



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 106834261 B

(45) 授权公告日 2022. 02. 18

(21) 申请号 201710117140.0

(22) 申请日 2011.02.03

(65) 同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 106834261 A

(43) 申请公布日 2017.06.13

(30) 优先权数据

61/301,478 2010.02.04 US

(62) 分案原申请数据

201180009074.6 2011.02.03

(73) 专利权人 生物马林药物股份有限公司

地址 美国加利福尼亚州

(72) 发明人 奥古斯塔斯·O·奥克哈玛菲

肖恩·M·贝尔

G·尼克·泽切尔勒

克里斯·安东森 张彦宏

基尤·Y·莱

P·A·菲茨帕特里克

E·D·卡基斯 M·C·维拉德

丹尼尔·J·温特

穆巴拉克·穆塔利夫

(74) 专利代理机构 北京安信方达知识产权代理有限公司 11262

代理人 郑霞

(51) Int.Cl.

C12N 9/88 (2006.01)

C12N 9/96 (2006.01)

审查员 张进

权利要求书1页 说明书63页

序列表23页 附图34页

(54) 发明名称

原核苯丙氨酸解氨酶变异体的组合物以及
利用其组合物的方法

(57) 摘要

本发明提供由原核生物产生的苯丙氨酸解氨酶(PAL)变异体,其中这类原核PAL变异体与野生型PAL相比具有较大的苯丙氨酸转化活性和/或降低的免疫原性。本发明进一步提供原核PAL及其生物活性片段、突变体、变异体或者类似物的组合物,以及用于生产、纯化、配制这类组合物以及将其用于工业和治疗目的(例如治疗高苯丙氨酸血症(包含苯丙酮尿症)以及其他疾病(包含癌症))的方法。

点形念珠藻 PAL 的基因序列

```
1 atgaatataa catctctaca acagaacata acgcgttctt ggcaaatacc ttctactaat
61 agttcagatt caatcgtaac tgtaggcgat cgcaatctga caatcgacga ggttgtaaat
121 gttgctcgtc atggaacaca ggtgcgctta actgataatg cagatgtcat tcgggggttt
181 caagcatctt gtgattacat taacaatgca gtcgaacag cagagccaat ttacgggggtg
241 acatctggct ttggcggat ggcagatgtt gtcattcttc gcgaacaagc agcggaaactt
301 cagactaatt taatttggtt tctgaatcc ggcgcaggaa acaaatatc gtttagcagac
361 gtgcgtgcag ctatgctctt acgtgcaaat tcacattigt atggtgcgtc tggatatacga
421 ctggaactta ttacgcggat tgaactttc ctcaacgtg gcgtgacacc ccattgtctat
481 gagtttggtt ctatcgggtc tagcggcgat ttggtgccat tatctacat tactggggcca
541 claatcggtc tagatcctag ctttacgtt gacttcgacg gtaagaat ggatgccgtt
601 acagccttgt ctggttggtt ttgccaag ttgcaattgc aaccgaagaa aggtttagca
661 atgatgaatg gcacctcagt catgacaggt attgcagcta actgtgtgta cgatgcgaaa
721 gttttgctcg ctctgacaat ggggtgtacac gccttagcca tccaaggttt atacggaacg
781 aatcaatctt tccaccggtt tattcatcag tgcgaagcac atcccggta actatggaca
841 gcagatcaaa tgttttctct gctgaagat tcattcttag ttctgaaga gttgtaggtt
901 aaacacgaat acggtggtta agatctgata caggatcgtt atctctccg ctgtctggca
961 cagttcatag ggccaatcgt tgatggggta tcagagatta ccaagcaaat cgaggtagaa
```

1. 一种用于纯化具有最小聚集的多变鱼腥藻苯丙氨酸解氨酶 (AvPAL) 变异体的方法, 该方法包括:

- (a) 通过均化作用对包含该AvPAL变异体的细菌细胞进行裂解, 以生成细胞裂解物;
 - (b) 加热该细胞裂解物至65℃达30至120min;
 - (c) 将加热的细胞裂解物离心, 其中保留包括该AvPAL变异体的上清液;
 - (d) 将该上清液过滤, 以去除沉淀物; 和
 - (e) 通过在阴离子交换 (AIEX) 柱, 然后在疏水作用 (HIC) 柱上进行的依序色谱法从污染蛋白质中分离该AvPAL变异体, 其中来自该HIC柱的洗出液包括该AvPAL变异体;
- 其中所述AvPAL变异体具有SEQ ID NO:11的氨基酸序列。

2. 根据权利要求1所述的方法, 其中所述方法是一种用于纯化具有最小聚集的聚乙二醇化的多变鱼腥藻苯丙氨酸解氨酶 (AvPAL) 变异体的方法, 该方法进一步包括:

- (f) 对所述来自该HIC柱的包括该AvPAL变异体的洗出液进行超滤、或者超滤和渗滤;
 - (g) 通过将聚乙二醇与该AvPAL变异体混合对该AvPAL变异体进行聚乙二醇化;
 - (h) 通过超滤和渗滤从该聚乙二醇化的AvPAL变异体中去除游离的聚乙二醇; 以及
 - (i) 配制该聚乙二醇化的AvPAL变异体,
- 其中所述AvPAL变异体被连接到聚乙二醇。

3. 根据权利要求2所述的方法, 其中在步骤(i)的制剂中AvPAL变异体和聚乙二醇的比率为1:3。

4. 根据权利要求2所述的方法, 其进一步包括冷冻和融化步骤(e)中获得的所述来自该HIC柱的包括该AvPAL变异体的洗出液, 其中在冷冻之前向该HIC柱洗出液添加一种或者多种选自如下的多元醇或者糖: 甘油、蔗糖、葡萄糖、海藻糖、甘露醇和山梨醇。

5. 根据权利要求4所述的方法, 其中所述多元醇是甘油。

6. 根据权利要求5所述的方法, 其中所述甘油的浓度是10% (v/v)。

7. 根据权利要求4所述的方法, 其中所述糖是蔗糖。

8. 根据权利要求7所述的方法, 其中所述蔗糖的浓度是10% (v/v)。

9. 根据权利要求4所述的方法, 其中以离散温度步骤来冷冻或融化所述来自该HIC柱的包括该AvPAL变异体的洗出液。

10. 根据权利要求4所述的方法, 其中以离散温度步骤来冷冻和融化所述来自该HIC柱的包括该AvPAL变异体的洗出液。

11. 根据权利要求2所述的方法, 其中步骤(f)中的渗滤缓冲液包括磷酸钾 (KPi) 以及一种或者多种由反式肉桂酸 (t-CA) 和甘油组成的药剂。

12. 根据权利要求11所述的方法, 其中所述渗滤缓冲液包括50mM Kpi、10mM t-CA、5% 甘油, pH值为8.5。

13. 根据权利要求2所述的方法, 其中向步骤(f)中获得的超滤、或者超滤和渗滤的来自该HIC柱的包括该AvPAL变异体的洗出液添加非离子去垢剂。

14. 根据权利要求13所述的方法, 其中该非离子去垢剂是聚山梨醇酯80 (PS80)。

15. 根据权利要求14所述的方法, 其中所述PS80的浓度是0.02%。

16. 根据权利要求1所述的方法, 其中该AIEX柱是Toyopearl Giga Cap Q 650M柱。

17. 根据权利要求1所述的方法, 其中该HIC柱是Toyopearl丁基650M柱。

原核苯丙氨酸解氨酶变异体的组合物以及利用其组合物的方法

[0001] 本申请是申请日为2011年02月03日、申请号为201180009074.6、名称为“原核苯丙氨酸解氨酶变异体的组合物以及利用其组合物的方法”的发明申请的分案。

技术领域

[0002] 本文提供与原核苯丙氨酸解氨酶 (PAL) 变异体相关的组合物, 包含优化这类组合物以提高原核PAL催化活性和/或稳定性而降低原核PAL的免疫原性和/或蛋白水解敏感性。本文还提供原核PAL变异体的这类最佳的组合物在治疗方面 (例如, 治疗高苯丙氨酸血症 (HPA), 其包含苯丙酮尿症 (PKU); 以及其他疾病, 其包含癌症) 的用途。

[0003] 发明背景

[0004] 苯丙氨酸解氨酶 (PAL) 是一种非哺乳类酶, 其广泛分布于植物 (Koukol, 等人, J.Biol.Chem.236:2692-2698 (1961); Hanson, 等人, The Enzymes 7:75-166 (1972); Poppe, 等人, Curr.Org.Chem.7:1297-1315 (2003))、一些真菌 (Rao, 等人, Can.J.Biochem.45:12:1863-1872 (1967); Abell, 等人, Methods Enzymol.142:242-253 (1987)) 和细菌 (Bezanson, 等人, Can.J.Microbiol.16:147-151 (1970); Xiang, 等人, J.Biol.Chem.277:32505-32509 (2002); Hill, 等人, Chem.Commun.1358-1359 (2003)) 中以及可以在大肠杆菌中重组产生。

[0005] 来自两种蓝细菌菌株多变鱼腥藻 (Av) 和点形念珠藻 (Np) 的PAL已被克隆并表达于细菌 (例如大肠杆菌 (E.coli)) 中, 以及显示, 在活体外和活体内具有PAL酶活性 (见, 例如美国专利号7,531,341; 7,534,595; 7,537,923; 以及7,560,263)。聚乙二醇化的重组多变鱼腥藻PAL (rAvPAL-PEG) 也已产生, 其中通过共价结合聚乙二醇 (PEG) 对rAvPAL蛋白质衍生化, 以延长其半衰期以及优化其药代动力学特性和/或降低其免疫原性 (同上)。已显示, rAvPAL-PEG可使苯丙氨酸产生代谢变化, 以及正在将rAvPAL-PEG开发作为酶替代疗法 (EST) 用于与苯丙氨酸水平升高有关的患者紊乱或者疾病, 例如HPA (包含PKU) 以及用于癌症疗法 (同上)。

[0006] 虽然PAL潜在地具有不同的治疗应用, 但是降低的特异性活性以及蛋白水解不稳定性可使得PAL的用途受限。跟其他治疗性蛋白质类似, PAL用作酶疗法伴随着多个缺点, 例如免疫原性和蛋白水解敏感性 (见Vellard, Curr.Opin.Biotechnol.14:1-7 (2003))。此外, 在底物亲和力和酶活性之间需要一种微妙的平衡, 以实现和维持在以高苯丙氨酸血症为特征的疾病中, 将血浆苯丙氨酸水平控制在正常但有些窄的范围内。到目前为止, 由于缺乏有关这种蛋白质的结构和生化知识, 尚未做出以改善这些参数为目的的协调一致的努力。

[0007] 因此, 仍然需要具有最佳动力学特征 (包含强效的催化活性、较长的生物半衰期、较大的生化稳定性和/或减弱的免疫原性) 的PAL分子, 以用于治疗用途, 包括HPA (其包含PKU) 以及其他疾病 (包含癌症) 的治疗。

[0008] 发明概述

[0009] 原核或者细菌PAL可以用来有效地治疗HPA (包含PKU) 以及其他疾病 (包含癌症)。本文提供具有改善属性 (例如更强效的催化活性、较大的生化稳定性以及用于治疗应用时,

具有减弱的免疫原性和/或较长的生物半衰期)的原核PAL及其生物活性片段、突变体、变异体或类似物的组合物。本文还提供药物组合物和制剂,该药物组合物和制剂包括原核PAL及其生物活性片段、突变体、变异体或类似物以及药学上可接受的载体(其可以包含防腐剂和/或稳定剂)。本文还提供生产和纯化原核PAL及其生物活性片段、突变体、变异体或类似物的方法;以及将这类组合物用于治疗目的(包括治疗HPA(包含PKU)以及其他疾病(包含癌症))的方法。

[0010] 如本文所用,“细菌PAL”和“原核PAL”可互换使用,用来指(1)来自原核生物的野生型PAL,包含但不限于来自海洋链霉菌(也称为EncP,SEQ ID NO:5,图4)、点形念珠藻(SEQ ID NO:2,图4)、多变鱼腥藻(SEQ ID NO:4,图4)、巢状倒囊藻(Lofflehardt, Z.Naturforsch.31(11-12):693-9(1976))、发光光杆状菌TT01(Williams,等人, Microbiology 151:2543-2550(2005)和轮丝链霉菌(Bezanson,等人,Can.J.Microbiol.16(3):147-51(1970)的PAL;(2)保留类似(即至少50%)的苯丙氨酸催化活性以及能够,例如,显示增加的催化活性、较大的生化稳定性、延长的半衰期和/或降低的免疫原性的这类野生型PAL酶的片段、突变体、变异体或者类似物;以及(3)连接至能提供其他有利的作用(例如,作为例子但不限于,延长的半衰期和/或降低的免疫原性)的其他化学部分的这类野生型PAL酶或其片段、突变体、变异体或类似物的化学修饰形式。例如,任何提到生产原核PAL及其片段、突变体、变异体、类似物或者化学修饰形式以及这类酶的组合物,以及将所述原核PAL及其片段、突变体、变异体、类似物或者化学修饰形式以及这类酶的组合物用于治疗目的的方法的文字意在指生产、利用或者配制所有这类野生型原核PAL或者其片段、突变体、变异体、类似物或者化学修饰的方法。

[0011] 在第一个方面,本文提供药物组合物,该药物组合物包括原核PAL及其生物活性片段、突变体、变异体或类似物以及药学上可接受的载体。一个实施方式是来自点形念珠藻(SEQ ID NO:2)的原核PAL或者其生物活性片段、突变体、变异体或者类似物。其他的实施方式是来自多变鱼腥藻(SEQ ID NO:4)的原核PAL或者其生物活性片段、突变体、变异体或者类似物。本文还提供与野生型PAL相比,具有较大的苯丙氨酸转化活性和/或降低的免疫原性的原核PAL变异体。

[0012] 在具体的实施方式中,该原核PAL变异体在对应于来自圆红冬孢酵母菌PAL的PAL(RtPAL)中的Ser210、Ala-Ser-Gly三联体(211-213)、Asp214、Leu215、Asn270、Val269、Leu266、Leu134、His137、Lys468、Glu496、Gln500的位置保留野生型活性位点残基或者这些活性位点残基的保守性替换,其中211-213上的Ala-Ser-Gly三联体被认为是针对苯丙氨酸的结合位点。

[0013] 原核PAL变异体包括这样的蛋白质,其中一种或者多种氨基酸(例如半胱氨酸)残基已被另一种氨基酸(例如丝氨酸)残基取代,以减少蛋白质聚集,所述蛋白质聚集可与活体内降低的酶活性、增加的免疫原性和/或其他不利的影响(例如降低的生物利用度)相关。本文提供一种药物组合物,其中该原核PAL变异体的一种或者多种氨基酸残基已被另一种氨基酸取代,其中与野生型PAL相比,所述取代提高了苯丙氨酸转化活性和/或降低了免疫原性。

[0014] 在一些实施方式中,该原核PAL变异体的一种或者多种氨基酸残基已被另一种氨基酸取代。在一些实施方式中,该原核PAL变异体的一种或者多种半胱氨酸残基已被丝氨酸

残基取代。在某些实施方式中,该原核PAL变异体是多变鱼腥藻PAL (AvPAL)。在其他的实施方式中,该AvPAL变异体的一种或者多种半胱氨酸残基已被选自如下的丝氨酸残基取代:位置64、318、503和565上的半胱氨酸残基。在具体的实施方式中,该AvPAL变异体的位置565上的半胱氨酸残基已被丝氨酸残基取代。在某一实施方式中,该AvPAL变异体的位置503和565上的半胱氨酸残基已被丝氨酸残基取代。

[0015] 原核PAL变异体还可以包括融合蛋白质,其中PAL酶已被融合至另一种异源性多肽,例如保留补救抗原表位 (salvage epitope) 的免疫球蛋白或者其片段的原生或者修饰的恒定区,如本领域已知,以延长半衰期。

[0016] 本文还提供已被连接至提供其他有利影响的化学部分的这类原核PAL多肽的化学修饰形式。例如,本领域已知,水溶性聚合物 (例如聚乙二醇) 到多肽的非特异性或者位点特异性 (例如N末端) 连接可改善半衰期,以及化学部分的连接还可降低免疫原性和/或改善蛋白酶抗性。

[0017] 在一些实施方式中,该原核PAL变异体包括水溶性聚合物。在某些实施方式中,该原核PAL变异体包括聚乙二醇。在其他的实施方式中,该原核PAL变异体是AvPAL以及AvPAL和聚乙二醇的比率为约1:3 (1:3AvPAL:PEG)。在具体的实施方式中,该原核PAL变异体是AvPAL变异体,AvPAL变异体和聚乙二醇的比率为约1:3 (1:3AvPAL:PEG),以及该AvPAL变异体的位置503和565上的半胱氨酸残基已被丝氨酸残基取代。

[0018] 在一些实施方式中,该原核PAL变异体的一种或者多种氨基酸残基已被赖氨酸残基取代。原核PAL变异体中其他赖氨酸残基的聚乙二醇化可以产生具有降低的免疫原性、增加的催化活性和/或改善的生化稳定性的酶。不受限于特定的理论,假定原核PAL的活性位点上/附近的酪氨酸残基 (例如AvPAL中的位置78) 可以是用于聚乙二醇化的位点,其降低了酶活性。在一个实施方式中,该原核PAL变异体的活性位点上/附近的不为酶活性所需的一种或者多种氨基酸由赖氨酸残基取代。不受限于特定的理论,假定对活性位点上/附近的取代的赖氨酸残基进行聚乙二醇化具有空间位阻效应,阻碍对酪氨酸残基 (例如AvPAL中的位置78) 的聚乙二醇化。

[0019] 这类原核PAL变异体根据本文提供的方法进行分离和纯化,因而其以使得能够在治疗上采用原核PAL酶的量而存在。在一些实施方式中,使用为精加工型或者野生型原核PAL编码的cDNA。然而,在其他的实施方式中,可以使用为其生物活性片段、突变体、变异体或者类似物编码的cDNA。此外,本文提供通过基于结构的分子工程方法获得的优化的原核PAL和/或PAL的化学修饰 (例如聚乙二醇化) 形式的组合物。具体的实施方式涉及适于治疗用途的具有改善的特异性活性、提高的稳定性、降低的免疫原性和/或蛋白水解敏感性的最佳的原核PAL组合物。在一个实施方式中,PAL是具有改善的特异性活性、提高的稳定性、降低的免疫原性和/或蛋白水解敏感性的聚乙二醇化形式的点形念珠藻PAL。在另一实施方式中,PAL是具有改善的特异性活性、提高的稳定性、降低的免疫原性和/或蛋白水解敏感性的聚乙二醇化形式的多变鱼腥藻PAL。

[0020] 在各种实施方式中,就PAL:PEG或者PEG:PAL的比率对PAL变异体的聚乙二醇化进行描述。如本文所用,以及除非另行指明,“PAL:PEG”的比率指在聚乙二醇化反应中PAL变异体上的赖氨酸残基与PEG分子的比率。同样地,如本文所用,以及除非另行指明,“PEG:PAL”的比率指在聚乙二醇化反应中PEG分子与PAL变异体上的赖氨酸残基的比率。

[0021] 在一个实施方式中,提供具有降低的免疫原性的聚乙二醇化的原核PAL变异体。另一实施方式是具有降低的免疫原性的聚乙二醇化形式的点形念珠藻PAL (NpPAL) 变异体。仍然另一实施方式是具有降低的免疫原性的聚乙二醇化形式的AvPAL变异体。具体的实施方式涉及NpPAL或者AvPAL变异体,其中聚乙二醇化通过将NpPAL或者AvPAL变异体与水溶性聚合物(例如PEG)反应来实现。在一些实施方式中,聚乙二醇化通过将NpPAL或者AvPAL变异体与PEG以至少1:1、至少1:1.5、至少1:2、至少1:3或者至少1:4的PAL:PEG的比率反应来实现。在一个实施方式中,该原核PAL变异体是AvPAL变异体,以及该聚乙二醇化通过利用1:3的PAL:PEG比率来实现。

[0022] 在一些实施方式中,聚乙二醇化的原核PAL变异体是AvPAL变异体以及AvPAL的位置503和565上的半胱氨酸残基已被丝氨酸残基取代(SEQ ID NO:11)。

[0023] 在一些实施方式中,对野生型原核PAL的生物活性位点进行修饰,以优化PAL动力学特性。在一个实施方式中,原核PAL变异体具有足够的活性,以降低并且维持血浆苯丙氨酸水平在约120 μ M到约240 μ M的最佳范围内。在其他的实施方式中,生物活性的原核PAL变异体具有至少约0.1s⁻¹或者大于约0.5s⁻¹的kcat。在一些实施方式中,生物活性的原核PAL变异体具有至少约0.2s⁻¹或者大于约1.0s⁻¹的kcat。在其他的实施方式中,生物活性的原核PAL变异体具有约10 μ M至约1000 μ M之间的Km。在其他的实施方式中,生物活性的原核PAL变异体具有约100 μ M至约1000 μ M之间的Km。在一个实施方式中,生物活性的原核PAL变异体显示出的酶催活性比野生型PAL的酶催活性大约2倍至约1000倍。在其他的实施方式中,生物活性的原核PAL变异体显示出的酶催活性比野生型PAL的酶催活性高约10%至100%。这类生物活性的原核PAL变异体可以利用本领域熟知的方法(例如通过定点诱变)形成。本文还提供使苯丙氨酸产生代谢变化(即,使苯丙氨酸转化为另一种物质)的原核PAL变异体或者其生物活性片段、突变体、变异体或者类似物在制备用于治疗哺乳动物(例如人类)体内PAH活性不足的药剂以及在制备用于治疗PAH活性不足的包含原核PAL变异体的药物组合物方面的用途。

[0024] 在一些实施方式中,可以对野生型原核PAL的生物活性位点进行修饰,以优化PAL动力学特性。在一个实施方式中,原核PAL变异体具有足够的活性,以利用本领域熟知的标准检测方法将对象体内的血浆苯丙氨酸水平降至从低于检测水平到约20 μ M至60 μ M之间的范围,例如小于约20 μ M或者小于约10 μ M。在其他的实施方式中,生物活性的原核PAL变异体具有至少约0.1s⁻¹(例如大于约0.5s⁻¹)以及大于约1.0s⁻¹的kcat。在某些实施方式中,生物活性的原核PAL变异体具有至少约0.4s⁻¹(例如大于约2.0s⁻¹)或者大于约4.0s⁻¹的kcat。在其他的实施方式中,生物活性的原核PAL变异体具有约10 μ M至约2000 μ M之间的Km。在某些实施方式中,生物活性的原核PAL变异体具有约10 μ M至约1000 μ M之间的Km。在其他的实施方式中,生物活性的原核PAL变异体具有约10 μ M至约500 μ M之间的Km。在仍然其他的实施方式中,生物活性的原核PAL变异体显示出的酶催活性范围从为野生型PAL的酶催活性的约至少50%到大于野生型PAL的酶催活性的约10倍。这类生物活性原核PAL变异体可以利用本领域熟知的方法(例如通过定点诱变)形成。本文还提供使苯丙氨酸产生代谢变化(即,使苯丙氨酸转化为另一种物质)的原核PAL变异体或者其生物活性片段、突变体、变异体或者类似物在制备用于预防或者治疗对象(例如人类对象)体内癌症的药剂以及在制备用于预防或者治疗对象(例如人类对象)体内癌症的包含原核PAL变异体或者其生物活性片段、突

变体、变异体或者类似物的药物组合物方面的用途。在一些实施方式中,该药剂用于预防人类对象体内的癌症。

[0025] 在一些实施方式中,该药物组合物包括单独或者结合有药学上适合的载体的、衍生自细菌的高度纯化的原核PAL变异体或者其生物活性片段、突变体或者类似物。在一些实施方式中,制剂包含纯度大于90%、95%、96%、97%、98%、99%、99.2%、99.5%、99.6%、99.7%、99.8%或者99.9%的原核PAL变异体。在其他的实施方式中,该原核PAL变异体的相对比活为野生型原核PAL的比活的至少约50%或者大于约110%。

[0026] 在第二个方面,本文提供将原核PAL组合物用于治疗目的的方法。在一个实施方式中,本文提供通过向需要这类治疗的对象施用治疗有效量的包括原核PAL变异体的药物组合物来治疗全部或者部分地由PAH活性不足导致的疾病的方法。PAH活性不足可以显示为与正常水平的PAH活性相比,是50%或更低、25%或更低或者10%或更低或者1%或更低的活性水平,以及可以表现为例如,在高苯丙氨酸血症、轻度苯丙酮尿症或者典型重度苯丙酮尿症中升高的苯丙氨酸水平。在一些实施方式中,该疾病为PKU。

[0027] 在具体的实施方式中,该对象是已被诊断具有突变苯丙氨酸羟化酶(mutant phenylalanine hydroxylase;突变PAH)者。该突变PAH可包括PAH催化区中的突变。示例性的这类突变包括但不限于F39L、L48S、I65T、R68S、A104D、S110C、D129G、E178G、V190A、P211T、R241C、R261Q、A300S、L308F、A313T、K320N、A373T、V388M E390G、A395P、P407S和Y414C突变。

[0028] 还涉及一种治疗血浆苯丙氨酸高于正常浓度(例如大于180 μ M或者360 μ M)的对象的方法,该方法包括按能导致该对象的血浆苯丙氨酸浓度下降的有效量向该对象施用原核PAL变异体组合物。在某些实施方式中,该对象在给药该原核PAL变异体之前具有大于180 μ M的血浆苯丙氨酸浓度。在一些实施方式中,该对象具有120 μ M和200 μ M之间的血浆苯丙氨酸浓度。在其他的实施方式中,该对象具有200 μ M和600 μ M之间的血浆苯丙氨酸浓度。在仍然其他的实施方式中,该对象具有600 μ M和1200 μ M之间的血浆苯丙氨酸浓度。还有另一类待治疗的对象是那些不受限的血浆苯丙氨酸浓度大于1200 μ M的对象。

[0029] 在具体的实施方式中,该对象是未成年对象(infant),例如血浆苯丙氨酸浓度大于1200 μ M的未成年对象。本文提供治疗患有苯丙酮尿症的未成年对象的方法,该方法包括按能导致该未成年对象的血浆苯丙氨酸浓度下降的有效量向该对象施用原核PAL变异体组合物。在某些实施方式中,该未成年对象在0到3岁之间。在一个实施方式中,该未成年对象具有约360 μ M至约4800 μ M之间的血浆苯丙氨酸浓度。在某些实施方式中,在给药原核PAL变异体之前,该未成年对象具有约1200 μ M的苯丙氨酸浓度,以及原核PAL变异体的给药将血浆苯丙氨酸浓度降低,例如至约1000 μ M。在其他的实施方式中,在给药原核PAL变异体之前,该未成年对象具有约800 μ M的苯丙氨酸浓度以及PAL的给药将血浆苯丙氨酸浓度降至,例如约600 μ M。在仍然进一步的实施方式中,在给药PAL变异体之前,该未成年对象具有约400 μ M的苯丙氨酸浓度以及PAL变异体的给药将血浆苯丙氨酸浓度降低,例如至约300 μ M。在一些实施方式中,本文涉及的治疗方法将该未成年对象的血浆苯丙氨酸浓度降至约120 μ M至约360 μ M之间的范围或者约120 μ M至约240 μ M之间的范围。

[0030] 本文还涉及用于治疗患有HPA的怀孕雌性对象(pregnant female)的方法,该方法包括向该对象单独或者结合限蛋白质饮食施用原核PAL变异体,其中与不进行联合给药时

的浓度相比,单独或者结合限蛋白质饮食施用原核PAL变异体对降低该对象的血浆中苯丙氨酸浓度有效。在某些实施方式中,该对象具有大于180 μ M但小于600 μ M的不受限的血浆苯丙氨酸浓度。在其他的实施方式中,该对象具有大于500 μ M但小于1200 μ M的不受限的血浆苯丙氨酸浓度。在仍然其他的实施方式中,该对象具有大于1200 μ M的不受限的血浆苯丙氨酸浓度。具有大于,例如1200 μ M血浆苯丙氨酸浓度的有孕对象是尤其适于这种类型疗法的候选者,打算怀孕的育龄女性对象也是如此。在其中该对象具有大于1200 μ M的血浆苯丙氨酸浓度的实施方式中,该方法可以可选择地进一步包括对该对象采取限蛋白质饮食。

[0031] 本文还提供治疗对象体内典型重度PKU的方法,该方法包括向该对象施用原核PAL变异体或者其生物活性片段、突变体、变异体或者类似物,其中与不施用原核PAL时的浓度相比,施用原核PAL变异体对降低该对象血浆中的苯丙氨酸浓度有效。在一些实施方式中,选择根据本文提供的方法进行治疗的对象在没有进行治疗时会有升高的,例如大于1800 μ M的血浆Phe浓度。其他的实施方式涉及在没有治疗方案的情况下具有大于1000 μ M的血浆苯丙氨酸浓度的对象。在一些实施方式中,本文提供的联合给药方法将该对象的血浆苯丙氨酸浓度降至小于600 μ M。在一个实施方式中,其被降至小于500 μ M。在另一实施方式中,联合给药将该对象的血浆苯丙氨酸浓度降至从约120 μ M至约360 μ M的范围内。在另一实施方式中,该对象的血浆苯丙氨酸浓度被降至从约120 μ M至约240 μ M的范围内。

[0032] 在一个实施方式中,本文提供用于治疗患有以PAH活性不足为特征的疾病的对象(例如高苯丙氨酸血症、轻度苯丙酮尿症或者典型重度苯丙酮尿症;苯丙氨酸高于正常浓度的对象、具有大于1200 μ M的血浆苯丙氨酸浓度的未成年对象或者患有苯丙氨酸血症的怀孕雌性对象)的方法,该方法包括向该对象施用治疗有效量的一种包括原核PAL变异体以及药学上可接受的载体的药物组合物,其中该原核PAL变异体与野生型PAL相比具有较大的苯丙氨酸转化活性和/或降低的免疫原性以及有效地将该对象的血液、血清或者血浆中的苯丙氨酸浓度降至上文所述的范围。在一些实施方式中,该原核PAL变异体的一种或者多种氨基酸残基已被另一种氨基酸取代,其中与野生型PAL相比,该取代提高了苯丙氨酸转化活性和/或降低了免疫原性。在某些实施方式中,该原核PAL变异体的一种或者多种半胱氨酸残基已被另一种氨基酸取代。在一些实施方式中,该原核PAL变异体的一种或者多种半胱氨酸残基已被丝氨酸残基取代。在一个实施方式中,该原核PAL变异体是AvPAL变异体。在某些实施方式中,该AvPAL变异体的一种或者多种半胱氨酸残基已被选自如下的丝氨酸残基取代:位置64、318、503和565上的半胱氨酸残基;位置565上的丝氨酸残基;或者位置503和565上的丝氨酸残基。在一些实施方式中,该原核PAL变异体包括水溶性聚合物。在一些实施方式中,该水溶性聚合物是聚乙二醇。在具体的实施方式中,该原核PAL变异体是AvPAL变异体,以及AvPAL变异体和聚乙二醇的比率为约1:3(1:3AvPAL:PEG)。在一个实施方式中,该原核PAL变异体是AvPAL变异体,AvPAL变异体和聚乙二醇的比率为约1:3(1:3AvPAL:PEG),以及该AvPAL变异体的位置503和565上的半胱氨酸残基已被丝氨酸残基取代。

[0033] 某些实施方式包括根据待治疗的生物(例如哺乳动物或者人类)的需要优化剂量,以有效地改善病症。原核PAL变异体可以按每日单剂量、每日多剂量、每周单剂量或者每周多剂量来给药。在一些实施方式中,原核PAL变异体疗法不是连续性的,而是每日给药原核PAL变异体,直至该对象的血浆苯丙氨酸浓度降低,例如至小于360 μ M。在一些实施方式中,其中每日监测该对象的血浆苯丙氨酸浓度,以及当观察到血浆苯丙氨酸浓度有10%的增长

时给药该原核PAL变异体。在其他的实施方式中,剂量每周给药一次。涉及至少0.001mg/kg、0.005mg/kg、0.01mg/kg或者0.05mg/kg的剂量,以及剂量的范围可以高达每周0.1mg/kg、0.5mg/kg、1.0mg/kg、2.0mg/kg或者更高。在一些实施方式中,剂量为2mg/kg/周、1mg/kg/周、0.1mg/kg/周或者0.01mg/kg/周。

[0034] 涉及多种进行当量剂量给药的肠胃外或者非肠胃外给药途径,包含口腔、经皮、透粘膜、肺内(包含雾化)、肌内、皮下或静脉内给药。特别地涉及通过弹丸注射或者直接输液进入关节或者CSF进行的给药,例如鞘内、脑内、心室内、经由腰椎穿刺或者经由小脑延髓池。在一些实施方式中,剂量通过皮下或者口服给药。

[0035] 还涉及提高人类对象体内原核PAL变异体活性的其他手段,包含基因疗法。原核PAL变异体基因的转移可能通过本领域已知的多种手段(包含病毒载体、同源重组或者DNA直接注射)进行。落入这方面范围内的是以核酸序列为特征的实施方式,该核酸序列编码全部或者部分的原核PAL变异体或者其生物活性突变体或类似物以及可以植入活体内受PAH不足影响的细胞。

[0036] 在其他的实施方式中,原核PAL变异体或者其生物活性片段、突变体、变异体或者类似物还可以结合限蛋白质饮食施用。本文所述方法中施用的限蛋白质饮食便是限制苯丙氨酸饮食,其中对象的总苯丙氨酸(Phe)摄入量限于小于600mg/日。在其他的实施方式中,该限蛋白质饮食是限制苯丙氨酸饮食,其中总的Phe限于小于300mg/日。在仍然其他的实施方式中,该限蛋白质饮食是补充有一种或者多种氨基酸(例如但不仅限于酪氨酸、缬氨酸、异亮氨酸和/或亮氨酸)的饮食。

[0037] 还涉及一种药物组合物,该药物组合物包括原核PAL变异体或者其生物活性片段、突变体、变异体或者类似物以及药学上可接受的载体、稀释液或者赋形剂。该药物组合物可以进一步包括药用蛋白质补充剂。在其他的实施方式中,该原核PAL变异体组合物是未成年对象配方的部分。在仍然其他的实施方式中,该蛋白质补充剂是不含苯丙氨酸的。该蛋白质补充剂可以添加有L-酪氨酸、L-谷氨酸、补充剂浓度为20mg/100g的L-肉碱、补充剂浓度为40mg/100g的L-牛磺酸和硒,以增加营养价值。它可以进一步包括推荐日剂量的矿物质,例如钙、磷和镁。该补充剂进一步可以包括推荐日剂量的选自如下的一种或者多种氨基酸:L-亮氨酸、L-脯氨酸、L-醋酸赖氨酸、L-缬氨酸、L-异亮氨酸、L-精氨酸、L-丙氨酸、甘氨酸、L-天冬酰胺一水物、L-色氨酸、L-丝氨酸、L-苏氨酸、L-组氨酸、L-蛋氨酸、L-谷氨酸和L-天冬氨酸。此外,该补充剂可以添加有推荐日剂量的维生素A、D和E,以增加营养价值。该补充剂可以包括提供该补充剂的至少40%能量的脂肪含量。这类补充剂可以粉状补充剂的形式或者以蛋白棒的形式提供。

[0038] 本文还提供通过向对象施用治疗有效量的一种包括原核PAL变异体的药物组合物来治疗各种形式的癌症的方法。在一个宽泛的实施方式中,该癌症是这样一种癌症,其中衍生自该癌症的细胞其增殖和/或存活对苯丙氨酸的限制或者缺失敏感。在一些实施方式中,该癌症是肺癌、脑癌或者中枢神经系统癌症、结肠癌、前列腺癌、肾癌、肝癌或者转移性黑素瘤。在其他的实施方式中,该癌症是头颈部癌、卵巢癌、子宫癌、白血病(例如急性骨髓性白血病或者急性成淋巴细胞性白血病)或者骨髓瘤。在仍然其他的实施方式中,该癌症是小儿癌症或者抗性癌症(即,已显示对癌症治疗剂或者靶向癌症治疗剂有抗性的癌症)。

[0039] 本文还提供通过向对象施用治疗有效量的一种包括原核PAL变异体的药物组合物

来治疗帕金森氏症(PD)的方法。

[0040] 在第三个方面,本文提供原核PAL变异体的药物组合物或者制剂,其包括原核PAL变异体及其生物活性片段、突变体、变异体或类似物,以及药学上可接受的载体,其中该药学上可接受的载体包括稳定剂。在一些实施方式中,该稳定剂是L-苯丙氨酸或其结构类似物。在一些实施方式中,该稳定剂选自如下:L-苯丙氨酸、反式肉桂酸和苯甲酸。在某些实施方式中,该稳定剂是L-苯丙氨酸。在一些实施方式中,该稳定剂是反式肉桂酸。在其他的实施方式中,该稳定剂是苯甲酸。还提供利用这类药物组合物或者制剂治疗癌症的方法。

[0041] 在具体的实施方式中,该药物组合物或者制剂包括原核PAL变异体以及药学上可接受的载体,其中该原核PAL变异体是AvPAL变异体,该AvPAL变异体和聚乙二醇的比率为约1:3 (1:3AvPAL:PEG),该AvPAL变异体的位置503和565上的半胱氨酸残基被丝氨酸残基取代,以及该药学上可接受的载体包括稳定剂。在一些实施方式中,该稳定剂是L-苯丙氨酸或其结构类似物。在其他的实施方式中,该稳定剂选自如下:L-苯丙氨酸、反式肉桂酸和苯甲酸。在一些实施方式中,该稳定剂是L-苯丙氨酸。在一个实施方式中,该稳定剂是反式肉桂酸。还提供利用这类药物组合物或者制剂来治疗高苯丙氨酸血症(包含苯丙酮尿症)的方法。

[0042] 在第四个方面,本文提供药物组合物或者制剂,该药物组合物或者制剂包括聚乙二醇化的AvPAL变异体,其中该AvPAL变异体和聚乙二醇的比率为约1:3 (1:3AvPAL:PEG) 以及该AvPAL变异体的一种或者多种半胱氨酸残基已被丝氨酸残基取代;以及药学上可接受的载体,其中该药学上可接受的载体包括一种或者多种(例如至少两种)稳定剂以及可选择地,防腐剂(即抗菌剂)。该制剂中聚乙二醇化的AvPAL变异体的浓度可以从约1至50mg/mL (约0.016至0.8mM),例如从约5至20mg/mL (约0.08至0.33mM) 或者从约5至15mg/mL (约0.08至0.25mM)。在一些实施方式中,该药物组合物或者制剂包括作为缓冲剂的Tris-HCl或者其等价物;和/或作为等渗调节剂的NaCl或者其等价物。该制剂中Tris-HCl或者其等价物的浓度可以从约5至50mM,例如从约5至20mM或者从约5至15mM。该制剂中NaCl或者其等价物的浓度可以从约100至200mM,例如从约120至170mM或者从约120至150mM。该制剂的pH可以从约pH6.0-8.0,例如约pH 6.5-7.5或者约pH 7.0-7.6。在一些实施方式中,该稳定剂是L-苯丙氨酸(Phe) 或者其结构类似物以及甘氨酸(Gly) 或者其结构类似物。该制剂中Phe或者其结构类似物的浓度可以从约0.1至10mM,例如从约0.5至5mM或者从约0.5至1.5mM。该制剂中Gly或者其结构类似物的浓度可以从约0.1至100mM,例如从约1.0至100mM、从约1.0至20mM或者从约20至100mM。例如,该制剂中Gly的浓度可以为约0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、1.0、2.0、3.0、4.0、5.0、10、15、20、25、30、40、50、60、70、80、90或者100mM。在一些实施方式中,该防腐剂是间甲酚或者其结构类似物。该制剂中间甲酚或者结构类似物的浓度可以从约0.1%至1% (w/v),例如从约0.1%至0.5% (w/v) 或者从约0.3%至0.5% (w/v)。在一些实施方式中,该稳定剂是Phe和Gly以及该防腐剂是间甲酚。本文提供的所述组合物或者制剂周密地考虑了本文提供的AvPAL变异体、稳定剂、缓冲剂、等渗剂、防腐剂和/或其他成分的任何组合以及相关的pH值和浓度。还提供了利用这类药物组合物或者制剂来治疗HPA(例如PKU) 或者癌症的方法。

[0043] 在具体的实施方式中,该药物组合物或者制剂包括聚乙二醇化的AvPAL变异体,其中该AvPAL变异体和聚乙二醇的比率为约1:3 (1:3AvPAL:PEG) 以及该AvPAL变异体的位置

503和565上的半胱氨酸残基已被丝氨酸残基取代;以及药学上可接受的载体,其包括作为缓冲剂的Tris-HCl、作为等渗剂的NaCl、作为稳定剂的Phe和Gly以及可选择地,作为防腐剂(即抗菌剂)的间甲酚。在一个实施方式中,该制剂中聚乙二醇化的AvPAL变异体的浓度为约 $10+/-5\text{mg/mL}$ (约 $0.16+/-0.08\text{mM}$)。在一些实施方式中,该制剂中Tris-HCl的浓度为约 $10\text{mM}+/-5\text{mM}$ 。在其他的实施方式中,该制剂的pH为约pH 7.3 $+/-0.3$ 。在另一实施方式中,该制剂中NaCl的浓度为约 $135\text{mM}+/-15\text{mM}$ 。在一些实施方式中,该制剂中Phe的浓度为约 $1+/-0.5\text{mM}$ 。在一些实施方式中,该制剂中Gly的浓度为约 $10.5+/-9.5\text{mM}$ 。在其他的实施方式中,该制剂中Gly的浓度为约 $60+/-40\text{mM}$ 。在其他的实施方式中,该制剂中Gly的浓度为约 $50.5+/-49.5\text{mM}$ 。在一些实施方式中,该制剂包括作为防腐剂的间甲酚。在另一实施方式中,该制剂中间甲酚的浓度为约 $0.4\%+/-0.1\%$ (w/v)。也周密考虑了上述浓度和pH值的组合。还提供利用这类药物组合物或者制剂来治疗HPA(例如PKU)或者癌症的方法。

[0044] 在第五个方面,本文提供以使得能够在治疗上采用酶的量生产重组原核PAL或者其生物活性片段、突变体、变异体或者类似物的方法。在某些实施方式中,PAL衍生自细菌包括但不限于链霉菌属、堆囊粘细菌属、假单胞菌属和蓝细菌属(例如念珠藻和鱼腥藻)。在一些实施方式中,PAL衍生自如下菌种:海洋链霉菌、轮丝链霉菌、纤维堆囊粘细菌、点形念珠藻、烟草念珠藻(*Nostoc tobacum*)、多变鱼腥藻或者恶臭假单胞菌。在某些实施方式中,PAL衍生自蓝细菌菌种:点形念珠藻或者多变鱼腥藻。在具体的实施方式中,PAL衍生自多变鱼腥藻。在另一实施方式中,原核PAL酶活性利用cDNA或者DNA序列生成,所述序列衍生自有时被描述为为HAL活性编码、以PAL-HAL基序为特征,但具有不同于HAL的关键PAL残基的序列。

[0045] 在一个宽泛的实施方式中,该方法包括将为全部或者部分的原核PAL或者其生物活性片段、突变体、变异体或者类似物编码的cDNA或者DNA转化入适于其表达的细胞的步骤。在一个实施方式中,表达载体被用于将DNA转移入适于其表达的细胞或者细胞系。在具体的实施方式中,将该cDNA或者DNA转化入大肠杆菌以及将重组原核PAL过表达,可选择地为融合蛋白质。在进一步的实施方式中,该生产原核PAL的方法包括:(a)

[0046] 在合适的生长培养基中培育细胞至合理密度,以产生种子培养物,所述细胞已通过编码全部原核PAL或者其生物活性片段、突变体、变异体或者类似物的cDNA或者DNA进行转化,(b)将转化的细胞引入生物反应器,(c)向该生物反应器提供合适的生长培养基,以及(d)从该培养基分离包含该酶的转染细胞。

[0047] 在一个实施方式中,在大肠杆菌BLR(DE3)/pLysS(Novagen)或者大肠杆菌BL21(DE3)/pLysS(Invitrogen)细胞中,在具有诱导型启动子(例如具有IPTG(异丙基- β -D-硫代吡喃半乳糖苷)的载体(例如pIBX1(Su,等人,Appl.Environ.Microbiol.62:2723-2734(1996))或者pET28a(Invitrogen))中,在存在或者不存在N末端标签(例如八聚组氨酰基标签)的情况下,将重组原核PAL或者其生物活性片段、突变体、变异体或者类似物过表达。在具体的实施方式中,该生产原核PAL的方法包括:(1)在摇瓶中从甘油菌为生物反应器/发酵罐培育种子培养物;(2)以补料分批方式将这类种子培养物引入可控的生物反应器;(3)在补充有葡萄糖的培养基中、pH为7.8、溶解氧 $>20\%$ 、搅动速度高达1200rpm、温度为 30°C 的条件下培育所述培养物,直至细胞密度达到 $70-1000\text{D}_{600}$ ($\sim 22-25\text{hr}$);(4)用 0.4mM IPTG诱导所述培养物;(5)在降低的温度 22 至 26°C 下培育所述培养物,直至活性变化值 $<0.1\text{IU/mL}$ (大

约40-48hr以及OD₆₀₀通常为200);以及(6)通过连续离心收获细菌。在一个实施方式中,细胞培养基包括酵母提取蛋白质、蛋白胨-胰化蛋白胨、葡萄糖、甘油、酪蛋白氨基酸、痕量盐和磷酸盐缓冲盐。

[0048] 在具体的实施方式中,该重组原核PAL或者其生物活性片段、突变体、变异体或者类似物是AvPAL变异体,以及该生产AvPAL变异体的方法包括:(1)于37℃下在摇瓶中从表达AvPAL变异体的细菌的甘油菌为生物反应器/发酵罐培育种子培养物,直至细胞密度达到2至40D₆₀₀; (2)将该种子培养物转移入可控的第一生物反应器(例如4L发酵罐); (3)于37℃下培育该培养物,直至细胞密度达到10至200D₆₀₀; (4)将该第一生物反应器(例如4L发酵)培养物转移入可控的第二生物反应器(例如100L发酵罐); (5)于37℃下培育该培养物,直至细胞密度达到至少2000D₆₀₀; (6)冷却该培养物至约15℃;以及(7)通过离心作用从该培养基分离得到细菌细胞。在一些实施方式中,该方法进一步包括将该第二生物反应器(例如100L发酵)培养物转移入可控的第三生物反应器(例如500L发酵罐或者更大)以及于37℃下培育该培养物,直至细胞密度达到至少2000D₆₀₀,然后冷却该培养物以及从该培养基分离得到细菌细胞。在一个实施方式中,该AvPAL变异体的位置503和565上的半胱氨酸残基已被丝氨酸残基取代(SEQ ID NO:11)。

[0049] 在第六方面,本文提供一种纯化原核PAL或者其生物活性片段、突变体、变异体或者类似物的方法。根据第一实施方式,培育转化的细胞团块(cell mass)并使其破碎,留下粗制重组酶。可从粗制块(crude bulk)分离外源性物质,以防止污染柱。可以利用一种或者几种色谱树脂进行色谱纯化。接着,可以将纯化的蛋白质配制为缓冲液,设计该缓冲液以在较长的时间段内提供稳定的活性。在另一实施方式中,该纯化原核PAL的方法包括:(a)对包含重组原核PAL的细菌进行裂解;(b)对裂解物进行热处理,以使大肠杆菌蛋白质变性并沉淀;(c)利用第二连续离心步骤和/或深层过滤澄清该裂解物;(d)使澄清的裂解物通过木炭过滤步骤;(e)在(d)中使滤出液通过中间深层过滤步骤(如用一种或者多种深层过滤器,例如Pa11 EKSP、Pa11 KS50P和/或Pa11 EKMP过滤器),然后通过最终的过滤步骤(如用Sartorius Sartopore或者Pa11 EDF 0.2μm过滤器);(f)使最终的滤出液通过疏水作用色谱树脂,例如丁基疏水作用色谱;(g)在(f)中使洗出液通过阴离子色谱树脂,例如Q离子交换柱;(h)可选择地,通过具有切向流过滤的缓冲液更换来回收最终产品;以及(i)对最终产品进行消毒。本领域的技术人员容易地理解可以省略或者取代色谱法步骤的一步或者多步;或者可以改变色谱法步骤的顺序。最后,根据需要可以进行适当的消毒步骤。本文还提供纯化的原核PAL或者其生物活性片段、突变体、变异体或者类似物(例如通过本文提供的纯化方法而产生),及其药物组合物和制剂,及其使用方法。

[0050] 在具体的实施方式中,该重组原核PAL或者其生物活性片段、突变体、变异体或者类似物是具有最小聚集的聚乙二醇化的AvPAL变异体,以及该纯化聚乙二醇化的AvPAL变异体的方法包括:(a)通过均化作用裂解包含AvPAL变异体的细菌细胞,以生成细胞裂解物;(b)加热该细胞裂解物至65℃达30至120min;(c)离心加热的细胞裂解物,其中保留包括该AvPAL变异体的上清液;(d)过滤该上清液,以去除沉淀物;(e)通过在阴离子交换(AIEX)柱(例如Toyopearl Giga Cap Q 650M柱),然后是疏水作用(HIC)柱(例如Toyopearl丁基650M柱)上进行的依序层析法从污染蛋白质中分离该AvPAL变异体,其中来自该HIC柱的洗出液包括该AvPAL变异体;(f)对来自该HIC柱的包括该AvPAL变异体的洗出液进行超滤或者超

滤/渗滤; (g) 通过混合聚乙二醇与该AvPAL变异体对该AvPAL变异体进行聚乙二醇化; (h) 通过超滤/渗滤将游离的聚乙二醇从聚乙二醇化的AvPAL变异体除去; 以及 (h) 配制该聚乙二醇化的AvPAL变异体。在一个实施方式中, 所述AvPAL变异体的位置503和565上的半胱氨酸残基已被丝氨酸残基取代 (SEQ ID NO:11)。在一个实施方式中, 该聚乙二醇化的AvPAL变异体包括聚乙二醇。在一个实施方式中, 该聚乙二醇化的AvPAL变异体包括聚乙二醇, 其中AvPAL变异体和该聚乙二醇的比率为约1:3。在一个实施方式中, 该AIEX柱是Toyopearl Giga Cap Q 650M柱。在一个实施方式中, 该HIC柱是Toyopearl丁基650M柱。

[0051] 在一个实施方式中, 该纯化聚乙二醇化的AvPAL变异体的方法进一步包括冷冻和融化来自该HIC柱的包括该AvPAL变异体的洗出液, 其中在冷冻之前, 向HIC柱洗出液添加一种或者多种多元醇或者糖, 例如约2.5%、5%、7.5%、10%、12.5%或者15%的甘油、蔗糖、葡萄糖、海藻糖、甘露醇或者山梨醇或诸如此类。在一个实施方式中, 该多元醇是甘油。在一个实施方式中, 甘油的浓度是10% (v/v)。在一个实施方式中, 该糖是蔗糖。在一个实施方式中, 蔗糖的浓度是10% (v/v)。在一个实施方式中, 该纯化聚乙二醇化的AvPAL变异体的方法进一步包括在冷冻之前, 通过超滤将来自该HIC柱的包括该AvPAL变异体的洗出液浓缩至约16X或更多 (例如约2X、3X、4X、5X、6X、8X、10X、12X、14X、16X、18X、20X或者25X)。在一个实施方式中, 利用离散 (discrete) 温度步骤冷冻来自该HIC柱的包括该AvPAL变异体的洗出液。在一个实施方式中, 利用离散温度步骤融化来自该HIC柱的包括该AvPAL变异体的洗出液。在一个实施方式中, 利用离散温度步骤冷冻和融化来自该HIC柱的包括该AvPAL变异体的洗出液。在一个实施方式中, 聚乙二醇化后, 在包括磷酸钾 (Kpi) 和一种或者多种降低聚集和/或保持酶活性的药剂 (例如反式肉桂酸 (t-CA) 和甘油) 的渗滤缓冲液中渗滤来自该HIC柱的包括该AvPAL变异体的洗出液。在一个实施方式中, 该渗滤缓冲液包括50mM Kpi、10mM t-CA、5% 甘油, pH为8.5。在一个实施方式中, 向来自该HIC柱的包括该AvPAL变异体的超滤/渗滤洗出液添加一种非离子去垢剂, 例如聚山梨醇酯80 (PS80)。在一个实施方式中, 该非离子去垢剂是PS80。在一个实施方式中, PS80的浓度是0.02% (v/v)。本文还提供具有最小聚集的聚乙二醇化的AvPAL变异体 (例如通过本文提供的纯化方法而产生), 及其药物组合物和制剂, 及其使用方法。

