



专论与综述

酶作为治疗性药物的研究进展

时清华 秦斌* 游松*

沈阳药科大学 辽宁 本溪 117000

摘要: 酶制剂作为药物已成为生物制药领域的一个热点。世界各国药典中含有越来越多的酶制剂, 其中大部分已成为治疗各种重大疾病的有效药物。酶对底物具有很高的亲和力和特异性, 而且能催化多种目标分子转化为所需产物, 这两种特性使得酶可作为一种特殊药物执行小分子无法进行的治疗性生物化学反应。利用生物技术开发新的酶类药物, 采用化学修饰的手段降低治疗酶的免疫原性及提高其相对稳定性, 是目前探索酶类药物的研究方向。本文系统地概述了国内外酶作为治疗性药物的最新研究进展及展望。

关键词: 酶类药物, 生物制药, 治疗应用, 研究进展

Advances in the application of enzymes as therapeutic drugs

SHI Qing-Hua QIN Bin* YOU Song*

Shenyang Pharmaceutical University, Benxi, Liaoning 117000, China

Abstract: The research on the application of enzyme drugs has become a hot spot in the field of biopharmaceuticals. Increasing number of enzymatic drugs have contained in pharmacopoeias in various countries, and most of them have become effective treatment drugs for various major diseases. Enzymes have great affinity and specificity for substrates and can catalyze the transformation of a variety of target molecules into desired products that make enzymes as special and effective drugs and perform therapeutic biochemical reactions, which can't be performed by small molecules. Utilizing biotechnology to promote the development of new enzymatic drugs, and chemical modification to reduce the immune prototype of therapeutic enzymes and improve their relative stability are the current research direction of exploring enzymatic drugs. This review systematically summarizes the latest research progress and prospects of enzymes as therapeutic drugs at home and abroad.

Keywords: Enzyme drugs, Biopharmaceutical, Therapeutic application, Research progress

目前, 酶作为药物的应用越来越广泛。供治疗的酶通常指一组用于治疗疾病和改善医疗状况的生物催化剂。酶作为药物有两个突出的特点: (1) 酶与底物具有高度亲和性和特异性; (2) 酶可以把

Foundation items: National Natural Science Foundation of China (31971207); Talent Research Foundation to Invigorate Liaoning of Liaoning Province (XLYC1907153)

*Corresponding authors: Tel: 86-24-43520910

E-mail: QIN Bin: to-qinbin@163.com; YOU Song: yousong206@aliyun.com

Received: 15-03-2020; **Accepted:** 21-05-2020; **Published online:** 14-06-2020

基金项目: 国家自然科学基金(31971207); 辽宁省兴辽英才计划(XLYC1907153)

*通信作者: Tel: 024-43520910

E-mail: 秦斌: to-qinbin@163.com; 游松: yousong206@aliyun.com

收稿日期: 2020-03-15; 接受日期: 2020-05-21; 网络首发日期: 2020-06-14

底物转化成所需的产物,且副作用较小。这两个特点使得酶区别于其他所有类型的药物,也使酶成为有价值的治疗工具,为治疗多种严重疾病提供了一个广阔的现代生物药物应用平台。

治疗用酶有利的动力学性质是低 K_m 和高 V_{max} , 这使其在非常低的浓度和底物浓度下即能达到最大效率。治疗用酶已在医学领域中得到了广泛的应用, 药物研发及生物技术在过去 20 年的进步, 极大地促进了治疗用酶在治疗一系列罕见和常见疾病上的应用。利用合成生物学、蛋白质组学和基因组学对酶进行改造, 不仅能使其催化出我们想要的手性药物分子, 还能极大地促进治疗用酶的开发^[1-3]。目前, 治疗用酶被广泛应用于遗传性疾病、心血管疾病、胃肠道疾病、癌症等疾病的治疗^[4-7]。酶制剂药物被认为是一个不断增长的市场, 到 2020 年预计将超过 55 亿美元。图 1 介绍了治疗用酶的相关应用。

1 治疗用酶的来源

治疗用酶广泛来源于动物、植物和微生物。早期研究中的酶是从动物和植物中提取而来。酶的来源决定了酶的方便性、成本和回收过程。由于受到经济可承受性和规模化制备可行性的影响, 一般更倾向于对微生物来源的酶进行商业化开发。通过重组 DNA (rDNA) 技术, 在遗传水平上对微生物进行操作可以获得更好的菌株, 从而改善酶的质量或特性, 并获得更高的产量^[8-9]。在基因重组技术中, 克隆所需蛋白质的 cDNA, 然后将克隆的 cDNA 插入到表达载体中, 利用表达载体转化大肠杆菌, 使其过表达, 最后纯化表达的蛋白。其中, 产量、质量、生产时间和提取方便是构建合适的重组酶表达载体的关键参数。目前, 多种表达体系已经被建立, 包括细菌、真菌、哺乳动物、植物或昆虫细胞等^[10]。在基因工程的

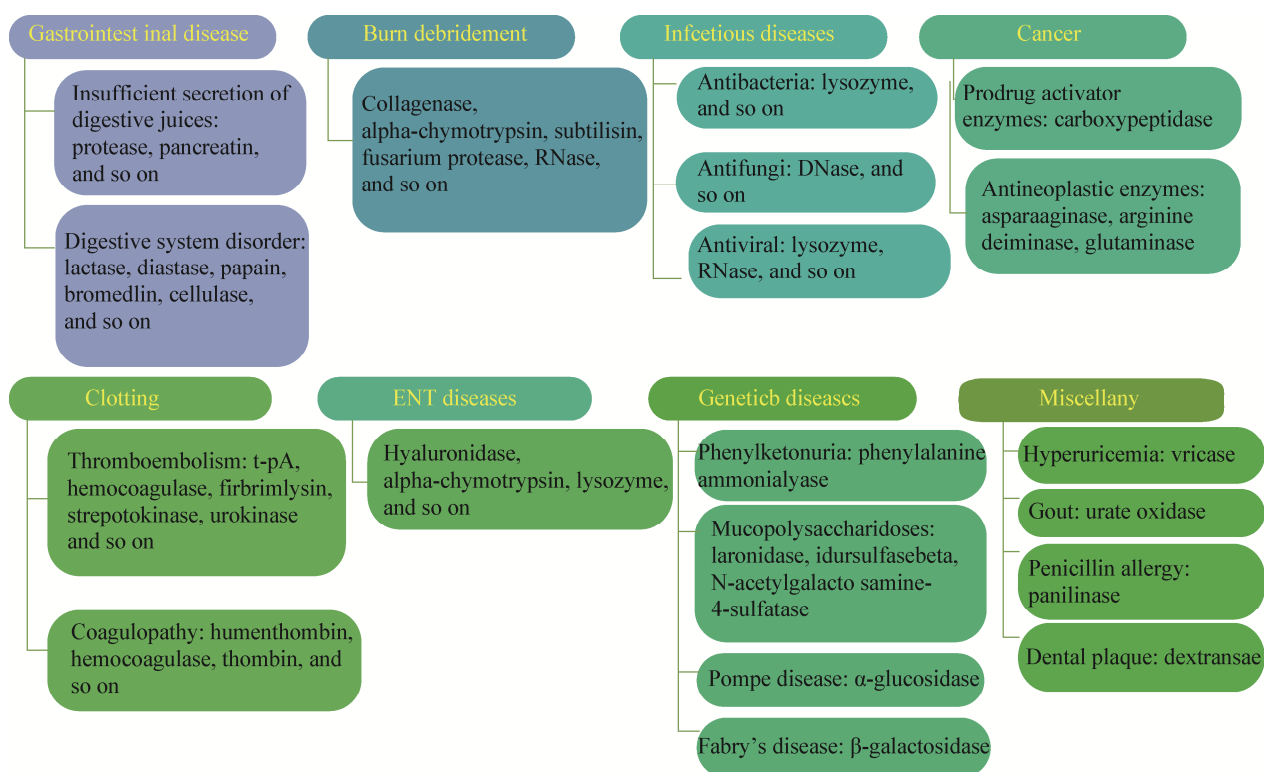


图 1 治疗用酶的广泛用途及代表性酶^[4-7]

Figure 1 Wide range of therapeutic enzymes and representative enzymes^[4-7]

帮助下, 理想的蛋白质可被大量生产出来, 从而满足酶工业的需要。迄今为止, 重组 DNA 技术已经产生了上百种具有治疗性的酶制剂^[11]。

2 酶作为治疗药物的应用

治疗用酶现在已经成为许多重大疾病的有效治疗药物, 如先天性缺酶症的治疗、血栓与冠心病的治疗以及抗肿瘤治疗等。据不完全统计, 已在临床使用的酶类药物已经超过近百种, 而酶类药物的制剂品种已经超过 700 种, 图 2 中介绍了部分治疗用酶的治疗作用机制。

