



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102481345 B

(45) 授权公告日 2015. 04. 22

(21) 申请号 201080023256. 4

(22) 申请日 2010. 03. 26

(30) 优先权数据

61/163, 863 2009. 03. 26 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2011. 11. 25

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/CN2010/071357 2010. 03. 26

(87) PCT国际申请的公布数据

W02010/124547 EN 2010. 11. 04

(73) 专利权人 香港理工大学

地址 中国香港九龙红磡

(72) 发明人 梁润松 劳伟雄

(74) 专利代理机构 北京派特恩知识产权代理有

限公司 11270

代理人 武晨燕 迟姗

(51) Int. Cl.

A61K 38/43(2006. 01)

A61P 35/00(2006. 01)

A61P 31/00(2006. 01)

(56) 对比文件

W0 2004000349 A1, 2003. 12. 31,

W0 2004022004 A3, 2004. 12. 23,

CN 1918298 A, 2007. 02. 21,

US 5766897 A, 1998. 06. 16,

W0 2004001048 A1, 2003. 12. 31,

审查员 江涵

权利要求书3页 说明书28页

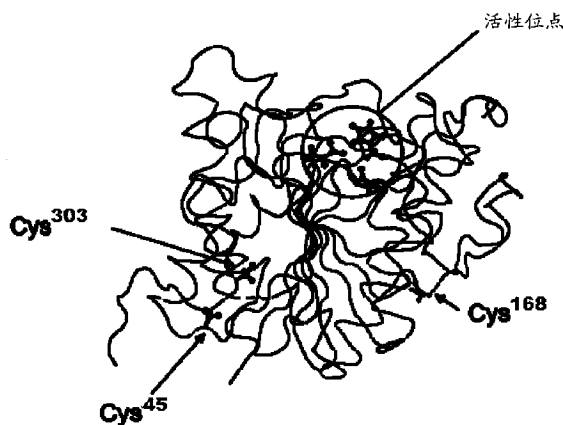
序列表25页 附图24页

(54) 发明名称

精氨酸酶的定向位点聚乙二醇化及其作为抗癌和抗病毒试剂的用途

(57) 摘要

单聚乙二醇化精氨酸酶偶联物及其制备方法。所述单聚乙二醇化精氨酸酶在分子量上是均一的, 并且显示出用于治疗癌症和病毒感染的治疗效果。制备所述精氨酸酶偶联物的方法包括遗传修饰编码精氨酸酶的基因使得 PEG 部分能够在预定的特定目标位点结合到该酶上的主要步骤。这通过除去位于该酶的不期望的位点的 PEG 结合氨基酸残基同时在该酶的期望的位点保留 (或增加, 如果需要的话) PEG 结合氨基酸残基来实现。如此制备的两种示例性的单聚乙二醇化精氨酸酶偶联物是人类精氨酸酶 I(HAI) 和热溶芽孢杆菌精氨酸酶 (BCA), 在所述人类精氨酸酶 I 中, 聚乙二醇 (PEG) 部分定点共价结合到该酶的 Cys⁴⁵; 在所述热溶芽孢杆菌精氨酸酶中, 聚乙二醇 (PEG) 部分定点共价结合到该酶的 Cys¹⁶¹。



1. 一种包含 PEG 部分的 PEG-精氨酸酶偶联物,所述 PEG 部分在预定位置共价结合到精氨酸酶上,并且所述 PEG-精氨酸酶偶联物就分子量而言是均一的,

其中所述预定位置是所述精氨酸酶的 Cys⁴⁵并且所述精氨酸酶为人类精氨酸酶 I,或者

其中所述预定位置是所述精氨酸酶的 Cys¹⁶¹并且所述精氨酸酶为热溶芽孢杆菌 (*Bacillus caldovelox*) 精氨酸酶。

2. 如权利要求 1 所述的 PEG-精氨酸酶偶联物,其中所述人类精氨酸酶 I 为人类精氨酸酶 I 的 C168S/C303S 突变体,其氨基酸序列示于 SEQ ID NO:10 或 SEQ ID NO:12;或者

其中热溶芽孢杆菌精氨酸酶为热溶芽孢杆菌精氨酸酶的 S161C 突变体,其氨基酸序列示于 SEQ ID NO:14 或 SEQ ID NO:16。

3. 如权利要求 1 所述的 PEG-精氨酸酶偶联物,其中所述 PEG 部分与所述精氨酸酶的比例基本为 1。

4. 如权利要求 1 所述的 PEG-精氨酸酶偶联物,其中所述 PEG 部分具有 5,000 至 30,000 的分子量。

5. 如权利要求 4 所述的 PEG-精氨酸酶偶联物,其中所述 PEG 部分具有约 20,000 的分子量。

6. 如权利要求 1 所述的 PEG-精氨酸酶偶联物,其中所述 PEG 部分是聚乙二醇。

7. 如权利要求 1 所述的 PEG-精氨酸酶偶联物,其中所述 PEG 部分具有单链。

8. 如权利要求 1 所述的 PEG-精氨酸酶偶联物,其中所述 PEG 部分具有支链。

9. 一种制备 PEG-精氨酸酶偶联物的方法,所述方法包括如下步骤:

(a) 指定精氨酸酶上的至少一个结合位置,其中在所述位置处的氨基酸残基用于与 PEG 部分形成共价键;

(b) 修饰所述精氨酸酶的编码基因,其中如果在所述结合位置处的氨基酸残基的密码子不是半胱氨酸密码子,则将所述密码子改变为编码半胱氨酸的密码子,并且如果所述基因具有第二个编码半胱氨酸残基的密码子,所述第二个半胱氨酸残基不在所述结合位置,并且从精氨酸酶暴露能够与 PEG 部分形成共价键,则将第二个半胱氨酸残基的密码子改变为编码不是半胱氨酸的氨基酸的密码子;

(c) 在宿主中表达所述基因以生成所述精氨酸酶;和

(d) 通过所述精氨酸酶的所述结合位置处的所述氨基酸和 PEG 部分之间的共价键将所述精氨酸酶蛋白与所述 PEG 部分偶联以获得分子量上均一的 PEG-精氨酸酶偶联物,

其中所述基因编码人类精氨酸酶 I,并且在步骤 (c) 中生成的所述精氨酸酶的所述结合位置处的所述氨基酸残基为 Cys⁴⁵,或者

其中所述基因编码热溶芽孢杆菌精氨酸酶,并且在步骤 (c) 中生成的所述精氨酸酶的所述结合位置处的所述氨基酸残基为 Cys¹⁶¹。

10. 如权利要求 9 所述的方法,其中在步骤 (c) 中生成的所述精氨酸酶含有单个半胱氨酸残基。

11. 如权利要求 10 所述的方法,其中在步骤 (c) 使用的所述宿主选自由细菌细胞、真菌细胞、植物细胞、动物细胞和转基因动物组成的组。

12. 如权利要求 10 所述的方法,其中在步骤 (c) 使用的所述宿主选自由昆虫细胞和酵母细胞组成的组。

13. 如权利要求 9 所述的方法, 其中所述共价键是在来自在所述结合位置处的所述氨基酸的硫醇基和来自所述 PEG 部分的马来酰亚胺基之间形成的硫醚键。

14. 如权利要求 9 所述的方法, 其中所述 PEG 部分具有约 20,000 的分子量, 并且具有直链或支链。

15. 一种药物组合物, 所述药物组合物包含分子量上均一的 PEG- 精氨酸酶偶联物和药学可接受的载体、赋形剂或辅助试剂,

其中所述 PEG- 精氨酸酶在人类精氨酸酶 I 和 PEG 部分之间形成, 所述人类精氨酸酶 I 具有在位置 45 处用于与所述 PEG 部分共价结合的唯一的半胱氨酸残基, 或者

其中所述 PEG- 精氨酸酶在热溶芽孢杆菌精氨酸酶和 PEG 部分之间形成, 所述热溶芽孢杆菌精氨酸酶具有在位置 161 处用于与所述 PEG 部分共价结合的唯一的半胱氨酸残基。

16. 如权利要求 15 所述的药物组合物, 其中所述人类精氨酸酶 I 为人类精氨酸酶 I 的 C168S/C303S 突变体, 其氨基酸序列示于 SEQ ID NO:10 或 SEQ ID NO:12; 或者

其中热溶芽孢杆菌精氨酸酶为热溶芽孢杆菌精氨酸酶的 S161C 突变体, 其氨基酸序列示于 SEQ ID NO:14 或 SEQ ID NO:16。

17. 如权利要求 15 所述的药物组合物, 所述药物组合物用于治疗精氨酸依赖型疾病。

18. 如权利要求 17 所述的药物组合物, 其中所述精氨酸依赖型疾病是癌症。

19. 如权利要求 17 所述的药物组合物, 其中所述精氨酸依赖型疾病是基本不表达鸟氨酸氨基甲酰转移酶的具有精氨酸脱亚胺酶敏感性的或具有精氨酸脱亚胺酶抗性的癌症。

20. 如权利要求 17 所述的药物组合物, 其中所述精氨酸依赖型疾病是被选自由 HIV、C 型肝炎病毒和 B 型肝炎病毒组成的组的病毒引起的感染。

21. 用于与 PEG 结合的热溶芽孢杆菌精氨酸酶或人类精氨酸酶 I, 其中所述精氨酸酶由包括以下步骤的方法制备:

(a) 指定精氨酸酶上的至少一个结合位置, 其中在所述位置处的氨基酸残基用于与 PEG 部分形成共价键;

(b) 修饰所述精氨酸酶的编码基因, 其中如果在所述结合位置处的氨基酸残基的密码子不是半胱氨酸密码子, 则将所述密码子改变为编码半胱氨酸的密码子, 并且如果所述基因具有第二个编码半胱氨酸残基的密码子, 所述第二个半胱氨酸残基不在所述结合位置, 并且从精氨酸酶暴露能够与 PEG 部分形成共价键, 则将第二个半胱氨酸残基的密码子改变为编码不是半胱氨酸的氨基酸的密码子; 和

(c) 在宿主中表达所述基因以生成所述精氨酸酶,

其中所述基因编码人类精氨酸酶 I, 并且在步骤 (c) 中生成的所述精氨酸酶的所述结合位置处的所述氨基酸残基为 Cys⁴⁵, 或者

其中所述基因编码热溶芽孢杆菌精氨酸酶, 并且在步骤 (c) 中生成的所述精氨酸酶的所述结合位置处的所述氨基酸残基为 Cys¹⁶¹。

22. 如权利要求 21 所述的热溶芽孢杆菌精氨酸酶或人类精氨酸酶 I, 其中所述热溶芽孢杆菌精氨酸酶为热溶芽孢杆菌精氨酸酶的 S161C 突变体, 所述人类精氨酸酶 I 为人类精氨酸酶 I 的 C168S/C303S 突变体。

23. 如权利要求 21 所述的热溶芽孢杆菌精氨酸酶或人类精氨酸酶 I, 其中所述热溶芽孢杆菌精氨酸酶具有增强酶活性, 其以脯氨酸取代热溶芽孢杆菌精氨酸酶位置 20 上的缬

氨酸。

24. 如权利要求 21 所述的热溶芽孢杆菌精氨酸酶或人类精氨酸酶 I, 其通过使用钴作为金属辅因子增强精氨酸酶活性。

25. 如权利要求 21 所述的热溶芽孢杆菌精氨酸酶或人类精氨酸酶 I, 其聚乙二醇化并具有增强对癌症的抗肿瘤作用。

26. 如权利要求 25 所述的热溶芽孢杆菌精氨酸酶或人类精氨酸酶 I, 其中所述癌症为肝癌、肺癌、结肠直肠癌、乳癌、黑色素瘤、白血病、胰癌、胃癌、子宫颈癌或前列腺癌。

精氨酸酶的定向位点聚乙二醇化及其作为抗癌和抗病毒试剂的用途

[0001] 交叉引用

[0002] 本申请要求在 2009 年 3 月 26 日提交的申请号为 61/163,863 的美国临时专利申请的权益,在此通过参考方式整体引入该申请的内容。

技术领域

[0003] 本发明涉及为增加精氨酸酶的血清或循环半衰期并提高其药代动力学性质、体内生物学活性、稳定性并降低对该酶的体内免疫反应(免疫原性)的目的而对该酶进行的修饰。更具体地说,本发明涉及通过遗传修饰编码精氨酸酶的基因使单聚乙二醇(monopolyethylene glycol)与精氨酸酶发生的定点共价偶联,以生成单-和定点聚乙二醇化精氨酸酶,这成为众多精氨酸依赖型疾病例如各种癌症和人类免疫缺陷病毒(HIV)感染的有效治疗措施。

背景技术

[0004] 精氨酸酶

[0005] 精氨酸酶是含有受金属激活的氢氧化物离子的锰金属酶,所述离子是催化水解和水合反应的金属酶中的关键亲核物质。精氨酸酶将天然存在的精氨酸转化为鸟氨酸和尿素。所述酶存在于包括细菌和人类在内的很多活体生物中(Jenkinson 等,1996, Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol,114:107-32)。

[0006] 精氨酸酶的聚乙二醇化

[0007] 精氨酸酶可以用作治疗剂并通过肠胃外施用于各种病状。然而,肠胃外施用的精氨酸酶(其是一种蛋白)可能具有免疫原性并且具有短的药理学半衰期。因此,在患者中难以实现该蛋白的治疗有用的血液水平。这些问题可以通过将该蛋白与聚合物例如聚乙二醇(PEG)偶联来克服。

[0008] 具有惰性的、非毒性的生物降解性聚合物 PEG 与分子的共价结合在生物技术和医药中具有重要的应用。据报道,具有生物学和药学生活性的蛋白的聚乙二醇化提高了药代动力学,从而延长了持续时间、改善了安全性(例如更低的毒性、免疫原性和抗原性)、增加了功效、降低了给药频率、提高了药物溶解度和稳定性、降低了蛋白质水解性并促进了药物的可控释放(Roberts 等,2002, Adv Drug Deliv Rev,54:459-76;Harris & Chess,2003, Nat Rev Drug Discov,2:214-221)。

[0009] 通过本领域中的常规方法生成的 PEG-蛋白偶联物含有不均一的物种,各自结合有数量不定(从 0 至该蛋白具有的氨基数)的 PEG 分子。即使对于结合有相同数目的 PEG 分子的物种,在该蛋白上的结合位点在这些物种之间也是不同的。然而,这种非特异性的聚乙二醇化可能得到部分无活性或基本无活性的偶联物。活性的降低可能是在 PEG 结合于不正确位点时遮蔽了该蛋白的活性受体结合域而造成的。因此,明确需要生成能够保留亲本蛋白的活性的均一(homogeneous)的聚乙二醇化蛋白分子并且使得临床用途所需的正确

和一致的剂量的施用成为可能的更好的方法。

[0010] 通过氨基酸剥夺的癌症治疗

[0011] 氨基酸剥夺疗法是用于一些癌症治疗的有效措施。虽然正常细胞不需要精氨酸，但是很多癌细胞系就这种氨基酸而言是营养缺陷型的。很多证据表明，体外精氨酸耗损（利用精氨酸降解酶或使用缺乏精氨酸的介质）导致大范围的癌细胞的迅速破坏（Scott et al., 2000, Br J Cancer, 83 :800-10）。然而酶（其是一种蛋白）的直接使用存在免疫原性、抗原性和短的循环半衰期的问题。

[0012] 通过精氨酸剥夺对病毒进行的抑制

[0013] 病毒感染是死亡的主要原因之一，每年数百万的死亡病例直接归因于若干种病毒，包括肝炎病毒和人类免疫缺陷病毒（HIV）。然而，使用目前的抗病毒疗法还存在若干问题。首先，有效的抗病毒药物相对较少。很多现有的抗病毒物质导致不利的或不希望的副作用。大部分有效的疗法（例如接种疫苗）只对单个病毒株具有高特异性。病毒经常发生突变，使得其对药物或疫苗产生抗性。需要不具与上述现有技术有关的问题的抑制病毒复制的方法。

[0014] 过去 30 年的研究表明，病毒的体外复制需要胞外精氨酸。过去这通过如下方法来实现：使组织培养物培养基缺乏精氨酸，并对作为增补物使用的血清进行透析以获得没有精氨酸的培养基。使用这种方法来实现精氨酸剥夺导致很多不同的病毒家族的复制受到抑制，所述病毒家族包括腺病毒（Rouse 等，1963, Virology, 20 :357-365）和疱疹病毒（Tankersley, 1964, J Bacteriol, 87 :609-13）。

[0015] 人类免疫缺陷病毒 (HIV)

[0016] 获得性免疫缺陷综合征（AIDS）是一种致命的疾病，据报道，该疾病的病例在过去数年内急剧增加。AIDS 病毒在 1983 年首次得到鉴定。该疾病具有数个名称和首字母缩略名。它是第三个已知的 T-嗜淋巴细胞病毒（HTLV-III），并且具有在免疫系统的细胞内复制的能力，导致深度的细胞破坏。AIDS 病毒是一种逆转录病毒（一种在复制期间使用逆转录酶的病毒）。目前已报道有两种明显不同的 HIV 病毒家族，即 HIV-1 和 HIV-2。本文中使用的首字母缩略名“HIV”一般表示人类免疫缺陷病毒。HIV 复制据信是精氨酸依赖型的，因此精氨酸的消耗将抑制 HIV 复制。

发明内容

[0017] 本发明的一个目的是提供新型的 PEG-精氨酸酶偶联物，所述偶联物基本上是均一的并且具有共价结合到精氨酸酶分子上的特定位点的 PEG 部分。本发明的两个优选的实施方式是 Cys⁴⁵-人类精氨酸酶 I (HAI) 和 Cys¹⁶¹-热溶芽孢杆菌 (*Bacillus caldovelox*) 精氨酸酶 (BCA)。

[0018] 本发明的另一个目的是提供制备定向位点、单聚乙二醇化精氨酸酶偶联物，所述偶联物具有强力的抗癌和抗病毒效果。本发明的一个特定的实施方式包括三个基本步骤。第一步骤是对编码精氨酸酶的基因的遗传修饰，使所得到的精氨酸酶将在给定的位置上具有单个自由的半胱氨酸残基。第二步骤是在选定的系统中表达经修饰的基因以生成所期望的精氨酸酶。表达系统可以是人类细胞或组织或者其它的生物体，包括例如细菌细胞、真菌细胞、植物细胞、动物细胞、昆虫细胞、酵母细胞或转基因动物。第三步骤是精氨酸酶的所述

自由的半胱氨酸残基与 PEG 化合物的马来酰亚胺基团 (MAL) 之间的偶联,这导致所述 PEG 化合物与精氨酸酶的所述自由的半胱氨酸之间发生共价结合。

[0019] 本发明的另一个目的是提供了通过精氨酸消耗治疗病毒感染的方法。该治疗方法采用均一的单聚乙二醇化精氨酸酶来抑制病毒的复制。

[0020] 本发明的另一个目的是提供抗人类免疫缺陷病毒 (HIV) 的方法。该方法采用均一的单聚乙二醇化精氨酸酶来抑制 HIV 的复制。

[0021] 本发明的另一个目的是提供通过用另外的氨基酸残基 (例如脯氨酸) 取代热溶芽孢杆菌精氨酸酶位置 20 (或者 HAI 和其它精氨酸酶的对位位置) 上的缬氨酸来增强精氨酸酶的酶促活性的方法。

[0022] 本发明的又一个目的是提供增强精氨酸酶的酶促活性的方法,所述方法通过用钴取代天然金属辅因子锰来实现。

[0023] 在所附的并构成本公开内容的一部分的权利要求书中具体指出表征本发明的各种新颖性特征。为了更好地理解本发明、本发明的操作优点以及使用本发明所实现的具体目标,应参考附图以及随后的其中展示并描述本发明的优选实施方式的具体实施方式部分。

附图说明

[0024] 图 1 显示了人类精氨酸酶 I 的核苷酸序列 (a) (SEQ ID No :1) 及其根据本发明为定向位点聚乙二醇化所设计的突变核苷酸酶序列 (b) (SEQ ID No :2);热溶芽孢杆菌精氨酸酶的核苷酸序列 (c) (SEQ ID No :3) 及其根据本发明为定向位点聚乙二醇化所设计的突变核苷酸酶序列 (d) (SEQ ID No :4)。

[0025] 图 2 显示了人类精氨酸酶 I 的氨基酸序列 (a) (SEQ ID No :5) 及其根据本发明为 Cys⁴⁵定向位点聚乙二醇化所设计的经修饰的氨基酸酶序列 (b) (SEQ ID No :6);热溶芽孢杆菌精氨酸酶的氨基酸序列 (c) (SEQ ID No :7) 及其根据本发明为 Cys¹⁶¹定向位点聚乙二醇化所设计的经修饰的氨基酸酶序列 (d) (SEQ ID No :8)。

[0026] 图 3 显示了为 Cys⁴⁵定向位点聚乙二醇化所设计的人类精氨酸酶 I 突变体 (C168S/C303S) 的核苷酸序列和氨基酸序列 (a) (SEQ ID No :9 和 SEQ ID No :10),为 Cys⁴⁵定向位点聚乙二醇化所设计的带有 6×His 标签的人类精氨酸酶 I 突变体 (C168S/C303S) 的核苷酸序列和氨基酸序列 (b) (SEQ ID No :11 和 SEQ ID No :12) 的比对,为 Cys¹⁶¹定向位点聚乙二醇化所设计的热溶芽孢杆菌精氨酸酶突变体 (S161C) 的核苷酸序列和氨基酸序列 (c) (SEQ ID No :13 和 SEQ ID No :14),为 Cys¹⁶¹定向位点聚乙二醇化所设计的带有 6×His 标签的热溶芽孢杆菌精氨酸酶突变体 (S161C) 的核苷酸序列和氨基酸序列 (d) (SEQ ID No :15 和 SEQ ID No :16) 的比对。

[0027] 图 4 显示了 (a) 野生型人类精氨酸酶 I 的晶体结构 (使用 Cn3D 4.1 软件从 NCBI 网站下载),其中示出 Cys⁴⁵远离活性位点;(b) 野生型热溶芽孢杆菌精氨酸酶的晶体结构,其中示出 Ser¹⁶¹远离活性位点。

[0028] 图 5 显示了用于具有单链 mPEG- 马来酰亚胺 (20kDa) 的带有 6×His 标签的人类精氨酸酶 I 突变体的 Cys⁴⁵- 定点单聚乙二醇化的偶联程序,其中示出马来酰亚胺的双键与巯基发生烷基化反应而形成稳定的硫醚键,和 (b) 用于带有 6×His 标签的热溶芽孢杆菌精

氨酸酶突变体的 Cys¹⁶¹- 特异性单聚乙二醇化的对应程序。

[0029] 图 6 显示了利用含有精氨酸酶基因的大肠杆菌 (*E. coli*) BL21-DE3 在 2 升发酵罐中发酵的时间过程, 其中显示出分批发酵获得的结果 (a1) 和补料 - 分批发酵获得的结果 (a2); 分批发酵的时间关系曲线图 (b1) 和补料 - 分批发酵的时间关系曲线图 (b2), 其中显示出诸如温度、搅拌速率、pH、溶解氧值等参数的变化; 来自螯合型 FF sepharose (琼脂糖) 柱的带有 6×His 标签的人类精氨酸酶 I 突变体的洗脱曲线 (c), 第一峰为蛋白杂质, 第二峰为经纯化的人类精氨酸酶 I; 和来自螯合型 FF sepharose 柱的带有 6×His 标签的热溶芽孢杆菌精氨酸酶突变体的洗脱曲线 (d), 第一峰为蛋白杂质, 第二峰为经纯化的热溶芽孢杆菌精氨酸酶。

[0030] 图 7 显示了含有带 6×His 标签的人类精氨酸酶 I 突变体 (a) 和带 6×His 标签的热溶芽孢杆菌精氨酸酶突变体 (b) 的不同组分的 SDS-PAGE 分析。

[0031] 图 8 显示了 (a) 没有聚乙二醇化的人类精氨酸酶 I 突变体和 Cys⁴⁵ 聚乙二醇化的人类精氨酸酶 I 突变体的 SDS-PAGE 分析 (泳道 1: 蛋白分子量标记, 泳道 2: 没有聚乙二醇化的人类精氨酸酶 I 突变体, 和泳道 3: Cys⁴⁵ 聚乙二醇化的人类精氨酸酶 I (HAI-PEG20)); (b) 没有聚乙二醇化的热溶芽孢杆菌精氨酸酶突变体和 Cys¹⁶¹ 聚乙二醇化的热溶芽孢杆菌精氨酸酶的 SDS-PAGE 分析 (泳道 1: 蛋白分子量标记, 泳道 2: 没有聚乙二醇化的热溶芽孢杆菌精氨酸酶突变体, 和泳道 3: Cys¹⁶¹ 聚乙二醇化的热溶芽孢杆菌精氨酸酶 (BCA-PEG20))。

[0032] 图 9 显示了 (a) 腹膜内注射到 BALB/c 小鼠中的单剂量非聚乙二醇化的和 Cys⁴⁵ 聚乙二醇化的人类精氨酸酶 I (HAI-PEG20) 的药代动力学曲线, 和 (b) 腹膜内注射到 BALB/c 小鼠中的单剂量非聚乙二醇化的和 Cys¹⁶¹ 聚乙二醇化的热溶芽孢杆菌精氨酸酶 (BCA-PEG20) 的药代动力学曲线。

[0033] 图 10 显示了腹膜内注射到 BALB/c 小鼠中长达 14 天的单剂量 Cys⁴⁵ 聚乙二醇化的人类精氨酸酶 I (HAI-PEG20) 的药效动力学曲线, 和 (b) 腹膜内注射到 BALB/c 小鼠中长达 14 天的单剂量 Cys¹⁶¹ 聚乙二醇化的热溶芽孢杆菌精氨酸酶 (BCA-PEG20) 的药效动力学曲线。

[0034] 图 11 显示了在研究过程中用不同药物注射的异种移植有 Hep3B 人类肝癌细胞的 BALB/c 裸小鼠 (a)、用 Cys¹⁶¹ 聚乙二醇化的热溶芽孢杆菌精氨酸酶注射的异种移植有 MCF-7 人类乳癌细胞的 BALB/c 裸小鼠 (b)、用不同药物注射的异种移植有 A549 肺癌细胞的 BALB/c 裸小鼠 (c) 和用不同药物注射的异种移植有 HCT-15 结肠直肠癌细胞的 BALB/c 裸小鼠 (d) 的平均体重 (± 标准误差 (s. e. m.))。

[0035] 图 12 显示了 (a) 非聚乙二醇化的和 Cys⁴⁵ 聚乙二醇化的人类精氨酸酶 I (HAI-PEG20) 在皮下移植有 Hep3B 人类肝肿瘤细胞的 BALB/c 裸小鼠中的体内活性 (功效); (b) Cys¹⁶¹ 聚乙二醇化的热溶芽孢杆菌精氨酸酶 (BCA-PEG20) 在皮下移植有 MCF-7 人类乳癌细胞的 BALB/c 裸小鼠中的体内活性; (c) Cys¹⁶¹ 聚乙二醇化的热溶芽孢杆菌精氨酸酶在皮下带有 A549 肺癌异种移植物的 BALB/c 裸小鼠中的体内功效; (d) Cys¹⁶¹ 聚乙二醇化的热溶芽孢杆菌精氨酸酶在皮下带有 A549 肺癌异种移植物的 BALB/c 裸小鼠中的体内功效 (数据表示为肿瘤体积的增大倍数的平均数 ± s. e. m.); (e) Cys¹⁶¹ 聚乙二醇化的热溶芽孢杆菌精氨酸酶在皮下带有 HCT-15 结肠直肠癌异种移植物的 BALB/c 裸小鼠中的体内功效; 和 (f) Cys¹⁶¹ 聚乙二醇化的热溶芽孢杆菌精氨酸酶在皮下带有 HCT-15 结肠直肠癌异种移植

的 BALB/c 裸小鼠中的体内功效（数据表示为肿瘤体积的增大倍数的平均数 $\pm$ s. e. m）。

[0036] 图 13 显示了 Cys⁴⁵聚乙二醇化的人类精氨酸酶 I (HAI-PEG20) 的 HIV 抑制测定。

[0037] 图 14 显示了叠氮胸腺嘧啶脱氧核苷 (azido-thymidine, AZT) 的 HIV 抑制测定。

[0038] 图 15 显示了 Cys⁴⁵聚乙二醇化的人类精氨酸酶 I (HAI-PEG20) 的细胞毒性。

[0039] 图 16 显示了带有不同金属辅因子即 Mn²⁺和 Co²⁺的人类精氨酸酶 I 的稳态动力学的比较。

[0040] 图 17 显示了热溶芽孢杆菌精氨酸酶 (BCA) 的 V20P 突变体和由 Mn²⁺ (BCAWTMn²⁺) 或 Co²⁺取代的野生型 BCA 的稳态动力学的比较。