[0052] 在具体的实施方式中, 该重组原核PAL或者其生物活性片段、突变体、变异体或者类似物是具有最小聚集的AvPAL变异体, 以及该纯化AvPAL变异体的方法包括: (a) 通过均化作用裂解包含AvPAL变异体的细菌细胞, 以生成细胞裂解物; (b) 加热该细胞裂解物至65℃达30至120min; (c) 离心加热的细胞裂解物, 其中保留包括该AvPAL变异体的上清液; (d) 过滤该上清液, 以去除沉淀物; (e) 通过在AIEX柱 (例如Toyopearl Giga Cap Q650M), 然后是疏水作用HIC柱 (例如Toyopearl丁基650M) 上进行的依序层析法从污染蛋白质分离该AvPAL变异体, 其中来自该HIC柱的洗出液包括该AvPAL变异体。在一个实施方式中, 在一个实施方式中, 所述AvPAL变异体的位置503和565上的半胱氨酸残基已被丝氨酸残基取代 (SEQ ID NO:11)。在一个实施方式中, 该AIEX柱是Toyopearl Giga Cap Q 650M柱。在一个实施方式中, 该HIC柱是Toyopearl丁基650M柱。本文还提供具有最小聚集的AvPAL变异体 (例如通过本文提供的纯化方法而产生), 及其药物组合物和制剂, 及其使用方法。

[0053] 在第七个方面, 本文提供用于识别可以通过使包含升高水平的苯丙氨酸的细胞接触细菌PAL来预防、改善或者治疗升高水平的苯丙氨酸的原核PAL或者其生物活性片段、突

变体、变异体或者类似物以及测定该细菌PAL是否降低这类升高水平的苯丙氨酸的筛选检定及其方法。这类筛选检定还可以包括先创建变异体,接着检测该变异体的活体外苯丙氨酸转化活性的步骤,该变异体在如下区域包括保守性或者非保守性取代:活性位点,例如来自海洋链霉菌的EncP中的Gly142、Thr-Ser-Gly三联体(143-145)、Asp146、Leu147、Asn196、Ile195、Leu192、Leu76、Asn79、Met400、Thr428、Gln432或者其他原核PAL(例如点形念珠藻或者多变鱼腥藻)中其等价物,其相当于来自圆红冬孢酵母菌的PAL(RtPAL)中的残基Ser210、Ala-Ser-Gly三联体(211-213)、Asp214、Leu215、Asn270、Val269、Leu266、Leu134、His137、Lys468、Glu496、Gln500;与该活性位点相邻的区域;或者遍布整个多肽序列的区域。在某些实施方式中,该方法是一种高产量检定。在一个实施方式中,利用生物信息学途径对菌种的完整基因组进行测序并进行关于是否存在原核PAL同系物的筛选。在另一实施方式中,这类同系物的蛋白质产品的PAL催化活性通过,例如检测在活体外将苯丙氨酸转化为反式肉桂酸的能力来确定。

[0054] 本文提供将原核PAL组合物用于诊断疾病的方法,所述疾病包含但不仅限于全部或者部分地由PAH活性不足导致的疾病。在一个实施方式中,原核PAL被用于测量血液、血浆或者血清样本中的Phe水平。本文还提供一种诊断试剂盒,所述诊断试剂盒包括用于监测对象的血液、血浆或者血清样本的Phe水平的原核PAL。

[0055] 将由下文的详细描述可见本文提供的所述组合物和方法的其他特征和优点。然而,应当理解的是,详细的描述和具体的实施例在表明本发明的具体实施方式的同时,仅仅通过描述性方法提供,因为基于该详细的描述,本发明精神和范围内的各种改变和修饰对本领域的技术人员来说将变得显而易见。

附图说明

[0056] 图1.图1A:点形念珠藻PAL(SEQ ID NO:1)的基因序列;图1B:点形念珠藻PAL(SEQ ID NO:2)的蛋白质序列。

[0057] 图2.图2A:多变鱼腥藻PAL(SEQ ID NO:3)的基因序列;图2B:多变鱼腥藻PAL(SEQ ID NO:4)的蛋白质序列。

[0058] 图3.来自原核生物和真核生物的芳香族氨基酸解氨酶的相关度树(Relatedness tree)。序列检索自GenBank(登录号提供在括号内)以及利用邻接法使用ClustalX(1.83)进行比对。

[0059] 图4.点形念珠藻PAL(SEQ ID NO:2)和多变鱼腥藻PAL(SEQ ID NO:4)与EncP PAL(SEQ ID.No.5)和恶臭假单胞菌HAL(SEQ ID NO:6)的藻蛋白质序列的比对。对应于PAL或者HAL活性的活性位点残基被显著标出。

[0060] 图5.图5A:在位置64具有半胱氨酸到丝氨酸的取代的多变鱼腥藻苯丙氨酸解氨酶(PAL)的蛋白质序列(AvPAL_C64S,SEQ ID NO:7);图5B:在位置318具有半胱氨酸到丝氨酸的取代的多变鱼腥藻PAL的蛋白质序列(AvPAL_C318S,SEQ ID NO:8);图5C:在位置503具有半胱氨酸到丝氨酸的取代的多变鱼腥藻PAL的蛋白质序列(AvPAL_C503S,SEQ ID NO:9);图5D:在位置565具有半胱氨酸到丝氨酸的取代的多变鱼腥藻PAL的蛋白质序列(AvPAL_C565S,SEQ ID NO:10);图5E:在位置503和565具有半胱氨酸到丝氨酸的取代的多变鱼腥藻PAL的蛋白质序列(AvPAL_C565SC503S,SEQ ID NO:11)。半胱氨酸到丝氨酸的取代以黑体下

划线标出。

[0061] 图6.图6A:37℃下孵育不同的时间段之后,非聚乙二醇化AvPAL的位置 565或者两位置565和503上半胱氨酸到丝氨酸的取代对活体外PAL酶比活的影响。图6B:37℃下孵育不同的时间段之后,聚乙二醇化AvPAL的位置 565或者两位置565和503上半胱氨酸到丝氨酸的取代对活体外PAL酶比活的影响。

[0062] 图7.图7A:如变性条件(左边小图)或者天然条件(右边小图)下通过凝胶电泳进行分析所得,AvPAL中半胱氨酸到丝氨酸的取代对溶液中蛋白质聚集体形成的影响。图7B:如通过SEC-HPLC进行分析所得,AvPAL中半胱氨酸到丝氨酸的取代对溶液中蛋白质聚集体形成的影响。

[0063] 图8.各种PEG浓度下,AvPAL中(db1突变体)位置565和503上的半胱氨酸到丝氨酸的取代对位点特异性聚乙二醇化作用的影响。

[0064] 图9.如通过SEC-HPLC分析所得,用0.05%吐温80或者10mM EDTA处理AvPAL对溶液中蛋白质聚集体形成的影响。

[0065] 图10.图10A:如通过SEC-HPLC分析所得,通过二硫苏糖醇(DTT)的AvPAL的处理对溶液中蛋白质聚集体形成的影响。图10B:如通过SEC-HPLC分析所得,通过DTT和N-乙基马来酰亚胺(NEM)处理AvPAL对溶液中蛋白质聚集体形成的影响。

[0066] 图11.如图所示,在4℃(上部小图)、25℃(中部小图)和37℃(下部小图)存储达不同的时间段(天数)的条件下,Phe和反式肉桂酸(t-CA)对在位置565和503(AvPAL_C565SC503S)上具有半胱氨酸到丝氨酸取代的聚乙二醇化AvPAL(rAV-PAL-PEG)的酶活性的影响。

[0067] 图12.如图所示,在4℃(上部小图)、25℃(中部小图)和37℃(下部小图)存储达不同的时间段(天数)的条件下,1和5mM酪氨酸(Tyr)对在位置565和503(AvPAL_C565SC503S)上具有半胱氨酸到丝氨酸取代的聚乙二醇化AvPAL(rAV-PAL-PEG)的酶活性的影响。

[0068] 图13.图13A:如图所示,在4℃(上部小图)和37℃(下部小图)存储达不同的时间段(周数)的条件下,Phe、苯甲酸和吡哆胺,单独或者组合地,对在位置565和503(AvPAL_C565SC503S)上具有半胱氨酸到丝氨酸取代的聚乙二醇化AvPAL(rAV-PAL-PEG)的酶活性的影响。图13B:显示了苯甲酸(左边)、苯丙氨酸(中间)和反式肉桂酸(右边)的化学结构。

[0069] 图14.如图所示,在4℃(上部小图)、25℃(中部小图)和40℃(下部小图)存储达不同的时间段(周数)的条件下,防腐剂苯甲醇(Benz'OH,1.5%)或者间甲酚(mCresol,0.3%)和/或稳定剂L-苯丙氨酸(Phe,1mM)和/或甘氨酸(Gly,1mM)对在位置565和503(AvPAL_C565SC503S)上具有半胱氨酸到丝氨酸取代的聚乙二醇化AvPAL(rAV-PAL-PEG)的比活(U/mg)的影响。

[0070] 图15.图15A:如图所示,在25℃(上部小图)和40℃(下部小图)存储达不同的时间段(如图所示,周数或者月数)的条件下,1至20mM的甘氨酸(Gly)对在位置565和503(AvPAL_C565SC503S)上具有半胱氨酸到丝氨酸取代的聚乙二醇化的AvPAL的归一化活性(%)的影响。图15B:如图所示,在40℃存储达不同的时间段(如图所示,周数)的条件下,20、50或者100mM的甘氨酸(Gly)对在位置565和503(AvPAL_C565SC503S)上具有半胱氨酸到丝氨酸取代的聚乙二醇化的AvPAL的酶活性(U/mL)的影响。

[0071] 图16.与服用溶媒或者4.0IU野生型聚乙二醇化的AvPAL的ENU2小鼠相比,聚乙二

醇化的AvPAL中位置565和503 (AvPAL_C565SC503S) 上的半胱氨酸到丝氨酸的取代对服用0.25IU (上部小图)、1.0IU (中部小图) 或者4.0IU (下部小图) 酶的ENU2小鼠活体内Phe水平的影响。

[0072] 图17. 与服用溶媒或者4.0IU野生型聚乙二醇化的AvPAL的ENU2小鼠相比, 聚乙二醇化的AvPAL中位置565和503 (AvPAL_C565SC503S) 上的半胱氨酸到丝氨酸的取代对服用0.25IU、1.0IU或者4.0IU酶的ENU2小鼠的体重的影响。

[0073] 图18. 与服用溶媒或者4.0IU野生型聚乙二醇化的AvPAL (AvPAL:PEG比率为1:3) 的ENU2小鼠相比, 聚乙二醇化的AvPAL中位置565和503 (AvPAL C503S/565S) 上的半胱氨酸到丝氨酸的取代对服用4IU酶 (AvPAL:PEG比率不同, 为1:1.6 (上部小图)、1:2.4 (中部小图) 或者1:3 (下部小图)) 的ENU2小鼠活体内Phe水平的影响。

[0074] 图19. 与服用溶媒或者4.0IU野生型聚乙二醇化的AvPAL (AvPAL:PEG比率为1:3) 的ENU2小鼠相比, 聚乙二醇化的AvPAL中位置565和503 (AvPAL_C565SC503S) 上的半胱氨酸到丝氨酸的取代对服用4IU酶 (AvPAL:PEG比率不同, 为1:1.6、1:2.4或者1:3) 的ENU2小鼠的体重的影响。

[0075] 图20. 图20A: 以4mg/kg (菱形) 和12mg/kg (正方形) 的剂量向食蟹猴单次皮下注射在位置565和503 (AvPAL_C565SC503S) 上具有半胱氨酸到丝氨酸取代的聚乙二醇化AvPAL随着时间的推移 (hr) 对血浆AvPAL_C565SC503S水平的影响。图20B: 以4mg/kg的剂量向食蟹猴单次皮下注射AvPAL_C565SC503S随着时间的推移 (hr) 对血浆AvPAL_C565SC503S (菱形) 和苯丙氨酸 (正方形) 水平的影响。

[0076] 图21. 图21A: 以1mg/kg (菱形)、5mg/kg (正方形) 和25mg/kg (三角形) 的剂量向大鼠单次静脉注射在位置 565和 503 (AvPAL_C565SC503S) 上具有半胱氨酸到丝氨酸取代的聚乙二醇化AvPAL随着时间的推移 (hr) 对血浆AvPAL_C565SC503S水平的影响。图21B: 以10mg/kg (菱形)、25mg/kg (正方形) 和250mg/kg (三角形) 的剂量向大鼠单次皮下注射AvPAL_C565SC503S水平随着时间的推移 (hr) 对血浆AvPAL_C565SC503S的影响。

[0077] 图22. 用于大规模制造具有最小聚集的聚乙二醇化AvPAL变异体多肽的生产工艺的流程图。指向左侧的箭头表示工序, 其是降低聚集的目标。

[0078] 发明详述

[0079] 本文提供原核PAL和生物活性片段、突变体、变异体或类似物的组合物及其在治疗方面的用途, 包含对高苯丙氨酸血症 (包含苯丙酮尿症) 以及其他疾病 (包含癌症) 的治疗。

[0080] A. 定义

[0081] 除非另有说明, 本申请 (包含说明书和权利要求书) 所用的下文的术语其定义在下文提供。必须指出的是, 如说明书和所附的权利要求书所用, 单数形式的“一种”和“该”包含所指对象的复数含义, 除非上下文另有明确规定。标准化学术语的定义可以见于参考文献, 包括Carey和Sundberg, *Advanced Organic Chemistry*, 3rd Edition, Vols. A和B (Plenum Press, New York 1992)。除非另行指明, 本发明实践中将采用本技术领域传统的有机合成化学方法、质谱分析法、色谱制备和分析法、蛋白质化学、生物化学、重组DNA技术和药理学。见, 例如T.E.Creighton, *Proteins: Structures and Molecular Properties* (W.H.Freeman and Company, 1993); A.L.Lehninger, *Biochemistry* (Worth Publishers, Inc., 4th Edition, 2004); Sambrook, 等人, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2nd Edition, 1989);

Methods In Enzymology (S.Colowick和N.Kaplan eds.,Academic Press,Inc.); Remington's Pharmaceutical Sciences,18th Edition (Easton,Pennsylvania:Mack Publishing Company,1990)。

[0082] 无论是上文还是下文,本文引用的所有出版物、专利和专利申请整体以引用方式并入本文。

[0083] 如下的氨基酸缩写词在全文中都有使用:

[0084] 丙氨酸:Ala (A)	精氨酸:Arg (R)
[0085] 天冬酰胺:Asn (N)	天冬氨酸:Asp (D)
[0086] 半胱氨酸:Cys (C)	谷氨酸:Gln (Q)
[0087] 谷氨酸:Glu (E)	甘氨酸:Gly (G)
[0088] 组氨酸:His (H)	异亮氨酸:Ile (I)
[0089] 亮氨酸:Leu (L)	赖氨酸:Lys (K)
[0090] 蛋氨酸:Met (M)	苯丙氨酸:Phe (F)
[0091] 脯氨酸:Pro (P)	丝氨酸:Ser (S)
[0092] 苏氨酸:Thr (T)	色氨酸:Trp (W)
[0093] 酪氨酸:Tyr (Y)	缬氨酸:Val (V)

[0094] “多聚核苷酸”指由核苷酸单元组成的聚合物。多聚核苷酸包括天然存在的核酸,例如脱氧核糖核酸(“DNA”)和核糖核酸(“RNA”)以及核酸类似物。核酸类似物包括那些包含有与其它核苷酸而非天然存在的磷酸二酯键连接的非天然存在的碱基、核苷酸的核酸类似物,或者包括通过连接部分而非磷酸二酯键连接的碱基的核酸类似物。因此,核苷酸类似物包括,例如以及不限于,磷硫酰、二硫代磷酸酯、磷酸三酯、氨基磷酸酯、硼烷磷酸酯、磷酸甲酯、手性-磷酸甲酯、2-0-甲基核糖核苷酸、肽-核酸(PNA)等等。这类多聚核苷酸可以例如,利用自动化的DNA合成仪合成。术语“核酸”通常指大的多聚核苷酸。术语“寡聚核苷酸”通常指短的多聚核苷酸,通常不大于约50个核苷酸。应理解的是,当核苷酸序列由DNA序列(即,A、T、G、C)表示时,这还包括RNA序列(即,A、U、G、C)其中“U”取代了“T”。

[0095] “cDNA”指单链或者双链形式的与mRNA互补或者相同的DNA。

[0096] 本文中的传统符号用于描述多聚核苷酸序列:单链多聚核苷酸序列的左端是5' 末端;双链多聚核苷酸序列左手方向被称为5' 方向。从5' 到3' 添加核苷酸至新生RNA转录物的方向被称为转录方向。与mRNA具有相同序列的DNA链被称为“编码链”;在与由DNA转录得到的mRNA具有相同序列的该DNA链上的、位于RNA转录物的5' 到5' 末端的序列被称为“上游序列”;在与RNA具有相同序列的DNA链上的、位于编码RNA转录物的3' 到3' 末端的序列被称为“下游序列”。

[0097] “互补”指两种多聚核苷酸的相互作用面具有拓扑兼容性或者匹配在一起。因此,所述两种分子可以描述为是互补的,而且,接触面特性彼此互补。如果第一多聚核苷酸的核苷酸序列与第二多聚核苷酸的结合有多聚核苷酸的配体的核苷酸序列相同,那么该第一多聚核苷酸与该第二多聚核苷酸互补。因此,序列为5' -TATAC-3' 的多聚核苷酸与序列为5' -GTATA-3' 的多聚核苷酸是互补的。

[0098] 如果与目标核苷酸序列(subject nucleotide sequence)互补的核苷酸序列与参考核苷酸序列(reference nucleotide sequence)大体上相同,那么该核苷酸序列与该参

考核苷酸序列“大体上互补”。

[0099] “编码”指一种多聚核苷酸(例如基因、cDNA或者mRNA)中核苷酸的特异性序列用作在生化过程中合成其他聚合物和大分子的模板的固有属性,所述生化过程具有定义的核苷酸序列(即rRNA、tRNA和mRNA)或者定义的氨基酸序列;以及由此产生的生物学属性。因此,如果由一种基因产生的mRNA的转录和翻译在细胞或者其他生物系统中产生了蛋白质,那么就说该基因编码蛋白质。基因或者cDNA的编码链(其核苷酸序列与mRNA序列是相同的并且通常提供于序列表中)和非编码链(用作转录模板)可以均视为编码该基因或者cDNA的蛋白质或者其他产品。除非另行指明,“编码氨基酸序列的核苷酸序列”包括所有的彼此互为简并序列以及编码相同的氨基酸序列的核苷酸序列。编码蛋白质和RNA的核苷酸序列可以包括内含子。

[0100] “重组多聚核苷酸”指序列不是天然地结合在一起的多聚核苷酸。扩增或者装配的重组多聚核苷酸可以包含在合适的载体中,以及该载体可用于转化合适的宿主细胞。包括该重组多聚核苷酸的宿主细胞便被称为“重组宿主细胞”。然后在该重组宿主细胞中表达基因,以产生,例如“重组多肽”。重组多聚核苷酸也可发挥非编码功能(例如启动子、复制起点、核糖体结合位点等等)。

[0101] “表达控制序列”指多聚核苷酸中,调节可操作地连接至其的核苷酸序列的表达(转录和/或翻译)的核苷酸序列。“可操作地连接”指两部分之间的功能关系,其中一部分的活性(例如调节转录的能力)造成对另一部分的影响(例如序列的转录)。表达控制序列可以包括,例如以及不限于,启动子(例如诱导型启动子或者组成型启动子)、增强子、转录终止子、起始密码子(即ATG)、内含子剪接信号和终止密码子的序列。

[0102] “表达载体”指包括重组多聚核苷酸的载体,该重组多聚核苷酸包括可操作地连接至待表达的核苷酸序列的表达控制序列。表达载体包括足够的用于表达的顺式作用元件;用于表达的其他元件可以由宿主细胞或者活体外表达系统提供。表达载体包括本领域已知的所有那些表达载体,例如粘粒、质粒(例如裸露的质粒或者包含在脂质体内的质粒)以及结合有重组多聚核苷酸的病毒。

[0103] “扩增”指借此可复制多聚核苷酸序列,以及因此将其扩展为更多数量的多聚核苷酸分子的任何手段,例如逆转录、聚合酶链反应和连接酶链反应。

[0104] “引物”指能够特异性杂交至指定的多聚核苷酸模板并为互补多聚核苷酸的合成提供起始点的多聚核苷酸。当多聚核苷酸引物置于下面的条件下时,这类合成便会发生:其中,即,在核苷酸、互补多聚核苷酸模板和用于聚合反应的药剂(例如DNA聚合酶)的存在下,对合成进行了诱导。引物通常是单键的,但也可以是双键的。引物通常是脱氧核糖核酸,但很多合成引物和天然存在的引物也有多种应用。引物与经设计,杂交有该引物并将该引物作为合成起始位点的模板是互补的,但是该引物并不必反映该模板的确切序列。在这种情况下,引物特异性杂交至模板取决于杂交条件的严格性。引物可以用,例如显色、放射性或者荧光部分进行标记以及可用作可检测的部分。

[0105] “多肽”是由如下成分组成的聚合物:氨基酸残基、相关的天然存在的结构变异体及其经由肽键连接的合成的非天然存在的类似物、相关的天然存在的结构变异体及其合成的非天然存在的类似物。合成的多肽可以例如,利用自动化的多肽合成仪来合成。术语“蛋白质”通常指大的多肽。术语“肽”通常指短的多肽。

[0106] 本文中用传统符号描述多肽序列：多肽序列的左端是氨基末端；多肽序列的右端是羧基末端。

[0107] “保守性取代”指用功能上相似的氨基酸取代氨基酸的多肽。下面六组中每组包含彼此互为保守性取代的氨基酸：

[0108] 1) 丙氨酸(A)、丝氨酸(S)、苏氨酸(T)；

[0109] 2) 天冬氨酸(D)、谷氨酸(E)；

[0110] 3) 天冬酰胺(N)、谷氨酰胺(Q)；

[0111] 4) 精氨酸(R)、赖氨酸(K)；

[0112] 5) 异亮氨酸(I)、亮氨酸(L)、蛋氨酸(M)、缬氨酸(V)；以及

[0113] 6) 苯丙氨酸(F)、酪氨酸(Y)、色氨酸(W)。

[0114] 氨基酸还可以分为如下几组：

[0115] (1) 疏水性：Met、Ala、Val、Leu、Ile；

[0116] (2) 中性亲水性：Cys、Ser、Thr；

[0117] (3) 酸性：Asp、Glu；

[0118] (4) 碱性：Asn、Gln、His、Lys、Arg；

[0119] (5) 影响链取向的残基：Gly、Pro；以及

[0120] (6) 芳香族：Trp、Tyr、Phe。

[0121] 术语“一致”或者百分比“一致度”，在两种或者两种以上的多聚核苷酸或者多肽序列的情况下，是指当进行最大对应性比较和比对时，利用2005年9月19日提交的、申请号为11/230,374的现有同时待审的美国专利申请(其以引用方式全部并入本文)中描述的序列比较算法或者通过目检所测得，两种或者两种以上序列或者子序列是相同的或者具有指定百分比的相同的核苷酸或者氨基酸残基。

[0122] 短语“大体上同源”或者“大体上一致”，在两种核酸或者多肽的情况下，通常指当进行最大对应性比较和比对时，利用下文的序列比较算法之一或者通过目检所测得，两种或者两种以上序列或者子序列具有至少40%、60%、80%、90%、95%、98%的核苷酸或者氨基酸残基一致度。大体上一致性可存在于长度为至少约50个残基的序列的区域，例如至少约100个残基的区域或者至少约150个残基的区域。在某些实施方式中，所比较的生物聚合物的任一种或者两种其整个长度范围内都具有大体上一致的序列。

[0123] “大体上纯的”或者“分离的”指对象物种(object species)是存在的主要物种(即，基于摩尔，比组合物中任何其他个体的大分子物种都要含量丰富)，以及大体上纯的组分是这样的，其中该对象物种包括存在的所有大分子物种的至少约50% (基于摩尔)。通常，大体上纯的组合物指组合物中存在的大分子物种的约80%至90%或者更多是所需的纯化物种。如果组合物主要包括单一大分子物种，对象物种则纯化至基本上是均质的(通过常规的检测方法不能检测出组合物中的杂质物种)。溶剂类、小分子(<500Da)、稳定剂(例如BSA)和元素离子类不认为是本定义的大分子物种。在一些实施方式中，该原核PAL变异体组合物是大体上纯的或者分离的。在一些实施方式中，该原核PAL变异体组合物相对于在其合成中所用的大分子起始物料是大体上纯的或者分离的。在一些实施方式中，该药物组合物包括混有一种或者多种药学上可接受的赋形剂的大体上纯的或者分离的原核PAL变异体。

[0124] “天然存在的”，当应用于对象时，指该对象可以发现于自然界这一事实。例如，生

物(包含病毒)中存在的、可以从天然源中分离得到而未经实验室刻意的人工修饰的多肽或者多聚核苷酸序列便是天然存在的。

[0125] 术语“野生型”(wt)指生物的天然遗传形式。野生型不同于突变体形式(具有基因突变的生物)。

[0126] 术语“多肽”和“蛋白质”指氨基酸残基的聚合物以及不仅限于最小长度的产品。因此,肽、低聚肽、二聚体、多聚体等等包含在该定义内。全长蛋白质及其片段均包含在该定义内。该术语还包含多肽的表达后修饰,例如糖基化、乙酰化、磷酸化等等。进一步地,如本文所用,“多肽”指一种包含对原生序列所做的各种修饰(例如删除、添加和取代(通常是保守性的))的蛋白质,前提是该蛋白质保持所需的活性。这类多肽在本文中可称为“突变体”。这些修饰可以是刻意的,如通过定点诱变进行修饰;或者可以是非刻意的,例如通过在宿主体内发生突变而产生蛋白质或者由于PCR扩增发生错误而导致的修饰。

[0127] 如本文所用,“变异体”、“类似物”或者“衍生物”是一种与给定的化合物(例如肽)相比,具有大于约70%但小于100%的序列相似度的化合物(例如肽)。这类变异体、类似物或者衍生物可以由非天然存在的氨基酸残基(作为例子包括但不限于高精氨酸、鸟氨酸、青霉胺和正缬氨酸)以及天然存在的氨基酸残基组成。这类变异体、类似物或者衍生物还可以由一种或者多种D-氨基酸残基组成,以及可以包含两种或者两种以上氨基酸残基之间的非肽连接部分。

[0128] 如本文所用,PAL多肽(例如AvPAL)和水溶性聚合物(例如聚乙二醇或者PEG)的“比率”指该PAL多肽和该水溶性聚合物之间的反应条件摩尔比。例如,AvPAL和聚乙二醇约1:3的比率(1:3AvPAL:PEG)指在如下的反应条件下产生化学修饰的PAL:每3mol的聚乙二醇配比AvPAL上的约1mol赖氨酸残基。因为AvPAL单体具有18个赖氨酸残基,所以约1:3的AvPAL:PEG比率相当于在聚乙二醇化反应中1mol AvPAL/54mol PEG。下文实施例6中所描述的反应条件下,约1:3AvPAL:PEG的比率产生约10-12mol PEG/mol AvPAL单体。

[0129] 如本文所用,“治疗”指预防性治疗或者治疗性治疗(therapeutic treatment)或者诊断性治疗。

[0130] “预防性”治疗是对未表现出疾病或病理(即癌症)迹象或者只表现出早期迹象的对象采用的以降低病理发展风险为目的的治疗。本文提供的包含制剂的所述原核PAL组合物可以作为预防性治疗提供,以降低病理(即癌症)发展的可能性;或者在病理发展的情况下提供以尽量降低病理的严重程度。

[0131] “治疗性”治疗是向表现出病理(即癌症)迹象或者症状的对象采用的以减少或消除这些迹象或者症状为目的的治疗。该迹象或症状可以是生化、细胞、组织、功能、主观或客观方面的。该原核PAL组合物可作为治疗性治疗提供或者用于诊断。

[0132] “诊断”指识别病理状况(即癌症)的存在或者性质。诊断方法的特异性和选择性各不相同。一个具体的诊断方法可能不会提供对病情的明确诊断,但是如果该方法提供了积极的有助于诊断的启示,那就足够了。

[0133] “药物组合物”指一种适于作为药物用于动物对象(包含人类和哺乳动物)的组合物。药物组合物包括药理学上有效量的原核PAL多肽,还包括药学上可接受的载体。药物组合物指包括有效成分、构成载体的惰性成分和由如下途径产生的任何产品的组合物:直接或者间接地产自任何两种或者两种以上成分的组合、络合或者聚集;或者产自一种或者多

种成分的分解反应;或者产自一种或者多种成分的其他类型的反应或者相互作用。相应地,该药物组合物包含通过混合本文提供的原核PAL多肽与药学上可接受的载体而制得的任何组合物。

[0134] “药学上可接受的载体”指任何标准的药物赋形剂、溶媒、稀释液、稳定剂、防腐剂、增溶剂、乳化剂、佐剂和/或载体(例如,作为举例但不仅限于,磷酸盐缓冲盐水、5%的右旋糖水溶液和乳剂,如油/水或者水/油乳剂)以及各种类型的润湿剂和/或佐剂。合适的药物载体和制剂的描述见于Remington's Pharmaceutical Sciences, 19th Ed. (Mack Publishing Co., Easton, 1995)。待用的药物载体可以取决于预期的活性剂给药方式。典型的给药方式包括肠(例如口腔)或者肠胃外(例如皮下、肌内、静脉内或者腹膜内注射;或者局部、经皮或者透粘膜给药)。“药学上可接受的盐”是可以配制为原核PAL变异体组合物用作药物的盐,其包括,例如金属盐(钠盐、钾盐、镁盐、钙盐等等)以及氨盐或者有机胺盐。

[0135] “药学上可接受的”或者“药理学上可接受的”指从生物学上或者其他方面来讲,材料不是不良的,也就是说,该材料可以施用至个体,而不会产生任何不良的生物效果或者以任何有害的方式,与包含该材料的组合物中的任何组分相互作用。

[0136] 如本文所用,术语“单位剂型”指物理上分离的单位,其适于作为用于人类和动物对象的单位剂量,每个单位包含结合有药学上可接受的稀释液、载体或者溶媒的预定量的原核PAL变异体,所述预定量是经计算能足以产生所需效果的量。新型单位剂型的规格可取决于所采用的具体的原核PAL变异体和要实现的效果;以及宿主中与每种原核PAL变异体有关的药效。

[0137] “生理pH”或者“生理范围内的pH”指包含在大约 7.2至8.0范围内,更通常的情况下,包含在大约 7.2至7.6范围内的pH。

[0138] 如本文所用,术语“对象”包含哺乳动物和非哺乳动物。哺乳动物的例子包括但不限于哺乳动物类的任何一员:人类、非人类灵长类动物(例如黑猩猩以及其他猿类和猴类);农用动物,例如牛、马、绵羊、山羊、猪;家养动物,例如兔、狗和猫;实验用动物,包括啮齿类动物(例如大鼠、小鼠和豚鼠);以及诸如此类。非哺乳动物的例子包括但不限于鸟类、鱼类等等。该术语不表示具体的年龄或者性别。

[0139] B. 原核PAL变异体

[0140] 对特定大分子的可靠三维结构或者结构模型的阐明使得有可能进行合理的设计,以形成一种用于优化所述大分子的具体结构和/或功能的有效方法。利用三维结构或者结构模型来优化PAL酶的方法在2005年9月 19日提交的申请号为11/230,374的现有共同待审的美国专利中有描述,该专利以引用方式全部并入本文。原核PAL的高分辨三维蛋白质晶体结构可用于涉及蛋白质工程的方法,以改善原核PAL的生物化学和生物物理特性,以及提高原核PAL的活体内疗效。本文提供与野生型原核PAL相比,具有较大的苯丙氨酸转化活性和/或降低的免疫原性的原核PAL变异体。本文还提供,与野生型原核PAL相比,具有较大的生化稳定性和/或生化半衰期的原核PAL变异体。

[0141] 已有先前实验描述了修饰形式的PAL,例如PAL突变体(Schuster, 等人, FEBS Lett. 349(2):252-254(1994); Schuster, 等人, Proc Natl Acad Sci USA 92(18):8433-8437(1995); Langer, 等人, Biochemistry 36:10867-10871(1997); El-Batal, 等人, Acta Microbiol Pol. 49(1):51-61(2000); Röther, 等人, Eur. J. Biochem. 269:3065-3075

(2002)) 以及 HAL 突变体 (Taylor, 等人, J. Biol. Chem. 269 (44) : 27473-27477 (1994) ; Baedeker, 等人, Eur. J. Biochem. 269 (6) : 1790-1797 (2002)) 。

[0142] 具有增强的催化活性的原核 PAL 变异体

[0143] 本文提供的野生型 PAL 的生物活性位点可以进行修饰, 以优化 PAL 动力学特性。提供的活性是最大值一半时的底物浓度 K_m 与 PAL 在将 Phe 水平保持在可接受的范围内 (即 $120\mu\text{M}$ 至 $240\mu\text{M}$) 方面的疗效密切相关。 K_m 是酶对底物的亲和力。通过控制亲和力, 人们可以限制或者控制任何酶对不同浓度的底物的效力。例如, 如果 K_m 是 $1000\mu\text{M}$ (例如来自圆红冬孢酵母菌的 PAL), 当血液 Phe 水平为 $240\mu\text{M}$ 时酶的活性将降至约 12.5% 以及当血液 Phe 水平为 $60\mu\text{M}$ 时, 酶的活性将降至约 3%。如果 K_m 是 $240\mu\text{M}$, 当血液 Phe 水平为 $240\mu\text{M}$ 时, 酶的活性将降至约 50% 以及当血液 Phe 水平为 $60\mu\text{M}$ 时, 酶的活性将降至约 12%。如果 K_m 是 $120\mu\text{M}$, 当血液 Phe 水平为 $240\mu\text{M}$ 时, 酶的活性将降至约 70% 以及当血液 Phe 水平为 $60\mu\text{M}$ 时, 酶的活性将降至约 35%。最佳情况下, 治疗目的将是具有的酶有足够的活性来降低 Phe 同时将其维持在约 $120\mu\text{M}$ 至约 $240\mu\text{M}$ 的最佳范围内。具有高 K_m (即 $1000\mu\text{M}$) 的酶随着 Phe 水平降至正常范围内会很快失去活性以及还会需要高浓度或者大量的剂量给药, 这是不切实际的。另一方面, 具有太低 K_m 的酶可以迅速地降低 Phe 水平, 这对高苯丙氨酸血症可能是致命的, 但对管控癌症却可能是有用的。

[0144] 在一些实施方式中, 生物活性修饰的 PAL 具有至少约 0.1s^{-1} 或者大于约 0.5s^{-1} 的 k_{cat} 。在其他的实施方式中, 生物活性修饰的 PAL 具有至少约 0.2s^{-1} 或者大于约 1.0s^{-1} 的 k_{cat} 。在其他的实施方式中, 生物活性修饰的 PAL 具有约 $10\mu\text{M}$ 至约 $1000\mu\text{M}$ 之间的 K_m 。在其他的实施方式中, 生物活性修饰的 PAL 具有约 $100\mu\text{M}$ 至约 $1000\mu\text{M}$ 之间的 K_m 。在其他的实施方式中, 生物活性修饰的 PAL 显示出的酶催活性比野生型的高约 2 倍至约 1000 倍。在其他的实施方式中, 生物活性修饰的 PAL 显示出的酶催活性比野生型的高约 10% 至约 100%。这类生物活性修饰的 PAL 蛋白质可以利用本领域熟知的方法 (例如通过定点诱变) 形成。

[0145] 除了 H83 和 E414 (其分别被缬氨酸和谷氨酸残基取代) 之外, HAL 中全部的活性位点残基均显示存在于 EncP 中 (Xiang, L., 等人, J. Biol. Chem. 277: 32505-32509 (2002))。HAL 中 H83 在结合和定位活性位点上 L-组氨酸的咪唑部分以及固定酶结合阳离子中间体方面的作用已有研究 (Xiang, 等人, J. Bacteriology 187 (12) : 4286-4289 (2005) ; Xiang, 等人, J. Bacteriology 188 (14) : 5331 (2006))。有人提出, E414 的羧酸盐基团可在催化反应中用作碱。在这项研究中, 通过定点诱变生成了 EncP 突变体, 以评估通过 EncP 形成肉桂酸时 V83 的贡献。用组氨酸取代缬氨酸生成了突变体 V83H, 其以丧失 PAL 活性为特征。用丙氨酸取代缬氨酸产生了突变体 V83A, 其活性高于野生型 EncP V83A, 但是相比野生型酶 $23\mu\text{M}$ 的 K_m , 其 K_m 为 $120\mu\text{M}$, 对 L-苯丙氨酸的亲和力略低。然而, 与野生型 EncP 相比, V83A 具有更高的 k_{cat} 以及比野生型酶具有更高活性。

[0146] 具有降低的免疫原性的原核 PAL 变异体

[0147] 目前采用了许多策略来降低蛋白质免疫原性。在某些实施方式中, 为达到免疫响应最小化而引入的修饰不破坏大分子的结构、功能或者稳定性。所用的有效策略包括增加人类序列量 (嵌合体和/或其他“人性化”方法)、改善溶液性质、移除抗体表位、引入化学衍生化 (例如聚乙二醇化) 和/或识别和移除 MHC 限制位。对于注射治疗, 活体内免疫反应性可以通过如下途径来解决: 执行表位作图, 接着通过理性突变来修饰免疫原性的诸多位点和/

或以其他方式使这些位点变异,单独地以及结合有位点特异性聚乙二醇化(Hershfield,等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 88:7185-7189(1991);Leong,等人,Cytokine 16(3):106-119(2001);Lee,等人,Pharm.Res.20(5):818-825(2003))或者其他的化学衍生方法,以将蛋白质免疫反应性降至可接受的水平。对抗原表面蛋白质区域的修饰降低免疫原性(Chirino,等人,Drug Discov.Today 9(2):82-90(2004))。一种改进的方法涉及构建尺寸较小的保留催化活性的蛋白质(例如,用吸光度法测量活性)。还可以将蛋白质工程与ELISA筛选联系起来,用以识别具有降低的免疫反应性的突变体。另一方法引入针对其他表面Lys位点的点突变,进行聚乙二醇化衍生反应,一种显示用测试酶嘌呤核苷磷酸化酶来降低免疫原性的方法(Hershfield,等人(1991),出处同上)。替代性的途径利用位于蛋白质抗原表位区域的残基突变来移除免疫原性位点(Yeung,等人,J.Immunol.172(11):6658-6665(2004))。在一种类似物抗体人源化的方法中,将来自人类抗体的同源环区和/或残基替换为同源蛋白质的相应环区。

[0148] 改善蛋白质的溶液性质可以提高酶比活和/或降低免疫原性。细菌表达重组蛋白质特有的一个溶液性质是由于,例如链间二硫键形成、疏水作用和/或二价阳离子而形成蛋白质聚集体(Chi,等人,Pharm.Res.20(9):1325-1336(2003))。重组表达蛋白质的聚集能够提高免疫响应(Hermeling,等人,Pharm.Res.21(6):897-903(1994);Schellekens,Nephrol.Dial.Transplant.20(suppl 6):vi3-9(2005))。一种改善方法涉及用其他的氨基酸残基(例如丝氨酸)取代表面半胱氨酸残基,以尽量减小形成链间二硫键的可能性。例如,用丝氨酸残基取代两种表面半胱氨酸残基使分支酸裂合酶的聚集对酶活性的影响变得较小(Holden,等人,Biochim.Biophys.Acta1594(1):160-167(2002))。

[0149] 本文提供原核PAL变异体,其一种或者多种半胱氨酸残基被其他的氨基酸残基,例如丝氨酸残基取代。在一些实施方式中,原核PAL的一种或者多种半胱氨酸残基被其他的氨基酸残基取代。在某些实施方式中,该原核PAL是AvPAL。在特定的实施方式中,AvPAL的一种或者多种半胱氨酸残基被半胱氨酸残基取代。

[0150] C. 化学修饰的原核PAL变异体

[0151] 大分子化学修饰可以非特异性方式(产生衍生物种的混合物)或者以位点特异性方式(基于野生型大分子反应活性导向的衍生化作用和/或利用定点诱变和化学修饰的组合的位点选择性修饰)或者,替代性地,利用表达蛋白质连接方法来执行(Hofmann,等人,Curr.Opin.Biotechnol.13(4):297-303(2002))。在某些实施方式中,利用化学修饰来降低免疫原性。聚乙二醇化是一种得到论证的降低蛋白质免疫原性的方法(Bhadra,等人,Pharmazie 57(1):5-29(2002)),但利用磷酸化作用、酰胺化作用、羧化作用、乙酰化作用、甲基化作用、生成酸加盐类、酰胺类、酯类和N-酰基衍生物进行修饰的糖基化以及其他化学衍生程序也是可能的降低蛋白质免疫原性的方法(Davis,Science 303:480-482(2004))。

[0152] 聚乙二醇化的蛋白质

[0153] 利用各种PEG化学试剂与PAL蛋白质的比率在PAL上进行的一系列不同的聚乙二醇化反应将为每种修饰方法提供PEG-PAL衍生物。最佳程度的聚乙二醇化可以基于利用吸光度法结合PAGE和非变性凝胶分析法或者通过利用具有多角度光散射(MALS)的SE-HPLC测得的每种衍生化的PAL物种获得的剩余活度来确定,以确定PEG衍生化作用的程度。最佳修饰的最初范围确定后,最佳PEG-PAL物种的比较动力学分析(包含 V_{max} 和 K_m 确定、底物的结合

常数、蛋白水解稳定性、活性的pH依赖性、活性的温度依赖性)和免疫反应性可以通过ELISA、免疫沉淀反应和Western blot来确定。蛋白质工程还可用来通过利用最佳的衍生化条件生成最有利于聚乙二醇化的PAL突变体;通过尽量减小PAL蛋白质的大小以及仅仅修饰PAL表面最具抗原性的区域将会降低PEG修饰的成本,与此同时保留最大量的酶催活性以及最小量的免疫原性。同样地,位点特异性聚乙二醇化作用可用来提供酶类衍生物。

[0154] 其他的化学修饰,例如Lys、Arg和Cys残基的磷酸化作用或其他化学修饰可用来掩盖免疫原性区域和/或蛋白水解敏感性区域。这类化学修饰包括Bednarsaki的聚合物添加法(polymer addition method)以及用于改善PAL稳定性、降低免疫原性和改善蛋白酶抗性的Altus Corporation的交联法是具有代表性的例子。Bednarsaki论证了聚合物添加能改善蛋白质的温度稳定性(Wang, 等人, J. Am. Chem. Soc. 114 (1): 378-380 (1992)), 以及Altus Corporation已发现戊二醛交联能改善酶的稳定性。

[0155] 为确定蛋白质(例如PAL)的活体内治疗半衰期是否得益于聚乙二醇化作用,合成了多种不同的PEG:PAL共轭物,并对其进行活体外表征以及活体内L-Phe降低检测。为了达到优化聚乙二醇化潜在影响以及识别PEG附着的一个或者多个位点这两个目的,采用了一种设计策略,其中聚合物长度、构象以及PEG附着的程度各有不同。在一些实施方式中,用于制备聚乙二醇化的PAL的方法通常包括:(a)在各种条件下使PAL与聚乙二醇反应,借以使PAL附着至一种或者多种PEG基团,以及(b)获得反应产物。因为PAL修饰的特异性位点可能极大地改变共轭物的内在活性,所以探究了不同类型和数量的PEG。用于PAL聚乙二醇化的化学反应是利用甲氧基-PEG(0-[(N-琥珀酰亚胺基氧基羰基)-甲基]-O'-甲基聚乙二醇)的NHS酯对PAL的伯胺进行酰化反应。利用甲氧基-PEG-NHS或者甲氧基-PEG-SPA的酰化反应产生酰胺键,所述酰胺键消除原伯胺上的电荷。

[0156] 本申请的方法提供聚合物:蛋白质共轭物的大体上均质的混合物。如本文所用,“大体上均质”指观察到的仅仅是聚合物:蛋白质共轭物分子。该聚合物:蛋白质共轭物具有生物活性以及本申请提供的“大体上均质的”聚乙二醇化的PAL制剂是那些足够均质以表现出均质制剂优势(例如,在临床应用中易于预测批与批之间的药代动力学)的制剂。

[0157] 涉及用于本文所述的聚乙二醇化方法的聚合物分子可以选自水溶性聚合物或者其混合物。水溶性聚合物可以选自如下:例如,聚乙二醇、单甲氧基-聚乙二醇、葡聚糖、聚-(N-乙烯基吡咯烷酮)、丙二醇均聚物、聚环氧丙烷/环氧乙烷共聚物、聚氧乙烯多元醇(例如甘油)、HPMA、Fleximer.TM.和聚乙烯醇、单-(C1-C10)烷氧基-PEG、芳氧基-PEG、三氟乙烷磺酰基单甲氧基PEG、PEG丙醛、二琥珀酰亚胺碳酸酯PEG、纤维素或者其他基于碳水化合物的聚合物。所选定的聚合物应该是水溶性的,以便附着有该聚合物的蛋白质不会在水相环境(例如生理环境)中沉淀。该聚合物可以是支化或者非支化的。在一些实施方式中,为了实现终产物制剂的治疗用途,该聚合物将是药学上可接受的。

[0158] 在一些实施方式中,此处所用的水溶性聚合物是聚乙二醇,缩写为PEG。如本文所用,聚乙二醇意在包含已用于使其他蛋白质衍生化的任何形式的PEG,例如单-(C1-C10)烷氧基-或者芳氧基-聚乙二醇。

[0159] 聚乙二醇分子与蛋白质分子的比例将随着它们在反应混合物中浓度的变化而变化。通常情况下,最佳比率(从反应效率来说,没有过量的未反应的蛋白质或聚合物)将通过选定的聚乙二醇的分子量以及基于存在的可用的反应基团(通常是ε氨基基团)的数量来确

定。通常情况下,所用聚合物的分子量越高,可附着至蛋白质的聚合物分子的数量越少。同样地,当对这些参数进行优化时,可以考虑对聚合物进行支化。通常,分子量越高(或者支链越多),聚合物:蛋白质比率越高。还涉及几种不同的直链PEG聚合物长度,包含但不限于5kDa和20kDa的两臂支化PEG聚合物的共轭物,包含但不限于10kDa和40kDa。在一些实施方式中,对于本文涉及的聚乙二醇化反应,平均分子量为约2kDa至约100kDa(术语“约”指 ± 1 kDa)。在其他的实施方式中,平均分子量为约5kDa至约40kDa。水溶性聚合物与PAL的比率范围通常对于单聚乙二醇是1:1;对于二聚乙二醇是2:1;等等。

[0160] 聚乙二醇化的原核PAL变异体

[0161] 共同拥有的美国专利7,531,341(该专利以引用方式全部并入本文)的实施例7到9描述了来自圆红冬孢酵母菌(RtPAL)、NpPAL和AvPAL的聚乙二醇化和非聚乙二醇化形式的赖氨酸突变体R91K PAL对ENU2或者BTBR^{enu2}小鼠体内Phe水平的影响。该动物模型是PAH部位的纯合突变体,导致动物具有重度高苯丙氨酸血症。高血浆Phe水平使得该动物成为用于评估PAL降低血浆Phe的能力的合适模型。分别与非聚乙二醇化的NpPAL和AvPAL相比,聚乙二醇化形式的NpPAL和AvPAL的施用更多地降低了ENU2小鼠体内的Phe。在十周的时间段内,经过每周注射维持了NpPAL的这些效果。这些结果显示,来自蓝细菌、点形念珠藻和多变鱼腥藻的PAL的聚乙二醇化在降低罹患PKU小鼠体内的Phe水平方面是至关重要的。

[0162] 本文实施例14描述了AvPAL多肽中半胱氨酸残基(例如位置503和565上的半胱氨酸残基)的丝氨酸取代对ENU2小鼠体内Phe水平的影响。施用聚乙二醇化的AvPAL双半胱氨酸突变体AvPAL_C565SC503S导致的血浆Phe的减少量与利用聚乙二醇化的野生型AvPAL实现的减少量相当。此外,与聚乙二醇化的野生型AvPAL相比,注射有聚乙二醇化的AvPAL变异体的动物体内抗PAL抗体滴度较低。这些结果显示,聚乙二醇化的AvPAL变异体具有(1)与该聚乙二醇化的野生型AvPAL相当的活体内PAL酶活性;以及(2)具有比该聚乙二醇化的野生型AvPAL低的免疫原性。

[0163] 本文提供具有降低的免疫原性的聚乙二醇化的PAL变异体。一个实施方式是具有降低的免疫原性的聚乙二醇化形式的NpPAL变异体。另一实施方式是具有降低的免疫原性的聚乙二醇化形式的AvPAL变异体。具体的实施方式涉及NpPAL或者AvPAL变异体,其中聚乙二醇化通过使NpPAL或者AvPAL变异体与水溶性聚合物,例如聚乙二醇(PEG)反应来实现。在一些实施方式中,聚乙二醇化通过使NpPAL或者AvPAL变异体与PEG按至少1:1、至少1:1.5、至少1:2、至少1:3或者至少1:4的PAL:PEG比率反应一次来实现。在一个实施方式中,该PAL变异体是AvPAL变异体,以及聚乙二醇化利用1:3的PAL:PEG比率来实现。本文还提供用于制备聚乙二醇化的PAL变异体的方法。

[0164] 在某些实施方式中,在原核PAL变异体的活性位点上和/或其附近引入一种或者多种赖氨酸残基,以部分地通过阻断该酶的活性位点上和/或其附近其他氨基酸残基(例如酪氨酸)的潜在聚乙二醇化或者通过阻断对酶活性具有重要性的赖氨酸残基的潜在聚乙二醇化来提高催化活性、降低免疫原性和/或改善生化稳定性。不受限于特定的理论,假定原核PAL的活性位点(即AvPAL中的位置78或者314)上和/或其附近的酪氨酸残基可以是用于聚乙二醇化的位点,其降低了酶活性。在一些实施方式中,该原核PAL的活性位点上和/或其附近的一种或者多种不为酶活性所需的氨基酸残基由赖氨酸残基取代。在某一实施方式中,该原核PAL是AvPAL。在一个实施方式中,位置78或者314上的AvPAL酪氨酸残基不可用于聚

乙二醇化。再次不受限于特定的理论,假定原核PAL(即AvPAL中的位置419)的赖氨酸残基(其聚乙二醇化通常因临近的赖氨酸残基PAL(即AvPAL中的位置413)的聚乙二醇化而受到阻断)可以是用于聚乙二醇化的位点,其降低了底物结合和/或催化活性。在一些实施方式中,该原核PAL的一种或者多种氨基酸残基由赖氨酸残基取代,使得对该酶的底物结合和/或催化活性具有重要性的赖氨酸残基不可用于聚乙二醇化。在具体的实施方式中,该原核PAL是AvPAL。在一个实施方式中,位置419上的AvPAL赖氨酸残基不可用于聚乙二醇化。

[0165] D. 原核PAL变异体的治疗用途和给药

[0166] 1. 各种形式的高苯丙氨酸血症 (HPA)

[0167] 本文提供治疗各种HPA患者群的方法,该方法包括单独利用原核PAL变异体组合物或者结合其他治疗方案来管控HPA和/或PKU。具体地涉及如下:原核PAL变异体组合物可用于治疗苯丙氨酸浓度足够低使得通常不采用膳食干预的患者群(即轻度HPA患者)、中度PKU患者、典型或者重度PKU患者以及任何其亚群。对用原核PAL变异体组合物进行的治疗具有依从性以改善轻度HPA影响的这类患者包括血清浓度小于200 μ M的孕妇和婴幼儿。本节进一步详细地讨论了各种患者群及其不同的治疗需求。

