



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 112513099 A

(43) 申请公布日 2021.03.16

(21) 申请号 201980051125.8

(22) 申请日 2019.05.31

(30) 优先权数据

62/678,300 2018.05.31 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2021.01.29

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/CN2019/089583 2019.05.31

(87) PCT国际申请的公布数据

W02019/228510 EN 2019.12.05

(71) 申请人 香港理工大学

地址 中国香港九龙

申请人 香港中文大学

(72) 发明人 梁润松 沈秀媛

(74) 专利代理机构 北京世峰知识产权代理有限公司 11713

代理人 王思琪 王建秀

(51) Int.Cl.

C07K 19/00 (2006.01)

A61K 38/16 (2006.01)

A61P 3/00 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

权利要求书2页 说明书59页

序列表50页 附图63页

(54) 发明名称

用于癌症、肥胖症、代谢紊乱和相关并发症及合并症的精氨酸耗竭剂的组合物和应用

(57) 摘要

本公开涉及精氨酸酶白蛋白结合域 (ABD) 融合蛋白及其制备方法和用途。还提供了用于治疗肥胖症、代谢紊乱和相关并发症及合并症的涉及精氨酸耗竭的方法。

1. 一种融合蛋白,其包含白蛋白结合域(ABD)多肽和精氨酸酶多肽。
2. 根据权利要求1所述的融合蛋白,其中,所述ABD多肽包含与SEQ ID NO:66、SEQ ID NO:67或SEQ ID NO:68具有至少93%序列同源性的多肽序列。
3. 根据权利要求1所述的融合蛋白,其中,所述精氨酸酶多肽包含与SEQ ID NO:69、SEQ ID NO:70、SEQ ID NO:71或SEQ ID NO:72具有至少95%序列同源性的多肽序列。
4. 根据权利要求1所述的融合蛋白,其中,所述ABD多肽包含与SEQ ID NO:66、SEQ ID NO:67或SEQ ID NO:68具有至少93%序列同源性的多肽序列,并且所述精氨酸酶多肽包含与SEQ ID NO:69、SEQ ID NO:70、SEQ ID NO:71或SEQ ID NO:72具有至少95%同源性的多肽序列。
5. 根据权利要求4所述的融合蛋白,其中,所述ABD多肽包含与SEQ ID NO:66具有至少93%序列同源性的多肽序列,并且所述精氨酸酶多肽包含与SEQ ID NO:69具有至少95%序列同源性的多肽序列。
6. 根据权利要求5所述的融合蛋白,其还包含连接所述ABD多肽的C-末端与所述精氨酸酶多肽的N-末端的肽接头,其中,所述肽接头是具有1至20个氨基酸的直链多肽。
7. 根据权利要求6所述的融合蛋白,其中,所述肽接头包含与SEQ ID NO:73或SEQ ID NO:74具有至少90%序列同源性的多肽序列。
8. 根据权利要求6所述的融合蛋白,其中,所述ABD多肽包含与SEQ ID NO:67具有至少93%序列同源性的多肽序列,并且所述精氨酸酶多肽包含与SEQ ID NO:72具有至少95%同源性的多肽序列。
9. 根据权利要求8所述的融合蛋白,其中,所述肽接头是具有4至8个组氨酸氨基酸的多组氨酸接头。
10. 根据权利要求1所述的融合蛋白,其中,所述融合蛋白包含与SEQ ID NO:49、SEQ ID NO:50、SEQ ID NO:51、SEQ ID NO:52、SEQ ID NO:53、SEQ ID NO:54、SEQ ID NO:55、SEQ ID NO:56、SEQ ID NO:75或SEQ ID NO:76具有至少98%序列同源性的多肽序列。
11. 根据权利要求1所述的融合蛋白,其中,所述融合蛋白包含与SEQ ID NO:49、SEQ ID NO:50、SEQ ID NO:75和SEQ ID NO:76具有至少98%序列同源性的多肽序列。
12. 根据权利要求1所述的融合蛋白,其中,所述融合蛋白包含选自SEQ ID NO:49、SEQ ID NO:50、SEQ ID NO:75和SEQ ID NO:76组成的组的多肽。
13. 一种药物组合物,其包含根据权利要求1所述的融合蛋白和药学上可接受的载体、赋形剂或其组合。
14. 一种治疗有此需要的受试者的癌症的方法,所述方法包括向所述受试者施用治疗有效量的根据权利要求1所述的融合蛋白的步骤。
15. 一种治疗有此需要的受试者的选自由肥胖症、代谢紊乱和相关并发症组成的组的至少一种病症的方法,所述方法包括向所述受试者施用治疗有效量的精氨酸耗竭剂的步骤。
16. 根据权利要求15所述的方法,其中,所述代谢紊乱选自由肥胖症、葡萄糖耐受不良、高血糖症、糖尿病组成的组,并且所述相关并发症是选自由以下各项组成的组的一种或多种病症:糖尿病肾病、糖尿病视网膜病变、糖尿病血管病变、糖尿病神经病变、高胆固醇血症、血脂异常、脂肪变性、脂肪性肝炎、纤维化、肝硬化、炎症、高血压、心血管疾病和褐色脂

肪变白。

17. 根据权利要求15所述的方法, 其中, 所述代谢紊乱是胰岛素抵抗。

18. 根据权利要求15所述的方法, 其中, 所述肥胖症的治疗包括预防脂肪量增加和降低脂肪量中的至少一种。

19. 根据权利要求15所述的方法, 其中, 所述代谢紊乱选自由肝脂肪变性、肾脂肪变性、胰腺脂肪变性和心脏脂肪变性组成的组。

20. 根据权利要求15所述的方法, 其中, 所述受试者血清中的精氨酸浓度保持低于50 μ M。

21. 根据权利要求15所述的方法, 其中, 所述精氨酸耗竭剂是精氨酸分解代谢酶。

22. 根据权利要求21所述的方法, 其中, 所述精氨酸分解代谢酶是精氨酸酶蛋白、精氨酸脱亚氨酶蛋白或精氨酸脱羧酶蛋白。

23. 根据权利要求22所述的方法, 其中, 所述精氨酸酶蛋白、精氨酸脱亚氨酶蛋白或精氨酸脱羧酶蛋白还包含一个或多个聚乙二醇 (PEG) 基团。

24. 根据权利要求23所述的方法, 其中, 所述精氨酸酶蛋白包含具有SEQ ID NO:101、SEQ ID NO:102、SEQ ID NO:103或SEQ ID NO:104的多肽。

25. 根据权利要求22所述的方法, 其中, 所述精氨酸酶蛋白、精氨酸脱亚氨酶蛋白或精氨酸脱羧酶蛋白还包含白蛋白结合域或人血清白蛋白或人IgG Fc域。

26. 根据权利要求25所述的方法, 其中, 所述精氨酸分解代谢酶是包含ABD多肽和精氨酸酶多肽的融合蛋白; 包含ABD多肽和精氨酸脱亚氨酶多肽的融合蛋白; 或包含ABD多肽和精氨酸脱羧酶多肽的融合蛋白。

27. 根据权利要求26所述的方法, 其中, 所述精氨酸分解代谢酶是根据权利要求1所述的融合蛋白。

28. 根据权利要求27所述的方法, 其中, 所述精氨酸分解代谢酶包含与SEQ ID NO:49、SEQ ID NO:50、SEQ ID NO:51、SEQ ID NO:52、SEQ ID NO:53、SEQ ID NO:54、SEQ ID NO:55、SEQ ID NO:56、SEQ ID NO:75或SEQ ID NO:76具有至少98%序列同源性的多肽。

29. 一种治疗有此需要的受试者的选自由病毒感染、多发性硬化症、类风湿性关节炎、自体免疫性疾病、先天性高精氨酸血症、移植物抗宿主病 (GvHD) 和炎症组成的组的至少一种病症的方法, 所述方法包括向所述受试者施用治疗有效量的根据权利要求1所述的融合蛋白的步骤。

用于癌症、肥胖症、代谢紊乱和相关并发症及合并症的精氨酸耗竭剂的组合物和应用

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求于2018年5月31日提交的美国临时申请第62/678,300号的优先权的权益,其全部内容通过引用并入本文中,用于所有目的。

技术领域

[0003] 本公开涉及精氨酸酶白蛋白结合域 (ABD) 融合蛋白及其制备方法和用途。还提供了用于治疗肥胖症、代谢紊乱和/或相关并发症和/或合并症的涉及精氨酸耗竭的方法。

背景技术

[0004] 精氨酸酶是催化精氨酸分解代谢为鸟氨酸和尿素的水解酶,其存在于大多数活的生物体中。在人类中,存在两种精氨酸酶亚型——I型精氨酸酶和II型精氨酸酶,它们在组织分布和分子特征方面存在差异。

[0005] 精氨酸酶I主要存在于肝脏的细胞质中,是一种以三聚体形式存在的35kD蛋白。而精氨酸酶II(一种~38.5kD蛋白)通常位于细胞的线粒体中,并且认为它参与了细胞中精氨酸/鸟氨酸浓度的调节。

[0006] 几种类型的肿瘤缺乏或产生低水平的精氨琥珀酸合成酶 (ASS) 和/或鸟氨酸氨甲酰基转移酶 (OTC),而这些酶是精氨酸合成所需的,因此这些肿瘤是精氨酸营养缺陷型肿瘤。精氨酸剥夺利用这些肿瘤细胞的明显弱点,因而导致它们迅速死亡。因此,酶介导的精氨酸耗竭已被用作选择性破坏肿瘤细胞的一种潜在策略。

[0007] 将酶介导的精氨酸耗竭开发为癌症疗法的主要障碍在于:精氨酸酶分子量低(<50kDa),因此其循环半衰期较短(几分钟到几小时),如此便会因肾脏清除而被迅速地消除。为了在体循环中维持有效的治疗浓度,可能需要频繁的给药方案,这可能会引起患者依从性问题。

[0008] 鉴于这个问题,已经开发出不同的策略来改善治疗性蛋白的药代动力学性质。聚乙二醇 (PEG) 与不同治疗性蛋白的缀合(即,PEG化)已被证明能增大其流体动力学半径,从而减缓其因肾脏清除而被消除。还研究了基于Fc新生受体 (FcRn) 循环机制的融合蛋白策略,其中证明了免疫球蛋白、白蛋白或白蛋白结合肽的可结晶片段 (Fc) 区与蛋白的融合可增加其循环半衰期。尽管如此,仍然需要开发具有改善药代动力学的精氨酸耗竭蛋白。

[0009] 肥胖症、代谢紊乱和相关并发症及合并症被认为属于21世纪最严重的全球公共卫生问题,给社会经济带来了沉重的负担。此外,肥胖症的代谢后果是其它疾病,例如2型糖尿病、葡萄糖耐受不良、胰岛素抵抗、高胆固醇血症、血脂异常、高血压、心血管疾病和癌症的驱动因素。因此,非常需要用于预防和/或治疗肥胖症、代谢紊乱和相关并发症及合并症的安全有效方法。肥胖症是能量摄入与能量消耗之间不平衡的结果。对于一些个体而言,仅进行生活方式干预不能有效使他们减轻足够的体重或维持持续的体重减轻以改善健康水平。可以服用抗肥胖药物(包括奥利司他 (Xenical)、氯卡色林 (Belviq) 以及芬特明和托吡酯的

组合(Qsymia)),以通过降低食欲或减少脂肪吸收来实现体重减轻。但是,这些药物具有多种副作用,例如,脂溶性维生素吸收的减少、头痛、疲劳、头晕、腹泻和大便失禁。例如胃绑带术之类的减肥手术可用于治疗严重的肥胖症,以实现长期减肥,而用于去除多余局部脂肪堆积的抽脂术因美容原因而备受欢迎。然而,这些类型的侵入性手术也会带来很大的风险。因此,需要开发改善的方法来治疗肥胖症、代谢紊乱和相关并发症及合并症。

发明内容

[0010] 为了解决一个或多个上述需求,本文提供了精氨酸酶ABD融合蛋白,其具有改善的体内半衰期和精氨酸分解代谢活性。本文所述的融合蛋白可用于治疗其中精氨酸耗竭发挥治疗作用的疾病或病症,例如用于治疗癌症、病毒感染、多发性硬化症、类风湿性关节炎、自身免疫性疾病、先天性高精氨酸血症、移植物抗宿主病(GvHD)、炎症、肥胖症、代谢紊乱和相关并发症及合并症。所述融合蛋白可以快速产生并从粗蛋白中纯化。所述融合蛋白可以单独使用,或与至少一种其它药剂组合使用,以对疾病的治疗或预防产生协同作用。

[0011] 本文还提供了通过耗竭受试者中的精氨酸水平(例如通过向受试者施用精氨酸耗竭剂)而治疗肥胖症、代谢紊乱和/或相关并发症和/或合并症的方法。

[0012] 在第一方面,本文提供了一种包含白蛋白结合域(ABD)多肽和精氨酸酶多肽的融合蛋白。

[0013] 在第一方面的第一实施方案中,本文提供了根据第一方面所述的融合蛋白,其中,所述ABD多肽包含与SEQ ID NO:66、SEQ ID NO:67或SEQ ID NO:68具有至少93%序列同源性的多肽序列。

[0014] 在第一方面的第二实施方案中,本文提供了根据第一方面所述的融合蛋白,其中,所述精氨酸酶多肽包含与SEQ ID NO:69、SEQ ID NO:70、SEQ ID NO:71或SEQ ID NO:72具有至少95%序列同源性的多肽序列。

[0015] 在第一方面的第三实施方案中,本文提供了根据第一方面所述的融合蛋白,其中,所述ABD多肽包含与SEQ ID NO:66、SEQ ID NO:67或SEQ ID NO:68具有至少93%序列同源性的多肽序列,并且所述精氨酸酶多肽包含与SEQ ID NO:69、SEQ ID NO:70、SEQ ID NO:71或SEQ ID NO:72具有至少95%同源性的多肽序列。

[0016] 在第一方面的第四实施方案中,本文提供了根据第一方面的第三实施方案所述的融合蛋白,其中,所述ABD多肽包含与SEQ ID NO:66具有至少93%序列同源性的多肽序列,并且所述精氨酸酶多肽包含与SEQ ID NO:69具有至少95%序列同源性的多肽序列。

[0017] 在第一方面的第五实施方案中,本文提供了根据第一方面的第四实施方案所述的融合蛋白,其还包含连接所述ABD多肽的C-末端与所述精氨酸酶多肽的N-末端的肽接头,其中,所述肽接头是具有1至20个氨基酸的直链多肽。

[0018] 在第一方面的第六实施方案中,本文提供了根据第一方面的第五实施方案所述的融合蛋白,其中,所述肽接头包含与SEQ ID NO:73或SEQ ID NO:74具有至少90%序列同源性的多肽序列。

[0019] 在第一方面的第七实施方案中,本文提供了根据第一方面的第六实施方案所述的融合蛋白,其中,所述ABD多肽包含与SEQ ID NO:67具有至少93%序列同源性的多肽序列,并且所述精氨酸酶多肽包含与SEQ ID NO:72具有至少95%同源性的多肽序列。

[0020] 在第一方面的第八实施方案中,本文提供了根据第一方面的第七实施方案所述的融合蛋白,其中,所述肽接头是具有4至8个组氨酸氨基酸的多组氨酸接头。

[0021] 在第一方面的第九实施方案中,本文提供了根据第一方面所述的融合蛋白,其中,所述融合蛋白包含与SEQ ID NO:49、SEQ ID NO:50、SEQ ID NO:51、SEQ ID NO:52、SEQ ID NO:53、SEQ ID NO:54、SEQ ID NO:55、SEQ ID NO:56、SEQ ID NO:75或SEQ ID NO:76具有至少98%序列同源性的多肽序列。

[0022] 在第一方面的第十实施方案中,本文提供了根据第一方面所述的融合蛋白,其中,所述融合蛋白包含与SEQ ID NO:49、SEQ ID NO:50、SEQ ID NO:75和SEQ ID NO:76具有至少98%序列同源性的多肽序列。

[0023] 在第一方面的第十一实施方案中,本文提供了根据第一方面所述的融合蛋白,其中,所述融合蛋白包含选自SEQ ID NO:49、SEQ ID NO:50、SEQ ID NO:75和SEQ ID NO:76组成的组的多肽。

[0024] 在第二方面,本文提供了一种药物组合物,其包含根据第一方面所述的融合蛋白和药学上可接受的载体、赋形剂或其组合。

[0025] 在第三方面,本文提供了一种治疗有此需要的受试者的癌症的方法,所述方法包括以下步骤:向所述受试者施用治疗有效量的根据第一方面所述的融合蛋白。

[0026] 在第四方面,本文提供了一种治疗有此需要的受试者的、选自由肥胖症、代谢紊乱和相关并发症组成的组的至少一种病症的方法,所述方法包括以下步骤:向所述受试者施用治疗有效量的精氨酸耗竭剂。

[0027] 在第四方面的第一实施方案中,本文提供了所述方法,其中,代谢紊乱选自由肥胖症、葡萄糖耐受不良、高血糖症和糖尿病组成的组,并且相关并发症是选自由以下各项组成的组的一种或多种病症:糖尿病肾病、糖尿病视网膜病变、糖尿病血管病变、糖尿病神经病变、高胆固醇血症、血脂异常、高甘油三酯血症、高瘦素血症、脂肪变性、脂肪性肝炎、纤维化、肝硬化、慢性轻度炎症、高血压、心血管疾病和褐色脂肪变白。

[0028] 在第四方面的第二实施方案中,本文提供了所述方法,其中,代谢紊乱是胰岛素抵抗。

[0029] 在第四方面的第三实施方案中,本文提供了所述方法,其中,肥胖症的治疗包括预防脂肪量增加和降低脂肪量中的至少一种。

[0030] 在第四方面的第四实施方案中,本文提供了所述方法,其中,代谢紊乱选自由肝脂肪变性、肾脂肪变性、胰腺脂肪变性和心脏脂肪变性组成的组。

[0031] 在第四方面的第五实施方案中,本文提供了所述方法,其中,受试者血清中的精氨酸浓度保持低于50 μ M。

[0032] 在第四方面的第六实施方案中,本文提供了所述方法,其中,所述精氨酸耗竭剂是精氨酸分解代谢酶。

[0033] 在第四方面的第七实施方案中,本文提供了根据第四方面的第六实施方案所述的方法,其中,所述精氨酸分解代谢酶是精氨酸酶蛋白、精氨酸脱亚氨酶蛋白或精氨酸脱羧酶蛋白。

[0034] 在第四方面的第八实施方案中,本文提供了根据第四方面的第七实施方案所述的方法,其中,所述精氨酸酶蛋白、精氨酸脱亚氨酶蛋白或精氨酸脱羧酶蛋白还包含一个或多

个聚乙二醇 (PEG) 基团。

[0035] 在第四方面的第九实施方案中,本文提供了根据第四方面的第八实施方案所述的方法,其中,所述精氨酸酶蛋白包含具有SEQ ID NO:101、SEQ ID NO:102、SEQ ID NO:103或SEQ ID NO:104的多肽。

[0036] 在第四方面的第十实施方案中,本文提供了根据第四方面的第七实施方案所述的方法,其中,所述精氨酸酶蛋白、精氨酸脱亚氨酶蛋白或精氨酸脱羧酶蛋白还包含白蛋白结合域或人血清白蛋白,或人IgG Fc域。

[0037] 在第四方面的第十一实施方案中,本文提供了根据第四方面的第十实施方案所述的方法,其中,所述精氨酸分解代谢酶是包含ABD多肽和精氨酸酶多肽的融合蛋白;包含ABD多肽和精氨酸脱亚氨酶多肽的融合蛋白;或包含ABD多肽和精氨酸脱羧酶多肽的融合蛋白。

[0038] 在第四方面的第十二实施方案中,本文提供了根据第四方面的第十一实施方案所述的方法,其中,所述精氨酸分解代谢酶是根据第一方面所述的融合蛋白。

[0039] 在第四方面的第十三实施方案中,本文提供了根据第四方面的第十二实施方案所述的方法,其中,所述精氨酸分解代谢酶包含与SEQ ID NO:49、SEQ ID NO:50、SEQ ID NO:51、SEQ ID NO:52、SEQ ID NO:53、SEQ ID NO:54、SEQ ID NO:55、SEQ ID NO:56、SEQ ID NO:75或SEQ ID NO:76具有至少98%序列同源性的多肽。

[0040] 在第五方面,本文提供了一种治疗有此需要的受试者的、选自由病毒感染、多发性硬化症、类风湿性关节炎、自体免疫性疾病、先天性高精氨酸血症、移植物抗宿主病 (GvHD) 和炎症组成的组的至少一种病症的方法,所述方法包括以下步骤:向所述受试者施用治疗有效量的根据第一方面所述的融合蛋白。

附图说明

[0041] 通过以下对本发明的描述,结合附图,本公开的上述目的和特征以及其它目的和特征将变得显而易见,在所述附图中:

[0042] 图1示出了通过十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 纯化白蛋白结合域 (ABD) 重组人精氨酸酶 (rhArg) 融合蛋白N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO:50)。泳道1:SDS-PAGE低范围标准品 (Bio-rad);泳道2:N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO:50),20倍稀释;泳道3:N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO:50),10倍稀释。

[0043] 图2A示出了示例性的N-ABD094-rhArg基因 (SEQ ID NO:38),其中对引物的结合位置进行了注释。

[0044] 图2B示出了理论pI/Mw为6.07/42555.38的N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO:50) 融合蛋白的蛋白序列。

[0045] 图3示出了具有单位点丝氨酸至半胱氨酸突变和C-末端组氨酸标签的工程化热溶芽孢杆菌 (*Bacillus caldovelox*) 精氨酸酶BCA (S161C) -His的蛋白序列 (SEQ ID NO:89)。突出显示了位置161处的半胱氨酸残基和6xHis-标签。

[0046] 图4示出了通过CLUSTALW进行的BCA (S161C) -His (SEQ ID NO:89)、BCA-6xHis-ABD融合蛋白BHA (SEQ ID NO:75) 和BCA-ABD-6xHis融合蛋白BAH (SEQ ID NO:76) 的蛋白序列比对。比对评分为:BCA与BHA:99.6721;BCA与BAH:98.0328;BHA与BAH:97.5138。

[0047] 图5A示出了通过单步骤充镍5mL HiTrap螯合HP柱色谱法从在500mL摇瓶培养物中

生长的大肠杆菌 (E.coli) 纯化BHA (SEQ ID NO:75) 的洗脱曲线。mAU:毫吸收单位;100%B=0.5M咪唑。

[0048] 图5B示出了来自针对BHA (SEQ ID NO:75) 的镍亲和层析的柱馏分的SDS-PAGE分析。M:SDS-PAGE分子量标准品,低范围 (Bio-Rad);FT:流穿;F2至F10:从柱上洗脱的馏分。

[0049] 图5C示出了通过单步骤充镍5mL HiTrap螯合HP柱色谱法从在500mL摇瓶培养物中生长的大肠杆菌细胞纯化BAH (SEQ ID NO:76) 的洗脱曲线。mAU:毫吸收单位;100%B=0.5M咪唑。

[0050] 图5D示出了来自针对BAH (SEQ ID NO:76) 的镍亲和层析的柱馏分的SDS-PAGE分析。M:SDS-PAGE分子量标准品,低范围 (Bio-Rad);FT:流穿;F2至F14:从柱上洗脱的馏分。

[0051] 图6A示出了色谱图,其显示使用柱床体积为196mL的XK50镍亲和柱大规模纯化工程化BCA (S161C) -His (SEQ ID NO:89)。与小规模纯化类似,采用四阶段洗脱梯度,并通过在280nm处的吸光度监测洗脱曲线。

[0052] 图6B示出了从工程化BCA (S161C) -His (SEQ ID NO:89) 的大规模纯化中选择的馏分的SDS-PAGE分析。泳道1是低范围分子量标准品。泳道2是细胞裂解物的总蛋白。泳道3表示热处理后收集的可溶性蛋白。泳道4示出了流经XK50镍亲和柱的蛋白。泳道5是非特异性结合蛋白 (来自A6-C3的合并级分)。泳道6至10分别表示级分E2、E3、F7、G3和A' 5。

[0053] 图7示出了非变性PAGE上N-ABD-rhArg融合蛋白 (SEQ ID NO:49) 与HSA之间的结合。泳道5至9分别示出了30皮摩尔HSA与7.5、15、30、60和120皮摩尔N-ABD-rhArg (SEQ ID NO:49) 的混合。30皮摩尔的HSA和N-ABD-rhArg (SEQ ID NO:49) 在非变性PAGE上的迁移分别在泳道2和3中示出。泳道1为空的或空白。泳道10示出了120皮摩尔N-ABD-rhArg (SEQ ID NO:49)。

[0054] 图8示出了非变性PAGE上BHA融合蛋白 (SEQ ID NO:75) 与HSA之间的结合。泳道1至5分别示出了60皮摩尔HSA与6、12、60、300和600皮摩尔BHA融合蛋白 (SEQ ID NO:75) 的混合。60皮摩尔的HSA和BHA融合蛋白 (SEQ ID NO:75) 在非变性PAGE上的迁移分别在泳道6和7中示出。标记为“BCA-ABD”的条带是BHA (SEQ ID NO:75)。

[0055] 图9示出了BCA (S161C) -His (SEQ ID NO:89) 和BHA融合蛋白 (SEQ ID NO:75) 对小鼠中血浆精氨酸的药效学。通过静脉内注射 (i.v.) 或腹膜内注射 (i.p.) 向每只BALB/c小鼠施用250U BCA (S161C) -His (SEQ ID NO:89) 或BHA融合蛋白 (SEQ ID NO:75)。注射后在指定的时间点采集血浆。时间0是指在注射前采集的血浆样品。通过Biochrom 30氨基酸分析仪确定每个样品中精氨酸的含量。在这些图中,低于检测极限 (3 μ M) 的精氨酸浓度被视为0 μ M。每个点代表三只小鼠的平均值 $\pm$ SD。

[0056] 图10示出了在接受 (A) 125U; (B) 250U; 和 (C) 500U N-ABD-rhArg (SEQ ID NO:49) 的单剂量腹膜内注射后,用Biochrom 30氨基酸分析仪测量的BALB/c小鼠的血浆精氨酸浓度。在第0天注射N-ABD-rhArg (SEQ ID NO:49)。

[0057] 图11示出了对PEG化His-rhArg (SEQ ID NO:101) 的生成的SDS-PAGE分析。泳道1和8:SDS-PAGE低范围分子量标准品 (Bio-rad);泳道2和3:His-rhArg (SEQ ID NO:101);泳道4和5:60%洗脱;泳道6和7:30%洗脱;泳道9和10:PEG化His-rhArg (SEQ ID NO:101)。PEG的分子量为5000。所使用的PEG是甲氧基聚乙二醇-琥珀酰亚胺丙酸酯 (mPEG-SPA5000)。如U.S.8,679,810中所述,His-rhArg (SEQ ID NO:101) 的蛋白表面赖氨酸残基经由丙酰氨基

(SPA) 接头共价连接至PEG (5000amu), 所述文献通过引用并入本文。

[0058] 图12示出了N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO:50) 的制备结果。泳道1:SDS-PAGE分子量标准品;泳道2:细胞裂解物;泳道3:热处理后;泳道4:流穿;泳道5:30%洗脱;泳道6:60%洗脱;泳道7:切向流过滤 (TFF) 后。泳道6或泳道7中的主要蛋白条带是纯化的N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO:50)。

[0059] 图13示出了在接受盐水中的500U N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO:50) 的单剂量腹膜内注射后,在不同时间点使用检测极限为0.3 μ M精氨酸的Agilent 6460液相色谱/电喷雾电离三重四极杆质谱仪测量的喂食普通饲料 (Chow) 的C57BL/6J雄性小鼠的血浆精氨酸浓度,表明血浆精氨酸浓度可被耗竭至<1 μ M达10天。每个时间点代表5只小鼠的平均值 $\pm$ SEM。

[0060] 图14示出了在向C57BL/6J雄性小鼠注射500U单剂量的N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO:50) 之后,通过ELISA测量的在不同时间点的N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO:50) 的血浆浓度,以检测人精氨酸酶 (n=5)。药物的循环半衰期约为4天。每个时间点代表5只小鼠的平均值 $\pm$ SEM。

[0061] 图15示出了喂食普通饲料 (Chow) 并用N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO:50) 处理的正常瘦型C57BL/6J雄性小鼠 [Chow (rhArg) 组] 的脂肪大量减少。(A) 与媒介物 (盐水) 处理的对照组 [Chow (媒介物) 组] 相比,用500U N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO:50) 以10天为间隔处理4周后内脏和皮下脂肪量显著减少。 $*P<0.05$,独立t检验。数据表示为 $\pm$ SEM,每组n=5。(B) 用N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO:50) 处理的小鼠的内脏白色脂肪组织 (WAT) 的苏木精和曙红 (H&E) 染色石蜡切片显示出脂肪细胞的尺寸显著减小。

[0062] 图16示出了利用实时qRT-PCR测量的几种与脂肪生成有关的关键基因在各种组织中的表达水平。与用媒介物处理的对照组 [Chow (媒介物) 组] 相比,用500U N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO:50) [Chow (rhArg) 组] 以10天为间隔处理4周后 (A) 内脏白色脂肪组织 (WAT) 和 (B) 肝脏中与脂肪生成相关的基因显著下调。相对于用媒介物处理的小鼠 [Chow (媒介物) 组] (其设定为1) 表示基因表达水平。 $*P<0.05$,独立t检验。数据表示为平均值 $\pm$ SEM,每组n=5。

[0063] 图17示出了用N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO:50) 进行处理显著改善了胰岛素敏感性。(A) 胰岛素耐性试验表明,与媒介物处理的对照组 [Chow (媒介物) 组] 相比,每隔10天注射500U N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO:50) 的小鼠 [Chow (rhArg) 组] 最快在处理两周表现出对胰岛素降血糖效果的敏感性明显提高。 $*P<0.05$,Chow (rhArg) 组,独立t检验。数据表示为平均值 $\pm$ SEM,每组n=5。(B) MTT试验表明,与未进行任何处理的对照 (con) 相比,用5U/mL N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO:50) 对小鼠原代肝细胞处理48小时不影响细胞生存力。(C) 小鼠原代肝细胞 (用5U/mL N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO:50) 进行24小时精氨酸耗竭,然后暴露于100nM胰岛素持续20分钟) 中磷酸化Akt (pAkt) (胰岛素信号标志物) 的蛋白水平的蛋白质免疫印迹分析。用N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO:50) 处理的肝细胞在受到胰岛素刺激后显示出更高水平的Akt磷酸化,这表明胰岛素信号增强。泳道1:con;泳道2:5U/mL N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO:50);泳道3:100nM胰岛素;泳道4:5U/mL N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO:50) +100nM胰岛素。

[0064] 图18显示,虽然被喂食含60kcal%脂肪的高脂饲料 (HFD) (从8周龄开始,持续12周) 的媒介物处理的C57BL/6J雄性小鼠 [HFD (媒介物) 组] 在 (A) 体重和 (B) 尺寸方面显示出

显著增加,但是同时每周一次用300U N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO:50) 对被喂食HFD (从8周龄开始,持续12周) 的雄性小鼠 [HFD (rhArg) 组] 进行处理可以有效防止体重增加。它们的体重保持与被喂食含10kcal%脂肪的匹配低脂饲料 (LFD) 的媒介物处理的瘦型对照小鼠 [LFD (媒介物) 组] 相似。数据表示为平均值 $\pm$ SEM,每组n=5。

[0065] 图19显示,每周一次、持续12周对喂食HFD的雄性小鼠同时用300U N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO:50) [HFD (rhArg) 组] 进行处理可有效防止HFD诱导的白色脂肪组织 (WAT) 扩张。(A) 主要内脏 (性腺周围、肾周、肠系膜) 和皮下 (腹股沟) 储库 (depot) 的脂肪垫重量。(B) 内脏WAT的H&E染色切片显示,同时用N-ABD094-rhArg进行处理预防HFD诱导的白色脂肪细胞肥大。(C) 相对于瘦型对照组 [LFD (媒介物) 组] (其设定为1) 表示的WAT中几个关键脂肪生成相关基因的表达水平。这些基因在用N-ABD094-rhArg处理的喂食HFD的小鼠中显著下调。 $*P<0.05$,采用单因素方差分析,然后采用Fisher最小显著差数法。数据表示为平均值 $\pm$ SEM,每组n=5。

[0066] 图20示出了每周一次,持续12周用300U N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO:50) 处理的小鼠 [HFD (rhArg) 组] 的骨骼肌中,HFD诱导的脂肪生成转录调节因子 (Pparg和Srebp1c) 的上调受到了抑制,同时关键脂肪生成酶 (Acc1和Scd1) 下调。 $*P<0.05$,采用单因素方差分析,然后采用Fisher最小显著差数法。数据表示为平均值 $\pm$ SEM,每组n=5。

[0067] 图21示出了同时用300U N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO:50) 每周一次进行处理 [HFD (rhArg) 组] 可以在C57BL/6J雌性小鼠中有效预防HFD诱导的肥胖症。(A) 从8周龄开始喂食HFD持续12周且同时用N-ABD094-rhArg或媒介物处理的小鼠的体重。喂食LFD的媒介物处理的雌性小鼠作为瘦型对照组 [LFD (媒介物) 组]。(B) 主要内脏 (性腺周围、肾周、肠系膜) 和皮下 (腹股沟) 储库处的脂肪垫重量。 $*P<0.05$,采用单因素方差分析,然后采用Fisher最小显著差数法。数据表示为平均值 $\pm$ SEM,每组n=5。

[0068] 图22示出了同时用300U N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO:50) 每周一次进行处理可以在C57BL/6J雌性小鼠中有效预防HFD诱导的胰岛素抵抗和葡萄糖耐受不良。(A) 在喂食HFD后第7周进行的胰岛素耐性试验 (ITT)。(B) 在喂食HFD后第11周进行的葡萄糖耐性试验 (GTT)。ITT和GTT的结果表示为曲线下面积 (AUC)。 $*P<0.05$,采用单因素方差分析,然后采用Fisher最小显著差数法。数据表示为平均值 $\pm$ SEM,每组n=5。

[0069] 图23示出了通过向培养基中添加N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO:50) (rhArg)、牛精氨酸酶或天然精氨酸脱亚氨酶 (ADI) 或使用无精氨酸的培养基来进行精氨酸耗竭,抑制了小鼠3T3-L1前体脂肪细胞向脂肪细胞的分化。向培养基中添加精氨酸酶分解代谢产物L-鸟氨酸或尿素或ADI代谢产物L-瓜氨酸没有对成脂分化和脂肪生成产生抑制作用。(*培养基含有0.4mM L-精氨酸,其可通过精氨酸酶转化为0.4mM L-鸟氨酸和0.4mM尿素,或通过ADI转化为0.4mM L-瓜氨酸)。在没有添加精氨酸耗竭剂或精氨酸酶/ADI的分解代谢产物的培养基中生长的细胞用作对照。在暴露于添加到培养基中的特定分化诱导因子后第6天,将细胞中的脂质用油红O染色。

[0070] 图24示出了N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO:50) 可以抑制3T3-L1前体脂肪细胞中的成脂分化和脂肪生成基因。将小鼠3T3-L1前体脂肪细胞在补充有特定因子的培养基中培养6天,以诱导分化为脂肪细胞 (分化)。在没有这些因子的培养基中生长的细胞保持未分化。向培养基中加入2U/mL N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO:50) (rhArg)。在不添加N-ABD094-

rhArg的培养基中生长的细胞用作对照。通过实时qRT-PCR测定脂肪生成途径中几个关键(A)成脂分化转录调节因子和(B)酶的mRNA表达水平,并将其相对于未分化(对照)组(其设定为1)表示。 $*P<0.05$,采用单因素方差分析,然后采用Fisher最小显著差数法。数据表示为平均值 $\pm$ SEM,每组 $n=3$ 。

[0071] 图25示出了3T3-L1前体脂肪细胞对各种浓度精氨酸的响应。将小鼠3T3-L1前体脂肪细胞在添加或不添加不同浓度L-精氨酸的无精氨酸培养基中培养6天。在补充有分化诱导因子的含精氨酸的正常培养基中培养的细胞作为分化的阳性(+ve)对照,而在没有补充分化诱导因子的含精氨酸的正常培养基中培养的细胞作为分化的阴性(-ve)对照。将一组细胞在补充有分化诱导因子的含精氨酸的正常培养基中进行培养,并用5U/mL N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO:50) (rhArg) 进行处理,以抑制分化。(A)用油红O对细胞进行脂质染色,并通过测量光密度来量化染色强度,所述光密度表示为相对于+ve对照组的百分比。(B)几个关键脂肪生成有关基因的mRNA水平相对于在无精氨酸培养基中培养的细胞(其设定为1)表示。数据表示为平均值 $\pm$ SEM,每组 $n=3$ 。

[0072] 图26显示,同时用300U N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO:50) 对喂食HFD的雄性小鼠每周一次进行处理[HFD (rhArg) 组]可有效预防HFD诱导的胰岛素抵抗。喂食HFD后(A)第6周和(B)第11周进行胰岛素耐性试验(ITT),结果表示为曲线下面积(AUC)。 $*P<0.05$,采用单因素方差分析,然后采用Fisher最小显著差数法。数据表示为平均值 $\pm$ SEM,每组 $n=5$ 。

[0073] 图27显示,同时用300U N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO:50) 对喂食HFD的雄性小鼠每周一次进行处理[HFD (rhArg) 组]可有效预防HFD诱导的葡萄糖耐受不良。在喂食HFD后(A)第5周和(B)第10周进行葡萄糖耐性试验(GTT),结果表示为曲线下面积(AUC)。 $*P<0.05$,采用单因素方差分析,然后采用Fisher最小显著差数法。数据表示为平均值 $\pm$ SEM,每组 $n=5$ 。

[0074] 图28显示,同时用300U N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO:50) 对喂食HFD的雄性小鼠每周一次进行处理[HFD (rhArg) 组]可以有效预防HFD诱导的空腹(A)血糖升高(使用血糖仪测量)和(B)胰岛素血浆浓度升高(使用ELISA测量)。(C)通过标准公式计算的HOMA-IR评分(其为胰岛素抵抗的一个度量)表明,同时用N-ABD094-rhArg进行处理预防了HFD诱导的胰岛素抵抗的发展。 $*P<0.05$,采用单因素方差分析,然后采用Fisher最小显著差数法。数据表示为平均值 $\pm$ SEM,每组 $n=5$ 。

[0075] 图29显示,同时用300U N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO:50) 对喂食HFD的雄性小鼠每周一次进行处理[HFD (rhArg) 组]预防/改善了HFD诱导的空腹血浆(A)瘦蛋白水平升高、(B)总胆固醇水平升高、(C)甘油三酯水平升高和(D)游离脂肪酸水平升高。 $*P<0.05$,采用单因素方差分析,然后采用Fisher最小显著差数法。数据表示为平均值 $\pm$ SEM,每组 $n=5$ 。

[0076] 图30显示,同时用300U N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO:50) 对喂食HFD的雄性小鼠每周一次、持续12周进行处理[HFD (rhArg) 组]预防了HFD诱导的肝脏增大。(A)完整新鲜肝脏的代表性图像。(B)肝脏重量。 $*P<0.05$,采用单因素方差分析,然后采用Fisher最小显著差数法。数据表示为平均值 $\pm$ SEM,每组 $n=5$ 。

[0077] 图31显示,同时用300U N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO:50) 对喂食HFD的雄性小鼠每周一次、持续12周进行处理[HFD (rhArg) 组]可以有效预防HFD诱导的肝脂肪变性。(A)用油红O染色的肝切片显示,在喂食HFD的媒介物处理的小鼠[HFD (媒介物) 组]中脂质大量积累,而在用N-ABD094-rhArg处理的小鼠中则没有出现这种情况。(B)N-ABD094-rhArg处理预防

了喂食HFD的小鼠肝脏中甘油三酯浓度的升高。(C) N-ABD094-rhArg抑制了肝脏中HFD诱导的脂肪生成相关基因的上调。 $*P<0.05$,采用单因素方差分析,然后采用Fisher最小显著差数法。数据表示为平均值 $\pm$ SEM,每组 $n=5$ 。

[0078] 图32显示,同时用300U N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO:50) 对喂食HFD的雄性小鼠每周一次、持续12周进行处理[HFD (rhArg) 组]预防了HFD诱导的血清丙氨酸氨基转移酶 (ALT) 水平 (通常作为肝损伤的生物标志物被测量) 的升高。 $*P<0.05$,采用单因素方差分析,然后采用Fisher最小显著差数法。数据表示为平均值 $\pm$ SEM,每组 $n=5$ 。

[0079] 图33显示,同时用300U N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO:50) 对喂食HFD的雄性小鼠每周一次、持续12周进行处理[HFD (rhArg) 组]预防了HFD诱导的 (A) 肾脏、(B) 胰腺和 (C) 心脏重量的增加。 $*P<0.05$,采用单因素方差分析,然后采用Fisher最小显著差数法。数据表示为平均值 $\pm$ SEM,每组 $n=5$ 。

[0080] 图34显示,同时用300U N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO:50) 对雄性小鼠每周一次、持续12周进行处理[HFD (rhArg) 组]可以有效 (A) 抑制HFD诱导的内脏WAT中促炎性脂肪因子的mRNA水平上调,其相对于瘦型对照小鼠[LFD (媒介物) 组] (其设定为1) 表示,并且 (B) 抑制HFD诱导的促炎性细胞因子血清水平的升高。 $*P<0.05$,采用单因素方差分析,然后采用Fisher最小显著差数法。数据表示为平均值 $\pm$ SEM,每组 $n=5$ 。

[0081] 图35显示,同时用300U N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO:50) 对雄性小鼠每周一次、持续12周进行处理[HFD (rhArg) 组]可以有效预防HFD诱导的褐色脂肪组织 (BAT) 变白。(A) 完整新鲜肩胛间BAT的代表性图像。(B) 肩胛间BAT的重量。(C) H&E染色的石蜡切片显示,在媒介物处理的喂食HFD的小鼠[HFD (媒介物) 组]的BAT中存在大量的具有大单孔 (脂质小球) (其为白色脂肪细胞的典型组织学特征) 的细胞,但在用N-ABD094-rhArg处理的喂食HFD的小鼠的BAT中很少发现这种情况。 $*P<0.05$,采用单因素方差分析,然后采用Fisher最小显著差数法。数据表示为平均值 $\pm$ SEM,每组 $n=5$ 。

[0082] 图36显示,同时用300U N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO:50) 对雄性小鼠每周一次、持续12周进行处理[HFD (rhArg) 组]显著上调了BAT中的关键产热调节因子 (Ucp1和Pgc1a) 的mRNA水平,并抑制了HFD诱导的BAT中脂肪酸氧化基因Acox1的下调。 $*P<0.05$,采用单因素方差分析,然后采用Fisher最小显著差数法。数据表示为平均值 $\pm$ SEM,每组 $n=5$ 。

[0083] 图37显示,在用N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO:50) 处理后,已存在 (通过从5周龄开始喂食HFD持续12周而诱导的) 肥胖症的C57BL/6J雄性小鼠显示出体重显著降低。(A) 每周一次、持续12周用600U N-ABD094-rhArg处理的小鼠[HFD (rhArg) 组]的体重。(B) 处理12周后小鼠的代表性图像。数据表示为平均值 $\pm$ SEM,每组 $n=5$ 。

[0084] 图38显示,向已存在HFD诱导的肥胖症的雄性小鼠施用600U N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO:50) [HFD (rhArg) 组],每周一次,持续12周,可以有效减少白色脂肪组织。(A) 用N-ABD094-rhArg处理后,肥胖小鼠的主要内脏 (性腺周围、肾周和肠系膜) 和皮下 (腹股沟) 储库的脂肪垫的重量与瘦型对照小鼠[LFD (rhArg) 组]高度相似。 $*P<0.05$,采用单因素方差分析,然后采用Fisher最小显著差数法。数据表示为平均值 $\pm$ SEM,每组 $n=5$ 。(B) H&E染色的内脏WAT切片显示,用N-ABD094-rhArg进行处理显著减小了肥胖小鼠的脂肪细胞尺寸。

[0085] 图39显示,向已存在HFD诱导的肥胖症的雄性小鼠施用600U N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO:50) [HFD (rhArg) 组],每周一次,可以有效逆转胰岛素抵抗。在用N-ABD094-rhArg处

理之前以及之后的第4、8和12周进行胰岛素耐性试验(ITT)。ITT的结果表示为曲线下面积(AUC)。* $P < 0.05$,采用单因素方差分析,然后采用Fisher最小显著差数法。数据表示为平均值 $\pm$ SEM,每组 $n=5$ 。

[0086] 图40显示,向已存在HFD诱导的肥胖症的雄性小鼠施用600U N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO:50) [HFD (rhArg) 组],每周一次,可以有效逆转葡萄糖耐受不良。在用N-ABD094-rhArg处理之前以及之后的第3、7和11周进行葡萄糖耐性试验(GTT)。GTT的结果表示为曲线下面积(AUC)。* $P < 0.05$,采用单因素方差分析,然后采用Fisher最小显著差数法。数据表示为平均值 $\pm$ SEM,每组 $n=5$ 。

[0087] 图41显示,向已存在HFD诱导的肥胖症的雄性小鼠施用600U N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO:50) [HFD (rhArg) 组],每周一次,可以有效逆转高血糖症、高胰岛素血症和胰岛素抵抗。用N-ABD094-rhArg处理后,肥胖小鼠的(A)空腹血糖、(B)空腹血浆胰岛素和(C)HOMA-IR评分被校正至接近正常水平。* $P < 0.05$,采用单因素方差分析,然后采用Fisher最小显著差数法。数据表示为平均值 $\pm$ SEM,每组 $n=5$ 。

[0088] 图42显示,向已存在HFD诱导的肥胖症的雄性小鼠施用600U N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO:50) [HFD (rhArg) 组],每周一次,可以有效逆转高瘦素血症和高胆固醇血症。用N-ABD094-rhArg处理后,肥胖小鼠的(A)空腹血浆瘦蛋白和(B)空腹血浆总胆固醇被校正至接近正常水平。* $P < 0.05$,采用单因素方差分析,然后采用Fisher最小显著差数法。数据表示为平均值 $\pm$ SEM,每组 $n=5$ 。

[0089] 图43显示,向已存在HFD诱导的肥胖症的雄性小鼠施用600U N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO:50) [HFD (rhArg) 组],每周一次、持续12周,可以有效逆转肝脏增大。(A)完整新鲜肝脏的代表性图像显示,用N-ABD094-rhArg处理后,肥胖小鼠的肝脏恢复至正常大小。(B)用N-ABD094-rhArg处理后,肥胖小鼠的肝脏重量显著降低,并且与瘦型对照小鼠[LFD (rhArg) 组]相似。* $P < 0.05$,采用单因素方差分析,然后采用Fisher最小显著差数法。数据表示为平均值 $\pm$ SEM,每组 $n=5$ 。

[0090] 图44显示,向已存在HFD诱导的肥胖症的雄性小鼠施用600U N-ABD094-rhArg (EQ ID NO:50) [HFD (rhArg) 组],每周一次、持续12周,可以有效逆转肝脂肪变性。在用N-ABD094-rhArg处理的肥胖小鼠的肝脏中,(A)肝切片的油红O染色显示脂质得到大量清除,(B)甘油三酯浓度降低至与瘦型对照小鼠[LFD (媒介物) 组]相当的水平,并且(C)几个关键脂肪生成有关基因的mRNA水平显著下调。表达水平相对于瘦型对照(其设定为1)表示。* $P < 0.05$,采用单因素方差分析,然后采用Fisher最小显著差数法。数据表示为平均值 $\pm$ SEM,每组 $n=5$ 。

[0091] 图45显示,向已存在HFD诱导的肥胖症的雄性小鼠施用600U N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO:50) [HFD (rhArg) 组],每周一次、持续12周,可以显著降低血清丙氨酸氨基转移酶(ALT)和天冬氨酸氨基转移酶(AST)(二者为肝损伤的常见生物标志物)的水平。* $P < 0.05$,采用单因素方差分析,然后采用Fisher最小显著差数法。数据表示为平均值 $\pm$ SEM,每组 $n=5$ 。

[0092] 图46显示,向已存在HFD诱导的肥胖症的雄性小鼠施用600U N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO:50) [HFD (rhArg) 组],每周一次、持续12周,可以逆转肾脂肪变性。在用N-ABD094-rhArg处理的肥胖小鼠中:(A)肾脏的重量、(B)肾脏中甘油三酯浓度、(C)H&E染色的肾脏切片的肾小管中的液泡结构和(D)油红O染色的肾脏切片的肾小球中脂滴的异位积累,显著减

少。 $*P<0.05$,采用单因素方差分析,然后采用Fisher最小显著差数法。数据表示为平均值 $\pm$ SEM,每组 $n=5$ 。

[0093] 图47显示,向已存在HFD诱导的肥胖症的雄性小鼠施用600U N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO:50) [HFD (rhArg) 组],每周一次、持续12周,可以逆转胰腺脂肪变性。在用N-ABD094-rhArg处理的肥胖小鼠中:(A) 胰腺的重量、(B) H&E染色的胰腺切片中示出的白色脂肪组织的小叶间和小叶内过度积累和(C) 胰腺中甘油三酯浓度显著降低。 $*P<0.05$,采用单因素方差分析,然后采用Fisher最小显著差数法。数据表示为平均值 $\pm$ SEM,每组 $n=5$ 。

[0094] 图48显示,向已存在HFD诱导的肥胖症的雄性小鼠施用600U N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO:50) [HFD (rhArg) 组],每周一次、持续12周,可以逆转心脏脂肪变性。在用N-ABD094-rhArg处理的肥胖小鼠中:(A) 心脏的重量、(B) 心脏中脂滴的过度积累和(C) 心脏中甘油三酯浓度显著降低。 $*P<0.05$,采用单因素方差分析,然后采用Fisher最小显著差数法。数据表示为平均值 $\pm$ SEM,每组 $n=5$ 。

[0095] 图49显示,向已存在HFD诱导的肥胖症的雄性小鼠施用600U N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO:50) [HFD (rhArg) 组],每周一次、持续12周,可以显著降低骨骼肌中的甘油三酯浓度。 $*P<0.05$,采用单因素方差分析,然后采用Fisher最小显著差数法。数据表示为平均值 $\pm$ SEM,每组 $n=5$ 。