具体实施方式

[0041] 人类精氨酸酶 I 基因 (HAI) 的克隆

[0042] 人类精氨酸酶 I 的基因序列如图 1a 所示 (SEQ ID No :1)。通过聚合酶链式反应 (PCR) 由 pAED4/HAI 质粒产生带有 6×His 标签的人类精氨酸酶 I 的基因 (HAI), 其中使用如下寡聚核苷酸以在 5' 末端产生 NdeI 位点和在 3' 末端产生 BamHI 位点: 引物 HuAr07-F : 5' GAT. ATA. CAT. ATG. CAT. CAC. CAT. CAC 3' (SEQ ID NO :17) 和引物 HuAr08-R : 5' AGT. GCA. GGA. TCC. TTA. CTT. AGG. TGG. GTT. AAG. GTA. GTC 3' (SEQ ID NO :18)。PCR 产物用 NdeI 和 BamHI 切割并亚克隆到 pET3a 表达质粒载体 (Stratagene) 中。

[0043] pET3a 大肠杆菌表达质粒载体含有 T7 启动子。所述 T7 启动子定位于基因 10 前导序列片段的上游。通过对人类精氨酸酶 I 的整个编码区进行 DNA 测序来证实序列的正确性 (图 1a)。该质粒表示为 pET3a/HAI。

[0044] 热溶芽孢杆菌精氨酸酶基因 (BCA) 的克隆

[0045] 热溶芽孢杆菌精氨酸酶的基因序列如图 1c 所示 (SEQ ID No :3)。使用 NdeI 和 BamHI 限制酶从质粒 pUC57/BCA 上切下带有 6×His 标签的热溶芽孢杆菌精氨酸酶的基因 (BCA)。将插入片段亚克隆到 pET3a 表达质粒载体 (Stratagene) 中。通过对热溶芽孢杆菌精氨酸酶的整个编码区进行测序来证实序列的正确性 (图 1c)。该质粒表示为 pET3a/BCA。

[0046] HAI 的诱变

[0047] 使用质粒 pET3a/HAI 作为模板, 根据 QuikChange® 定向位点诱变试剂盒 (Stratagene) 进行定向位点诱变。使用如下诱变引物 (分别为 SEQ ID No :19、20、21 和 22) 将 Cys¹⁶⁸和 Cys³⁰³残基的密码子分别突变为 Ser¹⁶⁸和 Ser³⁰³的密码子:

[0048] Cys¹⁶⁸密码子突变为 Ser¹⁶⁸密码子:

[0049] 引物 HuAr01-F : 5' GGG. TGA. CTC. CCT. CTA. TAT. CTG. CCA. AGG 3'

[0050] 引物 HuAr02-R : 5' CCT. TGG. CAG. ATA. TAG. AGG. GAG. TCA. CCC 3'

[0051] Cys³⁰³密码子突变为 Ser³⁰³密码子:

[0052] 引物 HuAr03-F : 5' GCA. ATA. ACC. TTG. GCT. TCT. TTC. GGA. CTT. GC 3'

[0053] 引物 HuAr04-R : 5' GCA. AGT. CCG. AAA. GAA. GCC. AAG. GTT. ATT. GC 3'。

[0054] 首先将突变质粒转化到感受态大肠杆菌 Top 10 细胞。通过 DNA 测序证实突变质粒的序列。为定向位点聚乙二醇化设计的 HAI 突变体的基因序列如图 1b 所示 (SEQ ID No : 2)。然后将突变质粒转化到大肠杆菌 BL21-DE3 细胞中进行蛋白表达。野生型 HAI 的氨基酸序列如图 2a 所示 (SEQ ID No :5)。C168S/C303S 突变体的氨基酸序列如图 2b (SEQ ID No :

6)、图 3a(SEQ ID No :10)、图 3b(SEQ ID No :12) 所示。如图 2b 所示,人类精氨酸酶 I 中的两个半胱氨酸残基被丝氨酸残基代替。这两个丝氨酸残基标有下划线。仅呈现的 Cys 是 Cys45。该突变体称为 C168S/C303S,其只含有一个单独的 Cys 残基(也标有下划线)。野生型 HAI 的晶体结构如图 4a 所示。根据该结构,进行用于构建 C168S/C303S 突变体的推理蛋白质药物设计(rational protein drug design)。在图 2d 中显示,热溶芽孢杆菌精氨酸酶中的一个丝氨酸残基被半胱氨酸残基代替。该半胱氨酸残基标有下划线。6×His 标签区域也标有下划线并且定位在 C 末端。该突变体称为 S161C。

[0055] 带有 6×His 标签的精氨酸酶的表达和纯化

[0056] 使带有含突变精氨酸酶基因的质粒的大肠杆菌 BL21-DE3 在 37℃ 在 LB 培养基中生长过夜,所述突变精氨酸酶基因编码带有 6×His 标签的人类精氨酸酶 I,所述 LB 培养基含有 80 μg/mL 氨苄青霉素。将接种物按 1 : 25 稀释并使其在摇瓶中生长到 OD₆₀₀ 为约 0.8,或者按 1 : 10 稀释并使其在发酵罐中生长到 OD₆₀₀ 为约 15。然后用 0.4mM IPTG 对细胞进行 4 小时的诱导。细菌细胞通过离心收集、重悬在 50mM Tris、0.1M NaCl、10mM MnCl₂(pH 7.4) 中,并通过高压匀浆进行破碎。

[0057] 通过经缓冲液 A(0.02M 磷酸钠,0.5M NaCl, pH 7.4) 平衡的螯合型 FF sepharose(GE Healthcare) 柱(5.0cm×9cm;床体积为 176mL) 纯化带有 6×His 标签的人类精氨酸酶 I。带有 6×His 标签的精氨酸酶用 0.15 至 0.25M 梯度的咪唑进行洗脱(图 6a 和图 6b)。流速为 20mL/min(毫升/分钟)。收集含有经纯化的精氨酸酶的组分(图 7a 和图 7b)。经纯化的精氨酸酶的产率为约 280mg/L 细胞培养物。

[0058] 重复带有 6×His 标签的人类精氨酸酶 I 的上述提取程序以获得经纯化的带有 6×His 标签的热溶芽孢杆菌精氨酸酶。

[0059] 带有 6×His 标签的精氨酸酶的定向位点聚乙二醇化

[0060] 图 5a 显示了用于将带有 6×His 标签的人类精氨酸酶 I 突变体与单链 mPEG- 马来酰亚胺(20kDa) 偶联(称为 HAI-PEG20) 的 Cys45- 定点单聚乙二醇化的程序。马来酰亚胺的双键经历了与巯基的烷基化反应而形成稳定的硫醚键。图 5b 显示了用于将带有 6×His 标签的热溶芽孢杆菌精氨酸酶突变体与单链 mPEG- 马来酰亚胺(20kDa)(称为 BCA-PEG20) 的 Cys¹⁶¹- 定点单聚乙二醇化的偶联程序。使用带有 10K(截留值)膜(Millipore) 的 Millipore Tangential Flow Filtration 系统(500mL),将 1 克带有 6×His 标签的精氨酸酶在 0.02M 磷酸钠、0.5M NaCl, pH 7.4 中进行渗滤。精氨酸酶的浓度最终稀释到约 2mg/mL。将 10 摩尔的摩尔超量的还原剂 Tris(2- 羧乙基) 膦(TCEP) 添加到 1 摩尔的精氨酸酶中进行还原,并在室温下温和搅拌 4 小时。按 20 摩尔的摩尔超量的 mPEG- 马来酰亚胺或 mPEG-MAL(20kDa) (Sunbright) 比 1 摩尔的精氨酸酶将 mPEG- 马来酰亚胺添加到经还原的精氨酸酶中并在 4℃ 搅拌过夜。

[0061] 通过 SDS-PAGE 监测定向位点聚乙二醇化的进程(图 8a 和 8b)。在上述条件下,人类精氨酸酶 I 上的位置 45 处的半胱氨酸的自由巯基通过稳定的硫醚键特异性地连接到 mPEG-MAL(20kDa) 的经激活的马来酰亚胺基团上。最终偶联产物包含优势量的 Cys⁴⁵ 聚乙二醇化人类精氨酸酶 I、未偶联的人类精氨酸酶 I 和 mPEG-MAL(20kDa)。对于热溶芽孢杆菌精氨酸酶,类似地,位置 161 处的半胱氨酸残基通过稳定的硫醚键特异性地连接到 mPEG-MAL(20kDa) 的经激活的马来酰亚胺基团上。

[0062] mPEG-MAL(20kDa) 聚乙二醇化精氨酸酶就更长的半衰期而言相对于 mPEG-MAL(5kDa) 聚乙二醇化精氨酸酶是有利的, 并且就更好的溶解性而言相对于 mPEG-MAL(40kDa) 聚乙二醇化精氨酸酶是有利的。

[0063] 在 2 升发酵罐中的分批发酵

[0064] 将含有精氨酸酶基因的大肠杆菌 BL21-DE3 株保存在 -80°C 。为了制备用于分批发酵和补料-分批发酵的种子接种物, 将 $100\ \mu\text{L}$ 上述菌株的冷冻储存液转移到装有 80mL 发酵培养基的 250mL 培养瓶中。将细菌培养物在 37°C 和 pH 7.0 于以 250rpm 旋转的定轨摇床中培养。当在约 8 至 10 小时 OD600nm 达到 5.5 至 6.0 时, 终止培养。将 12mL(1%) 种子接种物导入到装有 1200mL 经高压灭菌的滋养发酵培养基的 2L 发酵罐中。在 37°C 的温度进行分批发酵。通过添加氢氧化钠和盐酸将 pH 保持在 7.0。通过以 1 至 4L/分钟导入空气并将发酵罐的搅拌速度调节为 300 至 1200rpm, 将溶解氧水平控制为高于 30% 空气饱和度。当 OD600nm 在 5 小时为约 11.0 时, 将异丙基- β -D-硫代半乳糖-P(IPTG) (100mM) (热溶芽孢杆菌精氨酸酶 (BCA) 的蛋白表达诱导剂) 导入发酵液至 0.5mM 的终浓度。导入 IPTG 后, 继续发酵到 9 小时 (当 OD 600nm 为约 16.4 时)。IPTG 导入后 4 小时, 收获发酵细胞用于 BCA 的分离和纯化。前述菌株以约 105mg/L 的发酵培养基的量生成活性 BCA。发酵的时间过程作图于图 6a1 中。显示诸如温度、搅拌速率、pH、溶解氧值等参数的变化的该分批发酵的时间关系曲线图在图 6b1 中示出。

[0065] 在 2 升发酵罐中进行的补料-分批发酵

[0066] 使用高细胞密度培养物在 37°C 、pH 7.0 进行补料-分批发酵, 并在整个发酵过程中将溶解氧保持在高于 30% 空气饱和度。用于制备种子接种物的程序与上述分批发酵的类似。发酵最初通过将 5mL(1%) 种子接种物导入装有 500mL 经高压灭菌的滋养发酵培养基的 2L 发酵罐中而采用分批培养策略开始。溶解氧在分批培养周期中的生长期逐渐降低到约 30% 空气饱和度。一旦溶解氧水平增加到高于 80% (表示碳源消耗), 则添加补充性滋养培养基开始 P02stat 补料-分批策略。在该策略中, 补料速度调整为将溶解氧水平保持低于 60%, 这在发酵过程中提供了最小但是足够量的碳源。当在 18 小时 OD600nm 为约 100 时, 将异丙基- β -D-硫代半乳糖-P(IPTG) (100mM) 向发酵液中导入至 0.5mM 的终浓度。导入 IPTG 后, 继续发酵到 28 小时 (当 OD 600nm 为约 186.8 时)。IPTG 导入后 10 小时, 收获发酵细胞用于 BCA 的分离和纯化。前述菌株以约 1489.6mg/L 的发酵培养基的量生成活性 BCA。这高于所有其他所报道的不同类型精氨酸酶的产率。发酵的时间过程作图于图 6a2 中。显示该分批发酵的温度、搅拌速率、pH、溶解氧值等参数的变化的时间关系曲线图在图 6b2 中示出。

[0067] 分批发酵和补料-分批发酵的比较

[0068] 下表 1 比较了分批发酵和补料-分批发酵的结果。该比较证明, 就培养物 OD600、细胞干重和每升培养物的 BCA 产率而言, 补料-分批发酵远远优于分批发酵。

[0069] 表 1

[0070]

	分批发酵	补料-分批发酵
达到的最大 OD ₆₀₀	16.4	186.8
细胞干重(g)	4.9	76.6
BCA 产率(mg/L)	105.0	1489.6
BCA 产率(mg/g-细胞)	21.4	19.4

[0071] 定向位点聚乙二醇化精氨酸酶的纯化

[0072] 使用如下所述的亲和镍离子柱色谱层析法从 mPEG-MAL (20kDa) 分离出带有 6×His 标签的定向位点聚乙二醇化精氨酸酶。将偶联的最终产物装载到经缓冲液 A (0.02M 磷酸钠, 0.5M NaCl, pH 7.4) 平衡的螯合型 FF sepharose (GE Healthcare) 柱 (5.0cm×9cm; 床体积为 176mL)。用 5 柱体积的缓冲液 A 洗涤柱子以除去游离的 mPEG-MAL (20kDa)。使用 30% 至 100% 盐梯度的缓冲液 B (0.02M 磷酸钠, 0.5M NaCl, 0.5M 咪唑, pH 7.4) (5 柱体积) 洗脱聚乙二醇化精氨酸酶。在 280nm 波长处监测洗脱液的蛋白含量。以 20mL/ 分钟的流速洗脱柱子并收集聚乙二醇化精氨酸酶组分。所集中的组分渗滤到 PBS 缓冲液 (Gibco) 中并浓缩至 4 至 6mg/mL。在动物研究前, 使用 Q-filter (过滤器) (Sartoris) 除去蛋白质药物中的内毒素。

[0073] 定向位点聚乙二醇化精氨酸酶的体外细胞毒性

[0074] 通过在不同人类细胞 (黑色素瘤、肝细胞癌、胃腺癌、结肠直肠腺癌, 胰癌 (pancreatic carcinom)、胰腺癌 (pancreatic adenocarcinoma) 和 T 细胞白血病) 中进行的标准 MTT 测定来研究 Cys⁴⁵聚乙二醇化人类精氨酸酶 I 和 Cys¹⁶¹聚乙二醇化热溶芽孢杆菌精氨酸酶的体外细胞毒性。

[0075] 在不同浓度的 Cys⁴⁵聚乙二醇化人类精氨酸酶 I 和 Cys¹⁶¹聚乙二醇化热溶芽孢杆菌精氨酸酶存在的情况下, 在 5% CO₂ 培养箱中在 37℃ 将数量已知的细胞 (5000) 在 96 孔板的各个板孔中温育 68 小时。在药物温育 68 小时后, 将 50 μg 的 MTT (3-(4,5- 二甲基噻唑 -2- 基) -2,5- 二苯基四氮唑溴, 四唑) 溶液添加到各个板孔中并再温育 4 小时。弃掉上清并将 100 μl 的 10% 的 SDS/0.01M HCl 添加到各个板孔中, 然后温育过夜。通过微板读取器 (microplate reader, Bio-Rad) 在 540nm 处记录吸光度。针对不同的癌细胞系确定抑制 50% 细胞生长 (IC₅₀) 所需的各种药物的浓度。实验按 3 次重复进行。

[0076] 计算 Cys⁴⁵聚乙二醇化人类精氨酸酶 I 和 Cys¹⁶¹聚乙二醇化热溶芽孢杆菌精氨酸酶针对不同细胞系的 IC₅₀ 值, 结果列在表 2 中。由于热溶芽孢杆菌精氨酸酶的抗癌应答从未被知道, 因此这是首次证明了其抗癌性能和功效。在各种黑色素瘤细胞系 (SK-MEL-2、SK-MEL-28、A375) 中, 与 Cys¹⁶¹聚乙二醇化热溶芽孢杆菌精氨酸酶相比, Cys⁴⁵聚乙二醇化人类精氨酸酶 I 的 IC₅₀ 值较低。在不同肝细胞癌细胞系 (HepG2、Hep3B、PLC/PRF/5) 中, HepG2 细胞对 Cys⁴⁵聚乙二醇化人类精氨酸酶 I 和 Cys¹⁶¹聚乙二醇化热溶芽孢杆菌精氨酸酶都是最敏感的。总之, 所有受检的肝癌 (HCC) 和黑色素瘤细胞系均受到 BCA-PEG20 和 HAI-PEG20 的有效抑制。

[0077] 还针对其他 5 种癌细胞系 (包括胃腺癌、结肠直肠腺癌, 胰癌、胰腺癌和 T 细胞白血病) 进行了 Cys¹⁶¹聚乙二醇化热溶芽孢杆菌精氨酸酶测试。对于胃腺癌细胞系, Cys¹⁶¹

聚乙二醇化热溶芽孢杆菌精氨酸酶针对 MKN-45 细胞 (0.798U/mL) 的 IC_{50} 值类似于针对 AGS 细胞的 IC_{50} 值 (0.662U/mL)。在不同的结肠直肠腺癌细胞系 (WiDr、HT-29、SW1116) 中, WiDr 细胞和 HT-29 细胞对 Cys¹⁶¹ 聚乙二醇化热溶芽孢杆菌精氨酸酶都是敏感的。当将胰腺细胞系 (PANC-1) 和胰腺癌细胞系 (BxPC-3) 比较时, Cys¹⁶¹ 聚乙二醇化热溶芽孢杆菌精氨酸酶在 PANC-1 细胞中的 IC_{50} 值低 4 倍。对于 T 细胞白血病细胞系 (Jurkat、Clone E6-1), Cys¹⁶¹ 聚乙二醇化热溶芽孢杆菌精氨酸酶的 IC_{50} 值 (0.41U/mL) 也比其他癌细胞的低。总之, 所有受检的癌细胞系都对 HAI-PEG20 和 BCA-PEG20 治疗敏感 (并受到 HAI-PEG20 和 BCA-PEG20 治疗的抑制)。

[0078] 表 2

[0079]

肿瘤	细胞系	体外 IC_{50}			
		Cys ⁴⁵ 聚乙二醇化人类精氨酸酶 I	Cys ¹⁶¹ 聚乙二醇化热溶芽孢杆菌精氨酸酶	Cys ⁴⁵ 聚乙二醇化人类精氨酸酶 I	Cys ¹⁶¹ 聚乙二醇化热溶芽孢杆菌精氨酸酶
		U/mL	μg/mL	U/mL	μg/mL
黑色素瘤	SK-MEL-2	0.079	0.80	0.612	11.25
	SK-MEL-28	0.064	0.65	0.910	16.72
	A375	0.088	0.90	0.15	2.76
肝细胞癌	HepG2	0.097	0.99	2.002	36.79
	Hep3B	0.290	2.95	9.1	57.68
	PLC/PRF/5	0.94	9.56	2.376	43.67
胃腺癌	MKN-45	—	—	0.798	14.67
	AGS	—	—	0.662	12.17
结肠直肠腺癌	WiDr	0.075	0.76	0.192	3.53
[0080]	HT-29	—	—	0.220	4.04
	SW1116	0.41	4.18	1.515	27.84
	PANC-1	—	—	0.263	4.84
胰腺癌	BxPC-3	—	—	0.846	15.54
T 细胞白血病	Jurkat, Clone E6-1	—	—	0.410	7.54

[0081] 由定点聚乙二醇化精氨酸酶引起的精氨酸消耗

[0082] 使用 BALB/c 正常小鼠研究 Cys⁴⁵ 聚乙二醇化人类精氨酸酶 I 和 Cys¹⁶¹ 聚乙二醇化热溶芽孢杆菌精氨酸酶的药效动力学。该研究与药代动力学 (如下所述) 结合进行。因此, 程序保持相同。还有, 收集的血样立即在 13, 200rpm 离心 5 分钟, 并收集血浆层供采用氨基酸分析仪 (Biochrom 30, Biochrom Ltd., England) 进行的进一步分析使用。

[0083] 如图 10a 所示,鸟氨酸水平在注射 Cys⁴⁵聚乙二醇化人类精氨酸酶 I 后开始增加,并且在高水平上 ($> 150 \mu\text{M}$) 保持至第 3 天。从 6 小时 (第 0 天) 开始,精氨酸被完全消耗,并且在精氨酸酶施用 6.8 ± 2.3 天后开始出现。这表明 HAI-PEG20 有效地消耗血液精氨酸。

[0084] 对于 Cys¹⁶¹聚乙二醇化热溶芽孢杆菌精氨酸酶 (BCA-PEG20),鸟氨酸水平也开始增加并且保持高水平 ($> 170 \mu\text{M}$) 至第 3 天 (图 10b)。从 6 小时 (第 0 天) 开始精氨酸被完全消耗,并且在精氨酸酶施用 6.7 ± 2.1 天后开始出现。这表明 BCA-PEG20 有效地消耗血液精氨酸。

[0085] 两种聚乙二醇化的精氨酸酶 (Cys⁴⁵聚乙二醇化人类精氨酸酶 I 和 Cys¹⁶¹聚乙二醇化热溶芽孢杆菌精氨酸酶) 均显示出类似的药效动力学曲线。

[0086] 对肝癌的体内抗肿瘤功效

[0087] 然后研究了非聚乙二醇化人类精氨酸酶 I (HAI) 和 Cys⁴⁵聚乙二醇化人类精氨酸酶 I (HAI-PEG20) 对肝癌的体内抗肿瘤功效。

[0088] 很多 BALB/c 裸小鼠被腹膜内注射 (i. p.) 肝细胞癌 Hep3B 细胞并保持在体内。然后用 $\sim 1 \times 10^6$ 的体内保持癌细胞皮下注射 30 只 BALB/c 裸小鼠中的每一只的右腋窝。当形成 5mm 直径的可触摸的肿瘤时,将小鼠分为 3 个不同组 (见表 3)。从第 0 天开始每周腹膜内施用药物或 PBS 缓冲液,施用 8 周。测量体重和肿瘤尺寸 (L:肿瘤的较长直径的长度,和 W:肿瘤的较短直径的长度),每周两次。计算肿瘤体积 ($1/2 \times L \times W^2$) 并对时间作图。60 天后或者当肿瘤直径达到 2.5cm 时,对小鼠实施安乐死。在研究结束时记录小鼠的存活率。

[0089] 表 3

[0090]

体内抗肿瘤活性程序				
组	检测药物	小鼠	单位/小鼠	途径
1	PBS	5M5F	n/a	i.p.
2	非聚乙二醇化人类精氨酸酶 I	5M5F	500	i.p.
3	Cys ⁴⁵ 聚乙二醇化的人类精氨酸酶 I	5M5F	500	i.p.

[0091] 如图 11a 所示, PBS 对照组、Cys⁴⁵聚乙二醇化的人类精氨酸酶 I 组和非聚乙二醇化人类精氨酸酶 I 组的平均体重分别为 $25.9 \pm 0.2\text{g}$ 、 $25.0 \pm 0.2\text{g}$ 和 $25.5 \pm 0.2\text{g}$, 每个组在整个实验过程中没有显著变化。

[0092] 就肿瘤体积而言, Cys⁴⁵聚乙二醇化的人类精氨酸酶 I (HAI-PEG20) 从第 47 天开始显著地降低了肿瘤生长的速度 (与 PBS 对照组相比 ($p < 0.01$)); 而非聚乙二醇化人类精氨酸酶 I (HAI) 没有显示出任何显著的效果 ($p > 0.05$) (图 12a)。

[0093] 对乳癌的体内抗肿瘤功效

[0094] 接着确定了 Cys¹⁶¹聚乙二醇化的热溶芽孢杆菌精氨酸酶 (BCA-PEG20) 对乳癌的体内抗肿瘤功效。

[0095] 将无胸腺裸 BALB/c 小鼠 (6 至 8 周龄) 圈养在具有 12 小时光 - 暗周期的消毒条

件下,并让其自由食用经高压灭菌的食物。在实验开始前让小鼠适应至少 1 周。每只裸小鼠在右腋窝皮下注射 1×10^6 MCF-7 人类乳腺癌细胞。当形成 5mm 直径的可触摸的肿瘤时,将小鼠随机分为 2 个不同组(见表 4)。从第 0 天开始腹膜内注射药物或对照赋形剂(PBS),每周一次。在每个星期一、星期三和星期五,用游标卡尺测量肿瘤尺寸(L:最长直径,和 W:其垂直的直径)和体重。按公式 $(1/2 \times L \times W^2)$ 计算肿瘤体积并以第 0 天作为参照计算肿瘤体积的增大倍数。将结果对时间作图。在第 18 天或者当肿瘤直径达到 2.5cm 时,对小鼠实施安乐死,并记录最后的肿瘤和体重。

[0096] 表 4

[0097]

体内抗肿瘤活性程序				
组	检测药物	单位/小鼠	途径	小鼠
1	PBS(对照)	N/A	i.p.	4M 4F
2	Cys ¹⁶¹ 聚乙二醇化的热溶芽孢杆菌精氨酸酶	250	i.p.	4M 4F

[0098] 如图 11b 所示,在整个实验过程中,观察到对照组 (18.76 ± 0.50) 和 Cys¹⁶¹ 聚乙二醇化的热溶芽孢杆菌精氨酸酶 (19.76 ± 0.66) 的平均体重没有显著差异(图 11b)。Cys¹⁶¹ 聚乙二醇化的热溶芽孢杆菌精氨酸酶显著地抑制了肿瘤生长并降低了肿瘤增大倍数(与 PBS 对照组相比(双因素方差分析(2-way ANOVA): $p < 0.0001$,图 12b)。采用 Bonferroni 后检验(Bonferroni post-test),从第 15 天开始所述降低具有统计学显著性($p < 0.01$),其中所述降低超过 2.8 倍。

[0099] 对肺癌的体内抗肿瘤功效

[0100] 将无胸腺裸 BALB/c 小鼠(6 至 8 周龄)圈养在具有 12 小时光-暗周期的消毒条件下,并让其自由食用经高压灭菌的食物。在实验开始前让小鼠适应至少 1 周。每只裸小鼠在右腋窝将 5×10^6 A549 人类肺癌细胞和 matrigel 生长添加剂一起进行皮下注射。当形成 5mm 直径的可触摸的肿瘤时,将小鼠随机分为 3 个不同组(见表 5)。从第 0 天开始腹膜内注射药物或对照赋形剂(PBS),每周一次。在每个星期一、星期三和星期五,用游标卡尺测量肿瘤尺寸(L:最长直径,和 W:其垂直的直径)和体重。按公式 $(1/2 \times L \times W^2)$ 计算肿瘤体积并以第 0 天作为参照计算肿瘤体积的增大倍数(相对肿瘤体积)。

[0101] 表 5

[0102]

体内抗肿瘤活性程序				
组	检测药物	单位/小鼠	途径	小鼠
1	PBS(对照)	N/A	i.p.	5M 5F
2	非聚乙二醇化的热溶芽孢杆菌精氨酸酶	250	i.p.	5M 5F
3	Cys ¹⁶¹ 聚乙二醇化的热溶芽孢杆菌精氨酸酶	250	i.p.	5M 5F

[0103]

[0104] 在整个实验过程中观察到不同组之间的平均体重没有显著变化,实验结束时的最后记录如下:对照组为 $23.98 \pm 2.68\text{g}$, 非聚乙二醇化的热溶芽孢杆菌精氨酸酶为 $23.68 \pm 1.50\text{g}$, Cys^{161} 聚乙二醇化的热溶芽孢杆菌精氨酸酶为 $23.16 \pm 2.08\text{g}$ (图 11c)。

[0105] 然而,就肿瘤体积的进程变化(图 12c)和肿瘤倍数(图 12d)而言, Cys^{161} 聚乙二醇化的热溶芽孢杆菌精氨酸酶(BCA-PEG20)统计学显著地抑制了肿瘤的生长。双因素方差分析显示,两个参数的 P 值 < 0.0001 ,而 Bonferroni 后检验显示,肿瘤体积的差异从第 28 天 ($p < 0.05$) 开始至第 35 天 ($p < 0.001$),而相对肿瘤体积的差异从第 30 天开始至第 35 天(所有点均为 $p < 0.01$)。相同剂量方案的未聚乙二醇化的热溶芽孢杆菌精氨酸酶(BCA)也以类似的方式显示出程度类似的抗肺癌效果,两个参数具有统计学显著性(双因素方差分析,两者均为 $p < 0.0001$)。

[0106] 对结肠直肠癌的体内抗肿瘤功效

[0107] 非聚乙二醇化的热溶芽孢杆菌精氨酸酶(BCA)和 Cys^{161} 聚乙二醇化的热溶芽孢杆菌精氨酸酶(BCA-PEG20)对结肠直肠癌的体内抗肿瘤功效测定如下。

[0108] 将无胸腺裸 BALB/c 小鼠(6 至 8 周龄)圈养在具有 12 小时光-暗周期的消毒条件下,并让其自由食用经高压灭菌的食物。在实验开始前让小鼠适应至少 1 周。每只裸小鼠在右腋窝皮下移植有 $\sim 3\text{mm}^3$ 的体内保持 HCT-15 人类结肠直肠癌细胞。当形成 5mm 直径的可触摸的肿瘤时,将小鼠随机分为 5 个不同组(表 6)。从第 0 天开始进行精氨酸酶药物或对照赋形剂(PBS)的腹膜内施用(每周两次)和 5-氟尿嘧啶的腹膜内施用(每周一次)。在每个星期一、星期三和星期五,用游标卡尺测量肿瘤尺寸(L:最长直径,和 W:其垂直的直径)和体重。按公式 $(1/2 \times L \times W^2)$ 计算肿瘤体积并以第 0 天作为参照计算肿瘤体积的增大倍数(相对肿瘤体积)。将结果对时间作图。在实验结束时或者当肿瘤的直径达到 2.5cm 时对小鼠实施安乐死。