[0168] 某些实施方式涉及通过结合包括原核PAL变异体或者其生物活性变异体、突变体或片段的组合物,向对象施用限蛋白质饮食来治疗典型重度PKU,其中该限蛋白质饮食和原核PAL变异体的联合施用使得所述对象的血浆内苯丙氨酸浓度与不进行所述联合施用时的所述浓度相比得到有效的降低。此外,提供治疗患有HPA的孕妇的方法,该方法包括结合原核PAL变异体或者其生物活性衍生物,向该孕妇施用限蛋白质饮食,以便该限蛋白质饮食和原核PAL变异体的联合施用使得该孕妇血浆内的苯丙氨酸浓度与不进行所述联合施用时的这样的浓度相比得到有效的降低。在具体的实施方式中,为表现的Phe水平大于420 μ M的患者设计疗法。

[0169] 其他的实施方式需要向任何患有HPA的个体施用原核PAL变异体组合物,其中所述HPA的特点是在施用原核PAL变异体之前血浆Phe浓度大于180 μ M以及按能导致该患者的这类血浆Phe浓度下降的有效量给药。本文提供的方法还可用于通过利用本文所述的原核PAL变异体组合物来治疗患有以大于300 μ M的高Phe浓度为特征的PKU的未成年对象。“未成年对象”指0到约36个月之间的患者。

[0170] 重度典型PKU的特点及其治疗方法

[0171] 重度PKU表现在血浆Phe浓度大于1200 μ M以及有发现表明,该浓度高至4800 μ M。患有这种疾病的患者必须进行不含Phe的食疗,以便将其血浆Phe浓度降至临床上可接受的水平(通常小于600 μ M或者小于300 μ M)。这些患者仅能容许每日最多250-350mg之间的Phe摄入(Spaapen等人, *Mol. Genet. Metab.* 78:93-99 (2003))。就此而言,这类患者自出生后7-10天之间开始按限Phe的配方进食以及终生将受累于这种饮食限制。为缓解严格饮食限制获得的任何成果对受累于此的群体来说将是一份福祉。

[0172] 下文进一步详细地描述了用于诊断患有典型Phe的个体的检测。这些检测已表明,典型重度PKU患者需要低苯丙氨酸饮食(Lucke等人, *Pediatr. Neurol.* 28:228-230 (2003))。因此,考虑到的是,本文提供的某些方法将需要通过监测个体的血浆Phe浓度来确定该个体是否是典型PKU患者。然后可以通过单独地施用原核PAL变异体组合物或者实施低蛋白质饮食和PAL变异体的联合方案来治疗该患者,使得该患者的血浆Phe浓度产生至少25%的降

幅。在一些实施方式中,该方法将产生30%的血浆Phe浓度降幅。在其他的实施方式中,该方法将产生40%、50%、60%、70%、80%、90%或者更大的个体血浆Phe浓度降幅(例如,其中重度典型PKU患者的Phe浓度为4800 μ M,Phe浓度的90%降幅将产生480 μ M的血浆Phe浓度,此浓度足够低,以至于几乎不需要饮食限制)。当然,应理解的是,本文提供的治疗方法,不论是用于治疗重度典型PKU还是本文所述的任何其他HPA,都应尝试将患者的血浆Phe浓度降至尽可能靠近约120 μ M至约360 μ M $\pm$ 15 μ M的范围或者约120 μ M至约240 μ M的最佳范围的水平。

[0173] 在一些实施方式中,正在接受治疗的典型PKU患者的血浆Phe浓度从大于1000 μ M的任何量的不受限的血浆Phe浓度降至小于600 μ M的任何血浆Phe水平。当然,即使原核PAL变异体和限蛋白质饮食的联合治疗产生的血浆Phe浓度降幅较小,例如降至800 μ M至约1200 μ M之间的水平,这仍将被视作临床上有用的治疗成果,因为血浆Phe浓度在这个范围内的患者通过简单地限制饮食中蛋白质的量便可管控其病情,而无需按照限Phe的配方进食,从而显著地改善个体的生活质量以及提高患者对饮食限制的依从性。

[0174] 患者由于治疗可以容许的饮食中Phe水平的任何增量将视为治疗有效的成果。例如,考虑到的是,由于接受了原核PAL变异体疗法,患者将能够将其饮食中Phe的摄入量从250-350mg/日提高至350-400mg/日(即患者的Phe容许表型从典型PKU患者的Phe容许表型变为中度PKU患者的Phe容许表型)。当然,本文教导的治疗干预将有望允许患者将其饮食中Phe的摄入量从250-350mg/日提高至400-600mg/日(即患者的Phe容许表型从典型PKU患者的Phe容许表型变为轻度PKU患者的Phe容许表型)或者在有些情况下,将有望允许患者的Phe摄入量大于600mg/日(即正常饮食摄入量)。

[0175] 不对BH4做出响应的PKU患者的特点及其治疗方法

[0176] 可以用本文提供的所述组合物和方法治疗的第二组患者是那些已确定具有升高的血浆Phe浓度(即任何大于200 μ M的浓度)但已诊断不对BH4疗法做出响应(通过下文所述的BH4负荷试验确定)的个体。这类患者可以包括那些患有轻度PKU(即血浆Phe浓度高达600 μ M)的个体、患有中度PKU(即血浆Phe浓度在600 μ M至约1200 μ M之间)的个体以及典型重度PKU(即血浆Phe浓度大于1200 μ M)患者。

[0177] 在一些实施方式中,为了降低不对BH4疗法做出响应的患者体内的血浆Phe浓度,向其施用PAL变异体并结合以降低其饮食中的蛋白质量。施用原核PAL变异体时产生的患者体内血浆Phe浓度的降幅可以比不采用原核PAL变异体疗法而施用相同的饮食方案时产生的所述降幅大。饮食限制可以是这样一种饮食,其通过提供含有减少的Phe量的合成医用蛋白质配方来限制Phe摄入量;或者替代性地,饮食限制可以是这样一种饮食,其简单地要求患者限制其蛋白质摄入总量但仍然允许患者限量进食普通食品。

[0178] 讨论的针对典型PKU患者的治疗成果以引用方式并入本节。例如,针对中度PKU患者(即血浆Phe浓度从600 μ M至1200 μ M不受限的患者)的治疗成果可以包括该患者体内血浆Phe浓度的至少25%的降幅。在一些实施方式中,该方法将产生血浆Phe浓度的30%降幅。在其他的实施方式中,该方法将产生个体的血浆Phe浓度的40%、50%、60%、70%、80%、90%或者更大的降幅(例如,其中中度典型PKU患者的Phe浓度为1000 μ M,Phe浓度的90%降幅将产生100 μ M的血浆Phe浓度,此浓度足够低,以至于几乎不需要或者无需饮食限制)。

[0179] 在一些实施方式中,正在接受治疗的中度PKU患者的血浆Phe浓度从600 μ M至1200 μ M之间的任何量的不受限的血浆Phe浓度降至小于300 μ M的任何血浆Phe水平。在一个实施方

式中,利用原核PAL变异体(单独或者结合饮食限制)进行治疗降低了血浆Phe浓度,例如降至 $200\mu\text{M}$ 至约 $400\mu\text{M}$ 之间的水平,这仍将被视作临床上有用的治疗成果,因为血浆Phe浓度在这个范围内的患者通过简单地限制饮食中蛋白质的量便可管控其病情,而无需按照限Phe的配方进食。事实上,许多研究教导说,这类患者甚至可以正常饮食。

[0180] 患者由于治疗可以容许的饮食中Phe水平的任何增量将视为治疗有效的成果。例如,考虑到的是,由于接受了原核PAL变异体疗法(单独或者结合其他治疗干预),患者将能够将其饮食中Phe的摄入量从 $350\text{--}400\text{mg}/\text{日}$ 提高至 $400\text{--}600\text{mg}/\text{日}$ (即患者的Phe容许表型从中度PKU患者的Phe容许表型变为轻度PKU患者的Phe容许表型)。当然,本文教导的治疗干预将有望允许患者将其饮食中Phe的摄入量提高至 $350\text{--}400\text{mg}/\text{日}$ 以上,甚至达到大于 $600\text{mg Phe}/\text{日}$ 的摄入量(即正常饮食摄入量)。

[0181] 仅仅表现出轻度PKU的患者(即饮食许可量为 $400\text{--}600\text{mg Phe}$ 摄入量/日)可以利用本文提供的所述组合物和方法来治疗以及可以受益于基于原核PAL变异体的疗法,因为有望产生近可能接近 $360\mu\text{M}\pm 15\mu\text{M}$ 的正常的血浆Phe浓度。对于这类患者,有利的治疗成果将包括患者血浆Phe浓度的至少25%的降幅。在一个实施方式中,该方法将产生血浆Phe浓度的30%降幅。在另一实施方式中,该方法将产生个体的血浆Phe浓度的40%、50%、60%或者更大的降幅(例如,其中轻度PKU患者的Phe浓度为 $600\mu\text{M}$,Phe浓度的60%降幅将产生 $360\mu\text{M}$ 的血浆Phe浓度,即可接受的正常血浆Phe浓度)。

[0182] 在一些实施方式中,正在接受治疗的轻度PKU患者的血浆Phe浓度从 $400\mu\text{M}$ 至 $600\mu\text{M}$ 之间的任何量的不受限的血浆Phe浓度降至小于 $100\mu\text{M}$ 的任何血浆Phe水平。当然,即使利用原核PAL变异体(单独或者结合饮食限制)进行治疗产生的血浆Phe浓度降幅较小,例如降至 $200\mu\text{M}$ 至约 $400\mu\text{M}$ 之间的水平,这仍将被视作临床上有用的治疗成果。

[0183] 患者由于治疗可以容许的饮食中Phe水平的任何增量将视为治疗有效的成果。例如,考虑到的是,由于接受了原核PAL变异体疗法(单独或者结合其他治疗干预),患者将能够将其饮食中Phe的摄入量提高至 $400\text{--}600\text{mg}/\text{日}$ 以上(即患者的Phe容许表型从轻度PKU患者的Phe容许表型变为轻度HPA患者的Phe容许表型),甚至允许患者的摄入量大于 $600\text{mg Phe}/\text{日}$ (即正常饮食摄入量)。

[0184] 此外,即使患者仅仅表现出非PKU的HPA症状(即具有高达 $600\mu\text{M}$ 的高血浆Phe浓度,但仍然允许进行正常的蛋白质饮食),该患者仍将受益于原核PAL变异体疗法,因为升高的Phe浓度已显示对这类群体的智商具有显著的影响。而且,如下文所讨论,具有特殊需求的对象(例如孕妇和婴幼儿)的原核PAL变异体治疗干预尤为重要,即使患者的血浆Phe水平在小于 $200\mu\text{M}$ 这一被视为“安全”水平的范围内。

[0185] 母源性PKU及其治疗方法

[0186] 对患有PKU的计划怀孕的成年女子和这类孕妇体内的血浆Phe水平进行代谢控制是很重要的,因为不管胎儿的PAH状态如何,在子宫内胎儿暴露至哪怕中度升高的Phe水平也会导致严重的后果。血浆Phe浓度的治疗控制在妊娠的前三个月尤为重要,因为若未能实现适当的控制,便会导致多种疾病,包括小头畸形、智力缺陷和先天性心脏病。

[0187] 例如,据关于苯丙酮尿症的NIH共识声明(卷17#3,2000年10月)报道,胎儿暴露至 $3\text{--}10\text{mg}/\text{dL}$ 的母体Phe水平导致24%的小头畸形发病率,而那些暴露至大于 $20\text{mg}/\text{dL}$ (即大于 $1200\mu\text{M}$)的胎儿具有73%的小头畸形发病率。同样地,先天性心脏病发现于超过10%的曾暴

露至大于20mg/dL的母体Phe水平的儿童中。重要的是,已经指出大于6mg/dL的Phe水平极大地降低儿童的智力水平。因此,当务之急是确保患有所有形式的苯丙酮尿症的成年女子(甚至那些表现出最轻微HPA的成年女子)的血浆Phe浓度必须得到严格控制,以避免母源性PKU综合征的风险。然而,美国诊所已采用的PKU成年女子血浆Phe浓度的可接受目标水平在10mg/dL和15mg/dL之间的范围内,该水平比英国和德国诊所以降低罹患母源性PKU综合征风险为目的而推荐孕妇适用的2-6mg/dL水平或者其采用的1-4mg/dL要高得多。

[0188] 为孕妇所做的另一重要考虑是她们的总体蛋白质摄入量。妊娠期内,成年女子进食足够的蛋白质是很重要的,因为已有教导说,妊娠期内低蛋白质饮食将导致肾脏发育迟缓和肾单位数目后续减少并有可能导致成年后高血压。(D' Agostino, N. Engl. J. Med. 348 (17) 1723-1724, (2003))。下文的表格为不同的个体提供示例性的有关推荐的总饮食蛋白质摄入量的指南。

[0189] 美国饮食蛋白质需求指南

[0190]

	年龄	推荐的总蛋白质摄入量 (g)
婴幼儿	半岁或者更少	13
	半岁-1 岁	14
	1-3 岁	16
儿童	4-6 岁	24
	7-10 岁	28
男性	11-14 岁	45
	15-18 岁	59
	19-24	58
	25-50	63
	51+	63

[0191]

女性	11-14 岁	46
	15-18 岁	44
	19-24	46
	25-50	50
	51+	50
孕妇		60
哺乳期妇女		65

[0192] 从上文示例性的指南可以看出,在美国,育龄成年女子(例如小于51)的推荐蛋白质摄入量从约44g/日至50g/日,而孕妇需求的摄入量推荐为约60g/日。在加拿大和英国,孕妇的推荐蛋白质摄入量为约70g/日和52g/日。因此,确保孕妇的血浆Phe浓度水平得到严格控制的需要因这类PKU患者比年龄相当的未怀孕的PKU女性需要更多的蛋白质这一事实而进一步变得复杂化。

[0193] 鉴于上述情况,考虑到本文提供的PAL变异体疗法将对孕妇特别有用。考虑到可以将罹患任何形式的HPA的孕妇或者打算怀孕的女性置于原核PAL变异体疗程,以确保维持其血浆Phe浓度水平尽可能地接近180 μ M至约360 μ M。这类疗程将允许她提高其正常蛋白质摄入量水平。

[0194] 本申请上文所述的有关血浆Phe浓度的水平和这类Phe浓度应得的降幅的讨论并入本节,适用于孕妇。

[0195] 未成年对象PKU管控及其治疗方法

[0196] 如本文全篇所讨论,已确定未成年对象(0至3岁)血浆Phe浓度的上升导致该对象智商的显著下降。然而,如已在本说明书其他处所讨论的那样,具有高达400 μ M的高血浆Phe浓度的患者通常不接受任何饮食干预。因此,目前的疗法使0至3岁的未成年对象遭受重大的有害影响。本申请涉及用包括原核PAL变异体的治疗组合物来治疗具有大于360 μ M $\pm$ 15 μ M的不受限的血浆Phe浓度的任何未成年对象,以使得该对象的血浆Phe浓度产生有益的下降。

[0197] 在一些实施方式中,该未成年对象的年龄在0到3岁之间并在原核PAL变异体给药之前具有约1200 μ M的不受限的血浆Phe浓度,以及所述给药降低该血浆Phe浓度。在一个实施方式中,该血浆Phe浓度在给药后从大于1800 μ M降至约1500 μ M、约1200 μ M、约1100 μ M、约1000 μ M、约900 μ M、约800 μ M、约700 μ M、约600 μ M、约550 μ M、约500 μ M、约450 μ M、约400 μ M、约350 μ M、约300 μ M、约275 μ M、约250 μ M。在其他的实施方式中,该未成年对象的年龄在0到3岁之间并具有大于1200 μ M的不受限的血浆Phe浓度以及,该血浆Phe浓度在原核PAL变异体给药(单独或者结合有饮食)后降至约800 μ M、降至约500 μ M或者降至约360 μ M。涉及用原核PAL变异体来治疗具有大于360 μ M的不受限的血浆Phe浓度的未成年对象以降低所述血浆Phe浓度,对此,本领域的技术人员将会理解。上文关于通过治疗降低血浆Phe浓度的讨论以引用方式并入本文。此外,最初不受限的血浆Phe浓度的任何大于10%的降幅将被视作针对该未成年对象

的治疗方案的治疗性成果。应理解的是,该原核PAL变异体疗法可以结合饮食限制以引起这类未成年对象体内血浆Phe浓度的治疗性下降。

[0198] 2. 其他的治疗用途

[0199] 各种形式的癌症及其治疗方法

[0200] 本文还提供治疗各种形式的癌症的方法,该方法包括向对象施用治疗有效量的包括原核PAL变异体的药物组合物。在一个宽泛的实施方式中,该癌症是这样一种癌症,其中衍生自该癌症的细胞其增殖和/或存活对苯丙氨酸的限制或者缺失敏感。在一些实施方式中,该癌症是肺癌、脑癌或者中枢神经系统癌症、结肠癌、前列腺癌、肾癌、肝癌或者转移性黑素瘤。在其他的实施方式中,该癌症是头颈部癌、卵巢癌、子宫癌、白血病(例如急性骨髓性白血病或者急性成淋巴细胞性白血病)或者骨髓瘤。在仍然其他的实施方式中,该癌症是小儿癌症或者抗性癌症(即,已显示对癌症治疗剂或者靶向癌症治疗剂有抗性的癌症)。

[0201] 在某些实施方式中,提供一种用于治疗癌症的方法,该方法包括向需要这类治疗的对象施用治疗有效量的包括原核PAL变异体和药学上可接受的载体的药物组合物,其中该原核PAL变异体与野生型PAL相比具有较大的苯丙氨酸转化活性和/或降低的免疫原性,以及有效地将该对象的血液、血清或者血浆中的苯丙氨酸浓度降至从低于检测水平到约20 μM 至60 μM 之间的范围,例如小于约20 μM 或者小于约10 μM ,以及可选择地进一步包括向该对象施用限蛋白质(即不含苯丙氨酸的)饮食。

[0202] 帕金森氏症及其治疗方法

[0203] 一份有关Pah^{enu2}小鼠(PKU模型)脑部的详细的神经病理评估报告显示脑部的两个多巴胺能区域黑质(SN)和下丘脑中活化的小胶质细胞或者巨噬细胞(CD11b⁺细胞)在数量上增加以及诱导型一氧化氮合酶(iNOS)的免疫反应性增加(见Embury等人, *Pediatr. Res.* 58:283-287, 2005)。在帕金森氏症(PD)中也观察到SN中浸润CD11⁺细胞和iNOS上调的存在。PD和HPA/PKU的另一共同特征是脑部多巴胺的减少,后者的发生是由于Phe未转化为左旋多巴的前体酪氨酸(Tyr),而左旋多巴又是多巴胺的前体。此外,PD和PKU均与多巴胺能神经元的缺失或者损伤有关,以及PD以及至少Pah^{enu2}小鼠临床显示运动功能紊乱。

[0204] 本文提供治疗PD的方法,该方法包括向对象施用治疗有效量的包括原核PAL变异体的药物组合物。原核PAL变异体疗法可以结合其他疗法来治疗PD,包括,例如,神经递质(像多巴胺前体左旋多巴,已知其能够穿过血脑屏障)。

[0205] 治疗有效量的原核PAL变异体的施用将产生有益效果的疾病适应症包括但不限于HPA、PKU、酪氨酸血症、癌症和PD。肠胃外、口服或其他标准的给药途径和剂量可以利用标准方法确定。

[0206] 2. 用于治疗的组合物

[0207] 本文还提供PKU/HPA的治疗干预。这类干预最初基于使用原核PAL变异体,其可以单独使用或者结合饮食限制。进一步地,原核PAL变异体和/或饮食限制可以进一步结合其他设计以,例如对抗PKU其他表现症状(例如中性大氨基酸)的治疗组合物,以预防脑部Phe累积(见Koch,等人, *Mol. Genet. Metabol.* 79:110-113 (2003))或者酪氨酸补充剂。本节讨论可以用于本文涉及的治疗的组合物。

[0208] 原核PAL变异体组合物、药物组合物和制剂

[0209] 本文提供的药物组合物包括治疗有效量的原核PAL变异体以及一种或者多种药学上可接受的赋形剂、溶媒、稀释液、稳定剂、防腐剂、增溶剂、乳化剂、佐剂和/或载体。这类药物组合物包括缓冲液内容物(例如Tris-HCl、磷酸盐)、pH和离子强度各异的稀释液;添加剂,例如去垢剂和增溶剂(例如聚山梨醇酯 20、聚山梨醇酯 80)、抗氧化剂(例如抗坏血酸、焦亚硫酸钠)、防腐剂(例如乙基汞硫代水杨酸钠、苯甲醇)和填充剂(例如乳糖、甘露醇);见,例如Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th Edition (1990, Mack Publishing Co., Easton, Pa.) 1435-1712页,其以引用方式并入本文。有效成分的有效量是治疗上、预防上或者诊断上有效的量,其可以由本领域的技术人员通过考虑诸如体重、年龄和治疗目标之类的因素容易地确定。

[0210] 在一些实施方式中,该原核PAL变异体药物组合物包括缓冲剂,以将溶液的pH值维持在所需的范围内。这类缓冲剂包括Tris-HCl、乙酸钠、磷酸钠和柠檬酸钠。也可以使用这些缓冲剂的混合物。可用于所述组合物的缓冲剂的量在很大程度上取决于所用的具体缓冲液以及该溶液的pH。例如,pH=5的乙酸盐缓冲液比pH=6的效率,因此,pH=5的乙酸盐在溶液中的用量可以比pH=6的少。在一些实施方式中,该缓冲剂是Tris-HCl。在某些实施方式中,该药物组合物的pH范围为约pH 6.0-8.0,例如约pH 6.5-7.5或者约pH 7.0-7.6。

[0211] 本文提供的药物组合物可以进一步包括等渗调节剂,以使溶液变得等渗并更适于注射。在一些实施方式中,该等渗调节剂是浓度范围在100-200mM之间(例如120-170mM或者120-150mM)的氯化钠。

[0212] 药学上可接受的载体或者赋形剂可以包括稳定剂,其是稳定本文提供的原核PAL变异体组合物的分子。如本文所用,术语“稳定”意在包括,例如但不限于,延长原核PAL酶的储存期限、保护原核PAL酶使其不发生蛋白水解消化作用(proteolytic digestion)、保持原核PAL酶处于活性构象和/或使原核PAL酶在升高的温度下储存后保持活性。例如,稳定剂可以将聚乙二醇化的原核PAL变异体的储存期限(T_{90})延长至少约10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%、150%、200%、300%、400%、500%、600%、700%、800%、900%、1000%或者更多(例如约1.5倍、2倍、3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍或者10倍或者在其任何范围内)(例如与不存在稳定剂时的聚乙二醇化的原核PAL变异体相比),所述储存期限即在给定的温度(例如4℃、25℃、37℃、40℃或者42℃)下活体外酶比活(利用实施例3中所述的测定法确定)降低 $\geq 10\%$ 所需的时间。在某些实施方式中,该 T_{90} 在4℃时延长6倍至7倍之间;25℃时延长4倍至5倍之间,37℃时延长2倍至3倍之间,42℃时延长2倍至3倍之间,或者其组合。在一些实施方式中,该聚乙二醇化的原核PAL变异体是聚乙二醇化的双半胱氨酸突变体AvPAL_C565SC503S以及该稳定剂是Phe。替代性地,稳定剂可以使聚乙二醇化的原核PAL变异体在升高的温度下储存后保持酶活性,即该变异体在25℃、37℃或者40℃下储存特定的时间段(例如1周、2周、3周、4周、5周、6周、7周、8周、9周、10周、11周、3个月、4个月、6个月、9个月、1年、2年、5年或者更长或者其任何范围)后保留其活体外酶比活(利用实施例3中所述的测定法确定)的至少约40%、50%、60%、70%、80%、85%、90%、95%、99%或者更多或者在其任何范围内(例如与不存在稳定剂时的聚乙二醇化的原核PAL变异体相比)。

[0213] 稳定剂包括L-苯丙氨酸(Phe)及其结构类似物,例如反式肉桂酸(t-CA)、苯甲酸、酪氨酸(Tyr)等等。来自菜豆(PvPAL)的植物PAL已显示在亲和纯化去除其底物L-苯丙氨酸

之后其活性受损 (Da Cunha, Eur. J. Biochem. 178:243-248 (1988)), 以及来自圆红冬孢酵母菌 (RtPAL) 的酵母PAL已显示受到酪氨酸的保护, 没有因蛋白酶失活 (Wang, 等人, Mol. Genet. Metab. 86:134-140 (2005); Pilbak, 等人, FEBS J. 273:1004-1019 (2006))。下文显示, Phe和某些其结构类似物有能力稳定来自AvPAL的原核PAL的PEG:PAL共轭物 (见实施例11)。不受限于特定的理论, 假定原核PAL酶作为酶-底物复合物更稳定, 其中所结合的底物Phe转化为产物t-CA或者t-CA的过渡态类似物。该t-CA仍结合至其他具有高活性的活性位点中心 (M10基团), 从而稳定该原核PAL酶。相应地, 该原核PAL酶底物、Phe、产物、t-CA或者其结构类似物可以用作稳定剂。

[0214] 还提供包括原核PAL变异体以及药学上可接受的载体的药物组合物, 其中该药学上可接受的载体包括稳定剂。该稳定剂可以是Phe或者其结构类似物。该稳定剂可以选自如下: L-苯丙氨酸、反式肉桂酸和苯甲酸。该稳定剂的示例性范围是每摩尔原核PAL活性位点从约0.1至20mol的稳定剂, 例如每摩尔原核PAL活性位点从约0.5至10mol的稳定剂或者每摩尔原核PAL活性位点从约1至10mol的稳定剂。

[0215] 在一些实施方式中, 该药物组合物包括原核PAL变异体以及药学上可接受的载体, 其中该原核PAL变异体与野生型PAL相比具有较大的苯丙氨酸转化活性和/或降低的免疫原性, 以及其中该药学上可接受的载体包括稳定剂。在一些实施方式中, 该稳定剂是Phe或者其结构类似物。在一些实施方式中, 该稳定剂选自如下: L-苯丙氨酸、反式肉桂酸和苯甲酸。

[0216] 在某些实施方式中, 该药物组合物包括原核PAL变异体以及药学上可接受的载体, 其中该原核PAL变异体是AvPAL变异体, 其中该AvPAL变异体位置503和565上的半胱氨酸残基已被丝氨酸残基取代, 该AvPAL变异体进一步包括水溶性聚乙二醇聚合物, 其中AvPAL变异体和聚乙二醇的比率为约1:3, 以及其中该药学上可接受的载体包括稳定剂。在一些实施方式中, 该稳定剂是Phe或者其结构类似物。在一些实施方式中, 该稳定剂选自如下: L-苯丙氨酸、反式肉桂酸和苯甲酸。

[0217] 药学上可接受的载体或者赋形剂可以包括防腐剂 (例如抗菌剂), 其是终止或者防止微生物 (例如细菌、真菌或者原生动物) 生长以及杀死病毒的物质。抗菌剂可以杀死微生物 (杀菌) 或者防止它们生长 (抑菌)。防腐剂可用于, 例如但不仅限于, 保护原核PAL酶使其免受微生物污染、延长原核PAL酶的储存期限、保持原核PAL酶处于活性构象以及使原核PAL酶在升高的温度下储存后保持活性。

[0218] 本文提供的防腐剂可以包括酚及其结构类似物, 例如间甲酚等等。该防腐剂 (例如间甲酚) 的浓度示例性范围从约0.1%至1% (w/v)。在某些实施方式中, 间甲酚的范围从约0.1%至0.5% (w/v)。在其他的实施方式中, 间甲酚的范围从约0.3%至0.5% (w/v)。

[0219] 本文提供的稳定剂, 当单独或者结合防腐剂使用时, 包括Phe及其结构类似物和Gly及其结构类似物。稳定剂 (例如Phe) 的浓度示例性范围从约0.1至10mM。在一些实施方式中, Phe的范围从约0.5至5mM。在其他的实施方式中, Phe的范围从约0.5至1.5mM。稳定剂 (例如Gly) 的浓度示例性范围从约0.1至100mM。在一些实施方式中, Gly的范围从约1至100mM。在其他的实施方式中, Gly的范围从约1至20mM。在其他的实施方式中, Gly的范围从约20至100mM。

[0220] 在一些实施方式中, 该药物组合物包括原核PAL变异体以及药学上可接受的载体, 其中该原核PAL变异体与野生型PAL相比具有较大的苯丙氨酸转化活性和/或降低的免疫原

性,以及其中该药学上可接受的载体包括至少两种稳定剂以及可选择地,一种防腐剂(即抗菌剂)。在一些实施方式中,该至少两种稳定剂是Phe或者其结构类似物和Gly或者其结构类似物或者其任何组合。在一些实施方式中,该稳定剂是Phe和Gly。在一些实施方式中,该防腐剂是间甲酚或者其结构类似物。在具体的实施方式中,该稳定剂是Phe和Gly以及该防腐剂是间甲酚。

[0221] 在某些实施方式中,该药物组合物或者制剂包括聚乙二醇化的AvPAL变异体以及药学上可接受的载体,其中该AvPAL变异体和聚乙二醇的比率为约1:3(1:3AvPAL:PEG)以及该AvPAL变异体位置503和565上的半胱氨酸残基已被丝氨酸残基取代,以及其中该药学上可接受的载体包括至少两种稳定剂以及可选择地,一种防腐剂(即抗菌剂)。在一些实施方式中,该至少两种稳定剂是Phe或者其结构类似物和Gly或者其结构类似物或者其任何组合。在一些实施方式中,该稳定剂是Phe和Gly。在一些实施方式中,该防腐剂是间甲酚或者其结构类似物。在具体的实施方式中,该稳定剂是Phe和Gly以及该防腐剂是间甲酚。

[0222] 如本文所用,以及当涉及原核PAL变异体时,术语“治疗有效量”指导致对患者有益的血液、血浆或者血清L-苯丙氨酸的下降的量。该量将因个体的不同而不同并将取决于多种因素,包括患者的整体身体条件、饮食和病况。用于治疗的原核PAL变异体的所述量导致血液、血浆或者血清L-苯丙氨酸水平的可接受的降幅并在原核PAL变异体治疗期间将该数值保持在有益的水平(通常至少约30%以及通常在10%至50%的范围内)。本申请组合物的治疗有效量可以由本领域的技术人员利用公开可得的材料和程序容易地确定。

[0223] 在某些实施方式中,原核PAL变异体或者其药物组合物的给药频率比原生PAL少。给药频率将因正在治疗的疾病的不同而不同,但一般情况下,将是约1次/周。理解的是,实际采用的给药频率可因不同的个体对该原核PAL变异体作出的反应有差异而与本文披露的所述频率有所不同;术语“约”意在反映这种差异。考虑到的是,该原核PAL变异体的给药频率为每周约2次、每周约1次、每两周约1次、每月约1次或者比每月约1次更久。

[0224] 本文提供的所述组合物和方法可以用来降低血液、血浆或者血清L-苯丙氨酸水平。如上文所讨论,最常见的是血清L-苯丙氨酸水平因HPA而上升。可通过本文提供的所述组合物和方法治疗的疾病包括与PKU有关的HPA。可治疗的还有可导致血清L-酪氨酸水平提高的疾病(如这类发现的酪氨酸血症)。可以用本文提供的所述原核PAL变异体药物组合物和方法治疗的还有许多与癌症相关的疾病,其中血液、血浆或者血清L-苯丙氨酸水平的降低会是有益的。

[0225] 在某些实施方式中,本文提供的所述原核PAL变异体药物组合物通过肠胃外注射(静脉内、腹膜内、皮下、肌内、动脉内或者鞘内注射)给药。然而,其他给药途径也可以有效地利用,这对本领域的技术人员来说是显而易见的。

[0226] 本文所述的方法使用原核PAL变异体药物组合物,该原核PAL变异体药物组合物包括上文所述的分子,以及一种或者多种药学上可接受的赋形剂、溶媒、稀释液、稳定剂、防腐剂(例如抗菌剂)、增溶剂、乳化剂、佐剂和/或载体,以及可选择地,其他治疗性和/或预防性成分。这类赋形剂包括液体,例如水、盐水、甘油、聚乙二醇、透明质酸、乙醇、环糊精、修饰的环糊精(即磺丁基醚环糊精)等等。非液体制剂的合适赋形剂也为本领域的技术人员所熟知。

[0227] 可用于所述组合物的药学上可接受的盐包括,例如,矿物酸盐,如盐酸盐、氢溴酸

盐、磷酸盐、硫酸盐等等；以及有机酸盐，例如醋酸盐、丙酸盐、丙二酸盐、甲苯酸盐等等。有关药理学上可接受的赋形剂和盐的深刻讨论可见于Remington's Pharmaceutical Sciences,第18版(Easton,Pennsylvania:Mack Publishing Company,1990)。

[0228] 附加地,辅助物质,例如润湿剂或者乳化剂、生物缓冲物质、表面活性剂等等可以存在于这类溶媒中。事实上,生物缓冲液可以是药理学上可接受的以及为制剂提供所需pH(即生理学上可接受范围内的pH)的任何溶液。缓冲液的例子包括盐水、磷酸盐缓冲盐水、Tris缓冲盐水、Hank氏缓冲盐水等等。

[0229] 根据预期的给药途径,该药物组合物可以是例如,固体、半固体或者液体剂型的形式,如片剂、栓剂、丸剂、胶囊、粉末、液体、混悬液、乳膏、软膏、洗液或者诸如此类,例如适于精确剂量单一给药的单位剂型。该组合物可以包括结合有药理学上可接受的载体的治疗有效量的所述原核PAL变异体;此外,可以可选择地包括其他药剂、佐剂、稀释液、缓冲液等等。

[0230] 通常情况下,本文提供的所述原核PAL变异体药物组合物将作为药物制剂给药,所述药物制剂包含那些适于口服(包含口腔和舌下)、直肠、鼻内、局部、肺部、阴道或者肠胃外(包含肌内、动脉内、鞘内、皮下和静脉内)给药或者适于吸入或者吹入给药的形式的药物制剂。在某些实施方式中,该组合物利用可以根据病痛程度进行调整的方便的每日给药方案通过例如,静脉内给药。

[0231] 对于组合物,常规的无毒固体载体包括,例如,制药等级的甘露醇、乳糖、淀粉、硬脂酸镁、糖精钠、滑石粉、纤维素、葡萄糖、蔗糖、碳酸镁等等。药理学上可给药的液体组合物可以例如,通过将本文所述的原核PAL变异体组合物以及可选地药物佐剂溶解、分散(或者以其他方式)在例如,赋形剂(如水、盐水、水性右旋糖、甘油、乙醇等等)中从而形成溶液或者混悬液来制备。若需要,待给药的所述药物组合物还可以包含微量的无毒辅助物质,例如润湿剂或者乳化剂、pH缓冲剂、补益剂(tonicifying agent)以及诸如此类,例如,乙酸钠、失水山梨醇单月桂酸酯、三乙醇胺乙酸钠、三乙醇胺油酸酯等等。制备这类剂型的实际方法为本领域的技术人员所知或者将是显而易见;例如,见上文引用的Remington's Pharmaceutical Sciences。

[0232] 对于口服给药,该组合物通常会采取片剂、胶囊或者软胶囊的形式或者可以是水溶液或者非水溶液、混悬液或者糖浆。片剂和胶囊可以用作口服给药剂型。用于口服的片剂和胶囊通常会包括一种或者多种常用的载体,例如乳糖和玉米淀粉。通常还添加润滑剂,例如硬脂酸镁。当使用混悬液时,活性剂可以结合乳化剂和悬浮剂。如果需要,也可以添加调味剂、着色剂和/或甜味剂。本文用来掺入口服制剂的其他可选的组分包括但不限于,防腐剂、悬浮剂、增稠剂等等。

[0233] 肠胃外制剂可以常规形式制备:作为液体溶液或者混悬液;适于在注射之前于液体中还原、增溶或者混悬的固体或者冻干形式;或者作为乳剂。在某些实施方式中,可无菌注射的混悬液根据本领域已知的技术利用合适的载体、分散剂或者润湿剂和悬浮剂配制。可无菌注射的制剂还可以是含于无毒的肠胃外可接受的稀释液或者溶剂的可无菌注射的溶液或者混悬液。可以采用的可接受的溶媒和溶剂是水、林格氏溶液和等渗氯化钠溶液。此外,无菌、不挥发油、脂肪酯或者多元醇通常被用作溶剂或者悬浮培养基。此外,肠胃外给药可以涉及使用缓释或者持续释放系统,以便保持恒定的剂量水平。

[0234] 本文所述的所述原核PAL变异体组合物可以按治疗有效剂量施用至患者来治疗多

种疾病,包含高苯丙氨酸血症(包含苯丙酮尿症)以及其他疾病(包含癌症)。这类原核PAL变异体组合物的毒性和疗效可以通过例如细胞培养物或者实验动物体内标准的药物程序,如通过确定LD₅₀(群半数致死剂量)和ED₅₀(群半数治疗有效剂量)来确定。毒性和治疗作用之间的剂量比率是治疗指数以及它可以表示为LD₅₀/ED₅₀的比率。可以使用治疗指数显示大的原核PAL变异体组合物。

[0235] 从细胞培养物测定和动物研究中获得的数据可以用来配制各种用于人类的剂量。该剂量可以处于循环浓度的范围内,所述循环浓度包括毒性几乎为零或者毒性最小的ED₅₀。该剂量可以根据所采用的剂型以及所用的给药途径在此范围内变动。治疗有效剂量或者治疗有效量可以从细胞培养测定以及从动物模型确定。

[0236] 饮食蛋白质

[0237] 除了向HPA/PKU患者施用原核PAL变异体组合物,在某些实施方式中,考虑到,所述患者的饮食蛋白质也可以受限或者改变。本领域的技术人员知道各种市售的用于治疗PKU的蛋白质配方。这类配方包括MAXIMAID、PHENEX 1、PHENEX 2(英国利物浦Ross Laboratories),LOFENALAC、PHENYL-FREE(Mead-Johnson)等等。

[0238] 本领域的技术人员可以使用所提到的蛋白质配方,它们通常不含Phe组分。该蛋白质配方常补充有PKU患者体内缺乏的氨基酸。这类氨基酸包括,例如L-酪氨酸和L-谷氨酸。已有教导说,为PKU患者的饮食补充缬氨酸、异亮氨酸和亮氨酸会是可取的(见美国专利号4,252,822)。某些临床表现中,Phe阻碍脑部对其他氨基酸(例如酪氨酸和色氨酸)的摄取,从而导致PKU的毒性作用。已有发现表明,为PKU患者的饮食补充过多这类中性大氨基酸阻碍脑部对Phe的摄取并降低脑部Phe水平。因此,考虑到,对于本文提供的所述方法,饮食方案可以进一步补充包括一种或者多种这类氨基酸的组合物(Koch,等人,Mol.Genet.Metabol.79:110-113(2003))。

[0239] 进一步地,如众所周知,除了所述蛋白质受限之外,还应当提供通常发现于人乳以及其他动物源性食品中的L-肉碱和牛磺酸。在某些实施方式中,所述L-肉碱可以作为20mg/100g的蛋白质补充剂提供,以及牛磺酸可以作为40mg/100g蛋白质补充剂提供,以有助于提供适量的通常发现于人乳和动物源性食品中的这些因子。

[0240] 此外,本领域的技术人员参照美国国家科学院2000年的National Research Council Dietary Reference Intakes进一步查询应当提供给患者的其他组分(例如基本维生素和矿物质)列表,以确保在尽管饮食蛋白质受限的条件下,其他补充剂得以供应。

[0241] 参考上文关于总蛋白质量和所需血浆Phe浓度的讨论,本领域的技术人员将能够确定所需的饮食蛋白质受限量并因此对患者的饮食做出相应调整。以年龄约11-14的雄性对象为例,该个体应当接受45g蛋白质/日。倘若该个体是重度典型PKU对象,其不受限的血浆Phe浓度将会大于1200μM,以及对于该个体来说,绝大部分(如果不是所有的)饮食蛋白质来源很可能来自粉末状蛋白质补充剂,所述粉末状蛋白质补充剂可以将其血浆Phe浓度降至小于600μM。通过向该对象施用原核PAL变异体,治疗成果会是使患者的血浆Phe浓度产生较大的降幅这样一种情况;或者替代性地,该治疗成果是这样一种情况:其中该个体的血浆Phe浓度降至类似的程度,但该个体能够容许从正常饮食而非从饮食配方摄取蛋白质。

[0242] 同样地,对于年龄约11-14的患有中度PKU的雄性对象,可能会利用本文提供的所述方法通过正常蛋白质摄入而非受限配方来为其提供指定量的45g蛋白质/日。确定本文提

供的所述方法是否有效将涉及定期测定该患者的血浆Phe浓度,以确保血浆Phe浓度保持在至少400 μ M以下。下文描述用于测定这类浓度的检测法。在一些实施方式中,实现少于或者约360 μ M的浓度。

[0243] 3. 确认和监测患者群

[0244] 如本文讨论,确定特定患者是否对原核PAL变异体疗法有响应会是有必要的;以及有必要的在最初阶段测定该患者的苯丙氨酸浓度以确认正在接受治疗的PKU患者的类别并在治疗方案进行过程中测定该患者的苯丙氨酸浓度以监测该方案的疗效。下文对这类示例性的方法进行描述。

[0245] BH4负荷试验

[0246] BH4负荷试验使得有可能辨别因BH4不足或者因PAH不足而患HPA的患者。

[0247] 最简易的BH4负荷试验是这样的:其中施用外源性BH4以及测定该施用在降低血浆Phe浓度方面的效果。2mg/kg BH4静脉内负荷最初由Danks,等人,Lancet 1:1236 (1976)提出,随着纯度较高的BH4变得可得,已逐渐有可能通过按约2.5mg/kg体重的量口服给药BH4来执行所述试验。最终,Niederwieser等人提出了一种标准化的方法,其中施用7.5mg/kg口服单剂量的BH4(Niederwieser,等人,Eur.J.Pediatr.138:441 (1982)),虽然有些实验室仍然使用20mg BH4/kg体重以上。

[0248] 为了使简易BH4负荷试验产生可靠的结果,患者的血液Phe水平需要高于400 μ M。因此,经常习惯性的做法是在执行该负荷试验之前,让患者停止PKU饮食2天。BH4检测试剂盒由Dr.Schircks Laboratories (瑞士的Jona市)销售和分发。该试剂盒推荐摄入正常餐之后约30min 20mg BH4/kg体重的剂量。

[0249] Phe浓度测定

[0250] 用于测定血液中Phe的存在的方法有许多(参见,例如Shaw等人,Analytical Methods in Phenylketonuria-Clinical Biochemistry,In Bickett等人Eds., Phenylketonuria and Some Other Inborn Errors of Amino Acid Metabolism,Stuttgart, Georg Thiem Verlag,47-56 (1971))。通常,利用荧光测定从患者的血清中测定苯丙氨酸和酪氨酸浓度。这种测定依赖于当在亮氨酸基丙氨酸的存在下用水合茚三酮加热苯丙氨酸时荧光物质的形成(McCaman,等人,J.Lab.Clin.Med.59:885-890 (1962))。

[0251] 最普遍的用于测定Phe浓度的方法是Guthrie检测,其中用来自患者的血样本饱和滤纸,然后用打孔器将该滤纸打成一些圆片(disc)。在已种有枯草芽孢杆菌并包含枯草芽孢杆菌生长特异性抑制剂的琼脂盘中孵育这些均一的圆片。随着苯丙氨酸从该均一的圆片转移至该琼脂,Phe扭转了细菌生长抑制状况,从而收获细菌生长区,该细菌生长区与苯丙氨酸浓度的相关性情况可以通过与利用包含已知量的Phe的圆片执行的类似测定相比得出。

[0252] 量化Phe浓度的其他方法包括HPLC、质谱、薄层色谱法等等。这类方法可用于在治疗前测定患者的血浆Phe浓度以及在进行治疗方案过程中监测该Phe浓度以确定其功效。

[0253] 考虑到的是,患者的血浆Phe水平将在治疗方案的整个时间期内以方便的时间间隔(例如每天、每隔一天或者每周)进行监测。通过这样定期地监测血浆Phe水平,临床医师将能够对疗效进行评估以及相应地调整原核PAL变异体和/或饮食蛋白质要求。

[0254] 4. 联合疗法

[0255] 在本文提供的所述方法的某些实施方式中,原核PAL变异体和饮食蛋白质限制联合使用,以在患有各种形式的HPA的患者体内产生治疗成果。为了在本文涉及的所述组合疗法中实现适当的治疗成果,人们通常会向对象施用足以产生所需治疗成果(即降低血浆Phe浓度和/或能够容许较大的量的Phe/蛋白质摄入量而不产生随之增加的血浆Phe浓度)的有效组合量的所述原核PAL变异体组合物和所述饮食限制。这种方法可以涉及同时施用该原核PAL变异体组合物和饮食蛋白质治疗组合物。这可以通过施用单一组合物或者药理蛋白质制剂实现,所述药理蛋白质制剂包括所有的饮食蛋白质要求以及还包括所述蛋白质制剂内的原核PAL变异体。替代性地,饮食蛋白质(补充剂或者正常蛋白质餐)的进食与原核PAL变异体的药理制剂(片剂、注射液或者饮品)的施用大约是同时的。原核PAL变异体还可以配制成蛋白棒或者其他适于摄入的食品,例如布朗尼、薄煎饼、蛋糕。

[0256] 其他替代性的情况是,原核PAL变异体治疗可以在饮食蛋白质疗法之前或者之后,时间间隔从分钟到小时不等。在其中蛋白质和原核PAL变异体组合物单独给药的实施方式中,人们通常会确保每次给药时间点之间的显著时间段不会过期,以便原核PAL变异体仍将能够对患者发挥有利的影响。在这种情况下,考虑到的是,会在饮食蛋白质摄入(之前或者之后)约2-6h内施用原核PAL变异体,在有些实施方式中,延迟时间仅仅为约1h。在某些实施方式中,考虑到的是,原核PAL变异体疗法将是连续性疗法,其中向患者无限期地施用日剂量的原核PAL变异体。在其他情况下,例如对于仅仅患有较轻度的PKU和HPA的孕妇,原核PAL变异体疗法可能仅仅持续孕期和/或哺乳期。

[0257] 此外,除仅仅基于原核PAL变异体的给药和饮食蛋白质调节的疗法之外,本文提供的所述方法还涉及与第三种组合物的联合疗法,所述第三种组合物具体地靶向HPA的一种或者多种症状。例如,已知HPA导致的酪氨酸的不足导致神经递质多巴胺和血清素的不足。因此,考虑到的是,基于原核PAL变异体和饮食蛋白质的方法可以进一步结合左旋多巴、卡比多巴和5-羟基色氨酸神经递质的给药,以纠正饮食中酪氨酸量的降低导致的缺陷。

[0258] 由于原核PAL变异体的给药不会生成酪氨酸(不同于PAH的给药),这类治疗仍将导致酪氨酸是针对这类患者的基本氨基酸。因此,饮食补充酪氨酸对于接受原核PAL变异体并结合以BH4疗法的患者来说必定是可取的。

[0259] E. 原核PAL变异体的产物

[0260] 本文还提供一种生产原核PAL或者其生物活性片段、突变体、变异体或者类似物的方法。在一种示例性的实施方式中,在大肠杆菌BLR(DE3)/pLysS(Novagen)或者大肠杆菌BL21(DE3)/pLysS(Invitrogen)细胞中,在具有诱导型启动子(例如具有IPTG(异丙基- β -D-硫代吡喃半乳糖苷)的载体(例如pIBX1(Su,等人,Appl.Environ.Microbiol.62:2723-2734(1996))或者pET28a(Invitrogen))中,在存在或者不存在N末端标签(例如八聚组氨酰基标签)的情况下,将重组原核PAL或者其生物活性片段、突变体、变异体或者类似物过表达。在摇瓶中从甘油菌为生物反应器/发酵罐培育种子培养物。然后以补料分批方式将这类种子培养物用以引入(spike into)可控的生物反应器。补充葡萄糖,用碱(NH₄OH)控制pH,以及搅动达1200rpm。输入O₂保持溶氧大于20%。在37℃温度下培育细胞直至达到70-100的OD₆₀₀(~22-25h),然后用0.4mM IPTG进行诱导。将温度降至30℃并培育直至活性变化<0.1IU/mL(大约40-48h和OD₆₀₀通常为200)。细胞培养基通常定义为包括酵母提取蛋白质、蛋白胨-胰化蛋白胨、葡萄糖、甘油、酪蛋白氨基酸、痕量盐和磷酸盐缓冲盐。重组原核PAL产物或者其

生物活性片段、突变体、变异体或者类似物在细胞内而非分泌产生。通过连续离心 (Alfa-Laval、Carr、Cepa或者等同物) 收获细菌。本示例性方案的其他变化对本领域的技术人员来说将是显而易见的。

[0261] F. 原核PAL变异体的纯化

[0262] 本文还提供一种纯化原核PAL或者其生物活性片段、突变体、变异体或者类似物的方法。根据示例性的第一实施方式, 培育转化的细胞团块并使其破碎, 留下粗制重组酶。通常从粗制块分离外源性物质, 以防止污染管柱。利用一种或者几种色谱树脂进行色谱纯化。接着, 将纯化的蛋白质配制为缓冲液, 设计该缓冲液以在较长的时间段内提供稳定的活性。在另一实施方式中, 所述纯化原核PAL或者其生物活性片段、突变体、变异体或者类似物的方法包括: (a) 利用压力均质机 (但潜在地, 通过其他物理手段, 例如玻璃珠裂解) 对包含重组原核PAL或者其生物活性片段、突变体、变异体或者类似物的细菌进行裂解; (b) 加热处理; (c) 利用第二连续离心步骤和/或深层过滤 (如用Cuono Zeta Plus或者Maximizer, Pall Filtron或者Millipore Millistak或者Opticao过滤器) 澄清该裂解物; (d) 通过木炭过滤步骤 (如用Millipore Millistak 40AC); (e) 通过中间深层过滤步骤 (如用一种或者多种深层过滤器, 例如Pall EKSP、Pall KS50P和/或Pall EKMP过滤器), 然后是最终的过滤步骤 (如用Sartorius Sartopore或者Pall EDF 0.2 μ m过滤器); (f) 通过丁基疏水作用色谱 (如在来自Tosoh Biosciences的Toyopearl Butyl 650M中); (g) 通过Q离子交换柱 (如在来自BioRad的Macroprep High Q中); 以及 (h) 可选择地, 通过具有切向流过滤 (如用Sartorius Hydrosart或者PES 30kDa膜) 的缓冲液更换来回收最终产品。本领域的技术人员容易地理解可以省略或者取代色谱法步骤或者过滤步骤的一步或者多步; 或者可以改变色谱法步骤或者过滤步骤的顺序。最后, 根据需要可以进行适当的消毒步骤。

[0263] 现已对本发明进行了一般描述, 本发明可以通过下文对如下实施例的参考更容易地理解。所述实施例的提供仅为说明性用途, 而无论如何不会限制本发明的范围。已经努力确保关于所用数据 (例如量、温度等等) 的准确性, 但是当然应该考虑到有一些实验误差和偏差。

实施例

[0264] 实施例1

[0265] 点形念珠藻和多变鱼腥藻PAL的克隆

[0266] DNA操作

[0267] 点形念珠藻基因组DNA购自ATCC (29133D) 以及PAL基因 (ZP_00105927) 从引物5' - CACTGTCATATGAATATAACATCTCTACAACAGAACAT - 3' (SEQ ID NO:12) 和5' - GACAGTGGCGGCCGCT CACGTTGACTTTAAGCTCGAAAAATATG - 3' (SEQ ID NO:13) PCR扩增得到。由此产生的PCR产物用NdeI和NotI消化以及将1.7kb片段连接入pET-28a (+) 和pET-30a (+) (Novagen), 分别进行N-His标签化和不进行N-His标签化。

[0268] 多变鱼腥藻细胞购自ATCC (29413)。提取了基因组DNA (Qiagen) 以及通过SOE-PCR扩增了PAL基因 (YP_324488) 以去除NheI位点。引物1 (5' - CACTGTGCTAGCATGAAGACACTATCTC AAGCACAAG - 3') (SEQ ID NO:14) 和引物2 (5' - GGAAATTTTCCTCCATGATAGCTGGCTTGTTATCAAC ATCAATTA GTGG - 3') (SEQ ID NO:15) 被用来扩增核苷酸1-1190以及引物3 (5' - CCACTAATTG

