何糖苷酶或糖基转移酶处理的红细胞生成素(“IVGE之前的EP0”)和由前述本发明方法得到的红细胞生成素(“IVGE后的EP0”)。术语“重复”是指如上定义的聚N-乙酰基乳糖胺重复。

[0207] 表6:IVGE之前的EP0(比较数据)

[0208]	每个 EPO 分子重复的平均数量:	0 ₁
	具有 1 个和更少重复的 EPO 分子的分:	80 %
	具有 2 个和更多个重复的 EPO 分子的分:	20 %

[0209] 表7:IVGE后的EP0

[0210]	每个 EPO 分子重复的平均数量:	≥ 12
	具有 1 个和更少重复的 EPO 分子的分:	0 %
	具有 2 个和更多个重复的 EPO 分子的分:	100 %

[0211] CHO产生的未处理的EP0包含80%的具有每个EP0分子零个或一个聚N-乙酰基乳糖

胺重复的单独分子的分数,而体外糖基工程化的EP0包含100%的具有2个或更多个聚N-乙酰基乳糖胺重复的EP0糖蛋白。每EP0糖蛋白的聚N-乙酰基乳糖胺重复的平均数量为12或更多,而CHO产生的未处理的EP0包含每EP0糖蛋白约1个聚N-乙酰基乳糖胺重复。

序列表

<110> 豪夫迈·罗氏有限公司

<120> 一种体外糖基工程化红细胞生成刺激蛋白的方法

<130> P34172-WO (MME)

<150> EP 17161883.8

<151> 2017-03-20

<160> 6

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 165

<212> PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 1

[0001]

Ala Pro Pro Arg Leu Ile Cys Asp Ser Arg Val Leu Glu Arg Tyr Leu
1 5 10 15

Leu Glu Ala Lys Glu Ala Glu Asn Ile Thr Thr Gly Cys Ala Glu His
20 25 30

Cys Ser Leu Asn Glu Asn Ile Thr Val Pro Asp Thr Lys Val Asn Phe
35 40 45

Tyr Ala Trp Lys Arg Met Glu Val Gly Gln Gln Ala Val Glu Val Trp
50 55 60

Gln Gly Leu Ala Leu Leu Ser Glu Ala Val Leu Arg Gly Gln Ala Leu
65 70 75 80

Leu Val Asn Ser Ser Gln Pro Trp Glu Pro Leu Gln Leu His Val Asp
85 90 95

Lys Ala Val Ser Gly Leu Arg Ser Leu Thr Thr Leu Leu Arg Ala Leu
100 105 110

Gly Ala Gln Lys Glu Ala Ile Ser Pro Pro Asp Ala Ala Ser Ala Ala
115 120 125

Pro Leu Arg Thr Ile Thr Ala Asp Thr Phe Arg Lys Leu Phe Arg Val
130 135 140

Tyr Ser Asn Phe Leu Arg Gly Lys Leu Lys Leu Tyr Thr Gly Glu Ala
145 150 155 160

Cys Arg Thr Gly Asp
165

<210> 2

<211> 393

<212> PRT

<213> 智人

<400> 2

Met Val Ser Arg Ser Leu Val Gly Ile Leu Met Met Ala Asn Val Phe
1 5 10 15

[0002]