[0096] 图50显示,向已存在HFD诱导的肥胖症的雄性小鼠施用600U N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO:50) [HFD (rhArg) 组],每周一次、持续12周,可以显著(A) 下调内脏WAT中促炎性脂肪因子Mcp1的mRNA水平,其相对于瘦型对照小鼠[LFD(媒介物) 组](其设定为1)表示,并且(B) 降低促炎性细胞因子Mcp1的血清浓度。 $*P<0.05$,采用单因素方差分析,然后采用Fisher最小显著差数法。数据表示为平均值 $\pm$ SEM,每组 $n=5$ 。

[0097] 图51显示,向已存在HFD诱导的肥胖症的雄性小鼠施用600U N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO:50) [HFD (rhArg) 组],每周一次、持续12周,可以减轻肝脏中的炎症和纤维化。在用N-ABD094-rhArg处理的肥胖小鼠的肝脏中,出现显著的(A) 促炎性基因下调和(B) 促纤维化基因下调,但(C) 抗炎性基因却上调。mRNA水平相对于瘦型对照[LFD(媒介物)] (其设定为1)表示。 $*P<0.05$,采用单因素方差分析,然后采用Fisher最小显著差数法。数据表示为平均值 $\pm$ SEM,每组 $n=5$ 。

[0098] 图52显示,向已存在HFD诱导的肥胖症的雄性小鼠施用600U N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO:50) [HFD (rhArg) 组],每周一次、持续12周,可以减轻肾脏中的炎症和纤维化。在用N-ABD094-rhArg处理的肥胖小鼠的肾脏中,出现显著的(A) 促炎性基因下调和(B) 促纤维化基因下调,并且(C) 肾小管和肾小球周围胶原纤维过度沉积减少。mRNA水平相对于瘦型对照[LFD(媒介物) 组](其设定为1)表示。 $*P<0.05$,采用单因素方差分析,然后采用Fisher最小显著差数法。数据表示为平均值 $\pm$ SEM,每组 $n=5$ 。

[0099] 图53显示,向已存在HFD诱导的肥胖症的雄性小鼠施用600U N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO:50) [HFD (rhArg) 组],每周一次、持续12周,可以减轻胰腺中的炎症和纤维化。在用N-ABD094-rhArg处理的肥胖小鼠的胰腺中,出现显著的(A) 促炎性基因下调和(B) 促纤维化基因下调。mRNA水平相对于瘦型对照[LFD(媒介物) 组]表示。 $*P<0.05$,采用单因素方差分析,然后采用Fisher最小显著差数法。数据表示为平均值 $\pm$ SEM,每组 $n=5$ 。

[0100] 图54显示,向已存在HFD诱导的肥胖症的雄性小鼠施用600U N-ABD094-rhArg (SEQ

ID NO:50) [HFD (rhArg) 组], 每周一次、持续12周, 可以有效逆转褐色脂肪 (BAT) 变白。在用 N-ABD094-rhArg 处理的肥胖小鼠中, (A) 肩胛间BAT的重量、(B) 肩胛间BAT的形态和尺寸、以及 (C) H&E染色的BAT切片所示的组织学特征与瘦型对照小鼠相似。 $*P < 0.05$, 采用单因素方差分析, 然后采用Fisher最小显著差数法。数据表示为平均值 $\pm$ SEM, 每组 $n=5$ 。

[0101] 图55显示, 向已存在HFD诱导的肥胖症的雄性小鼠施用600U N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO:50) [HFD (rhArg) 组], 每周一次, 在进行药物处理之后5周时可以将肥胖小鼠的 (A) 收缩压和舒张压和 (B) 心率显著降低至与瘦型对照小鼠 [LFD (媒介物) 组] 相似的水平。 $*P < 0.05$, 采用单因素方差分析, 然后采用Fisher最小显著差数法。数据表示为平均值 $\pm$ SEM, 每组 $n=10$ 。

[0102] 图56显示, 从5周龄开始喂食LFD并接受500U N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO:50) 的腹膜内注射, 每周一次、持续8个月, 的C57BL/6J雄性小鼠 [LFD (rhArg) 组] 产生了非中和性抗药物抗体。(A) 使用ELISA测定法, 在用N-ABD094-rhArg处理的喂食LFD的小鼠的血浆中可以检测到平均抗体滴度为 10^8 的抗rhArg抗体。(B) 将血浆用1000U/mL N-ABD094-rhArg (rhArg*) 温育1小时, 之后测量精氨酸酶活性。精氨酸酶活性没有降低, 这表明在动物中产生的针对药物的抗体不是中和性抗体。数据表示为平均值 $\pm$ SEM, 每组 $n=3$ 。

[0103] 图57显示, 从5周龄开始向喂食LFD的C57BL/6J雄性小鼠施用500U N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO:50) [LFD (rhArg) 组], 每周一次、持续8个月, 不会引起对肝脏和肾脏的不良反应。用N-ABD094-rhArg处理喂食LFD的小鼠与用媒介物处理的喂食LFD的小鼠 [LFD (媒介物) 组] 相比, 在以下方面没有显示出任何显著的差异: (A) 血清丙氨酸氨基转移酶 (ALT) 和天冬氨酸氨基转移酶 (AST) 浓度 (其通常用作评估肝功能或疾病的生物标志物); 以及 (B) 血清肌酐和尿白蛋白/肌酐浓度 (其通常用作评估肾脏功能或疾病的生物标志物)。数据表示为平均值 $\pm$ SEM, 每组 $n=3$ 。

[0104] 图58显示, 从5周龄开始向喂食LFD的C57BL/6J雄性小鼠施用500U N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO:50) [LFD (rhArg) 组], 每周一次、持续8个月, 不会引起不良血管反应。用N-ABD094-rhArg处理喂食LFD的小鼠与用媒介物处理的喂食LFD的小鼠 [LFD (媒介物) 组] 相比, 在以下方面没有显示任何显著的差异: (A) 由苯肾上腺素引起的血管平滑肌收缩; (B) 乙酰胆碱诱导的内皮依赖性血管舒张; 以及 (C) 响应于一氧化氮供体硝普钠的非内皮依赖性血管舒张。数据表示为平均值 $\pm$ SEM, 每组 $n=3$ 。

[0105] 图59显示, 向已存在HFD诱导的肥胖症的C57BL/6J雄性小鼠施用300U PEG化His-rhArg (SEQ ID NO:101) [HFD (PEG-rhArg) 组], 每周一次、持续4周, 可以使小鼠的体重有效减少至与喂食普通饲料 (Chow) 的媒介物处理的瘦型对照小鼠 [Chow (媒介物) 组] 相似的重量。数据表示为平均值 $\pm$ SEM, 每组 $n=6$ 。

[0106] 图60显示, 向已存在HFD诱导的肥胖症的雄性小鼠施用300U PEG化His-rhArg (SEQ ID NO:101) [HFD (PEG-rhArg) 组], 每周一次、持续4周, 可以有效降低主要内脏 (性腺周围、肾周、肠系膜) 和皮下 (腹股沟) 储库处的脂肪量, 并减轻肝脏、肾脏、胰腺和心脏的重量。 $*P < 0.05$, 采用单因素方差分析, 然后采用Fisher最小显著差数法。数据表示为平均值 $\pm$ SEM, 每组 $n=4$ 。

[0107] 图61显示, 向已存在HFD诱导的肥胖症的雄性小鼠施用300U PEG化His-rhArg (SEQ ID NO:101) [HFD (PEG-rhArg) 组], 每周一次, 可以在药物处理后第2周进行的胰岛素耐性试

验 (ITT) 中显著 (A) 降低空腹血糖和 (B) 提高胰岛素敏感性。ITT 的结果表示为曲线下面积 (AUC)。* $P < 0.05$, 采用单因素方差分析, 然后采用 Fisher 最小显著差数法。数据表示为平均值 $\pm$ SEM, 每组 $n = 6$ 。

[0108] 图62显示, 向已存在HFD诱导的肥胖症的C57BL/6J雄性小鼠施用25-100U N-ABD094-rhArg-Co²⁺ [SEQ ID NO:50 (钴取代)], 每周一次、持续5周, 可以有效减轻小鼠的体重。数据表示为平均值 $\pm$ SEM, $n = 3$ 。

[0109] 图63显示BHA融合蛋白 (SEQ ID NO:75) 对MKN45胃癌细胞系的抗癌作用。MKN45的生长以剂量依赖性方式受到抑制。通过MTT终点比色测定法确定生存力。数据表示为平均值 $\pm$ SD, $n = 3$ 。

[0110] 图64显示N-ABD-rhArg (SEQ ID NO:49) 对4T1乳腺癌异种移植裸鼠中肿瘤体积的影响。“实验组”的曲线表示每周接受一次500U N-ABD-rhArg (SEQ ID NO:49) 注射的实验组; “对照组”的曲线表示每周接受一次PBS注射的对照组。* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs 实验组, t 检验, $n = 4-6$ 。

[0111] 图65显示N-ABD-rhArg (SEQ ID NO:49) 对4T1乳腺癌异种移植裸鼠中相对肿瘤体积的影响。“实验组”的曲线表示每周接受一次500U N-ABD-rhArg (SEQ ID NO:49) 注射的实验组。“对照组”的曲线表示每周接受一次PBS注射的对照组。* $P < 0.05$ vs 实验组, t 检验, $n = 4-6$ 。

[0112] 图66显示实验组和对照组之间的肿瘤重量的显著差异。实验组每周接受一次500U N-ABD-rhArg (SEQ ID NO:49) 注射。对照组每周接受一次PBS注射。* $P < 0.05$ vs 实验组, t 检验, $n = 4-6$ 。

[0113] 图67显示从对照组和N-ABD-rhArg (SEQ ID NO:49) 处理组的裸鼠收集的肿瘤的图片。

[0114] 图68显示N-ABD-rhArg (SEQ ID NO:49) 对4T1乳腺癌同种异体移植中相对肿瘤体积的影响。“500U ABD-rhArg”的曲线表示每周接受一次500U N-ABD-rhArg (SEQ ID NO:49) 注射的实验组。“250U ABD-rhArg”的曲线表示每周接受一次250U N-ABD-rhArg (SEQ ID NO:49) 注射的实验组。“500U PEG-rhArg”的曲线表示每周接受一次500U PEG化His-rhArg (SEQ ID NO:101) 注射的实验组。“对照组”的曲线表示每周接受一次PBS的对照组。* $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs 实验组, t 检验, $n = 6-8$ 。

[0115] 图69显示实验组和对照组之间肿瘤重量的显著差异。“500U ABD-rhArg”的数据表示每周接受一次500U N-ABD-rhArg (SEQ ID NO:49) 注射的组。“250U ABD-rhArg”的数据表示每周接受一次250U N-ABD-rhArg (SEQ ID NO:49) 注射的组。“500U PEG-rhArg”的数据表示每周接受一次500U PEG化His-rhArg (SEQ ID NO:101) 注射的组。“对照组”的数据表示每周接受一次PBS的对照组。* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs 实验组, t 检验, $n = 6-8$ 。

[0116] 图70显示4T1同种异体移植物的肺的转移结节的平均数目。(A) “500U ABD-rhArg”的数据表示每周接受一次500U N-ABD-rhArg (SEQ ID NO:49) 注射的组。“250U ABD-rhArg”的数据表示每周接受一次250U N-ABD-rhArg (SEQ ID NO:49) 注射的组。“500U PEG-rhArg”的数据表示每周接受一次500U PEG化His-rhArg (SEQ ID NO:101) 注射的组。“对照组”的数据表示每周接受一次PBS的对照组。* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs 实验组, t 检验, $n = 6-8$ 。(B) 图70A所示的4T1同种异体移植物的肺部的转移结节数目的散点图。

具体实施方式

[0117] 本公开大体涉及包含精氨酸酶多肽和ABD多肽的融合蛋白及其使用方法和制备方法。本文提供的融合蛋白是高效的精氨酸耗竭剂,并且由于与ABD多肽融合,因此与已知的精氨酸酶及精氨酸酶衍生物相比,其半衰期大大延长。所公开的融合蛋白可用于治疗其中精氨酸耗竭可产生治疗效果的疾病和病症,例如用于治疗癌症、病毒、多发性硬化症、类风湿性关节炎、自身免疫性疾病、先天性高精氨酸血症、移植物抗宿主病(GvHD)、炎症、肥胖症、代谢紊乱和相关并发症及合并症。

[0118] 本公开还大体涉及通过耗竭有此需要的受试者中的精氨酸水平来治疗受试者的肥胖症、代谢紊乱和相关并发症及合并症的方法。受试者体内精氨酸的耗竭可以使体重和脂肪量减少,使葡萄糖耐量和胰岛素反应性得到改善,使血糖水平、内分泌和代谢特性正常化,并且还使炎症、脂肪变性和纤维化减轻。能够耗竭受试者体内的精氨酸的任何试剂都可以用于本文所述的治疗肥胖症、代谢紊乱和相关并发症及合并症的方法中。

[0119] 术语定义

[0120] 本文所使用的术语的定义意在结合生物技术领域中每个术语公认的当前最新定义。在适当的情况下提供了示例。无论是单独使用还是作为较大组的一部分使用,这些定义适用于整个说明书中所使用的术语,除非在特定情况下另有限制。

[0121] 如本文所使用的,术语“半衰期”或“1/2寿命”是指,在例如向哺乳动物注射之后试剂(例如本文所述的融合蛋白或精氨酸耗竭剂)的浓度在体外或体内下降一半所需的时间。在某些情况下,注射后的血浆精氨酸浓度在本文中用作试剂的半衰期的替代指标。在这种情况下,术语“治疗持续时间”用于表示特定剂量的精氨酸耗竭剂能够将血浆精氨酸浓度维持在特定阈值浓度(在该浓度观察到期待治疗效果)以下的时间长度。在某些实施方案中,血浆精氨酸阈值浓度低于50 μ M、低于40 μ M、低于30 μ M、低于20 μ M、低于10 μ M、低于5 μ M、低于3 μ M,或者其浓度低于常规分析仪器的检测极限。例如,在注射本文所述的精氨酸分解代谢酶后,血浆精氨酸耗竭至低于Biochrom 30氨基酸分析仪检测极限(检测极限为3 μ M)的浓度达7天,则表明治疗持续时间为7天,半衰期为例如约7天。

[0122] 本文所使用的术语“连接(attach或attached)”是指通过键或非键相互作用的连接或联合,以将两种或更多种化合物保持在一起,其包括直接或间接连接,因此例如,第一多肽直接结合至第二多肽或其它分子;以及包括其中一个或多个中间化合物(例如,接头)(例如,多肽)位于第一多肽与第二多肽或其它分子之间的实施方案。

[0123] 本文所使用的术语“蛋白”或“多肽”表示包括两种或更多种氨基酸单体和/或其类似物的有机聚合物。术语“多肽”包括任何长度的氨基酸聚合物,包括全长蛋白和肽及其类似物和片段。具有三个或更多个氨基酸的多肽也称为寡肽。如本文所使用的,术语“氨基酸”、“氨基酸单体”或“氨基酸残基”是指二十种天然存在氨基酸中的任何一种,包括具有非天然侧链的合成氨基酸,并且包括D和L光学异构体。术语“氨基酸类似物”是指其中一个或多个单个原子已经被取代(被不同的原子、同位素取代,或被不同的官能团取代),但在其它方面与其天然氨基酸类似物相同的氨基酸。

[0124] 如本文所使用的,术语“非天然氨基酸”是指不是20种常见天然存在的氨基酸、硒代半胱氨酸或吡咯赖氨酸之一的任何氨基酸、修饰氨基酸和/或氨基酸类似物。

[0125] 如本文所使用的,术语“融合蛋白”是指包含例如通过酰胺、酯、尿素、氨基甲酸酯、

醚和/或二硫键共价连接的不同来源的蛋白或功能性蛋白片段(例如,精氨酸酶或其变体)的嵌合蛋白。

[0126] 如本文所使用的,术语“变体”是指不同于参考核酸或多肽但保留其基本特性的多核苷酸或核酸。通常,变体总体上与参考核酸或多肽非常相似,并且在许多区域与参考核酸或多肽相同。

[0127] 例如,变体可包含具有至少一个保守氨基酸替代的亲本多肽序列的氨基酸序列。替代地或另外地,变体可包含具有至少一个非保守氨基酸替代的亲本多肽序列的氨基酸序列。在这种情况下,优选非保守氨基酸替代不会干扰或抑制功能变体的生物活性。非保守氨基酸替代可以提高变体的生物活性,使得与亲本多肽相比,变体的生物活性提高。

[0128] 当用于多肽时,术语“功能片段”是指主体多肽的任何片段或部分,所述片段或部分保留了其作为一部分的多肽(亲本多肽)的生物活性。功能片段可以是包含其作为一部分的多肽的连续氨基酸的任何片段,只要所述功能片段仍表现出亲本多肽的生物活性的至少40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%或99%或具有与亲本多肽基本相同或甚至更高的生物活性。关于亲本多肽,功能片段可包含该亲本多肽的例如约10%、20%、25%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、98%或更多。

[0129] 功能片段可在氨基端或羧基端或者这两端包含其它氨基酸,例如亲本多肽的氨基酸序列中不包含的氨基酸。

[0130] 所述多肽的氨基酸替代可以是保守氨基酸替代。保守氨基酸替代在本领域中是已知的,其包括其中具有某些物理和/或化学性质的一个氨基酸被替换为具有相同或相似化学或物理性质的另一种氨基酸的氨基酸替代。例如,保守氨基酸替代可以是酸性/带负电荷极性氨基酸取代另一种酸性/带负电荷极性氨基酸(例如,Asp或Glu)、具有非极性侧链氨基酸取代具有非极性侧链的另一种氨基酸(例如,Ala、Gly、Val、Ile、Leu、Met、Phe、Pro、Trp、Cys、Val等)、碱性/带正电荷极性氨基酸取代另一种碱性/带正电荷极性氨基酸(例如,Lys、His、Arg等)、具有极性侧链的无电荷氨基酸取代另一种具有极性侧链的无电荷氨基酸(例如,Asn、Gln、Ser、Thr、Tyr等)、具有 β 支化侧链的氨基酸取代具有 β 支化侧链的另一种氨基酸(例如,Ile、Thr和Val)、具有芳香族侧链的氨基酸取代具有芳香族侧链的另一种氨基酸(例如,His、Phe、Trp和Tyr)等。

[0131] 术语“同源性百分比”和“序列同一性百分比”在用于多肽或多核苷酸序列时在本文中可互换使用,其是指多核苷酸和多肽之间的比较,并通过在比对窗口上比较两条最佳比对序列而确定,其中,对于两条序列的最佳比对,比对窗口中的多核苷酸或多肽序列的部分与参考序列(其不含有插入或缺失)相比可以包括插入或缺失(例如,缺口)。百分比通过如下方式计算:确定两条序列中相同核酸碱基或氨基酸残基出现的位置的数目,以得到匹配位置的数目;用匹配位置的数目除以比对窗口中的总位置数目;并将结果乘以100,得到序列同一性的百分比。使用本领域已知的多种序列比对算法和程序中的任何一种来评估同源性。此类算法和程序包括但绝不限于TBLASTN、BLASTP、FASTA、TFASTA和CLUSTALW [Pearson和Lipman,1988,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 85(8):2444-2448;Altschul等人,1990,J.Mol.Biol.215(3):403-410;Thompson等人,1994,Nucleic Acids Res.22(2):4673-4680;Higgins等人1996,Methods Enzymol.266:383-402;Altschul等人,1990,J.Mol.Biol.215(3):403-410;Altschul等人,1993,Nature Genetics 3:266-272]。在某些

实施方案中,使用本领域熟知的基本局部比对搜索工具(“BLAST”)评估蛋白和核酸序列同源性(请见例如,Karlin和Altschul,1990,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 87:2267-2268;Altschul等人,1990,J.Mol.Biol.215:403-410;Altschul等人,1993,Nature Genetics 3:266-272;Altschul等人,1997,Nuc.Acids Res.25:3389-3402)。

[0132] 如本文所使用的,术语“治疗(treat、treating、treatment)”等是指减轻或改善病症/疾病和/或与之相关的症状。应当理解,治疗疾病或病症并不要求完全消除改疾病、病症或与其相关的症状,尽管不排除这种情况。在某些实施方案中,治疗包括预防疾病或病症和/或与其相关的症状。本文所使用的术语“预防(prevention或prevent)”是指抑制或至少延迟疾病、病症或与其相关的症状的发展的任何作用。预防可包括一级、二级和三级预防水平,其中:a)一级预防避免疾病发展;b)二级预防活动旨在进行早期疾病治疗,从而增加干预措施预防疾病发展和症状出现的几率;而且c)三级预防通过恢复功能及减少与疾病相关的并发症来减少已确诊疾病的不良影响。

[0133] 如本文所使用的,术语“分解代谢(catabolism或catabolic)”是指分子化学反应为其它分子,例如更小的分子。例如,精氨酸分解代谢酶是指能够与精氨酸反应,从而将其转化为其它分子(例如鸟氨酸、瓜氨酸和胍丁胺)的任何酶。

[0134] 如本文所使用的,术语“受试者”是指任何动物(例如,哺乳动物),包括但不限于人、非人灵长类、犬科动物、猫科动物和啮齿动物。

[0135] 如本文所使用的,术语“体重指数”或“BMI”是指以Kg为单位的体重除以以米为单位的的身高的平方的比。

[0136] 如本文所使用的,术语“超重”是指成年人BMI在25至30之间。对于20岁以下的人,“超重”被定义为与同龄人相比,BMI介于第85至第95百分位之间。

[0137] 如本文所使用的,术语“肥胖症”是指成年人BMI在30至40之间。对于20岁以下的人,“肥胖症”被定义为与同龄人相比,BMI高于第95百分位。如本文所使用的,该术语可包括肥胖症和病态肥胖。

[0138] 如本文所使用的,术语“病态肥胖(morbid obesity)”是指成年人BMI大于40。

[0139] 如本文所使用的,术语“脂肪变性(steatosis)”是指脂肪在组织(例如,肝组织、肾组织、胰腺组织、心肌组织或其它肌肉组织)中积累的病症。

[0140] 如本文所使用的,术语“纤维化(fibrosis)”是指其中器官或组织(例如肝组织、肾组织、胰腺组织或心脏组织)中纤维结缔组织(包括胶原)过度沉积的病症。

[0141] 如本文所使用的,术语“高胆固醇血症(hypercholesterolemia)”是指与相同种族背景、年龄和性别的相应参照受试者的正常血液胆固醇平均水平相比,血液胆固醇水平升高的病症。对于人类而言,该术语具体是指血液总胆固醇水平高于约200,特别是高于约240mg/dL。

[0142] 如本文所使用的,术语“血脂异常(dyslipidemia)”和“高脂血症(hyperlipidemia)”是指血流中脂质/脂肪(包括胆固醇、胆固醇酯、磷脂、甘油三酯和/或脂蛋白)的水平与相同种族背景、年龄和性别的相应参照受试者的正常平均血液脂质/脂肪水平相比分别异常和升高的病症。

[0143] 本文提供的融合蛋白包含精氨酸酶多肽。精氨酸酶多肽可源自通过表达精氨酸酶的任何生物体表达的精氨酸酶蛋白。示例性精氨酸酶包括由细菌(例如,芽孢杆菌、农杆菌、

蓝藻细菌和分枝杆菌)和哺乳动物(例如,牛、猪、绵羊、山羊、啮齿动物和人)产生的那些精氨酸酶。当精氨酸酶多肽源自人精氨酸酶时,其可以是1型精氨酸酶(ARG1)或2型精氨酸酶(ARG2)。

[0144] 精氨酸酶多肽可包含全长精氨酸酶多肽或其功能片段和/或变体。

[0145] 精氨酸酶是一种含锰酶。如实施例32中所示,当本文所述的融合蛋白中存在的一种或多种锰离子被一种或多种二价金属阳离子(例如, Co^{2+} 或 Ni^{2+})替代时,可提高融合蛋白的催化活性。因此,在某些实施方案中,本文所述的融合蛋白包含除锰以外的一种或多种二价金属,例如 Co^{2+} 或 Ni^{2+} 。在某些实施方案中,融合蛋白包含一种或多种选自 Co^{2+} 和 Ni^{2+} 的金属。在某些实施方案中,融合蛋白包含两个 Co^{2+} 离子或两个 Ni^{2+} 离子。在其它实施方案中,融合蛋白包含两个 Mn^{2+} 离子。

[0146] 在某些实施方案中,精氨酸酶多肽是野生型人ARG1。在某些实施方案中,精氨酸酶多肽包含与SEQ ID NO:69具有至少95%序列同源性的序列。例如,精氨酸酶多肽可包含与SEQ ID NO:69具有至少96%、97%、98%、99%、99.1%、99.4%或99.7%同源性的多肽序列。在某些实施方案中,精氨酸酶多肽的序列可以与SEQ ID NO:69相差1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25或30个氨基酸修饰(例如,插入、取代、缺失等)。在某些实施方案中,精氨酸酶多肽包含具有保守氨基酸替代、非保守氨基酸替代或其组合的多肽。

[0147] 在某些实施方案中,精氨酸酶多肽是热溶芽孢杆菌精氨酸酶(BCA)。在某些实施方案中,精氨酸酶多肽包含与SEQ ID NO:70具有至少95%序列同源性的序列。例如,精氨酸酶多肽可包含与SEQ ID NO:70具有至少96%、97%、98%、99%、99.3%或99.7%同源性的多肽序列。在某些实施方案中,精氨酸酶多肽的序列可以与SEQ ID NO:70相差1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25或30个氨基酸修饰(例如,插入、取代、缺失等)。在某些实施方案中,精氨酸酶多肽包含具有保守氨基酸替代、非保守氨基酸替代或其组合的多肽。

[0148] 在某些实施方案中,精氨酸酶多肽是BCA,其中,丝氨酸161被半胱氨酸替代,如SEQ ID NO:71和SEQ ID NO:72所示。丝氨酸被半胱氨酸取代允许定点掺入可进一步改善融合蛋白性质的化学部分。例如,半胱氨酸161的侧链可与适当活化的PEG部分发生反应,从而形成PEG化精氨酸酶,其可以掺入到所得的融合蛋白中。融合蛋白的PEG化能够通过进一步保护本文所述的融合蛋白免受组织或细胞内部各种活跃的降解机制的影响而进一步延长其停留时间,从而提高其治疗潜力。因此,在某些实施方案中,精氨酸酶多肽包含与SEQ ID NO:71或SEQ ID NO:72具有至少95%序列同源性的序列。例如,精氨酸酶多肽可包含与SEQ ID NO:71或SEQ ID NO:72具有至少96%、97%、98%、99%、99.3%或99.7%同源性的多肽序列。在某些实施方案中,精氨酸酶多肽的序列可以与SEQ ID NO:71或SEQ ID NO:72相差1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25或30个氨基酸修饰(例如,插入、取代、缺失等)。在某些实施方案中,精氨酸酶多肽包含具有保守氨基酸替代、非保守氨基酸替代或其组合的多肽。

[0149] 在本文所述的融合蛋白被PEG化的情况下,PEG基团的分子量可以为约5000至约20000amu、约5000至约15000amu、约5000至约12000amu、约7000至约12000amu或约7000至约10000amu。在某些实施方案中,PEG基团的分子量为约4000amu至10000amu。在某些实施方案中,PEG基团为PEG4000或PEG7000。

[0150] PEG基团可直接共价连接至融合蛋白,或通过接头共价连接至融合蛋白。可以通过使存在于蛋白上的半胱氨酸或赖氨酸侧链与PEG化试剂发生反应而将PEG基团共价连接至

融合蛋白。或者,PEG基团可共价连接至蛋白的N-末端胺。

[0151] 在某些实施方案中,融合蛋白经由丙酸接头共价连接至PEG。在其它实施方案中,融合蛋白经由C2-C10、C2-C9、C2-C8、C2-C7、C2-C6、C2-C5或C2-C4直链或支链羧酸接头共价连接至PEG。在某些实施方案中,PEG基团连接至精氨酸酶多肽。

[0152] 本文所述的融合蛋白还包含白蛋白结合域(ABD)多肽。一些研究已经证明了白蛋白结合获得更长的治疗性蛋白半衰期的潜力。然而,包括ABD多肽的融合蛋白的设计可能具有挑战性,因为ABD多肽与蛋白治疗剂的融合会潜在地影响蛋白治疗剂的功效、ABD多肽的结合亲和力以及融合蛋白的溶解性。因此,ABD多肽的选择、其连接位点和任何必要接头的构建不是一个简单的过程,常常需要反复试验才能获得具有期望特征的融合性质。例如,图9、图10和图13表明,N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO:50)的治疗持续时间(和半衰期)出乎意料地比BHA和BAH都长得多。虽然BHA、BAH和N-ABD094-rhArg都表现出令人惊讶的长的治疗持续时间(和半衰期),但却没有预测到N-ABD094-rhArg的治疗持续时间(和半衰期)竟会如此之长。

[0153] 通常希望药物更长效。接头类型、长度、柔性以及生物活性肽或蛋白与半衰期延长模块的C-或N-末端的融合可对融合蛋白的活性产生深远影响。在本公开中,经由合适的接头将各种精氨酸酶与ABD分子融合,从而可以保留精氨酸酶的酶活性和ABD的白蛋白结合能力。良好的稳定性和溶解性也是必不可少的。要实现这一点是非常困难且具有挑战性的。与常见的HSA或Fc融合不同,对ABD融合了解甚少。本公开提供了可用于产生功能性精氨酸酶-ABD融合物的接头设计的实例。在本公开中,通过接头工程或者通过生物活性蛋白(精氨酸酶)相对于半衰期延长模块(ABD)的位置或者二者,优化了工程化精氨酸酶融合蛋白(N-ABD094-rhArg、N-ABD-rhArg等)的活性。

[0154] 在许多情况下,蛋白质工程可以用来克服活性损失。在一个实例中,使用接头工程技术来恢复因IFN-2b与HSA融合而丧失的活性[Prot Exp Purif.2008;61:73-7]。IFN-2b与HSA的直接融合导致了生物活性非常小的不稳定蛋白。在融合形式中,测试了各种接头对IFN-2b活性的影响。众所周知,肽接头会影响融合蛋白的表达、活性及药代动力学[Adv Drug Deliv Rev.2013;65:1357-69]。肽接头的两种主要类型是:(i)柔性接头(例如,(G4S)_n,其中n=1-4);(ii)刚性接头,例如,-螺旋接头[A(EAAAK)_nA]_x(其中n=2-4,x=1或2)和XP_n(其中X是A、K或E)。对于柔性接头,一个优点是可能需要柔性以使得分子的生物活性部分可以相对于其同源受体正确取向。但是,柔性接头在融合伴侣和生物活性蛋白之间不会留出很多空间。另一方面,刚性接头提供了更多的空间,但却缺乏灵活性。就IFN-2b-HSA融合蛋白而言,与天然IFN-2b相比,柔性接头产生约39%的活性,而刚性XP接头和-螺旋接头分别产生天然IFN-2b活性的68%和115%[Prot Exp Purif.2008;61:73-7]。

[0155] 某些接头可对融合蛋白的性质产生负面影响。例如,将粒细胞集落刺激因子(G-CSF)与转铁蛋白(Tf)融合。使用短亮氨酸-谷氨酸(LE)接头仅产生天然G-CSF活性的约10%。插入(G4S)₃或-螺旋[A(EAAAK)_nA]_m(n=2-4,m=1或2)接头显著提高了融合蛋白相对于G-CSF-LE-Tf的活性。用接头(A(EAAAK)₄LEA-(EAAAK)₄A)构建的融合蛋白产生的生物活性接近天然G-CSF的生物活性[Pharm Res.2006;23:2116-21]。在另一个实例中,虽然Fc部分的C-末端可以通过肽键直接与IFN-部分的N-末端连接,但Gillies等人[US 7,670,595B2]另外通过接头肽来连接Fc部分与IFN-部分。接头肽位于Fc部分的C-末端与成熟IFN-

部分的N-末端之间。在这种情况下,接头肽优选包括丝氨酸和甘氨酸残基,例如氨基酸序列G4SG4SG3SG。所有这些发现都证明了测试接头技术对于融合蛋白研发计划成功的重要性。

[0156] 已经使用不同的方法证明了融合位置对于活性的重要性[Curr Pharmaceut Biotechnol.2014;15:856-63]。将脑钠肽(BNP)以各种形式融合到HSA的N-末端或C-末端。结果表明,都融合到HSA的N-末端的BNP-HAS、BNP2-HAS(BNP的两个拷贝)和BNP4-HSA都没有活性。但是,与HSA的C-末端融合的HSA-BNP2具有与天然BNP相同的活性,并且是长效的。

[0157] 这些实例证明了努力进行融合蛋白的前导优化以通过接头工程、生物活性蛋白或肽相对于半衰期延长模块的位置或这两者来优化活性的重要性。重要的是,本发明使用了新的ABD融合方法将ABD和精氨酸酶结合在一起,从而可以保持精氨酸酶活性。成功生成了可以以pH依赖性方式与FcRn结合的稳定且可溶的精氨酸酶-ABD融合分子,从而实现了有效的核内体再循环。例如,本公开令人惊讶地发现,对于与ABD融合的rhArg,在小鼠中,蛋白质循环的最终半衰期从几分钟显著增加至4天。综上所述,可以使用多种不同的方法来微调精氨酸酶的药代动力学特性,以确保针对不同疾病情况在循环中适当的停留时间。开发任何治疗性蛋白的另一个关键问题是使免疫原性最小化,以避免不良作用。因此,观察到人精氨酸酶的低免疫原性以及ABD的成功去免疫化(例如,ABD094)(ABD在本公开中还用作延长体内半衰期的基因融合伴侣)是重要的。

[0158] 白蛋白结合蛋白是在由革兰氏阳性细菌表达的各种表面蛋白中发现的三螺旋蛋白结构域。衍生自链球菌蛋白G的白蛋白结合蛋白具有214个氨基酸,并包含三个白蛋白结合域(ABD1-3),其用于与人血清白蛋白结合,并逃避宿主的免疫系统。ABD3对应于46个氨基酸的序列,其已经被证明能与入血清白蛋白结合,并且是开发具有不同性质(例如,结合亲和力和结合选择性)的ABD多肽的许多研究与入血清白蛋白的亲和力成熟研究的对象。这类研究已经产生了大量性质各异的ABD多肽。

[0159] 白蛋白结合蛋白发现于其它细菌中。例如,天然存在的白蛋白结合蛋白包括来自革兰氏阳性细菌的某些表面蛋白,例如,链球菌M蛋白(例如,M1/Emm1、M3/Emm3、M12/Emm12、EmmL55/Emm55、Emm49/EmmL49和蛋白H)、链球菌蛋白G、MAG和ZAG以及来自大芬戈尔德菌(*Finkegoldia magna*)某些品系的PPL和PAB。

[0160] 在某些实施方案中,本文所述的融合蛋白包含衍生自链球菌蛋白G白蛋白结合域的ABD多肽。在某些实施方案中,ABD多肽是全长链球菌蛋白G白蛋白结合域3或其功能片段和/或变体。

[0161] 在某些实施方案中,融合蛋白包含ABD多肽,所述ABD多肽包含与SEQ ID NO:66具有至少93%序列同源性的多肽序列。例如,所述ABD多肽可包含与SEQ ID NO:66具有至少94%、96%或98%同源性的多肽序列。在某些实施方案中,ABD多肽的序列与SEQ ID NO:66可相差1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个氨基酸修饰(例如,插入、取代、缺失等)。在某些实施方案中,ABD多肽包含具有保守氨基酸替代、非保守氨基酸替代或其组合的多肽。

[0162] 在某些实施方案中,融合蛋白包含ABD多肽,所述ABD多肽包含与SEQ ID NO:67具有至少93%序列同源性的多肽序列。例如,所述ABD多肽可包含与SEQ ID NO:67具有至少94%、96%或98%同源性的多肽序列。在某些实施方案中,ABD多肽的序列与SEQ ID NO:67可相差1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个氨基酸修饰(例如,插入、取代、缺失等)。在某些实施方案中,ABD多肽包含具有保守氨基酸替代、非保守氨基酸替代或其组合的多肽。

[0163] 在某些实施方案中,融合蛋白包含ABD多肽,所述ABD多肽包含与SEQ ID NO:68具有至少93%序列同源性的多肽序列。例如,所述ABD多肽可包含与SEQ ID NO:68具有至少93%、95%或97%同源性的多肽序列。在某些实施方案中,ABD多肽的序列与SEQ ID NO:68可相差1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个氨基酸修饰(例如,插入、取代、缺失等)。在某些实施方案中,ABD多肽包含具有保守氨基酸替代、非保守氨基酸替代或其组合的多肽。

[0164] ABD多肽和精氨酸酶多肽的相对位置可以变化。例如,ABD多肽可在精氨酸酶多肽之前(例如,精氨酸酶多肽可以直接或间接地从ABD多肽的C-末端连接),或者精氨酸酶多肽可在ABD多肽之前(例如,ABD多肽可以直接或间接地从精氨酸酶多肽的C-末端连接)。

[0165] 在某些实施方案中,融合蛋白可包括一种或多种精氨酸酶多肽和/或一种或多种ABD多肽。例如,融合蛋白可具有通式结构ABD-rhArg-ABD、ABD094-rhArg-ABD094、ABD-BCA-ABD、ABD094-BCA-ABD094、rhArg-ABD-rhArg、rhArg-ABD094-rhArg、BCA-ABD-BCA或BCA-ABD094-BCA。

[0166] ABD多肽和精氨酸酶多肽可通过直接共价连接而连接,或经由肽接头间接连接。

[0167] 肽接头或接头是长度范围通常为约1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20或更多个氨基酸的多肽,其被设计来促进ABD多肽和精氨酸酶多肽功能性连接为连接融合蛋白。术语功能性连接是指促进多肽适当折叠成三维结构,使得连接的融合蛋白表现出产生其多肽成分的蛋白的部分或全部功能性方面或生物活性的连接。

[0168] 多肽接头可置于ABD多肽的N-末端与精氨酸酶多肽的C-末端之间,或可替代地,位于精氨酸酶多肽的N-末端与ABD多肽的C-末端之间。

[0169] 肽接头可包含天然存在的氨基酸、非天然氨基酸及其组合。

[0170] 在某些实施方案中,肽接头可包含甘氨酸、丝氨酸、天冬酰胺或其组合。示例性肽接头包括含有聚甘氨酸、 $(GS)_n$ 和 $(GGS)_n$ 的接头,其中,n为1-30。其它示例性肽接头包括柔性接头(例如, $(G_4S)_n$,其中n=1-4)或刚性接头(例如, α -螺旋接头 $[A(EAAAK)_nA]_x$,其中,n=2-4,x=1或2;以及 XP_n ,其中,X是A、K或E,并且n=1-10)。在某些实施方案中,肽接头是 $(A(EAAAK)_4ALEA-(EAAAK)_4A)$ (SEQ ID NO:105); $G_4SG_4SG_3SG$ (SEQ ID NO:106); $GS(N)_nGSG$,其中n=1-10; $GS(Q)_nGSG$,其中n=1-10等等。在某些实施方案中,肽接头包含与SEQ ID NO:73具有至少90%序列同源性的多肽序列。例如,肽接头可包含与SEQ ID NO:73具有至少91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%序列同源性或与SEQ ID NO:73一致的多肽。

[0171] 在某些实施方案中,肽接头可包含甘氨酸、丝氨酸、天冬酰胺或其组合。在某些实施方案中,肽接头包含与SEQ ID NO:74具有至少90%序列同源性的多肽序列。例如,肽接头可包含与SEQ ID NO:74具有至少91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%序列同源性或与SEQ ID NO:74一致的多肽。

[0172] 纯化标签可用于提高融合蛋白纯化(例如通过亲和色谱法纯化)的便捷性。众所周知的纯化标签是六组氨酸(6x His)标签,它是具有六个组氨酸残基的序列。因此,在某些实施方案中,融合蛋白还包含具有4至8个组氨酸氨基酸(例如6x His标签)的多组氨酸。多组氨酸可存在于融合蛋白的C-末端、融合蛋白的N-末端,或位于ABD多肽与精氨酸酶多肽之间。

[0173] 当多组氨酸位于ABD多肽与精氨酸酶多肽之间时,它可以作为肽接头,或可以除肽接头外被另外包括在内。例如,SEQ ID NO 75的融合蛋白在位置300-305处包含六个组氨酸

多肽接头,其用于连接ABD多肽和精氨酸酶多肽,并且可有利地用于通过亲和色谱法纯化融合蛋白。

[0174] 使用本领域通常已知的技术,在纯化完成后可以可选地除去多组氨酸标签。例如,可以使用肽链外切酶来除去N-末端多组氨酸标签(例如,Qiagen TAGZyme),而有利于使用肽链内切酶来去除多组氨酸标签的合适氨基酸序列可以在C-末端多组氨酸标签之前。因此,本公开的范围涵盖不包括N-末端和/或C-末端多组氨酸标签的融合蛋白。

[0175] 在某些实施方案中,ABD多肽包含与SEQ ID NO:66、SEQ ID NO:67或SEQ ID NO:68具有至少93%序列同源性的多肽序列,并且精氨酸酶多肽包含与SEQ ID NO:69、SEQ ID NO:70、SEQ ID NO:71或SEQ ID NO:72具有至少95%同源性的多肽序列。例如,ABD多肽包含与SEQ ID NO:66、SEQ ID NO:67或SEQ ID NO:68具有至少94%、95%、96%、97%、98%或99%序列同源性或与SEQ ID NO:66、SEQ ID NO:67或SEQ ID NO:68一致的多肽序列,并且精氨酸酶多肽包含与SEQ ID NO:69、SEQ ID NO:70、SEQ ID NO:71或SEQ ID NO:72具有至少96%、97%、98%或99%序列同源性或与SEQ ID NO:69、SEQ ID NO:70、SEQ ID NO:71或SEQ ID NO:72一致的多肽序列。

[0176] 在某些实施方案中,ABD多肽包含与SEQ ID NO:66具有至少93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%序列同源性或与SEQ ID NO:66一致的多肽序列,并且精氨酸酶多肽包含与SEQ ID NO:69具有至少95%、96%、97%、98%或99%序列同源性或与SEQ ID NO:69一致的多肽序列。

[0177] 在某些实施方案中,融合蛋白还包含肽接头,所述肽接头包含与SEQ ID NO:73或SEQ ID NO:74具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%序列同源性或与SEQ ID NO:73或SEQ ID NO:74一致的多肽序列。

[0178] 示例性融合蛋白包括与SEQ ID NO:49、SEQ ID NO:50、SEQ ID NO:51、SEQ ID NO:52、SEQ ID NO:53、SEQ ID NO:54、SEQ ID NO:55、SEQ ID NO:56、SEQ ID NO:75和SEQ ID NO:76具有至少95%、96%、97%、98%或99%同源性或与它们一致的融合蛋白。

[0179] 融合蛋白对血浆精氨酸浓度产生作用的治疗持续时间取决于施用的融合蛋白的量,治疗持续时间可为约1、约2、约3、约4、约5、约6、约7、约8、约9、约10、约11、约12、约13、约14或约15天或更长时间。在某些实施方案中,融合蛋白的治疗持续时间在约5天至约20天、约5天至约19天、约5天至约18天、约5天至约17天、约5天至约16天、约5天至约15天、约6天至约15天、约7天至约15天、约7天至约14天、约7天至约13天、约7天至约12天、约7天至约11天或约8天至约11天之间。

[0180] 在某些实施方案中,融合蛋白的半衰期为约1天至约10天、约1天至约9天、约1天至约8天、约1天至约7天、约1天至约6天、约1天至约5天、约1天至约4天、约1天至约3天或约1天至约2天。在其它实施方案中,融合蛋白的半衰期为约6小时至约30小时。

[0181] 本文所述的融合蛋白的精氨酸酶活性与产生其的精氨酸酶多肽的活性相比,可以基本相同、更低或更高。一个精氨酸酶活性单位被定义为在标准测定条件下,每分钟催化产生1 μ mol尿素的融合蛋白[例如,BHA(SEQ ID NO:75)、BAH(SEQ ID NO:76)、N-ABD-rhArg(SEQ ID NO:49)或N-ABD094-rhArg(SEQ ID NO:50)]或精氨酸酶[例如,BCA(SEQ ID NO:70)]的量。酶的比活性表示为每毫克(mg)蛋白的活性单位。在标准的二乙酰-肟(DAMO)测定条件(37 $^{\circ}$ C,pH 7.4)下,相比其所掺入的相应精氨酸酶多肽,融合蛋白的比活性可以低或

高约5%、约10%、约15%、约20%、约25%、约30%、约35%或约40%。在某些实施方案中,融合蛋白的比活性比其所掺入的相应精氨酸酶多肽低或高约5%至约40%、约10%至约40%、约10%至约35%、约10%至约30%、约20%至约30%、约20%至约35%、约15%至约30%、约15%至约25%或约10%至约20%。

[0182] 在某些实施方案中,融合蛋白的精氨酸酶活性基本上不受HSA存在的影响。这是有利的,因为ABD融合蛋白与HSA的结合可对融合蛋白的活性具有有害作用。

[0183] 还提供了编码本文所述的融合蛋白的多核苷酸序列,其为分离的多核苷酸或为表达载体的一部分或为线性DNA序列的一部分,包括用于体外转录/翻译的线性DNA序列、与组合物的原核或真核表达、分泌和/或展示相容的载体。本文公开了某些示例性多核苷酸,但是,鉴于给定表达系统中遗传密码的简并性或密码子偏好性,编码本文所述的融合蛋白的其它多核苷酸也在本公开的范围內。

[0184] 本文所述的多核苷酸可以通过化学合成来产生,例如,在自动化多核苷酸合成仪上进行固相多核苷酸合成,并组装成完整的单链或双链分子。或者,本发明的多核苷酸可以通过其它技术产生,例如通过PCR,之后进行常规克隆。产生或获得已知序列的多核苷酸的技术是本领域熟知的。

[0185] 本文所述的多核苷酸可以包含至少一种非编码序列,例如,启动子或增强子序列、内含子、多腺苷酸化信号等。所述多核苷酸序列还可以包含编码其它氨基酸的其它序列(其例如,编码标志物或标签序列(如,多组氨酸(6X His)或HA标签)以利于蛋白的纯化或检测)、信号序列、融合蛋白伴侣(例如,编码生物活性剂的cDNA)等。

[0186] 在另一个实施方案中,本文提供了一种包含本文所述的至少一种多核苷酸的载体。此类载体可以是质粒载体、病毒载体、用于杆状病毒表达的载体、基于转座子的载体或适于通过任何方式将本发明的多核苷酸引入到给定生物体或遗传背景中的任何其它载体。此类载体可以是包含可以控制、调节、引起或允许由此载体编码的多肽表达的核酸序列元件的表达载体。此类元件可以包含转录增强子结合位点、RNA聚合酶起始位点、核糖体结合位点以及在给定表达系统中促进编码多肽的表达的其它位点。此类表达系统可以是本领域已知的细胞基系统或无细胞系统。

[0187] 在许多细菌表达系统中,起始密码子通常编码甲硫氨酸,因此在这些表达系统中产生由N-末端甲硫氨酸起始的蛋白。但是,众所周知,某些细菌酶(例如,甲硫氨酸胺基肽酶(MetAP)等)可以催化从新合成的多肽水解切割N-末端甲硫氨酸。在下一个氨基酸是例如Gly、Ala、Ser或Thr的情况中通常可以观察到这种现象[In vivo processing of N-terminal methionine in E.coli,FEBS Lett.1990Jun 18;266(1-2):1-3]。因此,在某些实施方案中,本文所述的融合蛋白包括其中不存在蛋白的N-末端甲硫氨酸的变体。

[0188] 本文所述的融合蛋白可以使用本领域悉知的用于捕获、固定、分配或沉淀的分离方法进行分离,并纯化至商业应用所需的程度。

[0189] 为了治疗用途,可以将本文所述的融合蛋白制备为药物组合物,所述药物组合物包含治疗有效量的本文所述的融合蛋白,作为药学上可接受载体中的活性成分。术语“载体”是指与活性化合物一起施用的稀释剂、佐剂、赋形剂或媒介物。此类媒介物可以是液体,例如水和油,包括来自石油、动物、植物或合成来源的那些,例如花生油、大豆油、矿物油、芝麻油等。例如,可以使用0.9%盐水和0.3%甘氨酸。这些溶液是无菌的,通常不含颗粒物质。

可以通过常规的公知灭菌技术(例如,过滤)对它们进行灭菌。所述组合物可以含有近似生理条件所需的药学上可接受的辅助物质,例如,pH调节和缓冲剂、稳定剂、增稠剂、润滑剂和着色剂等。此类药物制剂中融合蛋白的浓度可在很大范围内变化,例如从小于约0.5重量%,通常为或至少为约1重量%至高达15或20重量%,根据所选的特定给药方式,其主要基于所需的剂量、流体体积、粘度等而进行选择。合适的媒介物和制剂在例如以下文献中描述:Remington:The Science and Practice of Pharmacy,第21版,Troy,D.B.编辑,Lipincott Williams and Wilkins,Philadelphia,Pa.2006,第5部分,Pharmaceutical Manufacturing,第691-1092页,尤其见第958-989页。

[0190] 本文所述的融合蛋白用于治疗用途的施用方式可以是将药剂递送至宿主的任何合适途径,例如肠胃外施用,如皮内、肌肉内、腹膜内、静脉内或皮下、肺内;经粘膜施用(口腔、鼻内、阴道内、直肠);使用片剂、胶囊、溶液、悬浮液、粉剂、凝胶、颗粒形式的制剂施用;包含在注射器、植入装置、渗透泵、药筒、微泵中进行施用;或本领域技术人员所熟知以及本领域众所周知的其它方式。定位施用可以通过例如关节内、支气管内、腹腔内、囊内、软骨内、腔内、胞内、小脑内、脑室内、结肠内、子宫颈管内、胃内、肝内、心内、骨内、骨盆内、心包内、腹膜内、胸膜内、前列腺内、肺内、直肠内、肾内、视网膜内、脊髓内、滑膜内、胸内、子宫内、血管内、膀胱内、病灶内、阴道、直肠、口腔、舌下、鼻内或经皮递送。

[0191] 本文所述的融合蛋白可用作精氨酸耗竭剂。此类试剂可用于在受试者中治疗精氨酸耗竭可以产生治疗效果的任何疾病或病症,例如用于治疗癌症、某些病毒、多发性硬化症、类风湿性关节炎、自身免疫性疾病、先天性高精氨酸血症、移植物抗宿主病(GvHD)以及本文所详述的肥胖症、代谢紊乱和相关并发症及合并症。

