



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101842482 B

(45) 授权公告日 2014. 10. 22

(21) 申请号 200880016898. 4

(22) 申请日 2008. 05. 23

(30) 优先权数据

11/807, 227 2007. 05. 25 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2009. 11. 20

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2008/006661 2008. 05. 23

(87) PCT国际申请的公布数据

W02008/153776 EN 2008. 12. 18

(73) 专利权人 生物马林药物股份有限公司

地址 美国加利福尼亚州

(72) 发明人 米歇尔·C·维拉德

P·A·菲茨帕特里克 E·D·卡基斯

丹尼尔·J·温特

(74) 专利代理机构 北京安信方达知识产权代理

有限公司 11262

代理人 武晶晶 郑霞

(51) Int. Cl.

C12N 9/88 (2006. 01)

(56) 对比文件

W0 0226028 A2, 2002. 04. 04, 全文.

Gordon V. Louie et al., Structural determinants and modulation of substrate specificity in phenylalanine-tyrosine ammonia-lyases. 《Chem. Biol. 》. 2006, 第 13 卷 (第 12 期), 1327-1338.

赵健身. 苯丙氨酸氨解酶. 《天然产物研究与开发》. 1993, 第 5 卷 (第 4 期), 47-56.

审查员 刘涛

权利要求书2页 说明书65页

序列表40页 附图19页

(54) 发明名称

原核生物苯丙氨酸氨裂合酶的组合物及使用所述组合物的方法

(57) 摘要

本发明涉及原核生物产生的苯丙氨酸氨裂合酶 (PAL), 其中这种原核生物 PAL 变体与野生型 PAL 相比具有更高的苯丙氨酸转化活性和 / 或降低的免疫原性。本发明因此提供了细菌 PAL 及其生物活性片段、突变体、变体和类似物的组合物, 以及为了治疗和工业目的生产、纯化和使用这些组合物的方法。

点形念珠藻 PAL 的基因序列

```
1  atgaaatgaa atctctatca aagaacata aagatgtttt agcaataaa ttctactaat
41  atttgaatt atctatgaa tttgaggttt agaatatga caatgaaga gtttgaatt
121  atttctatga atgaacata atctatgaa atctatgaa atctatgaa atctatgaa
181  atgaatgaa atgaatgaa atgaatgaa atgaatgaa atgaatgaa atgaatgaa
241  atgaatgaa atgaatgaa atgaatgaa atgaatgaa atgaatgaa atgaatgaa
301  atgaatgaa atgaatgaa atgaatgaa atgaatgaa atgaatgaa atgaatgaa
361  atgaatgaa atgaatgaa atgaatgaa atgaatgaa atgaatgaa atgaatgaa
421  atgaatgaa atgaatgaa atgaatgaa atgaatgaa atgaatgaa atgaatgaa
481  atgaatgaa atgaatgaa atgaatgaa atgaatgaa atgaatgaa atgaatgaa
541  atgaatgaa atgaatgaa atgaatgaa atgaatgaa atgaatgaa atgaatgaa
601  atgaatgaa atgaatgaa atgaatgaa atgaatgaa atgaatgaa atgaatgaa
661  atgaatgaa atgaatgaa atgaatgaa atgaatgaa atgaatgaa atgaatgaa
721  atgaatgaa atgaatgaa atgaatgaa atgaatgaa atgaatgaa atgaatgaa
781  atgaatgaa atgaatgaa atgaatgaa atgaatgaa atgaatgaa atgaatgaa
841  atgaatgaa atgaatgaa atgaatgaa atgaatgaa atgaatgaa atgaatgaa
901  atgaatgaa atgaatgaa atgaatgaa atgaatgaa atgaatgaa atgaatgaa
961  atgaatgaa atgaatgaa atgaatgaa atgaatgaa atgaatgaa atgaatgaa
1021  atgaatgaa atgaatgaa atgaatgaa atgaatgaa atgaatgaa atgaatgaa
1081  atgaatgaa atgaatgaa atgaatgaa atgaatgaa atgaatgaa atgaatgaa
1141  atgaatgaa atgaatgaa atgaatgaa atgaatgaa atgaatgaa atgaatgaa
1201  atgaatgaa atgaatgaa atgaatgaa atgaatgaa atgaatgaa atgaatgaa
1261  atgaatgaa atgaatgaa atgaatgaa atgaatgaa atgaatgaa atgaatgaa
1321  atgaatgaa atgaatgaa atgaatgaa atgaatgaa atgaatgaa atgaatgaa
1381  atgaatgaa atgaatgaa atgaatgaa atgaatgaa atgaatgaa atgaatgaa
1441  atgaatgaa atgaatgaa atgaatgaa atgaatgaa atgaatgaa atgaatgaa
1501  atgaatgaa atgaatgaa atgaatgaa atgaatgaa atgaatgaa atgaatgaa
1561  atgaatgaa atgaatgaa atgaatgaa atgaatgaa atgaatgaa atgaatgaa
1621  atgaatgaa atgaatgaa atgaatgaa atgaatgaa atgaatgaa atgaatgaa
1681  atgaatgaa atgaatgaa atgaatgaa atgaatgaa atgaatgaa atgaatgaa
```

1. 一种多变鱼腥藻苯丙氨酸氨裂合酶 (AvPAL) 变体, 其中 AvPAL 的第 503 和 565 位半胱氨酸残基被丝氨酸残基取代, 使得该 AvPAL 变体的氨基酸序列与 SEQ ID NO:11 所示的氨基酸序列相同, 其中所述 AvPAL 变体是以聚乙二醇被聚乙二醇化的。

2. 权利要求 1 的 AvPAL 变体, 其中所述聚乙二醇化是通过 AvPAL 变体与 NHS 活化的聚乙二醇以每个 AvPAL 变体赖氨酸残基至少 1.6 个聚乙二醇的比例进行反应而实现的。

3. 权利要求 1 的 AvPAL 变体, 其中所述聚乙二醇化是通过 AvPAL 变体与 NHS 活化的聚乙二醇以每个 AvPAL 变体赖氨酸残基至少 2.4 个聚乙二醇的比例进行反应而实现的。

4. 权利要求 1 的 AvPAL 变体, 其中所述聚乙二醇化是通过 AvPAL 变体与 NHS 活化的聚乙二醇以每个 AvPAL 变体赖氨酸残基 3 个聚乙二醇的比例进行反应而实现的。

5. 权利要求 1-4 任一项的 AvPAL 变体, 其中所述 AvPAL 变体的第 2、10、32、145、195、301、413、493 和 522 位赖氨酸残基中至少有 28% 是聚乙二醇化的。

6. 权利要求 1-4 任一项的 AvPAL 变体, 其中所述 AvPAL 变体的第 2、10、195、413、493 和 522 位赖氨酸残基中至少 51% 是聚乙二醇化的。

7. 权利要求 1-4 任一项的 AvPAL 变体, 其中所述 AvPAL 变体的第 2、10、195、493 和 522 位赖氨酸残基中至少 75% 是聚乙二醇化的。

8. 一种药物组合物, 其包含权利要求 1-7 任一项所述的 AvPAL 变体和药学上可接受的载体。

9. 权利要求 1-7 任一项所述的 AvPAL 变体在制备用于治疗个体中全部或部分由苯丙氨酸羟化酶 (PAH) 缺乏引起的疾病的药物中的应用。

10. 权利要求 9 的应用, 其中所述疾病的特征在于苯丙氨酸水平升高。

11. 权利要求 9 的应用, 其中所述个体具有正常 PAH 活性的 10% 或更低。

12. 权利要求 9 的应用, 其中在施用所述 AvPAL 变体之前, 所述个体的血浆苯丙氨酸浓度大于 200 μ M。

13. 权利要求 9 的应用, 其中所述药物被制备成降低所述个体血浆苯丙氨酸浓度的 10% 或更多。

14. 权利要求 9 的应用, 其中所述个体具有突变的 PAH。

15. 权利要求 14 的应用, 其中所述突变的 PAH 在 PAH 的催化域中包含突变。

16. 权利要求 15 的应用, 其中所述突变包含一个或多个选自 F39L、L48S、I65T、R68S、A104D、S110C、D129G、E178G、V190A、P211T、R241C、R261Q、A300S、L308F、A313T、K320N、A373T、V388M、E390G、A395P、P407S 和 Y414C 的突变。

17. 权利要求 9 的应用, 其中所述个体是人。

18. 权利要求 9 的应用, 其中所述药物被制备成与蛋白质限制性饮食联合施用给所述个体。

19. 权利要求 17 的应用, 其中所述个体是怀孕女性。

20. 权利要求 17 的应用, 其中所述个体是 0-3 岁的婴儿。

21. 权利要求 20 的应用, 其中所述婴儿的血浆苯丙氨酸浓度为 360 μ M 至 4800 μ M。

22. 权利要求 1-7 任一项的 Av-PAL 变体在制备用于治疗个体苯丙氨酸水平升高的药物中的应用。

23. 权利要求 22 的应用, 其中在施用所述 AvPAL 变体之前, 所述个体的血浆苯丙氨酸浓

度大于 200 μ M。

24. 权利要求 22 的应用,其中所述药物被制备成降低所述个体血浆苯丙氨酸浓度的 10% 或更多。

25. 权利要求 22 的应用,其中所述个体 PAH 活性缺乏。

26. 权利要求 25 的应用,其中所述个体具有突变的 PAH。

27. 权利要求 26 的应用,其中所述突变的 PAH 在 PAH 的催化域中包含突变。

28. 权利要求 27 的应用,其中所述突变包含一个或多个选自 F39L、L48S、I65T、R68S、A104D、S110C、D129G、E178G、V190A、P211T、R241C、R261Q、A300S、L308F、A313T、K320N、A373T、V388M、E390G、A395P、P407S 和 Y414C 的突变。

29. 权利要求 22 的应用,其中所述个体是人。

30. 权利要求 22 的应用,其中所述药物被制备成与蛋白质限制性饮食联合施用给所述个体。

31. 权利要求 29 的应用,其中所述个体是怀孕女性。

32. 权利要求 29 的应用,其中所述个体是 0-3 岁的婴儿。

33. 权利要求 32 的应用,其中所述婴儿的血浆苯丙氨酸浓度为 360 μ M 至 4800 μ M。

34. 权利要求 1-7 任一项的 Av-PAL 变体在制备用于治疗个体苯丙酮尿症 (PKU) 的药物中的应用。

35. 权利要求 34 的应用,其中所述 PKU 是经典严重的 PKU。

36. 权利要求 34 的应用,其中所述个体 PAH 活性缺乏。

37. 权利要求 36 的应用,其中所述个体具有突变的 PAH。

38. 权利要求 37 的应用,其中所述突变的 PAH 在 PAH 的催化域中包含突变。

39. 权利要求 38 的应用,其中所述突变包含一个或多个选自 F39L、L48S、I65T、R68S、A104D、S110C、D129G、E178G、V190A、P211T、R241C、R261Q、A300S、L308F、A313T、K320N、A373T、V388M、E390G、A395P、P407S 和 Y414C 的突变。

40. 权利要求 34 的应用,其中所述个体是人。

41. 权利要求 34 的应用,其中所述药物被制备成与蛋白质限制性饮食联合施用给所述个体。

42. 权利要求 40 的应用,其中所述个体是怀孕女性。

43. 权利要求 40 的应用,其中所述个体是 0-3 岁的婴儿。

44. 权利要求 43 的应用,其中所述婴儿的血浆苯丙氨酸浓度为 360 μ M 至 4800 μ M。

原核生物苯丙氨酸氨裂合酶的组合物及使用所述组合物的方法

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请是 2007 年 5 月 25 日提交的美国申请 11/807, 227 的部分继续申请, 该美国申请在此全文引入作为参考。

技术领域

[0003] 本发明提供原核生物苯丙氨酸氨裂合酶 (PAL) 及其组合物, 以及优化这些组合物以增强 PAL 催化活性和稳定性, 同时降低 PAL 的免疫原性和 / 或蛋白水解敏感性。本发明还提供这些优化的 PAL 组合物在治疗和工业方面的应用。

背景技术

[0004] PAL 是一种广泛分布在植物中的非哺乳动物酶 (Koukol 等人, J. Biol. Chem. 236 : 2692-2698 (1961) ; Hanson 等人, The Enzymes 7 : 75-166 (1972) ; Poppe 等人, Curr. Org. Chem. 7 : 1297-1315 (2003))、某些真菌 (Rao 等人, Can. J. Biochem. 45 : 1863-1872 (1967) ; Abell 等人, Methods Enzymol. 142 : 242-253 (1987)) 和细菌 (Bezanson 等人, Can. J. Microbiol. 16 : 147-151. (1970) ; Xiang 等人, J. Biol. Chem. 277 : 32505-32509 (2002) ; Hill 等人, Chem. Commun. 1358-1359 (2003)) 中的非哺乳动物酶, 并且可以在大肠杆菌中重组产生。

[0005] PAL 的代表性列表包括 : Q9ATN7 藿香 (*Agastache rugosa*) ; 093967 捕蝇鹅膏 (*Amanita muscaria*) ; P35510, P45724, P45725, Q9SS45, Q8RWP4 拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*) (鼠耳水芹) ; Q6ST23 白绿竹 (*Bambusa oldhamii*) ; Q42609 兰花 (*Bromheadia finlaysoniana*) ; P45726 茶 (*Camelliasinensis*) ; Q9MAX1 长春花 (*Catharanthus roseus*) (Madagascar periwinkle) ; Q9SMK9 鹰嘴豆 (*Cicer arietinum*) ; Q9XFX5, Q9XFX6 克莱门特柑 x 芦柑 (*Citrus Clementina* x *Citrus reticulate*) ; Q42667 柠檬 (*Citrus limon*) ; Q8H6V9, Q8H6W0 中果咖啡 (*Coffea canephora*) (罗巴斯塔咖啡) ; Q852S1 胡萝卜 (*Daucus carota*) ; 023924 毛地黄 (*Digitalis lanata*) ; 023865 胡萝卜 (*Daucus carota*) ; P27991 大豆 (*Glycine max*) ; 004058 向日葵 (*Helianthus annuus*) ; P14166, (Q42858) 甘薯 (*Ipomoea batatas*) ; Q8GZR8, Q8W2E4 莴苣 (*Lactuca sativa*) ; 049835, 049836 紫草 (*Lithospermum erythrorhizon*) ; P35511, P26600 番茄 (*Lycopersicon esculentum*) ; P35512 苹果 (*Malus domestica*) (欧洲苹果 (*Malus sylvestris*)) ; Q94C45, Q94F89 木薯 (*Manihot esculenta*) (树薯) ; P27990 紫花苜蓿 (*Medicago sativa*) ; P25872, P35513, P45733 烟草 (*Nicotiana tabacum*) ; Q6T1C9 栓皮栎 (*Quercus suber*) ; P14717, P53443, Q7M1Q5, Q84VE0, Q84VE0 水稻 (*Oryza sativa*) ; P45727 鳄梨 (*Persea americana*) ; Q9AXI5 牵牛花 (*Pharbitis nil*) (紫罗兰) (日本牵牛花 (*Japanese morning glory*)) ; P52777 火炬松 (*Pinus taeda*) ; Q01861, Q04593 豌豆 (*Pisum sativum*) ; P24481, P45728, P45729 欧芹 (*Petroselinum crispum*) (*Petroselinum hortense*) ; Q84LI2 蝴蝶兰 x

朵丽蝶兰 (*Phalaenopsis xDoritaenopsis*) 杂交栽培种 ;P07218, P19142, P19143 菜豆 (*Phaseolus vulgaris*) ;Q7XJC3, Q7XJC4 海岸松 (*Pinus pinaster*) ;Q6UD65 脂杨 *trichocarpa* 亚种 x 美洲黑杨 (*Populus balsamifera* subsp. *trichocarpa* x *Populus deltoids*) ;P45731, Q43052, 024266 大齿杨 (*Populus kitakamiensis*) ;Q8H6V5, Q8H6V6 颤杨 (*Populus tremuloides*) ;P45730 毛果杨 (*Populus trichocarpa*) ;064963 樱桃 (*Prunus avium*) ;Q94EN0 地黄 (*Rehmannia glutinosa*) ;P11544 圆红冬孢酵母 (*Rhodospiridium toruloides*) (酵母) (瘦弱红酵母 (*Rhodotorula gracilis*)) ;P10248 深红酵母 (*Rhodotorula rubra*) (酵母) (胶红酵母 (*Rhodotorula mucilaginosa*)) ;Q9M568, Q9M567 覆盆子 (*Rubus idaeus*) ;P31425, P31426 马铃薯 (*Solanum tuberosum*) ;Q6SPE8 长梗繁缕 (*Stellaria longipes*) ;P45732 矮柱花草 (*Stylosanthes humilis*) ;P45734 地三叶草 (*Trifolium subterraneum*) ;Q43210, Q43664 小麦 (*Triticum aestivum*) ;Q96V77 黑粉菌 (*Ustilago maydis*) ;P45735 葡萄 (*Vitis vinifera*) ;和 Q8VXG7 玉米 (*Zea mays*)。

[0006] 大量研究集中于使用酶苯丙氨酸氨裂合酶 (PAL, EC 4.3.1.5) 用于苯丙酮尿症 (PKU) 的酶替代治疗 (Hoskins 等人, *Lancet* 1(8165) :392-394(1980) ;Gilbert 等人, *Biochem. J.* 199(3) :715-723(1981) ;Hoskins, J. A. 等人, *Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol.* 35(2) :275-282(1982) ;Sarkissian 等人, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96(5) :2339-2344(1999) ;Liu 等人, *Artif. Cell Blood Substit. Immobil. Biotechnol.* 30(4) :243-257(2002) ;Wieder, K. J., *JBiol. Chem.* 254(24) :12579-12587(1979) ;Gamez 等人, *Mol. Ther.* 11(6) :986-989(2005) ;Ambrus 等人, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 224(3) :598-602(1983) ;Ambrus 等人, *Science* 201(4358) :837-839(1978) ;Kalghatgi, *Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol.* 27(3) :551-561(1980) ;Ambrus, *Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol.* 37(1) :105-111(1982) ;Gilbert 等人, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 131(2) :557-563(1985) ;Pedersen, *Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol.* 20(3) :559-569(1978) ;Marconi 等人, *Biochimie* 62(8-9) :575-580(1980) ;Larue 等人, *Dev. Pharmacol. Ther.* 9(2) :73-81(1986) ;Ambrus, CM. 等人, *Ann. Intern. Med.* 106(4) :531-537(1987) ;Bourget 等人, *Appl. Biochem. Biotechnol.* 10 :57-59(1984) ;Bourget 等人, *FEBS Lett.* 180(1) :5-8(1985) ;Bourget 等人, *Biochim. Biophys. Acta* 883(3) :432-438(1986) ;Chang 等人, *Artif. Cells Blood Substit. Immobil. Biotechnol.* 23(1) :1-21(1995) ;Chang 等人, *Mol Biotechnol.* 17(3) :249-260(2001) ;美国专利 5, 753, 487)。

[0007] PKU 是一种由于负责苯丙氨酸代谢的酶——肝苯丙氨酸羟化酶 (PAH) 的活性受损而引起的先天性氨基酸代谢障碍。具有导致 PKU 和高苯丙氨酸血症 (HPA) 的 PAH 突变的患者表现出苯丙氨酸水平升高、神经生理功能受损和认知发展下降。对于严重 PKU 患者, 存在不可逆的智力低下的可能性, 除非利用饮食限制将苯丙氨酸水平保持在低水平。PAL 将苯丙氨酸转化为氨和反式肉桂酸, 反式肉桂酸是一种无害的代谢物, 进一步代谢并且在尿中作为马尿酸盐排泄出去 (Hoskins 等人, (1980) 同上 ;Hoskins 等人, *Biomed Mass Spectrom* 11(6) :296-300(1984))。

[0008] 目前的对 PKU 的处理包括在一生中坚持低苯丙氨酸饮食 (Levy, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96(5) :1811-1813(1999))。这种饮食治疗难以坚持 (Matalon 等人, *Genet. Med.* 6(1) :27-32(2004) ;Woolf 等人, *Arch. Dis. Child.* 33(167) :31-45(1958) ;Kim, *Mol*

Ther. 10(2):220-224(2004)), 并且不总是能够消除可能由升高的苯丙氨酸水平引起的受损的神经学效应 (Sarkissian 等人, Mol. Genet. Metab. 69:188-194(2000))。怀孕期间低于理想水平的饮食控制可能导致先天缺陷 (Levy, (1999) 同上)。另外, PKU/HPA 患者在限制饮食的情况下非常难以享有正常的生活, 并且饮食治疗可能与几种营养物质的缺乏相关, 其中一些对于脑发育是有害的 (Levy, (1999) 同上)。大多数低苯丙氨酸饮食产品具有不能十分令人满意的感官特性, 使得对这种治疗的顺应性受到影响 (Levy, (1999) 同上)。因此, 治疗性处理的发展应代替或补充目前的饮食治疗, 并防止 PKU 患者所遭受的神经学损伤, 特别是对于那些患有该疾病的最严重形式的患者而言。

[0009] 1999 年, Scriver 及其同事报道了他们最初对来自圆红冬孢酵母的酶 PAL(Sarkissian 等人, (1999) 同上) 在 PKU 酶替代应用中的用途的研究。小鼠 PKU 和 HPA 模型研究证明了 PAL 给药 (通过腹膜内注射或口服, 使用与抑肽酶蛋白酶抑制剂联合的 PAL 或在大肠杆菌细胞中重组表达并存在的 PAL) 与较低的血液血浆苯丙氨酸水平有关。另外, 描述对 PKU 患者应用 PAL 的初步研究已经表明, 使用在肠溶衣包衣明胶胶囊中给药的 PAL(Hoskins 等人, (1980) 同上), 或使用体外酶来源 (Ambrus 等人, Ann. Intern. Med. 106(4):531-537(1987)), 导致苯丙氨酸水平降低。这些研究提示, 如果 PAL 受到针对蛋白水解降解的保护, 则在口服后可能使血浆 Phe 水平的明显降低。

[0010] 基于 PAL 限制向癌细胞供应苯丙氨酸营养物质从而抑制肿瘤生长的能力, 已经提出了 PAL 对于癌症治疗的应用 (Fritz 等人, J Biol Chem. 251(15):726(1976); Roberts 等人, Cancer Treat Rep. 60(3):261-263(1976); Shen 等人, Cancer Res. 37(4):1051-1056(1977); Shen 等人, Cancer TreatRep. 63(6):1063-1068(1979); Wieder 等人, J Biol Chem. 254(24):12579-12587(1979))。但是在第 13 次注射后, 静脉内注射的聚乙二醇化的 PAL 从循环血液中被快速清除。另外, PAL-介导的苯丙氨酸减少阻止了鼠白血病和转移性黑素瘤的增殖 (Abell 等人, Cancer Res. 33:2529-2532(1973); Roberts 等人, (1976) 同上; Shen 等人, (1977) 同上)。

[0011] 来自海洋细菌海洋链霉菌属 (*Streptomyces maritimus*) 的细菌 PAL 可以用作抑菌剂肠道菌素的重要来源。海洋链霉菌 PAL, EncP, 催化肠道菌素合成的第一步, 即苯丙氨酸向反式肉桂酸的转化 (Xiang 等人, J. Biol. Chem. 277:32505-32509(2002))。

[0012] PAL 可以用于工业合成 L-苯丙氨酸甲酯 (用于阿斯巴甜 (Aspartame) 的生产) (D' Cunha 等人, Enzyme and Microbial Technology 19(6):421-427(1996); Hamilton 等人, Trends in Biotechnol. 3(3):64-68(1985)) 和其它用作药物前体的取代的 L-苯丙氨酸衍生物的工业合成 (美国专利申请 20020102712)。

[0013] PAL 也可以具有农业应用, 其中 PAL 参与产生类苯基丙烷 (phenylpropanoids) 的初始酶促过程, 类苯基丙烷在植物、真菌和细胞中产生木素类、香豆素类和黄烷类。因此, PAL 活性的调节可以影响许多农业现象, 例如果实的褐变, 另外, 活性位点 PAL 抑制剂的基于结构的药物设计可以产生有效的除草剂 (Peppe 等人, (2003) 同上)。

[0014] 尽管 PAL 可能具有许多工业和治疗用途, 但是 PAL 的应用可能受到比活性降低和蛋白水解不稳定性的限制。类似于其它治疗性蛋白质, PAL 作为酶治疗剂的应用具有几个缺点, 例如免疫原性和蛋白水解敏感性。此外, 为了在以高苯丙氨酸血症为特征的疾病中实现血浆苯丙氨酸水平的控制并将其维持在略窄的正常范围内, 在底物亲和力与酶活性之间

需要精细的平衡。迄今为止,由于缺乏对这种蛋白质的结构和生化知识,还没有进行旨在改善这些参数的共同的努力。

[0015] 因此,仍然需要具有良好动力学特性的 PAL 分子,这些特性包括强催化活性和更长的生物半衰期、更高的生化稳定性和 / 或减弱的免疫原性。

发明内容

[0016] 已经有数种细菌 PAL 已被鉴定为 HAL/PAL 家族的一部分,包括但不限于来自海洋链霉菌的 PAL(也称为 EncP, SEQ ID NO :5, 图 4)、来自点形念珠藻 (*Nostoc punctiforme*) 的 PAL/HAL(登录号 ZP_00105927, 来自点形念珠藻 ATCC 29133, 2004 年 10 月 1 日提交, NCBI MicrobialGenomes Annotation Project) (SEQ ID NO :2, 图 4)、来自多变鱼腥藻 (*Anabaena variabilis*) (Gene ID 3679622, Ava_3988 苯丙氨酸 / 组氨酸氨裂合酶, 多变鱼腥藻 ATCC 29413, 2006 年 3 月 31 日 (SEQ ID NO :4, 图 4)、光合作用原核生物巢状组囊藻 (*Anacystis nidulans*) (Löfflehardt, Z. Naturforsch 31(11-12) :693-9(1976))、肠细菌科革兰氏阴性细菌、发光杆菌 (*Photobacterium luminescens*) TT01 (Williams 等人, Microbiology 151 : 2543-2550 (2005)) 和轮生链霉菌 (*Streptomyces verticillatus*) (Bezanson 等人, Can. J. Microbiol. 16(3) :147-51(1970)) 的 PAL/HAL。此外,已经评价了海洋链霉菌中的 PAL 活性 (Xiang, L. 等人, J. Biol. Chem. 277 :32505-32509 (2002))。已经对蓝藻如鱼腥藻和念珠藻进行了关于生物活性天然产物产生的研究,所述天然产物通过混合的多聚乙酰肽生物合成途径产生 (Moore, B. S., Natural Products Reports 22(5) :580-593 (2005) ;Becker 等人, Gene 325 :35-42(2004) ;Hoffman 等人, Gene 311 :171-180 (2003))。本发明是基于原核生物或细菌 PAL 可以有效治疗 PKU 和其它疾病的这一发现。本发明涉及细菌 PAL 及其生物活性片段、突变体、变体和类似物的组合物,其具有增强的性质,例如更强的催化活性、更高的生化稳定性,以及对于治疗应用而言,具有减弱的免疫原性和更长的生物半衰期。本发明还提供了细菌 PAL 及其生物活性片段、突变体、变体和类似物的生产和纯化方法,以及为了治疗和工业目的使用这些组合物的方法。

[0017] 此处使用的“细菌 PAL”和“原核生物 PAL”可以互换使用,是指 (1) 来自原核生物的野生型 PAL,包括但不限于来自海洋链霉菌 (也称为 EncP, SEQ ID NO :5, 图 4)、点形念珠藻 (SEQ ID NO :2, 图 4)、多变鱼腥藻 (SEQ ID NO :4, 图 4)、巢状组囊藻 (Löfflehardt, (1976) 同上)、发光杆菌 (*Photobacterium luminescens*) TT01 (Williams 等人, (2005) 同上) 和轮生链霉菌 (Bezanson 等人, (1970) 同上) 的 PAL ; (2) 这些野生型酶的片段、突变体、变体和类似物,它们保留对苯丙氨酸类似的 (即,至少 50%) 催化活性,并且在一些实施方案中,显示提高的催化活性和 / 或延长的半衰期和 / 或降低的免疫原性,和 (3) 这些野生型酶、其片段、突变体、变体和类似物的化学修饰形式,它们已经连接到提供其它有益效果如延长的半衰期的其它化学部分上。例如,当提到为了治疗或工业目的制备或使用原核生物 PAL、其片段、突变体、变体、类似物或化学修饰形式和这些酶的组合物时,是指制备、使用或配制所有这些野生型、其片段、突变体、变体、类似物或化学修饰形式的方法。

[0018] 第一方面,本发明提供细菌 PAL 及其生物活性片段、突变体、变体或类似物。一个实施方案是来自点形念珠藻的细菌 PAL (SEQ ID NO :2) 或其生物活性片段、突变体、变体或类似物。另一个实施方案是来自多变鱼腥藻的细菌 PAL (SEQ ID NO :4) 或其生物活性片段、

突变体、变体或类似物。在一些实施方案中,所述变体在对应于圆红冬孢酵母 PAL 的 Ser 210、Ala-Ser-Gly 三联体 (211-213)、Asp214、Leu 215、Asn270、Val269、Leu266、Leu134、His137、Lys468、Glu496、Gln500 的位置处保留野生型活性位点残基或这些野生型活性位点的保守置换,其中第 211-213 位的 Ala-Ser-Gly 三联体被认为是苯丙氨酸的结合位点。

[0019] 希望的变体可以包括蛋白质,其中一个或多个半胱氨酸残基已被另一种氨基酸(例如,丝氨酸)残基替换,从而减少可能与酶活性降低、免疫原性提高和/或其它不利的体内效应有关的蛋白质聚集。

[0020] 希望的变体可以包括融合蛋白,其中所述酶与本领域已知能够延长半衰期的另一种异源多肽融合,该异源多肽例如是免疫球蛋白的天然或修饰的恒定区或其保留补救表位(salvage epitope)的片段。

[0021] 本发明进一步涉及这些多肽的化学修饰形式,它们已与提供其它有利效应的化学部分连接。例如,本领域中已知水溶性聚合物与多肽的非特异性或位点特异性(例如,N-末端)连接能够延长半衰期,化学部分的连接也可以降低免疫原性和提高蛋白酶抗性。

[0022] 这种细菌 PAL 按照本发明的方法分离和纯化,并且由此以能够在治疗上使用该酶的量存在。在一些实施方案中,使用编码完整或野生型细菌 PAL 的 cDNA。但是在其它实施方案中,可以使用编码其生物活性片段或突变体的 cDNA。此外,本发明提供了通过基于结构的分子工程方法获得的优化的细菌 PAL 和/或 PAL 的化学修饰(例如,聚乙二醇化)形式的组合物。具体实施方案涉及适于治疗应用的、具有提高的比活性、增强的稳定性、降低的免疫原性和/或蛋白水解敏感性的优化的 PAL 组合物。一个实施方案是具有提高的比活性的点形念珠藻 PAL 的聚乙二醇化形式。另一个实施方案是具有提高的比活性的多变鱼腥藻 PAL 的聚乙二醇化形式。

[0023] 在各种实施方案中, PAL 变体的聚乙二醇化根据 PAL : PEG 或 PEG : PAL 的比例来描述。除非另外指出,此处使用的“PAL : PEG”比例是指聚乙二醇化反应中 PAL 变体上的赖氨酸残基与 PEG 分子的比例。类似地,除非另外指出,此处使用的“PEG : PAL”比例是指聚乙二醇化反应中 PEG 分子与 PAL 变体上的赖氨酸残基的比例。

[0024] 在一个实施方案中,本发明涉及免疫原性降低的聚乙二醇化的 PAL 变体。另一个实施方案是免疫原性降低的点形念珠藻 PAL (NpPAL) 变体的聚乙二醇化形式。另一个实施方案是免疫原性降低的多变鱼腥藻 PAL (AvPAL) 变体的聚乙二醇化形式。特定的实施方案涉及这样的 NpPAL 或 AvPAL 变体,其中聚乙二醇化是通过 NpPAL 或 AvPAL 变体与水溶性聚合物例如聚乙二醇 (PEG) 反应实现的。在一些实施方案中,聚乙二醇化是通过 NpPAL 或 AvPAL 变体与 PEG 以至少 1 : 1、至少 1 : 1.5、至少 1 : 2、至少 1 : 3 或至少 1 : 4 的 PAL : PEG 比例反应一次而实现的。在一个实施方案中, PAL 变体是 AvPAL 变体,并且聚乙二醇化是采用 1 : 3 的 PAL : PEG 比例实现的。

[0025] 本发明还涉及为了降低免疫原性而将聚乙二醇化的 PAL 变体再聚乙二醇化。在一些实施方案中,聚乙二醇化是通过 NpPAL 或 AvPAL 变体与 PEG 反应两次或更多次而实现的,每次聚乙二醇化的 PAL : PEG 比例为至少 1 : 1、至少 1 : 1.5、至少 1 : 2、至少 1 : 3 或至少 1 : 4。在一些实施方案中,聚乙二醇化是通过 NpPAL 或 AvPAL 变体与 PEG 反应两次、三次、四次、五次或更多次而实现的,每次聚乙二醇化的 PAL : PEG 比例为至少 1 : 1、至少 1 : 1.5、至少 1 : 2、至少 1 : 3 或至少 1 : 4。在一个实施方案中, PAL 变体是 AvPAL

变体,并且在第一次和第二次聚乙二醇化反应时均采用 1 : 3 的 PAL : PEG 比例实现聚乙二醇化。

[0026] 在一些实施方案中,本发明的野生型 PAL 的生物活性位点可以按照需要修饰,以优化 PAL 动力学特性。在一个实施方案中,修饰的 PAL 具有降低血浆苯丙氨酸水平并且使其保持在大约 $120\ \mu\text{M}$ 至大约 $240\ \mu\text{M}$ 的最佳范围内的足够的活性。在其它实施方案中,生物活性的修饰 PAL 具有至少大约 0.1s^{-1} 或大于大约 0.5s^{-1} 的 kcat。在一些实施方案中,生物活性的修饰 PAL 具有至少大约 0.2s^{-1} 或大于大约 1.0s^{-1} 的 kcat。在其它实施方案中,生物活性的修饰 PAL 具有大约 $10\ \mu\text{M}$ 至大约 $1000\ \mu\text{M}$ 的 K_m 。在其它实施方案中,生物活性的修饰 PAL 具有大约 $100\ \mu\text{M}$ 至大约 $1000\ \mu\text{M}$ 的 K_m 。在其它实施方案中,生物活性的修饰 PAL 显示比野生型高大约 2 倍至大约 1000 倍的酶活性。在其它实施方案中,生物活性的修饰 PAL 显示比野生型高大约 10% 至 100% 的酶活性。这些生物活性的修饰 PAL 蛋白可以使用本领域公知的方法形成,例如通过定点诱变。在进一步的实施方案中,本发明涉及代谢苯丙氨酸(即,将苯丙氨酸转化为另一种物质)的细菌 PAL 在制备治疗哺乳动物、特别是人类 PAH 活性缺乏的药物中的应用,以及用于治疗 PAH 活性缺乏的含有细菌 PAL 的药物组合物。在一些实施方案中,药物组合物含有单独的或与药学上合适的载体组合的来源于细菌的高度纯化的 PAL 或其生物活性片段、突变体或类似物。在一些实施方案中,制剂含有纯度大于 95%、96%、97%、98%、99%、99.2%、99.5%、99.6%、99.7%、99.8% 或 99.9% 的细菌 PAL。在其它实施方案中,本发明的细菌 PAL 的相对比活性高于野生型 PAL 的比活性的大约 110%。

[0027] 第二方面,本发明提供为了治疗和工业目的使用 PAL 组合物的新方法。在一个实施方案中,本发明涉及通过给需要这种治疗的个体施用治疗有效量的包含细菌 PAL 的药物组合物,治疗全部或部分由 PAH 活性缺乏引起的疾病的方法。PAH 活性的缺乏可以显示为,例如,与正常 PAH 活性水平相比,50% 或更低、25% 或更低、或 10% 或更低、或 1% 或更低的活性水平,并且可以表现为升高的苯丙氨酸水平,例如,在高苯丙氨酸血症、轻度苯丙酮尿症或经典严重苯丙酮尿症中。在一些实施方案中,所述疾病是苯丙酮尿症(PKU)。

[0028] 在特定的实施方案中,所述个体是被诊断为具有突变的苯丙氨酸羟化酶(PAH)的个体。突变 PAH 可以在 PAH 的催化域含有突变。这些突变的例子包括但不限于突变 F39L、L48S、I65T、R68S、A104D、S110C、D129G、E178G、V190A、P211T、R241C、R261Q、A300S、L308F、A313T、K320N、A373T、V388M、E390G、A395P、P407S 和 Y414C。

[0029] 也涉及一种治疗具有高于正常的血浆苯丙氨酸浓度(例如,大于 $180\ \mu\text{M}$ 或 $360\ \mu\text{M}$) 的个体的方法,包括以有效导致个体血浆苯丙氨酸浓度降低的量给该个体施用细菌 PAL 组合物。所述个体在施用细菌 PAL 之前可能具有大于 $180\ \mu\text{M}$ 的血浆苯丙氨酸浓度。更特别地,所述个体具有 $120\ \mu\text{M}$ 至 $200\ \mu\text{M}$ 的血浆苯丙氨酸浓度。在其它实施方案中,所述个体具有 $200\ \mu\text{M}$ 至 $600\ \mu\text{M}$ 的血浆苯丙氨酸浓度。在另外其它一些实施方案中,所述个体具有 $600\ \mu\text{M}$ 至 $1200\ \mu\text{M}$ 的血浆苯丙氨酸浓度。可治疗的另一类个体是具有大于 $1200\ \mu\text{M}$ 的无限制的血浆苯丙氨酸浓度的个体。

[0030] 在特定的实施方案中,所述个体为婴儿,更特别地为血浆苯丙氨酸浓度大于 $1200\ \mu\text{M}$ 的婴儿。本发明涉及治疗患苯丙酮尿症的婴儿的方法,包括以有效导致婴儿血浆苯丙氨酸浓度降低的量给婴儿施用细菌 PAL 组合物,其中婴儿为 0-3 岁,并且婴儿的血浆苯丙氨酸浓度为大约 $360\ \mu\text{M}$ 至大约 $4800\ \mu\text{M}$ 。在施用细菌 PAL 之前,婴儿的苯丙氨酸浓度为

约 1200 μ M, 并且细菌 PAL 的施用使血浆苯丙氨酸浓度降至大约 1000 μ M。在其它实施方案中, 在施用细菌 PAL 之前, 婴儿的苯丙氨酸浓度为大约 800 μ M, 并且 PAL 的施用使血浆苯丙氨酸浓度降至大约 600 μ M。在进一步的实施方案中, 在施用 PAL 之前, 婴儿的苯丙氨酸浓度为大约 400 μ M, 并且 PAL 的施用使血浆苯丙氨酸浓度降至大约 300 μ M。在某些实施方案中, 此处涉及的治疗方法应当使婴儿的血浆苯丙氨酸浓度降至大约 120 μ M 至大约 360 μ M 的范围, 或大约 120 μ M 至大约 240 μ M 的范围。

[0031] 本发明还涉及一种治疗患有高苯丙氨酸血症 (HPA) 的怀孕女性的方法, 包括给个体单独施用细菌 PAL 或与蛋白质限制性饮食联合施用, 其中与不进行联合施用时的浓度相比, 细菌 PAL 的单独施用或与蛋白质限制性饮食的联合施用可有效降低个体血浆中的苯丙氨酸浓度。在某些实施方案中, 个体具有大于 180 μ M 但是小于 600 μ M 的无限制的血浆苯丙氨酸浓度。在其它实施方案中, 个体具有大于 500 μ M 但是小于 1200 μ M 的无限制的血浆苯丙氨酸浓度。在另外其它一些实施方案中, 个体具有大于 1200 μ M 的无限制的血浆苯丙氨酸浓度。血浆苯丙氨酸浓度大于 1200 μ M 的怀孕者是这类治疗的特别有吸引力的候选者, 打算怀孕的育龄女性也是其候选者。在个体的血浆苯丙氨酸浓度大于 1200 μ M 的那些实施方案中, 所述方法进一步包括给个体施用蛋白质限制性饮食。

[0032] 本发明描述了治疗个体的经典严重苯丙酮尿症 (PKU) 的方法, 包括给个体施用细菌 PAL 或其生物活性片段、突变体、变体或类似物, 其中与不施用细菌 PAL 时的浓度相比, 细菌 PAL 的施用可有效降低个体血浆中的苯丙氨酸浓度。为按照本发明方法进行治疗而选择的个体具有升高的血浆 Phe 浓度, 在没有治疗剂的情况下该浓度可能大于 1800 μ M。其它实施方案涉及在没有治疗方案的情况下血浆苯丙氨酸浓度大于 1000 μ M 的个体。在一些实施方案中, 本发明的联合施用方法使个体的血浆苯丙氨酸浓度降至低于 600 μ M。在一个实施方案中, 降至低于 500 μ M。在另一个实施方案中, 联合给药使个体的血浆苯丙氨酸浓度降至大约 120 μ M 至大约 360 μ M 的范围。在另一个实施方案中, 个体的血浆苯丙氨酸浓度降至大约 120 μ M 至大约 240 μ M 的范围。

[0033] 某些实施方案包括优化剂量以满足所治疗的生物体 (例如哺乳动物或人类) 的需要, 以有效地改善疾病症状。PAL 可以每日单剂量、每日多剂量、每周单剂量或每周多剂量给药。在一些实施方案中, PAL 治疗不是连续的, 而是每日施用 PAL, 直到个体的血浆苯丙氨酸浓度降至低于 360 μ M。在一些实施方案中, 每日监测个体的血浆苯丙氨酸浓度, 并且当观察到血浆苯丙氨酸浓度升高 10% 时施用 PAL。在其它实施方案中, 剂量每周给予一次。本发明涉及至少 0.001mg/kg、0.005mg/kg、0.01mg/kg、0.05mg/kg 的剂量, 并且每周可达 0.1mg/kg、0.5mg/kg、1.0mg/kg 或更高的剂量。在一些实施方案中, 剂量是 1mg/kg/周、0.1mg/kg/周或 0.01mg/kg/周。

[0034] 本发明涉及递送同等剂量的多种肠胃外或非肠胃外给药途径, 包括口服、经皮、经粘膜、肺内 (包括喷雾)、肌肉内、皮下或静脉内给药。还特别涉及通过快速浓注或直接输注到关节或 CSF 内给药, 例如鞘内、脑内、心室内、经腰椎穿刺术或经小脑延髓池给药。在一些实施方案中, 剂量经皮下或口服递送。

[0035] 本发明还涉及其它提高人类个体中的 PAL 活性的手段, 包括基因治疗。PAL 基因的转移能够通过本领域已知的多种手段进行, 包括病毒载体、同源重组或直接 DNA 注射。该方面的范围中包括特征为编码细菌 PAL 或其生物活性突变体或类似物的全部或一部分的核

酸序列的实施方案,它们可以在体内施用至 PAH 缺乏的细胞内。

[0036] 在另一个实施方案中,细菌 PAL 也可以与蛋白质限制性饮食联合施用。在本发明的方法中施用的蛋白质限制性饮食是可将个体的总苯丙氨酸摄入量限制为小于每天 600mg 的苯丙氨酸限制性饮食。在其它实施方案中,蛋白质限制性饮食是其中总苯丙氨酸被限制为小于每天 300mg 的苯丙氨酸限制性饮食。在另外其它一些实施方案中,蛋白质限制性饮食是补充有诸如酪氨酸、缬氨酸、异亮氨酸和亮氨酸等氨基酸的饮食。还涉及包含细菌 PAL 和药学上可接受的载体、稀释剂或赋形剂的组合物。该组合物可以进一步包含药物蛋白质补充物。在其它实施方案中, PAL 组合物是婴儿配方的一部分。在另外其它一些实施方案中,蛋白质补充物不含苯丙氨酸。蛋白质补充物可以用浓度为 20mg/100g 补充物的 L- 酪氨酸、L- 谷氨酰胺、L- 肉碱、浓度为 40mg/100g 补充物的 L- 牛磺酸和硒强化。它可以进一步包含每日推荐剂量的矿物质,例如,钙、磷和镁。该补充物进一步可以包含每日推荐剂量的一种或多种氨基酸,该氨基酸选自 L- 亮氨酸、L- 脯氨酸、醋酸 L- 赖氨酸、L- 缬氨酸、L- 异亮氨酸、L- 精氨酸、L- 丙氨酸、甘氨酸、L- 天冬酰胺一水合物、L- 色氨酸、L- 丝氨酸、L- 苏氨酸、L- 组氨酸、L- 甲硫氨酸、L- 谷氨酸和 L- 天冬氨酸。另外,所述补充物可以用每日推荐剂量的维生素 A、D 和 E 强化。所述补充物可以包含提供至少 40% 的补充物能量的脂肪含量。这种补充物可以以粉末补充物或蛋白质条的形式提供。

[0037] 本发明涉及治疗各种形式的肿瘤生长和癌症的方法,包括但不限于淋巴瘤细胞性白血病、乳房肿瘤和黑素瘤。

[0038] 本发明涉及使用细菌 PAL 由氨和反式肉桂酸盐商业生产苯丙氨酸的方法。苯丙氨酸用于阿斯巴甜(一种甜味剂)和其它食品中,包括饮料、谷物、蛋糕、餐后甜点、蛋和奶酪食品、脂肪、油、鱼和其它海鲜、肉和肉制品、奶和奶制品、坚果、酱油和调味品、汤、糖、果酱和涂抹食品(spreads)和蔬菜。

[0039] 进一步预期细菌 PAL 可用于生产除草剂和抗微生物剂,包括肠道菌素和红霉素。

[0040] 第三方面,本发明提供一种以能够在治疗上使用该酶的量生产原核生物 PAL 或其生物活性片段、突变体、变体或类似物的方法。本发明涉及由细菌产生的 PAL,所述细菌包括但不限于链霉菌属(*Streptomyces*)、堆囊菌属(*Sorangium*)、假单胞菌属(*Pseudomonas*)和蓝细菌如念珠藻属和鱼腥藻属。在一些实施方案中, PAL 是由细菌种海洋链霉菌(*Streptomyces maritimus*)、轮丝链霉菌(*S. verticillatus*)、纤维堆囊菌(*Sorangium cellulosum*)、点形念珠藻、*Nostoc tobacum*、多变鱼腥藻和恶臭假单胞菌(*Pseudomonas putida*)产生的。在另一个实施方案中,原核生物 PAL 酶活性是使用 cDNA 或 DNA 序列产生的,上述序列来源于有时被描述为编码 HAL 活性或以 PAL-HAL 基序为特征但是具有不同于 HAL 的关键 PAL 残基的序列。

[0041] 在一个宽泛的实施方案中,所述方法包括将编码原核生物 PAL 或其生物活性片段、突变体、变体或类似物的全部或一部分的 cDNA 或 DNA 转化到适合其表达的细胞内的步骤。在一些实施方案中,使用表达载体将 DNA 转移到合适的细胞或细胞系中用于其表达。在一个实施方案中,将 cDNA 转化到大肠杆菌中,并且重组细菌 PAL 作为融合蛋白过量表达。在进一步的实施方案中,生产原核生物 PAL 的方法包括以下步骤:(a) 在合适的生长培养基中培养用编码完整原核生物 PAL 或生物活性变体、片段或突变体的 cDNA 转化的细胞至合适的密度,以产生种子培养物,(b) 将转化的细胞引入生物反应器中,(c) 向生物反应器中供

应合适的生长培养基,和(d)分离转染的细胞与含有所述酶的培养基。

[0042] 在一个实施方案中,重组 PAL 在诸如大肠杆菌 BL21 (DE3)/pLyseS(Invitrogen) 的载体中作为 N-末端八组氨酰标记的融合蛋白过量表达,该载体具有例如可用 IPTG(异丙基-β-D-硫代吡喃半乳糖苷)诱导的诱导型启动子。在另一个实施方案中,重组 PAL 在大肠杆菌 BL21 (DE3)/pLysS 细胞中过量表达,没有 N-末端标签。在另一个实施方案中,生产原核生物 PAL 的方法包括以下步骤:(1)在摇瓶中由甘油贮存物培养用于生物反应器/发酵罐的种子培养物;(2)以补料分批模式将该种子培养物引入到控制的生物反应器中;(3)在补充葡萄糖的培养基中培养所述培养物,培养条件为 pH(7.8), > 20%的溶解氧,最高 1200rpm 搅拌,30℃,直到达到 OD600 为 70-100 的细胞密度(约 22-25 小时);(4)用 0.4mM IPTG 诱导所述培养物;(5)在 22-26℃的较低温度下培养所述培养物,直到活性变化 < 0.1IU/ml(约 40-48 小时,OD600 一般为 200);和(5)通过连续离心收获细菌。在一个实施方案中,细胞培养基一般是成分确定的,并且由酵母提取蛋白、蛋白胨-胰蛋白胨、葡萄糖、甘油、酪蛋白氨基酸、痕量盐和磷酸缓冲盐组成。