2.1 癌症治疗

治疗酶在癌症中的应用涉及两种主要类型: 肿瘤所需氨基酸代谢酶和前体药物转化酶。代谢酶被用来消耗肿瘤细胞所必需的氨基酸, 从而抑制肿瘤生长; 转化酶被用于在肿瘤细胞中将前药转化为细胞毒性药物, 进而杀死肿瘤细胞。

2.1.1 L-天冬酰胺酶

L-天冬酰胺酶是一种四聚体酶, 能催化氨基酸 L-天冬酰胺的水解。大多数正常的人类细胞都能够合成 L-天冬酰胺, 但某些恶性肿瘤细胞却不能合成, 必须通过血液获得。因此, 利用 L-天冬酰胺酶代谢 L-天冬酰胺, 使恶性肿瘤细胞无法获得生长必需的天冬酰胺, 从而抑制其生长^[12]。L-天冬酰胺酶可以从各种各样的微生物(酵母、真菌、细菌)中提取, 其中细菌来源的 L-天冬酰胺酶应用较多^[13]。

L-天冬酰胺酶在临床上对急性淋巴细胞性白血病、淋巴肉瘤细胞性白血病及粒细胞性白血病的疗效比较好, 对黑色素瘤也有一定作用^[14]。其中, L-天冬酰胺酶对儿童的急性淋巴细胞性白血病效果较为突出, 有效率为 85.2%, 完全缓解率为 57.8%^[15]。但使用 L-天冬酰胺酶也存在一定的副作用, 主要包括严重的过敏反应、恶心、呕吐、发烧、肾功能和肝功能受损等^[16-17]。L-天冬酰胺酶与聚乙二醇(polyethylene glycol, PEG)偶联后可大大减少过敏反应, 经少量梳状 PEG 衍生分子 PM13 和

PM100 修饰的 L-天冬酰胺酶, 在降低免疫反应的同时还能保持较高的酶活性^[17-18]。此外, L-天冬酰胺酶还可与其他细胞毒药物合并应用, 例如其可与长春新碱和皮质类固醇等药物联合来治疗急性淋巴细胞性白血病^[18]。

2.1.2 精氨酸脱亚胺酶

精氨酸脱亚胺酶(arginine deiminase, ADI)是一种能将精氨酸分解成瓜氨酸和氨的酶。正常情况下, 体内精氨酸可由细胞自身的尿素循环酶即精氨酸代琥珀酸合成酶和精氨酸琥珀酸裂解酶合成^[19], 但具有代谢缺陷的某些恶性肿瘤, 如黑色素瘤、肺癌、前列腺癌和肝细胞癌则经常缺乏这些酶^[20-22]。由于上述肿瘤细胞的生长依赖于环境中的精氨酸, 所以 ADI 可用于治疗这些精氨酸营养缺陷型肿瘤。ADI 被认为是一种比 L-天冬酰胺酶好的白血病治疗药物, 因为 ADI 对精氨酸具有高度特异性, 不转化其他氨基酸, 而 L-天冬酰胺酶则是以天冬酰胺和谷氨酰胺为底物, 在降解谷氨酰胺时会产生一些导致副作用的有毒物质^[23]。ADI 可从化脓性链球菌、类链球菌和支原体中提取到。

ADI 虽然有较好的肿瘤杀伤力, 但由于其强抗原性和循环半衰期短(半衰期为 4 h), 在体内效果不明显^[24]。经过 20 kD 聚乙二醇(PEG-20)修饰的 ADI 能够避开循环和驻留巨噬细胞, 延长 ADI 半衰期并降低免疫原性。Feun 等经研究指出, 随着循环时间的增加, ADI-PEG-20 在体内外均对精氨酸代琥珀酸合成酶阴性的癌细胞显示出了强大的抗肿瘤效果, Pheonix 药物公司目前正在使用 ADI-PEG-20 治疗晚期肝细胞性肝癌(II/III 期)和黑色素瘤(I/II 期)的临床试验, 其中在肝癌治疗中已进入 III 期临床^[25]。此外, 还有相关报道将 ADI-PEG-20 作为胰腺癌放射治疗的辅助手段, 也可用于多形性胶质母细胞瘤及胸椎癌(间皮瘤和非小细胞肺癌)的治疗^[23,26-30]。Cheng 等通过蛋白质工程改变了 PpADI (来自 *Pseudomonas plecoglossicida* 的 ADI)突变体 M31 表面的氨基酸残基, 将 PpADI M31 表面的 4 个精氨酸替换成赖氨酸, 为其 PEG

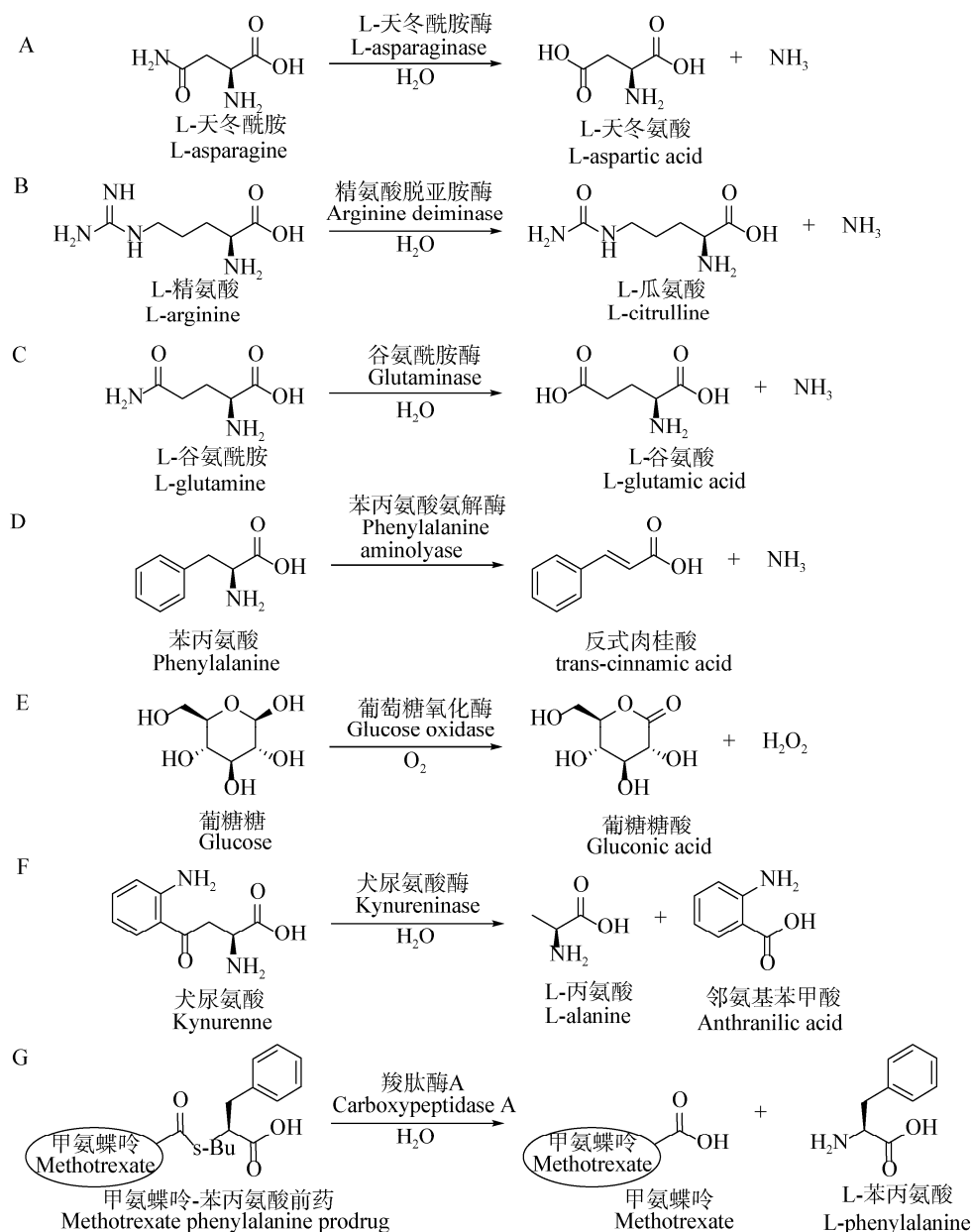


图2 部分治疗用酶的治疗作用机制

Figure 2 Therapeutic mechanism of partial therapeutic enzymes

注：A：L-天冬酰胺酶将L-天冬酰胺水解成L-天冬氨酸，从而阻止L-天冬酰胺供养肿瘤细胞；B：精氨酸脱亚胺酶将L-精氨酸水解成L-瓜氨酸，从而阻止L-精氨酸供养肿瘤细胞；C：谷氨酰胺酶将L-谷氨酰胺水解成L-谷氨酸，从而阻止L-谷氨酰胺供养肿瘤细胞；D：苯丙氨酸氨解酶将苯丙氨酸降解成反式肉桂酸，从而减少苯丙氨酸在体内的积累；E：葡萄糖氧化酶将葡萄糖氧化成葡萄糖酸和H₂O₂，从而达到杀死肿瘤细胞的目的；F：犬尿氨酸酶将犬尿氨酸水解成L-丙氨酸和邻氨基苯甲酸，从而激起人体免疫系统攻击肿瘤细胞；G：羧肽酶A将甲氨蝶呤-苯丙氨酸前药水解成甲氨蝶呤和L-苯丙氨酸，恢复甲氨蝶呤的细胞毒性。