Ile Tyr Phe Ile Met Glu Val Ser Lys Ser Ser Ser Gln Glu Lys Asn
20 25 30

Gly Lys Gly Glu Val Ile Ile Pro Lys Glu Lys Phe Trp Lys Ile Ser
35 40 45

Thr Pro Pro Glu Ala Tyr Trp Asn Arg Glu Gln Glu Lys Leu Asn Arg
50 55 60

Gln Tyr Asn Pro Ile Leu Ser Met Leu Thr Asn Gln Thr Gly Glu Ala
65 70 75 80

Gly Arg Leu Ser Asn Ile Ser His Leu Asn Tyr Cys Glu Pro Asp Leu
85 90 95

Arg Val Thr Ser Val Val Thr Gly Phe Asn Asn Leu Pro Asp Arg Phe
100 105 110

Lys Asp Phe Leu Leu Tyr Leu Arg Cys Arg Asn Tyr Ser Leu Leu Ile
115 120 125

Asp Gln Pro Asp Lys Cys Ala Lys Lys Pro Phe Leu Leu Leu Ala Ile

130	135	140	
Lys Ser Leu Thr Pro His Phe Ala Arg Arg Gln Ala Ile Arg Glu Ser			
145	150	155	160
Trp Gly Gln Glu Ser Asn Ala Gly Asn Gln Thr Val Val Arg Val Phe			
	165	170	175
Leu Leu Gly Gln Thr Pro Pro Glu Asp Asn His Pro Asp Leu Ser Asp			
	180	185	190
Met Leu Lys Phe Glu Ser Glu Lys His Gln Asp Ile Leu Met Trp Asn			
	195	200	205
Tyr Arg Asp Thr Phe Phe Asn Leu Ser Leu Lys Glu Val Leu Phe Leu			
210	215	220	
Arg Trp Val Ser Thr Ser Cys Pro Asp Thr Glu Phe Val Phe Lys Gly			
225	230	235	240
Asp Asp Asp Val Phe Val Asn Thr His His Ile Leu Asn Tyr Leu Asn			
[0003]	245	250	255
Ser Leu Ser Lys Thr Lys Ala Lys Asp Leu Phe Ile Gly Asp Val Ile			
	260	265	270
His Asn Ala Gly Pro His Arg Asp Lys Lys Leu Lys Tyr Tyr Ile Pro			
	275	280	285
Glu Val Val Tyr Ser Gly Leu Tyr Pro Pro Tyr Ala Gly Gly Gly Gly			
	290	295	300
Phe Leu Tyr Ser Gly His Leu Ala Leu Arg Leu Tyr His Ile Thr Asp			
305	310	315	320
Gln Val His Leu Tyr Pro Ile Asp Asp Val Tyr Thr Gly Met Cys Leu			
	325	330	335
Gln Lys Leu Gly Leu Val Pro Glu Lys His Lys Gly Phe Arg Thr Phe			
	340	345	350
Asp Ile Glu Glu Lys Asn Lys Asn Asn Ile Cys Ser Tyr Val Asp Leu			
	355	360	365

Met Leu Val His Ser Arg Lys Pro Gln Glu Met Ile Asp Ile Trp Ser
370 375 380

Gln Leu Gln Ser Ala His Leu Lys Cys
385 390

<210> 3

<211> 383

<212> PRT

<213> 拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*)

<400> 3

Met Gly Val His Glu Cys Pro Ala Trp Leu Trp Leu Leu Leu Ser Leu
1 5 10 15

Leu Ser Leu Pro Leu Gly Leu Pro Val Leu Gly Ala Pro Arg Asp Leu
20 25 30

Ser Arg Leu Pro Gln Leu Val Gly Val Ser Thr Pro Leu Gln Gly Gly
35 40 45

[0004]

