

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.

A61K 38/43 (2006.01)

A61P 1/16 (2006.01)

A61P 31/12 (2006.01)



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 200410076854.4

[43] 公开日 2006 年 3 月 15 日

[11] 公开号 CN 1745847A

[22] 申请日 2004.9.8

[21] 申请号 200410076854.4

[71] 申请人 康达医药科技有限公司

地址 中国香港

[72] 发明人 郑宁民

[74] 专利代理机构 永新专利商标代理有限公司

代理人 林晓红

权利要求书 2 页 说明书 19 页 附图 3 页

[54] 发明名称

用精氨酸酶治疗肝炎的药物组合物和方法

[57] 摘要

本发明涉及用聚乙二醇修饰的人精氨酸 I 酶治疗肝炎的方法及其制药方面的应用。

```
1 gaattgtacg tcaaaagagat gaagcagaaa aagtcgtcg agagaaggt gaacgacaaa
61 aagtgaaatg cgaaggaagt ccaagaaatg gtgattatga ggggtgtctat ttaccacaaa
121 acggagagata ttatttggaa taaagagctt ctgggaactg tcttgtaaat gctccttgta
181 atttaaaaga tattgaacata acgaagaggt tgtgttaaac agggagatta tatcttgata
241 aggttaagaa atttgaataa gttactatct ttcccatga cgtagaanaa caaaagatta
301 taacagaagt ggaagtaact cccagagagg ctttaccaga acattttgat tcaatagaac
361 taattagtag cgttttccaa tgaagagcgt tttttatttg gttagttgca taacactaaa
421 gatgttcagg tgacacatgag caatggagga aaggaacgct ttaaggggaa gggaaacctt
481 taaacagttc taatccctct tgattttatg ttctctgtaa actgcgtccg gtaaatctca
541 ggaatagaca tcggcggtta acggccttga tgcgggggca gtttagaag aatatgattg
601 gagggaattc tagatgattc accacacaa tcatatgagc gccaaagtcg gaactatag
661 gattattgga gctcctttct caaagggaca gccacagaga ggggtggaag aaggccctac
721 agtattcaga aaggcttgct tgccttgaaa acttaagaa caaagtggtg atgtgaagga
781 ttatggggac ctgccccttg ctgaactccc taatgacagt ccccttcaaa ttgtgaagaa
841 tccaaggtct gtgggaaaag caagcagaca gctggctggc aaggtggcac aagtcagaaa
901 gaacggaaga atcagcctgg tgcgggcgg agaccacagt ttggcaattg gaagcatctc
961 tggcaatgac aaggtccacc ctgactcttg agtcacttgg gctgatgttc aactgatat
1021 caaacctca ctgacacaca caagtggaaa ctgcatgga caactgtat ctctctctct
1081 gaaggaacta aaaggaagaa ttcccgatgt gccagatttc tccctgggtga ctccctgtat
1141 attcgcaag gatatttgtt atattgctt gagagacgtg gacccctggg aacactacat
1201 tttaaaact ctaggaataa aatacttttc aatgactgga gtgcacagac tgggaattg
1261 caagtgatg gaagaaacac tcagctatct actaggaaga aagaaagggc caattcatct
1321 aagttttgat gttgacggac tgaacccatc tttaacacaa gctactggca caccagtggt
1381 ggaaggtctg acctacagag aaggtcttca catcacagaa gaactctaca aaacaggggt
1441 actctcagga ttagatataa tggaaagtga cccatccctg ggggaagacac cagaagaagt
1501 aactcgaaca gtgaacacag cagttgcaat aaccttggtt tgtttcggac ttgtctggga
1561 aggtaatcac aagtcattg actaattna cccacotaa agtatctgga aactccgat
1621 ataaactca tagttaatgg cataataga aagctaatca ttttctaaag catagagtta
1681 tccctctaaa gaacttgtct ttcaaaaaaa tgtttttcca attagtataa actctacaaa
1741 tccctctctg gtttaaatc caagatgtgg aaattctaac ttttttgaaa tttaaaagct
1801 tataatttct aacttgcaa aagactatc cttaaaaaa gaagtgtaca ttgatttcca
1861 attaaaaatt tgcgtgcat aaaaataagc acacttaaat aagcccccat acatagagtg
1921 ggaactcttg aatcagaga caaagctacc acatgtgaaa aggtactatg tgtccatgct
1981 attcaaaaaa tgtgattcta ga
```

1. 一种精氨酸降解酶在制备治疗肝炎药品中的应用。
2. 如权利要求 1 的应用, 其中, 所述酶是一种分离的且基本上纯化的重组精氨酸酶。
3. 如权利要求 1 的应用, 其中, 所述重组精氨酸酶的纯度为 80-100%。
4. 如权利要求 3 的应用, 其中, 所述重组精氨酸酶是人精氨酸酶 I。
5. 如权利要求 3 的应用, 其中, 所述重组精氨酸酶是精氨酸脱亚胺酶。
6. 如权利要求 4 的应用, 其中, 所述酶具有与 SEQ ID NO:1 或 SEQ ID NO: 2 基本上相同的核苷酸序列, 其中, 所述核苷酸序列编码具有与 SEQ ID NO: 3 基本上相同的氨基酸序列。
7. 如权利要求 4 的应用, 其中, 所述酶具有至少 250 I.U/mg 的酶活性。
8. 如权利要求 4 的应用, 其中, 所述酶被修饰成在血清或血浆中具有足够稳定性, 并有大约至少三日的半衰期。
9. 如权利要求 8 的应用, 其中, 所述修饰为聚乙二醇化。
10. 如权利要求 9 的应用, 其中, 所述聚乙二醇化包括透过一个偶联剂将所述酶与至少一个聚乙二醇组份共价结合。
11. 如权利要求 9 的基本上纯化的重组人精氨酸酶, 其中, 所述偶联剂是 2,4,6-三氯-s-三嗪(三聚氰氯, CC)或琥珀酰亚胺丙酸 (SPA)。
12. 如权利要求 4 的应用, 其中所述人精氨酸酶 I 的氨基末端连接 6 个组氨酸。
13. 如权利要求 1 的应用, 其中, 所述肝炎为乙型肝炎。
14. 一种药物组合物, 其包含一种精氨酸降解酶。

15. 如权利要求 14 的药物组合物, 其中, 所述精氨酸降解酶是一种分离的且基本上纯化的重组精氨酸酶。

16. 如权利要求 15 的药物组合物, 其中, 所述酶的纯度为 80-100%。

17. 如权利要求 15 的药物组合物, 其中, 所述重组精氨酸酶是人精氨酸酶 I。

18. 如权利要求 15 的药物组合物, 其中, 所述重组精氨酸酶是精氨酸脱亚胺酶。

19. 如权利要求 17 的药物组合物, 其中, 所述酶基本上具有基本上与 SEQ ID NO:1 或 SEQ ID NO: 2 相同的核苷酸序列, 其中, 所述核苷酸序列编码具有基本上与 SEQ ID NO: 3 相同的氨基酸序列。