Note: A: L-asparaginase hydrolyzes L-asparagine to L-aspartic acid, thus preventing feeding of L-asparagine to tumor cells; B: Arginine deiminase hydrolyzes L-arginine to L-citrulline, thus preventing feeding of L-arginine to tumor cells; C: Glutamine hydrolyzes L-glutamine to L-glutamic acid, thus preventing feeding of L-glutamine to tumor cells; D: Phenylalanine aminolyase degrades phenylalanine into trans-cinnamic acid, thus reducing the accumulation of phenylalanine in the body; E: Glucose oxidase oxidizes glucose into gluconic acid and H₂O₂, so as to kill tumor cells; F: Kynureninase hydrolyzes kynurenine into L-alanine and anthranilic acid, so as to stimulate the human immune system to attack tumor cells; G: Carboxypeptidase A hydrolyzes methotrexate phenylalanine prodrugs into methotrexate and L-phenylalanine, and restores the cytotoxicity of methotrexate.

修饰提供初级胺^[31]。经研究得出通过将 299 和 382 位的精氨酸替换成赖氨酸(PpADI M36), 使 PpADI M31 的聚乙二醇化位点的平均数量从大约 12 个上升至大约 20 个, 经聚乙二醇修饰的 PpADI M36 在人血清中的半衰期得到显著提升(PEG-M31: 3.2 d; PEG-M36: 4.8 d)^[31]。

2.1.3 谷氨酰胺酶

谷氨酰胺是一种参与多种代谢和能量转换的关键氨基酸, 是哺乳动物体内主要的氮转运体, 在能量产生方面起主要作用^[32]。对癌细胞代谢的研究发现, 致癌基因或肿瘤抑制基因的许多突变增加了参与谷氨酰胺代谢和摄取蛋白的表达, 表明谷氨酰胺供应与肿瘤增殖之间存在很强的相关性^[33-34]。因此, 在氨基酸耗竭疗法中, 谷氨酰胺酶似乎是一种适合的药物。

由于谷氨酰胺酶的稳定性差和 K_m 值高, 单纯的谷氨酰胺酶在体内对肿瘤的生长和增殖均无明显抑制作用, 但是从假单胞菌(*Pseudomonas*) 7A 中分离的谷氨酰胺酶与天冬酰胺酶联用时能治疗对天冬酰胺酶产生耐药性的淋巴瘤, 对各种白血病也有一定的疗效^[35]。

2.1.4 前体药物激活酶

抗体导向酶-前体药物疗法(antibody-directed enzyme prodrug therapy, ADEPT)是一种利用转化酶作为癌症治疗剂的策略。在这种方法中, 前体药物激活酶与单克隆抗体偶联, 携带着酶到达肿瘤细胞^[36], 无细胞毒性的前药在该酶的催化下将转化为细胞毒性药物, 从而特异性地破坏癌细胞。这种方法正被用于发现和开发以激活前药的肿瘤靶向酶为基础的癌症治疗药物。有文献报道, 经过修饰的羧肽酶 A 可以激活前药甲氨蝶呤-苯丙氨酸的活性, 用于结肠癌的治疗^[37]。人类 β -葡萄糖醛酸酶也是一个有吸引力的酶类, 其能激活前药葡萄糖苷酸^[38]。

2.2 先天性缺酶症的替代治疗

代谢途径中所涉及的酶的缺陷与许多病理条件有关。在这些情况下, 为了弥补酶活性的损失, 人们采取了各种策略, 包括使用酶替代补充治疗

(enzyme-replacement therapy, ERT)或药物分子伴侣作为结构稳定剂^[39]。由表 1 可知, 美国食品和药物管理局(Food and Drug Administration, FDA)已经批准了多种酶制品作为孤儿药物(用于预防、治疗、诊断罕见病的药品), 用于治疗多种遗传性缺酶症。有关孤儿药物治疗缺酶症的应用研究, 我国开展得不多, 值得引起重视。

2.2.1 苯丙酮尿症

苯丙酮尿症(phenylketonuria, PKU)是一种常见的遗传性代谢疾病, 其特征是苯丙氨酸在体内的积累, 原因是苯丙氨酸羟化酶的活性低或没有活性, 不能催化苯丙氨酸转化为酪氨酸, 导致苯丙氨酸及其酮酸蓄积, 并从尿中大量排出, 其主要临床症状为智力低下、精神发育迟滞、湿疹、皮肤抓痕征及色素脱失和鼠气味; 苯丙氨酸氨解酶(phenylalanine ammonia lyase, PAL)可以催化苯丙氨酸转化为无毒无害的反式肉桂酸和氨, 反式肉桂酸被进一步代谢最后以马尿酸的形式随尿液排出, 由于 PAL 催化的反应生成无毒化合物, 所以 PAL 被认为是治疗 PKU 的一种药物^[40]。为了降低 PAL 的免疫原性, 优化传递方式及酶的来源, Bell 等对多种 PAL 进行评价, 筛选出来源于 *Anabaena variabilis* (Av)的 PAL 突变体 AvPAL (Cys503Ser/Cys565Ser), 经 PEG 修饰后表现出阳性药效学特征和良好的表达效价^[41]。目前, 此种 PAL 已在 2018 年被 FDA 批准用于 PKU 的治疗。杨顺楷从土壤中选育出高 PAL 活性的红酵母属菌种 CIBASA1401, 由此菌种产生的 PAL 在无任何防腐剂和保护剂存在下, 4 °C 保存 1 周后剩余酶活 95%, 在 -20 °C 保存 2 周后剩余酶活 82%, 显著提高了 PAL 的稳定性^[42]。此外, Codexis 公司与雀巢公司通过蛋白质工程手段提高了 PAL (CDX-6114)在消化道中的稳定性, 使口服 PAL 成为可能。目前, CDX-6114 正处于临床 I 期。Synlogic 公司还利用合成生物学策略, 构建了含有 PAL 等能代谢苯丙氨酸的益生菌, 期望在肠道中使用该菌治疗苯丙酮尿症^[43]。

2.2.2 黏多糖贮积症

黏多糖贮积症(mucopolysaccharidosis, MPS_S)有多种类型, MPS I 型是 MPS_S 中最严重的一种形式。MPS I 型是由 α-L-艾杜糖醛酸苷酶基因突变引起的一种常染色体隐性遗传病。α-L-艾杜糖酶是硫酸乙酰肝素和硫酸皮肤素等多糖降解过程中所必需的酶, 该酶的缺陷导致其天然底物在各组织溶酶体内堆积, 最终引起相应的临床症状。健赞公司的

硫酸艾杜糖醛酸酯酶(aldurazyme) 2003 获 FDA 批准上市, 成为首个用于治疗罕见的遗传性 MPS I 疾病的药物。

MPS II 是一种罕见的溶酶体贮积症, 也被称为亨特综合征(Hunter’s syndrome), 是由编码艾杜糖醛酸-2-硫酸酯酶(iduronate-2-sulfatase, IDS)的基因突变引起。亨特综合征患者个体的临床表现轻重不一, 取决于突变的严重程度和残余酶的活性^[44]。由

表 1 在美国批准作为孤儿药物的酶品种

Table 1 Enzyme varieties approved as orphan drugs in the United States of America

