



(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公告本

(11)證書號數：TW I804691 B

(45)公告日：中華民國 112 (2023) 年 06 月 11 日

(21)申請案號：108138739

(22)申請日：中華民國 108 (2019) 年 10 月 25 日

(51)Int. Cl. : A61K38/38 (2006.01)

C12N9/78 (2006.01)

A61P3/00 (2006.01)

A61P3/04 (2006.01)

(30)優先權：2019/05/31 中國大陸

PCT/CN2019/089583

(71)申請人：香港理工大學(香港地區) THE HONG KONG POLYTECHNIC UNIVERSITY (HK)
香港香港中文大學(香港地區) THE CHINESE UNIVERSITY OF HONG KONG (HK)
香港

(72)發明人：梁 潤松 LEUNG, YUN CHUNG (HK)；沈 秀媛 SHUM, ALISA SAU-WUN (HK)

(74)代理人：黃瑞賢

(56)參考文獻：

EP 0956864A1

EP 2411040B1

US 2014/0255377A1

審查人員：吳祖漢

申請專利範圍項數：13 項 圖式數：70 共 298 頁

(54)名稱

一種用於癌症、肥胖、代謝失調、及相關併發症與合併症之精胺酸消耗劑的組成物及用途

(57)摘要

本發明係關於精胺酸酶白蛋白結合結構域(ABD)融合蛋白及其製備方法與用途。本發明亦提供關於消耗精胺酸的方法，前述方法可用於治療肥胖、代謝失調、及相關併發症與合併症。

I804691

發明摘要

※ 申請案號：108138739

※ 申請日： 108年10月25日 ※IPC 分類： **A61K 38/38** (2006.01)
C12N 9/78 (2006.01)
A61P 3/00 (2006.01)
A61P 3/04 (2006.01)

【發明名稱】(中文/英文)

一種用於癌症、肥胖、代謝失調、及相關併發症與合併症之精胺酸消耗劑的組成物及用途

【中文】

本發明係關於精胺酸酶白蛋白結合結構域(ABD)融合蛋白及其製備方法與用途。本發明亦提供關於消耗精胺酸的方法，前述方法可用於治療肥胖、代謝失調、及相關併發症與合併症。

【代表圖】

【本案指定代表圖】：無

【本代表圖之符號簡單說明】：無

發明專利說明書

(本說明書格式、順序，請勿任意更動)

【發明名稱】(中文／英文)

一種用於癌症、肥胖、代謝失調、及相關併發症與合併症之精胺酸消耗劑的組成物及用途

【技術領域】

【0001】 本發明係關於精胺酸酶與白蛋白結合結構域(ABD)融合蛋白及其製備方法與用途。本發明亦提供關於消耗精胺酸的方法，可用於治療肥胖、代謝失調、及/或相關併發症、及/或合併症。

【先前技術】

【0002】 精胺酸酶係為一水解酶，催化精胺酸異化為鳥胺酸與尿素，其存在於大多數的生物體中。在人體內，存在第一型與第二型兩種精胺酸酶的異構物，兩者在組織分布以及分子特性上有所不同。

【0003】 第一型精胺酸酶主要存在於肝臟的細胞質，其蛋白分子量為 35kD，且以三聚體的形式存在。第二型精胺酸酶，其蛋白分子量約為 38.5kD，通常位於細胞的粒線體內，且被認為是負責調控細胞中精胺酸/鳥胺酸的濃度。

【0004】 部分型態的腫瘤會缺乏或產生過少的精胺丁二酸合成酶(ASS)及/或鳥胺酸胺基甲醯基轉移酶(OTC)，由於在精胺酸的合成中需要這些酵素的參與，因此導致精胺酸營養缺陷。精胺酸的缺乏會使得這些腫瘤細胞變得脆弱並導致其迅速凋亡。因此，目前已開發由酵素介導的精胺

酸耗竭作為選擇性破壞腫瘤細胞的潛在策略。

【0005】 開發酵素介導的精胺酸耗竭作為治療癌症的手段，其中最主要的障礙是精胺酸酶的循環半衰期短(從幾分鐘至幾小時)，這是由於精胺酸酶的分子量很小(小於 50kDa)，因此容易快速被腎臟清除。為了在體循環中維持治療上的有效濃度，可能需要頻繁的給藥，然而這可能會引起病患服藥順從性的問題。

【0006】 鑒於此問題，目前已發展出不同策略以改善此治療型蛋白質的藥物動力學特性。已知聚乙二醇(PEG)可被連接至不同的治療型蛋白質藥物，即聚乙二醇化(PEGylation)，增加流體力學半徑，藉此減緩上述蛋白質藥物被腎臟清除下的減少。基於新生兒 Fc 受體(FcRn)的回收機制亦發展出融合蛋白的策略，藉由將蛋白質與免疫球蛋白的結晶片段區域(Fc)、白蛋白或白蛋白結合胜肽融合，增加它的循環半衰期。儘管如此，目前仍然需要開發具提升藥物動力學特性的精胺酸耗竭蛋白。

【0007】 肥胖、代謝失調、及相關併發症與合併症被認為是 21 世紀全球最嚴重的公共衛生問題之一，造成社會經濟極大的負擔。此外，肥胖所造成的代謝後果是驅動其他疾病的因子，如第二型糖尿病、葡萄糖失耐、胰島素抗性、高膽固醇血症、血脂異常、高血壓、心血管疾病及癌症。因此，提供預防及/或治療肥胖、代謝失調、及相關併發症與合併症的安全及有效的方法，著實有其必要性。肥胖是由於能量的攝入與消耗不平衡所造成的結果。對於某些個體而言，僅藉由改變生活型態想要減掉足夠的體重或維持持續的減重以改善健康，是沒有效果的。抗肥胖藥物包含奧利司他(羅氏鮮，Xenical)、氯卡色林(沛麗婷，Belviq)及芬特明與托吡酯的

組合物(酷適美，Qsymia)，可能會藉由降低食慾或減低脂肪吸收而達到減重效果。然而，這些藥物具有不同的副作用，如降低脂溶性維生素的吸收、頭痛、疲倦、暈眩、腹瀉及排便失禁。減重手術由於美觀需求而日益受到歡迎，例如胃束帶可用來治療嚴重的肥胖症狀，以達到長期減重，而抽脂手術用於除去多餘的局部性脂肪堆積物。然而，這些侵入性的手術亦具有很大的風險。因此，開發出治療肥胖、代謝失調、及相關併發症與合併症的改善方法，著實有其必要性。

【發明內容】

【發明所欲解決之技術問題】

【0008】 鑒於上述一或多個需求，本發明提供具有改善的體內半衰期及精胺酸異化活性的精胺酸酶白蛋白結合結構域融合蛋白。前述融合蛋白可用於治療以精胺酸消耗劑治療下有療效的疾病或症狀，其包含治療癌症、病毒感染、多發性硬化症、類風濕性關節炎、自體免疫疾病、先天性高精胺酸血症、移植物對抗宿主疾病(GvHD)、發炎、肥胖、及代謝失調及相關併發症與合併症。本發明之融合蛋白可從粗蛋白被快速生產與純化。本發明之融合蛋白可單獨使用，或與至少一種其他試劑組合使用從而對疾病的治療或預防產生協同效果。

【0009】 本發明亦提供透過消耗受試者體內的精胺酸以治療肥胖、代謝失調、及/或相關併發症及/或合併症的方法，例如施予前述受試者一精胺酸消耗劑。

【技術手段】

【0010】 第一態樣中，提供一種融合蛋白，其特徵係其包含一個白蛋白結合結構域(ABD)多肽及一個精胺酸酶多肽。

【0011】 在第一態樣之第 1 實施型態中，提供一種第一態樣之融合蛋白，其中，前述白蛋白結合結構域多肽係包含一個與 SEQ ID NO: 66、SEQ ID NO: 67 或 SEQ ID NO: 68 具有至少 93%序列同源性之多肽序列。

【0012】 在第一態樣之第 2 實施型態中，提供一種第一態樣之融合蛋白，其中，前述精胺酸酶多肽係包含一個與 SEQ ID NO: 69、SEQ ID NO: 70、SEQ ID NO: 71 或 SEQ ID NO: 72 具有至少 95%序列同源性之多肽序列。

【0013】 在第一態樣之第 3 實施型態中，提供一種第一態樣之融合蛋白，其中，前述白蛋白結合結構域多肽係包含一個與 SEQ ID NO: 66、SEQ ID NO: 67 或 SEQ ID NO: 68 具有至少 93%序列同源性之多肽序列，且前述精胺酸酶多肽係包含一個與 SEQ ID NO: 69、SEQ ID NO: 70、SEQ ID NO: 71 或 SEQ ID NO: 72 具有至少 95%同源性之多肽序列。

【0014】 在第一態樣之第 4 實施型態中，提供一種第一態樣之第 3 實施型態之融合蛋白，其中，前述白蛋白結合結構域多肽係包含一個與 SEQ ID NO: 66 具有至少 93%序列同源性之多肽序列，且前述精胺酸酶多肽係包含一個與 SEQ ID NO: 69 具有至少 95%序列同源性之多肽序列。

【0015】 在第一態樣之第 5 實施型態中，提供一種第一態樣之第 4 實施型態之融合蛋白，其中，前述融合蛋白係進一步由一個胜肽連接子連接白蛋白結合結構域多肽的 C 端以及精胺酸酶多肽的 N 端，其中，前述胜

肽連接子係為一個具有 1~20 個胺基酸的直鏈多肽。

【0016】 在第一態樣之第 6 實施型態中，提供一種第一態樣之第 5 實施型態之融合蛋白，其中，前述胜肽連接子係包含一個與 SEQ ID NO: 73 或 SEQ ID NO: 74 具有至少 90%序列同源性之多肽序列。

【0017】 在第一態樣之第 7 實施型態中，提供一種第一態樣之第 6 實施型態之融合蛋白，其中，前述白蛋白結合結構域多肽係包含一個與 SEQ ID NO: 67 具有至少 93%序列同源性之多肽序列，且前述精胺酸酶多肽係包含一個與 SEQ ID NO: 72 具有至少 95%序列同源性之多肽序列。

【0018】 在第一態樣之第 8 實施型態中，提供一種第一態樣之第 7 實施型態之融合蛋白，其中，前述胜肽連接子係為一個具有 4~8 個組胺酸的多組胺酸連結子。

【0019】 在第一態樣之第 9 實施型態中，提供一種第一態樣之融合蛋白，其中，前述融合蛋白係包含一個與 SEQ ID NO: 49、SEQ ID NO: 50、SEQ ID NO: 51、SEQ ID NO: 52、SEQ ID NO: 53、SEQ ID NO: 54、SEQ ID NO: 55、SEQ ID NO: 56、SEQ ID NO: 75 或 SEQ ID NO: 76 具有至少 98%序列同源性之多肽序列。

【0020】 在第一態樣之第 10 實施型態中，提供一種第一態樣之融合蛋白，其中，前述融合蛋白係包含一個與 SEQ ID NO: 49、SEQ ID NO: 50、SEQ ID NO: 75 或 SEQ ID NO: 76 具有至少 98%序列同源性之多肽序列。

【0021】 在第一態樣之第 11 實施型態中，提供一種第一態樣之融合蛋白，其中，前述融合蛋白係包含一個選自以下所組成之群組的多肽：

SEQ ID NO: 49、SEQ ID NO: 50、SEQ ID NO: 75 及 SEQ ID NO: 76。

【0022】 第二態樣中，提供一種醫藥組成物，其特徵係其包含第一態樣之融合蛋白以及一醫藥上可接受之載劑、賦形劑或其組合。

【0023】 第三態樣中，提供一種治療一有需求之受試者之癌症的方法，且前述治療係包含對前述受試者施予治療有效量之前述第一態樣之融合蛋白的步驟。

【0024】 第四態樣中，提供一種治療一有需求之受試者的方法，其係治療選自由以下所組成之群組之症狀的至少一種：肥胖、代謝失調以及相關併發症，且前述治療係包含對前述受試者施予治療有效量之精胺酸消耗劑的步驟。

【0025】 在第四態樣之第 1 實施型態中，提供一種前述方法，其中，前述代謝失調係選自由以下組成之群組：肥胖、葡萄糖失耐、高血糖症、及糖尿病，且前述相關併發症係為選自由以下症狀所組成之群組的至少一種：糖尿病腎病變、糖尿病視網膜病變、糖尿病血管病變、糖尿病神經病變、高膽固醇血症、血脂異常、高三酸甘油脂血症、高瘦體素血症、脂肪變性、脂性肝炎、纖維化、肝硬化、慢性低度發炎、高血壓、心血管疾病以及棕色脂肪白化。

【0026】 在第四態樣之第 2 實施型態中，提供一種前述方法，其中，前述代謝失調係為胰島素抗性。

【0027】 在第四態樣之第 3 實施型態中，提供一種前述方法，其中，前述治療肥胖係包含防止脂肪量增加及減少脂肪量的至少一種。

【0028】 在第四態樣之第 4 實施型態中，提供一種前述方法，其

中，前述代謝失調係選自由以下組成之群組：肝脂肪變性、腎脂肪變性、胰腺脂肪變性及心臟脂肪變性。

【0029】 在第四態樣之第 5 實施型態中，提供一種前述方法，其中，前述受試者血清中的精胺酸濃度被維持在 50 μ M 以下。

【0030】 在第四態樣之第 6 實施型態中，提供一種前述方法，其中，前述精胺酸消耗劑係為一精胺酸異化酶。

【0031】 在第四態樣之第 7 實施型態中，提供一種第四態樣之第 6 實施型態之方法，其中，前述精胺酸異化酶係為一精胺酸酶蛋白、一精胺酸去亞胺酶蛋白或一精胺酸脫羧酶蛋白。

【0032】 在第四態樣之第 8 實施型態中，提供一種第四態樣之第 7 實施型態之方法，其中，前述精胺酸酶蛋白、精胺酸去亞胺酶蛋白或精胺酸脫羧酶蛋白係進一步包含至少一個聚乙二醇(PEG)基團。

【0033】 在第四態樣之第 9 實施型態中，提供一種第四態樣之第 8 實施型態之方法，其中，前述精胺酸酶蛋白係包含一個具有 SEQ ID NO: 101、SEQ ID NO: 102、SEQ ID NO: 103 或 SEQ ID NO: 104 之多肽。

【0034】 在第四態樣之第 10 實施型態中，提供一種第四態樣之第 7 實施型態之方法，其中，前述精胺酸酶蛋白、精胺酸去亞胺酶蛋白或精胺酸脫羧酶蛋白係進一步包含一個白蛋白結合結構域或人血清白蛋白、或一個人類免疫球蛋白 G 的結晶片段區結構域(IgG Fc domain)。

【0035】 在第四態樣之第 11 實施型態中，提供一種第四態樣之第 10 實施型態之方法，其中，前述精胺酸異化酶係為一個融合蛋白，前述融合蛋白係包含一白蛋白結合結構域多肽及一精胺酸酶多肽；一白蛋白結合

結構域多肽及一精胺酸去亞胺酶多肽；或一白蛋白結合結構域多肽及一精胺酸脫羧酶多肽。

【0036】 在第四態樣之第 12 實施型態中，提供一種第四態樣之第 11 實施型態之方法，其中，前述精胺酸異化酶係為第一態樣之融合蛋白。

【0037】 在第四態樣之第 13 實施型態中，提供一種第四態樣之第 12 實施型態之方法，其中，前述精胺酸異化酶係包含一個與 SEQ ID NO: 49、SEQ ID NO: 50、SEQ ID NO: 51、SEQ ID NO: 52、SEQ ID NO: 53、SEQ ID NO: 54、SEQ ID NO: 55、SEQ ID NO: 56、SEQ ID NO: 75 或 SEQ ID NO: 76 具有至少 98%序列同源性之多肽。

【0038】 在第五態樣中，提供一種治療一有需求之受試者的方法，其係治療選自由以下所組成之群組之症狀的至少一種：病毒感染、多發性硬化症、類風濕性關節炎、自體免疫疾病、先天性高精胺酸血症、移植物對抗宿主疾病(GvHD)及發炎，且前述方法係包含對前述受試者施予治療有效量之第一態樣之融合蛋白。

【圖式簡單說明】

【0039】 結合圖式，並藉由下述之描述對本發明進行說明，從而使本發明上述及其他目的與特徵可更顯見。

【0040】 【圖 1】表示透過十二烷基硫酸鈉聚丙烯醯胺凝膠電泳(SDS-PAGE)純化白蛋白結合結構域(ABD)重組人類精胺酸酶(rhArg)融合蛋白 N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO: 50)。泳道 1：SDS-PAGE 低範圍分子量蛋白標記(Bio-rad)；泳道 2：20 倍稀釋的 N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO:

50)；泳道 3：10 倍稀釋的 N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO: 50)。

【0041】 【圖 2A】表示例示性 N-ABD094-rhArg 基因(SEQ ID NO: 38)，其中標註引子之結合位點。

【0042】 【圖 2B】表示 N-ABD094-rhArg(SEQ ID NO: 50)融合蛋白的蛋白序列，其等電點/分子量之理論值為 6.07/42555.38。

【0043】 【圖 3】表示經工程之 *Bacillus caldovelox* 精胺酸酶 BCA(S161C)-His (SEQ ID NO: 89)的蛋白序列，其具有一個絲胺酸置換為半胱胺酸的點突變及一個 C 端的組胺酸標籤。圖式中標註了第 161 位置的半胱胺酸殘基以及 6xHis 的標籤。

【0044】 【圖 4】表示透過 CLUSTALW 程式進行 BCA (S161C)-His (SEQ ID NO: 89)、BCA-6xHis-ABD 融合蛋白 BHA(SEQ ID NO: 75)及 BCA-ABD-6xHis 融合蛋白 BAH (SEQ ID NO: 76)蛋白序列比對的結果。序列比對分數：BCA 相對 BHA：99.6721；BCA 相對 BAH：98.0328；BHA 相對 BAH：97.5138。

【0045】 【圖 5A】表示純化 BHA (SEQ ID NO: 75)的溶離曲線圖，其蛋白係純化自培養於 500 mL 搖瓶的大腸桿菌(*E. coli*)，並透過 5 mL HiTrap chelating HP column 以單一步驟鎳離子螯合的層析法獲得。mAU：毫吸收單位；100% B=0.5 M 咪唑。

【0046】 【圖 5B】表示 BHA (SEQ ID NO: 75)透過鎳離子親和性層析法從管柱分離出的流出液(fraction)，並透過 SDS-PAGE 分析之電泳膠圖。M：SDS-PAGE 分子量蛋白標記，低範圍(Bio-Rad)；FT：上樣時未結合之流出液(flow through)；F2~F10：從管柱溶離出的流出液(fraction)。

【0047】 【圖 5C】表示純化 BAH (SEQ ID NO: 76)的溶離曲線圖，其蛋白係純化自培養於 500 mL 搖瓶的大腸桿菌(*E. coli*)，並透過 5 mL HiTrap chelating HP column 以單一步驟鎳離子螯合的層析法獲得。mAU：毫吸收單位；100% B=0.5 M 咪唑。

【0048】 【圖 5D】表示 BAH (SEQ ID NO: 76)透過鎳離子親和性層析法從管柱分離出的流出液(fraction)，其以 SDS-PAGE 分析之電泳膠圖。M：SDS-PAGE 分子量蛋白標記，低範圍(Bio-Rad)；FT：上樣時未結合之流出液(flow through)；F2~F10：從管柱溶離出的流出液(fraction)。

【0049】 【圖 6A】表示使用填充 196 mL 膠床體積的 XK50 鎳親和性管柱，大規模純化經工程 BCA (S161C)-His (SEQ ID NO: 89)的層析圖。與小規模純化類似，採用 4 段溶離梯度，並偵測吸光度在波長 280 nm 的溶離曲線圖。

【0050】 【圖 6B】表示大規模純化經工程 BCA (S161C)-His (SEQ ID NO: 89)所選定之流出液以 SDS-PAGE 分析之電泳膠圖。泳道 1：低範圍分子量蛋白標記；泳道 2：細胞裂解液的總蛋白；泳道 3：熱處理後所收集的可溶性蛋白；泳道 4：上樣時從 XK50 鎳親和性管柱流出之未結合的蛋白；泳道 5：非專一性結合的蛋白(合併 A6~C3 的流出液)；泳道 6 至 10：分別代表 E2、E3、F7、G3 及 A'5 的流出液。

【0051】 【圖 7】表示 N-ABD-rhArg 融合蛋白(SEQ ID NO: 49)與 HSA 在非變性 PAGE 的結合。如泳道 5~9 所示，30 pmol 的 HSA 分別與 7.5、15、30、60 及 120 pmol 的 N-ABD-rhArg (SEQ ID NO: 49)混合。泳道 2 及 3 分別顯示 30 pmol 的 HSA 及 N-ABD-rhArg (SEQ ID NO: 49)在非變

性 PAGE 的泳動率。泳道 1 無樣本或為空白樣本。泳道 10 為 120 pmol 的 N-ABD-rhArg (SEQ ID NO: 49)。

【0052】 【圖 8】表示 BHA 融合蛋白(SEQ ID NO: 75)與 HSA 在非變性 PAGE 的結合。如泳道 1~5 所示，60 pmol 的 HSA 分別與 6、12、60、300 及 600 pmol 的 BHA 融合蛋白(SEQ ID NO: 75)混合。泳道 6 及 7 分別顯示 60 pmol 的 HSA 及 BHA 融合蛋白(SEQ ID NO: 75)在非變性 PAGE 的泳動率。標記「BCA-ABD」的條帶為 BHA (SEQ ID NO: 75)。

【0053】 【圖 9】表示 BCA (S161C)-His (SEQ ID NO: 89)及 BHA 融合蛋白(SEQ ID NO: 75)對於小鼠血漿精胺酸的藥效動力學。透過靜脈注射(i.v.)或腹腔注射(i.p.)，對每隻 BALB/c 小鼠施用 250 U BCA (S161C)-His (SEQ ID NO: 89)或 BHA 融合蛋白(SEQ ID NO: 75)，並在注射後的指定時間點採集血漿樣本。時間 0 小時係指在注射前所採集的血漿樣本。透過 Biochrom 30 胺基酸分析儀檢測每個樣本中精胺酸的量。在這些圖中，當精胺酸濃度低於檢測極限(3 μ M)則視為 0 μ M，圖中每個點代表來自三隻小鼠的數據的平均值 $\pm$ SD。

【0054】 【圖 10】表示透過腹腔注射對 BALB/c 小鼠施用一劑(A) 125U；(B) 250U；及(C) 500U N-ABD-rhArg (SEQ ID NO: 49)後，使用 Biochrom 30 胺基酸分析儀檢測其血漿精胺酸的濃度。在第 0 天注射 N-ABD-rhArg (SEQ ID NO: 49)。

【0055】 【圖 11】表示製備聚乙二醇化的 His-rhArg (SEQ ID NO: 101)，並透過 SDS-PAGE 分析之電泳膠圖。泳道 1 及 8：SDS-PAGE 低範圍分子量蛋白標記(Bio-rad)；泳道 2 及 3：His-rhArg (SEQ ID NO: 101)；

泳道 4 及 5：60%溶離緩衝液；泳道 6 及 7：30%溶離緩衝液；泳道 9 及 10：聚乙二醇化的 His-rhArg (SEQ ID NO: 101)。PEG 的分子量為 5,000。所使用的 PEG 為甲氧基聚乙二醇-琥珀醯亞胺基丙酸脂(mPEG-SPA 5,000)。參考美國專利文獻 U.S. 8,679,810 中所述，His-rhArg (SEQ ID NO: 101)蛋白表面的離胺酸殘基透過一個丙醯胺(propionamidyl，SPA)連接子與 PEG (5,000 amu)共價連接。

【0056】 【圖 12】表示製備 N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO: 50)的實驗結果。泳道 1：SDS-PAGE 分子量蛋白標記；泳道 2：細胞裂解物；泳道 3：熱處理後；泳道 4：上樣時未結合之流出液；泳道 5：30%溶離緩衝液；泳道 6：60%溶離緩衝液；泳道 7：切向流過濾(Tangential Flow Filtration，TFF)後。在泳道 6 或 7 中主要的蛋白條帶係純化的 N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO: 50)。

【0057】 【圖 13】表示透過腹腔注射對餵食一般正常飼料(chow diet)的 C57BL/6J 公鼠施用一劑 500U N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO: 50) (溶於生理食鹽水)，並在注射後的不同時間點，使用 Agilent 6460 液相層析/電噴霧電離三重四極柱式質譜儀(檢測極限為 0.3 μ M 精胺酸)測量小鼠血漿精胺酸的濃度，實驗結果顯示血漿精胺酸濃度可被消耗至小於 1 μ M 長達 10 天。各個時間點的實驗數據為 5 隻小鼠的平均值 $\pm$ SEM。

【0058】 【圖 14】表示對 C57BL/6J 公鼠注射一劑 500U N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO: 50)，並在注射後的不同時間點，透過 ELISA 偵測人類精胺酸酶以測量血漿中 N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO: 50)的濃度 (n = 5)。藥物的循環半衰期約 4 天。各個時間點的實驗數據為 5 隻小鼠的

平均值 $\pm$ SEM。

【0059】 【圖 15(A-B)】 餵食一般正常飼料(chow diet)並同時進行 N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO: 50)治療的 C57BL/6J 正常瘦公鼠(Chow(rhArg)組)，其脂肪顯著減少。(A)相較於載劑(生理食鹽水)處理的對照組(Chow(載劑)組)，每 10 天以 500U N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO: 50)治療，持續 4 週，其內臟及皮下的脂肪量顯著減少。獨立樣本 t 檢定；*， $P < 0.05$ 。每組 $n = 5$ ，實驗數據以 $\pm$ SEM 表示。(B)經 N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO: 50)治療的小鼠，其內臟白色脂肪組織(WAT)的蘇木精與伊紅(H&E)染色的石蠟切片顯示脂肪細胞的大小顯著變小。

【0060】 【圖 16(A-B)】 透過即時 qRT-PCR 檢測幾種關鍵的脂質合成(lipogenesis)相關基因在各種組織中的表現量。相較於載劑處理的對照組(Chow(載劑)組)，每 10 天以 500U N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO: 50)治療(Chow(rhArg)組)，持續 4 週，其脂質合成相關基因在(A)內臟白色脂肪組織(WAT)及(B)肝臟中被顯著下調。基因表現量表示為相對於載劑處理小鼠(Chow(載劑)組)的基因表現量，並將(Chow(載劑)組)的基因表現量設為 1。獨立樣本 t 檢定；*， $P < 0.05$ 。每組 $n = 5$ ，實驗數據以 $\pm$ SEM 表示。

【0061】 【圖 17(A-C)】 顯示 N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO: 50)治療可顯著提升胰島素敏感性。(A)胰島素耐受性試驗顯示，相較於載劑處理的對照組(Chow(載劑)組)，每 10 天注射 500U N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO: 50)的小鼠(Chow(rhArg)組)，最快在藥物治療 2 週後，其胰島素降血糖作用的敏感性顯著增加。獨立樣本 t 檢定；*，相對於 Chow(rhArg)組 $P < 0.05$ 。每組 $n = 5$ ，實驗數據以平均值 $\pm$ SEM 表示。(B)MTT 試驗顯示，相

較於未經任何處理的對照組(con)，小鼠初代肝細胞以 5U/mL N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO: 50)處理 48 小時後，其細胞存活率並不受影響。(C)小鼠初代肝細胞經 5U/mL N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO: 50)消耗精胺酸 24 小時後，再暴露於 100 nM 胰島素 20 分鐘，接著透過西方墨點法分析磷酸化 Akt (pAkt)的蛋白表現量(胰島素訊息傳遞的指標)。經 N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO: 50)處理後的肝細胞，在受到胰島素刺激後，Akt 磷酸化的比例更高，顯示胰島素訊息傳遞增強。泳道 1：con；泳道 2：5U/mL N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO: 50)；泳道 3：100 nM 胰島素；泳道 4：5U/mL N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO: 50) + 100nM 胰島素。

【0062】 【圖 18(A-B)】對載劑處理的 C57BL/6J 公鼠餵食含有 60 千卡%脂肪的高脂飲食(HFD)(8 週齡小鼠，持續餵食 12 週) (HFD(載劑組))，顯示(A)體重及(B)身形明顯增加；然而，餵食公鼠 HFD 的同時(8 週齡小鼠，持續餵食 12 週)，每週以 300U N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO: 50)治療一次(HFD(rhArg)組)，可有效預防體重增加，並且體重維持與載劑處理的瘦對照組小鼠(LFD(載劑)組)相似，前述瘦對照組餵食含 10 千卡%脂肪的低脂飲食(LFD)。每組 n = 5，實驗數據以平均值±SEM 表示。

【0063】 【圖 19(A-C)】餵食公鼠 HFD 並同時每週以 300U N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO: 50)治療一次(HFD(rhArg)組)，持續 12 週，可有效預防 HFD 所誘導的白色脂肪組織(WAT)擴大。(A)位於主要內臟(性腺周圍、腎周及腸繫膜)及皮下(腹股溝)的脂肪墊重量。(B)內臟 WAT 的 H&E 染色切片顯示同時進行 N-ABD094-rhArg 治療防止 HFD 所誘導的白色脂肪細胞肥大。(C)幾種關鍵的脂質合成(lipogenesis)相關基因在 WAT 中相對於

瘦對照組(LFD(載劑)組)的表現量，前述(LFD(載劑)組)的基因表現量設為 1。使用 N-ABD094-rhArg 治療餵食 HFD 的小鼠，此等基因被顯著下調。單因子變異數分析(one-way ANOVA)接著進行 Fisher's LSD 多重比較；*， $P < 0.05$ 。每組 $n = 5$ ，實驗數據以平均值 $\pm$ SEM 表示。

【0064】 【圖 20】每週以 300U N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO: 50) 治療一次(HFD(rhArg)組)，持續 12 週，在小鼠的骨骼肌中，可抑制 HFD 所誘導之脂肪生成轉錄調控因子(Pparg 及 Srebp1c)的上調，伴隨關鍵的脂質合成酵素(Acc1 及 Scd1)的下調。單因子變異數分析，接著進行 Fisher's LSD 多重比較；*， $P < 0.05$ 。每組 $n = 5$ ，實驗數據以平均值 $\pm$ SEM 表示。

【0065】 【圖 21(A-B)】同時每週以 300U N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO: 50)治療一次(HFD(rhArg)組)，對於 C57BL/6J 母鼠可有效預防 HFD 所誘導的肥胖。(A)為小鼠體重，小鼠從 8 週齡持續餵食 12 週 HFD，並同時以 N-ABD094-rhArg 或載劑治療，載劑處理之餵食 LFD 的母鼠作為瘦對照組(LFD(載劑)組)。(B)位於主要內臟(性腺周圍、腎周及腸繫膜)及皮下(腹股溝)的脂肪墊重量。單因子變異數分析，接著進行 Fisher's LSD 多重比較；*， $P < 0.05$ 。每組 $n = 5$ ，實驗數據以平均值 $\pm$ SEM 表示。

【0066】 【圖 22(A-B)】同時每週以 300U N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO: 50)治療一次(HFD(rhArg)組)，對於 C57BL/6J 母鼠可有效預防 HFD 所誘導之胰島素抗性及葡萄糖失耐。(A)餵食 7 週 HFD 後進行胰島素耐受性試驗(ITT)。(B)餵食 11 週 HFD 後進行葡萄糖耐受性試驗(GTT)。ITT 及 GTT 的結果以曲線下面積表示(AUC)。單因子變異數分析，接著進行 Fisher's LSD 多重比較；*， $P < 0.05$ 。每組 $n = 5$ ，實驗數據以平均值 $\pm$ SEM

表示。

【0067】 【圖 23】 將 N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO: 50) (rhArg)、牛精胺酸酶或原始精胺酸去亞胺酶(ADI)添加至培養基以消耗精胺酸，或使用無精胺酸的培養基，抑制小鼠 3T3-L1 前脂肪細胞分化為脂肪細胞。將精胺酸酶的代謝產物 L-鳥胺酸或尿素，或 ADI 的代謝產物 L-瓜胺酸，添加至培養基內，並不具有抑制脂肪生成(adipogenesis)及脂質合成(lipogenesis)的效果。(*，表示培養基中含有 0.4 mM L-精胺酸，並且可透過精胺酸酶轉變為 0.4 mM L-鳥胺酸及 0.4mM 尿素，或透過 ADI 轉變為 0.4 mM L-瓜胺酸)。生長於未添加精胺酸消耗劑或精胺酸酶/ADI 代謝產物培養基的細胞作為對照組。將特定分化誘導因子添加至培養基內，並在第 6 天透過油紅 O 染色細胞內的脂質。

【0068】 【圖 24(A-B)】 N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO: 50)可抑制 3T3-L1 前脂肪細胞脂肪生成(adipogenic)及脂質合成(lipogenic)的基因。將小鼠 3T3-L1 前脂肪細胞培養於添加特定因子的培養基 6 天，以誘導分化為脂肪細胞(分化)。細胞在不含此等因子的培養基中生長則保持未分化。在培養基內添加 2U/mL N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO: 50) (rhArg)。生長於未添加 N-ABD094-rhArg 培養基的細胞作為對照組。透過即時 qRT-PCR 分析幾種關鍵的(A)脂肪生成(adipogenesis)轉錄調控因子及(B)脂質合成路徑中的酵素的 mRNA 表現量，並表示為相對於未分化組(對照組)的基因表現量，將未分化組的基因表現量設為 1。單因子變異數分析，接著進行 Fisher's LSD 多重比較；*， $P < 0.05$ 。每組 $n = 3$ ，實驗數據以平均值 $\pm$ SEM 表示。

【0069】 【圖 25(A-B)】 3T3-L1 前脂肪細胞對各種濃度精胺酸的反應。在無精胺酸的培養基內添加或不添加各種濃度的 L-精胺酸，並將小鼠 3T3-L1 前脂肪細胞培養於該培養基 6 天。細胞培養於含有精胺酸的正常培養基，並添加分化誘導因子，作為分化的陽性對照組(+ve)；而細胞培養於含有精胺酸的正常培養基，並且不添加分化誘導因子，作為分化的陰性對照組(-ve)。一組細胞培養於含有精胺酸的正常培養基，其中添加分化誘導因子，並且細胞經 5U/mL N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO: 50) (rhArg)處理以抑制分化。(A)以油紅 O 染色細胞的脂質，並透過測定光密度以定量染色強度，染色強度表示為相對於+ve 對照組的百分比。(B)幾種關鍵的脂質合成(lipogenesis)相關基因的 mRNA 表現量，表示為相對於培養在無精胺酸培養基的細胞的基因表現量，並將前述培養於無精胺酸培養基的細胞的基因表現量設為 1。每組 n = 3，實驗數據以平均值±SEM 表示。

【0070】 【圖 26(A-B)】 餵食公鼠 HFD 並同時每週以 300U N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO: 50)治療一次(HFD(rhArg)組)，可有效預防 HFD 所誘導之胰島素抗性。餵食(A)6 週及(B)11 週 HFD 後進行胰島素耐受性試驗(ITT)，實驗結果以曲線下面積表示(AUC)。單因子變異數分析，接著進行 Fisher's LSD 多重比較；*，P < 0.05。每組 n = 5，實驗數據以平均值±SEM 表示。

【0071】 【圖 27(A-B)】 餵食公鼠 HFD 並同時每週以 300U N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO: 50)治療一次(HFD(rhArg)組)，可有效預防 HFD 所誘導之葡萄糖失耐。餵食(A)5 週及(B)10 週 HFD 後進行葡萄糖耐受性試驗(GTT)，實驗結果以曲線下面積表示(AUC)。單因子變異數分析，

接著進行 Fisher's LSD 多重比較；*， $P < 0.05$ 。每組 $n = 5$ ，實驗數據以平均值 $\pm$ SEM 表示。

【0072】 【圖 28(A-D)】餵食公鼠 HFD 並同時每週以 300U N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO: 50)治療一次(HFD(rhArg)組)，可有效預防 HFD 所誘導之(A)空腹血糖(透過血糖儀檢測)及(B)空腹血漿胰島素濃度(透過 ELISA 檢測)的升高。(C)透過標準公式計算 HOMA-IR 評分(作為測定胰島素抗性的指標)，結果顯示同時進行 N-ABD094-rhArg 治療可預防 HFD 所誘導之胰島素抗性的進展。單因子變異數分析，接著進行 Fisher's LSD 多重比較；*， $P < 0.05$ 。每組 $n = 5$ ，實驗數據以平均值 $\pm$ SEM 表示。

【0073】 【圖 29(A-D)】餵食公鼠 HFD 並同時每週以 300U N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO: 50)治療一次(HFD(rhArg)組)，預防/改善 HFD 所誘導之空腹血漿的(A)瘦體素、(B)總膽固醇、(C)三酸甘油脂、及(D)游離脂肪酸濃度的上升。單因子變異數分析，接著進行 Fisher's LSD 多重比較；*， $P < 0.05$ 。每組 $n = 5$ ，實驗數據以平均值 $\pm$ SEM 表示。

【0074】 【圖 30(A-B)】餵食公鼠 HFD 並同時每週以 300U N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO: 50)治療一次(HFD(rhArg)組)，持續 12 週，預防 HFD 所誘導的肝臟腫大。(A)新鮮全肝臟的代表圖。(B)肝臟重量。單因子變異數分析，接著進行 Fisher's LSD 多重比較；*， $P < 0.05$ 。每組 $n = 5$ ，實驗數據以平均值 $\pm$ SEM 表示。

【0075】 【圖 31(A-C)】餵食公鼠 HFD 並同時每週以 300U N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO: 50)治療一次(HFD(rhArg)組)，持續 12 週，可有效預防 HFD 所誘導之肝脂肪變性。(A)以油紅 O 染色的肝臟切片顯示，

在載劑處理之餵食 HFD 的小鼠(HFD(載劑)組)中有大量的脂質累積，然而同時進行 N-ABD094-rhArg 治療的小鼠卻沒有此現象。(B)餵食 HFD 的小鼠，進行 N-ABD094-rhArg 治療可預防肝臟內三酸甘油酯濃度的上升。(C) N-ABD094-rhArg 抑制 HFD 所誘導肝臟中脂質合成相關基因的上調。單因子變異數分析，接著進行 Fisher's LSD 多重比較；*， $P < 0.05$ 。每組 $n = 5$ ，實驗數據以平均值 $\pm$ SEM 表示。

【0076】 【圖 32】 餵食公鼠 HFD 並同時每週以 300U N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO: 50)治療一次(HFD(rhArg)組)，持續 12 週，預防 HFD 所誘導之血清中丙胺酸轉胺酶(ALT)濃度的升高，前述血清中 ALT 濃度常作為肝損傷的生物指標。單因子變異數分析，接著進行 Fisher's LSD 多重比較；*， $P < 0.05$ 。每組 $n = 5$ ，實驗數據以平均值 $\pm$ SEM 表示。

【0077】 【圖 33(A-C)】 餵食公鼠 HFD 並同時每週以 300U N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO: 50)治療一次(HFD(rhArg)組)，持續 12 週，預防 HFD 所誘導之(A)腎臟、(B)胰腺、及(C)心臟重量的增加。單因子變異數分析，接著進行 Fisher's LSD 多重比較；*， $P < 0.05$ 。每組 $n = 5$ ，實驗數據以平均值 $\pm$ SEM 表示。

【0078】 【圖 34(A-B)】 同時每週使用 300U N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO: 50)治療公鼠一次(HFD(rhArg)組)，持續 12 週，(A)可有效抑制 HFD 所誘導內臟 WAT 中促發炎脂肪激素的 mRNA 表現量的上調，其表示為相對於瘦對照組小鼠(LFD(載劑)組)的表現量，前述(LFD(載劑)組)的基因表現量設為 1；並且(B)可有效抑制 HFD 所誘導之血清中促發炎細胞激素濃度的升高。單因子變異數分析，接著進行 Fisher's LSD 多重比較；*，

$P < 0.05$ 。每組 $n = 5$ ，實驗數據以平均值 $\pm$ SEM 表示。

【0079】 【圖 35(A-C)】同時每週使用 300U N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO: 50)治療公鼠一次(HFD(rhArg)組)，持續 12 週，可有效預防 HFD 所誘導之棕色脂肪組織(BAT)的白化。(A) 新鮮全肩胛骨間 BAT 的代表圖。(B)肩胛骨間 BAT 的重量。(C) H&E 染色的石蠟切片顯示，載劑處理之餵食 HFD 的小鼠(HFD(載劑)組)的 BAT 中，有大量細胞具有一個大的單孔洞(脂質球)，係為白色脂肪細胞典型的組織學特徵；然而餵食 HFD 的小鼠同時進行 N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO: 50)治療，其 BAT 中很少發現此現象。單因子變異數分析，接著進行 Fisher's LSD 多重比較；*， $P < 0.05$ 。每組 $n = 5$ ，實驗數據以平均值 $\pm$ SEM 表示。

【0080】 【圖 36】同時每週使用 300U N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO: 50)治療公鼠一次(HFD(rhArg)組)，持續 12 週，顯著上調 BAT 中生熱作用的關鍵調控因子(Ucp1 及 Pgc1a)的 mRNA 表現量，並且抑制 HFD 所誘導 BAT 中脂肪酸氧化基因 Acox1 的下調。單因子變異數分析，接著進行 Fisher's LSD 多重比較；*， $P < 0.05$ 。每組 $n = 5$ ，實驗數據以平均值 $\pm$ SEM 表示。

【0081】 【圖 37(A-B)】已存在飲食誘導肥胖的 C57BL/6J 公鼠(從 5 週齡持續餵食 12 週 HFD)經 N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO: 50)治療後，顯示體重顯著減低。(A)小鼠體重，每週使用 600U N-ABD094-rhArg 治療一次(HFD(rhArg)組)，持續 12 週。(B) 治療 12 週後的小鼠代表圖。每組 $n = 5$ ，實驗數據以平均值 $\pm$ SEM 表示。

【0082】 【圖 38(A-B)】對已存在 HFD 誘導肥胖的公鼠(HFD(rhArg))

組)，每週施用一次 600U N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO: 50)，持續 12 週，可有效減少白色脂肪組織。(A)肥胖小鼠經 N-ABD094-rhArg 治療後，位於主要內臟(性腺周圍、腎周及腸繫膜)及皮下(腹股溝)的脂肪墊重量與瘦對照組小鼠(LFD(rhArg)組)高度相似。單因子變異數分析，接著進行 Fisher's LSD 多重比較；*， $P < 0.05$ 。每組 $n = 5$ ，實驗數據以平均值 $\pm$ SEM 表示。(B)內臟 WAT 的 H&E 染色切片顯示 N-ABD094-rhArg 治療明顯縮小肥胖小鼠脂肪細胞的大小。

【0083】 【圖 39】對已存在 HFD 誘導肥胖的公鼠(HFD(rhArg)組)每週施用一次 600U N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO: 50)，可有效逆轉胰島素抗性。在治療前以及 N-ABD094-rhArg 治療 4、8 及 12 週後進行胰島素耐受性試驗(ITT)。ITT 的實驗結果以曲線下面積表示(AUC)。單因子變異數分析，接著進行 Fisher's LSD 多重比較；*， $P < 0.05$ 。每組 $n = 5$ ，實驗數據以平均值 $\pm$ SEM 表示。

【0084】 【圖 40】對已存在 HFD 誘導肥胖的公鼠(HFD(rhArg)組)每週施用一次 600U N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO: 50)，可有效逆轉葡萄糖失耐。在治療前以及 N-ABD094-rhArg 治療 3、7 及 11 週後進行葡萄糖耐受性試驗(GTT)。GTT 的實驗結果以曲線下面積表示(AUC)。單因子變異數分析，接著進行 Fisher's LSD 多重比較；*， $P < 0.05$ 。每組 $n = 5$ ，實驗數據以平均值 $\pm$ SEM 表示。

【0085】 【圖 41(A-C)】對已存在 HFD 誘導肥胖的公鼠(HFD(rhArg)組)每週施用一次 600U N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO: 50)，可有效逆轉高血糖症、高胰島素血症及胰島素抗性。N-ABD094-rhArg 治療後，肥胖小

鼠的(A)空腹血糖、(B)空腹血漿胰島素及(C) HOMA-IR 評分恢復至接近正常的水平。單因子變異數分析，接著進行 Fisher's LSD 多重比較；*， $P < 0.05$ 。每組 $n = 5$ ，實驗數據以平均值 $\pm$ SEM 表示。

【0086】 【圖 42(A-B)】對已存在 HFD 誘導肥胖的公鼠(HFD(rhArg)組)每週施用一次 600U N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO: 50)，可有效逆轉高瘦體素血症及高膽固醇血症。N-ABD094-rhArg 治療後，肥胖小鼠的(A)空腹血漿瘦體素、及(B)空腹血漿總膽固醇恢復至接近正常的水平。單因子變異數分析，接著進行 Fisher's LSD 多重比較；*， $P < 0.05$ 。每組 $n = 5$ ，實驗數據以平均值 $\pm$ SEM 表示。

【0087】 【圖 43(A-B)】對已存在 HFD 誘導肥胖的公鼠(HFD(rhArg)組)每週施用一次 600U N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO: 50)，持續 12 週，可有效逆轉肝臟腫大。(A)新鮮全肝臟的代表圖顯示，N-ABD094-rhArg 治療後肥胖小鼠的肝臟恢復至正常大小。(B) N-ABD094-rhArg 治療後，肥胖小鼠的肝臟重量顯著減少，並且與瘦對照組小鼠(LFD(rhArg)組)相似。單因子變異數分析，接著進行 Fisher's LSD 多重比較；*， $P < 0.05$ 。每組 $n = 5$ ，實驗數據以平均值 $\pm$ SEM 表示。

【0088】 【圖 44(A-C)】對已存在 HFD 誘導肥胖的公鼠(HFD(rhArg)組)每週施用一次 600U N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO: 50)，持續 12 週，可有效逆轉肝脂肪變性。以 N-ABD094-rhArg 治療的肥胖小鼠的肝臟中，(A)油紅 O 染色的肝臟切片顯示脂質被大量清除，並且(B)三酸甘油脂濃度降低至與瘦對照組小鼠(LFD(載劑))相當的水平，並且(C)幾種關鍵的脂質合成相關基因的 mRNA 表現量被顯著下調。基因表現量表示為相對於瘦對照

組的基因表現量，將瘦對照組的基因表現量設為 1。單因子變異數分析，接著進行 Fisher's LSD 多重比較；*， $P < 0.05$ 。每組 $n = 5$ ，實驗數據以平均值 $\pm$ SEM 表示。

【0089】 【圖 45】對已存在 HFD 誘導肥胖的公鼠(HFD(rhArg)組)每週施用一次 600U N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO: 50)，持續 12 週，可顯著降低血清中丙胺酸轉胺酶(ALT)濃度以及血清中天冬胺酸轉胺酶(AST)濃度，ALT 及 AST 為肝損傷常見的生物指標。單因子變異數分析，接著進行 Fisher's LSD 多重比較；*， $P < 0.05$ 。每組 $n = 5$ ，實驗數據以平均值 $\pm$ SEM 表示。

【0090】 【圖 46(A-D)】對已存在 HFD 誘導肥胖的公鼠(HFD(rhArg)組)每週施用一次 600U N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO: 50)，持續 12 週，可逆轉腎脂肪變性。以 N-ABD094-rhArg 治療的肥胖小鼠：(A) 腎臟重量；(B)腎臟內三酸甘油脂濃度；(C)腎小管內空泡的結構(H&E 染色的腎臟切片)，以及(D)腎小球內油滴的異位累積(油紅 O 染色的腎切片)，顯著減少。單因子變異數分析，接著進行 Fisher's LSD 多重比較；*， $P < 0.05$ 。每組 $n = 5$ ，實驗數據以平均值 $\pm$ SEM 表示。

【0091】 【圖 47(A-C)】對已存在 HFD 誘導肥胖的公鼠(HFD(rhArg)組)每週施用一次 600U N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO: 50)，持續 12 週，可逆轉胰腺脂肪變性。以 N-ABD094-rhArg 治療的肥胖小鼠：(A)胰腺重量；(B) H&E 染色的胰腺切片顯示小葉內及小葉間大量累積的白色脂肪組織；以及(C)胰腺內三酸甘油脂濃度，顯著減少。單因子變異數分析，接著進行 Fisher's LSD 多重比較；*， $P < 0.05$ 。每組 $n = 5$ ，實驗數據以平均值 $\pm$ SEM

表示。

【0092】 【圖 48(A-C)】對已存在 HFD 誘導肥胖的公鼠(HFD(rhArg)組)每週施用一次 600U N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO: 50)，持續 12 週，可逆轉心臟脂肪變性。以 N-ABD094-rhArg 治療的肥胖小鼠：(A)心臟重量；(B)心臟內大量累積的油滴；以及(C)心臟內三酸甘油脂濃度，顯著減少。單因子變異數分析，接著進行 Fisher's LSD 多重比較；*， $P < 0.05$ 。每組 $n = 5$ ，實驗數據以平均值 $\pm$ SEM 表示。

【0093】 【圖 49】對已存在 HFD 誘導肥胖的公鼠(HFD(rhArg)組)每週施用一次 600U N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO: 50)，持續 12 週，可顯著降低骨骼肌內三酸甘油脂濃度。單因子變異數分析，接著進行 Fisher's LSD 多重比較；*， $P < 0.05$ 。每組 $n = 5$ ，實驗數據以平均值 $\pm$ SEM 表示。

【0094】 【圖 50(A-B)】對已存在 HFD 誘導肥胖的公鼠(HFD(rhArg)組)每週施用一次 600U N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO: 50)，持續 12 週，可顯著(A)下調內臟 WAT 中促發炎脂肪激素 Mcp1 的 mRNA 表現量，表示為相對於瘦對照組小鼠(LFD(載劑)組)的表現量，前述(LFD(載劑)組)的基因表現量設為 1；並且可顯著(B)降低血清中促發炎細胞激素 Mcp1 的濃度。單因子變異數分析，接著進行 Fisher's LSD 多重比較；*， $P < 0.05$ 。每組 $n = 5$ ，實驗數據以平均值 $\pm$ SEM 表示。

【0095】 【圖 51(A-C)】對已存在 HFD 誘導肥胖的公鼠(HFD(rhArg)組)每週施用一次 600U N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO: 50)，持續 12 週，可降低肝臟的發炎與纖維化。以 N-ABD094-rhArg 治療的肥胖小鼠的肝臟中，(A)促發炎基因與(B)促纖維化基因被顯著下調，而(C)抗發炎基因被顯

著上調。mRNA 表現量表示為相對於瘦對照組(LFD(載劑)組)的表現量，前述(LFD(載劑)組)的基因表現量設為 1。單因子變異數分析，接著進行 Fisher's LSD 多重比較；*， $P < 0.05$ 。每組 $n = 5$ ，實驗數據以平均值 $\pm$ SEM 表示。

【0096】 【圖 52(A-C)】對已存在 HFD 誘導肥胖的公鼠(HFD(rhArg)組)每週施用一次 600U N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO: 50)，持續 12 週，可降低腎臟的發炎與纖維化。以 N-ABD094-rhArg 治療的肥胖小鼠的腎臟中，(A)促發炎基因與(B)促纖維化基因被顯著下調，以及(C)腎小管與腎小球周圍過度沉積的膠原蛋白纖維顯著減少。mRNA 表現量表示為相對於瘦對照組(LFD(載劑)組)的表現量，前述(LFD(載劑)組)的基因表現量設為 1。單因子變異數分析，接著進行 Fisher's LSD 多重比較；*， $P < 0.05$ 。每組 $n = 5$ ，實驗數據以平均值 $\pm$ SEM 表示。

【0097】 【圖 53(A-B)】對已存在 HFD 誘導肥胖的公鼠(HFD(rhArg)組)每週施用一次 600U N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO: 50)，持續 12 週，可降低胰腺的發炎與纖維化。以 N-ABD094-rhArg 治療的肥胖小鼠的胰腺中，(A)促發炎基因與(B)促纖維化基因被顯著下調。mRNA 表現量表示為相對於瘦對照組(LFD(載劑)組)的表現量。單因子變異數分析，接著進行 Fisher's LSD 多重比較；*， $P < 0.05$ 。每組 $n = 5$ ，實驗數據以平均值 $\pm$ SEM 表示。

【0098】 【圖 54(A-C)】對已存在 HFD 誘導肥胖的公鼠(HFD(rhArg)組)每週施用一次 600U N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO: 50)，持續 12 週，可有效逆轉棕色脂肪(BAT)的白化。以 N-ABD094-rhArg 治療的肥胖小鼠，

(A)肩胛骨間 BAT 的重量；(B)肩胛骨間 BAT 的型態與大小；以及(C) H&E 染色的 BAT 切片的組織學特徵顯示與瘦對照組小鼠相似。單因子變異數分析，接著進行 Fisher's LSD 多重比較；*， $P < 0.05$ 。每組 $n = 5$ ，實驗數據以平均值 $\pm$ SEM 表示。

【0099】 【圖 55(A-B)】對已存在 HFD 誘導肥胖的公鼠(HFD(rhArg)組)每週施用一次 600U N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO: 50)，在藥物治療 5 週後，可顯著降低肥胖小鼠的(A)收縮壓與舒張壓及(B)心率，達到與瘦對照組小鼠(LFD(載劑)組)相似的水平。單因子變異數分析，接著進行 Fisher's LSD 多重比較；*， $P < 0.05$ 。每組 $n = 10$ ，實驗數據以平均值 $\pm$ SEM 表示。

【0100】 【圖 56(A-B)】C57BL/6J 公鼠從 5 週齡開始餵食 LFD 並且每週腹腔注射一次 500U N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO: 50) (LFD(rhArg)組)，持續 8 個月，產生非中和性抗藥物的抗體。(A)使用 ELISA 測定法，餵食 LFD 並且以 N-ABD094-rhArg 治療的小鼠的血漿中可檢測到抗 rhArg 的抗體，前述抗 rhArg 抗體的平均抗體力價為 108。(B)將血漿與 1,000U/mL N-ABD094-rhArg (rhArg*)培養 1 小時，接著測定精胺酸酶活性。精胺酸酶活性沒有降低，顯示動物體內產生抗藥物的抗體並不是中和抗體。每組 $n = 3$ ，實驗數據以平均值 $\pm$ SEM 表示。

【0101】 【圖 57(A-B)】餵食 LFD 的 C57BL/6J 公鼠(LFD(rhArg)組)，從 5 週齡開始每週施用一次 500U N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO: 50)，持續 8 個月，不會對肝臟及腎臟引起不良反應。以 N-ABD094-rhArg 治療餵食 LFD 的小鼠與載劑處理餵食 LFD 的小鼠(LFD(載劑)組)之間，(A)

血清中丙胺酸轉胺酶(ALT)與天冬胺酸轉胺酶(AST)的濃度(常作為評估肝功能或疾病的生物指標)；以及(B)血清肌酸酐濃度與尿液中白蛋白/肌酸酐比值(常作為評估腎功能或疾病的生物指標)，並無任何顯著差異。每組 $n = 3$ ，實驗數據以平均值 $\pm$ SEM 表示。

【0102】 【圖 58(A-C)】 餵食 LFD 的 C57BL/6J 公鼠(LFD(rhArg)組)，從 5 週齡開始每週施用一次 500U N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO: 50)，持續 8 個月，不會對血管引起不良反應。以 N-ABD094-rhArg 治療餵食 LFD 的小鼠與載劑處理餵食 LFD 的小鼠(LFD(載劑)組)之間，在(A)去氧腎上腺素(phenylephrine)引起的血管平滑肌收縮；(B)乙醯膽鹼誘導之內皮依賴性舒張；以及(C)一氧化氮供體硝普鈉引起之內皮非依賴性舒張，並無任何顯著差異。每組 $n = 3$ ，實驗數據以平均值 $\pm$ SEM 表示。

【0103】 【圖 59】 已存在 HFD 誘導肥胖的 C57BL/6J 公鼠(HFD(PEG-rhArg)組)每週施用一次 300U 聚乙二醇化 His-rhArg (SEQ ID NO: 101)，持續 4 週，可有效降低小鼠的體重，達到與載劑處理之餵食正常飼料(chow diet)的瘦對照組小鼠(Chow(載劑)組)的重量相似。每組 $n = 6$ ，實驗數據以平均值 $\pm$ SEM 表示。

【0104】 【圖 60】 已存在 HFD 誘導肥胖的公鼠(HFD(PEG-rhArg)組)每週施用一次 300U 聚乙二醇化 His-rhArg (SEQ ID NO: 101)，持續 4 週，可有效降低位於主要內臟(性腺周圍、腎周、腸繫膜)及皮下(腹股溝)的脂肪量，並且降低肝臟、腎臟、胰腺及心臟的重量。單因子變異數分析，接著進行 Fisher's LSD 多重比較；*， $P < 0.05$ 。每組 $n = 4$ ，實驗數據以平均值 $\pm$ SEM 表示。

【0105】 【圖 61(A-B)】已存在 HFD 誘導肥胖的公鼠(HFD(PEG-rhArg)組)每週施用一次 300U 聚乙二醇化 His-rhArg (SEQ ID NO: 101)，在藥物治療 2 週後(A)可顯著降低空腹血糖，並且(B)進行胰島素耐受性試驗(ITT)，顯示可顯著增加胰島素敏感性。ITT 實驗結果以曲線下面積表示(AUC)。單因子變異數分析，接著進行 Fisher's LSD 多重比較；*， $P < 0.05$ 。每組 $n = 6$ ，實驗數據以平均值 $\pm$ SEM 表示。

【0106】 【圖 62】已存在 HFD 誘導肥胖的 C57BL/6J 公鼠每週施用一次 25~100U N-ABD094-rhArg-Co²⁺ (SEQ ID NO: 50 (鈷替換))，持續 5 週，可有效降低小鼠的體重。 $n = 3$ ，實驗數據以平均值 $\pm$ SEM 表示。

【0107】 【圖 63】表示 BHA 融合蛋白(SEQ ID NO: 75)對 MKN45 胃癌細胞株的抗癌效果。透過劑量依賴性的方式抑制 MKN45 的生長。透過 MTT 終點比色法確定存活率。 $n = 3$ ，實驗數據以平均值 $\pm$ SD 表示。

【0108】 【圖 64】表示在異種移植 4T1 乳癌的裸鼠中，N-ABD-rhArg (SEQ ID NO: 49)對於腫瘤體積的影響。「實驗組」的曲線代表每週注射一次 500U N-ABD-rhArg (SEQ ID NO: 49)的組別；「對照組」的曲線代表每週注射一次 PBS 的組別。 t 檢定；實驗組與對照組相比* $P < 0.05$ ，** $P < 0.01$ ； $n = 4\sim 6$ 。

【0109】 【圖 65】表示在異種移植 4T1 乳癌的裸鼠中，N-ABD-rhArg (SEQ ID NO: 49)對於相對腫瘤體積的影響。「實驗組」的曲線代表每週注射一次 500U N-ABD-rhArg (SEQ ID NO: 49)的組別；「對照組」的曲線代表每週注射一次 PBS 的組別。 t 檢定；實驗組與對照組相比* $P < 0.05$ ； $n = 4\sim 6$ 。

【0110】 【圖 66】表示實驗組與對照組之間腫瘤重量具有顯著差異。實驗組每週注射一次 500U N-ABD-rhArg (SEQ ID NO: 49)；對照組每週注射一次 PBS。t 檢定；實驗組與對照組相比*P < 0.05；n = 4~6。

【0111】 【圖 67】表示從對照組與 N-ABD-rhArg (SEQ ID NO: 49) 處理組的裸鼠身上所採集的腫瘤的照片。

【0112】 【圖 68】表示在 4T1 乳癌的同種異體移植中，N-ABD-rhArg (SEQ ID NO: 49)對於相對腫瘤體積的影響。「500U ABD-rhArg」的曲線代表每週注射一次 500U N-ABD-rhArg (SEQ ID NO: 49)的實驗組；「250U ABD-rhArg」的曲線代表每週注射一次 250U N-ABD-rhArg (SEQ ID NO: 49)的實驗組；「500U PEG-rhArg」的曲線代表每週注射一次 500U 聚乙二醇化 His-rhArg (SEQ ID NO: 101)的實驗組；「對照組」的曲線代表每週注射一次 PBS 的組別。t 檢定；實驗組與對照組相比**P < 0.01，***P < 0.001；n = 6~8。

【0113】 【圖 69】表示實驗組與對照組之間腫瘤重量具有顯著差異。「500U ABD-rhArg」的數據代表每週注射一次 500U N-ABD-rhArg (SEQ ID NO: 49)的組別；「250U ABD-rhArg」的數據代表每週注射一次 250U N-ABD-rhArg (SEQ ID NO: 49)的組別；「500U PEG-rhArg」的數據代表每週注射一次 500U 聚乙二醇化 His-rhArg (SEQ ID NO: 101)的組別；「對照組」的數據代表每週注射一次 PBS 的組別。t 檢定；實驗組與對照組相比*P < 0.05，**P < 0.01；n = 6~8。

【0114】 【圖 70(A-B)】表示 4T1 同種異體移植的肺臟中，轉移結節的平均數量。(A)「500U ABD-rhArg」的數據代表每週注射一次 500U

N-ABD-rhArg (SEQ ID NO: 49)的組別；「250U ABD-rhArg」的數據代表每週注射一次 250U N-ABD-rhArg (SEQ ID NO: 49)的組別；「500U PEG-rhArg」的數據代表每週注射一次 500U 聚乙二醇化 His-rhArg (SEQ ID NO: 101)的組別；「對照組」的數據代表每週注射一次 PBS 的組別。t 檢定；實驗組與對照組相比 * $P < 0.05$ ，** $P < 0.01$ ； $n = 6\sim 8$ 。(B) 4T1 同種異體移植的肺臟中，轉移結節數量(圖 70A 所示)的散佈圖。

【實施方式】

【0115】 整體而言，本發明係關於一種融合蛋白，其包含一個精胺酸酶多肽與一個白蛋白結合結構域多肽，以及前述融合蛋白之使用與製備方法。本發明所提供之融合蛋白係為高效的精胺酸消耗劑，且由於此融合蛋白與一個白蛋白結合結構域多肽融合，故相較於已知的精胺酸酶及精胺酸酶衍生物，其半衰期被大大地延長。本發明之融合蛋白可用於治療藉由消耗精胺酸得到治療效果的疾病或症狀，其包含治療癌症、病毒、多發性硬化症、類風濕性關節炎、自體免疫疾病、先天性高精胺酸血症、移植物對抗宿主疾病(GvHD)、發炎、肥胖、及代謝失調及相關併發症與合併症。

【0116】 本發明整體而言亦關於一種透過消耗具有需求之受試者體內的精胺酸水平以治療肥胖、代謝失調、及相關併發症與合併症的方法。消耗受試者體內的精胺酸可降低體重與脂肪量、改善葡萄糖耐受性與胰島素反應性、維持血糖、內分泌與代謝的正常值、以及減輕發炎、脂肪變性與纖維化的症狀。任何能夠消耗受試者體內之精胺酸的藥劑，可用於本發明所記載用於治療肥胖、代謝失調、及相關併發症與合併症之方法

【名詞定義】

【0117】 本發明之用語的定義，係結合目前生物技術領域所公認的定義，並於此提供適切的說明。此等定義適用於整份說明書中，除非基於個別或較大群組中之一部分的特定情況下另有限制。

【0118】 本發明「半衰期」或「 $\frac{1}{2}$ 壽命($\frac{1}{2}$ -life)」之用語係指如本發明所記載之融合蛋白或精胺酸消耗劑，前述藥劑的濃度，例如注射入哺乳類動物後，於其體內或體外降低一半所需要的時間。在某些情況下，本發明以注射後血漿中精胺酸的濃度作為前述藥劑半衰期的替代指標。在這樣的情況下，「治療持續時間」之用語係指特定劑量之精胺酸消耗劑，其能夠使血漿中精胺酸的濃度維持在特定閾值濃度以下的時間長度，即觀察到理想治療效果的時間長度。在部分實施型態中，血漿中精胺酸的閾值濃度係為 50 μM 以下、40 μM 以下、30 μM 以下、20 μM 以下、10 μM 以下、5 μM 以下、3 μM 以下，或其濃度低於常規分析儀器的檢測極限。例如注射本發明所記載之精胺酸異化酶，若血漿中的精胺酸被消耗至其濃度低於 Biochrom 30 胺基酸分析儀的檢測極限(檢測極限為 3 μM)達 7 天，則顯示其治療持續時間為 7 天，及半衰期，舉例來說大約為 7 天左右。

【0119】 本發明「連接」或「連接的」之用語，係指藉由鍵結或非鍵結的交互作用使兩個或多個化合物相連或結合在一起，其包含直接或間接連接，例如第一個多肽直接與第二個多肽或其他分子結合，並且於部分實施型態，其中有一或多個中間化合物(如連接子)，像是多肽，位於第一個多肽與第二個多肽或其他分子之間。

【0120】 本發明「蛋白」或「多肽」之用語係指由兩個或多個胺基酸單體及／或其類似物所組成之有機聚合物。「多肽」之用語包含任何長度的胺基酸聚合物，包含全長蛋白與胜肽，及其類似物與片段。具有三或多個胺基酸的多肽亦稱為寡肽。本發明「胺基酸」、「胺基酸單體」或「胺基酸殘基」係指 20 種天然胺基酸中的任一種，包含具有非天然側鏈的合成胺基酸，亦包含右旋(D)與左旋(L)光學異構物。本發明「胺基酸類似物」之用語，係指一種胺基酸，其中一或多個原子被一個不同的原子、同位素或一個不同的官能基取代，但其他部分仍然與其天然胺基酸類似物相同。

【0121】 本發明「非天然胺基酸」之用語，係指任何非 20 種常見的天然胺基酸、硒半胱胺酸或吡咯離胺酸之胺基酸、修飾胺基酸、及/或胺基酸類似物。

【0122】 本發明「融合蛋白」之用語，係指包含不同來源的蛋白或功能性蛋白片段(如精胺酸酶或精胺酸酶之變異體)的嵌合蛋白，其透過共價相連，如醯胺、酯、尿素、胺基碳酸鹽、醚、及/或雙硫鍵。

【0123】 本發明「變異體」之用語，係指不同於參考的核酸或多肽的多核苷酸分子或核酸，但仍保有其基本特性。通常變異體與參考的核酸或多肽整體上非常相似，並在許多部份是相同的。

【0124】 舉例來說，變異體包含具有至少有一個保守性胺基酸替換之親本多肽序列的胺基酸序列。選擇性地或另外地，變異體可包含具有至少有一個非保守性胺基酸替換之親本多肽序列的胺基酸序列。在這樣的情況下，非保守性胺基酸替換不會干擾或抑制變異體的生物活性功能，係為

較佳。非保守性胺基酸替換可能會提升變異體的生物活性，使其生物活性相較於親本多肽而增加。

【0125】 關於用於指稱多肽之「功能性片段」之用語係指目標多肽之任何一部份或局部，該部分或局部係保留該部分所屬多肽(親本多肽)之生物活性。前述功能性片段可為任何包含該部分所屬多肽之連續胺基酸的片段，使前述功能性片段仍展現至少 40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%或 99%，或與親本多肽具有實質上相同或甚至更高之生物活性。舉例來說，參照親本多肽，前述功能性片段可包含約 10%、20%、25%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、98%或更高的親本多肽。

【0126】 前述功能性片段可在胺基端或羧基端、或這兩端包含額外的胺基酸，例如未在親本多肽胺基酸序列中找到的胺基酸。

【0127】 前述多肽之胺基酸替換，可為保守性胺基酸替換。保守性胺基酸替換係為所屬領域已知技術，且前述胺基酸替換包含將具有特定物理及/或化學的特性一個胺基酸替換為具有相同或相似之化學或物理特性之另一個胺基酸。例如，前述保守性胺基酸替換可以是：一個酸性/負電極性胺基酸被另一個酸性/負電極性胺基酸替換(如天門冬胺酸(Asp)或麩胺酸(Glu))；一個帶有非極性側鏈的胺基酸被另一個帶有非極性側鏈的胺基酸替換(如丙胺酸(Ala)、甘胺酸(Gly)、纈胺酸(Val)、異白胺酸(Ile)、白胺酸(Leu)、甲硫胺酸(Met)、苯丙胺酸(Phe)、脯胺酸(Pro)、色胺酸(Trp)、半胱胺酸(Cys)、纈胺酸(Val)等)；一個鹼性/正電極性胺基酸被另一個鹼性/正電極性胺基酸替換(如離胺酸(Lys)、組胺酸(His)、精胺酸(Arg)等)；一個帶有

極性側鏈的不帶電胺基酸被另一個帶有極性側鏈的不帶電胺基酸替換(如天門冬醯胺(Asn)、麩醯胺酸(Gln)、絲胺酸(Ser)、蘇胺酸(Thr)、酪胺酸(Tyr)等)；一個帶有 β -分枝的側鏈的胺基酸被另一個帶有 β -分枝的側鏈的胺基酸替換(如異白胺酸(Ile)、蘇胺酸(Thr)及纈胺酸(Val))；一個帶有芳香族側鏈的胺基酸被另一個帶有芳香族側鏈的胺基酸替換(如組胺酸(His)、苯丙胺酸(Phe)、色胺酸(Trp)及酪胺酸(Tyr))等。

【0128】 關於用於指稱多肽或多核苷酸序列之「同源性百分比」及「序列相似性百分比」之用語，於本發明中可互換使用，係指多核苷酸及多肽間的比較，並且係透過在比較窗口最佳地比較兩個比對序列來決定，其中，兩個序列的最佳比對下，當與參考序列比較時(不包含添加或剔除)，在比較窗口中多核苷酸或多肽序列的部分可包含能添加或剔除(即間隔)。百分比的計算係透過比對出在兩個序列中皆具有相同的核酸鹼基或胺基酸殘基的位置數，而得到匹配位置數，將此數值除以比較窗口中的總位置數，並且乘以 100 即得到序列相似性的百分比。同源性係透過所屬技術領域中任一種已知的各種序列比較演算法及程式進行評估，該比較演算法及程式包含 TBLASTN、BLASTP、FASTA、TFASTA 及

CLUSTALW(Pearson 與 Lipman, 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. USA

85(8):2444-2448; Altschul 等人, 1990, J. Mol. Biol. 215(3):403-410;

Thompson 等人, 1994, Nucleic Acids Res. 22(2):4673-4680; Higgins 等

人, 1996, Methods Enzymol. 266:383-402; Altschul 等人, 1990, J. Mol.