Ser Asn Ser Ala Ala Ala Ile Gly Gln Ser Ser Gly Glu Leu Arg Thr
50 55 60

Gly Gly Ala Arg Pro Pro Pro Pro Leu Gly Ala Ser Ser Gln Pro Arg
65 70 75 80

Pro Gly Gly Asp Ser Ser Pro Val Val Asp Ser Gly Pro Gly Pro Ala
85 90 95

Ser Asn Leu Thr Ser Val Pro Val Pro His Thr Thr Ala Leu Ser Leu
100 105 110

Pro Ala Cys Pro Glu Glu Ser Pro Leu Leu Val Gly Pro Met Leu Ile
115 120 125

Glu Phe Asn Met Pro Val Asp Leu Glu Leu Val Ala Lys Gln Asn Pro
130 135 140

Asn Val Lys Met Gly Gly Arg Tyr Ala Pro Arg Asp Cys Val Ser Pro
145 150 155 160

His Lys Val Ala Ile Ile Ile Pro Phe Arg Asn Arg Gln Glu His Leu

	165	170	175
	Lys Tyr Trp Leu Tyr Tyr Leu His Pro Val Leu Gln Arg Gln Gln Leu		
	180	185	190
	Asp Tyr Gly Ile Tyr Val Ile Asn Gln Ala Gly Asp Thr Ile Phe Asn		
	195	200	205
	Arg Ala Lys Leu Leu Asn Val Gly Phe Gln Glu Ala Leu Lys Asp Tyr		
	210	215	220
	Asp Tyr Thr Cys Phe Val Phe Ser Asp Val Asp Leu Ile Pro Met Asn		
	225	230	235 240
	Asp His Asn Ala Tyr Arg Cys Phe Ser Gln Pro Arg His Ile Ser Val		
	245	250	255
	Ala Met Asp Lys Phe Gly Phe Ser Leu Pro Tyr Val Gln Tyr Phe Gly		
	260	265	270
	Gly Val Ser Ala Leu Ser Lys Gln Gln Phe Leu Thr Ile Asn Gly Phe		
[0005]	275	280	285
	Pro Asn Asn Tyr Trp Gly Trp Gly Gly Glu Asp Asp Asp Ile Phe Asn		
	290	295	300
	Arg Leu Val Phe Arg Gly Met Ser Ile Ser Arg Pro Asn Ala Val Val		
	305	310	315 320
	Gly Arg Cys Arg Met Ile Arg His Ser Arg Asp Lys Lys Asn Glu Pro		
	325	330	335
	Asn Pro Gln Arg Phe Asp Arg Ile Ala His Thr Lys Glu Thr Met Leu		
	340	345	350
	Ser Asp Gly Leu Asn Ser Leu Thr Tyr Gln Val Leu Asp Val Gln Arg		
	355	360	365
	Tyr Pro Leu Tyr Thr Gln Ile Thr Val Asp Ile Gly Thr Pro Ser		
	370	375	380
	<210> 4		
	<211> 328		
	<212> PRT		

<213> 智人

<400> 4

Met Gly Val His Glu Cys Pro Ala Trp Leu Trp Leu Leu Leu Ser Leu
1 5 10 15

Leu Ser Leu Pro Leu Gly Leu Pro Val Leu Gly Val Ala Pro Val Glu
20 25 30

Met Lys Arg Arg Asn Lys Ile Gln Pro Cys Leu Ser Lys Pro Ala Phe
35 40 45

Ala Ser Leu Leu Arg Phe His Gln Phe His Pro Phe Leu Cys Ala Ala
50 55 60

Asp Phe Arg Lys Ile Ala Ser Leu Tyr Gly Ser Asp Lys Phe Asp Leu
65 70 75 80

Pro Tyr Gly Met Arg Thr Ser Ala Glu Tyr Phe Arg Leu Ala Leu Ser
85 90 95

[0006]

