

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发 明 专 利 说 明 书

专利号 ZL 02804318.9

[51] Int. Cl.

C12N 15/31 (2006.01)
C07K 14/195 (2006.01)
C07K 14/81 (2006.01)
C07K 16/12 (2006.01)
G01N 33/50 (2006.01)
G01N 33/53 (2006.01)

[45] 授权公告日 2009 年 7 月 22 日

[11] 授权公告号 CN 100516220C

[51] Int. Cl. (续)

C12Q 1/68 (2006.01)

C12Q 1/25 (2006.01)

A61K 38/55 (2006.01)

A61P 37/00 (2006.01)

[22] 申请日 2002.1.30 [21] 申请号 02804318.9

[30] 优先权

[32] 2001. 1.30 [33] EP [31] 01102050.0

[86] 国际申请 PCT/EP2002/000956 2002.1.30

[87] 国际公布 WO2002/060932 英 2002.8.8

[85] 进入国家阶段日期 2003.7.30

[73] 专利权人 雀巢制品公司

地址 瑞士沃韦

[72] 发明人 F·阿里戈尼 S·布卢姆

M·德利 M·A·舍尔

E·施夫林

[56] 参考文献

Pathogenic mechanisms induced by microbial proteases in microbial infections. . HIROSHI M. BIOLOGICAL CHEMISTRY HOPPE. SEYER, Vol. 377 No. 4. 1996

EBI DATABASE. SASAKE, EBI. 2000

审查员 吴汀晨

[74] 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

代理人 温宏艳 孟凡宏

权利要求书 1 页 说明书 11 页

[54] 发明名称

双歧杆菌的丝氨酸蛋白酶抑制剂

[57] 摘要

本发明涉及双歧杆菌的新基因及此基因编码的多肽。特别地,本发明是涉及属于丝氨酸蛋白酶抑制剂超家族的基因以及此基因在细菌丝氨酸蛋白酶抑制剂生产中的应用。同样的,本发明提供了生产细菌丝氨酸蛋白酶抑制剂多核苷酸和/或多肽的载体、宿主细胞以及方法。

1. SEQ ID. NO. 1 所示核酸。
2. SEQ ID. NO. 2 所示多肽。
3. 包含权利要求 1 中的核酸的载体。
4. 包含权利要求 1 中的核酸的一个或多个拷贝或权利要求 3 中的载体的宿主细胞。
5. 权利要求 4 中的宿主细胞，其中表达了权利要求 2 中的多肽。
6. 权利要求 1 或 2 中的核酸或多肽在鉴定、表征和/或纯化可影响与丝氨酸蛋白酶活性相关的生物学过程的分子中的用途。
7. 权利要求 1 或 2 中的核酸或多肽在开发用于治疗 and 诊断涉及丝氨酸蛋白酶活性的疾病状态的分子中的用途。
8. 权利要求 1 中的核酸或权利要求 2 中的多肽在制备用于治疗 and 诊断涉及丝氨酸蛋白酶活性的疾病状态的载体中的用途。
9. 权利要求 8 中的用途，其中载体是药物、食品或食品添加剂。
10. 权利要求 6 到 9 中任一项的用途，其中生物学过程或疾病状态选自凝血、纤维蛋白溶解、免疫反应、补体激活、炎症反应、细胞外基质的更新、细胞迁移和激素原激活、癌症转移。
11. 制备权利要求 2 中的多肽的方法，包括在合适的宿主中表达权利要求 1 中的核酸或权利要求 3 中的载体并对获得的多肽进行纯化。
12. 用于检测益生菌菌株的方法，包括用权利要求 1 中的核酸或抗权利要求 2 中多肽的抗体筛选微生物中所述核酸或所述多肽的存在，并确定微生物中丝氨酸蛋白酶抑制剂的存在。
13. 制备可表达或过量表达由权利要求 1 中的核酸编码的丝氨酸蛋白酶抑制剂的方法，包括用权利要求 1 的核酸转化微生物和表达编码丝氨酸蛋白酶抑制剂多肽的基因。
14. 食品，其包含权利要求 1 中的核酸、权利要求 2 中的多肽、权利要求 3 中的载体或权利要求 4 或 5 中任一项的宿主细胞。
15. 药品，其包含权利要求 1 中的核酸、权利要求 2 中的多肽、权利要求 3 中的载体或权利要求 4 或 5 中任一项的宿主细胞。

