



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 109153711 B

(45) 授权公告日 2022.04.26

(21) 申请号 201780014261.0
 (22) 申请日 2017.03.01
 (65) 同一申请的已公布的文献号
 申请公布号 CN 109153711 A
 (43) 申请公布日 2019.01.04
 (30) 优先权数据
 62/301,806 2016.03.01 US
 62/347,376 2016.06.08 US
 62/446,026 2017.01.13 US
 (85) PCT国际申请进入国家阶段日
 2018.08.30
 (86) PCT国际申请的申请数据
 PCT/US2017/020090 2017.03.01
 (87) PCT国际申请的公布数据
 WO2017/151707 EN 2017.09.08
 (73) 专利权人 伊利诺伊大学理事会
 地址 美国伊利诺伊州
 专利权人 美国政府代表退伍军人事务部
 (72) 发明人 阿尔农·拉维 海恩-安哈·源
 (74) 专利代理机构 中原信达知识产权代理有限
 责任公司 11219
 代理人 金海霞 杨青
 (51) Int. Cl.
 C07K 14/52 (2006.01)

A61K 38/50 (2006.01)

C12N 9/82 (2006.01)

(56) 对比文件

US 2015337027 A1,2015.11.26
 Georgia A等.Engineering thermal stability of L-asparaginase by in vitro directed evolution.《FEBS JOURNAL》.2009,第276卷摘要.
 Hien Anh Nguyen等.Structural Insight into Substrate Selectivity of Erwinia chrysanthemi L-Asparaginase.《BIOCHEMISTRY》.2016,第55卷摘要,图2-5,1252页右栏最后1段.
 Hien Anh Nguyen等.Structural Insight into Substrate Selectivity of Erwinia chrysanthemi L-Asparaginase.《BIOCHEMISTRY》.2016,第55卷摘要,图2-5,1252页右栏最后1段.

审查员 刘红霞

(续)

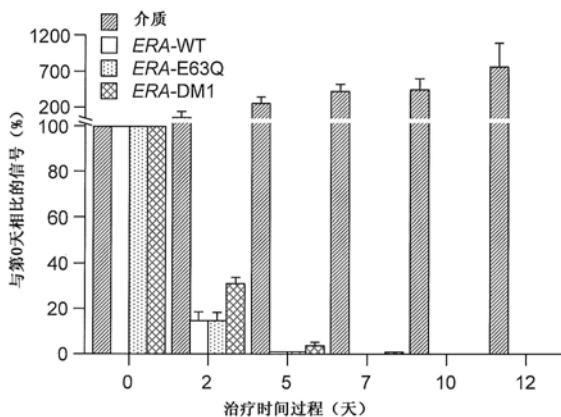
权利要求书2页 说明书32页
 序列表29页 附图5页

(54) 发明名称

具有降低的L-谷氨酰胺酶活性和增强的稳定性的L-天冬酰胺酶变体和融合蛋白

(57) 摘要

本发明描述了具有降低的L-谷氨酰胺酶活性和增强的体内循环的菊欧文氏菌(Erwinia chrysanthemi)L-天冬酰胺酶变体以及含有L-天冬酰胺酶和三个串联的可溶性TRAIL结构域的融合蛋白,其用于治疗癌症例如急性成淋巴细胞性白血病和急性髓性白血病。



CN 109153711 B

[接上页]

(56) 对比文件

Khosrow Aghaiypour等.Structural Basis for the Activity and Substrate Specificity of *Erwinia chrysanthemi* L-Asparaginase.《Biochemistry》.2001,第40卷摘

要,图1-5.

Khosrow Aghaiypour等.Structural Basis for the Activity and Substrate Specificity of *Erwinia chrysanthemi* L-Asparaginase.《Biochemistry》.2001,第40卷摘要,图1-5.

1. 一种菊欧文氏菌 (*Erwinia chrysanthemi*) L-天冬酰胺酶 (ErA) 变体, 其通过用谷氨酰胺替换在 SEQ ID NO:1 的第63位处的氨基酸并任选地分别用异亮氨酸或天冬酰胺替换在 SEQ ID NO:1 的第31或254位处的氨基酸来形成, 其中所述ErA变体表现出野生型ErA酶的至少75%的L-天冬酰胺酶反应速率, 并且表现出低于野生型ErA酶的60%的L-谷氨酰胺酶反应速率。

2. 权利要求1的ErA变体, 其包含SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3或SEQ ID NO:4中阐述的氨基酸序列。

3. 权利要求1的ErA变体, 其中所述ErA变体对L-天冬酰胺表现出低于250 μ M的 K_m 。

4. 权利要求1的ErA变体, 其中所述ErA变体对L-谷氨酰胺表现出高于3mM的 K_m 。

5. 权利要求1的ErA变体, 其还包含组氨酸标签、SUMO标签、白蛋白结合结构域或其组合。

6. 权利要求1的ErA变体, 其中所述ErA变体被PEG化。

7. 一种核酸分子, 其编码权利要求1至6任一项的ErA变体。

8. 一种表达载体, 其包含权利要求7的核酸分子。

9. 一种宿主细胞, 其包含权利要求7的核酸分子。

10. 一种药物组合物, 其包含权利要求1至6任一项的ErA变体和可药用赋形剂。

11. 权利要求10的药物组合物, 其还包含TRAIL的稳定形式。

12. 权利要求11的药物组合物, 其中所述TRAIL的稳定形式包含FOLDON序列GYIPEAPRDGQAYVRKDG EWVLLSTFL (SEQ ID NO:31)。

13. 权利要求1至6任一项的ErA变体在制备通过包括以下的方法治疗癌症的药物中的应用: 向需要治疗的对象给药有效量的权利要求1至6任一项的ErA变体, 由此治疗所述对象的癌症。

14. 权利要求13的应用, 其中所述癌症选自非霍奇金淋巴瘤、白血病、急性淋巴细胞性白血病、急性髓性白血病、B细胞淋巴瘤、伯基特淋巴瘤、慢性髓细胞性白血病、慢性淋巴细胞性白血病和毛细胞白血病。

15. 权利要求13的应用, 其中所述方法还包括给药TRAIL的稳定形式。

16. 权利要求15的应用, 其中所述TRAIL的稳定形式包含FOLDON序列GYIPEAPRDGQAYVRKDG EWVLLSTFL (SEQ ID NO:31)。

17. 一种融合蛋白, 其包含与三个串联的可溶性TRAIL结构域相连的权利要求1至6任一项的ErA变体。

18. 权利要求17的融合蛋白, 其中所述可溶性TRAIL结构域包含人类TRAIL的第115-281位残基。

19. 权利要求17的融合蛋白, 其中所述三个串联的可溶性TRAIL结构域通过包含1至8个氨基酸残基的肽连接基团彼此相连。

20. 权利要求19的融合蛋白, 其中所述氨基酸残基选自甘氨酸和丝氨酸。

21. 权利要求17的融合蛋白, 其中所述三个串联的可溶性TRAIL结构域通过包含1至20个氨基酸残基的肽连接基团连接到所述L-天冬酰胺酶。

22. 权利要求21的融合蛋白, 其中所述氨基酸残基选自甘氨酸和丝氨酸。

23. 权利要求17的融合蛋白, 其还包含组氨酸标签、SUMO标签、白蛋白结合结构域或其

组合。

24. 权利要求17的融合蛋白,其中所述融合蛋白被PEG化。

25. 一种核酸分子,其编码权利要求17至24任一项的融合蛋白。

26. 一种表达载体,其包含权利要求25的核酸分子。

27. 一种宿主细胞,其包含权利要求25的核酸分子。

28. 一种药物组合物,其包含权利要求17至24任一项的融合蛋白和可药用赋形剂。

29. 权利要求17至24任一项的融合蛋白在制备用于治疗癌症的药物中的应用。

30. 权利要求29的应用,其中所述癌症选自非霍奇金淋巴瘤、白血病、急性成淋巴细胞性白血病、急性髓性白血病、B细胞淋巴瘤、伯基特淋巴瘤、慢性髓细胞性白血病、慢性淋巴细胞性白血病和毛细胞白血病。

具有降低的L-谷氨酰胺酶活性和增强的稳定性的L-天冬酰胺酶变体和融合蛋白

技术领域

[0001] 本申请要求2016年3月1日提交的美国临时申请号62/301,806、2016年6月8日提交的62/347,376和2017年1月13日提交的62/446,026的优先权权益,所述临时申请的内容以其整体通过参考并入本文。

[0002] 本发明是在美国国立卫生研究院(National Institutes of Health)授予的资助号R01EB013685和美国退伍军人管理局(Veteran's Administration)授予的资助号I01BX001919的政府支持下做出的。美国政府在本发明中具有一定权利。

背景技术

[0003] 某些癌症例如急性成淋巴细胞性白血病(ALL)依赖于从血液中清除Asn,这种因子最通常归因于在这些癌症中天冬酰胺合成酶无表达/低表达。因此,L-天冬酰胺酶已被鉴定为这些癌症的治疗中的关键组分。L-天冬酰胺酶是具有双重活性的酶。主要活性是L-天冬酰胺酶活性,其将氨基酸L-天冬酰胺(Asn)水解成L-天冬氨酸(Asp)和氨。次要活性是L-谷氨酰胺酶活性,其将L-谷氨酰胺(Gln)水解成L-谷氨酸(Glu)和氨。对于FDA批准的酶例如ELSPAR®(从大肠埃希氏杆菌(*Escherichia coli*)获得的酶)和ERWINAZE®(从菊欧文氏菌(*Erwinia chrysanthemi*)获得的酶)来说,L-谷氨酰胺酶活性在主要的L-天冬酰胺酶活性的2至10%的范围内。虽然这些药物的L-天冬酰胺酶活性的重要性已被认可,但对于L-谷氨酰胺酶活性在杀死白血病细胞中的重要性,存在着有冲突的报道。此外,L-谷氨酰胺酶活性与L-天冬酰胺酶的许多临床毒性有关。事实上,L-天冬酰胺酶治疗的毒副作用严重限制了这种抗癌药物的使用。

[0004] 考虑到在ALL的治疗中使用L-天冬酰胺酶的治疗优点,试图寻求这些酶的更有效的变体。为此目的,解析了与Asp或Glu复合的菊欧文氏菌(*Erwinia chrysanthemi*)L-天冬酰胺酶的晶体结构。这一分析表明,大多数活性位点残基(Glu63、Thr95、Asp96和Lys168)的位置对配体的性质(Asp相比于Glu)不敏感。相反,Thr15的构象对配体的类型敏感(Nguyen等,(2016) *Biochemistry* 55(8):1246-53)。在较早的工作中,已推测菊欧文氏菌(*Erwinia chrysanthemi*) (ErA)的两个活性位点残基Glu63和Ser254与谷氨酰胺酶活性相关,其中显示将它们分别用Gln和Asn替换产生极低的L-谷氨酰胺酶活性(Aghaiypour等,(2001) *Biochemistry* 40(19):5655-5664)。

[0005] 突变分析表明,用缬氨酸或亮氨酸替换Asp133为ErA L-天冬酰胺酶提供了热稳定性(Kotzia和Labrou(2009) *FEBS J.* 276(6):1750-61)。也已显示,枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)L-天冬酰胺酶的Asn133和Val143的突变提高L-天冬酰胺酶活性(CN 104371993)。此外,大肠埃希氏杆菌(*Escherichia coli*)L-天冬酰胺酶的天冬酰胺内切肽酶抗性突变体(Asn24Ala)在与界面突变(Tyr250Leu)相组合时,提供与野生型酶相比具有极低的L-谷氨酰胺酶活性、降低的细胞毒性和243%的总IC₅₀的酶(Offman等,(2011) *Blood* 117:1614-21)。此外,Parmentier等人((2015) *Leuk. Res.* 39(7):757-62)描述了具有野生型

L-天冬酰胺酶活性和降低的L-谷氨酰胺酶活性的幽门螺旋杆菌 (*Helicobacter pylori*) L-天冬酰胺酶双突变体 (Met121Cys/Thr169Met), 其对人类白血病细胞系表现出降低的活性。此外, WO 2015/038639公开了一种来自于大肠埃希氏杆菌 (*E. coli*) 的在第58和59位处具有替换的修饰的L-天冬酰胺酶, 其表现出降低的L-谷氨酰胺酶活性。US 2013/0330316描述了一种来自于激烈火球菌 (*Pyrococcus furiosus*) 的L-天冬酰胺酶的突变体, 其包含替换 Lys274Glu、Thr53Gln和Thr53Gln/Lys274Glu, 并具有高的热稳定性、pH稳定性并且无L-谷氨酰胺酶活性。

[0006] 也已描述了L-天冬酰胺酶的翻译后修饰的形式。例如, 已将L-天冬酰胺酶连接到聚乙二醇 (PEG-天冬酰胺酶), 以便降低L-天冬酰胺酶治疗的免疫副作用并延长所述酶在疗法期间的半衰期。参见US 2010/0143324和US 2012/0100121。也已提出了将白蛋白结合肽融合到L-天冬酰胺酶, 用于增加该酶的半衰期。参见US 2012/0009123和US 2016/0213759。

[0007] 使用L-天冬酰胺酶治疗癌症的其他方法包括所述L-天冬酰胺酶与TNF相关的凋亡诱导配体 (TRAIL) 激动剂或TRAIL受体激动剂例如三个可溶性TRAIL结构域和其他功能性结构域例如抗体片段的共同给药。参见US 2015/0337027、US 2009/0131317和WO 2012/170640。就此而言, 已显示在对L-天冬酰胺酶单一治疗有抗性的神经胶质瘤细胞中, L-天冬酰胺酶克服了对由Bcl-2/Bcl-xL抑制剂ABT263诱导的内在凋亡和由TRAIL介导的外在凋亡两者的抗性 (Karpel-Massler等, (2016) *Oncotarget* 7 (23):33512-28)。

发明内容

[0008] 本发明提供了在SEQ ID NO:1的第31、63和254位中的一个或多个位置处具有氨基酸替换的菊欧文氏菌 (*Erwinia chrysanthemi*) L-天冬酰胺酶 (ErA) 变体。在某些实施方式中, 第31位处的氨基酸替换包括异亮氨酸、缬氨酸、亮氨酸或苏氨酸; 第63位处的氨基酸替换包括谷氨酰胺、天冬酰胺或天冬氨酸; 并且第254位处的氨基酸替换包括天冬酰胺或谷氨酰胺。在某些实施方式中, 所述ErA变体具有SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6或SEQ ID NO:7中阐述的氨基酸序列。理想情况下, 所述ErA变体表现出: 野生型ErA酶的至少75%的L-天冬酰胺酶反应速率 (k_{cat}); 对Asn表现出低于250 μ M的 K_m ; 低于野生型ErA酶的60%的L-谷氨酰胺酶反应速率 (k_{cat}); 和/或对Gln表现出大于3mM的 K_m 。在其他实施方式中, 所述ErA变体还包含: 组氨酸标签, SUMO标签, 白蛋白结合结构域, PEG化, 和/或三个串联的可溶性TRAIL结构域。在特定实施方式中, 所述可溶性TRAIL结构域包括人类TRAIL的第115-281位残基; 所述三个串联的可溶性TRAIL结构域通过包含例如选自甘氨酸和丝氨酸的1至8个氨基酸残基的肽连接基团彼此相连; 和/或所述三个串联的可溶性TRAIL结构域通过包含例如选自甘氨酸和丝氨酸的1至20个氨基酸残基的肽连接基团连接到所述ErA变体。在某些实施方式中, 使用在以下位置处具有半胱氨酸残基的ErA变体来实现PEG化: 第72、76、79、84、85、206、210、215、216、235、239、240、261、264、265、268、269、318、322位或其组合。

[0009] 本发明还提供了一种包含与三个串联的可溶性TRAIL结构域相连的L-天冬酰胺酶的融合蛋白。在某些实施方式中, 所述可溶性TRAIL结构域包括人类TRAIL的第115-281位残基; 所述三个串联的可溶性TRAIL结构域通过包含例如选自甘氨酸和丝氨酸的1至8个氨基酸残基的肽连接基团彼此相连; 和/或所述三个串联的可溶性TRAIL结构域通过包含例如选

自甘氨酸和丝氨酸的1至20个氨基酸残基的肽连接基团连接到所述ErA变体。在其他实施方式中,所述融合蛋白的L-天冬酰胺酶是来自于菊欧文氏菌 (*Erwinia chrysanthemi*) 或大肠埃希氏杆菌 (*Escherichia coli*) 的L-天冬酰胺酶。在某些实施方式中,所述菊欧文氏菌 (*E. chrysanthemi*) L-天冬酰胺酶 (ErA) 是在SEQ ID NO:1的第31、63和254位中的一个或多个位置处具有氨基酸替换的变体。此外,所述融合蛋白还包含:组氨酸标签,SUMO标签,白蛋白结合结构域,和/或PEG化。在某些实施方式中,所述PEG化的L-天冬酰胺酶是在以下位置处具有半胱氨酸残基的来自于菊欧文氏菌 (*Erwinia chrysanthemi*) 的L-天冬酰胺酶:第72、76、79、84、85、206、210、215、216、235、239、240、261、264、265、268、269、318、322位或其组合。

[0010] 还提供了含有所述ErA变体或融合蛋白的核酸分子、表达载体、宿主细胞和药物组合物,以及通过任选地与TRAIL的稳定形式相组合向需要治疗的对象给药有效量的所述ErA变体或融合蛋白来治疗癌症的方法。

附图说明

[0011] 图1A和1B使用表达萤光素酶的LOUCY (人类T-ALL;图1A) 和SUP-B15 (人类B-ALL;图1B) 细胞系显示,具有降低的L-谷氨酰胺酶活性的L-天冬酰胺酶在ALL动物中快速减少癌细胞数目。

[0012] 图2显示,用LOUCY (人类T-ALL) 细胞接种并给药野生型和ErA变体 (ErA-E63Q和ErA-E63Q-S254N (ErA-DM1)) 的动物的体重减轻与L-谷氨酰胺酶活性相关,其中较高的L-谷氨酰胺酶活性引起较多的体重减轻。对用SUP-B15 (人类B-ALL) 细胞接种的动物获得了相似结果。由于体重减轻是毒性的指示物,因此用低L-谷氨酰胺酶ErA变体治疗的动物的体重减轻的减少,表明这些酶具有降低的毒性。

[0013] 图3示出了来自于菊欧文氏菌 (*Erwinia chrysanthemi*) (A;UniProt entry P06608;SEQ ID NO:1)、胡萝卜欧文氏菌 (*E. carotovora*) (B;UniProt entry Q6Q4F4;SEQ ID NO:8)、大肠埃希氏杆菌 (*Escherichia coli*) (C;UniProt entry P00805;SEQ ID NO:9)、幽门螺旋杆菌 (*Helicobacter pylori*) (D;UniProt entry O25424;SEQ ID NO:10)、产琥珀酸沃廉氏菌 (*Wolinella succinogenes*) (E;UniProt entry P50286;SEQ ID NO:11) 和豚鼠 (*Cavia porcellus*) (F;UniProt entry HOW0T5;SEQ ID NO:12) 的L-天冬酰胺酶的序列比对。严格保守的残基用下划线标明。标注了为降低L-谷氨酰胺酶活性的目的而选择的用于诱变的4个位点。菊欧文氏菌 (*E. chrysanthemi*)、胡萝卜欧文氏菌 (*E. carotovora*) 和大肠埃希氏杆菌 (*E. coli*) 的酶含有N-端信号肽,该N-端信号肽未包含在所述比对中。对于豚鼠的酶来说,只示出了在其N-端L-天冬酰胺酶结构域中的残基。

[0014] 图4显示,超低L-谷氨酰胺酶ErA-TM2变体与高L-谷氨酰胺酶ErA-WT同样有效地消除T-ALL LOUCY细胞。将在4周前用表达萤光素酶的LOUCY细胞尾静脉注射的雌性小鼠每日用介质 (n=3)、ErA-WT (n=4) 和ErA-TM (n=4) 治疗,共14天 (药物剂量为50IU/小鼠/天; i.p.)。对于每个组来说,示出的代表性动物在治疗的第0天具有最高的生物发光成像信号。

[0015] 图5示出了TRAIL_{trimer}-ErA-TM2融合蛋白在急性髓性白血病 (AML) 的小鼠模型中的抗癌活性。

[0016] 发明详述

[0017] 现已发现, 归因于菊欧文氏菌 (*Erwinia chrysanthemi*) L-天冬酰胺酶 (ErA) 的L-谷氨酰胺酶活性的毒副作用可以通过所述ErA酶的第31、63和254位氨基酸残基中的一者或多者的突变来降低。此外, L-天冬酰胺酶的体内循环时间可以通过N-或C-端添加组氨酸标签、SUMO标签和/或白蛋白结合结构域来增加。此外, 现已证实, 将L-天冬酰胺酶融合到三个串联的可溶性TRAIL结构域, 通过为凋亡提供必需的信号 (L-天冬酰胺酶) 和诱导凋亡过程 (TRAIL) 两者促进细胞死亡。因此, 本发明提供了变体L-天冬酰胺酶和含有L-天冬酰胺酶的融合蛋白及其组合, 用于治疗依赖于Asn外部供应的存在的癌症例如淋巴瘤和白血病。本发明的L-天冬酰胺酶的提高的安全性, 将为当前的患者群体 (例如具有儿童ALL的患者) 提供益处, 并在其他患者群体 (例如成人ALL、AML和其他癌症) 中提供拓展的应用。

[0018] 正如本领域中已知的, L-天冬酰胺酶 (L-天冬酰胺氨基水解酶, E.C.3.5.1.1) 是将Asn中的酰胺键水解成Asp和氨的酰胺酶 (Kumar和Verma (2012) *Asian J. Biochem. Pharma Res.* 3:197-205)。在本发明中使用的L-天冬酰胺酶可以从任何适合的生物体 (包括动物、微生物或植物) 获得。理想情况下, 所述L-天冬酰胺酶从微生物例如细菌、真菌、酵母、放线菌或藻类获得。可以从中获得本发明的L-天冬酰胺酶的细菌物种包括但不限于大肠埃希氏杆菌 (*E. coli*) (Cedar和Schwartz (1968) *J. Bacteriol.* 96:2043-8; 也参见UniProt entry P00805)、胡萝卜欧文氏菌 (*Erwinia carotovora*) (Kotzia和Labrou (2005) *J. Bacteriol.* 119:309-323)、斯氏假单胞菌 (*Pseudomonas stutzeri*) (Manna等, (1995) *Curr. Microbiol.* 30:291-8)、食酸假单胞菌 (*Pseudomonas acidovorans*) (Davis等, (1977) *J. Bacteriol.* 129:1379-86)、海芋欧文氏菌 (*Erwinia aroideae*) (Peterson和Ciegler (1969) *Appl. Microbiol.* 18:64-7)、嗜热栖热菌 (*Thermus thermophilus*) (Pritsa等, (2001) *Anticancer Drugs* 12:137-42)、水生栖热菌 (*Thermus aquaticus*) (Curran等, (1985) *Arch. Biochem. Biophys.* 241:571-6)、金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*) (Rozalska和Mikucki (1992) *Acta Microbiol. Pol.* 41:145-50)、产琥珀酸弧菌 (*Vibrio succinogenes*) (Kafkewitz和Goodman (1974) *Appl. Microbiol.* 27:206-9)、弗氏柠檬酸杆菌 (*Citrobacter freundii*) (Davison等, (1977) *Biochim. Biophys. Acta* 480:282-94)、普通变形杆菌 (*Proteus vulgaris*) (Tosa等, (1972) *J. Biochem.* 11:217-22)、运动发酵单胞菌 (*Zymomonas mobilis*) (Pinheiro等, (2001) *Biomater. Diagn.* 6:243-4)、枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*) (Fisher和Wray (2002) *J. Bacteriol.* 184:2148-54)、地衣芽孢杆菌 (*Bacillus licheniformis*) (Golden和Bernlohr (1985) *J. Bacteriol.* 164:938-40)、环状芽孢杆菌 (*Bacillus circulans*) MTCC 8574 (Hymavathi等, (2009) *Appl. Biochem. Biotechnol.* 159:191-98)、产气肠杆菌 (*Enterobacter aerogenes*) (Mukherjee等, (2000) *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 53:180-4)、粘质沙雷氏菌 (*Serratia marcescens*) (Khan等, (1970) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 41:525-33)、产琥珀酸沃廉氏菌 (*Wolinella succinogenes*) (参见UniProt entry P50286)、幽门螺旋杆菌 (*Helicobacter pylori*) (参见UniProt entry O25424) 和豚鼠 (*Cavia porcellus*) (参见UniProt entry H0W0T5)。真菌和酵母物种例如*Aspergillus tamari*、*Aspergillus terreus*、泡盛曲霉 (*Aspergillus awamori*)、*Cylindrocarpon obtusisporum*、粉红镰刀菌 (*Fusarium roseum*)、*Fusarium saloni*、酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*)、产朊假丝酵母 (*Candida utilis*)、季也蒙假丝酵母 (*Candida guilliermondii*) 和*Rhodospodidium*

toruloids也可作为本发明的L-天冬酰胺酶的来源。

[0019] 最广泛使用并且可商购的L-天冬酰胺酶源自于大肠埃希氏杆菌 (*E. coli*) 或欧文氏菌属物种 (*Erwinia* sp)。在欧文氏菌属物种中, 菊欧文氏菌 (*E. chrysanthemi*) 和胡萝卜欧文氏菌 (*E. carotovora*) 来源的酶是已知的, 并且包括但不限于从菊欧文氏菌 (*E. chrysanthemi*) NCPPB 1066 (参见UniProtKB登记号P06608)、菊欧文氏菌 (*E. chrysanthemi*) 3937 (参见GENBANK登记号AAS67028)、菊欧文氏菌 (*E. chrysanthemi*) NCPPB 1125 (参见GENBANK登记号CAA31239)、胡萝卜欧文氏菌 (*E. carotovora*) *atroseptica* 亚种 (参见GENBANK登记号AAS67027或UniProtKB登记号Q6Q4F4) 和胡萝卜欧文氏菌 (*E. carotovora*) (参见GENBANK登记号AAP92666) 分离的酶。因此, 优选地, 本文中使用的L-天冬酰胺酶源自于大肠埃希氏杆菌 (*E. coli*)、菊欧文氏菌 (*E. chrysanthemi*) 或胡萝卜欧文氏菌 (*E. carotovora*)。特别地, 所述L-天冬酰胺酶优选从菊欧文氏菌 (*E. chrysanthemi*) 获得。在某些实施方式中, 本文中使用的L-天冬酰胺酶缺少N-端前导序列并具有N-端甲硫氨酸残基。示例性的菊欧文氏菌 (*E. chrysanthemi*) L-天冬酰胺酶具有SEQ ID NO:1中阐述的氨基酸序列。

