



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2021-0016434
(43) 공개일자 2021년02월15일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 9/78 (2006.01) A61K 38/00 (2006.01)
A61P 3/00 (2006.01) A61P 35/00 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12N 9/78 (2013.01)
A61K 38/00 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2020-7037922
(22) 출원일자(국제) 2019년05월31일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2020년12월30일
(86) 국제출원번호 PCT/CN2019/089583
(87) 국제공개번호 WO 2019/228510
국제공개일자 2019년12월05일
(30) 우선권주장
62/678,300 2018년05월31일 미국(US)

(71) 출원인
홍콩 폴리테크닉 유니버시티
중국 홍콩 카우룽 홍콩 셴리찬빌딩 10층 1009호
더 차이니스 유니버시티 오브 홍콩
중국 홍콩 엔. 티. 새턴 더 차이니스 유니버시티
오브 홍콩
(72) 발명자
량, 원 충
중국, 홍콩, 구룽 홍콩, 더 홍콩 폴리테크닉 유니
버시티
섬, 알리사 사우-운
중국, 홍콩, 더 차이니스 유니버시티 오브 홍콩
엔.티 스쿨 오브 바이오메디컬 사이언시스
(74) 대리인
이재민, 장재호

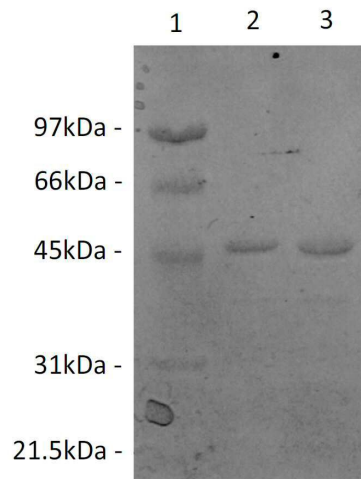
전체 청구항 수 : 총 29 항

(54) 발명의 명칭 아르기닌-고갈제의 조성 및 이의 암, 비만, 대사 장애 및 관련 합병증 및 동반질환에의 적용

(57) 요약

본 발명은 아르기나제 알부민 결합 도메인 (ABD) 융합 단백질 및 그의 제조 방법 및 사용에 관한 것이다. 또한 비만, 대사 장애 및 관련 합병증 및 동반질환(comorbidities)의 치료를 위해 아르기닌 고갈을 포함하는 방법이 제공된다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

A61P 3/00 (2018.01)

A61P 35/00 (2018.01)

C07K 14/76 (2013.01)

C12Y 305/03001 (2013.01)

C07K 2319/31 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

알부민 결합 도메인 (ABD) 폴리펩티드와 아르기나제 폴리펩티드를 포함하는 융합 단백질.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 ABD 폴리펩티드는 서열번호 66, 서열번호 67 또는 서열번호 68과 적어도 93%의 서열 상동성을 가지는 폴리펩티드 서열을 포함하는 것인, 융합 단백질.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 아르기나제 폴리펩티드는 서열번호 69, 서열번호 70, 서열번호 71 또는 서열번호 72와 적어도 95%의 서열 상동성을 가지는 폴리펩티드 서열을 포함하는 것인, 융합 단백질.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 ABD 폴리펩티드는 서열번호 66, 서열번호 67 또는 서열번호 68과 적어도 93%의 서열 상동성을 가지는 폴리펩티드 서열을 포함하고; 상기 아르기나제 폴리펩티드는 서열번호 69, 서열번호 70, 서열번호 71 또는 서열번호 72와 적어도 95%의 서열 상동성을 가지는 폴리펩티드 서열을 포함하는 것인, 융합 단백질.

청구항 5

제4항에 있어서, 상기 ABD 폴리펩티드는 서열번호 66과 적어도 93%의 서열 상동성을 가지는 폴리펩티드 서열을 포함하고; 상기 아르기나제 폴리펩티드는 서열번호 69와 적어도 95%의 서열 상동성을 가지는 폴리펩티드 서열을 포함하는 것인, 융합 단백질.

청구항 6

제5항에 있어서, 상기 융합 단백질은 상기 ABD 폴리펩티드의 C-말단과 상기 아르기나제 폴리펩티드의 N-말단을 연결하는 펩티드 링커를 추가로 포함하며, 여기서 상기 펩티드 링커는 1-20 개의 아미노산을 갖는 선형 폴리펩티드인 것인, 융합 단백질.

청구항 7

제6항에 있어서, 상기 펩티드 링커는 서열번호 73 또는 서열번호 74와 적어도 90%의 서열 상동성을 가지는 폴리펩티드 서열을 포함하는 것인, 융합 단백질.

청구항 8

제6항에 있어서, 상기 ABD 폴리펩티드는 서열번호 67과 적어도 93%의 서열 상동성을 가지는 폴리펩티드 서열을 포함하고; 상기 아르기나제 폴리펩티드는 서열번호 72와 적어도 95%의 서열 상동성을 가지는 폴리펩티드 서열을 포함하는 것인, 융합 단백질.

청구항 9

제8항에 있어서, 상기 펩티드 링커는 4-8 개의 히스티딘 아미노산을 갖는 폴리-히스티딘 링커인 것인, 융합 단백질.

청구항 10

제1항에 있어서, 상기 융합 단백질은 서열번호 49, 서열번호 50, 서열번호 51, 서열번호 52, 서열번호 53, 서열번호 54, 서열번호 55, 서열번호 56, 서열번호 75 또는 서열번호 76과 적어도 98%의 서열 상동성을 가지는 폴리펩티드 서열을 포함하는 것인, 융합 단백질.

청구항 11

제1항에 있어서, 상기 융합 단백질은 서열번호 49, 서열번호 50, 서열번호 75 및 서열번호 76과 적어도 98%의 서열 상동성을 가지는 폴리펩티드 서열을 포함하는 것인, 융합 단백질.

청구항 12

제1항에 있어서, 상기 융합 단백질은 서열번호 49, 서열번호 50, 서열번호 75 및 서열번호 76으로 이루어진 군에서 선택되는 폴리펩티드를 포함하는 것인, 융합 단백질.

청구항 13

제1항의 융합 단백질과 약학적으로 허용되는 담체, 부형제 또는 이들의 조합을 포함하는 약학적 조성물.

청구항 14

치료적 유효량의 제1항의 융합 단백질을 대상체에 투여하는 단계를 포함하는, 이를 필요로 하는 대상체에서 암을 치료하는 방법.

청구항 15

치료적 유효량의 아르기닌 고갈제를 대상체에 투여하는 단계를 포함하는, 이를 필요로 하는 대상체에서 비만, 대사 장애 및 관련 합병증으로 이루어진 군에서 선택되는 적어도 하나의 상태(condition)의 치료 방법.

청구항 16

제15항에 있어서, 상기 대사 장애는 비만, 포도당 불내성(glucose intolerance), 고혈당증 및 당뇨병으로 이루어진 군에서 선택되고; 상기 관련 합병증은 당뇨병 신장질환(diabetic nephropathy), 당뇨병 망막증(diabetic retinopathy), 당뇨병 혈관병(diabetic vasculopathy), 당뇨병 신경병증(diabetic neuropathy), 고콜레스테롤혈증(hypercholesterolemia), 이상 지질 혈증(dyslipidemia), 지방증(steatosis), 지방간염(steatohepatitis), 섬유증(fibrosis), 간경변(cirrhosis), 염증(inflammation), 고혈압(hypertension), 심혈관 질환(cardiovascular disease) 및 갈색 지방의 백색화(whitening of brown fat)로 이루어진 군에서 선택되는 것인, 치료 방법.

청구항 17

제15항에 있어서, 상기 대사 장애는 인슐린 저항성(인슐린 저항성)인 것인, 치료 방법.

청구항 18

제15항에 있어서, 상기 비만의 치료는 체지방(fat mass) 증가 방지 및 체지방(fat mass) 감소 중 적어도 하나를 포함하는 것인, 치료 방법.

청구항 19

제15항에 있어서, 상기 대사 장애는 간 지방증(hepatic steatosis), 신장 지방증(renal steatosis), 췌장 지방증(pancreatic steatosis) 및 심장 지방증(cardiac steatosis)으로 이루어진 군에서 선택되는 것인, 치료 방법.

청구항 20

제15항에 있어서, 상기 대상체의 혈청 내 아르기닌 농도는 50 μ M 미만으로 유지되는 것인, 치료 방법.

청구항 21

제15항에 있어서, 상기 아르기닌 고갈제는 아르기닌 이화 효소(catabolic enzyme)인 것인, 치료 방법.

청구항 22

제21항에 있어서, 상기 아르기닌 이화 효소는 아르기나제 단백질, 아르기닌 탈아민효소(deiminase) 단백질 또는

아르기닌 디카르복실라제 단백질인 것인, 치료 방법.

청구항 23

제22항에 있어서, 상기 아르기나제 단백질, 아르기닌 탈아민효소(deiminase) 단백질 또는 아르기닌 디카르복실라제 단백질은 하나 이상의 폴리에틸렌 글리콜(PEG)기를 추가로 포함하는 것인, 치료 방법.

청구항 24

제23항에 있어서, 상기 아르기나제 단백질은 서열번호 101, 서열번호 102, 서열번호 103 또는 서열번호 104의 폴리펩티드를 포함하는 것인, 치료 방법.

청구항 25

제22항에 있어서, 상기 아르기나제 단백질, 아르기닌 탈아민효소 단백질 또는 아르기닌 디카르복실라제 단백질은 알부민 결합 도메인 또는 인간 혈청 알부민, 또는 인간 IgG Fc 도메인을 추가로 포함하는 것인, 치료 방법.

청구항 26

제25항에 있어서, 상기 아르기닌 이화 효소는 ABD 폴리펩티드와 아르기나제 폴리펩티드; ABD 폴리펩티드와 아르기닌 탈아민효소 폴리펩티드; 또는 ABD 폴리펩티드와 아르기닌 디카르복실라제 폴리펩티드를 포함하는 융합 단백질인 것인, 치료 방법.

청구항 27

제26항에 있어서, 상기 아르기닌 이화 효소는 제1항의 융합 단백질인 것인, 치료 방법.

청구항 28

제27항에 있어서, 상기 아르기닌 이화 효소는 서열번호 49, 서열번호 50, 서열번호 51, 서열번호 52, 서열번호 53, 서열번호 54, 서열번호 55, 서열번호 56, 서열번호 75 또는 서열번호 76과 적어도 98%의 서열 상동성을 가지는 폴리펩티드를 포함하는 것인, 치료 방법.

청구항 29

치료적 유효량의 제1항의 융합 단백질을 대상체에 투여하는 단계를 포함하는, 이를 필요로 하는 대상체에서 바이러스 감염, 다발성 경화증, 류마티스 관절염, 자가 면역 질환, 선천성 과다 아르기닌혈증(congenital hyperargininemia), 이식편대숙주병(graft-versus-host disease (GvHD)) 및 염증으로 이루어진 군에서 선택되는 적어도 하나의 상태(condition)의 치료 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 관련 출원에 대한 상호 인용

[0002] 본 출원은 2018년 5월 31일에 출원된 미국 가출원 번호 62/678,300의 우선권 혜택을 주장하며, 그 내용은 모든 목적을 위해 전체가 이하에 참조로 포함된다.

[0003] 기술 분야

[0004] 본 발명은 아르기나제 알부민 결합 도메인(ABD) 융합 단백질 및 그의 제조 방법 및 사용에 관한 것이다. 또한 비만, 대사 장애 및 관련 합병증 및 동반질환(comorbidities)의 치료를 위해 아르기닌 고갈을 포함하는 방법이 제공된다.

배경 기술

[0005] 아르기나제는 아르기닌의 오르니틴 및 요소(urea)로의 이화 작용(catabolism)을 촉매하는 가수 분해 효소로서 대부분의 살아있는 유기체에 존재한다. 인간에서는 아르기나제 I 형과 II 형 두 가지의 이소형(isoforms) 아르기나제가 존재하며 이들은 조직 분포와 분자 특성에 있어 차이가 있다.

- [0006] 아르기나제 I은 주로 간의 세포질에서 발견되며 삼량체로 존재하는 35 kD의 단백질이다. 아르기나제 II는, 약 38.5kD의 단백질로서, 일반적으로 세포의 미토콘드리아에 위치하며 세포 내 아르기닌/오르니틴 농도 조절에 관여하는 것으로 생각된다.
- [0007] 몇몇 유형의 종양은 아르기닌 합성에 필요한 아르기니노숙시네이트 합성 효소(ASS) 및/또는 오르니틴 트랜스카르바모일라제(ornithine carbamoylase; OTC)가 결핍되거나 낮은 수준으로 생성하므로, 아르기닌-영양요구성(arginine-auxotrophic)이다. 아르기닌의 고갈(deprivation)은 이들 종양 세포의 심각한 취약성을 이용하여 이들의 급속한 사멸을 야기한다. 결과적으로, 효소-매개 아르기닌 고갈은 종양 세포의 선택적 파괴를 위한 잠재적 전략으로 연구되어 왔다.
- [0008] 암 치료제로서 효소-매개 아르기닌 고갈을 개발하는 데 있어서 주요 장애는 저분자량(< 50 kDa)으로 인한 아르기나제의 짧은 순환 반감기(몇 분 내지 몇 시간)이며 따라서 신장 제거(renal clearance)에 의해 신속히 제거된다. 전신 순환에서 효과적인 치료 농도를 유지하기 위해 빈번한 투여 스케줄이 필요할 수 있으며, 이로 인해 환자 순응도 문제가 야기될 수 있다.
- [0009] 이러한 문제점에 비추어 볼 때, 치료 단백질의 약동학적 특성을 개선하기 위해 다양한 전략이 발전되어왔다. 폴리에틸렌 글리콜(PEG)을 다른 치료 단백질에 결합(conjugation)(즉 폐길화(PEGylation))는 유체 역학적 반경(radius)을 증가시켜 신장 제거에 의한 제거 속도를 늦추는 것으로 나타났다. Fc 신생아 수용체 (Fc neonatal receptor; FcRn)의 재활용 메커니즘에 기반한 융합 단백질 전략도 연구되어왔으며, 단백질에 대한 면역글로불린, 알부민 또는 알부민 결합 펩티드의 단편 결정화 가능(fragment crystallizable; Fc) 영역의 융합은 순환 반감기를 증가시키는 것으로 나타났다. 그럼에도 불구하고 약동학이 개선된 아르기닌 고갈 단백질을 개발할 필요성은 여전히 존재한다.
- [0010] 비만, 대사 장애, 관련 합병증 및 동반 질환은 21 세기에 있어서 가장 심각한 글로벌 공중 보건 문제 중 일부로 간주되어 엄청난 사회 경제적 부담을 지우고 있다. 더욱이, 비만의 대사 결과는 제 2형 당뇨병, 포도당 불내성(glucose intolerance), 인슐린 저항성, 고콜레스테롤혈증, 이상지질혈증, 고혈압, 심혈관 질환 및 암과 같은 다른 질병의 원인이 된다. 따라서, 비만, 대사 장애, 관련 합병증 및 동반 질환의 예방 및/또는 치료를 위한 안전하고 효과적인 방법이 절실히 필요하다. 비만은 에너지 섭취와 소비 사이의 불균형의 결과이다. 생활방식에의 개입만으로는 일부 개인이 건강을 개선하기 위해 충분한 체중을 줄이거나 지속적인 체중 감소를 유지하는 데 비효율적일 수 있다. 오르리스타트(orlistat)(제니칼(Xenical)), 로카세린(lorcaserin)(벨빅(Belviq)) 및 펜터민(phentermine)과 토피라메이트(topiramate)(큐시미아(Qsymia))의 조합을 포함하는 항-비만 약물은 식욕 감소 또는 지방 흡수 감소를 통해 체중 감소를 성취하기 위해 복용될 수 있다. 그러나, 이들 약물은 지용성 비타민의 흡수 감소, 두통, 피로, 현기증, 설사 및 변실금(fecal incontinence)과 같은 다양한 부작용이 있다. 비만 수술(bariatric surgery)(예: 위 밴딩(gastric banding))은 장기적인 체중 감소를 위해 심한 비만을 치료하는 데 사용할 수 있으며, 원하지 않는 국소 지방 침착물 제거를 위한 지방 흡입술(liposuction)은 미용적인 이유로 인기를 얻고 있다. 그러나 이러한 유형의 침습적 절차(invasive procedures)는 또한 상당한 위험을 수반한다. 따라서 비만, 대사 장애, 관련 합병증 및 동반 질환을 치료하는 개선된 방법을 개발할 필요가 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

과제의 해결 수단

- [0011] 상기 언급된 니즈(needs)를 하나 이상 다루고자 본원에서는 개선된 생체 내 반감기를 갖는 아르기나제 ABD 융합 단백질 및 아르기닌 이화 활성을 제공한다. 본원에 기재된 상기 융합 단백질은 아르기닌 고갈이 암, 바이러스 감염, 다발성 경화증, 류마티스 관절염, 자가 면역 질환, 선천성 과다 아르기닌혈증(congenital hyperargininemia), 이식편대숙주병(graft-versus-host disease (GvHD)), 염증, 비만, 대사 장애 및 관련 합병증 및 동반 질환 치료에서와 같이 치료 효과를 갖는 질환 또는 상태(condition)의 치료에 유용하다. 상기 융합 단백질은 단백질은 조 단백질(crude protein)로부터 빠르게 생산되고 정제될 수 있다. 상기 융합 단백질은 질병의 치료 또는 예방에 대한 상승 효과를 제공하기 위해 단독으로 또는 적어도 하나의 다른 제제와 함께 병용될 수 있다.

- [0012] 또한, 대상체에서 아르기닌 고갈제를 투여하는 것과 같이 대상체의 아르기닌 수준을 고갈시킴으로써 비만, 대사 장애 및/또는 관련 합병증 및/또는 동반 질환을 치료하는 방법을 제공한다.
- [0013] 제 1 양태에서, 본원은 알부민 결합 도메인(ABD) 및 아르기나제 폴리펩티드를 포함하는 융합 단백질을 제공한다.
- [0014] 상기 제 1 양태의 제 1 구현예에서, 본원은 상기 제 1 양태의 융합 단백질을 제공하며, 여기서 상기 ABD 폴리펩티드는 서열번호 66, 서열번호 67 또는 서열번호 68과 적어도 93%의 서열 상동성을 가지는 폴리펩티드 서열을 포함한다.
- [0015] 상기 제 1 양태의 제 2 구현예에서, 본원은 상기 제 1 양태의 융합 단백질을 제공하며, 여기서 상기 아르기나제 폴리펩티드는 서열번호 69, 서열번호 70, 서열번호 71 또는 서열번호 72와 적어도 95%의 서열 상동성을 가지는 폴리펩티드 서열을 포함한다.
- [0016] 상기 제 1 양태의 제 3 구현예에서, 본원은 상기 제 1 양태의 융합 단백질을 제공하며, 여기서 상기 ABD 폴리펩티드는 서열번호 66, 서열번호 67 또는 서열번호 68과 적어도 93%의 서열 상동성을 가지는 폴리펩티드 서열을 포함하고; 상기 아르기나제 폴리펩티드는 서열번호 69, 서열번호 70, 서열번호 71 또는 서열번호 72와 적어도 95%의 서열 상동성을 가지는 폴리펩티드 서열을 포함한다.
- [0017] 상기 제 1 양태의 제 4 구현예에서, 본원은 상기 제 1 양태의 제 3 구현예의 융합 단백질을 제공하며, 여기서 상기 ABD 폴리펩티드는 서열번호 66과 적어도 93%의 서열 상동성을 가지는 폴리펩티드 서열을 포함하고; 상기 아르기나제 폴리펩티드는 서열번호 69와 적어도 95%의 서열 상동성을 가지는 폴리펩티드 서열을 포함한다.
- [0018] 상기 제 1 양태의 제 5 구현예에서, 본원은 상기 ABD 폴리펩티드의 C-말단과 상기 아르기나제 폴리펩티드의 N-말단을 연결하는 펩티드 링커를 추가로 포함하는 상기 제 1 양태의 제 4 구현예의 융합 단백질을 제공하며, 여기서 상기 펩티드 링커는 1-20 개의 아미노산을 갖는 선형 폴리펩티드이다.
- [0019] 상기 제 1 양태의 제 6 구현예에서, 본원은 상기 제 1 양태의 제 5 구현예의 융합 단백질을 제공하며, 여기서 상기 펩티드 링커는 서열번호 73 또는 서열번호 74와 적어도 90%의 서열 상동성을 가지는 폴리펩티드 서열을 포함한다.
- [0020] 상기 제 1 양태의 제 7 구현예에서, 본원은 상기 제 1 양태의 제 6 구현예의 융합 단백질을 제공하며, 여기서 상기 ABD 폴리펩티드는 서열번호 67과 적어도 93%의 서열 상동성을 가지는 폴리펩티드 서열을 포함하고; 상기 아르기나제 폴리펩티드는 서열번호 72와 적어도 95%의 서열 상동성을 가지는 폴리펩티드 서열을 포함한다.
- [0021] 상기 제 1 양태의 제 8 구현예에서, 본원은 상기 제 1 양태의 제 7 구현예의 융합 단백질을 제공하며, 여기서 상기 펩티드 링커는 4-8 개의 히스티딘 아미노산을 갖는 폴리-히스티딘 링커이다.
- [0022] 상기 제 1 양태의 제 9 구현예에서, 본원은 상기 제 1 양태의 융합 단백질을 제공하며, 여기서 상기 융합 단백질은 서열번호 49, 서열번호 50, 서열번호 51, 서열번호 52, 서열번호 53, 서열번호 54, 서열번호 55, 서열번호 56, 서열번호 75 또는 서열번호 76과 적어도 98%의 서열 상동성을 가지는 폴리펩티드 서열을 포함한다.
- [0023] 상기 제 1 양태의 제 10 구현예에서, 본원은 상기 제 1 양태의 융합 단백질을 제공하며, 여기서 상기 융합 단백질은 서열번호 49, 서열번호 50, 서열번호 75 및 서열번호 76과 적어도 98%의 서열 상동성을 가지는 폴리펩티드 서열을 포함한다.
- [0024] 상기 제 1 양태의 제 11 구현예에서, 본원은 상기 제 1 양태의 융합 단백질을 제공하며, 여기서 상기 융합 단백질은 서열번호 49, 서열번호 50, 서열번호 75 및 서열번호 76으로 이루어진 군에서 선택되는 폴리펩티드를 포함한다.
- [0025] 제 2 양태에서, 본원은 상기 제 1 양태의 융합 단백질과 약학적으로 허용되는 담체, 부형제 또는 이들의 조합을 포함하는 약학적 조성물을 제공한다.
- [0026] 제 3 양태에서, 본원은 치료적 유효량의 상기 제 1 양태의 융합 단백질을 대상체에 투여하는 단계를 포함하는, 이를 필요로 하는 대상체에서 암을 치료하는 방법을 제공한다.
- [0027] 제 4 양태에서, 본원은 치료적 유효량의 아르기닌 고갈제를 대상체에 투여하는 단계를 포함하는, 이를 필요로 하는 대상체에서 비만, 대사 장애 및 관련 합병증으로 이루어진 군에서 선택되는 적어도 하나의 상태(condition)의 치료 방법을 제공한다.

- [0028] 상기 제 4 양태의 제 1 구현예에서, 본원은 상기 방법을 제공하며, 여기서 상기 대사 장애는 비만, 포도당 불내성(glucose intolerance), 고혈당증 및 당뇨병으로 이루어진 군에서 선택되고; 상기 관련 합병증은 당뇨병 신장 질환(diabetic nephropathy), 당뇨병 망막증(diabetic retinopathy), 당뇨병 혈관병(diabetic vasculopathy), 당뇨병 신경병증(diabetic neuropathy), 고콜레스테롤혈증(hypercholesterolemia), 이상지질혈증(dyslipidemia), 고중성지방혈증(hypertriglyceridemia), 고렙틴혈증(hyperleptinemia), 지방증(steatosis), 지방간염(steatohepatitis), 섬유증(fibrosis), 간경변(cirrhosis), 만성 저급 염증(chronic low-grade inflammation), 고혈압(hypertension), 심혈관 질환(cardiovascular disease) 및 갈색 지방의 백색화(whitening of brown fat)로 이루어진 군에서 선택된다.
- [0029] 상기 제 4 양태의 제 2 구현예에서, 본원은 상기 방법을 제공하며, 여기서 상기 대사 장애는 인슐린 저항성(insulin resistance)이다.
- [0030] 상기 제 4 양태의 제 3 구현예에서, 본원은 상기 방법을 제공하며, 여기서 상기 비만의 치료는 지방 질량(fat mass)의 증가 방지 및 지방 질량(fat mass) 감소 중 적어도 하나를 포함한다.
- [0031] 상기 제 4 양태의 제 3 구현예에서, 본원은 상기 방법을 제공하며, 여기서 상기 대사 장애는 간 지방증(hepatic-steatosis), 신장 지방증(renal steatosis), 췌장 지방증(pancreatic steatosis) 및 심장 지방증(cardiac steatosis)으로 이루어진 군에서 선택된다.
- [0032] 상기 제 4 양태의 제 5 구현예에서, 본원은 상기 방법을 제공하며, 여기서 상기 대상체의 혈청 내 아르기닌 농도는 50 μ M 미만으로 유지된다.
- [0033] 상기 제 4 양태의 제 6 구현예에서, 본원은 상기 방법을 제공하며, 여기서 상기 아르기닌 고갈제는 아르기닌 이화 효소(catabolic enzyme)이다.
- [0034] 상기 제 4 양태의 제 7 구현예에서, 본원은 상기 제 4 양태의 제 6 구현예의 방법을 제공하며, 여기서 상기 아르기닌 이화 효소는 아르기나제 단백질, 아르기닌 탈아민효소(deiminase) 단백질 또는 아르기닌 디카복실라제 단백질이다.
- [0035] 상기 제 4 양태의 제 8 구현예에서, 본원은 상기 제 4 양태의 제 7 구현예의 방법을 제공하며, 여기서 상기 아르기나제 단백질, 아르기닌 탈아민효소(deiminase) 단백질 또는 아르기닌 디카복실라제 단백질은 하나 이상의 폴리에틸렌 글리콜(PEG) 그룹을 추가로 포함한다.
- [0036] 상기 제 4 양태의 제 9 구현예에서, 본원은 상기 제 4 양태의 제 8 구현예의 방법을 제공하며, 여기서 상기 아르기나제 단백질은 서열번호 101, 서열번호 102, 서열번호 103 또는 서열번호 104의 폴리펩티드를 포함한다.
- [0037] 상기 제 4 양태의 제 10 구현예에서, 본원은 상기 제 4 양태의 제 7 구현예의 방법을 제공하며, 여기서 상기 아르기나제 단백질, 아르기닌 탈아민효소 단백질 또는 아르기닌 디카복실라제 단백질은 알부민 결합 도메인 또는 인간 혈청 알부민, 또는 인간 IgG Fc 도메인을 추가로 포함한다.
- [0038] 상기 제 4 양태의 제 11 구현예에서, 본원은 상기 제 4 양태의 제 10 구현예의 방법을 제공하며, 여기서 상기 아르기닌 이화 효소는 ABD 폴리펩티드와 아르기나제 폴리펩티드; ABD 폴리펩티드와 아르기닌 탈아민효소 폴리펩티드; 또는 ABD 폴리펩티드와 아르기닌 디카복실라제 폴리펩티드를 포함하는 융합 단백질이다.
- [0039] 상기 제 4 양태의 제 12 구현예에서, 본원은 상기 제 4 양태의 제 11 구현예의 방법을 제공하며, 여기서 상기 아르기닌 이화 효소는 상기 제 1 양태의 융합 단백질이다.
- [0040] 상기 제 4 양태의 제 13 구현예에서, 본원은 상기 제 4 양태의 제 12 구현예의 방법을 제공하며, 여기서 상기 아르기닌 이화 효소는 서열번호 49, 서열번호 50, 서열번호 51, 서열번호 52, 서열번호 53, 서열번호 54, 서열번호 55, 서열번호 56, 서열번호 75 또는 서열번호 76과 적어도 98%의 서열 상동성을 가지는 폴리펩티드를 포함한다.
- [0041] 제 5 양태에서, 본원은 치료적 유효량의 상기 제 1 양태의 융합 단백질을 대상체에 투여하는 단계를 포함하는, 이를 필요로 하는 대상체에서 바이러스 감염, 다발성 경화증, 류마티스 관절염, 자가 면역 질환, 선천성 과다 아르기닌혈증(congenital hyperargininemia), 이식편대숙주병(graft-versus-host disease (GvHD)) 및 염증으로 이루어진 군에서 선택되는 적어도 하나의 상태(condition)의 치료 방법을 제공한다.

도면의 간단한 설명

[0042]

본 발명의 상기 및 기타 목적 및 특징은 첨부된 도면에 의거한 본 발명의 하기 설명으로부터 명백해질 것이며, 여기서:

도 1은 소듐 도데실 설페이트 폴리아크릴아미드 겔 전기 영동에 의한 알부민 결합 도메인(ABD) 재조합 인간 아르기나제(rhArg) 융합 단백질 N-ABD094-rhArg(서열번호 50)의 정제(purification)를 보여준다 (레인 1: SDS-PAGE 저범위 마커(Bio-rad); 레인 2: N-ABD094-rhArg(서열번호 50) 20 배 희석; 레인 3: N-ABD094-rhArg(서열번호 50) 10 배 희석).

도 2a는 프라이머의 결합 위치가 주석으로 표시된 예시적인 N-ABD094-rhArg 유전자(서열번호 38)를 보여준다.

도 2b는 이론적 pI/Mw가 6.07/42555.38인 N-ABD094-rhArg(서열번호 50) 융합 단백질의 단백질 서열을 보여준다.

도 3은 단일 부위 세린-시스테인 돌연변이(serine-to-cysteine mutation) 및 C-말단 히스티딘 태그를 갖는 조작된 바실러스 칼도벨록스 아르기나제 BCA(S161C)-His(서열번호 89)의 단백질 서열을 보여준다(161번 위치의 시스테인 잔기 및 6xHis-tag 가 하이라이트 되어 있다).

도 4는 CLUSTALW에 의해 BCA (S161C)-His(서열번호 89), BCA-6xHis-ABD 융합 단백질 BHA(서열번호 75) 및 BCA-ABD-6xHis 융합 단백질 BAH(서열번호 76)의 단백질 서열 정렬을 보여준다(정렬 점수: BCA 대(vs.) BHA: 99.6721; BCA 대(vs.) BAH: 98.0328; BHA 대(vs.) BAH: 97.5138)

도 5a는 500 mL 진탕 플라스크 배양에서 니켈 충전 5 mL HiTrap 킬레이팅 HP 컬럼 크로마토그래피의 단일 단계에 의해 성장된 *E. coli*로부터 BHA(서열번호 75)의 정제에 대한 용출 프로파일을 보여준다(mAU, 밀리(milli); 100% B=0.5 M 이미다졸).

도 5b는 BHA에 대한 니켈 친화성 크로마토그래피(서열번호 75)에서 컬럼 분획의 SDS-PAGE 분석을 보여준다(M, SDS-PAGE 분자량 마커, 저범위(Bio-Rad); flow through(FT); F2-F10, 컬럼으로부터의 용출 분획).

도 5c는 500 mL 진탕 플라스크 배양에서 니켈 충전 5 mL HiTrap 킬레이팅 HP 컬럼 크로마토그래피의 단일 단계에 의해 성장된 *E. coli* 세포들로부터 BHA(서열번호 76)의 정제에 대한 용출 프로파일을 보여준다(mAU, 밀리(milli) 흡수 단위; 100% B=0.5 M 이미다졸).

도 5d는 BHA에 대한 니켈 친화성 크로마토그래피(서열번호 76)에서 컬럼 분획의 SDS-PAGE 분석을 보여준다(M, SDS-PAGE 분자량 마커, 저범위(Bio-Rad); flow through(FT); F2-F14, 컬럼으로부터의 용출 분획).

도 6a는 층 부피(bed volume)가 196 mL인 XK50 니켈 친화성 컬럼을 사용하여 조작된 BCA(S161C)-His(서열번호 89)의 대규모 정제를 보여주는 크로마토그램을 보여준다. 소규모 정제와 유사하게, 4 분할 용출 구배(four-segment elution gradient)를 채택하고 용출 프로파일을 280 nm에서 흡광도로 모니터링하였다.

도 6b는 조작된 BCA(S161C)-His(서열번호 89)의 대규모 정제에서 선택된 분획의 SDS-PAGE 분석을 보여준다. 레인 1은 저범위 분자량 마커이다. 레인 2는 세포 용해물의 총 단백질이다. 레인 3은 열처리 후 수집된 가용성 단백질을 보여준다. 레인 4는 XK50 니켈 친화성 컬럼을 통한 단백질 흐름을 보여준다. 레인 5는 비특이적 결합 단백질(A6-C3에서 모은(pooled) 분획)이다. 레인 6 내지 10은 각각 분획 E2, E3, F7, G3 및 A'5를 보여준다.

도 7은 비변성 PAGE상에서 상기 N-ABD-rhArg 융합 단백질(서열번호 49)과 HSA 사이의 결합을 보여준다. 30 피코 몰의 HSA를 5 내지 9 번 레인과 같이 7.5, 15, 30, 60 및 120 피코 몰의 N-ABD-rhArg(서열번호 49)와 각각 혼합하였다. 비변성 PAGE 상에서 30 피코 몰의 HSA와 N-ABD-rhArg(서열번호 49)의 이동성(mobility)은 각각 레인 2와 3에 표시하였다. 레인 1은 비어 있다. 레인 10은 120 피코 몰의 N-ABD-rhArg를 보여준다.

도 8은 비변성 PAGE상에서 상기 BHA 융합 단백질(서열번호 75)과 HSA 사이의 결합을 보여준다. 60 피코 몰의 HSA를 1 내지 5 번 레인과 같이 6, 12, 60, 300 및 600 피코 몰의 BHA 융합 단백질(서열번호 75)와 각각 혼합하였다. 비변성 PAGE 상에서 60 피코 몰의 HSA와 BHA 융합 단백질(서열번호 75) 이동성은 각각 레인 6과 7에 표시하였다. "BCA-ABD"로 표시된 밴드는 BHA이다(서열번호 75).

도 9는 마우스에서 혈장 아르기닌에 대한 BCA(S161C)-His(서열번호 89) 및 BHA 융합 단백질(서열번호 75)의 역학학을 보여준다. 각각의 BALB/c 마우스는 250 U BCA(S161C)-His(서열번호 89) 또는 BHA 융합 단백질(서열번호 75)을 정맥 내 주사(i.v.) 또는 복강 내 주사(i.p.)를 통해 투여하였다. 주사 후 표시된 시점에 혈장을 수집하였다. 시간 0은 상기 주사 전에 수집된 혈장 샘플을 보여준다. 각 샘플의 아르기닌 양은 Biochrom 30 아미노산 분석기로 결정한다. 검출 한계(3 μ M) 미만의 아르기닌 농도는이 플롯에서 0 μ M로 간주된다. 각 포인트는 3 마

리 마우스의 평균 $\pm$ SD를 보여준다.

도 10 은 BALB/c 마우스에서 단일 용량의 (A) 125U; (B) 250U; 및 (C) 500 U 의 N-ABD-rhArg(서열번호 49)를 복강 내 주사 후 Biochrom 30 아미노산 분석기를 사용하여 측정된 혈장 아르기닌 농도를 보여준다. N-ABD-rhArg(서열번호 49)는 day 0에 주사하였다.

도 11 은 폐길화된 His-rhArg(서열번호 101)의 생산에 대한 SDS-PAGE 분석을 보여준다(레인 1 및 8: SDS-PAGE 저분자량 마커(Bio-rad); 레인 2 및 3: His-rhArg(서열번호 101); 레인 4 및 5: 60% 용출; 레인 6 및 7: 30% 용출; 레인 9 및 10: 폐길화된 His-rhArg(서열번호 101)). PEG 의 분자량은 5,000이다. 사용된 PEG는 메톡시폴리에틸렌 글리콜-숙신이미딜 프로피오네이트(mPEG-SPA 5,000)이다. His-rhArg(서열번호 101)의 단백질 표면 라이신 잔기는 프로피온아미딜(SPA) 링커를 통해 본원에 참조로 인용된 미국 특허 8,679,810에 기재된 PEG(5,000 amu)에 공유 결합된다.

도 12 는 N-ABD094-rhArg(서열번호 50)의 제조 결과를 보여준다 (레인 1: SDS-PAGE 분자량 마커; 레인 2: 세포 용해물; 레인 3: 열처리 후; 레인 4: flow through; 레인 5: 30% 용출; 레인 6: 60% 용출; 레인 7: 접선희름여과(tangential flow filtration; TFF) 후. 레인 6 또는 7의 주요 단백질 밴드는 정제된 N-ABD094-rhArg(서열번호 50)이다.

도 13 은 일반 식이(chow diet)를 섭취시킨 C57BL/6J 수컷 마우스의 혈장 아르기닌 농도를 나타내는 것으로서, 단일 용량의 식염수 상의 500 U의 N-ABD094-rhArg(서열번호 50)를 복강 내 주사 후, 검출 한계가 0.3 μ M 이하인 Agilent 6460 액체 크로마토그래피/전기 분무 이온화(Electrospray Ionization) 삼중 사극자 질량 분석기(Triple Quadrupole Mass Spectrometer)를 사용하여 상이한 시점들(time points)에 측정된 결과, 혈장 아르기닌 농도는 10 일 동안 1 μ M 미만으로 고갈될 수 있음이 밝혀졌다. 각 시점은 5 마리 마우스의 평균 $\pm$ SEM 을 보여준다.

도 14 는 500 U의 단일 용량으로 C57BL/6J 수컷 마우스에 주사 후 상이한 시점들(time points)에 N-ABD094-rhArg(서열번호 50)의 혈장 농도를 나타낸 것으로서, 인간 아르기나제를 검출하기 위해 ELISA로 측정하였다(n = 5). 약물의 순환 반감기는 약 4 일이다. 각 시점은 5 마리 마우스의 평균 $\pm$ SEM을 보여준다.

도 15 는 일반 식이(chow diet) 사료를 섭취시키고 N-ABD094-rhArg(서열번호 50)를 처리한 정상적인 마른(lean) C57BL/6J 수컷 마우스에서 유의한 지방 손실을 보여준다[Chow(rhArg) 군]. (A) 500 U의 N-ABD094-rhArg(서열번호 50)를 10일 간격으로 4 주간 처리 후, 비히클(식염수) 처리 대조군[Chow(비히클) 군]과 비교하여, 내장 및 피하 지방량의 현저한 감소. * $P < 0.05$, 독립적 t-test. 데이터는 평균 $\pm$ SEM 으로 나타내었고, 각 군에 대해 n은 5 이다. (B) N-ABD094-rhArg(서열번호 50)를 처리한 마우스에서 내장 백색 지방 조직(white adipose tissue; WAT)의 헤마톡실린 및 에오신(H&E)으로 염색한 파라핀 절편은 지방 세포 크기의 현저한 감소를 보여주었다

도 16 은 실시간 qRT-PCR을 이용하여 측정된 다양한 조직에서 몇몇 중요한 지질 생성(lipogenesis) 관련 유전자의 발현 수준을 보여준다. 500 U의 N-ABD094-rhArg(서열번호 50)를 10일 간격으로 4 주간 처리 후, 비히클-처리된 대조군[Chow(비히클) 군]과 비교하여, (A) 내장 백색 지방 조직(WAT) 및 (B) 간에서, 지질 생성 관련 유전자의 현저한 하향 조절. 유전자 발현 수준은 1로 설정된 비히클-처리된 마우스[Chow(비히클) 군]와 대조하여 나타내며, * $P < 0.05$, 독립적 t-test. 데이터는 평균 $\pm$ SEM 으로 나타내었고, 각 군에 대해 n은 5 이다.

도 17 은 N-ABD094-rhArg(서열번호 50) 처리가 인슐린 감수성을 현저히 개선함을 보여준다. (A) 인슐린 내성 검사 결과 500 U의 N-ABD094-rhArg(서열번호 50)[Chow(rhArg) 군]을 10 일 간격으로 주사한 마우스는, 비히클 처리 대조군과 비교하여, 처리 2 주 후부터 즉시 인슐린의 혈당 저하 효과에 대한 민감성이 현저하게 증가한 것으로 나타났다[Chow(rhArg) 군]. * $P < 0.05$ 대 Chow(rhArg) 군, 독립적 t-test. 데이터는 평균 $\pm$ SEM 으로 나타내었고, 각 군에 대해 n은 5 이다. (B) MTT 분석(assay) 은 마우스 1 차 간세포를 5U/mL N-ABD094-rhArg(서열번호 50)로 48 시간 처리 시, 처리하지 않은 대조군(con)과 비교하여 세포 생존능에 영향을 미치지 않는 것으로 나타났다. (C) 100nM 인슐린에 20분간 노출시키기 전에 5U/mL N-ABD094-rhArg (서열번호 50)를 포함하는 아르기닌 고갈에 노출시킨 마우스 1 차 간세포에서 인산화된 Akt(pAkt)(인슐린 신호전달(signaling) 마커)의 단백질 수치에 대한 웨스턴 블롯 분석 결과. 인슐린 자극 즉시 N-ABD094-rhArg(서열번호 50)로 처리한 간세포가 높은 수준의 Akt 인산화를 보인 것은 인슐린 신호전달의 향상을 의미하였다. 레인 1: 대조군(con); 레인 2: 5U/mL N-ABD094-rhArg(서열번호 50); 레인 3: 100nM 인슐린; 레인 4: 5U/mL N-ABD094-rhArg(서열번호 50) + 100nM 인슐린.

도 18 은 비히클 처리된 C57BL/6J 수컷 마우스는 60 kcal% 지방이 포함된 고지방 식단(HFD)을 섭취시킨 반면(8 주령부터 12 주 동안)[HFD(비히클) 군]은 (A) 체중과 (B) 크기에서 현저한 증가를 보인 반면, HFD(생후 8 주부터 12 주 동안)와 300 U N-ABD094-rhArg(서열번호 50)를 1주일에 한 번 동시에 섭취시킨 [HFD(rhArg) 군]은 체중 증가를 효과적으로 예방할 수 있음을 보여준다. 이들의 체중은 10 kcal% 지방을 포함한 일치하는(matched) 저지방 식단(LFD)을 섭취시킨 비히클 처리 마른 대조군 마우스[LFD(비히클) 군]와 유사하였다. 데이터는 평균±SEM 으로 나타내었고, 각 군에 대해 n은 5 이다.

도 19 는 300 U의 N-ABD094-rhArg(서열번호 50)와 HFD를 주 1회씩 12주 동안 동시에 섭취시킨 수컷 마우스 [HFD(rhArg) 군]은 백색 지방 조직(white adipose tissue(WAT))의 HFD로 유발된 확장(expansion)을 효과적으로 방지할 수 있음을 보여준다. (A) 주요 내장(성선 주위, 창막 주위 및 장간막) 및 피하(설측) 저장소(depots)에서 지방 패드(fat pad)의 무게. (B) 내장 WAT의 H&E 염색 절편은 N-ABD094-rhArg의 동시 처리가 HFD로 유발된 백색 지방 세포(WAT)의 비대(hypertrophy)를 방지하였다. (C)마른(lean) 대조군[LFD(vehicle) 군](1로 설정됨) 대비 WAT내 몇몇 중요한 지질 생성 관련 유전자의 발현 수준. 이들 유전자는 N-ABD094-rhArg로 처리된 HFD를 섭취시킨 마우스에서 극적으로 하향 조절되었다. * $P < 0.05$, 일원분산분석(one-way ANOVA) 이후Fisher의 LSD. 데이터는 평균±SEM 으로 나타내었고, 각 군에 대해 n은 5 이다.

도 20 은 300 U의 N-ABD094-rhArg(서열번호 50)를 주1회씩 12주 동안 처리한 마우스[HFD(rhArg) 군]의 골격근에서, HFD로 유발된 지질 생성 전사 조절제(transcriptional regulators; *Pparg* 및 *Srebp1c*)의 상향 조절 및 이와 동시에 진행되는 주요 지질 생성 효소(*Acc1* 및 *Scd1*)의 하향 조절을 억제함을 보여준다. * $P < 0.05$, 일원분산분석(one-way ANOVA) 이후 by Fisher의 LSD. 데이터는 평균±SEM 으로 나타내었고, 각 군에 대해 n은 5 이다].

도 21 은 300 U의 N-ABD094-rhArg(서열번호 50)[HFD(rhArg) 군]을 주 1 회 병용 처리 시 C57BL/6J 암컷 마우스에서 HFD로 유발된 비만을 효과적으로 예방할 수 있음을 보여준다. (A) 생후 8 주부터 12 주 동안 HFD를 섭취시키고 현재 N-ABD094-rhArg 또는 비히클을 처리한 마우스의 체중. LFD를 섭취시킨 비히클 처리된 암컷 마우스는 마른 대조군[LFD(비히클) 군]으로 사용되었다. (B) 주요 내장(성선 주위, 창막 주위 및 장간막) 및 피하(설측) 저장소(depots)에서 지방 패드(fat pad)의 무게. * $P < 0.05$, 일원분산분석(one-way ANOVA) 이후Fisher의 LSD. 데이터는 평균±SEM 으로 나타내었고, 각 군에 대해 n은 5 이다.

도 22 는 300 U의 N-ABD094-rhArg(서열번호 50)[HFD(rhArg) 군]을 주 1 회 병용 투여 시 C57BL/6J 암컷 마우스에서 HFD로 유발된 인슐린 저항성 및 포도당 불내성을 효과적으로 예방할 수 있음을 보여준다. (A) HFD를 섭취시킨 후 제 7 주에 실시한 인슐린 내성 검사(ITT). (B) 내당능 검사(glucose tolerance test; GTT)는 HFD를 섭취시킨 후 제 11 주에 실시되었다. ITT 및 GTT 결과는 곡선하 면적(area under the curve; AUC)으로 표현하였다. * $P < 0.05$, 일원분산분석(one-way ANOVA) 이후 Fisher의 LSD. 데이터는 평균±SEM 으로 나타내었고, 각 군에 대해 n은 5 이다.

도 23 은 N-ABD094-rhArg(서열번호 50)(rhArg), 소의(bovine) 아르기나제 또는 천연 아르기닌 탈아민 효소(arginine deiminase; ADI)를 배양 배지에 첨가하거나 또는 아르기닌이 없는 배지의 사용에 의한 아르기닌의 고갈이 마우스 3T3-L1 전 지방 세포(preadipocytes)가 지방 세포로 분화되는 것을 억제함을 보여준다. 아르기나제 대사 산물 L-오르니틴 또는 요소 또는 ADI 대사 산물 L-시트룰린을 배양 배지에 첨가해도 지방 생성(adipogenesis) 및 지질 생성(lipogenesis)에 대한 억제 효과가 없었다. (*상기 배지는 0.4 mM L- 아르기닌을 포함하며 아르기나제에 의해 0.4 mM L-오르니틴과 0.4 mM 요소로, 또는 ADI에 의해 0.4 mM L-시트룰린으로 전환될 수 있다.) 아르기닌 고갈제 또는 아르기나제/ADI의 대사 산물을 첨가하지 않은 배양 배지에서 배양된 세포를 대조군으로 사용하였다. 세포 내 지질은 배지에 첨가된 특정 분화 유도 인자에 노출된 지 6 일 후에 oil red O 로 염색하였다.

도 24 는 N-ABD094-rhArg(서열번호 50)가 3T3-L1 전 지방 세포에서 지방 생성- 및 지질 생성 유전자를 억제할 수 있음을 보여준다. 마우스 3T3-L1 전 지방 세포의 지방 세포로의 분화를 유도하기 위해 특정 인자가 보충된 배지에서 6 일 동안 배양하였다(분화됨). 이러한 인자가 없는 배지에서 성장시킨 세포는 미분화되지 않았다. 상기 배지에 2U/mL N-ABD094-rhArg(서열번호 50)(rhArg)를 첨가하였다. N-ABD094-rhArg를 첨가하지 않고 배지에서 성장시킨 세포를 대조군으로 사용하였다. 몇 가지 중요한 요소로서 (A) 지방 생성의 전사 조절 인자의 mRNA 발현 수준 및 (B) 지질 생성 경로의 효소는 실시간 qRT-PCR에 의해 결정하였으며, 미분화 군(대조군)을 기준으로 표현되었고, 1로 설정하였다. * $P < 0.05$, 일원분산분석(one-way ANOVA) 이후 Fisher의 LSD. 데이터는 평균±SEM 으로 나타내었고, 각 군에 대해 n은 3 이다.

도 25 는 여러 아르기닌 농도에 대한 3T3-L1 전 지방 세포의 반응을 나타낸다. 마우스 3T3-L1 전 지방 세포를 여러 농도의 L-아르기닌을 첨가하거나 첨가하지 않고 아르기닌이 없는 배지에서 6 일 동안 배양하였다. 분화 유도 인자가 보충된 정상 아르기닌 함유 배지에서 배양된 세포는 분화의 양성(+ ve) 대조군 역할을 한 반면, 분화 유도 인자의 보충 없이 정상적인 아르기닌 함유 배지에서 배양된 세포는 분화의 음성(-ve) 대조군 역할을 하였다. 일 군의 세포를 분화 유도 인자가 보충된 정상 아르기닌 함유 배지에서 배양하고 분화를 억제하기 위해 5U/mL N-ABD094-rhArg(서열번호 50)(rhArg)로 처리 하였다. (A) 세포를 오일 레드 0로 지질을 염색하고, 염색 강도는 광학 밀도를 측정하여 정량화하였으며, 이는 양성(+ ve) 대조군에 대한 백분율로 표시하였다. (B) 몇몇 중요한 지질 생성 관련 유전자의 mRNA 수준은 1로 설정된 아르기닌이 없는 배지에서 배양된 세포(1로 설정됨)에 대비하여 발현된다. 데이터는 평균±SEM 으로 나타내었고, 각 군에 대해 n은 3 이다.

도 26 은 수컷 마우스에 HFD와 300 U의 N-ABD094-rhArg(서열번호 50)[HFD(rhArg) 군]를 주 1 회 동시 처리 시, HFD로 유발된 인슐린 저항성을 효과적으로 예방할 수 있음을 보여준다. 인슐린 저항성 시험(ITT)은 HFD 를 섭취 시킨 후 (A) 6 주, (B) 11 주에 실시하였으며, 그 결과는 곡선하 면적(AUC)으로 표시하였다. * $P < 0.05$, 일원분산분석(one-way ANOVA) 이후 Fisher의 LSD. 데이터는 평균±SEM 으로 나타내었고, 각 군에 대해 n은 5 이다.

도 27 은 수컷 마우스에 HFD와 300 U의 N-ABD094-rhArg(서열번호 50)[HFD(rhArg) 군]를 주 1 회 동시 처리 시, HFD로 유발된 포도당 불내성을 효과적으로 예방할 수 있음을 보여준다. 내당능 검사(GTT)는 HFD를 섭취시킨 후 (A) 5 주, (B) 10 주에 실시하였으며, 그 결과는 곡선하 면적(AUC)으로 표시하였다. * $P < 0.05$, 일원분산분석(one-way ANOVA) 이후 Fisher의 LSD. 데이터는 평균±SEM 으로 나타내었고, 각 군에 대해 n은 5 이다.

도 28 은 수컷 마우스에 HFD와 300 U의 N-ABD094-rhArg(서열번호 50)[HFD(rhArg) 군]를 주 1 회 동시 처리 시, HFD로 유발된 공복 시의 (A) 혈당(혈당계를 사용하여 측정) 및 (B) 혈장 인슐린(ELISA로 측정)의 상승을 효과적으로 예방할 수 있음을 보여준다. (C) HOMA-IR 점수(표준 공식으로 계산한 인슐린 저항성의 측정값)는 N-ABD094-rhArg를 동시 처리 시 HFD 로 유발된 인슐린 저항성의 발병을 예방함을 보여 주었다. * $P < 0.05$, 일원분산분석(one-way ANOVA) 이후 Fisher의 LSD. 데이터는 평균±SEM 으로 나타내었고, 각 군에 대해 n은 5 이다.

도 29 는 수컷 마우스에 HFD와 300 U의 N-ABD094-rhArg(서열번호 50)[HFD(rhArg) 군]를 주 1 회 동시 처리 시, HFD로 유발된 공복 혈당의 (A) 렙틴 및 (B) 총 콜레스테롤, (C) 중성 지방 및 (D) 자유 지방산의 상승을 예방/경감했음을 보여준다. * $P < 0.05$, 일원분산분석(one-way ANOVA) 이후 Fisher의 LSD. 데이터는 평균±SEM 으로 나타내었고, 각 군에 대해 n은 5 이다.

도 30 은 수컷 마우스에 HFD와 300 U의 N-ABD094-rhArg(서열번호 50)[HFD(rhArg) 군]를 주 1 회씩 12 주 동안 동시 처리 시, HFD로 유발된 간의 확장을 방지했음을 보여준다. (A) 신선한 간 전체의 대표 이미지. (B) 간의 중량. * $P < 0.05$, 일원분산분석(one-way ANOVA) 이후 Fisher의 LSD. 데이터는 평균±SEM 으로 나타내었고, 각 군에 대해 n은 5 이다.

도 31 은 수컷 마우스에 HFD와 300 U의 N-ABD094-rhArg(서열번호 50)[HFD(rhArg) 군]를 주 1 회씩 12 주 동안 동시 처리 시, HFD로 유발된 간 지방증(hepatic steatosis)을 예방할 수 있음을 보여준다. (A) oil red 0 로 간 절편을 염색 시, HFD를 섭취시킨 비히클 처리된 마우스[HFD(비히클) 군]에서, N-ABD094-rhArg 로 처리한 마우스에서는 보이지 않던, 지질의 광범위한 축적을 보여주었다. (B) N-ABD094 처리는 HFD를 섭취시킨 마우스의 간에서 중성 지방 농도의 상승을 방지하였다. (C) N-ABD094-rhArg 는 간에서 HFD로 유발된 지질 생성 관련 유전자의 상향 조절을 억제하였다. * $P < 0.05$, 일원분산분석(one-way ANOVA) 이후 Fisher의 LSD. 데이터는 평균±SEM 으로 나타내었고, 각 군에 대해 n은 5 이다.

도 32 는 수컷 마우스에 HFD와 300 U의 N-ABD094-rhArg(서열번호 50)[HFD(rhArg) 군]를 주 1 회씩 12 주 동안 동시 처리 시, HFD로 유발된 간 손상에 대한 바이오 마커로 일반적으로 측정되는 알라닌 아미노트랜스퍼라제(ALT)의 혈청 수준 상승을 방지했음을 보여준다. * $P < 0.05$, 일원분산분석(one-way ANOVA) 이후 Fisher의 LSD. 데이터는 평균±SEM 으로 나타내었고, 각 군에 대해 n은 5 이다.

도 33 은 수컷 마우스에 HFD와 300 U의 N-ABD094-rhArg(서열번호 50)[HFD(rhArg) 군]를 주 1 회씩 12 주 동안 동시 처리 시, HFD로 유발된 (A) 신장, (B) 췌장 및 (C) 심장에서의 중량 증가를 방지했음을 보여준다. * $P < 0.05$, 일원분산분석(one-way ANOVA) 이후 Fisher의 LSD. 데이터는 평균±SEM 으로 나타내었고, 각 군에 대해 n은 5 이다.

도 34 는 수컷 마우스에 300 U의 N-ABD094-rhArg(서열번호 50)[HFD(rhArg) 군]를 주 1 회씩 12 주 동안 동시 처리 시, (A) 마른 대조군 마우스[LFD(비히클) 군](1로 설정됨)에 대해 표현되는HFD로 유발된 내장 WAT 내 염증

촉진 아디포킨(proinflammatory adipokines)의 mRNA의 상향 조절을 효과적으로 억제하고 및 (B) HFD로 유발된 혈청 내 염증촉진 사이토카인 수준의 상승을 효과적으로 억제할 수 있음을 보여준다. * $P < 0.05$, 일원분산분석(one-way ANOVA) 이후 Fisher의 LSD. 데이터는 평균 $\pm$ SEM 으로 나타내었고, 각 군에 대해 n은 5 이다.

도 35 는 수컷 마우스에 300 U의 N-ABD094-rhArg(서열번호 50)[HFD(rhArg) 군]를 주 1 회씩 12 주 동안 동시 처리 시, HFD로 유발된 갈색 지방 조직(brown adipose tissue (BAT))의 백색화를 효과적으로 방지할 수 있음을 보여준다. (A) 전체 신선한 견갑골 간 BAT의 대표 이미지. (B) 견갑골 간 BAT의 중량. (C) H&E 염색된 파라핀 절편은, 백색 지방 세포의 전형적인 조직학적 특징인 큰 단일 구멍(지질 소구(lipid globule))을 가진 세포들이 비히클로 처리된 HFD를 섭취시킨 마우스의 BAT[HFD(비히클) 군]에서 풍부하지만, N-ABD094-rhArg로 처리한 HFD를 섭취시킨 마우스의 BAT에서는 거의 발견되지 않음을 보여 주었다. * $P < 0.05$, 일원분산분석(one-way ANOVA) 이후 Fisher의 LSD. 데이터는 평균 $\pm$ SEM 으로 나타내었고, 각 군에 대해 n은 5 이다.

도 36 은 수컷 마우스에 300 U의 N-ABD094-rhArg(서열번호 50)[HFD(rhArg) 군]를 주 1 회씩 12 주 동안 동시 처리 시, BAT내 열 발생의 주요 조절 인자(*Ucp1* 및 *Pgc1a*)의 mRNA 수준을 크게 상향 조절하였고, HFD로 유발된 BAT내 지방산 산화 유전자(*Acox1*)의 하향 조절을 억제하였다. * $P < 0.05$, 일원분산분석(one-way ANOVA) 이후 Fisher의 LSD. 데이터는 평균 $\pm$ SEM 으로 나타내었고, 각 군에 대해 n은 5 이다.

도 37 은 생후 5 주부터 12 주 동안 HFD를 섭취시켜 유발된 기존 비만이 있는 C57BL/6J 수컷 마우스를 N-ABD094-rhArg(서열번호 50)로 처리 시, 체중이 현저하게 감소하였음을 보여준다. (A) 600 U의 N-ABD094-rhArg[HFD(rhArg) 군]을 주 1 회씩 12 주 동안 처리한 마우스의 체중. (B) 12 주 처리 후 마우스의 대표적인 이미지. 데이터는 평균 $\pm$ SEM 으로 나타내었고, 각 군에 대해 n은 5 이다.

도 38 은 HFD로 유발된 기존 비만을 가진 수컷 마우스[HFD(rhArg) 군]에 600 U의 N-ABD094-rhArg(서열번호 50)을 주 1 회씩 12 주 동안 투여 시, WAT를 효과적으로 감소시킬 수 있음을 보여준다. (A) 주요 내장(성선 주위, 창막 주위 및 장간막) 및 피하(설측) 저장소(depots)에서 지방 패드(fat pad)의 무게는 N-ABD094-rhArg 처리 후 마른 대조군 마우스[LFD(rhArg) 군]와 매우 유사하였다. * $P < 0.05$, 일원분산분석(one-way ANOVA) 이후 Fisher의 LSD. 데이터는 평균 $\pm$ SEM 으로 나타내었고, 각 군에 대해 n은 5 이다. (B) 내장 WAT의 H&E 염색 절편은 N-ABD094-rhArg 처리가 비만 마우스의 지방 세포의 크기를 현저히 감소시켰음을 보여주었다.

도 39 는 HFD로 유발된 기존 비만을 가진 수컷 마우스[HFD(rhArg) 군]에 600 U의 N-ABD094-rhArg(서열번호 50)을 주 1 회 투여 시, 인슐린 저항성을 효과적으로 역전시킬 수 있음을 보여준다. 인슐린 저항성 시험(ITT)은 N-ABD094-rhArg 처리 전 및 ABD094-rhArg 처리 후 4, 8 및 12 주에 수행되었다. ITT 결과는 곡선하 면적(AUC)으로 나타내었다. * $P < 0.05$, 일원분산분석(one-way ANOVA) 이후 Fisher의 LSD. 데이터는 평균 $\pm$ SEM 으로 나타내었고, 각 군에 대해 n은 5 이다.

도 40 은 HFD로 유발된 기존 비만을 가진 수컷 마우스[HFD(rhArg) 군]에 600 U의 N-ABD094-rhArg(서열번호 50)을 주 1 회 투여 시, 포도당 불내성을 효과적으로 역전시킬 수 있음을 보여준다. 내당능 시험(GTT)은 N-ABD094-rhArg 처리 전 및 ABD094-rhArg 처리 후 3, 7 및 11 주에 수행되었다. GTT 결과는 곡선하 면적(AUC)으로 나타내었다. * $P < 0.05$, 일원분산분석(one-way ANOVA) 이후 Fisher의 LSD. 데이터는 평균 $\pm$ SEM 으로 나타내었고, 각 군에 대해 n은 5 이다.

도 41 은 HFD로 유발된 기존 비만을 가진 수컷 마우스[HFD(rhArg) 군]에 600 U의 N-ABD094-rhArg(서열번호 50)을 주 1 회 투여 시, 고혈당증, 고인슐린혈증 및 인슐린 저항성을 효과적으로 역전시킬 수 있음을 보여준다. 비만 마우스의 (A) 공복 혈당, (B) 공복 혈장 인슐린 및 (C) HOMA-IR 점수는 N-ABD094-rhArg로 처리 후 거의 정상 수준으로 교정되었다. * $P < 0.05$, 일원분산분석(one-way ANOVA) 이후 Fisher의 LSD. 데이터는 평균 $\pm$ SEM 으로 나타내었고, 각 군에 대해 n은 5 이다.

도 42 는 HFD로 유발된 기존 비만을 가진 수컷 마우스[HFD(rhArg) 군]에 600 U의 N-ABD094-rhArg(서열번호 50)을 주 1 회 투여 시, 고렙틴혈증(hyperleptinemia) 및 고콜레스테롤 혈증(hypercholesterolemia)을 효과적으로 역전시킬 수 있음을 보여준다. 비만 마우스의 (A) 공복 혈장 렙틴 및 (B) 공복 혈장 총콜레스테롤은 N-ABD094-rhArg로 처리 후 거의 정상 수준으로 교정되었다. * $P < 0.05$, 일원분산분석(one-way ANOVA) 이후 Fisher의 LSD. 데이터는 평균 $\pm$ SEM 으로 나타내었고, 각 군에 대해 n은 5 이다.

도 43 은 HFD로 유발된 기존 비만을 가진 수컷 마우스[HFD(rhArg) 군]에 600 U의 N-ABD094-rhArg(서열번호 50)을 주 1 회씩 12 주 동안 투여 시, 간의 확장(enlargement)을 효과적으로 역전시킬 수 있음을 보여준다. (A) 신선한 간 전체의 대표적인 이미지는 N-ABD094-rhArg 처리 후 비만 마우스의 간이 정상 크기로 회복되었음을 보

여주었다. (B) 비만 마우스의 간 무게는 N-ABD094-rhArg 처리 후 급격히 감소하였으며, 마른 대조군 마우스 [LFD(rhArg) 군]와 유사했습니다. $*P < 0.05$, 일원분산분석(one-way ANOVA) 이후 Fisher의 LSD. 데이터는 평균 $\pm$ SEM 으로 나타내었고, 각 군에 대해 n은 5 이다.

도 44 는 HFD로 유발된 기존 비만을 가진 수컷 마우스[HFD(rhArg) 군]에 600 U의 N-ABD094-rhArg(서열번호 50)을 주 1 회씩 12 주 동안 투여 시, 간 지방증(hepatic steatosis)을 효과적으로 역전시킬 수 있음을 보여준다. N-ABD094-rhArg 를 처리한 비만 마우스에서, (A) 간의 oil red O 염색은 지질의 극적인 제거(dramatic clearance)를 보여주었고, (B) 중성 지방의 농도는 마른 대조군 마우스[LFD(비히클)]와 비슷한 수준으로 감소하였고, (C) 몇몇 중요한 지질 생성 관련 유전자의 mRNA 수준이 크게 하향 조절되었다. 상기 발현 수준은 마른 대조군(1로 설정됨)에 대해 표현되었다. $*P < 0.05$, 일원분산분석(one-way ANOVA) 이후 Fisher의 LSD. 데이터는 평균 $\pm$ SEM 으로 나타내었고, 각 군에 대해 n은 5 이다.

도 45 는 HFD로 유발된 기존 비만을 가진 수컷 마우스[HFD(rhArg) 군]에 600 U의 N-ABD094-rhArg(서열번호 50)을 주 1 회씩 12 주 동안 투여 시, 간 손상의 통상적 바이오 마커들인 알라닌 아미노트랜스아미나제(ALT) 및 아스파테이트 트랜스아미나제(AST)의 혈청 수준을 상당히 감소시킬 수 있음을 보여준다. $*P < 0.05$, 일원분산분석(one-way ANOVA) 이후 Fisher의 LSD. 데이터는 평균 $\pm$ SEM 으로 나타내었고, 각 군에 대해 n은 5 이다.

도 46 은 HFD로 유발된 기존 비만을 가진 수컷 마우스[HFD(rhArg) 군]에 600 U의 N-ABD094-rhArg(서열번호 50)을 주 1 회씩 12 주 동안 투여 시, 신장 지방증(renal steatosis)을 효과적으로 역전시킬 수 있음을 보여준다. N-ABD094-rhArg 를 처리한 비만 마우스에서, (A) 신장의 중량; (B) 신장의 중성 지방 농도; (C) H&E 염색된 신장 절편의 신장 세뇨관의 공포 구조(vacuolated structures) 및 (D) oil red O 로 염색된 신장 절편의 사구체에서 지질 방울의 이소성 축적(ectopic accumulation)이 현저하게 감소되었다. $*P < 0.05$, 일원분산분석(one-way ANOVA) 이후 Fisher의 LSD. 데이터는 평균 $\pm$ SEM 으로 나타내었고, 각 군에 대해 n은 5 이다.

도 47 은 HFD로 유발된 기존 비만을 가진 수컷 마우스[HFD(rhArg) 군]에 600 U의 N-ABD094-rhArg(서열번호 50)을 주 1 회씩 12 주 동안 투여 시, 췌장 지방증(pancreatic steatosis)을 효과적으로 역전시킬 수 있음을 보여준다. N-ABD094-rhArg 를 처리한 비만 마우스에서, (A) 췌장의 중량; (B) 췌장의 H&E 염색 부분에서 보이는 백색 지방 조직(WAT)의 과도한 간엽간(interlobular) 및 내엽(intralobular) 내 축적; 및 (C) 췌장의 중성 지방 농도가 현저하게 감소하였다. $*P < 0.05$, 일원분산분석(one-way ANOVA) 이후 Fisher의 LSD. 데이터는 평균 $\pm$ SEM 으로 나타내었고, 각 군에 대해 n은 5 이다.

도 48 은 HFD로 유발된 기존 비만을 가진 수컷 마우스[HFD(rhArg) 군]에 600 U의 N-ABD094-rhArg(서열번호 50)을 주 1 회씩 12 주 동안 투여 시, 심장 지방증(cardiac steatosis)을 효과적으로 역전시킬 수 있음을 보여준다. N-ABD094-rhArg 를 처리한 비만 마우스에서, (A) 심장의 중량; (B) 심장에 과도한 지질 방울 축적; (C) 심장의 중성 지방 농도가 현저하게 감소하였다. $*P < 0.05$, 일원분산분석(one-way ANOVA) 이후 Fisher의 LSD. 데이터는 평균 $\pm$ SEM 으로 나타내었고, 각 군에 대해 n은 5 이다.