20. 如权利要求 17 的药物组合物, 其中, 所述酶具有至少 250 I.U./mg 的酶活性。

21. 如权利要求 17 的药物组合物, 其中, 所述酶在患者血浆中的半衰期至少为 3 天。

22. 如权利要求 17 的药物组合物, 其中, 所述酶在患者血浆中的半衰期至少为 1 天。

23. 如权利要求 17 的药物组合物, 其中, 所述酶经聚乙二醇化的方法修饰。

24. 如权利要求 17 的应用, 其中所述酶的氨基末端连接 6 个组氨酸。

25. 如权利要求 14 的药物组合物, 其中所述酶能够降低患者体内精氨酸水平。

26. 如权利要求 14 的药物组合物, 其中所述酶可调节肝炎。

27. 如权利要求 24 的药物组合物, 其中所述肝炎为乙型肝炎。

28. 如权利要求 14 的药物组合物, 其中所述组合物进一步被制备成固体、液体、乳状液、悬浮液、微胶粒, 或微脂体的形式。

29. 如权利要求 14 的药物组合物, 其中所述组合物的配方是适用于口服或注射的形式。

用精氨酸酶治疗肝炎的药物组合物和方法

技术领域

本发明涉及药物组合物及其使用方法。具体地说，本发明涉及一种能够治疗肝炎的药物组合物。

背景技术

治疗肝炎的抗病毒药物有很多，目前多用以下几种：(1)干扰素：是一种广谱抗病毒剂，并不直接杀伤或抑制病毒，而主要是通过细胞表面受体作用使细胞产生抗病毒蛋白，从而抑制乙肝、丙肝病毒复制，同时还可以增强自然杀伤细胞、巨噬细胞和 T 淋巴细胞的活力，从而起到免疫调节作用并增强抗病毒能力。(2)白细胞介素-2：即 T 细胞生长因子，具有调节免疫、抗病毒、抗肿瘤作用。(3)核苷类化合物：如阿昔洛韦是一种合成的无环嘌呤核苷类化合物，可抑制多种脱氧核糖核酸病毒的增殖。(4)阿糖腺苷类：体内、体外均证明对乙肝病毒有潜在的作用。经观察用药期间部分患者的脱氧核糖核酸聚合酶阴转，生化和肝组织异常也有好转。(5)其他：促肝细胞生长素、胸腺肽、抗乙肝核糖核酸、病毒唑、左旋咪唑、香菇多糖、强力宁及植物血凝素等。然而，以上药物的疗效仍未臻理想，且易引起不良副作用。

发明内容

因此，本发明的一个方面提供一种更有效的肝炎治疗药物。具体地说，本发明提供一种选择性降低患者体内精氨酸水平的药物来治疗肝炎。

本发明的另一个方面是提供一种可降解精氨酸的酶（即精氨酸降解酶）在制药方面的应用。在一个优选的实施方案中，本发明的精氨酸降

解酶是精氨酸酶或精氨酸脱亚胺酶。在一个优选的实施方案中，本发明的精氨酸降解酶是一种分离的且基本上纯化的重组精氨酸酶。在一个更优选的实施方案中，本发明的精氨酸酶是人精氨酸酶 I。在更优选的实施方案中，本发明的人精氨酸酶 I 基本上具有与 SEQ ID NO:1 或 SEQ ID NO:2 基本上相同的核苷酸序列，其中，所述核苷酸序列编码具有与 SEQ ID NO:3 基本上相同的氨基酸序列。在另一个优选的实施方案中，本发明的重组精氨酸酶的纯度为 80-100%。在更优选的实施方案中，本发明的重组精氨酸酶的纯度为 90-100%。

在又一个实施方案中，本发明的精氨酸酶经修饰具有足够高的酶活性和稳定性以在患者体内保持 3 天的“足够的精氨酸剥夺” (adequate arginine deprivation, 以下简称 AAD)。一个优选的修饰方法是将本发明的精氨酸酶氨基末端连接 6 个组氨酸。另一个优选的修饰为聚乙二醇化 (pegylation) 以提高所述酶的稳定性使患者发生的免疫反应性最小。在更优选的实施方案中，本发明的聚乙二醇化包括透过一个偶联剂将精氨酸酶与至少一个聚乙二醇组份共价结合。在最优选的实施方案中，偶联剂是 2,4,6-三氯-s-三嗪 (三聚氰氯, CC) 或琥珀酰亚胺丙酸 (SPA)。经过修饰的精氨酸酶具有至少 250 I.U./mg 的酶活性。更优选的是具有至少 300-350 I.U./mg 的酶活性，最优选的是至少 500 I.U./mg 的酶活性。在另一个实施方案中，所述酶被修饰成在血清或血浆中具有足够稳定性，并有大约至少三日的半衰期。

在另一个优选的实施方案中，本发明提供的制药应用所制备的药品可用来治疗肝炎。在一个更优选的实施方案中，本发明提供的制药应用所制备的药品可用来治疗乙型肝炎。

本发明的另一方面涉及一种药物组合物，包含一种分离的且基本上纯化的重组精氨酸酶。在一个具体的实施方案中，本发明的药物组合物包含的重组精氨酸酶的纯度为 80-100%。在一个优选的实施方案中，重组人精氨酸酶是任何一种可降解精氨酸的酶，例如精氨酸脱亚胺酶或人

精氨酸酶 I。在更优选的实施方案中，所述酶是基本上具有核苷酸序列 SEQ ID NO:1 或 SEQ ID NO:2 的人精氨酸酶 I，其中，所述核苷酸序列编码具有 SEQ ID NO:3 的氨基酸序列。在优选的实施方案中，所述精氨酸酶具有足够高的酶活性和稳定性已在患者体内保持至少 3 天 AAD。在最优选的实施方案中，所述精氨酸酶还通过聚乙二醇化修饰以改良稳定性使免疫反应最小化。

在另一个优选的实施方案中，本发明的药物组合物能够降低患者体内精氨酸水平。在一个更优选的实施方案中，本发明的可调节肝炎。在一个最优选的实施方案中，本发明的药物组合物可以治疗乙型肝炎。在另一个实施方案中，本发明的药物组合物进一步被制备成固体、液体、乳状液、悬浮液、微胶粒、或微脂体的形式。在另一个实施方案中，本发明的药物组合物的配方是适用于口服或注射的形式。

附图说明

图 1A，1B 和 1C 是人精氨酸酶 I 的核苷酸序列及其推导的氨基酸序列。

图 1A 是质粒 pAB101 的 EcoRI/MunI 至 XbaI 位点的核苷酸序列(SEQ ID NO:1)。核苷酸(nt)1-6，EcoRI/MunI 位点；nt 481-486，启动子 1 的-35 区域；nt 504-509，启动子 1 的-10 区域；nt544-549，启动子 2 的-35 区域；nt 566-571，启动子 2 的-10 区域；nt 600-605，核糖体结合位点；nt 614-616，起始密码子；nt 632-637，NdeI 位点；nt 1601-1603，终止密码子；nt 1997-2002，XbaI 位点。