双歧杆菌的丝氨酸蛋白酶抑制剂

本发明涉及双歧杆菌的新基因以及此基因编码的多肽。特别地，本发明是关于属于丝氨酸蛋白酶抑制剂（Serpin）超家族的一个基因及其在细菌丝氨酸蛋白酶抑制剂生产中的应用。同样提供生产细菌丝氨酸蛋白酶抑制剂多核苷酸和/或多肽的载体、宿主细胞、以及方法。

乳酸菌可用于长时间储存和制备食物原料，这主要得益于它的低 pH 及其发酵活性期内产生的产物的作用。此外，乳酸菌与多种食品产物的生产相关，例如奶酪或酸奶。

最近，乳酸菌特别是乳酸杆菌和双歧杆菌引起很大的关注，这是由于已经发现它们的一些菌株在人和动物的摄食过程中展现出一些很有价值的特性。这些菌株通常被认为是益生菌，发现它们能够在胃肠道中普遍存在的严苛环境条件下存活，并且能够至少在肠粘膜上短暂集群，在这里它们对掺入它们的生物的产生阳性反应。

在 EP 0 768 375 中公开了双歧杆菌属的这样一株益生菌株，此菌株可以移植入肠道菌群中。据报导，此双歧杆菌可以辅助宿主的免疫调节，并且可以竞争性地排除致病菌对肠细胞的粘附，从而可以支持个体健康的维持。

此外，在参考文献 EP 0 577 903 中使用了具有替代幽门螺杆菌能力的乳酸菌，而幽门螺旋菌是公认的溃疡发展原因。

并且，在 WO 97/00078 中公开的一个特有的乳酸杆菌菌株就是这样的益生菌，命名为乳酸杆菌 GG (ATCC 53103)。此微生物可用来防止或治疗食物引起的过敏反应。

考虑到这些益生菌株可提供有价值的特性，特别希望能得到关于这些菌株生物学方面的详细信息，尤其是关于其与宿主的相互作用、它们能在肠道不同环境中生存的现象以及它们粘附肠粘膜的能力。特别地，其在免疫系统增强和防御病原体方面的作用引起了很大关注。

因此，本发明的一个问题就是提供关于展示出对人和/或动物有益的特性的细菌菌株资料并进行说明。

在研究益生菌双歧杆菌 BL29 菌株基因组过程中，本发明的发明

者们惊讶地发现了一个展示出与丝氨酸蛋白酶抑制剂超家族基因具有中等程度的同源性的基因（丝氨酸蛋白酶抑制剂）。目前为止仅在更高等生物体的细胞中发现这种类型的基因，例如人和植物细胞，但在细菌中没有发现。

结果，本发明提供了一种核酸，此核酸为 SEQ ID. NO. 1 或编码功能性多肽的其部分或变体，此变体与 SEQ ID. NO. 1 具有约 75% 的同源性，优选 80%，更优选 85%，甚至更优选 90%，甚至更优选 95%。

依照一个替代性实施方案，本发明也涉及多肽 SEQ ID. NO. 2 或其功能性部分或变体，此变体与 SEQ ID. NO. 2 具有约 75% 的同源性，优选 80%，更优选 85%，甚至更优选 90%，甚至更优选 95%。

丝氨酸蛋白酶抑制剂（Serpins）包含不同的蛋白群，而此蛋白形成了包含 100 多个成员在内的超家族。多数丝氨酸蛋白酶抑制剂充当蛋白酶抑制剂并参与对一些蛋白酶活化的生理过程的调节，其对于个体非常重要，例如血液凝固、补体介导的溶解、免疫应答、肾小球肾炎、痛觉、炎症、胰腺炎、癌症、受精调节、细菌感染和病毒成熟。虽然丝氨酸蛋白酶抑制剂的主要功能体现在对丝氨酸蛋白酶活性的中和上，但发现这些多肽在细胞外基质重塑和细胞迁移过程中也起作用。