도 49 는 HFD로 유발된 기존 비만을 가진 수컷 마우스[HFD(rhArg) 군]에 600 U의 N-ABD094-rhArg(서열번호 50)을 주 1 회씩 12 주 동안 투여 시, 골격근 내 중성 지방의 농도를 상당히 감소시킬 수 있음을 보여준다. $*P < 0.05$, 일원분산분석(one-way ANOVA) 이후 Fisher의 LSD. 데이터는 평균 $\pm$ SEM 으로 나타내었고, 각 군에 대해 n은 5 이다.

도 50 은 HFD로 유발된 기존 비만을 가진 수컷 마우스[HFD(rhArg) 군]에 600 U의 N-ABD094-rhArg(서열번호 50)을 주 1 회씩 12 주 동안 투여 시, (A) 마른 대조군 마우스[LFD(비히클) 군](1로 설정됨)에 대해 표현되는, 내장 WAT 내 염증촉진 아디포카인 Mcp1의 mRNA 수준을 상당히 하향 조절하고 (B) 염증촉진 사이토 카인 Mcp1의 혈청 농도를 상당히 감소시킬 수 있음을 보여준다. $*P < 0.05$, 일원분산분석(one-way ANOVA) 이후 Fisher의 LSD. 데이터는 평균 $\pm$ SEM 으로 나타내었고, 각 군에 대해 n은 5 이다.

도 51 은 HFD로 유발된 기존 비만을 가진 수컷 마우스[HFD(rhArg) 군]에 600 U의 N-ABD094-rhArg(서열번호 50)을 주 1 회씩 12 주 동안 투여 시, 간의 염증 및 섬유화를 감소시킬 수 있음을 보여준다. N-ABD094-rhArg 를 처리한 비만 마우스의 간에서, (A) 염증촉진(proinflammatory) 유전자 및 (B) 전 섬유화 유전자(profibrotic genes)의 상당한 하향 조절 및 (C) 항-염증성 유전자의 상당한 상향 조절이 관찰되었다. mRNA 수준은 마른 대조군[LFD(비히클)](1로 설정)에 대해 표현하였다. $*P < 0.05$, 일원분산분석(one-way ANOVA) 이후 Fisher의 LSD. 데이터는 평균 $\pm$ SEM 으로 나타내었고, 각 군에 대해 n은 5 이다.

도 52 는 HFD로 유발된 기존 비만을 가진 수컷 마우스[HFD(rhArg) 군]에 600 U의 N-ABD094-rhArg(서열번호 50)을 주 1 회씩 12 주 동안 투여 시, 간의 염증 및 섬유화를 감소시킬 수 있음을 보여준다. N-ABD094-rhArg 를 처리한 비만 마우스의 간에서, (A) 염증촉진(proinflammatory) 유전자 및 (B) 전 섬유화 유전자(profibrotic genes)의 상당한 하향 조절 및 (C) 항-염증성 유전자의 상당한 상향 조절이 관찰되었다. mRNA 수준은 마른 대조군[LFD(비히클)](1로 설정)에 대해 표현하였다. $*P < 0.05$, 일원분산분석(one-way ANOVA) 이후 Fisher의 LSD. 데이터는 평균 $\pm$ SEM 으로 나타내었고, 각 군에 대해 n은 5 이다.

0)을 주 1 회씩 12 주 동안 투여 시, 신장의 염증 및 섬유화를 감소시킬 수 있음을 보여준다. N-ABD094-rhArg를 처리한 비만 마우스의 신장에서, (A) 염증촉진(proinflammatory) 유전자 및 (B) 전 섬유화 유전자(profibrotic genes)의 상당한 하향 조절 및 (C) 신장 세뇨관 및 사구체 주변의 콜라겐 섬유의 과도한 침착 감소가 관찰되었다. mRNA 수준은 마른 대조군[LFD(비히클) 군](1로 설정)에 대해 표현하였다. $*P < 0.05$, 일원분산분석(one-way ANOVA) 이후 Fisher의 LSD. 데이터는 평균±SEM 으로 나타내었고, 각 군에 대해 n은 5 이다.

도 53 은 HFD로 유발된 기존 비만을 가진 수컷 마우스[HFD(rhArg) 군]에 600 U의 N-ABD094-rhArg(서열번호 50)을 주 1 회씩 12 주 동안 투여 시, 췌장의 염증 및 섬유화를 감소시킬 수 있음을 보여준다. N-ABD094-rhArg를 처리한 비만 마우스의 췌장에서, (A) 염증촉진(proinflammatory) 유전자 및 (B) 전 섬유화 유전자(profibrotic genes)의 상당한 하향 조절이 관찰되었다. mRNA 수준은 마른 대조군[LFD(비히클) 군](1로 설정)에 대해 표현하였다. $*P < 0.05$, 일원분산분석(one-way ANOVA) 이후 Fisher의 LSD. 데이터는 평균±SEM 으로 나타내었고, 각 군에 대해 n은 5 이다.

도 54 는 HFD로 유발된 기존 비만을 가진 수컷 마우스[HFD(rhArg) 군]에 600 U의 N-ABD094-rhArg(서열번호 50)을 주 1 회씩 12 주 동안 투여 시, 갈색 지방 조직(BAT)의 백색화를 효과적으로 역전시킬 수 있음을 보여준다. N-ABD094-rhArg를 처리한 비만 마우스에서, (A) 견갑골 간 BAT의 중량; (B) 견갑 간 BAT의 형태와 크기 및 (C) BAT의 H&E 염색 절편에 나타난 조직학적 특징은 마른 대조군 마우스와 유사하였다. $*P < 0.05$, 일원분산분석(one-way ANOVA) 이후 Fisher의 LSD. 데이터는 평균±SEM 으로 나타내었고, 각 군에 대해 n은 5 이다.

도 55 는 HFD로 유발된 기존 비만을 가진 수컷 마우스[HFD(rhArg) 군]에 600 U의 N-ABD094-rhArg(서열번호 50)을 주 1 회 투여 시, 상기 투약 처리 후 5주 까지 (A) 수축기 및 이완기 혈압 및 (B) 비만 마우스의 심박수가 마른 대조군 마우스[LFD(비히클) 군]와 유사한 수준으로 상당히 낮아졌다. $*P < 0.05$, 일원분산분석(one-way ANOVA) 이후 Fisher의 LSD. 데이터는 평균±SEM 으로 나타내었고, 각 군에 대해 n은 10 이다.

도 56 은 C57BL/6J 수컷 마우스에 LFD를 섭취시키고 5 주령부터 시작하여 500 U의 N-ABD094-rhArg(서열번호 50)[LFD (rhArg) 군]을 8 개월 동안 주 1 회 복강 내 주사한 경우, 이들 마우스가 비-중화 항-약물 항체(non-neutralizing anti-drug antibody)를 발생시킴을 보여준다. (A) ELISA 분석을 사용하여 평균 항체 역가가 10^8 인 항-rhArg 항체를 N-ABD094-rhArg로 처리한 LFD를 섭취시킨 마우스의 혈장에서 검출할 수 있다. (B) 혈장을 1,000 U/mL의 N-ABD094-rhArg(rhArg*)와 함께 1 시간 동안 배양 후 아르기나제 활성을 측정하였다. 아르기나제 활성의 감소는 없었으며, 약물에 대해 동물에서 생성 된 항체가 중화 항체가 아님을 보여주었다. 데이터는 평균±SEM 으로 나타내었고, 각 군에 대해 n은 3 이다.

도 57 은 LFD[LFD(rhArg) 군]를 주 1 회 섭취시킨 C57BL/6J 수컷 마우스에 500 U의 N-ABD094-rhArg(서열번호 50)를 5 주령부터 시작하여 8 개월 동안 투여 시, 간과 신장에 대한 부작용이 유도되지 않았음을 보여준다. N-ABD094-rhArg를 처리한 LFD 섭취 마우스는 (A) 간의 기능이나 질환 분석용 통상적 바이오 마커들인 알라닌 아미노트랜스아미나제(ALT) 및 아스파테이트 트랜스아미나제(AST)의 혈청 수준; 및 (B) 신장의 기능이나 질환 분석용 통상적 바이오 마커들인 크레아티닌 및 소변 알부민/크레아티닌 혈청 농도에 있어서, 비히클[LFD(비히클) 군]을 처리한 LFD 섭취 마우스와 유의한 차이를 보이지 않았다. 데이터는 평균±SEM 으로 나타내었고, 각 군에 대해 n은 3 이다.

도 58 은 LFD[LFD(rhArg) 군]를 주 1 회 섭취시킨 C57BL/6J 수컷 마우스에 500 U의 N-ABD094-rhArg(서열번호 50)를 5 주령부터 시작하여 8 개월 동안 투여 시, 혈관 부작용(adverse vascular effects)이 유도되지 않았음을 보여준다. N-ABD094-rhArg를 처리한 LFD 섭취 마우스는 (A) 페닐에프린(phenylephrine)에 의해 유발된 혈관 평활근의 수축; (B) 아세틸 콜린 유도 내피 의존성 이완(acetylcholine-induced endothelium-dependent relaxation); 및 (C) 산화 질소 공여체(nitric oxide donor) 나트륨 니트로 프러사이드(sodium nitroprusside)에 대한 내피 독립적 이완(endothelium-dependent relaxation)에 있어서, 비히클[LFD(비히클) 군]을 처리한 LFD 섭취 마우스와 유의한 차이를 보이지 않았다. 데이터는 평균±SEM 으로 나타내었고, 각 군에 대해 n은 3 이다.

도 59 는 HFD로 유발된 기존 비만을 가진 C57BL/6J 수컷 마우스[HFD(PEG-rhArg) 군]에 300 U의 폐길화된 His-rhArg(서열번호 101)을 주 1 회씩 4 주 동안 투여 시, 비히클 처리된 마른 대조군 마우스와 유사한 체중으로 마우스의 체중을 효과적으로 감소시킬 수 있음을 보여준다[Chow (vehicle) 군]. 데이터는 평균±SEM 으로 나타내었고, 각 군에 대해 n은 6 이다.

도 60 은 HFD로 유발된 기존 비만을 가진 수컷 마우스[HFD(PEG-rhArg) 군]에 300 U의 폐길화된 His-rhArg(서열번호 101)을 주 1 회씩 4 주 동안 투여 시, 주요 내장(성선 주위, 창막 주위 및 장간막) 및 피하(설측) 저장소(depots)에서 지방의 질량을 효과적으로 감소시킬 수 있고, 간, 신장, 췌장 및 심장의 중량을 효과적으로 감소시킬 수 있음을 보여준다. * $P < 0.05$, 일원분산분석(one-way ANOVA) 이후 Fisher의 LSD. 데이터는 평균±SEM 으로 나타내었고, 각 군에 대해 n은 4 이다.

도 61 은 HFD로 유발된 기존 비만을 가진 수컷 마우스[HFD(PEG-rhArg) 군]에 300 U의 폐길화된 His-rhArg(서열번호 101)을 주 1 회씩 4 주 동안 투여 시, 투약 처리 2주 후 실시된 인슐린 저항성 테스트(ITT)에서 (A) 공복혈당을 상당히 감소시키고 및 (B) increase 인슐린 민감성을 상당히 증가시킬 수 있음을 보여준다. ITT 결과는 곡선하 면적(AUC)으로 나타내었다. * $P < 0.05$, 일원분산분석(one-way ANOVA) 이후 Fisher의 LSD. 데이터는 평균±SEM 으로 나타내었고, 각 군에 대해 n은 6 이다.

도 62 는 HFD로 유발된 기존 비만을 가진 C57BL/6J 수컷 마우스에 주 1 회씩 5 주 동안 25-100U의 N-ABD094-rhArg-Co²⁺ [서열번호 50 (코발트 대체)] 을 투여 시, 마우스의 체중을 효과적으로 줄일 수 있음을 보여준다. 데이터는 평균±SEM 으로 나타내었고, 각 군에 대해 n은 3 이다.

도 63 은 MKN45 위암 세포주에 대한 BHA 용합 단백질(서열번호 75)의 항암 효과를 보여준다. MKN45의 성장은 용량 의존적으로 억제되었고, 생존력은 MTT 종점 비색 분석(MTT endpoint colorimetric assay)에 의해 결정되었다. 데이터는 평균±SEM 으로 나타내었고, 각 군에 대해 n은 3 이다.

도 64 는 4T1 유방암 이종 이식(xenograft) 누드 마우스에서 종양 부피에 대한 N-ABD-rhArg(서열번호 49)의 효과를 보여준다. “실험군” 곡선은 주 1 회 500 U의 N-ABD-rhArg(서열번호 49)를 주사한 실험군을 나타낸다; “Control Group”의 곡선은 매주 PBS를 주사한 대조군을 나타낸다. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs Experimental Group, t-test, n = 4-6.

도 65 는 4T1 유방암 이종 이식(xenograft) 누드 마우스에서 상대적 종양 부피에 대한 N-ABD-rhArg(서열번호 49)의 효과를 보여준다. “실험군” 곡선은 500 U의 N-ABD-rhArg(서열번호 49)를 주 1 회 주사한 실험군을 나타낸다; “Control Group”의 곡선은 매주 PBS를 주사한 대조군을 나타낸다. * $P < 0.05$ 대(vs) 실험군, t-test, n = 4-6.

도 66 은 실험군과 대조군 사이의 종양 중량의 유의한 차이를 보여준다. 실험군은 주 1 회 500 U의 N-ABD-rhArg(서열번호 49)를 주사하였다. 대조군은 일주일에 한 번 PBS를 주사하였다. * $P < 0.05$ 대(vs) 실험군, t-test, n = 4-6.

도 67 은 대조군과 N-ABD-rhArg(서열번호 49)를 처리한 군의 누드 마우스에서 수집한 종양 사진을 보여준다.

도 68 은 4T1 유방암 동종 이식(allografts)에서 상대적인 종양 부피에 대한 N-ABD-rhArg(서열번호 49)의 효과를 보여준다. “500 U ABD-rhArg”곡선은 500 U의 N-ABD-rhArg(서열번호 49)를 주 1 회 주사한 실험군을 나타낸다. “500 U PEG-rhArg”곡선은 주 1 회 500 U의 폐길화된 His-rhArg(서열번호 101)를 주사한 실험군을 나타낸다. “대조군”에 대한 곡선은 매주 PBS를 주사한 대조군을 나타낸다. ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ 대(vs) 실험군, t-test, n = 6-8.

도 69 는 실험군과 대조군 사이의 종양 중량의 유의한 차이를 보여준다. “500 U ABD-rhArg”데이터는 500 U의 N-ABD-rhArg(서열번호 49)를 주 1 회 주사한 군을 나타낸다. “250U ABD-rhArg”데이터는 250U의 N-ABD-rhArg(서열번호 49)를 주 1 회 주사한 군을 나타낸다. “500 U PEG-rhArg”데이터는 500 U의 폐길화된 His-rhArg(서열번호 101)를 주 1 회 주사한 군을 나타낸다. “대조군”의 데이터는 PBS를 주 1 회 주사한 대조군을 나타낸다. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 대(vs) 실험군, t-test, n = 6-8.

도 70 은 4T1 동종 이식편(allografts)의 폐로부터의 전이성 결절(metastatic nodules)의 평균 수를 보여준다. (A) “500 U ABD-rhArg”데이터는 500 U의 N-ABD-rhArg(서열번호 49)를 주 1 회 주사한 군을 나타낸다. 데이터 “250U ABD-rhArg”는 250U의 N-ABD-rhArg(서열번호 49)를 주 1 회 주사한 군을 나타낸다. “500 U PEG-rhArg”데이터는 500 U의 폐길화된 His-rhArg(서열번호 101)를 주 1 회 주사한 군을 나타낸다. “대조군”의 데이터는 PBS를 주 1 회 주사한 대조군을 나타낸다. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 대(vs) 실험군, t-test, n = 6-8. (B) 도 70A에 도시된 4T1 동종 이식의 폐에서 전이성 결절 수의 산점도(Scatter plot).

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0043] 본 발명은 일반적으로 아르기나제 폴리펩티드 및 ABD 폴리펩티드를 포함하는 융합 단백질 본 발명 및 이의 사용 방법 및 제조 방법에 관한 것이다. 본원에 제공된 단백질 단백질은 매우 효과적인 아르기닌 고갈제이며, ABD와의 융합으로 인해 공지된 아르기나제 및 아르기나제 유도체와 비교하여 상당히 연장된 반감기를 나타낸다. 개시된 단백질은 아르기닌의 고갈이 암, 바이러스, 다발성 경화증, 류마티스 관절염, 자가 면역 질환, 선천성 과다 아르기닌혈증(congenital hyperargininemia), 이식편대숙주병(graft-versus-host disease (GvHD)), 염증, 비만, 대사 장애, 및 관련 합병증 및 동반질환과 같은 그 결핍이 초래하는 질환 및 상태를 치료하는 데 유용하다.
- [0044] 본 발명은 또한 일반적으로 대상체에서 아르기닌의 수준을 고갈시켜 이를 필요로 하는 대상체에서 비만, 대사 장애 및 관련 합병증 및 동반 질환을 치료하는 방법에 관한 것이다. 대상체에서 아르기닌의 고갈은 체중 및 지방 질량 감소, 내당능 및 인슐린 반응성 개선, 혈당 수준 정상화, 내분비 및 대사 프로파일, 염증, 지방증(steatosis) 및 섬유증 완화를 초래한다. 대상체에서 아르기닌을 고갈시킬 수 있는 임의의 제제는 본원에 기재된 비만, 대사 장애 및 관련 합병증 및 동반 질환을 치료하는 방법에 사용될 수 있다.
- [0045] **용어의 정의**
- [0046] 본원에서 사용된 용어의 정의는 생명 공학 분야에서 각 용어에 대해 인식된 현재 최첨단 정의를 통합하는 것을 의미하며, 적절한 경우 예시를 제공한다. 이들 정의는 개별적으로 또는 더 큰 그룹의 일부로 특정 경우에 달리 제한되지 않는 한 본 명세서 전체에서 사용되는 용어에 적용된다.
- [0047] 본원에서 사용된 용어 "반감기(half-life 또는 $1/2$ -life)"는 예를 들어 본원에 기재된 제제(예: 융합 단백질 또는 아르기닌 고갈제)의 농도가 시험관 내 또는 생체 내(예: 포유 동물에 주사 후)에서 절반으로 감소하는 데 필요한 시간을 의미한다. 특정 예에서, 주사 후 혈장 아르기닌의 농도는 본원에서 상기 제제의 반감기의 프록시 지표(proxy indicator)로서 사용된다. 이러한 경우, 용어 "치료 기간(therapeutic duration)"은 아르기닌 고갈제의 특정 용량이 아르기닌의 혈장 농도를 원하는 치료 효과가 관찰되는 특정 역치(threshold) 농도 미만으로 유지할 수 있는 기간을 지칭하는 데 사용된다. 특정 예에서, 혈장 아르기닌의 역치 농도는 50 μ M 미만, 40 μ M 미만, 30 μ M 미만, 20 μ M 미만, 10 μ M 미만, 5 μ M 미만, 3 μ M 미만이거나 또는 기존 분석 기기의 검출 한계 미만의 농도이다. 예를 들어, 본원에 기재된 아르기닌 이화 효소 주사 시, 혈장 아르기닌이 7 일 동안 Biochrom 30 아미노산 분석기의 검출 한계(검출 한계는 3 μ M) 미만의 농도로 고갈되는 것은 치료 기간이 7 일이고 반감기가 예를 들어 약 7 일 정도임을 나타낸다.
- [0048] 용어 "부착" 또는 "부착된"은 2 개 이상의 화합물을 함께 유지하기 위해 결합 또는 비결합 상호 작용에 의해 연결하거나 결합하는 것을 의미하며, 예를 들어 제 1 폴리펩티드가 제 2 폴리펩티드 또는 다른 분자에 직접 결합되도록 하는 직접 또는 간접 부착을 포함하며, 하나 이상의 중간 화합물 (예: 링커), 예를 들어, 상기 제 1 폴리펩티드와 제 2 폴리펩티드 또는 다른 분자 사이에 배치되는 실시예를 포함한다.
- [0049] 상기 용어 "단백질" 또는 "폴리펩티드"는 2 개 이상의 아미노산 단량체 및/또는 이의 유사체로 구성된 유기 고분자를 의미한다. 용어 "폴리펩티드"는 전장 단백질 및 펩티드뿐만 아니라 이의 유사체 및 단편을 포함하는 임의의 길이의 아미노산 중합체를 포함한다. 3 개 이상의 아미노산으로 이루어진 DNA를 올리고 펩티드라고도 한다. 본원에 사용된 용어 "아미노산", "아미노산성 단량체(amino acidic monomer)" 또는 "아미노산 잔기"는 비천연 측쇄를 갖는 합성 아미노산을 포함하고 D 및 L 광학 이성질체 둘 모두를 포함하는 20 개의 자연 발생 아미노산 중 임의의 것을 의미한다. 상기 용어 "아미노산 유사체"는 하나 이상의 개별 원자가 원자나 동위 원소가 다르거나 작용기가 다르지만 천연 아미노산 유사체와 동일한 것으로 대체된 아미노산을 의미한다.
- [0050] 본원에서 사용된 용어 "비천연 아미노산"은 20 개의 일반적인 자연 발생 아미노산, 셀레노 시스테인(seleno cysteine) 또는 피롤리신(pyrrolysine) 중 하나가 아닌 임의의 아미노산, 변형된 아미노산 및/또는 아미노산 유사체를 의미한다.
- [0051] 본원에서 사용된 용어 "융합 단백질"은 공유 결합(예: 아마이드, 에스테르, 요소, 카바메이트, 에테르 및/또는 이황화 결합에 의해)된 다른 기원을 갖는 단백질 또는 기능성 단백질 단편(예: 아르기나제 또는 이의 변이체)을 포함하는 키메라 단백질을 의미한다.
- [0052] 본원에서 사용된 용어 "변이체(variant)"는 참조(reference) 핵산 또는 폴리펩티드와 다르지만, 이의 필수적인 특성을 보유하는 폴리뉴클레오티드 또는 핵산을 의미한다. 일반적으로 변이체는 전반적으로 매우 유사하며 많은 영역에서 참조 핵산 또는 폴리펩티드와 동일하다.

- [0053] 예를 들어 변이체는 적어도 하나의 보존적 아미노산 치환을 갖는 모체 폴리펩티드 서열의 아미노산 서열을 포함할 수 있다. 대안적으로 또는 추가적으로, 상기 변이체는 적어도 하나의 비보존적 아미노산 치환을 갖는 모체 폴리펩티드 서열의 아미노산 서열을 포함할 수 있다. 이 경우, 비보존적 아미노산 치환이 상기 기능적 변이체의 생물학적 활성을 방해하거나 억제하지 않는 것이 바람직하다. 비보존적 아미노산 치환은 상기 변이체의 생물학적 활성을 향상시킴으로써, 상기 변이체의 생물학적 활성이 모체와 비교하여 증가될 수 있다.
- [0054] 상기 용어 "기능성 단편"은 하나의 폴리펩티드를 참조하여 사용될 경우, 상기 폴리펩티드의 생물학적 활성을 유지하는 해당 폴리펩티드(모체 폴리펩티드)의 임의의 부분 또는 영역을 의미한다. 상기 기능성 단편은, 상기 기능성 단편이 여전히 상기 모체 폴리펩티드의 생물학적 활성의 적어도 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% 또는 99% 또는 실질적으로 동일하거나 더 높은 생물학적 활성을 가지는 경우, 그것이 상기 모체 폴리펩티드의 부분인 연속적(contiguous) 아미노산을 포함하는 임의의 단편일 수 있다. 상기 모체 폴리펩티드와 관련하여 기능성 단편은 예를 들어 하기를 포함할 수 있다.
- [0055] 상기 기능성 단편은 아미노 또는 카르복시 말단, 또는 양쪽 말단에 추가 아미노산(예: 상기 모체 폴리펩티드의 아미노산 서열에서 발견되지 않는 아미노산)을 포함할 수 있다.
- [0056] 상기 기재된 폴리펩티드들은 보존적 아미노산 치환일 수 있다. 상기 보존적 아미노산 치환은 당업계에 공지되어 있으며, 특정 물리적 및/또는 화학적 특성을 갖는 하나의 아미노산이 동일하거나 유사한 화학적 또는 물리적 특성을 갖는 다른 아미노산으로 교환되는 아미노산 치환을 포함한다. 예를 들어, 상기 보존적 아미노산 치환은 다른 산성/음으로 하전된 극성 아미노산(예: Asp 또는 Glu)으로 치환된 산성/음으로 하전된 극성 아미노산; 비극성 측쇄를 갖는 또 다른 아미노산으로 대체된 비극성 측쇄를 갖는 아미노산(예: Ala, Gly, Val, Ile, Leu, Met, Phe, Pro, Trp, Cys, Val 등), 다른 염기성/양전하를 띤 극성 아미노산(예: Lys, His, Arg 등)으로 치환된 염기성/양전하를 띤 극성 아미노산; 극성 측쇄를 갖는 또 다른 비하전 아미노산으로 치환된 극성 측쇄를 갖는 비하전 아미노산(예: Asn, Gln, Ser, Thr, Tyr 등), 베타-분지형 측쇄를 갖는 또 다른 아미노산으로 치환된 베타-분지형 측쇄를 갖는 아미노산(예: Ile, Thr 및 Val); 방향족 측쇄를 갖는 다른 아미노산(예: His, Phe, Trp 및 Tyr) 등으로 치환된 방향족 측쇄를 갖는 아미노산일 수 있다.
- [0057] 용어 "상동성 백분율" 및 "서열 동일성 백분율"은 본원에서 폴리펩티드 또는 폴리뉴클레오타이드 서열과 관련하여 사용될 경우, 폴리펩티드 및 폴리뉴클레오타이드 사이의 비교를 의미하기 위해 상호 교환적으로 사용되며, 비교 창(comparison window)에 대해 최적으로 정렬된 2 개의 서열을 비교하여 결정되며, 여기서 비교 창에서 폴리뉴클레오타이드 또는 폴리펩티드의 일부는 두 서열의 최적 정렬을 위해 참조 서열(추가 또는 결실을 포함하지 않음)과 비교하여 추가 또는 결실(즉, 갭)을 포함할 수 있다. 백분율은 두 서열에서 일치하는(matched) 위치의 수를 산출하기 위해 동일한 핵산 염기 또는 아미노산 잔기가 발생하는 위치의 수를 결정하여 계산되며, 일치하는(matched) 위치의 수를 비교 창의 총 위치 수로 나누고 결과에 100을 곱하여 서열 동일성의 백분율을 산출한다. 상동성은 당업계에 공지된 다양한 서열 비교 알고리즘 및 프로그램을 사용하여 평가된다. 이러한 알고리즘 및 프로그램의 예로서, TBLASTN, BLASTP, FASTA, TFASTA, and CLUSTALW [Pearson and Lipman, 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85(8):2444-2448; Altschul et al., 1990, J. Mol. Biol. 215(3):403-410; Thompson et al., 1994, Nucleic Acids Res. 22(2):4673-4680; Higgins et al. 1996, Methods Enzymol. 266:383-402; Altschul et al., 1990, J. Mol. Biol. 215(3):403-410; Altschul et al., 1993, Nature Genetics 3:266-272]을 포함하나, 결코 이에 제한되지 않는다. 특정 실시예에서, 단백질 및 핵산 서열의 상동성은 당업계에 잘 알려진 기본 국소 정렬 검색 도구(Basic Local Alignment Search Tool; "BLAST")를 사용하여 평가된다(참조, 예: Karlin and Altschul, 1990, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:2267-2268; Altschul et al., 1990, J. Mol. Biol. 215:403-410; Altschul et al., 1993, Nature Genetics 3:266-272; Altschul et al., 1997, Nuc. Acids Res. 25:3389-3402).
- [0058] 본원에 사용된 용어 "치료하다", "치료하는", "치료" 등은 그와 관련된 장애/질병 및/또는 증상을 감소시키거나 개선시키는 것을 의미한다. 제외되지는 않지만, 장애 또는 상태를 치료하는 것은 그와 관련된 장애, 상태 또는 증상의 완전한 제거를 요구하지 않음을 이해하여야 한다. 특정 실시예에서, 치료는 장애 또는 상태 및/또는 이와 관련된 증상의 예방을 포함한다. 본원에 사용된 용어 "예방" 또는 "예방하다"는 이와 관련된 장애, 상태 또는 증상의 발생을 억제하거나 적어도 지연시키는 임의의 작용을 의미한다. 예방은 1 차, 2 차 및 3 차 예방 수준을 포함할 수 있으며, 여기서 a) 1차 예방은 질병의 발병을 회피케 하며; b) 2 차 예방 활동은 질병의 조기 치료를 목표로 하여 질병의 진행과 증상의 출현을 예방하기 위한 개입 기회를 증가시키고; c) 3 차 예방은 기능 회복과 질병 관련 합병증의 감소를 통해 이미 확립된(established) 질병의 부정적인 영향을 감소시킨다.

- [0059] 본원에서 사용된 용어 "이화 작용(catabolism)" 또는 "이화적(catabolic)"은 분자가 다른 분자로의 화학 반응(예: 더 작은 분자로의 화학 반응)을 의미한다. 예를 들어 아르기닌 이화 효소는 아르기닌과 반응하여 오르니틴(ornithine), 시트룰린(citrulline) 및 아그마틴(agmatine)과 같은 다른 분자로 변형시킬 수 있는 모든 효소를 의미한다.
- [0060] 본원에서 사용된 용어 "대상체(subject)"는 인간, 비인간 영장류, 개, 고양이 및 설치류를 포함하나 이에 제한되지 않는 임의의 동물(예: 포유 동물)을 의미한다.
- [0061] 본원에 사용된 용어 "체질량 지수(body mass index)" 또는 "BMI"는 kg 단위의 중량을 미터 단위의 높이로 나눈 제곱의 비율을 의미한다.
- [0062] 본원에서 사용된 용어 "과체중(overweight)"은 성인의 BMI가 25와 30사이인 것을 의미한다. 20세 미만의 사람들에게 있어서, "과체중"은 같은 연령대에 비해 85번째 및 95번째 백분위 수 사이의 BMI로 정의된다.
- [0063] 본원에서 사용된 용어 "비만(obesity)"은 성인의 BMI가 30과 40사이인 경우를 의미한다. 20세 미만의 사람들에게 있어서, "비만"은 같은 연령대에 비해 95번째 백분위 수를 초과하는 BMI로 정의됩니다. 본원에서 상기 용어는 비만과 병적 비만(morbid obesity)을 모두 포함할 수 있다.
- [0064] 본원에서 사용된 용어 "병적 비만(morbid obesity)"은 성인의 BMI가 40을 초과함을 나타낸다.
- [0065] 본원에서 사용된 용어 "지방증(steatosis)"은 지방이 간 조직, 신장 조직, 췌장 조직, 심장 근육 조직 또는 기타 근육 조직과 같은 조직에 축적되는 상태를 의미한다.
- [0066] 본원에서 사용된 용어 "섬유증(fibrosis)"은 간 조직, 신장 조직, 췌장 조직 또는 심장 조직과 같은 기관 또는 조직에서 콜라겐을 포함하는 섬유성 결합 조직(fibrous connective tissue)의 과도한 침착이 있는 상태를 의미한다.
- [0067] 본원에서 사용된 용어 "고콜레스테롤혈증(hypercholesterolemia)"은 동일한 인종적 배경, 연령 및 성별의 각 참조 대상체에서 혈중 콜레스테롤 수치가 정상 평균 혈중 콜레스테롤 수치에 비해 상승하는 상태를 나타낸다. 인간과 관련하여 상기 용어는 특히 약 200 mg/dL 초과, 특히 약 240 mg/dL 초과와 총 콜레스테롤의 혈중 농도를 의미한다.
- [0068] 본원에서 사용된 용어 "이상지질혈증(dyslipidemia)" 및 "고지혈증(hyperlipidemia)"은 혈류에서 콜레스테롤, 콜레스테롤 에스테르, 인지질, 중성지방 및/또는 지질단백질을 포함한 지질/지방 수준이 동일한 인종적 배경, 연령 및 성별의 각 참조 대상체에서의 혈중 지질/지방의 정상 평균 수준과 비교하여 각각 비정상이고 상승한 상태를 나타낸다.
- [0069] 본원에 제공된 상기 융합 단백질은 아르기나제 폴리펩티드를 포함한다. 상기 아르기나제 폴리펩티드는 아르기나제를 발현하는 임의의 유기체에 의해 발현된 아르기나제 단백질로부터 유래될 수 있다. 아르기나제의 예로서는 바실러스, 아그로박테리아, 시아노박테리아 및 마이코박테리아와 같은 박테리아 및 소, 돼지, 양, 염소, 설치류 및 인간과 같은 포유 동물에 의해 생성되는 것들을 포함한다. 상기 아르기나제 폴리펩티드가 인간 아르기나제에서 유래된 경우 아르기나제 1형(ARG1) 또는 아르기나제 2형(ARG2)일 수 있다.
- [0070] 상기 아르기나제 폴리펩티드는 전장 아르기나제 폴리펩티드 또는 이의 기능적 단편 및/또는 변이체를 포함할 수 있다.
- [0071] 아르기나제는 망간을 포함하는 효소이다. 실시예 32에서 입증된 바와 같이, 본원에 기재된 융합 단백질에 존재하는 하나 이상의 망간 이온이 하나 이상의 2가 양이온성 금속(예: Co^{2+} 또는 Ni^{2+})으로 대체될 경우, 상기 융합 단백질의 촉매 활성이 증가할 수 있다. 따라서, 특정 실시예에서, 본원에 기재된 융합 단백질은 망간 이외의 하나 이상의 2가 금속(예: Co^{2+} 또는 Ni^{2+})을 포함한다. 특정 실시예에서, 상기 융합 단백질은 Co^{2+} 및 Ni^{2+} 로부터 선택된 하나 이상의 금속을 포함한다. 특정 실시예에서, 상기 융합 단백질은 2개의 Co^{2+} 이온 또는 2개의 Ni^{2+} 이온을 포함한다. 기타 실시예에서, 상기 융합 단백질은 2개의 Mn^{2+} 이온을 포함한다.
- [0072] 특정 실시예에서, 상기 아르기나제 폴리펩티드는 야생형 인간 ARG1이다. 특정 실시예에서, 상기 아르기나제 폴리펩티드는 서열번호 69와 적어도 95%의 서열 상동성을 갖는 서열을 포함한다. 예를 들면, 상기 아르기나제 폴리펩티드는 서열번호 69와 적어도 96%, 97%, 98%, 99%, 99.1%, 99.4% 또는 99.7%의 상동성을 갖는 폴리펩티드 서열을 포함한다. 특정 실시예에서, 상기 아르기나제 폴리펩티드의 서열은 서열번호 69와 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7,

8, 9, 10, 15, 20, 25 또는 30개 아미노산 변이(예: 삽입, 치환, 결실 등)에서 차이가 있을 수 있다. 특정 실시예에서, 상기 아르기나제 폴리펩티드는 보존적 아미노산 치환, 비-보존적 아미노산 치환 또는 이들의 조합을 갖는 폴리펩티드를 포함한다.

[0073] 특정 실시예에서, 상기 아르기나제 폴리펩티드는 *바실러스 칼도벨록스*(*Bacillus caldovelox*)의 아르기나제(BCA)이다. 특정 실시예에서, 상기 아르기나제 폴리펩티드는 서열번호 70과 적어도 95%의 서열 상동성을 갖는 서열을 포함한다. 예를 들면, 상기 아르기나제 폴리펩티드는 서열번호 70과 적어도 96%, 97%, 98%, 99%, 99.3% 또는 99.7%의 상동성을 갖는 폴리펩티드 서열을 포함한다. 특정 실시예에서, 상기 아르기나제 폴리펩티드의 서열은 서열번호 70과 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25 또는 30개 아미노산 변이(예: 삽입, 치환, 결실 등)에서 차이가 있을 수 있다. 특정 실시예에서, 상기 아르기나제 폴리펩티드는 보존적 아미노산 치환, 비-보존적 아미노산 치환 또는 이들의 조합을 갖는 폴리펩티드를 포함한다.

[0074] 특정 실시예에서, 상기 아르기나제 폴리펩티드는 BCA로서, 여기서 세린 161은 서열번호 71 및 서열번호 72에 제시된 바와 같이 시스테인으로 대체되었다. 세린의 시스테인으로의 치환은 융합 단백질의 특성을 추가로 개선할 수 있는 화학적 모이어티의 위치 지정된 통합(sited directed incorporation)을 허용한다. 예를 들어, 시스테인 161의 측쇄는 적절히 활성화된 PEG 모이어티와 반응하여 폐결화된 아르기나제를 형성할 수 있으며, 이는 생성된 융합 단백질에 통합될 수 있다. 상기 융합된 단백질의 폐결화는 조직 또는 세포 내에서 활성을 갖는 다양한 분해 메커니즘으로부터 이들을 추가로 보호함으로써 본원에 기재된 융합된 단백질의 체류 시간을 추가로 향상시키는 능력을 가지며, 이는 결과적으로 그들의 치료 잠재력(therapeutic potential)을 향상시킨다. 따라서, 특정 실시예에서, 상기 아르기나제 폴리펩티드는 서열번호 71 또는 서열번호 72 와 적어도 95%의 서열 상동성을 갖는 서열을 포함한다. 예를 들면, 상기 아르기나제 폴리펩티드는 서열번호 71 또는 서열번호 72 와 적어도 96%, 97%, 98%, 99%, 99.3% 또는 99.7%의 상동성을 갖는 폴리펩티드 서열을 포함한다. 특정 실시예에서, 상기 아르기나제 폴리펩티드의 서열은 서열번호 71 또는 서열번호 72 와 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25 또는 30개 아미노산 변이(예: 삽입, 치환, 결실 등)에서 차이가 있을 수 있다. 특정 실시예에서, 상기 아르기나제 폴리펩티드는 보존적 아미노산 치환, 비-보존적 아미노산 치환 또는 이들의 조합을 갖는 폴리펩티드를 포함한다.

[0075] 본원에 기재된 상기 융합 단백질이 폐결화된 경우, 상기 PEG 그룹은 약 5,000 내지 약 20,000 amu, 약 5,000 내지 약 15,000 amu, 약 5,000 내지 약 12,000 amu, 약 7,000 내지 약 12,000 amu, 또는 약 7,000 내지 약 10,000 amu의 분자량을 가질 수 있다. 특정 실시예에서, 상기 PEG 그룹의 분자량은 약 4,000 amu 내지 10,000 amu이다. 특정 실시예에서, 상기 PEG 그룹은 PEG4,000 또는 PEG7,000이다.

[0076] 상기 PEG 그룹은 융합 단백질에 직접 또는 링커를 통해 공유 결합될 수 있다. PEG 그룹은 상기 단백질에 존재하는 시스테인 또는 라이신 측쇄와 폐결화 시약의 반응에 의해 상기 융합 단백질에 공유 결합될 수 있다. 대안적으로, PEG 그룹은 상기 단백질의 N-말단 아민에 공유적으로 부착될 수 있다.

[0077] 특정 실시예에서, 상기 융합 단백질은 프로피온산 링커를 통해 PEG에 공유 적으로 부착된다. 기타 실시예에서, 상기 융합 단백질은 C2-C10, C2-C9, C2-C8, C2-C7, C2-C6, C2-C5 또는 C2-C4 직쇄 또는 분지쇄 카르복실산 링커를 통해 PEG에 공유적으로 부착된다. 특정 실시예에서, 상기 PEG 그룹은 상기 아르기나제 폴리펩티드에 부착된다.

[0078] 본원에 기재된 상기 융합 단백질은 알부민 결합 도메인(ABD) 폴리펩티드를 포함한다. 많은 연구에서 치료 단백질의 더 긴 반감기를 달성하기 위한 알부민 결합의 잠재력이 입증되었다. 그러나 ABD 폴리펩티드를 포함하는 융합 단백질의 디자인은 ABD 폴리펩티드를 단백질 치료제에 융합하는 것이 단백질 치료제의 효능, ABD폴리펩티드의 결합 친화력 및 상기 융합 단백질의 용해도에 모두 영향을 미칠 가능성이 있기 때문에 어려운 과제일 수 있다. 따라서 ABD 폴리펩티드를 선택하고, 부착 사이트를 선택하고, 필요한 링커를 구성하는 것은 간단한 과정이 아니며, 종종 원하는 특성을 가진 융합 특성에 도달하기 위해 시행 착오가 필요하다. 예를 들어, 도 9, 10 및 13은 N-ABD094-rhArg(서열번호 50)의 처리 기간(및 반감기)이 예상과 달리 BHA 및 BAH보다 훨씬 더 길다는 것을 보여준다. 모든 BHA, BAH 및 N-ABD094-rhArg는 놀랍도록 긴 처리 기간(및 반감기)을 나타내지만, N-ABD094-rhArg가 이토록 긴 치료 기간(및 반감기)을 가질 것이라고 예측할 수 없었다.

[0079] 일반적으로 약물은 보다 긴 작용시간을 갖는 것이 바람직하다. 링커의 유형, 길이, 유연성 및 생활성 펩타이드 또는 단백질의 반감기 연장 모듈의 C 또는 N 말단에 대한 융합은 융합 단백질의 활성에 중대한 영향을 미칠 수 있다. 본 발명에서는 다양한 아르기나제를 적합한 링커를 통해 ABD 분자에 융합시켜 아르기나제의 효소 활성과 ABD의 알부민 결합 능력을 모두 유지할 수 있도록 하였다. 좋은 안정성과 용해도도 필수적이며, 이들은 달성하기 매우 어렵고 도전적인 과제들이다. 일반적인 HSA 또는 Fc 융합과 달리 ABD 융합에 대해 알려진 것은 거의 없

다. 본 발명은 기능적 아르기나제-ABD 융합을 생성하는 데 사용될 수 있는 링커 설계의 예를 제공한다. 조작된 아르기나제 단백질(N-ABD094-rhArg, N-ABD-rhArg 등)의 활성은 링커 공학 또는 반감기 연장 모듈(ABD)에 대한 생활성 단백질(아르기나제)의 위치 또는 둘 모두를 통해 본 발명에서 최적화되었다

[0080] 많은 경우에 단백질 공학은 활성 손실을 극복하기 위해 사용될 수 있다. 일 예에서, 링커 공학은 IFN-2b와 HSA의 융합시 손실된 활성을 회복하는 데 사용되었다[Prot Exp Purif. 2008; 61:73-7]. IFN-2b를 HSA에 직접 융합하면 생물학적 활성이 거의 없는 불안정한 단백질이 생성되었다. 융합 형식에서 IFN-2b의 활성에 대한 다양한 링커의 효과를 테스트하였다. 완전한 링커는 융합 단백질의 발현, 활성 및 약동학에 영향을 미치는 것으로 알려져 있다[Adv Drug Deliv Rev. 2013; 65:1357-69]. 펩티드 링커의 두 가지 주요 유형은 다음과 같다. (i) 유연한 링커(예: (G4S)_n, 여기서 n = 1-4); (ii) -나선형 링커[A (EAAAK) nA]_x (여기서, n = 2-4 및 x = 1 또는 2) 및 XP_n (여기서, X는 A, K 또는 E)과 같은 강성 링커. 유연한 링커의 경우, 한 가지 장점은 동족 수용체(cognate receptor)에 대해 분자의 생활성 부분의 적절한 배향을 얻기 위해 유연성이 필요할 수 있다는 것이다. 그러나 유연한 링커는 융합 파트너와 생활성 단백질 사이에 많은 공간을 제공하지 않는다. 반면, 강성 링커는 더 많은 공간을 제공하지만 유연성이 부족하다. IFN-및 2b-HSA 융합 단백질의 경우, 유연한 링커는 네이티브 IFN-2b와 비교하여 약 39%의 활성을 나타낸 반면, 강성 XP 링커와 -나선형 링커는 각각 네이티브 IFN-2b 활성의 68 %와 115 %를 기록하였다[Prot Exp Purif. 2008; 61:73-7].

[0081] 특정 링커는 단백질의 특성에 부정적인 영향을 미칠 수 있다. 예를 들어, 과립구 콜로니 자극 인자(G-CSF)를 트랜스페린(Tf)에 융합시켰다. 짧은 류신-글루타메이트(LE) 링커의 사용은 천연 G-CSF 활성의 약 10%에 불과하였다. (G4S)₃ 또는 -나선형[A(EAAAK)nA]_m(n = 2-4, m = 1 또는 2) 링커의 삽입은 G-CSF-LE-Tf 보다 상기 융합 단백질의 활성을 유의하게 증가시켰다. 링커(A (EAAAK)4ALEA-(EAAAK)4A)로 구축된 상기 융합 단백질은 천연 G-CSF에 가까운 생물학적 활성을 나타내었다[Pharm Res. 2006; 23:2116-21]. 또 다른 예에서, Fc 모이어티의 C-말단은 펩티드 결합을 통해 IFN-모이어티의 N-말단에 직접 연결될 수 있지만, Gillies et al. [US 7,670,595 B2]는 추가로 링커 펩티드를 통해 Fc 모이어티와 IFN-모이어티를 연결한다. 상기 링커 펩티드는 Fc 모이어티의 C-말단과 성숙한 IFN-모이어티의 N-말단 사이에 위치한다. 이 경우 상기 링커 펩티드는 아미노산 서열 G4SG4SG3SG와 같은 세린 및 글리신 잔기로 구성되는 것이 바람직하다. 이러한 모든 발견은 융합 단백질 연구 및 개발 프로그램의 성공을 위해 링커 기술 테스트의 중요성을 보여준다.

[0082] 다른 접근법을 사용하여 활동에 대한 융합 위치의 중요성이 입증되었다[Curr Pharmaceut Biotechnol. 2014; 15:856-63]. 뇌 나트륨 이뇨 펩티드(brain natriuretic peptide; BNP)는 다양한 형식으로 HSA의 N 또는 C 말단에 융합되었다. 이들 결과는 HSA의 N 말단에 융합된 BNP-HSA, BNP2-HSA(BNP의 2 개 카피) 및 BNP4-HSA가 모두 활성을 보이지 않았음을 보여주었다. 그러나 HSA의 C-말단에 융합된 HSA-BNP2는 천연 BNP만큼 활성을 보였고 지속성을 보였다.

[0083] 이들 예는 활성을 최적화하기 위해 링커 공학, 반감기 연장 모듈에 대한 생활성 단백질 또는 펩타이드의 위치 또는 둘 모두를 통해 융합 단백질의 리드(lead) 최적화에 상당한 노력을 기울이는 것의 중요성을 보여준다. 중요한 점은, 본 발명은 아르기나제 활성이 유지될 수 있도록 ABD와 아르기나제를 함께 결합하기 위해 새로운 ABD 융합 접근법을 사용했다는 것이다. pH 의존적 방식으로 FcRn에 결합할 수 있는 안정적이고 가용성인 아르기나제-ABD 융합 분자가 성공적으로 생성되어 효율적인 엔도솜 재활용(endosomal recycling)이 가능해졌다. 예를 들어, 본 발명은 놀랍게도 ABD에 융합된 rhArg의 경우, 단백질 순환의 최종 반감기가 마우스에서 몇 분에서 4 일로 급격히 증가한다는 것을 발견하였다. 종합하면, 아르기나제의 약동학적 특성의 미세 조정을 위해 다양한 접근 방식을 사용할 수 있으므로 다양한 질병 상태에 대한 적절한 순환 체류 시간이 가능하다. 치료 단백질 개발에서 또 다른 핵심 문제는 부작용을 피하기 위해 면역원성을 최소화하는 것이다. 따라서, 인간 아르기나제에서 관찰된 낮은 면역원성과 생체 내 반감기를 연장하기 위해 본 발명에서 유전자 융합 파트너로도 사용된 ABD(예: ABD094)의 성공적인 탈면역화(deimmunization)가 중요하다.

[0084] 알부민 결합 단백질은 그람 양성 박테리아에 의해 발견되는 다양한 표면 단백질에서 발견되는 3-나선형 단백질 도메인이다. *Streptococcal* 단백질 G에서 유래된 알부민 결합 단백질은 214 개의 아미노산을 가지고 있으며 3 개의 알부민 결합 도메인(ABD1-3)을 포함하고 있으며, 이는 인간 혈청 알부민에 결합하고 숙주의 면역 체계를 회피하는 데 사용된다. ABD3는 인간 혈청 알부민에 결합하는 것으로 입증된 46 개 아미노산 서열에 해당하며 여러 연구 및 상이한 특성(예: 결합 친화성 및 결합 선택성)을 갖는 ABD폴리펩티드의 개발하기 위한 인간 혈청 알부민에 대한 친화성 성숙(affinity maturation)의 대상이 되었다. 이러한 연구는 매우 다양한 특성을 가진 상당한 수의 ABD폴리펩티드를 생성하였다.

- [0085] 알부민 결합 단백질은 다른 박테리아에서 발견된다. 예를 들어, 자연 발생 알부민 결합 단백질에는 *Streptococcal* M 단백질(예: M1/Emm1, M3 Emm3, M12/Emm12, EmmL55/Emm55, Emm49/EmmL49 및 단백질H) *Streptococcal* 단백질 G, MAG 및 ZAG 및 *Finegoldia magna* 의 특정 균주로부터의 PPL 및 PAB 와 같은 그람 양성 박테리아의 특정 표면 단백질이 포함된다.
- [0086] 특정 실시예에서, 본원에 기재된 상기 융합 단백질은 *Streptococcal* 단백질 G 알부민 결합 도메인으로부터 유래된 ABD 폴리펩티드를 포함한다. 특정 실시예에서, 상기 ABD 폴리펩티드는 전체 *Streptococcal* 단백질 G 알부민 결합 도메인 3 또는 이의 기능적 단편 및/또는 변이체이다.
- [0087] 특정 실시예에서, 상기 융합 단백질은 서열번호 66과 적어도 93%의 서열 상동성을 갖는 폴리펩티드 서열을 포함하는 ABD 폴리펩티드를 포함한다. 예를 들면, 상기 ABD 폴리펩티드는 서열번호 66과 적어도 94%, 96% 또는 98%의 상동성을 갖는 폴리펩티드 서열을 포함한다. 특정 실시예에서, 상기 ABD 폴리펩티드의 서열은 서열번호 66과 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10개 아미노산 변이(예: 삽입, 치환, 결실 등)에서 차이가 있을 수 있다. 특정 실시예에서, 상기 ABD 폴리펩티드는 보존적 아미노산 치환, 비-보존적 아미노산 치환 또는 이들의 조합을 갖는 폴리펩티드를 포함한다.
- [0088] 특정 실시예에서, 상기 융합 단백질은 서열번호 67과 적어도 93%의 서열 상동성을 갖는 폴리펩티드 서열을 포함하는 ABD 폴리펩티드를 포함한다. 예를 들면, 상기 ABD 폴리펩티드는 서열번호 67과 적어도 94%, 96% 또는 98%의 상동성을 갖는 폴리펩티드 서열을 포함한다. 특정 실시예에서, 상기 ABD 폴리펩티드의 서열은 서열번호 67과 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10개 아미노산 변이(예: 삽입, 치환, 결실 등)에서 차이가 있을 수 있다. 특정 실시예에서, 상기 ABD 폴리펩티드는 보존적 아미노산 치환, 비-보존적 아미노산 치환 또는 이들의 조합을 갖는 폴리펩티드를 포함한다.
- [0089] 특정 실시예에서, 상기 융합 단백질은 서열번호 68과 적어도 93%의 서열 상동성을 갖는 폴리펩티드 서열을 포함하는 ABD 폴리펩티드를 포함한다. 예를 들면, 상기 ABD 폴리펩티드는 서열번호 68과 적어도 94%, 96% 또는 98%의 상동성을 갖는 폴리펩티드 서열을 포함한다. 특정 실시예에서, 상기 ABD 폴리펩티드의 서열은 서열번호 68과 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10개 아미노산 변이(예: 삽입, 치환, 결실 등)에서 차이가 있을 수 있다. 특정 실시예에서, 상기 ABD 폴리펩티드는 보존적 아미노산 치환, 비-보존적 아미노산 치환 또는 이들의 조합을 갖는 폴리펩티드를 포함한다.
- [0090] ABD 폴리펩티드 및 아르기나제 폴리펩티드의 상대적 위치는 변할 수 있다. 예를 들어, 상기 ABD 폴리펩티드는 상기 아르기나제 폴리펩티드에 선행거나(예: 상기 아르기나제 폴리펩티드가 상기 ABD 폴리펩티드의 C-말단으로부터 직접 또는 간접적으로 부착) 또는 상기 아르기나제 폴리펩티드가 상기 ABD 폴리펩티드에 선행(예: 상기 ABD 폴리펩티드가 상기 아르기나제 폴리펩티드의 C-말단으로부터 직접 또는 간접적으로 부착)될 수 있다.
- [0091] 특정 실시예에서, 상기 융합 단백질은 하나 이상의 아르기나제 폴리펩티드 및/또는 하나 이상의 ABD 폴리펩티드를 포함할 수 있다. 예를 들면, 상기 융합 단백질은 ABD-rhArg-ABD, ABD094-rhArg-ABD094, ABD-BCA-ABD, ABD094-BCA-ABD094, rhArg-ABD-rhArg, rhArg-ABD094-rhArg, BCA-ABD-BCA 또는 BCA-ABD094-BCA의 일반적 구조를 가질 수 있다.
- [0092] 상기 ABD 폴리펩티드 및 상기 아르기나제 폴리펩티드는 펩티드 링커를 통하여 직접 공유적으로 결합되거나 간접적으로 결합될 수 있다.
- [0093] 상기 펩티드 링커 또는 링커는 상기 ABD 폴리펩티드 및 아르기나제 폴리펩티드의 기능적 연결을 용이하게 하도록 설계된, 길이가 전형적으로 약 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 또는 그 이상의 아미노산의 범위를 갖는 폴리펩티드이다. 기능적 연결이라는 용어는 링크된 융합 단백질이 이의 폴리펩티드 구성 성분이 유래된 단백질 (들)의 기능적 측면 또는 생물학적 활성의 일부 또는 전부를 나타내도록 허용되는 3 차원 구조로 적절하게 폴딩할 수 있게 하는 연결을 나타낸다.
- [0094] 상기 폴리펩티드 링커는 ABD 폴리펩티드의 N-말단과 상기 아르기나제 폴리펩티드의 C-말단 사이에 배치되거나 또는 대안적으로 상기 아르기나제 폴리펩티드의 N-말단과 상기 ABD 폴리펩티드의 C-말단 사이에 배치될 수 있다.
- [0095] 상기 펩티드 링커는 천연 아미노산, 비천연 아미노산 및 이들의 조합을 포함할 수 있다.
- [0096] 특정 실시예에서, 상기 펩티드 링커는 글리신, 세린, 아스파라긴 또는 이들의 조합을 포함할 수 있다. 상기 펩티드 링커의 예로서는 폴리-글리신, (GS)_n 및 (GGS)_n을 포함하는 링커를 포함할 수 있으며, 여기서 n 은 1-30이

다. 상기 펩티드 링커의 추가적 예로서는 유연한 링커(예: $(G_4S)_n$, 여기서 $n = 1-4$), 또는 강성 링커(예: 상기 알파-나선형 링커 $[A(EAAAK)_nA]_x$, 여기서 $n = 2-4$ 이고 $x = 1$ 또는 2 ; 및 XP_n , 여기서 X 는 A, K 또는 E 이고 $n = 1-10$). 특정 실시예에서, 상기 펩티드 링커는 $(A(EAAAK)_4ALEA-(EAAAK)_4A)$ (서열번호 105), $G_4SG_4SG_3SG$ (서열번호 106), $GS(N)_nGSG$, 여기서 $n = 1-10$, 이고 $GS(Q)_nGSG$, 여기서 $n = 1-10$, 등. 특정 실시예에서, 상기 펩티드 링커는 서열번호 73와 적어도 90%의 서열 상동성을 갖는 폴리펩티드 서열을 포함한다. 예를 들어, 상기 펩티드 링커는 서열번호 73과 적어도 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99%의 서열 상동성을 갖거나 서열번호 73과 동일한 폴리펩티드를 포함할 수 있다.

[0097] 특정 실시예에서, 상기 펩티드 링커는 글리신, 세린, 아스파라긴 또는 이들의 조합을 포함할 수 있다. 특정 실시예에서, 상기 펩티드 링커는 서열번호 74와 적어도 90%의 서열 상동성을 갖는 폴리펩티드 서열을 포함한다. 예를 들어, 상기 펩티드 링커는 서열번호 74와 적어도 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99%의 서열 상동성을 갖거나 서열번호 74와 동일한 폴리펩티드를 포함할 수 있다.

[0098] 정제 태그(Purification tags)는 친화성 크로마토그래피와 같이 상기 융합된 단백질의 정제 용이성을 개선하기 위해 사용될 수 있다. 잘 알려진 정제 태그는 6 개의 히스티딘 잔기의 서열인 헥사-히스티딘(6x His) 태그이다. 따라서, 특정 실시예에서, 상기 융합 단백질은 4-8 개의 히스티딘 아미노산(예: 6x His 태그)을 포함하는 폴리-히스티딘을 추가로 포함한다. 상기 폴리-히스티딘은 상기 융합 단백질의 C-말단, 상기 융합 단백질의 N-말단에 배치되거나, ABD 폴리펩티드와 아르기나제 폴리펩티드사이에 배치될 수 있다.

[0099] 상기 폴리-히스티딘이 상기 ABD 폴리펩티드와 상기 아르기나제 폴리펩티드 사이에 배치될 경우, 상기 폴리-히스티딘은 펩티드 링커로서 작용할 수 있거나 또는 상기 펩티드 링커에 더하여 포함될 수 있다. 예를 들면, 서열번호 75의 상기 융합 단백질은 위치 300-305에 6 개의 히스티딘 폴리펩티드를 포함하고, 이는 상기 ABD 폴리펩티드와 상기 아르기나제 폴리펩티드를 연결하는 역할을 하며, 친화성 크로마토그래피에 의해 상기 융합 단백질을 정제하는데 유리하게 사용될 수 있다.

[0100] 상기 폴리-히스티딘 태그는 당업계에 일반적으로 알려진 기술을 사용하여 정제가 완료된 후 선택적으로 제거될 수 있다. 예를 들어, N-말단 폴리-히스티딘 태그(예: Qiagen TAGZyme)는 엑소 펩티다아제를 사용하여 제거할 수 있으며, 엔도펩티다아제를 사용하여 폴리-히스티딘-태그의 제거를 용이하게 하는 적절한 아미노산 서열이 C-말단 폴리-히스티딘 태그 앞에 올 수 있다. 따라서, 폴리-히스티딘 태그의 N-말단 및/또는 C-말단을 제외한 융합 단백질은 본 발명의 범위 내에 포함된다.

[0101] 특정 실시예에서, 상기 ABD 폴리펩티드는 서열번호 66, 서열번호 67 또는 서열번호 68과 적어도 93%의 서열 상동성을 갖는 폴리펩티드 서열을 포함하는 ABD 폴리펩티드를 포함하며, 상기 아르기나제 폴리펩티드는 서열번호 69, 서열번호 70, 서열번호 71 또는 서열번호 72와 적어도 95%의 서열 상동성을 갖는 폴리펩티드 서열을 포함한다. 예를 들면, 상기 ABD 폴리펩티드는 서열번호 66, 서열번호 67 또는 서열번호 68 와 적어도 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99%의 서열 상동성을 갖거나 서열번호 66, 서열번호 67 또는 서열번호 68 와 동일한 폴리펩티드 서열을 포함하며, 상기 아르기나제 폴리펩티드는 서열번호 69, 서열번호 70, 서열번호 71 또는 서열번호 72와 적어도 96%, 97%, 98% 또는 99%의 서열 상동성을 갖거나 서열번호 69, 서열번호 70, 서열번호 71 또는 서열번호 72와 동일한 폴리펩티드 서열을 포함한다.

[0102] 특정 실시예에서, 상기 ABD 폴리펩티드는 서열번호 66과 적어도 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99%의 서열 상동성을 갖거나 서열번호 66과 동일한 폴리펩티드 서열을 포함하고, 상기 아르기나제 폴리펩티드는 서열번호 69와 적어도 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99%의 서열 상동성을 갖거나 서열번호 69 와 동일한 폴리펩티드 서열을 포함한다.

[0103] 특정 실시예에서, 상기 융합 단백질은 서열번호 73 또는 서열번호 74와 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99%의 서열 상동성을 갖거나 서열번호 73 또는 서열번호 74와 동일한 폴리펩티드 서열을 포함하는 펩티드 링커를 포함한다.

[0104] 융합 단백질의 예로서, 서열번호 49, 서열번호 50, 서열번호 51, 서열번호 52, 서열번호 53, 서열번호 54, 서열번호 55, 서열번호 56, 서열번호 75 및 서열번호 76 와 적어도 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99%의 서열 상동성을 갖거나 서열번호 49, 서열번호 50, 서열번호 51, 서열번호 52, 서열번호 53, 서열번호 54, 서열번호 55, 서열번호 56, 서열번호 75 및 서열번호 76 와 동일한 융합 단백질을 들 수 있다.

[0105] 혈장 아르기닌의 농도에 대한 상기 융합 단백질의 효과의 치료 기간(therapeutic duration)은 투여되는 상기 융

합 단백질의 양에 따라 다르며, 약 1, 약 2, 약 3, 약 4, 약 5, 약 6, 약 7, 약 8, 약 9, 약 10, 약 11, 약 12, 약 13, 약 14, 또는 약 15 일 이상일 수 있다. 특정 실시예에서, 상기 융합 단백질의 효과의 치료 기간은 약 5 일 내지 약 20 일, 약 5 일 내지 약 19 일, 약 5 일 내지 약 18 일, 약 5 일 내지 약 17 일, 약 5 일 내지 약 16 일, 약 5 일 내지 약 15 일, 약 6 일 내지 약 15 일, 약 7 일 내지 약 15 일, 약 7 일 내지 약 14 일, 약 7 일 내지 약 13 일, 약 7 일 내지 약 12 일, 약 7 일 내지 약 11 일, 또는 약 8 일 내지 약 11 일이다.

[0106] 특정 실시예에서, 상기 융합 단백질의 반감기는 약 1 일 내지 약 10 일, 약 1 일 내지 약 9 일, 약 1 일 내지 약 8 일, 약 1 일 내지 약 7 일, 약 1 일 내지 약 6 일, 약 1 일 내지 약 5 일, 약 1 일 내지 약 4 일, 약 1 일 내지 약 3 일, 또는 약 1 일 내지 약 2 일이다. 다른 구현 예에서, 상기 융합 단백질의 반감기는 약 6 시간 내지 약 30 시간이다.

[0107] 본원에 기재된 상기 융합 단백질의 아르기나제 활성은, 상기 융합 단백질이 유래된 아르기나제 폴리펩티드의 활성과 실질적으로 동일하거나, 더 낮거나, 더 높을 수 있다. 아르기나제 활성의 1 단위는 표준 분석 조건에서 분당 1 μmol 의 요소 생산을 촉매하는 융합 단백질[예: BHA(서열번호 75), BAH(서열번호 76), N-ABD-rhArg(서열번호 49) 또는 N-ABD094-rhArg(서열번호 50)] 또는 아르기나제 [예: BCA(서열번호 70)]의 양으로 정의된다. 상기 효소의 특이 활성은 단백질 mg 당 활성 단위로 표현된다. 표준 디아세틸모 녹심(diacetylmonoxime; DAMO) 분석 조건(37° C, pH 7.4)에서, 상기 융합 단백질은 상기 융합 단백질이 통합하는 해당 아르기나제 폴리펩티드보다 약 5%, 약 10%, 약 15%, 약 20%, 약 25% 약 30%, 약 35% 또는 약 40% 더 낮거나 더 높은 비활성을 가질 수 있다. 특정 실시예에서, 융합 단백질은 상기 융합 단백질이 통합하는 해당 아르기나제 폴리펩티드보다 약 5 % 내지 약 40%, 약 10% 내지 약 40%, 약 10% 내지 약 35 %, 약 10% 내지 약 30%, 약 20% 내지 약 30%, 약 20% 내지 약 35 %, 약 15 % 내지 약 30%, 약 15 % 내지 약 25 %, 또는 약 10% 내지 약 20% 더 낮거나 더 높은 비활성을 가질 수 있다.

[0108] 특정 실시예에서, 상기 융합 단백질의 아르기나제 활성은 실질적으로 HSA의 존재에 영향을 받지 않는다. 이는 HSA에 대한 ABD 융합 단백질의 결합이 상기 융합 단백질의 활성에 해로운 영향을 미칠 수 있기 때문에 유리하다.

[0109] 단리된 폴리뉴클레오티드로서 또는 발현 벡터의 일부로서 또는 선형 DNA 서열의 일부로서 본원에 기재된 상기 융합 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열도 제공되며, 이들은 시험관 내 전사/번역에 사용되는 선형 DNA 서열, 원핵 또는 진핵 발현과 호환되는 벡터, 조성물의 분비 및/또는 표시(display)를 포함한다. 특정 예시적 폴리뉴클레오티드가 본원에 개시되어 있지만, 그러나, 주어진 발현 시스템에서 유전 코드의 축퇴성 또는 코돈 선호도를 고려할 때, 본원에 기재된 상기 융합 단백질을 코딩하는 다른 폴리뉴클레오티드도 본 발명의 범위에 포함된다.

[0110] 본원에 기재된 폴리뉴클레오티드는 자동화된 폴리 뉴클레오티드 합성기 상의 고체상 폴리뉴클레오티드 합성과 같은 화학적 합성에 의해 생성되고 완전한 단일 또는 이중 가닥 분자로 조립될 수 있다. 대안적으로, 본 발명의 폴리뉴클레오티드는 PCR과 같은 다른 기술에 의해 생성될 수 있으며, 이어서 일상적 클로닝이 수행될 수 있다. 주어진 공지된 서열의 폴리뉴클레오티드를 생산하거나 수득하는 기술은 당업계에 잘 알려져 있다.

[0111] 본원에 기재된 폴리뉴클레오티드는 프로모터 또는 인핸서 서열, 인트론, 폴리아데닐화 신호 등과 같은 적어도 하나의 비코딩 서열(non-coding sequence)을 포함할 수 있다. 상기 폴리뉴클레오티드 서열은 또한, 단백질, 신호 서열, 융합 단백질 파트너(예: 생물 활성제를 코딩하는 cDNA 등)의 정제 또는 검출을 촉진하기 위해, 예를 들어 마커 또는 태그 서열(예: 폴리-히스티딘 (6 X His) 또는 HA 태그)을 코딩하는 추가 아미노산을 코딩하는 추가 서열을 포함할 수 있다.