[0043] 第四方面,本发明提供一种纯化细菌 PAL 或其生物活性片段、突变体或类似物的方法。根据第一实施方案,培养并破碎转化的细胞团块,获得粗重组酶。将外源性物质从粗物质(bulk)中正常分离,以防止柱的污染。使用一种或几种色谱树脂进行色谱纯化。随后,将纯化的蛋白质配制到为在较长的一段时间内提供稳定的活性而设计的缓冲液中。在另一个实施方案中,纯化细菌 PAL 的方法包括以下步骤:(a)裂解含有重组 PAL 的细菌;(b)热处理裂解物以灭活病毒;(c)使用第二个连续离心步骤和/或深度过滤澄清该裂解液;(d)使澄清的裂解液通过炭过滤步骤;(e)使(d)中的滤出液通过最后的过滤步骤(如使用 Sartorius Sartopore 0.2 μm 滤器);(f)使最终的滤出液通过疏水相互作用层析树脂,如丁基疏水相互作用层析;(g)使(f)中的洗脱物通过阴离子层析树脂,如 Q 离子交换柱;(h)利用正切流动过滤通过缓冲液交换回收终产物;和(i)将终产物灭菌。本领域技术人员将会容易地理解,可以省略或代替一个或多个层析步骤,或者可以在本发明的范围内改变层析步骤的顺序。最后,需要时可以进行适当的灭菌步骤。

[0044] 第五方面,本发明涉及用于鉴定能够阻止、改善或处理升高的苯丙氨酸水平的细菌 PAL 的筛选试验,包括使含有升高水平的苯丙氨酸的细胞与细菌 PAL 接触,以及确定细菌 PAL 是否降低这种升高的苯丙氨酸水平。这些筛选试验也可以包括产生变体、随后检测该变体的体外苯丙氨酸转化活性的步骤,该变体在活性位点(例如来自海洋链霉菌的 EncP 的 Gly 142、Thr-Ser-Gly 三联体(143-145)、Asp 146、Leu 147、Asn 196、He 195、Leu 192、Leu 76、Asn 79、Met 400、Thr 428、Gln 432,相当于来自圆红冬孢酵母的 PAL 的残基 Ser 210、Ala-Ser-Gly 三联体(211-213)、Asp214、Leu 215、Asn270、Val269、Leu266、Leu 134、His137、Lys468、Glu496、Gln 500)处、在邻近该活性位点的区域中、或在整个多肽序列中包含保守或非保守置换。在某些实施方案中,该方法是高通量试验。在一个实施方案中,对细菌种的全基因组进行测序,并使用生物信息学方法对 PAL 同源物的存在进行筛选。在另一个实施方案,例如通过检测在体外将苯丙氨酸转化为反式肉桂酸盐的能力,证实了这些同源物的蛋白质产物的 PAL 催化活性。

[0045] 第六方面,本发明提供使用细菌 PAL 组合物诊断疾病的方法,所述疾病包括但不限于全部或部分由 PAH 活性缺乏引起的疾病。在一个实施方案中,使用细菌 PAL 测定血样

中的苯丙氨酸水平。在进一步的实施方案中,本发明涉及包含细菌 PAL 的诊断试剂盒,其用于监测苯丙氨酸水平升高的个体的血样。

[0046] 通过以下详细描述,本发明的其它特征和优点将是明显的。但是应当理解,详述和具体实施例尽管说明了本发明的特定实施方案,但只是以举例说明的方式提供的,因为根据该详述,本领域技术人员将会明白在本发明的精神和范围内的各种改变和修改。

附图说明

[0047] 图 1. 图 1A :点形念珠藻 PAL 的基因序列 (SEQ ID NO :1);图 1B :点形念珠藻 PAL 的蛋白质序列 (SEQ ID NO :2)。

[0048] 图 2. 图 2A :多变鱼腥藻 PAL 的基因序列 (SEQ ID NO :3);图 2B :多变鱼腥藻 PAL 的蛋白质序列 (SEQ ID NO :4)。

[0049] 图 3. 来自原核生物和真核生物的芳香族氨基酸氨裂合酶的亲缘关系树。序列从 GenBank 获得 (括号中给出了登录号) 并且使用邻接法用 ClustalX(1.83) 比对。

[0050] 图 4. 点形念珠藻 PAL (SEQ ID NO :2) 和多变鱼腥藻 PAL (SEQ ID NO :4) 的蓝细菌蛋白质序列与 EncP PAL (SEQ ID. No. 5) 和恶臭假单胞菌 HAL (SEQ ID NO :6) 的比对。强调了对应于 PAL 或 HAL 活性的活性位点残基。

[0051] 图 5. 在 12 天的期限内, (A) 非聚乙二醇化的 NpPAL (1.0IU/mL) 和 (B) 聚乙二醇化的 NpPAL 1 : 3 PAL : PEG (Nippon Oil and Fat, NOFCorporation) (1.0IU/mL) 对苯丙氨酸水平 (μ M) 的影响。

[0052] 图 6. 在 12 天的期限内, (A) 非聚乙二醇化的 AvPAL (1.0IU/mL) 和 (B) 聚乙二醇化的 AvPAL 1 : 3 PAL : PEG (Nippon Oil and Fat, NOFCorporation) (1.0IU/mL) 对苯丙氨酸水平 (μ M) 的影响。

[0053] 图 7. 在 90 天的长期耐受性研究中,聚乙二醇化的 NpPAL 1 : 3PAL : PEG (Nippon Oil and Fat, NOF Corporation) (1.0IU/mL) 对苯丙氨酸水平 (μ M) 的影响。

[0054] 图 8. 图 8A :在 64 位含有半胱氨酸的丝氨酸取代的多变鱼腥藻苯丙氨酸氨裂合酶 (PAL) 蛋白质序列 (AvPAL_C64S, SEQ ID NO :7);图 8B :在 318 位含有半胱氨酸的丝氨酸取代的多变鱼腥藻 PAL 的蛋白质序列 (AvPAL_C318S, SEQ ID NO :8);图 8C :在 503 位含有半胱氨酸的丝氨酸取代的多变鱼腥藻 PAL 的蛋白质序列 (AvPAL_C503S, SEQ ID NO :9);图 8D :在 565 位含有半胱氨酸的丝氨酸取代的多变鱼腥藻 PAL 的蛋白质序列 (AvPAL_C565S, SEQ ID NO :10);图 8E :在 503 和 565 位含有半胱氨酸的丝氨酸取代的多变鱼腥藻 PAL 的蛋白质序列 (AvPAL_C565SC503S, SEQ ID NO. 11)。半胱氨酸的丝氨酸取代以粗体下划线标出。

[0055] 图 9. 图 9A :在 37℃温育不同时间长度后,非聚乙二醇化 AvPAL 的第 565 位或者第 565 和 503 位的半胱氨酸的丝氨酸取代对体外 PAL 酶比活性的影响。图 9B :在 37℃温育不同时间长度后,聚乙二醇化 AvPAL 的第 565 位或者第 565 和 503 位的半胱氨酸的丝氨酸取代对体外 PAL 酶比活性的影响。

[0056] 图 10. 图 10A :通过变性条件 (左图) 或非变性条件 (右图) 下的凝胶电泳分析, AvPAL 中的半胱氨酸的丝氨酸取代对溶液中蛋白质聚集体的形成的影响。图 10B :通过 SEC-HPLC 分析, AvPAL 中的半胱氨酸的丝氨酸取代对溶液中蛋白质聚集体的形成的影响。

[0057] 图 11. AvPAL 中第 565 和 503 位的半胱氨酸的丝氨酸取代 (db1 突变体) 对各种

PEG 浓度下位点特异性聚乙二醇化的影响。

[0058] 图 12. 通过 SEC-HPLC 分析,用 0.05% Tween80 或 10mM EDTA 处理 AvPAL 对溶液中蛋白质聚集体的形成的影响。

[0059] 图 13. 图 13A :通过 SEC-HPLC 分析,用二硫苏糖醇 (DTT) 处理 AvPAL 对溶液中蛋白质聚集体的形成的影响。图 13B :通过 SEC-HPLC 分析,用 DTT 和 N- 乙基马来酰亚胺 (NEM) 处理 AvPAL 对溶液中蛋白质聚集体的形成的影响。

[0060] 图 14. 与给予载体或 4.0IU 野生型聚乙二醇化 AvPAL 的 ENU2 小鼠相比,聚乙二醇化 AvPAL 中第 565 和 503 位的半胱氨酸的丝氨酸取代 (AvPAL_C565SC503S) 对给予 0.25IU (上图)、1.0IU (中图) 或 4.0IU (下图) 酶的 ENU2 小鼠的体内苯丙氨酸 (Phe) 水平的影响。

[0061] 图 15. 与给予载体或 4.0IU 野生型聚乙二醇化 AvPAL 的 ENU2 小鼠相比,聚乙二醇化 AvPAL 中第 565 和 503 位的半胱氨酸的丝氨酸取代 (AvPAL_C565SC503S) 对给予 0.25IU、1.0IU 或 4.0IU 酶的 ENU2 小鼠的体重的影响。

[0062] 图 16. 与给予载体或 AvPAL : PEG 比例为 1 : 3 的 4.0IU 野生型聚乙二醇化 AvPAL 的 ENU2 小鼠相比,在给予 AvPAL : PEG 比例为 1 : 1.6 (上图)、1 : 2.4 (中图) 或 1 : 3 (下图) 的 4IU 酶的 ENU2 小鼠中,聚乙二醇化 AvPAL 中第 565 和 503 位的半胱氨酸的丝氨酸取代 (AvPAL_C565S/C503S) 对体内苯丙氨酸 (Phe) 水平的影响。

[0063] 图 17. 与给予载体或 AvPAL : PEG 比例为 1 : 3 的 4.0IU 野生型聚乙二醇化 AvPAL 的 ENU2 小鼠相比,聚乙二醇化 AvPAL 中第 565 和 503 位的半胱氨酸的丝氨酸取代 (AvPAL_C565SC503S) 对给予 AvPAL : PEG 比例为 1 : 1.6、1 : 2.4 或 1 : 3 的 4IU 酶的 ENU2 小鼠体重的影响。

[0064] 图 18. 聚乙二醇化 AvPAL_C565SC503S 的再聚乙二醇化对 AvPAL 体外比活性的影响。(上图)rAvPAL-PEG 的比活性的恢复,其首先以 1 : 3 (2mM 赖氨酸残基 : 6mM PEG, 实心圆形) 的 PAL : PEG 比例聚乙二醇化,然后在所示的各种 PAL : PEG 比例和赖氨酸残基和 PEG 分子浓度下再聚乙二醇化。(下图)rAvPAL-PEG 的比活性的恢复,其首先以 1 : 1 (2mM 赖氨酸残基 : 2mM PEG, 实心正方形) 或 1 : 3 (2mM 赖氨酸残基 : 6mM PEG, 实心圆形) 的 PAL : PEG 比例聚乙二醇化,然后在所示的各种 PAL : PEG 比例和赖氨酸残基和 PEG 分子浓度下再聚乙二醇化。

[0065] 图 19. 图 19A :通过毛细管凝胶电泳 (CGE) 分析确定,提高再聚乙二醇化反应中的 PAL : PEG 比例对 rAvPAL-PEG 的总体聚乙二醇化的影响,其中首先以 1 : 3 (2mM 赖氨酸残基 : 6mM PEG) 的 PAL : PEG 比例进行聚乙二醇化。图 19B :通过 CGE 分析确定,提高初次聚乙二醇化反应中的 PAL : PEG 比例对 rAvPAL-PEG 的总体聚乙二醇化的影响,其中再聚乙二醇化反应以 1 : 3 (2mM 赖氨酸残基 : 6mM PEG) 的固定 PAL : PEG 比例进行。

[0066] 图 20. 首先以 1 : 3 (2mM 赖氨酸残基 : 6mM PEG) 的 PAL : PEG 比例聚乙二醇化,然后在所示的各种 PAL : PEG 比例和赖氨酸残基和 PEG 分子浓度下再聚乙二醇化,AvPAL_C565SC503S 的再聚乙二醇化对 AvPAL 中特定赖氨酸残基的聚乙二醇化百分比的影响。在测试的所有条件下,第 2 位的赖氨酸残基 (K2) 为 100% 聚乙二醇化 (未示出)。

[0067] 图 21. 首先以 1 : 3 (2mM 赖氨酸残基 : 6mM PEG) 的 PAL : PEG 比例聚乙二醇化,然后在相同的 PAL : PEG 比例和赖氨酸残基和 PEG 分子浓度下再聚乙二醇化,AvPAL_

C565SC503S 的再聚乙二醇化对如表 14 所述皮下给药的 ENU2 小鼠的体内血浆苯丙氨酸 (Phe) 水平的影响。

[0068] 发明详述

[0069] 尽管 PAL 是一种普遍存在的高等植物酶,在关键步骤中催化苯丙氨酸非氧化脱氧基为肉桂酸,产生类苯基丙烷代谢物 (Hahlbrock 等人, *Annu. Rev. Plant Phys. Plant Mol. Biol.* 40 :347-369(1989)),但是 PAL 只在少数细菌中发现,参与“海洋链霉菌”(Xiang 等人, *J. Biol. Chem.* 277 :32505-32509(2002)) 和纤维堆囊菌 (Hill 等人, *Chem. Commun.* 1358-1359(2003)) 中的苯甲酰-CoA 生物合成和轮丝链霉菌中的肉桂酰胺生物合成 (Bezanson 等人, *Can. J. Microbiol.* 16 :147-151(1970))。抑菌剂肠道菌素是海洋细菌“海洋链霉菌”的天然产物,其生物合成涉及大量不平常的特征 (Hertweck 等人, *Chem. Biol.* 11 :461-468(2004) ;Piel 等人, *Chem. Biol.* 7 :943-955(2000) ;Piel 等人, *J. Am. Chem. Soc.* 122 :5415-5416(2000) ;Xiang 等人, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101 :15609-15614(2004))。其中包括形成罕见的聚酮合酶 (PKS) 起始单位苯甲酰辅酶 A (CoA) (Moore 等人, *Nat. Prod. Rep.* 19 :70-99(2002))。最初的生化反应涉及新细菌苯丙氨酸氨裂合酶 (PAL, EC 4.3.1.5) EncP 将氨基酸 L- 苯丙氨酸转化为反式肉桂酸 (Xiang 等人, *J. Biol. Chem.* 277 :32505-32509(2002))。肉桂酸活化为其 CoA 硫酯,然后经过一轮 β -氧化,产生苯甲酰辅酶 A (Hertweck 等人, *Chem Bio Chem* 2 :784-786(2001) ;Hertweck 等人, *Tetrahedron* 56 :9115-9120(2000) ;Xiang 等人, *J. Bacteriol.* 185 :399-404(2003)),苯甲酰辅酶 A 引发肠道菌素 II 型 PKS 链延伸七个丙二酰-CoA 分子。

[0070] 表征了第一个原核生物 PAL 编码基因 (encP) (SEQ ID NO :5),它的灭活导致消除了“海洋链霉菌”中的肉桂酸和肠道菌素的从头合成 (Kalaitzis 等人, *J. Am. Chem. Soc.* 125 :9290-9291(2003) ;Xiang 等人, *J. Biol. Chem.* 277 :32505-32509(2002))。在 encP 灭活的突变体中,通过补充肉桂酸和苯甲酸以及用质粒携带的 encP 互补,可以恢复肠道菌素的生物合成。此外,encP 基因在天蓝色链霉菌 (*Streptomyces coelicolor*) 中在 ermE* 启动子控制下的异源表达导致在发酵培养物中产生桂酸 (Xiang 等人, *J. Biol. Chem.* 277 :32505-32509(2002))。encP 基因编码 522 个氨基酸的蛋白质,该蛋白质显著地比真核生物 PAL 小接近 200 个氨基酸残基。尽管与植物 PAL 例如来自欧芹的 PAL 的序列同源 (Rother 等人, *Eur. J. Biochem.* 269 :3065-3075(2002)) (CAA57056,30 % 相同和 48 % 相似),但是它与细菌组氨酸氨裂合酶 (HALs, EC 4.3.1.3) 例如来自恶臭假单胞菌的组氨酸氨裂合酶 (Schwede 等人, *Biochemistry* 27 :5355-5361(1999)) (A35251,36 % 相同和 54 % 相似, SEQ ID NO :6,图 4) 以及与来自荚膜红细菌 (*Rhodobacter capsulatus*) 的酪氨酸氨裂合酶 (TAL) (Kyndt 等人, *FEBS Lett.* 512 :240-244(2002)) 具有更高的同源性 (图 3)。同源性包括位于苯丙氨酸 / 组氨酸 / 酪氨酸家族氨裂合酶的第 143 位的保守活性位点丝氨酸残基,它可能是 4- 亚甲基咪唑-5- 酮 (MIO) 辅基中的修饰的脱氢丙氨酸残基的前体 (Langer 等人, *Adv. Prot. Chem.* 58 :175-188(2001) ;Poppe, *Curr. Opin. Chem. Biol.* 5 :512-524(2001) ;Schwede 等人, *Biochemistry* 27 :5355-5361(1999))。EncP 与 AdmH (AA039102,63 % 相同和 76 % 相似) 具有最高的序列同源性,AdmH 是一种参与成团泛菌 (*Pantoea agglomerans*) 中 andrimid 生物合成的推断的苯丙氨酸氨基变位酶,与来自球孢链霉菌 (*Streptomyces globisporus*) 的酪氨酸氨基变位酶 Sgc4 相关 (Christenson 等人, *J. Am. Chem. Soc.* 125 :

6062-6063(2003);Christenson 等人, *Biochemistry* 42:12708-12718(2003))。值得注意的是,由于 encP 与人蛋白质 (HAL) 具有密切的同源性,encP 可能具有较低的免疫原性。也因为它们非常类似,可以突变 encP 以看起来象人 HAL, encP 的一种人源化形式。

[0071] 对于化学上困难的分别除去组氨酸和苯丙氨酸的氨而言, HAL 和 PAL 显示具有共同的机制。利用这两种酶,超亲电子辅基 5 亚甲基 -3,5- 二氢咪唑并 -4- 酮 (MIO) 通过对芳香环的 Friedel-Crafts 类型的攻击,活化它们各自底物的非酸性 β 氢原子。产生的 σ 复合物通过使任何碱不能接近该酶的结合袋而阻止从环上提取质子。环外双键的形成是氨去除、重芳构化和断裂的关键。MIO 辅基再生并且形成产物尿刊酸酯或肉桂酸酯 (Poppe 等人, *Angew. Chem. Int. Ed.* 44:3668-3688(2005))。

[0072] 由于 HAL 与 PAL 之间具有高同源性,HAL 和 PAL 的保守区被称为 HAL/PAL 保守区。这种高同源性可能在如 NCBI 的数据库中产生关于“PAL-HAL”蛋白质可能的酶活性的一些不确定性,该蛋白质例如用在 NCBI 数据库中列出的点形念珠藻和多变鱼腥藻的蛋白质序列错误标记。因此,有些一些 PAL 酶可能被错误标记成 HAL 酶。尽管 PAL 和 HAL 的活性位点非常相似,但是预测它们在一些关键残基上不同 (Calabrese 等人, *Biochemistry* 43(36):11403-11416(2004);Xiang 等人, (2002) 同上;Williams 等人, (2005) 同上)。特别是在 HAL 中,来自恶臭假单胞菌 (SEQID NO:6) 的甲硫氨酸 382 和谷氨酰胺 414 在所有 HAL 中高度保守,但是在迄今描述的所有 (真核生物或原核生物)PAL 中总是分别被赖氨酸和谷氨酰胺取代 (图 4)。因此可以称所有具有“PAL-HAL”区并具有赖氨酸 382 和谷氨酰胺 414 的同系物的蛋白质都具有 PAL 活性蛋白质的序列特征。这种相对较新描述的 PAL 特征 (Williams 等人, (2005) 同上) 使得可以正确标记一些酶以区分 HAL 到 PAL, 并且能够用于从已经公布的基因和蛋白质数据库中鉴定某些新的 PAL 酶。

[0073] 本发明涉及这些原核生物 PAL 及其生物活性片段、突变体和变体的组合物,以及它们在治疗或工业方面的用途。

[0074] A. 定义

[0075] 除非另外说明,本申请,包括说明书和权利要求书中使用的下列术语,具有以下给出的定义。必须注意,当在说明书和所附权利要求书中使用时,单数形式“一个”、“一种”和“所述”包括复数形式,除非上下文中清楚地说明不是这样。标准化学术语的定义可见参考书,包括 Carey 和 Sundberg, *Advanced Organic Chemistry*, 3rd Edition, Vols. A and B (Plenum Press, New York 1992)。除非另外说明,本发明的实施将使用本领域技术之内的常规合成有机化学方法、质谱法、制备型和分析型色谱法、蛋白质化学、生物化学、重组 DNA 技术和药理学方法。参见,例如, T.E. Creighton, *Proteins: Structures and Molecular Properties* (W.H. Freeman and Company, 1993); A.L. Lehninger, *Biochemistry* (Worth Publishers, Inc., 4th Edition, 2004); Sambrook 等人, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2nd Edition, 1989); *Methods In Enzymology* (S. Colowick and N. Kaplan eds., Academic Press, Inc.); Remington's *Pharmaceutical Sciences*, 18th Edition (Easton, Pennsylvania: Mack Publishing Company, 1990)。

[0076] 无论是上文还是下文中,此处引用的所有出版物、专利和专利申请,都全文引入本文作为参考。

[0077] 在整个文本中使用如下的氨基酸缩写:

- [0078] 丙氨酸 :Ala(A) 精氨酸 :Arg(R)
[0079] 天冬酰胺 :Asn(N) 天冬氨酸 :Asp(D)
[0080] 半胱氨酸 :Cys(C) 谷氨酰胺 :Gln(Q)
[0081] 谷氨酸 :Glu(E) 甘氨酸 :Gly(G)
[0082] 组氨酸 :His(H) 异亮氨酸 :Ile(I)
[0083] 亮氨酸 :Leu(L) 赖氨酸 :Lys(K)
[0084] 甲硫氨酸 :Met(M) 苯丙氨酸 :Phe(F)
[0085] 脯氨酸 :Pro(P) 丝氨酸 :Ser(S)
[0086] 苏氨酸 :Thr(T) 色氨酸 :Trp(W)
[0087] 酪氨酸 :Tyr(Y) 缬氨酸 :Val(V)

[0088] “多核苷酸”是指由核苷酸单位组成的聚合物。多核苷酸包括天然存在的核酸,如脱氧核糖核酸(DNA)和核糖核酸(RNA),以及核酸类似物。核酸类似物包括非天然存在的碱基、参与除天然存在的磷酸二酯键之外的与其它核苷酸的键的核苷酸、或者包括通过除磷酸二酯键之外的键连接的碱基。因此,核苷酸类似物包括,例如但不限于,硫代磷酸酯、二硫代磷酸酯、磷酸三酯、氨基磷酸酯、硼烷磷酸酯、膦酸甲酯、手性膦酸甲酯、2-0-甲基核糖核苷酸、肽-核酸(PNA)等。例如可以使用自动DNA合成仪合成这些多核苷酸。术语“核酸”一般是指大的多核苷酸。术语“寡核苷酸”一般是指短的多核苷酸,通常不大于大约50个核苷酸。应当理解,当核苷酸序列用DNA序列(即,A、T、G、C)表示时,这也包括RNA序列(即,A、U、G、C),其中“U”代替“T”。

[0089] “cDNA”是指单链或双链形式的与mRNA互补或相同的DNA。

[0090] 在此使用常规表示法描述多核苷酸序列:单链多核苷酸序列的左手端为5'-末端;双链多核苷酸序列的左手方向被称为5'-方向。从5'至3'向新生RNA转录物上添加核苷酸的方向被称为转录方向。与mRNA具有相同序列的DNA链被称为“编码链”;位于与由DNA转录的mRNA具有相同序列的DNA链上并且位于RNA转录物5末端的5方向的序列被称为“上游序列”;位于与RNA具有相同序列的DNA链上并且位于编码RNA转录物3末端的3方向的序列被称为“下游序列”。

[0091] “互补”是指两个多核苷酸的相互作用表面的拓扑学相容性或匹配。因此,这两个分子可以描述为互补的,而且,接触表面的特征是彼此互补的。如果第一多核苷酸的核苷酸序列与第二多核苷酸的多核苷酸结合配偶体的核苷酸序列相同,则第一多核苷酸与第二多核苷酸互补。因此,序列为5'-TATAC-3'的多核苷酸与序列为5'-GTATA-3'的多核苷酸互补。

[0092] 如果与目标核苷酸序列互补的序列与参照核苷酸序列基本相同,则该核苷酸序列与参照核苷酸序列“基本互补”。

[0093] “编码”是指诸如基因、cDNA或mRNA等多核苷酸中核苷酸的特定序列作为模板用于合成生物过程中的其它聚合物和大分子的固有性质,这些聚合物和大分子具有确定的核苷酸序列(即,rRNA、tRNA和mRNA)或确定的氨基酸序列和由其产生的生物学性质。因此,如果在细胞或其它生物系统中,一个基因产生的mRNA的转录和翻译产生一种蛋白质,则该基因编码该蛋白质。用作基因或cDNA的转录模板的编码链(其核苷酸序列与mRNA序列相同并且通常在序列表中提供)和非编码链都可以被称为编码该基因或cDNA的蛋白质或其

它产物。除非另外说明,“编码氨基酸序列的核苷酸序列”包括彼此为简并形式并且编码相同氨基酸序列的所有核苷酸序列。编码蛋白质和 RNA 的核苷酸序列只可以包含内含子。

[0094] “重组多核苷酸”是指具有自然界并不连接在一起的序列的多核苷酸。扩增的或装配的重组多核苷酸可以包含在合适的载体中,并且该载体可以用来转化合适的宿主细胞。包含重组多核苷酸的宿主细胞被称为“重组宿主细胞”。然后该基因在重组宿主细胞中表达,以产生例如“重组多肽”。重组多核苷酸也可以发挥非编码功能(例如,启动子、复制起点、核糖体结合位点等)。

[0095] “表达控制序列”是指调节与之可操作连接的核苷酸序列的表达(转录和/或翻译)的多核苷酸中的核苷酸序列。“可操作连接”是指两个部分之间的功能关系,其中一个部分的活性(例如,调节转录的能力)导致对另一个部分的作用(例如,序列的转录)。表达控制序列可以包括,例如但不限于,启动子序列(例如,诱导型或组成型)、增强子、转录终止子、起始密码子(即,ATG)、内含子剪接信号和终止密码子。

[0096] “表达载体”是指包含重组多核苷酸的载体,该重组多核苷酸包含与将要表达的核苷酸序列可操作连接的表达控制序列。表达载体包含足以用于表达的顺式作用元件;其它表达元件可以由宿主细胞或体外表达系统提供。表达载体包括本领域已知的所有表达载体,如粘粒、质粒(例如,裸露的或包含于脂质体中的)和整合了重组多核苷酸的病毒。

[0097] “扩增”是指使多核苷酸序列复制从而延长为更大数目的多核苷酸分子的任何手段,例如通过逆转录、聚合酶链反应和连接酶链反应。

[0098] “引物”是指能够与指定的多核苷酸模板特异性杂交并且提供互补多核苷酸的合成起点的多核苷酸。当多核苷酸引物置于诱导合成的条件下时,即在核苷酸、互补多核苷酸模板和聚合作用试剂如 DNA 聚合酶的存在下,这种合成发生。引物一般是单链的,但是也可以是双链的。引物一般是脱氧核糖核酸,但是许多种类的合成和天然存在的引物也可用于许多应用。引物与设计与之杂交的模板互补,以用作启动合成的位点,但是不需要反映模板的确切序列。在这种情况下,引物与模板的特异性杂交取决于杂交条件的严格性。引物可以用例如发色、放射性或荧光部分标记,并且用作可检测部分。

[0099] “探针”当用于多核苷酸时,是指能够与另一多核苷酸的指定序列特异性杂交的多核苷酸。探针与目标互补多核苷酸特异性杂交,但是不需要反映模板的确切互补序列。在这种情况下,探针与靶标的特异性杂交取决于杂交条件的严格性。探针可以用例如发色、放射性或荧光部分标记,并且用作可检测部分。

[0100] 如果序列为第一序列的多核苷酸与序列为第二序列的多核苷酸特异性杂交,则第一序列是相对于第二序列的“反义序列”。

[0101] “特异性杂交”或“选择性杂交”是指当序列存在于复合混合物(例如,总细胞)DNA 或 RNA 中时,一种核酸分子在严格条件下优先与特定核苷酸序列结合、双链体化或杂交。

[0102] 术语“严格条件”是指在该条件下,探针优先与其目标亚序列杂交,而较低程度地与其它序列杂交,或者根本不杂交。在核酸杂交实验如 Southern 和 Northern 杂交中,“严格杂交”和“严格杂交洗涤条件”取决于序列,并且在不同的环境参数下是不同的。关于核酸杂交的详细指导可见 Tissen(1993) Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology-Hybridization with Nucleic Acid Probes part I chapter 2" Overview of principles of hybridization and the strategy of nucleic acid

probe assays", Elsevier, New York。通常,选择的高严格杂交和洗涤条件是在确定的离子强度和 pH 下比特定序列的热解链温度 (T_m) 低大约 5°C 。 T_m 是 50% 的靶序列与完全匹配的探针杂交时的温度 (在确定的离子强度和 pH 下)。选择的非常严格条件等于特定探针的 T_m 。

[0103] 对于 Southern 或 Northern 印迹法中在滤膜上具有超过 100 个互补残基的互补核酸的杂交,严格杂交条件的一个例子是 50% 的甲醛和 1mg 肝素, 42°C , 杂交进行过夜。高严格洗涤条件的一个例子是 0.15M NaCl, 72°C , 大约 15 分钟。严格洗涤条件的一个例子是在 65°C 下用 $0.2\times\text{SSC}$ 洗涤 15 分钟 (关于 SSC 缓冲液的说明, 参见, Sambrook 等人, (1989) 同上)。通常, 高严格洗涤之前为低严格洗涤, 以除去背景探针信号。用于例如超过 100 个核苷酸的双链体的中严格洗涤的一个例子是在 45°C 下用 $1\times\text{SSC}$ 洗涤 15 分钟。用于例如超过 100 个核苷酸的双链体的低严格洗涤的一个例子是在 40°C 下用 $4-6\times\text{SSC}$ 洗涤 15 分钟。通常, 特定杂交分析中的信噪比为无关探针的 $2\times$ (或更高) 表示检测到特异性杂交。

[0104] “多肽”是指由氨基酸残基、其有关的天然存在的结构变体和合成的非天然存在的类似物通过肽键连接组成的聚合物。例如, 可以使用自动化多肽合成仪合成多肽。术语“蛋白质”一般是指大的多肽。术语“肽”一般是指短的多肽。

[0105] 在此使用常规表示法来描述多肽序列: 多肽序列的左手端为氨基端; 多肽序列的右手端为羧基端。

[0106] “保守置换”是指多肽中的氨基酸被置换为功能上类似的氨基酸。以下六组各自含有彼此为保守置换的氨基酸:

[0107] 1) 丙氨酸 (A)、丝氨酸 (S)、苏氨酸 (T);

[0108] 2) 天冬氨酸 (D)、谷氨酸 (E);

[0109] 3) 天冬酰胺 (N)、谷氨酰胺 (Q);

[0110] 4) 精氨酸 (R)、赖氨酸 (K);

[0111] 5) 异亮氨酸 (I)、亮氨酸 (L)、甲硫氨酸 (M)、缬氨酸 (V); 和

[0112] 6) 苯丙氨酸 (F)、酪氨酸 (Y)、色氨酸 (W)。

[0113] 氨基酸也可以如下分组:

[0114] (1) 疏水性: Met、Ala、Val、Leu、He;

[0115] (2) 中性疏水性: Cys、Ser、Thr;

[0116] (3) 酸性: Asp、Glu;

[0117] (4) 碱性: Asn、Gln、His、Lys、Arg;

[0118] (5) 影响链取向的残基: Gly、Pro; 和

[0119] (6) 芳香族: Trp、Tyr、Phe。

[0120] “等位基因变体”是指占据同一基因座的一个基因的两个或多个多态性形式中的任意一个。等位基因变异是通过突变自然产生的, 并且可导致群体内的表型多态性。基因突变可以是沉默的 (编码的多肽中没有改变), 或者可以编码具有改变的氨基酸序列的多肽。“等位基因变体”也指来源于遗传等位基因变体的 mRNA 转录物的 cDNA, 及其编码的蛋白质。

[0121] 术语“相同”或百分“同一性”在用于两个或多个多核苷酸或多肽序列时, 是指当进行最大对应性的比较和比对时, 如使用以下序列比较算法之一或通过目视观察确定的, 两个或多个序列或亚序列相同或具有指定百分比的相同的核苷酸或氨基酸残基。

[0122] 短语“基本同源”或“基本相同”在用于两个核酸或多肽时,是指当进行最大对应性的比较和比对时,如使用以下序列比较算法之一或通过目视观察确定的,两个或多肽序列或亚序列至少有 40%、60%、80%、90%、95%、98% 的核苷酸或氨基酸残基相同。在一些实施方案中,基本相同性存在于长度至少为约 50 个残基的序列区域上、至少约 100 个残基的区域上或至少约 150 个残基的区域上。在另一个实施方案中,在所比较的生物聚合物中的任一个或两个的全长上,序列是基本相同的。

[0123] 对于序列比较,一般一个序列作为参照序列,测试序列与之进行比较。当使用序列比较算法时,将测试和参照序列输入计算机中,指定序列坐标 (subsequence coordinates),必要时,指定序列算法程序参数。序列比较算法然后基于指定的程序参数计算测试序列相对于参照序列的百分序列同一性。

[0124] 例如,通过 Smith & Waterman, Adv. Appl. Math. 2 :482(1981) 的局部同源性算法,通过 Needleman & Wunsch, J. Mol. Biol. 48 :443(1970) 的同源性比对算法,通过 Pearson & Lipman, Proc. Natl. Acad. Sci. USA85 :2444(1988) 的相似性检索法,通过计算机执行这些算法 (Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, WI 中的 GAP、BESTFIT、FASTA 和 TFASTA),或者通过目视观察,可以进行比较序列的最佳比对。

[0125] 有用的算法的一个例子是 PILEUP。PILEUP 使用渐进的逐对比对,产生一组相关序列的多序列比对,以显示相关性和百分序列同一性。它也制作树状图或系统树图,显示用来产生比对的聚类关系。PILEUP 使用简化的 Feng & Doolittle, J. Mol. Evol. 35 :351-360(1987) 的渐进比对法。使用的方法类似于 Higgins & Sharp, CABIOS 5 :151-153(1989) 所述的方法。该程序可以比对高达 300 个序列,最大长度各为 5,000 个核苷酸或氨基酸。多重比对程序开始于两个最相似的序列的逐对比对,产生两个比对的序列的聚类 (cluster)。这个聚类然后与下一个最相关的序列或对比序列的聚类进行比对。两个序列聚类通过两个序列的逐对比对的简单延伸进行比对。通过一系列渐进的逐对比对完成最终的比对。该程序通过为序列比较区指定特定序列和它们的氨基酸或核苷酸坐标以及通过指定程序参数而运行。例如,可以使用以下参数,将参照序列与另一个测试序列比较,以确定百分序列同一性关系:缺省空位权重 (3.00)、缺省空位长度权重 (0.10) 和加权末端空位。可用于产生序列多重比对的另一个算法是 Clustal W (Thompson 等人, Nucleic Acid Research 22 :4673-4680(1994))。

[0126] 适用于确定百分序列同一性和序列相似性的算法的另一个例子是由 Altschul 等人, J. Mol. Biol. 215 :403-410(1990) 描述的 BLAST 算法。执行 BLAST 分析的软件可以通过国家生物技术信息中心 (National Center for Biotechnology Information) 公开获得。该算法涉及首先通过确定查询序列中长度为 W 的短字母来确定高得分序列对 (HSP), 当与数据库序列中相同长度的字母比对时,这些短字母匹配或满足某些为阳性值的阈值得分 T。T 被称为邻近字母得分阈值 (Altschul 等人, (1990), 同上)。这些初始邻近字母命中作为种子来开始检索,以发现更长的含有它们的 HSP。字母命中然后沿每条序列双方向延长,只要累积比对得分可以增加。对于核苷酸序列,使用参数 M (一对匹配残基的奖励得分;总是 > 0) 和 N (对于错配残基的罚分;总是 < 0) 计算累积得分。对于氨基酸序列,利用打分矩阵计算累积得分。每个方向的字母命中的延长在以下情况时停止:累积比对得分比其

达到的最大值减少了量 X ;由于一个或多个负得分残基比对的积累,累积得分变为 0 或 0 以下 ;或到达任一序列的末端。BLAST 算法参数 W、T 和 X 决定了比对的灵敏度和速度。BLASTN 程序 (对于核苷酸序列) 使用字长 (W) 为 11、期望值 (E) 为 10、M = 5、N = -4 和两条链的比较作为缺省值。对于氨基酸序列, BLASTP 程序使用字长 (W) 为 3、期望值 (E) 为 10 和 BLOSUM62 打分矩阵作为缺省值 (参见 Henikoff & Henikoff, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89 : 10915 (1989))。

[0127] 除了计算百分序列同一性以外, BLAST 算法还对两个序列之间的相似性进行统计学分析 (参见, 例如, Karlin & Altschul, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90 : 5873-5787 (1993))。BLAST 程序提供的相似性的一个量度是最小总概率 (P(N)), 它指示两个核苷酸或氨基酸序列之间偶然发生匹配的概率。例如, 如果在测试核酸与参照核酸的比较中最小总概率小于大约 0.1、小于大约 0.01 或小于大约 0.001, 则认为该核酸类似于参照序列。

[0128] 两个核酸序列或多肽基本相同的进一步的指示是第一核酸编码的多肽与第二核酸编码的多肽在免疫学上交叉反应, 如下所述。因此, 例如, 当两个肽的区别仅在于保守置换时, 一个多肽一般与第二多肽基本相同。两个核酸序列基本相同的另一个指示是两个分子在如此处所述的严格条件下彼此杂交。

[0129] “基本纯的”或“分离的”是指目标物质是存在的主要物质 (即, 以摩尔计, 比组合物中的其它任何大分子物质都更丰富), 并且基本纯化的组分是其中目标物质占存在的所有大分子物质的至少约 50% (以摩尔计) 的组合物。通常, 基本纯的组合物是指该组合物中存在的大分子物质中的大约 80% 至 90% 或更多是纯化的目标物质。如果组合物基本由单一大分子物质组成, 目标物质纯化至基本均一性 (通常常规检测方法在组合物中无法检测到污染物)。对于该定义, 溶剂物质、小分子 (< 500 道尔顿)、稳定剂 (例如, BSA) 和元素离子种类不认为是大分子物质。在一些实施方案中, 本发明的化合物或偶联物是基本上纯的或分离的。在一些实施方案中, 本发明的化合物或偶联物相对于在其合成中使用的大分子起始物质是基本上纯的或分离的。在一些实施方案中, 本发明的药物组合物包含基本上纯化的或分离的 PAL 多肽和活性剂的偶联物与一种或多种药学上可接受的赋形剂的混合物。

[0130] “天然存在的”当用于客体时是指该客体可以在自然界中发现的事实。例如, 在生物体 (包括病毒) 中存在的、可以从天然来源中分离并且未在实验室中有意人工修饰的多肽或多核苷酸序列是天然存在的。

[0131] 术语“野生型” (wt) 是指生物体的自然遗传形式。野生型不同于突变形式 (具有遗传突变的生物体)。

[0132] 术语“多肽”和“蛋白质”是指氨基酸残基的聚合物, 并且不限于最小长度的产物。因此, 肽、寡肽、二聚体、多聚体等都包括在该定义内。全长蛋白质及其片段都包括在该定义中。该术语还包括多肽的表达后修饰, 例如, 糖基化、乙酰化、磷酸化等。此外, 对于本发明, “多肽”也指相对于天然序列包含诸如缺失、添加和置换 (通常在性质上为保守的) 等修饰的蛋白质, 只要该蛋白质保持所需的活性。这些修饰可以有意的, 如通过定点诱变, 也可以是无意的, 例如通过产生蛋白质的宿主发生的突变或 PCR 扩增引起的错误。

[0133] 此处使用的“类似物”或“衍生物”是与给定化合物例如肽具有大于约 70% 但小于

100%的序列相似性的化合物,例如肽。这些类似物或衍生物可以包含非天然存在的氨基酸残基,例如包括但不限于高精氨酸、鸟氨酸、青霉胺和正缬氨酸,以及天然存在的氨基酸残基。这些类似物或衍生物也可以包含一种或多种 D- 氨基酸残基,并且可以在两个或多个氨基酸残基之间含有非肽连接。

[0134] 术语“有效量”是指足以对个体的健康状况、病理学和疾病产生希望的结果或用于诊断目的的剂量。希望的结果可以包括剂量接受者的主观的或客观的改善。“治疗有效量”是指有效产生对健康的预期有益效果的药物的量。在任一个别情况中,适当的“有效”量可以由本领域技术人员使用常规实验确定。

[0135] “治疗”是指预防性治疗或治疗性治疗或诊断性治疗。

[0136] “预防性”治疗是给不显示疾病或病理症状(即,癌症)或只显示早期症状的个体进行的治疗。本发明的化合物或偶联物可以作为预防性治疗给予,以减少发病的可能性,或者如果已经发病,使疾病的严重程度最小化。

[0137] “治疗性”治疗是给显示疾病征兆或症状(即,癌症)的个体进行的治疗,目的是减少或消除所述征兆或症状。这些征兆或症状可以是生化的、细胞的、组织学的、功能性的、主观或客观的。本发明的化合物或偶联物可以作为治疗性治疗或为了诊断而给予。

[0138] “诊断”是鉴定病理状况的存在或性质。诊断方法在特异性和选择性方面不同。特定的诊断方法可能不提供对一种状况的明确的诊断,该方法能够提供帮助诊断的阳性指示就可以了。

[0139] “药物组合物”是指适合在包括人和哺乳动物的动物个体中作为药物使用的组合物。药物组合物包含药理学有效量的 PAL 多肽,也包含药学上可接受的载体。药物组合物包括包含活性成分和构成载体的惰性成分,以及由任意两种或多种成分的组合、复合或聚集、或一种或多种成分的解离、或一种或多种成分的其它类型的反应或相互作用直接或间接产生的任何产物。因此,本发明的药物组合物包括通过将本发明的化合物或偶联物与药学上可接受的载体混合制成的任何组合物。

[0140] “药学上可接受的载体”是指标准药物载体、缓冲液和赋形剂(如磷酸盐缓冲液、5%葡萄糖水溶液)和乳剂(如油包水型或水包油型乳剂)和各种类型的湿润剂和/或佐剂中的任何一种。合适的药物载体和制剂在 Remington's Pharmaceutical Sciences, 19th Ed. (Mack Publishing Co., Easton, 1995) 中有描述。药物载体取决于活性剂的预期的给药方式。典型的给药方式包括肠(例如,口服)或肠胃外(例如,皮下、肌肉内、静脉内或腹膜内注射;或局部、经皮或经粘膜给药)。“药学上可接受的盐”是能够配制为药用化合物或偶联物的盐,包括,例如,金属盐(钠、钾、镁、钙等)和氨或有机胺的盐。

[0141] “药学上可接受的”或“药理学上可接受的”意思是一种物质是生物学或其它方面理想的,即,该材料可以对个体施用而不引起任何不希望的生物效应或以有害的方式与包含它的组合物的任何成分相互作用。

[0142] 此处使用的术语“单位剂量形式”是指适合作为单一剂量用于人和动物个体的物理分散的单位,每个单位含有预定量的本发明的化合物或偶联物,其计算的含量足以与药学上可接受的稀释剂、载体或赋形剂组合产生希望的效应。本发明的新单位剂量形式的规格取决于使用的特定化合物或偶联物和将要达到的效果和宿主中与每种化合物或偶联物有关的药效学。

[0143] “生理 pH”或“生理范围中的 pH”是指在大约 7.2-8.0(含)的范围内的 pH,更特别地,在大约 7.2-7.6(含)的范围内的 pH。

[0144] 此处使用的术语“个体”包括哺乳动物和非哺乳动物。哺乳动物的例子包括但不限于哺乳动物纲的任何成员:人、非人灵长类动物,如黑猩猩和其它猿和猴种;农畜,如牛、马、绵羊、山羊、猪;驯养动物,如兔、狗和猫;实验室动物,包括啮齿动物,如大鼠、小鼠和豚鼠,等等。非哺乳动物的例子包括但不限于鸟类、鱼类等。该术语不表示特定的年龄或性别。

[0145] 在各种实施方案中, PAL 变体的聚乙二醇化根据 PAL : PEG 或 PEG : PAL 的比例来描述。除非另外指出,此处使用的“PAL : PEG”比例是指聚乙二醇化反应中 PAL 变体上的赖氨酸残基与 PEG 分子的比例。类似地,除非另外指出,此处使用的“PEG : PAL”比例是指聚乙二醇化反应中 PEG 分子与 PAL 变体上的赖氨酸残基的比例。

[0146] B. 基于结构的蛋白质工程化

[0147] 已知许多利用主要基于蛋白质结构信息的合理优化来进行蛋白质工程化的方法 (Brannigan 等人, *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 3(12):964-970(2002); Marshall 等人, *Drug Discov. Today* 8(5):212-221(2003))。结构特征的系统替代可以导致改善的蛋白质性质和 / 或底物特异性的重新设计。将一个基因家族的一个成员的功能补充到另一个同源成员中可以通过在紧邻底物结合附近引入有限数目的氨基酸取代来实现。通过产生改善的蛋白质变体使蛋白质功能改善可产生可用于工业、农业和治疗应用的蛋白质 (Bocanegra 等人, *Biochemistry* 32(11):2737-2740(1993); Failla 等人, *Fold Des.* 1(1):35-42(1996); Hayes 等人, *Proc Natl Acad Sci USA* 99(25):15926-15931(2002); Voigt 等人, *Nat. Struct. Biol.* 9(7):553-558(2002); Malashkevich 等人, *Nat Struct Biol.* 2(7):548-553(1995); Wells 等人, *Proc Natl Acad Sci USA* 84(15):5167-5171(1987); Wilks 等人, *Science* 242(4885):1541-1544(1988))。

[0148] C. PAL 的结构

[0149] 野生型原核生物 PAL 的三维结构可以利用 x 射线晶体学来确定。PAL 蛋白质是同源四聚体,每个单体主要由 α -螺旋组成,并且可以再分为四个结构域——中心催化域, N-末端结构域,与恶臭假单胞菌组氨酸氨裂合酶结构 (HAL, Schwede 等人, *Biochemistry* 38(17):5355-5361(1999)) 具有相似性的小 C-末端结构域,以及另外一个插入从完整四聚体分子的末端突出的 C 末端的结构域。在四聚体的全部 4 个单体中, N-末端前 25 个残基不可见,并且该区可能无序。对于 PAL 四聚体中的单体 B,位于残基 109-123 和 350-353 之间的环区无序,对于单体 A、C 和 D,103-123 和 350-353 区无序。圆红冬孢酵母 PAL 的另外两个 X-射线结构已经使用结晶过程中的反式肉桂酸盐和 NH_4 离子添加而确定,分辨率为 2.1 Å (P3221 空间群) 和 2.7 Å (P21 空间群; Calabrese 等人, *Biochemistry* 43(36):11403-11416(2004))。用于结晶的较低的 pH 和这些结构的较低的分辨率导致这些结构中更严重的固有、的无序 (特别是在 N-末端区) 以及不能将 MIO 辅因子上存在的额外的电子密度明确地分配给 NH_2 加合物。

[0150] 在这个从羧酸上催化消除各种基团的四聚体酶家族中存在大量的相关结构 (使用 DALI, Holm 等人, *J. Mol. Biol.* 233:123-138(1993)), 该家族包括氨裂合酶 (PAL、HAL 和天冬氨酸氨裂合酶 (AAL))、延胡索酸酶和精氨酸琥珀酸裂解酶 (Schwede 等人, *Biochemistry* 38(17):5355-5361(1999))。另外, δ -晶状体蛋白禽类晶状体蛋白具有类似的折叠但是该

结构家族的非酶形式 (Schwede 等人, (1999) 同上)。

[0151] 来自恶臭假单胞菌的 HAL (Röther 等人, Eur. J. Biochem. 268 :6011-6019 (2001) ; Schwede 等人, Biochemistry 27 :5355-5361 (1999) 和最近来自圆红冬孢酵母的 PAL (Calabrese 等人, Biochemistry 43 :11403-11416 (2004)) 的三维 X-射线结构显示, 这些四聚体酶的活性位点残基对于底物结合、催化和 MIO 的形成是重要的。除了 H83 和 E414 分别被缬氨酸和谷氨酰胺残基替代以外, HAL 中的所有活性位点残基在 EncP 中都存在 (Xiang, L. 等人, J. Biol. Chem. 277 :32505-32509 (2002))。提出 HAL 中的 H83 结合并定向活性位点处的 L-组氨酸的咪唑部分, 而 E414 的羧酸基团在催化中可能作为基础起作用。

[0152] PAL 的高分辨率三维蛋白质晶体结构可以用于涉及蛋白质工程化的方法中, 以改善 PAL 的生化 and 生理学性质, 和提高 PAL 的体内治疗有效性。另外, 该结构提供了关于该结构的哪些区最具柔性 (以除去和产生更紧密和稳定的 PAL 形式)、哪些残基位于活性位点附近 (用于突变以提高活性和 / 或使蛋白质的大小最小化以及为基于结构的抑制剂设计提供信息) 和哪些表面位置靠近免疫原性 (例如在作图研究中确定的线性表位) 和 / 或蛋白水解敏感部位 (来自蛋白酶作图研究) 的信息, 允许引入位点特异性突变体直接破坏问题部位, 或者表面聚乙二醇化或其它化学衍生化, 以保护天然 PAL 上存在的敏感部位。