ATGTTGATAACCAAGCCAGCTATCATGGAGGAAATTTCC-3') (SEQ ID NO:16) 和引物4 (5'-CACTGTGC GGCCGCTTAATGCAAGCAGGGTAAGATATCTTG-3') (SEQ ID NO:17) 被用来扩增核苷酸1142-1771。这两种PCR产物结合起来以用引物1和4扩增全长基因。由此产生的PCR产物用NheI消化,用Klenow (NEB) 补平,然后用NotI消化。1.7kb片段连接至pET-28a(+) 和pET-30a(+) (Novagen)。该质粒称为3p86-23。

[0269] AvPAL基因还被克隆入载体pIBX7 (Tkalec, 等人, Appl. Environ. Microbiol. 66: 29-35 (2000)), 该pIBX7衍生自pIBX1 (Su, 等人, Appl. Environ. Microbiol. 62:2723-2734 (1996)) (见实施例7)。

[0270] 细菌菌株和培养条件

[0271] 对于点形念珠藻PAL (NpPAL), 大肠杆菌BL21 (DE3) 细胞 (Stratagene) 用pGro7 (TaKaRa) 转化以及BL21 (DE3) pGro7感受态细胞通过Inoue方法制备 (Sambrook and Russell, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3rd Edition (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, 2001))。这些细胞将用pET-28-NpPAL转化以及于37°C下在含有50mg/L卡那霉素和20mg/L氯霉素的25mL LB中培养过夜。将20mL这种培养物种入含有卡那霉素、氯霉素和500mg/L L-阿拉伯糖的1L LB培养基中并于37°C下培育。当OD₆₀₀为0.6时, 将培养物在冰上冷却。5min之后, 用0.3mM IPTG诱导培养物并于20°C下培育16h。通过离心作用收获细胞。

[0272] BL21 (DE3) pLysS细胞 (Stratagene) 用AvPAL转化以及其培养类似于NpPAL而无阿拉伯糖诱导。

[0273] 克隆于pIBX7载体的AvPAL (见实施例7) 通过转化为BLR (DE3) /pLysS (Novagen) 细胞而引入并于37°C下在含有50mg/L卡那霉素的25mL LB培养过夜。将20mL这种培养物种入含有卡那霉素的1L LB培养基并于37°C下培育。当OD₆₀₀为0.6时, 将培养物在冰上冷却。5min之后, 用0.3mM IPTG诱导培养物并于30°C下培育16h。通过离心作用收获细胞。

[0274] 实施例2

[0275] NpPAL和AvPAL的纯化

[0276] 在台式离心机中按离心力5,000g离心所述培养物达20min并将上清液丢弃。通常在进一步处理之前于-70°C下冷冻沉淀细胞 (cell pellet)。融化后, 在TBS (25mM Tris, 150mM NaCl, pH 7.8) 中悬浮该沉淀细胞至大约80光密度单位 (600nm)。按12-14,000psi将细胞两次通过APV压力均质机来进行裂解。然后在55°C下加热处理粗制裂解物2h。按10,000g离心该裂解物30min, 以及保留上清液并用0.2μm真空过滤器 (Corning) 过滤。

[0277] 通过将澄清的裂解物依次穿过丁基650M柱 (Tosoh BioSciences) 和MacroPrep High Q柱 (BioRad) 从中纯化得到PAL。通过SDS PAGE和反相HPLC两种方法进行洗脱后的产物均表明具有高纯度。

[0278] 实施例3

[0279] 聚乙二醇化的PAL变异体的生成

[0280] 下文描述了用于使来自圆红冬孢酵母菌 (RtPAL) 的PAL聚乙二醇化的方法。类似的用于使原核PAL (例如NpPAL或者AvPAL) 聚乙二醇化的方法在实施例6中有描述。

[0281] 蛋白质聚乙二醇化

[0282] 聚乙二醇化利用文献方法的修饰 (Hershfield, 等人, (1991), 出处同上; 美国专利

号6,057,292;Lu,等人,Biochemistry 40(44):13288-13301(2001);Nektar Therapeutics,2003目录)。活化的PEG既包括直链PEG琥珀酰亚胺琥珀酸酯(mPEG-SPA,MW 5kDa或者MW 20kDa)又包括支链PEG羟基琥珀酰亚胺酯(mPEG2-NHS酯,MW 10kDa或者MW 40kDa),其均在一端封有甲氧基基团以及可从Nektar Therapeutics获得;最佳聚乙二醇化的蛋白质的实验确定通常是需要的(Veronese,等人,J.Bioactive Compatible Polymers 12:196-207(1997))。最佳聚乙二醇化的条件利用不同的PAL:PEG比率(考虑到蛋白质的摩尔比连同每个蛋白质单体的赖氨酸数量)、不同的pH、不同的缓冲液、各种温度和孵育时间来确定。高PAL蛋白质:PEG衍生比率是必要的,因为原生PAL具有大量的赖氨酸(每个圆红冬孢酵母菌(Rt)和多变鱼腥藻单体分别含29和18个赖氨酸),也因为未修饰的PAL反复注射到小鼠体内后表现出免疫反应性,还因为裸型(野生型)PAL暴露至蛋白酶后很快失活。通过-20℃冷冻停止聚乙二醇化反应并通过SDS-PAGE、MALDI-TOF质谱分析法以及活性、蛋白水解敏感性和免疫反应性评估来分析样本。

[0283] 在活性、蛋白水解和免疫评估之前,为了除去多余的未反应的PEG,利用Tube-0-Dialyzer(GenoTechnology)用pH值为8.5的0.05M磷酸钾缓冲液于4℃搅拌透析反应过夜。利用NI蛋白质检测试剂盒(GenoTechnology)确定蛋白质浓度之后,如前所述,利用标准的反应条件对未衍生化的和PEG衍生化的PAL样本进行PAL活性测量。活体外表征之后,利用PKU小鼠模型对最有希望的聚乙二醇化的治疗候选者进行活体内试验。

[0284] 表征

[0285] 利用PAL消光系数(针对RtPAL和AvPAL分别为0.5和0.75mg mL⁻¹cm⁻¹) 在280nm处测定非修饰的蛋白质样本和聚乙二醇化的蛋白质样本的蛋白质浓度,该浓度利用NI蛋白质检测(GenoTechnology)计算,该NI蛋白质检测包括样本处理,以去除可能干扰准确的蛋白质浓度测定的非蛋白质污染物。

[0286] PEG-PAL产物用MALDI-TOF MS表征,以确定附着至每个PAL单体的PEG分子数量,以及利用活性评估、SDS-PAGE和非变性凝胶分析法表征,以分别确保活性保持、衍生化完全以及四聚物PAL结构无损伤。对于PAL和PEG-PAL样本,MALDI-TOF质谱分析需要使用0.5M尿素或者0.025M盐酸胍,以改善亚基解离和物种检测的可再现性。

[0287] PEG-PAL产物用肽图谱技术表征以测定位点特异性聚乙二醇化(LC/ESI-MSD)以及用三硝基苯磺酸(TNBS)以测定聚乙二醇化前后的游离胺滴定。肽图谱确定聚乙二醇化在多数以赖氨酸终止的胰蛋白酶肽上的相对占有率,然而,由于尺寸和多个临近的赖氨酸胰蛋白酶肽,并非所有的位点利用这项技术都是可见的。TNBS检测法更准确地限定了每摩尔酶的平均PEG分子数量,但不提供关于对哪些位点进行聚乙二醇化的信息。出于此因,两种测定法均使用以及相辅相成。通过PEG的PAL产物衍生化百分比的粗略估算值可以通过SDS-PAGE和非变性凝胶分析法确定。利用酶法测定评估聚乙二醇化前后的比活以及提供有关四聚物PAL结构无损伤的证据。

[0288] PAL活性测定

[0289] PAL活性测定利用Cary UV分光光度计(Cary 50)以动力学模式进行。PAL对L-苯丙氨酸底物的活性在室温(25℃)下通过测量反式肉桂酸的生产(其通过290nm处的吸光度增加来监测)来测定(Hodgins,(1968),出处同上)。反式肉桂酸在290nm处的摩尔消光系数是10,238L M⁻¹cm⁻¹。反应混合物包含含于pH值为8.5的100mM Tris-HCl缓冲液的22.5mM苯丙

氨酸。对于标准测量来说,最终酶浓度是0.0035mg/mL,但对于动力学研究来说,该测定中的酶浓度调整使得每分钟在290nm处的斜度在0.005至0.02的范围内。活性数据表示为比活($\mu\text{mol} \times \text{min}^{-1} \text{mg}^{-1}$)。一单位的PAL定义为室温下每分钟产生1 μmol 反式肉桂酸的酶的量。

[0290] 实施例4

[0291] 活体外半衰期和免疫原性的检测

[0292] 生化表征之后,利用三种不同的互补技术(Western blot、ELISA和免疫沉淀反应(IP))针对由注射了原生PAL(非聚乙二醇化的PAL)的PKU小鼠产生的抗体,对最有希望的PEG-PAL候选者进行免疫反应性筛选。

[0293] 对于Western blot分析,将PAL抗血清(来自注射了原生PAL的小鼠)按1:10,000稀释使用。将来自缓冲液处理的小鼠的血清进行相同的稀释作为阴性对照组。将第二抗体碱性磷酸酶共轭的山羊抗小鼠IgG(Promega)稀释至1:5,000并利用碱性磷酸酶底物Western Blue(Promega)显色。采用含于PBS的1mg/mL PAL以及用PBS、0.05%吐温-20、2%BSA进行封闭的标准程序之后,利用Nunc/Immuno Maxisorp板(Nalge Nunc International)执行ELISA检测。在EB封闭液(PBS、0.05%吐温-20、2%BSA)中将小鼠抗血清(来自暴露于原生PAL的小鼠)按1:10,000稀释,以及将HRP-山羊抗小鼠IgG用作第二抗体,其中将TMB用于450nm检测。

[0294] 免疫沉淀反应被用来检测PAL抗体结合。在TTBS缓冲液(含有0.1%吐温的Tris缓冲盐水)中孵育蛋白质样本(PAL或者聚乙二醇化的PAL)以及在添加抗体样本之前测量PAL活性。用8倍过量的阳性对照抗PAL血清和利用非免疫小鼠血清的副本阴性对照反应孵育每个样本。孵育之后,考虑到磁珠的小鼠IgG结合能力,过量添加蛋白质G Sepharose 4(50%, v/v),以及4℃旋转再次孵育所述样本过夜。通过离心作用回收上清液以及在所述上清液上测定每个样本的PAL活性。未丢弃沉淀磁珠(bead pellet),以便可以执行通过Western blot的进一步分析。为确认抗体-磁珠结合已经发生,将Western blot用来检测所述磁珠上的PAL抗原。用TTBS和TBS缓冲液对PAL结合步骤之后通过离心作用已回收的磁珠进行多次清洗。这些清洗之后,向所述磁珠添加SDS-PAGE上样缓冲液并95℃加热所述样本5min。然后利用PAL抗血清通过Western blot分析样本。如通过Western blot检测的那样,抗体结合显示差的酶变体相应地在沉淀磁珠组分中几乎没有PAL以及表现出的残留在上清液中的活性与显示高抗体结合的原生未修饰的PAL相比更高。

[0295] 实施例5

[0296] 蛋白酶敏感性检测

[0297] 关于来自圆红冬孢酵母菌的原生PAL的蛋白酶图谱研究已经指出蛋白水解敏感性的基本位点。这类位点的去除可以降低或者消除蛋白水解敏感性并对有效PKU酶取代的发展有贡献。然而,这类蛋白水解敏感性位点的消除可以导致酶活性的降低或者丧失。

[0298] 蛋白质工程已经创建保留活性的改善型PAL(和PEG-PAL)突变体之后,通过利用胰蛋白酶/胰凝乳蛋白酶鸡尾酒的孵育,继之以活性保留(通过OD₂₉₀测量)和减少的蛋白质裂解(通过PAGE凝胶分析)的监测而进行的蛋白酶抗性筛选使得可能识别具有适当的活体外性质的突变体,以用于活体内检测。

[0299] 蛋白水解稳定性将通过利用蛋白酶鸡尾酒的孵育进行评估,所述蛋白酶鸡尾酒接近肠道环境以及包含2.3mM胰蛋白酶、3.5mM胰凝乳蛋白酶、3.05mM羧肽酶A和3.65mM羧肽酶

B.蛋白水解检测将涉及向PAL溶液添加蛋白酶的酶法孵育,以确定受测的不同蛋白质变异体(聚乙二醇化或者非聚乙二醇化或者进行其他化学修饰的原生或者突变体蛋白质)其蛋白酶敏感度,包含蛋白酶暴露之后活性保留和稳定性保留的时间过程。SDS-PAGE和MALDI-TOF质谱绘图实验(绘图experiment)将用来测定任何蛋白酶敏感位点的位置(Kriwacki, R.W.,等人,J.Biomol.Tech.9(3):5-15(1980))。这些绘图结果对于蛋白酶易感性基本位点(例如已经确认的两种基本位点)的测定会是重要的,以便所有主要的敏感性位点可以利用聚乙二醇化保护和/或突变来去除,以去除易感区域和/或保护易感区域不受PAL构架的影响。

[0300] 实施例6

[0301] 聚乙二醇化的NpPAL和AvPAL的生成

[0302] 通常情况下,NpPAL和AvPAL的聚乙二醇化均涉及混合蛋白质和SUNBRIGHT ME-200HS 20kDa NHS-活化的PEG(NOF)。

[0303] 用于聚乙二醇化的方案,利用NHS-活化的20kDa直链PEG的标准“HC”方法:

[0304] 1) 蛋白质内毒素的存在评估.将蛋白质溶液(0.1mL)在0.9mL新鲜的MQ水中稀释并用手提式Charles River设备(EndoPTS)按0.5EU/mL的敏感性水平对其进行内毒素检测。如果内毒素大于0.5EU/mL,则最先通过Mustang E过滤,然后通过Sterogene Etox树脂或者通过进一步的色谱纯化减少内毒素。通过穿过pH 7.8的DEAE FF(Amersham),减少量有限但足够有用了。

[0305] 2) 蛋白质的浓度和缓冲液更换.蛋白质浓缩至大于25mg/mL但小于或等于75mg/mL以及缓冲液更换为pH值为8.5的50mM KPO_4 。如果用旋转过滤器来制备这种浓度,首先通过仅仅用缓冲液,按降低的速度和时间(3000rpm,3min)旋转,然后对保留的缓冲液以与步骤1中蛋白质相同的方式进行内毒素检测从而进行过滤器内毒素检测。pH值为8.5的50mM KPO_4 的缓冲液批记录/配方由水(QS至1L)、磷酸氢二钾(48.75mM的8.4913g/L)和磷酸二氢钾(1.25mM的0.17011g/L)组成。将溶液通过0.2 μm 过滤器过滤并于室温下储存。将浓缩产物通过Mustang E Acrodisc过滤器缓慢过滤(1-2mL/min)。测量用pH值为7.5的无菌TBS稀释和空白的样本的A280,以确定蛋白质浓度。NpPAL和AvPAL的消光系数分别为0.83和0.75。

[0306] 3) NpPAL和AvPAL的聚乙二醇化.将通常储存于-80℃的PEG加热至室温。向PEG添加 KPO_4 缓冲液以通过按最高速度漩涡混合,以及手动猛烈摇晃以确保所有的大块悬浮起来实现PEG重新悬浮。替代性地,该PEG重新悬浮在pH~5的水中。首先润湿该PEG,继之以通过非常轻柔的倒置进行混合,这之后的1min之内向悬浮好的PEG溶液添加蛋白质。将裹于铝箔的管置于震荡器的轴上并于室温下非常轻柔地震荡3h。用TBS(pH 7.5)填充所述管并进行无菌过滤。悬浮液或者即刻配制或者4℃储存以用于配制。

[0307] 4) 配制.配制缓冲液配方/批记录由水(QS至1L)、Tris-Base(3.2mM)、Tris-HCl(16.8mM)和氯化钠组成;缓冲液通过0.2 μm 过滤器过滤并于室温下储存。利用带有100MWCO再生纤维素膜的Vivaflow 50(小批量)或者Vivaflow 200(大批量)对缓冲液进行切向流过滤。利用MQ水、0.1N NaOH以及再用200mL的水冲洗溶液。用pH值为7.5的TBS按50mL/min错流平衡溶液。测定渗透物的pH,以确保pH为7.5。

[0308] 溶液通过首先用TBS稀释大约3倍并恢复最初体积进行缓冲液更换至少四次。对于Vivaflow 50和200,错流通常均为180-200mL/min。

[0309] 最终产品通过Mustang E过滤。用1.9mL新鲜无菌水稀释0.1mL之后评估内毒素的存在。如果内毒素大于1EU/mL,则利用Sterogene Etox凝胶降低内毒素。配制的无菌聚乙二醇化的NpPAL或者AvPAL被密封在小瓶中并于-70℃置放,直至用于活体内研究。

[0310] 实施例7

[0311] AvPAL变异体(半胱氨酸突变体)的生成

[0312] 在AvPAL多肽中进行氨基酸取代以降低发生在细菌表达的重组蛋白质中的聚集。蛋白质聚集可以降低酶活性和/或提高活体内免疫原性。一种这类形式聚集的发生是由于链间二硫键的形成。为最大限度地减少这种可能性,各种AvPAL半胱氨酸残基,单独或者组合地,被丝氨酸残基取代。

[0313] AvPAL多肽在位置64、235、318、424、503和565上具有6个半胱氨酸残基(SEQ ID NO:4)。生成了如下的AvPAL半胱氨酸单突变体:AvPAL_C64S(SEQ ID NO:7)、AvPAL_C318S(SEQ ID NO:8)、AvPAL_C503S(SEQ ID NO:9)和AvPAL_C565S(SEQ ID NO:10)。还生成了AvPAL半胱氨酸双突变体:AvPAL_S565SC503S(SEQ ID NO:11)。图5A-5E显示这些AvPAL半胱氨酸突变体的氨基酸序列。

[0314] 克隆

[0315] AvPAL基因是利用正向引物AvarPALfor(5'-CACTGTCATATGAAGACACTATCTCAAGCACAAG-3')(SEQ ID NO:18)和反向引物AvarPALrev(5'-CACTGTCTCGAGATGCAAGCAGGGTAAGATATCTTG-3')(SEQ ID NO:19)从多变鱼腥藻基因组DNA(ATCC 29413-U,Qiagen DNeasy试剂盒)扩增得到的。由此产生的PCR产物用Taq处理,然后连接入pCR2.1TOPO TA(Invitrogen)。由此产生的质粒称为1p40。

[0316] 添加5'NheI位点以及通过SOE-PCR去除内部NheI位点。上游AvPAL片段是利用正向引物N-Nhe-AvPAL(5'-CACTGTGCTAGCATGAAGACACTATCTCAAGCACAAAG-3')(SEQ ID NO:20)和反向引物Nhe-AvPALrev(5'-GGAAATTTCTCCATGATAGCTGGCTTGGTTATCAACATCAATT AGTGG-3')(SEQ ID NO:21)从1p40扩增得到的,以及下游AvPAL片段是利用正向引物Nhe-AvPALfor(5'-CCACTAATTGATGTTGATAACCAAGCCAGCTATCATGGAGGAAA TTTCC-3')(SEQ ID NO:22)和反向引物AvPALrev-r(5'-ACAGTGGCGGCCGCTTAATGCAAGCAGGGTAAGATATCTTG-3')(SEQ ID NO:23)从1p40扩增得到的。在单PCR反应中,这两种PCR产物被退火以及利用DNA聚合酶延伸以产生全长AvPAL基因,然后利用引物N-Nhe-AvPAL和AvPALrev-r进行扩增。由此产生的PCR产物用NheI消化、用Klenow补平、用NotI消化以及连接入pET28a+载体(其通过用NdeI消化、用Klenow补平以及用NotI消化得以制备)。由此产生的质粒称为3p86-23。

[0317] 通过PCR添加新的限制性酶切位点。AvPAL是利用正向引物AvEcoRIfor

[0318] (5'-CACTGTGAATTCATGAAGACACTATCTCAAGCACAAAG-3')(SEQ ID NO:24)和反向引物AvSmaIrev(5'-CACTGTCCCGGGTTAATGCAAGCAGGGTAAGATATCT-3')(SEQ ID NO:25)从质粒3p86-23扩增得到。由此产生的PCR产物用EcoRI和SmaI消化以及连接入通过EcoRI和SmaI消化的pIBX7载体。由此产生的质粒称为7p56Av3。

[0319] 半胱氨酸突变体

[0320] AvPAL基因中的两个半胱氨酸密码子(对应于AvPAL多肽的位置503和565)通过定点诱变(QuickChange XL II,Stratagene)用丝氨酸密码子取代。位置503上的半胱氨酸密码子利用正向引物Av_C503S(5'-GTCATTACGATGCACGCGCCTCTCTATCACCTGCAACTGAG-3')(SEQ

ID NO:26) 和逆向引物Av_C503Srev (5' -CTCAGTTGCAGGTGATAGAGAGGCGCGTGCATCGTAATGAC-3') (SEQ ID NO:27) 通过PCR更换为质粒7p56Av3中的丝氨酸密码子。该丝氨酸密码子用下划线标出以及编码链中G到C的突变(非编码链中C到G突变)以粗体显示。由此产生的质粒称为j282。位置565上的半胱氨酸密码子利用正向引物Av_C565S (5' -CAGTTCAAGATATCTTACCC TCCTTGCAATTAACCCGGGCTGC-3') (SEQ ID NO:28) 和逆向引物Av_C565Srev (5' -GCAGCCCGGGT TAATGCAAGGAGGTAAGATATCTTGAAGT-3') (SEQ ID NO:29) 更换为质粒j282中的丝氨酸密码子。该丝氨酸密码子用下划线标出以及编码链中G到C的突变(非编码链中C到G突变)以粗体显示。由此产生的质粒称为j298a。

[0321] 在AvPAL多肽位置64、318和565上的AvPAL基因中的半胱氨酸密码子类似地利用如下的引物对以丝氨酸密码子取代:C64S, 正向引物Av_C64S (5' -GCAGGGTATTCAGGCATCTTCTG ATTACATTAATAATGCTGTTG-3') (SEQ ID NO:30) 和逆向引物Av_C64Srev (5' -CAACAGCATTATT AATGTAATCAGAAAGATGCCTGAATACCCTGC-3') (SEQ ID NO:31); C318S, 正向引物Av_C318S (5' -CAAGATCGTTACTACTCCGATCCCTTCCCCAGTATTTGGGGC-3') (SEQ ID NO:32) 和逆向引物Av_C318Srev (5' -GCCCCAAATACTGGGGAAGGGATCGGAGTGAGTAACGATCTTG-3') (SEQ ID NO:33); 以及C565S, 正向引物Av_C565S (SEQ ID NO:28) 和逆向引物Av_C565Srev (SEQ ID NO:29)。所述丝氨酸密码子用下划线标出以及编码链中G到C的突变和非编码链C到G的突变以粗体显示。

[0322] 实施例8

[0323] AvPAL变异体(半胱氨酸突变体)的活体外酶活性

[0324] 该项研究的目的是确定AvPAL多肽中各种半胱氨酸残基的丝氨酸取代对活体外苯丙氨酸解氨酶(PAL)酶活性的影响。

[0325] 如实施例7中所述克隆了AvPAL变异体(即半胱氨酸突变体。AvPAL半胱氨酸突变体表达质粒被转化入细菌, 以及AvPAL半胱氨酸突变体多肽如实施例1中所述进行表达以及如实施例2中所述进行纯化。

[0326] 野生型(WT) AvPAL和AvPAL半胱氨酸突变体如实施例3中所述进行活体外PAL酶活性检测。表1显示, 与非聚乙二醇化的WT AvPAL相比, 纯化的非聚乙二醇化的AvPAL半胱氨酸突变体蛋白质的活体外PAL比活因位置64 (AvPAL_C64S) 上半胱氨酸残基的丝氨酸取代而降低, 但并未受到位置503或565其一上或者503和565两个位置(分别是AvPAL_C503S、AvPAL_C565S和AvPAL_C565SC503S) 上半胱氨酸残基的丝氨酸取代的不利影响。

[0327] 表1: AvPAL半胱氨酸突变体的比活

[0328]

AvPAL蛋白质	聚乙二醇化	比活 (U/mg)
WT AvPAL	-	1.7
AvPAL_C503S	-	1.9
AvPAL_C64S	-	1.3
AvPAL_C565S E1	-	2.0
AvPAL_C565S E2	-	2.1
AvPAL_C565SC503S	-	2.2
WT AvPAL	+	1.1
AvPAL_C565SC503S	+	1.1

[0329] 为了确定丝氨酸残基的引入是否对聚乙二醇化的AvPAL蛋白质的酶催活性有所影响,如实施例6中所述对WT AvPAL和半胱氨酸双突变体AvPAL_C565SC503S进行了聚乙二醇化。表1显示聚乙二醇化的AvPAL蛋白质的活体外PAL比活并未受到503和565两个位置上的半胱氨酸残基的丝氨酸取代的不利影响。

[0330] 实施例9

[0331] AvPAL变异体(半胱氨酸突变体)的活体外生化表征

[0332] 该项研究的目的是确定AvPAL多肽中各种半胱氨酸残基的丝氨酸取代对如下三项的影响:(1)加速稳定性;(2)聚集体形成;以及(3)位点特异性聚乙二醇化。

[0333] 加速稳定性

[0334] AvPAL中半胱氨酸残基的丝氨酸取代对活体外稳定性的影响通过如下方式测定:将纯化的AvPAL半胱氨酸突变体(聚乙二醇化的或者非聚乙二醇化的)于37℃储存不同的时间段,然后如实施例3中所述,测量这些蛋白质的活体外PAL比活。

[0335] 野生型AvPAL和非聚乙二醇化的或者聚乙二醇化的AvPAL半胱氨酸突变体如实施例8中所述进行制备。

[0336] 如图6A中所示,非聚乙二醇化的AvPAL蛋白质37℃至少5天保持其比活稳定性,以及未受到位置565上或者503和565两个位置上半胱氨酸残基的丝氨酸取代的不利影响。同样地,如图6B中所示,聚乙二醇化的AvPAL蛋白质37℃至少6天保持其比活稳定性。37℃下6天之后,发现与野生型AvPAL和半胱氨酸AvPAL双突变体AvPAL_C565SC503S相比,半胱氨酸AvPAL单突变体AvPAL_C565S的稳定性有所降低。

[0337] 聚集体形成

[0338] AvPAL中半胱氨酸残基的丝氨酸取代对溶液中蛋白质聚集体形成的影响通过利用变性和非变性凝胶电泳或者利用SEC-HPLC对纯化的非聚乙二醇化的野生型AvPAL和AvPAL半胱氨酸突变体进行分离来测定。

[0339] 纯化的AvPAL制剂在变性条件(4-12%NuPAGE Bis-Tris)或者非变性条件(8%Tris-Gly,pH 8.3)下通过凝胶电泳来分离。分离得到的AvPAL蛋白质用考马斯蓝染色。

[0340] 纯化的AvPAL制剂通过SEC-HPLC进行分离。将AvPAL蛋白质装入含于pH值为6.9的20mM磷酸钠、300mM NaCl的TSK凝胶柱(G3000SWx1,7.8mm x 30cm,5μm(Tosoh Bioscience, LLC)),并用0.5mL/min的流速洗脱。将分离得到的AvPAL蛋白质在Agilent系列1100分光计上进行分析。

[0341] 通过凝胶电泳(图7A)或者SEC-HPLC(图7B)判断发现,野生型AvPAL制剂以及AvPAL_C503S和AvPAL_C64S制剂中存在聚集体,但AvPAL_C565S和AvPAL_C565SC503S制剂中则无聚集体。

[0342] 位点特异性聚乙二醇化

[0343] AvPAL中半胱氨酸残基的丝氨酸取代对位点特异性聚乙二醇化的影响通过如下方式得以测定:如实施例6中所述,对野生型AvPAL和半胱氨酸双突变体AvPAL_C503SC565S进行聚乙二醇化,然后与如下AvPAL赖氨酸残基上的相对聚乙二醇化进行比较:K2、K10、K32、K115、K145、K195、K301、K335、K413、K419、K493、K494和K522。

[0344] 在8M尿素中对大约100μg(浓度10μg/μL,共10μL)的非聚乙二醇化的或者聚乙二醇化的AvPAL蛋白质进行变性处理。然后将变性的蛋白质在含于0.8M尿素的pH值为8.2的胰蛋

白酶100μL反应体积中于37℃下消化过夜(~20h)。通过于37℃下用1μL的1M DTT处理1h来还原胰蛋白酶消化的蛋白质,然后用3μL 15%TFA淬灭。在C18反相柱上对消化的蛋白质进行分离。聚乙二醇化的AvPAL肽的每个的聚乙二醇化百分比通过相应的非聚乙二醇化的肽的消减肽图谱(subtractive peptide mapping)来计算。

[0345] 如图8中所示,AvPAL蛋白质:PEG的比率为1:3时,任何赖氨酸(K)残基的聚乙二醇化百分比并无显著差异,但可能K419是个例外,其中与野生型AvPAL相比,半胱氨酸双突变体C565SC503S的聚乙二醇化百分比低得多。然而,按增加的AvPAL蛋白质:PEG比率利用半胱氨酸双突变体获得的结果(其中未观察到剂量应答关系),连同相对小的聚乙二醇化百分比,表明从K1419处观察到的差异可能是无意义的。因此,位置503和565上的半胱氨酸残基的丝氨酸取代看起来并未影响AvPAL的位点特异性聚乙二醇化。

[0346] 实施例10

[0347] AvPAL蛋白质的聚集机制

[0348] 为了弄清细菌表达的AvPAL蛋白质的聚集机制,进行了多项研究。

[0349] 对纯化的AvPAL制剂进行浓缩并对浓缩的蛋白质溶液进行37℃2h孵育,这加速了纯化的AvPAL蛋白质在溶液中的聚集。通过利用SEC-HPLC进行AvPAL蛋白质分离来检测聚集。为确定二硫化物交联是否是聚集发生的原因,向浓缩的蛋白质溶液中添加50mM二硫苏糖醇(DTT),然后37℃孵育2h。

[0350] 在细菌中表达的AvPAL蛋白质如实施例2中所述进行纯化以及利用旋转过滤器(Millipore Biomax-10K NMWL)浓缩。将蛋白质在Eppendorf Centrifuge 5415C中以约15,000g旋转几分钟。对于倾向于聚集的半胱氨酸突变体(例如AvPAL_C503S和AvPAL_C64S),蛋白质浓缩至约20mg/mL并进行37℃2h孵育。对于抗聚集的半胱氨酸突变体(例如AvPAL_C565S和AvPAL_C565SC503S),蛋白质浓缩至约40mg/mL并进行37℃2h孵育。

[0351] 如表2中所示,纯化的AvPAL半胱氨酸突变体AvPAL_C64S和AvPAL_C503S的制剂在37℃2h的孵育后形成了聚集体。正如所料,AvPAL蛋白质在37℃2h的孵育之前进行浓缩的情况下,这种聚集更加严重。该聚集可以通过将浓缩的蛋白质暴露于DTT得以阻断,这表明该聚集是二硫化物交联引起的。相比之下,纯化的AvPAL半胱氨酸突变体AvPAL_C565S和AvPAL_C565SC503S的制剂在37℃2h的孵育后未形成聚集体,这表明位置565上的半胱氨酸残基参与经由二硫化物交联的AvPAL聚集。

[0352] 表2:AvPAL半胱氨酸突变体与二硫化物交联相关的聚集情况

[0353]

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

AvPAL_C565SC503S	浓缩+37°C/2h	-
AvPAL_C503S	浓缩+DTT+37°C/2h	-
AvPAL_C64S	浓缩+DTT+37°C/2h	-
AvPAL_C565S E1	浓缩+DTT+37°C/2h	-
AvPAL_C565S E2	浓缩+DTT+37°C/2h	-
AvPAL_C565SC503S	浓缩+DTT+37°C/2h	-

[0354] 为确定哪个半胱氨酸残基作为游离巯基存在,纯化的AvPAL制剂在8M尿素的存在下变性、通过碘乙酰胺烷基化、利用胰蛋白酶消化以及通过LC/MS分析。所有的AvPAL半胱氨酸残基都被碘乙酰胺标记,这表明细菌表达的AvPAL的所有半胱氨酸残基均作为游离巯基存在(数据未提供)。

[0355] 为确定哪个半胱氨酸残基存在于原生蛋白质的表面上,纯化的AvPAL制剂首先用N-乙基马来酰亚胺(NEM)处理,然后在8M尿素的存在下变性、通过碘乙酰胺烷基化、利用胰蛋白酶消化以及通过LC/MS分析。位置235和424上的半胱氨酸残基未通过NEM烷基化,以及位置318上的半胱氨酸残基通过NEM只是部分地烷基化,这表明位置64、503和565上的半胱氨酸残基在原生AvPAL的表面上以及位置318上的半胱氨酸残基部分地暴露在原生AvPAL的表面上(数据未提供)。

[0356] 为确定哪个半胱氨酸残基参与链间二硫化物交联,将纯化的非聚乙二醇化的野生型AvPAL制剂的浓度为0.7mg/mL的67μL溶液在37°C的包含20mM碘乙酰胺的8M尿素中进行变性和烷基化1h,然后在25°C的pH值为8.2的胰蛋白酶100μL反应体积中消化过夜(~17.5h)。胰蛋白酶消化的蛋白质通过质谱进行分离和分析,其中确认对应于预期二硫化物的肽并定量为总离子计数(TIC)。

[0357] 表3显示对二硫化物对的C503-C503、C503-C565、C565-C318和C565-C565检测。在纯化的AvPAL制剂的二硫化物对中发现了位置565上,以及在较小程度上,发现了位置503上的半胱氨酸残基。

[0358] 表3:聚集体二硫化物对

二硫化物对	结果(TIC/1000)
C64-C318	n.d. [#]
C64-C64	n.d.
C64-C503	n.d.
C64-C565	n.d.
C503-C318	n.d.
C503-C503	11
C503-C565	112
C565-C318	13
C565-C565	37
C318-C318	n.d.

[0360] [#]未检测出的

[0361] 为确定除了二硫化物交联之外,是否有其他的机制可能参与AvPAL蛋白质聚集,进行了多项研究。

[0362] 将纯化的AvPAL制剂用0.05%吐温或者10mM EDTA孵育,然后如实施例9中所述通过SEC-HPLC进行分离。由于疏水性相互作用,吐温减少了蛋白质聚集,以及由于二价阳离子的存在,EDTA减少了蛋白质聚集。如图9中所示,暴露于0.05%吐温或者10mM EDTA没有对AvPAL蛋白质聚集产生影响。在用10mM EDTA处理的AvPAL中10min时的附加峰是由210nm波长处EDTA的吸光导致的。

[0363] 为了进一步研究二硫化物交联在AvPAL蛋白质聚集中的作用,通过用DTT处理来还原纯化的AvPAL,然后脱盐再通过SEC-HPLC进行分离。如图10A中所示,AvPAL蛋白质聚集通过用DTT进行处理得以最小化,以及37℃18h孵育之后,聚集体再形成。相比之下,如图10B中所示,一旦在DTT暴露之后,但是在脱盐和37℃18h孵育之前,通过用N-甲基马来酰亚胺(NEM)处理进行了AvPAL表面半胱氨酸修饰(即烷基化),聚集体没有再形成。

[0364] 基于上文,细菌表达的AvPAL其聚集看起来仅仅是由于链间二硫键的形成,而非由于疏水效应或者二价阳离子的存在。位置565和503上的半胱氨酸残基参与AvPAL制剂中链间二硫键的形成。

[0365] 实施例11

[0366] 聚乙二醇化形式的AvPAL变异体(半胱氨酸突变体)的液体制剂

[0367] 为了弄清各种赋形剂(例如稳定剂)对本文提供的制剂中聚乙二醇化形式的AvPAL多肽变异体(例如在位置503和565上具有半胱氨酸残基的丝氨酸取代)的加速稳定性的影响,进行了多项研究。

[0368] 如实施例7中所述制备聚乙二醇化的AvPAL半胱氨酸双突变体AvPAL_C565SC503S。

[0369] 利用活体外活性测定(试管测定或者平板测定)对聚乙二醇化的AvPAL_C565SC503S的不同制剂进行加速稳定性测定。对于试管测定,在TBS稀释缓冲液中稀释纯化的聚乙二醇化的AvPAL_C565SC503S,然后加入包含100mM Tris-HCl、22.5mM Phe的pH值为8.5的测定缓冲液中。30℃孵育2min之后,通过290nm波长处的吸光度测量释放的反式肉桂酸(t-CA)的量。对于平板测定,在加了BSA/Phe/Brij中的TBS稀释缓冲液中稀释纯化的聚乙二醇化的AvPAL_C565SC503S,然后加入包含100mM Tris-HCl、22.5mM Phe的pH值为8.5的测定缓冲液中。30℃孵育10-20min之后,通过290nm波长处的吸光度测量释放的反式肉桂酸(t-CA)的量。一个国际单位(IU)的PAL活性等于1μMol TCA/min。

[0370] 在第一项加速稳定性研究中,评估了pH值对聚乙二醇化的半胱氨酸双突变体AvPAL AvPAL_C565SC503S的稳定性的影响。在pH值从4至9不等的10mM缓冲液和140mM NaCl中预先配制纯化的聚乙二醇化的AvPAL_C565SC503S。缓冲液检测:柠檬酸盐(pH 4)、醋酸盐(pH 5)、组氨酸(pH 6)、磷酸盐(pH 7)、Tris(pH 7.5,pH 8)和精氨酸(pH 9)。4℃、25℃或者37℃储存酶制剂30天之后,进行活体外活性测量。观察pH值为4时PAL酶活性的总损耗。选定从7到8的pH范围进行进一步的评估。

[0371] 在第二项加速稳定性研究中,评估了pH值和各种赋形剂对聚乙二醇化的AvPAL半胱氨酸双突变体AvPAL_C565SC503S的稳定性的影响。在没有或者存在0.5%EDTA;0.5%EDTA加0.5%抗坏血酸;或者0.5%EDTA加5mM蛋氨酸(Met)的条件下,于pH值为7、7.5或者8.0的10mM Tris和140mM NaCl中预先配制纯化的聚乙二醇化的AvPAL_C565SC503S。4℃、25℃或者37℃储存酶制剂60天之后,进行活体外活性测量。pH值7.0和7.5在保持酶活性方面看起来是平衡的,EDTA对酶活性的影响很小甚或没有,以及抗氧化剂抗坏血酸和蛋氨酸对

酶活性有负面影响。

[0372] 在相同的加速稳定性研究中,评估了AvPAL半胱氨酸双突变体AvPAL_C565SC503S的聚乙二醇化的影响。非聚乙二醇化和聚乙二醇化的AvPAL_C565SC503S之间具有类似的酶活性损失率。

[0373] 在第三项加速稳定性研究中,评估了作为赋形剂的酶底物和产物对聚乙二醇化的AvPAL半胱氨酸双突变体AvPAL_C565SC503S的稳定性的影响。在没有或者存在1mM Phe(每摩尔活性位点5mol底物)、2mM TCA(每摩尔活性位点10mol产物)或者0.05%吐温80(一种表面活性剂)的情况下,于pH值为7.5的10mM Tris和140mM NaCl中预先配制大约12mg/mL(0.2mM)的纯化的聚乙二醇化的AvPAL_C565SC503S。4℃、25℃或者37℃储存酶制剂不同的时间段后,每周进行活体外活性测量。Phe和t-CA均显著地提高了酶的稳定性,而吐温对酶稳定性没有影响。

[0374] 对加速稳定性研究1、2和3的总结如图11所示。

[0375] 在第四项加速稳定性研究中,评估了作为赋形剂的低浓度的Phe和t-CA对聚乙二醇化的AvPAL半胱氨酸双突变体AvPAL_C565SC503S的稳定性的影响。在没有或者存在0.4mM Phe(每摩尔活性位点2mol底物)或者0.4mM TCA(每摩尔活性位点2mol产物)的情况下,在pH值为7.5的10mM Tris和140mM NaCl中预先配制大约12mg/mL(0.2mM)的纯化的聚乙二醇化的AvPAL_C565SC503S。4℃、25℃或者37℃储存酶制剂不同的时间段后,每周进行活体外活性测量。低浓度的Phe和t-CA均有效地稳定了酶活性。

[0376] 在第五项加速稳定性研究中,评估了作为赋形剂的弱酶底物酪氨酸(Tyr)对聚乙二醇化的AvPAL半胱氨酸双突变体AvPAL_C565SC503S的稳定性的影响。在没有或者存在1或5mM Tyr(分别为每摩尔活性位点5或者25mol的底物)的情况下,在pH值为7.5的10mM Tris和140mM NaCl中预先配制大约12mg/mL(0.2mM)的纯化的聚乙二醇化的AvPAL_C565SC503S。4℃、25℃或者37℃储存酶制剂不同的时间段后,每周进行活体外活性测量。Tyr对酶活性稳定性具有最小的非剂量依赖的影响(图12)。

[0377] 在第六项加速稳定性研究中,评估了作为赋形剂的亲核清除剂对聚乙二醇化的AvPAL半胱氨酸双突变体AvPAL_C565SC503S的稳定性的影响。在没有或者存在1Phe(每摩尔活性位点3mol底物)、2mM亲核清除剂(每摩尔活性位点6mol苯甲酸或者吡哆胺)或者1mM Phe和2mM亲核清除剂两者的情况下,于pH值为7.5的10mM Tris和140mM NaCl中预先配制大约20mg/mL(0.33mM)的纯化的聚乙二醇化的AvPAL_C565SC503S。4℃或者37℃储存酶制剂不同的时间段后,每周进行活体外活性测量。苯甲酸有效地稳定了酶活性,但吡哆胺没有(图13A)。没有Phe和苯甲酸的附加效应,这暗示存在类似的稳定机制。

[0378] 苯甲酸和t-CA的稳定效应暗示,他们作为Phe的结构类似物发挥作用(见图13B)。

[0379] 将来自该六项加速稳定性研究的数据结合起来,以预测各种制剂中聚乙二醇化的AvPAL半胱氨酸双突变体AvPAL_C565SC503S的有效储存期限。储存期限测定如下:(1)为每个制剂条件测定活性衰减率($k_{\text{衰减}}$),其遵循一级动力学;(2)绘制 $\ln(k_{\text{衰减}})$ v. 1/温度(°K)图;(3)为给定的制剂条件测定活性衰减所需的 E_a ($\Delta G_{\text{衰减}}$);(4)在给定的温度下利用算得的 E_a 和观察得到的 $k_{\text{衰减}}$ 外推得到4℃时的 $k_{\text{衰减}}$;以及(5)测定储存期限(T_{90}),其是4℃时酶比活下降 $\geq 10\%$ 所需的时间。

[0380] 表4显示Phe和t-CA极大地提高了聚乙二醇化的AvPAL半胱氨酸双突变体AvPAL_

C565SC503S的预测储存期限。

[0381] 表4:具有各种赋形剂的聚乙二醇化的半胱氨酸双突变体

[0382] AvPAL_C565SC503S的预测储存期限 T_{90} (以周为单位)

赋形剂	42℃	37℃	25℃	4℃*	4℃(据观察)
无(TBS)	0.67	0.8	2.1	12.9	~9-13
Phe	1.63	2.2	9.1	85	>20
t-CA	ND	2.0	7.1	85.8	>20

[0384] *数字是基于来自6项不同实验的数据得出的估算值。

[0385] 总的来说,上文的预先配制研究表明,聚乙二醇化的AvPAL半胱氨酸双突变体AvPAL_C565SC503S的最佳pH值是7至7.5。抗氧化剂的存在导致酶活性大幅损失。在加速的条件(25℃和37℃)下,Phe和反式肉桂酸(t-CA)均将rAvPAL-PEG的稳定性提高了50%或者更多。每个rAvPAL-PEG活性位点2倍过量的Phe或者t-CA便足以稳定活性以及更高的浓度看起来没有附加的益处。更弱的PAL底物酪氨酸(Tyr)看起来没有稳定酶活性,而苯甲酸对rAvPAL-PEG活性的稳定程度与其结构类似物Phe类似。当结合Phe时,没有观察到苯甲酸具有附加的活性稳定化作用,这暗示存在普通的活性稳定化机制。

[0386] 实施例12

[0387] 聚乙二醇化形式的AvPAL变异体(半胱氨酸突变体)的冻干制剂

[0388] 为了弄清各种固体(例如冻干)制剂对聚乙二醇化形式的AvPAL多肽变异体(例如在位置503和565上具有半胱氨酸残基的丝氨酸取代)的活性的影响,进行了多项研究。

[0389] 如实施例7中所述制备聚乙二醇化的AvPAL半胱氨酸双突变体AvPAL_C565SC503S。

[0390] 聚乙二醇化的AvPAL半胱氨酸双突变体AvPAL_C565SC503S配制如下:(F1) 10mg/mL AvPAL_C565SC503S, 10mM Tris, pH 7.5; (F2) 10mg/mL AvPAL_C565SC503S, 10mM Tris, pH 7.5, 25mg/mL甘露醇;或者(F3) 10mg/mL AvPAL_C565SC503S, 10mM Tris, pH 7.5, 20mg/mL甘露醇, 5mg/mL蔗糖。配制之后,每个的PAL酶活性为1.7至1.8U/mg。冻干之后,4℃储存制剂达26,然后在新鲜的无菌过滤的MilliQ水中再悬浮。如实施例11中所述测定PAL酶活性。表5显示各种AvPAL_C565SC503S制剂冻干、储存或者再悬浮之后,看起来没有活性损失。

[0391] 表5:冻干制剂(LF)之后聚乙二醇化的半胱氨酸双突变体AvPAL_C565SC503S的比活

LF	LF之前	LF之后	LF + 5天/4℃之后	LF + 11天/4℃之后	LF + 26天/4℃之后
F1	1.78 +/- 0.04	1.60	1.59	1.71	1.48
F2	1.72 +/- 0.01	1.67	1.62	1.68	1.72
F3	1.65 +/- 0.09	1.66	1.73	1.76	1.59

[0393] 实施例13

[0394] 聚乙二醇化的AvPAL变异体的制剂

[0395] 为了弄清各种赋形剂(例如稳定剂和防腐剂(即抗菌剂))对本文提供的制剂中的聚乙二醇化形式的AvPAL多肽变异体(例如在位置503和565(AvPAL_C565SC503S)上具有半胱氨酸残基的丝氨酸取代)的加速稳定性的影响,进行了多项研究。

[0396] 如实施例7中所述配制聚乙二醇化的AvPAL半胱氨酸双突变体AvPAL_C565SC503S。

[0397] 如实施例11中所述,利用活体外活性测定确定聚乙二醇化的AvPAL_C565SC503S的不同制剂的加速稳定性。

[0398] 在初步防腐剂相容性(preservative compatibility)研究中,评估了防腐剂(即抗菌剂)的存在对聚乙二醇化的AvPAL半胱氨酸双突变体AvPAL_C565SC503S的活性和稳定性的影响。在pH值为7.35的10mM Tris缓冲液和135mM NaCl中配制纯化的聚乙二醇化的AvPAL_C565SC503S。防腐剂检测:苯甲醇(0.15%);间甲酚(0.3%);氯甲酚(0.25%);以及酚(0.5%)。在没有防腐剂或者在存在苯甲醇、间甲酚、氯甲酚或者酚的情况下,室温孵育酶制剂1h之后,进行初始活性测量。4℃储存酶制剂达65天之后,进行活体外活性测量。初始酶活性未受防腐剂的影响,以及所述酶与受测的每种防腐剂相容,虽然观察到间甲酚的活性缓慢衰减。

[0399] 在第一项防腐剂相容性研究中,评估了,在存在或者没有稳定剂(即L-苯丙氨酸(Phe)或者Gly)的情况下,防腐剂(即抗菌剂)的存在对聚乙二醇化的AvPAL半胱氨酸双突变体AvPAL_C565SC503S的活性和稳定性的影响。在pH值为7.35的10mM Tris缓冲液和135mM NaCl中配制纯化的聚乙二醇化的AvPAL_C565SC503S。防腐剂检测:苯甲醇(0.15%);间甲酚(0.3%);以及酚(0.5%)。稳定剂检测:Phe(1mM);以及Gly(1mM)。在没有任何防腐剂或者稳定剂,或者在存在所述防腐剂的一种、所述稳定剂的一种或者所述防腐剂的一种和所述稳定剂的一种的各种组合的情况下,4℃、25℃或者40℃储存酶制剂达18周之后,进行活体外活性测量。在该项研究中,所有的防腐剂都降低了初始酶活性,以及酚和Gly的组合是强效的酶抑制剂。在所有的情况下,在存在防腐剂时配制的酶其稳定性比单独存在Phe的情况下配制的那些酶要低。在接下来的研究中,在pH值为7.3的50mM Tris缓冲液、135mM NaCl中利用12mg/mL(0.19mM)酶制剂获得了类似结果。

[0400] 在第二项防腐剂相容研究中,评估了在存在或者没有稳定剂(即Phe或者Gly)的情况下,不同的Tris缓冲液浓度,以及防腐剂(即抗菌剂)的存在对聚乙二醇化的AvPAL半胱氨酸双突变体AvPAL_C565SC503S的稳定性的影响。在pH值为7.3的10mM、25mM或者50mM Tris缓冲液和135mM NaCl中配制纯化的聚乙二醇化的AvPAL_C565SC503S。防腐剂检测:苯甲醇(1.5%)。稳定剂检测:Phe(1mM);以及Gly(1mM)。仅仅在不同的Tris缓冲液中,或者在单独存在苯甲醇或者Phe或者苯甲醇、Phe和Gly的各种组合的情况下,在50mM Tris缓冲液中,4℃、25℃或者40℃储存酶制剂达12周之后,进行活体外活性测量。酶活性随着Tris缓冲液浓度的增加而降低。在受测浓度下,苯甲醇与所述酶不相容。受测的所有制剂中的所述酶其稳定性比单独存在Phe时的酶制剂要低。

[0401] 在第三项防腐剂相容性研究中,评估了防腐剂(即抗菌剂)的各种组合以及一种或者多种稳定剂(即Phe和Gly)的存在对聚乙二醇化的AvPAL半胱氨酸双突变体AvPAL_C565SC503S的稳定性的影响。在pH值为7.35的10mM Tris缓冲液和135mM NaCl中配制纯化的聚乙二醇化的AvPAL_C565SC503S。防腐剂检测:苯甲醇(1.5%);以及间甲酚(0.3%)。稳定剂检测:Phe(1mM);以及Gly(1mM)。单独在Phe中或者在Phe、Gly和苯甲醇或间甲酚的各种组合中,4℃、25℃或者40℃储存酶制剂达37周之后,进行活体外活性测量。该项研究的结果如图14中所示。正如上文所见,制剂中防腐剂的存在降低了初始酶活性,然而,4℃和25℃时,在包含间甲酚、Phe和Gly的酶制剂中酶活性的损失仅仅是短暂的。发现这种酶制剂最接近实施例11中观察到的针对单独Phe的稳定效应。

[0402] 在第四项防腐剂相容性研究中,评估了存在防腐剂(即间甲酚)和稳定剂(即Phe)的情况下,不同的Gly浓度对聚乙二醇化的AvPAL半胱氨酸双突变体AvPAL_C565SC503S的稳定性的影响。在没有Gly或者存在1、3、5、10或者20mM Gly的情况下,在pH值为7.2的10mM Tris缓冲液、135mM NaCl、1mM Phe和3.2mg/mL (0.32%)中配制纯化的聚乙二醇化的AvPAL_C565SC503S。25℃或者40℃储存酶制剂达12周之后,进行活体外活性测量。该项研究的结果如图15A所示。25℃或者40℃储存之后的酶活性损失(报告为归一化的活性(储存之前各种制剂中的酶活性%))通过添加Gly以剂量依赖性方式降低。如通过RP-HPLC所确定的,在包含防腐剂的制剂中通过Gly的酶活性的改善稳定性与聚乙二醇化的AvPAL_C565SC503S的主峰的保持很有相关性。

[0403] 在第五项防腐剂相容性研究中,评估了存在稳定剂(即Phe)但不存在防腐剂的情况下,不同的Gly浓度对聚乙二醇化的AvPAL半胱氨酸双突变体AvPAL_C565SC503S的稳定性的影响。存在各种浓度的Gly(从20到100mM的范围)的情况下,在pH值为7.2的10mM Tris缓冲液、135mM NaCl和1mM Phe中配制纯化的聚乙二醇化的AvPAL_C565SC503S。40℃储存酶制剂达8周之后,进行活体外活性测量。这项研究的结果如图15B中所示。40℃储存之后的酶活性损失通过在没有包含防腐剂的聚乙二醇化的AvPAL_C565SC503S制剂中添加Gly以剂量依赖性方式降低。