[0192] 由于ASS或OTC下调,精氨酸营养缺陷型肿瘤依赖于细胞外精氨酸,因此依赖精氨酸的细胞外来源存活。精氨酸耗竭剂已被证明对精氨酸营养缺陷型肿瘤具有细胞毒性,目前正在临床试验中研究其在癌症治疗中的用途。

[0193] 因此,本文所述的融合蛋白可用于治疗癌症,例如,胰腺癌、白血病、黑素瘤、头颈癌、结直肠癌、肺癌、乳腺癌、前列腺癌、宫颈癌、肝癌、鼻咽癌、食道癌、肉瘤、胃癌、间皮瘤、淋巴瘤、膀胱癌、骨癌、子宫内膜癌、卵巢癌、肾癌、眼癌、成神经细胞瘤、恶性胶质瘤、恶性外周神经鞘瘤(MPNST)和脑癌。所述癌症可以是精氨酸营养缺陷型癌症,例如,特征在于ASS和OTC中至少一种的下调的癌症。

[0194] 本文所述的融合蛋白也可用于治疗病毒感染,例如,人类免疫缺陷病毒(HIV)、乙型肝炎病毒(HBV)、丙型肝炎病毒(HCV)、单纯疱疹病毒(HSV)、人类乳头瘤病毒(HPV)、爱泼斯坦-巴尔病毒(Epstein-Barr virus,EBV)、疱疹病毒、水痘带状疱疹病毒和流感病毒。

[0195] 如本文中详细描述,本文提供的融合蛋白也可以用于治疗选自肥胖症、代谢紊乱及相关并发症和/或合并症组成的组的至少一种病症。

[0196] 如下文的实验中所示,精氨酸耗竭可显著降低肥胖。本文中我们研究了使用ABD精氨酸酶融合蛋白或PEG化精氨酸酶(例如,N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO:50)、PEG化His-rhArg (SEQ ID NO:101)和N-ABD094-rhArg-Co²⁺[SEQ ID NO:50(钴取代)])进行的精氨酸剥夺在治疗肥胖症和相关的代谢紊乱中的治疗潜力。本文呈现的数据证明,在正常瘦型小鼠和肥胖小鼠中,用例如N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO:50)进行精氨酸耗竭可显著减少脂肪量,抑制脂肪生成并提高胰岛素敏感性。已发现,例如用N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO:50)进

行精氨酸剥夺可预防和减少肥胖症、代谢紊乱及相关并发症和合并症(包括胰岛素抵抗)。

[0197] 本文示出的精氨酸耗竭效果令人惊讶且出乎意料,因为大量研究表明,增加饮食中某些氨基酸(AA)(包括精氨酸)的摄入量对葡萄糖和脂质分解代谢具有显著影响,并且可以使用AA补充剂来减轻体重。此外,由于精氨酸是半必需氨基酸,因此其耗竭不会对受试者产生有害影响。

[0198] 使用高脂饲料诱导肥胖症(DIO)的小鼠模型。开始高脂饲料的瘦型小鼠同时接受N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO:50)处理,以测试其预防DIO和相关代谢紊乱发展的功效。用N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO:50)处理已存在DIO的小鼠,以测试其减轻肥胖症、代谢紊乱及相关并发症和合并症的功效。

[0199] 如以下实例所示,用N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO:50)进行处理,导致体重和脂肪量的减少、葡萄糖耐量和胰岛素反应性的改善、内分泌和代谢特性的正常化、以及炎症、脂肪变性和纤维化的缓解,并预防或逆转了褐色脂肪变白。

[0200] 本文提供了一种在有此需要的受试者中治疗肥胖症和/或代谢紊乱的方法,所述方法包括向所述受试者施用治疗有效量的精氨酸耗竭剂的步骤。

[0201] 精氨酸耗竭剂可以是本领域已知的能够降低受试者血浆精氨酸水平和/或细胞精氨酸水平的任何精氨酸耗竭剂。精氨酸耗竭剂可以是小分子或蛋白。

[0202] 所述蛋白可以是融合蛋白和/或化学修饰蛋白,例如PEG化蛋白。示例性蛋白包括能够催化精氨酸代谢分解为其它产物的蛋白,例如,具有精氨酸酶、精氨酸脱亚氨酶、精氨酸脱羧酶或精氨酸2单加氧酶活性的蛋白。

[0203] 精氨酸酶可以是本领域已知的任何精氨酸酶,例如由细菌、真菌、鱼、人、牛、猪、兔、啮齿动物、灵长类动物、绵羊和山羊产生的那些。例如,热溶芽孢杆菌精氨酸酶、嗜热栖热菌(*Thermus thermophilus*)精氨酸酶、山羊(*Capra hircus*)精氨酸酶I、裸鼯鼠(*Heterocephalus glaber*)精氨酸酶I、黄牛(*Bos taurus*)精氨酸酶I、野猪(*Sus scrofa*)精氨酸酶I、香鱼(*Plecoglossus altivelis*)精氨酸酶I、大西洋鲑(*Salmo salar*)精氨酸酶I、虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)精氨酸酶I、胡瓜鱼(*Osmerus mordax*)精氨酸酶I、三角帆蚌(*Hyriopsis cumingii*)精氨酸酶I、褐家鼠(*Rattus norvegicus*)精氨酸酶I、小鼠(*Mus musculus*)精氨酸酶I、智人(*Homo sapiens*) (人)精氨酸酶I、黑猩猩(*Pan troglodytes*)精氨酸酶I、穴兔(*Oryctolagus cuniculus*)精氨酸酶I、褐家鼠精氨酸酶II、小鼠精氨酸酶II、智人(人)精氨酸酶II、黄牛精氨酸酶II、裸鼯鼠精氨酸酶II、黑猩猩精氨酸酶II、穴兔精氨酸酶II、代尔夫特菌属(*Delftia*)精氨酸酶、凝结芽孢杆菌(*Bacillus coagulans*)精氨酸酶、光养赫夫勒氏菌(*Hoeflea phototrophica*)精氨酸酶和光合玫瑰菌(*Roseiflexus castenholzii*)精氨酸酶。其它实例包括来自以下的精氨酸酶:甲醇芽孢杆菌(*Bacillus methanolicus*)、芽孢杆菌属物种(*Bacillus* sp.) NRRL B-14911、东海游动球菌(*Planococcus donghaensis*)、树枝形类芽孢杆菌(*Paenibacillus dendritiformis*)、迪门斯波拉菌属物种(*Desmospora* sp.)、好氧甲烷氧化细菌(*Methylobacter tundripaludum*)、寡养单胞菌属物种(*Stenotrophomonas* sp.)、产左聚糖微杆菌(*Microbacterium laevaniformans*)、葡萄红单胞菌(*Porphyromonas uenonis*)、土壤杆菌属物种(*Agrobacterium* sp.)、北极杆菌(*Octadecabacter arcticus*)、根癌农杆菌(*Agrobacterium tumefaciens*)、嗜热菌(*Anoxybacillus flavithermus*)、短小芽孢杆菌

(*Bacillus pumilus*)、热葡萄糖苷酶芽孢杆菌(*Geobacillus thermoglucosidasius*)、嗜热葡萄糖杆菌(*Geobacillus thermoglucosidans*)、侧孢短芽孢杆菌(*Brevibacillus laterosporus*)、瘤胃脱硫肠状菌(*Desulfotomaculum ruminis*)、嗜碱地芽孢杆菌(*Geobacillus kaustophilus*)、嗜热地芽孢杆菌(*Geobacillus thermoleovorans*)、嗜热脱氮芽孢杆菌(*Geobacillus thermodenitrificans*)、金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)、嗜盐古菌(*Halophilic archaeon*) DL31、盐脲菌(*Halopiger xanaduensis*)、极端嗜盐嗜碱菌(*Natrialba magadii*)、恶性疟原虫(*Plasmodium falciparum*)、幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*)等。

[0204] 精氨酸脱亚氨酶可以是本领域中已知的任何精氨酸脱亚氨酶,例如从支原体、乳球菌、假单胞菌、链球菌、大肠杆菌、分枝杆菌或芽孢杆菌微生物产生的那些。示例性的精氨酸脱亚氨酶包括但不限于由以下生物体产生的那些:人型支原体(*Mycoplasma hominis*)、精氨酸支原体(*Mycoplasma arginini*)、关节炎支原体(*Mycoplasma arthritidis*)、产气荚膜杆菌(*Clostridium perfringens*)、地衣芽孢杆菌(*Bacillus licheniformis*)、伯氏疏螺旋体(*Borrelia burgdorferi*)、回归热疏螺旋体(*Borrelia afzelii*)、粪肠球菌(*Enterococcus faecalis*)、乳酸乳球菌(*Lactococcus lactis*)、蜡样芽孢杆菌(*Bacillus cereus*)、酿脓链球菌(*Streptococcus pyogenes*)、链球菌性肺炎(*Streptococcus pneumoniae*)、清酒乳杆菌(*Lactobacillus sake*)、十二指肠贾第虫(*Giardia intestinalis*)、结核分枝杆菌(*Mycobacterium tuberculosis*)、变形假单胞菌(*Pseudomonas plecoglossicida*)、恶臭假单胞菌(*Pseudomonas putida*)、绿脓杆菌(*Pseudomonas aeruginosa*)等。

[0205] 精氨酸脱羧酶可以是本领域已知的任何精氨酸脱羧酶,例如由以下生物体产生的那些:大肠杆菌、鼠伤寒沙门氏菌(*Salmonella typhimurium*)、肺炎披衣菌(*Chlamydia pneumoniae*)、詹氏甲烷球菌(*Methanocaldococcus jannaschii*)、小球藻病毒1型(*Paramecium bursaria Chlorella virus 1*)、创伤弧菌(*Vibrio vulnificus*) YJ016、空肠弯曲菌亚种(*Campylobacter jejuni* subsp.)、克氏锥虫(*Trypanosoma cruzi*)、硫磺矿硫化叶菌(*Sulfolobus solfataricus*)、地衣芽孢杆菌、蜡样芽孢杆菌、番木瓜(*Carica papaya*)、红花烟草(*Nicotiana glauca*)、大豆(*Glycine max*)、百脉根(*Lotus corniculatus*)、创伤弧菌(*Vibrio vulnificus*)、霍乱弧菌(*Vibrio cholerae*)、小家鼠(*Mus musculus*)、热袍菌属(*Thermotoga*)、褐家鼠(*Rattus norvegicus*)、智人、黄牛、野猪、嗜热栖热菌(*Thermus thermophilus*)、*Thermus parvatiensis*、水生栖热菌(*Thermus aquaticus*)、嗜热栖热菌、冰岛栖热菌(*Thermus islandicus*)、拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)、燕麦(*Avena sativa*)等。

[0206] 精氨酸2-单加氧酶可以是本领域中已知的任何精氨酸2-单加氧酶,例如由以下生物体产生的那些:球形节杆菌(*Arthrobacter globiformis*) IF012137、简单节杆菌(*Arthrobacter simplex*) IF0 12069、黄色短杆菌(*Brevibacterium helvolum*) IF0 12073、同性恋螺杆菌(*Helicobacter cinaedi*) CCUG 18818、灰色链霉菌(*Streptomyces griseus*)等。

[0207] 精氨酸脱羧酶、精氨酸脱亚氨酶、精氨酸2-单加氧酶和精氨酸酶可以是全长蛋白或其功能片段和/或变体。可以,例如通过将蛋白或其功能片段和/或变体与人血清白蛋白、

白蛋白结合域、免疫球蛋白的Fc区、PEG基团或其组合融合来修饰精氨酸脱羧酶、精氨酸脱亚氨酶、精氨酸2-单加氧酶和精氨酸酶,以改善其药代动力学性质。

[0208] 本文所述的精氨酸分解代谢酶可以被工程化以包括酶上可以选择性连接PEG的特异性位点。所选择的PEG化位点优选位于从酶的活性位点去除的位点,并且通常暴露于溶剂中以允许与PEG化试剂发生反应。

[0209] 例如,可以产生Cys⁴⁵-人精氨酸酶I (HAI) 和Cys¹⁶¹-热溶芽孢杆菌 (BCA), 以与硫醇特异性PEG分子发生反应。经修饰的精氨酸酶的单个游离半胱氨酸残基与连接至PEG化合物的马来酰亚胺基团 (MAL) 之间的缀合可导致PEG化合物与经修饰的精氨酸酶的游离半胱氨酸之间形成共价键。SEQ ID NO:102和104包括被设计用于Cys⁴⁵定点PEG化的突变体 (C168S/C303S), 因此可以可选地被PEG化。SEQ ID NO:89还包括被设计用于Cys¹⁶¹定点PEG化的突变体 (S161C), 因此可以可选地被PEG化。

[0210] 在某些实施方案中,精氨酸酶可包含SEQ ID NO:101、SEQ ID NO:102、SEQ ID NO:103或SEQ ID NO:104,其中,SEQ ID NO:102和SEQ ID NO:104可选地包含聚乙二醇基团 (PEG)。

[0211] 本领域已知的任何PEG化试剂均可用于将PEG共价连接至本文所述的精氨酸分解代谢酶。示例性PEG化试剂包括但不限于,mPEG-ALD (甲氧基聚乙二醇-丙醛)、mPEG-MAL (甲氧基聚乙二醇-马来酰亚胺)、mPEG-NHS (甲氧基聚乙二醇-N-羟基琥珀酰亚胺)、mPEG-SPA (甲氧基聚乙二醇-丙酸琥珀酰亚胺酯) 和mPEG-CN (甲氧基聚乙二醇-三聚氰氰)。

[0212] PEG基团的分子量可以为约5000至约20000amu、约5000至约15000amu、约5000至约12000amu、约7000至约12000amu或约7000至约10000amu。在某些实施方案中,PEG基团的分子量为约2000amu至10000amu。在某些实施方案中,PEG基团是PEG4000、PEG5000、PEG6000或PEG7000。

[0213] PEG基团可以直接共价连接至精氨酸酶,或经由接头连接至精氨酸酶。在某些实施方案中,精氨酸酶经由丙酸接头共价连接至PEG。在其它实施方案中,精氨酸酶经由C2-C10、C2-C9、C2-C8、C2-C7、C2-C6、C2-C5或C2-C4直链或支链羧酸接头共价连接至PEG。

[0214] 在替代实施方案中,在有此需要的受试者中治疗选自肥胖症、代谢紊乱及相关并发症和/或合并症组成的组的至少一种病症的方法包括给与所述受试者低精氨酸或基本不含精氨酸的饮食。

[0215] 治疗选自肥胖症、代谢紊乱及相关并发症和/或合并症组成的组的至少一种病症的方法还可包括预防选自肥胖症、代谢紊乱及相关并发症和/或合并症组成的组的至少一种病症。

[0216] 代谢紊乱可包括肥胖症、高胆固醇血症、血脂异常、脂肪变性、胰岛素抵抗、葡萄糖耐受不良、高血糖症以及糖尿病或其组合;并且,相关并发症和/或合并症可包括糖尿病性视网膜病变、糖尿病肾病、糖尿病血管病变、糖尿病神经病变、脂肪性肝炎、纤维化、肝硬化、炎症、高血压、心血管疾病以及褐色脂肪变白或其组合。

[0217] 在某些实施方案中,代谢紊乱是例如在患有I型或特别是II型糖尿病的受试者中对胰岛素抵抗的治疗和/或预防。如以下实施例所示,精氨酸耗竭导致受试者的胰岛素敏感性提高。

[0218] 治疗肥胖症的方法可包括减少受试者的脂肪量或预防受试者脂肪量增加。用精氨

酸耗竭剂治疗受试者可导致内脏白色脂肪组织 (WAT)、肝脏和骨骼肌中几种成脂转录因子和脂肪生成酶 (例如, Pparg、Srebp1c、Acc 和 Scd1) 的 mRNA 表达水平与未经治疗的高脂饮食受试者相比降低。在某些实施方案中, 将脂肪生成调节因子的 mRNA 表达水平降低例如未经治疗的高脂饮食受试者的相应 mRNA 表达水平的至少约 10%、约 20%、约 30%、约 40%、约 50%、约 60%、约 70%、约 80% 或约 90%。在某些实施方案中, 用精氨酸耗竭剂治疗受试者导致受试者 WAT、肝和/或骨骼肌中选自由 Pparg、Srebp1c、Acc 和 Scd1 组成的一种或多种基因的 mRNA 表达降低。

[0219] 肥胖症可以是代谢紊乱 (例如, 高血糖症、高胰岛素血症) 和/或其它因素 (例如, 饮食过量、缺乏体育锻炼等) 导致的结果, 和/或与之相关。

[0220] 代谢紊乱还可包括治疗和/或预防受试者的脂肪变性, 例如, 心脏脂肪变性、肝脂肪变性、肾脏脂肪变性、胰腺脂肪变性和肌肉脂肪变性。

[0221] 代谢紊乱还可包括治疗和/或预防受试者的纤维化, 例如, 肝纤维化、肾脏纤维化、胰腺纤维化和心肌纤维化。

[0222] 代谢紊乱还可包括例如通过降低血浆总胆固醇、LDL 胆固醇、载脂蛋白 B 和/或甘油三酯水平来治疗高胆固醇血症、血脂异常。

[0223] 用精氨酸耗竭剂治疗受试者可将血浆瘦蛋白浓度降低, 例如未经治疗的 HFD 受试者的相应血浆瘦蛋白浓度的至少约 10%、约 20%、约 30%、约 40%、约 50%、约 60% 或约 70%。在某些实施方案中, 可将血浆瘦蛋白浓度降低未经治疗的 HFD 受试者的相应血浆瘦蛋白浓度的约 10% 至约 70%、约 10% 至约 60%、约 10% 至约 50%、约 10% 至约 40%、约 10% 至约 30%。

[0224] 用精氨酸耗竭剂治疗受试者可将血浆甘油三酯浓度降低例如未经治疗的 HFD 受试者的相应血浆甘油三酯浓度的至少约 20%、约 30% 或约 40%。在某些实施方案中, 可将血浆甘油三酯浓度降低未经治疗的 HFD 受试者的相应血浆甘油三酯浓度的约 5% 至约 40%、约 5% 至约 30% 或约 5% 至约 20%。

[0225] 用精氨酸耗竭剂治疗受试者可将血浆总胆固醇浓度降低例如未经治疗的 HFD 受试者的相应血浆总胆固醇浓度的至少约 5%、约 10% 或约 15%。在某些实施方案中, 可将血浆总胆固醇浓度降低未经治疗的 HFD 受试者的相应血浆总胆固醇浓度的约 5% 至约 15%、约 5% 至约 10% 或约 10% 至约 15%。

[0226] 用精氨酸耗竭剂治疗受试者可将血浆游离脂肪酸浓度降低例如未经治疗的 HFD 受试者的相应血浆游离脂肪酸浓度的至少约 5%、约 10%、约 15% 或约 20%。在某些实施方案中, 可将血浆游离脂肪酸浓度降低未经治疗的 HFD 受试者的相应血浆游离脂肪酸浓度的约 5% 至约 20%、约 5% 至约 15% 或约 5% 至约 10%。

[0227] 为了观察到治疗效果所需的受试者中的血浆精氨酸浓度可基于许多因素而变化, 所述因素包括受试者的状况以及疾病和/或医学状况的类型和严重程度和/或饮食组成。目标血浆精氨酸水平的选择完全在本领域普通技术人员的能力范围内。在某些实施方案中, 血浆精氨酸浓度低于约 100 μ M、约 90 μ M、约 80 μ M、约 70 μ M、约 60 μ M、约 50 μ M、约 40 μ M、约 30 μ M、约 20 μ M、约 10 μ M 或约 5 μ M。在某些实施方案中, 血浆精氨酸浓度为约 0.1 μ M 至约 100 μ M、约 0.1 μ M 至约 90 μ M、约 0.1 μ M 至约 80 μ M、约 0.1 μ M 至约 70 μ M、约 0.1 μ M 至约 60 μ M、约 0.1 μ M 至约 50 μ M、约 0.1 μ M 至约 40 μ M、约 0.1 μ M 至约 30 μ M、约 0.1 μ M 至约 20 μ M 或约 0.1 μ M 至约 10 μ M。在某些实施方案

中,精氨酸水平低于Biochrom 30氨基酸分析仪的检测极限(例如,低于约3 μ M),和/或低于Agilent 6460液相色谱/电喷雾电离三重四极杆质谱仪的检测极限(例如,低于约0.3 μ M)。

[0228] 治疗持续时间(例如,血浆精氨酸浓度在受试者体内维持在耗竭状态下的持续时间)的确定完全在本领域普通技术人员的能力范围内。在某些实施方案中,治疗持续时间为约1周、约2周、约3周、约4周、约8周、约12周、约16周、约20周、约24周、约28周、约32周、约36周、约40周、约44周、约48周、约52周、约56周或更长时间。

[0229] 精氨酸耗竭已被证明是许多病症的有效疗法,所述病症包括但不限于病毒感染(US 8,507,245,通过引用整体并入本文)、多发性硬化症、类风湿性关节炎、自身免疫性疾病(US 9,789,169,通过引用整体并入本文)、先天性高精氨酸血症(ClinicalTrials.gov Identifier:NCT02488044)、移植物抗宿主病(GvHD)(Hallet W.,等人,Exploiting arginase to prevent GVHD,Blood2010 116:5440-5441)、炎症(Sahin E.,等人,Macrophage PTEN regulates expression and secretion of arginase I modulating innate and adaptive immune responses,J Immunol.2014Aug 15;193(4):1717-27)以及视网膜神经血管变性(Fouda AY.等人,Arginase I promotes retinal neurovascular protection from ischemia through suppression of macrophage inflammatory responses Cell Death Dis.2018Sep 25;9(10):1001)。

[0230] 因此,本文还提供了一种在有此需要的受试者中治疗选自由病毒感染、多发性硬化症、类风湿性关节炎、自身免疫性疾病、先天性高精氨酸血症、移植物抗宿主病(GvHD)和炎症组成的组的至少一种病症的方法,所述方法包括施用治疗有效量的本文所述的融合蛋白的步骤。

[0231] 通过审阅本公开的以下实施例,本公开的其它目的、优点和新颖特征对于本领域技术人员将变得显而易见,而这些实施例并非旨在是限制性的。

[0232] 实施例1:构建ABD和ABD094融合蛋白

[0233] 通过在PCR反应中将表1所列出的引物01-08(SEQ ID NO:1-8)(每种引物的浓度为20nM)与1X iProof DNA聚合酶的反应缓冲液(Bio-rad)、0.2mM dNTP和0.5单位的iProof DNA聚合酶(Bio-rad)混合在一起,反应体积为50 μ L,构建用于N-末端融合的N-ABD的基因。PCR程序设定为:(1)98 $^{\circ}$ C,10秒;(2)50 $^{\circ}$ C,20秒;(3)72 $^{\circ}$ C,15秒;(4)重复(1)至(3),35次。然后将1 μ L PCR反应产物与1X iProof DNA聚合酶的反应缓冲液(Bio-rad)、0.2mM dNTP、0.2 μ M引物(N-ABDNde-F):5'-GATCTTAAGCATATGCATCATCACCATC-3'(SEQ ID NO:9)、引物(N-ABDHind-R):ACAGCTAAAAGCTTATCAGCCTAGGATCCGCCGCTACCATTG-3'(SEQ ID NO:93)和0.5单位的iProof DNA聚合酶一起添加到新的PCR反应中,反应体积为50 μ L。PCR程序设定为:(1)98 $^{\circ}$ C,10秒;(2)50 $^{\circ}$ C,20秒;(3)72 $^{\circ}$ C,15秒;(4)重复(1)至(3),35次;(5)72 $^{\circ}$ C,5分钟。N-ABD094基因的构建与N-ABD基因构建的步骤相同,除了使用表1中列出的引物09-16(SEQ ID NO:9-16)代替表1中列出的引物01-08(SEQ ID NO:1-8)。

[0234] 通过在PCR反应中将表1所列出的引物17-24(每种引物的浓度为20nM)与1X iProof DNA聚合酶的反应缓冲液、0.2mM dNTP和0.5单位的iProof DNA聚合酶混合在一起,反应体积为50 μ L,构建用于C-末端融合的C-ABD的基因。PCR程序设定为:(1)98 $^{\circ}$ C,10秒;(2)50 $^{\circ}$ C,20秒;(3)72 $^{\circ}$ C,15秒;(4)重复(1)至(3),35次。然后将1 μ L PCR反应产物与1X iProof DNA聚合酶的反应缓冲液、0.2mM dNTP、0.2 μ M引物(C-ABDNde-F):5'-TAGCTGATCATATGTTAT

GCGATGGATCCAGTAACAAC-3' (SEQ ID NO:91)、0.2 μ M引物(C-ABDHind-R):5'-GACCCTAAAAGC TTAATGGTGATGGTGATGATG-3' (SEQ ID NO:92)和0.5单位的iProof DNA聚合酶一起添加到新的PCR反应中,反应体积为50 μ L。PCR程序设定为:(1) 98 $^{\circ}$ C,10秒;(2) 50 $^{\circ}$ C,20秒;(3) 72 $^{\circ}$ C,15秒;(4) 重复(1)至(3),35次;(5) 72 $^{\circ}$ C,5分钟。C-ABD094基因的构建与C-ABD基因构建的步骤相同,除了使用表1中列出的引物25-32 (SEQ ID NO:25-32)代替表1中列出的引物17-24 (SEQ ID NO:17-24)。

[0235] PCR片段N-ABD、N-ABD094、C-ABD或C-ABD094中的任一者用限制性内切酶Nde I和Hind III进行消化,并连接至预先用相同酶消化的载体pRSET-lac,再转化入大肠杆菌Top10中,分别产生质粒pN-ABD、pN-ABD094、pC-ABD和pC-ABD094。通过用来自pGEMT-Easy载体(Promega)的lac启动子替换T7启动子,由pRSET-A (Invitrogen)修饰质粒pRSET-lac。

[0236] 通过将0.2 μ M引物HARGBam-F (5'-TTAGCTGGGGATCCGCCAAGTCCAGAACCATAGG-3') (SEQ ID NO:93)、0.2 μ M引物HARGHind-R (5'-GAGATCAAAGCTTACTTAGGTGGGTAAAGGTAGTC-3') (SEQ ID NO:94)与1X iProof DNA聚合酶的反应缓冲液、0.2mM dNTP、100ng人精氨酸酶I的cDNA和0.5单位的iProof DNA聚合酶混合在一起,反应体积为50 μ L,构建人精氨酸酶I基因的N-ABD或N-ABD094融合体。PCR程序设定为:(1) 98 $^{\circ}$ C,10秒;(2) 50 $^{\circ}$ C,20秒;(3) 72 $^{\circ}$ C,30秒;(4) 重复(1)至(3),35次;(5) 72 $^{\circ}$ C,5分钟。用限制性内切酶BamH I和Hind III消化PCR片段人精氨酸酶I基因,并连接至预先用相同酶消化的载体pN-ABD或pN-ABD094中,再转化入大肠杆菌ER2566 (NEB)中,分别产生质粒pN-ABD-rhArg和pN-ABD094-rhArg。

[0237] 通过将0.2 μ M引物HARGNde-F (5'-TAGGCTGCATATGAGCGCCAAGTCCAGAACCATAG-3') (SEQ ID NO:95)、0.2 μ M引物HARGBam-R (5'-ATCAGCTAGGATCCCTTAGGTGGGTAAAGGTAGTCAATAGG-3') (SEQ ID NO:96)与1X iProof DNA聚合酶的反应缓冲液(Bio-rad)、0.2mM dNTP、100ng人精氨酸酶I的cDNA和0.5单位的iProof DNA聚合酶(Bio-rad)混合在一起,反应体积为50 μ L,构建人精氨酸酶I基因的C-ABD或C-ABD094融合体。PCR程序设定为:(1) 98 $^{\circ}$ C,10秒;(2) 50 $^{\circ}$ C,20秒;(3) 72 $^{\circ}$ C,30秒;(4) 重复(1)至(3),35次;(5) 72 $^{\circ}$ C,5分钟。用限制性内切酶Nde I和BamH I消化PCR片段人精氨酸酶I基因,并连接至预先用相同酶消化的载体pC-ABD或pC-ABD094中,再转化入大肠杆菌ER2566 (NEB)中,分别产生质粒pC-ABD-rhArg和pC-ABD094-rhArg。

[0238] 通过将0.2 μ M引物BCABam-F (5'-ATGCTAGTGGATCCATGAAGCCAATTTCAATTATCG-3') (SEQ ID NO:97)、0.2 μ M引物BCAHind-R (5'-TCAGCCTAAAGCTTACATGAGTTTTTCACCAAACAACG-3') (SEQ ID NO:98)与1X iProof DNA聚合酶的反应缓冲液、0.2mM dNTP、100ng热溶芽孢杆菌的基因组DNA和0.5单位的iProof DNA聚合酶混合在一起,反应体积为50 μ L,构建热溶芽孢杆菌精氨酸酶(BCA)基因的N-ABD或N-ABD094融合体。PCR程序设定为:(1) 98 $^{\circ}$ C,10秒;(2) 50 $^{\circ}$ C,20秒;(3) 72 $^{\circ}$ C,30秒;(4) 重复(1)至(3),35次;(5) 72 $^{\circ}$ C,5分钟。用限制性内切酶BamH I和Hind III消化PCR片段热溶芽孢杆菌精氨酸酶基因,并连接至预先用相同酶消化的载体pN-ABD或pN-ABD094中,再转化入大肠杆菌ER2566 (NEB)中,分别产生质粒pN-ABD-BCA和pN-ABD094-BCA。

[0239] 通过将0.2 μ M引物BCANde-F (5'-ATGCTAGCCATATGAAGCCAATTTCAATTATCGGG-3') (SEQ ID NO:99)、0.2 μ M引物BCABam-R (5'-TCAGCTAAGGATCCCATGAGTTTTTCACCAAACAACG-3') (SEQ ID NO:100)与1X iProof DNA聚合酶的反应缓冲液、0.2mM dNTP、100ng热溶芽孢杆菌

的基因组DNA和0.5单位的iProof DNA聚合酶混合在一起,反应体积为50 μ L,构建热溶芽孢杆菌精氨酸酶(BCA)基因的C-ABD或C-ABD094融合体。PCR程序设定为:(1) 98 $^{\circ}$ C,10秒;(2) 50 $^{\circ}$ C,20秒;(3) 72 $^{\circ}$ C,30秒;(4) 重复(1)至(3),35次;(5) 72 $^{\circ}$ C,5分钟。用限制性内切酶Nde I和BamH I消化PCR片段热溶芽孢杆菌精氨酸酶基因,并连接至预先用相同酶消化的载体pC-ABD或pC-ABD094中,再转化入大肠杆菌ER2566 (NEB) 中,分别产生质粒pC-ABD-BCA和pC-ABD094-BCA。

[0240] 表1.ABD和ABD094基因合成中使用的DNA引物

[0241]	编号	序列
	01	5'-GGAGATGGACATATGCATCATCACCATCACCATGATGAAGCC GTGGATGC-3' (SEQ ID NO: 1)
	02	5'-GCTAAGACTTTAGCTTCAGCTAAGGAATTCGCATCCACGGCT TCATCATG-3' (SEQ ID NO: 2)
	03	5'-CCTTAGCTGAAGCTAAAGTCTTAGCTAACAGAGAACTTGAC AAATATGGA-3' (SEQ ID NO: 3)
	04	5'-TAGGTTCTTGTAATAGTCACTTACTCCATATTTGTCAAGTTCTC TGTTAG-3' (SEQ ID NO: 4)
	05	5'-GGAGTAAGTGACTATTACAAGAACCTAATCAACAATGCCAA

[0242]

	AACTGTTGA-3' (SEQ ID NO: 5)
06	5'-AAATTTTCATCTATCAGTGCTTTTACACCTTCAACAGTTTTGG CATTGTTG-3' (SEQ ID NO: 6)
07	5'-GTAAAAGCACTGATAGATGAAATTTTAGCTGCATTACCTTC GGGTAGTAA-3' (SEQ ID NO: 7)
08	5'-TCCGCCGCTACCATTTGTTATTATTGTTGTTACTACCCGAAG GTAATGCAG-3' (SEQ ID NO: 8)
09	5'-GATCTTAAGCATATGCATCATCACCATCACCATGATGAAGCG GTGGA-3' (SEQ ID NO: 9)
10	5'-GCTTCTTTTCGCTTCCGCCAGGCTGTTTCGCATCCACCGCTTCA TCATG-3' (SEQ ID NO: 10)
11	5'-GCGGAAGCGAAAGAAGCGGCGAACGCGGAACTGGATAGCT ATGGCGTGAG-3' (SEQ ID NO: 11)
12	5'-TTATCAATCAGGCGTTTATAAAAATCGCTCACGCCATAGCTA TCCAGTTC-3' (SEQ ID NO: 12)
13	5'-GATTTTATAAACGCCTGATTGATAAAGCGAAAACCGTGGA AGGCGTGGA-3' (SEQ ID NO: 13)
14	5'-CGGCAGCGCCGCCAGAATCGCATCTTTCAGCGCTTCCACGC CTTCCACGGT-3' (SEQ ID NO: 14)
15	5'-TTCTGGCGGCGCTGCCGTCGGGTAGTAACAACAATAATAAC AATGGTAGC-3' (SEQ ID NO: 15)
16	5'-GGATCCGCCGCTACCATTGTTATTATTGTTGTTACTACC-3' (SEQ ID NO: 16)
17	5'-CATATGTTAGCTGATGGATCCAGTAACAACAATAATAACA ATGGTAGCGG-3' (SEQ ID NO: 17)
18	5'-AATTCGCATCCACGGCTTCATCACCGCCGCTACCATTGTTA TTATTGTTG-3' (SEQ ID NO: 18)
19	5'-GAAGCCGTGGATGCGAATTCCTTAGCTGAAGCTAAAGTCTTAG CTAACAG-3' (SEQ ID NO: 19)
20	5'-CTTACTCCATATTTGTCAAGTTCTCTGTTAGCTAAGACTTTA GCTTCAGC-3' (SEQ ID NO: 20)
21	5'-GAGAACTTGACAAATATGGAGTAAGTGACTATTACAAGAA CCTAATCAAC-3' (SEQ ID NO: 21)
22	5'-TACACCTTCAACAGTTTTTGGCATTGTTGATTAGGTTCTTGT AATAGTCAC-3' (SEQ ID NO: 22)
23	5'-GCCAAAACCTGTTGAAGGTGTAAAAGCACTGATAGATGAAA TTTTAGCTGC-3' (SEQ ID NO: 23)
24	5'-ATGGTGATGGTGATGATGAGGTAATGCAGCTAAAATTTCA TCTATCAGTG-3' (SEQ ID NO: 24)
25	5'-CATATGTTATGCGATGGATCCAGTAACAACAATAATAACAA TGGTAGCGG-3' (SEQ ID NO: 25)
26	5'-TGTTTCGCATCCACCGCTTCATCACCGCCGCTACCATTGTTATT ATTGTTG-3' (SEQ ID NO: 26)
27	5'-GAAGCGGTGGATGCGAACAGCCTGGCGGAAGCGAAAGAA GCGGCGAACGC-3' (SEQ ID NO: 27)
28	5'-AAAATCGCTCACGCCATAGCTATCCAGTTCCGCGTTCCGCCGCT TCTTTCG-3' (SEQ ID NO: 28)
29	5'-CTATGGCGTGAGCGATTTTTATAAACGCCTGATTGATAAAGC GAAAACCG-3' (SEQ ID NO: 29)
30	5'-TCGCATCTTTCAGCGCTTCCACGCCTTCCACGGTTTTTCGCTTT ATCAATC-3' (SEQ ID NO: 30)
31	5'-GAAGCGCTGAAAGATGCGATTCTGGCGGCGCTGCCGCATCAT CACCATCA-3' (SEQ ID NO: 31)

[0243]

32	5'-CTAAAAGCTTAATGGTGATGGTGATGATGCGGCAG-3' (SEQ ID NO: 32)
----	---

[0244]

实施例2:通过发酵表达和纯化ABD-rhArg或ABD094-rhArg融合蛋白

[0245] 为了产生N-ABD-rhArg (SEQ ID NO:49) 融合蛋白,在定轨振荡器中,于30℃, 250rpm,使通过pN-ABD-rhArg转化的大肠杆菌ER2566在50mL种子培养基(1.5g酵母提取物、0.25g NaCl和5mg氨苄西林)中生长16小时。然后将种子培养物转移至1L发酵培养基(10g酵母提取物、16g胰蛋白胨、6.7g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、3.41g KH_2PO_4 、2.41g NH_4Cl 、0.67g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、10g甘油、1g葡萄糖、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、1mM CaCl_2 和0.1g氨苄西林)中,在供给1L/min空气以及最小速率为500rpm的情况下,使其在28℃生长,pH保持在7.4。自动加大搅拌速度,以保持最低溶解氧 pO_2 为至少20%。当培养物在600nm波长处的吸光度达到光密度(OD)为15时,以31.25mL/hr的速率加入500mL培养基(10g酵母提取物、16g胰蛋白胨、2.41g NH_4Cl 、0.67g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、20g甘油)连续16小时。通过离心收集细胞,并通过Ni-IDA琼脂糖凝胶柱纯化蛋白。通常获得超过1g/L的纯化蛋白培养物。然后通过Triton X-114方法从所述纯化蛋白中去除内毒素[Aida Y.和Pabst M.J. (1990) Journal of Immunological Methods,132:191-195,其通过引用并入本文]。用于制备融合蛋白N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO:50)、C-ABD-rhArg (SEQ ID NO:51)、C-ABD094-rhArg (SEQ ID NO:52)、N-ABD-BCA (SEQ ID NO:53)、N-ABD094-BCA (SEQ ID NO:54)、C-ABD-BCA (SEQ ID NO:55)和C-ABD094-BCA (SEQ ID NO:56)的步骤与N-ABD-rhArg (SEQ ID NO:49)的制备步骤相同,除了用相应质粒相应地转化细胞。图1和表2示出了上述白蛋白结合域重组人精氨酸酶(rhArg)(即N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO:50))的蛋白纯化的实例。

[0246] 表2. 制备N-ABD094-rhArg蛋白,得到990mg纯蛋白

[0247]		体积 (mL)	对照 (mg/mL)	总量 (mg)	比活性 (U/mg)
	N-ABD094-rhArg	50	19.81	990	184

[0248] 图12示出了制备的结果。得到了比活性为205U/mg且蛋白浓度为10.5mg/mL的709mg N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO:50)。

[0249] 实施例3: 构建和克隆N-ABD094-rhArg基因 (SEQ ID NO:38)

[0250] 通过基于N-ABD-rhArg基因 (SEQ ID NO:37) 的重叠延伸PCR,合成N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO:38)。进行两次PCR反应。首先,使用具有N-ABD094-rhArg基因 (SEQ ID NO:38) 的pRSET/lac质粒。在第一次PCR反应中,分离rhArg区域并通过ABD094-0F (SEQ ID NO:57) 和HuArgHinBam-R (SEQ ID NO:64) 进行扩增。分离PCR产物,并通过0.7%琼脂糖凝胶(Biorad) (100V下进行30分钟) 和凝胶带纯化试剂盒(GE Healthcare Life Science)进行纯化。之后通过第二次PCR反应向PCR产物中加入ABD094。首先用灭菌的Milli-Q水制备20倍稀释的引物混合物,包括ABD094-0F、ABD094-1F、ABD094-2F、ABD094-3F、ABD094-4F和ABD094-5F (SEQ ID NO:57-62)。引物混合物与abdNde-F彼此重叠。由abdNde-F (SEQ ID NO:63)、HuArgHinBam-R (SEQ ID NO:64) 和20倍稀释的引物混合物进行第二次PCR反应。通过上述相同的方法分离并纯化PCR产物。引物的序列示于表3中。引物的结合位置示于图2A中。所获得的N-ABD094-rhArg融合基因的DNA序列 (SEQ ID NO:38) 及其蛋白序列示于图2B中。

[0251] 表3. 用于克隆N-ABD094-rhArg基因 (SEQ ID NO:38) 的引物列表

引物名称	序列
ABD094-0F	5'-ATTCTGGCAGCGCTGCCGTCGGGTAG TAACAACAATAATAACA ATGGTAG-3' (SEQ ID NO: 57)
ABD094-1F	5'-AACCGTGGAAGGTGTGGAAGCGCTGAAA GATGCGATTCTGG CAGCGCTGC-3' (SEQ ID NO: 58)
ABD094-2F	5'-GATTTTTATAAACGTCTGATTGATAAAGCGAA AACCGTGGAAGGTGTGGA-3' (SEQ ID NO: 59)
[0252] ABD094-3F	5'-CTGGATAGCTATGGCGTGAGCGATTTTTATAAACG TCTGATTGATAAAGC-3' (SEQ ID NO: 60)
ABD094-4F	5'-GCGGAAGCGAAAGAAGCAGCAAACGCGGAAGT GATAGCTATGGCGTGAG-3' (SEQ ID NO: 61)
ABD094-5F	5'-ACCATGATGAAGCCGTGGATGCGAATTCC CTGGCGGAAGCGAAAGAAGCA-3' (SEQ ID NO: 62)
abdNde-F	5'-GGAGATATACATATGCATCATCACCATCACCAT GATGAAGCCGTGG-3' (SEQ ID NO: 63)
HuArgHinBam-R	5'-TGACTACCTTAACCCACCTAAGTAAGCTT GGATCCTGTAACG-3' (SEQ ID NO: 64)

[0253] 通过BamHI-HF和NdeI (New England BioLabs) 将PCR产物和pRSET/lac载体在37℃双重消化2小时。分离嵌件和载体,并通过0.7%琼脂糖凝胶 (Biorad) (100V下进行30分钟)和凝胶带纯化试剂盒 (GE Healthcare Life Science) 进行纯化。然后在室温下使用T4连接酶 (New England BioLabs) 将嵌件和载体连接20分钟。用重组DNA转化感受态细胞,并将其涂布于含有50μg/mL卡那霉素的LB平板上。将LB平板在37℃温育过夜。挑选8个菌落,并用abdNde-F和HuArgHinBam-R通过PCR检验N-ABD094-rhArg的存在。PCR阳性结果的菌落在具有50μg/mL卡那霉素的5mL 2x TY中于30℃进一步生长过夜。将细菌发酵液在1.7mL微量离心管中以16100x g离心1分钟。将细菌沉淀物重悬于溶解缓冲液 (50mM Tris-HCl、0.1M NaCl、1mM MnCl₂、pH 7.4) 中,并通过在液氮中反复冻融将其破碎。将细胞裂解物离心,以获得蛋白溶液。通过DAMO进行精氨酸酶活性测定,以测定精氨酸酶的存在。

[0254] 实施例4:构建BCA表达载体

[0255] 从GenScript订购编码BCA的基因 (Pubmed登录号:U48226),其通过从头 (de novo) 合成并被插入到pUC57克隆载体中。通过定点诱变引入单个半胱氨酸残基,同时将六组氨酸标签添加至C-末端以促进蛋白纯化过程。将工程化BCA基因亚克隆到pET-3a载体中,并转化到BL21 (DE3) 感受态细胞中进行BCA表达。可以从蛋白数据库中检索BCA (PDB:2CEV) 的晶体结构。图3中示出了工程化BCA (S161C) -His的蛋白序列 (SEQ ID NO:89)。

[0256] 实施例5:构建BCA-ABD表达载体

[0257] 构建一对编码白蛋白结合域 (ABD) 的引物,并通过重叠PCR对其进行扩增。简而言之,将200ng引物用作模板,并通过1单位的iProof高保真DNA聚合酶 (Bio-Rad) 进行扩增。将引物在98℃温育30秒,同时进行15个扩增循环,包括在98℃热变性10秒、在60℃退火30秒以及在72℃延伸15秒。

[0258] 5'-正义-ABD

[0259] GCGCAGCATGATGAAGCCGTGGATGCGAACAGCTTAGCTGAAGCTAAAGTCTTAGCTAACAGAGAACT
TGACAAATATGGAGTAAGTGACTATTACAAGAACC (SEQ ID NO:77)

[0260] 5'-反义-ABD

[0261] TTAAGGTAATGCAGCTAAAATTCATCTATCAGTGCTTTTACACCTTCAACAGTTTTGGCATTGTTGA

TTAGGTTCTTGTAATAGTCACTTACTCCAT (SEQ ID NO:78)

[0262] 由这对引物构建的ABD编码基因被两组不同的引物扩增,从而构建BCA-6xHis-ABD (也称为BHA) (SEQ ID NO:75) 和BCA-ABD-6xHis (也称为BAH) (SEQ ID NO:76)。对于BHA的构建,首先通过以下引物对扩增ABD,其中正向引物被设计来通过六组氨酸标签与BCA进行重叠PCR,同时引入BamH I限制位点和终止密码子,以使用反向引物连接到pET-3a载体:用于克隆ABD的正向引物:

[0263] 5'-GCATCACCATCACCATCAGCGCAGCATGATGAAG-3' (SEQ ID NO:79)

[0264] 用于克隆ABD的反向引物:

[0265] 5'-cgGGATCCTTAAGGTAATGCAGCTAAAATTCATCTAT-3' (SEQ ID NO:80)。

[0266] 对ABD扩增得到的PCR产物进行1.5%琼脂糖凝胶电泳,并纯化PCR产物。同时,使用以下缺失了终止密码子的引物对来克隆带有额外突变 (V20P) 的工程化BCA:

[0267] 用于克隆BCA的正向引物:

[0268] 5'-ggaattccCATATGAAGCCAATTTCAATTATCG-3' (SEQ ID NO:81)

[0269] 用于克隆BCA的反向引物:

[0270] 5'-GTGATGGTGATGGTGATGCA-3' (SEQ ID NO:82)。

[0271] 对通过上述引物扩增的BCA进行1%琼脂糖凝胶电泳,并纯化PCR产物。通过重叠PCR将BCA和ABD的上述PCR产物连接在一起。类似地,将200ng BCA和ABD用作模板,并通过1单位的iProof高保真DNA聚合酶进行扩增。将BCA和ABD在98℃温育30秒,同时进行15个扩增循环,包括在98℃热变性10秒、在60℃退火30秒以及在72℃延伸30秒。将重叠PCR的产物用作模板,以便使用以下引物对进行进一步扩增:

[0272] 用于克隆BHA的正向引物:

[0273] 5'-ggaattccCATATGAAGCCAATTTCAATTATCG-3' (SEQ ID NO:83)

[0274] 用于克隆BHA的反向引物:

[0275] 5'-cgGGATCCTTAAGGTAATGCAGCTAAAATTCATCTAT-3' (SEQ ID NO:84)。

[0276] 对PCR产物进行1%琼脂糖凝胶电泳,从凝胶上切下与BHA对应的条带进行纯化。

[0277] 为了构建BAH,首先通过以下引物对扩增ABD,其中正向引物被设计来直接与BCA进行重叠PCR,同时通过反向引物引入BamHI限制位点、六组氨酸标签和终止密码子:

[0278] 用于克隆ABD的正向引物:

[0279] 5'-CGTTGTTTGGTGAAAACTCATGGCGCAGCATGATGAAG-3' (SEQ ID NO:85)

[0280] 用于克隆ABD的反向引物:

[0281] 5'-cgGGATCCTTAGTGATGGTGATGGTGATGAGGTAATGCAGCTAAAATTCATCTAT-3' (SEQ ID NO:86)。

[0282] 对ABD扩增的PCR产物进行1.5%琼脂糖凝胶电泳,并纯化PCR产物。使用以下引物对来克隆带有额外突变 (V20P) 的工程化BCA,在该引物对中,中终止密码子和6组氨酸标签缺失:

[0283] 用于克隆BCA的正向引物:

[0284] 5'-ggaattccCATATGAAGCCAATTTCAATTATCG-3' (SEQ ID NO:81)

[0285] 用于克隆BCA的反向引物:

[0286] 5'-GTGATGGTGATGGTGATGCA-3' (SEQ ID NO:82)。

[0287] 对上述引物扩增的BCA进行1%琼脂糖凝胶电泳,并纯化PCR产物。通过重叠PCR将BCA和ABD的上述PCR产物连接在一起。类似地,将200ng BCA和ABD用作模板,并通过1单位的iProof高保真DNA聚合酶进行扩增。将BCA和ABD在98℃温育30秒,同时进行15个扩增循环,包括在98℃热变性10秒、在60℃退火30秒以及在72℃延伸30秒。将重叠PCR的产物用作模板,以便使用以下一引物对进行进一步扩增:

[0288] 用于克隆BAH的正向引物:

[0289] 5'-ggaattccCATATGAAGCCAATTTCAATTATCG-3' (SEQ ID NO:87)

[0290] 用于克隆BAH的反向引物:

[0291] 5'-cgGGATCCTTAGTGATGGTGATGGTGATGAGGTAATGCAGCTAAAATTCATCTAT-3' (SEQ ID NO:88)。

[0292] 对PCR产物进行1%琼脂糖凝胶电泳,从凝胶上切下与BHA对应的条带进行纯化。将编码BHA和BAH的PCR产物以及pET-3a载体用NdeI和BamHI进行双重消化。将BHA和BAH连接至pET-3a载体,并转化到TOP10感受态大肠杆菌细胞中。通过DNA测序证实BHA和BAH的核苷酸序列。将包含BHA或BAH嵌件的pET-3a载体转化至BL21 (DE3) 载体,进行蛋白表达。

[0293] 实施例6:BHA和BAH的蛋白构建体

[0294] 本研究使用的BCA的蛋白序列与Bewley等人 (Structure 7, 435-448, 1999) (PDB ID: 2CEV, 通过引用并入本文) 所使用的相同,除了其在C-末端含有6xHis标签,并含有S161C突变。设计了BCA-6xHis-ABD (BHA) 和BCA-ABD-6xHis (BAH) 的构建体,大肠杆菌细胞库可以表达BHA和BAH。在BHA和BAH中,BCA部分是BCA的突变形式,其在20位的缬氨酸残基突变为脯氨酸 (V20P),而ABD部分是具有接头序列 (AQHDEAVDANS) 的ABD的野生型形式 (Jonsson等人, 2008, Protein Eng. Des. Sel. 21, 515-527)。ABD部分位于融合蛋白的C-末端最末端 (对于BHA而言),或者融合于BCA和6x组氨酸标签之间 (对于BAH而言)。在本研究中使用的BCA、BHA和BAH的蛋白序列的比对在图4中示出。

[0295] BCA (野生型) 氨基酸序列 (PDB ID: 2CEV):