丝氨酸蛋白酶抑制剂的示例包括 $\alpha 1$ -抗胰蛋白酶、抗凝血酶 III、纤溶酶原激活剂抑制剂 1（PAI-1）或纤溶酶原激活剂抑制剂 2。

到目前为止丝氨酸蛋白酶抑制剂是进行了大量研究的实验对象，它们都有一个共有的特征环，称为反应位点环（RSL），其从包含相关丝氨酸蛋白酶活性位点的识别序列的分子表面向外延伸。据认为，每个抑制剂的特异性主要由丝氨酸蛋白酶抑制剂的潜在切割位点氨基末端侧紧邻的氨基酸的身份所确定。已知这个氨基酸是 Pi 位点残基，据认为它与丝氨酸蛋白酶的活性位点的丝氨酸形成酰基键。

丝氨酸蛋白酶抑制剂似乎作为“自杀抑制剂”而与靶蛋白酶形成 1:1 的化学数量复合物，从而阻断它们的活性。依照目前的资料显示抑制剂在反应中心被切割，并且复合物最有可能作为共价酰基-酶复合物被捕获。

由于丝氨酸蛋白酶抑制剂参与较高级的生物的复杂生物学过程，

例如免疫系统的调节或炎症反应或甚至细胞外基质的重塑，所以就没有预想到它们出现在原核生物中。事实上，到目前为止没有源自于原核细胞的丝氨酸蛋白酶抑制剂的报道。

因此，本发明者第一次发现一些细菌细胞可能也包含丝氨酸蛋白酶抑制剂。不受任何理论的约束，目前假定衍生该抑制剂的双歧杆菌菌株的益生特性如免疫系统调节或已知的特性至少部分归因于丝氨酸蛋白酶抑制剂的存在。

在本申请的上下文中，本发明中的核酸指定为多核苷酸 SEQ. ID. NO. 1 或可产生功能性多肽的其部分或变体。为了此目的，可在 SEQ. ID. NO. 1 所示的核酸的末端进行一定程度的截短，其产生的多肽仍然能产生生物学功能。同样的，在所得到的多肽仍然保持生物学的功能的前提下，可通过一个或多个核苷酸的缺失、添加或取代而对核酸进行修饰。

同样的，此处描述的多肽也是如此。根据本发明，术语多肽指定为 SEQ ID NO. 2 或其功能性部分或变体。因此，可在 SEQ ID NO. 2 中所示的多肽的末端进行一定程度的截短，该多肽仍然能产生生物学功能。同样的，在所得到的多肽仍然保持生物学的功能的前提下，可通过一个或多个氨基酸的缺失、添加或取代而对多肽进行修饰。

根据一种实施方案，以上提及的核酸可插入到合适的宿主细胞并在其中表达。为了此目的，本发明的核酸可插入到允许其在所需宿主细胞中增殖和/或表达并允许其插入的合适载体中。此载体应包含一个能够稳定增殖的标记基因。

同样地，利用同源重组现象或其他仅允许核酸插入到宿主的染色体上的技术也可将本发明的核酸包含在宿主基因组中。这些技术在如 EP 93 105 303.7 中有描述，其内容在此处引用作为参考。

依赖于是否基因产物将过量表达，也即为了收集和纯化多肽，或表达至一定程度从而通过载体系统如微生物递送给个体，可将本发明的核酸置于内源或外源调节子如启动子控制之下。调节子如启动子优选为可调节的和/或可诱导的，并且可通过公认的且易操作的方法将其与编码分子进行可操作性连接。

然后，将这些重组的构建体导入以在合适的宿主细胞，如原核宿主细胞如大肠杆菌、乳酸杆菌、链球菌或双歧杆菌或真核宿主细胞如

酿酒酵母、昆虫细胞、CHO 或 COS 细胞中表达，并在允许异源基因表达的环境中培养转化或转导的宿主细胞。应该明白，本核发明中的多核苷酸的基因产物在真核表达系统中表达时会进行糖基化。