商品名	通用名	批准年份	适应症	生产研究单位
Trade name	Generic name	Approval time	Indication	Sponsor
Revcovi	Alapegademase-lvlr	2018	For the treatment of children and adults with severe adenosine deaminase combined immunodeficiency syndrome	Leadiant Biosciences
Palynziq	Pegvaliase	2018	Used to treat phenylketonuria in adult	BioMarin Pharmaceuticals
Brineura	Cerliponase alfa	2017	Treatment of neuronal lipopolysaccharide lipofuscin type 2 in late infants	BioMarin Pharmaceuticals
Kanuma	Sebelipase alfa	2015	For the treatment of lysosomal acid lipase deficiency	Alexion Pharmaceuticals
Strensiq	Asfotase alfa	2015	Used for the treatment of childhood type of hypophosphatasia	Alexion Pharmaceuticals
Vimizim	Elosulfase alfa	2014	Treatment for mucopolysaccharidosis IV A (MPS IV A)	BioMarin Pharmaceuticals
Cerdelga	Eliglustat	2014	Long-term treatment of adult patients with type I Gaucher disease	Sanofi Synthelabo
Voraxaze	Glucarpidase	2012	Used to treat methotrexate poisoning caused by renal failure	Bio-Technology General
Elelyso	Taliglucerase alfa	2012	Treatment of pediatric patients with type I Gaucher disease	Pfizer/Protalix
Hunterase	Idursulfase-beta	2012	Treatment for mucopolysaccharidosis II (MPS II)	Green Cross Corporation
Erwinaze	Asparaginase Erwinia Chrysanthemi	2011	Used for the treatment of cute lymphoblastic leukemia	Jazz Pharmaceuticals
Lumizyme	Alglucosidase alfa	2010	For Pompe’s disease of all ages or phenotypes	Genzyme Corporation
Krystexxa	Pegloticase	2010	Used to treat Gout	Savient Pharmaceuticals
Vpriv	Velaglucerase alfa for injection	2010	Used for the long-term treatment of type I Gaucher disease in children and adults	Shire Pharmaceuticals
Naglazyme	Galsulfase	2005	Treatment for mucopolysaccharidosis VI (MPS VI)	BioMarin Pharmaceuticals
Aldurazyme	Laronidase	2003	Treatment for mucopolysaccharidosis I (MPS I)	Genzyme Corporation
Fabrazyme	Agalsidase beta	2003	Used to treat Fabry disease	Genzyme Corporation
Elitek	Rasburicase	2002	Used to treat hyperuricemia caused by tumor chemotherapy	Sanofi-Synthelabo
Sucraid	Sacrosidase	1998	Used for the treatment of congenital sucrose-isomaltase deficiency	Orphan Medical
Oncaspar	Pegaspargase	1994	Treatment of acute lymphoblastic leukemia	Enzon Pharmaceuticals
Cerezyme	Imiglucerase	1994	Used to treat Gaucher disease	Genzyme Corporation
Pulmozyme	Dornase alpha	1993	Used to treat the decrease of mucus viscosity caused by cystic fibrosis and to clear tracheal secretions	Genetech
Ceredase	Glucocerebrosidase injection	1991	Treatment of Gaucher disease type I	Genzyme Corporation
Adagen	Pegademase bovine	1990	Treatment of immunodeficiency syndrome	Enzon Pharmaceuticals

于亨特综合征患者缺乏 IDS 酶, 糖胺聚糖会在溶酶体内持续贮积, 导致细胞和器官功能障碍以及典型的寿命缩短。现已经有两种酶类药物用来治疗此种疾病, 分别为 Elaprase (爱尔兰夏尔公司, 艾杜硫酸酯注射剂) 及 Hunterase (韩国 GC 公司, 艾杜硫酸盐 β)。Elaprase 是利用 DNA 重组技术在 HT-1080 细胞中产生的, 而 Hunterase 是在中国仓鼠卵巢细胞 (Chinese Hamster Ovary, CHO) 中产生。两种商品酶的生化特征比较表明, 由于 Hunterase 的甲酰甘氨酸(其含量决定酶活性)含量较高, 所以比 Elaprase 特异性酶活性高。

MPS VI 型是一种隐性常染色体溶酶体疾病, 由于 N-乙酰半乳糖胺-4-硫酸酯酶部分或完全缺乏活性, 导致溶酶体内糖胺聚糖的积累。MPS VI 患者是一种慢性的多系统疾病, 不仅有很高的发病率, 而且还会导致早期死亡。MPS VI 的临床特征与其他 MPS 患者相似: 骨质疏松、面部粗糙、角膜混浊、内脏肿大、上气道阻塞和瓣膜性心脏病。这种疾病不会影响智力的发展^[45]。MPS VI 的特殊治疗包括造血干细胞移植(HSCT)和 ERT。从 CHO 中生产的重组人 N-乙酰半乳糖胺-4-硫酸酯酶 (naglazyme), 在美国(2005 年)和欧盟(2006 年)被批准作为 ERT 药物用于 MPS VI 患者^[46]。

2.2.3 庞贝氏症

庞贝氏(pompe)症是一种由溶酶体酸性 α -葡萄糖苷酶(acid α -glucosidase, GAA)基因缺陷或功能障碍导致的罕见病。由于缺乏这种酶, 患者心脏和肌细胞不能将糖原转化为能量, 导致糖原在细胞内贮积, 临床表现为进行性肌无力、呼吸困难, 最终因呼吸衰竭而死亡^[47]。美国健赞公司的 Lumizyme 是一种重组的 α -葡萄糖苷酶, 可取代有缺陷的 GAA, 降低糖原在心脏和骨骼肌中的积累, FDA 于 2010 年批准其用于 8 岁及以上晚发型庞贝氏症患者的治疗, 并在 2014 年将其适应症扩大为所有年龄段或表型的庞贝氏症患者的治疗。

2.2.4 戈谢病

戈谢病(gaucher disease, GD)是体内缺乏葡萄糖

脑苷脂酶或葡萄糖神经酰胺酶, 导致葡萄糖脑苷脂在细胞中积累的一种疾病, 是溶酶体贮积病中较为常见的一种。由于葡萄糖脑苷脂在肝、脾、肺、脑等脏器细胞中的贮积会导致受累组织器官出现病变, 临床表现为肝肿大、脾肿大、贫血、骨骼并发症和神经系统并发症等。

阿糖苷酶(ceredase)是最早用来治疗 GD 的药物, 其来源于人胎盘, 价格昂贵, 其升级产品即利用基因工程手段产生的伊米甘酶(cerezyme)于 1994 年上市。此外, 基因激活人纤维母细胞株产葡萄糖脑苷酯酶(vpriv)和植物细胞表达的重组葡萄糖脑苷酯酶(elelyso)也分别在 2010 和 2012 年上市用于治疗戈谢病。

2.2.5 法布瑞氏症

法布瑞氏症(Fabry's disease)是一种 X-连锁遗传病, 因体内缺乏半乳糖苷酶 A, 导致酰基鞘鞘醇三己糖在体内的积累。健赞公司的重组 β -半乳糖苷酶(fabrazyme)于 2003 年被批准用于治疗法布瑞氏症^[6]。

2.2.6 腺苷脱氨酶缺乏性重度联合免疫缺陷症

腺苷脱氨酶缺乏性重度联合免疫缺陷症(adenosine deaminase severe combined immunodeficiency, ADA-SCID)是一种极其罕见的遗传性疾病, 由腺苷脱氨酶(adenosine deaminase, ADA)缺乏导致。ADA-SCID 主要影响婴幼儿, 会导致患者免疫系统受损, 进而不能抵抗细菌、病毒和真菌的感染。2018 年, FDA 批准了 Leadiant Biosciences 公司的 Revcovi (elapegetademase-lvlr)用于治疗儿童和成人患者的 ADA-SCID, 该产品为聚乙二醇结合型重组腺苷脱氨酶^[48]。

2.2.7 低磷酸酯酶症

低磷酸酯酶症(hypophosphatasia, HPP)是 1948 年首次发现的一种罕见的遗传性全身系统疾病, 由碱性磷酸酯酶基因功能缺失突变导致血清及骨组织中碱性磷酸酯酶活性降低或无活性, 引起骨骼和牙齿矿化不全^[49]。

Strensiq (asfotase alfa)是第一种针对 HPP 的药

品, 通过替换缺陷的碱性磷酸酶, Strensiq 能够促进提高酶底物水平, 提升机体骨矿物质化的能力, 进而避免患者出现骨骼及其他器官严重异常和早夭。Strensiq 于 2015 年被 FDA 批准作为 ERT 药物治疗 HPP, 适用于治疗新生儿、婴幼儿和青少年患者^[50]。

2.2.8 溶酶体酸性脂肪酶缺乏症

溶酶体酸性脂肪酶缺乏症(lysosomal acid lipase deficiency, LALD)是一种罕见的常染色体隐性遗传性溶酶体贮积病。该病由基因突变导致溶酶体酸性脂肪酶功能缺失或降低, 使酸性脂肪酶不能在溶酶体中降解低密度脂蛋白、胆固醇酯和三酰甘油, 进而使胆固醇酯和三酰甘油在体内蓄积, 血浆胆固醇水平升高, 引起内脏器官黄瘤样病变, 常累及肝、肾上腺、脾、淋巴结、骨髓等多个器官^[51]。在 2015 年获得 FDA 批准的 Kanuma (活性成分为重组人溶酶体酸性脂肪酶)成为首款治疗 LALD 的药物^[52]。

