

發明專利說明書

(本說明書格式、順序及粗體字，請勿任意更動，※記號部分請勿填寫)

※ 申請案號：97/3/325

A61K 38/16 (2006.01)

※ 申請日期：97.8.15

※IPC 分類：~~C07K~~ A61K 47/48 (2006.01)

A61B 5/45 (2006.01)

G01N 33/574 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

一、發明名稱：(中文/英文)

原核生物苯丙胺酸解氨酶組合物及使用該組合物治療癌症之方法

COMPOSITIONS OF PROKARYOTIC PHENYLALANINE AMMONIA-
LYASE AND METHODS OF TREATING CANCER USING
COMPOSITIONS THEREOF

二、申請人：(共 1 人)

姓名或名稱：(中文/英文)

美商拜奧馬林製藥公司

BIOMARIN PHARMACEUTICAL INC.

代表人：(中文/英文)

露易莎 貝格妮雅

BIGORNIA, LUISA

住居所或營業所地址：(中文/英文)

美國加州諾維多市迪吉妥路105號

105 DIGITAL DRIVE, NOVATO, CALIFORNIA 94949, U.S.A.

國 籍：(中文/英文)

美國 U.S.A.

三、發明人：(共 7 人)

姓 名：(中文/英文)

1. 麥可 C 斐拉德
VELLARD, MICHEL C.
2. 保羅 A 費茲派翠克
FITZPATRICK, PAUL A.
3. 伊米 D 卡奇士
KAKKIS, EMIL D.
4. 丹尼爾 J 溫特
WENDT, DANIEL J.
5. 馬伯瑞克 慕薩立夫
MUTHALIF, MUBARACK
6. 尚恩 M 貝爾
BELL, SEAN M.
7. 奧古斯特 O 歐哈馬菲
OKHAMAFE, AUGUSTUS O.

國 籍：(中文/英文)

1. 法國 FRANCE
2. 美國 U.S.A.
3. 美國 U.S.A.
4. 美國 U.S.A.
5. 印度 INDIA
6. 美國 U.S.A.
7. 美國 U.S.A.

四、聲明事項：

☐ 主張專利法第二十二條第二項 ☐ 第一款或 ☐ 第二款規定之事實，其事實發生日期為： 年 月 日。

☒ 申請前已向下列國家（地區）申請專利：

【格式請依：受理國家（地區）、申請日、申請案號 順序註記】

☒ 有主張專利法第二十七條第一項國際優先權：

1. 美國；2007年08月17日；61/066,125

2.

☐ 無主張專利法第二十七條第一項國際優先權：

1.

2.

☐ 主張專利法第二十九條第一項國內優先權：

【格式請依：申請日、申請案號 順序註記】

☒ 主張專利法第三十條生物材料：

☐ 須寄存生物材料者：

國內生物材料 【格式請依：寄存機構、日期、號碼 順序註記】

國外生物材料 【格式請依：寄存國家、機構、日期、號碼 順序註記】

☒ 不須寄存生物材料者：

所屬技術領域中具有通常知識者易於獲得時，不須寄存。

九、發明說明：

【發明所屬之技術領域】

本發明係關於原核生物苯丙胺酸解氨酶(PAL)及其組合物，以及優化該等組合物以增強原核生物PAL催化活性及/或穩定性，同時降低原核生物PAL之免疫原性及/或蛋白質水解敏感性。本發明進一步係關於該等最佳原核生物PAL組合物用於治療癌症之用途。

【先前技術】

PAL為廣泛分布於植物(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. 45:1863-1872 (1967)；Abell等人，Methods Enzymol. 142:242-253 (1987))及細菌(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))中之非哺乳動物酶且其可於大腸桿菌(*Escherichia coli*)中重組產生。

PAL之一代表性清單包括：Q9ATN7 藿香 (*Agastache rugosa*)；O93967 長柄紅蕈 (*Amanita muscaria*；毒蠅傘 (*Fly agaric*))；P35510、P45724、P45725、Q9SS45、Q8RWP4 擬南芥 (*Arabidopsis thaliana*；鼠耳芥 (*Mouse-ear cress*))；Q6ST23 綠竹 (*Bambusa oldhamii*；剛竹 (*Giant timber bamboo*))；Q42609 蘭花 (*Bromheadia finlaysoniana*；

Orchid) ; P45726 茶 (*Camellia sinensis* ; Tea) ; Q9MAX1 長春花 (*Catharanthus roseus* ; Rosy periwinkle ; Madagascar periwinkle) ; Q9SMK9 鷹嘴豆 (*Cicer arietinum* ; Chickpea) ; Q9XFX5 、 Q9XFX6 克萊門柚 × 柑橘 (*Citrus clementina* × *Citrus reticulate*) ; Q42667 檸檬 (*Citrus limon* ; Lemon) ; Q8H6V9 、 Q8H6W0 中粒咖啡 (*Coffea canephora* ; Robusta coffee) ; Q852S1 胡蘿蔔 (*Daucus carota* ; Carrot) ; O23924 毛地黃 (*Digitalis lanata* ; Foxglove) ; O23865 胡蘿蔔 (*Daucus carota* ; Carrot) ; P27991 大豆 (*Glycine max* ; Soybean) ; O04058 向日葵 (*Helianthus annuus* ; 普通向日葵 (Common sunflower)) ; P14166 、 Q42858 甘薯 (*Ipomoea batatas* ; Sweet potato) ; Q8GZR8 、 Q8W2E4 萵苣 (*Lactuca sativa* ; Garden lettuce) ; O49835 、 O49836 紫草 (*Lithospermum erythrorhizon*) ; P35511 、 P26600 番茄 (*Lycopersicon esculentum* ; Tomato) ; P35512 蘋果 (*Malus domestica* ; Apple ; *Malus sylvestris*) ; Q94C45 、 Q94F89 木薯 (*Manihot esculenta* ; Cassava ; Manioc) ; P27990 紫苜蓿 (*Medicago sativa* ; Alfalfa) ; P25872 、 P35513 、 P45733 菸草 (*Nicotiana tabacum* ; 普通煙草 (Common tobacco)) ; Q6T1C9 栓皮櫟 (*Quercus suber* ; Cork oak) ; P14717 、 P53443 、 Q7M1Q5 、 Q84VE0 、 Q84VE0 稻 (*Oryza sativa* ; Rice) ; P45727 鱷梨 (*Persea americana* ; Avocado) ; Q9AXI5 牽牛花 (*Pharbitis nil* ; 紫羅蘭 (Violet) ; Japanese morning glory) ; P52777 火炬松 (*Pinus taeda* ; Loblolly pine) ;

Q01861、Q04593 豌豆 (*Pisum sativum* ; Garden pea) ;
P24481、P45728、P45729 歐芹 (*Petroselinum crispum* ;
Parsley ; *Petroselinum hortense*) ; Q84LI2 蝶蘭 × 朵麗蝶蘭
雜交栽培變種 (*Phalaenopsis* × *Doritaenopsis* hybrid
cultivar) ; P07218、P19142、P19143 菜豆 (*Phaseolus*
vulgaris ; Kidney bean ; French bean) ; Q7XJC3、Q7XJC4
海岸松 (*Pinus pinaster* ; Maritime pine) ; Q6UD65 大葉鑽天
楊毛果亞種 × 美洲黑楊 (*Populus balsamifera* subsp.
trichocarpa × *Populus deltoides*) ; P45731、Q43052、
O24266 白楊 (*Populus kitakamiensis* ; Aspen) ; Q8H6V5、
Q8H6V6 顫楊 (*Populus tremuloides* ; Quaking aspen) ;
P45730 毛果楊 (*Populus trichocarpa* ; Western balsam
poplar) ; O64963 甜櫻桃 (*Prunus avium* ; Cherry) ; Q94EN0
黏地黃 (*Rehmannia glutinosa*) ; P11544 紅冬孢酵母
(*Rhodospiridium toruloides* ; 酵母 (Yeast) ; 瘦弱紅酵母
(*Rhodotorula gracilis*)) ; P10248 深紅酵母 (*Rhodotorula*
rubra ; 酵母 ; 膠紅酵母 (*Rhodotorula mucilaginosa*)) ;
Q9M568、Q9M567 覆盆子 (*Rubus idaeus* ; Raspberry) ;
P31425、P31426 馬鈴薯 (*Solanum tuberosum* ; Potato) ;
Q6SPE8 長梗繁縷 (*Stellaria longipes* ; Longstalk
starwort) ; P45732 矮筆花豆 (*Stylosanthes humilis* ;
Townsville stylo) ; P45734 地三葉草 (*Trifolium*
subterraneum ; Subterranean clover) ; Q43210、Q43664 小
麥 (*Triticum aestivum* ; Wheat) ; Q96V77 玉米黑粉菌

(*Ustilago maydis* ; Smut fungus) ; P45735 葡萄 (*Vitis vinifera* ; Grape) ; 及 Q8VXG7 玉米 (*Zea mays* ; Maize) 。

大量研究已集中於使用酶苯丙胺酸解氨酶 (PAL ; EC 4.3.1.5) 用於苯酮尿症 (phenylketonuria , PKU) 之酶替代性治療 (Hoskins 等人 , *Lancet* 1(8165):392-394 (1980) ; Gilbert 等人 , *Biochem. J.* 199(3): 715-723 (1981) ; Hoskins, J.A. 等人 , *Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol.* 35(2): 275-282 (1982) ; Sarkissian 等人 , *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96(5):2339-2344 (1999) ; Liu 等人 , *Artif. Cells Blood Substit. Immobil. Biotechnol.* 30(4): 243-257 (2002) ; Wieder 等人 , *J Biol. Chem.* 254(24): 12579-12587 (1979) ; Gamez 等人 , *Mol. Ther.* 11(6): 986-989 (2005) ; Ambrus 等人 , *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 224(3): 598-602 (1983) ; Ambrus 等人 , *Science* 201(4358):837-839 (1978) ; Kalghatgi, *Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol.* 27(3): 551-561 (1980) ; Ambrus, *Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol.* 37(1): 105-111 (1982) ; Gilbert 等人 , *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 131(2): 557-563 (1985) ; Pedersen, *Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol.* 20(3): 559-569 (1978) ; Marconi 等人 , *Biochimie* 62(8-9): 575-580 (1980) ; Larue 等人 , *Dev. Pharmacol. Ther.* 9(2): 73-81 (1986) ; Ambrus 等人 , *Ann. Intern. Med.* 106(4): 531-537 (1987) ; Bourget 等人 , *Appl. Biochem. Biotechnol.* 10: 57-59 (1984) ; Bourget 等人 , *FEBS Lett.*

180(1): 5-8 (1985) ; Bourget等人 , Biochim. Biophys. Acta 883(3): 432-438 (1986) ; Chang等人 , Artif. Cells Blood Substit. Immobil. Biotechnol. 23(1): 1-21 (1995) ; Chang等人 , Mol Biotechnol. 17(3): 249-260 (2001) ; 美國專利第 5,753,487號)。

基於PAL能夠限制對癌細胞營養供應苯丙胺酸並從而抑制腫瘤生長，提出使用PAL來治療癌症(Fritz等人，J. Biol. Chem. 251(15): 4646-4650 (1976) ; Roberts等人，Cancer Treat. Rep. 60(3): 261-263 (1976) ; Shen等人，Cancer Res. 37(4): 1051-1056 (1977) ; Shen等人，Cancer Treat. Rep. 63(6): 1063-1068 (1979) ; Wieder等人，J. Biol. Chem. 254(24): 12579-12587 (1979))。此外，PAL介導之苯丙胺酸之減少阻止鼠類白血病及轉移性黑色素瘤之增殖。然而，靜脈內注射之聚乙二醇化PAL在第13次注射後，自循環血液中快速清除(Abell等人，Cancer Res. 33: 2529-2532 (1973) ; Roberts等人，(1976)，同上；Shen等人，(1977)，同上；Shen等人，J. Reticuloendothelial Soc. 23:167-175 (1978))。

某些贅生性或癌細胞比正常細胞對諸如苯丙胺酸之必需胺基酸具有更高代謝率及更高之需求。文獻中有證據提出，藉由使用胺基酸降解酶(例如PAL)限制或減少特定胺基酸(例如苯丙胺酸)可降低人類癌症患者及動物模型中某些腫瘤細胞之生長。舉例而言，某些白血病細胞缺乏由麩胺醯胺合成非必需胺基酸天冬醯胺之酶天冬醯胺合成酶且

因此依賴於天冬醯胺酸來存活。聚乙二醇化L-天冬醯胺酶培加帕酶 (Oncaspar)(培門冬酶 (pegaspargase), Enzon Pharmaceuticals, Inc.)已成功用於治療急性淋巴母細胞白血病 (ALL)(Graham, Adv. Drug Del. Rev. 55:1293-1302 (2003))。作為癌症療法中酶促損耗之潛在標靶之胺基酸的其他實例包含麩胺醯胺(麩胺醯胺去胺酶, Medical Enzymes AG)、精胺酸(精胺酸去亞胺酶, Phoenix Pharmacologics, Inc.)及甲硫胺酸(甲硫胺酸酶, Anticancer, Inc.)(參見, 例如美國專利第6,312,939號、第6,737,259號及第5,690,929號)。

已展示苯丙胺酸之飲食限制在動物模型中抑制高侵襲性轉移性黑色素瘤及雄激素非依賴性前列腺癌細胞之生長及轉移, 促進培養物中之腫瘤細胞而不是正常細胞之凋亡, 增加帶腫瘤小鼠之存活, 使腫瘤細胞對化學治療劑敏感, 且增強毒素之細胞毒性(Fu等人, Nutr. Cancer 31:1-7 (1998); Fu等人, Cancer Res. 59:758-765 (1999); Fu等人, Nutr. Cancer 45:60-73 (2003); Fu等人, J. Cell. Physiol. 209:522-534 (2006); Meadows等人, Cancer Res. 42:3056-3063 (1982); Elstad等人, Anticancer Res. 13:523-528 (1993); Elstad等人, Nutr. Cancer 25:47-60 (1996); Nunez等人, Cancer Lett. 236:133-141 (2006))。

使用來自酵母紅冬孢酵母(*Rhodospiridium toruloides*) (亦稱為黏紅酵母(*Rhodotorula glutinis*))之PAL(RtPAL)酶促損耗苯丙胺酸抑制活體外培養物(Abell等人, Cancer Res.

32:285-290 (1972)；Stith等人，Cancer Res. 33:966-971 (1973))及活體內小鼠(Abell等人，Cancer Res. 33:2529-2532 (1973))中之白血淋細胞之生長。然而，重複注射至小鼠中後，RtPAL自血漿之清除得到高度加速，且與非帶腫瘤小鼠相比，帶腫瘤小鼠中之清除速率更快(Fritz等人，J. Biol. Chem. 251:4646-4650 (1976)；Shen等人，Cancer Res. 37:1051-1056 (1977))。多次投藥後，歸因於抗體效價之增加，RtPAL之半衰期降低至約1小時，證明全身輻射對延遲清除及增強半衰期而言可為必要的(Shen等人，J. Reticuloendothelial Soc. 23:167-175 (1978))。

已使RtPAL聚乙二醇化以試圖降低酶之免疫原性及活體內清除速率(Wieder等人，J. Biol. Chem. 254:12579-12587 (1979))。單次靜脈注射至小鼠中後或多次靜脈注射至小鼠中後，聚乙二醇化RtPAL之血液半衰期比未聚乙二醇化之RtPAL長；然而，聚乙二醇化RtPAL在第13次靜脈注射後仍快速地自血液清除。

雖然PAL潛在具有各種治療性應用，但使用PAL可能受低比活性及蛋白質水解不穩定性限制。類似於其他治療性蛋白質，使用PAL作為酶治療劑伴有數個缺點，諸如免疫原性及蛋白質水解敏感性(參見 Vellard, Curr. Opin. Biotechnol. 14:1-7 (2003))。由於缺乏關於該蛋白質之結構及生物化學知識，因此迄今為止尚未共同致力於改良該等參數。

因此，仍對用於包括治療癌症之治療用途之具有最佳動

力學特徵之PAL分子存在需要，該等動力學特徵包括強催化活性及更長生物半衰期、更高生物化學穩定性及/或減弱之免疫原性。

【發明內容】

本發明係基於以下發現：原核生物或細菌PAL可用作癌症之有效治療。本發明涵蓋具有增強特性(諸如更強催化活性、更高生物化學穩定性，及對於治療性應用而言減弱之免疫原性及/或更長生物學半衰期)之原核生物PAL及其生物學活性片段、突變體、變異體或類似物的組合物。本發明提供醫藥組合物及調配物，其包含原核生物PAL及其生物學活性片段、突變體、變異體或類似物及醫藥學上可接受之載劑(包括穩定劑)。本發明亦提供製備及純化原核生物PAL及其生物學活性片段、突變體、變異體或類似物之方法，及使用該等組合物以達成治療目的、包括治療贅生性疾病及癌症之方法。

如本文中所使用，"細菌PAL"及"原核生物PAL"可互換使用來意謂：(1)來自原核生物體之野生型PAL，包括但不限於來自海洋鏈黴菌(*Streptomyces maritimus*)之PAL(亦稱EncP，SEQ ID NO: 5，圖4)、來自點形念珠藻(*Nostoc punctiforme*)之PAL(SEQ ID NO: 2，圖4)、來自多變魚腥藻(*Anabaena variabilis*)之PAL(SEQ ID NO: 4，圖4)、來自組囊藻(*Anacystis nidulans*)之PAL(Löfflehardt, Z. Naturforsch. 31(11-12):693-9 (1976))、來自發光桿菌(*Photobacterium luminescens*)TT01之PAL(Williams等人，

Microbiology 151:2543-2550 (2005))及來自輪枝鏈黴菌 (*Streptomyces verticillatus*)之PAL(Bezanson等人, Can. J. Microbiol. 16(3):147-51 (1970)); (2)保留針對苯丙胺酸之類似(亦即至少50%)催化活性且較佳展現增強之催化活性、更大之生物化學穩定性、延長之半衰期及/或降低之免疫原性的該等野生型PAL酶之片段、突變體、變異體或類似物;及(3)已與提供其他有利效應(諸如但不限於半衰期延長或免疫原性降低)之其他化學部分連接之該等野生型PAL酶之化學修飾型式或其片段、突變體、變異體或類似物。舉例而言,任何提及製備或使用原核生物PAL及其片段、突變體、變異體、類似物或化學修飾型式及該(等)酶之組合物以達成治療目的之方法均意指製備、使用或調配所有該等野生型原核生物PAL或其片段、突變體、變異體、類似物或化學修飾之方法。

在第一態樣中,本發明提供包含細菌PAL及其生物學活性片段、突變體、變異體或類似物及醫藥學上可接受之載劑的醫藥組合物。一較佳實施例為來自點形念珠藻(*Nostoc punctiforme*)之細菌PAL(SEQ ID NO: 2)或其生物學活性片段、突變體、變異體或類似物。另一較佳實施例為來自多變魚腥藻(*Anabaena variabilis*)之細菌PAL(SEQ ID NO: 4)或其生物學活性片段、突變體、變異體或類似物。本發明涵蓋與野生型PAL相比具有較高苯丙胺酸轉化活性及/或降低之免疫原性的原核生物PAL變異體。

較佳地,原核生物PAL變異體保留對應於紅冬孢酵母

PAL(RtPAL)之PAL中之Ser210 Ala-Ser-Gly三合物(211-213)、Asp214、Leu215、Asn270、Val269、Leu266、Leu134、His137、Lys468、Glu496、Gln500的位置處之野生型活性位點殘基，或該或該等活性位點殘基之保守性取代，其中咸信211-213處之Ala-Ser-Gly三合物為苯丙胺酸之結合位點。

合意原核生物PAL變異體可包括一或多個胺基酸殘基已經另一胺基酸殘基取代以減少可與活體內酶活性降低、免疫原性增強及/或其他不利效應(諸如生物可用性降低)相關之蛋白質聚集的蛋白質。本發明涵蓋醫藥組合物，其中原核生物PAL變異體之一或多個胺基酸殘基已經另一胺基酸取代，其中與野生型PAL相比，該取代增強苯丙胺酸轉化活性及/或降低免疫原性。

在一些實施例中，原核生物PAL變異體之一或多個胺基酸殘基已經另一胺基酸殘基取代。在一些實施例中，原核生物PAL變異體之一或多個半胱胺酸殘基已經絲胺酸殘基取代。在較佳實施例中，原核生物PAL變異體為多變魚腥藻PAL(AvPAL)。在更佳實施例中，AvPAL變異體之一或多個選自由位置64、318、503及565處之半胱胺酸殘基組成之群的半胱胺酸殘基已經絲胺酸殘基取代。在一更佳實施例中，AvPAL變異體之位置565處之半胱胺酸殘基已經絲胺酸殘基取代。在一最佳實施例中，AvPAL變異體之位置503及565處之半胱胺酸殘基已經絲胺酸殘基取代。

合意原核生物PAL變異體可包括融合蛋白質，其中該

PAL酶已與另一異源多肽融合，該異源多肽諸如保留此項技術中已知延長半衰期之補救抗原決定基或由對特殊形式之癌症具有特異性之蛋白質識別的免疫球蛋白之天然或經修飾恆定區或其片段。

本發明進一步涵蓋已與提供其他有利效應之化學部分連接之該等原核生物PAL多肽的化學修飾型式。舉例而言，此項技術中已知水溶性聚合物(例如，聚乙二醇)與多肽之非特異性或位點特異性(例如N-末端)連接可改良半衰期，且連接化學部分亦可降低免疫原性及/或改良蛋白酶抗性。

在一些實施例中，原核生物PAL變異體包含水溶性聚合物。在較佳實施例中，原核生物PAL變異體包含聚乙二醇。在一更佳實施例中，原核生物PAL變異體為多變魚腥藻PAL(AvPAL)且AvPAL與聚乙二醇之比率為約1:3(1:3 AvPAL:PEG)。在一最佳實施例中，原核生物PAL變異體為AvPAL變異體，AvPAL變異體與聚乙二醇之比率為約1:3(1:3 AvPAL:PEG)，且AvPAL變異體之位置503及565處之半胱胺酸殘基已經絲胺酸殘基取代。

在一些實施例中，原核生物PAL變異體之一或多個胺基酸殘基已經離胺酸殘基取代。使原核生物PAL變異體中之另一離胺酸殘基聚乙二醇化可產生免疫原性降低、催化活性增強及/或生物化學穩定性改良之酶。在不受特定理論束縛之情況下，假設原核生物PAL之活性位點處/附近之酪胺酸殘基(例如，AvPAL中之位置78)可為降低酶促活性之

聚乙二醇化的位點。在一較佳實施例中，原核生物PAL變異體之不為酶促活性所需之活性位點處/附近的一或多個胺基酸係經離胺酸殘基取代。在不受理論束縛之情況下，假設活性位點處/附近之取代離胺酸殘基之聚乙二醇化在空間上阻礙酪胺酸殘基(例如，AvPAL中之位置78)聚乙二醇化。

該等原核生物PAL變異體係根據本發明之方法分離及純化且因此以使得能夠治療性使用原核生物PAL酶之量存在。在一些實施例中，使用編碼完全或野生型原核生物PAL之cDNA。然而，在其他實施例中，可使用編碼其生物學活性片段、突變體、變異體或類似物之cDNA。此外，本發明提供由基於結構之分子工程方法獲得之經優化原核生物PAL及/或PAL之化學修飾(例如，聚乙二醇化)形式的組合物。特定實施例涵蓋具有適於治療用途之改良之比活性、增強之穩定性、降低之免疫原性及/或蛋白質水解敏感性的原核生物PAL之最佳組合物。一較佳實施例為具有改良之比活性、增強之穩定性、降低之免疫原性及/或蛋白質水解敏感性的點形念珠藻PAL之聚乙二醇化形式。另一較佳實施例為具有改良之比活性、增強之穩定性、降低之免疫原性及/或蛋白質水解敏感性的多變魚腥藻PAL之聚乙二醇化形式。

在一些實施例中，根據本發明之野生型原核生物PAL之生物學活性位點可視需要加以修飾以優化PAL動力學特徵。在一較佳實施例中，經修飾原核生物PAL具有在治療

後足以使個體中之血漿苯丙胺酸含量降低至(使用此項技術中熟知之標準偵測方法)偵測含量以下至約 20 μM 至 60 μM 之間、較佳至小於約 20 μM 且甚至更佳至小於約 10 μM 的範圍內的活性。在其他較佳實施例中，生物學活性修飾原核生物 PAL 具有至少約 0.1 s^{-1} 、較佳大於約 0.5 s^{-1} 且甚至更佳大於約 1.0 s^{-1} 之 kcat。在更佳實施例中，生物學活性修飾原核生物 PAL 具有至少約 0.4 s^{-1} 、較佳大於約 2.0 s^{-1} 且甚至更佳大於約 4.0 s^{-1} 之 kcat。在其他較佳實施例中，生物學活性修飾原核生物 PAL 具有約 10 μM 至約 2000 μM 之間的 K_m 。在更佳實施例中，生物學活性修飾原核生物 PAL 具有約 10 μM 至約 1000 μM 之間的 K_m 。在甚至更佳實施例中，生物學活性修飾原核生物 PAL 具有約 10 μM 至約 500 μM 之間的 K_m 。在其他較佳實施例中，生物學活性修飾原核生物 PAL 展現大於野生型 PAL 約至少 50% 至約 10 倍之酶促活性。在其他較佳實施例中，生物學活性修飾原核生物 PAL 展現比野生型 PAL 高約至少 50% 至約 100% 之酶促活性。該等生物活性修飾原核生物 PAL 蛋白質可使用此項技術中熟知之方法(諸如定點突變誘發)形成。

在其他實施例中，本發明涵蓋代謝苯丙胺酸(亦即，使苯丙胺酸轉化為另一物質)之原核生物 PAL 或其生物學活性片段、突變體、變異體或類似物在製備用於預防或治療個體、較佳人類個體之癌症之藥物以及用於預防或治療個體、較佳人類個體之癌症的含有原核生物 PAL 或其生物學活性片段、突變體、變異體或類似物之醫藥組合物中的用

途。在一些實施例中，該藥物係用於預防人類個體之癌症。在其他實施例中，該藥物係用於治療人類個體之癌症。在一較佳實施例中，醫藥組合物包含來源於細菌之高度純化PAL或其生物學活性片段、突變體、變異體或類似物及醫藥學上可接受之載劑。較佳製劑含有純度大於90%、95%、96%、97%、98%、99%、99.2%、99.5%、99.6%、99.7%、99.8%或99.9%之原核生物PAL或其生物學活性片段、突變體、變異體或類似物。本發明之原核生物PAL或其生物學活性片段、突變體、變異體或類似物之相對比活性較佳為野生型原核生物PAL之比活性之至少約50%且更佳大於約110%。

在第二態樣中，本發明之特徵在於使用原核生物PAL變異體組合物以達成治療目的之新穎方法。本發明涵蓋治療各種形式之癌症之方法。

在一實施例中，本發明涵蓋藉由向需要癌症治療之個體投與治療有效量之包含原核生物PAL變異體及醫藥學上可接受之載劑的醫藥組合物來治療癌症的方法，其中原核生物PAL變異體與野生型PAL相比具有較高之苯丙胺酸轉化活性及/或降低之免疫原性且有效使個體之血液、血清或血漿(較佳血漿)中之苯丙胺酸濃度降低至偵測含量以下至約20 μM 至60 μM 之間、較佳至小於約20 μM 且甚至更佳至小於約10 μM 的範圍內。在一些實施例中，原核生物PAL變異體之一或多個胺基酸殘基已經另一胺基酸殘基取代，其中與野生型PAL相比，該取代增強苯丙胺酸轉化活性及/

或降低免疫原性。在一些實施例中，原核生物PAL變異體之一或多個半胱胺酸殘基已經另一胺基酸殘基取代。在一些實施例中，原核生物PAL變異體之一或多個半胱胺酸殘基已經絲胺酸殘基取代。在一較佳實施例中，原核生物PAL變異體為多變魚腥藻PAL(AvPAL)變異體。在一尤其較佳實施例中，AvPAL變異體之一或多個選自由位置64、318、503及565處之半胱胺酸殘基組成之群的半胱胺酸殘基已經絲胺酸殘基取代，在位置565處經絲胺酸殘基取代或在位置503及565處經絲胺酸殘基取代。在一些實施例中，原核生物PAL變異體包含水溶性聚合物。在一些實施例中，該水溶性聚合物為聚乙二醇。在一較佳實施例中，原核生物PAL變異體為多變魚腥藻PAL(AvPAL)變異體且AvPAL變異體與聚乙二醇之比率為約1:3(1:3 AvPAL:PEG)。在一更佳實施例中，原核生物PAL變異體為多變魚腥藻PAL(AvPAL)變異體，AvPAL變異體與聚乙二醇之比率為約1:3(1:3 AvPAL:PEG)且AvPAL變異體之位置503及565處之半胱胺酸殘基已經絲胺酸殘基取代。

在一更尤其較佳實施例中，本發明提供治療癌症之方法，該方法包含向需要癌症治療之個體投與治療有效量之包含AvPAL變異體及醫藥學上可接受之載劑的醫藥組合物，其中AvPAL變異體之位置503及565處之半胱胺酸殘基已經絲胺酸殘基取代，AvPAL變異體進一步包含聚乙二醇之水溶性聚合物，其中AvPAL變異體與聚乙二醇之比率為約1:3，且AvPAL變異體有效使個體之血液、血清或血漿

(較佳血漿)中之苯丙胺酸濃度降低至偵測含量以下至約20 μM 至60 μM 之間、較佳至小於約20 μM 且甚至更佳至小於約10 μM 的範圍內。

在一廣泛實施例中，癌症為來源於癌症之細胞之增殖及/或存活對苯丙胺酸限制或耗盡敏感的癌症。在較佳實施例中，癌症為肺癌、腦癌或中樞神經系統癌症、結腸癌、前列腺癌、腎癌或轉移性黑色素瘤。在其他較佳實施例中，癌症為頭頸癌、卵巢癌、子宮癌、白血病(例如，急性骨髓白血病或急性類淋巴母細胞白血病)或骨髓瘤。在其他較佳實施例中，癌症為兒科癌症或抗性癌症(亦即，已展示對癌症治療劑或靶向癌症治療劑具有抗性之癌症)。

本發明描述治療個體之癌症之方法，該方法包含向該個體投與原核生物PAL或其生物學活性片段、突變體、變異體或類似物，其中與不存在原核生物PAL投藥之情況下之濃度相比，投與原核生物PAL有效使個體之血液、血清或血漿(較佳血漿)中之苯丙胺酸(Phe)濃度降低。所選擇用於根據本發明之方法治療的個體可具有任何血漿Phe濃度，例如約40 μM 至約2000 μM 或血漿Phe濃度之正常範圍，該濃度可在約40 μM 至約80 μM 範圍內，更通常在約50 μM 至約70 μM 範圍內，其中大多數人類個體之範圍係介於約55 μM 至約65 μM 之間。治療後個體之血漿Phe濃度降低至(使用此項技術中熟知之標準偵測方法)偵測含量以下至約20 μM 至60 μM 之間、較佳至小於約20 μM 且甚至更佳至小於約10 μM 的範圍內。

本發明亦涵蓋藉由與蛋白質限制性(亦即，不含苯丙胺酸)飲食組合向需要癌症治療之個體投與治療有效量之包含原核生物PAL變異體及醫藥學上可接受之載劑之醫藥組合物來治療癌症的方法，其中該治療有效達成在不存在組合投藥之情況下個體之血漿Phe濃度之降低。治療後個體之血漿Phe濃度降低至(使用此項技術中熟知之標準偵測方法)偵測含量以下至約20 μM 至60 μM 之間、較佳至小於約20 μM 且甚至更佳至小於約10 μM 的範圍內。

在另一實施例中，原核生物PAL或其生物學活性片段、突變體、變異體或類似物亦可與蛋白質限制性飲食組合投與。依本文中之方法投與之蛋白質限制性飲食為苯丙胺酸限制性飲食，其中個體之總Phe攝取量限制在小於每日600毫克。在其他實施例中，蛋白質限制性飲食為苯丙胺酸限制性飲食，其中總Phe限制在小於每日300毫克。在其他實施例中，蛋白質限制性飲食為補充有一或多種胺基酸(諸如但不限於酪胺酸、纈胺酸、異白胺酸及/或白胺酸)之限制性飲食。

本發明亦涵蓋一種醫藥組合物，其包含原核生物PAL或其生物學活性片段、突變體、變異體或類似物及醫藥學上可接受之載劑、稀釋劑或賦形劑。該醫藥組合物可進一步包含醫療蛋白質補充物。在其他實施例中，蛋白質補充物不含苯丙胺酸。蛋白質補充物較佳用濃度為每100公克補充物20毫克之L-酪胺酸、L-麩胺醯胺、L-肉鹼、濃度為每100公克補充物40毫克之L-牛磺酸以及硒強化。其可進一

步包含推薦每日劑量之礦物質，例如鈣、磷及鎂。補充物可進一步包含推薦每日劑量之一或多種選自由以下各胺基酸組成之群的胺基酸：L-白胺酸、L-脯胺酸、L-離胺酸乙酸鹽、L-纈胺酸、L-異白胺酸、L-精胺酸、L-丙胺酸、甘胺酸、L-天冬醯胺單水合物、L-色胺酸、L-絲胺酸、L-蘇胺酸、L-組胺酸、L-甲硫胺酸、L-麩胺酸及L-天冬胺酸。此外，補充物可用推薦每日劑量之維生素A、D及E強化。補充物較佳包含提供補充物能量之至少40%之脂肪含量。該補充物可以粉末補充物形式或蛋白質棒形式提供。

本發明亦涵蓋藉由與癌症治療劑或靶向癌症治療劑組合向需要癌症治療之個體投與治療有效量之包含原核生物PAL變異體及醫藥學上可接受之載劑之醫藥組合物來治療癌症的方法，其中該治療有效達成在不存在組合投藥之情況下個體血漿苯丙胺酸濃度之降低。治療後個體之血漿Phe濃度降低至(使用此項技術中熟知之標準偵測方法)偵測含量以下至約20 μM 至60 μM 之間、較佳至小於約20 μM 且甚至更佳至小於約10 μM 的範圍內。

較佳實施例包括針對待治療之生物體、較佳哺乳動物或人類之需要優化劑量以有效預防或改善疾病症狀。原核生物PAL可以每日單次劑量、每日多次劑量、每週單次劑量、每週多次劑量、每月單次劑量或每月多次劑量投與。在一些實施例中，PAL療法不為持續的，而是每日投與PAL直至個體之血漿Phe濃度降低至(使用此項技術中熟知之標準偵測方法)偵測含量以下至約20 μM 至60 μM 之間、

較佳至小於約 20 μM 且甚至更佳至小於約 10 μM 的範圍內。較佳地，每日監測個體之血漿 Phe 濃度，且當觀察到血漿 Phe 濃度增加 10%-20% 時，投與 PAL。在其他較佳實施例中，每週傳遞劑量一次。本發明涵蓋劑量為至少 0.001 mg/kg、0.005 mg/kg、0.01 mg/kg、0.05 mg/kg 且劑量可在至多每週 0.1 mg/kg、0.5 mg/kg、1.0 mg/kg、5.0 mg/kg、12 mg/kg 或 12 mg/kg 以上之範圍內。較佳劑量為每週 1 mg/kg，更佳劑量為每週 0.1 mg/kg，且甚至更佳劑量為每週 0.01 mg/kg。

涵蓋多種傳遞等效劑量之非經腸或經腸(nonparenteral)投藥途徑，包括經口、經皮、經黏膜、肺內(包括氣霧化)、肌肉內、皮下或靜脈內。亦特定涵蓋藉由快速注射或輸注直接向關節或 CSF 內投藥，諸如鞘內、腦內、心室內、經由腰椎穿刺或經由大池。較佳地，劑量經皮下或經口傳遞。

亦涵蓋增強人類個體中原核生物 PAL 活性之其他方法，包括基因療法。經由此項技術已知之多種方法(包括病毒載體、同源重組或直接 DNA 注射)轉移原核生物 PAL 基因為可能的。以編碼整個或部分原核生物 PAL 或其生物學活性片段、突變體、變異體或類似物之核酸序列為特徵之實施例在該態樣之範疇內，該等核酸序列可活體內向例如(但不限於)患有癌症、靠近或鄰接癌症定位之細胞、在血流中循環及/或遷移至癌症位點之造血細胞中投與。

在第三態樣中，本發明提供原核生物 PAL 變異體之醫藥

組合物或調配物，其包含細菌PAL及其生物學活性片段、突變體、變異體或類似物及醫藥學上可接受之載劑，其中醫藥學上可接受之載劑包含穩定劑。在一些實施例中，穩定劑為L-苯丙胺酸或其結構類似物。在一些實施例中，穩定劑係選自由L-苯丙胺酸、反式肉桂酸及苯甲酸組成之群。在一些實施例中，穩定劑為L-苯丙胺酸。在一些實施例中，穩定劑為反式肉桂酸。在一些實施例中，穩定劑為苯甲酸。在一較佳實施例中，本發明提供使用該等醫藥組合物或調配物治療癌症之方法。

在一尤其較佳實施例中，醫藥組合物或調配物包含原核生物PAL變異體及醫藥學上可接受之載劑，其中原核生物PAL變異體為AvPAL變異體，AvPAL變異體與聚乙二醇之比率為約1:3(1:3 AvPAL:PEG)，且AvPAL變異體之位置503及565處之半胱胺酸殘基已經絲胺酸殘基取代，且醫藥學上可接受之載劑包含穩定劑。在一些實施例中，穩定劑為L-苯丙胺酸或其結構類似物。在一些實施例中，穩定劑係選自由L-苯丙胺酸、反式肉桂酸及苯甲酸組成之群。在一些實施例中，穩定劑為L-苯丙胺酸。在一些實施例中，穩定劑為反式肉桂酸。在一尤其較佳實施例中，本發明提供使用該等醫藥組合物或調配物治療癌症之方法。

在第四態樣中，本發明之特徵為一種以使酶能夠用於治療之量製備重組原核生物PAL或其生物學活性片段、突變體、變異體或類似物的方法。本發明涵蓋來源於包括(但不限於)以下細菌之PAL：鏈黴菌(*Streptomyces*)、堆囊菌

(Sorangium)、假單胞菌 (*Pseudomonas*) 及藍藻菌 (cyanobacteria)(諸如念珠藻及魚腥藻)。在一些實施例中，PAL係來源於以下細菌物種：海洋鏈黴菌、輪枝鏈黴菌、纖維堆囊菌 (*Sorangium cellulosum*)、點形念珠藻、煙草念珠藻 (*Nostoc tobacum*)、多變魚腥藻或惡臭假單胞菌 (*Pseudomonas putida*)。在較佳實施例中，PAL係來源於藍藻菌物種點形念珠藻或多變魚腥藻。在一尤其較佳實施例中，PAL係來源於多變魚腥藻。在另一實施例中，原核生物PAL酶活性係使用cDNA或DNA序列產生，該等序列係來源於有時描述為編碼HAL活性或以PAL-HAL基元為特徵，但具有不同於HAL之關鍵PAL殘基的序列。

在一廣泛實施例中，該方法包含以下步驟：使編碼整個或部分原核生物PAL或其生物學活性片段、突變體、變異體或類似物之cDNA或DNA轉型至適於其表現之細胞內。在較佳實施例中，使用表現載體將DNA轉移至適於其表現之細胞或細胞株內。在一尤其較佳實施例中，使cDNA或DNA轉型至大腸桿菌內且使重組細菌PAL視情況過度表現為融合蛋白質。在另一實施例中，製備原核生物PAL之方法包含以下步驟：(a)使經編碼整個原核生物PAL或其生物學活性片段或突變體、變異體或類似物之cDNA或DNA轉型的細胞在合適生長培養基中生長至適當密度以製備菌種培養物；(b)將經轉型細胞引入生物反應器中；(c)向生物反應器中供應合適生長培養基；及(d)將經轉染細胞與含酶培養基分離。

在一較佳實施例中，使含或不含N-末端標籤(例如，八組胺鹽基標籤)之重組原核生物PAL或其生物學活性片段、突變體、變異體或類似物於具有誘導性啟動子(諸如IPTG(異丙基- β -D-硫代吡喃半乳糖苷)之載體(較佳pIBX1(Su等人, Appl. Environ. Microbiol. 62:2723-2734 (1996))或pET28a(Invitrogen))中或於大腸桿菌BLR(DE3)/pLysS(Novagen)或大腸桿菌BL21(DE3)/pLysS(Invitrogen)細胞中過度表現。在一尤其較佳實施例中，製備原核生物PAL之方法包含以下步驟：(1)使來自甘油儲備物之用於生物反應器/醱酵器之菌種培養物在搖瓶中生長；(2)以分批饋入模式將該菌種培養物引入受控生物反應器中；(3)使該培養物在補充有葡萄糖之培養基(pH 7.8, >20%溶解氧，攪動速率達1200 rpm, 30°C)中生長直至細胞密度達到OD600為70-100(約22-25小時)；(4)用0.4 mM IPTG誘導該培養物；(5)使該培養物在22°C至26°C之低溫下生長直至活性變化<0.1 IU/mL(約40-48小時，且OD600通常為200)；及(6)藉由連續離心收集細菌。在一較佳實施例中，細胞培養基通常經限定且包含以下各物：酵母提取蛋白質、蛋白腴-胰化蛋白腴、葡萄糖、甘油、酪蛋白胺基酸、痕量鹽及磷酸鹽緩衝鹽。

在第五態樣中，本發明之特徵為一種純化原核生物PAL或其生物學活性片段、突變體、變異體或類似物之方法。根據第一實施例，使經轉型細胞團生長且破裂，得到粗重組酶。通常使外源物質自粗塊體中分離出以防止管柱結

垢。層析純化係使用一或多種層析樹脂進行。隨後，將經純化蛋白質調配於經設計提供長期穩定活性之緩衝液中。在另一較佳實施例中，純化原核生物PAL之方法包含以下步驟：(a)使含有重組PAL之細菌溶解；(b)熱處理溶菌物以使病毒失活；(c)使用第二連續離心步驟及/或深度過濾使該溶菌物澄清；(d)使澄清溶菌物穿過炭過濾步驟；(e)使(d)中之濾液穿過最後過濾步驟(如用 Sartorius Sartopore 0.2 μm 過濾器)；(f)使最後濾液流過疏水性相互作用層析樹脂(諸如丁基疏水性相互作用層析)；(g)使(f)中之溶離液流過陰離子層析樹脂(諸如Q離子交換管柱)；(h)藉由緩衝液交換，以切向流過濾法回收最終產物；及(i)對最終產物進行滅菌。熟習此項技術者易於瞭解，一或多個層析步驟可經省略或取代，或在本發明之範疇內層析步驟之順序可變化。最後，可視需要執行適當滅菌步驟。

在第六態樣中，本發明涵蓋如下鑑別可預防、改善或治療癌症之原核生物PAL或其生物活性片段、突變體、變異體或類似物的篩選檢定：使培養中之腫瘤細胞與原核生物PAL接觸及判定原核生物PAL是否降低腫瘤細胞之增殖及/或存活。該等篩選檢定亦可包括如下步驟：產生在鄰近活性位點之區域中或在整個多肽序列中在活性位點處包括保守或非保守性取代之變異體，該等活性位點例如海洋鏈黴菌 EncP 中之 Gly142、Thr-Ser-Gly 三合物(143-145)、Asp146、Leu147、Asn196、Ile195、Leu192、Leu76、Asn79、Met400、Thr428、Gln432，或其在其它原核生物

PAL(諸如點形念珠藻或多變魚腥藻)中之等效物，其與紅冬孢酵母PAL(RtPAL)中之殘基Ser210、Ala-Ser-Gly三合物(211-213)、Asp214、Leu215、Asn270、Val269、Leu266、Leu134、His137、Lys468、Glu496、Gln500等效，接著測試變異體之活體外苯丙胺酸轉化活性。在某些實施例中，該方法為高產量檢定。在一較佳實施例中，使用生物資訊學方法對細菌物種之完整基因組進行測序並就原核生物PAL同源物之存在進行篩選。在另一較佳實施例中，諸如藉由測試活體外使苯丙胺酸轉化為反式肉桂酸酯之能力來證實該等同源物之蛋白質產物之PAL催化活性。

在第七態樣中，本發明提供使用原核生物PAL組合物診斷疾病(包括但不限癌症)之方法。在一實施例中，使用原核生物PAL來量測血液、血漿或血清樣品中Phe之含量。在另一實施例中，本發明涵蓋包含原核生物PAL用於監測個體之血液、血漿或血清樣品中Phe含量之診斷套組。

由下文之實施方式，本發明之其他特徵及優點將變得顯而易見。然而應瞭解，實施方式及特定實例雖然說明本發明之較佳實施例，但僅以說明之方式給出，因為由本實施方式，屬於本發明之精神及範疇內之不同變化及修改形式對於熟習此項技術者而言將變得明顯。

【實施方式】

已鑑別出數種細菌PAL為HAL/PAL家族之一部分，包括(但不限於)海洋鏈黴菌PAL(亦稱EncP，SEQ ID NO: 5，圖4)；點形念珠藻PAL/HAL(寄存編號ZP_00105927，來自點