本发明另一个方面也包括至少包含本发明的核酸的一个拷贝的重组微生物。此核酸可包含在用来向个体递送靶物质的微生物中。在此方面，益生菌是适合的，因为它们能够通过个体的胃肠道并至少可短暂植入宿主的肠粘膜中。在这个位点上，它能够发挥衍生其的本发明的益生菌株 BL29 的生物学功能。不受任何理论的约束，目前认为此核酸的基因产物参与双歧杆菌 BL29 菌株所显示的抗炎活性。同样，任何已包含本发明的核酸的菌株都可作为宿主细胞，其中也可能包括额外的靶核酸拷贝。

宿主细胞可表达本发明中的核酸的基因产物。因而宿主细胞可以用来大量合成本发明的多肽。

本发明的“宿主细胞”可以通过重组方法得到，因为可将本发明的核酸插入到合适的细胞中。然而，为了增加含有此类多肽的双歧杆菌中的双歧杆菌-丝氨酸蛋白酶抑制剂量，双歧杆菌本身可经由普通突变筛选技术从而使得具有提高的相应基因产物量。

蛋白分离可通过已知的方法从宿主细胞或宿主细胞培养物上清中进行。Ausubel I., Frederick M., Current Protocols in Mol. Biol. (1992), John Wiley and Sons, New York 中对这些方法进行了描述。可运用已知的包括免疫沉淀、凝胶过滤、离子交换层析、层析聚焦、等电聚焦、选择性沉淀、电泳等在内的蛋白纯化技术，通过亲和层析从重组产物中纯化多肽。

本发明进一步包括检测本发明的核酸或多肽的方法，此方法包括利用本发明中的任一核酸分子孵育样品如细胞裂解物或 RNA 样品的逆转录物，并确定该核酸分子在严格条件下与靶核酸分子的杂交从而确定核酸分子的存在，或利用抗体，优选抗本发明的多肽的单克隆抗体。也可利用 PCR 技术，优选应用通过如 Roche Diagnostics GmbH, DE 的 LightCycler™ 进行的定量 RT-PCR 对基因进行定量检测。

由于丝氨酸蛋白酶抑制剂基因似乎与细菌菌株的益生活性有关，本发明中的核酸和/或多核苷酸同样可用于寻找可展示益生活性的额外菌株。

为了确定给定的细菌菌株是否合适，可确定与细菌菌株的一种或多种靶核酸进行杂交的核酸的大约量。可很容易通过如检测杂交作用的可视检查定性确定杂交的大约量。例如，如果利用凝胶解析可与样品中靶核酸杂交的标记核酸，生成的条带就可进行可视检测。同样的，FACS 抗体应用可用于进行定量测量。

本发明的核酸或多肽可用于对可影响与丝氨酸蛋白酶活性相关的生物学过程的分子进行鉴定、表征和/或纯化。丝氨酸蛋白酶参与的生物学过程示例包括凝血、纤维蛋白溶解、免疫反应、补体激活、炎症反应、细胞外基质更新、细胞迁移和激素原激活、癌症转移。

同样的，本发明的核酸或多肽也可用于开发在治疗和/或诊断涉及丝氨酸蛋白酶活性的疾病状态中最终适用的分子。一旦了解了本发明中的丝氨酸蛋白酶抑制剂与靶蛋白酶的相互作用，就可设计蛋白酶的激动剂或拮抗剂以及丝氨酸蛋白酶抑制剂的激动剂或拮抗剂。如上所述，本发明考虑的疾病状态的非限制性示例为异常凝血、异常纤维蛋白溶解、免疫反应、补体激活、炎症反应、细胞外基质更新、细胞迁移和激素原激活、癌症转移。

多种模型系统的应用或结构研究能够开发用于调节本发明中的丝氨酸蛋白酶抑制剂和与之结合的蛋白酶的功能的激动剂或拮抗剂。可以想象，它们可为肽、突变的配体、可与本发明中的丝氨酸蛋白酶抑制剂相互作用的抗体或其他分子。

在适于表达多肽并收集和纯化多肽的条件下，通过在合适的宿主中表达本发明的核酸或包含此核酸的载体，本发明的核酸一般可用来合成用于大规模生产的多肽。

以下实施例例证了本发明，而没有对其进行限制。

实施例 1

丝氨酸蛋白酶抑制剂基因的分离

在对插入的克隆进行荧光自动化序列分析和利用软件程序对这些核苷酸片段序列（插入序列）进行组装后，在利用定向测序法对长双歧杆菌 BL29 基因组序列进行分析的过程中发现了一个开放阅读框。为了完成这些操作，产生了基因组片段，连接到合适的用来扩增和繁殖的载体上，并对相应片段进行测序。通过合适的软件对片段的重叠