[0112] 또 다른 실시예에서, 본원에 기재된 폴리뉴클레오티드 중 적어도 하나를 포함하는 벡터가 본원에 제공된다. 이러한 벡터는 플라스미드 벡터, 바이러스 벡터, 배콜로 바이러스(baculovirus) 발현용 벡터, 트랜스포존 기반 벡터 또는 임의의 수단에 의해 주어진 유기체 또는 유전적 배경에 본 발명의 폴리 뉴클레오티드를 도입하기에 적합한 임의의 다른 벡터일 수 있다. 이러한 벡터는 이러한 벡터에 의해 코딩된 폴리펩티드의 발현을 제어, 조절, 유발 또는 허용할 수 있는 핵산 서열 요소를 포함하는 발현 벡터일 수 있다. 이러한 요소는 주어진 발현 시스템에서 코딩된 폴리펩티드의 표현을 용이하게 하는 전사 인핸서 결합 부위, RNA 중합 효소 개시 부위, 리보솜 결합 부위 및 기타 부위를 포함할 수 있다. 이러한 발현 시스템은 당업계에 잘 알려진 세포 기반 또는 무-세포(cell-free) 시스템일 수 있다.

- [0113] 많은 박테리아 발현 시스템에서, 개시 코돈은 전형적으로 메티오닌을 코딩하며, 결과적으로 이러한 발현 시스템에서 N-말단 메티오닌으로 시작된 단백질을 생성한다. 그러나, 메티오닌 아미노 펩티다제(MetAP) 등과 같은 특정 박테리아 효소가 새로 합성된 폴리펩티드로부터 N-말단 메티오닌의 가수 분해 절단을 촉매할 수 있다는 것은 잘 알려져있다. 이것은 일반적으로 다음(next) 아미노산이 예를 들어 Gly, Ala, Ser 또는 Thr 인 경우에 관찰된다[*In vivo* processing of N-말단 methionine in *E. coli*, FEBS Lett. 1990 Jun 18; 266(1-2):1-3]. 따라서, 본원에 기재된 상기 융합 단백질의 특정 실시예에서, 단백질의 N-말단 메티오닌이 존재하지 않는 변이체를 포함한다.
- [0114] 본원에 기재된 상기 융합 단백질은 포획(capture), 고정화(immobilization), 분할(partitioning) 또는 침강(sedimentation)을 위해 당업계에 잘 알려진 분리 절차를 사용하여 분리될 수 있고, 상업적 적용에 필요한 정도로 정제될 수 있다.
- [0115] 치료적 용도를 위해, 본원에 기재된 상기 융합 단백질은 본원에 기재된 융합 단백질의 치료적 유효량을 약학적으로 허용되는 담체에 활성 성분으로서 함유하는 약학적 조성물로서 제조될 수 있다. 용어 "담체"는 활성 화합물과 같이 투여되는 희석제, 보조제, 부형제 또는 비히클을 의미한다. 상기 비히클은 물 및 석유, 동물, 식물성 또는 합성 유래의 것을 포함하는 오일(예: 땅콩유, 대두유, 광유, 참기름 등)과 같은 액체일 수 있다. 예를 들어, 0.9% 식염수 및 0.3% 글리신이 사용될 수 있다. 이러한 용액은 멸균되어 있으며 일반적으로 미립자 물질이 없다. 이들은 종래의 잘 알려진 멸균 기술(예: 여과)에 의해 멸균될 수 있다. 조성물은 pH 조절제 및 완충제, 안정화제, 점증제, 윤활제 및 착색제 등과 같은 생리적 조건에 근접시키는 데 필요한 제약상 허용되는 보조 물질을 함유할 수 있다. 이러한 약제학적 제형에서 상기 융합 단백질의 농도는 매우 다양할 수 있으며(예: 약 0.5% 미만, 일반적으로 적어도 약 1% 내지 최대 15 또는 20 중량%), 선택된 특정 투여 방식에 따라 주로 필요한 용량, 액체 부피, 점도 등에 따라 선택된다. 적합한 비히클 및 제형은 하기에 기재되어 있다(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, See especially pp. 958-989).
- [0116] 본원에 기재된 상기 융합 단백질의 치료적 사용을 위한 투여 방식은 숙주에 제제를 전달하는 임의의 적합한 경로일 수 있다(예: 비경구 투여(예: 피내, 근육 내, 복강 내, 정맥 내 또는 피하, 폐; 경 점막(경구, 비강, 질내, 직장)) 정제, 캡슐, 용액, 현탁액, 분말, 젤, 입자의 제형을 사용하는 것; 주사기, 이식 장치, 삼투 펌프, 카트리지, 마이크로 펌프에 포함된 것; 또는 당업자에 의해 인식되거나 당업계에 잘 알려진 다른 수단. 부위 특이적 투여는 예를 들어 관절 내(intraarticular), 기관지 내(intrabronchial), 복강 내(intraabdominal), 캡슐 내(intracapsular), 연골내(intracartilaginous), 강 내(intracavitary), 복 내(intracelial), 소뇌 내(intracerebellar), 뇌실 내(intracerebroventricular), 결장 내(intracolic), 자궁경관 내(intracervical), 위 내(intragastric), 간 내(intrahepatic), 심근 내(intracardial), 골내(intraosteal), 골반 내(intrapelvic), 심장강 내(intrapericardiac), 복강 내(intraperitoneal), 흉막 내(intrapleural), 전립선 내(intraprostatic), 폐내(intrapulmonary), 직장 내(intrarectal), 신장 내(intrarenal), 망막 내(intraretinal), 척추 내(intraspinal), 활액 내(intrasynovial), 흉강 내(intrathoracic), 자궁 내(intrauterine), 혈관 내(intravascular), 방광 내(intravesical), 병변 내(intralesional), 질(vaginal), 직장(rectal), 구강(buccal), 설하(sublingual), 비강(intranasal) 또는 경피 전달(transdermal delivery)를 들 수 있다.
- [0117] 본원에 기재된 상기 융합 단백질은 아르기닌 고갈제로서 사용될 수 있다. 이러한 제제는 대상체에서 아르기닌 고갈이 치료 효과를 초래하는 모든 질병 또는 상태(예: 암, 특정 바이러스, 다발성 경화증, 류마티스 관절염, 자가 면역 질환, 선천성 과다 아르기닌혈증(congenital hyperargininemia), 이식편대숙주병(graft-versus-host disease (GvHD)) 및 관련 합병증 및 동반질환)의 치료에 유용하다.
- [0118] 아르기닌 영양 요구성 종양은 ASS 또는 OTC의 하향 조절로 인해 세포 외 아르기닌에 의존하고 생존을 위해 아르기닌의 세포 외 공급원에 의존한다. 아르기닌 고갈제는 아르기닌 영양 요구성 종양에 세포 독성이 있는 것으로 나타났으며 암 치료 사용 여부는 현재 임상 시험이 진행 중이다.
- [0119] 따라서, 본원에 기재된 상기 융합 단백질은 췌장암, 백혈병, 흑색종, 두 경부암, 결장 직장암, 폐암, 유방암, 전립선암, 자궁경부암, 간암, 비인두암(nasopharyngeal cancer), 식도암, 육종, 위암, 중피종(mesothelioma), 림프종, 방광암, 골암, 자궁내막암(endometrial cancer), 난소암, 신장암, 안암(eye cancer), 신경모세포종(neuroblastoma), 교모세포종(glioblastoma), 악성 말초신경초종양(malignant peripheral nerve sheath tumor; MPNST) 및 뇌암 과 같은 암의 치료에 사용될 수 있다. 상기 암은 아르기닌 영양 요구성 암(예: ASS 및 OTC 중

적어도 하나의 하향 조절을 특징으로하는 암)일 수 있다.

- [0120] 본원에 기재된 상기 융합 단백질은 또한 인간 면역 결핍 바이러스(HIV), B 형 간염 바이러스(HBV), C 형 간염 바이러스(HCV), 단순 헤르페스 바이러스(HSV), 인간 유두종 바이러스(human papillomavirus; HPV), 엡스타인-바 바이러스(Epstein-Barr virus; EBV), 헤르페스 바이러스(herpes viruses), 수두 대상 포진 바이러스(Varicella zoster virus) 및 인플루엔자와 같은 바이러스 감염의 치료에 사용될 수 있다.
- [0121] 본원에 상세히 기재된 바와 같이, 본원에 제공된 상기 융합 단백질은 또한 비만, 대사 장애, 관련 합병증 및/또는 동반질환으로 이루어진 군으로부터 선택된 적어도 하나의 상태의 치료에 사용될 수 있다.
- [0122] 하기 실험에서 입증된 바와 같이, 아르기닌 고갈은 지방과다증(adiposity)을 극적으로 감소시킬 수 있다. 여기서 본 발명자들은 ABD 아르기나제 융합 단백질 또는 폐길화된 아르기나제(예: N-ABD094-rhArg(서열번호 50), 폐길화된 His-rhArg(서열번호 101) 및 N-ABD094-rhArg-Co²⁺[서열번호 50(코발트 대체됨)])를 사용하여 비만 및 관련 대사 장애의 치료에 있어서 아르기닌 고갈의 치료 잠재력을 조사하였다. 본원에 제시된 데이터는, 예를 들어 N-ABD094-rhArg(서열번호 50)에 의한 아르기닌 고갈이 정상적인 마른 마우스 및 비만 마우스에서 지방 질량(fat mass)을 현저히 감소시키고 지질 생성(lipogenesis)을 억제하며 인슐린 민감성을 증가시킬 수 있음을 입증한다. 아르기닌 고갈, 예를 들어 N-ABD094-rhArg(서열번호 50)를 사용 시, 비만, 대사 장애, 관련 합병증 및 저항성을 포함한 동반 질환을 예방하고 감소시킬 수 있는 것으로 밝혀졌다.
- [0123] 본원에 제시된 아르기닌 고갈의 효과는 놀랍고 예상치 못한 것으로서, 많은 연구에서 아르기닌을 포함한 일부 아미노산(AA)의 식이 섭취 증가가 포도당과 지질 대사에 상당한 영향을 미치며 아미노산 보충제를 사용하여 체중을 감소시킬 수 있음을 발견하였다. 더욱이 아르기닌은 준-필수 아미노산이기 때문에 그 고갈로 인해 대상체에 해로운 영향을 미치지 않는다.
- [0124] 고지방식이 유도 비만(high-fat diet-induced obesity; DIO) 마우스 모델을 사용하였다. 고지방식이를 시작한 마른 마우스를 N-ABD094-rhArg(서열번호 50)로 동시에 치료하여 DIO 발생 및 관련 대사 장애 예방에 대한 효능을 테스트하였다. 기존 DIO가 있는 마우스를 N-ABD094-rhArg(서열번호 50)로 처리하여 비만, 대사 장애, 관련 합병증 및 동반 질환 감소에 대한 효능을 테스트하였다.
- [0125] 하기 실시예에서 입증된 바와 같이, N-ABD094-rhArg(서열번호 50) 처리는 체중 및 지방 질량(fat mass)의 감소, 내당능 및 인슐린 반응성 개선, 내분비 및 대사 프로파일(metabolic profiles)의 정상화, 염증, 지방증(steatosis) 및 섬유증 완화, 갈색 지방의 백색화 방지 또는 역전을 야기하였다.
- [0126] 치료적 유효량의 아르기닌 고갈제를 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는 이를 필요로하는 대상체에서 비만 및/또는 대사 장애를 치료하는 방법이 본원에 제공된다.
- [0127] 상기 아르기닌 고갈제는 대상체에서 혈장 및/또는 세포 내 아르기닌의 수준을 감소시킬 수 있는 당업계에 공지된 임의의 아르기닌 고갈제일 수 있다. 상기 아르기닌 고갈제는 소분자 또는 단백질일 수 있다.
- [0128] 상기 단백질은 융합 단백질 및/또는 폐길화된 단백질과 같은 화학적으로 변형된 단백질일 수 있다. 상기 단백질의 예로서, 아르기나제를 갖는 단백질, 아르기닌 탈아민효소, 아르기닌 디카복실라제, 아르기닌 2 모노옥시게나제 활성과 같은 다른 생성물에 대한 아르기닌의 이화 작용(catabolism)을 촉매할 수 있는 단백질을 들 수 있다.
- [0129] 상기 아르기나제는 박테리아, 진균류, 어류, 인간, 소, 돼지, 토끼, 설치류, 영장류, 양 및 염소에 의해 생산되는 것과 같이 당업계에 알려진 임의의 아르기나제일 수 있다 (예: *바실러스 칼도벨록스*(*Bacillus caldovelox*) 아르기나제, *테르무스 테르모필루스*(*Thermus thermophilus*) 아르기나제, 염소(*Capra hircus*) 아르기나제 I, 벌거숭이 빠드렁니 쥐(*Heterocephalus glaber*) 아르기나제 I, 유럽 가축우(*Bos taurus*) 아르기나제 I, 멧돼지(*Sus scrofa*) 아르기나제 I, 은어(*Plecoglossus altivelis*) 아르기나제 I, 대서양 연어(*Salmo salar*) 아르기나제 I, 온코르힌쿠스 미키스(*Oncorhynchus mykiss*) 아르기나제 I, 오스메루스 모르다크스(*Osmerus mordax*) 아르기나제 I, 날개조개(*Hyriopsis cumingii*) 아르기나제 I, 갈색쥐(*Rattus norvegicus*) 아르기나제 I, (*Mus musculus*) 아르기나제 I, 호모 사피엔스(*Homo sapiens*) (사람) 아르기나제 I, 침팬지(*Pan troglodytes*) 아르기나제 I, 굴토끼(*Oryctolagus cuniculus*) 아르기나제 I, 갈색쥐(*Rattus norvegicus*) 아르기나제 II, 마우스(*Mus musculus*) 아르기나제 II, 호모 사피엔스(*Homo sapiens*) (사람) 아르기나제 II, 유럽 가축우(*Bostaurus*) 아르기나제 II, 벌거숭이 빠드렁니 쥐(*Heterocephalus glaber*) 아르기나제 II, 침팬지(*Pan troglodytes*) 아르기나제 II, 굴토끼(*Oryctolagus*

cuniculus) 아르기나제 II, 델프트아(*Delftia*) 아르기나제, 바실러스 코아쿨란스(*Bacillus coagulans*) 아르기나제, 헤플레아 포토트로피카(*Hoeflea phototrophica*) 아르기나제 및 로제이플렉서스 카스텐홀지(*Roseiflexus castenholzii*) 아르기나제. 기타 아르기나제로서는 바실러스 메탄올리쿠스(*Bacillus methanolicus*), 바실러스 속(*Bacillus* sp.), NRRL B-14911, 플라노코커스 동해엔시스(*Planococcus donghaensis*), 파에니바실러스 덴드리토포르미스(*Paenibacillus dendritiformis*), 데스모스포라 속(*Desmospora* sp.), 메틸로박터 툰드리팔루덤(*Methylobacter tundripaludum*), 스테노트로포모나스 속(*Stenotrophomonas* sp.), 마이크로박테리움 라에바니포르만스(*Microbacterium laevaniformans*), 포르피로모나스 우에노니스(*Porphyromonas uenonis*), 아그로박테리움 속(*Agrobacterium* sp.), 옥타데카박터 아르크티쿠스(*Octadecabacter arcticus*), 아그로박테리움 투메파시엔스(*Agrobacterium tumefaciens*), 아녹시바실러스 플라비테르무스(*Anoxybacillus flavithermus*), 바실러스 푸밀러스(*Bacillus pumilus*), 게오바실러스 테르모글루코시다시우스(*Geobacillus thermoglucosidasius*), 게오바실러스 테르모글루코시다스(*Geobacillus thermoglucosidans*), 브레리바실러스 라테르스포르스(*Brevibacillus laterosporus*), 데술포토마쿨럼 루미니스(*Desulfotomaculum ruminis*), 게오바실러스 카우스토폴러스(*Geobacillus kaustophilus*), 게오바실러스 테르모레오보란스(*Geobacillus thermoleovorans*), 게오바실러스 테르모데니트리피칸스(*Geobacillus thermodenitrificans*), 스타필로코커스 아우레우스(*Staphylococcus aureus*), 할로필릭 아르카에온(*Halophilic archaeon* DL31), 할로피게르 크사나두엔시스(*Halopiger xanaduensis*), 나트리알바 마가디(*Natrialba magadii*), 플라스모디움 팔시파룸(*Plasmodium falciparum*), 헬리코박터 파이로리(*Helicobacter pylori*) 등에서 유래된 아르기나제를 들 수 있다.

[0130] 상기 아르기닌 탈아민 효소는 마이코플라스마(*Mycoplasma*), 락토코커스(*Lactococcus*), 슈도모나스(*Pseudomonas*), 스트렙토코커스(*Streptococcus*), 에스케리키아(*Escherichia*), 마이코박테리움(*Mycobacterium*) 또는 바실러스(*Bacillus*) 미생물로부터 생산된 것과 같은 당업계에 알려진 임의의 아르기닌 탈아민효소일 수 있다. 아르기닌 탈아민효소의 예로서는 마이코플라스마 호미니스(*Mycoplasma hominis*), 마이코플라스마 아르기니니(*Mycoplasma arginini*), 마이코플라스마 아르쓰리티디스(*Mycoplasma arthritidis*), 클로스트리듐 페르프린젠스(*Clostridium perfringens*), 바실러스 리케니포르미스(*Bacillus licheniformis*), 보렐리아 부르그도르페리(*Borrelia burgdorferi*), 보렐리아 아프젤리이(*Borrelia afzelii*), 엔테로코커스 파에칼리스(*Enterococcus faecalis*), 락토코커스 락티스(*Lactococcus lactis*), 바실러스 세레우스(*Bacillus cereus*), 스트렙토코커스 피오게네스(*Streptococcus pyogenes*), 스트렙토코커스 뉴모니아(*Streptococcus pneumoniae*), 락토바실러스 사케(*Lactobacillus sake*), 기아르디아 인테스티날리스(*Giardia intestinalis*), 미코박테리움 튜버쿨로시스(*Mycobacterium tuberculosis*), 슈도모나스 플레코글로시사(*Pseudomonas plecoglossicida*), 슈도모나스 푸티다(*Pseudomonas putida*), 슈도모나스 아에루기노사(*Pseudomonas aeruginosa*) 등으로부터 생산된 것들을 들 수 있으나, 이에 한정되지 않는다.

[0131] 상기 아르기닌 디카복실라제는 대장균(*Escherichia coli*), 살모넬라 티필리움(*Salmonella typhimurium*), 클라미도필라 뉴모니아(*Chlamydia pneumoniae*), 메타노칼도코커스 야나시(*Methanocaldococcus jannaschii*), 파라메시움 부르사리아 클로렐라 바이러스 1(*Paramecium bursaria Chlorella virus 1*), 비브리오 벌니피쿠스 YJ016 (*Vibrio vulnificus* YJ016), 캄필로박터 제주니 subsp. (*Campylobacter jejuni* subsp.), 트리파노소마 크루지(*Trypanosoma cruzi*), 설펜로보스 솔파타리쿠스(*Sulfolobus solfataricus*), 바실러스 리케니포르미스(*Bacillus licheniformis*), 바실러스 세레우스(*Bacillus cereus*), 카리카 파파야(*Carica papaya*), 니코티아나토바쿰(*Nicotianatobacum*), 클리신 맥스(*Glycine max*), 로터스 코니쿨라타(*Lotus coniculata*), 비브리오 벌니피쿠스(*Vibrio vulnificus*), 비브리오 콜레라(*Vibrio cholerae*), 마우스(*Mus musculus*), 테르모토가(*Thermotoga*), 갈색쥐(*Rattus norvegicus*), 호모 사피엔스(*Homo sapiens*), 유럽 가축우(*Bos taurus*), 서스크로파(*Sus scrofa*), 테르무스 테르모필레스(*Thermus thermophilus*), 테르무스 파르바티엔시스(*Thermus parvatiensis*), 테르무스 아퀴티쿠스(*Thermus aquaticus*), 테르무스 테르모필러스(*Thermus thermophilus*), 테르무스 이슬란드쿠스(*Thermus islandicus*), 아라비도프시스 탈리아나(*Arabidopsis thaliana*), 아베나 사티바(*Avena sativa*) 등으로부터 생산된 것과 같은 당업계에 알려진 임의의 아르기닌 디카복실라제일 수 있다.

[0132] 상기 아르기닌 2-모노시계나제는 아르쓰로박터 글로비포르미스 IFO 12137(*Arthrobacter globiformis* IFO 12137), 아르쓰로박터 심플렉스(*Arthrobacter simplex* IFO 12069), 브레비박테리움 헬로볼룸 IFO 12073(*Brevibacterium helvolum* IFO 12073), 헬리코박터 시나에디 CCUG 18818(*Helicobacter cinaedi* CCUG 18818), 스트렙토코커스 그리세우스(*Streptomyces griseus*) 등으로부터 생산된 것과 같은 당업계에 알려진 임

의의 아르기닌 2-모노시게나제일 수 있다.

- [0133] 상기 아르기닌 디카르복실라제, 아르기닌 탈아민효소, 아르기닌 2-모노-옥 시게나제 및 아르기나제는 완전한 단백질 또는 이의 기능적 단편 및/또는 이의 변이체일 수 있다. 상기 아르기닌 디카르복실라제, 아르기닌 탈아민 효소, 아르기닌 2-모노-옥 시게나제 및 아르기나제는 단백질 또는 기능적 단편 및/또는 이의 변이체를 인간 혈청 알부민, 알부민 결합 도메인의 Fc 영역, 면역 글로불린, PEG 그룹 또는 이들의 조합과 융합시키는 것과 같은 변형을 통해 이들의 약동학적 특성을 개선할 수 있다.
- [0134] 본원에 기재된 상기 아르기닌 이화 효소는 PEG가 선택적으로 부착될 수있는 효소상의 특정 부위를 포함하도록 조작할 수있다. 상기 선택된 폐길화 부위는 바람직하게는 상기 효소의 활성 부위로부터 제거된 부위에 위치하며, 일반적으로 용매에 노출되어 폐길화 시약과 반응할 수 있다.
- [0135] 예를 들어, Cys⁴⁵-human 아르기나제 I(HAI) 및 Cys¹⁶¹-바실러스 칼도벨루스 아르기나제(BCA)는 티올-특이적 PEG 분자와 반응하도록 생성될 수 있다. 변형된 아르기나제의 단일 자유 시스테인 잔기와 PEG 화합물에 부착된 말레이미드 기(MAL) 사이의 결합(conjugation)은 PEG 화합물과 변형된 아르기나제의 자유 시스테인 사이에 공유 결합을 발생케 할 수 있다. 서열번호 102 및 104는 Cys⁴⁵ 부위-지정 폐길화를 위해 설계된 돌연변이(C168S/C303S)를 포함하므로 선택적으로 폐길화될 수 있다.
- [0136] 특정 실시예에서, 상기 아르기나제는 서열번호 101, 서열번호 102, 서열번호 103 또는 서열번호 104를 포함하며, 여기서 서열번호 102 및 서열번호 104는 선택적으로 PEG 그룹을 포함한다.
- [0137] 당업계에 공지된 임의의 폐길화 시약을 사용하여 PEG를 본원에 기재된 아르기닌 이화 효소에 공유적으로 부착시킬 수 있다. 폐길화 시약의 예로서, mPEG-ALD(메톡시폴리에틸렌 글리콜-프로피온알데히드); mPEG-MAL (메톡시폴리에틸렌 glycol-maleimide); mPEG-NHS(메톡시폴리에틸렌 glycol-N-hydroxy-succinimide); mPEG-SPA(메톡시폴리에틸렌 글리콜-숙신이미딜프로피오네이트); 및 mPEG-CN(메톡시폴리에틸렌 글리콜-시아누릭 클로라이드)를 들 수 있다.
- [0138] 상기 PEG 그룹은 약 5,000 내지 약 20,000 amu, 약 5,000 내지 약 15,000 amu, 약 5,000 내지 약 12,000 amu, 약 7,000 내지 약 12,000 amu, 또는 약 7,000 내지 약 10,000 amu의 분자량을 가질 수있다. 특정 실시예에서, 상기 PEG 그룹은 PEG4,000, PEG5,000, PEG6,000 또는 PEG7,000이다.
- [0139] 상기 PEG 그룹은 아르기나제에 직접 또는 링커를 통해 공유 결합될 수 있다. 특정 실시예에서, 상기 아르기나제는 프로피온산 링커를 통해 PEG에 공유 결합된다. 기타 실시예에서, 상기 아르기나제는 C2-C10, C2-C9, C2-C8, C2-C7, C2-C6, C2-C5, 또는 C2-C4 직쇄 또는 분지쇄 카르복실산 링커를 통해 PEG에 공유 결합된다.
- [0140] 대안적 실시예에서, 비만, 대사 장애 및 관련 합병증 및/또는 동반 질환으로 구성된 군에서 선택된 적어도 하나의 상태를 치료하는 방법은 낮은 아르기닌 또는 실질적으로 아르기닌이 없는 식단을 이를 필요로 하는 대상체에 게 투여하는 것을 포함한다.
- [0141] 비만, 대사 장애 및 관련 합병증 및/또는 동반 질환으로 구성된 군에서 선택된 적어도 하나의 상태를 치료하는 방법은 또한 비만, 대사 장애 및 관련 합병증 및/또는 동반 질환으로 구성된 군에서 선택된 적어도 하나의 상태를 예방하는 것을 포함한다.
- [0142] 상기 대사 장애는 비만, 고콜레스테롤 혈증, 이상지질혈증, 지방증, 인슐린 저항성, 포도당 불내성, 고혈당증 및 당뇨병 또는 이들의 조합 및 관련 합병증 및/또는 동반질환은 당뇨병 망막증, 당뇨병 신경병증, 당뇨병 혈관병, 당뇨병 신경병증, 지방간염, 섬유증, 간경변, 염증, 고혈압, 심혈관 질환 및 갈색 지방의 백색화 또는 이들의 조합을 포함할 수 있다.
- [0143] 특정 실시예에서, 상기 대사 장애는 저항성의 치료 및/또는 예방, 예를 들어 I 형 또는 특히 II 형 당뇨병을 가진 대상체에서 인슐린 저항성의 치료 및/또는 예방이다. 하기 실시예에서 알 수 있듯이 아르기닌은 대상체의 민감도를 증가시킨다.
- [0144] 상기 비만 치료 방법은 대상체의 지방 질량을 감소시키거나 또는 지방 질량의 증가 방지를 포함할 수 있다. 아르기닌 고갈제로 대상체를 치료하면, 고지방 식이를 섭취한 처리하지 않은 대상체와 비교하여, 내장 백색 지방 조직(WAT), 간 및 골격근에서 여러 지방 생성 전사 인자 및 지질 생성 효소(예: Pparg, Srebp1c, Acc 및 Scd 1)의 mRNA 발현 수준이 감소할 수 있다. 특정 실시예에서, 지질 생성 조절 인자의 mRNA 발현 수준의 감소의 발현 수준은, 고지방 식이(HFD)를 섭취시킨 처리하지 않은 대상체에서의 해당 mRNA 발현 수준의, 예를 들어, 적어

도 약 10%, 약 20%, 약 30%, 약 40%, 약 50%, 약 60%, 약 70%, 약 80% 또는 약 90%가 감소된다.

- [0145] 비만은 대사 장애(예: 고혈당증, 고인슐린혈증) 및/또는 기타 요인(예: 과식, 신체 운동 부족 등)의 결과 및/또는 이와 관련될 수 있다.
- [0146] 상기 대사 장애는 또한 심장 지방증, 간 지방증, 신장 지방증, 췌장 지방증 및 근육 지방증과 같은 대상체에서 지방증의 치료 및/또는 예방을 포함할 수 있다.
- [0147] 상기 대사 장애는 또한 간 섬유증, 신장 섬유증, 췌장 섬유증 및 심장 섬유증과 같은 대상체에서 섬유증의 치료 및/또는 예방을 포함할 수 있다.
- [0148] 상기 대사 장애는 또한 예를 들어 혈장 총콜레스테롤, LDL 콜레스테롤, 아포지질단백질 B 및/또는 중성 지방 수치의 감소에 의한 고콜레스테롤 혈증, 이상지질혈증의 치료를 포함할 수 있다.
- [0149] 아르기닌 고갈제로 대상체를 치료하면, 혈장 렙틴의 농도를 고지방 식이(HFD)를 섭취시킨 처리하지 않은 대상체의 해당 혈장 렙틴의 농도의 예를 들어, 적어도 약 10%, 약 20%, 약 30%, 약 40%, 약 50%, 약 60% 또는 약 70%를 감소시킬 수 있다. 특정 실시예에서, 상기 혈장 렙틴의 농도는 고지방 식이(HFD)를 섭취시킨 처리하지 않은 대상체의 해당 혈장 렙틴의 농도의 약 10% 내지 약 70%, 약 10% 내지 약 60%, 약 10% 내지 약 50%, 약 10% 내지 약 40%, 약 10% 내지 약 30%가 감소될 수 있다.
- [0150] 아르기닌 고갈제로 대상체를 치료하면, 혈장 중성 지방의 농도를 고지방 식이(HFD)를 섭취시킨 처리하지 않은 대상체의 해당 혈장 중성 지방의 농도의 예를 들어, 적어도 약 20%, 약 30% 또는 약 40%를 감소시킬 수 있다. 특정 실시예에서, 상기 혈장 중성 지방의 농도는 고지방 식이(HFD)를 섭취시킨 처리하지 않은 대상체의 해당 혈장 중성 지방의 농도의 약 5% 내지 약 40%, 약 5% 내지 약 30% 또는 약 5% 내지 약 20%가 감소될 수 있다.
- [0151] 아르기닌 고갈제로 대상체를 치료하면, 혈장 총콜레스테롤의 농도를 고지방 식이(HFD)를 섭취시킨 처리하지 않은 대상체의 해당 혈장 총콜레스테롤의 농도의 예를 들어, 적어도 약 5%, 약 10% 또는 약 15%를 감소시킬 수 있다. 특정 실시예에서, 상기 혈장 총콜레스테롤의 농도는 고지방 식이(HFD)를 섭취시킨 처리하지 않은 대상체의 해당 혈장 총콜레스테롤의 농도의 약 5% 내지 약 15%, 약 5% 내지 약 10% 또는 약 10% 내지 약 15%가 감소될 수 있다.
- [0152] 아르기닌 고갈제로 대상체를 치료하면, 혈장 지방산의 농도를 고지방 식이(HFD)를 섭취시킨 처리하지 않은 대상체의 해당 혈장 지방산의 농도의 예를 들어, 적어도 약 5%, 약 10%, 약 15%를 또는 약 20%를 감소시킬 수 있다. 특정 실시예에서, 상기 혈장 지방산의 농도는 고지방 식이(HFD)를 섭취시킨 처리하지 않은 대상체의 해당 혈장 지방산의 농도의 약 5% 내지 약 20%, 약 5% 내지 약 15% 또는 약 5% 내지 약 10%가 감소될 수 있다.
- [0153] 치료 효과를 관찰하는 데 필요한 대상체에서 혈장 아르기닌의 농도는 피험자의 상태, 질병의 유형 및 중증도 및/또는 의학적 상태 및/또는 식이 구성을 포함하는 수많은 요인에 따라 달라질 수 있다. 표적 혈장 아르기닌 수준의 선택은 당업자의 기술 범위 내에 있다. 특정 실시예에서, 상기 혈장 아르기닌의 농도는 약 100 μM , 약 90 μM , 약 80 μM , 약 70 μM , 약 60 μM , 약 50 μM , 약 40 μM , 약 30 μM , 약 20 μM , 약 10 μM 또는 약 5 μM 미만이다. 특정 실시예에서, 상기 혈장 아르기닌의 농도는 약 0.1 μM 에서 약 100 μM , 약 0.1 μM 에서 약 90 μM , 약 0.1 μM 에서 약 80 μM , 약 0.1 μM 에서 약 70 μM , 약 0.1 μM 에서 약 60 μM , 약 0.1 μM 에서 약 50 μM , 약 0.1 μM 에서 약 40 μM , 약 0.1 μM 에서 약 30 μM , 약 0.1 μM 에서 약 20 μM 또는 약 0.1 μM 에서 약 10 μM 이다. 특정 실시예에서, 상기 아르기닌의 수준은 Biochrom 30 아미노산 분석기의 검출 한계 미만(예: 약 3 μM 미만) 및/또는 Agilent 6460 액체 크로마토그래피/전기 분무 이온화(Electrospray Ionization) 삼중 사극자 질량 분석기(Triple Quadrupole Mass Spectrometer)의 검출 한계 미만(예: 약 0.3 μM 미만)이다.
- [0154] 치료 기간(예: 혈장 아르기닌 농도가 대상체에서 고갈된 상태로 유지되는 기간)의 결정은 당업자의 기술 범위 내에 있다. 특정 실시예에서, 상기 치료 기간은 약 1, 약 2, 약 3, 약 4, 약 8, 약 12, 약 16, 약 20, 약 24, 약 28, 약 32, 약 36, 약 40, 약 44, 약 48, 약 52, 약 56 주 또는 그 이상이다.
- [0155] 아르기닌의 고갈은 바이러스 감염(US 8,507,245는 그 전문이 본원에 참조로 포함됨), 다발성 경화증, 류마티스 관절염, 자가 면역 질환(US 9,789,169, 그 전문이 본원에 참조로 포함됨), 선천성 고아르기닌혈증(ClinicalTrials.gov 식별자(identifier): NCT02488044), 이식편대숙주병(graft-versus-host disease (GvHD))(Hallet W., et al., *Exploiting arginase to prevent GVHD*, Blood 2010 116:5440-5441), 염증(Sahin E., et al., *Macrophage PTEN regulates expression and secretion of arginase I modulating innate and adaptive immune responses*, J Immunol. 2014 Aug 15;193(4):1717-27), 및 망막 신경 혈관 변성(retinal

neurovascular degeneration)(Fouda AY. et al., *arginase 1 promotes retinal neurovascular protection from ischemia through suppression of macrophage inflammatory responses* Cell Death Dis. 2018 Sep 25;9(10):1001)을 포함하지만 이에 국한되지 않는 여러 상태의 효과적인 치료인 것으로 나타났다.

[0156] 따라서, 본원에서는 또한 본원에 기재된 치료적 유효량의 용합 단백질을 이를 필요로 하는 대상체에게 투여하는 것을 포함하는, 바이러스 감염, 다발성 경화증, 류마티스 관절염, 자가 면역 질환, 선천성 고아르기닌혈증 (congenital hyperargininemia), 이식편대숙주병(graft-versus-host disease (GvHD)) 및 염증으로 구성된 군으로부터 선택된 적어도 하나의 상태를 치료하는 방법이 제공된다.

[0157] 본 발명의 추가적인 목적, 이점 및 신규한 특징들은 하기 실시예들을 검토하면 당업자에게 명백해질 것이며, 이들 실시예들에 제한되지 않는다.

[0158] 실시예 1: ABD and ABD094 용합 유전자의 구축

[0159] PCR 반응에서 표 1에 나열된 프라이머 01-08(서열번호 1-8)을 각 프라이머와 20 nM의 농도로, iProof DNA 중합 효소(Bio-rad)의 1X 반응 완충액, 0.2 mM dNTP 및 0.5 단위의 iProof DNA 중합 효소 (Bio-rad)(50 μ L 반응 부피)와 혼합하여 N-말단 용합을 위한 N-ABD 유전자를 구축하였다. PCR 프로그램은 다음과 같이 설정하였다. (1) 98° C, 10초; (2) 50° C, 20 초; (3) 72° C, 15초; 이후 (4) (1) 내지 (3)을 35 회 반복 수행. 이후, 1 μ L의 PCR 반응 생성물을 새로운 PCR 반응에, iProof DNA 중합 효소(Bio-rad)의 1X 반응 완충액, 0.2 mM dNTP, 0.2 μ M 프라이머(N-ABD_{Nde}-F): 5' -GATCTTAAGCATATGCATCATCCATC-3'(서열번호 9), 프라이머(N-ABD_{Hind}-R): 5' -ACAGCTAAAAGCTTATCAGCCTAGGATCCGCCGCTACCATTG-3' (서열번호 93) 및 0.5 unit의 iProof DNA 중합 효소 (50 μ L 반응 부피)와 함께 추가하였다. PCR 프로그램은 다음과 같이 설정하였다. (1) 98° C, 10초; (2) 50° C, 20 초; (3) 72° C, 15초; 이후 (4) (1) 내지 (3)을 35 회 반복 수행, (5) 72° C, 5분. N-ABD094 유전자의 구축은 표 1에 기재된 프라이머 01-08(서열번호 1-8) 대신 표 1에 기재된 프라이머 09-16(서열번호 9-16)을 사용한 것을 제외하고는 N-ABD 유전자 구축의 절차와 동일하였다.

[0160] PCR 반응에서 표 1에 기재된 프라이머 17-24를 각 프라이머와 20 nM의 농도로, iProof DNA 중합 효소의 1X 반응 완충액, 0.2 mM dNTP 및 0.5 단위의 iProof DNA 중합 효소(Bio-rad)(50 μ L 반응 부피)와 혼합하여 C-말단 용합을 위한 C-ABD 유전자를 구축하였다. PCR 프로그램은 다음과 같이 설정되었다. (1) 98° C, 10초; (2) 50° C, 20 초; (3) 72° C, 15초; 이후 (4) (1) 내지 (3)을 35 회 반복 수행. 이후, 1 μ L의 PCR 반응 생성물을 새로운 PCR 반응에, iProof DNA 중합 효소의 1X 반응 완충액, 0.2 mM dNTP, 0.2 μ M 프라이머(C-ABD_{Nde}-F): 5'-TAGCTGATCATATGTTATGCGATGGATCCAGTAACAAC-3' (서열번호 91), 0.2 μ M primer (C-ABD_{Hind}-R): 5'-GACCCCTAAAAGCTTAATGGTGATGGTGATG-3'(서열번호 92) 및 0.5 unit의 iProof DNA 중합 효소 (50 μ L 반응 부피)와 함께 추가하였다. PCR 프로그램은 다음과 같이 설정되었다. (1) 98° C, 10초; (2) 50° C, 20 초; (3) 72° C, 15초; 이후 (4) (1) 내지 (3)을 35 회 반복 수행, (5) 72° C, 5분. C-ABD094 유전자의 구축은 표 1에 기재된 프라이머 17-24(서열번호 17-24) 대신 표 1에 기재된 프라이머 25-32(서열번호 25-32)를 사용한 것을 제외하고는 C-ABD 유전자 구축의 절차와 동일하였다.

[0161] PCR 단편 N-AND, N-ABD094, C-AND 또는 C-ABD094를 제한 효소 Nde I 및 Hind III로 절단 후, 동일 제한효소들로 미리 절단한 벡터 pRSET-lac에 연결시킨 후 *E. coli* Top10에 형질전환하여, 플라스미드 pN-ABD, pN-ABD094, pC-ABD 및 pC-ABD094를 각각 제작하였다. 플라스미드 pRSET-lac는 T7 프로모터를 pGEMT-Easy Vector (Promega)의 lac 프로모터로 대체하여 pRSET-A(Invitrogen)에서 변형되었다.

[0162] 0.2 μ M 프라이머 HARG_{Bam}-F(5'-TTAGCTGGGGATCCGCCAAGTCCAGAACCATAGG-3') (서열번호 93), 0.2 μ M 프라이머 HARG_{Hind}-R (5'-GAGATCAAAGCTTACTTAGGTGGGTTAAGGTAGTC-3') (서열번호 94)와 iProof DNA 중합 효소의 1X 반응 완충액, 0.2 mM dNTP, 100 ng의 인간 아르기나제 I의 cDNA 및 0.5 단위의 iProof DNA 중합 효소(Bio-rad)(50 μ L 반응 부피)와 혼합하여 인간 아르기나제 I 유전자의 N-ABD 또는 N-ABD094 용합을 구축하였다. PCR 프로그램은 다음과 같이 설정하였다. (1) 98° C, 10초; (2) 50° C, 20 초; (3) 72° C, 30 초; 이후 (4) (1) 내지 (3)을 35 회 반복 수행, (5) 72° C, 5분. 인간 아르기나제 I의 PCR 단편을 제한 효소 BamH I 및 Hind III 로 절단 후, 동일 제한효소들로 미리 절단한 벡터 pN-ABD 또는 pN-ABD094 에 연결시킨 후 *E. coli* ER2566(NEB)에 형질전환하여, 플라스미드 pN-ABD-rhArg 및 pN-ABD094-rhArg 을 각각 제작하였다.

[0163] 0.2 μ M 프라이머 HARG_{Nde}-F (5'-TAGCTGCATATGAGCGCCAAGTCCAGAACCATAG-3') (서열번호 95), 0.2 μ M primer HARG_{Bam}-R (5'-ATCAGCTAGGATCCCTTAGGTGGGTTAAGGTAGTCAATAGG-3') (서열번호 96)와 iProof DNA 중합 효소(Bio-rad)의 1X 반응 완충액, 0.2 mM dNTP, 100 ng의 인간 아르기나제 I의 cDNA 및 0.5 단위의 iProof DNA 중합 효

소(Bio-rad)(50 μ L 반응 부피)와 혼합하여 인간 아르기나제 I 유전자의 C-ABD 또는 C-ABD094 융합을 구축하였다. PCR 프로그램은 다음과 같이 설정하였다. (1) 98° C, 10초; (2) 50° C, 20 초; (3) 72° C, 30 초; 이후 (4) (1) 내지 (3)을 35 회 반복 수행, (5) 72° C, 5분. 인간 아르기나제 I의 PCR 단편을 제한 효소 Nde I 및 BamH I 로 절단 후, 동일 제한효소들로 미리 절단한 벡터 pC-ABD 또는 pC-ABD094 에 연결시킨 후 *E. coli* ER2566(NEB)에 형질전환하여, 플라스미드 pC-ABD-rhArg 및 pC-ABD094-rhArg 을 각각 제작하였다.

[0164] 0.2 μ M primer BCABam-F (5' -ATGCTAGTGGATCCATGAAGCCAATTCAATTATCG - 3')(서열번호 97), 0.2 μ M primer BCAHind-R (5' -TCAGCCTAAAGCTTACATGAGTTTTTCACCAAACAACG- 3')(서열번호)와 iProof DNA 중합 효소의 1X 반응 완충액, 0.2 mM dNTP, 100 ng의 *바실러스 칼도벨록스*의 게놈DNA 및 0.5 단위의 iProof DNA 중합 효소(Bio-rad)(50 μ L 반응 부피)와 혼합하여 *바실러스 칼도벨록스*(*Bacillus caldovelox*) 아르기나제(BCA) 유전자의 N-ABD 또는 N-ABD094 융합을 구축하였다. PCR 프로그램은 다음과 같이 설정하였다. (1) 98° C, 10초; (2) 50° C, 20 초; (3) 72° C, 30 초; 이후 (4) (1) 내지 (3)을 35 회 반복 수행, (5) 72° C, 5분. *바실러스 칼도벨록스* 아르기나제의 PCR 단편을 제한 효소 BamH I 및 Hind III 로 절단 후, 동일 제한효소들로 미리 절단한 벡터 pN-ABD 또는 pN-ABD094 에 연결시킨 후 *E. coli* ER2566(NEB)에 형질전환하여, 플라스미드 pN-ABD-BCA 및 pN-ABD094-BCA 을 각각 제작하였다.

[0165] 0.2 μ M 프라이머 BCANde-F (5' -ATGCTAGCCATATGAAGCCAATTCAATTATCGGG - 3') (서열번호 99), 0.2 μ M primer BCABam-R (5' -TCAGCTAAGGATCCCATGAGTTTTTCACCAAACAACG -3')(서열번호 100)와 iProof DNA 중합 효소의 1X 반응 완충액, 0.2 mM dNTP, 100 ng의 *바실러스 칼도벨록스*의 게놈 DNA 및 0.5 단위의 iProof DNA 중합 효소(50 μ L 반응 부피)와 혼합하여 *바실러스 칼도벨록스* 아르기나제(BCA)유전자의 C-ABD 또는 C-ABD094 융합을 구축하였다. PCR 프로그램은 다음과 같이 설정하였다. (1) 98° C, 10초; (2) 50° C, 20 초; (3) 72° C, 30 초; 이후 (4) (1) 내지 (3)을 35 회 반복 수행, (5) 72° C, 5분. *바실러스 칼도벨록스* 아르기나제의 PCR 단편을 제한 효소 Nde I 및 BamH I 로 절단 후, 동일 제한효소들로 미리 절단한 벡터 pC-ABD 또는 pC-ABD094 에 연결시킨 후 *E. coli* ER2566(NEB)에 형질전환하여, 플라스미드 pC-ABD-BCA 및 pC-ABD094-BCA 을 각각 제작하였다.

[0166] 표 1. ABD 및 ABD094 유전자 합성에 사용되는 DNA 프라이머

번호	서열
01	5'-GGAGATGGACATATGCATCATCACCATCACCATGATGAAGCC GTGGATGC-3' (서열번호 1)
02	5'-GCTAAGACTTTAGCTTCAGCTAAGGAATTCGCATCCACGGCT TCATCATG-3' (서열번호 2)
03	5'-CCTTAGCTGAAGCTAAAGTCTTAGCTAACAGAGAACTTGAC AAATATGGA-3' (서열번호 3)
04	5'-TAGGTTCTTGTAATAGTCACTTACTCCATATTTGTCAAGTTCTC TGTTAG-3' (서열번호 4)
05	5'-GGAGTAAAGTGAAGTATTACAAGAACCTAATCAACAATGCCAA AACTGTTGA-3' (서열번호 5)
06	5'-AAATTTTCATCTATCAGTGCTTTTACACCTTCAACAGTTTGG CATTGTTG-3' (서열번호 6)
07	5'-GTAAAAGCACTGATAGATGAAATTTTAGCTGCATTACCTTC GGGTAGTAA-3' (서열번호 7)
08	5'-TCCGCCGCTACCATTGTTATTATTGTTGTTACTACCCGAAG GTAATGCAG-3' (서열번호 8)
09	5'-GATCTTAAGCATATGCATCATCACCATCACCATGATGAAGCG GTGGA-3' (서열번호 9)
10	5'-GCTTCTTTCGCTTCCGCCAGGCTGTTTCGCATCCACCGCTTCA TCATG-3' (서열번호 10)
11	5'-GCGGAAGCGAAAGAAGCGGCGAACGCGGAAGTGGATAGCT ATGGCGTGAG-3' (서열번호 11)
12	5'-TTATCAATCAGGCGTTTATAAAAATCGCTCACGCCATAGCTA TCCAGTTC-3' (서열번호 12)
13	5'-GATTTTTATAAACGCCTGATTGATAAAGCGAAAACCGTGGA AGGCGTGGA-3' (서열번호 13)
14	5'-CGGCAGCGCCGCCAGAATCGCATCTTTCAGCGCTTCCACGC CTTCCACGGT-3' (서열번호 14)

[0167]

15	5'-TTCTGGCGGCGCTGCCGTCGGGTAGTAACAACAATAATAAC AATGGTAGC-3' (서열번호 15)
16	5'-GGATCCGCCGCTACCATTTGTTATTATTGTTGTTACTACC-3' (서열번호 16)
17	5'-CATATGTTAGCTGATGGATCCAGTAACAACAATAATAACA ATGGTAGCGG-3' (서열번호 17)
18	5'-AATTCGCATCCACGGCTTCATCACCGCCGCTACCATTTGTTA TTATTGTTG-3' (서열번호 18)
19	5'-GAAGCCGTGGATGCGAATTCCTTAGCTGAAGCTAAAGTCTTAG CTAACAG-3' (서열번호 19)
20	5'-CTTACTCCATATTTGTCAAGTTCTCTGTTAGCTAAGACTTTA GCTTCAGC-3' (서열번호 20)
21	5'-GAGAACTTGACAAATATGGAGTAAGTGAATTACAAGAA CCTAATCAAC-3' (서열번호 21)
22	5'-TACACCTTCAACAGTTTGGCATTGTTGATTAGGTTCTTGT AATAGTCAC-3' (서열번호 22)
23	5'-GCCAAACTGTTGAAGGTGTAAGAGCACTGATAGATGAAA TTTAGCTGC-3' (서열번호 23)
24	5'-ATGGTGATGGTGATGATGAGGTAATGCAGCTAAAATTCA TCTATCAGTG-3' (서열번호 24)
25	5'-CATATGTTATGCGATGGATCCAGTAACAACAATAATAACAA TGGTAGCGG-3' (서열번호 25)
26	5'-TGTTTCGCATCCACCGCTTCATCACCGCCGCTACCATTTGTTATT ATTGTTG-3' (서열번호 26)
27	5'-GAAGCGGTGGATGCGAAGAGCCTGGCGGAAGCGAAAGAA GCGGCGAACGC-3' (서열번호 27)
28	5'-AAAATCGCTCAGCCATAGCTATCCAGTTCCGCGTTCGCCGCT TCTTTTCG-3' (서열번호 28)
29	5'-CTATGGCGTGAGCGATTTTATAAACGCCTGATTGATAAAGC GAAAACCG-3' (서열번호 29)

[0168]

30	5'-TCGCATCTTTCAGCGCTTCCACGCCTTCCACGGTTTTTCGCTTT ATCAATC-3' (서열번호 30)
31	5'-GAAGCGCTGAAAGATGCGATTCTGGCGGCGCTGCCGCATCAT CACCATCA-3' (서열번호 31)
32	5'-CTAAAAGCTTAATGGTGATGGTGATGATGCGGCAG-3' (서열번호 32)

[0169]

[0170]

[0171]

실시예 2: 발효에 의한 ABD-rhArg 또는 ABD094-rhArg 융합 단백질의 발현 및 정제

N-ABD-rhArg(서열번호 49) 융합 단백질을 생산하기 위해, pN-ABD-rhArg로 형질전환된 *E. coli* ER2566을 50 mL 종자 배지(1.5 g 효모 추출물, 0.25 g NaCl 및 5 mg 암피실린)에서 16 시간 동안 250 rpm, 30°C의 오비탈

(orbital) 교반기에서 배양하였다. 종자 배양액을 1L 발효 배지(효모 추출물 10 g, 트립톤 16 g, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 6.7 g, KH_2PO_4 3.41 g, 2.41g NH_4Cl , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.67 g, 글리세롤 10 g, 글루코스 1 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1 mM CaCl_2 및 암피실린 0.1 g) 및 1 L/min 공기와 최소 500 rpm의 속도로 28° C에서 배양하였고, pH는 7.4로 유지하였다. 최소 용존 산소 pO_2 를 20% 이상 유지하기 위해 교반 속도가 자동으로 증가시켰다. 600nm 파장의 배양 물에서 흡광도가 광학 밀도 (OD) 15 에 도달하면, 500 mL 배지(효모 추출물 10g, 트립톤 16g, NH_4Cl 2.41g, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.67g, 글리세롤 20g)를 31.25 mL/hr의 속도로 연속 16 시간 동안 공급하였다. 세포를 원심분리하여 수집하고 단백질을 Ni-IDA 세파로스 컬럼으로 정제하였다. 일반적으로 1 g/L 이상의 정제된 단백질 배양 물이 수득되었다. 이후, Triton X-114 방법으로 정제된 단백질에서 내 독소를 제거하였다[Aida Y. and Pabst M.J. (1990) *Journal of Immunological Methods*. **132**: 191-195, herein incorporated by reference]. 융합 단백질 융합 단백질 N-ABD094-rhArg(서열번호 50), C-ABD-rhArg(서열번호 51), C-ABD094-rhArg(서열번호 52), N-ABD-BCA(서열번호 53), N-ABD094-BCA(서열번호 54), C-ABD-BCA(서열번호 55) and C-ABD094-BCA(서열번호 56)의 생산을 위한 과정은 세포가 각각의 플라스미드로 형질전환된 것을 제외하고 N-ABD-rhArg(서열번호 49)와 동일하였다. 도 1 및 표 2는 상기 언급한 결합 도메인 제조합 인간 아르기나제(rhArg), 즉N-ABD094-rhArg(서열번호 50)의 단백질 정제의 한 예를 나타낸 것이다.

표 2. N-ABD094-rhArg 단백질을 제조하였고990 mg 순수 단백질을 수득하였다.

	부피 (mL)	농도 (mg/mL)	합계 (mg)	비활성 (Specific Act.) (U/mg)
N-ABD094-rhArg	50	19.81	990	184

도 12는 제조 결과를 나타낸다. 709 mg의 N-ABD094-rhArg(서열번호 50)를 수득하였고, 비활성은 205 U/mg이었고 단백질 농도는 10.5 mg/mL이었다.

실시예 3: N-ABD094-rhArg 유전자 (서열번호 38)의 구축 및 클로닝

N-ABD094-rhArg(서열번호 38) 유전자는 N-ABD-rhArg 유전자(서열번호 37)를 기반으로하여 오버래핑 확장 (overlapping extension) PCR을 수행하여 합성하였다. 두 PCR 반응을 수행하였다. 먼저 N-ABD094-rhArg 유전자 (서열번호 38)를 갖는 pRSET/lac 플라스미드를 사용하였다. rhArg 영역은 ABD094-0F(서열번호 57) 및 HuArgHinBam-R(서열번호 64)에 의한 1차 PCR 반응에서 분리 및 증폭하였다. PCR 산물을 0.7% 아가로스겔 (Biorad) 상에서 100V 30분으로 분리 후 겔 밴드 정제 키트(GE Healthcare Life Science)로 정제하였다. 이후, ABD094를 두 번째 PCR 반응을 통해 PCR 산물에 첨가하였다. ABD094-0F, ABD094-1F, ABD094-2F, ABD094-3F, ABD094-4F 및 ABD094-5F(서열번호 57-62)를 포함하는 20x 희석 프라이머 혼합물을 먼저 멸균된 milli-Q 물로 제조하였다. 상기 프라이머 혼합물과 abdNde-F는 서로 중첩되며 상기 두 번째 PCR 반응은 abdNde-F(서열번호 63), HuArgHinBam-R(서열번호 64 및 20x 희석 프라이머 혼합물을 사용하여 수행하였다. PCR 산물은 상기과 동일한 방법으로 분리 및 정제하였다. 프라이머의 서열은 표 3에 나타내었다. 프라이머의 결합 위치는 도 2a에 도시되어 있다. 수득한 N-ABD094-rhArg 융합 유전자(서열번호 38)의 DNA 서열과 그 단백질 서열을 도 2b에 나타내었다.

[0177] 표 3. N-ABD094-rhArg 유전자(서열번호 38)의 클로닝을 위한 프라이머 목록

프라이머 이름	서열
ABD094-0F	5'-ATTCTGGCAGCGCTGCCGTCGGGTAG TAACAACAATAATAACA ATGGTAG-3' (서열번호 57)
ABD094-1F	5'-AACCGTGGAAGGTGTGGAAGCGCTGAAA GATGCGATTCTGG CAGCGCTGC-3' (서열번호 58)
ABD094-2F	5'-GATTTTTATAAACGTCTGATTGATAAAGCGAA AACCGTGGAAGGTGTGGA-3' (서열번호 59)
ABD094-3F	5'-CTGGATAGCTATGGCGTGAGCGATTTTTATAAACG TCTGATTGATAAAGC-3' (서열번호 60)
ABD094-4F	5'-GCGGAAGCGAAAGAAGCAGCAAACGCGGAACCTG GATAGCTATGGCGTGAG-3' (서열번호 61)
ABD094-5F	5'-ACCATGATGAAGCCGTGGATGCGAATTCC CTGGCGGAAGCGAAAGAAGCA-3' (서열번호 62)
abdNde-F	5'-GGAGATATACATATGCATCATCACCATCACCAT GATGAAGCCGTGG-3' (서열번호 63)
HuArgHinBam-R	5'-TGACTACCTTAACCCACCTAAGTAAGCTT GGATCCTGTAACG-3' (서열번호 64)

[0178]

[0179]

상기 PCR 산물과 pRSET/lac 벡터를 BamHI-HF 및 NdeI(New England BioLabs)에 의해 37°C에서 2 시간 동안 이중 절단하였다. 삽입물과 벡터를 모두 0.7% 아가로스겔(Biorad)에서 100V 30 분 분리 후 겔 밴드 정제 키트(GE Healthcare Life Science)로 정제하였다. 삽입물과 벡터를 모두 T4 리가제(New England BioLabs)를 사용하여 실온에서 20 분동안 연결하였다. 유능한 세포는 재조합 DNA에 의해 형질전환시킨 후 50 µg/mL의 카나마이신이 있는 LB 플레이트에 플레이트하였다. LB 플레이트는 37°C에서 밤새 배양하였다. 8 개의 콜로니를 선택하고 abdNde-F 및 HuArgHinBam-R을 사용한 PCR에 의해 N-ABD094-rhArg의 존재를 확인하였다. PCR에서 양성 결과를 가진 콜로니를 30°C에서 밤새 50 µg/mL의 카나마이신과 함께 5 mL 2x TY에서 추가로 배양하였다. 박테리아 배양액을 1.7 mL 미세 원심분리 튜브에서 16,100x g에서 1 분간 원심분리하였다. 박테리아 펠렛을 가용화 완충액(50 mM Tris-HCl, 0.1 M NaCl, 1 mM MnCl₂, pH 7.4)에 재현탁하고 액체 질소에서 동결 및 해동을 반복하여 분해하였다(broken). 상기 세포 용해물을 원심분리하여 단백질 용액을 수득하였다. 아르기나제의 존재를 테스트하기 위해 DAMO에 의한 아르기나제 활성 분석을 수행하였다.

[0180]

실시예 4: BCA 발현 벡터의 구축

[0181]

BCA(Pubmed accession no.: U48226)를 코딩하는 유전자는 GenScript에서 주문하여 de novo 합성 후 pUC57 클로닝 벡터에 삽입하였다. 단일 시스테인 잔기는 부위 지정 돌연변이 유발에 의해 도입하였으며 6-히스티딘 태그는 단백질 정제 과정을 용이하게 하기 위해 C-말단에 추가하였다. 조작된 BCA 유전자를 pET-3a 벡터에 서브 클로닝하고 BCA 발현을 위해 BL21(DE3) 컴피 턴트 세포로 형질전환시켰다. BCA의 결정 구조(PDB : 2CEV)는 단백질 데이터뱅크에서 검색할 수 있다. 조작된 BCA(S161C)-His(서열번호 89)의 단백질 서열은 도 3에 나타내었다.

[0182]

실시예 5: BCA-ABD 발현 벡터의 구축

[0183]

알부민 결합 도메인(ABD)을 코딩하는 한 쌍의 프라이머를 구축하고 오버래핑 PCR에 의해 증폭시켰다. 간단히 말해, 200 ng의 프라이머를 주형으로 사용하고 iProof High-Fidelity DNA 중합 효소(Bio-Rad) 1 단위를 사용하여 증폭하였다. 프라이머를 98°C에서 30 초 동안 배양하면서 98°C에서 10초 동안 열 변성, 60°C에서 30 초 동안 어닐링, 72°C에서 15초 동안 연장을 포함하는 15 사이클의 증폭을 수행하였다.