[0153] D. PAL 的结构坐标的应用

[0154] PAL 的高分辨率三维晶体结构可以用于计算机方法中, 为突变、修饰或组合突变和修饰选择蛋白质区域。例如, 可商购的程序 GETAREA 基于 X-射线结晶学坐标计算氨基酸残基的表面暴露。

[0155] 高分辨率三维晶体结构可以进一步用于计算机方法, 以设计酶活性位点的配体。例如, 可商购的用于对接和设计基于结构的小分子的软件程序可以用来设计 PAL 抑制剂 (Billett 等人, Biochim Biophys Acta 524 (1) :219-230 (1978) ; Janas 等人, Acta Biochim Pol. 32 (2) :131-143 (1985) ; Zon 等人, Phytochemistry 59 (1) :9-21 (2002) ; Alunni 等人, Arch Biochem Biophys. 412 (2) :170-175 (2003))。

[0156] 基于结构的 PAL 工程化

[0157] 特定大分子的可靠三维结构或结构模型的阐明允许合理设计用于优化所述大分子的特定结构和 / 或功能的生产性方法 (Penning 等人, Chem Rev. 101 (10) :3027-3046 (2001))。优化方法包括但不限于辅酶特异性的重建 (Bocanegra 等人, Biochemistry 32 (11) :2737-2740 (1993))、蛋白质稳定性的提高 (Malakauskas 等人, Nat Struct Biol. 5 (6) :470-475 (1998) ; Jiang 等人, Protein Sci. 10 (7) :1454-1465 (2001) ; Luo, Protein Sci. 11 (5) :1218-1226 (2002) ; Filikov 等人, Protein Sci. 11 (6) :1452-1461 (2002) ; Fagain, Enz Microb Technol. 33 :137-149 (2003) ; Cammett 等人, J Mol Biol. 327 (1) :285-297 (2003))、底物特异性的重新设计 (Hedstrom 等人, Science 255 (5049) :1249-1253 (1992) ; Failla 等人, Fold Des. 1 (1) :35-42 (1996) ; Malashkevich 等人, Nat Struct Biol. 2 (7) :548-553 (1995) ; Wilks 等人, Biochemistry 31 (34) :7802-7806 (1992) ; Feil 等人, Protein Eng. 10 (3) :255-262 (1997) ; Whittle 等人, J Biol Chem. 276 (24) :21500-21505 (2001))、配体或受体结合特异性的改变 (Cunningham 等人, Proc Natl Acad Sci USA 88 (8) :3407-3411 (1991) ; Reddy 等人, Nat Biotechnol. 14 (13) :1696-1699 (1996) ; Doyle 等人, Curr Opin Chem Biol. 4 (1) :60-63 (2000)) 和生物活性

的重建 (Chen 等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90(12) :5618-5622(1993) ;Sarkar 等人, Nat Biotechnol. 20 :908-913(2002) ;Blatt 等人., J Interferon Cytokine Res. 16(7) : 489-499(1996))。

[0158] 基于结构的工程化可以用来产生 PAL 变体,包括合理的突变体,如截短、缺失、插入、剪接变体、点突变、置换、嵌合体、环再建突变体、环交换突变体、表面镶饰突变体以及随机产生的突变体(包括单独的或与合理产生的突变体组合的定向进化产生的突变体)。另外,可以制备包含 PAL 突变的 PAL 变体,其中为了位点特异性聚乙二醇化和/或其它化学衍生化已经引入突变。用于这些方法的 PAL 突变体包括与野生型圆红冬孢酵母 PAL 具有基本相同的功能活性的任何 PAL 变体,包括亲本 PAL 蛋白质的变体、片段和化学衍生物。

[0159] 定向进化蛋白质优化

[0160] 定向进化法随机突变目的基因,以探索蛋白质突变空间的更彻底更大的区域。存在许多定向进化法,包括易错 PCR 和随机插入和缺失 (RID) 诱变以在整个 DNA 序列上引入多样性,和更聚集的或“定向的”产生多样性的方法,例如位点饱和诱变和其它基于寡核苷酸的诱变方法 (Brannigan 等人, (2002) 同上)。另外, DNA 序列重组法已经用于组合有利的突变位点,同时除去有害的突变,产生新的 DNA 序列(例如, DNA 改组法、StEP、RACHITT、ITCHY)。最后,基于结构的定向进化技术已经用于为了治疗优势重新设计蛋白质(基于结构的组合工程化、SCOPE 和蛋白质设计自动化、PDA 方法)。SCOPE 方法是基于半理性的蛋白质工程方法,它使用蛋白质结构信息与 DNA 操作技术的结合,设计和由非同源基因产生多交叉蛋白质变体文库 (O' Maille 等人, J Mol Biol. 321(4) :677-691(2002))。在 PDA 中,突变空间的计算初筛允许只包含与特定蛋白质折叠相容的突变,从而将序列变体数减少至适合实验筛选的大小(美国专利 6,403,312 ;Dahiyat 等人, Proc Natl Acad Sci USA 94(19) :10172-10177(1997) ;Dahiyat 等人, Protein Sci. 6(6) :1333-1337(1997) ; Hayes 等人, Proc Natl Acad Sci USA 99(25) :15926-15931(2002) Orenica 等人, Nature Struct Biol. 8 :238-242(2001)。

[0161] 存在大量的实例,其中使用定向进化(与有效的选择或筛选方案结合)导致改善的催化功能和生物物理学性质(例如,降低的免疫原性、提高的稳定性),其开始于最初的酶物质,并且为了改变和/或改善功能,对该物质进行突变 (Vasserot 等人, Drug Discovery Today 8(3) :118-126(2003))。例如,对许多不同的蛋白质使用定向进化和其它“随机”诱变方法已经获得了成功的突变体(磷酸丙糖异构酶, Hermes 等人, Proc Natl Acad Sci USA 87(2) :696-700(1990) ; β -内酰胺酶, Stemmer, W. P., Nature 370(6488) : 389-391(1994), Orenica, M. C. 等人, Nature Struct Biol 8 :238-242(2001), Voigt, C. A. 等人, (2002) 同上 ;对硝基苄基酯酶, Moore 等人, Nature Biotechnol. 14 :458-467(1996) ;半乳糖苷酶至岩藻糖苷酶, Zhang 等人, Proc Natl Acad Sci USA 94(9) :4504-4509(1997) ;天冬氨酸氨基转移酶, Yano 等人, Proc Natl Acad Sci USA 95(10) :5511-5515(1998) ;绿色荧光蛋白, Cramer 等人, Nat Biotechnol 14(3) :315-319(1996) ;辣根过氧化物酶, Lin 等人, Biotechnol Prog 15 :467-471(1999) ;细胞色素 P450, Joo 等人, Nature 399(6737) :670-673(1999) ;联苯基双加氧酶, Kumamaru 等人, Nat Biotechnol 16(7) : 663-666(1998) ;砷酸盐解毒途径, Cramer 等人, Nat Biotechnol 15(5) :436-438(1997) ;头孢菌素酶, Cramer 等人, Nature 391(6664) :288-291(1998) ;各种蛋白质, Shao 等人,

Curr Opin Struct Biol 6(4) :513-518(1996) ;各种蛋白质,Skandalis 等人,Chem Biol 4 :889-898(1997) ;枯草杆菌蛋白酶, Cunningham 等人, Protein Eng. 1(4) :319-325(1987) ;腈水解酶, DeSantis 等人, J Am Chem Soc. 125(38) :11476-11477(2003) ; α -天冬氨酰二肽酶, Kong 等人, Biochem Biophys Res Commun. 289(1) :137-142(2001) ;天冬氨酸氨基转移酶, Rothman 等人, ProteinScience 13(3) :763-772(2004) ;L-天冬氨酸酶, Wang 等人, Biochem Biophys Res Commun. 276(1) :346-349(2000) ;和乳酸脱氢酶, Wilks 等人, Biochemistry 31(34) :7802-7806(1992)。

[0162] 这些研究反复证明了应用“随机”诱变技术开发具有提高的稳定性、活性和降解途径抗性的改善的酶变体的应用。进化的蛋白质克隆的结构分析导致了对与获得的物理和化学性质改善有关的分子改变的了解 (Orencia 等人, in Advances in Protein Chemistry : Evolutionary proteindesign, F.H. Arnold, Editor, Academic Press :San Diego, pp. 227-259(2001))。鉴于涉及非活性位点残基的有益突变反复发生,应用定向进化技术得到的回报是特别明显的,其中距酶活性位点区15-20 Å以上的一些突变位点具有有益效果 (Oue 等人, J. Biol. Chem. 274(4) :2344-2349(1999))。定向进化和其它随机诱变技术,与选择和筛选方法结合,能够用来开发对蛋白水解更稳定和化学加强的 PAL 形式,以在工业应用或酶替代疗法(例如,用于 PKU)中使用。

[0163] E. 修饰的 PAL

[0164] 以前的实验已经描述了 PAL 的修饰形式,如 PAL 突变体 (Schuster 等人, FEBS Lett. 349(2) :252-254(1994) ;Schuster 等人, Proc Natl Acad Sci USA 92(18) :8433-8437(1995) ;Langer 等人, Biochemistry 36 :10867-10871(1997) ;El-Batal 等人, Acta Microbiol Pol. 49(1) :51-61(2000) ; R  ther 等人, Eur. J. Biochem. 269 :3065-3075(2002)) 和 HAL 突变体 (Taylor 等人, J. Biol. Chem. 269(44) :27473-27477(1994) ;Baedeker 等人, Eur. J. Biochem. 269(6) :1790-1797(2002))。

[0165] PAL 动力学的优化 - 具有增强的催化活性的原核生物突变体

[0166] 本发明的野生型 PAL 的生物活性位点可以根据需要修饰,以优化 PAL 动力学特征。 K_m - 获得半数最大活性的底物浓度 - 与 PAL 将 Phe 水平维持在可接受的范围内(即,120 μ M 至 240 μ M)的治疗效果密切相关。 K_m 是酶对底物的亲和力。通过控制亲和力,人们可以限制或控制任何酶对不同浓度的底物的效果。例如,如果 K_m 为 1000 μ M(圆红冬孢酵母),则该酶的活性将降至大约 12.5%,血液 Phe 水平为 240 μ M,以及降至大约 3%,血液 Phe 水平为 60 μ M。如果 K_m 为 240 μ M,则该酶的活性将降至大约 50%,血液 Phe 水平为 240 μ M,以及降至大约 12%,血液 Phe 水平为 60 μ M。如果 K_m 为 120 μ M,则该酶的活性将降至大约 70%,血液 Phe 水平为 240 μ M,以及降至大约 35%,血液 Phe 水平为 60 μ M。最佳地,治疗目标是使用其活性足以降低 Phe 而且使其保持在大约 120 μ M 至大约 240 μ M 的最佳范围内的酶。具有高 K_m (即,1000 μ M)的酶在 Phe 水平降至正常范围内时将快速丧失活性,并且也需要施用高度浓缩的或大体积的剂量,这是不切实际的。另一方面,具有极低 K_m 的酶可能快速消耗 Phe 水平,对于高苯丙氨酸血症来说这可能是致命的,但是可以用于控制癌症。

[0167] 在一些实施方案中,生物活性修饰的 PAL 具有至少为大约 0.1 s⁻¹ 或大于大约 0.5 s⁻¹ 的 kcat。在其它实施方案中,生物活性修饰的 PAL 具有至少为大约 0.2 s⁻¹ 或大于大约 1.0 s⁻¹ 的 kcat。在其它实施方案中,生物活性修饰的 PAL 具有大约 10 μ M 至大约 1000 μ M

之间的 K_m 。在其它实施方案中,生物活性修饰的 PAL 具有大约 $100\ \mu\text{M}$ 至大约 $1000\ \mu\text{M}$ 之间的 K_m 。在其它实施方案中,生物活性修饰的 PAL 显示为野生型的大约 2 倍至大约 1000 倍的酶活性。在其它实施方案中,生物活性修饰的 PAL 显示比野生型高大约 10% 至大约 100% 的酶活性。这些生物活性修饰的 PAL 蛋白质可以使用本领域公知的方法形成,例如通过定点诱变形成。

[0168] 除了 H83 和 E414 分别被缬氨酸和谷氨酰胺残基代替以外,HAL 中的所有活性位点残基在 EncP 中都存在 (Xiang, L. 等人, *J. Biol. Chem.* 277 :32505-32509(2002))。研究了 HAL 中的 H83 在结合和定向活性位点处的 L- 组氨酸的咪唑部分和在稳定酶结合的阳离子中间体中的作用 (Xiang 等人, *J. Bacteriology* 187(12) :4286-4289(2005) ;Xiang 等人, *J. Bacteriology* 188(14) :5331(2006))。提出 E414 的羧酸基团可能在催化中作为基础起作用。在该研究中,通过定点诱变产生了 EncP 突变体,以评价 V83 对 EncP 引起的肉桂酸形成的贡献。将缬氨酰替换为组氨酸产生了突变体 V83H,其特征是 PAL 活性丧失。将缬氨酰替换为丙氨酸产生突变体 V83A,它比野生型 EncP V83A 活性更高,对 L- 苯丙氨酸具有略低的亲和力,相对于野生型酶的 $23\ \mu\text{M}$,其 K_m 为 $120\ \mu\text{M}$ 。但是,与野生型 EncP 相比,V83A 具有更高的 k_{cat} ,并且比野生型酶活性更高。

[0169] 特殊的蛋白质变体:免疫原性降低的变体

[0170] 目前使用许多策略来降低蛋白质的免疫原性。在一些实施方案中,使免疫应答最小化而引入的修饰不会破坏大分子的结构、功能或稳定性。使用的有效策略包括提高人序列含量(嵌合体和/或其它“人源化”方法)、改善溶液性质、去除抗体表位、引入化学衍生化(如聚乙二醇化),和/或鉴定并去除 MHC 限制位。对于注射治疗剂,通过进行表位作图、然后进行合理诱变以修饰和/或以其它方式突变这些免疫原性位点,可以解决体内免疫反应性,该方法单独进行或与位点特异性聚乙二醇化 (Hershfield 等人, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88 :7185-7189(1991) ;Leong 等人, *Cytokine* 16(3) :106-119(2001) ;Lee 等人, *Pharm. Res.* 20(5) :818-825(2003)) 或其它化学衍生化方法组合进行,以降低蛋白质的免疫反应性至可以接受的水平。修饰抗原性表面蛋白区可降低免疫原性 (Chirino 等人, *Drug Discov. Today* 9(2) :82-90(2004))。一种改善方法包括构建大小较小的、保留催化活性的蛋白质(例如,使用吸光度测量进行活性测定)。第二种改善方法是蛋白质工程化结合 ELISA 筛选,也可以用来鉴定免疫反应性降低的突变体。另一种方法向聚乙二醇化衍生化引入额外表面 Lys 位点的点突变,使用测试嘌呤核苷磷酸化酶显示该方法降低了免疫原性 (Hershfield 等人 (1991) 同上)。一种替代途径采用位于蛋白质表位区的残基的突变,以除去免疫原性位点 (Yeung 等人, *J. Immunol.* 172(11) :6658-6665(2004))。在一种类似于抗体人源化的方法中,将来自人抗体的同源环区和/或残基替换为同源蛋白质的相应的环区。

[0171] 改善蛋白质的溶液性质可以提高酶的比活性和/或降低免疫原性。细菌表达的重组蛋白的典型溶液性质是例如由于链间二硫键形成、疏水相互作用和/或二价阳离子所致的蛋白质凝集体形成 (Chi 等人, *Pharm Res* 20(9) :1325-1336(2003))。重组表达的蛋白质的聚集可以提高免疫应答 (Hermeling 等人, *Pharm Res* 21(6) :897-903(1994) ;Schllekens, *Nephrol Dial Transplant* 20(suppl 6) :vi3-9(2005))。一种改善方法包括将表面半胱氨酸残基替换为其它氨基酸残基(例如,丝氨酸),以使链间二硫键形成的可能性

最小化。例如,将两个表面半胱氨酸残基替换为丝氨酸残基可减少分支酸裂合酶的聚集,而对酶活性的影响最小 (Holden 等人, *BiochimBiophys Acta* 1594(1):160-167(2002))。

[0172] 除去蛋白质治疗性的蛋白水解加工位点,通过阻止蛋白酶体加工从而阻止剪切和加工为用于抗原递呈细胞结合的肽片段,也可以使免疫原性降低。在 II 类 MHC 决定簇侧翼区的改变中也观察到类似的现象,其阻止了向自身反应性 T 细胞呈显 (Maverakis 等人, *Proc Natl Acad Sci, USA* 100(9):5342-5347(2003))。

[0173] 表位作图

[0174] 可以使用大量算法计算或者使用体外或体内方法通过实验确定蛋白质治疗性表位。计算机程序,如来自 DNASTar 的 Lasergene 程序套装中的“Peptide Companion”和“Protean”,常用来基于蛋白质的化学组成和构象估计蛋白质的表面表位区。蛋白质序列中的免疫原性区是基于亲水性指数具有计算的最高亲水性和基于计算的表面蛋白质区域的两亲性和其它构象参数具有最高的抗原性的区域。此外,蛋白质序列中的限制位可以基于潜在 HLA 结合的计算机模型预测来定位 (Robinson 等人, *NucleicAcids Res.* 31(1):311-314(2003); De Groot 等人, *Novartis Found. Symp.* 254:57-72(2003))。另外,表位也可以使用体外生物化学方法 (Tangri 等人, *Curr. Med. Chem.* 9(24):2191-2199(2002)) 和基于细胞的体外方法 (Stickler 等人, *J Immunother.* 23(6):654-660(2000); Stickler 等人, *J Immunol Methods* 281(1-2):95-108(2003)) 来确定。对于蛋白质工程,免疫原性的相对降低可以使用与 Stickler 等人 (*Toxicol Sci.* 77(2):280-289(2004)) 的基于细胞的体外分析类似的试验来监测。

[0175] 肽扫描分析(表位作图)涉及使用重叠肽文库,该文库覆盖酶序列的表面区,并且与针对覆盖整个酶蛋白质序列的重叠肽产生的兔多克隆抗体探针杂交,从而显示该酶中存在的线性表位。基于该酶的三维结构,通过随机突变表位区残基以除去表位识别位点,或者利用位点特异性突变在靠近这些表位位点的表面上引入 Lys 或 Cys 残基以提供聚乙二醇化位置,来突变通过实验鉴定的抗原性位点,从而覆盖和保护这些位点免于免疫原性识别。这些可能非免疫原性的酶突变体(或这些酶突变体的聚乙二醇化形式)的 ELISA 筛选提供了对显示降低的免疫反应性的酶突变体亚组的体外鉴定。

[0176] 表面残基鉴定和突变

[0177] 可以鉴定位于或靠近酶的免疫原性区的表面暴露的残基。这些位置是蛋白质中存在的溶剂可及的表面位置总数中的一部分,取决于与表面的接近程度以及免疫原性/抗原性区的接近程度。利用 X-射线结晶学、NMR 或同源性建模确定的蛋白质的三维结构可以在商业化的软件程序中使用,用于计算大分子的溶剂可及的表面积。应用程序 GETAREA 1.1 (Fraczkiewicz 等人, *J. Comp. Chem.* 19:319-333(1998)) 提供的输出对圆红冬孢酵母 PAL 的表面可及性给出了可靠的评估。GETAREA 和 PARAREA 及类似的程序基于 Gauss-Bonnet 原理利用连续能谱法通过参数化方法计算溶剂可及的表面积。PARAREA 使用每个原子的邻居清单中的所有原子对发现 Gauss-Bonnet 通道中潜在的交叉点,而 GETAREA 使用由双球相交平面限定的交叉半空间更有效地计算溶剂暴露的顶部。

[0178] 在天然 PAL 中,GETAREA 鉴定了 12 个分布在四聚体 PAL 蛋白质整个表面上的表面暴露的 Lys 残基,以及一个部分暴露的表面 Cys 残基 (Cys140)。这些位置直接可以进行聚乙二醇化衍生化。此外, PAL 的三维结构可以用来鉴定可用于定点诱变的另外的表面残基。

这些另外的位点可以使用标准蛋白质工程技术突变,以产生具有降低的免疫原性、提高的蛋白水解抗性和 / 或提高的稳定性 / 活性的更有利的 PAL 突变体。

[0179] 提供具有改善的性质如降低的免疫原性的蛋白质突变体的蛋白质突变策略在本领域中是已知的。一种常用的方法是将表位中的每个非丙氨酸残基突变为 Ala,并且将表位中的每个丙氨酸残基突变为 Gly。其它方法通过突变或缺失从表位区中除去带电荷的和疏水性的残基。其它的突变策略引入位点特异性突变,然后是位点特异性化学衍生化。

[0180] 截短也可以用于产生蛋白质改善。PAL 相对于组氨酸氨裂合酶 (HAL) 的生物信息学分析已经提示了截短突变体 (残基 23-716 和 1-564)。另外,基于高度同源性 HAL 蛋白结构中不存在 C-末端结构域区,PAL 三维结构的分析提供了用于截短的替代区域。C-末端结构域缺失突变体,包括其中来自 HAL 的相应环区融合到 PAL 序列中以代替 PAL 结构的 C-末端结构域突出区的突变体 (计算具有主要表位区),形成较小的、更强的并且预测具有较低免疫原性的 PAL 变体。

[0181] 在另一种方法中,利用合理诱变的蛋白质工程结合定向进化能够获得 PAL 的突变形式。例如,合理设计以及实验和组合设计的实施已经提高了 compstatin 的活性 (Morikis 等人, *Biochem. Soc. Trans.* 32(1):28-32(2004))。合理诱变与定向进化的组合已经证明是有前途的 (Bornscheuer 等人, *Curr. Opin. Chem. Biol.* 5(2):137-143(2001); Dwyer 等人, *Science* 304(5679):1967-1971(2004))。

[0182] 可以使用定向分子进化的蛋白质工程方法,将显示低于最佳酶活性的 PAL 突变形式针对活性进行进化,其中随机诱变步骤之后是对活性突变体的选择步骤,产生仅有具有活性的克隆的新蛋白质突变体库。例如,如果特定突变 PAL (我们已经设计靠近该结构的含表位区引入表面赖氨酸残基) 无活性,则对该突变体进行定向进化 (突变该非活性突变体并且选择具有活性的转化体) 产生新的突变体库,其中整个结构中含有使每个活性克隆恢复活性的这种有益的突变 (表面赖氨酸位点) 以及一部分其它随机突变。另外,能够杂交相同蛋白质的不同种类或不同蛋白质的类似序列的分子育种的定向进化技术 (Cramer 等人 *Nature*, 391:288-291(1998); Minshull 等人, *Curr. Opin. Chem. Biol.* 3(3):284-290(1999)) 可以替换人组氨酸氨裂合酶的序列,以将 PAL 的一些免疫原性最强的区域替换为不被免疫系统识别的人序列。

[0183] PAL 的突变形式可以通过以下方式获得:基于半经验方法制备杂交蛋白质变体,从而相对于纯基于定向进化的方法能够实现更定向水平的蛋白质设计,以及使用这些偏置蛋白质工程方法,对鉴定的蛋白质结构的这些区域提供更随机水平的突变操作。例如, PDA 法产生通过计算预筛选的蛋白质变体文库,允许比纯随机或非偏蛋白质工程方法更快速的蛋白质性质优化 (美国专利 6,403,312; Dahiyat, *Curr Opin Biotechnol.* 10(4):387-390(1999); Filikov 等人, (2002) 同上; Hayes 等人, (2002) 同上; Luo, P. 等人., (2002) 同上)。类似地, SCOPE 法基于结构的“等同”亚结构域构建杂交酶变体,允许从非同源性基因开始产生多重交叉的蛋白质变体文库, (O' Maille 等人., (2002) 同上)。以类似的方式, Voigt 等人开发的方法基于计算算法的应用构建杂合体,该算法鉴定可以重组而不破坏蛋白质三维结构完整性的蛋白质片段或“大纲” (Voigt 等人., (2002) 同上)。计算分析也可以基于二级结构元件分配,鉴定蛋白质折叠中结构和功能上重要的位置的保守核心区 (Mizuguchi 等人, *Bioinformatics* 16(12):1111-1119(2000))。PAL 的突变形式可以

按照本领域任何方法的步骤获得。

[0184] 作为备选酶取代物的 HAL

[0185] 基于恶臭假单胞菌 HAL 的结构,对来自海洋链霉菌的 encP 的结构已经进行了同源性建模。尽管比 PAL 小,但是海洋链霉菌的结构更类似于人 PAL,使得 encP 成为氨裂合酶的免疫原性可能较低的形式,以用于 PAL 蛋白质工程。获得非免疫原性 PAL 变体的一种替代方法包括使海洋链霉菌 encP 或其它原核生物 PAL 突变以将免疫原性序列替换为人组氨酸氨裂合酶序列 (HAL, Suchi 等人, Biochim. Biophys. Acta 1216 (2) :293-295 (1993)), 采用突变,然后选择具有 PAL 活性的 encP 或其它原核生物突变体,以获得“人源化的”encP 或其它原核生物 PAL 蛋白,该蛋白质可以在突变和活性选择步骤后进一步聚乙二醇化。

[0186] 特殊的蛋白质变体:蛋白酶敏感性降低的变体

[0187] 目前使用多种策略降低蛋白酶敏感性。在一些实施方案中,为使蛋白水解敏感性最小化而引入的修饰不会破坏大分子的结构、功能或稳定性。有效的策略包括给酶提供活性位点稳定物质,例如竞争性抑制剂 (Gilbert 等人, (1981) 同上;美国专利 6,548,644; 6,451,986; 6,433,158; 6,461,849), 化学修饰敏感的 Lys 和 / 或 Arg 位点中的氨基以阻断胰蛋白酶结合位点,将胰凝乳蛋白酶敏感的 Tyr、Phe 和 / 或 Trp 残基突变为较小的中性氨基酸以消除切割敏感性,将 PAL 连接或偶联到其它保护性大分子 (如 Fc 抗体结构域或肉毒杆菌神经毒素的非毒性成分) 上和 / 或靠近蛋白酶敏感的位点引入 Lys 或 Cys 位点以便后续使用 PEG 或其它化学保护基和稳定基进行化学衍生化。

[0188] F. 化学修饰的 PAL 变体

[0189] 大分子的化学修饰可以以非特异性的方式进行 (产生衍生化的种类的混合物), 或者以位点特异性的方式进行 (基于组合使用定点诱变和化学修饰对野生型大分子的反应性引导的衍生化和 / 或位点选择性修饰), 或者使用表达的蛋白质连接方法进行 (Hofmann 等人, Curr Opin Biotechnol. 13 (4) :297-303 (2002))。在一些实施方案中,利用化学修饰降低免疫原性。聚乙二醇化是已经证明的一种降低蛋白质免疫原性的方法 (Bhadra 等人, Pharmazie 57 (1) :5-29 (2002)), 但是也可以使用糖基化和其它化学衍生化方法, 使用磷酸化、酰胺化、羧化、乙酰化、甲基化、产生酸加成盐、酰胺、酯和 N-酰基衍生物 (Davis, Science 303 :480-482 (2004))。

[0190] 聚乙二醇化的蛋白质

[0191] 使用 PEG 化学试剂与 PAL 蛋白质的一定范围的比例对 PAL 进行一系列不同的聚乙二醇化反应将为每个修饰方法提供 PEG-PAL 衍生物。可以使用吸光度分析与 PAGE 和非变性凝胶分析的组,基于对每个衍生化 PAL 种类获得的残余活性,确定 PEG 衍生化的程度,从而确定最佳的聚乙二醇化程度。在确定最佳修饰的起始范围后,最佳 PEG-PAL 种类的比较动力学分析 (包括 V_{max} 和 K_m 测定、底物结合常数、蛋白水解稳定性、活性的 pH 依赖性、活性的温度依赖性) 和免疫反应性可以通过 ELISA、免疫沉淀法和 Western 印迹法确定。也可以使用最佳衍生化条件,利用蛋白质工程产生最有利于聚乙二醇化的 PAL 突变体;通过使 PAL 蛋白的大小为最小,并且只修饰 PAL 表面的抗原性最强的区域,PEG 修饰的成本将会降低,同时保持最大的酶活性和最小的免疫原性。类似地,可以利用位点特异性聚乙二醇化提供酶衍生物。

[0192] Lys、Arg 和 Cys 残基的其它化学修饰,如磷酸化或其它化学修饰,可以用来掩蔽

免疫原性区和 / 或蛋白水解敏感区。这些化学修饰包括 Bednarsaki 的聚合物添加方法和 Altus Corporation 的交联方法,用于提高 PAL 稳定性、降低免疫原性和改善蛋白酶抗性,是代表性的实例。Bednarsaki 证明了聚合物添加提高了蛋白质的温度稳定性 (Wang 等人, J. Am. Chem. Soc. 114(1) :378-380 (1992)), 而 Altus Corporation 发现戊二醛交联提高了酶稳定性。

[0193] 为了发现聚乙二醇化是否有益于蛋白质如 PAL 的体内治疗半衰期,合成了多种不同的 PEG : PAL 偶联物,在体外表征,并且在体内检测 L-Phe 的降低。为了优化聚乙二醇化的潜在作用和鉴定 PEG 连接的优选位点,使用一种设计策略,其中聚合物的长度、构象和 PEG 连接程度变化。

[0194] 制备本发明的聚乙二醇化 PAL 的方法通常包括以下步骤:(a) 在允许 PAL 连接到一个或多个 PEG 基团上的条件下使 PAL 与聚乙二醇反应,和 (b) 获得反应产物。因为 PAL 修饰的具体位点可能显著改变偶联物的固有活性,使用不同类型和量的 PEG。用于 PAL 聚乙二醇化的化学方法是使用甲氧基 -PEG 的 NHS- 酯 (O-[(N- 琥珀酰亚胺基氧羰基)- 甲基]-O'- 甲基聚乙二醇) 对 PAL 的伯胺的酰化。使用甲氧基 -PEG-NHS 或甲氧基 -PEG-SPA 的酰化产生了酰胺键,该酰胺键消除了原来伯胺上的电荷。

[0195] 本方法提供基本同源的聚合物:蛋白质偶联物的混合物。本文使用的“基本同源的”是指只观察到聚合物:蛋白质偶联物分子。聚合物:蛋白质偶联物具有生物活性,并且此处提供的“基本同源的”聚乙二醇化 PAL 制剂的同源性足以显示同源制剂的优点,例如,在批间药代动力学的可预测性方面易于临床应用。

[0196] 预期用于本文所述的聚乙二醇化方法的聚合物分子可以选自水溶性聚合物或其混合物。水溶性聚合物可以选自,例如,聚乙二醇、单甲氧基 - 聚乙二醇、葡聚糖、聚-(N- 乙基吡咯烷酮)、丙二醇均聚物、聚环氧丙烷 / 环氧乙烷共聚合物、聚氧乙基化多元醇 (例如,甘油)、HPMA、Fleximer™ 和聚乙烯醇、单-(C1-C10) 烷氧基 -PEG、芳氧基 -PEG、三氟代乙烷磺酰单甲氧基 PEG、PEG 丙醛、二琥珀酰亚胺基碳酸酯 PEG、纤维素或其它基于碳水化合物的聚合物。选择的聚合物应当是水溶性的,以使它所连接的蛋白质在水性环境如生理环境中不沉淀。聚合物可以是分支的或未分支的。在一些实施方案中,对于终产物制品的治疗应用而言,聚合物将是药学可接受的。

[0197] 在一些实施方案中,本文使用的水溶性聚合物是聚乙二醇,缩写为 PEG。本文使用的聚乙二醇意在包括已经用于衍生化其它蛋白质的任何形式的 PEG,如单-(C1-C10) 烷氧基 - 或芳氧基 - 聚乙二醇。

[0198] 聚乙二醇分子与蛋白质分子的比例将变化,它们在反应混合物中的浓度也将变化。通常,最佳比例 (在反应效率方面,没有过量的未反应蛋白质或聚合物) 将根据选择的聚乙二醇的分子量和存在的可用反应基团 (通常为 ϵ 氨基) 的数目来确定。关于分子量,通常,使用的聚合物的分子量越高,可以连接到该蛋白质上的聚合物分子的数目越少。类似地,当优化这些参数时应当考虑聚合物的分支。通常,分子量越高 (或者分支越多),聚合物:蛋白质比例越高。本发明涉及几种不同的线性 PEG 聚合物长度,包括但不限于 5kDa 和 20kDa,双臂分支的 PEG 聚合物的偶联物,包括但不限于 10kDa 和 40kDa。在一些实施方案中,对于此处预想的聚乙二醇化反应,平均分子量是大约 2kDa 至大约 100kDa (术语“大约”是指 ± 1 kDa)。在其它实施方案中,平均分子量是大约 5kDa 至大约 40kDa。水溶性聚合物

与 PAL 的比例范围通常是从单 PEG 的 1 : 1 至二 PEG 的 2 : 1, 等等。

[0199] 实施例 6 至 8 描述了在 12 天的时期中, 来自圆红冬孢酵母的赖氨酸突变体 R91KPAL 的聚乙二醇化和非聚乙二醇化形式、蓝细菌点形念珠藻产生的 PAL (NpPAL) 和蓝细菌多变鱼腥藻产生的 PAL (AvPAL) 对 ENU2 或 BTBR^{enu2} 小鼠中的苯丙氨酸水平的影响。该动物模型在苯丙氨酸羟化酶 (PAH) 基因座处是纯合突变体, 产生具有严重高苯丙氨酸血症的动物。因此, 高血浆苯丙氨酸 (Phe) 水平使该动物成为用于评价苯丙氨酸氨裂合酶 (PAL) 降低血浆 Phe 的能力的合适的模型。也在 12 天的时期中评价赖氨酸突变体 R91K PAL 和 NpPAL 的聚乙二醇化和非聚乙二醇化形式对该 PKU 动物模型中苯丙氨酸水平的影响。这些结果表明, 分别与非聚乙二醇化的 NpPAL 和 AvPAL 相比, NpPAL 和 AvPAL 的聚乙二醇化形式在 PKU 动物模型中导致苯丙氨酸降低的更多。此外, 聚乙二醇化的 NpPAL 使升高的苯丙氨酸水平降低的效应维持 10 周的一段时间。这些研究表明, 来自蓝细菌点形念珠藻和多变鱼腥藻的 PAL 的聚乙二醇化是降低 PKU 小鼠中苯丙氨酸水平的关键。该发现提示, 细菌 PAL 的聚乙二醇化变体可以作为控制 PKU 的有效治疗剂。

[0200] 本发明涉及免疫原性降低的聚乙二醇化的 PAL 变体。一个实施方案是免疫原性降低的点形念珠藻 PAL (NpPAL) 变体的聚乙二醇化形式。另一个实施方案是免疫原性降低的多变鱼腥藻 PAL (AvPAL) 变体的聚乙二醇化形式。特定实施方案涉及 NpPAL 或 AvPAL 变体, 其中通过 NpPAL 或 AvPAL 变体与水溶性聚合物例如聚乙二醇 (PEG) 反应实现聚乙二醇化。在一些实施方案中, 通过 NpPAL 或 AvPAL 变体与 PEG 以至少 1 : 1、至少 1 : 1.5、至少 1 : 2、至少 1 : 3 或至少 1 : 4 的 PAL : PEG 比例反应一次实现聚乙二醇化。在一个实施方案中, PAL 变体是 AvPAL 变体, 使用 1 : 3 的 PAL : PEG 比例实现聚乙二醇化。制备本发明的聚乙二醇化 PAL 变体的方法在上文描述。

[0201] 本发明还涉及为了降低免疫原性, 将聚乙二醇化的 PAL 变体再聚乙二醇化。在一些实施方案中, 通过 NpPAL 或 AvPAL 变体与 PEG 反应两次或多次实现聚乙二醇化, 每次聚乙二醇化的 PAL : PEG 比例为至少 1 : 1、至少 1 : 1.5、至少 1 : 2、至少 1 : 3 或至少 1 : 4。在一些实施方案中, 通过 NpPAL 或 AvPAL 变体与 PEG 反应两次、三次、四次、五次或更多次实现聚乙二醇化, 每次聚乙二醇化的 PAL : PEG 比例为至少 1 : 1、至少 1 : 1.5、至少 1 : 2、至少 1 : 3 或至少 1 : 4。在另一个实施方案中, PAL 变体是 AvPAL 变体, 并且第一次和第二次聚乙二醇化反应都使用 1 : 3 的 PAL : PEG 比例实现聚乙二醇化。

[0202] 制备本发明的再聚乙二醇化 PAL 变体的方法通常包括以下步骤: (a) 在允许 PAL 变体连接一个或多个 PEG 基团上的条件下使 PAL 变体与聚乙二醇反应, (b) 获得反应产物, (c) 在允许聚乙二醇化 PAL 变体连接到未被步骤 (a) 中的 PEG 占据的位置处的一个或多个 PEG 基团上的条件下, 使聚乙二醇化的 PAL 变体与聚乙二醇反应, 和 (d) 获得反应产物。因为 PAL 修饰的具体位点可能显著改变 PAL 变体的固有活性, 使用不同类型和量的 PEG。用于 PAL 聚乙二醇化的化学方法是使用甲氧基-PEG 的 NHS-酯 (O-[(N-琥珀酰亚胺基氧羰基)-甲基]-O'-甲基聚乙二醇) 对 PAL 的伯胺的酰化。使用甲氧基-PEG-NHS 或甲氧基-PEG-SPA 的酰化产生了酰胺键, 该酰胺键消除了原来伯胺上的电荷。

[0203] G. 选择和筛选试验

[0204] 为了产生和筛选活性 PAL 或 HAL 变体, 最初的突变体克隆表达可以使用任何已知的载体表达系统, 如 His- 标签载体表达系统, 以利于用于蛋白质变体分离的高通量金属螯

合物纯化步骤。可以使用三阶段筛选系统鉴定有利的蛋白质变体。最初的阳性克隆鉴定可以使用转化和对于在苯丙氨酸营养缺陷型大肠杆菌菌株中生长的选择。第二轮筛选可以采用适合高通量处理的 OD290 吸光度测量 (Hodgins, Biochem. Biophys. Res. Commun., 32 : 246-253 (1968))。最后,可以利用对蛋白水解抗性 (采用在蛋白酶混合物存在下的温育) 或免疫原性降低 (采用竞争性 ELISA 检测) 的筛选鉴定有利的蛋白质变体。

[0205] H. 优化的 PAL 蛋白的治疗应用和施用

[0206] 1. 高苯丙氨酸血症 (HPA) 的各种形式

[0207] 本发明涉及对多种 HPA 患者群体的治疗,使用的方法包括单独使用或与其它治疗方案联合使用 PAL 组合物,用于控制 HPA 和 / 或 PKU。特别是,预期可以使用 PAL 组合物治疗苯丙氨酸浓度低到一般不使用饮食干预的患者群体 (即,轻度 HPA 患者)、中度 PKU 患者、经典或严重 PKU 患者,和它们的任何亚群。适合用 PAL 组合物治疗以改善轻度 HPA 的这些患者包括血清浓度小于 $200\text{ }\mu\text{M}$ 的孕妇和婴儿。各种患者群体和他们的不同的治疗需要,在本部分中进一步详细描述。

[0208] 本发明的某些实施方案涉及通过给个体联合施用蛋白质限制性饮食和含有 PAL 或其生物活性变体、突变体或片段的组合物治疗经典严重 PKU,其中与不进行所述联合施用时的所述浓度相比,蛋白质限制性饮食和 PAL 的联合施用对降低所述个体血浆中的苯丙氨酸浓度是有效的。另外,本发明还涉及治疗患有 HPA 的孕妇,包括给该女性联合施用蛋白质限制性饮食和 PAL 或其生物活性衍生物,与不进行所述联合施用时的所述浓度相比,蛋白质限制性饮食和 PAL 的联合施用对降低所述孕妇血浆中的苯丙氨酸浓度是有效的。在特定实施方案中,治疗预期用于 Phe 水平显示大于 $420\text{ }\mu\text{M}$ 的患者。

[0209] 本发明的其它实施方案需要给在施用 PAL 之前血浆 Phe 浓度大于 $180\text{ }\mu\text{M}$ 的患有 HPA 的任何个体施用有效导致该患者血浆 Phe 浓度降低的量的 PAL 组合物。本发明的方法可用于使用本文所述的 PAL 组合物治疗以 Phe 浓度升高大于 $300\text{ }\mu\text{M}$ 为特征的患有 PKU 的婴儿。“婴儿”在本申请中是指年龄在 0 至大约 36 个月之间的患者。

[0210] 严重经典 PKU 的特征及其治疗方法

[0211] 严重 PKU 表现为血浆 Phe 浓度大于 $1200\text{ }\mu\text{M}$,并且发现可高达 $4800\text{ }\mu\text{M}$ 。患有该疾病的患者必须用不含 Phe 的饮食治疗,以使其血浆 Phe 浓度降至临床上可接受的水平 (一般小于 $600\text{ }\mu\text{M}$ 或小于 $300\text{ }\mu\text{M}$)。这些患者每天只能耐受最大 250-350mg 的饮食 (Spaapen 等人, Mol. Genet. Metab. 78 :93-99 (2003))。这样,这些患者在出生后 7-10 天开始使用 Phe- 限制性制品,并且在其一生中受到饮食限制。任何减轻拖累这些个体的严格饮食限制都将是有益的。

[0212] 用于诊断经典 Phe 的个体的试验在下面进一步详述。这些试验揭示了经典严重 PKU 患者需要低苯丙氨酸饮食 (Lucke 等人, Pediatr. Neurol. 28 :228-230 (2003))。因此,预期本发明的方法将需要通过监测个体的血浆 Phe 浓度来确定该患者患有经典 PKU。然后通过单独施用原核生物 PAL 组合物或者低蛋白质饮食和 PAL 的联合方案治疗该患者,使得患者的血浆 Phe 浓度至少降低 25%。在一些实施方案中,该方法使血浆 Phe 浓度降低 30%。在其它实施方案中,该方法使将产生个体血浆 Phe 浓度降低 40%、50%、60%、70%、80%、90% 或更多 (例如,在患有严重经典 PKU 的患者的 Phe 浓度为 $4800\text{ }\mu\text{M}$ 时,90% 的 Phe 浓度降低将产生 $480\text{ }\mu\text{M}$ 的血浆 Phe 浓度,该浓度足够低,需要极少的饮食限制)。当然,应当理

解本发明的治疗方法（无论是用于治疗严重经典 PKU 还是本文所述的其它任何 HPA）应当试图将患者的血浆 Phe 浓度尽可能地降低至接近大约 $120\ \mu\text{M}$ 至大约 $360\ \mu\text{M} \pm 15\ \mu\text{M}$ 范围的水平，或降至大约 $120\ \mu\text{M}$ 至大约 $240\ \mu\text{M}$ 的最佳范围。

[0213] 在一些实施方案中，所治疗的经典 PKU 患者的血浆 Phe 浓度从大于 $1000\ \mu\text{M}$ 的非限制血浆 Phe 浓度的任意量降至低于 $600\ \mu\text{M}$ 的任一血浆 Phe 水平。当然，即使 PAL 治疗与蛋白质限制性饮食联合产生较低的血浆 Phe 浓度降低，例如，降至 $800\ \mu\text{M}$ 至大约 $1200\ \mu\text{M}$ 之间的水平，这也被看作临床上有用的治疗结果，因为血浆 Phe 浓度在该范围的患者可以通过简单地限制饮食中蛋白质的量来控制其疾病，而不是食用限制 Phe 的制品，从而明显改善个体生活质量，并使患者对饮食限制的顺应性更高。

[0214] 如果治疗使得患者可以耐受的饮食 Phe 水平可以任意增加，则被认为是治疗有效的结果。例如，预期作为进行 PAL 治疗的结果，患者将能够使其饮食 Phe 摄入量从 $250\text{--}350\text{mg/天}$ 提高到 $350\text{--}400\text{mg/天}$ （即，该患者的 Phe 耐受表型从经典 PKU 患者改变为中度 PKU 患者）。当然，希望本文公开的治疗性干预允许患者使其饮食 Phe 摄入量从 $250\text{--}350\text{mg/天}$ 提高到大于 $400\text{--}600\text{mg Phe/天}$ （即，该患者的 Phe 耐受表型从经典 PKU 患者改变为轻度 PKU 患者），或者在某些情况下，使患者的摄入量大于 600mg Phe/天 （即，正常饮食摄入量）。

[0215] BH4- 非应答性 PKU 患者的特征及其治疗方法

[0216] 可以用本发明的方法治疗的第二组患者是经测定具有升高的血浆 Phe 浓度，即，大于 $200\ \mu\text{M}$ 的任何浓度，但是已经诊断为对 BH4 治疗为非应答性（通过以下所述的 BH4 负荷试验确定）的个体。这些患者可以包括患有轻度 PKU（即，血浆 Phe 浓度最高达 $600\ \mu\text{M}$ ）的个体、患有中度 PKU（即，血浆 Phe 浓度介于 $600\ \mu\text{M}$ 至大约 $1200\ \mu\text{M}$ 之间）的个体，以及患有经典严重 PKU（即，血浆 Phe 浓度大于 $1200\ \mu\text{M}$ ）的患者。

[0217] 向 BH4 治疗非应答性患者联合给予 PAL 和蛋白质的量减少的饮食，以降低该患者的血浆 Phe 浓度。本发明的方法使得，与不使用 PAL 治疗的情况下使用相同饮食方案导致的血浆 Phe 浓度降低相比，施用 PAL 导致患者血浆 Phe 浓度降低更多。饮食限制可以通过提供具有减量的 Phe 的合成医用蛋白质制品限制 Phe 摄入量的饮食，或者饮食限制可以只要求患者限制其蛋白质总摄入量，而允许患者吃限制量的正常食品。

[0218] 对于经典 PKU 患者讨论的治疗结果引入本部分作为参考。患有中度 PKU 的患者（即，具有 $600\ \mu\text{M}$ 至 $1200\ \mu\text{M}$ 的非限制血浆 Phe 浓度的患者）的治疗结果包括患者的血浆 Phe 浓度至少降低 25%。在一些实施方案中，该方法将使血浆 Phe 浓度降低 30%。在其它实施方案中，该方法将使个体血浆 Phe 浓度降低 40%、50%、60%、70%、80%、90% 或更多（例如，在患有中度经典 PKU 的患者的 Phe 浓度为 $1000\ \mu\text{M}$ 时，90% 的 Phe 浓度降低将产生 $100\ \mu\text{M}$ 的血浆 Phe 浓度，该浓度足够低，而不需要或只需要很少的饮食限制）。

[0219] 在一些实施方案中，所治疗的中度 PKU 患者的血浆 Phe 浓度从 $600\ \mu\text{M}$ 至 $1200\ \mu\text{M}$ 之间的血浆 Phe 浓度的非限制任意量降至低于 $300\ \mu\text{M}$ 的任一血浆 Phe 水平。在一个实施方案中，用 PAL（单独地或与饮食限制联合）治疗产生血浆 Phe 浓度降低，例如，降至 $200\ \mu\text{M}$ 至大约 $400\ \mu\text{M}$ 之间的水平，该水平被看作临床上有用的治疗结果，因为血浆 Phe 浓度在该范围的患者可以通过简单地限制饮食中蛋白质的量来控制其疾病，而不是食用限制 Phe 的制品。实际上，许多研究教导这些患者甚至可以食用正常的饮食。

[0220] 如果治疗使患者可以耐受的饮食 Phe 水平能够任意增加,则被认为是治疗有效的结果。例如,预期作为进行 PAL 治疗(单独地或与其它治疗性干预联合)的结果,患者将能够使其饮食 Phe 摄入量从 350-400mg/天提高到 400-600mg/天(即,该患者的 Phe 耐受表型从中度 PKU 患者改变为轻度 PKU 患者)。当然,希望本文公开的治疗性干预允许患者使其饮食 Phe 摄入量从 350-400mg/天提高到大于 600mg Phe/天(即,正常饮食摄入量)。

[0221] 即使所治疗的患者只表现为轻度 PKU,即,具有 400-600mg Phe 摄入量/天的饮食容许量,他也将受益于本发明的基于 PAL 的治疗,因为希望产生尽可能地接近 $360\mu\text{M} \pm 15\mu\text{M}$ 的正常血浆 Phe 浓度。对于这些患者,有利的治疗结果将包括患者血浆 Phe 浓度至少降低 25%。在一个实施方案中,该方法使血浆 Phe 浓度降低 30%。另一个实施方案中,该方法使个体血浆 Phe 浓度降低 40%、50%、60%或更多(例如,在患有中度经典 PKU 的患者的 Phe 浓度为 $600\mu\text{M}$ 时,60%的 Phe 浓度降低将产生 $360\mu\text{M}$ 的血浆 Phe 浓度,即可接受的正常血浆 Phe 浓度)。

[0222] 在一些实施方案中,所治疗的轻度 PKU 患者的血浆 Phe 浓度从 $400\mu\text{M}$ 至 $600\mu\text{M}$ 之间的血浆 Phe 浓度的非限制任意量降至低于 $100\mu\text{M}$ 的任一血浆 Phe 水平。当然,即使 PAL 治疗(单独地或与饮食限制联合)使血浆 Phe 浓度降低的不那么显著,例如,降至 $200\mu\text{M}$ 至大约 $400\mu\text{M}$ 之间的水平,这也被看作临床上有用的治疗结果。