[0020] “ErA变体”是指表现出L-天冬酰胺酶活性并包含至少一个与野生型ErA酶相比降低或减弱ErA的L-谷氨酰胺酶活性、提高其稳定性和/或增加其体内循环时间的突变或修饰的ErA酶的任何非天然存在的形式。相比而言, “野生型”L-天冬酰胺酶是指从天然存在的来源分离时L-天冬酰胺酶的典型形式。野生型是在自然种群中最经常观察到的形式, 因此被任意地命名为正常或野生型形式。

[0021] 正如本文中所证实的, 菊欧文氏菌 (*E. chrysanthemi*) L-天冬酰胺酶 (ErA; SEQ ID NO:1) 的第31、63和254位中的一个或多个位置的突变提供了具有降低或减弱的L-谷氨酰胺酶活性的酶 (参见表7)。具体来说, ErA变体的L-谷氨酰胺酶活性被降低到野生型ErA活性的0至65%、0至50%、0至35%、0至25%、0至20%、0至15%或0至10%之间。理想情况下, 本发明的ErA变体表现出低于野生型ErA酶的L-谷氨酰胺酶反应速率 (k_{cat}) 的60%、50%、40%、30%或20%的 k_{cat} 。此外, 优选地, 所述ErA变体对Gln表现出高于2、3、5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75或80mM的 K_m 。具体来说, 本发明包含对Gln表现出2至100mM、3至100mM、10至100mM或20至100mM范围内的 K_m 的ErA变体。

[0022] ErA变体包括在SEQ ID NO:1的第31、63和/或254位处具有突变的蛋白。因此, ErA变体包括SEQ ID NO:1的第31位、第63位、第254位、第31和63位、第31和254位、第63和254位以及第31、63和254位的突变。ErA变体蛋白中的突变包括用异亮氨酸、缬氨酸、亮氨酸或苏氨酸替换Ala31, 用谷氨酰胺、天冬酰胺或天冬氨酸替换Glu63, 和/或用天冬酰胺或谷氨酰胺替换Ser254。在SEQ ID NO:1的第31、63和254位中的一个或多个位置处具有突变的示例性ErA变体蛋白被提供在SEQ ID NO:2 (E63Q)、SEQ ID NO:3 (E63Q-S254N)、SEQ ID NO:4 (A31I-E63Q)、SEQ ID NO:5 (E63Q-S254Q)、SEQ ID NO:6 (A31I-E63Q-S254Q) 和SEQ ID NO:7 (A31I-E63Q-S254N) 下。

[0023] 除了ErA之外, 也可以在其他L-天冬酰胺酶中的相应位置处制造突变。当在比较、比对或鉴定一个多肽序列与另一个多肽序列的等同氨基酸的情形中使用术语“相应”是指当与所述另一个多肽序列比对时产生最高同一性百分数的比较或比对。例如, 在来自于胡萝卜欧文氏菌 (*E. carotovora*) 的L-天冬酰胺酶 (UniProt entry Q6Q4F4) 中, ErA的第31、

63和254位残基的相应位置位于SEQ ID NO:8的第29、61和252位处。

[0024] 有利情况下,本发明的ErA变体具有与野生型ErA可比的L-天冬酰胺酶活性。具体来说,所述ErA变体表现出野生型ErA酶的至少70%的L-天冬酰胺酶反应速率(k_{cat})。理想情况下,所述ErA变体表现出在野生型ErA酶的 k_{cat} 的50至150%、60至140%、70至130%或80至125%范围内的L-天冬酰胺酶 k_{cat} 。此外,优选地,所述ErA变体对Asn表现出小于250、200、150、140、130、120、110、100、90、80、70、60、50或40 μ M的 K_m 。具体来说,本发明包括对Asn表现出10至250 μ M、20至200 μ M、30至190 μ M或50至150 μ M范围内的 K_m 的ErA变体。

[0025] 为了增加本文中公开的L-天冬酰胺酶(包括野生型天冬酰胺酶和融合蛋白)的体内循环时间,本发明还提供了具有组氨酸标签(His)、SUMO标签(SUMO)、白蛋白结合结构域(ABD)或其组合的变体,特别是ErA变体。所述L-天冬酰胺酶变体可以在其C-端和/或N-端包含组氨酸标签、SUMO标签和/或白蛋白结合结构域。作为说明,所述L-天冬酰胺酶变体可以具有SUMO-天冬酰胺酶-ABD、His-SUMO-ABD-天冬酰胺酶、His-SUMO-天冬酰胺酶-ABD、His-SUMO-天冬酰胺酶、His-ABD-天冬酰胺酶、ABD-天冬酰胺酶、ABD-SUMO-天冬酰胺酶等的N->C-端结构。可以将编码所述His、SUMO或ABD的核酸同框插入到编码所述L-天冬酰胺酶的核酸的5'或3',由此产生融合蛋白。

[0026] 理想情况下,包含组氨酸标签、SUMO标签、白蛋白结合结构域中的一者或多者或其组合能显著增加L-天冬酰胺酶的体内循环时间。或者说,所述变体具有比以等量的蛋白质剂量给药的野生型L-天冬酰胺酶更长的 $t_{1/2}$ 。当在本文中使用时,术语“ $t_{1/2}$ ”或“半衰期”是指L-天冬酰胺酶或其变体或融合蛋白的浓度在体外或体内例如在注入到哺乳动物中之后下降一半所需要的时间。具体来说,所述变体在约50 μ g/kg(以蛋白质含量计)的剂量下具有至少约50、52、54、56、58、59、60、61、62、63、64或65小时的 $t_{1/2}$ 。或者,所述变体在约10 μ g/kg(以蛋白质含量计)的剂量下具有至少约30、32、34、36、37、38、39或40小时的 $t_{1/2}$ 。在另一个实施方式中,所述变体在约10,000至约15,000IU/m²(约20-30mg蛋白质/m²)范围内的剂量下具有至少约100至约200小时的 $t_{1/2}$ 。考虑到L-天冬酰胺酶的功效与所述药物的体内半衰期相关,本发明的变体在癌症例如白细胞和淋巴瘤的治疗中特别有用。

[0027] 当在本文中使用时,“组氨酸标签”是指由至少6个组氨酸(His)残基构成的氨基酸基序。组氨酸标签包括6(六组氨酸标签、6xHis标签或His₆标签)、7、8、9、10或多达20个组氨酸残基的多组氨酸。

[0028] “SUMO标签”是指将SUMO(小的泛素相关修饰物)蛋白融合到目标蛋白以增强所述目标蛋白的溶解性/稳定性。SUMO标签的包含可以使用已知的表达系统例如CHAMPION pET SUMO表达系统(Invitrogen)、EXPRESSO T7SUMO克隆和表达系统(Lucigen)或pET His6SUMO TEV LIC克隆载体(Addgene)来实现。除了SUMO标签之外,设想了还可以使用其他Ub1蛋白,包括但不限于Ub、Rub1、Hub1、ISG15、Ubi-L(MNSF)、FAT10、Apg12、Apg8和Urm1(Larsen和Wang(2002)J.Proteome Res.1(5):411-9)。也参见US 7,655,413,其整体通过参考并入本文。

[0029] “白蛋白结合结构域”是指在体内或体外结合白蛋白并改善治疗剂的血清半衰期和生物分布的多肽。白蛋白可以源自于任何动物物种,例如人类、猴或啮齿动物。白蛋白结合结构域被描述在例如US 6,267,964、WO 1991/19741、WO 2005/097202、WO 2001/45746、WO 2013/043071和US 2004/0001827中。此外,US 9,156,887公开了可用于本发明的非天然

的白蛋白结合结构域。在某些实施方式中,所述白蛋白结合结构域具有SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:14或SEQ ID NO:15中阐述的氨基酸序列。

[0030] 本文公开的L-天冬酰胺酶(包括野生型L-天冬酰胺酶、ErA变体和融合蛋白)的PEG化也可用于增加体内循环时间。术语“PEG化”是指L-天冬酰胺酶与聚乙二醇(PEG)的结合。PEG可以通过化学方法,经由PEG链末端处的羟基偶联(例如共价连接)到活性剂。可用于本发明的L-天冬酰胺酶的PEG化的PEG化方法被提供在例如US 4,179,337、US 5,766,897、US 2002/0065397和US 2009/0054590中。或者,正如本文中公开的,L-天冬酰胺酶可以通过经氨基酸替换引入到所述L-天冬酰胺酶的氨基酸序列中的1至5个半胱氨酸残基的位点特异性PEG化来PEG化。参见实施例6。在某些实施方式中,所述L-天冬酰胺酶是在以下位置处具有半胱氨酸残基的来自于菊欧文氏菌(*E. chrysanthemi*)的L-天冬酰胺酶(野生型、变体或融合蛋白):第72、76、79、84、85、206、210、215、216、235、239、240、261、264、265、268、269、318、322位或其组合。在特定实施方式中,本发明的L-天冬酰胺酶的PEG化通过以下方式来实现:用半胱氨酸替换野生型L-天冬酰胺酶(例如SEQ ID NO:1的ErA)、变体L-天冬酰胺酶(例如SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6或SEQ ID NO:7的变体)或其融合蛋白的Asp84,由此为所述L-天冬酰胺酶的基于马来酰亚胺的PEG化提供特异性位点。

[0031] 本文公开的L-天冬酰胺酶(即野生型和Era变体)的增强的细胞毒性活性可以通过将所述L-天冬酰胺酶结合或融合到三个串联的可溶性TRAIL结构域或将所述L-天冬酰胺酶与TRAIL的稳定形式共同给药来实现。正如在本文中证实的,发现所得到的融合蛋白提供与缺少所述三个串联的可溶性TRAIL结构域的L-天冬酰胺酶相比降低至少25倍的IC₅₀值。因此,本文公开的融合蛋白在癌症、特别是对L-天冬酰胺酶不敏感的癌症的治疗中特别有用。

[0032] “融合蛋白”是指含有以非本源方式可操作连接的蛋白质或蛋白质片段(例如L-天冬酰胺酶或其变体)的嵌合蛋白。按照本发明的融合蛋白,将三个串联的可溶性TRAIL结构域(TRAIL_{trimer})与L-天冬酰胺酶(例如菊欧文氏菌(*Erwinia chrysanthemi*)或大肠埃希氏杆菌(*Escherichia coli*)L-天冬酰胺酶)或其变体(例如Era变体)同框融合。所述融合蛋白可以在其C-端或N-端处包含TRAIL。作为说明,所述融合蛋白可以具有TRAIL-天冬酰胺酶或天冬酰胺酶-TRAIL的N->C-端结构。当与标签或修饰相组合使用时,所述融合蛋白可以具有SUMO-TRAIL-天冬酰胺酶-ABD、His-SUMO-ABD-TRAIL-天冬酰胺酶、His-SUMO-TRAIL-天冬酰胺酶-ABD、His-SUMO-天冬酰胺酶-TRAIL、His-ABD-TRAIL-天冬酰胺酶、ABD-天冬酰胺酶-TRAIL、ABD-SUMO-TRAIL-天冬酰胺酶等的结构。可以将编码TRAIL、特别是TRAIL_{trimer}的核酸同框插入到编码所述L-天冬酰胺酶的核酸的5'或3',由此产生融合蛋白。

[0033] 优选地,所述可溶性TRAIL结构域源自于哺乳动物、特别是人类人类TRAIL,包括其等位基因变体和/或衍生物。所述可溶性结构域包括TRAIL的细胞外部分,包括不含膜定位结构域的受体结合结构域。与TNF超家族的其他蛋白质相似,TRAIL通过15-30个氨基酸的N-端部分、即所谓的茎区(stalk-region)锚定到膜。所述茎区有助于三聚体形成并提供与细胞膜的一定距离。然而,所述茎区不是受体结合结构域(RBD)的一部分。因此,优选地,所述可溶性TRAIL结构域包括缺少来自于茎区的任何氨基酸的TRAIL的受体结合结构域(参见US2015/0337027)。

[0034] 所述可溶性TRAIL结构域可以源自于SEQ ID NO:16中阐述的人类TRAIL。优选地,

所述可溶性TRAIL结构域源自于人类TRAIL,特别是从第115-122位氨基酸开始,并包括SEQ ID NO:16的第115-281、120-281、121-281或122-281位氨基酸残基。在某些实施方式中,TRAIL_{trimer}的每个可溶性结构域由人类TRAIL (SEQ ID NO:16) 的第115-281位残基构成。人类TRAIL的第115-281位残基被阐述在SEQ ID NO:17中。

[0035] 设想了所有死亡受体结合性TRAIL结构域的衍生物和变体,并且它们可以通过经替换、添加和/或缺失/截短以改变它们的氨基酸序列或通过引入产生功能上等同的多肽的化学修饰来制造。本领域普通技术人员应该理解,任何多肽序列中的某些氨基酸可以用其他氨基酸替换,而对所述多肽的活性没有不利影响。

[0036] 本文公开的TRAIL结构域包括所公开的序列中一个或多个氨基酸的替换。专业技术人员能够使用公知的技术确定本文中阐述的肽的适合的序列变体。在某些实施方式中,本领域技术人员可以通过靶向据信对活性不重要的区域,鉴定所述分子中可以被改变而不破坏活性的适合区域。在其他实施方式中,专业技术人员可以鉴定所述分子中在相似多肽之间保守的残基和部分。在其他实施方式中,即使是对生物活性或结构来说重要的氨基酸残基也可以进行保守氨基酸替换,而不破坏其生物活性或对肽结构没有不利影响。

[0037] 所述三个可溶性TRAIL结构域优选地通过由1至8个氨基酸残基构成的肽连接基团彼此相连。同样地,TRAIL_{trimer}优选地通过由1至20个氨基酸残基构成的肽连接基团连接到所述L-天冬酰胺酶。术语“肽连接基团”或“连接物”意指充当分子桥以将两个不同分子可操作地连接在一起的肽组成部分。理想情况下,本发明的连接物由甘氨酸或丝氨酸或其组合构成。在特定实施方式中,TRAIL_{trimer}的每个可溶性结构域优选地通过单个甘氨酸或单个丝氨酸残基彼此相连。在所述三个可溶性TRAIL结构域之间包含单个甘氨酸残基的示例性TRAIL_{trimer}在本文中被阐述在SEQ ID NO:18中。关于位于TRAIL_{trimer}与L-天冬酰胺酶之间的肽连接基团,理想情况下该连接物是柔性连接物。所述柔性连接物优选地具有1至20个氨基酸残基的长度,特别是6、9、12、15或18个氨基酸残基的长度。所述柔性连接物优选为甘氨酸/丝氨酸连接物,即主要由氨基酸甘氨酸和丝氨酸构成的肽连接物。在特定实施方式中,所述TRAIL_{trimer}与L-天冬酰胺酶之间的连接物是(GGGS)_n连接物(SEQ ID NO:19),其中n是1至4;或其排列,包括例如GGGS(GGGGS)_n(SEQ ID NO:20),这里n是1至4。在某些实施方式中,所述TRAIL_{trimer}与L-天冬酰胺酶之间的连接物具有SEQ ID NO:21中阐述的氨基酸序列。具有在三个可溶性TRAIL结构域之间包含单个甘氨酸残基的TRAIL_{trimer}并在TRAIL_{trimer}与L-天冬酰胺酶之间具有甘氨酸/丝氨酸连接物的示例性TRAIL_{trimer}-ErA变体(TM2)融合蛋白在本文中被阐述在SEQ ID NO:22中。

[0038] TRAIL的稳定形式意指促进三聚体形成的TRAIL形式。具体来说,为了促进TRAIL的三聚体形成,已显示一种小的三聚体形成结构域FOLDON序列

(GYIPEAPRDGQAYVRKDGWVLLSTFL;SEQ ID NO:31) 在37°C下将TRAIL稳定性和生物活性维持至少48小时(Kouno等,(2013) J. Invest. Dermatol. 133 (9):2212-2220)。因此,将所述FOLDON肽插入到His-SUMO标签与TRAIL的N-端之间,产生His-SUMO-FOLDON-TRAIL融合蛋白。将所述融合蛋白表达,并在细菌培养物中获得>10mg/L融合蛋白的产率。所述蛋白质非常稳定,表明FOLDON的包含产生TRAIL的稳定形式。因此,可以将TRAIL的稳定形式与L-天冬酰胺酶共同给药和/或合并于药物组合物中,以增强L-天冬酰胺酶的细胞毒性活性。

[0039] 所述TRAIL的稳定形式和TRAIL-天冬酰胺酶融合蛋白可以被进一步修饰以包含组

氨酸标签、SUMO标签、白蛋白结合结构域、PEG化或其组合。在N-端处还包含多组氨酸标签和SUMO标签的示例性TRAIL-ErA变体(TM2)融合蛋白在本文中被阐述在SEQ ID NO:23中。此外,示例性的TRAIL的稳定形式可以具有His-SUMO-FOLDON-TRAIL的结构。

[0040] 本文中公开的变体和融合蛋白可以通过常规的重组蛋白技术容易地制备,其中将重组宿主细胞用带有编码所述变体或融合蛋白的核酸分子的表达构建物或载体转化或转导,将所述重组宿主细胞在适合的生长条件下生长以提供所述变体或融合蛋白的表达,并且随后分离并任选地纯化所述变体或融合蛋白。因此,本发明还提供了编码ErA变体(即在SEQ ID NO:1的第31、63和254位中的一个或多个位置处具有氨基酸替换和/或包含组氨酸标签、SUMO标签、白蛋白结合结构域或其组合的ErA)或融合蛋白(即与三个串联的可溶性TRAIL结构域相连的L-天冬酰胺酶)的核酸分子,以及含有所述核酸分子的表达盒和/或表达载体。理想情况下,所述表达盒和表达载体含有促进在目标宿主细胞中表达的必需的调控序列(例如启动子、终止子等)。包含编码ErA变体或融合蛋白的核酸分子的宿主细胞也被包括在本发明的范围之内。宿主细胞可以包括真核细胞(例如哺乳动物、真菌或酵母细胞)或原核细胞(例如大肠埃希氏杆菌(E.coli))。

[0041] 在被生产和分离/纯化后,本发明的ErA变体和/或融合蛋白可以原样使用或配制在含有可药用赋形剂的药物组合物中。本文中提供的药物组合物可以被具体配制成固体或液体形式用于静脉内给药或用于静脉内注射。最佳的药物组合物可以由本领域技术人员根据例如计划的给药途径、递送形式和所需剂量来确定。参见例如《Remington制药学》(Remington's Pharmaceutical Sciences)(第19版,1995)。

[0042] ErA变体和/或融合蛋白可以并入到常规的全身性剂型例如可注射制剂中。所述剂型也可以包括必需的生理上可接受的载体材料、赋形剂、润滑剂、缓冲剂、表面活性剂、抗菌剂、增量剂(例如甘露糖醇)、抗氧化剂(抗坏血酸或亚硫酸氢钠)等。

[0043] 药物组合物中主要的载体或赋形剂在本质上可以是水性或非水性的。例如,适合的载体或赋形剂可以是注射用水、生理盐水溶液或人造脑脊液,并可能增补有在用于肠胃外给药的组合物中常见的其他材料。其他示例性介质是中性缓冲盐水或与血清白蛋白混合的盐水。药物组合物可以包含约pH 7.0-8.5的Tris缓冲剂或约pH 4.0-5.5的乙酸盐缓冲剂,其可以进一步包含山梨糖醇或其适合的代用品。本发明的药物组合物可以通过将具有所需纯度的所选组合物与任选的配制剂《Remington制药学》(Remington's Pharmaceutical Sciences,同上)混合而制备成冷冻干燥饼或水性溶液的形式用于储存。此外,可以使用适合的赋形剂例如蔗糖或甘氨酸将本发明的ErA变体或融合蛋白配制成冷冻干燥物。

[0044] 用于本发明的ErA变体、融合蛋白或药物组合物的给药途径包括通过静脉内、腹膜内、脑内(实质内)、脑侧室内、肌肉内、眼内、动脉内、门静脉内或病灶内途径的注射,通过持续释放系统或通过植入装置。组合物可以通过推注给药或通过输注或通过植入装置连续给药。组合物也可以通过其上已吸附或包封有所需分子的膜、海绵或另一种适合的材料的植入进行局部给药。在使用植入装置的情况下,可以将所述装置植入到任何适合的组织或器官中,并且所需分子的递送可以通过扩散、定时释放球丸或连续给药来实现。

[0045] 本发明的组合物可以肠胃外递送。当设想肠胃外给药时,在本发明中使用的治疗性组合物可以为无热原、肠胃外可接受的水性溶液的形式,其在可药用介质中包含在本发

明的筛选方法中鉴定到的所需化合物。用于肠胃外注射的特别适合的介质是无菌蒸馏水，在无细菌蒸馏水中将所述在本发明的筛选方法中鉴定到的化合物配制成无菌、等渗并适合地防腐的溶液。制备可以包括用可以提供产品的受控或持续释放的试剂例如可注射微球、可生物侵蚀的粒子、聚合化合物（例如聚乳酸或聚乙醇酸）、珠子或脂质体来配制所需分子，所述产品随后可以通过储库注射来递送。含有透明质酸的制剂具有促进在循环中的持久性的效果。可以使用可植入药物递送装置来引入所需分子。

[0046] 所述组合物也可以被配制成用于吸入。在这些实施方式中，将所述ErA变体或融合蛋白配制成用于吸入的干粉，或者也可以使用用于气溶胶递送例如喷雾的推进剂来配制吸入溶液。肺部给药被进一步描述在W0 1994/020069中，其描述了化学修饰的蛋白质的肺部递送。

[0047] 本发明的组合物可以通过消化道例如口服来递送。这些可药用组合物的制备在本领域的技术范围之内。以这种方式给药的本发明的ErA变体或融合蛋白可以使用或不使用那些惯用于固体剂型例如片剂和胶囊的混合的载体来配制。胶囊可以被设计成在胃肠道中当生物利用度被最大化并且系统前降解被最小化时的地点处释放所述制剂的活性部分。可以包含另外的试剂以促进本文公开的本发明的肽的吸收。也可以使用稀释剂、调味剂、低熔点蜡、植物油、润滑剂、悬浮剂、片剂崩解剂和粘合剂。

[0048] 这些组合物也可含有辅助剂例如防腐剂、润湿剂、乳化剂和分散剂。微生物作用的阻止可以通过包含各种不同的抗细菌和抗真菌剂例如对羟基苯甲酸酯、氯丁醇、苯酚山梨酸等来确保。包含等渗剂例如糖、氯化钠等，也可能是合乎需要的。可注射药物形式的延长吸收，可以通过包含延迟吸收的试剂例如单硬脂酸铝和明胶来产生。

[0049] 本发明的ErA变体和/或融合蛋白在可以通过天冬酰胺贫化来治疗的疾病或病症的治疗中发现特别用途。因此，本发明还提供了用于治疗疾病、特别是癌症的方法，所述方法包括向需要治疗的对象给药有效量的ErA变体或融合蛋白。“有效量”在本文中使用时是指活性成分的足以实现以下预期目的的量：(a) 减轻所述障碍的严重性；(b) 限制或阻止待治疗障碍的特征性症状的发生；(c) 抑制待治疗障碍的特征性症状的恶化；(d) 在以前具有所述障碍的患者中限制或阻止所述障碍的复发；(e) 在以前表现出所述障碍的症状的患者中限制或阻止所述症状的复发；(f) 在疾病或障碍发生后降低死亡率；(g) 治愈；和(h) 疾病的预防。在每个个体病例中的有效量可以由专业技术人员按照本领域中已建立的方法凭经验确定。当在本发明的情形中使用，时，“给药”包括体内给药到个体以及在体外或离体直接给药到细胞或组织。ErA变体或融合蛋白的有效量通常是可以在所述对象的癌细胞或肿瘤中引起凋亡并减少循环L-天冬酰胺的量。临床医生可以确定剂量或给药途径以获得最佳治疗效果。

[0050] 在某些实施方式中，所述ErA变体或融合蛋白可用于治疗或制造药物以用于治疗成年人和儿童两者中的急性成淋巴细胞性白血病(ALL)以及预期天冬酰胺贫化在其中具有有用效果的其他病症。这些病症包括但不限于恶性肿瘤或癌症，包括但不限于血液恶性肿瘤、非霍奇金淋巴瘤、NK淋巴瘤、胰腺癌、霍奇金病、急性髓细胞性白血病、急性髓单核细胞性白血病、慢性淋巴细胞性白血病、淋巴肉瘤、网状细胞肉瘤和黑素肉瘤。对天冬酰胺贫化有响应的代表性的非恶性血液疾病包括免疫系统介导的血液病，例如传染病如由HIV感染引起的传染病(即AIDS)。与天冬酰胺依赖性相关的非血液疾病包括自体免疫疾病，例如类

风湿性关节炎、SLE、自体免疫、胶原蛋白血管病、AIDS等。其他自体免疫疾病包括骨关节炎、伊萨克氏综合征、银屑病、胰岛素依赖型糖尿病、多发性硬化症、硬化性全脑炎、系统性红斑狼疮、风湿热、炎性肠病(例如溃疡性结肠炎和克罗恩病)、原发性胆汁性肝硬化、慢性活动性肝炎、肾小球性肾炎、重症肌无力、寻常天胞疮和格雷夫斯病。在特定实施方式中,所述ErA变体或融合蛋白用于治疗非霍奇金淋巴瘤、白血病、急性成淋巴细胞性白血病、急性髓性白血病、B细胞淋巴瘤、伯基特淋巴瘤、慢性髓细胞性白血病、慢性淋巴细胞性白血病和毛细胞白血病。

[0051] 被怀疑引起疾病的细胞,可以在任何适合的体外或体内测定法例如其中生长培养基缺少天冬酰胺的体外测定法中测试天冬酰胺依赖性。因此,一种情况下,本发明涉及一种在患者中治疗可治疗疾病的方法,所述方法包括向所述患者给药有效量的本发明的结合物。在特定实施方式中,所述疾病是ALL。在特定实施方式中,在可以通过天冬酰胺贫化来治疗的疾病的治疗中使用的ErA变体或融合蛋白包括来自于欧文氏菌属物种、更具体为菊欧文氏菌(*Erwinia chrysanthemi*)的L-天冬酰胺酶。