形念珠藻 ATCC 29133，2004年10月1日提交，NCBI微生物基因組註解計劃(NCBI Microbial Genomes Annotation Project))(SEQ ID NO: 2，圖4)；多變魚腥藻 PAL/HAL(基因 ID 3679622，Ava_3988 苯丙胺酸/組胺酸解氨酶，多變魚腥藻 ATCC 29413，2006年3月31日)(SEQ ID NO:4，圖4)；光合原核生物組囊藻之 PAL/HAL(Lofflehardt, Z. Naturforsch 31 (11-12): 693-9 (1976))；腸內菌科革蘭氏陰性菌發光桿菌 TT01 之 PAL/HAL(Williams 等人，Microbiology 151: 2543-2550 (2005))及輪枝鏈黴菌之 PAL/HAL(Bezanson 等人，Can. J. Microbiol. 16 (3): 147-51 (1970))。此外，已評估海洋鏈黴菌中之 PAL 活性(Xiang 等人，J. Biol. Chem. 277:32505-32509 (2002))。已在產生生物活性天然產物(經由混合聚酮化合物-肽生物合成路徑產生)方面對藍藻細菌(諸如魚腥藻 (Anabaena)及念珠藻 (Nostoc))進行了研究(Moore, Nat. Prod. Rep. 22 (5):580-593 (2005)；Becker 等人，Gene 325:35-42 (2004)；Hoffman 等人，Gene 311: 171-180 (2003))。

雖然 PAL 為普遍存在之高等植物酶，其在產生苯丙酸類代謝物之執行步驟中催化苯丙胺酸非氧化性脫胺為肉桂酸(Hahlbrock 等人，Annu. Rev. Plant Phys. Plant Mol. Biol. 40: 347-369 (1989))，但 PAL 僅見於幾種細菌中，其中 PAL 參與"海洋鏈黴菌"(Xiang 等人，J. Biol. Chem. 277: 32505-32509 (2002))及纖維堆囊菌(Hill 等人，Chem. Commun. 1358-1359 (2003))中之苯甲醯基-輔酶 A 生物合成及輪枝鏈

黴菌中之肉桂醯胺生物合成(Bezanson等人, Can. J. Microbiol. 16:147-151 (1970))。抑菌劑促腸活動素(enterocin)為海洋細菌"海洋鏈黴菌"之天然產物,其生物合成涉及多種不常見特徵(Hertweck等人, Chem. Biol. 11:461-468 (2004); Piel等人, Chem. Biol. 7:943-955 (2000); Piel等人, J. Am. Chem. Soc. 122:5415-5416 (2000); Xiang等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 101:15609-15614 (2004))。其中一特徵為形成罕見的聚酮化合物合成酶(PKS)起始單元苯甲醯基-輔酶A(CoA)(Moore等人, Nat. Prod. Rep. 19:70-99 (2002))。初始生化反應涉及由新穎的細菌苯丙胺酸解氨酶(PAL, EC 4.3.1.5)EncP將胺基酸L-苯丙胺酸轉化為反式肉桂酸(Xiang等人, J. Biol. Chem. 277: 32505-32509 (2002))。將肉桂酸活化為其輔酶A硫酯,接著進行單輪 β -氧化產生苯甲醯基-輔酶A(Hertweck等人, Chem Bio Chem 2:784-786 (2001); Hertweck等人, Tetrahedron 56: 9115-9120 (2000); Xiang等人, J. Bacteriol. 185: 399-404 (2003)),其引發促腸活動素II型PKS進行七個丙二醯基-輔酶A分子之鏈延伸。

第一原核生物PAL編碼基因(encP)(SEQ ID NO: 5)已加以表徵且已鑑別出其在"海洋鏈黴菌"中之肉桂酸及促腸活動素從頭合成中之作用(Kalaitzis等人, J. Am. Chem. Soc. 125:9290-9291 (2003); Xiang等人, J. Biol. Chem. 277:32505-32509 (2002))。encP基因編碼比真核生物PAL明顯少將近200個胺基酸殘基之522個胺基酸之蛋白質。雖

然序列與植物PAL(諸如歐芹PAL)同源(Röther等人, Eur. J. Biochem. 269: 3065-3075 (2002))(CAA57056, 30%一致且48%類似), 但其與諸如惡臭假單胞菌之細菌組胺酸解氨酶(HAL, EC 4.3.1.3)(Schwede等人, Biochemistry 27: 5355-5361 (1999))(A35251, 36%一致且54%類似, SEQ ID NO: 6, 圖4)及莢膜紅細菌(*Rhodobacter capsulatus*)之酪胺酸解氨酶(TAL)(Kyndt等人, FEBS Lett. 512:240-244 (2002))共有更大的同源性(圖3)。同源性包括苯丙胺酸/組胺酸/酪胺酸解氨酶家族之位置143處之保守性活性位點絲胺酸殘基, 其為4-次甲基咪唑-5-酮(MIO)輔基中經修飾脫氫丙胺酸殘基之可能前驅物(Langer等人, Adv. Prot. Chem. 58:175-188 (2001); Poppe, Curr. Opin. Chem. Biol. 5:512-524 (2001); Schwede等人, Biochemistry 27:5355-5361 (1999))。EncP與AdmH(AAO39102, 63%一致且76%類似)共有最大的序列同源性, AdmH為參與成團泛菌(*Pantoea agglomerans*)中胺德咪素(andrimid)生物合成中之推定苯丙胺酸胺基歧化酶, 其與球孢鏈黴菌(*Streptomyces globisporus*)之酪胺酸胺基歧化酶Sgc4相關(Christenson等人, J. Am. Chem. Soc. 125: 6062-6063 (2003); Christenson等人, Biochemistry 42: 12708-12718 (2003))。

證明HAL與PAL享有分別來自組胺酸及苯丙胺酸中以化學方式艱難消除氮的共同機制。在兩種酶的作用下, 超親電子輔基5-亞甲基-3,5-二氮咪唑-4-酮(MIO)藉由對芳環之Friedel-Crafts型攻擊而使其各自受質之非酸性 β 氮原子活

變體、變異體或類似物之組合物以及其用於治療目的、包括治療癌症之用途。

A. 定義

除非另有說明，否則本申請案(包括說明書及申請專利範圍)中所使用之以下術語具有下文給出之定義。須注意，除非上下文另有明確規定，否則如本說明書及隨附申請專利範圍中所使用，單數形式"一"及"該"包括複數個所指物。標準化學術語之定義可見於參考著作中，包括 Carey及 Sundberg, *Advanced Organic Chemistry*，第3版，A卷及B卷(Plenum Press, New York 1992)。除非另有說明，否則本發明之實施將採用此項技術技能範圍內之合成有機化學、質譜學、製備型及分析型層析法、蛋白質化學、生物化學、重組DNA技術及藥理學之習知方法。參見，例如 T.E. Creighton, *Proteins: Structures and Molecular Properties* (W.H. Freeman and Company, 1993)；A.L. Lehninger, *Biochemistry* (Worth Publishers, Inc.，第4版，2004)；Sambrook等人，*Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (第2版，1989)；*Methods In Enzymology* (S. Colowick 及 N. Kaplan 編，Academic Press, Inc.)；*Remington's Pharmaceutical Sciences*，第18版(Easton, Pennsylvania: Mack Publishing Company, 1990)。

本文(無論上文或下文)中所引用之所有公開案、專利及專利申請案均整體以引用之方式併入本文中。

正文中通篇使用以下胺基酸縮寫：

丙胺酸：Ala(A)	精胺酸：Arg(R)
天冬醯胺：Asn(N)	天冬胺酸：Asp(D)
半胱胺酸：Cys(C)	麩胺醯胺：Gln(Q)
麩胺酸：Glu(E)	甘胺酸：Gly(G)
組胺酸：His(H)	異白胺酸：Ile(I)
白胺酸：Leu(L)	離胺酸：Lys(K)
甲硫胺酸：Met(M)	苯丙胺酸：Phe(F)
脯胺酸：Pro(P)	絲胺酸：Ser(S)
蘇胺酸：Thr(T)	色胺酸：Trp(W)
酪胺酸：Tyr(Y)	纈胺酸：Val(V)

"聚核苷酸"係指包含核苷酸單元之聚合物。聚核苷酸包括天然存在之核酸，諸如去氧核糖核酸("DNA")及核糖核酸("RNA")以及核酸類似物。核酸類似物包括：包括參與與其他核苷酸之鍵聯而不是天然存在之磷酸二酯鍵之非天然存在的鹼基、核苷酸的核酸類似物，或包括經由不同於磷酸二酯鍵之鍵聯連接之鹼基的核酸類似物。因此，核苷酸類似物包括(例如但不限於)硫代磷酸酯、二硫代磷酸酯、磷酸三酯、磷醯胺酸酯、硼烷磷酸酯、甲基磷酸酯、對掌性甲基磷酸酯、2-O-甲基核糖核苷酸、肽-核酸(PNA)及其類似物。該等聚核苷酸可(例如)使用自動化DNA合成儀合成。術語"核酸"通常指大聚核苷酸。術語"寡核苷酸"通常指短聚核苷酸，通常不大於約50個核苷酸。應瞭解，當核苷酸序列由DNA序列(亦即A、T、G、C)表示時，其亦包括RNA序列(亦即A、U、G、C)，其中"U"置換"T"。

"cDNA"係指與mRNA互補或一致之呈單鏈或雙鏈形式之DNA。

本文中使用的習知註解來描述聚核苷酸序列：單鏈聚核苷酸序列之左手端為5'-端；雙鏈聚核苷酸序列之左手方向稱為5'-方向。向初生RNA轉錄物以5'至3'添加核苷酸之方向稱為轉錄方向。具有與mRNA相同之序列之DNA鏈稱為"編碼鏈"；在具有與由之轉錄之mRNA相同之序列的DNA鏈上且位於RNA轉錄物之5'或5'端之序列稱為"上游序列"；在具有與RNA相同之序列之DNA鏈上且位於編碼RNA轉錄物之3'或3'端之序列稱為"下游序列"。

"互補"係指兩個聚核苷酸之相互作用表面之拓撲學相容性或匹配在一起。因此，該兩個分子可描述為互補，且此外，接觸表面特徵彼此互補。若第一聚核苷酸之核苷酸序列與第二聚核苷酸之聚核苷酸之結合搭配物之核苷酸序列一致，則第一聚核苷酸與第二聚核苷酸互補。因此，序列為5'-TATAC-3'之聚核苷酸與序列為5'-GTATA-3'之聚核苷酸互補。

若與目標核苷酸序列互補的序列與參考核苷酸序列大體上一致，則該目標核苷酸序列與參考核苷酸序列"大體上互補"。

"編碼"係指聚核苷酸(諸如基因、cDNA或mRNA)中之特定核苷酸序列在生物過程中充當合成其他具有確定核苷酸序列(亦即rRNA、tRNA及mRNA)或確定胺基酸序列及由此產生之生物學特性的聚合物及巨分子之模板的內在特性。

因此，若轉錄並轉譯基因所產生之mRNA在細胞或其他生物系統中產生蛋白質，則該基因編碼該蛋白質。基因或cDNA之核苷酸序列與mRNA序列一致且通常提供於序列表中之編碼鏈與用作轉錄模板之非編碼鏈可稱為編碼該基因或cDNA之蛋白質或其他產物。除非另有說明，否則"編碼胺基酸序列之核苷酸序列"包括彼此為簡併型式且編碼相同胺基酸序列之所有核苷酸序列。編碼蛋白質及RNA之核苷酸序列可包括內含子。

"重組聚核苷酸"係指具有並非天然接合在一起之序列之聚核苷酸。擴增或組裝之重組聚核苷酸可包括於合適載體中，且該載體可用於轉型合適宿主細胞。包含重組聚核苷酸之宿主細胞稱為"重組宿主細胞"。隨後使基因於重組宿主細胞中表現以產生(例如)"重組多肽"。重組聚核苷酸亦可起非編碼功能(例如啟動子、複製起點、核糖體結合位點等)。

"表現控制序列"係指聚核苷酸中的調控與其操作性連接之核苷酸序列之表現(轉錄及/或轉譯)的核苷酸序列。"操作性連接"係指兩部分之間的功能關係，其中一部分之活性(例如調控轉錄之能力)對另一部分產生作用(例如該序列之轉錄)。表現控制序列可包括(例如但不限於)啟動子(例如誘導型或組成型啟動子)、增強子、轉錄終止子、起始密碼子(亦即ATG)、內含子拼接信號及終止密碼子之序列。

"表現載體"係指包含重組聚核苷酸之載體，該重組聚核

苷酸包含與待表現之核苷酸序列操作性連接之表現控制序列。表現載體包含足夠的順式作用表現元件；其他表現元件可由宿主細胞或活體外表現系統提供。表現載體包括此項技術中已知之所有表現載體，諸如合併有重組聚核苷酸之黏質體、質體(例如裸露質體或包含於脂質體中之質體)及病毒。

"擴增"係指藉以複製聚核苷酸序列且從而使其擴增為大量之聚核苷酸分子的任何方法，例如逆轉錄、聚合酶鏈反應及連接酶鏈反應。

"引子"係指能夠與指定聚核苷酸模板特異性雜交且提供互補聚核苷酸合成之起始點的聚核苷酸。當將聚核苷酸引子置於誘導合成之條件下(亦即在核苷酸、互補聚核苷酸模板及聚合媒介(諸如DNA聚合酶)存在下)時，該合成發生。引子通常為單鏈，但可為雙鏈。引子通常為去氧核糖核酸，但多種合成及天然存在之引子適用於多種應用中。引子與經設計以與之雜交的模板互補以充當啟動合成之位點，但不一定反映該模板之確切序列。在該情況下，引子與模板之特異性雜交視雜交條件之嚴格性而定。引子可經(例如)發色部分、放射性部分或螢光部分標記且可用作可偵測部分。

"多肽"係指包含經由肽鍵連接之胺基酸殘基、其天然存在之相關結構變異體及非天然存在之合成類似物的聚合物、其天然存在之相關結構變異體及非天然存在之合成類似物。合成多肽可例如使用自動多肽合成儀合成。術語

"蛋白質"通常係指大型多肽。術語"肽"通常係指短多肽。

本文中使用的習知註解來描繪多肽序列：多肽序列之左手端為胺基末端；多肽序列之右手端稱為羧基末端。

"保守性取代"係指多肽中之胺基酸經功能相似之胺基酸取代。以下六組各自含有彼此間為保守性取代的胺基酸：

1) 丙胺酸(A)、絲胺酸(S)、蘇胺酸(T)；

2) 天冬胺酸(D)、麩胺酸(E)；

3) 天冬醯胺(N)、麩胺醯胺(Q)；

4) 精胺酸(R)、離胺酸(K)；

5) 異白胺酸(I)、白胺酸(L)、甲硫胺酸(M)、纈胺酸(V)；及

6) 苯丙胺酸(F)、酪胺酸(Y)、色胺酸(W)。

胺基酸亦可如下分組：

(1) 疏水性：Met、Ala、Val、Leu、Ile；

(2) 中性親水性：Cys、Ser、Thr；

(3) 酸性：Asp、Glu；

(4) 鹼性：Asn、Gln、His、Lys、Arg；

(5) 影響鏈取向之殘基：Gly、Pro；及

(6) 芳族：Trp、Tyr、Phe。

在兩個或兩個以上聚核苷酸或多肽序列之情況下，術語"一致"或"一致性"百分率係指如使用2005年9月15日申請之先前同在申請中之美國專利申請案第11/230,374號(其整體以引用之方式併入本文中)中所述之序列比較算法或藉由目測檢查所量測，當在達成最大對應性之情況下進行比較

並比對時，兩個或兩個以上序列或子序列相同或具有規定百分率之相同核苷酸或胺基酸殘基。

在兩個核酸或多肽之情況下，短語"大體上同源"或"大體上一致"通常係指如使用以下序列比較算法中之一種或藉由目測檢查所量測，當在達成最大對應性之情況下進行比較並比對時，兩個或兩個以上序列或子序列具有至少40%、60%、80%、90%、95%、98%之核苷酸或胺基酸殘基一致性。較佳地，大體一致性存在於長度為至少約50個殘基之區域中，更佳至少約100個殘基之區域中，且最佳序列在至少約150個殘基中大體上一致。在一最佳實施例中，序列在比較生物聚合物兩者中之任一者或兩者之整個長度範圍內大體上一致。

"大體上純"或"經分離"意謂目標物質為所存在之主要物質(亦即，以莫耳濃度計，豐度比組合物中之任何其他個別巨分子物質高)，且大體上經純化之部分為目標物質在所存在之所有巨分子物質中佔至少約50%(以莫耳濃度計)之組合物。通常，大體上純之組合物意謂存在於組合物中之巨分子物質中約80%至90%或90%以上為經純化之所關注物質。若組合物基本上由單一巨分子物質組成，則目標物質經純化為實質均質性(由習知偵測方法無法在組合物中偵測到污染物質)。就該定義而言，溶劑物質、小分子(<500道爾頓)、穩定劑(例如BSA)及元素離子物質不視為巨分子物質。在一些實施例中，本發明之原核生物PAL變異體組合物為大體上純或經分離。在一些實施例中，本發

明之原核生物PAL變異體組合物相對於其合成中所使用之巨分子起始物質而言為大體上純或經分離。在一些實施例中，本發明之醫藥組合物包含與一或多種醫藥學上可接受之賦形劑混合之大體上經純化或經分離之原核生物PAL變異體。

如應用於標的之"天然存在"係指該標的可見於自然界中之實情。舉例而言，可自自然界中之來源分離且尚未在實驗室中經人工有意修飾之生物體(包括病毒)中所存在之多肽或聚核苷酸序列為天然存在的。

術語"野生型"(wt)係指生物體之天然遺傳形式。野生型有別於突變形式(具有基因突變之生物體)。

術語"多肽"及"蛋白質"係指胺基酸殘基之聚合物且不限於產物之最小長度。因此，該定義內包括肽、寡肽、二聚體、多聚體及其類似物。全長蛋白質與其片段皆為該定義所涵蓋。該等術語亦包括多肽之表現後修飾，例如糖基化、乙醯化、磷酸化及其類似修飾。此外，出於本發明之目的，"多肽"係指包括對天然序列之修飾(諸如缺失、添加及取代(在性質上通常為保守性的))之蛋白質，只要該蛋白質維持所要活性。該等多肽在本文中可稱為"突變體"。該等修飾可為有意的，如經由定點突變誘發，或可為偶然的，諸如經由產生蛋白質之宿主或歸因於PCR擴增之錯誤所引起之突變。

如本文中所使用，"變異體"、"類似物"或"衍生物"為與給定化合物(例如肽)具有大於約70%但小於100%之序列相

似性之化合物(例如肽)。該等變異體、類似物或衍生物可包含非天然存在之胺基酸殘基(包括(例如但不限於)高精胺酸、鳥胺酸、青黴胺及正纈胺酸)以及天然存在之胺基酸殘基。該等變異體、類似物或衍生物亦可包含一個或複數個D-胺基酸殘基，且可在兩個或兩個以上胺基酸殘基之間含有非肽互連。

如本文中所使用，PAL多肽(例如AvPAL)與水溶性聚合物(例如聚乙二醇或PEG)之"比率"係指PAL多肽與水溶性聚合物之間的反應條件莫耳比。舉例而言，AvPAL與聚乙二醇之約1:3之比率(1:3 AvPAL:PEG)意謂經化學修飾PAL在每3莫耳聚乙二醇約1莫耳AvPAL之反應條件下產生。在下文實例6中所述之反應條件下，約1:3 AvPAL:PEG之比率產生每莫耳AvPAL單體約10-12莫耳PEG。

如本文中所使用，"治療"係指預防性治療或治療性治療或診斷性治療。

"預防性"治療為向不展現疾病或病理(亦即癌症)病徵或僅展現早期病徵之個體投與以達成降低發展病理之風險之目的治療。本發明之原核生物PAL組合物可以預防性治療形式給與以降低發展病理(亦即癌症)之可能性或使病理(若已發展)之嚴重程度最低。

"治療性"治療為向展現病理(亦即癌症)病徵或症狀之個體投與以達成減弱或消除該等病徵或症狀之治療。該等病徵或症狀可為生物化學、細胞學、組織學、機能、主觀或客觀病徵或症狀。本發明之原核生物PAL組合物可以治療

性治療形式給與或出於診斷之目的給與。

"診斷"意謂鑑別病理性病狀(亦即癌症)之存在或性質。診斷方法在其特異性及選擇性方面不同。雖然特定診斷方法可能不能提供對病狀之明確診斷,但該方法若能提供有助於診斷之陽性指示(positive indication)則足矣。

"醫藥組合物"係指適於目標動物(包括人類及哺乳動物)之醫藥用途之組合物。醫藥組合物包含藥理學上有效之量之原核生物PAL多肽且亦包含醫藥學上可接受之載劑。醫藥組合物涵蓋包含活性成分及構成載劑之惰性成分的組合物,以及由任何兩種或兩種以上成分組合、複合或聚集或由一或多種成分解離或由一或多種成分之其他類型反應或相互作用直接或間接形成的任何產物。因此,本發明之醫藥組合物涵蓋藉由將本發明之原核生物PAL多肽與醫藥學上可接受之載劑混合而製備之任何組合物。

"醫藥學上可接受之載劑"係指任何標準醫藥賦形劑、媒劑、稀釋劑、穩定劑、防腐劑、增溶劑、乳化劑、佐劑及/或載劑,諸如(但不限於)磷酸鹽緩衝生理食鹽水溶液、5%右旋糖水溶液及乳液,諸如油/水或水/油乳液,以及不同類型之濕潤劑及/或佐劑。合適醫藥載劑及調配物描述於Remington's Pharmaceutical Sciences, 第19版(Mack Publishing Co., Easton, 1995)中。較佳醫藥載劑視活性劑之預定投藥模式而定。典型投藥模式包括經腸投藥(例如經口)或非經腸投藥(例如皮下、肌肉內、靜脈內或腹膜內注射;或局部、經皮或經黏膜投藥)。
"醫藥學上可接受之

鹽"為可調配成用於醫藥用途之原核生物PAL變異體組合物之鹽，包括例如金屬鹽(鈉鹽、鉀鹽、鎂鹽、鈣鹽等)及氮或有機胺之鹽。

"醫藥學上可接受"或"藥理學上可接受"意謂在生物學上或其他方面並非不合需要之物質，亦即，該物質可向個體投與而不會引起任何不合需要之生物學效應或不會以有害方式與組合物中所含之任何組分相互作用。

如本文中所使用，術語"單位劑型"係指適用於人類及動物個體呈單劑量之物理個別單元，各單元含有足以產生所要效應之量計算的預定量之本發明原核生物PAL變異體，以及醫藥學上可接受之稀釋劑、載劑或媒劑。本發明之新穎單位劑型之規格視以下因素而定：所採用之特定原核生物PAL變異體及欲達成之效應，及各原核生物PAL變異體於宿主中相關之藥效學。

"生理pH值"或"生理範圍內之pH值"意謂約7.2至8.0(包括7.2及8.0)範圍內、更通常約7.2至7.6(包括7.2及7.6)範圍內之pH值。

如本文中所使用，術語"個體"涵蓋哺乳動物及非哺乳動物。哺乳動物之實例包括(但不限於)哺乳動物綱之任何成員：人類、非人類靈長類(諸如黑猩猩)及其他猿及猴種；農場動物，諸如牛、馬、綿羊、山羊、豬；家養動物，諸如兔、犬及貓；實驗室動物，包括齧齒動物，諸如大鼠、小鼠及天竺鼠，及其類似物。非哺乳動物之實例包括(但不限於)鳥、魚及其類似物。該術語不指定特定年齡或性

別。

B. 原核生物PAL變異體

特定巨分子之可靠三維結構或結構模型之闡述使得合理設計成為一種優化該巨分子之特定結構及/或功能之生產方法。使用三維結構或結構模型來優化PAL酶之方法描述於2005年9月19日申請之先前同在申請中之美國專利申請案第11/230,374號中，該申請案整體以引用之方式併入本文中。原核生物PAL之高解析三維蛋白質晶體結構可用於涉及蛋白質工程化以改良原核生物PAL之生物化學及生物物理性質及增強原核生物PAL之活體內治療功效的方法。本發明涵蓋與比野生型原核生物PAL相比具有較高之苯丙胺酸轉化活性及/或降低之免疫原性的原核生物PAL變異體。本發明亦涵蓋與野生型原核生物PAL相比具有較高之生物化學穩定性及/或生物化學半衰期之原核生物PAL變異體。

催化活性增強之原核生物PAL變異體

本發明之野生型原核生物PAL之生物學活性位點可視需要加以修飾以優化PAL動力學特徵。產生半最大活性之受質濃度 K_m 與PAL使Phe含量維持在可接受之範圍(亦即使用此項技術中熟知之標準偵測方法，自偵測含量以下至約20 μM 至60 μM 之間，較佳至小於約20 μM ，且甚至更佳至小於約10 μM)內之治療功效密切相關。 K_m 為酶對受質之親和力。藉由控制親和力，可限制或控制任何酶針對不同濃度受質之功效。舉例而言，若 K_m 為1000 μM (例如，紅冬

孢酵母PAL)，則酶之活性在240 μM 之血液Phe含量下將降至約12.5%且在60 μM 之血液Phe含量下將降至約3%。若 K_m 為240 μM ，則酶之活性在240 μM 之血液Phe含量下將降至約50%且在60 μM 之血液Phe含量下將降至約12%。一較佳治療目標將具有在治療後具有足以使Phe含量降低且維持在(使用此項技術中熟知之標準偵測方法)偵測含量以下至約20 μM 至60 μM 之間、較佳至小於約20 μM 且甚至更佳至小於約10 μM 範圍內的活性的原核生物PAL酶。具有約1000 μM 之 K_m 之酶將隨Phe含量下降至正常範圍(約55-60 μM ，參見Kaufmann, Proc. Natl. Acad. Sci USA 96:3160-3164 (1999))內快速喪失活性且亦將需要不可行地投與高濃度或大量劑量。具有較低 K_m 之酶可快速耗盡Phe且在治療後維持Phe含量在偵測含量以下至約20 μM 至60 μM 之間、較佳至小於約20 μM 且甚至更佳至小於約10 μM 範圍內，此可適用於控制癌症。

在較佳實施例中，生物學活性原核生物PAL變異體具有至少約0.1 s^{-1} 、較佳大於約0.5 s^{-1} 且甚至更佳大於約1.0 s^{-1} 之 k_{cat} 。在最佳實施例中，生物學活性原核生物PAL變異體具有至少約0.4 s^{-1} 、較佳大於約2.0 s^{-1} 且甚至更佳大於約4.0 s^{-1} 之 k_{cat} 。在其他較佳實施例中，生物學活性原核生物PAL變異體具有介於約10 μM 至約2000 μM 之間的 K_m 。在更佳實施例中，生物學活性原核生物PAL變異體具有介於約10 μM 至約1000 μM 之間的 K_m 。在甚至更佳實施例中，生物學活性原核生物PAL變異體具有介於約10 μM

至約500 μM 之間的 K_m 。在其他較佳實施例中，生物學活性原核生物PAL變異體展現比野生型PAL大約50%至約10倍之酶促活性。在其他較佳實施例中，生物學活性原核生物PAL變異體展現比野生型PAL高約50%至約100%之酶促活性。該等生物學活性原核生物PAL變異體可使用此項技術中熟知之方法(諸如定點突變誘發)形成。

免疫原性降低之原核生物PAL變異體

目前使用多種策略來降低蛋白質免疫原性。為使免疫反應最小化而引入之修飾較佳不破壞巨分子之結構、功能或穩定性。所使用之有效策略包括：增加人類序列含量(嵌合及/或其他"人化"方法)；改良溶解特性；移除抗體抗原決定基；引入化學衍生化(諸如聚乙二醇化)；及/或鑑別並移除MHC抗原識別位。對於注射治療劑而言，可藉由執行抗原決定基定位來定位活體內免疫反應性，接著單獨或與位點特異性聚乙二醇化(Hershfield等人，Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:7185-7189 (1991)；Leong等人，Cytokine 16(3):106-119(2001)；Lee等人，Pharm. Res. 20(5):818-825 (2003))或其他化學衍生化方法組合進行合理突變誘發以修飾該等免疫原性位點及/或以其他方式使其突變，從而將蛋白質免疫反應性降低至可接受之程度。對抗原表面蛋白質區域之修飾降低免疫原性(Chirino等人，Drug Discov. Today 9(2): 82-90 (2004))。一種改良方法涉及建構保留催化活性之尺寸更小的蛋白質(例如使用吸光度檢定進行活性量測)。亦可使用蛋白質工程化聯合ELISA篩選

來鑑別免疫反應性降低之突變體。另一方法將點突變引入其他表面Lys位點以便進行聚乙二醇化衍生化，該方法經證明可用測試酶嘌呤核苷磷酸化酶降低免疫原性(Hershfield等人，(1991)，同上)。一替代途徑使用位於蛋白質抗原決定基區域中之殘基之突變來移除免疫原性位點(Yeung等人，J. Immunol. 172(11): 6658-6665 (2004))。在類似於抗體人化之方法中，使來自人類抗體之同源環區域及/或殘基經取代為同源蛋白質之相應環區域。

改良蛋白質之溶解特性可增強酶比活性及/或降低免疫原性。細菌表現重組蛋白質之一典型溶解特性為歸因於(例如)鏈間二硫鍵形成、疏水性相互作用及/或二價陽離子而形成蛋白質聚集物(Chi等人，Pharm. Res. 20(9): 1325-1336 (2003))。重組表現蛋白質之聚集可增強免疫反應(Hermeling等人，Pharm. Res. 21(6): 897-903 (1994)；Schllekens, Nephrol. Dial. Transplant. 20(增刊6): vi3-9 (2005))。一種改良方法涉及用其他胺基酸殘基(例如絲胺酸)取代表面半胱胺酸殘基以使形成鏈間二硫鍵之可能性最小。舉例而言，用絲胺酸殘基取代兩個表面半胱胺酸殘基降低分支酸裂解酶(chorismate lyase)之聚集，而對酶活性之影響較小(Holden等人，Biochim. Biophys. Acta 1594(1): 160-167 (2002))。本發明涵蓋一或多個半胱胺酸殘基已經另一胺基酸殘基、較佳絲胺酸殘基取代之原核生物PAL變異體。在一些實施例中，原核生物PAL之一或多個半胱胺酸殘基已經另一胺基酸殘基取代。在較佳實施例

中，原核生物PAL為AvPAL。在更佳實施例中，AvPAL之一或多個半胱胺酸殘基已經半胱胺酸殘基取代。

C. 經化學修飾之原核生物PAL變異體

巨分子化學修飾可以非特異性方式(產生衍生化物質之混合物)或以位點特異性方式(基於使用定點突變誘發與化學修飾之組合進行之野生型巨分子反應性導向之衍生化及/或位點選擇性修飾)或者使用經表現蛋白質連接法(Hofmann等人, Curr. Opin. Biotechnol. 13 (4): 297-303 (2002))執行。較佳使用化學修飾來降低免疫原性。聚乙二醇化為降低蛋白質免疫原性之一例示方法(Bhadra等人, Pharmazie 57 (1): 5-29 (2002))，但糖基化及使用磷酸化、醯胺化、羧化、乙醯化、甲基化、形成酸加成鹽、醯胺、酯及N-醯基衍生物之修飾之其他化學衍生化程序亦可行(Davis, Science 303: 480-482 (2004))。聚乙二醇化PAL蛋白質及確定最佳聚乙二醇化度之方法描述於2005年9月19日申請之先前同在申請中之美國專利申請案第11/230,374號中，該申請案其整體以引用之方式併入本文中。本發明涵蓋包含水溶性聚合物(亦即，聚乙二醇或PEG)之原核生物PAL變異體。

本發明涵蓋在原核生物PAL變異體之活性位點處/附近引入一或多個離胺酸殘基以部分藉由阻斷該酶之活性位點處/附近之其他胺基酸殘基(例如酪胺酸)的潛在聚乙二醇化或藉由阻斷對酶活性重要之離胺酸殘基的潛在聚乙二醇化來增強催化活性、降低免疫原性及/或改良生物化學穩定

性。在不受特定理論束縛之情況下，假設原核生物PAL之活性位點處/附近之酪胺酸殘基(亦即，AvPAL中之位置78或314)可為降低酶活性之聚乙二醇化的位點。在一些實施例中，原核生物PAL之不為酶活性所需之活性位點處/附近的一或多個胺基酸殘基係經離胺酸殘基取代。在一較佳實施例中，原核生物PAL為AvPAL。在一更佳實施例中，位置78或314處之AvPAL酪胺酸殘基不能聚乙二醇化。同樣在不受特定理論束縛之情況下，假設歸因於相鄰離胺酸殘基PAL(亦即，AvPAL中之位置413)之聚乙二醇化而通常經阻斷不能聚乙二醇化的原核生物PAL之離胺酸殘基(亦即，AvPAL中之位置419)可為降低受質結合及/或催化活性之聚乙二醇化的位點。在一些實施例中，原核生物PAL之一或多個胺基酸殘基係經離胺酸殘基取代，以使得對酶之受質結合及/或催化活性重要的離胺酸殘基不能聚乙二醇化。在一較佳實施例中，原核生物PAL為AvPAL。在一更佳實施例中，位置419處之AvPAL離胺酸殘基不能聚乙二醇化。

經聚乙二醇化原核生物PAL變異體

2006年6月12日申請之先前同在申請中之美國專利申請案第11/451,999號(其整體以引用之方式併入本文中)的實例7至9描述來自紅冬孢酵母(RtPAL)之離胺酸突變型R91K PAL、藍藻菌點形念珠藻所產生之PAL(NpPAL)及藍藻菌多變魚腥藻所產生之PAL(AvPAL)的聚乙二醇化形式及非聚乙二醇化形式對ENU2或BTB^{Renu2}小鼠苯丙胺酸(Phe)含量

之影響。該動物模型為苯丙胺酸羥化酶基因(PAH)基因座處之同型接合突變體，其導致動物患有重度高苯丙胺酸血症。因此，高Phe血漿含量使得該動物成為評估PAL降低血漿Phe之能力的適當模型。分別與非聚乙二醇化NpPAL及AvPAL相比，投與NpPAL及AvPAL之聚乙二醇化形式使得ENU2小鼠之Phe降低更多。對於NpPAL而言，在每週注射持續十週之時間後該效應得以維持。該等結果表明來自藍藻菌點形念珠藻及多變魚腥藻之PAL之聚乙二醇化為降低PKU感染小鼠之Phe含量所必需。

2006年6月12日申請之先前同在申請中之美國專利申請案第11/451,999號(其整體以引用之方式併入本文中)中之實例14描述AvPAL多肽中絲胺酸取代半胱胺酸殘基(例如位置503及565處)對ENU2小鼠中之Phe含量的效應。投與聚乙二醇化AvPAL雙半胱胺酸突變型AvPAL_C565SC503S產生可比於聚乙二醇化野生型AvPAL所實現之血漿Phe降低。另外，抗PAL抗體效價在注射聚乙二醇化AvPAL變異體之動物中比在注射聚乙二醇化野生型AvPAL之動物中低。該等結果表明聚乙二醇化AvPAL變異體(1)具有可比於聚乙二醇化野生型AvPAL之活體內PAL酶活性及(2)具有比聚乙二醇化野生型AvPAL降低之免疫原性。

D. 原核生物PAL變異體之治療用途及投藥

1. 癌症之各種形式

本發明係針對用包含單獨或與其他治療方案組合使用原核生物PAL組合物之方法治療癌症，該等其他治療方案例

如(但不限於)癌症治療劑或靶向癌症治療劑。詳言之，涵蓋可使用原核生物PAL組合物來治療血液、血清或血漿苯丙胺酸(Phe)濃度在任何含量(例如，約40 μM 至2000 μM)下之患者群體，其中人類血漿中之正常範圍係介於約55 μM 與60 μM 之間(Kaufman, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96:3160-3164 (1999))。

如本文中所使用，"癌症治療劑"係指已展示對癌細胞發揮治療效應(亦即，抑制增殖及/或存活)之任何化合物，例如小分子或肽/多肽。癌症治療劑通常為細胞毒性劑或細胞生長抑制劑。

如本文中所使用，"靶向癌症治療劑"係指已展示對特定癌細胞或組織發揮治療效應(亦即，抑制增殖及/或存活)之任何化合物，例如小分子或肽/多肽或多肽或接合多肽。靶向癌症治療劑通常為與標靶細胞之表面選擇性結合之抗體、具有抗體樣域之多肽或其他多肽，例如酶、激素、生長因子、細胞激素等。抗體、具有抗體樣域之多肽或其他多肽可未經接合或可與癌症治療劑接合。靶向癌症治療劑可為對特定癌細胞或組織發揮治療效應之化合物。

本發明之原核生物PAL組合物適用於治療任何Phe限制或耗盡抑制增殖及/或存活之癌症。鑑別用本發明之原核生物PAL組合物治療可有效之癌症可根據活體外培養實驗(參見實例14)或小鼠中之活體內人類腫瘤異種移植研究(參見實例15)使用(例如)腫瘤活檢試樣進行或藉由與具有人類癌症之動物模型中已知或已證明之Phe限制或耗盡敏感性

的腫瘤類型比較進行。在較佳實施例中，癌症為肺癌、腦癌或中樞神經系統癌症、結腸癌、前列腺癌、腎癌或轉移性黑色素瘤。在其他較佳實施例中，癌症為頭頸癌、子宮癌、白血病(例如，急性骨髓白血病或急性淋巴母細胞白血病)或骨髓瘤。在其他較佳實施例中，癌症為兒科癌症或抗性癌症(亦即，已展示對癌症治療劑或靶向癌症治療劑具有抗性之癌症)。

本發明之某些實施例係針對藉由與蛋白質限制性(亦即，不含苯丙胺酸)飲食組合向個體投與包含原核生物PAL或其生物學活性片段、突變體、變異體或類似物之組合物來治療癌症，其中組合投與原核生物PAL及蛋白質限制性飲食有效使該個體之血液、血漿或血清中之Phe濃度與在不存在該組合投藥之情況下之濃度相比降低。

預期本發明之方法將必須監測待由原核生物PAL組合物治療之個體之血漿Phe濃度。隨後藉由單獨或與其他治療方案(諸如癌症治療劑或靶向癌症治療劑)或原核生物PAL與蛋白質限制性(亦即，不含苯丙胺酸)飲食之組合方案組合投與原核生物PAL組合物來治療患者以使得達成患者之血液、血漿或血清Phe濃度降低至少10%。較佳地，該方法應達成血液、血漿或血清Phe濃度降低至少25%且更佳降低至少50%。甚至更佳地，該方法應達成個體之血液、血清或血漿Phe濃度降低至少50%、60%、70%、80%、90%、95%或95%以上(例如，當治療血漿Phe濃度為60 μ M之患者時，Phe濃度降低50%、70%或90%應分別達成30

μM 、 $18\ \mu\text{M}$ 或 $6\ \mu\text{M}$ 之血漿Phe濃度)。當然，應瞭解，本發明之治療方法應在治療後努力使患者之血液、血清或血漿Phe濃度降至(使用此項技術中熟知之標準偵測方法)偵測含量以下至約 $20\ \mu\text{M}$ 至 $60\ \mu\text{M}$ 之間、較佳至小於約 $20\ \mu\text{M}$ 且甚至更佳至小於約 $10\ \mu\text{M}$ 的範圍內。

可使用標準方法實現非經腸、經口或其他標準途徑之投藥及劑量。

2.用於治療之組合物

本發明涵蓋癌症之治療性介入。該等介入最初係基於使用原核生物PAL組合物、醫藥組合物及調配物，其可單獨使用或與其他治療方案(諸如癌症治療劑或靶向癌症治療劑)或低蛋白質飲食(亦即低苯丙胺酸)與原核生物PAL之組合方案或兩者組合使用。此外，原核生物PAL及/或飲食限制可進一步與其他治療組合物組合，該等治療組合物經設計以(例如)對抗低苯丙胺酸含量之表現形式，諸如(但不限於)酪胺酸補充。該部分提供關於可用於本文中所涵蓋之治療中之組合物、醫藥組合物及調配物之論述。

原核生物PAL組合物、醫藥組合物及調配物

一般而言，本發明涵蓋醫藥組合物，其包含治療有效量之本發明之原核生物PAL組合物以及一或多種醫藥學上可接受之賦形劑、媒劑、稀釋劑、穩定劑、防腐劑、增溶劑、乳化劑、佐劑及/或載劑。該等醫藥組合物包括具有不同緩衝內含物(例如Tris-HCl、磷酸鹽)、pH值及離子強度之稀釋劑；添加劑，諸如清潔劑及增溶劑(例如聚山梨

醇酯 20、聚山梨醇酯 80)；抗氧化劑(例如抗壞血酸、偏亞硫酸氫鈉)；防腐劑(例如硫柳汞、苄醇)及增積物質(例如乳糖、甘露糖醇)；參見，例如 Remington's Pharmaceutical Sciences，第 18 版(1990, Mack Publishing Co., Easton, Pa) 第 1435:1712 頁，其以引用之方式併入本文中。活性成分之有效量為可由熟習此項技術者藉由考慮諸如體重、年齡及治療目標之因素容易地確定之治療有效量、預防有效量或診斷有效量。

● 本發明之原核生物 PAL 醫藥組合物可包括使溶液 pH 值維持在所要範圍內之緩衝劑。較佳緩衝劑包括 Tris-HCl、乙酸鈉、磷酸鈉及檸檬酸鈉。亦可使用該等緩衝劑之混合物。適用於組合物中之緩衝劑之量主要視所用之特定緩衝劑及溶液之 pH 值而定。舉例而言，乙酸鹽為在 pH 5 下比在 pH 6 下有效之緩衝劑，因此，在溶液中在 pH 5 下可使用比在 pH 6 下少之乙酸鹽。一更佳緩衝劑為 Tris-HCl。本發明之醫藥組合物之較佳 pH 值範圍為約 pH 6.0-8.5。本發明之醫藥組合物之更佳 pH 值範圍為約 pH 7.0-8.0。本發明之醫藥組合物之最佳 pH 值範圍為約 pH 7.0-7.6。

● 本發明之醫藥組合物可進一步包括使溶液等張且更適於注射之等張性調節劑。較佳試劑為 50-200 mM 濃度範圍內之氯化鈉。更佳試劑為 100-150 mM 濃度範圍內之氯化鈉。最佳試劑為 130-150 mM 濃度範圍內之氯化鈉。

醫藥學上可接受之載劑或賦形劑可包括穩定劑，該等穩定劑為使本發明之原核生物 PAL 組合物穩定之分子。如本

文中所使用，術語"穩定"意欲包含例如(但不限於)增加原核生物PAL酶之存放期、保護原核生物PAL酶以免蛋白質水解消化、維持原核生物PAL酶呈活性構形及在高溫下儲存後保持原核生物PAL酶活性。

本發明之穩定劑包括L-苯丙胺酸(Phe)及其結構類似物，諸如反式肉桂酸(t-CA)、苯甲酸、酪胺酸(Tyr)及其類似物。已展示在親和力純化後移除受質L-苯丙胺酸後來自菜豆之植物PAL(PvPAL)之活性喪失(Da Cunha, Eur. J. Biochem. 178:243-248 (1988))，且已展示來自紅冬孢酵母之酵母PAL(RtPAL)經保護而免於因酪胺酸而蛋白酶失活(Wang等人，Mol. Genet. Metab. 86:134-140 (2005)；Pilbak等人，FEBS J. 273:1004-1019 (2006))。如下文所示，Phe及某些其結構類似物具有使多變魚腥藻原核生物PAL(AvPAL)之PEG:PAL接合物穩定的能力(參見實例11)。在不受特定理論束縛之情況下，假設原核生物PAL酶呈酶-受質複合物形式更穩定，其中所結合受質Phe被轉化為產物t-CA或t-CA之過渡態類似物。t-CA仍與其他高反應性活性位點中心(MIO基團)保持結合，因此使PAL酶穩定。因此，PAL酶受質、Phe、產物、t-CA或其結構類似物為本發明之穩定劑。

本發明涵蓋包含原核生物PAL變異體及醫藥學上可接受之載劑的醫藥組合物，其中醫藥學上可接受之載劑包含穩定劑。穩定劑為Phe或其結構類似物。穩定劑係選自由L-苯丙胺酸、反式肉桂酸及苯甲酸組成之群。本發明之穩定

劑之較佳範圍係自每莫耳原核生物PAL活性位點約0.1莫耳至20莫耳穩定劑。本發明之穩定劑之更佳範圍係自每莫耳原核生物PAL活性位點約0.5莫耳至10莫耳穩定劑。本發明之穩定劑之最佳範圍係自每莫耳原核生物PAL活性位點約1莫耳至10莫耳穩定劑。

在一些實施例中，醫藥組合物包含原核生物PAL變異體及醫藥學上可接受之載劑，其中原核生物PAL變異體與野生型PAL相比具有較高之苯丙胺酸轉化活性及/或降低之免疫原性且有效使個體之血液、血清或血漿中之Phe濃度降至偵測含量以下至約20 μM 至60 μM 之間、較佳至小於約20 μM 且甚至更佳至小於約10 μM 的範圍內，且其中醫藥學上可接受之載劑包含穩定劑。在一些實施例中，穩定劑為Phe或其結構類似物。在一些實施例中，穩定劑係選自由L-苯丙胺酸、反式肉桂酸及苯甲酸組成之群。

在較佳實施例中，醫藥組合物包含原核生物PAL變異體及醫藥學上可接受之載劑，其中原核生物PAL變異體為多變魚腥藻PAL(AvPAL)變異體，其中AvPAL變異體之位置503及565處之半胱胺酸殘基已經絲胺酸殘基取代，AvPAL變異體進一步包含聚乙二醇之水溶性聚合物，其中AvPAL變異體與聚乙二醇之比率為約1:3；且AvPAL變異體有效使個體之血液、血清或血漿中之苯丙胺酸濃度降至偵測含量以下至約20 μM 至60 μM 之間、較佳至小於約20 μM 且甚至更佳至小於約10 μM 的範圍內，且其中醫藥學上可接受之載劑包含穩定劑。在一些實施例中，穩定劑為Phe或其結