Biol. 215(3):403-410; Altschul 等人, 1993, Nature Genetics 3:266-272), 但

不限於此等方法。在部分實施型態中，蛋白及核酸序列同源性係透過所屬

技術領域習知的 Basic Local Alignment Search Tool(BLAST)進行評估(例如參見：Karlin 與 Altschul，1990，Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:2267-2268；Altschul 等人，1990，J. Mol. Biol. 215:403-410；Altschul 等人，1993，Nature Genetics 3:266-272；Altschul 等人，1997，Nuc. Acids Res. 25:3389-3402)。

【0129】 本發明「治療」、「治療的」、「治療手段」等用語，係指減輕或改善失調/疾病及/或與其相關之症狀。應當理解，儘管未排除，但治療失調或病症並不需要完全消除失調、病症、或與其相關之症狀。在部分實施型態中，治療包含預防失調或病症、及/或與其相關之症狀。本發明「預防」或「防止」之用語係指抑制或至少延緩失調、病症、或與其相關之症狀的進程的任何手段。預防可包含一級、二級及三級預防等級，其中：a)一級預防防止疾病的進程；b)二級預防手段的目的在於早期疾病的治療，因此提升介入去預防疾病進程及症狀出現的機會；及 c)三級預防透過恢復功能並且減少疾病相關的併發症，降低已確診疾病的負面影響。

【0130】 本發明「異化」或「異化的」之用語係指分子轉變成其他，例如較小的分子，的化學反應。例如，精胺酸異化酶係指任何能夠與精胺酸反應的酵素，並使其轉化成其他分子，如鳥胺酸、瓜胺酸、及精胺。

【0131】 本發明「受試者」之用語係指任何動物(如哺乳動物)，包含人類、非人類靈長類、犬科動物、貓科動物、及嚙齒類動物，但不限於前述此等動物。

【0132】 本發明「身體質量指數」或「BMI」之用語，係指以公斤

(Kg)為單位的體重除以以公尺為單位的身高平方之比率。

【0133】 本發明「過重」之用語係指成人的 BMI 介於 25 至 30 之間。至於 20 歲以下的族群，「過重」被定義為其 BMI 相較於同年齡的人，介於第 85 至第 95 個百分位數之間。

【0134】 本發明「肥胖」之用語係指成人的 BMI 介於 30 至 40 之間。至於 20 歲以下的族群，「肥胖」被定義為其 BMI 相較於同年齡的人，高於第 95 個百分位數。如本發明所使用，此用語可包含肥胖及病態性肥胖。

【0135】 本發明「病態性肥胖」之用語係指成人的 BMI 高於 40。

【0136】 本發明「脂肪變性」之用語係指脂肪堆積於組織內的症狀，如肝臟組織、腎臟組織、胰臟組織、心肌組織或其他肌肉組織。

【0137】 本發明「纖維化」之用語係指纖維結締組織過度沉積的症狀，包含膠原蛋白，在器官或組織中沉澱，如肝臟組織、腎臟組織、胰臟組織或心臟組織。

【0138】 本發明「高膽固醇血症」之用語，係指在相同種族背景、年齡及性別下，相較於各個參考受試者的正常平均血膽固醇水平，其血膽固醇水平升高的症狀。對於人類而言，該用語特別係指血液總膽固醇高於約 200，特別係高於約 240 mg/dL。

【0139】 本發明「血脂異常」及「高血脂症」之用語，係指在相同種族背景、年齡及性別下，相較於各個參考受試者的正常平均血中脂質/脂肪水平，其血流中包含膽固醇、膽固醇酯、磷脂質、三酸甘油酯及/或脂蛋白的脂質/脂肪水平分別異常及升高的症狀。

【0140】 本發明提供之融合蛋白包含一個精胺酸酶多肽。前述精胺酸酶多肽可源自於被任何表現精胺酸酶的生物體表現的一個精胺酸酶蛋白。例示性的精胺酸酶產生於包含細菌如桿菌、農桿菌、藍綠菌、及分枝桿菌，以及哺乳動物如牛、豬、綿羊、山羊、嚙齒類動物及人類。當精胺酸酶多肽源自於人類精胺酸酶，其可為第一型精胺酸酶(ARG1)或第二型精胺酸酶(ARG2)。

【0141】 前述精胺酸酶多肽可包含一個全長精胺酸酶多肽或一個功能性片段及/或其變異體。

【0142】 精胺酸酶係為一個含錳的酵素。如實施例 32 所示，本發明所記載之融合蛋白存在至少一個錳離子，當它被至少一個二價陽離子取代，如 Co^{2+} 或 Ni^{2+} ，則可提升融合蛋白的催化活性。因此，在部分實施型態中，本發明所記載之融合蛋白除了錳之外，包含至少一個二價金屬，例如 Co^{2+} 或 Ni^{2+} 。在部分實施型態中，前述融合蛋白包含至少一個選自 Co^{2+} 及 Ni^{2+} 的金屬。在部分實施型態中，前述融合蛋白包含兩個 Co^{2+} 離子或兩個 Ni^{2+} 離子。在其他實施型態中，前述融合蛋白包含兩個 Mn^{2+} 離子。

【0143】 在部分實施型態中，前述精胺酸酶多肽係為野生型人類 ARG1。在部分實施型態中，前述精胺酸酶多肽包含一個與 SEQ ID NO: 69 具有至少 95% 序列同源性之序列。例如，前述精胺酸酶多肽可包含一個與 SEQ ID NO: 69 具有至少 96%、97%、98%、99%、99.1%、99.4% 或 99.7% 同源性之多肽序列。在部分實施型態中，前述精胺酸酶多肽的序列可透過 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25、或 30 個胺基酸修飾(如插入、替換、剔除等)，而與 SEQ ID NO: 69 相異。在部分實施型態

中，前述精胺酸酶多肽包含保守性胺基酸替換、非保守性胺基酸替換、或結合前述兩者的一個多肽。

【0144】 在部分實施型態中，前述精胺酸酶多肽係為 *Bacillus caldovelox* 精胺酸酶(BCA)。在部分實施型態中，前述精胺酸酶多肽包含一個與 SEQ ID NO: 70 具有至少 95%序列同源性之序列。例如，前述精胺酸酶多肽可包含一個與 SEQ ID NO: 70 具有至少 96%、97%、98%、99%、99.3%或 99.7%同源性之多肽序列。在部分實施型態中，前述精胺酸酶多肽的序列可透過 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25、或 30 個胺基酸修飾(如插入、替換、剔除等)，而與 SEQ ID NO: 70 相異。在部分實施型態中，前述精胺酸酶多肽包含保守性胺基酸替換、非保守性胺基酸替換、或結合前述兩者的一個多肽。

【0145】 在部分實施型態中，前述精胺酸酶多肽係為 BCA，其中第 161 個位置的絲胺酸被一個半胱胺酸替換，如 SEQ ID NO: 71 及 SEQ ID NO: 72 所示。前述絲胺酸被替換為半胱胺酸允許定點嵌入化學部份(moiety)，從而可進一步改善融合蛋白的特性。例如，第 161 個位置的半胱胺酸的側鏈可與適當活化的 PEG 部份(moiety)反應，形成一個聚乙二醇化(PEGylated)的精胺酸酶，前述聚乙二醇化的精胺酸酶可被結合到融合蛋白。融合蛋白的聚乙二醇化(PEGylation)能透過進一步保護融合蛋白免於組織或細胞內啟動的各種降解機制，進一步延長本發明之融合蛋白的滯留時間，從而改善其治療潛力。因此，在部分實施型態中，前述精胺酸酶多肽包含一個與 SEQ ID NO: 71 或 SEQ ID NO: 72 具有至少 95%序列同源性之序列。例如，前述精胺酸酶多肽可包含一個與 SEQ ID NO: 71 或 SEQ ID

NO: 72 具有至少 96%、97%、98%、99%、99.3%或 99.7%同源性之多肽序列。在部分實施型態中，前述精胺酸酶多肽的序列可透過 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25、或 30 個胺基酸修飾(如插入、替換、剔除等)，而與 SEQ ID NO: 71 或 SEQ ID NO: 72 相異。在部分實施型態中，前述精胺酸酶多肽包含保守性胺基酸替換、非保守性胺基酸替換、或結合前述兩者的一個多肽。

【0146】 例如在本發明中融合蛋白被聚乙二醇化(PEGylated)的情況下，PEG 基團的分子量可為約 5,000 至約 20,000 amu、約 5,000 至約 15,000 amu、約 5,000 至約 12,000 amu、約 7,000 至約 12,000 amu、或約 7,000 至約 10,000 amu。在部分實施型態中，前述 PEG 基團的分子量為約 4,000 amu 至 10,000 amu。在部分實施型態中，前述 PEG 基團係為 PEG4,000 或 PEG7,000。

【0147】 前述 PEG 基團可與融合蛋白直接共價連接或透過一個連接子連接。PEG 基團可透過蛋白上的半胱胺酸或離胺酸側鏈與聚乙二醇化(PEGylated)試劑反應而與融合蛋白共價連接。選擇性地，前述 PEG 基團可共價連接到蛋白的 N 端胺。

【0148】 在部分實施型態中，前述融合蛋白係透過一個丙酸連接子與 PEG 共價連接。在其他實施型態中，前述融合蛋白係透過一個 C2~C10、C2~C9、C2~C8、C2~C7、C2~C6、C2~C5、或 C2~C4 的直鏈或支鏈的羧酸連接子與 PEG 共價連接。在部分實施型態中，前述 PEG 基團係與精胺酸酶多肽連接。

【0149】 本發明之融合蛋白亦包含一個白蛋白結合結構域(ABD)多

肽。許多研究已表明，白蛋白的結合有潛力使治療型蛋白質具有更長的半衰期。然而，融合蛋白的設計包含 ABD 多肽可能具有挑戰性，因為 ABD 多肽與治療型蛋白質的融合會潛在的影響蛋白的治療功效、ABD 多肽結合的親和力、以及融合蛋白的溶解度。因此，ABD 多肽的選擇、連接位點、及任何必要連接子的建構並不是個容易的過程，時常需要反復試驗才能達到理想的融合特性。如圖 9、圖 10 及圖 13 所示，N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO: 50)的治療持續時間(及半衰期)超出預期地較 BHA 及 BAH 長很多。雖然 BHA、BAH 及 N-ABD094-rhArg 皆展現優異的長治療持續時間(及半衰期)，但 N-ABD094-rhArg 具有如此長的治療持續時間(及半衰期)係無法被預期。

【0150】 藥物具有更長的作用通常係為理想的。連接子的種類、長度、柔性及生物活性肽或蛋白與半衰期延長模組的 C 端或 N 端融合，可對融合蛋白的活性具有深遠的影響。本發明揭露透過一個合適的連接子將各種精胺酸酶與 ABD 分子融合，如此可保留精胺酸酶的酵素活性以及 ABD 的白蛋白結合能力。良好的穩定性及溶解度亦不可缺少。這是非常困難而且具有挑戰性。與常見的 HSA 或 Fc 的融合不同，對於 ABD 的融合所知甚少。本發明提供可用於產生功能性精胺酸酶-ABD 融合的連接子設計的實施例。本發明中，透過連接子工程或生物活性蛋白(精胺酸酶)相對於半衰期延長模組(ABD)的位置、或前述兩者，優化工程精胺酸酶融合蛋白(N-ABD094-rhArg、N-ABD-rhArg 等)的活性。

【0151】 在許多情況下，蛋白質工程可被用於克服活性缺失。在一實施例中，連接子工程被用於恢復 IFN- α 2b 與 HSA 因融合造成的活性喪

失(Prot Exp Purif. 2008; 61:73-7)。IFN- α 2b 與 HSA 的直接融合會形成一種不穩定的蛋白質，其生物活性非常小。關於融合形式，測試了各種連接子對 IFN- α 2b 活性的影響。已知胜肽連接子會影響融合蛋白的表現、活性及藥物動力學(Adv Drug Deliv Rev. 2013; 65:1357-69)。兩種主要的胜肽連接子為：(i)柔性連接子(如(G4S) n ，其中 $n=1\sim4$)；(ii)剛性連接子如 α 螺旋連接子(A(EAAAK) n A) x (其中 $n=2\sim4$ 且 $x=1$ 或 2)及 XP n (其中 X 為 A、K 或 E)。對於柔性連接子，一個優點係可能需要它的柔性使分子的生物活性部分相對於其同源受體能維持適當的方向。然而，柔性連接子無法在生物活性蛋白及與其融合對象之間留出很多空間。反過來說，剛性連接子可提供較多的空間但缺乏柔性。對於 IFN- α 2b-HSA 融合蛋白，柔性連接子使其具有將近 39%原始 IFN- α 2b 的活性，然而剛性 XP 連接子及 α 螺旋連接子可使其分別具有 68%及 115%原始 IFN- α 2b 的活性(Prot Exp Purif. 2008;61:73-7)。

【0152】 特定連接子會對融合蛋白的特性造成負面影響。例如，將顆粒性白血球聚落刺激因子(granulocyte colony-stimulating factor，G-CSF)與運鐵蛋白(Tf)融合。使用短白胺酸-麩胺酸(LE)連接子導致其僅有將近 10%原始 G-CSF 的活性。添加(G4S) 3 或 α 螺旋(A(EAAAK) n A) m ($n=2\sim4$ ， $m=1$ 或 2)連接子，相較於 G-CSF-LE-Tf，顯著增加融合蛋白的活性。融合蛋白與連接子(A(EAAAK) 4 A)LEA-(EAAAK) 4 A)建構，會使其具有接近原始 G-CSF 的生物活性(Pharm Res. 2006;23:2116-21)。在另一實施例中，雖然 Fc 部分(moiety)的 C 端可透過一個胜肽鍵直接與 IFN- β 部分(moiety)的 N 端連接，但 Gillies 等人(US 7,670,595 B2)另外透過一個連接

子胜肽連接 Fc 部分(moiety)與 IFN-β 部分(moiety)。前述連接子胜肽位於 Fc 部分(moiety)的 C 端與成熟 IFN-β 部分(moiety)的 N 端之間。在這樣的情況下，前述連接子胜肽較佳係由絲胺酸與甘胺酸殘基構成，如胺基酸序列 G4SG4SG3SG。此等發現顯示測試連接子技術對於融合蛋白研發計畫的成功的重要性。

【0153】 使用不同的方法顯示融合位點對於活性的重要性(Curr Pharmaceut Biotechnol. 2014;15:856-63)。腦利鈉肽(BNP)以各種形式被融合到 HSA 的 N 端或 C 端。此等結果顯示 BNP-HSA、BNP2-HSA(兩個 BNP)、及 BNP4-HSA 皆融合到 HSA 的 N 端，不具活性。然而，HSA-BNP2 融合到 HSA 的 C 端能與原始 BNP 的活性相當且持久。

【0154】 此等實施例顯示在融合蛋白的優化中做出重大努力，透過連接子工程、生物活性蛋白或胜肽相對於半衰期延長模組的位置、或前述兩者以優化融合蛋白活性的重要性。重要的是，本發明使用一個新的 ABD 融合方法將一個 ABD 與一個精胺酸酶結合在一起，從而能保留精胺酸酶的活性。成功製備能以 pH 依賴方式與 FcRn 結合的穩定且可溶的精胺酸酶-ABD 融合分子，以實現有效率的內體循環。例如，本發明驚訝地發現，針對 rhArg 與 ABD 融合，小鼠中蛋白循環的半衰期(terminal half-life)從幾分鐘急劇提升至 4 天。綜合上述，可透過各種不同的方法微調精胺酸酶的藥物動力學特性，以確保在不同疾病的情況下，藥物在循環中具有適當的停留時間。開發任何治療型蛋白藥物另一關鍵問題，係使免疫原性降至最低以避免產生不良影響。因此，重要的是觀察到低免疫原性的人類精胺酸酶及成功去免疫化(deimmunization)的 ABD(如 ABD094)，其在本發明中亦

作為基因融合對象以延長體內半衰期。

【0155】 白蛋白結合蛋白係為一個在革蘭氏陽性菌表現的各種表面蛋白中所發現的三股螺旋蛋白質結構域。源自鏈球菌蛋白 G 的前述白蛋白結合蛋白，具有 241 個胺基酸，並包含三個白蛋白結合結構域(ABD1-3)，其係用於與人類血清白蛋白結合以及避開宿主的免疫系統。ABD3 具有一個 46 個胺基酸的序列，該序列已被證實與人類血清白蛋白結合，並且為了開發具有不同特性的 ABD 多肽，如結合親和力及結合選擇性，該序列已成為許多研究以及針對人類血清白蛋白的親和力成熟的對象。此等研究已開發出大量具有廣泛變化特性的 ABD 多肽

【0156】 白蛋白結合蛋白在其它細菌被發現。例如，自然產生的白蛋白結合蛋白包含特定革蘭氏陽性菌的表面蛋白，如鏈球菌 M 蛋白(如 M1/Emm1、M3 Emm3、M12/Emm12、EmmL55/Emm55、Emm49/EmmL49 及蛋白 H)、鏈球菌蛋白 G、MAG 與 ZAG、以及來自特定 *Finnegoldia magna* 菌株的 PPL 與 PAB。

【0157】 在部分實施型態中，本發明所記載之融合蛋白包含一個 ABD 多肽，前述 ABD 多肽源自一個鏈球菌蛋白 G 白蛋白結合結構域。在部分實施型態中，前述 ABD 多肽係為完整的鏈球菌蛋白 G 白蛋白結合結構域 3 或其功能性片段及/或其變異體。

【0158】 在部分實施型態中，前述融合蛋白包含一個 ABD 多肽，前述 ABD 多肽包含一個與 SEQ ID NO: 66 具有至少 93%序列同源性之多肽序列。例如，前述 ABD 多肽可包含一個與 SEQ ID NO: 66 具有至少 94%、96%或 98%同源性之多肽序列。在部分實施型態中，前述 ABD 多肽

的序列可透過 1、2、3、4、5、6、7、8、9 或 10 個胺基酸修飾(如插入、替換、剔除等)，而與 SEQ ID NO: 66 相異。在部分實施型態中，前述 ABD 多肽包含保守性胺基酸替換、非保守性胺基酸替換、或結合前述兩者的一個多肽。

【0159】 在部分實施型態中，前述融合蛋白包含一個 ABD 多肽，前述 ABD 多肽包含一個與 SEQ ID NO: 67 具有至少 93%序列同源性之多肽序列。例如，前述 ABD 多肽可包含一個與 SEQ ID NO: 67 具有至少 94%、96%或 98%同源性之多肽序列。在部分實施型態中，前述 ABD 多肽的序列可透過 1、2、3、4、5、6、7、8、9 或 10 個胺基酸修飾(如插入、替換、剔除等)，而與 SEQ ID NO: 67 相異。在部分實施型態中，前述 ABD 多肽包含保守性胺基酸替換、非保守性胺基酸替換、或結合前述兩者的一個多肽。

【0160】 在部分實施型態中，前述融合蛋白包含一個 ABD 多肽，前述 ABD 多肽包含一個與 SEQ ID NO: 68 具有至少 93%序列同源性之多肽序列。例如，前述 ABD 多肽可包含一個與 SEQ ID NO: 68 具有至少 93%、95%或 97%同源性之多肽序列。在部分實施型態中，前述 ABD 多肽的序列可透過 1、2、3、4、5、6、7、8、9 或 10 個胺基酸修飾(如插入、替換、剔除等)，而與 SEQ ID NO: 68 相異。在部分實施型態中，前述 ABD 多肽包含保守性胺基酸替換、非保守性胺基酸替換、或結合前述兩者的一個多肽。

【0161】 前述 ABD 多肽與精胺酸酶多肽的相對位置可變換。例如，ABD 多肽可先於精胺酸酶多肽(如精胺酸酶多肽可被直接或間接連接

至 ABD 多肽的 C 端)或精胺酸酶多肽可先於 ABD 多肽(如 ABD 多肽可被直接或間接連接至精胺酸酶多肽的 C 端)。

【0162】 在部分實施型態中，前述融合蛋白可包含至少一個精胺酸酶多肽及/或至少一個 ABD 多肽。例如，前述融合蛋白可具有 ABD-rhArg-ABD、ABD094-rhArg-ABD094、ABD-BCA-ABD、ABD094-BCA-ABD094、rhArg-ABD-rhArg、rhArg-ABD094-rhArg、BCA-ABD-BCA、或 BCA-ABD094-BCA 的整體結構。

【0163】 前述 ABD 多肽與前述精胺酸酶多肽可透過直接共價連接或藉由一個胜肽連接子間接連接而被連接。

【0164】 前述胜肽連接子或連接子係長度通常在約 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20 或更多個胺基酸的一個多肽，其係被設計成利於 ABD 多肽及精胺酸酶多肽功能性連接成一個相連的融合蛋白。前述功能性連接之用語，係指利於多肽正確折疊成三維結構，使得相連的融合蛋白表現本身多肽組成所源自的蛋白的部分或全部的功能或生物活性。

【0165】 前述多肽連接子可被置於 ABD 多肽的 N 端及精胺酸酶多肽的 C 端之間，或選擇性地置於精胺酸酶多肽的 N 端及 ABD 多肽的 C 端之間。

【0166】 前述胜肽連接子可包含天然胺基酸、非天然胺基酸、及前述之組合。

【0167】 在部分實施型態中，前述胜肽連接子可包含甘胺酸、絲胺酸、天門冬醯胺、或前述之組合。例示性胜肽連接子包含，含有聚甘胺

酸、 $(GS)_n$ 、及 $(GGS)_n$ 的连接子，其中 n 為 1~30。其它例示性胜肽连接子包含柔性连接子(如 $(G_4S)_n$ ，其中 $n=1\sim4$)、或刚性连接子(如 α 螺旋连接子 $(A(EAAAK)_nA)_x$ ，其中 $n=2\sim4$ ，且 $x=1$ 或 2；及 XP_n ，其中 X 為 A、K 或 E，且 $n=1\sim10$)。在部分實施型態中，前述胜肽连接子係 $(A(EAAAK)_4ALEA-(EAAAK)_4A)$ (SEQ ID NO: 105)、 $G_4SG_4SG_3SG$ (SEQ ID NO: 106)、 $GS(N)_nGSG$ ，其中 $n=1\sim10$ 、及 $GS(Q)_nGSG$ ，其中 $n=1\sim10$ 等。在部分實施型態中，前述胜肽连接子包含一個與 SEQ ID NO: 73 具有至少 90%序列同源性的多肽序列。例如，胜肽连接子可包含一個與 SEQ ID NO: 73 具有至少 91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%序列同源性或與其相同之多肽。

【0168】 在部分實施型態中，前述胜肽连接子可包含甘胺酸、絲胺酸、天門冬醯胺、或前述之組合。在部分實施型態中，前述胜肽连接子包含一個與 SEQ ID NO: 74 具有至少 90%序列同源性的多肽序列。例如，胜肽连接子可包含一個與 SEQ ID NO: 74 具有至少 91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、或 99%序列同源性或與其相同之多肽。

【0169】 純化標籤可被用於改善純化融合蛋白的難度，例如透過親和性層析法。六個組胺酸標籤(6x His)係一個習知的純化標籤，其為 6 個組胺酸殘基的一個序列。因此，在部分實施型態中，前述融合蛋白進一步包含一個聚組胺酸，前述聚組胺酸包含 4~8 個組胺酸胺基酸，如 6x His 標籤。前述聚組胺酸可出現於前述融合蛋白的 C 端、前述融合蛋白的 N 端、或被置於 ABD 多肽及精胺酸酶多肽之間。

【0170】 當前述聚組胺酸被置於 ABD 多肽及精胺酸酶多肽之間

時，它可作為一個胜肽連接子或可被附加涵蓋在胜肽連接子內。例如，前述 SEQ ID NO 75 的融合蛋白包含一個在 300~305 位置的六個組胺酸多肽連接子，用於連接 ABD 多肽及精胺酸酶多肽，且可有利地被用於透過親和性層析法純化融合蛋白。

【0171】 在純化完成後，前述聚組胺酸標籤可透過所屬領域習知技術被選擇性地移除。例如，可使用外肽酶移除 N 端的聚組胺酸標籤(如 Qiagen TAGZyme)，並且 C 端聚組胺酸標籤之前可有適當的胺基酸序列，該序列有助於使用內肽酶移除聚組胺酸標籤。因此，排除 N 端及/或 C 端聚組胺酸標籤的融合蛋白，涵蓋在本發明所揭露的範圍內。

【0172】 在部分實施型態中，前述 ABD 多肽包含一個與 SEQ ID NO: 66、SEQ ID NO: 67、或 SEQ ID NO: 68 具有至少 93%序列同源性之多肽序列，並且前述精胺酸酶多肽包含一個與 SEQ ID NO: 69、SEQ ID NO: 70、SEQ ID NO: 71、或 SEQ ID NO: 72 具有至少 95%序列同源性之多肽序列。例如，前述 ABD 多肽包含一個與 SEQ ID NO: 66、SEQ ID NO: 67、或 SEQ ID NO: 68 具有至少 94%、95%、96%、97%、98%、或 99% 序列同源性或與其相同之多肽序列，並且前述精胺酸酶多肽包含一個與 SEQ ID NO: 69、SEQ ID NO: 70、SEQ ID NO: 71、或 SEQ ID NO: 72 具有至少 96%、97%、98%、或 99%序列同源性或與其相同之多肽序列。

【0173】 在部分實施型態中，前述 ABD 多肽包含一個與 SEQ ID NO: 66 具有至少 93%、94%、95%、96%、97%、98%、或 99%序列同源性或與其相同之多肽序列，並且前述精胺酸酶多肽包含一個與 SEQ ID NO: 69 具有至少 95%、96%、97%、98%、或 99%序列同源性或與其相同

之多肽序列。

【0174】 在部分實施型態中，前述融合蛋白進一步包含一個胜肽連接子，前述胜肽連接子包含一個與 SEQ ID NO: 73 或 SEQ ID NO: 74 具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、或 99% 序列同源性或與其相同之多肽序列。

【0175】 例示性融合蛋白包含與 SEQ ID NO: 49、SEQ ID NO: 50、SEQ ID NO: 51、SEQ ID NO: 52、SEQ ID NO: 53、SEQ ID NO: 54、SEQ ID NO: 55、SEQ ID NO: 56、SEQ ID NO: 75、及 SEQ ID NO: 76 具有有至少 95%、96%、97%、98%、或 99% 同源性或與其相同之融和蛋白。

【0176】 融合蛋白影響血漿中精胺酸濃度的治療持續時間取決於所施用融合蛋白的劑量，並且治療持續時間可為約 1 天、約 2 天、約 3 天、約 5 天、約 6 天、約 7 天、約 8 天、約 9 天、約 10 天、約 11 天、約 12 天、約 13 天、約 14 天、或約 15 天或更長時間。在部分實施型態中，融合蛋白的治療持續時間介於約 5 天至約 20 天、約 5 天至約 19 天、約 5 天至約 18 天、約 5 天至約 17 天、約 5 天至約 16 天、約 5 天至約 15 天、約 6 天至約 15 天、約 7 天至約 15 天、約 7 天至約 14 天、約 7 天至約 13 天、約 7 天至約 12 天、約 7 天至約 11 天、或約 8 天至約 11 天。

【0177】 在部分實施型態中，融合蛋白的半衰期為約 1 天至約 10 天、約 1 天至約 9 天、約 1 天至約 8 天、約 1 天至約 7 天、約 1 天至約 6 天、約 1 天至約 5 天、約 1 天至約 4 天、約 1 天至約 4 天、約 1 天至約 3 天、或約 1 天至約 2 天。在其它實施型態中，融合蛋白的半衰期為約 6 小時至約 30 小時。

【0178】 本發明所記載之融合蛋白的精胺酸酶活性，可基本上相同、低於、或高於來源的精胺酸酶多肽的活性。一單位的精胺酸酶活性被定義為，在標準測定條件下，每分鐘可催化 1 μmol 尿素之產生的融合蛋白(如 BHA(SEQ ID NO: 75)、BAH(SEQ ID NO: 76)、N-ABD-rhArg(SEQ ID NO: 49)、或 N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO: 50))或精胺酸酶(如 BCA(SEQ ID NO: 70))的量。酵素的比活性(specific activity)係表示每毫克蛋白所含的活性單位。在標準的二乙醯一肼(DAMO)測定條件下(37 °C，pH 7.4)，融合蛋白的比活性(specific activity)相較於嵌入其中之相應的精胺酸酶多肽，可低於或高於約 5%、約 10%、約 15%、約 20%、約 25%、約 30%、約 35%或約 40%。在部分實施型態中，融合蛋白的比活性(specific activity)相較於嵌入其中之相應的精胺酸酶多肽，可低於或高於約 5%至約 40%、約 10%至約 40%、約 10%至約 35%、約 10%至約 30%、約 20%至約 30%、約 20%至約 35%、約 15%至約 30%、約 15%至約 25%、或約 10%至約 20%。

【0179】 在部分實施型態中，融合蛋白的精胺酸酶活性基本上不受 HSA 存在的影響。這是有利的，因為 ABD 融合蛋白與 HSA 結合可能對融合蛋白的活性造成有害的影響。

【0180】 本發明亦提供編碼本發明所記載之融和蛋白的多核苷酸序列，前述多核苷酸序列可作為分離的多核苷酸，或可作為表現載體或直線型 DNA 序列的一部分，包含用於體外轉錄/轉譯的直線型 DNA 序列、可適用於原核或真核中表現、分泌及/或呈現組合物的載體。本發明揭露部分例示性多核苷酸，然而，在給定的表現系統中被賦予遺傳密碼子的簡併性

或偏好性的其它多核苷酸，當前述多核苷酸編碼本發明所記載之融合蛋白，其亦在本發明所揭露之範圍內。

【0181】 本發明所記載之多核苷酸可透過化學合成製備，例如在自動化多核苷酸合成儀上進行固相多核苷酸的合成，並且組裝成完整的單股或雙股分子。選擇性地，本發明之多核苷酸可透過其它技術製備，例如 PCR 後進行常規的選殖。製備或獲得已知序列的多核苷酸係為所屬技術領域中習知的技術。

【0182】 本發明所記載之多核苷酸可包含至少一個非編碼序列，如啟動子或增強子(enhancer)序列、內含子、多腺苷酸化訊號等。前述多核苷酸序列亦可包含編碼其它胺基酸的其他序列，例如前述序列編碼標記或標籤，如聚組胺酸(6X His)或 HA 標籤，有助於純化或檢測蛋白、訊號序列、融合蛋白伴侶(fusion protein partner)，如編碼生物活性劑的 cDNA 等。

【0183】 在另一實施型態中，本發明所提供之載體包含至少一種本發明所記載之多核苷酸。此等載體可為質體載體、病毒載體、供桿狀病毒表現之載體、基於跳躍子的載體或適於透過任意方式將本發明之多核苷酸導入給定的生物體或遺傳背景之其它任何載體。此等載體可為表現載體，其包含可控制、調節、引起或允許由此等載體編碼的多肽的表現的核苷酸序列元件。此等元件可包含轉譯增強子結合位點、RNA 聚合酶起始位點、核糖體結合位點、及其它有助於在給定的表現系統中表現編碼的多肽的位點。此表現系統可為所屬技術領域中習知的基於細胞(cell-based)、或無細胞(cell-free)的系統。

【0184】 在許多細菌的表現系統中，起始密碼子通常編碼甲硫胺酸，因此在此等表現系統中會產生 N 端為甲硫胺酸起始的蛋白。然而，習知部分細菌酵素如甲硫胺酸胺酶(MetAP)等，可催化新合成的多肽 N 端甲硫胺酸的水解。此通常在下一個胺基酸為例如 Gly、Ala、Ser、或 Thr 的情況下觀察到(*In vivo processing of N-terminal methionine in E. coli*, FEBS Lett. 1990 Jun 18;266(1-2):1-3)。因此，在部分實施型態中本發明所記載之融合蛋白包含在蛋白 N 端不存在甲硫胺酸之變異體。

【0185】 本發明所記載之融合蛋白可使用所屬技術領域中習知用於捕獲、固定、分配、或沉澱的分離流程分離，並且將其純化至商業適用性所需的程度。

【0186】 針對治療用途，可將本發明所記載之融合蛋白製備成醫藥組成物，前述醫藥組成物在醫藥上可接受之載劑中包含治療有效量之前述融合蛋白作為活性成分。「載劑」之用語係指與活性化合物一起施用之稀釋劑、佐劑、賦形劑、或媒介。此媒介可以係液體，如水及油，其來源包含石油、動物、植物或合成的，例如花生油、大豆油、礦物油、芝麻油等。例如，可使用 0.9%的鹽水及 0.3%的甘胺酸。此等溶劑為無菌並且通常不含顆粒物質。它們可透過常規、習知的滅菌技術(如過濾)進行滅菌。前述組成物可包含接近生理條件所需之醫藥上可接受之輔助物質，例如 pH 調節劑及緩衝劑、穩定劑、增稠劑、潤滑劑及著色劑等。此等藥劑劑型中融合蛋白的濃度可廣泛變化，例如重量百分濃度從少於約 0.5%、通常或至少約 1%至高達 15%或 20%，並且將主要取決於所選的特定給藥方式而基於所需的劑量、液體量、黏度等進行選擇。適當的媒介及劑型如

Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 21st Edition, Troy, D. B. ed., Lipincott Williams and Wilkins, Philadelphia, Pa. 2006, Part 5, Pharmaceutical Manufacturing pp 691-1092 所載，特別參見第 958~989 頁。

【0187】 本發明所記載之融合蛋白作為治療用途的給藥方式，可以係將藥劑遞送至宿主的任何適當的途徑，如腸道外給藥，例如皮內、肌肉內、腹腔內、靜脈內或皮下、肺；透過黏膜(口腔、鼻腔內、陰道內、直腸)；使用錠劑、膠囊劑、溶液劑、懸浮劑、散劑、膠漿劑、顆粒劑的劑型；並且填充於注射器、植入裝置、滲透壓幫浦、藥匣式(cartridge)、微型幫浦內；或所屬技術領域中習知的其他方式。部位專一性給藥可透過，例如關節內、支氣管內、腹腔內、囊內、軟骨內、腔內、體腔內(intracelial)、小腦內、腦室內、結腸內、子宮頸內、胃內、肝臟內、心內、骨骼內、骨盆內、心包膜內、腹膜內、胸膜內、前列腺內、肺內、直腸內、腎臟內、視網膜內、脊椎內、滑膜內、胸腔內、子宮內、血管內、膀胱內、病灶內、陰道、直腸、口頰、舌下、鼻腔內、或經皮輸藥達成。

【0188】 本發明所記載之融和蛋白可作為精胺酸消耗劑。此藥劑可用於治療透過消耗受試者的精胺酸達成治療效果的任何疾病或症狀，例如治療癌症、特定病毒感染、多發性硬化症、類風濕性關節炎、自體免疫疾病、先天性高精胺酸血症、移植物對抗宿主疾病(GvHD)，及本發明所記載之肥胖、代謝失調、及相關併發症與合併症。

【0189】 由於 ASS 或 OTC 的負調控，精胺酸營養缺陷型腫瘤仰賴細胞外的精胺酸，並且依賴源於細胞外的精胺酸以存活。精胺酸消耗劑已顯示出對精胺酸營養缺陷型腫瘤具有細胞毒性，並且目前正在臨床試驗中

研究其在癌症治療中的用途。

【0190】 因此本發明所記載之融合蛋白可用於治療癌症，例如胰腺癌、白血病、黑色素瘤、頭頸癌、大腸直腸癌、肺癌、乳癌、前列腺癌、子宮頸癌、肝癌、鼻咽癌、食道癌、肉瘤、胃癌、間皮瘤、淋巴瘤、膀胱癌、骨癌、子宮內膜癌、卵巢癌、腎癌、眼癌、神經母細胞瘤、膠質母細胞瘤、惡性周圍組織神經鞘腫瘤(MPNST)、及腦瘤。前述癌症可以係精胺酸營養缺陷型腫瘤，例如具有 ASS 及 OTC 中至少一種被負調控的特徵的癌症。

【0191】 本發明所記載之融合蛋白亦可用於治療病毒感染，例如人類免疫缺陷病毒(HIV)、B 型肝炎病毒(HBV)、C 型肝炎病毒(HCV)、單純疱疹病毒(HSV)、人類乳突病毒(HPV)、EB 病毒(Epstein-Barr virus, EBV)、疱疹病毒、水痘帶狀疱疹病毒、及流感。

【0192】 如本發明中所詳細描述，本發明提供之融合蛋白亦可用於治療選自由以下所組成之群組之症狀的至少一種：肥胖、代謝失調、以及相關併發症及/或合併症。

【0193】 如以下實驗所示，消耗精胺酸可大幅降低肥胖症。本發明中已探討使用 ABD 精胺酸酶融合蛋白或聚乙二醇化的精胺酸酶的精胺酸剝奪(arginine deprivation)的治療潛力，例如以 N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO: 50)、聚乙二醇化的 His-rhArg (SEQ ID NO: 101)、及 N-ABD094-rhArg-Co²⁺ (SEQ ID NO: 50(鈷替換))治療肥胖及相關代謝失調。本發明所示之數據顯示，在正常的瘦小鼠及肥胖小鼠中，使用如 N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO: 50)消耗精胺酸，可顯著減少脂肪量、抑制脂質合成

(lipogenesis)並增加胰島素敏感性。已發現使用如 N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO: 50)剝奪精氨酸，可預防並降低肥胖、代謝失調、以及相關併發症與合併症，包含胰島素抗性。

【0194】 本發明所示消耗精胺酸的效果驚人且出乎意料，因為大量研究顯示增加飲食中部份胺基酸(AAs)的攝取，包含精胺酸，對於葡萄糖及脂質代謝具有顯著效果，並且可透過補充 AA 減輕體重。此外，由於精胺酸為半必需胺基酸，其消耗不會對受試者造成有害影響。

【0195】 使用高脂飲食誘導肥胖(DIO)的小鼠模型。當瘦小鼠開始進行高脂飲食，同時給予 N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO: 50)，測試其預防 DIO 及相關代謝失調的進程的功效。已存在 DIO 的小鼠給予 N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO: 50)治療，測試其減輕肥胖、代謝失調、以及相關併發症與合併症的功效。

【0196】 如以下實施例所示，透過 N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO: 50)的治療，造成體重及脂肪量減少、提升葡萄糖耐受性及胰島素反應性、內分泌與代謝分析的正常化，並減緩發炎、脂肪變性、與纖維化，以及預防或逆轉棕色脂肪白化。

【0197】 本發明提供一種治療一有需求之肥胖及/或代謝失調受試者的方法，前述方法包含對該受試者施用治療有效量之精胺酸消耗劑之步驟。

【0198】 前述精胺酸消耗劑可以係所屬技術領域中已知能夠降低受試者血漿及/或細胞層級精胺酸的任何精胺酸消耗劑。前述精胺酸消耗劑可以係小分子或蛋白。

【0199】 前述蛋白可以係融合蛋白及/或化學修飾蛋白，如聚乙二醇化的蛋白。例示性的蛋白包含那些能夠催化精胺酸異化成其他產物的蛋白，例如具有精胺酸酶、精胺酸去亞胺酶、精胺酸脫羧酶、或精胺酸 2 單加氧酶活性的蛋白。

【0200】 前述精胺酸酶可以係所屬技術領域中已知的任何精胺酸酶，如那些由細菌、真菌、魚類、人類、牛、豬、兔、嚙齒類動物、靈長類動物、綿羊及山羊所產生的精胺酸酶。例如，*Bacillus caldovelox* 精胺酸酶、*Thermus thermophilus* 精胺酸酶、*Capra hircus* 第一型精胺酸酶、*Heterocephalus glaber* 第一型精胺酸酶、*Bos taurus* 第一型精胺酸酶、*Sus scrofa* 第一型精胺酸酶、*Plecoglossus altivelis* 第一型精胺酸酶、*Salmo salar* 第一型精胺酸酶、*Oncorhynchus mykiss* 第一型精胺酸酶、*Osmerus mordax* 第一型精胺酸酶、*Hyriopsis cumingii* 第一型精胺酸酶、*Rattus norvegicus* 第一型精胺酸酶、*Mus musculus* 第一型精胺酸酶、*Homo sapiens*(人類)第一型精胺酸酶、*Pan troglodytes* 第一型精胺酸酶、*Oryctolagus cuniculus* 第一型精胺酸酶、*Rattus norvegicus* 第二型精胺酸酶、*Mus musculus* 第二型精胺酸酶、*Homo sapiens* (人類)第二型精胺酸酶、*Bostaurus* 第二型精胺酸酶、*Heterocephalus glaber* 第二型精胺酸酶、*Pan troglodytes* 第二型精胺酸酶、*Oryctolagus cuniculus* 第二型精胺酸酶、*Delftia* 精胺酸酶、*Bacillus coagulans* 精胺酸酶、*Hoeflea phototrophica* 精胺酸酶及 *Roseiflexus castenholzii* 精胺酸酶。其他例子包含來自 *Bacillus methanolicus*、*Bacillus sp. NRRL B-14911*、*Planococcus donghaensis*、*Paenibacillus dendritiformis*、*Desmospora sp.*、*Methylobacter*

tundripaludum、*Stenotrophomonas sp.*、*Microbacterium laevaniformans*、
Porphyromonas uenonis、*Agrobacterium sp.*、*Octadecabacter arcticus*、
Agrobacterium tumefaciens、*Anoxybacillus flavithermus*、*Bacillus pumilus*、
Geobacillus thermoglucosidasius、*Geobacillus thermoglucosidans*、
Brevibacillus laterosporus、*Desulfotomaculum ruminis*、*Geobacillus*
kaustophilus、*Geobacillus thermoleovorans*、*Geobacillus*
thermodenitrificans、*Staphylococcus aureus*、*Halophilic archaeon DL31*、
Halopigerxanaduensis、*Natrialba magadii*、*Plasmodium falciparum*、
Helicobacter pylori 等的精胺酸酶。

【0201】 前述精胺酸去亞胺酶可以係所屬技術領域中已知的任何精胺酸去亞胺酶，例如那些由黴漿菌屬(*Mycoplasma*)、乳酸球菌屬(*Lactococcus*)、假單胞菌屬(*Pseudomonas*)、鏈球菌屬(*Streptococcus*)、埃希氏菌屬(*Escherichia*)、分枝桿菌屬(*Mycobacterium*)或芽孢桿菌屬(*Bacillus*)的微生物所產生的精胺酸去亞胺酶。例示性的精胺酸去亞胺酶包含但不限於那些由 *Mycoplasma hominis*、*Mycoplasma arginini*、*Mycoplasma arthritidis*、*Clostridium perfringens*、*Bacillus licheniformis*、*Borrelia burgdorferi*、*Borrelia afzelii*、*Enterococcus faecalis*、*Lactococcus lactis*、*Bacillus cereus*、*Streptococcus pyogenes*、*Streptococcus pneumoniae*、*Lactobacillus sake*、*Giardia intestinalis*、*Mycobacterium tuberculosis*、*Pseudomonas plecoglossicida*、*Pseudomonas putida*、*Pseudomonas aeruginosa* 等所產生的精胺酸去亞胺酶。

【0202】 前述精胺酸脫羧酶可以係所屬技術領域中已知的任何精胺

酸脫羧酶，例如那些由 *Escherichia coli*、*Salmonella typhimurium*、*Chlamydomonas reinhardtii*、*Methanocaldococcus jannaschii*、*Paramecium bursaria*、*Chlorella virus 1*、*Vibrio vulnificus* YJ016、*Campylobacter jejuni* subsp.、*Trypanosoma cruzi*、*Sulfolobus solfataricus*、*Bacillus licheniformis*、*Bacillus cereus*、*Carica papaya*、*Nicotianatobacum*、*Glycine max*、*Lotus coniculata*、*Vibrio vulnificus*、*Vibrio cholerae*、*Mus musculus*、*Thermotoga*、*Rattus norvegicus*、*Homo sapiens*、*Bos taurus*、*Sus scrofa*、*Thermus thermophiles*、*Thermus parvatiensis*、*Thermus aquaticus*、*Thermus thermophilus*、*Thermus islandicus*、*Arabidopsis thaliana*、*Avena sativa* 等所產生的精胺酸脫羧酶。

【0203】 前述精胺酸 2-單加氧酶可以係所屬技術領域中已知的任何精胺酸 2-單加氧酶，例如那些由 *Arthrobacter globiformis* IFO 12137、*Arthrobacter simplex* IFO 12069、*Brevibacterium helvolum* IFO 12073、*Helicobacter cinaedi* CCUG 18818、*Streptomyces griseus* 等所產生的精胺酸 2-單加氧酶。

【0204】 前述精胺酸脫羧酶、精胺酸去亞胺酶、精胺酸 2-單加氧酶、及精胺酸酶，可以係全長蛋白或其功能性片段及/或變異體。前述精胺酸脫羧酶、精胺酸去亞胺酶、精胺酸 2-單加氧酶、及精胺酸酶，可透過修飾而提升其藥物動力學特性，例如透過將蛋白或其功能性片段及/或變異體，與人類血清白蛋白、白蛋白結合結構域、免疫球蛋白的 Fc 區域、PEG 基團、或前述組合融合。

【0205】 可對本發明所記載之精胺酸異化酶進行工程，使其包含在

前述酵素上可選擇性連接 PEG 的特定位點。前述選擇性聚乙二醇化的位點，較佳係位於遠離酵素活性位點的位置，並且通常暴露於溶劑中，使其能與聚乙二醇化試劑反應。

【0206】 例如，可製備 Cys⁴⁵-人類第一型精胺酸酶(HAI)及 Cys¹⁶¹-*Bacillus caldovelox* 精胺酸酶(BCA)與硫醇專一性的 PEG 分子反應。修飾的精胺酸酶的單一游離半胱胺酸殘基與連接 PEG 化合物的馬來醯亞胺基團(MAL)接合，可導致 PEG 化合物與修飾的精胺酸酶的游離半胱胺酸之間形成共價鍵。SEQ ID NOs: 102 及 104 包含設計為用於 Cys⁴⁵ 定點聚乙二醇化的突變體(C168S/C303S)，因此可選擇性地被聚乙二醇化。SEQ ID NO: 89 亦包含設計為用於 Cys¹⁶¹ 定點聚乙二醇化的突變體(S161C)，因此可選擇性地被聚乙二醇化。

【0207】 在部分實施型態中，精胺酸酶可包含 SEQ ID NO: 101、SEQ ID NO: 102、SEQ ID NO: 103、或 SEQ ID NO: 104，其中 SEQ ID NO: 102 及 SEQ ID NO: 104 可選擇性地包含一個聚乙二醇基團(PEG)。

【0208】 可使用所屬技術領域中任何已知的聚乙二醇化試劑，進行 PEG 與本發明所記載之精胺酸異化酶的共價連接。例示性聚乙二醇化試劑包含 mPEG-ALD(甲氧基聚乙二醇-丙醛)；mPEG-MAL(甲氧基聚乙二醇-馬來醯亞胺)；mPEG-NHS(甲氧基聚乙二醇-N-羥基琥珀醯亞胺)；mPEG-SPA(甲氧基聚乙二醇-琥珀醯亞胺基丙酸脂)；及 mPEG-CN(甲氧基聚乙二醇-三聚氰氯)，但不限於此等試劑。

【0209】 PEG 基團的分子量可為約 5,000 至約 20,000 amu、約 5,000 至約 15,000 amu、約 5,000 至約 12,000 amu、約 7,000 至約 12,000 amu、

或約 7,000 至約 10,000 amu。在部分實施型態中，前述 PEG 基團的分子量為約 2,000 amu 至 10,000 amu。在部分實施型態中，前述 PEG 基團係為 PEG4,000、PEG5,000、PEG6,000、或 PEG7,000。

【0210】 前述 PEG 基團可與精胺酸酶直接共價連接或透過一個連接子連接。在部分實施型態中，前述精胺酸酶係透過一個丙酸連接子與 PEG 共價連接。在其他實施型態中，前述精胺酸酶係透過一個 C2~C10、C2~C9、C2~C8、C2~C7、C2~C6、C2~C5、或 C2~C4 的直鏈或支鏈的羧酸連接子與 PEG 共價連接。

【0211】 在選擇性的實施型態中，治療一有需求之受試者的選自由以下所組成之群組之症狀的至少一種：肥胖、代謝失調、以及相關併發症及/或合併症的方法，前述方法包含對該受試者施用低量精胺酸或基本上無精胺酸的飲食。

【0212】 前述治療一有需求之受試者的選自由以下所組成之群組之症狀的至少一種：肥胖、代謝失調、以及相關併發症及/或合併症的方法，亦可包含預防選自由以下所組成之群組之症狀的至少一種：肥胖、代謝失調、以及相關併發症及/或合併症。

【0213】 前述代謝失調可包含肥胖、高膽固醇血症、血脂異常、脂肪變性、胰島素抗性、葡萄糖失耐、高血糖症，及糖尿病或前述組合，且相關併發症及/或合併症，可包含糖尿病視網膜病變、糖尿病腎病變、糖尿病血管病變、糖尿病神經病變、脂性肝炎、纖維化、肝硬化、發炎、高血壓、心血管疾病、以及棕色脂肪白化或前述組合。

【0214】 在部分實施型態中，代謝失調係，例如在患有第一型或特

別係第二型糖尿病的受試者中，治療及/或預防胰島素抗性。如下述實施例所示，消耗精胺酸會導致受試者的胰島素敏感性增加。

【0215】 治療肥胖的方法可包含減少受試者的脂肪量或預防受試者的脂肪量增加。相較於進行高脂飲食且未使用精胺酸消耗劑治療的受試者，使用精胺酸消耗劑治療受試者，會導致內臟白色脂肪組織(WAT)、肝臟及骨骼肌中，數個脂肪生成(adipogenic)轉錄因子及脂質合成(lipogenic)酵素的 mRNA 表現量下降，例如 *Pparg*、*Srebp1c*、*Acc*、及 *Scd1*。在部分實施型態中，前述脂質合成(lipogenesis)調控因子的 mRNA 表現量的降低，係相對應於進行高脂飲食且未受治療的受試者的 mRNA 表現量，例如減少至少約 10%、約 20%、約 30%、約 40%、約 50%、約 60%、約 70%、約 80%、或約 90%。在部分實施型態中，使用精胺酸消耗劑治療受試者，會導致受試者 WAT、肝臟及/或骨骼肌中的基因的 mRNA 表現量下降，前述基因係選自由以下基因所組成之群組的至少一種：*Pparg*、*Srebp1c*、*Acc*、及 *Scd1*。

【0216】 代謝失調(如高血糖症、高胰島素血症)及/或其他因子(例如過量飲食、缺乏運動等)，可能導致肥胖及/或與肥胖相關。

【0217】 前述代謝失調亦可包含治療及/或預防受試者的脂肪變性，例如心臟脂肪變性、肝脂肪變性、腎脂肪變性、胰腺脂肪變性及肌肉脂肪變性。

【0218】 前述代謝失調亦可包含治療及/或預防受試者的纖維化，例如肝臟纖維化、腎臟纖維化、胰臟纖維化及心臟纖維化。

【0219】 前述代謝失調亦可包含透過降低，例如血漿總膽固醇、

LDL 膽固醇、載脂蛋白 B 及/或三酸甘油酯，以治療高膽固醇血症、血脂異常。

【0220】 使用精胺酸消耗劑治療受試者，可降低血漿瘦體素的濃度，例如相對應於進行高脂飲食(HFD)且未受治療的受試者的血漿瘦體素濃度的至少約 10%、約 20%、約 30%、約 40%、約 50%、約 60%、或約 70%。在部分實施型態中，相對應於進行 HFD 且未受治療的受試者的血漿瘦體素濃度，血漿瘦體素的濃度可被減少約 10%至約 70%、約 10%至約 60%、約 10%至約 50%、約 10%至約 40%、約 10%至約 30%。

【0221】 使用精胺酸消耗劑治療受試者，可降低血漿三酸甘油酯的濃度，例如相對應於進行 HFD 且未受治療的受試者的血漿三酸甘油酯濃度，血漿三酸甘油酯的濃度可被減少至少約 20%、約 30%、或約 40%。在部分實施型態中，相對應於進行 HFD 且未受治療的受試者的血漿三酸甘油酯濃度，血漿三酸甘油酯的濃度可被減少約 5%至約 40%、約 5%至約 30%、或約 5%至約 20%。

【0222】 使用精胺酸消耗劑治療受試者，可降低血漿總膽固醇的濃度，例如相對應於進行 HFD 且未受治療的受試者的血漿總膽固醇濃度，血漿膽固醇的濃度可被減少至少約 5%、10%、或約 15%。在部分實施型態中，相對應於進行 HFD 且未受治療的受試者的血漿膽固醇濃度，血漿膽固醇的濃度可被減少約 5%至約 15%、約 5%至約 10%、或約 10%至約 15%。

【0223】 使用精胺酸消耗劑治療受試者，可降低血漿游離脂肪酸的濃度，例如相對應於進行 HFD 且未受治療的受試者的血漿游離脂肪酸濃

度，血漿游離脂肪酸的濃度可被減少至少約 5%、10%、約 15%、或約 20%。在部分實施型態中，相對應於進行 HFD 且未受治療的受試者的血漿游離脂肪酸濃度，血漿游離脂肪酸的濃度可被減少約 5%至約 20%、約 5%至約 15%、或約 5%至約 10%。

【0224】 於受試者中，觀察到治療效果所需的血漿精胺酸濃度，可能基於許多因素而有所變化，包含受試者的狀況，以及疾病及/或醫學症狀的種類與嚴重性，及/或飲食組成。目標血漿精胺酸量的選擇，完全在所屬技術領域中具有通常知識者的能力範圍內。在部分實施型態中，血漿精胺酸的濃度低於約 100 μM 、約 90 μM 、約 80 μM 、約 70 μM 、約 60 μM 、約 50 μM 、約 40 μM 、約 30 μM 、約 20 μM 、約 10 μM 、或約 5 μM 。在部分實施型態中，血漿精胺酸的濃度為約 0.1 μM 至約 100 μM 、約 0.1 μM 至約 90 μM 、約 0.1 μM 至約 80 μM 、約 0.1 μM 至約 70 μM 、約 0.1 μM 至約 60 μM 、約 0.1 μM 至約 50 μM 、約 0.1 μM 至約 40 μM 、約 0.1 μM 至約 30 μM 、約 0.1 μM 至約 20 μM 、或約 0.1 μM 至約 10 μM 。在部分實施型態中，精胺酸量低於 Biochrom 30 胺基酸分析儀的檢測極限(如低於約 3 μM)及/或低於 Agilent 6460 液相層析/電噴霧電離三重四極柱式質譜儀的檢測極限(如低於約 0.3 μM)。

【0225】 決定治療持續時間，例如受試者血漿中精胺酸的濃度維持在耗盡狀態下的持續時間，係完全在所屬技術領域中具有通常知識者的能力範圍內。在部分實施型態中，治療持續時間約 1 週、約 2 週、約 3 週、約 4 週、約 8 週、約 12 週、約 16 週、約 20 週、約 24 週、約 28 週、約 32 週、約 36 週、約 40 週、約 44 週、約 48 週、約 52 週、約 56 週、或更

久。

【0226】 消耗精胺酸已被證明能有效治療許多症狀，包含病毒感染(美國專利 8,507,245，整體透過引用併入本說明書中)、多發性硬化症、類風濕性關節炎、自體免疫疾病(美國專利 9,789,169，整體透過引用併入本說明書中)、先天性高精胺酸血症(ClinicalTrials.gov Identifier: NCT02488044)、移植物對抗宿主疾病(GvHD)(Hallet W.等人，*Exploiting arginase to prevent GVHD*，Blood 2010 116:5440-5441)、發炎(Sahin E.等人，*Macrophage PTEN regulates expression and secretion of arginase I modulating innate and adaptive immune responses*，J Immunol。2014 Aug 15;193(4):1717-27)、及視網膜神經血管病變(Fouda AY.等人，*Arginase I promotes retinal neurovascular protection from ischemia through suppression of macrophage inflammatory responses* Cell Death Dis。2018 Sep 25;9(10):1001)，但不限於此等症狀。