[0052] 所述ErA变体或融合蛋白可以按照每周约3次至每月一次范围内、通常为每周一次或每隔周一天的日程表,作为单一药剂(例如单一疗法)或作为与化疗药物的组合的一部分给药,所述化疗药物包括但不限于糖皮质激素、皮质类固醇、抗癌化合物或其他药剂,包括但不限于甲氨蝶呤、地塞米松、泼尼松、泼尼松龙、长春新碱、环磷酰胺和蒽环霉素。作为实例,在包括诱导、巩固或强化和维持的3个化疗阶段内,将本发明的ErA变体或融合蛋白作为多药剂化疗的组分给药于患有ALL的患者。在特定实例中,所述ErA变体或融合蛋白不与天冬酰胺合成酶抑制剂(例如参见WO 2007/103290)一起给药。在另一个特定实例中,所述ErA变体或融合蛋白不与天冬酰胺合成酶抑制剂一起给药,但与其他化疗药物一起给药。所述ErA变体或融合蛋白可以在作为多药剂化疗方案的一部分的其他化合物之前、之后或同时给药。

[0053] 在特定实施方式中,所述方法包括以约1U/kg至约1000U/kg的量给药本发明的ErA变体或融合蛋白。在更特定的实施方式中,所述ErA变体或融合蛋白以选自约20、50、60、70、100、200、300、400、500和600U/kg的量给药。在另一个特定实施方式中,所述ErA变体或融合蛋白以约1000IU/m²至约20000IU/m²范围内的剂量(例如1000IU/m²、2000IU/m²、3000IU/m²、4000IU/m²、5000IU/m²、6000IU/m²、7000IU/m²、8000IU/m²、9000IU/m²、10000IU/m²、11000IU/m²、12000IU/m²、13000IU/m²、14000IU/m²、15000IU/m²、16000IU/m²、17000IU/m²、18000IU/m²、19000IU/m²或20000IU/m²)给药。在另一个特定实施方式中,所述ErA变体或融合蛋白以单剂药剂在约3天至约10天(例如3、4、5、6、7、8、9或10天)的时间段内将Asn贫化到不可检测的水平剂量给药。在另一个实施方式中,所述方法包括给药本发明的ErA变体或融合蛋白,本发明的ErA变体或融合蛋白与野生型L-天冬酰胺酶相比在单剂药剂后具有更长的体内循环半衰期。

[0054] 提供了下述非限制性实施例以进一步说明本发明。

[0055] 实施例1:材料和方法

[0056] ErA基因克隆和诱变。按照先前所描述的(Schalk等,(2014) *J. Biol. Chem.* 289: 33175-33186),通过Genscript来合成对应于缺少前21个氨基酸残基信号肽的ErA(UniProt entry P06608)的氨基酸序列的密码子优化过的合成基因。将所述合成基因用NdeI和

BamHI-HF限制性酶消化,凝胶纯化,并使用即时粘性末端DNA连接酶(Instant Sticky End DNA ligase)(New England Biolabs)连接到His₆-SUMO-pET14b载体中(其中His₆标签后跟随有酵母蛋白SUM0(小的泛素修饰物,Smt3p)),产生His₆-SUMO-ErA-WT质粒。随后将该质粒用作模板来产生下述13种ErA单突变体:Ala31Ser(A31S),Ala31Ile(A31I),Ala31Leu(A31L),Ala31Met(A31M),Ala31Asn(A31N),Ala31Thr(A31T),Ala31Val(A31V),Glu63Leu(E63L),Glu63Gln(E63Q),Pro123Ser(P123S),Pro123Asn(P123N),Ser254Asn(S254N),Ser254Pro(S254P)。然后将带有突变体E63Q的质粒用作模板来产生ErA双突变体(A31T-E63Q、A31I-E63Q、S254N-E63Q和S254Q-E63Q),同时将突变体S254N用于产生两个其他双突变体(A31I-S254N和A31T-S254N)。将带有双突变A31I-E63Q的质粒用作模板来产生两个三突变体A31I-E63Q-S254N和A31I-E63Q-S254Q。

[0057] ErA蛋白质表达和纯化。蛋白质表达和纯化如以前所述来进行(Schalk等,(2014) J. Biol. Chem. 289:33175-33186)。简单来说,将对应于野生型ErA(ErA-WT)或突变的插入片段(通过测序验证)的质粒转化到大肠埃希氏杆菌(*E. coli*) BL21 (DE3) C41细胞中用于表达。挑取单菌落并在37°C下在2xYT培养基中扩增。在培养物达到0.6-0.8的光密度(在600nm处)时,用0.3mM异丙基β-D-1-硫代吡喃半乳糖苷(IPTG)诱导蛋白质表达。然后降低温度并在接下来的12小时内维持在18°C。通过超声破碎细胞,并通过在4°C下以20,000g离心30分钟来清除碎片。将上清液装载到5mL HISTRAP镍亲和柱(GE Healthcare)上。随后将柱用由pH 8.5的25mM Tris-HCl、500mM NaCl和25、50和75mM咪唑构成的缓冲液洗涤。将结合的蛋白质用相同但含有500mM咪唑的缓冲液洗脱。用SUMO蛋白酶切割N-端His₆-SUMO标签,并将蛋白质溶液装载回镍亲和柱上以分离所述标签。将含有纯化的酶的流出级分在pH 8.5的25mM Tris、100mM NaCl溶液中透析,浓缩至20-80mg/ml,分装,在液氮中快速冷冻,并储存在-80°C下。

[0058] TRAIL基因克隆和诱变。通过Genscript来合成含有人类TRAIL(UniProt entry P50591)的三个重复序列的合成的基因(密码子优化过,以备在大肠埃希氏杆菌(*Escherichia coli*)中进行蛋白质表达)。每个重复序列包含TRAIL的第115至281位氨基酸残基(SEQ ID NO:17)。将单个甘氨酸或单个丝氨酸残基插入到第一与第二个重复序列之间以及第二与第三个重复序列之间。此外,将编码GGGS(GGGGS)₃连接物(SEQ ID NO:21)的57bp的寡核苷酸(5'-GGC GGT GGC AGC GGT GGA GGA GGC TCT GGT GGA GGC GGT AGC GGA GGC GGA GGC TCG-3';SEQ ID NO:24)添加到第三个重复序列的末端限制性位点BglIII与NdeI之间。将所得到的基因插入到pUC57载体中。

[0059] 使用定点诱变和引物Hano-203:5'-CGA ATG CAT CTA GAT CTC GAG cgt gag cgt g-3'(SEQ ID NO:25)和Hano-204:5'-cac gct cac gCT CGA GAT CTA GAT GCA TTC G-3'(SEQ ID NO:26),将含有BglIII-TRAIL₁-G-TRAIL₂-G-TRAIL₃-连接物-NdeI的载体pUC57的独一无二的BglIII位点修饰成XhoI位点,以便于亚克隆。然后将得到的质粒用XhoI和NdeI限制性酶消化,凝胶纯化,以产生双消化并纯化的插入片段XhoI-TRAIL₁-G/S-TRAIL₂-G/S-TRAIL₃-连接物-NdeI。

[0060] 编码ErA A31I-E63Q-S254Q三突变体(TM2)的载体His₆-SUMO-NdeI-ErA-TM2-pET14b,使用引物Hano-201:5'-gaa cag att ggt ggt CTC GAG gga gga att cCA TAT Gga taa act g-3'(SEQ ID NO:27)和Hano-202:5'-cag ttt atc CAT ATG gaa ttc ctc

cCT CGA Gac cac caa tct gtt c-3' (SEQ ID NO:28) 来扩增,由此产生XhoI位点。将得到的含有His₆-SUMO-XhoI-NdeI-ErA-TM2的pET14b质粒用XhoI和NdeI限制性酶消化并凝胶纯化,以产生双消化并纯化的载体pET14b-His₆-SUMO-XhoI-NdeI-ErA-TM2。

[0061] 使用即时粘性末端DNA连接酶(New England BioLabs)将双消化并纯化的插入片段XhoI-TRAIL₁-G/S-TRAIL₂-G/S-TRAIL₃-连接物-NdeI连接到双消化并纯化的载体pET14b-His₆-SUMO-XhoI-NdeI-ErA-TM2中,产生pET14b-His₆-SUMO-XhoI-TRAIL₁-G/S-TRAIL₂-G/S-TRAIL₃-连接物-NdeI-ErA-TM2质粒。正确的序列通过DNA序列分析来确认。使用引物Hano-211:5'-gca cgc tat atc acc atg acg aac gct tgc acc-3' (SEQ ID NO:29)和Hano-212:5'-ggg cga agc gtt cgt cat ggt gat ata gcg tgc-3' (SEQ ID NO:30),将该质粒用作模板,产生无活性的突变体pET14b-His₆-SUMO-XhoI-TRAIL₁-G-TRAIL₂-G-TRAIL₃-连接物-NdeI-ErA-TM2-K168M。

[0062] 融合蛋白表达和纯化。将pET14b-His₆-SUMO-XhoI-TRAIL₁-G/S-TRAIL₂-G/S-TRAIL₃-连接物-NdeI-ErA-TM2和pET14b-His₆-SUMO-XhoI-TRAIL₁-G/S-TRAIL₂-G/S-TRAIL₃-连接物-NdeI-ErA-TM2-K168M质粒分开转化到大肠埃希氏杆菌(E.coli)BL21(DE3)C41细胞中进行表达,其中得到的蛋白质在本文中分别被称为TRAIL_{trimer}-ErA-TM2和TRAIL_{trimer}-ErA-TM2-K168M。挑取单菌落并在37°C下在2YT培养基中生长过夜。建立了两种流程将所述蛋白质表达达到相似的高生产率。

[0063] 在第一种流程中,将过夜培养物转移到新鲜的2YT培养基中并在37°C下生长,直至培养物达到0.6-0.8的光密度(在600nm处)。蛋白质表达用0.1mM IPTG在37°C下诱导4至5小时,然后收获细胞。

[0064] 在第二种流程中,将过夜培养物转移到新鲜的ZY培养基(1%N-Z-Amine或胰蛋白酶加上0.5%酵母提取物)中,其中每1L ZY增补有20mL无菌的50xM(1.25M Na₂HPO₄,1.25M KH₂PO₄,2.5MNH₄Cl和0.25M Na₂SO₄),20mL无菌的50x5052(25%甘油,2.5%葡萄糖和10%单水α-乳糖),1mL无菌的2M MgSO₄和0.1-1mL无菌的1000x金属混合物(50mM FeCl₃·x6H₂O;20mM CaCl₂·x2H₂O;10mM MnCl₂;10mM ZnSO₄·x7H₂O;2mM CoCl₂·x6H₂O;2mM CuCl₂;2mM NiCl₂·x6H₂O;2mM Na₂MoO₄·x2H₂O;2mM Na₂SeO₃;2mMH₂BO₃)。然后降低温度并在20°C下维持过夜,然后收获细胞。

[0065] 将通过所述第一或第二种流程获得的细胞通过超声进行破碎,并通过在4°C下以20,000g离心30分钟来清除碎片。将上清液装载到5mL HISTRAP镍亲和柱(GE Healthcare)上。随后将柱用由pH 8.5的25mM Tris-HCl、500mM NaCl和25、50或75mM咪唑构成的缓冲液洗涤。将结合的蛋白质用相同但含有500mM咪唑的缓冲液洗脱。用带有His₆标签的SUMO蛋白酶切割N-端His₆-SUMO标签。将含有纯化的酶的流出级分在Dulbecco的磷酸盐缓冲盐水(DPBS, Mediatech)中透析。97kDa的融合蛋白的纯度通过SDS-PAGE来确认。

[0066] 动力学测定法。L-天冬酰胺酶活性如以前所述使用连续光谱酶偶联测定法来确定(Schalk等,(2014) J.Biol.Chem.289:33175-33186)。简单来说,所述测定法通过还原的NADH的1:1氧化来测量L-天冬氨酸的产生。NADH向NAD⁺的转变通过分光光度法在37°C下被测量为在340nm处吸光度的降低。所有测量进行一式三份。使用SIGMAPLOT软件(Systat Software Inc)将速率拟合到Michaelis-Menten方程。值得注意的是,融合蛋白TRAIL_{trimer}-ErA-TM2具有~10个国际单位(IU)/mg的比活性;而无活性的融合蛋白TRAIL_{trimer}-ErA-TM2-

K168M仅具有<0.2IU/mg的比活性。

[0067] 使用用于确定L-谷氨酰胺酶活性的常规测定法(Gella和Pascual(1982) Anal.Biochem.127:322-5)并做出一些修改。将纯化的酶混合到含有pH 8.5的50mM Tris-HCl、1mg/mL BSA、7U GDH(谷氨酸脱氢酶;Sigma-Aldrich)、3mM INT(碘硝基氯化四氮唑蓝, Sigma-Aldrich)、100mM PMS(吩嗪硫酸甲酯, Sigma-Aldrich)和100mM NAD⁺的溶液中。添加不同浓度的L-谷氨酰胺引发第一个反应,以产生氨和L-谷氨酸。后者在NAD⁺存在下和GDH的催化下被进一步分解成 α -酮戊二酸和氨。由该第二个反应产生的NADH与INT一起充当第三个反应的输入物,在第三个反应中在PMS催化下INT-甲口的形成可以通过分光光度法作为在500nm处吸光度的增加来跟踪。所有反应在37℃下进行。1IU的酶被定义为在37℃下在1分钟内产生1微摩尔产物所使用的酶量。

[0068] 细胞培养。LOUCY细胞系被核实是无支原体的,并被确认与来自于全球生物资源中心ATCC的相应的STR(短串联重复序列)概貌数据100%匹配。将细胞在潮湿气氛(5%CO₂, 37℃)中,使用增补有10%FBS(Hyclone)和1x青霉素-链霉素溶液(Invitrogen)的RPMI1640培养基进行培养。将L-谷氨酰胺直接添加到细胞培养物中至终浓度为2mM。

[0069] 细胞存活率-增殖测定法。将细胞悬液的90 μ L等分试样(每mL 2.5x10⁵个细胞)在圆底96孔微量滴定板中,在10 μ L DPBS(Dulbecco的磷酸盐缓冲盐水, Mediatech)或终浓度在0.0001至1IU/mL范围内的L-天冬酰胺酶存在下,一式三份进行培养。在将所述板在37℃下在含有5%CO₂的加湿空气中温育4天后,添加Alamar蓝(Invitrogen)至终浓度为10%v/v,并将所述板继续温育4小时,然后读取荧光信号。白血病细胞存活率被计算为在L-天冬酰胺酶存在下的荧光计数与DPBS对照中的荧光计数相比的百分率。

[0070] 结晶、X-射线数据收集和精化。使用悬滴气相扩散法在285K下生长ErA突变体的晶体。将2 μ L浓度为2.5-10mg/mL的酶与1-4 μ L储库缓冲溶液混合。所述储库溶液由pH 7.5的0.1M HEPES和24%的PEG MME 2000构成。

[0071] 在数据采集之前,将晶体用pH 7.5的0.1M HEPES和24%的PEG MME 2000中的10mM L-天冬氨酸(Sigma-Aldrich)或25mM L-谷氨酸(Sigma-Aldrich)浸泡5分钟。然后将浸泡过的晶体分别转移到相同但增补有25%甘油的溶液,以备低温保存。

[0072] 在位于Argonne National Laboratory的Life Sciences Collaborative Access Team(LS-CAT)光束线21-ID-F上收集衍射数据。用XDS软件包(Kabsch(2010) Acta Crystallogr.D Biol.Crystallogr.66:133-144)处理数据。通过使用MOLREP的分子置换(Roberts(1976) J.Biol.Chem.251:2119-2123),使用原子分辨率结构(PDB entry 107J)作为搜索模型来确定结构。使用REFMAC来进行精化(Steckel等,(1983) Biochem.Pharmacol.32:971-977),并且使用Coot来进行模型建造(Steckel等,(1983) Biochem.Pharmacol.32:971-977)。数据收集和精化统计数据列于表1中。使用PyMOL Molecular Graphics System(1.6.0版, Schrödinger)来制备结构。

[0073] 电子密度的检查显示在活性位点处存在浸泡的Asp。相反,没有观察到浸泡的Glu的电子密度。

[0074] 表1

结构	E63Q+Asp	<i>ErA</i> -A31I-E63Q+Asp	<i>ErA</i> -E63Q-S254Q+Asp
PDB编码	5I3Z	5I3Z	5I3Z
数据收集统计数据			
X-射线源和检测器	LS-CAT ID-D MARCCD 300	LS-CAT ID-F MARCCD 225	LS-CAT ID-D MARCCD 300
波长 (Å)	1.008264	0.97872	1.008264
温度 (K)	100	100	100
分辨率 ^a (Å)	1.008264	1.008264	1.60 (1.69-1.60)
反射数			
观察到的	437716 (49641)	1278167 (118300)	682869 (105570)
独特的	74069 (10093)	183230 (23339)	122786 (19113)
完整性 (%)	97.2 (83.5)	95.7 (76.2)	98.2 (95.7)
R _{sym} (%)	12.6 (53.7)	5.5 (60.8)	10.1 (61.6)
平均I/σ(I)	16.88 (4.08)	23.09 (3.01)	14.71 (3.36)
空间群	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁	I222
单位晶格 (Å) : a, b, c	77.89, 87.89, 175.99	77.19, 87.69, 175.11	76.98, 123.12, 198.44
Wilson B-因子 (Å ²)	16.5	16.6	17.1
精化统计数据			
精化程序	REFMAC5	REFMAC5	REFMAC5
R _{晶体} (%)	17.39	12.02	15.43
R _{游离} (%)	20.93	17.06	18.28
分辨率范围 (Å)	30.00-2.05	30.0-1.5	30.0-1.6
每a.u.的蛋白质分子	4	4	3
原子数目: 蛋白质 ^b	2455, 2455, 2464,	2487, 2481, 2466,	2521, 2499,
	2463	2487	2503
H ₂ O分子	976	1004	954
Asp分子	4	4	3
与理想情况的R.m.s.偏差:			
键长 (Å)	0.0135	0.0226	0.0193
键角 (°)	1.5853	1.9611	1.9204
平均B-因子 (Å ²)	21.0	20.0	16.0
蛋白质 ^b	22.1, 20.0, 19.9, 20.4	18.7, 19.9, 21.4, 19.4	14.9, 15.1, 16.5
水分子	27.4	30.9	26.7
Asp分子	21.3, 22.6, 18.8, 22.1	17.5	16.3, 16.6, 16.4
最有利的区域	96.81	96.67	97.38
另外允许的区域	2.88	3.01	2.29
异常数据区域	0.31	0.32	0.33

[0077] ^a括号中是高分辨率壳。

[0078] ^bProtA, protB, protC, protD。

[0079] 实施例2:L-天冬酰胺酶的体内功效不需要高的L-谷氨酰胺酶共同活性

[0080] 具有高L-天冬酰胺酶和低L-谷氨酰胺酶活性的ErA变体的设计和表征。据推断,为了将L-天冬酰胺酶成功用于治疗ALL,所述酶需要尽可能高的L-天冬酰胺酶活性(以杀死癌细胞)但尽可能低的L-谷氨酰胺酶活性(以使毒副作用最小化)。在FDA批准的两种细菌L-天

冬酰胺酶中,来自于菊欧文氏菌 (*E. chrysanthemi*) 的酶 (ErA) 具有比来自于大肠埃希氏杆菌 (*E. coli*) 的酶 (EcA) 更高的L-天冬酰胺酶活性。参见表2。

[0081] 表2

酶名称	k_{cat} (sec^{-1})	K_m (μM)	k_{cat}/K_m ($\text{sec}^{-1}\mu\text{M}^{-1}$)	$k_{obs}@50\mu\text{M}$ (sec^{-1})
<i>ErA</i> -WT	194.9±2.5	44.2±1.6	4.41	105.3
[0082] <i>ErA</i> -E63Q-S254Q (DM3)	147.3±1.0	179.1±5.6	0.82	36.3
<i>ErA</i> -E63Q	179.9±1.4	48.1±1.1	3.74	92.2
<i>EcA</i> -WT	44.4±0.3	15.0±0.5	2.96	41.3

[0083] 定义这些酶药物的天冬酰胺酶活化的参数是极为重要的。反应速率 (k_{cat}) 是重要的 (慢的酶在活化Asn方面低效), 但更关键的可能是 K_m 值。为了实现所需的低的微摩尔浓度的血液Asn, 所述酶必须具有在该范围内的 K_m 值。酶学家们通常将这两个参数合并成单一值 (k_{cat}/K_m), 其据认为代表了所述酶的效率。由于人类血液含有约50 μM Asn, 因此所述酶在该准确底物浓度下的Asn水解速率也是指示L-天冬酰胺酶的临床适合性的参数。表2示出了FDA批准的野生型ErA和EcA (即ErA-WT和EcA-WT) 的这些值。这些数字显示, 在Asn的生理浓度下, ErA-WT在水解Asn中比EcA-WT好~2倍。因此, 选择ErA酶用于开发具有低L-谷氨酰胺酶活性的变体。

[0084] 除了优越的L-天冬酰胺酶活性之外, ErA-WT还具有更高的L-谷氨酰胺酶活性 (表3)。

[0085] 表3

酶名称	k_{cat} (sec^{-1})	K_m (mM)	k_{cat}/K_m ($\text{sec}^{-1}\text{mM}^{-1}$)	$k_{obs}@50\text{mM}$ (sec^{-1})
<i>ErA</i> -WT	26.84±0.26	0.36±0.02	74.56	15.87
[0086] <i>ErA</i> -E63Q-S254Q (DM3)	2.93±0.03	15.8±0.3	0.19	0.11
<i>ErA</i> -E63Q	8.33±0.16	3.86±0.23	3.68	0.74
<i>EcA</i> -WT	0.89±0.01	1.38±0.09	0.64	0.22

[0087] 在0.5mM Gln的生理浓度下, 野生型ErA具有比EcA-WT高>70倍的L-谷氨酰胺酶活性。旨在降低固有L-谷氨酰胺酶活性并在同时维持其高L-天冬酰胺酶活性的ErA工程化尝试的结果产生了几种满足这些标准的变体, 其中前两种变体列于表3中。

[0088] Glu63向谷氨酰胺的单突变将L-谷氨酰胺酶活性降低>21倍。在E63Q之外, Ser254向天冬酰胺的突变产生双突变体 (ErA-DM1), 其具有进一步降低7倍的L-谷氨酰胺酶活性。两种ErA突变体不仅具有与ErA-WT相比显著降低的L-谷氨酰胺酶活性, 而且ErA-DM1与EcA-

WT相比甚至更低(表3)。然而,ErA-DM1的L-天冬酰胺酶活性被降低到与EcA-WT相近的水平(参见 $k_{obs}@50\mu\text{M Asn}$,表2)。

[0089] 对于临床使用来说,L-天冬酰胺酶与L-谷氨酰胺酶的相对比率是重要的。因此,在生理底物浓度(对于Asn来说 $50\mu\text{M}$,对于Gln来说 $500\mu\text{M}$)下观察到的速率和IU(临床上,L-天冬酰胺酶基于国际单位来给药)的基础上计算该比率。两种比率显示,相对于ErA-WT,ErA-DM2是优越的酶(表4)。值得注意的是,即使在与具有固有的低L-谷氨酰胺酶活性的酶EcA-WT相比时,ErA-DM1也显示出更低的L-谷氨酰胺酶活性。这一点使用NMR波谱术得以确认,所述波谱术被用于跟踪表4中列出的酶的L-谷氨酰胺酶速率。

[0090] 表4

酶名称	$K_{obs}[\text{Asn}_{\text{phs}}]/K_{obs}[\text{Gln}_{\text{phs}}]$	比活性(Asn)/比活性(Gln)
ErA-WT	6.6	7.3
ErA-DM1	330	59.9
ErA-E63Q	124.6	21.6
EcA-WT	187.7	49.9

[0092] 这些实验证实了所设计的ErA突变体的降低的L-谷氨酰胺酶速率和ErA-DM1的格外低的L-谷氨酰胺酶活性。

[0093] L-天冬酰胺酶的体外测试。小鼠白血病L5178Y细胞的生长对外源Asn的依赖性(Haley等,(1961)Cancer Res.21:532-536)使这种细胞系成为评估L-天冬酰胺酶活性的有用模型。因此,使用这种细胞系评估了ErA-E63Q突变体与ErA-WT和EcA-WT相比的活性。观察到在常规的细胞培养条件下,所有三种酶都高效地阻止这些细胞的增殖(表5)。

[0094] 表5

酶名称	IC ₅₀ (IU/mL)		提高倍数
	-Gln	+Gln	
<i>ErA</i> -WT	0.0036	0.0538	14.94
<i>ErA</i> -E63Q	0.0223	0.4259	19.10
<i>EcA</i> -WT	0.0174	0.4114	23.64

[0096] 使用IC₅₀值作为酶的细胞杀死能力的指示物,ErA-WT比EcA-WT或ErA-63Q更加高效(即更低的IC₅₀值)。由于这个顺序反映出这些酶的相对L-谷氨酰胺酶活性(ErA-WT>EcA-WT>ErA-63Q),因此据推测这种IC₅₀的差异主要是由于所述酶的这种副活性引起的。为了测试这一点,重复了剂量响应实验,但这次细胞培养基增补有Gln。事实上,IC₅₀值提高(表5)。Gln增补对观察到的IC₅₀值的影响是剧烈的,提高在~15-25倍的范围内(表5)。注意到,具有最低L-谷氨酰胺酶副活性的酶受到Gln增补最好的保护。换句话说,具有高L-谷氨酰胺酶活性的酶(例如ErA-WT)与具有降低的L-谷氨酰胺酶活性的酶(例如ErA-e63Q)相比在更大程度上克服了Gln增补。这据推测是由于高L-谷氨酰胺酶活性的酶水解了附加的Gln。

[0097] 以前针对L-天冬酰胺酶的L-谷氨酰胺酶副活性的作用的工作依赖于细胞培养物作为实验模型。由于在培养基中生长的任何细胞系都需要Gln,因此显然具有高L-谷氨酰胺酶活性的酶将显示出更好的杀死。然而,这不必定意味着L-天冬酰胺酶药物的这种副活性

是临床功效所需的。事实上,在极端情况下,具有低L-天冬酰胺酶但高L-谷氨酰胺酶活性的酶在细胞培养物中显得非常有效,但在治疗癌症例如依赖于外源Asn的ALL中没有临床相关性。因此,优选地使用体内模型来测试L-天冬酰胺酶中存在的L-谷氨酰胺酶副活性的重要性。

[0098] 用于评估L-天冬酰胺酶变体的ALL的人类异种移植模型的开发。过去,研究人员将L5178Y鼠类细胞系用于L-天冬酰胺酶的体内评估(例如Abuchowski等,(1984) *Cancer Biochem. Biophys.* 7:175-186;Kwon等,(2009) *J. Control Rel.* 139:182-189)。除了这种细胞系不是人类起源之外,这种同系ALL小鼠模型的另一个缺点是不能定量追踪动物的疾病负担。这使得难以正确评估不同的L-天冬酰胺酶制备物。因此,使用表达萤光素酶的LOUCY(人类T-ALL)和SUP-B15(人类B-ALL)细胞系开发了用于ALL的定量体内模型。这些系统的优点在于能够使用体内成像,其中由植入的表达萤光素酶的细胞产生的生物发光信号充当疾病负担的定量度量。