[0109] 表 6

[0110]

体内抗肿瘤活性程序				
组	检测药物	单位/小鼠	途径	小鼠
1	PBS(对照)	N/A	i.p.	4M 4F
2	未聚乙二醇化的热溶芽孢杆菌精氨酸酶	500	i.p.	4M 3F
3	Cys^{161} 聚乙二醇化的热溶芽孢杆菌精氨酸酶	250	i.p.	4M 3F
4	Cys^{161} 聚乙二醇化的热溶芽孢杆菌精氨酸酶 + 5-氟尿嘧啶	250	i.p.	4M 3F
5	5-氟尿嘧啶	1 mg/kg	i.p.	2M 2F

[0111] 在整个实验过程中观察到不同组之间的平均体重没有显著变化,实验结束时的最后记录如下:对照组为 $24.3 \pm 0.9\text{g}$, 未聚乙二醇化的热溶芽孢杆菌精氨酸酶组为 $22.1 \pm 1.0\text{g}$, Cys^{161} 聚乙二醇化的热溶芽孢杆菌精氨酸酶组为 $24.2 \pm 0.7\text{g}$, Cys^{161} 聚乙二醇化的热溶芽孢杆菌精氨酸酶 + 5-氟尿嘧啶组为 $23.5 \pm 1.2\text{g}$, 5-氟尿嘧啶组为

24.5±1.4g(图 11d)。

[0112] 在所有三个精氨酸酶药物治疗组中，Cys¹⁶¹聚乙二醇化的热溶芽孢杆菌精氨酸酶(BCA-PEG20) 和非聚乙二醇化的热溶芽孢杆菌精氨酸酶(BCA) 都具有统计学显著性地抑制了肿瘤生长(图 12e 和图 12f)。对于药物组合组(Cys¹⁶¹聚乙二醇化的热溶芽孢杆菌精氨酸酶+5- 氟尿嘧啶)，双因素方差分析显示，肿瘤体积倍数和肿瘤体积具有显著性(两种情况中均为：p < 0.0001)。Bonferroni 后检验进一步确认，肿瘤体积倍数的显著差异出现在第 36 天至第 40 天。对于 Cys¹⁶¹聚乙二醇化的热溶芽孢杆菌精氨酸酶单独组，双因素方差分析显示肿瘤体积倍数和肿瘤体积的显著性分别为：p = 0.0005 和 p = 0.0011。Bonferroni 后检验表明，肿瘤体积倍数的差异出现在第 38 天至 40 天，而肿瘤体积的差异出现在第 40 天。对于非聚乙二醇化的热溶芽孢杆菌精氨酸酶组，肿瘤体积倍数和肿瘤体积的 p 值分别为 0.0202 和 < 0.0001。就肿瘤体积倍数而言，5- 氟尿嘧啶组没有显示出显著的肿瘤抑制作用(图 12f)。药物组合组导致统计学显著地降低了肿瘤体积和肿瘤体积倍数(与 Cys¹⁶¹聚乙二醇化的热溶芽孢杆菌精氨酸酶单独组(分别为：p < 0.0001 和 p = 0.0120)) 和 5- 氟尿嘧啶单独组(分别为 p = 0.0158 和 p = 0.0434)。结果表明，Cys¹⁶¹聚乙二醇化的热溶芽孢杆菌精氨酸酶和 5- 氟尿嘧啶具有协同治疗效应。

[0113] 对乳癌转移的体内抑制功效

[0114] 将 1×10⁵的小鼠转移人癌细胞系(4T1) 细胞原位(orthotopically) 注射到 6 至 8 周龄的野生型 BALB/c 小鼠的 4 号腹股沟乳腺脂肪垫中。当肿瘤达到平均 5mm 时，将小鼠分为 2 个不同的治疗组(表 7)。从第 0 天开始腹膜内注射 BCA-PFG20(250U/ 小鼠) 或对照赋形剂(PBS)(每周两次)。每周测量体重。3 周后，处死小鼠并分析肺转移。用 PBS 冲洗后在解剖显微镜下对肺转移的数量进行计数。

[0115] 在整个实验过程中观察到不同组之间的平均体重没有显著差异。实验结束时的最后记录为：对照组 21.8g，BCA-PEG20 组 21.5。

[0116] 结果表明，与 PBS 赋形剂组相比，BCA-PEG20 降低了自然肺肿瘤节结形成。在 PBS 组中，自然肺转移多得难以计数，而在 BCA-PEG20 组中发现平均只有 4 个节结(表 8)。结果表明，由 BCA-PEG20 造成的精氨酸消耗抑制了乳腺肿瘤转移。

[0117] 表 7

[0118]

体内抗转移程序				
组	检测药物	单位/小鼠	途径	小鼠
1	PBS(对照)	N/A	i.p.	1M
2	BCA-PEG20	250	i.p.	2M

[0119] 表 8

[0120]

组	检测药物	自然肺转移
1	PBS(对照)	TNTC*
2	BCA-PEG20	4

[0121] HAI-PEG20 对 HIV 的效果

[0122] 测定 Cys⁴⁵聚乙二醇化的人类精氨酸酶 I (HAI-PEG20) 对人类免疫缺陷病 (HIV) 的 50% 抑制浓度 (IC₅₀) 作为其对 HIV 的效果的度量。

[0123] 使用用于病毒复制的细胞培养物模型可以评估抗病毒药物的功效。HIV 复制测定法采用 H9 细胞和 HIV-1 株 RF。来自人类 T 淋巴细胞的 H9 细胞对 CXCR4- 使用 HIV-1 分离物的感染高度易感, 并且在注射后数天就显示出细胞变性效果的明显症候。HIV-1 株 RF 是能够在 H9 细胞内高水平复制的 CXCR4- 使用 B 类型分离物。

[0124] 按 5×10^4 活细胞 / mL 将 H9 细胞接种到四个 96 孔板并将培养物于 37°C 温育。第二天, 以 0.005 感染复数 (50 μ L / 孔) 将 HIV-1 接种到两个 96 孔板中。

[0125] 感染 24 小时后, 用在组织培养基 (10% RPMI) 中稀释至 1U/mL、10U/mL 和 50U/mL 终浓度的 Cys⁴⁵聚乙二醇化的人类精氨酸酶 I (HAI-PEG20) 处理一个受感染的 96 孔板的各细胞。每种药物浓度检测 8 个重复, 并且每孔添加 100 μ L。

[0126] 该测定中使用叠氮胸腺嘧啶脱氧核苷 (AZT) 作为基准药物以确保获得剂量应答。叠氮胸腺嘧啶脱氧核苷适当地稀释 (0.01, 0.1 和 1 μ g/mL) 在 10% RPMI 中并添加到另一个受感染的板中。每种药物浓度检测 8 个重复, 并且每孔添加 100 μ L。

[0127] 平行设置细胞毒性对照; 该对照由用 3 种药物浓度 (1U/mL、10U/mL 和 50U/mL; 每种药物浓度 8 个重复) 处理的未感染细胞的一个 96 孔板组成。这可以确定细胞毒性浓度 (CC₅₀)

[0128] 剩下的 96 孔板用单独的组织培养基接种以用作阴性对照。

[0129] 感染后 5 天, 检查培养板的细胞变性效果, 并通过比较受药物治疗的细胞和不受治疗细胞中的合胞体细胞数目来确定药物的 IC₅₀。

[0130] 结果显示, 接种 HIV 株 RF 的 H9 细胞具有病毒感染, 而单独用组织培养基接种的 H9 细胞在整个研究过程中保持健康。在用 HIV 感染并用所有浓度的 Cys⁴⁵聚乙二醇化的人类精氨酸酶 I (HAI-PEG20) 处理的 H9 细胞培养物中观察到细胞变性效果。用终浓度为 1U/mL 的聚乙二醇化精氨酸酶处理的 8 个受感染板孔中的 8 个板孔 (8/8) 展现出细胞变性效果。对于用终浓度为 10U/mL 的酶处理的受感染板孔, 6/8 的板孔展现出细胞变性效果。当检测最高终浓度 (50U/mL) 的药物时, 3/8 的板孔展现出细胞变性效果。这些结果显示在表 9 和图 13 中。发现药物的 IC₅₀ 为约 37U/mL。

[0131] 当以 0.01 μ g/mL 将基准药物 AZT 添加到受感染的板孔时, 7/8 的板孔展现出细胞变性效果。对于用 0.1 μ g/mL 的 AZT 处理的受感染板孔, 6/8 的板孔展现出细胞变性效果。在 1 μ g/mL 检测时, 2/8 的板孔展现出细胞变性效果。这些结果在图 14 中展示。发现 AZT 的 IC₅₀ 为 0.58 μ g/mL。

[0132] 表 9

[0133]

病毒抑制测定

样品	结果
未经 Cys ⁴⁵ 聚乙二醇化的人类精氨酸酶 I 处理的 HIV	24/24
未经 Cys ⁴⁵ 聚乙二醇化的人类精氨酸酶 I 处理的 HIV(另一板)	22/24
经过 Cys ⁴⁵ 聚乙二醇化的人类精氨酸酶 I 处理的 HIV(50 U/ml)	3/8
经过 Cys ⁴⁵ 聚乙二醇化的人类精氨酸酶 I 处理的 HIV(10 U/ml)	6/8
经过 Cys ⁴⁵ 聚乙二醇化的人类精氨酸酶 I 处理的 HIV(1 U/ml)	8/8
经过 AZT 处理的 HIV(0.01 µg/ml)	7/8
经过 AZT 处理的 HIV(0.1 µg /ml)	6/8
经过 AZT 处理的 HIV(1 µg/ml)	2/8
阴性对照	0/96
细胞毒性对照-经过 Cys ⁴⁵ 聚乙二醇化的人类精氨酸酶 I 处理的没有感染细胞(50 U/ml)	8/8*
细胞毒性对照-经过 Cys ⁴⁵ 聚乙二醇化的人类精氨酸酶 I 处理的没有感染细胞(10 U/ml)	8/8*
细胞毒性对照-经过 Cys ⁴⁵ 聚乙二醇化的人类精氨酸酶 I 处理的没有感染细胞(1 U/ml)	8/8*

[0134] 各个板孔以 0.005 感染复数接种 50 µL 的 HIV。

[0135] * = 在各个板孔中观察到的细胞毒性, 因此每个浓度进行 1 个板孔的存活率计数。结果以比率的形式记录; 例如, 1/X, 其中 1 是阳性板孔数目 / 接种板孔数目。

[0136] 表 10 提供了细胞毒性对照的存活率计数。在细胞毒性检测中, 所有板孔展示了细胞毒性症状, 因此 Cys⁴⁵ 聚乙二醇化的人类精氨酸酶 I 的每个浓度都进行一个板孔的存活率计数。最高浓度得到的细胞存活率分别为: 50U/mL, 30%; 10U/mL, 39%。对于 1U/mL, 细胞存活率为 58%。基于此, 评测了所有 8 个板孔的细胞存活率, 并且确定平均值为 48.9%。根据细胞接种在 96 孔板上时细胞的存活率 (96.8%), 这大约为细胞存活率降低了 50%。这些结果展示在表 10 和图 15 中, 其中清楚地证明了 HAI-PEG20 对 HIV 复制具有抑制效果。

[0137] 表 10

[0138]

细胞毒性控制中的细胞存活率

样品	活细胞	总细胞	结果	
			存活率%	平均存活率%
50 U/mL-1 孔	9	30	30	N/A
10 U/mL-1 孔	11	28	39	N/A
1 U/mL	第 1 孔	33	58	48.9
	第 2 孔	63	48	
	第 3 孔	59	39	
	第 4 孔	60	35	
	第 5 孔	58	57	
	第 6 孔	56	52	
	第 7 孔	49	63	
	第 8 孔	61	39	

[0139] N/A = 不适用

[0140] 体外抗癌效果

[0141] 针对各种不同的癌类型进行了不同精氨酸消耗性酶的抗癌功效的体外癌细胞培养研究。

[0142] 细胞增殖测定：对于每种癌细胞系，将在 100 μ L 培养物培养基中的细胞 (5×10^3) 接种到 96 孔板的板孔中并采用标准方法温育 24 小时。用含有不同浓度的精氨酸酶或精氨酸脱亚胺酶 (ADI) 之一的培养基替换培养物培养基。在 37°C 在 95% 空气 / 5% CO₂ 的氛围中将培养板再温育 3 天。通过 MTT 测定法确定代谢性活细胞组分，进行该方法以估计培养物中的活细胞数量。通过采用 Prism4.0 (Graphpad Software) 进行的非线性回归来拟合 S 形 (sigmoidal) 剂量应答曲线，将实现 50% 的细胞生长抑制作用所需的每种精氨酸降解酶的量 (以 U/mL 或单位 / ml 或 μ g/mL 表示) 定义为 IC₅₀。

[0143] RT-PCR 研究：使用 Qiagen RNeasy 试剂盒从在培养物中生长的癌细胞系中提取总 RNA。对于逆转录 - 聚合酶链式反应 (RT-PCR)，首先根据生产商的说明书使用 iScript cDNA 合成试剂盒 (Bio-Rad, CA) 将 RNA 逆转录为 cDNA。简而言之，用 5 μ g 的总 RNA 在 42°C 进行 30 分钟的 RT (逆转录)。然后使用 50 μ L 含有 0.5 单位的 iTaq DNA 聚合酶 (Bio-Rad, CA) 的反应混合物扩增部分 cDNA (2 μ L)。在 DNA 热 MyCycler (Bio-Rad, CA) 中进行 PCR。使用以下侧翼引物：

[0144] (a) 人类 ASS (448bp 产物)：

[0145] 正义：5' -GGGGTCCCTGTGAAGGTGACC-3'；

[0146] 反义：5' -CGTTCATGCTCACCAGCTC-3'

[0147] (b) 人类 ASL (218bp 产物)：

[0148] 正义：5' -CTCCTGATGACCCTCAAGGGA-3'；

[0149] 反义:5' -CATCCCTTTGCGGACCAGGTA-3'

[0150] (c) 人类 OTC(221bp 产物):

[0151] 正义:5' -GATTGGACACCCTGGCTAA-3' ;

[0152] 反义:5' -GGAGTAGCTGCCTGAAGGTG-3'

[0153] (d) 人类 GAPDH(306bp 产物):

[0154] 正义:5' -AGCCACATCGCTCAGACA-3' ;

[0155] 反义:5' -GCCCAATACGACCAAATCC-3'

[0156] 对反应产物进行 1% 琼脂糖凝胶电泳。在电泳和用溴化乙锭染色后,通过荧光成像仪 (Lumi-Imager) (Boehringer Mannheim, IN) 分析所有 PCR 产物条带强度,并通过用看家基因 GAPDH 进行的归一化来估计相对 mRNA 表达水平。

[0157] 如结果所示,精氨酸酶和 ADI 全部都是有效的精氨酸降解酶。令人预想不到的是,本发明人发现在此受检的所有癌细胞系都对精氨酸酶敏感,但是很多癌细胞实际上对 ADI 处理具有抗性。在本发明中发现,这种差异是由于精氨酸酶事实上将精氨酸转化为鸟氨酸和尿素,而 ADI 将精氨酸转化为瓜氨酸和氨。如果癌细胞呈 ASS 阳性和 ASL 阳性,则瓜氨酸能够再循环回到精氨酸,导致药物抗性。最令人惊讶的是,如果癌细胞呈 OTC 阴性,即使它们呈 ASS 阳性和 ASL 阳性,它们也不能在细胞中将鸟氨酸循环回到精氨酸。已发现本发明提供的这种指导方针与本发明人的所有数据以及来自其他研究组的数据吻合。根据这种指导方针,例如,如果癌细胞呈 ASS 阴性和 / 或 ASL 阴性,它们将具有精氨酸酶敏感性和 ADI 敏感性。另一方面,如果癌细胞同时呈 ASS 阳性和 ASL 阳性但是呈 OTC 阴性,它们将具有精氨酸酶敏感性且具有 ADI 抗性。因此据信精氨酸酶具有比 ADI 更广泛的抗癌用途。而且,氨 (来自 ADI 反应的产物) 比尿素 (来自精氨酸酶反应的产物) 更具毒性。因此,相信本发明的精氨酸酶抗癌试剂比 ADI 更安全。

[0158] 体外抗癌功效结果总结在表 11a 至表 11g 中。如表 11a 所示,所有受检的黑素瘤细胞系对精氨酸酶处理敏感。当向培养物培养基中添加精氨酸酶时,精氨酸被转化为鸟氨酸和尿素。所有这些细胞都呈 OTC 阴性,并且根据上述讨论的指导方针,这些细胞不能在细胞中将精氨酸酶反应产物鸟氨酸再循环回到精氨酸,因此,所述细胞由于缺乏精氨酸而受到抑制。根据 IC₅₀ 值,所有受检的精氨酸酶对癌细胞生长的抑制都非常有效。

[0159] 尽管所有受检的黑素瘤细胞系都呈 ASS 阳性和 ASL 阳性,但是 ASS 的表达水平低,这可以通过进行 ASS 活性测定证实。低 ASS 表达水平解释了为什么这些细胞系都对 ADI 处理敏感。B16 是小鼠黑素瘤细胞系,并且对精氨酸酶和 ADI 也都是敏感的。因此据信 ADI 杀死黑素瘤细胞是因为 ASS 表达水平低,而精氨酸酶杀死黑素瘤细胞是因为它们呈 OTC 阴性。

[0160] 表 11b 显示,所有受检的白血病细胞系对精氨酸酶处理敏感。这些受检的癌细胞中的一些细胞呈 OTC 阴性,并且根据上述讨论的指导方针,这些细胞不能在细胞中将精氨酸酶反应产物鸟氨酸再循环回到精氨酸,因此所述细胞由于缺乏精氨酸而受到抑制。根据 IC₅₀ 值,所有受检的精氨酸酶对白血病细胞生长的抑制都非常有效。对于 ADI 处理,除了 RPMI8226 之外,所有受检的 4 种其它白血病细胞系都是敏感的, RPMI8226 对 ADI 处理具有抗性,很可能是因为事实上都呈 ASS 阳性和 ASL 阳性。因此,对于抑制白血病细胞,精氨酸酶比 ADI 有利。

[0161] 表 11c 显示,所有受检的结肠直肠癌细胞系都对精氨酸酶处理敏感。所有这些受

检的癌细胞都呈 OTC 阴性。与上述讨论的指导方针吻合的是,这些细胞不能在细胞中将精氨酸酶反应产物鸟氨酸再循环回到精氨酸,因此,所述细胞由于缺乏精氨酸而受到抑制。根据 IC_{50} 值,所有受检的精氨酸酶对结肠直肠癌细胞生长的抑制都非常有效。对于 ADI 处理,只有受检的两种结肠直肠癌细胞系 (WiDr 和 HT29) 是敏感的,其他 2 种 (SWI 116 和 HCT15) 对 ADI 处理具有抗性,很可能是因为它们事实上都呈 ASS 阳性和 ASL 阳性。对于 HT29,尽管根据 RT-PCR 数据,它是呈 ASS 阳性和 ASL 阳性,但是,如进行 ASS 活性测定所证实的那样,ASS 的表达水平低,这解释了为什么这种细胞系对 ADI 处理敏感。

[0162] 同样如表 11c 所示,更令人吃惊的是,所有受检的胰癌细胞系都对精氨酸酶处理敏感。所有受检的这些癌细胞都呈 OTC 阴性。如上所述,这些细胞不能在细胞中将精氨酸酶反应产物鸟氨酸再循环回到精氨酸,因此所述细胞由于缺乏精氨酸而受到抑制。根据 IC_{50} 值,所有受检的精氨酸酶对胰癌细胞生长的抑制都非常有效。对于 ADI 处理,只有受检的一种胰癌细胞系 (Panc1) 是敏感的,而其他 2 种 (BxPC3 和 HPAFII) 对 ADI 处理具有抗性。显然,对于抑制胰癌细胞系,精氨酸酶比 ADI 更好。

[0163] 表 11d 显示,所有受检的胃癌细胞系都对精氨酸酶处理敏感。所有受检的这些癌细胞都呈 OTC 阴性,因此,如上所述,这些细胞不能在细胞中将精氨酸酶反应产物鸟氨酸再循环回到精氨酸,因此,所述细胞由于缺乏精氨酸而受到抑制。如根据 IC_{50} 值所示,所有受检的精氨酸酶对胃癌细胞生长的抑制都非常有效。明显不同的是,所有受检的胃癌细胞系都对 ADI 处理具有抗性,很可能是因为它们事实上都呈 ASS 阳性和 ASL 阳性。在由受检的肝癌 (或 HCC) 细胞系中获得了这种类似的结果,如表 11e 所示。

[0164] 表 11e 还显示,受检的眼癌细胞系 Y79 对精氨酸酶处理敏感,但是对 ADI 处理具有抗性,很可能是因为它们都呈 ASS 阳性和 ASL 阳性。

[0165] 表 11f 显示,受检的肺癌细胞系 A549 对精氨酸酶处理敏感。这些受检的癌细胞呈 OTC 阴性,该细胞系对 ADI 处理也是敏感的,很可能是因为它们事实上呈 ASS 阴性或 ASL 阴性。相反,表 11f 还显示,受检的所有宫颈癌细胞系都对精氨酸酶处理敏感 (它们全都呈 OTC 阴性),但是只有 2 种受检的宫颈癌细胞系 (SiHa 和 C-33A) 是敏感的,而其他 3 种 (HeLa, ME180, CC3) 对 ADI 处理具有抗性,很可能是因为它们事实上均呈 ASS 阳性和 ASL 阳性。

[0166] 乳癌细胞的结果显示在表 11g 中。如表中所示,所有受检的乳癌细胞系都对精氨酸酶处理敏感 (它们全都呈 OTC 阴性)。令人吃惊的是,只有 1 种受检的乳癌细胞系 (MDA-MB-231) 是敏感的,而其他 3 种 (MCF-7、ZR-75-1、Hs578T) 对 ADI 处理具有抗性。

[0167] 表 11g 还显示了前列腺癌细胞系的结果,发现前列腺癌细胞系对精氨酸酶处理和 ADI 处理都敏感。如上所述,这个结果可以由该细胞系均呈 OTC 阴性和 ASS 阴性的事实所解释。

[0168] 表 11a

[0169]

癌症 类型	细胞系名 (培养基源)	BCA U/mL ($\mu\text{g/mL}$)	HAI U/mL ($\mu\text{g/mL}$)	rhArg U/mL ($\mu\text{g/mL}$)	ADI U/mL ($\mu\text{g/mL}$)	ARG	OTC	ASS	ASL
黑素瘤	SK-mel-2 (EMEM 10%FBS, 1%PS ATCC)	0.612 (11.25)	0.079 (0.80)	0.0556 (1.31)	0.0022 (0.082)	-	-	+	+
	SK-mel-24 (EMEM 10%FBS, 1%PS NCT)			0.204 (4.82)	0.012 (0.45)	-	-	+	+
	SK-mel-28 (EMEM 10%FBS, 1%PS ATCC)	0.91 (16.72)	0.064 (0.65)	0.0523 (1.233)	0.00084 (0.031)	-	-	+	+
	A375 (DMEM 10%FBS, 1%PS ATCC)	0.15 (2.76)	0.061 (0.62)	0.0288 (0.679)	0.00059 (0.022)	-	-	+	+
	B16 (DMEM 10%FBS, 1%PS ATCC)			0.02 (0.48)	0.004 (0.11)	-	-	+	+

[0170] 表 11b

[0171]

癌症类型	细胞系名 (培养基源)	BCA U/mL ($\mu\text{g/mL}$)	HAI U/mL ($\mu\text{g/mL}$)	rhArg U/mL ($\mu\text{g/mL}$)	ADI U/mL ($\mu\text{g/mL}$)	ARG	OTC	ASS	ASL
白血病	HL60 (RPMI 10%FBS, 1%PS ATCC)			0.03 (0.679)	0.016 (0.591)	+	-	-	+
	K562 (RPMI 20%FBS, 1%PS ATCC)			0.06 (1.357)	0.003 (0.085)	-	-	+	-
	RPMI8226 (RPMI 10%FBS, 1%PS ATCC)			0.09 (2.036)	R				
	Jurkat (RPMI 10%FBS, 1%PS ATCC)	0.41 (7.54)		0.037 (0.86)	0.002 (0.074)				

[0172] 表 11c

[0173]

细胞 类型	细胞系名 (培养基源)	BCA U/mL ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	HAI U/mL ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	rhArg U/mL ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	ADI U/mL ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	ARG	OTC	ASS	ASL
结肠直 肠癌	(WiDr DMEM 10%FBS, 1%PS ATCC)	0.215 (3.96)	0.075 (0.76)	0.038 (0.84)	0.035 (0.9)	+	-	+	-
	SW1116 (RPMI 10%FBS, 1%PS ATCC)	1.417 (20.98)	0.41 (4.18)	0.15 (3.394)	R	+	-	+	+
	HT29 (DMEM 10%FBS, 1%PS ATCC)	0.231 (4.24)		0.03 (0.679)	0.032 (0.83)	+	-	+	+
	HCT15 (RPMI 10%FBS, 1%PS ATCC)		0.63 (6.44)	0.083 (1.043)	R	+	-	+	+
胰癌	Panc1 (DMEM 10%FBS, 1%PS ATCC)	0.263 (4.84)		0.09 (2.036)	0.049 (1.39)	-	-	+	+
	BxPC3 (EMEM 10%FBS, 1%PS ATCC)	0.846 (15.54)		0.08 (1.809)	R	+	-	+	+
	HPAFII (DMEM 10%FBS, 1%PS ATCC)			0.86 (19.35)	R	-	-	+	+

[0174] 表 11d

[0175]

癌症 类型	细胞系名 (培养基源)	BCA U/mL ($\mu\text{g/mL}$)	HAI U/mL ($\mu\text{g/mL}$)	rhArg U/mL ($\mu\text{g/mL}$)	ADI U/mL ($\mu\text{g/mL}$)	ARG	OTC	ASS	ASL
胃癌	AGS (RPMI 10%FBS, 1%PS ATCC)	0.662 (12.17)		0.10 (2.262)	R	-	-	+	+
	MKN45 (RPMI 10%FBS, 1%PS 日本Riken 细胞文库)	0.798 (14.67)		0.79 (17.873)	R	-	-	+	+
	BCG-823 (RPMI 10%FBS, 1%PS 北京市肿 瘤防治研 究所)			0.11 (2.457)	R	-	-	+	+

[0176] 表 11e

[0177]

癌症 类型	细胞系名 (培养基源)	BCA U/mL ($\mu\text{g/mL}$)	HAI U/mL ($\mu\text{g/mL}$)	rhArg U/mL ($\mu\text{g/mL}$)	ADI U/mL ($\mu\text{g/mL}$)	ARG	OTC	ASS	ASL
HCC (肝癌)	PLC/PRF/5 (DMEM 10%FBS, 1%PS ATCC)	2.376 (43.67)	0.94 (9.56)	0.312 (7.07)	R	+	-	+	+
	Hep3B (DMEM 10%FBS, 1%PS ATCC)	9.1 (57.68)	0.29 (2.95)	0.65 (15.0)	R	+	-	+	+
	HepG2 (DMEM 10%FBS, 1%PS ATCC)	2.002 (36.79)	0.097 (0.99)	0.177 (4.00)	R	+	-	+	+
	Huh7 (DMEM 10%FBS, 1%PS ATCC)			1.59 (43)	R	+	-	+	+
	SK-HEP-1 (DMEM 10%FBS, 1%PS ATCC)	12.27 (77.79)	1.725 (6.05)	0.15 (4)	0.007 (0.2)	-	-	+	+
眼癌	Y79 (RPMI 10%FBS, 1%PS ATCC)			0.5 (11.3)	R	-	-	+	+

[0178] 表 11f

[0179]

癌症类型	细胞系名 (培养基源)	BCA U/mL ($\mu\text{g/mL}$)	HAI U/mL ($\mu\text{g/mL}$)	rhArg U/mL ($\mu\text{g/mL}$)	ADI U/mL ($\mu\text{g/mL}$)	ARG	OTC	ASS	ASL
肺癌	A549 (DMEM 10%FBS, 1%PS ATCC)	0.3294(2 .09)		0.035 (0.44)	0.011 (0.29)	-	-	-	+
子宫 颈癌	HeLa (DMEM 10%FBS, 1%PS ATCC)	0.719 (13.21)	0.366 (3.72)	0.065 (0.82)	R	-	-	+	+
	ME180 (DMEM 10%FBS, 1%PS ATCC)	1.42 (26.16)	0.214 (2.18)	0.153 (1.93)	R	-	-	+	+
	CC3 (DMEM 10%FBS, 1%PS ATCC)	0.84 (15.50)		0.42 (5.29)	R	-	-	+	+
	SiHa (DMEM 10%FBS, 1%PS ATCC)	0.32 (5.84)	0.024 (0.24)	0.03 (0.38)	0.0025 (0.064)	-	-	-	+
	C-33A (DMEM 10%FBS, 1%PS ATCC)	0.19 (3.55)	0.033 (0.34)	0.058 (0.72)	0.0014 (0.036)	-	-	-	+

[0180] 表 11g

[0181]

