



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 111936627 A

(43) 申请公布日 2020.11.13

(21) 申请号 201980016701.5

(74) 专利代理机构 北京世峰知识产权代理有限公司 11713

(22) 申请日 2019.01.18

代理人 康健 王思琪

(30) 优先权数据

BR1020180010336 2018.01.18 BR

(51) Int.Cl.

C12N 9/82 (2006.01)

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

A61K 38/50 (2006.01)

2020.09.02

C12N 15/55 (2006.01)

(86) PCT国际申请的申请数据

C12N 15/66 (2006.01)

PCT/BR2019/050017 2019.01.18

A61P 35/00 (2006.01)

(87) PCT国际申请的公布数据

W02019/140501 PT 2019.07.25

A61P 35/02 (2006.01)

(71) 申请人 奥斯瓦道·克鲁兹基金会

地址 巴西里约热内卢

(72) 发明人 T·D·A·C·B·德索萨

N·I·T·赞基 S·B·德莫雷斯

权利要求书2页 说明书25页

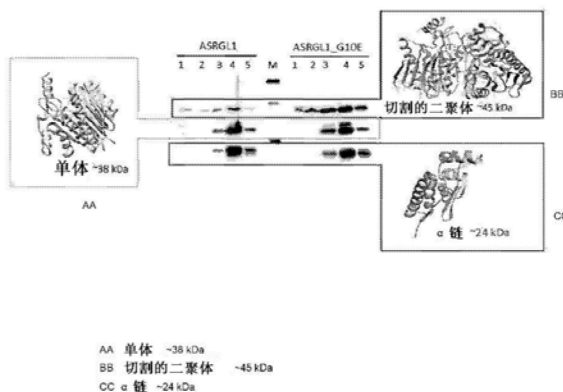
序列表9页 附图4页

(54) 发明名称

天冬酰胺酶活性多肽、表达盒、表达载体、宿主细胞、组合物、方法、癌症预防或治疗用途

(57) 摘要

本发明涉及具有天冬酰胺酶活性的多肽，与人野生L-天冬酰胺酶(ASRGL1)相比，其自体加工速率提高，在称为HGG环的HSRGL1富甘氨酸环(组氨酸8-甘氨酸9-甘氨酸10)中具有突变。本文还描述了编码本发明多肽的多核苷酸，包含所述多核苷酸的表达盒、表达载体、宿主细胞、药物组合物、本发明多肽在制造预防药物或癌症治疗中的用途、生产本发明多肽的方法以及预防或治疗癌症的方法。



1. 具有天冬酰胺酶活性的多肽,其特征在于其选自:
 - (i) 与SEQ ID NO:1所示的野生人L-天冬酰胺酶相比具有增加的自体加工速率的多肽;
 - (ii) 包含与SEQ ID NO:3-5中任一个的序列具有至少90%同一性的氨基酸序列的多肽;
 - (iii) 多肽,其中SEQ ID NO:1的位置10处的氨基酸甘氨酸被选自谷氨酸、天冬氨酸和组氨酸的氨基酸替代;
 - (iv) 包含SEQ ID NO:3-5中任何一个所示的氨基酸序列的多肽;和
 - (v) (i) 至 (iv) 的包含一个或多个保守氨基酸取代的多肽。
2. 根据权利要求1所述的多肽,其特征在于,其包含SEQ ID NO:3氨基酸序列。
3. 根据权利要求1或2所述的多肽,其特征在于,其用于预防或治疗癌症。
4. 根据权利要求3所述的多肽,其特征在于,所述癌症是急性髓性白血病(AMI)、慢性淋巴性白血病、卵巢癌、脑癌、前列腺癌、肺腺癌、非霍奇金淋巴瘤或肉瘤。
5. 根据权利要求4所述的多肽,其特征在于,所述肉瘤是淋巴肉瘤、网状肉瘤或黑素肉瘤。
6. 根据权利要求4所述的多肽,其特征在于,所述癌症是急性髓性白血病。
7. 多核苷酸,其特征在于,其编码权利要求1或2所定义的多肽。
8. 根据权利要求7所述的多核苷酸,其特征在于,其包括SEQ ID NO:6-8中任一个的核酸序列及其简并序列。
9. 表达盒,其特征在于,其包含与启动子和转录终止子可操作连接的权利要求7或8所定义的多核苷酸。
10. 表达载体,其特征在于,其包含权利要求7或8所定义的多核苷酸或权利要求9所定义的表达盒。
11. 宿主细胞,其特征在于,其包含权利要求9所定义的表达盒或权利要求10所定义的表达载体。
12. 药物组合物,其特征在于,其包含权利要求1或2所定义的多肽和药学上可接受的载体或赋形剂。
13. 根据权利要求12所述的组合物,其特征在于,其用于静脉内给药。
14. 根据权利要求12和13所述的组合物,其特征在于,其还包括其他化疗剂。
15. 权利要求1或2所述多肽的用途,其特征在于,所述用途发生在制备用于预防或治疗癌症的药物中。
16. 根据权利要求15所述的用途,其特征在于,所述癌症是急性髓性白血病(AMI)、慢性淋巴性白血病、卵巢癌、脑癌、前列腺癌、肺腺癌、非霍奇金淋巴瘤或肉瘤。
17. 根据权利要求16所述的用途,其特征在于,所述肉瘤是淋巴肉瘤、网状肉瘤或黑素肉瘤。
18. 根据权利要求16所述的用途,其特征在于,所述癌症是急性髓性白血病。
19. 产生具有天冬酰胺酶活性的多肽的方法,其特征在于,其包括:
 - (a) 提供权利要求11所定义的宿主细胞;
 - (b) 在有利于产生多肽的条件下培养这种细胞;和
 - (c) 从周围细胞或培养基中分离所述多肽。

20. 根据权利要求19所述的方法,其特征在於,所述多肽提供有标记。

21. 预防或治疗癌症的方法,其特征在於,包括对需要这种预防或治疗的个体施用治疗有效量的权利要求1和2所定义的多肽。

天冬酰胺酶活性多肽、表达盒、表达载体、宿主细胞、组合物、 方法、癌症预防或治疗用途

技术领域

[0001] 本发明涉及肿瘤学和生物技术领域。更具体而言，本发明涉及具有天冬酰胺酶活性、可用于预防和治疗癌症的多肽。

背景技术

[0002] 白血病是一种恶性疾病，其特征在于骨髓中异常细胞的过度且失控增殖，这些异常细胞是携带阻止其完成分化的突变积累的细胞，替代正常造血细胞。白血病对个体的主要后果是贫血和出血的风险增加，以及罹患感染的易感性增加。另外，白血病细胞可通过循环侵袭其他组织。如果没有有效的治疗，白血病是致命的。

[0003] 根据临床参数和病理参数，白血病细分为两种方式。第一种细分方式基于发展时间，包括急性和慢性形式。第二种与受影响的细胞类型有关。淋巴性白血病和髓性白血病的特征分别是淋巴样祖细胞和髓样祖细胞的瘤性改变。

[0004] 2012年的全球情况表明，所有癌症类型中有2.5%为白血病，在这一年总计约352,000例新病例。由于死亡率高，同一年全世界预计有265,000人死于白血病。在巴西，2016年报告了所有类型的白血病中估计有10070例新病例，其中急性淋巴性白血病(ALL)是儿童中最常见的癌症。这种疾病相当于0-14岁儿童中所有恶性肿瘤的30%(AMERICAN CANCER SOCIETY, 2016(美国癌症协会, 2016年))。

[0005] 目前，ALL的治疗由三个阶段构成。描述治疗阶段的方案是由欧洲集团柏林-法兰克福-慕尼黑(European group Berlin-Frankfurt-Munich, BFM)制定的，自1982年以来已被INCA的血液学系统采用(INCA, 2001)。该方案基于根据不同的疾病复发风险对患者分级。低风险组的患者是年龄在1-10岁之间的残障人士，白细胞计数少于50,000/ μL 血液。淋巴细胞的染色体或遗传变化、治疗开始后细胞计数的变化、脑脊液中白血病细胞的存在以及白血病细胞的来源(T或B淋巴细胞)都是也会影响预后的因素(US Cancer Institute(美国癌症研究所), 2015)。另外，为了降低患者抗性，该方案结合了不同的化疗药物。

[0006] 第一阶段称为诱导，持续一到三个月，目的是当在血液中的细胞计数恢复正常并且在骨髓中未发现白血病细胞时达到缓解。使用化疗、类固醇和天冬酰胺酶来进行诱导。第二阶段是巩固，试图通过防止剩余的白血病细胞变得有抗性来完全消除它们。为此目的，使用了几种化学治疗药物和天冬酰胺酶。这是治疗的最强烈阶段，持续两个月。白血病细胞完全缓解后，开始维持阶段，该阶段可以持续2-3年，并使用化疗和类固醇。(INCA, 2001; MÖRICHKE et al., 2008; INSTITUTO ONCOGUA, 2015)。

[0007] 在过去的40年中，在治疗婴儿ALL方面取得了显著进步，患者的存活率高达90%(AMERICAN CANCER SOCIETY(美国癌症协会), 2016)。二十世纪七十年代末在治疗中引入天冬酰胺酶有助于存活率提高至少15%。但是，仍然存在重大挑战，例如开发毒性较低的治疗方法。

[0008] 使用天冬酰胺酶治疗ALL的功效基于大多数白血病细胞所表现出的缺陷：天冬酰

胺合酶蛋白表达的缺乏或降低。天冬酰胺合酶进行从天冬氨酸到天冬酰胺的转化。由于白血病细胞不能再次合成天冬酰胺，因此其依赖循环天冬酰胺。肿瘤细胞，特别是ALL中的肿瘤细胞，需要大量的天冬酰胺以维持这些恶性疾病的异常生长特征。因此，针对ALL使用天冬酰胺酶是有利的。肌肉内或静脉内注射天冬酰胺酶会导致血浆中氨基酸的快速消耗，从而导致白血病细胞的代谢减少，并最终导致通过凋亡而死亡，而正常细胞则能够通过合成天冬酰胺来维持其功能。因此，与例如化疗剂不同，天冬酰胺酶对肿瘤细胞具有选择性作用，而化疗剂影响癌细胞和正常细胞的增殖过程。

[0009] 天冬酰胺是对所有健康和肿瘤细胞的生长均重要的非必需氨基酸。通过作用于蛋白质的生物合成，其消耗会损害细胞增殖 (AVRAMIS, 2012)。在用天冬酰胺酶治疗期间，天冬酰胺的循环浓度从50 μ M降低至3 μ M或更小 (AVRAMIS, 2012)，可通过激活凋亡信号传递阻止白血病细胞继续细胞周期。这与氨基酸的消耗可导致凋亡或自噬的诱导相符 (SONG et al., 2015)。在其他类型的癌症 (卵巢癌、慢性髓性白血病和肺腺癌) 中，据报道天冬酰胺酶不仅诱导凋亡，而且还诱导自噬，因为天冬酰胺是该过程的负调节剂。

[0010] 尽管天冬酰胺酶主要用于治疗ALL，但其仍具有用于其他类型癌症的潜力，例如急性髓性白血病 (WILLEMS et al., 2013)、卵巢癌 (LORENZI et al., 2008; YU et al., 2012; PURWAHA et al., 2014)、脑癌、前列腺癌、肺腺癌 (ZHANG et al., 2016)、非霍奇金淋巴瘤、慢性淋巴性白血病，诸如巴肉瘤、网状肉瘤和黑素肉瘤等肉瘤。

[0011] 目前，三种天冬酰胺酶用于ALL的治疗：大肠杆菌 (*E. coli*) 的天然L-天冬酰胺酶II，该酶的PEG化 (聚乙二醇化) 形式，以及分离的菊欧氏杆菌 (*Erwinia chrysanthemi*) L-天冬酰胺酶。构成化疗方案的天冬酰胺酶的选择取决于实施治疗的国家。待使用的酶版本的选择优先考虑减少副作用并保持治疗的有效性。在巴西，首选使用大肠杆菌L-天冬酰胺酶II (MÖRICKE et al., 2008; PIETERS et al., 2011)。

[0012] *E. coli* L-天冬酰胺酶II在三种可用的天冬酰胺酶中最具毒性并且是免疫原性的。即使在最近更新的BFM方案中，由于该酶的副作用，其剂量也减少了50%。给药后，*E. coli* L-天冬酰胺酶II很快被免疫系统细胞识别，因为它不扩散到细胞外空间。一旦免疫应答被激活，该酶的作用就会被中和。在60%的患者中会产生与药物失活有关的超敏反应。但是，针对*E. coli* L-天冬酰胺酶II产生的抗体并不总是伴有超敏反应的特征性症状 (过敏反应、水肿、血清病、支气管痉挛、荨麻疹和皮疹、四肢瘙痒和肿胀、红斑)。约有30%的患者出现沉默失活 (PIETERS et al., 2011; AVRAMIS, 2012)。

[0013] 在这些超敏反应和/或失活的情况下，建议使用PEG化酶和菊欧氏杆菌分离株作为替代品。PEG-天冬酰胺酶的免疫原性相对较低。但是，由于与患者已经存在的抗天冬酰胺酶抗体发生交叉反应，因此用天然酶治疗后的给药可能导致沉默失活。菊欧氏杆菌L-天冬酰胺酶极大地解决了超敏反应问题，因为开发针对该酶的抗体的机会为12-20%。但是，它的半衰期更短，研究报告称，没有完全缓解白血病细胞的患者数量明显更高 (PIETERS et al., 2011; RYTTING, 2012; AVRAMIS, 2012)。

[0014] 除了来自于免疫应答唤醒所产生的作用外，天冬酰胺酶多剂量给药还产生毒性作用。细菌天冬酰胺酶的高毒性与其水解非特异性有关，还导致谷氨酰胺消耗，谷氨酰胺通过这些酶转化为谷氨酸和氨。这种非特异性水解与大多数副作用有关，例如肝脏疾病、急性胰腺炎、高血糖症、糖尿、酮症酸中毒、中枢神经系统失调、血白蛋白减少、血纤维蛋白减少

(hypofibrinonemia)、高血凝症 (coagulation) 以及其他功能障碍。已经描述了谷氨酰胺耗尽可以激活到达线粒体的细胞内机制并激活细胞凋亡途径, 但这不减轻谷氨酰胺水解产生的毒性作用, 并且仍然可以诱导生长因子的表达 (AVRAMIS, 2012)。

[0015] 除选择性地导致白血病细胞死亡外, 天冬酰胺酶还通过进一步改善治疗效果来增强类固醇的抗白血病作用。因此, 用天冬酰胺酶进行的研究已寻求到了产生对天冬酰胺具有高亲和性和长半衰期的酶。这些特征可以在人天冬酰胺酶中找到, 这是细菌天冬酰胺酶的替代治疗选项。

[0016] 在急性淋巴性白血病的治疗中纳入人L-天冬酰胺酶可以解决细菌酶所面临的许多问题。然而, 这是具有挑战性的解决方案, 因为人酶仅在自结合阶段后才具有活性, 这表现出较低的体外效率, 从而降低了其酶活性。

[0017] 近年来, 由于对人冬酰胺酶 (ASRGL1) 在某些类型的癌症, 尤其是在 ALL 病例中的潜在治疗用途感兴趣, 对它的研究得到了加强。

[0018] 作为人蛋白, ASRGL1 可以大大降低治疗的免疫原性; 它满足药物必需的高热稳定性要求; 它对天冬酰胺具有很高的亲和性, 且尚不具有谷氨酰胺酶活性, ASRGL1 无法水解谷氨酰胺, 其特异性是比其他底物大的天冬酰胺 (CANTOR et al., 2009)。

[0019] 在 ALL 的治疗方案中使用 ASRGL1 的巨大挑战在于其酶活性。天冬酰胺酶蛋白 KM 的临床先决条件是微摩尔量级的低值, 而细菌天冬酰胺酶可以满足此要求, 在体外, hASRGL1 的 KM 量级为毫摩尔。用于治疗 ALL 的细菌天门冬酰胺酶来自与人蛋白质不同的亚家族; 而 ASRGL1 属于植物型 L-天冬酰胺酶亚家族, 而细菌天门冬酰胺酶属于细菌类型, 其变成有活性不需要经过自体加工 (CANTOR et al., 2009)。