[0099] 一开始,确定了这些人类ALL细胞系对ErA和EcA的野生型形式和对低L-谷氨酰胺酶ErA变体的体外敏感性。这个分析显示,两种细胞系都对L-天冬酰胺酶给药敏感。正如从它们较高的L-谷氨酰胺酶活性预期的,对于ErA-WT和EcA-WT来说,在培养物中确定的 IC_{50} 值被确定为比低L-谷氨酰胺酶ErA突变体低50至100%(表6)。

[0100] 表6

酶名称	IC_{50} (IU/mL)	
	LOUCY	SUP-B15
<i>ErA</i> -WT	0.00033	0.00016
<i>ErA</i> -E63Q	0.00055	0.00024
<i>ErA</i> -DM1	0.00065	0.00031
<i>EcA</i> -WT	0.00035	0.00022

[0101] 在核对了所述人类ALL细胞系的L-天冬酰胺酶敏感性之后,确认了这些细胞可以被植入到小鼠中。基于生物发光信号随时间的增加,证实了所述细胞的增殖和疾病负担的增加。

[0102] *ErA*-WT和*ErA*变体在T-ALL和B-ALL小鼠模型中的体内测试。为了测试*ErA*-WT中存在的非常高的固有L-谷氨酰胺酶活性是否为临床功效所需,将植入有LOUCY或SUP-B15细胞的小鼠用FDA批准的L-天冬酰胺酶治疗,并将活性与本文中描述的低L-谷氨酰胺酶变体进行比较。重要的是注意到,除了所述酶的酶学参数之外,其他变量也可影响体内响应。例如,具有长的体内稳定性的酶与具有短半衰期的酶相比在贫化血液Asn中更加高效。在人类中,已知*ErA*-WT具有比*EcA*-WT短得多的半衰期(0.65相比于1.24天;Asselin等,(1993) *J. Clin. Oncol.* 11:1780-1786)。在使用*ErA*-WT的第一组实验期间,没有观察到肿瘤细胞生长的降低。据推断,这是由于*ErA*-WT在小鼠中的低稳定性造成的,反映出在人类中的观察结果。为了测试这一点,将SUMO标签添加到*ErA*-WT的N-端以提供提高的稳定性而对酶性质没有不利影响。事实上,用SUMO-*ErA*-WT治疗的小鼠显示出肿瘤负担的显著降低。因此,在下述体内研究中使用的所有*ErA*酶都含有该稳定性标签。

[0104] 将植入有LOUCY T-ALL细胞的小鼠每日用L-天冬酰胺酶以50IU/小鼠的剂量通过腹膜内注射(i.p.)进行治疗,共14天。该剂量等同于提供给人类的ErA-WT剂量的约1/3,但在人类中它被每周给药三次并通过肌肉内或静脉内提供。这种给药方式的差异是值得注意的,因为在动物模型中的功效可能受到进入循环的药物量的影响。换句话说,尽管目标是测试L-谷氨酰胺酶ErA变体在体内限制癌症生长的能力,但可能存在其他因素决定体内功效。然而,由于比较在几乎一致的酶(ErA-WT和ErA突变体)之间进行,因此假定这些酶具有非常相近的药代动力学性质。

[0105] 高L-谷氨酰胺酶ErA-WT、低L-谷氨酰胺酶ErA-E63Q和极低L-谷氨酰胺酶ErA-DM2快速减少动物中癌细胞的数目(图1A)。使用ErA-DM1观察到的略微较慢的荧光素酶信号的降低可以归因于该突变体较高的Asn K_m 。然而,到治疗结束时,来自于所有ErA变体的荧光素酶信号的水平都接近于背景,证实了这些细胞的非常强力的杀死。

[0106] 使用B-ALL SUP-B15细胞系重复了这些实验。这次只比较了ErA-WT和ErA-DM1,因为这些酶就L-谷氨酰胺酶活性而言代表了极端(在ErA-WT中最高,在ErA-DM2中最低)。正如对T-ALL LOUCY细胞系所看到的,ErA-WT和ErA-DM1两者在小鼠中急剧减少癌细胞的数目(图1B)。

[0107] 低L-谷氨酰胺酶ErA变体的降低的毒性的指示。本文中示出的数据证实,只含有非常低L-谷氨酰胺酶活性的L-天冬酰胺酶在体内是ALL增殖的强力抑制剂。此外,注意到动物的体重受到药物给药的急剧影响,这是一种与相对L-谷氨酰胺酶活性相关的效应。药物的L-谷氨酰胺酶活性越高,体重减轻越大(图2)。值得注意的是,所述体重减轻与疾病负担无关联。事实上,介质处理的小鼠(病情最严重的组群)遭受最少的体重减轻。这表明观察到的体重减轻是由所述酶的Gln贫化造成的,其中较高的贫化(正如对ErA-WT所预期的)引起最大的体重减轻。相反,用预期引起最少Gln贫化的酶即ErA-DM2治疗的小鼠,提供了最低量的体重减轻。

[0108] 为了进一步探测ErA-WT、ErA-DM1和EcA-WT之间的活性差异,使用NMR来追踪在37℃下,溶液中的天冬酰胺和谷氨酰胺水平的变化。对于这些实验而言,选择在细胞培养实验中存在的浓度作为这些氨基酸的起始浓度,即2.05mM Gln和0.375mM Asn。值得注意的是,人类血液含有~0.6mM Gln和~0.05mM Asn。对于以0.5IU/ml的剂量添加的所有酶来说,到取得第一个时间点的时间为止,所有Asn已被水解成Asp。这表明,所测试的酶在贫化Asn的能力方面非常相似。

[0109] 作为比较,当评估Gln贫化时,所述酶展现出非常不同的性质。正如从动力学性质所预期的,ErA-WT在贫化Gln时非常高效;到48小时时间点为止,所有Gln已被水解成Glu。甚至在24小时后,Gln水平已被ErA-WT从~2mM降低到~0.1mM。由于评估L-天冬酰胺酶的细胞培养物研究通常将细胞与药物温育72或甚至96小时,因此ErA-WT表现出非常强力的细胞杀死能力并不令人吃惊,因为所述细胞将被非常长时间地贫化必需的Gln。EcA-WT固有地具有较低的L-谷氨酰胺酶活性,但在24和48小时时间点显示出与ErA-WT相同的Gln贫化(在5小时时间点中可以注意到它较慢的L-谷氨酰胺酶活性)。

[0110] 最重要的是,ErA-DM1变体具有显著降低的Gln贫化。在24小时时间点处,与该酶温育的溶液的Gln水平仍为~0.4mM,并且在48小时为~0.1mM。仅在72小时时间点处,Gln才被ErA-DM1完全贫化。值得注意的是,Gln经历自发水解,并且在使用的实验条件下,显著的Gln

在实验的4天温育期间被水解。因此,在较晚时间处Gln贫化的量是L-天冬酰胺酶催化的水解与自发水解的组合。因此,如果人们将所述分析限制到24小时时间点,此时发生的Gln自发水解可忽略,则非常明显地,ErA-DM1相对于ErA-WT或EcA-WT引起少得多的Gln贫化。

[0111] 有鉴于高的L-天冬酰胺酶活性和伴随的L-谷氨酰胺酶活性的降低,本文中描述的ErA变体,特别是采取PEG化的融合蛋白形式以增加体内半衰期,可以被容易地用于治疗癌症例如ALL。

[0112] 实施例3:工程化改造的ErA的低L-谷氨酰胺酶活性的结构基础

[0113] 用于诱变的残基的选择。鉴定了4个残基Ala31、Glu63、Pro123和Ser254作为可能影响L-谷氨酰胺酶/L-天冬酰胺酶比率的候选位点。由于在催化中的作用,在L-天冬酰胺酶/L-谷氨酰胺酶超家族之间的共有基序中存在的残基(在图3中用星号注明并包括T12GGT15、H93GTD197、S62、K168)被排除在突变的考虑之外。相反,围绕活性位点并且不必与底物相互作用的非保守残基成为靶点。在多序列比对(图3)的基础上,并与复合有产物Asp和Glu的ErA的晶体结构的分析相结合,Ala31、Glu63、Pro123和Ser254被鉴定为用于诱变的4个潜在候选位点。有趣的是,在这4个残基中,只有一个残基Glu63与底物发生直接相互作用。

[0114] 位点1即Ala31,是接近活性位点并在配体存在下变得有序的柔性N-端环的一部分。当有序时,Ala31位于底物结合口袋的入口处。尽管不与优选的底物Asn直接相互作用,但它在所述氨基酸的C α 原子的4 Å之内。在带有较大底物Gln的ErA结构中,观察到该氨基酸中存在的额外亚甲基原子在Ala31的方向上扭曲。为了维持Asn的接纳但排除Gln,目标是通过将小的丙氨酸侧链用体积较大的侧链代替以在空间上限制空腔。也就是说,做出这种设计是为了在空间上废除额外的Gln亚甲基。在建模研究的基础上,缬氨酸、异亮氨酸、亮氨酸和甲硫氨酸中存在的侧链被鉴定为最适合。另外,正如在序列比对(图3)中所示,在大肠埃希氏杆菌(*E. coli*)和幽门螺旋杆菌(*Helicobacter pylori*)L-天冬酰胺酶的情况下,Ala31分别被缬氨酸或丝氨酸替换。与ErA相比,已报道这些酶具有更低或可忽略的L-谷氨酰胺酶活性(Parmentier等,(2015) *Leuk. Res.* 39:757-762;Cappelletti等,(2008) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 377:1222-1226)。因此,将Ala31用丝氨酸或苏氨酸替换(后者模拟缬氨酸但保留丝氨酸的羟基)。

[0115] 位点2即Glu63,是与氨基酸底物的 α -氨基直接相互作用的残基。与Asp和Glu复合的ErA的结构分析显示,为了接纳较大的Glu,所述底物相对于被小的Asp所采用的结合位置在Glu63的方向上迁移。为了使Gln的这种重新定位不太有利,将Glu63用谷氨酰胺替换。这个突变选择通过下述事实得以强化:在低L-谷氨酰胺酶的幽门螺旋杆菌(*Helicobacter pylori*)和大肠埃希氏杆菌(*E. coli*)L-天冬酰胺酶中,Glu63的对应物是谷氨酰胺。谷氨酸和谷氨酰胺两者的侧链都含有氧原子,其可以参与结合Asn或Gln任一者的 α -氨基。然而,据推断谷氨酰胺侧链中存在的氨基(与谷氨酸中第二个氧原子形成对比)可能对于接纳Gln来说不太有利。除了E63Q突变体之外,还根据表现出高L-天冬酰胺酶活性的Q59L ErA变体的鉴定(Chan等,(2014) *Blood* 123:3596-3606)产生了E63L突变。

[0116] 被选择用于诱变的第三个位点是Pro123。选择该位点是因为这个残基在均表现出低L-谷氨酰胺酶活性的产琥珀酸沃廉氏菌(*Wolinella succinogenes*)L-天冬酰胺酶和幽门螺旋杆菌(*Helicobacter pylori*)L-天冬酰胺酶中分别是丝氨酸或天冬酰胺(图3)。在

Pro123位置的基础上,预期该残基可能在使对Asn的偏好性增加超过Gln中发挥间接作用。为了证实这一点,制备了P123S和P123N ErA变体。

[0117] 用于修饰的位点4即Ser254残基,位于底物结合口袋的入口处并起源于相邻的启动子。因此,正如上述对Ala31合理看出的,据推测用具有较大侧链的残基替换该丝氨酸将排除Gln。多序列比对(图3)揭示出在大肠埃希氏杆菌(*E. coli*)和豚鼠的酶(较低至没有L-谷氨酰胺酶活性)中,该残基的对应物分别是天冬酰胺和脯氨酸。因此,产生了突变体S254N和S254P以探测该位点对L-谷氨酰胺酶/L-天冬酰胺酶偏好性的影响。

[0118] ErA突变体的动力学表征。除了ErA-WT之外,还表达并纯化了表7中列出的18种ErA突变体。

[0119] 表7

酶	与 ErA-WT 相比 的 Glnase%	与 ErA-WT 相比的 Asnase%	同一蛋白内的 (Glnase/Asnase) % ^a
ErA-WT	100%	100%	14%
ErA-A31V	72%	81%	13%
ErA-A31S	124%	110%	16%
ErA-A31T	18%	28%	9%
ErA-A31N	3%	33%	1%
ErA-A31M	7%	26%	3%
ErA-A31I	65%	85%	12%
ErA-A31L	6%	12%	4%
[0120] ErA-E63L	0%	12%	0%
ErA-E63Q ^b	31%	90%	5%
ErA-P123S	2%	3%	11%
ErA-P123N	1%	2%	6%
ErA-S254N	34%	40%	12%
ErA-S254P ^b	0%	120%	0%
ErA-A31T + E63Q	8%	15%	7%
ErA-A31I + E63Q ^b	22%	60%	5%
ErA-S254N + E63Q ^b	0%	82%	0%
ErA-S254N + A31T	9%	18%	7%
ErA-S254N + A31I	22%	25%	12%
EcA-WT	100%	100%	2%

[0121] ^a使用20mM Gln和5nM酶测量的观察到的Glnase速率;使用2mMAsn和0.5nM酶测量的观察到的Asnase速率。

[0122] ^b被选择用于确定 k_{cat} 和 K_m 参数的突变体。

[0123] 使用比色酶偶联测定法,确定所述酶的L-天冬酰胺酶和L-谷氨酰胺酶活性。为了确保测量到在饱和底物浓度下的速率,对于L-谷氨酰胺酶和L-天冬酰胺酶测定来说分别使用10mM Gln和2mM Asn作为底物。所述18种突变体中的17种具有降低的L-谷氨酰胺酶活性(表7)。然而,对于大多数突变体来说,这种降低伴随有L-天冬酰胺酶活性的下降。使用判据(i)保留 $\geq 60\%$ 的L-天冬酰胺酶活性(相对于Erw-WT)和(ii)相对于L-天冬酰胺酶活性 $\leq 5\%$ 的L-谷氨酰胺酶活性,选择突变体ErA-E63Q、ErA-S254P、ErA-A31I+E63Q和ErA-S254N+E63Q用于进一步研究。

[0124] 根据在饱和底物浓度下的初始突变体筛选,单突变体ErA-S245P似乎具有最理想的性质:L-谷氨酰胺酶活性低于测定法条件的检测灵敏度,而L-天冬酰胺酶活性相对于野生型酶为120%(表7)。所述突变体的L-天冬酰胺酶活性的进一步动力学表征确认了使用Asn时的高周转速率。然而,它还揭示出对于Asn来说 K_m 值增加25倍(相对于ErA-WT)(表8)。

[0125] 表8

酶	K_m (μM)	k_{obs} @50 μM (sec^{-1})	k_{obs} @20 μM (sec^{-1})
ErA-WT	47.5 \pm 3.5	105.3	50.7
ErA-S254P	1154.2 \pm 25.5	10.5	4.5
ErA-E63Q	50.7 \pm 2.0	92.2	46.3
[0126] ErA-A31I-E63Q (DM2)	36.9 \pm 2.2	69.7	38.8
ErA-E63Q-S254N (DM1)	185.3 \pm 5.5	36.3	18.9
ErA-E63Q-S254Q (DM3)	179.1 \pm 5.6	30.8	14.2
ErA-A31I-E63Q-S254Q (TM2)	95.0 \pm 3.5	89.1	40.8
<i>Eca</i> -WT	15.0 \pm 0.5	41.3	28.3

[0127] 由于L-天冬酰胺酶的临床使用要求完全贫化血液Asn水平,因此所述酶的 K_m 必须在低的微摩尔范围内才是有效的。因此,尽管实现了大幅消除L-谷氨酰胺酶活性的目标,但有鉴于在L-天冬酰胺酶反应中Asn的 K_m 值的不可接受的提高,所述ErA-S245P变体未被选择用于进一步分析。

[0128] 来自于初始筛选的突变体的性质的进一步检查(表7)表明,随后3种最有希望的变体是E63Q(ErA-E63Q)单突变体和A31I-E63Q(ErA-DM2)和E63Q-S254N(ErA-DM1)双突变体。这些突变体的进一步动力学表征揭示出对底物Asn的关键 K_m 值与ErA-WT可比(表8和9)。事实上,ErA-DM2获得了甚至比ErA-WT更低的Asn K_m (37相比于48 μM)。相反,ErA-DM1变体表现出提高4倍的Asn K_m 。与接近野生型 k_{cat} (在ErA-WT的60-90%的范围内)合在一起,这些突变

体满足了实现从血液高效贫化Asn所需的判据。

[0129] 表9

酶名称	k_{cat} (sec^{-1})	K_m (μM)	k_{cat}/K_m ($\text{sec}^{-1}\mu\text{M}^{-1}$)	k_{obs} @50 μM (sec^{-1})	k_{obs} @20 μM (sec^{-1})	比活性 (IU/mg) ^a
<i>ErA</i> -WT	207.5± 3.6	47.5± 3.5	4.37	105.3	50.7	353.2± 6.1
<i>ErA</i> -E63Q	186.8± 1.7	50.7± 2.0	3.68	92.2	46.3	317.8± 2.9
<i>ErA</i> -A31I-E63Q(DM2)	123.0± 1.8	36.9± 2.2	3.33	69.7	38.8	209.1± 3.1
<i>ErA</i> -E63Q-S254N (DM1)	169.8± 1.5	185.3± 5.5	0.92	36.3	18.9	288.8± 2.6
<i>ErA</i> -S254P	250.0± 2.8	1154.2± 25.5	0.22	10.5	4.5	425.4± 4.8
<i>EcA</i> -WT	44.4± 0.3	15.0± 0.5	2.96	41.3	28.3	76.3± 0.5
<i>ErA</i> -E63Q-S254Q (DM3)	147.3± 1.0	179.1± 5.6	0.82	30.8	14.2	250.4± 1.7
<i>ErA</i> -A31I-E63Q-S254N (TM1)	109.7± 0.8	124.2± 4.3	0.89	29.2	16.4	186.4± 1.4
<i>ErA</i> -A31I-E63Q-S254Q (TM2)	261.2± 2.8	95.0± 3.5	2.75	89.1	40.8	443.5± 4.8

[0130]

[0131] ^a1IU的酶被定义为在37℃下在1分钟内产生1微摩尔产物所使用的酶量。

[0132] 随后确定不想要的L-谷氨酰胺酶活性的精确的动力学参数。这项工作确定了这些突变体的降低的L-谷氨酰胺酶活性是由于与*ErA*-WT相比降低的 k_{cat} (低3-9倍) 和高得多的 K_m (高8-44倍) (表10和11)。

[0133] 表10

酶	K_m (μM)	k_{obs} @500 μM (sec^{-1})	k_{obs} @100 μM (sec^{-1})
<i>ErA</i> -WT	360±20	15.06	6.118
<i>ErA</i> -E63Q	3860±230	0.72	0.098
<i>ErA</i> -A31I-E63Q (DM2)	2730±20	0.73	0.105
<i>ErA</i> -E63Q-S254N (DM1)	15800±300	0.07	0.019
<i>ErA</i> -E63Q-S254Q (DM3)	84000±560	0.02	0.009
<i>ErA</i> -A31I-E63Q-S254Q (TM2)	47500±700	0.0083	0.0045
<i>EcA</i> -WT	1380±90	0.22	0.047

[0134]

[0135] 表11

[0136]

酶名称	k_{cat} (sec^{-1})	K_m (μM)	k_{cat}/K_m ($\text{sec}^{-1}\mu\text{M}^{-1}$)	k_{obs} @1 mM (sec^{-1})	k_{obs} @0.5mM (sec^{-1})	比活性 (IU/mg) ^a
<i>ErA</i> -WT	26.84 ± 0.26	360 ± 20	74.56×10^{-3}	19.22	15.87	45.68 ± 0.44
<i>ErA</i> -E63Q	8.33 ± 0.16	$3,860 \pm 230$	3.68×10^{-3}	2.16	0.74	14.17 ± 0.27
<i>ErA</i> -A31I-E63Q (DM2)	6.01 ± 0.13	$2,730 \pm 200$	2.2×10^{-3}	2.20	0.83	10.22 ± 0.22
<i>ErA</i> -E63Q-S254N (DM1)	2.93 ± 0.03	$15,800 \pm 300$	0.19×10^{-3}	0.18	0.11	4.98 ± 0.05
<i>EcA</i> -WT	0.89 ± 0.01	$1,380 \pm 90$	0.64×10^{-3}	0.36	0.22	1.53 ± 0.02
<i>ErA</i> -E63Q-S254Q (DM3)	7.17 ± 0.64	$84,000 \pm 12,000$	0.85×10^{-3}	0.19	0.0226	12.17 ± 1.19
<i>ErA</i> -A31I-E63Q-S254N (TM1)	5.6 ± 0.2	$28,200 \pm 2,300$	0.19×10^{-3}	0.33	0.11	9.51 ± 0.34
<i>ErA</i> -A31I-E63Q-S254Q (TM2)	1.836 ± 0.11	$47,460 \pm 695$	0.04×10^{-3}	-	0.0083	3.12 ± 0.02

[0137] ^a1IU的酶被定义为在37°C下在1分钟内产生1微摩尔产物所使用的酶量。

[0138] 正如由 k_{cat}/K_m 参数所指示的,所述突变体的L-谷氨酰胺酶效率降低约20-400倍。同样地,在0.5mM的生理血液浓度下,观察到的L-谷氨酰胺酶速率相对于ErA-WT降低95-99%。这个分析证实,这三种突变体大体上满足L-谷氨酰胺酶活性严重受损但具有接近ErA-WT的L-天冬酰胺酶活性的设计标准。

[0139] 改进的L-天冬酰胺酶选择性的分子基础。尽管将结构考虑因素并入了上面讨论的突变体的设计中,但对Asn选择性提高的机制进行了核实。因此,将带有Asp或Glu(分别为L-天冬酰胺酶和L-谷氨酰胺酶反应的产物)的ErA-E63Q、ErA-DM1和ErA-DM2酶变体进行结晶。在两种Asp和Glu浸泡的晶体上收集高分辨率衍射数据。对于Asp浸泡的晶体来说(对于数据收集和精化统计数据,参见表1),在酶的活性位点处的电子密度的检查毫不含糊地显示出配体的存在。然而,尽管在不同的浸泡条件下进行了几种尝试(例如增加浸泡时间、提高Glu浓度),但没有观察到浸泡的Glu的电子密度。相反,Glu浸泡的晶体的活性位点具有作为结晶溶液的组分的HEPES缓冲剂的电子密度。以前观察到,HEPES的分子结合在使用相同条件结晶的apoErA-WT的活性位点处。值得注意的是,对于ErA-WT来说,浸泡的Asp和Glu两者都能够从活性位点置换出缓冲剂分子。相反,对于这里讨论的三种ErA突变体来说,只有Asp(但不是Glu)成功地完全置换出结合的HEPES分子。浸泡的Glu不能置换出ErA突变体晶体中的缓冲剂分子,与它们相对于野生型酶大大增加的Gln K_m 值相关。

[0140] ErA变体的总体结构。不论在活性位点处是否存在或不存在Asp/Glu,ErA-WT建立了由二聚体的二聚体构成的四聚体。然而,在不存在Asp/Glu的情况下,N-端区域(第18-34位残基)缺少清晰的电子密度。当Asp或Glu结合到ErA-WT时,观察到这个所谓的柔性N-端环是有序的并接近活性位点。对于这里分析的三种ErA变体(ErA-E63Q、ErA-DM1、ErA-DM2)来说,四聚体组织形式得以维持,并且所述柔性N-端环展示出清晰的电子密度并采取其封闭的构象。ErA-E63Q-Asp、ErA-DM1-Asp和ErA-DM2-Asp的结构分别以2.05 Å、1.50 Å和1.60 Å的分辨率被解析(表1),并且全都与ErA-WT-ASP的结构(PDB ID 5F52;rmsd为

0.09 – 0.135 Å) 非常相似。

[0141] ASP与ErA-E63Q的结合。正如所指出的,在野生型酶中,Glu63与氨基酸配体(Asp或Glu)的 α -氨基直接相互作用;在ErA-WT-Asp的具体情况中,该相互作用距离为2.8 Å。据推测,用谷氨酰胺替换Glu63将导致相互作用对距离更加敏感,因为尽管Glu63与底物的 α -氨基形成盐桥,但Gln63会形成氢键。这种相互作用的距离敏感性的提高,预计将影响Gln的结合但不影响Asn的结合。在化学推理的基础上进行Gln63侧链取向(羰基的氧原子相对于酰胺的氮原子)的指派,其中Gln63的酰胺氮原子(氢键供体)是更远离配体的 α -氨基(也是氢键供体)的原子。

[0142] 分析表明,在ErA-E63Q-Asp的结构中,配体(Asp)的 α -氨基与Gln63的谷氨酰胺侧链的羰基组成部分之间的相互作用距离已增加到3.0 Å。重要的是,Gln63的酰胺氮原子与ASP配体的 α -氨基之间的距离可接受地长,为3.9 Å。换句话说,在ASP的情况下(并且对于底物Asn来说也是如此),在这些氢键供体组成部分之间存在足够的分隔,以便对L-天冬酰胺酶反应没有负面影响。这解释了这种突变体为什么维持高的L-天冬酰胺酶活性。

[0143] Asp与ErA-DM1的结合。随后确定了与Asp复合的A31I-E63Q双突变体(ErA-DM2)(ErA-DM2-Asp)的晶体结构。E63Q突变对ErA-DM2的极小影响与对ErA-E63Q所看到的相似。相反,A31I突变的影响更加显著,冲击了柔性N-端环的构象。尽管仍然是封闭的,但该环采取与在ErA-WT-Asp复合结构中看到的构象不同的构象。替换较小的丙氨酸的第31位异亮氨酸阻止了这个N-端柔性环区段接近底物结合位点。在ErA-WT-Asp中,第31位处的丙氨酸距离结合的Asp的Ca和Cb原子分别为4.1和5.3 Å。当Ala31被更大的异亮氨酸替换时,柔性N-端环的位置调整,使得ErA-DM2-Asp中异亮氨酸的尖端距ASP几乎同样的距离(4.2和5.3 Å)。因此,这个结构揭示出该突变体如何适应以维持其L-天冬酰胺酶活性。

