



(45) 授权公告日 2014.05.07

[illegible]

1. 药物组合物,其包含 (a)AvPAL 变体,其中所述 AvPAL 变体第 503 和 565 位的半胱氨酸残基被丝氨酸残基替代 (SEQIDNO:11),且所述 AvPAL 变体被聚乙二醇化,和 (b) 药学上可接受的载体,包括稳定剂,其中所述稳定剂是 L- 苯丙氨酸或其结构类似物。
2. 权利要求 1 的药物组合物,其中所述稳定剂是 L- 苯丙氨酸。
3. 权利要求 1 的药物组合物,其中所述稳定剂是反式肉桂酸。
4. 权利要求 1 的药物组合物,其中所述稳定剂是安息香酸。
5. 权利要求 1-4 任意一项所述的药物组合物,其中 AvPAL 变体与聚乙二醇的比例为 1:3。
6. 权利要求 1 的药物组合物在制备治疗个体癌症的药物中的应用。
7. 权利要求 6 的应用,其中所述药物被制备成将所述个体血液、血清或血浆中的苯丙氨酸浓度降低到小于 60 微摩。
8. 权利要求 6 的应用,其中所述药物被制备成将个所述体血液、血清或血浆中的苯丙氨酸浓度降低到小于 20 微摩。
9. 权利要求 6 的应用,其中所述药物被制备成将所述个体血液、血清或血浆中的苯丙氨酸浓度降低到小于 10 微摩。
10. 权利要求 6 的应用,其中所述癌症是肺癌、脑癌、中枢神经系统癌、结肠癌、前列腺癌、肾癌、头颈癌、卵巢癌、子宫癌、膀胱癌、乳腺癌、胰腺癌、急性髓性白血病、急性淋巴母细胞白血病、骨髓瘤、儿童癌症和耐药性癌症。
11. 权利要求 6 的应用,其中所述癌症是转移性黑色素瘤。
12. 权利要求 6 的应用,其中源自所述癌症的细胞的增殖和 / 或生存对苯丙氨酸限制或去除敏感。
13. 权利要求 6 的应用,其中所述药物被制备成与癌症治疗剂或靶向癌症的治疗剂组合施用。
14. 权利要求 6 的应用,其中所述药物被制备成与蛋白限制性饮食组合施用。
15. 权利要求 1 的药物组合物在制备降低癌症个体血液、血清或血浆中的苯丙氨酸浓度的药物中的应用。
16. 权利要求 15 的应用,其中所述药物被制备成将所述个体血液、血清或血浆中的苯丙氨酸浓度降低到小于 60 微摩。
17. 权利要求 6 或 15 的应用,其中所述个体是人类个体。
18. 权利要求 6 或 15 的应用,其中所述稳定剂是 L- 苯丙氨酸。
19. 权利要求 6 或 15 的应用,其中所述稳定剂是反式肉桂酸。
20. 权利要求 6 或 15 的应用,其中所述稳定剂是安息香酸。

原核苯丙氨酸氨裂合酶的组合物及其组合物在制备治疗癌症的药物中的应用

发明领域

[0001] 本发明涉及原核苯丙氨酸氨裂合酶 (PAL) 及其组合物, 以及对这种组合物的优化以增强原核 PAL 催化活性和 / 或稳定性并降低原核 PAL 的免疫原性和 / 或蛋白水解敏感性。本发明还涉及原核 PAL 的这种最优组合物用于治疗癌症的用途。

[0002] 发明背景

[0003] PAL 是一种在植物中广泛分布的非哺乳动物酶 (Koukol 等, J. Biol. Chem. 236 : 2692-2698 (1961) ; Hanson 等, The Enzymes 7 : 75-166 (1972) ; Poppe 等, Curr. Org. Chem. 7 : 1297-1315 (2003)), some fungi (Rao 等, Can. J. Biochem. 45 : 1863-1872 (1967) ; Abell 等, Methods Enzymol. 142 : 242-253 (1987)) and bacteria (Bezanson 等, Can. J. Microbiol. 16 : 147-151 (1970) ; Xiang 等, J. Biol. Chem. 277 : 32505-32509 (2002) ; Hill 等, Chem. Commun. 1358-1359 (2003)), 并且可以在大肠杆菌中重组产生。

[0004] PAL 的代表性名单包括 : Q9ATN7 藿香 ; 093967 毒蝇伞 (Fly agaric) ; P35510, P45724, P45725, Q9SS45, Q8RWP4 拟南芥 (Mouse-ear cress) ; Q6ST23 绿竹 (斑竹) ; Q42609 Bromheadia finlaysoniana (兰花) ; P45726 Camellia sinensis (茶) ; Q9MAX1 Catharanthus roseus (长春花) (Madagascarperiwinkle) ; Q9SMK9 Cicer arietinum (鹰嘴豆) ; Q9XFX5, Q9XFX6 Citrus Clementina x Citrus reticulate ; Q42667 Citrus limon (柠檬) ; Q8H6V9, Q8H6W0 Coffea canephora (粗壮咖啡) ; Q852S1 Daucus carota (胡萝卜) ; 023924 Digitalis lanata (毛地黄) ; 023865 Daucus carota (胡萝卜) ; P27991 Glycine max (大豆) ; 004058 Helianthus annuus (普通向日葵) ; P14166, Q42858 Ipomoea batatas (甘薯) ; Q8GZR8, Q8W2E4 Lactuca sativa (莴苣) ; 049835, 049836 Lithospermum erythrorhizon ; P35511, P26600 Lycopersicon esculentum (番茄) ; P35512 Malus domestica (苹果) (Malus sylvestris) ; Q94C45, Q94F89 Manihot esculenta (木薯属) (木薯) ; P27990 Medicago sativa (苜蓿) ; P25872, P35513, P45733 Nicotiana tabacum (普通烟草) ; Q6T1C9 Quercus suber (栓皮栎) ; P14717, P53443, Q7M1Q5, Q84VE0, Q84VE0 Oryza sativa (稻米) ; P45727 Persea americana (鳄梨) ; Q9AXI5 Pharbitis nil (Violet) (日本牵牛花) ; P52777 Pinus taeda (火炬松) ; Q01861, Q04593 Pisum sativum (豌豆) ; P24481, P45728, P45729 Petroselinum crispum (欧芹) (Petroselinum hortense) ; Q84LI2 Phalaenopsis x Doritaenopsis 杂交品种 ; P07218, P19142, P19143 Phaseolus vulgaris (菜豆) (French bean) ; Q7XJC3, Q7XJC4 Pinus pinaster (海岸松) ; Q6UD65 Populus balsamifera subsp. trichocarpa x Populus deltoides ; P45731, Q43052, 024266 Populus kitakamiensis (白杨) ; Q8H6V5, Q8H6V6 Populus tremuloides (颤杨) ; P45730 Populus trichocarpa (Western balsampoplar) ; 064963 Prunus avium (樱桃) ; Q94EN0 Rehmannia glutinosa ; P11544 圆红冬孢酵母 (Rhodosporidium toruloides) (酵母) (细红酵母 (Rhodotorulagracilis)) ; P10248 深红酵母 (Rhodotorula rubra) (酵母) (胶红酵母 (Rhodotorulamucilaginosa)) ; Q9M568,

Q9M567 *Rubus idaeus*(悬钩子);P31425, P31426 *Solanum tuberosum*(马铃薯);Q6SPE8 *Stellaria longipes*(Longstalk starwort); P45732 *Stylosanthes humilis*(Townsville stylo);P45734 *Trifolium subterraneum*(地三叶 (Subterranean clover));Q43210, Q43664 *Triticum aestivum*(小麦);Q96V77 *Ustilago maydis*(黑粉菌);P45735 *Vitis vinifera*(葡萄);和 Q8VXG7 *Zea mays*(玉蜀黍)。

[0005] 大量研究集中于使用酶苯丙氨酸氨裂合酶 (PAL, EC 4.3.1.5) 用于苯丙酮尿症 (PKU) 的酶替代治疗 (Hoskins 等, *Lancet* 1(8165):392-394(1980);Gilbert 等, *Biochem. J.* 199(3):715-723(1981);Hoskins, J. A. 等, *Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol.* 35(2):275-282(1982);Sarkissian 等, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96(5):2339-2344(1999);Liu 等, *Artif. Cells Blood Substit. Immobil. Biotechnol.* 30(4):243-257(2002);Wieder 等, *J. Biol. Chem.* 254(24):12579-12587(1979);Gamez 等, *Mol. Ther.* 11(6):986-989(2005);Ambrus 等, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 224(3):598-602(1983);Ambrus 等, *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, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 131(2):557-563(1985);Pedersen, *Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol.* 20(3):559-569(1978);Marconi 等, *Biochimie* 62(8-9):575-580(1980);Larue 等, *Dev. Pharmacol. Ther.* 9(2):73-81(1986);Ambrus 等, *Ann. Intern. Med.* 106(4):531-537(1987);Bourget 等, *Appl. Biochem. Biotechnol.* 10:57-59(1984);Bourget 等, *FEBS Lett.* 180(1):5-8(1985);Bourget 等, *Biochim. Biophys. Acta* 883(3):432-438(1986);Chang 等, *Artif. Cells Blood Substit. Immobil. Biotechnol.* 23(1):1-21(1995);Chang 等, *Mol. Biotechnol.* 17(3):249-260(2001);美国专利号 5,753,487)。

[0006] PAL 用于癌症治疗的用途已经被提出,这是基于其限制向癌细胞的苯丙氨酸营养提供从而抑制肿瘤生长的能力 (Fritz 等, *J. Biol. Chem.* 251(15):4646-4650(1976);Roberts 等, *Cancer Treat. Rep.* 60(3):261-263(1976);Shen 等, *Cancer Res.* 37(4):1051-1056(1977);Shen 等, *Cancer Treat. Rep.* 63(6):1063-1068(1979);Wieder 等, *J. Biol. Chem.* 254(24):12579-12587(1979))。此外, PAL 介导的苯丙氨酸降低阻止了小鼠白血病和转移性黑色素瘤的增殖。但是,在 13 次注射后静脉注射的聚乙二醇化 PAL 被快速从循环血液中清除 (Abell 等, *Cancer Res.* 33:2529-2532(1973);Roberts 等, (1976), 同前;Shen 等, (1977), 同前;(Shen 等, *J. Reticuloendothelial Soc.* 23:167-175(1978))。

[0007] 一些肿瘤或癌细胞对于必需氨基酸诸如苯丙氨酸具有比正常细胞更高的代谢率和更大的需求。文献中有证据表明,特异氨基酸(例如,苯丙氨酸)通过使用氨基酸降解酶(例如, PAL)的限制或减少,可以在人类癌症患者和动物模型中减少某些肿瘤细胞的生长。例如,一些白血病细胞缺少酶天冬酰胺合成酶,其从谷氨酰胺合成非必需氨基酸天门冬酰胺,因此所述白血病细胞为了生存依赖于天门冬酰胺。Oncaspar(培门冬酶, Enzon Pharmaceuticals, Inc.), 一种聚乙二醇化的 L-天冬酰胺酶, 已经被成功用于治疗急性淋巴母细胞白血病 (ALL) (Graham, *Adv. Drug Del. Rev.* 55:1293-1302(2003))。癌症疗法中用于酶去除 (enzymatic depletion) 潜在靶标的氨基酸其他实例包括谷氨酰胺(谷氨酰胺脱氨酶, Medical Enzymes AG), 精氨酸(精氨酸脱氨酶, Phoenix Pharmacologies,

Inc.) 和甲硫氨酸 (甲硫氨酸酶, Anticancer, Inc.) (参见, 例如, 美国专利号 6, 312, 939, 6, 737, 259 和 5, 690, 929)。

[0008] 苯丙氨酸的饮食限制已经显示在动物模型中抑制高侵袭转移性黑色素瘤和不依赖雄激素的前列腺癌细胞的生长和转移, 在培养中促进肿瘤细胞而不是正常细胞的凋亡, 增加荷瘤小鼠的存活率, 使肿瘤细胞对化疗剂敏感, 和增强毒素的细胞毒性 (Fu 等., Nutr. Cancer 31:1-7(1998); Fu 等, Cancer Res. 59:758-765(1999); Fu 等, Nutr. Cancer 45:60-73(2003); Fu 等, J. Cell. Physiol. 209:522-534(2006); Meadows 等, Cancer Res. 42:3056-3063(1982); Elstad 等, Anticancer Res. 13:523-528(1993); Elstad 等, Nutr. Cancer 25:47-60(1996); Nunez 等, Cancer Lett. 236:133-141(2006))。

[0009] 利用来自圆红冬孢酵母 (*Rhodospiridium toruloides*) (亦称为粘红酵母 (*Rhodotorula glutinis*)) 的 PAL 酶 (RtPAL) 去除苯丙氨酸在体外培养中 (Abell 等, Cancer Res. 32:285-290(1972); Stith 等, Cancer Res. 33:966-971(1973)) 和小鼠体内 (Abell 等, Cancer Res. 33:2529-2532(1973)) 抑制白血病淋巴细胞的生长。但是, 在重复给小鼠注射后, RtPAL 的血浆清除率大大加速, 并且与非荷瘤小鼠相比, 荷瘤小鼠中的清除率更快 (Fritz 等, J. Biol. Chem. 251:4646-4650(1976); Shen 等, Cancer Res. 37:1051-1056(1977))。在多次施用后由于抗体滴度的增加, RtPAL 的半衰期减少到约 1 小时, 表明全身辐射可能是延缓清除率和延长半衰期必需的 (Shen 等, J. Reticuloendothelial Soc. 23:167-175(1978))。

[0010] 已经将 RtPAL 聚乙二醇化以求减少酶的免疫原性和体内的清除率 (Wieder 等, J. Biol. Chem. 254:12579-12587(1979))。在给小鼠单次静脉注射或多次静脉注射后, 聚乙二醇化 RtPAL 的血液半衰期长于未聚乙二醇化的 RtPAL; 但是, 在第十三次静脉注射后聚乙二醇化的 RtPAL 仍然被快速从血液清除。

[0011] 尽管 PAL 潜在地具有各种治疗应用, 但 PAL 的使用受到降低的比活性和蛋白水解不稳定性的限制。与其他治疗蛋白类似, 使用 PAL 作为酶疗法伴随有数个缺点, 诸如免疫原性和蛋白水解敏感性 (see Vellard, Curr. Opin. Biotechnol. 14:1-7(2003))。到目前为止, 改进这些参数的共同努力还没有实现, 这归因于对该蛋白结构和生化知识的贫乏。

[0012] 因此, 对于治疗用途包括治疗癌症来说仍然存在对具有最优动力学特性, 包括有效的催化活性、更长的生物半衰期、更高的生化稳定性、和 / 或减弱的免疫原性的 PAL 分子的需要。

[0013] 发明概述

[0014] 本发明基于以下发现, 原核或细菌 PAL 可以作为癌症的有效治疗。本发明涉及具有提高的特性, 例如对于治疗应用来说更有效的催化活性, 更高的生化稳定性, 减弱的免疫原性和 / 或更长的生物半衰期的原核 PAL 及其生物活性片段、突变体、变体或类似物。本发明提供药物组合物和制剂, 包括原核 PAL 及其生物活性片段、突变体、变体或类似物和药学上可接受的载体, 包括稳定剂。本发明还提供原核 PAL 及其生物活性片段、突变体、变体或类似物的生产和纯化方法, 以及使用这种组合物用于治疗目的的方法, 包括肿瘤性疾病和癌症的治疗。

[0015] 如本文所用, “细菌 PAL” 和 “原核 PAL” 可以互换使用, 表示 (1) 来自原核生物的野生型 PAL, 包括但不限于来自 *Streptomyces maritimus* (亦称为 EncP, SEQ ID NO:5,

图 4)、点形念珠藻 (*Nostoc punctiforme*) (SEQ ID NO:2, 图 4)、多变鱼腥藻 (*Anabaena variabilis*) (SEQ ID NO:4, 图 4)、组囊藻 (*Anacystis nidulans*) (Löfflehardt, Z. Naturforsch. 31(11-12):693-9(1976))、发光杆菌 (*Photobacterium luminescens*) TT01 (Williams 等, Microbiology 151:2543-2550(2005)) 和轮枝链霉菌 (*Streptomyces verticillatus*) (Bezanson 等, Can. J. Microbiol. 16(3):147-51(1970)) 的 PAL; (2) 这种野生型 PAL 酶的片段、突变体、变体或类似物, 其保留对苯丙氨酸类似的 (即, 至少 50%) 的催化活性, 并且优选地显示出增加的催化活性, 更高的生化稳定性, 增加的半衰期, 和 / 或降低的免疫原性, 和 (3) 这种野生型 PAL 酶或其片段、突变体、变体或类似物的化学修饰形式, 它们与其他化学基团连接以提供其他有益的效果, 诸如, 例如但不限于, 延长的半衰期和 / 或降低的免疫原性。例如, 任一提及为了治疗目的的制备或使用原核 PAL 及其片段、突变体、变体、类似物或化学修饰形式和这种酶的组合物旨在表示制备、使用或配制所有这种野生型原核 PAL 或其片段、突变体、变体、类似物或化学修饰的方法。

[0016] 第一个方面, 本发明提供药物组合物, 其包括细菌 PAL 及其生物活性片段、突变体、变体或类似物, 和药学上可接受的载体。优选的实施方案是来自点形念珠藻 (*Nostoc punctiforme*) 的细菌 PAL (SEQ ID NO:2) 或其生物活性片段、突变体、变体或类似物。另一优选的实施方案是来自多变鱼腥藻 (*Anabaena variabilis*) 的细菌 PAL (SEQ ID NO:4) 或其生物活性片段、突变体、变体或类似物。本发明涉及与野生型 PAL 相比具有更高苯丙氨酸转化活性和 / 或降低的免疫原性的原核 PAL 变体。

[0017] 优选地, 原核 PAL 变体保留对应于圆红冬孢酵母 PAL (RtPAL) 的 Ser210、Ala-Ser-Gly 三联体 (211-213)、Asp 214、Leu 215、Asn 270、Val 269、Leu 266、Leu 134、His 137、Lys 468、Glu 496、Gln 500 位的野生型活性位点残基或这些活性位点残基的保守替代, 其中第 211-213 位的 Ala-Ser-Gly 三联体被认为是苯丙氨酸的结合位点。

[0018] 优选的原核 PAL 变体可以包括其中一个或多个氨基酸残基被另一氨基酸残基替代以减少蛋白聚集的蛋白, 所述蛋白聚集可能与降低的酶活性, 增加的免疫原性, 和 / 或其他不利影响例如体内降低的生物利用率有关。本发明涉及一种药物组合物, 其中原核 PAL 变体的一个或多个氨基酸残基被另一氨基酸替代, 其中与野生型 PAL 相比, 所述替代增加苯丙氨酸转化活性和 / 或降低免疫原性。

[0019] 在一些实施方案中, 原核 PAL 变体的一个或多个氨基酸残基被另一氨基酸残基替代。在一些实施方案中, 原核 PAL 变体的一个或多个半胱氨酸残基被丝氨酸残基替代。在优选的实施方案中, 原核 PAL 变体是多变鱼腥藻 PAL (AvPAL)。在更优选的实施方案中, AvPAL 变体的一个或多个半胱氨酸残基被丝氨酸残基替代, 所述半胱氨酸残基选自第 64、318、503 和 565 位的半胱氨酸残基组成的组。在更优选的实施方案中, AvPAL 变体第 565 位的半胱氨酸残基被丝氨酸残基替代。在最优选的实施方案中, AvPAL 变体第 503 和 565 位的半胱氨酸残基被丝氨酸残基替代。

[0020] 优选的原核 PAL 变体可以包括融合蛋白, 其中 PAL 酶与本领域已知能增加半衰期或被对癌症的具体形式具有特异性的蛋白所识别的另一异源多肽融合, 该另一异源多肽例如免疫球蛋白的天然或修饰恒定区或其保留有救济表位 (salvage epitope) 片段。

[0021] 本发明还涉及这种原核 PAL 多肽的化学修饰形式, 其与提供其他有益的作用的化学基团连接。例如, 本领域已知水溶性聚合物例如聚乙二醇与多肽的非特异性或位点特异

性（例如，N 端）键合能延长半衰期，化学基团的键合还可以降低免疫原性和 / 或提高蛋白酶抗性。

[0022] 在一些实施方案中，原核 PAL 变体包括水溶性聚合物。在优选的实施方案中，原核 PAL 变体包括聚乙二醇。在更优选的实施方案中，原核 PAL 变体是多变鱼腥藻 PAL (AvPAL)，AvPAL 和聚乙二醇的比例是约 1 : 3 (1 : 3AvPAL : PEG)。在最优选的实施方案中，原核 PAL 变体是 AvPAL 变体，AvPAL 变体和聚乙二醇的比例是约 1 : 3 (1 : 3AvPALrPEG)，AvPAL 变体第 503 和 565 位的半胱氨酸残基被丝氨酸残基替代。

[0023] 在一些实施方案中，原核 PAL 变体的一个或多个氨基酸残基被赖氨酸残基替代。原核 PAL 变体中添加的赖氨酸残基的聚乙二醇化可以导致酶具有降低的免疫原性，增加的催化活性，和 / 或提高的生化稳定性。不受具体理论束缚，假定位于 / 邻近原核 PAL 活性位点（例如，AvPAL 的第 78 位）的酪氨酸残基可以是用于聚乙二醇化的位点，该聚乙二醇化降低酶活性。在优选的实施方案中，位于 / 邻近原核 PAL 变体活性位点的一个或多个氨基酸（不是酶活性所需要的）被赖氨酸残基替代。不受具体理论束缚，假定位于 / 邻近活性位点的替代赖氨酸残基的聚乙二醇化在空间上阻止酪氨酸残基（例如，AvPAL 的第 78 位）被聚乙二醇化。

[0024] 这种原核 PAL 变体根据本发明的方法分离和纯化，并因而以能够在治疗上利用原核 PAL 酶的量存在。在一些实施方案中，使用编码完整或野生型原核 PAL 的 cDNA。但是，在其他实施方案中，可以使用编码其生物活性片段、突变体、变体或类似物的 cDNA。此外，本发明提供通过基于结构的分子工程方法获得的优化的原核 PAL 和 / 或化学修饰（例如，聚乙二醇化）形式的 PAL 的组合物。具体实施方案涉及适于治疗用途的原核 PAL 的最优组合，其具有提高的比活性，增强的稳定性，降低的免疫原性和 / 或蛋白水解敏感性。优选的实施方案是点形念珠藻 PAL 的聚乙二醇化形式，其具有提高的比活性，增强的稳定性，降低的免疫原性和 / 或蛋白水解敏感性。另一优选的实施方案是多变鱼腥藻 PAL 的聚乙二醇化形式，其具有提高的比活性，增强的稳定性，降低的免疫原性和 / 或蛋白水解敏感性。

[0025] 在一些实施方案中，本发明的野生型原核 PAL 的生物活性位点可以按照需要进行修饰以优化 PAL 动力学特性。在优选的实施方案中，利用本领域公知的标准检测方法，修饰的原核 PAL 具有足够的活性以将接受治疗的个体的血浆苯丙氨酸水平降低到从低于检测水平到约 20 微摩和 60 微摩之间的范围，优选地低于约 20 微摩，甚至更优选地低于约 10 微摩。在其他优选的实施方案中，生物活性改变的原核 PAL 具有的 k_{cat} 为至少约 $0.1s^{-1}$ ，优选的大于约 $0.5s^{-1}$ ，甚至更优选的大于约 $1.0s^{-1}$ 。在其他优选的实施方案中，生物活性改变的原核 PAL 具有的 k_{cat} 为至少约 $0.4s^{-1}$ ，优选的大于约 $2.0s^{-1}$ ，甚至更优选的大于约 $4.0s^{-1}$ 。在其他优选的实施方案中，生物活性改变的原核 PAL 具有的 K_m 为约 10 微摩到约 2000 微摩。在更优选的实施方案中，生物活性改变的原核 PAL 具有的 K_m 为约 10 微摩到约 1000 微摩。在甚至更优选的实施方案中，生物活性改变的原核 PAL 具有的 K_m 为约 10 微摩到约 500 微摩。在其他优选的实施方案中，生物活性改变的原核 PAL 显示的酶活性为野生型 PAL 的约至少 50% 到大于野生型 PAL 的约 10 倍。在其他优选的实施方案中，生物活性改变的原核 PAL 显示的酶活性为野生型 PAL 的约至少 50% 到比野生型 PAL 高约 100%。这种生物学活性改变的原核 PAL 蛋白可以利用本领域公知的方法形成，例如通过定点诱变。

[0026] 在进一步的实施方案中，本发明涉及代谢苯丙氨酸（即，将苯丙氨酸转化为另一

物质)的原核 PAL 或其生物活性片段、突变体、变体或类似物在制备预防或治疗个体的癌症的药物中的用途,所述个体优选的为人类个体,以及用于预防或治疗个体的癌症的包含原核 PAL 或其生物活性片段、突变体、变体或类似物的药物组合物,所述个体优选为人类个体。在一些实施方案中,所述药物用于在人类个体中预防癌症。在其他实施方案中,所述药物用于在人类个体中治疗癌症。在优选的实施方案中,所述药物组合物包含来自细菌的高度纯化的 PAL,或其生物活性片段、突变体、变体或其类似物,和药学上可接受的载体。优选的制剂包含纯度大于 90%、95%、96%、97%、98%、99%、99.2%、99.5%、99.6%、99.7%、99.8%、或 99.9% 的原核 PAL 或其生物活性片段、突变体、变体或类似物。本发明原核 PAL 或其生物活性片段、突变体、变体或类似物的相对比活性优选为野生型原核 PAL 比活性的至少约 50%,更优选大于约 110%。

[0027] 第二个方面,本发明描述了利用原核 PAL 变体组合物用于治疗目的的新方法。本发明涉及治疗各种形式癌症的方法。

[0028] 在一个实施方案中,本发明涉及通过给需要这种治疗的个体施用治疗有效量的药物组合物来治疗癌症的方法,所述药物组合物包含原核 PAL 变体和药学上可接受的载体,其中与野生型 PAL 相比,所述原核 PAL 变体具有更高的苯丙氨酸转化活性和 / 或降低的免疫原性,可以有效地将个体血液、血清或血浆(优选的为血浆)中的苯丙氨酸浓度降低到从低于检测水平到约 20 微摩和 60 微摩之间的范围,优选低于约 20 微摩,甚至更优选地低于约 10 微摩。在一些实施方案中,原核 PAL 变体的一个或多个氨基酸残基被另一氨基酸残基替代,其中与野生型 PAL 相比,所述替代增加苯丙氨酸转化活性和 / 或降低免疫原性。在一些实施方案中,原核 PAL 变体的一个或多个半胱氨酸残基被另一氨基酸残基替代。在一些实施方案中,原核 PAL 变体的一个或多个半胱氨酸残基被丝氨酸残基替代。在优选的实施方案中,原核 PAL 变体是多变鱼腥藻 PAL (AvPAL) 变体。在特别优选的实施方案中,AvPAL 变体的选自第 64、318、503 和 565 位半胱氨酸残基的一个或多个半胱氨酸残基被丝氨酸残基替代,在第 565 位被丝氨酸残基替代,或在第 503 和 565 位被丝氨酸残基替代。在一些实施方案中,原核 PAL 变体包含水溶性聚合物。在一些实施方案中,所述水溶性聚合物是聚乙二醇。在优选的实施方案中,原核 PAL 变体是多变鱼腥藻 PAL (AvPAL) 变体,AvPAL 变体和聚乙二醇的比例是约 1 : 3 (1 : 3AvPAL : PEG)。在更优选的实施方案中,原核 PAL 变体是多变鱼腥藻 PAL (AvPAL) 变体,AvPAL 变体和聚乙二醇的比例是约 1 : 3 (1 : 3AvPAL : PEG),并且 AvPAL 变体第 503 和 565 位的半胱氨酸残基被丝氨酸残基替代。

[0029] 在更特别优选的实施方案中,本发明提供一种治疗癌症的方法,包括给需要这种治疗的个体施用治疗有效量的药物组合物,所述药物组合物包含 AvPAL 变体和药学上可接受的载体,其中 AvPAL 变体第 503 和 565 位的半胱氨酸残基被丝氨酸残基替代,所述 AvPAL 变体还包含聚乙二醇的水溶性聚合物,其中 AvPAL 变体和聚乙二醇的比例是约 1 : 3,该 AvPAL 变体能够有效地将个体血液、血清或血浆(优选血浆)中的苯丙氨酸浓度降低到从低于检测水平到约 20 微摩和 60 微摩之间的范围,优选地低于约 20 微摩,甚至更优选地低于约 10 微摩。

[0030] 在广泛的实施方案中,癌症是其中源自该癌症的细胞的增殖和 / 或生存对苯丙氨酸限制或去除敏感的癌症。在优选的实施方案中,所述癌症是肺 癌,脑或中枢神经系统癌,结肠癌,前列腺癌,肾癌或转移性黑色素瘤。在其他优选的实施方案中,所述癌症是头颈癌,

卵巢癌, 子宫癌, 白血病 (例如, 急性髓性白血病或急性类淋巴母细胞白血病) 或骨髓瘤。在其他优选的实施方案中, 所述癌症是儿童癌症或耐药性癌症 (即, 已经显示对癌症治疗剂或靶向癌症治疗剂具有抗性)。

[0031] 本发明描述了治疗个体癌症的方法, 包括给个体施用原核 PAL 或其生物活性片段、突变体、变体或类似物, 其中与不施用原核 PAL 的浓度相比, 原核 PAL 的施用有效地降低了个体血液、血清或血浆 (优选血浆) 中的苯丙氨酸 (Phe) 浓度。根据本发明方法挑选接受治疗的个体可以具有任意血浆 Phe 浓度, 例如, 约 40 微摩到约 2000 微摩, 或正常范围的血浆 Phe 浓度, 这种浓度范围可以是约 40 微摩到约 80 微摩, 更常见的范围是约 50 微摩到约 70 微摩, 大部分人类个体的范围是约 55 微摩到约 65 微摩。利用本领域公知的标准检测方法, 治疗时个体的血浆 Phe 浓度被降低到从低于检测水平到约 20 微摩和 60 微摩之间的范围, 优选地低于约 20 微摩, 甚至更优选地低于约 10 微摩。

[0032] 本发明还涉及治疗癌症的方法, 通过给需要这种治疗的个体施用治疗有效量的药物组合物和蛋白限制性 (即, 不含苯丙氨酸的) 饮食, 所述药物组合物包含原核 PAL 变体和药学上可接受的载体, 其中所述治疗有效地降低了没有联合施用情况下的个体血浆 Phe 浓度。利用本领域公知的标准检测方法, 治疗时个体的血浆 Phe 浓度被降低到从低于检测水平到约 20 微摩和 60 微摩之间的范围, 优选地低于约 20 微摩, 甚至更优选地低于约 10 微摩。

[0033] 在另一实施方案中, 原核 PAL 或其生物活性片段、突变体、变体或类似物可以与蛋白限制性饮食联合施用。本文方法中采用的蛋白限制性饮食 是一种苯丙氨酸限制性饮食, 其中个体的总 Phe 摄入量被限制为少于 600mg 每天。在其他实施方案中, 蛋白限制性饮食是苯丙氨酸限制性饮食, 其中总 Phe 被限制为低于 300mg 每天。仍在其他实施方案中, 蛋白限制性饮食添加了一种或多种氨基酸, 例如, 举例而非限制地, 酪氨酸、缬氨酸、异亮氨酸和 / 或亮氨酸。

[0034] 还涉及一种药物组合物, 所述药物组合物包含原核 PAL 或其生物活性片段、突变体、变体或其类似物, 和药学上可接受的载体、稀释剂或赋形剂。所述药物组合物还可以包含医药蛋白补充剂。仍在其他实施方案中, 所述蛋白补充剂不含苯丙氨酸。所述蛋白补充剂优选地是按照 20mg/100g 浓度添加的 L- 酪氨酸、L- 谷氨酰胺、L- 肉碱, 按照 40mg/100g 浓度添加的 L- 牛磺酸, 和硒加强。它还可以包含推荐的每日剂量的矿物质, 例如钙、磷和镁。补充剂还可以包含推荐的每日剂量的一种或多种氨基酸, 该氨基酸选自 L- 亮氨酸、L- 脯氨酸、L- 赖氨酸醋酸盐、L- 缬氨酸、L- 异亮氨酸、L- 精氨酸、L- 丙氨酸、甘氨酸、L- 天冬酰胺一水合物、L- 色氨酸、L- 丝氨酸、L- 苏氨酸、L- 组氨酸、L- 甲硫氨酸、L- 谷氨酸、和 L- 天门冬氨酸。此外, 所述补充剂还可以用推荐每日剂量的维生素 A、D 和 E 加强。补充剂优选地包含提供所述补充剂至少 40% 能量的脂肪含量。这种补充剂可以以采用粉末补充剂形式或蛋白棒形式提供。

[0035] 本发明还涉及通过给需要这种治疗的个体联合施用治疗有效量的药物组合物和癌症治疗剂或靶向癌症治疗剂来治疗癌症的方法, 所述药物组合物包含原核 PAL 变体和药学上可接受的载体, 其中所述治疗有效地降低了没有联合施用情况下的个体血浆苯丙氨酸浓度。利用本领域公知的标准检测方法, 治疗后个体的血浆 Phe 浓度被降低到从低于检测水平到约 20 微摩 和 60 微摩之间的范围, 优选地低于约 20 微摩, 甚至更优选地低于约 10

微摩。

[0036] 优选的实施方案包括优化待治疗的生物体所需的剂量以有效地预防或改善疾病症状,所述生物体优选地是哺乳动物或人。原核 PAL 可以按照以下方式施用:每日单次剂量,每日多次剂量,每周单次剂量,每周多次剂量,每月单次剂量或每月多次剂量。在一些实施方案中,PAL 疗法不是连续的,而是每天施用 PAL 直到个体的血浆 Phe 浓度利用本领域公知的标准检测方法检测降低到从低于检测水平到约 20 微摩和 60 微摩之间的范围,优选地低于约 20 微摩,甚至更优选地低于约 10 微摩。优选地,其中每天监测个体的血浆 Phe 浓度,当观察到血浆 Phe 浓度增加 10% -20% 时施用 PAL。在其他优选的实施方案中,剂量每周递送一次。本发明涉及至少 0.001mg/kg、0.005mg/kg、0.01mg/kg、0.05mg/kg 的剂量,可以高达每周 0.1mg/kg、0.5mg/kg、1.0mg/kg、5.0mg/kg、12mg/kg 或更高。优选的剂量是 1mg/kg/周,更优选的剂量是 0.1mg/kg/周,甚至更优选的剂量是 0.01mg/kg/周。

[0037] 涉及递送相当剂量的各种肠胃外或非肠胃外施用途径,包括口服、透皮、透粘膜、肺内(包括雾化)、肌内、皮下、或静脉内。还具体涉及通过直接推注或输入关节或 CSF 的施用,例如鞘内、脑内、心室内,通过腰椎穿刺或通过小脑延髓池。优选地通过皮下或口服递送所述剂量。

[0038] 还涉及其他在人类个体中增加原核 PAL 活性的方式,包括基因治疗。原核 PAL 基因的转移可通过本领域已知的各种方式实现,包括病毒载体,同源重组或直接 DNA 注射。属于这方面范围的实施方案是编码原核 PAL 或其生物活性片段、突变体、变体或类似物全部或一部分的核酸序列,其可以在体内施用给细胞,例如但不限于,被癌症感染的细胞、位于癌症附近或靠近癌症的细胞、在血流中循环和/或迁移到癌症部位的造血细胞。

[0039] 第三个方面,本发明提供原核 PAL 变体的药物组合物或制剂,其包含细菌 PAL 及其生物活性片段、突变体、变体或其类似物,和药学上可接受的载体,其中所述药学上可接受的载体包括稳定剂。在一些实施方案中,所述稳定剂是 L-苯丙氨酸或其结构类似物。在一些实施方案中,所述稳定剂选自 L-苯丙氨酸、反式肉桂酸和安息香酸。在一些实施方案中,所述稳定剂是 L-苯丙氨酸。在一些实施方式中,所述稳定剂是反式肉桂酸。在一些实施方式中,所述稳定剂是安息香酸。在优选的实施方案中,本发明提供了利用所述药物组合物或制剂治疗癌症的方法。

[0040] 在特别优选的实施方案中,所述药物组合物或制剂包含原核 PAL 变体和药学上可接受的载体,其中原核 PAL 变体是 AvPAL 变体,AvPAL 变体和聚乙二醇的比例是约 1 : 3 (1 : 3AvPAL : PEG),并且 AvPAL 变体第 503 和 565 位的半胱氨酸残基被丝氨酸残基替代,所述药学上可接受的载体包括稳定剂。在一些实施方案中,所述稳定剂是 L-苯丙氨酸或其结构类似物。在一些实施方案中,所述稳定剂选自 L-苯丙氨酸、反式肉桂酸和安息香酸。在一些实施方案中,所述稳定剂是 L-苯丙氨酸。在一些实施方式中,所述稳定剂是反式肉桂酸。在特别优选的实施方案中,本发明提供了利用所述药物组合物或制剂治疗癌症的方法。

[0041] 第四个方面,本发明描述一种以能够在治疗上利用酶的量产生重组原核 PAL 或其生物活性片段、突变体、变体或类似物的方法。本发明涉及源自细菌的 PAL,所述细菌包括但不限于链霉菌属 (*Streptomyces*)、堆囊粘细胞菌属 (*Sorangium*)、假单胞菌属 (*Pseudomonas*) 和蓝藻 (*cyanobacteria*) 如念珠藻和鱼腥藻。在一些实施方案中, PAL 源

自细菌种属 *Streptomyces maritimus*, 轮枝链霉菌, 纤维堆囊菌 (*Soragium cellulosum*), 点形念珠藻, *Nostoc tubum*, 多变鱼腥藻或恶臭假单胞菌。在优选的实施方案中, PAL 来源于蓝藻种属点形念珠藻或多变鱼腥藻。在特别优选的实施方案中, PAL 来源于多变鱼腥藻。在另一实施方案中, 原核 PAL 酶活性利用 cDNA 或 DNA 序列产生, 所述 cDNA 或 DNA 序列源自有时被描述为编码 HAL 活性或具有 PAL-HAL 模体特征的序列, 但它们具有不同于 HAL 的关键 PAL 残基。

[0042] 在一个广泛的实施方案中, 所述方法包括将编码原核 PAL 或其生物活性片段、突变体、变体或类似物的全部或一部分的 cDNA 或 DNA 转化适于表达其的细胞的步骤。在优选的实施方案中, 使用表达载体将 DNA 转移入表达其的合适细胞或细胞系。在特别优选的实施方案中, 将 cDNA 或 DNA 转化入大肠杆菌, 重组细菌 PAL 被过表达, 任选地作为融合蛋白表达。在进一步的实施方案中, 产生原核 PAL 的方法包括以下步骤: (a) 在合适的生长培养基中培养用编码原核 PAL 的全部或其生物活性片段、突变体、变体或类似物的 cDNA 或 DNA 转化细胞到合适的密度, 以产生种子培养物, (b) 将转化的细胞加入生物反应器, (c) 给生物反应器提供合适的生长培养基, (d) 将转染的细胞从包含酶的培养基分离。

[0043] 在优选的实施方案中, 在载体中有或没有 N 端标签 (例如, 八组氨酰 - 标签) 的重组原核 PAL 或其生物活性片段、突变体、变体或类似物在大肠杆菌 BLR(DE3)/pLysS(Novagen) 或大肠杆菌 BL21(DE3)/pLysS(Invitrogen) 细胞中过表达, 所述载体优选是 pIBX1(Su 等, Appl. Environ. Microbiol. 62:2723-2734(1996)) 或具有诱导型启动子如 IPTG (异丙基 - β -D- 硫代半乳糖苷) 的 pET28a(Invitrogen)。在特别优选的实施方案中, 产生原核 PAL 的方法包括以下步骤: (1) 在摇瓶中为生物反应器 / 发酵罐培养来自甘油储液的种子培养物; (2) 按照补料分批模式将所述种子培养物加入受控生物反应器; (3) 在添加葡萄糖的培养基 (pH(7.8), > 20% 溶解氧) 中培养所述培养物, 搅拌直至 1200rpm, 30°C 直至达到 OD600 为 70-100 的细胞密度 (-22-25 小时); (4) 利用 0.4mM IPTG 诱导所述培养物; (5) 在 22-26°C 的降低温度培养所述培养物, 直至活性变化 < 0.1IU/mL (大约 40-48 小时, OD600 通常为 200); 和 (5) 通过连续离心收集细菌。在优选的实施方案中, 细胞培养培养基被定义并由酵母提取蛋白、蛋白胨 - 胰蛋白胨、葡萄糖、甘油、酪蛋白氨基酸、微量盐和磷酸盐缓冲盐组成。