[0020] 由于自体加工是酶活性的关键事件, 并且已经证明动力学活性与自体加工速率成正比, 因此认为 ASRGL1 的低酶活性是由于自催化机制所致。基因工程的进展已允许进行各种修饰, 以提高体外自体加工的效率, 但尚未取得成功。

[0021] 自切割机制始于来自 T168 羟基的质子受体方案。去质子化后, T168 (具有增强的亲核特性) 攻击 G167 的羰基, 形成会被水解的共价键。两个残基之间的完全切割使 T168 的氨基自由地催化天冬酰胺的水解 (SU et al., 2013)。观察到, ASRGL1 的必需残基 T168 具有双重作用: 首先, 其侧链对于自切割反应是必需的。其次, 随着 G167 和 T168 之间肽键的断裂, T168 的游离氨基参与天冬酰胺水解的催化。

[0022] 了解 ASRGL1 自体加工的确切机制对于获得针对底物的低体外底物活性的解决方案至关重要。然而, 已证明人类酶的生化 and 结构研究具有挑战性, 因为针对研究而产生的重组蛋白是未加工 (非活性) 状态和加工 (活性) 状态的混合物。因此, 低的活化率 (野生酶仅实现 50% 的自体加工) 使得结构表征和酶促表征均困难 (CANTOR et al., 2009; LI et al., 2012)。

[0023] 在无活性的蛋白质中, T168 羟基与 G167 羰基之间的距离为 4.0 \AA , 这不利于自体加工所必需的化学事件, 这表明构象变化需要切割 (NOMME et al., 2012)。通过 T168A 突变使自体加工失活已导致突变蛋白 ($\Delta T_m = 10^\circ\text{C}$) 的热稳定性大大提高, 从而提供了空间电压激活机制的证据。这种张力是由于 T168 在非活性蛋白中的取向所致。甲基中的电子与该残基的羟基非常接近, 从而产生排斥力和不利的相互作用。自体加工导致 T168 侧链松弛, 使 T168 羟基更接近活性位点, 因为该羟基与 T168 氨基之间的距离合理为 2.7 \AA (LI et al.,

2012)。

[0024] 甘氨酸9 (G9) 可以促进自身切割区域的构象变化 (NOMME et al., 2012)。加工前后ASRGL1结构之间的比较表明G9羧基旋转了180° (图1.10 B)。在豚鼠47的III型天冬酰胺酶中也观察到G9构象的这种变化,它可以促进G167的重新定位 (NOMME et al.,2012),以使其更接近T168并促进自切割 (NOMME et al.,2012;LI et al.,2012)。

[0025] G9是称为HGG环 (组氨酸8-甘氨酸9-甘氨酸10) 的富含甘氨酸的环的一部分。在L-天冬酰胺酶植物型的整个系统发育过程中,此环都非常保守 (约100%) (LI),2012)。

[0026] LI等人 (LI et al.,2012) 分析了ASRGL1 HGG环残基中的突变,特别是甘氨酸9 (G9) 和甘氨酸10 (G10) 突变为丙氨酸,这导致自体加工速率降低 (分别为6和30倍) 和动力学活性降低 (分别为14和50倍)。

[0027] LI等人 (LI et al.,2016) 还评估了与野生ASRGL1相比,天冬酰胺残基 (N62)、苏氨酸186 (T186) 和苏氨酸219 (T219) 发生突变的ASRGL1变体的自体加工速率和催化活性。在Nomme et al.,2016中,针对与野生 ASRGL1相比的自体加工速率和催化活性,还研究了ASRGL1苏氨酸168 (T168) 和苏氨酸219 (T219) 残基中的突变。尽管这些变体中有一些显示出催化活性提高,但是所进行的突变均未导致自体加工速率的提高。

[0028] 迄今为止,在不同残基中产生的所有突变都有助于了解ASRGL1操作的机制基础,但都未能提高其自体加工速率及其对天冬酰胺的水解活性。

[0029] 在这种情况下,本发明描述了可用于治疗癌症的具有天冬酰胺酶活性的多肽,人L-天冬酰胺酶的变体,其与治疗上使用的细菌酶相比,由于它们毒性和免疫原性低而具有较低的副作用。本发明的这些和其他优点,以及与相同发明构思相结合的其他发明特征,在本文件中提供的发明描述中会是显而易见的。

[0030] 发明概述

[0031] 本发明旨在提供解决了上面列出的现有技术的主要问题、具有天冬酰胺酶活性的多肽。

[0032] 在第一方面,本发明提供了一种具有天冬酰胺酶活性的多肽,所述多肽选自:

[0033] (i) 与SEQ ID NO:1所示野生人L-天冬酰胺酶相比具有增加的自体加工速率的多肽;

[0034] (ii) 包含与SEQ ID NO:3-5中任一序列具有至少90%同一性的氨基酸序列的多肽;

[0035] (iii) 多肽,其中SEQ ID NO:1的位置10处氨基酸甘氨酸被选自谷氨酸、天冬氨酸和组氨酸的氨基酸替代;

[0036] (iv) 包含SEQ ID NO:3-5所示氨基酸序列的多肽;和

[0037] (v) (i) 至 (iv) 的包含一个或多个保守氨基酸取代的多肽。

[0038] 在第二方面,本发明提供了编码如上定义的具有天冬酰胺酶活性的多肽的多核苷酸。

[0039] 在第三方面,本发明提供了包含可操作地连接至启动子和转录终止子的如上定义的多核苷酸的表达盒。

[0040] 在第四方面,还提供了包含如上定义的多核苷酸或表达盒的表达载体。

[0041] 在第五方面,本发明提供了包含如上定义的表达盒或表达载体的宿主细胞。

[0042] 在第六方面,提供了包含本发明的多肽和药学上可接受的载体或赋形剂的药物组合物。

[0043] 在第七方面,提供了本发明多肽在制备用于预防或治疗癌症的药物中的用途。

[0044] 在第八方面,本发明提供了产生具有天冬酰胺酶活性的多肽的方法,包括以下步骤:(a) 提供转化的宿主细胞;(b) 在有利于多肽产生的条件下培养该细胞;(c) 从该细胞或周围培养基中分离该多肽。

[0045] 在第九方面,提供了预防或治疗癌症的方法,包括向需要这种预防或治疗的个体施用治疗有效量的具有天冬酰胺酶活性的多肽。

[0046] 附图简要说明

[0047] 图1显示了通过亲和层析纯化的ASRGL1和ASRGL1_G10E的蛋白质印迹分析[M-分子量标记(110、48以及25kDa);1-流穿(flow through);2-用50mM咪唑洗脱;3-用100mM咪唑洗脱;4-用500mM咪唑洗脱;5-镍树脂]。

[0048] 图2显示了在不同切割状态下ASRGL1二聚体的结构分析和电泳图谱。

[0049] 图3显示了用于琼脂糖凝胶电泳测试的分子量模式。

[0050] 图4显示了ASRGL1和ASRGL1_G10E序列的PCR产物的电泳图谱。

[0051] 图5显示了在pGEM-T Easy中克隆ASRGL1和ASRGL1_G10E PCR产物后分析消化的电泳图谱。

[0052] 图6显示了在pET28a-TEV表达载体中亚克隆后分析消化的电泳图谱。

[0053] 定义

[0054] 为了确保更好地理解本发明的范围而非限制因素,下面定义了本发明中使用的相关技术领域的技术术语。

[0055] 在整个说明书和权利要求书中,除非上下文由于所要求的表达或暗示语言另有要求,以包括性含义使用“包含(comprising)”或诸如“包含(comprise)”,“包含(comprises)”或“由……组(compri sed of)”等变体,即,用于指定存在所确定的资源,但不排除存在或添加可以实质上增加本发明任何术语的操作或实用性的其他资源。

[0056] 如在整个说明书和权利要求书中所使用的,“基本上由...组成(consist essentially of)”和变体例如“基本上由...组成(consist essentially of)”或“基本上由...组成(consisting essentially of)”,表示包括所提及的任何要素或要素组以及可选地包括其他要素,所述其他要素与所提到的要素具有相似或不同的性质,且不会实质上改变所要求保护的材料的性质或创新性质。

[0057] 术语“核酸”和“多核苷酸”互换使用,是指RNA和DNA。多核苷酸可以是单链(single tape)或双链(double tape)。多核苷酸的非限制性实例包括基因、基因片段、外显子、内含子、信使RNA、siRNA、miRNA、互补DNA、基因组DNA、合成DNA、重组DNA、盒、载体、探针和起始子。术语“重组DNA”是指由不同来源的DNA序列的组合产生的任何人工核苷酸序列。

[0058] 术语“简并核苷酸序列”是指与编码给定多肽的参照核酸分子相比,包含一个或多个简并密码子的核苷酸序列。简并密码子含有不同的核苷酸三联体,但是编码相同的氨基酸残基(例如,GAU和GAC均编码Asp)。

[0059] 术语“治疗有效量”是指当根据剂量并通过适当的给药给予时提供抗癌活性的蛋白质或多肽的量。

[0060] 术语“药学上可接受的载体或赋形剂”是指与药物制剂中所含的其他成分相容且没有治疗效果并且对人类或动物无害的成分。

[0061] “化疗剂”是可用于癌症治疗的化学化合物。化疗剂的种类包括但不限于：烷化剂、抗代谢物、激酶抑制剂、抗融合毒物植物生物碱、细胞毒性/抗肿瘤抗生素、拓扑异构酶抑制剂、光敏剂、抗雌激素和选择性雌激素受体调节剂 (SERM)、抗孕酮、雌激素受体下降调节剂 (ERD)、雌激素受体拮抗剂、黄体生成素释放激动剂、抗雄激素、芳香酶抑制剂、EGFR 抑制剂、VEGF抑制剂、抑制与异常细胞增殖或肿瘤生长相关的基因表达的反义寡核苷酸。可用于本发明治疗方法的化疗剂包括细胞生长抑制剂和/或细胞毒性剂。

[0062] 术语“个体 (individual)”是指人和动物。优选地，个体是人。

[0063] 术语“同一性”定义为当将一个核苷酸接着一个核苷酸或一个氨基酸接着一个氨基酸与参照序列进行比较时，DNA或氨基酸序列之间的相等程度。

[0064] 术语“序列同一性百分比”是指多核苷酸或多肽之间的比较，并且由两个理想比对的序列在某些比较参数下确定。这种比对可以包括缺口 (间隔)，当与参照序列相比时，产生有利于它们适当比较的间隔。一般而言，同一性百分比的计算考虑了与参照序列相比的序列中出现相同核苷酸或氨基酸的位置数，并且是通过比较序列的几种算法和本领域已知的程序进行。这样的算法和程序包括但不限于TBLASTN、BLASTP、FASTA、TFASTA、CLUSTALW、FASTDB。

[0065] 术语“聚合酶链式反应”或PCR是指如美国专利4,683,195所述的扩增核酸片段的方法。通常，目的序列的5'和3'末端所含的信息用于设计其涵盖的起始寡核苷酸或引物，即约8个合成核苷酸。这些引物具有与要扩增的序列互补的序列。PCR可用于扩增RNA序列、DNA或cDNA。

[0066] “表达盒”是指包含引入宿主细胞时可操作地连接的编码区和调节区的核酸构建体，分别导致RNA或多肽的转录和/或翻译。通常，表达盒应理解为允许转录开始的启动子、本发明的核酸和转录终止子，或由其构成。表述“可操作地连接”表示以编码序列表达受转录启动子和/或信号肽控制的方式组合元件。通常，将启动子序列置于目的基因上游，与目的基因的距离与表达控制相容。类似地，通常将信号肽序列合并于目的基因序列的上游，与此同时，合并于任何启动子的下游。间隔序列可以存在于调节元件和基因之间，因为它们不阻止表达和/或分选。在执行模式中，所述表达盒包含至少一个与启动子可操作连接的激活序列“增强子”。

[0067] 术语“载体”是指设计用于转运、转移和/或存储遗传物质，以及表达遗传物质和/或将遗传物质整合到宿主细胞染色体DNA中的核酸分子，例如质粒、粘粒、人工染色体、噬菌体和其他病毒。载体通常由至少三个基本单元组成，即复制源、选择标记和多克隆位点。

[0068] 本发明中使用的载体优选具有至少一种“选择标记”，其是允许选择遗传修饰的生物/细胞的遗传因子。这些标记包括抗生素抗性基因，例如但不限于氨苄青霉素、氯霉素、四环素、卡那霉素、潮霉素、博来霉素、腐草霉素、纯霉素 (puremycin) 和/或表型互补基因，例如但不限于甲氨蝶呤、二氢叶酸还原酶、氨苄青霉素、新霉素、霉酚酸、谷氨酰胺合酶。

[0069] 术语“表达载体”是指能够转运、转移和/或存储遗传物质，并且一旦进入宿主细胞，即被用作产生一种或多种基因产物 (基因表达) 的遗传信息来源的任何载体。

[0070] 另外，本发明的表达载体可以包括一个或多个调控核苷酸序列，以控制遗传物质

的基因复制、转移、转运、储存和表达的调节核苷酸序列,例如复制起点、选择标记、多克隆位点、启动子(例如T7 pol、pL和 p λ 噬菌体、SV40、CMV、HSV tk、pgk、T4 pol或EF-1 α 及其衍生物)、核糖体结合位点、RNA剪接位点、聚腺苷酸化位点、用于分泌的信号肽,以及基因转录终止序列。但是,本发明的表达载体不限于此。将控制序列并入载体的技术在现有技术中已有很好的表征。

[0071] 用于本发明的表达载体还可以具有正向或负向地影响启动子依赖性基因的表达“增强子”序列,也称为“顺式”元件。

[0072] “编码序列”是指在适当调节序列的控制下被转录成mRNA(信使RNA)并被翻译成多肽的核苷酸序列。编码序列的限制取决于DNA有义链5'末端的翻译起始密码子和DNA有义链3'末端的翻译终止密码子。由于遗传密码简并性的结果,不同的DNA序列可以编码相同的多肽序列。因此,编码区中的这种简并取代视为插入了本发明所述的序列中。

[0073] 术语“启动子”是足以指导基因转录的最小DNA序列,即指导RNA聚合酶结合从而促进信使RNA合成的序列。启动子可以是细胞类型、组织和物种特异性的,并且在某些情况下,响应某些称为诱导剂的外部物理或化学试剂,受调节元件调节。

[0074] 术语“转化”和“转染”是指将外源遗传物质的载体或其他载体媒介插入原核或真核宿主细胞中,以转运、转移、储存和/或遗传表达目的遗传物质的行为。

[0075] 术语“重组表达”是指在宿主细胞中表达重组多肽。

[0076] 术语“宿主细胞”是指会通过载体接受遗传物质的细胞和/或已经通过载体接受了遗传物质的细胞(转化的细胞或转染的细胞)。这些宿主细胞可以是原核的(原核微生物)或真核的(真核细胞或微生物)来源。

[0077] 在本申请中,术语“肽”、“多肽”或“蛋白质”可以互换使用,是指通过肽键连接的氨基酸多聚体,而与构成该链的氨基酸残基的数量无关。如本文所用,多肽包括它们的“变体”或“衍生物”,变体或衍生物是指相对于参照多肽在其氨基酸序列中包括变异或修饰的多肽,例如取代、缺失、添加或化学修饰,前提是衍生多肽的免疫抑制活性、稳定性、中年寿命(midlife)、药代动力学特征和/或理化特性等于或高于最初观察到的原始多肽。化学修饰的实例是糖基化、PEG化、PEG烷基化、烷基化、磷酸化、乙酰化、酰胺化等。根据 α 碳原子的氨基的取向,本发明多肽中的氨基酸可以属于L系列或D系列。多肽可以使用重组DNA技术由克隆的核苷酸序列人工生产(“重组多肽”),也可以通过已知的化学合成反应制备(“合成多肽”)。