2.3 心血管疾病的治疗

心血管疾病是由冠心病、外周动脉疾病、脑血管疾病、风湿性心脏病、先天性心脏病、深静脉血栓形成和肺栓塞等重要疾病组成的一类疾病, 导致该类疾病的其中一个原因是血管内血栓的形成。抗凝剂、血小板抑制剂、外科治疗或溶栓酶治疗是主要的治疗方法。使用溶栓酶进行溶栓治疗比使用抗凝剂和血小板抑制剂具有优势, 因为这些酶可以直接作用于现有的血栓^[35]。

链激酶(streptokinase, SK)最早于 1933 年被分离出来, 用于治疗外周动脉闭塞疾病。1972 年, 尿激酶被用于栓塞类疾病的治疗。1982 年, 基因泰克公司宣布成功生产重组的组织纤溶酶原激活剂 Alteplase (第二代纤溶酶原激活剂), 获得美国 FDA 的批准并于 1987 年批准用于治疗心肌梗死。Tenecteplase (第三代纤溶酶原激活剂)于 2000 年 6 月获得美国 FDA 批准。第三代分子主要是 t-PA 变体, 经突变之后 Tenecteplase 表现出良好的稳定性、安全性和有效性, 增强了纤维蛋白的特异性, 临床上用于发病 6 h 以内的急性心肌梗死患者的溶栓治

疗。在未来还可以使用脂质体技术靶向递送这些药物^[53]。直接作用于纤维蛋白或纤维蛋白原的蛇毒去纤酶, 对治疗脑血栓、心肌梗死具有很好的疗效。水蛭素是一种作用于凝血酶的抗凝抗栓剂, 其是凝血酶的专一抑制剂, 可以有效地抑制血栓的形成^[35]。蚓激酶(lumbrokinases, LKs)是一组从不同种类的蚯蚓中分离得到的蛋白酶, 如 *Lumbricus rubellus* 和 *Eisenia fetida*^[54]。这些蛋白酶不仅能直接降解纤维蛋白, 还能激活纤溶酶原和凝血酶原等前酶。Wang 等经研究指出 LK 还能降低血液黏度、提高血氧饱和度、改善血液循环, 是一种脑梗塞有效治疗剂^[55]。博洛克(蚓激酶肠溶胶囊)已获得中国食品药品监督管理局的批准。在美国、加拿大、日本等国家也有口服补品。

2.4 抗感染与炎症以及烧伤、清疮等疾病的治疗

溶菌酶是一种天然的抗菌剂, 在食品和消费品中被广泛应用。另外, Lee-Huang 等报道称, 溶菌酶可以选择性地降解病毒 RNA, 具有抗艾滋病病毒的活性^[56]。甲壳素是真菌、原生动物和蠕虫等多种病原生物细胞壁的重要组成部分, 是抗菌药物的良好靶点, 因此, 能够水解甲壳素的几丁质酶也是一种天然的抗菌剂^[57]。

溶葡萄球菌酶可用于治疗由金黄色葡萄球菌感染引起的心内膜炎、骨髓炎、肺炎、毒性休克综合征、食物中毒和各种皮肤感染(如毛囊炎、脓肿和乳腺炎等)。随着金黄色葡萄球菌耐药性问题的日益严峻, 对这些感染的治疗变得越来越具有挑战性, 而重组溶葡萄球菌酶是治疗金黄色葡萄球菌感染的最有希望的方法之一^[58]。目前外用的重组溶葡萄球菌酶涂剂正在由上海高科联合生物技术研发有限公司进行 III 期临床试验。

临床上常应用胰蛋白酶、糜蛋白酶、菠萝蛋白酶等治疗炎症和浮肿以清除坏死的组织、增加组织通透性、抑制水肿、促进病灶附近组织液的排出并抑制肉芽的形成。实验证明, 口服大剂量这些酶的肠溶片都具有很强的消水肿作用, 因此常用于治疗软组织损伤、椎间盘脱出所致的坐骨神经痛和缓解

背部疼痛及牙科手术等。此外, 胶原蛋白酶可用于烧伤清疮, 且去除结痂效果明显; 硫酸软骨素酶可用于治疗脊椎损伤, 能有效地促进脊索损伤的修复。

DNA 损伤在皮肤癌和癌前皮损的发生发展中起重要作用。用脂质体载体将细菌 DNA 修复酶(T4 核酸内切酶 V)外用于着色性干皮病患者日晒损伤的皮肤, 可降低两种损伤的发展速度, 而且在治疗一年内无不良反应^[59]。Debrase 凝胶敷料, 包含从菠萝中提取的酶的混合物, 在 2002 年获得 FDA 批准, 用于治疗部分和全层烧伤。Vibrilase (重组 vibriolysin) 是一种来自海洋微生物 *Vibrio proteolyticus* 的蛋白水解酶, 已被证明对皮肤烧伤中的变性蛋白有疗效^[60]。

2.5 胃肠道疾病治疗

利用酶作为消化促进剂是治疗性酶的最早应用。这类酶的作用是水解和消化食物中的成分, 如蛋白质、糖类和脂类等, 常用作促进消化作用的助消化剂, 多是含有蛋白酶、淀粉酶、脂肪酶和纤维素酶的复合制剂。

胰酶制剂是含脂肪酶、蛋白酶和淀粉酶的复合酶制剂, 用于治疗吸收障碍和胰液分泌不足, 尤其是胆囊纤维变性病人。胰酶复合物 TheraclEC TotalTM 是 3 种结晶经交联处理的复方组成, 于 2002 年在美国批准作为孤儿药物。胰酶制剂替代治疗是纠正胰源性消化不良的主要措施, 可以有效治疗胰腺外分泌功能不全, 缓解胰源性疼痛。

3 治疗酶新品种的研究

3.1 抗肿瘤酶新品种的研究

3.1.1 葡萄糖氧化酶

葡萄糖氧化酶(glucose oxidase, GOx)是一种广泛存在于生物体内的内源性氧化还原酶。近年来, GOx 因其固有的生物相容性、无毒性 and 独特的对葡萄糖的催化作用, 在生物医学领域引起了越来越多的关注。GOx 高效催化葡萄糖氧化成葡萄糖酸和过氧化氢(H_2O_2), 可被各种生物传感器用于检测癌症

生物标志物。基于 GOx 的催化性质, 其可作为治疗癌症的药物有以下理由: (1) 葡萄糖的消耗为癌症饥饿治疗提供了一种替代策略; (2) 耗氧增加肿瘤缺氧, 可用于缺氧激活治疗; (3) 葡萄糖酸的产生增强了肿瘤微环境的酸性, 可触发 pH 响应性药物释放; (4) H_2O_2 的产生增加了肿瘤氧化应激水平, H_2O_2 可转化为有毒的羟基自由基, 在光照或 Fenton 反应下杀死癌细胞。更重要的是, GOx 可以与其他酶、缺氧激活前药、光敏剂或 Fentons 试剂相结合, 产生基于癌症饥饿治疗、缺氧激活治疗、氧化治疗、光动力治疗或光热治疗的多模式协同癌症治疗。预期这种多模式方法比单一治疗模式具有更强的治疗效果^[61]。

3.1.2 犬尿氨酸酶

部分肿瘤细胞中会高表达吲哚胺 2,3-双加氧酶 1 (indoleamine 2,3-dioxygenase1, IDO 1)或色氨酸 2,3-双加氧酶(tryptophan-2,3-dioxygenase, TOD), IDO 1 或 TOD 会催化色氨酸过度生成犬尿氨酸, 从而抑制免疫。犬尿氨酸酶可以催化犬尿氨酸水解生成无毒的邻氨基苯甲酸与丙氨酸, 从而激发人体的免疫系统攻击肿瘤; 2018 年发表在 *Nature Biotechnology* 杂志上的研究表明, 体内 PEG-犬尿氨酸酶治疗可清除犬尿氨酸, 与免疫检查点抑制剂和肿瘤疫苗联合使用对黑色素瘤、乳腺癌及结肠癌表现出良好的治疗效果^[62]。

3.1.3 神经氨酸苷酶及核糖核酸酶

神经氨酸苷酶是唾液酸酶介导的肿瘤发生调节中的一个新兴靶点。该酶可去除癌细胞表面唾液酸残基, 改变其免疫原性, 使其对免疫反应更敏感。核糖核酸酶和多种蛋白水解酶作为抗肿瘤药物的研究正处于探索中^[63]。

3.2 溶栓酶新品种的研究

纳豆激酶(natto kinase, NK)是由纳豆枯草芽孢杆菌产生的一种具有强烈溶栓功能的蛋白酶。NK 来源于传统发酵食品, 生产工艺简便、溶栓效果好、安全性高, 有着良好的应用前景。纳豆激酶目前只有口服制剂, 对其纯化与注射剂的研究