图 1B 是经修饰的人精氨酸酶的编码核苷酸序列(SEQ ID NO:2)及其相应编码的氨基酸序列 (SEQ ID NO:3)。图 1A 中核苷酸 614-1603 是修饰的精氨酸酶氨基酸序列的编码区。N 末端的 6 组氨酸(SEQ ID NO:4)标

记以下划线标示。翻译终止密码子以*标示。

图 1C 是正常人精氨酸酶 I 的编码核苷酸序列 (SEQ ID NO:8) 及其相应编码的氨基酸序列 (SEQ ID NO:9)。

具体实施方案

本发明所用术语“聚乙二醇化精氨酸酶”是指通过聚乙二醇化修饰的本发明精氨酸酶 I (见专利申请 WO2004/001048 的说明书), 以提高所述酶的稳定性及使免疫反应性最小化。

本发明所用术语“基本相同”无论是针对 DNA 的核苷酸序列, RNA 的核糖核苷酸序列, 还是蛋白质的氨基酸序列, 均是指与本发明所揭示的实际序列有微小的及非相因而生的序列变化的序列。具有基本相同序列的种类被认为与所揭示序列相等价并包含在所附权利要求范围内。在此方面, “微小的及非相因而生的序列变化”是指与本文所揭示的和/或权利要求的 DNA, RNA 或蛋白质基本相同的序列与本文揭示的和/或权利要求的序列功能等价。功能等价序列以基本相同的方式起作用, 产生与本文所揭示的和权利要求的核酸和氨基酸组合物基本相同的组合物。特别地, 功能相等的 DNA 编码与本文所揭示的那些蛋白质相同的蛋白质, 或者编码具有保守氨基酸变化的蛋白质, 所述变化如用一个非极性残基取代另一个非极性残基, 或者用一个带电残基取代另一个相似带电的残基。这些变化包括本领域技术人员已知的那些基本不改变蛋白质三级结构的变化。术语“足够高的酶活性”是指重组人精氨酸酶的酶比活性为至少 250 I.U./mg, 优选至少 300-350 I.U./mg, 更优选至少 500 I.U./mg。在一个优选的实施方案中, 所述精氨酸酶的比活性为 500—600 I.U./mg。术语“稳定性”是指所述精氨酸酶在体外的稳定性。更优选地, 所述稳定性是指在体内的稳定性。酶活性降低率与分离的纯化的重组人精氨酸酶的血浆稳定性成反比。这种关系可从人精氨酸酶在血浆中的半衰期反映出来。

本发明所用术语“足够的精氨酸剥夺(AAD)”是指体内精氨酸水平为 $10\ \mu\text{M}$ 或低于 $10\ \mu\text{M}$ 。本发明所用术语“半衰期”是指所述精氨酸酶在体外人血浆中的浓度降至一半所需的时间。

所有其他本说明书未提及的技术手段与术语释义等资料，皆可在专利申请 WO2004/001048 和 WO2004/000349 的说明书找到。

为研究精氨酸酶的抗乙型肝炎病毒的作用，本发明在乙型肝炎病毒基因转染的人肝癌细胞系 2.2.15 细胞中，研究了精氨酸酶对细胞的毒性，对 HBsAg 和 HBeAg 分泌以及对 HBV-DNA 的抑制作用。并以英国葛兰素威康公司生产的抗乙型肝炎病毒药拉米夫定作为阳性对照进行了比较。结果显示：聚乙二醇化重组精氨酸酶的半数中毒浓度 (TC50) CPE 法加药 8 天为 40IU/ml ，最大无毒浓度(TC0)为 $20\pm 0\ \text{IU/ml}$ 。无毒浓度 20IU/ml 二批实验对细胞 HBeAg 的分泌抑制率为 68.69 ± 8.89 ，IC50 为 $6.37\pm 0.45\text{IU/ml}$ ，SI 为 6.30 ± 0.45 。对细胞 HBsAg 的分泌抑制率为 29.81 ± 27.35 ，IC50 为 10.72IU/ml (一批实验)，SI 为 3.73(一批实验)。对细胞培养上清液内 HBV-DNA 斑点杂交 IC50 为 $13.18\pm 0.45\ \text{IU/ml}$ ，选择指数为 3.19 ± 0.98 。对细胞内的 HBV-DNA Southern Blot Sum 的 IC50 为 $19.79\pm 7.95\ \text{IU/ml}$ ，选择指数为 2.91 ± 0.88 。对细胞内的 HBV-DNA Southern Blot In Lane 的 IC50 为 $20.06\pm 1.96\ \text{IU/ml}$ ，选择指数为 2.00 ± 0.20 。阳性对照拉米夫定的半数中毒浓度 (TC50) 和最大无毒浓度(TC0)分别为 1198.97 ± 97.50 和 $800\pm 0\ \mu\text{g/ml}$ 。最大无毒浓度药液 $800\ \mu\text{g/ml}$ 加入 2.2.15 细胞培养 8 天，对 HBeAg 和 HBsAg 的分泌无明显抑制作用。对细胞培养上清液的 HBV-DNA 斑点杂交的 IC50 为 $113.76\ \mu\text{g/ml}$ ，选择指数 SI 为 10.54。对细胞的 HBV-DNA Southern Blot Sum 抑制的 IC50 为 $88.78\pm 6.37\ \mu\text{g/ml}$ ，选择指数 SI 为 13.54 ± 0.97 ，与多次实验和文献一致，说明实验可靠。结果提示：精氨酸酶对 2.2.15 细胞分泌 HBsAg 和 HBeAg 以及细胞 HBV-DNA 明显抑制作用。

实施例1 试验材料的准备

1.1 受试药

名称：聚乙二醇化重组人精氨酸酶(BCT-100)，以下简称“精氨酸酶”。所述酶具有图1A,1B和1C所表示的核苷酸序列及其推导的氨基酸序列。

制备方法：请参考 WO2004/001048 说明书实施例 1-8。在 WO2004/001048 的最早申请日之前，可向 Ikemoto Masaki 教授于日本的实验室取得重组人精氨酸酶（京都大学；通信地址：53 Kawahara-cho, Shogoin, Sakyo-ku, Kyoto-shi, Kyoto 606-8507 Japan）。待测药物实验时根据所设计剂量组浓度用 MEM 培养液配制。

保存条件：4℃冰箱保存。

1.2 阳性对照药：拉米夫定 英国葛兰素威康公司生产，批号：B008923，每片含量 100mg，药物经培养液浸泡、溶解，离心去沉淀。实验时根据所设计剂量组浓度用 MEM 培养液配制。保存条件：4℃冰箱保存。

1.3 2.2.15 细胞：乙型肝炎病毒(HBV)基因转染人肝癌细胞(Hep G2)的 2.2.15 细胞系，美国 Mount Sinai 医学中心构建，我室引进后自行传代培养。