構類似物。在較佳實施例中，穩定劑係選自由L-苯丙胺酸、反式肉桂酸及苯甲酸組成之群。

如本文中所使用，當涵蓋原核生物PAL變異體組合物時，術語"治療有效量"係指有效達成對癌症患者之健康之預定有益效應的量。在一些實施例中，治療有效量之原核生物PAL變異體產生向患者提供益處之血液、血漿或血清(較佳血漿)L-苯丙胺酸含量的降低。該量應隨個體不同而變化且應視包括患者之總體身體狀況、飲食及疾病病況之多種因素而定。用於療法之原核生物PAL之量產生血液、血漿或血清(較佳血漿)L-苯丙胺酸含量之可接受之降低，且PAL治療期間使該值維持在有益含量下(通常在小於血液、血漿或血清(較佳血漿)L-苯丙胺酸之正常範圍之約5%至約35%與100%之間的範圍內、較佳小於約5%至約35%的範圍內且甚至更佳在小於約5%至約15%的範圍內)。在一些實施例中，與未經治療之患者相比，治療有效量之原核生物PAL變異體使經治療患者之腫瘤生長、腫瘤尺寸或腫瘤負重降低超過約10%、30%、50%、70%、90%、95%、98%或99%。在一些實施例中，與未經治療之患者相比，治療有效量之原核生物PAL變異體使經治療患者之腫瘤維持在靜態條件下。在一些實施例中，與未經治療之患者相比，治療有效量之原核生物PAL變異體使經治療患者之存活時間或無病時間增加至少約10%、20%、50%、100%、2倍、5倍或10倍長。本發明之原核生物PAL變異體組合物之治療有效量可由熟習此項技術者使用可公開獲得之材料及

程序容易地確定。

本發明提供頻率低於天然PAL之原核生物PAL變異體投藥。給藥頻率應視所治療之病狀而改變，但通常應為約每週一次。應瞭解，由於不同個體對原核生物PAL變異體之反應不同，因此實際使用之給藥頻率可與本文中所揭示之頻率有些不同；術語"約"旨在反映該等不同。預期約每週兩次、約每週一次、約每兩週一次、約每月一次或長於約每月一次投與原核生物PAL變異體。

● 本發明因此可用於降低血液、血漿或血清L-苯丙胺酸含量。可使用本發明之原核生物PAL變異體醫藥組合物治療多種血液、血漿或血清L-苯丙胺酸含量降低將有益之癌症相關病狀。

根據本發明製備之原核生物PAL醫藥組合物較佳藉由非經腸注射(靜脈內、腹膜內、皮下、肌肉內、動脈內或鞘內)投與。然而，對於熟習此項技術者應顯而易見，亦可有效地利用其他傳遞途徑來使用本發明之醫藥組合物。

● 本文所述之方法使用原核生物PAL醫藥組合物，該等醫藥組合物包含上述分子以及一或多種醫藥學上可接受之賦形劑、媒劑、稀釋劑、穩定劑、防腐劑、增溶劑、乳化劑、佐劑及/或載劑及視情況其他治療性及/或預防性成分。該等賦形劑包括液體，諸如水、生理食鹽水、甘油、聚乙二醇、玻糖醛酸、乙醇、環糊精、改質環糊精(亦即磺丁基醚環糊精)等。適於非液體調配物之賦形劑亦為熟習此項技術者所已知。

醫藥學上可接受之鹽可用於本發明之組合物中且包括(例如)無機酸鹽，諸如鹽酸鹽、氫溴酸鹽、磷酸鹽、硫酸鹽及其類似物；及有機酸鹽，諸如乙酸鹽、丙酸鹽、丙二酸鹽、苯甲酸鹽及其類似物。關於醫藥學上可接受之賦形劑及鹽之全面論述可於 *Remington's Pharmaceutical Sciences*，第18版(Easton, Pennsylvania: Mack Publishing Company, 1990)中獲得。

此外，該等媒劑中可存在輔助物質，諸如濕潤劑或乳化劑、生物學緩衝物質、界面活性劑及其類似物。生物學緩衝劑實際上可為藥理學上可接受且為調配物提供所要pH值(亦即，生理學可接受之範圍內的pH值)的任何溶液。緩衝溶液之實例包括生理食鹽水、磷酸鹽緩衝生理食鹽水、Tris緩衝生理食鹽水、漢克氏緩衝生理食鹽水(Hank's buffered saline)及其類似物。

視預定投藥模式而定，醫藥組合物可呈以下形式：固體、半固體或液體劑型，諸如錠劑、栓劑、丸劑、膠囊、散劑、液體、懸浮液、乳膏、軟膏、洗液或其類似劑型，較佳呈適於單次投與準確劑量之單位劑型。組合物應包括治療有效量之原核生物PAL以及醫藥學上可接受之載劑，且此外可包括其他醫藥劑、佐劑、稀釋劑、緩衝劑等。

一般而言，本發明之原核生物PAL醫藥組合物應以醫藥調配物(包括適於經口(包括經頰及舌下)、直腸、鼻、局部、肺、陰道或非經腸(包括肌肉內、動脈內、鞘內、皮下及靜脈內)投藥之調配物)之形式或以適於藉由吸入或吹

入投藥之形式投與。較佳投藥方式為使用方便之每日給藥方案靜脈內投藥，該每日給藥方案可根據患病程度加以調整。

對於固體組合物，習知無毒固體載體包括(例如)醫藥級甘露糖醇、乳糖、澱粉、硬脂酸鎂、糖精鈉、滑石粉、纖維素、葡萄糖、蔗糖、碳酸鎂及其類似物。醫藥學上可投與之液體組合物可如下製備：例如將如本文中所述之原核生物PAL變異體組合物及可選醫藥佐劑溶解、分散(等)於賦形劑(諸如水、生理食鹽水、右旋糖水溶液、甘油、乙醇及其類似物)中，從而形成溶液或懸浮液。需要時，待投與之醫藥組合物亦可含有少量無毒輔助物質，諸如濕潤劑或乳化劑、pH值緩衝劑、張力劑及其類似物，例如乙酸钠、脫水山梨糖醇單月桂酸酯、三乙醇胺乙酸钠、三乙醇胺油酸酯等。製備該等劑型之實際方法為熟習此項技術者所已知或將顯而易見，例如參見以上所提及之Remington's Pharmaceutical Sciences。

對於經口投藥，組合物通常應採用錠劑、膠囊或軟明膠膠囊形式或可為水性或非水性溶液、懸浮液或糖漿。錠劑及膠囊為較佳經口投藥形式。經口使用之錠劑及膠囊通常應包括一或多種常用載劑，諸如乳糖及玉米澱粉。通常亦添加諸如硬脂酸鎂之潤滑劑。當使用液體懸浮液時，可將活性劑與乳化劑及懸浮劑組合。需要時，亦可添加調味劑、著色劑及/或甜味劑。用於併入本文中之經口調配物中之其他可選組分包括(但不限於)防腐劑、懸浮劑、增稠

劑及其類似物。

非經腸調配物可製備成習知形式，諸如液體溶液或懸浮液形式、適於在注射之前復原、溶解或懸浮於液體中之固體或凍乾形式，或乳液形式。較佳根據此項技術中已知之技術，使用合適載劑、分散劑或濕潤劑及懸浮劑調配無菌注射懸浮液。無菌注射調配物亦可為於非經腸可接受之無毒稀釋劑或溶劑中之無菌注射溶液或懸浮液。可使用之可接受之媒劑及溶劑為水、林格氏溶液(Ringer's solution)及等張氯化鈉溶液。此外，無菌不揮發性油、脂肪酸酯或多元醇通常用作溶劑或懸浮介質。此外，非經腸投藥可包括使用緩慢釋放或持續釋放系統，以使得恆定水準之劑量得以維持。

本文中所述之本發明之原核生物PAL組合物可以治療有效劑量向患者投與來治療癌症。該等原核生物PAL組合物之毒性及治療功效可由標準醫藥程序於細胞培養物或實驗動物中測定，諸如藉由測定LD₅₀(使群體之50%致死之劑量)及ED₅₀(對群體之50%治療有效之劑量)。毒性效應與治療效應之間的劑量比為治療指數且其可表示為比率LD₅₀/ED₅₀。展現大治療指數之原核生物PAL組合物通常較佳。

獲自細胞培養檢定及動物研究之資料可用於調配供人類使用之劑量範圍。劑量較佳處於循環濃度之範圍(包括具有極小毒性或最小毒性之ED₅₀)內。視所使用之劑型及所使用之投藥途徑而定，劑量可在該範圍內改變。治療有效

劑量或治療有效量可由細胞培養檢定及動物模型確定。

飲食蛋白質

除向癌症患者投與原核生物PAL組合物外，預期亦可限制或修改患者之飲食蛋白質。熟習此項技術者已知用於治療PKU之多種市售蛋白質配方。該等配方包括MAXIMAID、PHENEX 1、PHENEX 2(Ross Laboratories, Liverpool, UK)、LOFENALAC、PHENYL-FREE(Mead-Johnson)及其類似物。

熟習此項技術者可使用參考蛋白質配方，其通常不含Phe濃度。蛋白質配方通常補充有PKU患者缺乏之胺基酸。該等胺基酸包括(例如)L-酪胺酸及L-麩胺醯胺。

此外，正如所知，除限制蛋白質之外，亦應提供人乳及其他動物來源食物中通常存在之L-肉鹼及牛磺酸。在某些實施例中，L-肉鹼可以每100 g蛋白質補充物20 mg的量提供，且牛磺酸可以每100 g蛋白質補充物40 mg的量提供，以幫助提供適量人乳及動物來源食物中通常存在之該等因子。

此外，熟習此項技術者可參考2000美國國家科學院國家研究委員會(2000 National Academy of Sciences-National Research Council)關於其他組分之另外清單的飲食參考攝入量(Dietary Reference Intakes)，該等其他組分諸如應提供給患者以確保縱使在飲食蛋白質限制下仍提供其他補充物之必須維生素及礦物質。

參考以上關於總蛋白質量及合意血漿Phe濃度之論述，

熟習此項技術者應能夠確定所需要之飲食蛋白質限制之量且因此相應地調整患者之飲食。向該個體投與原核生物PAL後，判定本發明之方法是否有效將必須定期測定患者之血漿Phe濃度以確保血漿Phe濃度保持在偵測含量以下至約20 μM 至60 μM 之間、較佳至小於約20 μM 且甚至更佳至小於約10 μM 的範圍內。測定該等濃度之測試描述如下。較佳實現小於偵測含量至約20 μM 至60 μM 之間、更佳至小於約20 μM 且甚至更佳至小於約10 μM 的濃度。

在某些實施例中，本發明提供治療癌症之方法，該方法包含向需要癌症治療之個體投與治療有效量之包含原核生物苯丙胺酸解氨酶(PAL)變異體及醫藥學上可接受之載劑的醫藥組合物，其中PAL變異體與野生型PAL相比具有較高之苯丙胺酸轉化活性及/或降低之免疫原性，且有效使個體之血液、血清或血漿中之苯丙胺酸濃度降至偵測含量以下至約20 μM 至60 μM 之間、較佳至小於約20 μM 且甚至更佳至小於約10 μM 的範圍內，且進一步包含向個體投與蛋白質限制性(亦即，不含苯丙胺酸)飲食。

本發明之某些方法包括組合使用原核生物PAL及飲食蛋白質限制以在患有各種形式之癌症之患者中實現治療結果。為在本文中涵蓋之組合療法中實現適當治療結果，通常較佳將以有效達成所要治療結果(亦即，使血漿Phe濃度降至(使用此項技術中熟知之標準偵測方法)偵測含量以下至最佳約20 μM 至60 μM 、較佳至小於約20 μM 且甚至更佳至小於約10 μM 的範圍內)之組合量向個體投與原核生物

PAL組合物及飲食限制。該方法可包括同時投與原核生物PAL組合物及飲食蛋白質治療組合物。此可藉由投與單一組合物或藥理學蛋白質調配物來實現，在該蛋白質調配物中包括所有飲食蛋白質需要量，且亦包括原核生物PAL。或者，在與原核生物PAL之藥理學調配物(錠劑、注射劑或飲料)大致相同之時間服用飲食蛋白質(補充物或常規蛋白粉)。原核生物PAL亦可調配成蛋白質棒或適於攝入之其他食品，諸如堅果巧克力餅、薄烤餅、蛋糕。

因為投與原核生物PAL不會產生酪胺酸(不同於投與PAH)，所以該等治療仍應產生為該等患者之必需胺基酸的酪胺酸。因此，補充有酪胺酸之飲食可為接受單獨或與飲食蛋白質療法組合之原核生物PAL之患者所需。

在其他替代方案中，原核生物PAL治療可先於或後於飲食蛋白質療法，間隔時間在數分鐘至數小時範圍內。在蛋白質與原核生物PAL組合物分開投與的實施例中，通常應確保各傳遞之時間間隔不大於有效時段，以使得PAL仍能夠對患者發揮有利效應。在該等情況下，預期將在飲食蛋白質攝入(之前或之後)約2-6小時內投與PAL，其中延遲時間僅為約1小時最佳。在某些實施例中，預期PAL療法為連續療法，其中無限期向患者投與PAL每日劑量。

3.組合療法

此外，除僅基於傳遞原核生物PAL及飲食蛋白質調控之療法外，本發明之方法亦涵蓋與特異性靶向癌症之一或多種症狀之組合物的組合療法。該等組合物包括(例如但不

限於)癌症治療劑及靶向癌症治療劑。

癌症治療劑

根據本文中所述之方法，任何對癌細胞發揮治療效應(亦即，抑制增殖及/或存活)之藥劑均可用作與本發明之原核生物PAL組合物組合的癌症治療劑。癌症治療劑通常為細胞毒性劑或細胞生長抑制劑。

癌症治療劑可作為與本發明之原核生物PAL組合物之癌症協同療法投與。如本文中所使用，"癌症協同療法"意謂同時或相繼投與癌症治療劑及原核生物PAL組合物，在癌症治療劑之後投與原核生物PAL組合物或以相反順序投與。

適用類別之細胞毒性劑包括(例如)抗微管蛋白劑、阿瑞他汀(auristatins)、DNA小溝結合劑、DNA複製抑制劑、烷化劑(例如，鉑錯合物，諸如順鉑、單(鉑)、雙(鉑)及三核鉑錯合物及卡鉑(carboplatin))、蒽環黴素(anthracycline)、抗生素、抗葉酸劑、抗代謝物、化學療法致敏劑、多卡米辛(duocarmycin)、依託泊苷(etoposide)、氟化嘧啶、離子載體、萊西曲辛(lexitropsin)、亞硝基脲、順氯氬鉑(platinol)、預成形化合物、嘌呤抗代謝物、嘌呤黴素(puromycin)、輻射致敏劑、類固醇、紫杉烷、拓撲異構酶抑制劑、長春花鹼(vinca alkaloid)及其類似物。

個別細胞毒性劑包括(例如)雄激素、安黴黴素(anthramycin, AMC)、天冬醯胺酶、5-氮胞苷、硫唑嘌呤、博萊黴素(bleomycin)、白消安(busulfan)、丁硫胺酸

亞砒胺(buthionine sulfoximine)、喜樹鹼(camptothecin)、卡鉑、卡莫司汀(carmustine, BSNU)、CC-1065、苯丁酸氮芥(chlorambucil)、順鉑(cisplatin)、秋水仙鹼(colchicine)、環磷醯胺(cyclophosphamide)、阿糖胞苷(cytarabine)、胞苷阿拉伯糖苷、細胞分裂抑素B(cytochalasin B)、達卡巴嗪(dacarbazine)、放線菌素D(dactinomycin)(先前稱為放線菌素(actinomycin))、柔紅黴素(daunorubicin)、氮烯咪胺(decarbazine)、多西他濱(docetaxel)、多表比星(doxorubicin)、雌激素、5-氟去氧尿苷、5-氟尿嘧啶、短桿菌肽D(gramicidin D)、羥基脲、伊達比星(idarubicin)、異環磷醯胺(ifosfamide)、伊立替康(irinotecan)、洛莫司汀(lomustine, CCNU)、氮芥(mechlorethamine)、美法倫(melphalan)、6-巰基嘌呤、甲胺喋呤(methotrexate)、米拉黴素(mithramycin)、絲裂黴素C(mitomycin C)、米托蒽醌(mitoxantrone)、硝基咪唑、太平洋紫杉醇(paclitaxel)、普卡黴素(plicamycin)、普卡比星(procarbazine)、鏈脲佐菌素(streptozotocin)、特諾波賽(tenoposide)、6-硫代鳥嘌呤、塞替派(thioTEPA)、拓朴替康(topotecan)、長春鹼(vinblastine)、長春新鹼(vincristine)、長春瑞賓(vinorelbine)、VP-16及VM-26。

在一些實施例中，癌症治療劑為細胞毒性劑。合適細胞毒性劑包括(例如)海兔毒素(dolastatin)(例如，阿瑞他汀E、AFP、MMAF、MMAE)、DNA小溝結合劑(例如，烯二炔類及萊西曲辛)、多卡米辛、紫杉烷(例如，太平洋紫杉

醇及多西他濱)、嘌呤黴素、長春花鹼、CC-1065、SN-38、拓朴替康、嗎啉基多表比星、根瘤菌素(rhizoxin)、氟基嗎啉基多表比星、棘黴素(echinomycin)、康柏斯達汀(combretastatin)、紡錘菌素(netropsin)、埃坡黴素(epothilone)A及B、雌莫司汀(estramustine)、念珠藻環肽(cryptophysin)、西馬多丁(cemadotin)、類美登素(maytansinoid)、迪斯德莫來(discodermolide)、艾榴素(eleutherobin)及米托蒽醌。

在某些實施例中，細胞毒性劑為習知化學治療劑，諸如多表比星、太平洋紫杉醇、美法倫、長春花鹼、甲胺喋呤、絲裂黴素C或依託泊苷。另外，可使用諸如CC-1065類似物、刺孢黴素、美登素、海兔毒素10類似物、根瘤菌素及皮群海葵毒素(palytoxin)之有效藥劑。

在某些實施例中，細胞毒性劑為DNA小溝結合劑，例如CBI化合物或烯二炔(例如，刺孢黴素)。

在某些實施例中，癌症治療劑為抗微管蛋白劑。抗微管蛋白劑的實例包括(但不限於)紫杉烷(例如，紫杉醇(TAXOL)(太平洋紫杉醇)、克癌易(TAXOTERE)(多西他濱))、T67(Tularik)、長春花生物鹼類(例如，長春新鹼、長春鹼、長春地辛(vindesine)及長春瑞賓(vinorelbine))及海兔毒素(例如，阿瑞他汀E(auristatin E)、AFP、MMAF、MMAE、AEB、AEVB)。其他抗微管蛋白劑包括(例如)漿果赤黴素(baccatin)衍生物、紫杉烷類似物(例如，埃坡黴素A及B)、諾考達唑(nocodazole)、秋水仙鹼及考拉西米

(colcimid)、雌莫司汀、念珠藻環肽、西馬多丁、類美登素、康柏斯達汀、迪斯德莫來及艾榴素。

在某些實施例中，細胞毒性劑為另一組抗微管蛋白劑類美登素，例如美登素或DM-1。

在某些實施例中，癌症治療劑為放射性同位素。在某些其他實施例中，癌症治療劑不為放射性同位素。

在某些實施例中，細胞毒性劑為抗代謝物。抗代謝物可為(例如)嘌呤拮抗劑(例如，硫唑嘌呤或黴酚酸嗎啉乙酯(mycophenolate mofetil))、二氫葉酸還原酶抑制劑(例如，甲胺喋呤)、阿昔洛韋(acyclovir)、甘昔洛韋(gancyclovir)、齊多夫定(zidovudine)、阿糖腺苷(vidarabine)、利巴韋林(ribavarin)、疊氮胸苷(azidothymidine)、胞苷阿拉伯糖苷(cytidine arabinoside)、金剛烷胺(amantadine)、雙脫氧尿苷(dideoxyuridine)、碘去氧尿苷(iododeoxyuridine)、膦甲酸鹽(poscarnet)或三氟尿苷(trifluridine)。

在其他實施例中，細胞毒性劑為他克莫司(tacrolimus)、環孢素(cyclosporine)或雷帕黴素(rapamycin)。在其他實施例中，細胞毒性劑為阿地白介素(aldesleukin)、阿萊珠單抗(alemtuzumab)、亞利崔托寧(alitretinoin)、別嘌醇(allopurinol)、六甲密胺(altretamine)、胺磷汀(amifostine)、阿那曲唑(anastrozole)、三氧化二砷、貝沙羅汀(bexarotene)、貝沙羅汀(bexarotene)、卡普峯酮(calusterone)、卡培他濱(capecitabine)、塞來昔布

(celecoxib)、克拉屈濱 (cladribine)、阿法達貝汀 (Darbepoetin alfa)、地尼白介素 (Denileukin diftitox)、右雷佐生 (dexrazoxane)、丙酸屈他雄酮 (dromostanolone propionate)、表柔比星 (epirubicin)、阿法依伯汀 (Epoetin alfa)、雌莫司汀、依西美坦 (exemestane)、非格司亭 (Filgrastim)、氟尿苷 (floxuridine)、氟達拉濱 (fludarabine)、氟維司群 (fulvestrant)、吉西他濱 (gemcitabine)、吉妥珠單抗奧唑米星 (gemtuzumab ozogamicin)、戈舍瑞林 (goserelin)、伊達比星 (idarubicin)、異環磷醯胺 (ifosfamide)、甲磺酸伊馬替尼 (imatinib mesylate)、干擾素 α -2a (Interferon alfa-2a)、伊立替康、來曲唑 (letrozole)、甲醯四氫葉酸 (leucovorin)、左旋咪唑 (levamisole)、米克羅乙胺 (meclorethamine) 或氮芥 (nitrogen mustard)、甲地孕酮 (megestrol)、美司鈉 (mesna)、甲胺喋呤、甲氧沙林 (methoxsalen)、絲裂黴素 C (mitomycin C)、米托坦 (mitotane)、苯丙酸諾龍 (nandrolone phenpropionate)、奧普瑞白介素 (oprelvekin)、奧克賽鉑 (oxaliplatin)、帕米膦酸鹽 (pamidronate)、培加酶 (pegademase)、培門冬酶 (pegaspargase)、乙二醇化非格司亭 (pegfilgrastim)、噴司他汀、哌泊溴烷 (pipobroman)、普卡黴素 (plicamycin)、卟吩姆鈉 (porfimer sodium)、丙卡巴肼 (procarbazine)、奎納克林 (quinacrine)、拉布立酶 (rasburicase)、利妥昔單抗、沙格司亭 (Sargramostim)、鏈佐星 (streptozocin)、他莫昔芬 (tamoxifen)、替莫唑胺

(temozolomide)、替尼泊苷(teniposide)、睾內酯(testolactone)、硫鳥嘌呤(thioguanine)、托瑞米芬(toremifene)、托西莫單抗(Tositumomab)、曲妥珠單抗、維甲酸(tretinoin)、尿嘧啶氮芥(uracil mustard)、伐柔比星(valrubicin)、長春鹼、長春新鹼、長春瑞賓及唑來膦酸鹽(zoledronate)。

在某些實施例中，本發明提供治療癌症之方法，該方法包含向需要該治療之個體投與治療有效量之包含原核生物苯丙胺酸解氨酶(PAL)變異體及醫藥學上可接受之載劑的醫藥組合物，其中PAL變異體與野生型PAL相比具有較高之苯丙胺酸轉化活性及/或降低之免疫原性，且有效使個體之血液、血清或血漿中之Phe濃度降至偵測含量以下至約20 μ M至60 μ M之間、較佳至小於約20 μ M且甚至更佳至小於約10 μ M的範圍內，且該方法進一步包含投與治療有效量之包含癌症治療劑之醫藥組合物。

靶向癌症治療劑

根據本文中所述之方法，任何對特定癌細胞發揮治療效應(亦即，抑制增殖及/或存活)之藥劑均可用作與本發明之原核生物PAL組合物組合的靶向癌症治療劑。靶向癌症治療劑通常為例如(但不限於)藉助於具有抗體樣靶向域或經由受體介導之結合而與特定類型之腫瘤細胞或組織選擇性結合的抗體或酶或蛋白質。抗體、具有抗體樣靶向域之多肽、酶或蛋白質可經放射性標記或可與毒素或其他能夠對所靶向細胞或組織發揮細胞毒性或細胞抑制效應的藥劑接

合。或者，靶向癌症治療劑可為藉助於抑制或活化優先表現於特定類型的腫瘤細胞或組織中或在其中具有活性的蛋白質(例如但不限於酶或受體)而對該特定癌細胞或組織發揮治療效應(亦即，抑制增殖及/或存活)的藥劑。

靶向癌症治療劑可作為與本發明之原核生物PAL組合物之靶向癌症協同療法投與。"靶向癌症協同療法"意謂同時或相繼投與靶向癌症治療劑及原核生物PAL組合物，靶向癌症治療劑之後投與原核生物PAL組合物或以相反順序投與。

在某些實施例中，靶向癌症治療劑為人化抗HER2單株抗體美羅華(RITUXAN)(利妥昔單抗(rituximab)；Genentech；一種嵌合抗CD20單株抗體)；歐伐萊克斯(OVAREX)(AltaRex Corporation, MA)；帕諾萊克斯(PANOREX)(Glaxo Wellcome, NC；一種鼠類IgG2a抗體)；西妥昔單抗(Cetuximab)艾比特思(Erbix)(Imclone Systems Inc., NY；一種抗EGFR IgG嵌合抗體)；維他欣(Vitaxin)(MedImmune, Inc., MD)；坎帕斯 I/H(Campath I/H)(Leukosite, MA；一種人化IgG1抗體)；斯馬特MI95(Smart MI95)(Protein Design Labs, Inc., CA；一種人化抗CD33 IgG抗體)；利菲西德(LymphoCide)(Immunomedics, Inc., NJ；一種人化抗CD22 IgG抗體)；斯馬特ID10(Smart ID10)(Protein Design Labs, Inc., CA；一種人化抗HLA-DR抗體)；奧康利姆(Oncolym)(Techniclone, Inc., CA；一種放射性標記鼠類抗HLA-Dr10抗體)；安洛姆尼

(Allomune)(BioTransplant, CA；一種人化抗CD2 mAb)；阿伐斯汀(Avastin)(Genentech, Inc., CA；一種抗VEGF人化抗體)；艾普妥單抗(Epratuzamab) (Immunomedics, Inc., NJ及Amgen, CA；一種抗CD22抗體)；及西西德(CEAcide) (Immunomedics, NJ；一種人化抗CEA抗體)。

其他合適抗體包括(但不限於)針對以下抗原的抗體：CA125、CA 15-3、CA19-9、L6、Lewis Y、Lewis X、 α 胎蛋白、CA 242、胎盤鹼性磷酸酯酶、前列腺特異性抗原、前列腺酸性磷酸酯酶、表皮生長因子、MAGE-1、MAGE-2、MAGE-3、MAGE-4、抗轉鐵蛋白受體、p97、MUC1-KLH、CEA、gp100、MART1、前列腺特異性抗原、IL-2受體、CD20、CD52、CD33、CD22、人絨毛膜促性腺激素、CD38、CD40、黏液素(mucin)、P21、MPG及Neu致癌基因產物。

在某些實施例中，靶向癌症治療劑為酶或具有抗體樣靶向域或具有與特定細胞或組織選擇性結合之能力(例如，藉由配位體-受體結合)的其他蛋白質。通常使具有抗體樣靶向域之蛋白質、酶或其他蛋白質與癌症治療劑接合，該癌症治療劑例如為能夠對所靶向細胞或組織發揮細胞毒性或細胞抑制效應之化合物或肽/多肽，諸如毒素(例如蓖麻毒素、白喉毒素、綠膿桿菌內毒素及其類似物(Kreitman, AAPS J. 8(3):E532-E551 (2006))或其他藥劑。

在某些實施例中，靶向癌症治療劑為對特定癌細胞或組織發揮治療效應之化合物(例如，小分子或肽/多肽)，例如

絲胺酸/蘇胺酸激酶抑制劑、酪胺酸激酶抑制劑、核受體促效劑、核受體拮抗劑及其類似物。

在某些實施例中，本發明提供治療癌症之方法，該方法包含向需要該治療之個體投與治療有效量之包含原核生物苯丙胺酸解氨酶(PAL)變異體及醫藥學上可接受之載劑的醫藥組合物，其中PAL變異體與野生型PAL相比具有較高之PAL苯丙胺酸轉化活性及/或降低之免疫原性，且有效使個體之血液、血清或血漿中之Phe濃度降至偵測含量以下至約20 μ M至60 μ M之間、較佳至小於約20 μ M且甚至更佳至小於約10 μ M的範圍內，且該方法進一步包含投與治療有效量之包含靶向癌症治療劑之醫藥組合物。

4.鑑別並監測患者群體

如本文中通篇所論述，在本發明之各種實施例中應必需判定給定癌症患者是否會對原核生物PAL療法產生反應及在最初與治療方案進行期間測定患者之苯丙胺酸(Phe)濃度以監測該方案在降低血漿Phe濃度方面之功效。該等方法之例示性方法描述於下文中。

鑑別對原核生物PAL療法具有反應性之患者

鑑別用本發明之原核生物PAL組合物治療可能有效之患者可根據活體外培養實驗或小鼠中之活體內人類腫瘤異種移植研究進行或藉由與人類癌症之動物模型中在生長及對Phe限制或耗盡之敏感性方面具有已知或已證明之Phe依賴性的腫瘤類型比較進行。

可使用此項技術中已知之方案執行活體外培養實驗，其

中在不存在或存在原核生物PAL組合物之情況下或在不存在或存在苯丙胺酸缺乏培養基之情況下培養腫瘤細胞(例如，來自腫瘤活檢或臨床抽吸)(參見，例如 Abell等人，Cancer Res. 32:285-290 (1972)；Stith等人，Cancer Res. 33:966-971 (1973)；Fu等人，Cancer Res. 59:758-765 (1999)；Fu等人，J. Cell. Physiol. 209:522-534 (2006)；Elstad等人，Nutr. Cancer 25:47-60 (1996)；Nunez等人，Cancer Lett. 236:133-141 (2006))。亦參見實例14。

● 可使用此項技術中已知之方案執行小鼠中之活體內人類腫瘤異種移植研究，其中將腫瘤細胞(例如，來自腫瘤活檢或臨床抽吸)注射至裸小鼠或SCID小鼠中，且隨後在不存在或存在原核生物PAL組合物之情況下或在不存在或存在苯丙胺酸缺乏飲食之情況下移植至未處理裸小鼠或SCID小鼠中(參見，例如 Abell等人，Cancer Res. 33:2529-2532 (1973)；Shen等人，Cancer Res. 37:1051-105 (1977)；Fu等人，Nutr. Cancer 31:1-7 (1998)；Fu等人，Nutr. Cancer 45:60-73 (2003)；Meadows等人，Cancer Res. 42:3056-3063, 1982；Elstad等人，Anticancer Res. 13:523-528, (1993))。亦參見實例15。

● 在人類癌症之動物模型中在生長及對Phe限制或耗盡之敏感性方面具有已知或已證明之Phe依賴性的腫瘤類型包括(例如)白血病、轉移性骨髓瘤及非雄激素依賴性前列腺癌(Abell等人，(1973)，同上；Shen等人，(1977)，同上；Fu等人，(1998)，同上；Fu等人，(2003)，同上；

Meadows 等人，(1982)，同上；Elstad 等人，(1993)，同上)。

實例 14 展示來源於肺癌、腦癌或中樞神經系統癌症、結腸癌、前列腺癌、腎癌、轉移性黑色素瘤、頭頸癌、子宮癌、白血病(例如，急性骨髓白血病或急性類淋巴母細胞白血病)及骨髓瘤之腫瘤細胞之增殖及/或存活在與本發明原核生物 PAL 組合物一起培育後對 Phe 限制敏感。

測定苯丙胺酸濃度

此項技術中已知測定血液、血清或血漿中苯丙胺酸(Phe)之濃度的方法，其中一些描述於 2005 年 9 月 19 日申請之先前同在申請中之美國專利申請案第 11/230,374 號中，該申請案其整體以引用之方式併入本文中。預期在整個治療方案時程中，將以方便的間隔時間(例如每日、隔日或每週)監測患者之血漿 Phe 含量。藉由如此定期地監測血漿 Phe 含量，臨床醫師將能夠評定治療功效並對原核生物 PAL 及/或飲食蛋白質需求作出相應調整。

E. 製備原核生物 PAL

本發明之另一態樣為製備原核生物 PAL 或其生物學活性片段、突變體、變異體或類似物之方法。在一較佳實施例中，使含或不含 N-末端標籤(例如，八組胺醯基標籤)之重組原核生物 PAL 或其生物學活性片段、突變體、變異體或類似物於具有誘導性啟動子(諸如 IPTG(異丙基- β -D-硫代吡喃半乳糖苷))之載體(較佳 pIBX1(Su 等人，Appl. Environ. Microbiol. 62:2723-2734 (1996))或 pET28a(Invitrogen))中

或於大腸桿菌 BLR(DE3)/pLysS(Novagen) 或大腸桿菌 BL21(DE3)/pLysS(Invitrogen)細胞中過度表現。使來自甘油儲備物之用於生物反應器/發酵器之菌種培養物在搖瓶中生長。隨後以分批饋入模式使用該菌種培養物以穿刺接種入受控生物反應器中。補充葡萄糖，且用鹼(NH_4OH)控制pH值，且攪動速率達1200 rpm。饋入 O_2 保持溶解氧大於20%。在 37°C 之溫度下使細胞生長直至達到 OD_{600} 值為70-100(約22-25小時)，且隨後用0.4 mM IPTG誘導。將溫度降至 30°C 且使其生長直至活性變化小於0.1 IU/mL(約40-48小時且 OD_{600} 通常為200)。細胞培養基通常經限定且包含以下各者：酵母萃取物蛋白質、蛋白腴-胰化蛋白腴、葡萄糖、甘油、酪蛋白胺基酸、痕量鹽及磷酸鹽緩衝鹽。重組原核生物PAL產物或其生物學活性片段、突變體、變異體或類似物以細胞內方式產生且不分泌。藉由連續離心(Alfa-Laval、Carr、Ceba，或等效物)收集細菌。

F.純化原核生物PAL

本發明之另一態樣之特徵為純化原核生物PAL或其生物學活性片段、突變體、變異體或類似物之方法。根據第一實施例，使經轉型細胞團生長且破裂，得到粗重組酶。通常自粗塊體中分離出外源物質以防止管柱結垢。層析純化係使用一或多種層析樹脂進行。隨後，將經純化蛋白質調配於經設計提供長期穩定活性之緩衝液中。在另一較佳實施例中，純化原核生物PAL或其生物學活性片段、突變體、變異體或類似物的之方法包含以下步驟：(a)使用壓力

均化器(但潛在可藉由其他物理方法，諸如玻璃珠溶解法)使含有重組原核生物PAL或其生物學活性片段、突變體、變異體或類似物之細菌溶解；(b)熱處理；(c)使用第二連續離心步驟及/或深度過濾(如用Cuono Zeta Plus或Maximizer, Pall Filtron，或Millipore Millistak或Opticac過濾)使該溶菌物澄清；(d)穿過炭過濾步驟(如用Millipore Millistak 40AC)；(e)穿過最後過濾步驟(如用Sartorius Sartopore 0.2 μm 過濾器)；(f)流經丁基疏水性相互作用層析(如Tosoh Biosciences之Toyopearl Butyl 650M)；(g)流經Q離子交換管柱(如BioRad之Macroprep High Q)；及(h)藉由緩衝液交換，經切向流過濾(如用Sartorius Hydrosart或PES 100 kDa膜)回收最終產物。熟習此項技術者易於瞭解，一或多個層析步驟可經省略或取代，或在本發明之範疇內層析步驟之順序可變化。最後，可視需要執行適當滅菌步驟。

現已對本發明進行一般性描述，經由隨後參考以下實例可更容易地瞭解本發明。該等實例僅出於說明性目的而提供，且不希望其以任何方式限制本發明之範疇。已努力確保有關所用數字(例如量、溫度等)之準確性，但理應容許存在某些實驗誤差及偏差。

實例

實例 1

選殖點形念珠藻及多變魚腥藻 PAL

DNA 操作

點形念珠藻基因組DNA係購自 ATCC(29133D)且PAL基因 (ZP_00105927)係由引子 5'-CACTGTCATATGAATATAACA TCTCTACAACAGAACAT-3' (SEQ ID NO: 12)及 5'-GACA GTGGCGGCCGCTCACGTTGACTTTAAGCTCGAAAAAATA TG-3'(SEQ ID NO: 13)經PCR擴增。用NdeI及NotI消化所得 PCR產物且將1.7 kb片段分別連接入pET-28a (+)及pET-30a (+)(Novagen)中以便經N-His標籤標記與未經標籤標記。

多變魚腥藻細胞係購自 ATCC(29413)。提取基因組 DNA(Qiagen)且藉由SOE-PCR擴增PAL基因(YP_324488)以 移除NheI位點。使用引子1(5'-CACTGTGCTAGCATGAAG ACACTATCTCAAGCACAAAG-3')(SEQ ID NO: 14)及引子 2(5'-GGAAATTTCTCCATGATAGCTGGCTTGGTTATCAAC ATCAATTAGTGG-3')(SEQ ID NO: 15)來擴增核苷酸1-1190 且使用引子3(5'-CCACTAATTGATGTTGATAACCAAGC CAGCTATCATGGAGGAAATTTCC-3')(SEQ ID NO: 16)及引 子 4(5'-CACTGTGCGGCCGCTTAATGCAAGCAGGGTAA GATATCTTG-3')(SEQ ID NO: 17)來擴增核苷酸1142- 1771。組合該兩種PCR產物以用引子1及4擴增全長基因。 將所得PCR產物用NheI消化，用Klenow(NEB)鈍化，隨後 用NotI消化。將1.7 kb片段連接入pET-28a (+)及pET-30a (+)(Novagen)中。將該質體命名為3p86-23。

亦將多變魚腥藻PAL(AvPAL)基因選殖於載體pIBX7 (Tkalec等人，Appl. Environ. Microbiol. 66:29-35 (2000)) 中，載體pIBX7係衍生自pIBX1(Su等人，Appl. Environ.

Microbiol. 62:2723-2734 (1996))(參見實例7)。

菌株及培養條件

對於點形念珠藻 PAL(NpPAL)，用 pGro7(TaKaRa)轉型大腸桿菌 BL21(DE3)細胞 (Stratagene) 且由 Inoue 方法 (Sambrook 及 Russell, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*，第3版 (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, 2001)) 製備勝任 BL21(DE3)pGro7細胞。用 pET-28-NpPAL 轉型該等細胞且在 37°C 下，在含有 50 mg/L 卡那黴素 (kanamycin) 及 20 mg/L 氯黴素 (chloramphenicol) 之 25 mL LB 中培養隔夜。將 20 毫升該培養物接種於含有卡那黴素、氯黴素及 500 mg/L L-阿拉伯糖 (L-arabinose) 之 1 L LB 培養基中且在 37°C 下培育。在 OD₆₀₀ 為 0.6 時，將培養物於冰上冷卻。5 分鐘後，用 0.3 mM IPTG 誘導培養物且在 20°C 下培育 16 小時。藉由離心收集細胞。

用 AvPAL 轉型 BL21(DE3)pLysS 細胞 (Stratagene) 且以與 NpPAL 相同之方式培養，但無阿拉伯糖誘導。

藉由轉型於 BLR(DE3)/pLysS(Novagen) 細胞中來引入選殖於 pIBX7 載體中之 AvPAL (參見實例7) 且在 37°C 下，在含有 50 mg/L 卡那黴素之 25 mL LB 中培養隔夜。將 20 毫升該培養物接種於含有卡那黴素之 1 L LB 培養基中且在 37°C 下培育。在 OD₆₀₀ 為 0.6 時，將培養物於冰上冷卻。5 分鐘後，用 0.3 mM IPTG 誘導培養物且在 30°C 下培育 16 小時。藉由離心收集細胞。

實例 2

純化 NpPAL 及 AvPAL

將培養物於台式離心機中在 5,000 g 下離心 20 分鐘且棄去上清液。在進一步處理之前，通常將細胞離心塊在 -70°C 下冷凍。解凍後，將細胞離心塊懸浮於 TBS (25 mM Tris、150 mM NaCl, pH 7.8) 中直至約 80 個光密度單位 (600 nm)。藉由在 12-14,000 psi 下兩次穿過 APV 壓力均化器溶解該等細胞。隨後將粗溶胞物在 55°C 下熱處理 2 小時。將溶胞物在 10,000 g 下離心 30 分鐘且保留上清液並用 0.2 µm 真空過濾器 (Corning) 過濾。

藉由依次流經丁基 650M 管柱 (Tosoh BioSciences) 及 MacroPrep High Q 管柱 (BioRad) 自澄清溶胞物中純化 PAL。由 SDS PAGE 與逆相 HPLC，溶離產物展示高純度。

實例 3

產生聚乙二醇化 PAL 變異體

下文描述使紅冬孢酵母 PAL (RtPAL) 聚乙二醇化之方法。使原核生物 PAL (例如，點形念珠藻 PAL (NpPAL) 或多變魚腥藻 PAL (AvPAL)) 聚乙二醇化使用類似方法，於實例 6 中描述。

蛋白質聚乙二醇化

聚乙二醇化使用文獻方法 (Hershfield 等人, (1991), 同上; 美國專利第 6,057,292 號; Lu 等人, Biochemistry 40 (44): 13288-13301 (2001); Nektar Therapeutics, 2003 年目錄) 之改良方法。經活化 PEG 包括線性 PEG 丁二醯亞胺基丁二酸酯 (mPEG-SPA, MW 5 kDa 或 MW 20 kDa) 與分枝 PEG

羥基丁二醯亞胺(mPEG₂-NHS 酯，MW 10 kDa 或 MW 40 kDa)，其皆在一端以甲氧基封端且可獲自 Nektar Therapeutics；通常需要對最佳聚乙二醇化蛋白質進行實驗測定(Veronese 等人，J. Bioactive Compatible Polymers 12: 196-207(1997))。最佳聚乙二醇化條件係使用不同比率之 PAL:PEG(考慮蛋白質之莫耳比以及每個蛋白質單體之離胺酸數目)、不同 pH 值、不同緩衝劑、不同溫度及培育時間確定。由於天然 PAL 具有大量離胺酸(每個紅冬孢酵母(Rt)單體具有 29 個)且由於未經修飾之 PAL 在重複注射於小鼠中後呈現免疫反應性且由於裸(野生型)PAL 在暴露於蛋白酶後快速失活，因此需要高 PAL 蛋白質：PEG 衍生化比率。藉由在 -20℃ 下冷凍來終止聚乙二醇化反應，且由 SDS-PAGE、MALDI-TOF 質譜法、活性評定、蛋白質水解敏感性 & 免疫反應性來分析樣品。

在活性、蛋白質水解及免疫評定之前，且為移除過量未反應 PEG，在 4℃ 下在攪拌下使用 Tube-O 透析器(GenoTechnology)以 pH 8.5 之 0.05 M 磷酸鉀緩衝液透析反應物隔夜。使用 NI 蛋白質檢定套組(Geno Technology)測定蛋白質濃度後，如前文所述使用標準反應條件對未衍生化之 PAL 樣品及經 PEG 衍生化之 PAL 樣品進行 PAL 活性量測。活體外表徵之後，使用 PKU 小鼠模型，用最有希望的聚乙二醇化治療性候選物進行活體內試驗。

表徵

對於未經修飾之蛋白質樣品及對於聚乙二醇化蛋白質樣

品，使用PAL消光係數(對於RtPAL及AvPAL而言分別為0.5及0.75 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$)，在280 nm下測定蛋白質濃度，該濃度係使用NI蛋白質檢定(GenoTechnology)計算出，NI蛋白質檢定包括樣品處理以移除可能干擾準確蛋白質濃度測定的非蛋白質污染物。

PEG-PAL產物由肽定位技術表徵以確定位點特異性聚乙二醇化(LC/ESI-MSD)，且由三硝基苯磺酸酯(TNBS)表徵以確定聚乙二醇化之前及之後的游離胺滴定。肽定位確定聚乙二醇化在大部分以離胺酸封端之胰蛋白酶肽中的相對占位，然後，歸因於尺寸及多個相鄰離胺酸胰蛋白酶肽，並非所有位點使用該技術均可見。雖然TNBS檢定更精確地確定每莫耳酶的平均PEG分子數目，但不給出關於哪個位點得以聚乙二醇化之資訊。出於此原因，該兩種檢定均使用且其相互補充。PEG對PAL產物的衍生百分率的粗略估算可由SDS-PAGE及天然凝膠分析確定。使用酶促檢定來評定聚乙二醇化之前及之後的比活性且提供四聚體PAL結構未損失之證據。

PAL活性檢定

使用Cary UV分光光度儀(Cary 50)，以動力學模式進行PAL活性檢定。在室溫(25°C)下藉由量測290 nm下之由吸光度增加所監測之反式肉桂酸酯產生來檢定PAL對於L-苯丙胺酸受質之活性(Hodgins, (1968)，同上)。反式肉桂酸在290 nm下之莫耳消光係數為10.238 $\text{L}\cdot\text{M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ 。反應混合物含有於100 mM Tris-HCl緩衝液(pH 8.5)中之22.5 mM

苯丙胺酸。對於標準量測，最終酶濃度為0.0035 mg/mL，但對於動力學研究，調整檢定中之酶濃度以使290 nm下每分鐘之斜率在0.005至0.02範圍內。活性資料表示為比活性($\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$)。一個單位之PAL定義為在室溫下每分鐘產生1 μmol 反式肉桂酸之酶的量。

