

(12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织
国际局



(43) 国际公布日
2006 年 3 月 16 日 (16.03.2006)

PCT

(10) 国际公布号
WO 2006/026915 A1

(51) 国际专利分类号: A61K 38/46, A61P 1/16

Man) [CN/CN]; 中国香港梅道12号嘉富丽苑1座6楼B室, Hong Kong (CN)。

(21) 国际申请号: PCT/CN2005/001411

(22) 国际申请日: 2005 年 9 月 6 日 (06.09.2005)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(30) 优先权:
200410076854.4
2004 年 9 月 8 日 (08.09.2004) CN

(71) 申请人 (对除美国外的所有指定国): 康达医药科技有限公司(BIO-CANCER TREATMENT INTERNATIONAL LIMITED) [CN/CN]; 中国香港中环皇后大道中5号衡怡大厦5楼501室, Hong Kong (CN)。

(74) 代理人: 北京天昊联合知识产权代理有限公司(TEE & HOWE INTELLECTUAL PROPERTY ATTORNEYS); 中国北京西城区西长安街88号首都时代广场718室丁业平, Beijing 100031 (CN)。

(81) 指定国 (除另有指明, 要求每一种可提供的国家保护): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW。

(72) 发明人; 及
(75) 发明人/申请人 (仅对美国): 郑宁民(CHENG, Ning)

(84) 指定国 (除另有指明, 要求每一种可提供的地区保护): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA,

[见续页]

(54) Title: PHARMACEUTICAL COMPOSITION AND METHOD OF TREATING HEPATITIS WITH ARGINASES

(54) 发明名称: 用精氨酸酶治疗肝炎的药物组合物和方法

(57) Abstract: The invention discloses methods for treating hepatitis with human arginase I modified by polyethylene glycol and uses of it in manufacturing of a medicament.

(57) 摘要:

1 gaattatgaag cnaagagat gaagagaaa aagtgatgag agagagagat gaagagaaa
61 aagtgagagat gaagagagat cnaagagagat gaagagagat gaagagagat gaagagagat
121 aagtgagagat gaagagagat cnaagagagat gaagagagat gaagagagat gaagagagat
181 aagtgagagat gaagagagat cnaagagagat gaagagagat gaagagagat gaagagagat
241 aagtgagagat gaagagagat cnaagagagat gaagagagat gaagagagat gaagagagat
301 aagtgagagat gaagagagat cnaagagagat gaagagagat gaagagagat gaagagagat
361 aagtgagagat gaagagagat cnaagagagat gaagagagat gaagagagat gaagagagat
421 aagtgagagat gaagagagat cnaagagagat gaagagagat gaagagagat gaagagagat
481 aagtgagagat gaagagagat cnaagagagat gaagagagat gaagagagat gaagagagat
541 aagtgagagat gaagagagat cnaagagagat gaagagagat gaagagagat gaagagagat
601 aagtgagagat gaagagagat cnaagagagat gaagagagat gaagagagat gaagagagat
661 aagtgagagat gaagagagat cnaagagagat gaagagagat gaagagagat gaagagagat
721 aagtgagagat gaagagagat cnaagagagat gaagagagat gaagagagat gaagagagat
781 aagtgagagat gaagagagat cnaagagagat gaagagagat gaagagagat gaagagagat
841 aagtgagagat gaagagagat cnaagagagat gaagagagat gaagagagat gaagagagat
901 aagtgagagat gaagagagat cnaagagagat gaagagagat gaagagagat gaagagagat
961 aagtgagagat gaagagagat cnaagagagat gaagagagat gaagagagat gaagagagat
1021 aagtgagagat gaagagagat cnaagagagat gaagagagat gaagagagat gaagagagat
1081 aagtgagagat gaagagagat cnaagagagat gaagagagat gaagagagat gaagagagat
1141 aagtgagagat gaagagagat cnaagagagat gaagagagat gaagagagat gaagagagat
1201 aagtgagagat gaagagagat cnaagagagat gaagagagat gaagagagat gaagagagat
1261 aagtgagagat gaagagagat cnaagagagat gaagagagat gaagagagat gaagagagat
1321 aagtgagagat gaagagagat cnaagagagat gaagagagat gaagagagat gaagagagat
1381 aagtgagagat gaagagagat cnaagagagat gaagagagat gaagagagat gaagagagat
1441 aagtgagagat gaagagagat cnaagagagat gaagagagat gaagagagat gaagagagat
1501 aagtgagagat gaagagagat cnaagagagat gaagagagat gaagagagat gaagagagat
1561 aagtgagagat gaagagagat cnaagagagat gaagagagat gaagagagat gaagagagat
1621 aagtgagagat gaagagagat cnaagagagat gaagagagat gaagagagat gaagagagat
1681 aagtgagagat gaagagagat cnaagagagat gaagagagat gaagagagat gaagagagat
1741 aagtgagagat gaagagagat cnaagagagat gaagagagat gaagagagat gaagagagat
1801 aagtgagagat gaagagagat cnaagagagat gaagagagat gaagagagat gaagagagat
1861 aagtgagagat gaagagagat cnaagagagat gaagagagat gaagagagat gaagagagat
1921 aagtgagagat gaagagagat cnaagagagat gaagagagat gaagagagat gaagagagat
1981 aagtgagagat gaagagagat cnaagagagat gaagagagat gaagagagat gaagagagat