[0404] 实施例14

[0405] 小鼠体内AvPAL变异体(半胱氨酸突变体)及其聚乙二醇化形式的影响

[0406] 这些研究的目的是确定AvPAL多肽中位置503和565上的半胱氨酸残基的丝氨酸取代对小鼠体内的活体内Phe水平的影响。

[0407] 基本上如2006年6月12日提交的先有共同待审的申请号为11/451,999的美国专利(其以引用方式全部并入本文)的实施例7到9中所述,对纯合ENU2(也称为BTBR^{enu2})小鼠体内的聚乙二醇化形式的AvPAL半胱氨酸双突变体AvPAL_C565SC503S进行了活体内活性检测。所述ENU2小鼠是PAH部位的纯合突变体,导致动物具有严重的高苯丙氨酸血症。高血浆Phe水平使得该动物成为用于评估PAL降低血浆Phe的能力的合适模型。

[0408] 在第一项研究中,按各种剂量对AvPAL半胱氨酸双突变体AvPAL_C565SC503S进行检测。将ENU2小鼠(雄性和雌性)分成5个剂量组:4个检测组(n=4)和一个溶媒组(n=2)。对每只小鼠每周给予8次皮下剂量的溶媒、低剂量的聚乙二醇化的半胱氨酸双突变体AvPAL(0.25IU)、中剂量的聚乙二醇化的半胱氨酸双突变体AvPAL(1.0IU)、高剂量的聚乙二醇化的半胱氨酸双突变体AvPAL(4.0IU)或者聚乙二醇化的野生型AvPAL(4.0IU)。给药前采集血浆以及给药后48h采集血浆(达57天)进行Phe水平分析。而且,给药前采集血清以及给药后48h采集血清(达57天)用于抗AvPAL抗体水平的分析。从第一次给药的前2天开始,还对小鼠进行每周一次的称重(达40天)。

[0409] 在该项研究进行过程中,有两只小鼠死亡,一只溶媒处理的小鼠和一只低剂量的聚乙二醇化的半胱氨酸双突变体AvPAL处理的小鼠。图16显示每次皮下注射聚乙二醇化的半胱氨酸双突变体AvPAL之后48h时所观察到的血浆中Phe水平的剂量依赖性降低。在剂量相等的情况下,用聚乙二醇化的野生型AvPAL或者聚乙二醇化的半胱氨酸双突变体AvPAL处理的小鼠之间血浆Phe水平没有差异。如图17中所示,用溶媒、聚乙二醇化的野生型AvPAL或者聚乙二醇化的半胱氨酸双突变体AvPAL处理的小鼠之间体重也无显著差异。观察到的体

重无显著差异可能是因为在在本项研究中同时使用了雄性小鼠和雌性小鼠。

[0410] 利用间接的ELISA测定分析这些小鼠体内的抗AvPAL抗体滴度。在该测定中,将微量滴定板涂覆AvPAL,封闭,然后暴露于从每只小鼠身上采血得到的适当稀释的血清。确认粘附在微量滴定板表面的AvPAL并通过血清样本中存在的AvPAL特异性抗体进行粘合。可检测标记的山羊抗小鼠IgG抗体检测出结合的抗AvPAL抗体。对血清样本进行1:50的初始稀释,以及对比“阈值”(cutpoint)进行分析,该阈值来自稀释1:50的池存的小鼠血清。信号低于所述阈值的样本据称<50或者是“阴性”的。将认为是“阳性”的其余样本通过在1:3系列滴度中进一步稀释为一种稀释物,其中信号降至所述阈值以下。产生阳性信号(即高于所述阈值的信号)的最高稀释倍数(highest dilution factor)据称是该样本的滴度。在该滴度系列执行过程中,滴度的3倍变化可能不会反映出所检测的抗体的显著差异,因为差异可能是阈值水平的信号最小变化的结果。

[0411] 如表6中所示,与用相等剂量(4.0IU)的聚乙二醇化的野生型AvPAL处理的小鼠相比,用聚乙二醇化的半胱氨酸双突变体AvPAL处理的小鼠体内的抗AvPAL抗体滴度要低。虽然未观察到明显的剂量应答,与用低剂量(0.25IU)的聚乙二醇化的半胱氨酸双突变体AvPAL处理的小鼠相比,用高剂量(4.0IU)的聚乙二醇化的半胱氨酸双突变体AvPAL处理的小鼠的抗AvPAL抗体滴度要高。

[0412] 表6:抗AvPAL IgG滴度

[0413]	聚乙二醇化的AvPAL蛋白质	样本	Pre	D 8	D 15	D 22	D 29
	AvPAL_C565SC503S (0.25 IU)	S 2 03	<50	50	<50	50	50
		S 2 04	<50	50	50	50	450
		S 2 05	<50	<50	<50	<50	<50
		S 2 06	<50	<50	50	50	50
	AvPAL_C565SC503S (1.0 IU)	S 3 07	<50	<50	<50	<50	<50
		S 3 08	<50	<50	<50	<50	<50
		S 3 09	<50	<50	<50	<50	50
		S 3 10	<50	<50	<50	<50	<50
	AvPAL_C565SC503S (4.0 IU)	S 4 11	<50	<50	<50	50	50
		S 4 12	<50	<50	50	50	50
		S 4 13	50	50	50	450	150
		S 4 14	<50	<50	<50	<50	<50
	WTAvPAL (4.0 IU)	S 5 15	<50	<50	150	150	450
		S 5 16	<50	50	150	150	450
		S 5 17	<50	<50	150	4050	12150

[0414]	聚乙二醇化的AvPAL蛋白质	样本	Pre	D 8	D 15	D 22	D 29
		S 5 18	<50	50	150	450	150

[0415]	聚乙二醇化的AvPAL蛋白质	样本	Pre	D 36	D 43	D 50	D 57
	AvPAL_C565SC503S (0.25IU)	S 2 03	<50	<50	150	150	<50
		S 2 04	<50	>1350	>1350	>1350	4050
		S 2 05	<50	N/A*	N/A	N/A	N/A
		S 2 06	<50	<50	50	50	<50
	AvPAL_C565SC503S (1.0IU)	S 3 07	<50	50	150	>1350	150

	S 3 08	<50	<50	<50	<50	<50
	S 3 09	<50	450	>1350	>1350	450
	S 3 10	<50	<50	50	50	<50
AvPAL_C565SC503S (4.0IU)	S 4 11	<50	50	150	50	50
	S 4 12	<50	150	150	150	50
	S 4 13	50	450	450	450	150
	S 4 14	<50	150	150	150	150
WTAvPAL (4.0IU)	S 5 15	<50	450	1350	1350	150
	S 5 16	<50	150	450	450	150
	S 5 17	<50	4050	4050	4050	450
	S 5 18	<50	50	50	50	<50

[0416] *无样本/数据不可用

[0417] 与施用了4.0IU聚乙二醇化的野生型AvPAL的小鼠相比,施用了4.0IU的聚乙二醇化的半胱氨酸双突变体AvPAL的小鼠在该项研究的整个过程中保持体内降低的抗AvPAL IgG滴度。

[0418] 在第二项研究中,以不同的聚乙二醇化比率检测AvPAL半胱氨酸双突变体AvPAL_C565SC503S。将雄性对象ENU2小鼠分成5个剂量组:4个检测组 (n=4) 和一个溶媒组 (n=2)。对每只小鼠每周给予8次皮下剂量的溶媒、低剂量的聚乙二醇化的半胱氨酸双突变体AvPAL (4IU和1:1.6AvPAL:PEG比率)、中剂量的聚乙二醇化的半胱氨酸双突变体AvPAL (4IU和1:2.4AvPAL:PEG比率)、高剂量的聚乙二醇化的半胱氨酸双突变体AvPAL (4IU和1:3AvPAL:PEG比率) 或者聚乙二醇化的野生型AvPAL (4IU和1:3AvPAL:PEG比率)。给药前采集血浆以及给药后4天采集血浆 (达61天) 进行Phe水平分析。而且,给药前采集血清以及给药后4天采集血清 (达57天) 用于抗AvPAL抗体水平的分析。从第一次给药的前2天开始,还对小鼠进行每周一次的称重 (达40天)。

[0419] 在该项研究进行过程中,有一只溶媒处理的小鼠死亡。图18显示每次皮下注射聚乙二醇化的半胱氨酸双突变体AvPAL之后4天时所观察到的血浆中Phe水平的PEG比率依赖性降低。在PEG比率相等的情况下,用聚乙二醇化的野生型AvPAL或者聚乙二醇化的半胱氨酸双突变体AvPAL处理的小鼠之间血浆Phe水平没有差异。如图19中所示,与溶媒处理的小鼠相比,用聚乙二醇化的野生型AvPAL或者聚乙二醇化的半胱氨酸双突变体AvPAL处理的小鼠其体重明显要高。

[0420] 如上文所述,利用间接的ELISA测定分析这些小鼠体内的抗AvPAL抗体滴度。

[0421] 如表7中所示,与用相等剂量的聚乙二醇化的野生型AvPAL (具有相同的AvPAL:PEG比率 (1:3)) 处理的小鼠相比,用聚乙二醇化的半胱氨酸双突变体AvPAL处理的小鼠具有较低的抗AvPAL抗体滴度。据观察,抗AvPAL抗体滴度AvPAL:PEG的比率之间具有反比剂量应答关系 (inverse dose response),这与关于蛋白质 (例如AvPAL) 聚乙二醇化与活体内免疫原性的降低有关的预想是相符的。

[0422] 表7:抗AvPAL IgG滴度

[0423]	聚乙二醇化的AvPAL蛋白质	样本	Pre	D 15	D 28	D 43	D 64
	WTA _{AvPAL} (PEG 1:3 NOF)	S 1 01	<50	450	12150	4050	>1350
		S 1 06	<50	450	450	450	4050
		S 1 10	<50	50	50	150	450
		S 1 17	<50	150	450	450	1350
	AvPAL_C565SC503S (PEG 1:1.6)	S 2 02	50	450	12150	1350	1350
		S 2 07	<50	1350	12150	12150	36450
		S 2 11	<50	450	1350	12150	12150
		S 2 18	50	150	36450	26.57 M	>36450
	AvPAL_C565SC503S (PEG 1:2.4)	S 3 03	<50	50	150	450	4050
		S 3 08	<50	50	50	50	450
		S 3 12	<50	50	150	450	4050
		S 3 13	<50	50	450	1350	4050
	AvPAL_C565SC503S (PEG 1:3)	S 4 04	<50	50	50	450	450
		S 4 09	50	50	50	150	450
		S 4 14	<50	<50	50	450	1350
		S 4 16	<50	<50	150	50	450
	溶媒	S 5 05	<50	<50	<50	<50	N/A*
		S 5 15	<50	<50	<50	<50	<50

[0424] *N/A:没有这个时间点的血清样本

[0425] 上文结果显示,聚乙二醇化的半胱氨酸双突变体AvPAL AvPAL_C565SC503S具有的活体内PAL酶活性与聚乙二醇化的野生型AvPAL的相当。因为非聚乙二醇化的野生型AvPAL没有检测出活体内PAL酶活性(见2006年6月12日提交的申请号为11/451,999的美国专利申请中的实施例8),可以得出这样的结论:包含聚乙二醇化的半胱氨酸双突变体AvPAL AvPAL_C565SC503S和聚乙二醇化的野生型AvPAL的AvPAL变异体比野生型AvPAL具有更大的苯丙氨酸转化活性。

[0426] 上文结果还显示,聚乙二醇化的AvPAL变异体(由于503和565两个位置上均有半胱氨酸到丝氨酸的取代,其活体外蛋白质聚集得以减少)与聚乙二醇化的野生型AvPAL相比具有较低的免疫原性。因为聚乙二醇化本身与免疫原性的降低有关,可以得出这样的结论:AvPAL变异体与野生型AvPAL相比具有较低活体内免疫原性。

[0427] 实施例15

[0428] 食蟹猴和大鼠体内的聚乙二醇化形式的AvPAL变异体(半胱氨酸突变体)的毒性/药物动力学研究

[0429] 为了确定对食蟹猴以及大鼠施用单剂量的聚乙二醇化形式的AvPAL多肽变异体(例如在位置503和565上具有半胱氨酸残基的丝氨酸取代)产生的影响,进行了毒性/药物动力学研究。

[0430] 如实施例7中所述配制聚乙二醇化的AvPAL半胱氨酸双突变体AvPAL_C565SC503S。

[0431] 食蟹猴毒性/药物动力学研究

[0432] 该项研究使用四(4)组猴,每组有三只雄性猴和三只雌性猴。组1接受安慰剂(mL/kg);以及组2、组3和组4分别接受单次皮下注射4、12和60mg/kg聚乙二醇化的AvPAL半胱氨酸

酸双突变体AvPAL_C565SC503S溶液。给药前,以及给药后于从3至504h不等的时间点从这些猴中采集血浆样本。发现60mg/kg剂量对这些猴有毒,因此终止该项研究的组4部分。

[0433] 图20A显示单次皮下注射4和12mg/kg之后不同的时间点血浆中聚乙二醇化的AvPAL半胱氨酸双突变体AvPAL_C565SC503S的浓度。数据显示聚乙二醇化的AvPAL半胱氨酸双突变体AvPAL_C565SC503S的单相消除。具有一级吸收的一室模型看起来描述了单次皮下注射之后聚乙二醇化的AvPAL半胱氨酸双突变体AvPAL_C565SC503S的血浆谱。

[0434] 图20B显示单次皮下注射4mg/kg之后不同的时间点血浆中Phe和聚乙二醇化的AvPAL半胱氨酸双突变体AvPAL_C565SC503S的浓度。按这个剂量使血浆Phe浓度在24h之内降到GC/MS测定中的定量限以下,以及血浆Phe的下降持续超过10天。

[0435] 大鼠毒性/药物动力学研究

[0436] 该项研究使用八(8)组大鼠,其中3只雄性和3只雌性在安慰剂组,以及6只雄性和6只雌性在检测组。组1和组5接受单次静脉内和皮下注射安慰剂。组2、组3和组4分别接受单次静脉注射1、5和25mg/kg聚乙二醇化的AvPAL半胱氨酸双突变体AvPAL_C565SC503S。组6、组7和组8分别接受单次皮下注射10、25和250mg/kg聚乙二醇化的AvPAL半胱氨酸双突变体AvPAL_C565SC503S。大鼠给药前,以及给药后在从1到360h不等的时间点采集血液样本。在每个采集时间点,从每个组的3只大鼠中采集血液。在该项研究中未在大鼠体内观察到毒性。

[0437] 图21A显示单次静脉注射1、5和25mg/kg之后不同的时间点血浆中聚乙二醇化的AvPAL半胱氨酸双突变体AvPAL_C565SC503S的浓度。

[0438] 数据显示单次静脉注射之后来自血浆的聚乙二醇化的AvPAL半胱氨酸双突变体AvPAL_C565SC503S的单相消除。

[0439] 图21B显示单次皮下注射10、25和250mg/kg之后不同的时间点血浆中聚乙二醇化的AvPAL半胱氨酸双突变体AvPAL_C565SC503S的浓度。具有一级吸收的一室模型看起来描述了单次皮下注射之后聚乙二醇化的AvPAL半胱氨酸双突变体AvPAL_C565SC503S的血浆谱。

[0440] 表8显示单次静脉内或者皮下注射之后聚乙二醇化的AvPAL半胱氨酸双突变体AvPAL_C565SC503S的药物动力学参数。

[0441] 表8:单次静脉内或者皮下给药之后聚乙二醇化的双半胱氨酸突变体AvPAL_C565SC503S的药物动力学参数

[0442]

途径	剂量 (mg/kg)	AUC _{0-∞} (ng·hr/mL)	C _{max} (ng/mL)	T _{max} (hr)	t _{1/2} * (hr)	F (%)
静脉内	1	657131	12600	4.5	27.9	--
	5	3579327	87667	2	39.1	--
	25	10860907	202238	9.0	30.4	--
皮下	10	1304016	16674	18.0	46.9	19.7
	25	2290754	29260	42.0	21.0	12.5 [#]
	250	37254683	225200	72.0	62.8	34.0

[0443] *皮下给药途径的终末t_{1/2}比静脉内给药途径的要长;这可能是由于来自皮

[0444] 下组织的吸收率比消除率慢(使得观察到的t_{1/2}实际上是吸收期)。

[0445] [#]利用25mg/kg时静脉内AUC数据得出的生物度是21.5%。

[0446] 在这项药物动力学研究中,看起来没有性别差异。对于静脉内和皮下给药途径, AUC_{inf} 和 C_{max} 均与剂量大致成比例。

[0447] 大鼠和食蟹猴中的多剂量毒性研究

[0448] 在重复给药毒性研究中,评估大鼠和食蟹猴体内聚乙二醇化的AvPAL双半胱氨酸突变体AvPAL_C565SC503S的安全性。

[0449] 对大鼠皮下给药25mg/kg聚乙二醇化的AvPAL双半胱氨酸突变体AvPAL_C565SC503S,每周两次,超过28天,大鼠表现没有毒性。

[0450] 对食蟹猴皮下给药1mg/kg剂量的聚乙二醇化的AvPAL双半胱氨酸突变体AvPAL_C565SC503S,每周两次,超过28天,食蟹猴表现没有显著毒性。第一次给药后观察到血浆Phe水平的剂量依赖性下降;然而,第七次给药之后,所有给药组中血浆Phe水平恢复到基线,表明可能有针对施用的酶的抗体反应。第28天时,在大部分1mg/kg处理的动物中观察到最小的抗AvPAL_C565SC503S IgG滴度。第28天时,在该项研究中的任何动物中都没观察到IgM滴度。

[0451] 实施例16

[0452] 示例性的原核PAL制剂

[0453] 下文的实施例提供有关用来配制如下组合物的参数的指导:该组合物包括原核PAL或者其生物活性片段、突变体、变异体或类似物,其可用于治疗以升高的苯丙氨酸水平为特征的疾病和紊乱,例如HPA(包含PKU)以及其他疾病(包含癌症)。用来配制原核PAL组合物的参数包括,但不仅限于,保持pH的缓冲剂、等渗调节剂、无或者有稳定剂以及无或者有其他赋形剂、溶媒、稀释液以及诸如此类。

[0454] 在实施例11中,聚乙二醇化的AvPAL双半胱氨酸突变体AvPAL_C565SC503S配制为约12-20mg/mL(约0.2-0.33mM)的浓度。一种原核PAL变异体配制为浓度范围从约1至50mg/mL(约0.016至0.8mM),例如从约5至20mg/mL(约0.08至0.33mM)或者从约5至15mg/mL(约0.08至0.25mM)。本文提供的原核PAL组合物的示例性制剂具有约10+/-5mg/mL(约0.16+/-0.08mM)的PAL酶浓度。

[0455] 在实施例11中,在pH值为7.0、7.5和8.0的10mM Tris-HCl、140mM NaCl中配制聚乙二醇化的AvPAL双半胱氨酸突变体AvPAL_C565SC503S。一种示例性的缓冲剂是浓度范围从5至50mM(例如从5至20mM或者从5至15mM)的Tris-HCl或者其等价物。本文提供的原核PAL组合物的示例性制剂具有浓度为约10+/-5mM的Tris-HCl缓冲液。

[0456] 该药物组合物的一种示例性pH值为约pH 6.0-8.5,例如约pH 7.0-8.0或者约pH 7.0-7.6。本文提供的所述原核PAL组合物的示例性制剂具有为约pH 7.3+/-0.3的pH值。

[0457] 一种示例性的等渗调节剂是NaCl或者其等价物,其浓度范围从约100至200mM,例如从约130至170mM或者从约130至150mM。本文提供的所述原核PAL组合物的一种示例性制剂是浓度为约140+/-10mM的NaCl。

[0458] 如实施例11中所示,Phe及其某些结构类似物(包括,例如,t-CA和苯甲酸)的存在稳定了所述聚乙二醇化的AvPAL双半胱氨酸突变体AvPAL_C565SC503S;Tyr对PAL酶具有最小的稳定效应。一种示例性的稳定剂是Phe或者其结构类似物,该稳定剂的范围从每摩尔原核PAL活性位点约0.1至20mol稳定剂,例如每摩尔原核PAL活性位点从约0.5至10mol稳定剂或者每摩尔原核PAL活性位点从约1至10mol的稳定剂。本文提供的所述原核PAL组合物的示

例性制剂具有的稳定剂浓度是每摩尔原核PAL活性位点约5+/-4mol的稳定剂。

[0459] 在pH<7或者pH>7.6时,或者存在EDTA、氨基胍或者吐温80时,所述聚乙二醇化的AvPAL双半胱氨酸突变体AvPAL_C565SC503S没有显著地变稳定;抗氧化剂抗坏血酸和蛋氨酸使所述PAL酶变得不稳定(实施例11,数据未提供)。然而,本文提供的所述组合物可以包括一种或者多种这些成分。

[0460] 原核PAL组合物可以制成液体制剂,但是也可以制备成固体(例如冻干)制剂。在这种情况下,可以添加赋形剂,例如填充剂(例如甘露醇和/或蔗糖)。在实施例12中,在没有甘露醇或者蔗糖;存在25mg/mL甘露醇;或者存在20mg/mL甘露醇加5mg/mL蔗糖的条件下,于pH值为7.5的10mM Tris-HCl、140mM NaCl中配制聚乙二醇化的AvPAL双半胱氨酸突变体AvPAL_C565SC503S并冻干。一种示例性的冻干制剂包括浓度从约1至5% (w/v) 或者10至50mg/mL,例如从约2至4%或者从约2至3%的甘露醇。另一种冻干制剂包括甘露醇和蔗糖,其中甘露醇的浓度从约1至5% (w/v) (或者10至50mg/mL),例如从约1至3%或者从约1.5至2.5%;以及蔗糖的浓度从约0.1至2% (w/v) (或者0.1至2mg/mL),例如从约0.2%至1%或者从约0.3%至0.7%。还有原核PAL组合物的另一种冻干制剂,其具有甘露醇浓度为约2.5+/-0.5%的甘露醇或者2.0+/-0.5%的甘露醇加0.5+/-0.2%的蔗糖。

[0461] 相应地,本文提供的所述原核PAL组合物的示例性制剂如表9所示。

[0462] 表9:原核PAL变异体的示例性制剂

	成分类别	成分类型	浓度范围
	原核PAL 变异体	聚乙二醇化的 AvPAL_C565SC503S	10 +/- 5 mg/mL (0.16 +/- 0.08 mM)
	缓冲剂	Tris-HCl	10 mM +/- 5 mM 以及 pH 7.3 +/- 0.3
[0463]	等渗调节剂	NaCl	140 mM +/- 10 mM
	稳定剂	Phe、t-CA 或者 苯甲酸	每摩尔PAL活性位点5 +/- 4 mol稳定剂
	其他赋形剂、填充剂*	甘露醇+/-蔗糖	2.5 +/- 0.5% (w/v) 甘露醇; 2.0 +/- 0.5% (w/v) 甘露醇 + 0.5 +/- 0.2% (w/v) 蔗糖

[0464] *用于冻干的原核PAL制剂

[0465] 实施例17

[0466] 聚乙二醇化的AvPAL变异体的示例性制剂

[0467] 下文的实施例提供包括聚乙二醇化的AvPAL变异体(即双半胱氨酸突变体AvPAL_C565SC503S)的组合物的示例性制剂,所述变异体可用于治疗以升高的苯丙氨酸水平为特征的疾病和紊乱,例如HPA(包含PKU)以及其他疾病(包含癌症)。用来配制原核PAL组合物的参数包括,但不仅限于,保持pH的缓冲剂、等渗调节剂、无或者有稳定剂以及无或者其他赋形剂、溶媒、稀释液以及诸如此类,例如防腐剂或者抗菌剂。理解的是,这些制剂适用于本文所述的其他聚乙二醇化的AvPAL变异体,例如其他AvPAL半胱氨酸突变体。

[0468] 在实施例13中,该聚乙二醇化的AvPAL双半胱氨酸突变体AvPAL_C565SC503S配制为约8-20mg/mL(约0.13-0.33mM)的浓度。一种聚乙二醇化的AvPAL变异体配制为浓度范围从约1至50mg/mL(约0.016至0.8mM),例如从约5至20mg/mL(约0.08至0.33mM)或者从约5至

15mg/mL (约0.08至0.25mM)。本文提供的所述聚乙二醇化的AvPAL变异体组合物的制剂具有约10+/-5mg/mL (约0.16+/-0.08mM)的酶浓度。

[0469] 在实施例13中,在pH值为7.3的10mM Tris-HCl、135mM NaCl中配制聚乙二醇化的AvPAL双半胱氨酸突变体AvPAL_C565SC503S。用于本文提供的制剂的一种示例性缓冲剂是Tris-HCl或者其等价物,其浓度范围从5至50mM,例如从5至20mM或者从5至15mM。本文提供的所述AvPAL变异体组合物的一种制剂具有约10+/-5mM的Tris-HCl缓冲液浓度。

[0470] 所述药物组合物的示例性pH为约pH 6.0-8.0,例如约pH 6.5-7.5或者约pH 7.0-7.6。本文提供的所述AvPAL变异体组合物的一种制剂具有的pH值为约pH 7.3+/-0.3。

[0471] 示例性的等渗调节剂是NaCl或者其等价物,其浓度范围从约100至200mM,例如从约120至170mM或者从约120至150mM。本文提供的所述AvPAL变异体组合物的一种制剂具有约135+/-15mM的NaCl浓度。

[0472] 如实施例13中所示,存在防腐剂或抗菌剂(即间甲酚)和两种稳定剂(即Phe和Gly)的组合的情况下,所述聚乙二醇化的AvPAL双半胱氨酸突变体AvPAL_C565SC503S变得稳定。示例性的防腐剂是间甲酚或其结构类似物,所述防腐剂的范围从约0.1%至1% (w/v),例如从约0.1%至0.5% (w/v) 或者从约0.3%至0.5% (w/v)。所述AvPAL变异体组合物的一种制剂具有约0.4%+/-0.1% (w/v)的防腐剂浓度。示例性的稳定剂是Phe或者其结构类似物和/或Gly或者其结构类似物,其中Phe或者结构类似物的范围从约0.1至10mM,例如从约0.5至5mM或者从约0.5至1.5mM,以及Gly或者结构类似物的范围从约0.1至100mM,例如从约1.0至100mM、从约1.0至20mM或者从约20至100mM。本文提供的所述AvPAL变异体组合物的一种制剂具有约1.0+/-0.5mM的Phe浓度和约50.5+/-49.5mM的Gly浓度。本文提供的所述AvPAL变异体组合物的另一种制剂具有约1.0+/-0.5mM的Phe浓度和约10.5+/-9.5mM的Gly浓度。本文提供的所述AvPAL变异体组合物的另一种制剂具有约1.0+/-0.5mM的Phe浓度和约60+/-40mM的Gly浓度。

[0473] 相应地,本文提供的所述聚乙二醇化的AvPAL变异体组合物的一种示例性制剂如表10所示。应理解的是,在这种示例性制剂中,防腐剂(即间甲酚)的存在是可选的。

[0474] 表10:聚乙二醇化的AvPAL半胱氨酸突变体的示例性制剂

[0475]	成分类别	成分类型	浓度范围
	AvPAL 变异体	聚乙二醇化的 AvPAL_C565SC503S	10 +/- 5 mg/mL (0.16 +/- 0.08 mM)
	缓冲剂	Tris-HCl	10 mM +/- 5 mM 以及 pH 7.3 +/- 0.3
	等渗调节剂	NaCl	135 mM +/- 15 mM
	防腐剂	间甲酚	0.4% +/- 0.1% (w/v)
	稳定剂	Phe	1 mM +/- 0.5 mM
	稳定剂	甘氨酸	50.5 mM +/- 49.5 mM

[0476] 实施例18

[0477] 具有降低的聚集的AvPAL变异体的生产

[0478] 在基于蛋白质的疗法的生产和配制中,对聚集的控制是值得关注的,当蛋白质本身具有免疫原性的时候更是如此。开发了一种生产方法,其将使得大规模生产具有最小聚

集的聚乙二醇化的AvPAL多肽变异体(例如在位置503和565上具有半胱氨酸残基的丝氨酸取代)成为可能。如本文所用,“最小聚集”指聚集的(即四聚物形式之前从SE-HPLC洗脱得到的形式)AvPAL变异体:未聚集的(即四聚物形式)AvPAL变异体的比率小于1%,例如小于0.5%、小于0.2%或者小于0.1%。

[0479] 在用于大规模生产聚乙二醇化的AvPAL多肽变异体的生产方法的进行过程中,发现所述酶容易沉淀和聚集。虽然沉淀物可以通过过滤去除,但是它们可以容易地再次形成。适当地使用过滤器和某些非离子去垢剂可以解决沉淀问题。确认了两种可溶性聚集体:较大型的100nm聚集体,其通过动态光散射测得以及可以通过过滤去除;以及较小型的聚集体,其通过SE-HPLC测得以及不可以通过过滤去除。在所述生产方法中,采取适当的步骤以减少或者最小化沉淀物和聚集体的存在量。

[0480] 图22显示描述用于大规模生产AvPAL双半胱氨酸突变体AvPAL_C565SC503S的示例性生产方法的流程图。指向左侧的箭头表示这样的生产步骤,其中实现了所述AvPAL双半胱氨酸突变体AvPAL_C565SC503S的聚集的减少,从上到下包括:(a)酶纯化过程中色谱法步骤的顺序;(b)对纯化的酶进行冷冻-融化之前添加冷冻保护剂;(c)各种赋形剂的使用和过滤步骤;以及(d)对纯化的酶进行预聚乙二醇化处理的过程中,缓冲条件的选择和赋形剂的使用。然而,将理解的是,这些生产步骤的任何一步或者多步可以单独或者以任何组合的形式使用,以获得与通过不含所述生产步骤的一步或者多步的方法制备的AvPAL变异体或者聚乙二醇化的AvPAL相比,具有降低的聚集(例如最小聚集)的AvPAL变异体或者聚乙二醇化的AvPAL变异体。对于AvPAL双半胱氨酸突变体AvPAL_C565SC503S的示例性生产方法中的每个步骤总结如下。

[0481] 发酵.将表达AvPAL变异体多肽AvPAL_C565SC503S(见实施例7)的BLR(DE3)/pLysS(Novagen)细胞的种瓶融化,转移入包含大约500mL培养基的2.8L瓶中,以及37℃搅动孵育直至细胞密度达到2至40D₆₀₀。将所述种瓶转移入第一生物反应器(4L发酵罐),并进行37℃发酵直至培养物的细胞密度达到10至200D₆₀₀。将所述第一生物反应器(4L发酵)培养物转移入第二生物反应器(100L发酵罐),并进行37℃发酵直至培养物的细胞密度达到至少2000D₆₀₀。将培养肉汤冷却至15℃,以及通过利用CEPA Z61离心机或者Westfalia CSC-6连续光盘堆栈离心机的离心作用从培养基中分离细胞。将细胞团(cell paste)-80℃冷冻。上述过程可扩大到第三生物反应器(例如500L甚或更大的生产发酵罐)的规模。

[0482] 细胞裂解.将冷冻过的细胞团融化并再悬浮于室温pH值为8.0的20mM Tris-HCl、100mM NaCl的缓冲液中,以生成密度为约120至1400D₆₀₀的细胞浆料。将细胞两次通过700-800Bar的Niro NS30006均质机(其中温度控制在30℃以下)以通过均化作用裂解细胞。监测裂解物的温度,以确保均化过程中温度保持在50℃以下。

[0483] 加热步骤.均化作用之后,将细胞裂解物的温度调整为20℃,以及通过添加1N NaOH将pH值调整为约8.0。将细胞裂解物渐渐加热到65℃,保持65℃ 30至120min,然后冷却至15℃。

[0484] 离心和过滤.通过利用CEPA Z61离心机或者Westfalia CSC-6连续光盘堆栈离心机的离心作用澄清加热处理过的细胞裂解物。保留包含可溶性AvPAL变异体多肽的上清液,以及丢弃不能溶解的沉淀裂解物。来自Westfalia离心机的已澄清的加热处理的裂解物具有污染下游过滤器的悬浮颗粒。对多种过滤器进行检测之后,确定了适于处理250L已澄清

的加热处理的裂解物的过滤方案:150LMH流速的已澄清的加热处理的裂解物连续通过(a) 1.3m²Cuno R55SP Zetacarbon深层过滤器,0.5-1.0μm; (b) 7.5m²PA11 KS50P基于单层纤维素的深层过滤器,0.4-0.8μm; (c) 7.5m²PA11 EKMP基于单层纤维素的深层过滤器,0.2-0.5μm; 以及(d) 6.6m²PA11 EDF双层PES/PVDF消毒级别过滤器,0.2μm。

[0485] AIEX色谱法和HIC色谱法.如实施例2中所述,通过使已澄清的加热处理的裂解物依次穿过疏水作用(HIC)柱和阴离子交换(AIEX)柱从中纯化得到所述AvPAL变异体多肽AvPAL_C565SC503S,但如下情况除外:当AIEX柱树脂从MacroPrep High Q更换为Toyopearl Giga Cap Q 650M(TPGQ,Tosoh Biosciences)时,则将柱顺序颠倒以便先穿过TPGQ AIEX柱,再穿过Toyopearl丁基650M(TPB,Tosoh Biosciences)HIC柱。应当理解的是,可以使用其他AIEX和HIC柱树脂,以及所述HIC柱可以替换为体积排阻色谱法。

[0486] 在pH值为7.8的25mM Tris-HCl中将已澄清的加热处理的裂解物稀释2倍,并装入在pH值为7.8的25mM Tris-HCl中平衡的TPGQ AIEX柱。该柱用pH值为7.8的25mM Tris-HCl、130mM NaCl清洗,以及利用含于pH值为7.8的25mM Tris-HCl中的130至1000mM NaCl的梯度洗脱AvPAL_C565SC503S。将包含AvPAL_C565SC503S的组分池存并利用pH值为6.5的25mM Tris-HCl、1.2M (NH₄)₂SO₄稀释2倍,以及装入在pH值为6.5的25mM Tris-HCl、0.64M (NH₄)₂SO₄中平衡的TPB HIC柱。该柱用pH值为6.5的25mM Tris-HCl、0.58M (NH₄)₂SO₄清洗,以及利用含于pH值为6.5的25mM Tris-HCl中的0.58至0M (NH₄)₂SO₄的梯度洗脱AvPAL_C565SC503S。将包含AvPAL_C565SC503S的组分池存。

[0487] 在所述生产方法的这个阶段,通过抗大肠杆菌宿主细胞蛋白质(ECP)ELISA,通过SDS-PAGE接着通过考马斯染色、银染色、抗AvPAL Western blot法和抗ECP Western blot法以及通过SE-HPLC确定纯化的AvPAL_C565SC503S显示了高水平纯度。通过SE-HPLC确定,颠倒柱顺序使得先HIC柱然后AIEX柱导致纯化的AvPAL_C565SC503S的聚集减少。在三次运行中,该HIC柱之后纯化的AvPAL_C565SC503S中测得0.07%+/-0.03%的聚集体(聚集比未聚集的(即四聚物)酶的百分比率),而与此比较的是该AIEX柱之后7.58%+/-1.68%。

[0488] AvPAL块(冷冻储存).从该HIC柱洗脱之后,纯化的AvPAL_C565SC503S通常冷冻储存。对于大规模生产,纯化的AvPAL_C565SC503S块利用离散温度步骤在液体氮中冷冻,然后以约-30℃或者以更低的温度(例如以约-70℃或者约-80℃)储存。与没有控制的冷冻相比,控制的冷冻使得酶聚集减少。在冷冻之前,向纯化的AvPAL_C565SC503S块添加糖或者多元醇(包含5%、10%或者15%甘油;10%蔗糖或者10%山梨醇)使得融化后的聚集减少。应当理解的是,在冷冻之前向纯化的AvPAL_C565SC503S块添加浓度范围从5%至20%(对于液体v/v和对于粉末w/v)不等的一种或者多种糖或者多元醇,例如,作为举例但不限于,甘油、蔗糖、海藻糖、丙三醇、山梨醇、甘露醇以及诸如此类使得融化后的聚集减少。

[0489] 为了确定在冷冻之前纯化的AvPAL_C565SC503S块是否可以浓缩而不会对酶的完整性或者比活或者聚集量产生不利的影响,进行了小规模的研究。

[0490] 将含于pH值为6.5的25mM Tris-HCl、~0.24M (NH₄)₂SO₄的纯化AvPAL_C565SC503S的制剂调整至10%(v/v)甘油的最终浓度,做成等分试样装瓶,在干冰上冷冻并以-80℃储存。冷冻的AvPAL_C565SC503S块在30℃水浴中融化,通过0.2μm PES真空过滤器过滤以及通过利用Hydrosart 30kDa分子量截留膜(Sartorius)进行超滤而浓缩。AvPAL_C565SC503S通过超滤浓缩。当酶浓缩2倍、4倍、8倍和16倍时去除等分试样,导致酶浓度从2.5mg/mL到约

35mg/mL。取出用于分析的样本通过0.2 μ m Acrodisk Supor注射器式滤器过滤, -80℃冷冻, 储存三天以及在30℃水浴中融化。通过冷冻-融化之后的蛋白质回收率、比活回收率、蛋白质完整性和聚集水平判断, AvPAL_C565SC503S块的浓度没有对酶产生任何有害的影响。

[0491] AvPAL块(融化)。对于大规模生产, 纯化的AvPAL_C565SC503S冷冻块以离散可控步骤融化。与没有控制的融化相比, 控制的融化导致酶聚集减少。

[0492] 超滤/渗滤。实施了一系列的过滤步骤, 以便在聚乙二醇化之前浓缩得到具有最小聚集的纯化的AvPAL_C565SC503S块。融化的纯化的AvPAL_C565SC503S块通过玻璃纤维过滤器, 然后通过尼龙过滤器过滤以去除大的聚集体。将过滤的纯化的AvPAL_C565SC503S块进行超滤/渗滤, 以将酶浓缩至约75mg/mL。原渗滤缓冲液是pH值为8.5的200mM磷酸钾(KPi), 但被更换为pH值为8.5的50mM磷酸钾(KPi)、10mM反式肉桂酸(t-CA)、5%甘油。SE-HPLC检测发现KPi浓度的降低以及t-CA和甘油的添加导致蛋白质聚集减少。可以使用其他缓冲液(例如碳酸盐和硼酸盐缓冲液)以及其他磷酸盐(例如磷酸钠(NaPi)), 只要将缓冲液浓度保持低到可以与后续的聚乙二醇化过程相容的浓度。超滤/渗滤之后, 纯化的AvPAL_C565SC503S块通过玻璃纤维过滤器, 然后通过尼龙过滤器再过滤。

[0493] 超滤/渗滤的AvPAL_C565SC503S在pH值为8的200mM Kpi、8mM t-CA、4%甘油、0.02%聚山梨醇酯80(PS80)中调整至约60mg/mL, 然后通过PVDF过滤器过滤。发现PS80的添加阻止蛋白质沉淀物的形成。其他非离子去垢剂可用于预防沉淀, 例如聚山梨醇酯20(PS20)、Brij 35等等。

[0494] 添加NHS-PEG。除了上文由于酶浓度提高而进行浓度调整之外, 基本上如实施例6中所述将纯化的AvPAL_C565SC503S聚乙二醇化。最终的聚乙二醇化反应混合物是15mg/mL AvPAL_C565SC503S、13.1mM 20kDa NHS-活化的PEG(NOF)、1.5mM t-CA和0.005%PS80。环境温度下3h之后, 将该反应混合物稀释至酶浓度为约2.3mg/mL, 以及通过添加Tris/NaCl缓冲液淬灭。

[0495] 游离PEG的去除和最终的配制。基本上如实施例6中所述通过超滤/渗滤从聚乙二醇化的AvPAL_C565SC503S中去除游离PEG, 然后基本上如实施例11和13中所述进行配制。

[0496] 聚乙二醇化的AvPAL_C565SC503S配制的大体积制剂(PEG-PAL FBDS)(冷冻储存)。将配制的聚乙二醇化的AvPAL_C565SC503S-70℃冷冻储存。最终配制的药物产品其酶浓度为10mg/mL, 具有最小聚集。

[0497] 实施例19

[0498] 对原核PAL组合物的临床评估

[0499] 下文的实施例提供有关用来对本文提供的治疗方法中的如下组合物进行临床评估的参数的指导: 该组合物包括原核PAL或其生物活性变异体、突变体和片段(“原核PAL”)。如其他部分所讨论的, 原核PAL可以用于治疗HPA、轻度PKU和典型PKU。将进行临床试验, 这将提供对原核PAL的口服或者皮下剂量在如下方面的评估: 安全性; 药物动力学; 以及替代和限定的临床终点的初始应答。试验将进行最少, 但不一定限于, 24周, 以采集针对100名可评估患者的足够的安全性信息。用于试验的初始剂量将从约0.001至约1.0mg/kg/周不等。倘若这种剂量没有导致患者体内过量的血浆Phe水平降低或者没有产生显著直接的临床益处(测量为增加每日口服Phe摄入量而不会提高血浆Phe水平的能力), 必要时可以增加剂量以及可以保持另外的最小时间段(但一定限于24周)以证实安全性并进一步评估疗效。

[0500] 安全性测量将包括不良事件、过敏反应、完整的临床化学检查(肾和肝功能检查)、验尿和全血细胞分类计数。此外,还将监测其他包含血液Phe水平的降幅、神经心理学和认知检测以及全面性评估的参数。本实施例还涉及确定循环中药品的药物动力学参数以及血液中原核PAL的总体分布和半衰期。据预计,这些测量将有助于将剂量与临床应答联系起来。

[0501] 方法

[0502] 血浆Phe水平升高的患者将进行如下检查:基本病史和体检、神经心理学和认知检测、一套标准的临床实验室检测(全血细胞计数、Panel 20、CH50、UA)、尿喋呤水平、二氢蝶啶还原酶(DHPR)水平以及血清氨基酸空腹血液(血浆)检查。患者将每周到诊所,得以实现对病情的紧密追踪。完成治疗期之后一周,患者将再到诊所接受整体评估。若需要逐步加大剂量,患者仍将遵循与上文所列相同的安排。整个试验过程中,将进行安全性监测。

[0503] 诊断和纳入/排除标准

[0504] 患者可以是女性或者男性,持有通过基因检测确定患有HPA或者轻度PKU的诊断记录以及有关血液中Phe水平升高的证据。该项研究将包括没有严格遵循饮食控制的HPA或者PKU患者。只是,有生育能力的女性患者在每次给药之前必须进行妊娠检测证明未孕(尿 β -hCG)以及必须接受建议在这项研究进行的整个期间采取医学上可接受的避孕方法。有如下情况的患者将不被纳入该项研究中:患者处于妊娠期或者哺乳期;在该项研究招募之前30天之内服用过试验药;或者患有医学疾病、严重的并发症或具有其他可以显著地降低研究依从性从而使效果减轻的情况。

[0505] 饮食干预

[0506] 最初进行随机化和两周的治疗期后,所有的研究参与者将接受饮食建议并将遵循标准的饮食和/或补充有Phe特异性医疗食品的标准Phe受限饮食,时间总共四至六周。饮食管控将居家进行以及饮食摄入情况将记录在日志中。将在治疗组之间进行关于营养素和医疗食品的摄入量的分析以及推荐饮食摄入量(RDI)的百分数的比较。

[0507] 原核PAL安全性

[0508] 如果该项研究进行的过程中没有发生显著的急性或者慢性药物反应,则确定原核PAL疗法具有安全性。如果在临床检查、临床实验室或其他适当的研究中没有观察到显著的异常情况,则确定所述药物更长时间的给药具有安全性。

[0509] 实施例20

[0510] 对聚乙二醇化的AvPAL变异体的临床评估

[0511] 所述聚乙二醇化的双半胱氨酸突变体AvPAL AvPAL_C565SC503S将以人类为对象进行临床评估。该临床评估的目的是为了确定PKU患者的安全性、耐受性、药物动力学(PK)和疗效。血液Phe水平将用作临床终点。

[0512] 阶段1

[0513] 阶段1是以16到50岁年龄之间的35名PKU患者为对象进行的公开标记单剂量递增研究。主要目标是评估聚乙二醇化的双半胱氨酸突变体AvPAL AvPAL_C565SC503S的安全性和耐受性以及次要目标是评估聚乙二醇化的酶的PK和Phe降低效果。每组5名对象,共7组,按递增剂量0.001、0.003、0.01、0.03、0.1、0.3和1mg/kg序贯给药聚乙二醇化的AvPAL_C565SC503S。每组中的对象接受单剂量,然后追踪总共6周。纳入标准是筛选时的血液Phe水

平和过去3年的平均血液Phe水平 $\geq 600\mu\text{M}$ 。

[0514] 阶段2

[0515] 阶段2的研究被分为没有中断的两个部分：

[0516] 第1部分-16周-8周给药，然后是剂量优化

[0517] 第2部分-40周-延长

[0518] 阶段2是以35名PKU患者为对象进行的由两部分组成的公开标记剂量优化研究。进行时间段超过16周的第1部分涉及聚乙二醇化的AvPAL_C565SC503S每周给药一次，达8周，然后是剂量优化期。对每个对象的剂量进行调整，以达到低于 $600\mu\text{M}$ 的血液Phe浓度。主要目标是评估聚乙二醇化的AvPAL_C565SC503S多次给药的安全性和耐受性，以及次要目标是评估聚乙二醇化的酶对血液Phe浓度、免疫应答（例如抗AvPAL抗体滴度）以及稳态PK的影响。在第2部分中，以个性化的优化剂量和给药频率对所述对象施用聚乙二醇化的AvPAL_C565SC503S达40周。

[0519] 阶段3

[0520] 一旦阶段1和阶段2的研究完成，进一步的研究可能包括针对更多对象的阶段3六个月双盲研究，以及针对特殊群体（例如，作为举例但不仅限于，非PKU HPA患者、对BH4做出响应的PKU患者和不对BH4做出响应的PHU患者）的进一步研究。

[0521] 序列表

[0522] 本说明书与序列表的计算机可读形式（CRF）的拷贝件一起提交。命名为11808-101_SEQLIST.txt，创建时间是2010年1月29日以及大小为53,623字节的CRF与纸件的序列表相同以及以引用方式整体并入本文。

[0523] *****

[0524] 上文说明性的例子中陈述的本发明的许多修改和变化是那些本领域的技术人员可以预料到的。因此，应当只用所附的权利要求中限定的范围来限定本发明。

[0001]	序列表
[0002]	<110> 生物马林药物股份有限公司
[0003]	<120> 原核苯丙氨酸解氨酶变异体的组合物以及利用其组合物
[0004]	的方法
[0005]	<130> 11808-101-888
[0006]	<160> 33
[0007]	<170> PatentIn version 3.4
[0008]	<210> 1
[0009]	<211> 1710
[0010]	<212> DNA
[0011]	<213> 点形念珠藻
[0012]	<400> 1
[0013]	atgaatataa catctctaca acagaacata acgcgttctt ggcaaatacc ttctactaat 60
[0014]	agttcagatt caatcgtaac tgtagcgcat cgcaatctga caatcgacga ggttgtaaat 120
[0015]	gttgctcgtc atggaacaca ggtgcgctta actgataatg cagatgtcat tcgggggtgt 180
[0016]	caagcatctt gtgattacat taacaatgca gtcgaaacag cacagccaat ttacgggggtg 240
[0017]	acatctggct ttggcggtat ggcagatgtt gtcatctctc gcgaacaagc agcggaactt 300
[0018]	cagactaatt taatttggtt tctgaaatcc ggcgaggaa acaaattatc gttagcagac 360
[0019]	gtgcgtgcag ctatgctctt acgtgcaaat tcacatttgt atggtgcgtc tggatatacga 420
[0020]	ctcgaactta ttcagcggtat tgaaactttc ctcaacgctg gcgtgacacc ccatgtctat 480
[0021]	gagtttggtt ctatcggtgc tagcgcgcat ttggtgcat tatectacat tactggggca 540
[0022]	ctaactcggtc tagatcctag ctttacagtt gacttcgacg gtaaagaaat ggatgccgtt 600
[0023]	acagccttgt ctcgtttggg ttgccaag ttgcaattgc aaccgaaaga aggttttagca 660
[0024]	atgatgaatg gcacctcagt catgacaggt attgcagcta actgtgtgta cgatgcgaaa 720
[0025]	gttttgctcg ctctgacaat ggggtgtacac gccttagcca tccaagggtt atacggaacg 780
[0026]	aatcaatctt tccaccggtt tattcatcag tgcaagccac atcccgttca actatggaca 840
[0027]	gcagatcaaa tgttttctct gctgaaagat tcacttttag ttcgtgaaga gttggatggt 900
[0028]	aaacacgaat accgtggtaa agatctgata caggatcgtt attctctccg ctgtctggca 960
[0029]	cagttcatag ggccaatcgt tgatggggta tcagagatta ccaagcaaat cgaggtagaa 1020
[0030]	atgaactcag tcaccgataa cccattgatt gatgtcgaga accaagttag ttatcacggc 1080
[0031]	ggcaattttc tcggacagta tgtgggtgtg acaatggatc gcctacgtta ttacataggg 1140
[0032]	ctattggcca aacacatcga tgtgcagatt gcacttcttg tctcgccaga gtttagcaac 1200
[0033]	ggcttaccac cctctttagt tggtaatagc gatcgcaaag ttaatatggg actcaaaggt 1260
[0034]	ttgcaaatca gtggaaactc gattatgcca ctgttagact tctatggaaa ttccctagcc 1320
[0035]	gatcgctttc ctaccacgc cgagcaattt aatcaaaata ttaacagcca aggctatatt 1380
[0036]	tccgcaaat tgacacgtcg ttccgtagac atatttcaga attatatggc gatcgcggtg 1440
[0037]	atgtttggag ttcaagctgt tgacctccgc acatataaga tgaaagggtca ttatgatgca 1500
[0038]	cgtacatgcc tctacccaa tactgtgcag ttatacacag cagtctgcga ggtagttgga 1560
[0039]	aagccactaa cgtctgtgcg tccatacatt tggaacgaca acgagcaatg tttagatgag 1620
[0040]	catattgccc ggatttcagc tgatatcgct ggtggtggtt taattgtgca agcagttgag 1680
[0041]	catatttttt cgagcttaaa gtcaacgtaa 1710

[0042]	<210> 2
[0043]	<211> 569
[0044]	<212> PRT
[0045]	<213> 点形念珠藻
[0046]	<400> 2
[0047]	Met Asn Ile Thr Ser Leu Gln Gln Asn Ile Thr Arg Ser Trp Gln Ile
[0048]	1 5 10 15
[0049]	Pro Phe Thr Asn Ser Ser Asp Ser Ile Val Thr Val Gly Asp Arg Asn
[0050]	20 25 30
[0051]	Leu Thr Ile Asp Glu Val Val Asn Val Ala Arg His Gly Thr Gln Val
[0052]	35 40 45
[0053]	Arg Leu Thr Asp Asn Ala Asp Val Ile Arg Gly Val Gln Ala Ser Cys
[0054]	50 55 60
[0055]	Asp Tyr Ile Asn Asn Ala Val Glu Thr Ala Gln Pro Ile Tyr Gly Val
[0056]	65 70 75 80
[0057]	Thr Ser Gly Phe Gly Gly Met Ala Asp Val Val Ile Ser Arg Glu Gln
[0058]	85 90 95
[0059]	Ala Ala Glu Leu Gln Thr Asn Leu Ile Trp Phe Leu Lys Ser Gly Ala
[0060]	100 105 110
[0061]	Gly Asn Lys Leu Ser Leu Ala Asp Val Arg Ala Ala Met Leu Leu Arg
[0062]	115 120 125
[0063]	Ala Asn Ser His Leu Tyr Gly Ala Ser Gly Ile Arg Leu Glu Leu Ile
[0064]	130 135 140
[0065]	Gln Arg Ile Glu Thr Phe Leu Asn Ala Gly Val Thr Pro His Val Tyr
[0066]	145 150 155 160
[0067]	Glu Phe Gly Ser Ile Gly Ala Ser Gly Asp Leu Val Pro Leu Ser Tyr
[0068]	165 170 175
[0069]	Ile Thr Gly Ala Leu Ile Gly Leu Asp Pro Ser Phe Thr Val Asp Phe
[0070]	180 185 190
[0071]	Asp Gly Lys Glu Met Asp Ala Val Thr Ala Leu Ser Arg Leu Gly Leu
[0072]	195 200 205
[0073]	Pro Lys Leu Gln Leu Gln Pro Lys Glu Gly Leu Ala Met Met Asn Gly
[0074]	210 215 220
[0075]	Thr Ser Val Met Thr Gly Ile Ala Ala Asn Cys Val Tyr Asp Ala Lys
[0076]	225 230 235 240
[0077]	Val Leu Leu Ala Leu Thr Met Gly Val His Ala Leu Ala Ile Gln Gly
[0078]	245 250 255
[0079]	Leu Tyr Gly Thr Asn Gln Ser Phe His Pro Phe Ile His Gln Cys Lys
[0080]	260 265 270
[0081]	Pro His Pro Gly Gln Leu Trp Thr Ala Asp Gln Met Phe Ser Leu Leu
[0082]	275 280 285
[0083]	Lys Asp Ser Ser Leu Val Arg Glu Glu Leu Asp Gly Lys His Glu Tyr