[0296] MKPISIIIGVPMDLGQTRRGVDMGPSAMRYAGVIERLERLHYDIEDLGDIPIGKAERLHEQGDSRLRNL
KAVAEANEKLAAAVDQVVQRGRFPLVLGGDHSIAIGTLAGVAKHYERLGVWYDAHGDVNTAETSPSGNIHGMPLA
ASLGFGHPALTQIGGYSPKIKPEHVVLIGVRSLEGEKKFIREKGIKIYTMHEVDRLGMTRVMEETIAYLKERTDG
VHLSLDLDGLDPSDAPGVGTPVIGGLTYRESHLAMEMLAEAQIITSAEFVEVNPILDERNKTASVAVALMGSLFGE
KLM (SEQ ID NO:70)

[0297] BCA (S161C) -His氨基酸序列:

[0298] MKPISIIIGVPMDLGQTRRGVDMGPSAMRYAGVIERLERLHYDIEDLGDIPIGKAERLHEQGDSRLRNL
KAVAEANEKLAAAVDQVVQRGRFPLVLGGDHSIAIGTLAGVAKHYERLGVWYDAHGDVNTAETSPSGNIHGMPLA
ASLGFGHPALTQIGGYCPKIKPEHVVLIGVRSLEGEKKFIREKGIKIYTMHEVDRLGMTRVMEETIAYLKERTDG
VHLSLDLDGLDPSDAPGVGTPVIGGLTYRESHLAMEMLAEAQIITSAEFVEVNPILDERNKTASVAVALMGSLFGE
KLMHHHHH (SEQ ID NO:71)

[0299] BHA氨基酸序列:

[0300] MKPISIIIGVPMDLGQTRRGPDMPGPSAMRYAGVIERLERLHYDIEDLGDIPIGKAERLHEQGDSRLRNL
KAVAEANEKLAAAVDQVVQRGRFPLVLGGDHSIAIGTLAGVAKHYERLGVWYDAHGDVNTAETSPSGNIHGMPLA
ASLGFGHPALTQIGGYCPKIKPEHVVLIGVRSLEGEKKFIREKGIKIYTMHEVDRLGMTRVMEETIAYLKERTDG

VHLSLDLDGLDPSDAPGVGTPVIGGLTYRESHLAMEMLAEAQIITSAEFVEVNPILDERNKTASVAVALMGSLFGE
KLMHHHHHHAQHDEAVDANSLAEAKVLANRELDKYGVSDYYKNLINNAKTVEGVKALIDEILAALP (SEQ ID NO:
75)

[0301] BAH氨基酸序列:

[0302] MKPISIIIGVPMDLGQTRRGPDMPGMSAMRYAGVIERLERLHYDIEDLGDIPIGKAERLHEQGDSRLRNL
KAVAEANEKLAAAVDQVVQRGRFPLVLGGDHSIAIGTLAGVAKHYERLGVWYDAHGDVNTAETSPSGNIHGMPLA
ASLGFGHPALTQIGGYCPKIKPEHVVLIGVRSLEGEKKFIREKGIKIYTMHEVDRLGMTRVMEETIAYLKERTDG
VHLSLDLDGLDPSDAPGVGTPVIGGLTYRESHLAMEMLAEAQIITSAEFVEVNPILDERNKTASVAVALMGSLFGE
KLMAQHDEAVDANSLAEAKVLANRELDKYGVSDYYKNLINNAKTVEGVKALIDEILAALPHHHHHH (SEQ ID NO:
76)

[0303] 实施例7:BHA和BAH的制备

[0304] 使用表达BHA和BAH的大肠杆菌细胞库。为了制备种子培养物,将少量的大肠杆菌
BL21 (DE3) 甘油储备液接种到补充有100 μ g/mL氨苄西林的10mL LB培养基中。在700rpm的振
荡下,使种子培养物在37 $^{\circ}$ C生长过夜(约16小时)。然后将2.5mL体积的过夜种子培养物用于
接种250mL的具有100 μ g/mL氨苄西林的LB培养基。在280rpm的振荡下,使接种的细胞在37 $^{\circ}$ C
生长2至4小时,达到在600nm波长的光密度(OD_{600})为0.6至0.8。然后将IPTG (0.2mM) 添加到
培养基中以诱导靶蛋白的过表达。使细胞再生长4小时,并通过在4500rpm离心进行收集。

[0305] 通过镍亲和色谱法进行蛋白纯化

[0306] 将大肠杆菌细胞沉淀物重悬于含有50mM Tris-HCl、100mM NaCl (pH7.4) 的缓冲液
中,并通过超声处理进行破裂。然后通过10000rpm离心40分钟来去除细胞碎片。将上清液
上样至装有Ni²⁺的5mL HiTrap螯合柱(GE Healthcare) 中,并使用ÄKTA 纯化器用缓冲液A
(20mM磷酸钠、0.5M NaCl、pH 7.4) 进行平衡。使用0-0.5M咪唑梯度来洗脱蛋白,所述梯度是
通过将缓冲液A与缓冲液B(缓冲液A中含0.5M咪唑) 以各种比例组合而实现的。使用12%聚
丙烯酰胺凝胶,通过十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE) 分析馏分,并且合并
含有靶蛋白的馏分。浓缩合并后的馏分,并使用离心过滤装置(Amicon) 或切向流过滤(TFF)
装置(Millipore) 将浓缩的合并馏分的缓冲液与20mM磷酸钠(pH 7.4) 交换。BHA和BAH的膜
截留值(membrane cut-off) 为30000MW。然后将保留物稀释至所需浓度,并通过0.2 μ m注射
器式过滤器进行无菌过滤,并在4 $^{\circ}$ C储存。

[0307] 根据BHA纯化的色谱图,在使用增加浓度的咪唑的洗脱过程中观察到三个峰(图
5A)。前两个峰合并在一起,随后是咪唑浓度达到 $\sim$ 0.13M时出现的第三个峰(图5A)。通过
SDS-PAGE进行分析时,发现第三个峰主要由约40kDa的靶蛋白组成(图5B,泳道F4至F8)。所
述靶蛋白可能是BHA,因为根据其氨基酸序列计算得出的BHA单体分子量为39.44kDa。因此,
这表明BHA已被成功表达和纯化。将含有相对纯的BHA的馏分合并在一起,以进行进一步处
理。

[0308] 根据BAH纯化的色谱图,在使用增加浓度的咪唑的洗脱过程中观察到三个峰(图
5C)。第二个峰和第三个峰合并在一起,其在咪唑浓度达到 $\sim$ 0.18M时出现(图5C)。通过SDS-
PAGE进行分析时,发现所述合并峰主要由约40kDa的靶蛋白组成(图5D,泳道F6至F14),所述
靶蛋白可能是BHA。与在 $\sim$ 0.13M咪唑洗脱的BHA相比,BAH似乎与镍亲和柱结合更紧密。这可
能是因为ABD域在插入BCA和6x组氨酸标签之间时有助于使6x组氨酸标签更加暴露,因此,

BAH可以比BHA更有效地与柱中的镍离子相互作用。将含有相对纯的BAH的馏分合并在一起,并使用切向流过滤(TFF)装置(Millipore)代替离心过滤装置来交换缓冲液。

[0309] 一个酶活性单位定义为在标准测定条件下每分钟催化产生1 μ mol尿素的酶(BCA、BHA或BAH)的量。酶的比活性表示为每毫克蛋白的活性单位。在标准DAMO测定条件下(37 $^{\circ}$ C, pH 7.4),新鲜纯化的BHA(SEQ ID NO:75)的比活性值为220.6 $\pm$ 15.8U/mg,其接近BCA(S161C)-His(SEQ ID NO:89)的值(243.30U/mg)。

[0310] 对于包含BCA多肽和ABD多肽的融合蛋白,在BHA(SEQ ID NO:75)的情况下获得了每L摇瓶培养物约290mg蛋白的极高蛋白产量。ABD融合蛋白的产量高度依赖于所使用的表达系统。据报道,与sCR1融合的ABD的产量范围为0.4-1.1 μ g/24h/mL中国仓鼠卵巢细胞培养物(Makrides等人,1996,J.Pharmacol.Exp.Ther.277,534-542)。从每L的HEK293细胞培养物中可获得约2-15mg单链双抗体-ABD融合蛋白(Hopp等人,2010,Protein Eng.Des.Sel.23,827-834;Stork等人,2007,Protein Eng.Des.Sel.20,569-576)。在大肠杆菌BL21宿主中表达的ABD-TolA融合蛋白的产量为20mg/L LB肉汤培养基(Ahmad等人,2012,Proteins 80,774-789)。相比之下,BHA的产量要高得多。我们的结果表明,BHA(SEQ ID NO:75)的生产简单且具有成本效益。

[0311] 实施例8:BCA(S161C)-His(SEQ ID NO:89)的表达和纯化

[0312] 在含有100 μ g/mL氨苄西林的5mL LB培养基中制备了用质粒pET-3a-BCA(S161C)-His转化的大肠杆菌菌株BL21(DE3)pLysS的过夜种子培养物,并在280rpm的振荡下,使其在摇瓶中于37 $^{\circ}$ C生长16小时。对于含有100 μ g/mL氨苄西林的250mL LB培养基,添加2.5mL过夜培养物,并在280rpm的振荡下,在37 $^{\circ}$ C培养,直到600nm处的光密度(OD₆₀₀)达到0.8至0.9。加入异丙基- β -D-硫代半乳糖苷(IPTG),至终浓度为0.2mM。诱导4小时后,于4 $^{\circ}$ C以12000x g离心20分钟来收集细胞。可以通过超声处理使细胞沉淀物破碎,并进行纯化,或者在-20 $^{\circ}$ C储存直至需要使用。将细胞沉淀物悬浮在含有10mM的MnCl₂的20mL溶解缓冲液(50mM Tris-HCl、100mM NaCl、pH 7.4)中。首先通过以每30秒40%振幅的脉冲在冰上超声处理10分钟来使细胞破裂。通过在4 $^{\circ}$ C以12000x g离心20分钟去除细胞碎片。将上清液在70 $^{\circ}$ C温育15分钟,并通过离心去除热处理步骤中形成的沉淀物。通过0.22 μ m过滤器过滤可溶级分,然后上样至5mL HisTrap螯合HP色谱柱中。在样品上样期间收集流穿的级分,并用5倍柱体积(CV)的起始缓冲液冲洗未结合蛋白,直到基线稳定下来。使用咪唑(起始缓冲液中含0.5M咪唑)通过竞争性梯度洗脱来洗脱结合在柱上的靶蛋白。鉴定目标级分,并将其合并在一起,按照制造商的指示,使用MW截留值为10kDa的Amicon Ultra-15离心过滤器,在pH 7.4的20mM磷酸钠中对其进行缓冲液交换。在无菌条件下通过0.22 μ m过滤器过滤样品,并在4 $^{\circ}$ C储存,直至需要使用。

[0313] 实施例9:通过补料分批发酵纯化BCA(S161C)-His(SEQ ID NO:89)

[0314] 在5L生物反应器中对表达BCA(S161C)-His的大肠杆菌细胞进行发酵,产生了248.86g湿细胞重量。将细胞沉淀物重悬浮于含DNase和RNase(其分解均质化释放的大量DNA和RNA,从而降低了细胞裂解物的粘度)的溶解缓冲液中。所述细胞裂解物在通过匀浆器3次后在37 $^{\circ}$ C温育15分钟以进一步降低粘度,然后进行离心以获得可溶级分。纯化的第一步通过在70 $^{\circ}$ C热处理15分钟(这使热不稳定蛋白沉淀)来除去非目标杂质,然后通过离心回收热稳定的BCA(S161C)-His(SEQ ID NO:89)。

[0315] 用装填196mL柱床体积的XK50柱通过Ni-亲和柱进一步纯化含有靶蛋白的可溶级分。简而言之,使用4段洗脱程序从Ni亲和柱洗脱BCA (S161C) -His (SEQ ID NO:89)。0%至30%洗脱缓冲液的第一洗脱梯度旨在去除非特异性结合在柱上的蛋白。第二段保持在30%,这允许完全洗脱非特异性结合蛋白。在第三段中,通过将洗脱缓冲液的浓度从30%提高至70%,洗脱出靶蛋白。第四段的70%至100%洗脱缓冲液洗脱仍结合在柱上的任何剩余蛋白。通过SDS-PAGE分析在280nm的UV波长处产生吸光度的级分,同时将包含靶蛋白的从E1至A' 5的24个级分(每个级分50mL)合并在一起(图6A和图6B)。根据我们对BCA(野生型)(SEQ ID NO:70)的六聚体结构的了解,通过切向流过滤(TFF)系统对含高浓度咪唑的合并级分进行脱盐,使用具有30kDa NMWC的膜进行TFF。将纯化的BCA (S161C) -His (SEQ ID NO:89)保持在PBS缓冲液中,在无菌条件下用0.2μm过滤器进行过滤,并在4℃储存,直至使用。通过两步中试规模纯化,获得了约1096mg的BCA (S161C) -His (SEQ ID NO:89)蛋白,其比活性经测定为264U/mg。

[0316] 实施例10:确定精氨酸酶活性

[0317] 使用二乙酰一肟(DAMO)通过直接比色法测定BCA (S161C) -His (SEQ ID NO:89)的活性,所述直接比色法确定酶促反应中产物尿素的量。简而言之,将0.3mL BCA溶液与0.15mL水和720mM精氨酸底物在pH 7.4的连续稀释液分别在37℃预温育10分钟。通过向预温育的酶溶液中添加0.3mL精氨酸底物来进行酶促反应。将反应混合物在37℃温育整整5分钟,然后加入淬灭剂[50%三氯乙酸(TCA)]来终止反应。空白样品以类似的方式制备,只是在TCA溶液之后加入相同体积的酶溶液。

[0318] 使用世界卫生组织(WHO)描述的DAMO直接比色法对由上述反应形成的尿素进行定量。所述方案已被WHO用作测量血液尿素浓度的标准操作程序(SOP)。关于SOP,制备了几种试剂,通过以下方式制备混合酸试剂:将100mL浓硫酸缓慢加入到400mL蒸馏水中,然后再加入0.3mL储备酸试剂(将0.5g六水合三氯化铁溶于15mL蒸馏水中,并用浓磷酸补足至25mL)。通过以下方式制备混合显色试剂:将35mL储备显色试剂A(50mL蒸馏水中含1g DAMO)和35mL储备显色试剂B(50mL蒸馏水含0.25g氨基硫脲)混合,并用蒸馏水补足至500mL。通过将5mL储备尿素标准品(50mL苯甲酸含0.5g尿素)添加到45mL苯甲酸(1g/dL)中来制备工作尿素标准品。通过将100μL的20倍稀释反应混合物添加到玻璃沸腾管中,然后加入3mL显色剂(其通过将蒸馏水、混合显色试剂和混合酸试剂按1:1:1的比例混合而成)来进行DAMO分析。将管在100℃温育15分钟,然后冷却至室温5分钟。之后测量540nm处的吸光度。一个精氨酸酶单位定义为在37℃,pH 7.4,每分钟将一微摩尔精氨酸转化为鸟氨酸和尿素的酶的量。使用以下方程式计算酶活性,从样品的吸光度值减去空白样品的吸光度值:

[0319] $\Delta A_{540nm} \text{ 样品} = A_{540nm} \text{ 样品} - A_{540nm} \text{ 空白样品}$

[0320] 所产生的尿素量根据以下标准曲线计算:

[0321]
$$\text{单位/ml 酶} = \frac{(\text{释放的尿素, 以 } \mu\text{mol 计})(df)}{(5)(0.3)}$$

[0322] df=酶的稀释因子

[0323] 0.3=所用酶的体积(以毫升为单位)

[0324] 5=根据单位定义的测定时间(以分钟为单位)。

[0325] 实施例11:确定蛋白浓度

[0326] 通过Bradford测定确定蛋白浓度。在使用前,将蛋白质测定染料试剂浓缩物(Bio-rad)稀释5倍。将20 μ L样品与1mL稀释的染料试剂混合,并在室温下温育10分钟。为了确定蛋白浓度,使用Quick Start牛血清白蛋白标准套装(Bio-rad)作为标准品,在0-1mg/mL的范围内于595nm处测量混合物。

[0327] 实施例12:BHA (SEQ ID NO:75) 融合蛋白的酶活性

[0328] 测定BHA (SEQ ID NO:75) 的精氨酸分解代谢活性,以了解在HSA存在下,酶活性是否会受到影响。结果表明,BHA (SEQ ID NO:75) 的活性不受加入到活性测定中的各种量的HSA影响。在结合研究中测试的BHA:HSA的摩尔比为1:10、1:5、1:1、5:1和10:1。在所有这些条件下,测得的单独的BHA (SEQ ID NO:75) 比活性与BHA-HSA复合物的比活性非常相似,约为200U/mg。

[0329] 实施例13:非变性PAGE分析揭示的N-ABD-rhArg (SEQ ID NO:49) 或BHA (SEQ ID NO:75) 与HAS的结合

[0330] 当将ABD与rhArg或BCA融合时,对于融合蛋白而言,保留白蛋白结合能力和酶活性都是重要的。为了证明ABD在融合蛋白中的结合能力,将固定量的人血清白蛋白 (HSA) 与N-ABD-rhArg (SEQ ID NO:49) 或BHA (SEQ ID NO:75) 以不同的摩尔比进行温育。在非变性PAGE (其中按尺寸和构象分离蛋白) 上以其天然条件分析反应混合物。

[0331] 在图7中,非变性PAGE的泳道2和3中分别示出了单独的HSA和N-ABD-rhArg (SEQ ID NO:49) 的迁移(图7)。以各种摩尔比针对N-ABD-rhArg (SEQ ID NO:49) 滴定固定量的HSA (30皮摩尔),结果在泳道5至9中示出。通过增加结合反应中N-ABD-rhArg (SEQ ID NO:49) 的量,游离HSA的量按比例减少,因此表明N-ABD-rhArg (SEQ ID NO:49) 与HSA的特异性结合。在图8中,分别在非变性PAGE的泳道6和7中显示单独的HSA和BHA (SEQ ID NO:75) 的迁移(图8)。以各种摩尔比针对BHA (SEQ ID NO:75) 滴定固定量的HSA (60皮摩尔),结果在泳道1至5中示出。通过增加结合反应中BHA (SEQ ID NO:75) 的量,游离HSA的量按比例减少,因此表明BHA (SEQ ID NO:75) 与HSA的特异性结合。

[0332] 实施例14:BHA (SEQ ID NO:75) 的体内研究

[0333] 用六只8周龄的BALB/c小鼠进行BHA (SEQ ID NO:75) 的体内研究。在注射BHA (SEQ ID NO:75) 之前,从每只小鼠中采集血液样品,用作对照(0小时)。将小鼠随机分为两组,分别进行腹膜内(i.p.)和静脉内(i.v.)注射。向每只小鼠注射BHA (SEQ ID NO:75) (250U),并在注射后6、24、72和120小时采集血液样品。用氨基酸分析仪(Biochrom)分析16 μ L的每个血液样品的血浆中的精氨酸和鸟氨酸含量。

[0334] 在BALB/c小鼠中研究了BHA (SEQ ID NO:75) 的体内精氨酸耗竭作用,并将其与BCA (S161C) -His (SEQ ID NO:89) 进行比较,如图9所示。根据结果,在注射BCA (S161C) -His (SEQ ID NO:89) 后24小时内血浆精氨酸水平迅速恢复至正常水平(图9)。相反,在注射BHA (SEQ ID NO:75) 后至少24小时内,血浆精氨酸水平都无法检测(图9)。这一结果表明,ABD的融合延长了BCA (S161C) -His (SEQ ID NO:89) 的体内循环半衰期。结果表明,ABD融合是改善精氨酸耗竭酶的药效学性质的可行且有前景的策略。给药途径似乎对BHA (SEQ ID NO:75) 的体内精氨酸耗竭作用没有影响(图9)。此外,由于没有观察到明显的副作用,所有小鼠都显示出对BHA (SEQ ID NO:75) 的施用的良好耐受性。综上所述,本文所述的融合蛋白

(例如BHA (SEQ ID NO:75)) 已通过将血浆精氨酸降低到无法检测的水平,持续比使用无ABD融合的天然BCA (S161C) -His (SEQ ID NO:89) (8小时) 长得多的时间(至少24小时),证明了ABD融合策略的可行性。

[0335] 实施例15:N-ABD-rhArg (SEQ ID NO:49) 的体内药效学研究

[0336] 很久以前就研究了精氨酸酶的抗癌作用 (Greenberg和Sassenrath, 1953, Cancer Res. 13, 709-715)。发现精氨酸酶在体外具有非常好的抗癌效果。但由于血浆半衰期较短,因此在体内几乎没有观察到效果。在向C3H小鼠注射天然精氨酸酶后3小时,血浆精氨酸水平降到了最低水平。在相同模型中注射后5小时,精氨酸增加至正常基础水平 (Greenberg和Sassenrath, 1953, Cancer Res. 13, 709-715)。因此,由于血浆半衰期短,精氨酸酶被认为是无效抗癌剂。这表明血浆半衰期可以影响酶药物的体内功效。N-ABD-rhArg (SEQ ID NO:49) 和N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO:50) 显示出相似的比活性。我们发现,通过与ABD融合来延长rhArg (SEQ ID NO:103) 的血浆半衰期是一种有效的方法。为了降低具有延长的血浆半衰期的rhArg (SEQ ID NO:103) 的制备成本,开发了N-ABD-rhArg (SEQ ID NO:49) 和N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO:50)。

[0337] 本研究使用了15只雌性BALB/c小鼠 (10周龄)。将它们每笼5只来分组。通过腹膜内注射向小鼠施用单剂量的N-ABD-rhArg (SEQ ID NO:49) (分别为500U、250U和125U)。使用肝素化毛细管从隐静脉采集血液样品,并以800x g进行离心,以获得血浆。使用Biochrom 30氨基酸分析仪对16微升血浆样品进行L-精氨酸浓度测量。结果示于图10中。血浆精氨酸浓度的测量表明,在BALB/c小鼠体内,500U的N-ABD-rhArg (SEQ ID NO:49) 可将血浆精氨酸耗竭至低于Biochrom 30氨基酸分析仪的检测极限 (3 μ M) 的水平至少9天,250U的N-ABD-rhArg (SEQ ID NO:49) 可将血清精氨酸耗竭至低于Biochrom 30氨基酸分析仪的检测极限的水平至少7天,而125U的N-ABD-rhArg (SEQ ID NO:49) 可将血清精氨酸耗竭至低于Biochrom 30氨基酸分析仪的检测极限的水平至少3天。这些结果清楚地表明,可以通过与ABD融合来延长rhArg的血浆半衰期。与BHA (SEQ ID NO:75) 相比 (图9), N-ABD-rhArg (SEQ ID NO:49) 可以在小鼠体内将精氨酸耗竭至低水平,持续极长的时间,这凸显了合理设计融合蛋白的要求的重要性。

[0338] 实施例16:N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO:50) 的体内药效学和药代动力学研究

[0339] 本研究使用了50只C57BL/6J雄性小鼠 (10至12周龄)。通过腹膜内注射向小鼠施用单剂量的500U N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO:50)。使用肝素化毛细管从隐静脉采集血液样品,并以800x g进行离心,以获得血浆。使用检测极限为0.3 μ M L-精氨酸的Agilent 6460液相色谱/电喷雾电离三重四极杆质谱仪通过液相色谱-串联质谱法对5微升血浆样品进行L-精氨酸浓度测量。使用专门检测人精氨酸酶且不会与小鼠精氨酸酶发生反应的人精氨酸酶I ELISA (酶联免疫吸附测定) 试剂盒 (Abcam) 对5微升的血浆样品进行N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO:50) 浓度测量。

[0340] 注射后,在第2小时、第4小时、第8小时、第16小时、第24小时 (第1天); 以及从第2天开始至第12天以24小时为间隔; 并且从第12天开始至第30天以72小时为间隔,采集血清。为了在所使用的动物数量之间取得平衡并使得由于血液采集而从小鼠去除N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO:50) 所导致的对药代动力学和药效学研究结果的影响最小化,将小鼠分为10组,每组n=5,并在括号中所示的指定时间点进行血液采集:第1组 (第2小时)、第2组 (第4小

时)、第3组(第8小时)、第4组(第16小时)、第5组(第24小时)、第6组(第2天、第7天、第12天)、第7组(第3天、第8天、第18天)、第8组(第4天、第9天、第21天)、第9组(第5天、第10天、第15天、第24天)、第10组(第0天、第6天、第11天、第27天、第30天)。药效学和药代动力学结果分别示于图13和图14中。

[0341] 血浆精氨酸浓度的测量结果表明,通过腹膜内注射施用的500U N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO:50) 在注射后2小时内可将血浆精氨酸浓度耗竭至1 μ M(图13)。血浆精氨酸浓度在 $\leq 1\mu$ M保持了10天,然后在接下来的几天逐渐升高(表4)。在第18天至第21天之间,血浆精氨酸浓度恢复到基础水平的一半。这些结果表明,N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO:50) 可以将小鼠体内血浆精氨酸维持在非常低的水平($\leq 1\mu$ M),持续极长的时间。

[0342] 表4.腹膜内注射500U N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO:50) 之前以及之后不同时间点的血浆精氨酸浓度

[0343]	注射后时间点	血浆精氨酸浓度(μ M) (5只小鼠的平均值 $\pm$ SEM)
	第0天	134.543 $\pm$ 3.791
[0344]	第2小时	1.007 $\pm$ 0.013
	第4小时	0.934 $\pm$ 0.021
	第8小时	0.912 $\pm$ 0.006
	第16小时	0.943 $\pm$ 0.010
	第24小时	0.934 $\pm$ 0.007
	第2天	0.944 $\pm$ 0.007
	第3天	0.965 $\pm$ 0.008
	第4天	0.535 $\pm$ 0.121
	第5天	0.681 $\pm$ 0.043
	第6天	0.896 $\pm$ 0.089
	第7天	0.792 $\pm$ 0.135
	第8天	0.916 $\pm$ 0.079
	第9天	1.224 $\pm$ 0.178
	第10天	0.721 $\pm$ 0.054
	第11天	3.828 $\pm$ 1.511
	第12天	7.607 $\pm$ 2.325
	第15天	31.283 $\pm$ 4.569
	第18天	48.648 $\pm$ 3.989
	第21天	73.55 $\pm$ 3.76
	第24天	76.07 $\pm$ 4.92
	第27天	111.09 $\pm$ 6.21
	第30天	110.91 $\pm$ 3.81

[0345] 用二室模型计算药代动力学参数。

[0346] 消除速率常数 k_e 由下式计算:

$$[0347] \quad k_e = \frac{\ln C_1 - \ln C_2}{t_2 - t_1}$$

[0348] 血浆半衰期 $t_{1/2}$ 由下式计算:

$$[0349] \quad t_{1/2} = \frac{\ln 2}{k_e}$$

[0350] 曲线下面积 (AUC) 通过梯形法则使用以下方程式计算:

$$[0351] \quad AUC_{t_1-t_2} = \frac{(C_1 + C_2)}{2} \times (t_2 - t_1)$$

[0352] 为了进行比较,我们使用文献中报道的天然rhArg的半衰期。融合蛋白N-ABD094-rhArg (SEQ ID No:50) 的消除半衰期为 3.9 ± 0.3 天(图14),这意味着它们的清除速度比非融合蛋白rhArg慢得多,后者的半衰期短得多。对于具体的比较,人精氨酸酶在循环中的半衰期仅为几分钟(Georgiou等人,US 8440,184 B2),这表明所述缀合极大地延长了循环时间。这些结果清楚地表明,通过与ABD融合,rhArg的血浆半衰期可以大大延长。通过PEG化延长了天然ADI的循环半衰期(几个小时)(Ensor等人,Cancer Res2002,62:5443-5450)。PEG化ADI的循环半衰期为2至3天,且只有PEG化ADI(而非天然ADI)才可有效抑制体内肿瘤生长。在比较时,将天然rhArg和PEG化rhArg通过腹膜内注射施用给大鼠,每只大鼠施用1500U的PEG化rhArg (6U/g大鼠) 可将循环精氨酸耗竭至低于氨基酸分析仪的检测极限 (3 μ M) 的水平,持续6天,而高剂量的天然rhArg (7500U/大鼠) 只会在注射后3小时内将循环精氨酸降低至 $\sim 20\mu$ M,在注射后约2天精氨酸恢复至基础水平(Tsui等人,Cancer Cell Int.2009Apr 17;9:9)。天然精氨酸酶在几分钟内从循环中清除(Savoca等人,Cancer Biochem.Biophys.7:261-268,1984)。对于临床使用,精氨酸酶的工程化至关重要,以使其能够在循环中持续许多天或许多周。在没有任何修饰的情况下,人精氨酸酶在循环中的半衰期仅为几分钟,因为其尺寸不大,不能避免被肾脏过滤(Georgiou等人,US 8440,184B2)。因此,本发明开发了完全新颖且高度改良的精氨酸酶形式,其具有显著改善的用于治疗用途的循环持久性。

[0353] 实施例17:用N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO:50) 进行治疗减轻正常瘦型小鼠的脂肪量、抑制脂肪生成并提高胰岛素敏感性

[0354] 我们关于小鼠模型的数据表明,向8周龄的正常瘦型C57BL/6J雄性小鼠腹膜内注射一次500U N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO:50) 可以使血浆精氨酸浓度保持在 $\leq 1\mu$ M至少10天,这证明了N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO:50) 的循环半衰期较长(图13)。因此,我们通过腹膜内注射500U N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO:50) 来处理喂食普通饲料(Chow)的正常瘦型C57BL/6J雄性小鼠,以10天为间隔,进行4周。处理4周后,与注射媒介物(盐水)的对照小鼠相比,内脏(性腺周围、肾周和肠系膜脂肪垫)和皮下(腹股沟脂肪垫)脂肪量降低超过25%(图15A)。内脏白色脂肪组织(WAT)的组织学检查显示,脂肪细胞尺寸显著减少(图15B)。我们还分析了脂肪生成,发现在用N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO:50) 处理的小鼠中,几种关键脂肪生成酶(包括乙酰辅酶A羧化酶1 (Acc1)、脂肪酸合成酶 (Fasn) 和硬脂酰辅酶A去饱和酶1 (Scd1))的mRNA水平在内脏WAT(图16A)和肝脏(图16B)中被显著抑制。

[0355] 肥胖症与胰岛素抵抗高度相关。因此,我们进行了体内和体外研究,以确定N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO:50) 处理是否会影响胰岛素敏感性。胰岛素耐性试验(ITT)的结果表明,用N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO:50) 处理的小鼠在进行药物处理2周后表现出胰岛素敏感性的显著增加(图17A)。然后,我们通过用含有5U/mL N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO:50) (其在所述浓度下不会影响细胞生存力)的培养基处理从C57BL/6J雄性小鼠制备的原代

肝细胞,专门检验肝胰岛素敏感性,(图17B)。在N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO:50) 或对照(不添加N-ABD094-rhArg) 培养基中培育后24小时,用100nM胰岛素刺激原代肝细胞20分钟。然后采集细胞进行蛋白质印迹分析,以检测磷酸化的蛋白激酶B (pAkt),蛋白激酶B通常用作胰岛素信号的标志物。结果显示,与对照组相比,用N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO:50) 处理的组中,Akt的磷酸化显著增加,这表明肝胰岛素信号增强(图17C)。

[0356] 对正常瘦型小鼠的研究结果表明,N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO:50) 的循环半衰期较长,并且在体内和体外均可减轻脂肪量,抑制脂肪生成并改善胰岛素敏感性。这些结果支持ABD-rhArg融合蛋白可用于预防和治疗肥胖症和相关的代谢紊乱,例如胰岛素抵抗、脂肪肝变性(脂肪肝)。

[0357] 实施例18:用N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO:50) 进行治疗有效预防HFD诱导的肥胖症

[0358] 用重组人精氨酸酶[N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO:50)] 进行治疗可显著降低正常瘦型小鼠的脂肪量,抑制脂肪生成并改善胰岛素敏感性。

[0359] 测试了N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO:50) 对肥胖动物的肥胖和各种代谢参数的影响。使用了高脂饲料诱导的肥胖(DIO) 小鼠模型[Wang和Liao,2012,Methods Mol.Biol.821:421-433],其具有与人类肥胖症相同的许多特征,被广泛用于测试预期的抗肥胖药[Vickers等人,2011,Br.J.Pharmacol.164(4):1248-1262]。具体而言,本研究使用的C57BL/6J是用于多基因肥胖模型的最常用的小鼠品系。据充分报道,喂食高脂饲料的C57BL/6J小鼠体重显著增加,变得肥胖,并出现高胰岛素血症、高血糖症、葡萄糖耐量减低和胰岛素抵抗[Gallou-Kabani等人,2007,Obesity 15(8):1996-2005]。

[0360] 为了确定N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO:50) 在预防小鼠出现饮食引起的肥胖症和相关代谢紊乱中的功效,从8周龄开始向C57BL/6J雄性小鼠喂食含有60kcal%脂肪的高脂饲料(HFD;Research Diets,D12492),持续12周,并同时以7天为间隔接受200至300U N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO:50) 的腹膜内注射,或注射盐水作为媒介物对照。喂食含10kcal%脂肪的匹配低脂饲料(LFD,Research Diets,D12450J) 并注射盐水的C57BL/6J小鼠作为各种测量的瘦型对照。

[0361] 分别进行了两个组的试验,每组n=5。每5只一组饲养小鼠。两个独立的组获得了相似的结果。实施例18至22总结了一组小鼠的数据。

[0362] 与喂食LFD并用媒介物处理的瘦型对照[称为LFD(媒介物)组]相比,喂食HFD的媒介物处理的雄性小鼠[称为HFD(媒介物)组]显示出体重(图18A) 和尺寸(图18B) 的明显增加,其中主要内脏(性腺周围、肾周和肠系膜) 和皮下(腹股沟) 储库的白色脂肪组织(WAT) 量显著增加(图19A)。然而,喂食HFD但同时用N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO:50) 进行处理的小鼠[称为HFD(rhArg)组]可有效预防因HFD摄入而导致的体重增加和WAT扩张。WAT的组织学检查表明,N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO:50) 处理显著抑制了脂肪细胞肥大(图19B)。使用实时qRT-PCR分析WAT中的mRNA表达水平还表明,几个关键的成脂分化转录因子(包括过氧化物酶体增殖物激活受体 γ (Pparg) 和固醇调节元件结合蛋白1c (Srebp1c),以及脂肪生成酶(Acc1和Scd1)) 急剧下调(图19C)。这些基因在用N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO:50) 处理的喂食HFD的小鼠的骨骼肌中也显著下调(图20),这表明N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO:50) 的抗脂肪生成作用不限于WAT。

[0363] 在确认了N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO:50) 对雄性小鼠的抗肥胖作用后,研究了N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO:50) 对雌性小鼠 (每组n=5) 的效果,以确定是否存在性别差异。结果表明,同时用N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO:50) 进行处理,同样可以有效预防从8周龄开始喂食HFD (持续12周) 的雌性小鼠的体重增加 (图21A) 和主要内脏 (性腺周围、肾周和肠系膜) 和皮下 (腹股沟) 储库处WAT的过量积累 (图21B), 并且可以改善胰岛素敏感性 (图22A) 和葡萄糖耐受不良 (图22B)。

[0364] 为了测试N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO:50) 对脂肪细胞的作用,使用了小鼠3T3-L1前体脂肪细胞,其通常用作研究成脂分化的细胞基模型 [Green和Meuth,1974,Cell 3:127-133]。发现N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO:50) 可以有效抑制3T3-L1细胞中的成脂分化和脂肪生成 (图23), 并显著抑制几种成脂分化转录因子 (图24A) 和脂质生成酶 (图24B) 的mRNA水平。当在牛精氨酸酶或另一种精氨酸耗竭酶——精氨酸脱亚氨酶 (ADI) 或无精氨酸的培养基中培养3T3-L1前体脂肪细胞时,观察到相似的抑制作用 (图23)。精氨酸酶将L-精氨酸转化为L-鸟氨酸和尿素,而ADI将L-精氨酸转化为L-瓜氨酸。但是,L-鸟氨酸、尿素或L-瓜氨酸不能抑制3T3-L1细胞中的成脂分化和脂肪生成 (图23)。

[0365] 此外,用不同浓度的L-精氨酸补充无精氨酸的培养基证明了精氨酸对成脂分化和脂肪生成的剂量依赖性作用 (图25A), 其中激活关键的成脂分化转录因子 (包括Cebpa和Pparg) 和脂质生成酶Scd1的阈值浓度在10至40 μ M精氨酸之间 (图25B)。

[0366] 综上所述,这些发现证明了,N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO:50) 的抗成脂分化和脂肪生成效果是通过精氨酸剥夺介导的。

[0367] 总的来说,这些发现支持通过ABD-rhArg融合蛋白或其它形式的精氨酸酶 (例如, rhArg-PEG、BCA-PEG或BCA-ABD) 或精氨酸耗竭酶 (例如,ADI-PEG、ADI-ABD、ADC-PEG或ADC-ABD) 进行的精氨酸耗竭可用作预防性的抗肥胖症疗法。

[0368] 实施例19:用N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO:50) 进行治疗预防HFD诱导的胰岛素抵抗、葡萄糖耐量减低和代谢异常

[0369] 肥胖症通常与胰岛素抵抗、葡萄糖耐量减低和代谢异常有关。实际上,与喂食LFD的媒介物处理的瘦型对照小鼠相比,在喂食HFD之后6周进行的胰岛素耐性试验 (ITT) 中,喂食HFD的媒介物处理的小鼠显示出对所注射胰岛素的降血糖效果的敏感性的显著降低 (图26A), 这在11周时进一步恶化 (图26B)。伴随胰岛素敏感性降低,这些小鼠在喂食HFD后5周在葡萄糖耐量试验 (GTT) 中注射D-葡萄糖后使血糖恢复至基础水平的效率显著降低 (图27A), 这意味着出现了葡萄糖耐量减低,这在食用HFD的10周后进一步恶化 (图27B)。实际上,与瘦型对照小鼠相比,在喂食HFD的媒介物处理的小鼠中,空腹 (5小时) 血糖 (图28A) 和空腹血浆胰岛素水平 (图28B) 显著升高,且HOMA-IR评分 (图28C) (胰岛素抵抗的一种度量) 更高。在喂食HFD后第12周进行测量时,空腹血浆瘦蛋白 (图29A)、总胆固醇 (图29B)、甘油三酯 (图29C) 和游离脂肪酸 (图29D) 的水平显著提高。值得注意的是,同时用N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO:50) 进行处理可以完全预防由HFD诱导的胰岛素抵抗、葡萄糖耐量减低、高血糖症、高胰岛素血症、高瘦素血症、高胆固醇血症、高甘油三酯血症和高游离脂肪酸血症的发展。

[0370] 总而言之,这些结果证明了,N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO:50) 可以有效预防胰岛素抵抗和葡萄糖耐受不良 (这是发展为2型糖尿病的先兆)。它还可以防止瘦蛋白抵抗和其

它代谢异常,包括与肥胖症相关的血脂异常。

[0371] 总的来说,这些结果支持通过ABD-rhArg融合蛋白或其它形式的精氨酸酶(例如, rhArg-PEG、BCA-PEG或BCA-ABD)或精氨酸耗竭酶(例如,ADI-PEG、ADI-ABD、ADC-PEG或ADC-ABD)进行的精氨酸耗竭可用作预防性抗糖尿病、抗血脂异常、抗动脉粥样硬化和抗代谢异常疗法。

[0372] 实施例20:用N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO:50)进行治疗预防HFD诱导的脂肪变性

[0373] 脂肪变性是指脂质在细胞内的异常滞留。非酒精性肝脂肪变性(非酒精性脂肪肝)是与肥胖症相关的常见合并症。尽管在早期可能没有症状,但它在肝脏发炎时会变成脂肪性肝炎,其可发展为纤维化,并在更晚期进一步发展为肝硬化,这大大增加了发展为肝细胞癌的风险。实际上,已经发现,在喂食HFD的媒介物处理的小鼠中,肝脏显著扩大,并且颜色苍白(图30A),其重量几乎是瘦型对照小鼠的两倍(图30B)。用油红O对肝脏切片进行染色显示出大脂滴的大量积累(图31A),甘油三酯浓度相应增加了十倍(图31B)。伴随这些发现,还发现血清丙氨酸氨基转移酶(ALT)水平(其通常作为肝损伤的生物标志物被测量)显著升高(图32)。值得注意的是,同时用N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO:50)进行处理可以有效防止喂食HFD的小鼠肝脏中脂质的过度积累,从而使得肝脏的重量和甘油三酯含量以及血清ALT水平与瘦型对照相似。根据这些研究结果,发现虽然HFD诱导肝脏中几种关键的成脂分化转录因子和脂肪生成酶的显著上调,但是,用N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO:50)进行处理显著抑制这些基因的上调(图31C)。总而言之,这些结果表明,N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO:50)在预防肝脂肪变性方面非常有效。

[0374] 除肝脏外,肥胖症还与脂质在肾脏(肾脂肪变性)、胰腺(胰腺脂肪变性)和心脏(心肌脂肪变性)中的过度积累有关,引起这些器官的脂毒性和功能障碍。实际上,发现在喂食HFD的媒介物处理的小鼠中,肾脏(图33A)、胰腺(图33B)和心脏(图33C)的重量显著增加。同时用N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO:50)进行处理可有效预防这些器官重量增加,这表明N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO:50)可以预防脂质的过度积累和在这些器官中的脂毒性。

[0375] 总的来说,这些结果支持ABD-rhArg融合蛋白可以有效预防脂肪变性,并且通过N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO:50)或其它形式的精氨酸酶(例如, rhArg-PEG、BCA-PEG或BCA-ABD)或精氨酸耗竭酶(例如,ADI-PEG、ADI-ABD、ADC-PEG或ADC-ABD)进行的精氨酸耗竭可用作预防性抗脂肪变性疗法。

[0376] 实施例21:用N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO:50)进行治疗预防HFD诱导的慢性炎症

[0377] WAT的过度扩张将增加许多脂肪因子的产生,这会引发慢性轻度炎症,从而促进胰岛素抵抗的出现。单核细胞趋化蛋白-1 (Mcp1)是WAT分泌的关键促炎性脂肪因子之一,其在肥胖症中调节巨噬细胞向WAT的浸润、胰岛素抵抗和肝脂肪变性。实际上,我们发现,喂食HFD的媒介物处理的小鼠的性腺周围WAT中Mcp1的mRNA水平显著上调(图34A)。与此伴随的是,与瘦型对照小鼠相比,通过酶联免疫吸附测定法(ELISA)测得的血清循环Mcp1水平显著升高(图34B)。其它促炎性脂肪因子(包括白介素1 β (Il1b)和肿瘤坏死因子 α (Tnfa))在性腺周围WAT中也显示出mRNA表达升高(图34A)。值得注意的是,同时用N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO:50)进行处理可抑制性腺周围WAT中这些脂肪因子上调,并抑制血清Mcp1水平升高。

[0378] 这些结果表明,N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO:50)可以预防与肥胖症相关的慢性轻度炎症,并且支持通过ABD-rhArg融合蛋白或其它形式的精氨酸酶(例如, rhArg-PEG、BCA-

PEG或BCA-ABD)或精氨酸耗竭酶(例如,ADI-PEG、ADI-ABD、ADC-PEG或ADC-ABD)进行的精氨酸耗竭可以作为预防性抗炎疗法。

[0379] 实施例22:用N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO:50)进行治疗预防HFD诱导的褐色脂肪组织变白和脂肪酸氧化失调,并增强非战栗产热

[0380] 褐色脂肪组织(BAT)用于将氧化性物质消散为热量(非战栗产热)。最近的研究表明,它具有巨大的能量消耗能力来抵抗肥胖。相反,BAT的变白与肥胖相关,并且会损害BAT的功能。实际上,我们发现,在喂食HFD的媒介物处理的小鼠中,肩胛间BAT显著增大(图35A),其重量是瘦型对照小鼠的两倍(图35B)。组织学检查表明,散布在多小叶褐色脂肪细胞之间的大的单小叶细胞出现大量积累(图35C),这表明褐色脂肪细胞转化为白色样细胞。然而,在喂食HFD且同时用N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO:50)处理的小鼠中,BAT的重量、尺寸和组织学表现都与瘦型对照小鼠相似。我们还发现,用N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO:50)进行处理显著上调了对产热作用至关重要的BAT特异性基因解偶联蛋白1(Ucp1),并且还上调了过氧化物酶体增殖物激活受体 γ 辅激活因子1 α (Pgc1 α)(其为褐色脂肪细胞中Ucp1的关键转录调节因子),同时抑制了HFD诱导的酰基辅酶A氧化酶1(Acox1)(其是参与脂肪酸氧化的主要基因)下调(图36)。发现N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO:50)处理可以阻止Acox1下调,这表明N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO:50)具有使脂肪酸氧化正常化的潜力。

[0381] 总而言之,这些结果表明,N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO:50)处理可有效预防BAT中与肥胖症相关的褐色脂肪变白和脂肪酸氧化失调,并增强非战栗产热,以对抗HFD的肥胖效应。

[0382] 这些发现支持通过ABD-rhArg融合蛋白或其它形式的精氨酸酶(例如,ABD094-rhArg、BCA-PEG或BCA-ABD)或精氨酸耗竭酶(例如,ADI-PEG、ADI-ABD、ADC-PEG或ADC-ABD)进行的精氨酸耗竭作为预防性抗肥胖症疗法的潜力。

[0383] 实施例23:用N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO:50)进行治疗有效减少HFD诱导的肥胖症

[0384] 在确认了同时用N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO:50)进行处理可以有效预防HFD诱导的肥胖症和相关并发症及合并症(包括胰岛素抵抗、葡萄糖耐受不良、高血糖症、血脂异常、肝脂肪变性、慢性炎症和BAT变白)后,接下来,我们研究了N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO:50)在已存在饮食诱导的肥胖症(DIO)的小鼠中减轻肥胖症和逆转这些疾病方面的功效。C57BL/6J雄性小鼠从5周龄开始喂食HFD,持续12周,以诱导肥胖症和相关并发症及合并症。然后根据体重将其分为2组,并用600至700U N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO:50)或盐水(用作媒介物对照)进行处理,以7天为间隔持续12周,同时继续喂食HFD。在整个研究过程中,给一组小鼠喂食匹配低脂饲料(LFD),并注射盐水,以作为各种测量的瘦型对照。分别进行了两个组的试验,每组n=5。将小鼠5只一组进行饲养。两个独立组中获得了相似的结果。实施例23至28中呈现了一组小鼠的数据。

[0385] 喂食HFD十二周可以使雄性小鼠的体重增加到超过50g,这明显重于喂食LFD的瘦型对照雄性小鼠(图37A和图37B)。用N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO:50)处理后,HFD诱导的肥胖小鼠的体重逐渐降低。到第5周时,它们的体重减少了超过30%,与瘦型对照小鼠相似。在完成12周的处理前,体重一直维持在该水平。在用N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO:50)处理的DIO小鼠中,主要内脏储库(性腺周围、肾周和肠系膜WAT)和皮下储库(腹股沟WAT)处的脂肪

垫的重量显著降低,并且与瘦型对照小鼠高度相似(图38A)。WAT的组织学检查显示,在用N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO:50) 处理的DIO小鼠中,脂肪细胞显著减少(图38B)。

[0386] 这些发现与实施例18的结果一起支持ABD-rhArg融合蛋白或其它形式的精氨酸酶(例如,rhArg-PEG、BCA-PEG或BCA-ABD) 或精氨酸耗竭酶(例如,ADI-PEG、ADI-ABD、ADC-PEG或ADC-ABD) 可用于肥胖症的治疗。

[0387] 实施例24:用N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO:50) 进行治疗逆转HFD诱导的胰岛素抵抗和葡萄糖耐量减低,并纠正代谢异常

[0388] 在处理之前,与瘦型对照小鼠相比,喂食HFD达12周的小鼠已出现外周胰岛素抵抗(图39)和葡萄糖耐量减低(图40),这是前驱糖尿病的特征。然而,在用N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO:50) 处理后4周,DIO小鼠显示出胰岛素敏感性显著增加,其变得与瘦型对照小鼠相当。在连续喂食HFD的同时接受N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO:50) 的小鼠中,胰岛素敏感性的正常化可以持续到12周的药物处理结束时。此外,用N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO:50) 处理的小鼠在处理3周时表现出葡萄糖耐受不良的显著改善,并且到处理第7周已完全恢复到与瘦型对照小鼠相似的水平。与这些改善一致的是,用N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO:50) 处理的DIO小鼠的空腹血糖(图41A) 和血浆胰岛素(图41B) 到rhArg处理的第4周已经恢复至与瘦型对照小鼠相似的水平,并维持在正常范围内,直到处理结束。这导致HOMA-1R评分从处理前小鼠的35.1急剧下降至处理后4周小鼠的1.2(图41C),这表明胰岛素抵抗得到逆转。空腹血浆瘦蛋白(图42A) 和总胆固醇水平(图42B) 也显著降低至正常水平。

[0389] 总体来说,我们的发现表明,在处理的4周内,N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO:50) 在逆转胰岛素抵抗、葡萄糖耐量减低、高血糖症、高胰岛素血症、高瘦素血症和高胆固醇血症方面具有巨大功效。

[0390] 总而言之,这些发现支持通过ABD-rhArg融合蛋白或其它形式的精氨酸酶(例如,rhArg-PEG、BCA-PEG或BCA-ABD) 或精氨酸耗竭酶(例如,ADI-PEG、ADI-ABD、ADC-PEG或ADC-ABD) 进行的精氨酸耗竭可用作胰岛素增敏剂,并可用于治疗以胰岛素抵抗、葡萄糖耐受不良和高血糖症为特征的前驱糖尿病和2型糖尿病以及与胰岛素抵抗相关的其它疾病。其也可用于治疗高瘦素血症和高胆固醇血症。

[0391] 实施例25:用N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO:50) 进行治疗逆转HFD诱导的脂肪变性