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

WO 2006/026915 A1



SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), 欧洲 (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG)。

本国际公布:

— 包括国际检索报告。

所引用双字母代码及其它缩写符号, 请参考刊登在每期PCT公报期刊起始的“代码及缩写符号简要说明”。

用精氨酸酶治疗肝炎的药物组合物和方法

技术领域

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

背景技术

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

发明内容

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

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

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

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

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

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

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

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

附图说明

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

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

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

记以下划线标示。翻译终止密码子以*标示。

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

具体实施方案

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

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

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

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

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

实施例 1 试验材料的准备

1.1 受试药

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

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

保存条件: 4℃ 冰箱保存。

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

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

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

胎牛血清, 美国 Hyclone Lab 公司产品;

L-谷氨酰胺, 京科化学试剂公司进口分装;

HBsAg、HBeAg 固相放免测定盒, 中国同位素公司北方免疫试剂研究所;

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

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

1.6 细胞培养液及试剂配制

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

1.7 2.2.15 细胞培养

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

实施例 2：精氨酸酶对细胞毒性试验

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

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

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

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

实施例 3：精氨酸酶对 HBeAg、HBsAg 抑制试验

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

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

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

② 计算药物抑制抗原半数有效浓度(IC50):

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

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

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

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

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

实施例 4: 精氨酸酶 对 2.2.15 细胞 DNA 抑制实验

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

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

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

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

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

结果

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

1.精氨酸酶在 2.2.15 细胞培养中的细胞毒性

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

2. 精氨酸酶对 HBeAg、HBsAg 抑制试验

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

2.1. 精氨酸酶 对 HBeAg 的抑制率

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

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

2.2. 精氨酸酶对 HBsAg 的抑制率

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

2.3. 拉米夫定对 HBsAg 和 HBeAg 的作用

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

2.4. 拉米夫定对 HBeAg 的抑制率

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

2.5. 拉米夫定对 HBsAg 的抑制率

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

实验 批次	加药 天数	药物浓度 IU/ml	Sum (IOD)	抑制率%	IC ₅₀ μg/ml	SI	In Lane (IOD)	抑制率%	IC ₅₀ IU/ml	SI
1	8	20	25011	14.9893	25.42	1.57	31436	25.2982	21.45	1.86
		10	24234	17.6303			32499	22.7722		
		5	20104	31.6679			28796	31.5717		
		2.5	21650	26.4131			28762	31.6525		
		细胞对照	29421				42082			
2	8	20	34433	47.9416	14.17	2.82	46760	38.6255	18.67	2.14
		10	46884	29.1172			66241	13.0559		
		5	46283	30.0259			61655	19.0752		
		2.5	68619	0			88350	38.6255		
		细胞对照	66143				76188			