【0227】 因此，本發明亦提供一種方法，其係用於治療一有需求之受試者的選自由以下所組成之群組之症狀的至少一種：病毒感染、多發性硬化症、類風濕性關節炎、自體免疫疾病、先天性高精胺酸血症、移植物對抗宿主疾病(GvHD)及發炎，前述方法包含對該受試者施用治療有效量之本發明所記載之融合蛋白的步驟。

【0228】 所屬技術領域中具有通常知識者透過下述實施例，應顯而易見本發明其他的目的、優點及新穎特徵，此等實施例並無意對本發明進行限制。

【0229】 實施例 1：建構 ABD 與 ABD094 融合基因

【0230】 透過下述步驟建構用於 N 端融合的 N-ABD 的基因。在 PCR 反應中，於 50 μ L 的反應體積，混合表 1 所示之引子 01~08 (SEQ ID NO: 1~8)，使各個引子的濃度為 20 nM，並連同 iProof DNA 聚合酶的 1X 反應緩衝液 (Bio-rad)、0.2 mM dNTP 及 0.5 單位 iProof DNA 聚合酶 (Bio-rad)。PCR 流程設定為：(1) 98 $^{\circ}$ C，10 秒；(2) 50 $^{\circ}$ C，20 秒；(3) 72 $^{\circ}$ C，15 秒；(4) (1)至(3)步驟重複 35 次。接著，將 1 μ L 的 PCR 反應產物加入新的 PCR 反應中，於 50 μ L 的反應體積，連同 iProof DNA 聚合酶的 1X 反應緩衝液 (Bio-rad)、0.2 mM dNTP、0.2 μ M 引子 (N-ABDNde-F): 5'-GATCTTAAGCATATGCATCATCACCATC-3' (SEQ ID NO: 9) 及引子 (N-ABDHind-R): 5'-ACAGCTAAAAGCTTATCAGCCTAGGATCCGCCGCTACCATTG-3' (SEQ ID NO: 93)、以及 0.5 單位 iProof DNA 聚合酶。PCR 流程設定為：(1) 98 $^{\circ}$ C，10 秒；(2) 50 $^{\circ}$ C，20 秒；(3) 72 $^{\circ}$ C，15 秒；(4) (1)至(3)步驟重複 35 次；(5) 72 $^{\circ}$ C，5 分鐘。建構 N-ABD094 基因的方法與建構 N-ABD 基因的步驟相同，除了使用表 1 所示之引子 09~16 (SEQ ID NO: 9-16)，取代列於表 1 之引子 01~08 (SEQ ID NO: 1~8)。

【0231】 透過下述步驟建構用於 C 端融合的 C-ABD 的基因。在 PCR 反應中，於 50 μ L 的反應體積，混合表 1 所示之引子 17~24，使各個引子的濃度為 20 nM，並連同 iProof DNA 聚合酶的 1X 反應緩衝液、0.2 mM dNTP 及 0.5 單位 iProof DNA 聚合酶。PCR 流程設定為：(1) 98 $^{\circ}$ C，10 秒；(2) 50 $^{\circ}$ C，20 秒；(3) 72 $^{\circ}$ C，15 秒；(4) (1)至(3)步驟重複 35 次。接著，將 1 μ L 的 PCR 反應產物加入新的 PCR 反應中，於 50 μ L 的反應體

積，連同 iProof DNA 聚合酶的 1X 反應緩衝液、0.2 mM dNTP、0.2 μ M 引子(C-ABDNde-F): 5'-

TAGCTGATCATATGTTATGCGATGGATCCAGTAACAAC-3' (SEQ ID NO: 91)、0.2 μ M 引子(C-ABDHind-R): 5'-

GACCCTAAAAGCTTAATGGTGATGGTGATGATG-3' (SEQ ID NO: 92)以及 0.5 單位 iProof DNA 聚合酶。PCR 流程設定為：(1) 98 °C，10 秒；(2) 50 °C，20 秒；(3) 72 °C，15 秒；(4) (1)至(3)步驟重複 35 次；(5) 72 °C，5 分鐘。建構 C-ABD094 基因的方法與建構 C-ABD 基因的步驟相同，除了使用表 1 所示之引子 25~32(SEQ ID NO: 25~32)，取代列於表 1 之引子 17~24(SEQ ID NO: 17~24)。

【0232】 將 N-ABD、N-ABD094、C-ABD 或 C-ABD094 的 PCR 片段，透過限制酶 Nde I 及 Hind III 切割，並連接至預先使用相同酵素切割的載體 pRSET-lac 中，接著轉形(transform)至 *Escherichia coli* Top10 中，分別產生質體 pN-ABD、pN-ABD094、pC-ABD 及 pC-ABD094。質體 pRSET-lac 係透過修飾 pRSET-A (Invitrogen)而產生，其係藉由將 T7 啟動子取代成源於 pGEMT-Easy Vector (Promega)的 lac 啟動子。

【0233】 透過下述步驟建構 N-ABD 或 N-ABD094 與人類第一型精胺酸酶基因的融合。於 50 μ L 的反應體積，混合 0.2 μ M 引子 HARGBam-F (5'-TTAGCTGGGGATCCGCCAAGTCCAGAACCATAGG-3') (SEQ ID NO: 93)、0.2 μ M 引子 HARGHind-R (5'-GAGATCAAAGCTTACTTAGGTGGGTAAAGGTAGTC-3') (SEQ ID NO: 94)，並連同 iProof DNA 聚合酶的 1X 反應緩衝液、0.2 mM dNTP、100 ng

人類第一型精胺酸酶 cDNA 及 0.5 單位 iProof DNA 聚合酶。PCR 流程設定為：(1) 98 °C，10 秒；(2) 50 °C，20 秒；(3) 72 °C，30 秒；(4) (1)至(3)步驟重複 35 次；(5) 72 °C，5 分鐘。將人類第一型精胺酸酶基因的 PCR 片段，透過限制酶 BamH I 及 Hind III 切割，並連接至預先使用相同酵素切割的載體 pN-ABD 或 pN-ABD094 中，接著轉形至 *Escherichia coli* ER2566 (NEB)中，分別產生質體 pN-ABD-rhArg 與 pN-ABD094-rhArg。

【0234】 透過下述步驟建構 C-ABD 或 C-ABD094 與人類第一型精胺酸酶基因的融合。於 50 μ L 的反應體積，混合 0.2 μ M 引子 HARGNde-F (5'-TAGGCTGCATATGAGCGCCAAGTCCAGAACCATAG-3') (SEQ ID NO: 95)、0.2 μ M 引子 HARGBam-R (5'-ATCAGCTAGGATCCCTTAGGTGGGTAAAGGTAGTCAATAGG-3') (SEQ ID NO: 96)，並連同 iProof DNA 聚合酶的 1X 反應緩衝液、0.2 mM dNTP、100 ng 人類第一型精胺酸酶 cDNA 及 0.5 單位 iProof DNA 聚合酶 (Bio-rad)。PCR 流程設定為：(1) 98 °C，10 秒；(2) 50 °C，20 秒；(3) 72 °C，30 秒；(4) (1)至(3)步驟重複 35 次；(5) 72 °C，5 分鐘。將人類第一型精胺酸酶基因的 PCR 片段，透過限制酶 Nde I 及 BamH I 切割，並連接至預先使用相同酵素切割的載體 pC-ABD 或 pC-ABD094 中，接著轉形至 *Escherichia coli* ER2566 (NEB)中，分別產生質體 pC-ABD-rhArg 與 pC-ABD094-rhArg。

【0235】 透過下述步驟建構 N-ABD 或 N-ABD094 與 *Bacillus caldovelox* 精胺酸酶(BCA)基因的融合。於 50 μ L 的反應體積，混合 0.2 μ M 引子 BCABam-F (5'-

ATGCTAGTGGATCCATGAAGCCAATTTCAATTATCG -3') (SEQ ID NO: 97)、0.2 μ M 引子 BCAHind-R (5'-TCAGCCTAAAGCTTACATGAGTTTTTCACCAAACAACG-3') (SEQ ID NO: 98)，並連同 iProof DNA 聚合酶的 1X 反應緩衝液、0.2 mM dNTP、100 ng *Bacillus caldovelox* 的基因組 DNA (genomic DNA)及 0.5 單位 iProof DNA 聚合酶。PCR 流程設定為：(1) 98 °C，10 秒；(2) 50 °C，20 秒；(3) 72 °C，30 秒；(4) (1)至(3)步驟重複 35 次；(5) 72 °C，5 分鐘。將 *Bacillus caldovelox* 精胺酸酶基因的 PCR 片段，透過限制酶 BamH I 及 Hind III 切割，並連接至預先使用相同酵素切割的載體 pN-ABD 或 pN-ABD094 中，接著轉形至 *Escherichia coli* ER2566 (NEB)中，分別產生質體 pN-ABD-BCA 與 pN-ABD094-BCA。

【0236】 透過下述步驟建構 C-ABD 或 C-ABD094 與 *Bacillus caldovelox* 精胺酸酶(BCA)基因的融合。於 50 μ L 的反應體積，混合 0.2 μ M 引子 BCANde-F (5'-ATGCTAGCCATATGAAGCCAATTTCAATTATCGGG -3') (SEQ ID NO: 99)、0.2 μ M 引子 BCABam-R (5'-TCAGCTAAGGATCCCATGAGTTTTTCACCAAACAACG -3') (SEQ ID NO: 100)，並連同 iProof DNA 聚合酶的 1X 反應緩衝液、0.2 mM dNTP、100 ng *Bacillus caldovelox* 的基因組 DNA 及 0.5 單位 iProof DNA 聚合酶。PCR 流程設定為：(1) 98 °C，10 秒；(2) 50 °C，20 秒；(3) 72 °C，30 秒；(4) (1)至(3)步驟重複 35 次；(5) 72 °C，5 分鐘。將 *Bacillus caldovelox* 精胺酸酶基因的 PCR 片段，透過限制酶 Nde I 及 BamH I 切割，並連接至預先使

用相同酵素切割的載體 pC-ABD 或 pC-ABD094 中，接著轉形至 *Escherichia coli* ER2566 (NEB)中，分別產生質體 pC-ABD-BCA 與 pC-ABD094-BCA 。

【0237】 表 1、用於 ABD 及 ABD094 基因合成的 DNA 引子

編號	序列
01	5'-GGAGATGGACATATGCATCATCACCATCACCATGATGAAGCC GTGGATGC-3' (SEQ ID NO: 1)
02	5'-GCTAAGACTTTAGCTTCAGCTAAGGAATTCGCATCCACGGCT TCATCATG-3' (SEQ ID NO: 2)
03	5'-CCTTAGCTGAAGCTAAAGTCTTAGCTAACAGAGAACTTGAC AAATATGGA-3' (SEQ ID NO: 3)
04	5'-TAGGTTCTTGTAATAGTCACTTACTCCATATTTGTCAAGTTCTC TGTTAG-3' (SEQ ID NO: 4)
05	5'-GGAGTAAGTGACTATTACAAGAACCTAATCAACAATGCCAA AACTGTTGA-3' (SEQ ID NO: 5)
06	5'-AAATTCATCTATCAGTGCTTTTACACCTTCAACAGTTTTGG CATTGTTG-3' (SEQ ID NO: 6)
07	5'-GTAAAAGCACTGATAGATGAAATTTTAGCTGCATTACCTTC GGGTAGTAA-3' (SEQ ID NO: 7)
08	5'-TCCGCCGCTACCATTGTTATTATTGTTGTTACTACCCGAAG GTAATGCAG-3' (SEQ ID NO: 8)
09	5'-GATCTTAAGCATATGCATCATCACCATCACCATGATGAAGCG GTGGA-3' (SEQ ID NO: 9)

10	5'-GCTTCTTTCGCTTCCGCCAGGCTGTTTCGCATCCACCGCTTCA TCATG-3' (SEQ ID NO: 10)
11	5'-GCGGAAGCGAAAGAAGCGGCGAACGCGGAACTGGATAGCT ATGGCGTGAG-3' (SEQ ID NO: 11)
12	5'-TTATCAATCAGGCGTTTATAAAAATCGCTCACGCCATAGCTA TCCAGTTC-3' (SEQ ID NO: 12)
13	5'-GATTTTTATAAACGCCTGATTGATAAAGCGAAAACCGTGGA AGGCGTGGA-3' (SEQ ID NO: 13)
14	5'-CGGCAGCGCCGCCAGAATCGCATCTTTCAGCGCTTCCACGC CTTCCACGGT-3' (SEQ ID NO: 14)
15	5'-TTCTGGCGGCGCTGCCGTCGGGTAGTAACAACAATAATAAC AATGGTAGC-3' (SEQ ID NO: 15)
16	5'-GGATCCGCCGCTACCATTGTTATTATTGTTGTTACTACC-3' (SEQ ID NO: 16)
17	5'-CATATGTTAGCTGATGGATCCAGTAACAACAATAATAACA ATGGTAGCGG-3' (SEQ ID NO: 17)
18	5'-AATTCGCATCCACGGCTTCATCACCGCCGCTACCATTGTTA TTATTGTTG-3' (SEQ ID NO: 18)
19	5'-GAAGCCGTGGATGCGAATTCCTTAGCTGAAGCTAAAGTCTTAG CTAACAG-3' (SEQ ID NO: 19)
20	5'-CTTACTCCATATTTGTCAAGTTCTCTGTTAGCTAAGACTTTA GCTTCAGC-3' (SEQ ID NO: 20)
21	5'-GAGAACTTGACAAATATGGAGTAAGTGACTATTACAAGAA

	CCTAATCAAC-3'(SEQ ID NO: 21)
22	5'-TACACCTTCAACAGTTTTGGCATTGTTGATTAGGTTCTTGT AATAGTCAC-3' (SEQ ID NO: 22)
23	5'-GCCAAAACCTGTTGAAGGTGTAAAAGCACTGATAGATGAAA TTTLAGCTGC-3' (SEQ ID NO: 23)
24	5'-ATGGTGATGGTGATGATGAGGTAATGCAGCTAAAATTCA TCTATCAGTG-3' (SEQ ID NO: 24)
25	5'-CATATGTTATGCGATGGATCCAGTAACAACAATAATAACAA TGGTAGCGG-3' (SEQ ID NO: 25)
26	5'-TGTTTCGCATCCACCGCTTCATCACCGCCGCTACCAATTGTTATT ATTGTTG-3' (SEQ ID NO: 26)
27	5'-GAAGCGGTGGATGCGAACAGCCTGGCGGAAGCGAAAGAA GCGGCGAACGC-3' (SEQ ID NO: 27)
28	5'-AAAATCGCTCACGCCATAGCTATCCAGTTCCGCGTTCGCCGCT TCTTTCG-3' (SEQ ID NO: 28)
29	5'-CTATGGCGTGAGCGATTTTTATAAACGCCTGATTGATAAAGC GAAAACCG-3' (SEQ ID NO: 29)
30	5'-TCGCATCTTTCAGCGCTTCCACGCCTTCCACGGTTTTCGCTTT ATCAATC-3' (SEQ ID NO: 30)
31	5'-GAAGCGCTGAAAGATGCGATTCTGGCGGCGCTGCCGCATCAT CACCATCA-3' (SEQ ID NO: 31)
32	5'-CTAAAAGCTTAATGGTGATGGTGATGATGCGGCAG-3' (SEQ ID NO: 32)

【0238】 實施例 2：透過發酵表現及純化 ABD-rhArg 或 ABD094-rhArg 融合蛋白

【0239】 透過下述步驟製備 N-ABD-rhArg (SEQ ID NO: 49)融合蛋白。將轉形 pN-ABD-rhArg 的 *Escherichia coli* ER2566 培養於 50 mL 種源 (seed)培養基(1.5 g 酵母萃取物、0.25 g NaCl 及 5 mg 安比西林 (ampicillin))，並置於迴轉式震盪器中以 30 °C、轉速 250 rpm 的條件，培養 16 小時。接著，將種源培養移至 1 L 發酵培養基(10 g 酵母萃取物、16 g 胰水解蛋白(tryptone)、6.7 g Na₂HPO₄·7H₂O、3.41 g KH₂PO₄, 2.41g NH₄Cl, 0.67 g (NH₄)₂SO₄、10 g 甘油、1 g 葡萄糖、MgSO₄·7H₂O、1 mM CaCl₂ 及 0.1 g 安比西林)，並置於 28 °C、供給 1L/min 的空氣、轉速至少 500 rpm、pH 保持在 7.4 的培養條件下。為了使氧氣的最小溶解度 pO₂ 保持在至少 20 %，會自動增加攪拌速率。當培養物在波長 600 nm 的吸光度達到光密度(OD)為 15 時，以連續 16 小時速率 31.25 mL/hr 的方式，添加 500 mL 的培養基(10 g 酵母萃取物、16 g 胰水解蛋白、2.41g NH₄Cl、0.67 g (NH₄)₂SO₄、20 g 甘油)。透過離心收集細胞，並以 Ni-IDA 瓊脂糖凝膠 (sepharose)管柱進行蛋白純化。通常培養物可獲得超過 1 g/L 的純化蛋白。接著透過 Triton X-114 方法去除純化蛋白中的細菌內毒素(endotoxin) (Aida Y. and Pabst M.J. (1990) *Journal of Immunological Methods*. **132**: 191-195，透過引用併入本說明書中)。製備融合蛋白 N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO: 50)、C-ABD-rhArg (SEQ ID NO: 51)、C-ABD094-rhArg (SEQ ID NO: 52)、N-ABD-BCA (SEQ ID NO: 53)、N-ABD094-BCA (SEQ ID NO: 54)、C-ABD-BCA (SEQ ID NO: 55)及 C-ABD094-BCA (SEQ ID NO: 56)的步驟，與

製備 N-ABD-rhArg (SEQ ID NO: 49)的步驟相同，除了細胞分別轉形與其相應的質體。上述白蛋白結合結構域人類精胺酸酶(rhArg)重組蛋白，即 N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO: 50)，其蛋白純化之實施例如圖 1 及表 2 所示。

【0240】 表 2、製備 N-ABD094-rhArg 蛋白並收獲 990 mg 純化蛋白

	體積 (mL)	濃度(mg/mL)	總重(mg)	比活性(U/mg)
N-ABD094-rhArg	50	19.81	990	184

製備結果如圖 12 所示，收獲 709 mg N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO: 50)，比活性為 205 U/mg，且蛋白濃度為 10.5 mg/mL。

【0241】 實施例 3：N-ABD094-rhArg 基因(SEQ ID NO: 38)之建構與選殖

【0242】 N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO: 38)基因，係透過基於 N-ABD-rhArg 基因(SEQ ID NO: 37)之重疊延伸聚合酶連鎖反應(overlapping extension PCR)合成而產生，其中會進行兩次 PCR 反應。首先，使用帶有 N-ABD094-rhArg 基因(SEQ ID NO: 38)之 pRSET/lac 質體。在第一次 PCR 反應中，透過 ABD094-0F (SEQ ID NO: 57)及 HuArgHinBam-R (SEQ ID NO: 64)，分離並擴增 rhArg 區域。其 PCR 產物透過 0.7 %瓊脂糖凝膠 (Biorad)，於電壓 100 V 條件下，進行 30 分鐘凝膠電泳分離，並接著使用凝膠條帶純化試劑組(gel band purification kit，GE Healthcare Life Science)進行純化。接著，ABD094 藉由第二次 PCR 反應被加入 PCR 產物中。以無菌的超純水(milli-Q)製備 20 倍稀釋的引子混合物，其包含 ABD094-

0F、ABD094-1F、ABD094-2F、ABD094-3F、ABD094-4F 及 ABD094-5F (SEQ ID NO: 57~62)。前述引子混合物與 abdNde-F 彼此重疊。透過 abdNde-F (SEQ ID NO: 63)、HuArgHinBam-R (SEQ ID NO: 64)、以及 20 倍稀釋的引子混合物，進行第二次 PCR 反應，並透過上述相同方法分離與純化其 PCR 產物。前述引子序列如表 3 所示，引子之結合位點如圖 2A 所示。收獲之 N-ABD094-rhArg 融合基因(SEQ ID NO: 38)的 DNA 序列及蛋白序列如圖 2B 所示。

【0243】 表 3、選殖 N-ABD094-rhArg 基因(SEQ ID NO: 38)之引子列表

引子名稱	序列
ABD094-0F	5'-ATTCTGGCAGCGCTGCCGTCGGGTAG TAACAACAATAATAACA ATGGTAG-3' (SEQ ID NO: 57)
ABD094-1F	5'-AACCGTGGAAGGTGTGGAAGCGCTGAAA GATGCGATTCTGG CAGCGCTGC-3' (SEQ ID NO: 58)
ABD094-2F	5'-GATTTTATATAAACGTCTGATTGATAAAGCGAA AACCGTGGAAGGTGTGGA-3' (SEQ ID NO: 59)
ABD094-3F	5'-CTGGATAGCTATGGCGTGAGCGATTTTATATAACG TCTGATTGATAAAGC-3' (SEQ ID NO: 60)
ABD094-4F	5'-GCGGAAGCGAAAGAAGCAGCAAACGCGGAACTG GATAGCTATGGCGTGAG-3' (SEQ ID NO: 61)
ABD094-5F	5'-ACCATGATGAAGCCGTGGATGCGAATTCC CTGGCGGAAGCGAAAGAAGCA-3' (SEQ ID NO: 62)
abdNde-F	5'-GGAGATATACATATGCATCATCACCATCACCAT GATGAAGCCGTGG-3' (SEQ ID NO: 63)

HuArgHinBam-R	5'-TGACTACCTTAACCCACCTAAGTAAGCTT GGATCCTGTAACG-3' (SEQ ID NO: 64)
---------------	--

【0244】 使用 BamHI-HF 與 NdeI (New England BioLabs)對 PCR 產物以及 pRSET/lac 載體，於 37 °C 進行雙酶切兩小時。插入片段(insert)以及載體皆透過 0.7 %瓊脂糖凝膠(Biorad)，於電壓 100 V 條件下，進行 30 分鐘凝膠電泳分離，並接著使用凝膠條帶純化試劑組(GE Healthcare Life Science)進行純化。接著，使用 T4 連接酶(New England BioLabs)，於室溫下連接插入片段與載體 20 分鐘。將重組 DNA 轉形至勝任細胞(competent cell)，之後將細胞塗佈於含有 50 µg/mL 卡納黴素(kanamycin)的 LB 平板培養基上，並於 37 °C 過夜培養。挑選 8 個菌落，並透過 PCR 以 abdNde-F 及 HuArgHinBam-R 確認 N-ABD094-rhArg 的存在。PCR 顯示陽性結果的菌落，進一步培養於含有 50 µg/mL 卡納黴素的 5 mL 2x TY，並於 30 °C 過夜培養。菌液於 1.7 mL 微量離心管中以 16,100 x g 離心 1 分鐘，其細菌的沉澱物以溶解緩衝液(50 mM Tris-HCl、0.1 M NaCl、1 mM MnCl₂，pH 7.4)懸浮，並透過在液態氮中反覆凍融破菌，離心分離細胞裂解物，以獲得蛋白溶液。透過 DAMO 進行精胺酸酶活性分析，以測試精胺酸酶的存在。

【0245】 實施例 4：建構 BCA 表現載體

【0246】 從 GenScript 訂購編碼 BCA 的基因(Pubmed 登錄號：U48226)，該基因係透過從頭合成(*de novo synthesis*)並且插入 pUC57 選殖載體。藉由點突變引入單個半胱胺酸殘基，並同時於 C 端加上六個組胺酸的標籤，以利於蛋白純化過程。將經工程 BCA 基因次選殖至 pET-3a 載體，並轉形至 BL21(DE3)勝任細胞以表現 BCA。可從蛋白質結構資料庫中

檢索 BCA (PDB: 2CEV)的晶體結構。經工程 BCA (S161C)-His (SEQ ID NO: 89)之蛋白序列如圖 3 所示。

【0247】 實施例 5：建構 BCA-ABD 表現載體

【0248】 透過重疊 PCR，建構並且擴增編碼白蛋白結合結構域 (ABD)之引子對。簡言之，以 200 ng 引子作為模板，並透過 1 單位 iProof High-Fidelity DNA 聚合酶(Bio-Rad)將其擴增。將前述引子置於 98°C 30 秒，同時進行 15 個循環的擴增，其步驟包含：98 °C 熱變性 10 秒、60 °C 黏合 30 秒以及 72 °C 延長 15 秒。

【0249】 5'-正義-ABD

GCGCAGCATGATGAAGCCGTGGATGCGAACAGCTTAGCTGAAG
CTAAAGTCTTAGCTAACAGAGAACTTGACAAATATGGAGTAAGTGAC
TATTACAAGAACC (SEQ ID NO: 77)

【0250】 5'-反義-ABD

TTAAGGTAATGCAGCTAAAATTTTCATCTATCAGTGCTTTTACACC
TTCAACAGTTTTGGCATTGTTGATTAGGTTCTTGTAATAGTCACTTAC
TCCAT (SEQ ID NO: 78)

【0251】 使用 2 組不同的引子擴增由上述引子對所建構之編碼 ABD 的基因，從而建構 BCA-6xHis-ABD (亦稱為 BHA) (SEQ ID NO: 75)以及 BCA-ABD-6xHis (亦稱為 BAH) (SEQ ID NO: 76)。關於 BHA 的建構，首先透過下述引子對擴增 ABD，其前置引子(forward primer)的設計，係為了藉由六個組胺酸標籤與 BCA 進行重疊 PCR，並且藉由反置引子(reverse primer)引入 BamH I 限制位及終止密碼子，使其能夠連接到 pET-3a 載體：

【0252】 選殖 ABD 之前置引子：

5'- GCATCACCATCACCATCACGCGCAGCATGATGAAG-3' (SEQ ID NO: 79)

【0253】 選殖 ABD 之反置引子：

5'- cgGGATCCTTAAGGTAATGCAGCTAAAATTCATCTAT-3' (SEQ ID NO: 80)

【0254】 將擴增 ABD 的 PCR 產物，進行 1.5%瓊脂糖凝膠電泳並純化。帶有額外突變(V20P)的經工程 BCA，使用下述去除終止密碼子的引子對選殖：

【0255】 選殖 BCA 之前置引子：

5'-ggaattccCATATGAAGCCAATTTCAATTATCG-3' (SEQ ID NO: 81)

【0256】 選殖 BCA 之反置引子：

5'- GTGATGGTGAATGGTGAATGCA-3' (SEQ ID NO: 82)

【0257】 BCA 透過上述引子擴增後，進行 1%瓊脂糖凝膠電泳，並純化其 PCR 產物。上述 BCA 與 ABD 的 PCR 產物透過重疊 PCR 相連。同樣地，以 200 ng 的 BCA 及 ABD 作為模板，並透過 1 單位 iProof High-Fidelity DNA 聚合酶將其擴增。將 BCA 及 ABD 置於 98°C 30 秒，並進行 15 個循環的擴增，其步驟包含：98 °C 熱變性 10 秒、60 °C 黏合 30 秒以及 72 °C 延長 30 秒。將重疊 PCR 的產物作為模板，使用下述引子對進行進一步的擴增：

【0258】 選殖 BHA 之前置引子：

5'-ggaattccCATATGAAGCCAATTTCAATTATCG-3' (SEQ ID NO: 83)

【0259】 選殖 BHA 之反置引子：

5'-cgGGATCCTTAAGGTAATGCAGCTAAAATTCATCTAT-3' (SEQ ID NO: 84)

【0260】 PCR 產物進行 1%瓊脂糖凝膠電泳後，從凝膠上切下對應於 BHA 的條帶，並將其純化。

【0261】 關於 BAH 的建構，首先透過下述引子對擴增 ABD，其前置引子的設計係為了直接與 BCA 進行重疊 PCR，並藉由反置引子將 BamH I 限制位、六個組胺酸標籤及終止密碼子引入：

【0262】 選殖 ABD 之前置引子：

5'-CGTTGTTTGGTGAAAACTCATGGCGCAGCATGATGAAG-3'
(SEQ ID NO: 85)

【0263】 選殖 ABD 之反置引子：

5'-
cgGGATCCTTAGTGATGGTGATGGTGATGAGGTAATGCAGCTAAAATT
TCATCTAT-3' (SEQ ID NO: 86)

【0264】 將擴增 ABD 的 PCR 產物，進行 1.5%瓊脂糖凝膠電泳，並純化其 PCR 產物。帶有額外突變(V20P)的經工程 BCA，使用下述去除終止密碼子及六個組胺酸標籤的引子對進行選殖：

【0265】 選殖 BCA 之前置引子：

5'-ggaattccCATATGAAGCCAATTTCAATTATCG-3' (SEQ ID NO: 81)

【0266】 選殖 BCA 之反置引子：

5'-GTGATGGTGATGGTGATGCA-3' (SEQ ID NO: 82)

【0267】 BCA 透過上述引子擴增後，進行 1%瓊脂糖凝膠電泳，並純化其 PCR 產物。上述 BCA 與 ABD 的 PCR 產物透過重疊 PCR 相連。同樣地，以 200 ng 的 BCA 及 ABD 作為模板，並透過 1 單位 iProof High-Fidelity DNA 聚合酶將其擴增。將 BCA 及 ABD 置於 98 °C 30 秒，並進行

15 個循環的擴增，其步驟包含：98 °C 熱變性 10 秒、60 °C 黏合 30 秒以及 72 °C 延長 30 秒。將重疊 PCR 的產物作為模板，使用下述引子對進行進一步的擴增：

【0268】 選殖 BAH 之前置引子：

5'-ggaattccCATATGAAAGCCAATTTCAATTATCG-3' (SEQ ID NO: 87)

【0269】 選殖 BAH 之反置引子：

5'-

cgGGATCCTTAGTGATGGTGATGGTGAATGCAGCTAAAATTT
CATCTAT-3' (SEQ ID NO: 88)

【0270】 PCR 產物進行 1%瓊脂糖凝膠電泳後，從凝膠上切下對應於 BHA 的條帶，並將其純化。編碼 BHA 與 BAH 的 PCR 產物以及 pET-3a 載體，透過 NdeI 與 BamHI 進行雙酶切。將 BHA 與 BAH 連接至 pET-3a 載體上，並轉形至 *E. coli* Top10 勝任細胞。透過 DNA 定序確認 BHA 與 BAH 的核酸序列。將帶有 BHA 或 BAH 插入片段的 pET-3a 載體轉形至 BL21(DE3)載體以表現蛋白。

【0271】 實施例 6：建構 BHA 與 BAH 蛋白

【0272】 本發明所使用之 BCA 的蛋白序列與 Bewley 等人所使用的相同(Structure 7, 435-448, 1999) (PDB ID: 2CEV，透過引用併入本說明書中)，除了其具有一個在 C 端的 6xHis 標籤，以及一個 S161C 突變。設計 BCA-6xHis-ABD (BHA)及 BCA-ABD-6xHis (BAH)的建構，並且 *E. coli* 細胞保存株能夠表現 BHA 及 BAH。在 BHA 及 BAH 中，BCA 部分為突變型 BCA，其第 20 個位置的纈胺酸殘基突變為脯胺酸(V20P)；而 ABD 部分為野生型 ABD，其具有一個連接子序列(AQHDEAVDANS) (Jonsson et al.,

2008, Protein Eng. Des. Sel. 21, 515-527)。前述 ABD 部分位於融合蛋白 C 端的最末端(BHA 之情形)或融合在 BCA 與 6 個組胺酸標籤之間(BAH 之情形)。本發明所使用之 BCA、BHA 及 BAH 的蛋白序列比對結果如圖 4 所示。

【0273】 BCA(野生型)胺基酸序列(PDB ID: 2CEV)：

MKPISIIGVPMDLGQTRRGVDMGPSAMRYAGVIERLERLHYDIEDL
GDIPIGKAERLHEQGDSRLRNLKAVAEANEKLAAAVDQVVQRGRFPLVL
GGDHSIAIGTLAGVAKHYERLGVIWYDAHGDVNTAETSPSGNIHGMP
LAASLGFGHPALTQIGGYSPKIKPEHVVLIGVRSLEGEKKFIREKGIKIYTM
HEVDRLGMTRVMEETIAYLKERTDGVHLSLDLDGLDPSDAPGVGTPVIG
GLTYRESHLAMEMPLAEAQIITSAEFVEVNPILDERNK TASVAVALMGSLF
GEKLM (SEQ ID NO: 70)

【0274】 BCA (S161C)-His 胺基酸序列：

MKPISIIGVPMDLGQTRRGVDMGPSAMRYAGVIERLERLHYDIEDL
GDIPIGKAERLHEQGDSRLRNLKAVAEANEKLAAAVDQVVQRGRFPLVL
GGDHSIAIGTLAGVAKHYERLGVIWYDAHGDVNTAETSPSGNIHGMP
LAASLGFGHPALTQIGGYCPKIKPEHVVLIGVRSLEGEKKFIREKGIKIYTM
HEVDRLGMTRVMEETIAYLKERTDGVHLSLDLDGLDPSDAPGVGTPVIG
GLTYRESHLAMEMPLAEAQIITSAEFVEVNPILDERNK TASVAVALMGSLF
GEKLMHHHHHH (SEQ ID NO: 71)

【0275】 BHA 胺基酸序列：

MKPISIIGVPMDLGQTRRGVDMGPSAMRYAGVIERLERLHYDIEDL
GDIPIGKAERLHEQGDSRLRNLKAVAEANEKLAAAVDQVVQRGRFPLVL
GGDHSIAIGTLAGVAKHYERLGVIWYDAHGDVNTAETSPSGNIHGMP
LAASLGFGHPALTQIGGYCPKIKPEHVVLIGVRSLEGEKKFIREKGIKIYTM
HEVDRLGMTRVMEETIAYLKERTDGVHLSLDLDGLDPSDAPGVGTPVIG
GLTYRESHLAMEMPLAEAQIITSAEFVEVNPILDERNK TASVAVALMGSLF

EKLMHHHHHHAQHDEAVDANSLAEAKVLANRELDKYGVSDYYKNLIN
NAKTVEGVKALIDEILAAP (SEQ ID NO: 75)

【0276】 BAH 胺基酸序列：

MKPISIIIGVPMDLGQTRRGPDMPGMSAMRYAGVIERLERLHYDIEDLG
DIPIGKAERLHEQGDSRLRNKAVAEANEKLAAAVDQVVQRGRFPLVLG
GDHSIAIGTLAGVAKHYERLGVIWYDAHGDVNTAETSPSGNIHGMPPLAA
SLGFGHPALTQIGGYCPKIKPEHVVLIGVRSLEGEKKFIREKGIKIYTMH
EVDRLGMTRVMEETIAYLKERTDGVHLSLDLDGLDPSDAPGVGTPVIGG
LTYRESHLAMEMLAEAQIITSAEFVEVNPILDERNKTASVAVALMGSLFG
EKLMAQHDEAVDANSLAEAKVLANRELDKYGVSDYYKNLINNAKTVE
GVKALIDEILAAPHHHHHH (SEQ ID NO: 76)

【0277】 實施例 7：生產 BHA 與 BAH

【0278】 使用表現 BHA 及 BAH 的 *E. coli* 細胞保存株。將少量 *E. coli* BL21 (DE3) 的甘油儲存保存株接種至 10 mL 含有 100 µg/mL 安比西林的 LB 培養基中，以作為種源培養。將前述種源培養置於 37 °C、轉速 700 rpm 生長過夜 (~16 小時)。接著，將 2.5 mL 培養過夜的種源接種至 250 mL 含有 100 µg/mL 安比西林的 LB 培養基中。接種的細胞於 37 °C、轉速 280 rpm 的條件下生長 2~4 小時，直到在波長 600 nm 的光密度(OD₆₀₀)為 0.6~0.8。接著，將 IPTG (0.2 mM) 加入培養基誘導目標蛋白過量表現。將細胞進一步培養 4 小時，並以 4,500 rpm 離心收集細胞。

【0279】 透過鎳離子親和層析法純化蛋白

【0280】 *E. coli* 細胞沉澱物以含有 50 mM Tris-HCl、100 mM NaCl (pH 7.4) 的緩衝液懸浮，並透過超音波震盪破菌。接著，在 10,000 rpm 下離心 40 分鐘以去除細胞碎屑。將上清液加入帶有 Ni²⁺ 的 5 mL HiTrap

chelating column (GE Healthcare)，並使用 ÄKTA purifier 以緩衝液 A(20 mM 磷酸鈉、0.5 M NaCl，pH 7.4)平衡。以濃度梯度 0~0.5 M 的咪唑將純化蛋白溶離下來，前述濃度梯度係透過緩衝液 A 與緩衝液 B(0.5 M 咪唑，其溶於緩衝液 A)以各種比例混合配製。透過 12%聚丙烯醯胺凝膠的十二烷基硫酸鈉聚丙烯醯胺凝膠電泳(SDS-PAGE)分析流出液，並合併含有目標蛋白的流出液。將合併的流出液濃縮，並以離心過濾裝置(Amicon)或切向流過濾(Tangential Flow Filtration，TFF)裝置(Millipore)將其緩衝液置換為 20 mM 磷酸鈉(pH 7.4)，BHA 及 BAH 的濾膜載留分子量為 30,000 MW。接著，將濃縮液稀釋到所需濃度，以 0.2 μ m 針筒過濾器進行無菌過濾，並保存於 4 °C。

【0281】 根據 BHA 純化的層析圖，在溶離過程中逐漸增加咪唑的濃度時，觀察到三個峰(圖 5A)。前面兩個峰併在一起，隨後當咪唑濃度達到約 0.13 M 時出現第三個峰(圖 5A)。透過 SDS-PAGE 分析發現，第三個峰主要由分子量約 40 kDa 的目標蛋白組成(圖 5B，泳道 F4~F8)。此目標蛋白很可能是 BHA，因為依據 BHA 的胺基酸序列所計算出 BHA 單體的分子量係 39.44 kDa。因此，顯示已成功表現與純化 BHA。將含有純度相對較高之 BHA 的流出液合併在一起，以利後續進一步處理。

【0282】 根據 BAH 純化的層析圖，在溶離過程中逐漸增加咪唑的濃度時，觀察到三個峰(圖 5C)。當咪唑濃度達到~0.18M 時，第二及第三個峰出現而且合併在一起(圖 5C)。透過 SDS-PAGE 分析發現，此合併的峰主要由分子量約 40 kDa 的目標蛋白組成(圖 5D，泳道 F6~F14)，此目標蛋白很可能是 BAH。相較於在咪唑濃度約 0.13 M 溶離出來的 BHA，BAH

似乎與鎳親和性管柱的結合更緊密，這很可能是因為當 ABD 區域插入 BCA 與 6 個組胺酸標籤之間，有助於 6 個組胺酸標籤更加暴露在外，因此相較於 BHA，BAH 能更有效地與管柱內的鎳離子交互作用。將含有純度相對較高之 BAH 的流出液合併在一起，接著使用切向流過濾(Tangential Flow Filtration, TFF)裝置(Millipore)置換其緩衝液，而不是離心過濾裝置。

【0283】 一單位酵素活性被定義為，在標準測定條件下，每分鐘可催化 1 μmol 尿素產生的酵素(BCA、BHA 或 BAH)的量。酵素的比活性係表示每毫克蛋白所含的活性單位。在標準的 DAMO 分析條件下(37 °C，pH 7.4)，剛純化出的 BHA (SEQ ID NO: 75)的比活性值為 220.6 ± 15.8 U/mg，該值與 BCA (S161C)-His (SEQ ID NO: 89) (243.30 U/mg)相近。

【0284】 對於包含一個 BCA 多肽及一個 ABD 多肽的融合蛋白，在 BHA (SEQ ID NO: 75)的情況下可獲得極高的蛋白產量，每公升的搖瓶培養收穫約 290 mg 的蛋白。ABD 融合蛋白的產量與所使用的表現系統高度相關。先前技術已揭露 ABD 與 sCR1 融合，其蛋白產量為每 24 小時，每毫升的中國倉鼠卵巢細胞培養，可產生 0.4 μg 至 1.1 μg 的蛋白(Makrides et al., 1996, J. Pharmacol. Exp. Ther. 277, 534-542)。每公升的 HEK293 細胞培養，可收穫約 2~15 mg 的單鏈雙抗體(diabody)-ABD 融合蛋白(Hopp et al., 2010, Protein Eng. Des. Sel. 23, 827-834; Stork et al., 2007, Protein Eng. Des. Sel. 20, 569-576)。在寄主 *E. coli* BL21 表現的 ABD-TolA 融合蛋白，其於 LB 培養基的蛋白產量為 20 mg/L(Ahmad et al., 2012, Proteins 80, 774-789)。相較而言，BHA 的產率高許多。此結果顯示 BHA (SEQ ID NO: 75)的生產

簡單且具有成本效益。

【0285】 實施例 8：表現與純化 BCA (S161C)-His (SEQ ID NO: 89)

【0286】 於 5 mL 含有 100 µg/mL 安比西林的 LB 培養基中，接種以載體 pET-3a-BCA(S161C)-His 轉形的 *E. coli* 菌株 BL21 (DE3)pLysS，作為種源培養，經生長過夜後，將其移至搖瓶培養，於 37 °C、轉速 280 rpm 生長 16 小時。對於 250 mL 含有 100 µg/mL 安比西林的 LB 培養基，加入 2.5 mL 過夜培養的種源，於 37 °C、轉速 280 rpm 培養直到 600 nm 的光密度(OD₆₀₀)達到 0.8~0.9，加入異丙基-β-D-硫代半乳糖苷(IPTG)，使其最終濃度為 0.2 mM。經 4 小時誘導後，於 4 °C 以 12,000 x g 離心 20 分鐘以收集細胞。細胞沉澱物可透過超音波震盪打破細胞隨後純化，或置於-20 °C 直至所需。以 20 mL 含有 10 mM MnCl₂ 的溶解緩衝液(50 mM Tris-HCl、100 mM NaCl，pH 7.4)懸浮細胞沉澱物。前述細胞首先置於冰上透過超音波震盪 10 分鐘將細胞打破，設定振幅 40%，每 30 秒一次脈衝。於 4 °C 以 12,000 x g 離心 20 分鐘以去除細胞碎片。將上清液置於 70 °C 15 分鐘，接著透過離心去除熱處理步驟中產生的沉澱。先以 0.22 µm 濾膜過濾可溶的濾液，再上樣至 5 mL HisTrap Chelating HP column。收集上樣時未結合之流出液(flow through)，並且以 5 倍管柱體積(CV)的起始緩衝液將未結合上的蛋白沖洗下來，或沖洗直到基準線穩定下來。透過咪唑(0.5 M 咪唑，其溶於起始緩衝液)之競爭性，以濃度梯度將結合到管柱上的目標蛋白溶離下來。確認目標流出液並合併在一起，依照廠商的使用說明書，使用載留分子量為 10 kDa 的 Amicon Ultra-15 離心過濾裝置，在 20 mM 磷酸鈉(pH 7.4)中置換其緩衝液。樣品在無菌條件下以 0.22 µm 濾膜過濾，並保存於 4

°C直至所需。

【0287】 實施例 9：從饋料批式發酵中純化 BCA (S161C)-His (SEQ ID NO: 89)

【0288】 在 5 L 生物反應器中，發酵表現 BCA (S161C)-His 的 *E. coli* 細胞，產生細胞濕重 248.86 g。將細胞沉澱物重新懸浮在含有 DNase 及 RNase 的溶解緩衝液中，前述 DNase 及 RNase 係為了分解在均質化的過程中所釋放大量的 DNA 及 RNA，以降低細胞裂解液的黏度。細胞裂解液通過均質機三次後，將其置於 37 °C 15 分鐘以進一步降低其黏度，接著透過離心獲得可溶性餾分。純化的第一個步驟係透過在 70 °C 熱處理 15 分鐘沉澱不耐熱的蛋白，以去除非目標的雜質，並透過離心回收熱穩定性 BCA (S161C)-His (SEQ ID NO: 89)。

【0289】 含有目標蛋白的可溶性餾分進一步以鎳親和性管柱純化，其中 XK50 管柱填充 196 mL 膠床體積。簡言之，透過 4 段溶離程序，將 BCA (S161C)-His (SEQ ID NO: 89) 從鎳親和性管柱上溶離下來。第一段使用溶離梯度 0% 到 30% 的溶離緩衝液，係為了去除與管柱非專一性結合的蛋白。第二段維持在 30%，使非專一性結合的蛋白完全被溶離下來。第三段透過從 30% 至 70% 逐漸增加溶離緩衝液的濃度，將目標蛋白溶離出來。第四段以 70% 至 100% 的溶離緩衝液，將所有仍結合在管柱上剩餘的蛋白溶離下來。以 SDS-PAGE 分析在 UV 波長 280 nm 有吸光度的流出液，並將含有目標蛋白的 E1 至 A'5 的 24 個流出液(各 50 mL)合併在一起(圖 6A 與圖 6B)。含有高濃度咪唑之合併的流出液透過切向流過濾(TFF)系統脫鹽，並基於對 BCA (野生型) (SEQ ID NO: 70) 六聚體結構的了解，在 TFF

使用 30 kDa NMWC 的濾膜。純化的 BCA (S161C)-His (SEQ ID NO: 89)保存於 PBS 緩衝液中，在無菌條件下以 0.2 μ m 濾膜過濾，並保存於 4 °C 直至使用。透過 2 步驟試量產規模的純化，收穫約 1096 mg 的 BCA (S161C)-His (SEQ ID NO: 89)蛋白，並測定其比活性為 264 U/mg。

【0290】 實施例 10：測定精胺酸酶酵素活性

【0291】 使用二乙醯一肼(DAMO)以直接比色法測定 BCA (S161C)-His (SEQ ID NO: 89)的活性，其在酵素反應中可測定產物(尿素)的量。簡言之，分別將 0.3 mL 序列稀釋的 BCA 溶液(含有 0.15 mL 水)以及 720 mM 精胺酸受質(pH 7.4)置於 37 °C 預熱 10 分鐘。在預熱的酵素溶液中加入 0.3 mL 精胺酸受質，開始進行酵素反應。將反應混合物置於 37 °C 反應 5 分鐘，並加入淬滅劑(50%三氯乙酸(TCA))終止反應。空白樣品以類似的方法製備，但相同體積的酵素溶液在加入 TCA 溶液之後才加入。

【0292】 使用世界衛生組織(WHO)所記載之 DAMO 直接比色法，對上述反應所生成之尿素進行定量。前述方法已被 WHO 採用作為測定血液尿素濃度的標準作業程序(SOP)。根據 SOP 製備幾種試劑，混合酸試劑的製備係透過將 100 mL 濃硫酸緩慢添加到 400 mL 蒸餾水中，接著再添加 0.3 mL 原液酸試劑 (0.5 g 氯化鐵六水合物溶於 15 mL 蒸餾水，並以濃磷酸補到 25 mL)。混合色試劑的製備係透過將 35 mL 原液色試劑 A(1 g DAMO 溶於 50 mL 蒸餾水)與 35 mL 原液色試劑 B(0.25 g 胺基硫脲溶於 50 mL 蒸餾水)混合，並以蒸餾水補到 500 mL。作用之尿素標準品的製備係透過將 5 mL 原液尿素標準品(0.5 g 尿素溶於 50 mL 苯甲酸)加入 45 mL 苯甲酸(1 g/dL)。將 100 μ L 20 倍稀釋的反應混合液加入玻璃大試管中，接著加入 3

mL 顯色劑進行 DAMO 試驗，前述顯色劑係將蒸餾水、混合色試劑及混合酸試劑以 1 : 1 : 1 的比例混合現配製備。將試管置於 100 °C 15 分鐘，接著冷卻至室溫 5 分鐘，並測定 540 nm 的吸光度。一單位精胺酸酶被定義為，在 37 °C、pH 7.4 的條件下，每分鐘將一微莫耳精胺酸分解為鳥胺酸及尿素的酵素量。透過以下公式計算酵素活性，樣品之吸光值應減去其空白樣品之吸光值：

$$\Delta A_{540\text{nm}} \text{樣品} = A_{540\text{nm}} \text{樣品} - A_{540\text{nm}} \text{空白樣品}$$

從標準曲線計算尿素的生成量：

$$\text{單位/ml 酵素} = \frac{(\mu\text{mol 釋放的尿素})(\text{df})}{(5)(0.3)}$$

df = 酵素的稀釋比

0.3 = 所使用的酵素體積(ml)

5 = 每單位定義的測定時間(分鐘)

【0293】 實施例 11：測定蛋白濃度

【0294】 透過布拉德福(Bradford's)定量法測定蛋白濃度。在使用之前，5 倍稀釋蛋白分析染劑濃縮液(Bio-rad)。混合 20 μL 樣品與 1 mL 稀釋的染劑，並置於室溫 10 分鐘。測量混合物 595 nm 的吸光值以測定蛋白濃度，同時以濃度區間 0~1 mg/mL 的 Quick Start 牛血清蛋白標準品組(Bio-rad)作為標準品。

【0295】 實施例 12：BHA (SEQ ID NO: 75)融合蛋白的酵素活性

【0296】 測定 BHA (SEQ ID NO: 75)的精胺酸異化活性，以了解在 HSA 存在的情況下是否會影響其酵素活性。實驗結果顯示，在活性試驗中加入不同濃度的 HSA，BHA (SEQ ID NO: 75)的活性並未受到影響。在結合分析中測定的 BHA：HSA 莫耳比為 1：10、1：5、1：1、5：1 及 10：1。在此等情況下，所測得單獨 BHA (SEQ ID NO: 75)及 BHA-HSA 複合物的比活性非常相近，約為 200 U/mg。

【0297】 實施例 13：透過非變性 PAGE 分析顯示 N-ABD-rhArg (SEQ ID NO: 49)或 BHA (SEQ ID NO: 75)與 HSA 之結合

【0298】 當 ABD 與 rhArg 或 BCA 融合時，對於融合蛋白而言，保留白蛋白結合能力以及酵素活性都很重要。為了測定融合蛋白中 ABD 的結合能力，將固定量的人類血清白蛋白(HSA)與 N-ABD-rhArg (SEQ ID NO: 49)或 BHA (SEQ ID NO: 75)以不同莫耳比例混合。以非變性 PAGE 分析反應混合物的原始狀態(native condition)，其中蛋白依據大小及構型分離。

【0299】 如圖 7 所示，非變性 PAGE 的泳道 2 及 3 分別顯示單獨 HSA 及 N-ABD-rhArg (SEQ ID NO: 49)的泳動率(圖 7)。以不同莫耳比例的 N-ABD-rhArg (SEQ ID NO: 49)滴定固定量的 HSA (30 pmoles)，其實驗結果如泳道 5~9 所示。當增加結合反應中 N-ABD-rhArg (SEQ ID NO: 49)的量，游離 HSA 的量會依比例減少，因此顯示 N-ABD-rhArg (SEQ ID NO: 49)與 HSA 為專一性結合。如圖 8 所示，非變性 PAGE 的泳道 6 及 7 分別顯示單獨 HSA 及 BHA (SEQ ID NO: 75)的泳動率(圖 8)。以不同莫耳比例的 BHA (SEQ ID NO: 75)滴定固定量的 HSA (60 pmoles)，其實驗結果如泳

道 1~5 所示。當增加結合反應中 BHA (SEQ ID NO: 75) 的量，游離 HSA 的量會依比例減少，因此顯示 BHA (SEQ ID NO: 75) 與 HSA 為專一性結合。

【0300】 實施例 14：BHA (SEQ ID NO: 75) 的體內試驗

【0301】 使用六隻 8 周大的 BALB/c 小鼠進行 BHA (SEQ ID NO: 75) 的體內試驗。在注射 BHA (SEQ ID NO: 75) 之前，先採集每隻小鼠的血液樣本作為對照組(0 小時)。將小鼠隨機分為兩組，分別進行腹膜內(i.p.)及靜脈內(i.v.)注射。對每隻小鼠注射 BHA (SEQ ID NO: 75) (250 U)，並在注射後 6、24、72、及 120 小時採集血液樣本。以胺基酸分析儀(Biochrom)檢測每個血液樣本 16 μ L 的血漿，以分析其精胺酸及鳥胺酸含量。

【0302】 如圖 9 所示，以 BALB/c 小鼠探討 BHA (BHA SEQ ID NO: 75) 的體內精胺酸耗竭效果，並將其與 BCA (S161C)-His (SEQ ID NO: 89) 進行比較。根據實驗結果，在注射 BCA (S161C)-His (SEQ ID NO: 89) 後 24 小時內，血漿精胺酸迅速恢復正常(圖 9)。反之，在注射 BHA (SEQ ID NO: 75) 後，血漿精胺酸至少 24 小時為檢測不到的水平(圖 9)。此結果顯示，ABD 的融合延長體內 BCA (S161C)-His (SEQ ID NO: 89) 的循環半衰期。此結果表明對於改善精胺酸耗竭酵素的藥效動力學特性，ABD 融合係可行且有希望的策略。給藥途徑似乎不會影響 BHA (SEQ ID NO: 75) 在體內的精胺酸耗竭效果(圖 9)。此外，由於並未觀察到明顯的副作用，所有小鼠對於施用 BHA (SEQ ID NO: 75) 皆顯示良好的耐受性。綜合上述，本發明所記載之融合蛋白，如 BHA (SEQ ID NO: 75)，透過更長的時間(至少 24 小時)下將血漿精胺酸降低至檢測不到的量，相較於使用未融合 ABD 的原始 BCA (S161C)-His (SEQ ID NO: 89)(8 小時)，已證明 ABD 融合策略的

可行性。

【0303】 實施例 15：探討 N-ABD-rhArg (SEQ ID NO: 49)之體內藥效動力學

【0304】 精胺酸酶的抗癌效果在很久以前已被研究(Greenberg and Sassenrath, 1953, Cancer Res. 13, 709-715)。精胺酸酶被發現在體外具有非常良好的抗癌效果，然而由於其血漿半衰期短，在體內幾乎觀察不到效果。對 C3H 小鼠注射原始精胺酸酶後 3 小時，血漿精胺酸降至最低。在相同模型中，注射後 5 小時，精胺酸增加至正常基礎水平(Greenberg and Sassenrath, 1953, Cancer Res. 13, 709-715)。因此，精胺酸酶由於血漿半衰期短被認為是無效的抗癌劑。此顯示血漿半衰期可影響酵素藥物在體內的效力。N-ABD-rhArg (SEQ ID NO: 49)及 N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO: 50)展現相似的比活性。我們發現透過與 ABD 融合，以延長 rhArg (SEQ ID NO: 103)的血漿半衰期是一種有效的方法。為了將具有延長血漿半衰期的 rhArg (SEQ ID NO: 103)的生產成本降低，而開發 N-ABD-rhArg (SEQ ID NO: 49)與 N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO: 50)。

【0305】 在本試驗中，使用 15 隻 BALB/c 母鼠(10 週齡)，每籠 5 隻為一組。透過腹腔(i.p.)注射對小鼠施用一劑 N-ABD-rhArg (SEQ ID NO: 49) (分別為 500 U、250 U、及 125 U)。使用抗凝血毛細管從隱靜脈採集血液樣本，並以 800 x g 離心獲得血漿。使用 Biochrom 30 胺基酸分析儀，對 16 µL 血漿樣本進行 L-精胺酸濃度的測定，結果如圖 10 所示。測定血漿精胺酸濃度的結果顯示，在 BALB/c 小鼠中，500U 的 N-ABD-rhArg (SEQ ID NO: 49)可消耗血漿精胺酸至低於 Biochrom 30 胺基酸分析儀的檢測極限(3

μM)至少 9 天，250U 的 N-ABD-rhArg (SEQ ID NO: 49)可消耗血清精胺酸至低於 Biochrom 30 胺基酸分析儀的檢測極限至少 7 天，而 125U 的 N-ABD-rhArg (SEQ ID NO: 49)可消耗血清精胺酸至低於 Biochrom 30 胺基酸分析儀的檢測極限至少 3 天。此等結果清楚地表明，可透過與 ABD 融合延長 rhArg 的血漿半衰期。相較於 BHA (SEQ ID NO: 75) (圖 9)，N-ABD-rhArg (SEQ ID NO: 49)可在小鼠中，將精胺酸消耗至非常低的量達更久的時間，此突顯對於融合蛋白之合理設計的需求的重要性。

【0306】 實施例 16：探討 N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO: 50)之體內藥效動力學與藥物動力學

【0307】 在本試驗中，使用 50 隻 C57BL/6J 公鼠(10~12 週齡)。透過腹腔(i.p.)注射對小鼠施用一劑 500U N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO: 50)。使用抗凝血毛細管從隱靜脈採集血液樣本，並以 800 x g 離心獲得血漿。使用 Agilent 6460 液相層析/電噴霧電離三重四極柱式質譜儀，透過液相色譜法-質譜聯用對 5 μL 血漿樣本進行 L-精胺酸濃度的測定，其檢測極限為 0.3 μM L-精胺酸。使用人類第一型精胺酸酶 ELISA(酵素連結免疫吸附分析法)試劑組(Abcam)，其專門用於檢測人類精胺酸酶，而不與小鼠精胺酸酶反應，對 5 μL 血漿樣本進行 N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO: 50)濃度的測定。

【0308】 在注射後第 2、4、8、16、24 小時(1 天)，以及從第 2 至第 12 天每隔 24 小時、從第 12 至第 30 天每隔 72 小時，收集血清。為了在所用動物的數量之間取得平衡，並且最大程度地減少因採血導致從小鼠身上去除 N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO: 50)造成對藥效動力學與藥物動力學

結果的影響，將小鼠分為 10 組，每組 $n = 5$ ，並在括號中所示之指定時間點採血：第 1 組(第 2 小時)、第 2 組(第 4 小時)、第 3 組(第 8 小時)、第 4 組(第 16 小時)、第 5 組(第 24 小時)、第 6 組(第 2、7、12 天)、第 7 組(第 3、8、18 天)、第 8 組(第 4、9、21 天)、第 9 組(第 5、10、15、24 天)、第 10 組(第 0、6、11、27、30 天)。藥效動力學及藥物動力學的結果分別如圖 13 及圖 14 所示。

【0309】 血漿精胺酸濃度的結果顯示，以腹腔(i.p.)注射施用 500U 的 N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO: 50)，可在注射後 2 小時內將血漿精胺酸濃度消耗至 $1\text{ }\mu\text{M}$ (圖 13)。血漿精胺酸濃度被維持在 $\leq 1\text{ }\mu\text{M}$ 達 10 天，隨後幾天逐漸升高(表 4)。在第 18 天至第 21 天之間，血漿精胺酸的濃度恢復至基礎水平的一半。此等結果顯示，在小鼠中 N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO: 50)可使血漿精胺酸維持在非常低的濃度($\leq 1\text{ }\mu\text{M}$)達特別久的時間。

【0310】 表 4、注射前及腹腔(i.p.)注射 500U N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO: 50)後不同時間點的血漿精胺酸濃度

注射後時間點	血漿精胺酸濃度(μM) (5 隻小鼠的平均值 $\pm$ SEM)
0	134.543 ± 3.791
第 2 小時	1.007 ± 0.013
第 4 小時	0.934 ± 0.021
第 8 小時	0.912 ± 0.006
第 16 小時	0.943 ± 0.010
第 24 小時	0.934 ± 0.007

第 2 天	0.944 ± 0.007
第 3 天	0.965 ± 0.008
第 4 天	0.535 ± 0.121
第 5 天	0.681 ± 0.043
第 6 天	0.896 ± 0.089
第 7 天	0.792 ± 0.135
第 8 天	0.916 ± 0.079
第 9 天	1.224 ± 0.178
第 10 天	0.721 ± 0.054
第 11 天	3.828 ± 1.511
第 12 天	7.607 ± 2.325
第 15 天	31.283 ± 4.569
第 18 天	48.648 ± 3.989
第 21 天	73.55 ± 3.76
第 24 天	76.07 ± 4.92
第 27 天	111.09 ± 6.21
第 30 天	110.91 ± 3.81

【0311】 以二房室模型計算藥物動力學參數

透過以下公式計算消除速率常數 k_e ：

$$k_e = \frac{\ln C_1 - \ln C_2}{t_2 - t_1}$$

透過以下公式計算血漿半衰期 $t_{1/2}$ ：

$$t_{1/2} = \frac{\ln 2}{k_e}$$

透過梯形法則使用以下公式計算曲線下面積(AUC)：

$$AUC_{t_1-t_2} = \frac{(C_1 + C_2)}{2} \times (t_2 - t_1)$$

為了進行比較，我們引用文獻中所記載之原始 rhArg 的半衰期。融合蛋白 N-ABD094-rhArg (SEQ ID No: 50)的消除半衰期為 3.9 ± 0.3 (圖 14)，暗示其被清除的速率比非融合蛋白 rhArg 慢得多，rhArg 的半衰期較短。具體比較下，人類精胺酸酶在循環中的半衰期只有幾分鐘(Georgiou et al., US 8440,184 B2)，顯示該結合大幅延長循環時間。此等結果清楚地表明，透過與 ABD 融合，rhArg 的血漿半衰期可大幅地延長。透過聚乙二醇化，延長原始 ADI 的循環半衰期(幾小時) (Ensor et al., Cancer Res 2002, 62:5443-5450)，聚乙二醇化的 ADI 之循環半衰期為 2~3 天，並且只有聚乙二醇化的 ADI(而不是原始 ADI)能夠在體內有效抑制腫瘤生長。對大鼠以腹腔(i.p.)注射施用原始 rhArg 及聚乙二醇化的 rhArg 進行比較，對每隻大鼠(6 U/g 大鼠)施用 1,500 U 聚乙二醇化的 rhArg，可將循環精胺酸消耗至低於胺基酸分析儀檢測極限($3 \mu\text{M}$)達 6 天，然而高劑量的原始 rhArg(每隻大鼠 7,500 U)僅能在注射後 3 小時內將循環精胺酸降低至約 $20 \mu\text{M}$ ，並在注射後約 2 天精胺酸恢復至基礎水平(Tsui et al., Cancer Cell Int. 2009 Apr 17;9:9)。幾分鐘內即可從循環中將原始精胺酸酶清除(Savoca et al., Cancer Biochem. Biophys. 7:261-268, 1984)。針對臨床用途，經工程精胺酸酶係至關重要，以使其能夠在循環中持續許多天或幾週。在沒有任何修飾的情況下，人類精胺酸酶在循環中的半衰期僅為幾分鐘，因為其大小不夠大而不足以避免被腎臟過濾(Georgiou et al., US 8440,184 B2)。因此，本發明已開發全新且高度改良之精胺酸酶的形式，其顯著改善循環持久性以作為治療

用途。

【0312】 實施例 17：在正常的瘦小鼠中，透過 N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO: 50)治療可減少脂肪量、抑制脂質合成(lipogenesis)及改善胰島素敏感性

【0313】 小鼠模型的實驗數據顯示，對 8 週齡正常的 C57BL/6J 瘦公鼠腹腔注射一劑 500U 的 N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO: 50)，可維持血漿精胺酸濃度 $\leq 1 \mu\text{M}$ 至少達 10 天，證明 N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO: 50)的長循環半衰期(圖 13)。因此，餵食一般正常飼料(chow diet)的 C57BL/6J 瘦公鼠，每隔 10 天腹腔注射 500U N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO: 50)，持續 4 週。經過 4 週的治療後，相較於注射載劑(生理食鹽水)的對照組小鼠，內臟(性腺周圍、腎周及腸繫膜脂肪墊)及皮下(腹股溝脂肪墊)的脂肪量減少超過 25%(圖 15A)。內臟白色脂肪組織(WAT)的組織學檢查顯示脂肪細胞的大小顯著變小(圖 15B)。進一步分析脂質合成(lipogenesis)發現以 N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO: 50)治療的小鼠，幾種關鍵的脂質合成(lipogenic)酵素包含乙醯輔酶 A 羧化酶 1 (Acc1)、脂肪酸合成酶(Fasn)及硬脂醯輔酶 A 去飽和酶 1(Scd1)，其 mRNA 表現量在內臟 WAT(圖 16A)及肝臟(圖 16B)中被顯著抑制。