[0392] 喂食12周的HFD诱导了雄性小鼠的肝脂肪变性(图30和图31)。将HFD喂食延长12周后,肝脏进一步肿大,并且颜色变浅(图43A)。肝脏重量大于瘦型对照小鼠的两倍(图43B)。大量脂质积累已经扩展到整个肝脏(图44A),同时甘油三酯含量相应增加(图44B)。关键的成脂分化转录因子Pparg和Srebp1c的表达水平被下调至与瘦型对照小鼠相似的水平,而脂质生成酶Acc1的表达水平进一步降低,并且Scd1被显著抑制(图44C)。与喂食HFD达12周的小鼠相比(实施例20,图32),喂食HFD达24周的小鼠的血清丙氨酸氨基转移酶(ALT) 水平进一步升高,并且血清天冬氨酸氨基转移酶(AST) 水平也显著升高(图45),这表明肝损伤进一步发展。然而,在用N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO:50) 处理的DIO小鼠中,肝脏的尺寸明显缩小,达到重量与瘦型对照相似的程度(图43B)。此外,肝脏恢复为微红的颜色(图43A),其与脂滴的明显清除(图44A) 高度相关,同时甘油三酯浓度降低至与瘦型对照类似的水平(图44B)。值得注意的是,血浆ALT和AST浓度与瘦型对照相当,这表明用N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO:50) 进行处理可防止现有肝损伤的进一步发展,并修正现有肝损伤。总体来说,我们

的发现表明,N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO:50) 对逆转肝脂肪变性具有显著作用。

[0393] 除肝脏外,肥胖症还与脂质在肾脏(肾脂肪变性)、胰腺(胰腺脂肪变性)和心脏(心肌脂肪变性)中的过度积累相关,引起这些重要器官的脂毒性和功能障碍。实际上,在用媒介物处理的DIO小鼠中,肾脏(图46A)、胰腺(图47A)和心脏(图48A)的重量显著增加。组织学检查显示出与肾小管中的脂滴类似的液泡的积累(图46C)。用油红O对肾切片进行染色显示肾小球中脂质的异位积累(图46D)。胰腺中WAT碎片在小叶内和小叶间大量积累(图47B),并且在心肌纤维中发现了白色脂肪细胞岛(图48B)。肾脏(图46B)、胰腺(图47C)、心脏(图48C)中甘油三酯浓度显著增加。此外,在骨骼肌中也发现甘油三酯浓度显著升高(图49)。这些发现表明,媒介物处理的DIO小鼠的这些器官中出现了脂肪变性。然而,用N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO:50) 进行处理可以将DIO小鼠的肾脏(图46A)、胰腺(图47A)和心脏(图48A)的重量显著降低至与瘦型对照相似的水平。组织学检查证明,通过油红O染色鉴定的肾小管中的液泡(图46C)和肾脏肾小球中的脂质(图46D)显著减少。胰腺(图47B)和心脏(图48B)内的WAT显著降低。用N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO:50) 处理的DIO小鼠的肾脏(图46B)、胰腺(图47C)、心脏(图48C)和骨骼肌(图49)中的甘油三酯浓度恢复至与瘦型对照相似的水平。这些发现表明,N-ABD-rhArg (SEQ ID NO:50) 可有效逆转肾脏、胰腺和心脏以及可能的其它器官中的脂肪变性。

[0394] 总体来说,这些发现支持ABD-rhArg融合蛋白或其它形式的精氨酸酶(例如,rhArg-PEG、BCA-PEG或BCA-ABD)或精氨酸耗竭酶(例如,ADI-PEG、ADI-ABD、ADC-PEG或ADC-ABD)可用于治疗脂肪变性。

[0395] 实施例26:用N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO:50) 进行治疗减少HFD诱导的慢性炎症和纤维化

[0396] 如实施例21所示,喂食HFD诱导了慢性炎症。在用媒介物处理的DIO小鼠中,促炎性脂肪因子Mcp1在性腺周围WAT中的表达上调(图50A),同时血清Mcp1浓度显著升高(图50B)。另一方面,在用N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO:50) 处理的DIO小鼠中,性腺周围WAT中Mcp1的表达显著下调,且血清Mcp1浓度被修正至与瘦型对照小鼠相似的水平(图50B),这表明N-ABD094-rhArg处理可以减轻HFD诱导的WAT中的慢性炎症。

[0397] 在媒介物处理的DIO小鼠的肝脏中,几种促炎性基因(包括白介素1 α 和白介素1 β (I11 α 和I11 β))显著上调(图51A)。慢性炎症与纤维化相关。实际上,关键的促纤维化基因—转化生长因子 β (Tgfb)显著上调(图51B)。用N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO:50) 进行处理可显著下调这些促炎性基因,并显著上调几种抗炎性基因,包括白介素10 (I110)、白介素22 (I122)和干扰素 γ (Infg) (图51C)。促纤维化基因Tgfb的表达恢复至与瘦型对照小鼠类似的水平。与肝脏相似,在媒介物处理的DIO小鼠的肾脏中,几种促炎性基因(包括Mcp1、肿瘤坏死因子 α (Tnfa)和I11 β)显著上调(图52A)。促纤维化基因I型胶原 α 1链 (Col1a1)也显著上调,这与通过天狼星红染色鉴定的胶原纤维在肾脏中过度沉积的结果一致(图52C)。值得注意的是,用N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO:50) 处理DIO小鼠可将这些促炎性基因的表达下调至与瘦型对照相似的水平。促纤维化基因Col1a1被大大抑制,且胶原纤维量显著减少。类似地,在胰腺中,用N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO:50) 进行处理可显著下调促炎性基因(例如,Mcp1) (图52A)和关键的促纤维化基因Tgfb(图53B)。

[0398] 总的来说,这些发现表明,N-ABD094-rhArg处理可有效缓解肝脏、肾脏、胰腺以及

可能的其它器官中的慢性炎症和纤维化。

[0399] 脂肪肝(肝脂肪变性)在早期可能无症状。当肝脏发炎时它会发展为脂肪性肝炎,其会发展为纤维化并在更晚期进一步发展为肝硬化,这大大增加了发展为肝细胞癌的风险。我们的发现表明,N-ABD094-rhArg处理可以阻止肝脏疾病的发展,并逆转肝损伤。

[0400] 综上所述,这些结果支持通过ABD-rhArg融合蛋白或其它形式的精氨酸酶(例如,rhArg-PEG、BCA-PEG、BCA-ABD)或精氨酸耗竭酶(例如,ADI-PEG、ABD-ADI、ADC-PEG或ADC-ABD)进行的精氨酸耗竭可用于治疗慢性炎症和纤维化。

[0401] 实施例27:用N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO:50)进行治疗逆转褐色脂肪变白

[0402] 长期喂食HFD后,与瘦型对照小鼠相比,在媒介物处理的DIO小鼠中,肩胛间BAT的尺寸(图54A)和重量(图54B)进一步增加,这与存在大量肿大的白色样单泡细胞相关(图54C)。相反,用N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO:50)处理DIO小鼠可将肩胛间BAT显著恢复至与瘦型对照小鼠相似的尺寸和重量,同时几乎完全缓解了白色样单泡细胞。总体来说,这些发现证明N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO:50)在逆转褐色脂肪变白方面的巨大能力。

[0403] 总而言之,这些结果支持ABD-rhArg融合蛋白或其它形式的精氨酸酶(例如,rhArg-PEG、BCA-PEG或BCA-ABD)或精氨酸耗竭酶(例如,ADI-PEG、ADI-ABD、ADC-PEG或ADC-ABD)可用于通过逆转褐色脂肪变白来治疗肥胖症。

[0404] 实施例28:用N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO:50)进行治疗降低血压

[0405] 肥胖症与心血管疾病和高血压相关。使用CODA非侵入性血压系统(Kents Scientific Corporation)通过尾袖法,对以7天为间隔用600U N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO:50)处理5周的DIO小鼠进行血压测量。发现用N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO:50)处理的DIO小鼠的收缩压和舒张压(图55A)以及心率(图55B)明显低于用媒介物处理的DIO小鼠,并与瘦型对照小鼠高度相当。实施例25表明,N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO:50)可以有效逆转肾脂肪变性和心脏脂肪变性,这对降低血压具有有益作用。

[0406] 总而言之,这些发现支持ABD-rhArg融合蛋白或其它形式的精氨酸酶(例如,rhArg-PEG、BCA-PEG或BCA-ABD)或精氨酸耗竭酶(例如,ADI-PEG、ADI-ABD、ADC-PEG或ADC-ABD)可用于治疗高血压。

[0407] 实施例29:N-ABD0094-rhArg (SEQ ID NO:50)不诱导中和抗体,并且长时间使用仍然有效

[0408] 中和抗体的产生可影响药物的药效学、药代动力学、稳定性和疗效。为了确定免疫原性应答,以7天为间隔、持续8个月,向喂食LFD的8周龄C57BL/6J雄性小鼠腹膜内注射500U的N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO:50),或注射盐水(作为媒介物对照)。发现虽然存在针对N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO:50)的抗药抗体(图56A),但是这些抗体对精氨酸酶活性并没有中和作用(图56B),这与血浆精氨酸浓度水平在整个研究期间保持在Biochrom 30氨基酸分析仪的检测极限(3 μ M)之下的研究结果一致。

[0409] 为了评估长期使用的安全性,从用N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO:50)处理8个月的喂食LFD的小鼠中采集血清和尿素样品,用于分析ALT和AST(其通常用作肝损伤的生物标志物),并分析血清肌酐和尿白蛋白/肌酐比,用于评估肾功能。发现在所有这些参数中,用药物处理的喂食LFD的小鼠并没有显示出与用媒介物处理的喂食LFD的小鼠有任何显著差异(图57A和图57B)。此外,在使用微血管张力测定系统(wire myography)检查分离的动

脉的功能性反应和血管反应性时,用N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO:50) 处理的喂食LFD的小鼠与用媒介物处理的喂食LFD的小鼠之间,在苯肾上腺素(图58A)引起的血管平滑肌收缩、乙酰胆碱诱导的内皮依赖性血管舒张(图58B)和响应于一氧化氮供体硝普钠的非内皮依赖性血管舒张(图58C)方面并没有显著的差异。

[0410] 在一项单独的研究中(其中饮食诱导的肥胖C57BL/6J雄性小鼠在继续喂食HFD的同时用600U N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO:50) 处理20周),到第五周时,体重降低至与瘦型对照小鼠相似的水平,并且继续保持在该水平而没有出现反弹。对血浆精氨酸浓度的定期监测表明,精氨酸保持在Biochrom 30氨基酸分析仪的检测极限(3 μ M)以下的水平下。这些结果支持N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO:50) 在整个处理期间保持有效。总而言之,这些发现支持N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO:50) 对于长期使用是安全且有效的。

[0411] 实施例30:重组人精氨酸酶(rhArg)的PEG化方案

[0412] 使用亲和层析通过纯化得到重组人精氨酸酶(His-rhArg SEQ ID NO:101)。在PEG化之前,用20mM磷酸钠(pH 8.0)对纯化的His-rhArg (SEQ ID NO:101) 进行渗滤,并将蛋白浓度调整为2mg/mL。PEG化试剂在20mM磷酸钠(pH 8.0)中配制。使用摩尔比为20:1的PEG试剂与rhArg。将PEG试剂添加到His rhArg (SEQ ID NO:101) 中,然后在室温下温育4小时,同时进行搅拌。然后使用切向流过滤(TFF),用20mM磷酸钠(pH 7.4)将反应混合物进行渗滤。用亲和层法去除流穿中多余的PEG,并通过用0.5M咪唑洗脱蛋白来回收PEG化His-rhArg (SEQ ID NO:101)。用另一轮亲和层析分离任何未衍生化的His-rhArg (SEQ ID NO:101)。然后使用12%聚丙烯酰胺凝胶通过SDS-PAGE对反应混合物进行分析。凝胶用考马斯蓝(Coomassie blue)染色,以便进行分子量鉴定,或用0.1m碘溶液染色,以检测游离PEG。

[0413] 例如,在制备过程中,获得150mg的PEG化His-rhArg (SEQ ID NO:101),其比活性为245U/mg,浓度为7.5mg/mL。图11和表5示出了PEG-rhArg的制备及其分析的实例。

[0414] 表5.PEG化His-rhArg (SEQ ID NO:101)的制备及其分析

[0415]		体积 (mL)	浓度 (mg/mL)	总量 (mg)	比活性 (U/mg)
	PEG 化 His-rhArg, 批次 3	11	3.5	38.5	189
	PEG 化 His-rhArg, 批次 3	35	5.3	185.5	213

[0416] 实施例31:用PEG化His-rhArg[SEQ ID NO:101]进行治疗减轻肥胖症并改善胰岛素敏感性

[0417] 在实施例30中描述了PEG化His-rhArg (SEQ ID NO:101)的制备。向已存在饮食诱导的肥胖症(DIO)的C57BL/6J雄性小鼠腹膜内注射300U PEG化His-rhArg[SEQ ID NO:101],或注射盐水(作为媒介物对照),以7天为间隔、持续5周,同时继续喂食HFD。用PEG化His-rhArg (SEQ ID NO:101) 处理的小鼠的体重逐渐降低至30g,这与喂食普通饲料(Chow)的媒介物处理的瘦型对照小鼠类似(图59)。主要内脏储库(性腺周围、肾周和肠系膜WAT)和皮下储库(腹股沟WAT)处的脂肪垫重量显著降低,并且在研究结束时与瘦型对照小鼠相似(图60)。肝脏、肾脏、胰腺和心脏的重量显著低于用媒介物处理的DIO小鼠,并且与瘦型对照小鼠相当(图60)。对血浆精氨酸浓度的定期监测表明,精氨酸水平在整个研究过程中保持在Biochrom 30氨基酸分析仪的检测极限(3 μ M)以下。

[0418] 在用PEG化His-rhArg[SEQ ID NO:101]处理后两周,与用媒介物处理的DIO小鼠相

比,DIO小鼠已经显示出较低的空腹血糖水平(图61A)和胰岛素敏感性的显著提高(图61B)。

[0419] 总而言之,这些发现支持PEG化His-rhArg[SEQ ID NO:101]具有类似于N-ABD094-rhArg[SEQ ID NO:50]的抗肥胖作用和胰岛素增敏作用。通过PEG化His-rhArg(SEQ ID NO:101)进行的精氨酸剥夺对治疗肥胖症和与胰岛素抵抗相关的疾病具有治疗作用。

[0420] 实施例32:金属离子取代

[0421] 野生型精氨酸酶通常包含 Mn^{2+} 金属离子(D'Antonio&Christianson,2011,Biochemistry,50:8018-27)。发现金属离子取代是一种制备更有效形式的ABD094-rhArg(低 K_m 值和高 k_{cat}/K_m 值)的方法。在20mM Tris-HCl缓冲液(pH 7.4)中,将纯化的N-ABD094-rhArg(SEQ ID NO:50)与20mM的不同二价金属离子(Mn^{2+} 、 Ni^{2+} 或 Co^{2+})混合,并在52至55℃温育15至60分钟,然后用PBS缓冲液(pH 7.4)交换缓冲液。

[0422] 对样品进行酶活性和酶动力学研究,以确定比活性和催化效率(k_{cat}/K_m)。将样品应用于电感耦合等离子体-原子发射光谱法(ICP-OES,Agilent 700系列ICP光发射光谱仪),以对金属含量进行定量分析。

[0423] 将每种蛋白样品(100至200 μ L)添加到10mL的1%w/v HNO_3 中,然后选择不同的元素和波长进行ICP-OES分析。通过将金属浓度除以蛋白浓度来确定金属与蛋白的比率。按照制造商的说明,使用PierceTM BCA蛋白测定(Thermo Fisher Scientific)来评估蛋白浓度。

[0424] 向N-ABD094-rhArg(SEQ ID NO:50)中加入 Co^{2+} 或 Ni^{2+} 金属离子,很好地实现了 Mn^{2+} 的去除和 Co^{2+} 或 Ni^{2+} 的掺入。

[0425] 已发现钴取代酶(N-ABD094-rhArg- Co^{2+})显示出小得多的 K_m (0.27-0.35mM),较高的 k_{cat} (250-316s⁻¹),以及较高的催化效率 k_{cat}/K_m (905-917s⁻¹mM⁻¹)。对于原始酶(N-ABD094-rhArg- Mn^{2+}),它的 K_m 为1.37-1.89mM, k_{cat} 为82-98s⁻¹,且 k_{cat}/K_m 为44-72s⁻¹mM⁻¹。金属取代法成功地用 Co^{2+} 替代了 Mn^{2+} ,导致饱和 Co^{2+} 与蛋白的比率为约2-4:1。数据表明,本文所述的N-ABD094-rhArg(SEQ ID NO:50)或其它融合蛋白的更有效形式可以通过用其它二价金属离子(例如, Ni^{2+} 或 Co^{2+})取代来制备。

[0426] 实施例33:用N-ABD094-rhArg- Co^{2+} [SEQ ID NO:50(钴取代)]进行治疗减轻肥胖症

[0427] 实施例32中描述了N-ABD094-rhArg- Co^{2+} [SEQ ID NO:50(钴取代)]的制备。向已存在饮食诱导的肥胖症(DIO)的C57BL/6J雄性小鼠腹膜内注射25-100U N-ABD094-rhArg- Co^{2+} [SEQ ID NO:50(钴取代)],持续5周,同时继续喂食HFD。在处理5周内,小鼠的体重从55g逐渐降低至30g(图62),与600-700U N-ABD094-rhArg的作用(图37)类似。这一结果支持用 Co^{2+} 取代 Mn^{2+} 明显提高了ABD-rhArg融合蛋白在降低体重方面的作用。

[0428] 实施例34:哺乳动物细胞培养与增殖测定

[0429] 将癌细胞系(例如,MKN45、AGS、BGC823、HCT-15和HCT-116)按照标准方案保持在含有10%FBS和100单位/毫升青霉素/链霉素的RPMI培养基中。

[0430] 对于细胞增殖测定,将体积为100 μ L的生长培养基中的癌细胞(5×10^3)接种到96孔板的每个孔中,并温育24小时。通过以下补充所述培养基:补充有不同浓度精氨酸的不含精氨酸的培养基(AFM)、含各种浓度的不同精氨酸耗竭酶的新鲜培养基、以及使用这些酶联合瓜氨酸。将板在含有95%空气和5%CO₂的湿润气氛的培养箱中于37℃再温育1至3天。

[0431] 如其它地方广泛描述的,采用MTT(3-[4,5-二甲基噻唑-2-基]-2,5-二苯基四唑溴化物)测定进行定量细胞增殖测定。在培养物中杀死50%细胞所需的精氨酸耗竭酶的量被

定义为IC₅₀。

[0432] 实施例35:通过各种精氨酸耗竭酶 (ADI、BCA和ADC) 抑制多种人类癌细胞系的增殖

[0433] 在对比研究中测定了精氨酸脱亚氨酶 (ADI)、细菌精氨酸酶 (BCA) 和精氨酸脱羧酶 (ADC) 在五种肿瘤细胞系 (A375、HeLa、BxPC-3、PANC-1和HCT116) 中的细胞毒性。

[0434] 由于ADI和BCA催化的反应都是尿素循环步骤,所以ADI和BCA的抗肿瘤作用均与细胞ASS水平相关。相反,ASS的存在对ADC的抗肿瘤作用的影响相对较小,因为ADC的催化产物都不是尿素循环的中间产物。我们的结果表明,ADI、BCA和ADC在所研究的细胞系中均发挥抑制作用。ADI对A375、HCT116、BxPC-3、PANC-1有效,但对HeLa细胞无效,而BCA和ADC对所测试的所有这五个癌细胞系均有效(表6)。ADC是最低效的精氨酸耗竭酶,但就疗效而言优于ADI和BCA,尤其是对ASS阳性癌细胞而言(表6)。

[0435] 肿瘤细胞对ADI的敏感性显示出与细胞ASS水平具有明显的关系(表6)。综上所述,与ADI相比,ADC和BCA可以以不依赖ASS的方式抑制人类癌细胞系的增殖。

[0436] 表6. ADI、BCA和ADC对五种人类癌细胞系的IC₅₀和最大细胞毒性。在MTT分析之前将细胞处理72小时。数据是以三个重复进行的三次实验的平均值。IC₅₀值定义为实现对细胞生存力的50%抑制所需的酶的量。最大细胞毒性表示为每种酶所实现的非存活细胞的最大百分比。ADI抗性细胞定义为在最大剂量的测试ADI下存活超过50%的细胞。

[0437] 表6.

[0438]

癌症类型	细胞系	ASS 蛋白水平	IC ₅₀ (μg/mL)			最大细胞毒性 (%)		
			ADI	BCA	ADC	ADI	BCA	ADC
黑素瘤	A375	不可检测, 不可诱导	0.03	0.12	5.61	93.92	86.92	84.76
结直肠癌	HCT116	低	0.10	0.22	12.23	72.18	81.05	84.35
胰腺癌	BxPC-3	中等	0.09	0.44	16.85	57.53	84.82	93.16

[0439]

	PANC-1	低/中等, 可诱导	0.04	1.81	4.65	55.68	63.01	82.98
子宫颈癌	HeLa	低/高, 可诱导	抵抗	1.25	3.82	<50	61.14	86.49

[0440] 实施例36: BHA (SEQ ID NO:75) 对胃癌细胞的细胞毒性

[0441] 通过将MKN45胃癌细胞系与不同浓度的BHA (SEQ ID NO:75) 温育72小时并借助于MTT测定确定MKN45的生存力,测试白蛋白结合精氨酸酶BHA (SEQ ID NO:75) 的体外功效。如图63所示,BHA (SEQ ID NO:75) 以剂量依赖的方式抑制MKN45癌细胞的生长。这进一步证实了精氨酸耗竭融合蛋白在培养条件(其中,培养基补充有胎牛血清(FBS),并包括白蛋白及其它不同蛋白)下的细胞毒性。

[0442] 实施例37:通过膜联蛋白V-FITC和PI双重染色评估细胞凋亡

[0443] 为了评估BCA精氨酸酶 (SEQ ID NO:71) 对细胞凋亡的诱导,在不同处理条件前的一天将3×10⁵个细胞接种在6孔板中。移除培养基并加入补充有不同浓度的BCA (SEQ ID NO:71) 的完全培养基。暴露于BCA24小时、48小时和72小时后,收集漂浮细胞和粘附细胞。简而言之,通过在室温下以100x g离心3分钟来收集培养基中的漂浮细胞,同时用PBS洗涤粘附细胞并通过与0.25%胰蛋白酶溶液在37℃温育3分钟而将其提起。加入完全培养基后,通过离心收集细胞。用PBS洗涤细胞,并重悬于含有碘化丙啶(PI)和膜联蛋白V-FITC的0.1mL

结合缓冲液 (0.01M HEPES, pH 7.4; 0.14M NaCl; 2.5mM CaCl_2) 中。在室温下黑暗中将细胞染色15分钟,并向每个试管中加入0.4mL结合缓冲液,然后使用FACS Aria (BD biosciences) 进行流式细胞术分析。将流式细胞仪设置为从每个样品的10000个细胞中获取数据,并通过FACS Aria软件对所述数据进行分析。

[0444] 根据流式细胞仪的结果,在BCA (SEQ ID NO:71) 处理 (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ BCA) 后,在HCT116人结肠癌细胞中以时间依赖性的方式诱导细胞凋亡。在BCA处理后24、48和72小时,分别有约16%、21%和25%的HCT116癌细胞发生细胞凋亡。

[0445] 实施例38:细胞生存力测定及联合用药效果

[0446] 在这些研究中使用了乳腺癌细胞系 (例如,人MCF-7和MDA-MB-231细胞)。将癌细胞 (5×10^3 个细胞) 接种到具有100 μL 完全培养基的96孔板 (TPP) 中。使板在培养箱中温育过夜,并允许细胞粘附于板上。然后将His-rhArg精氨酸酶 (SEQ ID NO:101) (2U/mL至0.0032U/mL) 和自噬抑制剂氯喹 (CQ, 100 μM 至0.16 μM) 添加至96孔板中。对于药物联合组,将His-rhArg (SEQ ID NO:101) (2U/mL至0.0032U/mL) 与20 μM CQ (非恒定比率法) 一起加入孔中。将每种剂量在3个孔中重复三次,以获得细胞生存力的平均变化。温育68小时后,添加10 μL 的5mg/mL MTT [3-[4,5-二甲基噻唑-2-基]-2,5-二苯基四唑溴化物] 溶液。将板放回培养箱中,再温育4小时。为了溶解由MTT形成的不溶性化合物甲臜,加入100 μL 的10% SDS在0.01M HCl中的溶液。将板在37 $^{\circ}\text{C}$ 温育过夜。通过分光光度计在570nm处测量颜色变化。对照组 (不含任何药物) 用作计算细胞生存力百分比的基准,而所述百分比用来通过Prism 6.0 (GraphPad) 软件绘制剂量反应曲线,以求出 IC_{50} 值。可以通过联合指数 (CI) 计算His-rhArg (SEQ ID NO:101) 与CQ之间的相互作用或联合效应。使用CalcuSyn软件 (Biosoft) 来计算CI值。

[0447] MCF-7癌细胞对精氨酸酶处理72小时所引起的精氨酸缺乏敏感 (表7)。CQ还显示其对MCF-7的细胞毒性作用 (表8)。对于药物联合组,His-rhArg (SEQ ID NO:101) 和CQ之间具有协同作用 ($\text{CI} < 1$) (表9)。表10示出了His-rhArg (SEQ ID NO:101)、CQ以及rhArg+CQ对于MCF-7癌细胞的 IC_{50} 。

[0448] 表7. 用His-rhArg (SEQ ID NO:101) 处理后MCF-7癌细胞的细胞生存力百分比

[0449]

His-rhArg浓度 (U/mL)	细胞生存力% 平均值 (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%

[0450] 表8. 用CQ处理后MCF-7癌细胞的细胞生存力百分比

[0451]

CQ 浓度(μ M)	细胞生存力%平均值 (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%

[0452]

0	100.00%	0.87%
---	---------	-------

[0453] 表9.His-rhArg (SEQ ID NO:101) 与CQ的组合对MCF-7细胞的联合指数 (CI) 和细胞生存力百分比

His-rhArg 浓度 (U/mL)	CQ 浓度 (μ M)	细胞生存力%平均值(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%	

[0454] 表10.His-rhArg (SEQ ID NO:101) 、CQ以及His-rhArg (SEQ ID NO:101) 与CQ的组合针对MCF-7癌细胞的 IC_{50}

[0455]

MCF-7	IC_{50}	SEM
His-rhArg	0.7869U/mL	0.0760U/mL
CQ	67.16 μ M	10.72 μ M
His-rhArg+CQ	0.07617U/mL	0.00576U/mL

[0456] 实验数据表明,MDA-MB-231乳腺癌细胞对His-rhArg (SEQ ID NO:101) 和CQ造成的精氨酸缺乏敏感(表11和表12)。His-rhArg (SEQ ID NO:101) 和CQ的组合也显示出对MDA-MB-231细胞的协同细胞毒性。CI值小于1(表13)。表14示出了His-rhArg (SEQ ID NO:101)、CQ以及His-rhArg (SEQ ID NO:101)+CQ对MDA-MB-231乳腺癌细胞的 IC_{50} 。

[0457] 表11.His-rhArg (SEQ ID NO:101) 针对MDA-MB-231细胞的细胞生存力百分比

[0458]

His-rhArg浓度 (U/mL)	细胞生存力%平均值 (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%

[0459] 表12. 与CQ温育72小时后MDA-MB-231细胞的细胞生存力百分比

	CQ 浓度(μ M)	细胞生存力%平均值 (n = 3)	SEM
[0460]	100	43.17%	0.97%
	20	75.18%	1.50%
	4	82.16%	0.49%
	0.8	98.14%	1.38%
[0461]	0.16	99.03%	1.67%
	0	100.00%	3.53%

[0462] 表13.His-rhArg (SEQ ID NO:101) 与CQ的组合针对MDA-MB-231乳腺癌细胞的联合指数(CI)和细胞生存力百分比

	His-rhArg 浓度 (U/mL)	CQ 浓度 (μ M)	细胞生存力%平均值(n = 3)	SEM	CI
[0463]	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%	

[0464] 表14.His-rhArg (SEQ ID NO:101)、CQ以及His-rhArg (SEQ ID NO:101) 与CQ的组合针对MDA-MB-231细胞的IC₅₀

[0465]	MDA-MB-231	IC ₅₀	SEM
	His-rhArg	0.9522U/mL	0.1299U/mL
	CQ	73.39 μ M	5.36 μ M
	His-rhArg+CQ	0.1408U/mL	0.0274U/mL

[0466] 我们还测试了His-rhArg (SEQ ID NO:101) (0.016、0.08或0.4U/mL) 和CQ (20 μ M) 对人肝癌细胞系“Red Flu HepG2”的药物联合。也观察到了协同效应(CI值小于1)。

[0467] 实施例39:跨孔迁移试验和侵入试验

[0468] 在这些研究中使用了乳腺癌细胞系(人MDA-MB-231细胞和小鼠4T1细胞)。迁移试验和侵入试验均在24孔Costar (Corning) 跨孔系统(聚碳酸酯膜嵌件(insert), 孔径为8.0 μ m) 中进行。在进行试验之前,将细胞在适当的无血清培养基中培养至少24小时。在将细胞接种到上腔室的前一天,将100 μ L稀释基质胶添加到嵌件的上腔室中以进行侵入试验。将无血清培养基(100 μ L) 添加到用于进行迁移试验的上腔室中。将24孔板在培养箱中温育过夜。第二天,用胰蛋白酶处理细胞并进行计数。在所述研究中,将3x10⁴个4T1细胞或5x 10⁴个MDA-MB-231细胞连同200 μ L适当的无血清培养基接种到上腔室中。将合适的完全培养基(750 μ L) 添加到下腔室中。对于药物处理组,将1U/mL His-rhArg (SEQ ID NO:101) 添加到两个腔室中。将24孔板在含有5%CO₂的37℃的湿润气氛中与温育20小时(4T1细胞) 或24小时(MDA-MB-231细胞)。

[0469] 温育后,除去上腔室中的培养基。将跨孔嵌件用1x PBS洗涤两次。将冷的100%甲

醇添加到上腔室和下腔室中10分钟,以固定细胞。将嵌件用1x PBS洗涤两次。之后,将1x PBS中的1%结晶紫添加到两个腔室中15分钟,以使细胞染色。将嵌件用1x PBS洗涤两次。再用棉签除去上腔室表面上的细胞。将嵌件风干过夜。通过共焦显微镜拍摄照片。结果显示,当用1U/mL His-rhArg (SEQ ID NO:101) 处理细胞时,可以通过跨孔嵌件而迁移和侵入的癌细胞的数量减少,这表明精氨酸酶引起的精氨酸耗竭可以抑制癌细胞的迁移和侵入。

[0470] 实施例40:N-ABD-rhArg (SEQ ID NO:49) 在体内抑制侵袭性乳腺癌细胞的生长和转移

[0471] 对于侵袭性4T1乳腺癌细胞异种移植模型研究,使用了10只雌性裸鼠(11至12周龄)。将它们每笼五只分组饲养,并任意提供食物和水。通过胰蛋白酶处理收获4T1癌细胞,将其用1X PBS洗涤两次,并重悬于1X PBS中,用于接种。将癌细胞(1x 10⁶个4T1细胞)皮下注射到小鼠的左侧腹。接种3天后,当肿瘤的平均长度为6mm时,将小鼠随机分为两组。每周给它们注射一次500U (3.2mg,230μL) N-ABD-rhArg (SEQ ID NO:49) 或1X PBS。从隐静脉采集血液样品。定期监测小鼠的肿瘤尺寸和重量。

[0472] 通过以下方程式估算肿瘤体积:

[0473] 肿瘤体积 (mm³) = $\frac{\text{长度} \times \text{宽度}^2}{2}$

[0474] 由于注射了PBS的对照组中肿瘤坏死,所以在癌细胞接种16天后(即,实验开始后13天),处死小鼠。处死后,从小鼠中收集肿瘤并测量肿瘤的重量。还收集了肺,并用1X PBS洗涤。将肺固定在Bouin溶液中过夜,并在固定后用1X PBS洗涤。计数肺转移结节的数量。

[0475] 重要的是,500U的白蛋白结合精氨酸酶N-ABD-rhArg (SEQ ID NO:49) 将BALB/c小鼠体中的精氨酸耗竭至低于Biochrom 30氨基酸分析仪的检测极限(3μM)的水平,持续至少10天(图10)。因此,每周一次通过腹膜内注射向4T1乳腺癌异种移植裸鼠施用500U N-ABD-rhArg (SEQ ID NO:49),以进行功效研究。表15显示,在实验期间500U N-ABD-rhArg (SEQ ID NO:49) 将精氨酸耗竭至无法检测的水平。

[0476] 表15.N-ABD-rhArg (SEQ ID NO:49) 处理组小鼠(小鼠1至4)的血清精氨酸水平。所述水平使用Biochrom 30氨基酸分析仪进行测量。BDL:低于检测水平;第0天:处理前

[0477]

	第0天	第6天	第13天
	精氨酸浓度 (μM)	精氨酸浓度 (μM)	精氨酸浓度 (μM)
1	132.5	0 (BDL)	0 (BDL)
2	117.0	0 (BDL)	0 (BDL)
3	130.5	0 (BDL)	0 (BDL)
4	122.5	0 (BDL)	0 (BDL)

[0478] 图64至图67显示,500U N-ABD-rhArg (SEQ ID NO:49) 可抑制裸鼠中4T1乳腺癌异种移植物的生长。在实验开始后的第12天和第13天,对照组和实验组之间的估计肿瘤体积存在显著差异(图64和图65)。两组之间的肿瘤尺寸也存在显著的差异(图66和图67)。

[0479] 这些结果表明,通过利用每周一次注射的500U N-ABD-rhArg (SEQ ID NO:49) 进行精氨酸耗竭可显著抑制裸鼠中4T1侵袭性乳腺癌异种移植物的生长。体内研究表明,N-ABD-rhArg (SEQ ID NO:49) 可以以安全有效的方式抑制裸鼠内癌症的生长。

[0480] 此外,我们发现,精氨酸缺乏可抑制4T1乳腺癌细胞转移,这与我们的体外实验结

果一致。在处死小鼠后,收集处理组小鼠的肺,并仔细检查转移的迹象。在对照组的3个不同的肺中发现了3个肺转移结节;而在N-ABD-rhArg (SEQ ID NO:49) 处理组中没有发现转移结节(表16)。所述结果有力地证明,N-ABD-rhArg (SEQ ID NO:49) 引起的精氨酸缺乏可以抑制肿瘤转移。这表明,精氨酸可能在细胞迁移和肿瘤转移中起着重要作用。N-ABD-rhArg (SEQ ID NO:49) 引起的精氨酸耗竭可以抑制一些对癌细胞转移较为重要的途径(Knott等人, 2018,Nature,554:378-381)。

[0481] 表16. 动物研究中转移结节的数量

组	肺中发现的转移结节数量	无转移动物%
PBS对照组 (n=6)	3	50%
500U N-ABD-rhArg处理组 (n=4)	0	100%

[0483] 实施例41:ABD094-rhArg (SEQ ID NO:50) 融合酶对人结肠癌细胞系的细胞毒性

[0484] 针对人结肠癌细胞系测试了ABD和rhArg融合蛋白的体外功效。将人结肠癌细胞系(HCT116、LOVO和HT29)以 5×10^3 细胞/孔的密度接种在96孔板中。温育1天后,用含有不同浓度(2、0.4、0.08、0.016和0.0032U/ml) N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO:50) 的培养基替换原培养基。在第3天[N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO:50) 处理后3天]进行MTT试验,以确定 IC_{50} 值。用MTT溶液(1mg/ml) (Invitrogen) 替换培养基,并在37℃温育4小时。温育后,用二甲基亚砜(DMSO) 替换MTT溶液,并以650nm为参考测量570nm处的吸光度。通过将N-ABD094-rhArg处理的细胞的吸光度除以未处理细胞的平均吸光度来确定细胞生存力。通过软件Prism 6.0分析N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO:50) 对于癌细胞系的 IC_{50} 值(95%置信区间)。对每个细胞系都进行了三组独立的实验(n=3)。结果示于表17中。

[0485] 表17. 使用N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO:50) 进行的单一药物实验; 药物=N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO:50); 细胞系=HCT116

药物浓度 (U/mL)	0	0.0032	0.016	0.08	0.4	2
平均细胞生存力 (%)	1	0.938	0.950	0.608	0.452	0.419
SEM	0	0.042	0.116	0.086	0.051	0.046

[0487] 细胞系=LOVO

药物浓度(U/mL)	0	0.0032	0.016	0.08	0.4	2
平均细胞生存力 (%)	1	0.922	0.848	0.566	0.432	0.392

SEM	0	0.048	0.037	0.075	0.040	0.038
-----	---	-------	-------	-------	-------	-------

[0490] 细胞系=HT29

药物浓度 (U/mL)	0	0.0032	0.016	0.08	0.4	2
平均细胞生存力 (%)	1	0.962	0.853	0.521	0.423	0.383
SEM	0	0.070	0.084	0.016	0.009	0.029

[0492] 所测试的所有结肠癌细胞系在体外对N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO:50) 融合酶都非常敏感,其 IC_{50} 值在0.22至0.58U/ml之间。HCT116是最敏感的肿瘤, IC_{50} 为0.22U/ml。LOVO

和HT29的 IC_{50} 值分别为0.38U/ml和0.58U/ml。

[0493] 实施例42:N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO:50) 与氯喹的组合对人结肠癌细胞系产生协同细胞毒性作用

[0494] 自噬抑制剂氯喹 (CQ) 的 IC_{50} 值按照如下方法进行测定:分别接种结肠癌细胞HCT116、LOVO和HT29,温育1天后,用含有不同浓度CQ (100、20、4、0.8、0.16 μ M) 的培养基替换原培养基。在第3天进行MTT试验。对每种细胞系都进行三组独立的实验 (n=3)。结果示于表18中。

[0495] 表18.使用CQ进行的单一药物实验;药物=氯喹 (CQ);细胞系=HCT116

[0496]	药物浓度 (U/mL)	0	0.16	0.8	4	20	100
	平均细胞生存力 (%)	1	0.981	0.967	0.921	0.897	0.874
	SEM	0	0.032	0.037	0.059	0.033	0.027

[0497] 细胞系=LOVO

[0498]	药物浓度 (U/mL)	0	0.16	0.8	4	20	100
	平均细胞生存力 (%)	1	0.973	0.921	0.759	0.495	0.060
	SEM	0	0.029	0.017	0.027	0.018	0.002

[0499] 细胞系=HT29

[0500]	药物浓度 (U/mL)	0	0.16	0.8	4	20	100
	平均细胞生存力 (%)	1	1.057	1.009	0.983	1.018	0.037
	SEM	0	0.079	0.071	0.083	0.073	0.006

[0501] CQ针对HCT116、LOVO和HT29的 IC_{50} 值分别为>100 μ M、15 μ M和71 μ M。对于药物联合试验,进行了非恒定比率分析 (Hastak等人,2010,Cancer Res.70 (20):7970-7980)。接种结肠癌细胞,温育1天后,将原培养基替换为含有不同浓度的N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO:50) (2、0.4、0.08、0.016、0.0032U/ml) 与固定量 (根据其 IC_{50}) 的CQ的培养基。在第3天进行MTT试验。通过软件CalcuSyn 2.1版分析N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO:50) 与CQ联合处理的联合指数 (CI)。对每个细胞系都进行三组独立的实验 (n=3)。结果示于表19中。

[0502] 表19.联合药物实验 (药物1+药物2);药物1=N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO:50);药物2=氯喹 (CQ) (浓度固定为20 μ M);细胞系=HCT116

[0503]	药物1浓度 (U/mL)	0	0.0032	0.016	0.08	0.4	2
	平均细胞生存力 (%)	1	0.951	0.885	0.476	0.273	0.231
	SEM	0	0.024	0.027	0.008	0.008	0.006

[0504] 细胞系=LOVO

[0505]	药物1浓度 (U/mL)	0	0.0032	0.016	0.08	0.4	2
	平均细胞生存力 (%)	1	0.555	0.542	0.211	0.186	0.177
	SEM	0	0.008	0.008	0.002	0.010	0.005

[0506] 细胞系=HT29

[0507]	药物1浓度 (U/mL)	0	0.0032	0.016	0.08	0.4	2
	平均细胞生存力 (%)	1	0.979	0.983	0.480	0.369	0.367
	SEM	0	0.035	0.054	0.036	0.027	0.023

[0508] 结果表明,当在所有这3种结肠癌细胞系中将0.08或0.4U/ml的N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO:50)与20 μ M的CQ组合时,CI值都<1.0。这表明,单独的N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO:50)具有活性,而与CQ联合的情况下具有协同作用。总而言之,自噬抑制剂氯喹(CQ)增强了N-ABD094-rhArg (SEQ ID NO:50)融合蛋白在人结肠癌细胞中的细胞死亡诱导作用。

[0509] 实施例43:N-ABD-rhArg (SEQ ID NO:49)和PEG化His-rhArg (SEQ ID NO:101)在体内抑制侵袭性乳腺癌细胞的生长和转移

[0510] 在另一项4T1乳腺癌同种异体移植研究中,使用了雌性裸鼠(5至6周龄)。将它们每笼五只分组饲养,并任意提供食物和水。将4T1乳腺癌细胞(1×10^5)经皮下注射到小鼠的右侧腹。当接种11天后肿瘤的平均长度为8mm时,将小鼠随机分为四组。有一个对照组($n=8$)和三个实验组,包括500U PEG化His-rhArg (SEQ ID NO:101) ($n=8$)、500U N-ABD-rhArg (SEQ ID NO:49) ($n=6$)以及250U N-ABD-rhArg (SEQ ID NO:49) ($n=8$)。对照组的小鼠每周注射一次1X PBS。对于500U ABD-rhArg组和250U ABD-rhArg组,每周一次分别给小鼠注射500U和250U ABD-rhArg;一个组每周注射一次500U PEG-rhArg。由于PBS对照组肿瘤坏死,所以在接种24天后(即,实验开始后14天)处死小鼠。处死后,解剖小鼠。从小鼠中收集肿瘤并测量其重量。还收集肺并用1X PBS洗涤。将肺固定在Bouin溶液中过夜,并在固定后用1X PBS洗涤。计数肺转移结节的数量。

[0511] 对于结果,图68示出了500U的ABD-rhArg和500U的PEG-rhArg均显著抑制侵袭性4T1实体瘤的生长。然而,较低剂量的250U ABD-rhArg并不能抑制肿瘤的生长。这一结果也与不同组中肿瘤重量的变化相符(图69)。因此,ABD-rhArg以剂量依赖性方式抑制肿瘤的生长。重要的是,数据清楚地表明,精氨酸缺乏(通过ABD-rhArg或通过PEG-rhArg引起)抑制或减少了肿瘤向肺的转移(图70A和图70B)。与对照组相比,500U PEG-rhArg组和500U ABD-rhArg组中肺的转移结节均显著减少。苏木精和曙红(H&E)染色的肺组织切片显示,结节是由一系列致密的乳腺癌细胞形成的。该结果表明,结节为转移性病灶。综上所述,长效精氨酸酶引起的精氨酸耗竭抑制了小鼠模型中侵袭性癌细胞的转移。由于癌症转移是患者死亡的主要原因(Knott等人,2018,Nature,554:378-381),因此,这一发现可能为更有效的癌症治疗开辟了新的可能性。

序列表

<110> 香港理工大学

香港中文大学

<120> 用于癌症、肥胖症、代谢紊乱和相关并发症及合并症的精氨酸耗竭剂的组合物
和应用

<130> P10866PCT00

<150> US 62/678,300

<151> 2018-05-31

<160> 106

<170> PatentIn版本3.5

<210> 1

<211> 50

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> ABD引物1,在实验室中合成

<400> 1

ggagatggac atatgcatca tcaccatcac catgatgaag ccgtggatgc 50

<210> 2

<211> 50

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> ABD引物2,在实验室中合成

<400> 2

gctaagactt tagcttcagc taaggaattc gcatccacgg cttcatcatg 50

<210> 3

<211> 50

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> ABD引物3,在实验室中合成

<400> 3

ccttagctga agctaaagtc ttagctaaca gagaacttga caaatatgga 50

<210> 4

<211> 50

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> ABD引物4,在实验室中合成

<400> 4

taggttcttg taatagtcac ttactccata tttgtcaagt tctctgtag 50

<210> 5

<211> 50

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> ABD引物5,在实验室中合成

<400> 5

ggagtaagtg actattacaa gaacctaate aacaatgcca aaactgttga 50

<210> 6

<211> 50

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> ABD引物6,在实验室中合成

<400> 6

aaatttcac tatcagtgc tttacacctt caacagtttt ggcattgttg 50

<210> 7

<211> 50

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> ABD引物7,在实验室中合成

<400> 7

gtaaaagcac tgatagatga aatttttagct gcattacctt cgggtagtaa 50

<210> 8

<211> 50

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> ABD引物8,在实验室中合成

<400> 8

tccgccgcta ccattgttat tattgttggtt actaccgaa ggtaatgcag 50

<210> 9

<211> 47

<212> DNA

<213> 人工序列
<220>
<223> ABD引物9,在实验室中合成
<400> 9
gatcttaagc atatgcatca tcaccatcac catgatgaag cgggtgga 47
<210> 10
<211> 47
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> ABD引物10,在实验室中合成
<400> 10
gctttctttcg cttccgccag gctgttcgca tccaccgctt catcatg 47
<210> 11
<211> 50
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> ABD引物11,在实验室中合成
<400> 11
gcggaagcga aagaagcggc gaacgcggaa ctggatagct atggcgtgag 50
<210> 12
<211> 50
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> ABD引物12,在实验室中合成
<400> 12
ttatcaatca ggcgtttata aaaatcgctc acgccatagc tatccagttc 50
<210> 13
<211> 50
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> ABD引物13,在实验室中合成
<400> 13
gattttttata aacgcctgat tgataaagcg aaaaccgtgg aaggcgtgga 50
<210> 14
<211> 51

<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> ABD引物14,在实验室中合成
<400> 14
cggcagcgcg gccagaatcg catctttcag cgcttccacg ctttccacgg t 51
<210> 15
<211> 50
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> ABD引物15,在实验室中合成
<400> 15
ttctggcggc gctgccgtcg ggtagtaaca acaataataa caatggtagc 50
<210> 16
<211> 39
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> ABD引物16,在实验室中合成
<400> 16
ggatccgccg ctaccattgt tattattggt gttactacc 39
<210> 17
<211> 50
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> ABD引物17,在实验室中合成
<400> 17
catatgttag ctgatggatc cagtaacaac aataataaca atggtagcgg 50
<210> 18
<211> 50
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> ABD引物18,在实验室中合成
<400> 18
aattgcgcatc cacggcttca tcaccgccgc taccattggt attattgttg 50
<210> 19

<211> 50
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> ABD引物19,在实验室中合成
<400> 19
gaagccgtgg atgcgaattc cttagctgaa gctaaagtct tagctaacag 50
<210> 20
<211> 50
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> ABD引物20,在实验室中合成
<400> 20
cttactccat atttgtcaag ttctctgtta gctaagactt tagcttcagc 50
<210> 21
<211> 50
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> ABD引物21,在实验室中合成
<400> 21
gagaacttga caaatatgga gtaagtgact attacaagaa cctaatacaac 50
<210> 22
<211> 50
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> ABD引物22, 在实验室中合成
<400> 22
tacaccttca acagttttgg cattgttgat taggttcttg taatagtcac 50
<210> 23
<211> 50
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> ABD引物23,在实验室中合成
<400> 23
gccaaaactg ttgaagggtg aaaagcactg atagatgaaa ttttagctgc 50

<210> 24
<211> 50
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> ABD引物24,在实验室中合成
<400> 24
atgggtgatgg tgatgatgag gtaatgcagc taaaatttca tctatcagtg 50
<210> 25
<211> 50
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> ABD引物25,在实验室中合成
<400> 25
catatgttat gcgatggatc cagtaacaac aataataaca atggtagcgg 50
<210> 26
<211> 50
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> ABD引物26,在实验室中合成
<400> 26
tgttcgcatc caccgcttca tcaccgccgc taccattgtt attattgttg 50
<210> 27
<211> 50
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> ABD引物27,在实验室中合成
<400> 27
gaagcggtag atgcgaacag cctggcggaa gcgaaagaag cggcgaacgc 50
<210> 28
<211> 50
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> ABD引物28,在实验室中合成
<400> 28

aaaatcgctc acgccatagc tatccagttc cgcgttcgcc gtttctttcg 50
<210> 29
<211> 50
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> ABD引物29,在实验室中合成
<400> 29
ctatggcgtg agcgattttt ataaacgcct gattgataaa gcgaaaaccg 50
<210> 30
<211> 50
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> ABD引物30,在实验室中合成
<400> 30
tcgcatcttt cagcgcttcc acgccttcca cggttttcgc tttatcaatc 50
<210> 31
<211> 50
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> ABD引物31,在实验室中合成
<400> 31
gaagcgctga aagatgcgat tctggcggcg ctgccgcac atcaccatca 50
<210> 32
<211> 35
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> ABD引物32,在实验室中合成
<400> 32
ctaaaagctt aatggtgatg gtgatgatgc ggcag 35
<210> 33
<211> 222
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> His-ABD-接头,在实验室中合成

<400> 33

atgcatcatc accatcacca tgatgaagcc gtggatgcga attccttagc tgaagctaaa 60
gtcttagcta acagagaact tgacaaatat ggagtaagtg actattacaa gaacctaatc 120
aacaatgcca aaactgttga aggtgtaaaa gcactgatag atgaaatfff agctgcatta 180
ccttcgggta gtaacaacaa taataacaat ggtagcggcg ga 222

<210> 34

<211> 222

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> His-ABD094-接头,在实验室中合成

<400> 34

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

<210> 35

<211> 222

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 接头-ABD-His,在实验室中合成

<400> 35

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

<210> 36

<211> 222

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 接头-ABD094-His,在实验室中合成

<400> 36

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

<210> 37

<211> 1191

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> N-ABD-rhArg基因,在实验室中合成

<400> 37

```
atgcatcatc accatcacca tgatgaagcc gtggatgcga attccttagc tgaagctaaa 60
gtcttagcta acagagaact tgacaaatat ggagtaagtg actattacaa gaacctaatc 120
aacaatgcc aactgttga aggtgtaaaa gactgatag atgaaatddd agctgcatta 180
ccttcgggta gtaacaacaa taataacaat ggtagcggcg gaatgtccgc caagtccaga 240
accataggga ttattggagc tcctttctca aaggacagc cacgaggagg ggtggaagaa 300
ggccctacag tattgagaaa ggctggtctg cttgagaaac tttaaagaaca agagtgtgat 360
gtgaaggatt atggggacct gccctttgct gacatcccta atgacagtcc ctttcaaatt 420
gtgaagaatc caaggtctgt gggaaaagca agcagcagc tggctggcaa ggtggcagaa 480
gtcaagaaga acggaagaat cagcctggtg ctggcgagg accacagttt ggcaattgga 540
agcatctctg gccatgccag ggtccaccct gatcttgag tcactctggg ggtgctcac 600
actgatatac aactccact gacaaccaca agtggaact tgcattgaca acctgtatct 660
ttcctcctga aggaactaaa aggaagatt 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 gacctctt tcacaccagc tactggcaca 960
ccagtcgtgg gaggtctgac atacagagaa ggtctctaca tcacagaaga aatctacaaa 1020
acagggttac tctcaggatt agatataatg gaagtgaacc catccctggg gaagacacca 1080
gaagaagtaa ctcgaacagt gaacacagca gttgcaataa ccttggttg tttcggaact 1140
gctcgggagg gtaatcaca gcctattgac taccttaacc cacctaagta a 1191
```