癌症类型	细胞系名 (培养基源)	BCA U/mL ($\mu\text{g/mL}$)	HAI U/mL ($\mu\text{g/mL}$)	rhArg U/mL ($\mu\text{g/mL}$)	ADI U/mL ($\mu\text{g/mL}$)	ARG	OTC	ASS	ASL
乳腺癌	MCF-7 (EMEM 10%FBS, 1%PS ATCC)	0.05 (0.91)		0.28 (6.36)	R	-	-	+	+
	ZR-75-1 (DMEM 10%FBS, 1%PS ATCC)			0.14 (3.18)	R	-	-	+	+
	Hs578T (DMEM 10%FBS, 1%PS, 10 ng/ml 胰岛素 NCI)			3.75 (85.2)			-	+	+
	MDA-MB-231 (DMEM 10%FBS, 1%PS NCI)	0.22 (4.11)	0.273	0.44 (10.0)	0.16 (5.93)	-	-	+	+
	4T1	0.68	0.058	0.023 (0.29)	0.0007 (0.017)				
前列腺癌	PC3 (DMEM 10%FBS, 1%PS ATCC)	0.263 (4.84)	0.40 (4.07)	0.08 (1.47)	0.0025 (0.064)	-	-	-	+
	LNCap (EMEM 10%FBS, 1%PS ATCC)	2.119 (38.94)	0.47 (4.78)	0.41 (5.16)	0.13 (3.34)				

[0182] 对于表 11, “+”= mRNA 被 RT-PCR 检测到, 表示相对应的基因得到表达; “-”= mRNA 没有被 RT-PCR 检测到, 表示该基因没有被表达; “R”表示细胞系具有 ADI 抗性并且 IC_{50} 值无法估算; 而“L”表示细胞系具有相对较低水平的 ASS 表达因此该细胞系仍然对 ADI 敏感。

[0183] 尽管不希望受以下假说和工作模式的束缚, 但是中请人相信以下假说和工作模式与本发明的实验数据相吻合, 并因此可以用于指导在此公开的本发明的进一步利用 (还参见图 18)。

[0184] 解释为什么 OTC 阴性癌细胞对精氨酸酶敏感却能够具有 ADI 抗性的假说和工作模式。当将精氨酸酶添加到培养物培养基或者将聚乙二醇化精氨酸酶注射到血液 (体内) 中时, 精氨酸通过精氨酸酶酶促反应而被转化为鸟氨酸和尿素。然后形成的鸟氨酸进入到癌细胞内。与正常细胞不一样的是, 癌细胞快速生长并需要比正常细胞多得多的精氨酸以用于蛋白质合成和其它细胞过程。如果癌细胞是 OTC 阳性、ASS 阳性和 ASL 阳性, 则鸟氨酸能够被再循环回到精氨酸。因此, 癌细胞仍然具有精氨酸, 并且它们没有缺乏精氨酸, 并且细胞生长没有受到抑制。另一方面, 呈 OTC 阴性或 ASS 阴性或 ASL 阴性或者这些缺陷的任意

组合或者这些基因中任意基因的表达水平低的癌细胞,从鸟氨酸到精氨酸的合成(或者再循环)途径被阻断,因此癌细胞缺乏精氨酸,癌细胞生长因而受到抑制,并可能出现癌细胞死亡。

[0185] 呈 OTC 阴性的肝癌细胞的假说和工作模式。模式相关尿素循环基因表达和耐聚乙二醇化精氨酸脱亚胺酶(ADI-PEG)和聚乙二醇化热溶芽孢杆菌精氨酸酶(BCA-PEG)的抗性。肝癌细胞表达尿素循环酶精胺琥珀酸合成酶(argininosuccinate synthetase, ASS)、精胺琥珀酸裂解酶(argininosuccinate lyase, ASL)和精氨酸酶(arginase, ARG),但是缺乏鸟氨酸氨基甲酰转移酶(ornithine transcarbamylase, OTC)。血流中的 BCA-PEG20 消耗精氨酸并生成鸟氨酸,鸟氨酸进入细胞但是由于缺乏 OTC 而不能通过尿素循环进行再循环。ADI-PEG 将精氨酸转化为瓜氨酸,瓜氨酸在吸收进入肝癌细胞后由 ASS 和 ASL 容易地转化回到精氨酸。因此,在该模式中,肝癌细胞对 BCA-PEG20 处理敏感(受 BCA-PEG20 抑制)而对 ADI-PEG 处理具有抗性。

[0186] 呈 OTC 阴性的癌细胞的假说和工作模式。模式相关基因在癌细胞中的表达和耐聚乙二醇化精氨酸脱亚胺酶(ADI-PEG)和聚乙二醇化热溶芽孢杆菌精氨酸酶(BCA-PEG20)的抗性。对于不能表达精氨酸酶(ARG)的癌细胞,癌细胞表达精胺琥珀酸合成酶(ASS)、精胺琥珀酸裂解酶(ASL),但是缺乏鸟氨酸氨基甲酰转移酶(OTC)。血流中的 BCA-PEG20 消耗精氨酸并生成鸟氨酸,鸟氨酸进入细胞但是由于缺乏 OTC 而不能进行再循环。ADI-PEG 将精氨酸转化为瓜氨酸,瓜氨酸在吸收进入癌细胞后由 ASS 和 ASL 容易地转化回到精氨酸。因此,在该模式中,癌细胞对 BCA-PEG20 处理敏感(受 BCA-PEG20 抑制)而对 ADI-PEG 处理具有抗性。这种模式通常能够应用于癌细胞。

[0187] 通过使用钴作为金属辅因子进一步增强精氨酸酶活性的方法

[0188] 精氨酸酶的天然金属辅因子是锰(Mn^{2+})。本发明令人惊讶地发现用钴代替锰显著地增强了酶活性。如上所述表达热溶芽孢杆菌精氨酸酶(BCA)或人类精氨酸酶 I(HAI)。纯化方法与前述相似,不同之处在于将 10mM 金属离子($CoSO_4$ 或 $MnSO_4$)添加到来自镍亲和层析的经纯化的蛋白质洗脱液中(而不是在镍亲和层析之前添加)。将含有精氨酸酶的洗脱组分与 10mM 金属在 50℃至 55℃温育 15 分钟,接着通过 0.45 μm 注射过滤器过滤。然后通过超滤将溶液与保存缓冲液进行交换。

[0189] 使用二乙酰一肟(DAMO)测定法来确定带有不同金属辅因子的人类精氨酸酶的动力学参数。所有酶促反应都在 pH7.4 进行。结果显示在图 16 中。重组人类精氨酸酶 I(HAI)或者取代有 Mn^{2+} 或 Co^{2+} 的 huArg 的稳态动力学在磷酸钠缓冲液(pH7.4)中在 25℃测量。带有 Mn^{2+} 的 HAI(HAI Mn^{2+})或 huArg Mn^{2+} 和带有 Co^{2+} 的 HAI(HAI Co^{2+})或 huArg Co^{2+} 的 K_m 分别为 1.83mM 和 0.19mM。由于在 HAI Co^{2+} 和 huArg Co^{2+} 中的 K_m 值提高了约 10 倍,其活性提高了约 10 倍,因此它是比 HAI Mn^{2+} 或 huArg Mn^{2+} 要有效得多的药物。

[0190] 通过进一步调节基因修饰来增强精氨酸酶活性

[0191] 本发明令人意外的发现,BCA 的位置 20 可以被其他氨基酸取代以提高酶活性。通过定向位点诱变(例如密码子 GTT[缬氨酸]变为 CCG[脯氨酸])用脯氨酸(或者任意提高 BCA 特异性的其它氨基酸如丝氨酸或甘氨酸)取代野生型序列中的第 20 位氨基酸残基。将突变基因进行克隆、表达和纯化以用于具体研究。示例性的这种突变酶通过用脯氨酸代替缬氨酸来制备,称为“BCA 突变体 V20P”或“bc Arg V20P 突变体”。在磷酸钠缓冲液(pH 7.4)

在 25℃ 测量带有 Mn^{2+} 或 Co^{2+} 的 BCA 突变体 V20P 和 BCA 的稳态动力学并显示在图 17 中。带有 Mn^{2+} 的 BCA 突变体 V20P (BCA 突变体 V20P Mn^{2+}) 和带有 Co^{2+} 的 BCA 突变体 V20P (BCA 突变体 V20P Co^{2+}) 的 K_m 值分别为约 1.29mM 和 0.18mM。带有 Mn^{2+} 的 BCA (BCAWTMn²⁺) 的 K_m 值为约 3.2mM。因此, 带有 Co^{2+} 作为辅因子的 BCA 突变体 V20P [$K_m = 0.18mM$] 是比 BCA (BCAWTMn²⁺) [$K_m = 3.2mM$] 有效得多的消耗精氨酸的药物。

[0192] 使用 BCA 突变体 V20P 进行的体外癌细胞系研究

[0193] 细胞增殖测定如下进行。

[0194] 将 2.5×10^3 Sk-mel-28 (EMEM)、 5×10^3 HEK293 (EMEM)、MCF-7 (EMEM)、HCT-15 (RPMI)、Hep3B (DMEM)、PANC-1 (DMEM)、HeLa (DMEM) 和 A549 (DMEM) 细胞接种在 96 孔板的各个板孔的 100 μ L 培养物培养基中并让其过夜粘附到培养板上。在第二天, 用含有不同浓度的 BCA 和 BCA 突变体 V20P 蛋白质药物的培养基替换培养物培养基。在添加蛋白质药物的那一天, 将 2×10^4 Jurkat (RPMI) 悬浮细胞接种到 96 孔板的各个板孔的 50 μ L 养物培养基中, 将在 50 μ L 中的不同浓度的蛋白质药物直接添加各个板孔中。将细胞在 37℃ 在 95% 空气 / 5% CO_2 的氛围中再温育 3 天。然后进行 MTT 细胞增殖测定 (Invitrogen) 以估计培养物中活细胞的数量。简而言之, 将 10 μ L 的 5mg/mL 的水溶性 MTT 试剂添加到 100 μ L 培养物培养基中, 并在 37℃ 温育 4 小时。MTT 被细胞化学还原为紫色的甲臞 (formazan), 然后甲臞被组织培养物培养基中的酸化 SDS (在 10% SDS 中的 0.01N HCl) 溶解。切割产物甲臞的浓度用带有 570nm 滤镜的分光光度计读取其吸光度来测量。细胞增殖数据表示为对照的百分数。使用 Prism4.0 (Graphpad Software) 通过非线性回归来拟合 S 形剂量应答曲线, 实现 50% 细胞生长抑制所需的蛋白质药物的量定义为 IC_{50} 。结果显示在表 12 中。相应的酶促活性显示在表 13 中。

[0195] 表 12 BCA 和 BCA 突变体 V20P 在不同种类的癌细胞中的 IC_{50}

[0196]

		IC ₅₀ 值				差异倍数(BCA/BCA	
		BCA		BCA 突变体 V20P		突变体 V20P)	
		(U/mL)	(mg/mL)	(U/mL)	(mg/mL)	(U/mL)	(mg/mL)
HCT-15	结肠癌	15.62	0.0916	7.34	0.0132	2.13	6.96
Jurkat	白血病	6.84	0.0401	0.90	0.0016	7.60	24.85
MCF-7	乳癌	5.51	0.0323	2.87	0.0051	1.92	6.28

[0197]

sk-mel-28	黑素瘤	3.35	0.0197	1.52	0.0027	2.20	7.21
HEK293	肾癌	3.86	0.0226	3.40	0.0061	1.14	3.71
A549	肺癌	2.67	0.0157	1.64	0.0029	1.63	5.32
Hep3B	肝癌	9.42	0.0552	9.43	0.0169	1.00	3.27
Hela	子宫颈 癌	2.83	0.0166	1.37	0.0025	2.07	6.75
PANC-1	胰癌	1.20	0.0070	0.87	0.0016	1.38	4.51

[0198] 表 13 蛋白的特异活性

[0199]

	蛋白浓度 (mg/mL)	特异活性 (U/mg)	酶活性 (U/mL)
BCA	3.046	170.47	519.3
<u>BCA 突变体 V20P</u>	2.63	557.3	1465.7

[0200] 结果显示,在体外药物功效研究中,BCA 突变体 V20P在杀死各种类型癌细胞中要有效得多。

[0201] 尽管已经如在本发明的优选实施方式中那样描述并指出本发明的新的基本特征,但是应当理解的是,本领域技术人员可以按实施方式所述形式和细节进行进行各种省略、代替和变动而没有脱离本发明的精神。本发明不受仅以举例方式提供的上述实施方式的限制,并且可以在所附专利权利要求书限定的保护范围之内进行各种形式的改变。

[0001]

序列表

<110> 香港理工大学

<120> 精氨酸酶的定向位点聚乙二醇化及其作为抗癌和抗病毒试剂的用途

<130> P1159-184

<150> US 61/163,863

<151> 2009-03-26

<160> 22

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 969

<212> DNA

<213> 人类精氨酸酶 I (1a)

<400> 1

atgagcgcca agtccagaac catagggatt attggagctc ctttctcaaa gggacagcca	60
cgaggagggg tggaagaagg ccctacagta ttgagaaagg ctggtctgct tgagaaactt	120
aaagaacaag agtgtgatgt gaaggattat ggggacctgc cttttgctga catccctaatt	180
gacagtcctt ttcaaattgt gaagaatcca aggtctgttg gaaaagcaag cgagcagctg	240
gctggcaagg tggcagaagt caagaagaac ggaagaatca gcctgggtgct gggcggagac	300
cacagtttgg caattggaag catctctggc catgccaggg tccacctga tcttggagtc	360
atctgggttg atgtcacac tgatatcaac actccactga caaccacaag tggaaacttg	420
catggacaac ctgtatcttt cctcctgaag gaactaaaag gaaagattcc cgatgtgcca	480
ggattctcct gggtgactcc ctgtatatct gccaaaggata ttgtgtatat tggcttgaga	540
gacgtggacc ctggggaaca ctacattttg aaaactctag gcattaaata cttttcaatg	600
actgaagtgg acagactagg aattggcaag gtgatggaag aaacactcag ctatctacta	660
ggaagaaaga aaaggccaat tcattctaagt ttgatgttg acggactgga cccatctttc	720

[0002]

acaccagcta ctggcacacc agtcgtggga ggtctgacat acagagaagg tctctacatc	780
acagaagaaa tctacaaaac agggctactc tcaggattag atataatgga agtgaaccca	840
tccctgggga agacaccaga agaagtaact cgaacagtga acacagcagt tgcaataacc	900
ttggcttggt tcggacttgc tcgggagggt aatcacaagc ctattgacta ccttaaccca	960
cctaagtaa	969
<210> 2	
<211> 969	
<212> DNA	
<213> 设计用于定向位点聚乙二醇化的人类精氨酸酶 I (1b)	
<400> 2	
atgagcgcca agtccagaac catagggatt attggagctc ctttctcaa gggacagcca	60
cgaggagggg tggaagaagg ccctacagta ttgagaaagg ctggtctgct tgagaaactt	120
aaagaacaag agtgtgatgt gaaggattat ggggacctgc cttttgctga catcccta	180
gacagtcctt ttcaaattgt gaagaatcca aggtctgtgg gaaaagcaag cgagcagctg	240
gctggcaagg tggcagaagt caagaagaac ggaagaatca gcctgggtgct gggcggagac	300
cacagtttgg caattggaag catctctggc catgccaggg tccaccctga tcttgagtc	360
atctgggtgg atgtcacac tgatatcaac actccactga caaccacaag tggaaacttg	420
catggacaac ctgtatcttt cctcctgaag gaactaaaag gaaagattcc cgatgtgcca	480
ggattctcct gggtgactcc ctctatatct gccaaggata ttgtgtatat tggcttgaga	540
gacgtggacc ctggggaaca ctacattttg aaaactctag gcattaaata cttttcaatg	600
actgaagtgg acagactagg aattggcaag gtgatggaag aaacactcag ctatctacta	660
ggaagaaaga aaaggccaat tcactaagt tttgatgttg acggactgga cccatctttc	720
acaccagcta ctggcacacc agtcgtggga ggtctgacat acagagaagg tctctacatc	780

[0003]

acagaagaaa tctacaaaac agggctactc tcaggattag atataatgga agtgaaccca	840
tccctgggga agacaccaga agaagtaact cgaacagtga acacagcagt tgcaataacc	900
ttggcttctt tcggacttgc tcgggagggt aatcacaagc ctattgacta ccttaaccca	960
cctaagtaa	969
<210> 3	
<211> 900	
<212> DNA	
<213> 热溶芽孢杆菌(<i>Bacillus caldovelox</i>)精氨酸酶(1c)	
<400> 3	
atgaagccaa tttcaattat cggggttccg atggatttag ggcagacacg ccgcggcggt	60
gatatggggc cgagcgcaat gcgttatgca ggcgtcatcg aacgtctgga acgtcttcat	120
tacgatattg aagatttggg agatattccg attggaaaag cagagcgggt gcacgagcaa	180
ggagattcac ggttgcgcaa ttgaaagcg gttgcggaag cgaacgagaa acttgcggcg	240
gcggttgacc aagtcgttca gcggggcgca ttccgcttg tgttggcgcg cgaccatagc	300
atgccattg gcacgctcgc cggggtggcg aaacattatg agcggcttgg agtgatctgg	360
tatgacgcgc atggcgacgt caacaccgcg gaaacgtcgc cgtctggaac cattcatggc	420
atgccgctgg cggcgagcct cgggtttggc catccggcgc tgacgcaaat cggcggatac	480
agccccaaaa tcaagccgga acatgtcgtg ttgatcggcg tccgttccct tgatgaaggg	540
gagaagaagt ttattcgca aaaaggaatc aaaatttaca cgatgcatga ggttgatcgg	600
ctcggaatga caaggtgat ggaagaaacg atgcctatt taaaagaacg aacggatggc	660
gttcatttgt cgcttgactt ggatggcctt gacccaagcg acgcaccggg agtcggaacg	720
cctgtcattg gaggattgac ataccgcgaa agccatttgg cgatggagat gctggccgag	780
gcacaaatca tcacttcagc ggaatttgtc gaagtgaacc cgatcttga tgagcggaac	840
aaaacagcat cagtggctgt agcgtgatg gggtcgttgt ttggtgaaaa actcatgtaa	900

[0004]

<210> 4
 <211> 918
 <212> DNA
 <213> 设计用于定向位点聚乙二醇化的热溶芽孢杆菌精氨酸酶(1d)

<400> 4
 atgaagccaa tttcaattat cggggttccg atggatttag ggcagacacg ccgcggcggtt 60
 gatatggggc cgagcgcaat gcgttatgca ggcgtcatcg aacgtctgga acgtcttcat 120
 tacgatattg aagatttggg agatattccg attggaaaag cagagcggtt gcacgagcaa 180
 ggagattcac ggttgcgcaa ttgaaagcg gttcggaag cgaacgagaa acttgcggcg 240
 gcggttgacc aagtcgttca gcggggcgga tttccgcttg tgttgggcgg cgaccatagc 300
 atcgccattg gcacgctcgc cggggtggcg aaacattatg agcggcttgg agtgatctgg 360
 tatgacgcgc atggcgacgt caacaccgcg gaaacgtcgc cgtctggaaa cattcatggc 420
 atgccgctgg cggcgagcct cgggtttggc catccggcgc tgacgcaaat cggcggatac 480
 tgccccaaaa tcaagccgga acatgtcgtg ttgatcggcg tccgttcctt tgatgaaggg 540
 gagaagaagt ttattcgca aaaaggaatc aaaatttaca cgatgcatga ggttgatcgg 600
 ctcggaatga caagggtgat ggaagaaacg atcgctatt taaaagaacg aacggatggc 660
 gttcatttgt cgcttgactt ggatggcctt gacccaagcg acgcaccggg agtcggaacg 720
 cctgtcattg gaggattgac ataccgcgaa agccatttgg cgatggagat gctggccgag 780
 gcacaaatca tcacttcagc ggaatttgtc gaagtgaacc cgatcttgga tgagcggaac 840
 aaaacagcat cagtggctgt agcgctgatg gggctcgttgt ttggtgaaaa actcatgcat 900
 caccatcacc atcactaa 918

<210> 5
 <211> 322
 <212> PRT

[0005]

<213> 人类精氨酸酶 I 的氨基酸序列 (2a)

<400> 5

Met Ser Ala Lys Ser Arg Thr Ile Gly Ile Ile Gly Ala Pro Phe Ser
1 5 10 15

Lys Gly Gln Pro Arg Gly Gly Val Glu Glu Gly Pro Thr Val Leu Arg
20 25 30

Lys Ala Gly Leu Leu Glu Lys Leu Lys Glu Gln Glu Cys Asp Val Lys
35 40 45

Asp Tyr Gly Asp Leu Pro Phe Ala Asp Ile Pro Asn Asp Ser Pro Phe
50 55 60

Gln Ile Val Lys Asn Pro Arg Ser Val Gly Lys Ala Ser Glu Gln Leu
65 70 75 80

Ala Gly Lys Val Ala Glu Val Lys Lys Asn Gly Arg Ile Ser Leu Val
85 90 95

Leu Gly Gly Asp His Ser Leu Ala Ile Gly Ser Ile Ser Gly His Ala
100 105 110

Arg Val His Pro Asp Leu Gly Val Ile Trp Val Asp Ala His Thr Asp
115 120 125

Ile Asn Thr Pro Leu Thr Thr Thr Ser Gly Asn Leu His Gly Gln Pro
130 135 140

Val Ser Phe Leu Leu Lys Glu Leu Lys Gly Lys Ile Pro Asp Val Pro
145 150 155 160

[0006]

Gly Phe Ser Trp Val Thr Pro Cys Ile Ser Ala Lys Asp Ile Val Tyr
165 170 175

Ile Gly Leu Arg Asp Val Asp Pro Gly Glu His Tyr Ile Leu Lys Thr
180 185 190

Leu Gly Ile Lys Tyr Phe Ser Met Thr Glu Val Asp Arg Leu Gly Ile
195 200 205

Gly Lys Val Met Glu Glu Thr Leu Ser Tyr Leu Leu Gly Arg Lys Lys
210 215 220

Arg Pro Ile His Leu Ser Phe Asp Val Asp Gly Leu Asp Pro Ser Phe
225 230 235 240

Thr Pro Ala Thr Gly Thr Pro Val Val Gly Gly Leu Thr Tyr Arg Glu
245 250 255

Gly Leu Tyr Ile Thr Glu Glu Ile Tyr Lys Thr Gly Leu Leu Ser Gly
260 265 270

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

Val Thr Arg Thr Val Asn Thr Ala Val Ala Ile Thr Leu Ala Cys Phe
290 295 300

Gly Leu Ala Arg Glu Gly Asn His Lys Pro Ile Asp Tyr Leu Asn Pro
305 310 315 320

Pro Lys

[0007]

<210> 6
<211> 322
<212> PRT
<213> Cys168 和 Cys303 被 Ser 代替的人类精氨酸酶 I 的氨基酸序列 (2b)

<400> 6

Met Ser Ala Lys Ser Arg Thr Ile Gly Ile Ile Gly Ala Pro Phe Ser
1 5 10 15

Lys Gly Gln Pro Arg Gly Gly Val Glu Glu Gly Pro Thr Val Leu Arg
20 25 30

Lys Ala Gly Leu Leu Glu Lys Leu Lys Glu Gln Glu Cys Asp Val Lys
35 40 45

Asp Tyr Gly Asp Leu Pro Phe Ala Asp Ile Pro Asn Asp Ser Pro Phe
50 55 60

Gln Ile Val Lys Asn Pro Arg Ser Val Gly Lys Ala Ser Glu Gln Leu
65 70 75 80

Ala Gly Lys Val Ala Glu Val Lys Lys Asn Gly Arg Ile Ser Leu Val
85 90 95

Leu Gly Gly Asp His Ser Leu Ala Ile Gly Ser Ile Ser Gly His Ala
100 105 110

Arg Val His Pro Asp Leu Gly Val Ile Trp Val Asp Ala His Thr Asp
115 120 125

Ile Asn Thr Pro Leu Thr Thr Thr Ser Gly Asn Leu His Gly Gln Pro
130 135 140

Val Ser Phe Leu Leu Lys Glu Leu Lys Gly Lys Ile Pro Asp Val Pro

[0008]

145	150	155	160
Gly Phe Ser Trp Val Thr Pro Ser Ile Ser Ala Lys Asp Ile Val Tyr			
165	170	175	
Ile Gly Leu Arg Asp Val Asp Pro Gly Glu His Tyr Ile Leu Lys Thr			
180	185	190	
Leu Gly Ile Lys Tyr Phe Ser Met Thr Glu Val Asp Arg Leu Gly Ile			
195	200	205	
Gly Lys Val Met Glu Glu Thr Leu Ser Tyr Leu Leu Gly Arg Lys Lys			
210	215	220	
Arg Pro Ile His Leu Ser Phe Asp Val Asp Gly Leu Asp Pro Ser Phe			
225	230	235	240
Thr Pro Ala Thr Gly Thr Pro Val Val Gly Gly Leu Thr Tyr Arg Glu			
245	250	255	
Gly Leu Tyr Ile Thr Glu Glu Ile Tyr Lys Thr Gly Leu Leu Ser Gly			
260	265	270	
Leu Asp Ile Met Glu Val Asn Pro Ser Leu Gly Lys Thr Pro Glu Glu			
275	280	285	
Val Thr Arg Thr Val Asn Thr Ala Val Ala Ile Thr Leu Ala Ser Phe			
290	295	300	
Gly Leu Ala Arg Glu Gly Asn His Lys Pro Ile Asp Tyr Leu Asn Pro			
305	310	315	320
Pro Lys			

[0009]

<210> 7
<211> 299
<212> PRT
<213> 热溶芽孢杆菌精氨酸酶的氨基酸序列(2c)

<400> 7

Met Lys Pro Ile Ser Ile Ile Gly Val Pro Met Asp Leu Gly Gln Thr
1 5 10 15

Arg Arg Gly Val Asp Met Gly Pro Ser Ala Met Arg Tyr Ala Gly Val
20 25 30

Ile Glu Arg Leu Glu Arg Leu His Tyr Asp Ile Glu Asp Leu Gly Asp
35 40 45

Ile Pro Ile Gly Lys Ala Glu Arg Leu His Glu Gln Gly Asp Ser Arg
50 55 60

Leu Arg Asn Leu Lys Ala Val Ala Glu Ala Asn Glu Lys Leu Ala Ala
65 70 75 80

Ala Val Asp Gln Val Val Gln Arg Gly Arg Phe Pro Leu Val Leu Gly
85 90 95

Gly Asp His Ser Ile Ala Ile Gly Thr Leu Ala Gly Val Ala Lys His
100 105 110

Tyr Glu Arg Leu Gly Val Ile Trp Tyr Asp Ala His Gly Asp Val Asn
115 120 125

Thr Ala Glu Thr Ser Pro Ser Gly Asn Ile His Gly Met Pro Leu Ala
130 135 140

[0010]

Ala Ser Leu Gly Phe Gly His Pro Ala Leu Thr Gln Ile Gly Gly Tyr
145 150 155 160

Ser Pro Lys Ile Lys Pro Glu His Val Val Leu Ile Gly Val Arg Ser
165 170 175

Leu Asp Glu Gly Glu Lys Lys Phe Ile Arg Glu Lys Gly Ile Lys Ile
180 185 190

Tyr Thr Met His Glu Val Asp Arg Leu Gly Met Thr Arg Val Met Glu
195 200 205

Glu Thr Ile Ala Tyr Leu Lys Glu Arg Thr Asp Gly Val His Leu Ser
210 215 220

Leu Asp Leu Asp Gly Leu Asp Pro Ser Asp Ala Pro Gly Val Gly Thr
225 230 235 240

Pro Val Ile Gly Gly Leu Thr Tyr Arg Glu Ser His Leu Ala Met Glu
245 250 255

Met Leu Ala Glu Ala Gln Ile Ile Thr Ser Ala Glu Phe Val Glu Val
260 265 270

Asn Pro Ile Leu Asp Glu Arg Asn Lys Thr Ala Ser Val Ala Val Ala
275 280 285

Leu Met Gly Ser Leu Phe Gly Glu Lys Leu Met
290 295

<210> 8

<211> 305

[0011]

<212> PRT

<213> 带有 6×His-标签的 Ser161 被 Cys 代替的热溶芽孢杆菌精氨酸酶的氨基酸序列, 该 Cys 称为 Cys161 (2d)

<400> 8

Met Lys Pro Ile Ser Ile Ile Gly Val Pro Met Asp Leu Gly Gln Thr
1 5 10 15

Arg Arg Gly Val Asp Met Gly Pro Ser Ala Met Arg Tyr Ala Gly Val
20 25 30

Ile Glu Arg Leu Glu Arg Leu His Tyr Asp Ile Glu Asp Leu Gly Asp
35 40 45

Ile Pro Ile Gly Lys Ala Glu Arg Leu His Glu Gln Gly Asp Ser Arg
50 55 60

Leu Arg Asn Leu Lys Ala Val Ala Glu Ala Asn Glu Lys Leu Ala Ala
65 70 75 80

Ala Val Asp Gln Val Val Gln Arg Gly Arg Phe Pro Leu Val Leu Gly
85 90 95

Gly Asp His Ser Ile Ala Ile Gly Thr Leu Ala Gly Val Ala Lys His
100 105 110

Tyr Glu Arg Leu Gly Val Ile Trp Tyr Asp Ala His Gly Asp Val Asn
115 120 125

Thr Ala Glu Thr Ser Pro Ser Gly Asn Ile His Gly Met Pro Leu Ala
130 135 140

Ala Ser Leu Gly Phe Gly His Pro Ala Leu Thr Gln Ile Gly Gly Tyr
145 150 155 160

[0012]