【0314】 肥胖與胰島素抗性高度相關。因此，在體內及體外皆進行測試，以確定 N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO: 50)治療是否會影響胰島素敏感性。胰島素耐受性試驗(ITT)結果顯示以 N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO: 50)治療的小鼠，在經過藥物治療 2 週後，其胰島素敏感性顯著增加(圖 17A)。接著，使用含 5U/mL N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO: 50)的培養基處

理從 C57BL/6J 公鼠所製備之初代肝細胞，具體檢測肝臟胰島素敏感性，其中該濃度下並不會對細胞存活率造成影響(圖 17B)。經 N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO: 50)或對照組(未添加 N-ABD094-rhArg)培養基培養 24 小時後，以 100 nM 胰島素刺激初代肝細胞 20 分鐘。收集細胞進行西方墨點法分析，以檢測磷酸化的蛋白激酶 B(pAkt)，該蛋白激酶通常作為胰島素訊息傳遞的指標。實驗結果顯示，相較於對照組，N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO: 50)處理組 Akt 的磷酸化顯著增加，顯示肝胰島素訊息傳遞增強(圖 17C)。

【0315】 在正常的瘦小鼠的發現證實 N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO: 50)具有長循環半衰期，並且降低脂肪量、抑制脂質合成(lipogenesis)、及在體內及體外皆可改善胰島素敏感性。此等結果證明 ABD-rhArg 融合蛋白可用於預防與治療肥胖及相關代謝失調之用途，例如胰島素抗性及肝脂肪變性(脂肪肝)。

【0316】 **實施例 18：N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO: 50)治療有效預防 HFD 誘導肥胖**

【0317】 重組人類精胺酸酶(N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO: 50))治療，可在正常的瘦小鼠中顯著降低脂肪量、抑制脂質合成(lipogenesis)及改善胰島素抗性。

【0318】 測試 N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO: 50)對肥胖動物的肥胖症狀及各種代謝參數的影響。使用高脂飲食誘導肥胖(DIO)的小鼠模型(Wang and Liao, 2012, Methods Mol. Biol. 821:421-433)，該動物模型與人類的肥胖有許多共同特徵，並廣泛用於測試前瞻性的抗肥胖劑(Vickers et al.,

2011, Br. J. Pharmacol. 164(4):1248-1262)。具體而言，本試驗使用 C57BL/6J，其係為多基因肥胖模型中最常使用的小鼠品系。據充分報導指出，進行高脂飲食的 C57BL/6J 小鼠，其體重會顯著增加、肥胖，並產生高胰島素血症、高血糖症、葡萄糖失耐及胰島素抗性(Gallou-Kabani et al., 2007, Obesity 15(8):1996-2005)。

【0319】 為測定 N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO: 50)預防小鼠飲食誘導的肥胖及相關代謝失調之功效，對 8 週齡的 C57BL/6J 公鼠持續 12 週餵食含有 60 千卡%脂肪的高脂飲食(HFD; *Research Diets*, D12492)，同時每 7 天腹腔注射 200~300U 的 N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO: 50)或注射生理食鹽水作為空白對照組。對 C57BL/6J 小鼠餵食含有 10 千卡%脂肪的低脂飲食(LFD; *Research Diets*, D12450J)，並注射生理食鹽水作為各種測定的瘦對照組。

【0320】 兩個隊列分開進行試驗，其中每組 $n = 5$ ，小鼠以 5 隻為一組飼養。在兩個獨立的隊列中得到相似的實驗結果，實施例 18~22 對其中一個隊列的小鼠的數據進行總結。

【0321】 相較於餵食 LFD 並且以載劑處理的瘦對照組(稱為 LFD(載劑)組)，以載劑處理餵食 HFD 的公鼠(稱為 HFD(載劑)組)，體重(圖 18A)及身形(圖 18B)明顯增加，位在主要內臟(性腺周圍、腎周及腸繫膜)及皮下(腹股溝)的白色脂肪組織(WAT)量顯著增加(圖 19A)。然而，餵食 HFD 但同時進行 N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO: 50)治療的小鼠(稱為 HFD(rhArg)組)，可有效預防因攝取 HFD 造成的體重增加以及 WAT 擴大。WAT 的組織學檢查顯示 N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO: 50)治療顯著抑制脂肪細胞肥

大(圖 19B)。使用即時 qRT-PCR 分析每克 WAT 的 mRNA 表現量，進一步顯示幾種關鍵的脂肪生成(adipogenic)轉錄因子包含過氧化物酶體增殖物活化受體 γ (*Pparg*)及固醇調節元件結合蛋白 1c (*Srebp1c*)，以及脂質合成(lipogenic)酵素(*Acc1* 及 *Scd1*)的基因表現量急劇下調(圖 19C)。在 N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO: 50)治療餵食 HFD 小鼠的骨骼肌中，此等基因的表現亦顯著下調(圖 20)，顯示 N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO: 50)抗脂質合成(anti-lipogenesis)的效果並不限於 WAT。

【0322】 在確定 N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO: 50)對公鼠具有抗肥胖效果之後，為了確定是否存在性別差異，接著探討 N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO: 50)對母鼠(每組 n = 5)的抗肥胖效果。實驗結果顯示，對 8 週齡母鼠持續 12 週餵食 HFD，並同時進行 N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO: 50)治療，同樣能有效避免體重增加(圖 21A)，以及避免 WAT 在主要內臟(性腺周圍、腎周及腸繫膜)及皮下(腹股溝)的過量累積(圖 21B)，並且可改善胰島素敏感性(圖 22A)及葡萄糖耐受性(圖 22B)。

【0323】 使用小鼠前脂肪細胞 3T3-L1 測試 N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO: 50)對脂肪細胞的功效，該細胞常作為脂肪生成(adipogenesis)研究的細胞模型(Green and Meuth, 1974, Cell 3:127-133)。N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO: 50)可有效抑制 3T3-L1 細胞的脂肪生成(adipogenesis)及脂質合成(lipogenesis)(圖 23)，並且顯著抑制幾種脂肪生成(adipogenic)轉錄因子(圖 24A)及脂質合成(lipogenic)酵素(圖 24B)的 mRNA 表現量。當 3T3-L1 前脂肪細胞培養於牛精胺酸酶、或另一種精胺酸消耗酶-精胺酸去亞胺酶(ADI)，或無精胺酸的培養基中，可觀察到相似的抑制效果(圖 23)。精胺酸

酶將 L-精胺酸轉為 L-鳥胺酸及尿素，而 ADI 將 L-精胺酸轉為 L-瓜胺酸。然而，L-鳥胺、尿素或 L-瓜胺酸無法抑制 3T3-L1 細胞的脂肪生成(adipogenesis)及脂質合成(lipogenesis)(圖 23)。

【0324】 此外，添加不同濃度的 L-精胺酸至無精胺酸的培養基中，顯示精胺酸對於脂肪生成(adipogenesis)及脂質合成(lipogenesis)具有劑量依賴性效果(圖 25A)，對於活化關鍵的脂肪生成(adipogenic)轉錄因子包含 Cebpa 及 Pparg，以及脂質合成(lipogenic)酵素 Scd1，精胺酸之閾值濃度介於 10~40 μ M(圖 25B)。

【0325】 綜合上述，此等發現顯示 N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO:50)之抗脂肪生成(adipogenesis)及脂質合成(lipogenesis)效果，係透過剝奪精胺酸所調控。

【0326】 綜合上述，此等發現證明，透過 ABD-rhArg 融合蛋白或其他形式的精胺酸酶(如 rhArg-PEG、BCA-PEG 或 BCA-ABD)或精胺酸消耗酶(如 ADI-PEG、ADI-ABD、ADC-PEG 或 ADC-ABD)消耗精胺酸，可作為預防性抗肥胖療法之用途。

【0327】 實施例 19：N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO: 50)治療預防 HFD 誘導胰島素抗性、葡萄糖失耐、及代謝失調

【0328】 肥胖經常與胰島素抗性、葡萄糖失耐及代謝失調相關。確實地，相較於載劑處理的瘦對照組之餵食 LFD 的小鼠，載劑處理之餵食 HFD 的小鼠在餵食 HFD 6 週後進行胰島素耐受性試驗(ITT)，顯現對注射胰島素之降血糖功效的敏感性顯著降低(圖 26A)，並在餵食 11 週後更加惡化(圖 26B)。伴隨著胰島素敏感性下降，這些小鼠在餵食 HFD 5 週後進行

葡萄糖耐受性試驗(GTT)，於試驗中注射 D-葡萄糖後，血糖恢復至基礎水平的效率顯著降低(圖 27A)，暗示形成葡萄糖失耐，並在攝取高脂飲食 10 週後更加惡化(圖 27B)。確實地，空腹(5 小時)的血糖(圖 28A)及血漿胰島素(圖 28B)濃度顯著升高，並且相較於瘦對照組小鼠，載劑處理之餵食 HFD 的小鼠 HOMA-IR 評分(測量胰島素抗性)較高(圖 28C)。在餵食 HFD 12 週後，所測得空腹血漿之瘦體素濃度(圖 29A)、總膽固醇濃度(圖 29B)、三酸甘油脂濃度(圖 29C)及游離脂肪酸濃度(圖 29D)顯著上升。值得注意的是，同時進行 N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO: 50)治療，可完全預防 HFD 所誘導之胰島素抗性、葡萄糖失耐、高血糖症、高胰島素血症、高瘦體素血症、高膽固醇血症、高三酸甘油脂血症、及高游離脂肪酸血症的產生。

【0329】 綜合上述，此等結果顯示 N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO: 50)可有效預防胰島素抗性及葡萄糖失耐，其為發展成第二型糖尿病的前兆。其亦可預防瘦體素抗性，以及其他代謝失調包含與防胖相關的血脂異常。

【0330】 綜合上述，此等結果證明，透過 ABD-rhArg 融合蛋白或其他形式的精胺酸酶(如 rhArg-PEG、BCA-PEG 或 BCA-ABD)，或精胺酸消耗酶(如 ADI-PEG、ADI-ABD、ADC-PEG 或 ADC-ABD)消耗精胺酸，可作為預防性的抗糖尿病、抗血脂異常、抗動脈粥樣硬化及抗代謝失調療法使用。

【0331】 **實施例 20：N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO: 50)治療預防 HFD 誘導脂肪變性**

【0332】 脂肪變性係指脂質在細胞中的異常滯留。非酒精性肝脂肪變性(非酒精性脂肪肝)係與肥胖相關之常見合併症。儘管早期並沒有症狀，然而當肝臟發炎時會轉變為脂性肝炎，其可進展為纖維化並在後期進一步發展為肝硬化，此大幅增加罹患肝細胞癌的風險。確實地，從載劑處理之餵食 HFD 的小鼠中發現，其肝臟明顯變大並且顏色蒼白(圖 30A)，重量幾乎為瘦對照組小鼠的兩倍(圖 30B)。以油紅 O 染色的肝臟切片顯示大油滴(lipid droplets)大量累積(圖 31A)，並且三酸甘油脂濃度相應增加十倍(圖 31B)。伴隨著此等發現，血清中丙胺酸轉胺酶(ALT)濃度顯著升高(圖 32)，其常作為肝損傷的生物指標。值得注意地，同時進行 N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO: 50)治療，可有效預防脂質在餵食 HFD 的小鼠肝臟中過量累積，從而使肝臟的重量及三酸甘油脂含量，以及血清中 ALT 濃度與瘦對照組相近。伴隨此等發現，儘管 HFD 誘導肝臟中幾種關鍵的脂肪生成(adipogenic)轉錄因子及脂質合成(lipogenic)酵素之表現顯著上調，然而 N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO: 50)治療可顯著抑制此等基因上調(圖 31C)。綜合上述，此等結果顯示 N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO: 50)對於預防肝脂肪變性高度有效。

【0333】 除肝臟外，肥胖亦與脂質在腎臟(腎脂肪變性)、胰腺(胰腺脂肪變性)、及心臟(心臟脂肪變性)過度累積相關，造成脂質毒性及此等器官的功能異常。確實地，從載劑處理之餵食 HFD 的小鼠中發現，腎臟(圖 33A)、胰腺(圖 33B)及心臟(圖 33C)的重量顯著增加。同時進行 N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO: 50)治療，可有效預防此等器官的重量增加，顯示 N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO: 50)可預防此等器官中的脂質過度累積

以及脂質毒性。

【0334】 綜合上述，此結果證明 ABD-rhArg 可有效預防脂肪變性，並且透過 N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO: 50)或其他形式的精胺酸酶(如 rhArg-PEG、BCA-PEG 或 BCA-ABD)，或精胺酸消耗酶(如 ADI-PEG、ADI-ABD、ADC-PEG 或 ADC-ABD)消耗精胺酸，可作為預防性抗脂肪變性療法使用。

【0335】 實施例 21：N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO: 50)治療預防 HDF 誘導慢性發炎

【0336】 WAT 過度膨大會增加多種脂肪激素的產生，引起慢性低度發炎，並造成胰島素抗性的產生。單核細胞趨化蛋白-1(Mcp1)係 WAT 所分泌之關鍵的促發炎脂肪激素之一，調控肥胖時巨噬細胞滲入 WAT、胰島素抗性及肝脂肪變性。確實地，在載劑處理之餵食 HFD 的小鼠性腺周圍 WAT，*Mcp1* 的 mRNA 表現量顯著上調(圖 34A)。隨之，透過酵素連結免疫吸附分析法(ELISA)檢測，血清中循環 Mcp1 的濃度相較於瘦對照組顯著上升(圖 34B)。其他促發炎脂肪激素，包含介白素 1 β (*Il1b*)及腫瘤壞死因子 α (*Tnfa*)，在性腺周圍 WAT 其 mRNA 表現量亦增加(圖 34A)。值得注意地，同時進行 N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO: 50)治療，可在性腺周圍 WAT 抑制此等脂肪激素的上調，並抑制血漿中 Mcp1 濃度的上升。

【0337】 此等結果顯示 N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO: 50)可預防與肥胖相關的慢性低度發炎，並且證明透過 ABD-rhArg 融和蛋白或其他形式的精胺酸酶(如 rhArg-PEG、BCA-PEG 或 BCA-ABD)，或精胺酸消耗酶(如 ADI-PEG、ADI-ABD、ADC-PEG 或 ADC-ABD)消耗精胺酸作為預防性抗

發炎療法之使用的潛力。

【0338】 實施例 22：N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO: 50)治療預防在棕色脂肪組織中 HFD 誘導的白化以及脂肪酸氧化的失調，並增強非顫抖性生熱作用

【0339】 棕色脂肪組織(BAT)用於將氧化燃料耗散為熱(非顫抖性生熱作用)。近期研究指出棕色脂肪組織具有極大的能量消耗能力以抵抗肥胖。相反地，BAT 白化與肥胖相關並會損害 BAT 的功能。確實地，從載劑處理之餵食 HFD 的小鼠中發現，肩胛骨間 BAT 明顯變大(圖 35A)，其重量為瘦對照組小鼠的兩倍(圖 35B)。組織學檢查顯示散佈於多房棕色脂肪細胞間的大單房細胞大量累積(圖 35C)，顯示棕色脂肪轉變為類似白色脂肪的細胞。然而，餵食 HFD 的小鼠同時進行 N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO: 50)治療，其體重、身形、及 BAT 的組織學外觀與瘦對照組的小鼠相似。進一步發現 N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO: 50)治療顯著上調 BAT 專一性基因解偶聯蛋白 1(*Ucp1*)的表現，該基因對於生熱作用相當重要，並且亦上調過氧化體增生劑活化受體 γ 輔啟動因子 1- α (*Pgc1 α*)，其為棕色脂肪細胞中 *Ucp1* 的關鍵轉錄調控因子，同時抑制 HFD 誘導之乙醯輔酶 A 氧化酶 1(*Acox1*)的下調，其為參與脂肪酸氧化的主要基因(圖 36)。N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO: 50)治療可阻礙 *Acox1* 的下調，顯現 N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO: 50)對於正常化脂肪酸氧化的潛力。

【0340】 綜合上述，此等結果顯示 N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO: 50)治療可有效預防與肥胖相關之褐色脂肪白化以及在 BAT 中脂肪酸氧化的失調，並增強非顫抖性生熱作用以對抗 HFD 的肥胖效果。

【0341】 此等結果證明，透過 ABD-rhArg 融合蛋白或其他形式的精胺酸酶(如 ABD094-rhArg、BCA-PEG 或 BCA-ABD)，或精胺酸消耗酶(如 ADI-PEG、ADI-ABD、ADC-PEG 或 ADC-ABD)消耗精胺酸作為預防性抗肥胖療法使用的潛力。

【0342】 實施例 23：N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO: 50)治療有效減輕 HFD 誘導肥胖

【0343】 經確認同時進行 N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO: 50)治療可有效預防 HFD 誘導肥胖以及相關併發症與合併症，包含胰島素抗性、葡萄糖失耐、高血糖症、血脂異常、肝脂肪變性、慢性發炎、及 BAT 白化，接著探討 N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO: 50)對於減輕肥胖以及在已存在飲食誘導肥胖(DIO)的小鼠中逆轉此等失調的功效。對 5 週齡 C57BL/6J 公鼠持續 12 週餵食 HFD 以誘導肥胖以及相關併發症與合併症。接著依據體重分為 2 組，持續 12 週每隔 7 天以 600~700U N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO: 50)或作為載體對照組的生理食鹽水治療，同時持續餵食 HFD。在整個試驗過程中，一組小鼠餵食低脂飲食(LFD)並注射生理食鹽水以作為各種測定的瘦對照組。兩個隊列分開進行試驗，其中每組 $n = 5$ 。小鼠以 5 隻為一組飼養。在兩個獨立的隊列中得到相似的實驗結果，實施例 23~28 呈現其中一個隊列的小鼠的數據。

【0344】 持續 12 週餵食 HFD 可使公鼠的體重增加至超過 50 g，其與餵食 LFD 的瘦對照組公鼠相比明顯較重(圖 37A 及圖 37B)。接著進行 N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO: 50)治療，HFD 誘導肥胖小鼠的體重逐漸下降。治療至第 5 週時，肥胖小鼠的體重減少超過 30%並且與瘦對照組小鼠

差不多。其體重維持在此水平直到完成 12 週的治療。以 N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO: 50)治療的 DIO 小鼠，位於主要內臟(性腺周圍、腎周及腸繫膜 WAT)及皮下(腹股溝 WAT)的脂肪墊重量顯著降低，並且與瘦對照組小鼠高度相似(圖 38A)。WAT 的組織學檢查顯示，以 N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO: 50)治療的 DIO 小鼠，其脂肪細胞明顯縮小(圖 38B)。

【0345】 綜合實施例 18 的實驗結果，此等結果證明 ABD-rhArg 融合蛋白或其他形式的精胺酸酶(如 rhArg-PEG、BCA-PEG 或 BCA-ABD)，或精胺酸消耗酶(如 ADI-PEG、ADI-ABD、ADC-PEG 或 ADC-ABD)可用於治療肥胖。

【0346】 實施例 24： N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO: 50)治療逆轉 HFD 誘導胰島素抗性及葡萄糖失耐，並改善代謝失調

【0347】 在治療之前，小鼠以 HFD 持續餵食 12 週，其相較於瘦對照組小鼠，已產生周邊胰島素抗性(圖 39)及葡萄糖失耐(圖 40)，係為糖尿病前期的特徵。然而，使用 N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO: 50)治療 4 週後，DIO 小鼠的胰島素敏感性顯著增加，變得與瘦對照組小鼠相當。在持續餵食 HFD 的同時，接受 N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO: 50)治療的小鼠，其胰島素敏感性可維持正常直到 12 週的藥物治療結束。此外，以 N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO: 50)治療的小鼠，在治療 3 週後其葡萄糖耐受性顯著提升，並且在治療 7 週後完全恢復到與瘦對照組小鼠相似的水平。與此等改善相符，經過 4 週的 rhArg 治療後，使用 N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO: 50)治療之 DIO 小鼠的空腹血糖(圖 41A)及血漿胰島素(圖 41B)已恢復到與瘦對照組小鼠相似的水平，並維持在正常範圍內直到治療結束。此

導致 HOMA-IR 評分從小鼠治療前的 35.1 急劇下降至小鼠治療 4 週後的 1.2(圖 41C)，暗示胰島素抗性的逆轉。空腹血漿瘦體素(圖 42A)及總膽固醇水平(圖 42B)亦顯著降低至正常水平。

【0348】 綜合上述，此等結果顯示 N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO: 50)在治療 4 週內對於逆轉胰島素抗性、葡萄糖失耐、高血糖症、高胰島素血症、高瘦體素血症及高膽固醇血症具有優異功效。

【0349】 綜合上述，此等結果證明透過 ABD-rhArg 融合蛋白或其他形式的精胺酸酶(如 rhArg-PEG、BCA-PEG 或 BCA-ABD)，或精胺酸消耗酶(如 ADI-PEG、ADI-ABD、ADC-PEG 或 ADC-ABD)消耗精胺酸，可作為胰島素增敏劑，並用於治療糖尿病前期及第二型糖尿病，其特徵為胰島素抗性、葡萄糖失耐及高血糖症，以及治療其他與胰島素抗性相關的失調。其亦可用於治療高瘦體素血症及高膽固醇血症。

【0350】 實施例 25：N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO: 50)治療逆轉 HFD 誘導脂肪變性

【0351】 持續 12 週餵食 HFD 誘導公鼠肝脂肪變性(圖 30 及圖 31)。將 HFD 再延長 12 週後，其肝臟進一步腫大並且顏色蒼白(圖 43A)，肝臟重量為瘦對照組小鼠肝臟重量的兩倍以上(圖 43B)。大量脂質累積已擴展至整個肝臟(圖 44A)，三酸甘油脂含量相對應增加(圖 44B)。關鍵的脂肪生成(adipogenic)轉錄因子 *Pparg* 及 *Srebp1c* 的表現量下調至與瘦對照組相似，而脂質合成(lipogenic)酵素 *Acc1* 的表現量被進一步降低，並且 *Scd1* 被徹底抑制(圖 44C)。相較於餵食 HFD 12 週的小鼠(實施例 20、圖 32)，餵食 HFD 24 週的小鼠其血清中丙胺酸轉胺酶(ALT)濃度進一步升高，並且血

清中天冬胺酸轉胺酶(AST)濃度亦顯著增加(圖 45)，顯示肝損傷進一步的進展。然而，以 N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO: 50)治療的 DIO 小鼠，肝臟的大小明顯縮小至其肝臟重量與瘦對照組相似的程度(圖 43B)。此外，肝臟恢復至略紅的顏色(圖 43A)，此與油滴的大量清除密切相關(圖 44A)，同時三酸甘油脂濃度下降至與瘦對照組相似的水平(圖 44B)。值得注意的是，血漿 ALT 及 AST 濃度與瘦對照組相當，此顯示 N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO: 50)治療可預防現存的肝損傷進一步的進展，並且改善現存的肝損傷。綜合上述，此等結果揭露 N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO: 50)對於逆轉肝脂肪變性的顯著效果。

【0352】 除肝臟外，肥胖亦與脂質在腎臟(腎脂肪變性)、胰腺(胰腺脂肪變性)、及心臟(心臟脂肪變性)過度累積相關，造成脂質毒性及此等重要器官的功能異常。確實地，以載劑處理之 DIO 小鼠，其腎臟(圖 46A)、胰腺(圖 47A)及心臟(圖 48A)的重量顯著增加。組織學檢查顯示類似於油滴的空泡在腎小管內累積(圖 46C)。腎切片的油紅 O 染色顯示脂質在腎小球內的異位累積(圖 46D)。WAT 的斑塊在胰腺的小葉內及小葉間大量累積(圖 47B)，並在心肌纖維中發現白色脂肪細胞的島狀物(圖 48B)。三酸甘油脂濃度在腎臟(圖 46B)、胰腺(圖 47C)、心臟(圖 48C)中顯著增加。此外，三酸甘油脂濃度亦在骨骼肌(圖 49)中顯著升高。此等結果指出以載劑處理之 DIO 小鼠的此等器官中產生脂肪變性。然而，N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO: 50)治療可將 DIO 小鼠之腎臟(圖 46A)、胰腺(圖 47A)及心臟(圖 48A)的重量顯著降低至與瘦對照組相似的程度。組織學檢查證實腎小管內的空泡(圖 46C)以及透過油紅 O 染色鑑定的腎小球內的脂質顯著減少(圖

46D)。胰腺(圖 47B)及心臟(圖 48B)內的 WAT 顯著降低。以 N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO: 50)治療之 DIO 小鼠，其腎臟(圖 46B)、胰腺(圖 47C)、心臟(圖 48C)及骨骼肌(圖 49)中三酸甘油脂濃度恢復到與瘦對照組相似的水平。此等結果顯示 N-ABD-rhArg (SEQ ID NO: 50)可有效逆轉腎臟、胰腺及心臟內的脂肪變性，並且在其他器官可能亦具有相同效果。

【0353】 綜合上述，此等結果證明 ABD-rhArg 融合蛋白或其他形式的精胺酸酶(如 rhArg-PEG、BCA-PEG 或 BCA-ABD)，或精胺酸消耗酶(如 ADI-PEG、ADI-ABD、ADC-PEG 或 ADC-ABD)可用於治療脂肪變性。

【0354】 實施例 26： N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO: 50)治療降低 HFD 誘導慢性發炎與纖維化

【0355】 如實施例 21 所示，餵食 HFD 會誘導慢性發炎。以載劑處理之 DIO 小鼠，隨著在性腺周圍 WAT 中促發炎脂肪激素 *Mcp1* 的表現上調(圖 50A)，血清中 *Mcp1* 的濃度顯著升高。另一方面，以 N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO: 50)治療的 DIO 小鼠，在性腺周圍 WAT 中 *Mcp1* 的表現顯著下調，並且血清中 *Mcp1* 的濃度恢復到與瘦對照組小鼠相似的水平(圖 50B)，顯示 N-ABD094-rhArg 治療可緩解 WAT 中 HFD 所誘導的慢性發炎。

【0356】 在載劑處理之 DIO 小鼠的肝臟中，幾種促發炎基因包含介白素 1α 及 1β (*Il1a* 及 *Il1b*)顯著上調(圖 51A)。慢性發炎與纖維化相關。確實地，關鍵的促纖維化基因乙型轉化生長因子(*Tgfb*)的表現顯著上調(圖 51B)。N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO: 50)治療可顯著下調此等促發炎基

因，並且顯著上調幾種抗發炎基因包含介白素 10 (*Il10*)、介白素 22 (*Il22*) 及干擾素 γ (*Infg*) (圖 51C)。促纖維化基因 *Tgfb* 的表現恢復到與瘦對照組相似的水平。與肝臟相似，在載劑處理之 DIO 小鼠的腎臟中，幾種促發炎基因包含 *Mcp1*、腫瘤壞死因子 α (*Tnfa*) 及 *Il1b* 的表現顯著上調 (圖 52A)。促纖維化基因第一型膠原蛋白 $\alpha 1$ 鏈 (*Colla1*) 亦顯著上調，此與透過天狼星紅 (Sirius red) 染色鑑定之腎臟內膠原蛋白纖維過度沉積的結果相符 (圖 52C)。值得注意地，以 N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO: 50) 治療 DIO 小鼠可下調此等促發炎基因的表現至與瘦對照組相似的水平。促纖維化基因 *Colla1* 被大幅抑制，並且膠原蛋白纖維明顯減少。同樣地，在胰腺內，N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO: 50) 治療可顯著下調促發炎基因如 *Mcp1* (圖 52A) 及關鍵的促纖維化基因 *Tgfb* (圖 53B)。

【0357】 綜合上述，此等結果顯示 N-ABD094-rhArg 治療可有效緩解肝臟、腎臟、胰腺內的慢性發炎及纖維化，並在其他器官可能亦具有相同功效。

【0358】 脂肪肝(肝脂肪變性)在早期可能沒有症狀。當肝臟發炎時會轉變為脂性肝炎，其可進展為纖維化並在後期進一步發展為肝硬化，此大幅增加罹患肝細胞癌的風險。上述結果顯示 N-ABD094-rhArg 治療可阻止肝臟疾病的進展並逆轉肝臟損傷。

【0359】 綜合上述，此等結果證明透過 ABD-rhArg 融合蛋白或其他形式的精胺酸酶(如 rhArg-PEG、BCA-PEG 或 BCA-ABD)，或精胺酸消耗酶(如 ADI-PEG、ABD-ADI、ADC-PEG 或 ADC-ABD)消耗精胺酸，可用於治療慢性發炎及纖維化。

【0360】 實施例 27：N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO: 50)治療逆轉棕色脂肪白化

【0361】 HFD 的餵食延長後，相較於瘦對照組小鼠，載劑處理之 DIO 小鼠其肩胛骨間 BAT 的大小(圖 54A)及重量(圖 54B)進一步增加，此與大量出現白色脂肪樣擴大的單房細胞有關(圖 54C)。相較之下，使用 N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO: 50)治療 DIO 小鼠可使肩胛骨間 BAT 的大小及重量顯著恢復至與瘦對照組小鼠相似，並幾乎可以完全緩解白色脂肪樣單房細胞的出現。綜合上述，此等結果顯示 N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO: 50)具有優異之逆轉棕色脂肪白化的能力。

【0362】 綜合上述，此等結果證明 ABD-rhArg 融合蛋白或其他形式的精胺酸酶(如 rhArg-PEG、BCA-PEG 或 BCA-ABD)，或精胺酸消耗酶(如 ADI-PEG、ADI-ABD、ADC-PEG 或 ADC-ABD)，可透過逆轉棕色脂肪白化用於治療肥胖。

【0363】 實施例 28：N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO: 50)治療降低血壓

【0364】 肥胖與心血管疾病及高血壓相關。持續 5 週每 7 天以 600U N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO: 50)治療 DIO 小鼠，並使用 CODA 非侵入式血壓系統(Kents Scientific Corporation)以尾部脈波描記法(tail-cuff method)測量血壓。以 N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO: 50)治療之 DIO 小鼠的收縮壓與舒張壓(圖 55A)及心率(圖 55B)顯著低於載劑處理之 DIO 小鼠，並且與瘦對照組小鼠高度相似。實施例 25 顯示 N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO: 50)可有效逆轉腎臟及心臟脂肪變性，此可能有益於降低血壓。

【0365】 綜合上述，此等結果證明 ABD-rhArg 融合蛋白或其他形式的精胺酸酶(如 rhArg-PEG、BCA-PEG 或 BCA-ABD)，或精胺酸消耗酶(如 ADI-PEG、ADI-ABD、ADC-PEG 或 ADC-ABD)，可用於治療高血壓。

【0366】 實施例 29：N-ABD0094-rhArg (SEQ ID NO: 50)不引起中和抗體並且長期施用下仍有效

【0367】 中和抗體的產生可能影響藥物的藥效動力學、藥物動力學、穩定性及功效。為了確認免疫原性反應，以 LFD 餵食 8 週齡 C57BL/6J 小鼠，每 7 天腹腔(i.p.)注射 500U 的 N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO: 50)或生理食鹽水作為載體對照組，持續 8 個月。實驗結果發現，儘管會出現抗 N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO: 50)的抗藥物抗體(圖 56A)，然而此等抗體對於精胺酸酶活性並不具中和效果(圖 56B)，此與血漿精胺酸濃度可在整個試驗期間維持在低於 Biochrom 30 胺基酸分析儀的檢測極限(3 μ M)的水平的結果相符。

【0368】 為了評估長期使用的安全性，收集 N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO: 50)治療 8 個月之餵食 LFD 的小鼠的血清及尿液樣本，以進行 ALT 及 AST 分析(常作為肝損傷的生物指標)，同時分析血清肌酸酐及尿液之白蛋白/肌酸酐比值以評估腎功能。實驗結果發現以藥物治療餵食 LFD 的小鼠與載劑處理餵食 LFD 的小鼠在此等參數上並無任何顯著差異(圖 57A 及 57B)。此外，使用肌動描記器檢測分離的動脈的功能反應以及血管反應性，以 N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO: 50)治療餵食 LFD 的小鼠與載劑處理餵食 LFD 的小鼠之間，在去氧腎上腺素引起的血管平滑肌收縮(圖 58A)、

乙醯膽鹼誘導之內皮依賴性舒張(圖 58B)及一氧化氮供體硝普鈉引起之內皮非依賴性舒張(圖 58C)並無顯著差異。

【0369】 在另一項研究中，使用 600U N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO: 50)治療飲食誘導肥胖 C57BL/6J 公鼠 20 週，同時持續餵食 HFD，至第 5 週時其體重降低至與瘦對照組小鼠相似的水平，並繼續保持在該水平不回升。定期監測血漿精胺酸的濃度顯示精胺酸維持在低於 Biochrom 30 胺基酸分析儀的檢測極限(3 μ M)的水平。此等結果證明 N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO: 50)在整個治療期間保持有效。綜合上述，此等結果證明 N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO: 50)在長期使用下是安全並且有效的。

【0370】 **實施例 30：重組人類精胺酸酶(rhArg)聚乙二醇化的實驗方法**

【0371】 使用親和層析法純化獲得重組人類精胺酸酶(His-rhArg SEQ ID NO: 101)。聚乙二醇化之前，純化的 His-rhArg (SEQ ID NO: 101)以 20 mM 磷酸鈉(pH 8.0)透析過濾，並將蛋白濃度調整至 2 mg/mL。聚乙二醇化試劑由 20 mM 磷酸鈉(pH 8.0)配製。PEG 試劑相對於 rhArg 的莫耳比為 20：1。將 PEG 試劑加入 His-rhArg (SEQ ID NO: 101)，並且置於室溫下攪拌 4 小時。接著使用切向流過濾(TFF)以 20 mM 磷酸鈉(pH 7.4)對反應混合物透析過濾。透過親和層析，在未結合之流出液(flow through)中去除過量的 PEG，並且以 0.5 M 咪唑溶離蛋白從而回收聚乙二醇化的 His-rhArg (SEQ ID NO: 101)。任何未衍生化 His-rhArg (SEQ ID NO: 101)則透過另一輪親和層析分離。反應混合物接著使用 12%聚丙烯醯胺凝膠進行 SDS-PAGE 分析。使用考馬斯亮藍(Coomassie blue)對凝膠染色以鑑別分子量，

或使用 0.1 M 碘液檢測游離 PEG。

【0372】 例如，在一次製備中，獲得 150 mg 乙二醇化的 His-rhArg (SEQ ID NO: 101)，具有比活性 245 U/mg 及濃度 7.5 mg/mL。圖 11 及表 5 顯示製備 PEG-rhArg 及其分析的實施例。

【0373】 表 5、製備聚乙二醇化 His-rhArg (SEQ ID NO: 101)及其分析

	體積(mL)	濃度(mg/mL)	總重(mg)	比活性 (U/mg)
聚乙二醇化His-rhArg 第3批	11	3.5	38.5	189
聚乙二醇化His-rhArg 第3批	35	5.3	185.5	213

【0374】 實施例 31：聚乙二醇化 His-rhArg (SEQ ID NO: 101)治療
減低肥胖並且改善胰島素敏感性

【0375】 聚乙二醇化 His-rhArg (SEQ ID NO: 101)的製備如實施例 30 所示。對已患有飲食誘導肥胖(DIO)的 C57BL/6J 公鼠每 7 天腹腔(i.p.)注射 300U 聚乙二醇化 His-rhArg (SEQ ID NO: 101)，或注射生理食鹽水作為載劑對照組，治療 5 週，同時持續餵食 HFD。使用聚乙二醇化 His-rhArg (SEQ ID NO: 101)治療的小鼠，其體重逐漸降低至 30g，與載劑處理之餵食正常飼料(chow diet)的瘦對照組小鼠相似(圖 59)。位於主要內臟(性腺周圍、腎周及腸繫膜 WAT)及皮下(腹股溝 WAT)的脂肪墊重量顯著降低，並且在實驗結束時與瘦對照組小鼠相似(圖 60)。其肝臟、腎臟、胰腺及心臟的重量顯著低於載劑處理的 DIO 小鼠，並與瘦對照組小鼠相當(圖 60)。在

整個試驗過程中，定期監測血漿精胺酸的濃度確定精胺酸維持在低於 Biochrom 30 胺基酸分析儀的檢測極限(3 μ M)的濃度。

【0376】 相較於使用載劑治療的 DIO 小鼠，聚乙二醇化 His-rhArg (SEQ ID NO: 101)治療 DIO 小鼠兩週後，其空腹血糖濃度較低(圖 61A)，並且胰島素敏感性顯著增加(圖 61B)。

【0377】 綜合上述，此等結果證明聚乙二醇化 His-rhArg (SEQ ID NO: 101)具有與 N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO: 50)相似之抗肥胖及胰島素增敏的功效。透過乙二醇化 His-rhArg (SEQ ID NO: 101)剝奪精胺酸，對於肥胖及胰島素抗性相關的疾病具有治療功效。

【0378】 實施例 32：金屬離子替換

【0379】 野生型精胺酸酶通常包含一個 Mn^{2+} 金屬離子(D'Antonio & Christianson, 2011, Biochemistry, 50:8018-27)。金屬離子替換被發現為一種製備更具效力 ABD094-rhArg(低 K_m 值及高 k_{cat}/K_m 值)的形式的方法。在 20 mM Tris-HCl 緩衝液(pH 7.4)中，將純化的 N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO: 50)與 20 mM 不同的二價金屬離子(Mn^{2+} 、 Ni^{2+} 或 Co^{2+})混合，並且置於 52 ~55 °C 15~60 分鐘，接著將緩衝液置換為 PBS 緩衝液(pH 7.4)。

【0380】 對樣品進行酵素活性及酵素動力學測試，測定比活性及催化效率(k_{cat}/K_m)。樣品透過電感耦合電漿體原子發射光譜法(ICP-OES，Agilent 700 系列 ICP 光學發射光譜儀)量化分析金屬含量。

【0381】 將蛋白樣品(100~200 μ L)加入 10 mL 的 1% w/v HNO_3 ，接著選擇不同的元素及波長進行 ICP-OES 分析。金屬與蛋白的比率係金屬濃度除以蛋白濃度。使用 Pierce™ BCA 蛋白測定法，依照廠商的使用說明書

(Thermo Fisher Scientific)分析蛋白濃度。

【0382】 將 Co^{2+} 或 Ni^{2+} 金屬離子加入 N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO: 50)，造成良好的 Mn^{2+} 移除以及 Co^{2+} 或 Ni^{2+} 的併入。

【0383】 實驗結果發現鈷替換的酵素(N-ABD094-rhArg- Co^{2+})展現更小的 K_m (0.27~0.35 mM)、更高的 k_{cat} (250~316 s^{-1})及更高的催化效率 k_{cat}/K_m (905~917 $\text{s}^{-1} \text{mM}^{-1}$)。至於原始的酵素(N-ABD094-rhArg- Mn^{2+})，其具有 K_m 值 1.37~1.89 mM、 k_{cat} 值 82~98 s^{-1} 以及 k_{cat}/K_m 值 44~72 $\text{s}^{-1} \text{mM}^{-1}$ 。金屬替換法成功地將 Mn^{2+} 取代成 Co^{2+} ，使得飽和 Co^{2+} 與蛋白的比率約為 2~4 : 1。此結果顯示 N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO: 50)或本發明所記載之其他融合蛋白可透過與其他二價金屬離子替換(如 Ni^{2+} 或 Co^{2+})以製備成更具效力的形式。

【0384】 **實施例 33：N-ABD094-rhArg- Co^{2+} (SEQ ID NO: 50 (鈷替換))治療減低肥胖**

【0385】 N-ABD094-rhArg- Co^{2+} (SEQ ID NO: 50 (鈷替換))的製備如實施例 32 所示。對已患有飲食誘導肥胖(DIO)的 C57BL/6J 公鼠腹腔(i.p.)注射 25~100U N-ABD094-rhArg- Co^{2+} (SEQ ID NO: 50 (鈷替換))治療 5 週，同時持續餵食 HFD。在治療的 5 週內，小鼠的體重逐漸從 55g 降低至 30g (圖 62)，與 600~700U N-ABD094-rhArg 的效果相似(圖 37)。此結果證明將 Mn^{2+} 替換成 Co^{2+} 明顯提升 ABD-rhArg 融合蛋白對於減低體重的效力。

【0386】 **實施例 34：哺乳動物細胞培養及細胞增生分析**

【0387】 依照標準實驗方法，將癌細胞株(如 MKN45、AGS、BGC823、HCT-15 及 HCT-116)培養於含有 10% FBS 及 100 單位/mL 青黴

素/鏈黴素的 RPMI 培養基。

【0388】 在 96 孔盤的每個孔內接種培養於體積 100 μ L 的培養基中的 5×10^3 顆癌細胞，培養 24 小時，以進行細胞增生試驗。將培養基更換為無精胺酸培養基(arginine free medium, AFM)，並分別添加不同濃度的精胺酸、含有各種濃度的不同精胺酸消耗酶的新鮮的培養基、以及此等消耗酶與瓜胺酸的組合。將孔盤置於含有加濕的 95%空氣及 5% CO₂ 空氣的培養箱內，37 °C 下再另外培養 1~3 天。

【0389】 如其他文獻廣泛記載，使用 MTT (3-(4,5-二甲基噻唑-2)-2,5-二苯基四氮唑溴鹽)測定法進行定量細胞增生分析。殺死 50%細胞所需精胺酸消耗酶的量定義為 IC₅₀。

【0390】 **實施例 35：透過各種精胺酸消耗酶(ADI、BCA 及 ADC)抑制各種人類癌細胞株增生**

【0391】 透過對五種癌細胞株：A375、HeLa、BxPC-3、PANC-1 及 HCT116 的比較試驗，確認精胺酸去亞胺酶(ADI)、細菌的精胺酸酶(BCA)及精胺酸脫羧酶(ADC)的細胞毒殺性。

【0392】 由於 ADI 及 BCA 所催化的反應為尿素循環的步驟，因此 ADI 及 BCA 抗腫瘤的效果皆與細胞 ASS 的水平相關。反之，ASS 的存在對於 ADC 抗腫瘤效果的影響可能相對較少，因為 ADC 所催化的產物皆不為尿素循環的中間產物。實驗結果顯示 ADI、BCA 及 ADC 對於本試驗的細胞株皆具有抑制效果。ADI 能有效抑制 A375、HCT116、BxPC-3、PANC-1，但對於 HeLa 細胞不具效果，然而 BCA 及 ADC 皆能夠有效抑制本試驗所使用的五種癌細胞株(表 6)。ADC 為效力(potency)最差精胺酸

消耗酶，然而就功效(efficacy)而言，特別係對於 ASS 陽性癌細胞，其功效優於 ADI 及 BCA(表 6)。

【0393】 腫瘤細胞對於 ADI 的敏感性與細胞 ASS 的水平呈現明顯的關聯性(表 6)。綜合上述，相較於 ADI，ADC 及 BCA 可透過 ASS 非依賴性的方式抑制人類癌細胞株的增生。

【0394】 表 6、ADI、BCA 及 ADC 對於五種人類癌細胞株的 IC₅₀ 及最大細胞毒殺性。細胞處理 72 小時之後進行 MTT 分析。每次實驗為三重複，實驗數據係三次獨立實驗的平均值。IC₅₀ 值定義為抑制 50%細胞存活所需的酵素量。最大細胞毒殺性表示每種酵素可達成的死亡細胞的最高百分比。對 ADI 具抗性的細胞定義為在本試驗最大劑量的 ADI 之下，仍有超過 50%存活率的細胞。

【0395】 表 6

癌症類型	細胞株	ASS蛋白水平	IC ₅₀ (μg/mL)			最大細胞毒殺性(%)		
			ADI	BCA	ADC	ADI	BCA	ADC
黑色素瘤	A375	無法偵測，無法誘導	0.03	0.12	5.61	93.92	86.92	84.76
大腸直腸癌	HCT116	低	0.10	0.22	12.23	72.18	81.05	84.35
胰臟癌	BxPC-3	中	0.09	0.44	16.85	57.53	84.82	93.16
	PANC-1	低/中，可誘導	0.04	1.81	4.65	55.68	63.01	82.98
子宮頸癌	HeLa	低/高，可誘導	抗性	1.25	3.82	<50	61.14	86.49

【0396】 實施例 36：BHA (SEQ ID NO: 75)對胃癌細胞的細胞毒殺

性

【0397】 將 MKN45 胃癌細胞株與各種濃度的 BHA (SEQ ID NO: 75) 培養 72 小時，並透過 MTT 試驗確定 MKN45 的存活率，藉此測試白蛋白結合精胺酸酶 BHA (SEQ ID NO: 75) 的體外功效。如圖 63 所示，BHA (SEQ ID NO: 75) 以劑量依賴性的方式抑制 MKN45 癌細胞的生長。此結果進一步確認，培養基在添加胎牛血清(FBS)並且含有白蛋白及其他不同蛋白的培養條件下，消耗精胺酸之融合蛋白的細胞毒殺性。

【0398】 **實施例 37：透過膜聯蛋白 V-FITC 及 PI 雙染進行細胞凋亡測試**

【0399】 為了測試 BCA 精胺酸酶(SEQ ID NO: 71)誘導細胞凋亡的效果，在細胞不同處理條件的前一天先將 3×10^5 個細胞接種於 6 孔盤內。接著去除原本的培養基，並更換為含有不同濃度 BCA (SEQ ID NO: 71) 的完全培養基。細胞在經過 24 小時、48 小時及 72 小時 BCA 的處理後，同時收集漂浮以及貼附的細胞。簡言之，透過在室溫下 $100 \times g$ 離心 3 分鐘以收集培養基內漂浮的細胞。而貼附的細胞以 PBS 洗滌後，將細胞與 0.25%胰蛋白酶溶液於 37°C 培養 3 分鐘即可脫離盤底，接著加入完全培養基，即可透過離心收集貼附的細胞。細胞以 PBS 洗滌，並重新懸浮於 0.1 mL 結合緩衝液(0.01 M HEPES, pH 7.4; 0.14 M NaCl; 2.5 mM CaCl_2)，前述結合緩衝液含有碘化丙啶(PI)及膜聯蛋白 V-FITC。細胞於室溫下在黑暗中染色 15 分鐘，並且在使用 FACS Aria (BD biosciences) 進行流式細胞技術分析前，每管先加入 0.4 mL 結合緩衝液。將流式細胞儀設定為從每個樣品的 10,000 顆細胞中獲得數據，並且透過 FACS Aria 軟體分析實

驗數據。

【0400】 根據流式細胞技術的實驗結果，在 BCA (SEQ ID NO: 71) 的處理下(50 $\mu\text{g/mL}$ 的 BCA)，可以時間依賴性的方式誘導 HCT116 人類大腸癌細胞的細胞凋亡。在 BCA 處理後的 24、48 及 72 小時，分別約 16%、21%及 25%的 HCT116 癌細胞已發生細胞凋亡。

【0401】 實施例 38：細胞存活試驗及藥物併用效果

【0402】 本試驗使用乳癌細胞株(如人類 MCF-7 及 MDA-MB-231 細胞)。將癌細胞(5×10^3 顆細胞)接種在含有 100 μL 完全培養基的 96 孔盤 (TPP)中，置於培養箱內過夜培養，使細胞貼壁。接著將 His-rhArg 精胺酸酶(SEQ ID NO: 101) (2 U/mL 至 0.0032 U/mL)及細胞自噬抑制劑氯奎 (chloroquine, CQ, 100 μM 至 0.16 μM)加入 96 孔盤內。將 His-rhArg 精胺酸酶(SEQ ID NO: 101) (2 U/mL 至 0.0032 U/mL)與 20 μM CQ(非恆定比率法)加入孔內作為藥物併用的實驗組，每個劑量以 3 個孔三重複，取得細胞存活率的平均變化。經培養 68 小時後，加入 10 μL 的 5 mg/mL MTT 溶液 (3-(4,5-二甲基噻唑-2)-2,5-二苯基四氮唑溴鹽)。將孔盤放回培養箱內，並進一步培養 4 小時。加入 100 μl 的 10% SDS(溶於 0.01 M HCl)以溶解 MTT 所形成的不可溶化合物甲臍(formazan)，接著將孔盤置於 37 $^{\circ}\text{C}$ 過夜培養，並以分光光度計於波長 570 nm 測量顏色變化。對照組(不含任何藥物)作為計算細胞存活百分率的基準，並使用 Prism 6.0 (GraphPad)軟體繪製劑量反應曲線以取得 IC_{50} 值。可透過合併指數(CI)計算 His-rhArg (SEQ ID NO: 101)與 CQ 之間的交互作用或併用效果，並使用 CalcuSyn 軟體(Biosoft)計算 CI 值。

【0403】 MCF-7 癌細胞對於精胺酸酶處理 72 小時所造成的精胺酸貧乏敏感(表 7)。CQ 亦顯示對於 MCF-7 的細胞毒殺性(表 8)。關於藥物併用的實驗組，His-rhArg (SEQ ID NO: 101)與 CQ 之間產生協同作用(CI < 1)(表 9)。表 10 顯示 His-rhArg (SEQ ID NO: 101)、CQ、及 rhArg 加上 CQ 對於 MCF-7 癌細胞的 IC₅₀。

【0404】 表 7、MCF-7 癌細胞經 His-rhArg (SEQ ID NO: 101)處理後的細胞存活百分率

His-rhArg 濃度(U/mL)	細胞存活%平均(n = 6)	SEM
2	45.29%	0.80%
0.4	48.75%	0.99%
0.08	70.68%	1.69%
0.016	88.99%	1.64%
0.0032	80.88%	2.40%
0	100.00%	1.44%

【0405】 表 8、MCF-7 癌細胞經 CQ 處理後細胞存活百分率

CQ 濃度(μM)	細胞存活%平均(n = 6)	SEM
100	40.73%	2.33%
20	72.41%	1.76%
4	83.34%	0.69%
0.8	85.88%	3.03%
0.16	96.33%	0.91%
0	100.00%	0.87%

【0406】 表 9、rhArg 與 CQ 的併用對 MCF-7 細胞的合併指數(CI)及細胞存活百分率

His-rhArg 濃度 (U/mL)	CQ 濃度(μM)	細胞存活%平均 (n = 6)	SEM	CI
2	20	35.98%	0.37%	0.463
0.4	20	37.34%	0.51%	0.190
0.08	20	45.90%	0.70%	0.253
0.016	20	59.78%	1.32%	0.669
0.0032	20	69.27%	0.98%	1.440
0	0	100.00%	1.44%	

【0407】 表 10、His-rhArg (SEQ ID NO: 101)、CQ 及 His-rhArg (SEQ ID NO: 101)與 CQ 的併用對 MCF-7 癌細胞的 IC₅₀

MCF-7	IC ₅₀	SEM
His-rhArg	0.7869 U/mL	0.0760 U/mL
CQ	67.16 μM	10.72 μM
His-rhArg + CQ	0.07617 U/mL	0.00576 U/mL

【0408】 實驗數據顯示 MDA-MB-231 乳癌細胞對於 His-rhArg (SEQ ID NO: 101)及 CQ 所造成的精胺酸貧乏敏感(表 11 及表 12)。His-rhArg (SEQ ID NO: 101)與 CQ 的併用亦顯示出對於 MDA-MB-231 細胞之細胞毒殺性的協同作用。CI 值小於 1(表 13)。表 14 顯示 His-rhArg (SEQ ID NO: 101)、CQ、及 His-rhArg (SEQ ID NO: 101)加上 CQ 對 MDA-MB-231 乳癌細胞的 IC₅₀。

【0409】 表 11、His-rhArg (SEQ ID NO: 101)對 MDA-MB-231 細胞

的細胞存活百分率

His-rhArg 濃度(U/mL)	細胞存活%平均(n = 3)	SEM
2	49.10%	1.67%
0.4	50.24%	0.33%
0.08	70.87%	1.39%
0.016	79.26%	7.62%
0.0032	93.70%	2.62%
0	100.00%	1.47%

【0410】 表 12、MDA-MB-231 細胞與 CQ 培養 72 小時後的細胞存活百分率

CQ 濃度(μM)	細胞存活%平均(n = 3)	SEM
100	43.17%	0.97%
20	75.18%	1.50%
4	82.16%	0.49%
0.8	98.14%	1.38%
0.16	99.03%	1.67%
0	100.00%	3.53%

【0411】 表 13、His-rhArg (SEQ ID NO: 101)與 CQ 的併用對 MDA-MB-231 乳癌細胞的合併指數(CI)及細胞存活百分率

His-rhArg 濃度(U/mL)	CQ 濃度(μM)	細胞存活%平均(n = 3)	SEM	CI
2	20	44.55%	1.88%	1.697
0.4	20	45.92%	0.65%	0.584

0.08	20	55.33%	1.42%	0.568
0.016	20	61.59%	2.68%	0.623
0.0032	20	46.62%	0.60%	0.263
0	0	100.00%	3.92%	

【0412】 表 14、His-rhArg (SEQ ID NO: 101)、CQ 及 His-rhArg (SEQ ID NO: 101)與 CQ 的併用對 MDA-MB-231 細胞的 IC₅₀

MDA-MB-231	IC ₅₀	SEM
His-rhArg	0.9522 U/mL	0.1299 U/mL
CQ	73.39 μM	5.36 μM
His-rhArg + CQ	0.1408 U/mL	0.0274 U/mL

【0413】 本發明亦測試 His-rhArg (SEQ ID NO: 101) (0.016、0.08、或 0.4 U/mL)與 CQ (20 μM)的藥物併用對於人類肝臟癌細胞株「Red Flu HepG2」的效果，其中亦觀察到協同作用(CI 值小於 1)。

【0414】 實施例 39： Trans-well 細胞遷移試驗及細胞侵入試驗

【0415】 本試驗使用乳癌細胞株(人類 MDA-MB-231 細胞及小鼠 4T1 細胞)。透過 24 孔 Costar (Corning) Trans-well 系統(聚碳酸酯膜嵌室，孔徑 8.0 μm)進行細胞遷移試驗與侵入試驗。試驗前，將細胞培養於適當的無血清培養基內至少 24 小時。在細胞接種於上層腔室(chamber)的前一天，先將 100 μL 稀釋的基質膠(matrigel)加入侵入試驗嵌室(insert)的上層腔室，將無血清培養基(100 μL)加入細胞遷移試驗用的上層腔室，接著將 24 孔盤置於培養箱內過夜培養。隔天，透過胰蛋白酶使細胞脫壁並且計數。本試驗，將 3 x 10⁴顆 4T1 細胞或 5 x 10⁴顆 MDA-MB-231 細胞，連同 200

μL 適當的無血清培養基接種於上層腔室，並將適當的完全培養基(750 μL) 加入下層腔室。在上下層腔室中加入 1 U/mL His-rhArg (SEQ ID NO: 101)，作為藥物處理組。將 24 孔盤置於含 5% CO_2 之加濕空氣的 37 °C 培養箱內，培養 20 小時(4T1 細胞)或 24 小時(MDA-MB-231 細胞)。

【0416】 培養後，去除上層腔室的培養基，並以 1x PBS 清洗 transwell 嵌室兩次。將冷的 100% 甲醇加入上下層腔室內並放置 10 分鐘以固定細胞，並以 1x PBS 清洗嵌室兩次。之後，將 1% 結晶紫(溶於 1x PBS)加入上下層腔室，放置 15 分鐘進行細胞染色，並以 1x PBS 清洗嵌室兩次。使用棉花棒將上層腔室表面的細胞去除，並將嵌室風乾過夜，透過共軛焦顯微鏡拍照。實驗結果顯示當細胞以 1 U/mL His-rhArg (SEQ ID NO: 101) 處理，可通過 transwell 嵌室遷移或侵入的癌細胞數量減少，顯示透過精胺酸酶消耗精胺酸可抑制癌細胞的遷移及侵入。

【0417】 **實施例 40：N-ABD-rhArg (SEQ ID NO: 49) 在體內抑制侵襲性乳癌細胞的生長與轉移**

【0418】 使用 10 隻母裸鼠(11~12 週齡)進行侵襲性乳癌細胞 4T1 異種移植模型的研究。五隻裸鼠為一籠飼養，並任食提供水與食物。透過胰蛋白酶使細胞脫壁、1X PBS 清洗兩次並將細胞重新懸浮於 1X PBS，收集 4T1 癌細胞進行接種。將癌細胞(1×10^6 顆 4T1 細胞)以皮下注射到裸鼠左側腹部。接種 3 天後，當腫瘤平均長度為 6 mm 時，將裸鼠隨機分為兩組，每週注射一次 500U (3.2 mg, 230 μL) N-ABD-rhArg (SEQ ID NO: 49) 或 1X PBS。從隱靜脈採集血液樣本，定期檢測腫瘤大小及裸鼠的體重。透過以下公式計算腫瘤體積：

【0419】 腫瘤體積(mm³) = $\frac{\text{長度} \times \text{寬度}^2}{2}$

【0420】 由於注射 PBS 的對照組中腫瘤壞死，因此於接種癌細胞 16 天後(即開始進行實驗 13 天後)犧牲。犧牲後，從裸鼠身上收集腫瘤並測量腫瘤重量，同時亦收集肺臟並以 1X PBS 清洗。將肺臟置於 Bouin 溶液中固定過夜，在固定後以 1X PBS 清洗，並計算肺部轉移結節的數量。

【0421】 重要的是，500U 白蛋白結合精胺酸酶 N-ABD-rhArg (SEQ ID NO: 49)可在 BALB/c 小鼠中將精胺酸消耗至低於 Biochrom 30 胺基酸分析儀的檢測極限(3 µM)的水平至少 10 天(圖 10)。因此，透過腹腔(i.p.)注射，對異種移植 4T1 乳癌的裸鼠每週施用一次 500 U N-ABD-rhArg (SEQ ID NO: 49)，進行功效試驗。表 15 顯示 500 U N-ABD-rhArg (SEQ ID NO: 49)可在實驗過程中將精胺酸消耗至無法檢測的水平。

【0422】 表 15、N-ABD-rhArg (SEQ ID NO: 49)處理組小鼠(小鼠 1~4)的血清精胺酸濃度，其透過 Biochrom 30 胺基酸分析儀檢測。BDL：低於儀器的檢測極限；第 0 天：處理前

	第 0 天	第 6 天	第 13 天
	精胺酸濃度(µM)	精胺酸濃度(µM)	精胺酸濃度(µM)
1	132.5	0 (BDL)	0 (BDL)
2	117.0	0 (BDL)	0 (BDL)
3	130.5	0 (BDL)	0 (BDL)
4	122.5	0 (BDL)	0 (BDL)

【0423】 圖 64~67 顯示 500U N-ABD-rhArg (SEQ ID NO: 49)可在裸鼠中抑制異種移植 4T1 乳癌的生長。開始進行實驗 12 及 13 天後，對照組

與實驗組間所估算腫瘤體積具有顯著差異(圖 64 及圖 65)。腫瘤大小在兩組之間亦存在顯著差異(圖 66 及圖 67)。

【0424】 此等結果顯示透過每週注射一次 500U N-ABD-rhArg (SEQ ID NO: 49)消耗精胺酸，可在裸鼠中顯著抑制異種移植 4T1 侵襲性乳癌的生長。體內試驗顯示 N-ABD-rhArg (SEQ ID NO: 49)可透過安全有效的方式抑制裸鼠中癌症的生長。

【0425】 此外，本試驗發現精胺酸貧乏可抑制 4T1 乳癌細胞的轉移，此與體外試驗的結果一致。在裸鼠犧牲後，收集處理組裸鼠的肺臟，並仔細檢查轉移的病徵。在對照組的 3 個不同的肺臟中發現三個肺部轉移結節；然而在 N-ABD-rhArg (SEQ ID NO: 49)處理組中未發現轉移結節(表 16)。此結果令人信服地表明 N-ABD-rhArg (SEQ ID NO: 49)所引起的精胺酸貧乏可抑制腫瘤轉移。此顯示精胺酸可能在細胞遷移與腫瘤轉移中扮演重要角色，透過 N-ABD-rhArg (SEQ ID NO: 49)消耗精胺酸可能會抑制部分對於癌細胞轉移至關重要的路徑(Knott et al., 2018, Nature, 554:378-381)。

【0426】 表 16、動物試驗中轉移結節的數量

組別	肺部轉移結節的數量	未發生轉移的動物%
PBS 對照組 (n = 6)	3	50%
500 U N-ABD-rhArg	0	100%

(n = 4)		
---------	--	--

【0427】 實施例 41：N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO: 50)融合酵素對人類大腸癌細胞株的細胞毒殺性

【0428】 使用人類大腸癌細胞株測試 ABD 及 rhArg 融合蛋白的體外功效。將人類大腸癌細胞株(HCT116、LOVO 及 HT29)以 5×10^3 顆細胞/孔的密度接種在 96 孔盤。培養 1 天後，將原本的培養基更換為含有不同濃度 N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO: 50)(2、0.4、0.08、0.016 及 0.0032 U/ml)的培養基，並在第 3 天(N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO: 50)處理後 3 天)進行 MTT 試驗確定 IC₅₀ 值。將培養基更換為 MTT 溶液(1 mg/ml) (Invitrogen)並且在 37 °C 培養 4 小時。培養後，去除 MTT 溶液並加入二甲基亞砷(DMSO)，以波長 650 nm 為參考測量 570 nm 的吸光值。細胞存活率為 N-ABD094-rhArg 處理的細胞的吸光值除以未處理的細胞的平均吸光值。透過 Prism 6.0 軟體分析 N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO: 50)對癌細胞株的 IC₅₀ 值(95%信賴區間)。每種細胞株進行三次獨立實驗(n=3)，結果如表 17 所示。

【0429】 表 17、使用 N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO: 50)進行單一藥物實驗；藥物：N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO: 50)；細胞株：HCT116

藥物濃度(U/mL)	0	0.0032	0.016	0.08	0.4	2
平均細胞存活率(%)	1	0.938	0.950	0.608	0.452	0.419
SEM	0	0.042	0.116	0.086	0.051	0.046

【0430】 細胞株：LOVO

藥物濃度(U/mL)	0	0.0032	0.016	0.08	0.4	2
平均細胞存活率(%)	1	0.922	0.848	0.566	0.432	0.392
SEM	0	0.048	0.037	0.075	0.040	0.038

【0431】 細胞株：HT29

藥物濃度(U/mL)	0	0.0032	0.016	0.08	0.4	2
平均細胞存活率(%)	1	0.962	0.853	0.521	0.423	0.383
SEM	0	0.070	0.084	0.016	0.009	0.029

【0432】 本試驗所測試的大腸癌細胞株在體外皆對 N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO: 50)融合酵素非常敏感，IC₅₀ 值介於 0.22 至 0.58 U/ml 之間。HCT116 係最敏感的腫瘤，IC₅₀ 為 0.22 U/ml。LOVO 及 HT29 的 IC₅₀ 值分別為 0.38 U/ml 及 0.58 U/ml。