[0223] 如果治疗使得患者可以耐受的饮食 Phe 水平可以任意增加,则被认为是治疗有效的结果。例如,预期作为进行 PAL 治疗(单独地或与其它治疗性干预联合)的结果,患者将能够从 400-600mg/天提高其饮食 Phe 摄入量(即,该患者的 Phe 耐受表型从轻度 PKU 患者改变为轻度 HPA 患者),以使该患者具有大于 600mg Phe/天的摄入量(即,正常饮食摄入量)。

[0224] 此外,即使患者只表现为非 PKU HPA 的症状,即,具有最高 $600\mu\text{M}$ 的升高的血浆 Phe 浓度,但是允许食用正常的蛋白质饮食,他也将受益于本发明的 PAL 治疗,因为已经证明升高的 Phe 浓度对这些个体的 IQ 具有显著的效果。而且,如下文所述,对具有特殊需要的个体例如孕妇和婴儿的 PAL 治疗性干预是特别重要的,如果该患者的血浆 Phe 水平在被认为是“安全的”低于 $200\mu\text{M}$ 的水平之内的话。

[0225] 母源性 PKU 及其治疗方法

[0226] 计划受孕和已经怀孕的 PKU 女性中血浆 Phe 水平的代谢控制是重要的,因为无论胎儿的 PAH 状态如何,在子宫内即使暴露于中度升高的 Phe 水平也会对胎儿造成严重的后果。血浆 Phe 浓度的治疗性控制在第一个妊娠期特别重要,因为如果不能充分控制将会导致包括小头畸形、心理缺陷和先天性心脏病等疾病。

[0227] 例如,关于苯丙酮尿症的 NIH Consensus Statement(vol 17#3,2000 年 10 月)报道,胎儿暴露于 3-10mg/dL 的母亲 Phe 水平产生 24%的小头畸形发病率,而暴露于大于 20mg/dL(即,大于 $1200\mu\text{M}$)具有 73%的小头畸形发病率。同样,在暴露于大于 20mg/dL 的母亲 Phe 水平的儿童中有超过 10%发现先天性心脏病。重要的是,已经注意到大于 6mg/dL 的 Phe 水平显著降低儿童的 IQ。因此,必须确保患有各种形式苯丙酮尿症的女性(甚至表现最轻度 HPA 的女性)的血浆 Phe 浓度必须严格控制,以避免母源性 PKU 综合征的风险。但是,已经在美国诊所使用的、PKU 女性可接受的目标血浆 Phe 浓度水平是在 10mg/dL 至 15mg/dL 的范围内,这大大高于为孕妇推荐的 2-6mg/dL 水平或在英国和德国诊所用来减

少发生母源性 PKU 综合征的风险的 1-4mg/dL。

[0228] 对于孕妇,另一个重要的考虑因素是她们的蛋白质总摄入量。在怀孕期间,女性食用足够的蛋白质是重要的,因为在怀孕期间建议低蛋白质饮食将导致肾发育延迟和随后肾单位数的减少,并且可能在成年期导致高血压 (D' Agostino, N. Engl. J. Med. 348(17)1723-1724, (2003))。下表提供了对各种个体的推荐饮食蛋白质总摄入量的示例性指导。

[0229] 表 1 :美国饮食蛋白质要求指导

[0230]

	年龄	推荐蛋白质总摄入量 (g)
婴儿	6 个月或以下	13
	6 个月 -1 岁	14
	1-3 岁	16
儿童	4-6 岁	24
	7-10 岁	28
	11-14 岁	45
男性	15-18 岁	59
	19-24 岁	58
	25-50 岁	63
	51+	63
	11-14 岁	46
女性	15-18 岁	44
	19-24 岁	46
	25-50 岁	50
	51+	50
	怀孕	60
哺乳		65

[0231] 从以上的示例性指导中可以看出,在美国,为育龄期女性(例如,小于 51 岁)推荐的蛋白质摄入量为大约 44-50g/天,而孕妇需要大约 60g/天的推荐摄入量。在加拿大和英

国,为孕妇推荐的蛋白质摄入量在大约 70g/天和 52g/天的数量级中。因此,这组 PKU 患者比年龄相当的非妊娠 PKU 女性需要更多的蛋白质这一事实使得确保孕妇的血浆 Phe 浓度水平被紧密控制的需要进一步复杂化。

[0232] 鉴于以上所述,预期本发明的 PAL 治疗对孕妇将特别有用。预期已怀孕或打算怀孕的患有任何 HPA 形式的女性将置于 PAL 治疗过程中,以确保她的血浆 Phe 浓度水平保持在尽可能地接近 180 μ M 至大约 360 μ M。这种治疗过程将使该女性能够提高她的正常蛋白质摄入水平。

[0233] 本文前面所述的关于血浆 Phe 浓度水平和这种 Phe 浓度应当降至的程度的讨论,引入关于孕妇的本部分中。

[0234] 控制婴儿中的 PKU 及其治疗方法

[0235] 如本文全文所述,已经确定了婴儿(年龄为 0-3 岁)中血浆 Phe 浓度的升高导致儿童的 IQ 显著下降。但是,如说明书其它部分已经描述的,血浆 Phe 浓度升高可达 400 μ M 的患者一般不接受任何饮食干预。因此,现有治疗对 0-3 岁的婴儿有显著不良影响。本申请涉及用含有 PAL 的治疗性组合物治疗具有大于 360 μ M $\pm$ 15 μ M 的非限制血浆 Phe 浓度的任何婴儿,以使个体血浆 Phe 浓度有益地降低。

[0236] 在一些实施方案中,婴儿为 0-3 岁并且在 PAL 施用之前具有大约 1200 μ M 的非限制的血浆 Phe 浓度,并且所述施用降低血浆 Phe 浓度。在一个实施方案中,施用后血浆 Phe 浓度从大于 1800 降至大约 1500 μ M、大约 1200 μ M、大约 1100 μ M、大约 1000 μ M、大约 900 μ M、大约 800 μ M、大约 700 μ M、大约 600 μ M、大约 550 μ M、大约 500 μ M、大约 450 μ M、大约 400 μ M、大约 350 μ M、大约 300 μ M、大约 275 μ M、大约 250 μ M。在其它实施方案中,婴儿为 0-3 岁并且具有大于 1200 μ M 的非限制的血浆 Phe 浓度,在单独施用或与饮食联合施用 PAL 后,该血浆 Phe 浓度降至大约 800 μ M、大约 500 μ M 或大约 360 μ M。本领域技术人员应当理解,本发明涉及用 PAL 治疗具有大于 360 μ M 的非限制血浆 Phe 浓度的婴儿,以产生这种血浆 Phe 浓度的降低。上文中关于血浆 Phe 浓度治疗性降低的讨论引入本部分作为参考。此外,使初始非限制血浆 Phe 浓度降低超过 10% 的任何降低将被认为是婴儿治疗方案的治疗结果。应当理解,PAL 治疗可以与饮食限制联合使用,以实现这些婴儿的血浆 Phe 浓度的治疗性降低。

[0237] 表 2 列出了几个疾病状况,其中施用治疗有效量的 PAL 将是有益的。肠胃外、口服或其它标准给药途径和剂量可以使用标准方法加以确定。

[0238] 表 2 :适合 PAL 蛋白质治疗的示例性疾病状况

[0239]

苯丙酮尿症
高苯丙氨酸血症
酪氨酸血症
癌症

[0240] 2. 用于治疗组合物

[0241] 本发明涉及 PKLVHPA 的治疗性干预。这种干预最初基于 PAL 的使用,它可以单独

使用或与饮食限制联合使用。此外, PAL 和 / 或饮食限制还可以与其他治疗组合物联合, 所述组合物设计成用于例如对抗 PKU 的其它表现, 例如大的中性氨基酸以阻止 Phe 在脑中的积累 (参见 Koch 等人, Mol. Genet. Metabol. 79 :110-113 (2003)), 或联合补充酪氨酸。本部分提供了关于可用于本文预期治疗的组合物的讨论。

[0242] PAL 组合物

[0243] 本发明涉及药物组合物, 其包括治疗有效量的本发明的蛋白质或衍生产物组合物以及药学上可接受的稀释剂、稳定剂、防腐剂、增溶剂、乳化剂、佐剂和 / 或载体。这种药物组合物包含各种缓冲液内容物 (例如 Tris-HCl、磷酸盐)、pH 和离子强度的稀释剂; 添加剂如去污剂和增溶剂 (例如聚山梨醇酯 20、聚山梨醇酯 80), 抗氧化剂 (例如抗坏血酸、焦亚硫酸钠), 防腐剂 (例如 Thimerosal、苯甲醇) 和填充物 (例如乳糖、甘露醇); 参见, 例如, Remington's Pharmaceutical Sciences, 第 18 版 (1990, Mack Publishing Co., Easton, Pa.) 第 1435 :1712 页, 其在此通过引用并入本文。活性成分的有效量是治疗、预防或诊断有效量, 其可由本领域技术人员考虑如体重、年龄和治疗目标等因素后容易地确定。

[0244] 本发明的 PEG : PAL 组合物也可以包含缓冲剂以维持溶液 pH 在所需范围内。缓冲剂的例子包括乙酸钠、磷酸钠和柠檬酸钠。还可以使用这些缓冲剂的混合物。组合物中有效的缓冲剂量主要取决于使用的具体缓冲液和溶液 pH。例如, 乙酸盐是在 pH 5 时比在 pH 6 时更有效的缓冲液, 所以在 pH 5 时可以比在 pH 6 时使用更少的乙酸盐。在一个实施方案中, 本发明的组合物的 pH 范围是 pH 3.0-7.5。

[0245] 本发明的药物组合物还可以包括等渗调节剂, 以使溶液等渗并且更适合于注射。一个例子是在 0-150mM 浓度范围内的氯化钠。最优选的试剂是在 130-150mM 浓度范围内的氯化钠。

[0246] 如本文使用的, 当涉及 PEG : PAL 偶联物时, 术语“治疗有效量”是指能够降低血清 L- 苯丙氨酸对患者有益的的量。该量将随个体而变化, 并且将取决于多种因素, 包括患者的身体总体状况。用于治疗的 PAL 的量使血清 L- 苯丙氨酸以可接受的速率降低, 并且使该值保持在有益的水平上 (通常至少大约 30%, 一般在 10% 至 50% 的范围内)。本发明的组合物的治疗有效量可以由本领域技术人员利用公开获得的材料和程序容易地确定。

[0247] 本发明提供比天然 PAL 频率更低地施用 PEG : PAL 偶联物。给药频率将根据接受治疗的疾病而改变, 但通常是约每周一次。应理解实际使用的给药频率可能与本文公开的频率略微不同, 这是由于不同个体对 PEG : PAL 偶联物的应答存在差异; 术语“约”旨在反映这种差异。

[0248] 因此本发明可用于降低血清 L- 苯丙氨酸水平。最常见的, 血清 L- 苯丙氨酸水平由于高苯丙氨酸血症而升高。在可用本发明治疗的疾病中包括与苯丙酮尿症相关的高苯丙氨酸血症。可以治疗可能导致血清 L- 酪氨酸水平升高 (如在酪氨酸血症中所见) 的疾病。另外, 对于许多癌症相关疾病, 降低血清 L- 苯丙氨酸和 / 或血清 L- 酪氨酸水平是有益的, 也可以用本发明的 PEG : PAL 偶联物进行治疗。

[0249] 在一个实施方案中, 根据本发明制备的 PEG : PAL 偶联物通过肠胃外、皮下或肌肉内注射施用。但是, 本领域技术人员应清楚其他递送途径也可有效用于本发明的组合物。

[0250] 本文描述的方法使用药物组合物, 其包含如上所述的分子, 以及一种或多种药学上可接受的赋形剂或运载体, 和任选的其他治疗和 / 或预防成分。这类赋形剂包括液体

诸如水、盐水、甘油、聚乙二醇、透明质酸、乙醇、环糊精、修饰的环糊精（即磺丁基乙醚环糊精）等等。用于非液体制剂的合适赋形剂也是本领域技术人员已知的。

[0251] 药学上可接受的盐可用于本发明的组合物，包括例如无机酸盐如盐酸盐、氢溴酸盐、磷酸盐、硫酸盐等等；和有机酸盐如乙酸盐、丙酸盐、丙二酸盐、苯甲酸盐等等。关于药学上可接受赋形剂和盐的深入讨论可以获自 Remington' s Pharmaceutical Sciences, 第18版 (Easton, Pennsylvania :MackPublishing Company, 1990)。

[0252] 此外，这类运载体中还可以存在辅助物，如湿润剂或乳化剂、生物缓冲剂、表面活性剂等等。生物缓冲剂实际上可以是任意溶液，其是药理学上可接受的，并为制剂提供所需 pH，即生理可接受范围内的 pH。缓冲液的实例包括盐水、磷酸缓冲盐溶液、Tris 缓冲盐溶液、Hank' s 缓冲盐溶液等等。

[0253] 取决于预期施用方式，药物组合物可以采用固体形式、半固体或液体剂型，例如片剂、栓剂、丸剂、胶囊、粉剂、液体、悬浮剂、乳剂、软膏、洗剂等等，在一些实施方案中，采用适于精确剂量单次施用的单位剂型。所述组合物将包括有效量的选择的药物以及药学上可接受的载体，此外，可以包括其他药剂、佐剂、稀释剂、缓冲液等等。

[0254] 通常，本发明的化合物或偶联物将作为药物制剂施用，包括那些适于口服（包括口腔和舌下）、直肠、鼻、局部、肺部、阴道或肠胃外（包括肌内、动脉内、鞘内、皮下和静脉内）施用或采用适于通过吸入或吹入施用的制剂。一种示例性的施用方式是使用方便的每日静脉内给药方案，其可以根据患病程度进行调整。

[0255] 对于固体组合物来说，常规的无毒固体载体包括例如药物级的甘露醇、乳糖、淀粉、硬脂酸镁、糖精钠、滑石、纤维素、葡萄糖、蔗糖、碳酸镁等等。药学上可施用的液体组合物可以例如通过将本文描述的活性化合物或偶联物和可选的药物佐剂在赋形剂（如水、盐水、水性葡萄糖、甘油、乙醇等等）中溶解、分散等等，从而形成溶液或悬液来制备。如果需要，待施用的药物组合物还可以包含微量的无毒辅助物如湿润剂或乳化剂、pH 缓冲剂、增强剂 (tonicifying agents) 等等，例如乙酸钠、脱水山梨醇单月桂酸酯、三乙醇胺乙酸钠、油酸三乙醇胺酯等等。制备这类剂型的实际方法对本领域技术人员来说是已知的，或对他们来说是显而易见的；例如，参见上文引用的 Remington' s Pharmaceutical Sciences。

[0256] 对于口服施用来说，组合物通常采用片剂、胶囊或软胶囊的形式，或可以是水性或非水性溶液、悬液或糖浆。片剂和胶囊是优选的口服给药形式。用于口服使用的片剂和胶囊通常包括一种或多种常用的载体诸如乳糖和玉米淀粉。通常还添加润滑剂，诸如硬脂酸镁。当使用液体悬液时，活性剂可以与乳化剂和悬浮剂组合。如果需要，还可以添加调味剂、着色剂和 / 或甜味剂。用于掺入本文口服制剂的其他可选组分包括但不限于防腐剂、悬浮剂、增稠剂等等。

[0257] 肠胃外制剂可以制备为常规形式，作为液体溶液或悬液，适于注射前在液体中溶解或悬浮的固体形式，或作为乳液。在一个实施方案中，利用合适的载体、分散剂或湿润剂和悬浮剂，根据本领域已知的技术配制注射用无菌悬液。注射用无菌制剂还可以是溶于无毒肠胃外可接受稀释剂或溶剂的注射用无菌溶液或悬液。可使用的可接受的赋形剂和溶剂包括水、林格氏溶液和等渗氯化钠溶液。此外，无菌、非挥发油、脂肪酯或多元醇通常被用作溶剂或悬浮介质。此外，肠胃外给药可以包括使用缓释或持续释放系统，以维持剂量的恒定水平。

[0258] 可以给患者施用治疗有效剂量的上述 PEG : PAL 偶联物以治疗或缓解心血管疾病。在细胞培养物或实验动物中通过标准药理学方法可以测定这种偶联物的毒性和治疗效果,例如通过测定 LD₅₀ (50%群体的致死剂量) 和 ED₅₀ (50%群体的治疗有效剂量)。毒性和治疗效果的剂量比例是疗效指数,其可以表示为 LD₅₀/ED₅₀ 的比例。在一些实施方案中使用显示高疗效指数的偶联物。

[0259] 从细胞培养物分析和动物研究中获得的数据可用于配制给人使用的剂量范围。在一些实施方案中,剂量处于循环浓度范围内,其包括具有最低或者最小毒性的 ED₅₀。该剂量可以在该范围内变化,这取决于使用的剂型和使用的给药途径。可以从细胞培养物分析和动物模型确定治疗有效的剂量。

[0260] 饮食蛋白质

[0261] 除了给 HPA/PKU 患者施用 PAL 和相关的类似物外,还预期可以限制或改变患者的饮食蛋白质。本领域技术人员清楚用于治疗 PKU 的各种商品化供应的蛋白质制品。这类制品包括 MAXIMAID、PHENEX 1、PHENEX2 (Ross Laboratories, Liverpool, UK)、LOFENALAC、PHENYL-FREE (Mead-Johnson) 等等。

[0262] 本领域技术人员可以使用提到的蛋白质制品,其通常不含 Phe 浓度。所述蛋白质制品中经常添加 PKU 患者缺乏的氨基酸。这些氨基酸包括例如 L- 酪氨酸和 L- 谷氨酰胺。已经提出,可能希望向 PKU 患者的饮食中补充缬氨酸异亮氨酸和亮氨酸 (参见美国专利 4, 252, 822)。在某些临床表现中, PKU 的毒性作用是由 Phe 阻断脑摄取其它氨基酸如酪氨酸和色氨酸而引起的。已经发现向 PKU 患者的饮食中补充过量的这些大中性氨基酸阻断了 Phe 向脑中的摄取并且降低了脑 Phe 水平。因此,预期对于本发明的方法而言,饮食方案可以进一步补充含有一种或多种这些氨基酸的组合物 (Koch 等人, Mol. Genet. Metabol. 79 : 110-113 (2003))。

[0263] 此外,除了蛋白质限制外,众所周知还应提供 L- 肉碱和牛磺酸 (通常发现于人乳和动物来源的其他食品)。在一些实施方案中, L- 肉碱可以作为 20mg/100g 的蛋白补充剂提供,牛磺酸可以作为 40mg/100g 的蛋白质补充剂提供,以帮助提供这些因子通常存在于人乳和动物来源食品中的量。

[0264] 此外,本领域技术人员可以查阅 2000 年国家科学院 - 国家研究委员会饮食参考摄入量 (2000 National Academy of Sciences - National Research Council Dietary Reference Intakes) 关于其他组分的进一步列表,如必需维生素和矿物质,这些应提供给患者以确保除了饮食蛋白质限制外提供其他补充剂。

[0265] 根据上文关于总蛋白质量和优选血浆 Phe 浓度的讨论,本领域技术人员将能确定需要的饮食蛋白质限制的量,进而相应地调节患者的饮食。例如,大约 11-14 岁的男性应当接受 45g 蛋白质 / 天。在个体患有严重经典 PKU 时,其非限制的 plasma Phe 浓度可能大于 1200 μ M, 并且该个体的饮食蛋白质来源的大部分 (如果不是全部的话) 可能来自于粉末蛋白质补充物,该补充物可使其 plasma Phe 浓度降至小于 600 μ M。通过对该个体施用 PAL, 治疗结果将是产生患者 plasma Phe 浓度的更大的降低,或者,治疗结果是个体的 plasma Phe 浓度降至相似的程度,但是个体能够耐受来自正常饮食而不是饮食制品的蛋白质。

[0266] 类似地,对于患有中度 PKU 的大约 11-14 岁的男性,可以使用本发明的方法通过正常蛋白质摄取而不是通过限制制品,分批给予 45g 蛋白质 / 天。确定本发明的方法是否有

效将需要定期确定患者的血浆 Phe 浓度,以确保血浆 Phe 浓度保持低于至少 400 μ M。确定这种浓度的试验在下文描述。在一些实施方案中,达到小于或大约 360 μ M 的浓度。

[0267] 3. 鉴定和监测患者群体

[0268] 如本文自始至终所讨论的,在本发明的各种实施方案中需要确定具体患者是否对 PAL 治疗产生应答,并在开始鉴定所治疗的 PKU 患者类别和治疗方案进行期间确定患者的苯丙氨酸浓度,以监测所述方案的效果。示例性的这类方法在下文描述。

[0269] BH4 负荷试验

[0270] BH4 负荷试验允许区别 BH4 缺乏导致的 HPA 或由于 PAH 缺乏导致的 HPA 的患者。

[0271] 最简单的 BH4 负荷试验是施用外源 BH4,并确定这种施用对血浆 Phe 浓度降低的影响。静脉内加载 2mg/kg BH4 最早由 Danks 等人, Lancet 1:1236 (1976) 提出,由于已经可以获得更高纯度的 BH4,因此能够利用口服大约 2.5mg/kg 体重的量的 BH4 进行该试验。最后,标准化的方法由 Niederwieser 等人提出,在该方法中施用 7.5mg/kg 单口服剂量的 BH4 (Niederwieser 等人, Eur. J. Pediatr. 138:441 (1982)), 尽管有些实验室仍然使用 20mg BH4/kg 体重以上的量。

[0272] 为了使简单的 BH4 负荷试验产生可行的结果,患者的血液 Phe 水平需要高于 400 μ M。因此,在进行负荷试验前该患者通常不进行 PKU 饮食两天。BH4 检测试剂盒从 Schircks Laboratories 博士 (Jona, Switzerland) 处获得。该试剂盒推荐在摄入正常膳食后大约 30 分钟 20mg BH4/kg 体重的剂量。

[0273] Phe 浓度的测定

[0274] 有大量的方法用于确定血液中 Phe 的存在 (Shaw 等人, Analytical Methods in Phenylketonuria-Clinical Biochemistry, In Bickett 等人. Eds., Phenylketonuria and Some Other Inborn Errors of Amino Acid Metabolism, Stuttgart, Georg Thiem Verlag, 47-56 (1971)。一般来说,使用荧光测定从患者的血清确定苯丙氨酸和酪氨酸浓度。该测定依赖于在亮氨酸丙氨酸存在下苯丙氨酸与茚三酮加热时荧光物质的形成 (McCaman 等人, J. Lab. Clin. Med. 59:885-890 (1962))。

[0275] 最常用的测定 Phe 浓度的方法是 Guthrie 试验,其中从已经用患者的血样饱和的滤纸上穿孔圆盘。均匀的圆盘在已经接种了枯草芽孢杆菌并且含有枯草芽孢杆菌生长的特异性抑制剂的琼脂盘上温育。由于苯丙氨酸从均匀的圆盘上转移到琼脂上, Phe 逆转了细菌生长的抑制,从而产生细菌生长区,通过与使用含有已知 Phe 量的圆盘进行的类似试验相比较,该生长区可能与苯丙氨酸浓度相关。

[0276] 其它定量 Phe 浓度的方法包括 HPLC、质谱法、薄层层析等。这些方法可以用来确定治疗前患者的血浆 Phe 浓度,以及监测治疗方案过程中的 Phe 浓度,以确定其有效性。

[0277] 预期在治疗方案的整个时程中以方便的间隔监测患者的血浆 Phe 水平 (例如,每日、每隔一日或每周)。通过这样定期地监测血浆 Phe 水平,医生将能够评价治疗的效果以及相应地调整 PAL 和 / 或饮食蛋白质的要求。

[0278] 4. 联合治疗

[0279] 本发明的某些方法包括联合使用 PAL 和限制蛋白质饮食,以在患有各种形式的 HPA 的患者中达到治疗结果。为了在本文预期的联合治疗中达到适当的治疗结果,通常可以给个体施用有效产生所需治疗结果 (即,血浆 Phe 浓度的降低和 / 或耐受更大量 Phe/ 蛋白

质摄入而不产生伴随的血浆 Phe 浓度升高的能力) 的组合量的 PAL 组合物和饮食限制。该方法可以包括同时施用 PAL 组合物和饮食蛋白质治疗组合物。这可以通过施用一种组合物或药理学蛋白质制剂而实现,其中包括所有的饮食蛋白质需求并且也包括所述蛋白质制剂内的 PAL。或者,在与 PAL 的药物制剂(片剂、注射剂或饮剂)大约相同的时间使用饮食蛋白质(补充或正常蛋白质膳食)。PAL 也可以配制为蛋白质条或其它适合摄入的食品,如核仁巧克力饼(brownies)、薄烤饼、蛋糕。

[0280] 在其它方案中,PAL 治疗可以在饮食蛋白质治疗之前或之后,其间隔从数分钟到数小时。在蛋白质和 PAL 组合物分开施用的实施方案中,通常要确保在每次递送时间之间,相当一段时间没有到期,使得 PAL 仍然能够对患者发挥有利的作用。在这些情况下,预期将在饮食蛋白质摄入的 2-6 小时内(之前或之后)施用 PAL,只延迟大约 1 小时。在一些实施方案中,预期 PAL 治疗是连续治疗,其中不确定地对患者施用每日 PAL 剂量。在其它情况下,例如对于只有较轻形式的 PKU 和 HPA 的孕妇,可能只继续 PAL 治疗,只要该女性怀孕和/或哺乳。

[0281] 此外,除了仅基于 PAL 递送和饮食蛋白调节的治疗以外,本发明的方法还涉及与第三组合物的联合治疗,该第三组合物特异性针对 HPA 的一个或多个症状。例如,已知 HPA 引起的酪氨酸缺乏导致神经递质多巴胺和血清素的缺乏。因此,在本发明中,预期基于 PAL 和饮食蛋白质的方法可以进一步与 L-多巴、卡比多巴和 5-羟色氨酸神经递质联合,以改正饮食中酪氨酸量降低引起的缺陷。

[0282] 由于 PAL 施用不产生酪氨酸(不同于 PAH 的施用),这种治疗仍将导致酪氨酸是这些患者的必需氨基酸。因此,对于接受 PAL 和 BH4 联合治疗的患者来说,在饮食中补充酪氨酸可能是需要的。

[0283] I. PAL 同源物的筛选和表征

[0284] 本发明的另一方面是用于鉴定能够阻止、改善或降低升高的苯丙氨酸水平的细菌 PAL 的筛选试验,包括使含有升高的苯丙氨酸水平的细菌与细菌 PAL 接触,并确定细菌 PAL 是否降低这种升高的苯丙氨酸水平。在某些实施方案中,该方法是一种高通量分析。在一个实施方案中,对细菌种的完整基因组进行测序,并使用生物信息学方法针对 PAL 同源物的存在进行筛选。在另一个实施方案中,鉴定与 *encP* 具有同源性的基因,并进行相关蛋白质序列的 BLAST 分析,以确定同一性百分比。对于 PAL 活性必需的保守残基的存在,评价这些蛋白质的一级序列比对。所有 HAL 酶的第 83 位(来自恶臭假单胞菌的 HAL)是组氨酸,而在具有 PAL 活性的酶中它是一种脂族氨基酸,例如,亮氨酸或缬氨酸。第 83 位的分析将阐明 HAL 注释的酶是否可能错误标记并且具有实际证明的 PAL 活性。例如,在大多数 HAL 酶中第 413 位是谷氨酰胺(Q),接下来在所有 HAL 酶中在第 414 位是谷氨酸(E)。通过比较,在迄今鉴定的大多数 PAL 酶中,第 414 位是谷氨酰胺(Q),接下来在第 415 位是天冬氨酸(D)或天冬酰胺。通过这种生物信息学方法确定为最有可能错误标记为原核生物 PAL 酶的代表性注释 HAL 酶包括来自球形红杆菌(*Rhodobactersphaeroides*) 2.4.1(ZP 00005404)、来自 *Rubrobacter xylanophilus* DSM9941(ZP 00188602)、来自发光杆状菌 *Laumondii* TT01 亚种(*Photorhabdus luminescens* subsp. *Laumondii* TT01)(NP 930421)、来自腾冲嗜热厌氧杆菌(*Thermoanaerobacter tengcongensis*)(AA051415)的 HAL 酶。

[0285] 在进一步的实施方案中,证实了这些同源物的蛋白质产物的 PAL 催化活性。在另

一个实施方案中,将 PAL 同源物的基因组 PCR 扩增并克隆到 pHIS8 或类似载体中。推断的 PAL 蛋白在大肠杆菌中异源表达为 His⁻ 标记的蛋白质,纯化并测定其 PAL 活性。PAL 活性测定可以包括但不限于,在体外将苯丙氨酸转化为肉桂酸盐的能力,在体外不能将酪氨酸转化为对-香豆酸酯,检测 HAL 活性的试验,和表征该酶的动力学的试验。

[0286] J. 原核生物 PAL 的生成

[0287] 本发明的另一方面是一种生成原核生物 PAL 的方法。在一个实施方案中,重组 PAL 在诸如大肠杆菌 BL21 (DE3) /pLysS (Invitrogen) 的载体中作为 N- 末端八组氨酰标记的融合蛋白过量表达,该载体具有例如可用 IPTG (异丙基-β-D-硫代吡喃半乳糖苷) 诱导的诱导型启动子。在另一个实施方案中,重组 PAL 在不含 N- 末端标签的大肠杆菌 BL21 (DE3) /pLysS 细胞中过量表达。用于生物反应器 / 发酵罐的种子培养物在摇瓶中从甘油贮存物生长。然后将这种种子培养物以补料分批模式加入受控生物反应器中。然后补充葡萄糖,并用碱 (NH₄OH) 调控 pH, 搅拌可达 1200rpm。添加 O₂ 保持大于 20% 的溶解氧。细胞在 30℃ 温度下生长,直至达到 OD₆₀₀ 为 70-100 (约 22-25 小时),然后用 0.4mM IPTG 诱导。使温度降至 22-26℃, 培养直至活性变化 < 0.1IU/ml (大约 40-48 小时, OD600 通常为 200)。细胞培养基通常成分确定,并且由酵母提取蛋白、蛋白胨-胰蛋白胨、葡萄糖、甘油、酪蛋白氨基酸、痕量盐和磷酸缓冲盐组成。重组 PAL 产物在细胞内产生而不分泌。通过连续离心 (Alfa-Laval、Carr、Ceba 或等同设备) 收集细菌。

[0288] K. 原核生物 PAL 的纯化

[0289] 本发明的另一方面描述一种纯化原核生物 PAL 或其生物活性片段、突变体、变体或类似物的方法。根据第一个实施方案,将转化的细胞群培养和裂解,产生粗重组酶。通常将外源性材料与粗制物分离以免弄脏柱子。利用一种或数种层析树脂进行层析纯化。随后,用设计成能在较长时间提供稳定活性的缓冲液配制纯化的蛋白质。在另一优选的实施方案中,纯化细菌 PAL 的方法包括:(a) 利用压力匀浆器裂解包含重组 PAL 的细菌(但还可以通过其他物理方式如玻璃珠裂解);(b) 热处理;(c) 利用第二次连续离心步骤和/或深层过滤净化该裂解物(例如用 Cuono Zeta Plus 或 Maximizer, Pall Filtron, 或 Millipore Millistak 或 Optica 过滤器);(d) 通过木炭过滤步骤(例如用 Millipore Millistak 40AC);(e) 通过最终过滤步骤(例如用 Sartorius Sartopore 0.2 μm 过滤器);(f) 通过丁基疏水相互作用层析(例如用 Tosoh Biosciences 的 Toyopearl Butyl 650M);(g) 通过 Q 离子交换柱(例如用 BioRad 的 Macroprep High Q);和(h) 利用切向流过滤通过缓冲液交换回收终产物(例如用 Sartorius Hydrosart 或 PES 100kDa 膜)。本领域技术人员很容易理解,在本发明范围内层析步骤中的一个或多个可以省略或替换,或层析步骤的顺序可以改变。最终,可以按照要求进行合适的灭菌步骤。

[0290] 现在已经大致描述了本发明,通过参考下列实施例可以更容易地理解本发明。提供这些实施例只是为了说明目的,而不是用于限制本发明的范围。已经尽力确保所使用的数字(例如量、温度等等)的准确性,但一些实验误差和偏差显然应当是允许的。

[0291] 实施例 1

[0292] 点形念珠藻和多变鱼腥藻 PAL 的克隆

[0293] DNA 操作

[0294] 点形念珠藻基因组 DNA 购自 ATCC(29133D), 并使用 5' -C ACTGTCATATGAAT

ATAACATCTCTACAACAGAACAT-3' (SEQ ID NO:12) 和 5' -GACAGTGGCGGCCGCTCACGTTGACTTTAAGCTCGAAAAAATATG-3 (SEQ ID NO:13) PCR 扩增 PAL 基因 (ZP_00105927)。产生的 PCR 产物用 NdeI 和 NotI 消化,将 1.7kb 片段分别连接到有 N-His 标签和没有标签的 pET-28a(+) 和 pET-30a(+) (Novagen) 内。

[0295] 多变鱼腥藻细胞购自 ATCC(29413)。提取基因组 DNA(Qiagen),通过 SOE-PCR 扩增 PAL 基因 (YP_324488) 以除去 NheI 位点。使用引物 1(5' -CACTGTGCTAGCATGAAGACACTATCTCAAGCACAAAG-3) (SEQ IDNO:14) 和引物 2(5' -GGAAATTTCTCCATGATAGCTGGCTTGGTTATCAACA TCAATTAGTGG-3') (SEQ ID NO:15) 扩增核苷酸 1-1190,并使用引物 3(5' -CCACTAATTGATGTTGATAACCAAGCCAGCTATCATGGAGGAAATTTCC-3) (SEQ ID NO:16) 和引物 4(5' -CACTGTGCGGCCGCTTAATGCAAGCAGGTAAGATATCTTG-3) (SEQ ID NO:17) 扩增核苷酸 1142-1771。组合这两个 PCR 产物,以使用引物 1 和 4 扩增全长基因。产生的 PCR 产物用 NheI 消化,用 Klenow(NEB) 平端化,然后用 NotI 消化。将 1.7kb 片段连接到 pET-28a(+) 和 pET-30a(+) (Novagen) 中。

[0296] 细菌菌株和培养条件

[0297] 大肠杆菌 BL21(DE3) 细胞 (Stratagene) 用 pGro7(TaKaRa) 转化,感受态 BL21(DE3)pGro7 细胞通过 Inoue 法准备 (Sambrook 和 Russell, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 第 3 版 (Cold Spring HarborLaboratory Press, Cold Spring Harbor, 2001))。这些细胞用 pET-28-NpPAL 转化,并在 25ml 含有 50mg/L 卡那霉素和 20mg/L 氯霉素的 LB 中 37℃ 培养过夜。将 20 毫升这种培养物接种到 1L 含有卡那霉素、氯霉素和 500mg/L L-阿拉伯糖的 LB 培养基中,并于 37℃ 生长。在 OD600 为 0.6 时,将培养物在冰上冷却。5 分钟后,培养物用 0.3mM IPTG 诱导,并于 20℃ 生长 16 小时。离心收集细胞。

[0298] BL21(DE3)pLysS 细胞 (Stratagene) 用 AvPAL 转化,并且除了不使用阿拉伯糖诱导外,与 NpPAL 相同地培养。

[0299] 实施例 2

[0300] NpPAL 和 AvPAL 的纯化

[0301] 培养物在台式离心机中以 5,000g 离心 20 分钟,并弃去上清液。细胞沉淀物在进一步处理之前一般冷冻于 -70℃。融化后,细胞沉淀物在 TBS(25mM Tris,150mM NaCl, pH 7.8) 中悬浮至大约 80 光密度单位 (600nm)。使细胞在 12-14,000psi 下两次通过 APV 压力匀浆器裂解。然后于 55℃ 热处理粗裂解物 2 小时。裂解物以 10,000g 离心 30 分钟,保留上清液,并使用 0.2 μm 真空滤器 (Corning) 过滤。

[0302] 经序贯通过丁基 650M 柱 (Tosoh BioSciences) 和 MacroPrep High Q 柱 (BioRad),从澄清的裂解物中纯化 PAL。通过 SDS PAGE 和反向 HPLC 确定,洗脱的产物显示高水平的纯度。

[0303] 实施例 3

[0304] 聚乙二醇化 PAL 变体的生成

[0305] 蛋白质的聚乙二醇化

[0306] 聚乙二醇化采用文献方法的改良 (Hershfield 等人, (1991) 同上;美国专利 6,057,292;Lu 等人, Biochemistry 40(44):13288-13301(2001);Nektar Therapeutics, 2003 年目录)。活化的 PEG 包括线性 PEG 琥珀酰亚胺琥珀酸酯 (mPEG-SPA, MW 5kDa 或 MW 20kDa) 和枝化 PEG 羟基琥珀酰亚胺 (mPEG₂-NHS 酯, MW 10kDa 或 MW 40kDa),这两个都在一端

用甲氧基封端,并且可从 Nektar Therapeutics 获得;通常需要实验确定最佳聚乙二醇化的蛋白质(Veronese, F. M. 等人, J. Bioactive Compatible Polymers 12:196-207(1997))。最佳聚乙二醇化条件使用不同的 PAL:PEG 比例(考虑蛋白质的摩尔比以及每个蛋白质单体中的赖氨酸数目)、不同的 pH、不同的缓冲液、不同的温度和温育时间来确定。高 PAL 蛋白质:PEG 衍生化比例是必要的,因为天然 PAL 具有大量的赖氨酸(每个圆红冬孢酵母(Rt)和多变鱼腥藻(Av)单体分别为 29 和 18 个),并且因为未修饰的 PAL 在小鼠中反复注射后显示免疫反应性,并且因为裸(野生型)PAL 在接触蛋白酶后快速灭活。通过在 -20℃ 冷冻终止聚乙二醇化反应,并通过 SDS-PAGE、MALDI-TOF 质谱法、活性评估、蛋白水解敏感性和免疫反应性分析样品。

[0307] 在活性、蛋白水解和免疫评估之前,为了除去过量的未反应的 PEG,使用 Tube-O-透析器(GenoTechnology)在搅拌和 4℃ 下用 pH 8.5 的 0.05M 磷酸钾缓冲液透析反应物过夜。使用 NI 蛋白质测定试剂盒(GenoTechnology)确定蛋白质浓度后,如前所述,使用标准反应条件对未衍生化的和 PEG 衍生化的 PAL 样品进行 PAL 活性测定。在体外表征后,使用 PKU 小鼠模型对最有希望的聚乙二醇化的治疗候选物进行体内试验。

[0308] 表征

[0309] 对于未修饰的蛋白质样品,使用 PAL 在 280nm 的消光系数(对于 RtPAL 和 AvPAL 分别为 0.5 和 0.83mg mL⁻¹cm⁻¹)确定蛋白质浓度,对于聚乙二醇化的蛋白质样品,使用 NI 蛋白质分析(GenoTechnology)计算浓度,包括经处理除去了可能干扰精确蛋白质浓度测定的非蛋白质污染物的样品。

[0310] PEG-PAL 产物使用 MALDI-TOF MS 表征,以确定连接到每个 PAL 单体上的 PEG 分子数,以及使用活性评估和 SDS-PAGE 和非变性凝胶分析来表征,以分别确定活性的保留、完全衍生化和四聚体 PAL 形成没有损失。对于 PAL 和 PEG-PAL 样品, MALDI-TOF 质谱分析需要使用 0.5M 尿素或 0.025M 盐酸胍来改善亚单位解离和种类检测的可再现性。

[0311] PAL 活性测定

[0312] PAL 活性测定使用 Cary 紫外分光光度计(Cary 50)在动力学模式下进行。在室温下(25℃)通过 290nm 处吸光度的增加来监测反式肉桂酸盐的产生,从而分析 PAL 对 L-苯丙氨酸底物的活性(Hodgins, (1968), 同上)。反式肉桂酸在 290nm 处的摩尔消光系数为 10.2381 升 M⁻¹cm⁻¹。反应混合物在 100mM Tris-HCl 缓冲液, pH 8.5 中含有 22.5mM 苯丙氨酸。对于标准测量,最终酶浓度为 0.0035mg/mL,但是对于动力学研究,调整该测定中的酶浓度以使每分钟 290nm 处的斜率在 0.005 至 0.02 的范围内。活性数据表示为比活性(μmol × min⁻¹mg⁻¹。一单位的 PAL 被定义为在室温下每分钟产生 1 μmol 反式肉桂酸的酶量。

[0313] 实施例 4

[0314] 体外半衰期和免疫原性的检测

[0315] 生化表征后,使用三种不同的和互补的技术(Western 印迹法、ELISA 和免疫沉淀法(IP)),针对对于由注射天然 PAL(非聚乙二醇化)的 PKU 小鼠产生的抗体的免疫反应性,筛选最有希望的 PEG-PAL 候选物。

[0316] 对于 Western 印迹分析, PAL 抗血清(来自注射天然 PAL 的小鼠)以 1:10,000 的稀释度使用。作为阴性对照,来自缓冲液处理的小鼠的血清也以相同的稀释度使用。

第二抗体,碱性磷酸酶偶联的山羊抗小鼠 IgG(Promega),稀释至 1 : 5,000,并且使用 AP 底物 Western Blue(Promega)显色。ELISA 检测使用 Nunc/Immuno Maxisorp 板 (Nalge Nunc International) 按照标准程序进行,其中使用 1mg/mL PAL 的 PBS 溶液,并用 PBS, 0.05% Tween-20, 2% BSA 封闭。小鼠抗血清(来自接触天然 PAL 的小鼠)在 EB 封闭溶液(PBS, 0.05% Tween-20, 2% BSA)中 1 : 10,000 稀释,HRP-山羊抗小鼠 IgG 用作第二抗体, TMB 用于在 450nm 处检测。

[0317] 使用免疫沉淀法检测 PAL 抗体结合。蛋白质样品(PAL 或聚乙二醇化的 PAL)在 TTBS 缓冲液(含 0.1% Tween 的 Tris 缓冲盐水)中温育,在加入抗体样品之前测定 PAL 活性。每个样品与 8 倍过量的阳性对照抗 PAL 血清一起温育,使用非免疫小鼠血清进行重复的阴性对照反应。温育后,根据珠子的小鼠 IgG 结合能力,添加过量的蛋白 G Sepharose 4(50%, v/v),在旋转条件下将样品再在 4℃温育过夜。离心回收上清液,测定上清液中各个样品的 PAL 活性。不丢弃珠子沉淀物,使得能够通过 Western 印迹法进行进一步的分析。为了证实发生了抗体-珠子结合,利用 Western 印迹法检测珠子上的 PAL 抗原。PAL 结合步骤后通过离心回收的珠子用 TTBS 和 TBS 缓冲液洗涤数次。这些漂洗后,向珠子中添加 SDS-PAGE 加样缓冲液,并且于 95℃加热样品 5 分钟。然后使用 PAL 抗血清通过 Western 印迹法分析样品。与显示高抗体结合的天然未修饰的 PAL 相比,如通过 Western 印迹法检测到的,显示较差抗体结合的酶变体在沉淀珠子级分中具有相应极少的 PAL,而显示在上清液中保留了较高的活性。

[0318] 实施例 5

[0319] 蛋白酶敏感性的检测

[0320] 对来自圆红冬孢酵母的天然 PAL 的蛋白酶作图研究表明了蛋白水解敏感性的主要位点。除去这些位点可以降低或消除蛋白水解敏感性并且有助于有效 PKU 酶替代物的开发。但是,蛋白水解敏感性的这些位点的消除可能导致酶活性的降低或损失。

[0321] 在蛋白质工程已经产生了保留活性的改良的 PAL(和 PEG-PAL)突变体后,通过与胰蛋白酶/胰凝乳蛋白酶蛋白酶混合物温育,然后监测活性的保留(通过 OD₂₉₀ 测量)和减少的蛋白质切割(通过 PAGE 凝胶分析),对蛋白酶抗性进行筛查,这能够鉴定出将用于体内试验的具有合适体外特性的突变体。

[0322] 蛋白水解稳定性通过与蛋白酶混合物温育进行评价,所述蛋白酶混合物近似于肠环境并且含有 2.3mM 胰蛋白酶、3.5mM 胰凝乳蛋白酶、3.05mM 羧肽酶 A 和 3.65mM 羧肽酶 B。蛋白水解试验包括酶温育,向 PAL 溶液中添加蛋白酶,确定所检测的不同蛋白质变体(进行或未进行聚乙二醇化或其它化学修饰的天然或突变蛋白质)的蛋白酶敏感性程度,包括蛋白酶暴露后活性保留和稳定性保留的时间过程。SDS-PAGE 和 MALDI-TOF 质谱作图实验用来确定任何蛋白酶敏感部位的位置(Kriwacki, R. W. 等人, J. Biomol. Tech. 9(3):5-15(1980))。这些作图结果对于确定蛋白酶敏感性的主要位点(如已经确定的两个主要位点)是非常重要的,使得可以使用聚乙二醇化保护和/或突变除去所有主要敏感性位点,从而从 PAL 结构上除去和/或保护敏感区。

[0323] 实施例 6

[0324] 聚乙二醇化的 NpPAL 和 AvPAL 的生成

[0325] 通常, NpPAL 和 AvPAL 的聚乙二醇化包括将蛋白质与 SUNBRIGHTME-200HS 20kDa

NHS 活化的 PEG (NOF) 混合。

[0326] 聚乙二醇化方案,使用 NHS 活化的 20kDa 线性 PEG 的标准“HC”方法:

[0327] 1) 评价蛋白质中内毒素的存在:

[0328] 将蛋白质溶液 (0.1mL) 用 0.9mL 新鲜 MQ 水稀释,并使用手持式 Charles River 装置 (EndoPTS) 以 0.5EU/mL 的灵敏度水平检测内毒素。如果内毒素大于 0.5EU/mL,则先通过 Mustang E 过滤,然后通过 Sterogene Etox 树脂来减少内毒素,任选地通过进一步的层析纯化。通过 pH 7.8 的 DEAE FF (Amersham) 的减少是有限的,但是足够有效。

[0329] 2) 蛋白的浓缩和缓冲液交换:

[0330] 将蛋白质浓缩为大于 25mg/mL 但小于或等于 75mg/mL,并将缓冲液交换为 50mM KPO_4 , pH 8.5。如果利用旋转过滤器准备该浓缩,则首先如下检测滤器的内毒素:只与缓冲液在低速和短时间 (3000rpm, 3 分钟) 下旋转,然后按照与步骤 1 中的蛋白质相同的方法检测保留的缓冲液的内毒素。50mM KPO_4 , pH 8.5 的缓冲液批次记录/配方由水 (足量至 1L)、磷酸氢二钾 (8.4913g/L 48.75mM) 和磷酸二氢钾 (0.17011g/L 1.25mM) 组成。溶液通过 0.2 μm 滤器过滤,并贮存在室温下。浓缩的产物缓慢通过 Mustang E 滤器 acrodisc 过滤 (1-2mL/min)。在 A280 处检测用无菌 TBS, pH 7.5 稀释的样品和空白对照,以确定蛋白质浓度。NpPAL 的消光系数为 0.83, AvPAL 为 0.75。

[0331] 3) NpPAL 和 AvPAL 的聚乙二醇化:

[0332] 使通常贮存在 -80°C 的 PEG 升温至室温。向 PEG 中加入 KPO_4 缓冲液,通过以最大速度涡旋振荡,并且用手用力摇动试管,以确保所有大块悬浮,从而进行重悬浮。在 PEG 第一次变湿 1 分钟内向充分悬浮的 PEG 溶液中加入蛋白质,并通过非常轻柔的颠倒进行混合。把用铝箔包裹的试管置于振荡器的轴上,并在室温下非常轻柔地摇动 3 小时。试管用 TBS (pH 7.5) 充满并无菌过滤。悬浮液立即配制,或者贮存于 4°C 直到准备配制。

[0333] 4) 配制

[0334] 配制缓冲液配方/批次记录由水 (足量至 1L)、Tris-碱 (3.2mM)、Tris-HCl (16.8mM) 和氯化钠组成;缓冲液通过 0.2 μm 滤器过滤,并且于室温贮存。使用 100MWC0 再生纤维素膜,使用 Vivalow 50 (小批量) 或 Vivalflow 200 (较大批量),对缓冲液进行切向流动过滤。该溶液用 MQ 水、0.1N NaOH 并再次用 200mL 冲洗。以 50mL/min 的横向流用 TBS, pH 7.5 平衡该溶液。确定渗透物的 pH 以确保 pH 为 7.5。

[0335] 通过首先用 TBS 稀释大约 3 倍,然后恢复到初始体积至少四次,对溶液进行缓冲液交换。对于 Vivaflow 50 和 200,横向流一般是 180-200mL/min。

[0336] 终产物通过 Mustang E 过滤。在用 1.9mL 无菌新鲜水稀释 0.1mL 后评价内毒素的存在。如果内毒素大于 1EU/mL,则使用 Sterogene Etox 凝胶减小内毒素。将配制好的和灭菌的聚乙二醇化 NpPAL 或 AvPAL 密封在小瓶中,并置于 -70°C ,直到准备用于体内研究。

[0337] 实施例 7

[0338] 点形念珠藻 PAL (NpPAL) 及其聚乙二醇化形式在患 PKU 小鼠中的效果

[0339] 本研究的目的是在皮下施用 NpPAL 或聚乙二醇化的 NpPAL 后确定血浆苯丙氨酸 (Phe) 水平。

[0340] 在纯合 ENU2 小鼠 (也称为 BTBR^{enu2}) 小鼠中检测以下物质的效果:(1) 剂量为 3.0IU/mL 的来自圆红冬孢酵母的赖氨酸突变体 R91K PAL 及其聚乙二醇化形式