[0044] 第五个方面, 本发明描述了一种纯化原核 PAL 或其生物活性片段、突变体、变体或类似物的方法。根据第一个实施方案, 培养和裂解转化的细胞群, 从而产生粗重组酶。通常将外源性材料与粗制物分离以免弄脏柱子。利用一种或数种层析树脂进行层析纯化。随后, 用设计成能在较长时间提供稳定活性的缓冲液配制纯化的蛋白。在另一优选的实施方案中, 纯化原核 PAL 的方法包括以下步骤: (a) 裂解包含重组 PAL 的细菌; (b) 加热处理裂解物以灭活病毒; (c) 利用第二次连续离心步骤和 / 或深层过滤净化该裂解物; (d) 将净化的裂解物通过木炭过滤步骤; (e) 将 (d) 的滤液通过最终过滤步骤 (例如用 Sartorius Sartopore 0.2 μ m 滤器); (f) 将最终滤液通过疏水性相互作用层析树脂, 如丁基疏水性相互作用层析; (g) 将 (f) 的洗脱物通过阴离子层析树脂, 如 Q 离子交换柱; (h) 利用切向流过滤通过缓冲液交换回收终产物; 和 (i) 对终产物进行灭菌。本领域技术人员很容易理解, 在本发明范围内层析步骤中的一个或多个可以省略或替换, 或层析步骤的顺序可以改变。最终, 可以按照要求进行合适的杀菌步骤。

[0045] 第六个方面,本发明涉及通过将所述原核 PAL 与培养的肿瘤细胞接触鉴定能预防、改善或治疗癌症的原核 PAL 或其生物活性片段、突变体、变体或类似物并确定该原核 PAL 能否降低肿瘤细胞增殖和 / 或生存的筛选分析。这种筛选分析还可以包括产生变体的步骤,所述变体包含活性位点,如 *Streptomyces maritimus* 的 EncP 中的 Gly 142、Thr-Ser-Gly 三联体 (143-145)、Asp 146、Leu 147、Asn 196、Ile 195、Leu 192、Leu 76、Asn 79、Met 400、Thr 428、Gln 432 处的保守或非保守替代,或其他原核 PAL 的它们的等同物,如点形念珠藻或多变鱼腥藻,其等同于圆红冬孢酵母的 PAL (RtPAL) 中的 Ser 210、Ala-Ser-Gly 三联体 (211-213)、Asp 214、Leu 215、Asn 270、Val 269、Leu 266、Leu 134、His 137、Lys 468、Glu 496、Gln 500,在接近于活性位点的区域,或遍及整个多肽序列;然后检测该变体的体外苯丙氨酸转化活性。在某些实施方案中,所述方法是高通量分析法。在优选的实施方案中,利用生物信息学方法对细菌种属的完整基因组进行测序,并筛选原核 PAL 同源物的存在。在另一优选的实施方案中,这种同源物蛋白产物的 PAL 催化活性被证实,例如通过在体外检测将苯丙氨酸转化为反式肉桂酸盐的能力来证实。

[0046] 第七个方面,本发明提供了用于诊断疾病的原核 PAL 组合物的使用方法,所述疾病包括但不限于癌症。在一个实施方案中,使用原核 PAL 检测血液、血浆或血清样品中的 Phe 水平。在其他实施方案中,本发明涉及一种包括原核 PAL 的诊断试剂盒,用于监测患者血液、血浆或血清样品的 Phe 水平。

[0047] 根据下面的详细说明,本发明的其他特征和优点将非常清楚。但是应当理解,当提及本发明的优选实施方式时,给出详细说明和特定实施例只是为了说明,因为根据该详细说明,在本发明精神和范围内的不同改变和修改对本领域技术人员来说都是显而易见的。

[0048] 附图的详细说明

[0049] 图 1. 图 1A :点形念珠藻 PAL 的基因序列 (SEQ ID NO :1);图 1B :点形念珠藻 PAL 的蛋白序列 (SEQ ID NO :2)。

[0050] 图 2. 图 2A :多变鱼腥藻 PAL 的基因序列 (SEQ ID NO :3);图 1B :多变鱼腥藻 PAL 的蛋白序列 (SEQ ID NO :4)。

[0051] 图 3. 来自原核生物和真核生物的芳香族氨基酸氨 - 裂合酶的亲缘树。序列获自 GenBank (括号内给出登录号),并使用 Neighbor Joining Method 通过 ClustalX (1.83) 进行比对。

[0052] 图 4. 点形念珠藻 PAL (SEQ ID NO :2) 和多变鱼腥藻 PAL (SEQ ID NO :4) 与 EncP PAL (SEQ ID. No. 5) 和恶臭假单胞菌 HAL (SEQ ID NO :6) 的蓝藻蛋白序列的比对。高亮显示对应于 PAL 或 HAL 活性的活性位点残基。

[0053] 图 5. 图 5A :多变鱼腥藻苯丙氨酸氨裂合酶 (PAL) 的蛋白序列,第 64 位具有半胱氨酸到丝氨酸的替代 (AvPAL_C64S, SEQ ID NO :7);图 5B :多变鱼腥藻 PAL 的蛋白序列,第 318 位具有半胱氨酸到丝氨酸的替代 (AvPAL_C318S, SEQ ID NO :8);图 5C :多变鱼腥藻 PAL 的蛋白序列,第 503 位具有半胱氨酸到丝氨酸的替代 (AvPAL_C503S, SEQ ID NO :9);图 5D :多变鱼腥藻 PAL 的蛋白序列,第 565 位具有半胱氨酸到丝氨酸的替代 (AvPAL_C565S, SEQ ID NO :10);图 5E :多变鱼腥藻 PAL 的蛋白序列,第 503 和 565 位具有半胱氨酸到丝氨酸的替代 (AvPAL_C565SC503S, SEQ ID NO :11)。半胱氨酸到丝氨酸的替代用粗体下划线表示。

[0054] 图 6. 图 6A :在 37℃ 温育不同时间段后,未聚乙二醇化 AvPAL 的第 565 位或第 565

和 503 位半胱氨酸到丝氨酸的替代对体外 PAL 特异酶活性的影响。图 6B :在 37℃ 温育不同时间段后,聚乙二醇化 AvPAL 的第 565 位或第 565 和 503 位半胱氨酸到丝氨酸的替代对体外 PAL 特异酶活性的影响。

[0055] 图 7. 图 7A :在变性条件(左栏)或天然条件(右栏)下通过凝胶电泳分析 AvPAL 中半胱氨酸到丝氨酸的替代对溶液中蛋白聚集形成的影响。图 7B :通过 SEC-HPLC 分析 AvPAL 中半胱氨酸到丝氨酸替代对溶液中蛋白聚集形成的影响。

[0056] 图 8. AvPAL 中第 565 和 503 位(双重突变)半胱氨酸到丝氨酸的替代对各种 PEG 浓度的位点特异性聚乙二醇化的影响。

[0057] 图 9. 通过 SEC-HPLC 分析利用 0.05% Tween80 或 10mM EDTA 处理 AvPAL 对溶液中蛋白聚集形成的影响。

[0058] 图 10. 图 10A :通过 SEC-HPLC 分析通过二硫苏糖醇(DTT)处理 AvPAL 对溶液中蛋白聚集形成的影响。图 10B :通过 SEC-HPLC 分析通过 DTT 和 N-乙基马来酰亚胺(NEM)处理 AvPAL 对溶液中蛋白聚集形成的影响。

[0059] 图 11. 标示的苯丙氨酸(Phe)和反式肉桂酸(t-CA)对 4℃(顶栏)、25℃(中间栏)和 37℃(底栏)保存不同时间(天数)的聚乙二醇化 AvPAL 的酶活性的影响,所述 AvPAL 的第 565 和 503 位具有半胱氨酸到丝氨酸的替代(AvPAL_C565SC503S)(rAV-PAL-PEG)。

[0060] 图 12. 标示的 1 和 5mM 的酪氨酸(Tyr)对 4℃(顶栏)、25℃(中间栏)和 37℃(底栏)保存不同时间(天数)的聚乙二醇化 AvPAL 的酶活性的影响,所述 AvPAL 的第 565 和 503 位具有半胱氨酸到丝氨酸的替代(AvPAL_C565SC503S)(rAV-PAL-PEG)。

[0061] 图 13. 图 13A :标示的单独或联合的苯丙氨酸(Phe)、安息香酸和吡哆胺对 4℃(顶栏)和 37℃(底栏)保存不同时间(周)的聚乙二醇化 AvPAL 的酶活性的影响,所述 AvPAL 的第 565 和 503 位具有半胱氨酸到丝氨酸的替代(AvPAL_C565SC503S)(rAV-PAL-PEG)。图 13B :显示安息香酸(左)、苯丙氨酸(中)和反式肉桂酸(右)的化学结构。

[0062] 图 14. 图 14A :给短尾猴单次皮下注射 4mg/kg(菱形)和 12mg/kg(正方形)聚乙二醇化 AvPAL 对血浆 AvPAL_C565SC503S 水平随时间(小时)的影响,所述 AvPAL 的第 565 和 503 位具有半胱氨酸到丝氨酸的替代(AvPAL_C565SC503S)。图 14B :给短尾猴单次皮下注射 4mg/kg AvPAL_C565SC503S 对血浆 AvPAL_C565SC503S(菱形)和苯丙氨酸(正方形)水平随时间(小时)的影响。

[0063] 图 15. 图 15A :给大鼠单次静脉注射 1mg/kg(菱形)、5mg/kg(正方形)和 25mg/kg(三角形)聚乙二醇化 AvPAL 对血浆 AvPAL_C565SC503S 水平随时间(小时)的影响,所述 AvPAL 的第 565 和 503 位具有半胱氨酸到丝氨酸的替代(AvPAL_C565SC503S)。图 15B :给大鼠单次皮下注射 10mg/kg(菱形)、25mg/kg(正方形)和 250mg/kg(三角形)AvPAL_C565SC503S 对血浆 AvPAL_C565SC503S 水平随时间(小时)的影响。

[0064] 图 16. 图 16A :标示的 0.01、0.1、1、10 和 100 微克/mL 聚乙二醇化 AvPAL 在体外对 NOM1 急性髓性白血病(AML)增殖的影响(通过碘化吡啶染色检测),所述 AvPAL 的第 565 和 503 位具有半胱氨酸到丝氨酸的替代(AvPAL_C565SC503S)。图 16B :标示的 0.1、1、10 和 100 微克/mL AvPAL_C565SC503S 在体外对 IM9 骨髓瘤细胞增殖的影响。

[0065] 图 17. 图 17A :标示的 0.01、0.1、1、10 和 100 微克/mL 聚乙二醇化 AvPAL 在体外对 SF268(顶)和 498L(底)脑/CNS 肿瘤细胞增殖(通过碘化吡啶染色检测)的影响,所述

AvPAL 的第 565 和 503 位具有半胱氨酸到丝氨酸的替代 (AvPAL_C565SC503S)。图 17B : 标示的 0.01、0.1、1、10 和 100 微克 /mL AvPAL_C565SC503S 在体外对 HT29 (顶) 和 HCT116 (底) 结肠肿瘤细胞增殖的影响。图 17C : 标示的 0.01、0.1、1、10 和 100 微克 /mL AvPAL_C565SC503S 在体外对 H460 (顶)、529L (中) 和 629L (底) 肺肿瘤细胞增殖的影响。图 17C : 标示的 0.01、0.1、1、10 和 100 微克 /mL AvPAL_C565SC503S 在体外对 LNCAP (顶)、PC3M (中) 和 DU145 (底) 前列腺肿瘤细胞增殖的影响。

[0066] 图 18. B16 黑色素瘤细胞系异种移植模型中, 第 565 和 503 位具有半胱氨酸到丝氨酸的替代的聚乙二醇化 AvPAL (AvPAL_C565SC503S) 对肿瘤大小的影响。按照标示通过皮下注射 40、80 或 100mg/kg 酶进行预防性 (顶部) 或治疗性 (底部) 施用。

[0067] 图 19 : SNU398 (顶部) 和 HepG2 (底部) 肝癌肿瘤细胞系异种移植模型中, 第 565 和 503 位具有半胱氨酸到丝氨酸的替代的聚乙二醇化 AvPAL (AvPAL_C565SC503S) 对肿瘤大小的影响。按照标示通过皮下注射 60mg/kg 酶进行预防性施用。

[0068] 发明详述

[0069] 已经有数种细菌 PAL 被鉴定为 HAL/PAL 家族的一部分, 包括但不限于来自 *Streptomyces maritimus* 的 PAL (亦称为 EncP, SEQ ID NO :5, 图 4), 来自点形念珠藻的 PAL/HAL (来自点形念珠藻 ATCC 29133 的登录号 ZP_00105927, 2004 年 10 月 1 日提交, NCBI Microbial Genomes Annotation Project) (SEQ ID NO :2, 图 4), 来自多变鱼腥藻 (Gene ID 3679622, Ava_3988 苯丙氨酸 / 组氨酸氨裂合酶, 多变鱼腥藻 ATCC 29413, 2006 年 3 月 31 日) (SEQ ID NO :4, 图 4)、光合原核生物组囊藻 (*Anacystis nidulans*) (Löfflehardt, Z. Naturforsch. 31(11-12) :693-9(1976))、肠杆菌科家族的革兰氏阴性菌、发光杆菌 (*Photobacterium luminescens*) TT01 (Williams 等, Microbiology 151 :2543-2550 (2005)) 和轮生链霉菌 (*Streptomyces verticillatus*) (Bezanson 等., Can. J. Microbiol. 16(3) :147-51(1970)) 的 PAL/HAL。此外, 还检测了 *Streptomyces maritimus* 中的 PAL 活性 (Xiang 等., J. Biol. Chem. 277 :32505-32509 (2002))。已经对蓝藻如鱼腥藻和念珠藻进行了关于生物活性天然产物产生的研究, 所述天然产物通过混合的多聚乙酰肽生物合成途径产生 (Moore, Nat. Prod. Rep. 22(5) :580-593 (2005) ; Becker 等., Gene 325 :35-42 (2004) ; Hoffman 等., Gene 311 :171-180 (2003))。

[0070] 尽管 PAL 是普遍存在的高等植物酶, 其在向苯丙素代谢产物的关键步骤中催化苯丙氨酸非氧化性脱氨成肉桂酸 (Hahlbrock 等., Annu. Rev. Plant Phys. Plant Mol. Biol. 40 :347-369 (1989)), 只有少量细菌中存在 PAL, 其中在 “*S. maritimus*” (Xiang, et al., J. Biol. Chem. 277 :32505-32509 (2002)) 和纤维堆囊菌 (*Sorangium cellulosum*) (Hill 等, Chem. Commun. 1358-1359 (2003)) 中其参与苯甲酰基辅酶 A 生物合成, 在轮生链霉菌中参与肉桂酰胺的生物合成 (Bezanson 等, Can. J. Microbiol. 16 :147-151 (1970))。抑菌剂肠道菌素是海洋细菌 “*Streptomyces maritimus*” 的天然产物, 其生物合成涉及大量不寻常的特性 (Hertweck 等, Chem. Biol. 11 :461-468 (2004) ; Piel 等, Chem. Biol. 7 :943-955 (2000) ; Piel 等, J. Am. Chem. Soc. 122 :5415-5416 (2000) ; Xiang 等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 101 :15609-15614 (2004))。其中之一是罕见多聚乙酰合酶 (PKS) 起始单位苯甲酰基辅酶 A (CoA) 的形成 (Moore 等, Nat. Prod. Rep. 19 :70-99 (2002))。起始生化反应包括通过新的细菌苯丙氨酸氨裂合酶 (PAL, EC 4.3.1.5) EncP 将氨基酸 L- 苯丙氨酸

转化为反式肉桂酸 (Xiang 等, J. Biol. Chem. 277 :32505-32509(2002))。肉桂酸活化为其辅酶 A 硫酯, 继之以单一一轮 beta 氧化得到苯甲酰基辅酶 A (Hertweck 等, Chem. Bio. Chem. 2 :784-786(2001) ;Hertweck 等, Tetrahedron 56 :9115-9120(2000) ;Xiang 等, J. Bacteriol. 185 :399-404(2003)), 其起始肠道菌素 II 型 PKS 利用丙二酰基辅酶 A 的 7 个分子进行链延伸。

[0071] 第一种原核 PAL- 编码基因 (encP) (SEQ ID NO :5) 被表征, 其在“*S. maritimus*”中新形成肉桂酸和肠道菌素合成中的作用已被鉴定 (Kalaitzis 等, J. Am. Chem. Soc. 125 :9290-9291(2003) ;Xiang 等, J. Biol. Chem. 277 :32505-32509(2002))。encP 基因编码 522 个氨基酸的蛋白, 即明显比真核 PALs 少几乎 200 个氨基酸残基。尽管序列与植物 PALs 诸如来自 *Petroselinum crispum* 的同源 (R  ther 等, Eur. J. Biochem. 269 :3065-3075(2002)) (CAA57056, 30 % 相同和 48 % 类似), 它与诸如来自恶臭假单胞菌 (Schwede 等, Biochemistry 27 :5355-5361(1999)) (A35251, 36 % 相同和 54 % 类似, SEQ ID NO :6, 图 4) 的细菌组氨酸氨裂合酶 (HALs, EC 4.3.1.3) 和来自荚膜红细菌 (*Rhodobacter capsulatus*) 的酪氨酸氨裂合酶 (TAL) (Kyndt 等, FEBS Lett. 512 :240-244(2002)) (图 3) 具有更高的同源性。同源性包括氨裂合 酶的苯丙氨酸 / 组氨酸 / 酪氨酸家族 143 位的保守活性位点丝氨酸残基, 其是 4-methylideneimidazole-5- 酮 (MIO) 辅基中修饰脱氢丙氨酸残基的可能前体 (Langer 等, Adv. Prot. Chem. 58 :175-188(2001) ;Poppe, Curr. Opin. Chem. Biol. 5 :512-524(2001) ;Schwede 等, Biochemistry 27 :5355-5361(1999))。EncP 与 AdmH(AA039102, 63 % 相同和 76 % 类似) 具有最高的序列同源性, AdmH 是一种假定的苯丙氨酸氨基变位酶, 参与成团泛菌 (*Pantoea agglomerans*) 的 andrimid 生物合成, 与球孢链霉菌 (*Streptomyces globisporus*) 的酪氨酸氨基变位酶 Sgc4 有关 (Christenson 等, J. Am. Chem. Soc. 125 :6062-6063(2003) ;Christenson 等, Biochemistry 42 :12708-12718(2003))。

[0072] 对于分别从组氨酸和苯丙氨酸化学上困难的清除氨来说, HAL 和 PAL 显示通常共享同一机制。利用这两种酶, 超亲电子的辅基 5 亚甲基 -3,5- 二氢咪唑并 -4- 酮 (MIO) 通过对芳香环 Friedel-Crafts- 型攻击活化它们相应底物的非酸 beta 氢原子。通过阻止任意碱基通向酶的结合口袋, 产生的 sigma 复合物阻止从环提取质子。环外双键的形成是氨清除、脱芳和断裂的关键。修复性 MIO 基团被再生, 形成产物尿刊酸酯或肉桂酸盐 (Poppe 等, Angew. Chem. Int. Ed. 44 :3668-3688(2005))。

[0073] 因为 HAL 和 PAL 的高同源性, HAL 和 PAL 的保守区 HAL/PAL 保守区。这种高同源性可能导致数据库像 NCBI 关于“PAL-HAL”蛋白可能酶活性的一些混淆, 导致错误标示, 诸如 NCBI 数据库中对于点形念珠藻和多变鱼腥藻所列的蛋白序列。因此一些 PAL 酶可能会被误标为 HAL 酶。尽管 PALs 和 HALs 活性位点非常类似, 但预测在一些关键残基上是不同的 (Calabrese 等., Biochemistry 43(36) :11403-11416(2004) ;Xiang et al., (2002), 同前 ;Williams et al., (2005), 同前)。尤其在 HAL 中, 恶臭假单胞菌的甲硫 氨酸 382 和谷氨酰胺 414 (SEQ ID NO :6) 在所有 HALs 中都是高度保守的, 但在迄今为止的描述中 (真核生物或原核生物), 在所有 PALs 中总是分别被赖氨酸和谷氨酰胺替换 (图 4)。所以可以说具有“PAL-HAL”区域并具有赖氨酸 382 和谷氨酰胺 414 同系物的所有蛋白都具有包含 PAL 活性的蛋白的序列标记物。这些相对较新描述的 PAL 标记物 (Williams 等, (2005), 同前)

允许正确标记一些酶以区分 HAL 和 PAL, 可以从已经公开的基因和蛋白数据库中鉴定一些新的 PAL 酶。

[0074] 本发明涉及这种原核 PAL 及其生物活性片段、突变体、变体或类似物的组合物, 以及它们用于治疗目的, 包括治疗癌症的用途。

[0075] A. 定义

[0076] 除非另有说明, 本申请中使用的下列术语, 包括说明书和权利要求, 具有下面给出的定义。必须注意到, 在本说明书和所附权利要求中使用的, 单数形式“一个”、“一种”和“所述”包括复数含义, 除非上下文明确另外规定。标准化学术语的定义可参见工具书, 包括 Carey and Sundberg, *Advanced Organic Chemistry*, 3rd Edition, Vols. A and B (Plenum Press, New York 1992)。本发明的实施将使用, 除非另外指出, 有机化学合成的常规方法、质谱分析、层析的制备型和分析型方法、蛋白化学、生物化学、重组 DNA 技术和药理学均属于本领域的技术范围内。参见, 例如, T. E. Creighton, *Proteins: Structures and Molecular Properties* (W. H. Freeman and Company, 1993); A. L. Lehninger, *Biochemistry* (Worth Publishers, Inc., 第 4 版, 2004); Sambrook 等, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (第 2 版, 1989); *Methods In Enzymology* (S. Colowick and N. Kaplan 编, Academic Press, Inc.); Remington's *Pharmaceutical Sciences*, 18th Edition (Easton, Pennsylvania: Mack Publishing Company, 1990)。

[0077] 所有本文引用的出版物、专利和专利申请均在此通过引用全文并入本文, 无论是在上文或下文。

[0078] 下列氨基酸缩写在全文贯穿使用:

[0079] 丙氨酸 :Ala (A)	精氨酸 :Arg (R)
[0080] 天门冬酰胺 :Asn (N)	天门冬氨酸 :Asp (D)
[0081] 半胱氨酸 :Cys (C)	谷氨酰胺 :Gln (Q)
[0082] 谷氨酸 :Glu (E)	甘氨酸 :Gly (G)
[0083] 组氨酸 :His (H)	异亮氨酸 :Ile (I)
[0084] 亮氨酸 :Leu (L)	赖氨酸 :Lys (K)
[0085] 甲硫氨酸 :Met (M)	苯丙氨酸 :Phe (F)
[0086] 脯氨酸 :Pro (P)	丝氨酸 :Ser (S)
[0087] 苏氨酸 :Thr (T)	色氨酸 :Trp (W)
[0088] 酪氨酸 :Tyr (Y)	缬氨酸 :Val (V)

[0089] “多核苷酸”是指由核苷酸单位组成的聚合物。多核苷酸包括天然存在的核酸, 如脱氧核糖核酸 (DNA) 和核糖核酸 (RNA) 以及核酸类似物。核酸类似物包括那些包含非天然存在碱基, 利用除了天然存在的磷酸二酯键以外的键与其他核苷酸键合的核苷酸, 或包括磷酸二酯键以外的键连接的碱基。因此, 核苷酸类似物的实例包括, 例如但不限于硫代磷酸酯、二硫代磷酸酯、磷酸三酯、氨基磷酸酯、boranophosphates、甲基磷酸酯、手性磷酸甲酯、2-O-甲基核糖核苷酸、肽-核酸 (PNA) 等等。这种多核苷酸可以是合成的, 例如, 利用自动化 DNA 合成仪。术语“核酸”通常是指大的多核苷酸。术语“寡核苷酸”通常是指短的多核苷酸, 通常不大于约 50 个核苷酸。应理解当核苷酸序列用 DNA 序列 (即 A、T、G、C) 表示时, 其还包括 RNA 序列 (即 A、U、G、C), 其中“U”替换“T”。

[0090] “cDNA”是指与 mRNA 互补或相同的 DNA,采用单链或双链形式。

[0091] 本文使用常规标志来描述多核苷酸序列:单链多核苷酸序列的左侧末端是 5' 端;双链多核苷酸序列的左侧方向是 5' 方向。向新生 RNA 转录物添加核苷酸的 5' 到 3' 方向被称作转录方向。与 mRNA 具有相同序列的 DNA 链被称作“编码链”;与该 DNA 转录的 mRNA 具有相同序列的 DNA 链上的序列(位于 5' 到 RNA 转录物的 5' 端)被称作“上游序列”;与 RNA 具有相同序列的 DNA 链上的序列(位于 3' 到编码 RNA 转录物的 3' 端)被称作“下游序列”。

[0092] “互补”是指两多核苷酸相互作用表面的拓扑相容或配对。因此,两个分子可以被称作互补的,此外,接触面特征是彼此互补的。如果第一多核苷酸的核苷酸序列与第二多核苷酸的多核苷酸结合伴侣的核苷酸序列相同,则第一多核苷酸与第二多核苷酸互补。因此,序列为 5' -TATAC-3' 的多核苷酸与序列为 5' -GTATA-3' 的多核苷酸互补。

[0093] 如果与所述核苷酸序列互补的序列与参照核苷酸序列基本上相同,则核苷酸序列与参照核苷酸序列“基本上互补”,。

[0094] “编码”是指多核苷酸(如基因,cDNA 或 mRNA)中的具体核苷酸序列的固有性质,它们在生物进程中作为合成其他聚合物和大分子的模板,具有确定的核苷酸序列(即 rRNA、tRNA 和 mRNA)或由此而来的确定氨基酸序列和生物学特性。因此,如果基因产生的转录和 mRNA 翻译在细胞或其他生物系统中产生蛋白,则该基因编码蛋白。编码链(其核苷酸序列与 mRNA 序列相同,通常以列表形式提供)和非编码链(用作基因或 cDNA 转录的模板)可以被称作编码该基因或 cDNA 的蛋白或其他产物。除非另作说明,“编码氨基酸序列的核苷酸序列”包括编码相同氨基酸序列的相互简并形式的所有核苷酸序列。编码蛋白和 RNA 的核苷酸序列可以包括内含子。

[0095] “重组多核苷酸”是指具有自然界未连接在一起的序列的多核苷酸。扩增或组装的重组多核苷酸可以包括在合适的载体中,所述载体可用于转化合适的宿主细胞。包括重组多核苷酸的宿主细胞被称作“重组宿主细胞”。基因然后在重组宿主细胞中表达以产生,例如,“重组多肽”。重组多核苷酸还可以发挥非编码功能(例如启动子、复制起点、核糖体结合位点等等)。

[0096] “表达控制序列”是指多核苷酸中的核苷酸序列,它调节与其可操作连结的核苷酸序列的表达(转录和/或翻译)。“可操作地连接”是指两部分的功能关系,其中一部分的活性(例如,调节转录的能力)导致对其他部分的作用(例如,序列的转录)。表达控制序列可以包括例如但不限于以下序列:启动子(例如,诱导型或组成型)、增强子、转录终止子、起始密码子(即 ATG)、内含子的剪接信号和终止密码子。

[0097] “表达载体”是指包含重组多核苷酸的载体,所述重组多核苷酸包含与待表达的核苷酸序列可操作地连接的表达控制序列。表达载体包括足够的用于表达的顺式作用元件;其他表达元件可以用宿主细胞或体外表达系统提供。表达载体包括所有本领域已知的那些,诸如整合了重组多核苷酸的粘粒、质粒(例如,裸质粒或包含于脂质体的质粒)和病毒。

[0098] “扩增”是指使多核苷酸序列复制从而增加到更多数目多核苷酸分子的任意方法,例如通过逆转录、聚合酶链式反应和连接酶链式反应复制。

[0099] “引物”是指能够与指定的多核苷酸模板特异性杂交并提供合成互补多核苷酸的起始点的多核苷酸。当多核苷酸引物置于诱导合成的条件下,即在核苷酸、互补多核苷酸模

板和聚合试剂如 DNA 聚合酶存在的条件下,这种合成发生。引物通常是单链的,但也可以是双链的。引物通常是脱氧核糖核酸,但各种合成和天然存在的引物具有很多应用。引物与模板互补,其被设计成与模板杂交作为合成起始的位点,但无需反映模板的确切序列。在这种情况下,引物与模板的特异性杂交取决于杂交条件的严谨性。引物可以用例如生色团、放射性基团或荧光基团标记,用作可检测基团。

[0100] “多肽”是指由氨基酸残基、相关的天然存在的结构变体及其合成的非天然存在的类似物通过肽键连结组成的聚合物,相关的天然存在的结构变体,以及其合成的非天然存在的类似物。合成多肽可以是合成的,例如,利用自动化多肽合成仪合成。术语“蛋白”通常是指大的多肽。术语“肽”通常是指短的多肽。

[0101] 本文使用常规标志来描述多肽序列:多肽序列的左侧末端是氨基端;多肽序列的右侧末端是羧基端。

[0102] “保守替代”是指在多肽中的氨基酸用功能类似的氨基酸替代。下列 6 组各包含互为保守替代的氨基酸:

[0103] 1) 丙氨酸 (A)、丝氨酸 (S)、苏氨酸 (T);

[0104] 2) 天冬氨酸 (D)、谷氨酸 (E);

[0105] 3) 天门冬酰胺 (N)、谷氨酰胺 (Q);

[0106] 4) 精氨酸 (R)、赖氨酸 (K);

[0107] 5) 异亮氨酸 (I)、亮氨酸、甲硫氨酸 (M)、缬氨酸 (V);和

[0108] 6) 苯丙氨酸 (F)、酪氨酸 (Y)、色氨酸 (W)。

[0109] 氨基酸还可以按如下分组:

[0110] (1) 疏水性的:Met、Ala、Val、Leu、Ile;

[0111] (2) 中度亲水性的:Cys、Ser、Thr;

[0112] (3) 酸性的:Asp、Glu;

[0113] (4) 碱性的:Asn、Gln、His、Lys、Arg;

[0114] (5) 影响链方向的残基:Gly、Pro;和

[0115] (6) 芳香族的:Trp、Tyr、Phe。

[0116] 在两种或更多种多核苷酸或多肽序列的上下文中,术语“一致”或百分比“一致性”是指,利用序列比较算法(描述于 2005 年 9 月 19 日提交的先前共同待决的美国专利申请号 11/230,374,其在此通过引用全文并入本文)或通过目测检测,当比较和比对最大对应性时,两种或更多种序列或子序列是相同的或具有指定百分比的相同核苷酸或氨基酸残基。

[0117] 在两种核酸或多肽的上下文中,短语“基本上同源”或“基本上一致”一般是指,利用下列序列比对算法之一或目测检测,当比较和比对最大对应性时,两种或更多种序列或子序列具有至少 40%、60%、80%、90%、95%、98%核苷酸或氨基酸残基一致性。优选地,长度至少约 50 个残基的序列区域,更优选至少约 100 个残基的区域基本上一致,最优选所述序列至少约 150 个残基基本上一致。在最优选的实施方案中,所述序列在两个比较生物高聚物中的任一或两者的全长上基本上一致。

[0118] “基本上纯的”或“分离的”表示目标种类是存在的优势种类(即在组合物中比任意其他个体大分子种类更多摩尔量),基本上纯化的组分是一种组合物,其中目标种类包含所有存在的大分子种类的至少约 50%(基于摩尔量)。通常,基本上纯的组合物是指该组

合物中存在的大分子种类的约 80% 到 90% 或更多是纯化的目标种类。如果组合物基本上由单一大分子种类组成, 则该目标种类被纯化到基本上同质 (通过常规检测方法无法检测到该组合物中的污染种类)。对于该定义来说, 溶剂种类, 小分子 ($< 500\text{Daltons}$), 稳定剂 (例如, BSA) 和基本离子种类不被认为是大分子种类。在一些实施方案中, 本发明的原核 PAL 变体组合物是基本上纯的或分离的。在一些实施方案中, 本发明的原核 PAL 变体组合物是相对于它们的合成中所使用的大分子起始原料来说基本上纯的或分离的。在一些实施方案中, 本发明的药物组合物包含与一种或多种药学上可接受的赋形剂混合的基本上纯化或分离的原核 PAL 变体。

[0119] 当“天然存在的”用于一个客体时, 是指该客体可在自然界发现的事实。例如, 存在于生物体 (包括病毒) 的多肽或多核苷酸序列是天然存在的, 它们可以从自然界的来源分离, 并且没有由人类在实验室中有意改变。

[0120] “野生型” (wt) 是涉及生物体天然遗传形式的术语。野生型不同于突变形式 (具有遗传突变的生物体)。

[0121] 术语“多肽”和“蛋白”是指氨基酸残基的聚合物, 不限于产物的最小长度。因此, 肽、寡肽、二聚体、多聚体等均包括在该定义内。全长蛋白及其片段均被该定义包括。该术语还包括多肽的表达后修饰, 例如, 糖基化、乙酰化、磷酸化等等。此外, 根据本发明的目的, “多肽”是指蛋白, 其包括对天然序列的修饰, 诸如缺失、添加和替代 (通常实际上是保守的), 只要蛋白维持所需活性。在本文中这种多肽可以称为“突变体”。这些修饰可以是有意, 如通过定点诱变, 或可以是偶然的, 如由产生蛋白的宿主造成的突变或归因于 PCR 扩增的错误。

[0122] 如本文使用的, “变体”、“类似物”或“衍生物”是一种化合物, 例如肽, 其与指定化合物例如肽具有超过约 70% 的但低于 100% 的序列相似性。这种变体、类似物或衍生物可以由非天然存在的氨基酸残基组成, 举例来说包括而限于高精氨酸、鸟氨酸、青霉胺和正缬氨酸, 以及天然存在的氨基酸残基。这种变体、类似物或衍生物还可以由一种或多种 D- 氨基酸残基组成, 且在两个或更多个氨基酸残基之间包含非肽键。

[0123] 如本文使用的, PAL 多肽 (例如, AvPAL) 与水溶性聚合物 (例如聚乙二醇或 PEG) 的“比例”是指 PAL 多肽和水溶性聚合物的反应条件摩尔比。例如, AvPAL 和聚乙二醇 1 : 3 的比例 (1 : 3AvPAL : PEG) 表示在约 1mol AvPAL 每 3mol 聚乙二醇的反应条件下产生化学修饰的 PAL。在实施例 6 描述的反应条件下, 见下文, 约 1 : 3AvPAL : PEG 的比例产生约 10-12mol PEG 每 molAvPAL 单体。

[0124] 本文使用的“治疗”是指预防性治疗或治疗性治疗或诊断性治疗。

[0125] “预防性”治疗是给不显示疾病或病理症状 (即, 癌症) 或只显示早期症状的个体施用的治疗, 目的是减少患病风险。可以给予发明的原核 PAL 组合物作为预防性治疗以降低发生疾病 (即, 癌症) 的可能性, 或如果已经发生的话, 把疾病的严重性降到最低。

[0126] “治疗性”治疗是给显示疾病征兆或症状 (即, 癌症) 的个体施用的治疗, 目的是减少或消除所述征兆或症状。所述征兆或症状可以是生化的, 细胞的, 组织学的, 功能性的, 主观或客观的。可以给予本发明的原核 PAL 组合物作为治疗性治疗或为了诊断。

[0127] “诊断”表示鉴定病理性疾病 (即, 癌症) 的存在或性质。诊断方法在它们的特异性和选择性方面不同。当特定诊断方法不能提供疾病的确切诊断时, 如果该方法提供有助

于诊断的阳性指示就足够了。

[0128] “药物组合物”是指适于受试动物（包括人和哺乳动物）药物使用的组合物。药物组合物包含药理学有效量的原核 PAL 多肽，还包含药学上可接受的载体。药物组合物包括包含活性成分，和惰性成份（组成载体）以及所述成分的任意两种或更多种结合、络合或聚集，或从所述成分的一种或者多种解离，或与所述成分的一种或多种的其他类型反应或相互作用所直接或间接产生的任意产物。因此，本发明的药物组合物包含通过混合本发明的原核 PAL 多肽与药学上可接受的载体制备的任意组合物。

[0129] “药学上可接受的载体”是指任一标准药物赋形剂、运载体、稀释剂、稳定剂、防腐剂、增溶剂、乳化剂、佐剂和 / 或载体，如但不限于磷酸缓冲盐溶液、葡萄糖的 5% 水溶液、和乳液如油 / 水或水 / 油乳化液，和各种类型的湿润剂和 / 或佐剂。合适的药物载体和制剂描述于 Remington's Pharmaceutical Sciences, 第 19 版 (Mack Publishing Co., Easton, 1995)。优选的药物载体取决于施用活性剂的预期方式。典型的施用方式包括肠的（例如，口服）或肠胃外的（例如，皮下、肌内、静脉内或腹膜内注射；或局部、透皮、或透粘膜施用）。“药学上可接受的盐”是可以配制原核 PAL 变体组合物用于药物用途的盐，包括例如金属盐（钠、钾、镁、钙等等）以及氨或有机胺的盐。

[0130] “药学上可接受的”或“药理学上可接受的”表示不是生物学上或其他方面不希望的材料，即该材料可以给个体施用，而不引起任何不良的生物学效应或以有害方式与组合物包含的任一组分相互作用。

[0131] 本文使用的术语“单位剂型”是指适用于人和动物个体的单位剂量的物理分散单位，每个单位包含预定量的本发明原核 PAL 变体以及药学上可接受的稀释剂、载体或赋形剂，经计算该量足以产生预期效果。本发明新的单位剂型的规格取决于使用的具体原核 PAL 变体和待实现的效果，以及与宿主中各原核 PAL 变体有关的药效学。

[0132] “生理 pH”或“生理范围的 pH”表示包括大约 7.2 到 8.0 范围的 pH，更常见的包括大约 7.2 到 7.6 的范围。

[0133] 本文使用的术语“个体”包括哺乳动物和非哺乳动物。哺乳动物的实例包括但不限于哺乳纲的任意成员：人，非人灵长类动物诸如黑猩猩，以及其他猿和猴物种；农畜如牛、马、绵羊、山羊、猪；家畜诸如兔、狗和猫；实验动物包括啮齿类动物，如大鼠、小鼠和豚鼠等等。非哺乳动物的实例包括但不限于鸟类、鱼等等。该术语不指定具体的年龄或性别。

[0134] B. 原核 PAL 变体

[0135] 对于具体大分子可靠三维结构或结构模型的阐述使合理设计成为优化所述大分子具体结构和 / 或功能的有效方法。使用三维结构或结构模型优化 PAL 酶的方法描述于 2005 年 9 月 19 日提交的先前共同待决的美国专利申请号 11/230,374 中，其在此通过引用全文并入本文。原核 PAL 的高分辨率三维蛋白晶体结构可用于涉及蛋白工程的方法，以提高原核 PAL 的生化和生物物理学特性，并增加原核 PAL 的体内疗效。本发明涉及与野生型原核 PAL 相比，具有更大苯丙氨酸转化活性和 / 或降低的免疫原性的原核 PAL 变体。本发明还涉及与野生型原核 PAL 相比，具有更大生化稳定性和 / 或生化半衰期的原核 PAL 变体。

[0136] 具有增强催化活性的原核 PAL 变体

[0137] 本发明的野生型原核 PAL 的生物活性位点可以按照需要改变以优化 PAL 动力学特性。Km，得到最大活性一半的底物浓度，与维持 Phe 水平在可接受范围内的 PAL 治疗效果密