<210> 38

<211> 1191

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> N-ABD094-rhArg基因,在实验室中合成

<400> 38

```
atgcatcatc accatcacca tgatgaagcg gtggatgcga acagcctggc ggaagcgaaa 60
gaagcggcga acgcggaact ggatagctat ggcgtgagcg atttttataa acgcctgatt 120
gataaagcga aaaccgtgga aggcgtggaa gcgctgaaag atgcgattct ggcgcgctg 180
ccgtcgggta gtaacaacaa taataacaat ggtagcggcg gaatgtccgc caagtccaga 240
accataggga ttattggagc tcctttctca aaggacagc cacgaggagg ggtggaagaa 300
ggccctacag tattgagaaa ggctggtctg cttgagaaac tttaaagaaca 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 ggtccaccct gatcttggag tcatctgggt ggatgctcac 600
 actgatatca acactccact gacaaccaca agtggaaact tgcattggaca acctgtatct 660
 ttctctctga aggaactaaa aggaaagatt cccgatgtgc caggattctc ctgggtgact 720
 ccctgtatat ctgccaagga tattgtgtat attggcttga gagacgtgga ccctggggaa 780
 cactacatct tgaaaaactct aggcattaaa tacttttcaa tgactgaagt ggacagacta 840
 ggaattggca aggtgatgga agaaacactc agctatctac taggaagaaa gaaaaggcca 900
 attcatctaa gttttgatgt tgacggactg gacccatctt tcacaccagc tactggcaca 960
 ccagtcgtgg gaggtctgac atacagagaa ggtctctaca tcacagaaga aatctacaaa 1020
 acagggtac tctcaggatt agatataatg gaagtgaacc catccctggg gaagacacca 1080
 gaagaagtaa ctcgaacagt gaacacagca gttgcaataa ccttggcttg ttctggactt 1140
 gctcgggagg gtaatcacia gcctattgac taccttaacc cacctaagta a 1191

<210> 39

<211> 1188

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> C-ABD-rhArg基因,在实验室中合成

<400> 39

atgagcgcca agtccagaac catagggatt attggagctc ctttctcaaa gggacagcca 60
 cgaggagggg tggaagaagg ccctacagta ttgagaaagg ctggtctgct tgagaaactt 120
 aaagaacaag agtgtgatgt gaaggattat ggggacctgc cttttgctga catccctaatt 180
 gacagtccct ttcaaatgtg gaagaatcca aggtctgtgg gaaaagcaag cgagcagctg 240
 gctggcaagg tggcagaagt caagaagaac ggaagaatca gcctgggtgct gggcggagac 300
 cacagtttgg caattggaag catctctggc catgccaggg tccaccctga tcttgagctc 360
 atctgggtgg atgctcacac 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
 ggaagaaaaga aaaggccaat tcattctaagt tttgatgttg acggactgga cccatctttc 720
 acaccagcta ctggcacacc agtcgtggga ggtctgacat acagagaagg tctctacatc 780
 acagaagaaa tctacaaaac agggctactc tcaggattag atataatgga agtgaaccca 840
 tccctgggga agacaccaga agaagtaact cgaacagtga acacagcagt tgcaataacc 900
 ttggcttggt tcggacttgc tcgggagggt aatcacaagc ctattgacta ccttaaccca 960
 cctaagggat ccagtaacaa caataataac aatggtagcg gcggtgatga agccgtggat 1020
 gcgaattcct tagctgaagc taaagtctta gctaacagag aacttgacaa atatggagta 1080

agtgactatt acaagaacct aatcaacaat gccaaaactg ttgaaggtgt aaaagcactg 1140
atagatgaaa ttttagctgc attacctcat catcaccatc accattaa 1188

<210> 40

<211> 1188

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> C-ABD094-rhArg基因,在实验室中合成

<400> 40

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

<210> 41

<211> 1125

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> N-ABD-BCA基因,在实验室中合成

<400> 41

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

ccttcgggta gtaacaacaa taataacaat ggtagcggcg gatccatgaa gccaatattca 240
 attatcgggg ttccgatgga tttagggcag acacgccgcg gcgttgatat ggggccgagc 300
 gcaatgcgtt atgcaggcgt catcgaacgt ctggaacgtc ttcattacga tattgaagat 360
 ttgggagata ttccgattgg aaaagcagag cggttgcacg agcaaggaga ttcacggttg 420
 cgcaatttga aagcggttgc ggaagcgaac gagaaacttg cggcggcggt tgaccaagtc 480
 gttcagcggg ggcgatttcc gcttgtgttg ggcggcgacc atagcatcgc cattggcacg 540
 ctcgccgggg tggcgaaaca ttatgagcgg cttggagtga tctggtatga cgcgcatggc 600
 gacgtcaaca ccgcgaaac gtcgccgtct ggaaacattc atggcatgcc gctggcggcg 660
 agcctcgggt ttggccatcc ggcgctgacg caaatcggcg gatacagccc caaatcaag 720
 ccggaacatg tcgtgttgat cggcgctcgt tcccttgatg aaggggagaa gaagtttatt 780
 cgcgaaaaag gaatcaaaat ttacacgatg catgaggttg atcggctcgg aatgacaagg 840
 gtgatggaag aaacgatcgc ctatttaaaa gaacgaacgg atggcgttca tttgtcgctt 900
 gacttgatg gccttgaccc aagcgacgca ccgggagtcg gaacgcctgt cattggagga 960
 ttgacatacc gcgaaagcca tttggcgatg gagatgctgg ccgaggcaca aatcatcact 1020
 tcagcgaat ttgtcgaagt gaacccgatc ttggatgagc ggaacaaaac agcatcagt 1080
 gctgtagcgc tgatggggtc gttgtttggt gaaaaactca tgtaa 1125

<210> 42

<211> 1125

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> N-ABD094-BCA基因,在实验室中合成

<400> 42

atgcatcatc accatcacca tgatgaagcg gtggatgcga acagcctggc ggaagcgaaa 60
 gaagcggcga acgcggaact ggatagctat ggcgtagcgc atttttataa acgcctgatt 120
 gataaagcga aaaccgtgga aggcgtggaa gcgctgaaag atgcgattct ggcggcgctg 180
 ccgtcgggta gtaacaacaa taataacaat ggtagcggcg gatccatgaa gccaatattca 240
 attatcgggg ttccgatgga tttagggcag acacgccgcg gcgttgatat ggggccgagc 300
 gcaatgcgtt atgcaggcgt catcgaacgt ctggaacgtc ttcattacga tattgaagat 360
 ttgggagata ttccgattgg aaaagcagag cggttgcacg agcaaggaga ttcacggttg 420
 cgcaatttga aagcggttgc ggaagcgaac gagaaacttg cggcggcggt tgaccaagtc 480
 gttcagcggg ggcgatttcc gcttgtgttg ggcggcgacc atagcatcgc cattggcacg 540
 ctcgccgggg tggcgaaaca ttatgagcgg cttggagtga tctggtatga cgcgcatggc 600
 gacgtcaaca ccgcgaaac gtcgccgtct ggaaacattc atggcatgcc gctggcggcg 660
 agcctcgggt ttggccatcc ggcgctgacg caaatcggcg gatacagccc caaatcaag 720
 ccggaacatg tcgtgttgat cggcgctcgt tcccttgatg aaggggagaa gaagtttatt 780
 cgcgaaaaag gaatcaaaat ttacacgatg catgaggttg atcggctcgg aatgacaagg 840
 gtgatggaag aaacgatcgc ctatttaaaa gaacgaacgg atggcgttca tttgtcgctt 900
 gacttgatg gccttgaccc aagcgacgca ccgggagtcg gaacgcctgt cattggagga 960

ttgacatacc gcgaaagcca tttggcgatg gagatgctgg ccgaggcaca aatcatcact 1020
tcagcgggaat ttgtcgaagt gaacccgatc ttggatgagc ggaacaaaac agcatcagtg 1080
gctgtagcgc tgatggggtc gttgtttggt gaaaaactca tgtaa 1125

<210> 43

<211> 1119

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> C-ABD-BCA基因,在实验室中合成

<400> 43

atgaagccaa tttcaattat cggggttccg atggatttag ggcagacacg ccgcggcggtt 60
gatatggggc cgagcgcaat gcgttatgca ggcgtcatcg aacgtctgga acgtcttcat 120
tacgatattg aagatttggg agatattccg attggaaaag cagagcggtt gcacgagcaa 180
ggagattcac ggttgcgcaa tttgaaagcg gttgcggaag cgaacgagaa acttgcggcg 240
gcggttgacc aagtcgttca gcgggggcca tttccgcttg tgttgggcgg cgaccatagc 300
atcgccattg gcacgctcgc cggggtggcg aaacattatg agcggcttgg agtgatctgg 360
tatgacgcgc atggcgacgt caacaccgcg gaaacgtcgc cgtctggaaa cattcatggc 420
atgccgctgg cggcgagcct cgggtttggc catccggcgc tgacgcaaat cggcggatac 480
agccccaaaa tcaagccgga acatgtcgtg ttgatcggcg tccgttccct tgatgaaggg 540
gagaagaagt ttattcgcga aaaaggaatc aaaatttaca cgatgcatga ggttgatcgg 600
ctcggaatga caagggatg ggaagaaacg atcgccattt taaaagaacg aacggatggc 660
gttcatttgt cgcttgactt ggatggcctt gacccaagcg acgcaccggg agtcggaacg 720
cctgtcattg gaggattgac ataccgcgaa agccatttgg cgatggagat gctggccgag 780
gcacaaatca tcacttcagc ggaatttgtc gaagtgaacc cgatcttggg tgagcggaac 840
aaaacagcat cagtggctgt agcgcctgat gggctcgttg ttggtgaaaa actcatggga 900
tccagtaaca acaataataa caatggtagc ggcggtgatg aagccgtgga tgcgaattcc 960
ttagctgaag cttaaagtctt agctaacaga gaacttgaca aatatggagt aagtgactat 1020
tacaagaacc taatcaacaa tgccaaaact gttgaagggtg taaaagcact gatagatgaa 1080
atttttagctg cattacctca tcatcaccat caccattaa 1119

<210> 44

<211> 1119

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> C-ABD094-BCA基因,在实验室中合成

<400> 44

atgaagccaa tttcaattat cggggttccg atggatttag ggcagacacg ccgcggcggtt 60
gatatggggc cgagcgcaat gcgttatgca ggcgtcatcg aacgtctgga acgtcttcat 120
tacgatattg aagatttggg agatattccg attggaaaag cagagcggtt gcacgagcaa 180

ggagattcac ggttgcgcaa tttgaaagcg gttgcggaag cgaacgagaa acttgcggcg 240
 gcggttgacc aagtcgttca gcgggggga tttccgcttg tggtgggcgg cgaccatagc 300
 atcgccattg gcacgctcgc cgggggtggcg aaacattatg agcggcttgg agtgatctgg 360
 tatgacgcgc atggcgacgt caacaccgcg gaaacgtcgc cgtctggaaa cattcatggc 420
 atgccgctgg cggcgagcct cgggtttggc catccggcgc tgacgcaa at cggcggatac 480
 agccccaaaa tcaagccgga acatgtcgtg ttgatcggcg tccgttccct tgatgaagg 540
 gagaagaagt ttattcgcga aaaaggaatc aaaatttaca cgatgcatga ggttgatcgg 600
 ctcggaatga caagggatg ggaagaaacg atgcctatt taaaagaacg aacggatggc 660
 gttcatattgt cgcttgactt ggatggcctt gacccaagcg acgcaccggg agtcggaacg 720
 cctgtcattg gaggattgac ataccgcgaa agccatttgg cgatggagat gctggccgag 780
 gcacaaatca tcacttcagc ggaatttgtc gaagtgaacc cgatcttga tgagcggaa 840
 aaaacagcat cagtggctgt agcgtgatg gggtcgttgt ttggtgaaa actcatggga 900
 tccagtaaca acaataataa caatggtagc ggcggtgatg aagcggtgga tgcaacagc 960
 ctggcgggaag cgaaagaagc ggcaacgcg gaactggata gctatggcgt gagcgtttt 1020
 tataaacgcc tgattgataa agcgaacc gtggaaggcg tggaagcgt gaaagatgcg 1080
 attctggcgg cgctgccga tcatcaccat caccattaa 1119

<210> 45

<211> 74

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> His-ABD-接头,在实验室中合成

<400> 45

Met	His	His	His	His	His	His	Asp	Glu	Ala	Val	Asp	Ala	Asn	Ser	Leu
1				5						10				15	
Ala	Glu	Ala	Lys	Val	Leu	Ala	Asn	Arg	Glu	Leu	Asp	Lys	Tyr	Gly	Val
				20						25				30	
Ser	Asp	Tyr	Tyr	Lys	Asn	Leu	Ile	Asn	Asn	Ala	Lys	Thr	Val	Glu	Gly
				35						40				45	
Val	Lys	Ala	Leu	Ile	Asp	Glu	Ile	Leu	Ala	Ala	Leu	Pro	Ser	Gly	Ser
				50						55				60	
Asn	Asn	Asn	Asn	Asn	Asn	Gly	Ser	Gly	Gly						
65										70					

<210> 46

<211> 74

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> His-ABD094-接头,在实验室中合成

<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> 人工序列

<220>

<223> 接头-ABD-His,在实验室中合成

<400> 47

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

<210> 48

<211> 73

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 接头-ABD094-His,在实验室中合成

<400> 48

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

Leu Asp Ser Tyr Gly Val Ser Asp Phe Tyr Lys Arg Leu Ile Asp Lys
 35 40 45
 Ala Lys Thr Val Glu Gly Val Glu Ala Leu Lys Asp Ala Ile Leu Ala
 50 55 60
 Ala Leu Pro His His His His His His
 65 70
 <210> 49
 <211> 396
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> N-ABD-rhArg, 在实验室中合成
 <400> 49
 Met His His His His His His Asp Glu Ala Val Asp Ala Asn Ser Leu
 1 5 10 15
 Ala Glu Ala Lys Val Leu Ala Asn Arg Glu Leu Asp Lys Tyr Gly Val
 20 25 30
 Ser Asp Tyr Tyr Lys Asn Leu Ile Asn Asn Ala Lys Thr Val Glu Gly
 35 40 45
 Val Lys Ala Leu Ile Asp Glu Ile Leu Ala Ala Leu Pro Ser Gly Ser
 50 55 60
 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> 人工序列		
<220>		
<223> N-ABD094-rhArg,在实验室中合成		
<400> 50		
Met His His His His His His Asp Glu Ala Val Asp Ala Asn Ser Leu		
1	5	10 15
Ala Glu Ala Lys Glu Ala Ala Asn Ala Glu Leu Asp Ser Tyr Gly Val		
	20	25 30
Ser Asp Phe Tyr Lys Arg Leu Ile Asp Lys Ala Lys Thr Val Glu Gly		
	35	40 45
Val Glu Ala Leu Lys Asp Ala Ile Leu Ala Ala Leu Pro Ser Gly Ser		
50	55	60

Asn	Asn	Asn	Asn	Asn	Asn	Gly	Ser	Gly	Gly	Met	Ser	Ala	Lys	Ser	Arg
65					70					75					80
Thr	Ile	Gly	Ile	Ile	Gly	Ala	Pro	Phe	Ser	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Gly
			85							90					95
Gly	Val	Glu	Glu	Gly	Pro	Thr	Val	Leu	Arg	Lys	Ala	Gly	Leu	Leu	Glu
			100						105				110		
Lys	Leu	Lys	Glu	Gln	Glu	Cys	Asp	Val	Lys	Asp	Tyr	Gly	Asp	Leu	Pro
		115					120					125			
Phe	Ala	Asp	Ile	Pro	Asn	Asp	Ser	Pro	Phe	Gln	Ile	Val	Lys	Asn	Pro
	130					135					140				
Arg	Ser	Val	Gly	Lys	Ala	Ser	Glu	Gln	Leu	Ala	Gly	Lys	Val	Ala	Glu
145					150					155					160
Val	Lys	Lys	Asn	Gly	Arg	Ile	Ser	Leu	Val	Leu	Gly	Gly	Asp	His	Ser
			165						170					175	
Leu	Ala	Ile	Gly	Ser	Ile	Ser	Gly	His	Ala	Arg	Val	His	Pro	Asp	Leu
		180						185					190		
Gly	Val	Ile	Trp	Val	Asp	Ala	His	Thr	Asp	Ile	Asn	Thr	Pro	Leu	Thr
		195						200				205			
Thr	Thr	Ser	Gly	Asn	Leu	His	Gly	Gln	Pro	Val	Ser	Phe	Leu	Leu	Lys
	210						215					220			
Glu	Leu	Lys	Gly	Lys	Ile	Pro	Asp	Val	Pro	Gly	Phe	Ser	Trp	Val	Thr
225					230					235					240
Pro	Cys	Ile	Ser	Ala	Lys	Asp	Ile	Val	Tyr	Ile	Gly	Leu	Arg	Asp	Val
			245						250				255		
Asp	Pro	Gly	Glu	His	Tyr	Ile	Leu	Lys	Thr	Leu	Gly	Ile	Lys	Tyr	Phe
		260						265					270		
Ser	Met	Thr	Glu	Val	Asp	Arg	Leu	Gly	Ile	Gly	Lys	Val	Met	Glu	Glu
		275					280					285			
Thr	Leu	Ser	Tyr	Leu	Leu	Gly	Arg	Lys	Lys	Arg	Pro	Ile	His	Leu	Ser
	290					295					300				
Phe	Asp	Val	Asp	Gly	Leu	Asp	Pro	Ser	Phe	Thr	Pro	Ala	Thr	Gly	Thr
305					310					315					320
Pro	Val	Val	Gly	Gly	Leu	Thr	Tyr	Arg	Glu	Gly	Leu	Tyr	Ile	Thr	Glu
			325						330				335		
Glu	Ile	Tyr	Lys	Thr	Gly	Leu	Leu	Ser	Gly	Leu	Asp	Ile	Met	Glu	Val
		340						345					350		
Asn	Pro	Ser	Leu	Gly	Lys	Thr	Pro	Glu	Glu	Val	Thr	Arg	Thr	Val	Asn
		355					360					365			
Thr	Ala	Val	Ala	Ile	Thr	Leu	Ala	Cys	Phe	Gly	Leu	Ala	Arg	Glu	Gly

370	375	380
Asn His Lys Pro Ile Asp Tyr Leu Asn Pro Pro Lys		
385	390	395
<210> 51		
<211> 395		
<212> PRT		
<213> 人工序列		
<220>		
<223> C-ABD-rhArg, 在实验室中合成		
<400> 51		
Met Ser Ala Lys Ser Arg Thr Ile Gly Ile Ile Gly Ala Pro Phe Ser		
1	5	10
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
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
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 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		
385	390	395	
<210> 52			
<211> 395			
<212> PRT			
<213> 人工序列			
<220>			
<223> C-ABD094-rhArg,在实验室中合成			
<400> 52			
Met Ser Ala Lys Ser	Arg Thr Ile Gly	Ile Ile Gly Ala	Pro Phe Ser
1	5	10	15
Lys Gly Gln Pro Arg	Gly Gly Val Glu	Glu Gly Pro Thr	Val Leu Arg
20	25	30	
Lys Ala Gly Leu Leu	Glu Lys Leu Lys	Glu Gln Glu Cys	Asp Val Lys
35	40	45	
Asp Tyr Gly Asp Leu	Pro Phe Ala Asp	Ile Pro Asn Asp	Ser Pro Phe
50	55	60	
Gln Ile Val Lys Asn	Pro Arg Ser Val	Gly Lys Ala Ser	Glu Gln Leu
65	70	75	80
Ala Gly Lys Val Ala	Glu Val Lys Lys	Asn Gly Arg Ile	Ser Leu Val

				85					90					95			
Leu	Gly	Gly	Asp	His	Ser	Leu	Ala	Ile	Gly	Ser	Ile	Ser	Gly	His	Ala		
				100					105					110			
Arg	Val	His	Pro	Asp	Leu	Gly	Val	Ile	Trp	Val	Asp	Ala	His	Thr	Asp		
				115					120					125			
Ile	Asn	Thr	Pro	Leu	Thr	Thr	Thr	Ser	Gly	Asn	Leu	His	Gly	Gln	Pro		
				130					135					140			
Val	Ser	Phe	Leu	Leu	Lys	Glu	Leu	Lys	Gly	Lys	Ile	Pro	Asp	Val	Pro		
145						150					155				160		
Gly	Phe	Ser	Trp	Val	Thr	Pro	Cys	Ile	Ser	Ala	Lys	Asp	Ile	Val	Tyr		
				165					170					175			
Ile	Gly	Leu	Arg	Asp	Val	Asp	Pro	Gly	Glu	His	Tyr	Ile	Leu	Lys	Thr		
				180					185					190			
Leu	Gly	Ile	Lys	Tyr	Phe	Ser	Met	Thr	Glu	Val	Asp	Arg	Leu	Gly	Ile		
				195					200					205			
Gly	Lys	Val	Met	Glu	Glu	Thr	Leu	Ser	Tyr	Leu	Leu	Gly	Arg	Lys	Lys		
				210					215					220			
Arg	Pro	Ile	His	Leu	Ser	Phe	Asp	Val	Asp	Gly	Leu	Asp	Pro	Ser	Phe		
225						230				235					240		
Thr	Pro	Ala	Thr	Gly	Thr	Pro	Val	Val	Gly	Gly	Leu	Thr	Tyr	Arg	Glu		
				245					250					255			
Gly	Leu	Tyr	Ile	Thr	Glu	Glu	Ile	Tyr	Lys	Thr	Gly	Leu	Leu	Ser	Gly		
				260					265					270			
Leu	Asp	Ile	Met	Glu	Val	Asn	Pro	Ser	Leu	Gly	Lys	Thr	Pro	Glu	Glu		
				275					280					285			
Val	Thr	Arg	Thr	Val	Asn	Thr	Ala	Val	Ala	Ile	Thr	Leu	Ala	Cys	Phe		
				290					295					300			
Gly	Leu	Ala	Arg	Glu	Gly	Asn	His	Lys	Pro	Ile	Asp	Tyr	Leu	Asn	Pro		
305						310					315				320		
Pro	Lys	Gly	Ser	Ser	Asn	Asn	Asn	Asn	Asn	Asn	Gly	Ser	Gly	Gly	Asp		
				325					330					335			
Glu	Ala	Val	Asp	Ala	Asn	Ser	Leu	Ala	Glu	Ala	Lys	Glu	Ala	Ala	Asn		
				340					345					350			
Ala	Glu	Leu	Asp	Ser	Tyr	Gly	Val	Ser	Asp	Phe	Tyr	Lys	Arg	Leu	Ile		
				355					360					365			
Asp	Lys	Ala	Lys	Thr	Val	Glu	Gly	Val	Glu	Ala	Leu	Lys	Asp	Ala	Ile		
				370					375					380			
Leu	Ala	Ala	Leu	Pro	His	His	His	His	His	His							
385						390								395			

<210> 53

<211> 374

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> N-ABD-BCA,在实验室中合成

<400> 53

```

Met His His His His His His Asp Glu Ala Val Asp Ala Asn Ser Leu
1           5           10           15
Ala Glu Ala Lys Val Leu Ala Asn Arg Glu Leu Asp Lys Tyr Gly Val
           20           25           30
Ser Asp Tyr Tyr Lys Asn Leu Ile Asn Asn Ala Lys Thr Val Glu Gly
           35           40           45
Val Lys Ala Leu Ile Asp Glu Ile Leu Ala Ala Leu Pro Ser Gly Ser
           50           55           60
Asn Asn Asn Asn Asn Asn Gly Ser Gly Gly Ser Met Lys Pro Ile Ser
65           70           75           80
Ile Ile Gly Val Pro Met Asp Leu Gly Gln Thr Arg Arg Gly Val Asp
           85           90           95
Met Gly Pro Ser Ala Met Arg Tyr Ala Gly Val Ile Glu Arg Leu Glu
           100          105          110
Arg Leu His Tyr Asp Ile Glu Asp Leu Gly Asp Ile Pro Ile Gly Lys
           115          120          125
Ala Glu Arg Leu His Glu Gln Gly Asp Ser Arg Leu Arg Asn Leu Lys
           130          135          140
Ala Val Ala Glu Ala Asn Glu Lys Leu Ala Ala Ala Val Asp Gln Val
145          150          155          160
Val Gln Arg Gly Arg Phe Pro Leu Val Leu Gly Gly Asp His Ser Ile
           165          170          175
Ala Ile Gly Thr Leu Ala Gly Val Ala Lys His Tyr Glu Arg Leu Gly
           180          185          190
Val Ile Trp Tyr Asp Ala His Gly Asp Val Asn Thr Ala Glu Thr Ser
           195          200          205
Pro Ser Gly Asn Ile His Gly Met Pro Leu Ala Ala Ser Leu Gly Phe
           210          215          220
Gly His Pro Ala Leu Thr Gln Ile Gly Gly Tyr Ser Pro Lys Ile Lys
225          230          235          240
Pro Glu His Val Val Leu Ile Gly Val Arg Ser Leu Asp Glu Gly Glu
           245          250          255

```

Lys	Lys	Phe	Ile	Arg	Glu	Lys	Gly	Ile	Lys	Ile	Tyr	Thr	Met	His	Glu
260				265				270							
Val	Asp	Arg	Leu	Gly	Met	Thr	Arg	Val	Met	Glu	Glu	Thr	Ile	Ala	Tyr
275				280				285							
Leu	Lys	Glu	Arg	Thr	Asp	Gly	Val	His	Leu	Ser	Leu	Asp	Leu	Asp	Gly
290				295				300							
Leu	Asp	Pro	Ser	Asp	Ala	Pro	Gly	Val	Gly	Thr	Pro	Val	Ile	Gly	Gly
305				310				315				320			
Leu	Thr	Tyr	Arg	Glu	Ser	His	Leu	Ala	Met	Glu	Met	Leu	Ala	Glu	Ala
				325				330				335			
Gln	Ile	Ile	Thr	Ser	Ala	Glu	Phe	Val	Glu	Val	Asn	Pro	Ile	Leu	Asp
340				345				350							
Glu	Arg	Asn	Lys	Thr	Ala	Ser	Val	Ala	Val	Ala	Leu	Met	Gly	Ser	Leu
355				360				365							
Phe	Gly	Glu	Lys	Leu	Met										
370															
<210> 54															
<211> 374															
<212> PRT															
<213> 人工序列															
<220>															
<223> N-ABD094-BCA,在实验室中合成															
<400> 54															
Met	His	His	His	His	His	His	Asp	Glu	Ala	Val	Asp	Ala	Asn	Ser	Leu
1	5				10				15						
Ala	Glu	Ala	Lys	Glu	Ala	Ala	Asn	Ala	Glu	Leu	Asp	Ser	Tyr	Gly	Val
20				25				30							
Ser	Asp	Phe	Tyr	Lys	Arg	Leu	Ile	Asp	Lys	Ala	Lys	Thr	Val	Glu	Gly
35				40				45							
Val	Glu	Ala	Leu	Lys	Asp	Ala	Ile	Leu	Ala	Ala	Leu	Pro	Ser	Gly	Ser
50				55				60							
Asn	Asn	Asn	Asn	Asn	Asn	Gly	Ser	Gly	Gly	Ser	Met	Lys	Pro	Ile	Ser
65	70				75				80						
Ile	Ile	Gly	Val	Pro	Met	Asp	Leu	Gly	Gln	Thr	Arg	Arg	Gly	Val	Asp
85				90				95							
Met	Gly	Pro	Ser	Ala	Met	Arg	Tyr	Ala	Gly	Val	Ile	Glu	Arg	Leu	Glu
100				105				110							
Arg	Leu	His	Tyr	Asp	Ile	Glu	Asp	Leu	Gly	Asp	Ile	Pro	Ile	Gly	Lys
115				120				125							

Ala Glu Arg Leu His Glu Gln Gly Asp Ser Arg Leu Arg Asn Leu Lys		
130	135	140
Ala Val Ala Glu Ala Asn Glu Lys Leu Ala Ala Val Asp Gln Val		
145	150	155
Val Gln Arg Gly Arg Phe Pro Leu Val Leu Gly Gly Asp His Ser Ile		
	165	170
Ala Ile Gly Thr Leu Ala Gly Val Ala Lys His Tyr Glu Arg Leu Gly		
	180	185
Val Ile Trp Tyr Asp Ala His Gly Asp Val Asn Thr Ala Glu Thr Ser		
	195	200
Pro Ser Gly Asn Ile His Gly Met Pro Leu Ala Ala Ser Leu Gly Phe		
	210	215
Gly His Pro Ala Leu Thr Gln Ile Gly Gly Tyr Ser Pro Lys Ile Lys		
225	230	235
Pro Glu His Val Val Leu Ile Gly Val Arg Ser Leu Asp Glu Gly Glu		
	245	250
Lys Lys Phe Ile Arg Glu Lys Gly Ile Lys Ile Tyr Thr Met His Glu		
	260	265
Val Asp Arg Leu Gly Met Thr Arg Val Met Glu Glu Thr Ile Ala Tyr		
	275	280
Leu Lys Glu Arg Thr Asp Gly Val His Leu Ser Leu Asp Leu Asp Gly		
	290	295
Leu Asp Pro Ser Asp Ala Pro Gly Val Gly Thr Pro Val Ile Gly Gly		
305	310	315
Leu Thr Tyr Arg Glu Ser His Leu Ala Met Glu Met Leu Ala Glu Ala		
	325	330
Gln Ile Ile Thr Ser Ala Glu Phe Val Glu Val Asn Pro Ile Leu Asp		
	340	345
Glu Arg Asn Lys Thr Ala Ser Val Ala Val Ala Leu Met Gly Ser Leu		
	355	360
Phe Gly Glu Lys Leu Met		
370		
<210> 55		
<211> 372		
<212> PRT		
<213> 人工序列		
<220>		
<223> C-ABD-BCA,在实验室中合成		
<400> 55		

Met	Lys	Pro	Ile	Ser	Ile	Ile	Gly	Val	Pro	Met	Asp	Leu	Gly	Gln	Thr
1				5					10					15	
Arg	Arg	Gly	Val	Asp	Met	Gly	Pro	Ser	Ala	Met	Arg	Tyr	Ala	Gly	Val
			20					25					30		
Ile	Glu	Arg	Leu	Glu	Arg	Leu	His	Tyr	Asp	Ile	Glu	Asp	Leu	Gly	Asp
		35					40					45			
Ile	Pro	Ile	Gly	Lys	Ala	Glu	Arg	Leu	His	Glu	Gln	Gly	Asp	Ser	Arg
	50					55					60				
Leu	Arg	Asn	Leu	Lys	Ala	Val	Ala	Glu	Ala	Asn	Glu	Lys	Leu	Ala	Ala
65				70						75				80	
Ala	Val	Asp	Gln	Val	Val	Gln	Arg	Gly	Arg	Phe	Pro	Leu	Val	Leu	Gly
			85					90					95		
Gly	Asp	His	Ser	Ile	Ala	Ile	Gly	Thr	Leu	Ala	Gly	Val	Ala	Lys	His
			100					105					110		
Tyr	Glu	Arg	Leu	Gly	Val	Ile	Trp	Tyr	Asp	Ala	His	Gly	Asp	Val	Asn
		115					120						125		
Thr	Ala	Glu	Thr	Ser	Pro	Ser	Gly	Asn	Ile	His	Gly	Met	Pro	Leu	Ala
		130					135					140			
Ala	Ser	Leu	Gly	Phe	Gly	His	Pro	Ala	Leu	Thr	Gln	Ile	Gly	Gly	Tyr
145				150						155				160	
Ser	Pro	Lys	Ile	Lys	Pro	Glu	His	Val	Val	Leu	Ile	Gly	Val	Arg	Ser
			165					170					175		
Leu	Asp	Glu	Gly	Glu	Lys	Lys	Phe	Ile	Arg	Glu	Lys	Gly	Ile	Lys	Ile
		180					185						190		
Tyr	Thr	Met	His	Glu	Val	Asp	Arg	Leu	Gly	Met	Thr	Arg	Val	Met	Glu
		195					200					205			
Glu	Thr	Ile	Ala	Tyr	Leu	Lys	Glu	Arg	Thr	Asp	Gly	Val	His	Leu	Ser
		210					215				220				
Leu	Asp	Leu	Asp	Gly	Leu	Asp	Pro	Ser	Asp	Ala	Pro	Gly	Val	Gly	Thr
225				230						235				240	
Pro	Val	Ile	Gly	Gly	Leu	Thr	Tyr	Arg	Glu	Ser	His	Leu	Ala	Met	Glu
			245					250					255		
Met	Leu	Ala	Glu	Ala	Gln	Ile	Ile	Thr	Ser	Ala	Glu	Phe	Val	Glu	Val
		260					265						270		
Asn	Pro	Ile	Leu	Asp	Glu	Arg	Asn	Lys	Thr	Ala	Ser	Val	Ala	Val	Ala
		275					280					285			
Leu	Met	Gly	Ser	Leu	Phe	Gly	Glu	Lys	Leu	Met	Gly	Ser	Ser	Asn	Asn
		290					295				300				
Asn	Asn	Asn	Asn	Gly	Ser	Gly	Gly	Asp	Glu	Ala	Val	Asp	Ala	Asn	Ser

305	310	315	320
Leu Ala Glu Ala Lys Val Leu Ala Asn Arg Glu Leu Asp Lys Tyr Gly			
	325	330	335
Val Ser Asp Tyr Tyr Lys Asn Leu Ile Asn Asn Ala Lys Thr Val Glu			
	340	345	350
Gly Val Lys Ala Leu Ile Asp Glu Ile Leu Ala Ala Leu Pro His His			
	355	360	365
His His His His			
370			
<210> 56			
<211> 372			
<212> PRT			
<213> 人工序列			
<220>			
<223> C-ABD094-BCA, 在实验室中合成			
<400> 56			
Met Lys Pro Ile Ser Ile Ile Gly Val Pro Met Asp Leu Gly Gln Thr			
1	5	10	15
Arg Arg Gly Val Asp Met Gly Pro Ser Ala Met Arg Tyr Ala Gly Val			
	20	25	30
Ile Glu Arg Leu Glu Arg Leu His Tyr Asp Ile Glu Asp Leu Gly Asp			
	35	40	45
Ile Pro Ile Gly Lys Ala Glu Arg Leu His Glu Gln Gly Asp Ser Arg			
	50	55	60
Leu Arg Asn Leu Lys Ala Val Ala Glu Ala Asn Glu Lys Leu Ala Ala			
65	70	75	80
Ala Val Asp Gln Val Val Gln Arg Gly Arg Phe Pro Leu Val Leu Gly			
	85	90	95
Gly Asp His Ser Ile Ala Ile Gly Thr Leu Ala Gly Val Ala Lys His			
	100	105	110
Tyr Glu Arg Leu Gly Val Ile Trp Tyr Asp Ala His Gly Asp Val Asn			
	115	120	125
Thr Ala Glu Thr Ser Pro Ser Gly Asn Ile His Gly Met Pro Leu Ala			
	130	135	140
Ala Ser Leu Gly Phe Gly His Pro Ala Leu Thr Gln Ile Gly Gly Tyr			
145	150	155	160
Ser Pro Lys Ile Lys Pro Glu His Val Val Leu Ile Gly Val Arg Ser			
	165	170	175
Leu Asp Glu Gly Glu Lys Lys Phe Ile Arg Glu Lys Gly Ile Lys Ile			

180	185	190
Tyr Thr Met His Glu Val Asp Arg Leu Gly Met Thr Arg Val Met Glu		
195	200	205
Glu Thr Ile Ala Tyr Leu Lys Glu Arg Thr Asp Gly Val His Leu Ser		
210	215	220
Leu Asp Leu Asp Gly Leu Asp Pro Ser Asp Ala Pro Gly Val Gly Thr		
225	230	235
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
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> 人工序列

<220>

<223> ABD094-0F引物,在实验室中合成

<400> 57

attctggcag cgctgccgtc gggtagtaac aacaataata acaatggtag 50

<210> 58

<211> 50

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> ABD094-1F引物,在实验室中合成

<400> 58
aaccgtggaa ggtgtggaag cgctgaaaga tgcgattctg gcagcgctgc 50
<210> 59
<211> 50
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> ABD094-2F引物,在实验室中合成
<400> 59
gattttttata aacgtctgat tgataaagcg aaaaccgtgg aaggtgtgga 50
<210> 60
<211> 50
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> ABD094-3F引物,在实验室中合成
<400> 60
ctggatagct atggcgtgag cgatttttat aaacgtctga ttgataaagc 50
<210> 61
<211> 50
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> ABD094-4F引物,在实验室中合成
<400> 61
gcggaagcga aagaagcagc aaacgcggaa ctggatagct atggcgtgag 50
<210> 62
<211> 50
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> ABD094-5F引物,在实验室中合成
<400> 62
accatgatga agccgtggat gcgaattccc tggcggaagc gaaagaagca 50
<210> 63
<211> 46
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>

<223> abdNde-F引物,在实验室中合成

<400> 63

ggagatatac atatgcatca tcaccatcac catgatgaag ccgtgg 46

<210> 64

<211> 42

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> HuArgHinBam-R引物,在实验室中合成

<400> 64

tgactacctt aaccacaccta agtaagcttg gatcctgtaa cg 42

<210> 65

<211> 1220

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> N-ABD094-rhArg基因,在实验室中合成

<400> 65

ggagatatac atatgcatca tcaccatcac catgatgaag ccgtggatgc gaattccctg 60
 gcggaagcga aagaagcagc aaacgcggaa ctggatagct atggcgtgag cgatttttat 120
 aaacgtctga ttgataaagc gaaaaccgtg gaaggtgtgg aagcgtgaa agatgacgatt 180
 ctggcagcgc tgccgtcggg tagtaacaac aataataaca atggtagcgg cggtatgagc 240
 gccaaagtcca gaaccatagg gattattgga gtccttttct caaagggaca gccacgagga 300
 ggggttgaag aaggccctac agtattgaga aaggctggct tgcttgagaa acttaaagaa 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 agtcatctgg 600
 gtggatgctc aactgatata caaactcca ctgacaacca caagtggaaa cttgcatgga 660
 caacctgtat ctttcctcct gaaggaacta aaaggaaaga ttcccgatgt gccaggattc 720
 tcctgggtga ctccctgtat atctgccaag gatattgtgt atattggctt gagagacgtg 780
 gaccttgggg aactacatcat tttgaaaact ctaggcatta aatacttttc aatgactgaa 840
 gtggacagac taggaattgg caaggtgatg gaagaaacac tcagctatct actaggaaga 900
 aagaaaaggc caattcatct aagttttgat gttgacggac tggaccatc ttccacacca 960
 gctactggca caccagtcgt gggaggtctg acatacagag aaggtctcta catcacagaa 1020
 gaaatctaca aaacagggtc actctcagga ttagatataa tggaagtga cccatccctg 1080
 gggaagacac cagaagaagt aactcgaaca gtgaacacag cagttgcaat aaccttggct 1140
 tgtttcggac ttgctcggga gggtaatcac aagcctattg actaccttaa cccacctaag 1200
 taagcttgga tcctgtaacg 1220

<210> 66

<211> 54

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 基于链球菌属物种G148的ABD,在实验室中合成

<400> 66

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

<210> 67

<211> 57

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 基于链球菌属物种G148的ABD,在实验室中合成

<400> 67

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

<210> 68

<211> 46

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 没有接头的ABD094, 在实验室中合成

<400> 68

```
Leu Ala Glu Ala Lys Glu Ala Ala Asn Ala Glu Leu Asp Ser Tyr Gly
1           5           10           15
```

Val Ser Asp Phe Tyr Lys Arg Leu Ile Asp Lys Ala Lys Thr Val Glu
 20 25 30
 Gly Val Glu Ala Leu Lys Asp Ala Ile Leu Ala Ala Leu Pro
 35 40 45
 <210> 69
 <211> 324
 <212> PRT
 <213> 智人
 <220>
 <221> Xaa
 <222> (1) .. (1)
 <223> Xaa在1位或者是蛋氨酸或者不存在。
 <400> 69
 Xaa Ala Ala Ser Ala Lys Ser Arg Thr Ile Gly Ile Ile Gly Ala Pro
 1 5 10 15
 Phe Ser Lys Gly Gln Pro Arg Gly Gly Val Glu Glu Gly Pro Thr Val
 20 25 30
 Leu Arg Lys Ala Gly Leu Leu Glu Lys Leu Lys Glu Gln Glu Cys Asp
 35 40 45
 Val Lys Asp Tyr Gly Asp Leu Pro Phe Ala Asp Ile Pro Asn Asp Ser
 50 55 60
 Pro Phe Gln Ile Val Lys Asn Pro Arg Ser Val Gly Lys Ala Ser Glu
 65 70 75 80
 Gln Leu Ala Gly Lys Val Ala Glu Val Lys Lys Asn Gly Arg Ile Ser
 85 90 95
 Leu Val Leu Gly Gly Asp His Ser Leu Ala Ile Gly Ser Ile Ser Gly
 100 105 110
 His Ala Arg Val His Pro Asp Leu Gly Val Ile Trp Val Asp Ala His
 115 120 125
 Thr Asp Ile Asn Thr Pro Leu Thr Thr Thr Ser Gly Asn Leu His Gly
 130 135 140
 Gln Pro Val Ser Phe Leu Leu Lys Glu Leu Lys Gly Lys Ile Pro Asp
 145 150 155 160
 Val Pro Gly Phe Ser Trp Val Thr Pro Cys Ile Ser Ala Lys Asp Ile
 165 170 175
 Val Tyr Ile Gly Leu Arg Asp Val Asp Pro Gly Glu His Tyr Ile Leu
 180 185 190
 Lys Thr Leu Gly Ile Lys Tyr Phe Ser Met Thr Glu Val Asp Arg Leu
 195 200 205

Gly Ile Gly Lys Val Met Glu Glu Thr Leu Ser Tyr Leu Leu Gly Arg
 210 215 220
 Lys Lys Arg Pro Ile His Leu Ser Phe Asp Val Asp Gly Leu Asp Pro
 225 230 235 240
 Ser Phe Thr Pro Ala Thr Gly Thr Pro Val Val Gly Gly Leu Thr Tyr
 245 250 255
 Arg Glu Gly Leu Tyr Ile Thr Glu Glu Ile Tyr Lys Thr Gly Leu Leu
 260 265 270
 Ser Gly Leu Asp Ile Met Glu Val Asn Pro Ser Leu Gly Lys Thr Pro
 275 280 285
 Glu Glu Val Thr Arg Thr Val Asn Thr Ala Val Ala Ile Thr Leu Ala
 290 295 300
 Cys Phe Gly Leu Ala Arg Glu Gly Asn His Lys Pro Ile Asp Tyr Leu
 305 310 315 320
 Asn Pro Pro Lys
 <210> 70
 <211> 299
 <212> PRT
 <213> 热溶芽孢杆菌
 <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> 人工序列			
<220>			
<223> BCA (S161C) 精氨酸酶, 在实验室中合成			
<400> 71			
Met Lys Pro Ile Ser Ile Ile Gly Val Pro Met Asp Leu Gly Gln Thr			
1	5	10	15
Arg Arg Gly Val Asp Met Gly Pro Ser Ala Met Arg Tyr Ala Gly Val			
	20	25	30
Ile Glu Arg Leu Glu Arg Leu His Tyr Asp Ile Glu Asp Leu Gly Asp			
	35	40	45
Ile Pro Ile Gly Lys Ala Glu Arg Leu His Glu Gln Gly Asp Ser Arg			
	50	55	60
Leu Arg Asn Leu Lys Ala Val Ala Glu Ala Asn Glu Lys Leu Ala Ala			
65	70	75	80
Ala Val Asp Gln Val Val Gln Arg Gly Arg Phe Pro Leu Val Leu Gly			
	85	90	95
Gly Asp His Ser Ile Ala Ile Gly Thr Leu Ala Gly Val Ala Lys His			

100	105	110
Tyr Glu Arg Leu Gly Val Ile Trp	Tyr Asp Ala His Gly Asp Val Asn	
115	120	125
Thr Ala Glu Thr Ser Pro Ser Gly	Asn Ile His Gly Met Pro Leu Ala	
130	135	140
Ala Ser Leu Gly Phe Gly His Pro	Ala Leu Thr Gln Ile Gly Gly Tyr	
145	150	155
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
Pro Val Ile Gly Gly Leu Thr Tyr	Arg Glu Ser His Leu Ala Met Glu	
245	250	255
Met Leu Ala Glu Ala Gln Ile Ile	Thr Ser Ala Glu Phe Val Glu Val	
260	265	270
Asn Pro Ile Leu Asp Glu Arg Asn	Lys Thr Ala Ser Val Ala Val Ala	
275	280	285
Leu Met Gly Ser Leu Phe Gly Glu	Lys Leu Met	
290	295	
<210> 72		
<211> 299		
<212> PRT		
<213> 人工序列		
<220>		
<223> BCA (V20P, S161C) 精氨酸酶, 在实验室中合成		
<400> 72		
Met Lys Pro Ile Ser Ile Ile Gly	Val Pro Met Asp Leu Gly Gln Thr	
1	5	10
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
Ala Val Asp Gln Val Val Gln Arg Gly Arg Phe Pro Leu Val Leu Gly		80
	85	90
Gly Asp His Ser Ile Ala Ile Gly Thr Leu Ala Gly Val Ala Lys His		95
	100	105
Tyr Glu Arg Leu Gly Val Ile Trp Tyr Asp Ala His Gly Asp Val Asn		110
	115	120
Thr Ala Glu Thr Ser Pro Ser Gly Asn Ile His Gly Met Pro Leu Ala		125
	130	135
Ala Ser Leu Gly Phe Gly His Pro Ala Leu Thr Gln Ile Gly Gly Tyr		140
145	150	155
Cys Pro Lys Ile Lys Pro Glu His Val Val Leu Ile Gly Val Arg Ser		160
	165	170
Leu Asp Glu Gly Glu Lys Lys Phe Ile Arg Glu Lys Gly Ile Lys Ile		175
	180	185
Tyr Thr Met His Glu Val Asp Arg Leu Gly Met Thr Arg Val Met Glu		190
	195	200
Glu Thr Ile Ala Tyr Leu Lys Glu Arg Thr Asp Gly Val His Leu Ser		205
	210	215
Leu Asp Leu Asp Gly Leu Asp Pro Ser Asp Ala Pro Gly Val Gly Thr		220
225	230	235
Pro Val Ile Gly Gly Leu Thr Tyr Arg Glu Ser His Leu Ala Met Glu		240
	245	250
Met Leu Ala Glu Ala Gln Ile Ile Thr Ser Ala Glu Phe Val Glu Val		255
	260	265
Asn Pro Ile Leu Asp Glu Arg Asn Lys Thr Ala Ser Val Ala Val Ala		270
	275	280
Leu Met Gly Ser Leu Phe Gly Glu Lys Leu Met		285
	290	295
<210> 73		
<211> 12		
<212> PRT		
<213> 人工序列		
<220>		
<223> 接头序列1,在实验室中合成		
<400> 73		
Gly Ser Asn Asn Asn Asn Asn Asn Gly Ser Gly Gly		

1	5	10
<210> 74		
<211> 13		
<212> PRT		
<213> 人工序列		
<220>		
<223> 接头序列2,在实验室中合成		
<400> 74		
Ser Gly Ser Asn Asn Asn Asn Asn Asn Gly Ser Gly Gly		
1	5	10
<210> 75		
<211> 362		
<212> PRT		
<213> 人工序列		
<220>		
<223> BHA融合蛋白,在实验室中合成		
<400> 75		
Met Lys Pro Ile Ser Ile Ile Gly Val Pro Met Asp Leu Gly Gln Thr		
1	5	10 15
Arg Arg Gly Pro Asp Met Gly Pro Ser Ala Met Arg Tyr Ala Gly Val		
20	25	30
Ile Glu Arg Leu Glu Arg Leu His Tyr Asp Ile Glu Asp Leu Gly Asp		
35	40	45
Ile Pro Ile Gly Lys Ala Glu Arg Leu His Glu Gln Gly Asp Ser Arg		
50	55	60
Leu Arg Asn Leu Lys Ala Val Ala Glu Ala Asn Glu Lys Leu Ala Ala		
65	70	75 80
Ala Val Asp Gln Val Val Gln Arg Gly Arg Phe Pro Leu Val Leu Gly		
85	90	95
Gly Asp His Ser Ile Ala Ile Gly Thr Leu Ala Gly Val Ala Lys His		
100	105	110
Tyr Glu Arg Leu Gly Val Ile Trp Tyr Asp Ala His Gly Asp Val Asn		
115	120	125
Thr Ala Glu Thr Ser Pro Ser Gly Asn Ile His Gly Met Pro Leu Ala		
130	135	140
Ala Ser Leu Gly Phe Gly His Pro Ala Leu Thr Gln Ile Gly Gly Tyr		
145	150	155 160
Cys Pro Lys Ile Lys Pro Glu His Val Val Leu Ile Gly Val Arg Ser		
165	170	175

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

<220>

<223> BAH融合蛋白,在实验室中合成

<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> 人工序列

<220>

<223> 5'-正向-ABD引物, 在实验室中合成

<400> 77

gcgcagcatg atgaagccgt ggatgcgaac agcttagctg aagctaaagt cttagctaac 60
agagaacttg acaaatatgg agtaagtgac tattacaaga acc 103

<210> 78

<211> 98

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 5'-反向-ABD引物, 在实验室中合成

<400> 78

ttaaggtaat gcagctaaaa ttcatctat cagtgccttt acaccttcaa cagttttggc 60
attgttgatt aggttcttgt aatagtcact tactccat 98

<210> 79

<211> 35

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 用于克隆ABD的正向引物, 在实验室中合成

<400> 79

gcacccat caccatcacg cgcagcatga tgaag 35

<210> 80

<211> 38

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 用于克隆ABD的反向引物, 在实验室中合成

<400> 80

cgggatcctt aaggtaatgc agctaaaatt tcacttat 38

<210> 81

<211> 33

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 用于克隆BCA的正向引物, 在实验室中合成

<400> 81
ggaattccca tatgaagcca atttcaatta tcg 33
<210> 82
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 用于克隆BCA的反向引物,在实验室中合成
<400> 82
gtgatggtga tggatgatgca 20
<210> 83
<211> 33
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 用于克隆BHA的正向引物,在实验室中合成
<400> 83
ggaattccca tatgaagcca atttcaatta tcg 33
<210> 84
<211> 38
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 用于克隆BHA的反向引物,在实验室中合成
<400> 84
cgggatcctt aaggtaatgc agctaaaatt tcatttat 38
<210> 85
<211> 39
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 用于克隆ABD的正向引物,在实验室中合成
<400> 85
cggtgttttg tgaaaaactc atggcgcagc atgatgaag 39
<210> 86
<211> 56
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>

<223> 用于克隆ABD的反向引物,在实验室中合成

<400> 86

cgggatcctt agtgatgggtg atggatgatga ggtaatgcag ctaaaatttc atctat 56

<210> 87

<211> 33

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 用于克隆BAH的正向引物,在实验室中合成

<400> 87

ggaattccca tatgaagcca atttcaatta tcg 33

<210> 88

<211> 56

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 用于克隆BAH的反向引物,在实验室中合成

<400> 88

cgggatcctt agtgatgggtg atggatgatga ggtaatgcag ctaaaatttc atctat 56

<210> 89

<211> 305

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> BCA (S161C) - His, 在实验室中合成

<400> 89

Met Lys Pro Ile Ser Ile Ile Gly Val Pro Met Asp Leu Gly Gln Thr

1 5 10 15

Arg Arg Gly Val Asp Met Gly Pro Ser Ala Met Arg Tyr Ala Gly Val

20 25 30

Ile Glu Arg Leu Glu Arg Leu His Tyr Asp Ile Glu Asp Leu Gly Asp

35 40 45

Ile Pro Ile Gly Lys Ala Glu Arg Leu His Glu Gln Gly Asp Ser Arg

50 55 60

Leu Arg Asn Leu Lys Ala Val Ala Glu Ala Asn Glu Lys Leu Ala Ala

65 70 75 80

Ala Val Asp Gln Val Val Gln Arg Gly Arg Phe Pro Leu Val Leu Gly

85 90 95

Gly Asp His Ser Ile Ala Ile Gly Thr Leu Ala Gly Val Ala Lys His

100	105	110
Tyr Glu Arg Leu Gly Val Ile Trp Tyr Asp Ala His Gly Asp Val Asn		
115	120	125
Thr Ala Glu Thr Ser Pro Ser Gly Asn Ile His Gly Met Pro Leu Ala		
130	135	140
Ala Ser Leu Gly Phe Gly His Pro Ala Leu Thr Gln Ile Gly Gly Tyr		
145	150	155
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
Pro Val Ile Gly Gly Leu Thr Tyr Arg Glu Ser His Leu Ala Met Glu		
245	250	255
Met Leu Ala Glu Ala Gln Ile Ile Thr Ser Ala Glu Phe Val Glu Val		
260	265	270
Asn Pro Ile Leu Asp Glu Arg Asn Lys Thr Ala Ser Val Ala Val Ala		
275	280	285
Leu Met Gly Ser Leu Phe Gly Glu Lys Leu Met His His His His His		
290	295	300

His

305

<210> 90

<211> 42

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> N-ABDHind-R引物,在实验室中合成

<400> 90

acagctaaaa gcttatcagc ctaggatccg ccgctacat tg 42

<210> 91

<211> 38

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> C-ABDNde-F引物,在实验室中合成

<400> 91

tagctgatca tatgttatgc gatggatcca gtaacaac 38

<210> 92

<211> 33

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> C-ABDHind-R,在实验室中合成

<400> 92

gaccctaaaa gcttaatggt gatggtgatg atg 33

<210> 93

<211> 34

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> HARGBam-F引物,在实验室中合成

<400> 93

ttagctgggg atccgccaag tccagaacca tagg 34

<210> 94

<211> 35

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> HARGHind-R引物,在实验室中合成

<400> 94

gagatcaaag cttacttagg tgggttaagg tagtc 35

<210> 95

<211> 35

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> HARGNde-F,在实验室中合成

<400> 95

taggtgcat atgagcgcca agtccagaac catag 35

<210> 96

<211> 41

<212> DNA

<213> 人工序列
<220>
<223> HARGBam-R引物,在实验室中合成
<400> 96
atcagctagg atcccttagg tgggttaagg tagtcaatag g 41
<210> 97
<211> 36
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> BCABam-F引物,在实验室中合成
<400> 97
atgctagtagg atccatgaag ccaatttcaa ttatcg 36
<210> 98
<211> 38
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> BCAHind-R引物,在实验室中合成
<400> 98
tcagcctaaa gcttacatga gtttttcacc aaacaacg 38
<210> 99
<211> 35
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> BCANde-F引物,在实验室中合成
<400> 99
atgctagcca tatgaagcca atttcaatta tcggg 35
<210> 100
<211> 37
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> BCABam-R引物,在实验室中合成
<400> 100
tcagctaagg atcccatgag tttttcacca aacaacg 37
<210> 101
<211> 329

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> His-rhArg, 在实验室中合成

<400> 101