Lys Leu Gln Ser Cys Asp Leu Phe Asp Glu Phe Asp Asn Ile Pro Cys
100 105 110

Lys Lys Cys Val Val Val Gly Asn Gly Gly Val Leu Lys Asn Lys Thr
115 120 125

Leu Gly Glu Lys Ile Asp Ser Tyr Asp Val Ile Ile Arg Met Asn Asn
130 135 140

Gly Pro Val Leu Gly His Glu Glu Glu Val Gly Arg Arg Thr Thr Phe
145 150 155 160

Arg Leu Phe Tyr Pro Glu Ser Val Phe Ser Asp Pro Ile His Asn Asp
165 170 175

Pro Asn Thr Thr Val Ile Leu Thr Ala Phe Lys Pro His Asp Leu Arg
180 185 190

Trp Leu Leu Glu Leu Leu Met Gly Asp Lys Ile Asn Thr Asn Gly Phe
195 200 205

Trp Lys Lys Pro Ala Leu Asn Leu Ile Tyr Lys Pro Tyr Gln Ile Arg

210	215	220	
Ile Leu Asp Pro Phe Ile Ile Arg Thr Ala Ala Tyr Glu Leu Leu His			
225	230	235	240
Phe Pro Lys Val Phe Pro Lys Asn Gln Lys Pro Lys His Pro Thr Thr			
	245	250	255
Gly Ile Ile Ala Ile Thr Leu Ala Phe Tyr Ile Cys His Glu Val His			
	260	265	270
Leu Ala Gly Phe Lys Tyr Asn Phe Ser Asp Leu Lys Ser Pro Leu His			
	275	280	285
Tyr Tyr Gly Asn Ala Thr Met Ser Leu Met Asn Lys Asn Ala Tyr His			
290	295	300	
Asn Val Thr Ala Glu Gln Leu Phe Leu Lys Asp Ile Ile Glu Lys Asn			
305	310	315	320
Leu Val Ile Asn Leu Thr Gln Asp			
	325		
[0007]			
<210>	5		
<211>	346		
<212>	PRT		
<213>	智人		
<400>	5		
Met Gly Val His Glu Cys Pro Ala Trp Leu Trp Leu Leu Ser Leu			
1	5	10	15
Leu Ser Leu Pro Leu Gly Leu Pro Val Leu Gly Ala Pro Glu Ala Ser			
	20	25	30
Phe Gln Val Trp Asn Lys Asp Ser Ser Ser Lys Asn Leu Ile Pro Arg			
	35	40	45
Leu Gln Lys Ile Trp Lys Asn Tyr Leu Ser Met Asn Lys Tyr Lys Val			
50	55	60	
Ser Tyr Lys Gly Pro Gly Pro Gly Ile Lys Phe Ser Ala Glu Ala Leu			
65	70	75	80

	Arg Cys His Leu Arg Asp His Val Asn Val Ser Met Val Glu Val Thr	
	85	90 95
	Asp Phe Pro Phe Asn Thr Ser Glu Trp Glu Gly Tyr Leu Pro Lys Glu	
	100	105 110
	Ser Ile Arg Thr Lys Ala Gly Pro Trp Gly Arg Cys Ala Val Val Ser	
	115	120 125
	Ser Ala Gly Ser Leu Lys Ser Ser Gln Leu Gly Arg Glu Ile Asp Asp	
	130	135 140
	His Asp Ala Val Leu Arg Phe Asn Gly Ala Pro Thr Ala Asn Phe Gln	
	145	150 155 160
	Gln Asp Val Gly Thr Lys Thr Thr Ile Arg Leu Met Asn Ser Gln Leu	
	165	170 175
	Val Thr Thr Glu Lys Arg Phe Leu Lys Asp Ser Leu Tyr Asn Glu Gly	
	180	185 190
[0008]	Ile Leu Ile Val Trp Asp Pro Ser Val Tyr His Ser Asp Ile Pro Lys	
	195	200 205
	Trp Tyr Gln Asn Pro Asp Tyr Asn Phe Phe Asn Asn Tyr Lys Thr Tyr	
	210	215 220
	Arg Lys Leu His Pro Asn Gln Pro Phe Tyr Ile Leu Lys Pro Gln Met	
	225	230 235 240
	Pro Trp Glu Leu Trp Asp Ile Leu Gln Glu Ile Ser Pro Glu Glu Ile	
	245	250 255
	Gln Pro Asn Pro Pro Ser Ser Gly Met Leu Gly Ile Ile Ile Met Met	
	260	265 270
	Thr Leu Cys Asp Gln Val Asp Ile Tyr Glu Phe Leu Pro Ser Lys Arg	
	275	280 285
	Lys Thr Asp Val Cys Tyr Tyr Tyr Gln Lys Phe Phe Asp Ser Ala Cys	
	290	295 300
	Thr Met Gly Ala Tyr His Pro Leu Leu Tyr Glu Lys Asn Leu Val Lys	