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

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

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

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

讨论

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

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

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

注: ①第 1 批实验, ②第 2 批实验

1. 精氨酸酶对 2.2.15 细胞培养的毒性

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

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

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

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

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

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

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

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

拉米夫定对细胞培养上清的 HBV-DNA 斑点杂交的 IC₅₀ 为

113.76 μ g/ml, SI 为: 10.54。Southern 印迹测定总的抑制作用, 两批实验 IC₅₀ 分别为: 84.27 和 93.28 μ g/ml, 平均为 88.78 $\pm$ 6.37 μ g/ml, TC₅₀ 为 1198.97 μ g/ml, SI 分别为 14.23 和 12.85, 平均为 13.54 $\pm$ 0.97。

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

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

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

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

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

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

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

所述药物配方也可以作为辅助治疗剂，与其它化疗剂一起使用。

权 利 要 求 书

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

24. 如权利要求 17 的药物组合物, 其中所述酶的氨基末端连接 6 个组氨酸。

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

26. 如权利要求 14 的药物组合物, 其中所述酶可调节肝炎。

27. 如权利要求 14 的药物组合物, 其中所述肝炎为乙型肝炎。

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

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

```

1  gaattgtacg tcaaagagat gaagcagaaa aacgtcgtcg agaagaagct gaacgacaaa
61 aagtgaaatg cgaggggaagt ccaagaaatg gtgattatga ggggtgtctat ttcacccaaa
121 acgggagaata tttatttgaa ttaagagtct ctgggactgc tcttgtaaat gctccttgta
181 atttaaagga tattgacata acgaaatggg tgtgtaaaac agggagatta tatcttgata
241 aggttaagaa atttgaaata gttactattc tttcccatga cgtagaaaat caaaaagatta
301 taacagaatg ggagtcactc ccagagaggg ctttaccgga acaatttgat tcataagaac
361 taattagtag cgctttccaa tggaggcgct tttttatttg ggtagttgca taccactaaa
421 gatgttcagg tgcacatgag cattggagga aaggaacgct ttagggggaa gggaaacctt
481 taaacagtc taatccccct tgattttatg ttctctgtaa actgcgtccg gtaaatctca
541 ggatagacaa tcggcggtta acggtttgag tgcgggggca gtttagaaag aatatgattg
601 gagggttca tagatgcac accatcacca tcatatgagc gccagtcca gaaccatagg
661 gattattgga gtccttttct caaagggaca gccacgagga ggggtggaag aaggccctac
721 agtattgaga aaggctggtc tgcttgagaa acttaaagaa caagagtgtg atgtgaagga
781 ttatggggac ctgccctttg ctgacatccc taatgacagt ccctttcaaa ttgtgaagaa
841 tccaaggtct gtgggaaaag caagcgagca gctggctggc aaggtggcac aagtcaagaa
901 gaacggaaga atcagcctgg tgctggcgag agaccacagt ttggcaattg gaagcatctc
961 tggccatgcc aggtccacc ctgatcttgg agtcatctgg gtggatgctc acactgatat
1021 caacactcca ctgacaacca caagtggaaa cttgcatgga caacctgtat ctttctcct
1081 gaaggaaacta aaaggaaaga ttcccgatgt gccaggattc tcctgggtga ctccctgtat
1141 atctgccaag gatattgtgt atattggctt gagagacgtg gacctgggg aacactacat
1201 tttgaaaact ctaggcatta aatacttttc aatgactgaa gtggacagac taggaattgg
1261 caaggtgatg gaagaaacac tcagctatct actaggaaga aagaaaaggc caattcatct
1321 aagttttgat gttgacggac tggacccatc tttcacacca gctactggca caccagtcgt
1381 gggaggtctg acatacagag aaggtctcta catcacagaa gaaatctaca aaacagggct
1441 actctcagga ttagatataa tggaaagtga cccatccctg gggaagacac cagaagaagt
1501 aactcgaaca gtgaacacag cagttgcaat aaccttggct tgtttcggac ttgctcggga
1561 gggtaatcac aagcctattg actaccttaa cccacctaa taaatgtgga aacatccgat
1621 ataaatctca tagttaatgg cataattaga aagctaata ttttcttaag catagagtta
1681 tccttctaaa gacttgttct ttcagaaaaa tgtttttcca attagtataa actctacaaa
1741 ttccctcttg gtgtaaaatt caagatgtgg aaattctaac ttttttgaaa tttaaaagct
1801 tatattttct aacttggcaa aagacttatc cttagaaaga gaagtgtaca ttgatttcca
1861 attaaaaatt tgotggcatt aaaaataaagc acacttacat aagcccccat acatagagtg
1921 ggactcttgg aatcaggaga caaagctacc acatgtggaa aggtactatg tgtccatgct
1981 attcaaaaaa tgtgattcta ga