还有待进行^[64]。

去氨普酶(desmoteplase)是一种纤维蛋白特异性高且无神经毒性的溶栓药。1974 年从吸血蝙蝠 *Desmodus rotundus* 的唾液中分离得到。这些食血动物在以家畜的血液为食时使用去氨普酶,以保持血液的流动性,减少血栓的形成。由于其非常强的纤维蛋白特异性,无神经毒性,且半衰期超过 2 h,使得去氨普酶成为一种很有前途的活化剂,具有治疗心血管疾病的潜力。但是,这些优点在进行随机临床实验时却没有体现出来^[65]。因此,很多人在去氨普酶的蛋白质工程改造上做出了许多努力。最近报道了一种结合了去氨普酶和第 3 代纤溶酶原激活剂 Tenecteplase 结构的嵌合蛋白,在该突变体中删除了 Tenecteplase 的 Kringle 2 结构域,并将 Finger 结构域替换为去氨普酶结构域,以提高其对纤维蛋白的特异性,然而构建的突变体仅比 t-PA 特异性高 8 倍,但比去氨普酶特异性低 25 倍^[66]。另一种方法侧重于防止 t-PA 的双链形式的产生。纤溶酶敏感位点被去氨普酶(Arg275His、Ile276Ser、Lys277Thr)的相应序列取代后,纤维蛋白的特异性提高了 28 倍。另一方面,将纤溶酶敏感位点(His191Arg、Ser192Ile、Thr193Lys)引入去氨普酶中导致特异性激活的丢失,从而证实了该区域对纤维蛋白选择性的重要性^[65]。

3.3 α -分泌酶在阿尔兹海默症中的应用研究

阿尔兹海默症(Alzheimer's disease, AD)是一种起病隐匿的进行性发展的神经系统退行性疾病,主要是由于患者脑内 β -淀粉样蛋白(β -amyloid, A β)代谢失衡、异常聚集并最终导致神经损伤。体内 A β 是由 APP (amyloid precursor protein)经 β -分泌酶和 γ -分泌酶系列水解而来。此外,APP 也可在 α -分泌酶和 γ -分泌酶的联合使用下水解成对细胞有益的胞外片段(soluble amyloid precursor protein alpha, sAPP α),同时去除 A β 完整分子的沉积^[67]。因此, α -分泌酶可以作为 AD 的治疗靶点,增加 α -分泌酶的表达和 sAPP α 的分泌也是用来治疗 AD 的有效途径^[67]。一类属于解聚素和金属蛋白酶(adisintegrin

and metalloproteinase, ADAM)家族成员的蛋白质(主要指 ADAM10、ADAM17 和 ADAM9),被认为具有 α -分泌酶的生物学功能;这类分子是具有多结构域的跨膜蛋白,其金属蛋白酶结构域是发挥 α -分泌酶活性的关键部位;将 ADAMs 基因转染到细胞中能增加 ADAMs 的表达,可使 sAPP α 分泌增加,A β 沉积减少,而应用 RNAi 下调其表达,则产生相反的结果。流行病学研究显示,因高血脂服用他汀类药物、绝经后服用雌性激素及因关节炎服用非甾体抗炎药的人群 AD 发生的危险性降低,随后的研究显示这些药都能够通过不同的途径使 α -分泌酶的活性发生改变; α -分泌酶作为各种物质影响 APP 分解代谢调节的最后通路,提示其有可能作为治疗 AD 的新的药物靶点^[68]。

3.4 酶在清除神经毒剂中的应用研究

目前,对神经毒剂中毒的治疗可以提高存活率,但对神经毒剂引起的运动和认知缺陷却不能做到很好的防护。Rochu 等研究表明,在体内使用人血浆衍生的丁基胆碱酯酶(human plasma-derived butyrylcholinesterase, HuBuChE)来中和神经毒剂的毒性作用,不仅助于生存,还可防止神经毒剂暴露后认知功能下降^[69]。对氧磷酶-1 (paraoxonase1, PON1)是一种天然存在的人血清酶,具有催化神经毒剂水解的能力,已知的 PON1 同工酶都能水解梭曼(甲氟磷酸异己酯、胆碱酯酶抑制剂)、沙林(甲氟磷酸异丙酯、乙酰胆碱酯酶抑制剂)和塔崩(二甲氨基磷酸乙酯、胆碱酯酶抑制剂)等神经毒剂及其相关的同分异构体,但分解的量较少,无法提供非常有效的保护^[70]。因此,或许通过定向进化策略可以设计出 PON1 的突变体,增强其活性和立体专一性,提高其对神经毒剂的催化效率,用于清除一些毒性强的神经毒剂^[71]。另外,人类的脯氨酸酶(prolidase)也具有相似的酶催化活性,其他非人类高效酶如细菌磷酸三酯酶(phosphotriesterase)或鱿鱼二异丙基氟磷酸酶(diisopropylfluorophosphatase)也存在活性,通过封装、聚乙二醇化或其他修饰是降低其固有的免疫原性的可能策略^[72]。

3.5 超氧化物歧化酶及过氧化氢酶的应用研究

超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)是细胞中最重要的解毒酶, 其将剧毒的超氧阴离子转化为中度毒性的过氧化氢。经过 PEG 修饰的 SOD (PEG-SOD)在血管、心脏、肺、大脑、肝脏和肾脏都有治疗活性。在血管中, PEG-SOD 已被证明能更好地抵抗氧化应激, 改善内皮细胞的舒张功能, 抑制脂质氧化; 在心脏中, PEG-SOD 对再灌注性心律失常和心肌缺血的治疗效果与天然 SOD 效果相同; 在肺组织中, PEG-SOD 似乎可以降低氧毒性和大肠杆菌诱导的肺损伤, 但在内毒素诱导的急性呼吸衰竭相关的肺生理病理学治疗和减少石棉诱导的细胞损伤中却无作用; 在脑缺血再灌注损伤中, PEG-SOD 的作用尚不确定, 这也是由于脑细胞难以穿透所致; 在肾脏和肝脏缺血时, PEG-SOD 可改善再灌注损伤。因此, 对 SOD 的研究应需进一步推进^[73]。

过氧化氢酶与 SOD 类似, 是另一种抗氧化剂, 可以将过氧化氢转化为水和氧气。活性氧(reactive oxygen species, ROS)是失血性休克多器官功能衰竭的重要因素^[74]。王切等研究指出肾缺血再灌注损伤可导致肝遭受过氧化损伤, 形态结构和功能受损, 过氧化氢酶可能在此过程中发挥了抗氧化应激作用, 对肝具有保护功能^[75]。过氧化氢酶有望通过减低活性氧的损伤来减低失血性休克器官损伤。

4 结论与展望

近年来, 治疗性酶已成为制药工业的主要参与者。随着以酶为基础的治疗新靶点的出现, 其应用有望在未来有所增长。酶制造商以及其他各个行业目前也正逐渐深入酶的研究, 以寻找新的酶以及更好地使用酶的改进方法。另外, 许多疾病的发生, 以及未知疾病的暴发都增加了对酶作为治疗剂的需求。目前, 治疗酶可作为药丸、胶囊、粉剂和食品补充剂等。

由微生物产生的重要医学用酶被用作抗凝血剂、溶瘤药、溶栓药、纤溶药、黏液药、抗炎药、

抗菌剂和助消化剂^[76]。酶与其他药物的组合也有诱导协同作用的能力。然而, 治疗酶遇到的一个主要问题是在其人体内的不稳定性和低循环寿命。酶的分子量大、免疫原性、半衰期短和较高的纯度要求是限制酶使用的关键因素。虽然过去几十年药物开发已经使酶治疗发生了革命性的变化, 有些疾病的治疗已经不需要静脉注射治疗用酶, 逐渐被口服和吸入型酶制剂取代, 现在还可采用纳米材料进行递送, 对酶制剂进行化学修饰(如加 PEG)也可大大降低治疗酶的免疫原型, 延长其半衰期, 而且已经开发出稳定性更好、抗原性更低的新药, 但仍存在许多挑战。蛋白质工程、基因组工程的发展为调整治疗酶的生化和生物物理特性以满足临床应用的特殊需要提供了新的技术和手段。