[0078] 术语“氨基酸取代”是指至少一个多肽氨基酸残基的取代,以产生具有等于或优于最初观察到的原始多肽的天冬酰胺酶活性、稳定性、中年寿命、药代动力学特征和/或理化特征的衍生物。替代氨基酸可以是天然的/修饰的或非常规的。

[0079] 在这方面,术语“氨基酸的保守替代”是指多肽中的氨基酸被具有相似侧链的那些氨基酸取代,因此具有非常接近的物理和化学特性。例如,将丙氨酸交换为缬氨酸或亮氨酸或异亮氨酸视为是保守的,因为涉及的氨基酸具有脂族侧链作为共同特征。含有基本侧链作为特征的基团由赖氨酸、精氨酸和组氨酸组成。在侧链中含有硫的基团包括氨基酸半胱氨酸和蛋氨酸。氨基酸苯丙氨酸、酪氨酸和色氨酸含有芳香族侧链。天冬酰胺和谷氨酰胺是含有酰胺的侧链氨基酸的一部分,而丝氨酸和苏氨酸含有与其脂族侧链相连的羟基。保守替代的其他实例包括将非极性氨基酸或疏水性氨基酸如异亮氨酸、缬氨酸、亮氨酸或蛋氨

酸替代为另一个非极性氨基酸。类似地,此处描述的本发明考虑了极性氨基酸或亲水性氨基酸的取代,例如精氨酸/赖氨酸、谷氨酰胺/天冬酰胺和苏氨酸/丝氨酸。另外,还考虑了碱性氨基酸如赖氨酸、精氨酸或组氨酸之间的取代,或酸性质的氨基酸例如天冬氨酸或谷氨酸之间的取代。保守氨基酸替代的实例是:亮氨酸或异亮氨酸替代缬氨酸,酪氨酸替代苯丙氨酸,精氨酸替代赖氨酸,缬氨酸替代丙氨酸和谷氨酰胺替代天冬酰胺。

[0080] 另外,修饰的或不常见氨基酸的说明性实例包括2-氨基己二酸、3-氨基己二酸、 β -丙氨酸、2-氨基丁酸、4-氨基丁酸、6-氨基己酸、2-氨基庚酸、2-氨基异丁酸、3-氨基异丁酸、2-氨基庚酸、2-氨基庚二酸、2,4-二氨基丁酸、锁链素、2,2'-二氨基庚酸、2,3-二氨基丙酸、N-乙基甘氨酸、N-乙基天冬酰胺、羟赖氨酸、卤代羟基赖氨酸(alohydroxylisin)、3-羟基脯氨酸、4-羟基脯氨酸、异锁链素、卤代异亮氨酸、N-甲基甘氨酸、N-甲基异亮氨酸、6-N-甲基赖氨酸、N-甲基缬氨酸、正缬氨酸、正亮氨酸、鸟氨酸等。

[0081] 根据本发明的详细说明和所附权利要求书会更好理解本发明的目的。

[0082] 发明详述

[0083] 除非进行了不同的定义,否则此处所用的所有技术和科学术语均与本发明所属领域的技术人员的理解具有相同含义。在本发明的描述中使用的术语仅旨在描述具体成就,而无意限制本教导的范围。除非另有说明,否则在说明书和权利要求书中使用的所有表示数量、百分比和比例的数字以及其他数值应理解为在所有情况下均由术语“约”修饰。因此,除非另有说明,否则说明书和权利要求书中所示的数值参数是可以根据要获得的性能而改变的近似值。

[0084] 本发明人通过修饰人L-天冬酰胺酶(SEQ ID NO:1)而提供具有天冬酰胺酶活性的多肽,从而解决了现有技术的问题,所述人L-天冬酰胺酶在其序列中在野生蛋白的游离甘氨酸占据的位置具有质子受体,因此,具有改善的自体加工机制。

[0085] 自切割机制始于来自T168羟基的质子受体方案。去质子化后,T168(具有增强的亲核特性)攻击G167的羰基,形成会被水解的共价键。两个残基之间的完全切割使T168的氨基自由地催化天冬酰胺的水解。

[0086] 观察到,ASRGL1的必需残基T168发挥双重作用:首先,其侧链对于自切割反应是必不可少的;其次,随着G167和T168之间肽键的断裂,T168的游离氨基会参与催化天冬酰胺水解。

[0087] 在无活性的蛋白质中,T168羟基与G167羰基之间的距离为 4.0 \AA ,这不利于自体加工所必需的化学事件,这表明切割需要构象转换。自体加工导致T168侧链松弛,使T168羟基更接近活性位点,因为该羟基与T168氨基之间的距离为合理的 2.7 \AA 。

[0088] 甘氨酸与T168羟基接近使其可作为外源性自体加工引物进行操作。由于蛋白质的翻译,内在的起始子对于激活该过程会是有利的。在这种情况下,本发明的发明人在游离甘氨酸占据的位置引入了质子受体,从而改善了体外自体加工机制。

[0089] 尽管游离甘氨酸令人满意地充当质子受体,但是对于蛋白质结构中所包括的甘氨酸而言并非如此。在蛋白质中,其氨基和羧基形成肽键,不能在质子的意义上自由发挥作用。而且,其仅由氢形成的侧链不执行该功能。

[0090] 由于血液的pH值为7.4,因此谷氨酸、天冬氨酸和组氨酸可以作为血液中的质子受体。这些氨基酸的侧链pKa通常低于血液pH,因此在这些条件下,COO⁻自由基比COOH占优势。

[0091] 甘氨酸9 (G9) 可促进自切割区域的构象变化。G9是称为HGG环的富含甘氨酸环的一部分(组氨酸8-甘氨酸9-甘氨酸10)。在整个L-天冬酰胺酶植物类型的系统发育过程中,该环都非常保守(约100%)。

[0092] 在无活性的蛋白质结构中,G10羰基的位置有利于G11和T219之间的氢键结合,并阻遏封闭的构象中的HGG环。另外,HGG的G9和L166环之间的紧密接近(1.6Å)有助于封闭的构象。相比之下,在活性酶中,G9的旋转会修饰G10羰基的位置,从而导致HGG环的位置发生改变。

[0093] 鉴于HGG环的柔韧性及其对激活自体加工的重要性,出于旨在改善自体加工机制的突变目的,考虑了该区域。

[0094] 通过对ASRGL1结构进行计算机修饰,发明人观察到G10突变为充当质子受体的氨基酸可将侧链的羧基置于活性位点附近,类似于优化自体加工反应的游离甘氨酸的位置。

[0095] 研究表明,与野生蛋白相比,突变蛋白的自体加工比例较高。如本文提出的实施例所证明的,本发明中提出的改变能够提高自体加工和人L-天冬酰胺酶活性的速率,实现改善自切割和水解反应的目的。

[0096] 在第一方面,本发明提供了一种具有选自以下的天冬酰胺酶活性的多肽:

[0097] (i) 与SEQ ID NO:1所示野生人L-天冬酰胺酶相比具有增减的自体加工速率的多肽;

[0098] (ii) 包含与SEQ ID NO:3-5中任一个的序列具有至少90%同一性的氨基酸序列的多肽;

[0099] (iii) 多肽,其中SEQ ID NO:1的位置10处的氨基酸甘氨酸被选自谷氨酸、天冬氨酸和组氨酸的氨基酸替代;

[0100] (iv) 包含SEQ ID NO:3-5中任何一个所示的氨基酸序列的多肽;和

[0101] (v) (i) 至 (iv) 的包含一个或多个保守氨基酸取代的多肽。

[0102] 一方面,本发明的多肽与SEQ ID NO:3-5的氨基酸序列至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%相同。

[0103] 在实施方案中,本发明的多肽包含SEQ ID NO:3-5中任一个的氨基酸序列,其中SEQ ID NO:1的位置10处的氨基酸甘氨酸分别被谷氨酸、天冬氨酸和组氨酸替代。

[0104] 在优选的实施方案中,本发明的多肽包含SEQ ID NO:3的氨基酸序列,其中SEQ ID NO:1的位置10处的氨基酸甘氨酸被谷氨酸替代(G10E突变)。

[0105] 通过在E.coli中诱导ASRGL1(SEQ ID NO:1)和ASRGL1_G10E(SEQ ID NO:3)的重组表达,可以产生更多量的用于自体加工分析的蛋白质。图1中所示的约38kDa的条带对应于未加工的蛋白质,约24kDa的条带对应于α链。由于组氨酸的尾部在该蛋白质的N末端,因此无法看到β链。除了38kDa和24kDa条带外,还观察到约45kDa的第三个条带。

[0106] 据信约45kDa的条带对应于通过二硫桥(SS桥)连接的α链二聚体。这是基于技术现状报告(Li et al. (2016)),其大小相当于α链的两倍,并且还基于该链中可能形成二硫桥的三个半胱氨酸的存在(图2a)。已知的是,由于它是强共价键,因此电泳样品缓冲液中的还原剂通常不足以破坏这种强相互作用,因此可以在凝胶上看到对应于具有二硫桥的二聚体的条带。如果不处理该二聚部分,则会具有大约75kDa的条带,但是,由于只能看到45kDa的迁移,因此可以得出结论,这是具有二硫桥的加工状态(图2b)。

[0107] 在图2a中,加工和未加工的ASRGL1二聚体的卡通表示。根据原子,其中C-灰色,N-蓝色,O-红色和S-黄色, α 链为米色, β 链为绿色,半胱氨酸为有色的半球形。红色椭圆形圆圈描述了单体之间最可能形成二硫桥的区域。

[0108] 图2b显示了在不同加工情况下二聚体的理论电泳图,其中:1-通过二硫键连接的二聚体由两个切割的单体(45kDa条带-具有SS桥的 α 链,15 kDa条带- β 链)构成,2-未通过二硫化物连接(disulphide link)而连接的二聚体由两个切割的单体(24kDa条带- α 链,15kDa条带- β 链)构成,3-通过二硫键连接的二聚体由两个未键合的单体(75kDa条带,其对应于通过二硫桥连接的38kDa的连续蛋白)构成,4-无二硫桥的无活性二聚体样品(35 kDa条带,其对应于连续多肽链),5-通过部分切割的二硫键连接的二聚体(仅一种单体是切割的,对应于两条 α 链和1条 β 链的65kDa条带,和对应于链 β 的15kDa条带),6-未通过部分切割的二硫化物连接而连接的二聚体(仅一个单体是切割的,对应于未连接的蛋白的38kDa条带,对应于 α 链的24 kDa条带,和对应于切割单体的 β 链的15kDa条带)。

[0109] 通过分析每种状态的含量,可以得出的结论是,与野生蛋白相比,突变蛋白显示出较高的自体加工比例。此外,G10E突变有利于45kDa中间体的形成。

[0110] 正如所期望的,ASRGL1 (SEQ ID NO:1) 和ASRGL1_G10E (SEQ ID NO:3) 的部分呈现出不同的kcat值,因为已经发现了不同状态的分子内自体加工。

[0111] 考虑到kcat是在给定的单位时间内每摩尔酶可转化为产物的最大底物摩尔数,因此观察到ASRGL1_active在野生天冬酰胺酶的三种状态下显示出最高的酶促效率,ASRGL1_intiva_a和ASRGL1_intiva_b具有相似的kcat 值(请参见实施例5)。

[0112] 本发明提出的突变是ASRGL1的能够增加自体加工和酶促活性速率的第一个修饰。ASRGL1_G10E的两个部分的kcat值最高。替代品G9A的kcat 为0,0126s⁻¹和G10A的kcat为0,0053s⁻¹。

[0113] G10E突变实现了改善对天冬酰胺进行体外自切割和水解反应的目的,但为了完全阐明该突变促进这种作用的机制,仍需要进一步的研究。

[0114] 在一实施方案中,本发明的多肽用于癌症预防或治疗。在优选的实施方案中,癌症选自急性髓性白血病(AMI)、慢性淋巴性白血病、卵巢癌、脑癌、前列腺癌、肺腺癌、非霍奇金淋巴瘤和肉瘤(淋巴肉瘤、网状肉瘤和黑素肉瘤)。在更优选的实施方案中,癌症是急性髓性白血病(AMI)。

[0115] 在第二方面,本发明提供了编码本文所述多肽的多核苷酸。

[0116] 本发明的多核苷酸包含SEQ ID NO:6-8中任一个的核酸序列及其简并序列。

[0117] 基于本申请提供的信息和现有技术的公知常识,本领域的技术人员应当认识到简并序列是完全得到支持的。例如,遗传密码的简并(即不同的密码子可以编码相同的氨基酸)是该技术中的公知常识,并且每个密码子编码的氨基酸的身份已经充分确立。

[0118] 基于现有技术中公知和建立的信息,本领域技术人员能够确定不改变所得氨基酸序列的核苷酸取代。例如,如果核苷酸序列含有编码亮氨酸的CTA密码子,那么本领域技术人员应当理解,用任何其他核苷酸(即 T、C或G)替代“A”仍会导致编码亮氨酸的密码子。因此,当同时具有基因的核苷酸序列和编码的蛋白质的氨基酸序列时,本领域技术人员应当容易地鉴定出编码具有相同氨基酸序列的相同蛋白质的简并序列。

[0119] 优选的密码子的使用可以根据要转录核酸的宿主细胞来调整。这些步骤可以根据

本领域技术人员熟知的方法进行,并且其中的一些方法在参考手册Sambrook等人(Sambrook et al.,2001)中有描述。

[0120] 从这个意义上讲,不同物种可以显示出优先的“密码子使用”。参见 Grantham et al.,*Nuc.Acids Res.*8:1893(1980),Haas et al.*Curr.Biol.*6:315 (1996),Wain-Hobson et al.,*Gene* 13:355(1981),Grosjean and Fiers,*Gene* 18:199(1982),Holm,*Nuc.Acids Res.*14:3075(1986),Ikemura,*J.Mol.Biol.* 158:573(1982),Sharp and Matassi,*Curr.Opinion.Genet.Dev.*4:851(1994), Kane,*Curr.Opinion.Biotechnol.*6:494(1995),以及Makrides,*Microbiol. Rev.*60:512(1996)。如本文所用,术语“优先的密码子使用”或“优先的密码子”是本领域中使用的术语,指的是在某些物种的细胞中最常使用的密码子。例如,氨基酸苏氨酸(Thr)可以由ACA、ACC、ACG或ACT编码,但是在哺乳动物细胞中,ACC是最常用的密码子。在其他物种中,例如,可能优选不同的Thr密码子。可以通过本领域已知的多种方法将具体物种的优选密码子引入本发明的多核苷酸中。例如,将优先密码子序列引入重组DNA中,可以通过在给定细胞类型中使翻译更高效来增加多肽产量。因此,可以针对不同物种优化本发明的多核苷酸序列。

[0121] 本发明的多核苷酸是通过现有技术中已知的方法获得的,例如 Sambrook等人(Sambrook et al.(2001))描述的那些。例如,可以通过比较序列来识别其他序列并在功能上注明。因此,本领域的技术人员可以使用公众可获得的序列和参数分析程序,在诸如GenBank等合适数据库中容易地鉴定出在功能上与本发明的多核苷酸等同的序列。

[0122] 在另一个实例中,本发明的多核苷酸可通过逆转录反应然后通过PCR 扩增获得。oligo-dT和随机起始子均可用于逆转录反应,以由分离自巨蝮蛇(*L.muta*) RNA制备单链cDNA,该RNA含有目的序列。可以通过称为使用Trizol试剂的方法(GIBCO-BRL/Life Technologies),Gaithersburg, Maryland)分离RNA。

[0123] Gobinda等人(*PCR Methods Applic.*2:318-22,1993)描述了“限制位点 PCR”,作为使用通用引物获得与已知基因座相邻的未知序列的直接方法。首先,在存在衔接子-起始子的情况下,并且在存在已知区域的特异性起始子的情况下,扩增基因组DNA,所述衔接子-启动子与连接到基因组DNA片段末端的衔接子序列同源。扩增的序列经过第二轮PCR,第二轮PCR使用相同的衔接子-起始子和位于第一个起始子内部的另一个特异性起始子。每一轮PCR的产物用合适的RNA聚合酶来转录,并使用逆转录酶进行测序。