1.4 试剂：Eagles MEM 干粉、G-418(Geneticin)、酵母 t-RNA、蛋白酶 K,美国 GIBCO 公司产品；

胎牛血清，美国 Hyclone Lab 公司产品；

L-谷氨酰胺，京科化学试剂公司进口分装；

HBsAg、HBeAg 固相放免测定盒，中国同位素公司北方免疫试剂研究所；

卡那霉素，华北制药厂产品；
聚乙二醇，瑞典 Fluka 产品；
二甲基亚砷，SIGMA 公司产品
d-³²p-dCTP，北京亚辉生物医学工程公司产品；

1.5 实验用品及仪器：培养瓶，丹麦 Tunclon TM；
培养板 96 孔板、24 孔板、6 孔板美国 Corning 公司产品；
二氧化碳孵箱，美国 Shel-Lab 产品；
γ-计数器，德国 BECKMAN 产品；
扫描仪：MICROTEK 产品；
gel-pro analyzer 软件：MEDIA Cybemetice®产品；

1.6 细胞培养液及试剂配制

MEM 培养液 100ml：含胎牛血清 10%，谷氨酰胺 0.03%，G418 380μg/ml，卡那霉素 50μg/ml。

1.7 2.2.15 细胞培养

在长满 2.2.15 细胞的培养瓶内加 0.25%胰酶，37℃消化 10 分钟，加培养液吹散，1:3 传代，10 天长满。

实施例 2：精氨酸酶对细胞毒性试验

实验分对照组和不同药物浓度药物组。细胞消化，配制成每毫升 20 万个细胞，接种培养板，96 孔板每孔 100μl，37℃ 5% CO₂ 培养 24 小时，细胞长成单层后进行实验。精氨酸酶用培养液配制成 40IU/ml 溶液，2 倍稀释 20、10、5、2.5 IU/ml 加入 96 孔细胞培养板，共 5 个稀释度，每浓度 3 孔，每 4 天换同浓度药液，以观察细胞病变为指标，8 天或 4 天显微镜下观察细胞病变，完全破坏为 4；75%为 3；50%为 2；25%为 1；无病

变为 0。按 Reed- Muench 法计算半数有毒浓度(TC50)和最大无毒浓度(TC0)。

$$TC50 = \text{Antilog} \left(B + \frac{50 - B}{A - B} \times C \right)$$

A=log>50%药物浓度 B=log<50%药物浓度 C=log 稀释倍数

实施例 3：精氨酸酶对 HBeAg、HBsAg 抑制试验

试验设 HBsAg、HBeAg 阳性对照组，阴性对照组，细胞对照组及不同药物浓度药物组。2.2.15 细胞每毫升 20 万个接种 24 孔细胞培养板，每孔 1ml，37℃ 5% CO₂ 培养 24 小时，实验药液无毒浓度以下 2 倍稀释，5 个稀释度分别为精氨酸酶 20、10、5、2.5、1.25 IU/ml，拉米夫定为 800、400、200、100、50μg/ml，每浓度 4 孔，37℃ 5% CO₂ 培养，每 4 天换原浓度药液培养，第 8 天时收获培养液，-20℃ 冰冻保存。试验重复二批，分别测定 HBsAg 和 HBeAg。用 γ-计数器测定每孔 cpm 值。

药物效果计算：计算细胞对照及实验药每浓度 cpm 均值及标准差，P/N 值和抑制百分率(%),半数有效浓度(IC50)及选择指数(SI)。

$$\text{① 抗原抑制百分率(\%)} = \frac{\text{细胞对照 cpm} - \text{给药组 cpm}}{\text{细胞对照 cpm}} \times 100$$

② 计算药物抑制抗原半数有效浓度(IC50):

$$IC50 = \text{Antilog} \left(B + \frac{50 - B}{A - B} \times C \right)$$

A=log>50%药物浓度 B=log<50%药物浓度 C=log 稀释倍数

③精氨酸酶在 2.2.15 细胞培养内对 HBsAg 和 HBeAg 的选择指数(SI), 按其对细胞毒性指标细胞病变(SI)计算。

$$SI = \frac{\text{细胞病变毒性 TC50}}{\text{IC50}}$$

④以 t 检验法计算各稀释度 HBsAg、HBeAg 和对照组间 cpm 差别的统计学意义。

实施例 4：精氨酸酶 对 2.2.15 细胞 DNA 抑制实验

2.2.15 细胞上清中 HBV-DNA 提取：2.2.15 细胞每毫升 20 万个接种 24 孔细胞培养板，每孔 1ml，接种后 24 小时加入药物，每 4 天换原浓度药液培养，加药后培养第 8 天收取上清液，经聚乙二醇沉淀、蛋白酶 K 裂解、苯酚：氯仿：异戊醇抽提、无水乙醇沉淀核酸等步骤，真空抽干，重溶于 TE 缓冲液中作样品。

斑点杂交：点样：取 20ul (DNA 含量 25ug), 经变性、中和，并以 20X SSC 缓冲液对倍稀释至 1:8 倍稀释于硝酸纤维素膜上，并经干烤、预杂交、杂交、洗膜、放射自显影等步骤。以常规方法冲洗 X 光片。扫描仪扫描光片，用 gel-pro 软件测定密度，计算抑制率及 IC50。

$$\text{2.2.15 细胞培养液中 HBV-DNA 抑制} = \frac{\text{IOD-TIOD}}{\text{CIOD}} \times 100\%$$

Southern blot：2.2.15 细胞内 HBV-DNA 提取：2.2.15 细胞加药后培养 8 天，吸除培养液收取细胞，细胞经裂解液裂解，等体积苯酚：氯仿：异戊醇抽提 2 次，加无水乙醇沉淀核酸，真空抽干，重溶于 20ul TE 缓冲液中，加入 DNA 样品缓冲液，将样品加于琼脂糖胶上电泳。电泳后依次经变性、中和、转膜后。同斑点杂交膜一同进行烤膜、杂交、曝光。扫

描仪扫描光片，以 gel-pro 凝胶分析软件分析相对密度，计算抑制率及 IC50。

结果

细胞培养毒性按 Reed-Muench 法计算半数有毒浓度(TC50)和最大无毒浓度(TC0)。对 HBsAg 和 HBeAg 抑制效果按所列公式计算，对 HBV-DNA 抑制效果以 gel-pro 凝胶分析软件分析光片相对密度，计算抑制率及 IC50。

1.精氨酸酶在 2.2.15 细胞培养中的细胞毒性

为观察精氨酸酶对乙型肝炎病毒基因转染的人肝癌 2.2.15 细胞的毒性，在接种 2.2.15 细胞后 24 小时，加 2 倍稀释药液。40 IU/ml 开始：20、10、5、2.5 IU/ml，4 天换一次药液，维持 8 天，用显微镜观察细胞病变，镜检 CPE，结果：精氨酸酶对乙型肝炎病毒基因转染的人肝癌 2.2.15 细胞毒性实验 CPE 法（加药 8 天）：二批实验半数中毒浓度（TC50）为 40 IU/ml，最大无毒浓度(TC0)为 $20 \pm 0 \mu\text{g/ml}$ 。阳性对照拉米夫定半数中毒浓度(TC50)为： $1198.97 \pm 97.50 \mu\text{g/ml}$ 。最大无毒浓度(TC0)为： $800 \pm 0 \mu\text{g/ml}$ 。（见表 1A.）