[0184]

5' -센스-ABD

[0185]

GCGCAGCATGATGAAGCCGTGGATGCGAACAGCTTAGCTGAAGCTAAAGTCTTAGCTAACAGAGAACTTGACAAATATGGAGTAAGTGACTATTACAAGAAC
(서열번호 77)

- [0186] 5' -**안티- 센스-ABD**
- [0187] TTAAGGTAATGCAGCTAAAAATTCATCTATCAGTGCTTTTACACCTTCAACAGTTTTGGCATTGTTGATTAGGTTCTTGAATAGTCACTTACTCCAT (서열번호 78)
- [0188] 상기 프라이머 쌍에 의해 구축된 ABD 코딩 유전자는 BCA-6xHis-ABD (BHA로도 불리움) (서열번호 75) 및 BCA-ABD-6xHis (BAH로도 불리움)(서열번호 76)를 구축하기 위해 2 개의 서로 다른 프라이머 세트에 증폭하였다. BHA의 구축을 위해 ABD는 먼저 하기 한 쌍의 프라이머로 증폭되었으며, 여기서 정방향 프라이머는 상기 6-히스티딘 태그를 통해 BCA와의 오버래핑 PCR을 위해 설계되었고, BamH I 제한 부위 및 정지 코돈(stop codon)은 역방향 프라이머를 사용하여 pET-3a 벡터에 대한 연결을 위해 도입하였다:
- [0189] **ABD 클로닝을 위한 정방향 프라이머:**
- [0190] 5' - GCATCACCATCACCATCACGCGCAGCATGATGAAG-3' (서열번호 79)
- [0191] **ABD 클로닝을 위한 역방향 프라이머:**
- [0192] 5' - cgGGATCCTTAAGGTAATGCAGCTAAAAATTCATCTAT-3' (서열번호 80)
- [0193] ABD의 증폭으로부터 얻은 PCR 산물을 1.5% 아가로스겔 전기영동하여 정제하였다. 추가 돌연변이(V20P)가 있는 조작된 BCA는 정지 코돈이 결실된 하기 한 쌍의 프라이머를 사용하여 클로닝하였다:
- [0194] **BCA 클로닝을 위한 정방향 프라이머:**
- [0195] 5' -ggaattccCATATGAAGCCAATTCAATTATCG-3' (서열번호 81)
- [0196] **BCA 클로닝을 위한 역방향 프라이머:**
- [0197] 5' - GTGATGGTGATGGTGATGCA-3' (서열번호 82)
- [0198] 상기 프라이머들로 증폭 된 BCA를 1% 아가로스겔 전기영동하여 PCR 산물을 정제 하였다. 상기 BCA와 ABD의 PCR 산물은 오버랩 PCR에 의해 테더링(tethering)되었다. 유사하게, 200 ng의 BCA 및 ABD를 주형으로 사용하고 iProof High-Fidelity DNA 중합 효소 1 단위를 사용하여 증폭하였다. 상기 BCA와 ABD는 98°C에서 30 초 동안 배양하였으며, 98°C에서 10초 동안 열 변성, 60°C에서 30 초 동안 어닐링 및 72°C에서 30 초 동안 연장을 포함한 15사이클의 증폭을 하였다. 오버래핑 PCR의 생성물은 하기 한 쌍의 프라이머를 사용하여 추가 증폭을 위한 주형으로 사용하였다:
- [0199] **BHA 클로닝을 위한 정방향 프라이머:**
- [0200] 5' -ggaattccCATATGAAGCCAATTCAATTATCG-3' (서열번호 83)
- [0201] **BHA 클로닝을 위한 역방향 프라이머:**
- [0202] 5' -cgGGATCCTTAAGGTAATGCAGCTAAAAATTCATCTAT-3' (서열번호 84)
- [0203] PCR 산물을 1% 아가로스겔 전기영동한 후 정제를 위해 BHA에 해당하는 밴드를 겔로부터 잘라내었다.
- [0204] BAH의 구축을 위해, ABD는 하기 프라이머 쌍에 의해 먼저 증폭하였고, 여기서 정방향 프라이머는 BCA와 직접 오버래핑 PCR을 위해 설계되었고, BamHI 제한 부위, six-히스티딘 태그 및 중지 코돈은 역방향 프라이머를 통해 도입하였다:
- [0205] **ABD 클로닝을 위한 정방향 프라이머:**
- [0206] 5' -CGTTGTTTGGTGAAAACTCATGGCGCAGCATGATGAAG -3' (서열번호 85)
- [0207] **ABD 클로닝을 위한 역방향 프라이머:**
- [0208] 5' -cgGGATCCTTAGTGATGGTGATGGTGATGAGGTAATGCAGCTAAAAATTCATCTAT-3' (서열번호 86)
- [0209] ABD 증폭으로부터 얻은 PCR 산물을 1.5% 아가로스겔 전기영동한 후 PCR 산물을 정제하였다. 추가 돌연변이(V20P)가 있는 조작된 BCA는 정지 코돈 및 6-히스티딘 태그가 결실된 하기 한 쌍의 프라이머를 사용하여 클로닝하였다.
- [0210] **BCA 클로닝을 위한 정방향 프라이머:**

- [0211] 5' -ggaattccCATATGAAGCCAATTTCAATTATCG-3' (서열번호 81)
- [0212] **BCA 클로닝을 위한 역방향 프라이머:**
- [0213] 5' - GTGATGGTATGGTATGCA-3' (서열번호 82)
- [0214] 상기 프라이머로 증폭 된 BCA를 1% 아가로스겔 전기영동하여 PCR 산물을 정제 하였다. 상기 BCA와 ABD의 PCR 산물은 오버랩 PCR에 의해 테더링(tethering)되었다. 유사하게, 200 ng의 BCA 및 ABD를 주형으로 사용하고 iProof High-Fidelity DNA 중합 효소 1 단위를 사용하여 증폭하였다. 상기 BCA와 ABD는 98°C에서 30 초 동안 배양하였으며, 98°C에서 10초 동안 열 변성, 60°C에서 30 초 동안 어닐링 및 72°C에서 30 초 동안 연장을 포함한 15사이클의 증폭을 하였다. 오버래핑 PCR의 생성물은 하기 한 쌍의 프라이머를 사용하여 추가 증폭을 위한 주형으로 사용하였다:
- [0215] **BAH 클로닝을 위한 정방향 프라이머:**
- [0216] 5' -ggaattccCATATGAAGCCAATTTCAATTATCG-3' (서열번호 87)
- [0217] **BAH 클로닝을 위한 역방향 프라이머:**
- [0218] 5' -cgGGATCCTTAGTGATGGTATGGTATGAGGTAATGCAGCTAAATTCATCTAT-3' (서열번호 88)
- [0219] PCR 산물을 1% 아가로스겔 전기영동한 후 정제를 위해 BHA에 해당하는 밴드를 겔로부터 잘라내었다. BHA 및 BAH 및 pET-3a 벡터를 코딩하는 PCR 산물은 NdeI 및 BamHI로 이중 절단하였다. 상기 BHA 및 BAH를 pET-3a 벡터에 연결 후 *E. coli* TOP10 컴피턴트 세포에 형질전환시켰다. BHA 및 BAH의 뉴클레오티드 서열은 DNA 시퀀싱에 의해 확인하였다. BHA 또는 BAH 삽입물을 포함하는 pET-3a 벡터는 단백질 발현을 위해 BL21(DE3) 벡터로 형질전환하였다.
- [0220] **실시예 6: BHA 및 BAH 단백질 구축**
- [0221] 본 연구에서 사용된 BCA의 단백질 서열은 C 말단에 6xHis 태그와 S161C 돌연변이가 있다는 점을 제외하고, Bewley 등(Structure 7, 435-448, 1999)(PDB ID: 2CEV, 참조로 본원에 포함됨)과 동일하다. BCA-6xHis-ABD(BHA) 및 BCA-ABD-6xHis(BAH)의 구축물을 설계하였고 *E. coli* 세포 스톡(stock)은 BHA 및 BAH를 발현할 수 있다. BHA와 BAH 모두에서 BCA 부분은 위치 20에 발린 잔기가 프롤린으로 돌연변이된(V20P) BCA의 돌연변이 버전이며, ABD 부분은 링커 서열이 있는 ABD의 야생형 버전이다(AQHDEAVDANS) (Jonsson et al., 2008, Protein Eng. Des. Sel. 21, 515-527). ABD 부분은 상기 융합 단백질의 바로 C 말단(BHA의 경우)에 위치하거나 BCA와 6x 히스티딘 태그 사이에 융합(BAH의 경우)된다. 본 연구에서 사용된 BCA, BHA, BAH의 단백질 서열 정렬은 도 4에 나타내었다.
- [0222] **BCA (야생형) 아미노산 서열 (PDB ID: 2CEV):**
- [0223] MKPISIIIGVPMDLGQTRRGVDMGPSAMRYAGVIERLERLHYDIEDLGDIPIGKAERLHEQGSRLRNKAVAEANEKLA AAVDQVVQRGRFPLVLGGDHSIAIGTLAGVAKHYERLGVIIWYDAHGDVNTAETSPSGNIHGMP LAASLGFGHPALTQIGGYSPKIKPEHVVLIGVRS LDEGEKKFIREKGIKIYTMHEVDRLGMTRVMEETIAYLKERTDGVHLSLDLDGLDPSDAPGVGTPVIGGLTYRESHLAMEMLAEAQIITSAEFVEVNPILDERNKTASVAALMGSLFGEKLM (서열번호 70)
- [0224] **BCA (S161C)-His 아미노산 서열:**
- [0225] MKPISIIIGVPMDLGQTRRGVDMGPSAMRYAGVIERLERLHYDIEDLGDIPIGKAERLHEQGSRLRNKAVAEANEKLA AAVDQVVQRGRFPLVLGGDHSIAIGTLAGVAKHYERLGVIIWYDAHGDVNTAETSPSGNIHGMP LAASLGFGHPALTQIGGYCPKIKPEHVVLIGVRS LDEGEKKFIREKGIKIYTMHEVDRLGMTRVMEETIAYLKERTDGVHLSLDLDGLDPSDAPGVGTPVIGGLTYRESHLAMEMLAEAQIITSAEFVEVNPILDERNKTASVAALMGSLFGEKLMHHHHHHH (서열번호 71)
- [0226] **BHA 아미노산 서열:**
- [0227] MKPISIIIGVPMDLGQTRRGVDMGPSAMRYAGVIERLERLHYDIEDLGDIPIGKAERLHEQGSRLRNKAVAEANEKLA AAVDQVVQRGRFPLVLGGDHSIAIGTLAGVAKHYERLGVIIWYDAHGDVNTAETSPSGNIHGMP LAASLGFGHPALTQIGGYCPKIKPEHVVLIGVRS LDEGEKKFIREKGIKIYTMHEVDRLGMTRVMEETIAYLKERTDGVHLSLDLDGLDPSDAPGVGTPVIGGLTYRESHLAMEMLAEAQIITSAEFVEVNPILDERNKTASVAALMGSLFGEKLMHHHHHHHAQHDEAVDANS LAEAKVLANRELDKYGVSDYYKNL INNAKTVEGVKALIDEILAALP (서열번호 75)

- [0228] BAH 아미노산 서열:
- [0229] MKPISIIIGVPMDLGQTRRGPDMPGSAMRYAGVIERLERLHYDIEDLGDIPIGKAERLHEQGSRLRNKAVAEANEKLA AAVDQVVRGRFPLVLGGDHSIA
IGTLAGVAKHYERLGVIIWYDAHGDVNTAETSPSGNIHGMPPLAASLGFGHPALTQIGGYCPKIKPEHVVLIGVRSLEGEKKFIREKGIKIYTMHEVDRLGMT
RVMEETIAYLKERTDGVHLSLDLDGLDPSDAPGVGTPVIGGLTYRESHLAMEMLAEAQIITSAEFVEVNPILDERNKTASVAVALMGSLFGEKLMQAQHD EAV
DANSLAEAKVLANRELDKYGVSDYYKNLINNAKTVEGVKALIDEILAALPHHHHHH (서열번호 76)
- [0230] 실시예 7: Production of BHA and BAH
- [0231] BHA 및 BAH를 발현한 *E. coli* 스톱을 사용하였다. 종자 배양물을 준비하기 위해 소량의 *E. coli* BL21(DE3) 글리 세룰 스톱을 100 µg/mL 암피실린이 보충된 10 mL LB 배지에 접종하였다. 종자 배양물을 밤새(약 16 시간 동안) 37°C, 700 rpm에서 흔들면서 배양하였다. 2.5 mL의 부피에서 밤새 종자 배양물을 100 µg/mL 암피실린이 포함된 250 mL의 LB 배지에 접종하였다. 접종된 세포를 600 nm 파장(OD₆₀₀)에서 0.6-0.8의 광학 밀도로 37°C, 280 rpm에서 흔들면서 2-4 시간 동안 배양하였다. 그후, IPTG(0.2 mM)를 배양 배지에 첨가하여 표적 단백질의 과발현을 유도하였다. 세포를 4 시간 동안 추가 배양 후 4,500 rpm에서 원심분리하여 수확하였다.
- [0232] 니켈 친화성 크로마토그래피에 의한 단백질 정제
- [0233] *E. coli* 세포 펠렛을 50 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl (pH 7.4)를 포함하는 완충액에 재현탁 후 초음파 처리에 의 해 파괴하였다. 이후, 10,000rpm에서 40 분간 원심분리하여 세포 찌꺼기(cell debris)를 제거하였다. Ni²⁺로 충 전된 5 mL HiTrap 킬레이팅 컬럼(GE Healthcare)에 상등액을 적용하고 ÄKTA 정제기를 사용하여 완충액 A(20 mM 인산 나트륨, 0.5 M NaCl, pH 7.4)로 평형화하였다. 다양한 비율에서 완충액 A와 완충액 B(완충액 A에서 0.5 M 이미다졸)의 조합에 의해 달성된 0 내지 0.5 M 이미다졸의 구배를 사용하여 단백질을 용출하였다. 분획은 12% 폴리아크릴아미드 겔을 사용하여 소듐 도데실 설페이트 폴리아크릴아미드 겔 전기영동(SDS-PAGE)에 의해 분석하 였으며, 표적 단백질을 포함하는 분획을 모았다(pooled). 상기 모아진 분획들을 농축하고 농축된 모아진 분획들 의 완충액을 원심 필터 장치(Amicon) 또는 접선 흐름 여과(TFF) 장치(Millipore)를 사용하여 20mM 인산 나트륨 (pH 7.4)으로 교환하였다. 막 컷오프(membrane cut-off)는 BHA 및 BAH에 대해 30,000 MW였다. 잔류물 (retentate)을 원하는 농도로 희석하고 0.2 µm 주사기 필터를 통해 멸균 여과 후 4°C에서 보관하였다.
- [0234] BHA 정제 크로마토그램에 의하면, 이미다졸의 농도를 증가시켜 용출 과정에서 3 개의 피크가 관찰되었다(도 5a). 처음 2 개의 피크가 합쳐진 후, 이미다졸 농도가 약 0.13M(도 5a)에 도달할 때 발생하는 세 번째 피크가 나타난다. SDS-PAGE로 분석한 결과 세 번째 피크는 주로 약 40 kDa(도 5b, 레인 F4-F8)의 표적 단백질로 구성되 어있는 것으로 나타났다. 이 표적 단백질은 아미노산 서열을 기준으로 계산된 BHA 단백질의 분자량이 39.44 kDa 이므로 BHA일 가능성이 높다. 따라서 BHA가 성공적으로 발현되고 정제되었음을 제시한다. 상대적으로 순수한 BHA를 포함하는 분획들을 추가 공정을 위해 함께 모았다(pooled).
- [0235] BAH 정제 크로마토그램에 의하면, 이미다졸의 농도를 증가시켜 용출 과정에서 3 개의 피크가 관찰되었다(도 5c). 두 번째와 세 번째 피크는 병합되며 이미다졸 농도가 약 0.18 M(도 5c)에 도달할 때 발생한다. SDS-PAGE로 분석했을 때, 이 병합된 피크는 주로 BAH일 가능성이 있는 약 40kDa(도 5d, 레인 F6-F14)의 표적 단백질로 구성 되어 있음을 발견하였다. 약 0.13 M 이미다졸에서 용출되는 BHA에 비해 BAH는 니켈 친화성 컬럼에 더 단단하게 결합하는 것으로 보인다. 이는 아마도 ABD 도메인이 BCA와 6x 히스티딘 태그 사이에 삽입될 때 6x 히스티딘 태 그를 더 많이 노출시키는 데 도움이되기 때문일 것이며, 따라서 BAH는 BHA보다 컬럼의 니켈 이온과 더 효과적으 로 상호 작용할 수 있다. 상대적으로 순수한 BAH를 포함하는 분획물을 함께 모아 원심 필터장치 대신 접선폰 여과(TFF) 장치(Millipore)를 사용하여 완충액을 교환하였다.
- [0236] 효소 활성의 한 단위는 표준 분석 조건에서 분당 1 µmol 요소의 생산을 촉매하는 효소(BCA, BHA 또는 BAH)의 양으로 정의된다. 효소의 비활성(specific activity)은 단백질 mg 당 활성 단위로 표현된다. 표준 DAMO 분석 조 건(37°C, pH 7.4)에서 새로 정제된 BHA(서열번호 75)는 220.6 ± 15.8 U/mg의 비활성 값을 가지며, 이는 BCA (S161C)-His(서열번호 89) (243.30 U/mg)의 값에 가깝다.
- [0237] BCA 폴리펩티드 및 ABD 폴리펩티드를 포함하는 융합 단백질의 경우, BHA(서열번호 75)의 경우에는 진탕 플라스 크 배양 1 L 당 약 290 mg의 매우 높은 단백질 수율을 보여 주었다. ABD 융합 단백질의 수율은 사용된 발현 시 스템에 크게 의존한다. sCR1과 융합된 ABD의 수율은 중국 햄스터 난소 세포 배양의 mL 당 24 시간당 0.4 내지

1.1 µg 범위로 보고되었다(Makrides et al., 1996, J. Pharmacol. Exp. Ther. 277, 534-542). HEK293 세포 배양의 각 1 L에서 약 2-15 mg의 단일 사슬 디아바디-ABD 융합 단백질을 얻을 수 있다(Hopp et al., 2010, Protein Eng. Des. Sel. 23, 827-834; Stork et al., 2007, Protein Eng. Des. Sel. 20, 569-576). *E. coli* BL21 숙주에서 발현된 ABD-TolA 융합 단백질의 수율은 20 mg/L LB 배양물 배지 (broth medium)(Ahmad et al., 2012, Proteins 80, 774-789)이다. 이들 결과는 BHA(서열번호 75)의 생산이 간단하고 비용 효율적이라는 것을 보여주었다.

[0238] **실시예 8: BCA (S161C)-His (서열번호 89)의 발현 및 정제**

[0239] 플라스미드 pET-3a-BCA (S161C)-His로 형질전환된 *E. coli* 균주 BL21(DE3) pLysS의 하룻밤 종자 배양물을 100 µg/mL 암피실린을 포함하는 5 mL LB 배지에서 제조한 후, 진탕 플라스크에서 280 rpm으로 흔들면서 37°C에서 16 시간 동안 배양하였다. 100 µg/mL 암피실린을 포함하는 250 mL의 LB 배지에 2.5 mL의 하룻밤 배양물을 첨가하고 광학 밀도(OD600)가 600 nm에서 0.8-0.9에 도달할 때까지 280 rpm으로 흔들면서 37°C에서 배양하였다. 이 소프로필 β -D-티오-갈락토피라노사이드(IPTG)를 최종 농도 0.2 mM로 첨가하였다. 4 시간 유도 후, 4°C에서 20 분간 12,000x g에서 원심분리하여 세포를 수확 하였다. 세포 펠렛은 초음파 처리에 의해 파괴되어 정제를 진행 하거나 필요할 때까지 -20 °C에서 보관할 수 있다. 상기 세포 펠렛을 10 mM MnCl₂를 포함하는 20 mL 가용화 완충액(50 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, pH 7.4)에 현탁시켰다. 세포를 40% 진폭(amplitude)에서 30 초마다 펄스로 10 분간 얼음에서 초음파 처리에 의해 먼저 파괴시킨 후, 세포 찌꺼기는 4°C에서 20 분간 12,000x g에서 원심분리하여 제거하였다. 상등액을 70°C에서 15 분간 배양하고 열처리 과정에서 형성된 침전물을 원심분리하여 제거 하였다. 가용성 분획은 5 mL HisTrap 킬레이팅 HP 컬럼에 로딩하기 전에 0.22 µm 필터를 통해 여과하였다. 플로우 스루(flow through) 분획은 샘플 로딩 동안 수집하였고 결합되지 않은 단백질은 시작 완충액(start buffer)의 5 컬럼 부피(CV)에 의해 또는 기준선 수준(baseline level)이 떨어질 때(off)까지 세척하였다. 컬럼에 결합된 표적 단백질은 이미다졸(시작 완충액에서 0.5 M 이미다졸)을 사용하여 경쟁 구배 용출로 용출하였다. 제조사의 지침에 따라 10 kDa MW 컷오프가 있는 Amicon Ultra-15 원심분리 필터 장치를 사용하여 pH 7.4에서 20 mM 인산 나트륨에서 완충액 교환할 대상 분획을 확인하고 함께 모았다(pooled). 샘플을 0.22 µm 필터를 통해 멸균 조건에서 여과하고 필요 시까지 4°C에서 보관하였다.

[0240] **실시예 9: 유가식 발효에서BCA (S161C)-His (서열번호 89)의 정제**

[0241] 5 L 생물 반응기에서 BCA(S161C)-His-발현 *E. coli* 세포의 발효는 248.86 g(습식 세포 중량)을 생산하였다. 세포 펠렛은 균질화에 의해 방출된 엄청난 양의 DNA 및 RNA를 절단한 DNase 및 RNase가 포함된 가용화 완충액에 재현 탁하여 세포 용해물의 점도를 감소시켰다. 상기 세포 용해물을 균질기에 3 회 통과시킨 후 37°C에서 15 분간 배양하여 점도를 더욱 낮춘 후 원심분리하여 가용성 분획을 얻었다. 정제 제 1 단계는 열에 불안정한(heat-labile) 단백질을 석출시킨 70°C에서 15 분간 열처리하여 비-표적 불순물을 제거하고 원심분리하여 열에 안정한 BCA (S161C)-His(서열번호 89)를 회수 하였다.

[0242] 표적 단백질을 함유하는 가용성 분획은 XK50 컬럼에 패키징된 196 mL 베드 부피를 갖는 Ni-친화성 컬럼에 의해 추가로 정제하였다. 간단히 말하면, Ni- 친화성 컬럼에서 BCA(S161C)-His(서열번호 89)를 용출하기 위해 4-세그먼트 용출 프로그램을 사용하였다. 0 내지 30 % 용출 완충액의 제 1 용출 구배는 컬럼에 비특이적으로 결합된 단백질을 제거하기 위한 것이었다. 두 번째 세그먼트는 비특이적 결합 단백질의 완전한 용출을 허용하도록 30%로 유지되었다. 표적 단백질은 용출 완충액의 농도를 30%에서 70%로 증가시켜 세 번째 세그먼트에서 완전 용출되었습니다(eluted out). 70 내지 100% 용출 완충액의 네 번째 세그먼트는 컬럼에 여전히 결합된 나머지 단백질을 용출하였다. UV 파장 280 nm에서 흡광도를 부여한 분획을 SDS-PAGE로 분석하였고, 상기 표적 단백질을 포함하는 E1에서 A'5까지의 24 개 분획(각각 50 mL)은 함께 모았다(pooled together)(도 6a 및 도 6b). 고농도의 이미다졸을 포함한 모아진 분획은 BCA(야생형)(서열번호 70)의 육량체 구조에 대한 이해를 바탕으로 접선희름여과(TFF) 시스템으로 탈염하였고, TFF는 30 kDa NMWC의 막을 사용하였다. 정제된 BCA (S161C)-His(서열번호 89)를 PBS 완충액에 보관하고 멸균 상태에서 0.2 µm 필터로 여과 후 사용 전까지 4°C에서 보관하였다. 2 단계 파일럿 규모 정제를 통해 약 1,096 mg의 BCA (S161C)-His(서열번호 89) 단백질을 수득하였고, 비활성(specific activity)은 264 U/mg으로 결정되었다.

[0243] **실시예 10: 아르기나제 효소 활성 결정**

[0244] BCA (S161C)-His(서열번호 89)의 활성은 효소 반응에서 생성물인 요소의 양을 결정하는 디아세틸 모노옥심(diacetyl monoxime; DAMO)을 이용하여 직접 비색법으로 분석하였다. 간단히 말해서, 0.15 mL 물과 720 mM 아

르기닌 기질과 함께 pH 7.4에서 0.3 mL BCA 용액의 연속 희석액을 37℃에서 10 분간 별도로 사전 배양하였다. 효소 반응은 0.3 mL의 아르기닌 기질을 사전 배양된 효소 용액에 첨가하여 수행하였다. 반응 혼합물을 37℃에서 정확히 5 분간 배양 후, 2차 시약[50% 트리클로로 아세트산(TCA)]을 첨가하여 반응을 정지시켰다. 샘플 블랭크는 유사한 방법으로 준비하였지만 TCA 용액 후에 동일한 부피의 효소 용액을 첨가하였다.

[0245] 상기 반응에서 형성된 요소는 세계 보건기구(WHO)에 기재된 DAMO 직접 비색법을 사용하여 정량화되었다. 상기 프로토콜은 혈액 요소 농도 측정을 위한 표준 운영 절차(SOP)로 WHO에 의해 채택되었다. SOP와 관련하여 몇몇 시약을 준비하였고, 혼합 산 시약(mixed acid reagent)은 100 mL 농축 황산을 400 mL 증류수에 천천히 첨가 후 0.3 mL 스톡 산 시약(stock acid reagent)(15 mL의 증류수 내 0.5 g의 염화 제이철 6 수화물(ferric chloride hexahydrate)에 농축 인산으로 최종 25 mL로 조정)을 첨가하여 제조하였다. 혼합 색상 시약은 35mL 스톡 색상 시약 A (50mL 증류수에 DAMO 1g)와 스톡 색상 시약 B 35mL(50 mL 증류수에 0.25 g의 티오세미카르바지드(thiosemicarbazide)를 혼합하고 증류수로 최종 부피 500 mL로 조정하여 제조하였다. 실시가능(working) 요소 표준은 5 mL의 스톡 요소 표준(50mL 벤조산에 0.5g의 요소)을 45 mL 벤조산(1g/dL)에 첨가하여 제조하였다. DAMO 분석은 100 μ L의 20 배 희석된 반응 혼합물을 유리 비등 튜브(glass boiling tube)에 첨가 후, 3 mL의 발색 시약을 첨가하여 수행하였으며, 여기서 증류수, 혼합 색상 시약(mixed color reagent), 혼합 산 시약(mixed acid reagent)을 1:1:1의 비율로 혼합하여 신선하게 제조하였다. 튜브는 100℃에서 15 분간 인큐베이션 후, 5 분간 실온으로 냉각시켰다. 540 nm에서 흡광도를 측정하였고, 아르기나제의 한 단위는 아르기닌의 마이크로 몰(mM)을 37℃, pH 7.4에서 1 분당 오르니틴과 요소로 전환시키는 효소의 양으로 정의된다. 효소 활성은 하기 방정식을 사용하여 계산하였으며 샘플의 흡광도 값은 블랭크에서 삭감하였다:

[0246] $DA_{540nm} \text{ 샘플} = A_{540nm} \text{ 샘플} - A_{540nm} \text{ 샘플 블랭크}$

[0247] 생산된 요소의 양은 표준 곡선으로부터 계산된다:

[0248] 단위/mL 효소 = (자유화된 요소(liberated urea)의 마이크로 몰(mM) (df)/(5)(0.3)

[0249] df = 효소의 희석 인자(dilution factor)

[0250] 0.3 = 사용된 효소의 부피 (mL)

[0251] 5 = 단위 정의(unit definition) 당 분석 시간(분)

[0252] **실시예 11: 단백질 농도의 결정**

[0253] 단백질 농도는 Bradford의 분석에 의해 결정하였다. 단백질 분석 염색 시약 농도(Bio-rad)를 사용 전 5 배 희석하였다. 20 μ L의 샘플을 1 mL의 희석한 염료 시약과 혼합 후 실온에서 10 분간 배양하였다. 단백질 농도를 결정하기 위해 혼합물을 0-1 mg/mL 범위의 표준으로 Quick Start 소혈청 알부민 표준 세트(Bio-rad)를 사용하여 595 nm에서 측정하였다.

[0254] **실시예 12: BHA(서열번호 75) 융합 단백질의 효소 활성**

[0255] BHA(서열번호 75)의 아르기닌 이화 활성(catabolic activity)을 분석하여 HSA의 존재 하에 효소 활성이 영향을 받는지 여부를 확인하였다. 그 결과 BHA(서열번호 75)의 활성은 활성 분석에 첨가된 다양한 양의 HSA에 영향을 받지 않는 것으로 나타났다. 결합 연구에서 테스트 된 BHA:HSA의 몰비는 1:10, 1:5, 1:1, 5:1 및 10:1 이었다. 이 모든 조건에서 BHA(서열번호 75) 단독과 BHA-HSA 복합체의 측정된 비활성은 매우 유사했으며 약 200 U/mg 이었다.

[0256] **실시예 13: 비변형 PAGE 분석에 의한 N-ABD-rhArg (서열번호 49) 또는 BHA (서열번호 75)의 HAS 결합**

[0257] ABD가 rhArg 또는 BCA에 융합될 때, 상기 융합 단백질이 알부민 결합 능력과 효소 활성을 모두 유지하는 것이 중요하다. 상기 융합 단백질에서 ABD의 결합능을 입증하기 위해 고정량의 인간 혈청 알부민(HSA)을 N-ABD-rhArg(서열번호 49) 또는 BH (서열번호 75)와 서로 다른 몰비로 배양하였다. 반응 혼합물은 단백질이 크기 및 형태별로 분리된 비변성 PAGE에서 이들의 고유 조건에서 분석하였다.

[0258] 도 7에서, HSA와 N-ABD-rhArg(서열번호 49) 각각의 이동성은 비변성 PAGE의 레인 2와 3에 각각 나타내었다(도 7). N-ABD-rhArg(서열번호 49)에 대해 고정된 양의 HSA (30 pmol)를 다양한 몰비로 적정하고 그 결과는 레인 5-9에 나타내었다. 결합 반응에서 N-ABD-rhArg(서열번호 49)의 양을 증가시키으로써, 유리 HSA의 양은 비례적으로 감소하였고 따라서 HSA에 대한 N-ABD-rhArg (서열번호 49)의 특이적 결합을 나타내었다. 도 8에서, HSA와 BHA (서열번호 75) 각각의 이동성은 비변성 PAGE의 레인 6과 7 에 각각 나타내었다(도 8). 고정량의 HSA(60

pmoles)를 BHA(서열번호 75)에 대해 다양한 몰비로 적정하였으며 그 결과는 Lanes 1-5에 나타내었다. 결합 반응에서 BHA(서열번호 75)의 양을 증가시켰으로써, 유리 HSA의 양은 비례적으로 감소하였고 따라서 HSA에 대한 BHA(서열번호 75)의 특이적 결합을 나타내었다.

[0259] **실시예 14: BHA(서열번호 75)의 생체 내 연구**

[0260] 8 주령 BALB/c 마우스 6 마리를 BHA(서열번호 75)의 생체 내 연구에 사용 하였다. BHA(서열번호 75) 주입 전에 각 마우스에서 채혈하여 대조군(0 시간)으로 사용하였다. 마우스를 복강 내(i.p.) 및 정맥 내(i.v.) 주사를 위해 각각 무작위로 두 그룹으로 나누었다. BHA(서열번호 75)(250U)를 각 마우스에 주입하고, 주입 후 6, 24, 72, 120 시간에 혈액 샘플을 채취하였다. 아르기닌과 오르니틴 함량에 대해 아미노산 분석기(Biochrom)로 16 μ L의 각 혈액 샘플의 혈장을 분석하였다.

[0261] BHA의 생체 내 아르기닌-고갈 효과(BHA 서열번호 75)는 BALB/c 마우스를 대상으로 연구하였으며, 도 9에 보이는 바와 같이 BCA(S161C)-His(서열번호 89)와 비교하였다. 결과에 따르면 혈장 아르기닌 수준은 BCA (S161C)-His (서열번호 89) 주입 후 24 시간 이내에 빠르게 정상으로 돌아왔다(도 9). 반면에, BHA(서열번호 75)는 주사 후 최소 24 시간 동안 검출할 수 없는 수준의 혈장 아르기닌이 유지되었다(도 9). 이러한 결과는 ABD의 융합이 생체 내 BCA (S161C)-His(서열번호 89)의 순환 반감기를 연장시켰음을 나타낸다. 이들 결과는 ABD 융합이 아르기닌 고갈 효소의 약력학적 특성을 개선하기 위한 실행 가능하고 유망한 전략임을 입증한다. 투여 경로는 생체 내 BHA (서열번호 75)의 아르기닌 고갈 효과에 영향을 미치지 않는 것으로 보인다(도 9). 또한 모든 마우스는 명백한 부작용이 관찰되지 않았기 때문에 BHA(서열번호 75) 투여에 대해 우수한 내성을 보였다. 종합하면, BHA(서열번호 75)와 같은 본원에 기재된 상기 융합 단백질은, 천연의 BCA(S161C)-His (서열번호 89)(8 시간)을 ABD 융합 없이 사용할 때보다 훨씬 더 긴 기간(적어도 24 시간) 동안 혈장 아르기닌을 검출 불가능한 수준으로 감소시켰으로써, ABD 융합 전략의 타당성을 입증하였다.

[0262] **실시예 15: N-ABD-rhArg (서열번호 49)의 생체 내 약리학 연구**

[0263] 아르기나제의 항암 효과는 오랜 기간 동안 조사되어 왔다(Greenberg and Sassenrath, 1953, Cancer Res. 13, 709-715). 아르기나제는 체외에서 매우 우수한 항암 효과가있는 것으로 밝혀졌다. 그러나 짧은 혈장 반감기로 인해 생체 내에서는 효과가 거의 관찰되지 않았다. 혈장 아르기닌은 천연 아르기나제를 C3H 마우스에 주입한 지 3 시간 후 최저 수준으로 떨어졌다. 아르기닌은 동일 모델에서 주사 5 시간 후 정상 기저 수준으로 증가하였다(Greenberg and Sassenrath, 1953, Cancer Res. 13, 709-715). 따라서 아르기나제는 혈장 반감기가 짧아 효과가 없는 항암제로 간주되었다. 이는 혈장 반감기가 생체 내 효소 약물의 효능에 영향을 미칠 수 있음을 시사하였다. N-ABD-rhArg (서열번호 49)와 N-ABD094-rhArg (서열번호 50)는 유사한 비활성을 나타내었다. 본 발명자들은 ABD와의 융합을 통해 rhArg (서열번호 103)의 혈장 반감기를 연장하는 것이 효과적인 방법임을 발견하였다. 혈장 반감기가 연장된 rhArg(서열번호 103)의 생산 비용을 줄이기 위해 N-ABD-rhArg(서열번호 49)와 N-ABD094-rhArg(서열번호 50)를 개발하였다.

[0264] 15 마리의 암컷 BALB/c 마우스(10 주령)를 연구에 사용하였다. 그들은 우리 당 5 개의 군으로 보관하였다. 단일 용량의 N-ABD-rhArg(서열번호 49) (각각 500 U, 250 U 및 125 U)를 복강 내(i.p.) 주사를 통해 마우스에 투여하였다. 헤파린화된(heparinized) 모세관을 사용하여 복제 정맥(saphenous vein)에서 혈액 샘플을 채취하고 800x g에서 원심분리하여 혈장을 얻었다. 16 mL의 혈장 샘플을 Biochrom 30 아미노산 분석기를 사용하여 L-아르기닌 농도를 측정하였다. 결과는 도 10에 나타내었다. 혈장 아르기닌 농도를 측정한 결과, BALB/c 마우스에서, 500 U의 N-ABD-rhArg(서열번호 49)는 혈장 아르기닌을 최소 9 일 동안 Biochrom 30 아미노산 분석기(3 μ M)의 검출 한계보다 낮은 수준으로 고갈시킬 수 있고, 250 U의 N-ABD-rhArg(서열번호 49)는 혈장 아르기닌을 최소 7 일 동안 Biochrom 30 아미노산 분석기의 검출 한계 미만으로 고갈시킬 수 있고, 125 U의 N-ABD-rhArg(서열번호 49)는 최소 3 일 동안 혈장 아르기닌을 Biochrom 30 아미노산 분석기의 검출 한계 미만으로 고갈시킬 수 있음을 보여주었다. 이러한 결과는 rhArg의 혈장 반감기가 ABD와의 융합에 의해 연장될 수 있음을 분명히 제시한다. BHA(서열번호 75)(도 9)와 비교할 때 N-ABD-rhArg (서열번호 49)는 마우스에서 매우 낮은 수준으로 매우 긴 기간 동안 아르기닌을 고갈시킬 수 있으며, 이는 상기 융합 단백질의 합리적인 디자인에 대한 요구 사항의 중요성을 강조한다.

[0265] **실시예 16: N-ABD094-rhArg (서열번호 50)의 생체 내 약리학 및 약동학 (pharmacodynamics and pharmacokinetics) 연구**

[0266] 50 마리의 C57BL/6J 수컷 마우스(10-12 주령)를 연구에 사용하였다. 500 U의 N-ABD094-rhArg(서열번호 50)의

단일 용량을 복강 내(i.p.) 주사를 통해 마우스에 투여하였다. 헤파린화된(heparinized) 모세관을 사용하여 복재 정맥(saphenous vein)에서 혈액 샘플을 채취하고 800x g에서 원심분리하여 혈장을 얻었다. 5 mL의 혈장 시료를 Agilent 6460 액체 크로마토그래피/전기 분무 이온화(Electrospray Ionization) 삼중 사극자 질량 분석기(Triple Quadrupole Mass Spectrometer)(L-아르기닌의 검출 한계: 0.3 μ M)를 사용하여 액체 크로마토그래피-탠덤 질량 분석법으로 L-아르기닌 농도를 측정하였다. 인간 아르기나제를 특이적으로 검출하고 마우스 아르기나제와 반응하지 않는, 인간 아르기나제 I 효소-결합 면역흡착 측정법(Enzyme-Linked Immunosorbent Assay; ELISA)을 이용하여 5 μ L의 혈장 샘플을 이용하여 N-ABD094-rhArg (서열번호 50)의 농도를 측정하였다.

[0267] 주사 후, 혈청은 2 시간, 4 시간, 8 시간, 16 시간, 24 시간 (제 1 일) 및 제 2 일부터 제 12 일까지 24 시간 간격으로, 제 12 일부터 제 30 일까지 72 시간 간격으로 수집하였다. 사용된 동물 수의 균형을 맞추고 혈액 채취 결과로 마우스에서 N-ABD094-rhArg(서열번호 50)를 제거하여 발생하는 약동학 및 약력학 연구 결과에 미치는 영향 최소화하기 위하여, 마우스를 각 그룹에서 n = 5로 10 개의 그룹으로 나누고 괄호 안에 표시된 표시된 시점에 혈액을 수집하였다. 그룹 1 (2 시간), 그룹 2 (4 시간), 그룹 3 (8 시간), 그룹 4 (16 시간), 그룹 5 (24 시간), 그룹 6 (제 2 일, 제 7 일, 제 12 일), 그룹 7 (제 3 일, 제 8 일, 제 18 일), 그룹 8 (제 4 일, 제 9 일, 제 21 일), 그룹 9 (제 5 일, 제 10 일, 제 15 일, 제 24 일), 그룹 10 (제 0 일, 제 6 일, 제 11 일, 제 27 일, 제 30 일). 약력학 및 약동학 결과는 각각 도 13 및 도 14에 나타내었다.

[0268] 혈장 아르기닌 농도를 측정한 결과, 500 U의 N-ABD094-rhArg(서열번호 50)를 복강 내(i.p.) 주사를 통한 주입은 주입 후 2 시간 이내에 혈장 아르기닌 농도를 1 μ M까지 고갈시킬 수 있다 (도 13). 혈장 아르기닌 농도는 10 일 동안 $\leq 1 \mu$ M로 유지된 후 이후의 날들에 점진적으로 증가하였다(표 4). 혈장 아르기닌의 농도는 제 18 일부터 제 21 일 사이에 기본 수준의 절반으로 회복되었다. 이러한 결과는 N-ABD094-rhArg(서열번호 50)가 마우스에서 매우 낮은 수준 ($\leq 1 \mu$ M)의 혈장 아르기닌을 예외적으로 장기간 유지할 수 있음을 제시한다.

[0269] 표 4. 500 U의 N-ABD094-rhArg(서열번호 50)의 복강 내(i.p.) 주사 이전 및 이후 다른 시점에서의 혈장 아르기닌 농도

주사 후 시점	혈청 아르기닌 농도 (μM) (5 마리 마우스의 평균 ± SEM)
0	134.543 ± 3.791
2 시간	1.007 ± 0.013
4 시간	0.934 ± 0.021
8 시간	0.912 ± 0.006
16 시간	0.943 ± 0.010
24 시간	0.934 ± 0.007
제 2 일	0.944 ± 0.007
제 3 일	0.965 ± 0.008
제 4 일	0.535 ± 0.121
제 5 일	0.681 ± 0.043
제 6 일	0.896 ± 0.089
제 7 일	0.792 ± 0.135
제 8 일	0.916 ± 0.079
제 9 일	1.224 ± 0.178
제 10 일	0.721 ± 0.054
제 11 일	3.828 ± 1.511
제 12 일	7.607 ± 2.325
제 15 일	31.283 ± 4.569
제 18 일	48.648 ± 3.989
제 21 일	73.55 ± 3.76
제 24 일	76.07 ± 4.92
제 27 일	111.09 ± 6.21
제 30 일	110.91 ± 3.81

[0270]

[0271] 약동학적 매개 변수는 2 개의 구획 모델로 계산된다.

[0272] 제거율 상수 k_e 는 하기 식으로 계산된다:

[0273]
$$k_e = \frac{\ln C_1 - \ln C_2}{t_2 - t_1}$$

[0274] 반감기 $t_{1/2}$ 는 하기 식으로 계산된다:

[0275]
$$t_{1/2} = \frac{\ln 2}{k_e}$$

[0276] 곡선하 면적(AUC)은 하기 식을 사용하여 사다리꼴 규칙(trapezoidal rule)으로 계산된다:

[0277]
$$AUC_{t_1-t_2} = \frac{(C_1 + C_2)}{2} \times (t_2 - t_1)$$

[0278] 비교를 위해 문헌에서보고된 천연 rhArg의 반감기를 사용하였다. 상기 단백질 N-ABD094-rhArg(서열번호 50)는 제거 반감기가 3.9 ± 0.3 일로(도 14), 반감기가 훨씬 더 짧은 비 융합 단백질 rhArg보다 훨씬 느리게 제거됨을 의미한다. 구체적인 비교를 위해 인간 아르기나제는 순환 시 반감기가 단지 몇 분(Georgiou et al., US

8440,184 B2)에 불과하며, 이는 결합(conjugation)이 순환 시간을 극적으로 연장함을 보여준다. 이러한 결과는 rhArg의 혈장 반감기가 ABD와의 융합에 의해 엄청나게 연장될 수 있음을 분명히 제시한다. 천연 ADI의 순환 반감기(몇 시간)는 폐길화에 의해 연장되었다(Ensor et al., Cancer Res 2002, 62 : 5443-5450). 상기 폐길화된 ADI는 2 내지 3 일의 순환 반감기를 가졌으며 오직 폐길화된 ADI(천연 ADI가 아님)만이 생체 내에서 종양의 성장을 억제하는 데 효과적이었다. 복강 내(i.p.) 주사를 통해 래트에 투여된 천연 rhArg 및 폐길화된 rhArg를 비교하면, 래트 당 1,500 U의 폐길화된 rhArg(래트 당 6 U/g) 투여는 순환 아르기닌을 6 일 동안 아미노산 분석기(3 μM)의 검출 한계 이하 수준으로 고갈시킬 수 있는 반면, 고용량의 천연 rhArg(래트 당 7,500 U)는 주사 후 3 시간 이내에 순환 아르기닌을 약 20 μM으로 감소시켰으며, 아르기닌은 주사 후 약 2 일에 기본 수준으로 회복되었다(Tsui et al., Cancer Cell Int. 2009 Apr 17;9:9). 천연 아르기나제는 몇 분 안에 순환에서 제거된다(Savoca et al., Cancer Biochem. Biophys. 7 : 261-268, 1984). 임상 사용을 위해서는 아르기나제가 순환하는 동안 몇 일 또는 몇 주 동안 지속될 수 있도록 설계되어야 한다. 여하한 변형이 없는 경우, 인간 아르기나제는 신장에 의한 여과를 피할만큼 크기가 크지 않기 때문에 순환에서 반감기가 단 몇 분 밖에 되지 않는다(Georgiou et al., US 8440,184 B2). 따라서, 본 발명은 치료 용으로 극적으로 개선된 순환 지속성(circulation persistence)을 갖는 완전히 새롭고 고도로 개선된 형태의 아르기나제를 개발하였다.

[0279] **실시예 17: N-ABD094-rhArg (서열번호 50) 처리는 정상 마른 마우스에서 지방 질량을 감소시키고, 지질 형성을 억제하며, 인슐린 민감성을 개선시킨다**

[0280] 본 발명자들의 마우스 모델에 대한 데이터에 따르면, 500 U의 N-ABD094-rhArg(서열번호 50)를 8 주령의 정상 마른 C57BL/6J 수컷 마우스에 단일 복강 내(i.p.) 주사하면 최소 10 일 동안 혈장 아르기닌 농도를 ≤1 μM로 유지할 수 있었으며, 이는 N-ABD094-rhArg(서열번호 50)(도 13)의 긴 순환 반감기를 나타낸다. 따라서, 본 발명자들은 일반 사료를 먹인 정상적인 마른 C57BL/6J 수컷 마우스에 500 U의 N-ABD094-rhArg(서열번호 50)를 10 일 간격으로 4 주 동안 복강 내(i.p.) 주사를 통해 투여하였다. 치료 4 주 후, 비히클(식염수)을 주사한 대조군 마우스와 비교하여 내장(성선 주위, 창막 주위 및 장간막) 및 피하(설측 지방 패드) 지방 질량(도 15A)이 25% 이상 감소하였다. 내장 백색 지방 조직(WAT)의 조직학적 검사는 지방 세포 크기의 현저한 감소를 보여 주었다(도 15B). 본 발명자들은 추가로 지방 생성을 분석한 결과 N-ABD094-rhArg(서열번호 50)로 처리한 마우스에서 아세틸-CoA 카르복실라제 1(Acc1), 지방산 합성 효소(Fasn) 및 스테아로일-CoA 불포화 효소 1(Scd1)을 포함한 몇몇 주요 지질 생성 효소의 mRNA 수준이 내장 WAT(도 16A) 및 간(도 16B)에서 극적으로 억제되었음을 발견하였다.

[0281] 비만은 저항성과 밀접한 관련이 있다. 따라서 본 발명자들은 N-ABD094-rhArg (서열번호 50)의 치료가 인슐린 민감성에 영향을 미치는지 알아보기 위해 생체 내 및 시험관 내 연구를 모두 수행하였다. 내성 시험(ITT) 결과 N-ABD094-rhArg(서열번호 50)로 치료한 마우스는 약물 치료 2 주 후 민감성이 상당히 증가한 것으로 나타났다(도 17A). 그후, 본 발명자들은 C57BL/6J 수컷 마우스로부터 준비한 1 차 간세포를 5U/mL N-ABD094-rhArg(서열번호 50)이 포함된 배지로 처리하여 간 민감성을 구체적으로 조사하였으며, 이 농도에서 세포 생존능에 영향을 미치지 않았다(도 17B). N-ABD094-rhArg(서열번호 50) 또는 대조군(N-ABD094-rhArg 미첨가) 배지에서 배양한 지 24 시간 후, 1 차 간세포를 100 nM으로 20 분 동안 자극하였다. 이후, 세포를 수집하여 웨스턴 블롯 분석을 통해 일반적으로 신호 전달의 마커로 사용되는 인산화된 단백질 키나제 B(pAkt)를 검출하였다. 상기 결과는 대조군과 비교했을 때, N-ABD094-rhArg(서열번호 50) 처리 군에서 Akt의 인산화가 현저하게 증가하여 간 인슐린 신호 전달(도 17C)의 향상을 보여주었다.

[0282] 정상적인 마른 마우스에 대한 발견은 N-ABD094-rhArg(서열번호 50)가 긴 순환 반감기를 가지고 있고, 지방 질량을 줄이고 지질 생성을 억제하며 생체 내 및 시험관 내에서 감도를 향상시킬 수 있음을 입증하였다. 이러한 결과는 ABD-rhArg 융합 단백질이 저항성 및 간 지방증(지방간)과 같은 비만 및 관련 대사 장애의 예방 및 치료에 사용될 수 있음을 뒷받침한다.

[0283] **실시예 18: N-ABD094-rhArg(서열번호 50) 처리는 HFD로 유발된 비만을 효과적으로 예방한다.**

[0284] 제조한 인간 아르기나제[N-ABD094-rhArg(서열번호 50)]를 이용한 치료는 정상적인 마른 마우스에서 지방 질량을 현저히 감소시키고 지질 형성을 억제하며 민감성을 향상시킬 수 있다.

[0285] N-ABD094-rhArg(서열번호 50)가 비만 동물의 지방 및 다양한 대사 변수에 미치는 영향을 테스트하였다. 인간 비만과 많은 특성을 공유하며 잠재적 항 비만 약제[Vickers et al., 2011, Br. J. Pharmacol. 164(4):1248-1262]를 테스트하는 데 널리 사용되는 고지방식이 유도 비만(DIO) 마우스 모델[Wang and Liao, 2012, Methods Mol. Biol. 821: 421-433]을 사용하였다. 구체적으로, 다 유전자(polygenic) 비만 모델에 가장 일반적으로 사용되는 마우스 균주인 C57BL/6J를 연구에 사용하였다. 고지방식이를 섭취한 C57BL/6J 마우스는 체중 증가가 두

드러지고 비만이 되며 고인슐린 혈증, 고혈당증, 내당능 장애 및 인슐린 저항성을 야기한다는 보고가 잘 알려져 있다[Gallou-Kabani et al., 2007, 비만 15(8):1996-2005].

- [0286] [00118] N-ABD094-rhArg(서열번호 50)가 마우스에서 식이로 유발된 비만 및 관련 대사 장애를 예방하는 효과를 확인하기 위해, C57BL/6J 수컷 마우스를 생후 8 주부터 12 주 동안 7 일 간격으로 60 kcal% 지방(HFD; Research Diets, D12492)이 포함된 고지방 식단을 섭취시켰으며 동시에 200U 내지 300 U의 N-ABD094-rhArg를 복강 내(i.p.) 주사하거나 비히클 대조군으로서 식염수를 섭취시켰다. C57BL/6J 마우스는 10 kcal% 지방(LFD; Research Diets, D12450J)을 포함하는 일치하는(matched) 저지방 식단을 공급하고 식염수를 주사한 마우스는 다양한 측정의 다른 대조군 역할을 하였다.
- [0287] 각 그룹에서 n = 5 인 두 코호트(cohorts)가 별도로 수행되었다. 마우스는 5 개의 그룹에 수용하였다. 2 개의 독립적인 코호트에서 유사한 결과가 얻어졌다. 한 개의 코호트 마우스의 데이터를 실시예 18-22에 요약하였다.
- [0288] LFD를 공급하고 비히클로 처리한 마른 대조군[LFD (비히클) 군으로 칭함]과 비교하면, HFD를 섭취시킨 비히클 처리된 수컷 마우스[HFD (비히클) 군으로 칭함]는 체중(도 18A)과 크기(도 18B)에서 현저한 증가를 보였으며, 주요 내장(성선 주위, 창막 주위 및 장간막) 및 피하(설측) 저장소(도 19A)에서 백색 지방 조직(WAT)의 질량이 크게 증가하였다. 그러나 HFD를 섭취시켰으나 동시에 N-ABD094-rhArg(서열번호 50)[HFD (rhArg) 군으로 칭함]를 병용 처리 한 마우스는 HFD 섭취로 인한 체중 증가와 WAT의 확장을 효과적으로 예방할 수 있었다. WAT의 조직학적 검사는 N-ABD094-rhArg(서열번호 50) 처리가 지방 세포 비대(adipocyte hypertrophy)를 현저하게 억제하는 것으로 나타났다(도 19B). gWAT에서 실시간 qRT-PCR을 사용한 mRNA 발현 수준의 분석은 퍼옥시좀 증식자 활성화 수용체 감마(peroxisome proliferator-activated receptor gamma; Pparg) 및 스테롤 조절 요소 결합 단백질 1c (sterol regulatory element-binding protein 1c; Srebp1c) 및 지질 생성 효소(Acc1 및 Scd1) 를 포함한 몇몇 중요한 지질 생성 전사 인자의 극적인 하향 조절을 추가로 보여 주었다(도 19C). 이들 유전자는 N-ABD094-rhArg(서열번호 50)를 처리한 HFD를 섭취시킨 마우스의 골격근에서도 상당히 하향 조절되었으며(도 20), 이는 N-ABD094-rhArg(서열번호 50)의 항-지질 형성 효과가 WAT에 국한되지 않음을 제시한다.
- [0289] N-ABD094-rhArg(서열번호 50)의 수컷 마우스에 대한 항 비만 효과를 확인 후, N-ABD094-rhArg(서열번호 50)가 암컷 마우스(각 그룹당 n = 5)에 미치는 영향을 연구하여 성별 차이가 있는지 확인하였다. 그 결과, N-ABD094-rhArg (서열번호 50)를 병용 투여하는 것이 12 주 동안 생후 8 주부터 HFD를 먹인 암컷 마우스를 체중 증가(도 21A) 및 주요 내장(성선 주위, 창막 주위 및 장간막) 및 피하(설측) 저장소에서 과도한 WAT 축적(도 21B)으로부터 보호하는 것과, 인슐린 민감성(도 22A) 및 내당능(도 22B)을 향상시킬 수 있는 유사한 효과가 있음을 보여주었다.
- [0290] N-ABD094-rhArg(서열번호 50)가 지방 세포에 미치는 영향을 시험하기 위해, 일반적으로 지질 생성을 연구하기 위한 세포 기반 모델로 사용되는 마우스 3T3-L1 전지방세포(pre-adipocytes)를 사용하였다[Green and Meuth, 1974, Cell 3:127-133]. N-ABD094-rhArg(서열번호 50)는 3T3-L1 세포(도 23)에서 지방 생성과 지질 생성을 효과적으로 억제할 수 있으며, 여러 지방 생성 전사 인자(도 24A) 및 지질 생성 효소(도 24B)의 mRNA 수준을 상당히 억제하는 것으로 나타났다. 3T3-L1 전지방세포를 소의 아르기나제 또는 다른 아르기닌 고갈 효소(ADI) 또는 아르기닌이 없는 배지(도 23)에서 배양했을 때 유사한 억제 효과가 관찰되었다. 아르기나제는 L-아르기닌을 L-오르니틴과 요소로 변환하는 반면, ADI는 L-아르기닌을 L-시트룰린으로 변환시킨다. 그러나 L-오르니틴, 요소 또는 L-시트룰린은 3T3-L1 세포에서 지방 생성과 지질 생성을 억제할 수 없었다(도 23).
- [0291] 더욱이, 다양한 농도의 L-아르기닌으로 아르기닌이 없는 배지를 보충 시 아르기닌이 지방 형성 및 지질 형성에 미치는 용량 의존적 효과가 입증되었으며(도 25A), Cebpa 및 Pparg 및 지질 생성 효소 Scd1 을 포함하는 중요한 지방 생성 전사 인자의 활성화를 위한 아르기닌의 역치 농도는 10-40 μ M 이었다(도 25B).
- [0292] 다함께, 이들 발견은 N-ABD094-rhArg (서열번호 50)의 항-지방 생성 및 지질 생성 효과가 아르기닌 고갈을 통해 매개된다는 것을 입증한다.
- [0293] 종합적으로, 이들 발견은 ABD-rhArg 융합 단백질 또는 다른 형태의 아르기나 제(예; rhArg-PEG, BCA-PEG 또는 BCA-ABD) 또는 아르기닌-고갈 효소(예; ADI-PEG, ADI-ABD, ADC-PEG 또는 ADC-ABD) 에 의한 아르기닌의 고갈을 뒷받침한다.
- [0294] **실시예 19: N-ABD094-rhArg (서열번호 50) 처리는 HFD로 유발된 인슐린 저항성, 내당능 장애(impaired glucose tolerance) 및 대사 교란(metabolic derangement)을 예방한다**
- [0295] 비만은 일반적으로 저항성, 내당능 장애 및 대사 장애와 관련이 있다. 실제로, LFD를 공급받은 비히클 처리된

마른 대조군 마우스와 비교하여, HFD를 공급 한 비히클 처리된 마우스는 인슐린 내성 시험(ITT)에서 주사된 인슐린의 혈당 저하 효과에 대한 민감성이 현저하게 감소한 것으로 나타났으며, 상기 테스트는 HFD(도 26A)를 섭취시킨 후 6 주에 수행되었으며 11 주(도 26B)에는 더욱 악화되었다. 감소된 인슐린 민감성과 더불어, 이들 마우스는 내당능 검사(GTT)에서, 5 주간 HFD를 섭취시킨 후 D-포도당을 주사 후 혈당이 기저 수준으로 회복되는 데 훨씬 덜 효율적이었으며(도 27A), 이는 이는 HFD 섭취 10 주 후 더욱 악화된 내당능 장애의 발생을 의미한다(도 27B). 실제로 공복 (5 시간) 혈당(도 28A)과 공복 인슐린 혈장 수치(도 28B)가 상당히 상승하였으며 인슐린 저항성의 측정치인 HOMA-IR 점수(도 28C)는 비히클 처리 된 HFD를 섭취시킨 마우스가 마른 대조군 마우스에 비해 더 높았다. 랩틴(도 29A), 총 콜레스테롤(도 29B), 중성 지방(도 29C) 및 유리 지방산(도 29D)의 공복 혈장 수치는 HFD 섭취 후 12 주에 측정했을 때 상당히 증가하였다. 주목할만하게도, N-ABD094-rhArg(서열번호 50)를 병용 투여하면 HFD 로 유발된 인슐린 저항성, 내당능 장애, 고혈당증, 고인슐린혈증, 고렙틴혈증, 고콜레스테롤혈증, 고중성지방혈증, 고지방산혈증(hyper-free fatty acidemia)을 완전히 예방할 수 있다.

[0296] 이들 결과는 N-ABD094-rhArg(서열번호 50)가 제 2 형 당뇨병 발병의 선행 증상(precursor)인 인슐린 저항성과 포도당 불내성(glucose intolerance)을 효과적으로 예방할 수 있음을 보여준다. 또한 비만과 관련된 이상지질혈증을 포함한 랩틴 내성 및 기타 대사 장애를 예방할 수 있다.

[0297] 종합적으로, 이들 결과는 ABD-rhArg 융합 단백질 또는 다른 형태의 아르기나제(예: rhArg-PEG, BCA-PEG 또는 BCA-ABD) 또는 아르기닌-고갈 효소(예: ADI-PEG, ADI-ABD, ADC-PEG 또는 ADC-ABD)가 예방적 항-당뇨병, 항-이상지질혈증, 항-죽상동맥경화증 및 항-대사 이상 장애의 치료요법에 사용될 수 있음을 뒷받침한다.

[0298] **실시예 20: N-ABD094-rhArg(서열번호 50) 처리는 HFD로 유발된 지방증을 예방한다**

[0299] 지방증은 세포 내 지질의 비정상적 체류를 의미한다. 비 알코올성 간 지방증 (비-알코올성 지방간)은 비만과 관련된 일반적인 동반 질환이다. 초기에는 무증상이지만 간에 염증이 생기면 지방 간염이 되고, 이는 섬유증으로 진행될 수 있으며 더 진행된 단계에서는 간경변으로 발전하여 간세포 암종이 될 위험을 크게 증가시킨다. 실제로, 비히클 처리된 마우스에서 HFD를 섭취시킨 경우, 간은 눈에 띄게 커졌고 색이 옅었으며(도 30A), 무게는 마른 대조군 마우스의 무게의 거의 2 배였다(도 30B). Oil red O로 간 절편을 염색한 결과, 큰 지질 방울(도 31A)이 광범위하게 축적되어 중성 지방의 농도가 10 배 증가하였다(도 31B). 이들 발견과 더불어, 일반적으로 간 손상에 대한 바이오 마커로 측정되는 알라닌 아미노 트랜스퍼라제(ALT)의 혈청 수준이 상당히 상승하였다(도 32). 주목할만하게도, N-ABD094-rhArg(서열번호 50)를 병용 투여하면 HFD를 섭취시킨 마우스의 간에 과도한 지질 축적을 효과적으로 예방할 수 있어서, 간의 무게와 중성 지방 함량, 그리고 ALT의 혈청 수준은 마른 대조군과 유사하였다. 이들 발견과 같은 맥락에서, HFD가 간에서 몇몇 중요한 지방 생성 전사 인자와 지질 생성 효소의 상당한 상향 조절을 유도한 반면, N-ABD094-rhArg(서열번호 50)로 처리하면 이러한 유전자의 상향 조절을 상당히 억제할 수 있었다(도 31C). 이들 결과는 N-ABD094-rhArg(서열번호 50)가 간 지방증 예방에 매우 효과적이라는 것을 보여준다.

[0300] 간 이외에 비만은 또한 신장(신장 지방증), 췌장(췌장 지방증) 및 심장(심장 지방증)에 지질이 과도하게 축적되어, 이들 기관의 지질 독성 및 기능 장애를 유발한다. 실제로, HFD를 섭취시킨 비히클 처리된 마우스에서 신장(도 33A), 췌장(도 33B) 및 심장(도 33C)의 무게가 현저하게 증가한 것으로 나타났다. N-ABD094-rhArg(서열번호 50)를 병용하면 이들 기관의 체중 증가를 효과적으로 예방할 수 있으며, 이는 N-ABD094-rhArg(서열번호 50)가 이들 기관의 과도한 지질 축적과 지질 독성을 예방할 수 있음을 암시한다.

[0301] 종합적으로, 이들 결과는 ABD-rhArg 융합 단백질이 지방증을 효과적으로 예방할 수 있고, N-ABD094-rhArg(서열번호 50) 또는 다른 형태의 아르기나제(예: rhArg-PEG, BCA-PEG 또는 BCA-ABD) 또는 아르기닌-고갈 효소(예: ADI-PEG, ADI-ABD, ADC-PEG 또는 ADC-ABD)에 의한 아르기닌 고갈이 예방적 항-지방증 치료요법으로 사용될 수 있음을 뒷받침한다.

[0302] **실시예 21: N-ABD094-rhArg(서열번호 50)처리는 HFD로 유발된 만성 염증을 예방한다**

[0303] WAT의 과도한 확장은 많은 아디포카인의 생성을 증가시켜 만성 저-등급 염증을 유발하여 인슐린 저항성을 야기하게 한다. 단핵구 화학 유인 단백질 -1 (Monocyte chemoattractant protein-1; Mclp1)은 WAT에 의해 분비되는 주요 염증촉진 아디포카인 중 하나로서, 비만에서 WAT 로의 대식세포의 침윤, 인슐린 저항성 및 간 지방증을 조절한다. 실제로, 본 발명자들은 HFD를 섭취시킨 비히클 처리 마우스의 성선 주위(perigonadal) WAT에서 Mclp1의 mRNA 수준이 상당히 상향 조절되었음을 발견하였다(도 34A). 이와 더불어, ELISA에 의해 측정된 순환성 Mclp1의 혈청 수준은 마른 대조군(도 34B)에 비해 상당히 상승하였다. 인터루킨 1 베타(interleukin 1 beta; *Il1b*) 및

종양 괴사 인자 알파(tumor necrosis factor alpha; Tnfa)를 포함하는 다른 염증촉진 아디포카인은 또한 성선 주위(perigonadal) WAT에서 증가된 mRNA 발현을 나타내었다(도 34A). 주목할만하게도, N-ABD094-rhArg(서열번호 50)의 병용 치료는 성선 주위(perigonadal) WAT에서 이러한 아디포카인의 상향 조절을 억제하고 Mcp1의 혈청 수준 상승을 억제할 수 있다.

[0304] 이들 결과는 N-ABD094-rhArg(서열번호 50)가 비만과 관련된 만성 저-등급 염증을 예방하고, ABD-rhArg 융합 단백질 또는 다른 형태의 아르기나제(예: rhArg-PEG, BCA-PEG 또는 BCA-ABD) 또는 아르기닌-고갈 효소(예: ADI-PEG, ADI-ABD, ADC-PEG 또는 ADC-ABD)에 의한 아르기닌 고갈이 예방적 항-염증 치료요법으로 사용될 수 있는 가능성(potential)을 뒷받침한다.

[0305] **실시예 22: N-ABD094-rhArg (서열번호 50)처리는 갈색 지방 조직에서 HFD로 유발된 백색화를 예방하고, 지방산 산화 조절을 완화(deregulation)하며, 비떨림열생산(non-shivering thermogenesis)을 개선시킨다.**

[0306] 갈색 지방 조직(BAT)은 산화성 연료를 열로 분산시키는 역할을 한다 (떨림없는 열 발생(non-shivering thermogenesis)). 최근 연구에 따르면 비만에 대응할 수 있는 에너지 소비 능력이 크다고 한다. 반대로 BAT의 백색화는 비만과 관련이 있으며 BAT 기능을 손상시킨다. 실제로, 본 발명자들은 HFD를 섭취시킨 비히클 처리 마우스에서 견갑골 간(interscapular) BAT가 눈에 띄게 비대해졌고(도 35A), 무게가 마른 대조군 마우스(도 35B)의 2 배로 증가되었음을 발견하였다. 조직학적 검사에서는 다엽(multilobular) 갈색 지방 세포(도 35C) 사이에 산재된 큰 단엽(unilobular) 세포가 광범위하게 축적되어 갈색 지방 세포가 흰색 같은(white-like) 세포로 전환된 것으로 나타났다. 그러나 N-ABD094-rhArg(서열번호 50)를 동시에 처리한 HFD를 섭취시킨 마우스에서 BAT의 무게, 크기 및 조직학적 외관은 마른 대조군 마우스와 유사하였다. 본 발명자들은 또한 N-ABD094-rhArg(서열번호 50) 처리가 지방산 산화에 관여하는 주요 유전자인 Acyl-CoA oxidase 1(Acox1)의 HFD로 유발된 하향 조절을 억제하는 한편(도 36), 열 발생에 중요한 BAT 특이 유전자 탈공역 단백질(Uncoupling protein 1; Ucp1)을 상당히 상향 조절하고, 갈색 지방 세포에서 Ucp1의 주요 전사 조절제인 퍼옥시좀증식제-활성화된 수용체 감마 보조 활성화제 1-알파(peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha; Pgc1a)를 상향 조절한다는 것을 발견하였다. N-ABD094-rhArg(서열번호 50) 처리는 Acox1의 하향 조절을 차단함을 발견하였으며, 이는 지방산 산화를 정상화 시의 N-ABD094-rhArg(서열번호 50)의 잠재력을 나타낸다.

[0307] 종합하면, 이들 결과는 N-ABD094-rhArg(서열번호 50) 처리가 비만과 관련된 BAT에서 갈색 지방의 백색화 및 지방산 산화의 조절 완화를 효과적으로 예방할 수 있으며 또한 HFD의 지방화(adiposity) 효과에 대항하기 위해 떨림없는 열 발생을 향상시킴을 입증한다.

[0308] 이들 결과는 ABD-rhArg 융합 단백질 또는 다른 형태의 아르기나제(예: ABD094-rhArg, BCA-PEG 또는 BCA-ABD) 또는 아르기닌-고갈 효소(예: ADI-PEG, ADI-ABD, ADC-PEG 또는 ADC-ABD)에 의한 아르기닌 고갈이 예방적 항-비만 치료요법으로 사용될 수 있는 가능성(potential)을 뒷받침한다.

[0309] **실시예 23: N-ABD094-rhArg(서열번호 50) 처리는 HFD로 유발된 비만을 효과적으로 감소시킨다**

[0310] N-ABD094-rhArg(서열번호 50)의 병용 치료가 HFD로 유발된 비만 및 관련 합병증 및 저항성, 포도당 불내성, 고혈당증, 이상 지질 혈증, 간지 방증, 만성 염증, BAT의 백색화를 포함한 동반 질환을 효과적으로 예방할 수 있음을 확인한 후, 본 발명자들은 N-ABD094-rhArg(서열번호 50)의 비만 감소 및 기존식이 유발 비만(DIO) 마우스에서 이러한 장애를 역전시키는 효과를 연구하였다. C57BL/6J 수컷 마우스는 비만 및 관련 합병증 및 동반 질환을 유발하기 위해 5 주령부터 12 주 동안 HFD를 섭취시켰다. 그후, 체중에 따라 이들을 2 개의 그룹으로 분류하고 HFD를 계속 섭취시키면서 12 주 동안 7 일 간격으로 600-700U N-ABD094-rhArg(서열번호 50) 또는 비히클 대조군으로 식염수로 처리하였다. 한 그룹의 마우스에게 일치하는(matched) 저지방 식이(LFD)를 공급하고 연구기간 내내 식염수를 주사하여 다양한 측정의 마른 대조군 역할을 하였다. 각 그룹에서 n = 5인 두 코호트를 별도로 수행하였다. 마우스는 5 개의 그룹에 수용하였다. 2 개의 독립적인 코호트에서 유사한 결과를 얻었다. 한 코호트 마우스의 데이터를 실시예 23-28에 나타내었다.

[0311] 12 주간의 HFD 급식은 수컷 마우스의 체중을 50g 이상으로 증가시킬 수 있는데, 이는 LFD를 섭취시킨 마른 대조군 수컷 마우스보다 현저하게 무게가 많이 나갔다(도 37A 및 37B). N-ABD094-rhArg(서열번호 50) 처리 후 HFD로 유발된 비만 마우스의 체중이 점차 감소하였다. 5 주가 되자 체중이 30% 이상 감소하였으며 마른 대조군 마우스와 비슷하였다. 체중은 12 주 치료가 끝날 때까지 이 수준이 유지되었다. N-ABD094-rhArg(서열번호 50)를 처리한 DIO 마우스에서 주요 내장 저장소(성선 주위, 폐막 및 장간막 WAT) 및 피하 저장소(설측 WAT)에서 지방 패드의 무게가 크게 감소하였고 마른 대조군 마우스와 매우 유사하였다(도 38A). WAT의 조직학적 검사는 N-ABD094-

rhArg(서열번호 50) (도 38B)로 처리된 DIO 마우스에서 지방 세포의 현저한 감소를 보여 주었다.

- [0312] 실시예 18의 결과와 함께 이들 결과는 ABD-rhArg 융합 단백질 또는 다른 형태의 아르기나제(예: rhArg-PEG, BCA-PEG 또는 BCA-ABD) 또는 아르기닌-고갈 효소(예: ADI-PEG, ADI-ABD, ADC-PEG 또는 ADC-ABD)에 의한 아르기닌 고갈이 비만의 치료(therapeutic treatment)에 사용될 수 있는 가능성을 뒷받침한다.
- [0313] 실시예 24: N-ABD094-rhArg (서열번호 50) 처리는 HFD로 유발된 인슐린 저항성 및 내당능 장애를 역전시키고 대사 교란(metabolic derangement)을 교정한다
- [0314] 마른 대조군 마우스와 비교하여, 치료 전 12 주 동안 HFD를 섭취시킨 마우스는 당뇨병 전증(prediabetes)의 특징인 말초 저항성(도 39)과 내당능 장애(도 40)가 발병되었다. 그러나 N-ABD094-rhArg(서열번호 50) 처리 4 주 후 DIO 마우스는 마른 대조군 마우스에 상당하는 인슐린 민감성이 현저하게 증가한 것으로 나타났다. N-ABD094-rhArg(서열번호 50)를 투여받은 마우스에서 HFD를 지속적으로 공급받으면서도 인슐린에 대한 민감성의 정상화는 12 주의 약물 치료가 끝날 때까지 지속될 수 있다. 또한 N-ABD094-rhArg(서열번호 50)를 처리한 마우스는 처리 3 주째에 내당능(glucose tolerance)이 현저하게 개선되었으며, 7 주 처리 후 마른 대조군 마우스와 유사한 수준으로 완전히 회복되었다. 이러한 개선에 따라 N-ABD094-rhArg (서열번호 50)를 처리 한 DIO 마우스의 공복 혈당 (도 41A) 및 혈장 인슐린 (도 41B)은 rhArg 처리 4주 후 마른 대조군 마우스와 유사한 수준으로 회복되었고 치료가 끝날 때까지 정상 범위 내에서 유지되었다. 이것은 HOMA-IR 점수를 처리 전 마우스의 35.1에서 처리 4주 후 마우스의 1.2로 급격히 감소되었고(도 41C), 이는 인슐린 저항성의 역전(reversion)을 나타낸다,
- [0315] 종합적으로, 본 발명자들의 연구 결과는 N-ABD094-rhArg(서열번호 50)가 처리 4주 이내에 인슐린 저항성, 내당능 장애, 고혈당증, 고인슐린혈증, 고렙틴혈증 및 고콜레스테롤 혈증을 역전시키는 데 있어서의 뛰어난 효능을 보여준다.
- [0316] 종합적으로, 이들 발견은 rhArg 융합 단백질 또는 다른 형태의 아르기나제(예: rhArg-PEG, BCA-PEG 또는 BCA-ABD) 또는 아르기닌-고갈 효소(예: ADI-PEG, ADI-ABD, ADC-PEG 또는 ADC-ABD)에 의한 아르기닌 고갈이 인슐린 감작제(insulin-sensitizing agent)로 사용될 수 있고 또한 인슐린 저항성, 포도당 불내성 및 고혈당증 및 기타 인슐린 저항성 관련 장애를 특징으로 하는 당뇨병 전증(prediabetes) 및 제 2 형 당뇨병의 치료 가능성을 뒷받침한다. 아르기닌 고갈은 고렙틴혈증 및 고콜레스테롤혈증의 치료에도 사용할 수 있다.
- [0317] 실시예 25: N-ABD094-rhArg (서열번호 50) 처리는 HFD로 유발된 지방증을 역전시킨다
- [0318] 12 주간의 HFD 급식은 수컷 마우스에서 간 지방증을 유발하였다(도 30 및 31). 12 주 동안 HFD의 급식을 연장한 후, 간은 더 비대해지고 색이 옅어 보였다(도 43A). 간 무게는 마른 대조군 마우스(도 43B)의 2배 이상이었다. 대규모 지질 축적은 간 전체(도 44A)로 확장되었으며, 이에 상응하는 중성 지방의 함량(도 44B)이 증가하였다. 지방 생성 효소 Acc1의 발현 수준은 더욱 감소하고 Scd1은 극적으로 억제된 반면(도 44C), 중요한 지방 형성 전사 인자들인 Pparg 및 Srebp1c의 발현 수준은 마른 대조군과 유사한 수준으로 하향 조절되었다. 12 주 동안 HFD를 섭취시킨 마우스와 비교하여(실시예 20, 도 32), 24 주 동안 HFD를 섭취시킨 마우스에서 혈청 알라닌 아미노 트랜스퍼 라제(ALT)의 수준이 추가로 상승하였고, 혈청 아스파르테이트 아미노 트랜스퍼라제(AST)의 수치도 상당히 증가(도 45)하여 간 손상이 추가 진행되었음을 보여 주었다. 그러나 N-ABD094-rhArg(서열번호 50)를 처리한 DIO 마우스에서는 간 크기가 체중이 마른 대조군(도 43B)과 유사한 정도로 현저하게 감소하였다. 또한 간은 붉은 색(도 43A)으로 회복되었으며, 이는 지질 방울의 극적인 제거(도 44A)와 잘 연관되어 있었고, 중성 지방의 농도는 마른 대조군과 유사한 수준으로 감소하였다(도 44B). 주목할만하게도, 혈장 ALT 및 AST 농도는 마른 대조군과 비슷하였으며, 이는 N-ABD094-rhArg(서열번호 50)에 의한 처리가 추가 진행을 예방하고 기존 간 손상을 교정할 수 있음을 암시한다. 종합적으로, 이들 연구 결과는 N-ABD094-rhArg(서열번호 50)가 간 지방증의 역전에 미치는 현저한 효과를 보여준다.
- [0319] 간 이외에도, 비만은 또한 신장(신장 지방증), 췌장(췌장 지방증) 및 심장(심장 지방증)에 지질이 과도하게 축적되어 이러한 중요한 기관의 지방 독성 및 기능 장애를 유발한다. 실제로 비히클을 처리한 DIO 마우스에서 신장(도 46A), 췌장(도 47A) 및 심장(도 48A)의 체중이 크게 증가하였다. 조직학적 검사에서 신장 세뇨관의 지질 방울과 유사한 액포의 축적이 밝혀졌다(도 46C). 신장 절편의 오일 레드 O 염색은 사구체에 지질의 이소성(ectopic) 축적이 있음을 보여 주었다(도 46D). 췌장(도 47B)에 WAT 패치가 소엽 내(intralobular) 및 소엽 간(interlobular) 축적이 광범위하게 이루어졌고, 심장 근육 섬유 사이에서 백색 지방 세포 섬(islands of white adipocytes)이 발견되었다(도 48B). 중성 지방 농도는 신장(도 46B), 췌장(도 47C), 심장(도 48C)에서 크게 증가하였다. 또한 골격근에서도 중성 지방 농도가 크게 증가하는 것으로 나타났다(도 49). 이들 발견은 비히클 처

리된 DIO 마우스의 이들 기관에서 지방증의 발생을 나타낸다. 그러나 N-ABD094-rhArg(서열번호 50) 처리는 DIO 마우스의 신장(도 46A), 췌장(도 47A) 및 심장(도 48A)의 체중을 마른 대조군과 유사한 수준으로 현저히 감소시킬 수 있다. 조직학적 검사는 Oil red O 염색에 의해 확인된 신장 세뇨관의 액포(도 46C)와 신장 사구체의 지질의 현저한 감소를 확인하였다(도 46D). 췌장(도 47B)과 심장(도 48B) 내에서 WAT의 현저한 감소가 있었다. N-ABD094-rhArg(서열번호 50)로 처리한 DIO 마우스의 신장(도 46B), 췌장(도 47C), 심장(도 48C) 및 골격근(도 49)의 중성 지방 농도는 마른 대조군과 유사한 수준으로 회복되었다. 이들 발견은 N-ABD-rhArg(서열번호 50)가 신장, 췌장 및 심장 및 가능하게는 다른 기관에서도 마찬가지로 지방증을 효과적으로 역전시킬 수 있음을 입증한다.