(1 : 3PA : PEG) (PEG 来自 Nippon Oil and Fat, NOF) ; (2) 剂量为 0.6IU/mL 至 3.0IU/mL 的 npPAL 及其聚乙二醇化形式 (1 : 3PAL : PEG NOF) ; 和 (3) 运载体。以经证明 R91K PAL 相对于野生型圆红冬孢酵母 PAL 具有提高的活性。R91K 位于跨越 Asp86 至 Leu101 的螺旋中, 接近该蛋白质的表面。所有溶液都含有少于 1.0EU/mL 的内毒素, 并且贮存在 -75-80℃。ENU2 或 BTBR^{enu2} 小鼠在苯丙氨酸羟化酶基因 (PAH) 基因座处是纯合突变体, 导致动物具有严重的高苯丙氨酸血症。高血浆苯丙氨酸 (Phe) 水平使该动物成为适于评价苯丙氨酸氨裂合酶 (PAL) 减少血浆 Phe 的能力的模型。

[0341] 实验设计

[0342] 表 3 : 分组说明和剂量水平

[0343]

组号	N	施用	剂量水平 (IU/ 小鼠)	检测物活性 (IU/mL)	剂量体积 (mL)
1	2	R91K	1.0	3.0	0.33
2	2	R91K 1 : 3PAL : PEG NOF	1.0	3.0	0.33
3	5	npPAL	0.2	0.6	0.33
4	5	npPAL	0.4	1.2	0.33
5	5	npPAL	0.6	1.8	0.33
6	5	npPAL	1.0	3.0	0.33
7	5	npPAL 1 : 3PAL : PEG NOF	0.2	0.46	0.43
8	5	npPAL 1 : 3PAL : PEG NOF	0.4	0.92	0.43
9	5	npPAL 1 : 3PAL : PEG NOF	0.6	1.38	0.43
10	5	npPAL 1 : 3PAL : PEG NOF	1.0	2.30	0.43
11	2	运载体	0.0	0.0	0.43

[0344] 溶液在第 1 天通过皮下大丸注射在肩胛骨之间施用,第 4 天在右腹施用,第 8 天在左腹施用。使用 25 号针头和 1cc 或 3cc 注射器将溶液施用到皮下间隙。每只动物接受在上表所示剂量体积中的 0.2、0.4、0.6 或 1.0IU 的测试物。动物通过吸入氟烷 (1-3% mg/kg) 轻微麻醉,并且也手工加以约束。每个给药日在大致相同的时间进行剂量施用。

[0345] 每日观察动物的发病率、死亡率和总体健康。特别是,观察注射部位发红或水肿的指征。在第 -3、8、12 天测量并记录体重,用作临床参数,但不用于确定剂量体积。在第 -3 天 (P, S)、第 2 天 (P)、给药前第 4 天 (P)、第 5 天 (P)、给药前第 8 天 (P, S)、第 9 天 (P, S)、第 12 天 (P) 和第 23 天 (S) 采血 (P- 血浆, S- 血清)。每个时间点采集大约 50-100 μ L 全血 (对于 25-50 μ L 血浆或血清)。从尾静脉采血。如以上时间表所示采集血浆或血清。刺破尾静脉并使用 RAM Scientific Green-Top 毛细采血管 (#07 7250) 采集小血滴。对于血清采集,将小血滴采集到不含添加物的试管中。收集血浆 / 血清并转移到贮存管中,贮存于 -20°C (血浆) 或 -80°C (血清)。

[0346] 结果

[0347] NpPAL 短期给药研究的结果证明了聚乙二醇化的酶在降低过高的苯丙氨酸水平方面的效果。值得注意的是,非聚乙二醇化的 NpPAL 在任一次注射后,甚至在可能存在任何免疫原性应答之前,都不降低苯丙氨酸水平。因此,聚乙二醇化是 NpPAL 能够用于治疗 PKU 的绝对必要条件 (图 5)。

[0348] 实施例 8

[0349] 多变鱼腥藻 PAL (AvPAL) 及其聚乙二醇化形式在患 PKU 小鼠中的效果

[0350] 本研究的目的是在皮下施用 AvPAL 或聚乙二醇化的 AvPAL 后确定血浆苯丙氨酸 (Phe) 水平。

[0351] 在纯合 ENU2 小鼠 (也称为 BTBR^{enu2}) 小鼠中检测以下物质的效果:应 (1) 剂量为 3.0IU/mL 的来自圆红冬孢酵母的赖氨酸突变体 R91K PAL 及其聚乙二醇化形式 (1 : 3PAL : PEG) (PEG 来自 Nippon Oil and Fat, NOF); (2) 剂量为 0.6IU/mL 至 3.0IU/mL 的 AvPAL 及其聚乙二醇化形式 (1 : 3PAL : PEG NOF); 和 (3) 运载体。已经证明 R91K PAL 相对于野生型圆红冬孢酵母 PAL 具有提高的活性。R91K 位于跨越 Asp86 至 Leu101 的螺旋中,接近该蛋白质的表面。所有溶液都含有少于 1.0EU/mL 的内毒素,并且贮存在 -75-80°C。ENU2 或 BTBR^{enu2} 小鼠在苯丙氨酸羟化酶基因 (PAH) 基因座处是纯合突变体,导致动物具有严重的高苯丙氨酸血症。高血浆苯丙氨酸 (Phe) 水平使该动物成为适于评价苯丙氨酸氨裂合酶 (PAL) 减少血浆 Phe 的能力的模型。

[0352] 实验设计

[0353] 表 4 :分组说明和剂量水平

[0354]

组号	N	施用	剂量水平 (IU/小鼠)	检测物活性 (IU/mL)	剂量体积 (mL)	途径	给药频率
1	3	运载体	0	0	0.33	皮下	第 1、4、8 天
2	5	avPAL	0.2	0.6	0.33		
3	5	avPAL	1.0	3.0	0.33		
4	5	avPAL PEG	0.2	0.6	0.33		
5	6	avPAL PEG	1.0	3.0	0.33		
6	5	R91K PEG	1.0	3.0	0.33		

[0355] 溶液在第 1、4、8 天通过皮下浓注施用到动物的后背。使用 25 号针头和 1cc 或 3cc 注射器将溶液施用到皮下间隙。每只动物接受上表所示的剂量体积中的 0.2、0.4、0.6 或 1.0IU 的测试物。动物通过吸入氟烷 (1-3% mg/kg) 轻微麻醉,并且也手工加以约束。每个给药日在大致相同的时间进行剂量施用。

[0356] 每日观察动物的发病率、死亡率和总体健康。特别是,观察注射部位发红或水肿的指征。在第 -3、8、12 天测量并记录体重,用作临床参数,但不用于确定剂量体积。在第 -3 天 (P, S)、第 2 天 (P)、给药前第 4 天 (P)、第 5 天 (P)、给药前第 8 天 (P, S)、第 9 天 (P, S)、第 12 天 (P) 和第 22 天 (S) 采血 (P- 血浆, S- 血清)。每个时间点采集大约 50-100 μ L 全血 (对于 25-50 μ L 血浆或血清)。从尾静脉采血。如以上时间表所示采集血浆或血清。刺破尾静脉并使用 RAM Scientific Green-Top 毛细采血管 (#077250) 采集小血滴。对于血清采集,将小血滴采集到不含添加物的试管中。收集血浆 / 血清并转移到贮存管中,贮存于 -20°C (血浆) 或 -80°C (血清)。

[0357] 结果

[0358] AvPAL 短期给药研究的结果证明了聚乙二醇化的酶在降低过高的苯丙氨酸水平方面的效果。值得注意的是,非聚乙二醇化的 AvPAL 在任一次注射后,甚至在可能存在任何免疫原性应答之前,都不降低苯丙氨酸水平。因此,聚乙二醇化是 AvPAL 能够用于治疗 PKU 的绝对必要条件 (图 6)。

[0359] 实施例 9

[0360] 非聚乙二醇化和聚乙二醇化的 R91K PAL 和聚乙二醇化的 NpPAL 在患 PKU 小鼠中的长期 (90 天) 耐受性研究

[0361] 本研究的目的是评价聚乙二醇化和非聚乙二醇化的 R91K PAL 和聚乙二醇化的 NpPAL 长期 (90 天) 给药在 ENU/2 小鼠 (一种苯丙酮尿症疾病模型) 中的药效学参数和免疫原性效应。

[0362] 每个测试制备两批 (R91K 及其聚乙二醇化形式 R91KPAL : PEG1 : 3, npPAL 及其聚乙二醇化形式 npPAL : PEG 1 : 3NOF, 和运载体 Tris-HCl), 一批用于本研究的前半部分, 第二批用于本研究的后半部分。测试溶液贮存在 -75°C 至 -80°C。总共使用 55 只 (每个剂量组 n = 3-7) 纯合 ENU2 小鼠 (aka BTBR^{enu2}), 并且在任何情况下都不使用非初次实验的动物 (以前注射过 PAL 的小鼠)。

[0363] 实验设计

[0364] 表 5 :分组说明和剂量水平

[0365]

组号	分组说明	施用	剂量数	N
1	运载体对照, s. i. d.	Tris NaCl	90	3
2	b. i. w. ^a	R91K	26	3
3	第 3 周后 b. i. w. ^b	R91K	22	3
4	逐渐增加的剂量, s. i. d.	R91K	90	7
5	逐渐降低的剂量, s. i. d.	R91K	90	7
6	b. i. w. ^a	R91K 1 : 3NOF	26	6
7	第 3 周后 b. i. w. ^b	R91K 1 : 3NOF	22	6
8	逐渐增加的剂量, s. i. d.	R91K 1 : 3NOF	90	7
9	逐渐降低的剂量, s. i. d.	R91K 1 : 3NOF	90	7
10	细菌 PAL, s. i. w. ^c	npPAL 1 : 3NOF	13	6

[0366] b. i. w. :每周两次 ;s. i. d. :每天一次 ;s. i. w. :每周一次

[0367] ^a 在 7 天日程的第 1 天和第 4 天给药 (例如, 每个星期一和星期四)

[0368] ^b 第 3 组和第 7 组在第 1 天和第 8 天给药, 从第 22 天开始将与第 2 组和第 6 组一样进行相同的 7 天日程。

[0369] ^c 在 7 天日程的第 1 天给药 (例如, 每个星期一)

[0370] 表 6 :剂量水平

[0371]

		给药日				
		1-14	15-28	29-42	43-56	57-90
组号	分组说明	剂量水平(IU/鼠/天)				
1	运载体对照	0	0	0	0	0
2、3、6、7	静态剂量, b.i.w.	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
4 和 8	逐渐增加的剂量, s.i.d.	0.2	0.4	0.6	0.8	1.0
5 和 9	逐渐减少的剂量, s.i.d.	3.0	2.0	1.0	0.8	0.6
10	细菌 PAL, s.i.w.	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0

[0372] 对第 1、4、5、8、9 组每天进行一次剂量施用, 第 2 组和第 6 组 (b. i. w.) 每周在第 1 天和第 4 天给药 2 次, 例如每个星期一和星期四。第 3 组和第 7 组 (3 周后 b. i. w.) 在第 1 天和第 8 天给药, 然后在第 22 天再次给药, 之后日程与第 2 组和第 6 组相同 (每个星期一和星期四)。第 10 组每周给药一次。使用 25 或 26 号针头和 1cc 注射器, 将测试溶液通过

皮下注射（大丸注射）施用到肩胛骨之间的皮下空隙中。每个动物接受使用测试溶液活性（IU/mL）和剂量水平（IU/鼠）计算的预定剂量体积。在每个给药日，剂量施用大致相同的时间进行。

[0373] 每日观察动物的发病率、死亡率和总体健康。特别是，观察注射部位发红或水肿的指征。每周一次（第-3、5、12...天，例如每个星期五）及在研究终止时测量并记录体重。如果发生死亡或垂死状态导致的未按期终止，则在此时记录体重。在每个时间点采集大约 100 μ L 全血（25 μ L 血浆，25 μ L 血清）。通过尾静脉穿刺从尾静脉采血。使用 RAM ScientificGreen-Top 毛细采血管（#077250）采集小血滴。对于血清采集，将血液采集到不含添加物的试管中。血液在湿冰上不超过 2 小时然后通过离心分离为血浆 / 血清，并贮存在 -70°C 至 -80°C，直到在试验中进行评价。采血以提供血浆和血清，用于在几天测定苯丙氨酸和抗体滴度：-3（研究开始前）、9、17、24、31、38、45、52、59、66、73、80、87 和 91。在第 89 天，也采集第 1、5、9、10 组动物的血液和血浆。每周一个时间点也许不能提供准确的血液 Phe 对给药的应答情况。额外的时间点显示 Phe 水平是否在给药剂量之间变化。第 9 天的样品对于研究的完整性是非常重要的，因为它标记了在迄今尝试的所有给药方案中 PD 效应均丧失的时间。最后采集 100 μ L 的血样。

[0374] 结果

[0375] 图 7 所示的长期给药研究显示在 10 周期限内每周注射（NpPAL-PEG）多次后的连续效果。

[0376] 实施例 10

[0377] AvPAL 变体（半胱氨酸突变体）的生成

[0378] 在 AvPAL 多肽中进行氨基酸取代以减少细菌表达的重组蛋白中发生的聚集。蛋白聚集可能降低酶活性和 / 或增强体内免疫原性。一种这类形式的聚集是由于链间二硫键形成而发生的。为了将这种可能性降到最低，单独或组合地用丝氨酸残基代替各个 AvPAL 半胱氨酸残基。

[0379] AvPAL 多肽在第 64、235、318、424、503 和 565 位具有 6 个半胱氨酸残基（SEQ ID NO :4）。产生了下列 AvPAL 单半胱氨酸突变体：AvPAL_C64S（SEQ ID NO :7）、AvPAL_C318S（SEQ ID NO :8）、AvPAL_C503S（SEQ ID NO :9）和 AvPAL_C565S（SEQ ID NO :10）。还产生了 AvPAL 半胱氨酸双突变体，AvPAL_S565SC503S（SEQ ID NO :11）。图 8 显示这些 AvPAL 半胱氨酸突变体的氨基酸序列。

[0380] 克隆

[0381] 使用正向引物 AvarPALfor（5' -CACTGTCATATGAAGACACTATCTCAAGCACAAAG-3'）（SEQ ID NO :18）和反向引物 AvarPALrev（5' -CACTGTCTCGAGATGCAAGCAGGGTAAGATATCTTG-3'）（SEQ ID NO :19），从多变鱼腥藻基因组 DNA（ATCC 29413-U，Qiagen DNeasy 试剂盒）扩增 AvPAL 基因。将得到的 PCR 产物用 Taq 处理，然后连接到 pCR2.1 TOPO TA（Invitrogen）中。将得到的质粒命名为 1p40。

[0382] 通过 SOE-PCR 添加 5' NheI 位点并除去内部 NheI 位点。使用正向引物 N-Nhe-AvPAL（5' -CACTGTGCTAGCATGAAGACACTATCTCAAGCACAAAG-3'）（SEQ ID NO :20）和反向引物 Nhe-AvPALrev（5' -GGAAATTTCTCCATGATAGCTGGCTTGGTTATCAACATCAATTAGTGG-3'）（SEQ ID NO :21）从 1p40 扩增上游 AvPAL 片段，使用正向引物 Nhe-AVPALfor（5' -CCACTAATTGATGTTGATA

ACCAAGCCAGCTARCATGGAGGAAATTTCC-3) (SEQ ID NO :22) 和反向引物 AvPALrev-r (5' -ACAG TGGCGGCCGCTTAATGCAAGCAGGGTAAGATATCTTG-3) (SEQ ID NO :23) 从 1p40 扩增下游 AvPAL 片段。在单 PCR 反应中,使两个 PCR 产物退火并使用 DNA 聚合酶延伸,产生全长 AvPAL 基因,然后使用引物 N-Nhe-AvPAL 和 AvPALrev-r 扩增。产生的 PCR 产物用 NheI 消化,用 Klenow 平端化,用 NotI 消化,并连接到 pET28a+ 载体 (通过用 NdeI 消化、用 Klenow 平端化、用 NotI 消化而准备)。将得到的质粒命名为 3p86-23。

[0383] 通过 PCR 添加新的限制酶切位点。使用正向引物 AVEcoRIfor (5' -CACTGTGAATTC ATGAAGACACIATCTCAAGCACAAAG-3') (SEQ ID NO :24) 和反向引物 AvSmaIrev (5' -CACTGTCCC GGGTTAATGCAAGCAGGGTAAGATATCT-3') (SEQ ID NO :25) 从质粒 3p86-23 扩增 AvPAL。产生的 PCR 产物用 EcoRI 和 SmaI 消化,并连接到 EcoRI- 和 SmaI- 消化的 pIBX7 载体中。将得到的质粒命名为 7p56 Av3。

[0384] 半胱氨酸突变体

[0385] 通过定点诱变 (QuickChange XL II, Stratagene), 将 AvPAL 基因中的两个半胱氨酸密码子 (对应于 AvPAL 多肽的第 503 和 565 位) 用丝氨酸密码子取代。使用正向引物 Av_C503S (5' -GTCATTACGATGCACGCGCCT **C** TCTATCACCTGCAACTGAG-3) (SEQ ID NO :26) 和反向引物 Av_C503Srev (5' -CTCAGTTGCAGGTGATAGA **G** AGGCGCGTGCATCGTAATGAC-3) (SEQ ID NO :27), 通过 PCR 将质粒 7p56Av3 中第 503 位的半胱氨酸密码子转变为丝氨酸密码子。丝氨酸密码子用下划线标出, 编码链中的 G 到 C 的突变 (非编码链中的 C 到 G 的突变) 用粗体表示。将得到的质粒命名为 j282。使用正向引物 Av_C565S (5' -CAGTTCAAGAT ATCTTACCCT **C** CTTGCATTAACCCGGGCTGC-3') (SEQ ID NO :28) 和反向引物 Av_C565Srev (5' -GCAGCCCGGG TTAATGCAAG **G** AGGGTAAGATATCTTGAAGT-3) (SEQ ID NO :29) 将质粒 j282 中将第 565 位的密码子转变为丝氨酸密码子。丝氨酸密码子用下划线标出, 编码链中的 G 到 C 的突变 (非编码链中的 C 到 G 的突变) 用粗体表示。将得到的质粒命名为 j298a。

[0386] AvPAL 基因中对应于 AvPAL 多肽第 64、318 和 565 位的半胱氨酸密码子用类似地用丝氨酸密码子取代, 使用下列引物对: C64S, 正向引物 Av_C64S (5' -GCAGGGTATTCAGGCATCTT **C** TGATTACATTAATAATGCTGTTG-3) (SEQ ID NO :30) 和反向引物 Av_C64Srev (5' -CAACAGCATTATTAATGTAATCA **G** AAGATGCCTGAATACCCTGC-3) (SEQ ID NO :31); C318S, 正向引物 Av_C318S (5' -CAAGATCGTTACTCACTCCGAT **C** CCTTCCCCAGTATTTGGGGC-3) (SEQ ID NO :32) 和反向引物 Av_C318Srev (5' -GCCCCAAATACTGG GGAAGG **G** ATCGGAGTGAGTAACGATCTTG-3) (SEQ ID NO :33); 和 C565S, 正向引物 Av_C565S (SEQ ID NO :28) 和反向引物 Av_C565Srev (SEQ ID NO :29)。丝氨酸密码子以下划线标出, 编码链中的 G 到 C 的突变和非编码链中 C 到 G 的突变用粗体表示。

[0387] 实施例 11

[0388] AvPAL 变体 (半胱氨酸突变体) 的体外酶活性

[0389] 该研究的目的是确定 AvPAL 多肽中各个半胱氨酸残基的丝氨酸取代对体外苯丙氨酸氨裂合酶 (PAL) 酶活性的影响。

[0390] AvPAL 变体 (即, 半胱氨酸突变体) 如实施例 10 所述克隆。将 AvPAL 半胱氨酸突变体表达质粒转化到细菌中, 并且如实施例 1 所述表达 AvPAL 半胱氨酸突变体多肽, 并且如实施例 2 所述纯化。

[0391] 如实施例 3 所述检测野生型 (WT) AvPAL 和 AvPAL 半胱氨酸突变体的体外 PAL 酶活性。表 7 显示与非聚乙二醇化的 WT AvPAL 相比,第 64 位半胱氨酸残基的丝氨酸取代 (AvPAL_C64S) 降低了纯化的非聚乙二醇化 AvPAL 半胱氨酸突变蛋白的体外 PAL 比活性,但第 503 或 565 位中任一个或第 503 和 565 位两处的半胱氨酸残基的丝氨酸取代 (分别为 AvPAL_C503S, AvPAL_C565S 和 AvPAL_C565SC503S) 对其不产生不利影响。

[0392] 表 7 :AvPAL 半胱氨酸突变体的比活性

[0393]

AvPAL 蛋白	聚乙二醇化	比活性 (U/mg)
WTAvPAL	-	1.7
AvPAL_C503S	-	1.9
AvPAL_C64S	-	1.3
AvPAL_C565S E1	-	2.0
AvPAL_C565S E2	-	2.1
AvPAL_C565S C503S	-	2.2
WTAvPAL	+	1.1
AvPAL_C565S C503S	+	1.1

[0394] 为了确定丝氨酸残基的引入对聚乙二醇化 AvPAL 蛋白的酶活性是否有影响,如实施例 6 所述将 WT AvPAL 和半胱氨酸双突变体 AvPAL_C565SC503S 聚乙二醇化。表 7 显示第 503 和 565 位半胱氨酸残基的丝氨酸取代对聚乙二醇化 AvPAL 蛋白的体外 PAL 比活性没有不利影响。

[0395] 实施例 12

[0396] AvPAL 变体 (半胱氨酸突变体) 的体外生化表征

[0397] 本研究的目的是确定 AvPAL 多肽中各个半胱氨酸残基的丝氨酸取代对以下各项的影响:(1) 增强的稳定性;(2) 聚集体形成;和 (3) 位点特异性聚乙二醇化。

[0398] 增强的稳定性

[0399] AvPAL 中半胱氨酸残基的丝氨酸取代对体外稳定性的影响通过以下方法确定:将纯化的 AvPAL 半胱氨酸突变体 (聚乙二醇化或非聚乙二醇化的) 在 37°C 保存不同时段,然后如实施例 3 所述测定这些蛋白质的体外 PAL 比活性。

[0400] 如实施例 11 所述制备野生型 AvPAL 和 AvPAL 半胱氨酸突变体 (非聚乙二醇化或聚乙二醇化的)。

[0401] 如图 9A 所示,非聚乙二醇化 AvPAL 蛋白的比活性在 37°C 至少稳定 5 天,并且第 565 位,或第 503 和 565 位两处半胱氨酸残基的丝氨酸取代对其没有不利影响。类似地,如图 9B 所示,聚乙二醇化 AvPAL 蛋白的比活性在 37°C 至少稳定 6 天。在 37°C 6 天后,与野

生型 AvPAL 和半胱氨酸 AvPAL 双突变体 AvPAL_C565SC503S 相比,半胱氨酸 AvPAL 单突变体 AvPAL_C565S 显示稍微降低的稳定性。

[0402] 聚集体形成

[0403] AvPAL 中半胱氨酸残基的丝氨酸取代对溶液中蛋白聚集体形成的影响通过以下方法确定:通过变性和非变性凝胶电泳或 SEC-HPLC 来分离纯化的、非聚乙二醇化的野生型 AvPAL 和 AvPAL 半胱氨酸突变体。

[0404] 在变性条件 (4-12% NuPAGE Bis-Tris) 或非变性条件 (8% Tris-Gly, pH 8.3) 下通过凝胶电泳分离纯化的 AvPAL 制品。利用考马斯蓝染色分离的 AvPAL 蛋白。

[0405] 通过 SEC-HPLC 分离纯化的 AvPAL 制品。在 20mM 磷酸钠、300mM NaCl、pH 6.9 中将 AvPAL 蛋白上样到 TSK 凝胶柱 (G3000SW $\times$ 1, 7.8mm $\times$ 30cm, 5 μ m (Tosoh Bioscience, LLC)), 并采用 0.5mL/min 的流速进行洗脱。在 Agilent 系列 1100 分光计上分析分离的 AvPAL 蛋白。

[0406] 根据凝胶电泳 (图 10A) 或 SEC-HPLC (图 10B) 判断,野生型 AvPAL 制品以及 AvPAL_C503S 和 AvPAL_C64S 制品中存在聚集体,但 AvPAL_C565S 和 AvPAL_C565SC503S 制品中不存在。

[0407] 位点特异性聚乙二醇化

[0408] AvPAL 中半胱氨酸残基的丝氨酸取代对位点特异性聚乙二醇化的影响通过以下方法确定:如实施例 6 所述将野生型 AvPAL 和半胱氨酸双突变体 AvPAL_C503SC565S 聚乙二醇化,然后比较下列 AvPAL 赖氨酸残基的相对聚乙二醇化:K2、K10、K32、K115、K145、K195、K301、K335、K413、K419、K493、K494 和 K522。

[0409] 用 8M 尿素变性大约 100 μ g (10 μ L, 10 μ g/ μ L) 非聚乙二醇化或聚乙二醇化的 AvPAL 蛋白。变性的蛋白质然后在 100 μ L 的反应体积中用 pH 8.2 的胰蛋白酶在 37 $^{\circ}$ C 下消化过夜 (约 20 小时)。通过在 37 $^{\circ}$ C 用 1 μ L 1M DTT 处理 1 小时还原胰蛋白酶消化的蛋白质,然后用 3 μ L 15% TFA 终止反应。在 C18 反相柱上分离消化的蛋白质。通过减去相应的非聚乙二醇化肽的肽图计算每个聚乙二醇化 AvPAL 肽的聚乙二醇化百分比。

[0410] 如图 11 所示,当 AvPAL 蛋白:PEG 的比例为 1:3 时,可能除了 K419 之外,任意赖氨酸 (K) 残基的聚乙二醇化百分比不存在显著差异,其中半胱氨酸双突变体 C565SC503S 的聚乙二醇化百分比低于野生型 AvPAL。但是,利用 AvPAL 蛋白:PEG 比例增加的半胱氨酸双突变体获得的结果 (其中没有观察到剂量应答关系),结合相对较小的聚乙二醇化百分比,表明 K419 观察到的差异不可能是有意义的。因此,第 503 和 565 位半胱氨酸残基的丝氨酸取代看起来不影响 AvPAL 的位点特异性聚乙二醇化。

[0411] 实施例 13

[0412] AvPAL 蛋白的聚集机制

[0413] 进行研究以探索细菌表达的 AvPAL 蛋白的聚集机制。

[0414] 浓缩纯化的 AvPAL 制品,并在 37 $^{\circ}$ C 温育浓缩的蛋白质溶液 2 小时,以加速溶液中纯化的 AvPAL 蛋白的聚集。通过 SEC-HPLC 分离 AvPAL 蛋白来检测聚集。为了确定二硫键交联是否造成聚集,向浓缩蛋白质溶液中添加 50mM 二硫苏糖醇 (DTT),然后在 37 $^{\circ}$ C 温育 2 小时。

[0415] 如实施例 2 所述纯化在细菌中表达的 AvPAL 蛋白,并利用旋转滤器 (Millipore

Biomax-10K NMWL) 进行浓缩。在 Eppendorf Centrifuge 5415C 中以大约 15,000g 离心蛋白质数分钟。对于倾向于聚集的半胱氨酸突变体 (例如, AvPAL_C503S 和 AvPAL_C64S), 将蛋白质浓缩到大约 20mg/mL, 并在 37°C 温育 2 小时。对于不易聚集的半胱氨酸突变体 (例如, AvPAL_C565S 和 AvPAL_C565SC503S), 将蛋白质浓缩到大约 40mg/mL, 并在 37°C 温育 2 小时。

[0416] 如表 8 所示, 在 37°C 温育 2 小时后, 纯化的 AvPAL 半胱氨酸突变体 AvPAL_C64S 和 AvPAL_C503S 的制品形成聚集体。与预期一致, 在 37°C 温育 2 小时前将 AvPAL 蛋白浓缩将加剧这种聚集。通过将浓缩蛋白质暴露于 DTT 可以阻断聚集, 这表明该聚集是由于二硫键交联引起的。与此相反, 在 37°C 温育 2 小时后纯化的 AvPAL 半胱氨酸突变体 AvPAL_C565S 和 AvPAL_C565SC503S 的制品不形成聚集体, 这表明第 565 位的半胱氨酸残基通过二硫键交联参与 AvPAL 聚集。

[0417] 表 8 : 二硫键交联相关的 AvPAL 半胱氨酸突变体的聚集

[0418]

AvPAL 蛋白	处理	聚集体形成
AvPAL_C503S	37°C /2h	+
AvPAL_C64S	37°C /2h	+
AvPAL_C565S E1	37°C /2h	-
AvPAL_C565S E2	37°C /2h	-
AvPAL_C565SC503S	37°C /2h	-
AvPAL_C503S	浓缩 +37°C /2h	++
AvPAL_C64S	浓缩 +37°C /2h	++
AvPAL_C565S E1	浓缩 +37°C /2h	-
AvPAL_C565S E2	浓缩 +37°C /2h	-
AvPAL_C565SC503S	浓缩 +37°C /2h	-
AvPAL_C503S	浓缩 +DDT+37°C /2h	-
AvPAL_C64S	浓缩 +DDT+37°C /2h	-
AvPAL_C565S E1	浓缩 +DDT+37°C /2h	-
AvPAL_C565S E2	浓缩 +DDT+37°C /2h	-
AvPAL_C565SC503S	浓缩 +DDT+37°C /2h	-

[0419] 为了确定哪些半胱氨酸残基作为游离巯基存在,将纯化的AvPAL制品在8M尿素存在下变性,用碘乙酰胺烷基化,用胰蛋白酶消化,并通过LC/MS进行分析。所有AvPAL半胱氨酸残基都被碘乙酰胺标记,提示细菌表达的AvPAL的所有半胱氨酸残基都作为游离巯基存在。

[0420] 为了确定哪些半胱氨酸残基存在于天然蛋白质的表面,纯化的AvPAL制品首先用N-乙基马来酰亚胺(NEM)处理,然后在8M尿素存在下变性,用碘乙酰胺烷基化,用胰蛋白酶消化,并通过LC/MS进行分析。第235和424位的半胱氨酸残基未被NEM烷基化,第318位的半胱氨酸残基只被NEM部分烷基化,提示第64、503和565位的半胱氨酸残基位于天然AvPAL的表面上,第318位的半胱氨酸残基部分暴露于天然AvPAL的表面上。

[0421] 为了确定哪些半胱氨酸残基参与链间二硫键交联,在37℃将67 μL 0.7mg/mL纯化的非聚乙二醇化野生型AvPAL制品溶液在8M尿素中变性1小时,然后在100 μL反应体积中用pH 8.2的胰蛋白酶的25℃消化过夜(约17.5小时)。分离胰蛋白酶消化的蛋白质并通过质谱法进行分析,其中鉴定对应于预测的二硫键对的肽并定量为总离子计数(TIC)。

[0422] 表9显示检测到的二硫键对C503-C503、C503-C565、C565-C318和C565-C565。在纯化的AvPAL制品的二硫键对中,发现了第565位的半胱氨酸残基,并较低程度地发现了第503位的半胱氨酸残基。

[0423] 表9:聚集体二硫键对

[0424]

二硫键对	结果 (TIC/1000)
C64-C318	n. d. #
C64-C64	n. d.
C64-C503	n. d.
C64-C565	n. d.
C503-C318	n. d.
C503-C503	11
C503-C565	112
C565-C318	13
C565-C565	37
C318-C318	n. d.

[0425] # 未检测到

[0426] 进行研究以确定除了二硫键交联外的其他机制是否可能参与AvPAL蛋白聚集。

[0427] 将纯化的AvPAL制品与0.05% Tween或10mM EDTA温育,然后如实施例12所述通过SEC-HPLC分离。Tween减少由疏水相互作用引起的蛋白质聚集,而EDTA减少由于存在二价阳离

子引起的蛋白质聚集。如图 12 所示,暴露于 0.05% Tween 或 10mM EDTA 对 AvPAL 蛋白质聚集没有影响。10mM EDTA 处理的 AvPAL 中第 10 分钟的附加峰是由于 EDTA 在 210nm 处的吸收。

[0428] 为了进一步研究二硫键交联在 AvPAL 蛋白聚集中的作用,在通过 SEC-HPLC 分离前,纯化的 AvPAL 先通过 DTT 处理进行还原,然后脱盐。如图 13A 所示,通过 DTT 处理使 AvPAL 蛋白聚集降到最低,但在 37℃温育 18 小时后聚集体再次形成。与此相反,如图 13B 所示,在 DTT 暴露后以及脱盐和 37℃温育 18 小时前一且 AvPAL 表面半胱氨酸通过 N-乙基马来酰亚胺 (NEM) 处理被修饰 (即烷基化),则聚集体不再形成。

[0429] 基于以上所述,细菌表达的 AvPAL 的聚集看起来仅仅是由于链间二硫键的形成,而不是因为疏水作用或二价阳离子的存在。第 565 和 503 位的半胱氨酸残基参与 AvPAL 制品中链间二硫键的形成。

[0430] 实施例 14

[0431] AvPAL 变体 (半胱氨酸突变体) 及其聚乙二醇化形式在小鼠中的效应

[0432] 这些研究的目的是确定 AvPAL 多肽第 503 和 565 位半胱氨酸残基的丝氨酸取代在小鼠中对体内苯丙氨酸 (Phe) 水平的影响。

[0433] 基本如实施例 8 所述在纯合 ENU2 (也称为 BTBR^{enu2}) 小鼠中检测了半胱氨酸双突变体 AvPAL_C565SC503S 的聚乙二醇化形式的体内活性。ENU2 小鼠在 PAH 基因座处是纯合突变体,产生具有严重 HPA 的动物。高血浆 Phe 水平使得该动物成为评价 PAL 降低血浆 Phe 的能力的合适模型。

[0434] 在第一项研究中,AvPAL 半胱氨酸双突变体 AvPAL_C565SC503S 在各种剂量下进行检测。ENU2 小鼠 (雄性或雌性) 分为 5 个剂量组:4 个试验组 (n = 4) 和 1 个运载体组 (n = 2)。每只小鼠给予 8 个每周皮下剂量的运载体、低剂量聚乙二醇化半胱氨酸双突变体 AvPAL (0.25IU)、中剂量聚乙二醇化半胱氨酸双突变体 AvPAL (1.0IU)、高剂量聚乙二醇化半胱氨酸双突变体 AvPAL (4.0IU) 或聚乙二醇化的野生型 AvPAL (4.0IU)。在给药前和给药后 48 小时 (最多到第 57 天) 采集血浆,并分析 Phe 水平。也在给药前和给药后 48 小时 (最多到第 57 天) 采集血清,用于分析抗 AvPAL 抗体水平。小鼠从第一次给药前 2 天开始 (最多到第 40 天) 每周称重一次。

[0435] 两只小鼠在研究过程中死亡,一只只是运载体处理的小鼠,另一只是低剂量聚乙二醇化半胱氨酸双突变体 AvPAL 处理的小鼠。如图 14 所示,在每次皮下注射聚乙二醇化的半胱氨酸双突变体 AvPAL 后 48 小时,在血浆中观察到剂量依赖性的 Phe 水平降低。在相同的剂量下,用聚乙二醇化的野生型 AvPAL 或聚乙二醇化的半胱氨酸双突变体 AvPAL 处理的小鼠之间,血浆 Phe 水平没有差异。如图 15 所示,在用运载体、聚乙二醇化的野生型 AvPAL 或聚乙二醇化的半胱氨酸双突变体 AvPAL 处理的小鼠之间,体重没有显著性差异。没有观察到体重的显著性差异可能是因为雄性和雌性小鼠都在该研究中使用。

[0436] 使用间接 ELISA 试验分析这些小鼠中的抗 AvPAL 滴度。在该试验中微量滴定板用 AvPAL 包被,封闭,然后暴露于适当稀释的来自每次小鼠采血的血清。结合到微量滴定板表面上的 AvPAL 被血清样品中存在的 AvPAL 特异性抗体识别并结合。用检测标记的山羊抗小鼠 IgG 抗体检测结合的抗 AvPAL 抗体。血清样品在开始时 1 : 50 稀释,并且与来自于 1 : 50 稀释的合并小鼠血清的“截点”相比进行分析。信号低于截点的样品报告为 < 50, 或“阴性”。其余的样品被认为是“阳性”,进一步以 1 : 3 系列稀释,滴定到信号降至截点

以下的稀释度。获得阳性信号（即，高于截点）的最高稀释倍数报告为该样品的滴度。在该滴度系列过程中，3 倍的滴度改变也许不能反映检测的抗体的显著性差异，因为这种差异可能是截点水平上信号最小改变的结果。

[0437] 如表 10 所示，聚乙二醇化的半胱氨酸双突变体 AvPAL 处理的小鼠中的抗 AvPAL 抗体滴度低于用相同剂量（4.0IU）的聚乙二醇化的野生型 AvPAL 处理的小鼠。尽管没有观察到明显的剂量应答，但是用高剂量（4.0IU）聚乙二醇化的半胱氨酸双突变体 AvPAL 处理的小鼠比用低剂量（0.25IU）聚乙二醇化的半胱氨酸双突变体 AvPAL 处理的小鼠具有更高的抗 AvPAL 抗体滴度。

[0438] 表 10：抗 -AvPAL IgG 滴度

[0439]

聚乙二醇化的 AvPAL 蛋白质	样品	前	D8	D15	D22	D29
AvPAL_C565SC503S (0.25 IU)	S203	< 50	50	< 50	50	50
	S204	< 50	50	50	50	450
	S205	< 50	< 50	< 50	< 50	< 50
	S206	< 50	< 50	50	50	50
AvPAL_C565SC503S(1.0IU)	S307	< 50	< 50	< 50	< 50	< 50
	S308	< 50	< 50	< 50	< 50	< 50
	S309	< 50	< 50	< 50	< 50	50
	S310	< 50	< 50	< 50	< 50	< 50
AvPAL_C565SC503S(4.0IU)	S411	< 50	< 50	< 50	50	50
	S412	< 50	< 50	50	50	50
	S413	50	50	50	450	150
	S414	< 50	< 50	< 50	< 50	< 50
WT AvPAL(4.0IU)	S515	< 50	< 50	150	150	450
	S516	< 50	< 50	150	150	450
	S517	< 50	< 50	150	4050	12150
	S518	< 50	< 50	150	450	150

[0440]

聚乙二醇化的 AvPAL 蛋白质	样品	前	D36	D43	D50	D57
AvPAL_C565SC503S (0.25 IU)	S203	< 50	< 50	150	150	< 50
	S204	< 50	> 1350	> 1350	> 1350	450
	S205	< 50	N/A*	N/A	N/A	N/A
	S206	< 50	< 50	50	50	< 50
AvPAL_C565SC503S (1.0IU)	S307	< 50	50	150	> 1350	150
	S308	< 50	< 50	< 50	< 50	< 50
	S309	< 50	450	> 1350	> 1350	450
	S310	< 50	< 50	50	50	< 50
AvPAL_C565SC503S (4.0IU)	S411	< 50	50	150	50	50
	S412	< 50	150	150	150	50
	S413	50	450	450	450	150
	S414	< 50	150	150	150	150
WT AvPAL (4.0IU)	S515	< 50	450	1350	1350	150
	S516	< 50	150	450	450	150
	S517	< 50	4050	4050	4050	450
	S518	< 50	50	50	50	< 50

[0441] * 未获得样品 / 数据

[0442] 与 4.0IU 聚乙二醇化的野生型 AvPAL 相比,施用 4.0IU 聚乙二醇化的半胱氨酸双突变体 AvPAL 的小鼠中降低的抗 AvPAL 抗体滴度在整个研究中持续。

[0443] 在第二项研究中,在不同的聚乙二醇化比例下检测了 AvPAL 半胱氨酸双突变体 AvPAL_C565SC503S。将雄性 ENU2 小鼠分至 5 个剂量组:4 个试验组 (n = 4) 和 1 个载体组 (n = 2)。每只小鼠给予 8 个每周皮下剂量的运载体、低剂量聚乙二醇化半胱氨酸双突变体 AvPAL (4IU 和 1 : 1.6AvPAL : PEG 比)、中剂量聚乙二醇化半胱氨酸双突变体 AvPAL (4IU 和 1 : 2.4AvPAL : PEG 比)、高剂量聚乙二醇化半胱氨酸双突变体 AvPAL (4IU 和 1 : 3AvPAL : PEG 比) 或聚乙二醇化的野生型 AvPAL (4IU 和 1 : 3AvPAL : PEG 比)。在

给药前和给药后 4 天（最多到第 61 天）采集血浆，并分析 Phe 水平。也在给药前和给药后 4 天（最多到第 57 天）采集血清，用于分析抗 AvPAL 抗体水平。小鼠从第一次给药前 2 天开始（到第 40 天）每周称重一次。

[0444] 一只运载体处理的小鼠在研究过程中死亡。如图 16 所示，在每次皮下注射聚乙二醇化的半胱氨酸双突变体 AvPAL 后 4 天，在血浆中观察到 PEG 比例依赖性的 Phe 水平降低。在相同的 PEG 比例下，用聚乙二醇化的野生型 AvPAL 或聚乙二醇化的半胱氨酸双突变体 AvPAL 处理的小鼠之间，血浆 Phe 水平没有差异。如图 17 所示，用聚乙二醇化的野生型 AvPAL 或聚乙二醇化的半胱氨酸双突变体 AvPAL 处理的小鼠的体重显著高于运载体处理的小鼠。

[0445] 使用如上所述的间接 ELISA 试验分析这些小鼠中的抗 AvPAL 滴度。

[0446] 如表 11 所示，在相同的 AvPAL : PEG 比例 (1 : 3) 下，聚乙二醇化的半胱氨酸双突变体 AvPAL 处理的小鼠中的抗 AvPAL 抗体滴度低于用相同剂量的聚乙二醇化的野生型 AvPAL 处理的小鼠。在抗 AvPAL 抗体滴度与 AvPAL : PEG 比例之间观察到相反的剂量应答，这与蛋白质如 AvPAL 的聚乙二醇化与降低的体内免疫原性相关的预期一致。

[0447] 表 11 : 抗 -AvPAL IgG 滴度

[0448]

聚乙二醇化的 AvPAL 蛋白质	样品	前	D15	D28	D43	D64
WT_AvPAL (PEG 1 : 3NOF)	S101	< 50	450	12150	4050	> 1350
	S106	< 50	450	450	450	4050
	S110	< 50	50	50	150	450
	S117	< 50	150	450	450	1350
AvPAL_C565SC503S (PEG 1 : 1.6)	S202	50	450	12150	1350	1350
	S207	< 50	1350	12150	12150	36450
	S211	< 50	450	1350	12150	12150
	S218	50	150	36450	26.57 M	> 36450
AvPAL_C565SC503S (PEG 1 : 2.4)	S303	< 50	50	150	450	4050
	S308	< 50	50	50	50	450
	S312	< 50	50	150	450	4050

	S313	< 50	50	450	1350	4050
AvPAL_C565SC503S (PEG 1 : 3)	S404	< 50	50	50	450	450
	S409	50	50	50	150	450
	S414	< 50	< 50	50	450	1350
	S416	< 50	< 50	150	50	450
运载体	S505	< 50	< 50	< 50	< 50	N/A*
	S515	50	< 50	< 50	< 50	< 50

[0449] *N/A :该时间点没有血清样品

[0450] 上述结果表明,聚乙二醇化的半胱氨酸双突变体 AvPALAvPAL_C565SC503S 具有与聚乙二醇化的野生型 AvPAL 相当的体内 PAL 酶活性。由于非聚乙二醇化的野生型 AvPAL 没有可检测到的体内 PAL 酶活性 (参见实施例 8),因此可以得出以下结论:AvPAL 变体,包括聚乙二醇化的半胱氨酸双突变体 AvPAL, AvPAL_C565SC503S,和聚乙二醇化的野生型 AvPAL,具有比野生型 AvPAL 更高的苯丙氨酸转化活性。

[0451] 上述结果也表明,聚乙二醇化的 AvPAL 变体,它由于第 503 和 565 位半胱氨酸到丝氨酸的取代而具有减少的体外蛋白质聚集,与聚乙二醇化的野生型 AvPAL 相比具有降低的免疫原性。由于聚乙二醇化本身与降低的免疫原性有关,因此结论是 AvPAL 变体与野生型 AvPAL 相比具有降低的体内免疫原性。

[0452] 实施例 15

[0453] AvPAL 变体的再聚乙二醇化形式的产生

[0454] 进行研究以确定 AvPAL 变体的聚乙二醇化形式是否能够进行再聚乙二醇化以提高聚乙二醇化的量,即,AvPAL 赖氨酸残基上 PEG 分子的百分比,如果能,确定 AvPAL 变体的再聚乙二醇化形式是否保持体外酶活性并且具有任何改善的体内性质,即降低的免疫原性。

[0455] AvPAL 变体的聚乙二醇化

[0456] 半胱氨酸双突变体 AvPAL, AvPAL_C565SC503S,基本如实施例 6 所述以不同的 PAL : PEG 比例聚乙二醇化 (即,AvPAL_C565SC503S :SUNBRIGHT ME-200HS 20kDa NHS- 活化的 PEG (NOF))。

[0457] 简言之,标准反应混合物含有:7mg/ml (相当于 2mM 赖氨酸残基)AvPAL_C565SC503S 和 2、3、4 或 6mM mPEG20K-NHS (甲氧基聚乙二醇 - 羧甲基 -N- 羟基琥珀酰亚胺酯,20kDa,SUNBRIGHT ME-200HS,NOF),在 50mM 磷酸钾缓冲液 pH 8.5 中,分别相当于 1 : 1、1 : 1.5、1 : 2 或 1 : 3 摩尔比的总 AvPAL 赖氨酸残基 : PEG 分子 (见表 12)。在室温温育 3 小时后,将反应混合物的缓冲液交换为 200mM 磷酸钾 pH 8.5,并使用切向流过滤 (Vivaflow 50 或 200,聚醚砜或再生的纤维素膜,100kDaMWC0,Sartorius) 浓缩到大于 20mg/ml,准备用于下一步的再聚乙二醇化步骤。

[0458] 表 12 :AvPAL 的聚乙二醇化和再聚乙二醇化条件

[0459]

聚乙二醇化			再聚乙二醇化		
AvPAL (mg/ml)	总赖氨酸 残基(mM)	mPEG20K-NHS (mM)	rAvPAL-PEG (mg/ml)	总赖氨酸 残基(mM)	mPEG20K-NHS (mM)
7	2	6	-	-	-
7	2	6	7	2	6
7	2	6	3.5	1	3
7	2	6	7	2	2
7	2	6	7	2	4
7	2	6	7	2	6
7	2	6	10.5	3	6
7	2	2	-	-	-
7	2	2	7	2	2
7	2	2	7	2	6
7	2	2	10.5	3	6
7	2	2	14	4	6
7	2	3	7	2	6
7	2	4	7	2	6

[0460] 聚乙二醇化的 AvPAL 变体的再聚乙二醇化

[0461] 以不同的 PAL : PEG 比例聚乙二醇化的 AvPAL_C565SC503S 基本如实施例 6 所述再聚乙二醇化,其中使用各种浓度的聚乙二醇化的酶,及不同量和不同比例的 AvPAL 酶中的赖氨酸残基和 SUNBRIGHTME-200HS 20kDa NHS- 活化的 PEG (NOF) 分子。

[0462] 对于每个再聚乙二醇化反应,起始材料为在 200mM 磷酸钾 pH 8.5 中浓缩为大于 20mg/mL 的聚乙二醇化的 AvPAL_C565SC503S (rAvPAL-PEG)。对于每个再聚乙二醇化反应分别称取 mPEG20K-NHS,并重悬浮于最小体积的水中。必要时用缓冲液稀释的 rAvPAL-PEG 直接加到重悬浮的 mPEG20K-NHS 溶液中,以达到表 12 所示的终浓度。再聚乙二醇化反应在室温下进行 3 小时,然后通过用 25mM TrisHCl, pH 7.3 稀释 2 倍终止。使用切向过滤法 (Vivaflow 50 或 200, 聚醚砜或再生的纤维素膜,100kDa MWCO, Sartorius) 进行缓冲液交换,并且在 10mM TrisHCl,135mM NaCl,1mM L-Phe pH 7.3 中浓缩再聚乙二醇化的 rAvPAL-PEG 样品。需要时,利用离心浓缩将最终的再聚乙二醇化的 rAvPAL-PEG 样品进一步浓缩。

[0463] 体外表征方法

[0464] 总蛋白质测定:使用来自 Pierce(cat#23227) 的商品化测定试剂盒,使用牛血清白蛋白作为标准,通过二喹啉甲酸 (BCA) 分析测定聚乙二醇化的和再聚乙二醇化的 rAvPAL-PEG 样品的浓度。简言之,25 μ L 样品和标准与 200 μ L BCA 试剂在 37°C 温育 30 分钟。使用 SPECTRAma $\times$ PLUS 微孔板分光光度计 (Molecular Devices Corporation) 读取 562nm 处的吸光度。

[0465] rAvPAL 活性测定:如实施例 3 所述基于建立的 PAL 活性测定方案测定聚乙二醇化的和再聚乙二醇化的 rAvPAL-PEG 样品的比活性。简言之,在向 1mL 测定反应中添加蛋白质样品 (25-50 μ L) 后,监测由于 L-Phe 转化为反式肉桂酸引起的 OD₂₉₀ 的降低。必要时,在测定之前用测定稀释缓冲液 (10mM TrisHCl,135mM NaCl,pH7.3) 稀释样品。每个数据点代表