實例4

測試活體外半衰期及免疫原性

進行生物化學表徵後，使用三種不同但互補之技術(西方墨點法、ELISA及免疫沈澱法(IP))就針對經天然PAL(非聚乙二醇化)注射之PKU小鼠所產生之抗體的免疫反應性篩選最有希望之PEG-PAL候選物。

對於西方墨點法分析，以1:10,000稀釋率使用PAL抗血清(來自經天然PAL注射之小鼠)。亦以相同稀釋率使用來自經緩衝液處理之小鼠的血清作為陰性對照。將二次抗體(鹼性磷酸酯酶接合山羊抗小鼠IgG)(Promega)稀釋至1:5,000且使用AP受質西方藍(Western Blue)(Promega)顯色。使用Nunc/Immuno Maxisorp板(Nalge Nunc International)根據標準程序使用於PBS中之1 mg/mL PAL且用PBS、0.05% Tween-20、2% BSA阻斷來執行ELISA測試。將小鼠抗血清(來自天然PAL暴露小鼠)1:10,000稀釋於EB阻斷溶液(PBS、0.05% Tween-20、2% BSA)中，且使用HRP-山羊抗小鼠IgG作為二次抗體，在450 nm下使用TMB以供偵測。

使用免疫沈澱法測試PAL抗體結合。將蛋白質樣品(PAL

或聚乙二醇化PAL)於TTBS緩衝液(含有0.1% Tween的Tris緩衝鹽水)中培育且在添加抗體樣品之前量測PAL活性。將各樣品與8倍過量之陽性對照抗PAL血清一起培育，且使用非免疫小鼠血清進行重複陰性對照反應。培育之後，考慮小鼠IgG與珠粒之結合容量，添加過量蛋白質G瓊脂糖4(50%，v/v)，且將樣品再在4℃下，在旋轉下培育隔夜。藉由離心回收上清液且對上清液檢定各樣品之PAL活性。不棄去珠粒離心塊，以便可藉由西方墨點法進一步執行分析。為證實已發生抗體-珠粒結合，使用西方墨點法偵測珠粒上之PAL抗原。將PAL結合步驟之後藉由離心回收之珠粒用TTBS及TBS緩衝液洗滌數次。在該等沖洗後，將SDS-PAGE加樣緩衝液添加至珠粒中且將樣品在95℃下加熱5分鐘。隨後使用PAL抗血清，藉由西方墨點法分析樣品。如藉由西方墨點法所偵測，展示不良抗體結合的酶變異體在離心塊狀珠粒部份中具有相應的極少PAL，且此表明，與呈現高抗體結合的天然未修飾PAL相比，上清液中保留更高活性。

實例5

測試蛋白酶敏感性

對天然紅冬孢酵母PAL的蛋白酶定位研究已指出蛋白質水解敏感性之主要位點。移除該等位點可降低或消除蛋白質水解敏感性並促使有效PKU酶取代之形成。然而，消除該等蛋白質水解敏感性位點會使得酶活性降低或損失。

在蛋白質工程化已形成保留活性之經改良PAL(及PEG-

PAL)突變體之後，使用以胰蛋白酶/胰凝乳蛋白酶蛋白酶混合物培育來針對蛋白酶抗性加以篩選，接著監測活性保留(經由OD₂₉₀量測)及蛋白質裂解減少(經由PAGE凝膠分析)，從而可鑑別具有適當活體外特性之突變體以用於活體內測試。

使用以接近腸環境且含有2.3 mM胰蛋白酶、3.5 mM胰凝乳蛋白酶、3.05 mM羧基肽酶A及3.65 mM羧基肽酶B的蛋白酶混合物培育來評定蛋白質水解穩定性。蛋白質水解測試包括酶促培育(將蛋白酶添加至PAL溶液中)以測定所檢測之不同蛋白質變異體(進行或未進行聚乙二醇化或其他化學修飾的天然或突變型蛋白質)的蛋白酶敏感度，包括在蛋白酶暴露之後活性保持及穩定性保持的時程。使用SDS-PAGE及MALDI-TOF質譜定位實驗來測定任何蛋白酶敏感性位點之位置(Kriwacki, R.W.等人, J. Biomol. Tech. 9 (3): 5-15 (1980))。該等定位結果對於測定蛋白酶易感性之主要位點(諸如已經鑑別的兩個主要位點)而言為重要的，以便可使用聚乙二醇化保護及/或突變來移除所有主要的敏感性位點以移除及/或保護PAL結構中之易感區域。

實例6

產生聚乙二醇化NpPAL及AvPAL

一般而言，NpPAL與AvPAL之聚乙二醇化包括將蛋白質與SUNBRIGHT ME-200HS 20 kDa NHS活化之PEG(NOF)混合。

使用經NHS活化之20 kDa線性PEG的聚乙二醇化方案(標

準 "HC" 方法)：

1) 評估蛋白質中內毒素之存在

將蛋白質溶液(0.1 mL)稀釋於0.9 mL新鮮MQ水中且用手持式Charles River裝置(EndoPTS)在0.5 EU/mL敏感度下測試內毒素。若內毒素大於0.5 EU/mL，則最初藉由Mustang E過濾、接著藉由Sterogene Etox樹脂且不太佳藉由進一步層析純化來減少內毒素。減少係有限的，但藉由在pH 7.8下流經DEAE FF(Amersham)足夠有用。

2) 蛋白質之濃縮及緩衝液交換

將蛋白質濃縮至大於25 mg/mL，但小於或等於75 mg/mL，且緩衝液交換至50 mM KPO₄(pH 8.5)中。若使用旋轉過濾器製備該濃縮物，則首先藉由僅用緩衝液在減小之速度及時間(3000 rpm，3分鐘)下旋轉來測試過濾器之內毒素，隨後以與步驟1中之蛋白質相同的方式測試所保留之緩衝液之內毒素。50 mM KPO₄(pH 8.5)之緩衝液批次記錄/配方由水(補足至1 L)、磷酸氫二鉀(8.4913 g/L，48.75 mM)及磷酸二氫鉀(0.17011 g/L，1.25 mM)組成。將溶液經由0.2 μm過濾器過濾且在室溫下儲存。將濃縮產物經由Mustang E過濾器acrodisc緩慢過濾(1-2 mL/min)。在A280下量測經無菌TBS(pH 7.5)稀釋之樣品及無菌TBS(pH 7.5)空白樣品，以測定蛋白質濃度。NpPAL之消光係數為0.83且AvPAL之消光係數為0.75。

3) NpPAL及AvPAL之聚乙二醇化

將在-80°C下正常儲存的PEG溫至室溫。將KPO₄緩衝液

添加至PEG中，以最大速度渦旋使其再懸浮，且用手將試管猛烈震盪以確保所有的大塊體懸浮。蛋白質在1分鐘內添加至充分懸浮之PEG溶液中，首先使PEG濕潤且藉由極輕緩的倒置混合。將包裹於鋁箔中的試管置於搖動器之軸上且在室溫下極輕緩地搖動3小時。將TBS(pH 7.5)裝填於試管中且滅菌過濾。立即調配懸浮液，或在4°C下儲存直至準備用於調配。

4)調配

調配物緩衝液配方/批次記錄由水(補足至1 L)、Tris-鹼(3.2 mM)、Tris-HCl(16.8 mM)及氯化鈉組成；緩衝溶液經由0.2 μ m過濾器過濾且在室溫下儲存。使用具有100 MWCO再生纖維素膜的Vivaflow 50(較小批次)或Vivaflow 200(較大批次)，使緩衝溶液經切向流過濾。溶液用MQ水、0.1 N NaOH且再用200 mL水沖洗。溶液用TBS(pH 7.5)以50 mL/min橫向流平衡。測定滲透物之pH以確保pH為7.5。

溶液首先用TBS稀釋約3倍且恢復至原始體積來進行至少四次緩衝液交換。Vivaflow 50與Vivaflow 200的橫向流通常皆為180-200 mL/min。

最終產物經Mustang E過濾。取0.1 mL用1.9 mL滅菌新鮮水稀釋之後，評估內毒素之存在。若內毒素大於1 EU/mL，則用Sterogene Etox凝膠使其減少。將調配之滅菌聚乙二醇化NpPAL或AvPAL密封於小瓶中且置放於-70°C下直至準備用於活體內研究。

實例 7

產生 AvPAL 變異體 (半胱胺酸突變體)

在 AvPAL 多肽中進行胺基酸取代以使發生於細菌表現之重組蛋白質中的聚集減少。蛋白質聚集在活體內會降低酶活性及/或增強活體內免疫原性。一種該形式之聚集因形成鏈間二硫鍵而發生。為將此可能性降至最小，將單獨或組合之不同 AvPAL 半胱胺酸殘基置換為絲胺酸殘基。

AvPAL 多肽具有在位置 64、235、318、424、503 及 565 處之 6 個半胱胺酸殘基 (SEQ ID NO: 4)。產生以下 AvPAL 單半胱胺酸突變體：AvPAL_C64S (SEQ ID NO: 7)、AvPAL_C318S (SEQ ID NO: 8)、AvPAL_C503S (SEQ ID NO: 9) 及 AvPAL_C565S (SEQ ID NO: 10)。亦產生 AvPAL 雙半胱胺酸突變體 AvPAL_S565SC503S (SEQ ID NO: 11)。圖 5A-5E 展示該等 AvPAL 半胱胺酸突變體之胺基酸序列。

選殖

用正向引子 AvarPALfor (5'-CACTGTTCATATGAAGACAC TATCTCAAGCACAAAG-3') (SEQ ID NO: 18) 及反向引子 AvarPALrev (5'-CACTGTCTCGAGATGCAAGCAGGGTAAGATATCTTG-3') (SEQ ID NO: 19) 由多變魚腥藻基因組 DNA 擴增 AvPAL 基因 (ATCC 29413-U, Qiagen DNeasy 套組)。將所得 PCR 產物用 Taq 處理且隨後連接入 pCR2.1 TOPO TA (Invitrogen) 中。將所得質體命名為 1p40。

藉由 SOE-PCR 添加 5'NheI 位點並移除內部 NheI 位點。用正向引子 N-Nhe-AvPAL (5'-CACTGTGCTAGCATGAAGACA

CTCAAGCACAAAG-3')(SEQ ID NO:20)及反向引子 Nhe-AvPALrev(5'-GGAAATTTCTCCATGATAGCTGGCTTGGTTTCAACATCAATTAGTGG-3')(SEQ ID NO: 21)由 1p40 擴增上游 AvPAL 片段，且用正向引子 Nhe-AvPALfor(5'-CCACTAATTGATGTTGATAACCAAGCCAGCTATCATGGAGGAAATTTCC-3')(SEQ ID NO: 22)及反向引子 AvPALrev-r(5'-ACAGTGGCGGCCGCTTAATGCAAGCAGGGTAAGATACTTG-3')(SEQ ID NO: 23)由 1p40 擴增下游 AvPAL 片段。在單一 PCR 反應中，將兩個 PCR 產物黏接且用 DNA 聚合酶延伸以產生全長 AvPAL 基因，且接著用引子 N-Nhe-AvPAL 及 AvPALrev-r 擴增。將所得 PCR 產物用 NheI 消化，用 Klenow 鈍化，用 NotI 消化，且連接入 pET28a+ 載體(藉由用 NdeI 消化、用 Klenow 鈍化且用 NotI 消化製備)中。將所得質體命名為 3p86-23。

藉由 PCR 添加新的限制性位點。用正向引子 AvEcoRIfor(5'-CACTGTGAATTCATGAAGACACTATCTCACACAAAG-3')(SEQ ID NO: 24)及反向引子 AvSmaIrev(5'-CACTGTCCCGGGTTAATGCAAGCAGGGTAAGATATCT-3') SEQ ID NO: 25)由質體 3p86-23 擴增 AvPAL。將所得 PCR 產物用 EcoRI 及 SmaI 消化且連接入經 EcoRI 及 SmaI 消化之 pIBX7 載體中。將所得質體命名為 7p56 Av3。

半胱氨酸突變體

藉由定點突變誘發(QuickChange XL II, Stratagene)，將 AvPAL 基因中的兩個半胱氨酸密碼子(對應於 AvPAL 多肽之

位置 503 及 565) 用絲胺酸密碼子取代。使用正向引子 Av_C503S(5'-GTCATTACGATGCACGCGCCTCTCTTATCACCAACTGAG-3')(SEQ ID NO:26)及反向引子 Av_C503Srev(5'-CTCAGTTGCAGGTGATAGAGAGGGCGCGTGCATCGTAATGAC-3')(SEQ ID NO:27)，藉由PCR將質體 7p56 Av3 中位置 503 處的半胱胺酸密碼子改為絲胺酸密碼子。絲胺酸密碼子加有下劃線且編碼鏈中之 G 突變為 C(非編碼鏈中之 C 突變為 G)以粗體標明。將所得質體命名為 j282。用正向引子 Av_C565S(5'-CAGTTCAAGATATCTTACCCTCTCTTTGCATTA CCGGGCTGC-3')(SEQ ID NO: 28) 及反向引子 Av_565Srev(5'-GCAGCCCCGGGTTAATGCAAGGAGGGGTAAGAT TCTTGAAGT-3')(SEQ ID NO: 29)將質體 j282 中位置 565 處之半胱胺酸密碼子改為絲胺酸密碼子。絲胺酸密碼子加有下劃線且編碼鏈中之 G 突變為 C(非編碼鏈中之 C 突變為 G)以粗體標明。將所得質體命名為 j298a。

使用以下引子對將 AvPAL 基因中位於 AvPAL 多肽之位置 64、318 及 565 處之半胱胺酸密碼子類似地用絲胺酸密碼子取代：C64S：正向引子 Av_C64S(5'-GCAGGGTATTCAG CATTCTCTGATTACATTAATAATGCTGTTG-3')(SEQ ID NO:30) 及反向引子 Av_C64Srev(5'-CAACAGCATTATTAATGTAATC AGAAGATGCCTGAATACCCTGC-3')(SEQ ID NO:31)；C318S：正向引子 Av_C318S(5'-CAAGATCGTTACTCACT CCCGATCCCTTCCCCAGTATTTGGGGC-3')(SEQ ID NO:32) 及反向引子 Av_C318Srev(5'-GCCCCAAATACTGGGGAAGGGA

TCGGAGTGAGTAACGATCTTG-3')(SEQ ID NO:33) ; 及 C565S : 正向引子 Av_C565S (SEQ ID NO:28) 及反向引子 Av_C565Srev (SEQ ID NO:29) 。絲胺酸密碼子加下劃線且編碼鏈中之 G 突變為 C 及非編碼鏈中之 C 突變為 G 以粗體標明。

實例 8

AvPAL 變異體 (半胱胺酸突變體) 之活體外酶活性

此研究之目的為測定絲胺酸取代 AvPAL 多肽中之不同半胱胺酸殘基對活體外苯丙胺酸解氨酶 (PAL) 酶活性的影響。

如實例 7 中所述，選殖 AvPAL 變異體 (亦即半胱胺酸突變體)。將 AvPAL 半胱胺酸突變體表現質體轉型至細菌中，且如實例 1 中所述表現 AvPAL 半胱胺酸突變型多肽，且如實例 2 中所述加以純化。

如實例 3 中所述，測試野生型 (WT) AvPAL 及 AvPAL 半胱胺酸突變體的活體外 PAL 酶活性。表 1 展示，與未聚乙二醇化之 WT AvPAL 相比，經純化未聚乙二醇化 AvPAL 半胱胺酸突變型蛋白質之活體外 PAL 比活性因絲胺酸取代位置 64 處之半胱胺酸殘基 (AvPAL_C64S) 而降低，但未因絲胺酸取代位置 503 或 565 中任一處或位置 503 與 565 兩處之半胱胺酸殘基 (分別為 AvPAL_C503S、AvPAL_C565S 及 AvPAL_C565SC503S) 而受到不利影響。

表 1：AvPAL 半胱胺酸突變體之比活性

AvPAL蛋白質	聚乙二醇化	比活性(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

為判定引入絲胺酸殘基是否對聚乙二醇化 AvPAL 蛋白質之酶促活性產生任何影響，如實例 6 中所述，將 WT AvPAL 及雙半胱胺酸突變體 AvPAL_C565SC503S 聚乙二醇化。表 1 展示，聚乙二醇化 AvPAL 蛋白質之活體外 PAL 比活性未因絲胺酸取代位置 503 與位置 565 兩處之半胱胺酸殘基而受到不利影響。

實例 9

AvPAL 變異體(半胱胺酸突變體)之活體外生物化學表徵

此研究之目的為測定絲胺酸取代 AvPAL 多肽中之不同半胱胺酸殘基對：(1)加速穩定性；(2)聚集物形成；及(3)位點特異性聚乙二醇化的影響。

加速穩定性

如下測定絲胺酸取代 AvPAL 中之半胱胺酸殘基對活體外穩定性的影響：將經純化之 AvPAL 半胱胺酸突變體(聚乙二醇化或未聚乙二醇化)在 37°C 儲存不同時段，且隨後如實例 3 中所述量測該等蛋白質之活體外 PAL 比活性。

野生型 AvPAL 及 AvPAL 半胱胺酸突變體(未聚乙二醇化或

聚乙二醇化)係如實例8中所述製備。

如圖6A所示，未聚乙二醇化AvPAL蛋白質之比活性在37°C下穩定至少5天，且未因絲胺酸取代位置565或位置503與565兩處之半胱胺酸殘基而受到不利影響。類似地，如圖6B所示，聚乙二醇化AvPAL蛋白質之比活性在37°C下穩定至少6天。在37°C下6天之後，與野生型AvPAL及雙半胱胺酸AvPAL突變體AvPAL_C565SC503S相比，單半胱胺酸AvPAL突變體AvPAL_C565S展示略微降低的穩定性。

聚集物形成

絲胺酸取代AvPAL中之半胱胺酸殘基對溶液中蛋白質聚集物形成的影響係藉由以變性及天然凝膠電泳法或以SEC-HPLC將經純化之未聚乙二醇化野生型AvPAL及AvPAL半胱胺酸突變體分離來測定。

經純化之AvPAL製劑係藉由在變性條件(4-12% NuPAGE Bis-Tris)或天然條件(8% Tris-Gly, pH 8.3)下進行凝膠電泳加以分離。將所分離之AvPAL蛋白質用庫馬斯藍(Coomassie Blue)染色。

將經純化之AvPAL製劑藉由SEC-HPLC分離。將AvPAL蛋白質加樣至於20 mM磷酸鈉、300 mM NaCl(pH 6.9)中的TSK凝膠管柱(G3000SW $\times$ 1, 7.8 mm $\times$ 30 cm, 5 μ m(Tosoh Bioscience, LLC))上，且以0.5 mL/min之流速溶離。以Agilent系列1100光譜儀分析所分離的AvPAL蛋白質。

如藉由凝膠電泳(圖7A)或SEC-HPLC(圖7B)所判定，聚集物存在於野生型AvPAL製劑中及AvPAL_C503S及

AvPAL_C64S 製劑中，但不存在於 AvPAL_C565S 及 AvPAL_C565SC503S 製劑中。

位點特異性聚乙二醇化

絲胺酸取代 AvPAL 中之半胱胺酸殘基對位點特異性聚乙二醇化的影響係如下測定：將野生型 AvPAL 及雙半胱胺酸突變體 AvPAL_C503SC565S 如實例 6 中所述聚乙二醇化，且隨後比較以下 AvPAL 離胺酸殘基處之相對聚乙二醇化：K2、K10、K32、K115、K145、K195、K301、K335、K413、K419、K493、K494 及 K522。

使約 100 μg (10 $\mu\text{L} \times 10 \mu\text{g}/\mu\text{L}$) 未聚乙二醇化或聚乙二醇化 AvPAL 蛋白質於 8 M 尿素中變性。隨後在 37°C 下，以 100 μL 反應體積將變性蛋白質用胰蛋白酶在 0.8 M 尿素中在 pH 8.2 下消化隔夜 (約 20 小時)。藉由在 37°C 下用 1 μL 之 1 M DTT 處理 1 小時、接著用 3 μL 15% TFA 中止來使經胰蛋白酶消化之蛋白質還原。將經消化之蛋白質用 C18 逆相管柱分離。藉由相應未聚乙二醇化肽之肽減法定位計算出各聚乙二醇化 AvPAL 肽之聚乙二醇化百分率。

如圖 8 所示，AvPAL 蛋白質：PEG 之比率為 1:3 時，任何離胺酸 (K) 殘基之聚乙二醇化百分率不存在顯著差異 (可能例外為 K419)，其中雙半胱胺酸突變體 C565SC503S 之聚乙二醇化百分率低於野生型 AvPAL。然而，使用遞增 AvPAL 蛋白質：PEG 比率下之雙半胱胺酸突變體所獲得的結果 (其中未觀測到劑量反應關係)，結合相對較小的聚乙二醇化百分率表明，所觀測到之 K1419 差異可能沒有意義。因

此，絲胺酸取代位置503與565處之半胱胺酸殘基似乎不影響AvPAL之位點特異性聚乙二醇化。

實例 10

AvPAL蛋白質之聚集機制

執行研究以探究細菌表現之AvPAL蛋白質之聚集機制。

將經純化之AvPAL製劑濃縮，且將經濃縮之蛋白質溶液在37°C下培育2小時，經純化AvPAL蛋白質在溶液中加速聚集。藉由以SEC-HPLC將AvPAL蛋白質分離來偵測聚集。為判定是否為二硫鍵交聯引起聚集，將50 mM二硫蘇糖醇(DTT)添加至經濃縮蛋白質溶液中，接著在37°C下培育2小時。

將在細菌中表現的AvPAL蛋白質如實例2中所述純化，且使用旋轉過濾器(Millipore Biomax-10K NMWL)濃縮。將蛋白質於Eppendorf離心機5415C中以約15,000g旋轉數分鐘。對於趨向聚集的半胱胺酸突變體(例如AvPAL_C503S及AvPAL_C64S)，將蛋白質濃縮至約20 mg/mL且在37°C下培育2小時。對於抗聚集的半胱胺酸突變體(例如AvPAL_C565S及AvPAL_C565SC503S)，將蛋白質濃縮至約40 mg/mL且在37°C下培育2小時。

如表2中所示，經純化AvPAL半胱胺酸突變體AvPAL_C64S及AvPAL_C503S之製劑在37°C下培育2小時後形成聚集物。正如所料，當將AvPAL蛋白質濃縮後再在37°C下培育2小時時，此聚集加劇。此聚集可藉由使經濃縮蛋白質暴露於DTT來阻斷，表明此聚集係起因於二硫鍵

交聯。相反，經純化 AvPAL 半胱胺酸突變體 AvPAL_C565S 及 AvPAL_C565SC503S 之製劑在 37°C 下培育 2 小時後不形成聚集物，表明位置 565 處之半胱胺酸殘基與 AvPAL 經由二硫鍵交聯之聚集相關。

表 2：AvPAL 半胱胺酸突變體之二硫鍵交聯相關性聚集

AvPAL 蛋白質	處理	聚集物形成
AvPAL_C503S	37°C/2 h	+
AvPAL_C64S	37°C/2 h	+
AvPAL_C565S E1	37°C/2 h	-
AvPAL_C565S E2	37°C/2 h	-
AvPAL_C565SC503S	37°C/2 h	-
AvPAL_C503S	濃縮+37°C/2 h	++
AvPAL_C64S	濃縮+37°C/2 h	++
AvPAL_C565S E1	濃縮+37°C/2 h	-
AvPAL_C565S E2	濃縮+37°C/2 h	-
AvPAL_C565SC503S	濃縮+37°C/2 h	-
AvPAL_C503S	濃縮+DTT+37°C/2 h	-
AvPAL_C64S	濃縮+DTT+37°C/2 h	-
AvPAL_C565S E1	濃縮+DTT+37°C/2 h	-
AvPAL_C565S E2	濃縮+DTT+37°C/2 h	-
AvPAL_C565SC503S	濃縮+DTT+37°C/2 h	-

為判定哪些半胱胺酸殘基以游離氫硫基之形式存在，將經純化 AvPAL 製劑在 8 M 尿素存在下變性，用碘乙醯胺烷基化，用胰蛋白酶消化且藉由 LC/MS 分析。所有 AvPAL 半胱胺酸殘基經碘乙醯胺標記，表明細菌表現之 AvPAL 之所有半胱胺酸殘基以游離氫硫基之形式存在(資料未展示)。

為測定哪些半胱胺酸殘基存在於天然蛋白質之表面上，將經純化 AvPAL 製劑首先用 N-乙基順丁烯二醯亞胺(NEM)處理，隨後在 8 M 尿素存在下變性，用碘乙醯胺烷基化，

用胰蛋白酶消化且藉由LC/MS分析。位置235及424處之半胱胺酸殘基未被NEM烷基化，且位置318處之半胱胺酸殘基僅部分被NEM烷基化，表明位置64、503及565處之半胱胺酸殘基位於天然AvPAL之表面上且位置318處之半胱胺酸殘基部分暴露於天然AvPAL之表面上(資料未展示)。

為判定哪些半胱胺酸殘基與鏈間二硫鍵交聯有關，使67 μ L經純化未聚乙二醇化野生型AvPAL製劑之0.7 mg/mL溶液變性且在37°C下在含有20 mM碘代乙醯胺之8 M尿素中烷基化1小時，且隨後在25°C下以100 μ L反應體積用胰蛋白酶在pH 8.2下消化隔夜(約17.5小時)。將經胰蛋白酶消化的蛋白質分離且藉由質譜分析，其中鑑別與預測二硫鍵對相對應的肽且以總離子計數(TIC)定量。

表3展示偵測出C503-C503、C503-C565、C565-C318及C565-C565之二硫鍵對。在經純化AvPAL製劑之二硫鍵對中可見位置565處之半胱胺酸殘基及位置503處數量較少之半胱胺酸殘基。

表3：聚集物二硫鍵對

二硫鍵對	結果(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.

[#]未偵測出

執行研究以判定是否除二硫鍵交聯機制外的其他機制可能與AvPAL蛋白質聚集有關。

將經純化AvPAL製劑用0.05% Tween或10 mM EDTA培育，且隨後如實例9中所述藉由SEC-HPLC分離。Tween使蛋白質聚集因疏水性相互作用而減少，且EDTA使蛋白質聚集因二價陽離子之存在而減少。如圖9中所示，暴露於0.05% Tween或10 mM EDTA對AvPAL蛋白質聚集無影響。經10 mM EDTA處理之AvPAL在第10分鐘之額外峰係由於EDTA在210 nm下之吸光度。

為進一步探究二硫鍵交聯在AvPAL蛋白質聚集中的作用，將經純化AvPAL藉由用DTT處理來還原且隨後去鹽，再藉由SEC-HPLC分離。如圖10A中所示，AvPAL蛋白質聚集藉由用DTT處理而減至最小，且在37°C下培育18小時後，聚集物再形成。相反，如圖10B中所示，一旦將AvPAL表面半胱胺酸藉由DTT暴露之後，但在去鹽及在37°C下培育18小時之前用N-甲基順丁烯二醯亞胺(NEM)處理加以修飾(亦即烷基化)，則聚集物便不再形成。

基於以上所述，細菌表現之AvPAL之聚集似乎僅歸因於鏈間二硫鍵之形成，而非歸因於疏水性作用或存在二價陽離子。位置565及503處之半胱胺酸殘基與AvPAL製劑中鏈間二硫鍵之形成有關。

實例 11

AvPAL變異體(半胱胺酸突變體)之聚乙二醇化形式之液體調配物

執行研究以探究不同賦形劑(例如穩定劑)對AvPAL多肽變異體(例如，在位置503及565處半胱胺酸殘基經絲胺酸取代)之聚乙二醇化形式在本發明調配物中的加速穩定性的影響。

如實例7中所述製備聚乙二醇化AvPAL雙半胱胺酸突變體AvPAL_C565SC503S。

使用活體外活性檢定比色管檢定或板檢定來測定聚乙二醇化AvPAL_C565SC503S之不同調配物之加速穩定性。對於比色管檢定，將經純化聚乙二醇化AvPAL_C565SC503S稀釋於TBS稀釋緩衝液中，且隨後添加至含有22.5 mM苯丙胺酸(Phe)、100 mM Tris-HCl(pH 8.5)之檢定緩衝液中。在30°C下培育2分鐘後，由290 nm下之吸光度量測所釋放之反式肉桂酸(t-CA)之量。對於板檢定，將經純化聚乙二醇化AvPAL_C565SC503S稀釋於TBS稀釋緩衝液加BSA/Phe/Brij中，且隨後添加至含有22.5 mM Phe、100 mM Tris-HCl(pH 8.5)之檢定緩衝液中。在30°C下培育10-20分鐘後，由290 nm下之吸光度量測所釋放之反式肉桂酸(t-CA)之量。1 IU之PAL活性等於1 μ Mol TCA/min。

在第一加速穩定性研究中，評估pH值對聚乙二醇化雙半胱胺酸突變體AvPAL AvPAL_C565SC503S之穩定性的影響。將經純化聚乙二醇化AvPAL_C565SC503S預調配於具有4至9之不同pH值之10 mM緩衝液及140 mM NaCl中。所測試緩衝液：檸檬酸鹽(pH 4)、乙酸鹽(pH 5)、組胺酸(pH 6)、磷酸鹽(pH 7)、Tris(pH 7.5、pH 8)及精胺酸(pH 9)。

將酶調配物在4℃、25℃或37℃下儲存至多30天後，量測活體外活性。在pH 4下觀察到PAL酶活性之總體喪失。選擇7至8範圍內之pH值以供進一步評估。

在第二加速穩定性研究中，評估pH值及多種賦形劑對聚乙二醇化AvPAL雙半胱胺酸突變體AvPAL_C565SC503S之穩定性的影響。將經純化聚乙二醇化AvPAL_C565SC503S預調配於不存在或存在0.5% EDTA、0.5% EDTA加0.5%抗壞血酸或0.5% EDTA加5 mM甲硫胺酸(Met)之pH值為7、7.5或8.0的10 mM Tris及140 mM NaCl中。將酶調配物在4℃、25℃或37℃下儲存至多60天後，量測活體外活性。pH 7.0及7.5在維持酶活性方面似乎等效，EDTA對酶活性產生極少或不產生影響，且抗氧化劑抗壞血酸及甲硫胺酸負面影響酶活性。

在同一加速穩定性研究中，評估AvPAL雙半胱胺酸突變體AvPAL_C565SC503S之聚乙二醇化之影響。酶活性之損失率在未聚乙二醇化與聚乙二醇化AvPAL_C565SC503S之間類似。

在第三加速穩定性研究中，評估酶受質及產物作為賦形劑對聚乙二醇化AvPAL雙半胱胺酸突變體AvPAL_C565SC503S之穩定性的影響。將約12 mg/mL(0.2 mM)經純化聚乙二醇化AvPAL_C565SC503S預調配於不存在或存在1 mM Phe(每莫耳活性位點5莫耳受質)、2 mM TCA(每莫耳活性位點10莫耳產物)或0.05% Tween 80(界面活性劑)之pH值為7.5的10 mM Tris及140 mM NaCl中。將酶調配物

在4°C、25°C或37°C下儲存不同時間後，每週量測活體外活性。Phe與t-CA顯著增強酶之穩定性，而Tween不對酶穩定性產生影響。

加速穩定性研究1、2及3之概述展示於圖11中。

在第四加速穩定性研究中，評估低濃度Phe及t-CA作為賦形劑對聚乙二醇化AvPAL雙半胱胺酸突變體AvPAL_C565SC503S之穩定性的影響。將約12 mg/mL(0.2 mM)經純化聚乙二醇化AvPAL_C565SC503S預調配於不存在或存在0.4 mM Phe(每莫耳活性位點2莫耳受質)或0.4 mM TCA(每莫耳活性位點2莫耳產物)之pH值為7.5的10 mM Tris及140 mM NaCl中。將酶調配物在4°C、25°C或37°C下儲存不同時間後，每週量測活體外活性。低濃度Phe與t-CA有效使酶活性穩定。

在第五加速穩定性研究中，評估弱酶受質酪胺酸(Tyr)作為賦形劑對聚乙二醇化AvPAL雙半胱胺酸突變體AvPAL_C565SC503S之穩定性的影響。將約12 mg/mL(0.2 mM)經純化聚乙二醇化AvPAL_C565SC503S預調配於不存在或存在1或5 mM Tyr(分別為每莫耳活性位點5或25莫耳受質)之pH值為7.5的10 mM Tris及140 mM NaCl中。將酶調配物在4°C、25°C或37°C下儲存不同時間後，每週量測活體外活性。Tyr對酶活性具有極小非劑量依賴性穩定效應(圖12)。

在第六加速穩定性研究中，評估親核淨化劑作為賦形劑對聚乙二醇化AvPAL雙半胱胺酸突變體AvPAL_C565SC503S

之穩定性的影響。將約 20 mg/mL (0.33 mM) 經純化聚乙二醇化 AvPAL_C363SC303S 預調配於不存在或存在 1 Phe (每莫耳活性位點 3 莫耳受質)、2 mM 親核淨化劑 (每莫耳活性位點 6 莫耳苯甲酸或吡哆胺) 或 1 mM Phe 與 2 mM 親核淨化劑兩者之 pH 值為 7.5 的 10 mM Tris 及 140 mM NaCl 中。將酶調配物在 4°C 或 37°C 下儲存不同時間後，每週量測活體外活性。苯甲酸有效使酶活性穩定，但吡哆胺不然 (圖 13A)。Phe 與苯甲酸不存在疊加效應，提示穩定機制類似。

苯甲酸與 t-CA 之穩定效應提示其充當 Phe 之結構類似物 (參見圖 13B)。

組合 6 個加速穩定性研究之資料以預測聚乙二醇化 AvPAL 雙半胱胺酸突變體 AvPAL_C565SC503S 在不同調配物中之有效存放期。如下測定存放期：(1) 測定各調配條件之活性衰變 ($k_{\text{衰變}}$) 之速率，其遵循一級動力學；(2) 繪示 $\ln(k_{\text{衰變}})$ 對 $1/\text{溫度} (^{\circ}\text{K})$ 之圖；(3) 測定給定調配條件之活性衰變所需之 E_a ($\Delta G_{\text{衰變}}$)；(4) 使用給定溫度下之計算 E_a 及觀察 $k_{\text{衰變}}$ 外推 4°C 下之 $k_{\text{衰變}}$ ；及 (5) 確定存放期 (T_{90})，其為特定酶活性在 4°C 下下降 $\geq 10\%$ 之時間。

表 4 展示 Phe 及 t-CA 大大增加聚乙二醇化 AvPAL 雙半胱胺酸突變體 AvPAL_C565SC503S 之預測存放期。

表 4：在不同賦形劑下聚乙二醇化雙半胱胺酸突變體

AvPAL_C565SC503S之預測存放期 T_{90} (週)

賦形劑	42°C	37°C	25°C	4°C*	4°C(觀察值)
無(TBS)	0.67	0.8	2.1	12.9	約9-13
Phe	1.63	2.2	9.1	85	>20
t-CA	ND	2.0	7.1	85.8	>20

*數值為基於至多6個不同實驗之資料之估算值。

總之，以上預調配研究表明聚乙二醇化AvPAL雙半胱胺酸突變體AvPAL_C565SC503S之pH最佳值為7至7.5。抗氧化劑之存在導致酶活性急劇損失。苯丙胺酸(Phe)與反式肉桂酸(t-CA)在加速條件(25°C及37°C)下使rAvPAL-PEG之穩定性增加50%或50%以上。每個rAvPAL-PEG活性位點2倍過量之Phe或t-CA足以使活性穩定且更高濃度似乎不產生額外益處。較弱PAL受質酪胺酸(Tyr)似乎不使酶活性穩定，而苯甲酸使rAvPAL-PEG活性穩定至與其結構類似物Phe類似之程度。當苯甲酸與Phe組合時，未觀察到額外活性穩定化，提示具有共同活性穩定化機制。

實例12

AvPAL變異體(半胱胺酸突變體)之聚乙二醇化形式之凍乾調配物

執行研究以探究不同固體(例如，凍乾)調配物對本發明之AvPAL多肽變異體(例如，在位置503及565處半胱胺酸殘基經絲胺酸取代)之聚乙二醇化形式之活性的影響。

如實例7中所述製備聚乙二醇化AvPAL雙半胱胺酸突變體AvPAL_C565SC503S。

如下調配聚乙二醇化AvPAL雙半胱胺酸突變體AvPAL_C565SC503S：(F1)10 mg/mL AvPAL_C565SC503S、10 mM Tris(pH 7.5)；(F2)10 mg/mL AvPAL_C565SC503S、10 mM Tris(pH 7.5)、25 mg/mL 甘露糖醇；或(F3)10 mg/mL AvPAL_C565SC503S、10 mM Tris(pH 7.5)、20 mg/mL甘露糖醇、5 mg/mL蔗糖。調配後，各自之PAL酶活性為1.7至1.8 U/mg。凍乾後，將調配物在4℃下儲存至多26天，且隨後再懸浮於新鮮的無菌過濾MilliQ水中。如實例 11 中所述測定 PAL 酶活性。表 5 展示在將不同AvPAL_C565SC503S調配物凍乾、儲存或再懸浮後，活性似乎未損失。

表 5：凍乾調配(LF)後聚乙二醇化雙半胱胺酸突變體AvPAL_C565SC503S之比活性

LF	LF之前	LF之後	LF之後 +5天/4℃	LF之後 + 11天/4℃	LF之後 +26天/4℃
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

實例 13

獼猴及大鼠中AvPAL變異體(半胱胺酸突變體)之聚乙二醇化形式之毒性/藥物動力學研究

執行毒性/藥物動力學研究以測定投與單次劑量之AvPAL多肽變異體(例如，在位置503及565處半胱胺酸殘基經絲胺酸取代)之聚乙二醇化形式在獼猴及大鼠中的效應。

如實例 7 中所述製備聚乙二醇化AvPAL雙半胱胺酸突變

體 AvPAL_C565SC503S。

獼猴毒性/藥物動力學研究

該研究使用四(4)組猴，各具有3隻雄性及3隻雌性。第1組接受安慰劑(mL/kg)；且第2、3及4組分別接受4、12及60 mg/kg之於溶液中之聚乙二醇化AvPAL雙半胱胺酸突變體 AvPAL_C565SC503S的單次皮下注射。自給藥前及給藥後不同時間(3至504小時)之猴收集血漿樣品。可見60 mg/kg劑量對猴有毒性，所以終止該研究之第4組部分。

圖14A展示4 mg/kg及12 mg/kg單次皮下注射後不同時間聚乙二醇化AvPAL雙半胱胺酸突變體 AvPAL_C565SC503S於血漿中之濃度。資料展示聚乙二醇化AvPAL雙半胱胺酸突變體 AvPAL_C565SC503S單相清除。呈示具有一級吸收之單室模型來描述單次皮下注射後聚乙二醇化AvPAL雙半胱胺酸突變體 AvPAL_C565SC503S之血漿分布。

圖14B展示4 mg/kg單次皮下注射後不同時間苯丙胺酸(Phe)及聚乙二醇化AvPAL雙半胱胺酸突變體 AvPAL_C565SC503S於血漿中之濃度。在該劑量下，血漿Phe濃度在24小時內降至GC/MS檢定之定量限界以下，且血漿Phe之下降持續超過10天。

大鼠毒性/藥物動力學研究

該研究使用八(8)組大鼠，其中安慰劑組3隻雄性及3隻雌性，且測試組6隻雄性及6隻雌性。第1及5組接受單次靜脈內及皮下安慰劑注射。第2、3及4組分別接受1、5及25 mg/kg之單次聚乙二醇化AvPAL雙半胱胺酸突變體

AvPAL_C565SC503S 靜脈內注射。第 6、7 及 8 組分別接受 10、25 及 250 mg/kg 之單次聚乙二醇化 AvPAL 雙半胱胺酸突變體 AvPAL_C565SC507S 皮下注射。自給藥前及給藥後不同時間 (1 至 360 小時) 之大鼠收集血液樣品。在各收集時間，自各組中之 3 隻大鼠收集血液。在該研究中之大鼠中未觀察到毒性。

圖 15A 展示 1、5 及 25 mg/kg 單次靜脈內注射後不同時間聚乙二醇化 AvPAL 雙半胱胺酸突變體 AvPAL_C565SC503S 於血漿中之濃度。資料展示單次靜脈內注射後聚乙二醇化 AvPAL 雙半胱胺酸突變體 AvPAL_C565SC503S 自血漿中單相清除。

圖 15B 展示 10、25 及 250 mg/kg 單次皮下注射後不同時間聚乙二醇化 AvPAL 雙半胱胺酸突變體 AvPAL_C565SC503S 於血漿中之濃度。呈示具有一級吸收之單室模型來描述單次皮下注射後聚乙二醇化 AvPAL 雙半胱胺酸突變體 AvPAL_C565SC503S 之血漿分布。

表 6 展示單次靜脈內或皮下注射後聚乙二醇化 AvPAL 雙半胱胺酸突變體 AvPAL_C565SC503S 之藥物動力學參數。

表 6：單次靜脈內或皮下給藥後聚乙二醇化雙半胱胺酸突變體 AvPAL_C565SC503S 之藥物動力學參數

途徑	劑量 (mg/kg)	AUC _{0-∞} (ng·hr/mL)	C _{max} (ng/mL)	T _{max} (hr)	t _{1/2} * (hr)	F (%)
靜脈內	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

*對於皮下投藥途徑，終點 t_{1/2} 比靜脈內長；此可歸因於皮下組織之吸收速率比清除速率低(因而所觀察到之 t_{1/2} 實際上為吸收)。

[#] 使用 25 mg/kg 下之靜脈內 AUC 資料之生物可用性為 21.5%。

該藥物動力學研究中似乎無性別差異。AUC_{inf} 及 C_{max} 大致與靜脈內與皮下投藥途徑之劑量成比例。

大鼠及獼猴中之多次劑量毒性研究

在大鼠及獼猴重複劑量毒性研究中評估聚乙二醇化 AvPAL 雙半胱胺酸突變體 AvPAL_C565SC503S 之安全性。

經 28 天每週兩次皮下投與至多 25 mg/kg 聚乙二醇化 AvPAL 雙半胱胺酸突變體 AvPAL_C565SC503S 的大鼠不展現毒性。

經 28 天每週兩次皮下投與至多 1 mg/kg 劑量之聚乙二醇化 AvPAL 雙半胱胺酸突變體 AvPAL_C565SC503S 的獼猴不展現顯著毒性。第 1 次劑量後觀察到血漿 Phe 含量之劑量依

賴性降低；然而，第7次劑量後，所有劑量組血漿Phe含量重新回至基線，表明對所投與之酶可能產生抗體反應。第28天時在大多數1 mg/kg處理動物中觀察到最小抗AvPAL_C565SC503S IgG效價。第28天時，在該研究中之任何動物中均未觀察到IgM效價。

實例14

AvPAL變異體(半胱胺酸突變體)對培養物中之腫瘤細胞的效應

執行研究以探究AvPAL多肽變異體(例如，在位置503及565處半胱胺酸殘基經絲胺酸取代)之聚乙二醇化形式對活體外培養物中生長之腫瘤細胞之增殖的效應。

如實例7中所述製備聚乙二醇化AvPAL雙半胱胺酸突變體AvPAL_C565SC503S。

使用如Dengler等人，Anti-Cancer Drugs 6:522-532 (1995)中所述之碘化丙啶螢光檢定量測活體外腫瘤細胞之增殖。

血液科腫瘤

就聚乙二醇化雙半胱胺酸突變體AvPAL_C565SC503S對活體外細胞增殖之效應評估二十四(24)個血液科腫瘤細胞株之組，包括14個白血病、5個淋巴瘤及5個骨髓瘤。

第0天，以5,000個細胞/孔將血液科腫瘤細胞株接種於培養板中。第1天，向培養物中添加不同濃度(0.01至100 µg/mL)之聚乙二醇化雙半胱胺酸突變體AvPAL_C565SC503S。第5天，收集細胞且由碘化丙啶染色量測

DNA含量。測定 IC_{50} 、 IC_{70} 及 IC_{90} 。對各血液科腫瘤細胞株執行該等實驗兩或三次。

表7展示如由碘化丙啶染色所量測，聚乙二醇化雙半胱胺酸突變體AvPAL_C565SC503S有效抑制數種血液科腫瘤細胞株之活體外增殖。

表7：聚乙二醇化雙半胱胺酸突變體AvPAL_C565SC503S
對活體外血液科腫瘤細胞株之碘化丙啶染色之抑制

腫瘤細胞株	細胞類型	IC_{50} $\mu\text{g/mL}$	IC_{70} $\mu\text{g/mL}$
CCRF CEM	ALL-T細胞淋巴瘤	1	>100
		>100	>100
		>100	>100
EM2	CML	>100	>100
		>100	>100
		>100	>100
HL-60	APL	0.904	>100
		>100	>100
		46.41	>100
JURKAT	人類T細胞淋巴瘤	0.38	2.928
		14.125	>100
		10.000	>100
JURLMK1	CML	0.766	>100
		10	>100
		3.162	>100
K562	CML	0.701	59.948
		>100	>100
		11.659	>100
KCL22	CML	0.9	15.399
		>100	>100
		1	>100
KG1	AML	43.287	>100
		>100	>100
		>100	>100

MEG01	CML	1.258	>100
		>100	>100
		0.926	>100
MOLT4	ALL-T細胞淋巴瘤	0.326	1.873
		1.082	5.298
		1.096	6.918
Mv411	AML	5.994	74.989
		>100	>100
		>100	>100
NOMO1	AML	0.304	2.511
		0.732	8.659
		0.863	6.449
OCIAML2	AML	0.261	0.938
		>100	>100
		7.305	>100
PL21	AML	>100	>100
		>100	>100
		>100	>100
HUT78	Lym CTL	6.105	18.276
		17.782	>100
		0.096	>100
L5178Y	小鼠T細胞淋巴瘤	6.683	41.595
		3.981	10
		3.019	7.585
MYLA	Lym CTL	4.436	>100
		5.379	>100
		8.171	>100
RAJI	伯基特淋巴瘤(Burkitt Lymphoma)	0.261	0.938
		21.544	>100
		2.154	>100
U937	組織淋巴瘤	0.803	>100
		>100	>100
		>100	>100
8226	骨髓瘤	0.229	0.825
		>100	>100
		0.691	7.742
IM9	人類淋巴母細胞	0.271	1.467