[0124] 仍然以说明性的方式,反向PCR允许基于已知区域由引物开始获得未知序列(Triglia,T.et al.,*Nucleic Acids Res* 16:8186,1988)。该方法使用几种限制酶生成已知基因区域中的片段。然后通过分子内连接使片段环化并用作PCR的模板。不同的起始子来自已知区域。

[0125] 另外,已知还可以借助简并引物和基于PCR的方法获得同一性降低的序列。

[0126] 通常,可用于通过PCR扩增核酸分子的引物的核酸序列可基于例如由 SEQ ID NO: 3-5所示的本发明多肽的氨基酸序列。在本发明中,SEQ ID NO:9-11代表用于扩增编码人野生L-天冬酰胺酶(ASRGL1)和突变的人L-天冬酰胺酶(ASRGL1_G10E;SEQ ID NO:3)的基因的起始寡核苷酸。

[0127] 在第三方面,本发明提供了包含可操作地连接于表达所必需序列的本发明的多核苷酸的表达盒。通常,编码区和调节区彼此是异源的。

[0128] 在本发明的第四方面,本发明提供了包含本发明的多核苷酸或表达盒的表达载体。该表达载体可用于转化宿主细胞并允许本发明的核酸在细胞中表达。

[0129] 有利的是,表达载体包含允许核酸表达的调节元件和允许其在本发明的宿主细胞中选择的元件。根据所需表达的宿主细胞选择这些元件的方法是本领域技术人员所熟知的,并在文献中有广泛描述。

[0130] 可以通过本领域技术人员众所周知的经典分子生物学技术来构建载体。适合在宿主细胞中表达的表达载体的非限制性实例是质粒和病毒或细菌载体。

[0131] 在本发明的第五方面,本发明提供了用于转化或转染细胞的本发明的多核苷酸、表达盒或表达载体。可以以瞬时或稳定的方式转化/转移宿主细胞,且核酸、盒或载体可以以附加体或染色体形式包含在细胞中。

[0132] 将多核苷酸、表达盒或载体插入感受态原核或真核宿主细胞中。选择重组克隆,然后通过限制酶和DNA测序对其进行分析,从而使用本领域技术人员众所周知的方法、试剂盒和设备确认的克隆序列。

[0133] 因此,本发明的多肽可以使用重组DNA技术制备,其中包含本发明多核苷酸序列的盒或表达载体可操作地连接于启动子,所述多核苷酸序列例如编码多肽SEQ ID NO:3-5中的任一个。在合适的条件下培养宿主细胞并表达多肽。宿主细胞可以是细菌、真菌、植物或动物的细胞。从培养物中回收多肽,其中回收可包括多肽的纯化步骤。适当时,分析并处理获得的重组多肽以使其溶解。然后,使用例如生物化学领域常用的方法,例如HPLC、SDS-PAGE、蛋白质印迹、pH梯度等电聚焦、圆二色性,来纯化和生化表征溶解的多肽。使用这些方法,可以确定重组多肽表达的特征,例如产量;除了确定对生物技术药物的开发很重要的其他特征外,还确定二级结构的特征。

[0134] 多肽可以与标签“融合”表达。术语“标签(tag)”或英文术语“标签(tag)”是指在表达载体的多克隆位点附近嵌入的编码序列,使得其翻译可以伴随并邻近克隆的重组多肽的序列。因此,标记与重组多肽融合表达。这样的标记在现有技术中是众所周知的,并且包括化合物和肽,例如聚组氨酸、聚精氨酸、FLAG、谷胱甘肽S-转移酶、麦芽糖结合蛋白(MBP)、纤维素结合结构域(CBD)、 β -Gal、OMNI、硫氧还蛋白、NusA、misine、几丁质结合结构域、角质酶、荧光化合物(例如GFP、YFP、FITC、若丹明、镧系元素)、酶(例如过氧化物酶、荧光素酶、碱性磷酸酶)、化学发光化合物、生物素基、抗体识别的表位例如亮氨酸拉链、c-myc、金属结合结构域和二抗的结合位点。

[0135] 也可以使用本领域已知的方法合成获得多肽。本发明多肽的直接合成可以使用固相合成、在溶液中或其他常规介质中合成,通常使用 α -氨基、 α -羧基和/或氨基酸侧链官能团来进行。例如,在固相合成中,被充分保护的氨基酸残基通过其羧基结合至不溶的聚合物载体,例如聚苯乙烯或聚酰胺交联树脂。固相合成方法包括BOC和FMOC方法,它们分别使用叔丁基羰基和9-芴基甲基氧羰基作为保护基团 α -氨基,这都是本领域技术人员众所周知的(Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual (分子克隆:实验室手册), 2nd edition (第二版), Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, N.Y.; Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology (最新分子生物学实验方法), John Wiley and Sons, New York, 1995)。

[0136] 以下保护基团可以是用于合成本发明多肽的实例:9-芴基甲基氧羰基(Fmoc)、叔

丁基氧羰基 (Boc)、苄氧羰基 (Cbz)、2-氯-3-苄基甲氧基羰基 (Clmoc)、苯(f) 苄-3-基-甲氧基羰基 (Bimoc)、1,1-二氧化代苯并[b]噻吩-2-基-甲氧基羰基 (Bsmoc)、2,2,2-三氯乙氧基羰基 (Troc)、2-(三甲基甲硅烷基)乙氧基羰基 (Teoc)、高苄氧基羰基 (hZ)、1,1-二甲基-2,2,2-三氯乙氧基羰基 (TCBoc)、1-甲基-1(4-联苯基)乙氧基羰基 (Bpoc)、1-(3,5-二叔丁基苯基)-1-甲基乙氧基羰基 (t-Bumeoc)、2-(2'-或4'-吡啶基)乙氧基羰基 (Pyoc)、乙烯基氧羰基 (Voc)、1-异丙基烯丙氧基羰基 (Ipaoc)、3-(吡啶基)烯丙基氧羰基 (Paloc)、对甲氧基苄氧基羰基 (Moz)、对硝基氨基甲酸酯 (PNZ)、4-叠氮基苄氧基羰基 (AZBZ)、苯偶酰 (Bn)、MeO、BnO、甲氧基甲基 (Mom)、甲硫基甲基 (MTM)、苯基二甲基甲硅烷基甲氧基甲基 (SMOM)、叔丁基二甲基甲硅烷基 (TBDMS)、苄氧基甲基 (BOM)、对甲氧基苄氧基甲基 (PMBM)、硝基苄氧基甲基 (NBOM)、p-anisylloxymethyl (p-AOM)、pBuOCH₂O-、4-戊烯基氧甲基 (POM)、2-甲氧基乙氧基甲基 (MEM)、2-(三甲基甲硅烷基)乙氧基甲基 (SEM)、薄荷氧基甲基 (menthoxymethyl, MM)、四氢吡喃基 (tetrahydropyranil, THP)、-OCOC₀ph、乙酰基、ClCH₂CO₂-、-CO₂CH₂CCl₃、2-(三甲基甲硅烷基)乙基 (TMSE)、2(对甲苯磺酰基)乙基 (Tse)。(Greene T.W. Wuts P.G.M., Protective groups in organic synthesis, 3rd ed. (有机合成中的保护基, 第三版), John Wiley & Sons, INC, New York, USA, 1999)。

[0137] 化学反应后,可以通过已知的纯化方法分离和纯化多肽。这种纯化方法的实例可以包括溶剂提取、蒸馏、柱层析、液相层析、重结晶等的组合。

[0138] 在第六方面,本文提供了包含本发明的具有天冬酰胺酶活性的多肽和至少一种载体或药学上可接受的赋形剂的药物组合物。

[0139] 根据本发明组合物的最终形式选择药学上可接受的载体或赋形剂,最终形式可以是胶囊、片剂或用于口服给药的溶液、用于鼻腔给药的溶液、用于肌肉内、静脉内、皮下注射的溶液的形式。

[0140] 药学上可接受的赋形剂、载体或稳定剂在所采用的剂量和浓度下对受体生物无毒,包括缓冲剂,例如磷酸盐、柠檬酸盐和其他有机酸;抗氧化剂,如抗坏血酸和蛋氨酸;防腐剂,例如十八烷基二甲基苄基氯化铵、六甲基氯化铵、苯扎氯铵、苄索氯铵、苯酚、丁醇、苄醇,烷基对羟基苯甲酸酯(alkyl parabens)例如对羟基苯甲酸甲酯和对羟基苯甲酸丙酯,儿茶酚、间苯二酚,环己醇、3-戊醇和间甲酚;蛋白质,例如白蛋白、明胶或免疫球蛋白;氨基酸、单糖、二糖和其他碳水化合物,例如葡萄糖、甘露糖、蔗糖、甘露醇或山梨糖醇;聚合赋形剂,例如聚乙烯吡咯烷酮、Ficoll®、糊精和聚乙二醇;调味剂;增甜剂;抗静电剂;螯合剂,例如EDTA或EGTA;离子释放盐,例如钠;金属配合物;非离子表面活性剂,例如聚山梨酯20和80;脂质,例如磷脂,脂肪酸和类固醇,例如胆固醇。制备各种药物组合物的方法是药学技术领域的专家所熟知的,或者根据本发明会是显而易见的。

[0141] 另外,组合物可包含添加剂以增加给药的便利性、储存能力和抗降解性、生物利用度、半衰期、提供等渗制剂等。用于制备药物组合物的添加剂是本领域众所周知的。

[0142] 在实施方案中,本发明的组合物包含至少一种选自以下的其他化疗剂:烷化剂、抗代谢物、激酶抑制剂、抗纺锤体毒性植物生物碱、细胞毒性/抗肿瘤抗生素、拓扑异构酶抑制剂、光敏剂、抗雌激素和选择性雌激素受体调节剂(SERM)、抗孕酮、雌激素受体下降调节剂(ERD)、雌激素受体拮抗剂、黄体生成素释放激动剂、抗雄激素、芳香酶抑制剂、EGFR抑制剂、VEGF抑制剂、抑制与异常细胞增殖或肿瘤生长相关的基因表达的反义寡核苷酸。可用于

本发明治疗方法的化疗剂包括细胞生长抑制剂和/或细胞毒性剂。

[0143] 本发明的药物组合物必须包含治疗有效量的多肽。对于任何化合物,都可以首先在例如癌细胞等细胞培养试验中,或在通常是小鼠、兔、狗或猪等动物模型中估计治疗有效剂量。动物模型也可以用于确定合适的浓度范围和给药途径。然后,可以使用此类信息来确定人的可用剂量和给药途径。

[0144] 本发明的药物组合物包含0.1%至99%w/w,优选1%至60%w/w,特别是10%至50%w/w的本发明的多肽。

[0145] 根据本发明,所述药物组合物的给药可以通过口服、舌下、鼻、静脉内、肌肉内、腹膜内、关节内、皮下、皮肤、透皮给药途径进行,且不限于这些。在优选的实施方案中,本发明的组合物用于静脉内给药。

[0146] 在第七方面,本发明提供了本发明的多肽在制备用于预防或治疗癌症的药物中的用途。在优选的实施方案中,癌症选自急性髓性白血病(AMI)、慢性淋巴性白血病、卵巢癌、脑癌、前列腺癌、肺腺癌、非霍奇金淋巴瘤和肉瘤。在实施方案中,肉瘤选自淋巴肉瘤、网状肉瘤和黑素肉瘤。在优选的实施方案中,癌症是急性髓性白血病(ALL)。

[0147] 本发明还涉及产生本发明的具有天冬酰胺酶活性的多肽的方法,该方法包括在体内表达系统中插入本发明的多核苷酸、盒或表达载体,并收集由该系统产生的多肽。商业上可利用许多体内表达系统,包括使用合适的宿主细胞,且就其专业技术而言,这些系统的使用是众所周知的。

[0148] 特别合适的表达系统包括用噬菌体、质粒或粘粒重组DNA表达载体转化的微生物,例如细菌;用酵母表达载体转化的酵母;用病毒表达载体(例如杆状病毒)感染的昆虫细胞系统;用病毒表达载体(例如,花椰菜花叶病毒CaMV、烟草花叶病毒TMV)或用细菌表达载体(例如Ti或pBR322质粒)转化的植物细胞系统;或动物细胞系统。也可以采用无细胞翻译系统来产生本发明的多肽。

[0149] 可以使用许多标准实验室手册中描述的方法,将编码本发明多肽的多核苷酸引入宿主细胞,例如Davis et al., Basic Methods in Molecular Biology(分子生物学基本方法)(1986)和Sambrook et al., Molecular Cloning: Laboratory Manual(分子克隆:实验室手册), Cold Spring Harbor, NY (1989)。

[0150] 然后使上述转化或转染的宿主细胞在有助于表达本发明免疫抑制多肽表达的条件下在合适的营养培养基中生长。用于使细胞生长的培养基可以是适合培养宿主细胞的任何常规培养基,例如含有适当补充物的基本培养基或复合培养基。合适的方法可以从商业供应商处获得,或者可以根据公开的配方(例如,在美国典型培养物保藏中心(American Type Culture Collection)目录中)制备。然后通过常规方法从细胞或培养基中回收由细胞产生的本发明的多肽,所述常规方法包括通过离心或过滤从培养基中分离宿主细胞,沉淀上清液的含水蛋白质成分或通过盐例如硫酸铵的方式过滤,通过各种层析程序纯化,例如离子交换层析、排阻层析、疏水相互作用层析、凝胶过滤层析、亲和色层析或取决于所讨论多肽的类型。

[0151] 根据本发明的第八方面,提供了产生本发明的具有天冬酰胺酶活性的多肽的方法,该方法包括:

[0152] (a) 将本发明的多核苷酸转移到宿主细胞中,以获得转化或转染的宿主细胞;

- [0153] (b) 使转化或转染的宿主细胞生长以获得细胞培养物；
- [0154] (c) 在转化或转染的宿主细胞中表达本发明的多核苷酸，以产生多肽；和
- [0155] (e) 从细胞或细胞培养物中分离本发明的多肽。
- [0156] 在本发明的一个具体方面，宿主细胞是原核微生物或真核细胞或真核微生物。在本发明的另一方面，为所述多肽提供了“标签”。
- [0157] 在本发明的第九方面，提供了预防或治疗癌症的方法，其特征在于向需要这种预防或治疗的个体施用治疗有效量的本发明的多肽。
- [0158] 一个人所需的实际量会取决于该个体疾病状况的严重程度、总体健康、年龄、体重和性别和饮食、给药时间和频率，药物组合/多种组合、反应敏感性和对治疗的耐受性/响应。因此，要提供的剂量取决于在进行临床试验之前无法测量的许多因素。然而，本领域技术人员知道如何获得用于不同治疗的合适剂量。
- [0159] 以下实施例仅是说明性的，并且仅应用于更好地理解本发明的开发，然而，不应用于限制所描述的目的。

实施例

[0160] 实施例1:克隆

[0161] 使用在GenBank上存储的序列(GI:20799289)，设计具有NdeI和XhoI酶限制位点的ASRGL1的合成基因。GenScript(美国新泽西州)在pUC57载体(ASRGL1-pUC57)中进行了基因合成和克隆。

[0162] 1.1 寡核苷酸绘图

[0163] 由于目标区域位于序列的开头，因此在ASRGL1基因的扩增步骤中插入G10E突变。表1描述了用于扩增编码人野生L-天冬酰胺酶(ASRGL1)和突变的人L-天冬酰胺酶(ASRGL1_G10E)的基因的起始寡核苷酸。

[0164] 表1.用于扩增人野生L-天冬酰胺酶(ASRGL1)和突变(ASRGL1_G10E)的寡核苷酸序列及其相应限制位点。

寡核苷酸	序列(5' - 3')	限制位点	SEQ ID NO:
[0165] ASRGL1 正向	CATATGAATCCCATCGTAGTGGTC	Ndel	SEQ ID NO: 9
ASRGL1_G10E 正向	CATATGAATCCCATCGTAGTGGTCCACG GCGAAGGAGCC	Ndel	SEQ ID NO: 10
ASRGL1 反向	CTCGAGTTAGGGAAGGTCGGTGATAGT	XhoI	SEQ ID NO: 11