[0320] 종합적으로, 이들 발견은 ABD-rhArg 융합 단백질 또는 다른 형태의 아르기나제(예: rhArg-PEG, BCA-PEG 또는 BCA-ABD) 또는 아르기닌-고갈 효소(예: ADI-PEG, ADI-ABD, ADC-PEG 또는 ADC-ABD)가 지방증의 치료에 사용될 수 있음을 뒷받침한다.

[0321] **실시예 26: N-ABD094-rhArg(서열번호 50) 처리는 HFD로 유발된 만성 염증 및 섬유화를 감소시킨다**

[0322] 실시예 21에 예시된 바와 같이, HFD 섭취는 만성 염증을 유도한다. 비히클 처리된 DIO 마우스에서, 성선 주위(perigonadal) WAT(도 50A)에서 염증촉진 아디포카인 Mcp1의 상향 조절된 발현과 함께 Mcp1의 혈청 농도가 유의하게 상승하였다(도 50B). 반면에, N-ABD094-rhArg(서열번호 50)를 처리한 DIO 마우스에서는 성선 주위(perigonadal) WAT에서 Mcp1 발현이 현저히 하향 조절되었고 Mcp1의 혈청 농도는 마른 대조군 마우스와 유사한 수준으로 교정되었으며(도 50B), 이는 N-ABD094-rhArg 처리가 WAT에서 HFD로 유발된 만성 염증을 완화시킬 수 있음을 시사한다.

[0323] 비히클 처리된 DIO 마우스의 간에서 인터루킨 1 알파 및 1 베타(I11a 및 I11b)(도 51A)를 포함한 여러 전 염증 유전자(proinflammatory genes)의 상당한 상향 조절이 있었다. 만성 염증은 섬유증과 관련이 있다. 실제로, 중요한 섬유화 촉진 유전자(profibrotic gene) 형질전환 성장 인자(Transforming growth factor beta; Tgfb)의 상당한 상향 조절이 있었다(도 51B). N-ABD094-rhArg(서열번호 50)로 처리 시, 이러한 전 염증 유전자를 현저하게 하향 조절하고 인터루킨 10(I110), 인터루킨 22(I122) 및 인터페론 감마(Infg)(도 51C)를 포함한 여러 항-염증 유전자를 현저하게 상향 조절할 수 있다. 섬유화 촉진 유전자(profibrotic gene) 형질전환 성장 인자(Tgfb)의 발현은 마른 대조군과 유사한 수준으로 회복되었다. 간과 유사하게, 비히클 처리된 DIO 마우스의 신장에서 Mcp1, 종양 괴사 인자 알파(Tumor necrosis factor alpha; Tnfa) 및 I11b(도 52A)를 포함한 여러 염증촉진 유전자의 상당한 상향 조절이 있었다. 섬유화 촉진 유전자(profibrotic gene) 콜라겐 1형 알파 1 사슬(Collagen type 1 alpha; Colla1)도 상당히 상향 조절되었으며, 이는 신장에서 Sirius red 염색으로 확인된 콜라겐 섬유화의 과도한 침착(deposition)의 발견과 일치한다(도 52C). 주목할만하게도, DIO 마우스를 N-ABD094-rhArg(서열번호 50)로 처리하면 이러한 염증촉진 유전자의 발현이 마른 대조군과 유사한 수준으로 하향 조절될 수 있다. 섬유화 촉진 유전자(profibrotic gene) Colla1은 크게 억제되었고 콜라겐 섬유의 양은 현저히 감소하였다. 유사하게, 췌장에서 N-ABD094-rhArg(서열번호 50) 치료는 Mcp1(도 52A)와 같은 염증촉진 유전자 및 중요한 섬유화 촉진 유전자(profibrotic gene) Tgfb(도 53B)를 상당히 하향 조절할 수 있다.

[0324] 종합적으로, 이들 발견은 N-ABD094-rhArg 처리가 간, 신장, 췌장 및 가능하게는 다른 기관에서의 만성 염증 및 섬유증을 효과적으로 경감시킬 수 있음을 보여준다.

[0325] 지방간(간 지방증(hepatic steatosis))은 초기 단계에서 무증상일 수 있다. 간에 염증이 생기면 지방 간염(steatohepatitis)이 되어 섬유증(fibrosis)으로 진행되고 더 진행된 단계에서 간경변(cirrhosis)으로 발전할 수 있으며, 이는 간세포 암이 될 위험을 크게 증가시킨다. 본 발명자들의 연구 결과는 N-ABD094-rhArg 처리가 간 질환의 진행을 막고 간 손상을 역전시킬 수 있음을 암시한다.

[0326] 종합적으로, 이들 결과는 ABD-rhArg 융합 단백질 또는 다른 형태의 아르기나제(예: rhArg-PEG, BCA-PEG 또는 BCA-ABD) 또는 아르기닌-고갈 효소(예: ADI-PEG, ADI-ABD, ADC-PEG 또는 ADC-ABD)에 의한 아르기닌 고갈이 만성 염증 및 섬유증의 치료에 사용될 수 있는 가능성을 뒷받침한다.

[0327] **실시예 27: N-ABD094-rhArg(서열번호 50) 처리는 갈색 지방의 백색화를 역전시킨다**

[0328] HFD를 장기간 섭취시킨 후, 비히클 처리된 DIO 마우스의 크기(도 54A)와 견갑골 간 BAT의 무게(도 54B)가 마른 대조군 마우스에 비해 추가로 증가하였으며, 이는 엄청난 양의 확대된 백색-같은 단안 세포(unilocular cells)의 존재와 관련이 있다(도 54C). 반면에, N-ABD094-rhArg(서열번호 50)로 DIO 마우스를 처리하면 견갑골 간 BAT를 백색-같은 단안 세포(unilocular cells)의 거의 완전한 관해(remission)와 함께 마른 대조군 마우스와 유사

한 크기와 무게로 극적으로 복원할 수 있다. 종합적으로, 이들 발견은 N-ABD094-rhArg(서열번호 50)가 갈색 지방의 백색화를 역전시키는 능력이 있음을 보여준다.

[0329] 종합적으로, 이들 발견은 ABD-rhArg 융합 단백질 또는 다른 형태의 아르기나제(예: rhArg-PEG, BCA-PEG 또는 BCA-ABD) 또는 아르기닌-고갈 효소(예: ADI-PEG, ADI-ABD, ADC-PEG 또는 ADC-ABD)에 의한 아르기닌 고갈이 갈색 지방의 백색화를 역전시켜 비만의 치료에 사용할 수 있음을 뒷받침한다.

[0330] **실시예 28: N-ABD094-rhArg(서열번호 50) 처리는 혈압을 낮춘다**

[0331] 비만은 심혈관 질환 및 고혈압과 관련이 있다. 600 U의 N-ABD094-rhArg(서열번호 50)를 7 일 간격으로 5 주 동안 처리한 DIO 마우스는 CODA 비침습적 혈압 시스템(Kents Scientific Corporation)을 사용하여 꼬리 커프(tail cuff) 방법으로 혈압을 측정하였다. N-ABD094-rhArg(서열번호 50)로 처리한 DIO 마우스의 수축기 및 이완기 혈압(도 55A)과 심박수(도 55B)는 비히클 처리된 DIO 마우스보다 상당히 낮았으며 마른 대조군 마우스와 비슷하였다. 실시예 25는 N-ABD094-rhArg(서열번호 50)가 신장 및 심장 지방증을 효과적으로 역전시킬 수 있으며, 이는 혈압 강하에 이로인 효과가 있을 수 있음을 보여준다.

[0332] 종합적으로, 이들 결과는 ABD-rhArg 융합 단백질 또는 다른 형태의 아르기나제(예: rhArg-PEG, BCA-PEG 또는 BCA-ABD) 또는 아르기닌-고갈 효소(예: ADI-PEG, ADI-ABD, ADC-PEG 또는 ADC-ABD)에 의한 아르기닌 고갈이 고혈압 치료에 사용될 수 있는 가능성을 뒷받침한다.

[0333] **실시예 29: N-ABD094-rhArg(서열번호 50)는 항체 중성화를 유발하지 않고 연장된 사용에 효과적이다**

[0334] 중화 항체의 생성은 약물의 약리학, 약동학, 안정성 및 효능에 영향을 미칠 수 있다. 면역원성 반응을 결정하기 위해, LFD를 섭취시킨 8 주령 C57BL/6J 수컷 마우스는 500 U의 N-ABD094-rhArg(서열번호 50)를 복강 내(i.p.) 주사 또는 비히클 조절용 식염수를 7 일 간격으로 8 개월 동안 투여하였다. N-ABD094-rhArg(서열번호 50)(도 56A)에 대한 항-약물 항체가 존재함에도 불구하고 이들 항체는 아르기나제 활성화에 대한 중화 효과가 없음을 발견하였고(도 56B), 이는 혈장 아르기닌 농도가 전체 연구 기간 동안 Biochrom 30 아미노산 분석기(3 μ M)의 검출 한계보다 낮은 수준으로 유지될 수 있다는 발견과 일치한다.

[0335] 장기 사용의 안전성 평가 목적으로, 간 손상의 바이오 마커 및 혈청 크레아티닌 및 소변 알부민/크레아티닌 비율로 신장 기능을 평가하는 데 일반적으로 사용되는 ALT 및 AST의 분석을 위하여, N-ABD094-rhArg(서열번호 50)를 8 개월 동안 처리한 LFD를 섭취시킨 마우스의 혈청 및 소변 샘플을 수집하였다. 약물을 처리한, LFD를 먹인 마우스는 이들 모든 매개 변수에 있어서 비히클(도 57A 및 57B)로 처리된 LFD를 섭취시킨 마우스와 상당한 차이를 보이지 않는 것으로 밝혀졌다. 또한 와이어 근육 단층촬영(wire myography)을 이용하여 분리된 동맥의 기능적 반응과 혈관 반응성을 검사결과, N-ABD094-rhArg(서열번호 50)를 처리한 LFD를 섭취시킨 마우스와 비히클로 처리된 LFD를 섭취시킨 마우스 사이에는 산화 질소 공여자 나트륨 니트로프루사이드(도 58C)에 대한 반응으로서 페닐에프린에 의해 유발된 혈관 평활근 수축(도 58A), 아세틸 콜린 유도 내피 의존성 이완(도 58B) 및 내피 독립적 이완에서 상당한 차이가 없었다(도 58C).

[0336] 식이로 유도된 비만 C57BL/6J 수컷 마우스에 HFD를 계속 섭취시키면서 600 U의 N-ABD094-rhArg(서열번호 50)를 20 주 동안 처리하고 별도의 연구에서, 체중은 5 주까지 마른 대조군 마우스와 유사한 수준으로 감소되었고 반동(rebound)없이 이 수준을 계속 유지하였다. 혈장 아르기닌 농도를 정기적으로 모니터링한 결과 아르기닌이 Biochrom 30 아미노산 분석기 (3 μ M)의 검출 한계보다 낮은 수준으로 유지됨을 확인하였다. 이러한 결과는 N-ABD094-rhArg(서열번호 50)가 처리 기간 내내 효과적임을 뒷받침한다. 종합적으로, 이들 결과는 N-ABD094-rhArg(서열번호 50)가 장기간 사용하기에 안전하고 효과적이라는 것을 뒷받침한다.

[0337] **실시예 30: 재조합 인간 아르기나제 (rhArg)를 위한 폐길화 프로토콜**

[0338] 재조합 인간 아르기나제(His-rhArg 서열번호 101)는 친화도 크로마토그래피를 사용하여 정제하여 수득하였다. 폐길화 전에, 정제된 His-rhArg(서열번호 101)를 20mM 인산 나트륨(pH 8.0)에 대해 정용 여과하고(diafiltered), 단백질 농도는 2 mg/mL로 조정하였다. 폐길화 시약은 20mM 인산 나트륨 pH 8.0)에 제조하였고, 20:1의 PEG 시약 대 rhArg의 물비를 사용하였다. His-rhArg(서열번호 101)에 PEG 시약을 넣고 교반하면서 상온에서 4 시간 동안 배양하였다. 이어서 반응 혼합물을 접선 흐름 여과 (TFF)를 사용하여 20mM 인산 나트륨(pH 7.4)에 대해 정용 여과하였다. 친화도 크로마토그래피를 이용하여 플로우 스루(flow through)에서 과잉 PEG를 제거하고 0.5M 이미다졸로 단백질을 용출하여 폐길화된 His-rhArg(서열번호 101)를 회수하였다. 미성숙화된(underivatized) His-rhArg(서열번호 101)는 또 다른 친화성 크로마토그래피를 통하여 분리하였다. 이후, 반응 혼합물을 12% 폴리아크릴아미드 겔을 사용하여 SDS-PAGE로 분석하였다. 겔은 분자량 식별을 위해 Coomassie

blue로 염색하거나 유리 PEG를 검출하기 위해 0.1 M 요오드 용액으로 염색하였다.

[00171] 예를 들면, 제조에 있어서, 비활성이 245 U/mg이고 농도가 7.5 mg/mL인, 150 mg의 폐길화된 His-rhArg(서열번호 101)를 수득하였다. 도 11 과 표 5는 PEG-rhArg의 생산 및 그 분석의 예를 나타낸다.

표 5. 폐길화된 His-rhArg (서열번호 101)의 생산 및 이의 분석

	부피 (mL)	농도 (mg/mL)	합계 (mg)	비활성 (U/mg)
폐길화된 His-rhArg 배치 3	11	3.5	38.5	189
폐길화된 His-rhArg 배치 3	35	5.3	185.5	213

실시예 31: 폐길화된 His-rhArg[서열번호 101]의 처리는 비만을 감소시키고 인슐린 민감성을 개선시킨다

폐길화된 His-rhArg(서열번호 101)의 생산은 실시예 30에 기재되어 있다. 기존식이 유발된 비만(DIO)이 있는 C57BL/6J 수컷 마우스는 HFD를 계속 섭취시키면서, i.p. 300 U 폐길화된 His-rhArg[서열번호 101] 또는 비히클 대조군으로 식염수를 7 일 간격으로 5 주 동안 주입하였다. 폐길화된 His-rhArg(서열번호 101)를 처리한 마우스의 체중은 점차 30g으로 감소하였으며, 이는 비히클 처리된 마른 대조군 마우스와 유사하였다(도 59). 주요 내장 저장소(성선 주위, 폐막 및 장간막 WAT) 및 피하 저장소(설측 WAT)에서 지방 패드의 무게가 크게 감소하였고, 연구 종료 시 마른 대조군 마우스와 유사하였다(도 60). 간, 신장, 췌장 및 심장의 무게는 비히클 처리된 DIO 마우스보다 현저히 낮았고, 마른 대조군 마우스와 견줄만하였다(도 60). 혈장 아르기닌 농도를 정기적으로 모니터링 한 결과 아르기닌이 연구 전반에 걸쳐 Biochrom 30 아미노산 분석기(3 μM)의 검출 한계 미만 수준으로 유지되었음을 확인하였다.

폐길화된 His-rhArg[서열번호 101]를 처리 후 2 주 후, DIO 마우스는 비히클 처리된 DIO 마우스(도 61B)와 비교하여 이미 공복 혈당 수치가 낮아졌고(도 61A) 인슐린 민감성이 현저하게 증가하였다.

종합적으로, 이들 발견은 폐길화된 His-rhArg[서열번호 101]가 N-ABD094-rhArg[서열번호 50]과 유사한 항-지방 증 및 감작 효과가 있음을 뒷받침한다. 폐길화된 His-rhArg(서열번호 101)에 의한 아르기닌 고갈은 비만과 관련된 인슐린 저항성과 관련된 질병을 치료하는 치료 효과가 있다.

실시예 32: 금속 이온 치환

야생형 아르기나제는 전형적으로 Mn^{2+} 금속 이온을 포함한다(D'Antonio & Christianson, 2011, Biochemistry, 50:8018-27). 금속 이온 치환은 훨씬 더 강력한 형태의 ABD094-rhArg를 제조하는 방법임이 밝혀졌다(낮은 K_m 수치 및 높은 k_{cat}/K_m 수치). 20mM Tris-HCl 완충액(pH 7.4)에 정제된 N-ABD094-rhArg(서열번호 50)를 20mM의 다른 2가 금속 이온(Mn^{2+} , Ni^{2+} 또는 Co^{2+})과 혼합하고 52-55°C 에서 15-60 분 동안 배양한 다음 PBS 완충액(pH 7.4)으로 완충액을 교환하였다.

비활성 및 촉매 효율(k_{cat}/K_m)을 결정하기 위해 샘플들을 효소 활성 및 효소 동역학 연구에 적용하였다. 금속 함량의 정량 분석을 위해 샘플들을 유도 결합 플라즈마 원자 방출 분광기(inductively coupled plasma atomic emission spectroscopy; ICP-OES, Agilent 700 Series ICP 광학 방출 분광계(optical emission spectrometer))에 적용하였다.

각 단백질 샘플(100-200 μL)을 10 ml의 1% w/v HNO_3 에 첨가한 다음 ICP-OES 분석을 위해 다른 원소들과 파장들을 선택하였다. 금속 대 단백질 비율은 금속 농도를 단백질 농도로 나누어 결정하였다. Pierce & BCA 단백질 분석은 제조사의 지침에 따라 단백질 농도를 평가하는 데 사용하였다(Thermo Fisher Scientific).

N-ABD094-rhArg(서열번호 50)에 Co^{2+} 또는 Ni^{2+} 금속 이온을 첨가하면 Mn^{2+} 가 잘 제거되고 Co^{2+} 또는 Ni^{2+} 가 통합된다.

코발트 치환 효소(N-ABD094-rhArg- Co^{2+})는 훨씬 더 작은 K_m (0.27 내지 0.35 mM), 더 높은 k_{cat} (250 내지 316 s^{-1})

및 더 높은 촉매 효율 k_{cat}/K_m (905 내지 $917\text{ s}^{-1}\text{ mM}^{-1}$)을 보임을 발견하였다. 오리지널 효소(N-ABD094-rhArg-Mn²⁺)의 경우 K_m 은 1.37 내지 1.89 mM, k_{cat} 은 82-98 s⁻¹, k_{cat}/K_m 은 44 내지 $72\text{ s}^{-1}\text{ mM}^{-1}$ 이다. 금속 치환 방법은 Mn²⁺ +를 Co²⁺ +로 성공적으로 대체하여 약 2-4 : 1의 포화된 Co²⁺ 대 단백질 비율로 이어졌다. 상기 데이터는 보다 강력한 형태의 N-ABD094-rhArg(서열번호 50) 또는 본원에 기재된 다른 융합 단백질이 다른 2가 금속 이온(예: Ni²⁺ 또는 Co²⁺)으로 치환함으로써 제조될 수 있음을 암시한다.

[0352] **실시예 33: N-ABD094-rhArg-Co²⁺ [서열번호 50(코발트 치환됨)]의 처리는 비만을 감소시킨다**

[0353] N-ABD094-rhArg-Co²⁺의 생산[서열번호 50(코발트 치환)]은 실시예 32에 기재되어 있다. 식이로 유발된 비만(DIO)이있는 C57BL/6J 수컷 마우스는 HFD를 계속 섭취시키면서, 25 내지 100 U의 N-ABD094-rhArg-Co²⁺ [서열번호 50 (코발트 치환)]를 5 주간 복강 내(i.p.) 주사로 투여하였다. 마우스의 체중은 600 U 내지 700 U의 N-ABD094-rhArg(도 37)의 효과와 유사하게 치료 5 주 이내에 55 g에서 30 g으로 점차 감소하였다(도 62). 이 결과는 Mn²⁺를 Co²⁺로 대체하여 체중 감소에서 ABD-rhArg 융합 단백질의 효능을 현저하게 증가 시킨다는 것을 뒷받침한다.

[0354] **실시예 34: 포유 동물 세포의 배양 및 증식 분석**

[0355] 암 세포주들(예: MKN45, AGS, BGC823, HCT-15 및 HCT-116)은 표준 프로토콜에 따라 10% FBS 및 100 유닛/mL의 페니실린/스트렙토마이신이 포함된 RPMI 배지에서 유지되었다.

[0356] 세포 증식의 분석을 위해, 100 μL 의 성장 배지 부피에 있는 암 세포(5×10^3)를 96 웰 플레이트의 각 웰에 분배한 후 24 시간 동안 배양하였다. 시트룰린과 함께 이들 효소를 사용할 뿐 아니라 다양한 농도의 아르기닌 고갈 효소를 다양한 농도로 포함하는 신선한 배지인, 아르기닌이 공급된 아르기닌 유리 배지(AFM)로 배양 배지를 보충하였다. 플레이트는 95% 공기 및 5% CO₂의 가습 분위기를 포함하는 배양기에서 37° C에서 추가로 1-3 일 동안 배양하였다.

[0357] 정량적 세포 증식 분석은 다른 곳에서 널리 설명된 바와 같이 MTT(3-[4,5-디메틸티아졸-2-일]-2,5-디페닐테트라졸륨 브로마이드) 분석을 사용하여 수행하였다. 배양액에서 세포의 50%를 죽이는 데 필요한 아르기닌 고갈 효소의 양을 IC₅₀으로 정의하였다.

[0358] **실시예 35: 다양한 아르기닌-고갈 효소(ADI, BCA 및 ADC)에 의한 다양한 인간 암세포주의 억제 및 증식**

[0359] 아르기닌 탈아민효소(ADI), 박테리아 아르기나제(BCA) 및 아르기닌 디아실라제의 세포 독성은 5개의 종양 세포주(A375, HeLa, BxPC-3, PANC-1, 및 HCT116)에 대한 비교 연구에서 결정하였다.

[0360] ADI 및 BCA로 촉매된 반응은 모두 요소 회로(urea cycle)의 단계이므로 ADI 및 BCA의 항 종양 효과는 모두 세포 ASS 수준과 관련이 있다. 반면에, ADC의 촉매 생성물은 그 어느 것도 요소 회로의 중간체가 아니기 때문에 ADC의 항 종양 효과는 ASS의 존재에 의해 상대적으로 영향을 덜 받을 수 있다. 본 발명자들의 결과는 ADI, BCA 및 ADC가 모두 연구된 세포주에서 억제 효과를 발휘한다는 것을 입증하였다. ADI는 A375, HCT116, BxPC-3, PANC-1에 대해 효과적이지만 HeLa 세포에는 효과가 없었고, BCA와 ADC는 테스트된 5개의 암 세포주 모두에 대해 효과적이었다(표 6). ADC는 가장 약한 아르기닌 고갈 효소이지만, 특히 ASS 양성 암 세포에서 효능 측면에서 ADI 및 BCA보다 유리하다(표 6).

[0361] ADI에 대한 종양 세포의 민감도는 세포 ASS 수준과 명확한 관계를 나타낸다(표 6). 종합적으로, ADC와 BCA는 ADI와 비교하여 ASS 독립적인(ASS-independent) 방식으로 인간 암 세포주의 증식을 억제할 수 있다.

[0362] **표 6.** 5개의 인간 암 세포주에서 ADI, BCA 및 ADC의 IC₅₀ 및 최대 세포 독성. 세포는 MTT 분석 전에 72 시간 동안 처리되었고, 데이터는 3 번 수행된 세 가지 실험의 평균 수치이다. IC₅₀ 값은 세포 생존능을 50% 억제하는 데 필요한 효소의 양으로 정의된다. 최대 세포 독성은 각 효소에 의해 달성된 비생존 세포(nonviable cells)의 최대 백분율로 표현된다. ADI 내성 세포는 테스트된 ADI의 최대 용량에서 50% 이상 생존하는 세포로 정의된다.

표 6.

암 유형	세포주	ASS 단백질 수치	IC ₅₀ (μg/mL)			최대 독성(%)		
			ADI	BCA	ADC	ADI	BCA	ADC
흑색종 (Melanoma)	A375	검출 불가, 유발 불가	0.03	0.12	5.61	93.92	86.92	84.76
대장암 (Colorectal)	HCT116	낮음	0.10	0.22	12.23	72.18	81.05	84.35
췌장암 (Pancreatic)	BxPC-3	중간	0.09	0.44	16.85	57.53	84.82	93.16
	PANC-1	낮음/중간, 유발가능	0.04	1.81	4.65	55.68	63.01	82.98
자경경부암 (Cervical)	HeLa	낮음/높음, 유발가능	저항성	1.25	3.82	<50	61.14	86.49

실시예 36: BHA (서열번호 75)의 위암세포에 대한 세포 독성

알부민-결합 아르기나제인 BHA(서열번호 75)의 시험관 내 효능을 테스트하고자 MKN45 위암 세포주를 다양한 농도의 BHA(서열번호 75)와 함께 72 시간 동안 배양하고 MKN45의 생존력을 MTT 분석에 의해 결정하였다. 도 63에 나타난 바와 같이 MKN45 암세포의 성장은 용량-의존적으로 BHA(서열번호 75)에 의해 억제되었다. 이는 배지배양 소 태아 혈청(FBS) 및 알부민 및 기타 다른 단백질을 포함하여 보충된 배양 조건에서 아르기닌-고갈 용합 단백질의 세포 독성을 추가로 확인하였다.

실시예 37: 아넥신 V-FITC 및 PI 이중 염색에 의한 세포 사멸사 평가

BCA 아르기나제(서열번호 71)에 의한 세포사멸(apoptosis)의 유도를 평가하기 위해, 다른 처리 조건 하루 전에 3×10^5 세포를 6-웰 플레이트에 분배하였다. 배지를 제거 후(withdrawn) 다른 농도의 BCA(서열번호 71)가 공급된 완전 배지로 보충하였다. 24 시간, 48 시간 및 72 시간 동안 BCA에 노출시킨 후 부유 세포(floating cells)와 부착 세포(adherent cells)를 모두 수집하였다. 간단히 말해서, 배양 배지의 부유 세포를 실온에서 3 분 동안 100x g에서 원심분리하여 수집하였고, 부착 세포를 PBS로 세척하고 0.25 % 37° C에서 트립신 용액에서 3 분 동안 배양하여 들어 올렸다(lifted). 완전한 배지를 첨가한 후, 세포를 원심분리하여 수집하였다. 세포를 PBS로 세척하고 프로피듐 요오드화물(propidium iodide; PI) 및 아넥신 V-FITC를 포함하는 0.1 mL 결합 완충액(0.01 M HEPES, pH 7.4; 0.14 M NaCl; 2.5 mM CaCl₂)에 재현탁시켰다. 세포를 실온의 어두운 곳에서 15 분 동안 염색하고 FACSaria (BD biosciences)를 사용한 유세포 분석 전에 0.4 mL의 결합 완충액을 각 튜브에 첨가하였다. 상기 분석계는 각 샘플에 대해 10,000 개의 세포에서 데이터를 수집하도록 설정되었으며 데이터는 FACSaria 소프트웨어로 분석하였다.

유세포 분석 결과에 따라, BCA(서열번호 71) 처리(50 μg/mL의 BCA)하여 HCT116 인간 대장 암 세포에서 시간-의존적으로 세포 사멸을 유도하였다. BCA 치료 후 24, 48 및 72 시간에 HCT116 암 세포의 약 16%, 21% 및 25%가 각각 세포사멸에 처하였다.

실시예 38: 세포 생존능 평가 및 복합 약물 효과

유방암 세포주(예: 인간 MCF-7 및 MDA-MB-231 세포)를 본 연구에 사용하였다. 암 세포(5×10^3 세포)를 100 μL의 완전 배지를 포함한 96-웰 플레이트(TPP)에 분배하였다. 이들 플레이트를 배양기에서 밤새 배양하여 세포를 플레이트에 부착시켰다. 이후, His-rhArg 아르기나제(서열번호 101) (2 U/mL 내지 0.0032 U/mL)와 자가 포식 억제제(autophagy inhibitor) 클로로퀸(CQ, 100 μM ~ 0.16 μM)을 96-웰 플레이트에 첨가하였다. 약물 조합군의 경우 His-rhArg(서열번호 101)(2 U/mL 내지 0.0032 U/mL)를 20 μM CQ (비-상수율 법(non-constant ratio method))와 함께 웰에 첨가하였다. 각 투여량은 세포 생존능의 평균 변화를 얻기 위해 3 개의 웰에서 3 중(triplicated)으로 처리하였다. 68 시간 배양 후, 10 μL의 5 mg/mL MTT [3-(4,5-디메틸티아졸-2-일)-2,5-디페닐테트라졸륨 브로마이드] 용액을 첨가 하였다. 플레이트를 다시 배양기에 넣고 4 시간 동안 추가로 배양하였다. MTT에 의해 형성된 불용성 화합물인 포르마잔(formazan)을 용해하기 위해 0.01 M HCl에 100 μL의 10% SDS를 첨가하였다. 플레이트를 37° C에서 밤새 배양 하였다. 색 변화는 570 nm에서 분광 광도계로 측정하

였다. 대조군의 설정(약물 처리 없음)은 IC_{50} 값을 구하기 위해 소프트웨어 Prism 6.0 (GraphPad)에 의해 용량 반응 곡선의 작성에 사용된 세포 생존율(percentage of cell viability)을 계산하기 위한 기초로 사용하였다. His-rhArg(서열번호 101)와 CQ의 상호 작용 또는 조합의 효과는 조합 지수(combination index; CI)로 계산할 수 있다. CalcuSyn 소프트웨어(Biosoft)를 사용하여 CI 수치를 계산하였다.

MCF-7 암세포는 아르기나제에 의한 아르기닌 고갈(starvation)에 72 시간 동안 민감성을 나타내었다(표 7). CQ는 또한 MCF-7에 대한 세포 독성 효과를 나타내었다(표 8). 약물 조합 군(drug combination group)의 경우 His-rhArg(서열번호 101)와 CQ(표 9)간에 시너지 효과(CI <1)가 나타났다. 표 10은 MCF-7 암세포에 대한 His-rhArg(서열번호 101), CQ 및 (rhArg + CQ)의 IC_{50} 을 보여준다.

표 7. His-rhArg로 처리 후 MCF-7 암세포의 세포 생존능(%)

His-rhArg 농도 (U/mL)	평균 세포 생존능 % (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%

표 8. CQ 처리 후 MCF-7 암세포의 세포 생존능%

CQ 농도 (μ M)	평균 세포 생존능 % (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%

표 9. His-rhArg(서열번호 101) 및 CQ 조합의 조합 지수(CI) 및 MCF-7 세포에 대한 세포 생존율

His-rhArg 농도 (U/mL)	CQ 농도 (μ M)	평균 세포 생존능 % (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%	

[0379] 표 10. His-rhArg(서열번호 101), CQ 및 His-rhArg(서열번호 101) 와 CQ의 조합의 MCF-7 암세포에 대한 IC₅₀

[0380]

[0381] 상기 실험 데이터는 MDA-MB-231 유방암 세포가 His-rhArg(서열번호 101) 및 CQ(표 11 및 표 12)에 의한 아르기닌 고갈(starvation)에 민감함을 보여 주었다. His-rhArg(서열번호 101)와 CQ의 조합은 MDA-MB-231 세포에서 상승적인 세포 독성을 보였다. CI 값은 1 미만이었다 (표 13). 표 14는 MDA-MB-231 유방암 세포에 대한 His-rhArg(서열번호 101), CQ 및 His-rhArg(서열번호 101) + CQ의 IC₅₀을 보여준다.

[0382] 표 11. MDA-MB-231 세포에 대한 His-rhArg(서열번호 101)의 세포 생존능(%)

[0383]

[0384] 표 12. CQ와 72 시간 배양 후 MDA-MB-231 세포의 세포 생존능(%)

[0385]

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

His-rhArg 농도 (U/mL)	평균 세포 생존능% (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%

CQ 농도 (μM)	평균 세포 생존능% (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%

표 13. His-rhArg(서열번호 101) 및 CQ의 복합 지수(CI) 및 MDA-MB-231 유방암 세포에 대한 세포 생존능(%)

His-rhArg 농도 (U/mL)	CQ 농도 (μM)	평균 세포 생존능% (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%	

표 14. MDA-MB-231 세포에 대한 His-rhArg(서열번호 101), CQ 및 His-rhArg (서열번호 101)와 CQ의 조합의 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

본 발명자들은 인간 간암 세포주 "Red Flu HepG2"에 대하여 His-rhArg(서열번호 101)(0.016, 0.08 또는 0.4 U/mL) 및 CQ(20 μM)의 약물 조합을 테스트하였다. 시너지 효과(1 미만의 CI 값)도 관찰되었다.

실시예 39: 트랜스-웰(Trans-well) 이동(migration) 분석 및 침입(invasion) 분석

본 연구에는 유방암 세포주(인간 MDA-MB-231 세포 및 마우스 4T1 세포)를 사용하였다. 이동 분석 및 침입 분석 모두 24-웰 Costar(코닝) 트랜스-웰 시스템(폴리카보네이트 막 삽입물(inserts), 기공 크기 8.0 μm)에서 수행하였다. 분석 전, 세포는 적어도 24 시간 동안 적절한 무-혈청 배지에서 배양하였다. 세포를 상부 챔버에 분배하기 하루 전에 100 μL의 희석된 매트릭젤(matrigel)을 침입 분석을 위해 삽입물의 상부 챔버에 첨가하였다. 무-혈청 배지(100 μL)를 이동 분석에 사용된 상부 챔버에 첨가하였다. 24-웰 플레이트를 배양기에서 밤새 배양하였다. 다음날, 세포를 트립신으로 처리하고 계수하였다. 본 연구에서, 200 μL의 적절한 무-혈청 배지와 함께 4T1(3 x 10⁴ 개 세포) 또는 MDA-MB-231(5 x 10⁴ 개 세포)를 상부 챔버에 분배하였다. 적절한 완전 배지(750 μL)를 하부 챔버에 첨가하였다. 약물 치료군의 경우 상기 두 챔버에 1 U/mL His-rhArg(서열번호 101)를 첨가하였다. 24-웰 플레이트를 20 시간(4T1 세포) 또는 24 시간(MDA-MB-231 세포) 동안 5% CO₂와 함께 37° C 습기의 대기에서 배양하였다.

배양 후 상부 챔버의 배지를 제거하였다. 트랜스-웰 삽입물을 1x PBS로 2 회 세척하였다. 차가운 100% 메탄올을 상부 챔버와 하부 챔버 모두에 10 분 동안 첨가하여 세포를 고정하였다. 상기 삽입물을 1x PBS로 2 회 세척하였다. 그 후, 1x PBS 중의 1% 크리스탈 바이올렛(crystal violet)을 상기 두 챔버에 15 분 동안 첨가하여 세포를 염색하였다. 상기 삽입물을 1x PBS로 두 번 세척한 후 상부 챔버 표면의 세포를 면봉으로 제거하였다. 상기 삽입물을 밤새 공기 건조시켰다. 사진은 공초점 현미경(confocal microscope)으로 촬영하였다. 1 U/mL의 His-rhArg (서열번호 101)로 처리한 결과 트랜스-웰 삽입물을 통해 이동 및 침입할 수 있는 암세포의 수가 감소한 것으로 나타났으며, 이로써 아르기나제에 의한 아르기닌 고갈이 암세포의 이동과 침입을 억제할 수 있음을 암시하였다.

실시예 40: N-ABD-rhArg (서열번호 49)는 생체 내에서 공격적인 유방암 세포의 성장과 전이를 억제한다

공격적인 4T1 유방암 세포 이종 이식(xenograft) 모델 연구를 위해 10 마리의 암컷 누드 마우스(11-12 주령)를 사용하였다. 이들 마우스를 케이지 당 5 마리씩 그룹으로 수용하였고 음식과 물을 자유롭게 제공하였다(ad libitum). 4T1 암세포를 트립신 처리하여 수확한 후, 1X PBS로 2 회 세척하고 접종을 위해 1X PBS에 재현탁시켰다. 암세포 (4T1의 1 x 10⁶ 세포)를 마우스의 왼쪽 옆구리(flank)에 피하 주사하였다. 접종 3 일 후 종양의 평

균 길이가 6 mm 일 때 마우스를 무작위로 두 그룹으로 분리하였다. 500 U(3.2 mg, 230 μ L)의 N-ABD-rhArg(서열번호 49) 또는 1X PBS를 주 1 회 주사하였다. 복재 정맥(aphenous vein)에서 혈액 샘플을 수집하였다. 마우스의 종양 크기 및 체중을 정기적으로 모니터링하였다. 종양 부피는 하기 방정식으로 추정하였다:

$$\text{종양부피} (mm^3) = \frac{\text{길이} \times \text{폭}^2}{2}$$

마우스는 PBS 투여 대조군에서 종양의 괴사로 인해 암세포 접종 후 16 일(즉, 실험 시작 후 13 일)에 희생되었다. 희생된 마우스로부터 종양을 채취하고 종양의 무게를 측정하였다. 폐도 수집하여 1X PBS로 세척하였다. 폐를 밤새 Bouin 용액에 고정하였고, 고정 후 1X PBS로 세척한 후 폐 전이성 결절을 계수하였다.

중요한 점으로서, 500 U의 알부민-결합 아르기나제 N-ABD-rhArg(서열번호 49)가 BALB/c 마우스에서 아르기닌을 최소 10 일 동안 Biochrom 30 아미노산 분석기(3 μ M)의 검출 한계보다 낮은 수준으로 고갈시켰다 (도 10). 따라서 500 U의 N-ABD-rhArg(서열번호 49)를 복강 내(i.p.) 주사의 효능 연구를 위해 4T1 유방암 이종 이식 누드 마우스에 주 1 회 투여하였다. 표 15는 500 U의 N-ABD-rhArg(서열번호 49)가 실험 중에 아르기닌을 검출되지 않은 수준으로 고갈시켰음을 보여준다.

표 15. N-ABD-rhArg(서열번호 49) 처리 군 마우스(마우스 1-4)의 혈청 아르기닌 수치. 이들 수치는 Biochrom 30 아미노산 분석기를 사용하여 측정하였다. BDL: 탐지 수준 미만; 0 일: 치료 전

	제 0 일	제 6 일	제 13 일
	아르기닌 농도 (μ M)	아르기닌 농도 (μ M)	아르기닌 농도 (μ M)
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)

도 64-67은 500 U의 N-ABD-rhArg(서열번호 49)가 누드 마우스에서 4T1 유방암 이종 이식의 성장을 억제할 수 있음을 보여준다. 실험 시작 후 12 일과 13 일 후에 대조군과 실험군간에 추정 된 종양 부피에 유의 한 차이가 있었다 (도 64 및 도 65). 또한, 상기 두 그룹간에 종양 크기의 현저한 차이가 있었다(도 66 및 도 67).

이들 결과는 500 U의 N-ABD-rhArg(서열번호 49)를 주 1 회 투여하여 아르기닌 고갈이 누드 마우스에서 4T1 공격적인 유방암 이종 이식의 성장을 상당히 억제할 수 있음을 암시하였다. 생체 내 연구는 N-ABD-rhArg(서열번호 49)가 누드 마우스의 암 성장을 안전하고 효율적으로 억제할 수 있음을 보여주었다.

더욱이, 본 발명자들은 아르기닌 고갈(starvation)이 시험관 내 결과와 일치하는 결과인, 4T1 유방암 세포 전이를 억제할 수 있음을 발견하였다. 처리 군에서 마우스의 폐를 수집하여 희생시킨 후 전이의 징후를 세밀히 조사하였다. 대조군의 3 개의 다른 폐에서 3 개의 폐 전이성 결절이 발견되었다; N-ABD-rhArg(서열번호 49) 치료군에서는 전이성 결절이 발견되지 않았다(표 16). 이들 결과는 N-ABD-rhArg(서열번호 49)에 의한 아르기닌 고갈이 종양 전이를 억제할 수 있다는 것을 확실히 보여 주었다. 이것은 아르기닌이 세포 이동과 종양 전이에서 중요한 역할을 할 수 있음을 시사하였다. N-ABD-rhArg(서열번호 49)에 의한 아르기닌의 고갈은 암세포의 전이에 중요한 일부 경로를 억제할 수도 있다(Knott et al., 2018, Nature, 554 : 378-381).

표 16. 동물 연구에서 전이성 결절의 수

군	폐에서 발견된 전이성 결절의 수	전이 없는 동물%
PBS 대조군 (n = 6)	3	50%
500 U 의 N-ABD-rhArg (n = 4)	0	100%

실시예 41: N-ABD094-rhArg(서열번호 50) 융합 효소의 인간 결장암(colon cancer) 세포주에 대한 세포 독성

BD 및 rhArg 융합 단백질의 시험관 내 효능을 인간 결장암(colon cancer) 세포주에서 테스트하였다. 인간 결장암 세포주(HCT116, LOVO 및 HT29)를 5×10^3 세포/웰의 밀도로 96-웰 플레이트에 분배하였다. 배양 1 일 후 N-ABD094-rhArg(서열번호 50)의 농도가 다른(2, 0.4, 0.08, 0.016 및 0.0032 U/ml) 배지로 교체하였다. 제3 일 [N-ABD094-rhArg (서열번호 50) 처리 후 3 일]에 MTT 분석을 수행하여 IC₅₀ 값을 결정하였다. 배양 배지를 MTT 용액(1 mg/ml)(Invitrogen)으로 교체 후 37° C에서 4 시간 동안 배양하였다. 배양 후 MTT 용액을 디메틸 설펝사이드(dimethyl sulfoxide; DMSO)로 교체한 후 650 nm 기준으로 570 nm에서 흡광도를 측정하였다. 세포 생존율은 N-ABD094-rhArg 처리된 세포의 흡광도를 처리되지 않은 세포의 평균 흡광도로 나누어 결정하였다. 암세포 주(95% 신뢰 구간)에 대한 N-ABD094-rhArg(서열번호 50)의 IC₅₀ 값은 소프트웨어 Prism 6.0으로 분석하였다. 3 개의 독립적인 실험 세트(n = 3)를 각 세포주에 대해 수행하였고 그 결과는 표 17에 나타내었다.

표 17. N-ABD094-rhArg (서열번호 50)를 이용한 단일 약물 실험; 약물 = N-ABD094-rhArg(서열번호 50); 세포주 = HCT116

약물 농도 (U/mL)	0	0.0032	0.016	0.08	0.4	2
평균 세포 생존능 (%)	1	0.938	0.950	0.608	0.452	0.419
SEM	0	0.042	0.116	0.086	0.051	0.046

세포주 = LOVO

약물 농도 (U/mL)	0	0.0032	0.016	0.08	0.4	2
평균 세포 생존능 (%)	1	0.922	0.848	0.566	0.432	0.392
SEM	0	0.048	0.037	0.075	0.040	0.038

세포주 = HT29

약물 농도 (U/mL)	0	0.0032	0.016	0.08	0.4	2
평균 세포 생존능 (%)	1	0.962	0.853	0.521	0.423	0.383
SEM	0	0.070	0.084	0.016	0.009	0.029

테스트된 모든 결장암(colon cancer) 세포주는 시험관 내 N-ABD094-rhArg(서열번호 50) 융합 효소에 매우 민감했으며 IC₅₀ 값은 0.22 U/ml 내지 0.58 U/ml이었다. HCT116은 0.22 U/ml의 IC₅₀으로 가장 민감한 종양이었다. LOVO 및 HT29의 IC₅₀ 값은 각각 0.38 U/ml 및 0.58 U/ml이었다.

실시예 42: N-ABD094-rhArg(서열번호 50)와 클로로퀸(chloroquine)의 조합은 인간 결장암(colon cancer) 세포주에 대해 상승적 세포 독성 효과를 나타낸다

[0411] 자가 포식 억제제(autophagy inhibitor) 클로로퀸(CQ)의 IC_{50} 값은 하기와 같이 결정되었다. 결장암 세포주 HCT116, LOVO 및 HT29를 개별적으로 분배하고 1 일간 배양 후, 배양 배지는 다른 농도의 CQ(100, 20, 4, 0.8, 0.16 μ M)를 포함하는 배지로 교체하였다. MTT 분석은 제 3 일에 수행하였다. 3 개의 독립적인 실험 세트(n = 3)를 각 세포주에 대해 수행하였고 그 결과는 표 18에 나타내었다.

[0412] 표 18. CQ를 이용한 단일 약물 실험; 약물 = 클로로퀸 (CQ); 세포주 = HCT116

약물 농도 (U/mL)	0	0.16	0.8	4	20	100
평균 세포 생존능 (%)	1	0.981	0.967	0.921	0.897	0.874
SEM	0	0.032	0.037	0.059	0.033	0.027

세포주 = LOVO

약물 농도 (U/mL)	0	0.16	0.8	4	20	100
평균 세포 생존능 (%)	1	0.973	0.921	0.759	0.495	0.060
SEM	0	0.029	0.017	0.027	0.018	0.002

세포주 = HT29

약물 농도 (U/mL)	0	0.16	0.8	4	20	100
평균 세포 생존능 (%)	1	1.057	1.009	0.983	1.018	0.037
SEM	0	0.079	0.071	0.083	0.073	0.006

[0413]

[0414] HCT116, LOVO 및 HT29에 대한 CQ의 IC_{50} 값은 각각 $>100 \mu$ M, 15μ M 및 71μ M이었다. 약물-조합 분석의 경우, 비-상수율(non-constant ratio)분석을 수행하였다(Hastak et al., 2010, Cancer Res. 70 (20): 7970-7980). 결장암 세포를 분배 하고 1 일간 배양 후 배양액을 IC_{50} 에 따라 고정된 양의 CQ와 조합된 다른 농도의 N-ABD094-rhArg(서열번호 50)(2, 0.4, 0.08, 0.016, 0.0032 U/ml)를 포함하는 배지로 교체하였다. MTT 분석은 제 3 일에 수행하였다. 조합된 N-ABD094-rhArg(서열번호 50) 및 CQ 처리의 조합 지수 (CI)는 소프트웨어 CalcuSyn 버전 2.1로 분석하였다. 3 개의 독립적인 실험 세트(n = 3)를 각 세포주에 대해 수행하였고 그 결과는 표 19에 나타내었다.

[0415] 표 19. 약물 조합 실험 (약물 1 + 약물 2); 약물 1 = N-ABD094-rhArg (서열번호 50); 약물 2 = 클로로퀸 (CQ) (고정 농도 20μ M); 세포주 = HCT116

약물 1 농도 (U/mL)	0	0.0032	0.016	0.08	0.4	2
평균 세포 생존능 (%)	1	0.951	0.885	0.476	0.273	0.231
SEM	0	0.024	0.027	0.008	0.008	0.006

세포주 = LOVO

약물 1 농도 (U/mL)	0	0.0032	0.016	0.08	0.4	2
평균 세포 생존능 (%)	1	0.555	0.542	0.211	0.186	0.177
SEM	0	0.008	0.008	0.002	0.010	0.005

세포주 = HT29

약물 1 농도 (U/mL)	0	0.0032	0.016	0.08	0.4	2
평균 세포 생존능 (%)	1	0.979	0.983	0.480	0.369	0.367
SEM	0	0.035	0.054	0.036	0.027	0.023

[0416]

[0417]

상기 결과는 0.08 또는 0.4 U/ml의 N-ABD094-rhArg(서열번호 50)를 3 개의 결장암(colon cancer) 세포주 모두에서 20 μ M의 CQ와 조합했을 때 CI 값이 1.0 미만임을 보여준다. 이는 N-ABD094-rhArg(서열번호 50)가 단독으로 활성화되어 CQ와 병용 시 시너지 효과가 있음을 시사한다. 종합적으로, 자가 포식 억제제(autophagy inhibitor) 클로로퀸(CQ)은 인간 결장암 세포에서 N-ABD094-rhArg(서열번호 50) 융합 단백질의 세포 사멸 유도 효과를 향상시킨다.

[0418]

실시예 43: N-ABD-rhArg(서열번호 49) 및 폐결핵된 His-rhArg(서열번호 101)는 모두 공격적인 유방암 세포의 생체 내 성장 및 전이를 억제한다

[0419]

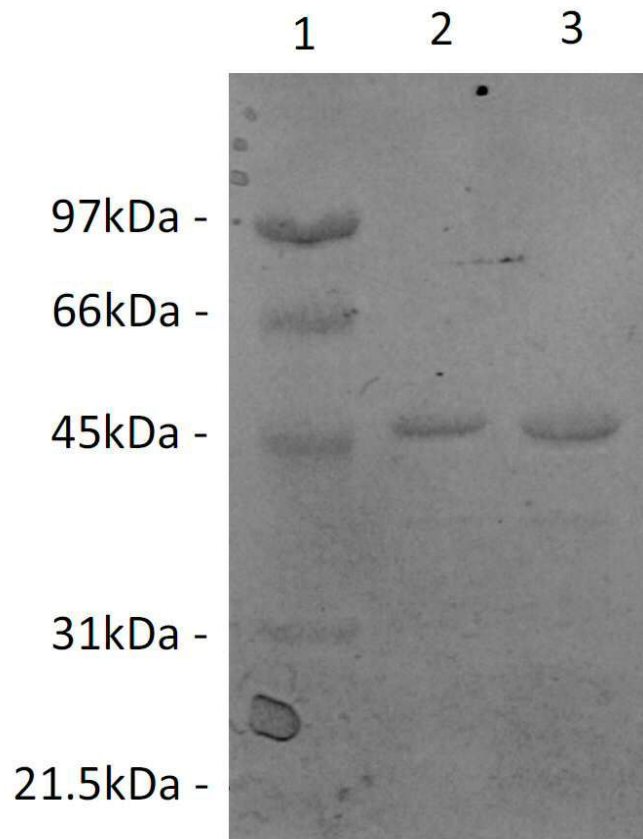
또 다른 4T1 유방암 동종 이식 연구에서 암컷 누드 마우스(5-6 주령)를 사용하였다. 이들 마우스는 케이지 당 5 마리씩 그룹으로 수용하였고 음식과 물을 자유롭게 제공하였다(ad libitum). 4T1 유방암 세포(1×10^5)를 마우스의 오른쪽 옆구리(flank)에 피하로 투여하였다. 접종 11 일 후 종양의 평균 길이가 8mm 일 때 이들 마우스를 무작위로 4 개의 그룹으로 분리하였다. 대조군 1 개($n = 8$)와 실험군 3 개(500 U PEGylated His-rhArg(서열번호 101) ($n = 8$), 500 U N-ABD-rhArg(서열번호 49) ($n = 6$) 및 250U N-ABD-rhArg(서열번호 49)($n = 8$) 포함)가 사용되었다. 대조군의 마우스는 매주 1X PBS를 주사 하였다. 500 U ABD-rhArg 그룹과 250U ABD-rhArg 그룹의 경우 마우스에 각각 500 U 및 250U ABD-rhArg를 주 1 회 주사하였다; 한 그룹은 매주 1회 500 U의 PEG-rhArg를 주사하였다. 이들 마우스는 PBS 대조군에서 종양의 괴사 때문에 접종 24 일 후(즉, 실험 시작 14 일 후) 희생되었다. 희생 후 마우스를 해부하고 마우스에서 종양을 수집하고 체중을 측정하였다. 폐도 수집하고 1X PBS로 세척하였다. 폐를 밤새 Bouin 용액에 고정하였고, 고정 후 1X PBS로 세척한 후 폐 전이성 결절을 계수하였다.

[0420]

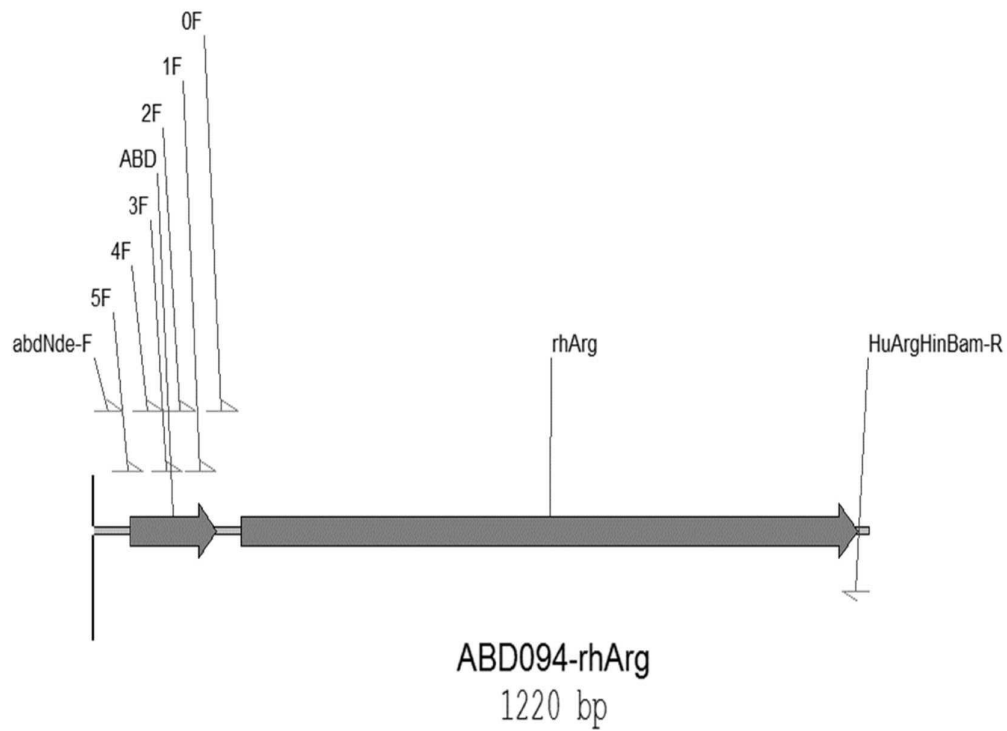
상기 결과에서, 도 68은 500 U의 ABD-rhArg와 500 U의 PEG-rhArg 모두 공격적인 4T1 고형 종양의 성장을 상당히 억제했음을 보여준다. 그러나 더 낮은 용량인 250U의 ABD-rhArg는 종양의 성장을 억제하지 못하였다. 상기 결과는 다른 그룹의 종양 무게 변화와도 일치하였다(도 69). 따라서 ABD-rhArg는 용량-의존적으로 종양 성장을 억제하였다. 중요한 것은, 상기 데이터는 아르기닌 고갈(starvation)(ABD-rhArg 또는 PEG-rhArg에 의함)가 폐로 종양 전이가 되는 것을 억제 또는 감소시켰음을 분명히 보여주었다(도 70A 및도 70B). 500 U PEG-rhArg 군과 500 U ABD-rhArg 군 모두에서 폐의 전이 결절이 대조군에 비해 매우 현저히 감소하였다. 헤마톡실린 및 에오신(H & E) 염색을 사용한 폐조직학적 절편은 이들 결절이 일련의 고밀도 유방암 세포에 의해 형성되었음을 보여주었다. 상기 결과는 결절이 전이성 병소(metastatic foci)임을 암시하였다. 종합하면, 장기간 지속되는 아르기닌 결핍에 의한 아르기닌의 고갈은 마우스 모델에서 공격적인 암세포의 전이를 억제한다. 암 전이가 환자의 주요 사망 원인이기 때문에(Knott et al., 2018, Nature, 554 : 378-381) 이러한 발견은 보다 효과적인 암 치료를 위한 새로운 가능성을 열 수 있을 것으로 생각된다.