[0084]	290	295	300
[0085]	Arg Gly Lys Asp Leu Ile Gln Asp Arg Tyr Ser Leu Arg Cys Leu Ala		
[0086]	305	310	315 320
[0087]	Gln Phe Ile Gly Pro Ile Val Asp Gly Val Ser Glu Ile Thr Lys Gln		
[0088]		325	330 335
[0089]	Ile Glu Val Glu Met Asn Ser Val Thr Asp Asn Pro Leu Ile Asp Val		
[0090]		340	345 350
[0091]	Glu Asn Gln Val Ser Tyr His Gly Gly Asn Phe Leu Gly Gln Tyr Val		
[0092]		355	360 365
[0093]	Gly Val Thr Met Asp Arg Leu Arg Tyr Tyr Ile Gly Leu Leu Ala Lys		
[0094]	370	375	380
[0095]	His Ile Asp Val Gln Ile Ala Leu Leu Val Ser Pro Glu Phe Ser Asn		
[0096]	385	390	395 400
[0097]	Gly Leu Pro Pro Ser Leu Val Gly Asn Ser Asp Arg Lys Val Asn Met		
[0098]		405	410 415
[0099]	Gly Leu Lys Gly Leu Gln Ile Ser Gly Asn Ser Ile Met Pro Leu Leu		
[0100]		420	425 430
[0101]	Ser Phe Tyr Gly Asn Ser Leu Ala Asp Arg Phe Pro Thr His Ala Glu		
[0102]		435	440 445
[0103]	Gln Phe Asn Gln Asn Ile Asn Ser Gln Gly Tyr Ile Ser Ala Asn Leu		
[0104]		450	455 460
[0105]	Thr Arg Arg Ser Val Asp Ile Phe Gln Asn Tyr Met Ala Ile Ala Leu		
[0106]	465	470	475 480
[0107]	Met Phe Gly Val Gln Ala Val Asp Leu Arg Thr Tyr Lys Met Lys Gly		
[0108]		485	490 495
[0109]	His Tyr Asp Ala Arg Thr Cys Leu Ser Pro Asn Thr Val Gln Leu Tyr		
[0110]		500	505 510
[0111]	Thr Ala Val Cys Glu Val Val Gly Lys Pro Leu Thr Ser Val Arg Pro		
[0112]		515	520 525
[0113]	Tyr Ile Trp Asn Asp Asn Glu Gln Cys Leu Asp Glu His Ile Ala Arg		
[0114]		530	535 540
[0115]	Ile Ser Ala Asp Ile Ala Gly Gly Gly Leu Ile Val Gln Ala Val Glu		
[0116]	545	550	555 560
[0117]	His Ile Phe Ser Ser Leu Lys Ser Thr		
[0118]		565	
[0119]	<210> 3		
[0120]	<211> 1704		
[0121]	<212> DNA		
[0122]	<213> 多变鱼腥藻		
[0123]	<400> 3		
[0124]	atgaagacac tatctcaagc acaaagcaaa acctcatctc aacaattttc ttttactgga 60		
[0125]	aattcttctg ccaatgtaat tattggtaat cagaaactca caatcaatga tggtgcaagg 120		

[0126]	gtagcgcgta atggcacctt agtgtcttta accaataaca ctgatatttt gcagggtatt	180
[0127]	caggcatctt gtgattacat taataatgct gttgaatctg gggaaccaat ttatggagtg	240
[0128]	acatctgggt ttggcggtat ggccaatggt gccatatccc gtgaacaagc atctgaactc	300
[0129]	caaaccaact tagtttggtt cctgaaaaca ggtgcaggga acaaattacc cttggcggat	360
[0130]	gtgcgcgcag ctatgtcttt gcgtgcaaac tctcatatgc gcggtgcac tgccatcaga	420
[0131]	ttagaactta tcaagcgtat ggagattttc cttaacgctg gtgtcacacc atatgtgtat	480
[0132]	gagtttggtt caattgggtgc aagtgggtgat ttagtgccac tatectacat tactggttca	540
[0133]	ctgataggct tagatcccag ttttaaggtt gacttcaacg gtaaagaaat ggatgcgcca	600
[0134]	acagctctac gtcaactgaa tttgtcaccc ttgacattgt tgccgaagga aggcttggcg	660
[0135]	atgatgaacg gcacttcagt catgacaggt attgcagcaa actgcgtcta cgatactcaa	720
[0136]	attttaactg cgatcgctat gggcggtcac gctctagata tccaagcttt aaacgggaacc	780
[0137]	aatcaatcat tccatccatt tatccataat tccaaaccac atcctggtca attatgggca	840
[0138]	gcagatcaga tgatttcttt gttagccaat tcccagttag ttcgtgatga gttagatggt	900
[0139]	aaacacgatt atcgtgatca cgagttgatt caagatcgtt actcactccg atgccttccc	960
[0140]	cagtatttgg ggccaatcgt tgatggaatt tcccagattg ccaaacaat tgaaatcgaa	1020
[0141]	atcaactcag tcaccgataa cccactaatt gatgttgata accaagctag ctatcatgga	1080
[0142]	ggaaatttcc tcggacagta cgtgggtatg ggaatggatc acctgcgtta ctatattggg	1140
[0143]	ttattggcta aacacctaga tgtgcagatt gccctcctcg cctcaccaga gtttagcaat	1200
[0144]	ggactaccac catctttatt aggcaaccga gaacgtaaag tcaatatggg actcaaaggt	1260
[0145]	ctgcaaatat gcggtaaactc aattatgcca ctgttgacct tctatggaaa ttccatcgcc	1320
[0146]	gatcgctttc ctacccatgc agaacaattt aatcagaaca tcaacagtca aggatacact	1380
[0147]	tcagcgactc tagcccgccg ttctgtggat atcttccaga attatgtggc gatcgctctg	1440
[0148]	atgtttggag tccaagctgt tgacctcgcg acatataaaa agactggtca ttacgatgca	1500
[0149]	cgcgcctgtc taccacctgc aactgagcgc ttatatcag cagtccgcca cgtagttgga	1560
[0150]	caaaaaccaa cttcagatcg cccatatatt tggaatgata atgagcaagg actggatgag	1620
[0151]	catattgccc ggatttctgc tgatatcgct gctggtggtg tgattgtgca agcagttcaa	1680
[0152]	gatatcttac cctgcttgca ttaa	1704
[0153]	<210> 4	
[0154]	<211> 567	
[0155]	<212> PRT	
[0156]	<213> 多变鱼腥藻	
[0157]	<400> 4	
[0158]	Met Lys Thr Leu Ser Gln Ala Gln Ser Lys Thr Ser Ser Gln Gln Phe	
[0159]	1 5 10 15	
[0160]	Ser Phe Thr Gly Asn Ser Ser Ala Asn Val Ile Ile Gly Asn Gln Lys	
[0161]	20 25 30	
[0162]	Leu Thr Ile Asn Asp Val Ala Arg Val Ala Arg Asn Gly Thr Leu Val	
[0163]	35 40 45	
[0164]	Ser Leu Thr Asn Asn Thr Asp Ile Leu Gln Gly Ile Gln Ala Ser Cys	
[0165]	50 55 60	
[0166]	Asp Tyr Ile Asn Asn Ala Val Glu Ser Gly Glu Pro Ile Tyr Gly Val	
[0167]	65 70 75 80	

[0168]	Thr Ser Gly Phe Gly Gly Met Ala Asn Val Ala Ile Ser Arg Glu Gln		
[0169]		85	90 95
[0170]	Ala Ser Glu Leu Gln Thr Asn Leu Val Trp Phe Leu Lys Thr Gly Ala		
[0171]		100	105 110
[0172]	Gly Asn Lys Leu Pro Leu Ala Asp Val Arg Ala Ala Met Leu Leu Arg		
[0173]		115	120 125
[0174]	Ala Asn Ser His Met Arg Gly Ala Ser Gly Ile Arg Leu Glu Leu Ile		
[0175]		130	135 140
[0176]	Lys Arg Met Glu Ile Phe Leu Asn Ala Gly Val Thr Pro Tyr Val Tyr		
[0177]		145	150 155 160
[0178]	Glu Phe Gly Ser Ile Gly Ala Ser Gly Asp Leu Val Pro Leu Ser Tyr		
[0179]		165	170 175
[0180]	Ile Thr Gly Ser Leu Ile Gly Leu Asp Pro Ser Phe Lys Val Asp Phe		
[0181]		180	185 190
[0182]	Asn Gly Lys Glu Met Asp Ala Pro Thr Ala Leu Arg Gln Leu Asn Leu		
[0183]		195	200 205
[0184]	Ser Pro Leu Thr Leu Leu Pro Lys Glu Gly Leu Ala Met Met Asn Gly		
[0185]		210	215 220
[0186]	Thr Ser Val Met Thr Gly Ile Ala Ala Asn Cys Val Tyr Asp Thr Gln		
[0187]		225	230 235 240
[0188]	Ile Leu Thr Ala Ile Ala Met Gly Val His Ala Leu Asp Ile Gln Ala		
[0189]		245	250 255
[0190]	Leu Asn Gly Thr Asn Gln Ser Phe His Pro Phe Ile His Asn Ser Lys		
[0191]		260	265 270
[0192]	Pro His Pro Gly Gln Leu Trp Ala Ala Asp Gln Met Ile Ser Leu Leu		
[0193]		275	280 285
[0194]	Ala Asn Ser Gln Leu Val Arg Asp Glu Leu Asp Gly Lys His Asp Tyr		
[0195]		290	295 300
[0196]	Arg Asp His Glu Leu Ile Gln Asp Arg Tyr Ser Leu Arg Cys Leu Pro		
[0197]		305	310 315 320
[0198]	Gln Tyr Leu Gly Pro Ile Val Asp Gly Ile Ser Gln Ile Ala Lys Gln		
[0199]		325	330 335
[0200]	Ile Glu Ile Glu Ile Asn Ser Val Thr Asp Asn Pro Leu Ile Asp Val		
[0201]		340	345 350
[0202]	Asp Asn Gln Ala Ser Tyr His Gly Gly Asn Phe Leu Gly Gln Tyr Val		
[0203]		355	360 365
[0204]	Gly Met Gly Met Asp His Leu Arg Tyr Tyr Ile Gly Leu Leu Ala Lys		
[0205]		370	375 380
[0206]	His Leu Asp Val Gln Ile Ala Leu Leu Ala Ser Pro Glu Phe Ser Asn		
[0207]		385	390 395 400
[0208]	Gly Leu Pro Pro Ser Leu Leu Gly Asn Arg Glu Arg Lys Val Asn Met		
[0209]		405	410 415

[0210]	Gly Leu Lys Gly Leu Gln Ile Cys Gly Asn Ser Ile Met Pro Leu Leu
[0211]	420 425 430
[0212]	Thr Phe Tyr Gly Asn Ser Ile Ala Asp Arg Phe Pro Thr His Ala Glu
[0213]	435 440 445
[0214]	Gln Phe Asn Gln Asn Ile Asn Ser Gln Gly Tyr Thr Ser Ala Thr Leu
[0215]	450 455 460
[0216]	Ala Arg Arg Ser Val Asp Ile Phe Gln Asn Tyr Val Ala Ile Ala Leu
[0217]	465 470 475 480
[0218]	Met Phe Gly Val Gln Ala Val Asp Leu Arg Thr Tyr Lys Lys Thr Gly
[0219]	485 490 495
[0220]	His Tyr Asp Ala Arg Ala Cys Leu Ser Pro Ala Thr Glu Arg Leu Tyr
[0221]	500 505 510
[0222]	Ser Ala Val Arg His Val Val Gly Gln Lys Pro Thr Ser Asp Arg Pro
[0223]	515 520 525
[0224]	Tyr Ile Trp Asn Asp Asn Glu Gln Gly Leu Asp Glu His Ile Ala Arg
[0225]	530 535 540
[0226]	Ile Ser Ala Asp Ile Ala Ala Gly Gly Val Ile Val Gln Ala Val Gln
[0227]	545 550 555 560
[0228]	Asp Ile Leu Pro Cys Leu His
[0229]	565
[0230]	<210> 5
[0231]	<211> 523
[0232]	<212> PRT
[0233]	<213> 海洋链霉菌
[0234]	<400> 5
[0235]	Met Thr Phe Val Ile Glu Leu Asp Met Asn Val Thr Leu Asp Gln Leu
[0236]	1 5 10 15
[0237]	Glu Asp Ala Ala Arg Gln Arg Thr Pro Val Glu Leu Ser Ala Pro Val
[0238]	20 25 30
[0239]	Arg Ser Arg Val Arg Ala Ser Arg Asp Val Leu Val Lys Phe Val Gln
[0240]	35 40 45
[0241]	Asp Glu Arg Val Ile Tyr Gly Val Asn Thr Ser Met Gly Gly Phe Val
[0242]	50 55 60
[0243]	Asp His Leu Val Pro Val Ser Gln Ala Arg Gln Leu Gln Glu Asn Leu
[0244]	65 70 75 80
[0245]	Ile Asn Ala Val Ala Thr Asn Val Gly Ala Tyr Leu Asp Asp Thr Thr
[0246]	85 90 95
[0247]	Ala Arg Thr Ile Met Leu Ser Arg Ile Val Ser Leu Ala Arg Gly Asn
[0248]	100 105 110
[0249]	Ser Ala Ile Thr Pro Ala Asn Leu Asp Lys Leu Val Ala Val Leu Asn
[0250]	115 120 125
[0251]	Ala Gly Ile Val Pro Cys Ile Pro Glu Lys Gly Ser Leu Gly Thr Ser

[0252]	130	135	140
[0253]	Gly Asp Leu Gly Pro Leu Ala Ala Ile Ala Leu Val Cys Ala Gly Gln		
[0254]	145	150	155
[0255]	Trp Lys Ala Arg Tyr Asn Gly Gln Ile Met Pro Gly Arg Gln Ala Leu		
[0256]		165	170
[0257]	Ser Glu Ala Gly Val Glu Pro Met Glu Leu Ser Tyr Lys Asp Gly Leu		
[0258]		180	185
[0259]	Ala Leu Ile Asn Gly Thr Ser Gly Met Val Gly Leu Gly Thr Met Val		
[0260]		195	200
[0261]	Leu Gln Ala Ala Arg Arg Leu Val Asp Arg Tyr Leu Gln Val Ser Ala		
[0262]		210	215
[0263]	Leu Ser Val Glu Gly Leu Ala Gly Met Thr Lys Pro Phe Asp Pro Arg		
[0264]		225	230
[0265]	Val His Gly Val Lys Pro His Arg Gly Gln Arg Gln Val Ala Ser Arg		
[0266]		245	250
[0267]	Leu Trp Glu Gly Leu Ala Asp Ser His Leu Ala Val Asn Glu Leu Asp		
[0268]		260	265
[0269]	Thr Glu Gln Thr Leu Ala Gly Glu Met Gly Thr Val Ala Lys Ala Gly		
[0270]		275	280
[0271]	Ser Leu Ala Ile Glu Asp Ala Tyr Ser Ile Arg Cys Thr Pro Gln Ile		
[0272]		290	295
[0273]	Leu Gly Pro Val Val Asp Val Leu Asp Arg Ile Gly Ala Thr Leu Gln		
[0274]		305	310
[0275]	Asp Glu Leu Asn Ser Ser Asn Asp Asn Pro Ile Val Leu Pro Glu Glu		
[0276]		325	330
[0277]	Ala Glu Val Phe His Asn Gly His Phe His Gly Gln Tyr Val Ala Met		
[0278]		340	345
[0279]	Ala Met Asp His Leu Asn Met Ala Leu Ala Thr Val Thr Asn Leu Ala		
[0280]		355	360
[0281]	Asn Arg Arg Val Asp Arg Phe Leu Asp Lys Ser Asn Ser Asn Gly Leu		
[0282]		370	375
[0283]	Pro Ala Phe Leu Cys Arg Glu Asp Pro Gly Leu Arg Leu Gly Leu Met		
[0284]		385	390
[0285]	Gly Gly Gln Phe Met Thr Ala Ser Ile Thr Ala Glu Thr Arg Thr Leu		
[0286]		405	410
[0287]	Thr Ile Pro Met Ser Val Gln Ser Leu Thr Ser Thr Ala Asp Phe Gln		
[0288]		420	425
[0289]	Asp Ile Val Ser Phe Gly Phe Val Ala Ala Arg Arg Ala Arg Glu Val		
[0290]		435	440
[0291]	Leu Thr Asn Ala Ala Tyr Val Val Ala Phe Glu Leu Leu Cys Ala Cys		
[0292]		450	455
[0293]	Gln Ala Val Asp Ile Arg Gly Ala Asp Lys Leu Ser Ser Phe Thr Arg		

[0294]	465	470	475	480
[0295]	Pro Leu Tyr Glu Arg Thr Arg Lys Ile Val Pro Phe Phe Asp Arg Asp			
[0296]		485	490	495
[0297]	Glu Thr Ile Thr Asp Tyr Val Glu Lys Leu Ala Ala Asp Leu Ile Ala			
[0298]		500	505	510
[0299]	Gly Glu Pro Val Asp Ala Ala Val Ala Ala His			
[0300]		515	520	
[0301]	<210> 6			
[0302]	<211> 510			
[0303]	<212> PRT			
[0304]	<213> 恶臭假单胞菌			
[0305]	<400> 6			
[0306]	Met Thr Glu Leu Thr Leu Lys Pro Gly Thr Leu Thr Leu Ala Gln Leu			
[0307]	1	5	10	15
[0308]	Arg Ala Ile His Ala Ala Pro Val Arg Leu Gln Leu Asp Ala Ser Ala			
[0309]		20	25	30
[0310]	Ala Pro Ala Ile Asp Ala Ser Val Ala Cys Val Glu Gln Ile Ile Ala			
[0311]		35	40	45
[0312]	Glu Asp Arg Thr Ala Tyr Gly Ile Asn Thr Gly Phe Gly Leu Leu Ala			
[0313]		50	55	60
[0314]	Ser Thr Arg Ile Ala Ser His Asp Leu Glu Asn Leu Gln Arg Ser Leu			
[0315]	65	70	75	80
[0316]	Val Leu Ser His Ala Ala Gly Ile Gly Ala Pro Leu Asp Asp Asp Leu			
[0317]		85	90	95
[0318]	Val Arg Leu Ile Met Val Leu Lys Ile Asn Ser Leu Ser Arg Gly Phe			
[0319]		100	105	110
[0320]	Ser Gly Ile Arg Arg Lys Val Ile Asp Ala Leu Ile Ala Leu Val Asn			
[0321]		115	120	125
[0322]	Ala Glu Val Tyr Pro His Ile Pro Leu Lys Gly Ser Val Gly Ala Ser			
[0323]		130	135	140
[0324]	Gly Asp Leu Ala Pro Leu Ala Thr Met Ser Leu Val Leu Leu Gly Glu			
[0325]	145	150	155	160
[0326]	Gly Lys Ala Arg Tyr Lys Gly Gln Trp Leu Ser Ala Thr Glu Ala Leu			
[0327]		165	170	175
[0328]	Ala Val Ala Gly Leu Glu Pro Leu Thr Leu Ala Ala Lys Glu Gly Leu			
[0329]		180	185	190
[0330]	Ala Leu Leu Asn Gly Thr Gln Ala Ser Thr Ala Tyr Ala Leu Arg Gly			
[0331]		195	200	205
[0332]	Leu Phe Tyr Ala Glu Asp Leu Tyr Ala Ala Ala Ile Ala Cys Gly Gly			
[0333]		210	215	220
[0334]	Leu Ser Val Glu Ala Val Leu Gly Ser Arg Ser Pro Phe Asp Ala Arg			
[0335]	225	230	235	240

[0336]	Ile His Glu Ala Arg Gly Gln Arg Gly Gln Ile Asp Thr Ala Ala Cys		
[0337]		245	250 255
[0338]	Phe Arg Asp Leu Leu Gly Asp Ser Ser Glu Val Ser Leu Ser His Lys		
[0339]		260	265 270
[0340]	Asn Cys Asp Lys Val Gln Asp Pro Tyr Ser Leu Arg Cys Gln Pro Gln		
[0341]		275	280 285
[0342]	Val Met Gly Ala Cys Leu Thr Gln Leu Arg Gln Ala Ala Glu Val Leu		
[0343]		290	295 300
[0344]	Gly Ile Glu Ala Asn Ala Val Ser Asp Asn Pro Leu Val Phe Ala Ala		
[0345]	305	310	315 320
[0346]	Glu Gly Asp Val Ile Ser Gly Gly Asn Phe His Ala Glu Pro Val Ala		
[0347]		325	330 335
[0348]	Met Ala Ala Asp Asn Leu Ala Leu Ala Ile Ala Glu Ile Gly Ser Leu		
[0349]		340	345 350
[0350]	Ser Glu Arg Arg Ile Ser Leu Met Met Asp Lys His Met Ser Gln Leu		
[0351]		355	360 365
[0352]	Pro Pro Phe Leu Val Glu Asn Gly Gly Val Asn Ser Gly Phe Met Ile		
[0353]		370	375 380
[0354]	Ala Gln Val Thr Ala Ala Ala Leu Ala Ser Glu Asn Lys Ala Leu Ser		
[0355]	385	390	395 400
[0356]	His Pro His Ser Val Asp Ser Leu Pro Thr Ser Ala Asn Gln Glu Asp		
[0357]		405	410 415
[0358]	His Val Ser Met Ala Pro Ala Ala Gly Lys Arg Leu Trp Glu Met Ala		
[0359]		420	425 430
[0360]	Glu Asn Thr Arg Gly Val Pro Ala Ile Glu Trp Leu Gly Ala Cys Gln		
[0361]		435	440 445
[0362]	Gly Leu Asp Leu Arg Lys Gly Leu Lys Thr Ser Ala Lys Leu Glu Lys		
[0363]		450	455 460
[0364]	Ala Arg Gln Ala Leu Arg Ser Glu Val Ala His Tyr Asp Arg Asp Arg		
[0365]	465	470	475 480
[0366]	Phe Phe Ala Pro Asp Ile Glu Lys Ala Val Glu Leu Leu Ala Lys Gly		
[0367]		485	490 495
[0368]	Ser Leu Thr Gly Leu Leu Pro Ala Gly Val Leu Pro Ser Leu		
[0369]		500	505 510
[0370]	<210> 7		
[0371]	<211> 567		
[0372]	<212> PRT		
[0373]	<213> 人工序列		
[0374]	<220>		
[0375]	<223> 在位置64具有半胱氨酸到丝氨酸的取代的多变鱼腥藻PAL		
[0376]	<400> 7		
[0377]	Met Lys Thr Leu Ser Gln Ala Gln Ser Lys Thr Ser Ser Gln Gln Phe		

[0378]	1	5	10	15
[0379]	Ser Phe Thr Gly Asn Ser Ser Ala Asn Val Ile Ile Gly Asn Gln Lys			
[0380]	20	25	30	
[0381]	Leu Thr Ile Asn Asp Val Ala Arg Val Ala Arg Asn Gly Thr Leu Val			
[0382]	35	40	45	
[0383]	Ser Leu Thr Asn Asn Thr Asp Ile Leu Gln Gly Ile Gln Ala Ser Ser			
[0384]	50	55	60	
[0385]	Asp Tyr Ile Asn Asn Ala Val Glu Ser Gly Glu Pro Ile Tyr Gly Val			
[0386]	65	70	75	80
[0387]	Thr Ser Gly Phe Gly Gly Met Ala Asn Val Ala Ile Ser Arg Glu Gln			
[0388]	85	90	95	
[0389]	Ala Ser Glu Leu Gln Thr Asn Leu Val Trp Phe Leu Lys Thr Gly Ala			
[0390]	100	105	110	
[0391]	Gly Asn Lys Leu Pro Leu Ala Asp Val Arg Ala Ala Met Leu Leu Arg			
[0392]	115	120	125	
[0393]	Ala Asn Ser His Met Arg Gly Ala Ser Gly Ile Arg Leu Glu Leu Ile			
[0394]	130	135	140	
[0395]	Lys Arg Met Glu Ile Phe Leu Asn Ala Gly Val Thr Pro Tyr Val Tyr			
[0396]	145	150	155	160
[0397]	Glu Phe Gly Ser Ile Gly Ala Ser Gly Asp Leu Val Pro Leu Ser Tyr			
[0398]	165	170	175	
[0399]	Ile Thr Gly Ser Leu Ile Gly Leu Asp Pro Ser Phe Lys Val Asp Phe			
[0400]	180	185	190	
[0401]	Asn Gly Lys Glu Met Asp Ala Pro Thr Ala Leu Arg Gln Leu Asn Leu			
[0402]	195	200	205	
[0403]	Ser Pro Leu Thr Leu Leu Pro Lys Glu Gly Leu Ala Met Met Asn Gly			
[0404]	210	215	220	
[0405]	Thr Ser Val Met Thr Gly Ile Ala Ala Asn Cys Val Tyr Asp Thr Gln			
[0406]	225	230	235	240
[0407]	Ile Leu Thr Ala Ile Ala Met Gly Val His Ala Leu Asp Ile Gln Ala			
[0408]	245	250	255	
[0409]	Leu Asn Gly Thr Asn Gln Ser Phe His Pro Phe Ile His Asn Ser Lys			
[0410]	260	265	270	
[0411]	Pro His Pro Gly Gln Leu Trp Ala Ala Asp Gln Met Ile Ser Leu Leu			
[0412]	275	280	285	
[0413]	Ala Asn Ser Gln Leu Val Arg Asp Glu Leu Asp Gly Lys His Asp Tyr			
[0414]	290	295	300	
[0415]	Arg Asp His Glu Leu Ile Gln Asp Arg Tyr Ser Leu Arg Cys Leu Pro			
[0416]	305	310	315	320
[0417]	Gln Tyr Leu Gly Pro Ile Val Asp Gly Ile Ser Gln Ile Ala Lys Gln			
[0418]	325	330	335	
[0419]	Ile Glu Ile Glu Ile Asn Ser Val Thr Asp Asn Pro Leu Ile Asp Val			

[0420]	340	345	350
[0421]	Asp Asn Gln Ala Ser Tyr His Gly Gly Asn Phe Leu Gly Gln Tyr Val		
[0422]	355	360	365
[0423]	Gly Met Gly Met Asp His Leu Arg Tyr Tyr Ile Gly Leu Leu Ala Lys		
[0424]	370	375	380
[0425]	His Leu Asp Val Gln Ile Ala Leu Leu Ala Ser Pro Glu Phe Ser Asn		
[0426]	385	390	395
[0427]	Gly Leu Pro Pro Ser Leu Leu Gly Asn Arg Glu Arg Lys Val Asn Met		
[0428]	405	410	415
[0429]	Gly Leu Lys Gly Leu Gln Ile Cys Gly Asn Ser Ile Met Pro Leu Leu		
[0430]	420	425	430
[0431]	Thr Phe Tyr Gly Asn Ser Ile Ala Asp Arg Phe Pro Thr His Ala Glu		
[0432]	435	440	445
[0433]	Gln Phe Asn Gln Asn Ile Asn Ser Gln Gly Tyr Thr Ser Ala Thr Leu		
[0434]	450	455	460
[0435]	Ala Arg Arg Ser Val Asp Ile Phe Gln Asn Tyr Val Ala Ile Ala Leu		
[0436]	465	470	475
[0437]	Met Phe Gly Val Gln Ala Val Asp Leu Arg Thr Tyr Lys Lys Thr Gly		
[0438]	485	490	495
[0439]	His Tyr Asp Ala Arg Ala Cys Leu Ser Pro Ala Thr Glu Arg Leu Tyr		
[0440]	500	505	510
[0441]	Ser Ala Val Arg His Val Val Gly Gln Lys Pro Thr Ser Asp Arg Pro		
[0442]	515	520	525
[0443]	Tyr Ile Trp Asn Asp Asn Glu Gln Gly Leu Asp Glu His Ile Ala Arg		
[0444]	530	535	540
[0445]	Ile Ser Ala Asp Ile Ala Ala Gly Gly Val Ile Val Gln Ala Val Gln		
[0446]	545	550	555
[0447]	Asp Ile Leu Pro Cys Leu His		
[0448]	565		
[0449]	<210> 8		
[0450]	<211> 567		
[0451]	<212> PRT		
[0452]	<213> 人工序列		
[0453]	<220>		
[0454]	<223> 在位置318具有半胱氨酸到丝氨酸的取代的多变鱼腥PAL		
[0455]	<400> 8		
[0456]	Met Lys Thr Leu Ser Gln Ala Gln Ser Lys Thr Ser Ser Gln Gln Phe		
[0457]	1	5	10
[0458]	Ser Phe Thr Gly Asn Ser Ser Ala Asn Val Ile Ile Gly Asn Gln Lys		
[0459]	20	25	30
[0460]	Leu Thr Ile Asn Asp Val Ala Arg Val Ala Arg Asn Gly Thr Leu Val		
[0461]	35	40	45

[0462]	Ser Leu Thr Asn Asn Thr Asp Ile Leu Gln Gly Ile Gln Ala Ser Cys		
[0463]	50	55	60
[0464]	Asp Tyr Ile Asn Asn Ala Val Glu Ser Gly Glu Pro Ile Tyr Gly Val		
[0465]	65	70	75
[0466]	Thr Ser Gly Phe Gly Gly Met Ala Asn Val Ala Ile Ser Arg Glu Gln		
[0467]	85	90	95
[0468]	Ala Ser Glu Leu Gln Thr Asn Leu Val Trp Phe Leu Lys Thr Gly Ala		
[0469]	100	105	110
[0470]	Gly Asn Lys Leu Pro Leu Ala Asp Val Arg Ala Ala Met Leu Leu Arg		
[0471]	115	120	125
[0472]	Ala Asn Ser His Met Arg Gly Ala Ser Gly Ile Arg Leu Glu Leu Ile		
[0473]	130	135	140
[0474]	Lys Arg Met Glu Ile Phe Leu Asn Ala Gly Val Thr Pro Tyr Val Tyr		
[0475]	145	150	155
[0476]	Glu Phe Gly Ser Ile Gly Ala Ser Gly Asp Leu Val Pro Leu Ser Tyr		
[0477]	165	170	175
[0478]	Ile Thr Gly Ser Leu Ile Gly Leu Asp Pro Ser Phe Lys Val Asp Phe		
[0479]	180	185	190
[0480]	Asn Gly Lys Glu Met Asp Ala Pro Thr Ala Leu Arg Gln Leu Asn Leu		
[0481]	195	200	205
[0482]	Ser Pro Leu Thr Leu Leu Pro Lys Glu Gly Leu Ala Met Met Asn Gly		
[0483]	210	215	220
[0484]	Thr Ser Val Met Thr Gly Ile Ala Ala Asn Cys Val Tyr Asp Thr Gln		
[0485]	225	230	235
[0486]	Ile Leu Thr Ala Ile Ala Met Gly Val His Ala Leu Asp Ile Gln Ala		
[0487]	245	250	255
[0488]	Leu Asn Gly Thr Asn Gln Ser Phe His Pro Phe Ile His Asn Ser Lys		
[0489]	260	265	270
[0490]	Pro His Pro Gly Gln Leu Trp Ala Ala Asp Gln Met Ile Ser Leu Leu		
[0491]	275	280	285
[0492]	Ala Asn Ser Gln Leu Val Arg Asp Glu Leu Asp Gly Lys His Asp Tyr		
[0493]	290	295	300
[0494]	Arg Asp His Glu Leu Ile Gln Asp Arg Tyr Ser Leu Arg Ser Leu Pro		
[0495]	305	310	315
[0496]	Gln Tyr Leu Gly Pro Ile Val Asp Gly Ile Ser Gln Ile Ala Lys Gln		
[0497]	325	330	335
[0498]	Ile Glu Ile Glu Ile Asn Ser Val Thr Asp Asn Pro Leu Ile Asp Val		
[0499]	340	345	350
[0500]	Asp Asn Gln Ala Ser Tyr His Gly Gly Asn Phe Leu Gly Gln Tyr Val		
[0501]	355	360	365
[0502]	Gly Met Gly Met Asp His Leu Arg Tyr Tyr Ile Gly Leu Leu Ala Lys		
[0503]	370	375	380

[0504]	His Leu Asp Val Gln Ile Ala Leu Leu Ala Ser Pro Glu Phe Ser Asn		
[0505]	385	390	395 400
[0506]	Gly Leu Pro Pro Ser Leu Leu Gly Asn Arg Glu Arg Lys Val Asn Met		
[0507]	405	410	415
[0508]	Gly Leu Lys Gly Leu Gln Ile Cys Gly Asn Ser Ile Met Pro Leu Leu		
[0509]	420	425	430
[0510]	Thr Phe Tyr Gly Asn Ser Ile Ala Asp Arg Phe Pro Thr His Ala Glu		
[0511]	435	440	445
[0512]	Gln Phe Asn Gln Asn Ile Asn Ser Gln Gly Tyr Thr Ser Ala Thr Leu		
[0513]	450	455	460
[0514]	Ala Arg Arg Ser Val Asp Ile Phe Gln Asn Tyr Val Ala Ile Ala Leu		
[0515]	465	470	475 480
[0516]	Met Phe Gly Val Gln Ala Val Asp Leu Arg Thr Tyr Lys Lys Thr Gly		
[0517]	485	490	495
[0518]	His Tyr Asp Ala Arg Ala Cys Leu Ser Pro Ala Thr Glu Arg Leu Tyr		
[0519]	500	505	510
[0520]	Ser Ala Val Arg His Val Val Gly Gln Lys Pro Thr Ser Asp Arg Pro		
[0521]	515	520	525
[0522]	Tyr Ile Trp Asn Asp Asn Glu Gln Gly Leu Asp Glu His Ile Ala Arg		
[0523]	530	535	540
[0524]	Ile Ser Ala Asp Ile Ala Ala Gly Gly Val Ile Val Gln Ala Val Gln		
[0525]	545	550	555 560
[0526]	Asp Ile Leu Pro Cys Leu His		
[0527]	565		
[0528]	<210> 9		
[0529]	<211> 567		
[0530]	<212> PRT		
[0531]	<213> 人工序列		
[0532]	<220>		
[0533]	<223> 在位置503具有半胱氨酸到丝氨酸的取代的多变鱼腥藻PAL		
[0534]	<400> 9		
[0535]	Met Lys Thr Leu Ser Gln Ala Gln Ser Lys Thr Ser Ser Gln Gln Phe		
[0536]	1	5	10 15
[0537]	Ser Phe Thr Gly Asn Ser Ser Ala Asn Val Ile Ile Gly Asn Gln Lys		
[0538]	20	25	30
[0539]	Leu Thr Ile Asn Asp Val Ala Arg Val Ala Arg Asn Gly Thr Leu Val		
[0540]	35	40	45
[0541]	Ser Leu Thr Asn Asn Thr Asp Ile Leu Gln Gly Ile Gln Ala Ser Cys		
[0542]	50	55	60
[0543]	Asp Tyr Ile Asn Asn Ala Val Glu Ser Gly Glu Pro Ile Tyr Gly Val		
[0544]	65	70	75 80
[0545]	Thr Ser Gly Phe Gly Gly Met Ala Asn Val Ala Ile Ser Arg Glu Gln		

[0546]	85	90	95
[0547]	Ala Ser Glu Leu Gln Thr Asn Leu Val Trp Phe Leu Lys Thr Gly Ala		
[0548]	100	105	110
[0549]	Gly Asn Lys Leu Pro Leu Ala Asp Val Arg Ala Ala Met Leu Leu Arg		
[0550]	115	120	125
[0551]	Ala Asn Ser His Met Arg Gly Ala Ser Gly Ile Arg Leu Glu Leu Ile		
[0552]	130	135	140
[0553]	Lys Arg Met Glu Ile Phe Leu Asn Ala Gly Val Thr Pro Tyr Val Tyr		
[0554]	145	150	155
[0555]	Glu Phe Gly Ser Ile Gly Ala Ser Gly Asp Leu Val Pro Leu Ser Tyr		
[0556]	165	170	175
[0557]	Ile Thr Gly Ser Leu Ile Gly Leu Asp Pro Ser Phe Lys Val Asp Phe		
[0558]	180	185	190
[0559]	Asn Gly Lys Glu Met Asp Ala Pro Thr Ala Leu Arg Gln Leu Asn Leu		
[0560]	195	200	205
[0561]	Ser Pro Leu Thr Leu Leu Pro Lys Glu Gly Leu Ala Met Met Asn Gly		
[0562]	210	215	220
[0563]	Thr Ser Val Met Thr Gly Ile Ala Ala Asn Cys Val Tyr Asp Thr Gln		
[0564]	225	230	235
[0565]	Ile Leu Thr Ala Ile Ala Met Gly Val His Ala Leu Asp Ile Gln Ala		
[0566]	245	250	255
[0567]	Leu Asn Gly Thr Asn Gln Ser Phe His Pro Phe Ile His Asn Ser Lys		
[0568]	260	265	270
[0569]	Pro His Pro Gly Gln Leu Trp Ala Ala Asp Gln Met Ile Ser Leu Leu		
[0570]	275	280	285
[0571]	Ala Asn Ser Gln Leu Val Arg Asp Glu Leu Asp Gly Lys His Asp Tyr		
[0572]	290	295	300
[0573]	Arg Asp His Glu Leu Ile Gln Asp Arg Tyr Ser Leu Arg Cys Leu Pro		
[0574]	305	310	315
[0575]	Gln Tyr Leu Gly Pro Ile Val Asp Gly Ile Ser Gln Ile Ala Lys Gln		
[0576]	325	330	335
[0577]	Ile Glu Ile Glu Ile Asn Ser Val Thr Asp Asn Pro Leu Ile Asp Val		
[0578]	340	345	350
[0579]	Asp Asn Gln Ala Ser Tyr His Gly Gly Asn Phe Leu Gly Gln Tyr Val		
[0580]	355	360	365
[0581]	Gly Met Gly Met Asp His Leu Arg Tyr Tyr Ile Gly Leu Leu Ala Lys		
[0582]	370	375	380
[0583]	His Leu Asp Val Gln Ile Ala Leu Leu Ala Ser Pro Glu Phe Ser Asn		
[0584]	385	390	395
[0585]	Gly Leu Pro Pro Ser Leu Leu Gly Asn Arg Glu Arg Lys Val Asn Met		
[0586]	405	410	415
[0587]	Gly Leu Lys Gly Leu Gln Ile Cys Gly Asn Ser Ile Met Pro Leu Leu		

[0588]	420	425	430
[0589]	Thr Phe Tyr Gly Asn Ser Ile Ala Asp Arg Phe Pro Thr His Ala Glu		
[0590]	435	440	445
[0591]	Gln Phe Asn Gln Asn Ile Asn Ser Gln Gly Tyr Thr Ser Ala Thr Leu		
[0592]	450	455	460
[0593]	Ala Arg Arg Ser Val Asp Ile Phe Gln Asn Tyr Val Ala Ile Ala Leu		
[0594]	465	470	475 480
[0595]	Met Phe Gly Val Gln Ala Val Asp Leu Arg Thr Tyr Lys Lys Thr Gly		
[0596]	485	490	495
[0597]	His Tyr Asp Ala Arg Ala Ser Leu Ser Pro Ala Thr Glu Arg Leu Tyr		
[0598]	500	505	510
[0599]	Ser Ala Val Arg His Val Val Gly Gln Lys Pro Thr Ser Asp Arg Pro		
[0600]	515	520	525
[0601]	Tyr Ile Trp Asn Asp Asn Glu Gln Gly Leu Asp Glu His Ile Ala Arg		
[0602]	530	535	540
[0603]	Ile Ser Ala Asp Ile Ala Ala Gly Gly Val Ile Val Gln Ala Val Gln		
[0604]	545	550	555 560
[0605]	Asp Ile Leu Pro Cys Leu His		
[0606]	565		
[0607]	<210> 10		
[0608]	<211> 567		
[0609]	<212> PRT		
[0610]	<213> 人工序列		
[0611]	<220>		
[0612]	<223> 在位置565具有半胱氨酸到丝氨酸的取代的多变鱼腥藻PAL		
[0613]	<400> 10		
[0614]	Met Lys Thr Leu Ser Gln Ala Gln Ser Lys Thr Ser Ser Gln Gln Phe		
[0615]	1 5 10 15		
[0616]	Ser Phe Thr Gly Asn Ser Ser Ala Asn Val Ile Ile Gly Asn Gln Lys		
[0617]	20 25 30		
[0618]	Leu Thr Ile Asn Asp Val Ala Arg Val Ala Arg Asn Gly Thr Leu Val		
[0619]	35 40 45		
[0620]	Ser Leu Thr Asn Asn Thr Asp Ile Leu Gln Gly Ile Gln Ala Ser Cys		
[0621]	50 55 60		
[0622]	Asp Tyr Ile Asn Asn Ala Val Glu Ser Gly Glu Pro Ile Tyr Gly Val		
[0623]	65 70 75 80		
[0624]	Thr Ser Gly Phe Gly Gly Met Ala Asn Val Ala Ile Ser Arg Glu Gln		
[0625]	85 90 95		
[0626]	Ala Ser Glu Leu Gln Thr Asn Leu Val Trp Phe Leu Lys Thr Gly Ala		
[0627]	100 105 110		
[0628]	Gly Asn Lys Leu Pro Leu Ala Asp Val Arg Ala Ala Met Leu Leu Arg		
[0629]	115 120 125		

[0630]	Ala Asn Ser His Met Arg Gly Ala Ser Gly Ile Arg Leu Glu Leu Ile
[0631]	130 135 140
[0632]	Lys Arg Met Glu Ile Phe Leu Asn Ala Gly Val Thr Pro Tyr Val Tyr
[0633]	145 150 155 160
[0634]	Glu Phe Gly Ser Ile Gly Ala Ser Gly Asp Leu Val Pro Leu Ser Tyr
[0635]	165 170 175
[0636]	Ile Thr Gly Ser Leu Ile Gly Leu Asp Pro Ser Phe Lys Val Asp Phe
[0637]	180 185 190
[0638]	Asn Gly Lys Glu Met Asp Ala Pro Thr Ala Leu Arg Gln Leu Asn Leu
[0639]	195 200 205
[0640]	Ser Pro Leu Thr Leu Leu Pro Lys Glu Gly Leu Ala Met Met Asn Gly
[0641]	210 215 220
[0642]	Thr Ser Val Met Thr Gly Ile Ala Ala Asn Cys Val Tyr Asp Thr Gln
[0643]	225 230 235 240
[0644]	Ile Leu Thr Ala Ile Ala Met Gly Val His Ala Leu Asp Ile Gln Ala
[0645]	245 250 255
[0646]	Leu Asn Gly Thr Asn Gln Ser Phe His Pro Phe Ile His Asn Ser Lys
[0647]	260 265 270
[0648]	Pro His Pro Gly Gln Leu Trp Ala Ala Asp Gln Met Ile Ser Leu Leu
[0649]	275 280 285
[0650]	Ala Asn Ser Gln Leu Val Arg Asp Glu Leu Asp Gly Lys His Asp Tyr
[0651]	290 295 300
[0652]	Arg Asp His Glu Leu Ile Gln Asp Arg Tyr Ser Leu Arg Cys Leu Pro
[0653]	305 310 315 320
[0654]	Gln Tyr Leu Gly Pro Ile Val Asp Gly Ile Ser Gln Ile Ala Lys Gln
[0655]	325 330 335
[0656]	Ile Glu Ile Glu Ile Asn Ser Val Thr Asp Asn Pro Leu Ile Asp Val
[0657]	340 345 350
[0658]	Asp Asn Gln Ala Ser Tyr His Gly Gly Asn Phe Leu Gly Gln Tyr Val
[0659]	355 360 365
[0660]	Gly Met Gly Met Asp His Leu Arg Tyr Tyr Ile Gly Leu Leu Ala Lys
[0661]	370 375 380
[0662]	His Leu Asp Val Gln Ile Ala Leu Leu Ala Ser Pro Glu Phe Ser Asn
[0663]	385 390 395 400
[0664]	Gly Leu Pro Pro Ser Leu Leu Gly Asn Arg Glu Arg Lys Val Asn Met
[0665]	405 410 415
[0666]	Gly Leu Lys Gly Leu Gln Ile Cys Gly Asn Ser Ile Met Pro Leu Leu
[0667]	420 425 430
[0668]	Thr Phe Tyr Gly Asn Ser Ile Ala Asp Arg Phe Pro Thr His Ala Glu
[0669]	435 440 445
[0670]	Gln Phe Asn Gln Asn Ile Asn Ser Gln Gly Tyr Thr Ser Ala Thr Leu
[0671]	450 455 460

[0672]	Ala Arg Arg Ser Val Asp Ile Phe Gln Asn Tyr Val Ala Ile Ala Leu
[0673]	465 470 475 480
[0674]	Met Phe Gly Val Gln Ala Val Asp Leu Arg Thr Tyr Lys Lys Thr Gly
[0675]	485 490 495
[0676]	His Tyr Asp Ala Arg Ala Cys Leu Ser Pro Ala Thr Glu Arg Leu Tyr
[0677]	500 505 510
[0678]	Ser Ala Val Arg His Val Val Gly Gln Lys Pro Thr Ser Asp Arg Pro
[0679]	515 520 525
[0680]	Tyr Ile Trp Asn Asp Asn Glu Gln Gly Leu Asp Glu His Ile Ala Arg
[0681]	530 535 540
[0682]	Ile Ser Ala Asp Ile Ala Ala Gly Gly Val Ile Val Gln Ala Val Gln
[0683]	545 550 555 560
[0684]	Asp Ile Leu Pro Ser Leu His
[0685]	565
[0686]	<210> 11
[0687]	<211> 567
[0688]	<212> PRT
[0689]	<213> 人工序列
[0690]	<220>
[0691]	<223> 在位置503和565具有半胱氨酸到丝氨酸的取代的多变鱼腥藻PAL
[0692]	<400> 11
[0693]	Met Lys Thr Leu Ser Gln Ala Gln Ser Lys Thr Ser Ser Gln Gln Phe
[0694]	1 5 10 15
[0695]	Ser Phe Thr Gly Asn Ser Ser Ala Asn Val Ile Ile Gly Asn Gln Lys
[0696]	20 25 30
[0697]	Leu Thr Ile Asn Asp Val Ala Arg Val Ala Arg Asn Gly Thr Leu Val
[0698]	35 40 45
[0699]	Ser Leu Thr Asn Asn Thr Asp Ile Leu Gln Gly Ile Gln Ala Ser Cys
[0700]	50 55 60
[0701]	Asp Tyr Ile Asn Asn Ala Val Glu Ser Gly Glu Pro Ile Tyr Gly Val
[0702]	65 70 75 80
[0703]	Thr Ser Gly Phe Gly Gly Met Ala Asn Val Ala Ile Ser Arg Glu Gln
[0704]	85 90 95
[0705]	Ala Ser Glu Leu Gln Thr Asn Leu Val Trp Phe Leu Lys Thr Gly Ala
[0706]	100 105 110
[0707]	Gly Asn Lys Leu Pro Leu Ala Asp Val Arg Ala Ala Met Leu Leu Arg
[0708]	115 120 125
[0709]	Ala Asn Ser His Met Arg Gly Ala Ser Gly Ile Arg Leu Glu Leu Ile
[0710]	130 135 140
[0711]	Lys Arg Met Glu Ile Phe Leu Asn Ala Gly Val Thr Pro Tyr Val Tyr
[0712]	145 150 155 160
[0713]	Glu Phe Gly Ser Ile Gly Ala Ser Gly Asp Leu Val Pro Leu Ser Tyr

[0714]		165		170		175
[0715]	Ile Thr Gly Ser Leu Ile Gly Leu Asp Pro Ser Phe Lys Val Asp Phe					
[0716]		180		185		190
[0717]	Asn Gly Lys Glu Met Asp Ala Pro Thr Ala Leu Arg Gln Leu Asn Leu					
[0718]		195		200		205
[0719]	Ser Pro Leu Thr Leu Leu Pro Lys Glu Gly Leu Ala Met Met Asn Gly					
[0720]		210		215		220
[0721]	Thr Ser Val Met Thr Gly Ile Ala Ala Asn Cys Val Tyr Asp Thr Gln					
[0722]	225		230		235	240
[0723]	Ile Leu Thr Ala Ile Ala Met Gly Val His Ala Leu Asp Ile Gln Ala					
[0724]		245		250		255
[0725]	Leu Asn Gly Thr Asn Gln Ser Phe His Pro Phe Ile His Asn Ser Lys					
[0726]		260		265		270
[0727]	Pro His Pro Gly Gln Leu Trp Ala Ala Asp Gln Met Ile Ser Leu Leu					
[0728]		275		280		285
[0729]	Ala Asn Ser Gln Leu Val Arg Asp Glu Leu Asp Gly Lys His Asp Tyr					
[0730]		290		295		300
[0731]	Arg Asp His Glu Leu Ile Gln Asp Arg Tyr Ser Leu Arg Cys Leu Pro					
[0732]	305		310		315	320
[0733]	Gln Tyr Leu Gly Pro Ile Val Asp Gly Ile Ser Gln Ile Ala Lys Gln					
[0734]		325		330		335
[0735]	Ile Glu Ile Glu Ile Asn Ser Val Thr Asp Asn Pro Leu Ile Asp Val					
[0736]		340		345		350
[0737]	Asp Asn Gln Ala Ser Tyr His Gly Gly Asn Phe Leu Gly Gln Tyr Val					
[0738]		355		360		365
[0739]	Gly Met Gly Met Asp His Leu Arg Tyr Tyr Ile Gly Leu Leu Ala Lys					
[0740]		370		375		380
[0741]	His Leu Asp Val Gln Ile Ala Leu Leu Ala Ser Pro Glu Phe Ser Asn					
[0742]	385		390		395	400
[0743]	Gly Leu Pro Pro Ser Leu Leu Gly Asn Arg Glu Arg Lys Val Asn Met					
[0744]		405		410		415
[0745]	Gly Leu Lys Gly Leu Gln Ile Cys Gly Asn Ser Ile Met Pro Leu Leu					
[0746]		420		425		430
[0747]	Thr Phe Tyr Gly Asn Ser Ile Ala Asp Arg Phe Pro Thr His Ala Glu					
[0748]		435		440		445
[0749]	Gln Phe Asn Gln Asn Ile Asn Ser Gln Gly Tyr Thr Ser Ala Thr Leu					
[0750]		450		455		460
[0751]	Ala Arg Arg Ser Val Asp Ile Phe Gln Asn Tyr Val Ala Ile Ala Leu					
[0752]	465		470		475	480
[0753]	Met Phe Gly Val Gln Ala Val Asp Leu Arg Thr Tyr Lys Lys Thr Gly					
[0754]		485		490		495
[0755]	His Tyr Asp Ala Arg Ala Ser Leu Ser Pro Ala Thr Glu Arg Leu Tyr					