和最后排序及其核苷酸序列进行评定。

利用以下算法评定了蛋白和/或核酸序列的同源性：

- (1) BLASTP: 将氨基酸询问序列与蛋白序列数据库进行比较
- (2) BLASTN: 将核苷酸询问序列与核苷酸序列数据库进行比较
- (3) BLASTX: 将在所有阅读框中翻译的核苷酸询问序列与蛋白序列数据库进行比较
- (4) TBLASTN: 将蛋白询问序列与在所有阅读框内动态翻译的核苷酸数据库进行比较

已经注意到与已知的鼠丝氨酸蛋白酶抑制剂 α -2-抗纤溶酶具有约 43 % 的中度总体同源性。而此多肽展示出与反应位点环 (RSL) 具有约 63 % 的同源性。

实施例 2

双歧杆菌丝氨酸蛋白酶抑制剂基因的克隆和多肽的分离

依照普通的技术，将编码从其信号肽上去除的推定的双歧杆菌丝氨酸蛋白酶抑制剂的核酸克隆到大肠杆菌表达载体 pDEST 17 (Invitrogen Life Technologies) 上并在大肠杆菌中制备了相应的蛋白以作为 6-His 标记的融合蛋白 (Janknecht R et al. (1991) : Proc. Natl. Acad. Sci. USA: 88 (20) pp 8972-8976)。

按照 Quiagen 的 QIA-Expressionist 手册中的指导说明，在镍-氨三乙酸基质上利用金属亲和层析将 6-His 标记的融合蛋白纯化至均匀，并用于在兔中进行功能研究和多克隆抗体产生的研究。

实施例 3

在 BL29 中表达的丝氨酸蛋白酶抑制剂样蛋白的潜在的抗炎活性

利用体外溶血测定法鉴定实施例 2 中分离得到的多肽作为丝氨酸蛋白酶抑制剂的活性。

为了此目的，将 50 μ L 连续双倍稀释的人 AB 血清 (Sigma) 与 50 μ L 1.7 % 的绵羊抗体激活的绵羊红细胞悬液在 96 孔微量滴定板中混合。为了评估重组丝氨酸蛋白酶抑制剂的抗溶血活性，每孔加入 1 μ g 重组蛋白并且在 37°C 孵育混合物 1 小时。然后将滴定板离心，以沉淀完整的细胞沉淀并将细胞碎屑和上清转入另一新板中。溶血活性是通

过测定在 450nm 释放血红蛋白的吸光度来测定。

将双歧杆菌丝氨酸蛋白酶抑制剂活性与人的丝氨酸蛋白酶抑制剂 $\alpha 1$ -抗胰蛋白酶 ($5 \mu\text{g}/\text{孔}$) 进行了比较。以蒸馏水作为阳性对照获得了 100% 的红细胞溶解, 人失活 AB 血清作为阴性对照 (由于补体失活而无溶解)。

结果清楚地表明, 从双歧杆菌获得的重组丝氨酸蛋白酶抑制剂与人 $\alpha 1$ -抗胰蛋白酶抑制红细胞溶解的程度相同, $\alpha 1$ -抗胰蛋白酶是一种已知的丝氨酸蛋白酶抑制子。

 序列表

<110> 雀巢制品公司

<120> 双歧杆菌的丝氨酸蛋白酶抑制剂

<130> NO 7204/W0

<140> WO 02060932

<141> 2002-01-30

<150> EP 01102050.0

<151> 2001-01-30

<160> 2

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 1395

<212> DNA

<213> 长双歧杆菌 (*Bifidobacterium longum*)