切相关,该可接受范围利用本领域公知的标准检测方法检测为低于约 20 微摩到 60 微摩的检测水平,优选地低于约 20 微摩,甚至更优选地低于约 10 微摩。 K_m 是酶对底物的亲和力。通过控制亲和力,可以限制或控制任意酶对不同浓度底物的效果。例如,如果 K_m 是 1000 微摩(例如,圆红冬孢酵母的 PAL),在 240 微摩的血液 Phe 水平酶活性将降低到约 12.5%,在 60 微摩的血液 Phe 水平酶活性将降低到约 3%。如果 K_m 是 240 微摩,在 240 微摩的血液 Phe 水平酶活性将降低到约 50%,在 60 微摩的血液 Phe 水平酶活性将降低到约 12%。优选的治疗目标是治疗时原核 PAL 酶具有足够活性以降低 Phe 水平并将其维持在从低于检测水平到约 20 微摩和 60 微摩之间的范围,优选地低于约 20 微摩,甚至更优选地低于约 10 微摩,这可利用本领域公知的标准检测方法检测。当 Phe 水平跌至正常范围内(大约 55–60 微摩,参见 Kaufmann, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96 :3160–3164(1999)) 时, K_m 为约 1000 微摩的酶将快速丧失活性,仍需要不切实际地施用高浓度或大体积剂量。治疗时具有更低 K_m 的酶可以快速去除 Phe 并将 Phe 维持在从低于检测水平到约 20 微摩和 60 微摩之间的范围,优选地低于约 20 微摩,甚至更优选地低于约 10 微摩,这可用于控制癌症。

[0138] 在优选的实施方案中,生物活性原核 PAL 变体的 k_{cat} 为至少约 $0.1s^{-1}$, 优选的大于约 $0.5s^{-1}$, 甚至更优选的大于约 $1.0s^{-1}$ 。在最优选的实施方案中,生物活性原核 PAL 变体的 k_{cat} 为至少约 $0.4s^{-1}$, 优选的大于约 $2.0s^{-1}$, 甚至更优选的大于约 $4.0s^{-1}$ 。在其他优选的实施方案中,生物活性原核 PAL 变体的 K_m 为约 10 微摩到约 2000 微摩。在更优选的实施方案中,生物活性原核 PAL 变体的 K_m 为约 10 微摩到约 1000 微摩。在甚至更优选的实施方案中,生物活性原核 PAL 变体的 K_m 为约 10 微摩到约 500 微摩。在其他优选的实施方案中,生物活性原核 PAL 变体显示的酶活性为野生型 PAL 的约 50% 到比野生型 PAL 高约 10 倍。在其他优选的实施方案中,生物活性原核 PAL 显示的酶活性为野生型 PAL 的约至少 50% 到比野生型 PAL 高约 100%。这种生物活性原核 PAL 变体可以利用本领域公知的方法形成,如通过定点诱变形成。

[0139] 具有降低免疫原性的原核 PAL 变体

[0140] 目前大量策略被用于降低蛋白免疫原性。优选地,被引入以最小化免疫应答的改变不破坏大分子的结构、功能或稳定性。使用的有效策略包括增加人序列含量(嵌合体和/或其他“人源化”方法),改进溶液性质,去除抗体表位,引入化学衍生化(诸如聚乙二醇化),和/或鉴定并去除 MHC 抗原识别位。对于注射治疗,通过进行表位作图继之以合理诱变以改变和/或另外突变免疫原性的这些位点,单独地和结合位点特异性聚乙二醇化(Hershfield 等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88 :7185–7189(1991); Leong 等, Cytokine 16(3) :106–119(2001); Lee 等, Pharm. Res. 20(5) :818–825(2003)) 或其他化学衍生化方法来降低蛋白免疫反应性到可接受的程度,从而可以解决体内免疫反应性。抗原表面蛋白区域的改变降低免疫原性(Chirino 等., Drug Discov. Today 9(2) :82–90(2004))。一种改进方法包括构建保留催化活性的尺寸更小的蛋白(例如,使用吸光度分析进行活性测量)。还可以使用蛋白工程结合 ELISA 筛选来鉴定免疫反应性降低的突变体。另一种方法是引入点突变以增加用于聚乙二醇衍生化的表面 Lys 位点,这种方法显示降低对试验酶嘌呤核苷磷酸化酶的免疫原性(Hershfield 等(1991), 同前)。一种可选途径使用位于蛋白表位区的残基突变来去除免疫原性位点(Yeung 等, J. Immunol. 172(11) :6658–6665(2004))。在类似于抗体人源化的方法中,用来自人抗体的同源环区和/或残基替代同源蛋白的相应环

区。

[0141] 改进蛋白的溶液特性可以增加特异性酶活性和 / 或降低免疫原性。细菌表达的重组蛋白的一种典型溶液特性是蛋白聚集体的形成,这归因于,例如,链内二硫键形成、疏水性相互作用和 / 或二价阳离子 (Chi 等, Pharm. Res. 20 (9) :1325-1336 (2003))。重组表达蛋白的聚集能够增强免疫应答 (Hermeling 等, Pharm. Res. 21 (6) :897-903 (2994) ; Schellekens, Nephrol. Dial. Transplant. 20 (suppl 6) :vi3-9 (2005))。一种改进方法包括用其他氨基酸残基 (例如,丝氨酸) 替代表面半胱氨酸残基,以将形成链内二硫键的可能性降到最低。例如,用丝氨酸残基替代两个表面半胱氨酸残基减少分支酸裂合酶的聚集,而对酶活性影响较小 (Holden 等., Biochim. Biophys. Acta 1594 (1) :160-167 (2002))。本发明涉及一个或多个半胱氨酸残基被另一氨基酸残基 (优选的丝氨酸残基) 替代的原核 PAL 变体。在一些实施方案中,原核 PAL 的一个或多个半胱氨酸残基被另一氨基酸残基替代。在优选的实施方案中,原核 PAL 是 AvPAL。在更优选的实施方案中,AvPAL 的一个或多个半胱氨酸残基被丝氨酸残基替代。

[0142] C. 化学修饰的原核 PAL 变体

[0143] 大分子化学修饰可以采用以下方式进行:非特异性方式 (导致衍生种类的混合物) 或位点特异性方式 (基于野生型大分子反应性定向的衍生,和 / 或 定点诱变和化学修饰联用的位点选择性修饰),或任选地利用表达蛋白的结扎法 (ligation methods) (Hofmann 等, Curr. Opin. Biotechnol. 13 (4) :297-303 (2002))。优选地,使用化学修饰降低免疫原性。聚乙二醇化是一种得到确认的降低蛋白免疫原性的方法 (Bhadra 等, Pharmazie 57 (1) :5-29 (2002)),但糖基化和其他化学衍生步骤,利用磷酸化、酰胺化、羧化、乙酰化、甲基化的修饰,酸加成盐、酰胺、酯和 N- 酰基衍生物的形成也是可行的 (Davis, Science 303 :480-482 (2004))。用于聚乙二醇化 PAL 蛋白和确定聚乙二醇化最适程度的方法描述于 2005 年 9 月 19 日提交的之前共同待决的美国专利申请号 11/230,374,其在此通过引用全文并入本文。本发明涉及包含水溶性聚合物 (即聚乙二醇或 PEG) 的原核 PAL 变体。

[0144] 本发明涉及在原核 PAL 变体的活性位点 / 其附近引入一个或多个赖氨酸残基以增强催化活性、降低免疫原性和 / 或提高生化稳定性,部分通过阻断酶活性位点 / 其附近的其他氨基酸残基 (例如,酪氨酸) 的潜在聚乙二醇化或阻断对于酶活性重要的赖氨酸残基的潜在聚乙二醇化来实现。不受具体理论的约束,假定原核 PAL 活性位点 / 其附近的酪氨酸残基 (即, AvPAL 中第 78 或 314 位) 可能是聚乙二醇化位点,这会降低酶活性。在一些实施方案中,原核 PAL 活性位点 / 其附近的一个或多个氨基酸残基 (不是酶活性需要的) 被赖氨酸残基替代。在优选的实施方案中,原核 PAL 是 AvPAL。在更优选的实施方案中,第 78 或 314 位的 AvPAL 酪氨酸残基不易被聚乙二醇化。再一次不受具体理论约束,假定原核 PAL 的赖氨酸残基 (即, AvPAL 中第 419 位) 可以是会降低底物结合和 / 或催化活性的聚乙二醇化位点,其由于相邻赖氨酸残基 PAL (即, AvPAL 中第 413 位) 的聚乙二醇化而通常被阻断进行聚乙二醇化。在一些实施方案中,原核 PAL 的一个或多个氨基酸残基被赖氨酸残基替代,从而使对于酶的底物结合和 / 或催化活性非常重要的赖氨酸残基不易被聚乙二醇化。在优选的实施方案中,原核 PAL 是 AvPAL。在更优选的实施方案中,第 419 位的 AvPAL 赖氨酸残基不易被聚乙二醇化。

[0145] 聚乙二醇化的原核 PAL 变体

[0146] 2006 年 6 月 12 日提交的先前共同待决的美国专利申请号 11/451,999 (其在此通过引用全文并入本文) 的实施例 7 到 9 描述了下列 PAL 的聚乙二醇和非聚乙二醇形式对 ENU2 或 BTBR^{enu2} 小鼠中苯丙氨酸 (Phe) 水平的影响:圆红冬孢酵母的赖氨酸突变体 R91K PAL (RtPAL)、蓝藻点形念珠藻产生的 PAL (NpPAL)、和 cyanobacterium 多变鱼腥藻产生的 PAL (AvPAL)。该动物模型是苯丙氨酸羟化酶基因 (PAH) 基因座处纯合的突变体,导致动物患严重高苯丙氨酸血症。高血浆 Phe 水平使该动物成为评价 PAL 降低血浆 Phe 能力的合适模型。与未聚乙二醇化的 NpPAL 和 AvPAL 相比,分别施用聚乙二醇化形式的 NpPAL 和 AvPAL 在 ENU2 小鼠中分别导致 Phe 的更大降低。对于 NpPAL 来说,通过每周注射可以维持这种作用超过十周。这些结果表明对来自蓝藻、点形念珠藻和多变鱼腥藻的 PAL 的聚乙二醇化对于降低患 PKU 小鼠的 Phe 水平非常重要。

[0147] 2006 年 6 月 12 日提交的先前共同待决的美国专利申请号 11/451,999 (其在此通过引用全文并入本文) 的实施例 14 描述了 AvPAL 多肽中半胱氨酸残基 (例如,第 503 和 565 位) 的丝氨酸替代对 ENU2 小鼠 Phe 水平的影响。与利用聚乙二醇化野生型 AvPAL 得到的血浆 Phe 相比,聚乙二醇化 AvPAL 半胱氨酸双突变体 AvPAL_C565SC503S 的施用导致血浆 Phe 的降低。此外,与聚乙二醇化的野生型 AvPAL 相比,注射聚乙二醇化 AvPAL 变体的动物中抗 PAL 抗体滴度更低。这些结果显示聚乙二醇化的 AvPAL 变体具有 (1) 与聚乙二醇化的野生型 AvPAL 相当的体内 PAL 酶活性,和 (2) 具有比聚乙二醇化的野生型 AvPAL 降低的免疫原性。

[0148] D. 原核 PAL 变体的治疗用途和施用

[0149] 1. 癌症的各种形式

[0150] 本发明涉及利用包括使用原核 PAL 组合物的方法治疗癌症,单独施用或与其他治疗,例如但不限于癌症治疗剂或靶向癌症治疗剂联用。具体来说,本发明涉及,原核 PAL 组合物可用于治疗任意水平 (例如,从约 40 微摩到 2000 微摩) 血液、血清或血浆苯丙氨酸 (Phe) 浓度的患者群体,其中人血浆中的正常范围是约 55 微摩到 60 微摩 (Kaufman, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96 :3160-3164(1999))。

[0151] 本文使用的“癌症治疗剂”是指任意化合物,例如,小分子或肽 / 多肽,其已经被证明对癌细胞发挥治疗功效 (即,增殖和 / 或生存的抑制)。通常,癌症治疗剂是细胞毒剂或细胞生长抑制剂。

[0152] 本文使用的“靶向癌症治疗剂”是指任意化合物,例如,小分子或肽 / 多肽,或多肽或偶联的多肽,其已经被证明对特定癌细胞或组织发挥治疗功效 (即,增殖和 / 或生存的抑制)。通常,靶向癌症治疗剂是抗体,具有抗体样结构域的多肽,或其他多肽,例如酶、激素、生长因子、细胞因子等等,它们选择性结合靶细胞的表面。抗体、具有抗体样结构域的多肽或其他多肽可以是不偶联的,或可以偶联到癌症治疗剂。靶向癌症治疗剂可以是对特定癌细胞或组织发挥治疗功效的化合物。

[0153] 本发明的原核 PAL 组合物可用于治疗任意 Phe 限制或去除抑制其增殖和 / 或生存的癌症。对本发明的原核 PAL 组合物治疗有效的癌症的鉴定可以基于体外培养实验 (参见实施例 14) 或小鼠中的体内人肿瘤异种移植研究 (参见实施例 15) 使用例如肿瘤活检标本或与在人类癌症的动物模型中已知的或得到证实的对 Phe 限制或去除敏感的肿瘤类型进行比较来进行。在优选的实施方案中,癌症是肺癌、脑癌或中枢神经系统癌、结肠癌、前列

腺癌、肾癌或转移性黑色素瘤。在其他优选的实施方案中，癌症是头颈癌、子宫癌、白血病（例如急性髓性白血病或急性淋巴母细胞白血病）或骨髓瘤。在其他优选的实施方案中，癌症是儿童癌症或耐药性癌症（即，已经被证实对癌症治疗剂或靶向癌症治疗剂有抗性的癌症）。

[0154] 本发明的一些实施方案涉及通过给个体联合施用组合物和蛋白限制性（即不含苯丙氨酸）饮食来治疗癌症，所述组合物包含原核 PAL 或其生物活性片段、突变体、变体或类似物，其中与不存在所述联合施用的浓度相比，原核 PAL 和蛋白限制性饮食的联合施用有效地降低了所述个体血液、血浆或血清中的 Phe 浓度。

[0155] 预期本发明的方法需要监测接受原核 PAL 组合物治疗的个体的血浆 Phe 浓度。患者然后通过单独施用原核 PAL 组合物，或联合施用其他治疗如癌症治疗剂或靶向癌症治疗剂，或联合施用原核 PAL 和蛋白限制型（即不含苯丙氨酸）饮食来进行治疗，从而使患者血液、血浆或血清 Phe 浓度至少降低 10%。优选地，所述方法使血液、血浆或血清 Phe 浓度至少降低 25%，更优选地至少降低 50%。更优选地，所述方法使个体血液、血清或血浆 Phe 浓度至少降低 50%、60%、70%、80%、90%、95% 或更多（例如当血浆 Phe 浓度为 60 微摩的患者接受治疗时，Phe 浓度降低 50%、70% 或 90% 将分别产生 30 微摩、18 微摩或 6 微摩的血浆 Phe 浓度）。显然，应理解本发明的治疗方法会努力将治疗后的患者的血液、血清或血浆 Phe 浓度降低到低于检测水平到约 20 微摩和 60 微摩之间的范围，优选地低于约 20 微摩，甚至更优选地低于约 10 微摩，这可以利用本领域公知的标准检测方法检测。

[0156] 肠胃外、口服或其他标准施用途径和剂量可以利用标准方法实现。

[0157] 2. 用于治疗组合物

[0158] 本发明涉及癌症的治疗性介入。这种介入最初基于原核 PAL 组合物、药物组合物和制剂的使用，它们可以单独使用或与其他治疗如癌症治疗剂或靶向癌症治疗剂联合使用，或将低蛋白饮食（即低苯丙氨酸）和原核 PAL 联合施用，或上述两者。此外，原核 PAL 和 / 或限制性饮食还可以与其他治疗组合物联合，所述组合物设计成用于例如对抗低苯丙氨酸水平现象，例如例如但不限于酪氨酸补充法。该部分提供了关于可用于本文预期治疗的组合物、药物组合物和制剂的讨论。

[0159] 原核 PAL 组合物、药物组合物和制剂

[0160] 通常，本发明涉及药物组合物，其包括治疗有效量的本发明的原核 PAL 组合物以及一种或多种药学上可接受的赋形剂、运载体、稀释剂、稳定剂、防腐剂、增溶剂、乳化剂、佐剂和 / 或载体。这种药物组合物包含各种缓冲液内容物（例如 Tris-HCl、磷酸盐）、pH 和离子强度的稀释剂；添加剂如去污剂和增溶剂（例如聚山梨醇酯 20、聚山梨醇酯 80），抗氧化剂（例如抗坏血酸、焦亚硫酸钠），防腐剂（例如 Thimerosal、苯甲醇）和填充物（例如乳糖、甘露醇）；参见，例如，Remington's Pharmaceutical Sciences, 第 18 版（1990, Mack Publishing Co., Easton, Pa.）第 1435 : 1712 页，其在此通过引用并入本文。活性成分的有效量是治疗、预防或诊断有效量，其由本领域技术人员考虑这类因素如体重、年龄和治疗目标后可以很容易地确定。

[0161] 本发明的原核 PAL 药物组合物可以包括缓冲剂以维持溶液 pH 在所需范围内。优选的缓冲剂包括 Tris-HCl、醋酸钠、磷酸钠、和柠檬酸钠。还可以使用这些缓冲剂的混合物。组合物中有效的缓冲剂量主要取决于使用的具体缓冲液和溶液 pH。例如，醋酸盐在 pH 5 是

比在 pH 6 更有效的缓冲液,所以在 pH 5 可以使用比在 pH 6 更少的醋酸盐。更优选的缓冲剂是 Tris-HCl。用于本发明药物组合物的优选 pH 范围是约 pH 6.0-8.5。用于本发明药物组合物的更优选 pH 范围是约 pH 7.0-8.0。用于本发明药物组合物的最优选 pH 范围是约 pH 7.0-7.6。

[0162] 本发明的药物组合物还可以包括等渗调节剂,以使溶液等渗并且更适合于注射。优选的试剂是在 50-200mM 浓度范围内的氯化钠。更优选的试剂是在 100-150mM 浓度范围内的氯化钠。最优选的试剂是在 130-150mM 浓度范围内的氯化钠。

[0163] 药学上可接受的载体或赋形剂可以包括稳定剂,其是稳定本发明原核 PAL 组合物的分子。本文使用的术语“稳定”,旨在包括,例如但不限于,增加原核 PAL 酶的保存期限、保护原核 PAL 酶免受蛋白水解消化、维持原核 PAL 酶的活性构象、以及在高温保存时保留原核 PAL 酶活性。

[0164] 本发明的稳定剂包括 L- 苯丙氨酸 (Phe) 及其结构类似物,如反式桂皮酸 (t-CA)、安息香酸、酪氨酸 (Tyr) 等。在亲和纯化除去其底物 L- 苯丙氨酸后,来自菜豆 (*Phaseolus vulgaris*) 的植物 PAL (PvPAL) 显示活性丧失 (Da Cunha, Eur. J. Biochem. 178 : 243-248 (1988)), 并且已经表明酪氨酸保护来自圆红冬孢酵母的酵母 PAL (RtPAL) 免遭蛋白酶灭活 (Wang 等., Mol. Genet. Metab. 86 :134-140 (2005) ;Pilbak 等, FEBS J. 273 : 1004-1019 (2006))。如下文所示, Phe 及其结构类似物中的一些具有稳定多变鱼腥藻原核 PAL (AvPAL) 的 PEG : PAL 偶联物的能力 (参见实施例 11)。不受具体理论的约束,假定原核 PAL 酶作为酶-底物复合物更稳定,其中结合的底物 Phe 被转变为产物 t-CA 或 t-CA 的过渡态类似物。t-CA 保持与其他高反应性活性位点中心 (MIO 基团) 的结合,从而稳定 PAL 酶。因此, PAL 酶底物、Phe、产物、t-CA 或其结构类似物是本发明的稳定剂。

[0165] 本发明涉及一种药物组合物,其包含原核 PAL 变体和药学上可接受的载体,其中所述药学上可接受的载体包括稳定剂。所述稳定剂是 Phe 或其结构类似物。所述稳定剂选自 L- 苯丙氨酸、反式肉桂酸和安息香酸。本发明稳定剂的优选范围是每摩尔原核 PAL 活性位点约 0.1 到 20 摩尔稳定剂。本发明稳定剂的更优选的范围是每摩尔原核 PAL 活性位点约 0.5 到 10 摩尔稳定剂。本发明稳定剂的最优选的范围是每摩尔原核 PAL 活性位点约 1 到 10 摩尔稳定剂。

[0166] 在一些实施方案中,药物组合物包含原核 PAL 变体和药学上可接受的载体,其中与野生型 PAL 相比,所述原核 PAL 变体具有更高的苯丙氨酸转化活性和 / 或降低的免疫原性,能够有效地将个体血液、血清或血浆中的 Phe 浓度降低到从低于检测水平到约 20 微摩和 60 微摩之间的范围,优选地低于约 20 微摩,甚至更优选地低于约 10 微摩,其中所述药学上可接受的载体包括稳定剂。在一些实施方案中,所述稳定剂是 Phe 或其结构类似物。在一些实施方案中,所述稳定剂选自 L- 苯丙氨酸、反式肉桂酸和安息香酸。

[0167] 在优选的实施方案中,药物组合物包含原核 PAL 变体和药学上可接受的载体,其中所述原核 PAL 变体是多变鱼腥藻 PAL (AvPAL) 变体,其中 AvPAL 变体第 503 和 565 位的半胱氨酸残基被丝氨酸残基替代,所述 AvPAL 变体还包括聚乙二醇的水溶性聚合物,其中 AvPAL 变体和聚乙二醇的比例是约 1 : 3,所述 AvPAL 变体能够有效地将个体血液、血清或血浆中的苯丙氨酸浓度降低到从低于检测水平到约 20 微摩和 60 微摩之间的范围,优选地低于约 20 微摩,甚至更优选地低于约 10 微摩,其中所述药学上可接受的载体包括稳定剂。

在一些实施方案中,所述稳定剂是 Phe 或其结构类似物。在优选的实施方案中,所述稳定剂选自 L- 苯丙氨酸、反式肉桂酸和安息香酸。

[0168] 如本文使用的,当涉及原核 PAL 变体组合物时,术语“治疗有效量”是指能够有效产生对癌症患者健康状况的预期有益效果的量。在一些实施方案中,原核 PAL 变体的治疗有效量导致血液、血浆或血清(优选的血浆)L- 苯丙氨酸水平的降低,这有利于患者。该量对于不同个体间是不同的,取决于大量因素,包括患者的总体身体健康状况、饮食和疾病状态。用于治疗的原核 PAL 的量导致血液、血浆或血清(优选的血浆)L- 苯丙氨酸水平的可接受的降低,并在 PAL 治疗期间将该值维持在有益水平(通常范围是低于血液、血浆或血清(优选的血浆)L- 苯丙氨酸正常范围的约 5%到约 35%和 100%之间,优选的范围是低于约 5%到约 35%,甚至更优选的范围是低于约 5%到约 15%)。在一些实施方案中,与未接受治疗的患者相比,原核 PAL 变体的治疗有效量在接受治疗的患者中减少肿瘤生长、肿瘤大小或肿瘤负荷大于约 10%、30%、50%、70%、90%、95%、98%或 99%。在一些实施方案中,与未接受治疗的患者相比,原核 PAL 变体的治疗有效量在接受治疗的患者中将肿瘤维持在稳定状态。在一些实施方案中,与未接受治疗的患者相比,原核 PAL 变体的治疗有效量在接受治疗的患者中增加存活时间或无病时间至少约 10%、20%、50%、100%、2 倍、5 倍或 10 倍的更长时间。本领域技术人员利用公开提供的材料和步骤可以轻易地确定本发明原核 PAL 变体组合物的治疗有效量。

[0169] 本发明提供比天然 PAL 施用频率更低的原核 PAL 变体施用。给药频率将根据接受治疗的疾病而改变,但通常是约每周一次。应理解实际使用的给药频率可以稍微不同于本文公开的频率,这归因于不同个体对原核 PAL 变体应答的差异;术语“约”旨在反映这种差异。预期施用原核 PAL 变体约每周两次,约每周一次,约每两周一次,约每月一次,或比约每月一次更长。

[0170] 因此本发明可用于降低血液、血浆或血清 L- 苯丙氨酸水平。许多癌症相关疾病,其中血液、血浆或血清 L- 苯丙氨酸水平的去除是有益的,都可以用本发明的原核 PAL 变体药物组合物进行治疗。

[0171] 根据本发明制备的原核 PAL 药物组合物优选地通过肠胃外注射、静脉内、腹腔内、皮下、肌内、动脉内或鞘内施用。但是,本领域技术人员应清楚其他递送途径也可有效用于本发明的药物组合物。

[0172] 本文描述的方法使用原核 PAL 药物组合物,其包含如上所述的分子,以及一种或多种药学上可接受的赋形剂、运载体、稀释剂、稳定剂、防腐剂、增溶剂、乳化剂、佐剂和 / 或载体,和任选的其他治疗和 / 或预防成分。这类赋形剂包括液体诸如水、盐水、甘油、聚乙二醇、透明质酸、乙醇、环糊精、修饰的环糊精(即磺丁基乙醚环糊精)等等。用于非液体制剂的合适赋形剂还可以是本领域技术人员已知的那些。

[0173] 药学上可接受的盐可用于本发明的组合物,包括例如无机酸盐如盐酸盐、氢溴酸盐、磷酸盐、硫酸盐等等;和有机酸盐如醋酸盐、丙酸盐、丙二酸盐、苯甲酸盐等等。关于药学上可接受赋形剂和盐的深入讨论可以获自 Remington' s Pharmaceutical Sciences,第 18 版 (Easton, Pennsylvania :MackPublishing Company,1990)。

[0174] 此外,这类运载体中还可以存在辅助物,如湿润剂或乳化剂、生物缓冲剂、表面活性剂等等。生物缓冲剂实际上可以是任意溶液,其是药理学上可接受的,并为制剂提供所需

pH,即生理可接受范围内的 pH。缓冲液的实例包括盐水、磷酸缓冲盐溶液、Tris 缓冲盐溶液、Hank's 缓冲盐溶液等等。

[0175] 取决于预期施用方式,药物组合物可以采用固体形式、半固体或液体剂型,例如片剂、栓剂、丸剂、胶囊、粉剂、液体、悬浮剂、乳剂、软膏、洗剂等等,优选地采用适于精确剂量单次施用的单位剂型。所述组合物将包括治疗有效量的原核 PAL 以及药学上可接受的载体,此外,可以包括其他药剂、佐剂、稀释剂、缓冲液等等。

[0176] 通常,本发明的原核 PAL 药物组合物将作为药物制剂施用,如那些适于口服(包括口腔和舌下)、直肠、鼻、局部、肺部、阴道或肠胃外(包括肌内、动脉内、鞘内、皮下和静脉内)施用或采用适于通过吸入或吹入施用的制剂。优选的施用方式是利用方便的每日静脉内给药方案,其可以根据患病程度进行调整。

[0177] 对于固体组合物来说,常规的无毒固体载体包括例如药物级的甘露醇、乳糖、淀粉、硬脂酸镁、糖精钠、滑石、纤维素、葡萄糖、蔗糖、碳酸镁等等。药学上可施用的液体组合物可以例如通过将本文描述的原核 PAL 变体组合物和可选的药物佐剂在赋形剂(如水、盐水、水性葡萄糖、甘油、乙醇等等)中溶解、分散等等,从而形成溶液或悬液来制备。如果需要,待施用的药物组合物还可以包含微量的无毒辅助物如湿润剂或乳化剂、pH 缓冲剂、增强剂(tonicifying agents)等等,例如醋酸钠、脱水山梨醇单月桂酸酯、三乙醇胺醋酸钠、油酸三乙醇胺酯等等。制备这类剂型的实际方法对本领域技术人员来说是已知的,或对他们来说是显而易见的;例如,参见 Remington's Pharmaceutical Sciences,如上文的参考。

[0178] 对于口服给药来说,组合物通常采用片剂、胶囊或软胶囊的形式,或可以是水性或非水性溶液、悬液或糖浆。片剂和胶囊是优选的口服给药形式。用于口服使用的片剂和胶囊通常包括一种或多种常用的载体诸如乳糖和玉米淀粉。通常还添加润滑剂,诸如硬脂酸镁。当使用液体悬液时,活性剂可以与乳化剂和悬浮剂组合。如果需要,还可以添加调味剂、着色剂和/或甜味剂。用于掺入本文口服制剂的其他可选组分包括,但不限于防腐剂、悬浮剂、增稠剂等等。

[0179] 肠胃外制剂可以制备为常规形式,作为液体溶液或悬液,适于重建的固体或冻干形式,注射前在液体中溶解或悬浮,或作为乳液。优选的,利用合适的载体、分散剂或湿润剂和悬浮剂,根据本领域已知的技术配制注射用无菌悬液。注射用无菌制剂还可以是溶于无毒肠胃外可接受稀释剂或溶剂的注射用无菌溶液或悬液。属于可使用的可接受赋形剂和溶剂的是水、Ringer's 溶液和等渗氯化钠溶液。此外,无菌、非挥发油、脂肪酯或多元醇通常被用做溶剂或悬浮介质。此外,肠胃外给药可以包括使用缓释或持续释放系统,这样的话可以维持剂量的恒定水平。

[0180] 可以给患者施用治疗有效剂量的本文描述的本发明的原核 PAL 组合物以治疗癌症。在细胞培养物或实验动物中通过标准药学方法可以测定这种原核 PAL 组合物的毒性和治疗效果,例如通过测定 LD_{50} (50%群体的致死剂量)和 ED_{50} (50%群体的治疗有效剂量)。毒性和治疗效果的剂量比例是疗效指数,其可以表示为 LD_{50}/ED_{50} 的比例。显示高疗效指数的原核 PAL 组合物通常是优选的。

[0181] 从细胞培养物分析和动物研究获得的数据可用于配制给人使用的剂量范围。剂量优选的处于循环浓度范围内,其包括具有最低或者最小毒性的 ED_{50} 。该范围内的剂量可以

变化,这取决于使用的剂型和使用的施用途径。可以从细胞培养物分析和动物模型确定治疗有效的剂量或量。

[0182] 饮食蛋白

[0183] 除了给癌症患者施用原核 PAL 组合物外,还预期可以限制或改变患者的饮食蛋白。本领域技术人员清楚用于治疗 PKU 的各种商品化供应的蛋白配制品。这类配制品包括 MAXIMAID、PHENEX 1、PHENEX 2(Ross Laboratories, Liverpool, UK)、LOFENALAC、PHENYL-FREE(Mead-Johnson) 等等。

[0184] 本领域技术人员可以使用参考蛋白配制品,其通常不含 Phe 浓度。该蛋白配制品中经常添加 PKU 患者缺乏的氨基酸。这种氨基酸包括例如 L- 酪氨酸和 L- 谷氨酰胺。

[0185] 此外,除了蛋白限制外,众所周知还应提供 L- 肉碱和牛磺酸(通常发现于人乳和动物来源的其他食品)。在一些实施方案中,L- 肉碱可以作为 20mg/100g 的蛋白补充剂提供,牛磺酸可以作为 40mg/100g 的蛋白补充剂提供,以帮助提供这些因子通常存在于人乳和动物来源食品中的量。

[0186] 此外,本领域技术人员可以查阅 2000 国家科学院-国家研究委员会饮食参考摄入量(2000 National Academy of Sciences-National Research Council Dietary Reference Intakes)关于其他组分的进一步列表,如必需维生素和矿物,这些应提供给患者以确保除了饮食蛋白限制外其他补充剂被提供。

[0187] 根据上文关于总蛋白量和优选血浆 Phe 浓度的讨论,本领域将能确定要求的饮食蛋白限制的量,进而调节患者的饮食。当给该个体施用原核 PAL 时,确定本发明方法是否有效需要定期地检测患者的血浆 Phe 浓度以确保血浆 Phe 浓度维持在从低于检测水平到约 20 微摩和 60 微摩之间的范围,优选地低于约 20 微摩,甚至更优选地低于约 10 微摩。检测这种浓度的试验在下文描述。优选地,实现低于约 20 微摩到 60 微摩的检测水平的浓度,更优选地低于约 20 微摩,甚至更优选地低于约 10 微摩。

[0188] 在一些实施方案中,本发明提供一种治疗癌症的方法,包括给需要这种治疗的个体施用治疗有效量的药物组合物,还包括给个体施用蛋白限制性(即,不含苯丙氨酸)饮食,所述药物组合物包含原核苯丙氨酸氨裂合酶(PAL)变体和药学上可接受的载体,其中与野生型 PAL 相比,所述 PAL 变体具有更高的苯丙氨酸转化活性和/或降低的免疫原性,能够有效将个体血液、血清或血浆中的苯丙氨酸浓度降低到从低于检测水平到约 20 微摩和 60 微摩之间的范围,优选地低于约 20 微摩,甚至更优选地低于约 10 微摩。

[0189] 本发明的一些方法包括原核 PAL 与饮食蛋白限制的联合使用,以影响患有各种形式癌症的患者的治疗效果。为了在本文涉及的联合疗法中实现合适的治疗效果,优选地通常给个体施用原核 PAL 组合物和饮食限制的组合物有效量以产生所需治疗结果(即,利用本领域公知的标准检测方法检测,血浆 Phe 浓度降低到低于最佳约 20 微摩到 60 微摩的检测水平的范围,优选地低于约 20 微摩,甚至更优选地低于约 10 微摩)。该步骤可以包括施用原核 PAL 组合物并同时施用饮食蛋白治疗组合物。这可以通过施用单一组合物或药理学蛋白制剂来实现,该组合物或药理学蛋白制剂包含所有饮食蛋白需要,还包括原核 PAL。可选地,饮食蛋白(补充剂或正常蛋白粉)与原核 PAL 的药理学制剂(片剂,注射剂或饮料)在大约同一时间摄取。还可以将原核 PAL 配制入适于摄入的蛋白棒或其他食品如核仁巧克力饼、薄烤饼、蛋糕中。

[0190] 因为施用原核 PAL 不会产生酪氨酸（与 PAH 的施用不同），因此这种治疗仍然会使酪氨酸成为这类患者的必需氨基酸。因此，对于只接受原核 PAL 联合饮食蛋白疗法的患者来说，含有酪氨酸的饮食补充法是合乎需要的。

[0191] 在其他选择中，原核 PAL 治疗可以在饮食蛋白疗法前或后进行，间隔范围从数分钟到数小时。在蛋白和原核 PAL 组合物分开施用的实施方案中，通常要确保每次递送时间之间的重要时间段不会过期，从而使 PAL 仍能够发挥对患者的有利作用。在这种情况下，预期在饮食蛋白摄入约 2-6 小时内（之前或之后）施用 PAL，只有约 1 小时的延时是最优选的。在一些实施方案中，预期当 PAL 的每日剂量给患者长时间施用时，PAL 疗法将是连续的疗法。

[0192] 3. 联合疗法

[0193] 此外，除了仅仅基于原核 PAL 递送和饮食蛋白调节的疗法之外，本发明的方法还涉及与特异性靶向一种或多种癌症症状的组合物一起的联合疗法。这类组合物包含例如但不限于癌症治疗剂和靶向癌症治疗剂。

[0194] 癌症治疗剂

[0195] 根据本文描述的方法，任意对癌细胞具有治疗作用（即，抑制增殖和 / 或生存）的药剂都可以用作与本发明原核 PAL 组合物联合的癌症治疗剂。通常，癌症治疗剂是细胞毒剂或细胞生长抑制剂。

[0196] 癌症治疗剂可以与本发明的原核 PAL 组合物一起作为癌症协同疗法施用。本文使用的“癌症协同疗法”是指癌症治疗剂和原核 PAL 组合物同时或连续施用，所述癌症治疗剂在原核 PAL 组合物之后施用，或反过来。

[0197] 细胞毒剂的有用类型包括例如抗微管蛋白剂、auristatins、DNA 小沟结合剂、DNA 复制抑制剂、烷化剂（例如，铂复合物如顺铂、单铂、双铂和三核铂复合物和卡铂）、蒽环类、抗生素、抗叶酸物、抗代谢物、化疗敏化剂、多卡米星、鬼臼亚乙苷、氟化嘧啶、离子载体、lexitropsins、亚硝基脲、顺铂、预形成化合物、嘌呤抗代谢物、嘌呤霉素、辐射敏化剂、类固醇、紫杉烷类、拓扑异构酶抑制剂、长春花生物碱等等。

[0198] 个体细胞毒剂包括例如雄激素、氨基霉素（AMC）、天冬酰胺酶、5- 氮胞苷、咪唑硫嘌呤、博来霉素、白消安、丁硫氨酸硫酸亚胺、喜树碱、卡铂、亚硝基氮芥（BSNU）、CC-1065、苯丁酸氮芥、顺铂、秋水仙碱、环磷酰胺、阿糖胞苷、胞苷阿糖胞苷、细胞松弛素 B、氮烯唑胺、更生霉素（原先的放线菌素）、道诺红菌素、氮烯咪胺、紫杉萜、多柔比星、雌激素、5- 氟脱氧尿苷、5- 氟尿嘧啶、短杆菌肽 D、羟基脲、伊达比星、异磷酰胺、依立替康、环己亚硝基（CCNU）、氮芥、苯丙氨酸氮芥、6- 巯基嘌呤、氨甲蝶呤、光辉霉素、丝裂霉素 C、米托蒽醌、硝基咪唑、紫杉醇、普卡霉素、丙卡巴肼、链脲霉素、替尼泊甙、6- 硫代鸟嘌呤、噻替派、托泊替康、长春碱、长春新碱、长春瑞滨、VP-16 和 VM-26。

[0199] 在一些实施方案中，癌症治疗剂是细胞毒剂。合适的细胞毒剂包括例如多拉司他汀（例如 auristatin E、AFP、MMAF、MMAE）、DNA 小沟结合剂（例如烯二炔和 lexitropsins）、多卡米星、紫杉烷类（例如紫杉醇和紫杉萜）、嘌呤霉素、长春花生物碱、CC-1065、SN-38、托泊替康、吗啉代 - 多柔比星、根霉素、氰基吗啉 - 多柔比星、棘霉素、考布他汀、纺锤菌素、埃博霉素 A 和 B、雌氮芥、cryptophysins、西马多丁、美登素类、discodermolide、eleutherobin、和米托蒽醌。

[0200] 在一些实施方案中,细胞毒剂是常规化疗剂例如多柔比星、紫杉醇、苯丙氨酸氮芥、长春花生物碱、氨甲蝶呤、丝裂霉素 C 或鬼臼亚乙苷。此外,可以使用有效药剂诸如 CC-1065 类似物、加利车霉素、美登素、多拉司他汀 10 类似物、根霉素、和海葵毒素。

[0201] 在一些实施方案中,细胞毒剂是 DNA 小沟结合剂,例如 CBI 化合物或烯二炔类(例如,加利车霉素)。

[0202] 在一些实施方案中,癌症治疗剂是抗微管蛋白剂。抗微管蛋白剂的实例包括紫杉烷类(例如 TAXOL(紫杉醇)、TAXOTERE(紫杉萜))、T67(Tularik)、长春花生物碱(例如长春新碱、长春碱、长春地辛和长春瑞滨)、和多拉司他汀(例如 auristatin E、AFP、MMAF、MMAE、AEB、AEVB)。其他抗微管蛋白剂包括例如浆果赤霉素衍生物、紫杉烷类似物(例如埃博霉素 A 和 B)、噻氨酯吡啶、秋水仙碱和秋水酰胺、雌氮芥、cryptophysins、西马多丁、美登素类、考布他汀、discodermolide、和 eleutherobin。

[0203] 在一些实施方案中,细胞毒剂是美登素类,另一类抗微管蛋白剂,例如美登素或 DM-1。

[0204] 在一些实施方案中,癌症治疗剂是放射性同位素。在一些实施方案中,癌症治疗剂不是放射性同位素。

[0205] 在一些实施方案中,细胞毒剂是抗代谢物。抗代谢物可以是例如嘌呤拮抗剂(例如,硫唑嘌呤或霉酚酸酯)、二氢叶酸还原酶抑制剂(例如,氨甲蝶呤)、无环鸟苷、更昔洛韦、叠氮胸苷、阿糖腺苷、利巴韦林、叠氮胸腺嘧啶、胞苷阿糖胞苷、氨基三环癸烷、双脱氧尿苷、碘苷、poscarnet、或曲氟尿苷。