[0756]	500	505	510
[0757]	Ser Ala Val Arg His Val Val Gly Gln Lys Pro Thr Ser Asp Arg Pro		
[0758]	515	520	525
[0759]	Tyr Ile Trp Asn Asp Asn Glu Gln Gly Leu Asp Glu His Ile Ala Arg		
[0760]	530	535	540
[0761]	Ile Ser Ala Asp Ile Ala Ala Gly Gly Val Ile Val Gln Ala Val Gln		
[0762]	545	550	555 560
[0763]	Asp Ile Leu Pro Ser Leu His		
[0764]	565		
[0765]	<210> 12		
[0766]	<211> 38		
[0767]	<212> DNA		
[0768]	<213> 人工序列		
[0769]	<220>		
[0770]	<223> 点形念珠藻PAL引物1 (正向)		
[0771]	<400> 12		
[0772]	cactgtcata tgaatataac atctctacaa cagaacat 38		
[0773]	<210> 13		
[0774]	<211> 45		
[0775]	<212> DNA		
[0776]	<213> 人工序列		
[0777]	<220>		
[0778]	<223> 点形念珠藻 PAL引物2 (反向)		
[0779]	<400> 13		
[0780]	gacagtggcg gccgctcacg ttgacttta gctcgaaaaa atatg 45		
[0781]	<210> 14		
[0782]	<211> 38		
[0783]	<212> DNA		
[0784]	<213> 人工序列		
[0785]	<220>		
[0786]	<223> 多变鱼腥藻 PAL引物1 (正向, N-末端片段)		
[0787]	<400> 14		
[0788]	cactgtgcta gcatgaagac actatctcaa gcacaaag 38		
[0789]	<210> 15		
[0790]	<211> 49		
[0791]	<212> DNA		
[0792]	<213> 人工序列		
[0793]	<220>		
[0794]	<223> 多变鱼腥藻 PAL引物2 (反向, N-末端片段)		
[0795]	<400> 15		
[0796]	ggaaatttcc tccatgatag ctggcttggt tatcaacatc aattagtgg 49		
[0797]	<210> 16		

[0798]	<211> 49
[0799]	<212> DNA
[0800]	<213> 人工序列
[0801]	<220>
[0802]	<223> 多变鱼腥藻 PAL引物3 (正向, C-末端片段)
[0803]	<400> 16
[0804]	ccactaattg atgttgataa ccaagccagc tatcatggag gaaatttcc 49
[0805]	<210> 17
[0806]	<211> 41
[0807]	<212> DNA
[0808]	<213> 人工序列
[0809]	<220>
[0810]	<223> 多变鱼腥藻 PAL引物4 (反向, C-末端片段)
[0811]	<400> 17
[0812]	cactgtgcgg ccgcttaatg caagcagggt aagatatctt g 41
[0813]	<210> 18
[0814]	<211> 35
[0815]	<212> DNA
[0816]	<213> 人工序列
[0817]	<220>
[0818]	<223> 多变鱼腥藻 PAL 正向引物
[0819]	<400> 18
[0820]	cactgtcata tgaagacact atctcaagca caaag 35
[0821]	<210> 19
[0822]	<211> 36
[0823]	<212> DNA
[0824]	<213> 人工序列
[0825]	<220>
[0826]	<223> 多变鱼腥藻 PAL 反向引物
[0827]	<400> 19
[0828]	cactgtctcg agatgcaagc agggtaagat atcttg 36
[0829]	<210> 20
[0830]	<211> 38
[0831]	<212> DNA
[0832]	<213> 人工序列
[0833]	<220>
[0834]	<223> 多变鱼腥藻 PAL引物以添加5'NheI位点并去除
[0835]	内部NheI位点(正向, N-末端)
[0836]	<400> 20
[0837]	cactgtgcta gcatgaagac actatctcaa gcacaaag 38
[0838]	<210> 21
[0839]	<211> 49

- [0840] <212> DNA
[0841] <213> 人工序列
[0842] <220>
[0843] <223> 多变鱼腥藻 PAL引物以添加5'NheI位点并去除
[0844] 内部NheI位点 (反向, N-末端)
[0845] <400> 21
[0846] ggaaatttcc tccatgatag ctggcttggg tatcaacatc aattagtgg 49
[0847] <210> 22
[0848] <211> 49
[0849] <212> DNA
[0850] <213> 人工序列
[0851] <220>
[0852] <223> 多变鱼腥藻 PAL引物以添加5'NheI位点并去除
[0853] 内部NheI位点 (正向, C-末端片段)
[0854] <400> 22
[0855] ccactaattg atgttgataa ccaagccagc tatcatggag gaaatttcc 49
[0856] <210> 23
[0857] <211> 41
[0858] <212> DNA
[0859] <213> 人工序列
[0860] <220>
[0861] <223> 多变鱼腥藻 PAL引物以添加5'NheI位点并去除
[0862] 内部NheI位点 (反向, C-末端片段)
[0863] <400> 23
[0864] acagtggcgg ccgcttaatg caagcagggt aagatatctt g 41
[0865] <210> 24
[0866] <211> 38
[0867] <212> DNA
[0868] <213> 人工序列
[0869] <220>
[0870] <223> 多变鱼腥藻 PAL引物以添加5'NheI位点和3'SmaI位点
[0871] (正向)
[0872] <400> 24
[0873] cactgtgaat tcatgaagac actatctcaa gcacaaag 38
[0874] <210> 25
[0875] <211> 37
[0876] <212> DNA
[0877] <213> 人工序列
[0878] <220>
[0879] <223> 多变鱼腥藻 PAL引物以添加5'NheI位点和3'SmaI位点
[0880] (反向)
[0881] <400> 25

[0882]	cactgtcccg ggttaatgca agcagggtaa gatattct 37
[0883]	<210> 26
[0884]	<211> 41
[0885]	<212> DNA
[0886]	<213> 人工序列
[0887]	<220>
[0888]	<223> 多变鱼腥藻 PAL引物在位置503上形成半胱氨酸至丝氨酸的取代
[0889]	(正向)
[0890]	<400> 26
[0891]	gtcattacga tgcacgcgcc tctctatcac ctgcaactga g 41
[0892]	<210> 27
[0893]	<211> 41
[0894]	<212> DNA
[0895]	<213> 人工序列
[0896]	<220>
[0897]	<223> 多变鱼腥藻 PAL引物在位置503上形成半胱氨酸至丝氨酸的取代
[0898]	(反向)
[0899]	<400> 27
[0900]	ctcagttgca ggtgatagag aggcgctgc atcgtaatga c 41
[0901]	<210> 28
[0902]	<211> 42
[0903]	<212> DNA
[0904]	<213> 人工序列
[0905]	<220>
[0906]	<223> 多变鱼腥藻 PAL引物在位置565上形成半胱氨酸至丝氨酸的取代
[0907]	(正向)
[0908]	<400> 28
[0909]	cagttcaaga tatcttacct tccttgcat aacccgggct gc 42
[0910]	<210> 29
[0911]	<211> 42
[0912]	<212> DNA
[0913]	<213> 人工序列
[0914]	<220>
[0915]	<223> 多变鱼腥藻 PAL引物在位置565上形成半胱氨酸至丝氨酸的取代
[0916]	(反向)
[0917]	<400> 29
[0918]	gcagcccggt ttaatgcaag gagggtaaga tatcttgaac tg 42
[0919]	<210> 30
[0920]	<211> 44
[0921]	<212> DNA
[0922]	<213> 人工序列
[0923]	<220>

- [0924] <223> 多变鱼腥藻 PAL引物在位置64上形成半胱氨酸至丝氨酸的取代
[0925] (正向)
[0926] <400> 30
[0927] gcagggtatt caggcatctt ctgattacat taataatgct gttg 44
[0928] <210> 31
[0929] <211> 44
[0930] <212> DNA
[0931] <213> 人工序列
[0932] <220>
[0933] <223> 多变鱼腥藻 PAL引物在位置64上形成半胱氨酸至丝氨酸的取代
[0934] (反向)
[0935] <400> 31
[0936] caacagcatt attaattgtat tcagaagatg cctgaatacc ctgc 44
[0937] <210> 32
[0938] <211> 43
[0939] <212> DNA
[0940] <213> 人工序列
[0941] <220>
[0942] <223> 多变鱼腥藻 PAL引物在位置318上形成半胱氨酸至丝氨酸的取代
[0943] (正向)
[0944] <400> 32
[0945] caagatcggtt actcactccg atcccttccc cagtatttgg ggc 43
[0946] <210> 33
[0947] <211> 43
[0948] <212> DNA
[0949] <213> 人工序列
[0950] <220>
[0951] <223> 多变鱼腥藻 PAL引物在位置318上形成半胱氨酸至丝氨酸的取代
[0952] (反向)
[0953] <400> 33
[0954] gcccacaata ctggggaagg gatcggagtg agtaacgac ttg 43

点形念珠藻 PAL 的基因序列

1	atgaatataa	catctctaca	acagaacata	acgcgttctt	ggcaatacc	tttactaat
61	agttcagatt	caatcgtaac	tgtaggcgat	cgcaatctga	caatcgacga	ggttgtaaat
121	gttgctcgtc	atggaacaca	ggtgcgctta	actgataatg	cagatgtcat	tcggggtgtt
181	caagcatctt	gtgattacat	taacaatgca	gtcgaacacg	cacagccaat	ttacggggtg
241	acatctggct	ttggcggtat	ggcagatggt	gtcatctctc	gcgaacaagc	agcggaaactt
301	cagactaatt	taatttgggt	tctgaaatcc	ggcgcaggaa	acaaattatc	gtagcagac
361	gtgcgtgcag	ctatgctctt	acgtgcaaat	tcacatttgt	atggtgcgtc	tggtatacga
421	ctcgaactta	ttcagcggat	tgaaaacttc	ctcaacgctg	gcgtgacacc	ccatgtcttat
481	gagtttggct	ctatcgggtc	tagcggcgat	ttggtgccat	tatcctacat	tactggggca
541	ctaalcggtc	tagatccctag	ctttacagtt	gacttcgacg	gtaaaagaaat	ggatgccggtt
601	acagccttgt	ctcgtttggg	tttgccaaag	ttgcaattgc	aaccgaaaaga	aggtttagca
661	atgatgaatg	gcacctcagt	catgacagggt	attgcagcta	actgtgtgta	cgatgcgaaa
721	gttttgctcg	ctctgacaaat	gggtgtacac	gccttagcca	tccaagggttt	atacggaaacg
781	aatcaatctt	tccacccggt	tattcatcag	tgcaagccac	atcccgggtca	actatggaca
841	gcagatcaaa	tgttttctct	gctgaaagat	tcatcttttag	ttcgtgaaga	ggttgatggt
901	aaacacgaat	accgtggtaa	agatctgata	caggatcggt	attctctccg	ctgtctggca
961	cagttcatag	ggccaatcgt	tgatggggta	tcagagatta	ccaagcaaat	cgaggtagaa

图1A

点形念珠藻 PAL 的基因序列

1021	atgaactcag	tcaccgataa	cccatgatt	gatgtcgaga	accaagttag	ttatcacggc
1081	ggcaattttc	tcggacagta	tgtgggtgtg	acaatggatc	gcctacgtta	ttacataggg
1141	ctattggcca	aacacatcga	tgtgcagatt	gcacttcttg	tctcgccaga	gttagcaac
1201	ggcttaccac	cctctttagt	tggtaatagc	gatcgcaaaag	ttaatatggg	actcaaaggt
1261	ttgcaaatca	gtggaactc	gattatgcca	ctgttgagct	tctatggaaa	ttccctagcc
1321	gatcgctttc	ctacccacgc	cgagcaattt	aatcaaaaata	ttaacagcca	aggctatat
1381	tccgcaaatt	tgacacgtcg	ttccgtagac	atatttcaga	attatatggc	gatcgcggtg
1441	atgtttggag	ttcaagctgt	tgacctccgc	acataataaga	tgaaagggtca	ttatgatgca
1501	cgtacatgcc	tctcacccaa	tactgtgcag	ttatacacag	cagtcctgca	ggtagttgga
1561	aagccactaa	cgtctgtgcg	tccatacatt	tggaacgaca	acgagcaatg	tttagatgag
1621	catattgccc	ggatttcagc	tgatatcgct	ggtggtggtt	taattgtgca	agcagttgag
1681	catatTTTTT	cgagcttaaa	gtcaacgtaa			

图1A-1

点形念珠藻 PAL 的基因序列

MNITSLQQNITRSWQIPFTNSSDSIVTVGDRNLTIDEVNVNVARH
GTQVRLTDNADVIRGVQASCDYINNAVETAQPIYGVTSGGFGMADVVISREQAAELQT
NLIWFLKSGAGNKLSLADVRAAMLIRANSHLYGASGIRLELIQRIETFLNAGVTPHVV
EFGSIGASGDLVPLSYITGALIGLDPSTVDFDGKEMDAVTALSRGLPKLQLQPKEG
LAMMGTSMVTGIAANCVDYDAKVLLALTMGVHALAIQGLYGTNQSFHPFIHQCKPHPG
QLWTADQMFSLLKDSSLVREELDGKHEYRGKDLIQDRYSLRCLAQFIGPIVDGVSEIT
KQIEVEMNSVTDNPLIDVENQVSYHGGNFLGQYVGVTMDRLRYIIGLLAKHIDVQIAL
LVSPEFSNGLPPSLVGNSDRKVNMGKGLQISGNSIMPLLSFYGNSLADRFPTHAEQF
NQINISQGYISANLTRRSVDIFQNYMAIALMFGVQAVDLRTYKMKGHYDARTCLSPNT
VQLYTAVCEVVGKPLTSVRPYYIWNDEQCLDEHIARISADIAGGGLIVQAVEHIFSSL
KST

图1B

多变鱼腥藻 PAL 的基因序列

1	atgaagacac	tatctcaagc	acaaagcaaa	acctcatctc	aacaattttc	ttttactgga
61	aattcttctg	ccaatgtaat	tattggtaat	cagaaactca	caatcaatga	tggtgcaagg
121	gtagcgcgta	atggcacctt	agtgtcttta	accaataaca	ctgatatatt	gcagggtatt
181	caggcatctt	gtgattacat	taataatgct	gttgaatctg	gggaaccaat	ttatggagtg
241	acatctgggt	ttggcgggat	ggccaatggt	gccatatccc	gtgaacaagc	atctgaactc
301	caaaccaact	tagtttggtt	cctgaaaaca	ggtgcaggga	acaaattacc	cttggcggat
361	gtgcgcgcag	ctatgtctct	gcgtgcaaac	tctcatatgc	gcggtgcac	tggtcatcaga
421	ttagaactta	tcaagcgtat	ggagattttc	cttaacgctg	gtgtcacacc	atatgtgtat
481	gagtttggtt	caattggtgc	aagtgtgat	ttagtgccac	tatcctacat	tactgggttca
541	ctgataggct	tagatcccag	ttttaagggt	gacttcaacg	gtaaaagaat	ggatgcgccca
601	acagctctac	gtcaactgaa	tttgtcacc	ttgacattgt	tgccgaagga	aggcttggcg
661	atgatgaacg	gcacttcagt	catgacaggt	attgcagcaa	actgcgtcta	cgatactcaa
721	attttaactg	cgatcgctat	gggcgttcac	gctctagata	tccaagcttt	aaacggaacc
781	aatcaatcat	tccatccatt	tatccataat	tccaaaccac	atcctgggtca	attatgggca
841	gcagatcaga	tgattttctt	gttagccaat	tcccagttag	ttcgtgatga	gtagatgggt
901	aaacacgatt	atcgtgatca	cgagttgatt	caagatcggt	actcactccg	atgccttccc
961	cagtatttgg	ggccaatcgt	tgatgggaatt	tcccagattg	ccaaacaat	tgaatatcgaa

图2A

多变鱼腥藻 PAL 的基因序列

1021	atcaactcag	tcaccgataa	cccactaatt	gatgttgata	accaagctag	ctatcatgga
1081	ggaaatttcc	tcggacagta	cgtgggtatg	ggaatggatc	acctgcgtta	ctatatggg
1141	ttattggcta	aacacctaga	tgtgcagatt	gccctcctcg	cctcaccaga	gtttagcaat
1201	ggactaccac	catctttatt	aggcaaccga	gaacgtaaag	tcaatatggg	actcaaaggt
1261	ctgcaaatat	gcggtactc	aattatgcca	ctgttgacct	tctatggaaa	ttccatcgcc
1321	gacgccttc	ctaccatgc	agaacaattt	aatcagaaca	tcaacagtca	aggatacact
1381	tcagcgactc	tagcccgccg	ttctgtggat	atcttccaga	attatgtggc	gacgcgtctg
1441	atgtttggag	tccaagctgt	tgacctccgc	acataataaa	agactggtca	ttacgatgca
1501	cgcgcctgtc	tatcacctgc	aactgagcgc	ttatatcag	cagtccgcca	cgtagttgga
1561	caaaaaccaa	cttcagatcg	cccataat	tggaatgata	atgagcaagg	actggatgag
1621	catattgccc	ggatttctgc	tgatatcgct	gctggtggtg	tgattgtgca	agcagttcaa
1681	gatattctac	cctgcttgca	ttaa			

图2A-1

多变鱼腥藻 PAL 的蛋白质序列

1	mktlsqaqsk	tssqqfsftg	nssanviign	qkltindvar	varngtlvsl	tnntdilqgi
61	qascdyinna	vesgepiygv	tsgfggmanv	aisreqasel	qtnlvwflkt	gagnklplad
121	vraamliran	shmrqasgir	lelikrmeif	lnagvtpyvy	efgsigasgd	lvplsyitgs
181	ligldpsfkv	dfngkemdap	talrqlnlsp	ltllpkegla	mmngtsvmtg	iaancvydtq
241	iltaiamgvh	aldiaqlngt	nqsfhpfihn	skphpgqlwa	adqmisl lan	sqlvrdeIdg
301	khdyrdheli	qdryslrcIp	qylgpivdgi	sqiakqieie	insvtdnpli	dvdnqasyhg
361	gnflgqyvgm	gmdhlryyig	llakhldvqi	allaspefsn	glppsllgnr	erkvnmglkg
421	lqicgnsimp	lltfygnsia	drfpthaeqf	nqninsqgyt	satlarrrsd	ifqnyvaial
481	mfgvqvavdlr	tykktghyda	racIspater	lysavrhvvg	qkptsdrpyi	wndneqglde
541	hiarisadia	aggvivqavq	dilpchl			

图2B

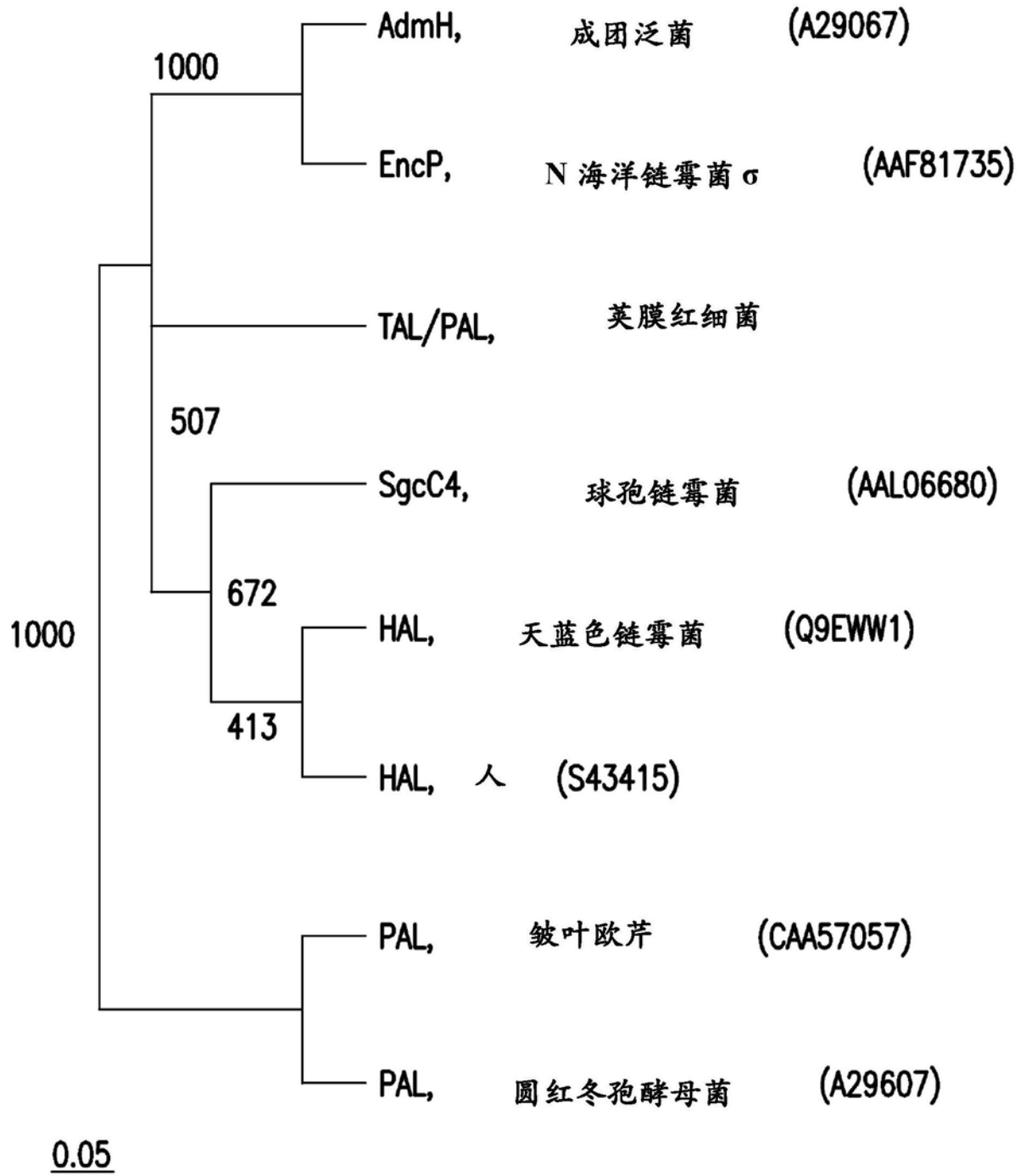


图3

点形念珠藻 PAL (SEQ ID NO:4) 和多变鱼腥藻 PAL (SEQ ID NO:2) 与 EncP PAL (SEQ ID. No:5) 和恶臭假单胞菌 HAL (SEQ ID NO:6) 的蓝细菌蛋白质序列的比对。对应于 PAL 或者 HAL 活性的活性位点残基利用下划线显著标出。

Avar03005300	MKTL SQAQ SK	TSSQ QFS FTG	NSSAN VI IGN	QKL TIND VAR	VARNGTLVSL
Npun02008223	MNITSLQ QNI	TRSWQIPFTN	SSDSIVTVGD	RNLTIDEV VN	VARHGTQVRL
EncP			..MTFV IELD	MNVTL DQLED	AARQ RT PVEL
PputidaHAL			..MTEL TLKP	GTL TLAQLRA	IHAAPVRL QL
Avar03005300	TNNTDILQGI	QASCDYINNA	VESGEPIYGV	TSGFGG MANV	AISREQ ASEL
Npun02008223	TDNADVIRGV	QASCDYINNA	VETAQPIYGV	TSGFGG MADV	VISREQ AAEL
EncP	S.. APVRSRV	RASRDVLVKF	VQDERVIYGV	NTSMGGFVDH	LVPV SQARQL
PputidaHAL	D.. ASAAPAI	DASVACVEQI	IAEDRTAYGI	NTGFGL LAST	RIASHD LENL
Avar03005300	QTNLVW FL KT	GAGNKLPLAD	VRAAMLLRAN	SHMRGASGIR	LELIK RMEIF
Npun02008223	QTNLIW FL KS	GAGNKL SLAD	VRAAMLLRAN	SHLYGASGIR	LELIQ RIETF
EncP	QENLINAV AT	NVGAYLDDTT	ARTIMLSRIV	SLARGNSA IT	PANLDKL VAV
PputidaHAL	QRSLVL SHAA	GIGAPLDDDL	VRLIMV LKIN	SLSRGFSGIR	RKVIDAL IAL

图4

Avar03005300	LNAGVTPYVY	EFGSIGASGD	LVPLSYITGS	LIGLDPSFKV	DFNGKEMDAP
Npun02008223	LNAGVTPHVY	EFGSIGASGD	LVPLSYITGA	LIGLDPSFTV	DFDGKEMDAV
EncP	LNAGIVPCIP	EKGS LGTSGD	LGPLAAIALV	CAGQW...KA	RYNGQIMPGR
PputidaHAL	VNAEVYPHIP	LKGSV GASGD	LAPLATMSLV	LLGEG...KA	RYKGQWLSAT
Avar03005300	TALRQLNLSP	LTLLPKEGLA	MMNGTSVMTG	IAANCVYDTQ	ILTAIAMGVH
Npun02008223	TALSRLGLPK	LQLQPKEGLA	MMNGTSVMTG	IAANCVYDAK	VLLALTMGVH
EncP	QALSEAGVEP	MELSYKDGLA	LINGTSGMVG	LGTMLQAAR	RLVDRYLQVS
PputidaHAL	EALAVAGLEP	LTAAKEGLA	LLNGTQASTA	YALRGLFYAE	DLYAAAIACG
Avar03005300	ALDIQALNGT	NQSFHPFIHN	SKPHPGQLWA	ADQMISLLAN	SQLVRDEL DG
Npun02008223	ALAIQGLYGT	NQSFHPFIHQ	CKPHPGQLWT	ADQMFSLLKD	SSLVREELDG
EncP	ALSVEGLAGM	TKPFDPRVHG	VKPHRGQRQV	ASRLWEGGLAD	SHLAVNELDT
PputidaHAL	GLSVEAVLGS	RSPFDARIHE	ARGQRGQIDT	AACFRDLLGD	SSEVS.....

图4-1

Avar03005300	K	HDYRDHELIQ	DRYSLRCLPQ	YLGPIVDGIS	QIAKQIEIEI
Npun02008223	K	HEYRGKDLIQ	DRYSLRCLAQ	FIGPIVDGVS	EITKQIEVEM
EncP	EQTLAGEMGT	VAKAGSLAIE	DAYSIRCTPQ	ILGPVVDVLD	RIGATLQDEL
PputidaHAL		LSHKNCCKVQ	DPYSLRCQPQ	VMGACLTQLR	QAAEVLGIEA
Avar03005300	NSVTDNPLID	VDNQASYHGG	NFLGQYVGMG	MDHLRYYIGL	LAKHLDVQIA
Npun02008223	NSVTDNPLID	VENQVSYHGG	NFLGQYVGV	MDRLRYYIGL	LAKHIDVQIA
EncP	NSSNDNPIVL	PEEAQVFNHG	HFHGQYVAMA	MDHLNMALAT	VTNLANRRVD
PputidaHAL	NAVSDNPLVF	AAEGDVISGG	NFHAEPVAMA	ADNLALAI	IGSLSERRIS
Avar03005300	LLASPEFSNG	LPPSLLGNRE	RKVNMLKGL	QICGNSIMPL	LTIFYGNSIAD
Npun02008223	LLVSPEFSNG	LPPSLVGNSD	RKVNMLKGL	QISGNSIMPL	LSFYGNSLAD
EncP	RFLDKSNSNG	LPAFLCREDP	.GLRLGLMGG	QFMTASITAE	TRTLTIPMSV
PputidaHAL	LMDKHMS.Q	LPPFLVENG.	.GVNSGFMIA	QVTAALASE	NKALSHPHSV
Avar03005300	RFPTHAEQFN	<u>Q</u> NINSQGYTS	ATLARRSVDI	FQNYVAIALM	FGVQAVDLRT
Npun02008223	RFPTHAEQFN	<u>Q</u> NINSQGYIS	ANLTRRSVDI	FQNYMAIALM	FGVQAVDLRT
EncP	QSLTSTADF.	<u>Q</u> DIVSFGFVA	ARRAREVLTN	AAYVAFELL	CACQAVDIRG
PputidaHAL	DSLPTSANQ.	<u>E</u> DHVSMAFPA	GKRLWEMAEN	TRGVPAIEWL	GACQGLDLRK

图4-2

Avar03005300	YKKTGHYDAR	ACLSPATERL	YSAVRHVVGQ	KPTSDRPYIW	NDNEQQLDEH
Npun02008223	YKMKGHYDAR	TCLSPNTVQL	YTAVCEVVGK	PLTSVRPYIW	NDNEQQLDEH
EncP	ADKL.....	...SSFTRPL	YERTRKIVP.	F	FDRDEITIDY
PputidaHAL	GLKT.....	...SAKLEKA	RQALRSEVA.	H	YDRDRFFAPD
Avar03005300	IARISADIAA	GGVIVQAVQD	ILPCLH..		
Npun02008223	IARISADIAG	GGLIVQAVEH	IFSSLKST		
EncP	VEKLAADLIA	GEPVDAAVAA	H.....		
PputidaHAL	IEKAVELLAK	GSLTGLLPAG	VLPSL...		

图4-3

AvPAL 变异体 (半胱氨酸突变体) 的蛋白质序列

A. AvPAL_C64S (SEQ ID NO:7)

MKTL SQAQSKTSSQQFSFTGNSSANV IIGNQKL TINDVARVARNGLVSLTNNTDILQGIQAS SDYINNA
VESGEPIYGVTS GFGGMANVAISREQASELQTNL VWFLKTGAGNKLPLADVRAAMLLRANSHMRGASGIR
LELIKRM EIFLNAGVTPYVYEFSGISGASGDLVPLSYITGSLIGLDPSFKVDFNGKEMDAPTALRQLNLSP
LTLLPKEGLAMMNGTSVMTGIAANCVYDTQILTAIAMGVHALDIQALNGTNQSFHPFIHNSKPHPGQLWA
ADQMISLLANSQVRDEL DGKHDYRDHEL IQDRYSLRCLPQYLGPIVDGISQIAKQIEIEINSVTDNPLI
DVDNQASYHGGNFLGQYVGMGMDHLRYYIGLLAKHLDVQIALLASPEFSNGLPPSLLGNRERKVNMGKKG
LQICGNSIMPLLTFYGNSIADRFPTHAEQFNQINSQGYTSATLARRSVDIFQNYVAIALMFGVQAVDLR
TYKKTGHYDARACLSPATERLYSAVRHVVGQKPTSDRPYIWNDNEQGLDEHIARISADIAAGGVIVQAVQ
DILPCLH

图5A

AvPAL 变体 (半胱氨酸突变体) 的蛋白质序列

B. AvPAL_C318S (SEQ ID NO:8)

MKTLSQAQSKTSSQQFSFTGNSSANVIIGNQKLTINDVARVARGTLVSLTNNTDILQGIQASCDYINNA
 VESGEPYGVTSFGGGMANVAISREQASELQTNLVWFLKTGAGNKLPLADVRAAMLLRANSHMRGASGIR
 LELIKRMEIFLNAGVTPYVVEFGSIGASGDLVPLSYITGSLIGLDPSEKVDENGKEMDAPTALRQLNLSP
 LTLLPKEGLAMMNGTSVMTGIAANCVYDTQILTAIAMGVHALDIQALNGTNQSFHPIHNSKPHPGQLWA
 ADQMISLLANSQVRDELGKHDYRDHEL IQDRYSLRSLPQYLGPIVDGISQIAKQIEIEINSVTDNPLI
 DVDNQASYHGGNFLGQYVGMGMDHLRYIIGLLAKHLDVQIALLASPEFSNGLPPSLLGNRERKVNMLKG
 LQICGNSIMPLLTFYGNSIADRFPTHAEQFNQINSQGYTSATLARRSVDIFQNYVAIALMFGVQAVDLR
 TYKKTGHYDARACLSPATERLYSAVRHVVGQKPTSDRPYIWNDNEQGLDEHIARISADIAAGGVIVQAVQ
 DILPCLH

图5B

AvPAL 变异体 (半胱氨酸突变体) 的蛋白质序列

C. AvPAL_C503S (SEQ ID NO:9)

MKTLSQAQSKTSSQQFSFTGNSSANV I I G N Q K L T I N D V A R V A R N G T L V S L T N N T D I L Q G I Q A S C D Y I N N A
 V E S G E P I Y G V T S G F G G M A N V A I S R E Q A S E L Q T N L V W F L K T G A G N K L P L A D V R A A M L L R A N S H M R G A S G I R
 L E L I K R M E I F L N A G V T P Y V Y E F G S I G A S G D L V P L S Y I T G S L I G L D P S F K V D F N G K E M D A P T A L R Q L N L S P
 L T L L P K E G L A M M N G T S V M T G I A A N C V Y D T Q I L T A I A M G V H A L D I Q A L N G T N Q S F H P F I H N S K P H P G Q L W A
 A D Q M I S L L A N S Q L V R D E L D G K H D Y R D H E L I Q D R Y S L R C L P Q Y L G P I V D G I S Q I A K Q I E I E I N S V T D N P L I
 D V D N Q A S Y H G G N F L G Q Y V G M G M D H L R Y Y I G L L A K H L D V Q I A L L A S P E F S N G L P P S L L G N R E R K V N M G L K G
 L Q I C G N S I M P L L T F Y G N S I A D R F P T H A E Q F N Q N I N S Q G Y T S A T L A R R S V D I F Q N Y V A I A L M F G V Q A V D L R
 T Y K K T G H Y D A R A S L S P A T E R L Y S A V R H V V G Q K P T S D R P Y I W N D N E Q G L D E H I A R I S A D I A A G G V I V Q A V Q
 D I L P C L H

图5C

AvPAL 变异体 (半胱氨酸突变体) 的蛋白质序列

D. AvPAL_C565S (SEQ ID NO:10)

MKTL^SQAQSKTSSQQFSFTGNSSANV^IIIGNQKLTINDVARV^RNGTLVSLTNNTDILQGIQASCDYINNA
VESGEPIYGVTS^GGFGGMANVAISREQASELQTNLVWFLKTGAGNKLPLADVRAAMLLRANSHMRGASGIR
LELIK^RMEIFLNAGVTPYVYEF^GSGIGASGDLVPLSYITGSLIGLDP^SFKVDFNGKEMDAPTALRQLNLS^P
LTLLPKEGLAMMNGTSVMTGIAANCVYDTQILTAI^AMGVHALDIQALNGTNQSFH^PFIHNSKPHPGQLWA
ADQMISLLANSQ^LVRDEL^DGKHDYRDHEL IQDRYSLRCLPQYLGPIVDGISQIAKQIEIEINSVTDNPLI
DVDNQASYHGGN^FLGQYVGMGMDHLRYYIGLLAKHLDVQIALLASPEFSNGLPPSLLGNRERKVN^MGLKG
LQICGNSIMPL^LTFYGNSIADRFPT^HAEEFNQINSQGYTSATLARRSV^DIFQNYVAIALMFGVQAVDLR
TYKKTGHYDARACLS^PATERLYSAVRHVVGQKPTSDR^PYIWN^DNEQGLDEHIARISADIAAGGVIVQAVQ
DILP^SLH

图5D

AvPAL 变异体 (半胱氨酸突变体) 的蛋白质序列

E. AvPAL_C565SC503S (SEQ ID NO:11)

MKTLSQAQSKTSSQQFSFTGNSSANVIIGNQKLTINDVARVARNGLVSLTNNTDILQGIQASCDYINNA
 VESGEPIYGVTSFGGGMANVAISREQASELQTNLVWFLKTGAGNKLPLADVRAAML RANSHMRGASGIR
 LELIKRMEIFLNAGVTPYVYEFSGISGASGDLVPLSYITGSLIGLDPFKVDFNGKEMDAPTALRQLNLSP
 LTLLPKEGLAMMNGTSVMTGIAANCVDYDTQILTAIAMGVHALDIQALNGTNQSFHPFIHNSKPHPGQLWA
 ADQMISLLANSQVRDEL DGKH DYRDHEL IQDRYSLRCLPQYLGPIVDGISQIAKQIEIEINSVTDNPLI
 DVDNQASYHGGNFLGQYVGMGMDHLRYYIGLLAKHLDVQIALLASPEFSNGLPPSLLGNRERKVMGLKG
 LQICGNSIMPLLLTFYGNSIADRFPTHAEQFNQINSQGYTSATLARRSVDIFQNYVAIALMFGVQAVDLR
 TYKKTGHYDARASLSPATERLYSAVRHVVGQKPTSDRPYIWNDNEQGLDEHIARISADIAAGGVIVQAVQ
 DILPSLH