Cys Pro Lys Ile Lys Pro Glu His Val Val Leu Ile Gly Val Arg Ser
165 170 175

Leu Asp Glu Gly Glu Lys Lys Phe Ile Arg Glu Lys Gly Ile Lys Ile
180 185 190

Tyr Thr Met His Glu Val Asp Arg Leu Gly Met Thr Arg Val Met Glu
195 200 205

Glu Thr Ile Ala Tyr Leu Lys Glu Arg Thr Asp Gly Val His Leu Ser
210 215 220

Leu Asp Leu Asp Gly Leu Asp Pro Ser Asp Ala Pro Gly Val Gly Thr
225 230 235 240

Pro Val Ile Gly Gly Leu Thr Tyr Arg Glu Ser His Leu Ala Met Glu
245 250 255

Met Leu Ala Glu Ala Gln Ile Ile Thr Ser Ala Glu Phe Val Glu Val
260 265 270

Asn Pro Ile Leu Asp Glu Arg Asn Lys Thr Ala Ser Val Ala Val Ala
275 280 285

Leu Met Gly Ser Leu Phe Gly Glu Lys Leu Met His His His His His
290 295 300

His
305

<210> 9
<211> 969

[0013]

<212> DNA

<213> 人类精氨酸酶 I 突变体 (C168S/C303S) (3a)

<400> 9

atgagcgcca agtcagaac catagggatt attggagctc ctttctcaa gggacagcca	60
cgaggagggg tggaagaagg ccctacagta ttgagaaagg ctggtctgct tgagaaactt	120
aaagaacaag agtgtgatgt gaaggattat ggggacctgc cttttgctga catcccta	180
gacagtcctt ttcaaattgt gaagaatcca aggtctgtgg gaaaagcaag cgagcagctg	240
gctggcaagg tggcagaagt caagaagaac ggaagaatca gcctgggtgct gggcggagac	300
cacagtttgg caattggaag catctctggc catgccaggg tccaccctga tcttggagtc	360
atctgggtgg atgtcacac tgatatcaac actccactga caaccacaag tggaaacttg	420
catggacaac ctgtatcttt cctcctgaag gaactaaaag gaaagattcc cgatgtgcca	480
ggattctcct gggtgactcc ctctatatct gccaaaggata ttgtgtatat tggcttgaga	540
gacgtggacc ctggggaaca ctacattttg aaaactctag gcattaaata cttttcaatg	600
actgaagtgg acagactagg aattggcaag gtgatggaag aaacactcag ctatctacta	660
ggaagaaaga aaaggccaat tcatctaagt ttgatgttg acggactgga cccatctttc	720
acaccagcta ctggcacacc agtcgtggga ggtctgacat acagagaagg tctctacatc	780
acagaagaaa tctacaaaac agggctactc tcaggattag atataatgga agtgaaccca	840
tccctgggga agacaccaga agaagtaact cgaacagtga acacagcagt tgcaataacc	900
ttggcttctt tcggacttgc tcgggagggt aatcacaagc ctattgacta ccttaaccca	960
cctaagtaa	969

<210> 10

<211> 322

<212> PRT

<213> 人类精氨酸酶 I 突变体 (C168S/C303S) (3a) aa

[0014]

<400> 10

Met Ser Ala Lys Ser Arg Thr Ile Gly Ile Ile Gly Ala Pro Phe Ser
1 5 10 15

Lys Gly Gln Pro Arg Gly Gly Val Glu Glu Gly Pro Thr Val Leu Arg
20 25 30

Lys Ala Gly Leu Leu Glu Lys Leu Lys Glu Gln Glu Cys Asp Val Lys
35 40 45

Asp Tyr Gly Asp Leu Pro Phe Ala Asp Ile Pro Asn Asp Ser Pro Phe
50 55 60

Gln Ile Val Lys Asn Pro Arg Ser Val Gly Lys Ala Ser Glu Gln Leu
65 70 75 80

Ala Gly Lys Val Ala Glu Val Lys Lys Asn Gly Arg Ile Ser Leu Val
85 90 95

Leu Gly Gly Asp His Ser Leu Ala Ile Gly Ser Ile Ser Gly His Ala
100 105 110

Arg Val His Pro Asp Leu Gly Val Ile Trp Val Asp Ala His Thr Asp
115 120 125

Ile Asn Thr Pro Leu Thr Thr Thr Ser Gly Asn Leu His Gly Gln Pro
130 135 140

Val Ser Phe Leu Leu Lys Glu Leu Lys Gly Lys Ile Pro Asp Val Pro
145 150 155 160

Gly Phe Ser Trp Val Thr Pro Ser Ile Ser Ala Lys Asp Ile Val Tyr
165 170 175

[0015]

Ile Gly Leu Arg Asp Val Asp Pro Gly Glu His Tyr Ile Leu Lys Thr
 180 185 190

Leu Gly Ile Lys Tyr Phe Ser Met Thr Glu Val Asp Arg Leu Gly Ile
 195 200 205

Gly Lys Val Met Glu Glu Thr Leu Ser Tyr Leu Leu Gly Arg Lys Lys
 210 215 220

Arg Pro Ile His Leu Ser Phe Asp Val Asp Gly Leu Asp Pro Ser Phe
 225 230 235 240

Thr Pro Ala Thr Gly Thr Pro Val Val Gly Gly Leu Thr Tyr Arg Glu
 245 250 255

Gly Leu Tyr Ile Thr Glu Glu Ile Tyr Lys Thr Gly Leu Leu Ser Gly
 260 265 270

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

Val Thr Arg Thr Val Asn Thr Ala Val Ala Ile Thr Leu Ala Ser Phe
 290 295 300

Gly Leu Ala Arg Glu Gly Asn His Lys Pro Ile Asp Tyr Leu Asn Pro
 305 310 315 320

Pro Lys

<210> 11

<211> 990

[0016]

<212> DNA

<213> 带有 6×His-标签的人类精氨酸酶 I 突变体(C168S/C303S) (3b)

<400> 11

atgcatcacc atcaccatca catgagcgcc aagtcagaa ccatagggat tattggagct	60
ccitttctcaa agggacagcc acgaggagg gtggaagaag gccctacagt attgagaaag	120
gctggtctgc ttgagaaact taaagaacaa gagtgtgatg tgaaggatta tggggacctg	180
ccctttgctg acatccctaa tgacagtecc ttcaaattg tgaagaatcc aaggtctgtg	240
ggaaaagcaa gcgagcagct ggctggcaag gtggcagaag tcaagaagaa cggaagaatc	300
agcctggtgc tggggcgaga ccacagttig gcaattggaa gcatctctgg ccatgccagg	360
gtccaccctg atcttggagt catctgggtg gatgtcaca ctgatatcaa cactccactg	420
acaaccacaa gtggaaactt gcatggacaa cctgtatctt tcctcctgaa ggaactaaaa	480
ggaaagattc ccgatgtgcc aggattctcc tgggtgactc cctctatata tgccaaggat	540
attgtgtata ttggcttgag agacgtggac cctggggaac actacatctt gaaaactcta	600
ggcattaaat acttttcaat gactgaagtg gacagactag gaattggcaa ggtgatggaa	660
gaaacactca gctatctact aggaagaaag aaaaggccaa ttcactaag ttttgatgtt	720
gacggactgg acccatcttt cacaccagct actggcacac cagtcgtggg aggtctgaca	780
tacagagaag gtctctacat cacagaagaa atctacaaaa cagggtact ctcaggatta	840
gatataatgg aagtgaaccc atccctgggg aagacaccag aagaagtaac tcgaacagtg	900
aacacagcag ttgcaataac cttggcttct ttcggacttg ctcgggaggg taatcacaag	960
cctattgact accttaaccc acctaagtaa	990

<210> 12

<211> 329

<212> PRT

<213> 带有 6×His-标签的人类精氨酸酶 I 突变体(C168S/C303S) (3b) aa

[0017]

<400> 12

Met His His His His His His Met Ser Ala Lys Ser Arg Thr Ile Gly
1 5 10 15

Ile Ile Gly Ala Pro Phe Ser Lys Gly Gln Pro Arg Gly Gly Val Glu
20 25 30

Glu Gly Pro Thr Val Leu Arg Lys Ala Gly Leu Leu Glu Lys Leu Lys
35 40 45

Glu Gln Glu Cys Asp Val Lys Asp Tyr Gly Asp Leu Pro Phe Ala Asp
50 55 60

Ile Pro Asn Asp Ser Pro Phe Gln Ile Val Lys Asn Pro Arg Ser Val
65 70 75 80

Gly Lys Ala Ser Glu Gln Leu Ala Gly Lys Val Ala Glu Val Lys Lys
85 90 95

Asn Gly Arg Ile Ser Leu Val Leu Gly Gly Asp His Ser Leu Ala Ile
100 105 110

Gly Ser Ile Ser Gly His Ala Arg Val His Pro Asp Leu Gly Val Ile
115 120 125

Trp Val Asp Ala His Thr Asp Ile Asn Thr Pro Leu Thr Thr Thr Ser
130 135 140

Gly Asn Leu His Gly Gln Pro Val Ser Phe Leu Leu Lys Glu Leu Lys
145 150 155 160

Gly Lys Ile Pro Asp Val Pro Gly Phe Ser Trp Val Thr Pro Ser Ile
165 170 175

[0018]

Ser Ala Lys Asp Ile Val Tyr Ile Gly Leu Arg Asp Val Asp Pro Gly
180 185 190

Glu His Tyr Ile Leu Lys Thr Leu Gly Ile Lys Tyr Phe Ser Met Thr
195 200 205

Glu Val Asp Arg Leu Gly Ile Gly Lys Val Met Glu Glu Thr Leu Ser
210 215 220

Tyr Leu Leu Gly Arg Lys Lys Arg Pro Ile His Leu Ser Phe Asp Val
225 230 235 240

Asp Gly Leu Asp Pro Ser Phe Thr Pro Ala Thr Gly Thr Pro Val Val
245 250 255

Gly Gly Leu Thr Tyr Arg Glu Gly Leu Tyr Ile Thr Glu Glu Ile Tyr
260 265 270

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

Leu Gly Lys Thr Pro Glu Glu Val Thr Arg Thr Val Asn Thr Ala Val
290 295 300

Ala Ile Thr Leu Ala Ser Phe Gly Leu Ala Arg Glu Gly Asn His Lys
305 310 315 320

Pro Ile Asp Tyr Leu Asn Pro Pro Lys
325

<210> 13

<211> 900

[0019]

<212> DNA

<213> 热溶芽孢杆菌精氨酸酶突变体(S161C) (3c)

<400> 13

```

atgaagccaa tttaattat cggggttccg atggatttag ggcagacacg ccgcggcggtt      60
gatatggggc cgagcgcaat gcgttatgca ggcgtcatcg aacgtctgga acgtcttcat      120
tacgatattg aagatttggg agatattccg attgaaaag cagagcggtt gcacgagcaa      180
ggagattcac ggttgcgcaa ttgaaaagcg gttgcggaag cgaacgagaa acttgcggcg      240
gcggttgacc aagtcgttca gcgggggcga tttccgcttg tgttggcgcg cgaccatagc      300
atcgccattg gcacgctcgc cggggtggcg aaacattatg agcggttgg agtgatctgg      360
tatgacgcgc atggcgacgt caacaccgcg gaaacgtcgc cgtctggaaa cattcatggc      420
atgccgctgg cggcgagcct cgggtttggc catccggcgc tgacgcaaat cggcggatac      480
tgccccaaaa tcaagccgga acatgtcgtg ttgatcgcg tccgttcct tgatgaaggg      540
gagaagaagt ttattcgca aaaaggaatc aaaatttaca cgatgcatga ggttgatcgg      600
ctcggaatga caagggtgat ggaagaaacg atgcctatt taaaagaacg aacggatggc      660
gttcatttgt cgcttgactt ggatggcctt gaccaagcg acgcaccggg agtcggaacg      720
cctgtcattg gaggattgac ataccgcgaa agccatttgg cgatggagat gctggccgag      780
gcacaaatca tcacttcagc ggaatttgtc gaagtgaacc cgatcttggg tgagcggaac      840
aaaacagcat cagtggctgt agcgctgatg gggtcgttgt ttggtgaaaa actcatgtaa      900

```

<210> 14

<211> 299

<212> PRT

<213> 热溶芽孢杆菌精氨酸酶突变体(S161C) (3c) aa

<400> 14

```

Met Lys Pro Ile Ser Ile Ile Gly Val Pro Met Asp Leu Gly Gln Thr
1           5           10           15

```

[0020]

Arg Arg Gly Val Asp Met Gly Pro Ser Ala Met Arg Tyr Ala Gly Val
20 25 30

Ile Glu Arg Leu Glu Arg Leu His Tyr Asp Ile Glu Asp Leu Gly Asp
35 40 45

Ile Pro Ile Gly Lys Ala Glu Arg Leu His Glu Gln Gly Asp Ser Arg
50 55 60

Leu Arg Asn Leu Lys Ala Val Ala Glu Ala Asn Glu Lys Leu Ala Ala
65 70 75 80

Ala Val Asp Gln Val Val Gln Arg Gly Arg Phe Pro Leu Val Leu Gly
85 90 95

Gly Asp His Ser Ile Ala Ile Gly Thr Leu Ala Gly Val Ala Lys His
100 105 110

Tyr Glu Arg Leu Gly Val Ile Trp Tyr Asp Ala His Gly Asp Val Asn
115 120 125

Thr Ala Glu Thr Ser Pro Ser Gly Asn Ile His Gly Met Pro Leu Ala
130 135 140

Ala Ser Leu Gly Phe Gly His Pro Ala Leu Thr Gln Ile Gly Gly Tyr
145 150 155 160

Cys Pro Lys Ile Lys Pro Glu His Val Val Leu Ile Gly Val Arg Ser
165 170 175

Leu Asp Glu Gly Glu Lys Lys Phe Ile Arg Glu Lys Gly Ile Lys Ile
180 185 190

[0021]

Tyr Thr Met His Glu Val Asp Arg Leu Gly Met Thr Arg Val Met Glu
195 200 205

Glu Thr Ile Ala Tyr Leu Lys Glu Arg Thr Asp Gly Val His Leu Ser
210 215 220

Leu Asp Leu Asp Gly Leu Asp Pro Ser Asp Ala Pro Gly Val Gly Thr
225 230 235 240

Pro Val Ile Gly Gly Leu Thr Tyr Arg Glu Ser His Leu Ala Met Glu
245 250 255

Met Leu Ala Glu Ala Gln Ile Ile Thr Ser Ala Glu Phe Val Glu Val
260 265 270

Asn Pro Ile Leu Asp Glu Arg Asn Lys Thr Ala Ser Val Ala Val Ala
275 280 285

Leu Met Gly Ser Leu Phe Gly Glu Lys Leu Met
290 295

<210> 15

<211> 918

<212> DNA

<213> 带有 6×His-标签的热溶芽孢杆菌精氨酸酶突变体 (S161C) (3d)

<400> 15

atgaagccaa tttcaattat cggggttccg atggatttag ggcagacacg ccgcggcggtt 60

gatatggggc cgagcgcaat gcgttatgca ggcgtcatcg aacgtctgga acgtcttcat 120

tacgatattg aagatttggg agatattccg attggaaaag cagagcggtt gcacgagcaa 180

ggagattcac ggttgcgcaa tttgaaagcg gttgcggaag cgaacgagaa acttgcggcg 240

[0022]

gcggttgacc aagtcgttca gcgggggcga tttccgcttg tgttgggcgg cgaccatagc 300

atgccattg gcacgctcgc cggggtggcg aaacattatg agcggcttgg agtgatctgg 360

tatgacgcgc atggcgacgt caacaccgcg gaaacgtcgc cgtctggaaa cattcatggc 420

atgccgctgg cggcgagcct cgggtttggc catccggcgc tgacgcaa at cggcggatac 480

tgccccaaaa tcaagccgga acatgtcgtg ttgatcggcg tccgttccct tgatgaaggg 540

gagaagaagt ttatttcgca aaaaggaatc aaaatttaca cgatgcatga ggttgatcgg 600

ctcggaatga caagggtgat ggaagaaacg atgcctatt taaaagaacg aacggatggc 660

gttcatttgt cgcttgactt ggatggcctt gaccaagcg acgcaccggg agtcggaacg 720

cctgtcattg gaggattgac ataccgcgaa agccatttgg cgatggagat gctggccgag 780

gcacaaatca tcacttcagc ggaatttgtc gaagtgaacc cgatcttga tgagcggaac 840

aaaacagcat cagtggctgt agcgtgatg gggtcgttgt ttggtgaaaa actcatgcat 900

caccatcacc atcactaa 918

<210> 16

<211> 305

<212> PRT

<213> 带有 6×His-标签的热溶芽孢杆菌精氨酸酶突变体(S161C) (3d) aa

<400> 16

Met Lys Pro Ile Ser Ile Ile Gly Val Pro Met Asp Leu Gly Gln Thr
1 5 10 15

Arg Arg Gly Val Asp Met Gly Pro Ser Ala Met Arg Tyr Ala Gly Val
20 25 30

Ile Glu Arg Leu Glu Arg Leu His Tyr Asp Ile Glu Asp Leu Gly Asp
35 40 45

[0023]

Ile Pro Ile Gly Lys Ala Glu Arg Leu His Glu Gln Gly Asp Ser Arg
50 55 60

Leu Arg Asn Leu Lys Ala Val Ala Glu Ala Asn Glu Lys Leu Ala Ala
65 70 75 80

Ala Val Asp Gln Val Val Gln Arg Gly Arg Phe Pro Leu Val Leu Gly
85 90 95

Gly Asp His Ser Ile Ala Ile Gly Thr Leu Ala Gly Val Ala Lys His
100 105 110

Tyr Glu Arg Leu Gly Val Ile Trp Tyr Asp Ala His Gly Asp Val Asn
115 120 125

Thr Ala Glu Thr Ser Pro Ser Gly Asn Ile His Gly Met Pro Leu Ala
130 135 140

Ala Ser Leu Gly Phe Gly His Pro Ala Leu Thr Gln Ile Gly Gly Tyr
145 150 155 160

Cys Pro Lys Ile Lys Pro Glu His Val Val Leu Ile Gly Val Arg Ser
165 170 175

Leu Asp Glu Gly Glu Lys Lys Phe Ile Arg Glu Lys Gly Ile Lys Ile
180 185 190

Tyr Thr Met His Glu Val Asp Arg Leu Gly Met Thr Arg Val Met Glu
195 200 205

Glu Thr Ile Ala Tyr Leu Lys Glu Arg Thr Asp Gly Val His Leu Ser
210 215 220

[0024]

Leu Asp Leu Asp Gly Leu Asp Pro Ser Asp Ala Pro Gly Val Gly Thr
225 230 235 240

Pro Val Ile Gly Gly Leu Thr Tyr Arg Glu Ser His Leu Ala Met Glu
245 250 255

Met Leu Ala Glu Ala Gln Ile Ile Thr Ser Ala Glu Phe Val Glu Val
260 265 270

Asn Pro Ile Leu Asp Glu Arg Asn Lys Thr Ala Ser Val Ala Val Ala
275 280 285

Leu Met Gly Ser Leu Phe Gly Glu Lys Leu Met His His His His His
290 295 300

His
305

<210> 17
<211> 24
<212> DNA
<213> 引物 HuAr07-F

<400> 17
gatatacata tgcacaccca tcac

24

<210> 18
<211> 36
<212> DNA
<213> 引物 HuAr08-R

<400> 18
agtcgaggat ccttacttag gtgggttaag gtagtc

36

<210> 19
<211> 27

[0025]

<212> DNA	
<213> 引物 HuAr01-F	
<400> 19	
gggtgactcc ctctatatct gccaaagg	27
<210> 20	
<211> 27	
<212> DNA	
<213> 引物 HuAr02-R	
<400> 20	
ccttggcaga tatagaggga gtcaccc	27
<210> 21	
<211> 29	
<212> DNA	
<213> 引物 HuAr03-F	
<400> 21	
gcaataacct tggcttcttt cggacttgc	29
<210> 22	
<211> 29	
<212> DNA	
<213> 引物 HuAr04-R	
<400> 22	
gcaagtccga aagaagccaa ggttattgc	29

ATGAGCGCCAAGTCCAGAACCATAGGGATTATTGGAGCTCCTTTCTCAAAGGGACAGCCA 60
CGAGGAGGGGTGGAAGAAGGCCCTACAGTATTGAGAAAGGCTGGTCTGCTTGAGAACTT 120
AAAGAACAAGAGTGTGATGTGAAGGATTATGGGGACCTGCCCTTTGCTGACATCCCTAAT 180
GACAGTCCCTTTCAAATTGTGAAGAATCCAAGGTCTGTGGGAAAAGCAAGCGAGCAGCTG 240
GCTGGCAAGGTGGCAGAAGTCAAGAAGAACGGAAGAATCAGCCTGGTGTGGGCGGAGAC 300
CACAGTTTGGCAATTGGAAGCATCTCTGGCCATGCCAGGGTCCACCCTGATCTTGGAGTC 360
ATCTGGGTGGATGCTCACACTGATATCAACACTCCACTGACAACCACAAGTGGAACCTTG 420
CATGGACAACCTGTATCTTTCTCCTGAAGGAACTAAAAGGAAAGATTCCCGATGTGCCA 480
GGATTCTCCTGGGTGACTCCCTGTATATCTGCCAAGGATATTGTGTATATTGGCTTGAGA 540
GACGTGGACCCCTGGGGAACACTACATTTTGAAAACCTCTAGGCATTAAATACTTTTCAATG 600
ACTGAAGTGGACAGACTAGGAATTGGCAAGGTGATGGAAGAAACACTCAGCTATCTACTA 660
GGAAGAAAGAAAAGGCCAATTCATCTAAGTTTTGATGTTGACGGACTGGACCCATCTTTC 720
ACACCAGCTACTGGCACACCAGTCGTGGGAGGTCTGACATACAGAGAAGGTCTCTACATC 780
ACAGAAGAAATCTACAAAACAGGGCTACTCTCAGGATTAGATATAATGGAAGTGAACCCA 840
TCCCTGGGGAAGACACCAGAAGAAGTAACTCGAACAGTGAACACAGCAGTTGCAATAACC 900
TTGGCTTGTTTCGGACTTGCTCGGGAGGGTAATCACAAGCCTATTGACTACCTTAACCCA 960
CCTAAGTAA 969|

图 1a

ATGAGCGCCAAGTCCAGAACCATAGGGATTATTGGAGCTCCTTTCTCAAAGGGACAGCCA 60
CGAGGAGGGGTGGAAGAAGGCCCTACAGTATTGAGAAAGGCTGGTCTGCTTGAGAACTT 120
AAAGAACAAGAGTGTGATGTGAAGGATTATGGGGACCTGCCCTTTGCTGACATCCCTAAT 180
GACAGTCCCTTTCAAATTGTGAAGAATCCAAGGTCTGTGGGAAAAGCAAGCGAGCAGCTG 240
GCTGGCAAGGTGGCAGAAGTCAAGAAGAACGGAAGAATCAGCCTGGTGTGGGCGGAGAC 300
CACAGTTTGGCAATTGGAAGCATCTCTGGCCATGCCAGGGTCCACCCTGATCTTGGAGTC 360
ATCTGGGTGGATGCTCACACTGATATCAACACTCCACTGACAACCACAAGTGGAACCTTG 420
CATGGACAACCTGTATCTTTCTCCTGAAGGAACTAAAAGGAAAGATTCCCGATGTGCCA 480
GGATTCTCCTGGGTGACTCCCTCTATATCTGCCAAGGATATTGTGTATATTGGCTTGAGA 540
GACGTGGACCCCTGGGGAACACTACATTTTGAAAACCTCTAGGCATTAAATACTTTTCAATG 600
ACTGAAGTGGACAGACTAGGAATTGGCAAGGTGATGGAAGAAACACTCAGCTATCTACTA 660
GGAAGAAAGAAAAGGCCAATTCATCTAAGTTTTGATGTTGACGGACTGGACCCATCTTTC 720
ACACCAGCTACTGGCACACCAGTCGTGGGAGGTCTGACATACAGAGAAGGTCTCTACATC 780
ACAGAAGAAATCTACAAAACAGGGCTACTCTCAGGATTAGATATAATGGAAGTGAACCCA 840
TCCCTGGGGAAGACACCAGAAGAAGTAACTCGAACAGTGAACACAGCAGTTGCAATAACC 900
TTGGCTTCTTTCGGACTTGCTCGGGAGGGTAATCACAAGCCTATTGACTACCTTAACCCA 960
CCTAAGTAA 969

图 1b

ATGAAGCCAATTTCAATTATCGGGGTTCCGATGGATTTAGGGCAGACACG 50
CCGCGGCGTTGATATGGGGCCGAGCGCAATGCGTTATGCAGGCGTCATCG 100
AACGTCTGGAACGTCTTCATTACGATATTGAAGATTTGGGAGATATTCCG 150
ATTGGAAAAGCAGAGCGGTTGCACGAGCAAGGAGATTCACGGTTGCGCAA 200
TTTGAAAGCGGTTGCGGAAGCGAACGAGAACTTGCGGCGGCGGTTGACC 250
AAGTCGTTCAGCGGGGGCGATTTCGCTTGTTGGGCGGCGACCATAGC 300
ATCGCCATTGGCACGCTCGCCGGGGTGGCGAAACATTATGAGCGGCTTGG 350
AGTGATCTGGTATGACGCGCATGGCGACGTCAACACCGCGGAAACGTCCG 400
CGTCTGGAAACATTATGCGCATGCCGCTGGCGGCGAGCCTCGGGTTTGGC 450
CATCCGGCGCTGACGCAAATCGGCGGATACAGCCCCAAAATCAAGCCGGA 500
ACATGTCGTGTTGATCGGCGTCCGTTCCCTTGATGAAGGGGAGAAGAAGT 550
TTATTCGCGAAAAAGGAATCAAAATTTACACGATGCATGAGGTTGATCGG 600
CTCGGAATGACAAGGGTGATGGAAGAAACGATCGCCTATTTAAAAGAACG 650
AACGGATGGCGTTTCATTTGTCGCTTGACTTGATGGCCTTGACCCAAGCG 700
ACGCACCGGGAGTCGGAACGCCCTGTCATTGGAGGATTGACATACCGCGAA 750
AGCCATTTGGCGATGGAGATGCTGGCCGAGGCACAAATCATCACTTCAGC 800
GGAATTTGTCGAAGTGAACCCGATCTTGATGAGCGGAACAAAACAGCAT 850
CAGTGGCTGTAGCGCTGATGGGGTCGTTGTTTGGTGAAAACTCATGTAA 900

图 1c

ATGAAGCCAATTTCAATTATCGGGGTTCCGATGGATTTAGGGCAGACACG 50
CCGCGGCGTTGATATGGGGCCGAGCGCAATGCGTTATGCAGGCGTCATCG 100
AACGTCTGGAACGTCTTCATTACGATATTGAAGATTTGGGAGATATTCCG 150
ATTGGAAAAGCAGAGCGGTTGCACGAGCAAGGAGATTCACGGTTGCGCAA 200
TTTGAAAGCGGTTGCGGAAGCGAACGAGAACTTGCGGCGGCGGTTGACC 250
AAGTCGTTCAGCGGGGGCGATTTCGCTTGTTGGGCGGCGACCATAGC 300
ATCGCCATTGGCACGCTCGCCGGGGTGGCGAAACATTATGAGCGGCTTGG 350
AGTGATCTGGTATGACGCGCATGGCGACGTCAACACCGCGGAAACGTCCG 400
CGTCTGGAAACATTATGCGCATGCCGCTGGCGGCGAGCCTCGGGTTTGGC 450
CATCCGGCGCTGACGCAAATCGGCGGATACTGCCCCAAAATCAAGCCGGA 500
ACATGTCGTGTTGATCGGCGTCCGTTCCCTTGATGAAGGGGAGAAGAAGT 550
TTATTCGCGAAAAAGGAATCAAAATTTACACGATGCATGAGGTTGATCGG 600
CTCGGAATGACAAGGGTGATGGAAGAAACGATCGCCTATTTAAAAGAACG 650
AACGGATGGCGTTTCATTTGTCGCTTGACTTGATGGCCTTGACCCAAGCG 700
ACGCACCGGGAGTCGGAACGCCCTGTCATTGGAGGATTGACATACCGCGAA 750
AGCCATTTGGCGATGGAGATGCTGGCCGAGGCACAAATCATCACTTCAGC 800
GGAATTTGTCGAAGTGAACCCGATCTTGATGAGCGGAACAAAACAGCAT 850
CAGTGGCTGTAGCGCTGATGGGGTCGTTGTTTGGTGAAAACTCATGCAT 900
CACCATCACCATCACTAA 918