도면

도면1



도면2a



도면2b

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
IHLSDVDGL	DPSFTPATGT	PVVGGLTYRE	GLYITEEIIYK	TGLLSGLDIM	EVNPSLGKTP
370	380	390			
EEVTRTVNTA	VAITLACFGL	AREGNHKPID	YLNPPK		

도면3

MKPISIIIGVPMDLGQTRRGVDMGPSAMRYAGVIERLERLHYDIEDLGDIPIGKAERLHEQ
 GDSRLRNLKAVAEANEKLAAAVDQVVQRGRFPLVLGGDHSIAIGTLAGVAKHYERLGVIV
 YDAHGDVNTAETSPSGNIHGMPLAASLGFGHPALTQIGGYCPKIKPEHVVLIGVRSDEG
 EKKFIREKGIKIYTMHEVDRLGMTRVMEETIAYLKERTDGVHLSLDLDGLDPSDAPGVGT
 PVIIGGLTYRESHLAMEMPLAEAQIITSAEFVEVNPILDERNKTASVAVALMGSLFGEKLMH
 HHHHH

도면4

BCA	MKPISIIIGVPMDLGQTRRGVDMGPSAMRYAGVIERLERLHYDIEDLGDIPIGKAERLHEQ
BHA	MKPISIIIGVPMDLGQTRRGVDMGPSAMRYAGVIERLERLHYDIEDLGDIPIGKAERLHEQ
BAH	MKPISIIIGVPMDLGQTRRGVDMGPSAMRYAGVIERLERLHYDIEDLGDIPIGKAERLHEQ

BCA	GDSRLRNLKAVAEANEKLAAAVDQVVQRGRFPLVLGGDHSIAIGTLAGVAKHYERLGVIV
BHA	GDSRLRNLKAVAEANEKLAAAVDQVVQRGRFPLVLGGDHSIAIGTLAGVAKHYERLGVIV
BAH	GDSRLRNLKAVAEANEKLAAAVDQVVQRGRFPLVLGGDHSIAIGTLAGVAKHYERLGVIV

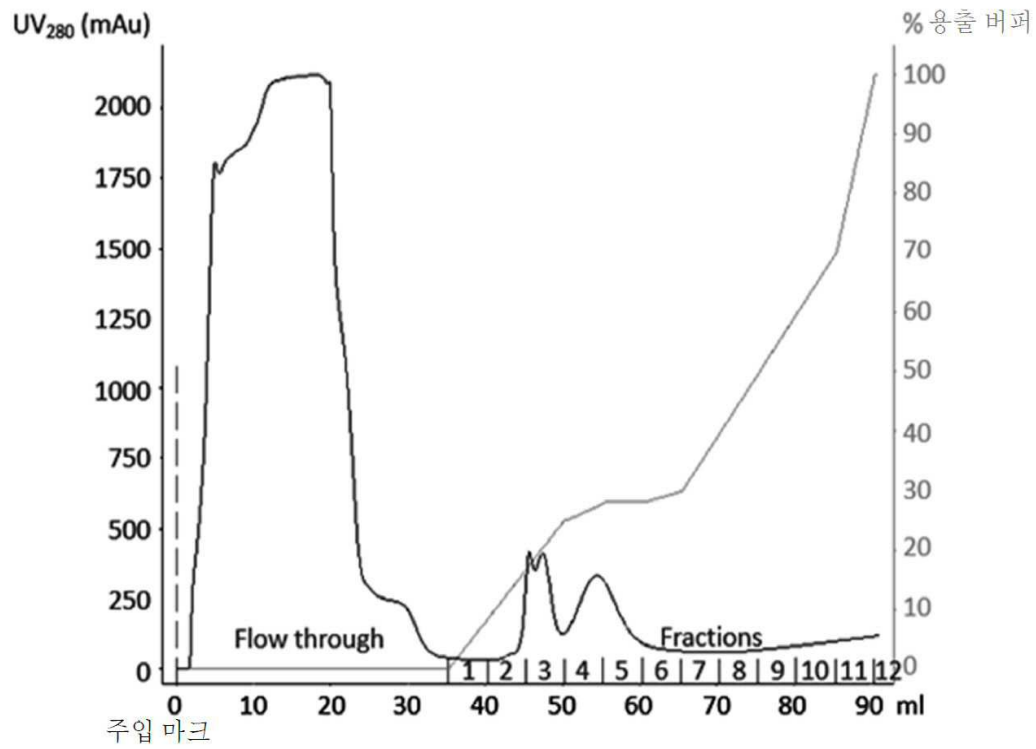
BCA	YDAHGDVNTAETSPSGNIHGMPLAASLGFGHPALTQIGGYCPKIKPEHVVLIGVRSDEG
BHA	YDAHGDVNTAETSPSGNIHGMPLAASLGFGHPALTQIGGYCPKIKPEHVVLIGVRSDEG
BAH	YDAHGDVNTAETSPSGNIHGMPLAASLGFGHPALTQIGGYCPKIKPEHVVLIGVRSDEG

BCA	EKKFIREKGIKIYTMHEVDRLGMTRVMEETIAYLKERTDGVHLSLDLDGLDPSDAPGVGT
BHA	EKKFIREKGIKIYTMHEVDRLGMTRVMEETIAYLKERTDGVHLSLDLDGLDPSDAPGVGT
BAH	EKKFIREKGIKIYTMHEVDRLGMTRVMEETIAYLKERTDGVHLSLDLDGLDPSDAPGVGT

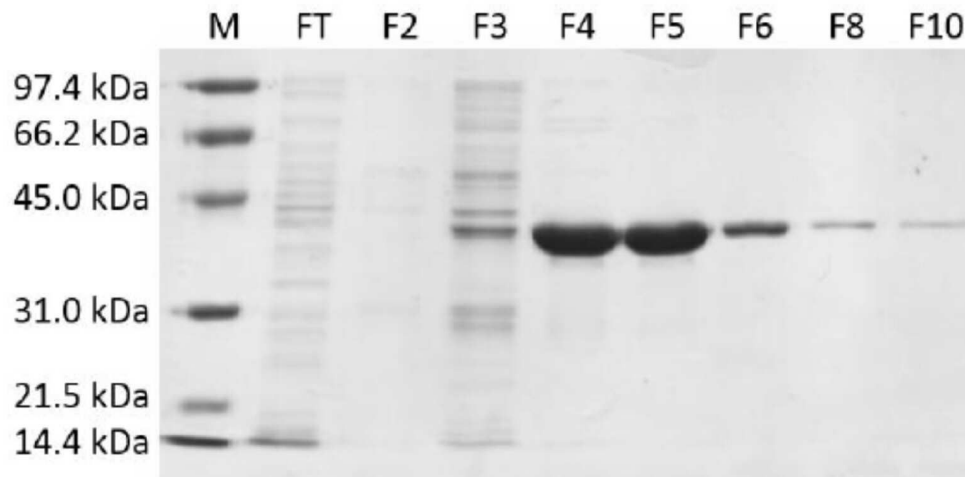
BCA	PVIIGGLTYRESHLAMEMPLAEAQIITSAEFVEVNPILDERNKTASVAVALMGSLFGEKLMH
BHA	PVIIGGLTYRESHLAMEMPLAEAQIITSAEFVEVNPILDERNKTASVAVALMGSLFGEKLMH
BAH	PVIIGGLTYRESHLAMEMPLAEAQIITSAEFVEVNPILDERNKTASVAVALMGSLFGEKLMH

BCA	HHHHH-----
BHA	HHHHHAQHDEAVDANSLAEAKVLANRELDKYGVSDYYKNLINNAKTVEGVKALIDEILAA
BAH	QHDEAVDAN-----SLAEAKVLANRELDKYGVSDYYKNLINNAKTVEGVKALIDEILAA
	:*,.
BCA	-----
BHA	LP-----
BAH	LPHHHHH

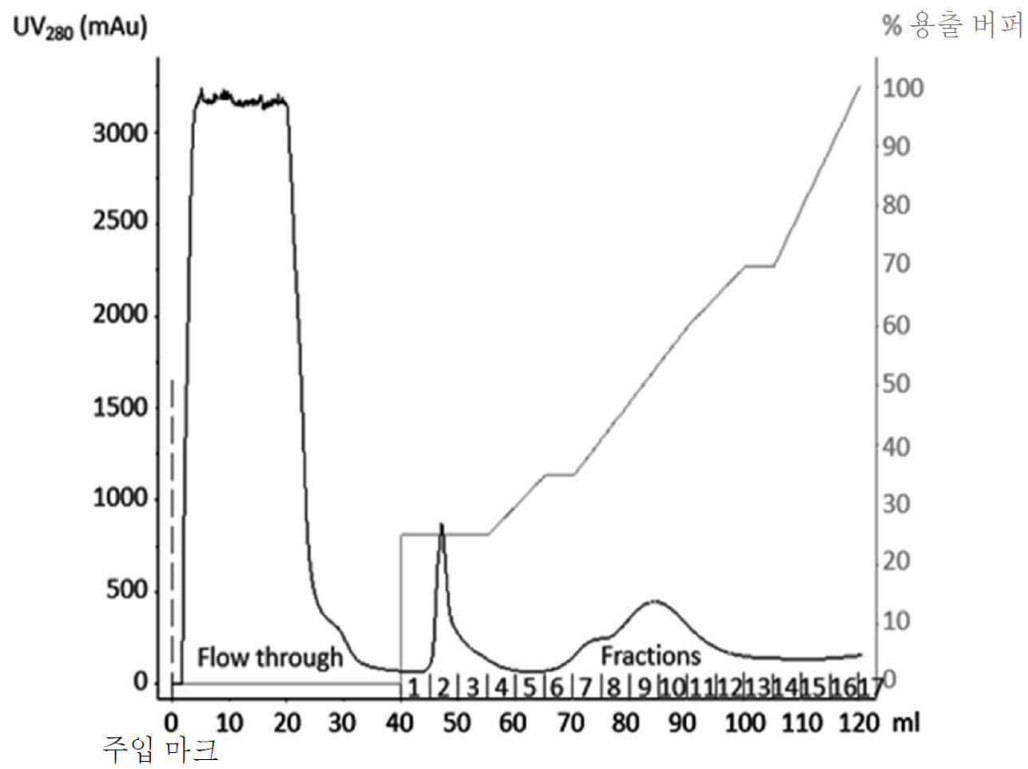
도면5a



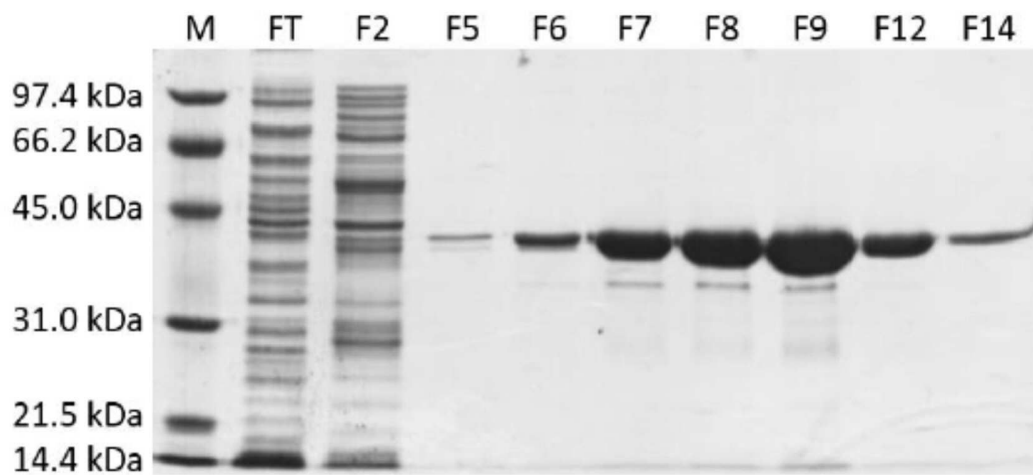
도면5b



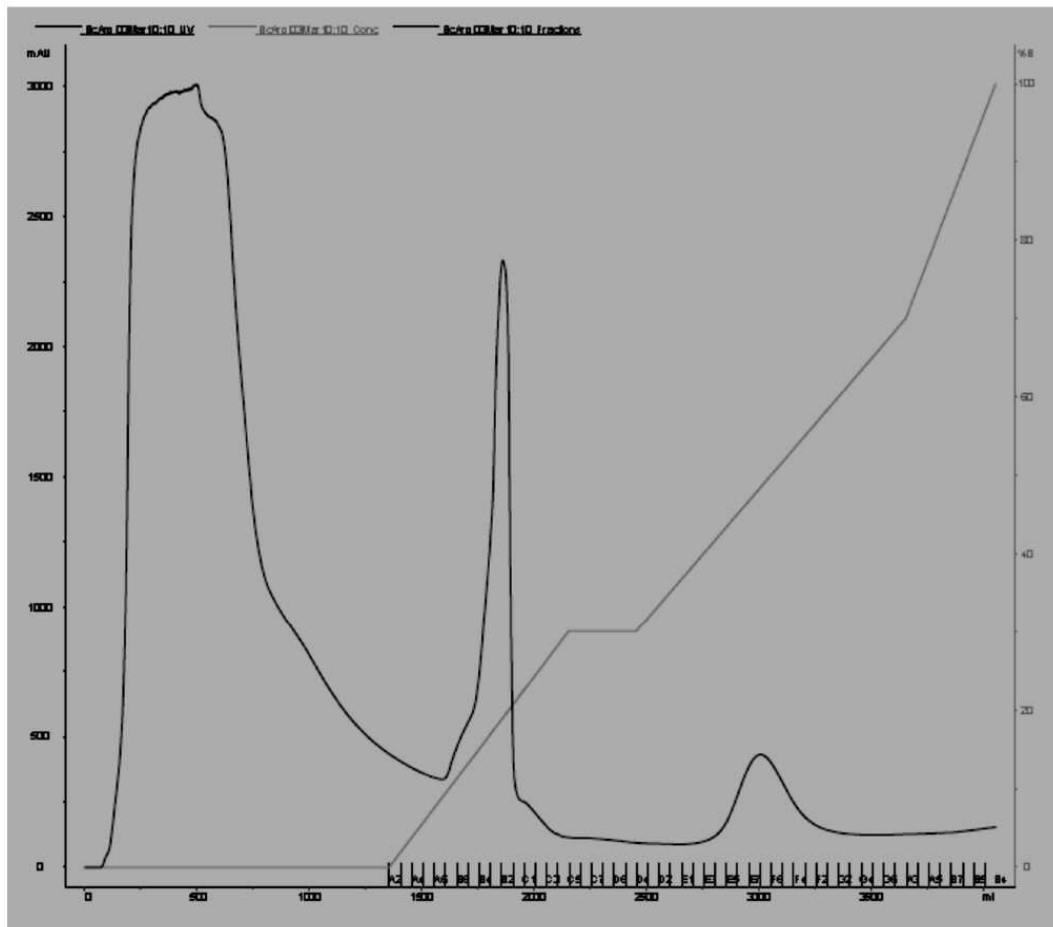
도면5c



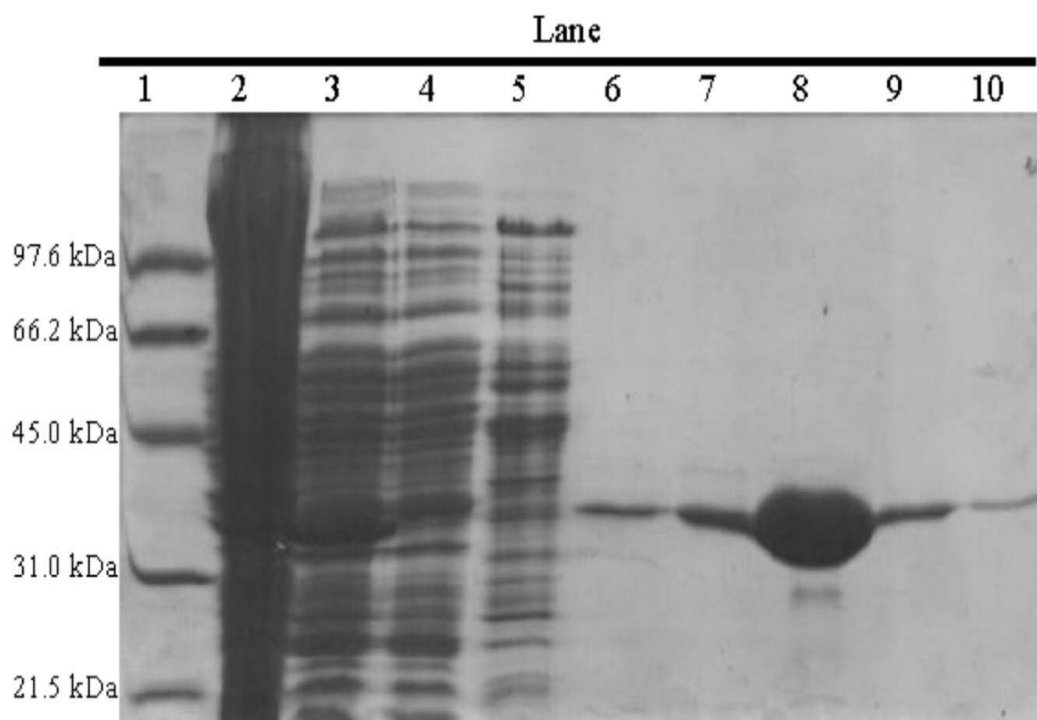
도면5d



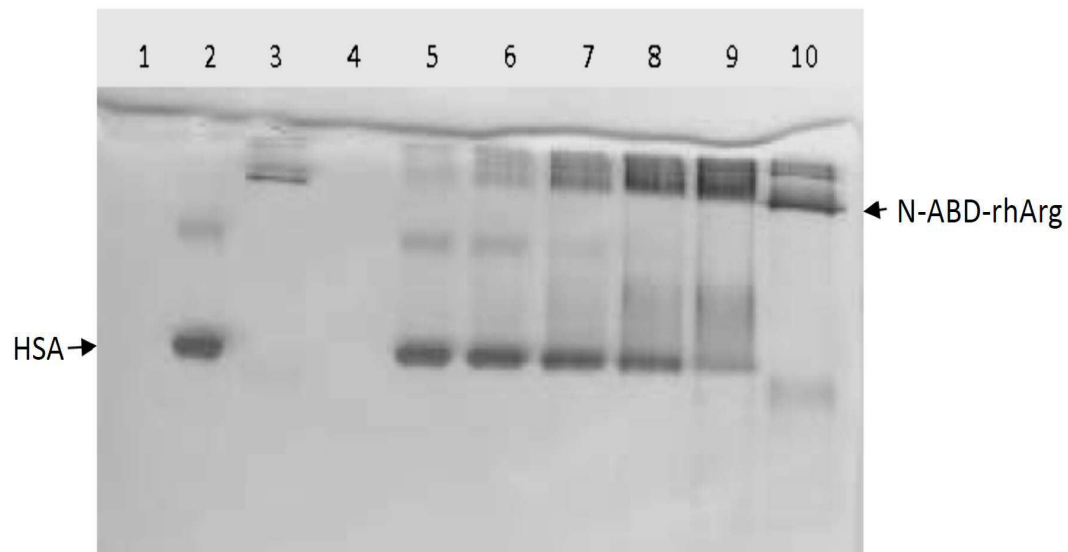
도면6a



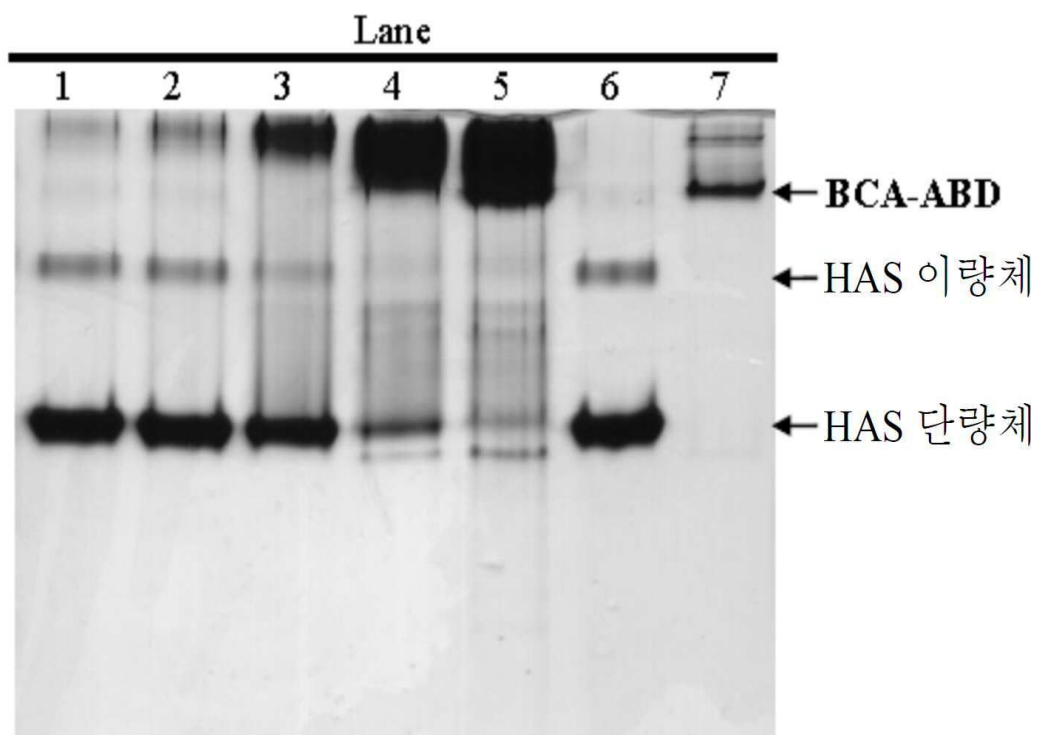
도면6b



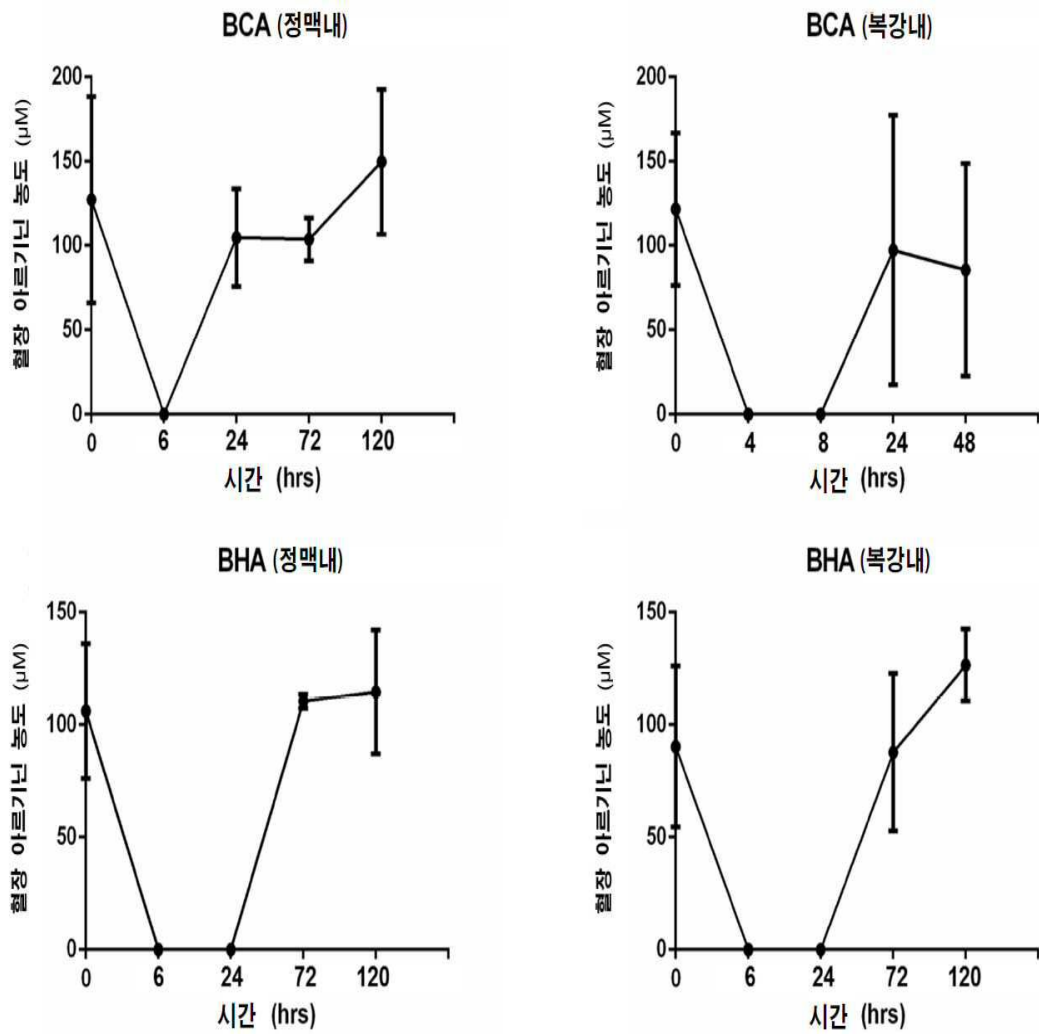
도면7



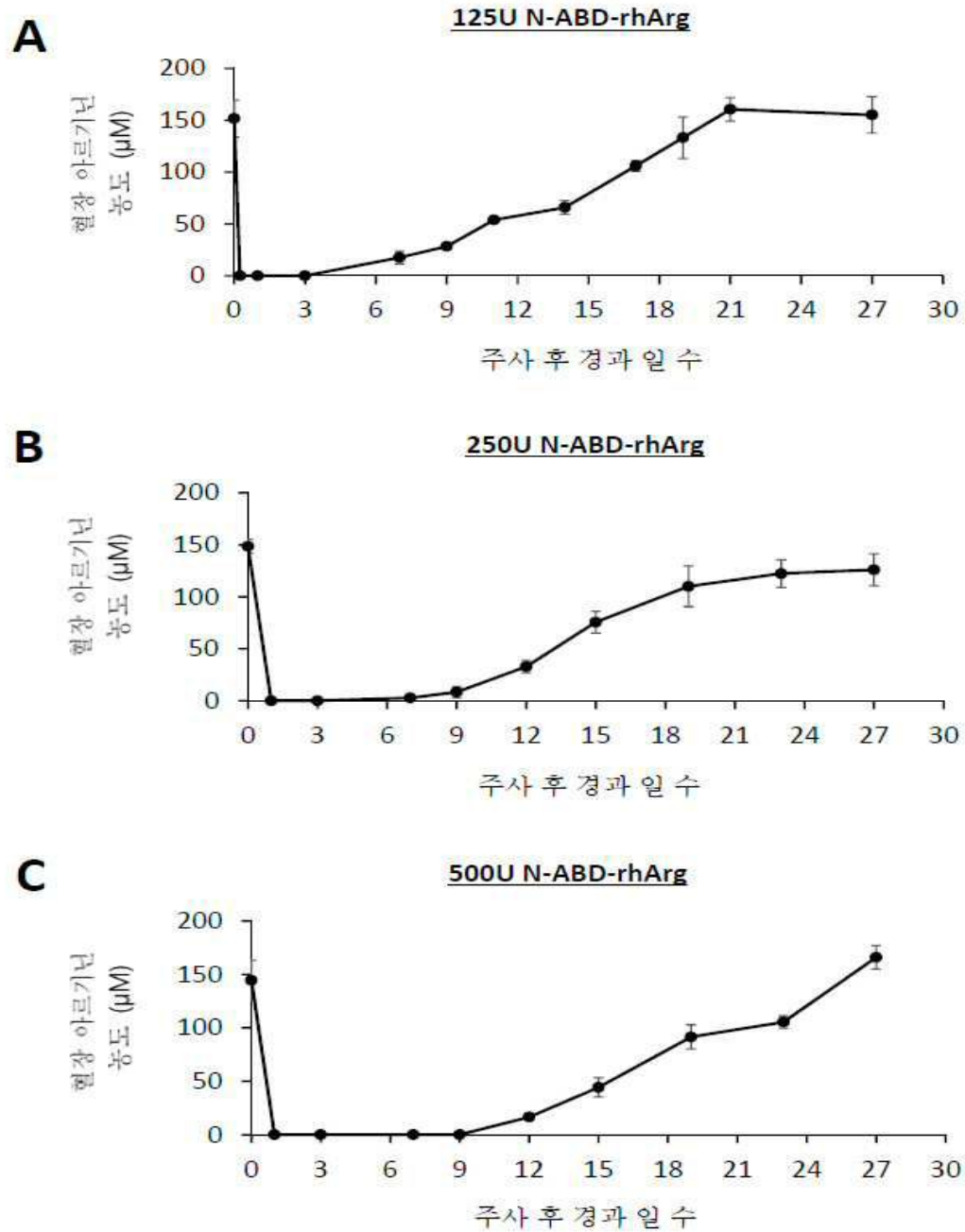
도면8



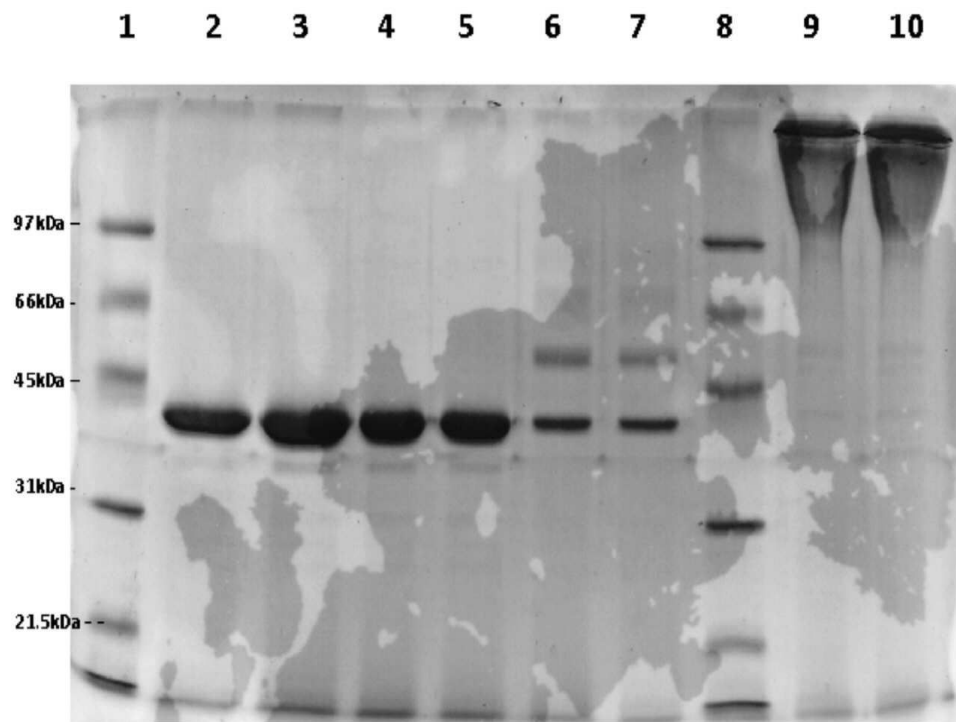
도면9



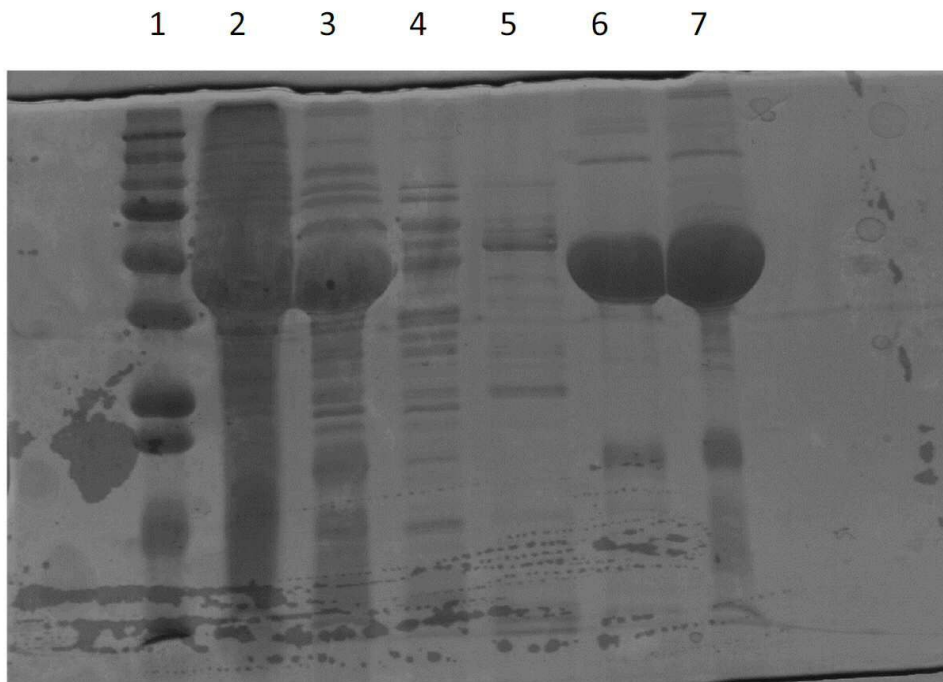
도면10



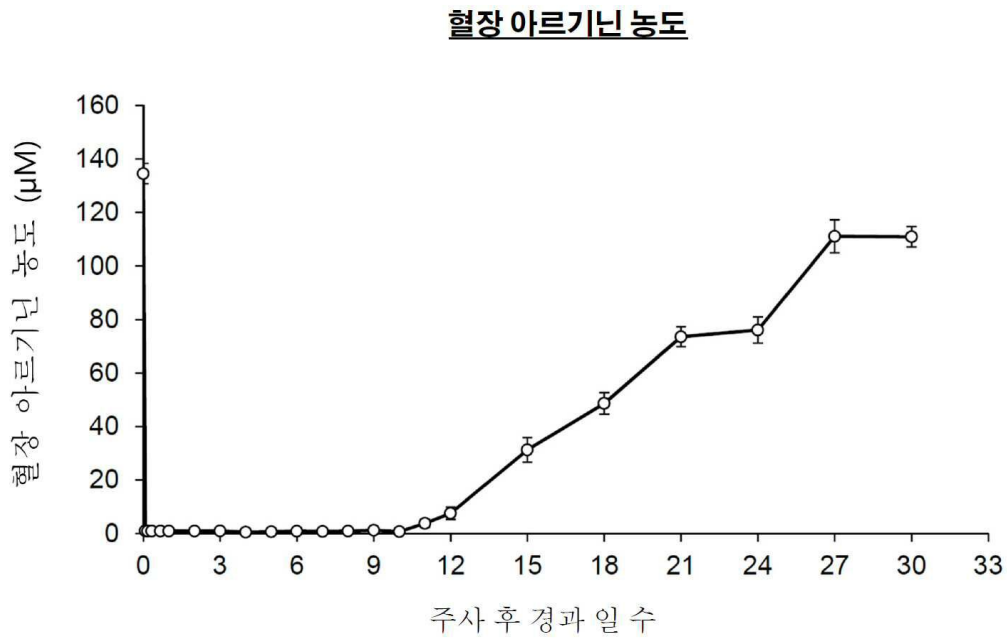
도면11



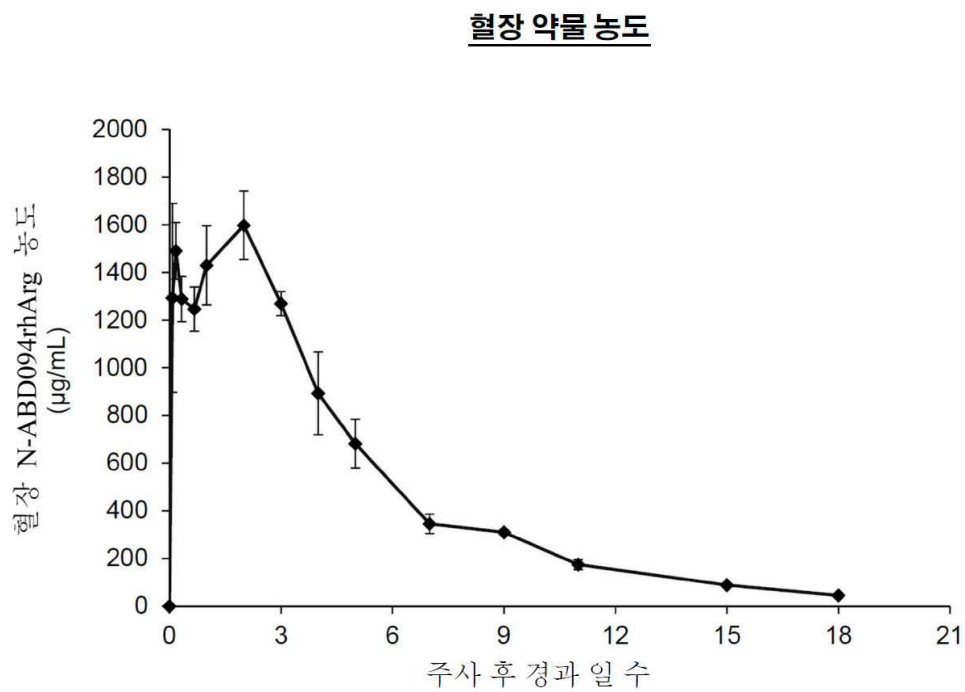
도면12



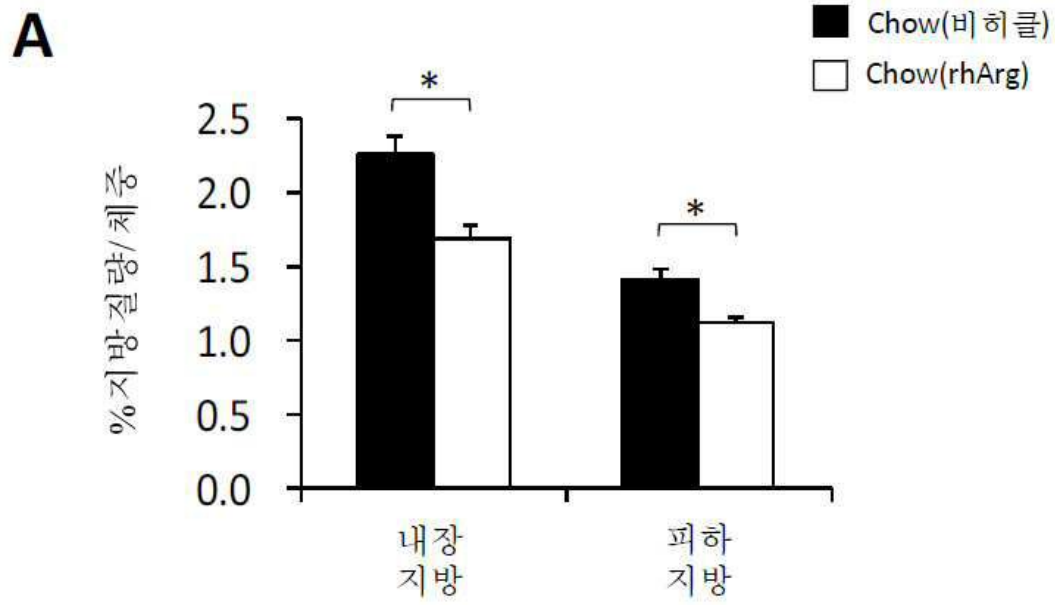
도면13



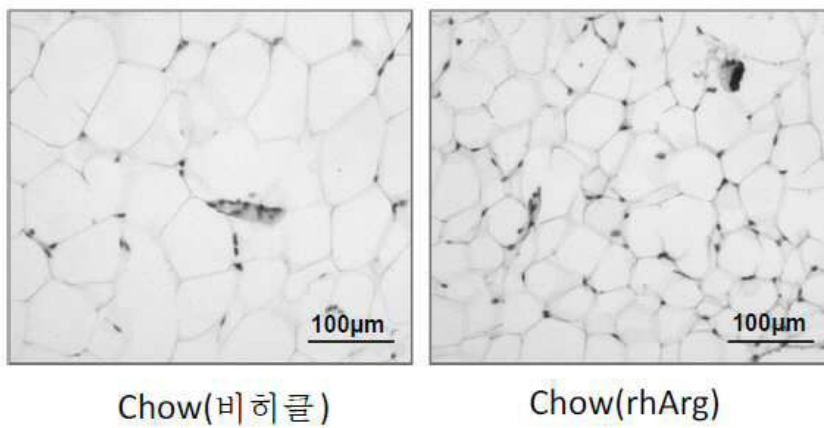
도면14



도면15



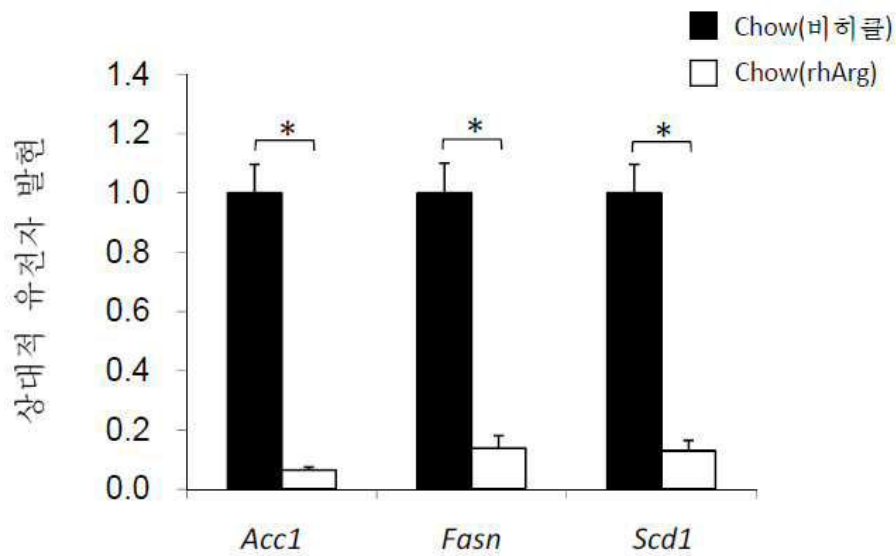
B WAT의 H&E 염색



도면16

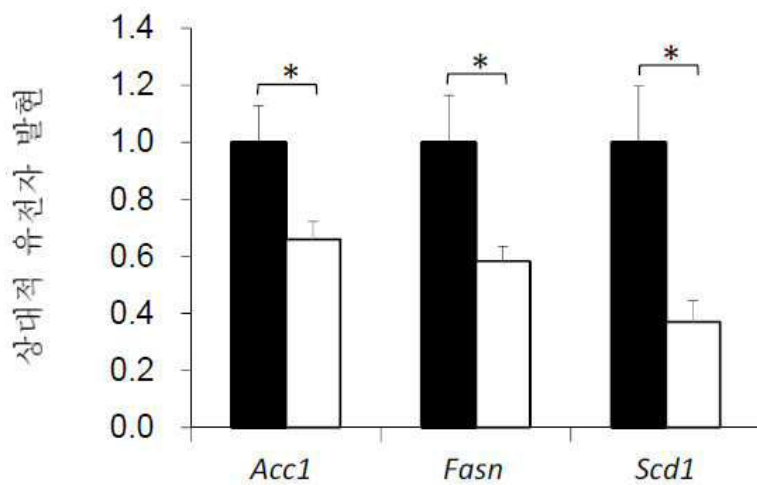
A

내장 WAT 내 지방 생성 관련 유전자

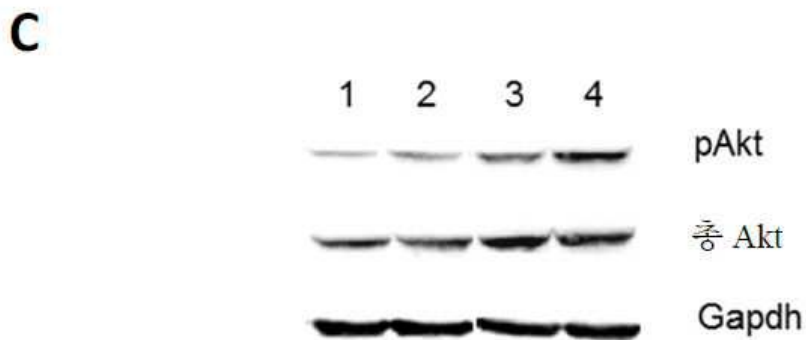
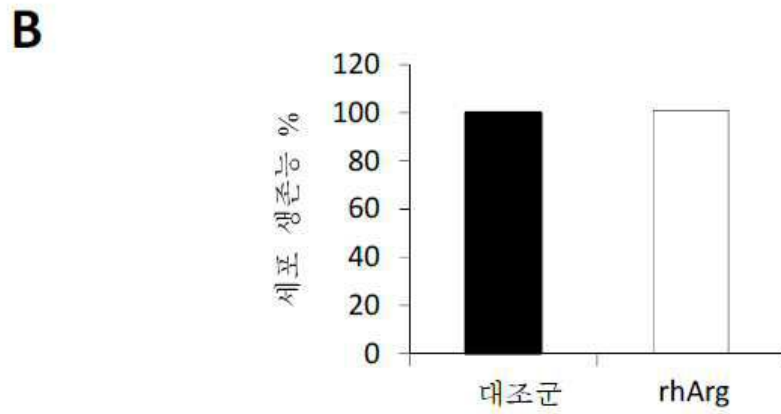
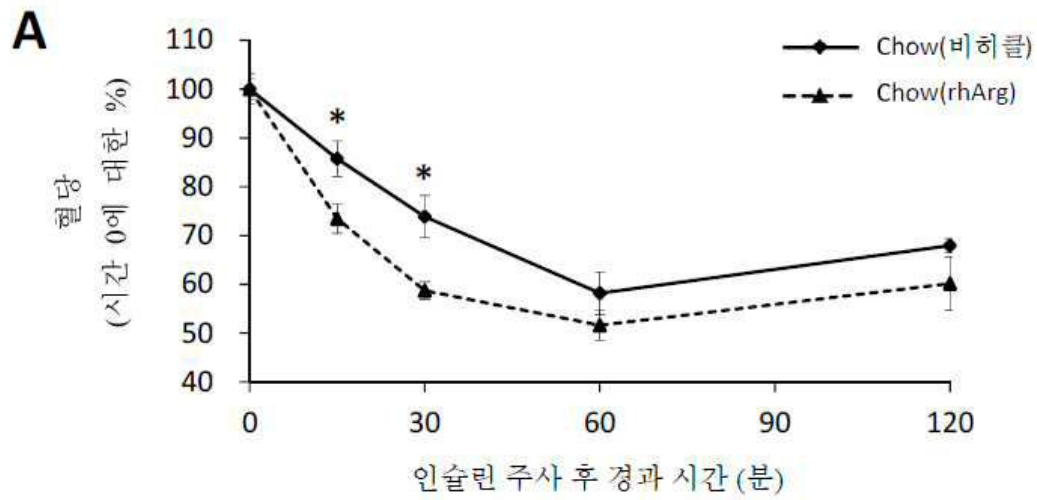


B

간 내 지방 생성 관련 유전자



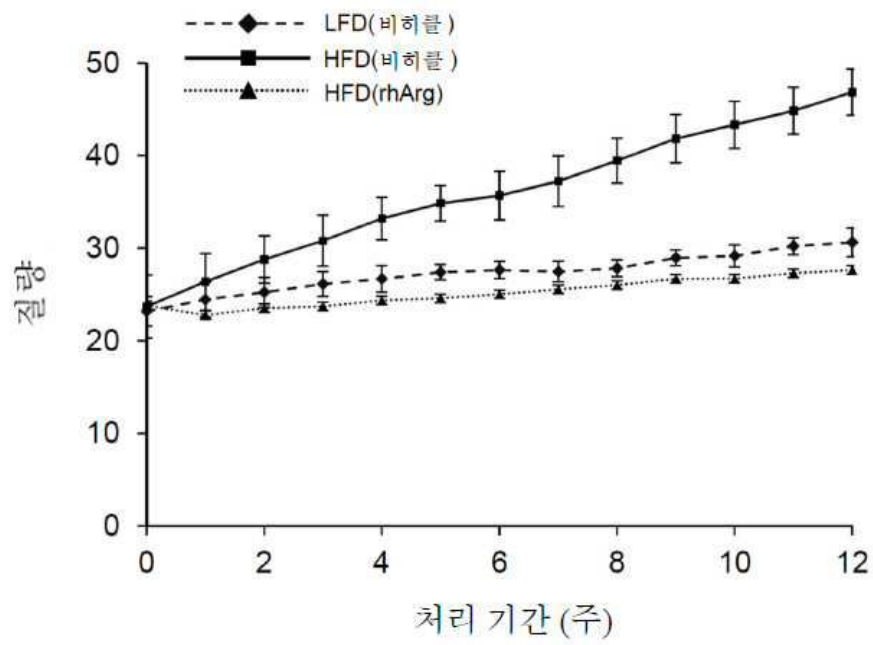
도면17



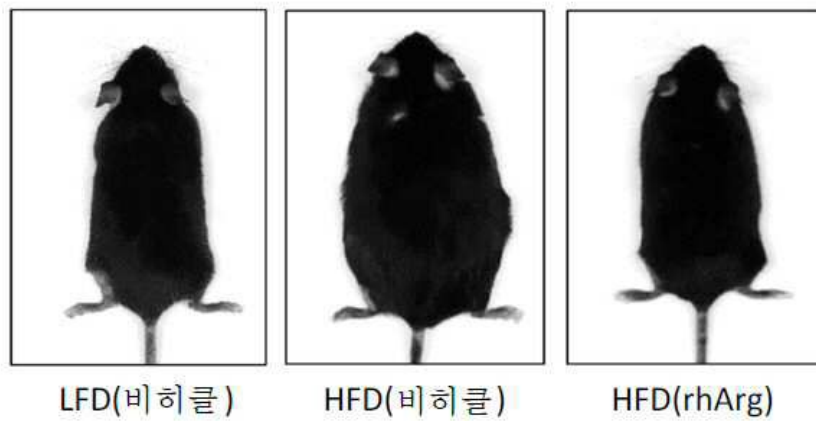
도면18

A

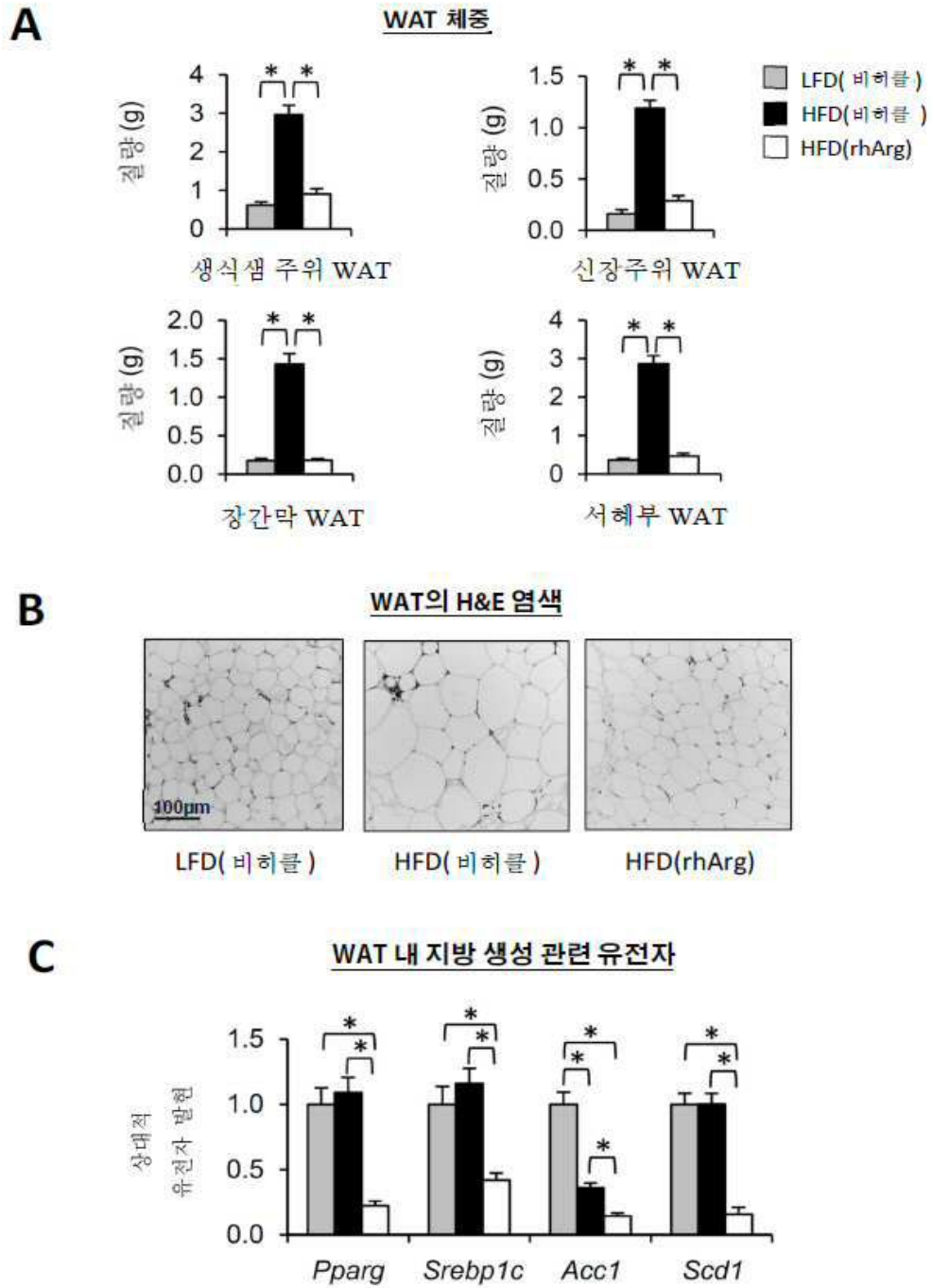
체중 (수컷)



B

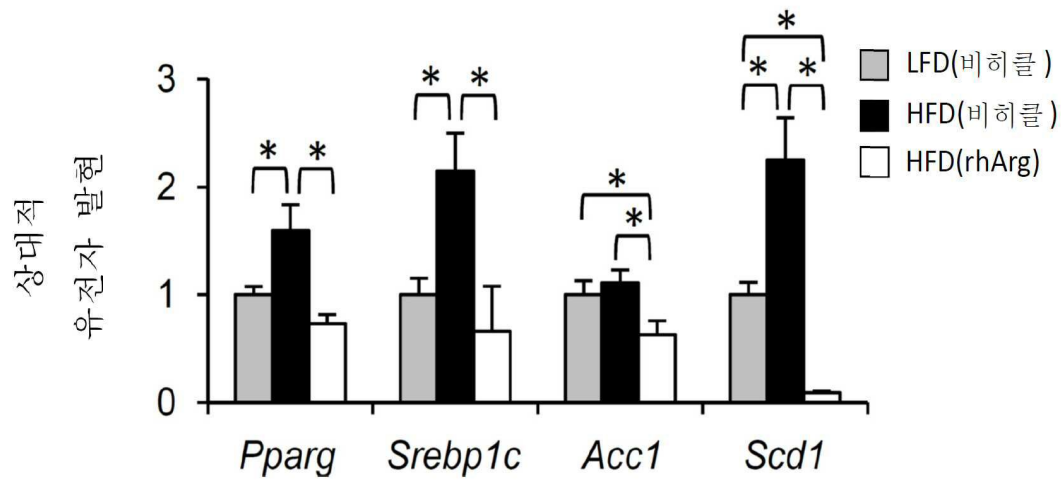


도면19

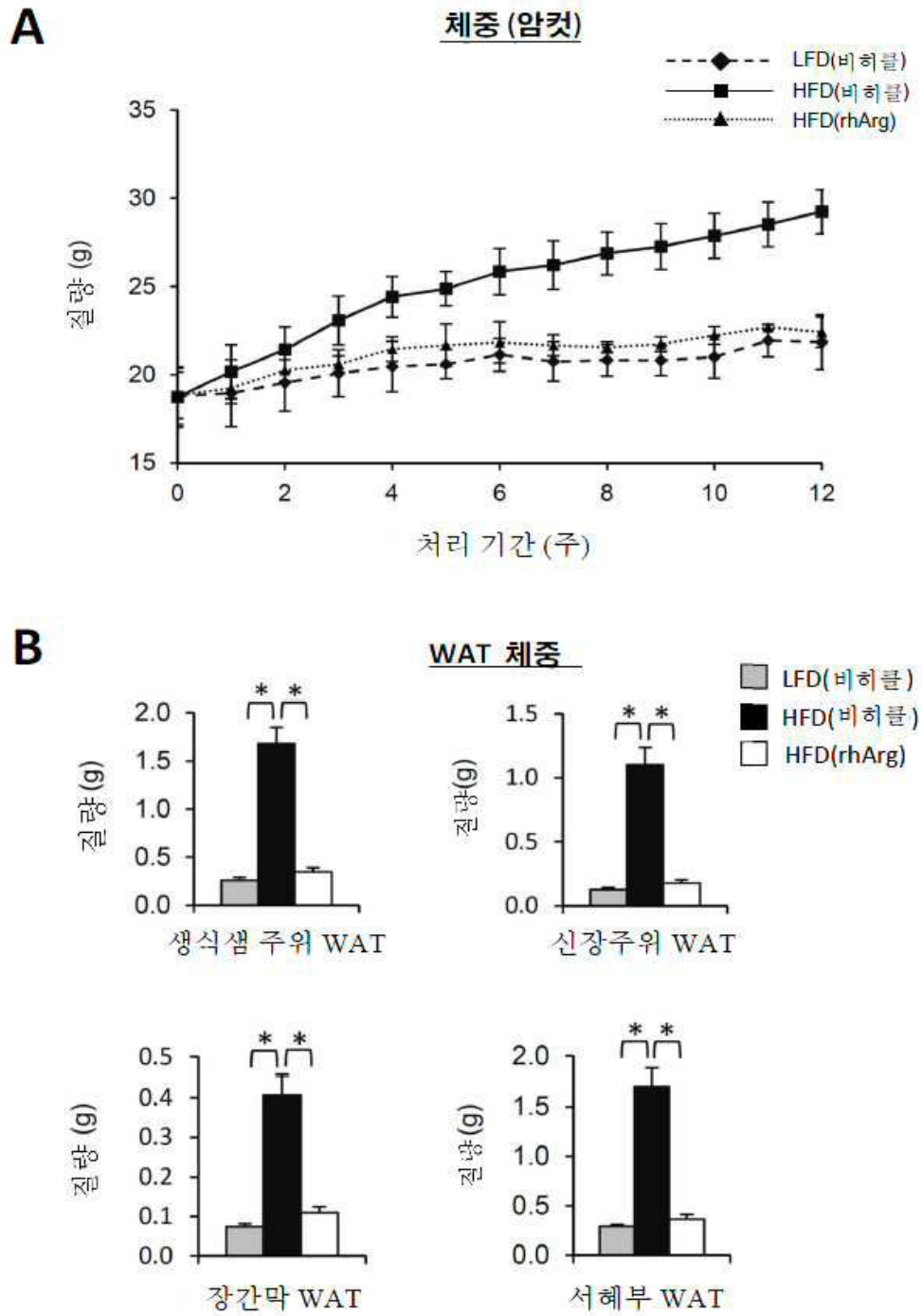


도면20

골격근의 지방 생성 관련 유전자



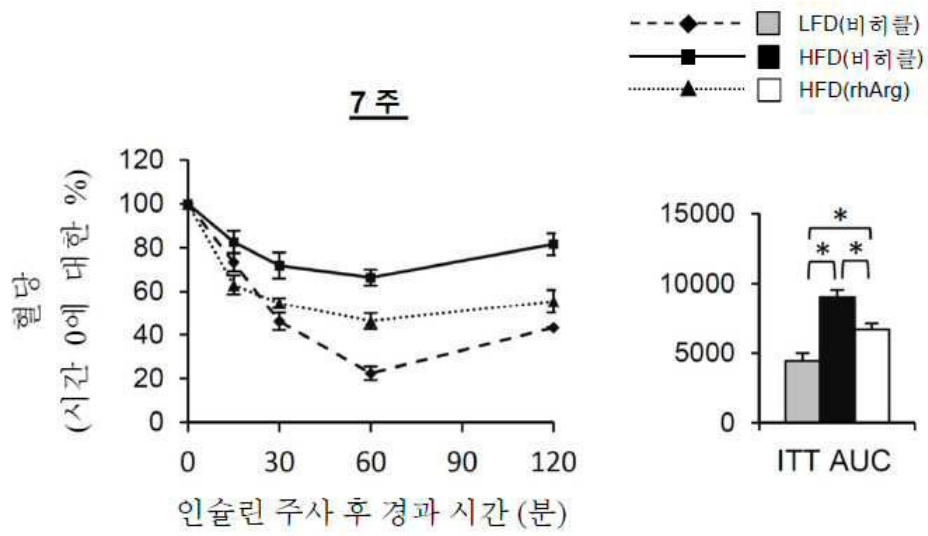
도면21



도면22

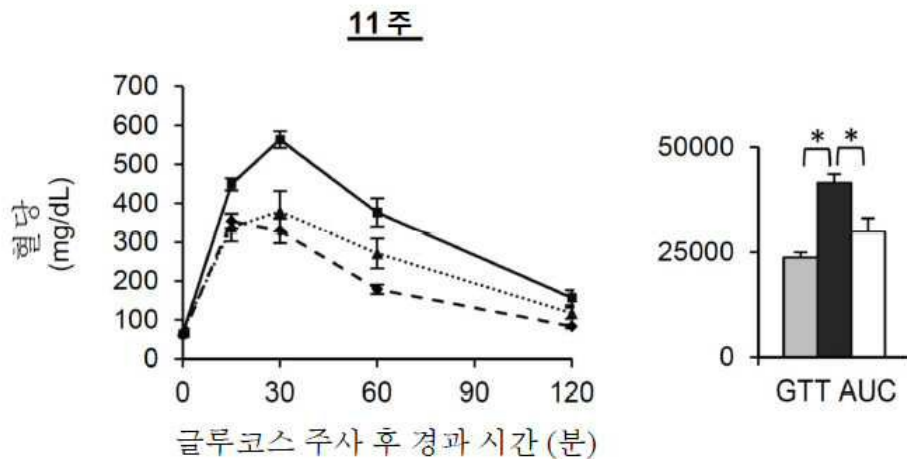
A

인슐린 내성 검사

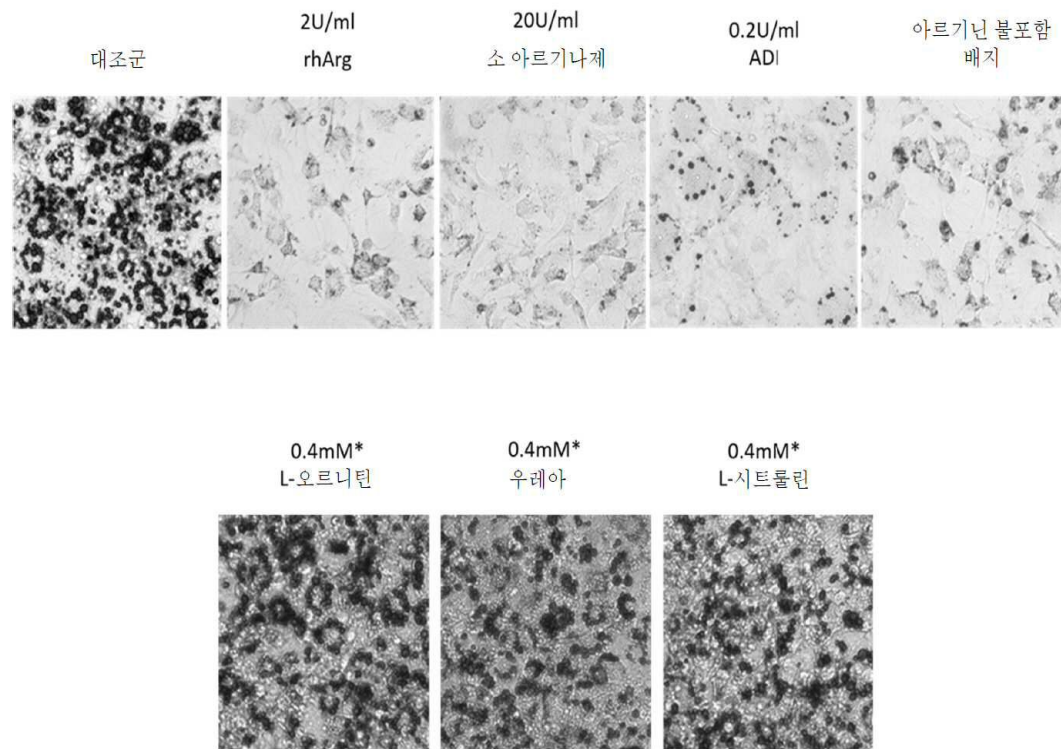


B

내당능 검사



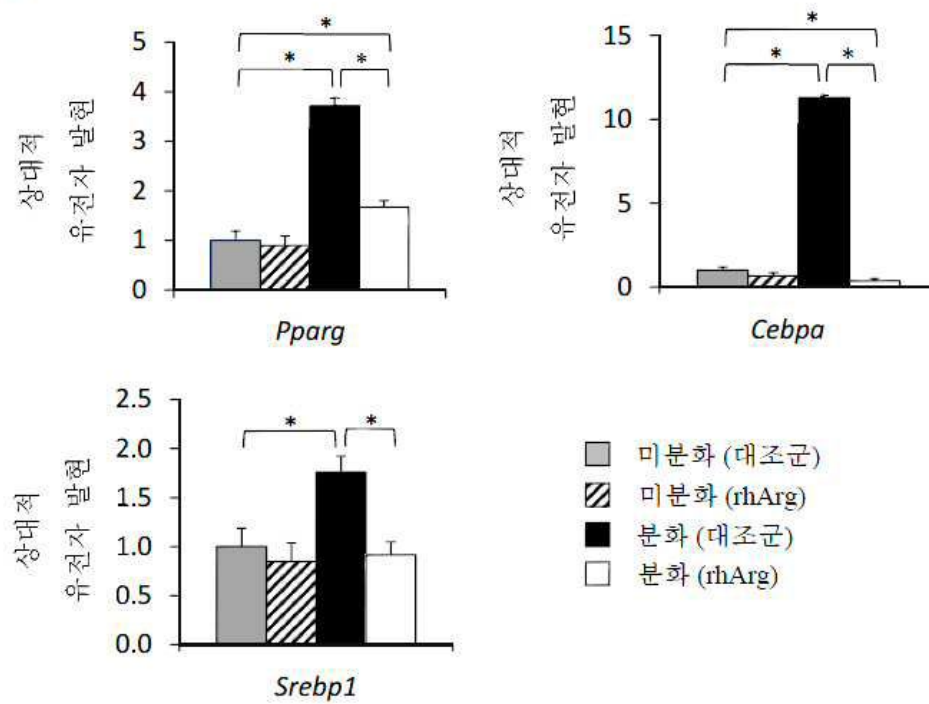
도면23



도면24

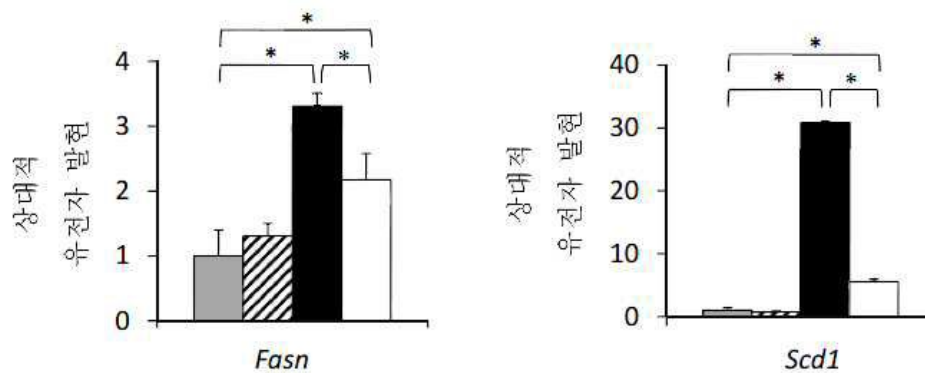
A

3T3-L1 세포 내 지방 생성 유전자

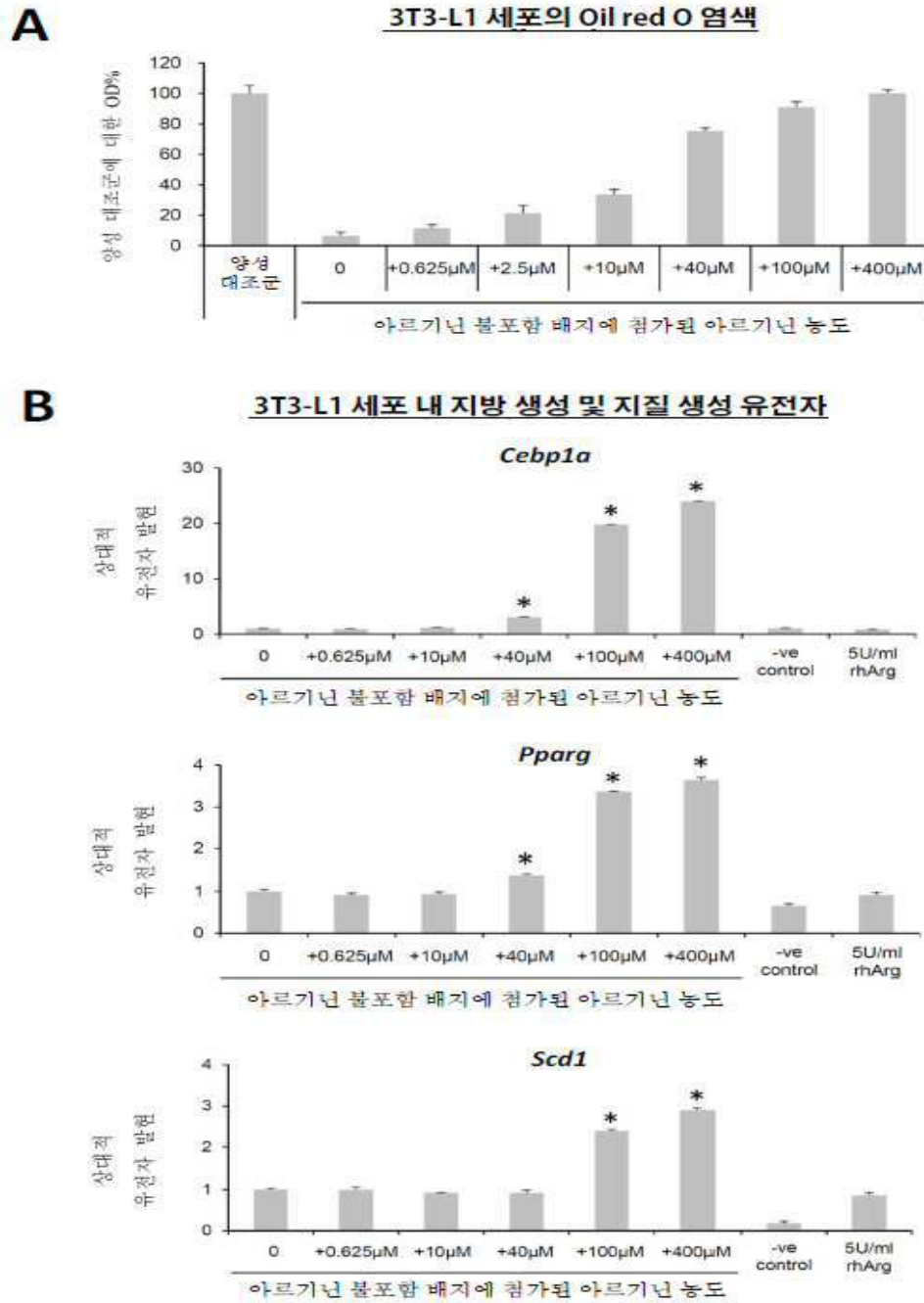


B

3T3-L1 세포 내 지질 생성 유전자



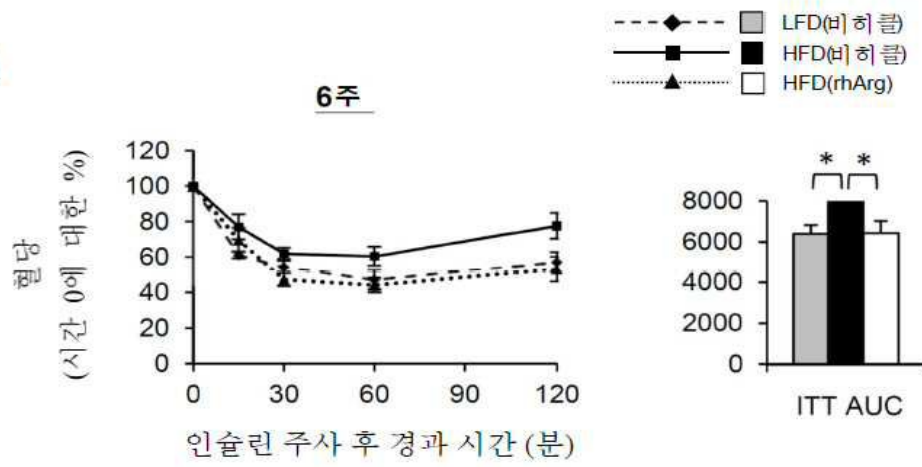
도면25



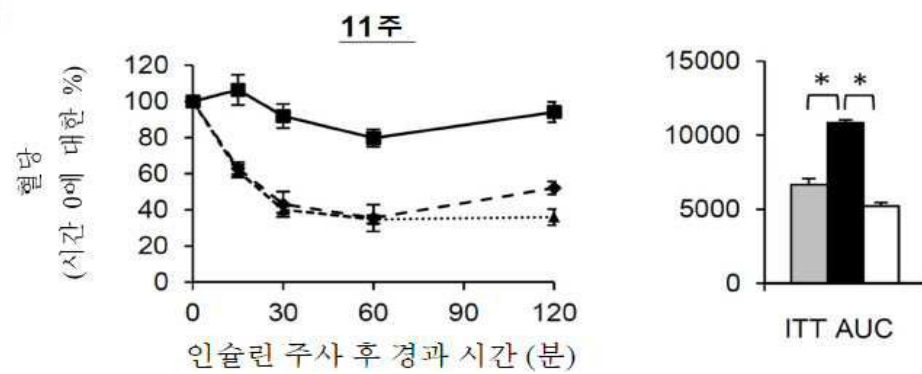
도면26

인슐린 내성 검사

A



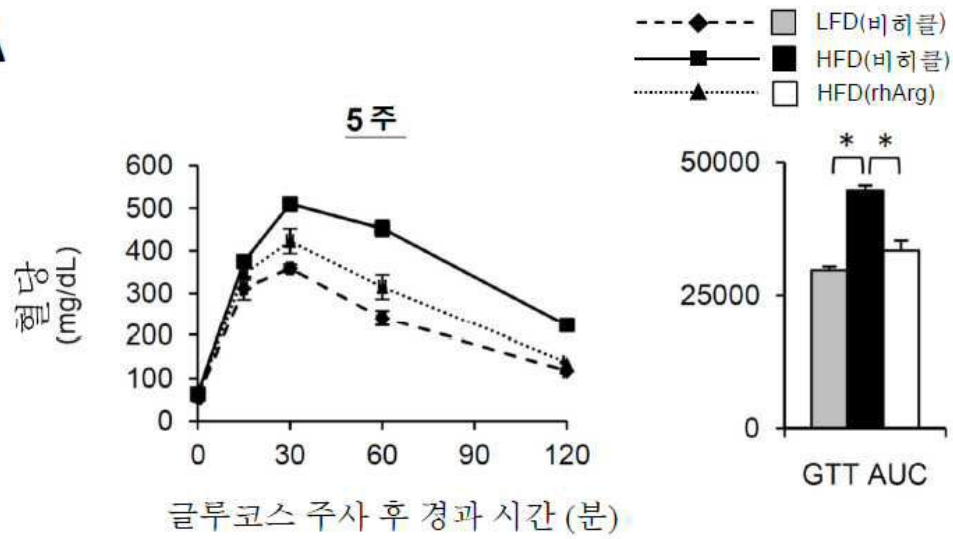
B



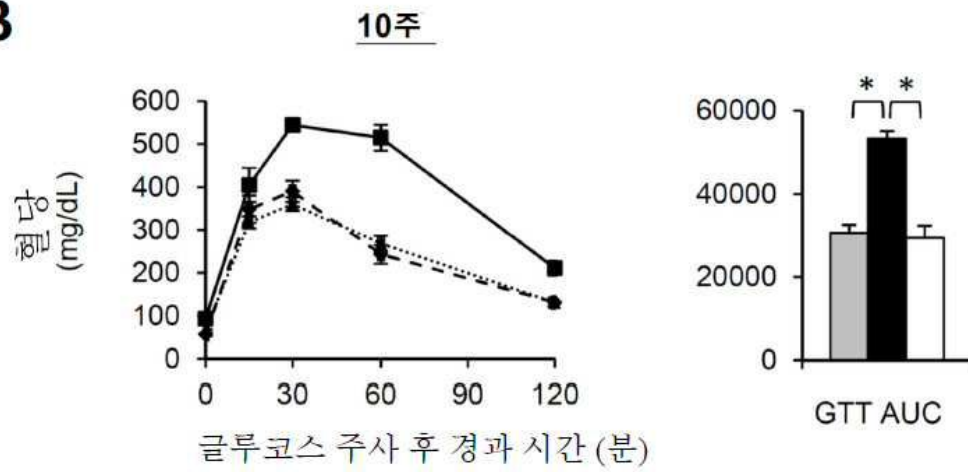
도면27

내당능 검사

A

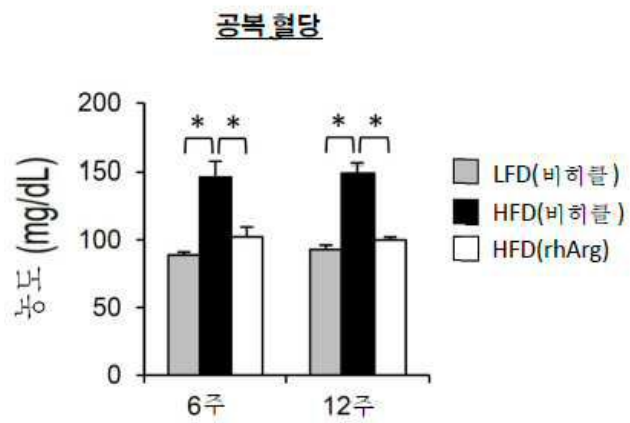


B

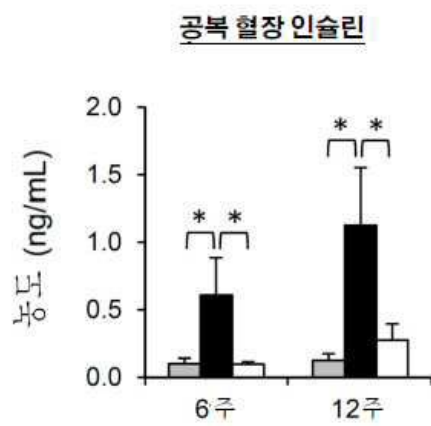


도면28

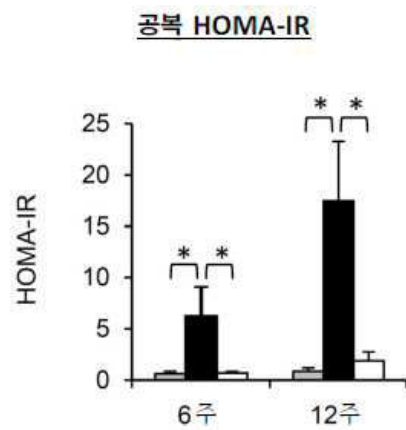
A



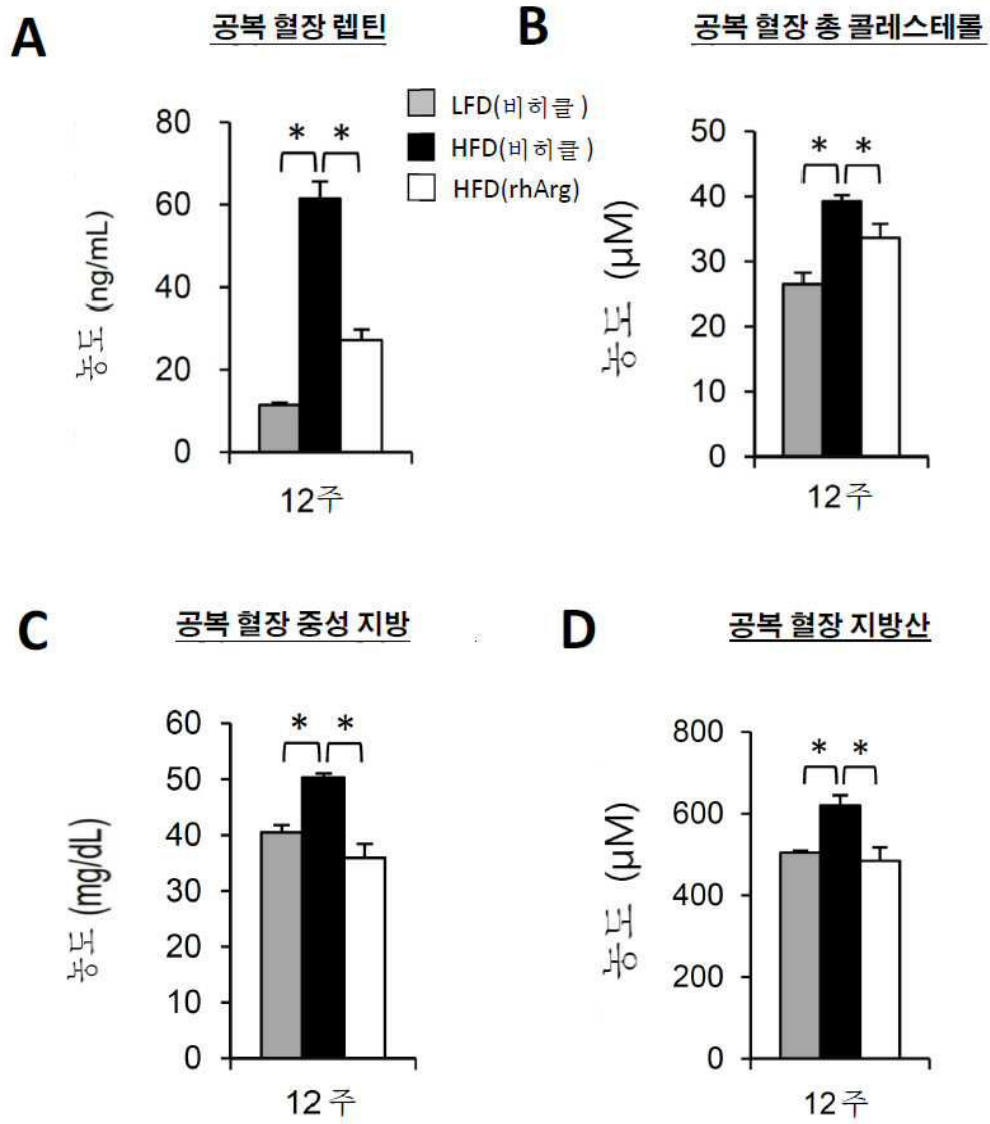
B



C



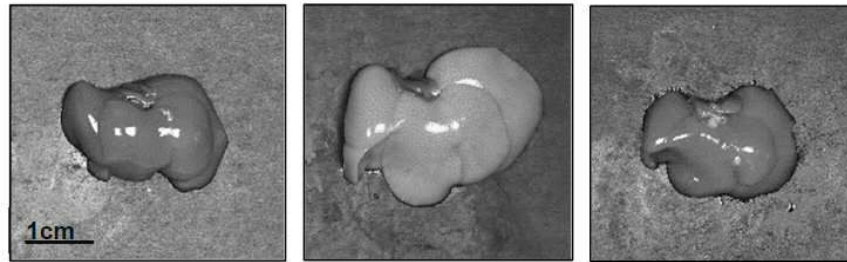
도면29



도면30

A

신선한 전체 간



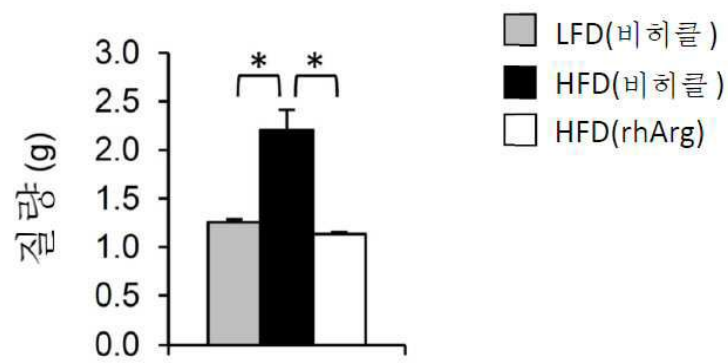
LFD(비히클)