图5E

37°C 储存的 AvPAL 变异体的比活

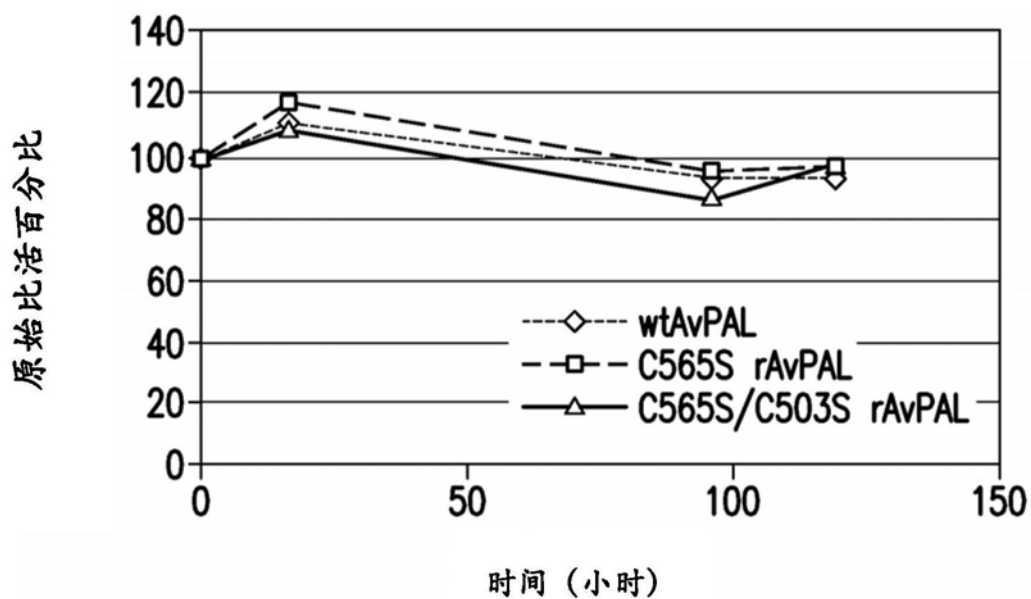


图6A

37°C 时 AvPAL-PEG 变异体的稳定性

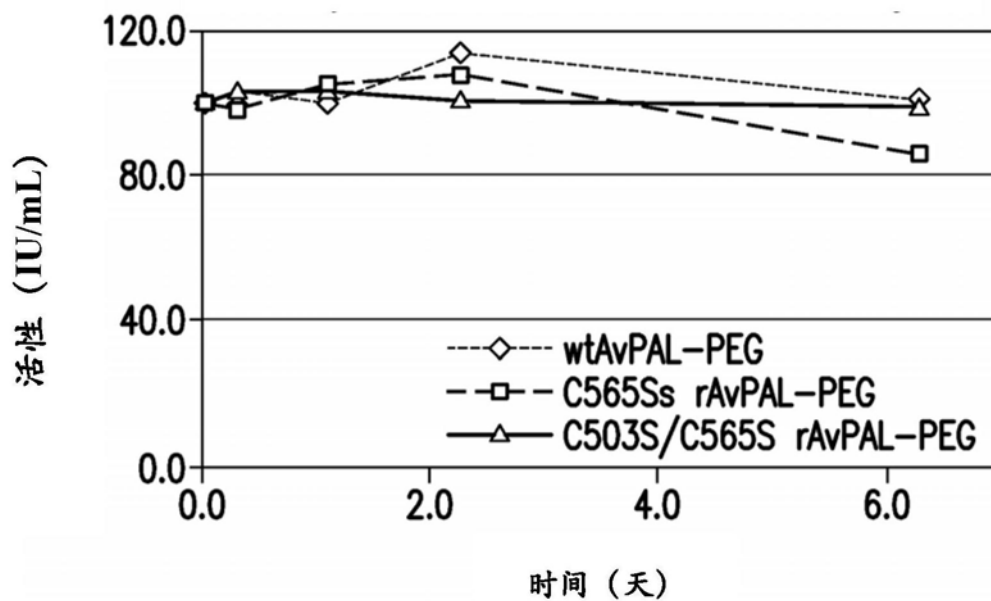


图6B

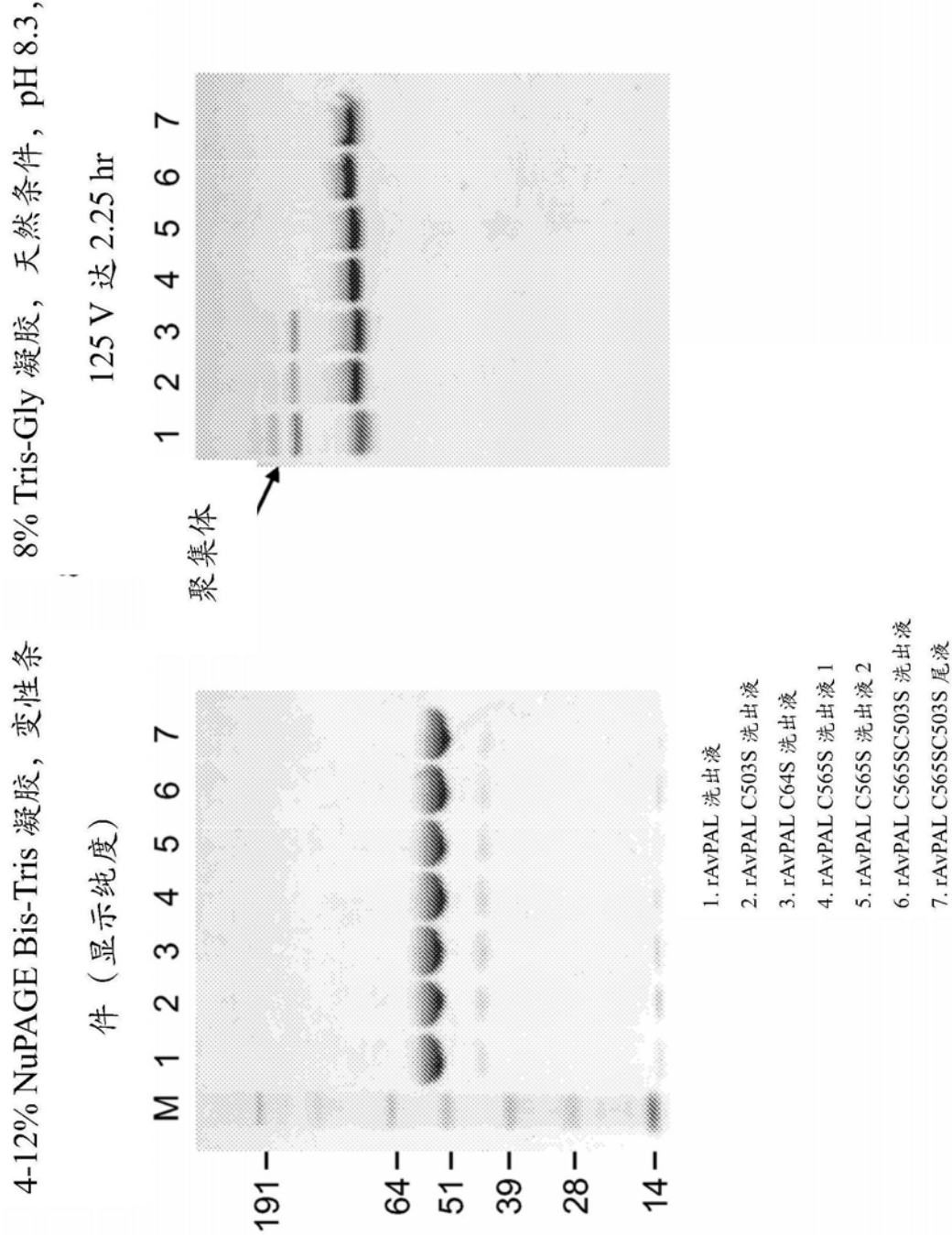


图7A

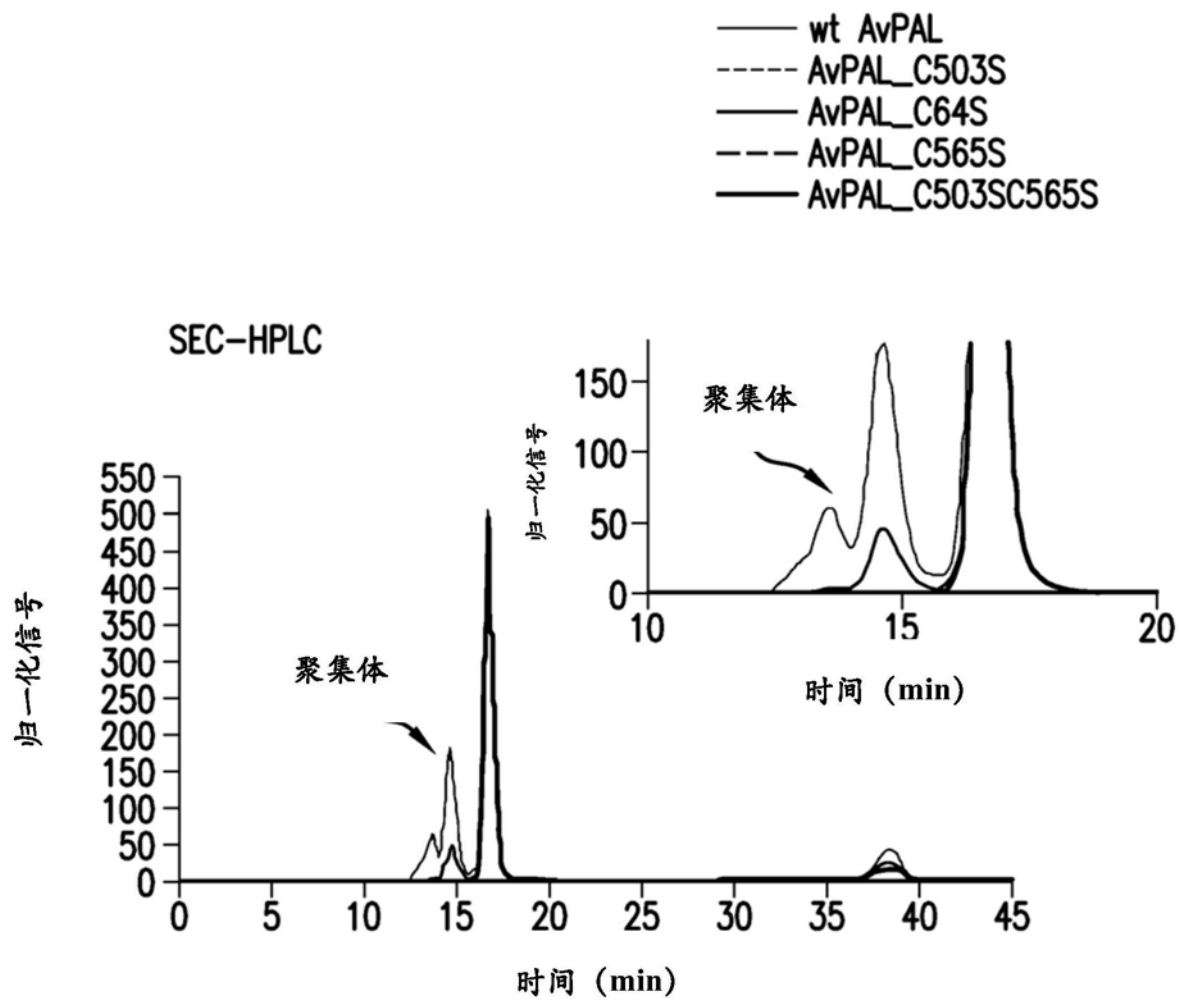


图7B

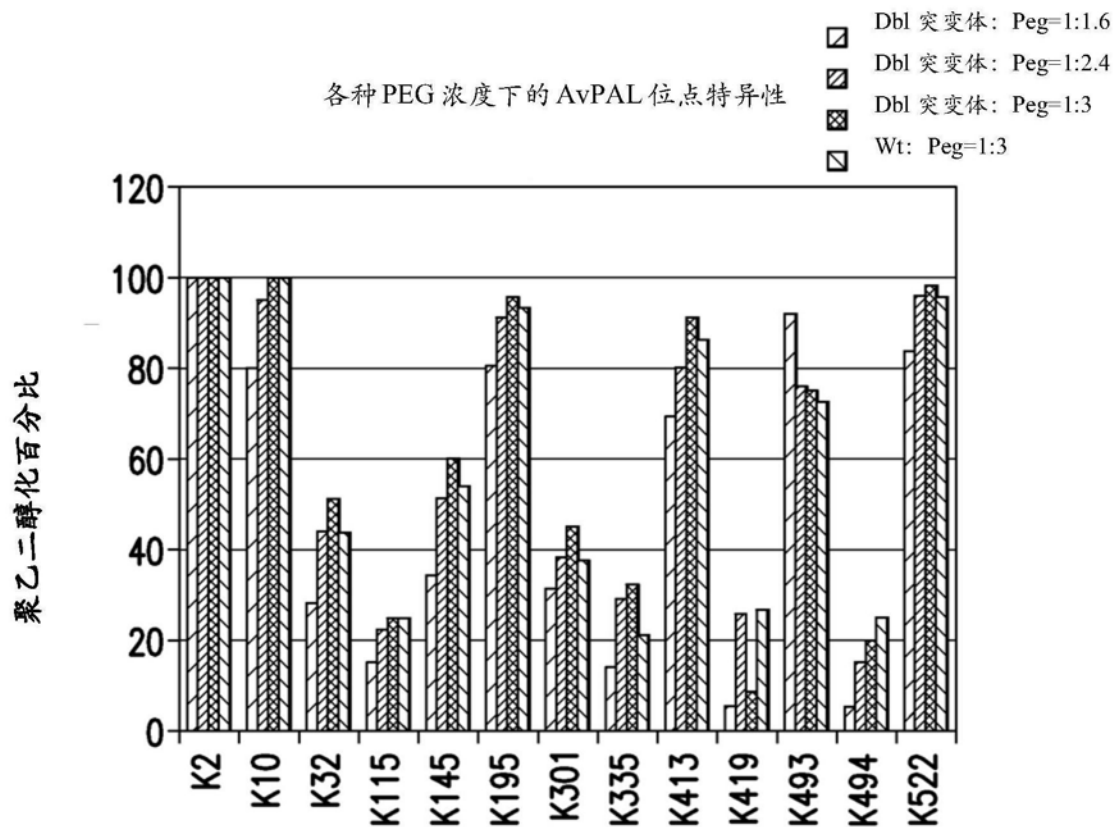


图8

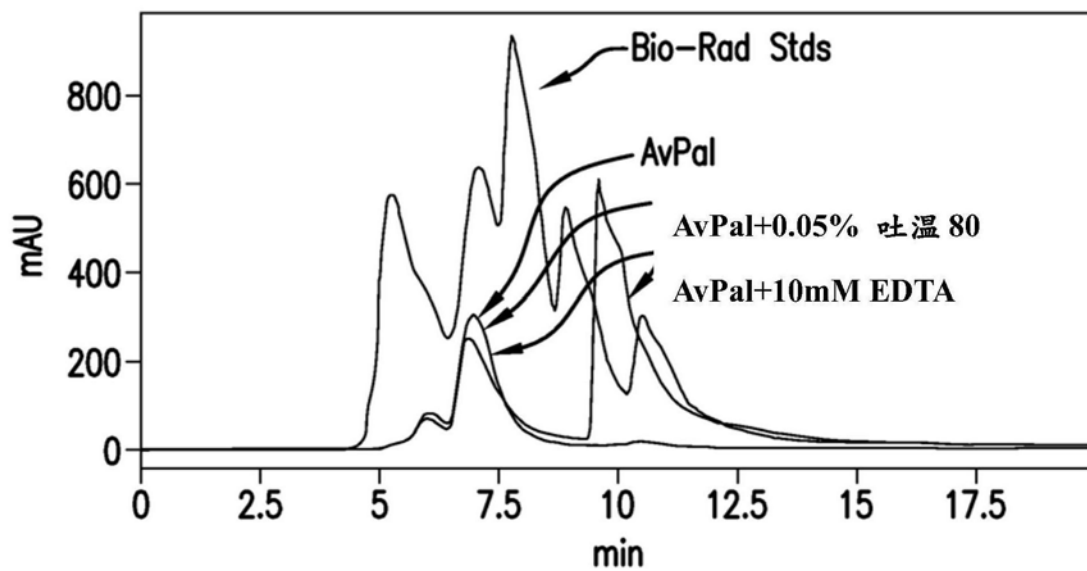


图9

用 DTT 还原 AvPal，然后在配制缓冲液中脱盐

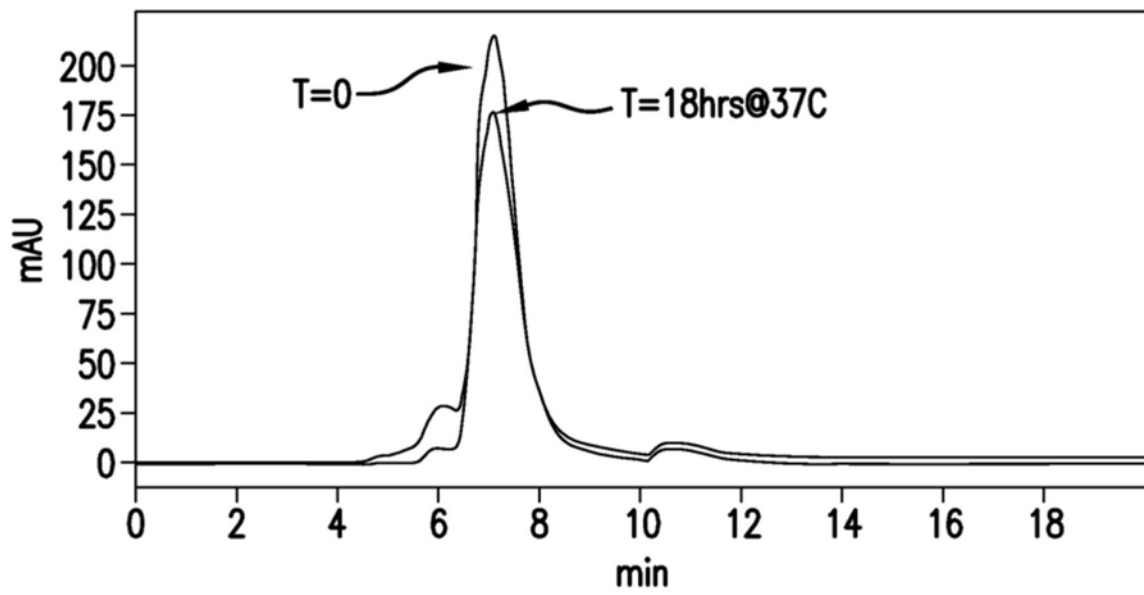


图10A

用 DTT 还原 AvPal，通过 NEM 修饰表面半胱氨酸，然后脱

盐进入配制缓冲液

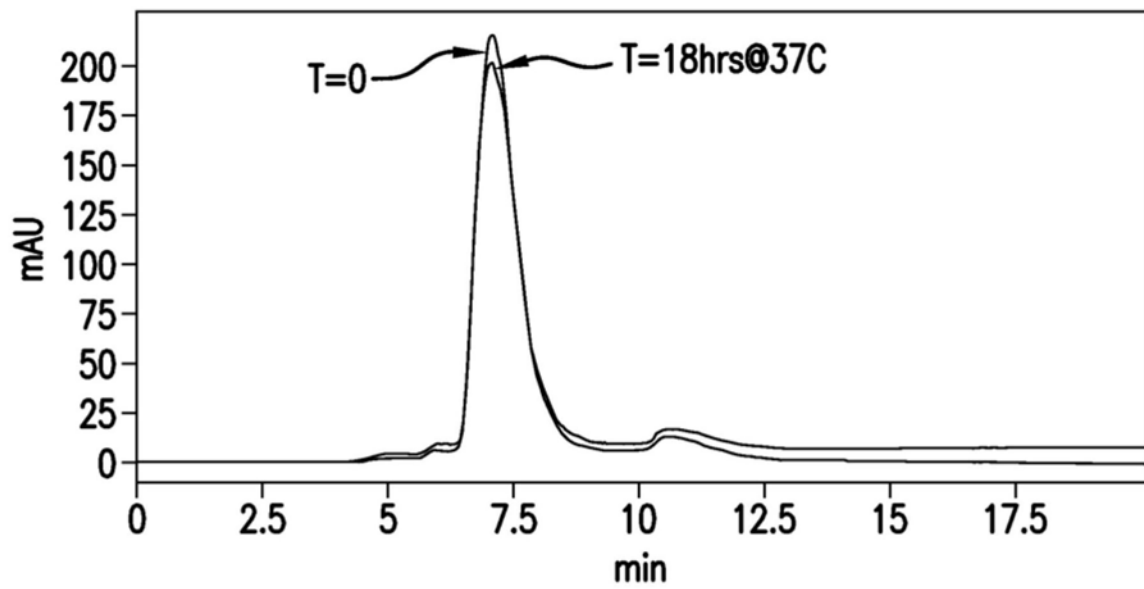


图10B

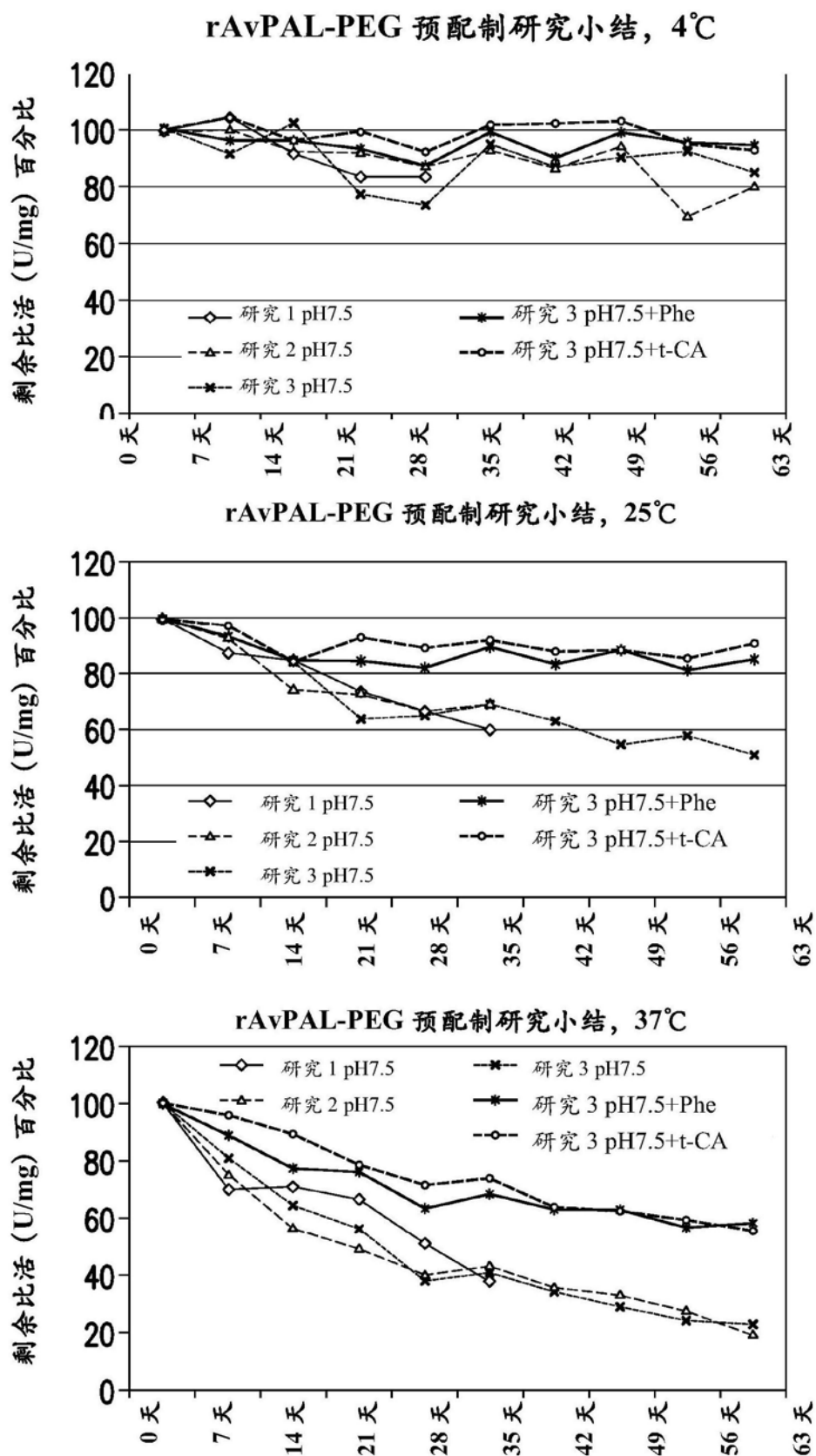


图11

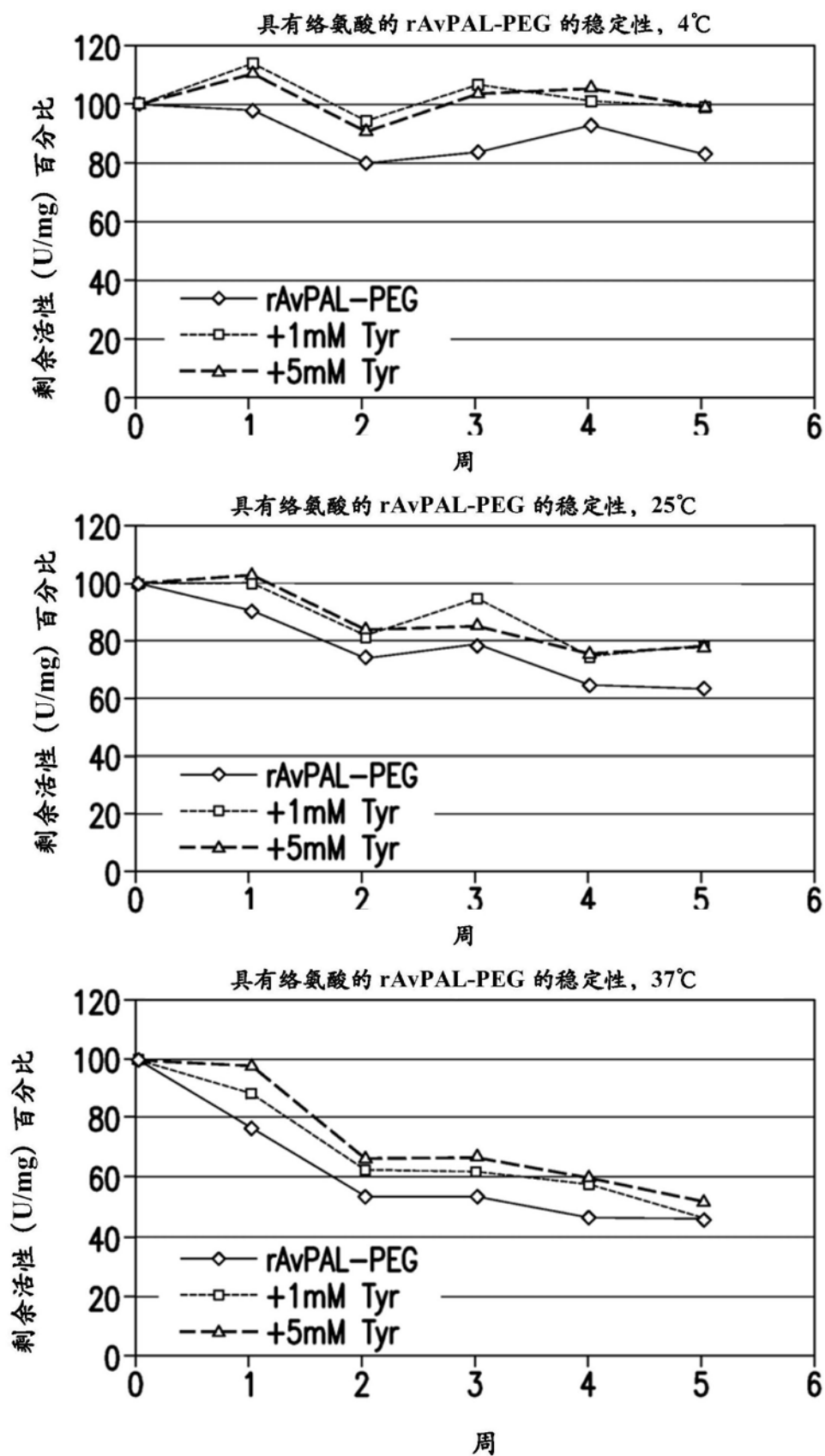


图12

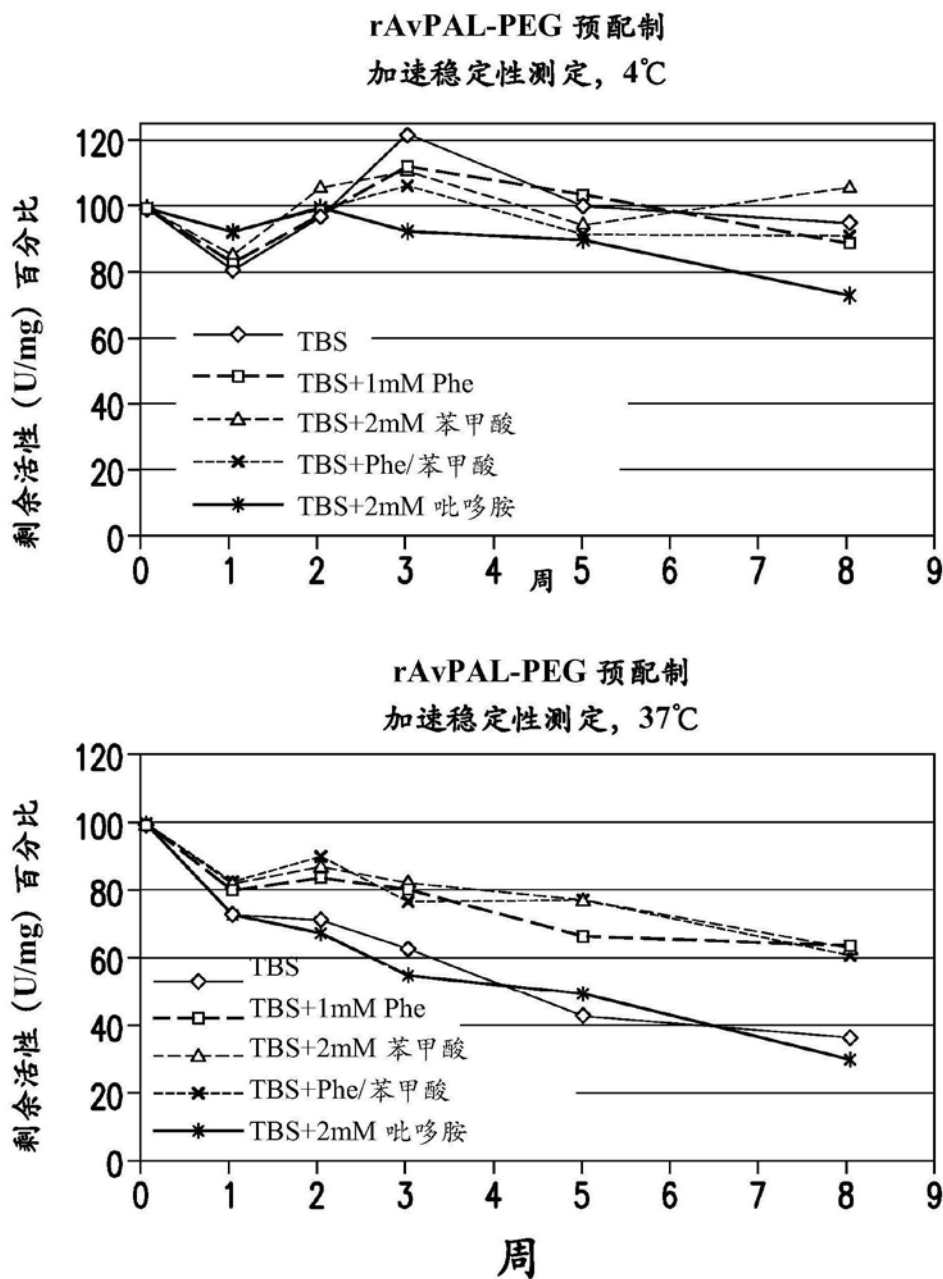


图13A

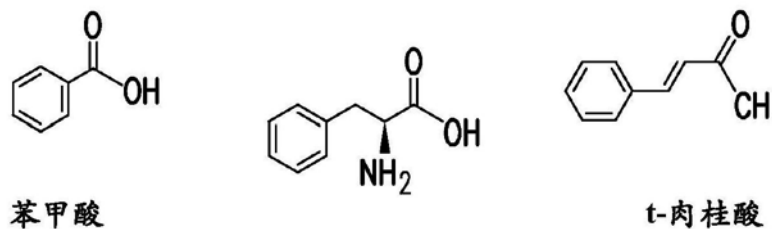
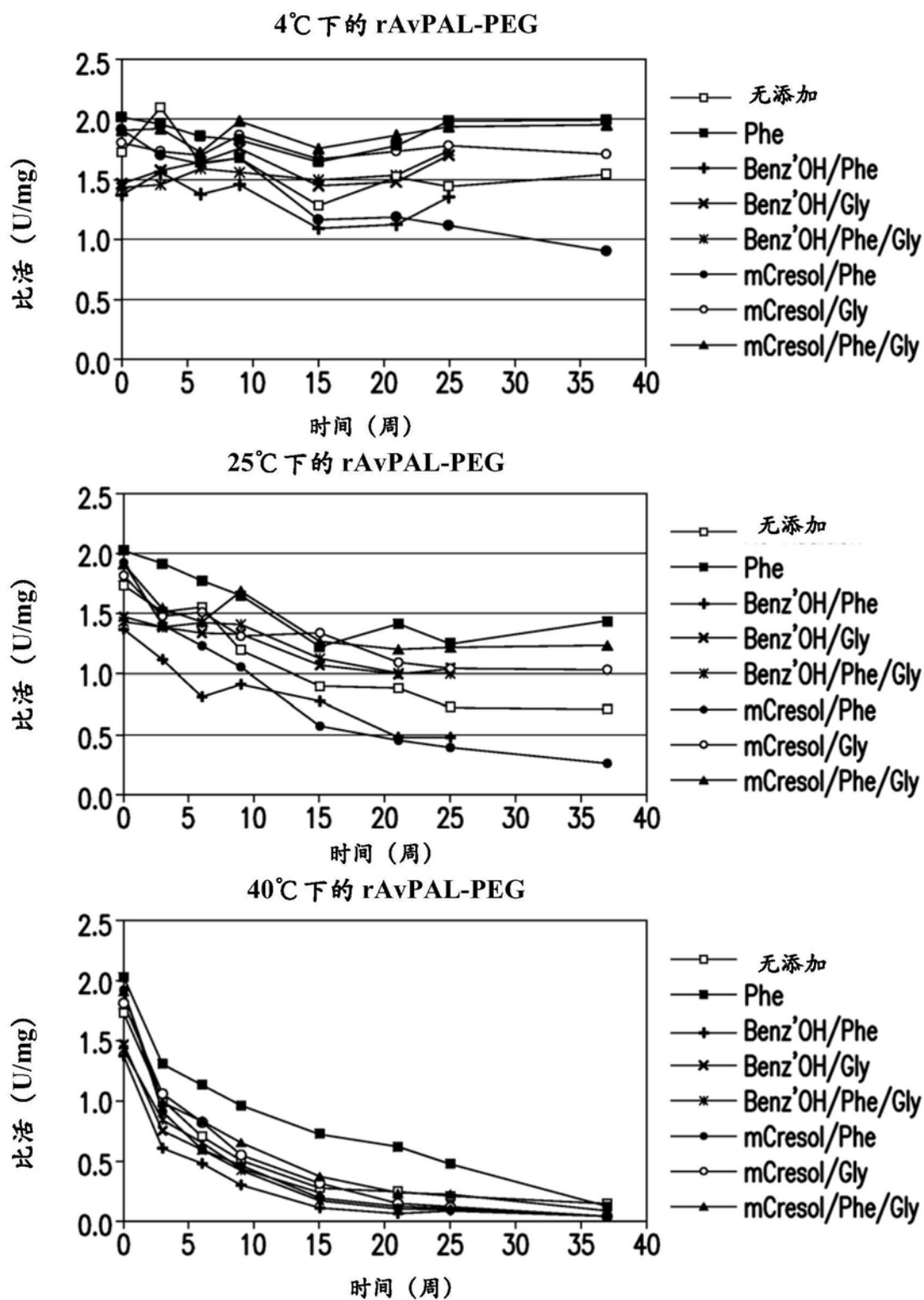


图13B



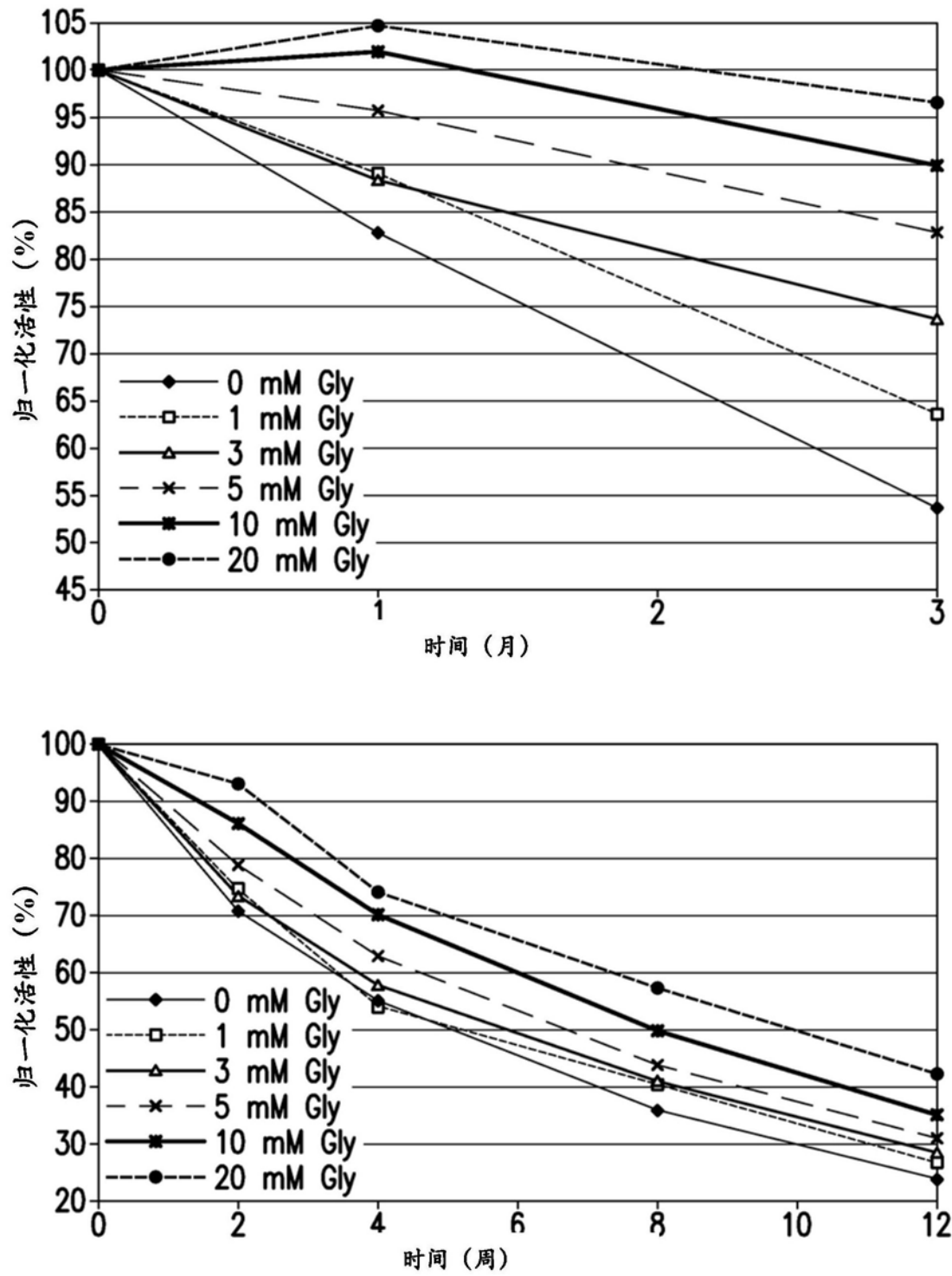


图15A

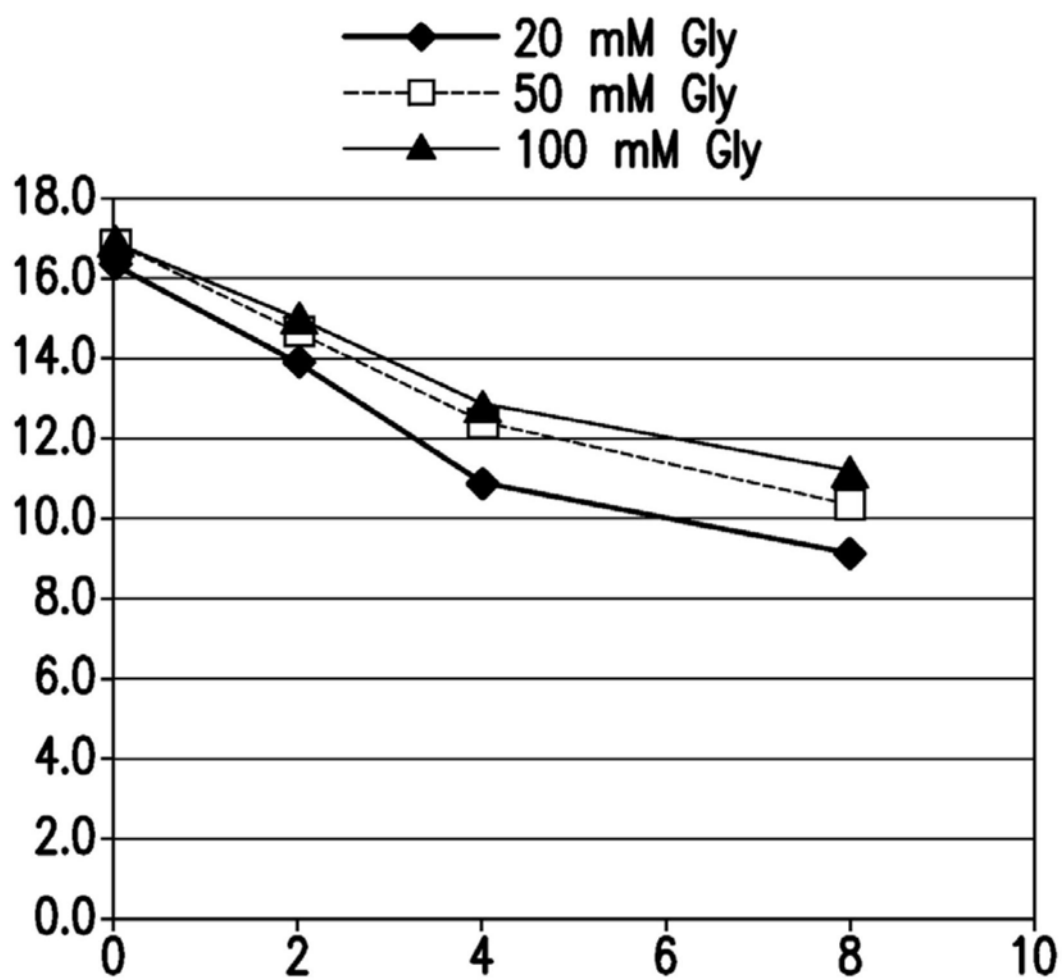


图15B

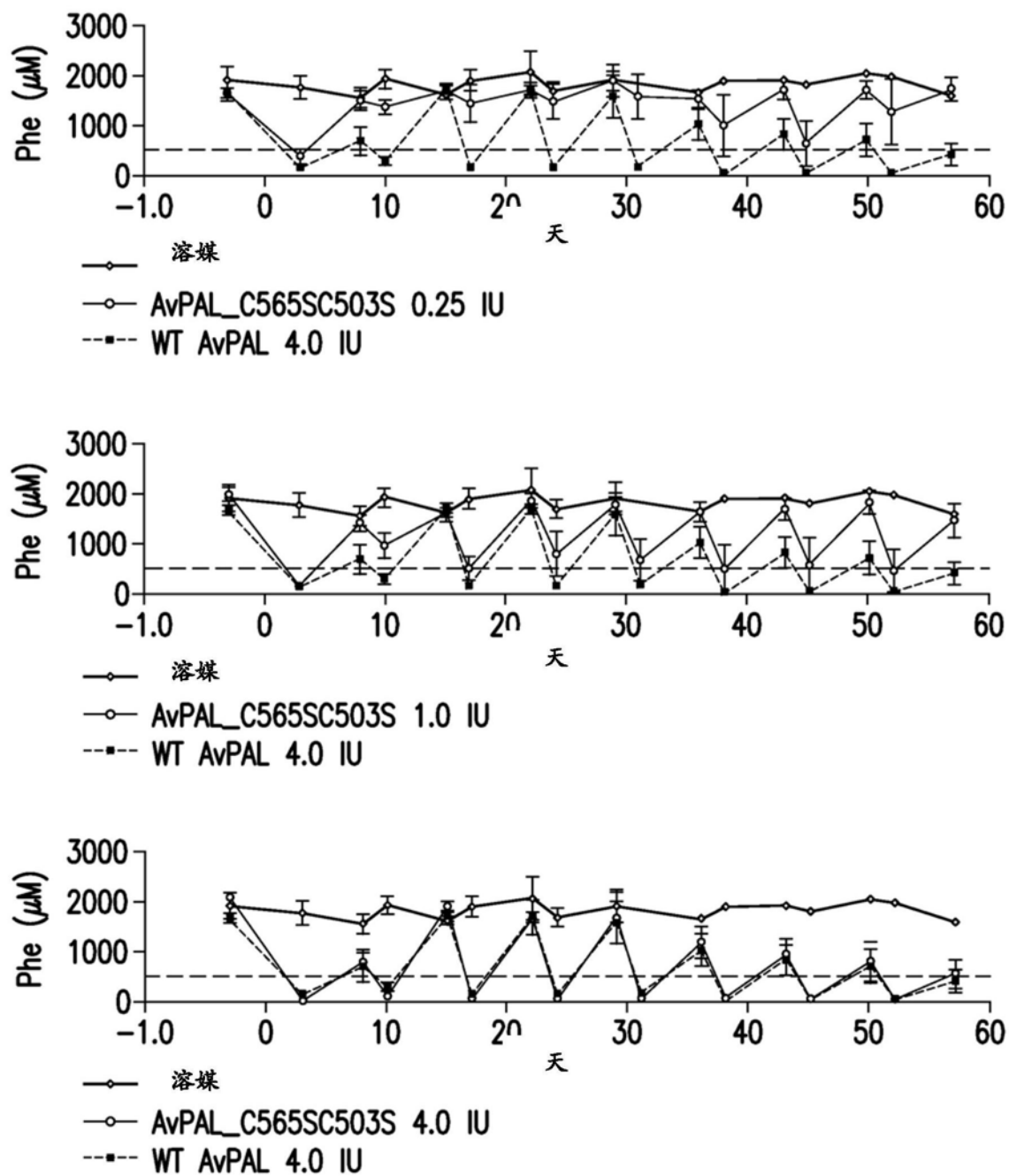


图16

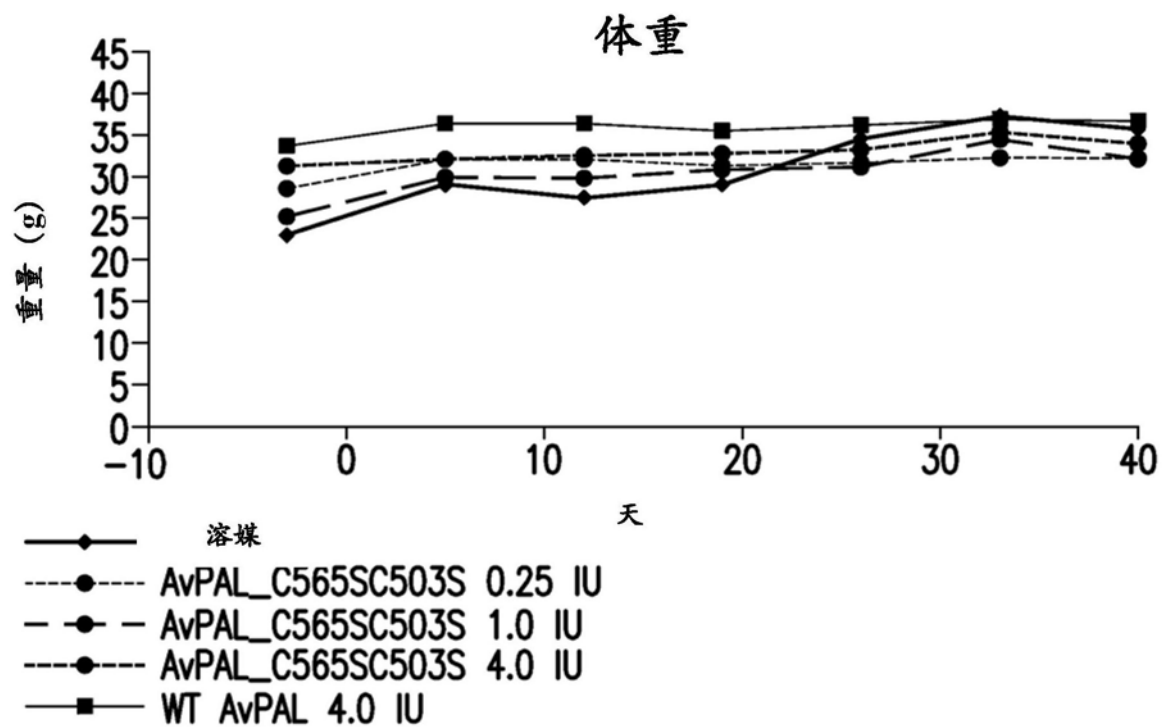


图17

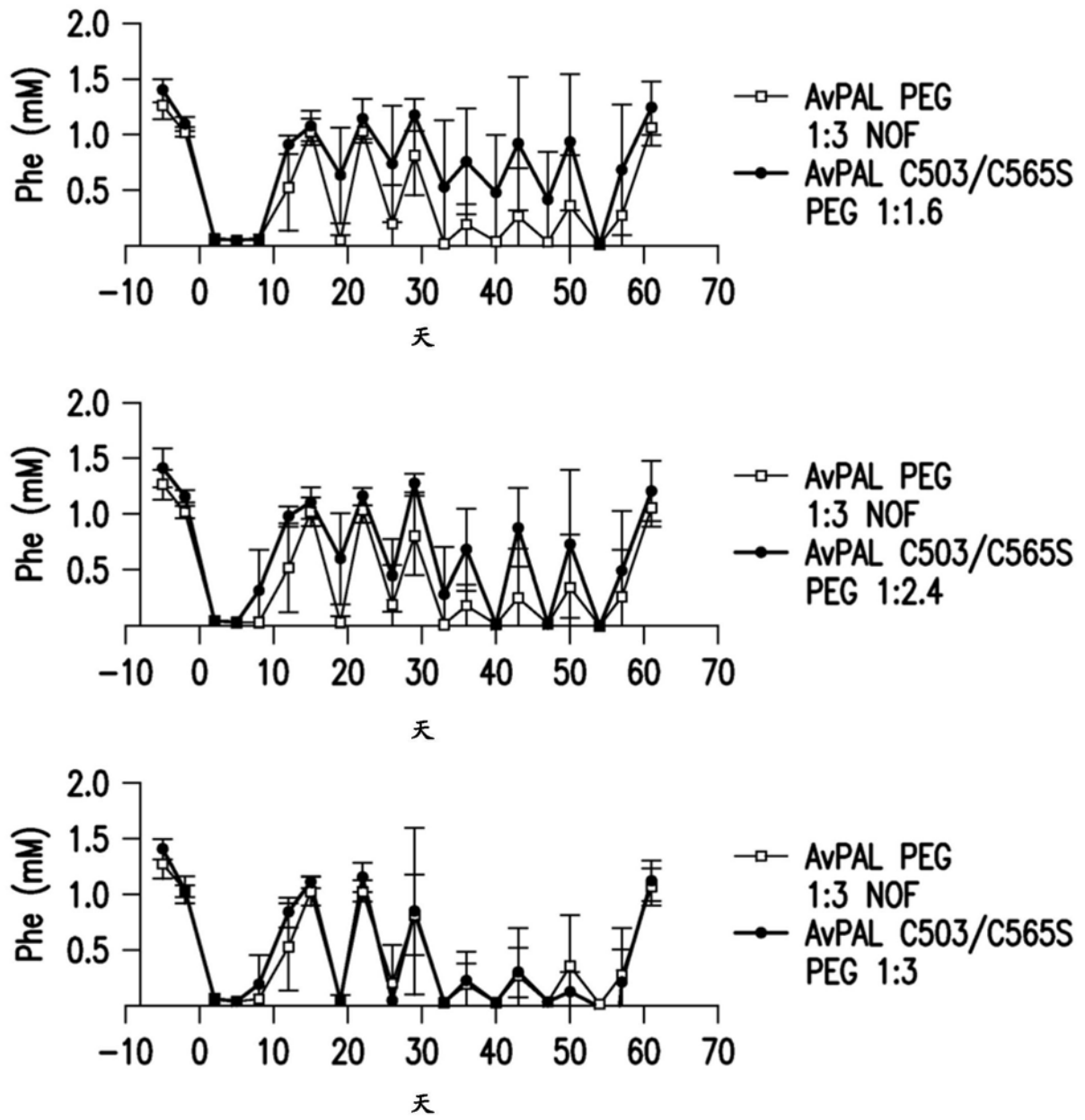


图18

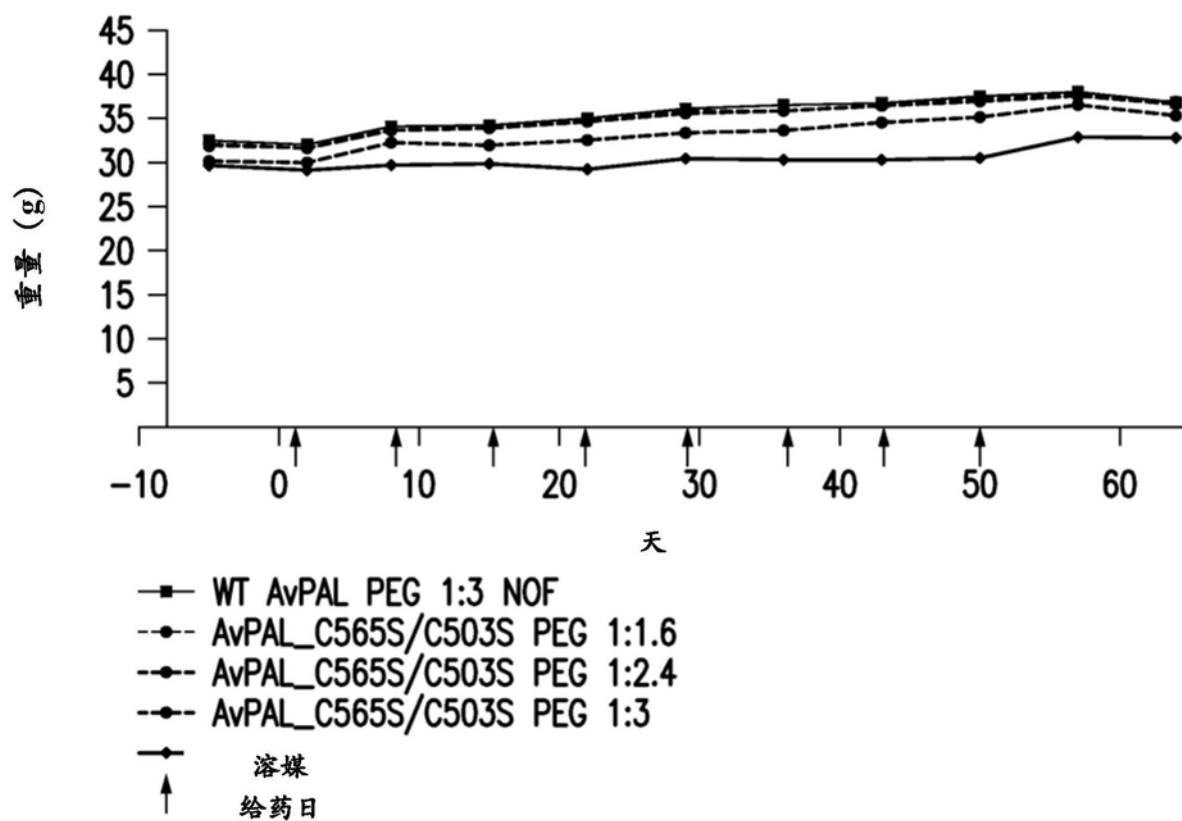


图19

单次皮下注射之后

食蟹猴的血浆中 AvPAL_C565SC503S 的浓度

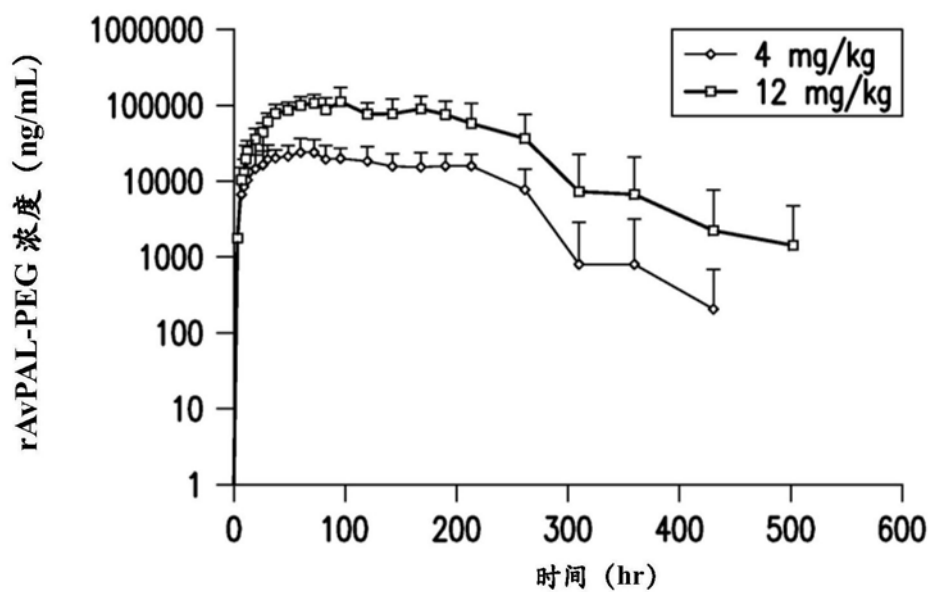


图20A

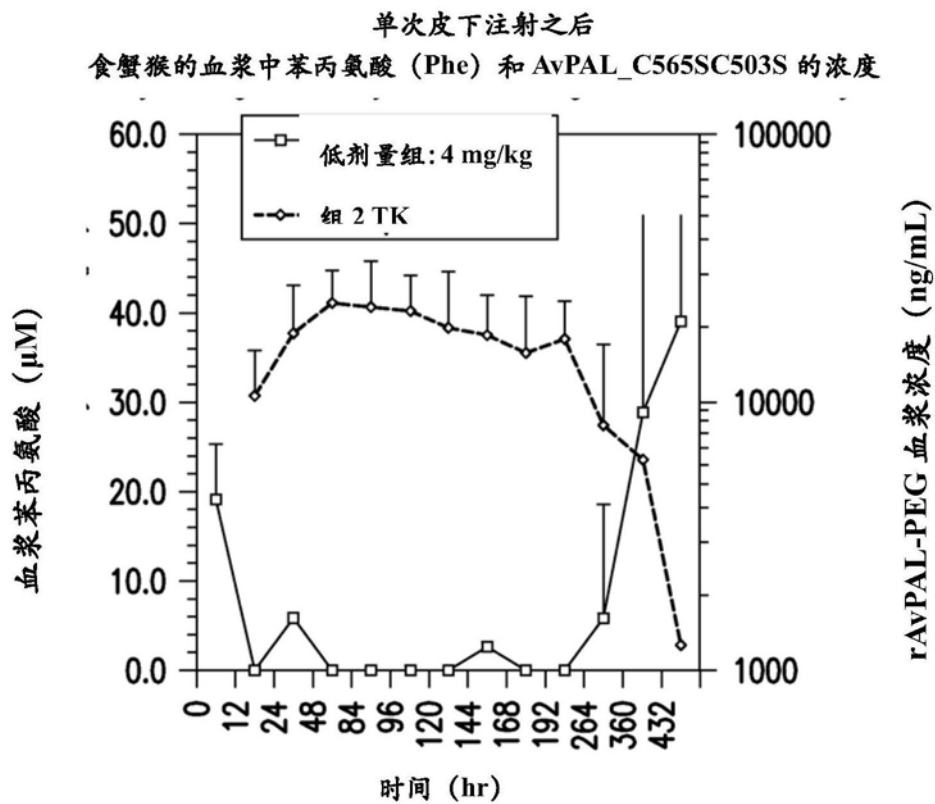


图20B

单次皮下注射之后

大鼠的血浆中 AvPAL_C565SC503S 的浓度

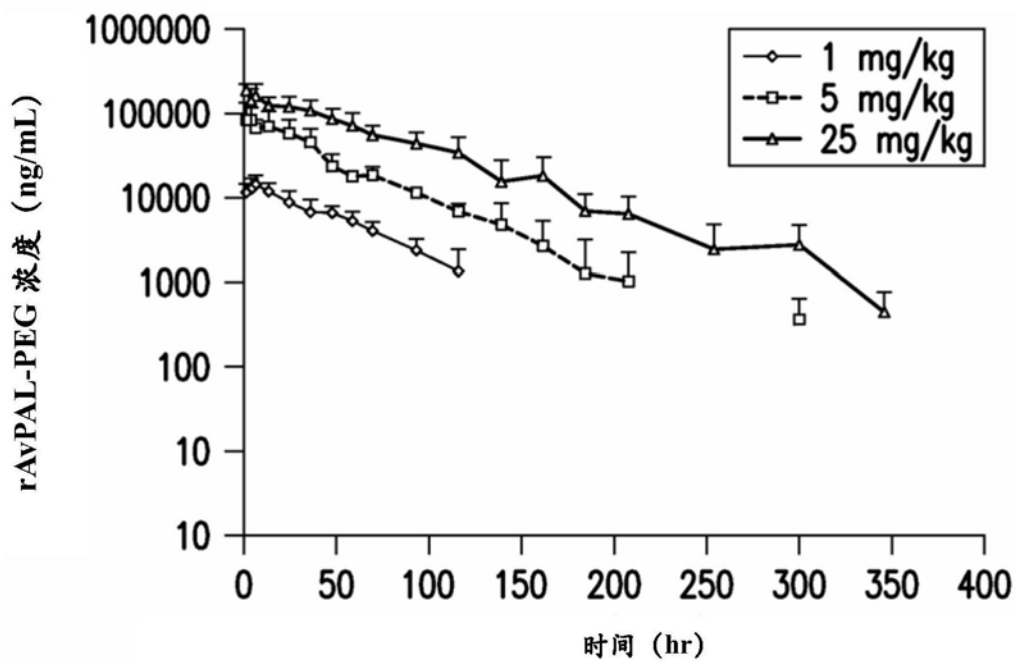


图21A

单次皮下注射之后

大鼠的血浆中 AvPAL_C565SC503S 的浓度

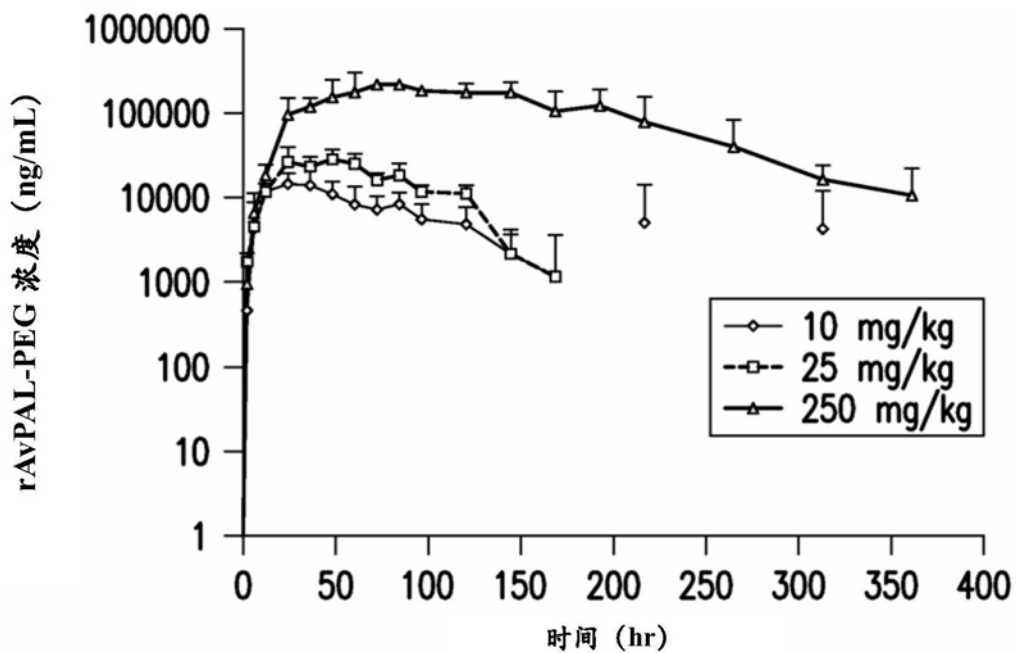


图21B

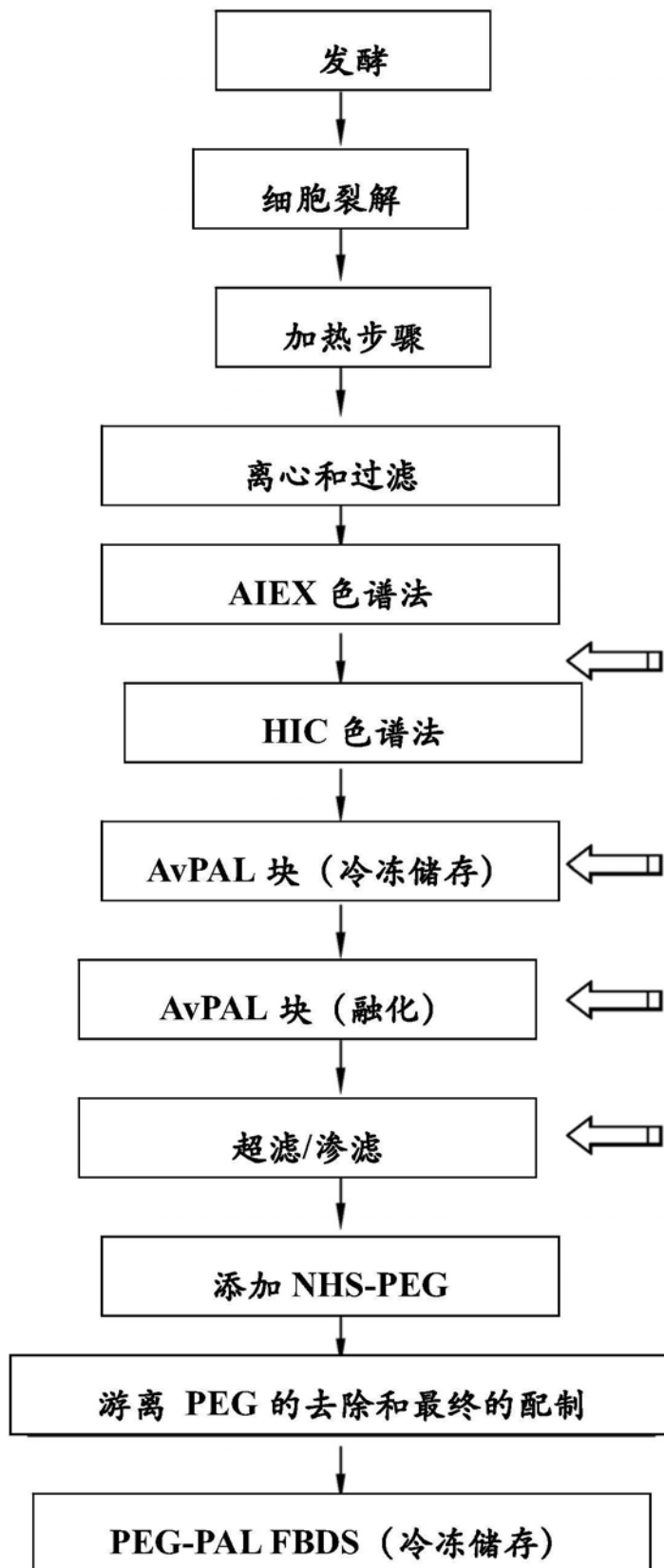


图22