		0.295	1.311
		0.063	0.188
L363	人類漿細胞白血病	7.943	>100
		1.73	15.505
LP1	人類多發性骨髓瘤	0.774	100
		0.71	6.309
NCIH929	人類多發性骨髓瘤	>100	>100
		11.288	>100
		2.154	>100

如由碘化丙啶染色之減少所確定的兩種敏感性血液科腫瘤細胞 NOMO1 及 IM9 中聚乙二醇化雙半胱胺酸突變體 AvPAL_C565SC503S 對細胞增殖之劑量依賴性抑制分別展示於圖 14A 及 21B 中。該等腫瘤細胞株具有分別小於 1.0 $\mu\text{g/mL}$ 及 10.0 $\mu\text{g/mL}$ 之 IC_{50} 及 IC_{70} 。比較而言，天冬醯胺酶在人類白血病細胞株中具有 1-10 $\mu\text{g/mL}$ 之 IC_{50} 。然而，如根據 IC_{70} 值所判定，血液科腫瘤細胞株通常比實體腫瘤細胞株更具抗性(參見下文)。

實體腫瘤

就聚乙二醇化雙半胱胺酸突變體 AvPAL_C565SC503S 對活體外細胞增殖之效應評估三十六(36)個實體腫瘤細胞株之組，包括來源於膀胱、腦、結腸、胃、頭頸部、肺、乳房、卵巢、胰腺、前列腺、腎及子宮之腫瘤。第0天，以 5,000 個細胞/孔將實體腫瘤細胞株接種於培養板中。第1天，向培養物中添加不同濃度(0.01至100 $\mu\text{g/mL}$)之聚乙二醇化雙半胱胺酸突變體 AvPAL_C565SC503S。第5天，由碘化丙啶染色量測DNA含量。測定 IC_{50} 、 IC_{70} 及 IC_{90} 。

表8展示如由碘化丙啶染色所量測，聚乙二醇化雙半胱

胺酸突變體 AvPAL_C565SC503S 有效抑制數種實體腫瘤細胞株之活體外增殖。

表 8：聚乙二醇化雙半胱胺酸突變體 AvPAL_C565SC503S

對活體外實體腫瘤細胞株之碘化丙啶染色之抑制

腫瘤細胞株	器官/細胞類型	IC ₅₀ μg/mL	IC ₇₀ μg/mL
	膀胱		
1218L	ATCC, Freiburg; 泌尿上皮腺癌	1.1	7.498
T24	異種移植物	0.617	2.154
	腦/CNS		
498NL	異種移植物, Freiburg	0.691	2.154
SF268	NCI	0.59	1.492
	結腸		
HCT116	NCI; 腺癌, pd	0.316	0.9
HT29	NCI; 腺癌, pd	0.508	0.94
	胃		
251L	異種移植物, Freiburg; 腺癌pd	2.682	37.275
	頭頸部		
536L	異種移植物, Freiburg; 下嚥癌	0.606	1.887
	肺		
1121L	異種移植物	0.715	3.548
289L	異種移植物, Freiburg; 腺癌pd	2.807	23.101
529L	異種移植物, Freiburg; 大細胞, du	0.539	1.73
629L	異種移植物, Freiburg; 腺癌pd	0.457	1.467
H460	NCI; 大細胞癌	0.215	0.644
	乳房		
401NL	異種移植物, Freiburg; 乳頭腺癌, wd	1.873	7.564
MCF7	NCI; 乳腺癌	0.599	1.623
	黑色素瘤		
276L	異種移植物	4.124	268.269
394NL	異種移植物	0.887	3.856
462NL	異種移植物	0.954	6.189
514L	異種移植物	0.828	4.216
520L	異種移植物	1.359	6.309

	卵巢		
1619L	異種移植植物，Freiburg；腺癌，md	0.322	0.688
899L	異種移植植物，Freiburg；乳頭漿液癌，md	1.279	6.628
OVCAR3	NCI；腺癌，md	1.185	6.528
	胰腺		
1657L	異種移植植物，Freiburg；腺癌，md	1.951	8.619
PANC1	ATCC	0.825	5.179
	前列腺		
22RV1	ATCC；腺癌，md	0.87	7.079
DU145	NCI；腺癌，md	0.622	1.873
LNCAP	DSMZ；腺癌，md	0.584	0.974
PC3M	NCI；腺癌，md	0.501	1.274
	胸膜間皮瘤		
1752L	異種移植植物，Freiburg；胸膜間皮瘤	1.637	8.483
	腎		
1781L	異種移植植物，Freiburg；腎癌	2.371	10
393NL	異種移植植物，Freiburg；腎上腺樣瘤，wd	0.55	1.995
486L	異種移植植物	0.859	5.336
944L	異種移植植物	0.71	3.727
	子宮		
1138L	異種移植植物，Freiburg；癌肉瘤，wd	0.621	1.258

來源於腦/CNS、結腸、肺及前列腺癌之腫瘤細胞株中如由碘化丙啶染色減少所確定之聚乙二醇化雙半胱胺酸突變體 AvPAL_C565SC503S 對細胞增殖的劑量依賴性抑制分別展示於圖 17A-D 中。

AvPAL_C565SC503S 在該廣泛組實體腫瘤細胞株中呈現選擇性抗增殖活性，且在來源於肺、腦/CNS、結腸、前列腺及腎之腫瘤細胞株中尤其有效（亦即， IC_{50} 介於 0.2 $\mu\text{g/mL}$ 與 0.7 $\mu\text{g/mL}$ 之間）。至少一種來源於膀胱、頭頸部、乳房、卵巢及子宮之腫瘤細胞株亦對 AvPAL_

C565SC503S 之細胞殺傷敏感。數種黑色素瘤亦對 AvPAL_C565SC503S 之細胞殺傷敏感。

實例 15

AvPAL 變異體(半胱胺酸突變體)在裸小鼠中之抗腫瘤活性
執行研究以探究 AvPAL 多肽變異體(例如，在位置 503 及 565 處半胱胺酸殘基經絲胺酸取代)之聚乙二醇化形式對裸小鼠中活體內生長之腫瘤細胞之增殖的效應。

如實例 7 中所述製備聚乙二醇化 AvPAL 雙半胱胺酸突變體 AvPAL_C565SC503S。

已成功使用免疫缺乏裸小鼠或 SCID 小鼠中人類腫瘤細胞之皮下異種移植物作為測試癌症治療劑以及靶向癌症治療劑之活體內功效之人類癌症模型，該等靶向癌症治療劑諸如抗體及毒素接合物(關於回顧，參見 Kerbel, Cancer Biol. Ther. 2(4)：增刊 1:S134-S139 (2003))。

可使用裸小鼠中人類腫瘤細胞之異種移植物測試僅聚乙二醇化 AvPAL 雙半胱胺酸突變體 AvPAL_C565SC503S 之活體內抗腫瘤活性或其與癌症治療劑或靶向癌症治療劑組合或與苯丙胺酸限制性飲食組合之活性。

為建立人類腫瘤異種移植物，用於 0.2 mL PBS 中之約 5×10^6 個人類腫瘤細胞皮下注射裸小鼠。平均腫瘤尺寸隨時間增加。自帶腫瘤裸小鼠切除人類異種移植腫瘤，且製備約 30 mm³ 之腫瘤組織塊。使用於評估聚乙二醇化 AvPAL 雙半胱胺酸突變體 AvPAL_C565SC503S 之活體內抗腫瘤活性之天然裸小鼠各自皮下植入一個腫瘤組織塊。腫瘤啟始

之前或當一組裸小鼠內之平均腫瘤尺寸為約100-150 mm³(預防模型)時，及/或腫瘤建立後，當一組裸小鼠內之平均腫瘤尺寸超過500 mm³(治療模型)時，啟始治療性治療。

第一步，確定將使血漿苯丙胺酸(Phe)含量降至近似為零的聚乙二醇化AvPAL雙半胱胺酸突變體AvPAL_C565SC503S之劑量。執行諸如2006年6月12日申請之先前同在申請中之美國專利申請案第11/451,999號中的實例7至9及14中所述的實驗，其中例外為使用裸小鼠而非ENU2小鼠。在該啟始步驟中確定PAL酶劑量及投藥頻率。

第二步，在來源於患者或細胞株之不同人類腫瘤異種移植植物中評定聚乙二醇化AvPAL雙半胱胺酸突變體AvPAL_C565SC503S之抗腫瘤活性。腫瘤模型包括不同癌症類型，例如(但不限於)中樞神經系統(CNS)癌症、結腸癌、肺癌、前列腺癌、轉移性黑色素瘤及腎癌。可測試之腫瘤及腫瘤細胞株之非全面清單提供於表7(血液科腫瘤)及8(實體腫瘤)中。

為評定聚乙二醇化AvPAL雙半胱胺酸突變體AvPAL_C565SC503S之抗腫瘤活性，以約5至500 mg/kg範圍內之(例如)三種不同劑量含量皮下給予之AvPAL_C565SC503S處理帶有不同人類腫瘤皮下異種移植植物之裸小鼠。該劑量可產生約0.1至10 mg/kg之人類劑量。以腫瘤體積抑制及/或絕對生長延遲分析抗腫瘤活性。同時以死亡率及/或體重變化評估AvPAL_C565SC503S之耐受

性。

各活體內抗腫瘤研究由至少四個組組成，一個媒劑對照組及至少三個原核生物PAL酶處理組。組規模應為至少8隻小鼠，產生總計32隻接受皮下腫瘤植入之小鼠。對於隨機化(第0天)使用具有類似尺寸腫瘤($100-150\text{ mm}^3$)之小鼠。

在抗腫瘤效應之情況下，可在原核生物PAL酶處理終止後再監測小鼠2週以偵測可能的腫瘤生長重新啟始。根據動物實驗之規定，若腫瘤直徑超過1.6 cm，則處死小鼠。

每週量測腫瘤直徑以及體重兩次。根據式 $a \times b^2 / 2$ (其中'a'為腫瘤之最大直徑且'b'為垂直軸)計算腫瘤體積。基於第0天(給藥第1天)之值計算各個別腫瘤之相對腫瘤體積及主體重量。當腫瘤達到約 $100-150\text{ mm}^3$ 之體積時，開始治療。按照動物研究之規定，若腫瘤體積超過 1600 mm^3 ，則處死小鼠。

也可使用裸小鼠連續繼代中所建立之患者來源之腫瘤作為測試腫瘤。該等腫瘤通常保留原始患者腫瘤之重要特徵，包括組織學及藥物敏感性。對於某些腫瘤，例如一種CNS癌及兩種前列腺癌，使用癌細胞株來源之腫瘤。

實例 16

例示性原核生物PAL調配物

以下實例提供關於欲用於調配適用於治療贅生性疾病及癌症的包含原核生物PAL或其生物學活性片段、突變體、變異體或類似物之組合物之參數的指南。欲用於調配本發明之原核生物PAL組合物之參數包括(但不限於)維持pH值

之緩衝劑、等張調節劑、穩定劑之不存在性或存在性及其他賦形劑、媒劑、稀釋劑及其類似物之不存在性或存在性。

在實例 11 中，聚乙二醇化 AvPAL 雙半胱氨酸突變體 AvPAL_C565SC503S 經調配為濃度為約 12-20 mg/mL (約 0.2-0.33 mM)。較佳原核生物 PAL 變異體經調配為濃度在約 1 至 50 mg/mL (約 0.016 至 0.8 mM)、較佳約 5 至 20 mg/mL (約 0.08 至 0.33 mM) 且更佳約 5 至 15 mg/mL (約 0.08 至 0.25 mM) 之範圍內。本發明之原核生物 PAL 組合物之最佳調配物的 PAL 酶濃度為約 10 +/- 5 mg/mL (約 0.16 +/- 0.08 mM)。

在實例 11 中，聚乙二醇化 AvPAL 雙半胱氨酸突變體 AvPAL_C565SC503S 係調配於 pH 值為 7.0、7.5 及 8.0 之 10 mM Tris-HCl、140 mM NaCl 中。較佳緩衝劑為 Tris-HCl 或其等效物，其濃度在 5 至 50 mM、較佳 5 至 20 mM 且更佳 5 至 15 mM 之範圍內。本發明之原核生物 PAL 組合物之最佳調配物的 Tris-HCl 緩衝劑濃度為約 10 +/- 5 mM。

醫藥組合物之較佳 pH 值為約 pH 6.0-8.5，較佳約 pH 7.0-8.0，且更佳約 pH 7.0-7.6。本發明之原核生物 PAL 組合物之最佳調配物的 pH 值為約 pH 7.3 +/- 0.3。

較佳等張調節劑為 NaCl 或其等效物，其濃度在約 100 至 200 mM、較佳約 130 至 170 mM 且更佳約 130 至 150 mM 之範圍內。本發明之原核生物 PAL 組合物之最佳調配物的 NaCl 濃度為約 140 +/- 10 mM。

如實例11中所示，聚乙二醇化AvPAL雙半胱胺酸突變體AvPAL_C565SC503S在苯丙胺酸(Phe)及某些其結構類似物(包括例如反式肉桂酸(t-CA)及苯甲酸)存在下穩定；酪胺酸(Tyr)對PAL酶具有最小穩定效應。較佳穩定劑為Phe或其結構類似物，其中穩定劑之範圍為每莫耳原核生物PAL活性位點約0.1至20莫耳穩定劑，較佳每莫耳原核生物PAL活性位點約0.5至10莫耳穩定劑，且更佳每莫耳原核生物PAL活性位點約1至10莫耳穩定劑。本發明之原核生物PAL組合物之最佳調配物的穩定劑濃度為每莫耳原核生物PAL活性位點約5 +/- 4莫耳穩定劑。

聚乙二醇化AvPAL雙半胱胺酸突變體AvPAL_C565SC503S在pH < 7或pH > 7.6下或在EDTA、胺基胍或Tween 80存在下並不非常穩定；抗氧化劑抗壞血酸及甲硫胺酸使PAL酶不穩定(實例11且資料未展示)。

雖然本發明之原核生物PAL組合物較佳以液體調配物形式製備，但亦可以固體(例如，凍乾)調配物形式製備。在該情況下，可添加賦形劑，例如增積劑，諸如甘露糖醇及/或蔗糖。在實例12中，聚乙二醇化AvPAL雙半胱胺酸突變體AvPAL_C565SC503S係調配於不存在甘露糖醇或蔗糖、存在25 mg/mL甘露糖醇或存在20 mg/mL甘露糖醇加5 mg/mL蔗糖之pH值為7.5之10 mM Tris-HCl、140 mM NaCl中且在其中凍乾。較佳凍乾調配物包含濃度為約1至5% (w/v)或10至50 mg/mL、較佳約2至4%且更佳約2至3%之甘露糖醇。另一較佳凍乾調配物包含甘露糖醇及蔗糖，其中

甘露糖醇之濃度為約1至5%(w/v)或10至50 mg/mL，較佳約1至3%且更佳約1.5至2.5%，且蔗糖之濃度為約0.1至2%(w/v)或0.1至2 mg/mL，較佳約0.2%至1%且更佳約0.3%至0.7%。本發明之原核生物PAL組合物之最佳凍乾調配物的甘露糖醇濃度為約2.5 +/- 0.5%甘露糖醇或2.0 +/- 0.5%甘露糖醇加0.5 +/- 0.2%蔗糖。

因此，本發明之原核生物PAL組合物之較佳調配物展示於表9中。

表9：原核生物PAL變異體之例示性調配物

成分種類	成分類型	濃度範圍
原核生物PAL變異體	聚乙二醇化 AvPAL_C565SC503S	10+/-5 mg/mL (0.16+/-0.08 mM)
緩衝劑	Tris-HCl	10 mM+/-5 mM且 pH 7.3+/-0.3
等張調節劑	NaCl	140 mM +/- 10 mM
穩定劑	Phe、t-CA或苯甲酸	每莫耳PAL活性位點5 +/- 4莫耳穩定劑
其他賦形劑、增積劑*	甘露糖醇+/-蔗糖	2.5+/-0.5%(w/v)甘露糖醇； 2.0+/-0.5%(w/v)甘露糖醇 +0.5+/-0.2%(w/v)蔗糖

*用於凍乾原核生物PAL調配物

實例17

使用原核生物PAL組合物來治療癌症之臨床評估

以下實例提供關於欲用於臨床評估本發明之治療方法中包含原核生物PAL或其生物學活性片段、突變體、變異體或類似物之組合物之參數的指南。如本文中通篇所論述，原核生物PAL組合物將用於治療癌症。將進行臨床試驗，

該等試驗將提供對經口或皮下給與原核生物PAL之安全性、藥物動力學及替代臨床終點與規定臨床終點之初始反應的評定。試驗應進行最短(但不必限於)24週，以收集100位可評估患者之足夠安全性資訊。試驗之最初劑量應為約0.001至約1.0毫克/公斤/週不等。在該劑量不達成患者之血漿苯丙胺酸(Phe)含量降低，例如自約50 μM 至約70 μM 之正常範圍降至偵測含量以下至小於約30 μM 、較佳小於約20 μM 且甚至更佳小於約10 μM 之範圍的情況下，應視需要增大劑量，且將該劑量再維持最短(但不必限於)24週之時段以建立安全性及評估進一步功效。

安全性之量測將包括不利事件、過敏反應、完整臨床化學概況(腎功能及肝功能)、尿分析及差示CBC。此外，亦將監測其他參數，包括血液Phe含量之含量降低、神經心理學及認知測試及全面評定。本實例亦涵蓋測定藥物在循環中之藥物動力學參數及PAL在血液中之一般性分布及半衰期。預期該等量測將有助於顯示劑量與臨床反應的關係。

方法

無癌症對照患者及已診斷出患有某種形式之癌症之患者將經歷基礎檢查、病史檢查及體格檢查；神經心理學及認知測試；一套標準的臨床實驗測試(CBC，概況20，CH50，UA)；尿喋呤含量、二氫喋啶還原酶(DHPR)含量及血清胺基酸之空腹血液(血漿)概況。將量測基線血液、血清或血漿Phe含量。將每週一次臨床隨訪密切追蹤患

者。治療期結束後第一週，患者應復診以作全面評估。若需增大劑量，則患者應遵循以上概述之相同時程。在試驗過程中始終監測安全性。

診斷及納入/排除標準

患者可為已證實確診患有某種形式之癌症之男性或女性。研究將包括先前已經歷手術、化學療法、放射療法及/或其他抗癌療法且處於好轉(例如，無疾病至少5年)之癌症患者。若患者已診斷患有某種形式之癌症但尚未經歷某種形式之抗癌療法，則該患者將排除在該最初研究以外。

原核生物PAL安全性

若研究過程中未發生明顯的急性或慢性藥物反應，則應判定原核生物PAL療法為安全的。若臨床檢查、臨床實驗或其他適當研究中未觀測到明顯的異常，則應判定長期投與該藥物為安全的。

原核生物PAL功效

一旦原核生物PAL療法判定為安全的且有效降低患者之血漿苯丙胺酸(Phe)含量，例如自約50 μM 至約70 μM 之正常範圍降至偵測含量以下至小於約30 μM 、較佳小於約20 μM 且甚至更佳小於約10 μM 之範圍，則即可在先前已經歷手術、化學療法、放射療法及/或其他抗癌療法且處於好轉(例如，無疾病至少5年)之癌症患者以及已診斷患有某種形式癌症但尚未經歷某種形式之抗癌療法之患者中測試本發明之原核生物PAL組合物。

對於處於好轉期之癌症患者，僅投與原核生物PAL或與

特殊形式癌症之標準癌症療法組合投與原核生物PAL以判定給予PAL療法之患者是否比未給予本發明原核生物PAL組合物之患者保持更長時間之好轉(亦即，無病)。

對於患有活性形式癌症之癌症患者，僅投與原核生物PAL或與特殊形式癌症之標準癌症療法組合投與原核生物PAL以判定給予PAL療法之患者是否對癌症療法具有比未給予本發明原核生物PAL組合物之患者更佳之反應(例如，保持無病更久，具有較長存活時間或具有較低腫瘤生長、腫瘤尺寸或腫瘤負擔)。

可僅投與原核生物PAL療法或與癌症治療劑或靶向癌症治療劑或蛋白質限制性飲食(亦即，無苯丙胺酸)或兩者組合投與原核生物PAL療法。

實例 18

AvPAL變異體(半胱胺酸突變體)在B16黑色素瘤腫瘤細胞株異種移植模型中之抗腫瘤活性

在B16黑色素瘤腫瘤細胞株異種移植模型中評估預防性或治療性給予如實例7中所述製備且以2.86及7.14 mg/mL調配於pH值為7.5之10 mM Tris-HCl、140 mM NaCl、1 mM反式肉桂酸(t-CA)中的聚乙二醇化AvPAL雙半胱胺酸突變體AvPAL_C565SC503S之抗腫瘤效應。預防性治療意謂向未展現疾病病徵之個體投與之治療，且治療性治療意謂向展現疾病病徵之個體投與之治療。由B16黑色素瘤異種移植物之生長延遲及小鼠存活時間之增加量測用聚乙二醇化AvPAL變異體預防性或治療性治療之抗腫瘤功效。

為建立腫瘤異種移植物，對96隻6週大的雌性B6J小鼠在後肋中皮下注射約 1×10^6 個B16黑色素瘤腫瘤細胞。將經注射小鼠隨機指定為兩組，代表預防性治療組及治療性治療組。

將指定為預防性組之小鼠進一步分為四組，各組每週接受兩次皮下注射媒劑(10 mM Tris-HCl、140 mM NaCl、1 mM 反式肉桂酸(t-CA)，pH 7.5)或不同劑量含量(40、80或100 mg/kg)之聚乙二醇化AvPAL雙半胱胺酸突變體AvPAL_C565SC503S。如圖18(上圖)中所指示，在預防性組中，第1天指示向小鼠注射B16黑色素瘤細胞之日。

然而，如圖18(下圖)所指示，在治療性組中，第1天指示向小鼠注射之B16黑色素瘤腫瘤體積達到 $200-300 \text{ mm}^3$ 之日。當指定為治療性組之小鼠中之腫瘤體積達到 $200-300 \text{ mm}^3$ 時，將該等小鼠進一步分為四組，各組在相對於腫瘤之肋中每週接受兩次皮下注射媒劑(10 mM Tris-HCl、140 mM NaCl、1 mM t-CA，pH 7.5)或不同劑量含量(40、80或100 mg/kg)之聚乙二醇化AvPAL雙半胱胺酸突變體AvPAL_C565SC503S。

每日觸診所有小鼠直至腫瘤可量測。每週由數位測徑規量測法使用式 $(l \times w^2)/2$ 測定腫瘤體積三次，其中w為腫瘤之兩個垂直軸中之最短軸。

每週量測體重三次，且每日進行臨床觀察(死亡率、異常及疼痛或痛苦之病徵)。每週在投與劑量之前(每週第1天)、給藥後48小時(每週第3天)及終止時經由後眼眶竇收

集執行血液收集。

第36天時或個別地當腫瘤體積達到1500 mm³時(無論何者先發生)，終止小鼠。終止時採集腫瘤且經福馬林固定以用於組織學檢查。

預防性組中的一些小鼠截止第16天時腫瘤體積為1500 mm³(參見圖18(上圖))。治療組中的一些小鼠截止第10天時腫瘤體積為1500 mm³(參見圖18(下圖))。

圖18展示當預防性(上圖)或治療性(下圖)投與聚乙二醇化AvPAL雙半胱胺酸突變體AvPAL_C565SC503S時，該酶能夠以劑量依賴性方式延遲B16黑色素瘤細胞株異種移植物之生長。

表10展示如腫瘤體積小於1500 mm³之小鼠之百分率所確定，當預防性或治療性投與聚乙二醇化AvPAL雙半胱胺酸突變體AvPAL_C565SC503S時，該酶能夠以劑量依賴性方式增加存活。

表 10：B16黑色素瘤腫瘤異種移植模型中rAVPAL-PEG_C565SC503S對存活之效應

治療組	存活(預防性)*	存活(治療性)*
媒劑	第13天	第10天
40 mg/kg rAVPAL-PEG	第18天	第13天
80 mg/kg rAVPAL-PEG	第20天	第15天
100 mg/kg rAVPAL-PEG	第25天	第15天

*治療組中至少50%之小鼠腫瘤體積超過1500 mm³之日

該研究展示當在黑色素瘤小鼠模型中預防性或治療性投與聚乙二醇化AvPAL雙半胱胺酸突變體AvPAL_

C565SC503S時，其發揮抗腫瘤效應。

實例 19

AvPAL變異體(半胱胺酸突變體)在肝細胞瘤腫瘤細胞株異種移植模型中之抗腫瘤活性

在兩個肝細胞瘤腫瘤細胞株異種移植模型中評估預防性給予如實例7中所述製備且以9.1 mg/mL調配於pH值為7.5之10 mM Tris-HCl、140 mM NaCl、1 mM反式肉桂酸(t-CA)中的聚乙二醇化AvPAL雙半胱胺酸突變體AvPAL_C565SC503S之抗腫瘤效應。預防性治療意謂向未展現疾病病徵之個體投與之治療。由肝細胞瘤異種移植物之生長延遲及小鼠存活時間之增加量測用聚乙二醇化AvPAL變異體預防性治療之抗腫瘤功效。

為建立腫瘤異種移植物，對20隻6週大的雌性B6J小鼠在後肋中皮下注射約 1×10^7 個SNU398肝細胞瘤腫瘤細胞或約 5×10^6 個HepG2肝細胞瘤腫瘤細胞。

將經SNU398注射及經HepG2注射之小鼠各自分為兩組，各組每週接受三次皮下注射媒劑(10 mM Tris-HCl、140 mM NaCl、1 mM反式肉桂酸(t-CA)，pH 7.5)或60 mg/kg之聚乙二醇化AvPAL雙半胱胺酸突變體AvPAL_C565SC503S。如圖19中所指示，第1天指示向小鼠注射SNU398細胞或HepG2細胞之日。

每日觸診所有小鼠直至腫瘤可量測。每週由數位測徑規量測法使用式 $(l \times w^2)/2$ 測定腫瘤體積三次，其中w為腫瘤之兩個垂直軸中之最短軸。

每週量測體重三次，且每日進行臨床觀察(死亡率、異常及疼痛或痛苦之病徵)。研究前、第7次給藥後48小時及終止時經由後眼眶竇收集執行血液收集。

第60天時或個別地當腫瘤體積達到1500 mm³時(無論何者先發生)，終止小鼠。終止時採集腫瘤且經福馬林固定以用於組織學檢查。

圖19展示預防性投與聚乙二醇化AvPAL雙半胱胺酸突變體AvPAL_C565SC503S能夠延緩SNU398(上圖)及HepG2(下圖)肝細胞瘤細胞株異種移植物之生長。

表11展示如SNU398及HepG2肝細胞瘤細胞株異種移植物之腫瘤體積小於1500 mm³之小鼠的百分率所確定，預防性投與聚乙二醇化AvPAL雙半胱胺酸突變體AvPAL_C565SC503S能夠增加存活。

表 11：兩個肝細胞瘤腫瘤異種移植模型中rAVPAL-PEG_C565SC503S對存活之效應

治療組	存活(SNU398)*	存活(HepG2)*
媒劑	第33天	第54天
60 mg/kg rAVPAL-PEG	>第60天	>第60天

*治療組中至少50%之小鼠腫瘤體積超過1500 mm³之日

該等研究展示當在兩個肝細胞瘤小鼠模型中預防性投與聚乙二醇化AvPAL雙半胱胺酸突變體AvPAL_C565SC503S時，其發揮抗腫瘤效應。

預期熟習此項技術者可想到如以上說明性實例中所陳述

之本發明之大量修改及變化形式。因此，僅受隨附申請專利範圍中所出現之該等限制才應限制本發明。

【圖式簡單說明】

圖 1：圖 1A：點形念珠藻 PAL 之基因序列 (SEQ ID NO: 1)；圖 1B：點形念珠藻 PAL 之蛋白質序列 (SEQ ID NO: 2)。

圖 2：圖 2A：多變魚腥藻 PAL 之基因序列 (SEQ ID NO: 3)；圖 2B：多變魚腥藻 PAL 之蛋白質序列 (SEQ ID NO: 4)。

圖 3：原核生物及真核生物之芳族胺基酸解氨酶之關係樹。序列係自 GenBank 中擷取 (圓括號中給出寄存編號) 且使用鄰接法 (Neighbor Joining Method) 用 ClustalX (1.83) 比對。

圖 4：點形念珠藻 PAL (SEQ ID NO: 2) 及多變魚腥藻 PAL (SEQ ID NO: 4) 與 EncP PAL (SEQ ID. No. 5) 及惡臭假單胞菌 HAL (SEQ ID NO: 6) 之藍藻菌蛋白質序列之比對。突出顯示對應於 PAL 或 HAL 活性之活性位點殘基。

圖 5：圖 5A：位置 64 處半胱胺酸取代為絲胺酸之多變魚腥藻苯丙胺酸解氨酶 (PAL) 的蛋白質序列 (AvPAL_C64S, SEQ ID NO: 7)；圖 5B：位置 318 處半胱胺酸取代為絲胺酸之多變魚腥藻 PAL 的蛋白質序列 (AvPAL_C318S, SEQ ID NO: 8)；圖 5C：位置 503 處半胱胺酸取代為絲胺酸之多變魚腥藻 PAL 的蛋白質序列 (AvPAL_C503S, SEQ ID NO: 9)；圖 5D：位置 565 處半胱胺酸取代為絲胺酸之多變魚腥

藻PAL的蛋白質序列(AvPAL_C565S, SEQ ID NO: 10); 圖5E: 位置503及565處半胱胺酸取代為絲胺酸之多變魚腥藻PAL的蛋白質序列(AvPAL_C565SC503S, SEQ ID NO: 11)。以粗體加下劃線顯示半胱胺酸至絲胺酸之取代。

圖6: 圖6A: 在37°C下培育不同長度之時間後, 未聚乙二醇化AvPAL之位置565處或位置565與503處半胱胺酸取代為絲胺酸對活體外PAL酶比活性的效應。圖6B: 在37°C下培育不同長度之時間後, 聚乙二醇化AvPAL之位置565處或位置565與503處半胱胺酸取代為絲胺酸對活體外PAL酶比活性的效應。

圖7: 圖7A: 如由在變性條件(左圖)或天然條件(右圖)下之凝膠電泳法所分析, AvPAL中半胱胺酸取代為絲胺酸對溶液中蛋白質聚集物之形成的效應。圖7B: 如由SEC-HPLC所分析, AvPAL中半胱胺酸取代為絲胺酸對溶液中蛋白質聚集物之形成的效應。

圖8: 在不同PEG濃度下, AvPAL中位置565及503處之半胱胺酸取代為絲胺酸(dbl突變體)對位點特異性聚乙二醇化的效應。

圖9: 如由SEC-HPLC所分析, 用0.05% Tween80或10 mM EDTA處理AvPAL對溶液中蛋白質聚集物之形成的效應。

圖10: 圖10A: 如由SEC-HPLC所分析, 用二硫蘇糖醇(DTT)處理AvPAL對溶液中蛋白質聚集物之形成的效應。

圖10B: 如由SEC-HPLC所分析, 用DTT及N-乙基順丁烯二

鹽亞胺(NEM)處理 AvPAL 對溶液中蛋白質聚集物之形成的效應。

圖 11：如所指示之苯丙胺酸(Phe)及反式肉桂酸(t-CA)對在 4°C 下(上圖)、在 25°C 下(中間圖)及在 37°C 下(下圖)儲存不同時間(日)的位置 565 及 503 處半胱胺酸取代為絲胺酸之聚乙二醇化 AvPAL(AvPAL_C565SC503S)(rAV-PAL-PEG)之酶活性的效應。

圖 12：如所指示之 1 mM 及 5 mM 之酪胺酸(Tyr)對在 4°C 下(上圖)、在 25°C 下(中間圖)及在 37°C 下(下圖)儲存不同時間(日)的位置 565 及 503 處半胱胺酸取代為絲胺酸之聚乙二醇化 AvPAL(AvPAL_C565SC503S)(rAV-PAL-PEG)之酶活性的效應。

圖 13：圖 13A：如所指示之苯丙胺酸(Phe)、苯甲酸及吡哆胺單獨或組合對在 4°C 下(上圖)及在 37°C 下(下圖)儲存不同時間(週)的位置 565 及 503 處半胱胺酸取代為絲胺酸之聚乙二醇化 AvPAL(AvPAL_C565SC503S)(rAV-PAL-PEG)之酶活性的效應。圖 13B：描繪苯甲酸(左圖)、苯丙胺酸(中間圖)及反式肉桂酸(右圖)之化學結構。

圖 14：圖 14A：向獼猴(*Cynomolgus monkey*)中單次皮下注射 4 mg/kg(菱形)及 12 mg/kg(方形)的位置 565 及 503 處半胱胺酸取代為絲胺酸之聚乙二醇化 AvPAL(AvPAL_C565SC503S)隨時間(小時)對血漿 AvPAL_C565SC503S 含量的效應。圖 14B：向獼猴中單次皮下注射 4 mg/kg AvPAL_C565SC503S 隨時間(小時)對血漿

AvPAL_C565SC503S(菱形)及苯丙胺酸(方形)含量的效應。

圖 15：圖 15A：向大鼠中單次靜脈內注射 1 mg/kg(菱形)、5 mg/kg(方形)及 25 mg/kg(三角形)的位置 565 及 503 處半胱胺酸取代為絲胺酸之聚乙二醇化 AvPAL(AvPAL_C565SC503S) 隨時間(小時)對血漿 AvPAL_C565SC503S 含量的效應。圖 15B：向大鼠中單次皮下注射 10 mg/kg(菱形)、25 mg/kg(方形)及 250 mg/kg(三角形)的 AvPAL_C565SC503S 隨時間(小時)對血漿 AvPAL_C565SC503S 含量之效應。

圖 16：圖 16A：如所指示之 0.01、0.1、1、10 及 100 $\mu\text{g/mL}$ 的位置 565 及 503 處半胱胺酸取代為絲胺酸之聚乙二醇化 AvPAL(AvPAL_C565SC503S) 在活體外對 NOMO1 急性骨髓白血病(AML)細胞之增殖(如碘化丙啶染色所量測)的效應。圖 16B：如所指示之 0.1、1、10 及 100 $\mu\text{g/mL}$ 的 AvPAL_C565SC503S 在活體外對 IM9 骨髓瘤細胞之增殖之效應。

圖 17：圖 17A：如所指示之 0.01、0.1、1、10 及 100 $\mu\text{g/mL}$ 的位置 565 及 503 處半胱胺酸取代為絲胺酸之聚乙二醇化 AvPAL(AvPAL_C565SC503S) 在活體外對 SF268(上圖)及 498L(下圖)腦/CNS 腫瘤細胞之增殖(如碘化丙啶染色所量測)的效應。圖 17B：如所指示之 0.01、0.1、1、10 及 100 $\mu\text{g/mL}$ 的 AvPAL_C565SC503S 在活體外對 HT29(上圖)及 HCT116(下圖)結腸腫瘤細胞之增殖之效應。圖 17C：如所指示之 0.01、0.1、1、10 及 100 $\mu\text{g/mL}$ 的 AvPAL_

C565SC503S 在活體外對 H460(上圖)、529L(中間圖)及 629L(下圖)肺腫瘤細胞之增殖之效應。圖 17D：如所指示之 0.01、0.1、1、10 及 100 $\mu\text{g/mL}$ 的 AvPAL_C565SC503S 在活體外對 LNCAP(上圖)、PC3M(中間圖)及 DU145(下圖)前列腺腫瘤細胞之增殖之效應。

圖 18：位置 565 及 503 處半胱胺酸取代為絲胺酸之聚乙二醇化 AvPAL(AvPAL_C565SC503S)對 B16 黑色素瘤腫瘤細胞株異種移植模型中之腫瘤尺寸之效應。如所指示，藉由皮下注射 40、80 或 100 mg/kg 來預防性(上圖)或治療性(下圖)投與酶。

圖 19：位置 565 及 503 處半胱胺酸取代為絲胺酸之聚乙二醇化 AvPAL(AvPAL_C565SC503S)對 SNU398(上圖)及 HepG2(下圖)肝細胞瘤腫瘤細胞株異種移植模型中之腫瘤尺寸之效應。如所指示，藉由皮下注射 60 mg/kg 來預防性投與酶。

序列表

<110> 美商拜奧馬林製藥公司

<120> 原核生物苯丙胺酸解氨酶組合物及使用該組合物治療癌症之方法

<130> 11808-030-228

<140> 097131325

<141> 2008-08-15

<150> US 61/066,125

<151> 2007-08-17

<160> 33

<170> PatentIn version 3.4

<210> 1

<211> 1710

<212> DNA

<213> 點形念珠藻

```

<400> 1
atgaatataa catctctaca acagaacata acgcgttctt ggcaaatacc ttctactaat    60
agttcagatt caatcgtaac tgtaggcgal cgcaatctga caatcgacga ggttgtaaat    120
gttgctcgtc atggaacaca ggtgcgctta actgataatg cagatgicat tcgggggtgt    180
caagcatctt gtagttacat taacaatgca gtcgaaacag cacagccaat ttacggggtg    240
acatcggctt ttggcgggat ggcatgtgt gtcctctctc gcgaacaagc agcgggaact    300
cagactaatl taatttgggt tcigaaatcc ggcgaggaa acaaatlalc gtttagcagac    360
gtgcgtgcag ctatgctctt acgtgcaaat tcacatttgt atggctcgtc tggatatacga    420
ctcgaactta ttacgggat tgaactttc ctcaacgctg gcgtgacacc ccatgtctat    480
gagtttggct ctatcgggtg tagcggcgat ttgggtccat tatcctacat tactggggca    540
ctaatcgggtc tagatcctag cttaacagt gacttcgacg gtaaaagaaat ggatgccgtt    600
acagccttgt ctcgtttggg ttgccaag ttgcaattgc aaccgaaaga aggtttagca    660
atgaatgaat gcacctcagt catgacaggt atgcagcta actgtgtgta cgatgcgaaa    720
gttttgcctc ccttgacaat ggggtgtacac gccttagcca tccaagggtt atacggaacg    780
aatcaatctt tccacccgtt tattcatcag tgcaagccac atcccggta actatggaca    840
gcagatcaaa tgttttctct gctgaaagat tcatctttag ttctgtgaaga gttggatggt    900
aaacacgaat accgtggtaa agatctgata caggatcgtt attctctccg ctgtctggca    960
cagttcatag ggccaatcgt tgaatgggta tcagagatta ccaagcaaat cgaggtagaa    1020
atgaactcag tcaccgataa cccattgatt gatgtcgaga accaagttag ttatcacggc    1080
ggcaattttc tcggacagta tgtgggtgtg acaatggatc gcctacgta ttacataggg    1140
ctattggcca aacacatcga tgtgcagatt gcacttcttg tctcgccaga gtttagcaac    1200
ggcttaccac cctctttagt tggtaatagc gatcgcaaag ttaatatggg actcaaaggt    1260
ttgcaaatca gtggaaactc gattatgcca ctgttgagct tctatggaaa ttccctagcc    1320
gatcgctttc ctaccacgc cgagcaattt aatcaaaata ttaacagcca aggctatatt    1380
    
```

```

tccgcaaatt tgacacgtcg ticcgtagac atatttcaga attatatggc gatcgcgltg 1440
atgtttggag ttcaagctgt tgacctccgc acatataaga tgaagggtca ttaatgatga 1500
cgtacatgcc tctcacccaa tactgtgcag ttatacacag cagtcgtcga ggtagttgga 1560
aagccactaa cgtctgtgcg tccatacatt tggaacgaca acgagcaatg tttagatgag 1620
cataatgccc ggatltcagc tgatatcgct ggtgggtgggt taatgtgca agcagttgag 1680
cataatitit cgagcttaaa gtcaacgtaa 1710

```

<210> 2
 <211> 569
 <212> PRT
 <213> 點形念珠藻
 <400> 2

```

Met Asn Ile Thr Ser Leu Gln Gln Asn Ile Thr Arg Ser Trp Gln Ile 15
1      5      10
Pro Phe Thr Asn Ser Ser Asp Ser Ile Val Thr Val Gly Asp Arg Asn
20      25      30
Leu Thr Ile Asp Glu Val Val Asn Val Ala Arg His Gly Thr Gln Val
35      40      45
Arg Leu Thr Asp Asn Ala Asp Val Ile Arg Gly Val Gln Ala Ser Cys
50      55      60
Asp Tyr Ile Asn Asn Ala Val Glu Thr Ala Gln Pro Ile Tyr Gly Val
65      70      75      80
Thr Ser Gly Phe Gly Gly Met Ala Asp Val Val Ile Ser Arg Glu Gln
85      90      95
Ala Ala Glu Leu Gln Thr Asn Leu Ile Trp Phe Leu Lys Ser Gly Ala
100     105     110

Gly Asn Lys Leu Ser Leu Ala Asp Val Arg Ala Ala Met Leu Leu Arg
115     120     125
Ala Asn Ser His Leu Tyr Gly Ala Ser Gly Ile Arg Leu Glu Leu Ile
130     135     140
Gln Arg Ile Glu Thr Phe Leu Asn Ala Gly Val Thr Pro His Val Tyr
145     150     155     160
Glu Phe Gly Ser Ile Gly Ala Ser Gly Asp Leu Val Pro Leu Ser Tyr
165     170     175
Ile Thr Gly Ala Leu Ile Gly Leu Asp Pro Ser Phe Thr Val Asp Phe
180     185     190
Asp Gly Lys Glu Met Asp Ala Val Thr Ala Leu Ser Arg Leu Gly Leu
195     200     205
Pro Lys Leu Gln Leu Gln Pro Lys Glu Gly Leu Ala Met Met Asn Gly
210     215     220
Thr Ser Val Met Thr Gly Ile Ala Ala Asn Cys Val Tyr Asp Ala Lys
225     230     235     240
Val Leu Leu Ala Leu Thr Met Gly Val His Ala Leu Ala Ile Gln Gly
245     250     255
Leu Tyr Gly Thr Asn Gln Ser Phe His Pro Phe Ile His Gln Cys Lys
260     265     270
Pro His Pro Gly Gln Leu Trp Thr Ala Asp Gln Met Phe Ser Leu Leu
275     280     285
Lys Asp Ser Ser Leu Val Arg Glu Glu Leu Asp Gly Lys His Glu Tyr

```

290

295

300

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

His Ile Phe Ser Ser Leu Lys Ser Thr
565

<210> 3
<211> 1704
<212> DNA
<213> 多變魚腥藻

<400> 3

atgaagacac tatctcaagc acaaagcaaa acctcatctc aacaattttc ttttactgga 60

aattcttctg ccaatgtaat tatlggtaat cagaaactca caatcaatga tgttgcaagg 120

gtagcgcgta atggcacctt agtgcttita accaataaca ctgatatttt gcagggtatt 180

caggcatctt gtgattacat taataatgct gttgaatctg gggaaccaat ttatggagt 240

acatctggtt ttggcggtat ggccaatggt gccatatccc gtgaacaagc atctgaactc 300

caaaccaact tagtttgggt cctgaaaaca ggtgcaggga acaaattacc ctllggcggt 360

gtgcgcgcag ctatgctctt gcglgcaaac tctcatalgc gcgglgcatc tggcatcaga 420

tlagaactta tcaagcgtat ggagattttc cttaacgctg gtgtcacacc atatgigtat 480

gagtttgggt caattgggtc aagttggat ttagtgccac taccctacat tacttggtca 540
 ctgataggct tagatcccag ttttaagggt gacttcaacg gtaaagaaa ggatgcgcca 600
 acagctctac gtcaactgaa ttgttcaccc ttgacattgt tgcgaagga aggcctggcg 660
 atgatgaacg gcacttcagt catgacaggt atgcagcaa actgcgtcta cgatactcaa 720
 atttlaactg cgatcgctat gggcggtcac gctctagata tccaagcttt aaacggaacc 780
 aatcaatcat tccatccatt tatccataat tccaaaccac atcctggica attatgggca 840
 gcagatcaga tgatttcttt gttagccaat tcccagttag ttcgtgatga gttagatggt 900
 aaacacgatt atcgtgatca cgagttgatt caagatcgtt actcactccg atgccttccc 960
 cagtatttgg ggccaatcgt tgaatggaatt tcccagattg ccaaacaaa tgaaatcgaa 1020
 atcaactcag tcaccgataa cccactaatt galgttgata accaagctag ctatcatgga 1080
 ggaaatttcc tcggacagta cgtgggtatg ggaatggatc acctgcgtta ctatatggg 1140
 ttattggcta aacacctaga tgtgcagatt gccctcctcg cctcaccaga gtttagcaat 1200
 ggactaccac catctttatt aggcaaccga gaacglaaag tcaatatggg actcaaaggt 1260
 ctgcaaatai gcggtlaactc aattatgcca ctgttgacct tctatggaaa tccatcgcc 1320
 gatcgcttcc ctacccatgc agaacaattt aatcagaaca tcaacagica aggatacact 1380
 tcagcgactc tagcccgccg ttctgtggat atcttccaga attatgtggc gatcgctctg 1440
 atgtttggag tccaagctgt tgacctccgc acatataaaa agactggica ttacgatgca 1500
 cgcgcctgtc tatcacctgc aactgagcgc ttatatlcag cagtcggcca cgtagttgga 1560
 caaaaaccaa cticagatcg cccatatatt tggaaatgata atgagcaagg actggatgag 1620
 catattgccc ggatttctgc tgalatcgct gctgggtggg tgatttgtca agcagttcaa 1680
 gatatactac cctgcttgca ttaa 1704