【0433】 實施例 42：N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO: 50)與氯奎的併用對人類大腸癌細胞株的細胞毒殺性產生協同作用

【0434】 細胞自噬抑制劑氯奎(CQ)的 IC₅₀ 值透過下述方法確定：分別接種大腸癌細胞株 HCT116、LOVO 及 HT29，培養 1 天後，將培養基更換為含有不同濃度 CQ(100、20、4、0.8、0.16 μM)的培養基，並在第 3 天進行 MTT 試驗。每種細胞株進行三次獨立實驗(n=3)，實驗結果如表 18 所示。

【0435】 表 18、使用 CQ 進行單一藥物實驗；藥物：氯奎(CQ)；細胞株：HCT116

藥物濃度(U/mL)	0	0.16	0.8	4	20	100
------------	---	------	-----	---	----	-----

平均細胞存活率(%)	1	0.981	0.967	0.921	0.897	0.874
SEM	0	0.032	0.037	0.059	0.033	0.027

【0436】 細胞株：LOVO

藥物濃度(U/mL)	0	0.16	0.8	4	20	100
平均細胞存活率(%)	1	0.973	0.921	0.759	0.495	0.060
SEM	0	0.029	0.017	0.027	0.018	0.002

【0437】 細胞株：HT29

藥物濃度(U/mL)	0	0.16	0.8	4	20	100
平均細胞存活率(%)	1	1.057	1.009	0.983	1.018	0.037
SEM	0	0.079	0.071	0.083	0.073	0.006

【0438】 CQ 對 HCT116、LOVO 及 HT29 的 IC₅₀ 值分別為大於 100 μM、15 μM 及 71 μM。以非恆定比率分析進行藥物併用試驗(Hastak et al., 2010, Cancer Res. 70(20):7970-7980)。接種大腸癌細胞，並在培養 1 天後，將培養基更換為含有不同濃度 N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO: 50) (2、0.4、0.08、0.016、0.0032 U/ml)且併用固定量(根據其 IC₅₀)CQ 的培養基。在第 3 天進行 MTT 試驗。透過 CalcuSyn 2.1 版軟體分析併用 N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO: 50)與 CQ 處理的合併指數(CI)。每種細胞株進行三次獨立實驗(n=3)，實驗結果如表 19 所示。

【0439】 表 19、藥物併用實驗(藥物 1 加藥物 2)；藥物 1：N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO: 50)；藥物 2：氯奎(CQ) (固定濃度 20 μM)；細胞株：HCT116

藥物 1 濃度(U/mL)	0	0.0032	0.016	0.08	0.4	2
平均細胞存活率(%)	1	0.951	0.885	0.476	0.273	0.231
SEM	0	0.024	0.027	0.008	0.008	0.006

【0440】 細胞株：LOVO

藥物 1 濃度(U/mL)	0	0.0032	0.016	0.08	0.4	2
平均細胞存活率(%)	1	0.555	0.542	0.211	0.186	0.177
SEM	0	0.008	0.008	0.002	0.010	0.005

【0441】 細胞株：HT29

藥物 1 濃度(U/mL)	0	0.0032	0.016	0.08	0.4	2
平均細胞存活率(%)	1	0.979	0.983	0.480	0.369	0.367
SEM	0	0.035	0.054	0.036	0.027	0.023

【0442】 實驗結果顯示當濃度 0.08 或 0.4 U/ml 的 N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO: 50)與 20 μ M 的 CQ 併用，在 3 種大腸癌細胞株的 CI 值均小於 1.0。此顯示 N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO: 50)單獨具有活性，並且與 CQ 併用下產生協同作用。綜合上述，在人類大腸癌細胞中，細胞自噬抑制劑氯奎(CQ)增強 N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO: 50)融合蛋白所誘導之細胞死亡的效果。

【0443】 實施例 43：N-ABD-rhArg (SEQ ID NO: 49)與聚乙二醇化的 His-rhArg (SEQ ID NO: 101)皆在體內抑制侵襲性乳癌細胞的生長及轉移

【0444】 使用母裸鼠(5~6 週齡)進行另一項 4T1 乳癌同種異體移植

的研究。五隻裸鼠為一籠飼養，並任食提供食物與水。將 4T1 乳癌細胞(1×10^5)以皮下注射到裸鼠右側腹部。接種後 11 天，當腫瘤平均長度為 8 mm 時，將裸鼠隨機分為四組，分別為一組對照組($n = 8$)，與三組實驗組包含 500U 聚乙二醇化的 His-rhArg (SEQ ID NO: 101) ($n = 8$)、500U N-ABD-rhArg (SEQ ID NO: 49) ($n = 6$)及 250U N-ABD-rhArg (SEQ ID NO: 49) ($n = 8$)。對照組的裸鼠每週注射 1X PBS。500U ABD-rhArg 組及 250U ABD-rhArg 組的裸鼠，每週分別注射一次 500U 及 250U 的 ABD-rhArg；另一組每週注射一次 500U 的 PEG-rhArg。由於注射 PBS 的對照組中腫瘤壞死，因此於接種 24 天後(即開始進行實驗 14 天後)犧牲。犧牲後，解剖裸鼠。從裸鼠身上收集腫瘤並測量腫瘤重量，同時亦收集肺臟並以 1X PBS 清洗。將肺臟置於 Bouin 溶液中固定過夜，在固定後以 1X PBS 清洗，並計算肺部轉移結節的數量。

【0445】 實驗結果如圖 68 所示，500U 的 ABD-rhArg 及 500U 的 PEG-rhArg 皆顯著抑制 4T1 實質固態瘤的生長。然而，較低劑量 250U 的 ABD-rhArg 並無法抑制腫瘤生長。此結果亦與不同組別腫瘤重量的變化相符(圖 69)。因此，ABD-rhArg 以劑量依賴性的方式抑制腫瘤生長。重要的是，此實驗結果清楚地顯示精胺酸貧乏(透過 ABD-rhArg 或 PEG-rhArg)可抑制或降低腫瘤轉移至肺部(圖 70A 及圖 70B)。相較於對照組，500U PEG-rhArg 組與 500U ABD-rhArg 組肺部轉移結節的數量均顯著減少。以蘇木精與伊紅(H&E)染色的肺組織切片顯示結節係由一系列緻密的乳癌細胞所形成，此結果表明結節係轉移的病灶。綜合上述，透過長效精胺酸酶消耗精胺酸，在動物模型中可抑制侵襲性癌細胞的轉移。由於癌症轉移係

病患死亡的主要原因(Knott et al., 2018, Nature, 554:378-381)，此一發現可能為更有效的癌症療法開闢新的可能性。

【符號說明】

【0446】 無

序列表

- <110> 香港理工大學(The Hong Kong Polytechnic University)
香港中文大學(Chinese University of Hong Kong)
- <120> 一種用於癌症、肥胖、代謝失調、及相關併發症與合併症之精胺酸消耗劑的組成物及用途
- <130> P10866PCT00
- <140> TW 108138739
- <141> 2019-10-25
- <150> PCT/CN2019/089583
- <151> 2019-05-31
- <160> 106
- <170> PatentIn version 3.5
- <210> 1
- <211> 50
- <212> DNA
- <213> 人工序列

<220>

<223> ABD 引子 1, 於實驗室合成

<400> 1

ggagatggac atatgcatca tcaccatcac catgatgaag ccgtggatgc 50

<210> 2

<211> 50

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> ABD 引子 2, 於實驗室合成

<400> 2

gctaagactt tagcttcagc taaggaattc gcatccacgg cttcatcatg 50

<210> 3

<211> 50

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> ABD 引子 3, 於實驗室合成

<400> 3

ccttagctga agctaaagtc ttagctaaca gagaacttga caaatatgga 50

<210> 4

<211> 50

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> ABD 引子 4, 於實驗室合成

<400> 4

taggttcttg taatagtcac ttactccata ttgtcaagt tctctgtag 50

<210> 5

<211> 50

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> ABD 引子 5, 於實驗室合成

<400> 5
ggagtaagtg actattacaa gaacctaatc aacaatgcca aaactgttga 50

<210> 6
<211> 50
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> ABD 引子 6, 於實驗室合成

<400> 6
aaatttcacg tatcagtgtt ttacacctt caacagtttt ggcattgttg 50

<210> 7
<211> 50
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> ABD 引子 7, 於實驗室合成

<400> 7
gtaaaagcac tgatagatga aatttttagct gcattacctt cgggtagtaa 50

<210> 8

<211> 50

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> ABD 引子 8, 於實驗室合成

<400> 8

tccgccgcta ccattgttat tattgttggtt actacccgaa ggtaatgcag 50

<210> 9

<211> 47

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> ABD 引子 9, 於實驗室合成

<400> 9

gatcttaagc atatgcatca tcaccatcac catgatgaag cggtgga 47

<210> 10

<211> 47

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> ABD 引子 10, 於實驗室合成

<400> 10

gcttctttcg cttccgccag gctgttcgca tccaccgctt catcatg 47

<210> 11

<211> 50

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> ABD 引子 11, 於實驗室合成

<400> 11

gcggaagcga aagaagcggc gaacgcgga ctggatagct atggcgtgag 50

<210> 12

<211> 50

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> ABD 引子 12, 於實驗室合成

<400> 12

ttatcaatca ggcgtttata aaaatcgctc acgcatagc tatccagttc 50

<210> 13

<211> 50

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> ABD 引子 13, 於實驗室合成

<400> 13

gatttttata aacgcctgat tgataaagcg aaaaccgtgg aaggcgtgga 50

<210> 14

<211> 51

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> ABD 引子 14, 於實驗室合成

<400> 14

cggcagcgcc gccagaatcg catctttcag cgcttcacag ccttcacgg t 51

<210> 15

<211> 50

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> ABD 引子 15, 於實驗室合成

<400> 15

ttctggcggc gctgccgtcg ggtagtaaca acaataataa caatggtagc 50

<210> 16

<211> 39

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> ABD 引子 16, 於實驗室合成

<400> 16

ggatccgccg ctaccattgt tattattgtt gttactacc 39

<210> 17

<211> 50

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> ABD 引子 17, 於實驗室合成

<400> 17

catatgtag ctgatggatc cagtaacaac aataataaca atggtagcgg 50

<210> 18

<211> 50

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> ABD 引子 18, 於實驗室合成

<400> 18
aattcgcatc cacggcttca tcaccgccgc taccattgtt attattgttg 50

<210> 19
<211> 50
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> ABD 引子 19, 於實驗室合成

<400> 19
gaagccgtgg atgcgaattc cttagctgaa gctaaagtct tagctaacag 50

<210> 20
<211> 50
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> ABD 引子 20, 於實驗室合成

<400> 20
cttactccat atttgtcaag ttctctgtta gctaagactt tagcttcagc 50

<210> 21

<211> 50

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> ABD 引子 21, 於實驗室合成

<400> 21

gagaacttga caaatatgga gtaagtgact attacaagaa cctaatcaac 50

<210> 22

<211> 50

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> ABD 引子 22, 於實驗室合成

<400> 22

tacaccttca acagttttgg cattgttgat taggttcttg taatagtcac 50

<210> 23

<211> 50

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> ABD 引子 23, 於實驗室合成

<400> 23

gccaaaactg ttgaagggtgt aaaagcactg atagatgaaa ttttagctgc 50

<210> 24

<211> 50

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> ABD 引子 24, 於實驗室合成

<400> 24

atgggtgatgg tgatgatgag gtaatgcagc taaaatttca tctatcagtg 50

<210> 25

<211> 50

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> ABD 引子 25, 於實驗室合成

<400> 25

catatgttat gcgatggatc cagtaacaac aataataaca atggtagcgg 50

<210> 26

<211> 50

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> ABD 引子 26, 於實驗室合成

<400> 26

tgttcgcate caccgcttca tcaccgccgc taccattgtt attattgttg 50

<210> 27

<211> 50

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> ABD 引子 27, 於實驗室合成

<400> 27

gaagcgggtgg atgcgaacag cctggcgga gcgaaagaag cggcgaacgc 50

<210> 28

<211> 50

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> ABD 引子 28, 於實驗室合成

<400> 28

aaaatcgctc acgcatagc tatccagttc cgcgttcgcc gcttctttcg 50

<210> 29

<211> 50

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> ABD 引子 29, 於實驗室合成

<400> 29
ctatggcgtg agcgattttt ataaacgcct gattgataaa gcgaaaaccg 50

<210> 30

<211> 50

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> ABD 引子 30, 於實驗室合成

<400> 30
tcgcatcttt cagcgcttcc acgccttcca cggttttcgc tttatcaatc 50

<210> 31

<211> 50

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> ABD 引子 31, 於實驗室合成

<400> 31

gaagcgctga aagatgcgat tctggcggcg ctgccgcac atcaccatca 50

<210> 32

<211> 35

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> ABD 引子 32, 於實驗室合成

<400> 32

ctaaaagctt aatggtgatg gtgatgatgc ggcag 35

<210> 33

<211> 222

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> His-ABD-連接子, 於實驗室合成

<400> 33

atgcatcatc accatcacca tgatgaagcc gtggatgcga attccttagc tgaagctaaa 60

gtcttagcta acagagaact tgacaaatat ggagtaagtg actattacaa gaacctaatc 120
aacaatgcc aactgttga aggtgtaaaa gactgatag atgaaatttt agctgcatta 180
ccttcgggta gtaacaacaa taataacaat ggtagcggcg ga 222

<210> 34

<211> 222

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> His-ABD094-連接子，於實驗室合成

<400> 34

atgcatcatc accatcacca tgatgaagcg gtggatgcga acagcctggc ggaagcgaaa 60
gaagcggcga acgcggaact ggatagctat ggcgtgagcg atttttataa acgcctgatt 120
gataaagcga aaaccgtgga aggcgtggaa gcgctgaaag atgcgattct ggcggcgctg 180
ccgtcgggta gtaacaacaa taataacaat ggtagcggcg ga 222

<210> 35

<211> 222

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 連接子-ABD-His, 於實驗室合成

<400> 35

ggatccagta acaacaataa taacaatggt agcggcggtg atgaagccgt ggatgcgaat 60
tccttagctg aagctaaagt cttagctaac agagaacttg acaaatatgg agtaagtgac 120
tattacaaga acctaataca caatgccaaa actgttgaag gtgtaaaagc actgatagat 180
gaaatttttag ctgcattacc tcatcatcac catcaccatt aa 222

<210> 36

<211> 222

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 連接子-ABD094-His, 於實驗室合成

<400> 36

ggatccagta acaacaataa taacaatggt agcggcggtg atgaagccgt ggatgcgaac 60
agcctggcgg aagcgaaaga agcggcgaac gcggaactgg atagctatgg cgtgagcgat 120
ttttataaac gcctgattga taaagcgaaa accgtggaag gcgtggaagc gctgaaagat 180
gcgattctgg cggcgctgcc gcatcatcac catcaccatt aa 222

<210> 37

<211> 1191

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> N-ABD-rhArg 基因，於實驗室合成

<400> 37

atgcatcacc accatcacca tgatgaagcc gtggatgcga attccttagc tgaagctaaa	60
gtcttagcta acagagaact tgacaaatat ggagtaagtg actattacaa gaacctaatc	120
aacaatgcc aactgttga aggtgtaaaa gcactgatag atgaaatttt agctgcatta	180
ccttcgggta gtaacaacaa taataacaat ggtagcggcg gaatgtccgc caagtccaga	240
accataggga ttattggagc tcctttctca aaggacagc cagcaggagg ggtggaagaa	300
ggccctacag tattgagaaa ggctggctcg cttgagaaac ttaaagaaca agagtgtgat	360
gtgaaggatt atggggacct gccctttgct gacatcccta atgacagtcc ctttcaaatt	420
gtgaagaatc caaggtctgt gggaaaagca agcagcagc tggctggcaa ggtggcagaa	480
gtcaagaaga acggaagaat cagcctgggtg ctgggcggag accacagttt ggcaattgga	540
agcatctctg gccatgccag ggtccaccct gatcttgag tcctctgggt ggatgctcac	600
actgatatac aactccact gacaaccaca agtggaaact tgcattggac acctgtatct	660
ttcctctga aggaactaaa aggaagatt ccgatgtgc caggattctc ctgggtgact	720
ccctgtatat ctgccaagga tattgtgtat attggcttga gagacgtgga ccctggggaa	780
cactacattt tgaaaactct aggcattaaa tacttttcaa tgactgaagt ggacagacta	840
ggaattggca aggtgatgga agaaacactc agctatctac taggaagaaa gaaaaggcca	900
attcatctaa gttttgatgt tgacggactg gacctctt tcacaccagc tactggcaca	960
ccagtcgtgg gaggtctgac atacagagaa ggtctctaca tcacagaaga aatctacaaa	1020

acagggctac tctcaggatt agatataatg gaagtgaacc catccctggg gaagacacca 1080
gaagaagtaa ctcgacagct gaacacagca gttgcaataa ccttggcttg tttcggactt 1140
gctcgggagg gtaatcacao gcctattgac taccttaacc cacctaagta a 1191

<210> 38

<211> 1191

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> N-ABD094-rhArg 基因，於實驗室合成

<400> 38

atgcatcatc accatcacca tgatgaagcg gtggatgcga acagcctggc ggaagcgaaa 60
gaagcggcga acgcggaact ggatagctat ggcgtgagcg atttttataa acgcctgatt 120
gataaagcga aaaccgtgga aggcgtggaa gcgctgaaag atgcgattct ggcggcgctg 180
ccgtcgggta gtaacaacaa taataacaat ggtagcggcg gaatgtccgc caagtccaga 240
accataggga ttattggagc tccttttctca aaggacagc cacgaggagg ggtggaagaa 300
ggccctacag tattgagaaa ggctggtctg cttgagaaac ttaaagaaca agagtgtgat 360
gtgaaggatt atggggacct gccctttgct gacatcccta atgacagtcc ctttcaaatt 420
gtgaagaatc caaggtctgt gggaaaagca agcgagcagc tggctggcaa ggtggcagaa 480
gtcaagaaga acggaagaat cagcctggtg ctgggcggag accacagttt ggcaattgga 540
agcatctctg gccatgccag ggtccaccct gatcttgag tcatctgggt ggatgctcac 600
actgatatca aactccact gacaaccaca agtggaaact tgcattggaca acctgtatct 660

ttctctctga aggaactaaa aggaaagatt cccgatgtgc caggattctc ctgggtgact 720
ccctgtatat ctgccaagga tattgtgtat attggcttga gagacgtgga ccctggggaa 780
cactacattt tgaaaactct aggcattaaa tacttttcaa tgactgaagt ggacagacta 840
ggaattggca aggtgatgga agaaacactc agctatctac taggaagaaa gaaaaggcca 900
attcatctaa gttttgatgt tgacggactg gacctatctt tcacaccagc tactggcaca 960
ccagtcgtgg gaggtctgac atacagagaa ggtctctaca tcacagaaga aatctacaaa 1020
acagggctac tctcaggatt agatataatg gaagtgaacc catccctggg gaagacacca 1080
gaagaagtaa ctggaacagt gaacacagca gttgcaataa ccttggcttg tttcggactt 1140
gctcgggagg gtaatcaciaa gcctattgac taccttaacc cacctaagta a 1191

<210> 39

<211> 1188

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> C-ABD-rhArg 基因，於實驗室合成

<400> 39

atgagcgcca agtccagaac catagggatt attggagctc ctttctcaaa gggacagcca 60
cgaggagggg tggaagaagg ccctacagta ttgagaaagg ctggtctgct tgagaaactt 120
aaagaacaag agtgtgatgt gaaggattat ggggacctgc cttttgctga catccctaatt 180
gacagtccct ttcaaattgt gaagaatcca aggtctgttg gaaaagcaag cgagcagctg 240
gctggcaagg tggcagaagt caagaagaac ggaagaatca gcctggtgct gggcggagac 300

cacagtttgg caattggaag catctctggc catgccaggg tccaccctga tcttggagtc	360
atctgggttg atgctcacac tgatatcaac actccactga caaccacaag tggaaacttg	420
catggacaac ctgtatcttt cctcctgaag gaactaaaag gaaagattcc cgatgtgcca	480
ggattctcct gggtgactcc ctgtatatct gccaaaggata ttgtgtatat tggcttgaga	540
gacgtggacc ctggggaaca ctacattttg aaaactctag gcattaaata cttttcaatg	600
actgaagtgg acagactagg aattggcaag gtgatggaag aaacactcag ctatctacta	660
ggaagaaaga aaaggccaat tcctctaagt tttgatgttg acggactgga cccatctttc	720
acaccagcta ctggcacacc agtcgtggga ggtctgacat acagagaagg tctctacatc	780
acagaagaaa tctacaaaac agggctactc tcaggattag atataatgga agtgaaccca	840
tccctgggga agacaccaga agaagtaact cgaacagtga acacagcagt tgcaataacc	900
ttggcttggt tcggacttgc tcgggagggt aatcacaagc ctattgacta ccttaaccca	960
cctaagggat ccagtaacaa caataataac aatggtagcg gcggtgatga agccgtggat	1020
gcgaattcct tagctgaagc taaagtctta gctaacagag aacttgacaa atatggagta	1080
agtgactatt acaagaacct aatcaacaat gccaaaactg ttgaagggtg aaaagcactg	1140
atagatgaaa ttttagctgc attacctcat catcaccatc accattaa	1188

<210> 40

<211> 1188

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> C-ABD094-rhArg 基因，於實驗室合成

<400> 40

atgagcgcca agtccagaac catagggatt attggagctc ctttctcaaa gggacagecca	60
cgaggagggg tggaagaagg ccctacagta ttgagaaagg ctggtctgct tgagaaactt	120
aaagaacaag agtgtgatgt gaaggattat ggggacctgc cttttgctga catccctaata	180
gacagtcctt ttcaaattgt gaagaatcca aggtctgtgg gaaaagcaag cgagcagctg	240
gctggcaagg tggcagaagt caagaagaac ggaagaatca gcctggtgct gggcggagac	300
cacagtttgg caattggaag catctctggc catgccaggg tccacctga tcttgagtc	360
atctgggtgg atgtcacac tgatatcaac actccactga caaccacaag tggaaacttg	420
catggacaac ctgtatcttt cctcctgaag gaactaaaag gaaagattcc cgatgtgcca	480
ggattctcct ggggtactcc ctgtatatct gccaaaggata ttgtgtatat tggcttgaga	540
gacgtggacc ctggggaaca ctacattttg aaaactctag gcattaaata cttttcaatg	600
actgaagtgg acagactagg aattggcaag gtgatggaag aaacactcag ctatctacta	660
ggaagaaaga aaaggccaat tcatctaagt tttgatgttg acggactgga cccatctttc	720
acaccagcta ctggcacacc agtcgtggga ggtctgacat acagagaagg tctctacatc	780
acagaagaaa tctacaaaac agggctactc tcaggattag atataatgga agtgaaccca	840
tccttgggga agacaccaga agaagtaact cgaacagtga acacagcagt tgcaataacc	900
ttggcttggt tcggacttgc tcgggagggt aatcacaagc ctattgacta ccttaaccca	960
cctaagggat ccagtaacaa caataataac aatggtagcg gcggtgatga agcgggtgat	1020
gcgaacagcc tggcggaagc gaaagaagcg gcgaacgcgg aactggatag ctatggcgtg	1080
agcgatTTTT ataaacgcct gattgataaa gcgaaaaccg tggaaggcgt ggaagcgtg	1140
aaagatgcga ttctggcggc gctgccgat catcaccatc accattaa	1188

<210> 41

<211> 1125

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> N-ABD-BCA 基因，於實驗室合成

<400> 41

atgcatcatc accatcacca tgatgaagcc gtggatgcga attccttagc tgaagctaaa	60
gtcttagcta acagagaact tgacaaatat ggagtaagtg actattacaa gaacctaatc	120
aacaatgcc aactgttga aggtgtaaaa gcactgatag atgaaatfff agctgcatta	180
ccttcgggta gtaacaacaa taataacaat ggtagcggcg gatccatgaa gccaatttca	240
attatcgggg ttccgatgga tttagggcag acacgccgcg gcgttgatat ggggccgagc	300
gcaatgcgtt atgcaggcgt catcgaacgt ctggaacgtc ttcattacga tattgaagat	360
ttgggagata ttccgattgg aaaagcagag cggttgcacg agcaaggaga ttcacggttg	420
cgcaatttga aagcggttgc ggaagcgaac gagaaacttg cggcggcggg tgaccaagtc	480
gttcagcggg ggcgatttcc gcttgtgttg ggcggcgacc atagcatcgc cattggcacg	540
ctcgccgggg tggcgaaaca ttatgagcgg cttggagtga tctggtatga cgcgcattgc	600
gacgtcaaca ccgcggaaac gtcgccgtct gaaacattc atggcatgcc gctggcggcg	660
agcctcgggt ttggccatcc ggcgctgacg caaatcggcg gatacagccc caaaatcaag	720
ccggaacatg tcgtgttgat cggcgtccgt tcccttgatg aaggggagaa gaagttttatt	780
cgcgaaaaag gaatcaaaat ttacacgatg catgaggttg atcggctcgg aatgacaagg	840
gtgatggaag aaacgatcgc ctatttaaaa gaacgaacgg atggcgttca tttgtcgtt	900
gacttgatg gccttgacct aagcgacgca ccgggagtcg gaacgcctgt cattggagga	960
ttgacatacc gcgaaagcca tttggcgatg gagatgctgg ccgaggcaca aatcatcact	1020

tcagcggaat ttgtcgaagt gaacccgata ttggatgagc ggaacaaaac agcatcagtg 1080
gctgtagcgc tgatggggtc gttgtttggt gaaaaactca tgtaa 1125

<210> 42

<211> 1125

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> N-ABD094-BCA 基因，於實驗室合成

<400> 42

atgcatcacc accatcacca tgatgaagcg gtggatgcga acagcctggc ggaagcgaaa 60
gaagcggcga acgcggaact ggatagctat ggcgtgagcg atttttataa acgcctgatt 120
gataaagcga aaaccgtgga aggcgtggaa gcgctgaaag atgcgattct ggcggcgctg 180
ccgtcgggta gtaacaacaa taataacaat ggtagcggcg gatccatgaa gccaatttca 240
attatcgggg ttccgatgga tttaggcag acacgccgcg gcgttgatat ggggccgagc 300
gcaatgcgtt atgcaggcgt catcgaacgt ctggaacgtc ttcattacga tattgaagat 360
ttgggagata ttccgattgg aaaagcagag cggttgacag agcaaggaga ttcacggttg 420
cgcaatttga aagcggttgc ggaagcgaac gagaaacttg cggcggcggt tgaccaagtc 480
gttcagcggg ggcgatttcc gcttgtgttg ggcggcgacc atagcatcgc cattggcacg 540
ctcgccgggg tggcgaaaca ttatgagcgg cttggagtga tctggtatga cgcgcatggc 600
gacgtcaaca ccgcggaaac gtcgccgtct ggaaacattc atggcatgcc gctggcggcg 660
agcctcgggt ttggccatcc ggcgctgacg caaatcggcg gatacagccc caaaatcaag 720

ccggaacatg tcgtgttgat cggcgtccgt tcccttgatg aaggggagaa gaagtttatt 780
cgcgaaaaag gaatcaaaat ttacacgatg catgaggttg atcggctcgg aatgacaagg 840
gtgatggaag aaacgatcgc ctatttaaaa gaacgaacgg atggcgttca tttgtcgctt 900
gacttgatg gccttgaccc aagcgacgca ccgggagtcg gaacgcctgt cattggagga 960
ttgacatacc gcgaaagcca tttggcgatg gagatgctgg ccgaggcaca aatcatcact 1020
tcagcggaat ttgtcgaagt gaacccgatc ttggatgagc ggaacaaaac agcatcagtg 1080
gctgtagcgc tgatggggtc gttgttttgt gaaaaactca tgtaa 1125

<210> 43

<211> 1119

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> C-ABD-BCA 基因, 於實驗室合成

<400> 43

atgaagccaa tttcaattat cggggttccg atggatttag ggcagacacg ccgcggcgtt 60
gatatggggc cgagcgcaat gcgttatgca ggcgtcatcg aacgtctgga acgtcttcat 120
tacgatattg aagatttggg agatattccg attggaaaag cagagcggtt gcacgagcaa 180
ggagattcac ggttgcgcaa tttgaaagcg gttgcggaag cgaacgagaa acttgcggcg 240
gcggttgacc aagtcgttca gcgggggcga tttccgcttg tgttgggcgg cgaccatagc 300
atcgccattg gcacgctcgc cggggtggcg aaacattatg agcggttgg agtgatctgg 360
tatgacgcgc atggcgacgt caacaccgcg gaaacgtcgc cgtctggaac cattcatggc 420

atgccgctgg cggcgagcct cgggtttggc catccggcgc tgacgcaaat cggcggatac 480
agccccaaaa tcaagccgga acatgtcgtg ttgatcggcg tccgttcctt tgatgaaggg 540
gagaagaagt ttatttcgca aaaaggaatc aaaatttaca cgatgcatga ggttgatcgg 600
ctcggaatga caagggtgat ggaagaaacg atgcctatt taaaagaacg aacggatggc 660
gttcatttgt cgcttgactt ggatggcctt gacccaagcg acgcaccggg agtcggaacg 720
cctgtcattg gaggattgac ataccgcgaa agccatttgg cgatggagat gctggccgag 780
gcacaaatca tcacttcagc ggaatttgtc gaagtgaacc cgatcttgga tgagcggaac 840
aaaacagcat cagtggctgt agcgtgatg gggtcgttgt ttggtgaaaa actcatggga 900
tccagtaaca acaataataa caatggtagc ggcggtgatg aagccgtgga tgcgaattcc 960
ttagctgaag ctaaagtctt agctaacaga gaacttgaca aatatggagt aagtgactat 1020
tacaagaacc taatcaacaa tgccaaaact gttgaagggtg taaaagcact gatagatgaa 1080
attttagctg cattacctca tcatcaccat caccattaa 1119

<210> 44

<211> 1119

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> C-ABD094-BCA 基因，於實驗室合成

<400> 44

atgaagccaa tttaattat cggggttccg atggatttag ggcagacacg ccgcggcggtt 60
gatatggggc cgagcgcaat gcgttatgca ggcgtcatcg aacgtctgga acgtcttcat 120

tacgatattg aagatttggg agatattccg attggaaaag cagagcggtt gcacgagcaa 180
ggagattcac ggttgcgcaa tttgaaagcg gttgcggaag cgaacgagaa acttgcggcg 240
gcggttgacc aagtcgttca gcgggggcga tttccgcttg tgttgggcgg cgaccatagc 300
atcgccattg gcacgctcgc cggggtggcg aaacattatg agcggcttgg agtgatctgg 360
tatgacgcgc atggcgacgt caacaccgcg gaaacgtcgc cgtctggaac cattcatggc 420
atgccgctgg cggcgagcct cgggtttggc catccggcgc tgacgcaaat cggcggatac 480
agccccaaaa tcaagccgga acatgtcgtg ttgatcggcg tccgttccct tgatgaaggg 540
gagaagaagt ttattcgcga aaaaggaatc aaaatttaca cgatgcatga ggttgatcgg 600
ctcggaatga caagggtagt ggaagaaacg atcgcttatt taaaagaacg aacggatggc 660
gttcatttgt cgttgactt ggatggcctt gacccaagcg acgcaccggg agtcggaacg 720
cctgtcattg gaggattgac ataccgcgaa agccatttgg cgatggagat gctggccgag 780
gcacaaatca tcacttcagc ggaatttgtc gaagtgaacc cgatcttgga tgagcggaac 840
aaaacagcat cagtggctgt agcgctgatg gggtcgttgt ttggtgaaaa actcatggga 900
tccagtaaca acaataataa caatggtagc ggcggtgatg aagcgggtgga tgcgaacagc 960
ctggcggaag cgaaagaagc ggcgaacgcg gaactggata gctatggcgt gagcgatttt 1020
tataaacgcc tgattgataa agcgaaaacc gtggaaggcg tggaagcgct gaaagatgcg 1080
attctggcgg cgctgccgca tcatcaccat caccattaa 1119

- <210> 45
- <211> 74
- <212> PRT
- <213> 人工序列

<220>

〈223〉 His-ABD-連接子，於實驗室合成

<400> 45

Met His His His His His His Asp Glu Ala Val Asp Ala Asn Ser Leu

1 5 10 15

Ala Glu Ala Lys Val Leu Ala Asn Arg Glu Leu Asp Lys Tyr Gly Val

20 25 30

Ser Asp Tyr Tyr Lys Asn Leu Ile Asn Asn Ala Lys Thr Val Glu Gly

35 40 45

Val Lys Ala Leu Ile Asp Glu Ile Leu Ala Ala Leu Pro Ser Gly Ser

50 55 60

Asn Asn Asn Asn Asn Asn Gly Ser Gly Gly

65 70

<210> 46

<211> 74

<212> PRT

〈213〉 人工序列

 $\langle 220 \rangle$

〈223〉 His-ABD094-連接子，於實驗室合成

<400> 46

I804691

Met His His His His His His Asp Glu Ala Val Asp Ala Asn Ser Leu

1 5 10 15

Ala Glu Ala Lys Glu Ala Ala Asn Ala Glu Leu Asp Ser Tyr Gly Val

20 25 30

Ser Asp Phe Tyr Lys Arg Leu Ile Asp Lys Ala Lys Thr Val Glu Gly

35 40 45

Val Glu Ala Leu Lys Asp Ala Ile Leu Ala Ala Leu Pro Ser Gly Ser

50 55 60

Asn Asn Asn Asn Asn Asn Gly Ser Gly Gly

65 70

<210> 47

<211> 73

<212> PRT

〈213〉 人工序列

<220>

〈223〉 連接子-ABD-His, 於實驗室合成

<400> 47

Gly Ser Ser Asn Asn Asn Asn Asn Asn Gly Ser Gly Gly Asp Glu Ala

1 5 10 15

30

H00023-P01

Val Asp Ala Asn Ser Leu Ala Glu Ala Lys Val Leu Ala Asn Arg Glu
20 25 30
Leu Asp Lys Tyr Gly Val Ser Asp Tyr Tyr Lys Asn Leu Ile Asn Asn
35 40 45
Ala Lys Thr Val Glu Gly Val Lys Ala Leu Ile Asp Glu Ile Leu Ala
50 55 60
Ala Leu Pro His His His His His His
65 70

<210> 48

<211> 73

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 連接子-ABD094-His, 於實驗室合成

<400> 48

Gly Ser Ser Asn Asn Asn Asn Asn Asn Gly Ser Gly Gly Asp Glu Ala
1 5 10 15
Val Asp Ala Asn Ser Leu Ala Glu Ala Lys Glu Ala Ala Asn Ala Glu
20 25 30
Leu Asp Ser Tyr Gly Val Ser Asp Phe Tyr Lys Arg Leu Ile Asp Lys

35 40 45
Ala Lys Thr Val Glu Gly Val Glu Ala Leu Lys Asp Ala Ile Leu Ala
50 55 60
Ala Leu Pro His His His His His His
65 70

<210> 49

<211> 396

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> N-ABD-rhArg, 於實驗室合成

<400> 49

Met His His His His His His Asp Glu Ala Val Asp Ala Asn Ser Leu
1 5 10 15
Ala Glu Ala Lys Val Leu Ala Asn Arg Glu Leu Asp Lys Tyr Gly Val
20 25 30
Ser Asp Tyr Tyr Lys Asn Leu Ile Asn Asn Ala Lys Thr Val Glu Gly
35 40 45
Val Lys Ala Leu Ile Asp Glu Ile Leu Ala Ala Leu Pro Ser Gly Ser
50 55 60

1

Asp Pro Gly Glu His Tyr Ile Leu Lys Thr Leu Gly Ile Lys Tyr Phe
260 265 270
Ser Met Thr Glu Val Asp Arg Leu Gly Ile Gly Lys Val Met Glu Glu
275 280 285
Thr Leu Ser Tyr Leu Leu Gly Arg Lys Lys Arg Pro Ile His Leu Ser
290 295 300
Phe Asp Val Asp Gly Leu Asp Pro Ser Phe Thr Pro Ala Thr Gly Thr
305 310 315 320
Pro Val Val Gly Gly Leu Thr Tyr Arg Glu Gly Leu Tyr Ile Thr Glu
325 330 335
Glu Ile Tyr Lys Thr Gly Leu Leu Ser Gly Leu Asp Ile Met Glu Val
340 345 350
Asn Pro Ser Leu Gly Lys Thr Pro Glu Glu Val Thr Arg Thr Val Asn
355 360 365
Thr Ala Val Ala Ile Thr Leu Ala Cys Phe Gly Leu Ala Arg Glu Gly
370 375 380
Asn His Lys Pro Ile Asp Tyr Leu Asn Pro Pro Lys
385 390 395

<210> 50

<211> 396

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> N-ABD094-rhArg, 於實驗室合成

<400> 50

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

145						150						155						160
Val	Lys	Lys	Asn	Gly	Arg	Ile	Ser	Leu	Val	Leu	Gly	Gly	Asp	His	Ser			
					165						170						175	
Leu	Ala	Ile	Gly	Ser	Ile	Ser	Gly	His	Ala	Arg	Val	His	Pro	Asp	Leu			
					180						185						190	
Gly	Val	Ile	Trp	Val	Asp	Ala	His	Thr	Asp	Ile	Asn	Thr	Pro	Leu	Thr			
					195						200						205	
Thr	Thr	Ser	Gly	Asn	Leu	His	Gly	Gln	Pro	Val	Ser	Phe	Leu	Leu	Lys			
					210						215						220	
Glu	Leu	Lys	Gly	Lys	Ile	Pro	Asp	Val	Pro	Gly	Phe	Ser	Trp	Val	Thr			
225						230						235						240
Pro	Cys	Ile	Ser	Ala	Lys	Asp	Ile	Val	Tyr	Ile	Gly	Leu	Arg	Asp	Val			
					245						250						255	
Asp	Pro	Gly	Glu	His	Tyr	Ile	Leu	Lys	Thr	Leu	Gly	Ile	Lys	Tyr	Phe			
					260						265						270	
Ser	Met	Thr	Glu	Val	Asp	Arg	Leu	Gly	Ile	Gly	Lys	Val	Met	Glu	Glu			
					275						280						285	
Thr	Leu	Ser	Tyr	Leu	Leu	Gly	Arg	Lys	Lys	Arg	Pro	Ile	His	Leu	Ser			
					290						295						300	
Phe	Asp	Val	Asp	Gly	Leu	Asp	Pro	Ser	Phe	Thr	Pro	Ala	Thr	Gly	Thr			
305						310						315						320
Pro	Val	Val	Gly	Gly	Leu	Thr	Tyr	Arg	Glu	Gly	Leu	Tyr	Ile	Thr	Glu			
					325						330						335	
Glu	Ile	Tyr	Lys	Thr	Gly	Leu	Leu	Ser	Gly	Leu	Asp	Ile	Met	Glu	Val			

340 345 350
Asn Pro Ser Leu Gly Lys Thr Pro Glu Glu Val Thr Arg Thr Val Asn
355 360 365
Thr Ala Val Ala Ile Thr Leu Ala Cys Phe Gly Leu Ala Arg Glu Gly
370 375 380
Asn His Lys Pro Ile Asp Tyr Leu Asn Pro Pro Lys
385 390 395

- <210> 51
- <211> 395
- <212> PRT
- <213> 人工序列
- <220>
- <223> C-ABD-rhArg, 於實驗室合成
- <400> 51

Met Ser Ala Lys Ser Arg Thr Ile Gly Ile Ile Gly Ala Pro Phe Ser
1 5 10 15
Lys Gly Gln Pro Arg Gly Gly Val Glu Glu Gly Pro Thr Val Leu Arg
20 25 30
Lys Ala Gly Leu Leu Glu Lys Leu Lys Glu Gln Glu Cys Asp Val Lys
35 40 45

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

Thr Pro Ala Thr Gly Thr Pro Val Val Gly Gly Leu Thr Tyr Arg Glu
245 250 255
Gly Leu Tyr Ile Thr Glu Glu Ile Tyr Lys Thr Gly Leu Leu Ser Gly
260 265 270
Leu Asp Ile Met Glu Val Asn Pro Ser Leu Gly Lys Thr Pro Glu Glu
275 280 285
Val Thr Arg Thr Val Asn Thr Ala Val Ala Ile Thr Leu Ala Cys Phe
290 295 300
Gly Leu Ala Arg Glu Gly Asn His Lys Pro Ile Asp Tyr Leu Asn Pro
305 310 315 320
Pro Lys Gly Ser Ser Asn Asn Asn Asn Asn Asn Gly Ser Gly Gly Asp
325 330 335
Glu Ala Val Asp Ala Asn Ser Leu Ala Glu Ala Lys Val Leu Ala Asn
340 345 350
Arg Glu Leu Asp Lys Tyr Gly Val Ser Asp Tyr Tyr Lys Asn Leu Ile
355 360 365
Asn Asn Ala Lys Thr Val Glu Gly Val Lys Ala Leu Ile Asp Glu Ile
370 375 380
Leu Ala Ala Leu Pro His His His His His His
385 390 395

<210> 52

<211> 395

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> C-ABD094-rhArg, 於實驗室合成

<400> 52

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

130 135 140
Val Ser Phe Leu Leu Lys Glu Leu Lys Gly Lys Ile Pro Asp Val Pro
145 150 155 160
Gly Phe Ser Trp Val Thr Pro Cys Ile Ser Ala Lys Asp Ile Val Tyr
165 170 175
Ile Gly Leu Arg Asp Val Asp Pro Gly Glu His Tyr Ile Leu Lys Thr
180 185 190
Leu Gly Ile Lys Tyr Phe Ser Met Thr Glu Val Asp Arg Leu Gly Ile
195 200 205
Gly Lys Val Met Glu Glu Thr Leu Ser Tyr Leu Leu Gly Arg Lys Lys
210 215 220
Arg Pro Ile His Leu Ser Phe Asp Val Asp Gly Leu Asp Pro Ser Phe
225 230 235 240
Thr Pro Ala Thr Gly Thr Pro Val Val Gly Gly Leu Thr Tyr Arg Glu
245 250 255
Gly Leu Tyr Ile Thr Glu Glu Ile Tyr Lys Thr Gly Leu Leu Ser Gly
260 265 270
Leu Asp Ile Met Glu Val Asn Pro Ser Leu Gly Lys Thr Pro Glu Glu
275 280 285
Val Thr Arg Thr Val Asn Thr Ala Val Ala Ile Thr Leu Ala Cys Phe
290 295 300
Gly Leu Ala Arg Glu Gly Asn His Lys Pro Ile Asp Tyr Leu Asn Pro
305 310 315 320

Pro Lys Gly Ser Ser Asn Asn Asn Asn Asn Asn Gly Ser Gly Gly Asp
325 330 335
Glu Ala Val Asp Ala Asn Ser Leu Ala Glu Ala Lys Glu Ala Ala Asn
340 345 350
Ala Glu Leu Asp Ser Tyr Gly Val Ser Asp Phe Tyr Lys Arg Leu Ile
355 360 365
Asp Lys Ala Lys Thr Val Glu Gly Val Glu Ala Leu Lys Asp Ala Ile
370 375 380
Leu Ala Ala Leu Pro His His His His His His
385 390 395

<210> 53

<211> 374

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> N-ABD-BCA, 於實驗室合成

<400> 53

Met His His His His His His Asp Glu Ala Val Asp Ala Asn Ser Leu
1 5 10 15

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

Pro Ser Gly Asn Ile His Gly Met Pro Leu Ala Ala Ser Leu Gly Phe
210 215 220
Gly His Pro Ala Leu Thr Gln Ile Gly Gly Tyr Ser Pro Lys Ile Lys
225 230 235 240
Pro Glu His Val Val Leu Ile Gly Val Arg Ser Leu Asp Glu Gly Glu
245 250 255
Lys Lys Phe Ile Arg Glu Lys Gly Ile Lys Ile Tyr Thr Met His Glu
260 265 270
Val Asp Arg Leu Gly Met Thr Arg Val Met Glu Glu Thr Ile Ala Tyr
275 280 285
Leu Lys Glu Arg Thr Asp Gly Val His Leu Ser Leu Asp Leu Asp Gly
290 295 300
Leu Asp Pro Ser Asp Ala Pro Gly Val Gly Thr Pro Val Ile Gly Gly
305 310 315 320
Leu Thr Tyr Arg Glu Ser His Leu Ala Met Glu Met Leu Ala Glu Ala
325 330 335
Gln Ile Ile Thr Ser Ala Glu Phe Val Glu Val Asn Pro Ile Leu Asp
340 345 350
Glu Arg Asn Lys Thr Ala Ser Val Ala Val Ala Leu Met Gly Ser Leu
355 360 365
Phe Gly Glu Lys Leu Met
370

<210> 54

<211> 374

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> N-ABD094-BCA, 於實驗室合成

<400> 54

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

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

290 295 300
Leu Asp Pro Ser Asp Ala Pro Gly Val Gly Thr Pro Val Ile Gly Gly
305 310 315 320
Leu Thr Tyr Arg Glu Ser His Leu Ala Met Glu Met Leu Ala Glu Ala
325 330 335
Gln Ile Ile Thr Ser Ala Glu Phe Val Glu Val Asn Pro Ile Leu Asp
340 345 350
Glu Arg Asn Lys Thr Ala Ser Val Ala Val Ala Leu Met Gly Ser Leu
355 360 365
Phe Gly Glu Lys Leu Met
370

<210> 55

<211> 372

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> C-ABD-BCA, 於實驗室合成

<400> 55

Met Lys Pro Ile Ser Ile Ile Gly Val Pro Met Asp Leu Gly Gln Thr
1 5 10 15

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

Glu Thr Ile Ala Tyr Leu Lys Glu Arg Thr Asp Gly Val His Leu Ser
210 215 220
Leu Asp Leu Asp Gly Leu Asp Pro Ser Asp Ala Pro Gly Val Gly Thr
225 230 235 240
Pro Val Ile Gly Gly Leu Thr Tyr Arg Glu Ser His Leu Ala Met Glu
245 250 255
Met Leu Ala Glu Ala Gln Ile Ile Thr Ser Ala Glu Phe Val Glu Val
260 265 270
Asn Pro Ile Leu Asp Glu Arg Asn Lys Thr Ala Ser Val Ala Val Ala
275 280 285
Leu Met Gly Ser Leu Phe Gly Glu Lys Leu Met Gly Ser Ser Asn Asn
290 295 300
Asn Asn Asn Asn Gly Ser Gly Gly Asp Glu Ala Val Asp Ala Asn Ser
305 310 315 320
Leu Ala Glu Ala Lys Val Leu Ala Asn Arg Glu Leu Asp Lys Tyr Gly
325 330 335
Val Ser Asp Tyr Tyr Lys Asn Leu Ile Asn Asn Ala Lys Thr Val Glu
340 345 350
Gly Val Lys Ala Leu Ile Asp Glu Ile Leu Ala Ala Leu Pro His His
355 360 365
His His His His
370

<210> 56

<211> 372

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> C-ABD094-BCA, 於實驗室合成

<400> 56

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

115 120 125
Thr Ala Glu Thr Ser Pro Ser Gly Asn Ile His Gly Met Pro Leu Ala
130 135 140
Ala Ser Leu Gly Phe Gly His Pro Ala Leu Thr Gln Ile Gly Gly Tyr
145 150 155 160
Ser Pro Lys Ile Lys Pro Glu His Val Val Leu Ile Gly Val Arg Ser
165 170 175
Leu Asp Glu Gly Glu Lys Lys Phe Ile Arg Glu Lys Gly Ile Lys Ile
180 185 190
Tyr Thr Met His Glu Val Asp Arg Leu Gly Met Thr Arg Val Met Glu
195 200 205
Glu Thr Ile Ala Tyr Leu Lys Glu Arg Thr Asp Gly Val His Leu Ser
210 215 220
Leu Asp Leu Asp Gly Leu Asp Pro Ser Asp Ala Pro Gly Val Gly Thr
225 230 235 240
Pro Val Ile Gly Gly Leu Thr Tyr Arg Glu Ser His Leu Ala Met Glu
245 250 255
Met Leu Ala Glu Ala Gln Ile Ile Thr Ser Ala Glu Phe Val Glu Val
260 265 270
Asn Pro Ile Leu Asp Glu Arg Asn Lys Thr Ala Ser Val Ala Val Ala
275 280 285
Leu Met Gly Ser Leu Phe Gly Glu Lys Leu Met Gly Ser Ser Asn Asn
290 295 300
Asn Asn Asn Asn Gly Ser Gly Gly Asp Glu Ala Val Asp Ala Asn Ser

[illegible]

<210> 57

<211> 50

<212> DNA

〈213〉 人工序列

 $\langle 220 \rangle$

〈223〉 ABD094-0F 引子，於實驗室合成

<400> 57

attctggcag cgctgccgtc gggtagtaac aacaataata acaatggtag 50

<210> 58

<211> 50

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> ABD094-1F 引子, 於實驗室合成

<400> 58

aaccgtggaa ggtgtggaag cgctgaaaga tgcgattctg gcagcgctgc 50

<210> 59

<211> 50

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> ABD094-2F 引子, 於實驗室合成

<400> 59

gattttttata aacgtctgat tgataaaagcg aaaaccgtgg aaggtgtgga 50

<210> 60

<211> 50

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> ABD094-3F 引子，於實驗室合成

<400> 60

ctggatagct atggcgtgag cgatTTTTat aaacgtctga ttgataaagc 50

<210> 61

<211> 50

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> ABD094-4F 引子，於實驗室合成

<400> 61

gcggaagcga aagaagcagc aaacgcggaa ctggatagct atggcgtgag 50

<210> 62

<211> 50

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> ABD094-5F 引子，於實驗室合成

<400> 62
accatgatga agccgtggat gcgaattccc tggcggaagc gaaagaagca 50

<210> 63

<211> 46

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> abdNde-F 引子，於實驗室合成

<400> 63
ggagatatac atatgcatca tcaccatcac catgatgaag ccgtgg 46

<210> 64

<211> 42

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> HuArgHinBam-R 引子，於實驗室合成

<400> 64

tgactacctt aaccaccta agtaagcttg gatcctgtaa cg 42

<210> 65

<211> 1220

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> N-ABD094-rhArg 基因，於實驗室合成

<400> 65

ggagatatac atatgcatca tcaccatcac catgatgaag ccgtggatgc gaattccctg 60

gcggaagcga aagaagcagc aaacgcggaa ctggatagct atggcgtgag cgatttttat 120

aaacgtctga ttgataaagc gaaaaccgtg gaagggtgtg aagcgtgaa agatgcgatt 180

ctggcagcgc tgccgtcggg tagtaacaac aataataaca atggtagcgg cggtatgagc 240

gccaaagtcca gaaccatagg gattattgga gtccttttct caaagggaca gccacgagga 300

ggggtggaag aaggccctac agtattgaga aaggctggtc tgcttgagaa acttaaagaa 360

caagagtgtg atgtgaagga ttatggggac ctgccctttg ctgacatccc taatgacagt 420

ccctttcaaa ttgtgaagaa tccaaggtct gtgggaaaag caagcgagca gctggctggc 480

aagggtggcag aagtcaagaa gaacggaaga atcagcctgg tgctgggcgg agaccacagt 540

ttggcaattg gaagcatctc tggccatgcc agggctccacc ctgatcttgg agtcatctgg 600

gtggatgctc aactgatata caacactcca ctgacaacca caagtggaaa cttgcatgga 660

caacctgtat ctttcctcct gaaggaacta aaaggaaaga ttcccgatgt gccaggattc 720

tcctgggtga ctccctgtat atctgccaag gatatttgtgt atattggctt gagagacgtg 780

gaccctgggg aacactacat tttgaaaact ctaggcatta aatacttttc aatgactgaa 840
gtggacagac taggaattgg caaggtgatg gaagaaacac tcagctatct actaggaaga 900
aagaaaaggc caattcatct aagttttgat gttgacggac tggacccatc tttcacacca 960
gctactggca caccagtcgt gggaggtctg acatacagag aaggtctcta catcacagaa 1020
gaaatctaca aaacagggtc actctcagga ttagatataa tggaagttaa cccatccctg 1080
gggaagacac cagaagaagt aactcgaaca gtgaacacag cagttgcaat aaccttggct 1140
tgtttcggac ttgctcggga gggtaatcac aagcctattg actaccttaa cccacctaag 1200
taagcttgga tcctgtaacg 1220

<210> 66

<211> 54

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 基於Streptococcus sp. G148之ABD, 於實驗室合成

<400> 66

Asp Glu Ala Val Asp Ala Asn Ser Leu Ala Glu Ala Lys Val Leu Ala
1 5 10 15
Asn Arg Glu Leu Asp Lys Tyr Gly Val Ser Asp Tyr Tyr Lys Asn Leu
20 25 30
Ile Asn Asn Ala Lys Thr Val Glu Gly Val Lys Ala Leu Ile Asp Glu

35 40 45
Ile Leu Ala Ala Leu Pro

50

<210> 67

<211> 57

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 基於Streptococcus sp. G148之ABD, 於實驗室合成

<400> 67

Ala Gln His Asp Glu Ala Val Asp Ala Asn Ser Leu Ala Glu Ala Lys

1 5 10 15

Val Leu Ala Asn Arg Glu Leu Asp Lys Tyr Gly Val Ser Asp Tyr Tyr

20 25 30

Lys Asn Leu Ile Asn Asn Ala Lys Thr Val Glu Gly Val Lys Ala Leu

35 40 45

Ile Asp Glu Ile Leu Ala Ala Leu Pro

50 55

<210> 68

<211> 46

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> ABD094 不具連接子，於實驗室合成

<400> 68

Leu Ala Glu Ala Lys Glu Ala Ala Asn Ala Glu Leu Asp Ser Tyr Gly
1 5 10 15
Val Ser Asp Phe Tyr Lys Arg Leu Ile Asp Lys Ala Lys Thr Val Glu
20 25 30
Gly Val Glu Ala Leu Lys Asp Ala Ile Leu Ala Ala Leu Pro
35 40 45

<210> 69

<211> 324

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> Xaa

<222> (1)..(1)

<223> 於位置1之Xaa為甲硫胺酸或不存在.