[0206] 在其他实施方案中,细胞毒剂是他克莫司、环孢菌素或雷帕霉素。在其他实施方案中,细胞毒剂是阿地白介素、阿仑珠单抗、阿利维 A 酸、别嘌呤醇、六甲密胺、氨磷汀、阿那曲唑、三氧化二砷、贝沙罗汀、贝沙罗汀、二甲睾酮、卡培他滨、塞来昔布、克拉屈滨、Darbepoetin alfa、Denileukindiftitox、右雷佐生、屈他雄酮丙酸盐、表柔比星、Epoetin alfa、雌氮芥、依西美坦、非格司亭、氟尿苷、氟达拉滨、氟维司群、吉西他滨、吉妥珠单抗、奥佐米星、戈舍瑞林、伊达比星、异磷酰胺、伊马替尼、去铁胺、干扰素 alfa-2a、依立替康、来曲唑、甲酰四氢叶酸、左旋四咪唑、meclorothamine 或氮芥、甲地孕酮、美司钠、氨甲蝶呤、甲氧沙林、丝裂霉素 C、米托坦、苯丙酸诺龙、奥普瑞白介素、奥沙利铂、氨羟二磷酸二钠、培加酶、培门冬酶、培非司亭、喷司他丁、双溴丙基哌嗪、普卡霉素、吡非尔钠、甲基苄肼、阿的平、拉布立酶、利妥昔单抗、沙莫司亭、链脲霉素、三苯氧胺、替莫唑胺、鬼臼噻吩甙、睾内酯、硫鸟嘌呤、托瑞米芬、托西莫单抗、曲妥单抗、维甲酸、尿嘧啶氮芥、戊柔比星、长春碱、长春新碱、长春瑞滨和唑来膦酸。

[0207] 在一些实施方案中,本发明提供了一种治疗癌症的方法,包括给需要这种治疗的个体施用治疗有效量的药物组合物,还包括施用治疗有效量的包括癌症治疗剂的药物组合物,所述药物组合物包含原核 Phe 氨裂合酶(PAL)变体和药学上可接受的载体,其中与野生型 PAL 相比,所述 PAL 变体具有更大的 Phe 转化活性和/或降低的免疫原性,能够有效将个体血液、血清或血浆中的 Phe 浓度降低到从低于检测水平到约 20 微摩和 60 微摩之间的范围,优选地低于约 20 微摩,甚至更优选地低于约 10 微摩。

[0208] 靶向癌症治疗剂

[0209] 根据本文描述的方法,任意对特定癌细胞具有治疗作用(即,抑制增殖和/或生

存)的药剂都可以用作与本发明的原核 PAL 组合物联合的靶向癌症治疗剂。通常,靶向癌症治疗剂是选择性结合特定类型的肿瘤细胞或组织的抗体或酶或蛋白,例如但不限于,借助于具有抗体样的靶向结构域或通过受体介导的结合。抗体、具有抗体样靶向结构域的多肽、酶或蛋白可以被放射标记,或与对靶细胞或组织具有细胞毒或抑制细胞效应的毒素或其他药剂偶联。可选地,靶向癌症治疗剂可以是通过抑制或活化蛋白,例如但不限于,酶或受体(其优选地在特定类型的肿瘤细胞或组织中表达或显示活性)而对特定癌细胞或组织发挥治疗作用(即,抑制增殖和/或生存)的药剂。

[0210] 靶向癌症治疗剂可以与本发明的原核 PAL 组合物一起作为靶向癌症协同疗法施用。本文使用的“靶向癌症协同疗法”是指靶向癌症治疗剂和原核 PAL 组合物同时或连续施用,所述靶向癌症治疗剂在原核 PAL 组合物之后施用,或反过来。

[0211] 在一些实施方案中,靶向癌症治疗剂是人源化的抗 HER2 单克隆抗体,RITUXAN(利妥昔单抗;Genentech;嵌合抗 CD20 单克隆抗体);OVAREX(AltaRex Corporation, MA);PANOREX(Glaxo Wellcome, NC;小鼠 IgG2a 抗体);Cetuximab Erbitux(Imclone Systems Inc., NY;抗 EGFR IgG 嵌合抗体);Vitaxin(MedImmune, Inc., MD;Campath 1/H(Leukosite, MA;人源化 IgG1 抗体);Smart MI95(Protein Design Labs, Inc., CA;人源化抗 CD33IgG 抗体);LymphoCide(Immunomedics, Inc., NJ;人源化抗 CD22IgG 抗体);Smart ID10(Protein Design Labs, Inc., CA;人源化抗 HLA-DR 抗体);Oncolym(Techniclone, Inc., CA;放射标记的小鼠抗 HLA-Dr10 抗体);Allomune(BioTransplant, CA;人源化抗 CD2mAb);Avastin(Genentech, Inc., CA;抗 VEGF 人源化抗体);Epratuzamab(Immunomedics, Inc., NJ and Amgen, CA;抗 CD22 抗体);和 CEAcide(Immunomedics, NJ;人源化抗 CEA 抗体)。

[0212] 其他合适的抗体包括但不限于抗下列抗原的抗体:CA125、CA 15-3、CA19-9、L6、Lewis Y、Lewis X、甲胎蛋白、CA 242、胎盘碱性磷酸酶、前列腺特异性抗原、前列腺酸性磷酸酶、表皮生长因子、MAGE-1、MAGE-2、MAGE-3、MAGE-4、抗转铁蛋白受体、p97、MUC1-KLH、CEA、gp100、MART1、前列腺特异性抗原、IL-2 受体、CD20、CD52、CD33、CD22、人绒毛膜促性腺激素、CD38、CD40、粘蛋白、P21、MPG、和 Neu 癌基因产物。

[0213] 在一些实施方案中,靶向癌症治疗剂是具有抗体样靶向结构域或具有选择性结合特定细胞或组织的能力(例如,通过配体受体结合)的酶或其他蛋白。通常,具有抗体样靶向结构域的蛋白、酶或其他蛋白与癌症治疗剂例如化合物或肽/多肽,例如毒素如蓖麻毒、白喉毒素、假单胞菌内毒素等等(Kreitman, AAPS J. 8(3):E532-E551(2006))或对靶细胞或组织具有细胞毒或抑制细胞效应的其他药剂偶联。

[0214] 在一些实施方案中,靶向癌症治疗剂是对特定癌细胞或组织具有治疗作用的化合物(例如,小分子或肽/多肽),例如丝氨酸/苏氨酸激酶抑制剂、酪氨酸激酶抑制剂、核受体激动剂、核受体拮抗剂等等。

[0215] 在一些实施方案中,本发明提供一种治疗癌症的方法,包括给需要这种治疗的个体施用治疗有效量的药物组合物,还包括施用治疗有效量的包括靶向癌症治疗剂的药物组合物,所述药物组合物包含原核 Phe 氨裂合酶(PAL)变体和药学上可接受的载体,其中与野生型 PAL 相比,所述 PAL 变体具有更大的 Phe 转化活性和/或降低的免疫原性,能够有效将个体血液、血清或血浆中的 Phe 浓度降低到从低于检测水平到约 20 微摩和 60 微摩之间的范围,优选地低于约 20 微摩,甚至更优选地低于约 10 微摩。

[0216] 4. 鉴定和监测患者群体

[0217] 如本文自始至终所讨论的,在本发明的各种实施方案中需要检测指定癌症患者是否对原核 PAL 疗法产生应答,并检测开始和治疗方案进行期间患者的苯丙氨酸 (Phe) 浓度,以根据血浆 Phe 浓度的降低监测所述方案的效果。示例性的这类方法在下文描述。

[0218] 鉴定患者对原核 PAL 疗法的应答

[0219] 对本发明原核 PAL 组合物治疗有效的患者的鉴定可以基于体外培养实验或小鼠中的体内人肿瘤异种移植研究来进行,或与已知的或得到证实的其生长依赖 Phe 的并且在人类癌症的动物模型中对 Phe 限制或去除敏感的肿瘤类型进行比较来进行。

[0220] 可以利用本领域已知的方案进行体外培养实验,其中肿瘤细胞(例如,来自肿瘤活检或临床吸出物)在存在或没有原核 PAL 组合物或存在或没有缺乏苯丙氨酸的培养基的条件下生长(参见,例如,Abell 等, *Cancer Res.* 32 :285-290(1972);Stith 等, *Cancer Res.* 33 :966-971(1973);Fu 等, *Cancer Res.* 59 :758-765(1999);Fu 等, *J. Cell. Physiol.* 209 :522-534(2006);Elstad 等, *Nutr. Cancer* 25 :47-60(1996);Nunez 等, *Cancer Lett.* 236 :133-141(2006))。还可参见实施例 14。

[0221] 可以利用本领域已知的方案在小鼠中进行体内人肿瘤异种移植研究,其中将肿瘤细胞(例如,来自肿瘤活检或临床吸出物)注射入裸鼠或 SCID 小鼠,然后在存在或没有原核 PAL 组合物或存在或没有缺乏苯丙氨酸的饮食的条件下移植入新生裸鼠或 SCID 小鼠(参见,例如,Abell 等, *Cancer Res.* 33 :2529-2532(1973);Shen 等, *Cancer Res.* 37 :1051-105(1977);Fu 等, *Nutr. Cancer* 31 :1-7(1998);Fu 等, *Nutr. Cancer* 45 :60-73(2003);Meadows 等, *Cancer Res.* 42 :3056-3063,1982;Elstad 等, *Anticancer Res.* 13 :523-528, (1993))。还可参见实施例 15。

[0222] 已知或得到证实的其生长依赖于 Phe 并且在人类癌症的动物模型中对 Phe 限制或去除敏感的肿瘤类型包括例如白血病、转移性骨髓瘤和不依赖雄激素的前列腺癌 (Abell 等, (1973), 同前;Shen 等, (1977), 同前;Fu 等, (1998), 同前;Fu 等, (2003), 同前;Meadows 等, (1982), 同前;Elstad 等, (1993), 同前)。

[0223] 实施例 14 显示源自以下癌症的肿瘤细胞的增殖和/或生存在与本发明原核 PAL 组合物温育时对 Phe 限制敏感:肺癌、脑癌或中枢神经系统癌、结肠癌、前列腺癌、肾癌、转移性黑色素瘤、头颈癌、子宫癌、白血病(例如急性髓性白血病或急性类淋巴母细胞白血病)和骨髓瘤。

[0224] 苯丙氨酸浓度的检测

[0225] 检测血液、血清或血浆中苯丙氨酸 (Phe) 浓度的方法是本领域已知的,其中一些描述于 2005 年 9 月 19 日提交的先前共同待决的美国专利申请号 11/230,374,其在此通过引用全文并入本文。预期在治疗方案的整个过程都按照适当间隔(例如每天、每隔一天或每周)监测患者的血浆 Phe 水平。通过这种规律性的监测血浆 Phe 水平,临床医生将能够评价治疗效果并据此调整原核 PAL 和/或饮食蛋白需要量。

[0226] E. 原核 PAL 的产生

[0227] 本发明的另一方面是一种产生原核 PAL 或其生物活性片段、突变体、变体或类似物的方法。在优选的实施方案中,在载体中有或没有 N 端标签(例如,八组氨酰-标签)的重组原核 PAL 或其生物活性片段、突变体、变体或类似物在大肠杆菌 BLR(DE3)/

pLysS(Novagen) 或大肠杆菌 BL21 (DE3) /pLysS(Invitrogen) 细胞中过表达,所述载体优选是 pIBX1(Su 等, Appl. Environ. Microbiol. 62 :2723-2734(1996)) 或具有诱导型启动子诸如 IPTG(异丙基 - β -D- 硫代半乳糖苷) 的 pET28a(Invitrogen)。用于生物反应器 / 发酵罐的种子培养物在摇瓶的甘油储液中生长。然后将所述种子培养物按照补料分批方式加入受控生物反应器。然后补充葡萄糖,并用碱 (NH₄OH) 调控 pH, 搅拌直至 1200rpm。添加 O₂ 保持大于 20% 的溶解氧。细胞在 37℃ 的温度生长,直至达到 OD₆₀₀ 为 70-100 (22-25 小时), 然后用 0.4mM IPTG 诱导。温度降低到 30℃, 培养直至活性变化 < 0.1IU/mL (大约 40-48 小时, OD₆₀₀ 通常为 200)。细胞培养基通常被定义并由酵母提取蛋白、蛋白胨 - 胰蛋白胨、葡萄糖、甘油、酪蛋白氨基酸、微量盐和磷酸盐缓冲盐组成。重组原核 PAL 产物或其生物活性片段、突变体、变体或类似物在胞内产生,不分泌。通过连续离心 (Alfa-Laval, Carr, Ceba, 或等同物) 收集细菌。

[0228] F. 原核 PAL 的纯化

[0229] 本发明的另一方面描述一种纯化原核 PAL 或其生物活性片段、突变体、变体或类似物的方法。根据第一个实施方案,转化的细胞群被培养和裂解,产生粗重组酶。通常将外源性材料与粗制物分离以免弄脏柱子。利用一种或数种层析树脂进行层析纯化。随后,用设计成能在较长时间提供稳定活性的缓冲液配制纯化的蛋白。在另一优选的实施方案中,纯化原核 PAL 或其生物活性片段、突变体变体或类似物的方法包括以下步骤:(a) 利用压力匀浆器裂解包含重组 PAL 或其生物活性片段、突变体变体或类似物的细菌 (但还可以通过其他物理方式如玻璃珠裂解);(b) 热处理 ;(c) 利用第二次连续离心步骤和 / 或深层过滤净化该裂解物 (例如用 Cuono Zeta Plus 或 Maximizer, Pall Filtron, 或 Millipore Millistak 或 Optica 过滤器);(d) 通过木炭过滤步骤 (例如用 Millipore Millistak 40AC);(e) 通过最终过滤步骤 (例如用 Sartorius Sartopore 0.2 μ m 滤器);(f) 通过疏水性相互作用层析 (例如用 Tosoh Biosciences 的 Toyopearl Butyl 650M);(g) 通过 Q 离子交换柱 (例如用 BioRad 的 Macroprep High Q);和 (h) 利用切向流过滤通过缓冲液交换回收终产物 (例如用 Sartorius Hydrosart 或 PES 100kDa 膜)。本领域技术人员很容易理解,在本发明范围内层析步骤中的一个或多个可以省略或替换,或层析步骤的顺序可以改变。最终,可以按照要求进行合适的杀菌步骤。

[0230] 现在已经大致描述了本发明,通过参考下列实施例将更容易理解相同内容。提供实施例只是为了说明目的,无论如何不是用于限制本发明的范围。已经尽力确保使用的数字 (例如量、温度等等) 的准确性,但显然应允许一些实验误差和偏差。

实施例

[0231] 实施例 1

[0232] 点形念珠藻和多变鱼腥藻 PAL 的克隆

[0233] DNA 操作

[0234] 点形念珠藻基因组 DNA 购自 ATCC (29133D), 并利用引物 5' -CACTGTC ATATG AAT AT AAC ATCTCTAC AAC AG AAC AT-3' (SEQ ID NO:12) 和 5' -GACAGTGGCGGCCGCTCACGTTGACCTTAAGCTCGAAAAATATG-3 (SEQ ID NO:13) PCR 扩增 PAL 基因 (ZP_00105927)。用 NdeI 和 NotI 消化所获 PCR 产物,将 1.7kb 片段分别连入有 N-His 标签和没有标签的 pET-28a(+) 和

pET-30a(+) (Novagen)。

[0235] 多变鱼腥藻细胞购自 ATCC(29413)。提取基因组 DNA(Qiagen), 并利用 SOE-PCR 扩增 PAL 基因 (YP_324488) 以去除 NheI 位点。引物 1(5' -CACTGTGCTAGCATGAAGACACTATCTC AAGCACAAAG-3') (SEQ ID NO:14) 和引物 2(5' -GGAAATTTCTCCATGATAGCTGGCTTGTTATCAACAT CAATTAGTGG-3') (SEQ ID NO:15) 用于扩增核苷酸 1-1190, 引物 3(5' -CCACTAATTGATGTTG ATAACCAAGCCAGCTATCATGGAGGAAATTTCC-3') (SEQ ID NO:16) 和引物 4(5' -CACTGTGCGGCCGCT TAATGCAAGCAGGGTAAGATATCTTG-3') (SEQ ID NO:17) 用于扩增核苷酸 1142-1771。利用引物 1 和 4 将这两种 PCR 产物结合以扩增全长基因。所获 PCR 产物用 NheI 消化, Klenow(NEB) 钝化, 然后用 NotI 消化。将 1.7kb 片段连入 pET-28a(+) 和 pET-30a(+) (Novagen)。该质粒被命名为 3p86-23。

[0236] 还将多变鱼腥藻 PAL(AvPAL) 基因克隆入 pIBX7(Tkalec 等, Appl. Environ. Microbiol. 66:29-35(2000)), 该载体来源于 pIBX1(Su 等, Appl. Environ. Microbiol. 62:2723-2734(1996)) (参见实施例 7)。

[0237] 菌株和培养条件

[0238] 对于点形念珠藻 PAL(NpPAL), 利用 pGro7(TaKaRa) 转化大肠杆菌 BL21(DE3) 细胞 (Stratagene), 感受态 BL21(DE3)pGro7 细胞用 Inoue 方法制备 (Sambrook and Russell, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 第 3 版 (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, 2001))。这些细胞用 pET-28-NpPAL 转化, 并在含 50mg/L 卡那霉素和 20mg/L 氯霉素的 25mLLB 中 37℃ 培养过夜。将 20 毫升该培养物种入 1L 含卡那霉素、氯霉素和 500mg/L L-阿拉伯糖的 LB 培养基中, 并在 37℃ 培养。当 OD₆₀₀ 为 0.6 时, 将培养物在冰上冷却。5 分钟后, 培养物用 0.3mM IPTG 诱导, 并在 20℃ 生长 16 小时。通过离心收集细胞。

[0239] BL21(DE3)pLysS 细胞 (Stratagene) 用 AvPAL 转化, 并进行和 NpPAL 相同的培养, 但无阿拉伯糖诱导。

[0240] 通过转化将克隆入 pIBX7 载体的 AvPAL(参见实施例 7) 导入 BLR(DE3)/pLysS(Novagen) 细胞, 并在含 50mg/L 卡那霉素的 25mL LB 中 37℃ 培养过夜。将 20 毫升该培养物种入 1L 含卡那霉素的 LB 培养基中, 并在 37℃ 培养。当 OD₆₀₀ 为 0.6 时, 将培养物在冰上冷却。5 分钟后, 培养物用 0.3mM IPTG 诱导, 并在 30℃ 生长 16 小时。通过离心收集细胞。

[0241] 实施例 2

[0242] NpPAL 和 AvPAL 的纯化

[0243] 在台式离心机上 5,000g 离心培养物 20 分钟, 弃去上清。在进一步处理前细胞沉淀通常冻存于 -70℃。解冻时, 将细胞沉淀用 TBS(25mM Tris, 150mM NaCl, pH 7.8) 悬浮到大约 80 个光密度单位 (600nm)。利用两次通过 12-14,000psi 的 APV 压力匀浆器裂解细胞。然后在 55℃ 热处理粗裂解物 2 小时。在 10,000g 离心裂解物 30 分钟, 保留上清, 并用 0.2 μm 真空滤器 (Corning) 过滤。

[0244] 利用连续通过丁基 650M 柱 (Tosoh BioSciences) 和 MacroPrep High Q 柱 (BioRad), 从净化的裂解物纯化 PAL。在 SDS PAGE 和反相 HPLC 中洗脱产物均显示高的纯度水平。

[0245] 实施例 3**[0246] 聚乙二醇化 PAL 变体的产生**

[0247] 聚乙二醇化圆红冬孢酵母 PAL (RtPAL) 的方法在下文描述。用于聚乙二醇化原核 PAL (例如, 点形念珠藻 (NpPAL) 或多变鱼腥藻 (AvPAL)) 的类似方法描述于实施例 6。

[0248] 蛋白聚乙二醇化

[0249] 聚乙二醇化利用文献方法的改进 (Hershfield 等., (1991), 同前; 美国专利号 6, 057, 292; Lu 等, Biochemistry 40(44):13288-13301(2001); Nektar Therapeutics, 2003 目录)。活化的 PEG 包括线性 PEG 琥珀酰亚胺琥珀酸酯 (mPEG-SPA, MW 5kDa 或 MW 20kDa) 和分枝 PEG 羟基丁二酰亚胺 (mPEG2-NHS 酯, MW 10kDa 或 MW 40kDa), 它们两者在一端都覆盖甲氧基, 并可获自 Nektar Therapeutics; 通常需要实验确定最适聚乙二醇化蛋白 (Veronese 等, J. Bioactive Compatible Polymers 12:196-207(1997))。利用不同比例的 PAL : PEG (考虑蛋白的摩尔比以及每蛋白单体的赖氨酸数目)、不同的 pH、不同的缓冲液、各种温度和孵育时间来确定最适聚乙二醇化条件。高的 PAL 蛋白 : PEG 衍生物比例是必需的, 因为天然 PAL 具有大量赖氨酸 (每个圆红冬孢酵母 (Rt) 单体 29 个), 且因为在小鼠中重复注射时未修饰的 PAL 显示免疫反应性, 还因为裸 (野生型) PAL 在暴露于蛋白酶时很快灭活。在 -20℃ 冷冻终止聚乙二醇化反应, 并通过 SDS-PAGE, MALDI-TOF 质谱分析, 活性评价, 蛋白水解敏感性和免疫反应性来分析样品。

[0250] 在活性、蛋白水解和免疫评价前, 为了除去过量的未反应 PEG, 将反应物用 pH 8.5, 0.05M 磷酸钾缓冲液在 4℃ 透析过夜, 利用 Tube-0-Dialyzers (GenoTechnology) 搅拌。在利用 NI 蛋白分析试剂盒 (GenoTechnology) 测定蛋白浓度后, 利用先前描述的标准反应条件对未衍生化和 PEG 衍生化的 PAL 样品进行 PAL 活性测量。在体外表征后, 利用 PKU 小鼠模型对最有希望的聚乙二醇化治疗候选物进行体内试验。

[0251] 表征

[0252] 利用 280nm 处的 PAL 消光系数 (对于 RtPAL 和 AvPAL 来说分别是 0.5 和 0.75mg mL⁻¹cm⁻¹) 测定非修饰蛋白样品和聚乙二醇化蛋白样品的蛋白浓度, 利用 NI Protein Assay (GenoTechnology) 计算浓度, 包括采样处理以去除可能干扰精确蛋白浓度测定的非蛋白污染物。

[0253] PEG-PAL 产物通过下列方法表征: 肽作图技术以确定位点特异性聚乙二醇化 (LC/ESI-MSD) 和三硝基苯磺酸 (TNBS) 以检测聚乙二醇化前后的游离胺滴度。肽作图确定大多数胰蛋白酶肽 (终止于赖氨酸) 的聚乙二醇化相对占有率, 但是, 由于大小以及多个相邻赖氨酸胰蛋白酶肽, 利用该技术无法检测到所有位点。TNBS 分析更准确的确定每 mol 酶的平均 PEG 分子数, 但无法给出哪些位点被聚乙二醇化的信息。因此, 这两种分析法都被使用, 以便彼此互补。通过 SDS-PAGE 和天然凝胶分析可以粗略估计 PAL 产物被 PEG 衍生化的百分比。使用酶分析评价聚乙二醇化前后的比活性, 并提供不存在四聚体 PAL 结构损失的证据。

[0254] PAL 活性分析

[0255] 利用 Cary UV 分光光度计 (Cary 50) 按动力学方式进行 PAL 活性分析。在室温下 (25℃) 通过 290nm 处吸光度的增加来监测反式肉桂酸盐的产生, 从而分析 PAL 对 L- 苯丙氨酸底物的活性 (Hodgins, (1968), 同前)。290nm 处反式肉桂酸的摩尔消光系数是 10, 238

升 $M^{-1}Cm^{-1}$ 。反应混合物包含溶于 100mM Tris-HCl 缓冲液, pH 8.5 的 22.5mM 苯丙氨酸。对于标准测量来说, 最终酶浓度是 0.0035mg/mL, 但对于动力学研究来说, 分析中的酶浓度被调整以使 290nm 处的每分钟斜率在 0.005 到 0.02 范围内。活性数据可以表示为比活性 (微摩 $\times min^{-1}mg^{-1}$)。PAL 的一个单位被定义为室温下每分钟产生 1 微摩反式肉桂酸的酶量。

[0256] 实施例 4

[0257] 体外半衰期和免疫原性试验

[0258] 在生化表征后, 利用 3 种不同和互补的技术 (Western 印迹、ELISA 和免疫沉淀 (IP)), 针对抗抗体的免疫反应性 (通过给 PKU 小鼠注射天然 PAL (非聚乙二醇化) 激发) 对最有希望的 PEG-PAL 候选物进行筛选。

[0259] 对于 Western 印迹分析, 使用 1 : 10,000 稀释度的 PAL 抗血清 (来自注射了 PAL 的小鼠)。作为阴性对照, 来自缓冲液处理小鼠的血清也使用相同稀释度。将二抗、碱性磷酸酶偶联的山羊抗小鼠 IgG (Promega) 稀释到 1 : 5,000, 并利用 AP 底物 Western Blue (Promega) 显色。使用 1mg/mL 溶于 PBS 的 PAL 并用 PBS 并用 0.05% Tween-20, 2% BSA 封闭, 在 Nunc/Immuno Maxisorp 板 (Nalge Nunc International) 中按照标准程序进行 ELISA 检测。将小鼠抗血清 (来自天然 PAL 暴露小鼠) 用 EB 封闭液 (PBS, 0.05% Tween-20, 2% BSA) 稀释到 1 : 10,000, 使用 HRP-山羊抗小鼠 IgG 作为二抗, TMB 用于 450nm 处的检测。

[0260] 使用免疫沉淀检测 PAL 抗体结合。蛋白样品 (PAL 或聚乙二醇化 PAL) 在 TTBS 缓冲液 (含 0.1% Tween 的 Tris 缓冲液盐水) 中温育, 在添加抗体样品前检测 PAL 活性。每个样品与 8 倍过量的阳性对照抗 PAL 血清温育, 并利用未免疫小鼠血清进行双份阴性对照反应。温育后, 根据珠子的小鼠 IgG 结合能力, 添加过量的蛋白 G Sepharose 4 (50%, v/v), 在转动条件下将样品再在 4°C 温育过夜。通过离心回收上清, 分析上清中各样品的 PAL 活性。不丢弃珠子沉淀物, 这样的话可以通过 Western 印迹进行进一步的分析。为了证实抗体-珠子结合的存在, 使用 Western 印迹检测珠子上的 PAL 抗原。PAL 结合步骤后通过离心回收的珠子用 TTBS 和 TBS 缓冲液清洗若干次。在这些清洗后, 向珠子中添加 SDS-PAGE 上样缓冲液, 在 95°C 加热样品 5 分钟。然后利用 PAL 抗血清通过 Western 印迹分析样品。通过 Western 印迹检测, 与显示高抗体结合的天然未修饰 PAL 相比, 显示较差抗体结合的酶变体在沉淀的珠子组分中具有相应较少的 PAL, 但在上清中显示保留更高的活性。

[0261] 实施例 5

[0262] 蛋白酶敏感性的检测

[0263] 对天然圆红冬孢酵母 PAL 的蛋白酶作图研究显示蛋白水解敏感性的主要位点。去除这类位点可以降低或消除蛋白水解敏感性, 并有助于开发出有效的 PKU 酶替代物。但是, 清除蛋白水解敏感性的这类位点可能导致酶活性的降低或损失。

[0264] 在蛋白工程化产生保留活性的改进 PAL (和 PEG-PAL) 突变体后, 与胰蛋白酶 / 糜蛋白酶的蛋白酶混合物一起温育筛选蛋白酶抗性, 然后检测活性保留 (通过 OD290 测量值) 和减少的蛋白裂解 (通过 PAGE 凝胶分析), 这能够鉴定出将用于体内试验的具有合适体外特性的突变体。

[0265] 与蛋白酶混合物一起温育评价蛋白水解稳定性, 所述蛋白酶混合物近似于肠环境并包含 2.3mM 胰蛋白酶、3.5mM 糜蛋白酶、3.05mM 羧肽酶 A 和 3.65mM 羧肽酶 B。蛋白水解试

验包括酶温育,向 PAL 溶液中添加蛋白酶,以确定待测不同蛋白变体(进行或未进行聚乙二醇化或其他化学修饰的天然或突变蛋白)的蛋白酶敏感程度,包括蛋白酶暴露后的活性保持和稳定性保持时长。使用 SDS-PAGE 和 MALDI-TOF 质谱作图实验确定任意蛋白酶敏感位点的位置(Kriwacki, R. W. 等., J. Biomol. Tech. 9(3):5-15(1980))。这些作图结果对于确定蛋白酶易感性的主要位点(诸如已经鉴定的两个主要位点)非常重要,从而使全部主要敏感位点可以利用聚乙二醇化保护和/或突变来去除,以去除和/或保护 PAL 结构的敏感区。

[0266] 实施例 6

[0267] 聚乙二醇化 NpPAL 和 AvPAL 的产生

[0268] 通常, NpPAL 和 AvPAL 的聚乙二醇化包括将蛋白与 SUNBRIGHTME-200HS 20kDa NHS-活化的 PEG(NOF) 混合。

[0269] 聚乙二醇化方案,利用 NHS-活化的 20kDa 线性 PEG 的标准“HC”方法:

[0270] 1) 评价蛋白中内毒素的存在。将蛋白溶液(0.1mL)稀释于 0.9mL 新鲜 MQ 水中,利用手持式 Charles River 装置(EndoPTS)在 0.5EU/ml 灵敏度检测内毒素。如果内毒素大于 0.5EU/mL,则先通过 Mustang E 过滤,然后是 Sterogene Etox 树脂来减少内毒素,不太优选通过进一步层析纯化来减少内毒素。通过 pH 7.8 的 DEAE FF(Amersham)的减少是有限的,但足够有效。

[0271] 2) 蛋白的浓缩和缓冲液交换。将蛋白浓缩到大于 25mg/mL 但小于或等于 75mg/mL,缓冲液交换为 50mM KPO_4 , pH 8.5。如果使用旋转滤器制备该浓缩物,则首先如下检测滤器的内毒素:只与缓冲液在降低的速度下旋转减少的时间(3000rpm, 3 分钟),然后按照和步骤 1 相同的方法检测残留缓冲液中的内毒素。50mM KPO_4 , pH 8.5 的缓冲液批次记录/配方包含水(QS 到 1L)、磷酸氢二钾(8.4913g/L, 48.75mM)和磷酸二氢钾(0.17011g/L, 1.25mM)。溶液经过 0.2 μm 滤器过滤,并保存在室温。浓缩产物缓慢通过 Mustang E 滤器 acrodisc 过滤(1-2mL/分钟)。在 A280 处检测稀释的样品和无菌 TBS, pH 7.5 的空白对照测定蛋白浓度。NpPAL 的消光系数是 0.83, AvPAL 的消光系数是 0.75。

[0272] 3) NPPAL 和 AvPAL 的聚乙二醇化。将通常保存于 -80°C 的 PEG 加热到室温。向 PEG 中添加 KPO_4 进行混悬,以最大速度涡旋,并在手中剧烈摇动管子以确保所有大团块被混悬。在 PEG 第一次变湿 1 分钟内将蛋白添加到充分混悬的 PEG 溶液中,并通过非常轻柔的倒置进行混合。将用铝箔包好的管子放置于振荡器的轴上,在室温下非常温和地振荡 3 小时。将所述管中充满 TBS(pH 7.5) 并进行无菌过滤。立即配制悬液或在 4°C 保存直至准备好配制。

[0273] 4) 配制。配制缓冲液配方/批次记录包含水(QS 到 1L)、Tris-Base(3.2mM)、Tris-HCl(16.8mM)和氯化钠;缓冲液经过 0.2 μm 滤器过滤,室温下保存。利用 Vivaflow 50(小批量)或 Vivafiw 200(更大批量)通过 100MWCO 再生纤维素膜对缓冲液进行切向流动过滤。溶液再用 MQ 水、0.1N NaOH 和 200mL 水冲洗。用 50mL/分钟横流的 TBS, pH 7.5 平衡溶液。确定渗透物的 pH 以确保 pH 为 7.5。

[0274] 通过首先用 TBS 稀释大约 3 倍然后恢复到初始体积至少 4 次,对溶液进行缓冲液交换。对于 Vivaflow 50 和 200 来说横流通常是 180-200mL/分钟。

[0275] 终产物经过 Mustang E 过滤。在将 0.1mL 用 1.9mL 无菌新鲜水稀释后,评价内毒

素的存在。如果内毒素大于 1EU/mL,利用 Sterogene Etox 凝胶减少内毒素。将配制好的无菌聚乙二醇化 NpPAL 或 AvPAL 密封在小瓶中,放置于 -70℃ 直至准备好用于体内研究。

[0276] 实施例 7

[0277] AvPAL 变体(半胱氨酸突变体)的产生

[0278] 在 AvPAL 多肽中进行氨基酸替代以减少细菌表达的重组蛋白中存在的聚集。蛋白聚集可能降低酶活性和/或在体内增加免疫原性。一种这类形式的聚集是作为链内二硫键形成的结果发生的。为了将这种可能性降到最低,各个 AvPAL 半胱氨酸残基,单独地或一起,被丝氨酸残基替代。

[0279] AvPAL 多肽具有 6 个半胱氨酸残基,位于第 64、235、318、424、503 和 565 位 (SEQ ID NO:4)。产生下列 AvPAL 单半胱氨酸突变体:AvPAL_C64S (SEQ ID NO:7)、AvPAL_C318S (SEQ ID NO:8)、AvPAL_C503S (SEQ ID NO:9) 和 AvPAL_C565S (SEQ ID NO:10)。还产生 AvPAL 半胱氨酸双突变体,AvPAL_S565SC503S (SEQ ID NO:11)。图 5A-5E 显示这些 AvPAL 半胱氨酸突变体的氨基酸序列。

[0280] 克隆

[0281] 利用正向引物 AvarPALfor (5' -CACTGTCATATGAAGACACTATCTCAAGCACAAAG-3') (SEQ ID NO:18) 和反向引物 AvarPALrev (5' -CACTGTCTCGAGATGCAAGCAGGGTAAGATATCTTG-3') (SEQ ID NO:19) 从多变鱼腥藻基因组 DNA (ATCC 29413-U, Qiagen Dneasy 试剂盒) 扩增 AvPAL 基因。所获 PCR 产物用 Taq 处理,然后连接入 pCR2.1 TOPO TA (Invitrogen)。所获质粒被命名为 1p40。

[0282] 通过 SOE-PCR 添加 5' NheI 位点并去除内部 NheI 位点。利用正向引物 N-Nhe-AvPAL (5' -CACTGTGCTAGCATGAAGACACTATCTCAAGCACAAAG-3') (SEQ ID NO:20) 和反向引物 Nhe-AvPALrev (5' -GGAAATTTCTCCATGATAGCTGGCTTGGTTATCAACATCAATTAGTGG-3') (SEQ ID NO:21) 从 1p40 扩增上游 AvPAL 片段,利用正向引物 Nhe-AvPALfor (5' -CCACTAATTGATGTTGATAACCAAGCCAGCTATCATGGAGGAAATTTCC-3') (SEQ ID NO:22) 和反向引物 AvPALrev-r (5' -ACAGTGGCGGCCGCTTAATGCAAGCAGGGTAAGATATCTTG-3') (SEQ ID NO:23) 从 1p40 扩增下游 AvPAL 片段。在单个 PCR 反应中,将上述两种 PCR 产物退火,并用 DNA 聚合酶延伸得到全长 AvPAL 基因,然后用引物 N-Nhe-AvPAL 和 AvPALrev-r 进行扩增。所获 PCR 产物用 NheI 消化、Klenow 钝化、NotI 消化,并连接入 pET28a+ 载体(通过 NdeI 消化、Klenow 钝化和 NotI 消化来制备)。所获质粒被命名为 3p86-23。

[0283] 通过 PCR 添加新的限制酶切位点。利用正向引物 AvEcoRIfor (5' -CACTGTGAATTCATGAAGACACTATCTCAAGCACAAAG-3') (SEQ ID NO:24) 和反向引物 AvSmaIrev (5' -CACTGTCCGGGTTAATGCAAGCAGGGTAAGATATCT-3') (SEQ ID NO:25) 从质粒 3p86-23 扩增 AvPAL。所获 PCR 产物用 EcoRI 和 SmaI 消化,并连接入 EcoRI- 和 SmaI- 消化的 pIBX7 载体。所获质粒被命名为 7p56Av3。

[0284] 半胱氨酸突变体

[0285] 通过定点诱变 (QuickChange XL II, Stratagene), 将 AvPAL 基因中的两个半胱氨酸密码子(对应于 AvPAL 多肽的第 503 和 565 位)用丝氨酸密码子替代。通过利用正向引物 Av_C503S (5' -GTCATTACGATGCACGCGCCT C TCTATCACCTGCAACTGAG-3') (SEQ ID NO:26) 和反向引物 Av_C503Srev (5' -CTCAGTTGCAGGTGATAGA G AGGCGCGTGCATCGTAATGAC-3') (SEQ ID

NO:27) 的 PCR, 将质粒 7p56 Av3 中将第 503 位的半胱氨酸密码子转变为丝氨酸密码子。丝氨酸密码子用下划线表示, 编码链中的 G 到 C 突变 (非编码链中的 C 到 G 突变) 用粗体表示。所获质粒被命名为 j282。利用正向引物 Av_C565S (5' -CAGTTCAAGATATCTTACCCT **C** CTTGCATTAACCCGGGCTGC-3') (SEQ ID NO:28) 和反向引物 Av_C565Srev (5' -GCAGCCCGGT TAATGCAAG **G** AGGGTAAGATATCTTGAAGT-3') (SEQ ID NO:29) 将质粒 j282 中将第 565 位的密码子转变为丝氨酸密码子。丝氨酸密码子用下划线表示, 编码链中的 G 到 C 突变 (非编码链中的 C 到 G 突变) 用粗体表示。所获质粒被命名为 j282a。

[0286] AvPAL 基因中对应于 AvPAL 多肽第 64、318 和 565 位的半胱氨酸密码子被类似地用丝氨酸密码子替代, 使用下列引物对: C64S, 正向引物 Av_C64S (5' -GCAGGGTATTTCAGGCATCTT **C** TGATTACATTAATAATGCTGTTG-3') (SEQ ID NO:30) 和反向引物 Av_C64Srev (5' -CAACAGCATTATTAATGTAATCA **G** AAGATGCCTGAATACCCTGC-3') (SEQ ID NO:31); C318S, 正向引物 Av_C318S (5' -CAAGATCGTTACTCACTCCGAT **C** CCTTCCCCAGTATTTGGGGC-3') (SEQ ID NO:32) 和反向引物 Av_C318Srev (5' -GCCCCAAATACTGG GGAAGG **G** ATCGGAGTGAGTAACGATCTTG-3') (SEQ ID NO:33); 和 C565S, 正向引物 Av_C565S (SEQ ID NO:28) 和反向引物 Av_C565Srev (SEQ ID NO:29)。丝氨酸密码子用下划线表示, 编码链中的 G 到 C 突变和非编码链中的 C 到 G 突变用粗体表示。

[0287] 实施例 8

[0288] AvPAL 变体 (半胱氨酸突变体) 的体外酶活性

[0289] 该研究的目的是确定 AvPAL 多肽中各种半胱氨酸残基的丝氨酸替代对体外苯丙氨酸氨裂合酶 (PAL) 的酶活性的影响。

[0290] 按照实施例 7 的描述克隆 AvPAL 变体 (即, 半胱氨酸突变体)。将 AvPAL 半胱氨酸突变体表达质粒转化细菌, 按照实施例 1 的描述表达 AvPAL 半胱氨酸突变多肽, 并按照实施例 2 的描述进行纯化。

[0291] 按照实施例 3 的描述检测野生型 (WT) AvPAL 和 AvPAL 半胱氨酸突变体的体外 PAL 酶活性。表 1 显示与未聚乙二醇化的 WT AvPAL 相比, 纯化的未聚乙二醇化 AvPAL 半胱氨酸突变蛋白的体外 PAL 比活性被第 64 位半胱氨酸残基的丝氨酸替代 (AvPAL_C64S) 降低, 但第 503 或 565 中任一个或第 503 和 565 位半胱氨酸残基的丝氨酸替代 (分别为 AvPAL_C503S, AvPAL_C565S 和 AvPAL_C565SC503S) 对其不产生不利影响。

[0292] 表 1: AvPAL 半胱氨酸突变体的比活性

[0293]

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

[0294] 为了确定丝氨酸残基的引入对聚乙二醇化 AvPAL 蛋白的酶活性是否有影响, 按照

实施例 6 的描述将 WT AvPAL 和半胱氨酸双突变体 AvPAL_C565SC503S 聚乙二醇化。表 1 显示第 503 和 565 位半胱氨酸残基的丝氨酸替代对聚乙二醇化 AvPAL 蛋白的体外 PAL 比活性没有不利影响。

[0295] 实施例 9

[0296] AvPAL 变体（半胱氨酸突变体）的体外生化表征

[0297] 该研究的目的是确定 AvPAL 多肽中各种半胱氨酸残基的丝氨酸替代对：(1) 加速的稳定性；(2) 聚集体形成；和 (3) 位点特异性聚乙二醇化的影响。