```

图 1A

```

1 atgcatcaccatcaccatcat
  M H H H H H H
22 atgagcgccaagtccagaaccatagggattattggagctcctttc
   M S A K S R T I G I I G A P F
67 tcaaagggacagccacgaggaggggtggaagaaggccctacagta
   S K G Q P R G G V E E G P T V
112 ttgagaaaggctggtctgcttgagaaacttaaagaacaagagtgt
   L R K A G L L E K L K E Q E C
157 gatgtgaaggattatggggacctgccctttgctgacatccctaatt
   D V K D Y G D L P F A D I P N
202 gacagtccttttcaaattgtgaagaatccaaggtctgtgggaaaaa
   D S P F Q I V K N P R S V G K
247 gcaagcgagcagctggctggcaaggtggcacaagtcaagaagaac
   A S E Q L A G K V A Q V K K N
292 ggaagaatcagcctggtgctggcgagaccacagtttggcaatt
   G R I S L V L G G D H S L A I
337 ggaagcatctctggccatgccagggtccaccctgatcttggagtc
   G S I S G H A R V H P D L G V
382 atctgggtggatgctcacactgatatacaactccactgacaacc
   I W V D A H T D I N T P L T T
427 acaagtggaaacttgcatggacaacctgtatctttcctcctgaag
   T S G N L H G Q P V S F L L K
472 gaactaaaaggaaagattcccgatgtgccaggattctcctgggtg
   E L K G K I P D V P G F S W V
517 actcctgtatatactgccaaggatattgtgtatattggcttgaga
   T P C I S A K D I V Y I G L R
562 gacgtggaccctggggaacactacattttgaaaactctaggcatt
   D V D P G E H Y I L K T L G I
607 aaatacttttcaatgactgaagtggacagactaggaattggcaag
   K Y F S M T E V D R L G I G K
652 gtgatggaagaaacactcagctatctactaggaagaaagaaaagg
   V M E E T L S Y L L G R K K R
697 ccaattcatctaagttttgatgttgacggactggacccatctttc
   P I H L S F D V D G L D P S F
742 acaccagctactggcacaccagtcgtgggaggtctgacatacaga
   T P A T G T P V V G G L T Y R
787 gaaggctctctacatcacagaagaaatctacaaaacagggtactc
   E G L Y I T E E I Y K T G L L
832 tcaggattagatataatggaagtgaacccatccctggggaagaca
   S G L D I M E V N P S L G K T
877 ccagaagaagtaactcgaacagtgaaacacagcagttgcaataacc
   P E E V T R T V N T A V A I T
922 ttggcttggtttcggacttgctcgggagggtaatcacaagcctatt
   L A C F G L A R E G N H K P I
967 gactacottaacccacctaagtaa 990
   D Y L N P P K *