<400> 1

atgagcgagc aactgatgga acagtaccgg ttgcggggac aaogcaaatg cegtaacgct	60
tgtatcgccg ccategtgac agtagtgctt gtccttgccg togcggggcg cgtatggtgg	120
acggccggcg atggcagcgc attggttcgc aatatgttca agccgaagge cacgcctgcc	180
acgcagccgg tagtcaacag caccgcaacc ttgcctacc gcaccgcacc ggaattcctg	240
gcgatggaag cggcgaccg aggcaccggc aatgtgaact actctcctgc ttcgatgtgg	300
atggcgttgg ccategccgc gcaggggccc aatggcacga ccgctcgca actgaacgaa	360
ctgctgggct ccggttcgct gaccgatagc gactaccaat cgtgctaag ttcgatcaac	420
gggcaatatt cggggggcga atccgagatg agcgccgcga actcgctgtg gattgatgac	480
gactactctc ttgccagcga ttaccaatcc accgtcaaga agatgttcga ggccgaagtc	540
accacgttac cgttcgacga tcaggccgoc gccaaagatgt ccgattggat tgccaagcat	600
acgaatggtt cgctcaagcc gaagatcacg ctgcgtgacc gtgaagtcct gtccatcatc	660
aacaccgtct atgcggatgg ccgctggaag gatccgttcg aagagcagtc caccggcaac	720
ggcaccttcc acggcgaagc cggagatgct caggtgccga tgatgcacca gaccttcagc	780

```

caaatggctt acggacatga tgagtacaac acttggcagc ggggtggagat tccgttcgac      840
aacggcggca atctggccat cgtgctgcgc gccgaagggc atttcgacga gttggccggc      900
gatgccgaga agctcagttg ggcgttcggt acatgctcga cggcatccct tggcgagggc      960
gcaatgggtt gcgcgcggga cagtatgccc ggctggggcg totccgtcaa ctcggtcatg     1020
gtgaacgtca cgctaccgcg attcaccatc gacagcatgt tcgactcgga agccaccatc     1080
aaggcattcg aaaaactggg ggtgaccgat gcgttcagtg caggcgacgc cgacttcacc     1140
aagatgatcg acaccggttc gcacggcgag aacctgtata tcggctcgat tctgcaaggc     1200
acgcgcacgc aggtgaacga agccggcgcc aaggccatgt ccttcaccaa ggtcggcgca     1260
gactccgtta gcgcgcgggt ggacaacgtc gagttcacgg tggatcgccc atttctgtat     1320
tcgtacgtca ccccgacggg cataaccatta ttcacggtg cgggtgcgca cctcggcgga     1380
gtcgggtggag aaaac                                     1395

```

<210> 2

<211> 465

<212> PRT

<213> 长双歧杆菌 (*Bifidobacterium longum*)

<400> 2

```

Met Ser Glu Gln Leu Met Glu Gln Tyr Arg Leu Arg Gly Gln Arg Lys
1              5              10              15

```

```

Cys Arg Asn Ala Cys Ile Ala Ala Ile Val Thr Val Val Leu Val Leu
20              25              30

```

```

Ala Val Ala Gly Gly Val Trp Trp Thr Ala Gly Asp Gly Ser Ala Leu
35              40              45

```

```

Val Arg Asn Met Phe Lys Pro Lys Ala Thr Pro Ala Thr Gln Pro Val
50              55              60

```

```

Val Asn Ser Thr Ala Thr Phe Ala Tyr Arg Thr Ala Pro Glu Phe Leu
65              70              75              80

```

```

Ala Met Glu Ala Gly Asp Arg Gly Thr Gly Asn Val Asn Tyr Ser Pro
85              90              95