[0298] 加速的稳定性

[0299] AvPAL 中半胱氨酸残基的丝氨酸替代对体外稳定性的影响通过以下方法确定：将纯化的 AvPAL 半胱氨酸突变体（聚乙二醇化或未聚乙二醇化的）在 37℃ 保存不同时段，然后按照实施例 3 的描述检测这些蛋白的体外 PAL 比活性。

[0300] 按照实施例 8 的描述制备野生型 AvPAL 和 AvPAL 半胱氨酸突变体（未聚乙二醇化或聚乙二醇化的）。

[0301] 如图 6A 所示，未聚乙二醇化 AvPAL 蛋白的比活性在 37℃ 至少稳定 5 天，并且第 565 位，或第 503 和 565 位半胱氨酸残基的丝氨酸替代对其没有不利影响。类似地，如图 6B 所示，聚乙二醇化 AvPAL 蛋白的比活性在 37℃ 至少稳定 6 天。在 37℃ 6 天后，与野生型 AvPAL 和半胱氨酸 AvPAL 双突变体 AvPAL_C565SC503S 相比，半胱氨酸 AvPAL 单突变体 AvPAL_C565S 显示稍微降低的稳定性。

[0302] 聚集体形成

[0303] AvPAL 中半胱氨酸残基的丝氨酸替代对溶液中蛋白聚集体形成的影响通过以下方法确定：通过变性和天然凝胶电泳或 SEC-HPLC 来分离纯化的、未聚乙二醇化野生型 AvPAL 和 AvPAL 半胱氨酸突变体。

[0304] 在变性条件（4–12% NuPAGE Bis-Tris）或天然条件（8% Tris-Gly, pH 8.3）下通过凝胶电泳分离纯化的 AvPAL 制品。利用 Coomassie Blue 染色分离的 AvPAL 蛋白。

[0305] 通过 SEC-HPLC 分离纯化的 AvPAL 制品。将 AvPAL 蛋白上样到含 20mM 磷酸钠、300mM NaCl、pH 6.9 的 TSK 凝胶柱（G3000SWx1, 7.8mm×30cm, 5 μm (Tosoh Bioscience, LLC)），并采用 0.5mL/ 分钟的流速进行洗脱。在 Agilent 系列 1100 分光计上分析分离的 AvPAL 蛋白。

[0306] 根据凝胶电泳（图 7A）或 SEC-HPLC（图 7B）判断，野生型 AvPAL 制品以及 AvPAL_C503S 和 AvPAL_C64S 制品中存在聚集体，但 AvPAL_C565S 和 AvPAL_C565SC503S 制品中不存在。

[0307] 位点特异性聚乙二醇化

[0308] AvPAL 中半胱氨酸残基的丝氨酸替代对位点特异性聚乙二醇化的影响通过以下方法确定：按照实施例 6 的描述聚乙二醇化野生型 AvPAL 和半胱氨酸双突变体 AvPAL_C503SC565S，然后比较下列 AvPAL 赖氨酸残基的相对聚乙二醇化：K2、K10、K32、K115、K145、K195、K301、K335、K413、K419、K493、K494 和 K522。

[0309] 用 8M 尿素变性大约 100 微克（10 μL×10 微克/μL）未聚乙二醇化或聚乙二醇化的 AvPAL 蛋白。变性蛋白然后在 100 μL 的反应体积（含 0.8M 尿素，pH 8.2）中用胰蛋白酶在 37℃ 消化过夜（约 20 小时）。在 37℃ 用 1 μL 1MDTT 还原胰蛋白酶消化的蛋白 1 小时，

然后用 3 μ L 15% TFA 终止反应。在 C18 反相柱上分离消化的蛋白。通过减去对应未聚乙二醇化肽的肽图计算每个聚乙二醇化 AvPAL 肽的聚乙二醇化百分比。

[0310] 如图 8 所示,当 AvPAL 蛋白: PEG 的比例为 1 : 3 时,可能除了 K419 之外,任意赖氨酸(K) 残基的聚乙二醇化百分比不存在显著差异,其中半胱氨酸双突变体 C565SC503S 的聚乙二醇化百分比低于野生型 AvPAL。但是,利用 AvPAL 蛋白: PEG 比例增加的半胱氨酸双突变体获得的结果(其中没有观察到剂量反应关系),结合相对较小的聚乙二醇化百分比,表明 K1419 处观察到的差异不可能是有意义的。因此,第 503 和 565 位半胱氨酸残基的丝氨酸替代看起来不影响 AvPAL 的位点特异性聚乙二醇化。

[0311] 实施例 10

[0312] AvPAL 蛋白聚集的机制

[0313] 进行研究以探索细菌表达的 AvPAL 蛋白的聚集机制。

[0314] 浓缩纯化的 AvPAL 制品,并在 37°C 温育浓缩的蛋白溶液 2 小时,以加速溶液中纯化 AvPAL 蛋白的聚集。通过 SEC-HPLC 分离 AvPAL 蛋白来检测聚集。为了确定是否由二硫键交联造成聚集,向浓缩蛋白液中添加 50mM 二硫苏糖醇(DTT),然后在 37°C 温育 2 小时。

[0315] 按照实施例 2 的描述纯化细菌中表达的 AvPAL 蛋白,并利用旋转滤器(Millipore Biomax-10K NMWL) 进行浓缩。在 Eppendorf Centrifuge 5415C 中大约 15,000g 旋转蛋白数分钟。对于倾向聚集的半胱氨酸突变体(例如,AvPAL_C503S 和 AvPAL_C64S),将蛋白浓缩到约 20mg/mL 并在 37°C 温育 2 小时。对于抗聚集的半胱氨酸突变体(例如,AvPAL_C565S 和 AvPAL_C565SC503S),将蛋白浓缩到约 40mg/mL 并在 37°C 温育 2 小时。

[0316] 如表 2 所示,在 37°C 温育 2 小时后,纯化 AvPAL 半胱氨酸突变体 AvPAL_C64S 和 AvPAL_C503S 的制品形成聚集体。与预期一致,在 37°C 温育 2 小时前将 AvPAL 蛋白浓缩将导致该聚集现象加剧。通过将浓缩蛋白暴露于 DTT 可以阻断聚集,这表明该聚集是因为二硫键交联。与此相反,在 37°C 温育 2 小时后纯化 AvPAL 半胱氨酸突变体 AvPAL_C565S 和 AvPAL_C565SC503S 的制品不形成聚集体,这表明第 565 位的半胱氨酸残基通过二硫键交联参与 AvPAL 聚集。

[0317] 表 2 :二硫键交联相关的 AvPAL 半胱氨酸突变体聚集

[0318]

AvPAL 蛋白	处理	聚集成
AvPAL_C503S	37°C /2h	+
AvPAL_C64S	37°C /2h	+
AvPAL_C565S E1	37°C /2h	-
AvPAL_C565S E2	37°C /2h	-
AvPAL_C565SC503S	37°C /2h	-
AvPAL_C503S	浓缩 +37°C /2h	++
AvPAL_C64S	浓缩 +37°C /2h	++
AvPAL_C565S E1	浓缩 +37°C /2h	-
AvPAL_C565S E2	浓缩 +37°C /2h	-
AvPAL_C565SC503S	浓缩 +37°C /2h	-
AvPAL_C503S	浓缩 . +DTT+37°C /2h	-
AvPAL_C64S	浓缩 . +DTT+37°C /2h	-
AvPAL_C565S E1	浓缩 . +DTT+37°C /2h	-
AvPAL_C565S E2	浓缩 . +DTT+37°C /2h	-
AvPAL_C565SC503S	浓缩 . +DTT+37°C /2h	-

[0319] 为了确定哪些半胱氨酸残基作为游离巯基存在,纯化的 AvPAL 制品在 8M 尿素存在条件下被变性,用碘乙酰胺烷基化,胰蛋白酶消化,并通过 LC/MS 进行分析。所有 AvPAL 半胱氨酸残基都被碘乙酰胺标记,提示细菌表达的 AvPAL 的所有半胱氨酸残基都作为游离巯基存在(数据未显示)。

[0320] 为了确定哪些半胱氨酸残基存在于天然蛋白的表面,纯化的 AvPAL 制品首先用 N-乙基马来酰亚胺(NEM)处理,然后在 8M 尿素存在条件下被变性,用碘乙酰胺烷基化,胰蛋白酶消化,并通过 LC/MS 进行分析。第 235 和 424 位的半胱氨酸残基不被 NEM 烷基化,第 318 位的半胱氨酸残基只被 NEM 部分烷基化,提示第 64、503 和 565 位的半胱氨酸残基位于天然 AvPAL 的表面,第 318 位的半胱氨酸残基部分暴露于天然 AvPAL 的表面(数据未显示)。

[0321] 为了确定哪些半胱氨酸残基参与链内二硫键交联,在 37℃ 将 67 μ L 0.7mg/mL 纯化的未聚乙二醇化野生型 AvPAL 制品溶液在包含 20mM 碘乙酰胺的 8M 尿素中变性和烷基化 1 小时,然后在 25℃ 含胰蛋白酶的 100 μ L 反应体积 pH 8.2 中消化过夜(约 17.5 小时)。分离胰蛋白酶消化的蛋白并通过质谱法进行分析,其中鉴定对应于预测的二硫键配对的肽并定量为总离子计数(TIC)。

[0322] 表 3 显示检测到 C503-C503、C503-C565、C565-C318 和 C565-C565 的二硫键配对。在纯化的 AvPAL 制品的二硫键配对中发现第 565 位的半胱氨酸残基,并较低程度地发现第 503 位的半胱氨酸残基。

[0323] 表 3:聚集体二硫键配对

[0324]

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

[0325] # 未检测到

[0326] 进行研究以确定除了二硫键交联外的其他机制是否参与 AvPAL 蛋白聚集。

[0327] 将纯化的 AvPAL 制品与 0.05% Tween 或 10mM EDTA 温育,然后按照实施例 9 的描述通过 SEC-HPLC 分离。Tween 因为疏水性相互作用减少蛋白聚集,而 EDTA 由于二价阳离子的存在减少蛋白聚集。如图 9 所示,暴露于 0.05% Tween 或 10mM EDTA 对 AvPAL 蛋白聚集没有影响。10mMEDTA 处理的 AvPAL 中第 10 分钟的附加峰是由于 EDTA 在 210nm 处的吸收。

[0328] 为了进一步研究二硫键交联在 AvPAL 蛋白聚集中的作用,在通过 SEC-HPLC 分离前,纯化的 AvPAL 先通过 DTT 处理进行还原,然后脱盐。如图 10A 所示,通过 DTT 处理 AvPAL 蛋白聚集被降到最低,但在 37℃ 温育 18 小时后聚集体再次形成。与此相反,如图 10B 所示,在 DTT 暴露后以及脱盐和 37℃ 温育 18 小时前一旦 AvPAL 表面半胱氨酸通过 N-乙基马来酰亚胺(NEM)处理被修饰(即烷基化),则聚集体不再形成。

[0329] 基于以上所述,细菌表达的 AvPAL 的聚集看起来仅仅归因于链内二硫键的形成,

而不是因为疏水作用或二价阳离子的存在。第 565 和 503 位的半胱氨酸残基参与 AvPAL 制品中链内二硫键的形成。

[0330] 实施例 11

[0331] AvPAL 变体（半胱氨酸突变体）聚乙二醇化形式的液体制剂

[0332] 进行研究以调查各种赋形剂（例如，稳定剂）对本发明制剂中 AvPAL 多肽变体（例如，第 503 和 565 位半胱氨酸残基的丝氨酸替代）的聚乙二醇化形式的加速稳定性的影响。

[0333] 按照实施例 7 的描述制备聚乙二醇化的 AvPAL 半胱氨酸双突变体 AvPAL_C565SC503S。

[0334] 利用体外活性分析，比色杯分析或板分析，检测聚乙二醇化 AvPAL_C565SC503S 不同制剂的加速稳定性。对于比色杯分析来说，纯化的聚乙二醇化 AvPAL_C565SC503S 用 TBS 稀释缓冲液稀释，然后添加到含 22.5mM 苯丙氨酸 (Phe)、100mM Tris-HCl, pH 8.5 的分析缓冲液中。在 30°C 温育 2 分钟后，通过 290nm 处的吸光度测量释放的反式肉桂酸 (t-CA) 量。对于板分析来说，纯化的聚乙二醇化 AvPAL_C565SC503S 用 TBS 稀释缓冲液加 BSA/Phe/Brij 稀释，然后添加到含 22.5mM Phe、100mM Tris-HCl, pH8.5 的分析缓冲液中。在 30°C 温育 10-20 分钟后，通过 290nm 处的吸光度测量释放的反式肉桂酸 (t-CA) 量。— IU 的 PAL 活性等于 1 微摩 TCA/ 分钟。

[0335] 在第一个加速稳定性研究中，评价 pH 对聚乙二醇化半胱氨酸双突变体 AvPAL_C565SC503S 稳定性的影响。将纯化的聚乙二醇化 AvPAL_C565SC503S 在从 4 到 9 的各个 pH 的 10mM 缓冲液和 140mM NaCl 中预先配制。测试的缓冲液：柠檬酸盐 (pH 4)、醋酸盐 (pH 5)、组氨酸 (pH 6)、磷酸盐 (pH 7)、Tris (pH 7.5、pH 8) 和精氨酸 (pH 9)。在 4°C、25°C 或 37°C 保存酶制剂直至 30 天后，检测体外活性。在 pH 4 观察到 PAL 酶活性的全部丧失。选择 7 到 8 的 pH 范围作进一步鉴定。

[0336] 在第二个加速稳定性研究中，评价 pH 和各种赋形剂对聚乙二醇化半胱氨酸双突变体 AvPAL_C565SC503S 稳定性的影响。在存在或没有 0.5% EDTA、0.5% EDTA 加 0.5% 抗坏血酸或 0.5% EDTA 加 5mM 甲硫氨酸 (Met) 的条件下，将纯化的聚乙二醇化在 pH 7、7.5 或 8.0 的 10mM Tris 和 140mM NaCl 中预先配制。在 4°C、25°C 或 37°C 保存酶制剂直至 60 天后，检测体外活性。pH 7.0 和 7.5 在维持酶活性方面看起来是相当的，EDTA 对酶活性几乎没有影响，抗氧化剂抗坏血酸和甲硫氨酸对酶活性有负面影响。

[0337] 在相同的加速稳定性研究中，评价 AvPAL 半胱氨酸双突变体 AvPAL_C565SC503S 的聚乙二醇化的影响。未聚乙二醇化和聚乙二醇化的 AvPAL_C565SC503S 之间酶活性的损失率是相似的。

[0338] 在第三个加速稳定性研究中，评价酶底物和产物作为赋形剂对聚乙二醇化半胱氨酸双突变体 AvPAL_C565SC503S 稳定性的影响。在存在或没有 1mM Phe (底物, 5 摩尔每摩尔活性位点)、2mM TCA (产物, 10 摩尔每摩尔活性位点) 或 0.05% Tween 80 (表面活性剂) 的条件下，将大约 12mg/mL (0.2mM) 纯化的聚乙二醇化 AvPAL_C565SC503S 在 pH 7.5 的 10mM Tris 和 140mM NaCl 中预先配制。在 4°C、25°C 或 37°C 保存酶制剂不同时间后，每周检测体外活性。Phe 和 t-CA 均显著增加酶的稳定性，而 Tween 对酶稳定性没有影响。

[0339] 加速稳定性研究 1、2 和 3 的概述显示于图 11。

[0340] 在第四个加速稳定性研究中，评价低浓度的 Phe 和 t-Ca 在低浓度作为赋形剂对聚

乙二醇化 AvPAL 半胱氨酸双突变体 AvPAL_C565SC503S 稳定性的影响。在存在或没有 0.4mM Phe (底物, 2 摩尔每摩尔活性位点) 或 0.4mM TCA (产物, 2 摩尔每摩尔活性位点) 的条件下, 将大约 12mg/mL (0.2mM) 纯化的聚乙二醇化 AvPAL_C565SC503S 在 pH 7.5 的 10mM Tris 和 140mM NaCl 中预先配制。在 4°C、25°C 或 37°C 保存酶制剂不同时间后, 每周检测体外活性。低浓度的 Phe 和 t-CA 均能有效的稳定酶活性。

[0341] 在第五个加速稳定性研究中, 评价弱的酶底物酪氨酸 (Tyr) 作为赋形剂对聚乙二醇化 AvPAL 半胱氨酸双突变体 AvPAL_C565SC503S 稳定性的影响。在存在或没有 1 或 5mM Tyr (底物, 分别为 5 或 25 摩尔每摩尔活性位点) 的条件下, 将大约 12mg/mL (0.2mM) 纯化的聚乙二醇化 AvPAL_C565SC503S 在 pH 7.5 的 10mM Tris 和 140mM NaCl 中预先配制。在 4°C、25°C 或 37°C 保存酶制剂不同时间后, 每周检测体外活性。Tyr 对酶活性具有极小的、非剂量依赖性稳定作用 (图 12)。

[0342] 在第六个加速稳定性研究中, 评价亲核净化剂作为赋形剂对聚乙二醇化 AvPAL 半胱氨酸双突变体 AvPAL_C565SC503S 稳定性的影响。在存在或没有 1Phe (底物, 3 摩尔每摩尔活性位点)、2mM 亲核净化剂 (安息香酸 或 吡哆胺, 6 摩尔每摩尔活性位点) 或 1mM Phe 和 2mM 亲核净化剂的条件下, 将大约 20mg/mL (0.33mM) 纯化的聚乙二醇化 AvPAL_C363SC303S 在 pH 7.5 的 10mM Tris 和 140mM NaCl 中预先配制。在 4°C 或 37°C 保存酶制剂不同时间后, 每周检测体外活性。安息香酸而不是吡哆胺能够有效稳定酶活性 (图 13A)。Phe 和安息香酸没有叠加作用, 表明是类似的稳定机制。

[0343] 安息香酸和 t-CA 的稳定效应表明它们起 Phe 结构类似物的作用 (参见图 13B)。

[0344] 将 6 个加速稳定性研究的数据合并以预测各种制剂中聚乙二醇化 AvPAL 半胱氨酸双突变体 AvPAL_C565SC503S 的有效保存期限。保存期限如下确定: (1) 确定活性衰变的速率 (k_{decay}), 其遵循针对每种制剂条件的一级动力学; (2) 绘制 $\ln(k_{\text{decay}})$ v. $1/\text{温度} (^{\circ}\text{K})$ 的曲线; (3) 检测指定制剂条件的活性衰变需要的 E_a (ΔG_{decay}); (4) 利用计算的 E_a 和指定温度观察到的 k_{decay} 推断 4°C 的 k_{decay} ; 和 (5) 确定保存期限 (T_{90}), 其是 4°C 酶比活性下降 > 10% 的时间。

[0345] 表 4 显示 Phe 和 t-CA 均大大增强聚乙二醇化 AvPAL 半胱氨酸双突变体 AvPAL_C565SC503S 的预期保存期限。

[0346] 表 4: 利用各种赋形剂的聚乙二醇化半胱氨酸双突变体 AvPAL_C565SC503S 的预测保存期限 T_{90} (单位为周)

[0347]

赋形剂	42°C	37°C	25°C	4°C *	4°C (观察到的)
无 (TBS)	0.67	0.8	2.1	12.9	~ 9-13
Phe	1.63	2.2	9.1	8.5	> 20
t-CA	ND	2.0	7.1	85.8	> 20

[0348] * 数字是基于 6 个不同实验的数据估算的。

[0349] 总之, 上述处方前研究提示聚乙二醇化 AvPAL 半胱氨酸双突变体 AvPAL_C565SC503S 的最优 pH 是 7 到 7.5。抗氧化剂的存在导致酶活性的显著损失。在加速条件 (25°C 和 37°C) 下, 苯丙氨酸 (Phe) 和反式肉桂酸 (t-CA) 使 rAvPAL-PEG 的稳定性增加 50% 或更高。每个 rAvPAL-PEG 活性位点 2 倍过量的 Phe 或 t-CA 足以稳定活性, 更高浓度看起来没有额外益处。较弱的 PAL 底物 (Tyr) 看起来不能稳定酶活性, 而安息香酸稳定 rAvPAL-PEG

活性的程度类似于其结构类似物 Phe。当与 Phe 联用时,没有观察到与安息香酸的增加活性稳定作用,表明活性稳定的通用机制。

[0350] 实施例 12

[0351] AvPAL 变体(半胱氨酸突变体)聚乙二醇化形式的冻干制剂

[0352] 进行研究以探索各种固体(例如,冻干)制剂对本发明 AvPAL 多肽变体(例如,第 503 和 565 位半胱氨酸残基的丝氨酸替代)的聚乙二醇化形式的活性的影响。

[0353] 按照实施例 7 的描述制备聚乙二醇化的 AvPAL 半胱氨酸双突变体 AvPAL_C565SC503S。

[0354] 如下配制聚乙二醇化的 AvPAL 半胱氨酸双突变体 AvPAL_C565SC503S:(F1) 10mg/mL AvPAL_C565SC503S, 10mM Tris, pH7.5;(F2) 10mg/mL AvPAL_C565SC503S, 10mM Tris, pH 7.5, 25mg/mL 甘露醇;或(F3) 10mg/mL AvPAL_C565SC503S, 10mM Tris, pH 7.5, 20mg/mL 甘露醇, 5mg/mL 蔗糖。配制后,每种中的 PAL 酶活性为 1.7 到 1.8U/mg。冻干后,将制剂在 4℃ 保存直至使用,然后用新鲜无菌过滤的 MilliQ 水重悬。按照实施例 11 的描述检测 PAL 酶活性。表 5 显示,在 AvPAL_C565SC503S 制剂的冻干、保存或重悬时看起来不存在活性损失。

[0355] 表 5:冻干配制(LF)时聚乙二醇化半胱氨酸双突变体 AvPAL_C565SC503S 的比活性

[0356]

LF	LF 前	LF 后	LF 后 +5 天 /4℃	LF 后 +11 天 /4℃	LF 后 +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

[0357] 实施例 13

[0358] 短尾猴和大鼠中 AvPAL 变体(半胱氨酸突变体)聚乙二醇化形式的毒性/药代动力学研究

[0359] 在短尾猴和大鼠中进行毒性/药代动力学研究以确定施用单剂量 AvPAL 多肽变体(例如,第 503 和 565 位半胱氨酸残基的丝氨酸替代)的聚乙二醇化形式的影响。

[0360] 按照实施例 7 的描述制备聚乙二醇化的 AvPAL 半胱氨酸双突变体 AvPAL_C565SC503S。

[0361] 短尾猴毒性/药代动力学研究

[0362] 该研究使用四(4)组猴子,每组含 3 只雄性和 3 只雌性。组 1 接受安慰剂(mL/kg);组 2、3 和 4 分别接受单次皮下注射溶液形式的 4、12 和 60mg/kg 聚乙二醇化 AvPAL 半胱氨酸双突变体 AvPAL_C565SC503S。在给药前和给药后的不同时间(从 3 到 504 小时)采集猴的血浆样品。发现 60mg/kg 剂量对猴来说是有毒性的,所以终止该研究的组 4 部分。

[0363] 图 14A 显示在单次皮下注射 4 和 12mg/kg 后不同时间血浆中聚乙二醇化 AvPAL 半胱氨酸双突变体 AvPAL_C565SC503S 的浓度。数据显示聚乙二醇化 AvPAL 半胱氨酸双突变体 AvPAL_C565SC503S 的单相清除。具有一级吸收的单室模型看起来描述了单次皮下注射后聚乙二醇化 AvPAL 半胱氨酸双突变体 AvPAL_C565SC503S 的血浆模式。

[0364] 图 14B 显示在单次皮下注射 4mg/kg 后不同时间血浆中苯丙氨酸(Phe)和聚乙二醇化 AvPAL 半胱氨酸双突变体 AvPAL_C565SC503S 的浓度。在该剂量,血浆 Phe 浓度在 24 小时内降低到低于 GC/MS 分析的定量下限,并且血浆 Phe 的下降维持超过 10 天。

[0365] 大鼠毒性 / 药代动力学研究

[0366] 该研究使用八 (8) 组大鼠, 安慰剂组含 3 只雄性和 3 只雌性, 检测组含 6 只雄性和 6 只雌性。组 1 和 5 接受安慰剂的单次静脉内和皮下注射。组 2、3 和 4 分别接受 1、5 和 25mg/kg 聚乙二醇化 AvPAL 半胱氨酸双突变体 AvPAL_C565SC503S 的单次静脉内注射。组 6、7 和 8 分别接受 10、25 和 250mg/kg 聚乙二醇化 AvPAL 半胱氨酸双突变体 AvPAL_C565SC503S 的单次皮下注射。在给药前和给药后的不同时间 (从 1 到 360 小时) 采集大鼠的血液样品。在每次采集时间, 采集每组 3 只大鼠的血液。在该研究中没有观察到大鼠中的毒性。

[0367] 图 15A 显示在单次静脉内注射 1、5 和 25mg/kg 后不同时间血浆中聚乙二醇化 AvPAL 半胱氨酸双突变体 AvPAL_C565SC503S 的浓度。数据显示单次静脉注射后聚乙二醇化 AvPAL 半胱氨酸双突变体 AvPAL_C565SC503S 从血浆的单相清除。

[0368] 图 15B 显示在单次皮下注射 10、25 和 250mg/kg 后不同时间血浆中聚乙二醇化 AvPAL 半胱氨酸双突变体 AvPAL_C565SC503S 的浓度。具有一级吸收的单室模型看起来描述了单次皮下注射后聚乙二醇化 AvPAL 半胱氨酸双突变体 AvPAL_C565SC503S 的血浆模式。

[0369] 表 6 显示单次静脉内或皮下注射后聚乙二醇化 AvPAL 半胱氨酸双突变体 AvPAL_C565SC503S 的药代动力学参数。

[0370] 表 6 : 单次静脉内或皮下给药后聚乙二醇化半胱氨酸双突变体 AvPAL_C565SC503S 的药代动力学参数。

[0371]

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

[0372] * 对于皮下施途径,最终 t_{1/2} 长于静脉内;这可能归因于与清除率相比皮下组织的吸收率更慢(这样的话观察到的 t_{1/2} 实际上是吸收)。

[0373] # 利用 25mg/kg 静脉 AUC 数据的生物利用度是 21.5%。

[0374] 在该药代动力学研究中看起来不存在性别差异。对于静脉内和皮下施途径来说

AUC_{inf} 和 C_{max} 与剂量大致成正比。

[0375] 大鼠和短尾猴中的多次给药毒性研究

[0376] 在大鼠和短尾猴的重复给药毒性研究中评价聚乙二醇化 AvPAL 半胱氨酸双突变体 AvPAL_C565SC503S 的安全性。

[0377] 给大鼠每周两次皮下施用直至 25mg/kg 的聚乙二醇化 AvPAL 半胱氨酸双突变体 AvPAL_C565SC503S, 超过 28 天没有显示毒性。

[0378] 给短尾猴每周两次皮下施用高达 1mg/kg 剂量的聚乙二醇化 AvPAL 半胱氨酸双突变体 AvPAL_C565SC503S, 超过 28 天没有显示显著毒性。在第一次给药后观察到血浆 Phe 水平的剂量依赖性降低; 在第一次给药后, 所有剂量组中血浆 Phe 水平都回到基线, 这表明对于所施用酶的可能的抗体应答。第 28 天在大多数 1mg/kg 治疗的动物中观察到最低的抗 AvPAL_C565SC503S IgG 滴度。该研究第 28 天在任意动物中都未观察到 IgM 滴度。

[0379] 实施例 14

[0380] AvPAL 变体 (半胱氨酸突变体) 对培养的肿瘤细胞的影响

[0381] 进行研究以探索 AvPAL 多肽变体 (例如, 第 503 和 565 位半胱氨酸残基的丝氨酸替代) 的聚乙二醇化形式对体外培养的肿瘤细胞增殖的影响。

[0382] 按照实施例 7 的描述制备聚乙二醇化的 AvPAL 半胱氨酸双突变体 AvPAL_C565SC503S。

[0383] 肿瘤细胞的体外增殖利用碘化吡啶荧光分析法检测, 如 Dengler 等, Anti-Cancer Drugs 6 :522-532 (1995) 所述。

[0384] 血液肿瘤

[0385] 针对聚乙二醇化半胱氨酸双突变体 AvPAL_C565SC503S 对细胞体外增殖的影响, 评价一组二十四 (24) 种血液肿瘤细胞系, 包括 14 例白血病, 5 例淋巴瘤和 5 例骨髓瘤。

[0386] 第 0 天按照 5,000 细胞 / 孔将血液肿瘤细胞系种入培养板。第 1 天, 向培养物中添加各种浓度 (从 0.01 到 100 微克 / mL) 的聚乙二醇化半胱氨酸双突变体 AvPAL_C565SC503S。第 5 天, 收集细胞, 通过碘化吡啶染色检测 DNA 含量。确定 IC_{50} 、 IC_{70} 和 IC_{90} 。这些实验对每种血液肿瘤细胞系进行两次或三次。

[0387] 表 7 显示通过碘化吡啶染色检测, 聚乙二醇化半胱氨酸双突变体 AvPAL_C565SC503S 有效抑制数种血液肿瘤细胞系的体外增殖。

[0388] 表 7 : 聚乙二醇化半胱氨酸双突变体 AvPAL_C565SC503S 在体外对血液肿瘤系碘化吡啶染色的抑制

[0389]

肿瘤系	细胞类型	IC_{50} μ g/mL	IC_{70} μ g/mL
CCRF CEM	ALL-T 细胞淋巴瘤	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

[0390]

肿瘤系	细胞类型	IC ₅₀ μg/mL	IC ₇₀ μg/L
JURKAT	人 T 细胞白血病	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- 细胞淋巴瘤	0.326	1.873
		1.082	5.298
		1.096	6.918
Mv411	AML	5.994	74.989
		> 100	> 100
		> 100	> 100
NOM01	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	淋巴瘤 CTL	6.105	18.276
		17.782	> 100
		0.096	> 100
L5178Y	鼠 T 细胞白血病	6.683	41.595
		3.981	10
		3.019	7.585
MYLA	淋巴瘤 CTL	4.436	> 100
		5.379	> 100
		8.171	> 100
RAJI	Burkitt 淋巴瘤	0.261	0.938
		21.544	> 100
		2.154	> 100
U937	Histio 淋巴瘤	0.803	> 100
		> 100	> 100
		> 100	> 100
8226	骨髓瘤	0.229	0.825
		> 100	> 100

[0391]

肿瘤系	细胞类型	IC ₅₀ μg/mL	IC ₇₀ μg/mL
		0.691	7.742
IM9	人淋巴母细胞	0.271	1.467
		0.295	1.311
		0.063	0.188
L363	人浆细胞白血病	7.943	> 100
		1.73	15.505
LP1	人多发性骨髓瘤	0.774	100
		0.71	6.309
NCIH929	人多发性骨髓瘤	> 100	> 100
		11.288	> 100
		2.154	> 100

[0392] 在两种敏感型血液肿瘤细胞 NOM01 和 IM9 中,聚乙二醇化半胱氨酸双突变体 AvPAL_C565SC503S 对细胞增殖的剂量依赖性抑制(由碘化吡啶染色的减弱可以确定)分别显示于图 14A 和 21B。这些肿瘤细胞系分别具有低于 1.0 和 10.0 微克/mL 的 IC₅₀ 和 IC₇₀。为了比较,人白血病细胞系中天冬酰胺酶具有 1-10 微克/mL 的 IC₅₀。但是,通常,通过 IC₇₀ 值判断,血液肿瘤细胞系比实体瘤系更具抗性(见下文)。

[0393] 实体瘤

[0394] 针对聚乙二醇化半胱氨酸双突变体 AvPAL_C565SC503S 对体外细胞增殖的影响,评价一组三十六(36)种实体瘤细胞系,包括源自膀胱、脑、结肠、胃、头和颈、肺、乳腺、卵巢、胰腺、前列腺、肾和子宫的肿瘤。第 0 天按照 5,000 细胞/孔将实体瘤细胞系种入培养板。第 1 天,向培养物中添加各种浓度(从 0.01 到 100 微克/mL)的聚乙二醇化半胱氨酸双突变体 AvPAL_C565SC503S。第 5 天,通过碘化吡啶染色检测 DNA 含量。确定 IC₅₀、IC₇₀ 和 IC₉₀。

[0395] 表 8 显示通过碘化吡啶染色检测,聚乙二醇化半胱氨酸双突变体 AvPAL_C565SC503S 有效抑制数种实体瘤细胞系的体外增殖。

[0396] 表 8:聚乙二醇化半胱氨酸双突变体 AvPAL_C565SC503S 在体外对实体瘤系碘化吡啶染色的抑制

[0397]

肿瘤系	器官/细胞类型	IC ₅₀ μg/mL	IC ₇₀ μg/mL
	膀胱		
1218L	ATCC, Freiburg; 泌尿道上皮腺癌	1.1	7.498
T24	异种移植植物	0.617	2.154
	脑/CNS		
498NL	异种移植植物, Freibru	0.691	2.154
SF268	NCI	0.59	1.492
	结肠		
HCT116	NCI; 腺癌, pd	0.316	0.9
HT29	NCI; 腺癌, pd	0.508	0.94
	胃		
251L	异种移植植物, Freibru; 腺癌, pd	2.682	37.275
	头和颈		
536L	异种移植植物, Freibru; 下咽癌	0.606	1.887
	肺		
1121L	异种移植植物	0.715	3.548
289L	异种移植植物, Freibru; 腺癌, pd	2.807	23.101

529L	异种移植, Freibru ; 大细胞, du	0. 539	1. 73
629L	异种移植, Freibru ; 腺癌, pd	0. 457	1. 467
H460	NCI ; 大细胞癌	0. 215	0. 644
	乳腺		
401NL	异种移植, Freibru ; Pap 腺癌, wd	1. 873	7. 564
MCF7	NCI ; 乳腺癌	0. 599	1. 623
	黑色素瘤		
276L	异种移植	4. 124	268. 269
394NL	异种移植	0. 887	3. 856
462NL	异种移植	0. 954	6. 189
514L	异种移植	0. 828	4. 216
520L	异种移植	1. 359	6. 309
	卵巢		
1619L	异种移植, Freibru ; 腺癌, md	0. 322	0. 688
899L	异种移植, Freibru ; PAp 浆液性癌, md	1. 279	6. 628
OVCAR3	NCI ; 腺癌, md	1. 185	6. 528
	胰腺		
1657L	异种移植, Freibru ; 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
	胸膜间皮瘤		
1752L	异种移植, Freibru ; 胸膜间皮瘤	1. 637	8. 483
	肾		
1781L	异种移植, Freibru ; 肾癌	2. 371	10
393NL	异种移植, Freibru ; 肾上腺样瘤, wd	0. 55	1. 995
486L	异种移植	0. 859	5. 336
944L	异种移植	0. 71	3. 727

[0398]

肿瘤系	器官 / 细胞类型	IC ₅₀ μ g/mL	IC ₇₀ μ g/mL
	子宫		
1138L	异种移植, Freibrug ; 癌肉瘤, wd	0. 621	1. 258

[0399] 在源自脑 /CNS 癌、结肠癌、肺癌和前列腺癌的肿瘤细胞系中, 聚乙二醇化半胱氨酸双突变体 AvPAL_C565SC503S 对细胞增殖的剂量依赖性抑制 (由碘化吡啶染色的减弱可以确定) 分别显示于图 17A-D。

[0400] 在实体瘤细胞系的这种宽泛组中 AvPAL_C565SC503S 显示选择性的抗增殖活性, 在来自肺、脑 /CNS、结肠、前列腺和肾的肿瘤细胞系中尤其有效 (即, IC₅₀ 在 0. 2 和 0. 7 微克 /mL 之间)。至少源自膀胱、头和颈、乳腺、卵巢及子宫的肿瘤细胞系对 AvPAL_C565SC503S 的细胞杀伤也是敏感的。数种黑色素瘤对 AvPAL_C565SC503S 的细胞杀伤也是敏感的。

[0401] 实施例 15

[0402] AvPAL 变体 (半胱氨酸突变体) 在裸鼠中的抗癌活性

[0403] 进行研究以调查 AvPAL 多肽变体 (例如, 第 503 和 565 位半胱氨酸残基的丝氨酸替代) 的聚乙二醇化形式对裸鼠体内肿瘤细胞增殖的影响。

[0404] 按照实施例 7 的描述制备聚乙二醇化的 AvPAL 半胱氨酸双突变体 AvPAL_

C565SC503S。

[0405] 免疫缺陷裸鼠或 SCID 小鼠中人类肿瘤细胞的皮下异种移植物已经成功地被用作人类癌症模型,以检测癌症治疗剂以及靶向癌症治疗剂(诸如抗体和毒素偶联物)的体内功效(综述参见 Kerbel, Cancer Biol. Ther. 2(4):Suppl. 1:S134-S139(2003))。

[0406] 利用裸鼠中人类肿瘤细胞的异种移植物,可以单独检测,或与癌症治疗剂或靶向癌症治疗剂联合检测,或与苯丙氨酸限制饮食联合检测聚乙二醇化 AvPAL 半胱氨酸双突变体 AvPAL_C565SC503S 的体内抗癌活性。

[0407] 为了建立人类肿瘤异种移植物,给裸鼠皮下注射溶于 0.2mL PBS 的约 5×10^6 个人类肿瘤细胞。平均肿瘤大小随时间增加。从荷瘤裸鼠切除人类异种移植肿瘤,制备大约 30mm^3 的肿瘤组织块。给用于评价聚乙二醇化 AvPAL 半胱氨酸双突变体 AvPAL_C565SC503S 的体内抗癌活性的新生裸鼠每只皮下植入一个肿瘤组织块。在肿瘤开始前或一组裸鼠中的平均肿瘤大小为大约 $100\text{--}150\text{mm}^3$ 时起始治疗性治疗(预防模型),和/或建立肿瘤后当一组裸鼠中的平均肿瘤大小超过 500mm^3 时起始治疗性治疗(治疗模型)。

[0408] 第一步,确定将血浆苯丙氨酸(Phe)水平降低到接近于零的聚乙二醇化 AvPAL 半胱氨酸双突变体 AvPAL_C565SC503S 的剂量。按照如 2006 年 6 月 12 日提交的先前共同待决的美国专利申请号 11/451,999 的实施例 7 到 9 和 14 的描述进行实验,除了使用的是裸鼠而不是 ENU2 小鼠。在这起始步骤中确定 PAL 酶剂量和施用频率。

[0409] 第二步,在源自患者的各种人类肿瘤异种移植物或细胞系中评价聚乙二醇化 AvPAL 半胱氨酸双突变体 AvPAL_C565SC503S 的抗肿瘤活性。肿瘤模型包括不同的癌症类型,例如但不限于,中枢神经系统(CNS)癌、结肠癌、肺癌、前列腺癌、转移性黑色素瘤和肾癌。可以测试的肿瘤和肿瘤细胞系的非综合提供于表 7(血液肿瘤)和 8(实体瘤)。

[0410] 为了评价聚乙二醇化 AvPAL 半胱氨酸双突变体 AvPAL_C565SC503S 的抗癌活性,将皮下载有不同人类肿瘤异种移植物的裸鼠通过皮下给予 3 种不同剂量水平(约 5 到 500mg/kg)的 AvPAL_C565SC503S 进行治疗。该剂量可以导致约 0.1 到 10mg/kg 的人类剂量。通过肿瘤体积抑制和/或绝对生长延缓来分析抗癌活性。还通过致死率和/或体重改变来评价 AvPAL_C565SC503S 的耐受性。

[0411] 每个体内抗癌研究由至少四个组组成,一个运载体对照组和至少三个原核 PAL 酶治疗组。组大小至少是 8 只小鼠,导致总共 32 只小鼠接受皮下肿瘤移植。具有相似大小肿瘤($100\text{--}150\text{mm}^3$)的小鼠被随机分组(第 0 天)。

[0412] 就抗癌效果来说,在原核 PAL 酶治疗结束后可以再监测小鼠 2 周,以检测肿瘤生长的可能重新开始。根据动物试验规程,如果肿瘤直径超过 1.6cm,处死小鼠。

[0413] 每周两次检测肿瘤直径以及体重。根据公式 $a \cdot b^2/2$ (其中 'a' 是肿瘤的最大直径, 'b' 是垂直轴)计算肿瘤体积。基于第 0 天(给药第一天)计算每个个体肿瘤的相对肿瘤体积和体重。当肿瘤体积达到大约 $100\text{--}150\text{mm}^3$ 时开始治疗。根据动物研究规程,如果肿瘤体积超过 1600mm^3 ,处死小鼠。