2. 精氨酸酶对 HBeAg、HBsAg 抑制试验

精氨酸酶和阳性对照药拉米夫定最大无毒浓度加入 2.2.15 细胞培养中，第 8 天测定 HBsAg 和 HBeAg 表达的 cpm 值，计算药物抑制效果。实验结果见表 2.。

2.1. 精氨酸酶 对 HBeAg 的抑制率

精氨酸酶两批实验：自最大无毒浓度 20IU/ml，2 倍稀释 10、5、2.5、1.25 IU/ml 各浓度组对 2.2.15 细胞培养第 8 天上清液 HBeAg 的平均抑制

率分别为:20 IU/ml 抑制 $68.69 \pm 8.89\%$; 10 IU/ml 抑制 $60.73 \pm 17.49\%$; 5 IU/ml 抑制 $53.96 \pm 20.36\%$; 2.5 IU/ml 抑制 $51.83 \pm 14.16\%$; 1.25 IU/ml 抑制 37.34% 。平均半数有效浓度(IC_{50})为 6.37 ± 0.45 IU/ml, 选择指数(SI)为 6.30 ± 0.45 。

2.2. 精氨酸酶对 HBsAg 的抑制率

精氨酸酶第 1 批实验: 20、10、5、2.5、1.25 IU/ml 各浓度组对 2.2.15 细胞培养第 8 天上清液 HBsAg 的抑制率分别为 49.16%, 47.97%, 42.29% 和 37.18%, 半数有效剂量(IC_{50})为 10.72 IU/ml, 选择指数为 3.7.3。但第 2 批试验抑制率较低, 最大无毒浓度 20 IU/ml 对 HBsAg 抑制%未达 50%, $IC_{50} > 20$ IU/ml。

2.3. 拉米夫定对 HBsAg 和 HBeAg 的作用

拉米夫定自最大无毒浓度 800 μ g/ml 开始 2 倍稀释、400、200、100、50 μ g/ml 加入 2.2.15 细胞培养体系中, 第 8 天测定培养液 HBsAg 和 HBeAg 滴度, 计算抑制效果 (见表 1B)。

2.4. 拉米夫定对 HBeAg 的抑制率

两批试验拉米夫定 800、400、200、100、50 μ g/ml 各浓度组对 2.2.15 细胞培养第 8 天上清液 HBsAg 的平均抑制率为: $8.23 \pm 3.02\%$ 、 $12.99 \pm 0.46\%$ 、 $17.83 \pm 2.09\%$ 、 $15.84 \pm 2.33\%$ 、 $14.10 \pm 1.27\%$ 。无明显抑制作用。

2.5. 拉米夫定对 HBsAg 的抑制率

两批试验拉米夫定 800、400、200、100、50 μ g/ml 各浓度组对 2.2.15 细胞培养第 8 天上清液 HBeAg 的平均抑制率分别为: $4.65 \pm 6.58\%$ 、 $4.05 \pm 5.73\%$ 、 $5.67 \pm 4.70\%$ 、 $8.60 \pm 4.88\%$ 、 $3.45 \pm 3.95\%$ 。无明显抑制作用。

表 1A.精氨酸酶在 2215 细胞培养内对 HBsAg 和 HBeAg 的抑制作用 (%)

药物名	实验批次	加药天	药物浓度 IU/ml	HBeAg (CPM)			HBsAg (CPM)		
				抑制%	IC50 IU/ml	SI	抑制%	IC50 IU/ml	SI
精氨酸酶	1	8	20	74.9808	6.69	5.98	49.1558	10.72	3.73
			10	73.0985			47.9651		
			5	68.3484			42.2871		
			2.5	61.8387			37.1787		
	2	8	20	62.4033	6.05	6.61	10.4731	>20.00-	-
			10	48.3596			6.0761		
			5	39.5618			1.4739		
			2.5	41.8149			2.6703		
			1.25	37.3426			4.463		
	二批实验平均		20	68.69±8.89	6.37±0.45	6.30±0.45	29.81±27.35	第 1 批	
			10	60.73±17.49			27.02±29.62	10.72	
			5	53.96±20.36			21.88±28.86	第 2 批	
			2.5	51.83±14.16			19.92±24.40	>20	
			1.25	37.34			4.46	未平均	

表 1B. 拉米夫定在 2215 细胞培养内对 HBsAg 和 HBeAg 的抑制作用(%)

药物	实验批次	加药	药物浓度 $\mu\text{g/ml}$	HBeAg (CPM)			HBsAg (CPM)		
				抑制%	IC50 $\mu\text{g/ml}$	SI	抑制%	IC50 $\mu\text{g/ml}$	SI
拉米夫定	1	8	800	6.10	>800		0	>800	
			400	12.67			8.10		
			200	16.35			2.35		
			100	17.48			12.05		
			50	13.20			6.24		
	2	8	800	10.37	>800		9.299	>800	
			400	13.32			0		
			200	19.31			8.99		
			100	14.19			5.15		
			50	14.99			0.65		
	二批实验平均	8	800	8.23 $\pm$ 3.02	>800 $\pm$ 0 最大无毒浓度 800 $\mu\text{g/ml}$		4.65 $\pm$ 6.58	>800 $\pm$ 0 最大无毒浓度 800 $\mu\text{g/ml}$	
			400	12.99 $\pm$ 0.46			4.05 $\pm$ 5.73		
			200	17.83 $\pm$ 2.09			5.67 $\pm$ 4.7		
			100	15.84 $\pm$ 2.33			8.6 $\pm$ 4.88		
			50	14.10 $\pm$ 1.27	无明显抑制		3.45 $\pm$ 3.95	无明显抑制作用	

3. 精氨酸酶和拉米夫定对 2.2.15 细胞培养上清液 HBV-DNA 的抑制作用

3.1 精氨酸酶在 2.2.15 细胞培养上清液中 HBV-DNA 斑点杂交

精氨酸酶在 2.2.15 细胞培养上清液中对 HBV-DNA 的作用,加药后培养 8 天两批实验原液对 HBV-DNA 的 IC50 分别为 16.04、10.31IU/ml, 平均 IC50 为 13.18 $\pm$ 4.05 IU/ml, 选择指数分别为 2.49、3.88, 平均: 3.19 $\pm$ 0.98。结果见 (表 2.)。

表 2.精氨酸酶在 2.2.15 细胞培养上清液中对 HBV-DNA 的作用

实验 批次	加药 天数	药物浓度 ($\mu\text{g/ml}$)	细胞上清液HBV-DNA稀释倍数/抑制率%			
			原液 (IOD)	抑制率%	IC50($\mu\text{g/ml}$)	SI
1	8	20	1643.3	30.8113	16.04	2.49
		10	1680.6	29.2409		
		5	2090.38	11.9877		
		2.5	1783.34	24.9152		
		细胞对照	2375.1			
2	8	20	2430.14	47.7577	10.31	3.88
		10	2881.48	38.0549		
		5	2613.11	43.8243		
		2.5	4118.31	11.466		
		1.25	3917.78	15.7769		
		细胞对照	4651.67			
两批平均					13.18 $\pm$ 4.05	3.19 $\pm$ 0.98