```

Ala Ser Met Trp Met Ala Leu Ala Ile Ala Ala Gln Gly Ala Asn Gly
100 105 110

Thr Thr Arg Ser Gln Leu Asn Glu Leu Leu Gly Ser Gly Ser Leu Thr
115 120 125

Asp Ser Asp Tyr Gln Ser Leu Leu Ser Ser Ile Asn Gly Gln Tyr Ser
130 135 140

Gly Ala Lys Ser Glu Met Ser Ala Ala Asn Ser Leu Trp Ile Asp Asp
145 150 155 160

Asp Tyr Ser Leu Ala Ser Asp Tyr Gln Ser Thr Val Lys Lys Met Phe
165 170 175

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

Met Ser Asp Trp Ile Ala Lys His Thr Asn Gly Ser Leu Lys Pro Lys
195 200 205

Ile Thr Leu Arg Asp Arg Glu Val Leu Ser Ile Ile Asn Thr Val Tyr
210 215 220

Ala Asp Gly Arg Trp Lys Asp Pro Phe Glu Glu Gln Ser Thr Gly Asn
225 230 235 240

Gly Thr Phe His Gly Glu Ala Gly Asp Ala Gln Val Pro Met Met His
245 250 255

Gln Thr Phe Ser Gln Met Ala Tyr Gly His Asp Glu Tyr Asn Thr Trp
260 265 270

Gln Arg Val Glu Ile Pro Phe Asp Asn Gly Gly Asn Leu Ala Ile Val
275 280 285

Leu Pro Ala Glu Gly His Phe Asp Glu Leu Ala Gly Asp Ala Glu Lys
290 295 300

Leu Ser Trp Ala Phe Gly Thr Cys Ser Thr Ala Ser Leu Gly Glu Gly
305 310 315 320

Ala Met Gly Cys Ala Ala Asp Ser Met Pro Gly Trp Gly Val Ser Val
325 330 335

Asn Ser Val Met Val Asn Val Thr Leu Pro Arg Phe Thr Ile Asp Ser
340 345 350

Met Phe Asp Ser Glu Ala Thr Ile Lys Ala Phe Glu Lys Leu Gly Val
355 360 365

Thr Asp Ala Phe Ser Ala Gly Asp Ala Asp Phe Thr Lys Met Ile Asp
370 375 380

Thr Gly Ser His Gly Glu Asn Leu Tyr Ile Gly Ser Ile Leu Gln Gly
385 390 395 400

Thr Arg Ile Glu Val Asn Glu Ala Gly Ala Lys Ala Met Ser Phe Thr
405 410 415

Lys Val Gly Ala Asp Ser Val Ser Ala Pro Val Asp Asn Val Glu Phe
420 425 430

Thr Val Asp Arg Pro Phe Leu Tyr Ser Tyr Val Thr Pro Asp Gly Ile
435 440 445

Pro Leu Phe Ile Gly Ala Val Arg Asn Leu Gly Gly Val Gly Gly Glu
450 455 460

Asn
465

专利名称(译)	双歧杆菌的丝氨酸蛋白酶抑制剂		
公开(公告)号	CN100516220C	公开(公告)日	2009-07-22
申请号	CN02804318.9	申请日	2002-01-30
[标]申请(专利权)人(译)	雀巢制品公司		
申请(专利权)人(译)	雀巢制品公司		
当前申请(专利权)人(译)	雀巢制品公司		
[标]发明人	F阿里戈尼 S布卢姆 M德利 MA舍尔 E施夫林		
发明人	F·阿里戈尼 S·布卢姆 M·德利 M·A·舍尔 E·施夫林		
IPC分类号	C12N15/31 C07K14/195 C07K14/81 C07K16/12 G01N33/50 G01N33/53 C12Q1/68 C12Q1/25 A61K38/55 A61P37/00 A23C9/123 A23L1/30 A61K31/7052 A61K35/64 A61K35/74 A61K36/06 A61K38/00 A61K39/00 A61P1/04 A61P1/12 A61P1/14 A61P7/02 A61P29/00 A61P35/04 A61P37/02 A61P43/00 C07H21/04 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/20 C12N1/21 C12N5/10 C12N9/99 C12N15/09 C12P21/02 C12P21/08 C12Q1/04 C12Q1/37 C12R1/01 G01N33/569		
CPC分类号	C12R1/01 A23Y2300/00 C07H21/04 A23C2220/202 A23C9/1234 G01N2500/00 A61K38/00 C07K14/8121 C12Q1/37 G01N2333/8121 C07K14/195 A61K39/00 A61P1/00 A61P1/04 A61P1/12 A61P1/14 A61P29/00		
优先权	2001102050 2001-01-30 EP		
其他公开文献	CN1518598A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及双歧杆菌的新基因及此基因编码的多肽。特别地，本发明是涉及属于丝氨酸蛋白酶抑制剂超家族的基因以及此基因在细菌丝氨酸蛋白酶抑制剂生产中的应用。同样的，本发明提供了生产细菌丝氨酸蛋白酶抑制剂多核苷酸和/或多肽的载体、宿主细胞以及方法。