[0414] 在裸鼠连续传代中建立的患者来源的肿瘤也可以用作试验肿瘤。通常,这些肿瘤保留原始患者肿瘤的重要特征,包括组织学和药物敏感性。对于某些肿瘤,例如,一种 CNS 和两种前列腺癌,使用癌细胞系来源的肿瘤。

[0415] 实施例 16

[0416] 示例性原核 PAL 制剂

[0417] 下列实施例提供用于配制组合物的参数的指导,所述组合物包含原核 PAL 或其生物活性片段、突变体、变体或类似物,其可用于治疗肿瘤病和癌症。用于配制本发明原核 PAL 组合物的参数包括但不限于维持 pH 的缓冲剂,等渗调节剂,稳定剂的缺失或存在,以及其他赋形剂、运载体、稀释剂的缺失或存在等。

[0418] 在实施例 11 中,将聚乙二醇化 AvPAL 半胱氨酸双突变体 AvPAL_C565SC503S 配制为约 12-20mg/mL (about 0.2-0.33mM) 的浓度。优选的原核 PAL 变体被配制为约 1 到 50mg/mL (约 0.016 到 0.8mM) 的浓度范围,优选地为约 5 到 20mg/mL (约 0.08 到 0.33mM),和更优选地为约 5 到 15mg/mL (约 0.08 到 0.25mM)。本发明原核 PAL 组合物最优选的制剂具有约 10+/-5mg/mL (约 0.16+/-0.08mM) 的 PAL 酶浓度。

[0419] 在实施例 11 中,聚乙二醇化 AvPAL 半胱氨酸双突变体 AvPAL_C565SC503S 用 pH 7.0、7.5 和 8.0 的 10mM Tris-HCl, 140mM NaCl 配制。优选的缓冲剂是 Tris-HCl, 或其等同物, 浓度范围为 5 到 50mM, 优选为 5 到 20mM, 和更优选为 5 到 15mM。本发明原核 PAL 组合物最优选的制剂具有浓度为约 10+/-5mM 的 Tris-HCl。

[0420] 药物组合物优选的 pH 是约 pH 6.0-8.5, 优选约 pH 7.0-8.0, 更优选约 pH 7.0-7.6。本发明原核 PAL 组合物最优选的制剂具有约 pH 7.3+/-0.3 的 pH。

[0421] 优选的等渗调节剂是 NaCl 或其等同物, 浓度范围为约 100 到 200mM, 优选为约 130 到 170mM, 和更优选为约 130 到 150mM。本发明原核 PAL 组合物最优选的制剂具有浓度为约 140+/-10mM 的 NaCl。

[0422] 如实施例 11 所示, 在苯丙氨酸 (Phe) 和某些其结构类似物 (包括, 例如, 反式肉桂酸 (t-CA) 和安息香酸) 存在的条件下聚乙二醇化 AvPAL 半胱氨酸双突变体 AvPAL_C565SC503S 是稳定的; 酪氨酸 (Tyr) 对 PAL 酶的稳定效应最小。优选的稳定剂是 Phe 或其结构类似物, 稳定剂的范围为约 0.1 到 20 摩尔稳定剂每摩尔原核 PAL 活性位点, 优选为约 0.5 到 10 摩尔稳定剂每摩尔原核 PAL 活性位点, 更优选为约 1 到 10 摩尔稳定剂每摩尔原核 PAL 活性位点。本发明原核 PAL 组合物最优选的制剂具有的稳定剂浓度为约 5+/-4 摩尔稳定剂每摩尔原核 PAL 活性位点。

[0423] 在 pH < 7 或 pH > 7.6, 或 EDTA、氨基胍或 Tween 80 存在的条件下, 聚乙二醇化 AvPAL 半胱氨酸双突变体 AvPAL_C565SC503S 不是显著稳定的; 而抗氧化剂抗坏血酸和甲硫氨酸使 PAL 酶不稳定 (实施例 11, 数据未显示)。

[0424] 优选地将本发明的原核 PAL 组合物制备为液体制剂, 但也可以制备为固体 (例如, 冻干) 制剂。在这种情况下, 可以添加赋形剂, 例如填充剂如甘露醇和 / 或蔗糖。在实施例 12 中, 在没有甘露醇或蔗糖, 存在 25mg/mL 甘露醇, 或存在 20mg/mL 甘露醇加 5mg/mL 蔗糖的条件下, 用 pH 7.5 的 10mM Tris-HCl, 140mM NaCl 配制聚乙二醇化 AvPAL 半胱氨酸双突变体 AvPAL_C565SC503S, 并将其冻干。优选的冻干制剂包括浓度为约 1 到 5% (w/v) 或 10 到 50mg/mL 的甘露醇, 优选的为约 2 到 4%, 更优选的为约 2 到 3%。另一优选的冻干制剂包括甘露醇和蔗糖, 其中甘露醇的浓度为约 1 到 5% (w/v) 或 10 到 50mg/mL, 优选的为约 1 到 3%, 更优选的为约 1.5 到 2.5%, 蔗糖的浓度为约 0.1 到 2% (w/v) 或 0.1 到 2mg/mL, 优选的为约 0.2% 到 1%, 更优选的为约 0.3% 到 0.7%。本发明原核 PAL 组合物最优选的冻干制剂具有的甘露醇浓度为约 2.5+/-0.5% 甘露醇或 2.0+/-0.5% 甘露醇加 0.5+/-0.2%

蔗糖。

[0425] 因此,本发明的原核 PAL 组合物的优选制剂显示于表 9。

[0426] 表 9 :原核 PAL 变体的示例性制剂

[0427]

成分种类	成分类型	浓度范围
原核 PAL 变体	聚乙二醇化的 AvPAL_C565SC503S	10+/-5mg/mL (0.16+/-0.08mM)

[0428]

缓冲剂	Tris-HCl	10mM+/-5mM, 和	pH 7.3+/-0.3
等渗调节剂	NaCl	140mM+/-10mM	
稳定剂	Phe, t-CA, 或苯甲酸	每摩尔 PAL 活性位点	5+/-4 摩尔稳定剂
其他赋形剂, 填充剂*	甘露醇 +/- 蔗糖	2.5+/-0.5%甘露醇; 2.0+/-0.5%甘露醇	0.5+/-0.2%蔗糖

- [0429] * 用于冻干的原核 PAL 制剂
- [0430] 实施例 17
- [0431] 原核 PAL 组合物用于癌症治疗的临床评价
- [0432] 下列实施例提供了用于临床评价本发明的治疗方法中的组合物的有关参数的指

导,所述组合物包含原核 PAL 或其生物活性片段、突变体、变体或类似物。如本文自始至终所述,原核 PAL 组合物将用于癌症的治疗。进行临床试验,其将提供关于原核 PAL 的口服或皮下给药的安全性、药代动力学的评价,以及替代物和指定的临床终点的初始应答。该试验将进行至少而不是必须限于 24 周,以收集 100 位可评价患者的足够安全性信息。该试验的初始剂量将在约 0.001 到约 1.0mg/kg/ 周之间变化。如果该剂量不导致患者血浆苯丙氨酸(Phe) 水平的降低,例如从约 50 微摩到约 70 微摩的正常范围降低到从低于检测水平到低于约 30 微摩的范围,优选地低于约 20 微摩,甚至更优选地低于约 10 微摩,则根据需要应当增加剂量,并维持额外的最短时间,但不必限于 24 周,以确定安全性并评价进一步的效果。

[0433] 安全性的检测将包括不良事件、变态反应、完整的临床化学组(肾和肝功能)、尿分析和差别 CBC。此外,还将监测其他参数,包括血液 Phe 水平的降低、神经心理学和认知试验,并还监测全球性评价。本实施例还涉及检测药物在循环中的药代动力学参数,以及血液中 PAL 的一般分配和半衰期。可以预期这些检测将有助于将剂量与临床反应联系起来。

[0434] 方法

[0435] 无癌对照患者和已经诊断患有某种形式癌症的患者将经历基准医疗史和身体检查,神经心理学和认知测验,一套标准的临床实验室试验(CBC, Panel 20, CH50, UA),尿蝶呤水平、二氢蝶啶还原酶(DHPR) 水平和禁食血液(血浆) 组的血清氨基酸检测。将检测基准血液、血清或血浆 Phe 水平。患者将到诊所进行密切的每周随访。在完成治疗周期一周后患者将回到诊所进行全面评价。如果需要升高剂量,则患者将遵循上面所列的相同方案。在该试验自始至终都将监测安全性。

[0436] 诊断和包括/ 排除标准

[0437] 患者可以是男性或女性,具有某种形式癌症的记载的诊断书。该研究将包括先前接受过手术、化疗、放疗和/ 或其他抗癌疗法并且处于症状缓解期(例如,无病至少 5 年) 的癌症患者。如果患者已经诊断出患某种形式的癌症,但还未接受某些形式的抗癌疗法,则该患者将被排除出该初步研究。

[0438] 原核 PAL 安全性

[0439] 如果在研究过程中不存在显著的急性或慢性药物反应,则可以确定原核 PAL 疗法是安全的。如果在临床检查、临床试验或其他相应研究中未观察到显著异常,则可以确定药物的更长时间施用是安全的。

[0440] 原核 PAL 功效

[0441] 一旦确定原核 PAL 疗法是安全的并且能够有效降低患者的血浆苯丙氨酸(Phe) 水平,例如,从约 50 微摩到约 70 微摩的正常范围降低到从低于检测水平到低于约 30 微摩的范围,优选地低于约 20 微摩,甚至更优选地低于约 10 微摩,本发明的原核 PAL 组合物可以在下列癌症患者中进行检测:先前接受过手术、化疗、放疗和/ 或其他抗癌疗法并处于症状缓解期(例如,无病至少 5 年) 的癌症患者,以及已经诊断出患有某种形式的癌症但至今还未接受任意形式抗癌疗法的患者。

[0442] 对于症状缓解期的癌症患者,单独施用原核 PAL,或与特定形式癌症的标准癌症疗法联合施用,以确定接受 PAL 疗法的患者是否比未接受本发明原核 PAL 组合物的患者在症状缓解期(即,无病) 维持更长时间。

[0443] 对于患有活性形式癌症的癌症患者,单独施用原核 PAL,或与特定形式癌症的标准

癌症疗法联合施用,以确定接受 PAL 疗法的患者是否比未接受本发明原核 PAL 组合物的患者对所述癌症疗法具有更好的响应(例如,保持无病状态更长时间,具有更长的生存时间,或具有更低的肿瘤生长、肿瘤大小或肿瘤负荷)。

[0444] 原核 PAL 疗法可以单独施用,或与癌症治疗剂或靶向癌症治疗剂联合施用,或与蛋白限制性饮食(即,不含苯丙氨酸)联合施用,或上述两者。

[0445] 实施例 18

[0446] AvPAL 变体(半胱氨酸突变体)在 B166 黑色素瘤细胞系异种移植模型中的抗癌活性

[0447] 在 B16 黑色素瘤细胞系异种移植模型中评价聚乙二醇化 AvPAL 半胱氨酸双突变体 AvPAL_C565SC503S 的预防性或治疗性给药的抗肿瘤效果,所述 AvPAL_C565SC503S 按照实施例 7 的描述制备,并用 10mM Tris-HCl, 140mM NaCl, 1mM 反式肉桂酸(t-CA), pH 7.5 配制为 2.86 和 7.14mg/mL。预防性治疗表示给未显示病征的个体施用的治疗,而治疗性治疗表示给显示病征的个体施用的治疗。利用聚乙二醇化 AvPAL 变体的预防性或治疗性治疗的抗肿瘤效果通过 B16 黑色素瘤异种移植植物生长的延缓和小鼠存活时间的增加来检测。

[0448] 为了建立肿瘤异种移植植物,给 96 只 6 周龄雌性 B6J 小鼠在后腰窝处皮下注射约 1×10^6 个 B16 黑色素瘤细胞。将注射的小鼠随机分为两组,代表预防性治疗和治疗性治疗群体。

[0449] 分配到预防组的小鼠被进一步分成四组,每组接受每周两次皮下注射运载体(10mM Tris-HCl, 140mM NaCl, 1mM 反式肉桂酸(t-CA), pH 7.5)或不同剂量水平(40、80 或 100mg/kg)的聚乙二醇化 AvPAL 半胱氨酸双突变体 AvPAL_C565SC503S。预防组的第 1 天表示将 B16 黑色素瘤细胞注射到小鼠的那一天,如图 18(顶部)所示。

[0450] 但是,在治疗组中,第 1 天表示注射到小鼠的 B16 黑色素瘤体积达到 $200-300\text{mm}^3$ 的那一天,如图 18(底部)所示。当分到治疗组的小鼠的肿瘤体积达到 $200-300\text{mm}^3$ 时,这些小鼠被进一步分成四组,每组接受每周两次在肿瘤相反一侧腰窝皮下注射运载体(10mM Tris-HCl, 140mM NaCl, 1mM 反式肉桂酸(t-CA), pH 7.5)或不同剂量水平(40、80 或 100mg/kg)的聚乙二醇化 AvPAL 半胱氨酸双突变体 AvPAL_C565SC503S。

[0451] 每天触诊所有小鼠,直至肿瘤可以测量。通过数字式测径器测量每周检测肿瘤体积三次,利用公式 $(1 \times w^2)/2$, 其中 w 是肿瘤 2 条垂直轴的最短值。

[0452] 每周检测体重三次,每天进行临床观察(死亡、异常、以及疼痛或痛苦的症状)。在给药施用前(每周的第 1 天)、给药后 48 小时(每周的第 3 天)和结束时通过眼球后窦道采集每周进行血液采集。

[0453] 在第 36 天或个别地在肿瘤体积达到 1500mm^3 时杀死小鼠,无论哪一种情况首先发生。在结束时采集肿瘤,并用福尔马林固定用于组织学检查。

[0454] 到第 16 天预防组的一些小鼠具有 1500mm^3 的肿瘤体积(参见图 18(顶部))。到第 10 天治疗组的一些小鼠具有 1500mm^3 的肿瘤体积(底部))。

[0455] 图 18 显示当预防性(顶部)或治疗性(底部)施用酶时,聚乙二醇化 AvPAL 半胱氨酸双突变体 AvPAL_C565SC503S 能够以剂量依赖性方式延缓 B16 黑色素瘤细胞系异种移植植物的生长。

[0456] 表 10 显示当预防性或治疗性施用酶时,聚乙二醇化 AvPAL 半胱氨酸双突变体

AvPAL_C565SC503S 能够增加存活率(通过肿瘤体积小于 1500mm^3 的小鼠的百分比来确定)。

[0457] 表 10 :B16 黑色素瘤异种移植模型中 rAVPAL-PEG_C565SC503S 对存活率的影响

[0458]

治疗组	存活(预防性)*	存活(治疗性)*
运载体	第 13 天	第 10 天
40mg/kg rAVPAL-PEG	第 18 天	第 13 天
80mg/kg rAVPAL-PEG	第 20 天	第 15 天
100mg/kg rAVPAL-PEG	第 25 天	第 15 天

[0459] * 至少 50% 治疗组中的小鼠具有大于 1500mm^3 的肿瘤体积的那一天

[0460] 该研究显示,当在黑色素瘤小鼠模型中预防性或治疗性施用,聚乙二醇化的 AvPAL 半胱氨酸双突变体 AvPAL_C565SC503S 发挥抗肿瘤作用。

[0461] 实施例 19

[0462] AvPAL 变体(半胱氨酸突变体)在肝癌肿瘤细胞系异种移植模型中的抗癌活性

[0463] 在两种肝癌肿瘤细胞系异种移植模型中评价聚乙二醇化 AvPAL 半胱氨酸双突变体 AvPAL_C565SC503S 的预防性给药的抗肿瘤效果,所述 AvPAL_C565SC503S 按照实施例 7 的描述制备,并用 10mM Tris-HCl,140mM NaCl,1mM 反式肉桂酸(t-CA),pH 7.5 配制为 9.1mg/mL。预防性治疗表示给未显示病征的个体施用的治疗。利用聚乙二醇化 AvPAL 变体的预防性治疗的抗肿瘤效果通过肝癌异种移植生长的延缓和小鼠存活时间的增加来检测。

[0464] 为了建立肿瘤异种移植,给 20 只 6 周龄雌性 B6J 小鼠在后腰窝处皮下注射约 1×10^7 个 SNU398 肝癌肿瘤细胞或约 5×10^6 个 HepG2 肝癌肿瘤细胞。

[0465] 将注射 SNU398 和注射 HepG2 的小鼠分成两组,每组接受每周三次皮下注射运载体(10mM Tris-HCl,140mM NaCl,1mM 反式肉桂酸(t-CA),pH7.5)或 60mg/kg 聚乙二醇化 AvPAL 半胱氨酸双突变体 AvPAL_C565SC503S。第 1 天表示 SNU398 细胞或 HepG2 细胞注射到小鼠的那一天,如图 19 所示。

[0466] 每天触诊所有小鼠,直至肿瘤可以测量。通过数字式测径器测量每周检测肿瘤体积三次,利用公式 $(1 \times w^2)/2$,其中 w 是肿瘤 2 条垂直轴的最短值。

[0467] 每周检测体重三次,每天进行临床观察(死亡、异常、以及疼痛或痛苦的症状)。在研究前、第 7 次给药后 48 小时和结束时进行通过眼球后窦道采集的血液采集。

[0468] 在第 60 天或个别地在肿瘤体积达到 1500mm^3 时杀死小鼠,无论哪一种情况首先发生。在结束时采集肿瘤,并用福尔马林固定用于组织学检查。

[0469] 图 19 显示聚乙二醇化 AvPAL 半胱氨酸双突变体 AvPAL_C565SC503S 的预防性施用能够延缓 SNU398(顶部)和 HepG2(底部)肝癌细胞系异种移植物的生长。

[0470] 表 11 显示聚乙二醇化 AvPAL 半胱氨酸双突变体 AvPAL_C565SC503S 的预防性施用能够增加存活率,通过 SNU398 和 HepG2 肝癌细胞系异种移植肿瘤体积小于 1500mm^3 的小鼠的百分比确定。

[0471] 表 11 :两种肝癌肿瘤异种移植模型中 rAVPAL-PEG_C565SC503S 对存活率的影响

[0472]

治疗组	存活(SNU398)*	存活(HepG2)*
运载体	第 33 天	第 54 天
60mg/kg rAVPAL-PEG	>第 60 天	>第 60 天

[0473] * 至少 50% 治疗组中的小鼠具有大于 1500mm^3 的肿瘤体积的那一天

[0474] 这些研究显示,当在两种肝癌小鼠模型中预防性施用,聚乙二醇化的 AvPAL 半胱氨酸双突变体 AvPAL_C565SC503S 发挥抗肿瘤作用。

[0475] 对在上述说明性实施例中阐述的本发明的多种修改和变化预期会被本领域技术人员想到。因此本发明只受所附权利要求书的限制。

[0001]

序列表

<110> 生物马林药物股份有限公司
米歇尔·C·维拉德
P·A·菲茨帕特里克
E·D·卡基斯
丹尼尔·J·温特
穆巴拉克·穆塔利夫
肖恩·M·贝尔
奥古斯塔斯·O·奥克哈玛菲

<120> 原核苯丙氨酸氨裂合酶的组合物及利用其组合物治疗癌症的方法

<130> 11808-030-228

<150> US 61/066, 125

<151> 2007-08-17

<160> 33

<170> PatentIn version 3.4

<210> 1

<211> 1710

<212> DNA

<213> 点形念珠藻

<400> 1

atgaatataa catctctaca acagaacata acgcgttctt ggcaaatacc tttcactaat	60
agttcagatt caatcgtaac tgtaggcgat cgcaatctga caatcgacga ggttgtaa	120
gttgctcgtc atggaacaca ggtgcgctta actgataatg cagatgtcat tcggggtgtt	180
caagcatctt gtgattacat taacaatgca gtcgaaacag cacagccaat ttacggggtg	240
acatctggct ttggcggtat ggcagatgtt gtcattcttc gcgaacaagc agcggaactt	300
cagactaatt taatttggtt tctgaaatcc ggcgagcaggaa acaaattatc gttagcagac	360
gtgcgtgcag ctatgctctt acgtgcaa	420
ctcgaactta ttcagcggtat tgaaacttct ctcaacgctg gcgtgacacc ccatgtctat	480

[0002]

gagtttggct ctatcggtgc tagcggcgat ttggtgccat tatcctacat tactggggca	540
ctaatecggtc tagatectag ctttacagtt gacttcgacg gtaaagaaat ggatgccgtt	600
acagccttgt ctcgtttggg ttgcccgaag ttgcaattgc aaccgaaaga aggttttagca	660
atgatgaatg gcacctcagt catgacaggt attgcagcta actgtgtgta cgatgcgaaa	720
gttttgctcg ctctgacaat ggggtgtacac gccttagcca tccaaggttt atacggaacg	780
aatcaatctt tccacccgtt tattcatcag tgcaagccac atcccgttca actatggaca	840
gcagatcaaa tgttttctct gctgaaagat tcattcttag ttcgtgaaga gttggatggt	900
aaacacgaat accgtggtaa agatctgata caggatcgtt attctctccg ctgtctggca	960
cagttcatag ggccaatcgt tgatggggta tcagagatta ccaagcaaat cgaggtagaa	1020
atgaactcag tcaccgataa cccattgatt gatgtcgaga accaagttag ttatcacggc	1080
ggcaattttc tcggacagta tgtgggtgtg acaatggatc gcctacgtta ttacataggg	1140
ctattggcca aacacatcga tgtgcagatt gcattcttg tctcgccaga gtttagcaac	1200
ggcttaccac cctctttagt tggtaatagc gatcgcaaag ttaatatggg actcaaagg	1260
ttgcaaatca gtggaaactc gattatgcca ctgttagct tctatggaaa ttcctagcc	1320
gatcgctttc ctaccacgc cgagcaattt aatcaaaata ttaacagcca aggtatatt	1380
tccgcaaatt tgacacgtcg ttccgtagac atatttcaga attatatggc gatcgcggtg	1440
atgtttggag ttcaagctgt tgacctccgc acatataaga tgaaaggta ttatgatgca	1500
cgtacatgcc tctacccaa tactgtgcag ttatacacag cagtctgca ggtagttgga	1560
aagccactaa cgtctgtgcg tccatacatt tggaacgaca acgagcaatg tttagatgag	1620
catattgccc ggatttcagc tgatatcgct ggtgggtggt taattgtgca agcagttgag	1680
catatTTTTT cgagcttaaa gtcaacgtaa	1710

<210> 2

<211> 569

[0003]

<212> PRT

<213> 点形念珠藻

<400> 2

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

[0004]

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

[0005]

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

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

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

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

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

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

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

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

His Ile Phe Ser Ser Leu Lys Ser Thr
565

<210> 3

<211> 1704

<212> DNA

<213> 多变鱼腥藻

<400> 3

atgaagacac tatctcaagc acaaagcaaa acctcatctc aacaattttc ttttactgga 60

aattcttctg ccaatgtaat tattggtaat cagaaactca caatcaatga tgttgcaagg 120

gtagcgcgta atggcacctt agtgtcttta accaataaca ctgatatttt gcagggtatt 180

caggcatctt gtgattacat taataatgct gttgaatctg gggaaccaat ttatggagtg 240

acatctggtt ttggcggtat ggccaatggt gccatatccc gtgaacaagc atctgaactc 300

caaaccaact tagtttggtt cctgaaaaca ggtgcaggga acaaattacc cttggcggat 360

[0006]

gtgcgcgcag ctatgctctt gcggtgcaaac tctcatatgc gcggtgcac tggcatcaga	420
ttagaactta tcaagcgtat ggagatttct cttaacgctg gtgtcacacc atatgtgtat	480
gagtttggtt caatiggtgc aagtggatgat ttagtgccac tatectacat tactggttca	540
ctgataggct tagatcccag ttttaagggt gacttcaacg gtaaagaaat ggatgcgcca	600
acagctctac gtcaactgaa ttgtcaccc ttgacattgt tgccgaagga aggcttggcg	660
atgatgaacg gcacttcagt catgacaggt attgcagcaa actgcgtcta cgataactca	720
attttaactg cgatcgctat gggcggtcac gctctagata tccaagcttt aaacggaacc	780
aatcaatcat tccatccatt tatccataat tccaaaccac atcctggatca attatgggca	840
gcagatcaga tgatttcttt gttagccaat tcccagttag ttcgtgatga gttagatggt	900
aaacacgatt atcgtgatca cgagttgatt caagatcgtt actcactccg atgccttccc	960
cagtatttgg ggccaatcgt tgatggaatt tcccagattg ccaaacaat tgaaatcgaa	1020
atcaactcag tcaccgataa cccactaatt gatgttgata accaagctag ctatcatgga	1080
ggaaatttcc tcggacagta cgtgggtatg ggaatggatc acctgcgtta ctatattggg	1140
ttattggcta aacacctaga tgtgcagatt gccctctctg cctcaccaga gtttagcaat	1200
ggactaccac catctttatt aggcaaccga gaacgtaaag tcaatatggg actcaaaggt	1260
ctgcaaatat gcggtaacct aattatgcca ctgttgacct tctatggaaa ttccatcgcc	1320
gatcgctttc ctacccatgc agaacaattt aatcagaaca tcaacagtca aggatacact	1380
tcagcgactc tagcccgccg ttctgtggat atcttccaga attatgtggc gatcgctctg	1440
atgtttggag tccaagctgt tgacctccgc acatataaaa agactggatca ttacgatgca	1500
cgcgcctgtc tatcacctgc aactgagcgc ttatattcag cagtccgcca cgtagttgga	1560
caaaaaccaa cttcagatcg cccatatatt tggaatgata atgagcaagg actggatgag	1620
catattgccc ggatttctgc tgatatcgct gctgggtgtg tgattgtgca agcagttcaa	1680

[0007]

gatatcttac cctgcttgca ttaa

1704

<210> 4

<211> 567

<212> PRT

<213> 多变鱼腥藻

<400> 4

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

[0008]

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

[0009]

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> *Streptomyces maritimus*

<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

[0010]

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			

[0011]

Ser Leu Ala Ile Glu Asp Ala Tyr Ser Ile Arg Cys Thr Pro Gln Ile			
290	295	300	
Leu Gly Pro Val Val Asp Val Leu Asp Arg Ile Gly Ala Thr Leu Gln			
305	310	315	320
Asp Glu Leu Asn Ser Ser Asn Asp Asn Pro Ile Val Leu Pro Glu Glu			
	325	330	335
Ala Glu Val Phe His Asn Gly His Phe His Gly Gln Tyr Val Ala Met			
	340	345	350
Ala Met Asp His Leu Asn Met Ala Leu Ala Thr Val Thr Asn Leu Ala			
	355	360	365
Asn Arg Arg Val Asp Arg Phe Leu Asp Lys Ser Asn Ser Asn Gly Leu			
	370	375	380
Pro Ala Phe Leu Cys Arg Glu Asp Pro Gly Leu Arg Leu Gly Leu Met			
385	390	395	400
Gly Gly Gln Phe Met Thr Ala Ser Ile Thr Ala Glu Thr Arg Thr Leu			
	405	410	415
Thr Ile Pro Met Ser Val Gln Ser Leu Thr Ser Thr Ala Asp Phe Gln			
	420	425	430
Asp Ile Val Ser Phe Gly Phe Val Ala Ala Arg Arg Ala Arg Glu Val			
	435	440	445
Leu Thr Asn Ala Ala Tyr Val Val Ala Phe Glu Leu Leu Cys Ala Cys			
	450	455	460
Gln Ala Val Asp Ile Arg Gly Ala Asp Lys Leu Ser Ser Phe Thr Arg			
465	470	475	480
Pro Leu Tyr Glu Arg Thr Arg Lys Ile Val Pro Phe Phe Asp Arg Asp			
	485	490	495
Glu Thr Ile Thr Asp Tyr Val Glu Lys Leu Ala Ala Asp Leu Ile Ala			
	500	505	510

[0012]

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

<210> 6

<211> 510

<212> PRT

<213> 恶臭假单胞菌

<400> 6

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

[0013]

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

[0014]

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

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

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

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

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

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

<210> 7

<211> 567

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 多变鱼腥藻 PAL 第 64 位的半胱氨酸代替为丝氨酸

<400> 7

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

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

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

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

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

[0015]

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

[0016]

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

[0017]

Asp Ile Leu Pro Cys Leu His
565

<210> 8

<211> 567

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 多变鱼腥藻 PAL 第 318 位的半胱氨酸代替为丝氨酸

<400> 8

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

[0018]

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

[0019]

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Asp Ile Leu Pro Cys Leu His
565

<210> 9

<211> 567

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 多变鱼腥藻 PAL 第 503 位的半胱氨酸代替为丝氨酸

<400> 9

[0020]

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

[0021]

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

[0022]

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

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

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

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

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

Asp Ile Leu Pro Cys Leu His
565

<210> 10

<211> 567

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 多变鱼腥藻 PAL 第 565 位的半胱氨酸代替为丝氨酸

<400> 10

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

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

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

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

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

[0023]

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

[0024]

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

[0025]

Asp Ile Leu Pro Ser Leu His
565

<210> 11

<211> 567

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

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

<400> 11

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

[0026]

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

[0027]

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Asp Ile Leu Pro Ser Leu His
565

<210> 12

<211> 38

<212> DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 点形念珠藻 PAL 引物 1(前导)

<400> 12

cactgtcata tgaatataac atctctacaa cagaacat

38

[0028]

<210> 13	
<211> 45	
<212> DNA	
<213> 人工的	
<220>	
<223> 点形念珠藻 PAL 引物 2(反向)	
<400> 13	
gacagtggcg gccgctcacg ttgactttaa gctcgaaaaa atatg	45
<210> 14	
<211> 38	
<212> DNA	
<213> 人工的	
<220>	
<223> 多变鱼腥藻 PAL 引物 1(前导, N-末端片断)	
<400> 14	
cactgtgcta gcatgaagac actatctcaa gcacaaag	38
<210> 15	
<211> 49	
<212> DNA	
<213> 人工的	
<220>	
<223> 多变鱼腥藻 PAL 引物 2(反向, N-末端片断)	
<400> 15	
ggaaatttcc tccatgatag ctggtttggt tatcaacatc aattagtgg	49
<210> 16	
<211> 49	
<212> DNA	
<213> 人工的	
<220>	
<223> 多变鱼腥藻 PAL 引物 3(前导, C-末端片断)	
<400> 16	
ccactaattg atgttgataa ccaagccagc tatcatggag gaaatttcc	49

[0029]

<210> 17	
<211> 41	
<212> DNA	
<213> 人工的	
<220>	
<223> 多变鱼腥藻 PAL 引物 4(反向, C-末端片断)	
<400> 17	
cactgtgcgg ccgcttaatg caagcagggt aagatatctt g	41
<210> 18	
<211> 35	
<212> DNA	
<213> 人工的	
<220>	
<223> 多变鱼腥藻 PAL 前导引物	
<400> 18	
cactgtcata tgaagacact atctcaagca caaag	35
<210> 19	
<211> 36	
<212> DNA	
<213> 人工的	
<220>	
<223> 多变鱼腥藻 PAL 反向引物	
<400> 19	
cactgtctcg agatgcaagc agggtaagat atcttg	36
<210> 20	
<211> 38	
<212> DNA	
<213> 人工的	
<220>	
<223> 多变鱼腥藻 PAL 引物创建 5' NheI 位点并删除内部 NheI 位点(前导, N-末端)	
<400> 20	
cactgtgcta gcatgaagac actatctcaa gcacaaag	38

[0030]

<210>	21	
<211>	49	
<212>	DNA	
<213>	人工的	
<220>		
<223>	多变鱼腥藻 PAL 引物创建 5' NheI 位点并删除内部 NheI 位点(反向, N-末端)	
<400>	21	
	ggaaatttcc tccatgatag ctggcttggt tatcaacatc aattagtgg	49
<210>	22	
<211>	49	
<212>	DNA	
<213>	人工的	
<220>		
<223>	多变鱼腥藻 PAL 引物创建 5' NheI 位点并删除内部 NheI 位点(前导, C-末端)	
<400>	22	
	ccactaattg atgttgataa ccaagccagc tatcatggag gaaatttcc	49
<210>	23	
<211>	41	
<212>	DNA	
<213>	人工的	
<220>		
<223>	多变鱼腥藻 PAL 引物创建 5' NheI 位点并删除内部 NheI 位点(反向, C-末端)	
<400>	23	
	acagtggcgg ccgcttaatg caagcagggt aagatatctt g	41
<210>	24	
<211>	38	
<212>	DNA	
<213>	人工的	
<220>		
<223>	多变鱼腥藻 PAL 引物创建 5' NheI 位点和 3' SmaI 位点(前导)	
<400>	24	
	cactgtgaat tcatgaagac actatctcaa gcacaaag	38

[0031]

<210>	25	
<211>	37	
<212>	DNA	
<213>	人工的	
<220>		
<223>	多变鱼腥藻 PAL 引物创建 5' NheI 位点和 3' SmaI 位点(反向)	
<400>	25	
	cactgtcccg ggttaatgca agcagggtaa gatatct	37
<210>	26	
<211>	41	
<212>	DNA	
<213>	人工的	
<220>		
<223>	多变鱼腥藻 PAL 引物在第 503 位产生半胱氨酸的丝氨酸替代(前导)	
<400>	26	
	gtcattacga tgcacgcgcc tctctatcac ctgcaactga g	41
<210>	27	
<211>	41	
<212>	DNA	
<213>	人工的	
<220>		
<223>	多变鱼腥藻 PAL 引物在第 503 位产生半胱氨酸的丝氨酸替代(反向)	
<400>	27	
	ctcagttgca ggtgatagag aggcgcgtgc atcgtaatga c	41
<210>	28	
<211>	42	
<212>	DNA	
<213>	人工的	
<220>		
<223>	多变鱼腥藻 PAL 引物在第 565 位产生半胱氨酸的丝氨酸替代(前导)	
<400>	28	
	cagttcaaga tatcttaccc tccttgcatc aacccgggct gc	42

[0032]

<210>	29	
<211>	42	
<212>	DNA	
<213>	人工的	
<220>		
<223>	多变鱼腥藻 PAL 引物在第 565 位产生半胱氨酸的丝氨酸替代(反向)	
<400>	29	
	gcagcccgagg ttaatgcaag gagggtaaga tatcttgaac tg	42
<210>	30	
<211>	44	
<212>	DNA	
<213>	人工的	
<220>		
<223>	多变鱼腥藻 PAL 引物在第 64 位产生半胱氨酸的丝氨酸替代(前导)	
<400>	30	
	gcagggtatt caggcatctt ctgattacat taataatgct gttg	44
<210>	31	
<211>	44	
<212>	DNA	
<213>	人工的	
<220>		
<223>	多变鱼腥藻 PAL 引物在第 64 位产生半胱氨酸的丝氨酸替代(反向)	
<400>	31	
	caacagcatt attaagttaa tcagaagatg cctgaatacc ctgc	44
<210>	32	
<211>	43	
<212>	DNA	
<213>	人工的	
<220>		
<223>	多变鱼腥藻 PAL 引物在第 318 位产生半胱氨酸的丝氨酸替代(前导)	
<400>	32	
	caagatcggtt actcactccg atcccttccc cagtatttgg ggc	43

[0033]

<210> 33

<211> 43

<212> DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 多多变鱼腥藻 PAL 引物在第 318 位产生半胱氨酸的丝氨酸替代(反向)

<400> 33

gccccaaata ctggggaagg gatcggagtg agtaacgac ttg

43

点形念珠藻 PAL 的基因序列

```

1   atgaatataa catctctaca acagaacata acgcgttctt ggcaaatacc ttctactaat
61  agttcagatt caatcgtaac tgtaggcgat cgcaatctga caatcgacga gggtgtaaat
121 gttgctcgtc atggaacaca ggtgcgctta actgataatg cagatgtcat tcgggggtgtt
181 caagcatctt gtgattacat taacaatgca gtcgaaacag cacagccaat ttacgggggtg
241 acatctggct ttggcgggat ggcagatgtt gtcctctctc gcgaacaagc agcgggaactt
301 cagactaatt taatttgggt tctgaaatcc ggcgaggaa acaaattatc gttagcagac
361 gtgcgtgcag ctatgctctt acgtgcaaat tcacatttgt atggtgctgc tggatatacga
421 ctggaactta ttcagcggat tgaaactttc ctcaacgctg gcgtgacacc ccatgtctat
481 gagtttggct ctatcggtgc tagcggcgat ttggtgccat taccctacat tactggggca
541 ctaatcgtgc tagatcctag ctttacagtt gacttcgacg gtaaagaaat ggatgccgtt
601 acagccttgt ctggttggg tttgccaaag ttgcaattgc aaccgaaaga aggttttagca
661 atgatgaatg gcacctcagt catgacaggt attgcagcta actgtgtgta cgatgcgaaa
721 gttttgctcg ctctgacaat ggggtgtacac gccttagcca tccaaggttt atacggaacg
781 aatcaatctt tccaccogtt tattcatcag tgcaagccac atcccgtca actatggaca
841 gcagatcaaa tgttttctct gctgaaagat tcattcttag ttcgtgaaga gttggatggt
901 aaacacgaat accgtggtaa agatctgata caggatcgtt attctctccg ctgtctggca
961 cagttcatag ggccaatcgt tgatggggtg tcagagatta ccaagcaaat cgaggtagaa
1021 atgaactcag tcaccgataa cccattgatt gatgtcgaga accaagttag ttatcacggc
1081 ggcaattttc tcggacagta tgtgggtgtg acaatggatc gcctacgtta ttacataggg
1141 ctattggcca aacacatoga tgtgcagatt gcacttcttg tctcgccaga gtttagcaac
1201 ggcttaccac cctctttagt tggtaatagc gatcgcaaag ttaatatggg actcaaaggt
1261 ttgcaaatca gtggaaactc gattatgcca ctgttgagct tctatggaaa ttccttagcc
1321 gatcgctttc ctacccacgc cgagcaattt aatcaaaata ttaacagcca aggctatatt
1381 tccgcaaatt tgacacgtcg ttcogtagac atatttcaga attatatggc gatcgcggtg
1441 atgtttggag ttcaagctgt tgacctcgc acatataaga tgaaaggcca ttatgatgca
1501 cgtacatgcc tctcacccaa tactgtgcag ttatacacag cagtctgcga ggtagttgga
1561 aagccactaa cgtctgtgcg tccatacatt tggaacgaca acgagcaatg ttttagatgag
1621 catattgccc ggatttcagc tgatatcgct ggtggtggtt taattgtgca agcagttgag
1681 catatttttt cgagcttaaa gtcaacgtaa

```

图 1A

点形念珠藻 PAL 的蛋白序列

MNITSLQQNITRSWQIPFTNSSDSIVTVGDRNLTIDEVVNVARH
GTQVRLTDNADVIRGVQASCDYINNAVETAQPIYGVTSFGGMADVVISREQAAELQT
NLIWFLKSGAGNKLSLADVRAAMLLRANSHLYGASGIRLELIQRIETFLNAGVTPHVY
EFGSIGASGDLVPLSYITGALIGLDPSFTVDFDGKEMDAVTALSRLGLPKLQLQPKEG
LAMMNGTSVMTGIAANCYDAKVLLALTMGVHALAIQGLYGTNQSFHFFIHQCKPHPG
QLWTADQMFSLLKDSSLVREELDGKHEYRGKDLIQDRYSLRCLAQFIGPIVDGVSEIT
KQIEVEMNSVTDNPLIDVENQVSYHGGNFLGQYVGVTMDRLRYIIGLLAKHIDVQIAL
LVSPEFSNGLPPSLVGNSDRKVMGLKGLQISGNSIMPLLSFYGNSLADRFPETHAEQF
NQNINSQGYISANLTRRSVDIFQNYMAIALMFGVQAVDLRTYKMKGHYDARTCLSPNT
VQLYTAVCEVVGKPLTSVRPYIWNNDNEQCLDEHIARISADIAGGGLIVQAVEHIFSSL
KST