3.2 拉米夫定在 2.2.15 细胞培养中对上清液中 HBV-DNA 的作用

拉米夫定一批实验对 2.2.15 细胞上清液内 HBV-DNA 的作用,IC50 为 113.76 $\mu\text{g/ml}$, TC50 为 1198.97 $\pm$ 97.50 $\mu\text{g/ml}$, 选择指数为 10.54。结果见表 3。

药物 名称	加药 天数	药物浓度 ($\mu\text{g/ml}$)	细胞上清液HBV-DNA稀释倍数/抑制率%			
			CPM	抑制率%	IC50 ($\mu\text{g/ml}$)	SI
拉米 夫定	8	800	663.013	82.5905	113.76	10.54
		400	795.628	79.1083		
		200	1080.03	71.6404		
		100	1465.31	61.5237		
		50	2831.21	25.6576		
		细胞对照	3808.34			

表 3. 拉米夫定在 2.2.15 细胞培养中对上清液中 HBV-DNA 的作用

3.3. 精氨酸酶和拉米夫定在 2.2.15 细胞内对 HBV—DNA Southern Blot 的抑制作用

3.3.1 精氨酸酶在 2.2.15 细胞内对 HBV—DNA 的 Southern Blot 抑制作用

结果表明：精氨酸酶加药后培养 8 天对 2.2.15 细胞内总 HBV-DNA Southern 印迹测定的总的抑制作用：二批实验 IC₅₀ 分别为 25.42、14.17IU/ml，平均 IC₅₀ 为 19.79±7.95IU/ml,选择指数分别为 1.57、2.82，平均：2.19±0.88。对 2.2.15 细胞内总 HBV-DNA Southern 印迹测定的 In Lane 的抑制作用：二批实验 IC₅₀ 分别为 21.45、18.67IU/ml，平均 IC₅₀ 为 20.06±1.96IU/ml,选择指数分别为 1.86、2.14，平均：2.00±0.20。结果见表 4.

表 4.精氨酸酶在 2.2.15 细胞内 HBV—DNA Southern Blot 的抑制作用

实验 批次	加药 天数	药物浓度 IU/ml	Sum (IOD)	抑制率%	IC50 μg/ml	SI	In Lane (IOD)	抑制率%	IC50 IU/ml	SI
1	8	20	25011	14.9893	25.42	1.57	31436	25.2982	21.45	1.86
		10	24234	17.6303			32499	22.7722		
		5	20104	31.6679			28796	31.5717		
		2.5	21650	26.4131			28762	31.6525		
		细胞对照	29421				42082			
2	8	20	34433	47.9416	14.17	2.82	46760	38.6255	18.67	2.14
		10	46884	29.1172			66241	13.0559		
		5	46283	30.0259			61655	19.0752		
		2.5	68619	0			88350	38.6255		
		细胞对照	66143				76188			

3.3.2 拉米夫定在 2.2.15 细胞内 HBV—DNA 的 Southern Blot 抑制作用

结果表明：拉米夫定对 2.2.15 细胞培养的细胞内总 HBV-DNA Southern 印迹测定总的抑制作用，两批实验 IC₅₀ 分别为：84.27 和 93.28μg/ml，平均为 88.78±6.37μg/ml，TC₅₀ 为 1198.97μg/ml，SI 分别为 14.23 和 12.85，平均为 13.54±0.97 (见表 5)。

表 5. 拉米夫定在 2.2.15 细胞内 HBV—DNA Southern Blot 的抑制作用

实验 批次	加药 天数	药物浓度 ($\mu\text{g/ml}$)	Sum (IOD)	抑制率%	IC50 $\mu\text{g/ml}$	SI
1	8	800 $\mu\text{g/ml}$	143.91	90.50	84.27	14.23
		400	317.332	70.04		
		200	366.35	75.80		
		100	491.77	67.52		
		50	748.91	50.54		
		细胞对照	1514.08			
2	8	800 $\mu\text{g/ml}$	509.85	79.01	93.28	12.85
		400	804.63	66.87		
		200	589.01	75.75		
		100	1002.21	58.74		
		50	710.239	70.76		
		细胞对照	2428.92			
两批平均					88.78 $\pm$ 6.37	13.54 $\pm$ 0.97

讨论

本试验在乙型肝炎病毒转染人肝癌细胞 2215 细胞系培养中观察了精氨酸酶和抗乙型肝炎病毒阳性对照药物拉米夫定加药后培养 8 天对细胞的毒性, 对 HBsAg 和 HBeAg 分泌及细胞培养上清和细胞内 HBV-DNA 的抑制作用, 总结见表 6。

表 6. 精氨酸酶和拉米夫定在 2.2.15 细胞培养内对 HBV 抑制作用总结表

药品	细胞毒性		HBeAg		HBsAg		细胞上清 HBV-DNA		细胞 HBV-DNA (Southern Blot)			
	IU/ml											
	TC50	TC0	IC50 IU/ml	SI	IC50 IU/ml	SI	IC50 $\mu\text{g/ml}$	SI	IC50 $\mu\text{g/ml}$	SI	IC50 $\mu\text{g/ml}$	SI
精氨酸酶	40	20 $\pm$ 0	6.37 $\pm$ 0.45	6.30 $\pm$ 0.45	①10.72 ②>20	①3.73 ② $\leq$ 1	13.18 $\pm$ 4.05	3.19 $\pm$ 0.98	19.79 $\pm$ 7.95	2.19 $\pm$ 0.88	20.06 $\pm$ 1.96	2.00 $\pm$ 0.20
拉米夫定	1198.97 $\pm$ 97.50	800 $\pm$ 0 $\mu\text{g/ml}$	>800 $\mu\text{g/ml}$		-		>800 $\mu\text{g/ml}$	-	113.76	10.54	88.78 $\pm$ 6.37	13.54 $\pm$ 0.97

注: ①第 1 批实验, ②第 2 批实验

1. 精氨酸酶对 2.2.15 细胞培养的毒性

精氨酸酶半数中毒浓度 (TC50) 为: 40 IU/ml, 无毒浓度(TC0)为 20±0 IU/ml。

阳性对照拉米夫定的半数中毒浓度 (TC50) 为: 1198.97±97.50µg/ml; 无毒浓度 (TC0) 为: 800±0µg/ml。

2. 精氨酸酶和拉米夫定在 2.2.15 细胞培养内对 HBsAg 和 HBeAg 的分泌的抑制作用

精氨酸酶最大无毒浓度 20 IU/ml 以下 2 倍稀释 4 个浓度分别加入 2.2.15 细胞培养 8 天, 两批实验平均对 HBeAg 分泌的抑制率为 68.69±8.89%, 对 HBeAg 的半数有效浓度 (IC50) 为: 6.37±0.45 IU/ml, 选择指数 (SI) 为: 6.30±0.45。对 HBsAg 分泌的抑制率为 29.81±27.35%, 对 HBsAg 的半数有效浓度 (IC50): 第 1 批为: 10.72 IU/ml, 选择指数 (SI) 为: 3.73, 第 2 批 20 IU/ml。