	305	310	315	320
	His Leu Asn Gln Gly Thr Asp Glu Asp Ile Tyr Leu Leu Gly Lys Ala			
	325	330	335	
	Thr Leu Pro Gly Phe Arg Thr Ile His Cys			
	340	345		
	<210> 6			
	<211> 382			
	<212> PRT			
	<213> 产气荚膜梭菌 (Clostridium perfringens)			
	<400> 6			
	Met Cys Asn Lys Asn Asn Thr Phe Glu Lys Asn Leu Asp Ile Ser His			
	1 5 10 15			
	Lys Pro Glu Pro Leu Ile Leu Phe Asn Lys Asp Asn Asn Ile Trp Asn			
	20 25 30			
[0009]	Ser Lys Tyr Phe Arg Ile Pro Asn Ile Gln Leu Leu Asn Asp Gly Thr			
	35 40 45			
	Ile Leu Thr Phe Ser Asp Ile Arg Tyr Asn Gly Pro Asp Asp His Ala			
	50 55 60			
	Tyr Ile Asp Ile Ala Ser Ala Arg Ser Thr Asp Phe Gly Lys Thr Trp			
	65 70 75 80			
	Ser Tyr Asn Ile Ala Met Lys Asn Asn Arg Ile Asp Ser Thr Tyr Ser			
	85 90 95			
	Arg Val Met Asp Ser Thr Thr Val Ile Thr Asn Thr Gly Arg Ile Ile			
	100 105 110			
	Leu Ile Ala Gly Ser Trp Asn Thr Asn Gly Asn Trp Ala Met Thr Thr			
	115 120 125			
	Ser Thr Arg Arg Ser Asp Trp Ser Val Gln Met Ile Tyr Ser Asp Asp			
	130 135 140			
	Asn Gly Leu Thr Trp Ser Asn Lys Ile Asp Leu Thr Lys Asp Ser Ser			
	145 150 155 160			

[0010]

Lys Val Lys Asn Gln Pro Ser Asn Thr Ile Gly Trp Leu Gly Gly Val		
165	170	175
Gly Ser Gly Ile Val Met Asp Asp Gly Thr Ile Val Met Pro Ala Gln		
180	185	190
Ile Ser Leu Arg Glu Asn Asn Glu Asn Asn Tyr Tyr Ser Leu Ile Ile		
195	200	205
Tyr Ser Lys Asp Asn Gly Glu Thr Trp Thr Met Gly Asn Lys Val Pro		
210	215	220
Asn Ser Asn Thr Ser Glu Asn Met Val Ile Glu Leu Asp Gly Ala Leu		
225	230	235
Ile Met Ser Thr Arg Tyr Asp Tyr Ser Gly Tyr Arg Ala Ala Tyr Ile		
245	250	255
Ser His Asp Leu Gly Thr Thr Trp Glu Ile Tyr Glu Pro Leu Asn Gly		
260	265	270
Lys Ile Leu Thr Gly Lys Gly Ser Gly Cys Gln Gly Ser Phe Ile Lys		
275	280	285
Ala Thr Thr Ser Asn Gly His Arg Ile Gly Leu Ile Ser Ala Pro Lys		
290	295	300
Asn Thr Lys Gly Glu Tyr Ile Arg Asp Asn Ile Ala Val Tyr Met Ile		
305	310	315
Asp Phe Asp Asp Leu Ser Lys Gly Val Gln Glu Ile Cys Ile Pro Tyr		
325	330	335
Pro Glu Asp Gly Asn Lys Leu Gly Gly Gly Tyr Ser Cys Leu Ser Phe		
340	345	350
Lys Asn Asn His Leu Gly Ile Val Tyr Glu Ala Asn Gly Asn Ile Glu		
355	360	365
Tyr Gln Asp Leu Thr Pro Tyr Tyr Ser Leu Ile Asn Lys Gln		
370	375	380