图 1B

多变鱼腥藻 PAL 的基因序列

```

1   atgaagacac tatctcaagc acaaagcaaa acctcatctc aacaattttc ttttactgga
61  aattcttctg ccaatgtaat tattggtaat cagaactca caatcaatga tgttgcaagg
121 gtagcgcgta atggcacctt agtgtcttta accaataaca ctgatatttt gcaggggtatt
181 caggcatctt gtgattacat taataatgct gttgaatctg gggaaccaat ttatggagtg
241 acatctggtt ttggcgggat ggccaatgtt gccatatccc gtgaacaagc atctgaactc
301 caaaccaact tagtttggtt cctgaaaaca ggtgcaggga acaaattacc cttggcggat
361 gtgcgcgcag ctatgctctt gcgtgcaaac tctcatatgc gcggtgcacg tggcatcaga
421 ttagaactta tcaagcgtat ggagattttc cttaacgctg gtgtcacacc atatgtgtat
481 gagtttggtt caattggtgc aagtgggtat ttagtgccac taccctacat tactggttca
541 ctgataggct tagatcccag ttttaagggt gacttcaacg gtaaagaaat ggatgcgcca
601 acagctctac gtcaactgaa tttgtcacc ttgacattgt tgccgaagga aggcttggcg
661 atgatgaacg gcacttcagt catgacaggt attgcagcaa actgctctca cgatactcaa
721 attttaactg cgatcgctat gggcgttcac gctctagata tccaagcttt aaacggaacc
781 aatcaatcat tccatccatt tatccataat tccaaaccac atcctggtca attatgggca
841 gcagatcaga tgatttcttt gttagccaat tcccagttag ttctgtgatg gttagatggt
901 aaacacgatt atcgtgatca cgagttgatt caagatcgtt actcactccg atgccttccc
961 cagtatttgg ggccaatcgt tgatggaatt tcccagattg ccaaacaaat 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 ctgttgacct tctatggaaa ttccatcgcc
1321 gatcgctttc ctacccatgc agaacaattt aatcagaaca tcaacagtca aggatacaact
1381 tcagcgactc tagcccgccg ttctgtggat atcttccaga attatgtggc gatcgctctg
1441 atgtttggag tccaagctgt tgacctccgc acatataaaa agactgggtca ttacgatgca
1501 cgcgcctgtc tatcacctgc aactgagcgc ttatatcag cagtccgcca cgtagtggga
1561 caaaaaccaa cttcagatcg cccatatatt tggaatgata atgagcaagg actggatgag
1621 catattgccc ggatttctgc tgatatcgct gctgggtggtg tgattgtgca agcagttcaa
1681 gatattctac cctgcttgca ttaa

```

图 2A

多变鱼腥藻 PAL 的蛋白序列

```

1      mktlsqaqsk tssqqfsftg nssanviign qkitindvar varngtlvsl tnntdilqgi
61     qascdyinna vesgepiygv tsqfggmanv aisreqasel qtnlvwflkt gagnklplad
121    vraamllran shmrgasgir lelikrmeif inagvtpyvy efgsiqasgd lvplsyitgs
181    ligldpsfkv dfngkemdap talrqnlsp ltllpkegla mngtsvmtg iaancvydtq
241    iltaiamgvh aldiqalngt nqsfhpfihn skphpgqlwa adqaisllan sqlvrdeidg
301    khdyrdheli qdryslrclp qylgpivdgi sqiakqieie insvtdnpli dvdnqasyhg
361    gnflqpyvqm gmdhlryyig llakhldvqi allaspefsn glppsllgnr erkvnmgikg
421    lqicgnsimp lltfygnsia drfpthaeqf nqninsqgyt satlarrsvd ifqnyvaial
481    mfgvqavdlr tykktghyda racispater lysavrhvvg qkptsdrpyi wndneqglde
541    hiarisadia aggvivqavq dilpclh

```

图 2B

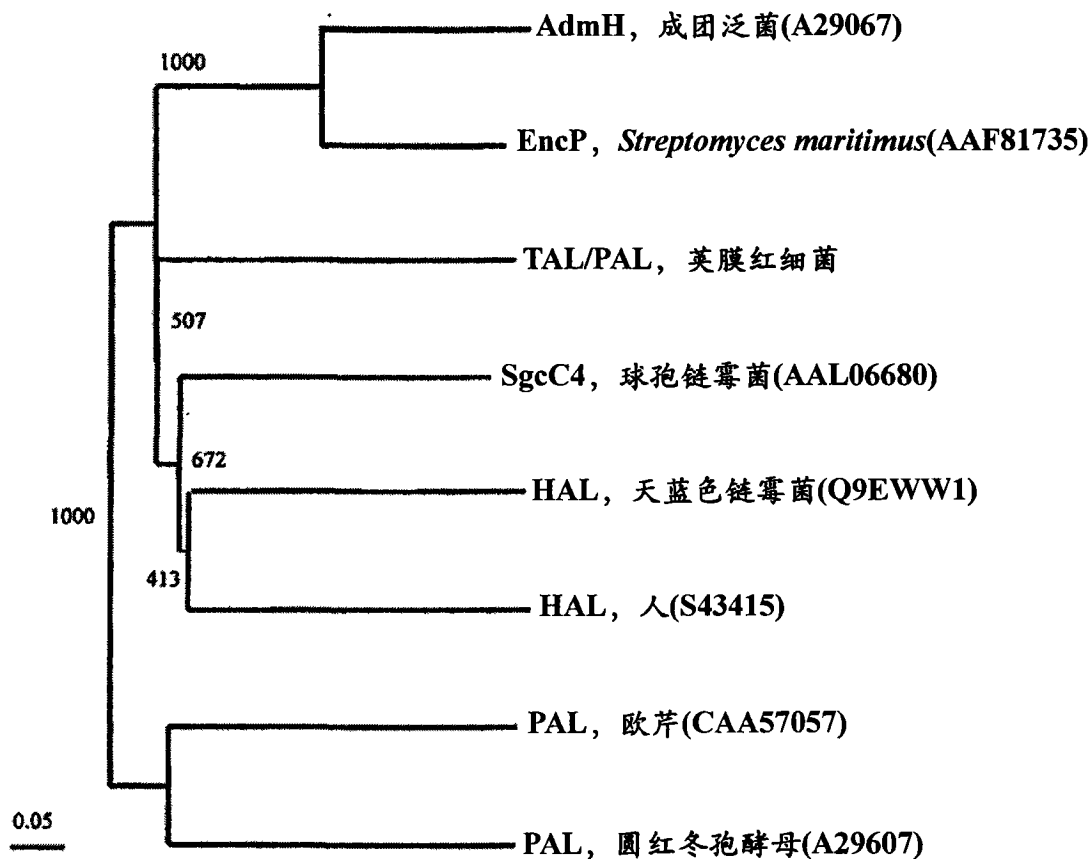


图 3

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

Avar03005300	MKTLQAQSK TSSQQFSFTG NSSANVIIGN QKLTINDVAR VARNGTLVSL
Npun02008223	MNITSLQQNI TRSWQIPFTN SSDSIVTVGD RNLTIDEVNV VARHGTVRL
EncP	MTFVIELD MNVTLDQLED AARQRTFVEL
PputidaHAL	MTELTLPK GTLTALQLRA IHAAPVRLQL
Avar03005300	TNNTDILQGI QASCDYINNA VESGEPIYGV TSGFGGMANV AISREQASEL
Npun02008223	TDNADVIRGV QASCDYINNA VETAQPIYGV TSGFGGMADV VISREQAAEL
EncP	S..APVRSRV RASRDVLVKF VQDERVIYGV NTSNGGFVDH LVPVSAQARQL
PputidaHAL	D..ASAAPAI DASVACVEQI IAEDRTAYGI NTGFGLLAST RIASHDLENL
Avar03005300	QTNLVWFLKT GAGNKLPLAD VRAAMLLRAN SHMRGASGIR LELIKRMEIF
Npun02008223	QTNLIWFLKS GAGNKLPLAD VRAAMLLRAN SHLYGASGIR LELIQRIETP
EncP	QENLINAVAT NVGAYLDDTT ARTIMLSRIV SLARGNSAIT PANLDKLAV
PputidaHAL	QRSLVLSHAA GIGAPLDDDL VRLIMVLKIN SLSRGFSGIR RKVIDALIAL
Avar03005300	LNAGVTPYVY EFGSIGASGD LVPLSYITGS LIGLDPSFKV DFNKGEMDAP
Npun02008223	LNAGVTPHYV EFGSIGASGD LVPLSYITGA LIGLDPSFTV DFDGKEMDAV
EncP	LNAGIVPCIP EKGSIGTSGD LGPLAAIALV CAGQW...KA RYNGQIMPGR
PputidaHAL	VNAEVYPHIP LKGSVGASGD LAPLATMSLV LLGEG...KA RYKGQWLSAT
Avar03005300	TALRQLNLSP LTLKPKEGLA MMNGTSVMTG IAANCVYDTQ ILTAIANGVH
Npun02008223	TALSRLGLPK LQLKPKEGLA MMNGTSVMTG IAANCVYDAK VLLALTMGVH
EncP	QALSEAGVEP MELSYKDGLA LINGTSQMVG LGTMVLQAAR RLVDRLQVS
PputidaHAL	EALAVAGLEP LTLAAKEGLA LLNGTQASTA YALRGLFYAE DLYAAAIACO
Avar03005300	ALDIQALNGT NQSFHPFIHN SKPHPGQLWA ADQMISLLAN SQLVRDELGD
Npun02008223	ALAIQGLYGT NQSFHPFIHQ CKPHPGQLWT ADQMFSLLKO SSLVREELDG
EncP	ALSVEGLAGM TKPFDPRVHG VKPHRGQRQV ASRLWEGLAD SHLAVNELDT
PputidaHAL	GLSVEAVLGS RSPFDARIHE ARGQRQIDT AACFRDLLGD SSEVS.....

图 4

Avar03005300	K HDYRDHELIQ DRYSLRCLPQ YLGPIVDGIS QIAKQIEIEI
Npun02008223	K HEYRGKDLIQ DRYSLRCLAQ FIGPIVDGVS EITKQIEVEM
EncP	EQTLAGEMGT VAKAGSLAIE DAYSIRCTPQ ILGPVVDVLD RIGATLQDEL
PputidaHAL	 LSHKNC DKVQ DPYSLRCQPQ VMGACLTQLR QAAEVLGIEA
Avar03005300	NSVTDNPLID VDNQASYHGG NFLGQYVGMG MDHLRYYYIGL LAKHLDVQIA
Npun02008223	NSVTDNPLID VENQVSYHGG NFLGQYVGVT MDRLRYYYIGL LAKHIDVQIA
EncP	NSSNDNPIVL PEEAEVFHNG HFHGQYVAMA MDHLNMLAT VTNLANRRVD
PputidaHAL	NAVSDNPLVF AAEGDVISGG NFHAEPVAMA ADNLALAIIE IGSLSERIS
Avar03005300	LLASPEFSNG LPPSLLGNGRE RKVNMGLKGL QICGNSIMPL LTFYGNISAD
Npun02008223	LLVSPEFSNG LPPSLVGNSD RKVNMGLKGL QISGNSIMPL LSFYGNISAD
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. EDHVSMAFAA GKRLWEMAEN TRGVPAIEWL GACQGLDLRK
Avar03005300	YKKTGHYDAR ACLSPATERL YSAVRHVVGQ KPTSDRPYIW NDNEQGLDEH
Npun02008223	YKMKGHYDAR TCLSPNTVQL YTAVCEVVGK PLTSVRPYIW NDNEQCLDEH
EncP	ADKL..... .SSFTRPL YERTRKIVP.F FDRDETITDY
PputidaHAL	GLKT..... .SAKLEKA RQALRSEVA.H YDRDRFFAPD
Avar03005300	IARISADIAA GGVIVQAVQD ILPCLH..
Npun02008223	IARISADIAG GGLIVQAVEH IFSSLKST
EncP	VEKLAADLIA GEPVDAAVAA H.....
PputidaHAL	IEKAVELLAK GSLTGLLPAG VLPSL...

图4(续)

AvPAL 变体 (半胱氨酸突变) 蛋白序列

A. AvPAL_C64S (SEQ ID NO:7)

MKTL**SQAQ**SKTSSQQFSFTGNSSANV**IIGNQ**KL**TINDVARVAR**NGTLVSLTNNTDILQGIQAS**SDY**INNA
 VESGEPIYGVTS**SGFGG**MANVAISREQASELQTNLVWFLKTGAGNKLPLADVRAAMLLRANSHMRGASGIR
 LELIKRMEIFLNAGVTPYVYEF**SGIS**ASGDLVPLSYITGSLIGLDPSFKVDFNGKEMDAPTALRQNLSP
 LTLLPKEGLAMMNGTSVMTGIAANCVYDTQILTAIAMGVHALDIQALNGTNQSFH**PF**FIHNSKPHPGQLWA
 ADQMISLLANSQ**LVRDELDGKH**DYRDHELIQDRYSLRCLPQYLGPIVDGISQIAKQIEIEINSVTDNPLI
 DVDNQASYHGGN**FLGQYVGM**MDHLRYYIGLLAKHLDVQIALLASPEFSNGLPPSLLGNRERKVN**MGLK**G
 LQICGNSIMPL**LLTFY**GNSIADRFPT**HA**EQFNQININSQGYTSATLARRSV**DI**FQNYVAIALMFGVQAVDLR
 TYKKTGHYDARACLS**PATERLY**SAVRHVVGQKPTSDRPYIWN**DNEQGL**DEHIARISADIAAGGVIVQAVQ
 DILPCLH

B. AvPAL_C318S (SEQ ID NO:8)

MKTL**SQAQ**SKTSSQQFSFTGNSSANV**IIGNQ**KL**TINDVARVAR**NGTLVSLTNNTDILQGIQASCDYINNA
 VESGEPIYGVTS**SGFGG**MANVAISREQASELQTNLVWFLKTGAGNKLPLADVRAAMLLRANSHMRGASGIR
 LELIKRMEIFLNAGVTPYVYEF**SGIS**ASGDLVPLSYITGSLIGLDPSFKVDFNGKEMDAPTALRQNLSP
 LTLLPKEGLAMMNGTSVMTGIAANCVYDTQILTAIAMGVHALDIQALNGTNQSFH**PF**FIHNSKPHPGQLWA
 ADQMISLLANSQ**LVRDELDGKH**DYRDHELIQDRYSLRCLPQYLGPIVDGISQIAKQIEIEINSVTDNPLI
 DVDNQASYHGGN**FLGQYVGM**MDHLRYYIGLLAKHLDVQIALLASPEFSNGLPPSLLGNRERKVN**MGLK**G
 LQICGNSIMPL**LLTFY**GNSIADRFPT**HA**EQFNQININSQGYTSATLARRSV**DI**FQNYVAIALMFGVQAVDLR
 TYKKTGHYDARACLS**PATERLY**SAVRHVVGQKPTSDRPYIWN**DNEQGL**DEHIARISADIAAGGVIVQAVQ
 DILPCLH

C. AvPAL_C503S (SEQ ID NO:9)

MKTL**SQAQ**SKTSSQQFSFTGNSSANV**IIGNQ**KL**TINDVARVAR**NGTLVSLTNNTDILQGIQASCDYINNA
 VESGEPIYGVTS**SGFGG**MANVAISREQASELQTNLVWFLKTGAGNKLPLADVRAAMLLRANSHMRGASGIR
 LELIKRMEIFLNAGVTPYVYEF**SGIS**ASGDLVPLSYITGSLIGLDPSFKVDFNGKEMDAPTALRQNLSP
 LTLLPKEGLAMMNGTSVMTGIAANCVYDTQILTAIAMGVHALDIQALNGTNQSFH**PF**FIHNSKPHPGQLWA
 ADQMISLLANSQ**LVRDELDGKH**DYRDHELIQDRYSLRCLPQYLGPIVDGISQIAKQIEIEINSVTDNPLI
 DVDNQASYHGGN**FLGQYVGM**MDHLRYYIGLLAKHLDVQIALLASPEFSNGLPPSLLGNRERKVN**MGLK**G
 LQICGNSIMPL**LLTFY**GNSIADRFPT**HA**EQFNQININSQGYTSATLARRSV**DI**FQNYVAIALMFGVQAVDLR
 TYKKTGHYDARAS**LS**PATERLYSAVRHVVGQKPTSDRPYIWN**DNEQGL**DEHIARISADIAAGGVIVQAVQ
 DILPCLH

D. AvPAL_C565S (SEQ ID NO:10)

MKTL**SQAQ**SKTSSQQFSFTGNSSANV**IIGNQ**KL**TINDVARVAR**NGTLVSLTNNTDILQGIQASCDYINNA
 VESGEPIYGVTS**SGFGG**MANVAISREQASELQTNLVWFLKTGAGNKLPLADVRAAMLLRANSHMRGASGIR
 LELIKRMEIFLNAGVTPYVYEF**SGIS**ASGDLVPLSYITGSLIGLDPSFKVDFNGKEMDAPTALRQNLSP
 LTLLPKEGLAMMNGTSVMTGIAANCVYDTQILTAIAMGVHALDIQALNGTNQSFH**PF**FIHNSKPHPGQLWA
 ADQMISLLANSQ**LVRDELDGKH**DYRDHELIQDRYSLRCLPQYLGPIVDGISQIAKQIEIEINSVTDNPLI
 DVDNQASYHGGN**FLGQYVGM**MDHLRYYIGLLAKHLDVQIALLASPEFSNGLPPSLLGNRERKVN**MGLK**G
 LQICGNSIMPL**LLTFY**GNSIADRFPT**HA**EQFNQININSQGYTSATLARRSV**DI**FQNYVAIALMFGVQAVDLR
 TYKKTGHYDARACLS**PATERLY**SAVRHVVGQKPTSDRPYIWN**DNEQGL**DEHIARISADIAAGGVIVQAVQ
 DILP**SLH**

E. AvPAL_C565SC503S (SEQ ID NO:11)

MKTL**SQAQ**SKTSSQQFSFTGNSSANV**IIGNQ**KL**TINDVARVAR**NGTLVSLTNNTDILQGIQASCDYINNA
 VESGEPIYGVTS**SGFGG**MANVAISREQASELQTNLVWFLKTGAGNKLPLADVRAAMLLRANSHMRGASGIR
 LELIKRMEIFLNAGVTPYVYEF**SGIS**ASGDLVPLSYITGSLIGLDPSFKVDFNGKEMDAPTALRQNLSP
 LTLLPKEGLAMMNGTSVMTGIAANCVYDTQILTAIAMGVHALDIQALNGTNQSFH**PF**FIHNSKPHPGQLWA
 ADQMISLLANSQ**LVRDELDGKH**DYRDHELIQDRYSLRCLPQYLGPIVDGISQIAKQIEIEINSVTDNPLI
 DVDNQASYHGGN**FLGQYVGM**MDHLRYYIGLLAKHLDVQIALLASPEFSNGLPPSLLGNRERKVN**MGLK**G
 LQICGNSIMPL**LLTFY**GNSIADRFPT**HA**EQFNQININSQGYTSATLARRSV**DI**FQNYVAIALMFGVQAVDLR
 TYKKTGHYDARAS**LS**PATERLYSAVRHVVGQKPTSDRPYIWN**DNEQGL**DEHIARISADIAAGGVIVQAVQ
 DILP**SLH**

图 5A-5E

37°C保存的 AvPAL 变体的比活性

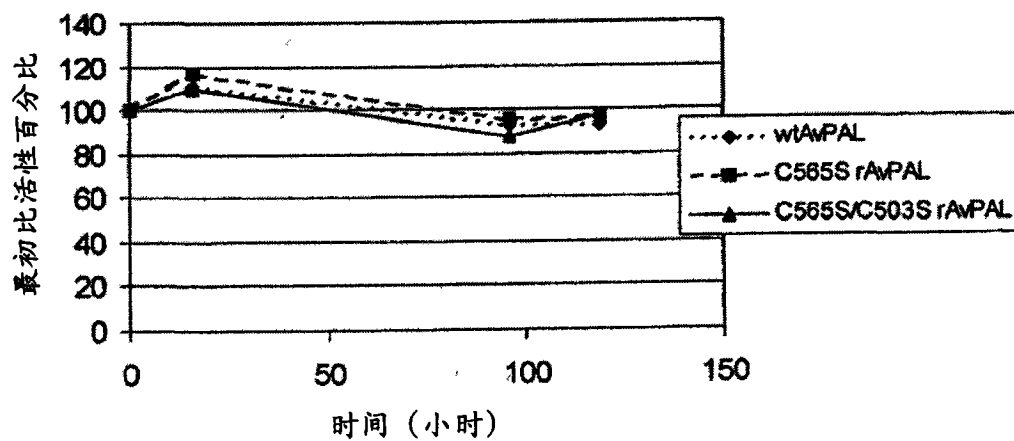


图 6A

37°C 变体 AvPAL-PEG 的稳定性

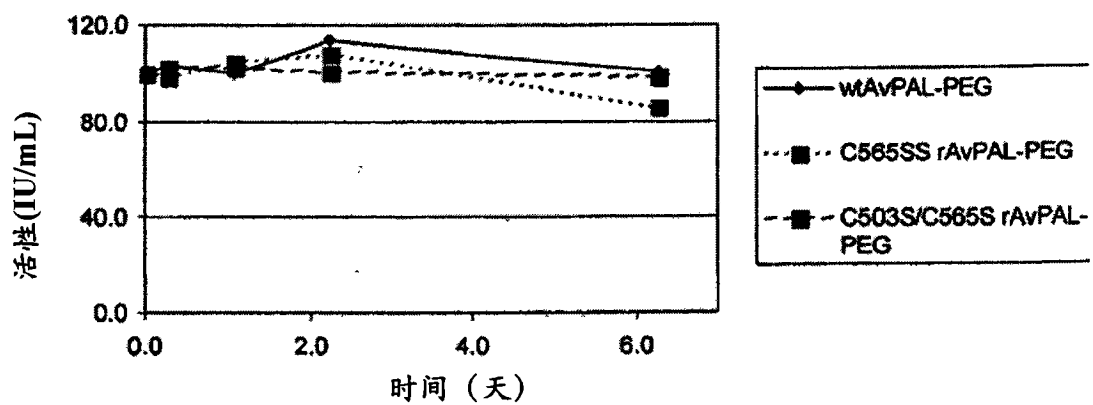


图 6B

4-12%NuPAGE Bis-Tris 凝胶,
变性条件 (显示纯度)