<210> 4
 <211> 567
 <212> PRT
 <213> 多變魚腥藻
 <400> 4

Met Lys Thr Leu Ser Gln Ala Gln Ser Lys Thr Ser Ser Gln Gln Phe
 1 5 10 15
 Ser Phe Thr Gly Asn Ser Ser Ala Asn Val Ile Ile Gly Asn Gln Lys
 20 25 30
 Leu Thr Ile Asn Asp Val Ala Arg Val Ala Arg Asn Gly Thr Leu Val
 35 40 45
 Ser Leu Thr Asn Asn Thr Asp Ile Leu Gln Gly Ile Gln Ala Ser Cys
 50 55 60
 Asp Tyr Ile Asn Asn Ala Val Glu Ser Gly Glu Pro Ile Tyr Gly Val
 65 70 75 80
 Thr Ser Gly Phe Gly Gly Met Ala Asn Val Ala Ile Ser Arg Glu Gln
 85 90 95
 Ala Ser Glu Leu Gln Thr Asn Leu Val Trp Phe Leu Lys Thr Gly Ala
 100 105 110
 Gly Asn Lys Leu Pro Leu Ala Asp Val Arg Ala Ala Met Leu Leu Arg
 115 120 125
 Ala Asn Ser His Met Arg Gly Ala Ser Gly Ile Arg Leu Glu Leu Ile

130	135	140
Lys Arg Met Glu Ile Phe Leu Asn Ala Gly Val Thr Pro Tyr Val Tyr 145 150 155 160		
Glu Phe Gly Ser Ile Gly Ala Ser Gly Asp Leu Val Pro Leu Ser Tyr 165 170 175		
Ile Thr Gly Ser Leu Ile Gly Leu Asp Pro Ser Phe Lys Val Asp Phe 180 185 190		
Asn Gly Lys Glu Met Asp Ala Pro Thr Ala Leu Arg Gln Leu Asn Leu 195 200 205		
Ser Pro Leu Thr Leu Leu Pro Lys Glu Gly Leu Ala Met Met Asn Gly 210 215 220		
Thr Ser Val Met Thr Gly Ile Ala Ala Asn Cys Val Tyr Asp Thr Gln 225 230 235 240		
Ile Leu Thr Ala Ile Ala Met Gly Val His Ala Leu Asp Ile Gln Ala 245 250 255		
Leu Asn Gly Thr Asn Gln Ser Phe His Pro Phe Ile His Asn Ser Lys 260 265 270		
Pro His Pro Gly Gln Leu Trp Ala Ala Asp Gln Met Ile Ser Leu Leu 275 280 285		
Ala Asn Ser Gln Leu Val Arg Asp Glu Leu Asp Gly Lys His Asp Tyr 290 295 300		
Arg Asp His Glu Leu Ile Gln Asp Arg Tyr Ser Leu Arg Cys Leu Pro 305 310 315 320		
Gln Tyr Leu Gly Pro Ile Val Asp Gly Ile Ser Gln Ile Ala Lys Gln 325 330 335		
Ile Glu Ile Glu Ile Asn Ser Val Thr Asp Asn Pro Leu Ile Asp Val 340 345 350		
Asp Asn Gln Ala Ser Tyr His Gly Gly Asn Phe Leu Gly Gln Tyr Val 355 360 365		
Gly Met Gly Met Asp His Leu Arg Tyr Tyr Ile Gly Leu Leu Ala Lys 370 375 380		
His Leu Asp Val Gln Ile Ala Leu Leu Ala Ser Pro Glu Phe Ser Asn 385 390 395 400		
Gly Leu Pro Pro Ser Leu Leu Gly Asn Arg Glu Arg Lys Val Asn Met 405 410 415		
Gly Leu Lys Gly Leu Gln Ile Cys Gly Asn Ser Ile Met Pro Leu Leu 420 425 430		
Thr Phe Tyr Gly Asn Ser Ile Ala Asp Arg Phe Pro Thr His Ala Glu 435 440 445		
Gln Phe Asn Gln Asn Ile Asn Ser Gln Gly Tyr Thr Ser Ala Thr Leu 450 455 460		
Ala Arg Arg Ser Val Asp Ile Phe Gln Asn Tyr Val Ala Ile Ala Leu 465 470 475 480		
Met Phe Gly Val Gln Ala Val Asp Leu Arg Thr Tyr Lys Lys Thr Gly 485 490 495		
His Tyr Asp Ala Arg Ala Cys Leu Ser Pro Ala Thr Glu Arg Leu Tyr 500 505 510		
Ser Ala Val Arg His Val Val Gly Gln Lys Pro Thr Ser Asp Arg Pro 515 520 525		

Tyr Ile Trp Asn Asp Asn Glu Gln Gly Leu Asp Glu His Ile Ala Arg
 530 535 540
 Ile Ser Ala Asp Ile Ala Ala Gly Gly Val Ile Val Gln Ala Val Gln
 545 550 555 560
 Asp Ile Leu Pro Cys Leu His
 565

<210> 5
 <211> 523
 <212> PRT
 <213> 海洋鏈黴菌
 <400> 5

Met Thr Phe Val Ile Glu Leu Asp Met Asn Val Thr Leu Asp Gln Leu
 1 5 10 15
 Glu Asp Ala Ala Arg Gln Arg Thr Pro Val Glu Leu Ser Ala Pro Val
 20 25 30
 Arg Ser Arg Val Arg Ala Ser Arg Asp Val Leu Val Lys Phe Val Gln
 35 40 45
 Asp Glu Arg Val Ile Tyr Gly Val Asn Thr Ser Met Gly Gly Phe Val
 50 55 60
 Asp His Leu Val Pro Val Ser Gln Ala Arg Gln Leu Gln Glu Asn Leu
 65 70 75 80
 Ile Asn Ala Val Ala Thr Asn Val Gly Ala Tyr Leu Asp Asp Thr Thr
 85 90 95
 Ala Arg Thr Ile Met Leu Ser Arg Ile Val Ser Leu Ala Arg Gly Asn
 100 105 110
 Ser Ala Ile Thr Pro Ala Asn Leu Asp Lys Leu Val Ala Val Leu Asn
 115 120 125
 Ala Gly Ile Val Pro Cys Ile Pro Glu Lys Gly Ser Leu Gly Thr Ser
 130 135 140
 Gly Asp Leu Gly Pro Leu Ala Ala Ile Ala Leu Val Cys Ala Gly Gln
 145 150 155 160
 Trp Lys Ala Arg Tyr Asn Gly Gln Ile Met Pro Gly Arg Gln Ala Leu
 165 170 175
 Ser Glu Ala Gly Val Glu Pro Met Glu Leu Ser Tyr Lys Asp Gly Leu
 180 185 190
 Ala Leu Ile Asn Gly Thr Ser Gly Met Val Gly Leu Gly Thr Met Val
 195 200 205
 Leu Gln Ala Ala Arg Arg Leu Val Asp Arg Tyr Leu Gln Val Ser Ala
 210 215 220
 Leu Ser Val Glu Gly Leu Ala Gly Met Thr Lys Pro Phe Asp Pro Arg
 225 230 235 240
 Val His Gly Val Lys Pro His Arg Gly Gln Arg Gln Val Ala Ser Arg
 245 250 255
 Leu Trp Glu Gly Leu Ala Asp Ser His Leu Ala Val Asn Glu Leu Asp
 260 265 270
 Thr Glu Gln Thr Leu Ala Gly Glu Met Gly Thr Val Ala Lys Ala Gly
 275 280 285
 Ser Leu Ala Ile Glu Asp Ala Tyr Ser Ile Arg Cys Thr Pro Gln Ile
 290 295 300
 Leu Gly Pro Val Val Asp Val Leu Asp Arg Ile Gly Ala Thr Leu Gln
 305 310 315 320

<210>	6
<211>	510
<212>	PRT
<213>	惡臭假單胞菌
<400>	6

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 7
<211> 567
<212> PRT
<213> 人造序列
<220>

<223> 多變魚腥藻PAL中位置64處之半胱氨酸取代為絲氨酸

<400> 7

```

Met Lys Thr Leu Ser Gln Ala Gln Ser Lys Thr Ser Ser Gln Gln Phe
 1          5          10          15
Ser Phe Thr Gly Asn Ser Ser Ala Asn Val Ile Ile Gly Asn Gln Lys
 20          25          30
Leu Thr Ile Asn Asp Val Ala Arg Val Ala Arg Asn Gly Thr Leu Val
 35          40          45
Ser Leu Thr Asn Asn Thr Asp Ile Leu Gln Gly Ile Gln Ala Ser Ser
 50          55          60
Asp Tyr Ile Asn Asn Ala Val Glu Ser Gly Glu Pro Ile Tyr Gly Val
 65          70          75          80
Thr Ser Gly Phe Gly Gly Met Ala Asn Val Ala Ile Ser Arg Glu Gln
 85          90          95
Ala Ser Glu Leu Gln Thr Asn Leu Val Trp Phe Leu Lys Thr Gly Ala
100          105          110
Gly Asn Lys Leu Pro Leu Ala Asp Val Arg Ala Ala Met Leu Leu Arg
115          120          125
Ala Asn Ser His Met Arg Gly Ala Ser Gly Ile Arg Leu Glu Leu Ile
130          135          140
Lys Arg Met Glu Ile Phe Leu Asn Ala Gly Val Thr Pro Tyr Val Tyr
145          150          155          160
Glu Phe Gly Ser Ile Gly Ala Ser Gly Asp Leu Val Pro Leu Ser Tyr
165          170          175
Ile Thr Gly Ser Leu Ile Gly Leu Asp Pro Ser Phe Lys Val Asp Phe
180          185          190
Asn Gly Lys Glu Met Asp Ala Pro Thr Ala Leu Arg Gln Leu Asn Leu
195          200          205
Ser Pro Leu Thr Leu Leu Pro Lys Glu Gly Leu Ala Met Met Asn Gly
210          215          220
Thr Ser Val Met Thr Gly Ile Ala Ala Asn Cys Val Tyr Asp Thr Gln
225          230          235          240
Ile Leu Thr Ala Ile Ala Met Gly Val His Ala Leu Asp Ile Gln Ala
245          250          255
Leu Asn Gly Thr Asn Gln Ser Phe His Pro Phe Ile His Asn Ser Lys
260          265          270
Pro His Pro Gly Gln Leu Trp Ala Ala Asp Gln Met Ile Ser Leu Leu
275          280          285
Ala Asn Ser Gln Leu Val Arg Asp Glu Leu Asp Gly Lys His Asp Tyr
290          295          300
Arg Asp His Glu Leu Ile Gln Asp Arg Tyr Ser Leu Arg Cys Leu Pro
305          310          315          320
Gln Tyr Leu Gly Pro Ile Val Asp Gly Ile Ser Gln Ile Ala Lys Gln
325          330          335
Ile Glu Ile Glu Ile Asn Ser Val Thr Asp Asn Pro Leu Ile Asp Val
340          345          350
Asp Asn Gln Ala Ser Tyr His Gly Gly Asn Phe Leu Gly Gln Tyr Val
355          360          365
Gly Met Gly Met Asp His Leu Arg Tyr Tyr Ile Gly Leu Leu Ala Lys

```

370 375 380
 His Leu Asp Val Gln Ile Ala Leu Leu Ala Ser Pro Glu Phe Ser Asn
 385 390 395 400
 Gly Leu Pro Pro Ser Leu Leu Gly Asn Arg Glu Arg Lys Val Asn Met
 405 410 415
 Gly Leu Lys Gly Leu Gln Ile Cys Gly Asn Ser Ile Met Pro Leu Leu
 420 425 430
 Thr Phe Tyr Gly Asn Ser Ile Ala Asp Arg Phe Pro Thr His Ala Glu
 435 440 445
 Gln Phe Asn Gln Asn Ile Asn Ser Gln Gly Tyr Thr Ser Ala Thr Leu
 450 455 460
 Ala Arg Arg Ser Val Asp Ile Phe Gln Asn Tyr Val Ala Ile Ala Leu
 465 470 475 480
 Met Phe Gly Val Gln Ala Val Asp Leu Arg Thr Tyr Lys Lys Thr Gly
 485 490 495
 His Tyr Asp Ala Arg Ala Cys Leu Ser Pro Ala Thr Glu Arg Leu Tyr
 500 505 510
 Ser Ala Val Arg His Val Val Gly Gln Lys Pro Thr Ser Asp Arg Pro
 515 520 525
 Tyr Ile Trp Asn Asp Asn Glu Gln Gly Leu Asp Glu His Ile Ala Arg
 530 535 540
 Ile Ser Ala Asp Ile Ala Ala Gly Gly Val Ile Val Gln Ala Val Gln
 545 550 555 560
 Asp Ile Leu Pro Cys Leu His
 565

<210> 8
 <211> 567
 <212> PRT
 <213> 人造序列

<220>
 <223> 多變魚腥藻PAL中位置318處之半胱胺酸取代為絲胺酸

<400> 8

Met Lys Thr Leu Ser Gln Ala Gln Ser Lys Thr Ser Ser Gln Gln Phe
 1 5 10 15
 Ser Phe Thr Gly Asn Ser Ser Ala Asn Val Ile Ile Gly Asn Gln Lys
 20 25 30
 Leu Thr Ile Asn Asp Val Ala Arg Val Ala Arg Asn Gly Thr Leu Val
 35 40 45
 Ser Leu Thr Asn Asn Thr Asp Ile Leu Gln Gly Ile Gln Ala Ser Cys
 50 55 60
 Asp Tyr Ile Asn Asn Ala Val Glu Ser Gly Glu Pro Ile Tyr Gly Val
 65 70 75 80
 Thr Ser Gly Phe Gly Gly Met Ala Asn Val Ala Ile Ser Arg Glu Gln
 85 90 95
 Ala Ser Glu Leu Gln Thr Asn Leu Val Trp Phe Leu Lys Thr Gly Ala
 100 105 110
 Gly Asn Lys Leu Pro Leu Ala Asp Val Arg Ala Ala Met Leu Leu Arg
 115 120 125
 Ala Asn Ser His Met Arg Gly Ala Ser Gly Ile Arg Leu Glu Leu Ile
 130 135 140

Lys Arg Met Glu Ile Phe Leu Asn Ala Gly Val Thr Pro Tyr Val Tyr
 145 150 155 160
 Glu Phe Gly Ser Ile Gly Ala Ser Gly Asp Leu Val Pro Leu Ser Tyr
 165 170 175
 Ile Thr Gly Ser Leu Ile Gly Leu Asp Pro Ser Phe Lys Val Asp Phe
 180 185 190
 Asn Gly Lys Glu Met Asp Ala Pro Thr Ala Leu Arg Gln Leu Asn Leu
 195 200 205
 Ser Pro Leu Thr Leu Leu Pro Lys Glu Gly Leu Ala Met Met Asn Gly
 210 215 220
 Thr Ser Val Met Thr Gly Ile Ala Ala Asn Cys Val Tyr Asp Thr Gln
 225 230 235 240
 Ile Leu Thr Ala Ile Ala Met Gly Val His Ala Leu Asp Ile Gln Ala
 245 250 255
 Leu Asn Gly Thr Asn Gln Ser Phe His Pro Phe Ile His Asn Ser Lys
 260 265 270
 Pro His Pro Gly Gln Leu Trp Ala Ala Asp Gln Met Ile Ser Leu Leu
 275 280 285
 Ala Asn Ser Gln Leu Val Arg Asp Glu Leu Asp Gly Lys His Asp Tyr
 290 295 300
 Arg Asp His Glu Leu Ile Gln Asp Arg Tyr Ser Leu Arg Ser Leu Pro
 305 310 315 320
 Gln Tyr Leu Gly Pro Ile Val Asp Gly Ile Ser Gln Ile Ala Lys Gln
 325 330 335
 Ile Glu Ile Glu Ile Asn Ser Val Thr Asp Asn Pro Leu Ile Asp Val
 340 345 350
 Asp Asn Gln Ala Ser Tyr His Gly Gly Asn Phe Leu Gly Gln Tyr Val
 355 360 365
 Gly Met Gly Met Asp His Leu Arg Tyr Tyr Ile Gly Leu Leu Ala Lys
 370 375 380
 His Leu Asp Val Gln Ile Ala Leu Leu Ala Ser Pro Glu Phe Ser Asn
 385 390 395 400
 Gly Leu Pro Pro Ser Leu Leu Gly Asn Arg Glu Arg Lys Val Asn Met
 405 410 415
 Gly Leu Lys Gly Leu Gln Ile Cys Gly Asn Ser Ile Met Pro Leu Leu
 420 425 430
 Thr Phe Tyr Gly Asn Ser Ile Ala Asp Arg Phe Pro Thr His Ala Glu
 435 440 445
 Gln Phe Asn Gln Asn Ile Asn Ser Gln Gly Tyr Thr Ser Ala Thr Leu
 450 455 460
 Ala Arg Arg Ser Val Asp Ile Phe Gln Asn Tyr Val Ala Ile Ala Leu
 465 470 475 480
 Met Phe Gly Val Gln Ala Val Asp Leu Arg Thr Tyr Lys Lys Thr Gly
 485 490 495
 His Tyr Asp Ala Arg Ala Cys Leu Ser Pro Ala Thr Glu Arg Leu Tyr
 500 505 510
 Ser Ala Val Arg His Val Val Gly Gln Lys Pro Thr Ser Asp Arg Pro
 515 520 525
 Tyr Ile Trp Asn Asp Asn Glu Gln Gly Leu Asp Glu His Ile Ala Arg
 530 535 540

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

Asp Ile Leu Pro Cys Leu His
565

<210> 9
<211> 567
<212> PRT
<213> 人造序列

<220>
<223> 多變魚腥藻PAL中位置503處之半胱胺酸取代為絲胺酸

<400> 9

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Asp Ile Leu Pro Cys Leu His
565

<210> 10
<211> 567
<212> PRT
<213> 人造序列

<220>
<223> 多變魚腥藻PAL中位置565處之半胱氨酸取代為絲氨酸

<400> 10

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

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

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

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

Asp Tyr Ile Asn Asn Ala Val Glu Ser Gly Glu Pro Ile Tyr Gly Val

65	70	75	80
Thr Ser Gly Phe Gly Gly Met Ala Asn Val Ala Ile Ser Arg Glu Gln	85	90	95
Ala Ser Glu Leu Gln Thr Asn Leu Val Trp Phe Leu Lys Thr Gly Ala	100	105	110
Gly Asn Lys Leu Pro Leu Ala Asp Val Arg Ala Ala Met Leu Leu Arg	115	120	125
Ala Asn Ser His Met Arg Gly Ala Ser Gly Ile Arg Leu Glu Leu Ile	130	135	140
Lys Arg Met Glu Ile Phe Leu Asn Ala Gly Val Thr Pro Tyr Val Tyr	145	150	160
Glu Phe Gly Ser Ile Gly Ala Ser Gly Asp Leu Val Pro Leu Ser Tyr	165	170	175
Ile Thr Gly Ser Leu Ile Gly Leu Asp Pro Ser Phe Lys Val Asp Phe	180	185	190
Asn Gly Lys Glu Met Asp Ala Pro Thr Ala Leu Arg Gln Leu Asn Leu	195	200	205
Ser Pro Leu Thr Leu Leu Pro Lys Glu Gly Leu Ala Met Met Asn Gly	210	215	220
Thr Ser Val Met Thr Gly Ile Ala Ala Asn Cys Val Tyr Asp Thr Gln	225	230	240
Ile Leu Thr Ala Ile Ala Met Gly Val His Ala Leu Asp Ile Gln Ala	245	250	255
Leu Asn Gly Thr Asn Gln Ser Phe His Pro Phe Ile His Asn Ser Lys	260	265	270
Pro His Pro Gly Gln Leu Trp Ala Ala Asp Gln Met Ile Ser Leu Leu	275	280	285
Ala Asn Ser Gln Leu Val Arg Asp Glu Leu Asp Gly Lys His Asp Tyr	290	295	300
Arg Asp His Glu Leu Ile Gln Asp Arg Tyr Ser Leu Arg Cys Leu Pro	305	310	320
Gln Tyr Leu Gly Pro Ile Val Asp Gly Ile Ser Gln Ile Ala Lys Gln	325	330	335
Ile Glu Ile Glu Ile Asn Ser Val Thr Asp Asn Pro Leu Ile Asp Val	340	345	350
Asp Asn Gln Ala Ser Tyr His Gly Gly Asn Phe Leu Gly Gln Tyr Val	355	360	365
Gly Met Gly Met Asp His Leu Arg Tyr Tyr Ile Gly Leu Leu Ala Lys	370	375	380
His Leu Asp Val Gln Ile Ala Leu Leu Ala Ser Pro Glu Phe Ser Asn	385	390	400
Gly Leu Pro Pro Ser Leu Leu Gly Asn Arg Glu Arg Lys Val Asn Met	405	410	415
Gly Leu Lys Gly Leu Gln Ile Cys Gly Asn Ser Ile Met Pro Leu Leu	420	425	430
Thr Phe Tyr Gly Asn Ser Ile Ala Asp Arg Phe Pro Thr His Ala Glu	435	440	445
Gln Phe Asn Gln Asn Ile Asn Ser Gln Gly Tyr Thr Ser Ala Thr Leu	450	455	460
Ala Arg Arg Ser Val Asp Ile Phe Gln Asn Tyr Val Ala Ile Ala Leu			

465 470 475 480
 Met Phe Gly Val Gln Ala Val Asp Leu Arg Thr Tyr Lys Lys Thr Gly
 485 490 495
 His Tyr Asp Ala Arg Ala Cys Leu Ser Pro Ala Thr Glu Arg Leu Tyr
 500 505 510
 Ser Ala Val Arg His Val Val Gly Gln Lys Pro Thr Ser Asp Arg Pro
 515 520 525
 Tyr Ile Trp Asn Asp Asn Glu Gln Gly Leu Asp Glu His Ile Ala Arg
 530 535 540
 Ile Ser Ala Asp Ile Ala Ala Gly Gly Val Ile Val Gln Ala Val Gln
 545 550 555 560
 Asp Ile Leu Pro Ser Leu His
 565

<210> 11
 <211> 567
 <212> PRT
 <213> 人造序列

<220>
 <223> 多變魚腥藻PAL中位置565及503處之半胱胺酸取代為絲胺酸

<400> 11

Met Lys Thr Leu Ser Gln Ala Gln Ser Lys Thr Ser Ser Gln Gln Phe
 1 5 10 15
 Ser Phe Thr Gly Asn Ser Ser Ala Asn Val Ile Ile Gly Asn Gln Lys
 20 25 30
 Leu Thr Ile Asn Asp Val Ala Arg Val Ala Arg Asn Gly Thr Leu Val
 35 40 45
 Ser Leu Thr Asn Asn Thr Asp Ile Leu Gln Gly Ile Gln Ala Ser Cys
 50 55 60
 Asp Tyr Ile Asn Asn Ala Val Glu Ser Gly Glu Pro Ile Tyr Gly Val
 65 70 75 80
 Thr Ser Gly Phe Gly Gly Met Ala Asn Val Ala Ile Ser Arg Glu Gln
 85 90 95
 Ala Ser Glu Leu Gln Thr Asn Leu Val Trp Phe Leu Lys Thr Gly Ala
 100 105 110
 Gly Asn Lys Leu Pro Leu Ala Asp Val Arg Ala Ala Met Leu Leu Arg
 115 120 125
 Ala Asn Ser His Met Arg Gly Ala Ser Gly Ile Arg Leu Glu Leu Ile
 130 135 140
 Lys Arg Met Glu Ile Phe Leu Asn Ala Gly Val Thr Pro Tyr Val Tyr
 145 150 155 160
 Glu Phe Gly Ser Ile Gly Ala Ser Gly Asp Leu Val Pro Leu Ser Tyr
 165 170 175
 Ile Thr Gly Ser Leu Ile Gly Leu Asp Pro Ser Phe Lys Val Asp Phe
 180 185 190
 Asn Gly Lys Glu Met Asp Ala Pro Thr Ala Leu Arg Gln Leu Asn Leu
 195 200 205
 Ser Pro Leu Thr Leu Leu Pro Lys Glu Gly Leu Ala Met Met Asn Gly
 210 215 220
 Thr Ser Val Met Thr Gly Ile Ala Ala Asn Cys Val Tyr Asp Thr Gln
 225 230 235 240

Ile Leu Thr Ala Ile Ala Met Gly Val His Ala Leu Asp Ile Gln Ala
245 250 255
Leu Asn Gly Thr Asn Gln Ser Phe His Pro Phe Ile His Asn Ser Lys
260 265 270
Pro His Pro Gly Gln Leu Trp Ala Ala Asp Gln Met Ile Ser Leu Leu
275 280 285
Ala Asn Ser Gln Leu Val Arg Asp Glu Leu Asp Gly Lys His Asp Tyr
290 295 300
Arg Asp His Glu Leu Ile Gln Asp Arg Tyr Ser Leu Arg Cys Leu Pro
305 310 315 320
Gln Tyr Leu Gly Pro Ile Val Asp Gly Ile Ser Gln Ile Ala Lys Gln
325 330 335
Ile Glu Ile Glu Ile Asn Ser Val Thr Asp Asn Pro Leu Ile Asp Val
340 345 350
Asp Asn Gln Ala Ser Tyr His Gly Gly Asn Phe Leu Gly Gln Tyr Val
355 360 365
Gly Met Gly Met Asp His Leu Arg Tyr Tyr Ile Gly Leu Leu Ala Lys
370 375 380
His Leu Asp Val Gln Ile Ala Leu Leu Ala Ser Pro Glu Phe Ser Asn
385 390 395 400
Gly Leu Pro Pro Ser Leu Leu Gly Asn Arg Glu Arg Lys Val Asn Met
405 410 415
Gly Leu Lys Gly Leu Gln Ile Cys Gly Asn Ser Ile Met Pro Leu Leu
420 425 430
Thr Phe Tyr Gly Asn Ser Ile Ala Asp Arg Phe Pro Thr His Ala Glu
435 440 445
Gln Phe Asn Gln Asn Ile Asn Ser Gln Gly Tyr Thr Ser Ala Thr Leu
450 455 460
Ala Arg Arg Ser Val Asp Ile Phe Gln Asn Tyr Val Ala Ile Ala Leu
465 470 475 480
Met Phe Gly Val Gln Ala Val Asp Leu Arg Thr Tyr Lys Lys Thr Gly
485 490 495
His Tyr Asp Ala Arg Ala Ser Leu Ser Pro Ala Thr Glu Arg Leu Tyr
500 505 510
Ser Ala Val Arg His Val Val Gly Gln Lys Pro Thr Ser Asp Arg Pro
515 520 525
Tyr Ile Trp Asn Asp Asn Glu Gln Gly Leu Asp Glu His Ile Ala Arg
530 535 540
Ile Ser Ala Asp Ile Ala Ala Gly Gly Val Ile Val Gln Ala Val Gln
545 550 555 560
Asp Ile Leu Pro Ser Leu His
565

<210> 12
<211> 38
<212> DNA
<213> 人造序列

<220>
<223> 點形念珠藻PLA引子1 (正向)

<400> 12
cactgtcata tgaatataac atctctacaa cagaacat

<210>	13	
<211>	45	
<212>	DNA	
<213>	人造序列	
<220>		
<223>	點形念珠藻PLA引子2（反向）	
<400>	13	
	gacagtggcg gccgcicacg ttgactltaa gctcgaaaaa atalg	45
<210>	14	
<211>	38	
<212>	DNA	
<213>	人造序列	
<220>		
<223>	多變魚腥藻PAL引子1（正向，N-末端片段）	
<400>	14	
	cactgtgcta gcatgaagac actatctcaa gcacaaag	38
<210>	15	
<211>	49	
<212>	DNA	
<213>	人造序列	
<220>		
<223>	多變魚腥藻PAL引子2（反向，N-末端片段）	
<400>	15	
	ggaaatttcc tccatgatag ctggcttggc tatcaacalc aattagigg	49
<210>	16	
<211>	49	
<212>	DNA	
<213>	人造序列	
<220>		
<223>	多變魚腥藻PAL引子3（正向，C-末端片段）	
<400>	16	
	ccactaatlg atgttgataa ccaagccagc tatcatggag gaaatttcc	49
<210>	17	
<211>	41	
<212>	DNA	
<213>	人造序列	
<220>		
<223>	多變魚腥藻PAL引子4（反向，C-末端片段）	
<400>	17	
	cactgtgcgg ccgcctaatg caagcagggt aagatacttt g	41
<210>	18	
<211>	35	
<212>	DNA	
<213>	人造序列	
<220>		
<223>	多變魚腥藻PAL正向引子	
<400>	18	
	cactgtcata tgaagacact atctcaagca caaag	35
<210>	19	
<211>	36	
<212>	DNA	
<213>	人造序列	
<220>		
<223>	多變魚腥藻PAL反向引子	
<400>	19	

cactgtctcg agatgcaagc agggtaagat atcttg	36
<210> 20	
<211> 38	
<212> DNA	
<213> 人造序列	
<220>	
<223> 形成5' NheI位點並缺失內部NheI位點的 多變魚腥藻PAL引子（正向，N-末端）	
<400> 20	
cactgtgcta gcatgaagac actatctcaa gcacaaag	38
<210> 21	
<211> 49	
<212> DNA	
<213> 人造序列	
<220>	
<223> 形成5' NheI位點並缺失內部NheI位點的 多變魚腥藻PAL引子（反向，N-末端）	
<400> 21	
ggaaatttcc tccatgatag ctggcttggc tatcaacatc aattagtgg	49
<210> 22	
<211> 49	
<212> DNA	
<213> 人造序列	
<220>	
<223> 形成5' NheI位點並缺失內部NheI位點的 多變魚腥藻PAL引子（正向，C-末端片段）	
<400> 22	
ccactaatg atgttgataa ccaagccagc tatcatggag gaaatttcc	49
<210> 23	
<211> 41	
<212> DNA	
<213> 人造序列	
<220>	
<223> 形成5' NheI位點並缺失內部NheI位點的 多變魚腥藻PAL引子（反向，C-末端片段）	
<400> 23	
acagtgccgg ccgcttaatg caagcagggt aagatactt g	41
<210> 24	
<211> 38	
<212> DNA	
<213> 人造序列	
<220>	
<223> 形成5' NheI位點及3' SmaI位點的 多變魚腥藻PAL引子（正向）	
<400> 24	
cactgtgaat tcatgaagac actatctcaa gcacaaag	38
<210> 25	
<211> 37	
<212> DNA	
<213> 人造序列	
<220>	
<223> 形成5' NheI位點及3' SmaI位點的 多變魚腥藻PAL引子（反向）	
<400> 25	
cactgtcccg ggtaatgca agcagggtaa gataatct	37
<210> 26	

<211> 41
 <212> DNA
 <213> 人造序列

 <220>
 <223> 在位置503形成絲胺酸取代半
 胱胺酸的多變魚腥藻PAL引子 (正向)
 <400> 26
 gtcattacga tgcacgcgcc tctctatcac ctgcaactga g 41

 <210> 27
 <211> 41
 <212> DNA
 <213> 人造序列

 <220>
 <223> 在位置503形成絲胺酸取代半
 胱胺酸的多變魚腥藻PAL引子 (反向)
 <400> 27
 ctccagttgca ggtgatagag aggcgcgtgc atcgtaatga c 41

 <210> 28
 <211> 42
 <212> DNA
 <213> 人造序列

 <220>
 <223> 在位置565形成絲胺酸取代半
 胱胺酸的多變魚腥藻PAL引子 (正向)
 <400> 28
 cagttcaaga tatcttacct tccttgcatt aacccgggct gc 42

 <210> 29
 <211> 42
 <212> DNA
 <213> 人造序列

 <220>
 <223> 在位置565形成絲胺酸取代半
 胱胺酸的多變魚腥藻PAL引子 (反向)
 <400> 29
 gcagcccggg ttaatgcaag gagggtaaga tatcttgaac tg 42

 <210> 30
 <211> 44
 <212> DNA
 <213> 人造序列

 <220>
 <223> 在位置64形成絲胺酸取代半
 胱胺酸的多變魚腥藻PAL引子 (正向)
 <400> 30
 gcagggtatt caggcatctt ctgattacat taataatgct gttg 44

 <210> 31
 <211> 44
 <212> DNA
 <213> 人造序列

 <220>
 <223> 在位置64形成絲胺酸取代半
 胱胺酸的多變魚腥藻PAL引子 (反向)
 <400> 31
 caacagcatt attaatgtaa tcagaagatg cctgaatacc ctgc 44

 <210> 32
 <211> 43
 <212> DNA
 <213> 人造序列

<220>
<223> 在位置318形成絲胺酸取代半
胱胺酸的多變魚腥藻PAL引子（正向）
<400> 32
caagatcgtt actcactccg atcccttccc caglatltagg ggc 43
<210> 33
<211> 43
<212> DNA
<213> 人造序列
<220>
<223> 在位置318形成絲胺酸取代半
胱胺酸的多變魚腥藻PAL引子（反向）
<400> 33
gccccaaata ctggggaagg gatcggagtg agtaacgatac ttg 43

五、中文發明摘要：

本發明係針對原核生物產生之苯丙胺酸解氨酶(PAL)變異體，其中該原核生物PAL變異體與野生型PAL相比具有較高之苯丙胺酸轉化活性及/或降低之免疫原性。本發明提供原核生物PAL及其生物學活性片段、突變體、變異體或類似物之組合物，以及製備、純化該等組合物之方法，及使用該等組合物用於治療目的、包括治療癌症之方法。

六、英文發明摘要：

The present invention is directed to phenylalanine ammonia-lyase (PAL) variants produced by prokaryotes, wherein such prokaryotic PAL variant has a greater phenylalanine-converting activity and/or a reduced immunogenicity as compared to a wild-type PAL. The invention provides compositions of prokaryotic PAL and biologically active fragments, mutants, variants or analogs thereof, as well as methods for the production, purification, and use of such compositions for therapeutic purposes, including the treatment of cancer.

十一、圖式：

點形念珠藻PLA之基因序列

```

1   atgaatataa catctctaca acagaacata acgcgttctt ggcaaatacc tttcactaat
61   agttcagatt caatcgtaac tgtaggcgat cgcaatctga caatcgacga ggttgtaa
121  gttgctcgtc atggaacaca ggtgcgctta actgataatg cagatgtcat tcgggggtgt
181  caagcatctt gtgattacat taacaatgca gtcgaaacag cacagccaat ttacgggggtg
241  acatctggct ttggcgggtat ggcagatggt gtcctctctc gcgaacaagc agcgggaactt
301  cagactaatt taatttggtt tctgaaatcc ggcgcaggaa acaaattatc gttagcagac
361  gtgcgtgcag ctatgctctt acgtgcaaat tcacatttgt atgggtgcgtc tggtatacga
421  ctcgaaactta ttcagcggat tgaaactttc ctcaacgctg gcgtgacacc ccatgtctat
481  gagtttggct ctatcgggtc tagcggcgat ttggtgccat tatectacat tactgggggca
541  ctaatcggtc tagatcctag ctttacagtt gacttcgacg gtaaagaaat ggatgccgtt
601  acagccttgt ctcgtttggg ttgccaaag ttgcaattgc aaccgaaaga aggttttagca
661  atgatgaatg gcacctcagt catgacaggt attgcagcta actgtgtgta cgatgcgaaa
721  gttttgctcg ctctgacaat ggggtgtacac gccttagcca tccaaggttt atacggaacg
781  aatcaatctt tccacccgtt tattcatcag tgcaagccac atcccgttca actatggaca
841  gcagatcaaa tgttttctct gctgaaagat tcacttttag ttcgtgaaga gttggatggt
901  aaacacgaat accgtggtaa agatctgata caggatcgtt attctctccg ctgtctggca
961  cagttcatag ggccaatcgt tgatggggta tcagagatta ccaagcaaat cgaggtagaa
1021 atgaactcag tcaccgataa cccattgatt gatgtcgaga accaagttag ttatcacggc
1081 ggcaattttc tcggacagta tgtgggtgtg acaatggatc gcctacgtta ttacataggg
1141 ctattggcca aacacatcga tgtgcagatt gcacttcttg tctcgccaga gtttagcaac
1201 ggcttaccac cctctttagt tggtaatagc gatcgcaaag ttaatatggg actcaaaggt
1261 ttgcaaatca gtggaaactc gattatgcc a ctgttgagct tctatggaaa ttccctagcc
1321 gatcgctttc ctacccacgc cgagcaattt aatcaaaata ttaacagcca aggctatatt
1381 tccgcaaatt tgacacgtcg ttccgtagac atatttcaga attatatggc gatcgcggtg
1441 atgtttggag ttcaagctgt tgacctccgc acatataaga tgaaagggtca ttatgatgca
1501 cgtacatgcc tctcacccaa tactgtgcag ttatacacag cagtctgcga ggtagttgga
1561 aagccactaa cgtctgtgcg tccatacatt tggaacgaca acgagcaatg tttagatgag
1621 catattgccc ggatttcagc tgatatcgct ggtggtgggt taattgtgca agcagttgag
1681 catatttttt cgagcttaaa gtcaacgtaa
  
```

圖1A

點形念珠藻PLA之蛋白質序列

MNITSLQQNITRSWQIPFTNSSDSIVTVGDRNLTIDEVVNVARH
GTQVRLTDNADVIRGVQASCDYINNAVETAQPIYGVTSFGGMADVVISREQAAELQT
NLIWFLKSGAGNKLSLADVRAAMLLRANSHLYGASGIRLELIQRIETFLNAGVTPHVY
EFGSIGASGDLVPLSYITGALIGLDPSFTVDFDGKEMDAVTALSRLGLPKLQLQPKEG
LAMMNGTSVMTGIAANCVDKVLALLTMGVHALAIQGLYGTNQSFHPFIHQCKPHPG
QLWTADQMFSLLKDSSLVRELDGKHEYRGKDLIQDRYSLRCLAQFIGPIVDGVSEIT
KQIEVEMNSVTDNPLIDVENQVSYHGGNFLGQYVGVTMDRLRYYIGLLAKHIDVQIAL
LVSPEFSNGLPPSLVGNSDRKVMGLKGLQISGNSIMPLLSFYGNLADRFPTHAEQF
NQNINSQGYISANLTRRSVDIFQNYMAIALMFGVQAVDLRTYKMKGHYDARTCLSPNT
VQLYTAVCEVVGKPLTSVRPYIWNDNEQCLDEHIARISADIAGGGLIVQAVEHIFSSL
KST

圖 1B

多變魚腥藻PLA之基因序列

```

1   atgaagacac tatctcaagc acaaagcaaa acctcatctc aacaattttc ttttactgga
61  aattctttctg ccaatgtaat tattggtaat cagaaactca caatcaatga tgttgcaagg
121 gtagcgcgta atggcacctt agtgtcttta accaataaca ctgatatttt gcagggtatt
181 caggcatctt gtgattacat taataatgct gttgaatctg gggaaccaat ttatggagtg
241 acatctgggtt ttggcggtat ggccaatggt gccatatccc gtgaacaagc atctgaactc
301 caaaccaact tagtttggtt cctgaaaaca ggtgcaggga acaaattacc cttggcggat
361 gtgcgcgcag ctatgctctt gcgtgcaaac tctcatatgc gcggtgcac tggcatcaga
421 ttagaactta tcaagcgtat ggagattttc cttaacgctg gtgtcacacc atatgtgtat
481 gagtttggtt caattggtgc aagtgggtgat ttagtgccac tatcctacat tactggttca
541 ctgataggct tagatcccag ttttaagggt gacttcaacg gtaaagaaat ggatgcgcc
601 acagctctac gtcaactgaa tttgtcaccc ttgacattgt tgccgaagga aggcttggcg
661 atgatgaacg gcacttcagt catgacaggt attgcagcaa actgcgtcta cgatactcaa
721 attttaactg cgatcgctat gggcggtcac gctctagata tccaagcttt aaacggaacc
781 aatcaatcat tccatccatt tatccataat tccaaaccac atcctggtca attatgggca
841 gcagatcaga tgattttctt gttagccaat tcccagttag ttcgtgatga gttagatggt
901 aaacacgatt atcgtgatca cgagttgatt caagatcggt actcactccg atgccttccc
961 cagtatttgg ggccaatcgt tgatggaatt tcccagattg ccaaacaat tgaaatcgaa
1021 atcaactcag tcaccgataa cccactaatt gatgttgata accaagctag ctatcatgga
1081 ggaaatttcc tcggacagta cgtgggtatg ggaatggatc acctgcgtta ctatattggg
1141 ttattggcta aacacctaga tgtgcagatt gccctcctcg cctcaccaga gtttagcaat
1201 ggactaccac catctttatt aggcaaccga gaacgtaaag tcaatatggg actcaaagg
1261 ctgcaaatat gcggttaactc aattatgcca ctggtgacct tctatggaaa ttccatcgcc
1321 gatcgcttct ctacccatgc agaacaattt aatcagaaca tcaacagtca aggatacact
1381 tcagcgactc tagcccgccg ttctgtggat atcttccaga attatgtggc gatcgctctg
1441 atgtttggag tccaagctgt tgacctccgc acatataaaa agactgggtca ttacgatgca
1501 cgcgcctgtc tatcacctgc aactgagcgc ttatattcag cagtccgcca cgtagttgga
1561 caaaaaccaa cttcagatcg cccatatatt tggaatgata atgagcaagg actggatgag
1621 catattgccc ggattttctgc tgatatcgct gctgggtggtg tgattgtgca agcagttcaa
1681 gatattctac cctgcttgca ttaa

```

圖2A

多變魚腥藻PLA之蛋白質序列

```

1      mktlsqaqsk tssqqfsftg nssanviign qkltindvar varngtlvsl tnntdilggi
61     qascdyinna vesgepiygv tsgfggmanv aisreqasel qtnlvwflkt gagnklplad
121    vraamllran shmrgasgir lelikrmeif lnagvtpyvy efgsigasgd lvplsytgs
181    ligldpsfkv dfngkemdap talrqlnlsp ltllpkegla mmngtsvmtg iaancvydtq
241    iltaiamgvh aldiqalngt nqsfhpfihn skphpgqlwa adqmisllan sqlvrdeldg
301    khdyrdheli qdryslrclp qylgpivdgi sqiakqieie insvtdnpli dvdnqasyhg
361    gnflgqyvqm gmdhlryyig llakhldvqi allaspefsn glppsllgnr erkvnmgkkg
421    lqicgnsimp lltfygnsia drfpthaeqf nqninsqgyt satlarrsvd ifqnyvaial
481    mfgvqavdlr tykktghyda racfspater lysavrhvvg qkptsdrpyi wndneqglde
541    hiarisadia aggvivqavq dilpclh

```

圖 2B

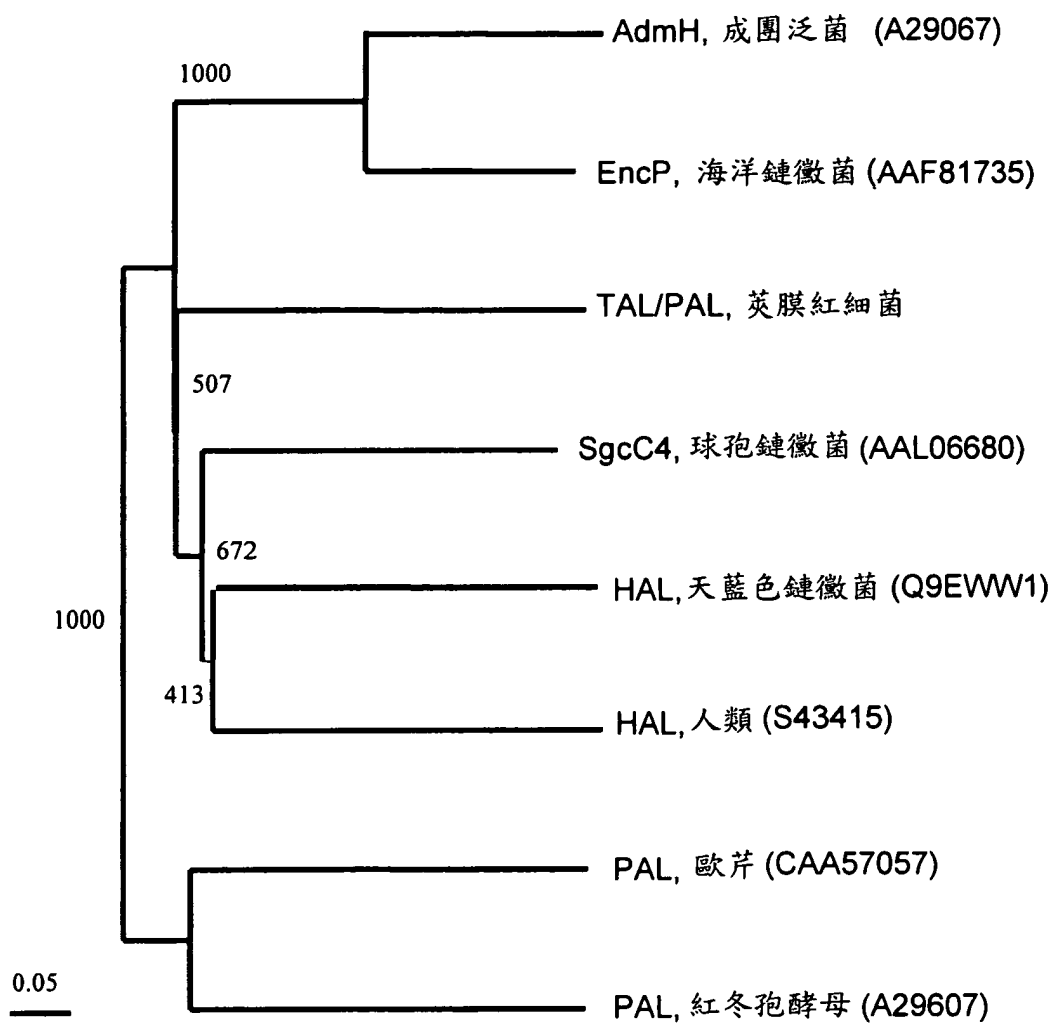


圖3

點形念珠藻PAL (SEQ ID NO: 2) 及多變魚腥藻PAL (SEQ ID NO: 4)
與EncP PAL (SEQ ID NO: 5) 及惡臭假單胞菌HAL (SEQ ID NO: 6) 之
藍藻菌蛋白質序列之比對。突出顯示對應於PAL或HAL活性之活性位點殘基。

Avar03005300	MKTLQAQSK TSSQQFSFTG NSSANVIIGN QKLTINDVAR VARNGTLVSL
Npun02008223	MNITSLQQNI TRSWQIPFTN SSDSIVTVGD RNLTIDEVVN VARHGTQVRL
EncP	MTFVIELD MNVTLDQLED AARQRTPVLE
PputidaHAL	MTELTLPK GTLTLAQLRA IHAAPVRLQL

Avar03005300	TNNTDILQGI QASCDYINNA VESGEPIYGV TSGFGGMANV AISREQASEL
Npun02008223	TDNADVIRGV QASCDYINNA VETAQPIYGV TSGFGGMADV VISREQAAEL
EncP	S..APVRSRV RASRDVLVKF VQDERVIYGV NTSMGGFVDH LVPVSQARQL
PputidaHAL	D..ASAAPAI DASVACVEQI IAEDRTAYGI NTGFGLLAST RIASHDLLENL

Avar03005300	QTNLVWFLKT GAGNKLPLAD VRAAMLLRAN SHMRGASGIR LELIKRMEIF
Npun02008223	QTNLIWFLKS GAGNKLPLAD VRAAMLLRAN SHLYGASGIR LELIQRIETF
EncP	QENLINAVAT NVGAYLDDTT ARTIMLSRIV SLARGNSAIT PANLDKLVAV
PputidaHAL	QRSLVLSHAA GIGAPLDDDL VRLIMVLKIN SLRSGFSGIR RKVIDALIAL

Avar03005300	LNAGVTPYVY EFGSIGASGD LVPLSYITGS LIGLDPSFKV DFNGKEMDAP
Npun02008223	LNAGVTPHYV EFGSIGASGD LVPLSYITGA LIGLDPSFTV DFDGKEMDAV
EncP	LNAGIVPCIP EKGSLGTSGD LGPLAAIALV CAGQW...KA RYNGQIMPGR
PputidaHAL	VNAEVYPHIP LKGSVGASGD LAPLATMSLV LLGEG...KA RYKGQWLSAT

Avar03005300	TALRQLNLSP LTLLPKEGLA MMNGTSVMTG IAANCVYDTQ ILTAIAMGVH
Npun02008223	TALSRLGLPK LQLQPKGLA MMNGTSVMTG IAANCVYDAK VLLALTMGVH
EncP	QALSEAGVEP MELSYPDGLA LINGTSGMVG LGTMVLQAAR RLVDRLQVS
PputidaHAL	EALAVAGLEP LTLAAKEGLA LLNGTQASTA YALRGLFYAE DLYAAAIACG

Avar03005300	ALDIQALNGT NQSFHPFIHN SKPHPGQLWA ADQMISLLAN SQLVRDELGD
Npun02008223	ALAIQGLYGT NQSFHPFIHQ CKPHPGQLWT ADQMFSLLKD SSLVREELGD
EncP	ALSVEGLAGM TKPFDPRVHG VKPHRGQRQV ASRLWEGLAD SHLAVNELDT
PputidaHAL	GLSVEAVLGS RSPFDARIHE ARGQRGQIDT AACFRDLLGD SSEVS.....