HFD(비히클)

HFD(rhArg)

B

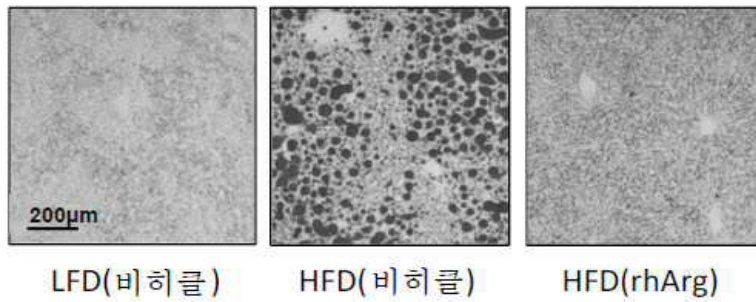
간 중량



도면31

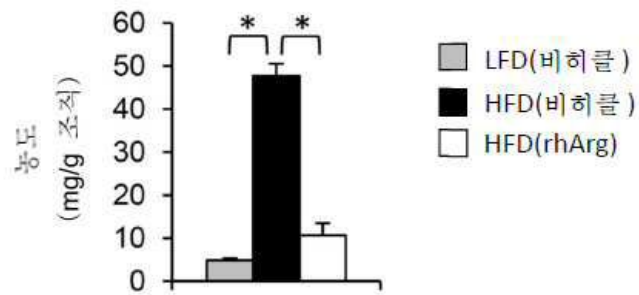
A

간 내 지질의 Oil red O 염색



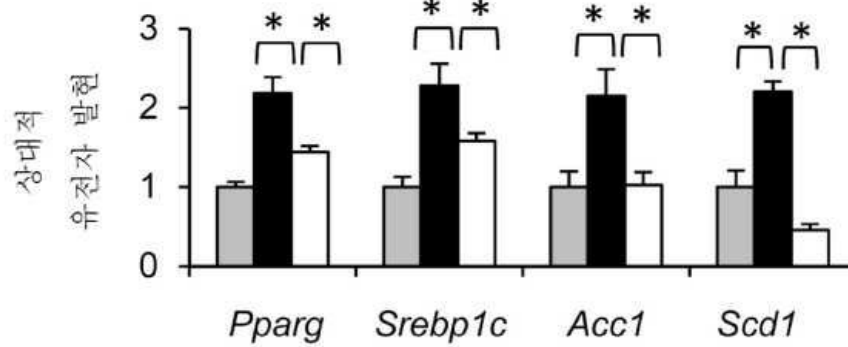
B

간의 중성 지방

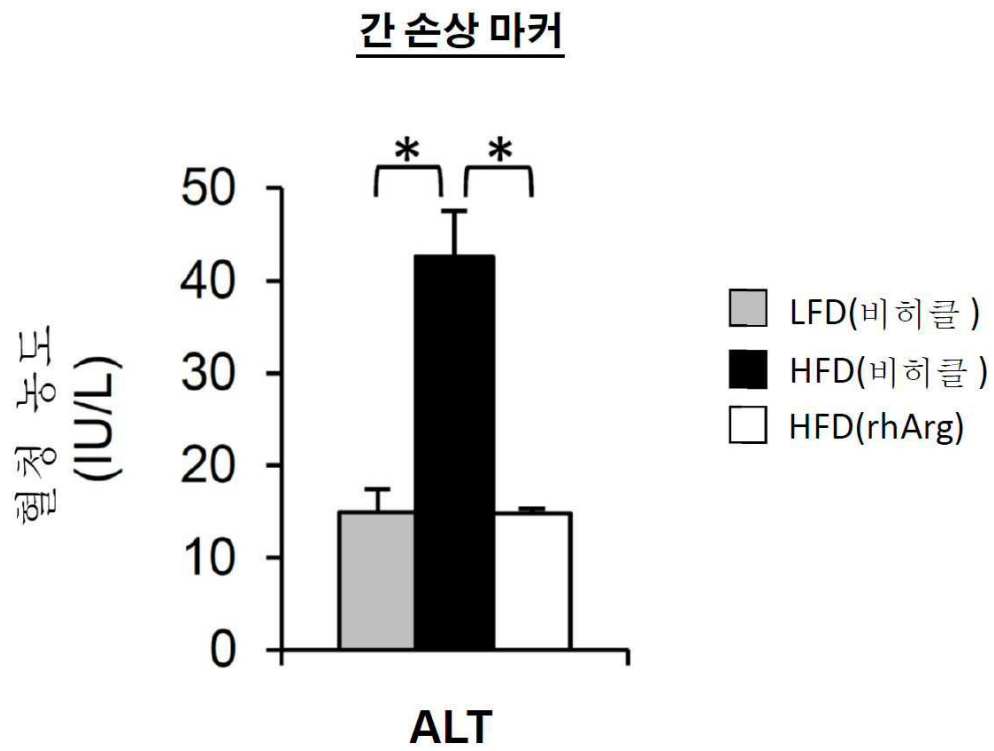


C

간 내 지방 생성 관련 유전자

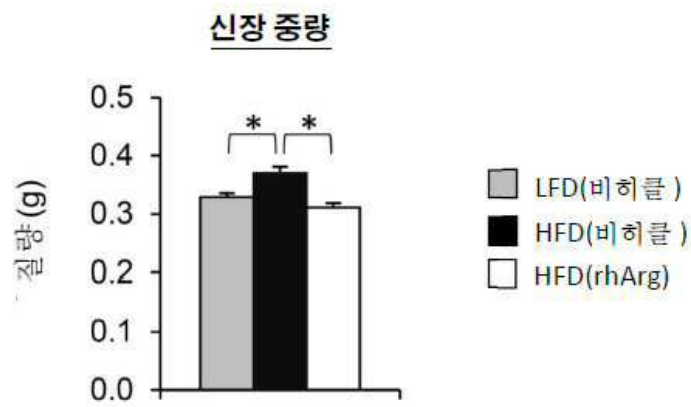


도면32

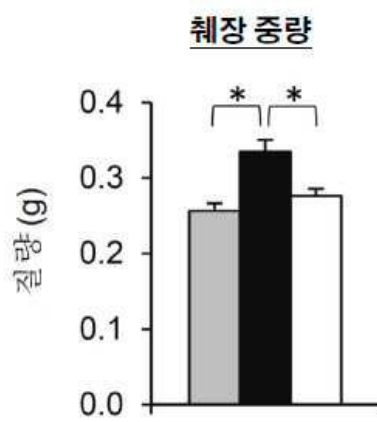


도면33

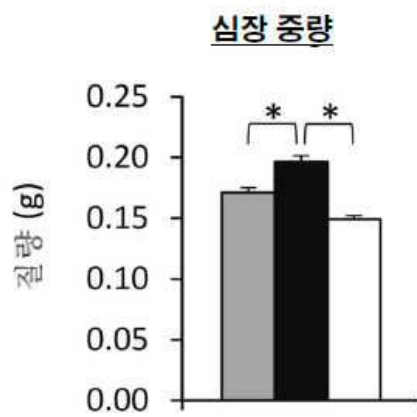
A



B



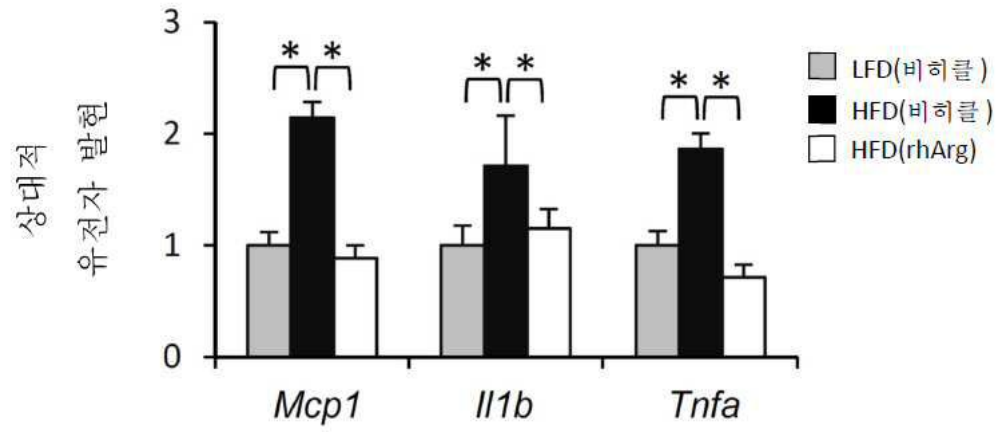
C



도면34

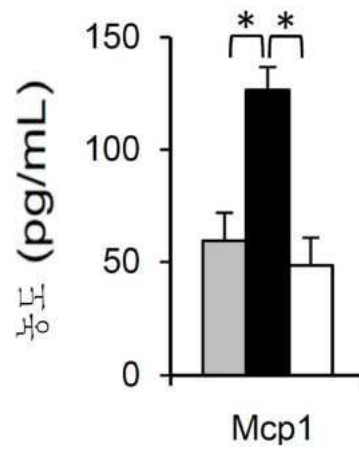
A

내장 WAT 내 염증촉진 아디포킨



B

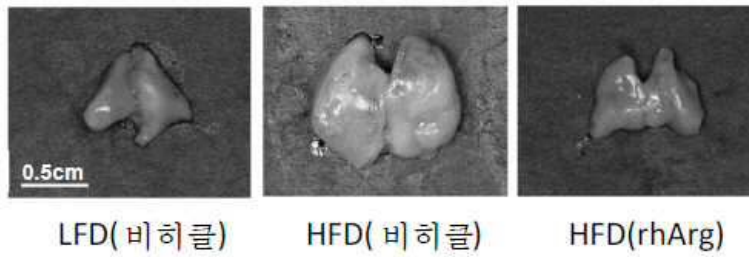
혈청 내 염증촉진 사이토카인



도면35

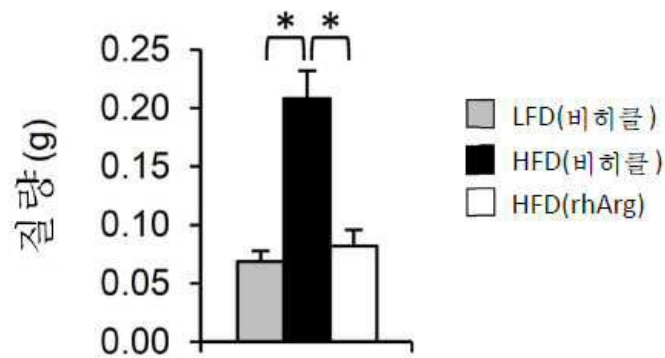
A

신선한 전체 견갑골간 BAT



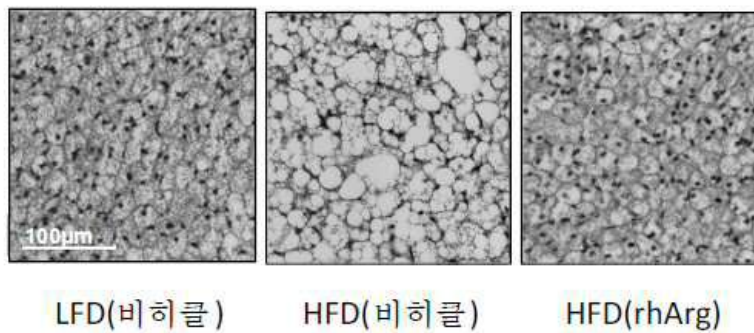
B

견갑골간 BAT 중량



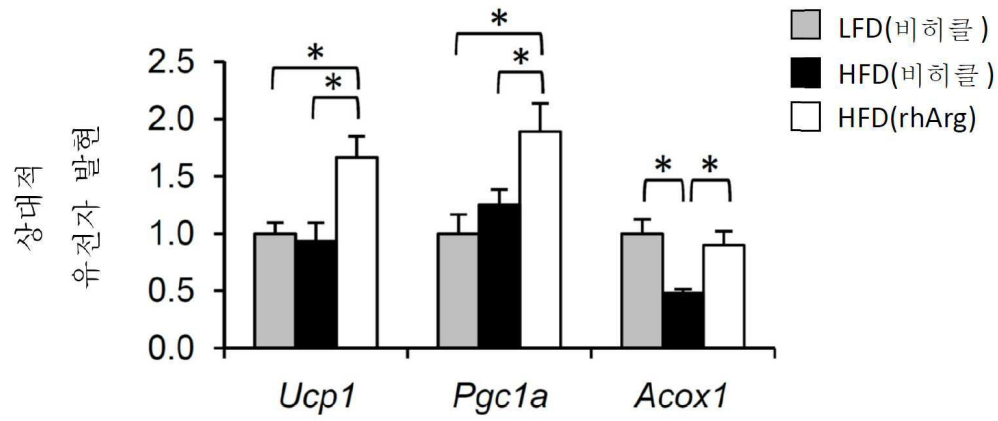
C

BAT의 H&E 염색

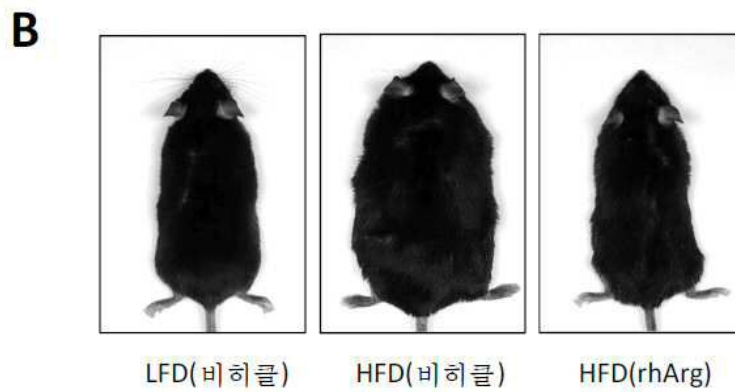
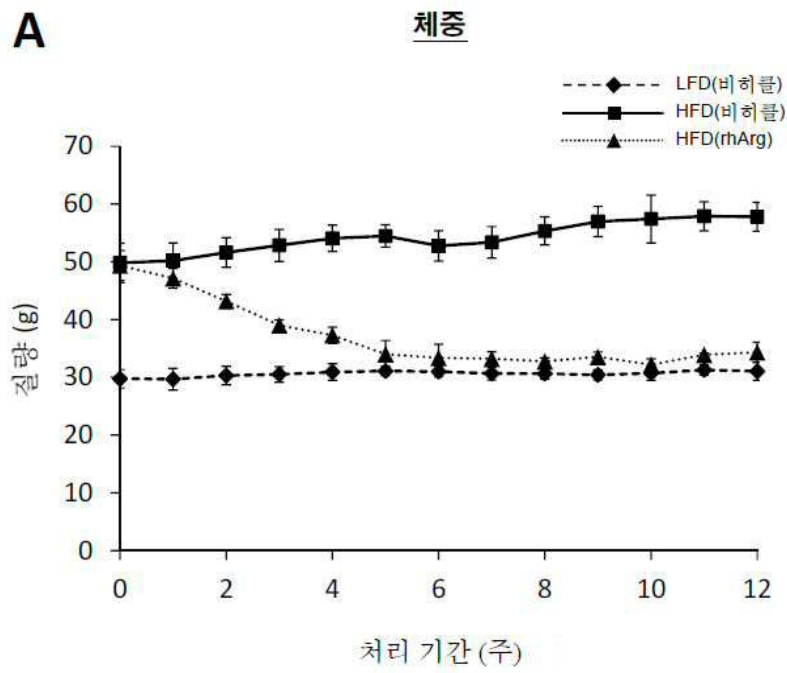


도면36

BAT 내 열발생 및 지방산 산화 조절기

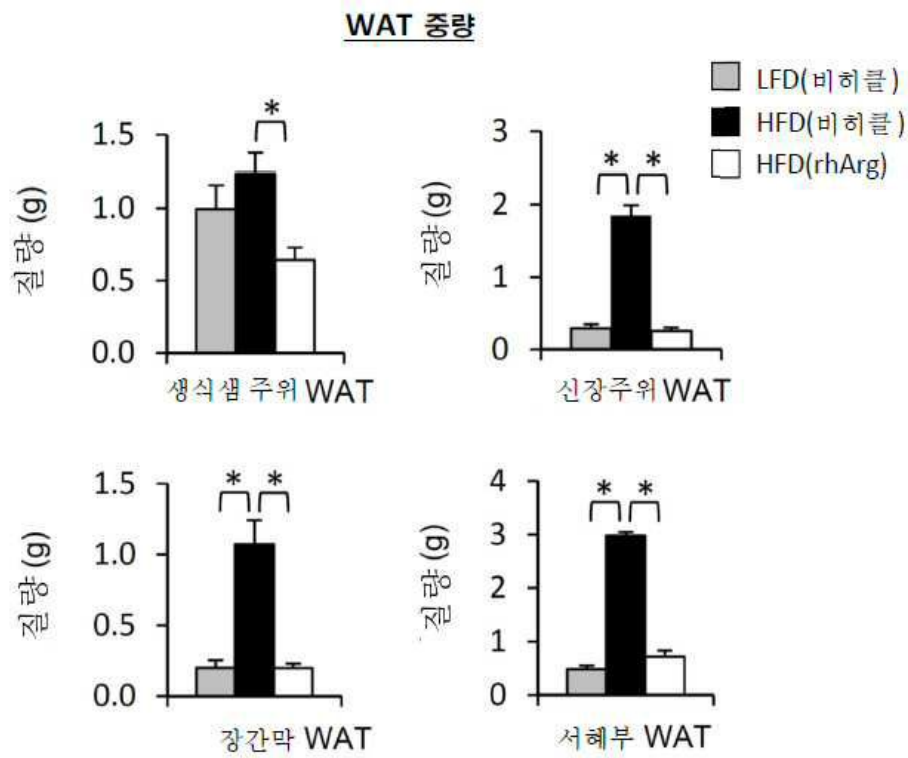


도면37

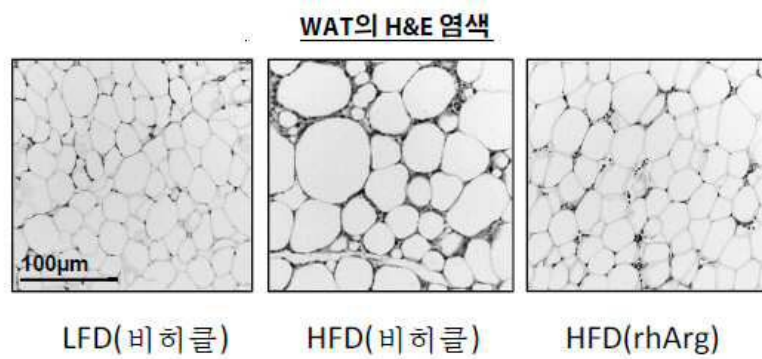


도면38

A

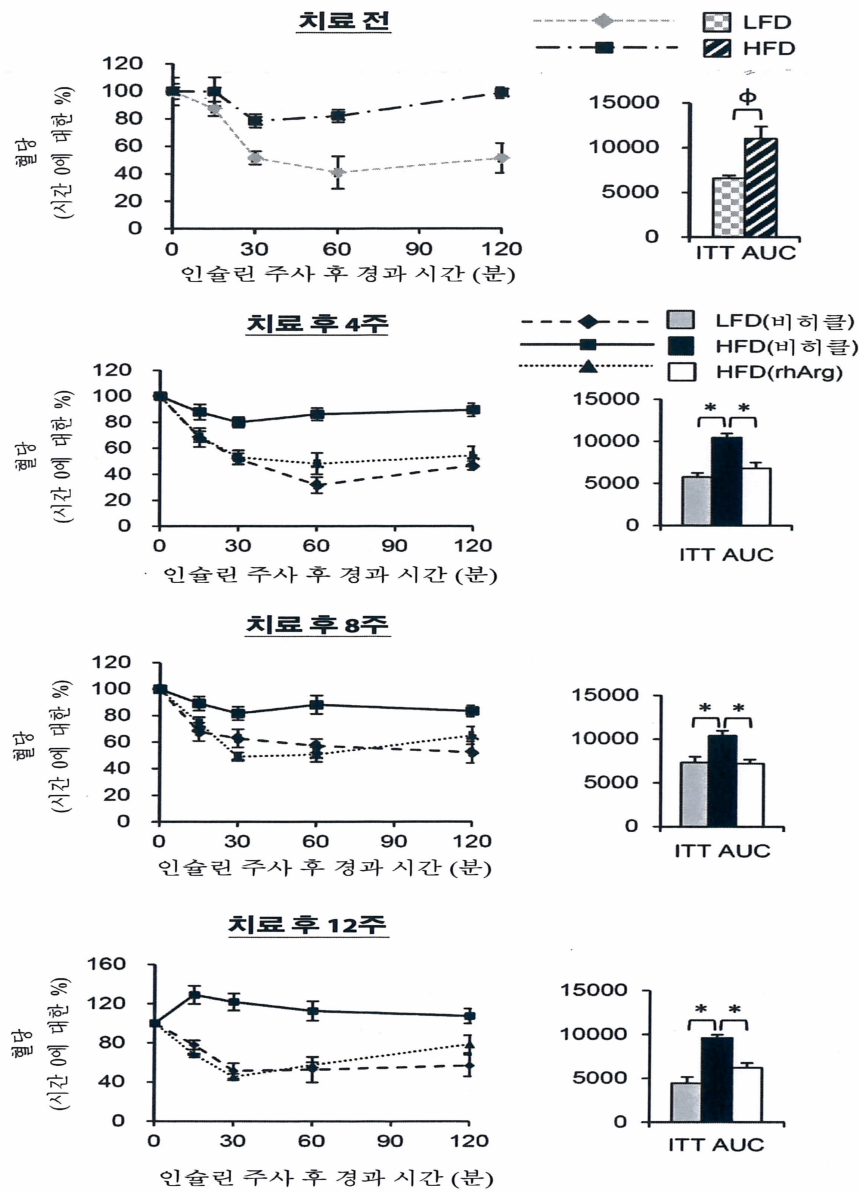


B



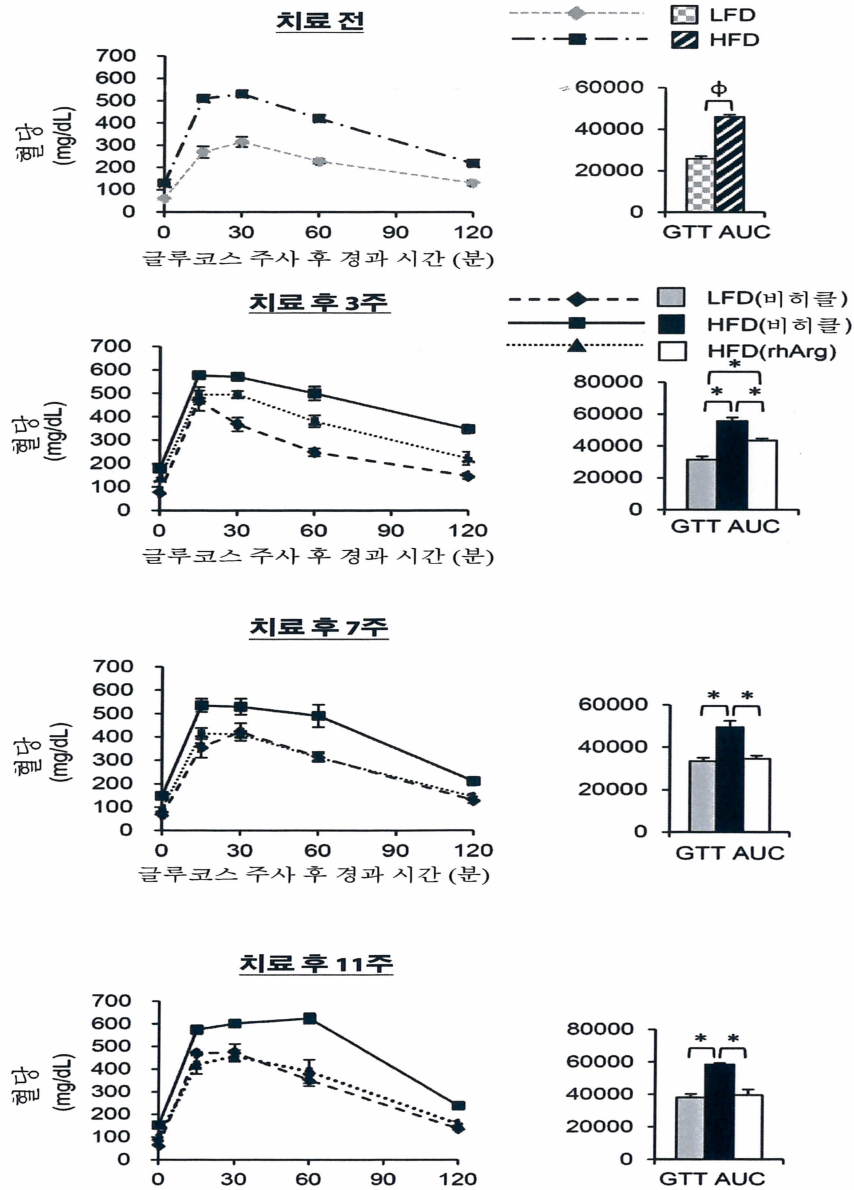
도면39

인슐린 내성 검사

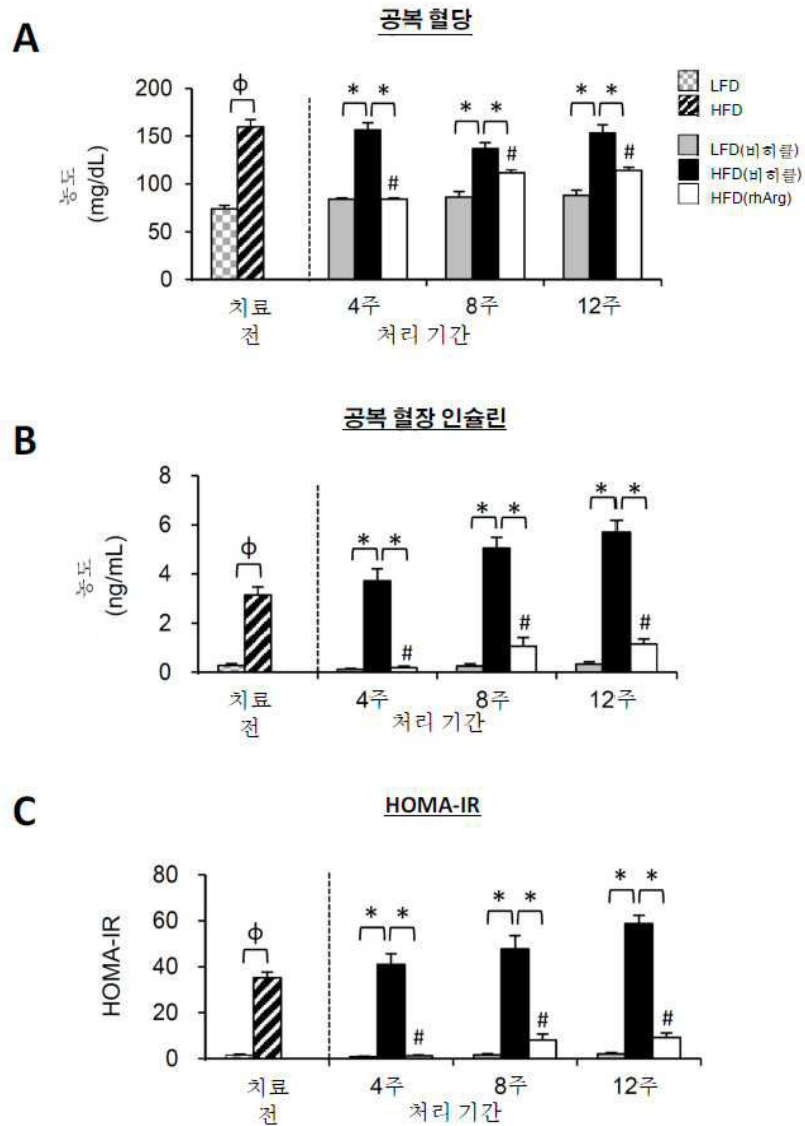


도면40

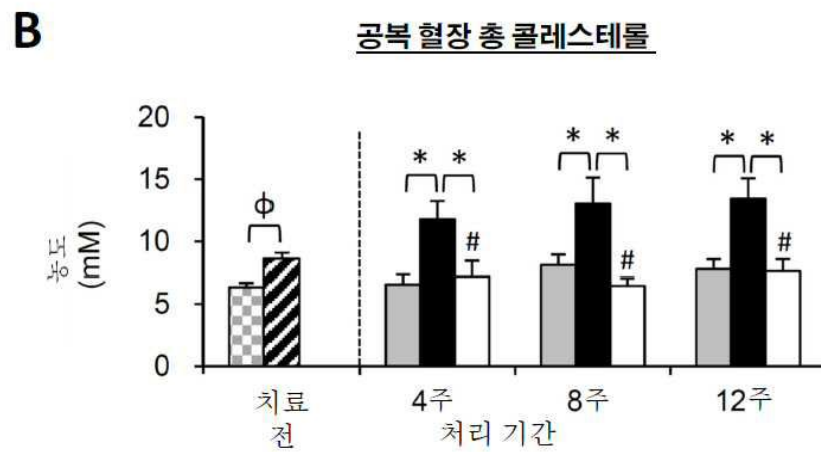
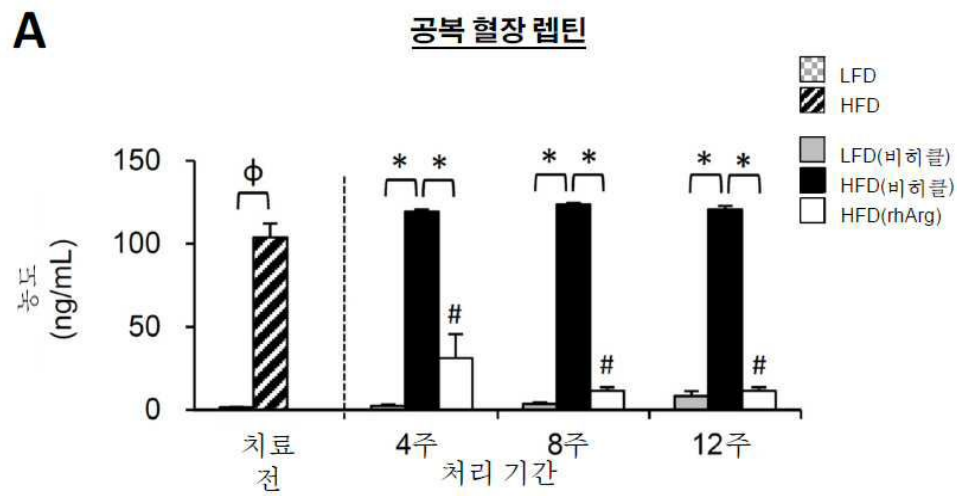
내당능 검사



도면41



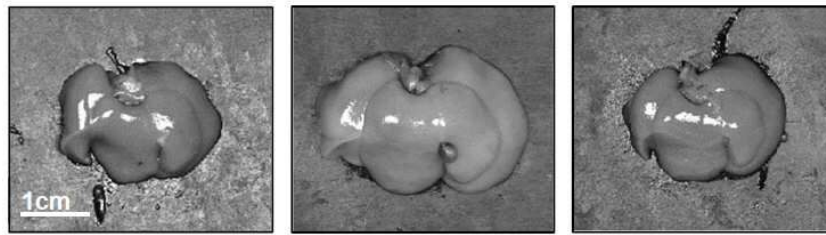
도면42



도면43

A

신선한 전체 간



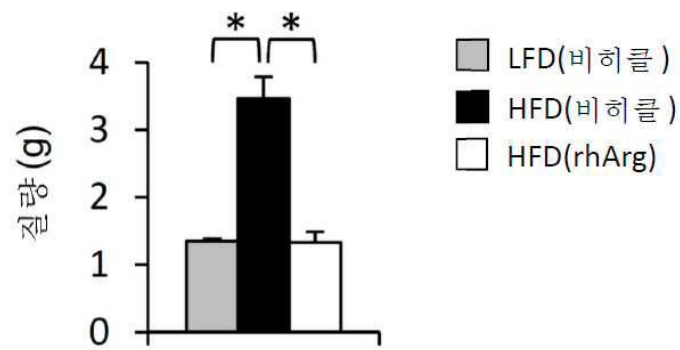
LFD(비히클)

HFD(비히클)

HFD(rhArg)