REFERENCES

- [1] Qin FY, Qin B, Zhang WH, et al. Discovery of a switch between Prelog and anti-Prelog reduction toward halogen-substituted acetophenones in short-chain dehydrogenase/reductases[J]. ACS Catalysis, 2018, 8(7): 6012-6020
- [2] Qin B, Matsuda Y, Mori T, et al. An unusual chimeric diterpene synthase from *Emericella varicolor* and its functional conversion into a sesterterpene synthase by domain swapping[J]. Angewandte Chemie International Edition, 2016, 55(5): 1658-1661
- [3] Qin FY, Qin B, Mori T, et al. Engineering of *Candida glabrata* ketoreductase 1 for asymmetric reduction of α -halo ketones[J]. ACS Catalysis, 2016, 6(9): 6135-6140
- [4] Shahriari M, Zahiri M, Abnous K, et al. Enzyme responsive drug delivery systems in cancer treatment[J]. Journal of Controlled Release, 2019, 308: 172-189
- [5] Gurung N, Ray S, Bose S, et al. A broader view: microbial enzymes and their relevance in industries, medicine, and beyond[J]. BioMed Research International, 2013, 2013: 329121
- [6] Baldo BA. Enzymes approved for human therapy: indications, mechanisms and adverse effects[J]. BioDrugs, 2015, 29(1): 31-55
- [7] Kurosawa Y, Nirengi S, Homma T, et al. A single-dose of oral nattokinase potentiates thrombolysis and anti-coagulation profiles[J]. Scientific Reports, 2015, 5: 11601
- [8] da Gama Ferreira R, Azzoni AR, Freitas S. Techno-economic analysis of the industrial production of a low-cost enzyme using *E. coli*: the case of recombinant β -glucosidase[J]. Biotechnology for Biofuels, 2018, 11: 81

- [9] Dean SN, Turner KB, Medintz IL, et al. Targeting and delivery of therapeutic enzymes[J]. *Therapeutic Delivery*, 2017, 8(7): 577-595
- [10] Lambert C, Garvey M, Klinger J, et al. Challenges and advances in the heterologous expression of cellulolytic enzymes: a review[J]. *Biotechnology for Biofuels*, 2014, 7: 135
- [11] Khan S, Ullah MW, Siddique R, et al. Role of recombinant DNA technology to improve life[J]. *International Journal of Genomics*, 2016, 2016: 2405954
- [12] Izadpanah Qeshmi F, Homaei A, Fernandes P, et al. Marine microbial L-asparaginase: biochemistry, molecular approaches and applications in tumor therapy and in food industry[J]. *Microbiological Research*, 2018, 208: 99-112
- [13] Shi R, Liu Y, Mu Q, et al. Biochemical characterization of a novel L-asparaginase from *Paenibacillus barengoltzii* being suitable for acrylamide reduction in potato chips and mooncakes[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2017, 96: 93-99
- [14] Meghavarham AK, Salah M, Sreepriya M, et al. Growth inhibitory and proapoptotic effects of L-asparaginase from *Fusarium culmorum* ASP-87 on human leukemia cells (Jurkat)[J]. *Fundamental & Clinical Pharmacology*, 2017, 31(3): 292-300
- [15] Cecconello DK, de Magalhães MR, Werlang ICR, et al. Asparaginase: an old drug with new questions[J]. *Hematology, Transfusion and Cell Therapy*, 2019. DOI: 10.1016/j.htct.2019.07.010
- [16] Meena B, Anburajan L, Dheenan PS, et al. Novel glutaminase free L-asparaginase from *Nocardia alba* NIOT-VKMA08: production, optimization, functional and molecular characterization[J]. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 2015, 38(2): 373-388
- [17] Galindo-Rodríguez G, Jaime-Pérez JC, Salinas-Carmona MC, et al. Do immunoglobulin G and immunoglobulin E anti-L-asparaginase antibodies have distinct implications in children with acute lymphoblastic leukemia? A cross-sectional study[J]. *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia*, 2017, 39(3): 202-209
- [18] Labrou NE, Papageorgiou AC, Avramis VI. Structure-function relationships and clinical applications of L-asparaginases[J]. *Current Medicinal Chemistry*, 2010, 17(20): 2183-2195
- [19] Somani RR, Chaskar PK. Arginine deiminase enzyme evolving as a potential antitumor agent[J]. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*, 2018, 18(4): 363-368
- [20] Xiong LF, Teng JLL, Botelho MG, et al. Arginine metabolism in bacterial pathogenesis and cancer therapy[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2016, 17(3): 363
- [21] Wu LN, Li L, Meng SC, et al. Expression of argininosuccinate synthetase in patients with hepatocellular carcinoma[J]. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 2013, 28(2): 365-368
- [22] Ott PA, Carvajal RD, Pandit-Taskar N, et al. Phase I/II study of pegylated arginine deiminase (ADI-PEG 20) in patients with advanced melanoma[J]. *Investigational New Drugs*, 2013, 31(2): 425-434
- [23] Beddowes E, Spicer J, Chan PY, et al. Phase 1 dose-escalation study of pegylated arginine deiminase, cisplatin, and pemetrexed in patients with argininosuccinate synthetase 1-deficient thoracic cancers[J]. *Journal of Clinical Oncology*, 2017, 35(16): 1778-1785
- [24] Jiang H, Guo S, Xiao D, et al. Arginine deiminase expressed *in vivo*, driven by human telomerase reverse transcriptase promoter, displays high hepatoma targeting and oncolytic efficiency[J]. *Oncotarget*, 2017, 8(23): 37694-37704
- [25] Feun L, Savaraj N. Pegylated arginine deiminase: a novel anticancer enzyme agent[J]. *Expert Opinion on Investigational Drugs*, 2006, 15(7): 815-822
- [26] Singh PK, Deorukhkar AA, Venkatesulu BP, et al. Exploiting arginine auxotrophy with pegylated arginine deiminase (ADI-PEG20) to sensitize pancreatic cancer to radiotherapy via metabolic dysregulation[J]. *Molecular Cancer Therapeutics*, 2019, 18(12): 2381-2393
- [27] Han RZ, Xu GC, Dong JJ, et al. Arginine deiminase: recent advances in discovery, crystal structure, and protein engineering for improved properties as an anti-tumor drug[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2016, 100(11): 4747-4760
- [28] Maletzki C, Rosche Y, Riess C, et al. Deciphering molecular mechanisms of arginine deiminase-based therapy – comparative response analysis in paired human primary and recurrent glioblastomas[J]. *Chemico-Biological Interactions*, 2017, 278: 179-188
- [29] Szlosarek PW, Steele JP, Nolan L, et al. Arginine deprivation with pegylated arginine deiminase in patients with argininosuccinate synthetase 1-deficient malignant pleural mesothelioma: a randomized clinical trial[J]. *JAMA Oncol*, 2017, 3(1): 58-66
- [30] Covini D, Tardito S, Bussolati O, et al. Expanding targets for a metabolic therapy of cancer: L-asparaginase[J]. *Recent Patents on Anti-Cancer Drug Discovery*, 2012, 7(1): 4-13
- [31] Cheng F, Yang JH, Schwaneberg U, et al. Rational surface engineering of an arginine deiminase (an antitumor enzyme) for increased PEGylation efficiency[J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2019, 116(9): 2156-2166
- [32] Cluntun AA, Lukey MJ, Cerione RA, et al. Glutamine metabolism in cancer: understanding the heterogeneity[J]. *Trends in Cancer*, 2017, 3(3): 169-180
- [33] Chen L, Cui HM. Targeting glutamine induces apoptosis: a cancer therapy approach[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2015, 16(9): 22830-22855