三个独立测定的平均值。

[0466] 毛细管凝胶电泳 (CGE) : 使用来自 Beckman-Coulter 的 ProteomeLabSDS-MW 分析试剂盒 (cat#390953) 进行 CGE 分析。聚乙二醇化的和再聚乙二醇化的 rAvPAL-PEG 和 rAvPAL-PEG-RP1 样品在 SDS 和 β -巯基乙醇的存在下于 95°C 加热 5 分钟, 然后上样到来自 Beckman-Coulter 的 P/ACE MDQ 毛细管电泳系统中的毛细管 (PA800CE, 23cm 熔融石英) 中。CGE 谱显示 214nm 处的紫外吸光度量。每个 CGE 样品含有 10kDa 迁移标记作为分析参照。毛细管在 rAvPAL-PEG 样品之间重新调整。

[0467] TNBS 分析 : 三硝基苯磺酸 (TNBS) 分析用来提供对聚乙二醇化和再聚乙二醇化的 rAvPAL-PEG 样品中存在的游离胺基团的估计值。

[0468] 肽图分析 : 如实施例 10 所述进行 rAvPAL-PEG 和 rAvPAL-PEG- 样品的胰蛋白酶肽图分析以确定 AvPAL 变体蛋白质上的赖氨酸残基处的聚乙二醇化百分。确定聚乙二醇化的量, 即, 再聚乙二醇化 AvPAL_C565SC503S 的 AvPAL 赖氨酸残基 K10、K32、K115、K145、K195、K301、K335、K413、K493/K494 和 K522 上的 PEG 分子的百分比。

[0469] 聚乙二醇化和再聚乙二醇化的 AvPAL 变体的体外表征

[0470] rAvPAL 酶活性 : 如图 18(上图) 所示, 聚乙二醇化或再聚乙二醇化导致体外 rAvPAL 酶活性临时降低。这看起来是由于在靠近催化活性位点的特定酪氨酸残基处的可逆聚乙二醇化。与一次聚乙二醇化相比, 再聚乙二醇化看起来提高了聚乙二醇化反应对 rAvPAL 酶活性的影响, 即, 临时降低其比活性, 其随着时间逐渐恢复。聚乙二醇化反应中较高的 PEG 浓度与较大的比活性临时降低有关。但是, 在 4°C 几周后, 首先用多种 PAL : PEG 比例及酶和 PEG 分子浓度 (示出了 AvPAL 和 PEG 中赖氨酸残基的 mM 浓度) 产生的再聚乙二醇化的 rAvPAL-PEG 的比活性, 达到使用 1 : 3 的 PAL : PEG 比例 (2mM 赖氨酸残基 : 6mM PEG, 实心圆形) 产生的单次聚乙二醇化的 AvPAL-PEG 的至少约 80%。此外, 聚乙二醇化和再聚乙二醇化的 AvPAL-PEG 酶在聚乙二醇化后具有相当的活性恢复速率。

[0471] 如图 18(下图) 所示, 首先使用 1 : 1 的 PAL : PEG 比例 (2mM 赖氨酸残基 : 2mM PEG, 实心正方形) 产生聚乙二醇化的 rAvPAL-PEG 时, 观察到类似的趋势。总之, 尽管再聚乙二醇化临时影响 AvPAL 活性, 但是与以 1 : 3 的 PAL : PEG 比例产生的单次聚乙二醇化的 rAvPAL-PEG 相比, 再聚乙二醇化的 rAvPAL-PEG 的最终比活性在可接受的范围内。

[0472] 聚乙二醇化和再聚乙二醇化的 rAvPAL 的 CGE 分析 : CGE 分析表明, 相对于单次聚乙二醇化, 再聚乙二醇化提高了聚乙二醇化的总程度。如图 19A 所示, 再聚乙二醇化导致 rAvPAL-PEG 的电泳迁移率降低, 暗示由于连接了额外的 PEG 分析导致分子大小增加。此外, 聚乙二醇化程度与再聚乙二醇化步骤过程中使用的 PEG 浓度极好地相关。如图 19B 所示, 无论第一个聚乙二醇化步骤中的反应条件如何, 6mM 或更高浓度的 mPEG20K-NHS 在提高 rAvPAL-PEG 的聚乙二醇化方面同样有效。总之, 与单次聚乙二醇化的 rAvPAL 相比, 再聚乙二醇化的 rAvPAL-PEG 清楚地显示降低的 CGE 迁移率, 因此显示提高的分子量。

[0473] 再聚乙二醇化后 rAvPAL-PEG 中的游离胺 : 进行 TNBS 分析以评估相对于单次聚乙二醇化的 rAvPAL-PEG, 再聚乙二醇化的 rAvPAL-PEG 中存在的游离胺基团的量。如表 13 所示, 在较高的 PEG 浓度如 6mM 下再聚乙二醇化最显著地降低了 rAvPAL 蛋白上存在的游离胺的量, 表明聚乙二醇化总体增加。在本文使用的条件下, 可以化学修饰的非聚乙二醇化 rAvPAL 中的大多数游离胺在再聚乙二醇化被有效地聚乙二醇化。

[0474] 表 13 :再聚乙二醇化的 rAvPAL-PEG 中存在的游离胺

[0475]

	[AvPAL] μ M	[游离胺] μ M	游离胺 /rAvPAL 单体	摩尔 PEG/ 摩尔 rAvPAL
rAvPAL	13.9	204.0	14.6	—
2mM Lys : 6 mM PEG	23.5	66.8	2.8	11.8
2 : 6 和 1 : 3	22.9	42.3	1.8	12.8
2 : 6 和 2 : 2	33.1	118.1	3.6	11.0
2 : 6 和 2 : 4	32.9	96.3	2.9	11.7
2 : 6 和 2 : 6	26.3	16.8	0.6	14.0
2 : 6 和 3 : 6	30.5	37.2	1.2	13.4

[0476] 再聚乙二醇化后赖氨酸残基的聚乙二醇化百分比 :如图 20 所示,胰蛋白酶肽图分析表明再聚乙二醇化提高了 rAvPAL-PEG 上赖氨酸残基的聚乙二醇化百分比。除了 AvPAL 第 10 位的赖氨酸残基已经在单次聚乙二醇化步骤过程中 100% 聚乙二醇化以外,其余的未偶联的赖氨酸残基将在再聚乙二醇化时聚乙二醇化。最特别地,AvPAL 第 301 位赖氨酸残基处的聚乙二醇化在再聚乙二醇化后提高了多达 500%。存在较高浓度如 6mM 的活化 mPEG20K-NHS 的再聚乙二醇化条件看来在增加 rAvPAL-PEG 的聚乙二醇化程度方面比较低的 PEG 浓度如 2mM 更有效。

[0477] 实施例 16

[0478] 再聚乙二醇化 AvPAL-PEG 变体在小鼠中的效应

[0479] 如实施例 15 所述在第一次和第二次聚乙二醇化反应中都使用 1 : 3 的 PAL : PEG 比例产生的再聚乙二醇化的 AvPAL_C565SC503S(rAvPAL-PEG-RP1),与如实施例 6 和 15 所述使用 1 : 3 的 PAL : PEG 比例产生的单次聚乙二醇化的 AvPAL_C565SC503S(rAvPAL-PEG),在降低小鼠 PKU 模型的血浆 Phe 水平的能力以及诱导体内抗体应答方面进行比较。

[0480] 如实施例 3 所述测定聚乙二醇化和再聚乙二醇化的 AvPAL 变体酶的比活性。发现 rAvPAL-PEG-RP1 具有比 rAvPAL-PEG 的比活性 (1.47U/mg) 低大约 20% 的比活性 (1.17U/mg)。

[0481] 基本如实施例 8 所述,分别检测了 AvPAL_C565SC503S 的聚乙二醇化和再聚乙二醇化形式, rAvPAL-PEG 和 rAvPAL-PEG-RP1,在纯合 ENU2 (也称为 BTBR^{enu2}) 小鼠中的体内活性。研究设计在下面的表 14 中显示。

[0482] 表 14 :用于比较 AvPAL 变体的聚乙二醇化和再聚乙二醇化形式的体内研究的设计

[0483]

组号	N	测试物	给药时间(周)	剂量(mg/kg)	标称测试物活性(IU/mL)	剂量体积(mL/kg)	剂量总数和给药频率
1	4	rAvPAL-PEG	第 1-8 周	80	12	10	每周一次给药 14 次(7 天一周的 第 1 天)
			第 9-14 周	20	3		
2	4	rAvPAL-PEG-RP1	第 1-8 周	80	12		
			第 9-14 周	20	3		
3	4	rAvPAL-PEG	第 1-8 周	80	12		
		rAvPAL-PEG-RP1	第 9-14 周	20	3		

[0484] 两组小鼠(第 1 组和第 2 组)分别皮下施用高(80mg/kg)每周剂量的 rAvPAL-PEG 或 rAvPAL-PEG-RP1,持续 8 周,然后分别施用低(20mg/kg)每周剂量的 rAvPAL-PEG 或 rAvPAL-PEG-RP1,持续 6 周。一组小鼠(第 3 组)施用高剂量的 rAvPAL-PEG,然后施用低剂量的 rAvPAL-PEG-RP1。给药前和给药后各天采集血浆,并分析 Phe 水平。如实施例 8 所述测定血浆 Phe 水平,获得的数据显示在图 21 中。也在给药前和给药后不同天采集血清,用于分析抗 AvPAL 抗体水平。如所述实施例 14 测定血清抗 rAvPAL IgG 滴度,获得的数据显示在表 15 中。

[0485] 如图 21 所示,对于全部 3 个组,每周 80mg/kg 皮下施用 rAvPAL-PEG(DP,实心圆形或实心倒三角形)或 rAvPAL-PEG-RP1 2×PEG,空心圆形)7-8 周导致血浆 Phe 水平稳定在 < 200 μM。稳定后,减至每周 20mg/kg 皮下施用 rAvPAL-PEG 导致血浆 Phe 水平在 4 天内 < 200 μM。用 20mg/kg rAvPAL-PEG 处理的 ENU2 小鼠(DP,实心圆形)中的血浆 Phe 水平低于用 20mg/kg rAvPAL-PEG-RP1 处理的小鼠(2×PEG,空心圆形或实心倒三角形),这可能是由于单次聚乙二醇化的 rAvPAL-PEG 的比活性高于两次聚乙二醇化的 rAvPAL-PEG-RP1 的比活性。

[0486] 如表 15 所示,注射 rAvPAL-PEG-RP1 的 ENU2 小鼠(第 2 组)中的抗 AvPAL IgG 滴度低于注射 rAvPAL-PEG 的小鼠(第 1 组和第 3 组)。这表明,再聚乙二醇化 AvPAL 变体以具有提高的聚乙二醇化量,特别是使用 20kDa 线性 PEG 分子,与降低的体内免疫原性相关。

[0487] 表 15:抗-AvPAL IgG 滴度

[0488]

聚乙二醇化的 AvPAL 蛋白	样品	D-2	D14	D26	D42	D68
rAvPAL-PEG	1-1	< 50	50	150	150	150
	1-2	< 50	50	1350	450	150
	1-3	150	450	4050	1350	1350
	1-4	150	1350	450	450	1350
rAvPAL-PEG-RP1	2-1	< 50	< 50	50	150	50

	2-2	150	50	< 50	50	< 50
	2-3	< 50	< 50	< 50	50	< 50
	2-4	< 50	< 50	< 50	< 50	< 50
第 1-8 周 rAvPAL-PEG, 然后	3-1	50	450	1350	1350	450
第 9-14 周 rAvPAL-PEG-RP1	3-2	50	1350	1350	1350	1350
	3-3	< 50	450	4050	1350	1350
	3-4	< 50	50	450	150	450

[0489] 总之,使用 20kDa 线性 PEG 分子再聚乙二醇化 AvPAL-PEG 变体以提高 AvPAL 中各赖氨酸残基处的聚乙二醇化百分比,与略微降低的体内酶活性相关,但是重要的是,与降低的体内免疫原性相关。

[0490] 实施例 17

[0491] 原核生物 PAL 组合物的临床评价

[0492] 以下实施例提供了关于用于临床评价本发明治疗方法中包含原核生物 PAL 或其生物活性变体、突变体和片段 (“PAL”) 的组合物的参数的指导。如本文全文所述, PAL 将用于治疗 HPA, 包括 HPA、轻度苯丙酮尿症 (PKU) 和经典 PKU。进行临床试验, 其将提供对口服或皮下 PAL 给药的安全性、药代动力学以及替代物和指定的临床终点的初始应答的评价。该试验将进行至少而不是必须限于 24 周, 以收集 100 位可评价患者的足够的安全性信息。该试验的初始剂量将在约 0.001 到约 1.0mg/kg/周之间变化。如果该剂量不导致患者血浆苯丙氨酸 (Phe) 水平的降低, 或者不产生显著的直接临床益处 (以提高每日口服 Phe 摄入量而不提高血浆 Phe 水平的能力衡量), 则根据需要应当增加剂量, 并维持额外的最短时间, 但不必限于 24 周, 以确定安全性并评价进一步的效果。

[0493] 安全性的检测将包括不良事件、变态反应、完整的临床化学组 (肾和肝功能)、尿分析和差别 CBC。此外, 还将监测其它参数, 包括血液 Phe 水平的降低、神经心理学和认知试验, 并还监测总体评价。本实施例还涉及检测药物在循环中的药代动力学参数, 以及血液中 PAL 的一般分布和半衰期。可以预期这些检测将有助于将剂量与临床反应联系起来。

[0494] 方法

[0495] 血浆 Phe 水平升高的患者将经历基准医疗史和身体检查、神经心理学和认知测验, 一套标准的临床实验室试验 (CBC, Panel 20, CH50, UA), 尿蝶呤水平、二氢蝶啶还原酶 (DHPR) 水平和空腹血液 (血浆) 组的血清氨基酸检测。患者将到诊所进行密切的每周随访。在完成治疗周期一周后患者将回到诊所进行全面评价。如果需要升高剂量, 则患者将遵循上面所列的相同方案。在该试验中自始至终都将监测安全性。

[0496] 诊断和入选 / 排除标准

[0497] 患者可以是男性或女性, 具有经过遗传检测和血液 Phe 水平升高的证据证实的 HPA 或轻度 PKU 的书面诊断。该研究将包括没有正确地进行饮食控制的 HPA 或 PKU 患者。具有妊娠可能的女性患者必须是恰在每次给药之前为妊娠试验 (尿 β -hCG) 阴性, 并且必

须建议在整个研究过程中使用医学上接受的避孕方法。如果患者怀孕或者哺乳；在加入研究之前 30 天内曾经接受过试验药物；或者具有医学状况、严重的间发性疾病或其它可能显著降低研究顺应性的情况，则必须从本研究中排除该患者。

[0498] 饮食干预

[0499] 在初步随机化和 2 周的治疗期后，所有研究参加者都将进行饮食咨询并且使用标准饮食和 / 或标准 Phe- 限制性饮食，补充专门的 Phe 医用食品，总共 4-6 周。饮食在家处理，并且在日志中记录饮食摄入量。对营养物和医用食品的摄入量和占推荐饮食摄入量 (RDI) 的百分比的分析在治疗组之间进行比较。

[0500] PAL 安全性

[0501] 如果在研究过程中没有发生显著的急性或慢性药物反应，则可以确定 PAL 治疗是安全的。如果在临床检查、临床试验或其他适当的研究中未观察到显著异常，则可以确定药物的更长期使用是安全的。

[0502] 实施例 18

[0503] 聚乙二醇化的 AvPAL 变体的临床评价

[0504] 聚乙二醇化的半胱氨酸双突变体 AvPAL, AvPAL_C565SC503S, 在人体中进行临床评价。该临床评价的目的是确定在 PKU 患者中的安全性、耐受性、药代动力学 (PK) 和有效性。血液苯丙氨酸 (Phe) 水平将作为临床终点。

[0505] 1 期

[0506] 1 期是在 35 名年龄在 16-50 岁之间的 PKU 患者中进行的标签公开的单剂量增加研究。主要目的是评价聚乙二醇化的半胱氨酸双突变体 AvPAL, AvPAL_C565SC503S 的安全性和耐受性，次要目的是评价聚乙二醇化的酶的 PK 和 Phe 减少。对各有 5 个个体的 7 个组按顺序施用剂量逐渐增加的 0.001、0.003、0.01、0.03、0.1、0.3 和 1mg/kg 聚乙二醇化的 AvPAL_C565SC503S。每个组中的个体接受单剂量，然后随访共 6 周。纳入标准是筛查时的血液 Phe 水平和过去 3 年的平均血液 Phe 水平 $> 600 \mu\text{M}$ 。

[0507] 2 期

[0508] 2 期研究分为没有中断的两个部分：

[0509] ● 第 1 部分 -16 周 -8 周给药，然后剂量优化

[0510] ● 第 2 部分 -40 周 - 延长

[0511] 2 期是在 35 名 PKU 患者中进行的两部分的、标签公开的、剂量优化研究。在 16 周的持续时间内进行的第 1 部分包括施用聚乙二醇化的 AvPAL_C565SC503S 的剂量，每周一次，共 8 周，然后是一段时间的剂量优化。将每名患者的剂量调整为达到低于 $600 \mu\text{M}$ 的血液 Phe 浓度。主要目的是评价聚乙二醇化的 AvPAL_C565SC503S 多次给药的安全性和耐受性，次要目的是评价聚乙二醇化的酶对 Phe 浓度、免疫应答例如抗 AvPAL 抗体滴度和稳态 PK 的影响。在第 2 部分中，以个体优化的给药剂量和频率给个体施用聚乙二醇化的 AvPAL_C565SC503S 40 周。

[0512] 3 期

[0513] 一旦 1 期和 2 期研究结束，额外的研究可能包括在大量患者中进行的 6 个月的 3 期双盲研究，以及在特殊群体，例如但不限于非 PKU 高苯丙氨酸血症 (HPA) 患者、BH4 应答性 PKU 患者和非 BH4 应答性 PHU 患者中进行的额外研究。

序列表

<110> 生物马林药物股份有限公司
米歇尔·C·维拉德
P·A·菲茨帕特里克
E·D·卡基斯
丹尼尔·J·温特

<120> 原核生物苯丙氨酸氨裂合酶的组合物及使用所述组合物的方法

<130> 0165 PC10

<150> US 11/451,999

<151> 2006-06-12

<160> 33

<170> PatentIn version 3.4

<210> 1

<211> 1710

<212> DNA

<213> 点形念珠藻

<400> 1

atgaatataa catctctaca acagaacata acgcgttctt ggcaaatacc tttcactaat	60
agttcagatt caatcgtaac tgtaggcgat cgcaatctga caatcgacga ggttgtaaat	120
gttgctcgtc atggaacaca ggtgcgctta actgataatg cagatgtcat tcggggtgtt	180
caagcatctt gtgattacat taacaatgca gtcgaaacag cacagccaat ttacggggtg	240
acatctggct ttggcggtat ggcagatgtt gtcatctctc gcgaacaagc agcggaactt	300
cagactaatt taatttggtt tctgaaatcc ggcgaggaa acaaattatc gttagcagac	360
gtgcgtgcag ctatgctctt acgtgcaaat tcacatttgt atggtgcgtc tggatatacga	420
ctcgaactta ttcagcggtat tgaaactttc ctcaacgctg gcgtgacacc ccatgtctat	480
gagtttggtt ctatcggtgc tagcggcgat ttggtgccat taccctacat tactggggca	540

ctaatacgggtc tagatcctag ctttacagtt gacttcgacg gtaaagaaat ggatgccgtt	600
acagccttgt ctcgtttggg tttgccaaag ttgcaattgc aaccgaaaga aggttttagca	660
atgatgaatg gcacctcagt catgacaggt attgcagcta actgtgtgta cgatgcgaaa	720
gttttgctcg ctctgacaat ggggtgtacac gccttagcca tccaaggttt atacggaacg	780
aatcaatctt tccacccgtt tattcatcag tgcaagccac atcccgttca actatggaca	840
gcagatcaaa tgttttctct gctgaaagat tcatctttag ttcgtgaaga gttggatggt	900
aaacacgaat accgtggtaa agatctgata caggatcgtt attctctccg ctgtctggca	960
cagttcatag ggccaatcgt tgatggggta tcagagatta ccaagcaaat cgaggtagaa	1020
atgaactcag tcaccgataa cccattgatt gatgtcgaga accaagttag ttatcacggc	1080
ggcaattttc tcggacagta tgtgggtgtg acaatggatc gcctacgtta ttacataggg	1140
ctattggcca aacacatcga tgtgcagatt gcacttcttg tctcgccaga gtttagcaac	1200
ggcttaccac cctctttagt tggtaatagc gatcgcaaag ttaatatggg actcaaaggt	1260
ttgcaaatca gtggaaactc gattatgcca ctgttgagct tctatggaaa ttccttagcc	1320
gatcgctttc ctaccacgc cgagcaattt aatcaaaata ttaacagcca aggctatatt	1380
tccgcaaatt tgacacgtcg ttccgtagac atatttcaga attatatggc gatcgcttg	1440
atgtttggag ttcaagctgt tgacctccgc acatataaga tgaaaggta ttatgatgca	1500
cgtacatgcc tctcacccaa tactgtgcag ttatacacag cagtctgcga ggtagttgga	1560
aagccactaa cgtctgtgcg tccatacatt tggaacgaca acgagcaatg tttagatgag	1620
catattgccc ggatttcagc tgatatcgct ggtgggtggt taattgtgca agcagttgag	1680
catatttttt cgagcttaaa gtcaacgtaa	1710

<210> 2

<211> 569

<212> PRT

<213> 点形念珠藻

<400> 2

Met Asn Ile Thr Ser Leu Gln Gln Asn Ile Thr Arg Ser Trp Gln Ile
1 5 10 15

Pro Phe Thr Asn Ser Ser Asp Ser Ile Val Thr Val Gly Asp Arg Asn
20 25 30

Leu Thr Ile Asp Glu Val Val Asn Val Ala Arg His Gly Thr Gln Val
35 40 45

Arg Leu Thr Asp Asn Ala Asp Val Ile Arg Gly Val Gln Ala Ser Cys
50 55 60

Asp Tyr Ile Asn Asn Ala Val Glu Thr Ala Gln Pro Ile Tyr Gly Val
65 70 75 80

Thr Ser Gly Phe Gly Gly Met Ala Asp Val Val Ile Ser Arg Glu Gln
85 90 95

Ala Ala Glu Leu Gln Thr Asn Leu Ile Trp Phe Leu Lys Ser Gly Ala
100 105 110

Gly Asn Lys Leu Ser Leu Ala Asp Val Arg Ala Ala Met Leu Leu Arg
115 120 125

Ala Asn Ser His Leu Tyr Gly Ala Ser Gly Ile Arg Leu Glu Leu Ile
130 135 140

Gln Arg Ile Glu Thr Phe Leu Asn Ala Gly Val Thr Pro His Val Tyr
145 150 155 160

Glu Phe Gly Ser Ile Gly Ala Ser Gly Asp Leu Val Pro Leu Ser Tyr
165 170 175

Ile Thr Gly Ala Leu Ile Gly Leu Asp Pro Ser Phe Thr Val Asp Phe
180 185 190

Asp Gly Lys Glu Met Asp Ala Val Thr Ala Leu Ser Arg Leu Gly Leu
195 200 205

Pro Lys Leu Gln Leu Gln Pro Lys Glu Gly Leu Ala Met Met Asn Gly
210 215 220

Thr Ser Val Met Thr Gly Ile Ala Ala Asn Cys Val Tyr Asp Ala Lys
225 230 235 240

Val Leu Leu Ala Leu Thr Met Gly Val His Ala Leu Ala Ile Gln Gly
245 250 255

Leu Tyr Gly Thr Asn Gln Ser Phe His Pro Phe Ile His Gln Cys Lys
260 265 270

Pro His Pro Gly Gln Leu Trp Thr Ala Asp Gln Met Phe Ser Leu Leu
275 280 285

Lys Asp Ser Ser Leu Val Arg Glu Glu Leu Asp Gly Lys His Glu Tyr
290 295 300

Arg Gly Lys Asp Leu Ile Gln Asp Arg Tyr Ser Leu Arg Cys Leu Ala
305 310 315 320

Gln Phe Ile Gly Pro Ile Val Asp Gly Val Ser Glu Ile Thr Lys Gln
325 330 335

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

Glu Asn Gln Val Ser Tyr His Gly Gly Asn Phe Leu Gly Gln Tyr Val
355 360 365

Gly Val Thr Met Asp Arg Leu Arg Tyr Tyr Ile Gly Leu Leu Ala Lys
370 375 380

His Ile Asp Val Gln Ile Ala Leu Leu Val Ser Pro Glu Phe Ser Asn
385 390 395 400

Gly Leu Pro Pro Ser Leu Val Gly Asn Ser Asp Arg Lys Val Asn Met
405 410 415

Gly Leu Lys Gly Leu Gln Ile Ser Gly Asn Ser Ile Met Pro Leu Leu
420 425 430

Ser Phe Tyr Gly Asn Ser Leu Ala Asp Arg Phe Pro Thr His Ala Glu
435 440 445

Gln Phe Asn Gln Asn Ile Asn Ser Gln Gly Tyr Ile Ser Ala Asn Leu
450 455 460

Thr Arg Arg Ser Val Asp Ile Phe Gln Asn Tyr Met Ala Ile Ala Leu
465 470 475 480

Met Phe Gly Val Gln Ala Val Asp Leu Arg Thr Tyr Lys Met Lys Gly
485 490 495

His Tyr Asp Ala Arg Thr Cys Leu Ser Pro Asn Thr Val Gln Leu Tyr
500 505 510

Thr Ala Val Cys Glu Val Val Gly Lys Pro Leu Thr Ser Val Arg Pro
515 520 525

Tyr Ile Trp Asn Asp Asn Glu Gln Cys Leu Asp Glu His Ile Ala Arg
530 535 540

Ile Ser Ala Asp Ile Ala Gly Gly Gly Leu Ile Val Gln Ala Val Glu
545 550 555 560

His Ile Phe Ser Ser Leu Lys Ser Thr
565

<210> 3

<211> 1704

<212> DNA

<213> 多变鱼腥藻

<400> 3

```
atgaagacac tatctcaage acaaagcaaa accatcatc acaaatcttc ttttactgga 60
aattcttctg ccaatgtaat tattggtaat cagaaactca caatcaatga tgttgcaagg 120
gtagcgcgta atggcacctt agtgtcttta accaataaca ctgatatttt gcagggtatt 180
caggcatctt gtgattacat taataatgct gtigaatctg gggaaccaat ttaatggagt 240
acatctgggt ttggcggtat ggccaatgtt gccatatccc gtgaacaagc atctgaactc 300
caaaccaact tagtttggtt cctgaaaaca ggtgcaggga acaaattacc ctggcggtat 360
gtgcgcgcag ctatgctctt gcgtgcaaac tctcatatgc gcggtgcac tggeatcaga 420
ttagaactta tcaagcgtat ggagattttc cttaacgtg gtgtcacacc atatgtgtat 480
gagtttggtt caattggtgc aagtgggtgat ttagtgccac taccctacat tactggttca 540
ctgataggct tagatcccag ttttaagggt gacttcaacg gtaaagaaat ggatgcgcca 600
acagctctac gtcaactgaa tttgtcacc ttgacattgt tgccgaagga aggcttggcg 660
```

atgatgaacg gcacttcagt catgacaggt attgcagcaa actgcgtcta cgataactcaa	720
attttaactg cgatcgctat gggcggttcac gctctagata tccaagcttt aaacggaacc	780
aatcaatcat tccatccatt tatccataat tccaaaccac atcctggtea attatgggca	840
gcagatcaga tgatttcttt gttagccaat tcccagttag ttcgtgatga gttagatggt	900
aaacacgatt atcgtgatca cgagttgatt caagatcggt actcactccg atgccttccc	960
cagtatttgg ggccaatcgt tgatggaatt tcccagattg ccaaacaaat tgaaatcgaa	1020
atcaactcag tcaccgataa cccactaatt gatgttgata accaagctag ctatcatgga	1080
ggaaatttcc tcggacagta cgtgggtatg ggaatggatc acctgcgtta ctatattggg	1140
ttattggcta aacacctaga tgtgcagatt gccctcctcg cctcaccaga gtttagcaat	1200
ggactaccac catctttatt aggcaaccga gaacgtaaag tcaatatggg actcaaaggt	1260
ctgcaaatat gcggtaacct aattatgcca ctgttgacct tctatggaaa ttccatcgcc	1320
gatcgcttcc ctacccatgc agaacaattt aatcagaaca tcaacagtea aggatacact	1380
tcagcgactc tagcccgccg ttctgtggat atcttcaga attatgtggc gatcgctctg	1440
atgtttggag tccaagctgt tgacctccgc acatataaaa agactggtea ttacgatgca	1500
cgcgcctgtc taccactgc aactgagcgc ttatatcag cagtcgccca cgtagttgga	1560
caaaaaccaa cttcagatcg cccatatatt tggaatgata atgagcaagg actggatgag	1620
catattgccc ggatttctgc tgatatcgct gctgggtgtg tgattgtgca agcagttcaa	1680
gatatcttac cctgcttgca ttaa	1704

<210> 4

<211> 567

<212> PRT

<213> 多变鱼腥藻

<400> 4

Met Lys Thr Leu Ser Gln Ala Gln Ser Lys Thr Ser Ser Gln Gln Phe
1 5 10 15

Ser Phe Thr Gly Asn Ser Ser Ala Asn Val Ile Ile Gly Asn Gln Lys
20 25 30

Leu Thr Ile Asn Asp Val Ala Arg Val Ala Arg Asn Gly Thr Leu Val
35 40 45

Ser Leu Thr Asn Asn Thr Asp Ile Leu Gln Gly Ile Gln Ala Ser Cys
50 55 60

Asp Tyr Ile Asn Asn Ala Val Glu Ser Gly Glu Pro Ile Tyr Gly Val
65 70 75 80

Thr Ser Gly Phe Gly Gly Met Ala Asn Val Ala Ile Ser Arg Glu Gln
85 90 95

Ala Ser Glu Leu Gln Thr Asn Leu Val Trp Phe Leu Lys Thr Gly Ala
100 105 110

Gly Asn Lys Leu Pro Leu Ala Asp Val Arg Ala Ala Met Leu Leu Arg
115 120 125

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

Lys Arg Met Glu Ile Phe Leu Asn Ala Gly Val Thr Pro Tyr Val Tyr
145 150 155 160

Glu Phe Gly Ser Ile Gly Ala Ser Gly Asp Leu Val Pro Leu Ser Tyr
165 170 175

Ile Thr Gly Ser Leu Ile Gly Leu Asp Pro Ser Phe Lys Val Asp Phe
180 185 190

Asn Gly Lys Glu Met Asp Ala Pro Thr Ala Leu Arg Gln Leu Asn Leu
195 200 205

Ser Pro Leu Thr Leu Leu Pro Lys Glu Gly Leu Ala Met Met Asn Gly
210 215 220

Thr Ser Val Met Thr Gly Ile Ala Ala Asn Cys Val Tyr Asp Thr Gln
225 230 235 240

Ile Leu Thr Ala Ile Ala Met Gly Val His Ala Leu Asp Ile Gln Ala
245 250 255

Leu Asn Gly Thr Asn Gln Ser Phe His Pro Phe Ile His Asn Ser Lys
260 265 270

Pro His Pro Gly Gln Leu Trp Ala Ala Asp Gln Met Ile Ser Leu Leu
275 280 285

Ala Asn Ser Gln Leu Val Arg Asp Glu Leu Asp Gly Lys His Asp Tyr
290 295 300

Arg Asp His Glu Leu Ile Gln Asp Arg Tyr Ser Leu Arg Cys Leu Pro
305 310 315 320

Gln Tyr Leu Gly Pro Ile Val Asp Gly Ile Ser Gln Ile Ala Lys Gln
325 330 335

Ile Glu Ile Glu Ile Asn Ser Val Thr Asp Asn Pro Leu Ile Asp Val
340 345 350

Asp Asn Gln Ala Ser Tyr His Gly Gly Asn Phe Leu Gly Gln Tyr Val
355 360 365

Gly Met Gly Met Asp His Leu Arg Tyr Tyr Ile Gly Leu Leu Ala Lys
370 375 380

His Leu Asp Val Gln Ile Ala Leu Leu Ala Ser Pro Glu Phe Ser Asn
385 390 395 400

Gly Leu Pro Pro Ser Leu Leu Gly Asn Arg Glu Arg Lys Val Asn Met
405 410 415

Gly Leu Lys Gly Leu Gln Ile Cys Gly Asn Ser Ile Met Pro Leu Leu
420 425 430

Thr Phe Tyr Gly Asn Ser Ile Ala Asp Arg Phe Pro Thr His Ala Glu
435 440 445

Gln Phe Asn Gln Asn Ile Asn Ser Gln Gly Tyr Thr Ser Ala Thr Leu
450 455 460

Ala Arg Arg Ser Val Asp Ile Phe Gln Asn Tyr Val Ala Ile Ala Leu
465 470 475 480

Met Phe Gly Val Gln Ala Val Asp Leu Arg Thr Tyr Lys Lys Thr Gly
485 490 495

His Tyr Asp Ala Arg Ala Cys Leu Ser Pro Ala Thr Glu Arg Leu Tyr
500 505 510

Ser Ala Val Arg His Val Val Gly Gln Lys Pro Thr Ser Asp Arg Pro
515 520 525

Tyr Ile Trp Asn Asp Asn Glu Gln Gly Leu Asp Glu His Ile Ala Arg
530 535 540

Ile Ser Ala Asp Ile Ala Ala Gly Gly Val Ile Val Gln Ala Val Gln
545 550 555 560

Asp Ile Leu Pro Cys Leu His
565

<210> 5
<211> 523
<212> PRT
<213> 海洋链霉菌属

<400> 5

Met Thr Phe Val Ile Glu Leu Asp Met Asn Val Thr Leu Asp Gln Leu
1 5 10 15

Glu Asp Ala Ala Arg Gln Arg Thr Pro Val Glu Leu Ser Ala Pro Val
20 25 30

Arg Ser Arg Val Arg Ala Ser Arg Asp Val Leu Val Lys Phe Val Gln
35 40 45

Asp Glu Arg Val Ile Tyr Gly Val Asn Thr Ser Met Gly Gly Phe Val
50 55 60

Asp His Leu Val Pro Val Ser Gln Ala Arg Gln Leu Gln Glu Asn Leu
65 70 75 80

Ile Asn Ala Val Ala Thr Asn Val Gly Ala Tyr Leu Asp Asp Thr Thr
85 90 95

Ala Arg Thr Ile Met Leu Ser Arg Ile Val Ser Leu Ala Arg Gly Asn
100 105 110

Ser Ala Ile Thr Pro Ala Asn Leu Asp Lys Leu Val Ala Val Leu Asn
115 120 125

Ala Gly Ile Val Pro Cys Ile Pro Glu Lys Gly Ser Leu Gly Thr Ser
130 135 140

Gly Asp Leu Gly Pro Leu Ala Ala Ile Ala Leu Val Cys Ala Gly Gln
145 150 155 160

Trp Lys Ala Arg Tyr Asn Gly Gln Ile Met Pro Gly Arg Gln Ala Leu
165 170 175

Ser Glu Ala Gly Val Glu Pro Met Glu Leu Ser Tyr Lys Asp Gly Leu
180 185 190

Ala Leu Ile Asn Gly Thr Ser Gly Met Val Gly Leu Gly Thr Met Val
195 200 205

Leu Gln Ala Ala Arg Arg Leu Val Asp Arg Tyr Leu Gln Val Ser Ala
210 215 220

Leu Ser Val Glu Gly Leu Ala Gly Met Thr Lys Pro Phe Asp Pro Arg
225 230 235 240

Val His Gly Val Lys Pro His Arg Gly Gln Arg Gln Val Ala Ser Arg
245 250 255

Leu Trp Glu Gly Leu Ala Asp Ser His Leu Ala Val Asn Glu Leu Asp
260 265 270

Thr Glu Gln Thr Leu Ala Gly Glu Met Gly Thr Val Ala Lys Ala Gly
275 280 285

Ser Leu Ala Ile Glu Asp Ala Tyr Ser Ile Arg Cys Thr Pro Gln Ile
290 295 300

Leu Gly Pro Val Val Asp Val Leu Asp Arg Ile Gly Ala Thr Leu Gln
305 310 315 320

Asp Glu Leu Asn Ser Ser Asn Asp Asn Pro Ile Val Leu Pro Glu Glu
325 330 335

Ala Glu Val Phe His Asn Gly His Phe His Gly Gln Tyr Val Ala Met
340 345 350

Ala Met Asp His Leu Asn Met Ala Leu Ala Thr Val Thr Asn Leu Ala
355 360 365

Asn Arg Arg Val Asp Arg Phe Leu Asp Lys Ser Asn Ser Asn Gly Leu
370 375 380

Pro Ala Phe Leu Cys Arg Glu Asp Pro Gly Leu Arg Leu Gly Leu Met
385 390 395 400

Gly Gly Gln Phe Met Thr Ala Ser Ile Thr Ala Glu Thr Arg Thr Leu
405 410 415

Thr Ile Pro Met Ser Val Gln Ser Leu Thr Ser Thr Ala Asp Phe Gln
420 425 430

Asp Ile Val Ser Phe Gly Phe Val Ala Ala Arg Arg Ala Arg Glu Val
435 440 445

Leu Thr Asn Ala Ala Tyr Val Val Ala Phe Glu Leu Leu Cys Ala Cys
450 455 460

Gln Ala Val Asp Ile Arg Gly Ala Asp Lys Leu Ser Ser Phe Thr Arg
465 470 475 480

Pro Leu Tyr Glu Arg Thr Arg Lys Ile Val Pro Phe Phe Asp Arg Asp
485 490 495

Glu Thr Ile Thr Asp Tyr Val Glu Lys Leu Ala Ala Asp Leu Ile Ala
500 505 510

Gly Glu Pro Val Asp Ala Ala Val Ala Ala His
515 520

<210> 6
<211> 510
<212> PRT
<213> 恶臭假单胞菌

<400> 6

Met Thr Glu Leu Thr Leu Lys Pro Gly Thr Leu Thr Leu Ala Gln Leu
1 5 10 15

Arg Ala Ile His Ala Ala Pro Val Arg Leu Gln Leu Asp Ala Ser Ala
20 25 30

Ala Pro Ala Ile Asp Ala Ser Val Ala Cys Val Glu Gln Ile Ile Ala
35 40 45

Glu Asp Arg Thr Ala Tyr Gly Ile Asn Thr Gly Phe Gly Leu Leu Ala
50 55 60

Ser Thr Arg Ile Ala Ser His Asp Leu Glu Asn Leu Gln Arg Ser Leu
65 70 75 80

Val Leu Ser His Ala Ala Gly Ile Gly Ala Pro Leu Asp Asp Asp Leu
85 90 95

Val Arg Leu Ile Met Val Leu Lys Ile Asn Ser Leu Ser Arg Gly Phe
100 105 110

Ser Gly Ile Arg Arg Lys Val Ile Asp Ala Leu Ile Ala Leu Val Asn
115 120 125

Ala Glu Val Tyr Pro His Ile Pro Leu Lys Gly Ser Val Gly Ala Ser
130 135 140

Gly Asp Leu Ala Pro Leu Ala Thr Met Ser Leu Val Leu Leu Gly Glu
145 150 155 160

Gly Lys Ala Arg Tyr Lys Gly Gln Trp Leu Ser Ala Thr Glu Ala Leu
165 170 175

Ala Val Ala Gly Leu Glu Pro Leu Thr Leu Ala Ala Lys Glu Gly Leu
180 185 190

Ala Leu Leu Asn Gly Thr Gln Ala Ser Thr Ala Tyr Ala Leu Arg Gly
195 200 205

Leu Phe Tyr Ala Glu Asp Leu Tyr Ala Ala Ala Ile Ala Cys Gly Gly
210 215 220

Leu Ser Val Glu Ala Val Leu Gly Ser Arg Ser Pro Phe Asp Ala Arg
225 230 235 240

Ile His Glu Ala Arg Gly Gln Arg Gly Gln Ile Asp Thr Ala Ala Cys
245 250 255

Phe Arg Asp Leu Leu Gly Asp Ser Ser Glu Val Ser Leu Ser His Lys
260 265 270

Asn Cys Asp Lys Val Gln Asp Pro Tyr Ser Leu Arg Cys Gln Pro Gln
275 280 285

Val Met Gly Ala Cys Leu Thr Gln Leu Arg Gln Ala Ala Glu Val Leu
290 295 300

Gly Ile Glu Ala Asn Ala Val Ser Asp Asn Pro Leu Val Phe Ala Ala
305 310 315 320

Glu Gly Asp Val Ile Ser Gly Gly Asn Phe His Ala Glu Pro Val Ala
325 330 335

Met Ala Ala Asp Asn Leu Ala Leu Ala Ile Ala Glu Ile Gly Ser Leu
340 345 350

Ser Glu Arg Arg Ile Ser Leu Met Met Asp Lys His Met Ser Gln Leu
355 360 365

Pro Pro Phe Leu Val Glu Asn Gly Gly Val Asn Ser Gly Phe Met Ile
370 375 380

Ala Gln Val Thr Ala Ala Ala Leu Ala Ser Glu Asn Lys Ala Leu Ser
385 390 395 400

His Pro His Ser Val Asp Ser Leu Pro Thr Ser Ala Asn Gln Glu Asp
405 410 415

His Val Ser Met Ala Pro Ala Ala Gly Lys Arg Leu Trp Glu Met Ala
420 425 430

Glu Asn Thr Arg Gly Val Pro Ala Ile Glu Trp Leu Gly Ala Cys Gln
435 440 445

Gly Leu Asp Leu Arg Lys Gly Leu Lys Thr Ser Ala Lys Leu Glu Lys
450 455 460

Ala Arg Gln Ala Leu Arg Ser Glu Val Ala His Tyr Asp Arg Asp Arg
465 470 475 480

Phe Phe Ala Pro Asp Ile Glu Lys Ala Val Glu Leu Leu Ala Lys Gly
485 490 495

Ser Leu Thr Gly Leu Leu Pro Ala Gly Val Leu Pro Ser Leu
500 505 510

<210> 7
<211> 567
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 多变鱼腥藻 PAL 第 64 位的半胱氨酸替代为丝氨酸

<400> 7

Met Lys Thr Leu Ser Gln Ala Gln Ser Lys Thr Ser Ser Gln Gln Phe
1 5 10 15

Ser Phe Thr Gly Asn Ser Ser Ala Asn Val Ile Ile Gly Asn Gln Lys
20 25 30

Leu Thr Ile Asn Asp Val Ala Arg Val Ala Arg Asn Gly Thr Leu Val
35 40 45

Ser Leu Thr Asn Asn Thr Asp Ile Leu Gln Gly Ile Gln Ala Ser Ser
50 55 60

Asp Tyr Ile Asn Asn Ala Val Glu Ser Gly Glu Pro Ile Tyr Gly Val
65 70 75 80

Thr Ser Gly Phe Gly Gly Met Ala Asn Val Ala Ile Ser Arg Glu Gln
85 90 95

Ala Ser Glu Leu Gln Thr Asn Leu Val Trp Phe Leu Lys Thr Gly Ala
100 105 110

Gly Asn Lys Leu Pro Leu Ala Asp Val Arg Ala Ala Met Leu Leu Arg
115 120 125

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

Lys Arg Met Glu Ile Phe Leu Asn Ala Gly Val Thr Pro Tyr Val Tyr
145 150 155 160

Glu Phe Gly Ser Ile Gly Ala Ser Gly Asp Leu Val Pro Leu Ser Tyr
165 170 175

Ile Thr Gly Ser Leu Ile Gly Leu Asp Pro Ser Phe Lys Val Asp Phe
180 185 190

Asn Gly Lys Glu Met Asp Ala Pro Thr Ala Leu Arg Gln Leu Asn Leu
195 200 205

Ser Pro Leu Thr Leu Leu Pro Lys Glu Gly Leu Ala Met Met Asn Gly
210 215 220

Thr Ser Val Met Thr Gly Ile Ala Ala Asn Cys Val Tyr Asp Thr Gln
225 230 235 240

Ile Leu Thr Ala Ile Ala Met Gly Val His Ala Leu Asp Ile Gln Ala
245 250 255

Leu Asn Gly Thr Asn Gln Ser Phe His Pro Phe Ile His Asn Ser Lys
260 265 270

Pro His Pro Gly Gln Leu Trp Ala Ala Asp Gln Met Ile Ser Leu Leu
275 280 285

Ala Asn Ser Gln Leu Val Arg Asp Glu Leu Asp Gly Lys His Asp Tyr
290 295 300

Arg Asp His Glu Leu Ile Gln Asp Arg Tyr Ser Leu Arg Cys Leu Pro
305 310 315 320

Gln Tyr Leu Gly Pro Ile Val Asp Gly Ile Ser Gln Ile Ala Lys Gln
325 330 335

Ile Glu Ile Glu Ile Asn Ser Val Thr Asp Asn Pro Leu Ile Asp Val
340 345 350

Asp Asn Gln Ala Ser Tyr His Gly Gly Asn Phe Leu Gly Gln Tyr Val
355 360 365

Gly Met Gly Met Asp His Leu Arg Tyr Tyr Ile Gly Leu Leu Ala Lys
370 375 380

His Leu Asp Val Gln Ile Ala Leu Leu Ala Ser Pro Glu Phe Ser Asn
385 390 395 400

Gly Leu Pro Pro Ser Leu Leu Gly Asn Arg Glu Arg Lys Val Asn Met
405 410 415

Gly Leu Lys Gly Leu Gln Ile Cys Gly Asn Ser Ile Met Pro Leu Leu
420 425 430

Thr Phe Tyr Gly Asn Ser Ile Ala Asp Arg Phe Pro Thr His Ala Glu
435 440 445

Gln Phe Asn Gln Asn Ile Asn Ser Gln Gly Tyr Thr Ser Ala Thr Leu
450 455 460

Ala Arg Arg Ser Val Asp Ile Phe Gln Asn Tyr Val Ala Ile Ala Leu
465 470 475 480

Met Phe Gly Val Gln Ala Val Asp Leu Arg Thr Tyr Lys Lys Thr Gly
485 490 495

His Tyr Asp Ala Arg Ala Cys Leu Ser Pro Ala Thr Glu Arg Leu Tyr
500 505 510

Ser Ala Val Arg His Val Val Gly Gln Lys Pro Thr Ser Asp Arg Pro
515 520 525

Tyr Ile Trp Asn Asp Asn Glu Gln Gly Leu Asp Glu His Ile Ala Arg
530 535 540

Ile Ser Ala Asp Ile Ala Ala Gly Gly Val Ile Val Gln Ala Val Gln
545 550 555 560

Asp Ile Leu Pro Cys Leu His
565

<210> 8

<211> 567

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 多变鱼腥藻 PAL 第 318 位的半胱氨酸替代为丝氨酸

<400> 8

Met Lys Thr Leu Ser Gln Ala Gln Ser Lys Thr Ser Ser Gln Gln Phe
1 5 10 15

Ser Phe Thr Gly Asn Ser Ser Ala Asn Val Ile Ile Gly Asn Gln Lys
20 25 30

Leu Thr Ile Asn Asp Val Ala Arg Val Ala Arg Asn Gly Thr Leu Val
35 40 45

Ser Leu Thr Asn Asn Thr Asp Ile Leu Gln Gly Ile Gln Ala Ser Cys
50 55 60

Asp Tyr Ile Asn Asn Ala Val Glu Ser Gly Glu Pro Ile Tyr Gly Val
65 70 75 80

Thr Ser Gly Phe Gly Gly Met Ala Asn Val Ala Ile Ser Arg Glu Gln
85 90 95

Ala Ser Glu Leu Gln Thr Asn Leu Val Trp Phe Leu Lys Thr Gly Ala
100 105 110

Gly Asn Lys Leu Pro Leu Ala Asp Val Arg Ala Ala Met Leu Leu Arg
115 120 125

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

Lys Arg Met Glu Ile Phe Leu Asn Ala Gly Val Thr Pro Tyr Val Tyr
145 150 155 160

Glu Phe Gly Ser Ile Gly Ala Ser Gly Asp Leu Val Pro Leu Ser Tyr
165 170 175

Ile Thr Gly Ser Leu Ile Gly Leu Asp Pro Ser Phe Lys Val Asp Phe
180 185 190

Asn Gly Lys Glu Met Asp Ala Pro Thr Ala Leu Arg Gln Leu Asn Leu
195 200 205

Ser Pro Leu Thr Leu Leu Pro Lys Glu Gly Leu Ala Met Met Asn Gly
210 215 220

Thr Ser Val Met Thr Gly Ile Ala Ala Asn Cys Val Tyr Asp Thr Gln
225 230 235 240

Ile Leu Thr Ala Ile Ala Met Gly Val His Ala Leu Asp Ile Gln Ala
245 250 255

Leu Asn Gly Thr Asn Gln Ser Phe His Pro Phe Ile His Asn Ser Lys
260 265 270

Pro His Pro Gly Gln Leu Trp Ala Ala Asp Gln Met Ile Ser Leu Leu
275 280 285

Ala Asn Ser Gln Leu Val Arg Asp Glu Leu Asp Gly Lys His Asp Tyr
290 295 300

Arg Asp His Glu Leu Ile Gln Asp Arg Tyr Ser Leu Arg Ser Leu Pro
305 310 315 320

Gln Tyr Leu Gly Pro Ile Val Asp Gly Ile Ser Gln Ile Ala Lys Gln
325 330 335

Ile Glu Ile Glu Ile Asn Ser Val Thr Asp Asn Pro Leu Ile Asp Val
340 345 350

Asp Asn Gln Ala Ser Tyr His Gly Gly Asn Phe Leu Gly Gln Tyr Val
355 360 365

Gly Met Gly Met Asp His Leu Arg Tyr Tyr Ile Gly Leu Leu Ala Lys
370 375 380

His Leu Asp Val Gln Ile Ala Leu Leu Ala Ser Pro Glu Phe Ser Asn
385 390 395 400

Gly Leu Pro Pro Ser Leu Leu Gly Asn Arg Glu Arg Lys Val Asn Met
405 410 415

Gly Leu Lys Gly Leu Gln Ile Cys Gly Asn Ser Ile Met Pro Leu Leu
420 425 430

Thr Phe Tyr Gly Asn Ser Ile Ala Asp Arg Phe Pro Thr His Ala Glu
435 440 445

Gln Phe Asn Gln Asn Ile Asn Ser Gln Gly Tyr Thr Ser Ala Thr Leu
450 455 460

Ala Arg Arg Ser Val Asp Ile Phe Gln Asn Tyr Val Ala Ile Ala Leu
465 470 475 480

Met Phe Gly Val Gln Ala Val Asp Leu Arg Thr Tyr Lys Lys Thr Gly
485 490 495

His Tyr Asp Ala Arg Ala Cys Leu Ser Pro Ala Thr Glu Arg Leu Tyr
500 505 510

Ser Ala Val Arg His Val Val Gly Gln Lys Pro Thr Ser Asp Arg Pro
515 520 525

Tyr Ile Trp Asn Asp Asn Glu Gln Gly Leu Asp Glu His Ile Ala Arg
530 535 540

Ile Ser Ala Asp Ile Ala Ala Gly Gly Val Ile Val Gln Ala Val Gln
545 550 555 560

Asp Ile Leu Pro Cys Leu His
565

<210> 9
<211> 567
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 多变鱼腥藻 PAL 第 503 位的半胱氨酸代替为丝氨酸