<400> 69

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

Val Pro Gly Phe Ser Trp Val Thr Pro Cys Ile Ser Ala Lys Asp Ile
165 170 175
Val Tyr Ile Gly Leu Arg Asp Val Asp Pro Gly Glu His Tyr Ile Leu
180 185 190
Lys Thr Leu Gly Ile Lys Tyr Phe Ser Met Thr Glu Val Asp Arg Leu
195 200 205
Gly Ile Gly Lys Val Met Glu Glu Thr Leu Ser Tyr Leu Leu Gly Arg
210 215 220
Lys Lys Arg Pro Ile His Leu Ser Phe Asp Val Asp Gly Leu Asp Pro
225 230 235 240
Ser Phe Thr Pro Ala Thr Gly Thr Pro Val Val Gly Gly Leu Thr Tyr
245 250 255
Arg Glu Gly Leu Tyr Ile Thr Glu Glu Ile Tyr Lys Thr Gly Leu Leu
260 265 270
Ser Gly Leu Asp Ile Met Glu Val Asn Pro Ser Leu Gly Lys Thr Pro
275 280 285
Glu Glu Val Thr Arg Thr Val Asn Thr Ala Val Ala Ile Thr Leu Ala
290 295 300
Cys Phe Gly Leu Ala Arg Glu Gly Asn His Lys Pro Ile Asp Tyr Leu
305 310 315 320
Asn Pro Pro Lys

<210> 70

<211> 299

<212> PRT

<213> Bacillus caldovelox

<400> 70

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

<211> 299

〈213〉 人工序列

<220>

<223> BCA (S161C) 精胺酸酶，於實驗室合成

<400> 71

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

Ala Ser Leu Gly Phe Gly His Pro Ala Leu Thr Gln Ile Gly Gly Tyr
145 150 155 160
Cys Pro Lys Ile Lys Pro Glu His Val Val Leu Ile Gly Val Arg Ser
165 170 175
Leu Asp Glu Gly Glu Lys Lys Phe Ile Arg Glu Lys Gly Ile Lys Ile
180 185 190
Tyr Thr Met His Glu Val Asp Arg Leu Gly Met Thr Arg Val Met Glu
195 200 205
Glu Thr Ile Ala Tyr Leu Lys Glu Arg Thr Asp Gly Val His Leu Ser
210 215 220
Leu Asp Leu Asp Gly Leu Asp Pro Ser Asp Ala Pro Gly Val Gly Thr
225 230 235 240
Pro Val Ile Gly Gly Leu Thr Tyr Arg Glu Ser His Leu Ala Met Glu
245 250 255
Met Leu Ala Glu Ala Gln Ile Ile Thr Ser Ala Glu Phe Val Glu Val
260 265 270
Asn Pro Ile Leu Asp Glu Arg Asn Lys Thr Ala Ser Val Ala Val Ala
275 280 285
Leu Met Gly Ser Leu Phe Gly Glu Lys Leu Met
290 295

<210> 72

<211> 299

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> BCA (V20P, S161C) 精胺酸酶, 於實驗室合成

<400> 72

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

130 135 140
Ala Ser Leu Gly Phe Gly His Pro Ala Leu Thr Gln Ile Gly Gly Tyr
145 150 155 160
Cys Pro Lys Ile Lys Pro Glu His Val Val Leu Ile Gly Val Arg Ser
165 170 175
Leu Asp Glu Gly Glu Lys Lys Phe Ile Arg Glu Lys Gly Ile Lys Ile
180 185 190
Tyr Thr Met His Glu Val Asp Arg Leu Gly Met Thr Arg Val Met Glu
195 200 205
Glu Thr Ile Ala Tyr Leu Lys Glu Arg Thr Asp Gly Val His Leu Ser
210 215 220
Leu Asp Leu Asp Gly Leu Asp Pro Ser Asp Ala Pro Gly Val Gly Thr
225 230 235 240
Pro Val Ile Gly Gly Leu Thr Tyr Arg Glu Ser His Leu Ala Met Glu
245 250 255
Met Leu Ala Glu Ala Gln Ile Ile Thr Ser Ala Glu Phe Val Glu Val
260 265 270
Asn Pro Ile Leu Asp Glu Arg Asn Lys Thr Ala Ser Val Ala Val Ala
275 280 285
Leu Met Gly Ser Leu Phe Gly Glu Lys Leu Met
290 295

<210> 73

<211> 12

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 連接子 序列 1, 於實驗室合成

<400> 73

Gly Ser Asn Asn Asn Asn Asn Asn Gly Ser Gly Gly
1 5 10

<210> 74

<211> 13

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 連接子 序列 2, 於實驗室合成

<400> 74

Ser Gly Ser Asn Asn Asn Asn Asn Asn Gly Ser Gly Gly
1 5 10

<210> 75

<211> 362

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> BHA 融合蛋白，於實驗室合成

<400> 75

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

115			120			125									
Thr	Ala	Glu	Thr	Ser	Pro	Ser	Gly	Asn	Ile	His	Gly	Met	Pro	Leu	Ala
130			135			140									
Ala	Ser	Leu	Gly	Phe	Gly	His	Pro	Ala	Leu	Thr	Gln	Ile	Gly	Gly	Tyr
145			150			155			160						
Cys	Pro	Lys	Ile	Lys	Pro	Glu	His	Val	Val	Leu	Ile	Gly	Val	Arg	Ser
165			170			175									
Leu	Asp	Glu	Gly	Glu	Lys	Lys	Phe	Ile	Arg	Glu	Lys	Gly	Ile	Lys	Ile
180			185			190									
Tyr	Thr	Met	His	Glu	Val	Asp	Arg	Leu	Gly	Met	Thr	Arg	Val	Met	Glu
195			200			205									
Glu	Thr	Ile	Ala	Tyr	Leu	Lys	Glu	Arg	Thr	Asp	Gly	Val	His	Leu	Ser
210			215			220									
Leu	Asp	Leu	Asp	Gly	Leu	Asp	Pro	Ser	Asp	Ala	Pro	Gly	Val	Gly	Thr
225			230			235			240						
Pro	Val	Ile	Gly	Gly	Leu	Thr	Tyr	Arg	Glu	Ser	His	Leu	Ala	Met	Glu
245			250			255									
Met	Leu	Ala	Glu	Ala	Gln	Ile	Ile	Thr	Ser	Ala	Glu	Phe	Val	Glu	Val
260			265			270									
Asn	Pro	Ile	Leu	Asp	Glu	Arg	Asn	Lys	Thr	Ala	Ser	Val	Ala	Val	Ala
275			280			285									
Leu	Met	Gly	Ser	Leu	Phe	Gly	Glu	Lys	Leu	Met	His	His	His	His	His
290			295			300									
His	Ala	Gln	His	Asp	Glu	Ala	Val	Asp	Ala	Asn	Ser	Leu	Ala	Glu	Ala

<211> 362

〈213〉 人工序列

 $\langle 220 \rangle$

〈223〉 BAH 融合蛋白，於實驗室合成

<400> 76

1 5 10 15

20 25 30

35 40 45

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

Pro Val Ile Gly Gly Leu Thr Tyr Arg Glu Ser His Leu Ala Met Glu
245 250 255
Met Leu Ala Glu Ala Gln Ile Ile Thr Ser Ala Glu Phe Val Glu Val
260 265 270
Asn Pro Ile Leu Asp Glu Arg Asn Lys Thr Ala Ser Val Ala Val Ala
275 280 285
Leu Met Gly Ser Leu Phe Gly Glu Lys Leu Met Ala Gln His Asp Glu
290 295 300
Ala Val Asp Ala Asn Ser Leu Ala Glu Ala Lys Val Leu Ala Asn Arg
305 310 315 320
Glu Leu Asp Lys Tyr Gly Val Ser Asp Tyr Tyr Lys Asn Leu Ile Asn
325 330 335
Asn Ala Lys Thr Val Glu Gly Val Lys Ala Leu Ile Asp Glu Ile Leu
340 345 350
Ala Ala Leu Pro His His His His His His
355 360

<210> 77

<211> 103

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 5'-正義-ABD 引子，於實驗室合成

<400> 77

gcgcagcatg atgaagccgt ggatgcgaac agcttagctg aagctaaagt cttagctaac 60

agagaacttg acaaatatgg agtaagtgac tattacaaga acc 103

- <210> 78
- <211> 98
- <212> DNA
- <213> 人工序列

<220>

<223> 5’-反義-ABD 引子，於實驗室合成

<400> 78

ttaaggtaat gcagctaaaa ttcatctat cagtgcctttt acaccttcaa cagttttggc 60

attgttgatt aggttcttgt aatagtcact tactccat 98

- <210> 79
- <211> 35
- <212> DNA
- <213> 人工序列

<220>

<223> 用於選殖ABD之正向引子，於實驗室合成

<400> 79

gcacacccat caccatcacg cgcagcatga tgaag 35

<210> 80

<211> 38

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 用於選殖ABD之反向引子，於實驗室合成

<400> 80

cgggatcctt aaggtaatgc agctaaaatt tcatttat 38

<210> 81

<211> 33

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 用於選殖BCA之正向引子，於實驗室合成

<400> 81

ggaattccca tatgaagcca atttcaatta tcg

33

<210> 82

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 用於選殖BCA之反向引子，於實驗室合成

<400> 82

gtgatggtga tggatgatgca

20

<210> 83

<211> 33

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 用於選殖BHA之正向引子，於實驗室合成

<400> 83

ggaattccca tatgaagcca atttcaatta tcg

33

<210> 84

<211> 38

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 用於選殖BHA之反向引子，於實驗室合成

<400> 84

cgggatcctt aaggtaatgc agctaaaatt tcattctat 38

<210> 85

<211> 39

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 用於選殖ABD之正向引子，於實驗室合成

<400> 85

cgttgtttgg tgaaaaactc atggcgcagc atgatgaag 39

<210> 86

<211> 56

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 用於選殖ABD之反向引子，於實驗室合成

<400> 86

cgggatcctt agtgatggtg atggtgatga ggtaatgcag ctaaaatttc atctat 56

<210> 87

<211> 33

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 用於選殖BAH之正向引子，Syntesized in the Lab

<400> 87

ggaattccca tatgaagcca atttcaatta tcg 33

<210> 88

<211> 56

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 用於選殖BAH之反向引子，於實驗室合成

<400> 88

cgggatcctt agtgatggtg atggtgatga ggtaatgcag ctaaaatttc atctat 56

<210> 89

<211> 305

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> BCA (S161C) - His, 於實驗室合成

<400> 89

Met Lys Pro Ile Ser Ile Ile Gly Val Pro Met Asp Leu Gly Gln Thr
1 5 10 15
Arg Arg Gly Val Asp Met Gly Pro Ser Ala Met Arg Tyr Ala Gly Val
20 25 30
Ile Glu Arg Leu Glu Arg Leu His Tyr Asp Ile Glu Asp Leu Gly Asp
35 40 45
Ile Pro Ile Gly Lys Ala Glu Arg Leu His Glu Gln Gly Asp Ser Arg

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

245 250 255
Met Leu Ala Glu Ala Gln Ile Ile Thr Ser Ala Glu Phe Val Glu Val
260 265 270
Asn Pro Ile Leu Asp Glu Arg Asn Lys Thr Ala Ser Val Ala Val Ala
275 280 285
Leu Met Gly Ser Leu Phe Gly Glu Lys Leu Met His His His His His
290 295 300
His
305

<210> 90

<211> 42

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> N-ABDHind-R 引子, 於實驗室合成

<400> 90

acagctaaaa gcttatcagc ctaggatccg ccgctaccat tg 42

<210> 91

<211> 38

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> C-ABDNde-F 引子，於實驗室合成

<400> 91

tagctgatca tatgttatgc gatggatcca gtaacaac 38

<210> 92

<211> 33

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> C-ABDHind-R, 於實驗室合成

<400> 92

gaccctaaaa gcttaatggt gatggtgatg atg 33

<210> 93

<211> 34

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> HARGBam-F 引子, 於實驗室合成

<400> 93

ttagctgggg atccgccaag tccagaacca tagg 34

<210> 94

<211> 35

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> HARGHind-R 引子, 於實驗室合成

<400> 94

gagatcaaag cttacttagg tgggttaagg tagtc 35

<210> 95

<211> 35

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> HARGNde-F, 於實驗室合成

<400> 95

taggctgcat atgagcgcca agtccagaac catag 35

<210> 96

<211> 41

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> HARGBam-R 引子, 於實驗室合成

<400> 96

atcagctagg atcccttagg tgggttaagg tagtcaatag g 41

<210> 97

<211> 36

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> BCABam-F 引子, 於實驗室合成

<400> 97

atgctagtgg atccatgaag ccaatttcaa ttatcg 36

<210> 98

<211> 38

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> BCAHind-R 引子，於實驗室合成

<400> 98

tcagcctaaa gcttacatga gtttttcacc aaacaacg 38

<210> 99

<211> 35

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> BCANde-F 引子，於實驗室合成

<400> 99

atgctagcca tatgaagcca atttcaatta tcggg 35

<210> 100

<211> 37

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> BCABam-R 引子, 於實驗室合成

<400> 100

tcagctaagg atcccatgag tttttcacca aacaacg 37

<210> 101

<211> 329

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> His-rhArg, 於實驗室合成

<400> 101

Met His His His His His His Met Ser Ala Lys Ser Arg Thr Ile Gly

1 5 10 15

Ile Ile Gly Ala Pro Phe Ser Lys Gly Gln Pro Arg Gly Gly Val Glu

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

210 215 220
Tyr Leu Leu Gly Arg Lys Lys Arg Pro Ile His Leu Ser Phe Asp Val
225 230 235 240
Asp Gly Leu Asp Pro Ser Phe Thr Pro Ala Thr Gly Thr Pro Val Val
245 250 255
Gly Gly Leu Thr Tyr Arg Glu Gly Leu Tyr Ile Thr Glu Glu Ile Tyr
260 265 270
Lys Thr Gly Leu Leu Ser Gly Leu Asp Ile Met Glu Val Asn Pro Ser
275 280 285
Leu Gly Lys Thr Pro Glu Glu Val Thr Arg Thr Val Asn Thr Ala Val
290 295 300
Ala Ile Thr Leu Ala Cys Phe Gly Leu Ala Arg Glu Gly Asn His Lys
305 310 315 320
Pro Ile Asp Tyr Leu Asn Pro Pro Lys
325

- <210> 102
- <211> 329
- <212> PRT
- <213> 人工序列
- <220>
- <223> His-rhArg-mono-Cys, 於實驗室合成

<400> 102

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

Ser Ala Lys Asp Ile Val Tyr Ile Gly Leu Arg Asp Val Asp Pro Gly
180 185 190
Glu His Tyr Ile Leu Lys Thr Leu Gly Ile Lys Tyr Phe Ser Met Thr
195 200 205
Glu Val Asp Arg Leu Gly Ile Gly Lys Val Met Glu Glu Thr Leu Ser
210 215 220
Tyr Leu Leu Gly Arg Lys Lys Arg Pro Ile His Leu Ser Phe Asp Val
225 230 235 240
Asp Gly Leu Asp Pro Ser Phe Thr Pro Ala Thr Gly Thr Pro Val Val
245 250 255
Gly Gly Leu Thr Tyr Arg Glu Gly Leu Tyr Ile Thr Glu Glu Ile Tyr
260 265 270
Lys Thr Gly Leu Leu Ser Gly Leu Asp Ile Met Glu Val Asn Pro Ser
275 280 285
Leu Gly Lys Thr Pro Glu Glu Val Thr Arg Thr Val Asn Thr Ala Val
290 295 300
Ala Ile Thr Leu Ala Ser Phe Gly Leu Ala Arg Glu Gly Asn His Lys
305 310 315 320
Pro Ile Asp Tyr Leu Asn Pro Pro Lys
325

<210> 103

<211> 322

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 103

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

Gly Phe Ser Trp Val Thr Pro Cys Ile Ser Ala Lys Asp Ile Val Tyr
165 170 175
Ile Gly Leu Arg Asp Val Asp Pro Gly Glu His Tyr Ile Leu Lys Thr
180 185 190
Leu Gly Ile Lys Tyr Phe Ser Met Thr Glu Val Asp Arg Leu Gly Ile
195 200 205
Gly Lys Val Met Glu Glu Thr Leu Ser Tyr Leu Leu Gly Arg Lys Lys
210 215 220
Arg Pro Ile His Leu Ser Phe Asp Val Asp Gly Leu Asp Pro Ser Phe
225 230 235 240
Thr Pro Ala Thr Gly Thr Pro Val Val Gly Gly Leu Thr Tyr Arg Glu
245 250 255
Gly Leu Tyr Ile Thr Glu Glu Ile Tyr Lys Thr Gly Leu Leu Ser Gly
260 265 270
Leu Asp Ile Met Glu Val Asn Pro Ser Leu Gly Lys Thr Pro Glu Glu
275 280 285
Val Thr Arg Thr Val Asn Thr Ala Val Ala Ile Thr Leu Ala Cys Phe
290 295 300
Gly Leu Ala Arg Glu Gly Asn His Lys Pro Ile Asp Tyr Leu Asn Pro
305 310 315 320
Pro Lys

<210> 104

<211> 322

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> rhArg-mono-Cys, 於實驗室合成

<400> 104

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

115				120				125							
Ile	Asn	Thr	Pro	Leu	Thr	Thr	Thr	Ser	Gly	Asn	Leu	His	Gly	Gln	Pro
130				135				140							
Val	Ser	Phe	Leu	Leu	Lys	Glu	Leu	Lys	Gly	Lys	Ile	Pro	Asp	Val	Pro
145				150				155				160			
Gly	Phe	Ser	Trp	Val	Thr	Pro	Ser	Ile	Ser	Ala	Lys	Asp	Ile	Val	Tyr
165				170				175							
Ile	Gly	Leu	Arg	Asp	Val	Asp	Pro	Gly	Glu	His	Tyr	Ile	Leu	Lys	Thr
180				185				190							
Leu	Gly	Ile	Lys	Tyr	Phe	Ser	Met	Thr	Glu	Val	Asp	Arg	Leu	Gly	Ile
195				200				205							
Gly	Lys	Val	Met	Glu	Glu	Thr	Leu	Ser	Tyr	Leu	Leu	Gly	Arg	Lys	Lys
210				215				220							
Arg	Pro	Ile	His	Leu	Ser	Phe	Asp	Val	Asp	Gly	Leu	Asp	Pro	Ser	Phe
225				230				235				240			
Thr	Pro	Ala	Thr	Gly	Thr	Pro	Val	Val	Gly	Gly	Leu	Thr	Tyr	Arg	Glu
245				250				255							
Gly	Leu	Tyr	Ile	Thr	Glu	Glu	Ile	Tyr	Lys	Thr	Gly	Leu	Leu	Ser	Gly
260				265				270							
Leu	Asp	Ile	Met	Glu	Val	Asn	Pro	Ser	Leu	Gly	Lys	Thr	Pro	Glu	Glu
275				280				285							
Val	Thr	Arg	Thr	Val	Asn	Thr	Ala	Val	Ala	Ile	Thr	Leu	Ala	Ser	Phe
290				295				300							
Gly	Leu	Ala	Arg	Glu	Gly	Asn	His	Lys	Pro	Ile	Asp	Tyr	Leu	Asn	Pro

305 310 315 320

Pro Lys

<210> 105

<211> 46

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> A(EAAAK)4ALEA-(EAAAK)4A 胜肽 连接子, 於實驗室合成

<400> 105

Ala Glu Ala Ala Ala Lys Glu Ala Ala Ala Lys Glu Ala Ala Ala Lys

1 5 10 15

Glu Ala Ala Ala Lys Ala Leu Glu Ala Glu Ala Ala Ala Lys Glu Ala

20 25 30

Ala Ala Lys Glu Ala Ala Ala Lys Glu Ala Ala Ala Lys Ala

35 40 45

<210> 106

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> G4SG4SG3SG 胜肽 連接子，於實驗室合成

<400> 106

Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly
1				5				10					15	

申請專利範圍

1. 一種精胺酸消耗劑用於製備藥物之用途，其特徵係前述藥物係用於治療一有需求之受試者的選自由以下所組成之群組之症狀的至少一種：肥胖、代謝失調以及相關併發症，前述精胺酸消耗劑係為一精胺酸異化酶選自精胺酸酶蛋白、精胺酸去亞胺酶蛋白及精胺酸脫羧酶蛋白所組成之群組，前述代謝失調係選自由以下組成之群組：葡萄糖失耐、高血糖症、糖尿病、胰島素抗性、肝脂肪變性、腎脂肪變性、胰腺脂肪變性及心臟脂肪變性；且前述相關併發症係為選自由以下症狀所組成之群組的至少一種：糖尿病腎病變、糖尿病血管病變、糖尿病神經病變、高膽固醇血症、血脂異常、高三酸甘油脂血症、高瘦體素血症、高胰島素血症、脂肪變性、脂性肝炎、高血壓、動脈粥樣硬化以及棕色脂肪白化。
2. 如申請專利範圍第1項所記載之用途，其中，前述代謝失調係為胰島素抗性。
3. 如申請專利範圍第1項所記載之用途，其中，前述治療肥胖係包含防止脂肪量增加及減少脂肪量的至少一種。
4. 如申請專利範圍第1項所記載之用途，其中，前述代謝失調係選自由以下組成之群組：肝脂肪變性、腎脂肪變性、胰腺脂肪變性及心臟脂肪變性。
5. 如申請專利範圍第1項所記載之用途，其中，前述受試者血清中的精胺酸濃度被維持在50 μ M以下。

6. 如申請專利範圍第1項所記載之用途，其中，前述精胺酸酶蛋白、精胺酸去亞胺酶蛋白或精胺酸脫羧酶蛋白係進一步包含至少一個聚乙二醇(PEG)基團。
7. 如申請專利範圍第6項所記載之用途，其中，前述精胺酸酶蛋白係包含一個具有SEQ ID NO: 101、SEQ ID NO: 102、SEQ ID NO: 103或SEQ ID NO: 104之多肽。
8. 如申請專利範圍第1項所記載之用途，其中，前述精胺酸酶蛋白係包含一個與SEQ ID NO: 69、SEQ ID NO: 70、SEQ ID NO: 71或SEQ ID NO: 72具有至少95%序列同源性之多肽。
9. 如申請專利範圍第1項所記載之用途，其中，前述精胺酸酶蛋白、精胺酸去亞胺酶蛋白或精胺酸脫羧酶蛋白係進一步包含一個白蛋白結合結構域(ABD)或人血清白蛋白、或一個人類免疫球蛋白G的結晶片段區結構域(IgG Fc domain)。
10. 如申請專利範圍第9項所記載之用途，其中，前述ABD係包含一個與SEQ ID NO: 66、SEQ ID NO: 67或SEQ ID NO: 68具有至少93%序列同源性之多肽。
11. 如申請專利範圍第9項所記載之用途，其中，前述精胺酸異化酶係為一個融合蛋白，前述融合蛋白係包含：一白蛋白結合結構域多肽及一精胺酸酶多肽；一白蛋白結合結構域多肽及一精胺酸去亞胺酶多肽；或一白蛋白結合結構域多肽及一精胺酸脫羧酶多肽。

12.如申請專利範圍第11項所記載之用途，其中，前述精胺酸異化酶係為一個融合蛋白，前述融合蛋白包含一白蛋白結合結構域多肽及一精胺酸酶多肽。

13.如申請專利範圍第12項所記載之用途，其中，前述精胺酸異化酶係包含一個與SEQ ID NO: 49、SEQ ID NO: 50、SEQ ID NO: 51、SEQ ID NO: 52、SEQ ID NO: 53、SEQ ID NO: 54、SEQ ID NO: 55、SEQ ID NO: 56、SEQ ID NO: 75或SEQ ID NO: 76具有至少98%序列同源性之多肽。

圖式

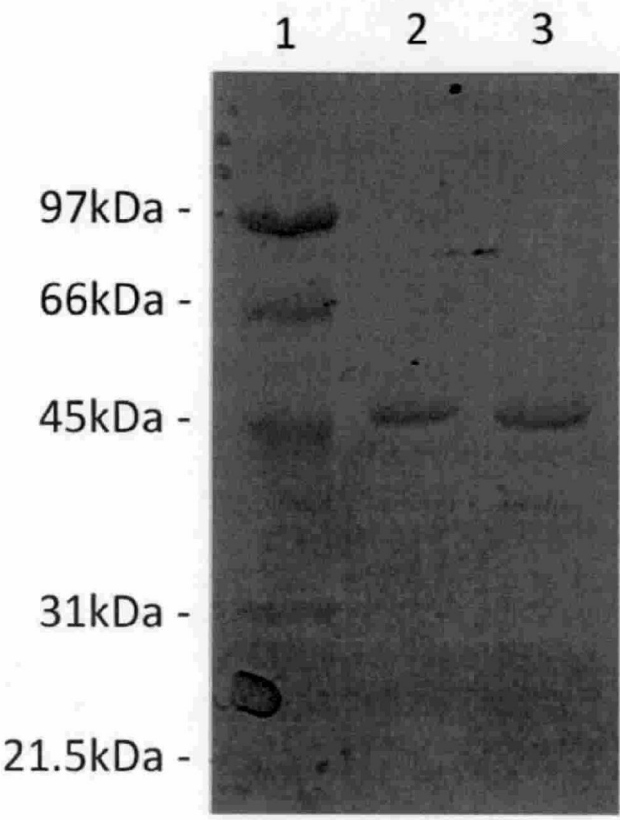
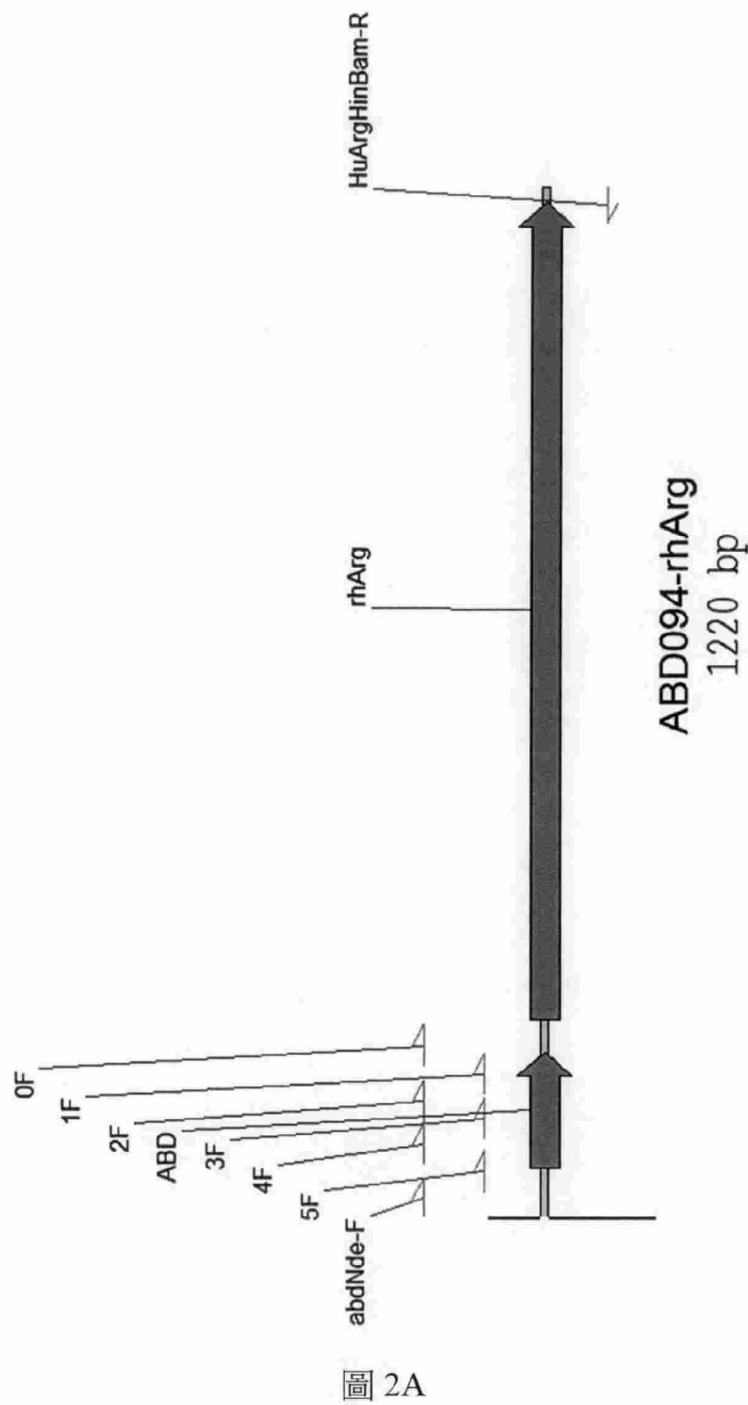


圖 1



2A

10	20	30	40	50	60
MHHHHHHDEA	VDANSLAEAK	EAANAELDSY	GVSDFYKRLI	DKAKTVEGVE	ALKDAILAAL
70	80	90	100	110	120
PSGSNNNNNN	GSGGMSAKSR	TIGIIGAPFS	KGQPRGGVEE	GPTVLRKAGL	LEKLKEQECD
130	140	150	160	170	180
VKDYGDLPFA	DIPNDSPFQI	VKNPRSVGKA	SEQLAGKVAE	VKKNGRISLV	LGGDHSLAIG
190	200	210	220	230	240
SISGHARVHP	DLGVIWVDAH	TDINTPLTTT	SGNLHGQPVS	FLLKELKGKI	PDVPGFSWVT
250	260	270	280	290	300
PCISAKDIVY	IGLRDVDPGE	HYILKTLGIK	YFSMTEVDRL	GIGKVMEETL	SYLLGRKKRP
310	320	330	340	350	360
IHLSEFDVDGL	DPSFTPATGT	PVVGGGLTYRE	GLYITEEIIYK	TGLLSGLDIM	EVNPSLGKTP
370	380	390			
EEVTRTVNTA	VAITLACFGL	AREGNHKPID	YLNPPK		

圖 2B

MKPISIIIGVPMDLGQTRRGVDMGPSAMRYAGVIERLERLHYDIEDLGDIPIGKAERLHEQ
GDSRLRNLKAVAEANEKLAAAVDQVVQRGRFPLVLGGDHSIAIGTLAGVAKHYERLGVIW
YDAHGDVNTAETSPSGNIHGMPLAASLGFGHPALTQIGGYCPKIKPEHVVLIGVRSLEGE
EKKFIREKGIKIYTMHEVDRLGMTRVMEETIAYLKERTDGVHLSLDLDGLDPSDAPGVGT
PVIIGGLTYRESHLAMEMPLAEAQIITSAEFVEVNPILDERNKTSVAVALMGSLFGEKLMH
HHHHH

圖 3

BCA	MKPISIIIGVPMDLGQTRRGVDMGPSAMRYAGVIERLERLHYDIEDLGDIPIGKAERLHEQ
BHA	MKPISIIIGVPMDLGQTRRGVDMGPSAMRYAGVIERLERLHYDIEDLGDIPIGKAERLHEQ
BAH	MKPISIIIGVPMDLGQTRRGVDMGPSAMRYAGVIERLERLHYDIEDLGDIPIGKAERLHEQ

BCA	GDSRLRNLKAVAEANEKLA AAVDQVVQRGRFPLVLGGDHSTAIGTLAGVAKHYERLGVIW
BHA	GDSRLRNLKAVAEANEKLA AAVDQVVQRGRFPLVLGGDHSTAIGTLAGVAKHYERLGVIW
BAH	GDSRLRNLKAVAEANEKLA AAVDQVVQRGRFPLVLGGDHSTAIGTLAGVAKHYERLGVIW

BCA	YDANGDVNTAETSPSGNHGMFLAASLGFGHPALTQIGGYCPKIKPEHVVLIGVRSLDEG
BHA	YDANGDVNTAETSPSGNHGMFLAASLGFGHPALTQIGGYCPKIKPEHVVLIGVRSLDEG
BAH	YDANGDVNTAETSPSGNHGMFLAASLGFGHPALTQIGGYCPKIKPEHVVLIGVRSLDEG

BCA	EKKFIREKGIKIYTMHEVDRLGNTRVMEETIAYLKERTDGVHLSLDLDGLDPSDAPGVGT
BHA	EKKFIREKGIKIYTMHEVDRLGNTRVMEETIAYLKERTDGVHLSLDLDGLDPSDAPGVGT
BAH	EKKFIREKGIKIYTMHEVDRLGNTRVMEETIAYLKERTDGVHLSLDLDGLDPSDAPGVGT

BCA	PVIGGLTYRESHLANEMLAEAQIITSAEFVEVNPILDERNKTASVAVALMGSLFGEKLMH
BHA	PVIGGLTYRESHLANEMLAEAQIITSAEFVEVNPILDERNKTASVAVALMGSLFGEKLMH
BAH	PVIGGLTYRESHLANEMLAEAQIITSAEFVEVNPILDERNKTASVAVALMGSLFGEKLMH

BCA	HHHH{-----
BHA	HHHHHAQHDEAVDANSIAEAKVLANRELDKYGVSDYYKNLINNAKTVEGVKALIDEILAA
BAH	QHDEAVDAN-----SLAEAKVLANRELDKYGVSDYYKNLINNAKTVEGVKALIDEILAA
	:*..
BCA	-----
BHA	LP-----
BAH	LP000000