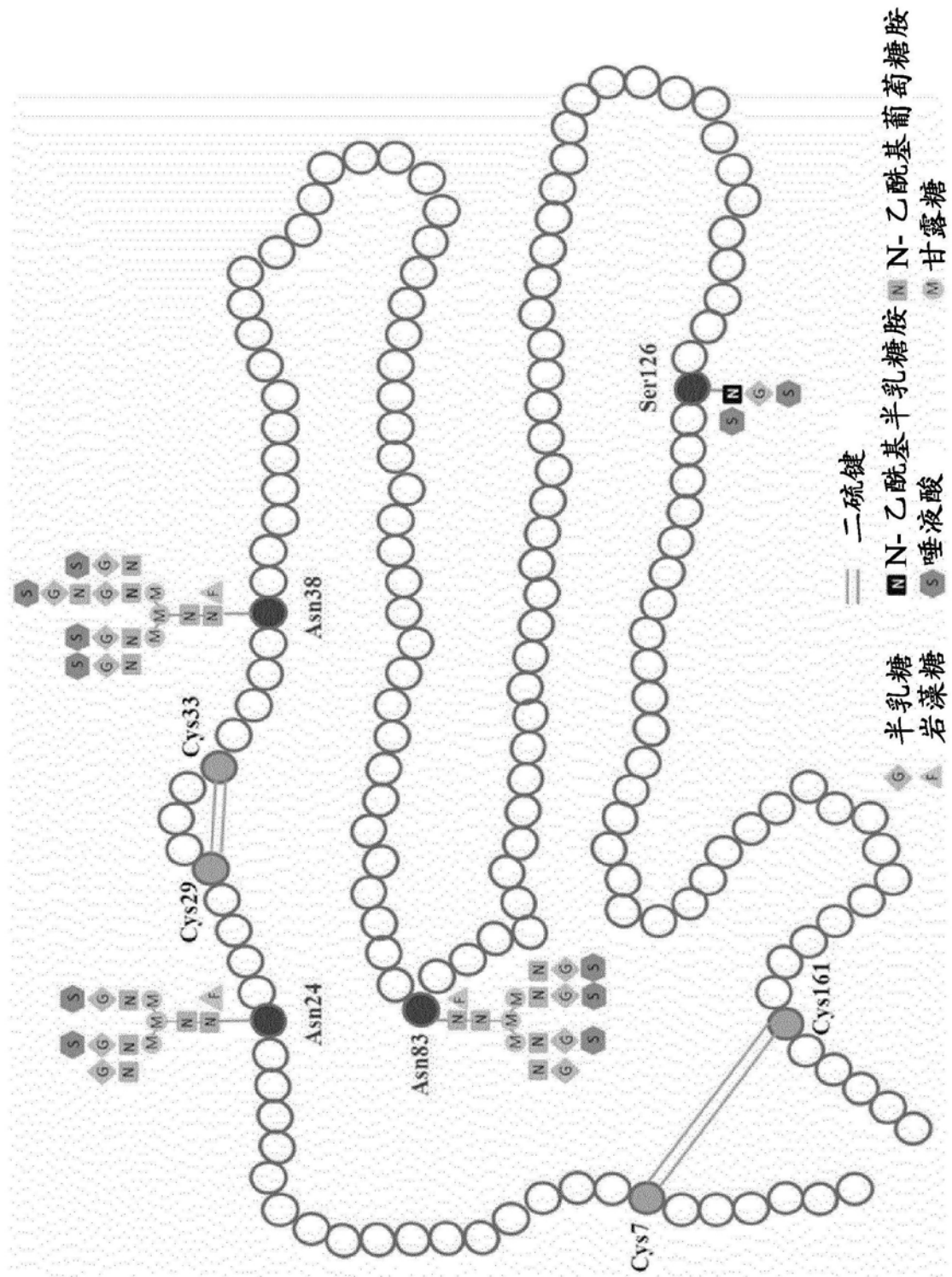


图1

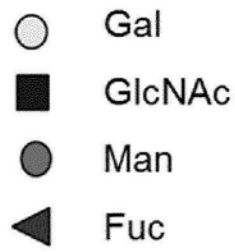


图 2 A

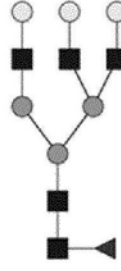


图 2 B

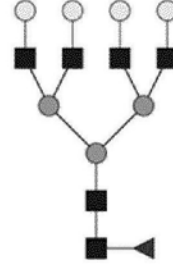


图 2 C

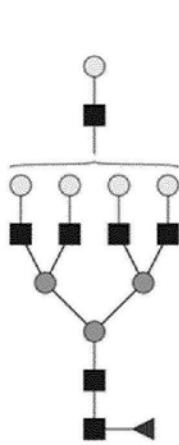


图 2 D

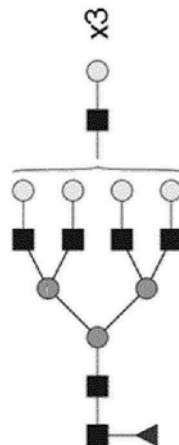


图 2 E