<400> 9

Met Lys Thr Leu Ser Gln Ala Gln Ser Lys Thr Ser Ser Gln Gln Phe
1 5 10 15

Ser Phe Thr Gly Asn Ser Ser Ala Asn Val Ile Ile Gly Asn Gln Lys
20 25 30

Leu Thr Ile Asn Asp Val Ala Arg Val Ala Arg Asn Gly Thr Leu Val
35 40 45

Ser Leu Thr Asn Asn Thr Asp Ile Leu Gln Gly Ile Gln Ala Ser Cys
50 55 60

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

Ile Leu Thr Ala Ile Ala Met Gly Val His Ala Leu Asp Ile Gln Ala
245 250 255

Leu Asn Gly Thr Asn Gln Ser Phe His Pro Phe Ile His Asn Ser Lys
260 265 270

Pro His Pro Gly Gln Leu Trp Ala Ala Asp Gln Met Ile Ser Leu Leu
275 280 285

Ala Asn Ser Gln Leu Val Arg Asp Glu Leu Asp Gly Lys His Asp Tyr
290 295 300

Arg Asp His Glu Leu Ile Gln Asp Arg Tyr Ser Leu Arg Cys Leu Pro
305 310 315 320

Gln Tyr Leu Gly Pro Ile Val Asp Gly Ile Ser Gln Ile Ala Lys Gln
325 330 335

Ile Glu Ile Glu Ile Asn Ser Val Thr Asp Asn Pro Leu Ile Asp Val
340 345 350

Asp Asn Gln Ala Ser Tyr His Gly Gly Asn Phe Leu Gly Gln Tyr Val
355 360 365

Gly Met Gly Met Asp His Leu Arg Tyr Tyr Ile Gly Leu Leu Ala Lys
370 375 380

His Leu Asp Val Gln Ile Ala Leu Leu Ala Ser Pro Glu Phe Ser Asn
385 390 395 400

Gly Leu Pro Pro Ser Leu Leu Gly Asn Arg Glu Arg Lys Val Asn Met
405 410 415

Gly Leu Lys Gly Leu Gln Ile Cys Gly Asn Ser Ile Met Pro Leu Leu
420 425 430

Thr Phe Tyr Gly Asn Ser Ile Ala Asp Arg Phe Pro Thr His Ala Glu
435 440 445

Gln Phe Asn Gln Asn Ile Asn Ser Gln Gly Tyr Thr Ser Ala Thr Leu
450 455 460

Ala Arg Arg Ser Val Asp Ile Phe Gln Asn Tyr Val Ala Ile Ala Leu
465 470 475 480

Met Phe Gly Val Gln Ala Val Asp Leu Arg Thr Tyr Lys Lys Thr Gly
485 490 495

His Tyr Asp Ala Arg Ala Ser Leu Ser Pro Ala Thr Glu Arg Leu Tyr
500 505 510

Ser Ala Val Arg His Val Val Gly Gln Lys Pro Thr Ser Asp Arg Pro
515 520 525

Tyr Ile Trp Asn Asp Asn Glu Gln Gly Leu Asp Glu His Ile Ala Arg
530 535 540

Ile Ser Ala Asp Ile Ala Ala Gly Gly Val Ile Val Gln Ala Val Gln
545 550 555 560

Asp Ile Leu Pro Cys Leu His
565

<210> 10

<211> 567

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 多变鱼腥藻 PAL 第 565 位的半胱氨酸替代为丝氨酸

<400> 10

Met Lys Thr Leu Ser Gln Ala Gln Ser Lys Thr Ser Ser Gln Gln Phe
1 5 10 15

Ser Phe Thr Gly Asn Ser Ser Ala Asn Val Ile Ile Gly Asn Gln Lys
20 25 30

Leu Thr Ile Asn Asp Val Ala Arg Val Ala Arg Asn Gly Thr Leu Val
35 40 45

Ser Leu Thr Asn Asn Thr Asp Ile Leu Gln Gly Ile Gln Ala Ser Cys
50 55 60

Asp Tyr Ile Asn Asn Ala Val Glu Ser Gly Glu Pro Ile Tyr Gly Val
65 70 75 80

Thr Ser Gly Phe Gly Gly Met Ala Asn Val Ala Ile Ser Arg Glu Gln
85 90 95

Ala Ser Glu Leu Gln Thr Asn Leu Val Trp Phe Leu Lys Thr Gly Ala
100 105 110

Gly Asn Lys Leu Pro Leu Ala Asp Val Arg Ala Ala Met Leu Leu Arg
115 120 125

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

Lys Arg Met Glu Ile Phe Leu Asn Ala Gly Val Thr Pro Tyr Val Tyr
145 150 155 160

Glu Phe Gly Ser Ile Gly Ala Ser Gly Asp Leu Val Pro Leu Ser Tyr
165 170 175

Ile Thr Gly Ser Leu Ile Gly Leu Asp Pro Ser Phe Lys Val Asp Phe
180 185 190

Asn Gly Lys Glu Met Asp Ala Pro Thr Ala Leu Arg Gln Leu Asn Leu
195 200 205

Ser Pro Leu Thr Leu Leu Pro Lys Glu Gly Leu Ala Met Met Asn Gly
210 215 220

Thr Ser Val Met Thr Gly Ile Ala Ala Asn Cys Val Tyr Asp Thr Gln
225 230 235 240

Ile Leu Thr Ala Ile Ala Met Gly Val His Ala Leu Asp Ile Gln Ala
245 250 255

Leu Asn Gly Thr Asn Gln Ser Phe His Pro Phe Ile His Asn Ser Lys
260 265 270

Pro His Pro Gly Gln Leu Trp Ala Ala Asp Gln Met Ile Ser Leu Leu
275 280 285

Ala Asn Ser Gln Leu Val Arg Asp Glu Leu Asp Gly Lys His Asp Tyr
290 295 300

Arg Asp His Glu Leu Ile Gln Asp Arg Tyr Ser Leu Arg Cys Leu Pro
305 310 315 320

Gln Tyr Leu Gly Pro Ile Val Asp Gly Ile Ser Gln Ile Ala Lys Gln
325 330 335

Ile Glu Ile Glu Ile Asn Ser Val Thr Asp Asn Pro Leu Ile Asp Val
340 345 350

Asp Asn Gln Ala Ser Tyr His Gly Gly Asn Phe Leu Gly Gln Tyr Val
355 360 365

Gly Met Gly Met Asp His Leu Arg Tyr Tyr Ile Gly Leu Leu Ala Lys
370 375 380

His Leu Asp Val Gln Ile Ala Leu Leu Ala Ser Pro Glu Phe Ser Asn
385 390 395 400

Gly Leu Pro Pro Ser Leu Leu Gly Asn Arg Glu Arg Lys Val Asn Met
405 410 415

Gly Leu Lys Gly Leu Gln Ile Cys Gly Asn Ser Ile Met Pro Leu Leu
420 425 430

Thr Phe Tyr Gly Asn Ser Ile Ala Asp Arg Phe Pro Thr His Ala Glu
435 440 445

Gln Phe Asn Gln Asn Ile Asn Ser Gln Gly Tyr Thr Ser Ala Thr Leu
450 455 460

Ala Arg Arg Ser Val Asp Ile Phe Gln Asn Tyr Val Ala Ile Ala Leu
465 470 475 480

Met Phe Gly Val Gln Ala Val Asp Leu Arg Thr Tyr Lys Lys Thr Gly
485 490 495

His Tyr Asp Ala Arg Ala Cys Leu Ser Pro Ala Thr Glu Arg Leu Tyr
500 505 510

Ser Ala Val Arg His Val Val Gly Gln Lys Pro Thr Ser Asp Arg Pro
515 520 525

Tyr Ile Trp Asn Asp Asn Glu Gln Gly Leu Asp Glu His Ile Ala Arg
530 535 540

Ile Ser Ala Asp Ile Ala Ala Gly Gly Val Ile Val Gln Ala Val Gln
545 550 555 560

Asp Ile Leu Pro Ser Leu His
565

<210> 11

<211> 567

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 多变鱼腥藻 PAL 第 565 和 503 位的半胱氨酸代替为丝氨酸

<400> 11

Met Lys Thr Leu Ser Gln Ala Gln Ser Lys Thr Ser Ser Gln Gln Phe
1 5 10 15

Ser Phe Thr Gly Asn Ser Ser Ala Asn Val Ile Ile Gly Asn Gln Lys
20 25 30

Leu Thr Ile Asn Asp Val Ala Arg Val Ala Arg Asn Gly Thr Leu Val
35 40 45

Ser Leu Thr Asn Asn Thr Asp Ile Leu Gln Gly Ile Gln Ala Ser Cys
50 55 60

Asp Tyr Ile Asn Asn Ala Val Glu Ser Gly Glu Pro Ile Tyr Gly Val
65 70 75 80

Thr Ser Gly Phe Gly Gly Met Ala Asn Val Ala Ile Ser Arg Glu Gln
85 90 95

Ala Ser Glu Leu Gln Thr Asn Leu Val Trp Phe Leu Lys Thr Gly Ala
100 105 110

Gly Asn Lys Leu Pro Leu Ala Asp Val Arg Ala Ala Met Leu Leu Arg
115 120 125

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

Lys Arg Met Glu Ile Phe Leu Asn Ala Gly Val Thr Pro Tyr Val Tyr
145 150 155 160

Glu Phe Gly Ser Ile Gly Ala Ser Gly Asp Leu Val Pro Leu Ser Tyr
165 170 175

Ile Thr Gly Ser Leu Ile Gly Leu Asp Pro Ser Phe Lys Val Asp Phe
180 185 190

Asn Gly Lys Glu Met Asp Ala Pro Thr Ala Leu Arg Gln Leu Asn Leu
195 200 205

Ser Pro Leu Thr Leu Leu Pro Lys Glu Gly Leu Ala Met Met Asn Gly
210 215 220

Thr Ser Val Met Thr Gly Ile Ala Ala Asn Cys Val Tyr Asp Thr Gln
225 230 235 240

Ile Leu Thr Ala Ile Ala Met Gly Val His Ala Leu Asp Ile Gln Ala
245 250 255

Leu Asn Gly Thr Asn Gln Ser Phe His Pro Phe Ile His Asn Ser Lys
260 265 270

Pro His Pro Gly Gln Leu Trp Ala Ala Asp Gln Met Ile Ser Leu Leu
275 280 285

Ala Asn Ser Gln Leu Val Arg Asp Glu Leu Asp Gly Lys His Asp Tyr
290 295 300

Arg Asp His Glu Leu Ile Gln Asp Arg Tyr Ser Leu Arg Cys Leu Pro
305 310 315 320

Gln Tyr Leu Gly Pro Ile Val Asp Gly Ile Ser Gln Ile Ala Lys Gln
325 330 335

Ile Glu Ile Glu Ile Asn Ser Val Thr Asp Asn Pro Leu Ile Asp Val
340 345 350

Asp Asn Gln Ala Ser Tyr His Gly Gly Asn Phe Leu Gly Gln Tyr Val
355 360 365

Gly Met Gly Met Asp His Leu Arg Tyr Tyr Ile Gly Leu Leu Ala Lys
370 375 380

His Leu Asp Val Gln Ile Ala Leu Leu Ala Ser Pro Glu Phe Ser Asn
385 390 395 400

Gly Leu Pro Pro Ser Leu Leu Gly Asn Arg Glu Arg Lys Val Asn Met
405 410 415

Gly Leu Lys Gly Leu Gln Ile Cys Gly Asn Ser Ile Met Pro Leu Leu
420 425 430

Thr Phe Tyr Gly Asn Ser Ile Ala Asp Arg Phe Pro Thr His Ala Glu
435 440 445

Gln Phe Asn Gln Asn Ile Asn Ser Gln Gly Tyr Thr Ser Ala Thr Leu
450 455 460

Ala Arg Arg Ser Val Asp Ile Phe Gln Asn Tyr Val Ala Ile Ala Leu
465 470 475 480

Met Phe Gly Val Gln Ala Val Asp Leu Arg Thr Tyr Lys Lys Thr Gly
485 490 495

His Tyr Asp Ala Arg Ala Ser Leu Ser Pro Ala Thr Glu Arg Leu Tyr
500 505 510

Ser Ala Val Arg His Val Val Gly Gln Lys Pro Thr Ser Asp Arg Pro
515 520 525

Tyr Ile Trp Asn Asp Asn Glu Gln Gly Leu Asp Glu His Ile Ala Arg
530 535 540

Ile Ser Ala Asp Ile Ala Ala Gly Gly Val Ile Val Gln Ala Val Gln
545 550 555 560

Asp Ile Leu Pro Ser Leu His
565

<210> 12

<211> 38

<212>	DNA	
<213>	人工的	
<220>		
<223>	点形念珠藻 PAL 引物 1(前导)	
<400>	12	
	cactgtcata tgaatataac atctctacaa cagaacat	38
<210>	13	
<211>	45	
<212>	DNA	
<213>	人工的	
<220>		
<223>	点形念珠藻 PAL 引物 2(反向)	
<400>	13	
	gacagtggcg gccgctcacg ttgactttaa gctcgaaaaa atatg	45
<210>	14	
<211>	38	
<212>	DNA	
<213>	人工的	
<220>		
<223>	多变鱼腥藻 PAL 引物 1(前导, N-末端片断)	
<400>	14	
	cactgtgcta gcatgaagac actatctcaa gcacaaag	38
<210>	15	
<211>	49	
<212>	DNA	
<213>	人工的	
<220>		
<223>	多变鱼腥藻 PAL 引物 2(反向, N-末端片断)	
<400>	15	
	ggaaatttcc tccatgatag ctggcttggt tatcaacatc aattagtgg	49

<210>	16	
<211>	49	
<212>	DNA	
<213>	人工的	
<220>		
<223>	多变鱼腥藻 PAL 引物 3(前导, C-末端片断)	
<400>	16	
	ccactaattg atgttgataa ccaagccagc tatcatggag gaaatttcc	49
<210>	17	
<211>	41	
<212>	DNA	
<213>	人工的	
<220>		
<223>	多变鱼腥藻 PAL 引物 4(反向, C-末端片断)	
<400>	17	
	cactgtgcgg ccgcttaatg caagcagggt aagatatctt g	41
<210>	18	
<211>	35	
<212>	DNA	
<213>	人工的	
<220>		
<223>	多变鱼腥藻 PAL 前导引物	
<400>	18	
	cactgtcata tgaagacact atctcaagca caaag	35
<210>	19	
<211>	36	
<212>	DNA	
<213>	人工的	
<220>		

<223> 多变鱼腥藻 PAL 反向引物

<400> 19

cactgtctcg agatgcaagc agggtaagat atcttg

36

<210> 20

<211> 38

<212> DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 多变鱼腥藻 PAL 引物创建 5' NheI 位点并删除内部 NheI 位点(前导, N-末端)

<400> 20

cactgtgcta gcatgaagac actatctcaa gcacaaag

38

<210> 21

<211> 49

<212> DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 多变鱼腥藻 PAL 引物创建 5' NheI 位点并删除内部 NheI 位点(反向, N-末端)

<400> 21

ggaaatttcc tccatgatag ctggcttggt tatcaacatc aattagtgg

49

<210> 22

<211> 49

<212> DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 多变鱼腥藻 PAL 引物创建 5' NheI 位点并删除内部 NheI 位点(前导, C-末端)

<400> 22

ccactaatig atgttgataa ccaagccagc tatcatggag gaaatttcc

49

<210> 23

<211> 41

- <212> DNA
<213> 人工的
- <220>
<223> 多变鱼腥藻 PAL 引物创建 5' NheI 位点并删除内部 NheI 位点(反向, C-末端)
- <400> 23
acagtggcgg ccgcttaatg caagcagggt aagatatctt g 41
- <210> 24
<211> 38
<212> DNA
<213> 人工的
- <220>
<223> 多变鱼腥藻 PAL 引物创建 5' NheI 位点和 3' SmaI 位点(前导)
- <400> 24
cactgtgaat tcatgaagac actatctcaa gcacaaag 38
- <210> 25
<211> 37
<212> DNA
<213> 人工的
- <220>
<223> 多变鱼腥藻 PAL 引物创建 5' NheI 位点和 3' SmaI 位点(反向)
- <400> 25
cactgtcccg ggtaatgca agcagggtaa gatatct 37
- <210> 26
<211> 41
<212> DNA
<213> 人工的
- <220>
<223> 多变鱼腥藻 PAL 引物在第 503 位产生半胱氨酸的丝氨酸替代(前导)
- <400> 26
gtcattacga tgcacgcgc tctctatcac ctgcaactga g 41

<210>	27	
<211>	41	
<212>	DNA	
<213>	人工的	
<220>		
<223>	多变鱼腥藻 PAL 引物在第 503 位产生半胱氨酸的丝氨酸替代(反向)	
<400>	27	
	ctcagttgca ggtgatagag aggcgcgtgc atcgtaatga c	41
<210>	28	
<211>	42	
<212>	DNA	
<213>	人工的	
<220>		
<223>	多变鱼腥藻 PAL 引物在第 565 位产生半胱氨酸的丝氨酸替代(前导)	
<400>	28	
	cagttcaaga tatcttacct tccttgcatc aacccgggct gc	42
<210>	29	
<211>	42	
<212>	DNA	
<213>	人工的	
<220>		
<223>	多变鱼腥藻 PAL 引物在第 565 位产生半胱氨酸的丝氨酸替代(反向)	
<400>	29	
	gcagcccgagg ttaatgcaag gagggtaaga tatcttgaac tg	42
<210>	30	
<211>	44	
<212>	DNA	
<213>	人工的	
<220>		

<223> 多变鱼腥藻 PAL 引物在第 64 位产生半胱氨酸的丝氨酸替代(前导)		
<400> 30		
gcagggtatt caggcatctt ctgattacat taataatgct gttg		44
<210> 31		
<211> 44		
<212> DNA		
<213> 人工的		
<220>		
<223> 多变鱼腥藻 PAL 引物在第 64 位产生半胱氨酸的丝氨酸替代(反向)		
<400> 31		
caacagcatt attaatgtaa tcagaagatg cctgaatacc ctgc		44
<210> 32		
<211> 43		
<212> DNA		
<213> 人工的		
<220>		
<223> 多变鱼腥藻 PAL 引物在第 318 位产生半胱氨酸的丝氨酸替代(前导)		
<400> 32		
caagatcggtt actcactccg atcccttccc cagtatttgg ggc		43
<210> 33		
<211> 43		
<212> DNA		
<213> 人工的		
<220>		
<223> 多变鱼腥藻 PAL 引物在第 318 位产生半胱氨酸的丝氨酸替代(反向)		
<400> 33		
gccccaata ctggggaagg gatcggagtg agtaacgac ttg		43

点形念珠藻 PAL 的基因序列

```
1   atgaatataa catctctaca acagaacata acgcgttctt ggcaaatacc tttcactaat
61  agttcagatt caatcgtaac tgtaggcgat cgcaatctga caatcgacga ggttgtaaat
121 gttgctogtc atggaacaca ggtgogctta actgataatg cagatgtcat tcgggggtgtt
181 caagcatctt gtgattacat taacaatgca gtcgaaacag cacagccaat ttacgggggtg
241 acatctggct ttggcgggat ggcagatggt gtcctctctc gcgaacaagc agcgggaactt
301 cagactaatt taatttggtt tctgaaatcc ggcgaggaa acaaattatc gttagcagac
361 gtgcgtgcag ctatgctctt acgtgcaaat tcacatttgt atggtgcgtc tggatatacga
421 ctcgaaactta ttcagcggat tgaaactttc ctcaacgctg gcgtgacacc ccatgtctat
481 gagtttggtt ctatcggtgc tagcggcgat ttggtgccat tatcctacat tactggggca
541 ctaatcggtc tagatcctag ctttacagtt gacttcgacg gtaaagaaat ggatgccgtt
601 acagccttgt ctggtttggg tttgccaaag ttgcaattgc aaccgaaaga aggttttagca
661 atgatgaatg gcacctcagt catgacaggt attgcagcta actgtgtgta cgatgcgaaa
721 gttttgctcg ctctgacaat ggggtgtacac gccttagcca tccaagggtt atacggaaacg
781 aatcaatctt tccaccggtt tattcatcag tgcaagccac atcccgggtc actatggaca
841 gcagatcaaa tgttttctct gctgaaagat tcctctttag ttcgtgaaga gttggatggt
901 aaacacgaat accgtggtaa agatctgata caggatcgtt attctctccg ctgtctggca
961 cagttcatag ggccaatcgt tgatggggta tcagagatta ccaagcaaat cgaggtagaa
1021 atgaactcag tcaccgataa cccattgatt gatgtcgaga accaagttag ttatcacggc
1081 ggcaattttc toggacagta tgtgggtgtg acaatggatc gcctacgtta ttacataggg
1141 ctattggcca aacacatoga tgtgcagatt gcacttcttg tctcgccaga gtttagcaac
1201 ggcttaccac cctctttagt tggtaatagc gatcgcaaag ttaatatggg actcaaaggt
1261 ttgcaaatca gtggaaactc gattatgcca ctggtgagct tctatggaaa ttccctagcc
1321 gatcgctttc ctacccaogc cgagcaattt aatcaaaaata ttaacagcca aggctatatt
1381 tccgcaaatt tgacacgtcg ttccgtagac atatttcaga attatatggc gatcgcggtg
1441 atgtttgag ttcaagctgt tgacctccgc acatataaga tgaaagggtc ttatgatgca
1501 cgtacatgcc tctcacccaa tactgtgcag ttatacacag cagtctgcga ggtagttgga
1561 aagccactaa cgtctgtgog tccatacatt tggaacgaca acgagcaatg tttagatgag
1621 catattgccc ggatttcagc tgatatcgct ggtggtggtt taattgtgca agcagttgag
1681 catatttttt cgagcttaaa gtcaacgtaa
```

图 1A

点形念珠藻 PAL 的蛋白序列

MNITSLQQNITRSWQIPFTNSSDSIVTVGDRNLTIDEVVNVARH
GTQVRLTDNADVIRGVQASCDYINNAVETAQPIYGVTSFGGMADVVISREQAAELQT
NLIWFLKSGAGNKLSDLADVRAAMLLRANSHLYGASGIRLELIQRIETFLNAGVTPHVV
EFGSIGASGDLVPLSYITGALIGLDPSFTVDFDGKEMDAVTALSRLGLPKLQLQPKEG
LAMMNGTSVMTGIAANCYDAKVLLALTMGVHALAIQGLYGTNQSFHFFIHQCKPHPG
QLWTADQMFSLLKDSSLVREELDGKHEYRGKDLIQDRYSLRCLAQFIGPIVDGVSEIT
KQIEVEMNSVTDNPLIDVENQVSYHGGNFLGQYVGVTMDRLRYIIGLLAKHIDVQIAL
LVSPEFSNGLPPSLVGNSDRKVMGLKGLQISGNSIMPLLSFYGNSLADRFPETHAEQF
NQNINSQGYISANLTRRSVDIFQNYMAIALMFGVQAVDLRTYKMKGHYDARTCLSPNT
VQLYTAVCEVVGKPLTSVRPFIWNDNEQCLDEHIARISADIAGGGLIVQAVEHIFSSL
KST

图 1B

多变鱼腥藻 PAL 的基因序列

```
1   atgaagacac tatctcaagc acaaagcaaa acotcatctc aacaattttc ttttactgga
61  aattcttctg ccaatgtaat tatttgtaat cagaaactca caatcaatga tgttgcaagg
121 gtagcgcgta atggcacctt agtgtcttta accaataaca ctgatatttt gcagggtatt
181 caggcatctt gtgattacat taataatgct gttgaatctg gggaaccaat ttatggagtg
241 acatctgggt ttggcggtat ggccaatgtt gccatatccc gtgaacaagc atctgaactc
301 caaaccaact tagtttggtt cctgaaaaca ggtgcaggga acaattacc cttggcggtat
361 gtgcgcgcag ctatgctctt gcgtgcaaac tctcatatgc gcggtgcato tggcatcaga
421 ttagaactta tcaagcgtat ggagattttc cttaacgctg gtgtcacacc atatgtgtat
481 gagtttggtt caattggtgc aagtgggtgat ttagtgccac tatectacat tactgggtca
541 ctgataggct tagatcccag ttttaagggt gacttcaacg gtaaagaaat ggatgcgcga
601 acagctctac gtcaactgaa tttgtcacc ttgacattgt tgccgaagga aggcttggcg
661 atgatgaacg gcacttcagt catgacaggt attgcagcaa actgcgtcta cgatactcaa
721 attttaactg cgatcgctat gggcggtcac gctctagata tccaagcttt aaacggaacc
781 aatcaatcat tccatccatt tatccataat tccaaaccac atcctgggtc attatgggca
841 gcagatcaga tgatttcttt gttagccaat tcccagttag ttctgtgatg gttagatggt
901 aaacacgatt atcgtgatca cgagttgatt caagatcgtt actcaactcc atgccttccc
961 cagtatttgg ggccaatcgt tgatggaatt tcccagattg ccaaacaaat tgaatcgaa
1021 atcaactcag tcaccgataa cccactaatt gatgttgata accaagctag ctatcatgga
1081 ggaaatttcc tcggacagta cgtgggtatg ggaatggatc acctgcgtta ctatattggg
1141 ttattggcta aacacctaga tgtgcagatt gccctcctcg cctcaccaga gtttagcaat
1201 ggactaccac catctttatt aggcaaccga gaacgtaaag tcaatatggg actcaaagggt
1261 ctgcaaatat gcgtaactc aattatgcca ctgttgacct tctatggaaa ttccatcgcc
1321 gatcgcttct ctacccatgc agaacaattt aatcagaaca tcaacagtca aggatacaact
1381 tcagcgactc tagccgcgcg ttctgtggat atcttccaga attatgtggc gatcgctctg
1441 atgtttggag tccaagctgt tgacctccgc acatataaaa agactgggtc ttacgatgca
1501 cgcgcctgtc tatcacctgc aactgagcgc ttatattcag cagtccgcca cgtagttgga
1561 caaaaaccaa cttcagatcg cccatatatt tggaatgata atgagcaagg actggatgag
1621 catattgccc ggatttctgc tgatatcgtt gctgggtggtg tgattgtgca agcagttcaa
1681 gatattctac cctgcttgca ttaa
```

图 2A

多变鱼腥藻 PAL 的蛋白序列

```

1      mktlsqaqsk tssqqfsftg nssanviign qkltindvar varngtlvsl tnntdilqgi
61     qascdyinna vesgepiygv tsqfggmanv aisreqasel qtnlvwflkt gagnklplad
121    vraamilran shmrgasgir lelikrmeif lnagvtpyvy efgsigasgd lvplysitgs
181    ligldpsfkv dfngkemdap talrqnlsp ltllpkegla mmngtsvmtg iaancvydtq
241    iltaiamgvh aldiqalngt nqsfhpfihn skphpgqlwa adqmisllan sqlvrdeidg
301    khdyrdheli gdryslrcip qylgpivdgi sqiakqieie insvtdnpli dvdnqasyhg
361    gnflgqyvqm gmdhlryyig llakhldvqi allaspefsn glppsllgnr erkvnmgikg
421    lqicgnsimp lltfygnsia drfpthaeqf nqninsqgyt satlarrsvd ifqnyvaial
481    mfgvqavdlr tykktghyda racispater lysavrhvvg qkptsdrpyi wndneqglde
541    hiarisadia aggvivqavq dilpclh

```

图 2B

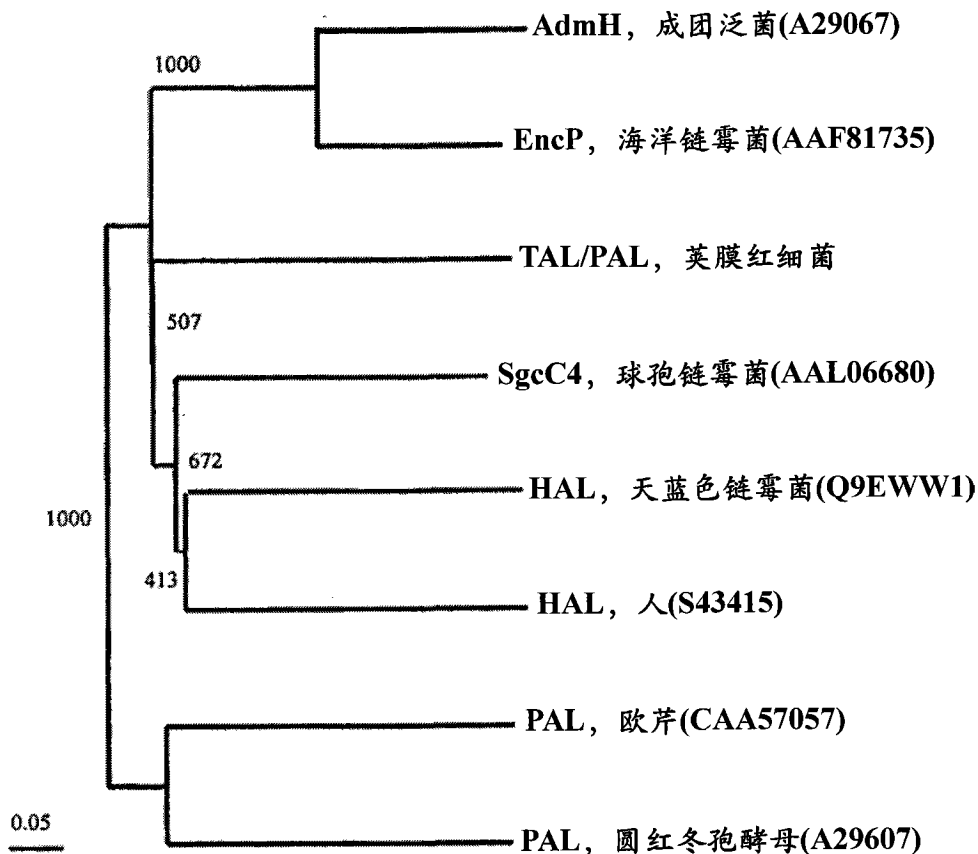


图 3

点形念珠藻(*N. punctiforme*)PAL (SEQ ID NO:4)和多变鱼腥藻(*A. variabilis*)PAL (SEQ ID NO:2)与 *EncP* PAL (SEQ ID. No. 5)和恶臭假单胞菌(*P. putida*)HAL (SEQ ID NO:6)的蓝藻蛋白序列的比对。对应于 PAL 或 HAL 活性的活性位点残基被强调。

Avar03005300	MKTLQAQSK TSSQQFSFTG NSSANVIIGN QKLTINDVAR VARNGTLVSL
Npun02008223	MNITSLQQNI TRSWQIPFTN SSDSIVTVGD RNLTIDEVNV VARHGTQVRL
EncP	 MTFVIELD MNVTLDQLED AARQRTPEL
PputidaHAL	 MTELTLP GTTLTAQLRA IHAAPVRLQL
Avar03005300	TNNTDILQGI QASCDYINNA VESGEPIYGV TSGFGGMANV AISREQASEL
Npun02008223	TDNADVIRGV QASCDYINNA VETAQPIYGV TSGFGGMADV VISREQAAEL
EncP	S..APVRSRV RASRDVLVKF VQDERVIYGV NTSMGGFVDH LVPVSQARQL
PputidaHAL	D..ASAAPAI DASVACVEQI IAEDRTAYGI NTGFGLLAST RIASHDLENL
Avar03005300	QTNLVWFLKT GAGNKLPLAD VRAAMLLRAN SHMRGASGIR LELIKRMEIF
Npun02008223	QTNLIWFLKS GAGNKLPLAD VRAAMLLRAN SHLYGASGIR LELIQRIETF
EncP	QENLINAVAT NVGAYLDDTT ARTIMLSRIV SLARGNSAIT PANLDKLVAV
PputidaHAL	QRLVLVSHAA GIGAPLDDDL VRLIMVLKIN SLSRGFSGIR RKVIDALIAL
Avar03005300	LNAGVTPYVY EFGSIGASGD LVPLSYITGS LIGLDPSFKV DFNGKEMDAP
Npun02008223	LNAGVTPHYV EFGSIGASGD LVPLSYITGA LIGLDPSFTV DFDGKEMDAV
EncP	LNAGIVPCIP EKGS LGTSGD LGPLAAIALV CAGQW...KA RYNGQIMPGR
PputidaHAL	VNAEVYPHIP LKGSVGASGD LAPLATMSLV LLGEG...KA RYKGQWLSAT
Avar03005300	TALRQLNLSP LTLKPKEGLA MMNGTSVMTG IAANCVYDTQ ILTAIANGVH
Npun02008223	TALSRLGLPK LQLQPKKEGLA MMNGTSVMTG IAANCVYDAK VLLALTMGVH
EncP	QALSEAGVEP MELSYKDGLA LINGTSGMVG LGTMVLQAAR RLVDRLQVS
PputidaHAL	EALAVAGLEP LTLAAKEGLA LLNGTQASTA YALRGLFYAE DLYAAAIACG
Avar03005300	ALDIQALNGT NQSFHPFIHN SKPHPGQLWA ADQMISLLAN SQLVRDELDG
Npun02008223	ALAIQGLYGT NQSFHPFIHQ CKPHPGQLWT ADQMFSLLKD SSLVREELDG
EncP	ALSVEGLAGM TKPFDPRVHG VKPHRGQRQV ASRLWEGLAD SHLAVNELDT
PputidaHAL	GLSVEAVLGS RSPFDARIHE ARGQRGQIDT AACFRDLLGD SSEVS.....

图 4

Avar03005300	K HDYRDHELIQ DRYSLRCLPQ YLGPIVDGIS QIAKQIEIEI
Npun02008223	K HEYRGKDLIQ DRYSLRCLAQ FIGPIVDGVS EITKQIEVEM
EncP	EQTLAGEMGT VAKAGSLAIE DAYSIRCTPQ ILGPVVDVLD RIGATLQDEL
PputidaHAL	 LSHKNC DKVQ DPYSLRCQPQ VMGACLTQLR QAAEVLGIEA
Avar03005300	NSVTDNPLID VDNQASYHGG NFLGQYVGMG MDHLRYYIGL LAKHLDVQIA
Npun02008223	NSVTDNPLID VENQVSYHGG NFLGQYVGVT MDRLRYYIGL LAKHIDVQIA
EncP	NSSNDNPIVL PEEAEVFHNG HFHGQYVAMA MDHLNMLAT VTNLANRRVD
PputidaHAL	NAVSDNPLVF AAEGDVISGG NFHAEPVAMA ADNLALAIAB IGSLSERRIS
Avar03005300	LLASPEFSNG LPPSLLGNRE RKVNMGLKGL QICGNSIMPL LTFYGNISAD
Npun02008223	LLVSPEFSNG LPPSLVGNSD RKVNMGLKGL QISGNSIMPL LSFYGNSLAD
EncP	RFLDKSNSNG LPAFLCREDP .GLRLGLMGG QFMTASITAE TRTLTIPMSV
PputidaHAL	LMMDKHMS.Q LPPFLVENG. .GVNSGFMIA QVTAAALASE NKALSHPHSV
Avar03005300	RFPTHAEQFN QNINSQGYTS ATLARRSVDI FQNYVAIALM FGVQAVDLRT
Npun02008223	RFPTHAEQFN QNINSQGYIS ANLTRRSVDI FQNYMAIALM FGVQAVDLRT
EncP	QSLTSTADF. QDIVSPGFVA ARRAREVLTN AAYVVAPELL CACQAVDIRG
PputidaHAL	DSLPTSANQ. EDHVSMAFAA GKRLWEMAEN TRGVPAIEWL GACQGLDLRK
Avar03005300	YKKTGHYDAR ACLSPATERL YSAVRHVVGQ KPTSDRPYIW NDNEQGLDEH
Npun02008223	YKMKGHYDAR TCLSPNTVQL YTAVCEVVGK PLTSVRPYIW NDNEQCLDEH
EncP	ADKL..... ..SSFTRPL YERTRKIVP.F FDRDETITDY
PputidaHAL	GLKT..... ..SAKLEKA RQALRSEVA.H YDRDRPFAPD
Avar03005300	IARISADIAA GGVIVQAVQD ILPCLH..
Npun02008223	IARISADIAG GGLIVQAVEH IFSSLKST
EncP	VEKLAADLIA GEPVDAAVAA H.....
PputidaHAL	IEKAVELLAK GSALTCLLPAG VLPSL...

图 4(续)

实验 05-019: 组 6 – NpPAL 1.0 IU

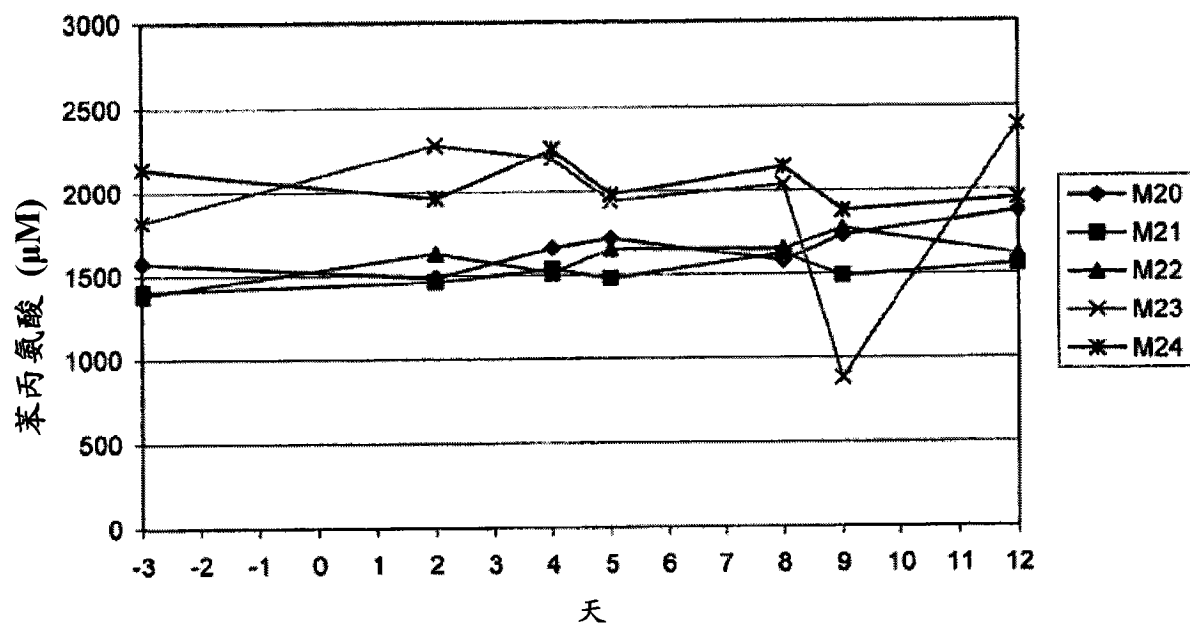


图 5A

实验 05-019: 组 10 – NpPAL 1:3 PAL:PEG NOF 1.0 IU

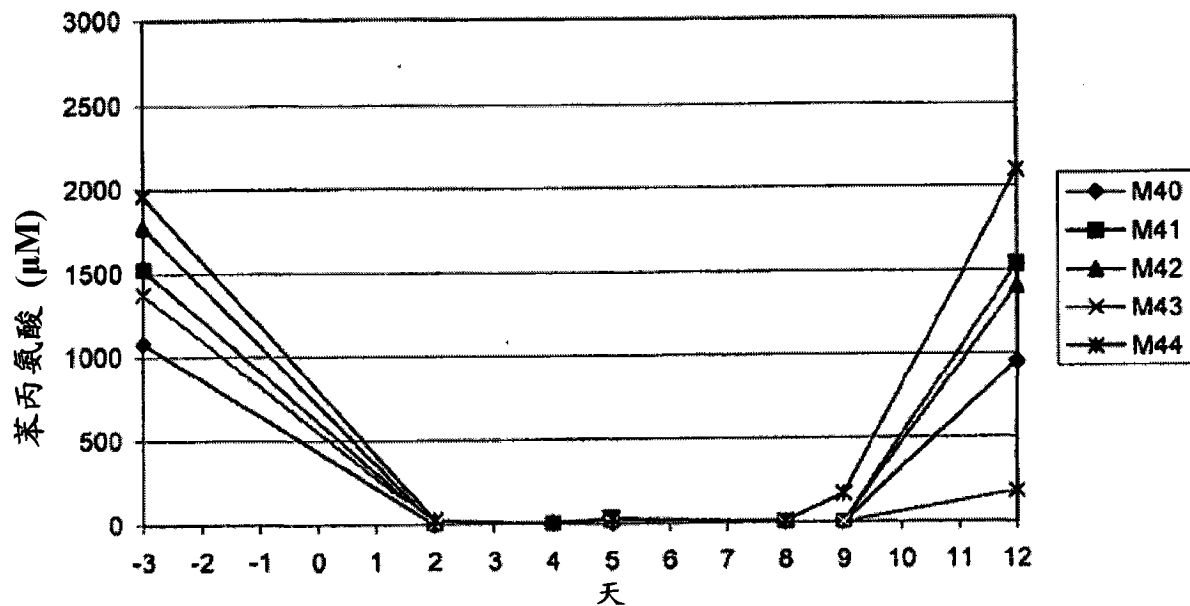


图 5B

组 3 - AvPAL (1.0 IU)

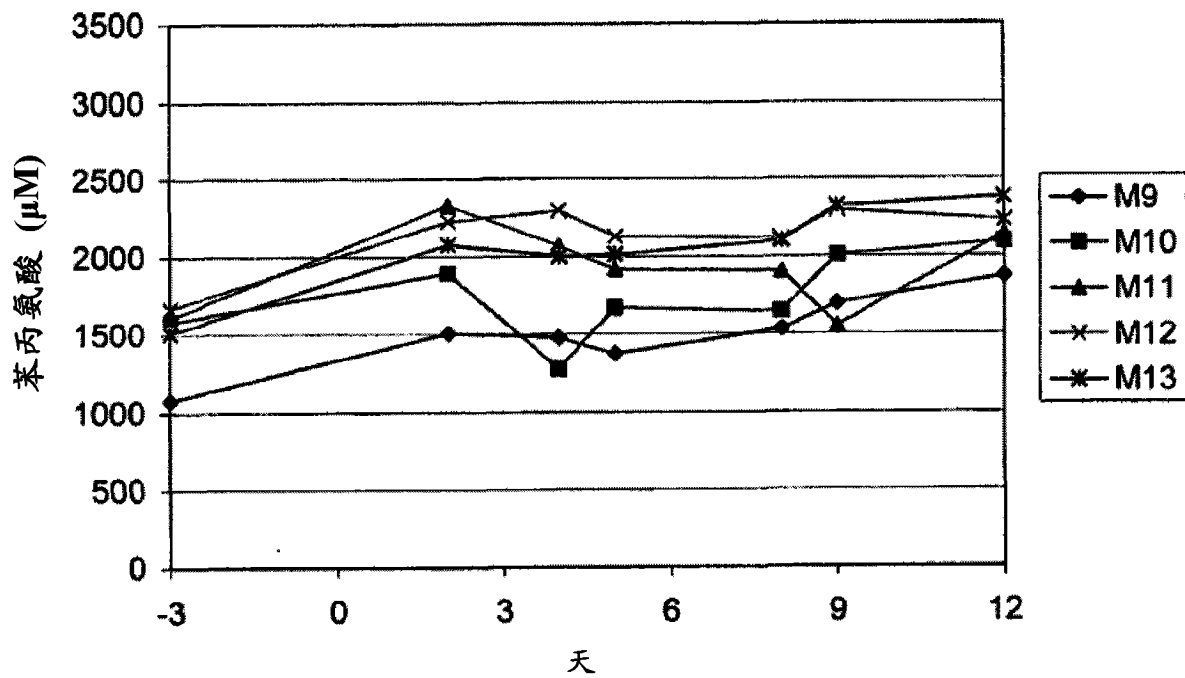


图 6A

组 5 - AvPAL-PEG (1.0 IU)