[0144] Asp与ErA-DM1的结合。将Ser254单替换成天冬酰胺,产生L-天冬酰胺酶和L-谷氨酰胺酶活性可比地降低的突变体(表7)。有趣的是,将S254N突变与E63Q突变组合(ErA-DM1),产生对Asn高度选择性的变体(表8和10)。为了理解这种现象,解析了与Asp复合的ErA-DM1(ErA-DM1-Asp)的晶体结构。同样地,E63Q突变的较小影响与先前讨论的相似。第二个突变的位点第254位残基源自于四聚体酶中相邻的启动子(用数字后的单引号表示)。在ErA-WT中,Ser254'不与结合的ASP直接相互作用(距Asp的 α -氨基的距离为4.0 Å),而是起到定位保守的Asp96的侧链的作用(Ser254'的羟基与Asp96的侧链之间的距离为2.7 Å)。当Ser254'被突变成天冬酰胺时,较大的侧链现在更接近结合的ASP(距Asp的 α -氨基3.5 Å),并维持与Asp96的定位相互作用(3.1 Å)。Asn254'的取向由Asp96支配,使得Asn254'的侧链酰胺氮原子(氢键供体)面朝Asp96的羧酸组成部分(氢键受体)。这是重点,因为由Asp96定位的Asn254'的侧链酰胺氮原子现在对Asn或Gln的 α -氨基产生排斥。这解释了使用Asn和Gln两者时ErA-S254N单突变体为什么具有降低的活性(表7)。

[0145] 当将S254N突变与E63Q突变组合(即ErA-DM1)时,酶的动力学性质显著不同。与以前的含有E63Q的变体相似,在ErA-DM1-Asp结构中第63位处的侧链与Asp之间的距离增加到3.0 Å。这种距离的增加尽管小,但将Asn254'与底物Asn之间的分隔增加到3.5 Å。Asp位置的这种迁移(由E63Q突变造成)允许它减小与Asn254'的侧链的排斥相互作用。换句话说,E63Q突变充分地置换配体,以便限制配体的 α -氨基(氢键供体)与Asn254'的酰胺氮原子(也

是氢键供体)之间的排斥相互作用。这允许ErA-DM1维持高的L-天冬酰胺酶活性。

[0146] ErA变体的Glu结合模式的建模。先前的结构分析证实了所述突变与使用Asn的酶活性的相容性。因此,试图寻找所述突变与Gln水解的不相容性的基础。然而,突变体如何结合Gln的直接实验观察是不可能的,因为所述突变体酶的Glu浸泡的晶体不能结合所述氨基酸。因此,将ErA-WT-Glu与突变体结构叠加。尽管不受理论限制,但在这种类型的分析中,据推测Glu以与对ErA-WT所观察到的相同的方式结合到突变体酶。这个分析为突变变体的可能的Glu结合模式提供了见解。

[0147] E63Q突变必定在Asn与Gln之间的辨别中发挥关键作用,因为它存在于到目前为止讨论的具有高L-天冬酰胺酶/低L-谷氨酰胺酶性质的所有三种突变体中。ErA-WT-Glu和ErA-E63Q结构的叠加为ErA-E63Q提供了推断的Glu结合模式,并揭示出Glu α -氨基与Gln63酰胺氮原子之间的距离短(3.5 Å)。由于这两个组成部分都是氢键供体,因此这种接近对于该氨基酸的结合来说是不利的。正如所讨论的,在ASP的情况下,它的较小尺寸允许它改变位置以远离Gln63,类似的氢键:氢键距离是3.9 Å,因此不利程度较低。在野生型酶中,代替酰胺氮,存在Glu63侧链羧酸的第二个氧原子,其是氢键受体,并且这解释了为什么Gln是ErA-WT的相对好的底物。Glu不像ASP那样改变位置以增加距Gln63的酰胺氮原子的距离,因为Glu的侧链羧酸(和Asp的侧链羧酸)被Thr95锚定。该苏氨酸与Thr15相组合,对于Asn和Gln的酶水解来说是重要的。因此,E63Q突变利用下述要求来辨别Gln:该较大的氨基酸通过在Glu63/Gln63的方向上迁移以契合到活性位点中,所述迁移进而将Gln的 α -氨基不利地放置成与Gln63的酰胺氮原子接近(但与野生型Glu63相容)。

[0148] A31I(正如在ErA-DM2中存在的)不起到提高Gln的辨别的作用,而是降低Asn的 K_m (从ErA-E63Q中的51 μ M降低到ErA-DM2中的37 μ M)。这个突变也降低Gln的 K_m 。ErA-DM1-ASP结构揭示,该突变迫使柔性N-端环相对于野生型酶所采取的封闭构象采取不同的封闭构象。这如何降低Asn K_m 值并不能从所述结构明显看出。据推测,该突变影响环闭合的动力学,并且这最终影响底物 K_m 值。

[0149] S254N突变(正如在ErA-DM1中存在的)提高在Asn与Gln之间的选择性,并且它以与E63Q突变类似的方式做到这一点。也就是说,该突变将氢键供体引入到Gln的 α -氨基附近。ErA-WT-Glu与ErA-DM1-Asp的叠加揭示出Glu在结合到突变体酶时采取的可能位置。这种叠加揭示,较大的Glu通过向Asn254'迁移,将在氢键基团之间产生不利的短的(3.2 Å)分隔。较小的底物Asn不在显著程度上受这个突变影响(尽管它的 K_m 也从ErA-E63Q中的51 μ M增加到ErA-DM1中的185 μ M)的原因是由于这些氢键供体基团之间较大的分隔(3.5 Å)。

[0150] 利用结构分析来开发改进的第二代突变体。先前的工作将第63和254位鉴定为Asn/Gln选择性的“热点”,并将第31位鉴定为降低底物 K_m 值的“热点”。因此,确定了在所有三个热点处具有替换的变体是否具有改进的性质。三突变体ErA-A31I-E63Q-S254N(ErA-TM1)确实对Asn具有较低的 K_m (110 μ M相比于ErA-DM1的170 μ M,表9),但它的L-谷氨酰胺酶速率提高(表11)。合在一起,ErA-TM1仅仅比以前的最佳变体ErA-DM1略微好些。

[0151] ErA-DM1-Asp的结构表明第254位处的谷氨酰胺可能更好地辨别Gln。事实上,ErA-E63Q-S254Q(ErA-DM3)变体与ErA-DM1相比具有甚至更高的Gln K_m (84mM相比于15.8mM)(表8)。关键的是,通过将Ser254从天冬酰胺(如在ErA-DM1中)改变成谷氨酰胺,ErA-DM3的L-天冬酰胺酶活性不受负面影响(表8)。

[0152] 由于鉴定到具有极高Gln Km值的变体 (ErA-DM3), 因此将A31A突变添加到该变体。向该变体添加A31A突变的益处包括降低Asn Km值。事实上, ErA-A31I-E63Q-S254Q (ErA-TM2) 的Asn Km值大约为ErA-DM3的一半 (95 μ M相比于179 μ M, 表8)。Gln的Km值也被降低 (47.5mM相比于84mM), 但尽管出现这种降低, 仍比生理血液Gln浓度高100倍。因此, ErA三突变体A31I-E63Q-S254Q (ErA-TM2) 具有高L-天冬酰胺酶/低L-谷氨酰胺酶性质的最佳组合 (表12)。

[0153] 表12

酶名称	$k_{obs}[Asn_{50}]/k_{obs}[Gln_{500}]^a$	比活性 (Asn) / 比活性 (Gln) ^b
<i>ErA</i> -WT	6.6	7.3
[0154] <i>ErA</i> -E63Q	125	22
<i>ErA</i> -E63Q-S254N (DM1)	330	60
<i>ErA</i> -A31I-E63Q-S254Q (TM2)	8910	142
<i>EcA</i> -WT	188	50

[0155] ^a对于Asn来说在50 μ M下的 k_{obs} , 对于Gln来说在500 μ M下的 k_{obs} 。

[0156] ^b比活性 (单位为IU/mg) 在饱和底物浓度 (Asn或Gln) 下确定。

[0157] 超低L-谷氨酰胺酶ErA-TM2变体维持它的细胞杀死性质。本工作设计并表征了几种具有高L-天冬酰胺酶和低L-谷氨酰胺酶活性的ErA变体, 其中两种变体 (ErA-DM3和ErA-TM2) 具有超低L-谷氨酰胺酶性质。为了测试具有超低L-谷氨酰胺酶活性的变体是否维持杀死ALL细胞的能力, 将人类T-ALL LOUCY细胞系暴露于浓度不断增加的ErA-TM2, 并确定该酶的IC₅₀值。这项分析表明, ErA-TM2具有与ErA-WT (0.00033IU/mL) 可比的IC₅₀值 (0.00061IU/mL)。

[0158] 超低L-谷氨酰胺酶ErA-TM2在小鼠中的功效。将雌性小鼠用表达萤光素酶的LOUCY细胞进行尾静脉注射。四周后, 将小鼠每天用介质 (n=3)、ErA-WT (n=4) 或ErA-TM2 (n=4) 治疗共14天 (药物剂量50IU/小鼠/天; i.p.)。在第0、7和14天测量生物发光信号。评估第14天时的相对生物发光成像 (BLI) 通量, 并发现其在介质治疗的小鼠中相对于第0天提高10倍。对于两个治疗组 (ErA-WT和ErA-TM2) 来说, 通量相对于介质对照急剧降低 (p-值 < 0.0001), 到第14天时回到背景水平, 并且在所述治疗组之间没有显著差异。在治疗开始之前一周 (第-7天)、治疗开始时 (第0天) 和治疗结束时 (第14天) 确定外周血huCD45+%水平。在第0天, 所有动物被高度移植, 正如huCD45+% > 8%所指示的。到第14天时, 对于介质处理的小鼠来说, huCD45+%增加到40-60%, 而对于两个治疗组来说, huCD45+%不可检测 (在介质处理与酶治疗组之间p-值 < 0.0001)。在第0天, 在与用于治疗的小鼠具有相似BLI通量的三只小鼠中骨髓huCD45+%的评估揭示出高移植。在第14天, 在介质处理的小鼠中骨髓huCD45+%仍然高, 但在两个酶治疗组中不可检测 (在介质处理与酶治疗组之间p-值 < 0.0001)。来自于介质处理的小鼠的脾脏高度扩大, 而来自于ErA-WT和ErA-TM2组的脾脏在尺寸上类似于正常小鼠脾脏。来自于介质、ErA-WT和ErA-TM2治疗的小鼠的肝脏的H&E染色

的石蜡切片显示,介质处理的动物具有充满成淋巴细胞性白血病细胞的沉积物的肝脏。相反,用ErA-WT或ErA-TM2治疗的小鼠的肝脏没有可检测的白血病细胞存在。对于杀死活性来说,该分析的结果指示了ErA-TM2对ALL细胞的显著杀灭效果(图4)。具体来说,超低L-谷氨酰胺酶ErA-TM2与高L-谷氨酰胺酶ErA-WT同样有效地消除T-ALL LOUCY细胞。此外,使用体重减轻(单位为克,相对于第0天)作为毒性的指示物,观察到尽管ErA-WT治疗的小鼠表现出显著的每天体重减轻,但在ErA-TM2治疗组中体重减轻被改善0.29g/天(p-值<0.0001)。

[0159] 为了进一步将L-谷氨酰胺酶活性与毒性相关联,对CD-1小鼠进行急性单剂量递增毒性研究。每组具有3只雄性和3只雌性,例外的是第6组由于ErA-TM2短缺而只有4只动物(3只雌性,1只雄性)。给药ErA-WT的动物表现出显著的身体和行为症状,而给药ErA-TM2的动物大体上没有这些症状(表13)。

[0160] 表13

组	<i>ErA-WT</i>			<i>ErA-TM2</i>		
	1	2	3	4	5	6
剂量 (IU/g)	40	80	160	40	80	160
弓背姿势	6 (2-4)	6 (2-4)	6 (1-4)	0*	0*	4 (1)
活动性降低	0	6 (3)	0	0	0*	0
眼睛凹陷	1 (2-3)	6 (2-3)	6 (1-4)	0	0*	0*
毛皮粗糙	6 (1-4)	6 (1-4)	6 (1-4)	4 (1-2)	0*	0*

[0162] 表现出症状的动物的数目(总共6只中的)被注明。在括号中,标注了观察到症状的天数。第3组中的1只雄性被给药136IU/g,第5组中的1只雌性被给药60IU/g。*p<0.05,通过Fisher精确检验进行分析:(第1组相比于第4组,第2组相比于第5组,第3组相比于第6组)。*p<0.05,通过Mann-Whitney U检验进行分析:(第1组相比于第4组,第2组相比于第5组,第3组相比于第6组)。

[0163] 实施例4:TRAIL-ErA融合蛋白

[0164] TRAIL (TNF相关凋亡诱导配体)是一种通过凋亡诱导细胞死亡的蛋白质。因此,产生了TRAIL-天冬酰胺酶融合蛋白以合并这两种蛋白质的活性。使用这种融合蛋白,L-天冬酰胺酶组分向细胞发出经历凋亡的信号,TRAIL组分诱导细胞死亡。

[0165] 融合蛋白TRAIL_{trimer}-ErA-TM2对人类AML细胞的功效。使用增补有10%FBS (Hyclone)和1x青霉素-链霉素溶液 (Invitrogen)的RPMI1640培养基(含L-谷氨酰胺),将人类急性髓性白血病MV4;11细胞在潮湿气氛(5%CO₂,37°C)中培养。将细胞悬液的90μL等分试样(每mL 2.5x10⁵个细胞)在圆底96孔微量滴定板中,在10μL DPBS或终浓度在0.0001至2.5IU/mL范围内的TRAIL_{trimer}-ErA-TM2存在下,一式三份进行培养。在将所述板在37°C下在

含有5%CO₂的加湿空气中温育4天后,添加Alamar蓝(Invitrogen)至终浓度为10%v/v,并将所述板继续温育4小时,然后读取荧光信号。白血病细胞存活率被计算为在L-天冬酰胺酶存在下的荧光计数与DPBS对照中的荧光计数相比的百分率。这项分析表明,与单独的L-天冬酰胺酶ErA-TM2(IC₅₀=1.631IU/mL)相比,有活性的TRAIL_{trimer}-ErA-TM2融合蛋白对MV4;11细胞系具有明显更好的杀灭性质(IC₅₀=0.064IU/mL)。

[0166] 为了确认TRAIL_{trimer}-ErA-TM2的更好的抗癌效果来自于TRAIL_{trimer}和L-天冬酰胺酶两者的同步化而不是单独的TRAIL_{trimer}的活性,将TRAIL_{trimer}-ErA-TM2用相同量的无活性突变体TRAIL_{trimer}-ErA-TM2-K168M代替。这项分析的结果证实,具有受损的L-天冬酰胺酶活性的融合蛋白TRAIL_{trimer}-ErA-TM2-K168M丧失其MV4;11细胞杀灭效果。

[0167] 在小鼠中融合蛋白TRAIL_{trimer}-ErA-TM2对人类AML细胞的功效。将4只非肥胖型糖尿病/严重联合免疫缺陷γ(NSG)小鼠(The Jackson Laboratory)在6周龄时用含有5x10⁶个萤光素酶阳性MV4;11细胞的150μL DPBS i.v.注射。在规定的时间点,使用IVIS Lumina II成像系统(PerkinElmer)测量生物发光。在植入后(第0天),将小鼠每天用15IU/小鼠的TRAIL_{trimer}-ErA-TM2通过i.p.注射进行治疗,共一周。在第0天和第7天测量生物发光信号。这项分析的结果指示了TRAIL_{trimer}-ErA-TM2对MV4;11细胞的显著杀灭效果(图5)。

[0168] 实施例5:用于增加体内半衰期的标签

[0169] L-天冬酰胺酶的功效与所述药物的体内半衰期相关;半衰期越长,所述酶发挥作用以水解血液天冬酰胺的时间越长。因此,为了增加L-天冬酰胺酶以及本文中公开的变体和融合蛋白的体内半衰期,将标签融合到L-天冬酰胺酶的N-端。所述标签包括His₆-酵母SUMO标签、His₆-人类SUMO标签和白蛋白结合肽SA21标签。每个所述标签增加L-天冬酰胺酶的循环时间。此外,测试了标签的组合。具体来说,将SA21和酵母SUMO标签组合以获得具有甚至更长半衰期的变体。

[0170] 组氨酸标签。定义了一串6至9个组氨酸残基的DNA序列常常被用于载体中,用来生产重组蛋白。结果是具有融合到N-或C-端的6xHis或多His标签的重组蛋白的表达。

[0171] 表达的带有His标签的蛋白质可以容易地纯化和检测,并提供了在不使用蛋白质特异性抗体或探针的情况下特异性纯化或检测重组蛋白的手段。对于His标签蛋白来说,试剂盒是可商购的。

[0172] SUMO修饰。已发现,在原核和真核表达系统中,作为N-端融合配偶体的SUMO在显著改进蛋白质稳定性和溶解性的基础上增强有功能蛋白质的生产。

[0173] 在融合蛋白表达和纯化后,SUMO标签可以被特异性(SUMO)蛋白酶通过它们的内肽酶活性在体外切割,以产生释放出的蛋白质配偶体的所需N-端。SUMO标签表达系统是可商购的。在某些实施方式中,所述SUMO标签是酵母SUMO标签(例如Smt3)。在其他实施方式中,所述SUMO标签是人类SUMO标签(例如SUMO-1、SUMO-2或SUMO-3)。

[0174] His-SUMO修饰。将多组氨酸(例如6xHis)标签和SUMO修饰组合提供了L-天冬酰胺酶的高效纯化、增加的表达和溶解性以及增加的半衰期。为目标蛋白提供所述His-SUMO修饰的表达系统是可商购的。参见例如CHAMPION pET SUMO蛋白质表达系统(Invitrogen)。

[0175] 白蛋白结合结构域。白蛋白结合结构域是存在于革兰氏阳性细菌表达的各种不同表面蛋白中的小的、三螺旋蛋白结构域。这些白蛋白结合区域已被用于蛋白质纯化或固定化。示例性的白蛋白结合结构域包括但不限于SA20(QRLIEDICLPWGCLWEDDF;SEQ ID NO:

13)、SA21 (RLIEDICLPRWGCLWEDD;SEQ ID NO:14) 和SA31 (RLIEDICLPRWGCLW;SEQ ID NO:15)。

[0176] 此外,通过将些结构域融合到治疗性蛋白,通过非共价结合到白蛋白来改进药代动力学,已被显示是成功的。参见Dennis等,(2002) J.Biol.Chem.277 (38):35035-35043;US 2016/0185874;和US2004/0001827。

[0177] 实施例6:位点特异性PEG化

[0178] PEG的功能是保护L-天冬酰胺酶以防御蛋白质水解降解和宿主免疫系统。为了允许L-天冬酰胺酶的基于马来酰亚胺的PEG化,将各种不同的氨基酸残基突变成半胱氨酸残基,以鉴定对酶活性具有很少至没有影响的适合位置。值得注意的是,ErA-WT和ErA-TM2不含任何半胱氨酸残基。因此,该氨基酸残基的引入必须在酶的适合位置处,以便不破坏折叠或活性。因此,对ErA-TM2的结构进行分析,以鉴定可以被突变成半胱氨酸的残基的区域。鉴定到5个这样的区域(表14),它们:(1)位于表面上,(2)与寡聚化界面的距离适合(ErA-TM2是四聚体,所以对靠近界面的残基进行PEG化可能对酶的活性不利),并且(3)包含指向外部的残基。

[0179] 表14

区域	残基
1	K72
	R76
	E79
	D84
	D85
2	R206
	D210
	T215
	S216
3	D235
	Q239
	H240
4	A261
	R264
	K265
	E268
	K269
5	K318
	E322

[0181] 为了验证表14中的氨基酸残基作为用于位点特异性PEG化的位点的用途,将ErA-TM2的残基Asp84突变成半胱氨酸。将得到的ErA-TM2-D84C蛋白表达、纯化,并用mPEG-10K进行PEG化。基于SDS-PAGE分析,ErA-TM2-D84C被PEG化,正如ErA-TM2-D84C蛋白的分子量的可测量的增加所证实的。

[0182] 随后,核实了所述D84C突变及其PEG化的形式对酶活性没有负面影响。当比较ErA-TM2、ErA-TM2-D84C和PEG化的ErA-TM2-D84C的活性时,观察到每种酶的计算速率是可比的,其中与ErA-TM2相比,ErA-TM2-D84C的PEG化使活性降低小于10%(表15)。

[0183] 表15

变体	在 2mM Asn 下的 k_{obs} (1/sec)	相对于 <i>ErA</i> -TM2 的%
<i>ErA</i> -TM2	178.8	100
<i>ErA</i> -TM2-D84C	172.8	97
10K PEG 化 的 <i>ErA</i> -TM2-D84C	163.4	91

[0185] 根据这些数据,本文中公开的L-天冬酰胺酶存在5个区域可以被靶向以包含用于PEG化的半胱氨酸残基的并入(表14)。根据本发明,PEG化可以通过半胱氨酸残基与作为直链或支链PEG分子的大分子量PEG分子例如PEG5K、PEG10K、PEG20K、PEG40K的基于马来酰亚胺的结合来实现。设想了可以在表14中指示的位置处并入1、2、3、4或5个半胱氨酸残基,由此提供1至5个PEG附连位点。

- [0001] 序列表
- [0002] <110> 伊利诺伊大学理事会(The Board of Trustees of the University of Illinois)
- [0003] <120> 具有降低的L-谷氨酰胺酶活性和增强的稳定性的L-天冬酰胺酶变体和融合蛋白
- [0004] <130> UIC0062W0
- [0005] <150> US 62/446,026
- [0006] <151> 2017-01-13
- [0007] <150> US 62/347,376
- [0008] <151> 2016-06-08
- [0009] <150> US 62/301,806
- [0010] <151> 2016-03-01
- [0011] <160> 31
- [0012] <170> PatentIn version 3.5
- [0013] <210> 1
- [0014] <211> 327
- [0015] <212> PRT
- [0016] <213> 菊欧文氏菌(*Erwinia chrysanthemi*)
- [0017] <400> 1
- [0018] Met Asp Lys Leu Pro Asn Ile Val Ile Leu Ala Thr Gly Gly Thr Ile
- [0019] 1 5 10 15
- [0020] Ala Gly Ser Ala Ala Thr Gly Thr Gln Thr Thr Gly Tyr Lys Ala Gly
- [0021] 20 25 30
- [0022] Ala Leu Gly Val Asp Thr Leu Ile Asn Ala Val Pro Glu Val Lys Lys
- [0023] 35 40 45
- [0024] Leu Ala Asn Val Lys Gly Glu Gln Phe Ser Asn Met Ala Ser Glu Asn
- [0025] 50 55 60
- [0026] Met Thr Gly Asp Val Val Leu Lys Leu Ser Gln Arg Val Asn Glu Leu
- [0027] 65 70 75 80
- [0028] Leu Ala Arg Asp Asp Val Asp Gly Val Val Ile Thr His Gly Thr Asp
- [0029] 85 90 95
- [0030] Thr Val Glu Glu Ser Ala Tyr Phe Leu His Leu Thr Val Lys Ser Asp
- [0031] 100 105 110
- [0032] Lys Pro Val Val Phe Val Ala Ala Met Arg Pro Ala Thr Ala Ile Ser
- [0033] 115 120 125
- [0034] Ala Asp Gly Pro Met Asn Leu Leu Glu Ala Val Arg Val Ala Gly Asp
- [0035] 130 135 140
- [0036] Lys Gln Ser Arg Gly Arg Gly Val Met Val Val Leu Asn Asp Arg Ile

[0037]	145	150	155	160
[0038]	Gly Ser Ala Arg Tyr Ile Thr Lys Thr Asn Ala Ser Thr Leu Asp Thr			
[0039]		165	170	175
[0040]	Phe Lys Ala Asn Glu Glu Gly Tyr Leu Gly Val Ile Ile Gly Asn Arg			
[0041]		180	185	190
[0042]	Ile Tyr Tyr Gln Asn Arg Ile Asp Lys Leu His Thr Thr Arg Ser Val			
[0043]		195	200	205
[0044]	Phe Asp Val Arg Gly Leu Thr Ser Leu Pro Lys Val Asp Ile Leu Tyr			
[0045]		210	215	220
[0046]	Gly Tyr Gln Asp Asp Pro Glu Tyr Leu Tyr Asp Ala Ala Ile Gln His			
[0047]		225	230	240
[0048]	Gly Val Lys Gly Ile Val Tyr Ala Gly Met Gly Ala Gly Ser Val Ser			
[0049]		245	250	255
[0050]	Val Arg Gly Ile Ala Gly Met Arg Lys Ala Met Glu Lys Gly Val Val			
[0051]		260	265	270
[0052]	Val Ile Arg Ser Thr Arg Thr Gly Asn Gly Ile Val Pro Pro Asp Glu			
[0053]		275	280	285
[0054]	Glu Leu Pro Gly Leu Val Ser Asp Ser Leu Asn Pro Ala His Ala Arg			
[0055]		290	295	300
[0056]	Ile Leu Leu Met Leu Ala Leu Thr Arg Thr Ser Asp Pro Lys Val Ile			
[0057]		305	310	320
[0058]	Gln Glu Tyr Phe His Thr Tyr			
[0059]		325		
[0060]	<210> 2			
[0061]	<211> 327			
[0062]	<212> PRT			
[0063]	<213> 人工序列			
[0064]	<220>			
[0065]	<223> 合成多肽			
[0066]	<400> 2			
[0067]	Met Asp Lys Leu Pro Asn Ile Val Ile Leu Ala Thr Gly Gly Thr Ile			
[0068]	1	5	10	15
[0069]	Ala Gly Ser Ala Ala Thr Gly Thr Gln Thr Thr Gly Tyr Lys Ala Gly			
[0070]		20	25	30
[0071]	Ala Leu Gly Val Asp Thr Leu Ile Asn Ala Val Pro Glu Val Lys Lys			
[0072]		35	40	45
[0073]	Leu Ala Asn Val Lys Gly Glu Gln Phe Ser Asn Met Ala Ser Gln Asn			
[0074]		50	55	60
[0075]	Met Thr Gly Asp Val Val Leu Lys Leu Ser Gln Arg Val Asn Glu Leu			