8%Tris-Gly 凝胶, 天然条件
pH 8.3, 125V 2.25 小时

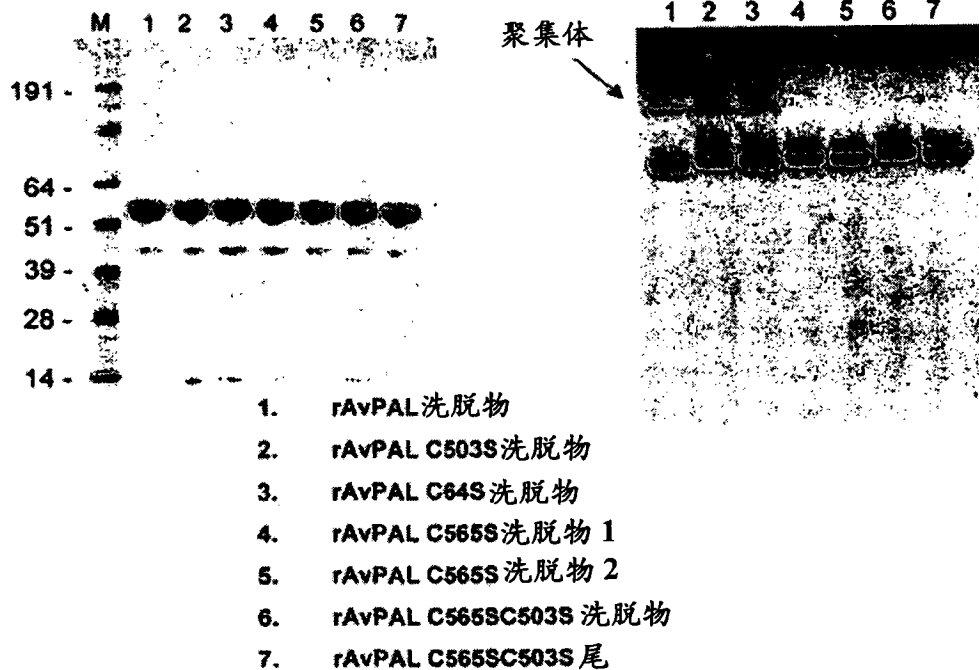


图 7A

SEC-HPLC

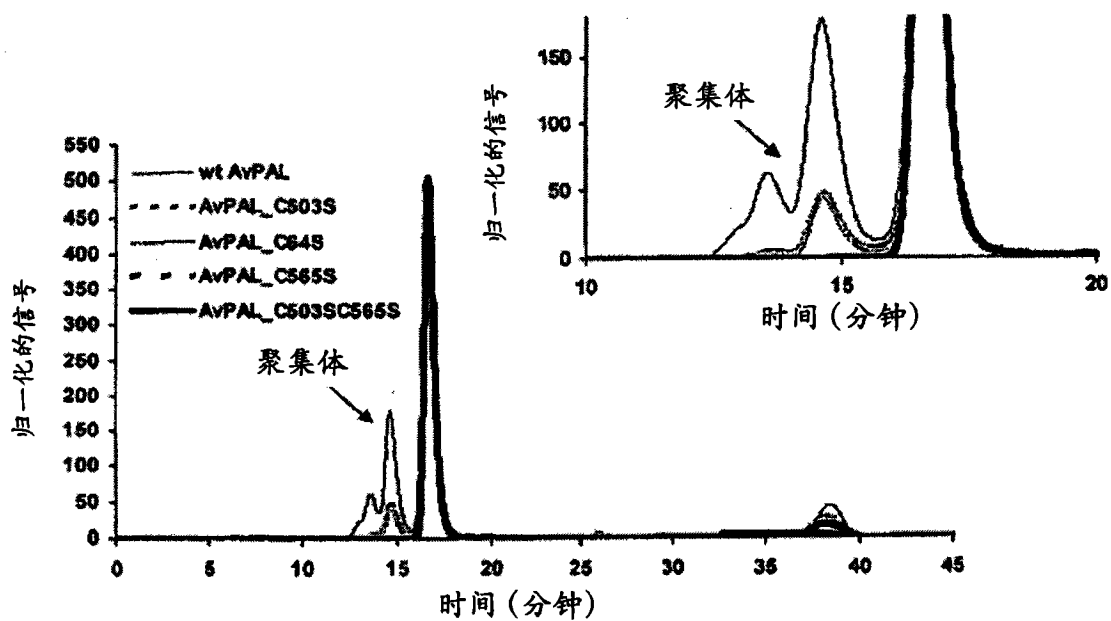


图 7B

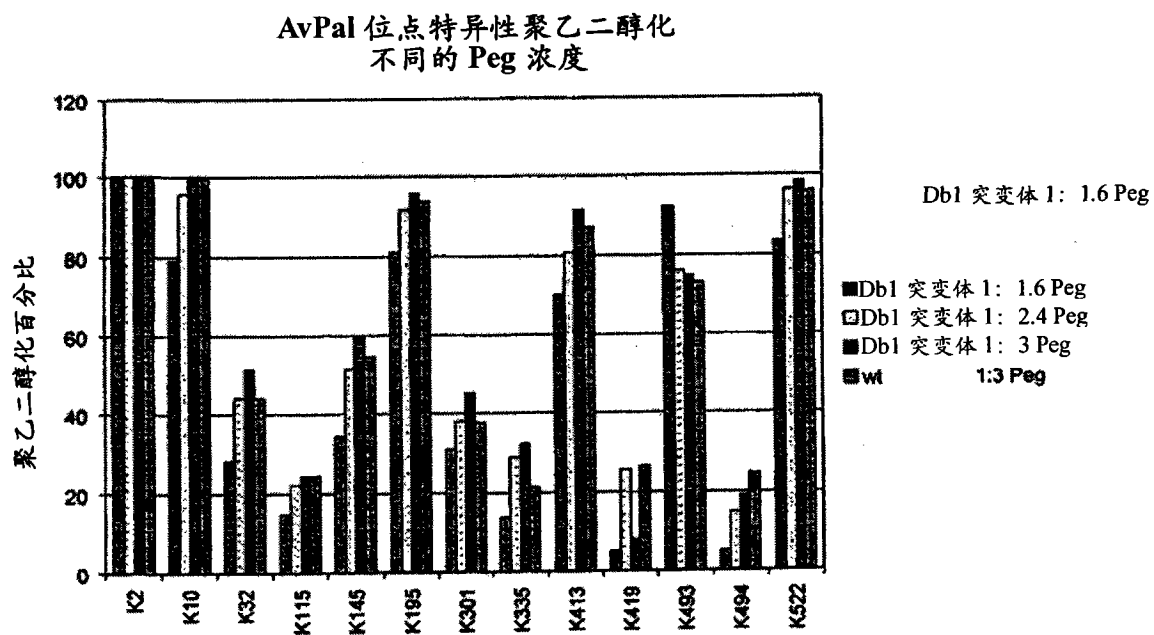


图 8

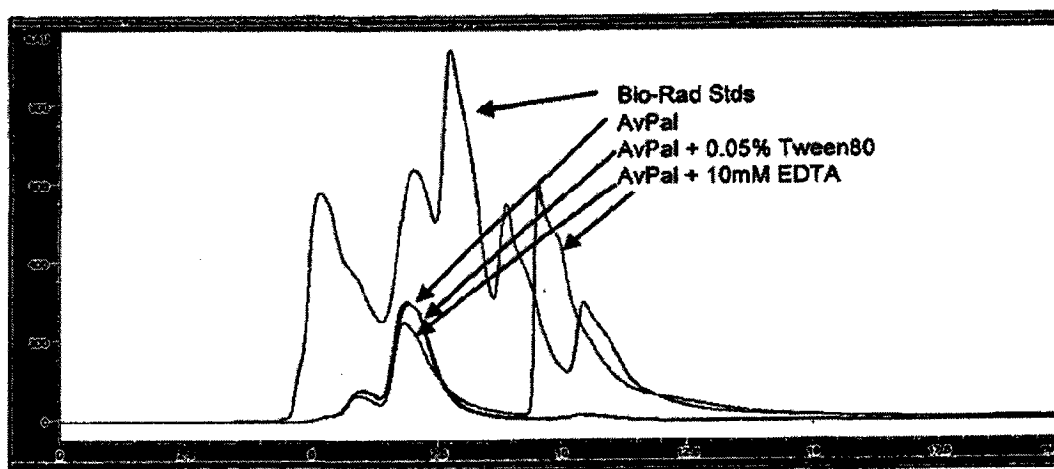


图 9

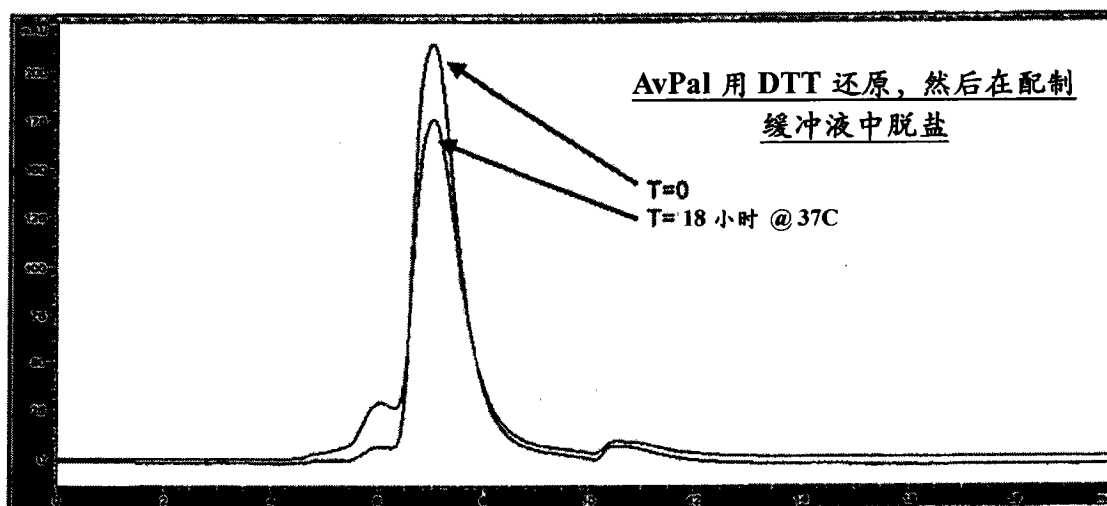


图 10A

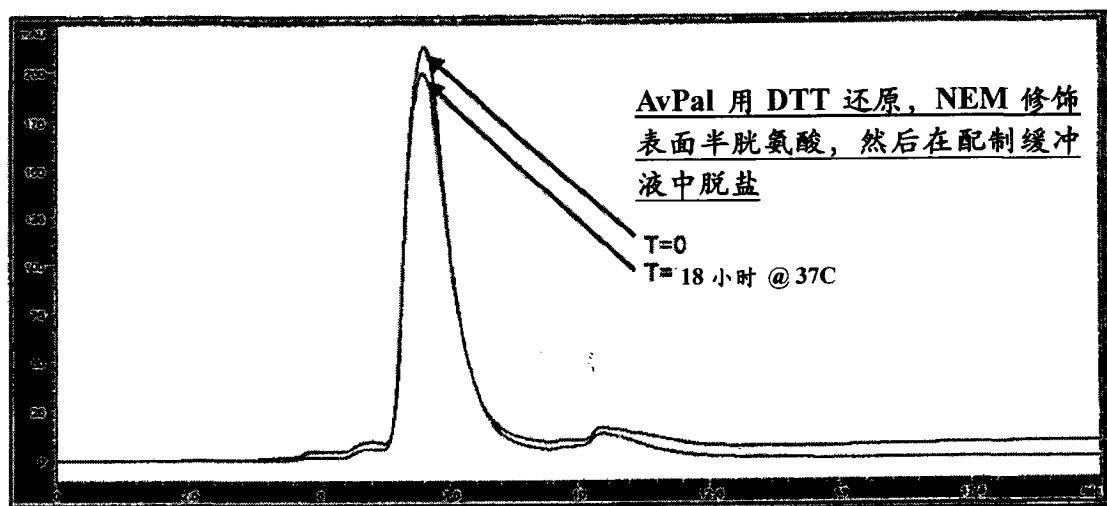


图 10B

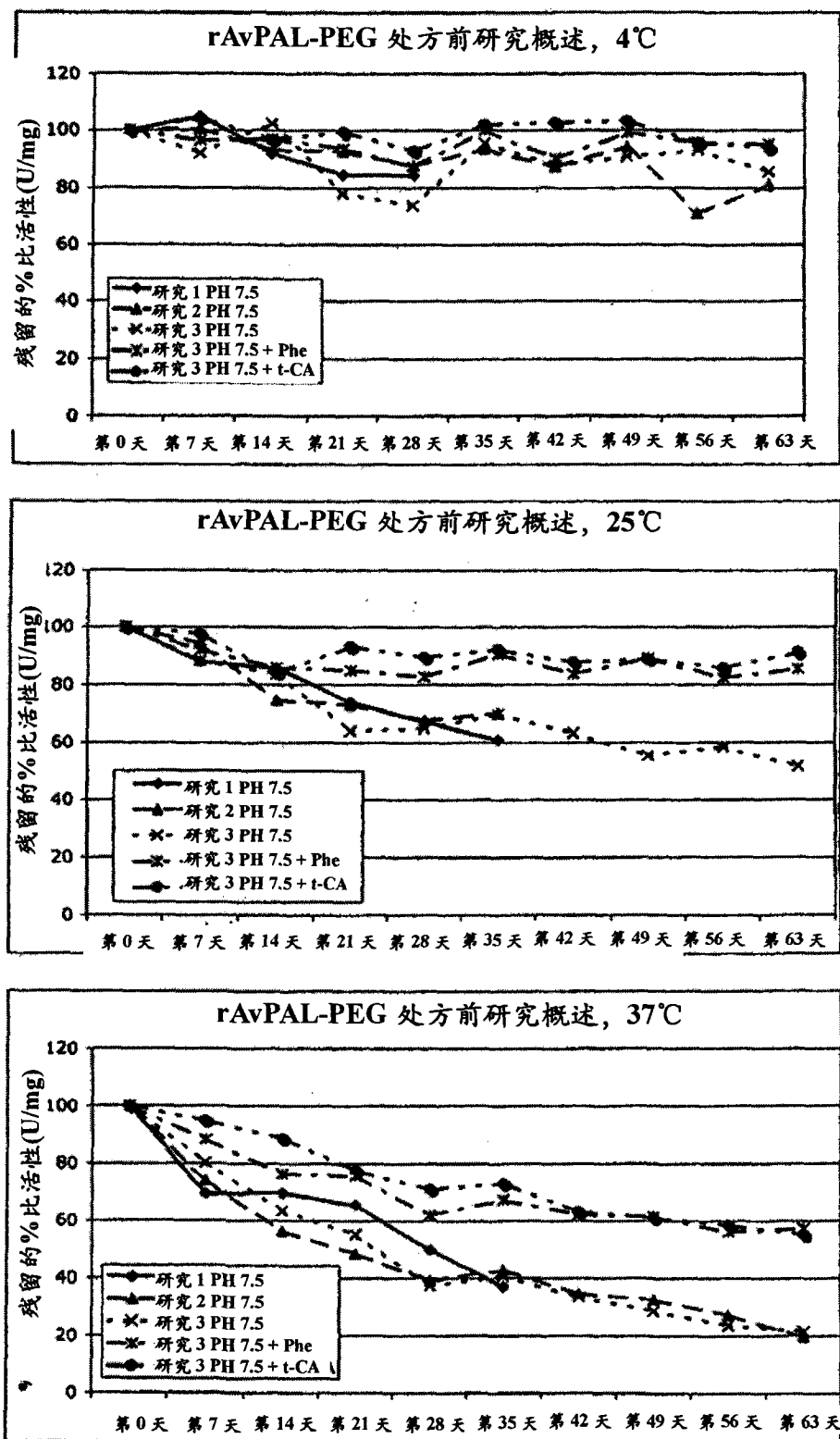


图 11

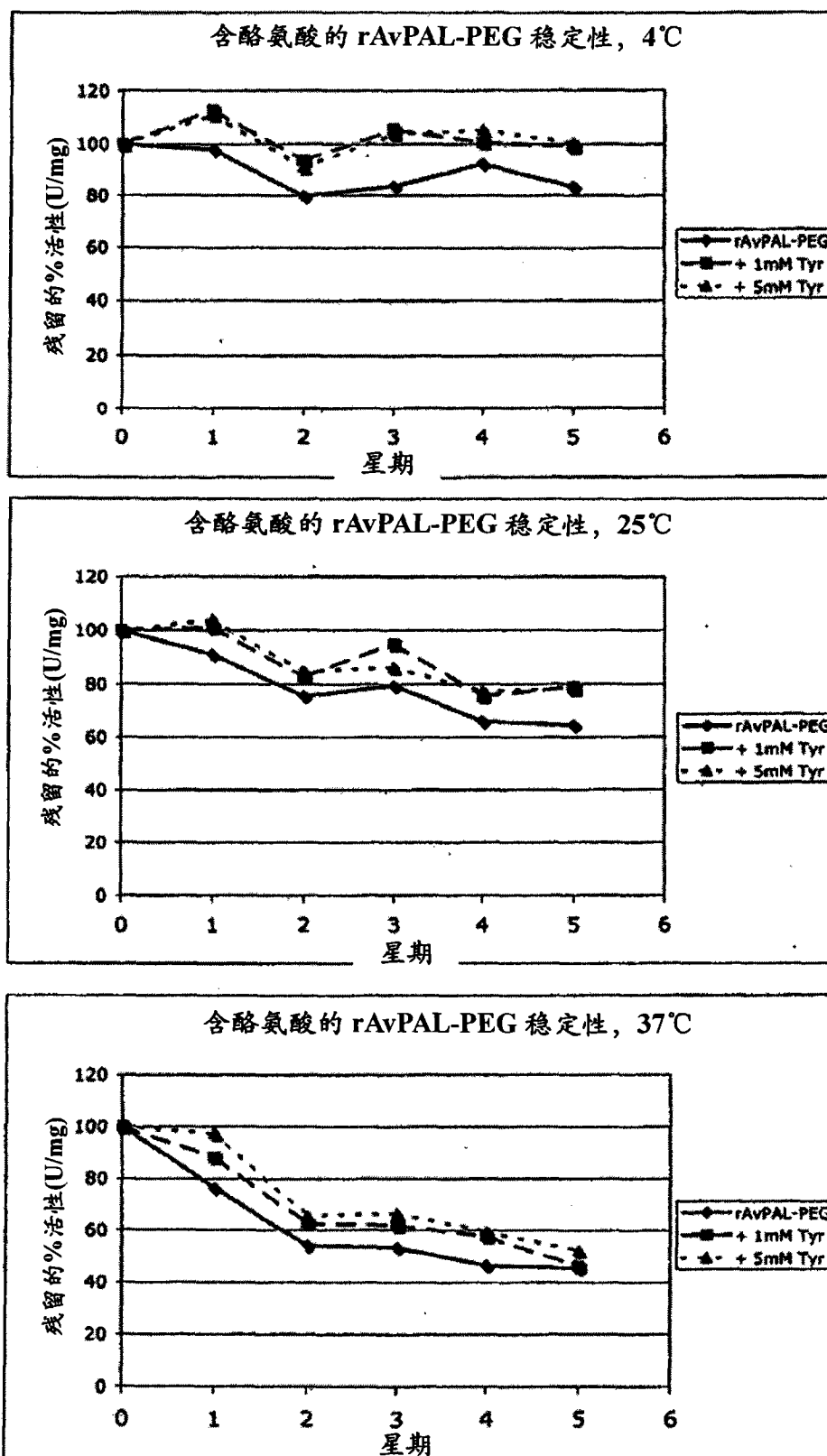


图 12

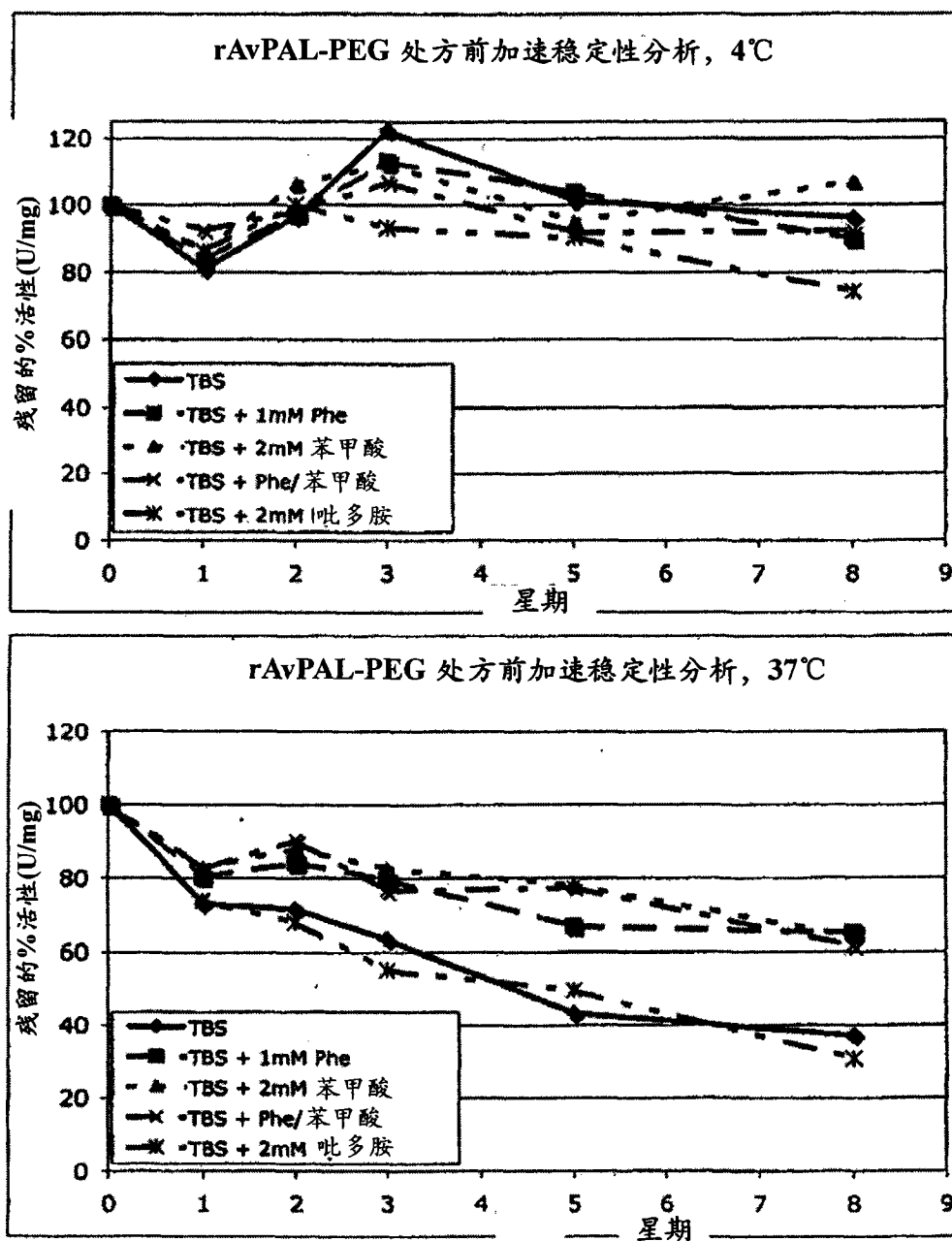


图 13A

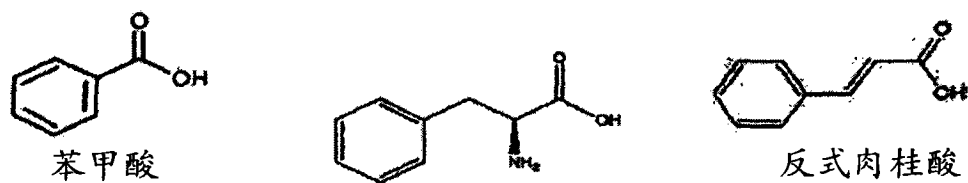


图 13B

A. 单次皮下注射后短尾猴血浆中 AvPAL_C565SC503S 的浓度

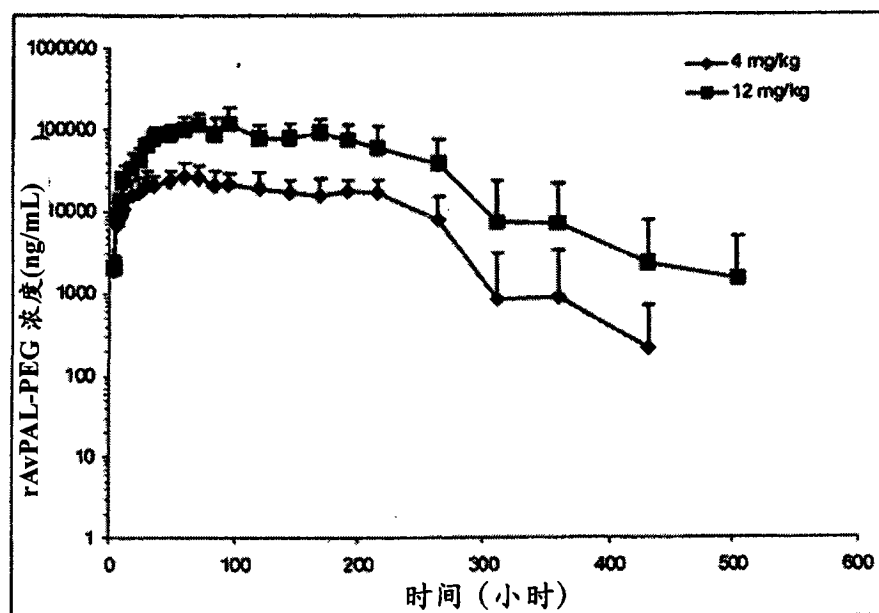


图 14A

B. 单次皮下注射后短尾猴血浆中苯丙氨酸(Phe)和 AvPAL_C565SC503S 的浓度

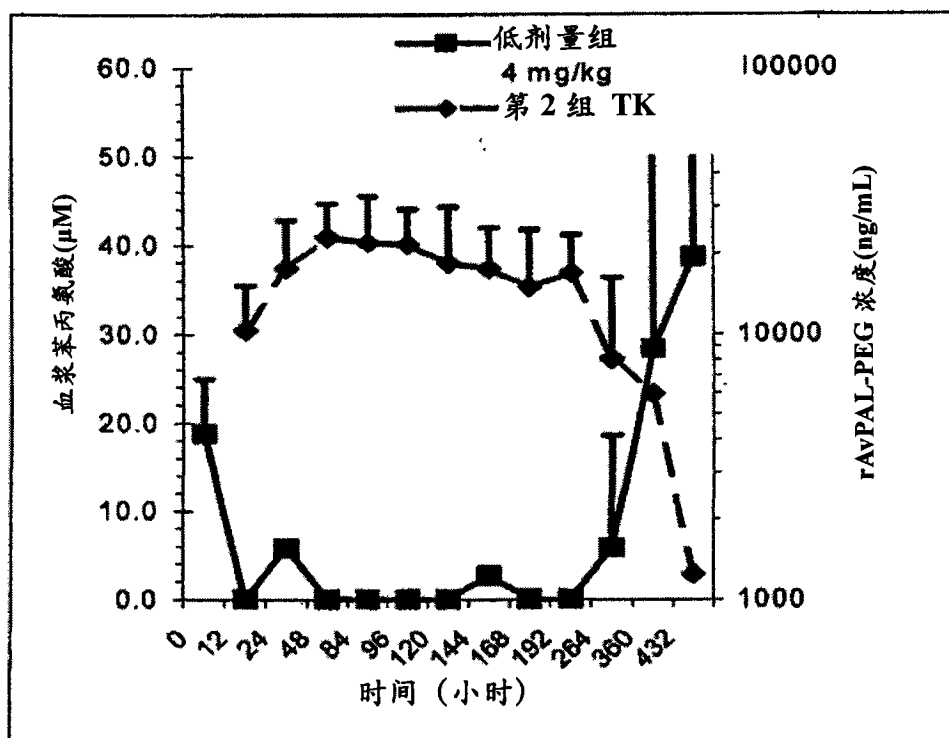


图 14B

A. 单次静脉内注射后大鼠血浆中 AvPAL_C565SC503S 的浓度

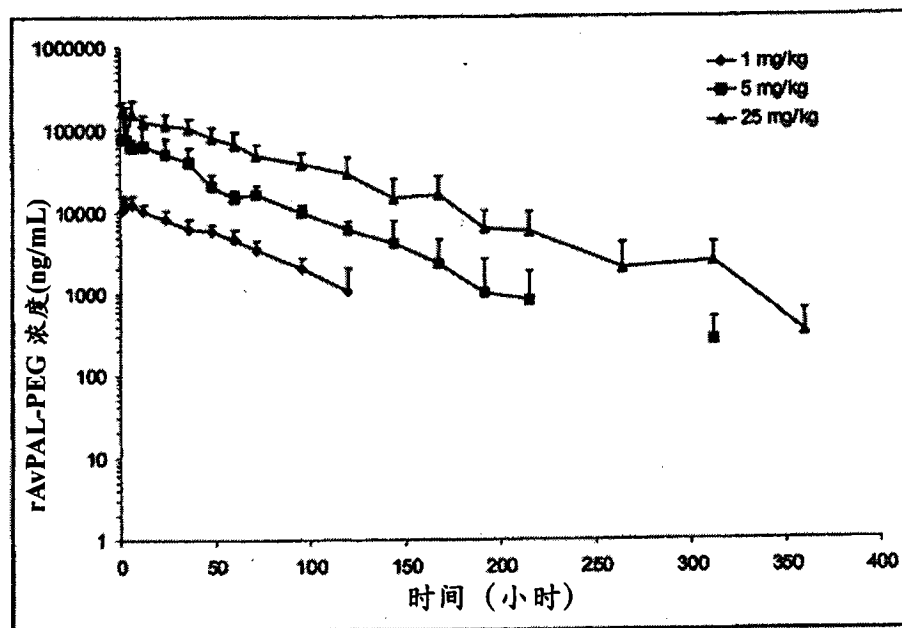


图 15A

B. 单次皮下注射后大鼠血浆中 AvPAL_C565SC503S 的浓度

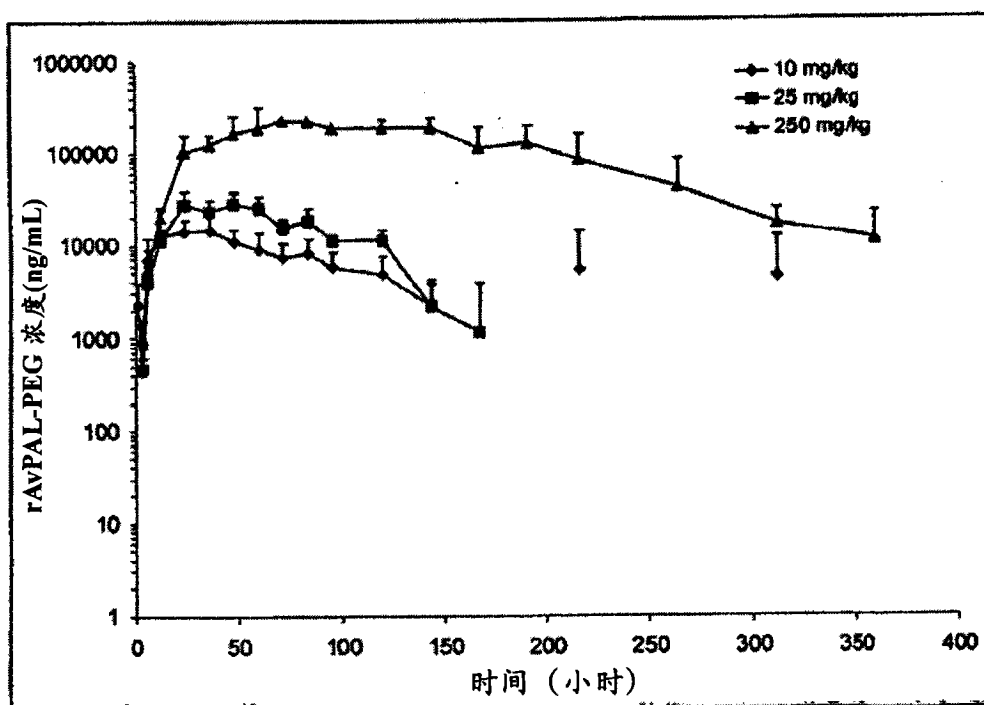


图 15B

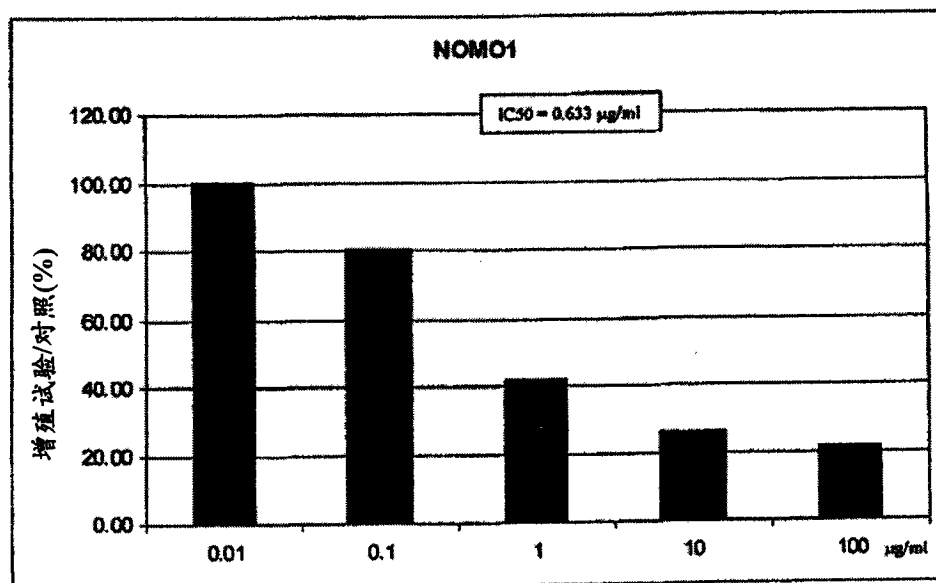
A. NOMO1 急性骨髓性白血病(AML)细胞

图 16A

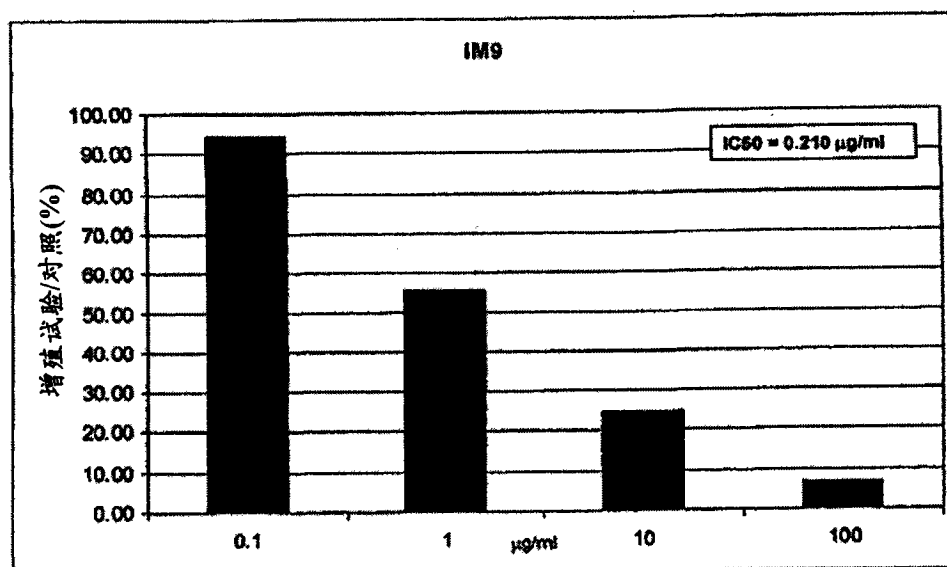
B. IM9 骨髓瘤细胞

图 16B

A. 脑/CNS-SF268 (顶)和 498L (底)

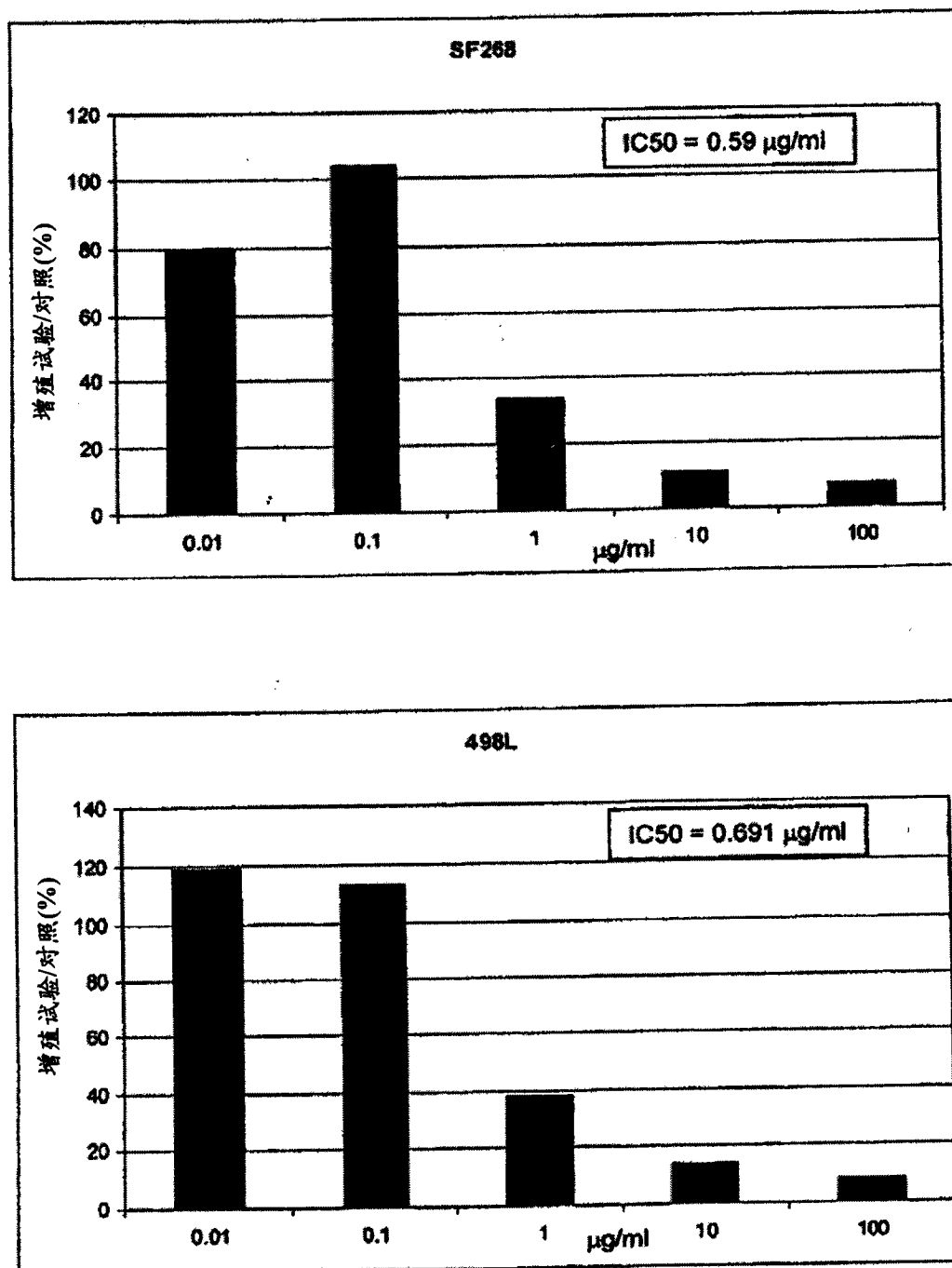


图 17A

B. 结肠-HT29 (顶)和 HCT116 (底)

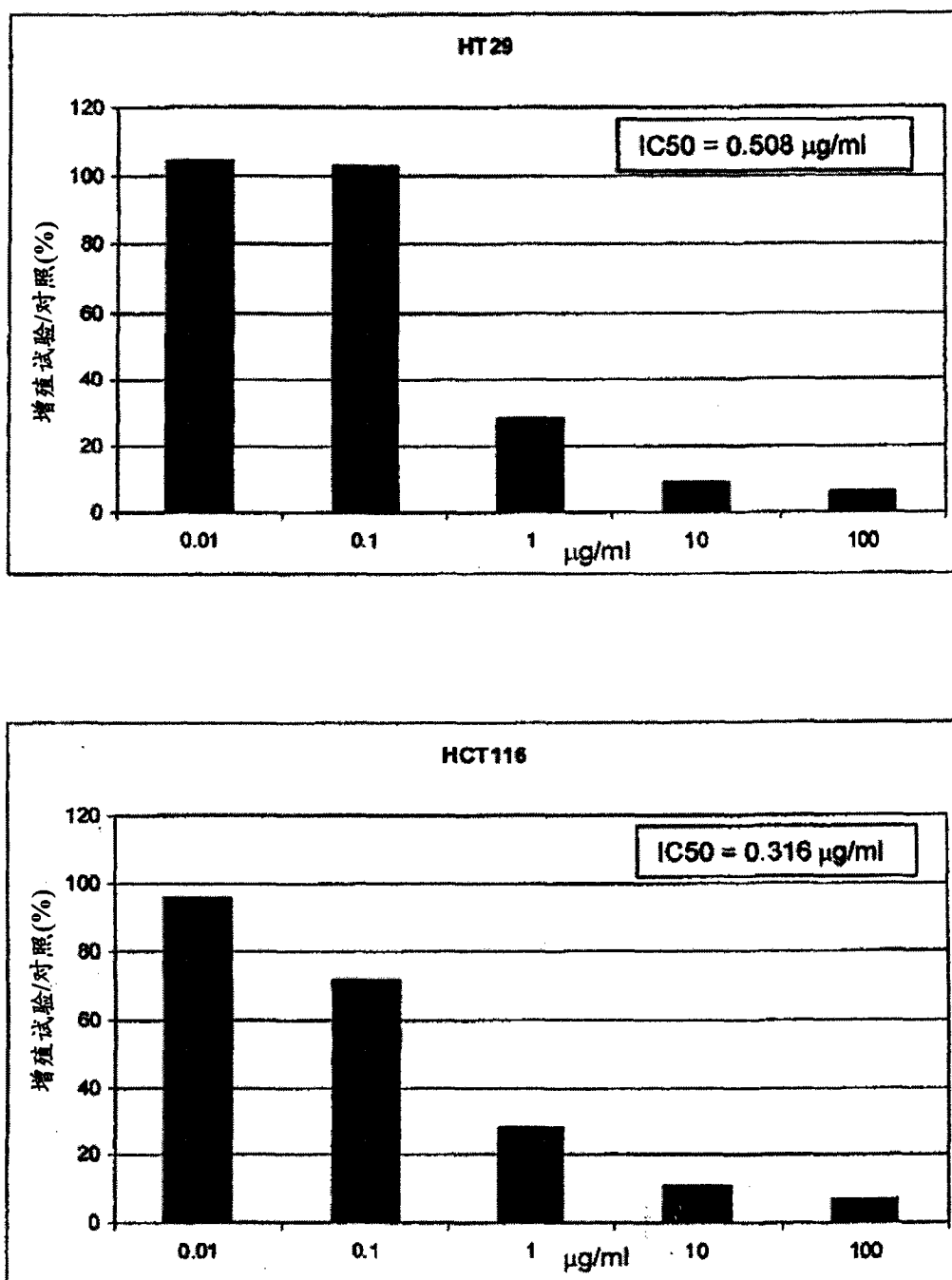


图 17B

C. 肺-H460 (顶)、529L (中)和 629L (底)

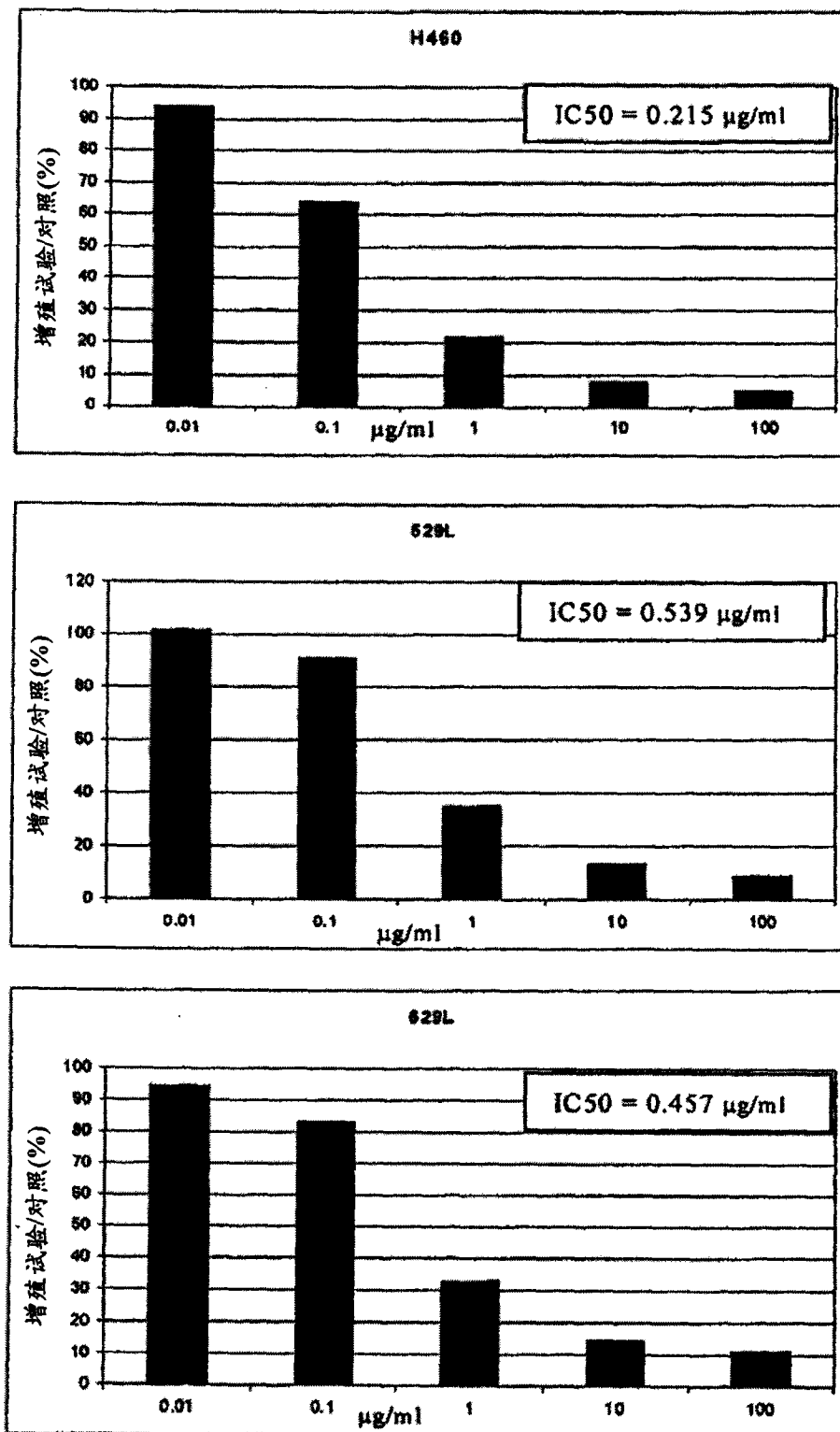


图 17C

D. 前列腺-LNCAP (顶)、PC3M (中)和 DU145 (底)

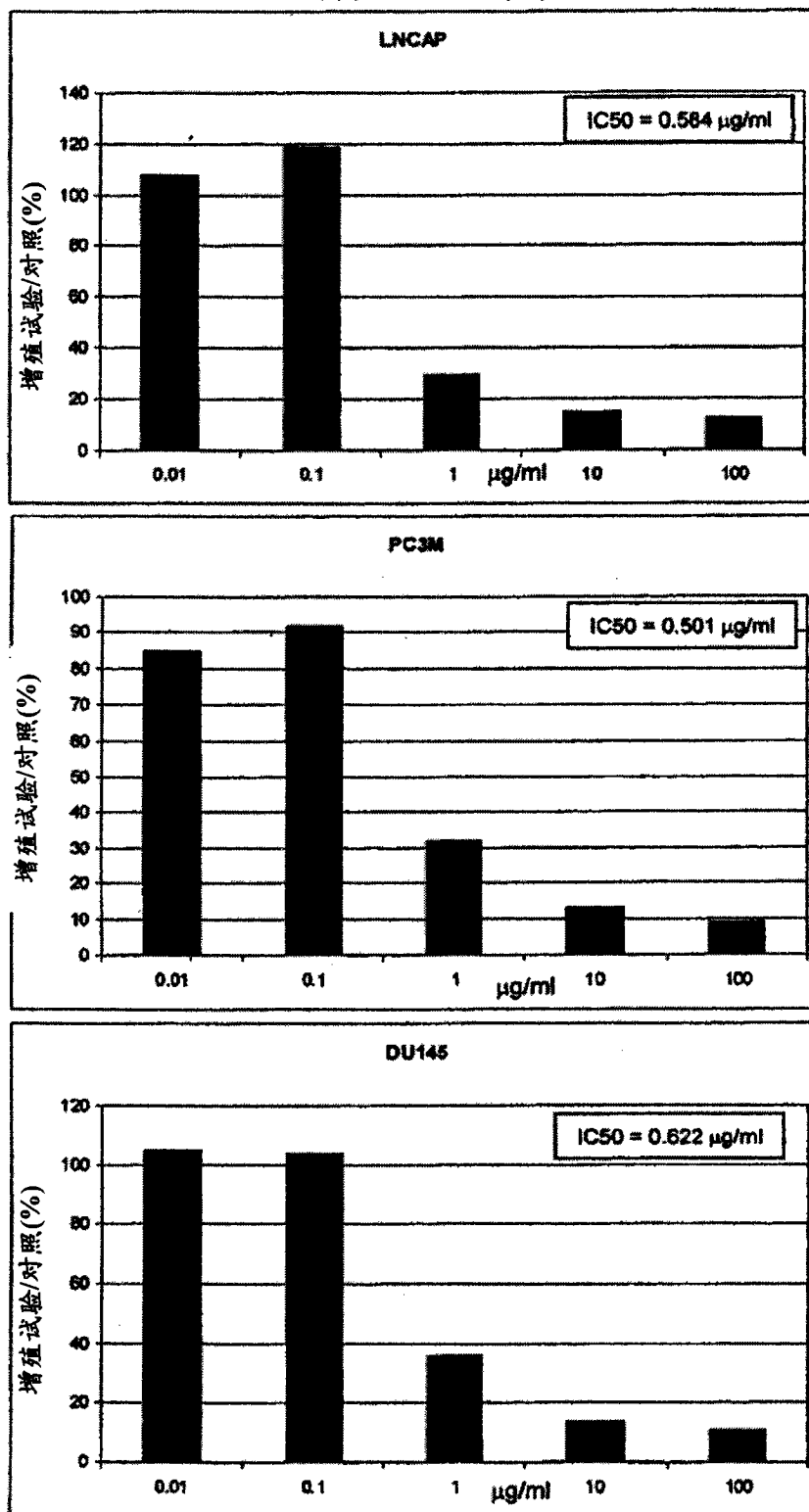


图 17D

B16 黑色素瘤研究：肿瘤大小—预防性（顶部）或治疗性（底部）

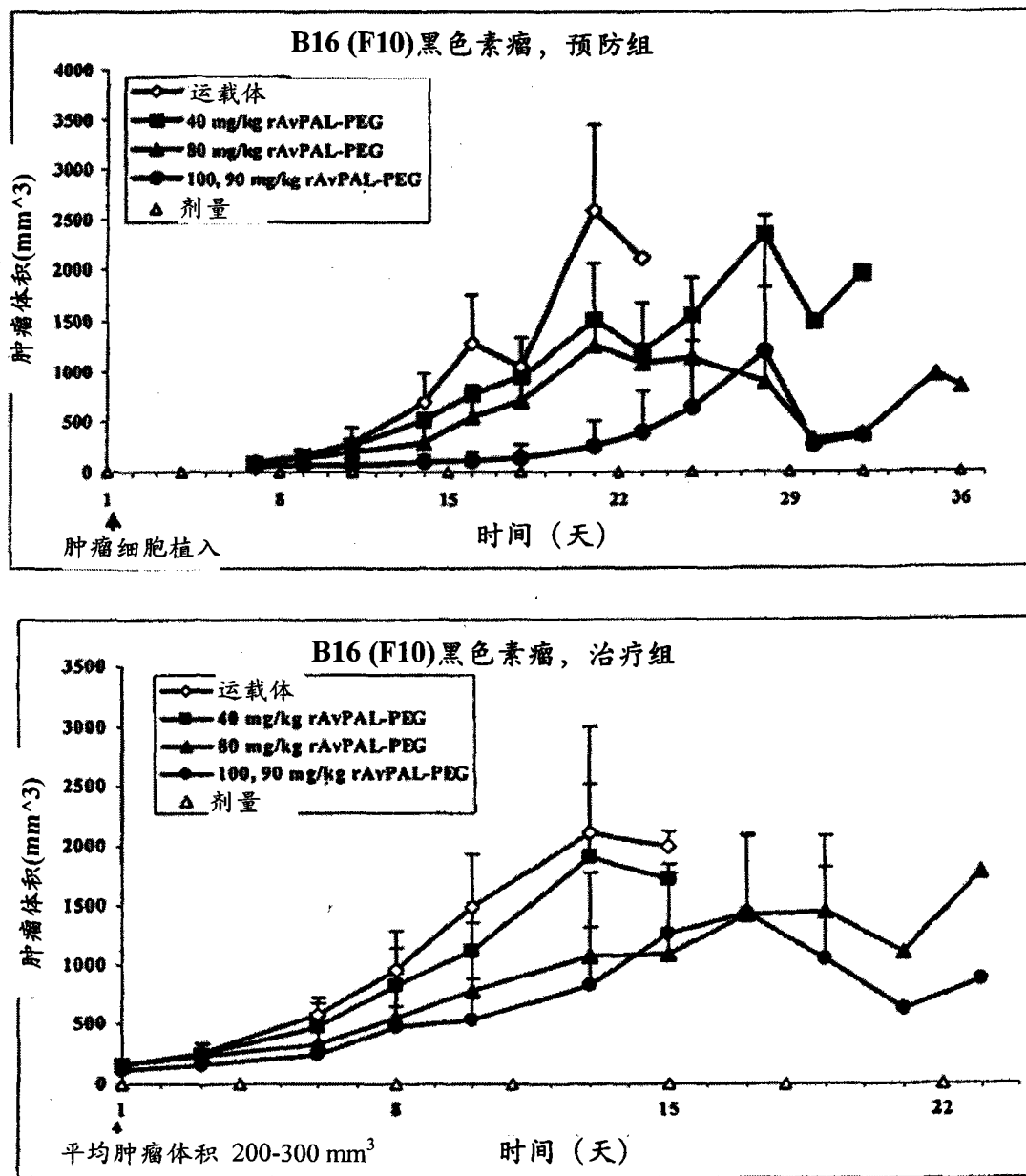


图 18

肝癌研究：SNU398（顶部）和 HepG2（底部）

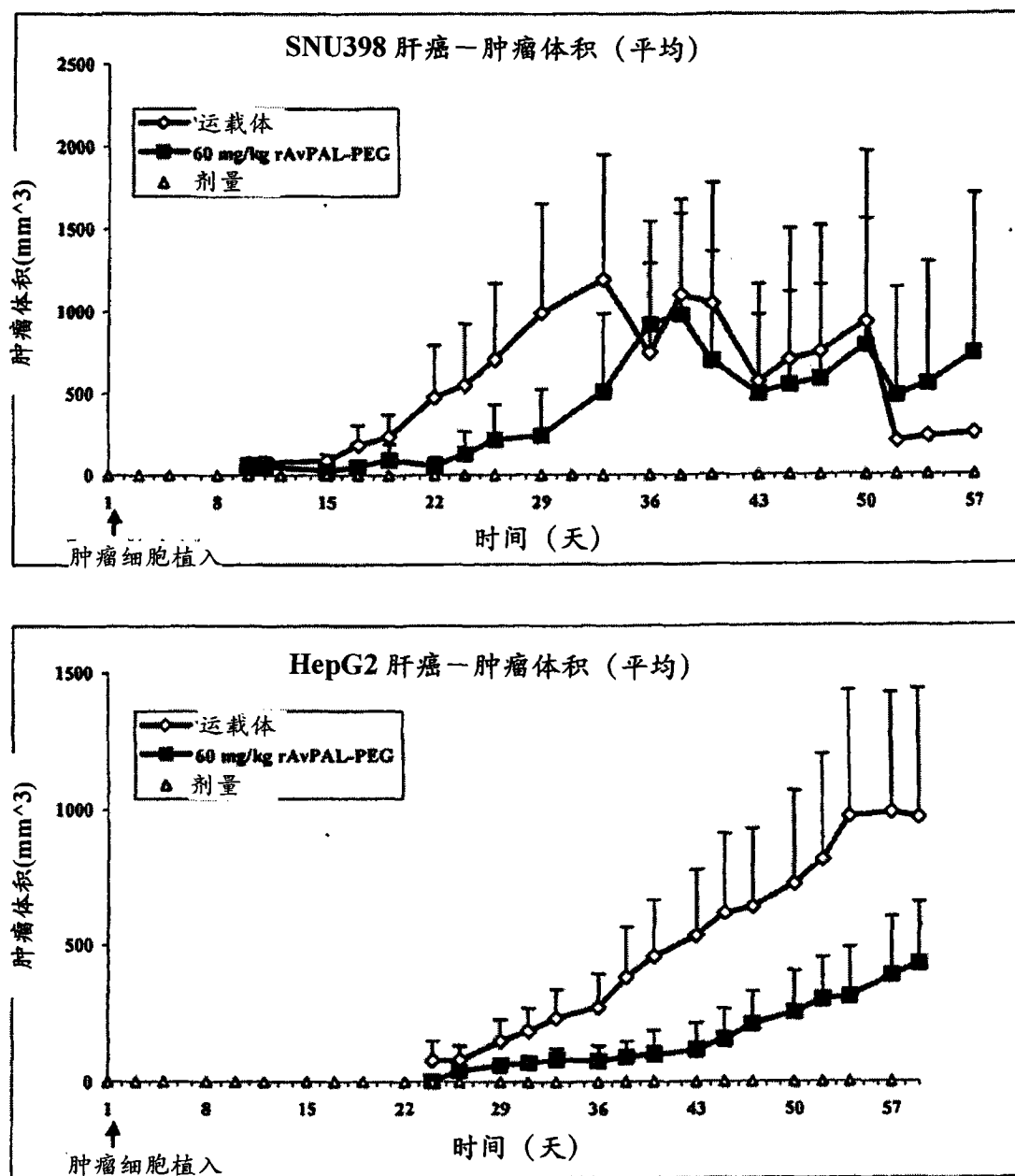


图 19