[0166] 注意:ASRGL1反向起始子用于扩增野生和突变构建体。ASRGL1_G10E正向起始子中带下划线的密码子对应于G10E突变。

[0167] 1.2 PCR基因扩增

[0168] 通过聚合酶链反应(PCR)(MULLIS et al.,1986)，使用6.75ng DNA,2 μL 10X PCR缓冲液(Invitrogen),1.6μL 10mM dNTPs(Invitrogen),5μM 每对寡核苷酸,0.8μL 50mM MgCl₂,1μL Taq DNA聚合物,总体积20 μL,由合成基因ASRGL1-pUC57扩增ASRGL1和ASRGL1_G10E构建体。该程序在94°C下开始,持续5分钟,然后进行以下30个循环:94°C/30s, X°C/30s,72°C/60s,并在72°C下持续15分钟完成。表2显示了每个反应中所用的环温度(X)。

[0169] 表2.PCR反应的环温度

[0170]	构建体	环温度(X ^o C)
	ASRGL1	58,9
	ASRGL1_G10E	86,7

[0171] 1.3 琼脂糖凝胶电泳

[0172] DNA电泳在1%琼脂糖凝胶上进行。使用1Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen)、DNA Ladder (Invitrogen) 作为分子量标准品和MassRuler DNA Ladder Mix (Thermo Scientific)。电泳在90V下进行1小时。图3显示了这些分子量标准品, A) 是所示的一种, 即1Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen); B) O' GeneRuler 1kb Plus DNA Ladder (Thermo Scientific) 和C) MassRuler DNA Ladder Mix (Thermo Scientific)。

[0173] 通过PCR扩增ASRGL1和ASRGL1_G10E编码序列已扩增出约950bp 大小的序列, 该序列对应于ASRGL1基因的大小 (944bp)。图4显示了 ASRGL1和ASRGL1_G10E序列的PCR产物的电泳图谱。在A中, ASRGL1 (944bp) (MW:1Kb Plus DNA Ladder, Invitrogen), 在B中, ASRGL1_G10E (944bp) (M:O' GeneRuler 1kb Plus DNA Ladder, Thermo Scientific)。

[0174] 1.4 从琼脂糖凝胶中提取DNA

[0175] PCR产物的琼脂糖凝胶电泳后, 使用低熔点琼脂糖电泳切出所需的核苷酸序列条带并纯化。在65^oC下孵育15分钟并随后在室温下添加苯酚后, 将DNA与琼脂糖分离。

[0176] 1.5 连接在克隆载体中

[0177] 使用3 μ L纯化的凝胶样品、5 μ L 2X Binding Plug (Promega)、1 μ L pGEM[®]-T Easy (Promega) 和1 μ L T4 DNA Ligase (Promega) 连接pGEM[®]-T Easy (Promega) 载体插入片段 (insert)。孵育在4^oC下进行16小时。

[0178] 1.6 钙感受态细菌的制备

[0179] 为了制备钙感受态细菌, 采用Sambrook等人 (Sambrook et al. (2001)) 描述对的CaCl₂方法。用5mL含有适当抗生素的Luria-Bertani (LB) 培养基 (10.0g/L Bacto-triptone、5.0g/L的NaCl和5.0g/L的酵母提取物) 接种E. coli DH5 α 菌落。在200rpm的恒定搅拌下, 将培养物在37^oC下孵育18小时。将体积为1mL的该收获物转移至250mL的LB培养基中。将细胞在相同的搅拌条件下于37^oC孵育, 直至达到指数生长期 (D.O.600为0.6)。

[0180] 将培养物在4^oC下以2700x g离心10分钟, 然后将细胞悬浮于30mL转化缓冲液 (Transformation Buffer) I中, 并在冰上保持15分钟。将悬浮液在4^oC下以580x g离心15分钟, 将细胞悬浮在10mL处理缓冲液 (Processing Buffer) II中, 在干冰中保持2小时, 然后分装并保存在-70^oC下。

[0181] 1.7 钙感受态细菌的转化

[0182] 重组或结合反应物与70 μ L E.coli钙感受态悬浮液在冰上孵育30分钟。在这段时间之后, 通过在42^oC下孵育2分钟, 然后在冰上孵育2分钟, 然后添加1mL LB培养基以在37^oC在200rpm的恒定搅拌下孵育1小时, 使细胞遭受热冲击。将100 μ L等分试样分装在用于转化细菌的一半LB-琼脂中, 该LB-琼脂根据载体赋予的抗性添加了抗生素 (选择性培养基), 并在37^oC下孵育16小时。

[0183] 特别是在pGEM-T Easy克隆的情况下, 向LB-琼脂培养基添加100 μ g/mL氨苄青霉素、0.04mg/mL X-gal (5-溴-4-氯-3-吡啶基- β -D-吡喃半乳糖苷) 和0.4mM异丙基- β -D-硫代吡喃半乳糖苷 (IPTG) 诱导剂。在这种情况下, 由于存在或不存在 β -半乳糖苷酶表达, 通过对

菌落进行颜色分析来选择阳性克隆。这种酶的表达由IPTG诱导,降解X-gal底物,从而产生蓝色底物。如果将该片段并入载体中,则酶 β -半乳糖苷酶不表达,菌落保持白色,有助于鉴定阳性克隆,随后对其进行测序。

[0184] 1.8 小规模质粒DNA提取

[0185] 提取阳性克隆的质粒DNA。为此,选择菌落,并在5mL LB培养基中在200rpm的搅拌下于37°C孵育16小时。离心细菌细胞并将其悬浮在250 μ L的缓冲液中,该缓冲液含有50mM葡萄糖、25mM Tris HCl pH 8.0和10 mM EDTA pH 8.0。已添加250 μ L含NaOH 0.2N、1%SDS的缓冲液,然后搅拌使细胞破裂,并立即添加3M乙酸钾缓冲液、11.5% (v/v) 冰醋酸。离心除去细胞残留物后,通过用苯酚:氯仿(1:1)孵育分离含有核酸的级分。通过添加乙醇使质粒沉淀,然后将其悬浮在10mM Tris-HCl pH 8.5中。

[0186] 1.9 质粒的选择

[0187] 通过分析消化测定法进行初步选择,其中将先前提取的载体与侧翼为目的区域的限制酶一起孵育。用于ASRGL1和ASRGL1_G10E基因的酶是FastDigest™ NdeI和XhoI (Thermo Scientific)酶,并带有制造商指定的缓冲液和试剂浓度。为了选择质粒,通过琼脂糖凝胶电泳评估反应。

[0188] 通过Carlos Chagas Institute的测序服务-FIOCRUZ/PR对所选择的质粒进行测序。使用的顺序是Single Extension(单扩展)。在Macrogen(韩国)制备样品后,将样品用乙醇沉淀,然后使用Automatic Sequencer 3730xl进行测序。结果证明了这些克隆中所含的人L-天冬酰胺酶的身份。

[0189] 图5显示了在pGEM-T Easy中克隆ASRGL1和ASRGL1_G10E PCR产物后分析消化的电泳图谱。在A中,ASRGL1_pGEM-T Easy(944pb的插入片段)(M:1Kb Plus DNA Ladder, Invitrogen);以及在B中,ASRGL1_G10E_pGEM-T Easy(944pb的插入片段)(M:MassRuler DNA Ladder Mix,Thermo Scientific)。

[0190] 1.10 将插入片段连接到表达和转化的载体

[0191] 在确认送去测序的质粒构建体(含有插入片段的重组克隆载体)的身份后,进行预消化,其中根据制造商的指示将pGEM-T Easy载体与酶 FastDigest™ NdeI和XhoI (Thermo Scientific)一起孵育。琼脂糖凝胶电泳之后,通过QIAquick Gel Extraction Kit Protocol (QIAGEN)纯化插入片段。

[0192] 将纯化的插入片段亚克隆到表达载体pET28a-TEV中。2U T4 DNA连接酶(Invitrogen),2 μ L 5X DNA连接酶缓冲液(Invitrogen),插入片段:质粒之比为1:1.5。最终体积为10 μ L,反应在4°C下孵育16小时。pET28a-TEV 载体先前已用相同的酶消化。将插入片段连接到载体后,遵照1.7节中所述的热冲击转化方案,在菌株DH5 α ({F- Φ 80lacZ Δ M15 Δ (lacZYA-argF) U169 recA1 endA1 hsdR17(rk-,mk+) supE44 λ -thi-1gyrA96 relA1 phoA})中进行转化。通过分析消化,然后进行测序,对含有插入片段的表达载体进行确认。

[0193] 图6显示了亚克隆到pET28a-TEV表达载体中后分析消化的电泳图谱。在A中,ASRGL1_pET28a-TEV(944bp的插入片段),在B中,ASRGL1_G10E_pET28a-TEV(944bp的插入片段)。

[0194] 实施例2:表达测试

[0195] 使用ASRGL1-pET28a-TEV和ASRGL1_G10E-pET28a-TEV表达载体转化E.coli BL21 Star (DE3; {F-ompT hsdSB (rB-,mB-) gal dcmrne131 (DE3)} 和/或E.coli C43 (DE3; {F-ompT hsdSB (rB-,mB-) gal dcm (DE3)}) 菌株,并因此在37、30和20℃的温度下测试表达。

[0196] 基于T7启动子(例如pET28a-TEV)调节的载体显示了BL21 Star (DE3) 菌株的高表达水平,Star (DE3) 菌株由Cantor等人(Cantor et al 2009)衍生自用于ASRGL1表达的菌株。这是因为它们在编码酶RNase E(参与mRNA降解的内切核酸酶)的rne131基因中具有突变。该内切核酸酶基因中的突变使得对转录的mRNA的稳定性更大,因此,目的蛋白质的表达增加 (GRUNBERG-MANAGO et al,1999)。

[0197] 还测试了E.coli C43 (DE3) 菌株与Nomme等人(Nomme et al,2012)描述的方案的相容性。该菌株是有效表达所有生物体(包括哺乳动物)的有毒蛋白质的菌株。T7 RNAP的活性水平通过突变而降低,从而减少了与许多有毒蛋白的过表达相关的细胞死亡(DUMON-SEGNOVERT et al,2004)。

[0198] 使一个分离的菌落在5mL含卡那霉素(25μg/ml)的LB培养基中,在200rpm的搅拌下,在37℃下生长16小时。在这段时间之后,进行稀释(1:100),使培养物在37℃下生长,直至达到对数生长期(D.O.600 0.8)。此时,分离等分试样,并用0.5mM异丙基-β-D-硫代吡喃半乳糖苷(IPTG)诱导剂诱导培养物。在37℃、30℃和20℃下继续孵育4小时。为了测试20℃的温度,仅当D.O.600达到1.2时,才用IPTG诱导培养物。

[0199] 通过在4℃下以6,000x g离心15分钟来收集细胞,并将其重悬于1mL 缓冲液A(TrisHCl 50mM pH 7.4,NaCl 300mM)中。与溶菌酶(10μg/mL)一起孵育30分钟后,以30秒的间隔提供2次15秒的脉冲(Ultrasonic Processor 500,Cole Parmer),通过超声处理进行裂解。在4℃以20,000x g离心30分钟后,将颗粒和上清液分离,分别指代不溶性级分和可溶性级分。将颗粒重悬于1mL添加了8M尿素的缓冲液A中。对于聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-Page),每通道取5μL蛋白样品缓冲液4X至15μL等分试样(总提取物,以及离心后的沉淀和上清液,分别对应于不溶性和可溶性级分),在95℃下孵育5分钟,以应用于传统方法制备的凝胶(LAEMMLI,1970)。将制备的样品应用于分离凝胶(13%的双丙烯酰胺)和浓缩器(5%双丙烯酰胺)中。使用的分子量标记是Precision Plus Protein™ Unstained Standards (BioRad)。

[0200] 实施例3:自体加工测试

[0201] 3.1 镍树脂的表达和纯化

[0202] 为了评估重组蛋白的自切割效率,在E.coli BL21 Star (DE3; {F-ompT hsdSB (rB-,mB-) gal dcmrne131 (DE3)}) 中进行表达。将分离的菌落接种于5mL含有25μg/mL卡那霉素(kanamycin)的LB培养基中。在37℃和200 rpm下生长16小时后,在500mL添加了25μg/mL卡那霉素(kanamycin)的LB培养基中进行1:100稀释。收获物生长到指数生长期(D.O.600 0.8)发生于37℃下以200rpm搅拌的条件下。然后添加0.5mM IPTG诱导剂,并在相同条件下再继续生长4小时。

[0203] 将培养物在4℃以6,000×g离心15分钟,并悬浮于添加了10mg/ml溶菌酶的缓冲液A中。在冰上孵育30分钟后,以30秒脉冲和60秒间隔通过8轮超声处理进行裂解。通过在4℃下以20,000×g离心30分钟将颗粒物和上清液分别分离为不溶性级分和可溶性级分。

[0204] 通过以下步骤在镍树脂(Ni-NTA Superflow,QIAGEN)中纯化可溶性级分:将可溶

性级分与镍树脂在搅拌的条件下孵育1小时；离心并去除上清液（称为流穿（Flow through），因为它对应于未结合到层析柱的级分）；通过与添加了50mM咪唑的缓冲液A一起孵育进行洗涤；离心并除去上清液（用50mM咪唑洗脱）；通过与添加了100mM咪唑的缓冲液A一起孵育进行洗涤；离心并除去上清液（用100mM咪唑洗脱），用缓冲液B（TrisHCl 50mM pH 7.4, NaCl 300mM, 咪唑500mM）洗脱；离心并除去上清液（用500 mM咪唑洗脱）。通过SDS-Page 13%电泳评估溢流和洗脱级分。

[0205] 3.2 蛋白质印迹

[0206] 通过在蛋白质印迹技术中可视化对应于每个状态的条带来验证自体加工的效率（TOWBIN et al., 1979）。首先，使样品进行13%的SDS-Page凝胶电泳。电泳后，在Semidry系统中将蛋白质在20V下转移到事先用100%甲醇敏化的PVDF膜上，持续50分钟。一旦完成转移，将膜用Ponceau溶液染色，以检查转移的质量，然后用水装饰，以在室温下用封闭溶液孵育30分钟。在这段时间之后，用PBS-TWEEN 20缓冲液进行3次5分钟的洗涤。

[0207] 然后将含有蛋白质的膜在含有1:3000稀释的一抗（anti-his抗体）的PBS-TWEEN 20缓冲液（PBS-Tween 20 0.1%）中孵育。该孵育在4℃、搅拌下进行2小时。在如上所述的洗涤步骤之后，将膜与以1:10,000稀释的二抗（过氧化物酶缀合的抗小鼠抗体，Sigma）在PBS缓冲液-TWEEN 20中一起在4℃、搅拌下孵育1小时。

[0208] 然后再次洗涤膜，以进行化学发光。根据制造商的指示，将1:1的鲁米诺和过氧化物酶溶液（SuperSignal™ West Pico Chemiluminescent Substrate, Thermo Scientific）分布在膜上，并通过在L-Pix Chemi Express照片记录仪（photodocumenter）（Loccus）上曝光5-20分钟，通过L-Pix Image Software展现。

[0209] 实施例4：重组蛋白的表达和纯化

[0210] 4.1 表达

[0211] 按如下进行ASRGL1和ASRGL1_G10E在E.coli BL21 Star (DE3; {F- ompT hsdSB (rB-, mB-) gal dcmrne131 (DE3)}) 中的大规模表达：在5mL含有卡那霉素（25μg/ml）的LB培养基中，在37℃下以200rpm的搅拌使一个分离的菌落生长16小时。在这段时间之后，进行稀释（1:100），使培养物在37℃下生长，直至达到对数生长期（1:100）。此时，分离等分试样，并用0.5mM异丙基-β-D-硫代吡喃半乳糖苷（IPTG）诱导剂诱导培养。在37℃下继续孵育4小时。通过在4℃下以6,000×g离心15分钟来收集细胞。