```

Met His His His His His His Met Ser Ala Lys Ser Arg Thr Ile Gly
1           5           10           15
Ile Ile Gly Ala Pro Phe Ser Lys Gly Gln Pro Arg Gly Gly Val Glu
           20           25           30
Glu Gly Pro Thr Val Leu Arg Lys Ala Gly Leu Leu Glu Lys Leu Lys
           35           40           45
Glu Gln Glu Cys Asp Val Lys Asp Tyr Gly Asp Leu Pro Phe Ala Asp
           50           55           60
Ile Pro Asn Asp Ser Pro Phe Gln Ile Val Lys Asn Pro Arg Ser Val
65           70           75           80
Gly Lys Ala Ser Glu Gln Leu Ala Gly Lys Val Ala Glu Val Lys Lys
           85           90           95
Asn Gly Arg Ile Ser Leu Val Leu Gly Gly Asp His Ser Leu Ala Ile
           100          105          110
Gly Ser Ile Ser Gly His Ala Arg Val His Pro Asp Leu Gly Val Ile
           115          120          125
Trp Val Asp Ala His Thr Asp Ile Asn Thr Pro Leu Thr Thr Thr Ser
           130          135          140
Gly Asn Leu His Gly Gln Pro Val Ser Phe Leu Leu Lys Glu Leu Lys
145          150          155          160
Gly Lys Ile Pro Asp Val Pro Gly Phe Ser Trp Val Thr Pro Cys Ile
           165          170          175
Ser Ala Lys Asp Ile Val Tyr Ile Gly Leu Arg Asp Val Asp Pro Gly
           180          185          190
Glu His Tyr Ile Leu Lys Thr Leu Gly Ile Lys Tyr Phe Ser Met Thr
           195          200          205
Glu Val Asp Arg Leu Gly Ile Gly Lys Val Met Glu Glu Thr Leu Ser
           210          215          220
Tyr Leu Leu Gly Arg Lys Lys Arg Pro Ile His Leu Ser Phe Asp Val
225          230          235          240
Asp Gly Leu Asp Pro Ser Phe Thr Pro Ala Thr Gly Thr Pro Val Val
           245          250          255
Gly Gly Leu Thr Tyr Arg Glu Gly Leu Tyr Ile Thr Glu Glu Ile Tyr
           260          265          270

```

Lys Thr Gly Leu Leu Ser Gly Leu Asp Ile Met Glu Val Asn Pro Ser
 275 280 285
 Leu Gly Lys Thr Pro Glu Glu Val Thr Arg Thr Val Asn Thr Ala Val
 290 295 300
 Ala Ile Thr Leu Ala Cys Phe Gly Leu Ala Arg Glu Gly Asn His Lys
 305 310 315 320
 Pro Ile Asp Tyr Leu Asn Pro Pro Lys
 325

<210> 102

<211> 329

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> His-rhArg-单-Cys, 在实验室中合成

<400> 102

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

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

<210> 103

<211> 322

<212> PRT

<213> 智人

<400> 103

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

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

Pro Lys

<210> 104

<211> 322

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> rhArg-单-Cys,在实验室中合成

<400> 104

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

50	55	60
Gln Ile Val Lys Asn Pro Arg Ser Val Gly Lys Ala Ser Glu Gln Leu		
65	70	75
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
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
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
Pro Lys		320
<210> 105		
<211> 46		
<212> PRT		
<213> 人工序列		
<220>		

〈223〉 A (EAAAK) 4ALEA- (EAAAK) 4A肽接头,在实验室中合成

<400> 105

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

$\langle 210 \rangle$ 106

<211> 15

<212> PRT

〈213〉 人工序列

 $\langle 220 \rangle$

〈223〉 G4SG4SG3SG肽接头,在实验室中合成

<400> 106

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

1 5 10 15

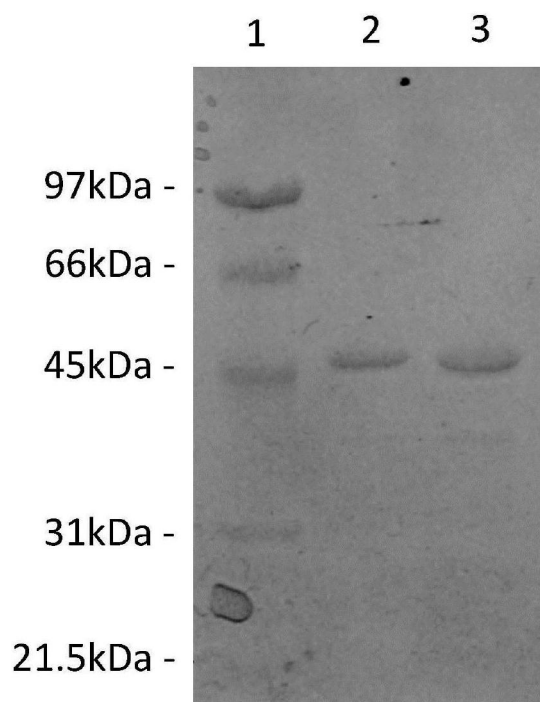


图1

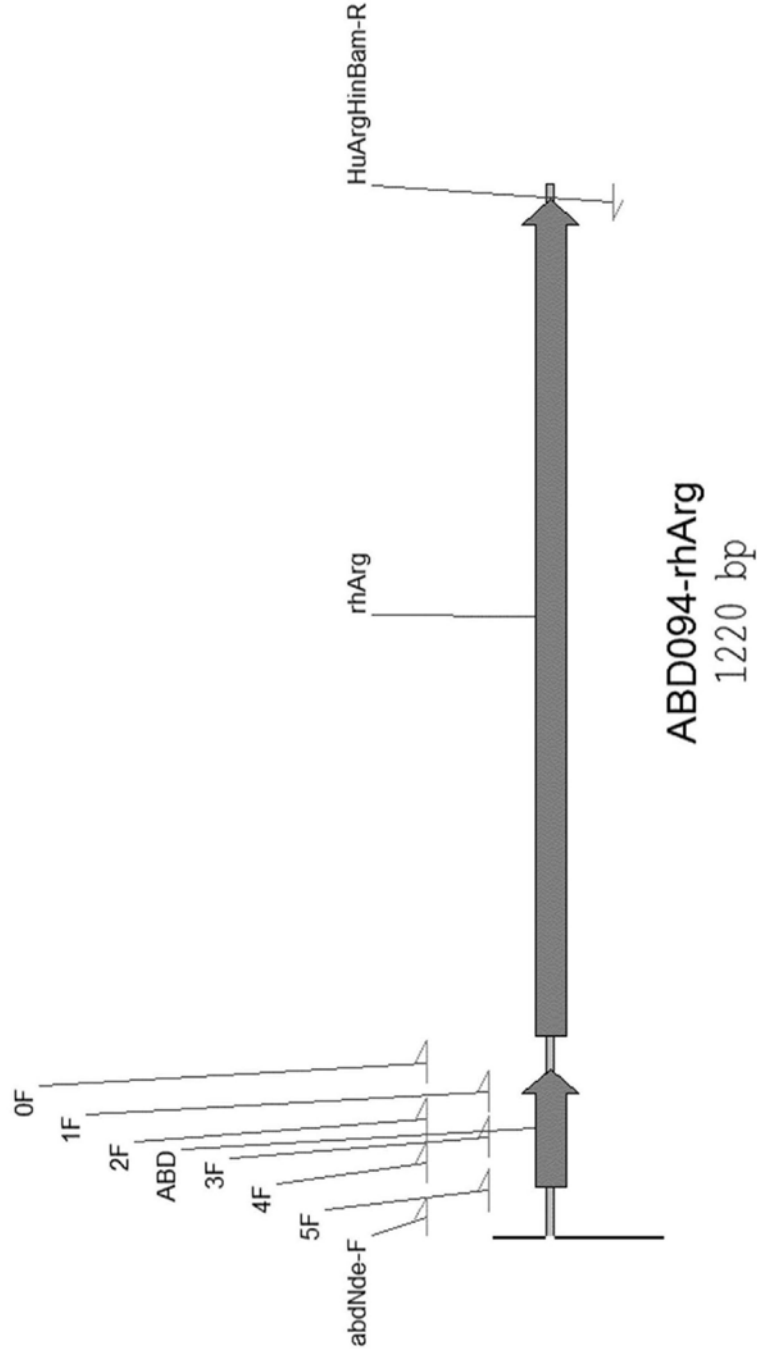


图2A

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