圖4

Avar03005300	K HDYRDHELIQ DRYSLRCLPQ YLGPIVDGIS QIAKQIEIEI
Npun02008223	K HEYRGKDLIQ DRYSLRCLAQ FIGPIVDGVS EITKQIEVEM
EncP	EQTLAGEMGT VAKAGSLAIE DAYSIRCTPQ ILGPVVDVLD RIGATLQDEL
PputidaHAL	 LSHKNCDKVQ DPYSLRCQPQ VMGACLTQLR QAAEVLGIEA

Avar03005300	NSVTDNPLID VDNQASYHGG NFLGQYVGMG MDHLRYIIGL LAKHLDVQIA
Npun02008223	NSVTDNPLID VENQVSYHGG NFLGQYVGVT MDRLRYIIGL LAKHIDVQIA
EncP	NSSNDNPVL PEEAEVFHNG HFHGQYVAMA MDHLNMALAT VTNLANRRVD
PputidaHAL	NAVSDNPLVF AAEGDVISGG NFHAEPVAMA ADNLAIAIE IGSLSERRIS

Avar03005300	LLASPEFSNG LPPSLLGNRE RKNMGLKGL QICGNSIMPL LTFYGNSIAD
Npun02008223	LLVSPEFSNG LPPSLVGNSD RKNMGLKGL QISGNSIMPL LSFYGNLAD
EncP	RFLDKSNSNG LPAFLCREDP .GLRLGLMGG QFMTASITAE TRTLTIPMSV
PputidaHAL	LMMDKHMS.Q LPPFLVENG. .GVNSGFMIA QVTAAALASE NKALSHPHSV

Avar03005300	RFPTHAEQFN QNINSQGYTS ATLARRSVDI FQNYVAIALM FGVQAVDLRT
Npun02008223	RFPTHAEQFN QNINSQGYIS ANLTRRSVDI FQNYMAIALM FGVQAVDLRT
EncP	QSLTSTADF. QDIVSFGFVA ARRAREVLTN AAYVVAPELL CACQAVDIRG
PputidaHAL	DSLPTSANQ. BDHVSMAPIA GKRLWEMAEN TRGVPAIEWL GACQGLDLRK

Avar03005300	YKKTGHYDAR ACLSPATERL YSAVRHVVGQ KPTSDRPYIW NDNEQGLDEH
Npun02008223	YKMKGHYDAR TCLSPNTVQL YTAVCEVVGK PLTSVRPYIW NDNEQCLDEH
EncP	ADKL..... .SSFTRPL YERTRKIVP.F FDRDETITDY
PputidaHAL	GLKT..... .SAKLEKA RQALRSEVA.H YDRDRFFAPD

Avar03005300	IARISADIAA GGVIVQAVQD ILPCLH..
Npun02008223	IARISADIAG GGLIVQAVEH IFSSLKST
EncP	VEKLAADLIA GEPVDAAVAA H.....
PputidaHAL	IEKAVELLAK GSLTGLLPAG VLPSSL...

圖4(續)

AvPAL變異體（半胱氨酸突變體）之蛋白質序列

A. AvPAL_C64S (SEQ ID NO:7)

MKTLTSAQSKTSSQQFSFTGNSSANVIIGNQKLTINDVARVARNGTLVSLTNNTDILQGIQASDYINNA
VESGEPIYGVTSFGFGGMANVAISREQASELQTNLVWFLKTGAGNKLPLADVRAAMLLRANSHMRGASGIR
LELIKRMIEIFLNAGVTPYVYEFSGSIGASGDLVPLSYITGSLIGLDPSFKVDFNGKEMDAPTALRQLNLS
LTLLPK EGLAMNGTSVMTGIAANCYDQTQILTAIAMGVHALDIQALNGTNQSFHFFIHNSKPHPGQLWA
ADQMISLLANSQ LVRDEL DKGHDYRDHELIQDRYSLRCLPQYLGPIVDGISQIAKQIEIEINSVTDNPLI
DVDNQASYHGGNFLGQYVGMGMDHLRYYIGLLAKHLVDQIALLASPEFSNGLPPSLLGNRERKVMNGLKG
LQICGNSIMPLLTFFYGNSIADRFPTHAEQFNQININSQGYTSATLARRSVDIFQNYVAIALMFGVQAVDLR
TYKKTGHYDARACLS PATERLYSAVRHVVGQKPTSDRPYIWN DNEQGLDEHIARISADIAAGGVIVQAVQ
DILPCLH

B. AvPAL_C318S (SEQ ID NO:8)

MKTLTSAQSKTSSQQFSFTGNSSANVIIGNQKLTINDVARVARNGTLVSLTNNTDILQGIQASCDYINNA
VESGEPIYGVTSFGFGGMANVAISREQASELQTNLVWFLKTGAGNKLPLADVRAAMLLRANSHMRGASGIR
LELIKRMIEIFLNAGVTPYVYEFSGSIGASGDLVPLSYITGSLIGLDPSFKVDFNGKEMDAPTALRQLNLS
LTLLPK EGLAMNGTSVMTGIAANCYDQTQILTAIAMGVHALDIQALNGTNQSFHFFIHNSKPHPGQLWA
ADQMISLLANSQ LVRDEL DKGHDYRDHELIQDRYSLRCLPQYLGPIVDGISQIAKQIEIEINSVTDNPLI
DVDNQASYHGGNFLGQYVGMGMDHLRYYIGLLAKHLVDQIALLASPEFSNGLPPSLLGNRERKVMNGLKG
LQICGNSIMPLLTFFYGNSIADRFPTHAEQFNQININSQGYTSATLARRSVDIFQNYVAIALMFGVQAVDLR
TYKKTGHYDARACLS PATERLYSAVRHVVGQKPTSDRPYIWN DNEQGLDEHIARISADIAAGGVIVQAVQ
DILPCLH

C. AvPAL_C503S (SEQ ID NO:9)

MKTLTSAQSKTSSQQFSFTGNSSANVIIGNQKLTINDVARVARNGTLVSLTNNTDILQGIQASCDYINNA
VESGEPIYGVTSFGFGGMANVAISREQASELQTNLVWFLKTGAGNKLPLADVRAAMLLRANSHMRGASGIR
LELIKRMIEIFLNAGVTPYVYEFSGSIGASGDLVPLSYITGSLIGLDPSFKVDFNGKEMDAPTALRQLNLS
LTLLPK EGLAMNGTSVMTGIAANCYDQTQILTAIAMGVHALDIQALNGTNQSFHFFIHNSKPHPGQLWA
ADQMISLLANSQ LVRDEL DKGHDYRDHELIQDRYSLRCLPQYLGPIVDGISQIAKQIEIEINSVTDNPLI
DVDNQASYHGGNFLGQYVGMGMDHLRYYIGLLAKHLVDQIALLASPEFSNGLPPSLLGNRERKVMNGLKG
LQICGNSIMPLLTFFYGNSIADRFPTHAEQFNQININSQGYTSATLARRSVDIFQNYVAIALMFGVQAVDLR
TYKKTGHYDARAS_{SL} PATERLYSAVRHVVGQKPTSDRPYIWN DNEQGLDEHIARISADIAAGGVIVQAVQ
DILPCLH

D. AvPAL_C565S (SEQ ID NO:10)

MKTLTSAQSKTSSQQFSFTGNSSANVIIGNQKLTINDVARVARNGTLVSLTNNTDILQGIQASCDYINNA
VESGEPIYGVTSFGFGGMANVAISREQASELQTNLVWFLKTGAGNKLPLADVRAAMLLRANSHMRGASGIR
LELIKRMIEIFLNAGVTPYVYEFSGSIGASGDLVPLSYITGSLIGLDPSFKVDFNGKEMDAPTALRQLNLS
LTLLPK EGLAMNGTSVMTGIAANCYDQTQILTAIAMGVHALDIQALNGTNQSFHFFIHNSKPHPGQLWA
ADQMISLLANSQ LVRDEL DKGHDYRDHELIQDRYSLRCLPQYLGPIVDGISQIAKQIEIEINSVTDNPLI
DVDNQASYHGGNFLGQYVGMGMDHLRYYIGLLAKHLVDQIALLASPEFSNGLPPSLLGNRERKVMNGLKG
LQICGNSIMPLLTFFYGNSIADRFPTHAEQFNQININSQGYTSATLARRSVDIFQNYVAIALMFGVQAVDLR
TYKKTGHYDARACLS PATERLYSAVRHVVGQKPTSDRPYIWN DNEQGLDEHIARISADIAAGGVIVQAVQ
DILP_{SL} LH

E. AvPAL_C565SC503S (SEQ ID NO:11)

MKTLTSAQSKTSSQQFSFTGNSSANVIIGNQKLTINDVARVARNGTLVSLTNNTDILQGIQASCDYINNA
VESGEPIYGVTSFGFGGMANVAISREQASELQTNLVWFLKTGAGNKLPLADVRAAMLLRANSHMRGASGIR
LELIKRMIEIFLNAGVTPYVYEFSGSIGASGDLVPLSYITGSLIGLDPSFKVDFNGKEMDAPTALRQLNLS
LTLLPK EGLAMNGTSVMTGIAANCYDQTQILTAIAMGVHALDIQALNGTNQSFHFFIHNSKPHPGQLWA
ADQMISLLANSQ LVRDEL DKGHDYRDHELIQDRYSLRCLPQYLGPIVDGISQIAKQIEIEINSVTDNPLI
DVDNQASYHGGNFLGQYVGMGMDHLRYYIGLLAKHLVDQIALLASPEFSNGLPPSLLGNRERKVMNGLKG
LQICGNSIMPLLTFFYGNSIADRFPTHAEQFNQININSQGYTSATLARRSVDIFQNYVAIALMFGVQAVDLR
TYKKTGHYDARAS_{SL} PATERLYSAVRHVVGQKPTSDRPYIWN DNEQGLDEHIARISADIAAGGVIVQAVQ
DILP_{SL} LH

圖5A-5E

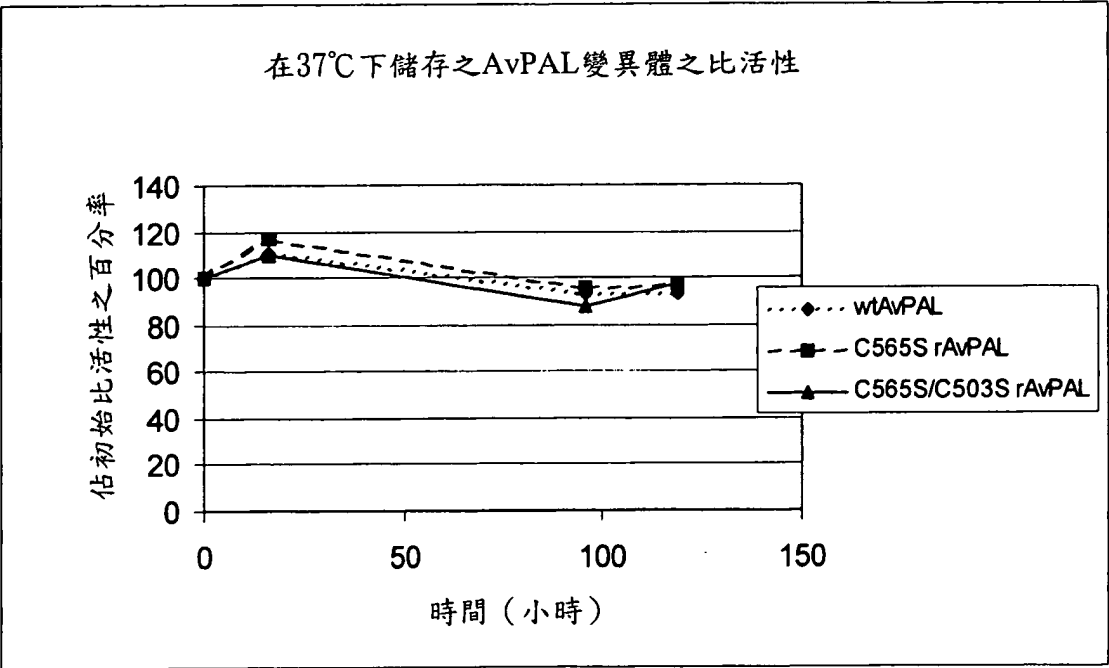


圖6A

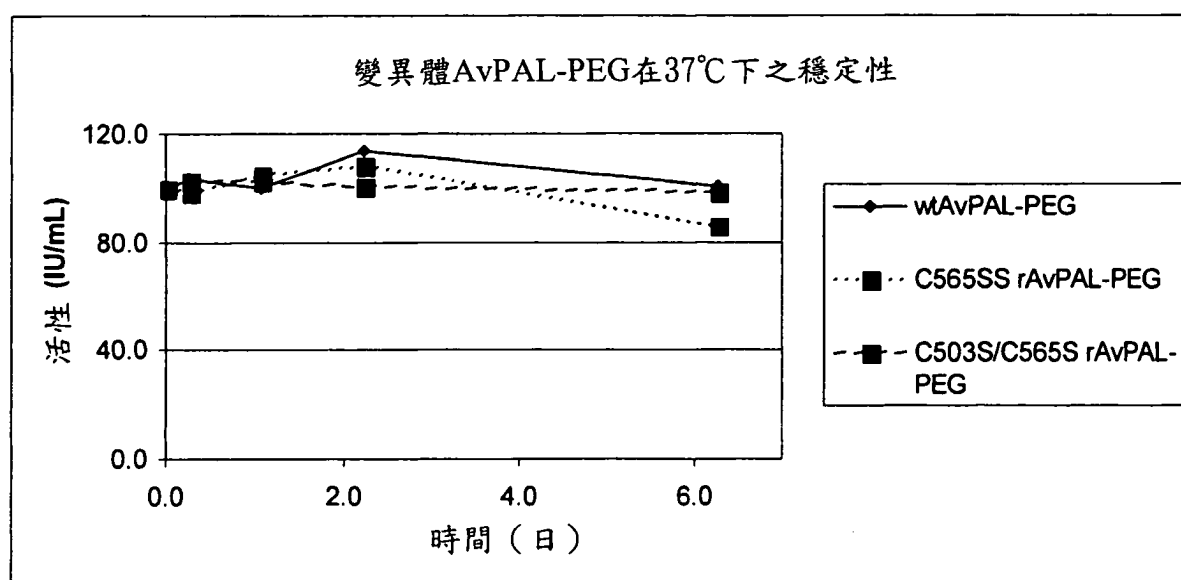


圖 6B

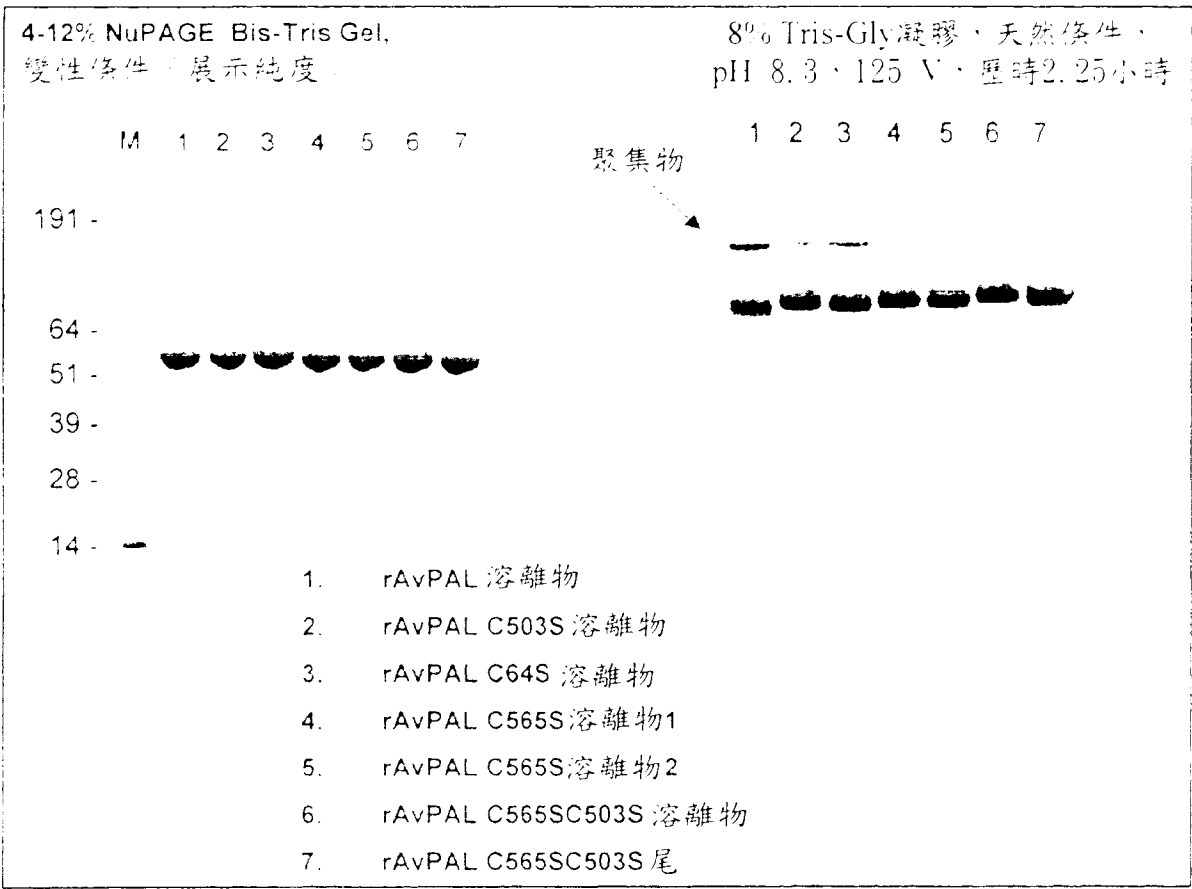


圖7A

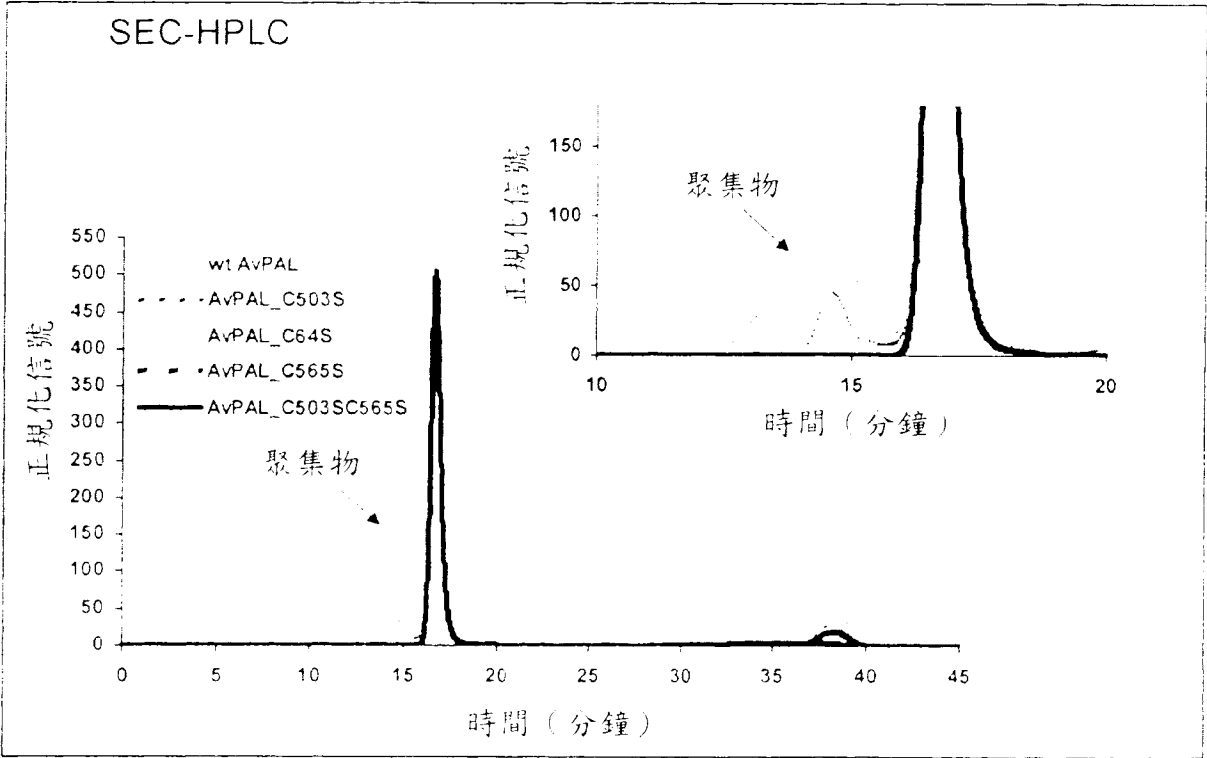


圖 7B

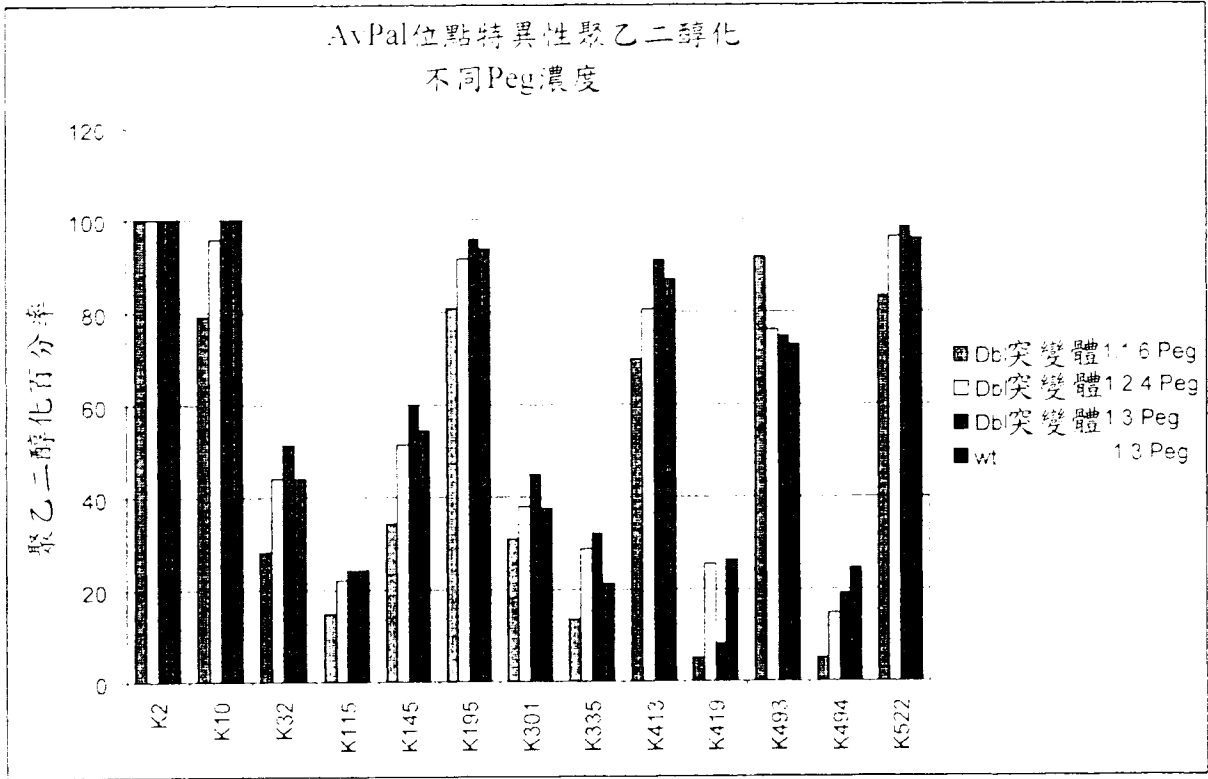


圖8

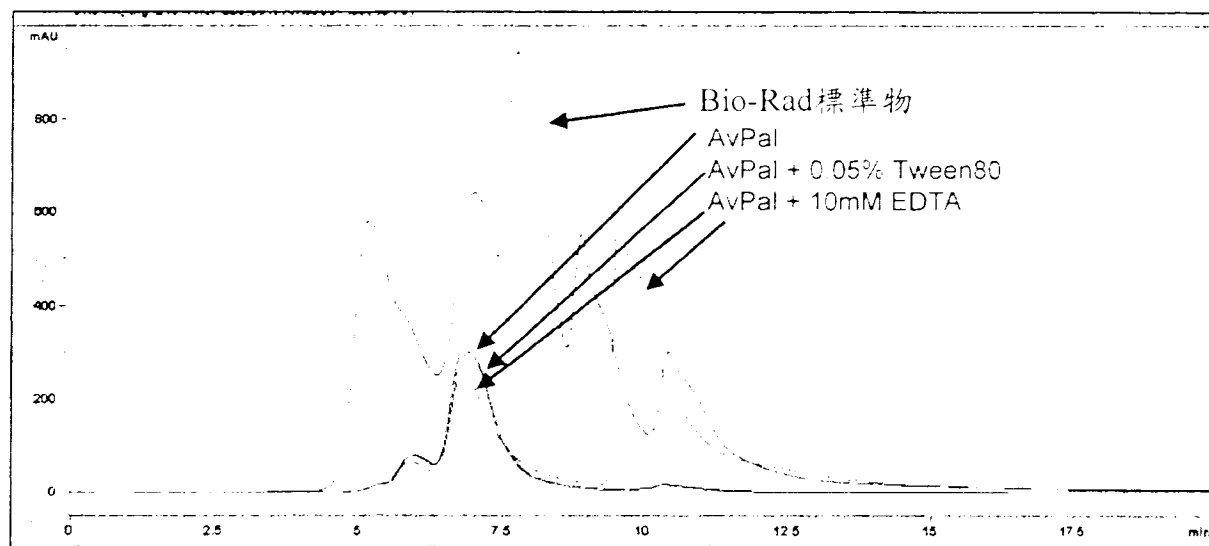


圖9

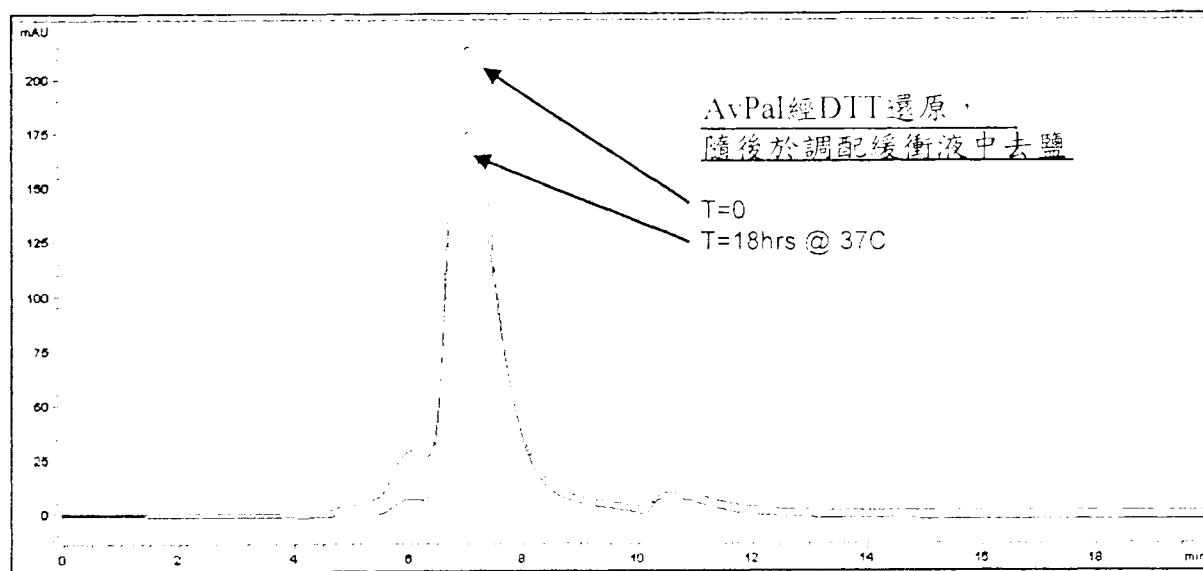


圖10A

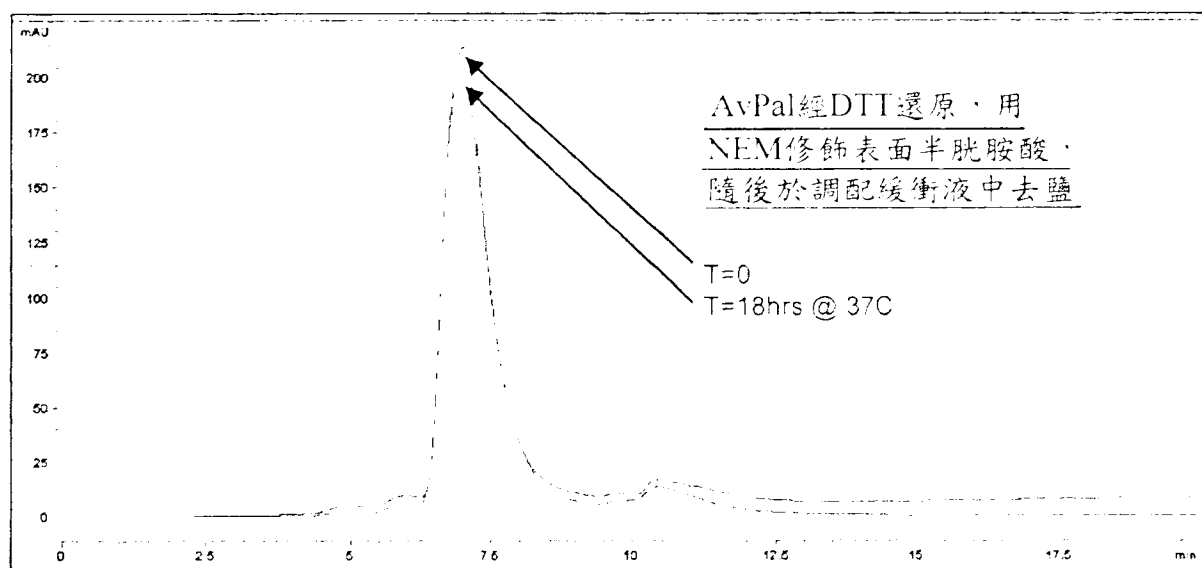


圖10B

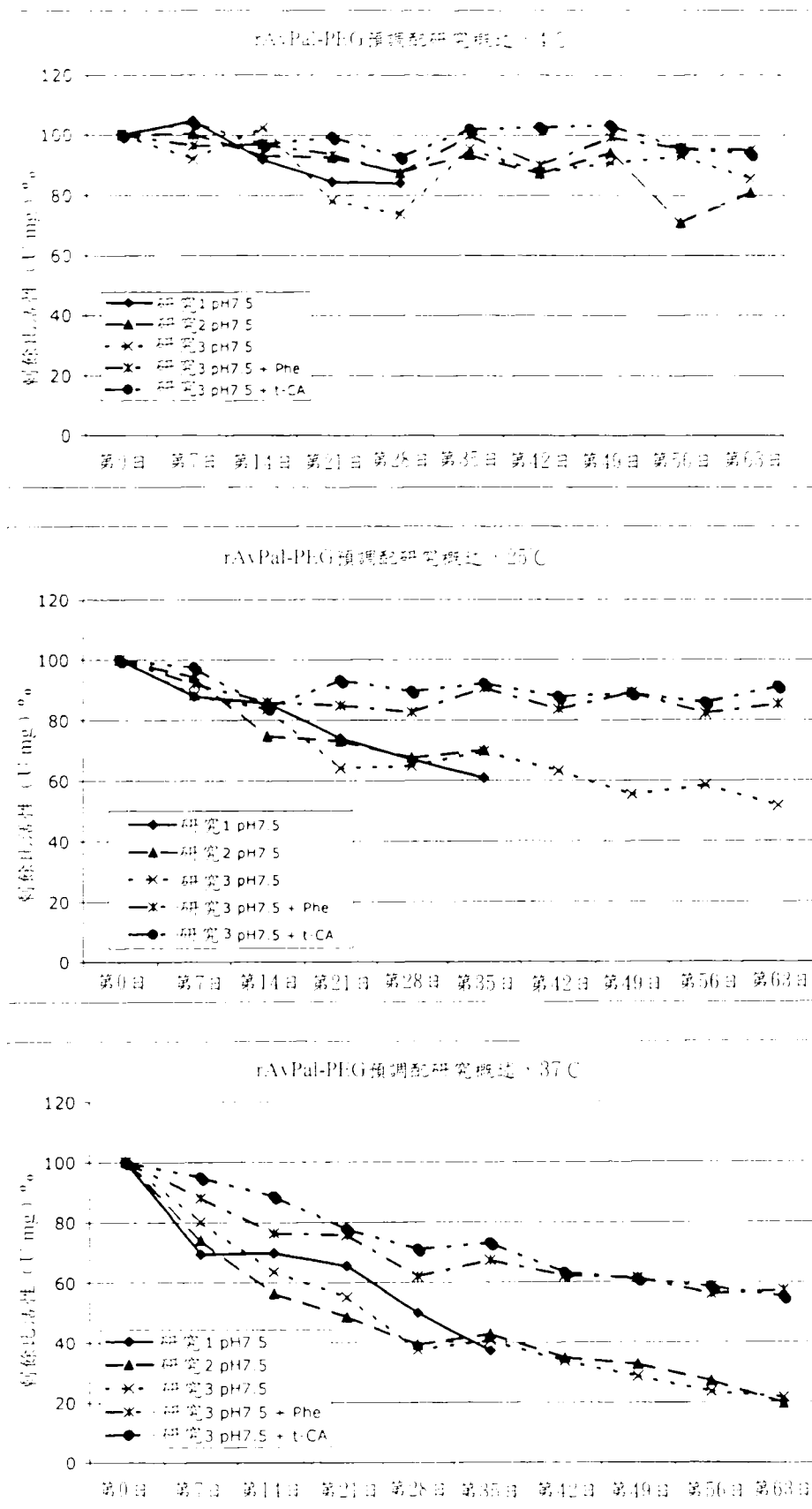


圖 11

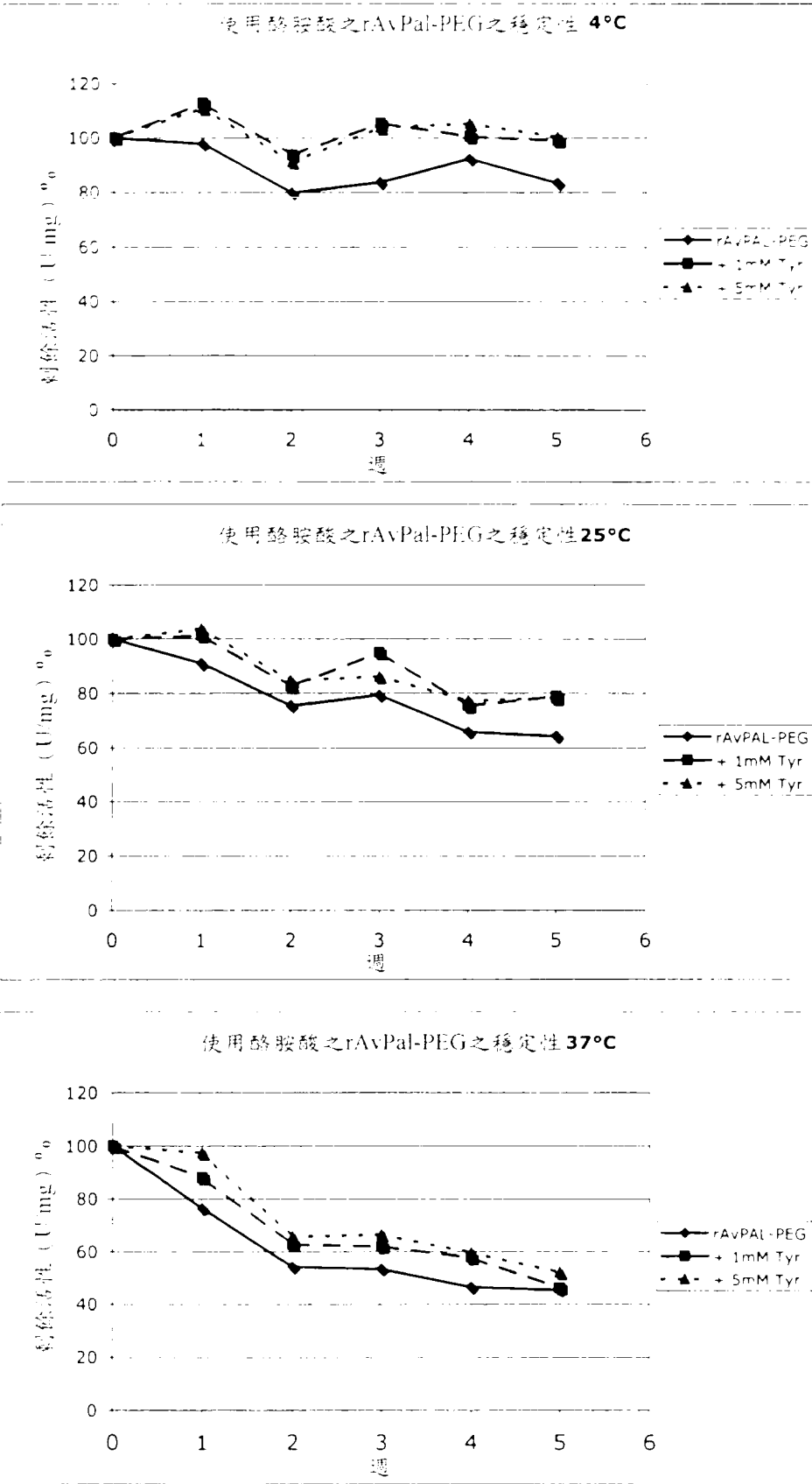
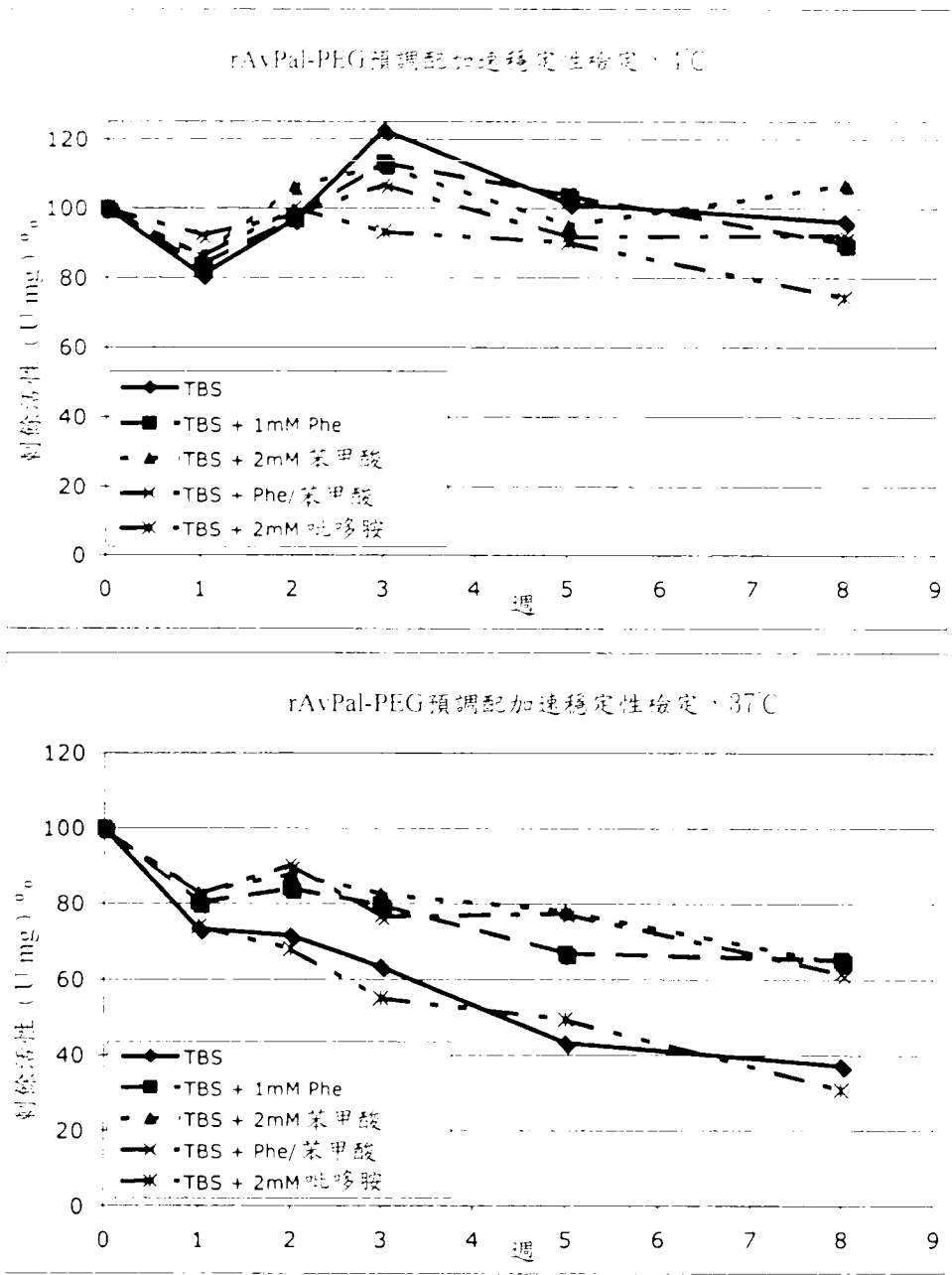


圖12

A.



B.