圖 4

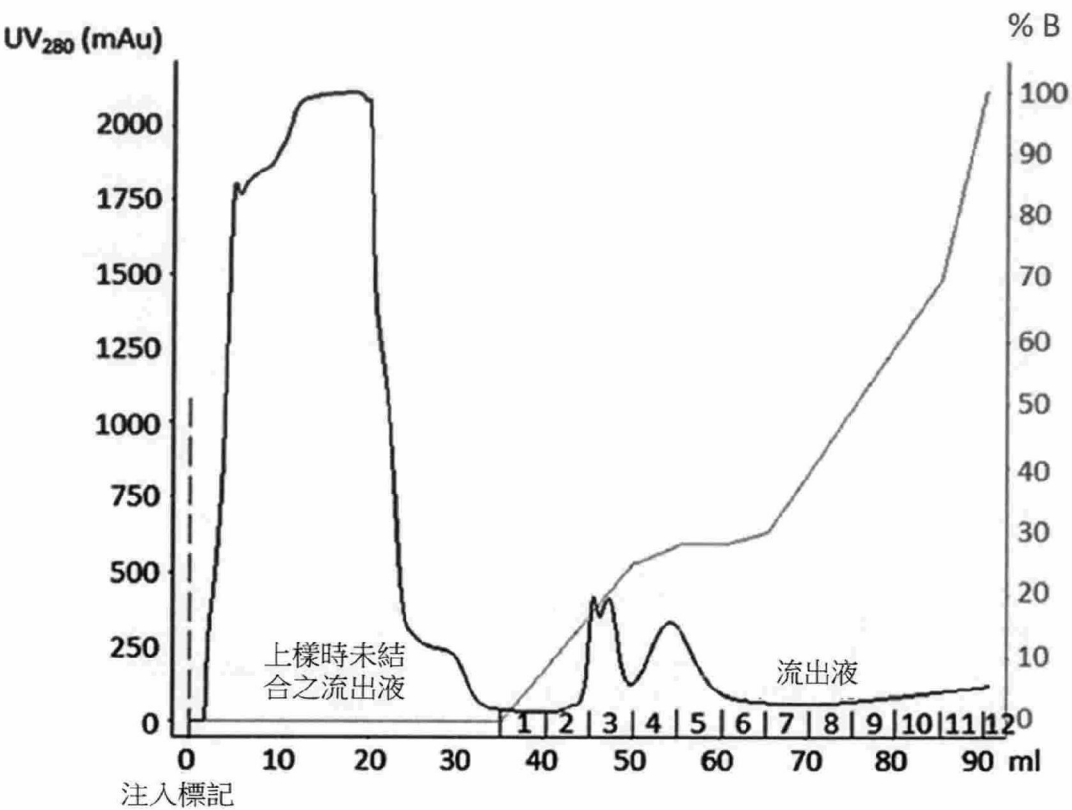


圖 5A

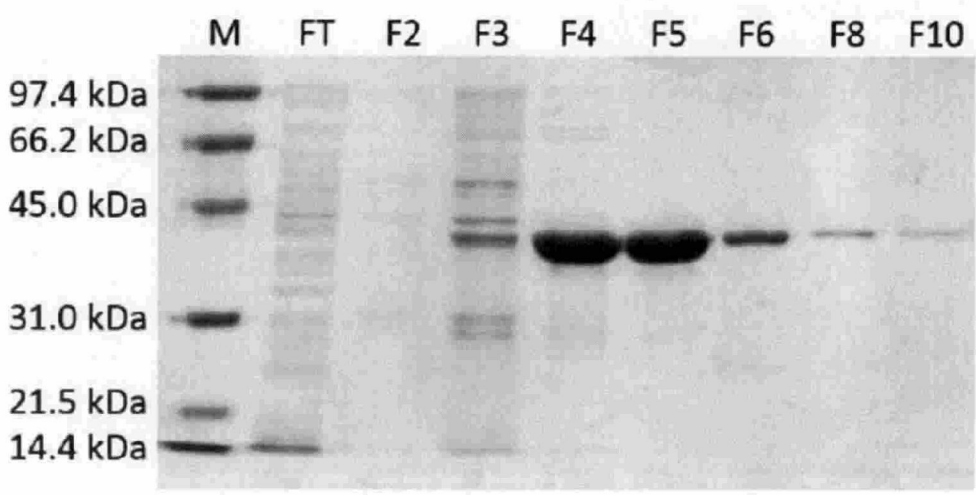


圖 5B

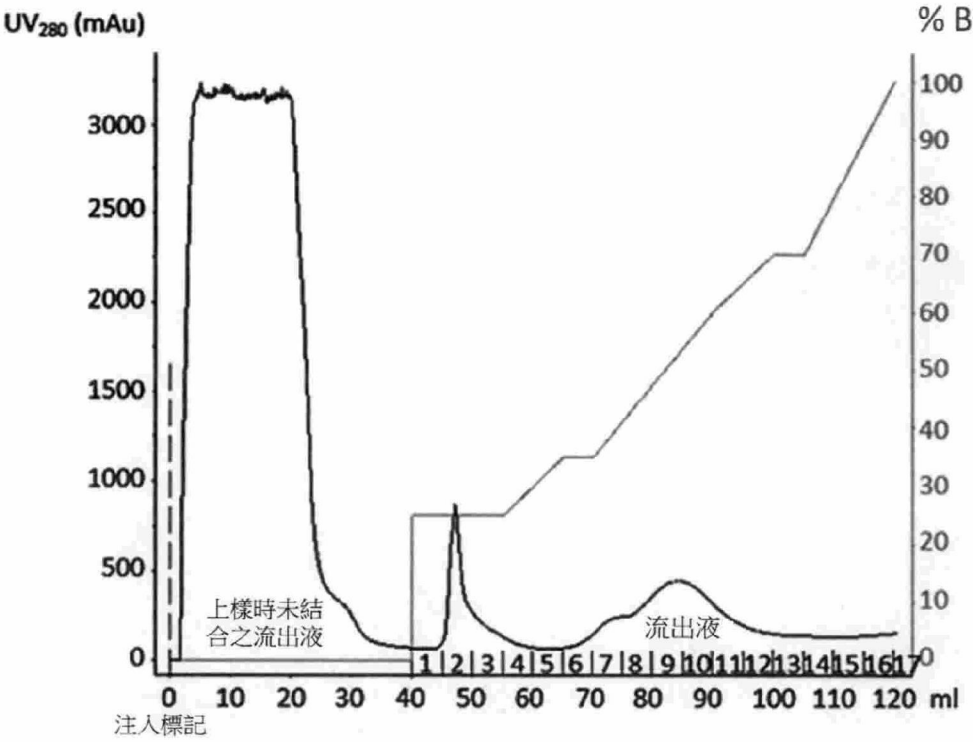


圖 5C

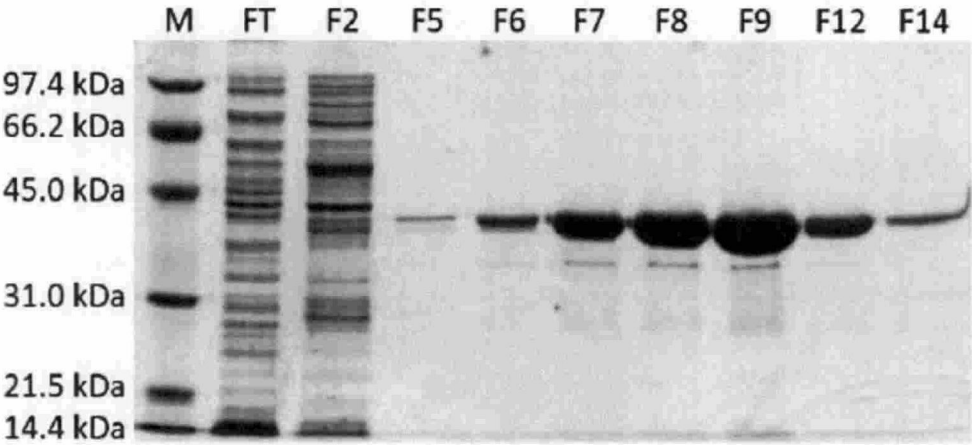


圖 5D

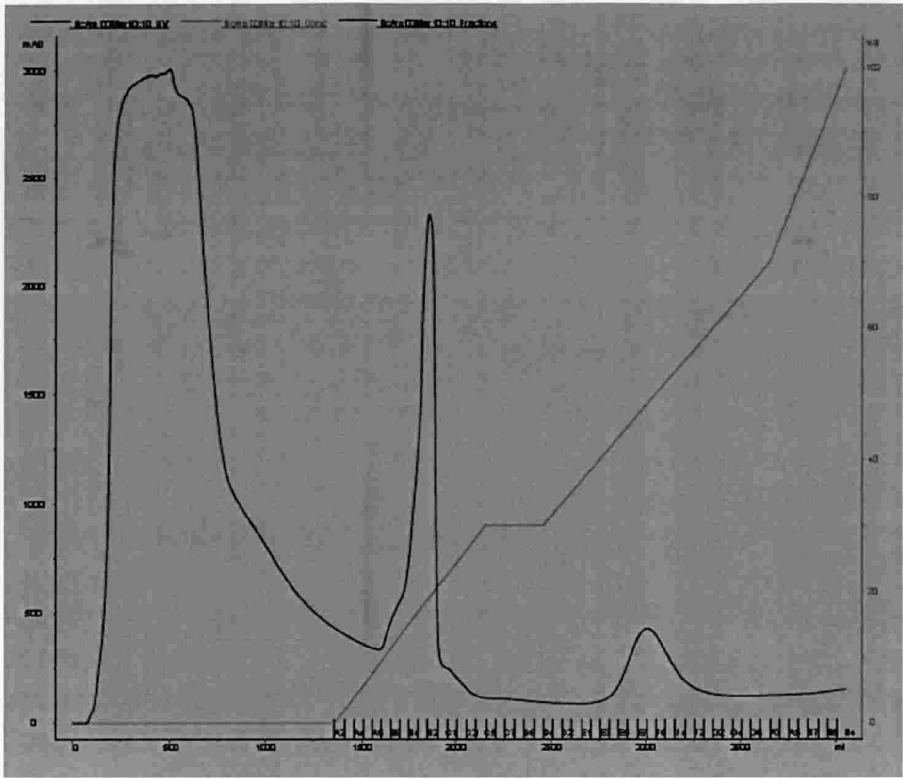


圖 6A

泳道

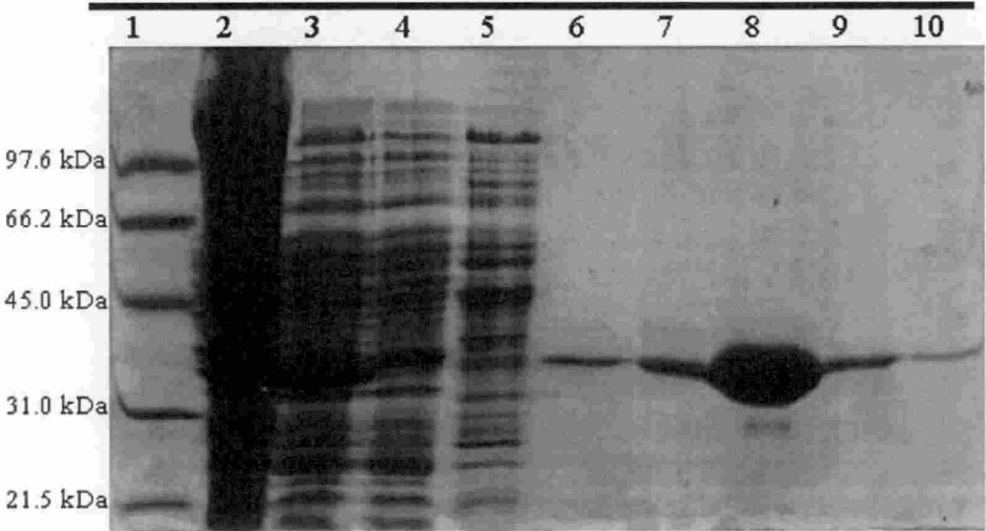


圖 6B

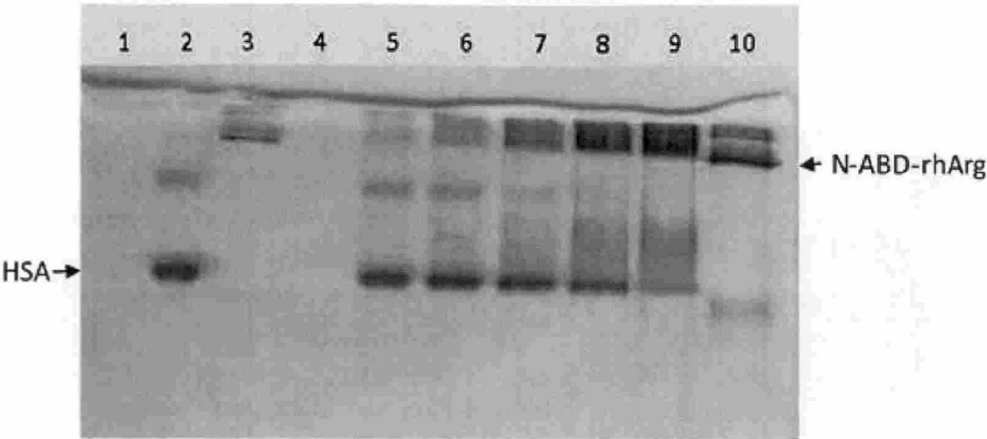


圖 7

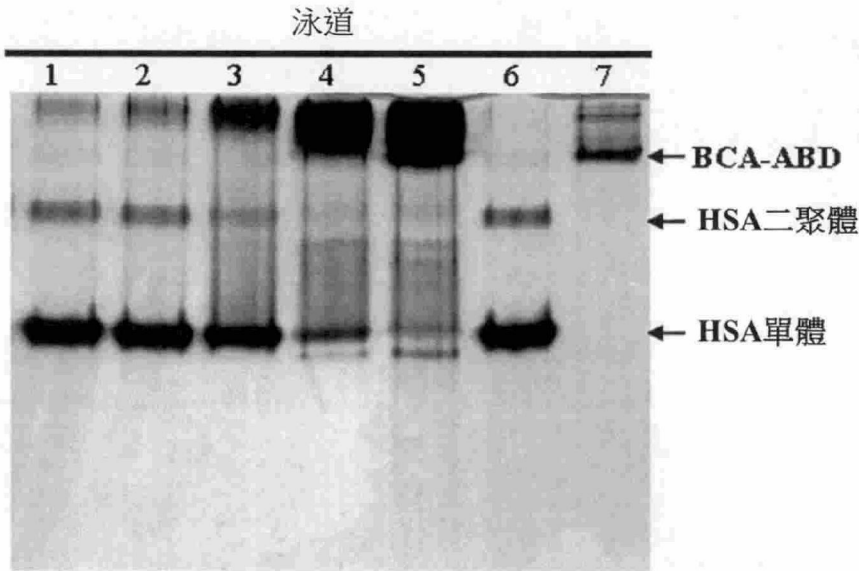


圖 8

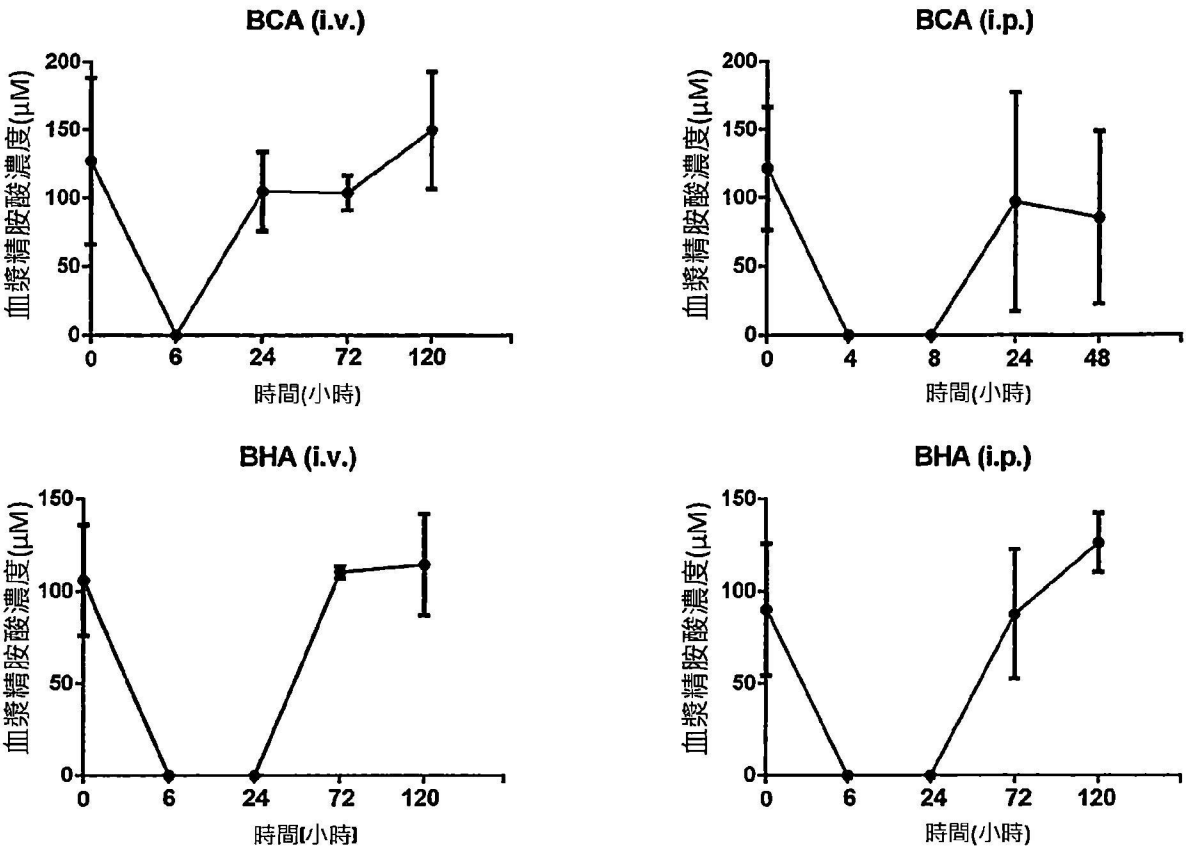


圖 9

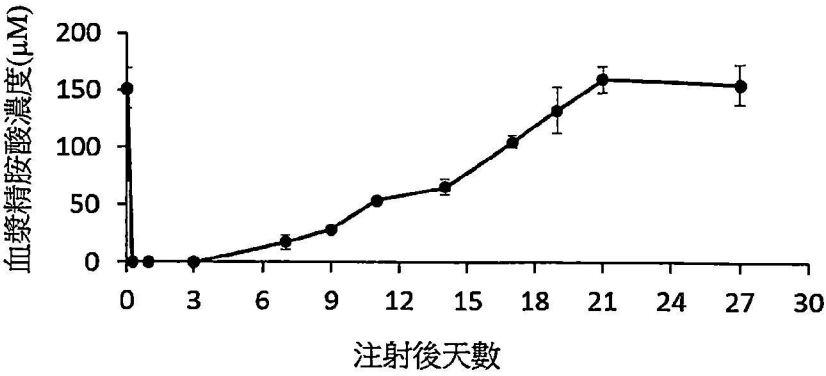


圖 10A

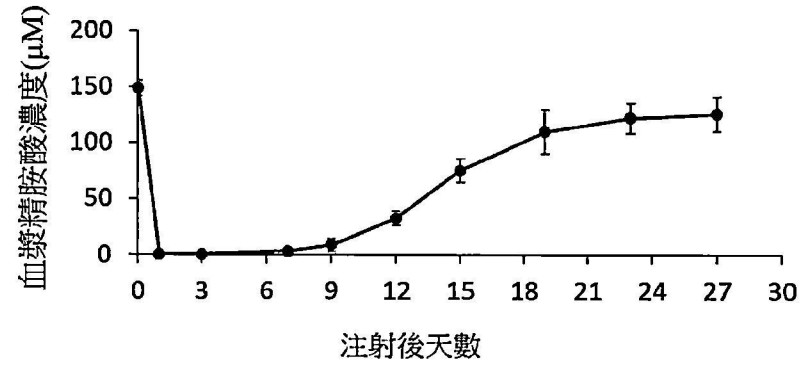


圖 10B

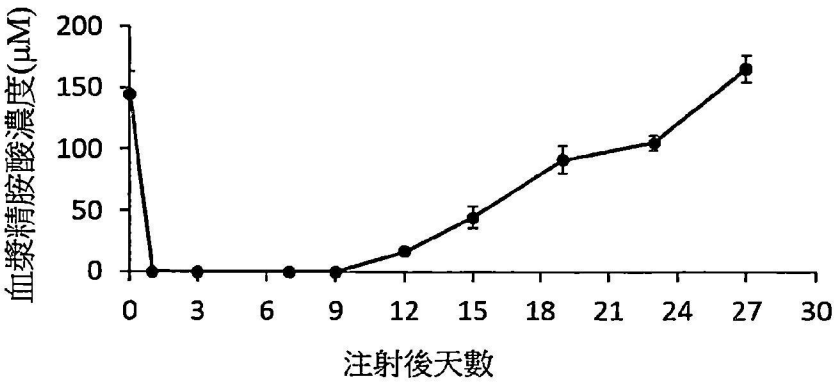


圖 10C

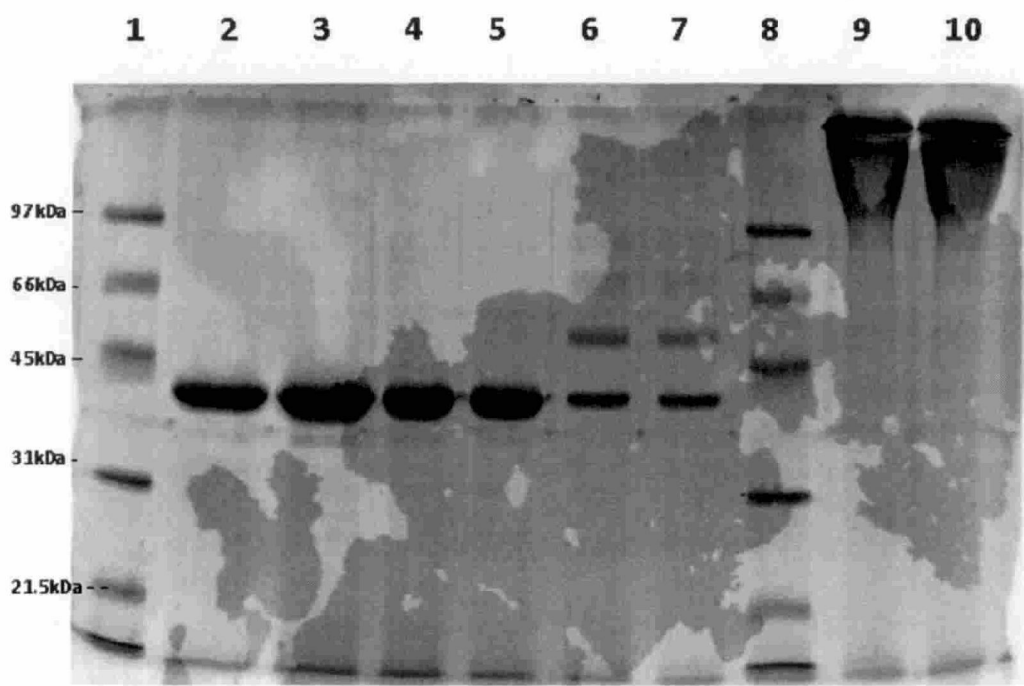


圖 11

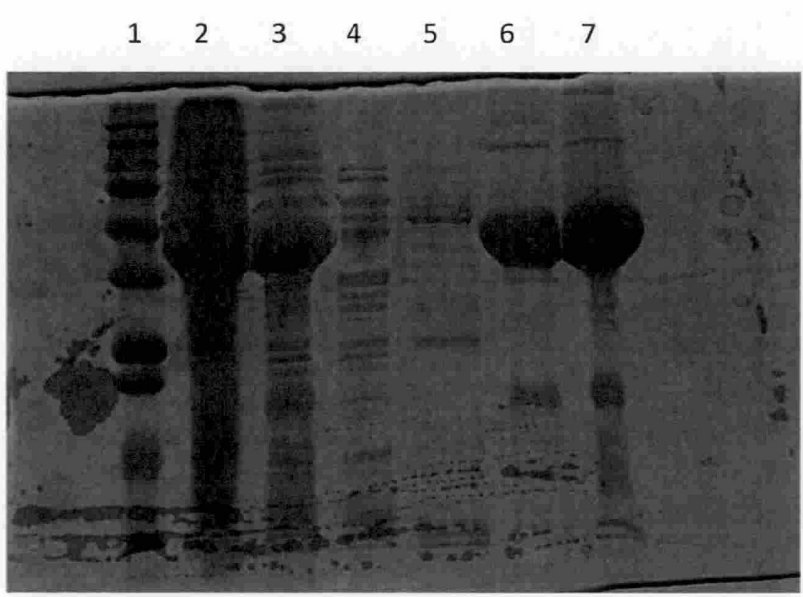


圖 12

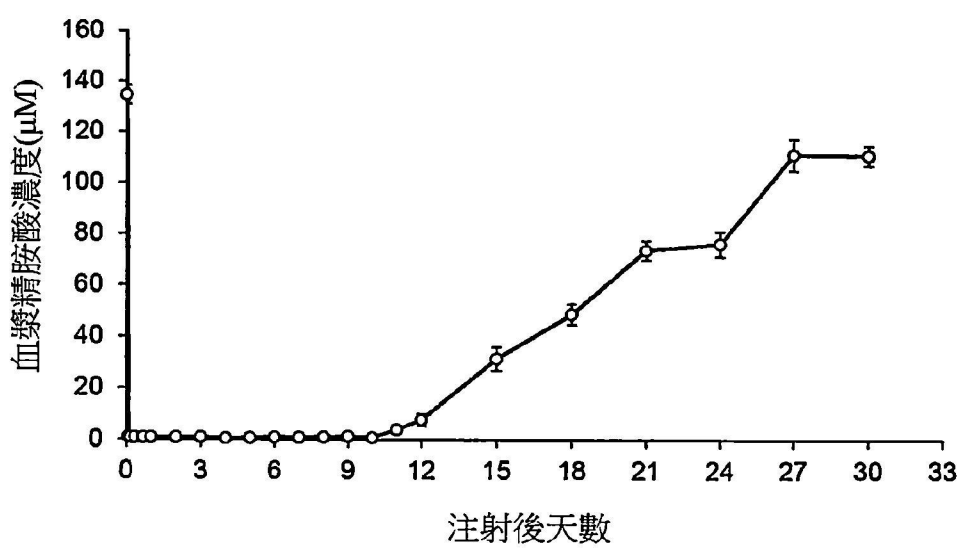


圖 13

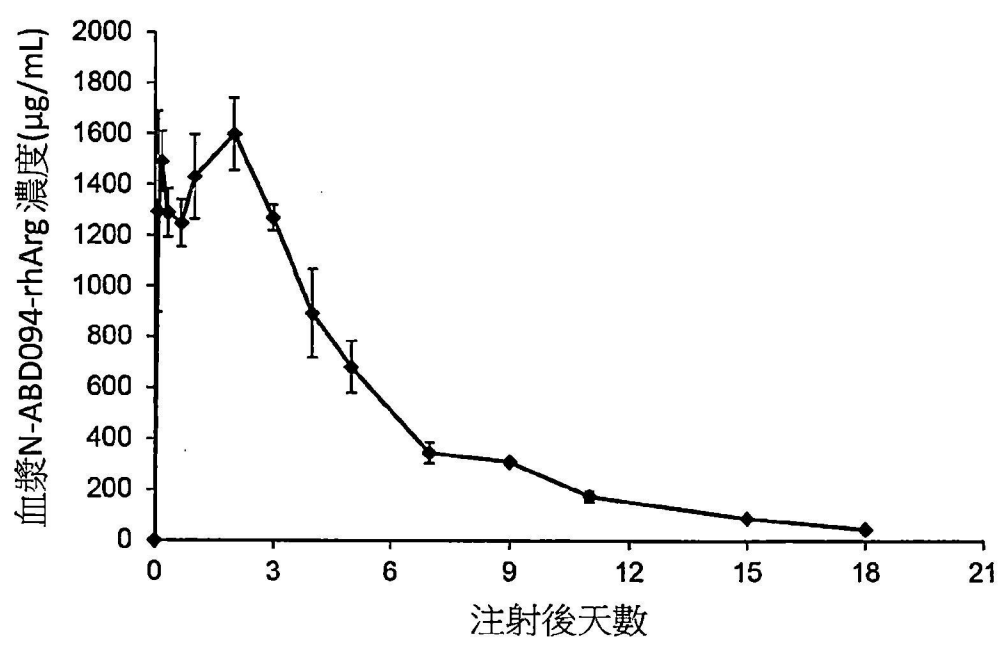


圖 14

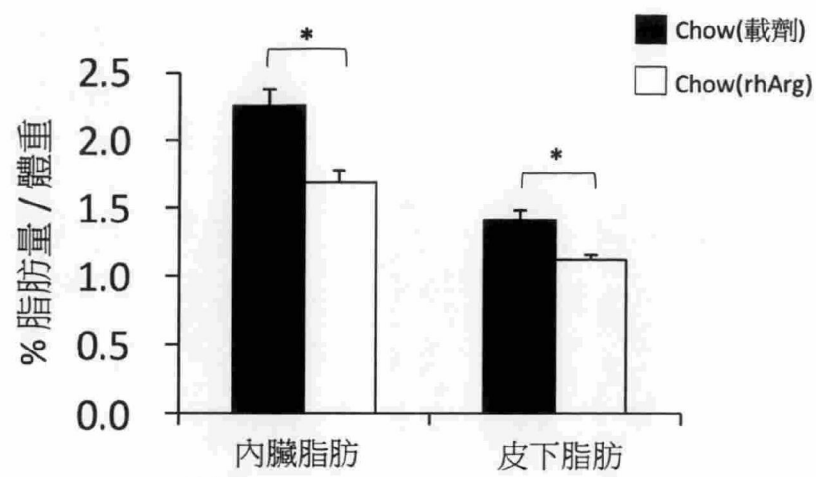


圖 15A

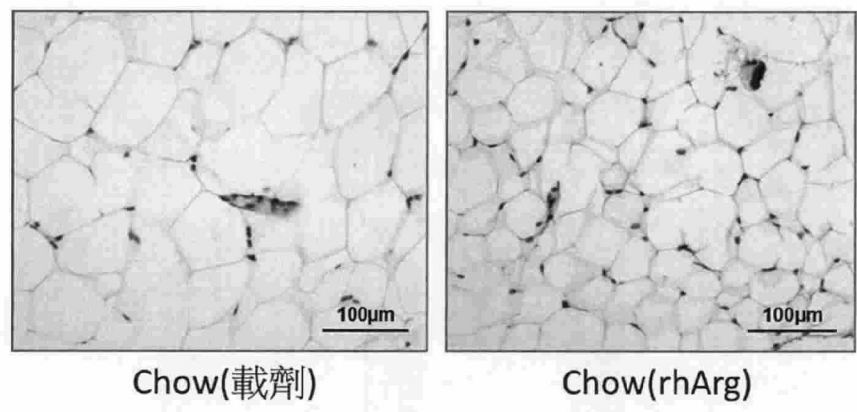


圖 15B

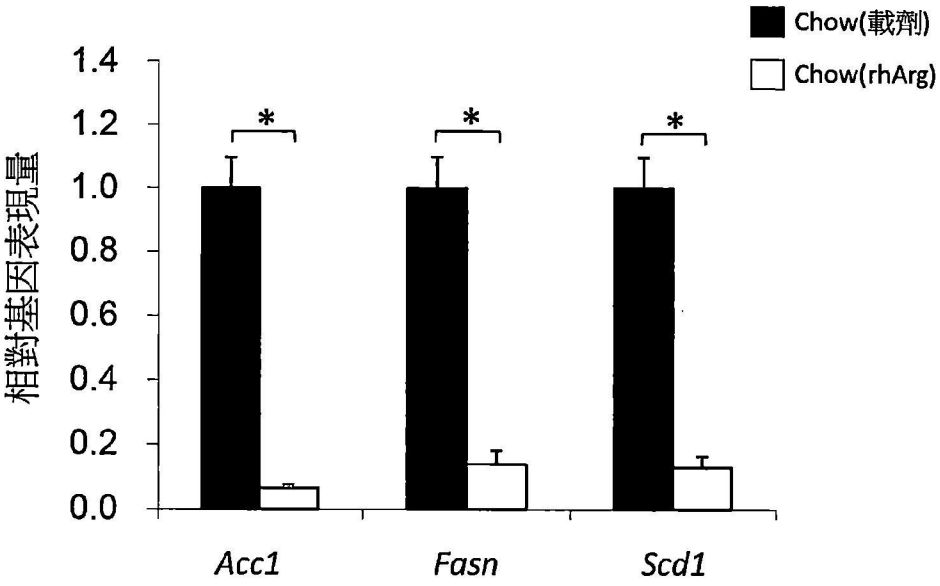


圖 16A

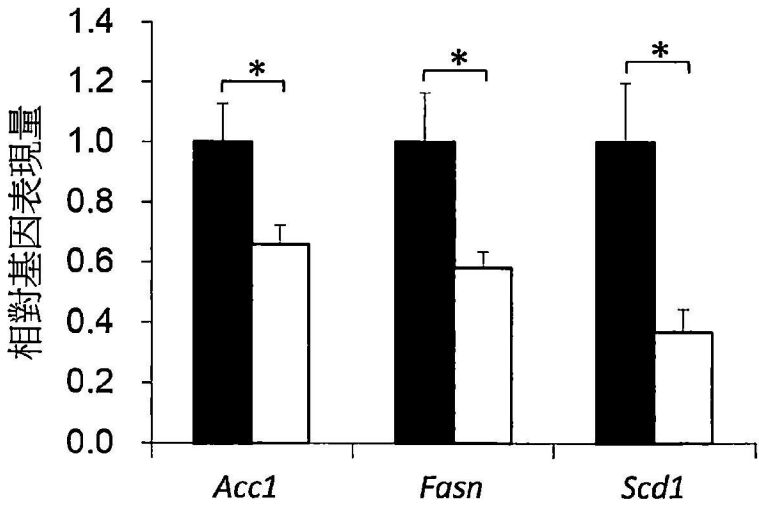


圖 16B

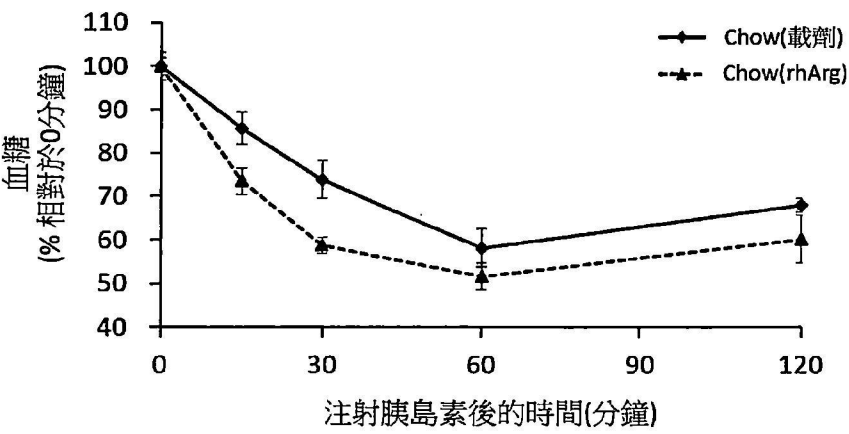


圖 17A

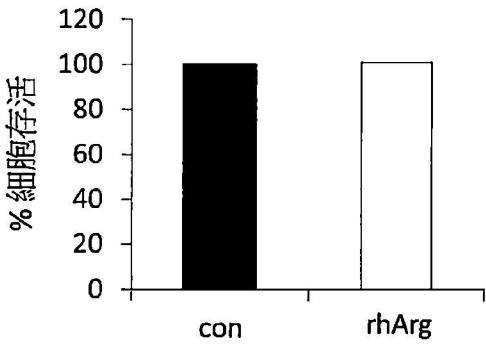


圖 17B

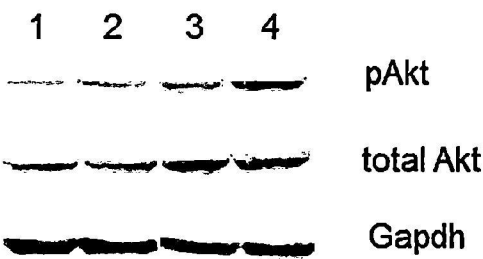


圖 17C

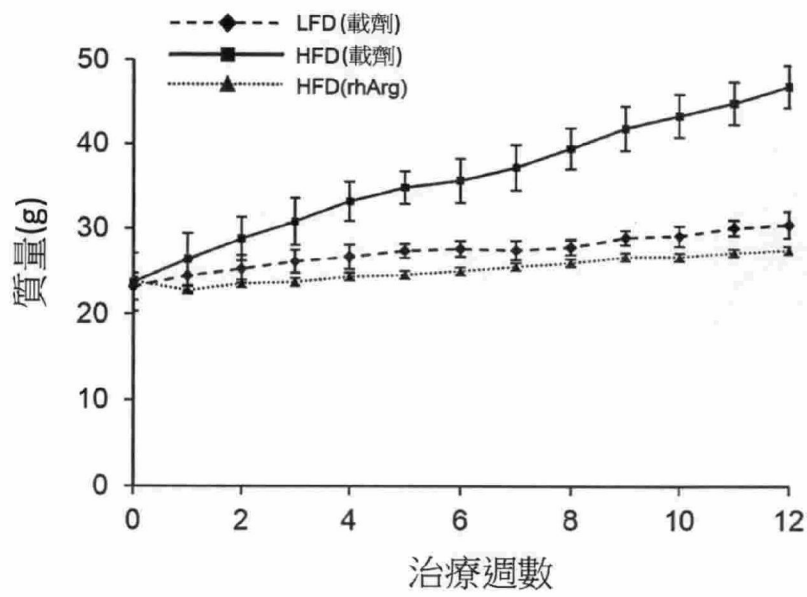


圖 18A

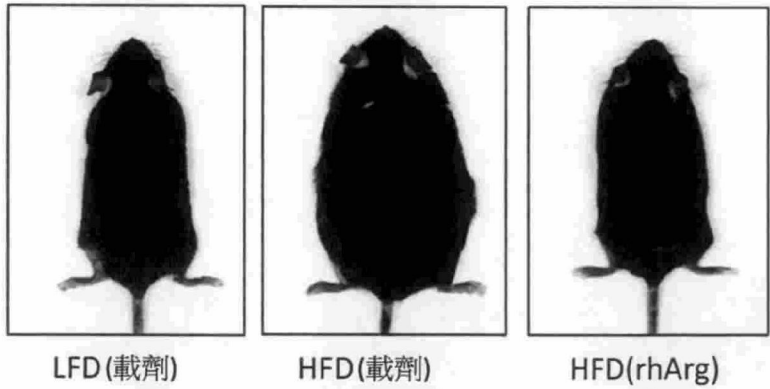


圖 18B

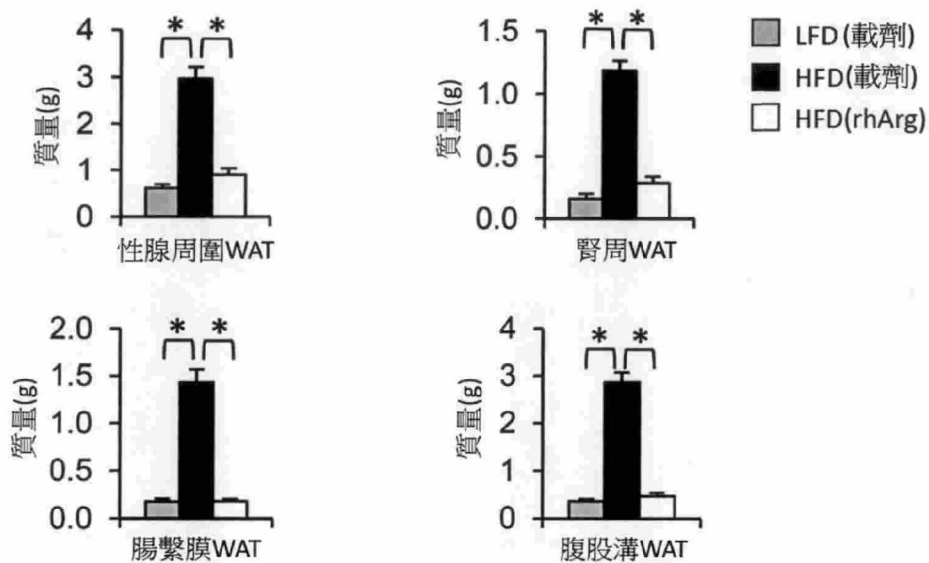


圖 19A

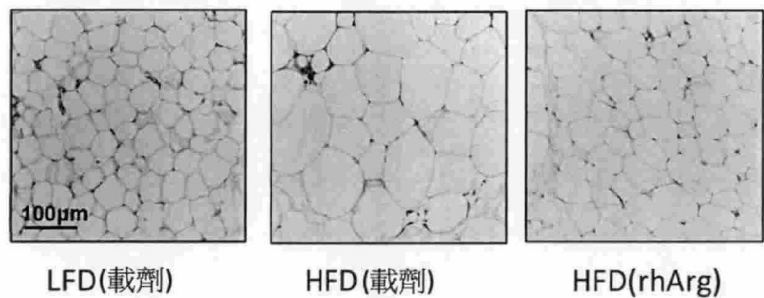


圖 19B

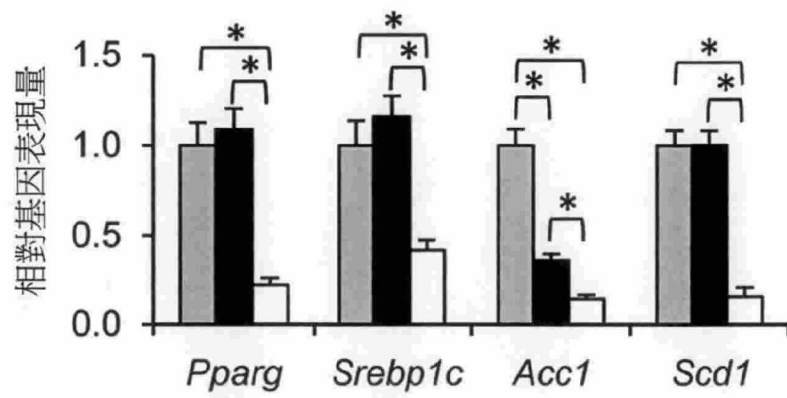


圖 19C

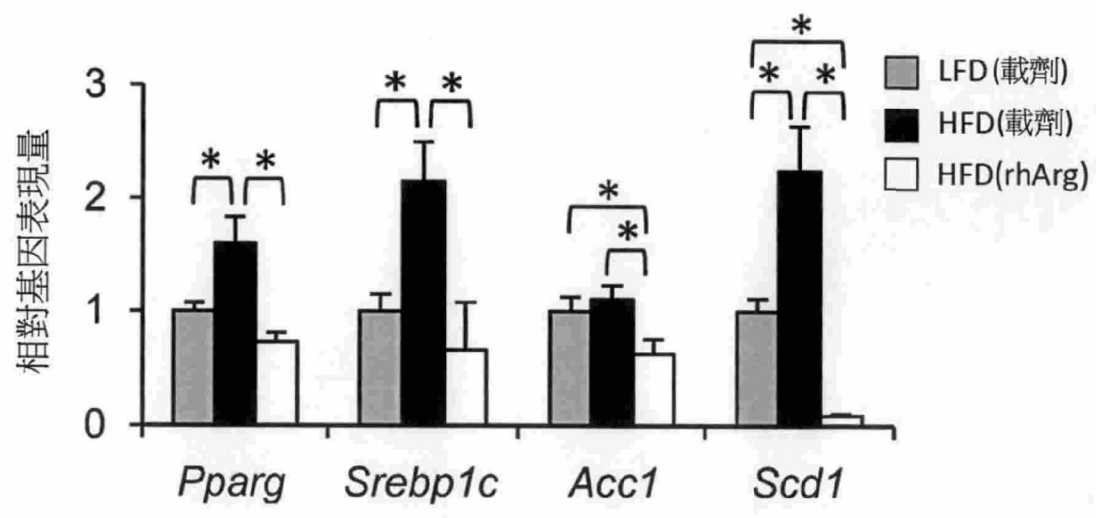


圖 20

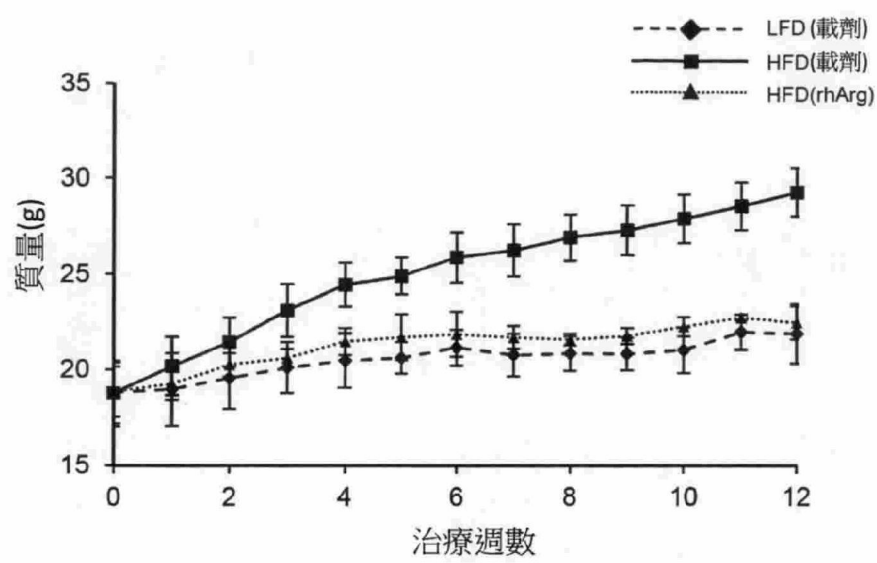


圖 21A

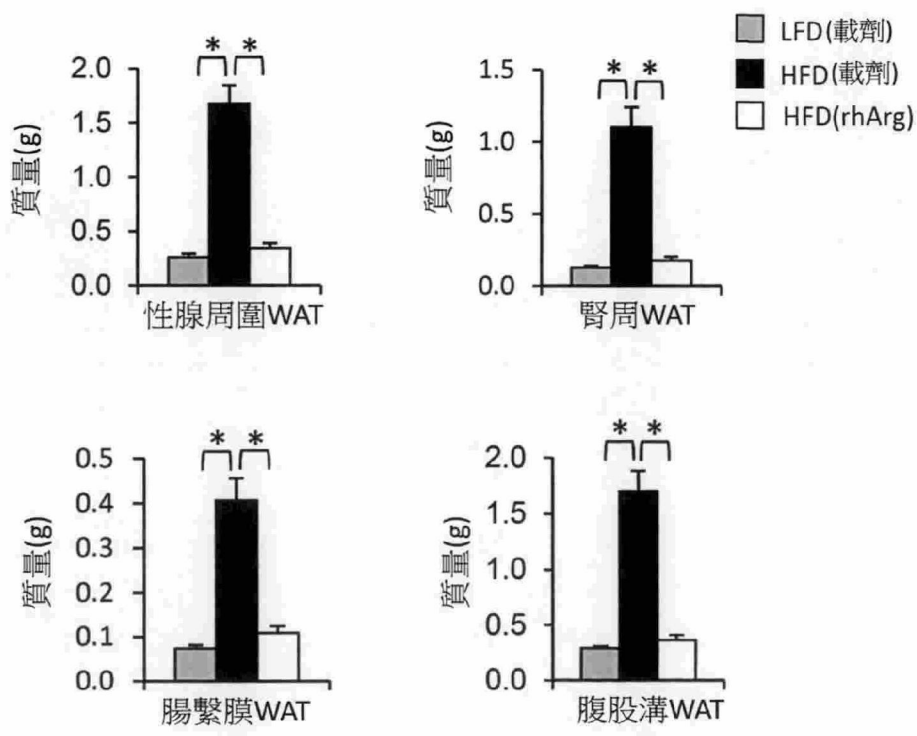


圖 21B

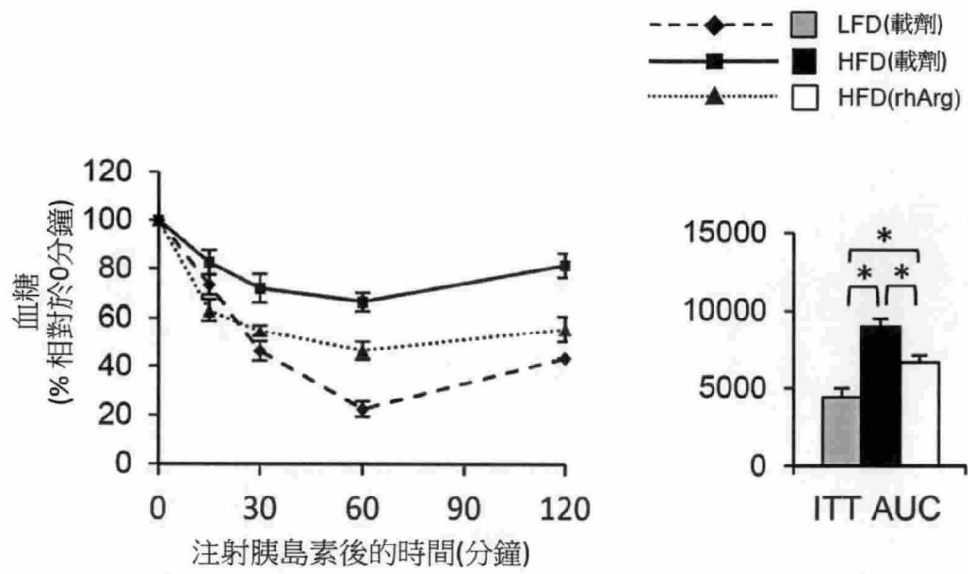


圖 22A

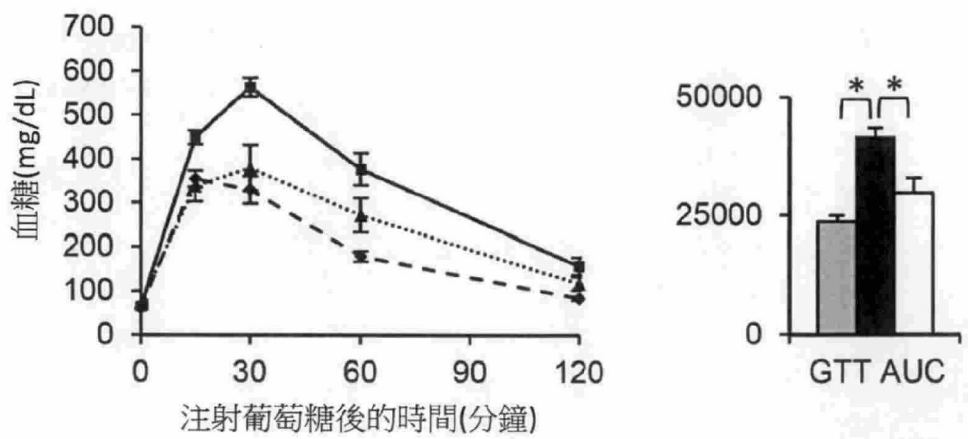


圖 22B

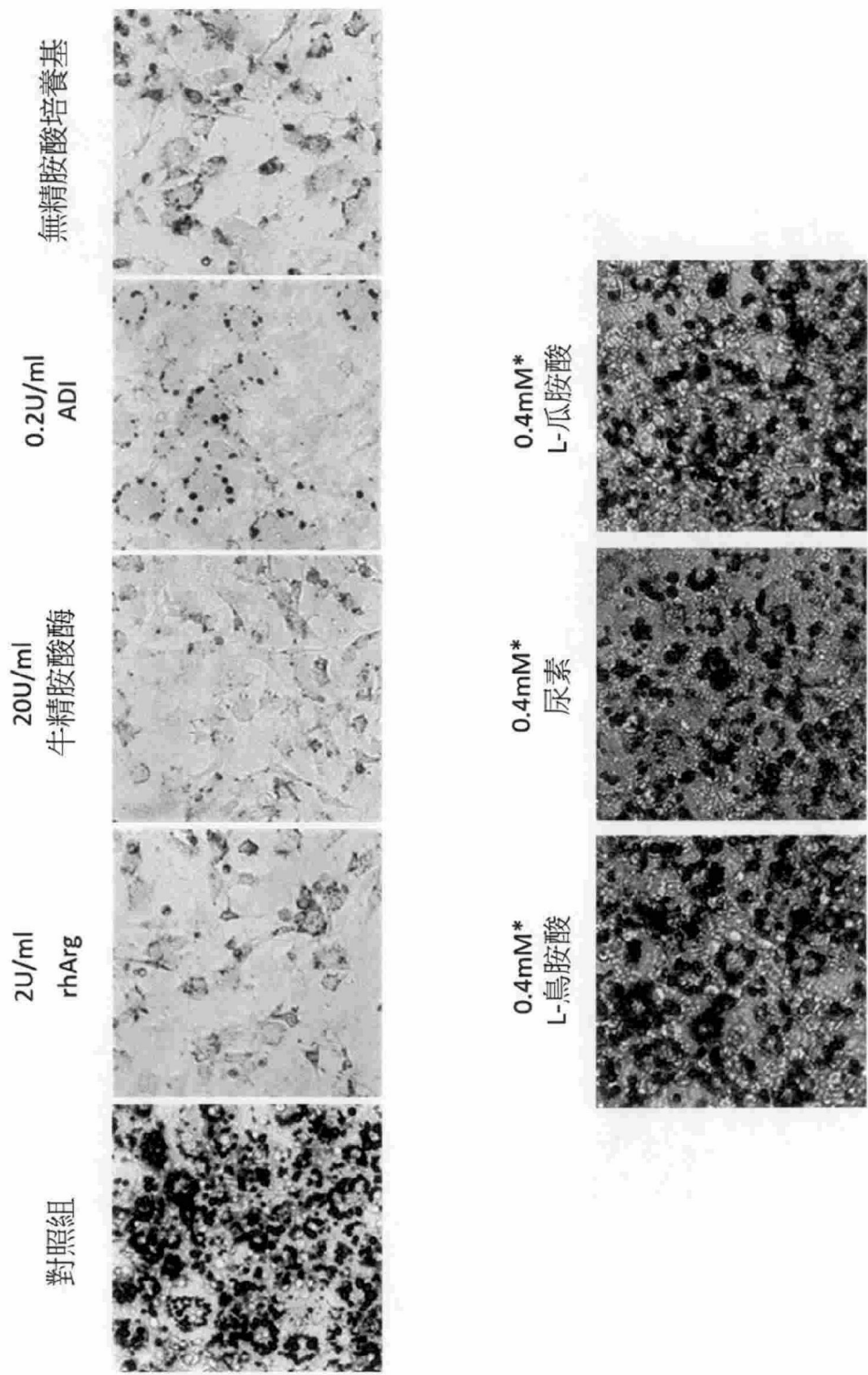


圖 23

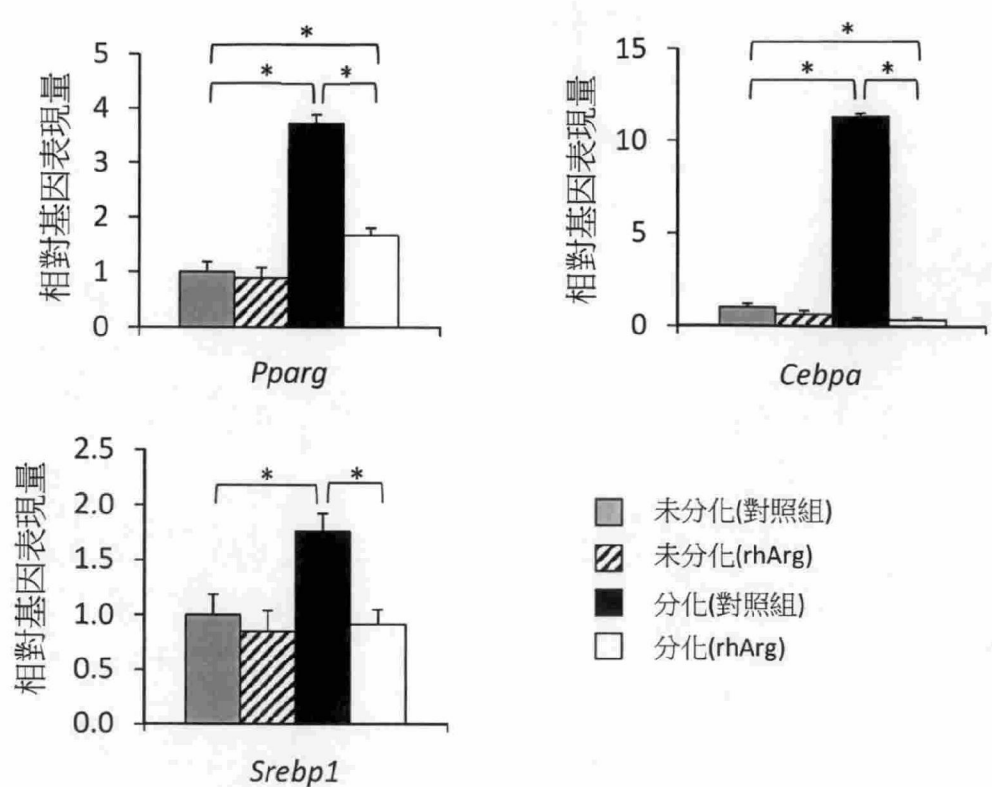


圖 24A

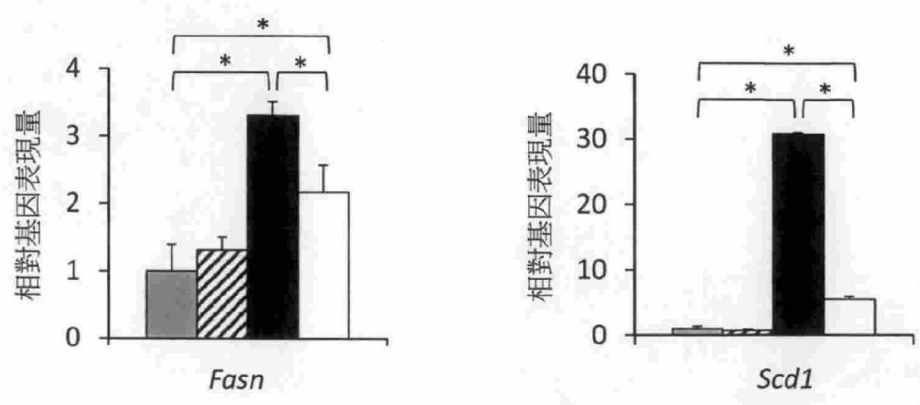


圖 24B

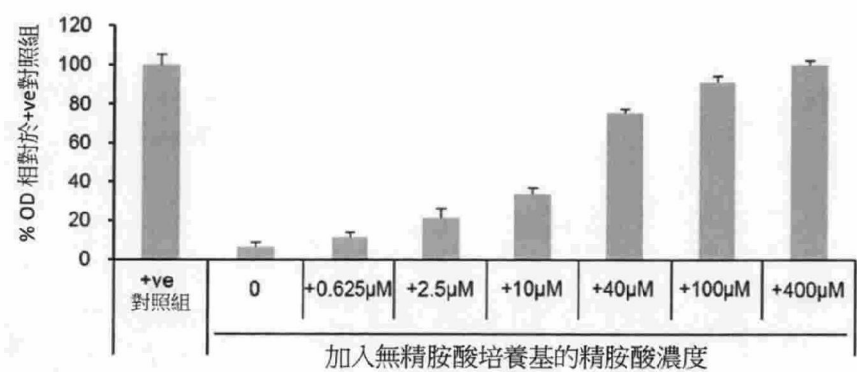


圖 25A

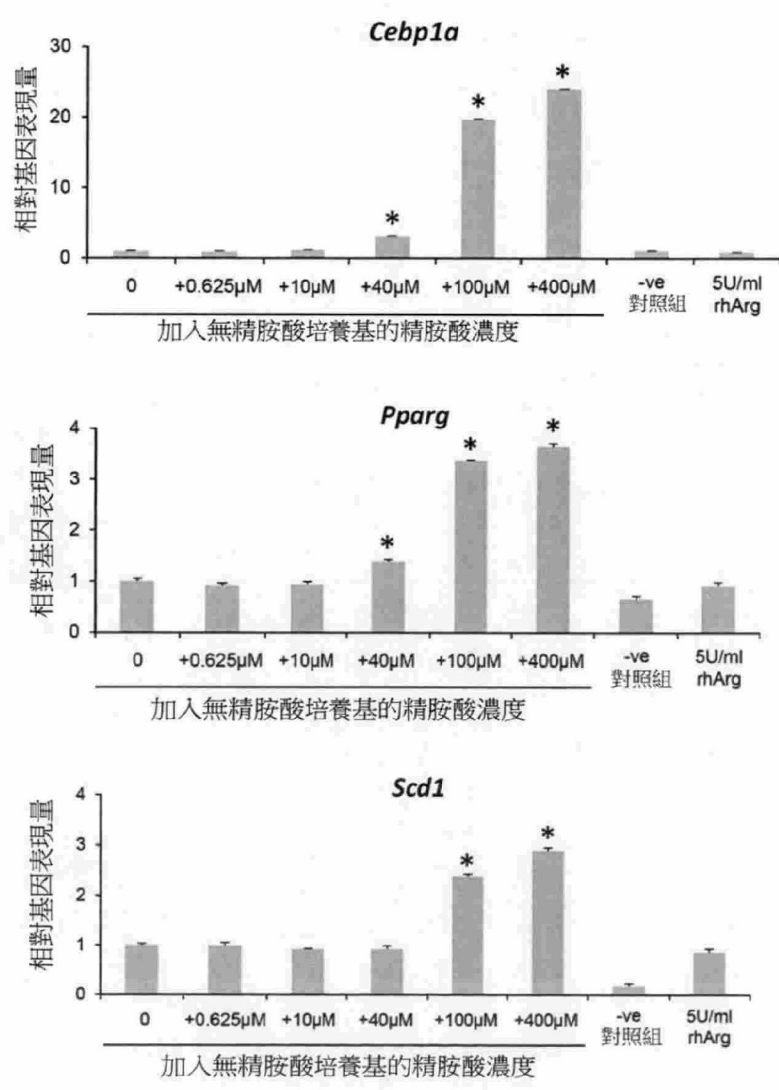


圖 25B

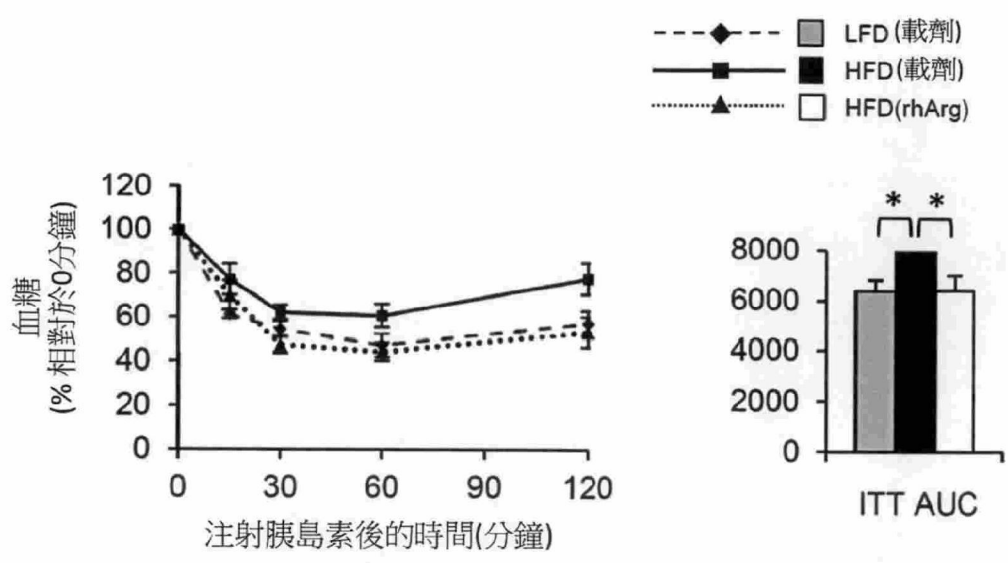


圖 26A

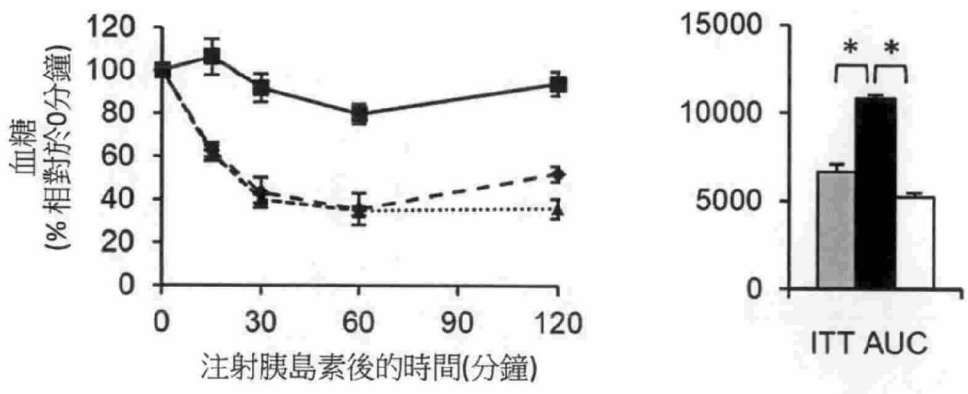


圖 26B

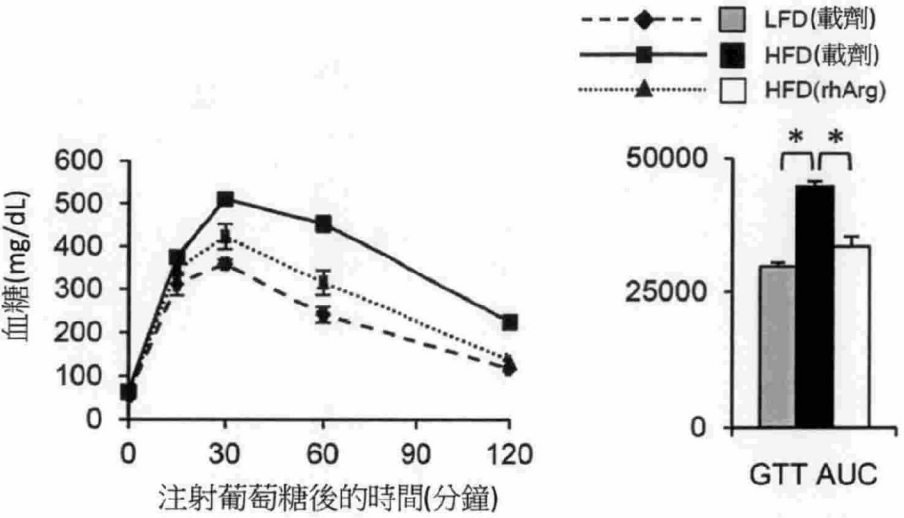


圖 27A

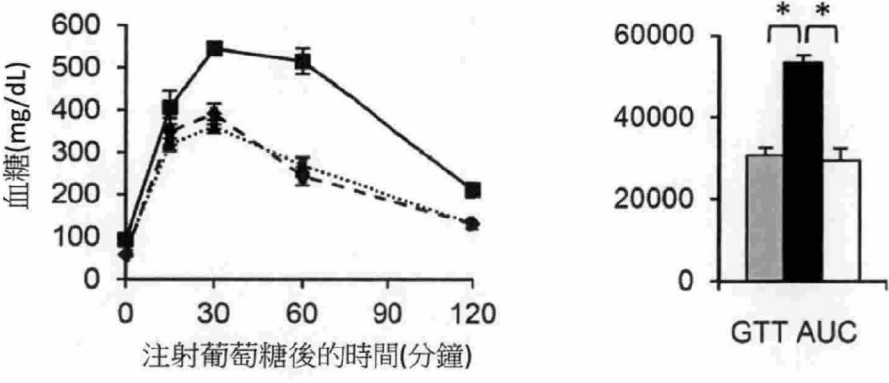


圖 27B

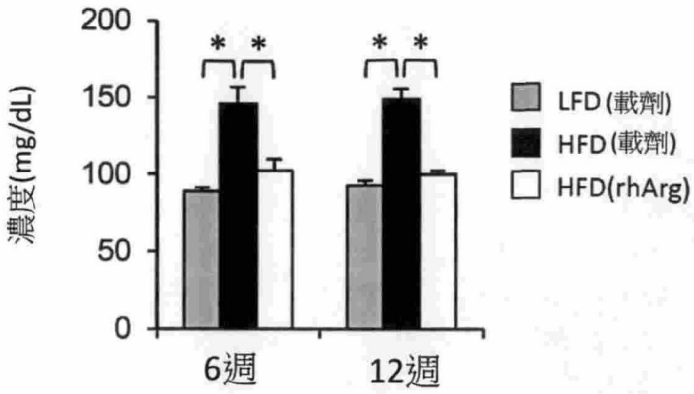


圖 28A

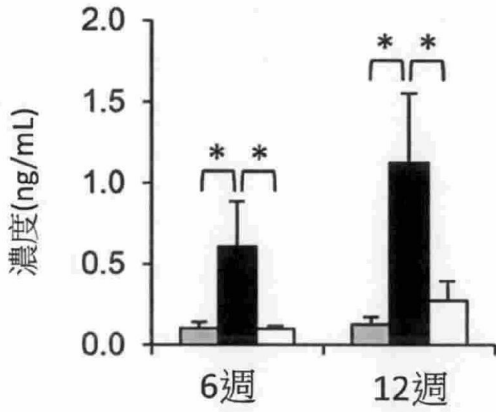


圖 28B

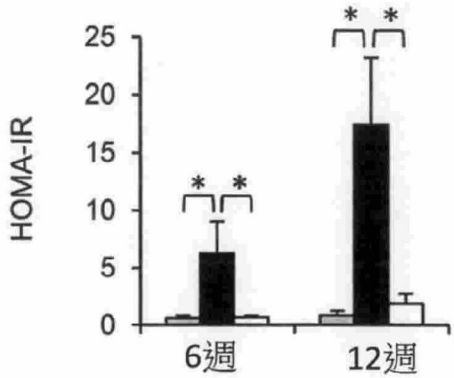


圖 28C

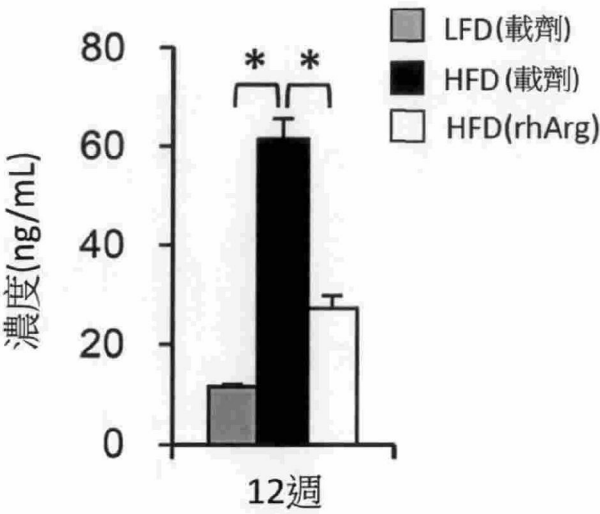


圖 29A

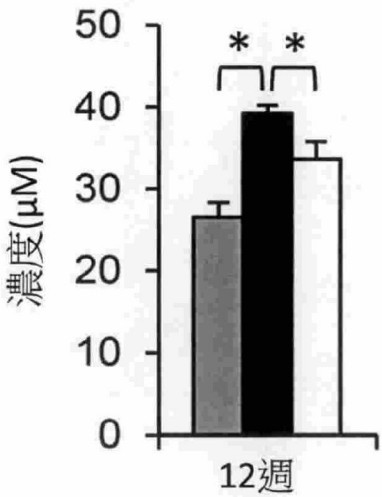


圖 29B

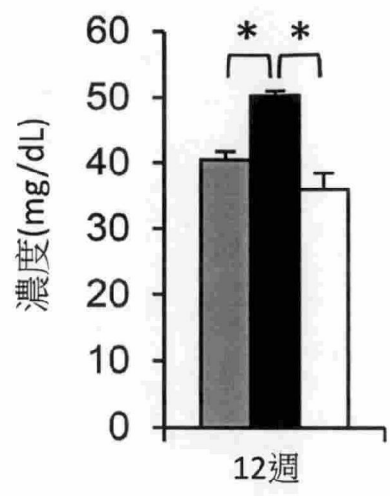


圖 29C

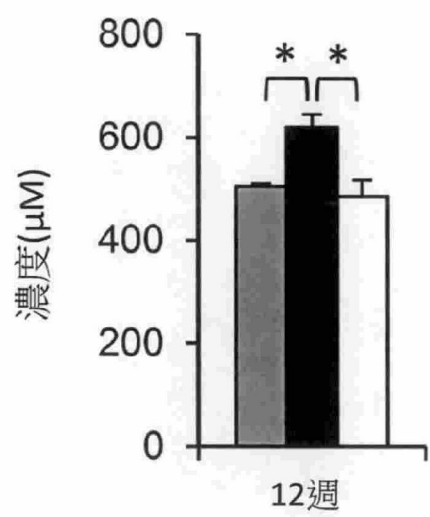


圖 29D

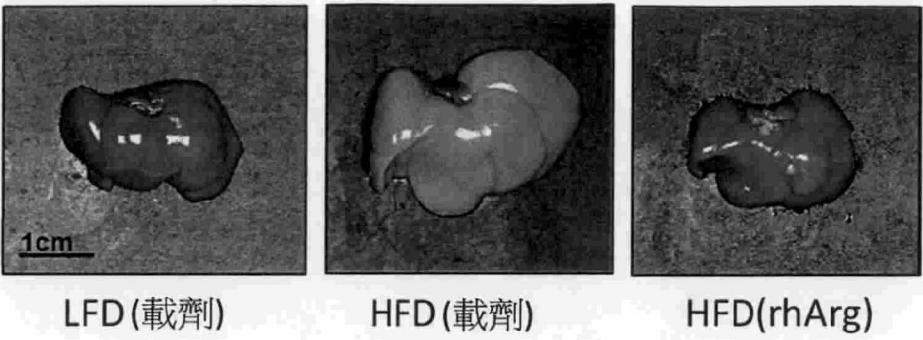


圖 30A

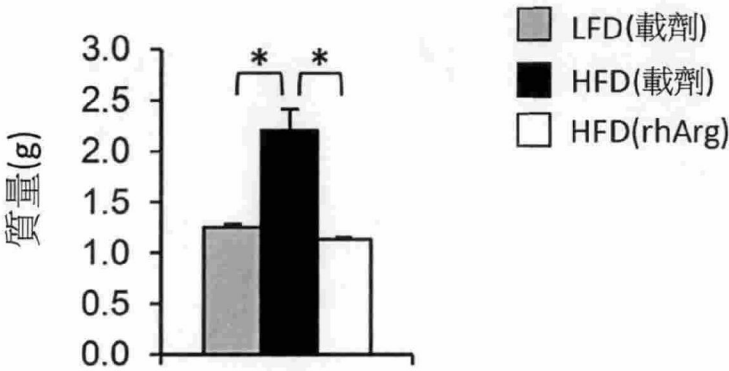


圖 30B

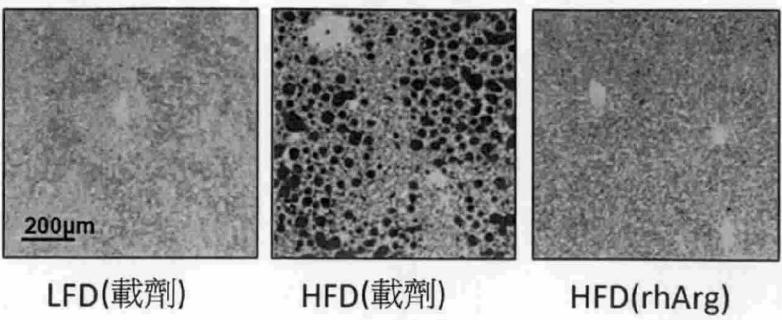


圖 31A

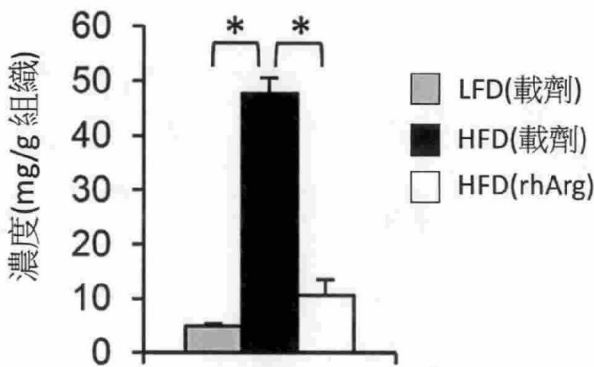


圖 31B

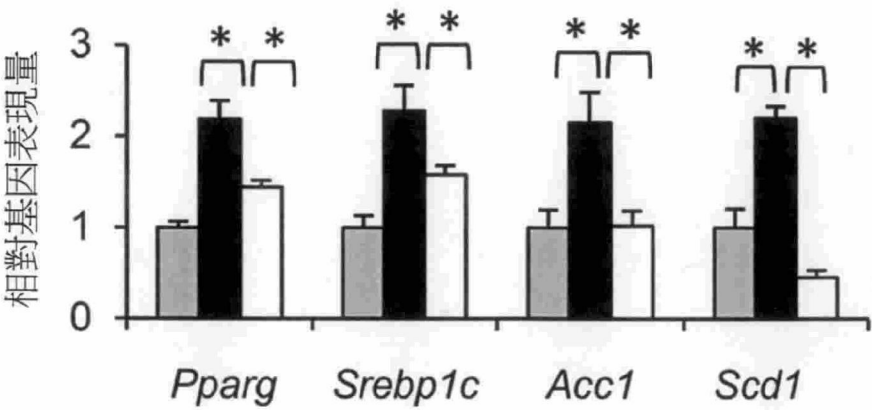


圖 31C

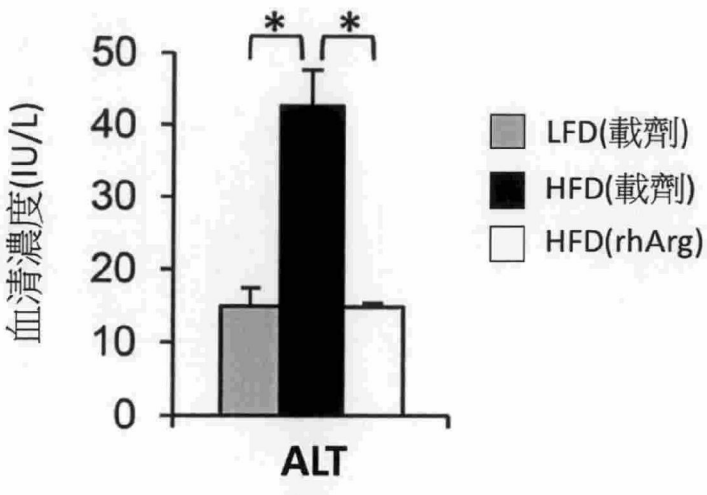


圖 32

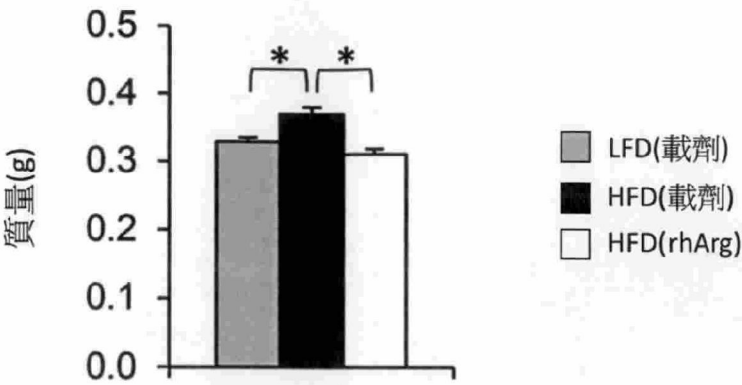


圖 33A

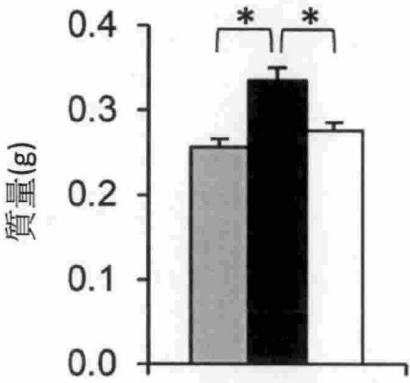


圖 33B

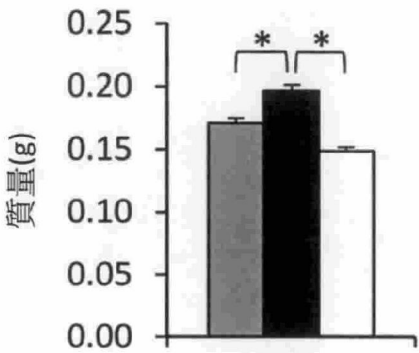


圖 33C

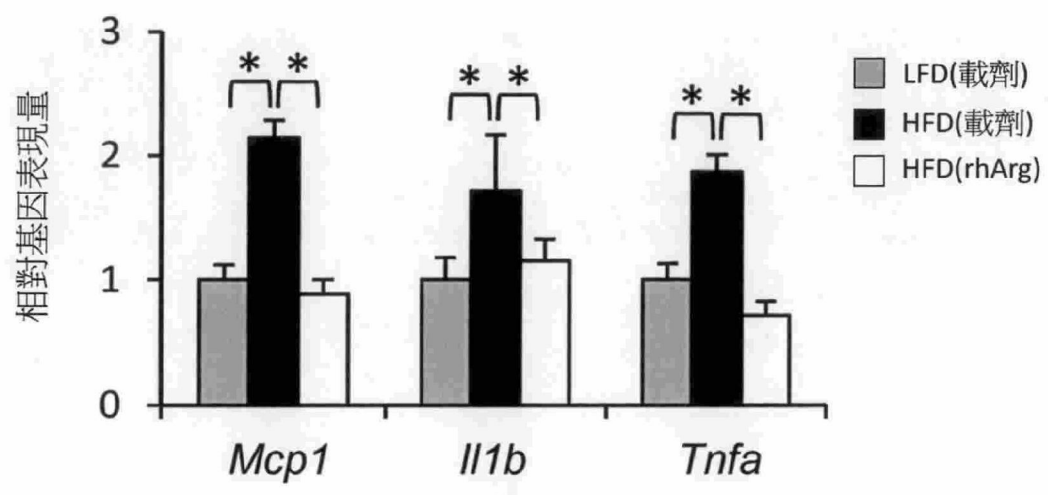


圖 34A

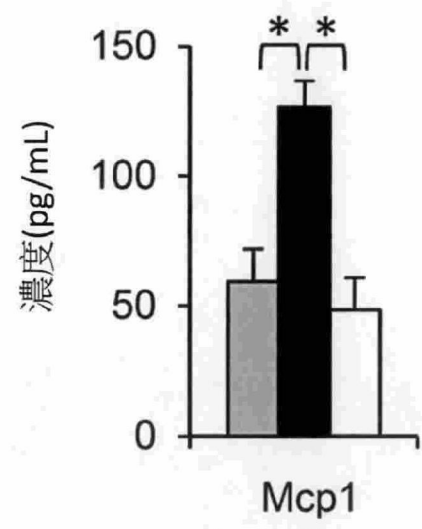


圖 34B

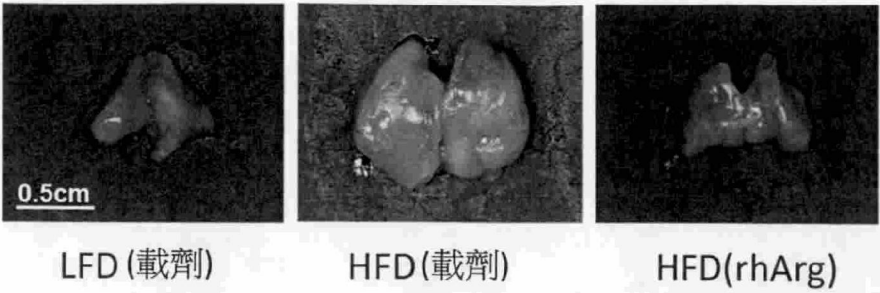


圖 35A

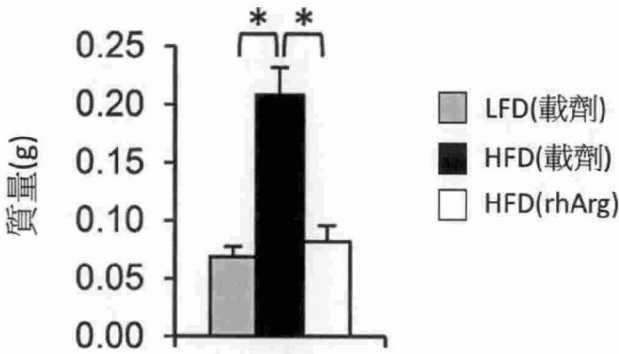


圖 35B

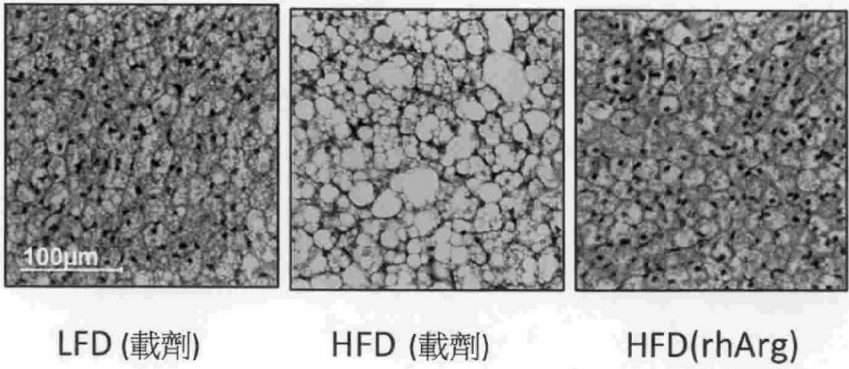


圖 35C

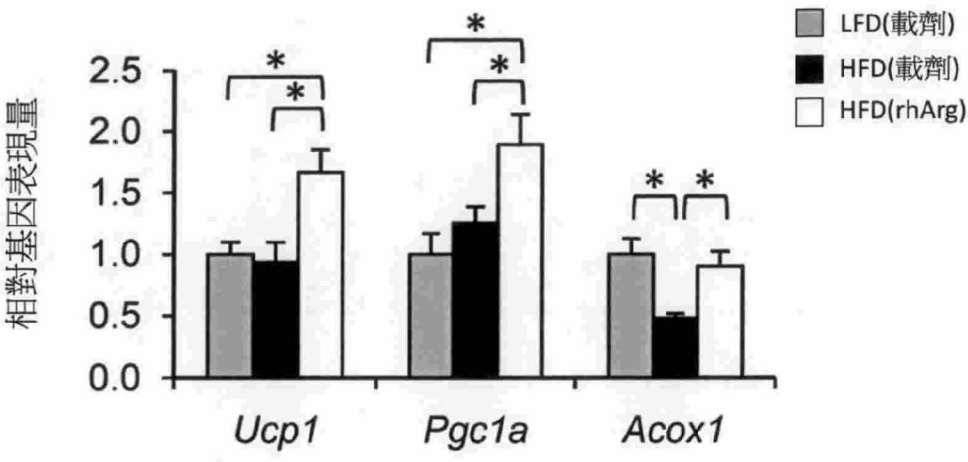


圖 36