图 1d

MSAKSRTIGIIGAPFSKGQPRGGVEEGPTVLRKAGLLEKLKEQEC⁶⁰VDVKDYGDLPFADIPN 60
 DSPFQIVKNPRSVGKASEQLAGKVAEVKKNGRISLVLGGDHSLAIGSISGHARVHPDLGV 120
 IWVDAHTDINTPLTTTSGNLHGQPVSFLLKELKGKIPDVPGFSWVTPCISAKDIVYIGLR 180
 DVDPGEHYILKTLGIKYFSMTEVDRLGIGKVMEETLSYLLGRKKRPIHLSFDVDGLDPSF 240
 TPATGTFVVGGLTYREGLYITEEIYKTGLLSGLDIMEVNPSLGKTPEEVTRTVNTAVAIT 300
 LACFGLAREGNHKPIDYLNPPK 322

图 2a

MSAKSRTIGIIGAPFSKGQPRGGVEEGPTVLRKAGLLEKLKEQEC⁶⁰VDVKDYGDLPFADIPN 60
 DSPFQIVKNPRSVGKASEQLAGKVAEVKKNGRISLVLGGDHSLAIGSISGHARVHPDLGV 120
 IWVDAHTDINTPLTTTSGNLHGQPVSFLLKELKGKIPDVPGFSWVTPSISAKDIVYIGLR 180
 DVDPGEHYILKTLGIKYFSMTEVDRLGIGKVMEETLSYLLGRKKRPIHLSFDVDGLDPSF 240
 TPATGTFVVGGLTYREGLYITEEIYKTGLLSGLDIMEVNPSLGKTPEEVTRTVNTAVAIT 300
 LASFGLAREGNHKPIDYLNPPK 322

图 2b

MKPISIIGVPMDLGQTRRGVDMGPSAMRYAGVIERLERLHYDIEDLGDIP 50
 IGKAERLHEQGDSRLRNKAVAEANEKLA¹⁰⁰AVDQVVQGRFPLVLGGDHS 100
 IAIGTLAGVAKHYERLGV¹⁵⁰IWYDAHGDVNTAETSPSGNIHGMP¹⁵⁰LAASLGFG 150
 HPALTQIGGYSPKIKPEHVVLIGVRS²⁰⁰LDEGEKKFIREKG²⁰⁰IKIYTMHEVDR 200
 LGMTRVMEETIAYLKERTDGVHLSLDL²⁵⁰DGLDPSDAPGVGTPVIGGLTYRE 250
 SHLAM²⁹⁹EMLAEAQIITSAEFVEVNPILDERNKTASVAVALMGSLFGEKLM 299

图 2c

MKPISIIGVPMDLGQTRRGVDMGPSAMRYAGVIERLERLHYDIEDLGDIP 50
 IGKAERLHEQGDSRLRNKAVAEANEKLA¹⁰⁰AVDQVVQGRFPLVLGGDHS 100
 IAIGTLAGVAKHYERLGV¹⁵⁰IWYDAHGDVNTAETSPSGNIHGMP¹⁵⁰LAASLGFG 150
 HPALTQIGGYCPKIKPEHVVLIGVRS²⁰⁰LDEGEKKFIREKG²⁰⁰IKIYTMHEVDR 200
 LGMTRVMEETIAYLKERTDGVHLSLDL²⁵⁰DGLDPSDAPGVGTPVIGGLTYRE 250
 SHLAM³⁰⁰EMLAEAQIITSAEFVEVNPILDERNKTASVAVALMGSLFGEKLMH 300
 HHHHH 305

图 2d

atgagcgccaagtccagaacctagggattattggagctcctttctcaaagggacagcca
M S A K S R T I G I I G A P F S K G Q P
cgaggaggggtggaagaaggccctacagtattgagaaaggctgggtctgcttgagaaactt
R G G V E E G P T V L R K A G L L E K L
aaagaacaagagtgtgatgtgaaggattatggggacctgccctttgctgacatcccta
K E Q E C D V K D Y G D L P F A D I P N
gacagtccttttcaaattgtgaagaatccaaggctctgtgggaaaagcaagcgagcagctg
D S P F Q I V K N P R S V G K A S E Q L
gctggcaagggtggcagaagtcaagaagaacggaagaatcagcctgggtgctgggcggagac
A G K V A E V K K N G R I S L V L G G D
cacagtttggcaattggaagcatctctggccatgccagggtccaccctgatcttggagtc
H S L A I G S I S G H A R V H P D L G V
atctgggtggatgctcacactgatatacaactccactgacaaccacaagtggaaacttg
I W V D A H T D I N T P L T T T S G N L
catggacaacctgtatctttcctcctgaagggaactaaaaggaaagattcccgatgtgcca
H G Q P V S F L L K E L K G K I P D V P
ggattctcctgggtgactccctctatatctgccaaggatattgtgtatatattggcttgaga
G F S W V T P S I S A K D I V Y I G L R
gacgtggaccctggggaacactacattttgaaaactctaggcattaaatacttttcaatg
D V D P G E H Y I L K T L G I K Y F S M
actgaagtggacagactaggaattggcaagggtgatggaagaacactcagctatctacta
T E V D R L G I G K V M E E T L S Y L L
ggaagaaagaaaaggccaattcatctaagttttgatgttgacggactggacccatctttc
G R K K R P I H L S F D V D G L D P S F
acaccagctactggcacaccagtcgtgggaggtctgacatacagagaagggtctctacatc
T P A T G T P V V G G L T Y R E G L Y I
acagaagaaatctacaaaacagggtactctcaggattagatataatggaagtgaaccca
T E E I Y K T G L L S G L D I M E V N P
tccctggggaagacaccagaagaagtaactcgaacagtgaacacagcagttgcaataacc
S L G K T P E E V T R T V N T A V A I T
ttggcttcttttcggacttgctcgggagggtaatcacaagcctattgactaccttaaccca
L A S F G L A R E G N H K P I D Y L N P
cctaagtaa
P K -

图 3a

atgcatcaccatcaccatcacatgagcgccaagtccagaaccatagggattattggagct
M H H H H H M S A K S R T I G I I G A
ccttttctcaaagggacagccacgaggaggggtggaagaaggccctacagtattgagaaag
P F S K G Q P R G G V E E G P T V L R K
gctgggtctgcttgagaaacttaaagaacaagagtgtgatgtgaaggattatggggacctg
A G L L E K L K E Q E C D V K D Y G D L
cccttttgctgacatccctaataatgacagtcocctttcaaattgtgaagaatccaagggtctgtg
P F A D I P N D S P F Q I V K N P R S V
ggaaaagcaagcgagcagctggctggcaagggtggcagaagtcaagaagaacggaagaatc
G K A S E Q L A G K V A E V K K N G R I
agcctgggtgctggggcggagaccacagtttggcaattggaagcatctctggccatgccagg
S L V L G G D H S L A I G S I S G H A R
gtccaccctgatcttggagtcacatctgggtggatgctcacactgatataacactccactg
V H P D L G V I W V D A H T D I N T P L
acaaccacaagtggaaacttgcatggacaacctgtatctttcctcctgaaggaaactaaaa
T T T S G N L H G Q P V S F L L K E L K
ggaaagattcccgatgtgccaggattctcctgggtgactccctctatatctgccaggat
G K I P D V P G F S W V T P S I S A K D
attgtgtatatattggccttgagagacgtggaccctggggaacactacattttgaaaactcta
I V Y I G L R D V D P G E H Y I L K T L
ggcattaaatacttttcaatgactgaagtggacagactaggaattggcaagggtgatggaa
G I K Y F S M T E V D R L G I G K V M E
gaaacactcagctatctactaggaagaaagaaaaggccaattcatcctaagttttgatggt
E T L S Y L L G R K K R P I H L S F D V
gacggactggacccatctttcacaccagctactggcacaccagtcgtgggaggtctgaca
D G L D P S F T P A T G T P V V G G L T
tacagagaagggtctctacatcacagaagaaatctacaaaacagggctactctcaggatta
Y R E G L Y I T E E I Y K T G L L S G L
gatataatggaagtgaacccatccctggggaagacaccagaagaagtaactcgaacagtg
D I M E V N P S L G K T P E E V T R T V
aacacagcagttgcaataaccttggcttctttcggacttgctcgggagggtaatcacaaag
N T A V A I T L A S F G L A R E G N H K
cctattgactaccttaacccacctaagtaa
P I D Y L N P P K -

图 3b

atgaagccaattttcaattatcggggttccgatggatttagggcagacacgcgcggcggtt
M K P I S I I G V P M D L G Q T R R G V
gatatggggccgagcgcgaatgcgttatgcaggcgtcatcgaacgtctggaacgtcttcat
D M G P S A M R Y A G V I E R L E R L H
tacgatattgaagatttgggagatattccgattggaaaagcagagcgggttgacagagcaa
Y D I E D L G D I P I G K A E R L H E Q
ggagattcacgggttgcgcaatttgaaagcgggttgcggaagcgaacgagaaaacttgcgggcg
G D S R L R N L K A V A E A N E K L A A
gcgggttgaccaagtcgttcagcgggggcgatttccgcttggtgttgggcgggcgaccatagc
A V D Q V V Q R G R F P L V L G G D H S
atcgccattggcacgctcgccgggggtggcgaaacattatgagcggccttgagtgatctgg
I A I G T L A G V A K H Y E R L G V I W
tatgacgcgcgatggcgacgtcaacaccgcggaaacgtcgccgtctggaacattcatggc
Y D A H G D V N T A E T S P S G N I H G
atgccgctggcgggcgagcctcggggttgcccatccggcgctgacgcaaactcggcgggatac
M P L A A S L G F G H P A L T Q I G G Y
tgcccaaaaatcaagccggaacatgtcgtgttgatcggcgtccgttcccttgatgaagg
C P K I K P E H V V L I G V R S L D E G
gagaagaagttttatttcgcgaaaaaggaatcaaaatttacacgatgcatgagggttgatcgg
E K K F I R E K G I K I Y T M H E V D R
ctcggaatgacaaggggtgatggaagaaacgatcgcctattttaaagaacgaacggatggc
L G M T R V M E E T I A Y L K E R T D G
gttcatttgtcgcttgacttggatggccttgacccaagcgacgcacccgggagtcggaacg
V H L S L D L D G L D P S D A P G V G T
cctgtcattggaggattgacataccgcgaaagccatttggcgatggagatgctggccgag
P V I G G L T Y R E S H L A M E M L A E
gcacaaatcatcacttcagcgggaatttgtcgaagtgaaccgatcttggatgagcgggaac
A Q I I T S A E F V E V N P I L D E R N
aaaacagcatcagtggtgttagcgtgatggggtcggttgtttggtgaaaaactcatgtaa
K T A S V A V A L M G S L F G E K L M -

图 3c

atgaagccaatttcaattatcggggttccgatggatttagggcagacacgccgcggcggtt
 M K P I S I I G V P M D L G Q T R R G V
 gatatggggccgagcgcgaatgcgttatgcaggcgcgcacgaacgtctggaacgtcttcat
 D M G P S A M R Y A G V I E R L E R L H
 tacgatattgaagatttgggagatatccgatttgaaaagcagagcgggttgccagagcaa
 Y D I E D L G D I P I G K A E R L H E Q
 ggagattcacgggttgccgaatttgaaagcgggttgccgaagcgaacgagaaacttgccggcg
 G D S R L R N L K A V A E A N E K L A A
 gcgggttgaccaagtcgttcagcggggggcgatttccgcttggttgggcccgcaccatagc
 A V D Q V V Q R G R F P L V L G G D H S
 atcgccattggcacgcctcgccgggggtggcgaaacattatgagcggccttgagtgatctgg
 I A I G T L A G V A K H Y E R L G V I W
 tatgacgcgcacgtgcacgcgtcaacaccgcggaaacgtcgccgtctggaacattcatggc
 Y D A H G D V N T A E T S P S G N I H G
 atgcgcgtggcggcgagcctcggggttggccatccggcgcgtgacgcaaatacgccggatac
 M P L A A S L G F G H P A L T Q I G G Y
 tgcccaaaaatcaagccggaacatgtcgtgttgatcggcgtccgttcccttgatgaaggg
 C P K I K P E H V V L I G V R S L D E G
 gagaagaagttttattcgcgaaaaaggaatcaaaatttacacgatgcatgaggttgatcgg
 E K K F I R E K G I K I Y T M H E V D R
 ctcggaatgacaaggggtgatggaagaaacgatcgccctattttaaagaacgaacggatggc
 L G M T R V M E E T I A Y L K E R T D G
 gttcatttgtcgcttgacttggatggccttgacccaagcgcacgcaccgggagtcggaacg
 V H L S L D L D G L D P S D A P G V G T
 cctgtcatttgaggattgacataccgcgaaagccatttggcgatggagatgctggccgag
 P V I G G L T Y R E S H L A M E M L A E
 gcacaaatcatcacttcagcgggaatttgtcgaagtgaacccgatcttgatgagcgggaac
 A Q I I T S A E F V E V N P I L D E R N
 aaaacagcatcagtggtgtagcgcgtgatgggggtcggttgtttggtgaaaaactcatgcat
 K T A S V A V A L M G S L F G E K L M H
 caccatcaccatcacctaa
 H H H H H -



6 × His-标签编码密码子

图 3d

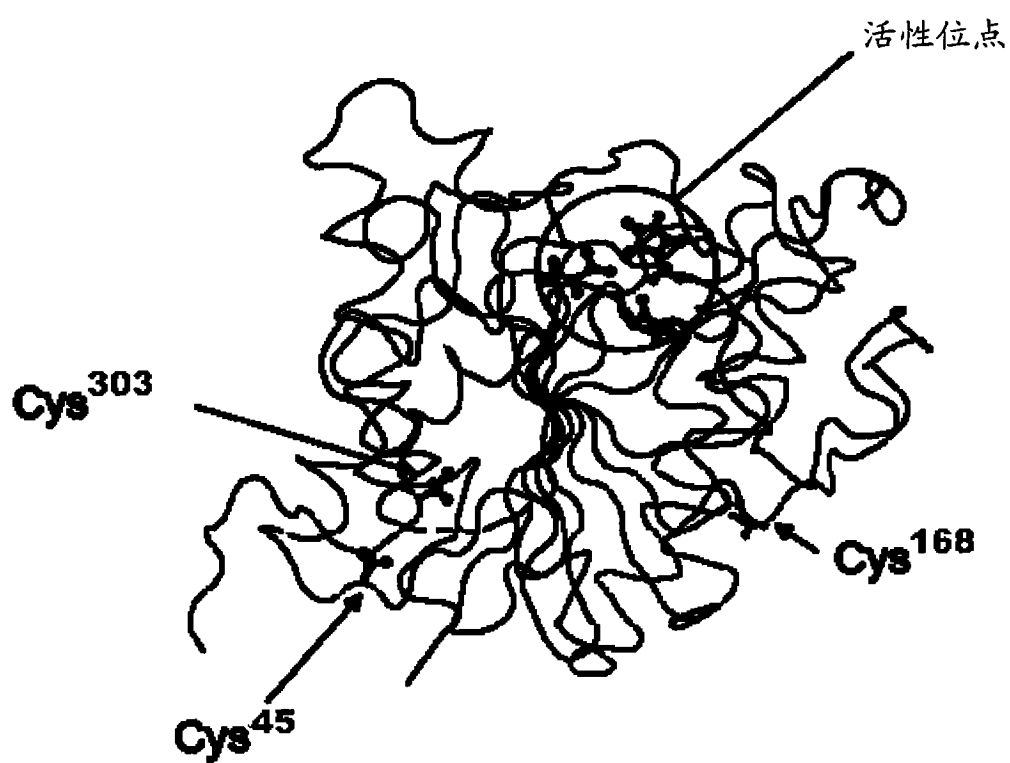


图 4a

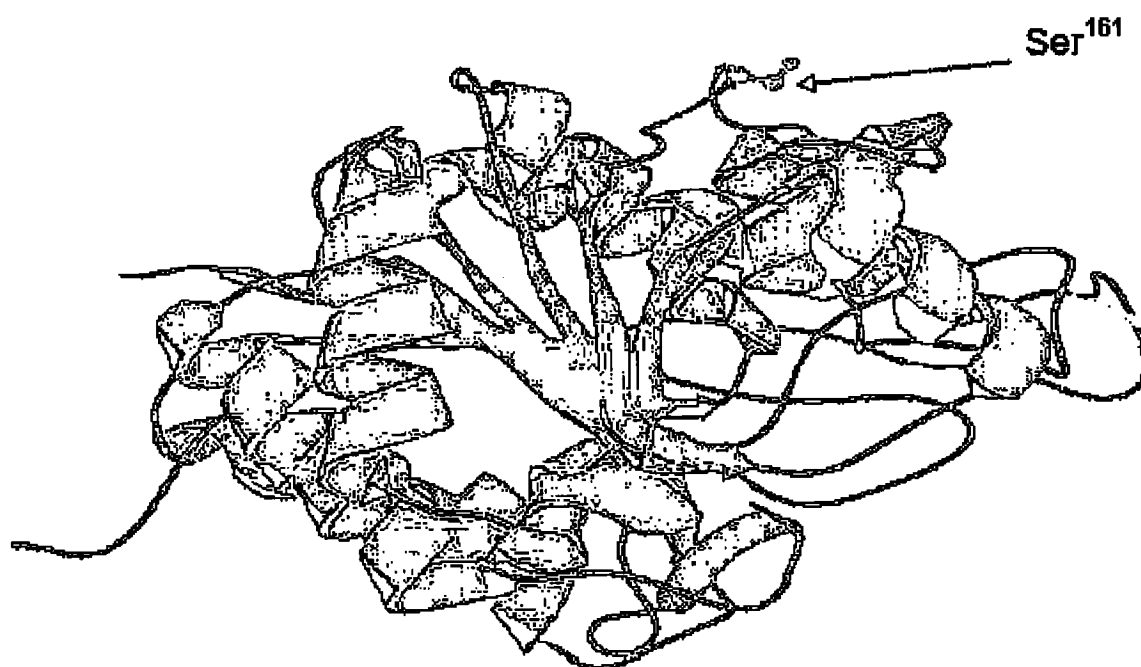
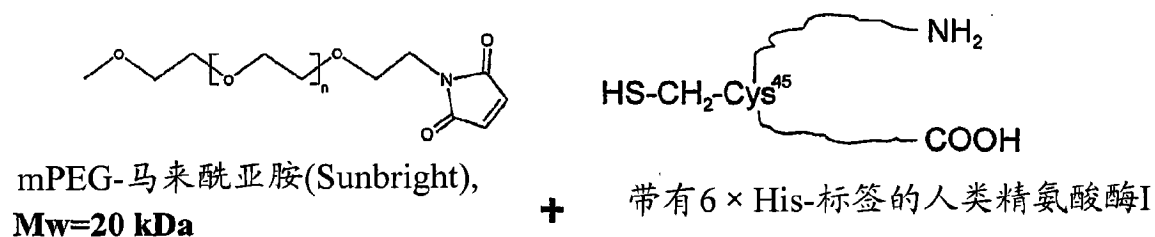


图 4b



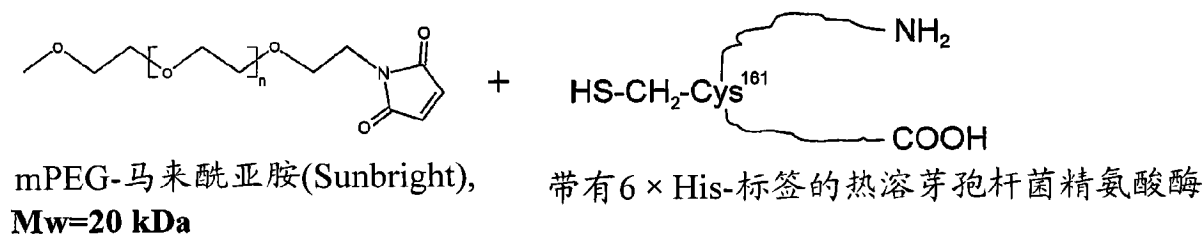
在pH7.4还原(使用
TCEP)

PEG:蛋白比例(PEG:人类精氨酸酶I)=20:1



天然的

图 5a



在pH7.4还原(使用
TCEP)