抑制率未达 50%, IC50 >20 IU/ml, SI: ≤1。两批试验未作平均。

拉米夫定最大无毒浓度药液 800µg/ml 加入 2.2.15 细胞培养 8 天, 对 HBeAg 和 HBsAg 的分泌无明显抑制作用。不能计算半数有效浓度和选择指数。

3. 精氨酸酶和拉米夫定在 2.2.15 细胞培养内对 HBV-DNA 抑制作用

结果表明: 精氨酸酶对细胞培养上清内 HBV-DNA 斑点杂交加药 8 天 IC50 为 13.18±4.05 IU/ml, 选择指数为 3.19±0.98。对细胞内的 HBV-DNA Southern Blot 加药 8 天 Sum 的 IC50 为 19.79±7.95 IU/ml, 选择指数为 2.19±0.88。对细胞内的 HBV-DNA Southern Blot 加药 8 天 In Lane 的 IC50 为 20.06±1.96µg/ml, 选择指数为 2.00±0.20。

拉米夫定对细胞培养上清的 HBV-DNA 斑点杂交的 IC50 为

113.76 $\mu\text{g/ml}$, SI 为: 10.54。Southern 印迹测定总的抑制作用, 两批实验 IC50 分别为: 84.27 和 93.28 $\mu\text{g/ml}$, 平均为 $88.78\pm6.37\mu\text{g/ml}$, TC50 为 1198.97 $\mu\text{g/ml}$, SI 分别为 14.23 和 12.85, 平均为 13.54 ± 0.97 。

必需注意本文所用的及在权利要求中所用的单数形式术语“一个”“这个”除非特别指出, 还包括复数形式。因此, 例如“一种药物制品”包括不同制品的混合物, “治疗方法”包括本领域技术人员已知的等价的步骤和方法等等。

除非另外指出, 本文所用所有技术和科学术语具有与本领域技术人员通常理解的相同的含义。尽管与本文所述的那些相似或相同的任何方法和材料可以用于本发明的实践和测试中, 但本文描述了优选的方法和材料。本文提及的所有出版物在此并入参考, 以阐述和揭示与所引用的内容相关联的特殊内容。本发明已经充分地进行了描述, 本领域技术人员可以在本发明范围内对其加以修改。所有这种修改包含在本发明的范围内。

本发明的药物组合物的配方可以是固体, 溶液, 乳液, 分散液, 胶囊, 脂质体等形式使用, 其中在本发明的实际应用中所得配方含有一或多种修饰的人精氨酸酶作为活性成分, 与适于肠道或非肠道施用的有机或无机载体或赋形剂混合。所述活性成分可以是精氨酸酶, 例如伴有用于片剂、小丸、胶囊、栓剂、溶液、乳液、悬浮液和适于生产固体、半固体或液体形式制剂的任何其它形式的常规非毒性的药物可接受的载体。除了辅助剂之外, 还可以使用稳定剂, 增稠剂和色素及香味剂。所述药物配方中包含的一或多种精氨酸酶活性成分的量足以对靶过程、症状或疾病产生所需作用。

含有本发明活性成分的药物配方可以是适于口服形式的, 例如片剂, 口含片 (troches), 锭剂, 水性或油性悬浮液, 分散粉末或颗粒, 乳液, 硬或软胶囊, 或糖浆或酏剂。口服配方可以根据本领域已知生产药物配方的任何方法制备。片剂可以无包衣, 或者可以通过已知技术包衣, 以延迟

在胃肠道中的崩解和吸收，从而在更长的时间内提供持续作用。它们也可以包衣形成渗透性治疗片剂以控制释放。

在一些情况中，口服配方可以是硬明胶胶囊，其中活性成分与惰性固体稀释剂例如碳酸钙，磷酸钙，高岭土等混合。它们也可以是软明胶胶囊形式，其中活性成分与水或油介质例如花生油、液体石蜡或橄榄油混合。

所述药物配方也可以是无菌注射溶液或悬浮液。这种悬浮液可以根据已知方法配制，使用适当的分散或增湿剂或悬浮剂。所述无菌注射制品也可以是在无毒肠道外可接受的稀释剂或溶剂中的无菌注射溶液或悬浮液，例如于1,4-丁二醇中的溶液。无菌的不易挥发的油常规用作溶剂或悬浮介质。为此目的可以应用任何柔和的不易挥发油，包括合成的甘油一酯或甘油二酯，脂肪酸（包括油酸），天然植物油如芝麻油，椰子油，花生油，棉花子油，或者合成的脂肪酸载体，如油酸乙酯等。如果需要，可以掺入缓冲剂，葡萄糖溶液防腐剂，抗氧化剂等或者它们可以用作溶质以溶解可溶的酶。

所述药物配方也可以作为辅助治疗剂，与其它化疗剂一起使用。

图. 1A

```
1  gaattgtacg tcaaagagat gaagcagaaa aacgtcgtcg agaagaagct gaacgacaaa
61  aagtgaaatg cgaggggaagt ccaagaaatg gtgattatga ggggtgtctat ttcaccaaaa
121 acggagaata tttattggaa ttaagagtct ctgggactgc tcttgtaaata gctccttgta
181 atttaaagga tattgacata acgaaatggt tgtgtaaaac agggagatta tatcttgata
241 aggttaagaa atttgaaata gttactattc tttcccatga cgtagaaaat caaaagatta
301 taacagaatg ggagtcactc ccagagagg ctttaccgga acaatttgat tcataagaac
361 taattagtag cgctttccaa tggaggcgct tttttatttg ggtagttgca taccactaaa
421 gatgttcagg tgcacatgag cattggagga aaggaaacgt ttagggggaa gggaaacctt
481 taaacagctct taatccccct tgattttatg ttctctgtaa actgcgtccg gtaaatctca
541 ggatagacaa tcggcggtta acggcttgag tgcgggggca gtttagaaaag aatatgattg
601 gagggattca tagatgcatc accatcacca tcatatgagc gccaaagtcca gaaccatagg
661 gattattgga gctcctttct caaagggaca gccacgagga ggggtggaag aaggccctac
721 agtattgaga aaggctggtc tgcttgagaa acttaaagaa caagagtgtg atgtgaagga
781 ttatggggac ctgccctttg ctgacatccc taatgacagt ccctttcaaa ttgtgaagaa
841 tccaaggtct gtgggaaaag caagcgagca gctggctggc aagggtggcac aagtcaagaa
901 gaacggaaga atcagcctgg tgctgggcgg agaccacagt ttggcaattg gaagcatctc
961 tggccatgcc aggggtccacc ctgatcttgg agtcatctgg gtggatgctc acactgatat
1021 caacactcca ctgacaacca caagtggaaa cttgcatgga caacctgtat ctttctcctc
1081 gaaggaaacta aaaggaaaaga ttcccgatgt gccaggattc tcctgggtga ctccctgtat
1141 atctgccaaag gatattgtgt atattggctt gagagacgtg gaccctgggg aacactacat
1201 tttgaaaact ctaggcatta aatacttttc aatgactgaa gtggacagac taggaattgg
1261 caaggtgatg gaagaaacac tcagctatct actaggaaga aagaaaaggc caattcatct
1321 aagttttgat gttgacggac tggacccatc tttcacacca gctactggca caccagtcgt
1381 gggaggtctg acatacagag aaggtctcta catcacagaa gaaatctaca aaacagggct
1441 actctcagga ttagatataa tggaagtgaa cccatccctg gggaaagacac cagaagaagt
1501 aactcgaaca gtgaacacag cagttgcaat aaccttggct tgtttcggac ttgctcggga
1561 gggtaatcac aagcctattg actaccttaa cccacctaag taaatgtgga aacatccgat
1621 ataaatctca tagttaatgg cataattaga aagctaatac ttttcttaag catagagtta
1681 tccttctaaa gacttgttct ttcagaaaaa tgtttttcca attagtataa actctacaaa
1741 ttcctctctg gtgtaaaatt caagatgtgg aaattctaac ttttttgaag tttaaaagct
1801 tatattttct aacttggcaa aagacttatc cttagaaaga gaagtgtaca ttgatttcca
1861 attaaaaatt tgctggcatt aaaaataagc acacttacat aagcccccac acatagagtg
1921 ggactcttgg aatcaggaga caaagctacc acatgtggaa aggtactatg tgtccatgtc
1981 attcaaaaaa tgtgattcta ga
```