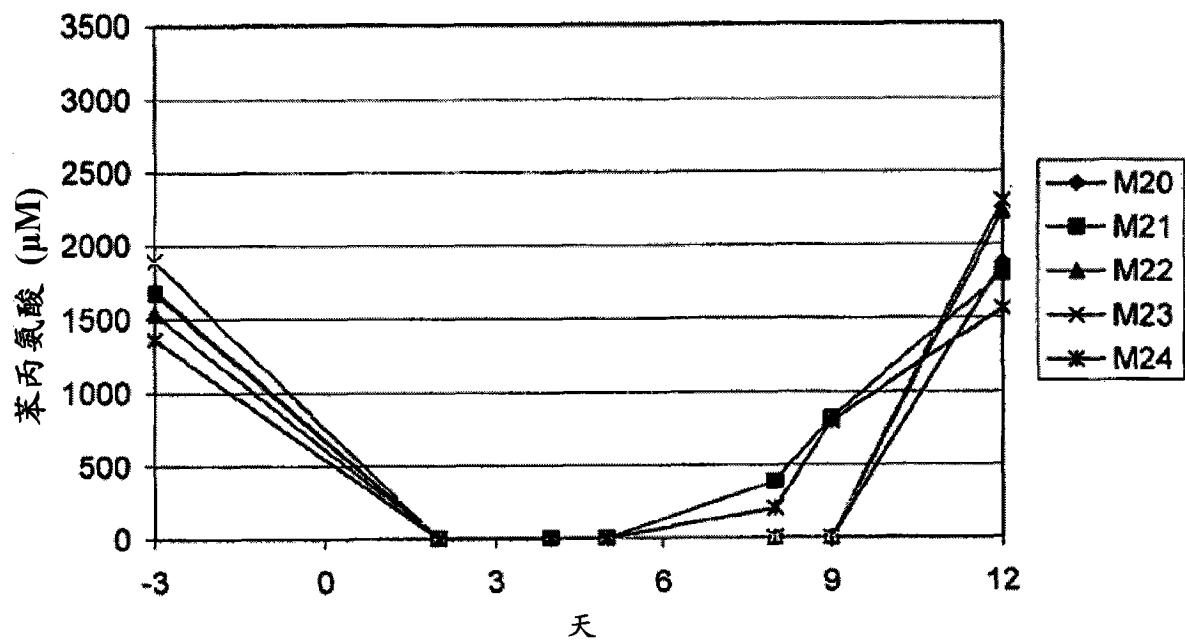


图 6B

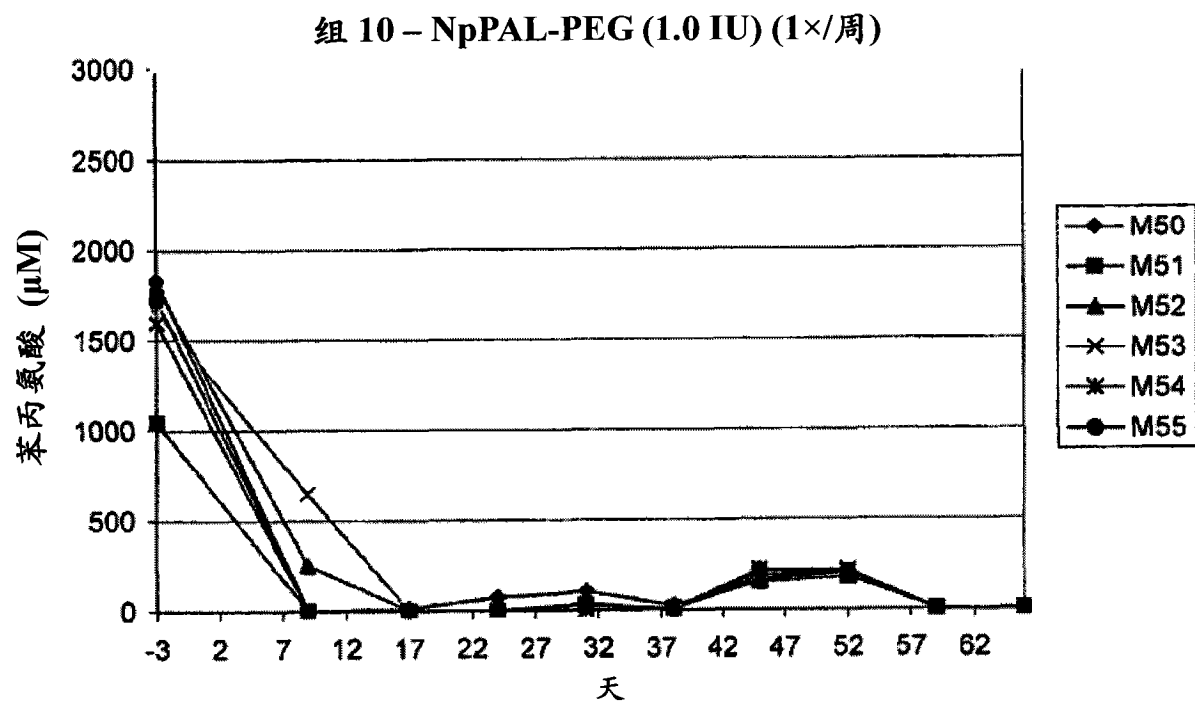


图 7

AvPAL 变体 (半胱氨酸突变) 蛋白序列

A. AvPAL_C64S (SEQ ID NO:7)

MKTL**SQAQ**SKTSSQQFSFTGNSSANV**IIGNQ**KL**TINDVARVAR**NGTLVSLTNNTDILQGIQAS**SDY**INNA
 VESGEPIYGVTS**SGFGG**MANVAISREQASELQTNLVWFLKTGAGNKLPLADVRAAMLLRANSHMRGASGIR
 LELIKRMEIFLNAGVTPYVYEF**SGISASG**DLVPLSYITGSLIGLDPSFKVDFNGKEMDAPTALRQNLSP
 LTLLPKEGLAMMNGTSVMTGIAANCVYDTQILTAI**AMGVHALDIQ**ALNGTNQSFHFFIHNSKPHPGQLWA
 ADQMISLLANSQ**LVRDELDGKH**DYRDHELIQDRYSLRCLPQYLGPIVDGISQIAKQIEIEINSVTDNPLI
 DVDNQASYHGGN**FLGQYVGM**MDHLRYYIGLLAKHLDVQIALLASPEFSNGLPPSLLGNRERKVN**MGLKG**
 LQICGNSIMPL**LLTFY**GNSIADRFPT**HAEQFNQ**NINSQGYTSATLARRSVDFQNYVAIALMFGVQAVDLR
 TYKKTGHYDARACLS**PATERLYSAVRHVV**GQKPTSDRPYIWN**DNEQGLDEH**IARISADIAAGGVIVQAVQ
 DILPCLH

B. AvPAL_C318S (SEQ ID NO:8)

MKTL**SQAQ**SKTSSQQFSFTGNSSANV**IIGNQ**KL**TINDVARVAR**NGTLVSLTNNTDILQGIQASCDYINNA
 VESGEPIYGVTS**SGFGG**MANVAISREQASELQTNLVWFLKTGAGNKLPLADVRAAMLLRANSHMRGASGIR
 LELIKRMEIFLNAGVTPYVYEF**SGISASG**DLVPLSYITGSLIGLDPSFKVDFNGKEMDAPTALRQNLSP
 LTLLPKEGLAMMNGTSVMTGIAANCVYDTQILTAI**AMGVHALDIQ**ALNGTNQSFHFFIHNSKPHPGQLWA
 ADQMISLLANSQ**LVRDELDGKH**DYRDHELIQDRYSLRCLPQYLGPIVDGISQIAKQIEIEINSVTDNPLI
 DVDNQASYHGGN**FLGQYVGM**MDHLRYYIGLLAKHLDVQIALLASPEFSNGLPPSLLGNRERKVN**MGLKG**
 LQICGNSIMPL**LLTFY**GNSIADRFPT**HAEQFNQ**NINSQGYTSATLARRSVDFQNYVAIALMFGVQAVDLR
 TYKKTGHYDARACLS**PATERLYSAVRHVV**GQKPTSDRPYIWN**DNEQGLDEH**IARISADIAAGGVIVQAVQ
 DILPCLH

C. AvPAL_C503S (SEQ ID NO:9)

MKTL**SQAQ**SKTSSQQFSFTGNSSANV**IIGNQ**KL**TINDVARVAR**NGTLVSLTNNTDILQGIQASCDYINNA
 VESGEPIYGVTS**SGFGG**MANVAISREQASELQTNLVWFLKTGAGNKLPLADVRAAMLLRANSHMRGASGIR
 LELIKRMEIFLNAGVTPYVYEF**SGISASG**DLVPLSYITGSLIGLDPSFKVDFNGKEMDAPTALRQNLSP
 LTLLPKEGLAMMNGTSVMTGIAANCVYDTQILTAI**AMGVHALDIQ**ALNGTNQSFHFFIHNSKPHPGQLWA
 ADQMISLLANSQ**LVRDELDGKH**DYRDHELIQDRYSLRCLPQYLGPIVDGISQIAKQIEIEINSVTDNPLI
 DVDNQASYHGGN**FLGQYVGM**MDHLRYYIGLLAKHLDVQIALLASPEFSNGLPPSLLGNRERKVN**MGLKG**
 LQICGNSIMPL**LLTFY**GNSIADRFPT**HAEQFNQ**NINSQGYTSATLARRSVDFQNYVAIALMFGVQAVDLR
 TYKKTGHYDARAS**LS**PATERLYSAVRHVV**GQKPTSDRPYIWN**DNEQGLDEH**IARISADIAAGGVIVQAVQ**
 DILPCLH

D. AvPAL_C565S (SEQ ID NO:10)

MKTL**SQAQ**SKTSSQQFSFTGNSSANV**IIGNQ**KL**TINDVARVAR**NGTLVSLTNNTDILQGIQASCDYINNA
 VESGEPIYGVTS**SGFGG**MANVAISREQASELQTNLVWFLKTGAGNKLPLADVRAAMLLRANSHMRGASGIR
 LELIKRMEIFLNAGVTPYVYEF**SGISASG**DLVPLSYITGSLIGLDPSFKVDFNGKEMDAPTALRQNLSP
 LTLLPKEGLAMMNGTSVMTGIAANCVYDTQILTAI**AMGVHALDIQ**ALNGTNQSFHFFIHNSKPHPGQLWA
 ADQMISLLANSQ**LVRDELDGKH**DYRDHELIQDRYSLRCLPQYLGPIVDGISQIAKQIEIEINSVTDNPLI
 DVDNQASYHGGN**FLGQYVGM**MDHLRYYIGLLAKHLDVQIALLASPEFSNGLPPSLLGNRERKVN**MGLKG**
 LQICGNSIMPL**LLTFY**GNSIADRFPT**HAEQFNQ**NINSQGYTSATLARRSVDFQNYVAIALMFGVQAVDLR
 TYKKTGHYDARACLS**PATERLYSAVRHVV**GQKPTSDRPYIWN**DNEQGLDEH**IARISADIAAGGVIVQAVQ
 DILPCLH

E. AvPAL_C565SC503S (SEQ ID NO:11)

MKTL**SQAQ**SKTSSQQFSFTGNSSANV**IIGNQ**KL**TINDVARVAR**NGTLVSLTNNTDILQGIQASCDYINNA
 VESGEPIYGVTS**SGFGG**MANVAISREQASELQTNLVWFLKTGAGNKLPLADVRAAMLLRANSHMRGASGIR
 LELIKRMEIFLNAGVTPYVYEF**SGISASG**DLVPLSYITGSLIGLDPSFKVDFNGKEMDAPTALRQNLSP
 LTLLPKEGLAMMNGTSVMTGIAANCVYDTQILTAI**AMGVHALDIQ**ALNGTNQSFHFFIHNSKPHPGQLWA
 ADQMISLLANSQ**LVRDELDGKH**DYRDHELIQDRYSLRCLPQYLGPIVDGISQIAKQIEIEINSVTDNPLI
 DVDNQASYHGGN**FLGQYVGM**MDHLRYYIGLLAKHLDVQIALLASPEFSNGLPPSLLGNRERKVN**MGLKG**
 LQICGNSIMPL**LLTFY**GNSIADRFPT**HAEQFNQ**NINSQGYTSATLARRSVDFQNYVAIALMFGVQAVDLR
 TYKKTGHYDARAS**LS**PATERLYSAVRHVV**GQKPTSDRPYIWN**DNEQGLDEH**IARISADIAAGGVIVQAVQ**
 DILPCLH

图 8A-8E

37°C 保存的 AvPAL 变体的比活性

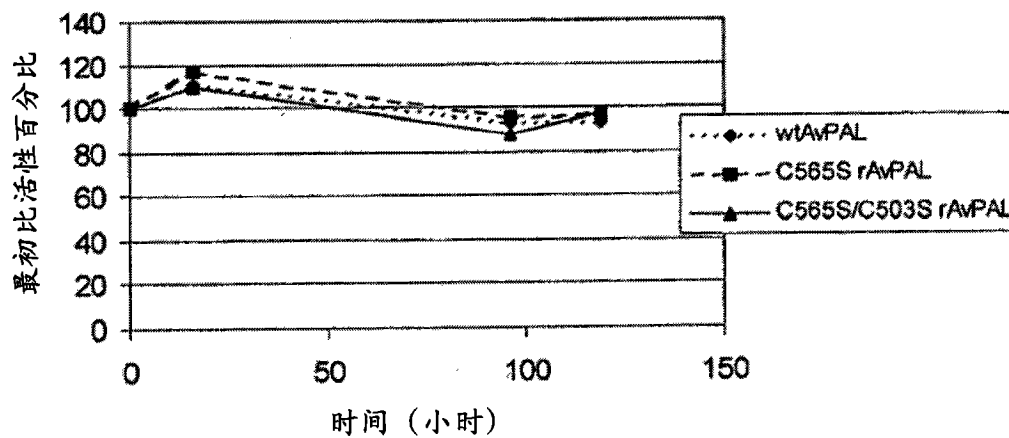


图 9A

37°C 变体 AvPAL-PEG 的稳定性

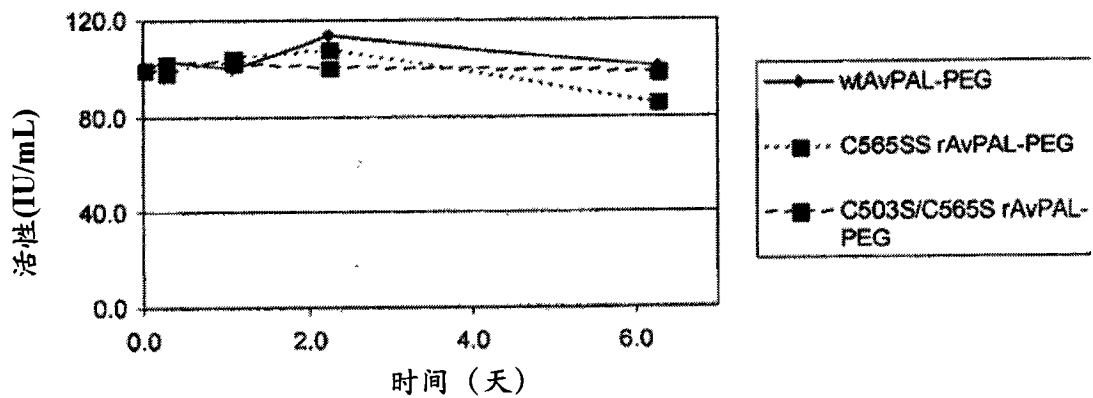


图 9B

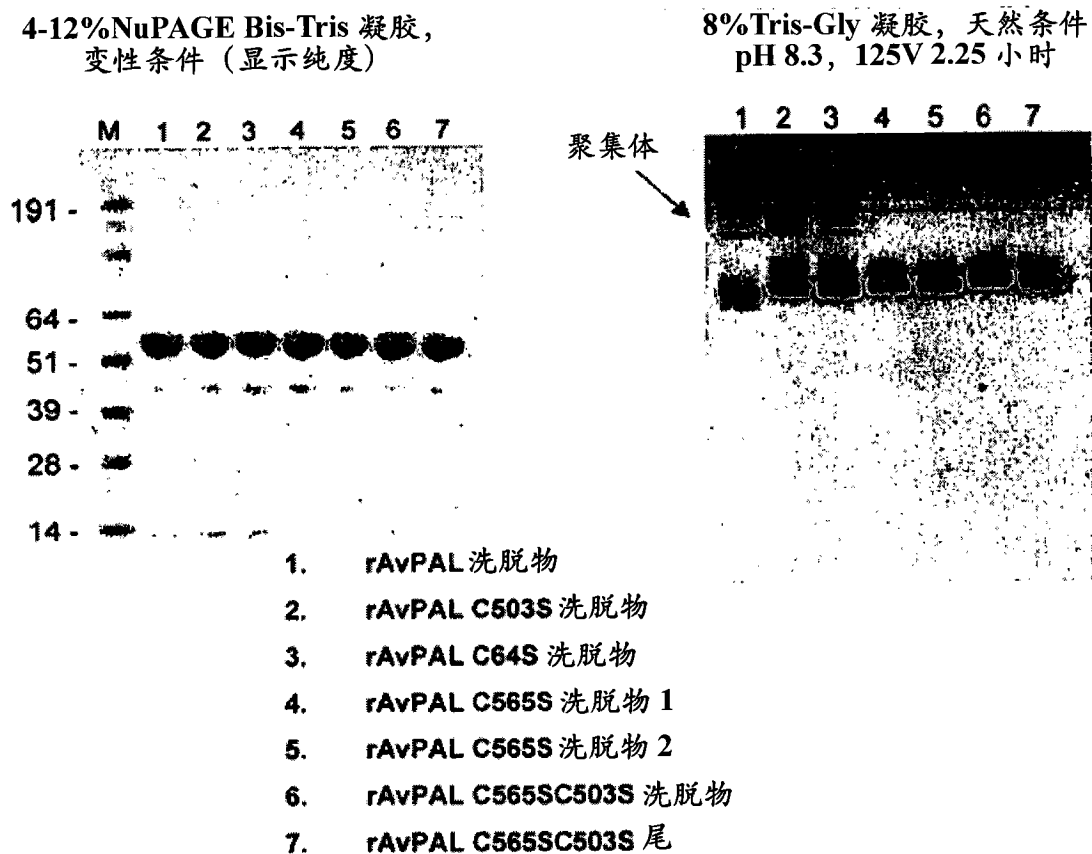


图 10A

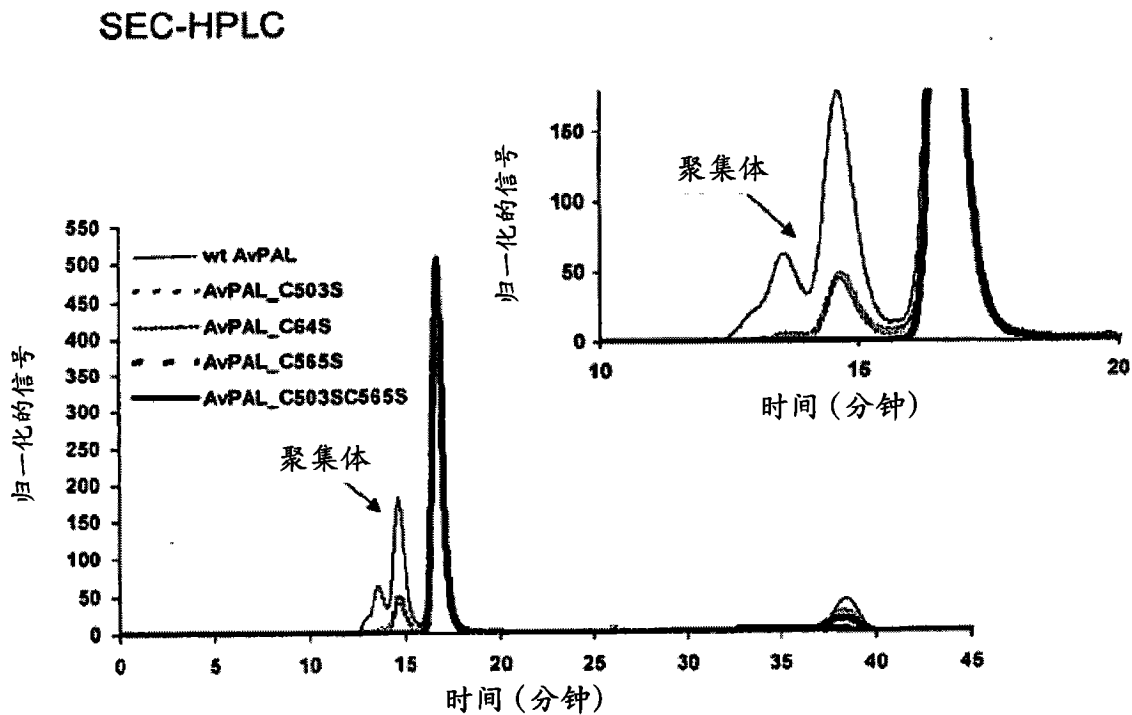


图 10B

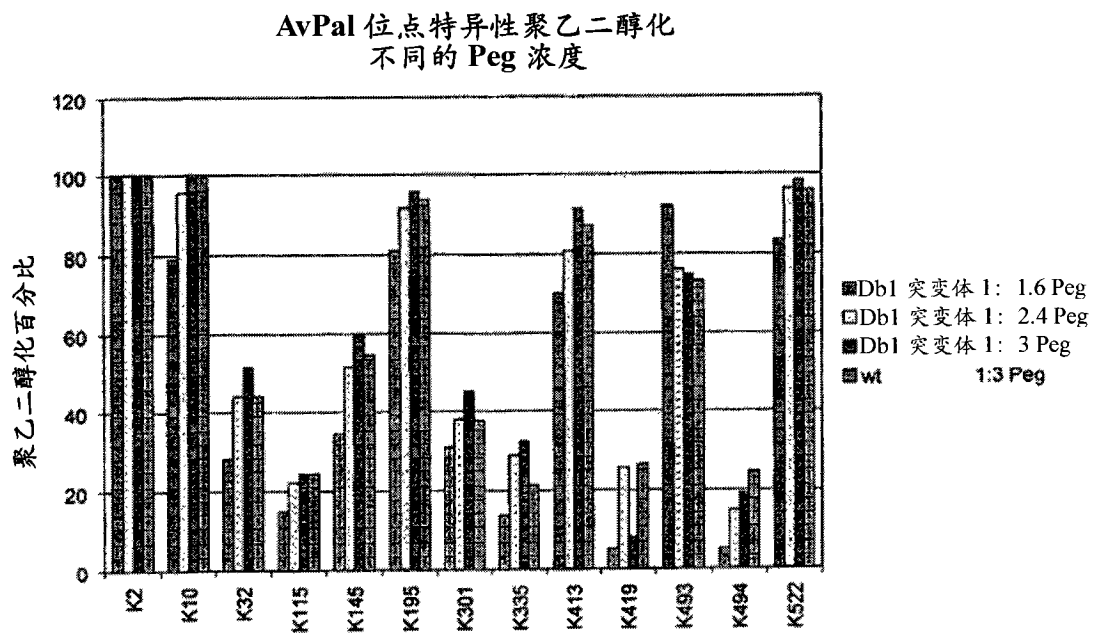


图 11

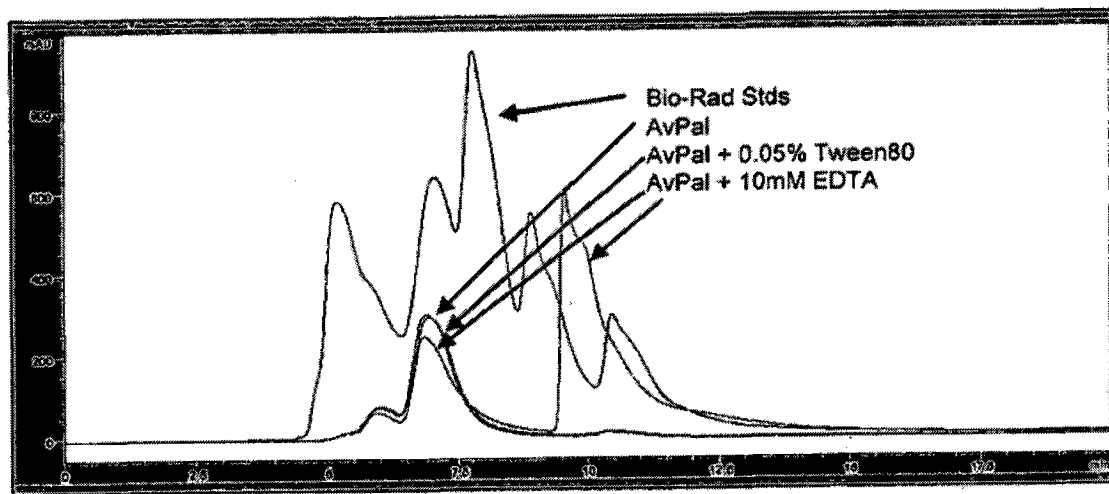


图 12

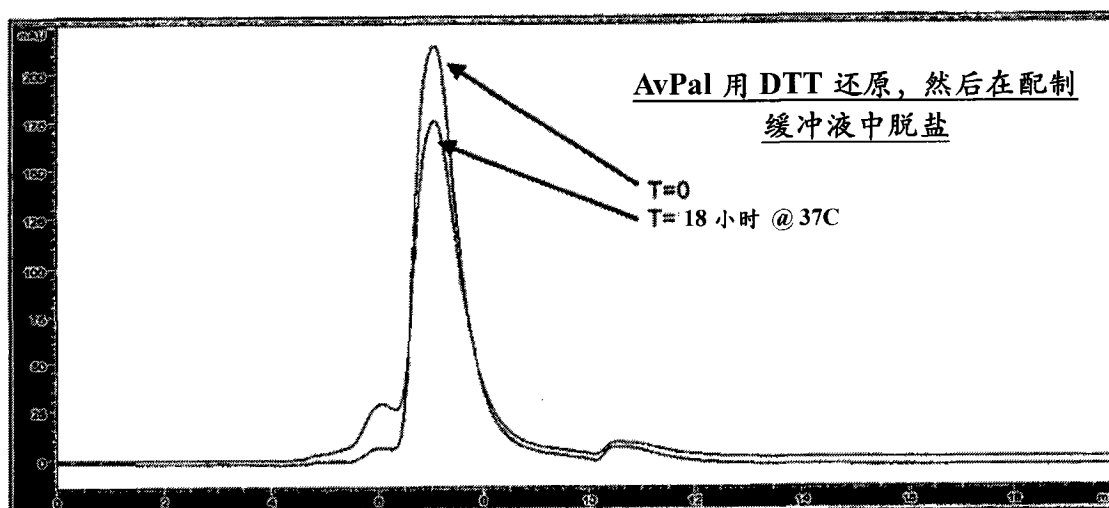


图 13A

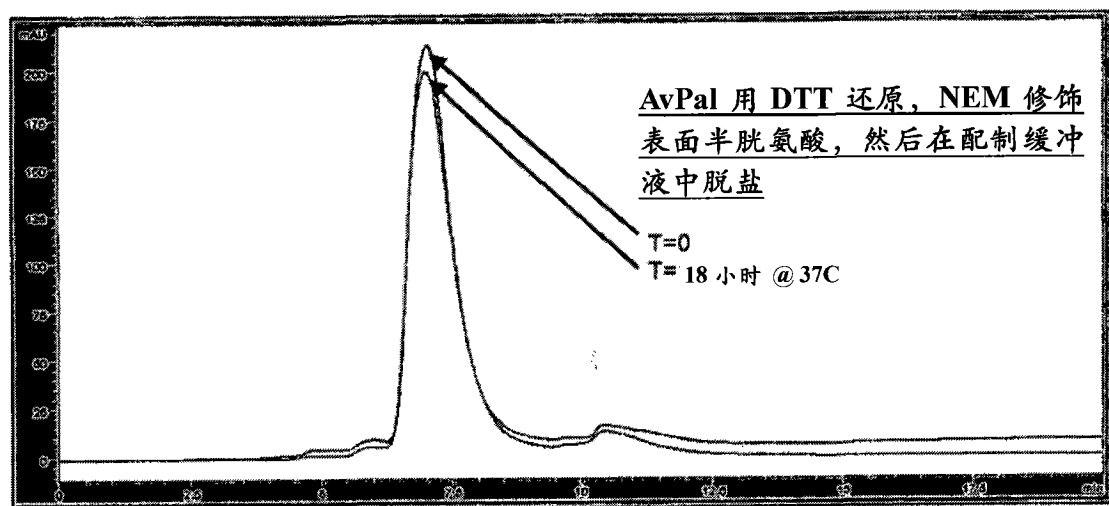


图 13B

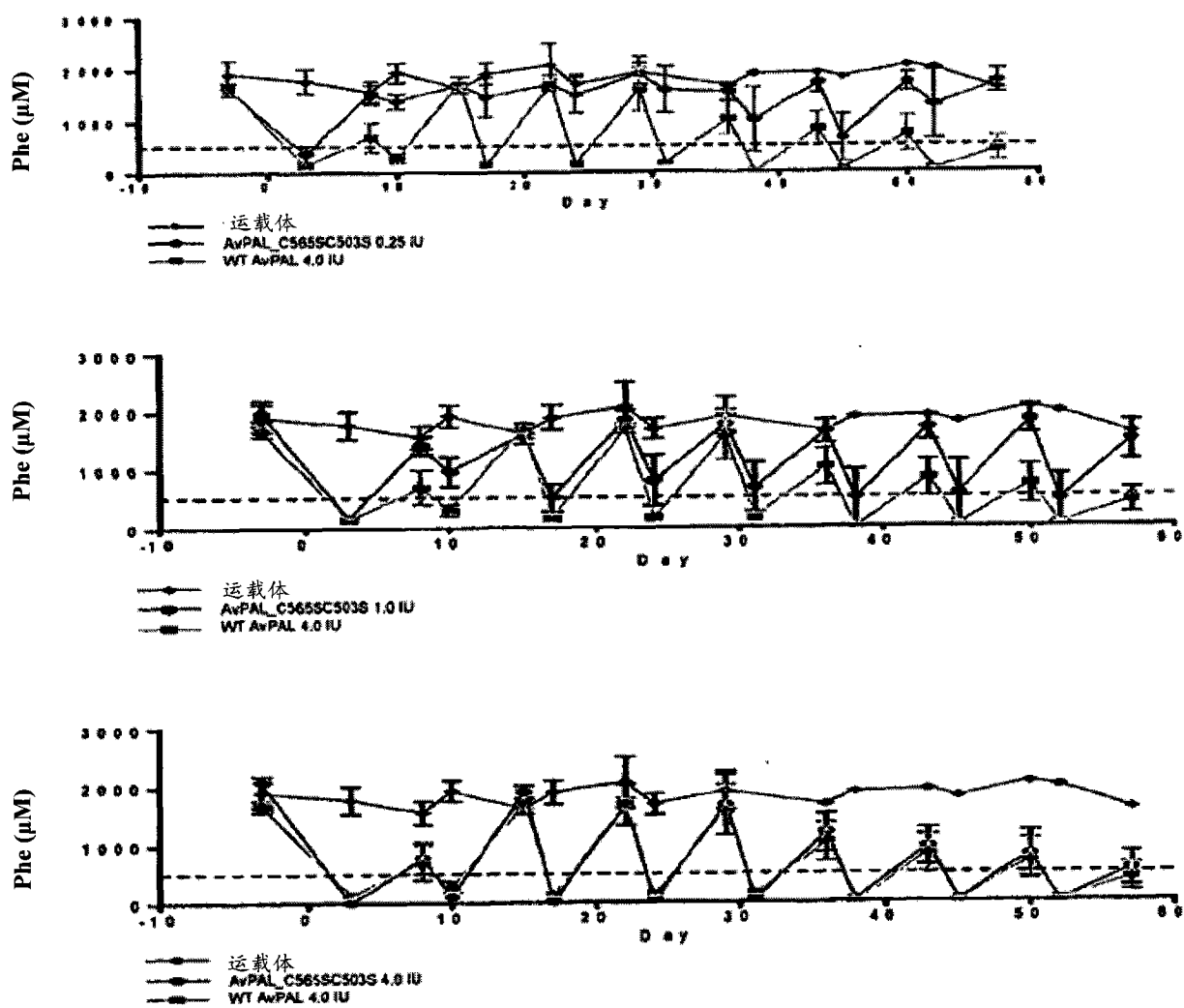


图 14

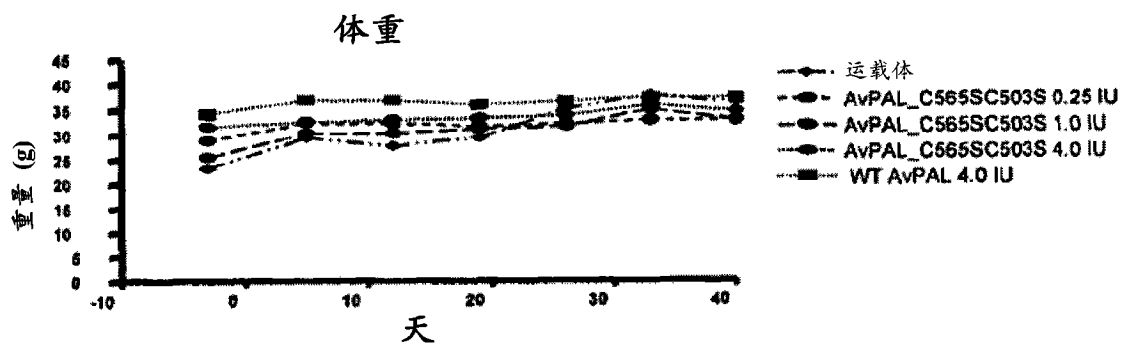


图 15

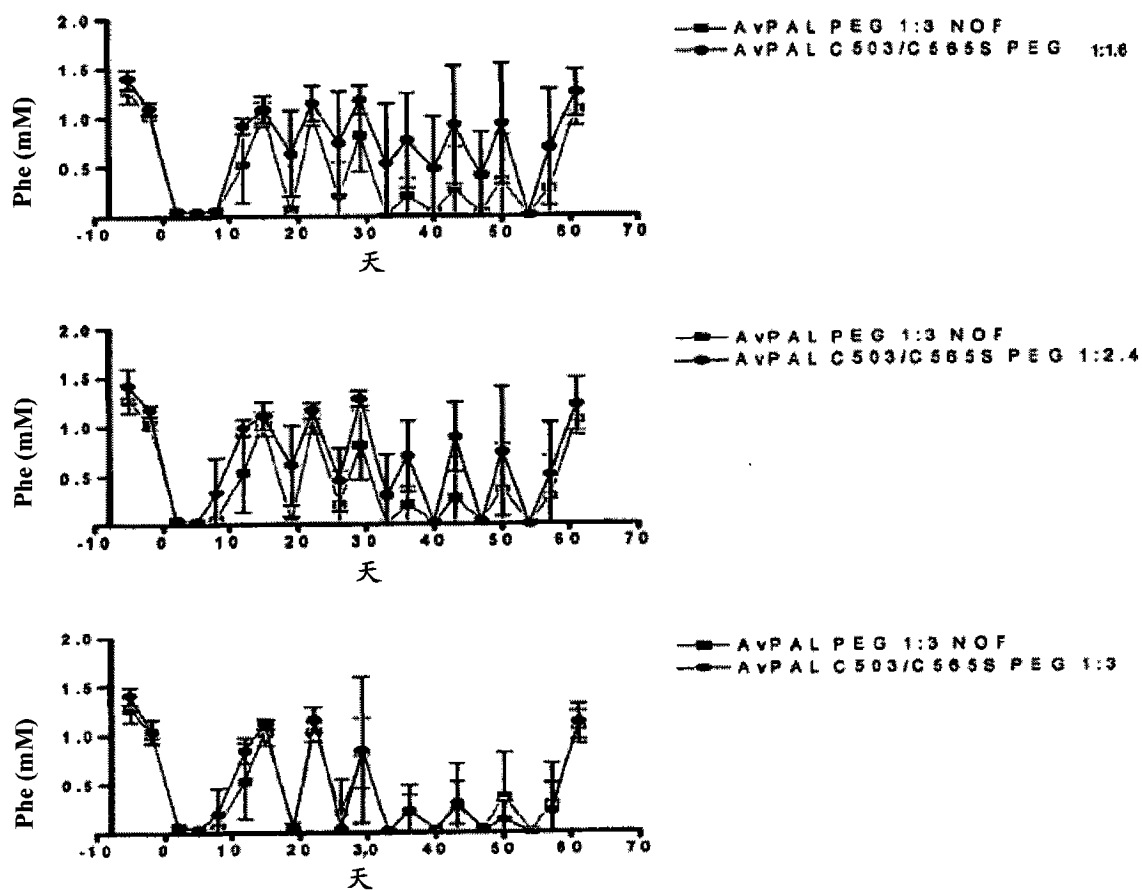


图 16

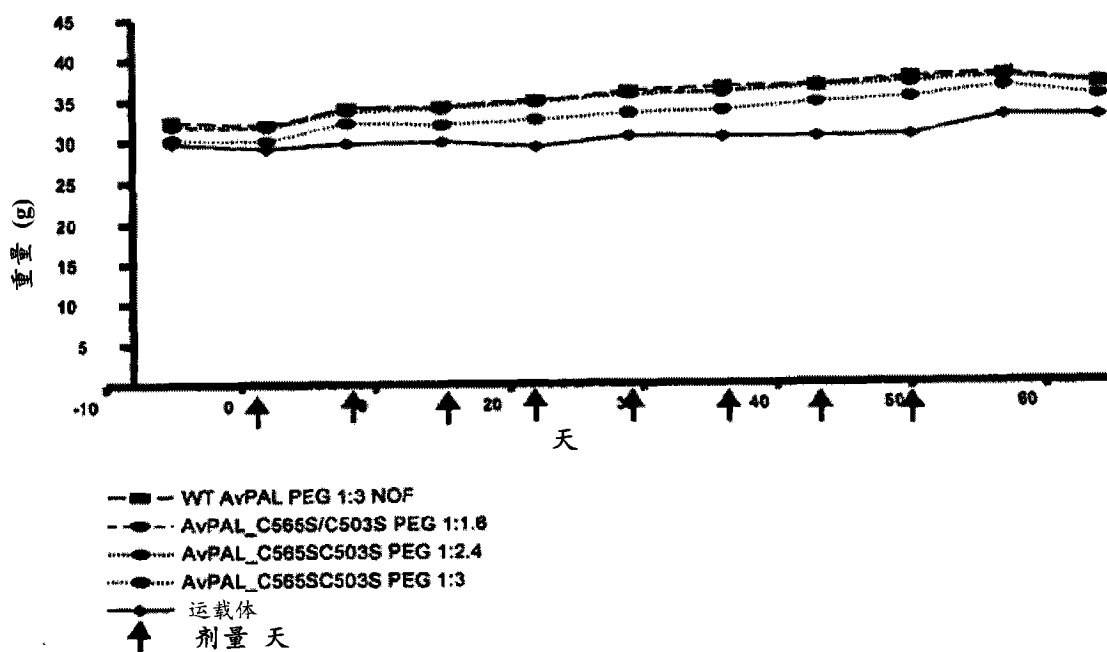


图 17

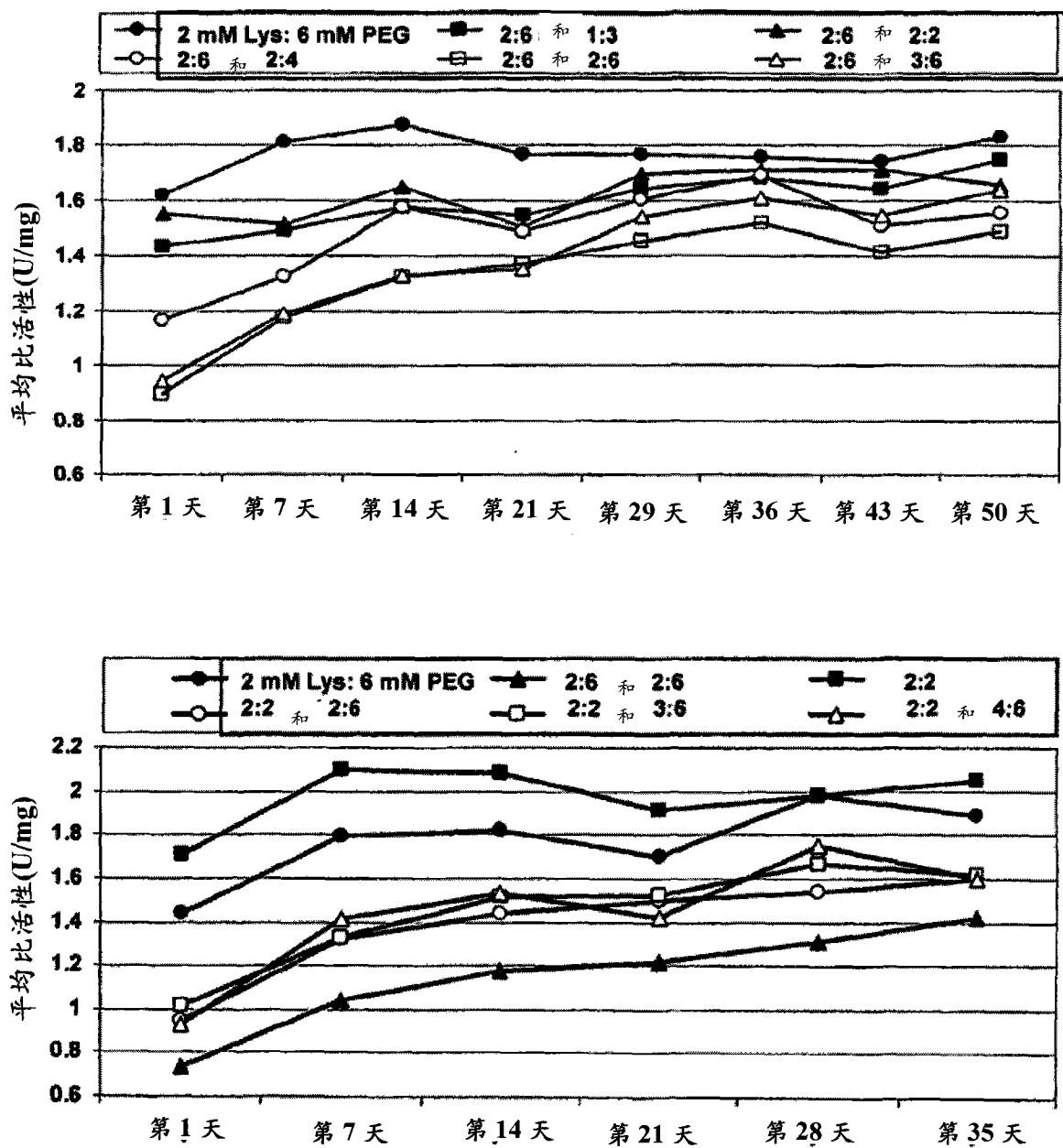


图 18

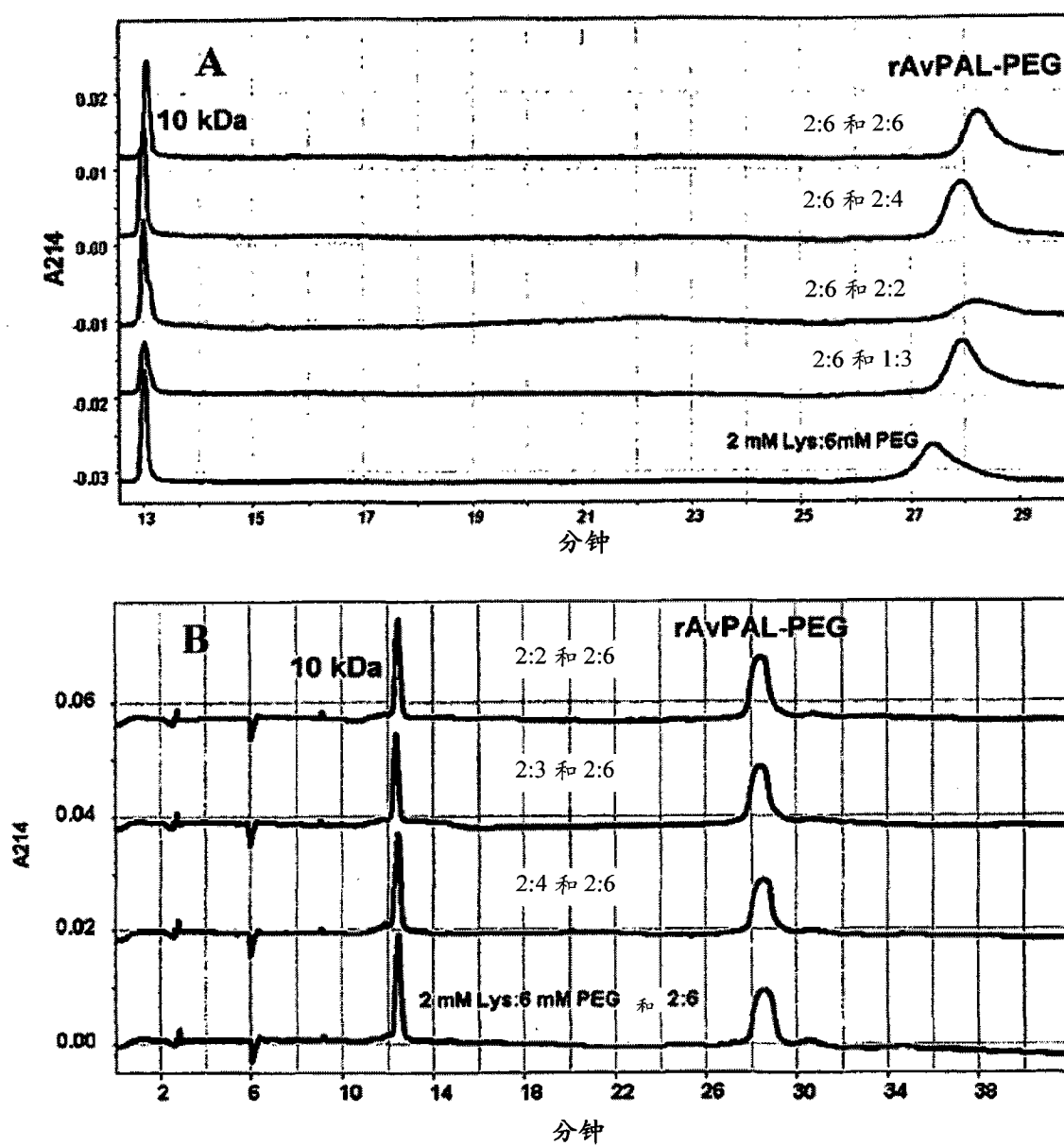


图 19A-19B

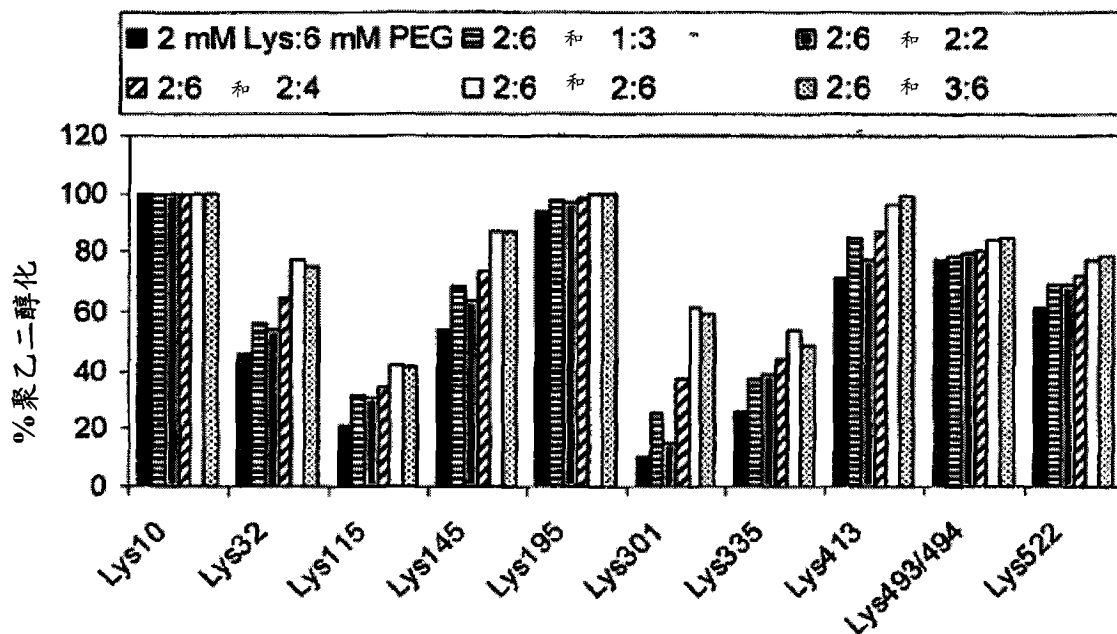


图 20

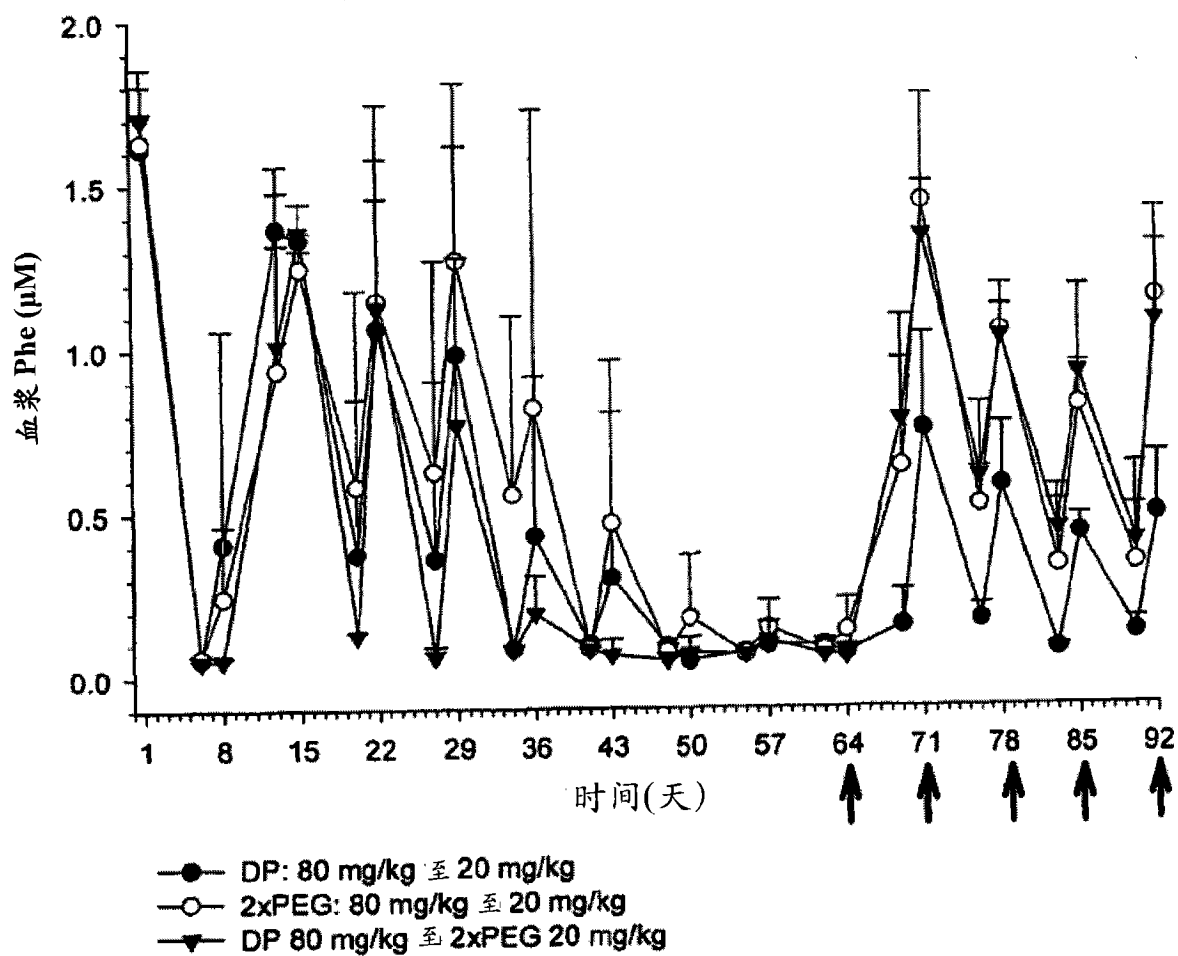


图 21