- [34] Matés JM, Campos-Sandoval JA, Márquez J. Glutaminase isoenzymes in the metabolic therapy of cancer[J]. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer*, 2018, 1870(2): 158-164
- [35] Li Q, Wang YT, Wu WT. Research on the application of enzymes as therapeutic drugs[A]//China Bio-Pharmaceutical Innovation Research Forum[C]. Deyang: Chinese Pharmaceutical Association, 2012: 51-62 (in Chinese)
李谦, 王友同, 吴梧桐. 酶作为治疗药物的应用研究[A]//中国生物药物创新研究论坛论文集[C]. 德阳: 中国药学会, 2012: 51-62
- [36] Sharma SK, Bagshawe KD. Antibody directed enzyme prodrug therapy (ADEPT): trials and tribulations[J]. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2017, 118: 2-7
- [37] Deckert PM, Bornmann WG, Ritter G, et al. Specific tumour localisation of a huA33 antibody - carboxypeptidase A conjugate and activation of methotrexate-phenylalanine[J]. *International Journal of Oncology*, 2004, 24(5): 1289-1295
- [38] Chen KC, Wu CH, Chang CY, et al. Directed evolution of a lysosomal enzyme with enhanced activity at neutral pH by mammalian cell-surface display[J]. *Chemistry & Biology*, 2008, 15(12): 1277-1286
- [39] Mohamed FE, Al-Gazali L, Al-Jasmi F, et al. Pharmaceutical chaperones and proteostasis regulators in the therapy of lysosomal storage disorders: current perspective and future promises[J]. *Frontiers in Pharmacology*, 2017, 8: 448
- [40] Wang L, Gamez A, Sarkissian CN, et al. Structure-based chemical modification strategy for enzyme replacement treatment of phenylketonuria[J]. *Molecular Genetics and Metabolism*, 2005, 86(1/2): 134-140
- [41] Bell SM, Wendt DJ, Zhang YH, et al. Formulation and PEGylation optimization of the therapeutic PEGylated phenylalanine ammonia lyase for the treatment of phenylketonuria[J]. *PLoS One*, 2017, 12(3): e0173269
- [42] Yang SK. PAL enzymatic biotherapy: hope for phenylketonuria[N]. *China Science Daily*, 2018-07-26(6) (in Chinese)
杨顺楷. PAL 酶法生物治疗: 苯丙酮尿症的希望[N]. *中国科学报*, 2018-07-26(6)
- [43] Isabella VM, Ha BN, Castillo MJ, et al. Development of a synthetic live bacterial therapeutic for the human metabolic disease phenylketonuria[J]. *Nature Biotechnology*, 2018, 36(9): 857-864
- [44] Sonoda H, Morimoto H, Yoden E, et al. A blood-brain-barrier-penetrating anti-human transferrin receptor antibody fusion protein for neuronopathic mucopolysaccharidosis II[J]. *Molecular Therapy*, 2018, 26(5): 1366-1374
- [45] Harmatz P, Hendriks CJ, Lampe C, et al. The effect of galsulfase enzyme replacement therapy on the growth of patients with mucopolysaccharidosis VI (Maroteaux-Lamy syndrome)[J]. *Molecular Genetics and Metabolism*, 2017, 122(1/2): 107-112
- [46] Lourenço CM, Giugliani R. Evaluation of galsulfase for the treatment of mucopolysaccharidosis VI (Maroteaux-Lamy syndrome)[J]. *Expert Opinion on Orphan Drugs*, 2014, 2(4): 407-417
- [47] Kishnani PS, Beckemeyer AA. New therapeutic approaches for Pompe disease: enzyme replacement therapy and beyond[J]. *Pediatric Endocrinology Reviews: PER*, 2014, 12(S1): 114-124
- [48] Lü XL, Lin KL, Guo LL, et al. Overviews of the new drug in 2018 approved by U.S. FDA[J]. *Chinese Journal of Pharmaceuticals*, 2019, 50(1): 1-33 (in Chinese)
吕训磊, 林快乐, 郭琳琳, 等. 2018 年美国 FDA 批准上市的新药简介[J]. *中国医药工业杂志*, 2019, 50(1): 1-33
- [49] Mornet E. Hypophosphatasia[J]. *Metabolism*, 2018, 82: 142-155
- [50] Scott LJ. Asfotase alfa: a review in paediatric-onset hypophosphatasia[J]. *Drugs*, 2016, 76(2): 255-262
- [51] Zandanel S, Primavesi F, Aigner E. Hepatosteatosis from lysosomal acid lipase deficiency[J]. *Journal of Gastrointestinal Surgery*, 2019, 23(3): 601-602
- [52] Frampton JE. Sebelipase alfa: a review in lysosomal acid lipase deficiency[J]. *American Journal of Cardiovascular Drugs*, 2016, 16(6): 461-468
- [53] Koudelka S, Mikulik R, Masěk J, et al. Liposomal nanocarriers for plasminogen activators[J]. *Journal of Controlled Release*, 2016, 227: 45-57
- [54] Akazawa SI, Tokuyama H, Sato S, et al. High-pressure tolerance of earthworm fibrinolytic and digestive enzymes[J]. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2018, 125(2): 155-159
- [55] Wang XM, Fan SC, Chen Y, et al. Earthworm protease in anti-thrombosis and anti-fibrosis[J]. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 2019, 1863(2): 379-383
- [56] Lee-Huang S, Huang PL, Sun YT, et al. Lysozyme and RNases as anti-HIV components in β -core preparations of human chorionic gonadotropin[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1999, 96(6): 2678-2681
- [57] Mali N, Wavikar P, Vavia P. Serratiopeptidase loaded chitosan nanoparticles by polyelectrolyte complexation: *in vitro* and *in vivo* evaluation[J]. *AAPS PharmSciTech*, 2015, 16(1): 59-66
- [58] Duman ZE, Ünlü A, Çakar MM, et al. Enhanced production of recombinant *Staphylococcus simulans* lysostaphin using medium engineering[J]. *Preparative Biochemistry & Biotechnology*, 2019, 49(5): 521-528

- [59] Yarosh D, Klein J, O'Connor A, et al. Effect of topically applied T4 endonuclease V in liposomes on skin cancer in xeroderma pigmentosum: a randomised study[J]. *The Lancet*, 2001, 357(9260): 926-929
- [60] Patry J, Blanchette V. Enzymatic debridement with collagenase in wounds and ulcers: a systematic review and meta-analysis[J]. *International Wound Journal*, 2017, 14(6): 1055-1065
- [61] Fu LH, Qi C, Lin J, et al. Catalytic chemistry of glucose oxidase in cancer diagnosis and treatment[J]. *Chemical Society Reviews*, 2018, 47(17): 6454-6472
- [62] Triplett TA, Garrison KC, Marshall N, et al. Reversal of indoleamine 2,3-dioxygenase-mediated cancer immune suppression by systemic kynurenine depletion with a therapeutic enzyme[J]. *Nature Biotechnology*, 2018, 36(8): 758-764
- [63] Thulasiraman P, Kerr K, McAlister K, et al. Neuraminidase 1 regulates proliferation, apoptosis and the expression of cadherins in mammary carcinoma cells[J]. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 2019, 462(1/2): 207-215
- [64] Duan CR, Feng YF, Zhou H, et al. Optimization of fermentation condition of man-made bee-bread by response surface methodology[A]//Zhang TC, Nakajima M. *Advances in Applied Biotechnology*[M]. Berlin, Heidelberg: Springer, 2015: 353-363
- [65] Mican J, Toul M, Bednar D, et al. Structural biology and protein engineering of thrombolytics[J]. *Computational and Structural Biotechnology Journal*, 2019, 17: 917-938
- [66] Kazemali MR, Majidzadeh-A K, Sardari S, et al. Design of a novel chimeric tissue plasminogen activator with favorable Vampire bat plasminogen activator properties[J]. *Enzyme and Microbial Technology*, 2014, 67: 82-86
- [67] Ray B, Maloney B, Sambamurti K, et al. Rivastigmine modifies the α -secretase pathway and potentially early Alzheimer's disease[J]. *Translational Psychiatry*, 2020, 10(1): 47
- [68] Sun Y, Chen H, Wu CY. Evaluation of clinical efficacy of α -secretase in the treatment of Alzheimer's disease[J]. *International Journal of Clinical and Experimental Medicine*, 2018, 11(6): 6076-6081
- [69] Rochu D, Chabrière E, Masson P. Human paraoxonase: a promising approach for pre-treatment and therapy of organophosphorus poisoning[J]. *Toxicology*, 2017, 233(1/3): 47-59
- [70] Gupta RC. *Handbook of Toxicology of Chemical Warfare Agents*[M]. 2nd ed. Amsterdam: Academic Press, 2015
- [71] Wille T, Thiermann H, Worek F. *In vitro* kinetics of nerve agent degradation by fresh frozen plasma (FFP)[J]. *Archives of Toxicology*, 2013, 88(2): 301-307
- [72] Fan FF, Zheng YC, Zhang YW, et al. A comprehensive understanding of enzymatic degradation of the g-type nerve agent by phosphotriesterase: revised role of water molecules and rate-limiting product release[J]. *ACS Catalysis*, 2019, 9(8): 7038-7051
- [73] Che MX, Wang R, Li XX, et al. Expanding roles of superoxide dismutases in cell regulation and cancer[J]. *Drug Discovery Today*, 2016, 21(1): 143-149
- [74] Koehler RC, Wang J, Seno S, et al. Neuroprotection with polynitroxylated PEGylated Hemoglobin as a macromolecular superoxide dismutase/catalase mimetic drug for resuscitation after traumatic brain injury combined with hemorrhage shock[J]. *The FASEB Journal*, 2019, 33(S1): 688
- [75] Wang Q, Wang SL, Wang L. Expression of peroxiredoxin I, catalases and extracellular SOD in the liver of model rats with renal ischemia-reperfusion injury[J]. *Chinese Journal of Anatomy*, 2016, 39(4): 401-405 (in Chinese)
王切, 王素玲, 王磊. 大鼠肾缺血再灌注损伤肝内过氧化酶 I、过氧化氢酶、细胞外超氧化物歧化酶的表达变化[J]. *解剖学杂志*, 2016, 39(4): 401-405
- [76] Nunes CS, Kumar V. *Enzymes in Human and Animal Nutrition: Principles and Perspectives*[M]. London: Academic Press, 2018: 301-312