```

图 1B

```
1 atgagcgccaagtcagaaaccatagggattattggagctcctttc
M S A K S R T I G I I G A P F
46 tcaaagggacagccacgaggaggggtggaagaaggccctacagta
S K G Q P R G G V E E G P T V
91 ttgagaaaggctggtctgcttgagaaacttaaagaacaagagtgt
L R K A G L L E K L K E Q E C
136 gatgtgaaggattatggggacctgccctttgctgacatccctaatt
D V K D Y G D L P F A D I P N
181 gacagtcocctttcaaattgtgaagaatccaaggtctgtgggaaaa
D S P F Q I V K N P R S V G K
226 gcaagcgagcagctggctggcaaggtggcacaagtcaagaagaac
A S E Q L A G K V A Q V K K N
271 ggaagaatcagcctggtgctggcgaggagaccacagtttggcaatt
G R I S L V L G G D H S L A I
316 ggaagcatctctggccatgccagggtccaccctgatcttgagctc
G S I S G H A R V H P D L G V
361 atctgggtggatgctcacactgatatcaacactccactgacaacc
I W V D A H T D I N T P L T T
406 acaagtggaaacttgcatggacaacctgtatctttcctcctgaag
T S G N L H G Q P V S F L L K
451 gaactaaaaggaaagattcccgatgtgccaggattctcctgggtg
E L K G K I P D V P G F S W V
496 actccctgtatatctgccaaggatattgtgtatattggcttgaga
T P C I S A K D I V Y I G L R
541 gacgtggaccctggggaacactacattttgaaaactctaggcatt
D V D P G E H Y I L K T L G I
586 aaatacttttcaatgactgaagtggacagactaggaattggcaag
K Y F S M T E V D R L G I G K
631 gtgatggaagaaacactcagctatctactaggaagaaagaaaagg
V M E E T L S Y L L G R K K R
676 ccaattcatctaagttttgatgttgacggactggacccatctttc
P I H L S F D V D G L D P S F
721 acaccagctactggcacaccagtcgtgggaggtctgacatacaga
T P A T G T P V V G G L T Y R
766 gaaggtctctacatcacagaagaaatctacaaaacagggctactc
E G L Y I T E E I Y K T G L L
811 tcaggattagatataatggaagtgaacccatccctggggaagaca
S G L D I M E V N P S L G K T
856 ccagaagaagtaactcgaacagtgaacacagcagttgcaataacc
P E E V T R T V N T A V A I T
901 ttggcttgtttcggacttgctcgggagggtaatcacaagcctatt
L A C F G L A R E G N H K P I
946 gactaccttaacccacctaagtaa 969
D Y L N P P K *
```

图 1C

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2005/001411

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC7:A61K38/46,A61P1/16

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC7: A61K38, A61P1

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

CNKI, MEDLINE, CA

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CNPAT, CNKI and keywords: ARGINASE, HEPATITIS

WPI, EPODOC, PAJ, MEDLINE, CA and keywords: ARGINASE, HEPATITIS

GENEBANK: sequence search based on SEQ ID NO: 3

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO2004001048A1 (BIO-CANCER TREATMENT INTERNATIONAL LIMITED (CHINA)) 31.DEC 2003 (31.12.2003) claims, sequences list.	15-17,19-24
A	CN1140588A (HAO,Wenxue (CHINA)) 22.JAN 1997 (22.01.1997) all the text	2-4,6-13

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☒ See patent family annex.

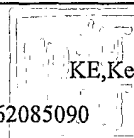
* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which may throw doubts on priority claim (S) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search
16.NOV 2005(16.11.2005)

Date of mailing of the international search report
08 · DEC 2005 (08 · 12 · 2005)

Name and mailing address of the ISA/CN
The State Intellectual Property Office, the P.R.China
6 Xitucheng Rd., Jimen Bridge, Haidian District, Beijing, China
100088
Facsimile No. 86-10-62019451

Authorized officer



Telephone No. (86-10)62085090

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2005/001411

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☒ Claims Nos.: 1, 5, 14, 18, 25-29
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
these claims relate to the use or pharmaceutical compositions of arginine degradative enzyme or arginine deiminase. However the tests in description are only based on arginase. These enzymes don't have just the same character as that of arginase. So the results of these enzymes can't be deduced from the description. Thus claims 1,5,14,18,25-29 are not supported by the description and don't meet the criterion mentioned in article 6 PCT.
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fees, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2005/001411

Patent Documents referred in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
WO2004001048	31.12.2003	AU2002325782 A1	06.01.2004