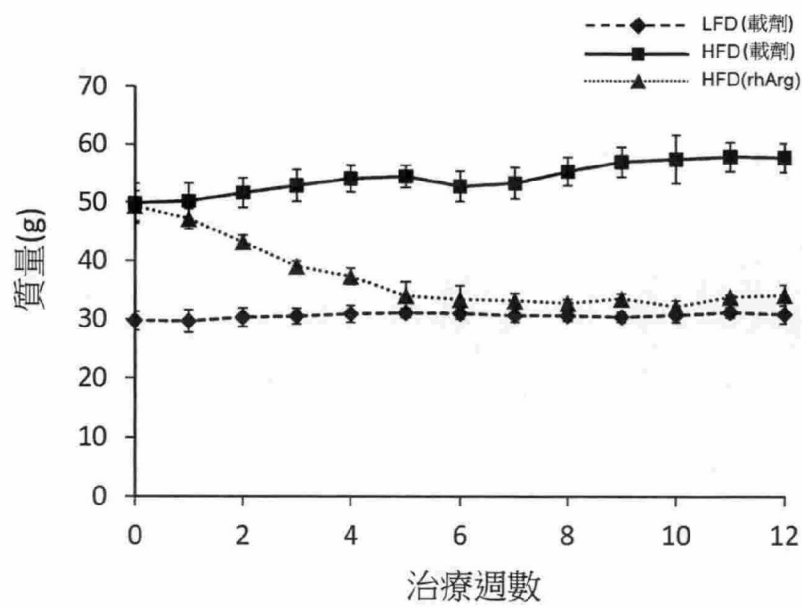


圖 37A

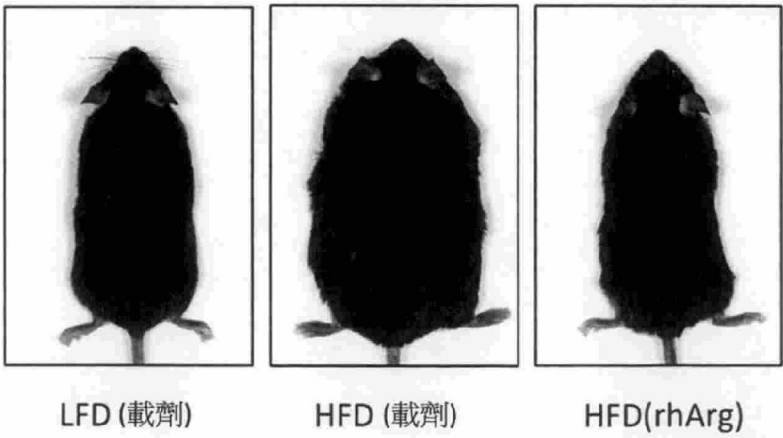


圖 37B

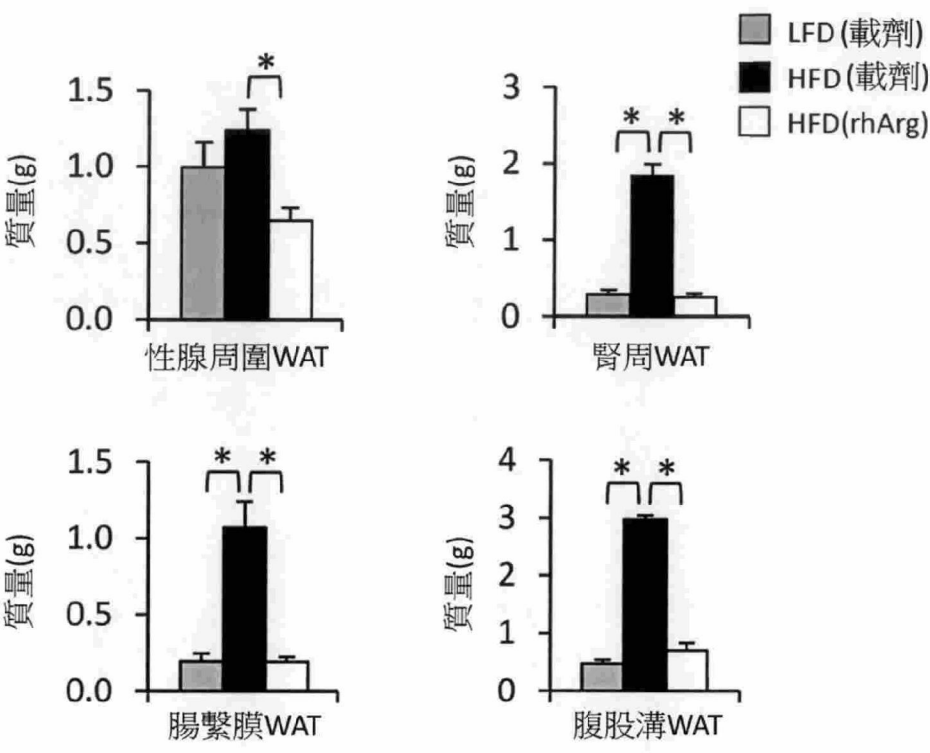


圖 38A

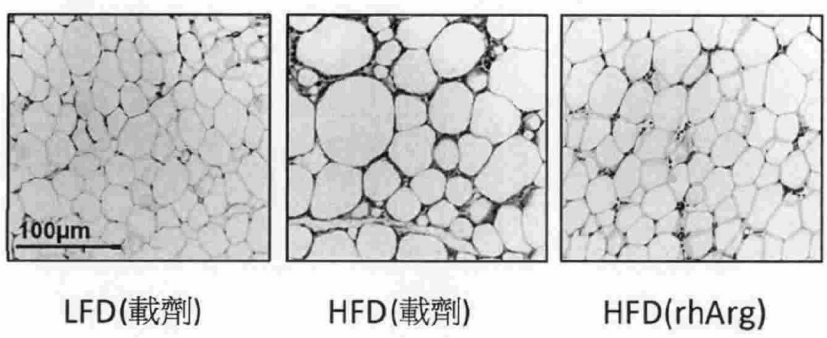


圖 38B

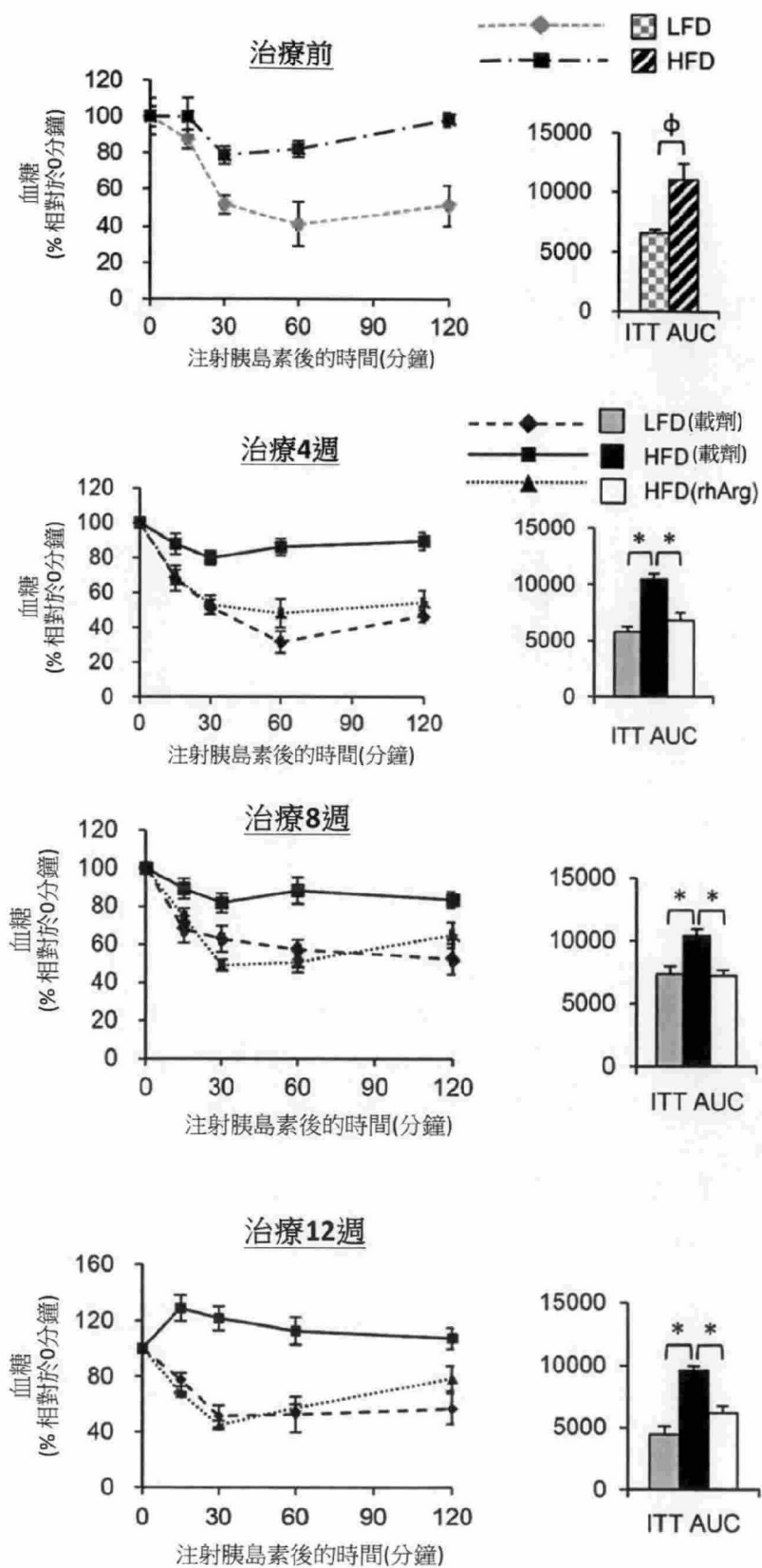


圖 39

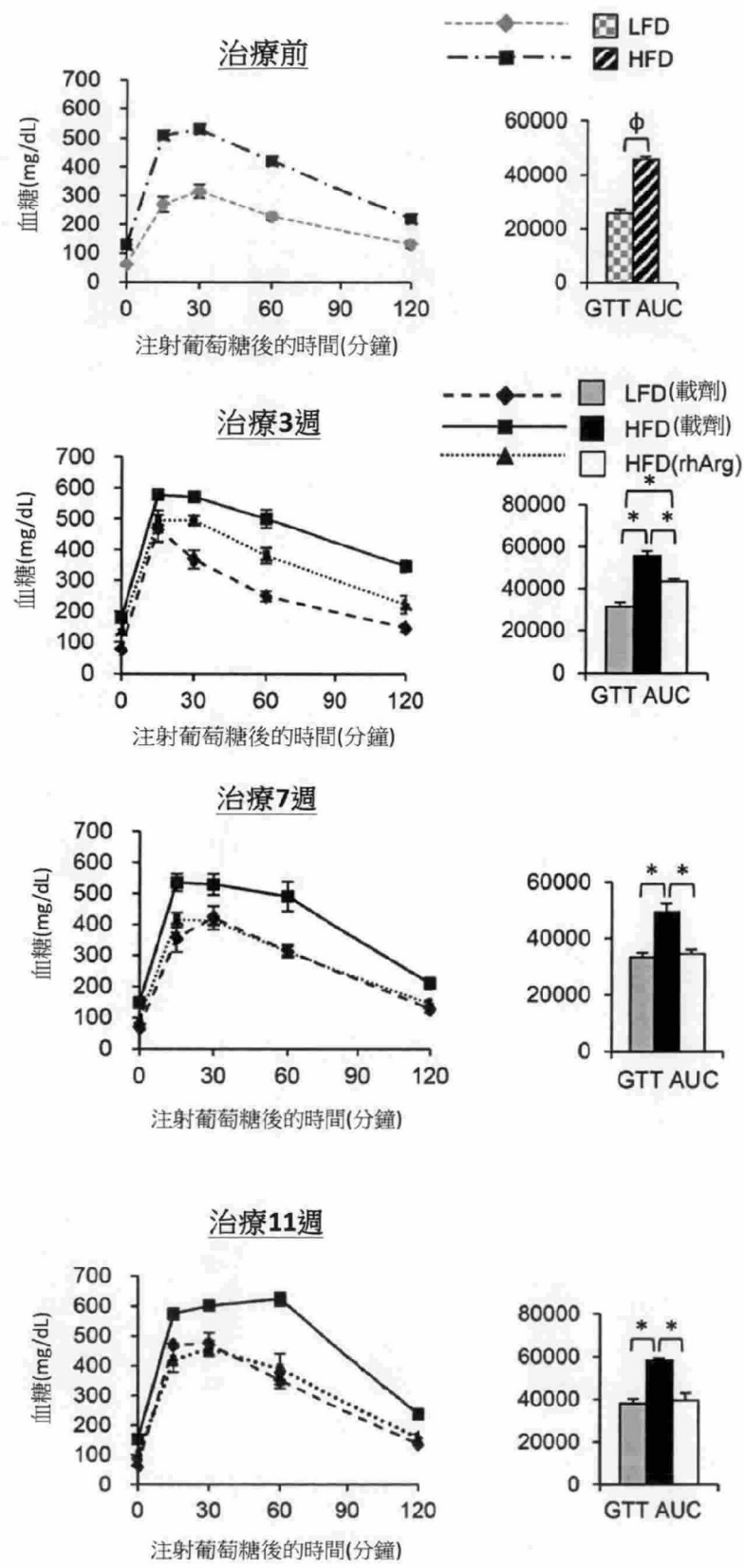


圖 40

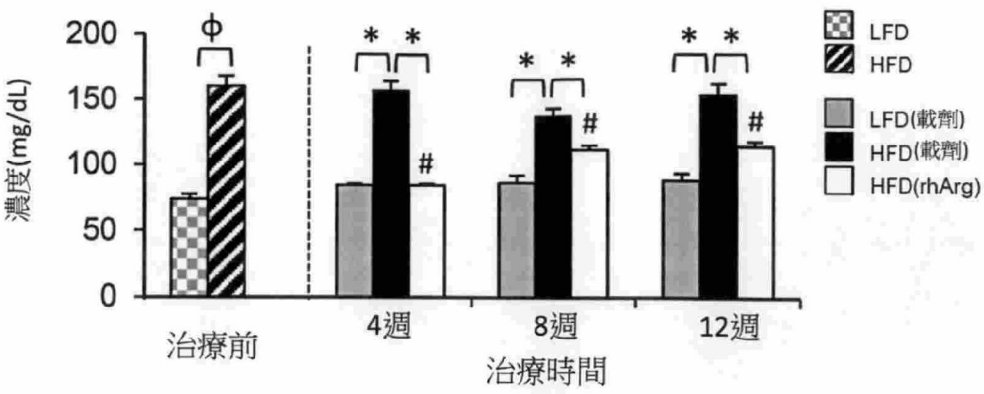


圖 41A

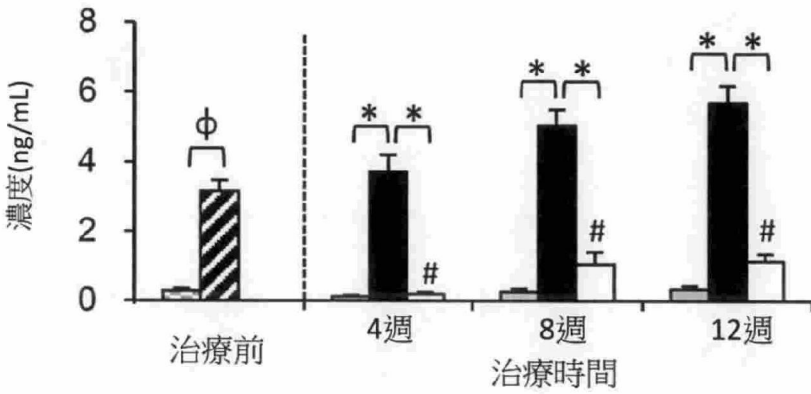


圖 41B

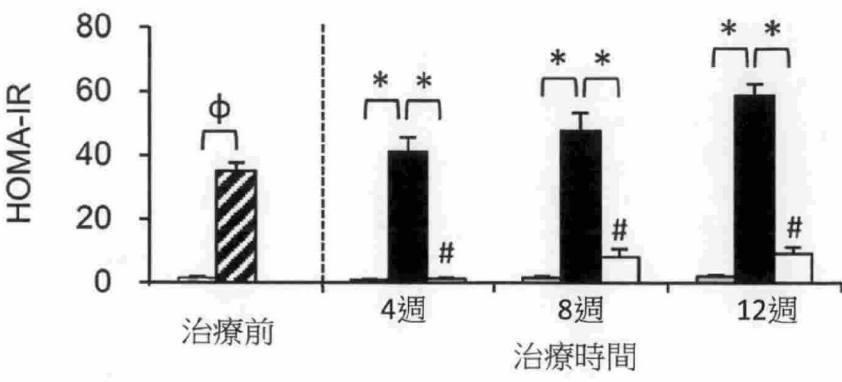


圖 41C

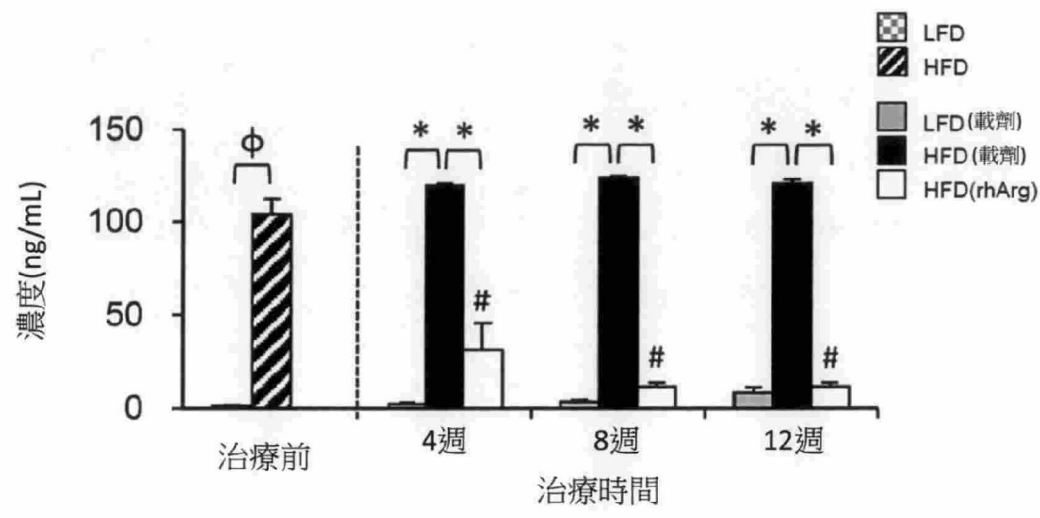


圖 42A

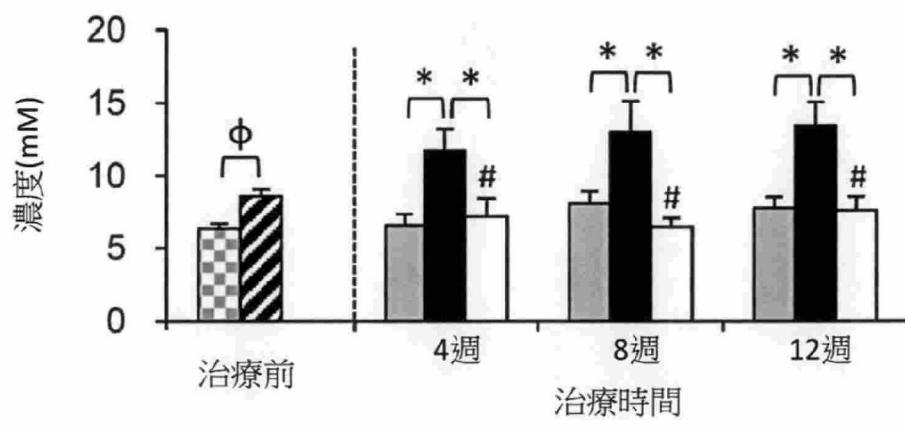


圖 42B

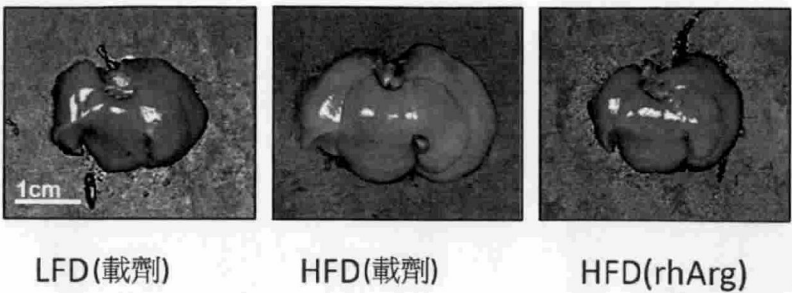


圖 43A

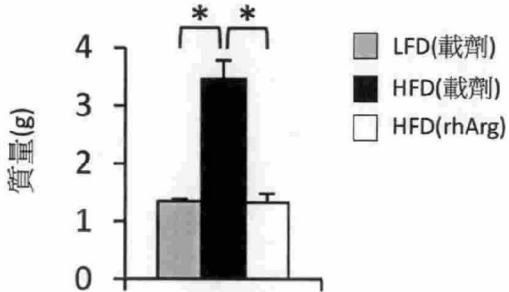


圖 43B

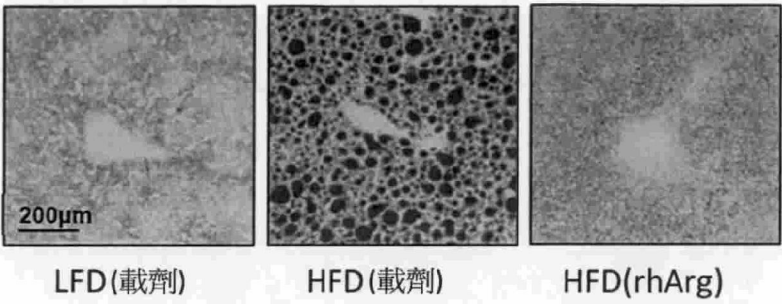


圖 44A

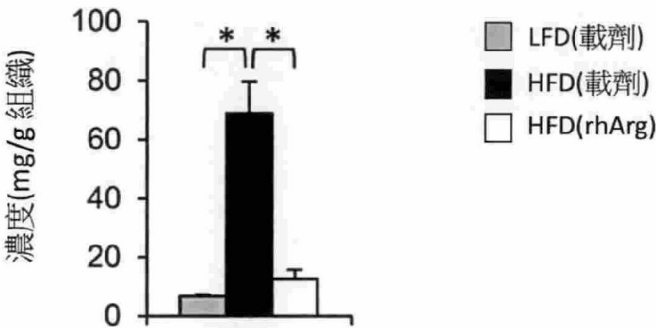


圖 44B

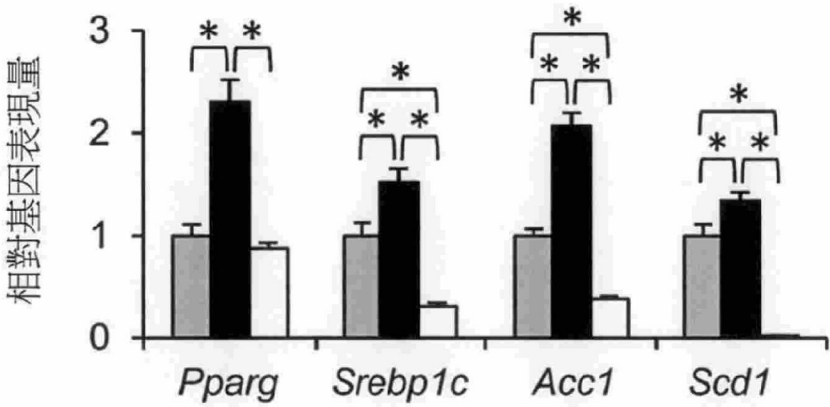


圖 44C

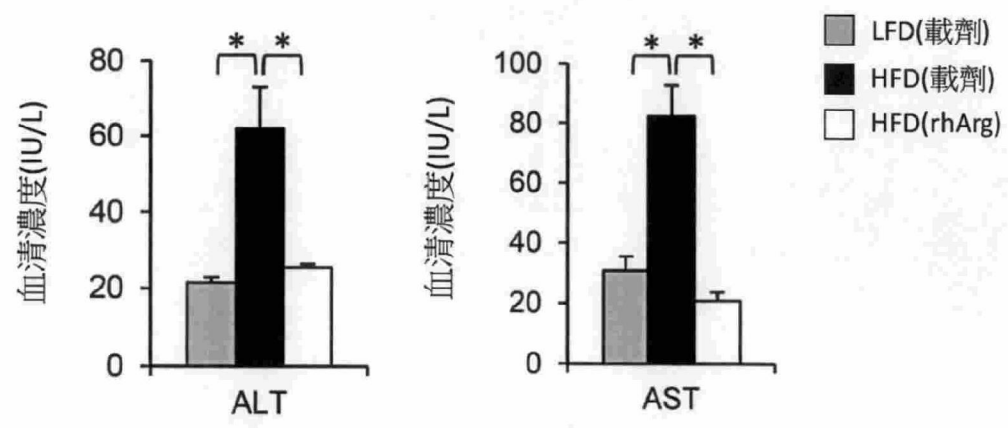


圖 45

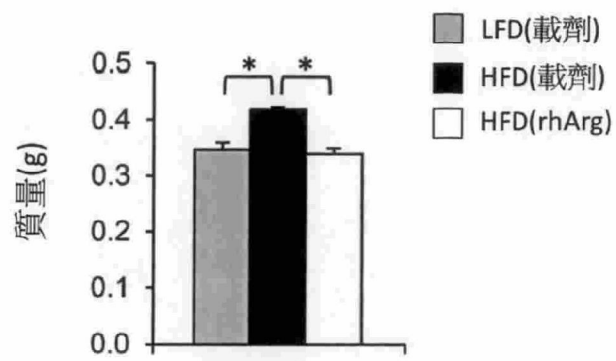


圖 46A

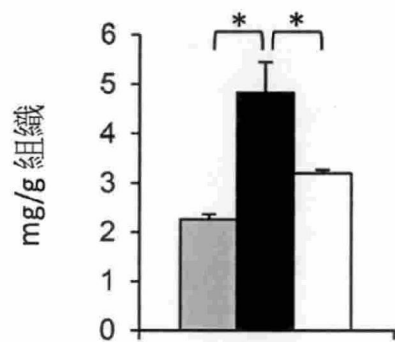


圖 46B

腎小管內空泡的結構

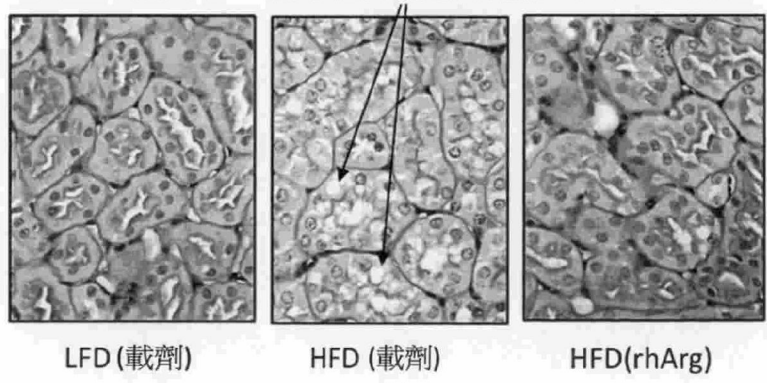


圖 46C

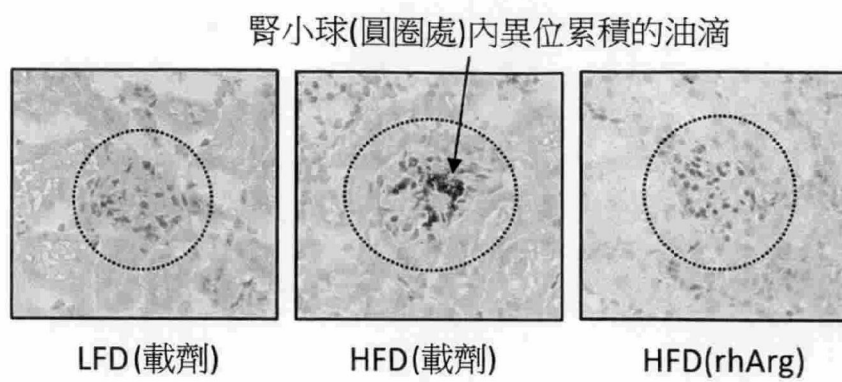


圖 46D

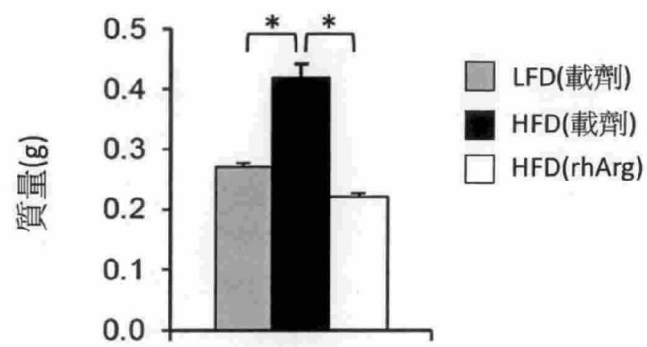


圖 47A

小葉內及小葉間大量累積的白色脂肪組織

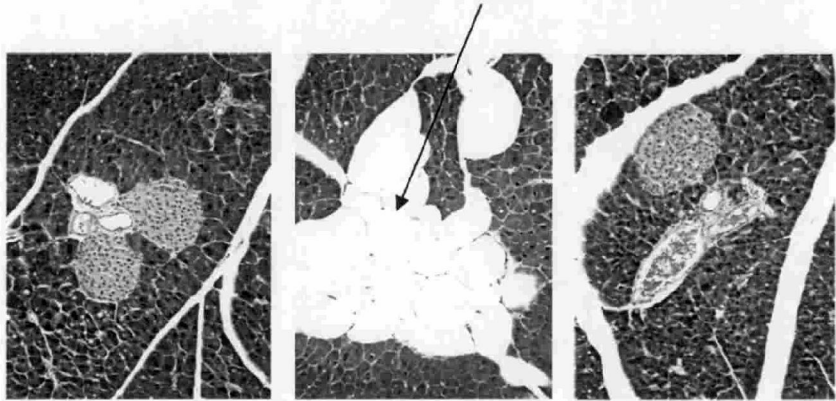


圖 47B

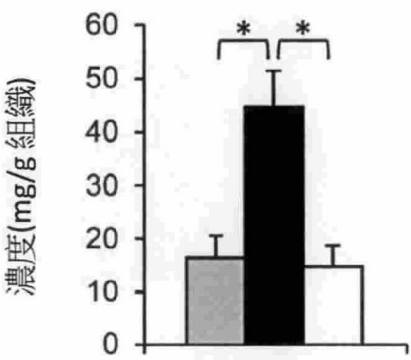


圖 47C

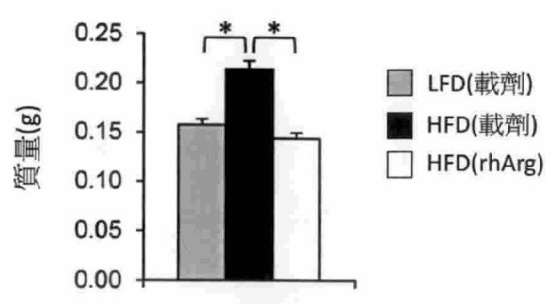


圖 48A

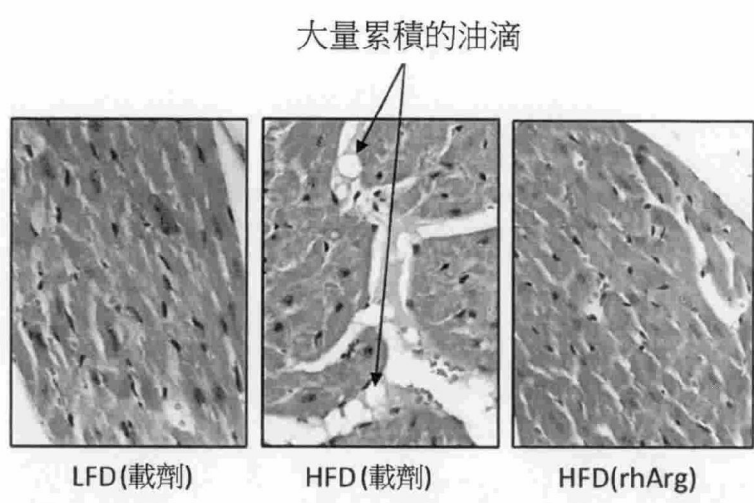


圖 48B

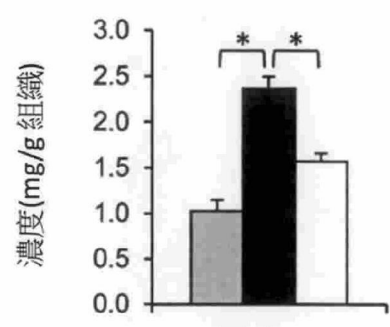


圖 48C

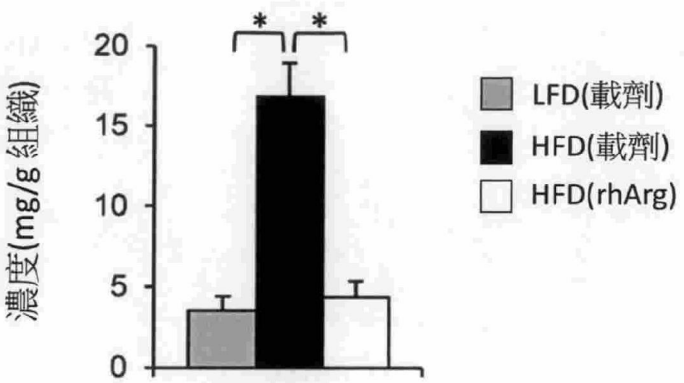


圖 49

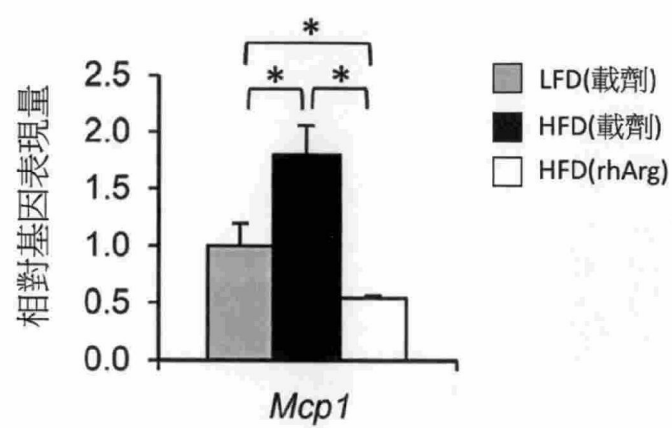


圖 50A

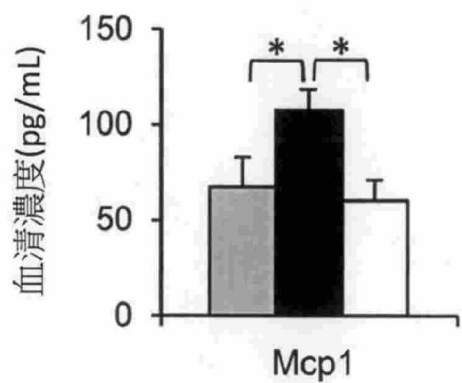


圖 50B

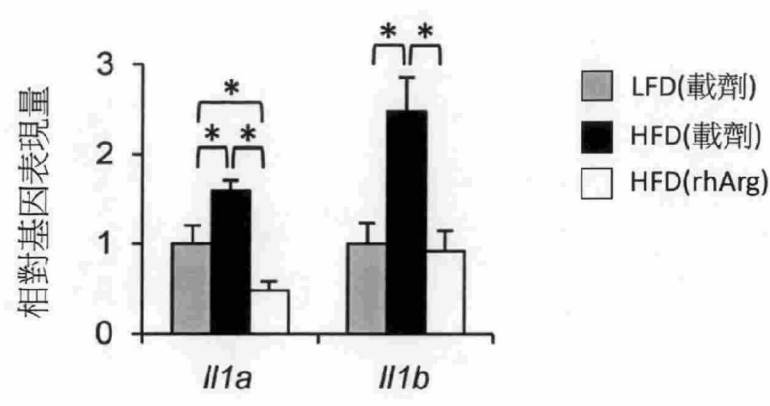


圖 51A

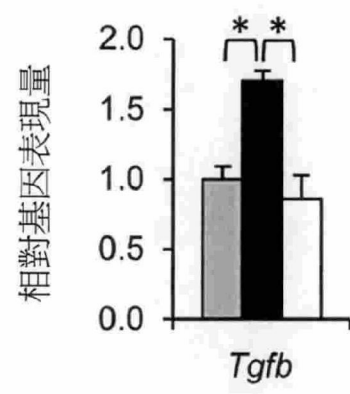


圖 51B

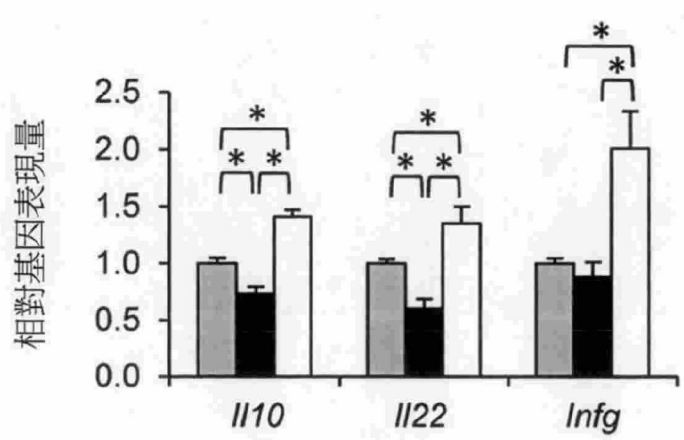


圖 51C

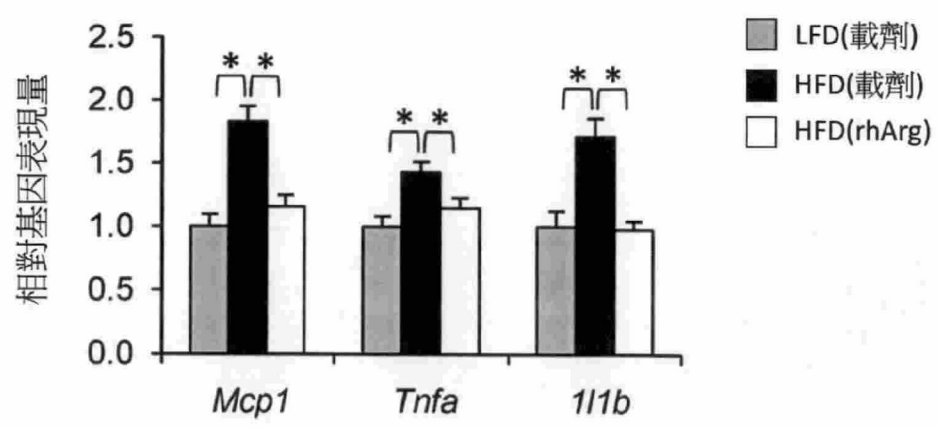


圖 52A

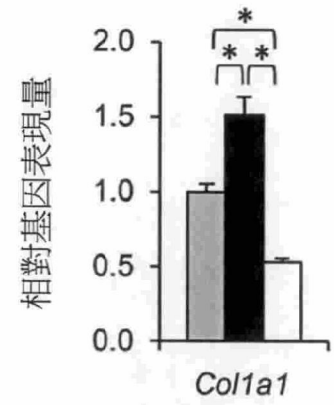


圖 52B

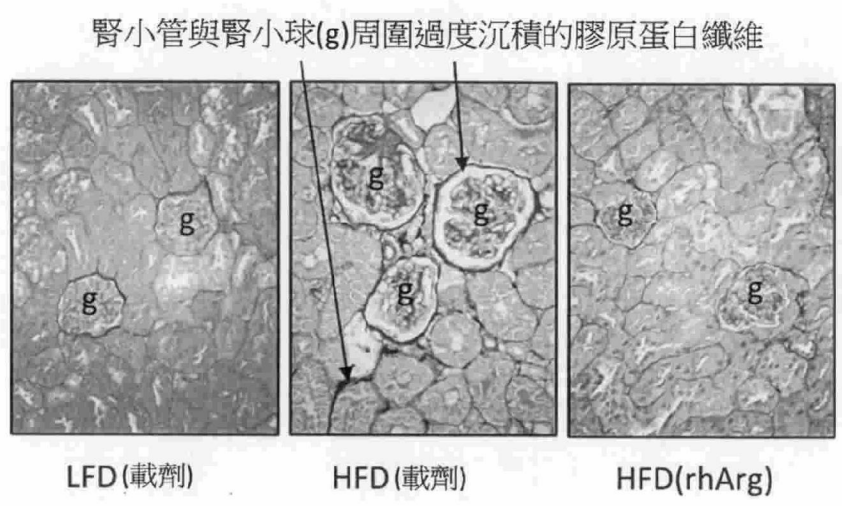


圖 52C

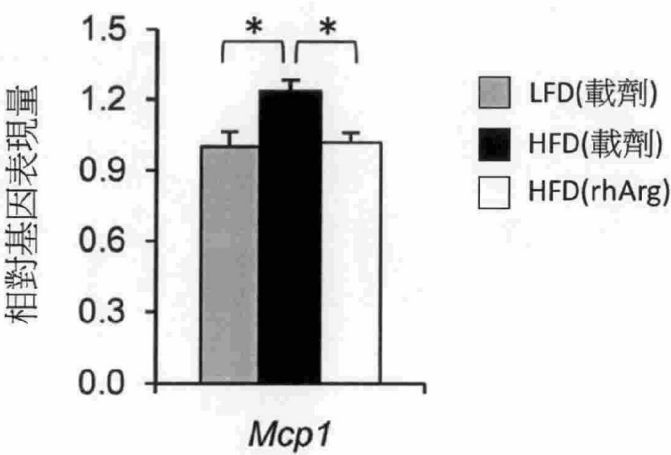


圖 53A

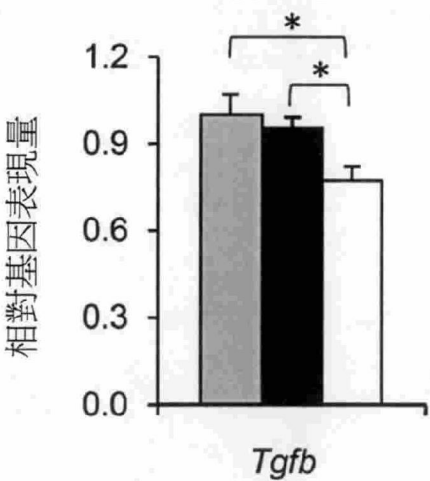


圖 53B

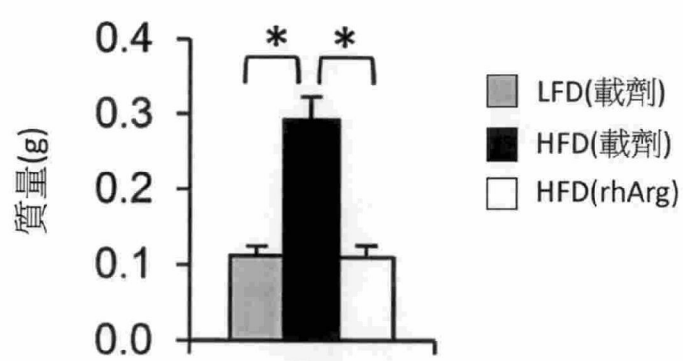


圖 54A



圖 54B

白色脂肪細胞具有單一大脂質球

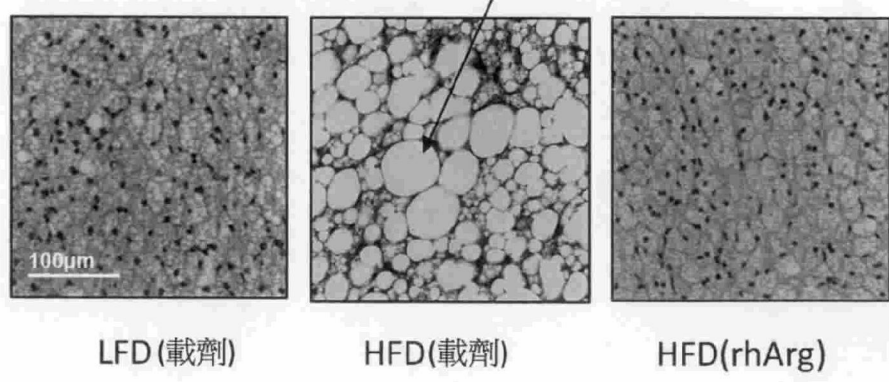


圖 54C

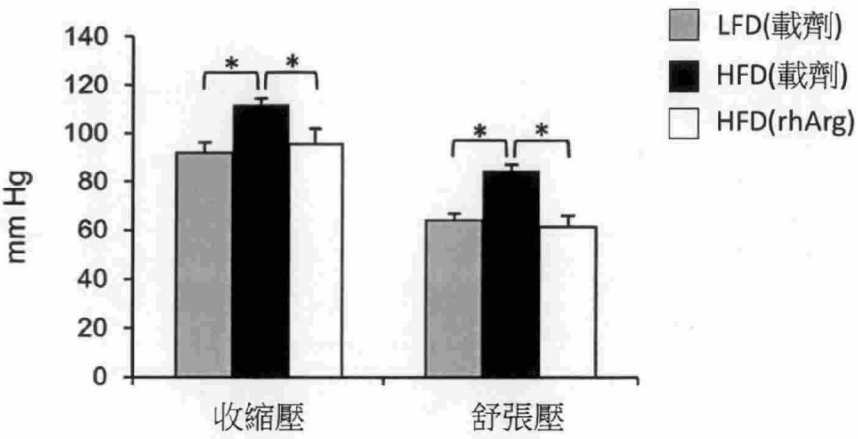


圖 55A

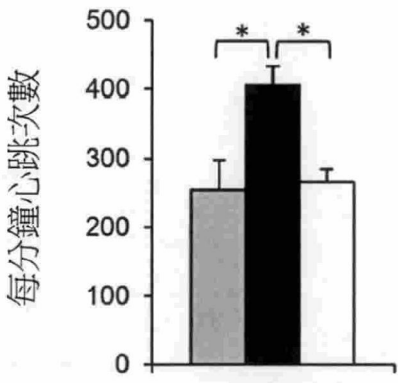


圖 55B

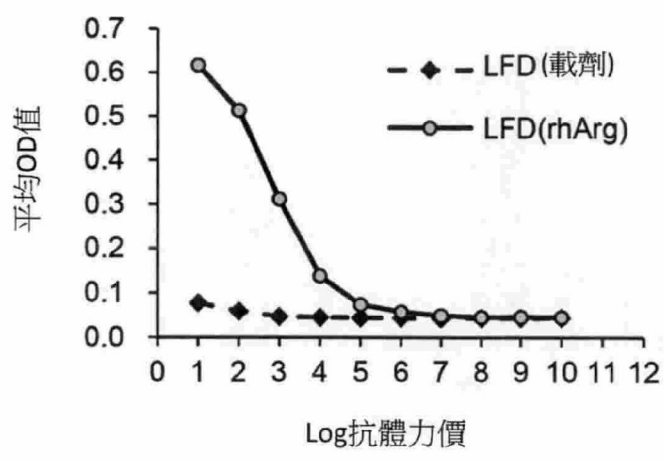


圖 56A

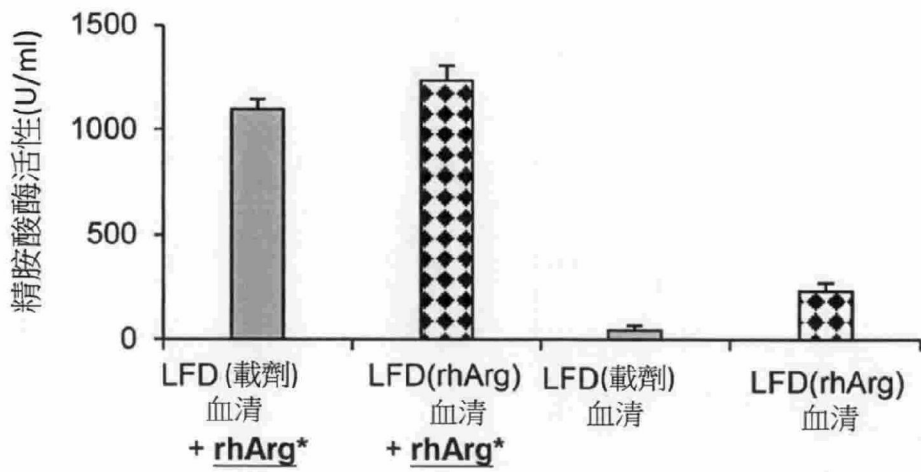


圖 56B

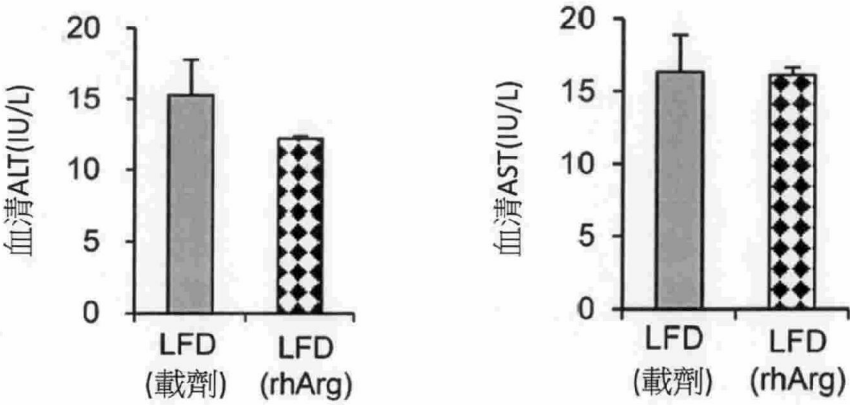


圖 57A

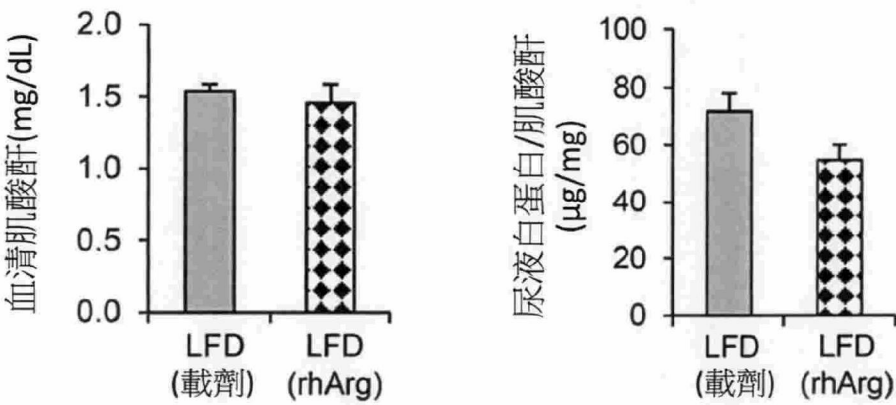


圖 57B

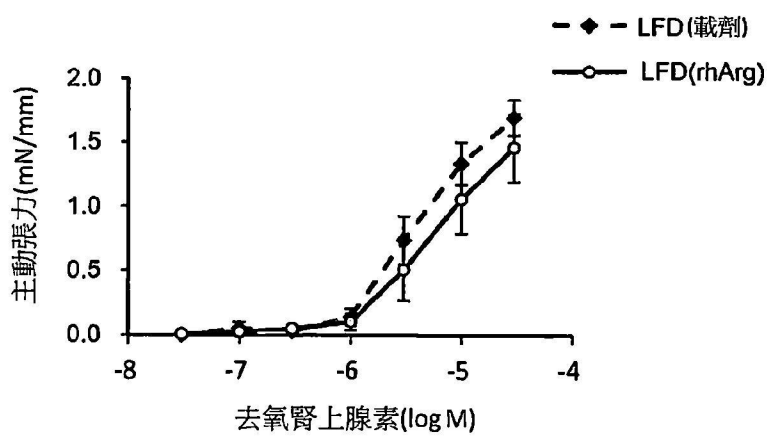


圖 58A

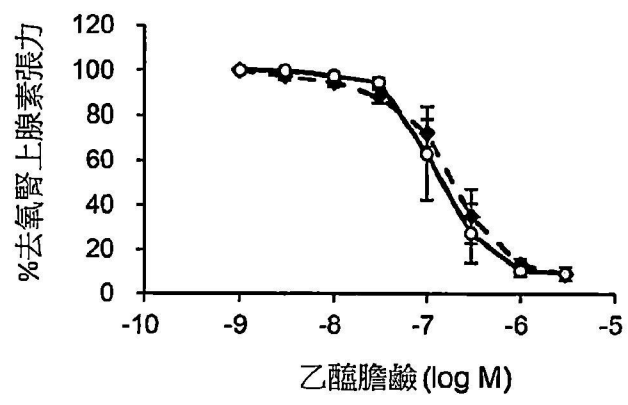


圖 58B

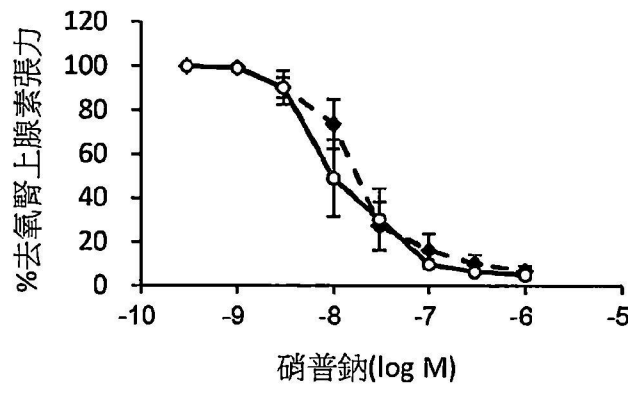


圖 58C

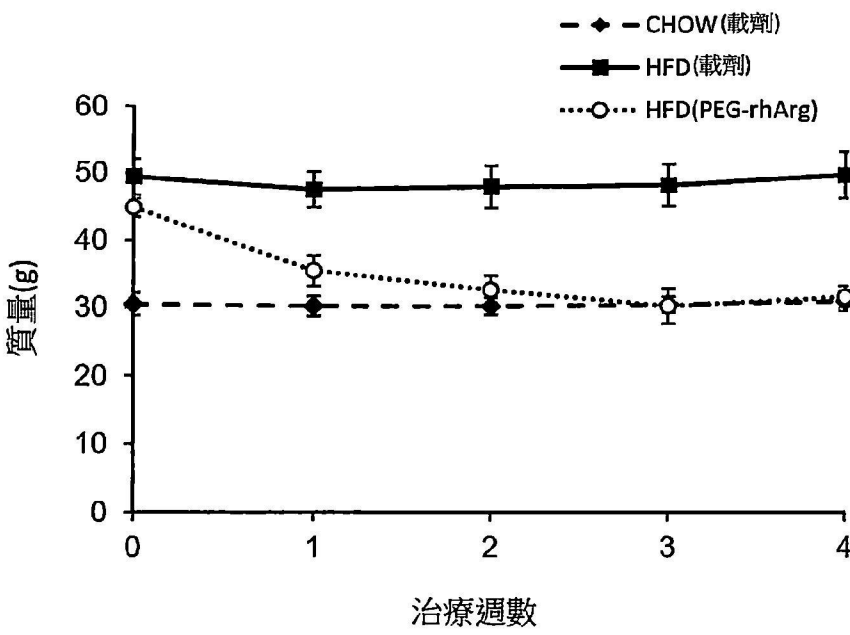


圖 59

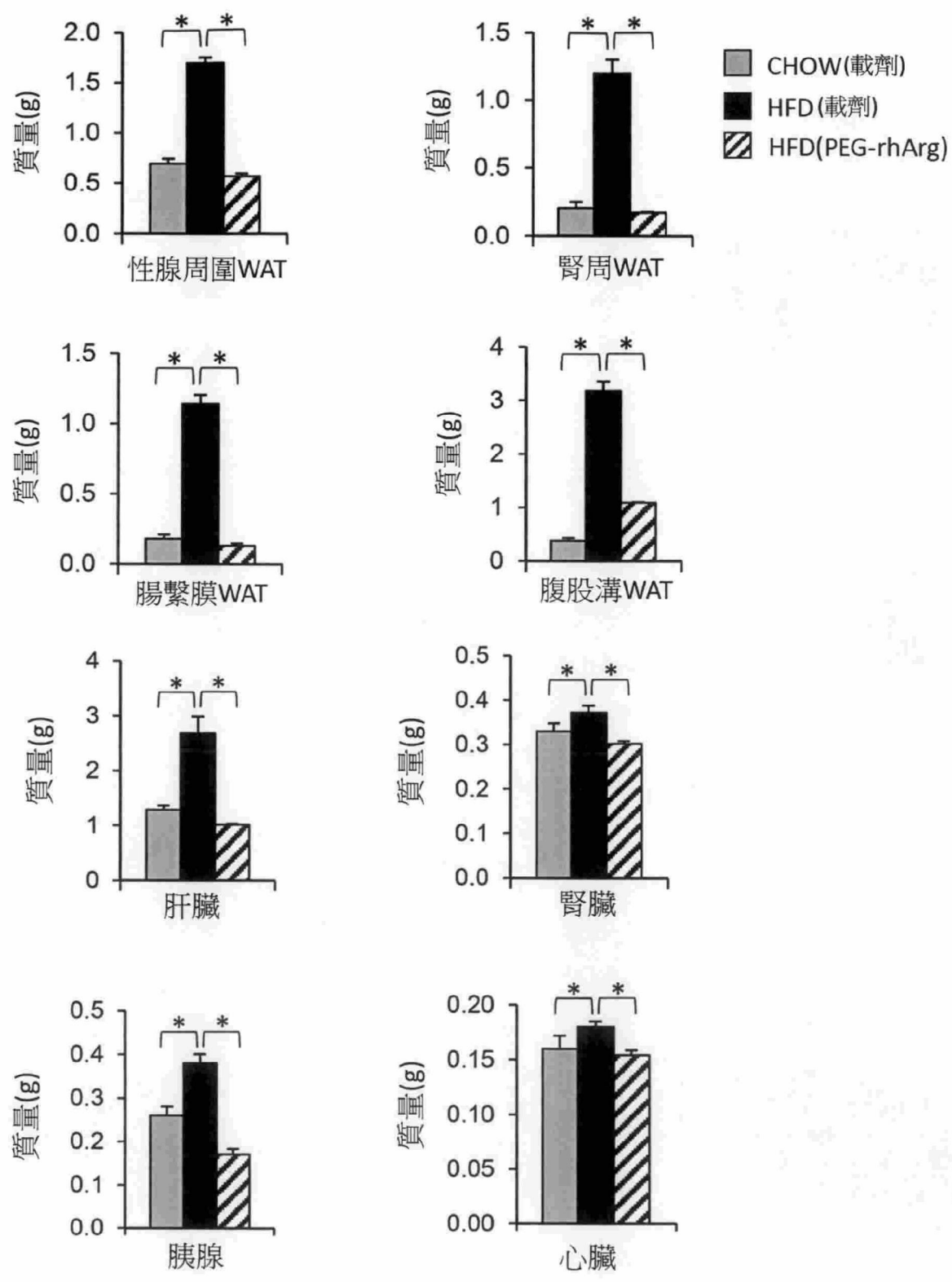


圖 60

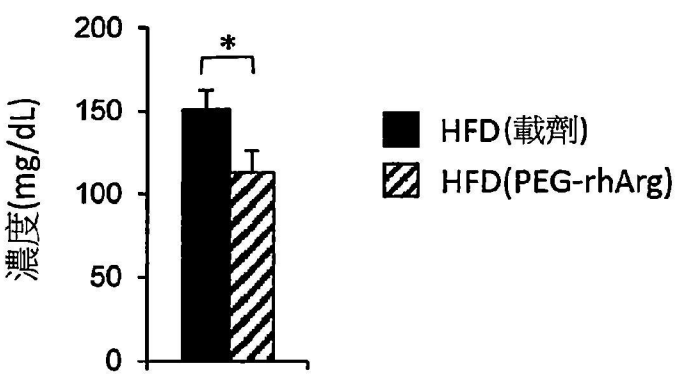


圖 61A

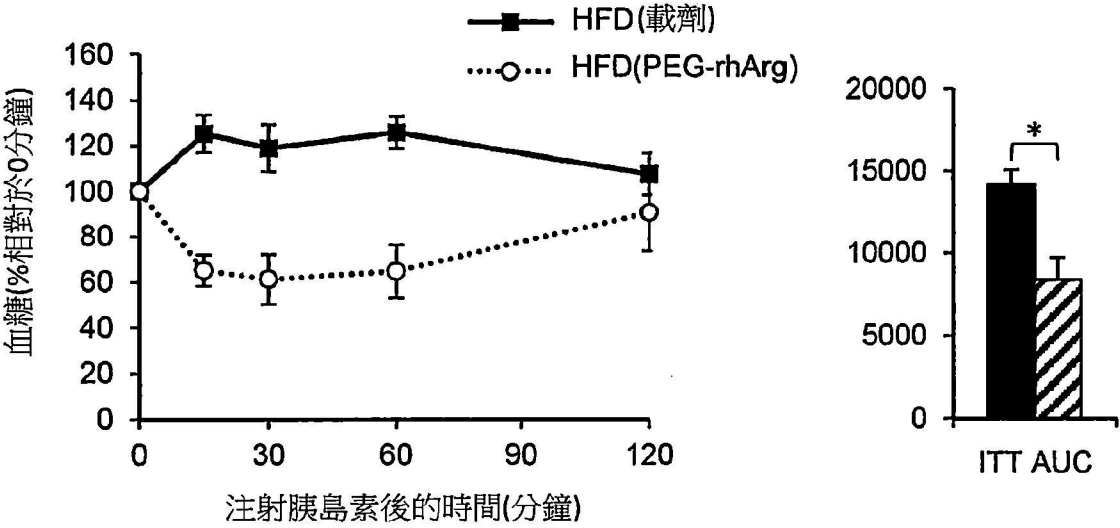


圖 61B

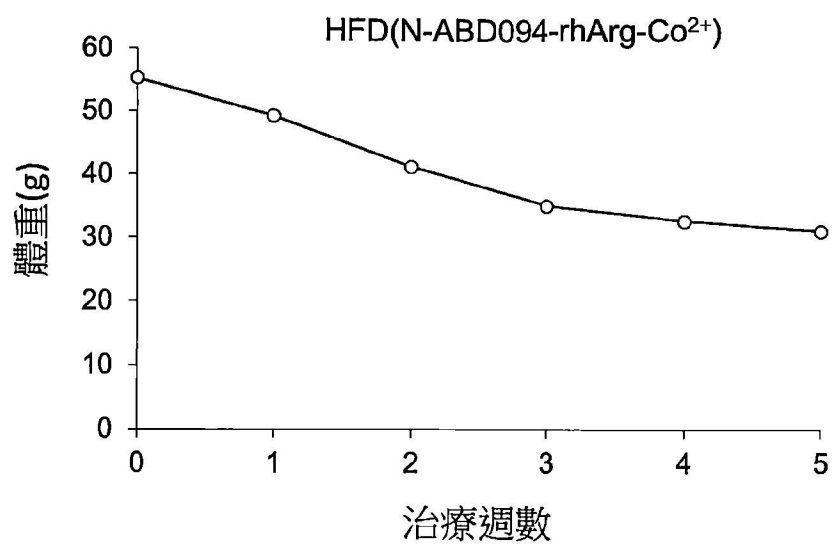


圖 62

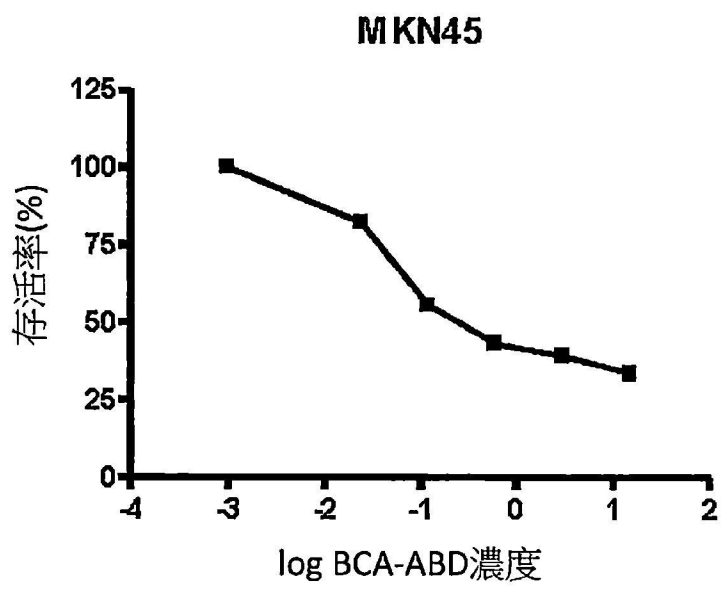


圖 63

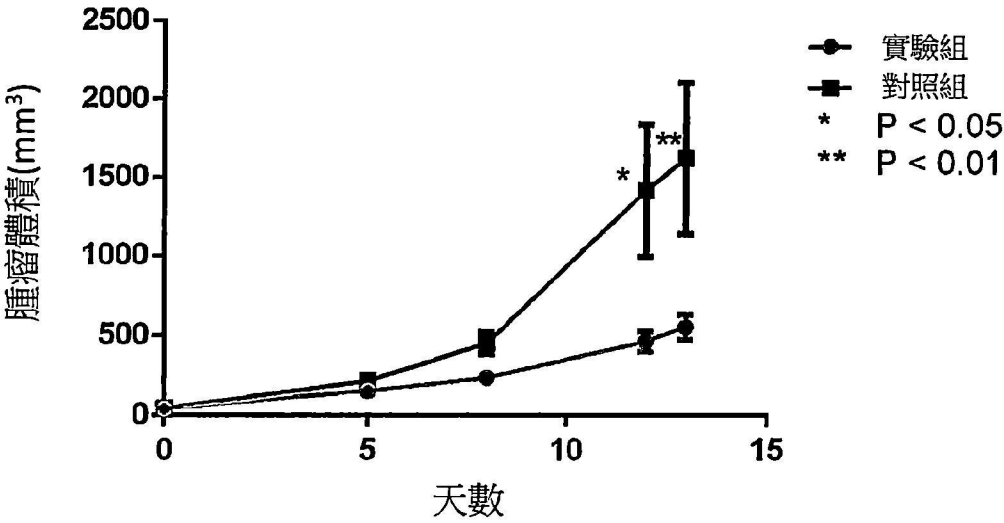


圖 64

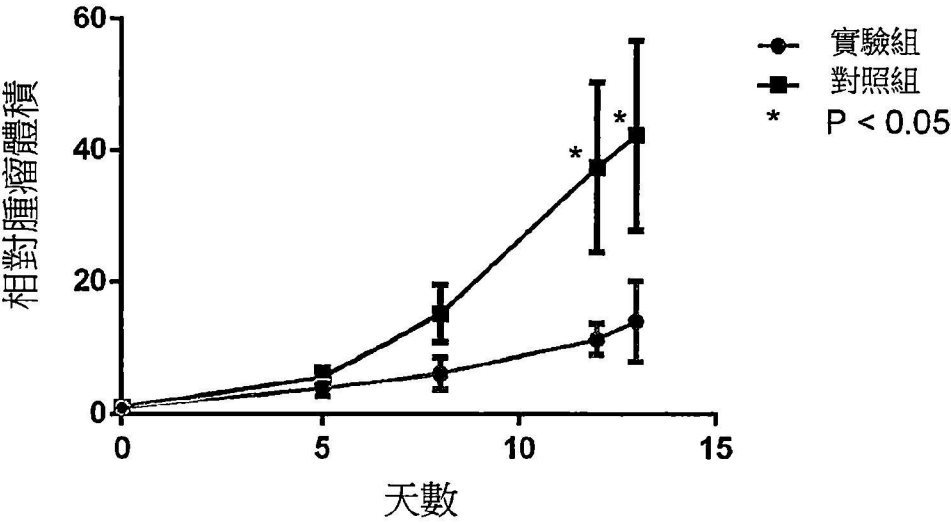


圖 65

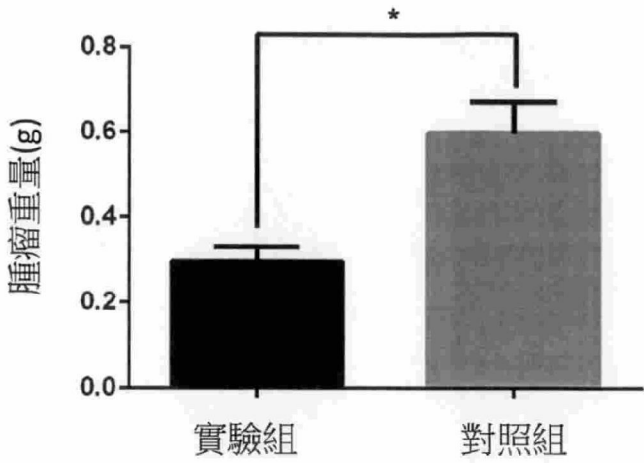


圖 66

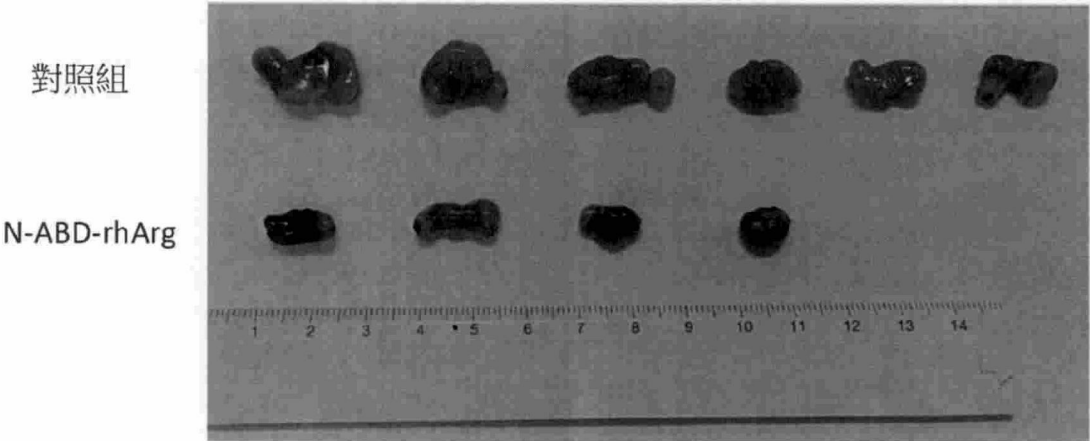


圖 67

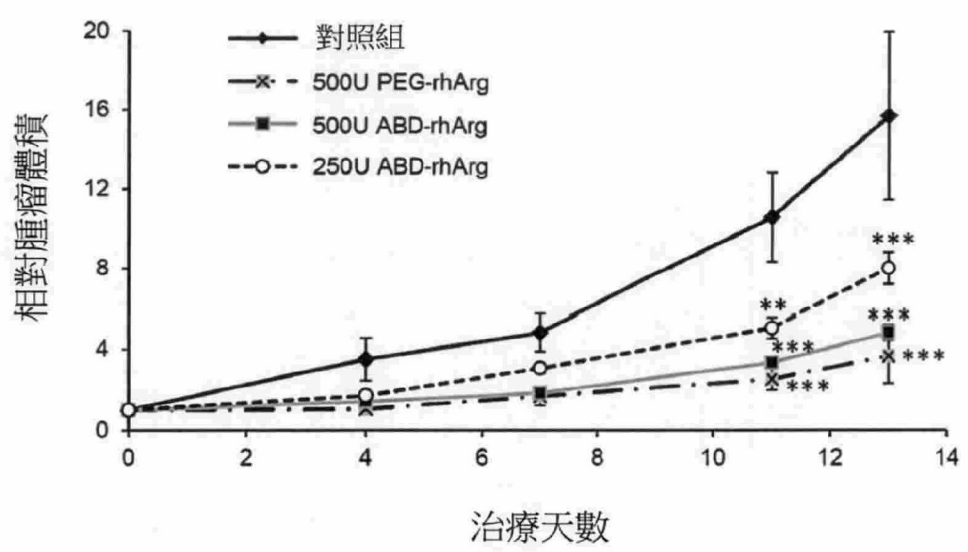


圖 68

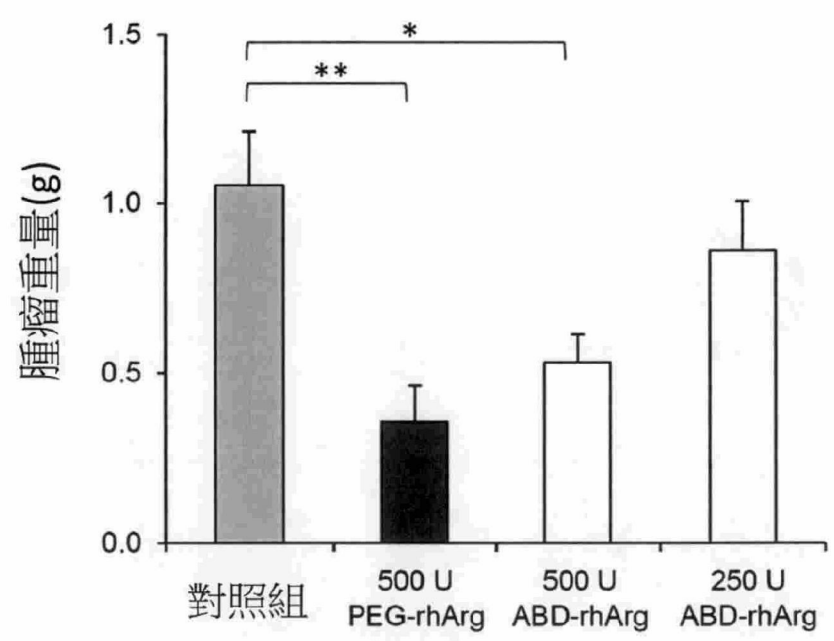


圖 69

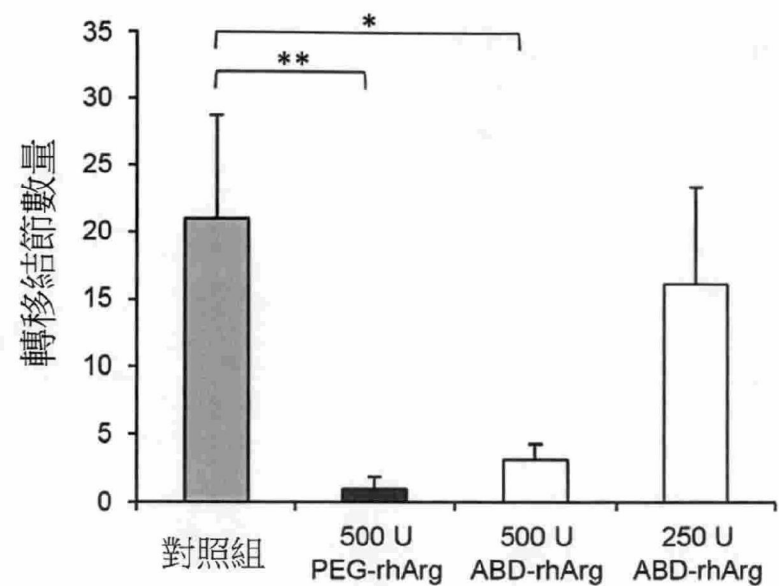


圖 70A

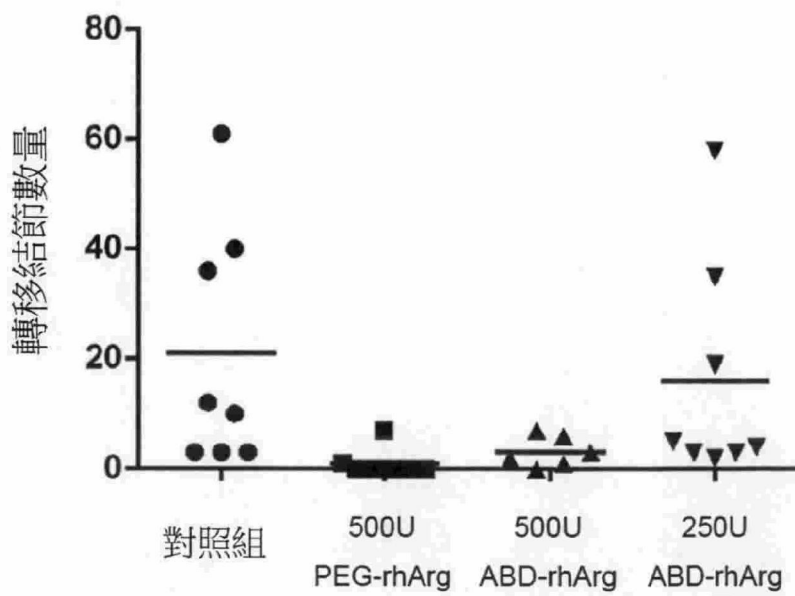


圖 70B