图. 1B

```
1 atgcatcaccatcaccatcat
  M H H H H H H
22 atgagcgccaagtccagaaccatagggattattggagctcctttc
  M S A K S R T I G I I G A P F
67 tcaaagggacagccacgaggaggggtggaagaaggccctacagta
  S K G Q P R G G V E E G P T V
112 ttgagaaaggctggtctgcttgagaaacttaagaacaagagtgt
  L R K A G L L E K L K E Q E C
157 gatgtgaaggattatggggacctgccctttgctgacatccctaatt
  D V K D Y G D L P F A D I P N
202 gacagtcctcttcaaatgtgaagaatccaaggtctgtgggaaaa
  D S P F Q I V K N P R S V G K
247 gcaagcgagcagctggctggcaaggtggcacaagtcaagaagaac
  A S E Q L A G K V A Q V K K N
292 ggaagaatcagcctggtgctgggcgagaccacagtttggaatt
  G R I S L V L G G D H S L A I
337 ggaagcatctctggccatgccagggtccaccctgatcttgagtc
  G S I S G H A R V H P D L G V
382 atctgggtggatgctcacactgatatacaactccactgacaacc
  I W V D A H T D I N T P L T T
427 acaagtggaaacttgcatggacaacctgtatctttcctcctgaag
  T S G N L H G Q P V S F L L K
472 gaactaaaaggaaagattcccgatgtgccaggattctcctgggtg
  E L K G K I P D V P G F S W V
517 actccctgtatatctgccaaggatattgtgtatatattggcttgaga
  T P C I S A K D I V Y I G L R
562 gacgtggaccctggggaacactacattttgaaaactctaggcatt
  D V D P G E H Y I L K T L G I
607 aaatacttttcaatgactgaagtggacagactaggaattggcaag
  K Y F S M T E V D R L G I G K
652 gtgatggaagaaacactcagctatctactaggaagaaagaaaagg
  V M E E T L S Y L L G R K K R
697 ccaattcatctaagttttgatgttgacggactggacccatctttc
  P I H L S F D V D G L D P S F
742 acaccagctactggcacaccagtcgtgggaggtctgacatacaga
  T P A T G T P V V G G L T Y R
787 gaagggtctctacatcacagaagaaatctacaaaacagggtactc
  E G L Y I T E E I Y K T G L L
832 tcaggattagatataatggaagtgaacccatccctggggaagaca
  S G L D I M E V N P S L G K T
877 ccagaagaagtaactcgaacagtgaacacagcagttgcaataacc
  P E E V T R T V N T A V A I T
922 ttggcttggttgcgacttgctcgggagggtaatcacaagcctatt
  L A C F G L A R E G N H K P I
967 gactaccttaacccacctaagtaa 990
  D Y L N P P K *
```

图. 1C

```
1 atgagcgccaagtccagaaccatagggattattggagctcctttc
  M S A K S R T I G I I G A P F
46 tcaaaggacagccacgaggaggggtggaagaaggccctacagta
  S K G Q P R G G V E E G P T V
91 ttgagaaaggctggtctgcttgagaaacttaaagaacaagagtgt
  L R K A G L L E K L K E Q E C
136 gatgtgaaggattatggggacctgccctttgctgacatccctaata
  D V K D Y G D L P F A D I P N
181 gacagtcctctttcaaattgtgaagaatccaaggtctgtgggaaaa
  D S P F Q I V K N P R S V G K
226 gcaagcgagcagctggctggcaaggtggcacaagtcaagaagaac
  A S E Q L A G K V A Q V K K N
271 ggaagaatcagcctggtgctggcgagaccacagtttggcaatt
  G R I S L V L G G D H S L A I
316 ggaagcatctctggccatgccagggtccaccctgatcttgagtc
  G S I S G H A R V H P D L G V
361 atctgggtggatgctcacactgatatacaactccactgacaacc
  I W V D A H T D I N T P L T T
406 acaagtggaaacttgcatggacaacctgtatctttcctcctgaag
  T S G N L H G Q P V S F L L K
451 gaactaaaaggaaagattcccgatgtgccaggattctcctgggtg
  E L K G K I P D V P G F S W V
496 actccctgtatatctgccaaggatattgtgtatattggcttgaga
  T P C I S A K D I V Y I G L R
541 gacgtggaccctggggaacactacatcttggaaaactctaggcatt
  D V D P G E H Y I L K T L G I
586 aaatacttttcaatgactgaagtggacagactaggaattggcaag
  K Y F S M T E V D R L G I G K
631 gtgatggaagaaacactcagctatctactaggaagaaagaaaagg
  V M E E T L S Y L L G R K K R
676 ccaattcatctaagttttgatgttgacggactggacccatctttc
  P I H L S F D V D G L D P S F
721 acaccagctactggcacaccagtcgtgggaggtctgacatacaga
  T P A T G T P V V G G L T Y R
766 gaaggtctctacatcacagaagaaatctacaaaacagggtactc
  E G L Y I T E E I Y K T G L L
811 tcaggattagatataatggaagtgaacccatccctggggaagaca
  S G L D I M E V N P S L G K T
856 ccagaagaagtaactcgaacagtgaacacagcagttgcaataacc
  P E E V T R T V N T A V A I T
901 ttggcttggttcggacttgctcgggagggtaatcacaagcctatt
  L A C F G L A R E G N H K P I
946 gactaccttaacccacctaagtaa 969
  D Y L N P P K *
```