B

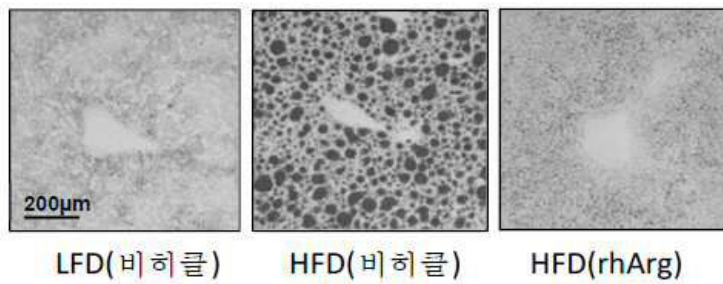
간 중량



도면44

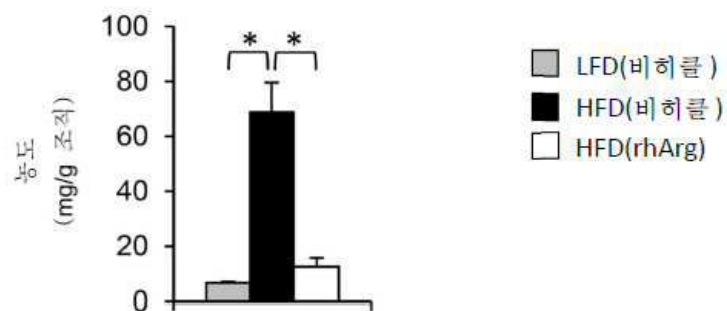
A

간 내 지질의 Oil red O 염색



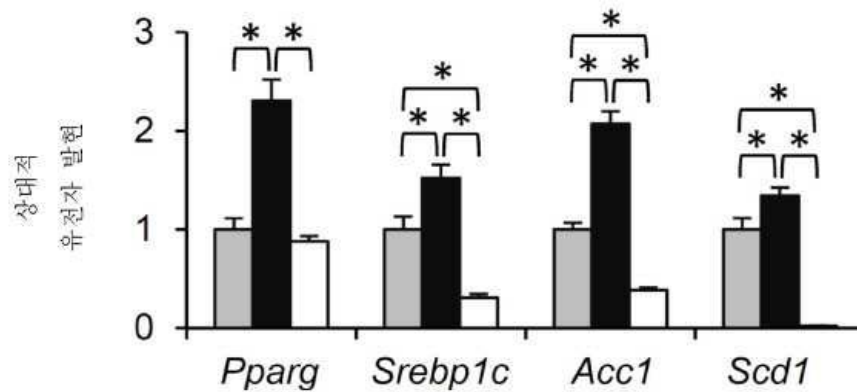
B

간의 중성 지방



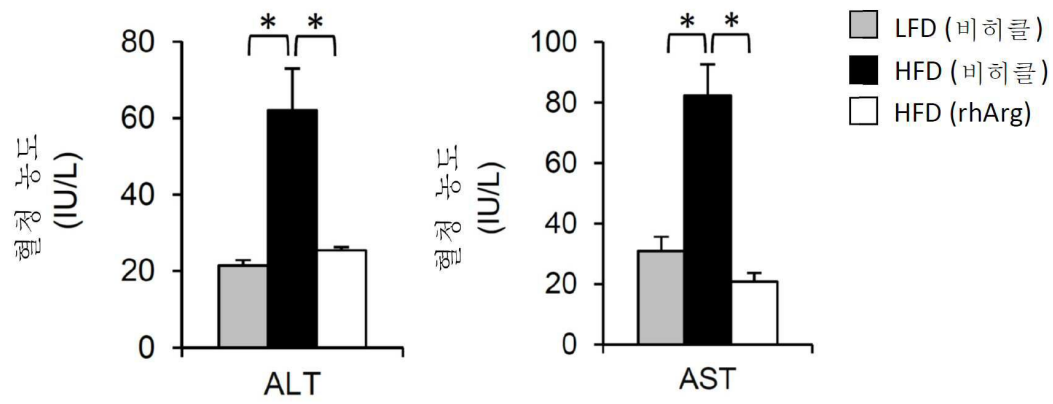
C

간 내 지방 생성 관련 유전자

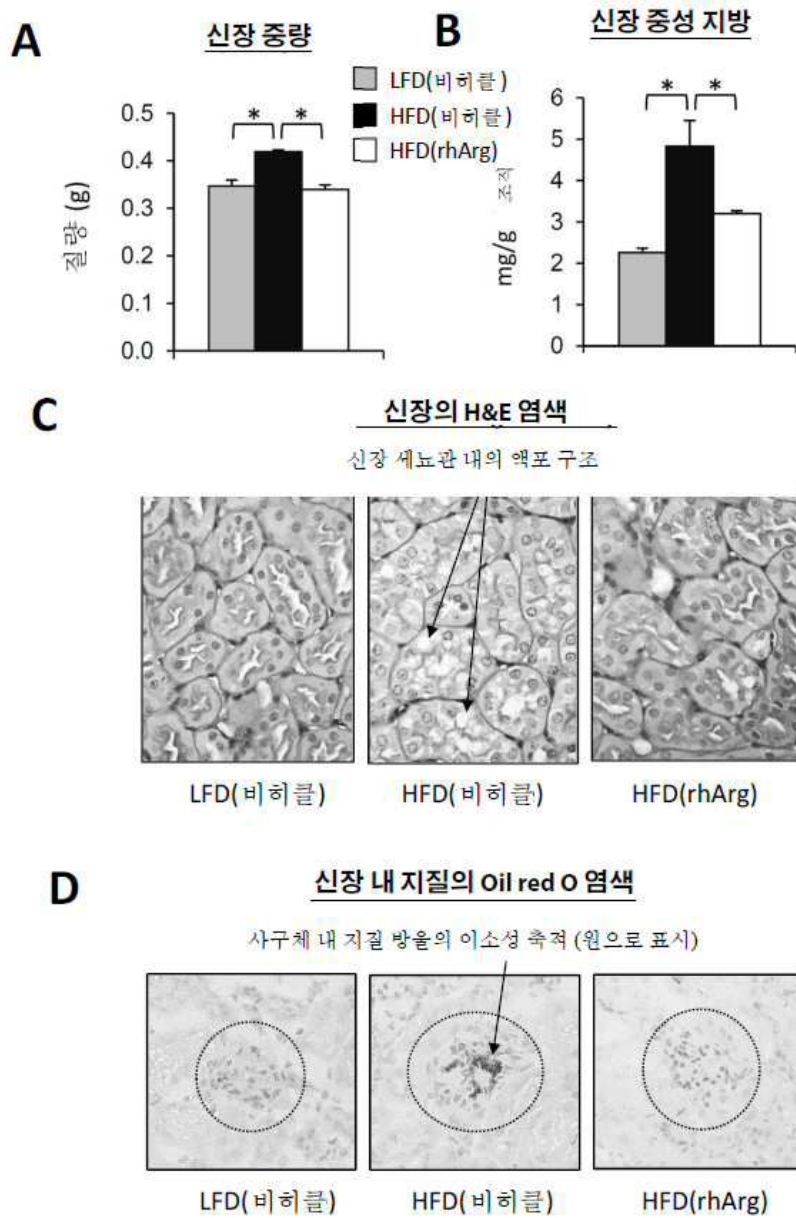


도면45

간 손상 마커

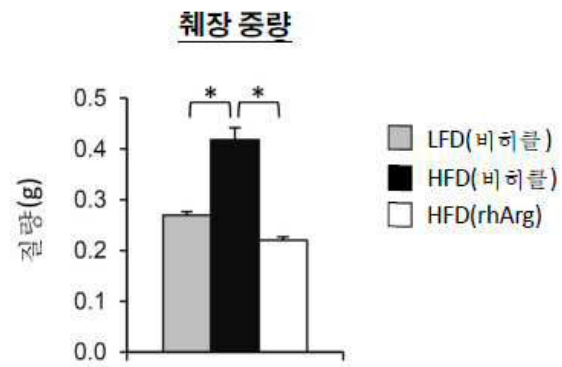


도면46



도면47

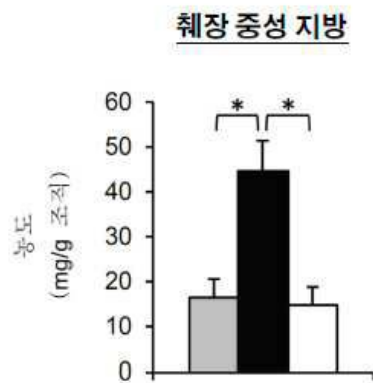
A



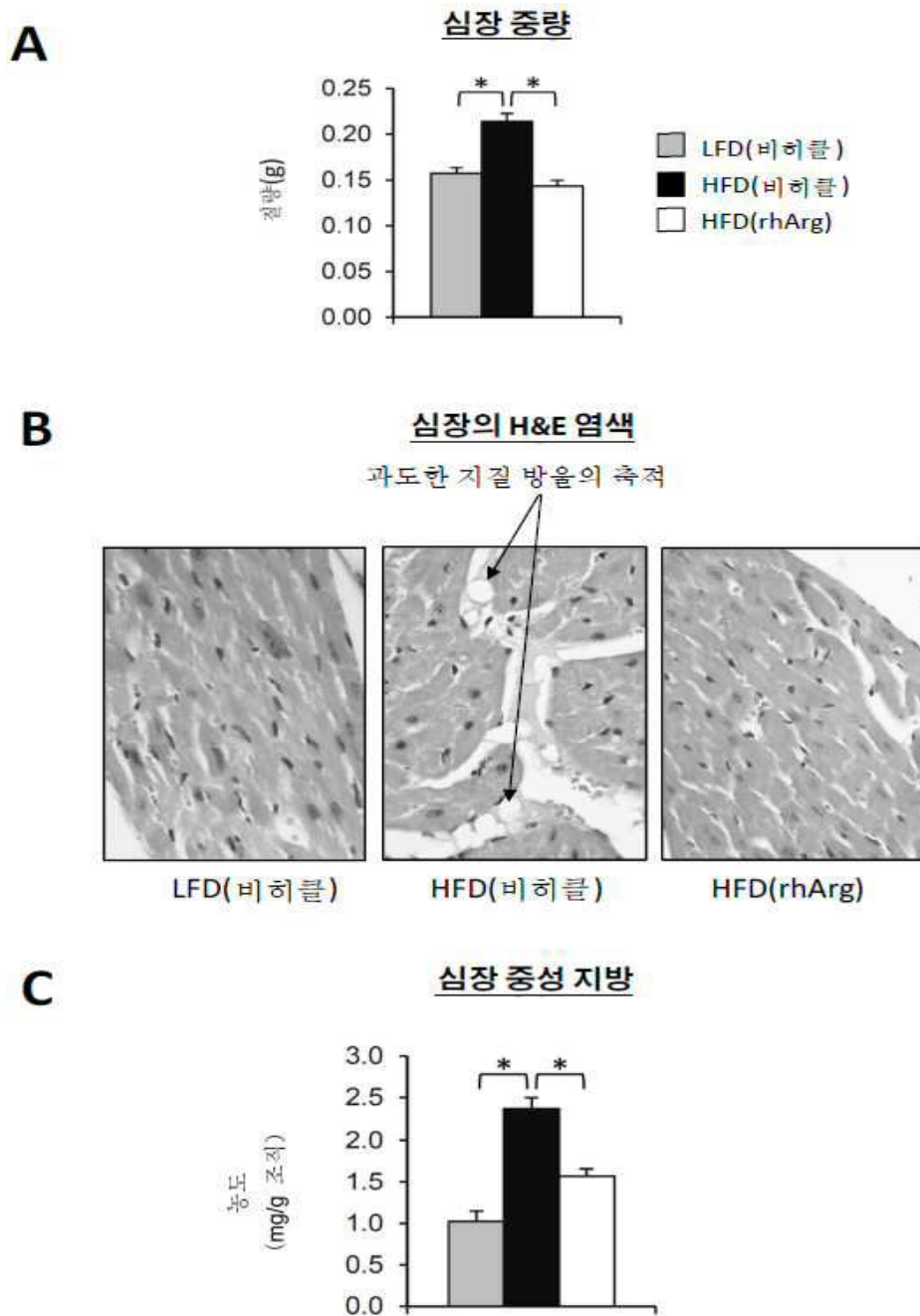
B



C

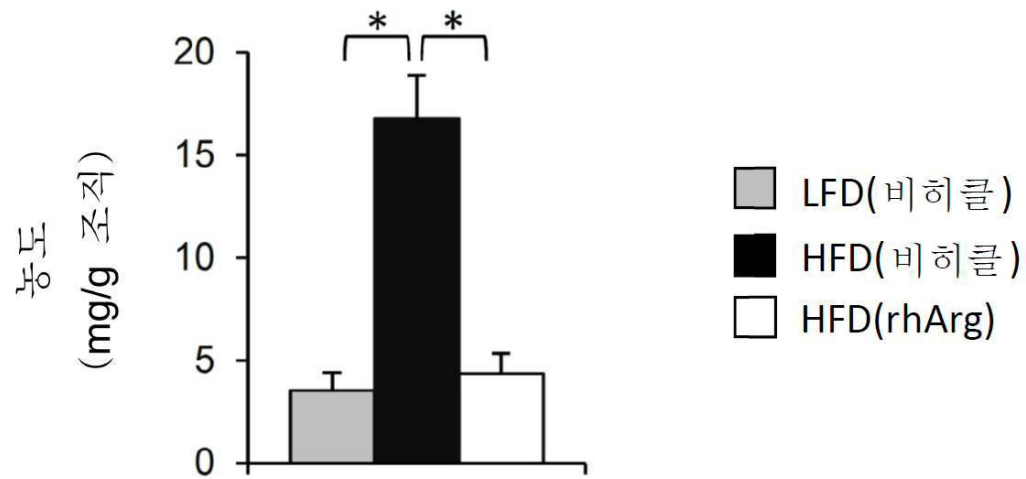


도면48



도면49

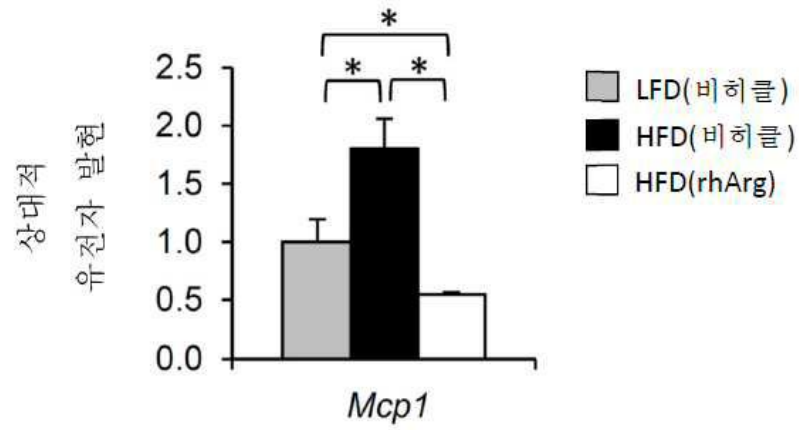
골격근의 중성 지방



도면50

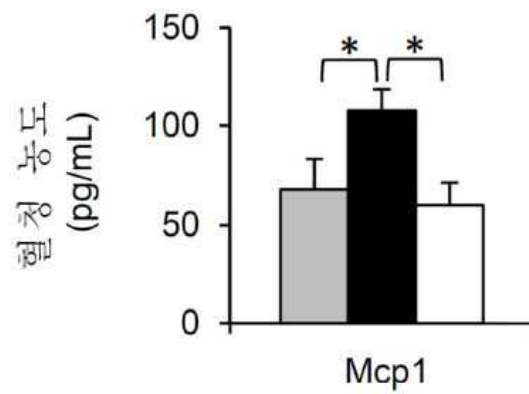
A

내장 WAT 내 염증촉진 아디포킨

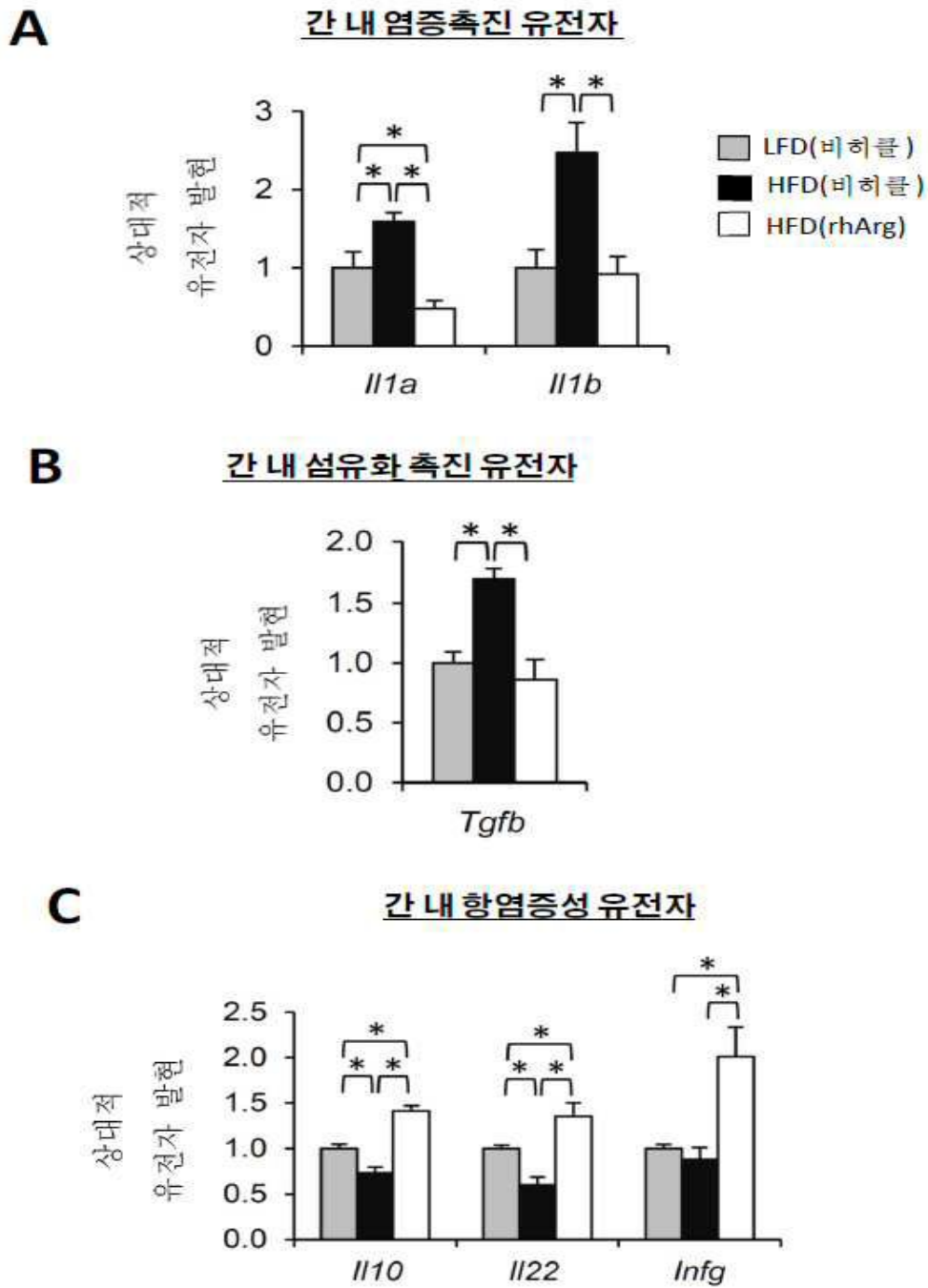


B

혈청 내 염증촉진 사이토카인

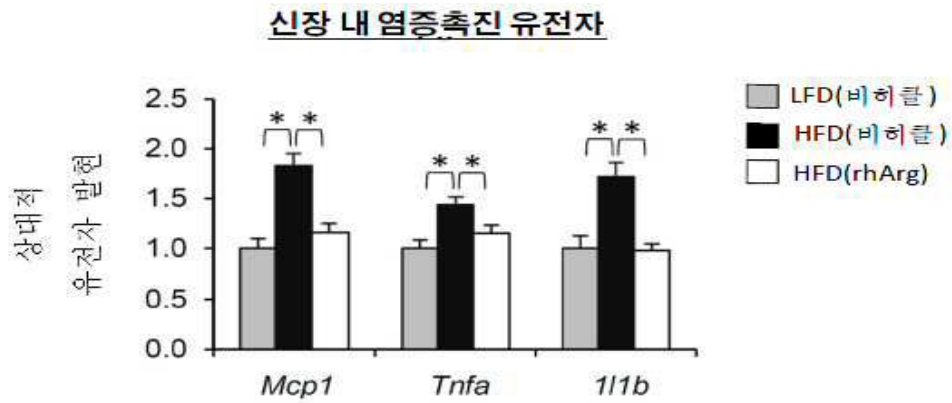


도면51

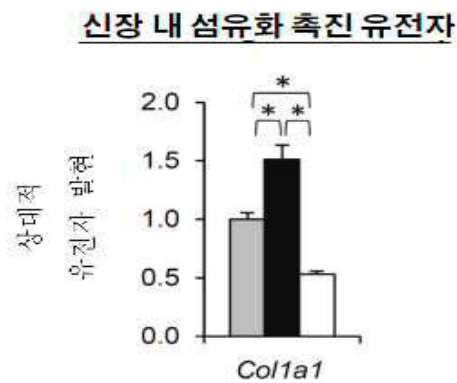


도면52

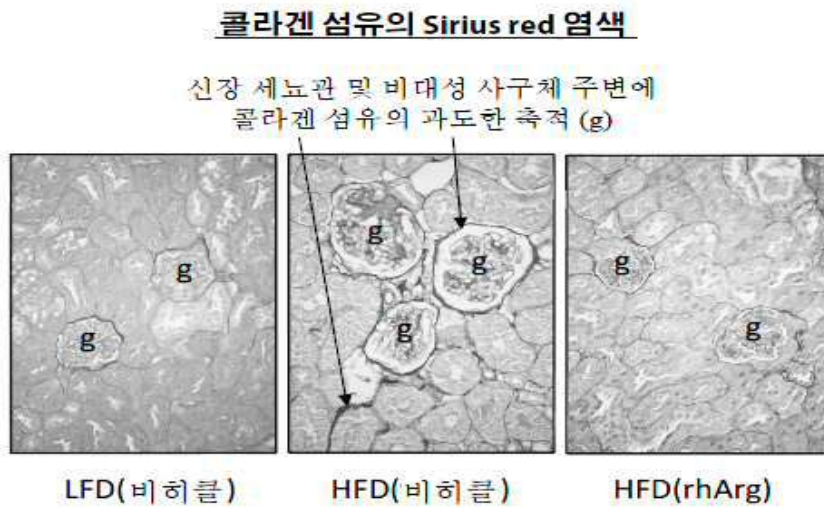
A



B



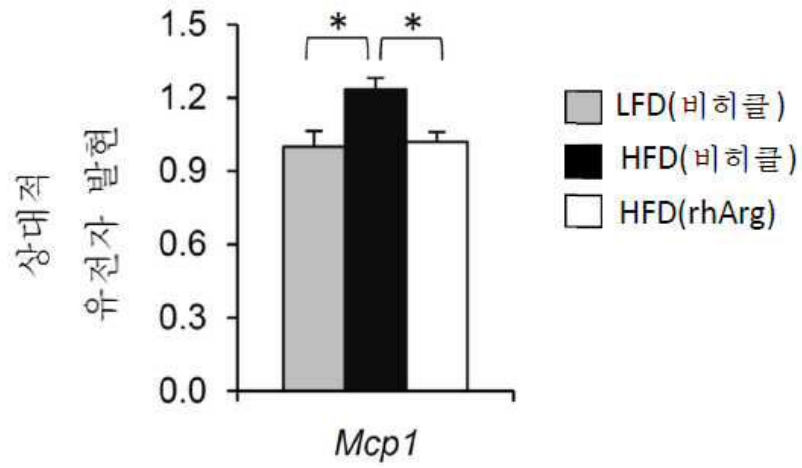
C



도면53

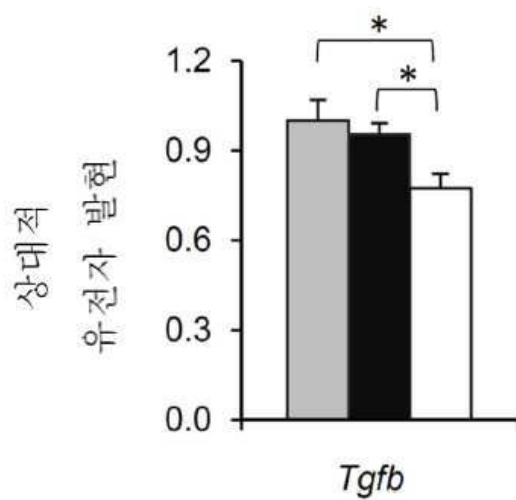
A

췌장 내 염증촉진 유전자



B

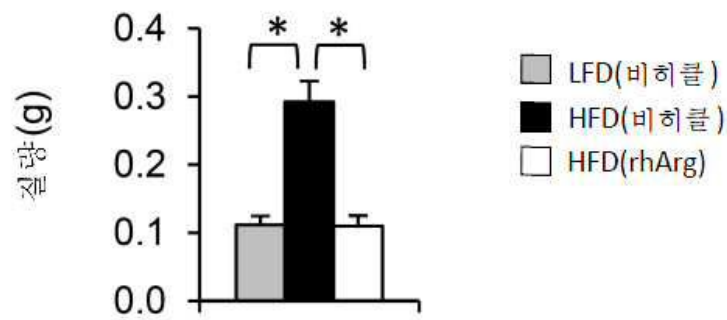
췌장 내 섬유화 촉진 유전자



도면54

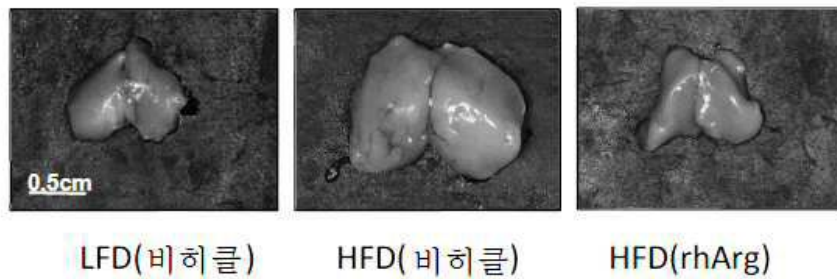
A

견갑골간 BAT 중량



B

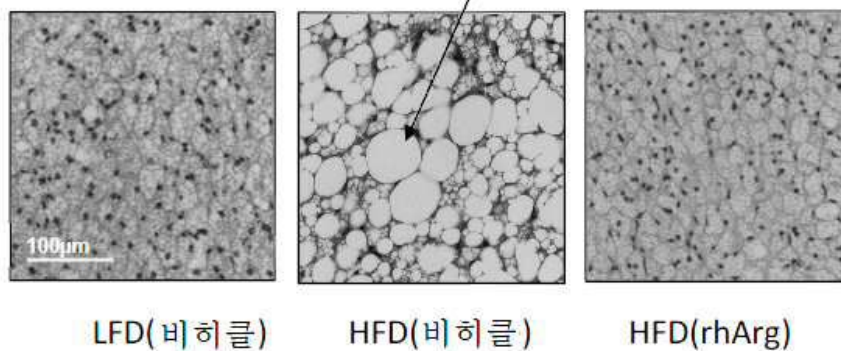
신선한 전체 견갑골간 BAT



C

견갑골간 BAT의 H&E 염색

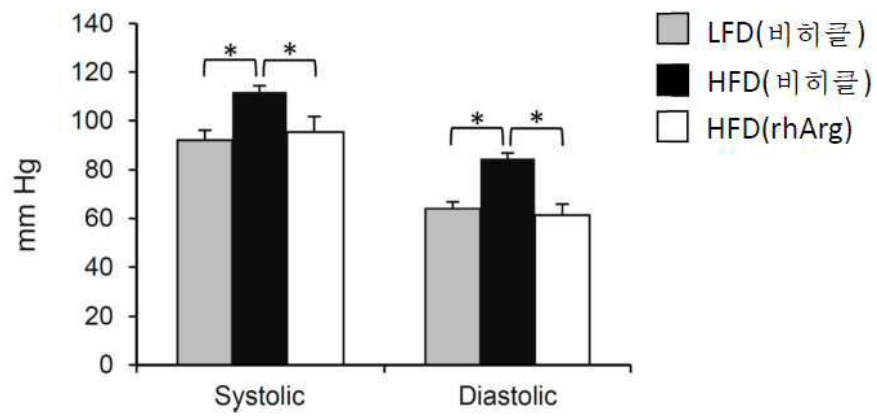
단일 대형 지질 소구체를 가진 백색 지방 세포



도면55

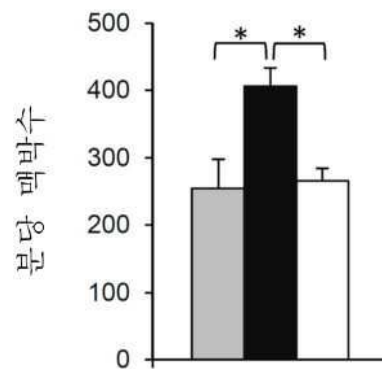
A

혈압



B

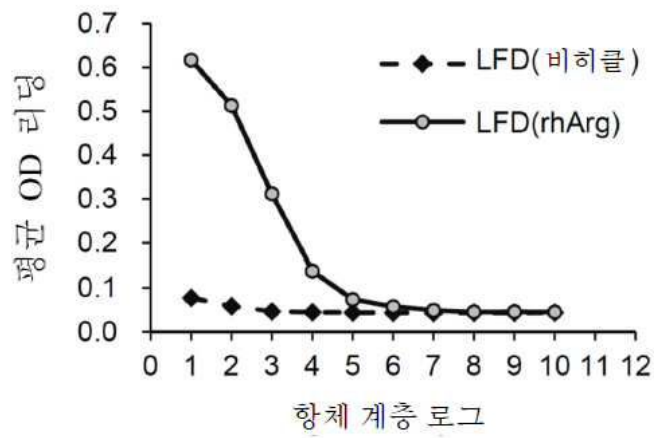
심박수



도면56

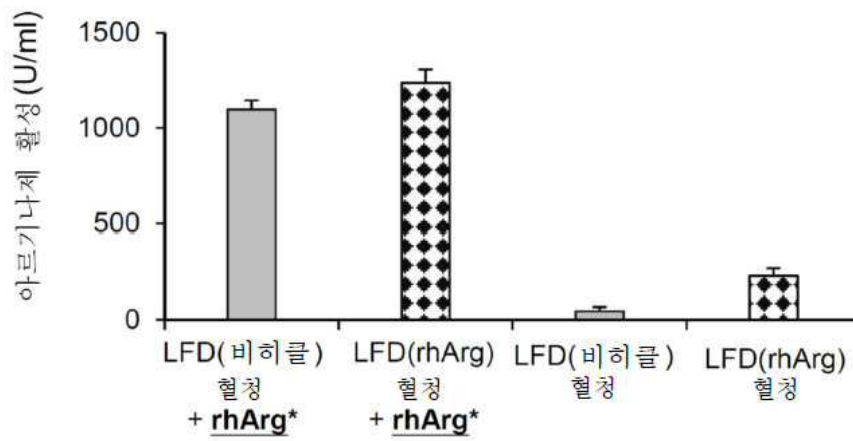
A

항-rhArg 항체



B

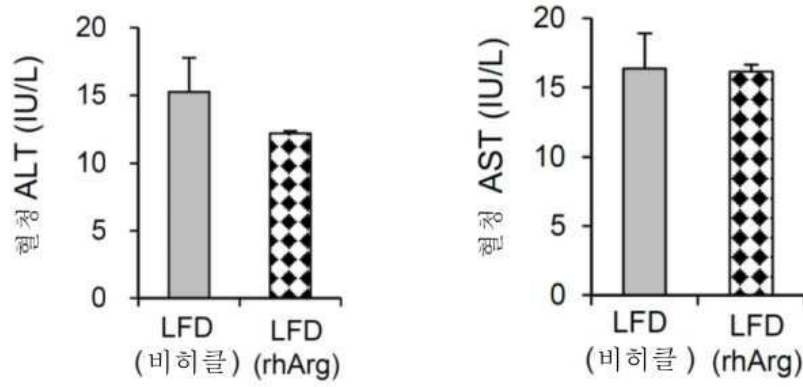
중화 활성



도면57

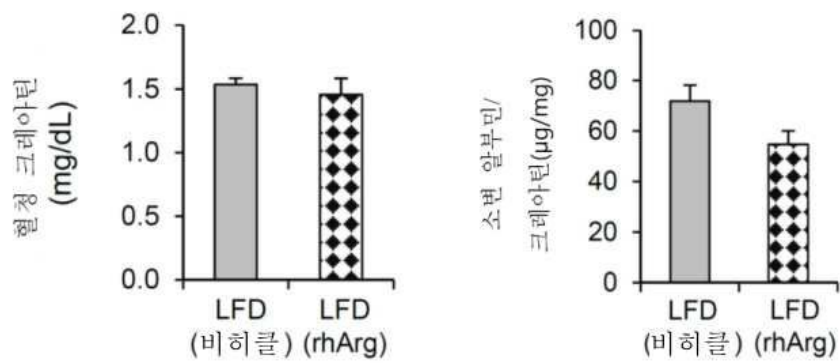
A

간 손상 마커



B

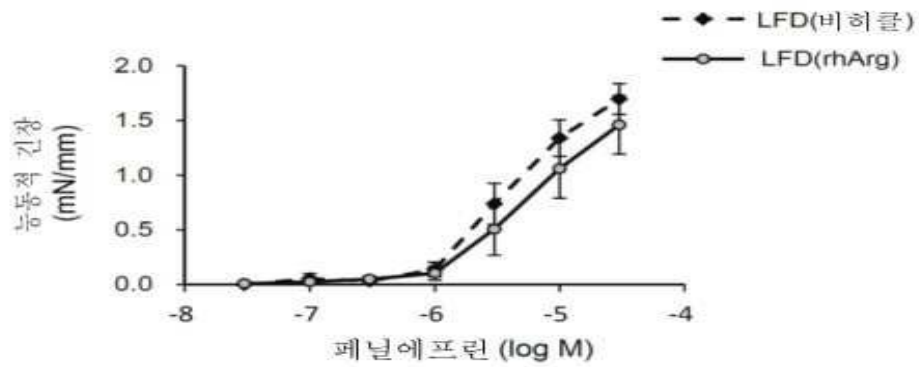
신장 기능/질병 마커



도면58

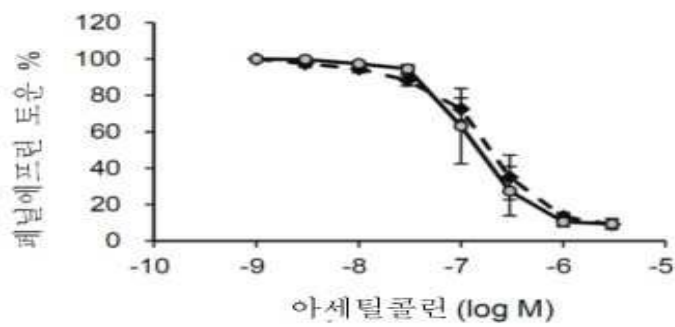
A

혈관 평활근 수축



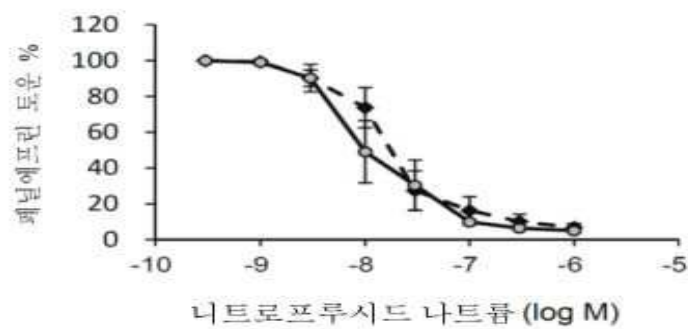
B

내피-의존적 이완



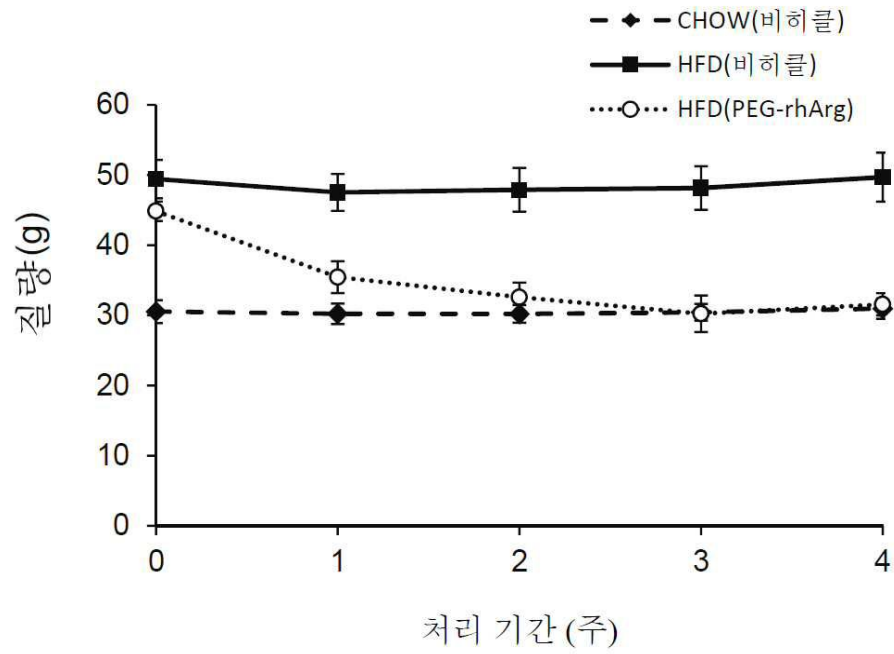
C

내피-비의존적 이완



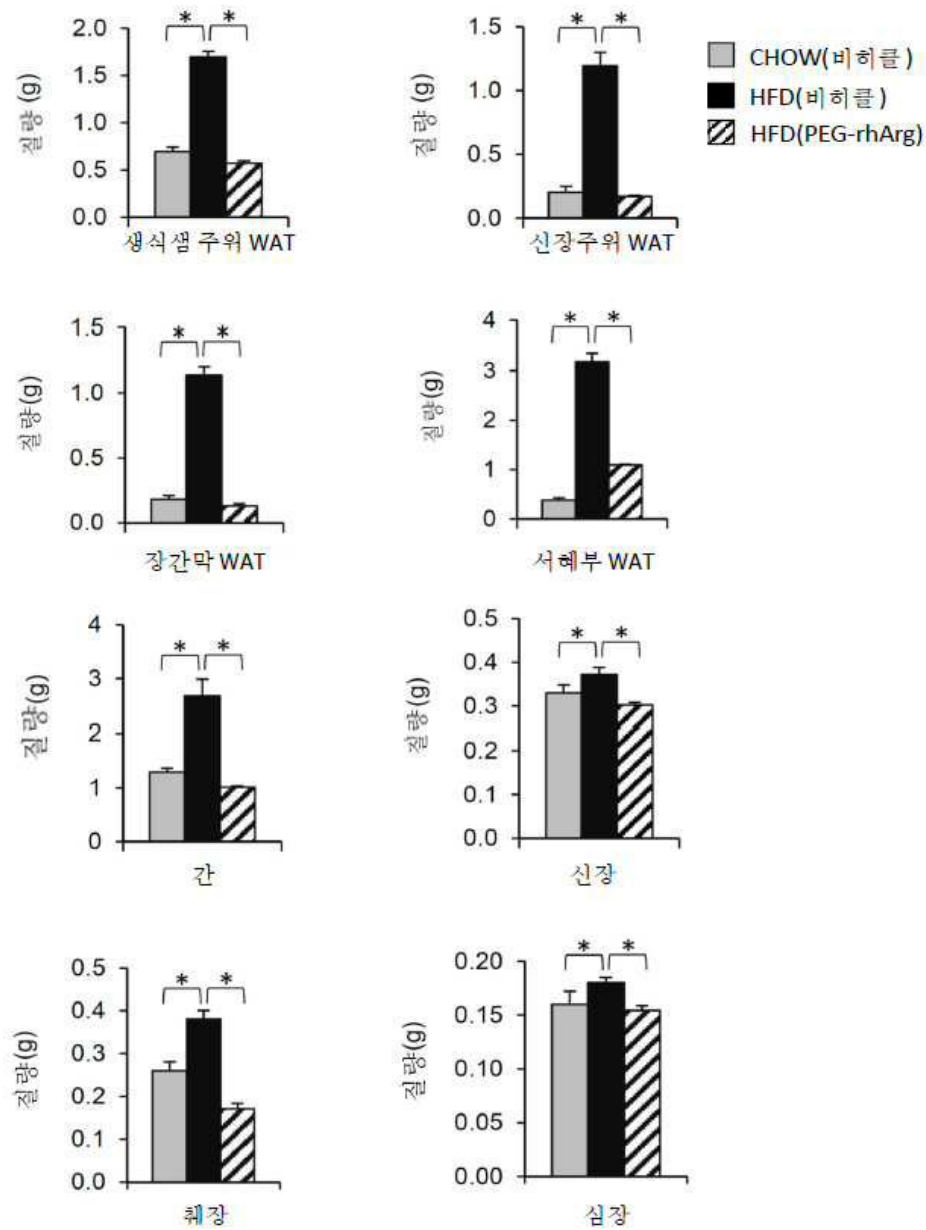
도면59

체중



도면60

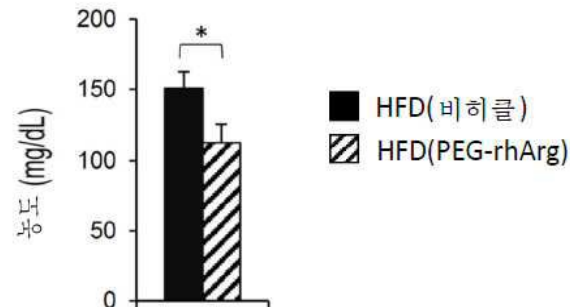
장기 체중



도면61

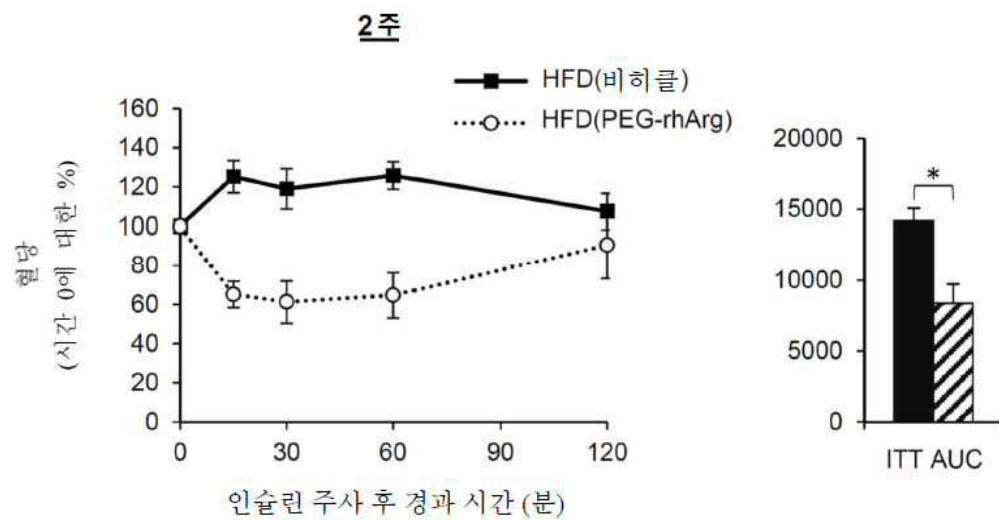
A

공복 혈당

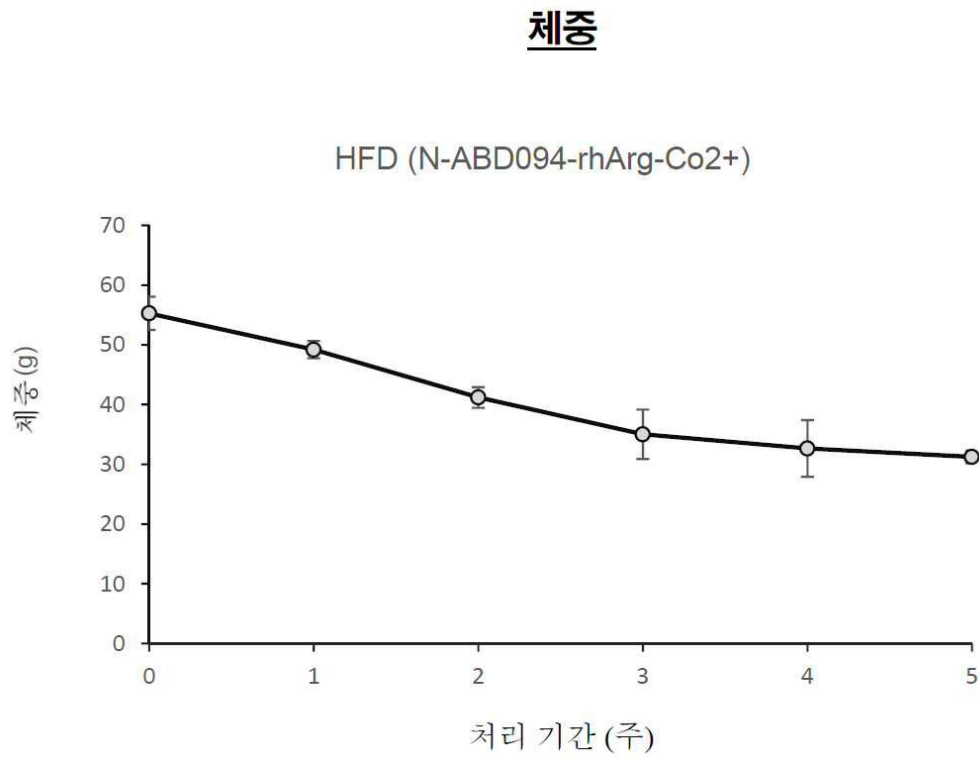


B

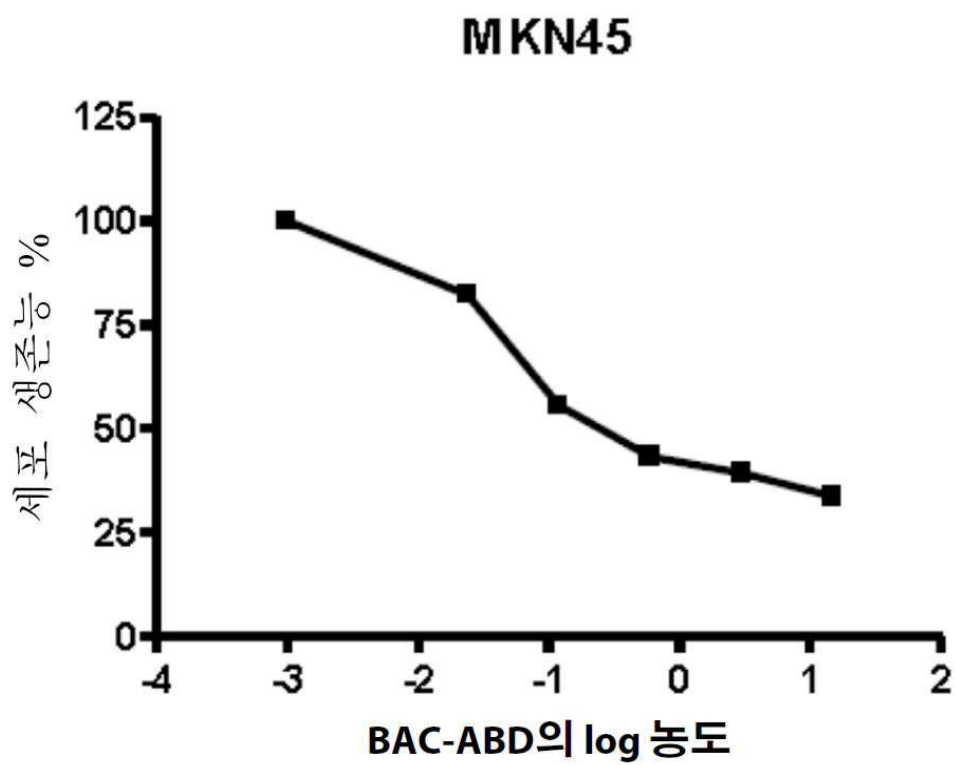
인슐린 내성 검사



도면62

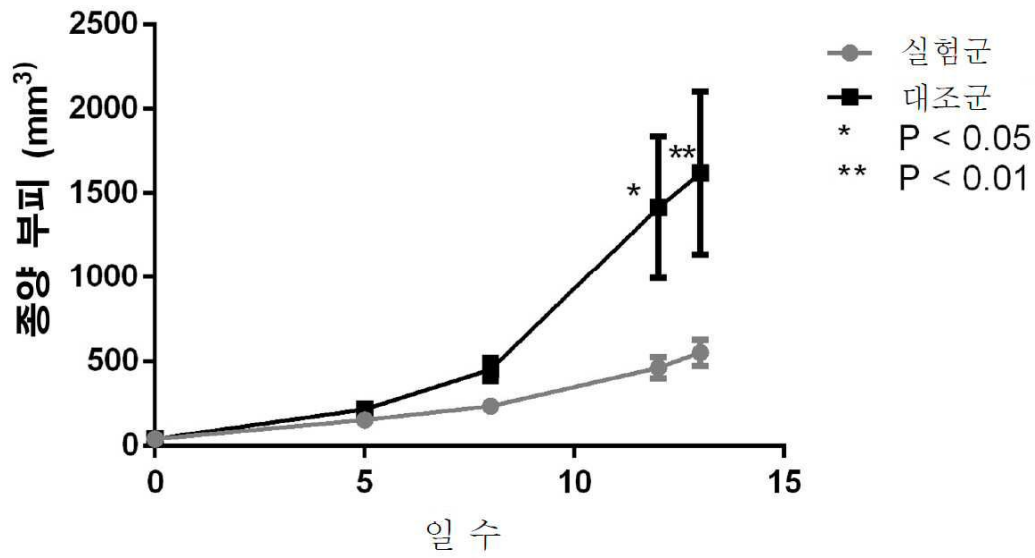


도면63



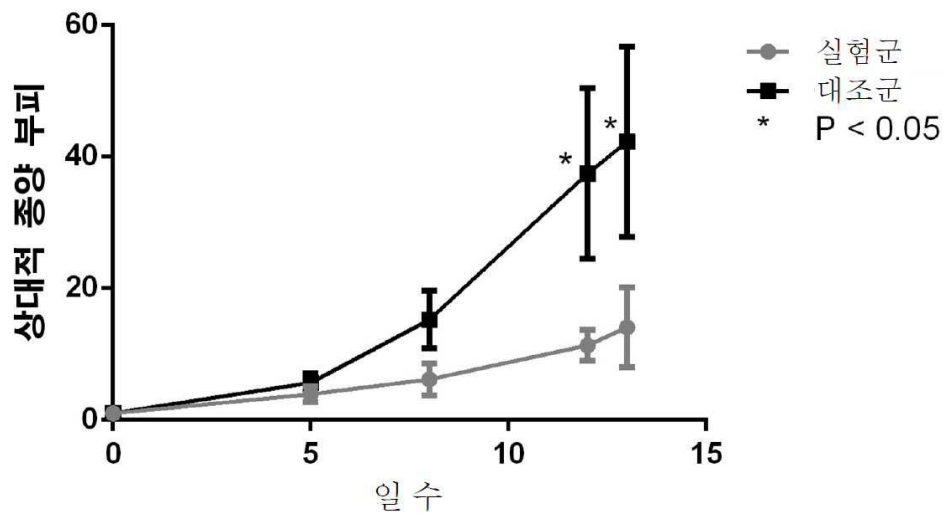
도면64

종양 부피

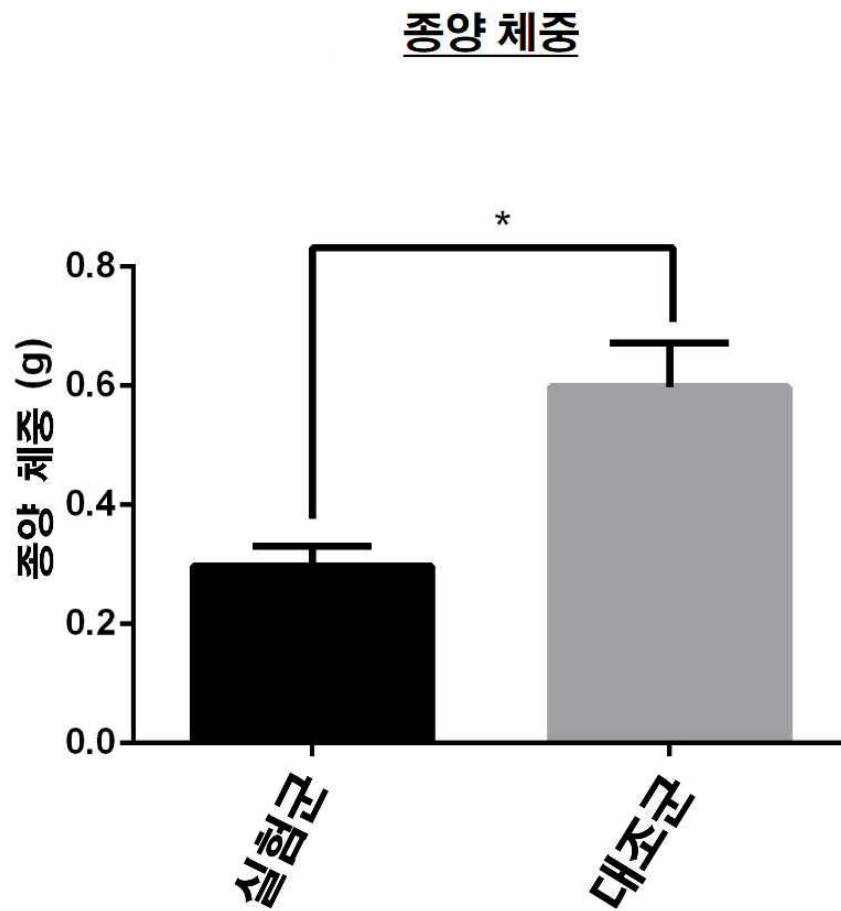


도면65

상대적 종양 부피



도면66

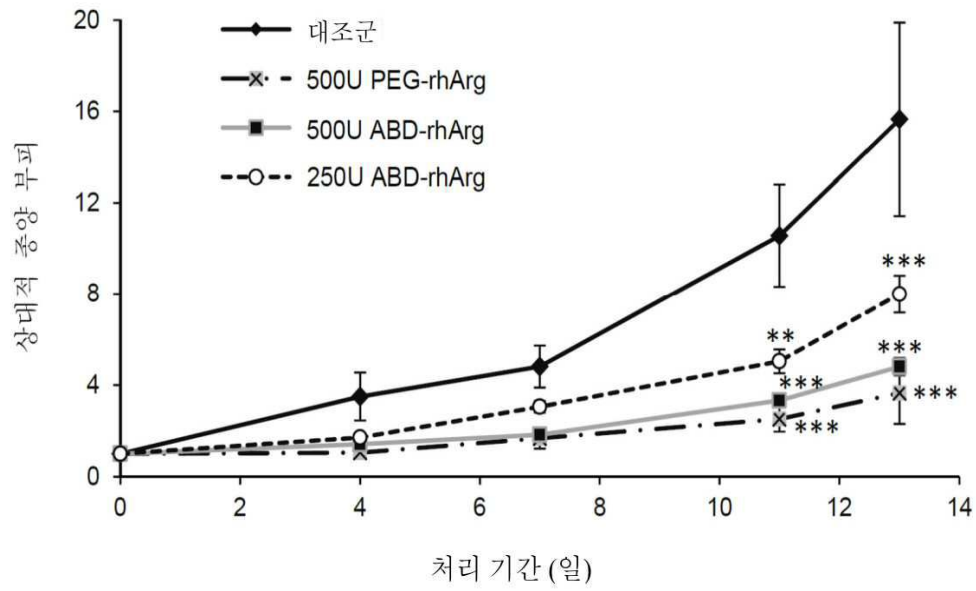


도면67



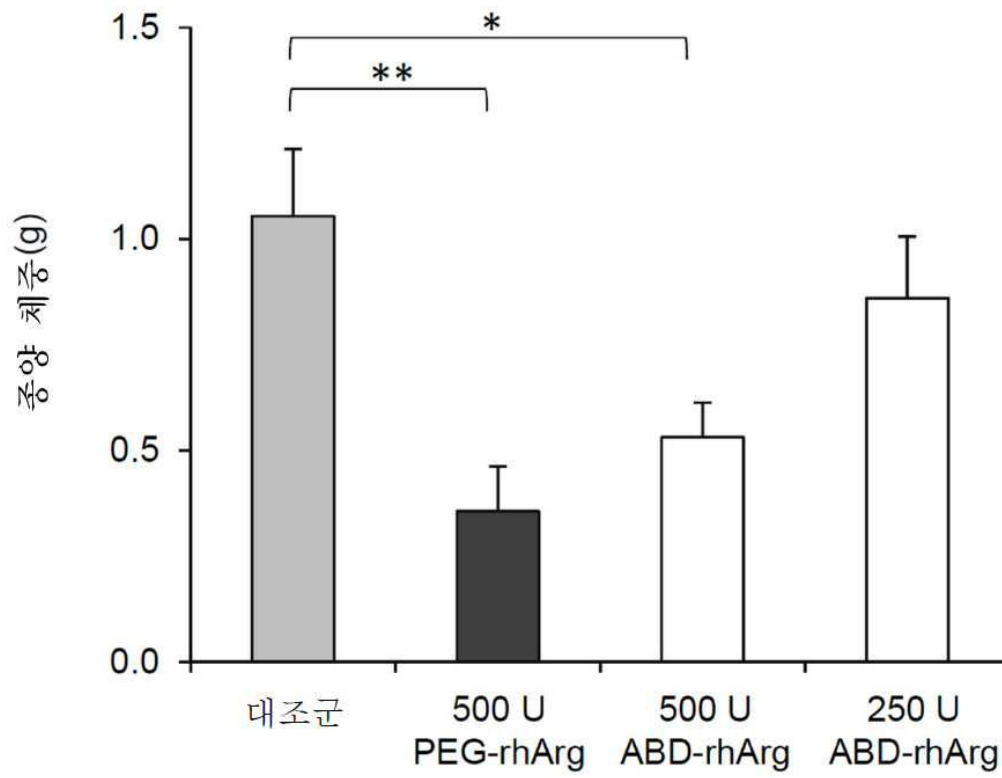
도면68

상대적 종양 부피



도면69

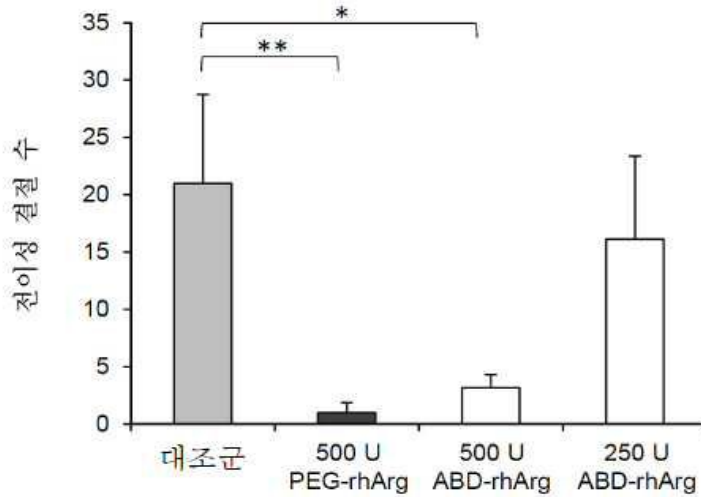
종양 체중



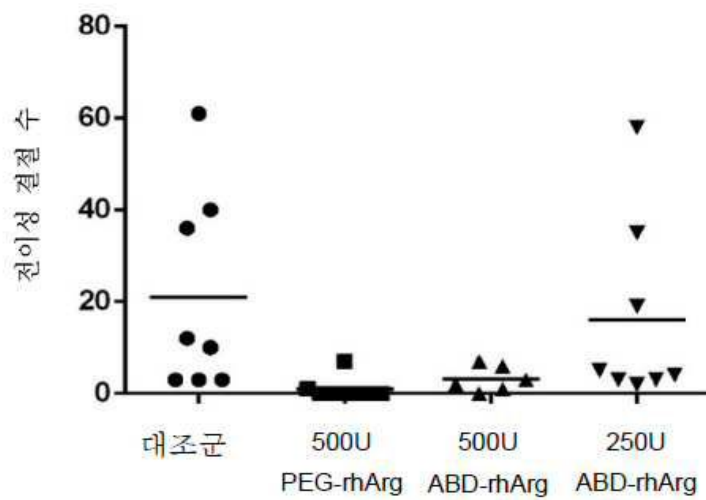
도면70

A

전이성 결절 수



B



서열 목록

SEQUENCE LISTING

<110> The Hong Kong Polytechnic University

The Chinese University of Hong Kong

<120> Composition and Application of Arginine-depleting Agents for
Cancer, Obesity, Metabolic Disorders, and Related Complications
and Comorbidities

<130> P10866PCT00

<150> US 62/678,300

<151> 2018-05-31

<160> 106

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 50

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> ABD Primer 1, Synthesized in the Lab

<400>

> 1

ggagatggac atatgcatca tcaccatcac catgatgaag ccgtggatgc 50

<210> 2

<211> 50

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> ABD Primer 2, Synthesized in the Lab

<400> 2

gctaagactt tagcttcagc taaggaattc gcatccaagg cttcatcatg 50

<210> 3

<211> 50

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> ABD Primer 3, Synthesized in the Lab

<400> 3

ccttagctga agctaaagtc ttagctaaca gagaacttga caaatatgga 50

<210> 4

<211> 50

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> ABD Primer 4, Synthesized in the Lab

<400> 4

taggttcttg taatagtcac ttactccata ttgtcaagt tctctgtag 50

<210> 5
 <211> 50
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> ABD Primer 5, Synthesized in the Lab
 <400> 5
 ggagtaagtg actattacaa gaacctaatac aacaatgccca aaactgttga 50
 <210> 6
 <211> 50
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> ABD Primer 6, Synthesized in the Lab
 <400> 6
 aaatttcatac tatcagtgtt ttacacattt caacagtttt ggcatgtgtg 50
 <210> 7
 <211> 50
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> ABD Primer 7, Synthesized in the Lab
 <400> 7
 gtaaaagcac ttagatagatga aatttttagct gcattacatt cgggtagtaa 50
 <210> 8
 <211> 50
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> ABD Primer 8, Synthesized in the Lab
 <400> 8
 tccgccgcta ccattgttat tattgttgtt actaccgaa ggtaatgcag 50
 <210> 9
 <211> 47
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> ABD Primer 9, Synthesized in the Lab

<400> 9
gatcttaagc atatgcatca tcaccatcac catgatgaag cgggtgga 47
<210> 10
<211> 47
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> ABD Primer 10, Synthesized in the Lab
<400> 10
gcttcttttcg cttccgccag gctgttcgca tccaccgctt catcatg 47
<210> 11
<211> 50
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> ABD Primer 11, Synthesized in the Lab
<400> 11
gcggaagcga aagaagcggc gaacgcggaa ctggatagct atggcgtgag 50
<210> 12

<211> 50
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> ABD Primer 12, Synthesized in the Lab
<400> 12
ttatcaatca ggcgtttata aaaatcgctc acgccaatagc tatccagttc 50
<210> 13
<211> 50
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> ABD Primer 13, Synthesized in the Lab
<400> 13
gatttttata aacgcctgat tgataaagcg aaaaccgtgg aaggcgtgga 50
<210> 14
<211> 51
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220><223> ABD Primer 14, Synthesized in the Lab

<400> 14

cggcagcgcc gccagaatcg catctttcag cgtttccacg cttccacgg t 51

<210> 15

<211> 50

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> ABD Primer 15, Synthesized in the Lab

<400> 15

ttctggcggc gctgccgtcg ggtagtaaca acaataataa caatggtagc 50

<210> 16

<211> 39

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> ABD Primer 16, Synthesized in the Lab

<400> 16

ggatccgccg ctaccattgt tattattgtt gttactacc 39

<210> 17

<211> 50

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> ABD Primer 17, Synthesized in the Lab

<400> 17

catatgttag ctgatggatc cagtaacaac aataataaca atggtagcgg 50

<210> 18

<211> 50

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> ABD Primer 18, Synthesized in the Lab

<400> 18

aattcgcatc cagcgttca tcaccgccgc taccattgtt attattgttg 50

<210> 19

<211> 50

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> ABD Primer 19, Synthesized in the Lab

<400> 19

gaagccgtgg atgcgaattc cttagctgaa gctaaagtct tagctaacag 50

<210> 20

<211> 50

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> ABD Primer 20, Synthesized in the Lab

<400> 20

cttactccat atttgtcaag ttctctgtta gctaagactt tagcttcagc 50

<210> 21

<211> 50

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> ABD Primer 21, Synthesized in the Lab

<400> 21

gagaacttga caaatatgga gtaagtgact attacaagaa cctaataaac 50

<210> 22

<211> 50

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> ABD Primer 22, Synthesized in the Lab

<400> 22

tacaccttca acagttttgg cattgttgat taggttcttg taatagtcac 50

<210> 23

<211> 50

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> ABD Primer 23, Synthesized in the Lab

<400> 23

gccaaaactg ttgaagggtg aaaagcactg atagatgaaa ttttagctgc 50

<210> 24

<211> 50

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> ABD Primer 24, Synthesized in the Lab

<400> 24

atggtgatgg tgatgatgag gtaatgcagc taaaatttca tctatcagtg 50

<210> 25

<211> 50

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> ABD Primer 25, Synthesized in the Lab

<400> 25

catatgttat gcgatggatc cagtaacaac aataataaca atggtagcgg 50

<210> 26

<211> 50

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> ABD Primer 26, Synthesized in the Lab

<400> 26

tgttcgcac caccgcttca tcaccgccgc taccattgtt attattgttg 50

<210> 27

<211> 50

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> ABD Primer 27, Synthesized in the Lab

<400> 27

gaagcggatg atcggaacag cctggcggaa gcgaaagaag cggcgaacgc 50

<210> 28

<211> 50

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> ABD Primer 28, Synthesized in the Lab

<400> 28
 aaaatcgctc acgccatagc tatccagttc cgcgttcgcc gcttctttcg 50
 <210> 29
 <211> 50
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> ABD Primer 29, Synthesized in the Lab

<400> 29
 ctatggcgtg agcgattttt ataaacgcct gattgataaa gcgaaaaccg 50
 <210> 30
 <211> 50
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> ABD Primer 30, Synthesized in the Lab

<400> 30
 tcgcacatctt cagcgcttcc acgccttcca cggttttcgc tttatcaatc 50
 <210> 31
 <211> 50
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> ABD Primer 31, Synthesized in the Lab

<400> 31
 gaagcgctga aagatgcgat tctggcggcg ctgccgcac atcaccatca 50
 <210> 32
 <211> 35
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> ABD Primer 32, Synthesized in the Lab

<400> 32
 ctaaaagctt aatggtgatg gtgatgatgc ggcag 35
 <210> 33
 <211> 222
 <212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> His-ABD-Linker, Synthesized in the Lab

<400> 33

atgcatcatc accatcacca tgatgaagcc gtggatgcga attccttagc tgaagctaaa	60
gtcttagcta acagagaact tgacaaatat ggagtaagtg actattacaa gaacctaatc	120
aacaatgcc aactgttga aggtgtaaaa gcactgatag atgaaatttt agctgcatta	180

ccttcgggta gtaacaacaa taataacaat ggtagcggcg ga	222
--	-----

<210> 34

<211> 222

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> His-ABD094-Linker, Synthesized in the Lab

<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> Artificial Sequence

<220><223> Linker-ABD-His, Synthesized in the Lab

<400> 35

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

<210> 36

<211> 222

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><

223> Linker-ABD094-His, Synthesized in the Lab

<400> 36

ggatccagta acaacaataa taacaatggt agcggcgggtg atgaagcggg ggatgcgaac 60

agcctggcgg aagcgaaaga agcggcgaac gcggaactgg atagctatgg cgtgagcgat 120

ttttataaac gcctgattga taaagcgaag accgtggaag gcgtggaagc gctgaaagat 180

gcgattctgg cggcgcctgcc gcacatcac catcaccatt aa 222

<210> 37

<211> 1191

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> N-ABD-rhArg gene, Synthesized in the Lab

<400> 37

atgcatcatc accatcacca tgatgaagcc gtggatgcga attccttagc tgaagctaaa 60

gtccttagcta acagagaact tgacaaatat ggagtaagtg actattacaa gaacctaatac 120

aacaatgcc aactgttga aggtgtaaaa gcactgatag atgaaatgtt agctgcatta 180

ccttcgggta gtaacaacaa taataacaat ggtagcggcg gaatgtccgc caagtccaga 240

accataggga ttattggagc tcctttctca aaggacagc cacgaggagg ggtggaagaa 300

ggcctacag tattgagaaa ggctggtctg ctgagaaac ttaaagaaca agagtgtgat 360

gtgaaggatt atggggacct gccctttgct gacatcccta atgacagtcc ctttcaaatt 420

gtgaagaatc caaggtctgt gggaaaagca agcgagcagc tggctggcaa ggtggcagaa 480

gtcaagaaga acggaagaat cagcctgggtg ctgggcggag accacagttt ggcaattgga 540

agcatctctg gccatgccag ggtccacct gatcttggag tcactctgggt ggatgctcac 600

actgatatca aactccact gacaaccaca agtggaaact tgcatggaca acctgtatct 660

ttcctcctga aggaactaaa aggaagatt 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 ctgaacagt gaacacagca gttgcaataa ccttggcttg ttccggactt 1140

gctcgggagg gtaatcaca gcctattgac taccttaacc cacctaagta a 1191

<210> 38

<211> 1191

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> N-ABD094-rhArg gene, Synthesized in the Lab

<400>

> 38

```

atgcatcatc accatcacca tgatgaagcg gtggatgcga acagcctggc ggaagcgaaa      60
gaagcggcga acgcggaact ggatagctat ggcgtgagcg attttataa acgcctgatt      120
gataaagcga aaaccgtgga aggcgtggaa gcgctgaaag atgcgattct ggcggcgctg      180
ccgtcgggta gtaacaacaa taataacaat ggtagcggcg gaatgtccgc caagtccaga      240
accataggga ttattggagc tcctttctca aaggacagc cacgaggagg ggtggaagaa      300
ggccctacag tattgagaaa ggctggctctg cttgagaaac ttaaagaaca agagtgtgat      360
gtgaaggatt atggggacct gccctttgct gacatcccta atgacagtcc ctttcaaatt      420

gtgaagaatc caaggtctgt gggaaaagca agcagcagc tggctggcaa ggtggcagaa      480
gtcaagaaga acggaagaat cagcctgggtg ctggcgagg accacagttt ggcaattgga      540
agcatctctg gccatgccag ggtccaccct gatcttggag tcacttgggt ggatgctcac      600
actgatatca aactccact gacaaccaca agtggaact tgcatggaca acctgtatct      660
ttcctctga aggaactaaa aggaaagatt ccgatgtgc caggattctc ctgggtgact      720
ccctgtatat ctgccaagga tattgtgtat attggcttga gagacgtgga ccctggggaa      780
cactacattt tgaactctt aggcattaaa tacttttcaa tgactgaagt ggacagacta      840

ggaattggca aggtgatgga agaaacactc agctatctac taggaagaaa gaaaaggcca      900
attcatctaa gttttgatgt tgacggactg gacctatctt tcacaccagc tactggcaca      960
ccagtctggg gaggtctgac atacagagaa ggtctctaca tcacagaaga aatctacaaa     1020
acagggctac tctcaggatt agatataatg gaagtgaacc catccctggg gaagacacca     1080
gaagaagtaa ctgcaacagt gaacacagca gttgcaataa ccttggcttg tttcggactt     1140
gtcggggagg gtaatcaca gcctattgac taccttaacc cacctaagta a                 1191

```

<210> 39

<211> 1188

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> C-ABD-rhArg gene, Synthesized in the Lab

<400> 39

atgagcgcca agtccagaac catagggatt attggagctc ctttctcaa gggacagcca 60
cgaggagggg tggaagaagg ccctacagta ttgagaaagg ctggtctgct tgagaaactt 120
aaagaacaag agtgtgatgt gaaggattat ggggacctgc cctttgctga catccctaat 180
gacagtcctt ttcaaattgt gaagaatcca aggtctgtgg gaaaagcaag cgagcagctg 240
gctggcaagg tggcagaagt caagaagaac ggaagaatca gcctgggtgct gggcggagac 300
cacagtttgg caattggaag catctctggc catgccaggg tccacctga tcttgagtc 360

atctgggtgg atgctcacac tgatatcaac actccactga caaccacaag tggaaacttg 420
catggacaac ctgtatcttt cctcctgaag gaactaaaag gaaagattcc cgatgtgcca 480
ggattctcct gggtgactcc ctgtatatct gccaaggata ttgtgtatat tggcttgaga 540
gacgtggacc ctggggaaca ctacattttg aaaactctag gcattaaata cttttcaatg 600
actgaagtgg acagactagg aattggcaag gtgatggaag aaacactcag ctatctacta 660
ggaagaaaga aaaggccaat tcatctaagt ttgatgttg 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 ttgaaggtgt aaaagcactg 1140
atagatgaaa ttttagctgc attacctcat catcaccatc accattaa 1188

<210> 40

<211> 1188

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> C-ABD094-rhArg gene, Synthesized in the Lab

<400> 40

atgagcgcca agtccagaac catagggatt attggagctc ctttctcaa gggacagcca 60
cgaggagggg tggaagaagg ccctacagta ttgagaaagg ctggtctgct tgagaaactt 120
aaagaacaag agtgtgatgt gaaggattat ggggacctgc cctttgctga catccctaat 180
gacagtcctt ttcaaattgt gaagaatcca aggtctgtgg gaaaagcaag cgagcagctg 240
gctggcaagg tggcagaagt caagaagaac ggaagaatca gcctgggtgct gggcggagac 300

cacagtttgg caattggaag catctctggc catgccaggg tccacctga tcttgagtc 360
 atctgggtgg atgtcacac tgatatcaac actccactga caaccacaag tggaaacttg 420
 catggacaac ctgtatcttt cctcctgaag gaactaaaag gaaagattcc cgatgtgcca 480
 ggattctcct ggggtgactcc ctgtatatct gccaaaggata ttgtgtatat tggcttgaga 540
 gacgtggacc ctggggaaca ctacattttg aaaactctag gcattaaata cttttcaatg 600
 actgaagtgg acagactagg aattggcaag gtgatggaag aaacactcag ctatctacta 660
 ggaagaaaga aaaggccaat tcatctaagt ttgatgttg 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 agcgggtgat 1020
 gcgaacagcc tggcggaagc gaaagaagcg gcgaacgcgg aactggatag ctatggcgtg 1080
 agcgattttt ataaacgcct gattgataaa gcgaaaaccg tggaaggcgt ggaagcgtg 1140

 aaagatgcga ttctggcggc gctgccgcat catcaccatc accattaa 1188
 <210> 41
 <211> 1125
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> N-ABD-BCA gene, Synthesized in the Lab
 <400> 41
 atgcatcatc accatcacca tgatgaagcc gtggatgcga attccttagc tgaagctaaa 60
 gtcttagcta acagagaact tgacaaatat ggagtaagtg actattacaa gaacctaatc 120
 aacaatgcca aaactgttga aggtgtaaaa gcactgatag atgaaatttt 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 cggttgacag agcaaggaga ttcacggttg 420
 cgcaatttga aagcggttgc ggaagcgaac gagaaacttg cggcggcggt tgaccaagtc 480
 gttcagcggg ggcgatttcc gcttgtgttg ggccggcgacc atagcatcgc cattggcacg 540
 ctgcgccggg tggcgaaaca ttatgagcgg cttggagtga tctggtatga cgcgcatggc 600

gacgtcaaca ccgcggaaac gtcgccgtct ggaacattc atggcatgcc gctggcggcg 660

agcctcgggt ttggccatcc ggcgtgacg caaatcggcg gatacagccc caaatcaag 720

ccggaacatg tcgtgttgat cggcgtccgt tcccttgatg aaggggagaa gaagtttatt 780

cgcgaaaaag gaatcaaat ttacacgatg catgaggttg atcggtcgg aatgacaagg 840

gtgatggaag aaacgatcgc ctatttaaaa gaacgaacgg atggcgttca tttgtcgctt 900

gacttggatg gccttgacc aagcgacgca ccgggagtcg gaacgcctgt cattggagga 960

ttgacatacc gcgaaagcca tttggcgatg gagatgctgg ccgaggcaca aatcatcact 1020

tcagcggaat ttgtcgaagt gaaccgcgac ttggatgagc ggaacaaaac agcatcagt 1080

gctgtagcgc tgatggggtc gttgtttggt gaaaaactca tgtaa 1125

<210> 42

<211> 1125

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> N-ABD094-BCA gene, Synthesized in the Lab

<400> 42

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 gatccatgaa gccaatattca 240

attatcgggg ttccgatgga tttagggcag acacgcccg cggttgatat 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 atagcatgc cattggcacg 540

ctcgccgggg tggcgaaaca ttatgagcgg cttggagtga tctggtatga cgcgcatggc 600

gacgtcaaca ccgcggaaac gtcgccgtct ggaacattc atggcatgcc gctggcggcg 660

agcctcgggt ttggccatcc ggcgtgacg caaatcggcg gatacagccc caaatcaag 720

ccggaacatg tcgtgttgat cggcgtccgt tcccttgatg aaggggagaa gaagtttatt 780

cgcgaaaaag gaatcaaat ttacacgatg catgaggttg atcggtcgg aatgacaagg 840

gtgatggaag aaacgatcgc ctatttaaaa gaacgaacgg atggcgttca tttgtcgctt 900

gacttggatg gccttgacc aagcgacgca ccgggagtcg gaacgcctgt cattggagga 960

ttgacataacc gcgaaagcca ttggtgatg gagatgctgg ccgaggcaca aatcatcact 1020

tcagcggaaat ttgtcgaagt gaacccgatc ttggatgagc ggaacaaaac agcatcagtg 1080

gctgtagcgc tgatggggtc gttgttttgt gaaaaactca tgtaa 1125

<210> 43

<211> 1119

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> C-ABD-BCA gene, Synthesized in the Lab

<400> 43

atgaagccaa ttcaattat cgggggttccg atggatttag ggagacacg ccgcggcgtt 60

gatatggggc cgagcgcaat gcgttatgca ggctcatcg aacgtctgga acgtcttcat 120

tacgatattg aagatttggg agatattccg attggaaaag cagagcgggt gcacgagcaa 180

ggagattcac ggttgcgcaa ttgaaagcg gttgcggaag cgaacgagaa acttgcggcg 240

gcggttgacc aagtcttca gcgggggcga ttccgcttg tgttgggcgg cgaccatagc 300

atcgccattg gcacgctcg cggggtggcg aacattatg agcggcttgg agtgatctgg 360

tatgacgcgc atggcgacgt caacaccgcg gaaacgtcg cgtctgaaa cattcatggc 420

atgccgttg cgcgagcct cgggtttggc catccggcgc tgacgcaaat cggcggatac 480

agccccaaaa tcaagccgga acatgtctg ttgatcggcg tccgttcct tgatgaaggg 540

gagaagaagt ttattcgca aaaaggaatc aaaatttaca cgatgcatga ggttgatcgg 600

ctcggaatga caagggtgat ggaagaaacg atcgctatt taaaagaacg aacggatggc 660

gttcatttgt cgttgactt ggatggcctt gacccaagcg acgcaccggg agtcggaacg 720

cctgtcattg gaggattgac ataccgcaa 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 agtaacaga gaacttgaca aatatggagt aagtgactat 1020

tacaagaacc taatcaaca tgccaaaact gttgaagtg taaaagcact gatagatgaa 1080

atattagctg cattacctca tcatcacat caccattaa 1119

<210> 44

<211> 1119

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> C-ABD094-BCA gene, Synthesized in the Lab

<400> 44

atgaagccaa tttaattat cggggttccg atggatttag ggacagacacg ccgcggcggtt	60
gataatggggc cgagcgcgaat gcgttatgca ggcgtctatcg aacgtctgga acgtcttcat	120
tacgatattg aagatttggg agatattccg atttgaaaag cagagcgggtt gcacgagcaa	180
ggagattcac ggttgcgcaa tttagaaagc gttgcggaag cgaacagaaa acttgcggcg	240

gcggttgacc aagtcgttca gcgggggcga ttccgccttg tgttgggcgg cgaccatagc	300
atcgccattg gcacgctcgc cggggtggcg aaacattatg agcggcttgg agtgatctgg	360
tatgacgcgc atggcgacgt caacaccgcg gaaacgtcgc cgtctggaaa cattcatggc	420
atgccgttgg cggcgagcct cgggtttggc catccggcgc tgacgcaaat cggcggatac	480
agccccaaaa tcaagccgga acatgtcgtg ttgatcggcg tccgttcctt tgatgaaggg	540
gagaagaagt ttattcgca aaaaggaatc aaaatttaca cgatgcatga ggttgatcgg	600
ctcggaatga caagggtgat ggaagaaacg atcgctatt 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 agcgcgtgat gggtcgttgt ttggtgaaaa actcatggga	900
tccagtaaca acaataataa caatggtagc ggcggtgatg aagcggtgga tgcgaacagc	960
ctggcggaag cgaaagaagc ggcgaaacgc gaactggata gctatggcgt gagcgatttt	1020
tataaacgcc tgattgataa agcgaaaacc gtggaagcgc tggaagcgct gaaagatgcg	1080

attctggcgg cgctgccgca tcatcaccat caccattaa 1119

<210> 45

<211> 74

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> His-ABD-Linker, Synthesized in the Lab

<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> Artificial Sequence

<220><223> His-ABD094-Linker, Synthesized in the Lab

<400> 46

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> Artificial Sequence

<220><223> Linker-ABD-His, Synthesized in the Lab

<400> 47

Gly Ser Ser 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 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> Artificial Sequence

<220><223> Linker-ABD094-His, Synthesized in the Lab

<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> Artificial Sequence

<220><223> N-ABD-rhArg, Synthesized in the Lab

<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
 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> 50
 <211> 396
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> N-ABD094-rhArg, Synthesized in the Lab
 <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> Artificial Sequence

<220><223> C-ABD-rhArg, Synthesized in the Lab

<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> Artificial Sequence

<220><223> C-ABD094-rhArg, Synthesized in the Lab

<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
 385 390 395
 <210> 53
 <211> 374
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> N-ABD-BCA, Synthesized in the Lab

<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> Artificial Sequence

<220><223> N-ABD094-BCA, Synthesized in the Lab

<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> Artificial Sequence
 <220><223> C-ABD-BCA, Synthesized in the Lab
 <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> Artificial Sequence

<220><223> C-ABD094-BCA, Synthesized in the Lab

<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
305					310					315					320
Leu	Ala	Glu	Ala	Lys	Glu	Ala	Ala	Asn	Ala	Glu	Leu	Asp	Ser	Tyr	Gly
325					330					335					

Val Ser Asp Phe Tyr Lys Arg Leu Ile Asp Lys Ala Lys Thr Val Glu
340 345 350
Gly Val Glu Ala Leu Lys Asp Ala Ile Leu Ala Ala Leu Pro His His
355 360 365

His His His His

370

<210> 57

<211> 50

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> ABD094-0F Primer, Synthesized in the Lab

<400> 57

attctggcag cgctgccgtc gggtagtaac aacaataata acaatggtag

50

<210> 58

<211> 50

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> ABD094-1F Primer, Synthesized in the Lab

<400> 58

aaccgtggaa ggtgtggaag cgctgaaaga tgcgattctg gcagcgctgc 50

<210> 59

<211> 50

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> ABD094-2F Primer, Synthesized in the Lab

<400> 59

gatttttata aacgtctgat tgataaagcg aaaaccgtgg aagggtgtgga 50

<210> 60

<211> 50

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> ABD094-3F Primer, Synthesized in the Lab

<400> 60

ctggatagct atggcgtgag cgatttttat aaacgtctga ttgataaagc 50

<210> 61

<211> 50

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> ABD094-4F Primer, Synthesized in the Lab

<400> 61

gcggaagcga aagaagcagc aaacgcggaa ctggatagct atggcgtgag 50

<210> 62

<211> 50

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> ABD094-5F Primer, Synthesized in the Lab

<400> 62

accatgatga agccgtggat gcgaattccc tggcgggaagc gaaagaagca 50

<210
> 63
<211> 46
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> abdNde-F Primer, Synthesized in the Lab
<400> 63
ggagatatac atatgcatca tcaccatcac catgatgaag ccgtgg 46
<210> 64
<211> 42
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> HuArgHinBam-R Primer, Synthesized in the Lab
<400> 64
tgactacctt aaccaccta agtaagcttg gatcctgtaa cg 42
<210> 65
<211> 1220
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> N-ABD094-rhArg gene, Synthesized in the Lab

<400> 65
ggagatatac atatgcatca tcaccatcac catgatgaag ccgtggatgc gaattccctg 60
gcggaagcga aagaagcagc aaacgcggaa ctggatagct atggcgtgag cgatttttat 120
aaacgtctga ttgataaagc gaaaaccgtg gaaggtgtgg aagcgctgaa agatgcgatt 180
ctggcagcgc tgccgtcggg tagtaacaac aataataaca atggtagcgg cggtatgagc 240
gccaaagtcca gaaccatagg gattattgga gctcctttct caaagggaca gccacgagga 300
ggggtggaag aaggccctac agtattgaga aaggctggtc tgcttgagaa acttaagaa 360
caagagtgtg atgtgaagga ttatggggac ctgccctttg ctgacatccc taatgacagt 420

ccctttcaaa ttgtgaagaa tccaaggtct gtgggaaaag caagcgagca gctggctggc 480
aaggtggcag aagtcaagaa gaacggaaga atcagcctgg tgctgggcgg agaccacagt 540
ttggcaattg gaagcatctc tggccatgcc agggctccacc ctgatcttgg agtcattctg 600
gtggatgctc aactgatat caacactcca ctgacaacca caagtggaaa cttgcatgga 660
caacctgtat ctttctcct gaaggaacta aaaggaaaga ttcccgatgt gccaggattc 720

tcctgggtga ctccctgtat atctgccaag gatatttgtt atattggctt gagagacgtg 780
gaccttgggg aacactacat ttgaaaact ctaggcatta aatacttttc aatgactgaa 840

gtggacagac taggaattgg caagtgatg gaagaaacac tcagctatct actaggaaga 900
aagaaaaggc caattcatct aagttttgat gttgacggac tggacccatc ttccacacca 960
gctactggca caccagtcgt gggaggtctg acatacagag aaggtctcta catcacagaa 1020
gaaatctaca aaacagggtc actctcagga ttagatataa tggaaagtga cccatccctg 1080
gggaagacac cagaagaagt aactcgaaca gtgaacacag cagttgcaat aaccttggct 1140
tgtttcggac ttgctcggga gggtaatcac aagcctattg actaccttaa cccacctaag 1200
taagcttggg tcctgtaacg 1220

<210> 66

<211> 54

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> ABD based on Streptococcus sp. G148, Synthesized in the Lab

<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> Artificial Sequence

<220><223> ABD based on Streptococcus sp. G148, Synthesized in the Lab

<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> Artificial Sequence

<220><223> ABD094 Without Linker, Synthesized in Lab

<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> Xaa at position one is either methionine or not present.

<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
 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
290 295

<210> 71

<211> 299

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> BCA (S161C) Arginase, Synthesized in the Lab

<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> Artificial Sequence

<220><223> BCA (V20P, S161C) Arginase, Synthesized in the Lab

<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> Artificial Sequence

<220><223> Linker Sequence 1, Synthesized in the Lab

<400> 73

Gly Ser Asn Asn Asn Asn Asn Asn Gly Ser Gly Gly

1 5 10

<210> 74

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Linker Sequence 2, Synthesized in the Lab

<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> Artificial Sequence

<220><223> BHA Fusion Protein, Synthesized in the Lab

<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
305 310 315 320
Lys Val Leu Ala Asn Arg Glu Leu Asp Lys Tyr Gly Val Ser Asp Tyr
325 330 335
Tyr Lys Asn Leu Ile Asn Asn Ala Lys Thr Val Glu Gly Val Lys Ala
340 345 350
Leu Ile Asp Glu Ile Leu Ala Ala Leu Pro
355 360

<210> 76

<211> 362

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> BAH Fusion Protein, Synthesized in the Lab

<400> 76

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 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> Artificial Sequence		
<220><223> 5'-Sense-ABD Primer, Synthesized in Lab		
<400> 77		
gcgcagcatg atgaagccgt ggatgcgaac agcttagctg aagctaaagt ctagctaac	60	
agagaacttg acaaatatgg agtaagtgac tattacaaga acc	103	
<210> 78		
<211> 98		
<212> DNA		
<213> Artificial Sequence		
<220><223> 5'-Anti-sense-ABD Primer, Synthesized in the Lab		
<400> 78		
ttaaggaat gcagctaaaa ttctatctat cagtgccttt acaccttcaa cagttttggc	60	
attgttgatt aggttcttgt aatagtcact tactccat	98	
<210> 79		
<211> 35		
<212> DNA		
<213> Artificial Sequence		
<220><223> Forward Primer for Cloning ABD, Synthesized in the Lab		
<400> 79		
gcataccat caccatcacg gcgagcatga tgaag	35	
<210> 80		
<211> 38		
<212> DNA		
<213> Artificial Sequence		
<220><223> Reverse Primer for Cloning ABD, Synthesized in the Lab		
<400> 80		
cgggatacctt aaggtaatgc agctaaaatt tcattctat	38	

<210> 81

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Forward Primer for Cloning BCA, Synthesized in the Lab

<400> 81

ggaattccca tatgaagcca atttcaatta tcg 33

<210> 82

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Reverse Primer for Cloning BCA, Synthesized in the Lab

<400> 82

gtgatggtga tggatgatgca 20

<210> 83

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Forward Primer for Cloning BHA, Synthesized in the Lab

<400> 83

ggaattccca tatgaagcca atttcaatta tcg 33

<210> 84

<211> 38

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Reverse Primer for Cloning BHA, Synthesized in the Lab

<400> 84

cgggatcctt aaggtaatgc agctaaaatt tcattctat 38

<210> 85

<211> 39

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Forward Primer for Cloning ABD, Synthesized in the Lab

<400> 85

cgttgttttg tgaaaaactc atggcgcagc atgatgaag 39

<210> 86

<211> 56

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Reverse Primer for Cloning ABD, Synthesized in the Lab

<400> 86

cgggatcctt agtgatggtg atggatga ggtaatgcag ctaaaatttc atctat 56

<210> 87

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Forward Primer for Cloning BAH, Syntesized in the Lab

<400> 87

ggaattccca tatgaagcca atttcaatta tcg 33

<210> 88

<211> 56

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Reverse Primer for Cloning BAH, Synthesized in the Lab

<400> 88

cgggatcctt agtgatggtg atggatga ggtaatgcag ctaaaatttc atctat 56

<210> 89

<211> 305

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> BCA (S161C) - His, Synthesized in Lab

<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> Artificial Sequence

<220><223> N-ABDHind-R Primer, Synthesized in the Lab

<400> 90

acagctaaaa gcttatcagc ctaggatccg ccgctaccat tg 42

<210> 91

<211> 38

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> C-ABDNde-F Primer, Synthesized in the Lab

<400> 91

tagctgatca tatgttatgc gatggatcca gtaacaac 38

<210> 92

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> C-ABDHind-R, Synthesized in the Lab

<400> 92

gaccctaaaa gcttaatggt gatggtgatg atg 33

<210> 93

<211> 34

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> HARGBam-F Primer, Synthesized in the Lab

<400> 93

ttagctgggg atccgccaag tccagaacca tagg 34

<210> 94

<211> 35

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> HARGHind-R Primer, Synthesized in the Lab

<400> 94

gagatcaaag cttacttagg tgggttaagg tagtc 35

<210> 95

<211> 35

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> HARGNde-F, Synthesized in the Lab

<400> 95

taggctgcat atgagcgcca agtccagaac catag 35

<210> 96

<211> 41

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> HARGBam-R Primer, Synthesized in the Lab

<400> 96

atcagctagg atcccttagg tgggttaagg tagtcaatag g 41

<210> 97

<211> 36

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> BCABam-F Primer, Synthesized in the Lab

<400> 97

atgctagtgg atccatgaag ccaatttcaa ttatcg 36

<210> 98

<211> 38

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> BCAlind-R Primer, Synthesized in the Lab

<400> 98

tcagcctaaa gcttacatga gtttttcacc aaacaacg 38

<210> 99

<211> 35

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> BCANde-F Primer, Synthesized in the Lab

<400> 99

atgctagcca tatgaagcca atttcaatta tcggg 35

<210> 100

<211> 37

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> BCABam-R Primer, Synthesized in the Lab

<400> 100

tcagctaagg atcccatgag tttttcacca aacaacg 37

<210> 101

<211> 329

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> His-rhArg, Synthesized in Lab

<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
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
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> Artificial Sequence

<220><223> His-rhArg-mono-Cys, Synthesized in Lab

<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>	Artificial Sequence														
<220><223>	rhArg-mono-Cys, Synthesized in the Lab														
<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> Artificial Sequence

<220><223> A(EAAAK)4ALEA-(EAAAK)4A Peptide Linker, Synthesized in the Lab

<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> Artificial Sequence

<220><223> G4SG4SG3SG Peptide Linker, Synthesized in the Lab

<400> 106

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly

1

5

10

15