PEG:蛋白比例(PEG:热溶芽孢杆菌精氨酸酶)=20:1



聚乙二醇化, 在4℃
搅拌过夜

图 5b

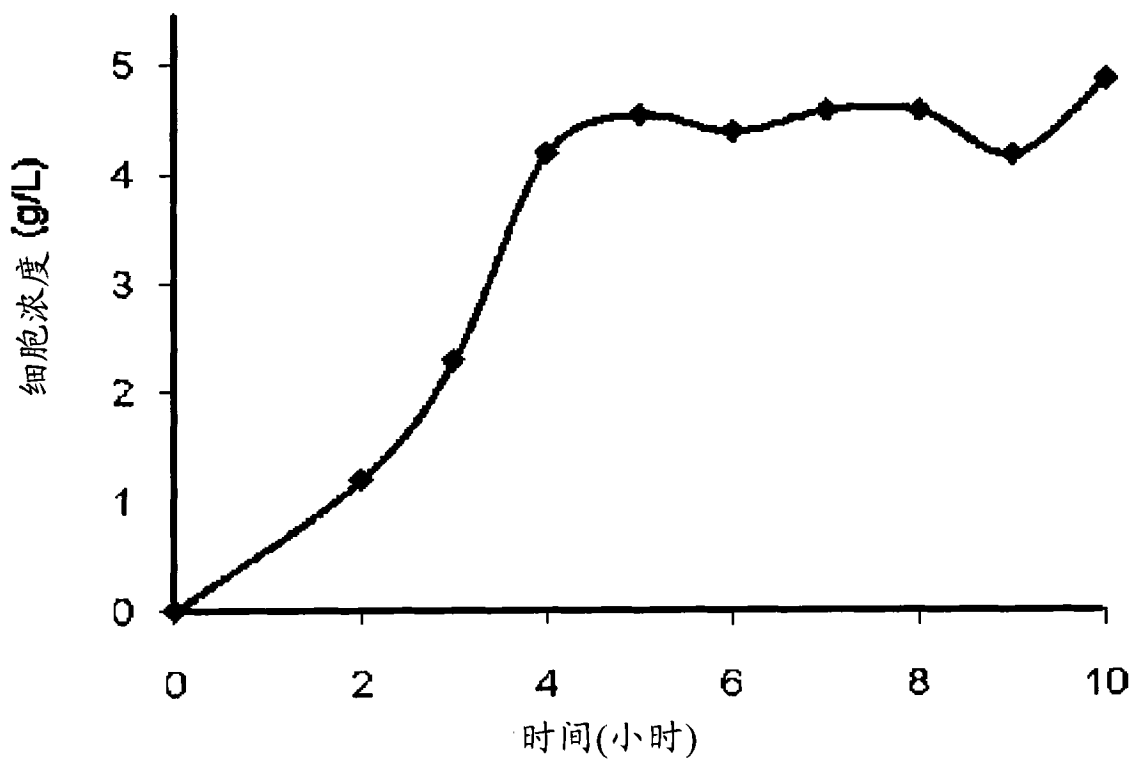


图 6a1

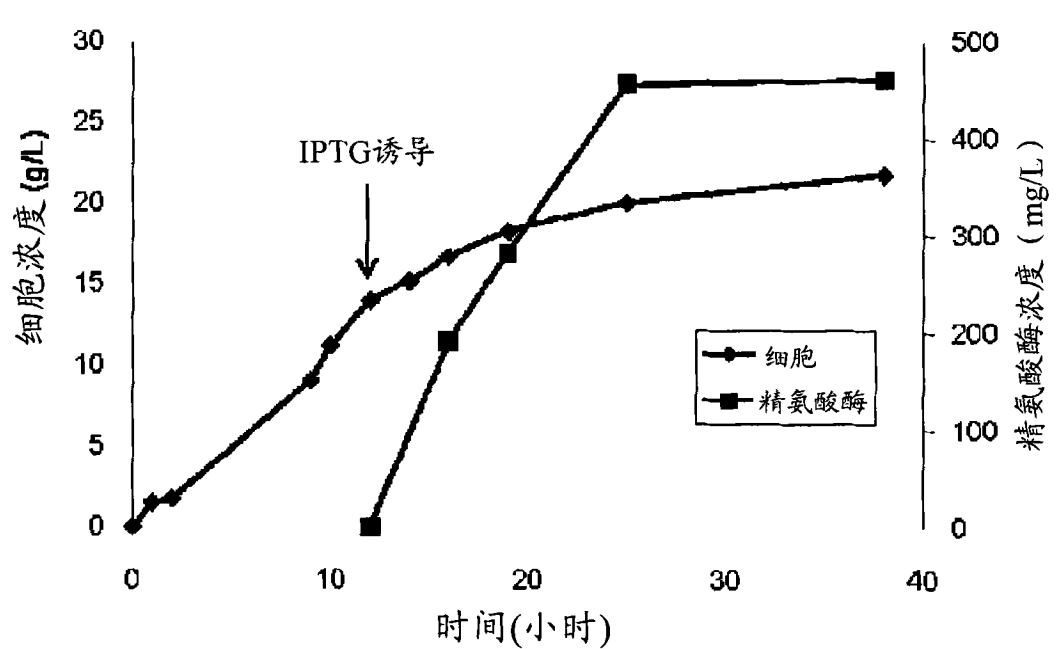


图 6a2

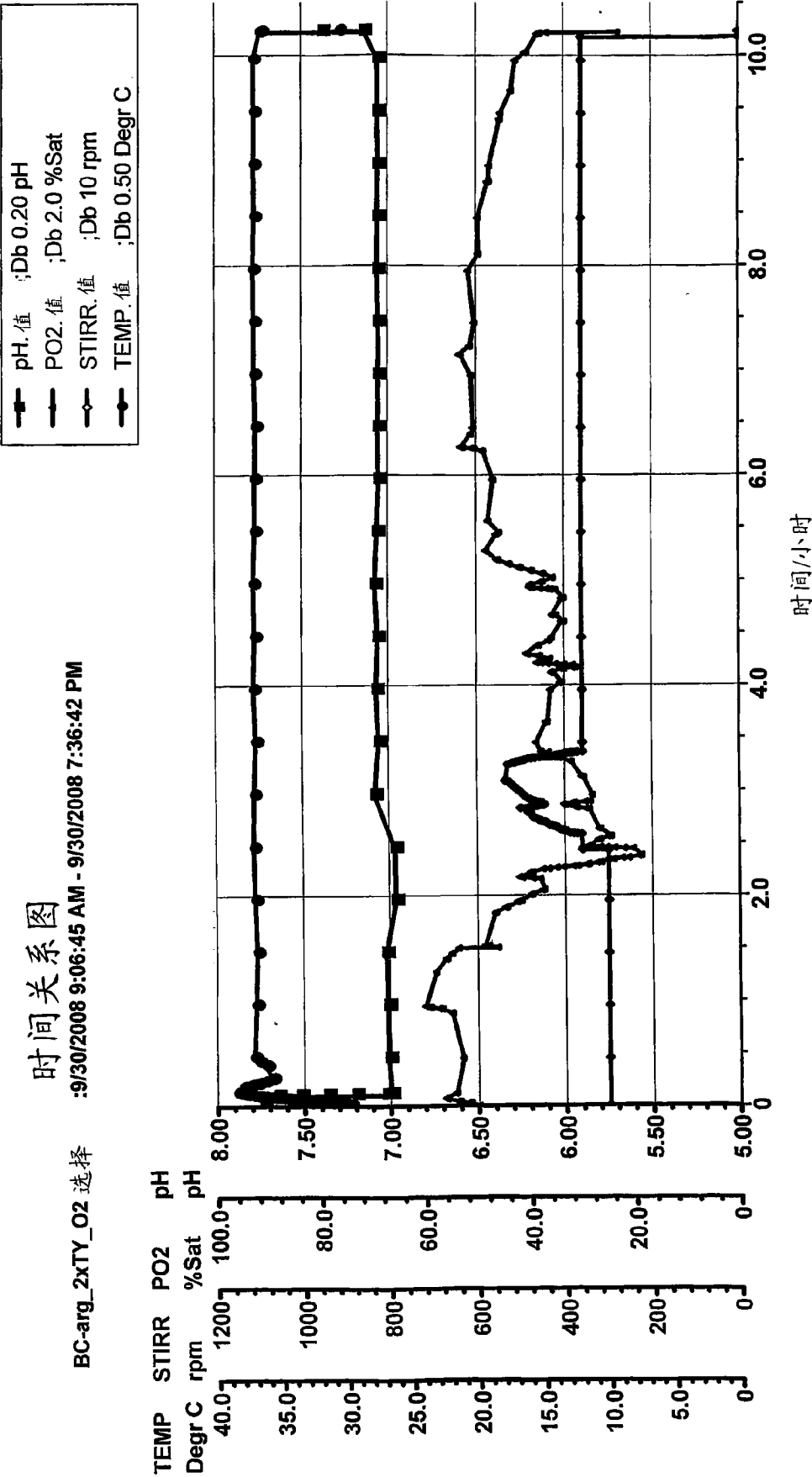


图 6b1

时间关系图

BC-Arg-丙三醇_15012009(完成)选择: 1/15/2009 12:10:01 AM- 1/16/2009 11:22:26 AM

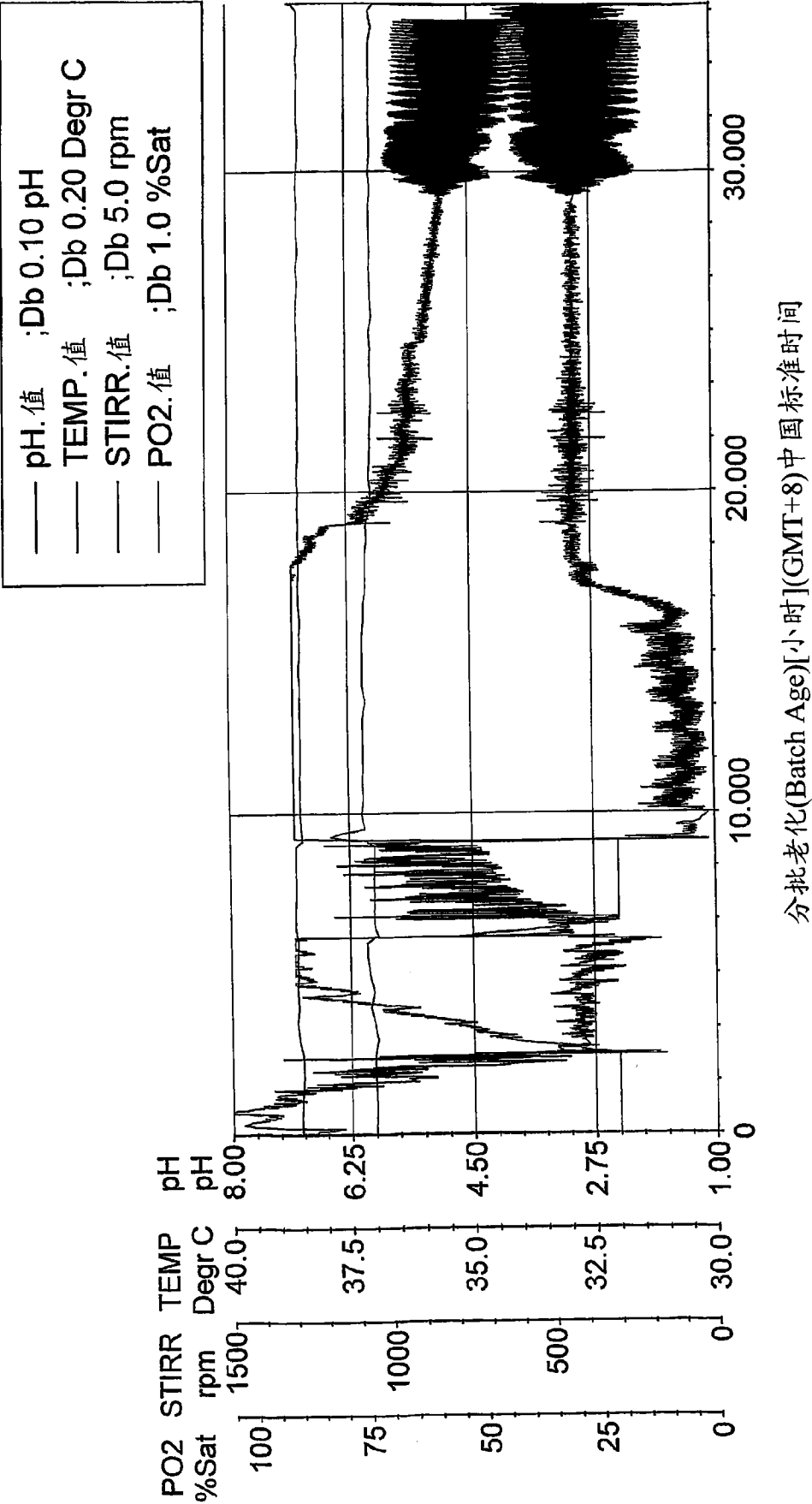


图 6b2

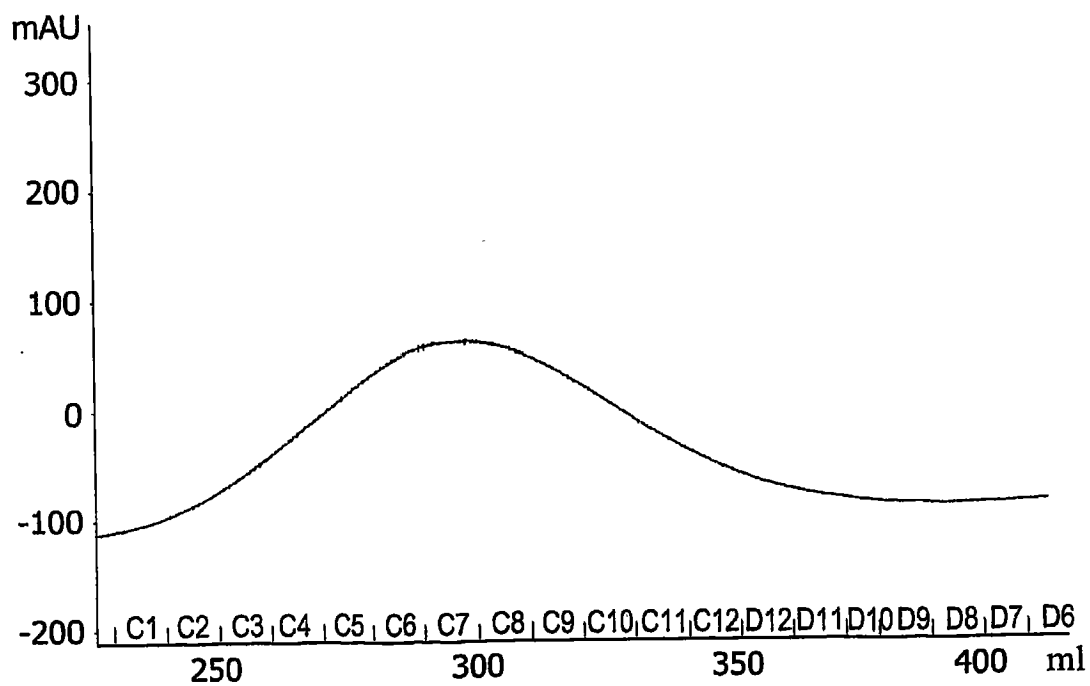
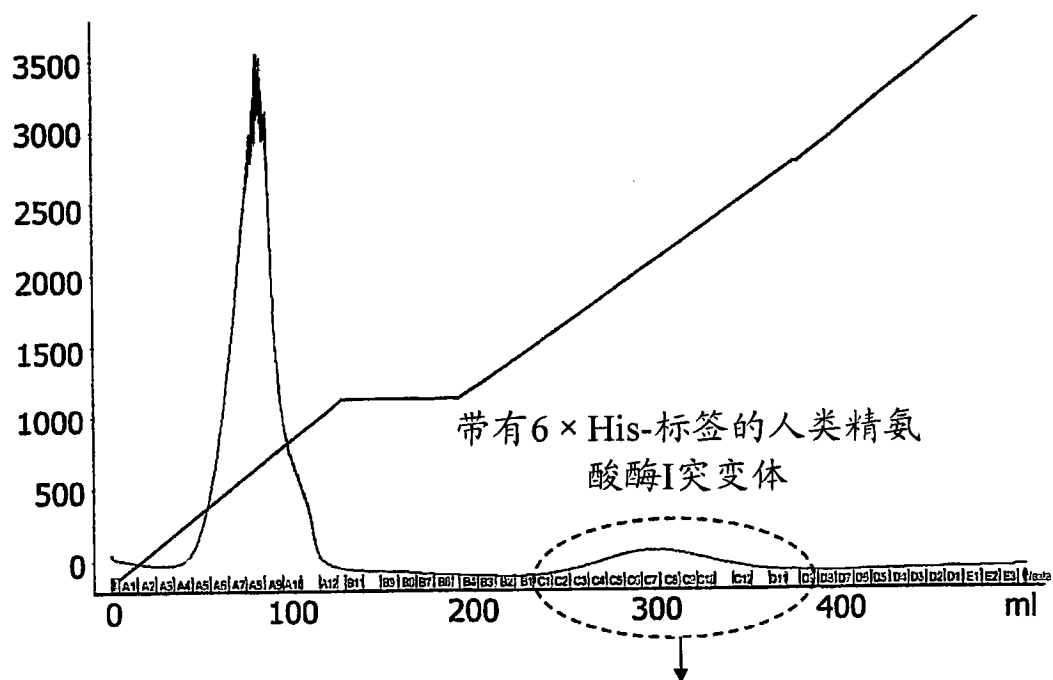


图 6c

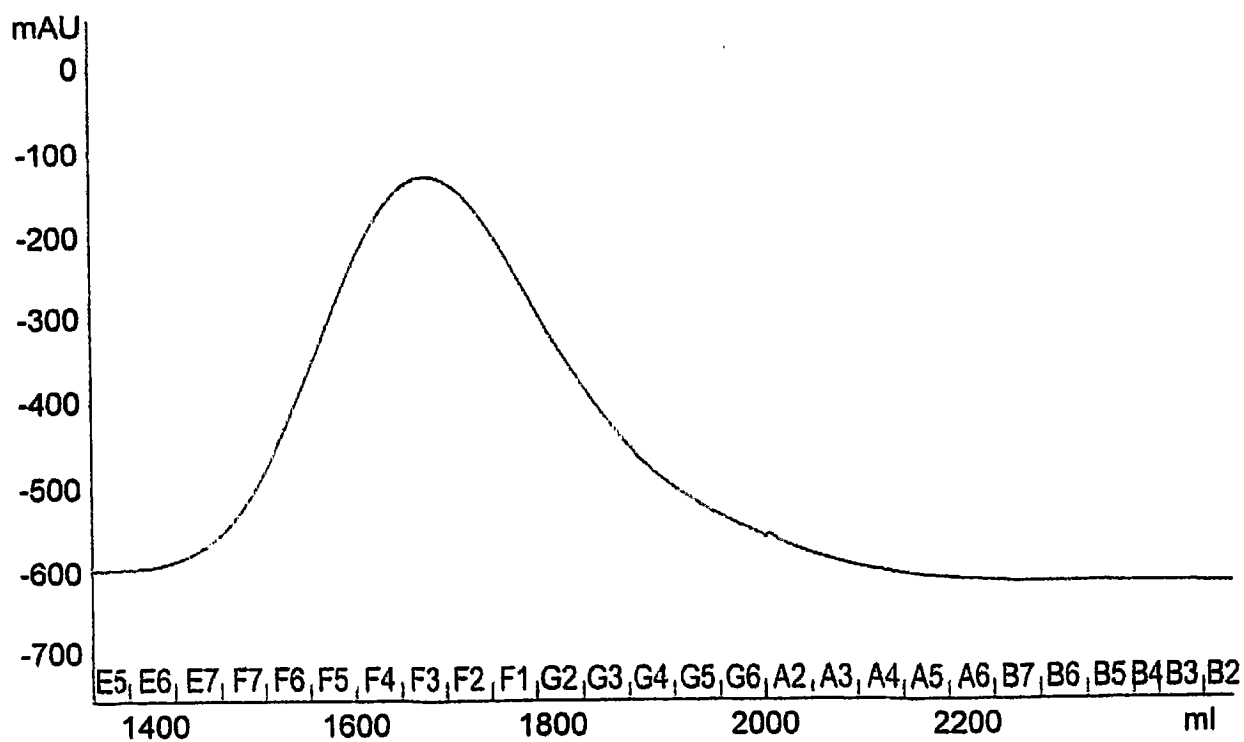
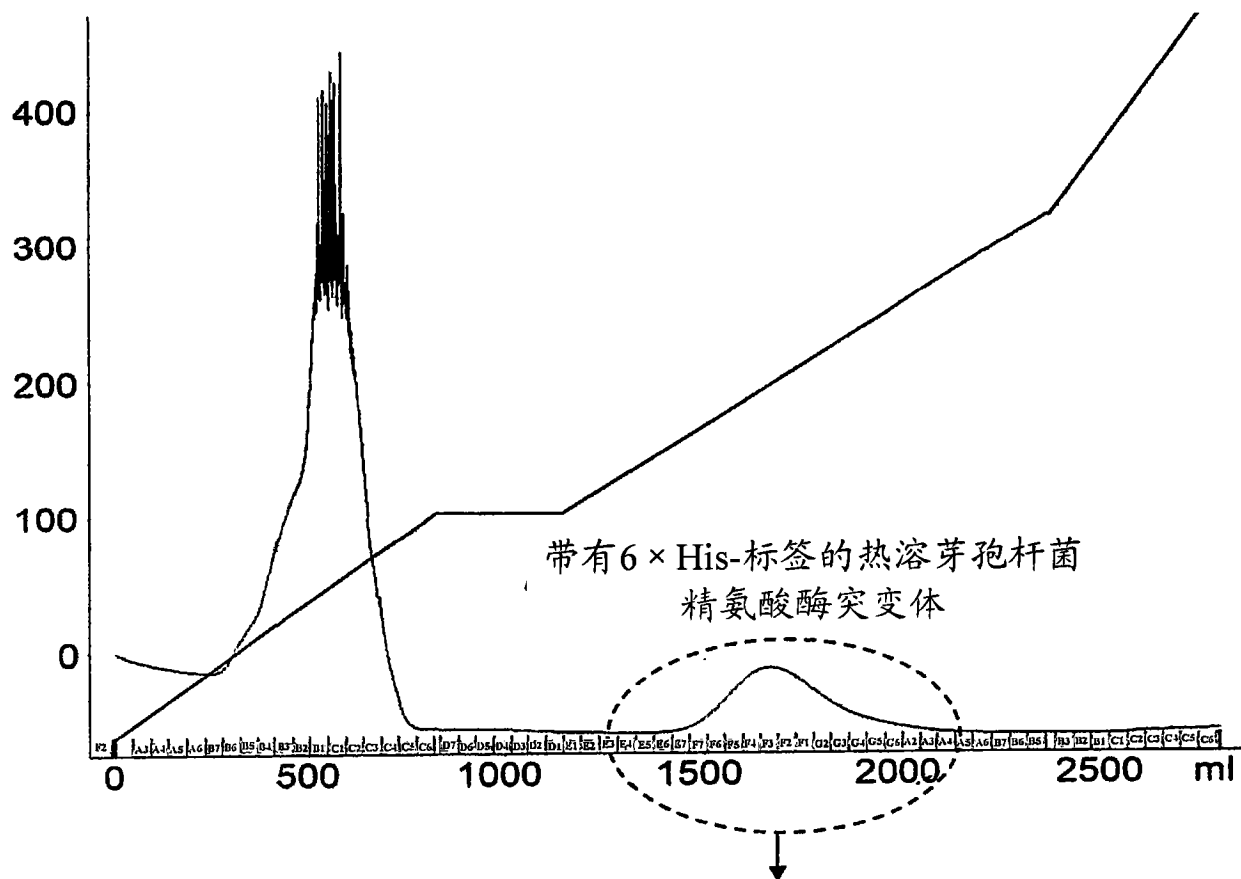
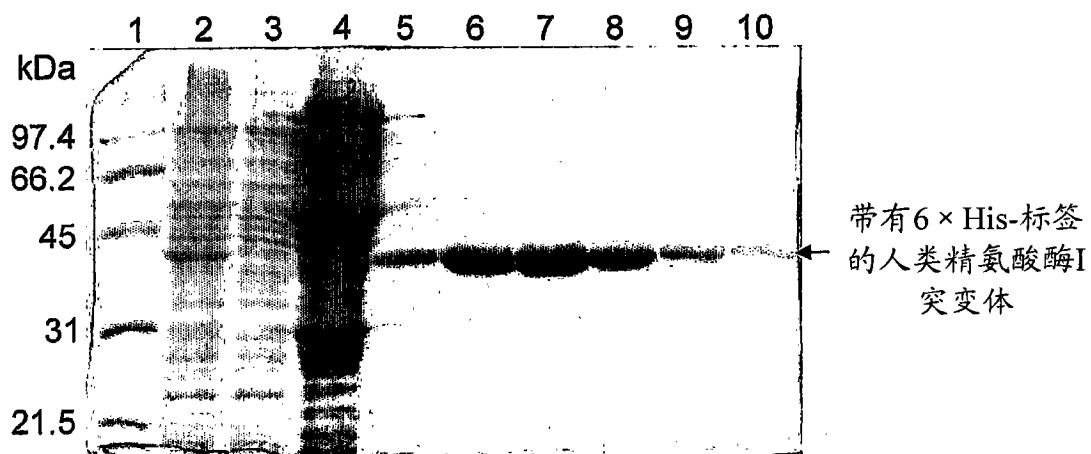
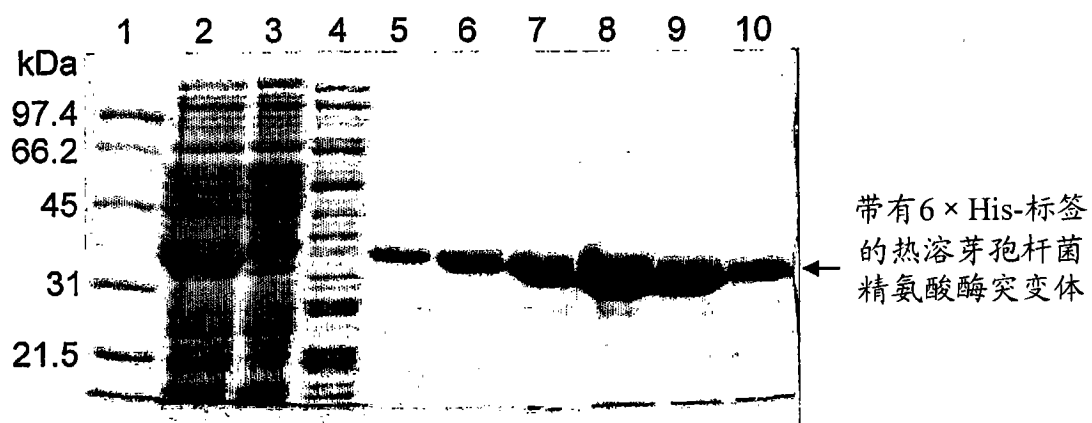


图 6d



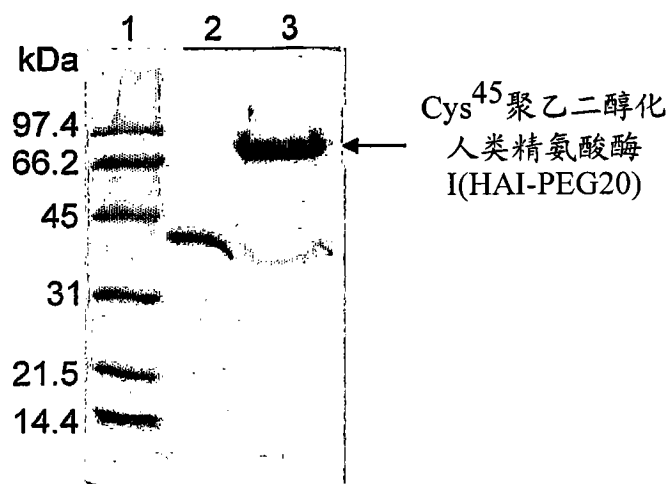
泳道 1:	低范围蛋白标记, Bio-Rad
泳道 2:	在螯合型FF琼脂糖柱之前 (2.5μL)
泳道 3:	直通液 (2.5μL)
泳道 4:	组分 A8 (10 μL)
泳道 5:	组分 C2 (10 μL)
泳道 6:	组分 C5 (10 μL)
泳道 7:	组分 C8 (10 μL)
泳道 8:	组分 C11 (10 μL)
泳道 9:	组分 D11 (10 μL)
泳道 10:	组分 D7 (10 μL)

图 7a



泳道 1:	低范围蛋白标记, Bio-Rad
泳道 2:	在螯合型FF琼脂糖柱之前 (2.5μL)
泳道 3:	直通液 (5μL)
泳道 4:	组分 C1 (10 μL)
泳道 5:	组分 E7 (10 μL)
泳道 6:	组分 F7 (10 μL)
泳道 7:	组分 F6 (10 μL)
泳道 8:	组分 F3 (10 μL)
泳道 9:	组分 G2 (10 μL)
泳道 10:	组分 G5 (10 μL)