[0076]	65	70	75	80
[0077]	Leu Ala Arg Asp Asp Val Asp Gly Val Val Ile Thr His Gly Thr Asp			
[0078]		85	90	95
[0079]	Thr Val Glu Glu Ser Ala Tyr Phe Leu His Leu Thr Val Lys Ser Asp			
[0080]		100	105	110
[0081]	Lys Pro Val Val Phe Val Ala Ala Met Arg Pro Ala Thr Ala Ile Ser			
[0082]		115	120	125
[0083]	Ala Asp Gly Pro Met Asn Leu Leu Glu Ala Val Arg Val Ala Gly Asp			
[0084]		130	135	140
[0085]	Lys Gln Ser Arg Gly Arg Gly Val Met Val Val Leu Asn Asp Arg Ile			
[0086]		145	150	155
[0087]	Gly Ser Ala Arg Tyr Ile Thr Lys Thr Asn Ala Ser Thr Leu Asp Thr			
[0088]		165	170	175
[0089]	Phe Lys Ala Asn Glu Glu Gly Tyr Leu Gly Val Ile Ile Gly Asn Arg			
[0090]		180	185	190
[0091]	Ile Tyr Tyr Gln Asn Arg Ile Asp Lys Leu His Thr Thr Arg Ser Val			
[0092]		195	200	205
[0093]	Phe Asp Val Arg Gly Leu Thr Ser Leu Pro Lys Val Asp Ile Leu Tyr			
[0094]		210	215	220
[0095]	Gly Tyr Gln Asp Asp Pro Glu Tyr Leu Tyr Asp Ala Ala Ile Gln His			
[0096]		225	230	235
[0097]	Gly Val Lys Gly Ile Val Tyr Ala Gly Met Gly Ala Gly Ser Val Ser			
[0098]		245	250	255
[0099]	Val Arg Gly Ile Ala Gly Met Arg Lys Ala Met Glu Lys Gly Val Val			
[0100]		260	265	270
[0101]	Val Ile Arg Ser Thr Arg Thr Gly Asn Gly Ile Val Pro Pro Asp Glu			
[0102]		275	280	285
[0103]	Glu Leu Pro Gly Leu Val Ser Asp Ser Leu Asn Pro Ala His Ala Arg			
[0104]		290	295	300
[0105]	Ile Leu Leu Met Leu Ala Leu Thr Arg Thr Ser Asp Pro Lys Val Ile			
[0106]		305	310	315
[0107]	Gln Glu Tyr Phe His Thr Tyr			
[0108]		325		
[0109]	<210> 3			
[0110]	<211> 327			
[0111]	<212> PRT			
[0112]	<213> 人工序列			
[0113]	<220>			
[0114]	<223> 合成多肽			

[0115] <400> 3
 [0116] Met Asp Lys Leu Pro Asn Ile Val Ile Leu Ala Thr Gly Gly Thr Ile
 [0117] 1 5 10 15
 [0118] Ala Gly Ser Ala Ala Thr Gly Thr Gln Thr Thr Gly Tyr Lys Ala Gly
 [0119] 20 25 30
 [0120] Ala Leu Gly Val Asp Thr Leu Ile Asn Ala Val Pro Glu Val Lys Lys
 [0121] 35 40 45
 [0122] Leu Ala Asn Val Lys Gly Glu Gln Phe Ser Asn Met Ala Ser Gln Asn
 [0123] 50 55 60
 [0124] Met Thr Gly Asp Val Val Leu Lys Leu Ser Gln Arg Val Asn Glu Leu
 [0125] 65 70 75 80
 [0126] Leu Ala Arg Asp Asp Val Asp Gly Val Val Ile Thr His Gly Thr Asp
 [0127] 85 90 95
 [0128] Thr Val Glu Glu Ser Ala Tyr Phe Leu His Leu Thr Val Lys Ser Asp
 [0129] 100 105 110
 [0130] Lys Pro Val Val Phe Val Ala Ala Met Arg Pro Ala Thr Ala Ile Ser
 [0131] 115 120 125
 [0132] Ala Asp Gly Pro Met Asn Leu Leu Glu Ala Val Arg Val Ala Gly Asp
 [0133] 130 135 140
 [0134] Lys Gln Ser Arg Gly Arg Gly Val Met Val Val Leu Asn Asp Arg Ile
 [0135] 145 150 155 160
 [0136] Gly Ser Ala Arg Tyr Ile Thr Lys Thr Asn Ala Ser Thr Leu Asp Thr
 [0137] 165 170 175
 [0138] Phe Lys Ala Asn Glu Glu Gly Tyr Leu Gly Val Ile Ile Gly Asn Arg
 [0139] 180 185 190
 [0140] Ile Tyr Tyr Gln Asn Arg Ile Asp Lys Leu His Thr Thr Arg Ser Val
 [0141] 195 200 205
 [0142] Phe Asp Val Arg Gly Leu Thr Ser Leu Pro Lys Val Asp Ile Leu Tyr
 [0143] 210 215 220
 [0144] Gly Tyr Gln Asp Asp Pro Glu Tyr Leu Tyr Asp Ala Ala Ile Gln His
 [0145] 225 230 235 240
 [0146] Gly Val Lys Gly Ile Val Tyr Ala Gly Met Gly Ala Gly Asn Val Ser
 [0147] 245 250 255
 [0148] Val Arg Gly Ile Ala Gly Met Arg Lys Ala Met Glu Lys Gly Val Val
 [0149] 260 265 270
 [0150] Val Ile Arg Ser Thr Arg Thr Gly Asn Gly Ile Val Pro Pro Asp Glu
 [0151] 275 280 285
 [0152] Glu Leu Pro Gly Leu Val Ser Asp Ser Leu Asn Pro Ala His Ala Arg
 [0153] 290 295 300

[0154]	Ile Leu Leu Met Leu Ala Leu Thr Arg Thr Ser Asp Pro Lys Val Ile
[0155]	305 310 315 320
[0156]	Gln Glu Tyr Phe His Thr Tyr
[0157]	325
[0158]	<210> 4
[0159]	<211> 327
[0160]	<212> PRT
[0161]	<213> 人工序列
[0162]	<220>
[0163]	<223> 合成多肽
[0164]	<400> 4
[0165]	Met Asp Lys Leu Pro Asn Ile Val Ile Leu Ala Thr Gly Gly Thr Ile
[0166]	1 5 10 15
[0167]	Ala Gly Ser Ala Ala Thr Gly Thr Gln Thr Thr Gly Tyr Lys Ile Gly
[0168]	20 25 30
[0169]	Ala Leu Gly Val Asp Thr Leu Ile Asn Ala Val Pro Glu Val Lys Lys
[0170]	35 40 45
[0171]	Leu Ala Asn Val Lys Gly Glu Gln Phe Ser Asn Met Ala Ser Gln Asn
[0172]	50 55 60
[0173]	Met Thr Gly Asp Val Val Leu Lys Leu Ser Gln Arg Val Asn Glu Leu
[0174]	65 70 75 80
[0175]	Leu Ala Arg Asp Asp Val Asp Gly Val Val Ile Thr His Gly Thr Asp
[0176]	85 90 95
[0177]	Thr Val Glu Glu Ser Ala Tyr Phe Leu His Leu Thr Val Lys Ser Asp
[0178]	100 105 110
[0179]	Lys Pro Val Val Phe Val Ala Ala Met Arg Pro Ala Thr Ala Ile Ser
[0180]	115 120 125
[0181]	Ala Asp Gly Pro Met Asn Leu Leu Glu Ala Val Arg Val Ala Gly Asp
[0182]	130 135 140
[0183]	Lys Gln Ser Arg Gly Arg Gly Val Met Val Val Leu Asn Asp Arg Ile
[0184]	145 150 155 160
[0185]	Gly Ser Ala Arg Tyr Ile Thr Lys Thr Asn Ala Ser Thr Leu Asp Thr
[0186]	165 170 175
[0187]	Phe Lys Ala Asn Glu Glu Gly Tyr Leu Gly Val Ile Ile Gly Asn Arg
[0188]	180 185 190
[0189]	Ile Tyr Tyr Gln Asn Arg Ile Asp Lys Leu His Thr Thr Arg Ser Val
[0190]	195 200 205
[0191]	Phe Asp Val Arg Gly Leu Thr Ser Leu Pro Lys Val Asp Ile Leu Tyr
[0192]	210 215 220

[0193]	Gly Tyr Gln Asp Asp Pro Glu Tyr Leu Tyr Asp Ala Ala Ile Gln His
[0194]	225 230 235 240
[0195]	Gly Val Lys Gly Ile Val Tyr Ala Gly Met Gly Ala Gly Ser Val Ser
[0196]	245 250 255
[0197]	Val Arg Gly Ile Ala Gly Met Arg Lys Ala Met Glu Lys Gly Val Val
[0198]	260 265 270
[0199]	Val Ile Arg Ser Thr Arg Thr Gly Asn Gly Ile Val Pro Pro Asp Glu
[0200]	275 280 285
[0201]	Glu Leu Pro Gly Leu Val Ser Asp Ser Leu Asn Pro Ala His Ala Arg
[0202]	290 295 300
[0203]	Ile Leu Leu Met Leu Ala Leu Thr Arg Thr Ser Asp Pro Lys Val Ile
[0204]	305 310 315 320
[0205]	Gln Glu Tyr Phe His Thr Tyr
[0206]	325
[0207]	<210> 5
[0208]	<211> 327
[0209]	<212> PRT
[0210]	<213> 人工序列
[0211]	<220>
[0212]	<223> 合成多肽
[0213]	<400> 5
[0214]	Met Asp Lys Leu Pro Asn Ile Val Ile Leu Ala Thr Gly Gly Thr Ile
[0215]	1 5 10 15
[0216]	Ala Gly Ser Ala Ala Thr Gly Thr Gln Thr Thr Gly Tyr Lys Ala Gly
[0217]	20 25 30
[0218]	Ala Leu Gly Val Asp Thr Leu Ile Asn Ala Val Pro Glu Val Lys Lys
[0219]	35 40 45
[0220]	Leu Ala Asn Val Lys Gly Glu Gln Phe Ser Asn Met Ala Ser Gln Asn
[0221]	50 55 60
[0222]	Met Thr Gly Asp Val Val Leu Lys Leu Ser Gln Arg Val Asn Glu Leu
[0223]	65 70 75 80
[0224]	Leu Ala Arg Asp Asp Val Asp Gly Val Val Ile Thr His Gly Thr Asp
[0225]	85 90 95
[0226]	Thr Val Glu Glu Ser Ala Tyr Phe Leu His Leu Thr Val Lys Ser Asp
[0227]	100 105 110
[0228]	Lys Pro Val Val Phe Val Ala Ala Met Arg Pro Ala Thr Ala Ile Ser
[0229]	115 120 125
[0230]	Ala Asp Gly Pro Met Asn Leu Leu Glu Ala Val Arg Val Ala Gly Asp
[0231]	130 135 140

[0232]	Lys Gln Ser Arg Gly Arg Gly Val Met Val Val Leu Asn Asp Arg Ile
[0233]	145 150 155 160
[0234]	Gly Ser Ala Arg Tyr Ile Thr Lys Thr Asn Ala Ser Thr Leu Asp Thr
[0235]	165 170 175
[0236]	Phe Lys Ala Asn Glu Glu Gly Tyr Leu Gly Val Ile Ile Gly Asn Arg
[0237]	180 185 190
[0238]	Ile Tyr Tyr Gln Asn Arg Ile Asp Lys Leu His Thr Thr Arg Ser Val
[0239]	195 200 205
[0240]	Phe Asp Val Arg Gly Leu Thr Ser Leu Pro Lys Val Asp Ile Leu Tyr
[0241]	210 215 220
[0242]	Gly Tyr Gln Asp Asp Pro Glu Tyr Leu Tyr Asp Ala Ala Ile Gln His
[0243]	225 230 235 240
[0244]	Gly Val Lys Gly Ile Val Tyr Ala Gly Met Gly Ala Gly Gln Val Ser
[0245]	245 250 255
[0246]	Val Arg Gly Ile Ala Gly Met Arg Lys Ala Met Glu Lys Gly Val Val
[0247]	260 265 270
[0248]	Val Ile Arg Ser Thr Arg Thr Gly Asn Gly Ile Val Pro Pro Asp Glu
[0249]	275 280 285
[0250]	Glu Leu Pro Gly Leu Val Ser Asp Ser Leu Asn Pro Ala His Ala Arg
[0251]	290 295 300
[0252]	Ile Leu Leu Met Leu Ala Leu Thr Arg Thr Ser Asp Pro Lys Val Ile
[0253]	305 310 315 320
[0254]	Gln Glu Tyr Phe His Thr Tyr
[0255]	325
[0256]	<210> 6
[0257]	<211> 327
[0258]	<212> PRT
[0259]	<213> 人工序列
[0260]	<220>
[0261]	<223> 合成多肽
[0262]	<400> 6
[0263]	Met Asp Lys Leu Pro Asn Ile Val Ile Leu Ala Thr Gly Gly Thr Ile
[0264]	1 5 10 15
[0265]	Ala Gly Ser Ala Ala Thr Gly Thr Gln Thr Thr Gly Tyr Lys Ile Gly
[0266]	20 25 30
[0267]	Ala Leu Gly Val Asp Thr Leu Ile Asn Ala Val Pro Glu Val Lys Lys
[0268]	35 40 45
[0269]	Leu Ala Asn Val Lys Gly Glu Gln Phe Ser Asn Met Ala Ser Gln Asn
[0270]	50 55 60

[0271]	Met Thr Gly Asp Val Val Leu Lys Leu Ser Gln Arg Val Asn Glu Leu
[0272]	65 70 75 80
[0273]	Leu Ala Arg Asp Asp Val Asp Gly Val Val Ile Thr His Gly Thr Asp
[0274]	85 90 95
[0275]	Thr Val Glu Glu Ser Ala Tyr Phe Leu His Leu Thr Val Lys Ser Asp
[0276]	100 105 110
[0277]	Lys Pro Val Val Phe Val Ala Ala Met Arg Pro Ala Thr Ala Ile Ser
[0278]	115 120 125
[0279]	Ala Asp Gly Pro Met Asn Leu Leu Glu Ala Val Arg Val Ala Gly Asp
[0280]	130 135 140
[0281]	Lys Gln Ser Arg Gly Arg Gly Val Met Val Val Leu Asn Asp Arg Ile
[0282]	145 150 155 160
[0283]	Gly Ser Ala Arg Tyr Ile Thr Lys Thr Asn Ala Ser Thr Leu Asp Thr
[0284]	165 170 175
[0285]	Phe Lys Ala Asn Glu Glu Gly Tyr Leu Gly Val Ile Ile Gly Asn Arg
[0286]	180 185 190
[0287]	Ile Tyr Tyr Gln Asn Arg Ile Asp Lys Leu His Thr Thr Arg Ser Val
[0288]	195 200 205
[0289]	Phe Asp Val Arg Gly Leu Thr Ser Leu Pro Lys Val Asp Ile Leu Tyr
[0290]	210 215 220
[0291]	Gly Tyr Gln Asp Asp Pro Glu Tyr Leu Tyr Asp Ala Ala Ile Gln His
[0292]	225 230 235 240
[0293]	Gly Val Lys Gly Ile Val Tyr Ala Gly Met Gly Ala Gly Gln Val Ser
[0294]	245 250 255
[0295]	Val Arg Gly Ile Ala Gly Met Arg Lys Ala Met Glu Lys Gly Val Val
[0296]	260 265 270
[0297]	Val Ile Arg Ser Thr Arg Thr Gly Asn Gly Ile Val Pro Pro Asp Glu
[0298]	275 280 285
[0299]	Glu Leu Pro Gly Leu Val Ser Asp Ser Leu Asn Pro Ala His Ala Arg
[0300]	290 295 300
[0301]	Ile Leu Leu Met Leu Ala Leu Thr Arg Thr Ser Asp Pro Lys Val Ile
[0302]	305 310 315 320
[0303]	Gln Glu Tyr Phe His Thr Tyr
[0304]	325
[0305]	<210> 7
[0306]	<211> 327
[0307]	<212> PRT
[0308]	<213> 人工序列
[0309]	<220>

[0310] <223> 合成多肽
 [0311] <400> 7
 [0312] Met Asp Lys Leu Pro Asn Ile Val Ile Leu Ala Thr Gly Gly Thr Ile
 [0313] 1 5 10 15
 [0314] Ala Gly Ser Ala Ala Thr Gly Thr Gln Thr Thr Gly Tyr Lys Ile Gly
 [0315] 20 25 30
 [0316] Ala Leu Gly Val Asp Thr Leu Ile Asn Ala Val Pro Glu Val Lys Lys
 [0317] 35 40 45
 [0318] Leu Ala Asn Val Lys Gly Glu Gln Phe Ser Asn Met Ala Ser Gln Asn
 [0319] 50 55 60
 [0320] Met Thr Gly Asp Val Val Leu Lys Leu Ser Gln Arg Val Asn Glu Leu
 [0321] 65 70 75 80
 [0322] Leu Ala Arg Asp Asp Val Asp Gly Val Val Ile Thr His Gly Thr Asp
 [0323] 85 90 95
 [0324] Thr Val Glu Glu Ser Ala Tyr Phe Leu His Leu Thr Val Lys Ser Asp
 [0325] 100 105 110
 [0326] Lys Pro Val Val Phe Val Ala Ala Met Arg Pro Ala Thr Ala Ile Ser
 [0327] 115 120 125
 [0328] Ala Asp Gly Pro Met Asn Leu Leu Glu Ala Val Arg Val Ala Gly Asp
 [0329] 130 135 140
 [0330] Lys Gln Ser Arg Gly Arg Gly Val Met Val Val Leu Asn Asp Arg Ile
 [0331] 145 150 155 160
 [0332] Gly Ser Ala Arg Tyr Ile Thr Lys Thr Asn Ala Ser Thr Leu Asp Thr
 [0333] 165 170 175
 [0334] Phe Lys Ala Asn Glu Glu Gly Tyr Leu Gly Val Ile Ile Gly Asn Arg
 [0335] 180 185 190
 [0336] Ile Tyr Tyr Gln Asn Arg Ile Asp Lys Leu His Thr Thr Arg Ser Val
 [0337] 195 200 205
 [0338] Phe Asp Val Arg Gly Leu Thr Ser Leu Pro Lys Val Asp Ile Leu Tyr
 [0339] 210 215 220
 [0340] Gly Tyr Gln Asp Asp Pro Glu Tyr Leu Tyr Asp Ala Ala Ile Gln His
 [0341] 225 230 235 240
 [0342] Gly Val Lys Gly Ile Val Tyr Ala Gly Met Gly Ala Gly Asn Val Ser
 [0343] 245 250 255
 [0344] Val Arg Gly Ile Ala Gly Met Arg Lys Ala Met Glu Lys Gly Val Val
 [0345] 260 265 270
 [0346] Val Ile Arg Ser Thr Arg Thr Gly Asn Gly Ile Val Pro Pro Asp Glu
 [0347] 275 280 285
 [0348] Glu Leu Pro Gly Leu Val Ser Asp Ser Leu Asn Pro Ala His Ala Arg

[0349]	290	295	300
[0350]	Ile Leu Leu Met Leu Ala Leu Thr Arg Thr Ser Asp Pro Lys Val Ile		
[0351]	305	310	315 320
[0352]	Gln Glu Tyr Phe His Thr Tyr		
[0353]	325		
[0354]	<210> 8		
[0355]	<211> 325		
[0356]	<212> PRT		
[0357]	<213> 胡萝卜欧文氏菌(<i>Erwinia carotovora</i>)		
[0358]	<400> 8		
[0359]	Met Leu Pro Asn Ile Val Ile Leu Ala Thr Gly Gly Thr Ile Ala Gly		
[0360]	1	5	10 15
[0361]	Ser Ala Ala Ala Asn Thr Gln Thr Thr Gly Tyr Lys Ala Gly Ala Leu		
[0362]	20	25	30
[0363]	Gly Val Glu Thr Leu Ile Gln Ala Val Pro Glu Leu Lys Thr Leu Ala		
[0364]	35	40	45
[0365]	Asn Ile Lys Gly Glu Gln Val Ala Ser Ile Gly Ser Glu Asn Met Thr		
[0366]	50	55	60
[0367]	Ser Asp Val Leu Leu Thr Leu Ser Lys Arg Val Asn Glu Leu Leu Ala		
[0368]	65	70	75 80
[0369]	Arg Ser Asp Val Asp Gly Val Val Ile Thr His Gly Thr Asp Thr Leu		
[0370]	85	90	95
[0371]	Asp Glu Ser Pro Tyr Phe Leu Asn Leu Thr Val Lys Ser Asp Lys Pro		
[0372]	100	105	110
[0373]	Val Val Phe Val Ala Ala Met Arg Pro Ala Thr Ala Ile Ser Ala Asp		
[0374]	115	120	125
[0375]	Gly Pro Met Asn Leu Tyr Gly Ala Val Lys Val Ala Ala Asp Lys Asn		
[0376]	130	135	140
[0377]	Ser Arg Gly Arg Gly Val Leu Val Val Leu Asn Asp Arg Ile Gly Ser		
[0378]	145	150	155 160
[0379]	Ala Arg Phe Ile Ser Lys Thr Asn Ala Ser Thr Leu Asp Thr Phe Lys		
[0380]	165	170	175
[0381]	Ala Pro Glu Glu Gly Tyr Leu Gly Val Ile Ile Gly Asp Lys Ile Tyr		
[0382]	180	185	190
[0383]	Tyr Gln Thr Arg Leu Asp Lys Val His Thr Thr Arg Ser Val Phe Asp		
[0384]	195	200	205
[0385]	Val Thr Asn Val Asp Lys Leu Pro Ala Val Asp Ile Ile Tyr Gly Tyr		
[0386]	210	215	220
[0387]	Gln Asp Asp Pro Glu Tyr Met Tyr Asp Ala Ser Ile Lys His Gly Val		

[0388]	225	230	235	240
[0389]	Lys Gly Ile Val Tyr Ala Gly Met Gly Ala Gly Ser Val Ser Lys Arg			
[0390]		245	250	255
[0391]	Gly Asp Ala Gly Ile Arg Lys Ala Glu Ser Lys Gly Ile Val Val Val			
[0392]		260	265	270
[0393]	Arg Ser Ser Arg Thr Gly Ser Gly Ile Val Pro Pro Asp Ala Gly Gln			
[0394]		275	280	285
[0395]	Pro Gly Leu Val Ala Asp Ser Leu Ser Pro Ala Lys Ser Arg Ile Leu			
[0396]		290	295	300
[0397]	Leu Met Leu Ala Leu Thr Lys Thr Thr Asn Pro Ala Val Ile Gln Asp			
[0398]	305	310	315	320
[0399]	Tyr Phe His Ala Tyr			
[0400]		325		
[0401]	<210> 9			
[0402]	<211> 327			
[0403]	<212> PRT			
[0404]	<213> 大肠埃希氏杆菌 (Escherichia coli)			
[0405]	<400> 9			
[0406]	Met Leu Pro Asn Ile Thr Ile Leu Ala Thr Gly Gly Thr Ile Ala Gly			
[0407]	1	5	10	15
[0408]	Gly Gly Asp Ser Ala Thr Lys Ser Asn Tyr Thr Val Gly Lys Val Gly			
[0409]		20	25	30
[0410]	Val Glu Asn Leu Val Asn Ala Val Pro Gln Leu Lys Asp Ile Ala Asn			
[0411]		35	40	45
[0412]	Val Lys Gly Glu Gln Val Val Asn Ile Gly Ser Gln Asp Met Asn Asp			
[0413]		50	55	60
[0414]	Asn Val Trp Leu Thr Leu Ala Lys Lys Ile Asn Thr Asp Cys Asp Lys			
[0415]	65	70	75	80
[0416]	Thr Asp Gly Phe Val Ile Thr His Gly Thr Asp Thr Met Glu Glu Thr			
[0417]		85	90	95
[0418]	Ala Tyr Phe Leu Asp Leu Thr Val Lys Cys Asp Lys Pro Val Val Met			
[0419]		100	105	110
[0420]	Val Gly Ala Met Arg Pro Ser Thr Ser Met Ser Ala Asp Gly Pro Phe			
[0421]		115	120	125
[0422]	Asn Leu Tyr Asn Ala Val Val Thr Ala Ala Asp Lys Ala Ser Ala Asn			
[0423]		130	135	140
[0424]	Arg Gly Val Leu Val Val Met Asn Asp Thr Val Leu Asp Gly Arg Asp			
[0425]	145	150	155	160
[0426]	Val Thr Lys Thr Asn Thr Thr Asp Val Ala Thr Phe Lys Ser Val Asn			

[0466]	100	105	110
[0467]	Lys Pro Val Val Leu Val Gly Ala Met Arg Asn Ala Ala Ser Leu Ser		
[0468]	115	120	125
[0469]	Ala Asp Gly Ala Leu Asn Leu Tyr Asn Ala Val Ser Val Ala Leu Asn		
[0470]	130	135	140
[0471]	Glu Lys Ser Ala Asn Lys Gly Val Leu Val Val Met Asp Asp Asn Ile		
[0472]	145	150	155
[0473]	Phe Ser Ala Arg Glu Val Ile Lys Thr His Thr Thr His Thr Ser Thr		
[0474]	165	170	175
[0475]	Phe Lys Ala Leu Asn Ser Gly Ala Ile Gly Ser Val Tyr Tyr Gly Lys		
[0476]	180	185	190
[0477]	Thr Arg Tyr Tyr Met Gln Pro Leu Arg Lys His Thr Thr Glu Ser Glu		
[0478]	195	200	205
[0479]	Phe Ser Leu Ser Gln Leu Lys Thr Pro Leu Pro Lys Val Asp Ile Ile		
[0480]	210	215	220
[0481]	Tyr Thr His Ala Gly Met Thr Pro Asp Leu Phe Gln Ala Ser Leu Asn		
[0482]	225	230	235
[0483]	Ser His Ala Lys Gly Val Val Ile Ala Gly Val Gly Asn Gly Asn Val		
[0484]	245	250	255
[0485]	Ser Ala Gly Phe Leu Lys Ala Met Gln Glu Ala Ser Gln Met Gly Val		
[0486]	260	265	270
[0487]	Val Ile Val Arg Ser Ser Arg Val Asn Ser Gly Glu Ile Thr Ser Gly		
[0488]	275	280	285
[0489]	Glu Ile Asp Asp Lys Ala Phe Ile Thr Ser Asp Asn Leu Asn Pro Gln		
[0490]	290	295	300
[0491]	Lys Ala Arg Val Leu Leu Gln Leu Ala Leu Thr Lys Thr Asn Asn Lys		
[0492]	305	310	315
[0493]	Glu Lys Ile Gln Glu Met Phe Glu Glu Tyr		
[0494]	325	330	
[0495]	<210> 11		
[0496]	<211> 330		
[0497]	<212> PRT		
[0498]	<213> 产琥珀酸沃廉氏菌(<i>Wolinella succinogenes</i>)		
[0499]	<400> 11		
[0500]	Met Ala Lys Pro Gln Val Thr Ile Leu Ala Thr Gly Gly Thr Ile Ala		
[0501]	1	5	10
[0502]	Gly Ser Gly Glu Ser Ser Val Lys Ser Ser Tyr Ser Ala Gly Ala Val		
[0503]	20	25	30
[0504]	Thr Val Asp Lys Leu Leu Ala Ala Val Pro Ala Ile Asn Asp Leu Ala		