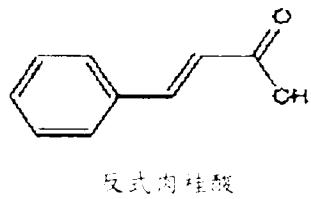
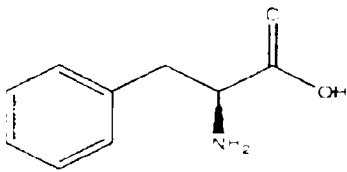
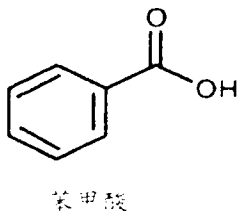
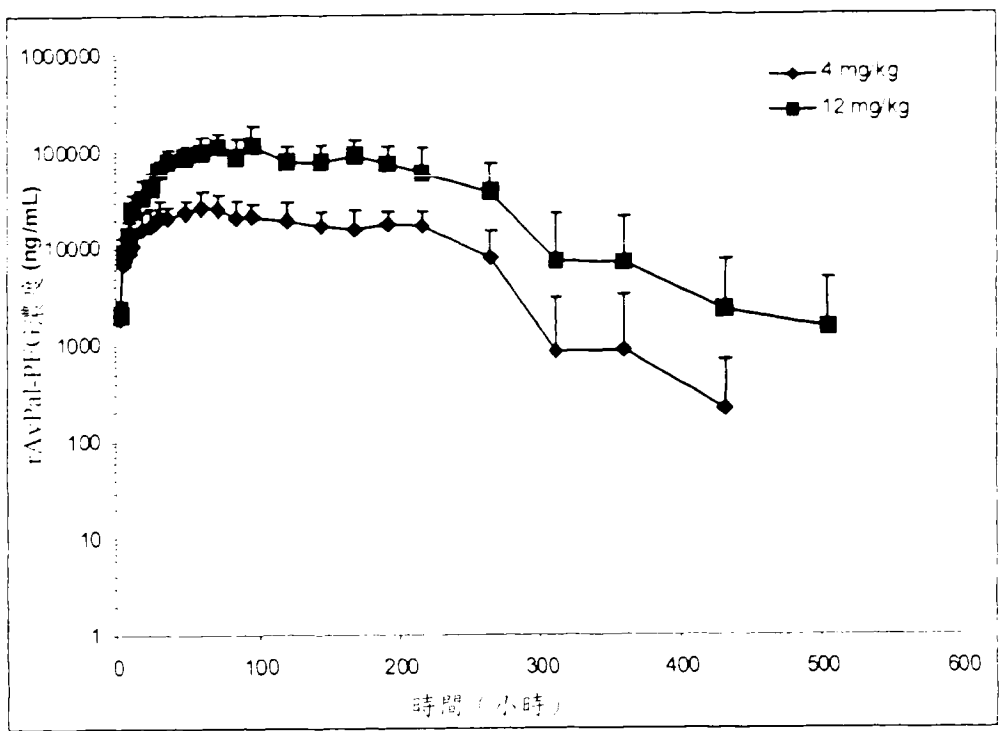


圖13A-B

A. 單次皮下注射後獼猴血漿中AvPAL_C565SC503S之濃度



B. 單次皮下注射後獼猴血漿中苯丙胺酸 (Phe) 及AvPAL_C565SC503S之濃度

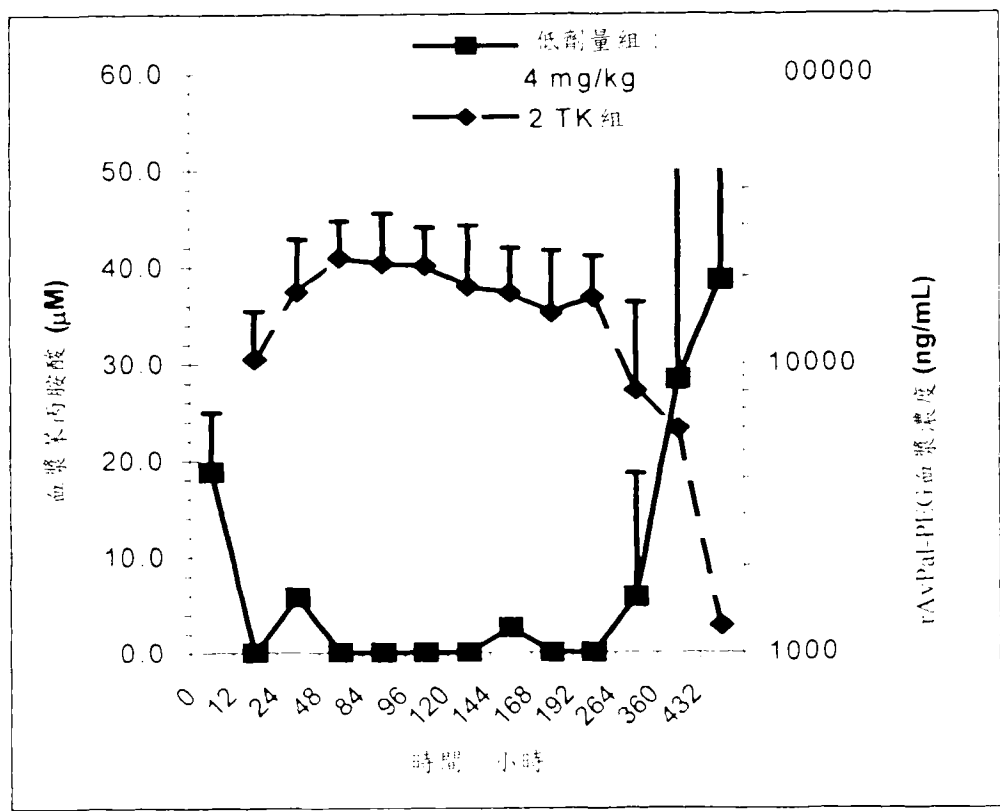
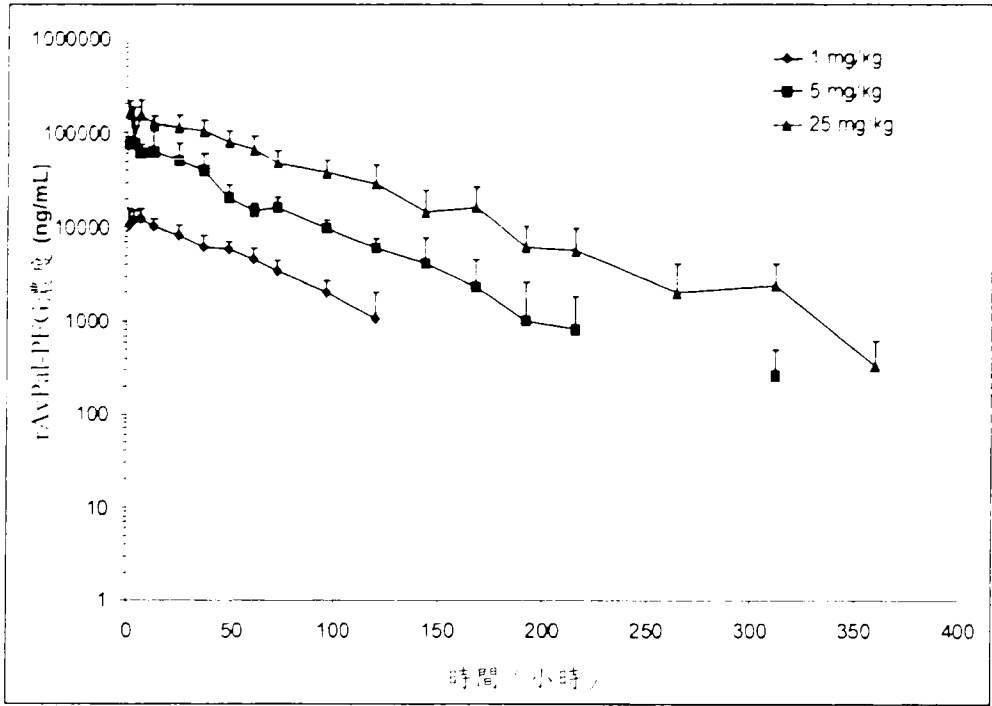


圖14A-B

A. 單次靜脈注射後大鼠血漿中AvPAL₁-C565SC503S之濃度



B. 單次皮下注射後大鼠血漿中AvPAL₁-C565SC503S之濃度

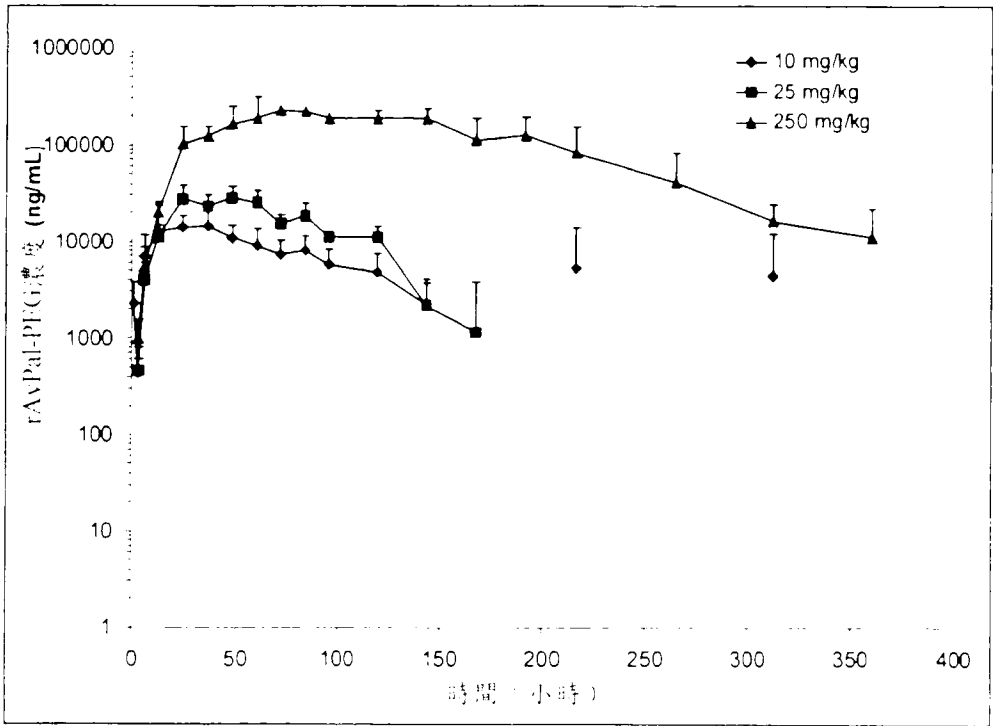
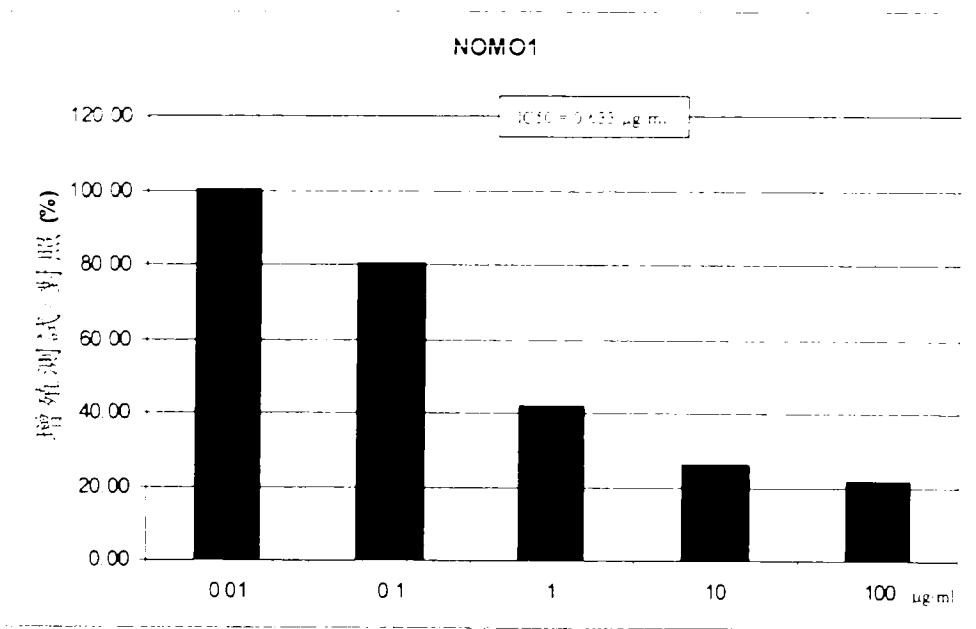


圖 15A-B

A. NOMO1急性骨髓白血病 (AML) 細胞



B. IM9骨髓細胞

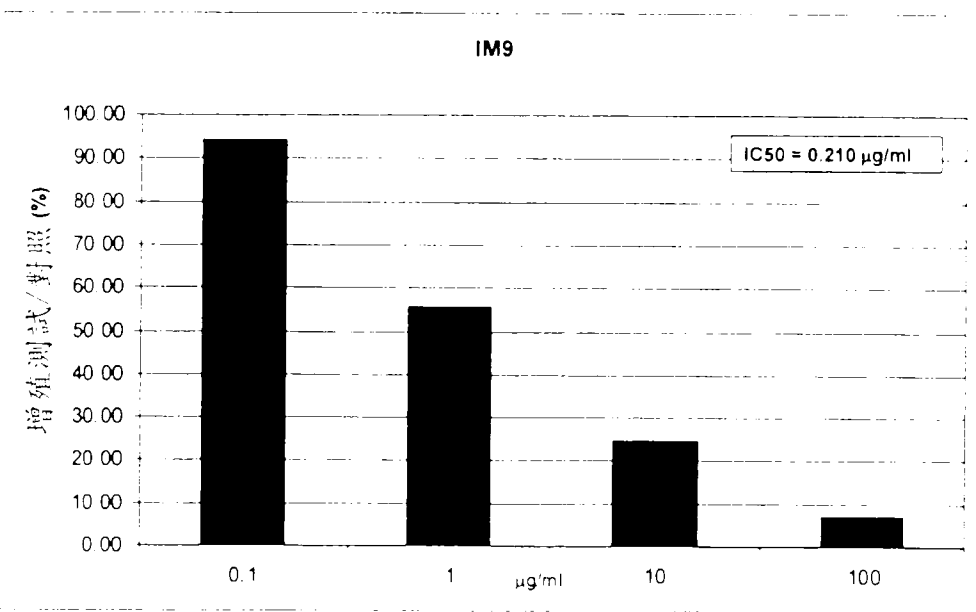


圖 16A-B

A. 弱 CNS-SF268 (上圖) 及498L (下圖)

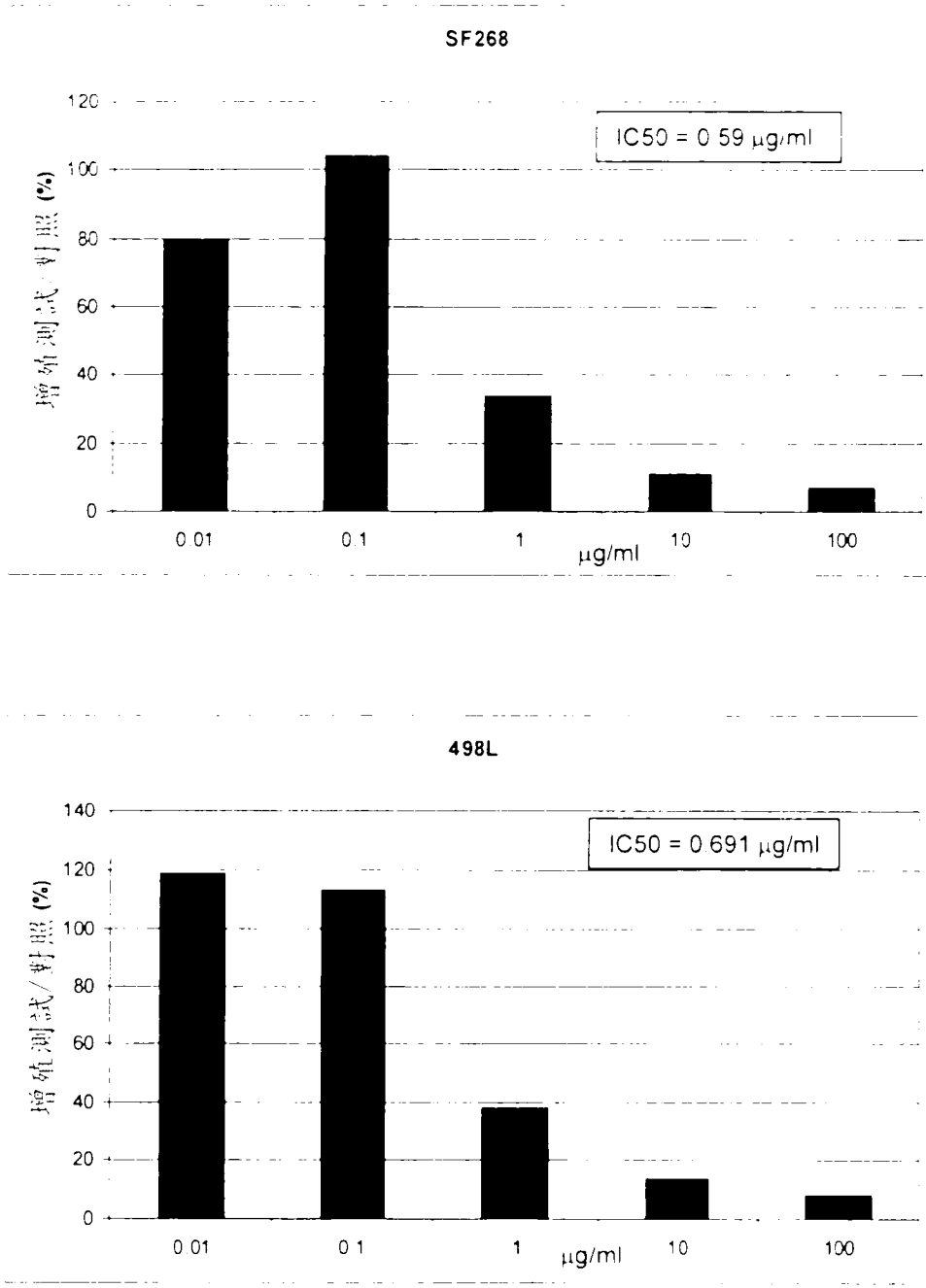


圖17A

B. 結錫 HT29 (上圖) 及HCT116 (下圖)

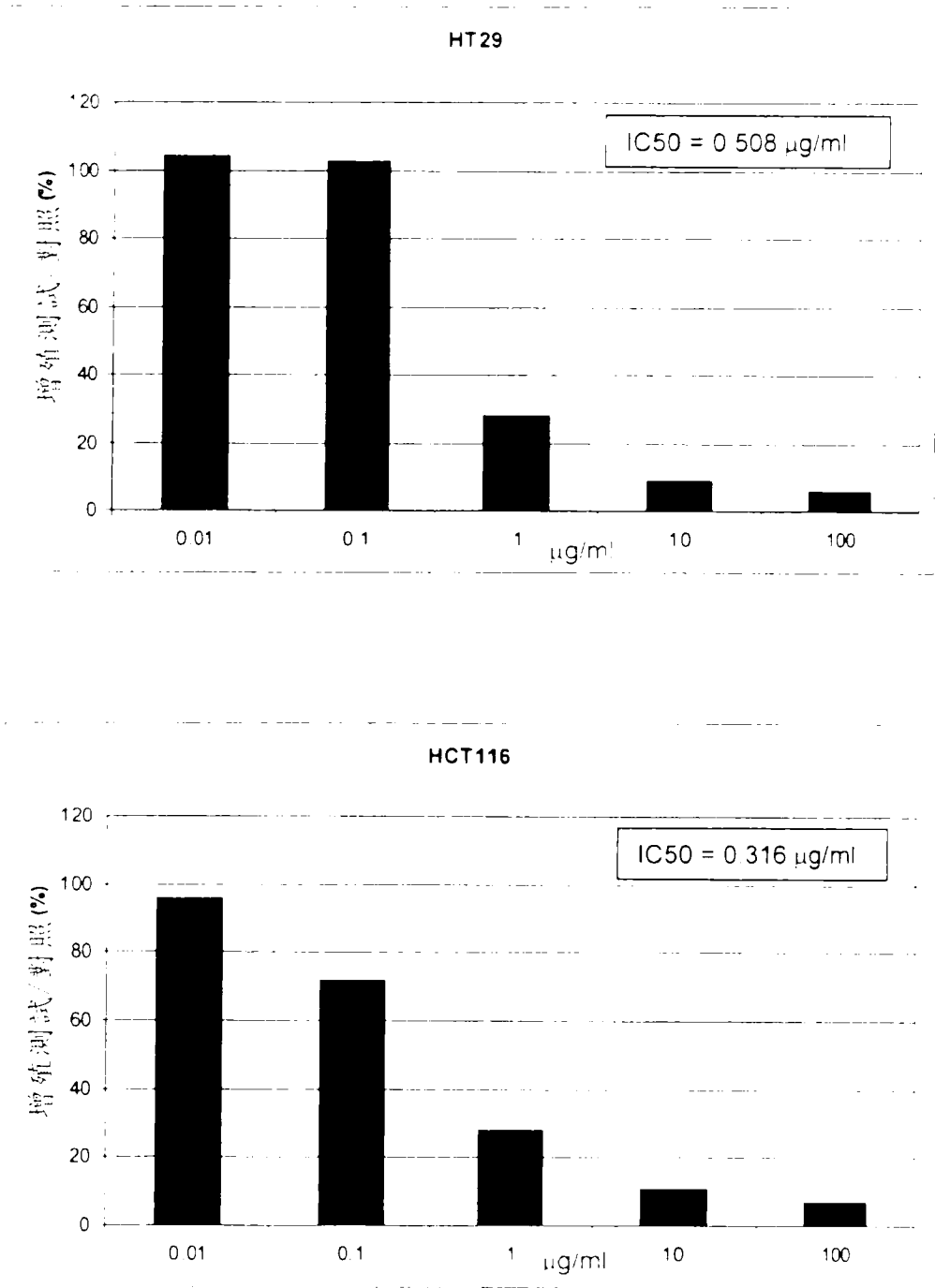


圖 17B

C. 肺-H460 上圖、529L 中間圖 及629L 下圖

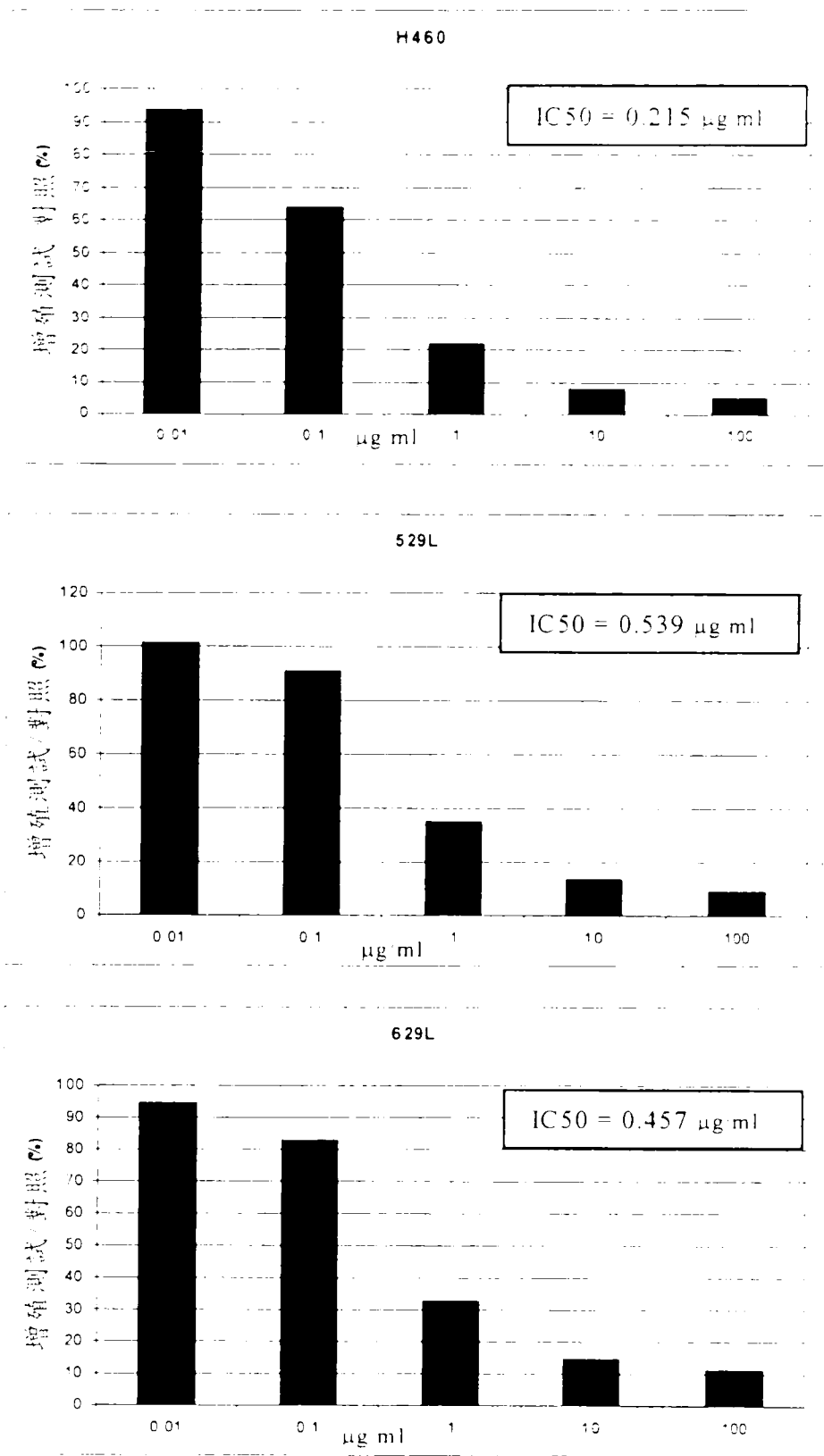


圖17C

D. 前列腺 LNCAP (上圖)、PC3M (中間圖) 及DU145 (下圖)

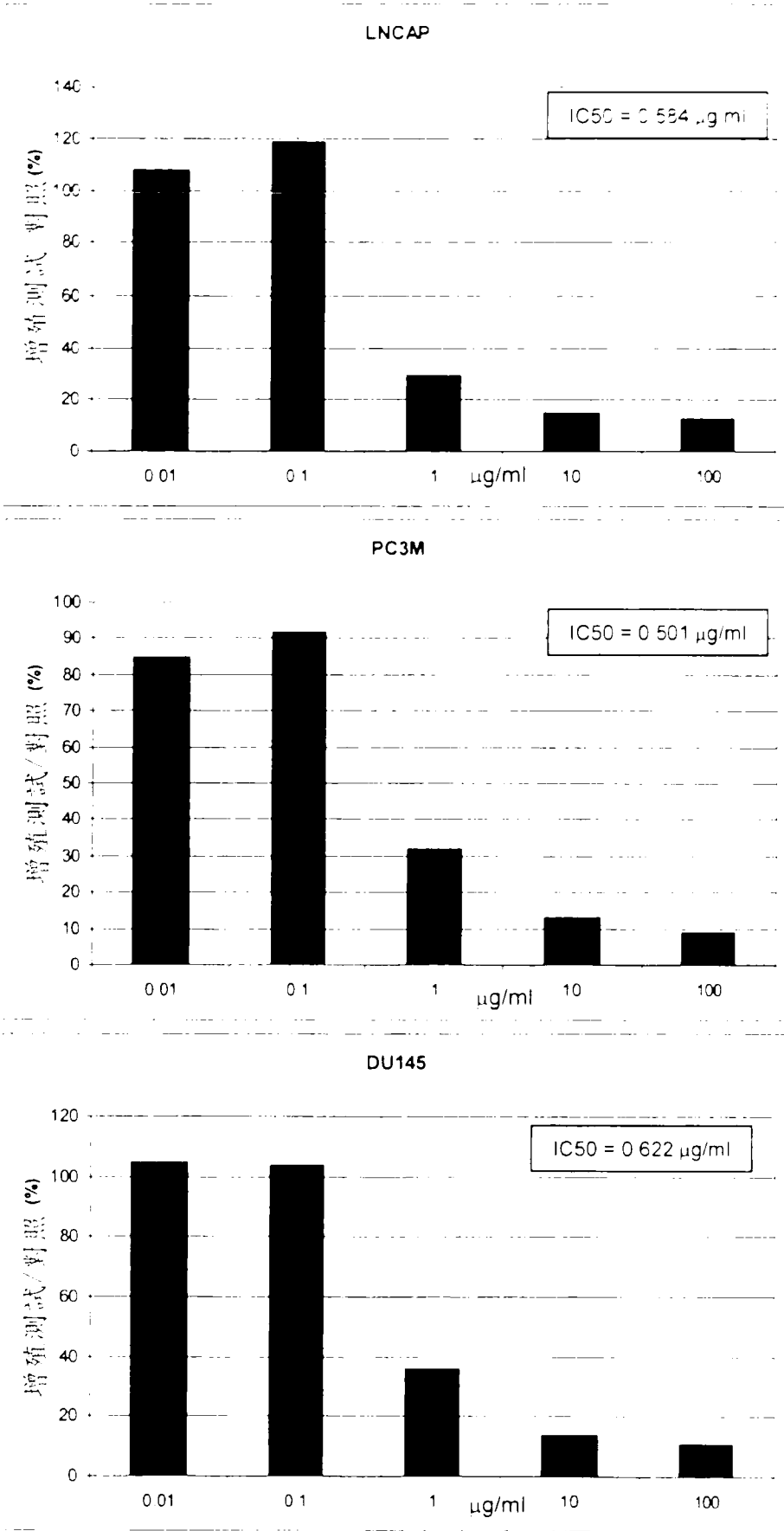


圖 17D

B16黑色素瘤研究：腫瘤尺寸-預防性（上圖）及治療性（下圖）

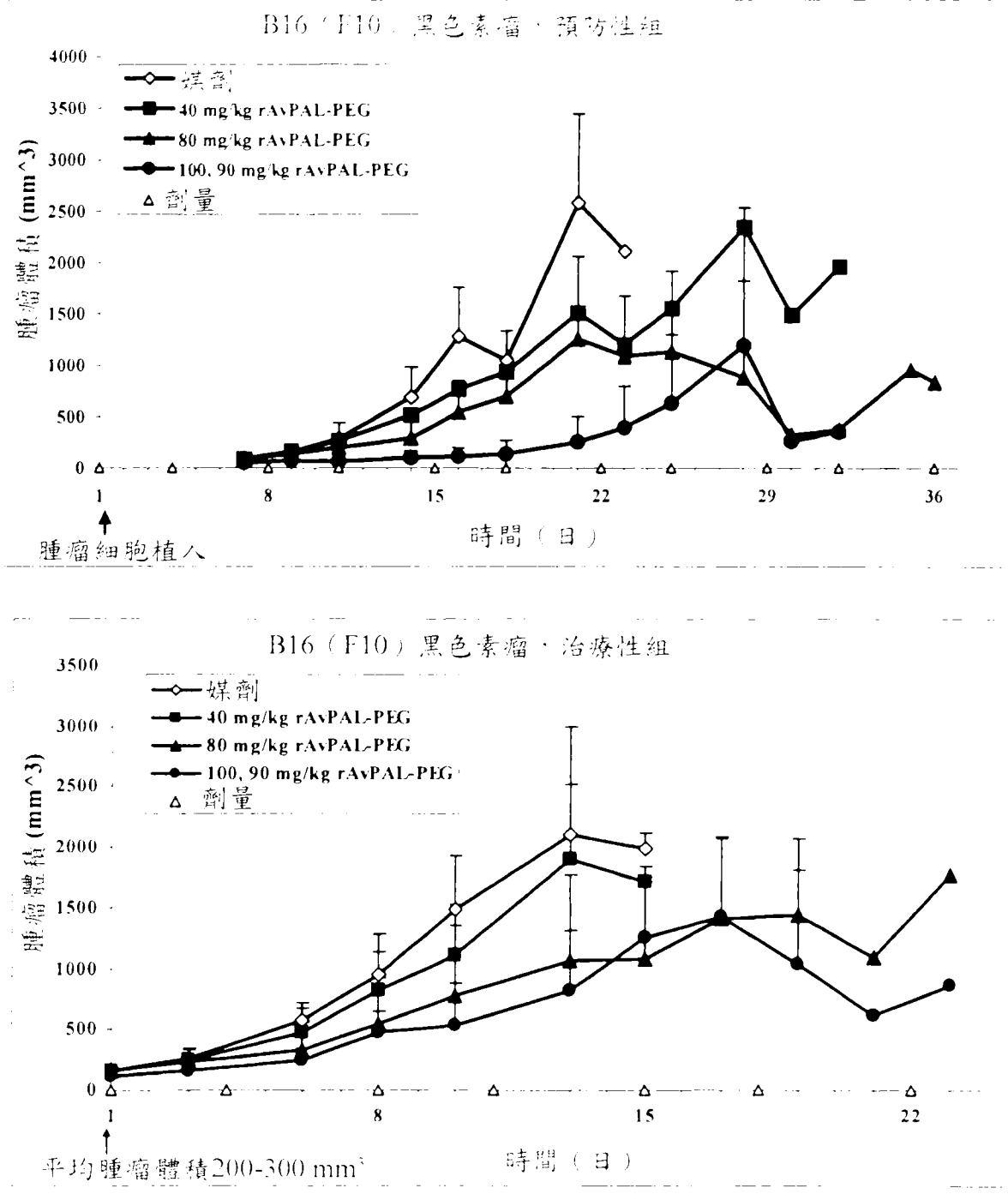


圖18

肝細胞瘤研究：SNU398（上圖）及HepG2（下圖）

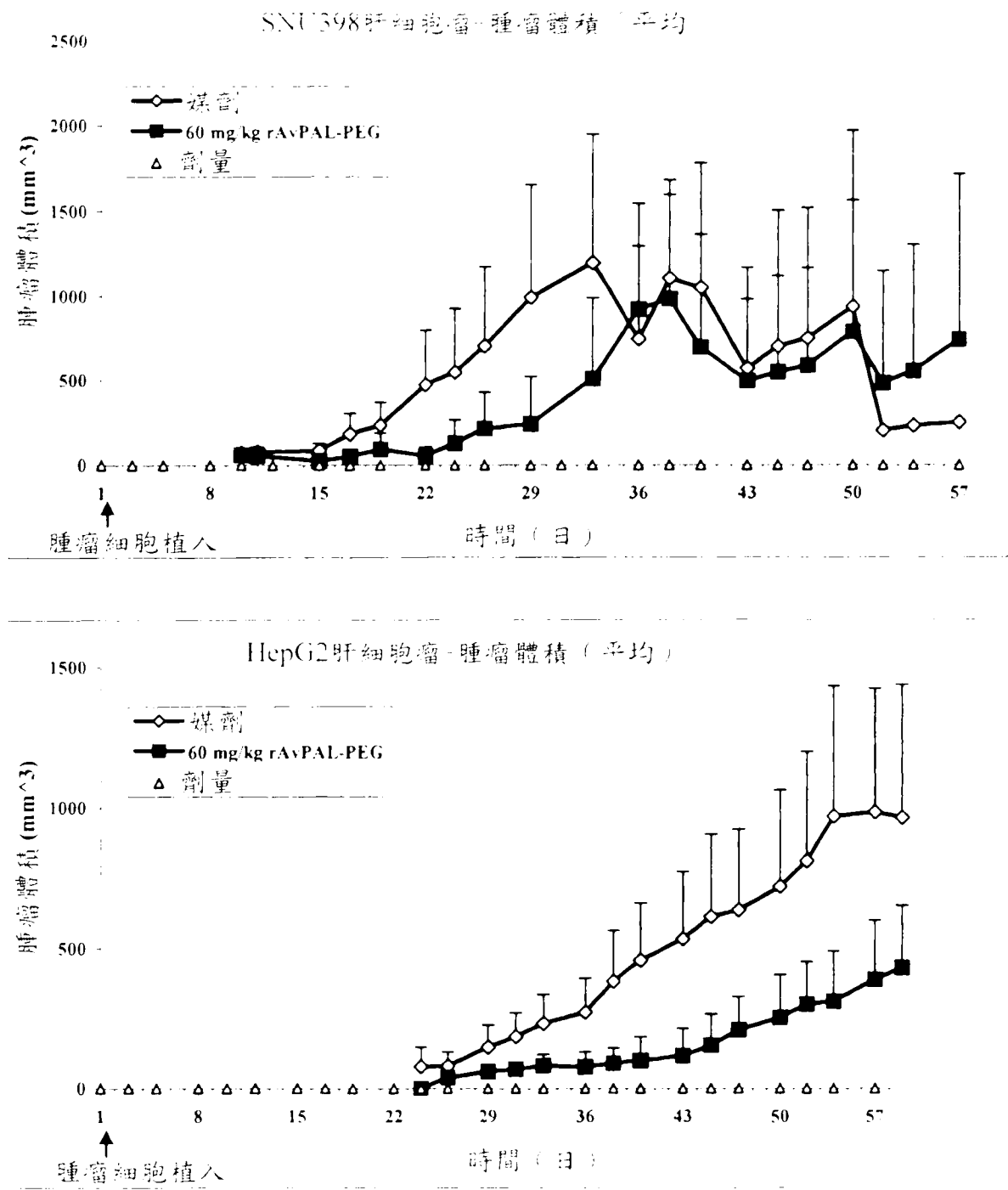


圖19

七、指定代表圖：

(一)本案指定代表圖為：第 (18) 圖。

(二)本代表圖之元件符號簡單說明：

(無元件符號說明)

八、本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式：

(無)

化。所產生之 σ 複合物藉由阻止任何鹼基接近酶之結合袋來阻止質子自環中吸出。環外雙鍵之形成為氫消除、再芳族化及斷裂之關鍵。MIO輔基再生且形成產物尿刊酸酯(urocanate)或肉桂酸酯(Poppe等人, Angew. Chem. Int. Ed. 44: 3668-3688 (2005))。

由於HAL與PAL之間的高同源性，因此HAL與PAL之保守區域稱為HAL/PAL保守區。該高同源性會在如NCBI之資料庫中在"PAL-HAL"蛋白質之潛在酶活性方面造成一些含糊而導致誤標，諸如NCBI資料庫中關於點形念珠藻及多變魚腥藻所列之蛋白質序列。因此，一些PAL酶可能被誤標為HAL酶。雖然PAL及HAL之活性位點極其相似，但預計其在一些關鍵殘基方面不同(Calabrese等人, Biochemistry 43 (36): 11403-11416 (2004); Xiang等人, (2002), 同上; Williams等人, (2005), 同上)。尤其在HAL中，惡臭假單胞菌之甲硫胺酸383及麩胺酸415(SEQ ID NO: 6)在所有HAL中為高度保守的，但在迄今所述之所有PAL(真核生物或原核生物)中總是分別經離胺酸及麩胺酸置換(圖4)。因此可認為具有"PAL-HAL"區域且具有離胺酸383及麩胺酸415之同源物的所有蛋白質具有帶PAL活性之蛋白質之序列標誌。該相對新近描述之PAL標誌(Williams等人, (2005), 同上)使得正確標記自HAL至PAL之一些酶且可用於自己公開之基因及蛋白質資料庫中鑑別出一些新穎PAL酶。

本發明係關於該原核生物PAL及其生物學活性片段、突

十、申請專利範圍：

1. 一種醫藥組合物，其包含(a)多變魚腥藻(*Anabaena variabilis*)苯丙胺酸解氨酶(AvPAL)變異體，其中該AvPAL變異體之位置565之半胱胺酸殘基已經絲胺酸殘基取代(SEQ ID NO:10)，及(b)包含穩定劑之醫藥學上可接受之載劑，其中該穩定劑為L-苯丙胺酸或其結構類似物。
2. 一種醫藥組合物，其包含(a) AvPAL變異體，其中該AvPAL變異體之位置503及565之半胱胺酸殘基已經絲胺酸殘基取代(SEQ ID NO:11)，及(b)包含穩定劑之醫藥學上可接受之載劑，其中該穩定劑為L-苯丙胺酸或其結構類似物。
3. 如請求項1或2之醫藥組合物，其中該穩定劑為L-苯丙胺酸。
4. 如請求項1或2之醫藥組合物，其中該穩定劑為反式肉桂酸。
5. 如請求項1或2之醫藥組合物，其中該穩定劑為苯甲酸。
6. 一種醫藥組合物，其包含(a) AvPAL變異體，其中該AvPAL變異體之位置503及565之半胱胺酸殘基已經絲胺酸殘基取代(SEQ ID NO: 11)，且該AvPAL變異體進一步包含聚乙二醇，及(b)包含穩定劑之醫藥學上可接受之載劑，其中該穩定劑為L-苯丙胺酸或其結構類似物。
7. 如請求項6之醫藥組合物，其中該穩定劑為L-苯丙胺酸。

8. 如請求項6之醫藥組合物，其中該穩定劑為反式肉桂酸。
9. 如請求項6之醫藥組合物，其中該穩定劑為苯甲酸。
10. 如請求項6至9中任一項之醫藥組合物，其中AvPAL變異體與聚乙二醇之比率為約1:3。
11. 一種醫藥組合物之用途，其係用以製備用於治療個體癌症之藥物，其中該醫藥組合物包含：(a) AvPAL變異體，其中該AvPAL變異體之位置503之半胱胺酸殘基已經絲胺酸殘基取代(SEQ ID NO: 9)，且其中該AvPAL變異體進一步包含聚乙二醇，及(b)包含穩定劑之醫藥學上可接受之載劑，其中該穩定劑為L-苯丙胺酸或其結構類似物。
12. 一種醫藥組合物之用途，其係用以製備用於治療個體癌症之藥物，其中該醫藥組合物包含：(a) AvPAL變異體，其中該AvPAL變異體之位置565之半胱胺酸殘基已經絲胺酸殘基取代(SEQ ID NO: 10)，且其中該AvPAL變異體進一步包含聚乙二醇，及(b)包含穩定劑之醫藥學上可接受之載劑，其中該穩定劑為L-苯丙胺酸或其結構類似物。
13. 如請求項11或12之用途，其中該穩定劑為L-苯丙胺酸。
14. 如請求項11或12之用途，其中該穩定劑為反式肉桂酸。
15. 如請求項11或12之用途，其中該穩定劑為苯甲酸。
16. 一種醫藥組合物之用途，其係用以製備用於治療個體癌症之藥物，其中該醫藥組合物包含：(a) AvPAL變異體，其中該AvPAL變異體之位置503及565之半胱胺酸殘基已經絲胺酸殘基取代(SEQ ID NO: 11)，且其中該AvPAL變

異體進一步包含聚乙二醇，及(b)包含穩定劑之醫藥學上可接受之載劑，其中該穩定劑為L-苯丙胺酸或其結構類似物。

17. 如請求項16之用途，其中該穩定劑為L-苯丙胺酸。
18. 如請求項16之用途，其中該穩定劑為反式肉桂酸。
19. 如請求項16之用途，其中該穩定劑為苯甲酸。
20. 如請求項17至19中任一項之用途，其中該AvPAL變異體與該聚乙二醇之比率為約1:3。
21. 如請求項16之用途，其中該醫藥組合物包含治療有效量之AvPAL變異體，其使個體之血液、血清或血漿苯丙胺酸濃度降低至小於60 μM 。
22. 如請求項16之用途，其中該癌症係肺癌、腦癌、中樞神經系統癌症、結腸癌、前列腺癌、腎癌、頭頸癌、卵巢癌、子宮癌、膀胱癌、乳癌、胰臟癌、急性骨髓白血病、急性淋巴母細胞白血病、骨髓瘤、兒科癌或抗性癌。
23. 如請求項16之用途，其中該癌為轉移性黑色素瘤。
24. 如請求項16之用途，其中源自癌症細胞之增殖及/或存活係對苯丙胺酸之限制或耗盡敏感。
25. 如請求項16之用途，其中該藥物係用於投與治療有效量之包含癌症治療劑或靶向癌症治療劑之醫藥組合物至該個體。
26. 如請求項16之用途，其中該藥物係用於向該個體投與蛋白質限制性飲食。

27. 如請求項16之用途，其中該醫藥組合物包含治療有效量之AvPAL變異體，其可將該個體之血液、血清或血漿中之苯丙胺酸濃度降低至小於約20 μ M的範圍。
28. 如請求項16之用途，其中該醫藥組合物包含治療有效量之AvPAL變異體，其可將該個體之血液、血清或血漿中之苯丙胺酸濃度降低至小於約10 μ M的範圍。
29. 如請求項16之用途，其中該個體為人類。
30. 一種醫藥組合物之用途，其係用以製備用於降低罹癌個體血液、血清或血漿中苯丙胺酸濃度之藥物，其中該醫藥組合物包含：(a) AvPAL變異體，其中該AvPAL變異體之位置503及565之半胱胺酸殘基已經絲胺酸殘基取代 (SEQ ID NO: 11)，且其中該AvPAL變異體進一步包含聚乙二醇，及(b)包含穩定劑之醫藥學上可接受之載劑，其中該穩定劑為L-苯丙胺酸或其結構類似物。
31. 如請求項30之用途，其中該AvPAL變異體與該聚乙二醇之比率為約1:3。
32. 如請求項30之用途，其中該醫藥組合物包含治療有效量之AvPAL變異體，其使該個體之血液、血清或血漿苯丙胺酸濃度降低至小於60 μ M。
33. 如請求項32之用途，其中該穩定劑為L-苯丙胺酸。
34. 如請求項32之用途，其中該穩定劑為反式肉桂酸。
35. 如請求項32之用途，其中該穩定劑為苯甲酸。