图 7b

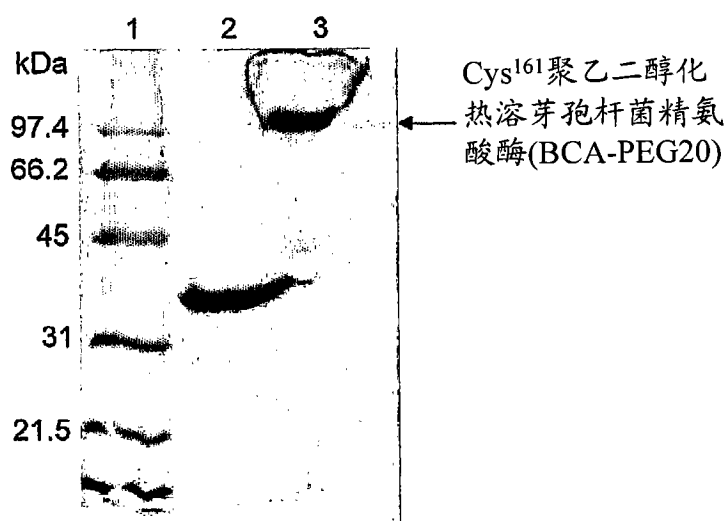


泳道 1: 低范围蛋白标记, Bio-Rad

泳道 2: 未聚乙二醇化人类精氨酸酶I

泳道 3: Cys ⁴⁵ 聚乙二醇化人类精氨酸酶I

图 8a



泳道 1: 低范围蛋白标记, Bio-Rad

泳道 2: 未聚乙二醇化的热溶芽孢杆菌精氨酸酶

泳道 3: Cys ¹⁶¹ 聚乙二醇化热溶芽孢杆菌精氨酸酶
--

图 8b

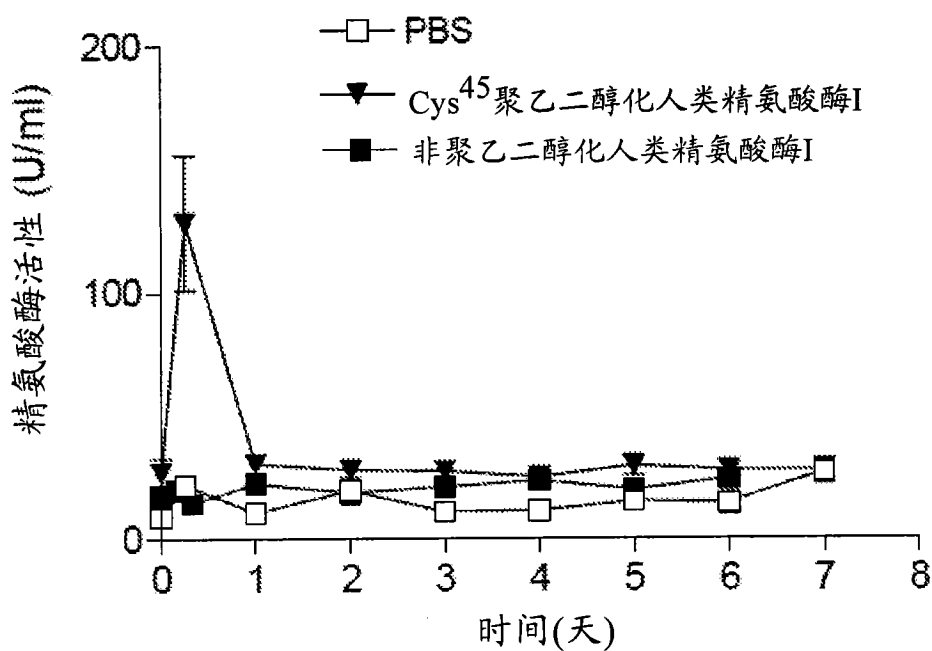


图 9a

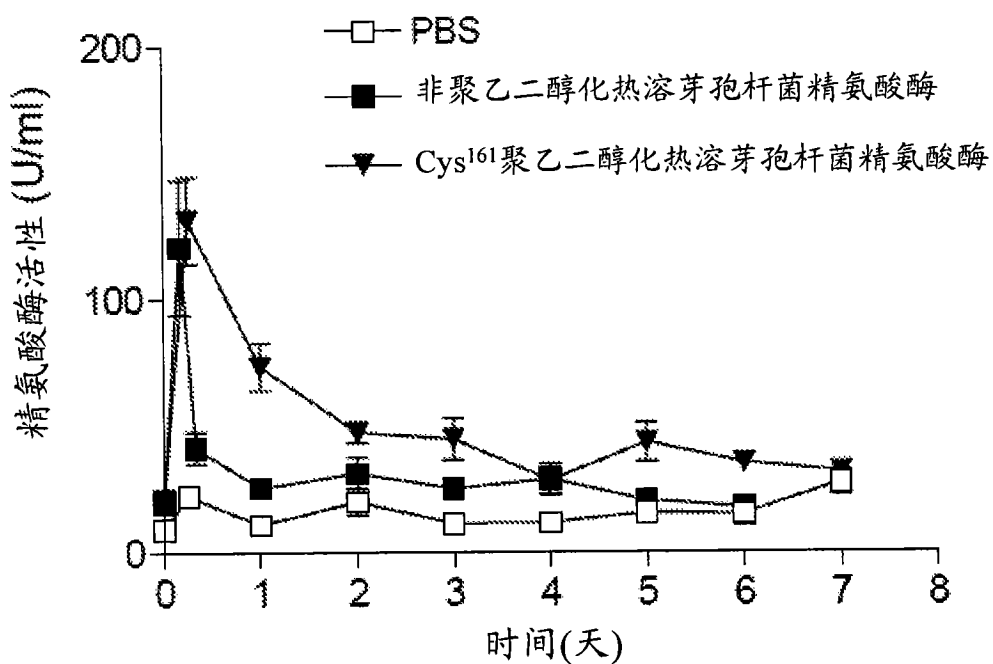


图 9b

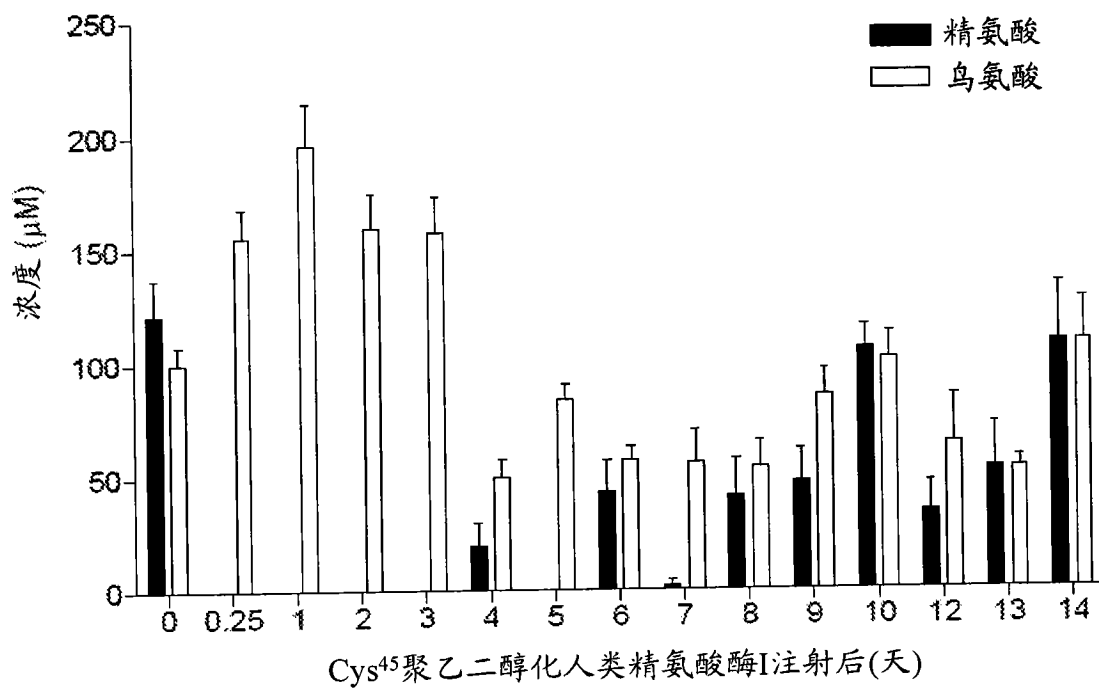


图 10a

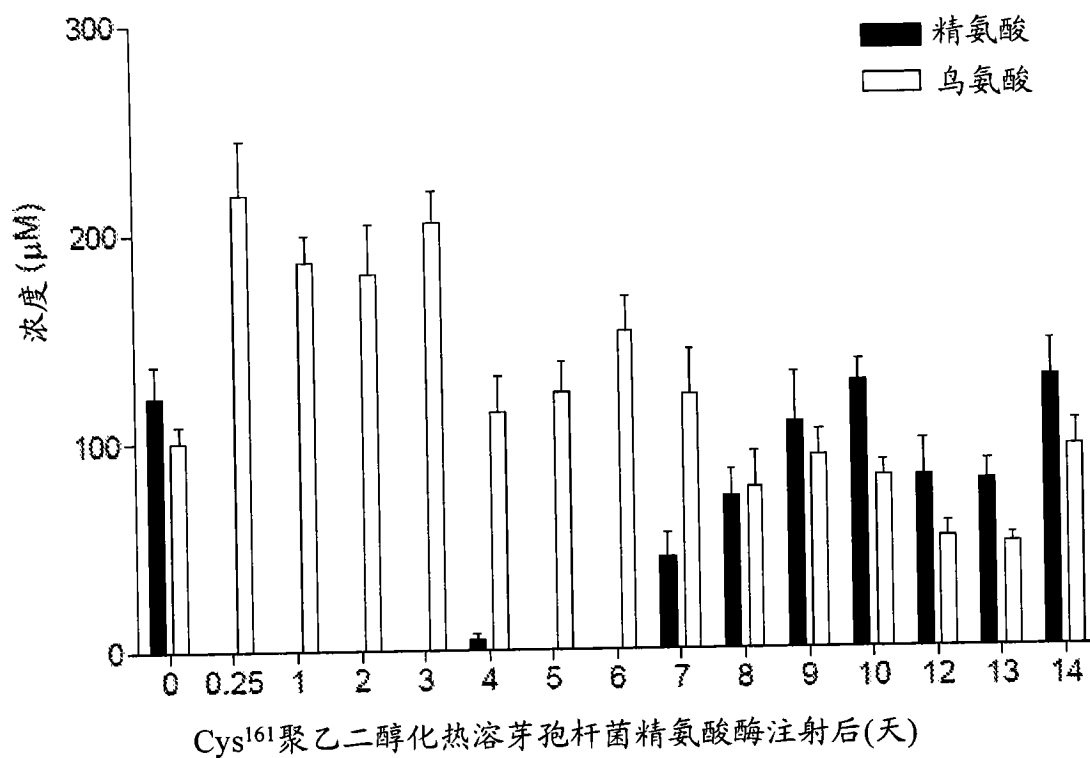


图 10b

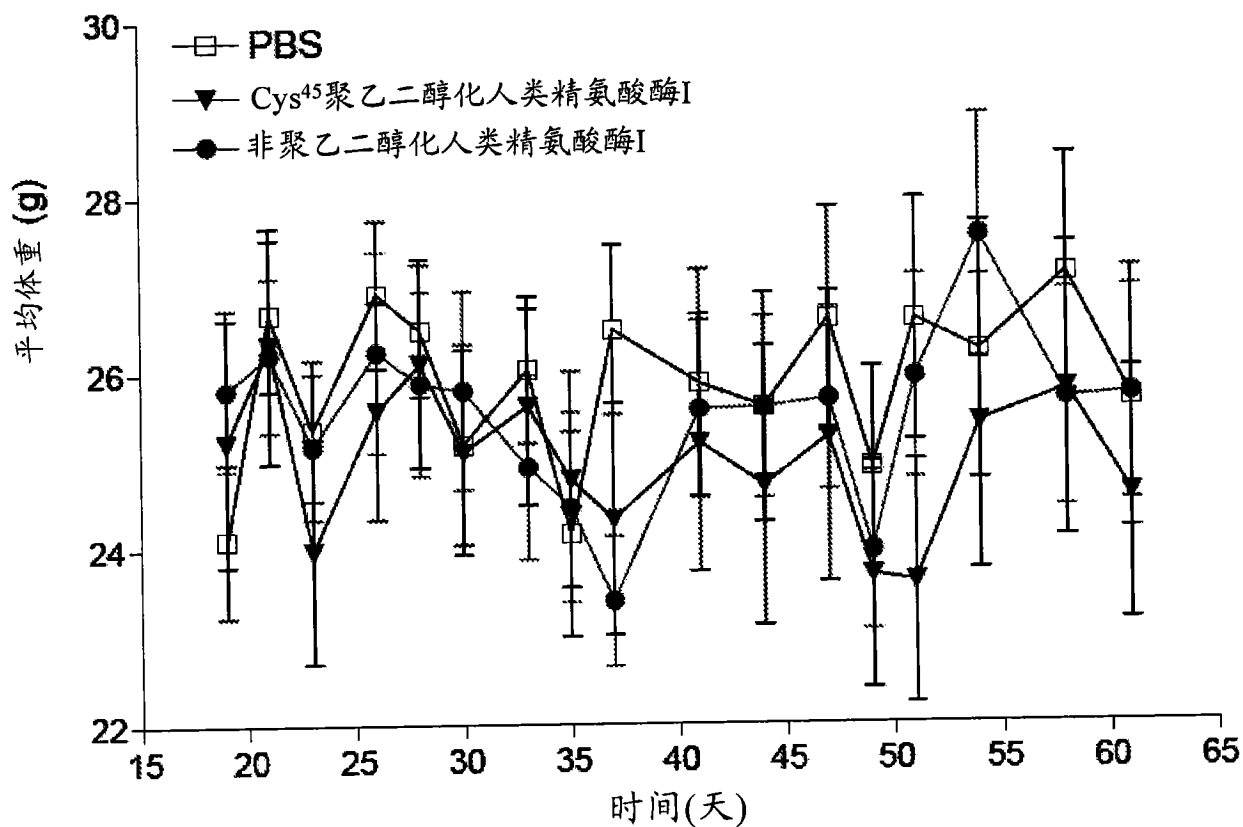


图 11a

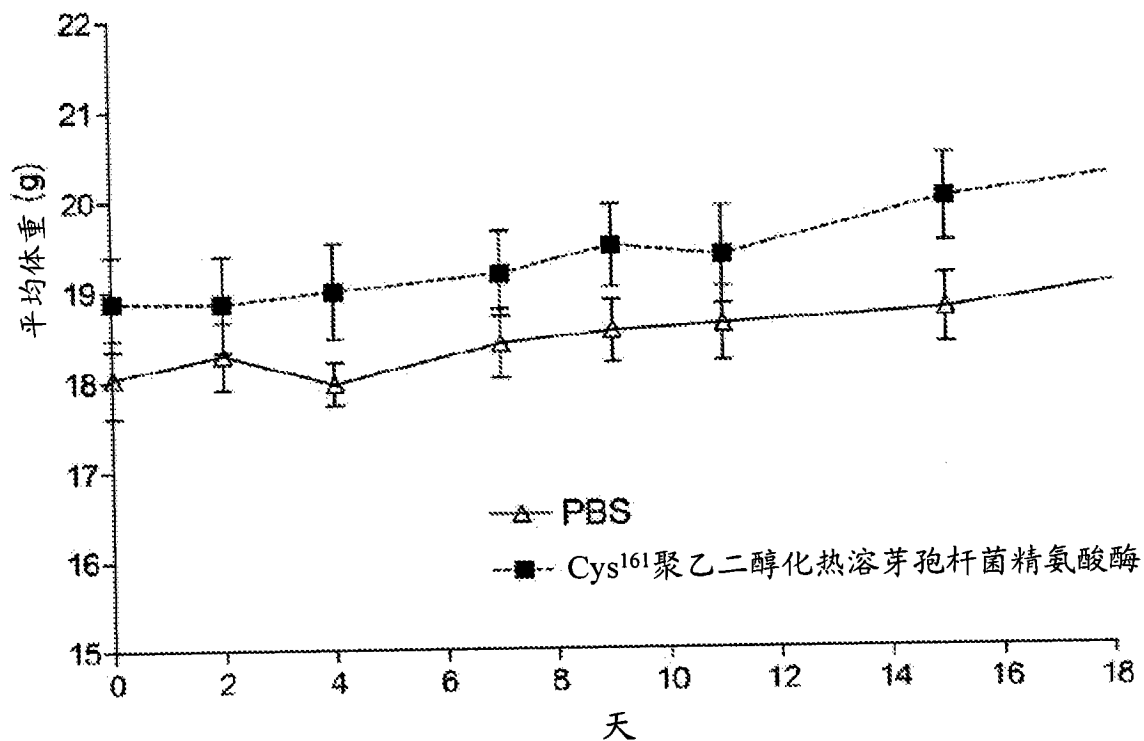


图 11b

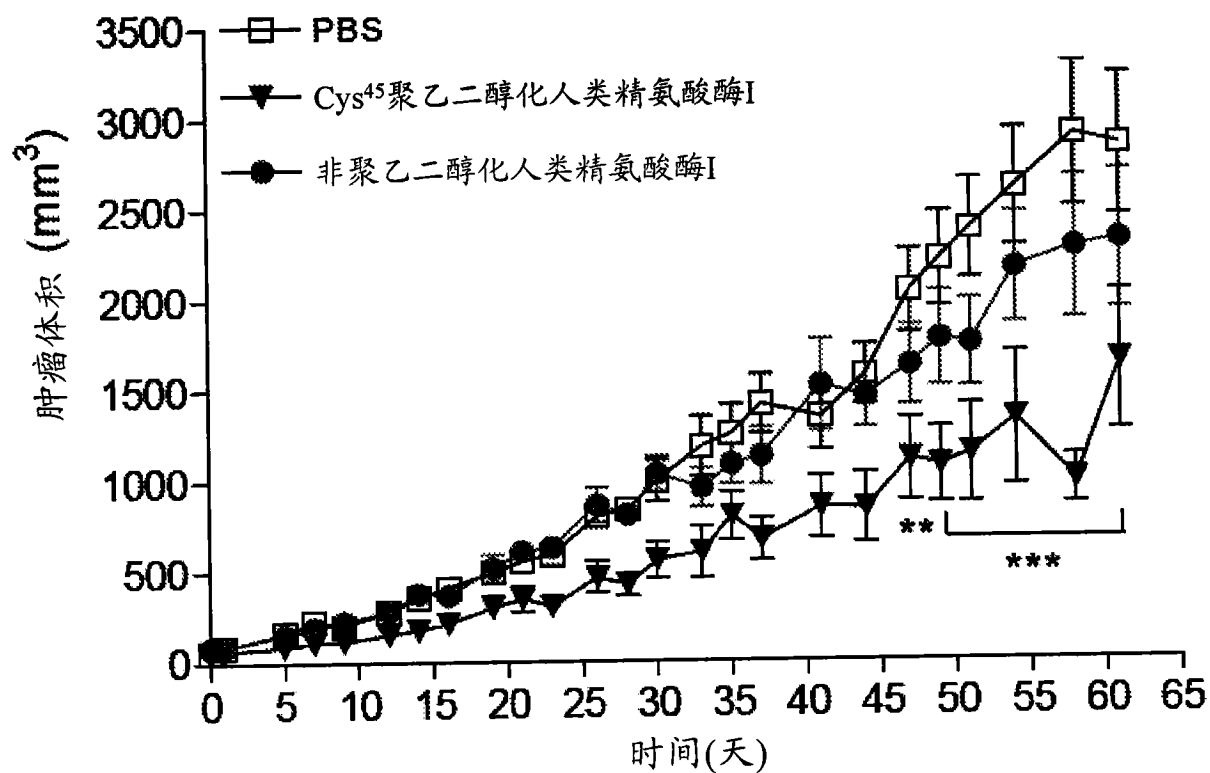


图 12a

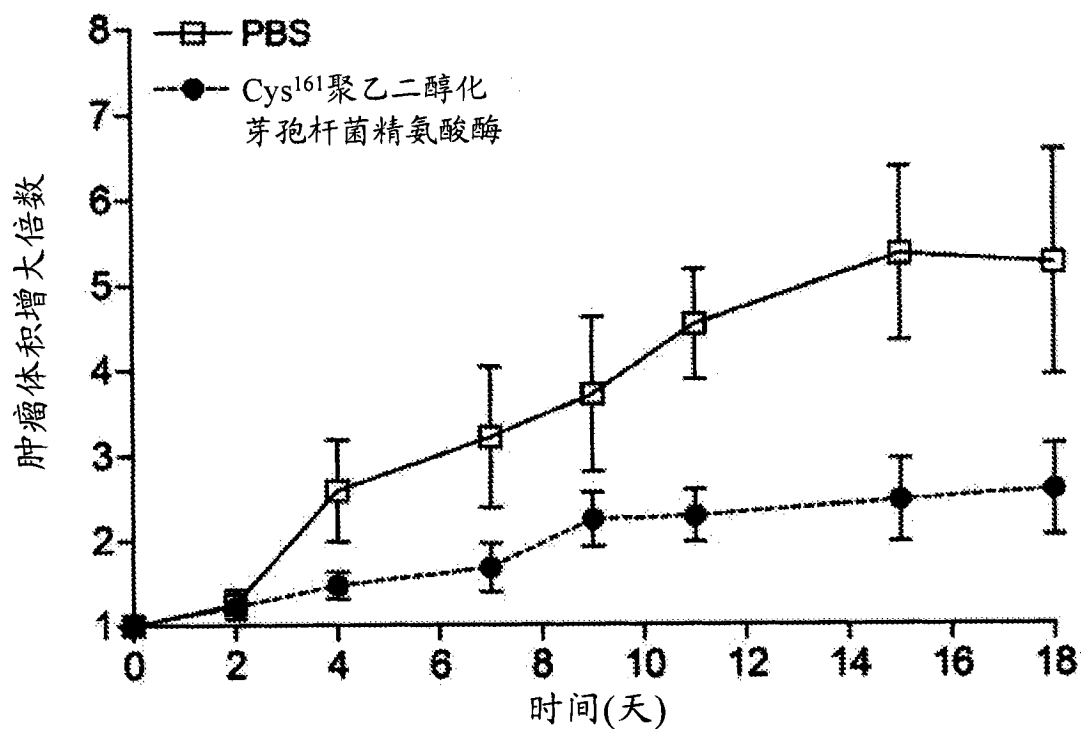


图 12b

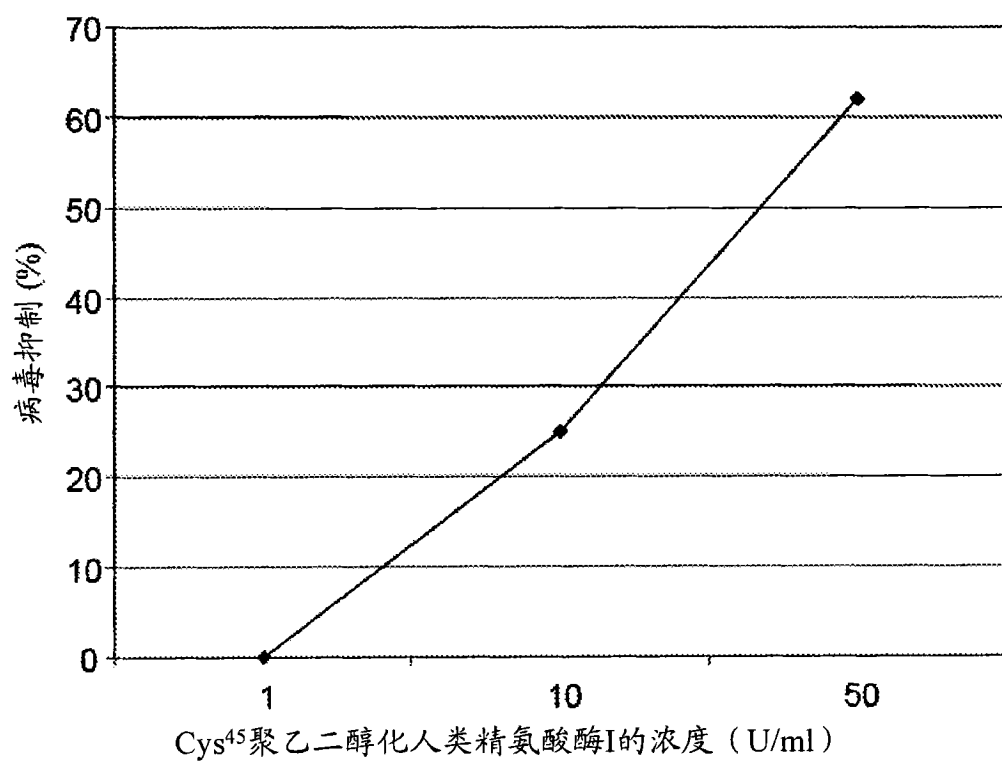


图 13

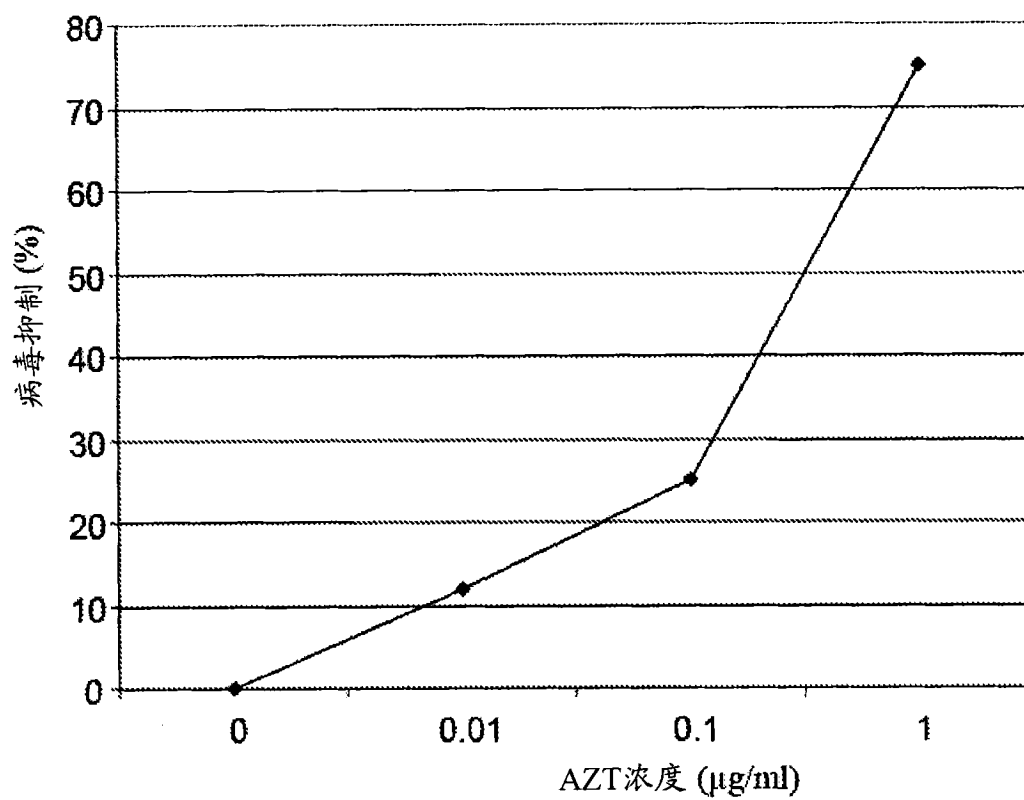


图 14

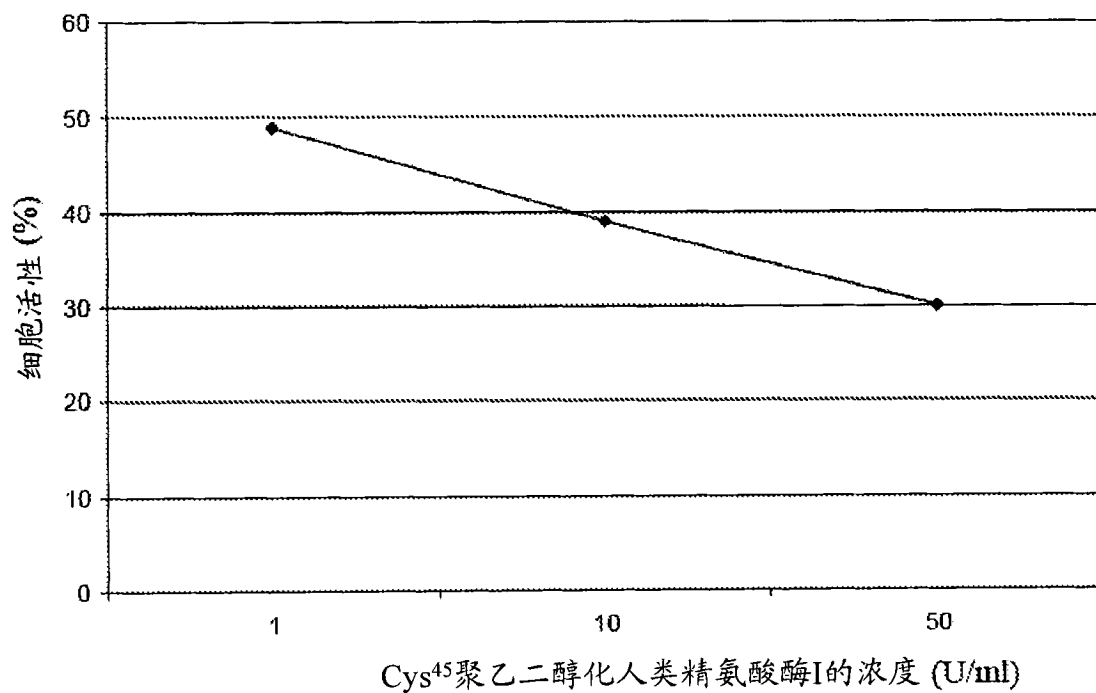
Cys⁴⁵聚乙二醇化人类精氨酸酶I(HAI-PEG20)的细胞毒性

图 15

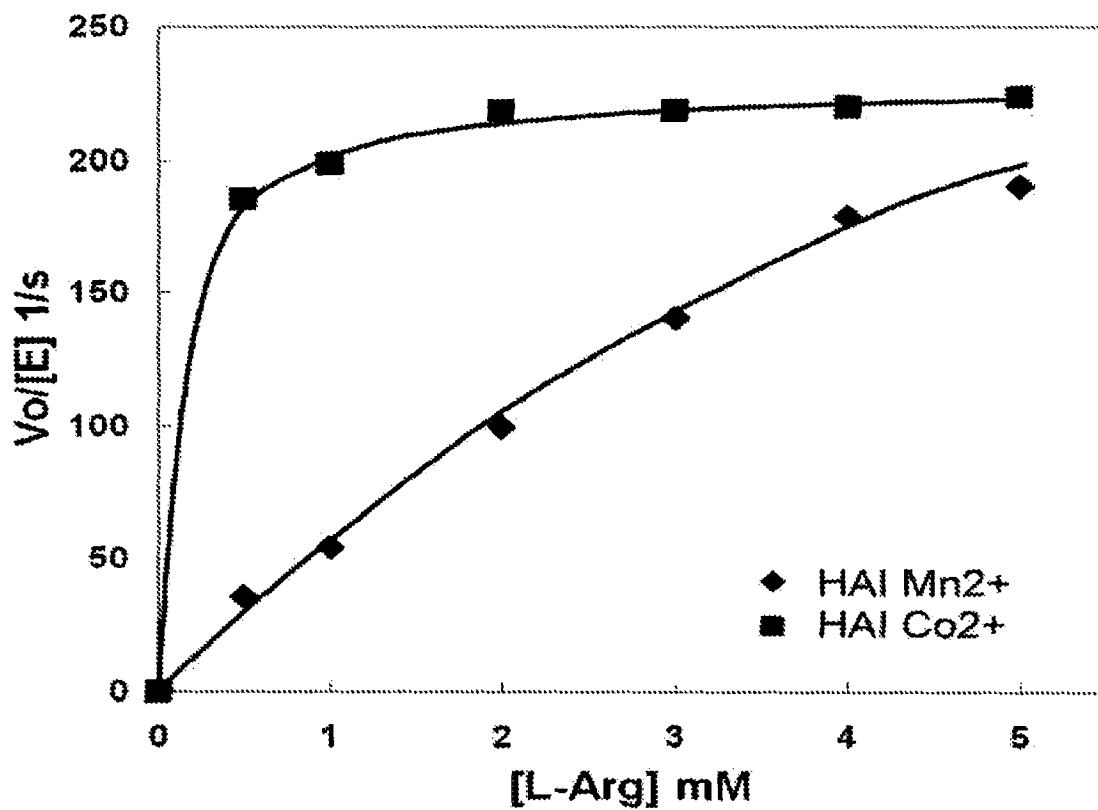


图 16

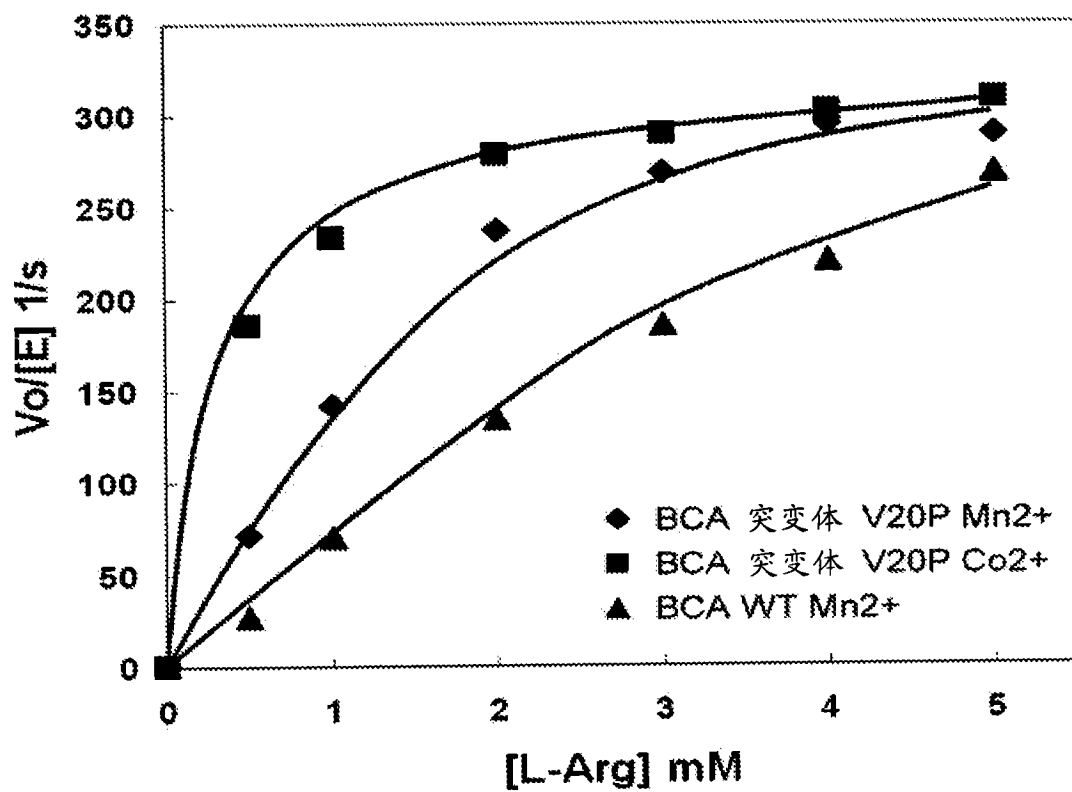


图 17

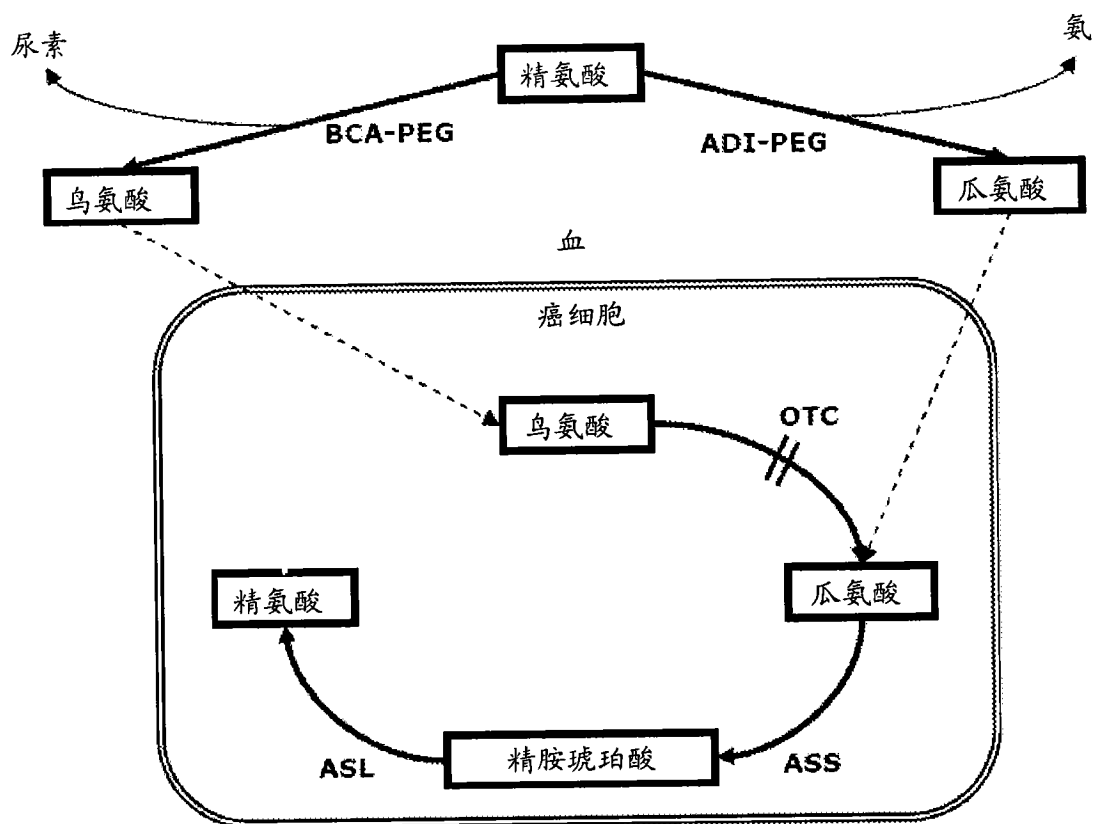


图 18