[0505]	35	40	45
[0506]	Thr Ile Lys Gly Glu Gln Ile Ser Ser Ile Gly Ser Gln Glu Met Thr		
[0507]	50	55	60
[0508]	Gly Lys Val Trp Leu Lys Leu Ala Lys Arg Val Asn Glu Leu Leu Ala		
[0509]	65	70	75
[0510]	Gln Lys Glu Thr Glu Ala Val Ile Ile Thr His Gly Thr Asp Thr Met		
[0511]	85	90	95
[0512]	Glu Glu Thr Ala Phe Phe Leu Asn Leu Thr Val Lys Ser Gln Lys Pro		
[0513]	100	105	110
[0514]	Val Val Leu Val Gly Ala Met Arg Ser Gly Ser Ser Met Ser Ala Asp		
[0515]	115	120	125
[0516]	Gly Pro Met Asn Leu Tyr Asn Ala Val Asn Val Ala Ile Asn Lys Ala		
[0517]	130	135	140
[0518]	Ser Thr Asn Lys Gly Val Val Ile Val Met Asn Asp Glu Ile His Ala		
[0519]	145	150	155
[0520]	Ala Arg Glu Ala Thr Lys Leu Asn Thr Thr Ala Val Asn Ala Phe Ala		
[0521]	165	170	175
[0522]	Ser Pro Asn Thr Gly Lys Ile Gly Thr Val Tyr Tyr Gly Lys Val Glu		
[0523]	180	185	190
[0524]	Tyr Phe Thr Gln Ser Val Arg Pro His Thr Leu Ala Ser Glu Phe Asp		
[0525]	195	200	205
[0526]	Ile Ser Lys Ile Glu Glu Leu Pro Arg Val Asp Ile Leu Tyr Ala His		
[0527]	210	215	220
[0528]	Pro Asp Asp Thr Asp Val Leu Val Asn Ala Ala Leu Gln Ala Gly Ala		
[0529]	225	230	235
[0530]	Lys Gly Ile Ile His Ala Gly Met Gly Asn Gly Asn Pro Phe Pro Leu		
[0531]	245	250	255
[0532]	Thr Gln Asn Ala Leu Glu Lys Ala Ala Lys Ser Gly Val Val Val Ala		
[0533]	260	265	270
[0534]	Arg Ser Ser Arg Val Gly Ser Gly Ser Thr Thr Gln Glu Ala Glu Val		
[0535]	275	280	285
[0536]	Asp Asp Lys Lys Leu Gly Phe Val Ala Thr Glu Ser Leu Asn Pro Gln		
[0537]	290	295	300
[0538]	Lys Ala Arg Val Leu Leu Met Leu Ala Leu Thr Lys Thr Ser Asp Arg		
[0539]	305	310	315
[0540]	Glu Ala Ile Gln Lys Ile Phe Ser Thr Tyr		
[0541]	325	330	
[0542]	<210> 12		
[0543]	<211> 353		

[0544] <212> PRT
 [0545] <213> 豚鼠 (*Cavia porcellus*)
 [0546] <400> 12
 [0547] Met Ala Arg Ala Ser Gly Ser Glu Arg His Leu Leu Leu Ile Tyr Thr
 [0548] 1 5 10 15
 [0549] Gly Gly Thr Leu Gly Met Gln Ser Lys Gly Gly Val Leu Val Pro Gly
 [0550] 20 25 30
 [0551] Pro Gly Leu Val Thr Leu Leu Arg Thr Leu Pro Met Phe His Asp Lys
 [0552] 35 40 45
 [0553] Glu Phe Ala Gln Ala Gln Gly Leu Pro Asp His Ala Leu Ala Leu Pro
 [0554] 50 55 60
 [0555] Pro Ala Ser His Gly Pro Arg Val Leu Tyr Thr Val Leu Glu Cys Gln
 [0556] 65 70 75 80
 [0557] Pro Leu Leu Asp Ser Ser Asp Met Thr Ile Asp Asp Trp Ile Arg Ile
 [0558] 85 90 95
 [0559] Ala Lys Ile Ile Glu Arg His Tyr Glu Gln Tyr Gln Gly Phe Val Val
 [0560] 100 105 110
 [0561] Ile His Gly Thr Asp Thr Met Ala Ser Gly Ala Ser Met Leu Ser Phe
 [0562] 115 120 125
 [0563] Met Leu Glu Asn Leu His Lys Pro Val Ile Leu Thr Gly Ala Gln Val
 [0564] 130 135 140
 [0565] Pro Ile Arg Val Leu Trp Asn Asp Ala Arg Glu Asn Leu Leu Gly Ala
 [0566] 145 150 155 160
 [0567] Leu Leu Val Ala Gly Gln Tyr Ile Ile Pro Glu Val Cys Leu Phe Met
 [0568] 165 170 175
 [0569] Asn Ser Gln Leu Phe Arg Gly Asn Arg Val Thr Lys Val Asp Ser Gln
 [0570] 180 185 190
 [0571] Lys Phe Glu Ala Phe Cys Ser Pro Asn Leu Ser Pro Leu Ala Thr Val
 [0572] 195 200 205
 [0573] Gly Ala Asp Val Thr Ile Ala Trp Asp Leu Val Arg Lys Val Lys Trp
 [0574] 210 215 220
 [0575] Lys Asp Pro Leu Val Val His Ser Asn Met Glu His Asp Val Ala Leu
 [0576] 225 230 235 240
 [0577] Leu Arg Leu Tyr Pro Gly Ile Pro Ala Ser Leu Val Arg Ala Phe Leu
 [0578] 245 250 255
 [0579] Gln Pro Pro Leu Lys Gly Val Val Leu Glu Thr Phe Gly Ser Gly Asn
 [0580] 260 265 270
 [0581] Gly Pro Ser Lys Pro Asp Leu Leu Gln Glu Leu Arg Ala Ala Ala Gln
 [0582] 275 280 285

[0583] Arg Gly Leu Ile Met Val Asn Cys Ser Gln Cys Leu Arg Gly Ser Val
 [0584] 290 295 300
 [0585] Thr Pro Gly Tyr Ala Thr Ser Leu Ala Gly Ala Asn Ile Val Ser Gly
 [0586] 305 310 315 320
 [0587] Leu Asp Met Thr Ser Glu Ala Ala Leu Ala Lys Leu Ser Tyr Val Leu
 [0588] 325 330 335
 [0589] Gly Leu Pro Glu Leu Ser Leu Glu Arg Arg Gln Glu Leu Leu Ala Lys
 [0590] 340 345 350
 [0591] Asp
 [0592] <210> 13
 [0593] <211> 20
 [0594] <212> PRT
 [0595] <213> 人工序列
 [0596] <220>
 [0597] <223> 合成肽
 [0598] <400> 13
 [0599] Gln Arg Leu Ile Glu Asp Ile Cys Leu Pro Arg Trp Gly Cys Leu Trp
 [0600] 1 5 10 15
 [0601] Glu Asp Asp Phe
 [0602] 20
 [0603] <210> 14
 [0604] <211> 18
 [0605] <212> PRT
 [0606] <213> 人工序列
 [0607] <220>
 [0608] <223> 合成肽
 [0609] <400> 14
 [0610] Arg Leu Ile Glu Asp Ile Cys Leu Pro Arg Trp Gly Cys Leu Trp Glu
 [0611] 1 5 10 15
 [0612] Asp Asp
 [0613] <210> 15
 [0614] <211> 15
 [0615] <212> PRT
 [0616] <213> 人工序列
 [0617] <220>
 [0618] <223> 合成肽
 [0619] <400> 15
 [0620] Arg Leu Ile Glu Asp Ile Cys Leu Pro Arg Trp Gly Cys Leu Trp
 [0621] 1 5 10 15

[0661]	Ser Phe Phe Gly Ala Phe Leu Val Gly Leu
[0662]	275 280
[0663]	<210> 17
[0664]	<211> 167
[0665]	<212> PRT
[0666]	<213> 智人(Homo sapiens)
[0667]	<400> 17
[0668]	Arg Glu Arg Gly Pro Gln Arg Val Ala Ala His Ile Thr Gly Thr Arg
[0669]	1 5 10 15
[0670]	Gly Arg Ser Asn Thr Leu Ser Ser Pro Asn Ser Lys Asn Glu Lys Ala
[0671]	20 25 30
[0672]	Leu Gly Arg Lys Ile Asn Ser Trp Glu Ser Ser Arg Ser Gly His Ser
[0673]	35 40 45
[0674]	Phe Leu Ser Asn Leu His Leu Arg Asn Gly Glu Leu Val Ile His Glu
[0675]	50 55 60
[0676]	Lys Gly Phe Tyr Tyr Ile Tyr Ser Gln Thr Tyr Phe Arg Phe Gln Glu
[0677]	65 70 75 80
[0678]	Glu Ile Lys Glu Asn Thr Lys Asn Asp Lys Gln Met Val Gln Tyr Ile
[0679]	85 90 95
[0680]	Tyr Lys Tyr Thr Ser Tyr Pro Asp Pro Ile Leu Leu Met Lys Ser Ala
[0681]	100 105 110
[0682]	Arg Asn Ser Cys Trp Ser Lys Asp Ala Glu Tyr Gly Leu Tyr Ser Ile
[0683]	115 120 125
[0684]	Tyr Gln Gly Gly Ile Phe Glu Leu Lys Glu Asn Asp Arg Ile Phe Val
[0685]	130 135 140
[0686]	Ser Val Thr Asn Glu His Leu Ile Asp Met Asp His Glu Ala Ser Phe
[0687]	145 150 155 160
[0688]	Phe Gly Ala Phe Leu Val Gly
[0689]	165
[0690]	<210> 18
[0691]	<211> 503
[0692]	<212> PRT
[0693]	<213> 人工序列
[0694]	<220>
[0695]	<223> 合成多肽
[0696]	<400> 18
[0697]	Arg Glu Arg Gly Pro Gln Arg Val Ala Ala His Ile Thr Gly Thr Arg
[0698]	1 5 10 15
[0699]	Gly Arg Ser Asn Thr Leu Ser Ser Pro Asn Ser Lys Asn Glu Lys Ala

[0739] Arg Glu Arg Gly Pro Gln Arg Val Ala Ala His Ile Thr Gly Thr Arg
 [0740] 340 345 350
 [0741] Gly Arg Ser Asn Thr Leu Ser Ser Pro Asn Ser Lys Asn Glu Lys Ala
 [0742] 355 360 365
 [0743] Leu Gly Arg Lys Ile Asn Ser Trp Glu Ser Ser Arg Ser Gly His Ser
 [0744] 370 375 380
 [0745] Phe Leu Ser Asn Leu His Leu Arg Asn Gly Glu Leu Val Ile His Glu
 [0746] 385 390 395 400
 [0747] Lys Gly Phe Tyr Tyr Ile Tyr Ser Gln Thr Tyr Phe Arg Phe Gln Glu
 [0748] 405 410 415
 [0749] Glu Ile Lys Glu Asn Thr Lys Asn Asp Lys Gln Met Val Gln Tyr Ile
 [0750] 420 425 430
 [0751] Tyr Lys Tyr Thr Ser Tyr Pro Asp Pro Ile Leu Leu Met Lys Ser Ala
 [0752] 435 440 445
 [0753] Arg Asn Ser Cys Trp Ser Lys Asp Ala Glu Tyr Gly Leu Tyr Ser Ile
 [0754] 450 455 460
 [0755] Tyr Gln Gly Gly Ile Phe Glu Leu Lys Glu Asn Asp Arg Ile Phe Val
 [0756] 465 470 475 480
 [0757] Ser Val Thr Asn Glu His Leu Ile Asp Met Asp His Glu Ala Ser Phe
 [0758] 485 490 495
 [0759] Phe Gly Ala Phe Leu Val Gly
 [0760] 500
 [0761] <210> 19
 [0762] <211> 16
 [0763] <212> PRT
 [0764] <213> 人工序列
 [0765] <220>
 [0766] <223> 合成肽
 [0767] <220>
 [0768] <221> MISC_FEATURE
 [0769] <222> (5) .. (15)
 [0770] <223> 残基可以存在或不存在
 [0771] <400> 19
 [0772] Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser
 [0773] 1 5 10 15
 [0774] <210> 20
 [0775] <211> 24
 [0776] <212> PRT
 [0777] <213> 人工序列

[0778] <220>
 [0779] <223> 合成肽
 [0780] <220>
 [0781] <221> MISC_FEATURE
 [0782] <222> (10) .. (24)
 [0783] <223> 残基可以存在或不存在.
 [0784] <400> 20
 [0785] Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
 [0786] 1 5 10 15
 [0787] Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
 [0788] 20
 [0789] <210> 21
 [0790] <211> 24
 [0791] <212> PRT
 [0792] <213> 人工序列
 [0793] <220>
 [0794] <223> 合成肽
 [0795] <400> 21
 [0796] Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
 [0797] 1 5 10 15
 [0798] Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
 [0799] 20
 [0800] <210> 22
 [0801] <211> 855
 [0802] <212> PRT
 [0803] <213> 人工序列
 [0804] <220>
 [0805] <223> 合成多肽
 [0806] <400> 22
 [0807] Arg Glu Arg Gly Pro Gln Arg Val Ala Ala His Ile Thr Gly Thr Arg
 [0808] 1 5 10 15
 [0809] Gly Arg Ser Asn Thr Leu Ser Ser Pro Asn Ser Lys Asn Glu Lys Ala
 [0810] 20 25 30
 [0811] Leu Gly Arg Lys Ile Asn Ser Trp Glu Ser Ser Arg Ser Gly His Ser
 [0812] 35 40 45
 [0813] Phe Leu Ser Asn Leu His Leu Arg Asn Gly Glu Leu Val Ile His Glu
 [0814] 50 55 60
 [0815] Lys Gly Phe Tyr Tyr Ile Tyr Ser Gln Thr Tyr Phe Arg Phe Gln Glu
 [0816] 65 70 75 80

[0817]	Glu Ile Lys Glu Asn Thr Lys Asn Asp Lys Gln Met Val Gln Tyr Ile
[0818]	85 90 95
[0819]	Tyr Lys Tyr Thr Ser Tyr Pro Asp Pro Ile Leu Leu Met Lys Ser Ala
[0820]	100 105 110
[0821]	Arg Asn Ser Cys Trp Ser Lys Asp Ala Glu Tyr Gly Leu Tyr Ser Ile
[0822]	115 120 125
[0823]	Tyr Gln Gly Gly Ile Phe Glu Leu Lys Glu Asn Asp Arg Ile Phe Val
[0824]	130 135 140
[0825]	Ser Val Thr Asn Glu His Leu Ile Asp Met Asp His Glu Ala Ser Phe
[0826]	145 150 155 160
[0827]	Phe Gly Ala Phe Leu Val Gly Gly Arg Glu Arg Gly Pro Gln Arg Val
[0828]	165 170 175
[0829]	Ala Ala His Ile Thr Gly Thr Arg Gly Arg Ser Asn Thr Leu Ser Ser
[0830]	180 185 190
[0831]	Pro Asn Ser Lys Asn Glu Lys Ala Leu Gly Arg Lys Ile Asn Ser Trp
[0832]	195 200 205
[0833]	Glu Ser Ser Arg Ser Gly His Ser Phe Leu Ser Asn Leu His Leu Arg
[0834]	210 215 220
[0835]	Asn Gly Glu Leu Val Ile His Glu Lys Gly Phe Tyr Tyr Ile Tyr Ser
[0836]	225 230 235 240
[0837]	Gln Thr Tyr Phe Arg Phe Gln Glu Glu Ile Lys Glu Asn Thr Lys Asn
[0838]	245 250 255
[0839]	Asp Lys Gln Met Val Gln Tyr Ile Tyr Lys Tyr Thr Ser Tyr Pro Asp
[0840]	260 265 270
[0841]	Pro Ile Leu Leu Met Lys Ser Ala Arg Asn Ser Cys Trp Ser Lys Asp
[0842]	275 280 285
[0843]	Ala Glu Tyr Gly Leu Tyr Ser Ile Tyr Gln Gly Gly Ile Phe Glu Leu
[0844]	290 295 300
[0845]	Lys Glu Asn Asp Arg Ile Phe Val Ser Val Thr Asn Glu His Leu Ile
[0846]	305 310 315 320
[0847]	Asp Met Asp His Glu Ala Ser Phe Phe Gly Ala Phe Leu Val Gly Gly
[0848]	325 330 335
[0849]	Arg Glu Arg Gly Pro Gln Arg Val Ala Ala His Ile Thr Gly Thr Arg
[0850]	340 345 350
[0851]	Gly Arg Ser Asn Thr Leu Ser Ser Pro Asn Ser Lys Asn Glu Lys Ala
[0852]	355 360 365
[0853]	Leu Gly Arg Lys Ile Asn Ser Trp Glu Ser Ser Arg Ser Gly His Ser
[0854]	370 375 380
[0855]	Phe Leu Ser Asn Leu His Leu Arg Asn Gly Glu Leu Val Ile His Glu

[0856]	385	390	395	400
[0857]	Lys Gly Phe Tyr Tyr Ile Tyr Ser Gln Thr Tyr Phe Arg Phe Gln Glu			
[0858]	405	410	415	
[0859]	Glu Ile Lys Glu Asn Thr Lys Asn Asp Lys Gln Met Val Gln Tyr Ile			
[0860]	420	425	430	
[0861]	Tyr Lys Tyr Thr Ser Tyr Pro Asp Pro Ile Leu Leu Met Lys Ser Ala			
[0862]	435	440	445	
[0863]	Arg Asn Ser Cys Trp Ser Lys Asp Ala Glu Tyr Gly Leu Tyr Ser Ile			
[0864]	450	455	460	
[0865]	Tyr Gln Gly Gly Ile Phe Glu Leu Lys Glu Asn Asp Arg Ile Phe Val			
[0866]	465	470	475	480
[0867]	Ser Val Thr Asn Glu His Leu Ile Asp Met Asp His Glu Ala Ser Phe			
[0868]	485	490	495	
[0869]	Phe Gly Ala Phe Leu Val Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser			
[0870]	500	505	510	
[0871]	Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser His			
[0872]	515	520	525	
[0873]	Met Asp Lys Leu Pro Asn Ile Val Ile Leu Ala Thr Gly Gly Thr Ile			
[0874]	530	535	540	
[0875]	Ala Gly Ser Ala Ala Thr Gly Thr Gln Thr Thr Gly Tyr Lys Ile Gly			
[0876]	545	550	555	560
[0877]	Ala Leu Gly Val Asp Thr Leu Ile Asn Ala Val Pro Glu Val Lys Lys			
[0878]	565	570	575	
[0879]	Leu Ala Asn Val Lys Gly Glu Gln Phe Ser Asn Met Ala Ser Gln Asn			
[0880]	580	585	590	
[0881]	Met Thr Gly Asp Val Val Leu Lys Leu Ser Gln Arg Val Asn Glu Leu			
[0882]	595	600	605	
[0883]	Leu Ala Arg Asp Asp Val Asp Gly Val Val Ile Thr His Gly Thr Asp			
[0884]	610	615	620	
[0885]	Thr Val Glu Glu Ser Ala Tyr Phe Leu His Leu Thr Val Lys Ser Asp			
[0886]	625	630	635	640
[0887]	Lys Pro Val Val Phe Val Ala Ala Met Arg Pro Ala Thr Ala Ile Ser			
[0888]	645	650	655	
[0889]	Ala Asp Gly Pro Met Asn Leu Leu Glu Ala Val Arg Val Ala Gly Asp			
[0890]	660	665	670	
[0891]	Lys Gln Ser Arg Gly Arg Gly Val Met Val Val Leu Asn Asp Arg Ile			
[0892]	675	680	685	
[0893]	Gly Ser Ala Arg Tyr Ile Thr Lys Thr Asn Ala Ser Thr Leu Asp Thr			
[0894]	690	695	700	

[0895]	Phe Lys Ala Asn Glu Glu Gly Tyr Leu Gly Val Ile Ile Gly Asn Arg
[0896]	705 710 715 720
[0897]	Ile Tyr Tyr Gln Asn Arg Ile Asp Lys Leu His Thr Thr Arg Ser Val
[0898]	725 730 735
[0899]	Phe Asp Val Arg Gly Leu Thr Ser Leu Pro Lys Val Asp Ile Leu Tyr
[0900]	740 745 750
[0901]	Gly Tyr Gln Asp Asp Pro Glu Tyr Leu Tyr Asp Ala Ala Ile Gln His
[0902]	755 760 765
[0903]	Gly Val Lys Gly Ile Val Tyr Ala Gly Met Gly Ala Gly Gln Val Ser
[0904]	770 775 780
[0905]	Val Arg Gly Ile Ala Gly Met Arg Lys Ala Met Glu Lys Gly Val Val
[0906]	785 790 795 800
[0907]	Val Ile Arg Ser Thr Arg Thr Gly Asn Gly Ile Val Pro Pro Asp Glu
[0908]	805 810 815
[0909]	Glu Leu Pro Gly Leu Val Ser Asp Ser Leu Asn Pro Ala His Ala Arg
[0910]	820 825 830
[0911]	Ile Leu Leu Met Leu Ala Leu Thr Arg Thr Ser Asp Pro Lys Val Ile
[0912]	835 840 845
[0913]	Gln Glu Tyr Phe His Thr Tyr
[0914]	850 855
[0915]	<210> 23
[0916]	<211> 967
[0917]	<212> PRT
[0918]	<213> 人工序列
[0919]	<220>
[0920]	<223> 合成多肽
[0921]	<400> 23
[0922]	Met Gly Ser Ser His His His His His His Gly Thr Met Ser Asp Ser
[0923]	1 5 10 15
[0924]	Glu Val Asn Gln Glu Ala Lys Pro Glu Val Lys Pro Glu Val Lys Pro
[0925]	20 25 30
[0926]	Glu Thr His Ile Asn Leu Lys Val Ser Asp Gly Ser Ser Glu Ile Phe
[0927]	35 40 45
[0928]	Phe Lys Ile Lys Lys Thr Thr Pro Leu Arg Arg Leu Met Glu Ala Phe
[0929]	50 55 60
[0930]	Ala Lys Arg Gln Gly Lys Glu Met Asp Ser Leu Arg Phe Leu Tyr Asp
[0931]	65 70 75 80
[0932]	Gly Ile Arg Ile Gln Ala Asp Gln Thr Pro Glu Asp Leu Asp Met Glu
[0933]	85 90 95

[0934]	Asp Asn Asp Ile Ile Glu Ala His Arg Glu Gln Ile Gly Gly Leu Glu
[0935]	100 105 110
[0936]	Arg Glu Arg Gly Pro Gln Arg Val Ala Ala His Ile Thr Gly Thr Arg
[0937]	115 120 125
[0938]	Gly Arg Ser Asn Thr Leu Ser Ser Pro Asn Ser Lys Asn Glu Lys Ala
[0939]	130 135 140
[0940]	Leu Gly Arg Lys Ile Asn Ser Trp Glu Ser Ser Arg Ser Gly His Ser
[0941]	145 150 155 160
[0942]	Phe Leu Ser Asn Leu His Leu Arg Asn Gly Glu Leu Val Ile His Glu
[0943]	165 170 175
[0944]	Lys Gly Phe Tyr Tyr Ile Tyr Ser Gln Thr Tyr Phe Arg Phe Gln Glu
[0945]	180 185 190
[0946]	Glu Ile Lys Glu Asn Thr Lys Asn Asp Lys Gln Met Val Gln Tyr Ile
[0947]	195 200 205
[0948]	Tyr Lys Tyr Thr Ser Tyr Pro Asp Pro Ile Leu Leu Met Lys Ser Ala
[0949]	210 215 220
[0950]	Arg Asn Ser Cys Trp Ser Lys Asp Ala Glu Tyr Gly Leu Tyr Ser Ile
[0951]	225 230 235 240
[0952]	Tyr Gln Gly Gly Ile Phe Glu Leu Lys Glu Asn Asp Arg Ile Phe Val
[0953]	245 250 255
[0954]	Ser Val Thr Asn Glu His Leu Ile Asp Met Asp His Glu Ala Ser Phe
[0955]	260 265 270
[0956]	Phe Gly Ala Phe Leu Val Gly Gly Arg Glu Arg Gly Pro Gln Arg Val
[0957]	275 280 285
[0958]	Ala Ala His Ile Thr Gly Thr Arg Gly Arg Ser Asn Thr Leu Ser Ser
[0959]	290 295 300
[0960]	Pro Asn Ser Lys Asn Glu Lys Ala Leu Gly Arg Lys Ile Asn Ser Trp
[0961]	305 310 315 320
[0962]	Glu Ser Ser Arg Ser Gly His Ser Phe Leu Ser Asn Leu His Leu Arg
[0963]	325 330 335
[0964]	Asn Gly Glu Leu Val Ile His Glu Lys Gly Phe Tyr Tyr Ile Tyr Ser
[0965]	340 345 350
[0966]	Gln Thr Tyr Phe Arg Phe Gln Glu Glu Ile Lys Glu Asn Thr Lys Asn
[0967]	355 360 365
[0968]	Asp Lys Gln Met Val Gln Tyr Ile Tyr Lys Tyr Thr Ser Tyr Pro Asp
[0969]	370 375 380
[0970]	Pro Ile Leu Leu Met Lys Ser Ala Arg Asn Ser Cys Trp Ser Lys Asp
[0971]	385 390 395 400
[0972]	Ala Glu Tyr Gly Leu Tyr Ser Ile Tyr Gln Gly Gly Ile Phe Glu Leu