国际检索报告

国际申请号
PCT/CN2005/001411

A. 主题的分类

IPC7: A61K38/46, A61P1/16

按照国际专利分类表(IPC)或者同时按照国家分类和 IPC 两种分类

B. 检索领域

检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)

IPC7: A61K38, A61P1

包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献

CNKI, MEDLINE, CA

在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称, 和使用的检索词(如使用))

CNPAT, CNKI 和关键词: 精氨酸酶, 肝炎

WPI, EPODOC, PAJ, MEDLINE, CA 和关键词: ARGINASE, HEPATITIS

GENEBANK: 根据氨基酸序列 SEQ ID NO: 3 的序列检索

C. 相关文件

类 型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求
X	WO2004001048A1 (BIO-CANCER TREATMENT INTERNATIONAL LIMITED (中国)) 31.12 月 2003 (31.12.2003) 权利要求, 序列表	15-17, 19-24
A	CN1140588A (郝文学 (中国)) 22.1月 1997 (22.01.1997) 全文	2-4, 6-13

☐ 其余文件在 C 栏的续页中列出。

☒ 见同族专利附件。

* 引用文件的具体类型:

“A” 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件

“E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利

“L” 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件

“O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件

“P” 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件

“T” 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了理解发明之理论或原理的在后文件

“X” 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性

“Y” 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性

“&” 同族专利的文件

国际检索实际完成的日期

16.11 月 2005 (16.11.2005)

国际检索报告邮寄日期

08 · 12月 2005 (08 · 12 · 2005)

中华人民共和国国家知识产权局(ISA/CN)

中国北京市海淀区蓟门桥西土城路 6 号 100088

传真号: (86-10)62019451

受权官员



电话号码: (86-10)62085090

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2005/001411

第II栏 关于某些权利要求不能作为检索主题的意见(接第1页第2项)

按条约 17(2)(a)对某些权利要求未作国际检索报告的理由如下:

1. ☐ 权利要求:

因为它们涉及到不要求本国际检索单位进行检索的主题, 即:

2. ☒ 权利要求: 1, 5, 14, 18, 25-29

因为它们涉及到国际申请中不符合规定的要求的部分, 以致不能进行任何有意义的国际检索,

具体地说:

这些权利要求涉及精氨酸降解酶和精氨酸脱亚胺酶的用途或药物组合物, 说明书仅仅对精氨酸酶进行了试验, 而这些酶的性质与精氨酸酶不完全相同, 从说明书中不能推出这些酶的效果, 因此, 权利要求 1, 5, 14, 18, 25-29 得不到说明书的支持, 不符合 PCT6 的规定。

3. ☐ 权利要求:

因为它们是从属权利要求, 并且没有按照细则 6.4(a)第 2 句和第 3 句的要求撰写。

第III栏 关于缺乏发明单一性时的意见(接第1页第3项)

本国际检索单位在该国际申请中发现多项发明, 即:

1. ☐ 由于申请人按时缴纳了被要求缴纳的全部附加检索费, 本国际检索报告针对全部可作检索的权利要求。

2. ☐ 由于无需付出有理由要求附加费的劳动即能对全部可检索的权利要求进行检索, 本国际检索单位未通知缴纳任何附加费。

3. ☐ 由于申请人仅按时缴纳了部分被要求缴纳的附加检索费, 本国际检索报告仅涉及已缴费的那些权利要求。具体地说, 是权利要求:

4. ☐ 申请人未按时缴纳被要求的附加检索费。因此, 本国际检索报告仅涉及权利要求中首次提及的发明; 包含该发明的权利要求是:

关于异议的说明: ☐ 申请人缴纳了附加检索费, 同时提交了异议书, 缴纳了异议费。

☐ 申请人缴纳了附加检索费, 同时提交了异议书, 但未缴纳异议费。

☐ 缴纳附加检索费时未提交异议书。

国际申请号
PCT/CN2005/001411

检索报告中引用的 专利文件	公布日期	同族专利	公布日期
WO2004001048	31.12.2003	AU2002325782 A1	06.01.2004