[0212] 4.2 样品制备

[0213] 将颗粒重悬于C缓冲液（TrisHCl 50mM pH 7.4, NaCl 300mM）中后，在微流化器（M-110L Microfluidizer®）, Microfluidics）中于80psi的压力下裂解8-12代（passage），然后在4℃下以20,000xg离心30分钟。保留可溶性级分用于纯化。

[0214] 4.3 ASRGL1纯化

[0215] 4.3.1 亲和层析

[0216] 表达载体pET28a-TEV使重组蛋白表达融合到组氨酸尾上，这使得可以使用含有固定的固相镍的层析柱进行纯化过程，因为组氨酸尾对该金属具有亲和性。对于该层析方法，缓冲液C（TrisHCl 50mM pH 7.4, NaCl 300mM）和D（TrisHCl 50mM pH 7.4, NaCl 300mM, 咪唑1M）。

[0217] 在Äkta系统（Äkta Pure M25或Äkta Purifier UPC 100, GE Healthcare）FPLC

(Fast Performance Liquid Chromatography (快速高效液相层析)), Amersham Bioscience) 的 HisTrap HP 1mL 层析柱 (GE Healthcare) 中进行镍柱亲和色谱。首先,在 C 缓冲液 (TrisHCl 50mM pH 7.4, NaCl 300mM) 中使层析柱平衡。然后注入样品,并用 C 缓冲液冲洗层析柱以除去未结合的蛋白质。在纯化过程中,因为咪唑与组氨酸竞争与固定于层析柱中的镍结合,所以使用 0-100% 的 D 缓冲液 (TrisHCl 50mM pH 7.4, NaCl 300mM, 咪唑 1M) 梯度洗脱蛋白质。根据吸收信号的幅度,保留 D 缓冲液梯度,以提高层析分离效率。以每分钟 1mL 的流量收集层析的级分,并通过 SDS- Page 分析。将含有最纯形式的目的蛋白质的级分合并,并使用 Amicon Ultra 10 (10000MWC0) 过滤器, Millipore) 以 3,000x g 离心浓缩。

[0218] 4.3.2 离子交换层析

[0219] 为了获得纯度更高的 ASRGL1 样品,需要 HiTrap Q FF (GE Healthcare) 柱离子交换层析。为此,将样品在 E 缓冲液 (TrisHCl 50mM pH 7.4) 中稀释 10 倍以降低盐浓度。选择缓冲液 E 的 pH 7.4 是考虑到树脂的正电荷,并注意 ASRGL1 的理论 pI 等于 6.27 (Expasy ProtParam 软件),此时蛋白质会发现自身带负电荷 (阴离子交换),从而可与层析柱有效相互作用。

[0220] 在 ÄktaFPLC 系统中,在 E 缓冲液中使层析柱平衡,注入后,用 E 缓冲液洗涤样品。通过 0-100% 的 F 缓冲液 (TrisHCl 50mM pH 7.4, NaCl 1M) 梯度在 20 倍柱体积中进行洗脱,其高盐浓度促进了蛋白质与层析柱的解偶联。再次,根据吸光度在梯度中使用保留。合并含有最纯形式的目的蛋白质的级分,并使用 Amicon Ultra 10 过滤器 (10000MWC0, Millipore) 通过以 3,000x g 离心进行浓缩。

[0221] 4.3.3 过滤凝胶层析

[0222] 为了完全去除污染物,使用 ÄktaFPLC 系统中的 Superdex 75 10/300GL (GE Healthcare) 层析柱,对在先前层析步骤中浓缩的 ASRGL1 级分进行凝胶层析过滤。所施加的样品体积在 320-450µL 之间变化,并且,根据在离子交换层析中观察到的盐浓度,在 1.5 倍柱体积的 G 缓冲液 (TrisHCl 50mM pH 7.4, NaCl 180mM) 或 H (TrisHCl 50mM pH 7.4, NaCl 470mM) 中进行野生蛋白的洗脱,流速为每分钟 0.5mL。过滤凝胶层析是大分子分析方法,包括根据生物分子的大小和形状对其进行分离。该方法中的层析柱含有具有确定的孔径交联的聚合物。较大的分子会比较小的分子迁移更快,因为它们不能穿透树脂孔内部,从而从层析柱直接洗脱。较小的分子穿过层析柱的孔进入,并花费更长的时间穿过孔,因此其洗脱晚于较大的分子。

[0223] 4.4 ASRGL1_G10E 纯化

[0224] 4.1 亲和层析

[0225] 在 ÄktaFPLC 系统中的 HisTrap HP 1mL 层析柱 (GE Healthcare) 中进行 ASRGL1_G10E 亲和层析。首先,使该层析柱在 C 缓冲液中平衡。然后注入样品,并用 C 缓冲液 (TrisHCl 50mM pH 7.4, NaCl 300mM) 洗涤层析柱,以除去未结合的蛋白质。进行了两次洗脱步骤,第一次以 10 倍柱体积使用 0-15% 的 D 缓冲液 (TrisHCl 50mM pH 7.4, NaCl 300mM, 咪唑 1M) 梯度进行,第二步使用 15-100% 的 D 缓冲液,以 10 倍柱体积进行。

[0226] 将目的级分合并,并浓缩,但是因为它们显示出一致的污染物存在,所以使用相同的方法进行了第二次亲和层析。仅更改了第一个洗脱步骤,其中增加至 20 倍柱体积。通过 SDS-Page 和蛋白质印迹分析所得级分,然后通过离心浓缩。

[0227] 4.2 离子交换层析

[0228] ASRGL1_G10E的离子交换色谱表现出与用ASRGL1进行的层析相同的阴离子特性，因为在E的pH 7.4时，ASRGL1_G10E缓冲液(pI 5.81)带负电。所使用的方法与第3.8.3.2节中所述的方法相同，包括样品制备，供应用于HiTrap Q FF层析柱(GE Healthcare)。将来自该层析的级分分别浓缩，以用于实施例5和6所述的测试中。

[0229] 实施例5:酶促测定

[0230] 通过AHA测定(FRAER;BURREL,1955;VERMA,2005;LI et al.,2012)评估了酶的动力学活性。

[0231] 与酶ASRGL1和ASRGL1_G10E的反应用0.004mg的每一级分、10 μ L的AHA溶液(AHA 10mM)和足够量的反应缓冲液进行，总体积为200 μ L。将反应在37 $^{\circ}$ C下温孵育10分钟，然后添加TCA溶液以终止反应。添加1000 μ L Oxin溶液后，将样品加热至95 $^{\circ}$ C，持续1分钟，然后在4 $^{\circ}$ C冷却10分钟，以随后在705nm下读数(Synergy HI Hybrid Reader,BioTek)。

[0232] 通过以下方程式将获得的吸光度值转换为在反应中生成的天冬氨酸的 μ mol数：

$$[0233] \text{反应中天冬氨酸的}\mu\text{mol数} = \left(\frac{DO_{705}}{1,77 \cdot 10^4} \right) \cdot 0,26 \cdot 10^6$$

[0234] 然后，通过以下方程式将反应中生成的天冬氨酸的量转化为实验的酶活性(每mL酶产生的天冬氨酸的 μ mol数)：

$$[0235] \text{酶活性实验} = \frac{\text{反应中天冬氨酸的}\mu\text{mol数}}{\text{酶体积} \cdot \text{反应时间} \cdot \text{反应总体积}}$$

[0236] 为了计算每一级分的k_{cat}值，用反应速度除以反应中酶的总浓度，其中通过将反应中生成的天冬氨酸的量(以 μ mol为单位)除以总反应时间(以秒为单位)来计算速度。

[0237] ASRGL1和ASRGL1_G10E级分的AHA水解动力学参数如下表3所示。

[0238] 表3:ASRGL1和ASRGL1_G10E级分的AHA水解动力学参数。实验酶活性的值可以在每ml酶产生的天冬氨酸的 μ mol数处找到。

样品	Kcat (s ⁻¹)	实验酶活性
ASRGL1_inactive_a	0,1 \pm 0,05	5,87 \pm 2,94
ASRGL1_inactive_b	0,13 \pm 0,04	7,83 \pm 2,61
ASRGL1_active	0,32 \pm 0,12	9,55 \pm 3,67
ASRGL1_G10E_active_a	4,73 \pm 0,13	143,95 \pm 3,92
ASRGL1_G10E_active_b	3,35 \pm 0,07	101,85 \pm 2,28

[0240] 实施例6:差示扫描荧光法

[0241] 在最后一个层析步骤的洗脱缓冲液中，将野生蛋白和突变蛋白的每一级分稀释至2 μ M，然后分配到96孔(Axygen)PCR微孔板中。已向每个孔中添加了200X SYPRO Orange(SYPRO®Orange蛋白凝胶染料,Life Technologies)，最终体积为25 μ L。每一级分一式三份进行测试。用粘性密封垫(Adhesive PCR Film,Thermo Scientific)密封板以防止任何蒸发。实验在Real-Time 7500PCR机(Applied Biosystems)上进行。

[0242] 通过OriginProB软件确定每一级分的T_M。为此，通过Boltzmann的S型回归模型调整了数据，其中拐点代表T_M。

[0243] 参考文献

- [0244] 1. DOLOWY, W.C., HEMNISON, D., CORNET, J., SELLIN, H. Toxic and antineoplastic effects of L-asparaginase. *Cancer* 19, 1813-1819 (1966).
- [0245] 2. Hill, J.M. et al. L-asparaginase therapy for leukemia and other malignant neoplasms. *JAMA J. Am. Med. Assoc.* 202, 882-8 (1967).
- [0246] 3. Pejovic, T. & Schwartz, P.E. Leukemias. *Clin. Obstet. Gynecol.* 45, 866-878 (2002).
- [0247] 4. INCA. Instituto Nacional de **Câncer** José Alencar Gomes da Silva. Estimativa 2016: Incidência de **Câncer** no Brasil. Ministério da Saúde (2015). Available at: <http://www.inca.gov.br>. (Accessed: 1st July 2016)
- [0248] 5. Rose-Inman, H. & Kuehl, D. Acute leukemia. *Emerg. Med. Clin. North Am.* 32, 579-96 (2014).
- [0249] 6. Avramis, V.I. Asparaginases: Biochemical pharmacology and modes of drug resistance. *Anticancer Res.* 32, 2423-2437 (2012).
- [0250] 7. Instituto Nacional de Cancer José Alencar Gomes da Silva. INCA-Instituto Nacional de **Câncer**-Estimativa 2016. Ministério da Saúde Instituto Nacional de Cancer José Alencar Gomes da Silva (2016). doi: 978-85-7318-283-5
- [0251] 8. Moghrabi, A. et al. Results of the Dana-Farber Cancer Institute ALL Consortium Protocol 95-01 for children with acute lymphoblastic leukemia. *Blood J.* 109, 896-905 (2007).
- [0252] 9. Carroll, W.L. et al. Pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Hematol. Am Soc Hematol Educ Program* 102-131 (2003). doi: 10.1182/asheducation-2010.1.363
- [0253] 10. Cooper, S.L. & Brown, P.A. Treatment of pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Pediatr. Clin. North Am.* 62, 61-73 (2015).
- [0254] 11. Hunger, S.P. et al. Improved survival for children and adolescents with acute lymphoblastic leukemia between 1990 and 2005: A report from the children's oncology group. *J. Clin. Oncol.* 30, 1663-1669 (2012).
- [0255] 12. American Cancer Society. Cancer Facts & Figures 2014. Cancer Facts Fig. 1-72 (2014). doi: 10.1177/0300985809357753
- [0256] 13. Richards, N.G.J. & Kilberg, M.S. Asparagine synthetase chemotherapy. *Annu. Rev. Biochem.* 75, 629-54 (2006).
- [0257] 14. Li, B.S. et al. The downregulation of asparagine synthetase expression can increase the sensitivity of cells resistant to L-asparaginase. *Leukemia* 20, 2199-201 (2006).
- [0258] 15. Song, P. et al. Asparaginase induces apoptosis and cytoprotective autophagy in chronic myeloid leukemia cells. *Oncotarget* 6, 3861-73 (2015).
- [0259] 16. Li, B.S. et al. The downregulation of asparagine synthetase expression can increase the sensitivity of cells resistant to L-asparaginase. *Leukemia* 20, 2199-2201 (2006).
- [0260] 17. Pieters, R., Hunger, S.P., Boos, J., Rizzari, C. & Pui, C. L-asparaginase

treatment in acute lymphoblastic leukemia:a focus on Erwinia asparaginase.Cancer 117,238- 249(2011) .

[0261] 18.Ueno,T.et al.Cell cycle arrest and apoptosis of leukemia cells induced by L- asparaginase.Leukemia 11,1858-61(1997) .

[0262] 19.Yu,M.et al.L-asparaginase inhibits invasive and angiogenic activity and induces autophagy in ovarian cancer.16,2369-2378(2012) .

[0263] 20.Willems,L.et al.Inhibiting glutamine uptake represents an attractive new strategy for treating acute myeloid leukemia Inhibiting glutamine uptake represents an attractive new strategy for treating acute myeloid leukemia.122,3521-3532 (2013) .

[0264] 21.Zhang,B.et al.Targeting asparagine and autophagy for pulmonary adenocarcinoma therapy.Appl.Microbiol.Biotechnol.100,9145-9161(2016) .

[0265] 22.Lorenzi,P.L.,Claerhout,S.,Mills,G.B.&Weinstein,J.N.A curated census of autophagy-modulating proteins and small molecules.Autophagy 10, 1316-1326 (2014) .

[0266] 23.Panosyan,E.H.et al.Asparaginase depletion potentiates the cytotoxic effect of chemotherapy against brain tumors.Mol Cancer Res 12,694-702(2014) .

[0267] 24.Sircar,K.et al.Integrative molecular profiling reveals asparagine synthetase is a target in castration-resistant prostate cancer.Am.J.Pathol.180,895-903(2012) .

[0268] 25.Kobrinisky,N.L.et al.Outcomes of Treatment of Children and Adolescents With Recurrent Non-Hodgkin's Lymphoma and Hodgkin's Chemotherapy, and Transplantation:Children's Cancer Group Study CCG-5912.J.Clin.Oncol.19, 2390-2396(2001) .

[0269] 26.Bansal,S.et al.Hyperthermophilic asparaginase mutants with enhanced substrate affinity and antineoplastic activity:structural insights on their mechanism of action. FASEB J.26,1161-1171(2012) .

[0270] 27.Roth,G.et al.L-ASPARAGINASE II PRODUCTION IN Escherichia coli FED-BATCH CULTURES.Braz.J.Chem.Eng.30,245-256(2013) .

[0271] 28.Rytting,M.E.Role of L-asparaginase in acute lymphoblastic leukemia:focus on adult patients.Blood Lymphat.Cancer Targets Ther.2,117-124 (2012) .

[0272] 29.Müller,H.J.&Boos,J.Use of L-asparaginase in childhood ALL. Oncology/Hematology 28,97-113(1998) .

[0273] 30.Patel,N.et al.A dyad of lymphoblastic lysosomal cysteine proteases degrades the antileukemic drug L-asparaginase.J.Clin.Invest.119,1964-1973 (2009) .