[0973]		405		410		415
[0974]	Lys Glu Asn Asp Arg Ile Phe Val Ser Val Thr Asn Glu His Leu Ile					
[0975]		420		425		430
[0976]	Asp Met Asp His Glu Ala Ser Phe Phe Gly Ala Phe Leu Val Gly Gly					
[0977]		435		440		445
[0978]	Arg Glu Arg Gly Pro Gln Arg Val Ala Ala His Ile Thr Gly Thr Arg					
[0979]		450		455		460
[0980]	Gly Arg Ser Asn Thr Leu Ser Ser Pro Asn Ser Lys Asn Glu Lys Ala					
[0981]		465		470		480
[0982]	Leu Gly Arg Lys Ile Asn Ser Trp Glu Ser Ser Arg Ser Gly His Ser					
[0983]		485		490		495
[0984]	Phe Leu Ser Asn Leu His Leu Arg Asn Gly Glu Leu Val Ile His Glu					
[0985]		500		505		510
[0986]	Lys Gly Phe Tyr Tyr Ile Tyr Ser Gln Thr Tyr Phe Arg Phe Gln Glu					
[0987]		515		520		525
[0988]	Glu Ile Lys Glu Asn Thr Lys Asn Asp Lys Gln Met Val Gln Tyr Ile					
[0989]		530		535		540
[0990]	Tyr Lys Tyr Thr Ser Tyr Pro Asp Pro Ile Leu Leu Met Lys Ser Ala					
[0991]		545		550		560
[0992]	Arg Asn Ser Cys Trp Ser Lys Asp Ala Glu Tyr Gly Leu Tyr Ser Ile					
[0993]		565		570		575
[0994]	Tyr Gln Gly Gly Ile Phe Glu Leu Lys Glu Asn Asp Arg Ile Phe Val					
[0995]		580		585		590
[0996]	Ser Val Thr Asn Glu His Leu Ile Asp Met Asp His Glu Ala Ser Phe					
[0997]		595		600		605
[0998]	Phe Gly Ala Phe Leu Val Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser					
[0999]		610		615		620
[1000]	Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser His					
[1001]		625		630		640
[1002]	Met Asp Lys Leu Pro Asn Ile Val Ile Leu Ala Thr Gly Gly Thr Ile					
[1003]		645		650		655
[1004]	Ala Gly Ser Ala Ala Thr Gly Thr Gln Thr Thr Gly Tyr Lys Ile Gly					
[1005]		660		665		670
[1006]	Ala Leu Gly Val Asp Thr Leu Ile Asn Ala Val Pro Glu Val Lys Lys					
[1007]		675		680		685
[1008]	Leu Ala Asn Val Lys Gly Glu Gln Phe Ser Asn Met Ala Ser Gln Asn					
[1009]		690		695		700
[1010]	Met Thr Gly Asp Val Val Leu Lys Leu Ser Gln Arg Val Asn Glu Leu					
[1011]		705		710		720

[1012]	Leu Ala Arg Asp Asp Val Asp Gly Val Val Ile Thr His Gly Thr Asp
[1013]	725 730 735
[1014]	Thr Val Glu Glu Ser Ala Tyr Phe Leu His Leu Thr Val Lys Ser Asp
[1015]	740 745 750
[1016]	Lys Pro Val Val Phe Val Ala Ala Met Arg Pro Ala Thr Ala Ile Ser
[1017]	755 760 765
[1018]	Ala Asp Gly Pro Met Asn Leu Leu Glu Ala Val Arg Val Ala Gly Asp
[1019]	770 775 780
[1020]	Lys Gln Ser Arg Gly Arg Gly Val Met Val Val Leu Asn Asp Arg Ile
[1021]	785 790 795 800
[1022]	Gly Ser Ala Arg Tyr Ile Thr Lys Thr Asn Ala Ser Thr Leu Asp Thr
[1023]	805 810 815
[1024]	Phe Lys Ala Asn Glu Glu Gly Tyr Leu Gly Val Ile Ile Gly Asn Arg
[1025]	820 825 830
[1026]	Ile Tyr Tyr Gln Asn Arg Ile Asp Lys Leu His Thr Thr Arg Ser Val
[1027]	835 840 845
[1028]	Phe Asp Val Arg Gly Leu Thr Ser Leu Pro Lys Val Asp Ile Leu Tyr
[1029]	850 855 860
[1030]	Gly Tyr Gln Asp Asp Pro Glu Tyr Leu Tyr Asp Ala Ala Ile Gln His
[1031]	865 870 875 880
[1032]	Gly Val Lys Gly Ile Val Tyr Ala Gly Met Gly Ala Gly Gln Val Ser
[1033]	885 890 895
[1034]	Val Arg Gly Ile Ala Gly Met Arg Lys Ala Met Glu Lys Gly Val Val
[1035]	900 905 910
[1036]	Val Ile Arg Ser Thr Arg Thr Gly Asn Gly Ile Val Pro Pro Asp Glu
[1037]	915 920 925
[1038]	Glu Leu Pro Gly Leu Val Ser Asp Ser Leu Asn Pro Ala His Ala Arg
[1039]	930 935 940
[1040]	Ile Leu Leu Met Leu Ala Leu Thr Arg Thr Ser Asp Pro Lys Val Ile
[1041]	945 950 955 960
[1042]	Gln Glu Tyr Phe His Thr Tyr
[1043]	965
[1044]	<210> 24
[1045]	<211> 57
[1046]	<212> DNA
[1047]	<213> 人工序列
[1048]	<220>
[1049]	<223> 合成寡核苷酸
[1050]	<400> 24

- [1051] ggcggtggca gcggtggagg aggctctggt ggaggcggtta gcggaggcgg agggtcg 57
- [1052] <210> 25
- [1053] <211> 31
- [1054] <212> DNA
- [1055] <213> 人工序列
- [1056] <220>
- [1057] <223> 合成寡核苷酸
- [1058] <400> 25
- [1059] cgaatgcatc tagatctcga gcgtgagcgt g 31
- [1060] <210> 26
- [1061] <211> 31
- [1062] <212> DNA
- [1063] <213> 人工序列
- [1064] <220>
- [1065] <223> 合成寡核苷酸
- [1066] <400> 26
- [1067] cacgctcacg ctcgagatct agatgcattc g 31
- [1068] <210> 27
- [1069] <211> 46
- [1070] <212> DNA
- [1071] <213> 人工序列
- [1072] <220>
- [1073] <223> 合成寡核苷酸
- [1074] <400> 27
- [1075] gaacagattg gtggtctcga gggaggaatt ccatatggat aaactg 46
- [1076] <210> 28
- [1077] <211> 46
- [1078] <212> DNA
- [1079] <213> 人工序列
- [1080] <220>
- [1081] <223> 合成寡核苷酸
- [1082] <400> 28
- [1083] cagtttatcc atatggaatt cctccctcga gaccaccaat ctgttc 46
- [1084] <210> 29
- [1085] <211> 33
- [1086] <212> DNA
- [1087] <213> 人工序列
- [1088] <220>
- [1089] <223> 合成寡核苷酸

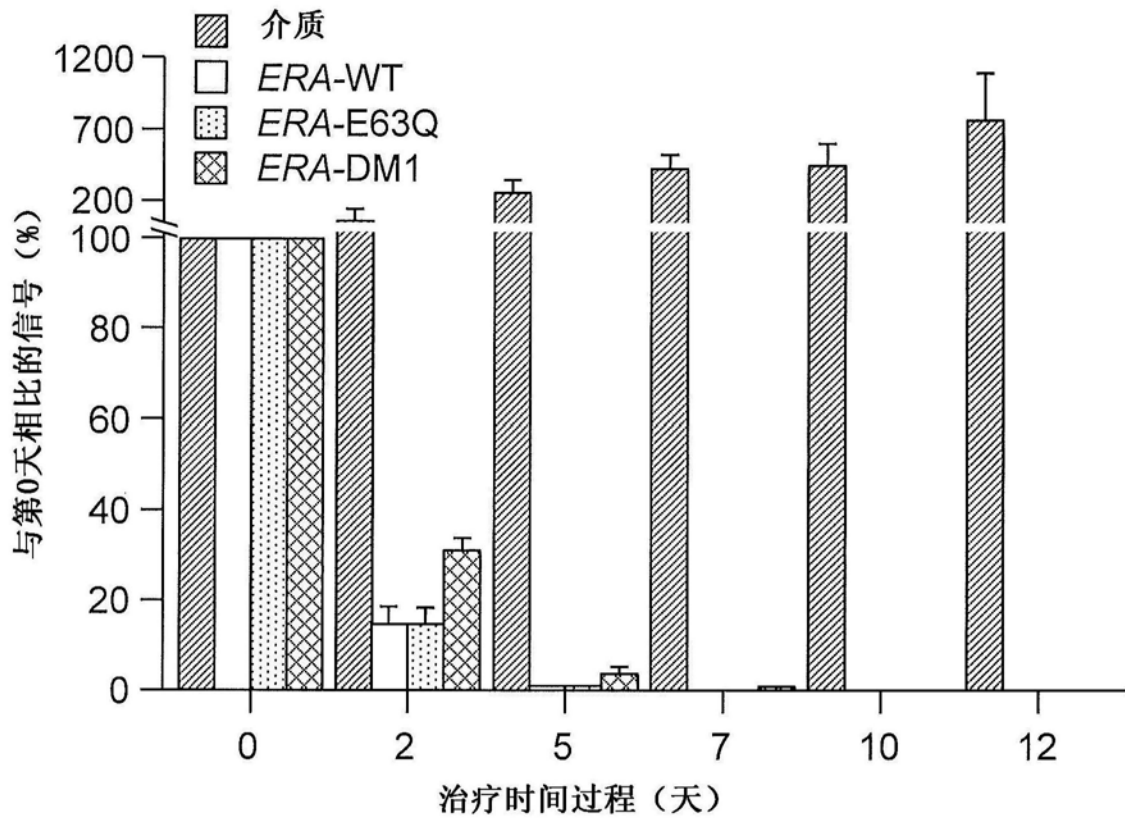


图1A

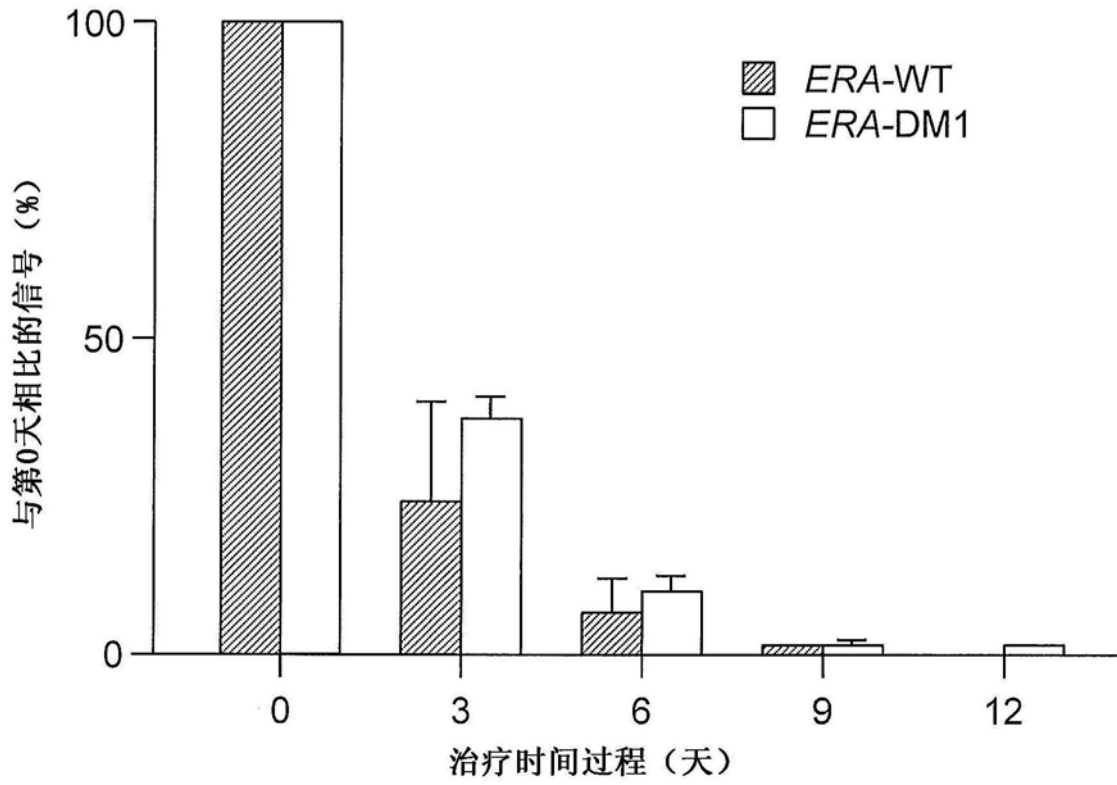


图1B

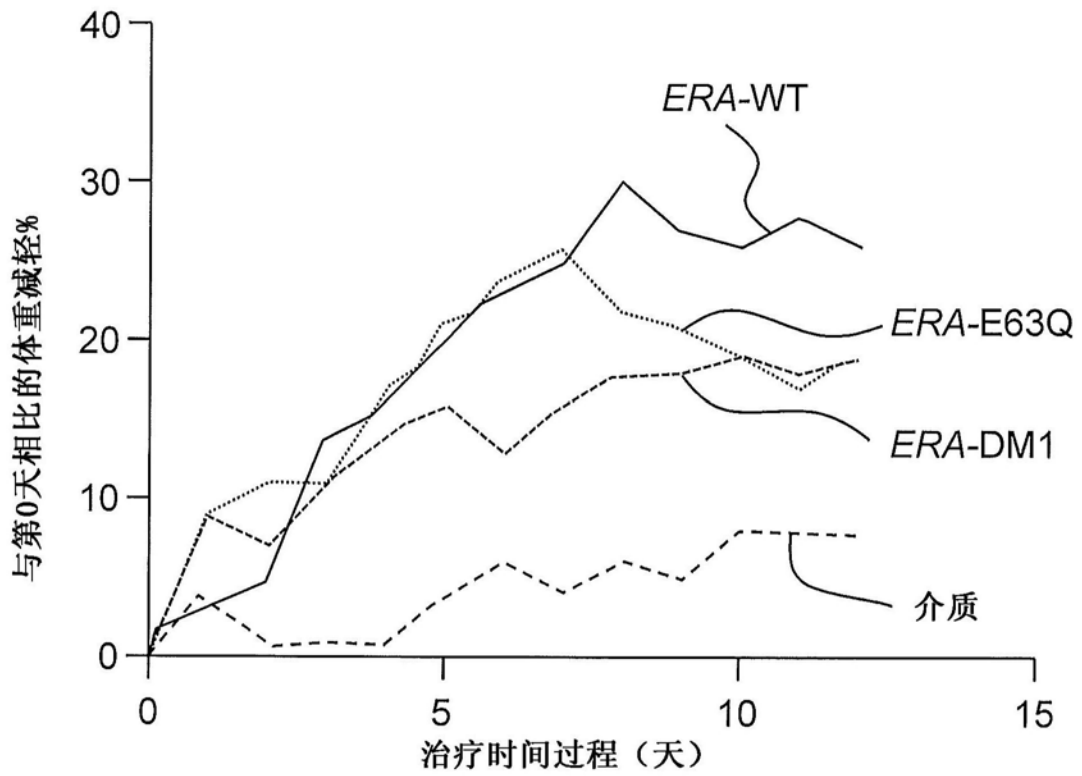


图2

* 位点1 - A31

A MDKLPNIVILATGGTIAGSAATGTQTTGYKAGALGVDTLINAVPEVKKLANV KGEQFSNM
 B MLPNIVILATGGTIAGSAANTQTTGYKAGALGVETLIQAVPELKTLANI KGEQVASI
 C MLPNITILATGGTIAAGGDSAT . KSNYTVGKGVENLVNAVFOQKDIANV KGEQVVNI
 D MAQNLPTIALLATGGTIAAGSASAS . IGSYKSGELGIKELKKAIPSLNRLARI QGEQISNI
 E MAKPOVTILATGGTIAAGGESSV . KSSYSAGAVTVDKLLAAVPAINDLATI KGEQISSI
 F MARASGSERHLLLIYTGGLTGMQS KGGVLVPGPGLVTLRLTLPMFHDKFEFAQOGLPDHALALPPASHGPRVLYTVLEQPLL

* 位点2 - E63

A ASENMTGDVVLKLSQRVNE LLARDVDGVVITHGTDTVEESAYFLHLTV . KSDKPVVVFVAAAMRPATAISADGPMNLLLEAVRVAGDKQS
 B GSENMTSDVLLTLSKRVNELLARSDDVGVVITHGDTLDESYPFLNLTV . KSDKPVVVFVAAAMRPATAISADGPMNLYGAVKVAADKNS
 C GSQDMNDNVWLTAKKINTDCD . . KTDGFVITHGDTMEETAYFLDLTV . KCDKPVVMVGAMRPSTMSADGPFNLYNAVVTAAKAS
 D GSQDMNEEVWFKLAKRAQELLDSDRIQGVVITHGDTLEESAYFLNLVL . RSTKPVVLVVGAMRNAASLSADGALNLYNAVSVALNEKS
 E GSQEMTKVWLKAKRVNELLAQKETEAVIITHGDTMEETAFFNLTV . KSQKPVVLVVGAMRSGSSMSADGPMNLYNAVNVAINKAS
 F DSSDMTIDDWIRIAKIIERHYE . . QYQGFVVIHGTDTMASGASMLSFMLENLHKPVILTGAQVPIRVLWNDARENLLGALLVAGQYI .

A RGRGMVVLNDRIGSARYITKTNASTLDTFKANEEGYLGVIIGNRIYQNRIDKLHTRSVFVDRGLT . SLPKVDILYGYQDDPEYLY
 B RGRGVLVNDRIGSARFISKTNASTLDTFKAPEEGYLGVIIGDKIYYQTRLDKVHTRSVFVDTNVD . KLPVAVDIIYGYQDDPEYMY
 C ANRGVLVMMNDTVLDGRDVTKTNTDVAFTKSVNYGPLYIHNGKIDYQRTPARKHTSDTFFDVSKLN . ELPKVGIVINYANASDLPA
 D ANKGVLVMMDDNIFSAREVIKTHHTTSTFKALNSGAI GSVYYGKTRYMQPLRKHTTESEFSLSQLKTPLPKVDIIYTHAGMTPDLF
 E TNKGVVIVMNDEIHAAREATKLNTTAVNAFASPNTGKIGTVYYGKVEYFTQSVRPHTLASEFDISKIE . ELPRVDILYAHPDDTDLV
 F . IPEVCLFMNSQLFRGNRVTKVDSQKFEAFCSPNLSPLATVGADVTIAWDLVRKVKWKDPLVVHSNME . . HDVALLRLRYPGIPASLV

* 位点3 - P123

A DAAIQHGVKGI VYAGMG . . AGSVSVRGIAGMRKAMEKGVVIVIRSTRTGNNGIVPPDEE LPGLVSDSLNPA . . HARILLMLALTR
 B DÄSIKHGVKGI VYAGMG . . AGSVKRGDAGIRKÄESKGI VVVRSSRTGSGIVPPDAG QPGLVADSLSPA . . KSRILLMLALTK
 C KÄLV DAGYDGI VYAGVG . . NGNLYKSVFDTLATAÄKTGTAVVRSRVPFTGATTQDAEVDDAKYGFVASGTLNPQ . . KARVLLQJALTQ
 D QÄSLNSHAKGVI VYAGVG . . NGNVSAGFLKAMQÄSOMGVVIVRSSRVNSGEITSGEIDD . . KAFITSDNLNPQ . . KARVLLQJALTK
 E NÄALQAGAKGI IHAGMG . . NGNPFPLTQNALEKÄAKSGVVVARSSRVGSGSTTQEAEVDDKKLGFVATESLNPQ . . KARVLLMLALTK
 F RÄFLQPPPLKGVVLETFGSGNGPSPKPDLLQELRÄÄQRGLIMVNCSQLRGSVTPGYATSLAGANIVSGLDMTSEÄALAKLSYVILGPE

A TSDPKVIOEYFHTY
 B TTNPAVIODYFHAY
 C TKDPQIQIIFNQY
 D TNNKEIQEMFEY
 E TSDREAIQIFSTY
 F LSL.ERRQELAKD

图3
68

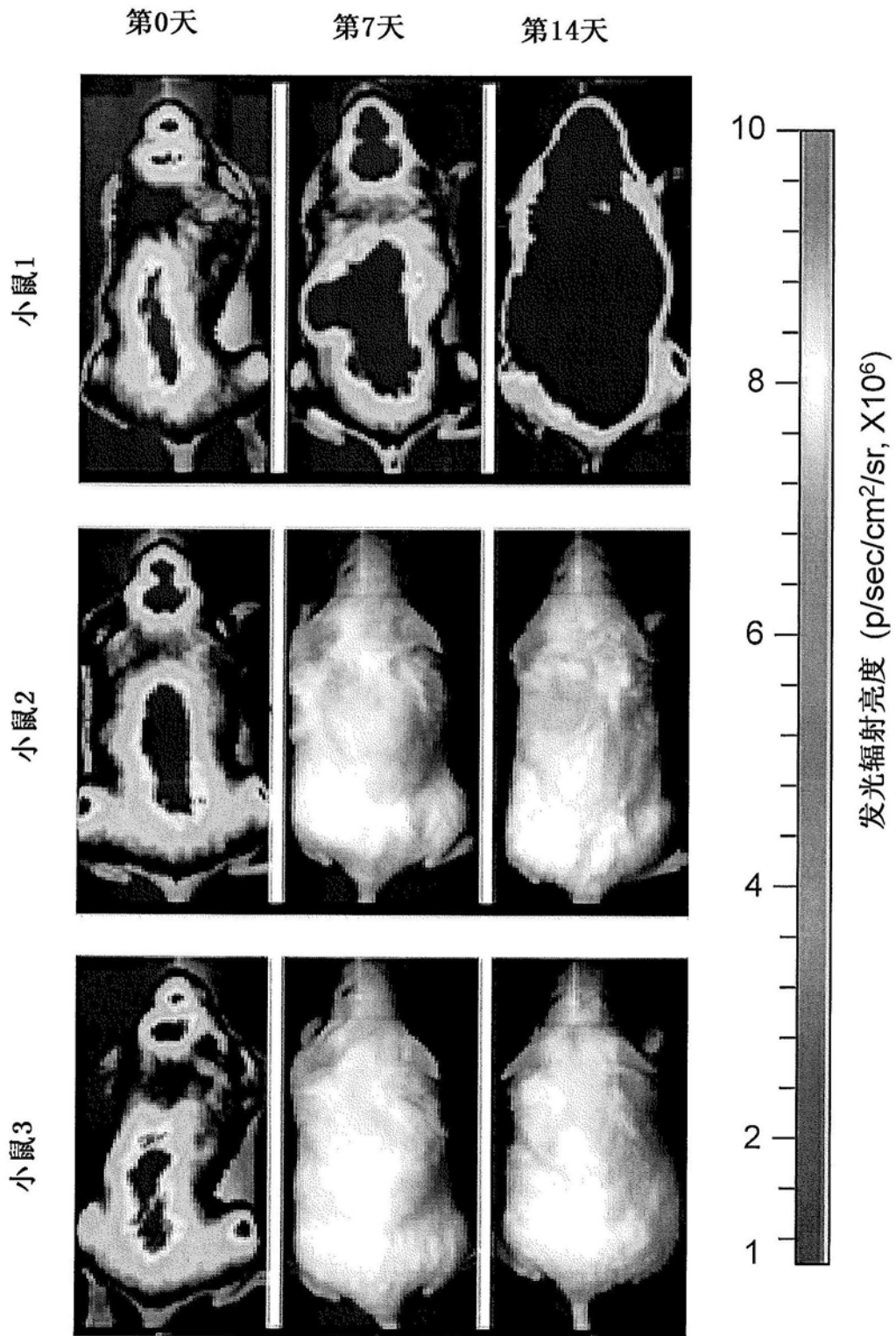


图4

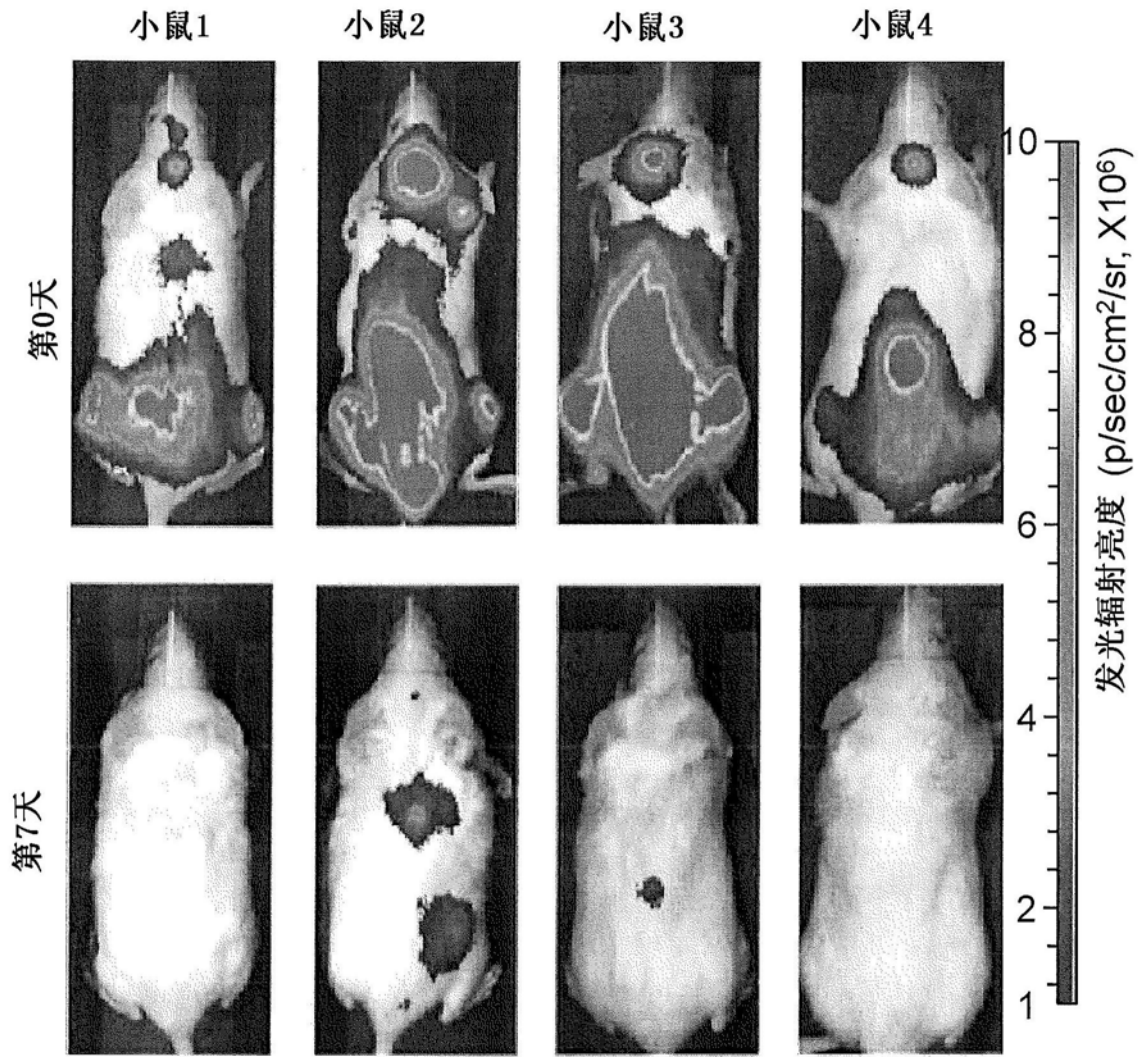


图5