[0274] 31.Avramis,V.I.&Tiwari,P.N.Asparaginase(native ASNase or pegylated

- ASNase) in the treatment of acute lymphoblastic leukemia. *Int. J. Nanomedicine* 1, 241-254 (2006).
- [0275] 32. Oinonen, C., Tikkanen, R., Rouvinen, J. & Peltonen, L. Three-dimensional structure of human lysosomal aspartylglucosaminidase. *Nat. Struct. Biol.* 2, 1102-1108 (1995).
- [0276] 33. Sugimoto, H., Odani, S. & Yamashita, S. Cloning and expression of cDNA encoding rat liver 60-kDa lysophospholipase containing an asparaginase-like region and ankyrin repeat. *J. Biol. Chem.* 273, 12536-12542 (1998).
- [0277] 34. Cantor, J. R., Stone, E. M., Chantranupong, L. & Georgiou, G. The Human Asparaginase-Like Protein 1 hASRGL1 is an Ntn-Hydrolase with β -aspartyl Peptidase Activity. *Biochemistry (Mosc.)* 48, 11025-11031 (2009).
- [0278] 35. Böhme, L. et al. Isoaspartate residues dramatically influence substrate recognition and turnover by proteases. *Biol. Chem.* 389, 1043-1053 (2008).
- [0279] 36. Michalska, K. & Jaskólski, M. Structural aspects of l-asparaginases, their friends and relations. *Acta Biochim. Pol.* 53, 627-640 (2006).
- [0280] 37. Dieterich, D. C. et al. Gliap) a novel untypical L-asparaginase localized to rat brain astrocytes. 1117-1125 (2003). doi:10.1046/j.1471-4159.2003.01766.x
- [0281] 38. Evtimova, V., Zeillinger, R., Kaul, S. & Weidle, U. H. Identification of CRASH, a gene deregulated in gynecological tumors. *Int. J. Oncol.* 24, 33-41 (2004).
- [0282] 39. Brannigan, J. A. et al. A protein catalytic framework with an N-terminal nucleophile is capable of self-activation. *Nature* 378, 416-419 (1995).
- [0283] 40. Bush, L. A. N. N. et al. A Novel Asparaginase-Like Protein Is a Sperm Autoantigen in Rats. 247, 233-247 (2002).
- [0284] 41. Nomme, J., Su, Y., Konrad, M. & Lavie, A. Structures of apo and product-bound human L-asparaginase: Insights into the mechanism of autoproteolysis and substrate hydrolysis. *Biochemistry (Mosc.)* 51, 6816-6826 (2012).
- [0285] 42. Li, W. et al. Intramolecular Cleavage of the hASRGL1 Homodimer Occurs in Two Stages. *Biochemistry (Mosc.)* 55, 960-969 (2016).
- [0286] 43. Nomme, J., Su, Y. & Lavie, A. Elucidation of the specific function of the conserved threonine triad responsible for human l-Asparaginase autocleavage and substrate hydrolysis. *J. Mol. Biol.* 426, 2471-2485 (2014).
- [0287] 44. Su, Y. et al. Free glycine accelerates the autoproteolytic activation of human asparaginase. *Chem. Biol.* 20, 533-540 (2013).
- [0288] 45. Li, W., Cantor, J. R., Yogesha, S. D., Yang, S. & Chantranupong, L. Uncoupling Intramolecular Processing and Substrate Hydrolysis in the N-terminal Nucleophile Hydrolase hASRGL1 by Circular Permutation. *ACS Chem. Biol.* 7, 1840-1847 (2012).

[0289] 46.Karamitros,C.S.&Konrad,M.Bacterial co-expression of the alpha and beta protomers of human l-asparaginase-3:Achieving essential N-terminal exposure of a catalytically critical threonine located in the beta-subunit.Protein Expr.Purif.93, 1-10 (2014) .

[0290] 47.Schalk,A.M.&Lavie,A.Structural and Kinetic Characterization of Guinea Pig. Biochemistry (Mosc.) 53,2318-2328 (2014) .

序列表

<110> 奥斯瓦道·克鲁兹基金会

<120> 具有天冬酰胺酶活性的多肽、表达盒、表达载体、宿主细胞、药物组合物,产生具有天冬酰胺酶活性的多肽的方法,预防或治疗癌症的方法,以及多肽的用途

<130> Case 159

<160> 11

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 308

<212> PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 1

```

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

```

Ala Asp Asn Asp Ile Gly Ala Val Ser Thr Thr Gly His Gly Glu Ser
 210 215 220
 Ile Leu Lys Val Asn Leu Ala Arg Leu Thr Leu Phe His Ile Glu Gln
 225 230 235 240
 Gly Lys Thr Val Glu Glu Ala Ala Asp Leu Ser Leu Gly Tyr Met Lys
 245 250 255
 Ser Arg Val Lys Gly Leu Gly Gly Leu Ile Val Val Ser Lys Thr Gly
 260 265 270
 Asp Trp Val Ala Lys Trp Thr Ser Thr Ser Met Pro Trp Ala Ala Ala
 275 280 285
 Lys Asp Gly Lys Leu His Phe Gly Ile Asp Pro Asp Asp Thr Thr Ile
 290 295 300
 Thr Asp Leu Pro
 305

<210> 2

<211> 1332

<212> DNA

<213> 智人

<400> 2

cggggagcgg cggtaccggg cggctgcggg gctggctcga cccagcttga ggtctcggcg 60
 tccgcgtcct gcggtgccct gggatccgcc gacatgaatc ccatcgtagt ggtccacggc 120
 ggccggagccg gtcccatctc caaggatcgg aaggagcgag tgcaccaggg catggtcaga 180
 gccgccaccg tgggctacgg catcctccgg gagggcgga gcgccgtgga tgccgtagag 240
 ggagctgtcg tcgccctgga agacgatccc gagttcaacg caggttgtgg gtctgtcttg 300
 aacacaaatg gtgaggttga aatggatgct agtatcatgg atggaaaaga cctgtctgca 360
 ggagcagtgt ccgcagtcca gtgtatagca aatcccatta aacttgctcg gcttgtcatg 420
 gaaaagacac ctcatgtctt tctgactgac caaggcgcag cgcagtttgc agcagctatg 480
 ggggttccag agattcctgg agaaaaactg gtgacagaga gaaacaaaaa gcgcctggaa 540
 aaagagaagc atgaaaaagg tgctcagaaa acagattgtc aaaaaactt gggaaccgtg 600
 ggtgctgttg ccttgactg caaagggaat gtaacctacg caacctccac aggcggtatc 660
 gttaataaaa tggtcggccg cgttggggac tcaccgtgtc taggagctgg aggttatgcc 720
 gacaatgaca tcggagccgt ctcaaccaca gggcatgggg aaagcatcct gaaggtgaac 780
 ctggctagac tcaccctggt ccacatagaa caaggaaaga cggtagaaga ggctgcggac 840
 ctatcgttgg gttatatgaa gtcaagggtt aaaggtttag gtggcctcat cgtggtttagc 900
 aaaacaggag actgggtggc aaagtggacc tccacctcca tgccttgggc agccgccaag 960
 gacggcaagc tgcactttgg aattgatcct gacgatacta ctatcaccga ctttcctaa 1020
 gccgctggaa gattgtattc cagatgctag cttagaggtc aagtacagtc tcctcatgag 1080
 acatagccta atcaattaga tctagaattg gaaaaattgt cccgtctgtc acttgttttg 1140
 ttgccttaat aagcatctga atgtttggtt gtggggcggg ttttgaagcg atgagagaaa 1200

tgcccgtatt aggaggatta cttgagccct ggaggtcaaa gctgaggtga gccatgatta 1260
 ctccactgca ctccagcctg ggcaacagag ccaggcctg tatcaaaaaa aaaaaaaaaa 1320
 aaaaaaaaaa aa 1332

<210> 3

<211> 308

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 野生序列的位置10上G被E取代

<400> 3

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

	165		170		175
Lys Gly Asn Val Thr Tyr Ala Thr Ser Thr Gly Gly Ile Val Asn Lys					
	180		185		190
Met Val Gly Arg Val Gly Asp Ser Pro Cys Leu Gly Ala Gly Gly Tyr					
	195		200		205
Ala Asp Asn Asp Ile Gly Ala Val Ser Thr Thr Gly His Gly Glu Ser					
	210		215		220
Ile Leu Lys Val Asn Leu Ala Arg Leu Thr Leu Phe His Ile Glu Gln					
225		230		235	240
Gly Lys Thr Val Glu Glu Ala Ala Asp Leu Ser Leu Gly Tyr Met Lys					
	245		250		255
Ser Arg Val Lys Gly Leu Gly Gly Leu Ile Val Val Ser Lys Thr Gly					
	260		265		270
Asp Trp Val Ala Lys Trp Thr Ser Thr Ser Met Pro Trp Ala Ala Ala					
	275		280		285
Lys Asp Gly Lys Leu His Phe Gly Ile Asp Pro Asp Asp Thr Thr Ile					
	290		295		300
Thr Asp Leu Pro					
305					
<210> 5					
<211> 308					
<212> PRT					
<213> 人工序列					
<220>					
<223> 野生序列的位置10上G被H取代					
<400> 5					
Met Asn Pro Ile Val Val Val His Gly His Gly Ala Gly Pro Ile Ser					
1	5		10		15
Lys Asp Arg Lys Glu Arg Val His Gln Gly Met Val Arg Ala Ala Thr					
	20		25		30
Val Gly Tyr Gly Ile Leu Arg Glu Gly Gly Ser Ala Val Asp Ala Val					
	35		40		45
Glu Gly Ala Val Val Ala Leu Glu Asp Asp Pro Glu Phe Asn Ala Gly					
	50		55		60
Cys Gly Ser Val Leu Asn Thr Asn Gly Glu Val Glu Met Asp Ala Ser					
65		70		75	80
Ile Met Asp Gly Lys Asp Leu Ser Ala Gly Ala Val Ser Ala Val Gln					
	85		90		95
Cys Ile Ala Asn Pro Ile Lys Leu Ala Arg Leu Val Met Glu Lys Thr					

100	105	110
Pro His Cys Phe Leu Thr Asp Gln Gly Ala Ala Gln Phe Ala Ala Ala		
115	120	125
Met Gly Val Pro Glu Ile Pro Gly Glu Lys Leu Val Thr Glu Arg Asn		
130	135	140
Lys Lys Arg Leu Glu Lys Glu Lys His Glu Lys Gly Ala Gln Lys Thr		
145	150	155
Asp Cys Gln Lys Asn Leu Gly Thr Val Gly Ala Val Ala Leu Asp Cys		
165	170	175
Lys Gly Asn Val Thr Tyr Ala Thr Ser Thr Gly Gly Ile Val Asn Lys		
180	185	190
Met Val Gly Arg Val Gly Asp Ser Pro Cys Leu Gly Ala Gly Gly Tyr		
195	200	205
Ala Asp Asn Asp Ile Gly Ala Val Ser Thr Thr Gly His Gly Glu Ser		
210	215	220
Ile Leu Lys Val Asn Leu Ala Arg Leu Thr Leu Phe His Ile Glu Gln		
225	230	235
Gly Lys Thr Val Glu Glu Ala Ala Asp Leu Ser Leu Gly Tyr Met Lys		
245	250	255
Ser Arg Val Lys Gly Leu Gly Gly Leu Ile Val Val Ser Lys Thr Gly		
260	265	270
Asp Trp Val Ala Lys Trp Thr Ser Thr Ser Met Pro Trp Ala Ala Ala		
275	280	285
Lys Asp Gly Lys Leu His Phe Gly Ile Asp Pro Asp Asp Thr Thr Ile		
290	295	300
Thr Asp Leu Pro		
305		
<210> 6		
<211> 1332		
<212> DNA		
<213> 人工序列		
<220>		
<223> 野生序列位置29上g被a取代		
<400> 6		
cggggagcgg cggtaccggg cggetgag gctggctcga cccagcttga ggtctcggcg 60		
tccggtcct gcggtgccct gggatccgcc gacatgaatc ccatcgtagt ggtccacggc 120		
ggcggagccg gtccatctc caaggatcgg aaggagcag tgcaccaggg catggtcaga 180		
gccgccaccg tgggctacgg catctccgg gagggcgga gcgccgtgga tgccgtagag 240		
ggagctgtcg tcgccctgga agacgatccc gaggttcaac caggttgtgg gtctgtcttg 300		

aacacaaatg gtgaggttga aatggatgct agtatcatgg atggaaaaga cctgtctgca 360
 ggagcagtgt ccgcagtcca gtgtatagca aatcccatta aacttgctcg gcttgtcatg 420
 gaaaagacac ctcatgtctt tctgactgac caaggcgcag cgcagtttgc agcagctatg 480
 ggggttccag agattcctgg agaaaaactg gtgacagaga gaaacaaaaa gcgcctggaa 540
 aaagagaagc atgaaaaagg tgctcagaaa acagattgtc aaaaaaactt gggaaccgtg 600
 ggtgctgttg ccttgactg caaaggggaat gtaacctacg caacctccac aggcggtatc 660
 gttaataaaa tggtcggccg cgttggggac tcacctgtc taggagctgg aggttatgcc 720
 gacaatgaca tcggagccgt ctcaaccaca gggcatgggg aaagcatcct gaaggtgaac 780
 ctggctagac tcacctgtt ccacatagaa caaggaaaga cggtagaaga ggctgcggac 840
 ctatcgttgg gttatatgaa gtcaagggtt aaaggtttag gtggcctcat cgtggtttagc 900
 aaaacaggag actgggtggc aaagtggacc tccacctcca tgccctgggc agccgccaag 960
 gacggcaagc tgcactttgg aattgatcct gacgatacta ctatcaccga ctttcctaa 1020
 gccgctggaa gattgtatc cagatgetag cttagagtc aagtacagtc tcctcatgag 1080
 acatagccta atcaattaga tctagaattg gaaaaattgt cccgtctgtc acttgttttg 1140
 ttgccttaat aagcatctga atgtttggtt gtggggcggg ttttgaagcg atgagagaaa 1200
 tgcccgtatt aggaggatta cttgagccct ggaggtcaaa gctgaggtga gccatgatta 1260
 ctccactgca ctccagcctg ggcaacagag ccaggccctg tatcaaaaaa aaaaaaaaaa 1320
 aaaaaaaaaa aa 1332

<210> 7

<211> 1331

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<221> misc_feature

<222> (30) .. (30)

<223> n不是t或c

<400> 7

cggggagcgg cgggtaccggg cggtgcgan ctggctcgac ccagcttgag gtctcggcgt 60
 ccgctcctg cggtgccctg ggatccgccg acatgaatcc catcgtagtg gtccacggcg 120
 gcggagccgg tcccattctc aaggatcgga aggagcgagt gcaccagggc atggctcagag 180
 ccgccaccgt gggctacggc atcctccggg agggcgggag cgccgtggat gccgtagagg 240
 gagctgtcgt cgccctggaa gacgateccg agttcaacgc aggttgtggg tctgtcttga 300
 acacaaatgg tgaggtttaa atggatgcta gtatcatgga tggaaaagac ctgtctgcag 360
 gagcagtgtc cgcagtccag tgtatagcaa atcccattaa acttgctcgg cttgtcatgg 420
 aaaagacacc tcattgcttt ctgactgacc aaggcgcagc gcagtttgca gcagctatgg 480
 gggttccaga gattcctgga gaaaaactgg tgacagagag aaacaaaaag gccttgaaa 540
 aagagaagca tgaaaaagg tctcagaaaa cagattgtca aaaaaacttg ggaaccgtgg 600
 gtgctgttgc cttggactgc aaaggggaatg taacctacgc aacctccaca ggcggtatcg 660
 ttaataaaaat ggtcggccgc gttggggact caccgtgtct aggagctgga ggttatgccg 720

acaatgacat cggagccgtc tcaaccacag ggcattggga aagcatcctg aaggtgaacc 780
 tggctagact caccctgttc cacatagaac aaggaaagac ggtagaagag gctgcggacc 840
 tatcgttggg ttatatgaag tcaagggtta aaggtttagg tggcctcatc gtggttagca 900
 aaacaggaga ctgggtggca aagtggacct ccacctccat gccctgggca gccgccaagg 960
 acggcaagct gcactttgga attgatcctg acgatactac tatcaccgac cttccctaag 1020
 ccgctggaag attgtattcc agatgctagc ttagagggtca agtacagtct cctcatgaga 1080
 catagcctaa tcaattagat ctagaattgg aaaaattgtc ccgtctgtca cttgttttgt 1140
 tgccttaata agcatctgaa tgtttggtt tggggcgggt tttgaagcga tgagagaaat 1200
 gcccgattta ggaggattac ttgagccctg gaggtcaaag ctgaggtgag ccatgattac 1260
 tccactgcac tccagcctgg gcaacagagc caggccctgt atcaaaaaaa aaaaaaaaaa 1320
 aaaaaaaaaa a 1331

<210> 8

<211> 1332

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<221> misc_feature

<222> (30) .. (30)

<223> n不是t或c

<400> 8

cggggagcgg cggtaccggg cggctgccan gctggctcga cccagcttga ggtctcggcg 60
 tccgcgtcct gcggtgccct gggatccgcc gacatgaatc ccatcgtagt ggtccacggc 120
 ggccggagccg gtcccatctc caaggatcgg aaggagcgag tgcaccaggg catggtcaga 180
 gccgccaccg tgggctacgg catcctccgg gagggcggga gcgccgtgga tgccgtagag 240
 ggagctgtcg tcgccctgga agacgatccc gagttcaacg caggttgtgg gtctgtcttg 300
 aacacaaatg gtgaggttga aatggatgct agtatcatgg atggaaaaga cctgtctgca 360
 ggagcagtggt ccgcagtcca gtgtatagca aatcccatta aacttgctcg gcttgtcatg 420
 gaaaagacac ctcatgtctt tctgactgac caaggcgcag cgcagtttgc agcagctatg 480
 ggggttccag agattcctgg agaaaaactg gtgacagaga gaaacaaaaa gcgcctggaa 540
 aaagagaagc atgaaaaagg tgctcagaaa acagattgtc aaaaaaactt gggaaccgtg 600
 ggtgctgttg ccttggaactg caaagggaat gtaacctacg caacctccac aggcggtatc 660
 gttaataaaa tggtcggccc cgttggggac tcaccgtgtc taggagctgg aggttatgcc 720
 gacaatgaca tcggagccgt ctcaaccaca gggcatgggg aaagcatcct gaaggtgaac 780
 ctggctagac tcacctgtt ccacatagaa caaggaaaga cggtagaaga ggctgcggac 840
 ctatcgttgg gttatatgaa gtcaagggtt aaaggtttag gtggcctcat cgtggttagc 900
 aaaacaggag actgggtggc aaagtggacc tccacctcca tgccctgggc agccgccaag 960
 gacggcaagc tgcactttgg aattgatcct gacgatacta ctatcaccga ctttcctaa 1020
 gccgctggaa gattgtattc cagatgctag cttagaggtc aagtacagtc tcctcatgag 1080
 acatagccta atcaattaga tctagaattg gaaaaattgt cccgtctgtc acttgttttg 1140

ttgccttaat aagcatctga atgtttggtt gtggggcggg ttttgaagcg atgagagaaa 1200
tgcccgtatt aggaggatta cttgagccct ggaggtcaaa gctgaggtga gccatgatta 1260
ctccactgca ctccagcctg ggcaacagag ccaggcctg tatcaaaaaa aaaaaaaaaa 1320
aaaaaaaaaa aa 1332

<210> 9

<211> 24

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 起始子

<400> 9

catatgaatc ccatcgtagt ggtc 24

<210> 10

<211> 39

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 起始子

<400> 10

catatgaatc ccatcgtagt ggtccacggc gaaggagcc 39

<210> 11

<211> 27

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 起始子

<400> 11

ctcgagttag ggaaggtcgg tgatagt 27

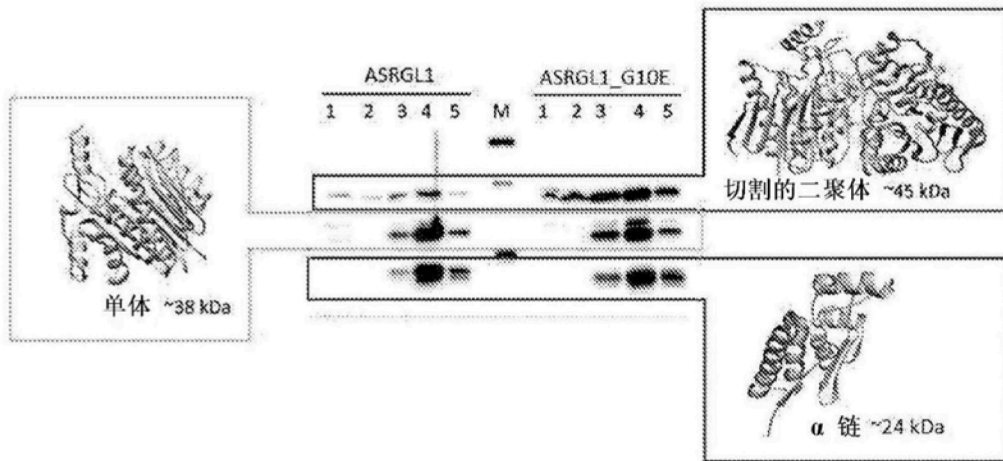


图1

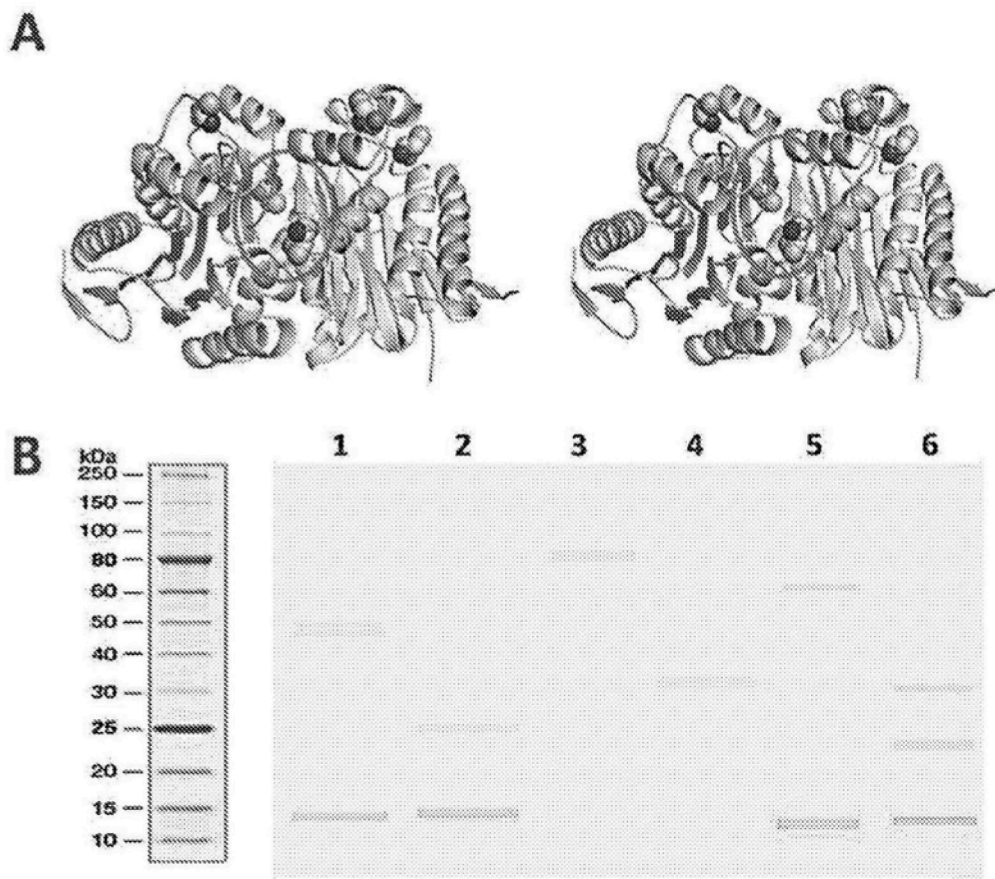


图2

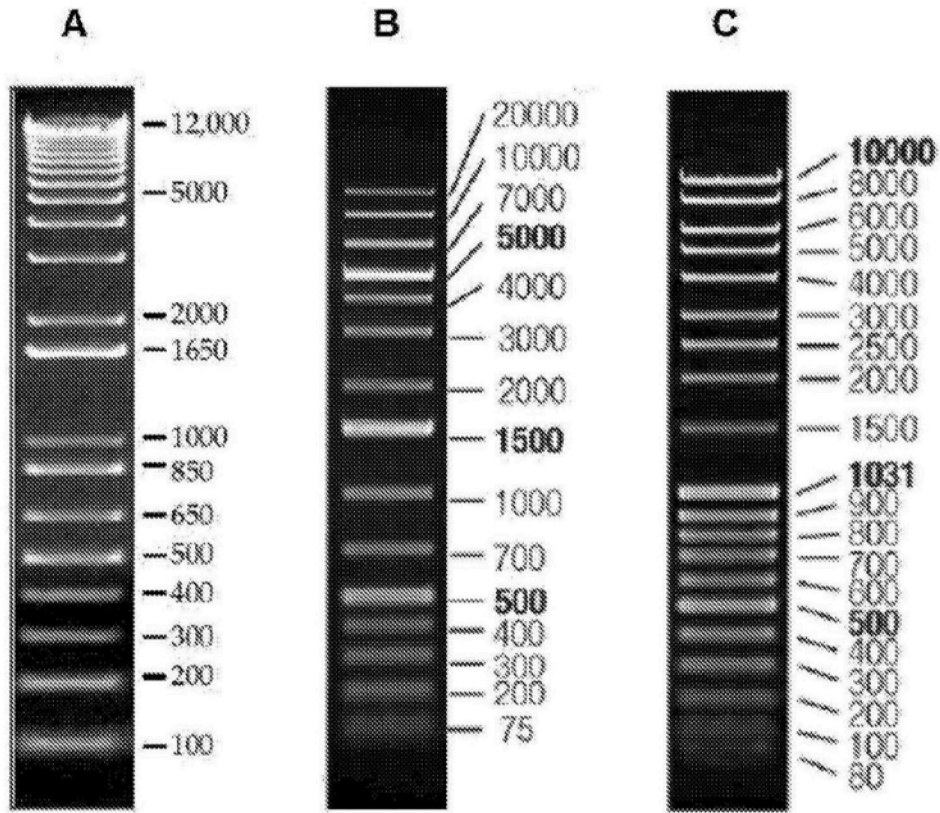


图3

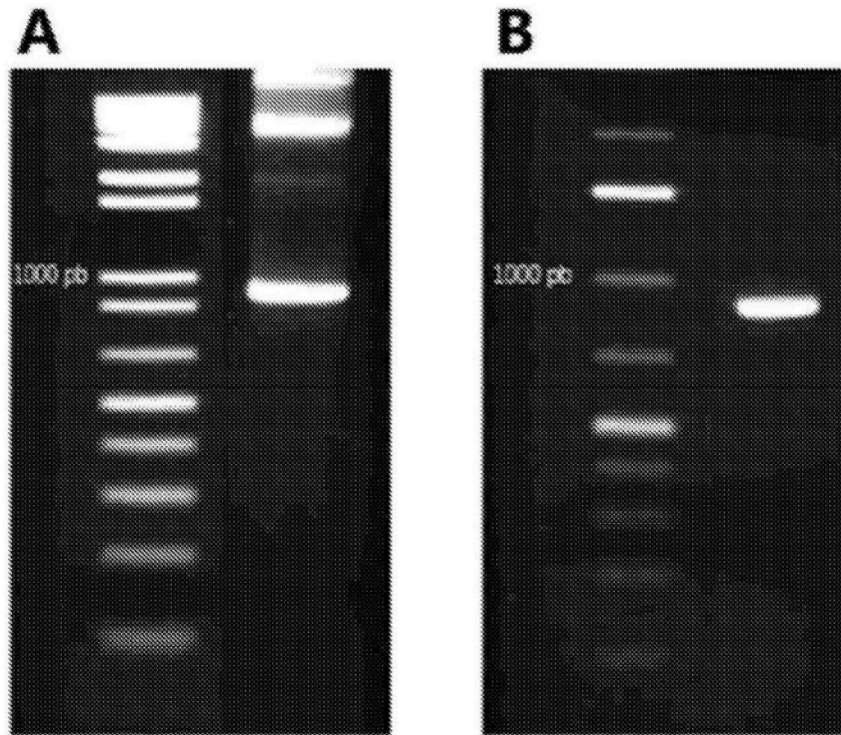


图4

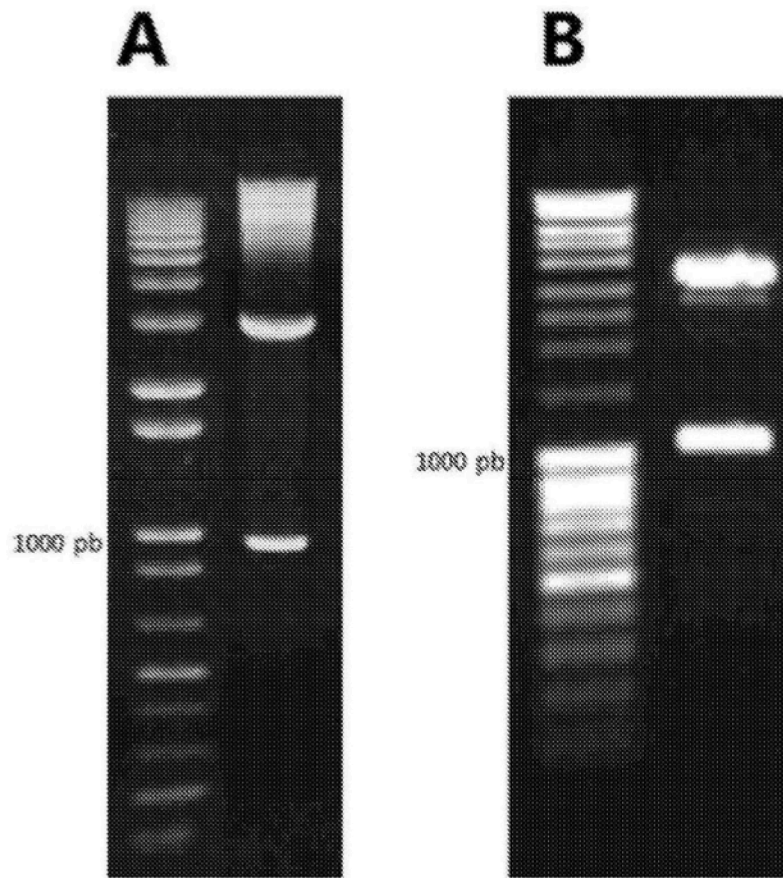


图5

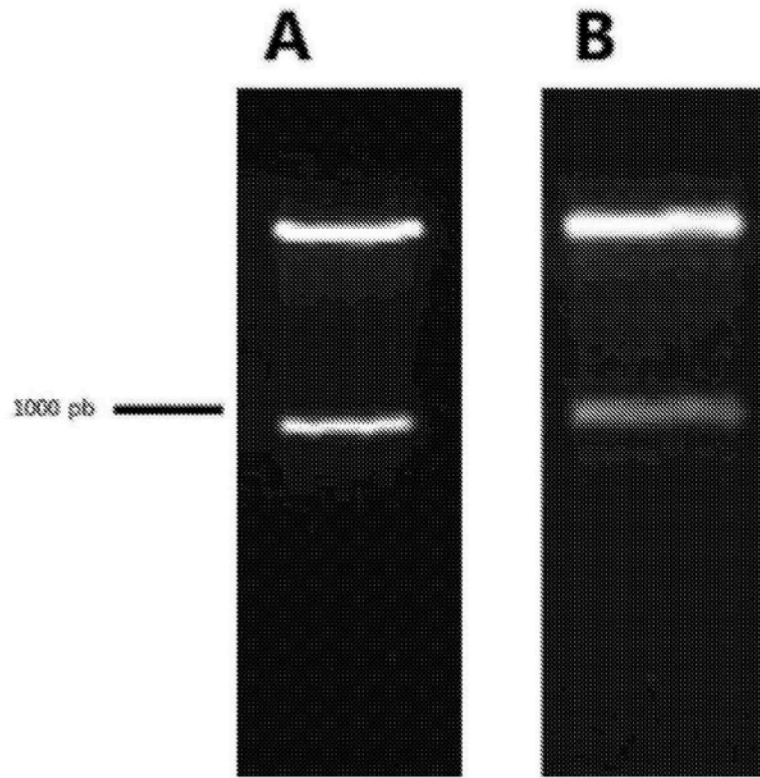


图6