图2B

MKPISIIGVPMDLGQTRRGVDMGPSAMRYAGVIERLERLHYDIEDLGDIPIGKAERLHEQ
 GDSRLRNLKAVAEANEKLAAVDQVVQRGRFPLVLGGDHSIAIGTLAGVAKHYERLGVIW
 YDAHGDVNTAETSPSGNIHGMPLAASLGFGHPALTQIGGYCPKIKPEHVVLIGVRSDEG
 EKKFIREKGIKIYTMHEVDRLGMTRVMEETIAYLKERTDGVHLSLDLDGLDPSDAPGVGT
 PVIGGLTYRESHLAMEMLAEAQIITSAEFVEVNPILDERNKTASVAVALMGSLFGEKLMH
 HHHHH

图3

BCA	MKPISIIGVPMDLGQTRRGVDMGPSAMRYAGVIERLERLHYDIEDLGDIPIGKAERLHEQ
BHA	MKPISIIGVPMDLGQTRRGVDMGPSAMRYAGVIERLERLHYDIEDLGDIPIGKAERLHEQ
BAH	MKPISIIGVPMDLGQTRRGVDMGPSAMRYAGVIERLERLHYDIEDLGDIPIGKAERLHEQ

BCA	GDSRLRNLKAVAEANEKLAAAVDQVVQRGRFPLVLGGDHSIAIGTLAGVAKHYERLGVW
BHA	GDSRLRNLKAVAEANEKLAAAVDQVVQRGRFPLVLGGDHSIAIGTLAGVAKHYERLGVW
BAH	GDSRLRNLKAVAEANEKLAAAVDQVVQRGRFPLVLGGDHSIAIGTLAGVAKHYERLGVW

BCA	YDANGDVNTAETSPSGNINHGMPLAASLGFGHPALTQIGGYCPKIKPEHVVLIGVRSLDEG
BHA	YDANGDVNTAETSPSGNINHGMPLAASLGFGHPALTQIGGYCPKIKPEHVVLIGVRSLDEG
BAH	YDANGDVNTAETSPSGNINHGMPLAASLGFGHPALTQIGGYCPKIKPEHVVLIGVRSLDEG

BCA	EKKFIREKGIKIYTMHEVDRLGMTRVMEETIAYLKERTDGVHLSLDLDGLDPSDAPGVGT
BHA	EKKFIREKGIKIYTMHEVDRLGMTRVMEETIAYLKERTDGVHLSLDLDGLDPSDAPGVGT
BAH	EKKFIREKGIKIYTMHEVDRLGMTRVMEETIAYLKERTDGVHLSLDLDGLDPSDAPGVGT

BCA	PVIGGLTYRESHLAMEMLAEAQIITSAEFVEVNPILDERNKTASVAVALMGSLFGEKLMH
BHA	PVIGGLTYRESHLAMEMLAEAQIITSAEFVEVNPILDERNKTASVAVALMGSLFGEKLMH
BAH	PVIGGLTYRESHLAMEMLAEAQIITSAEFVEVNPILDERNKTASVAVALMGSLFGEKLMH

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

图4

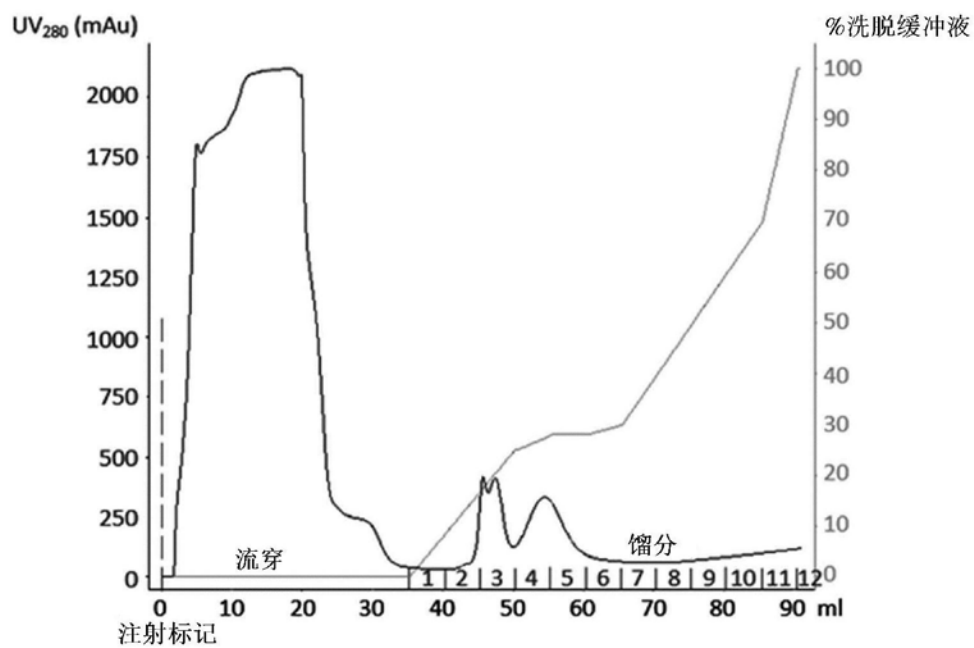


图5A

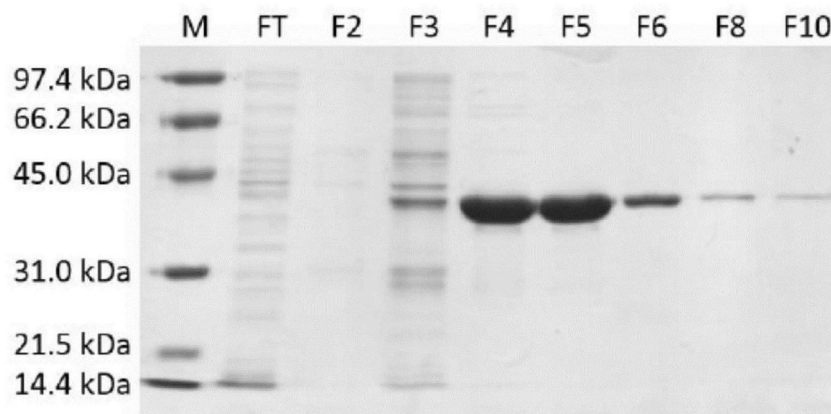


图5B

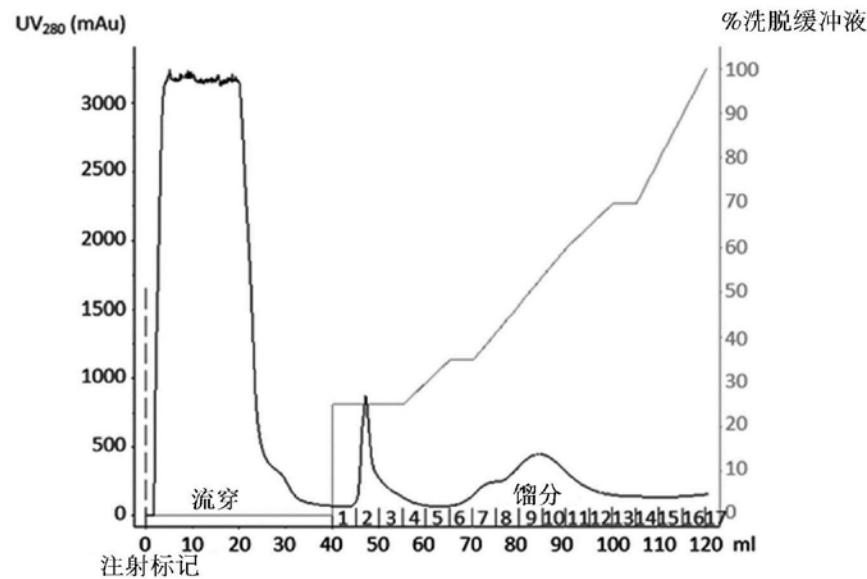


图5C

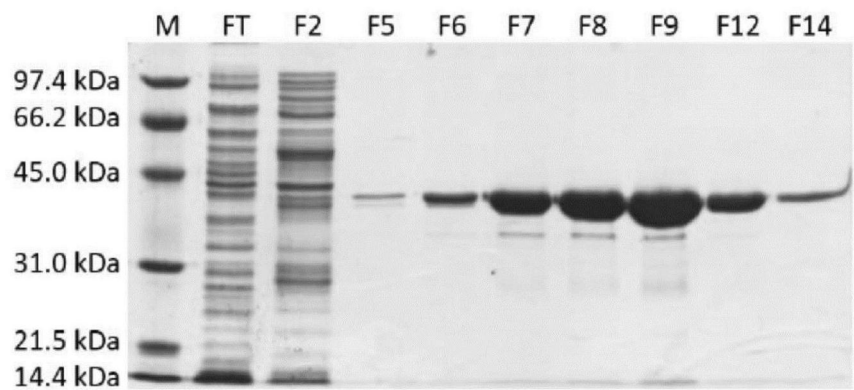


图5D

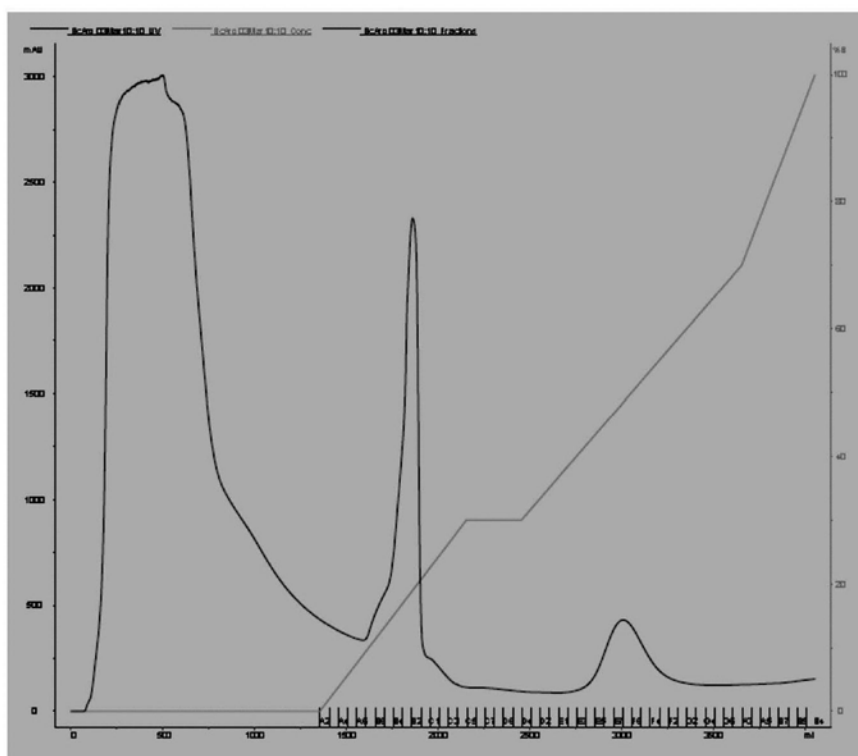


图6A

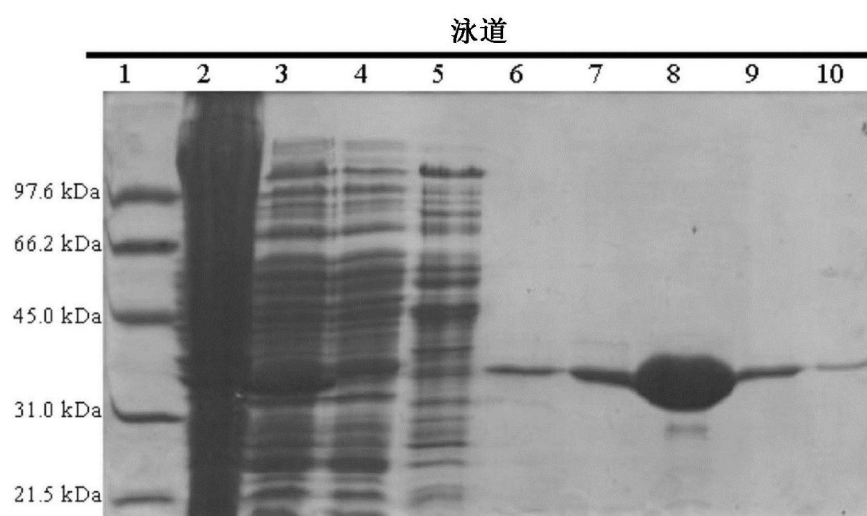


图6B

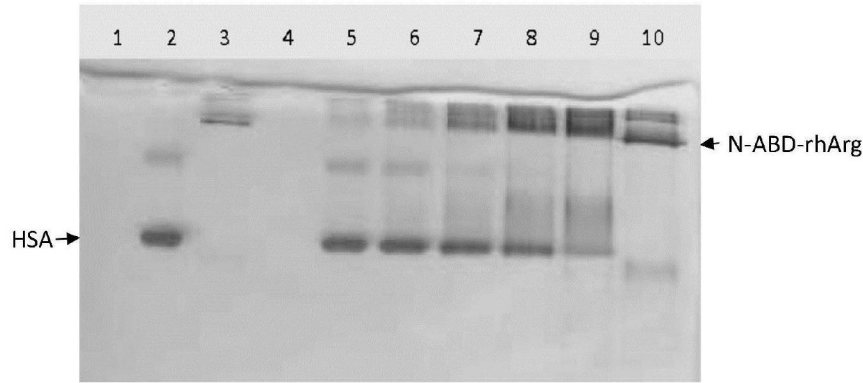


图7

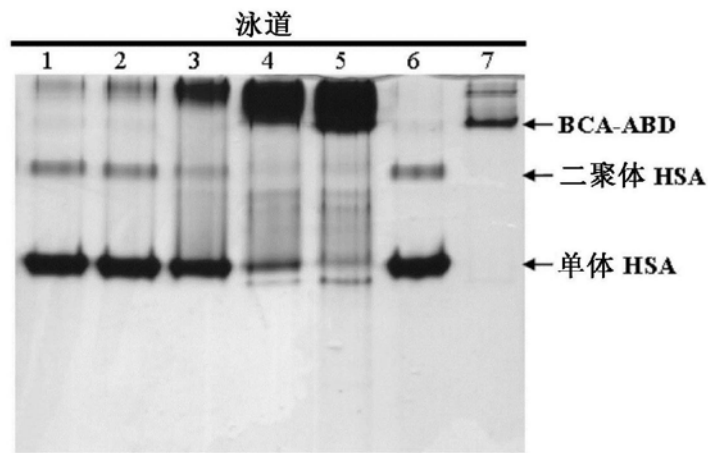


图8

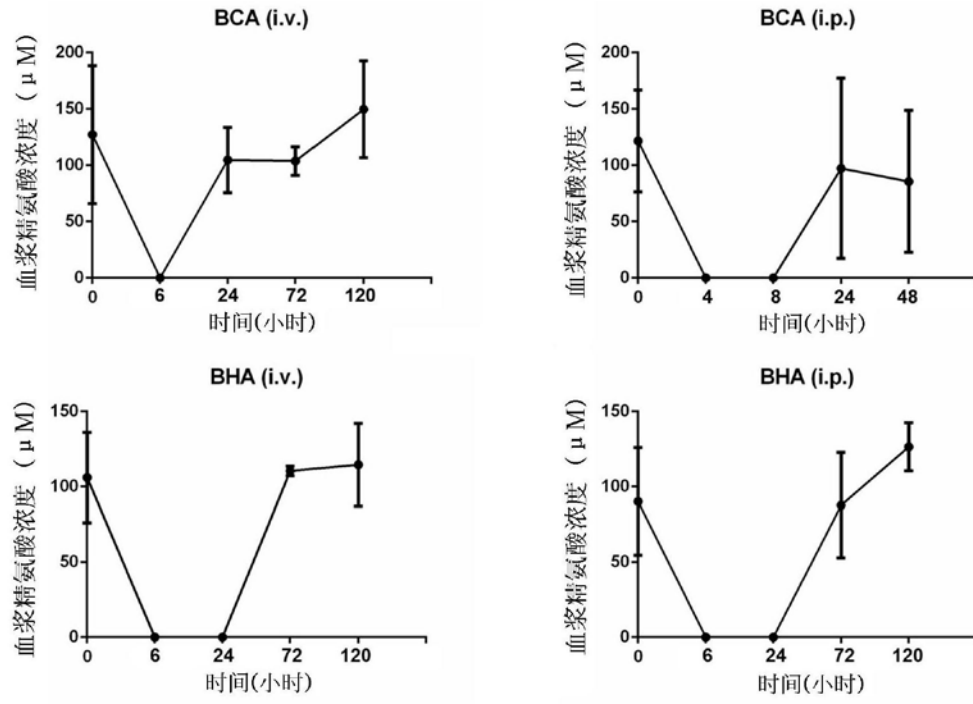


图9

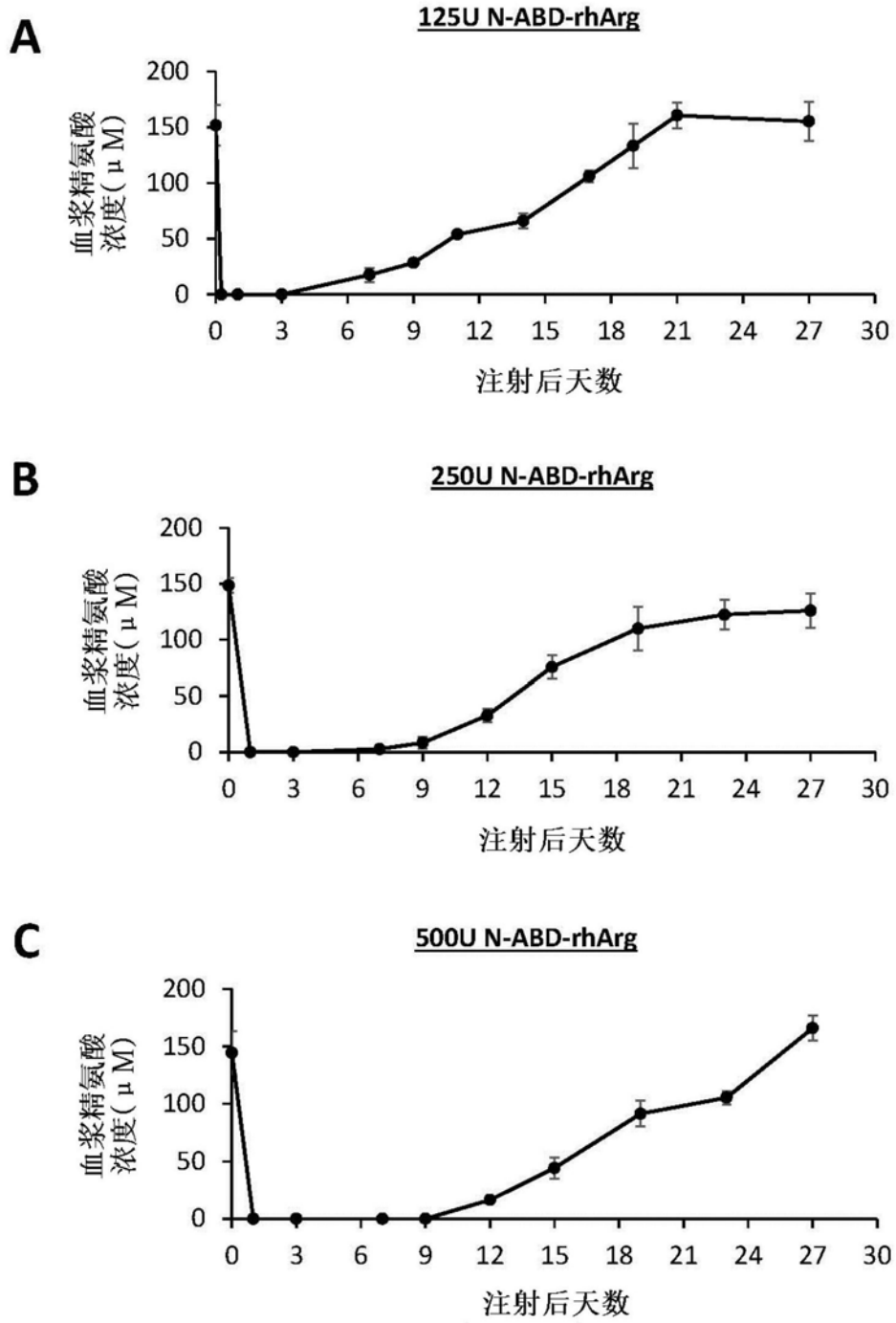


图10

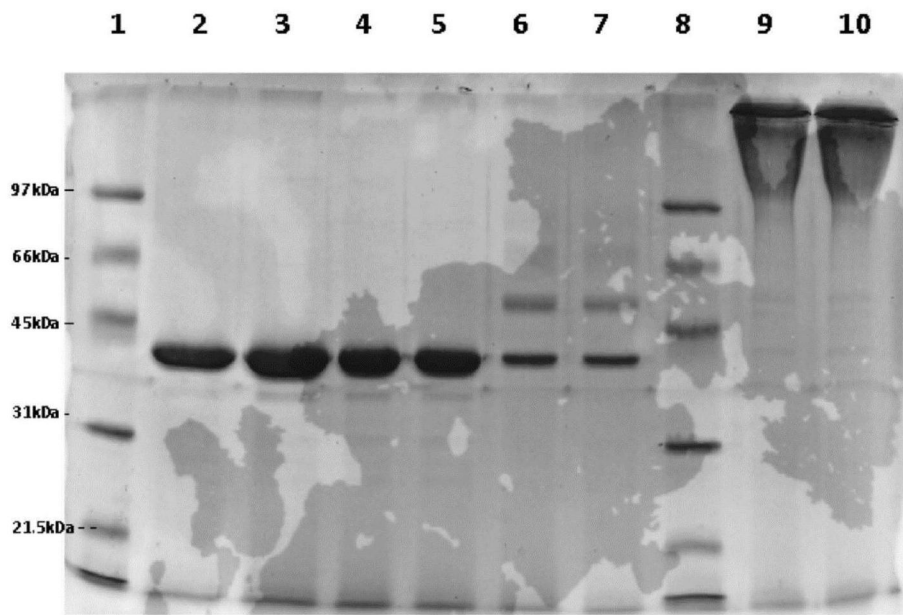


图11

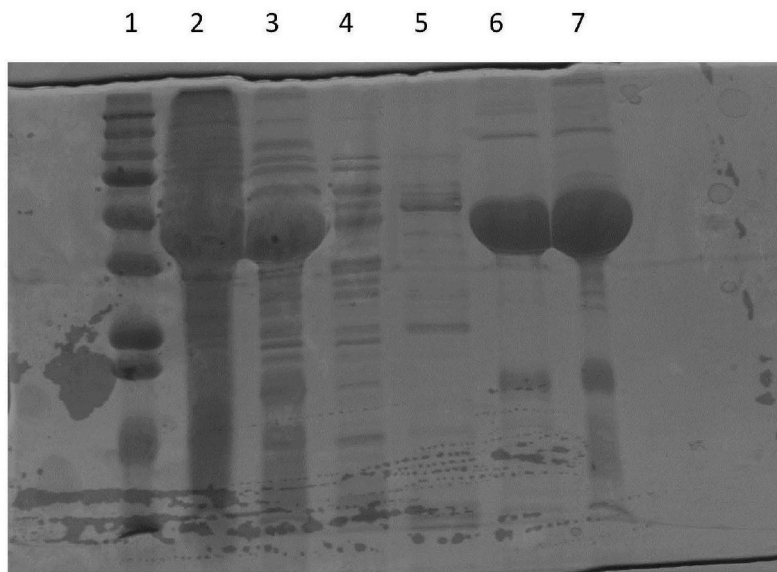


图12

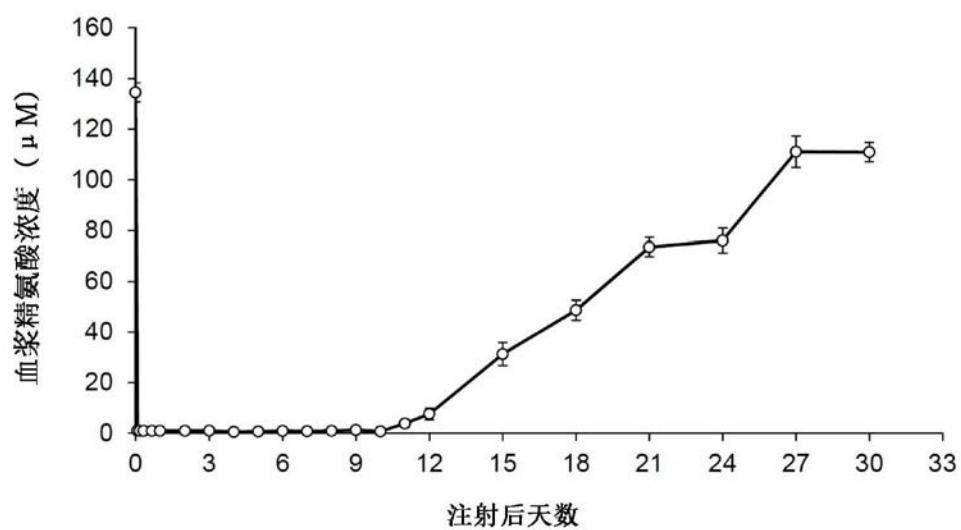
血浆精氨酸浓度

图13

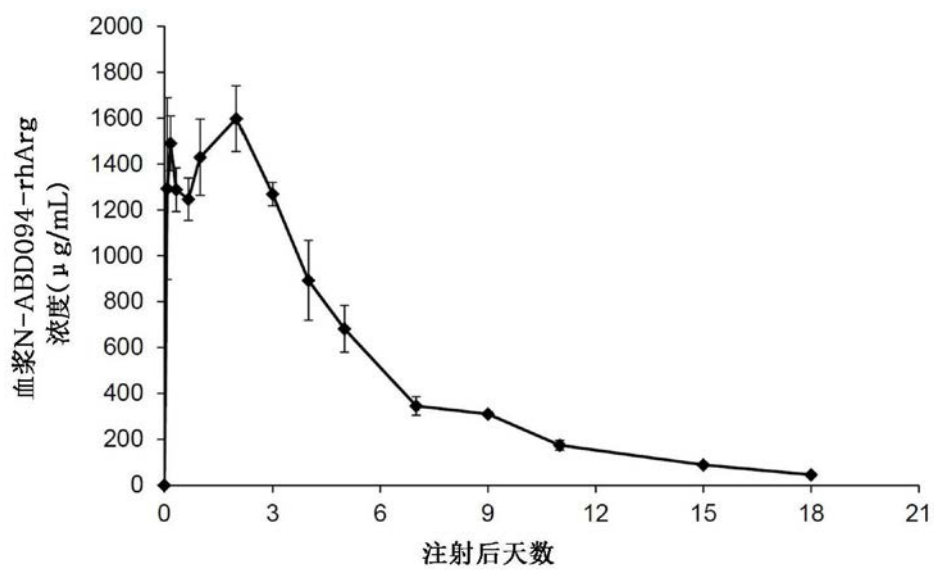
血浆药物浓度

图14

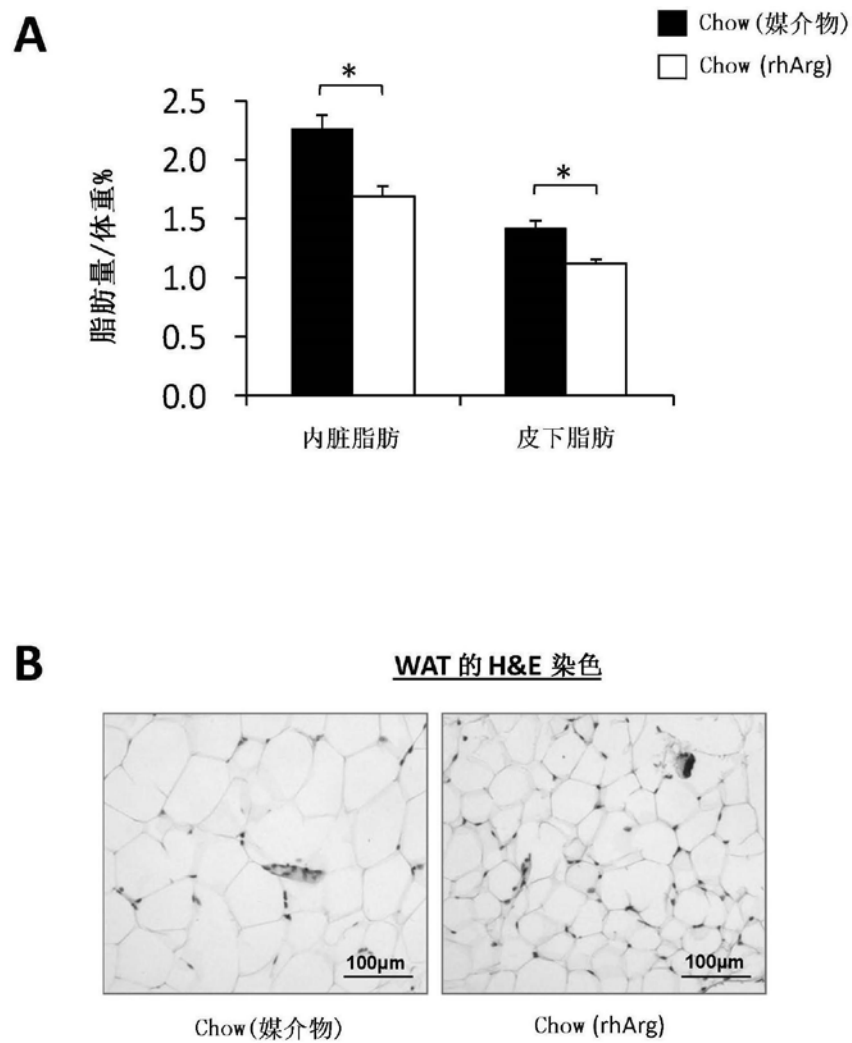


图15

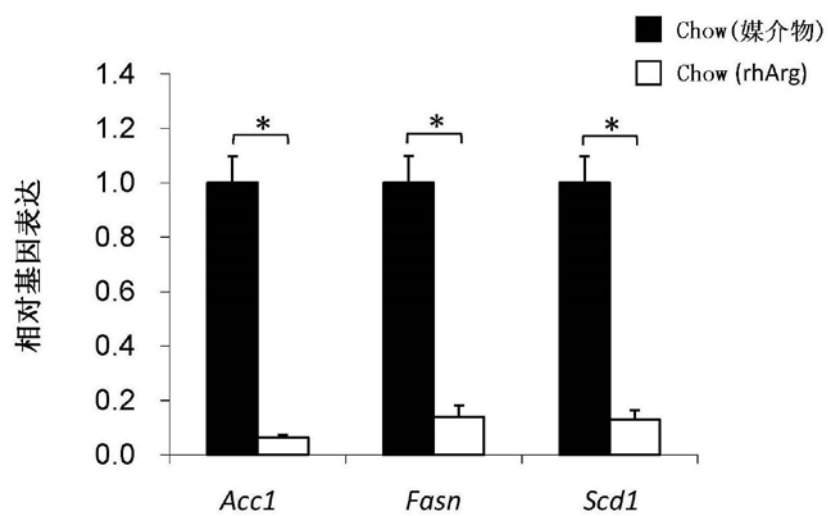
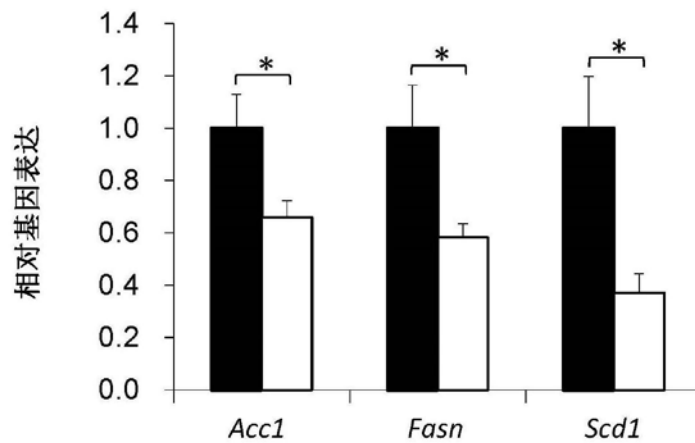
A内脏WAT中的脂肪生成相关基因**B**肝脏中的脂肪生成相关基因

图16

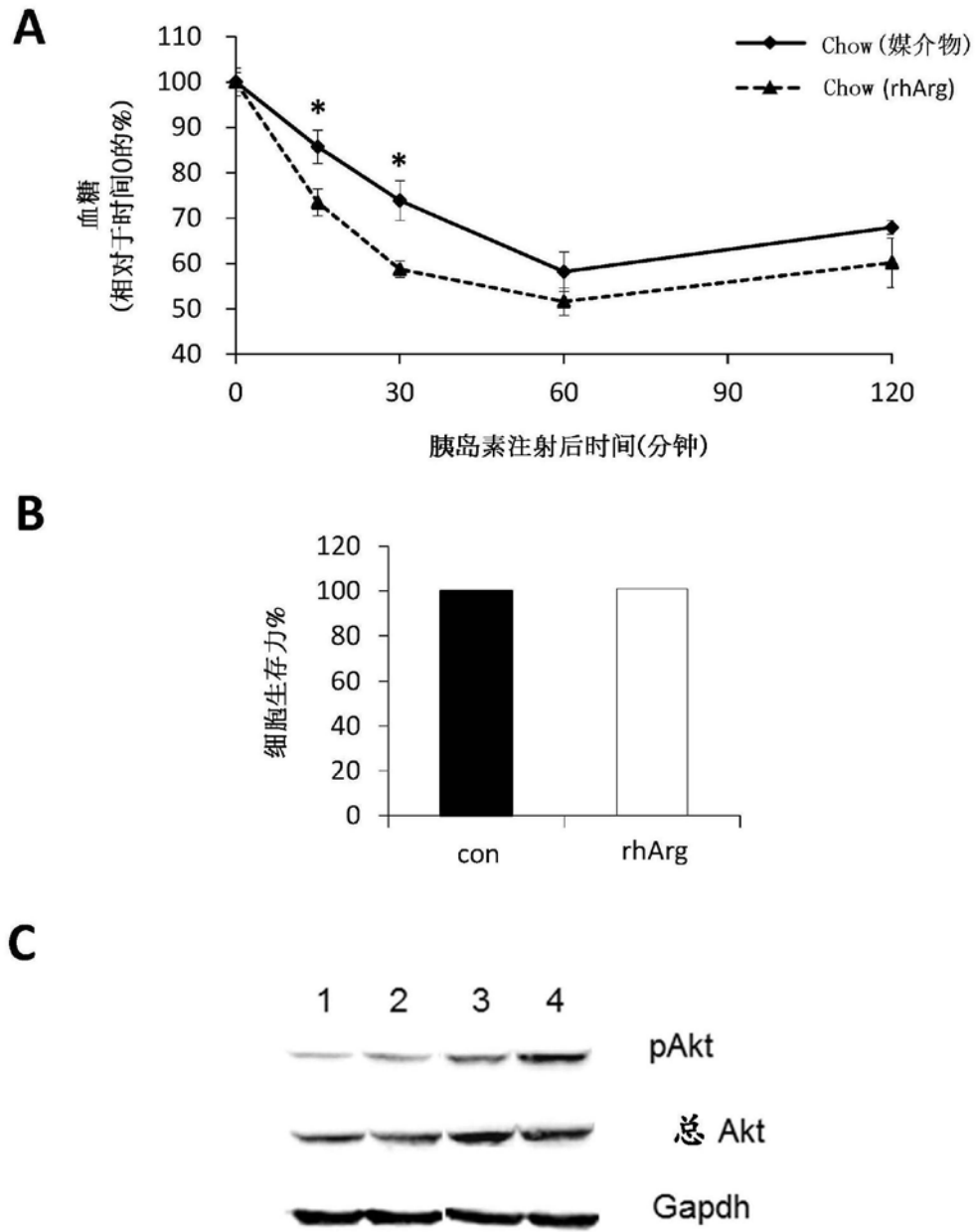


图17

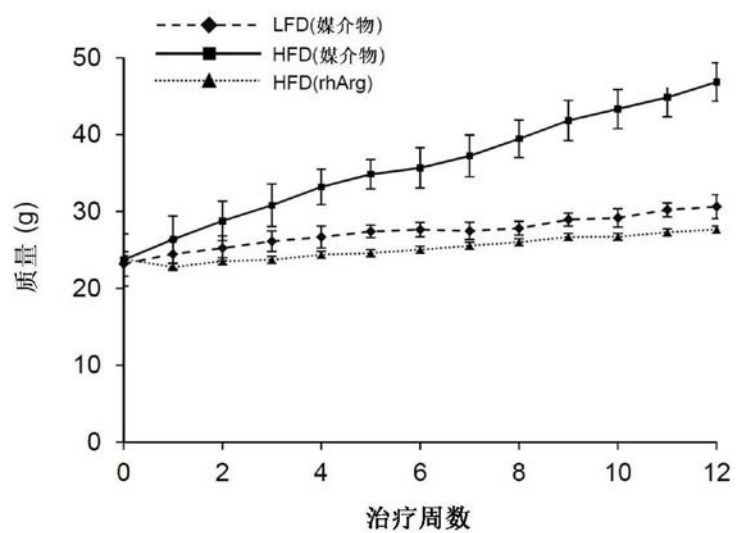
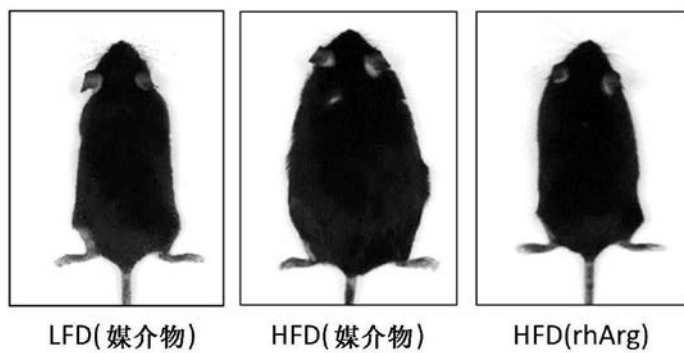
A体重(雄性)**B**

图18

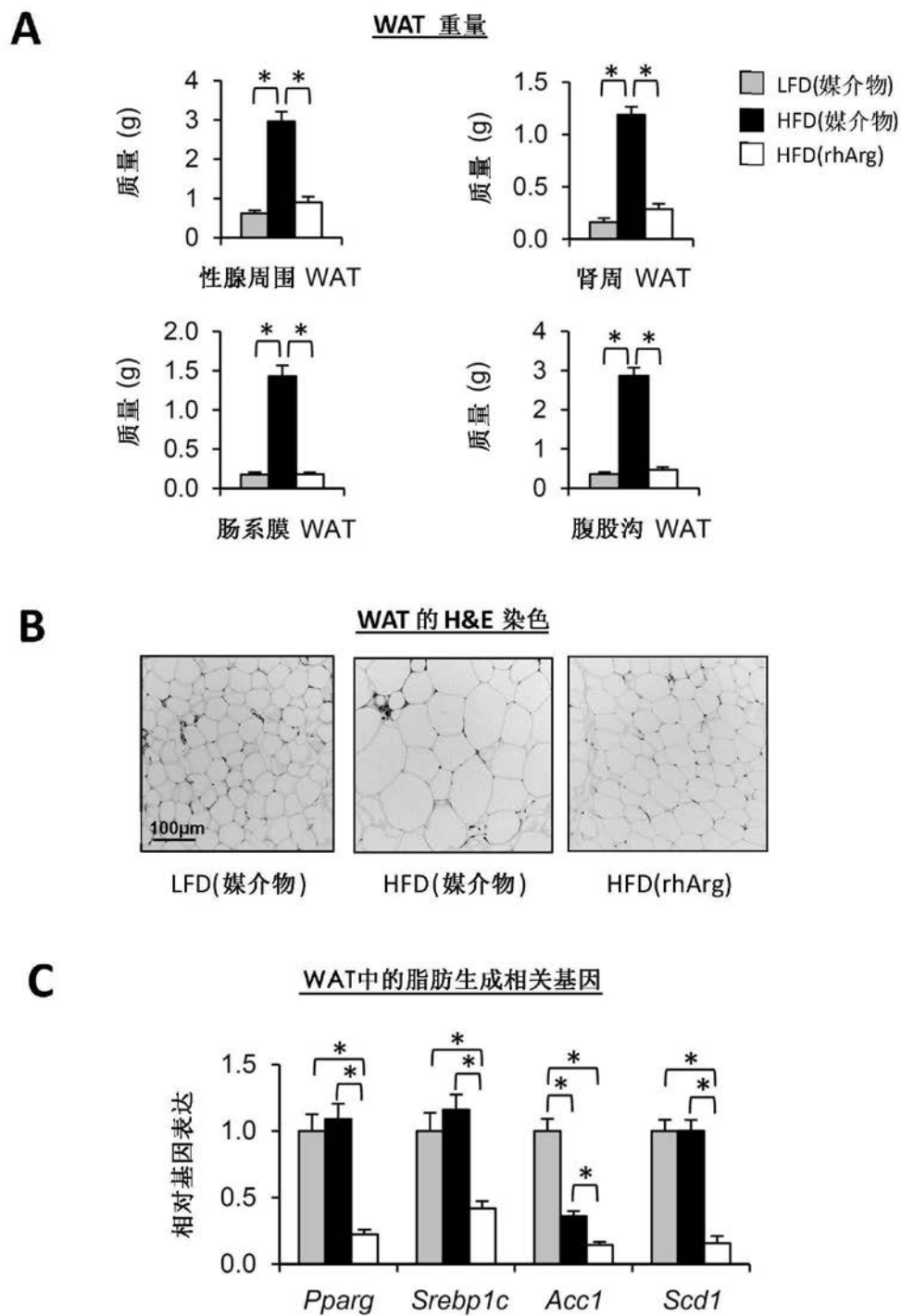


图19

骨骼肌中的脂肪生成相关基因

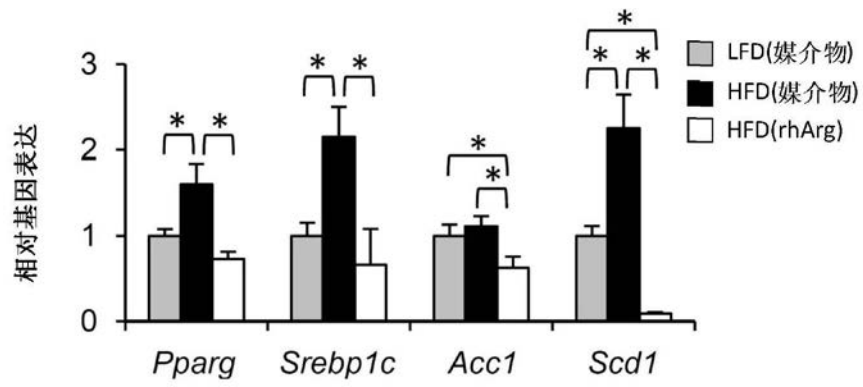


图20

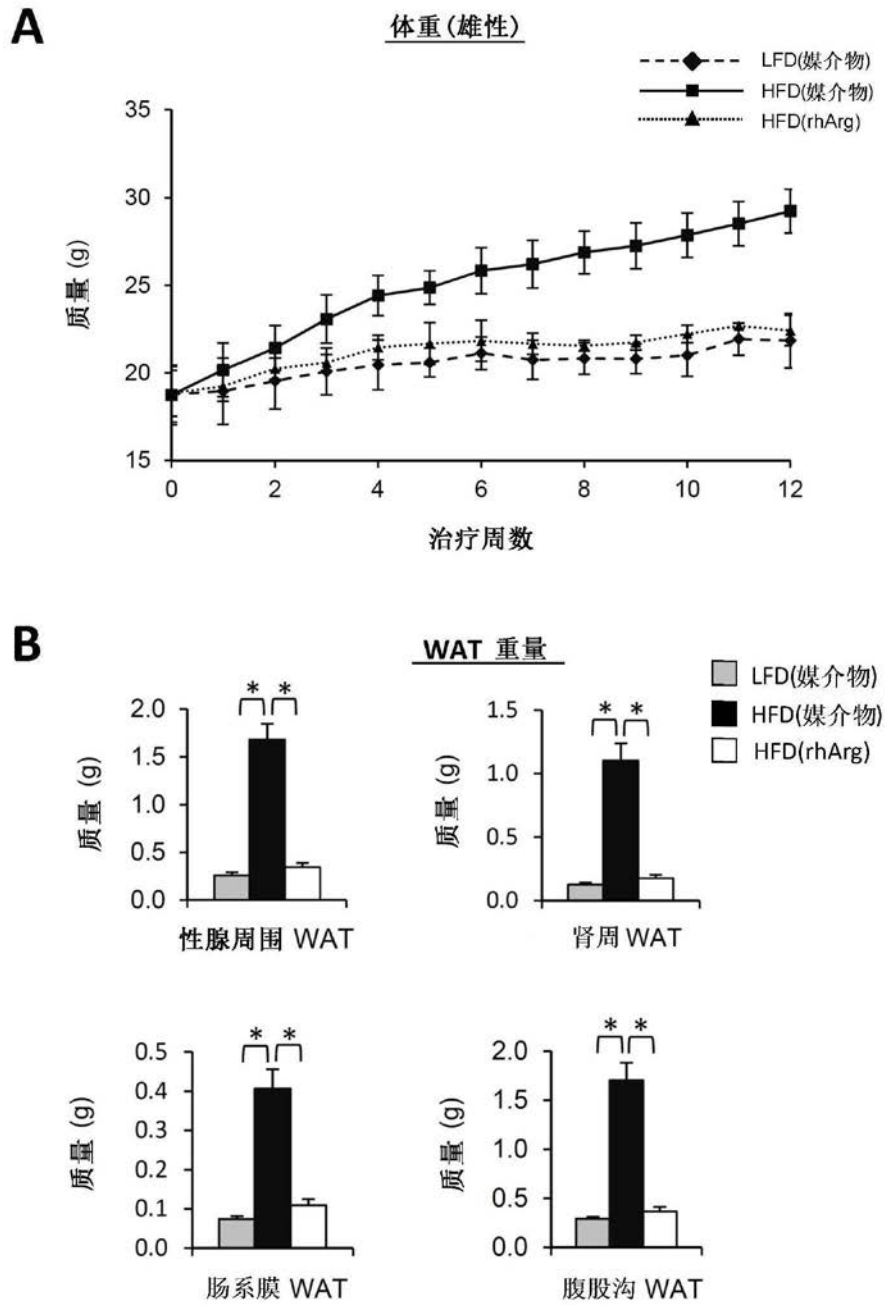


图21

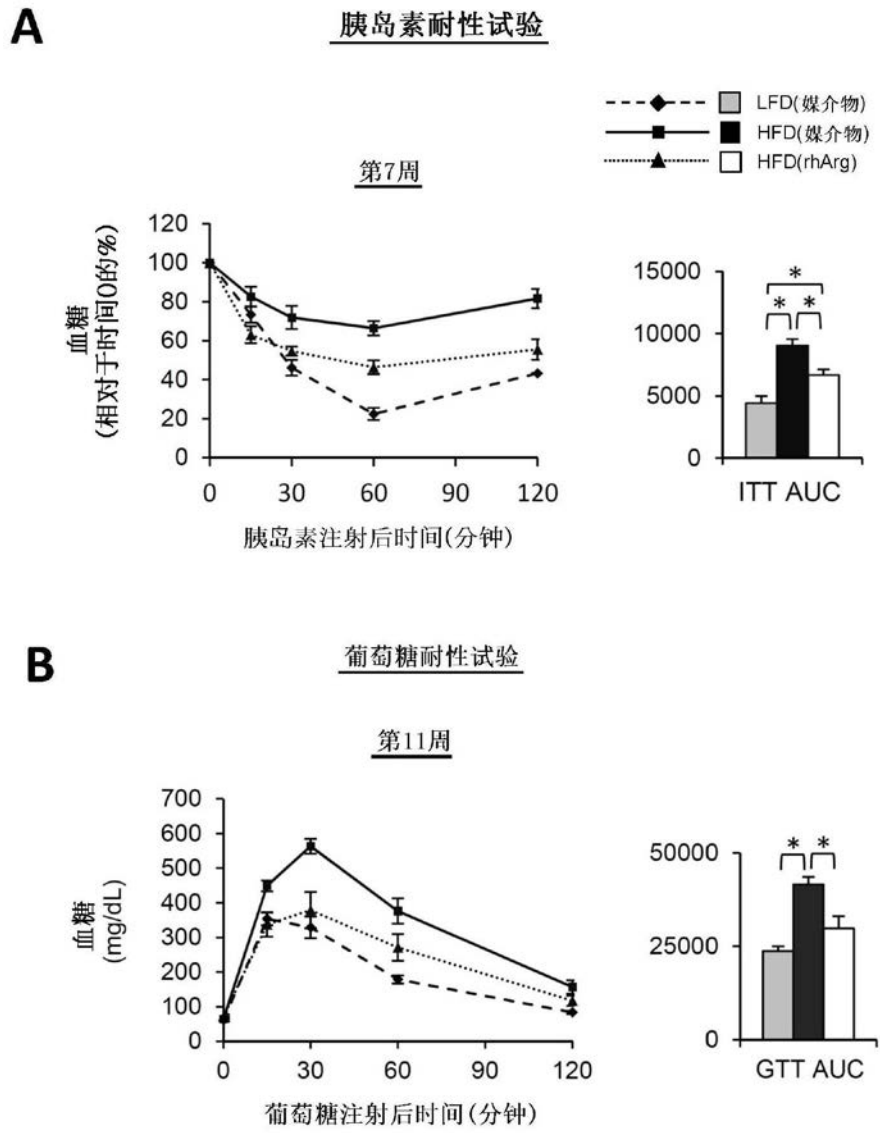


图22

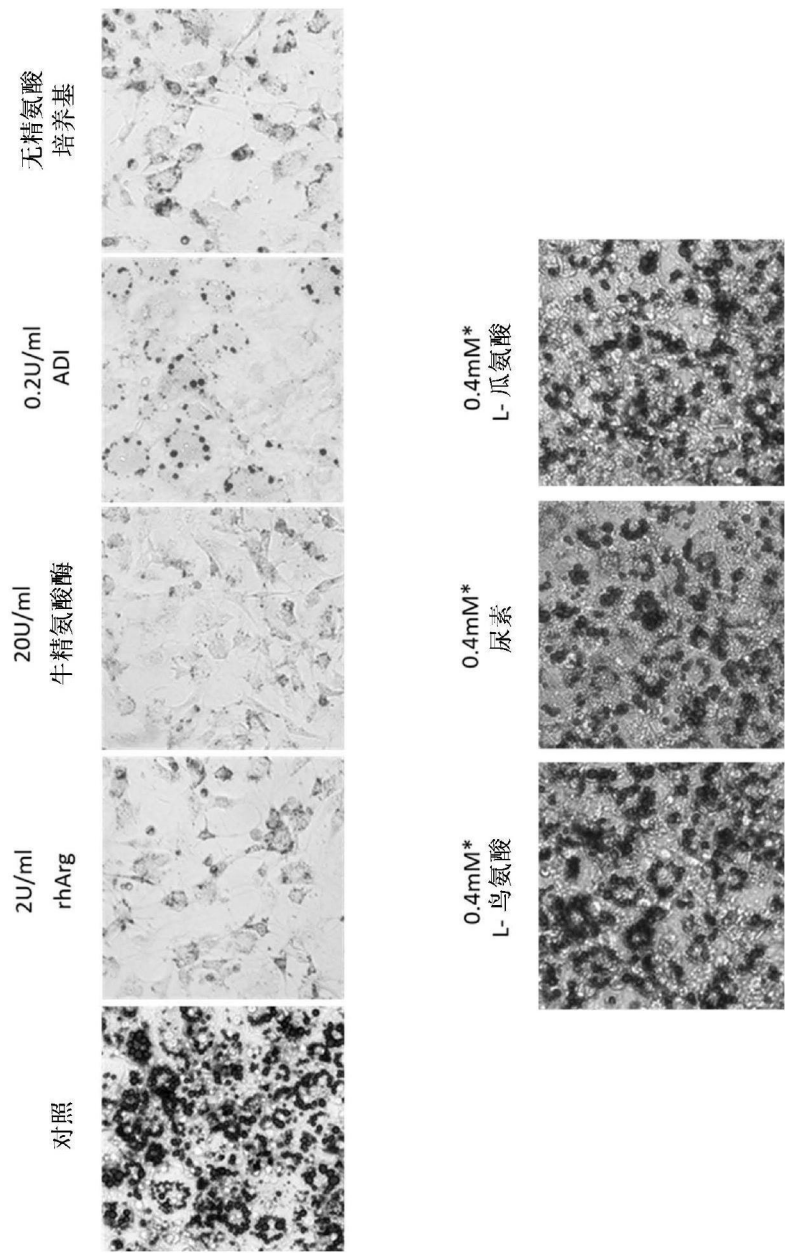


图23

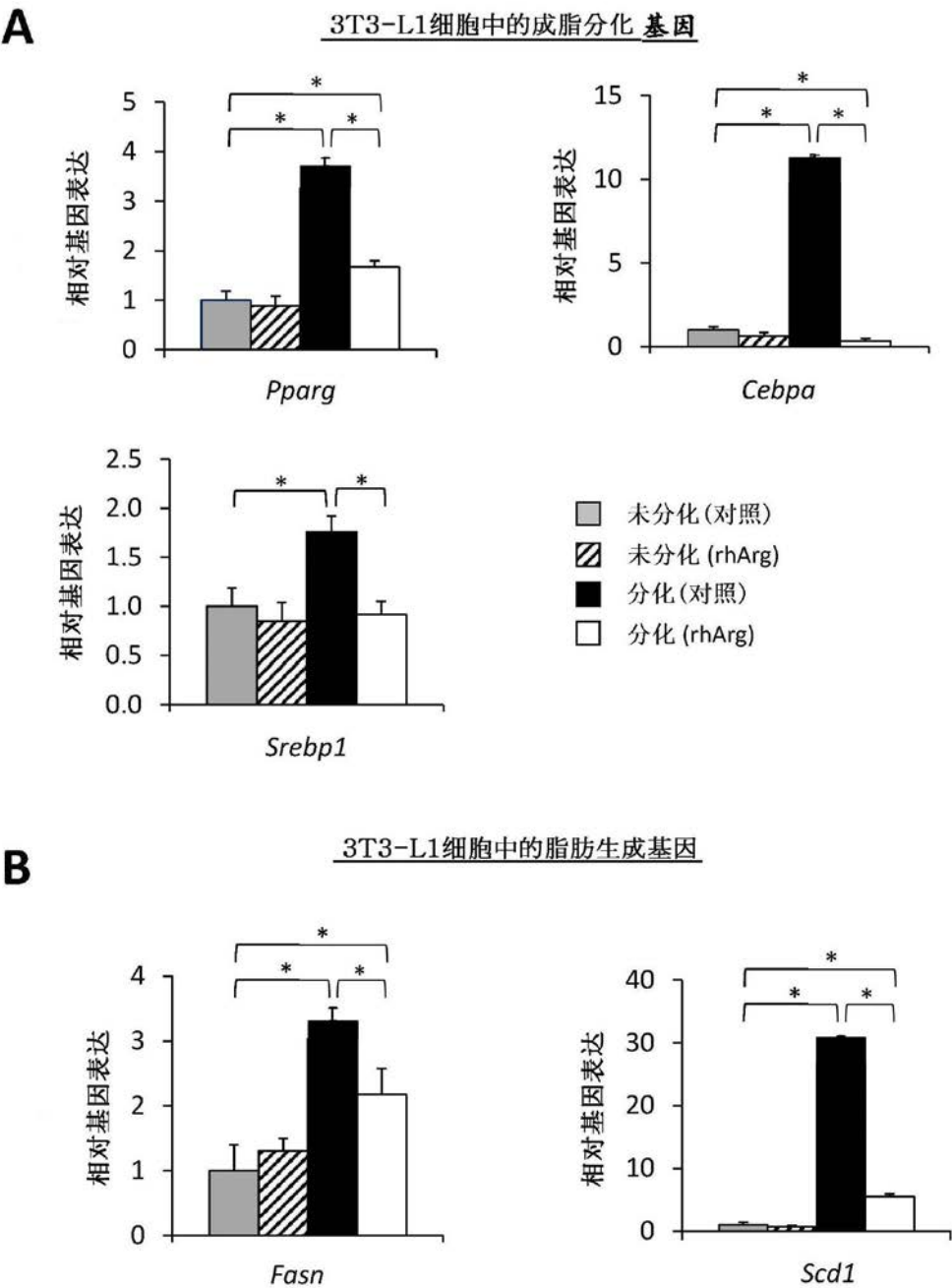


图24

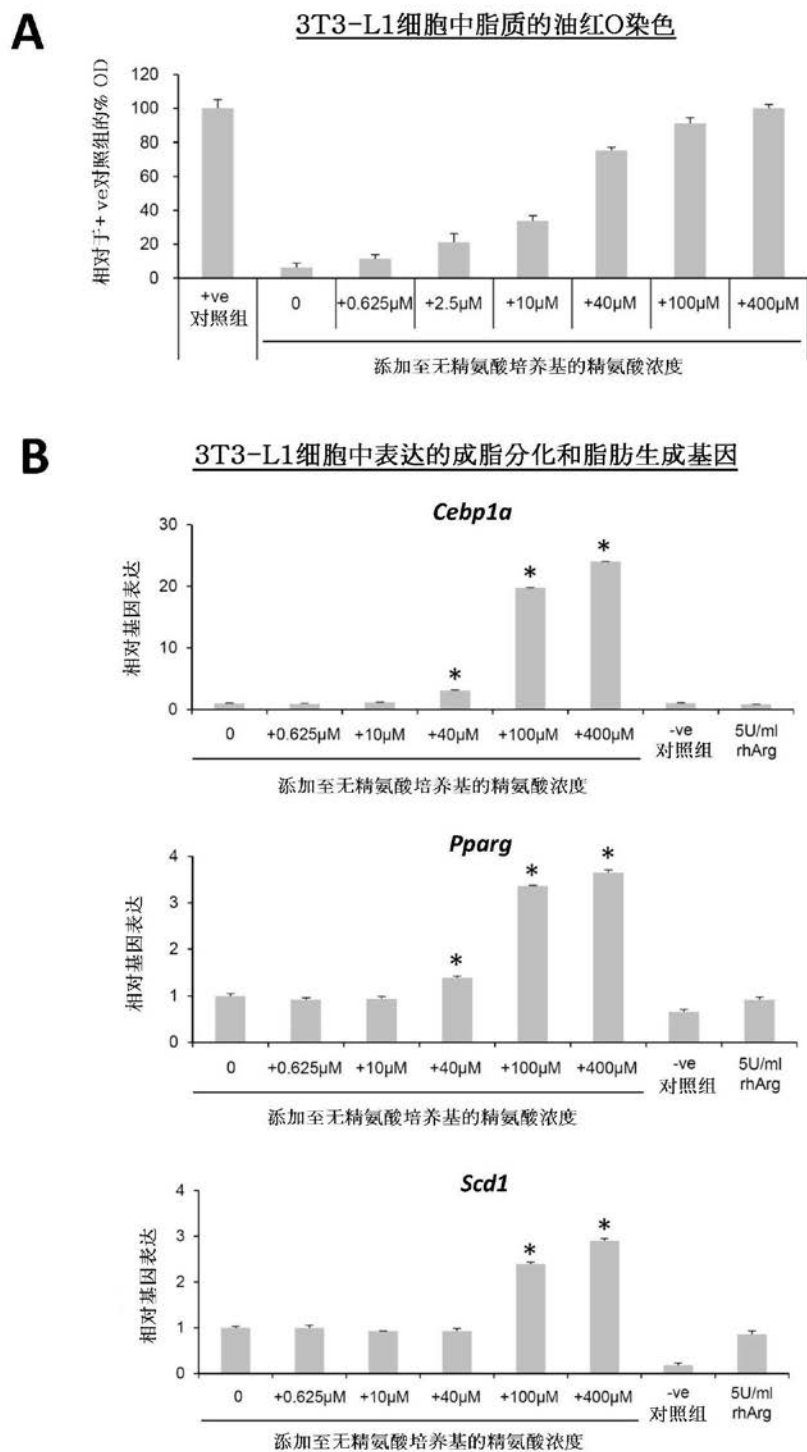


图25

胰岛素耐性试验

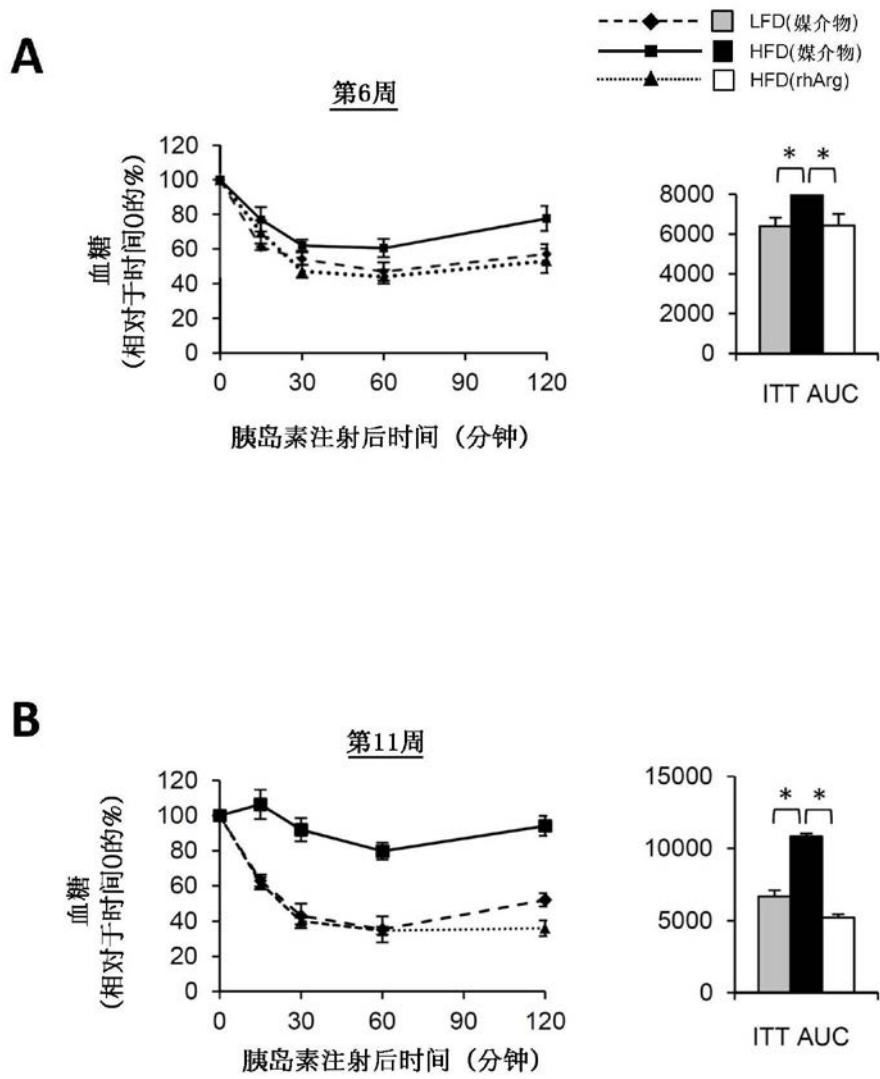


图26

葡萄糖耐性试验

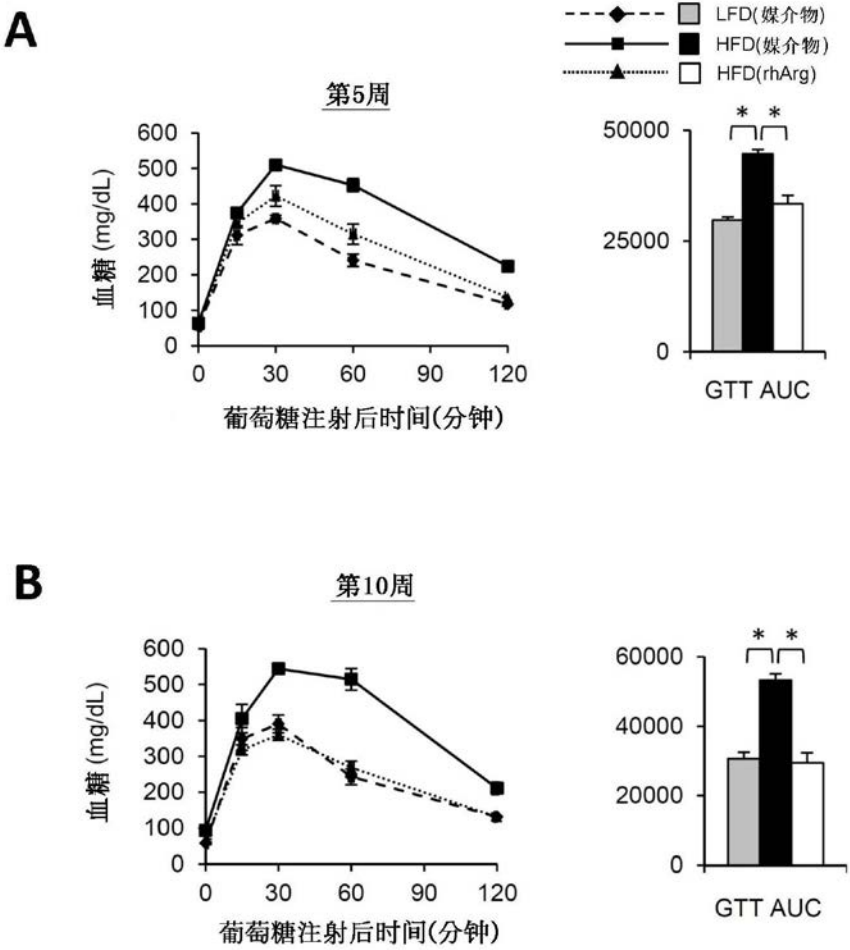


图27

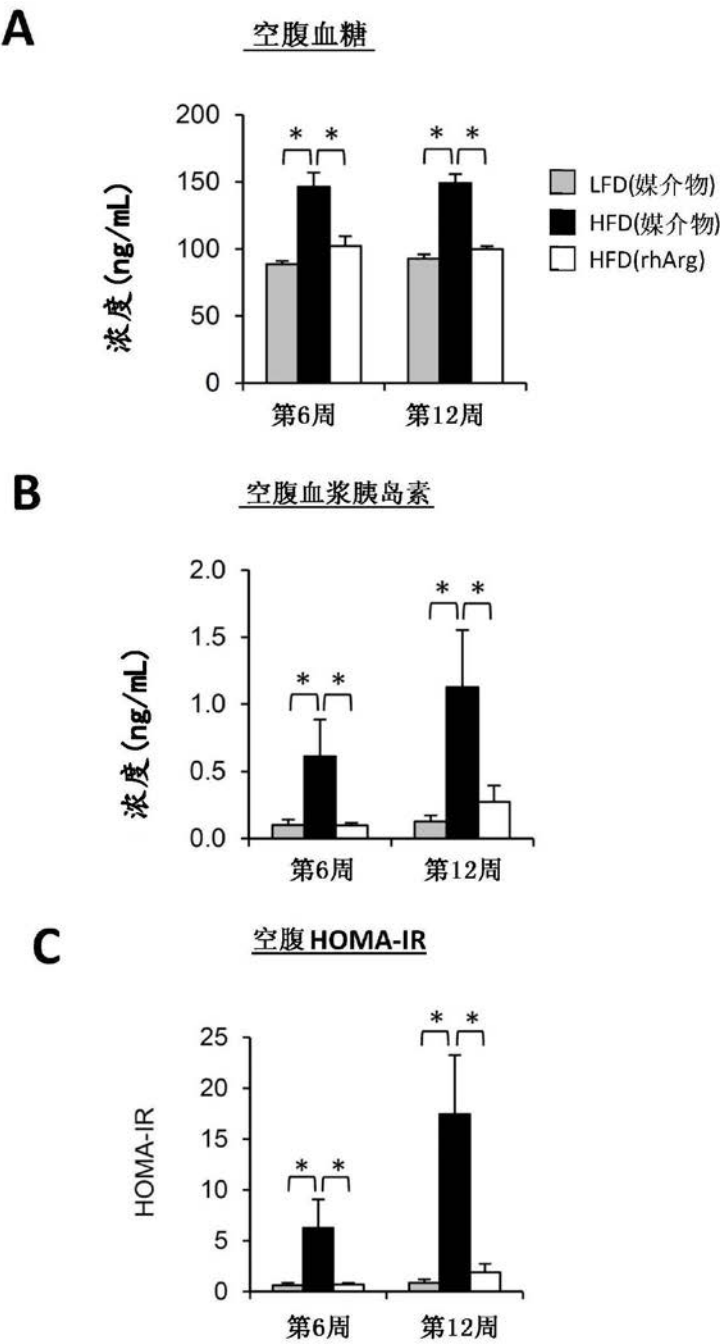


图28

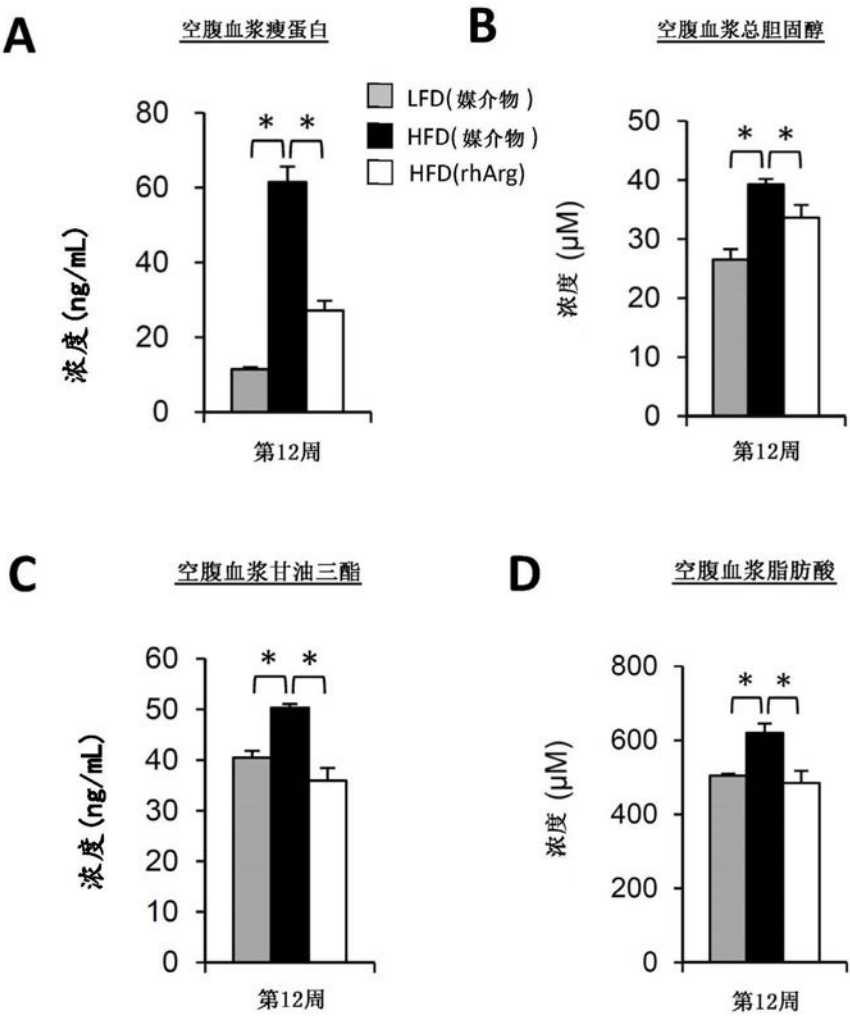


图29

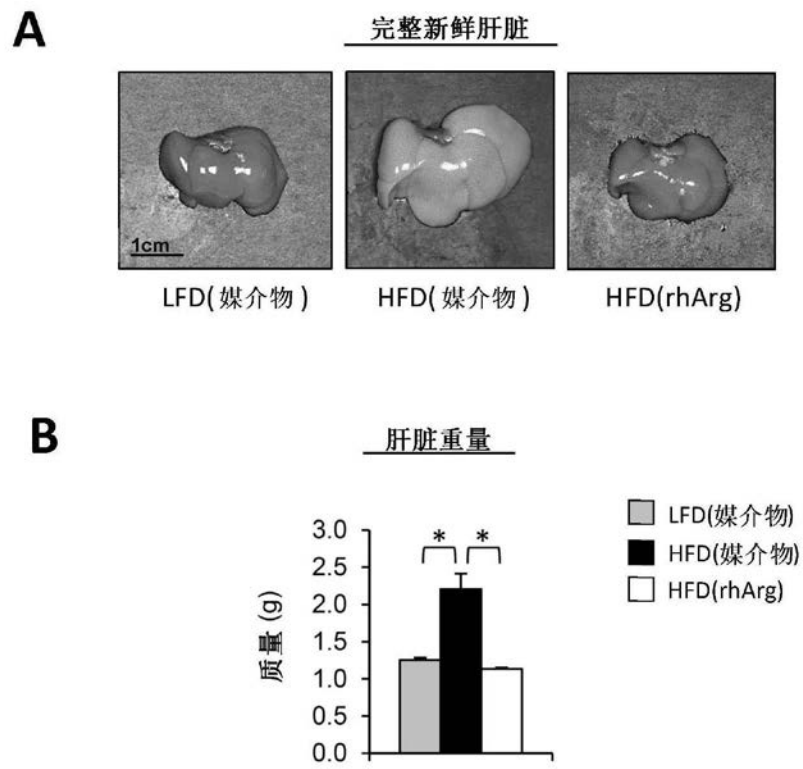


图30

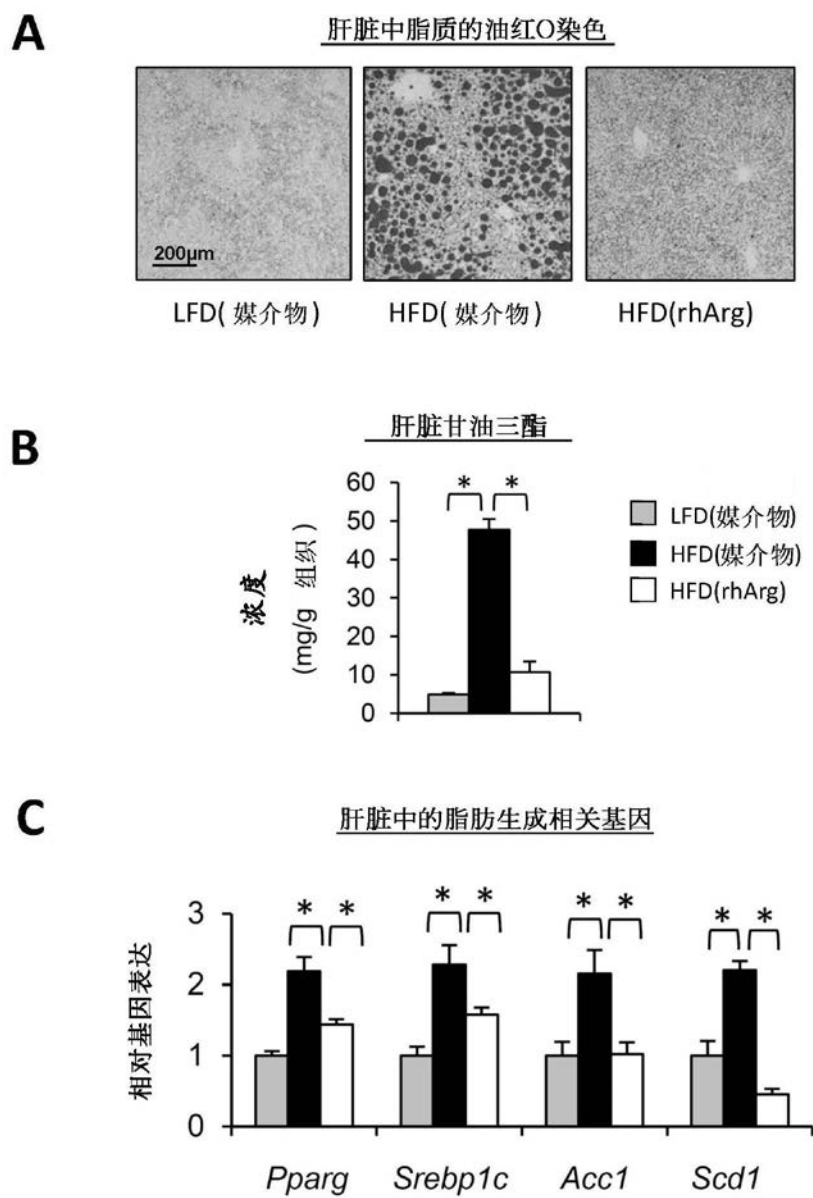


图31

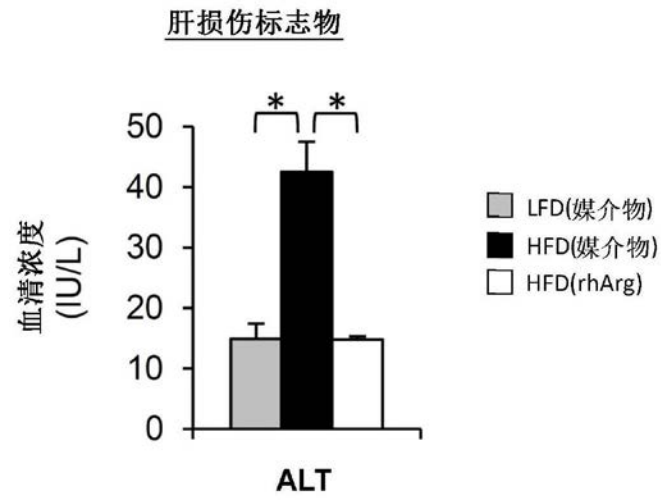


图32

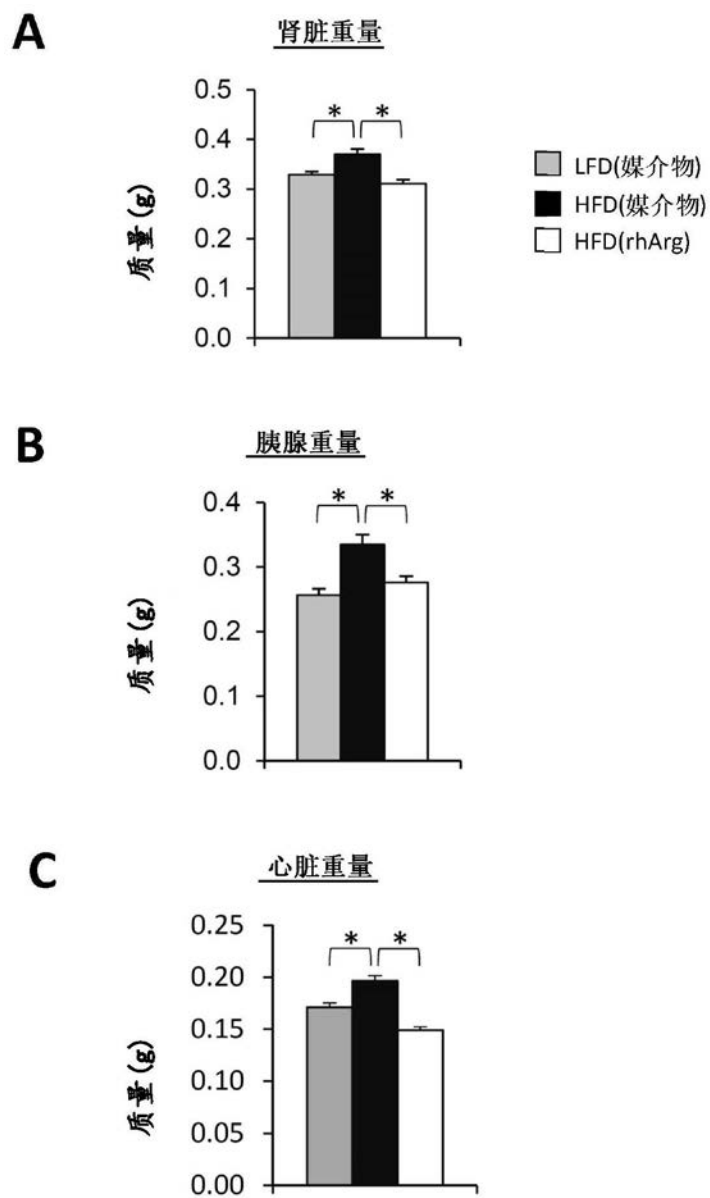


图33

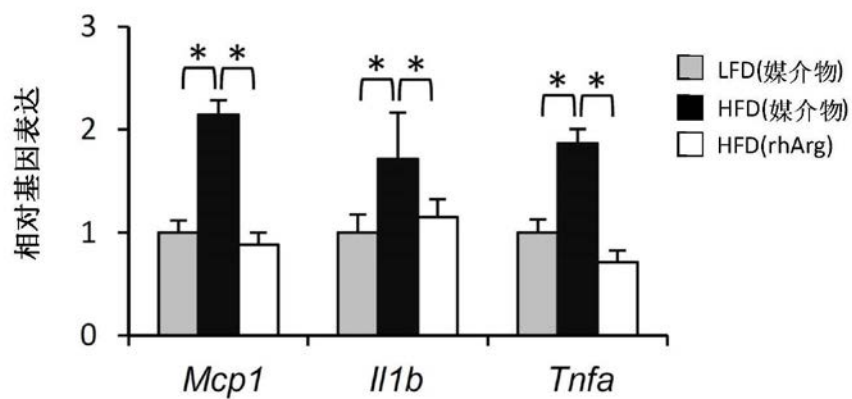
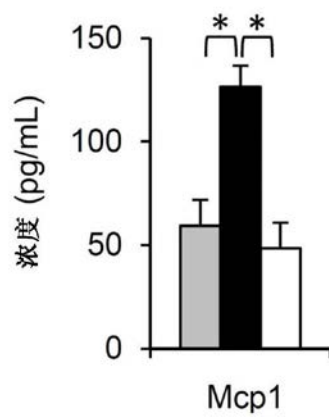
A内脏WAT中的促炎性脂肪因子**B**血清中的促炎细胞因子

图34

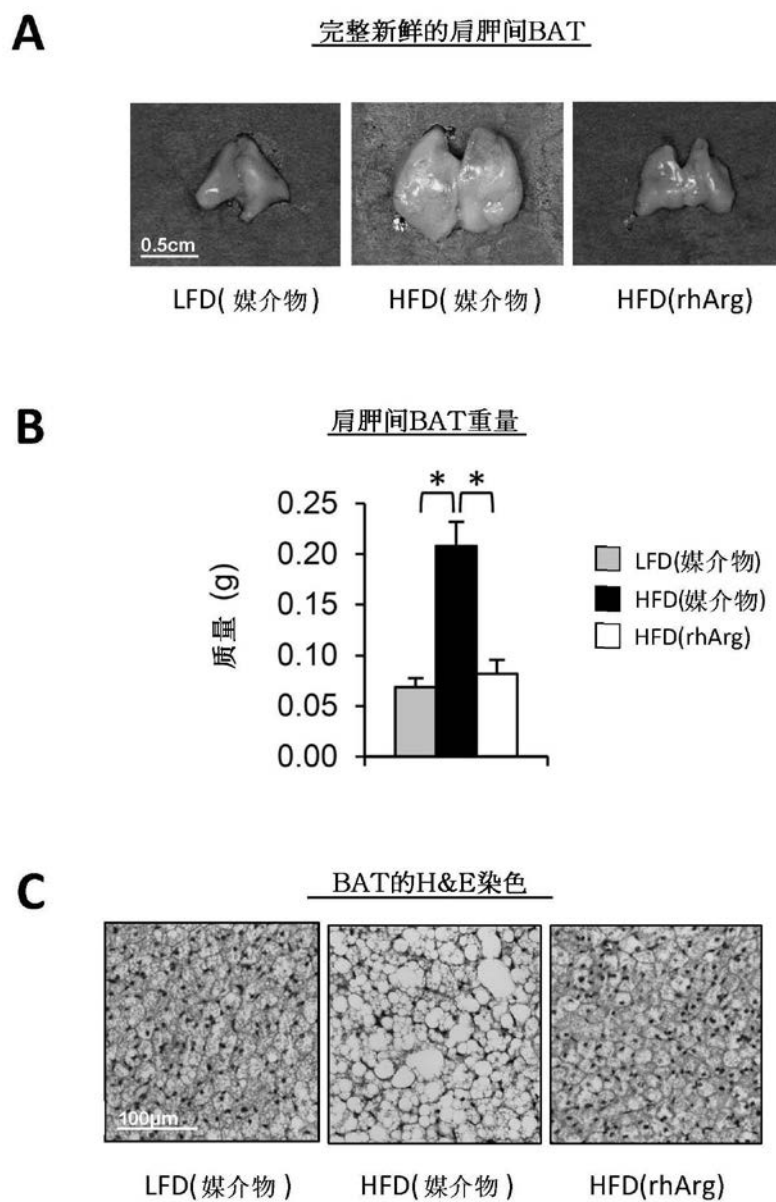


图35

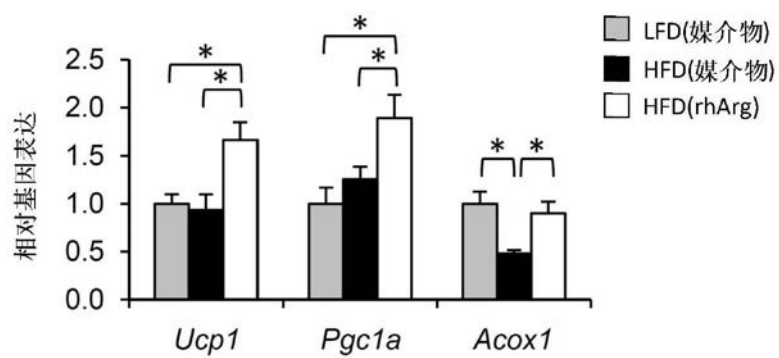
BAT的产热和脂肪酸氧化调节因子

图36

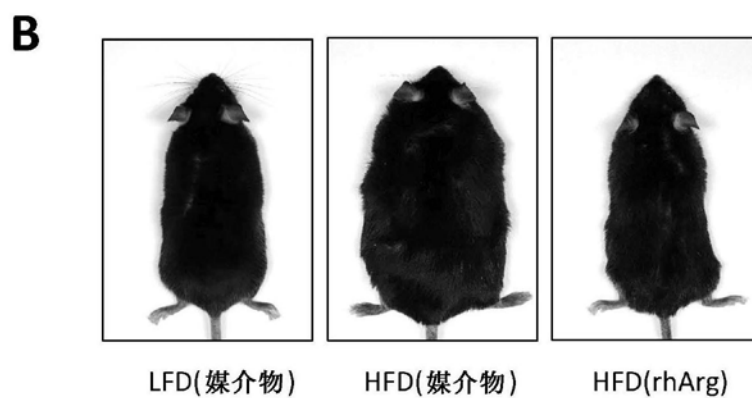
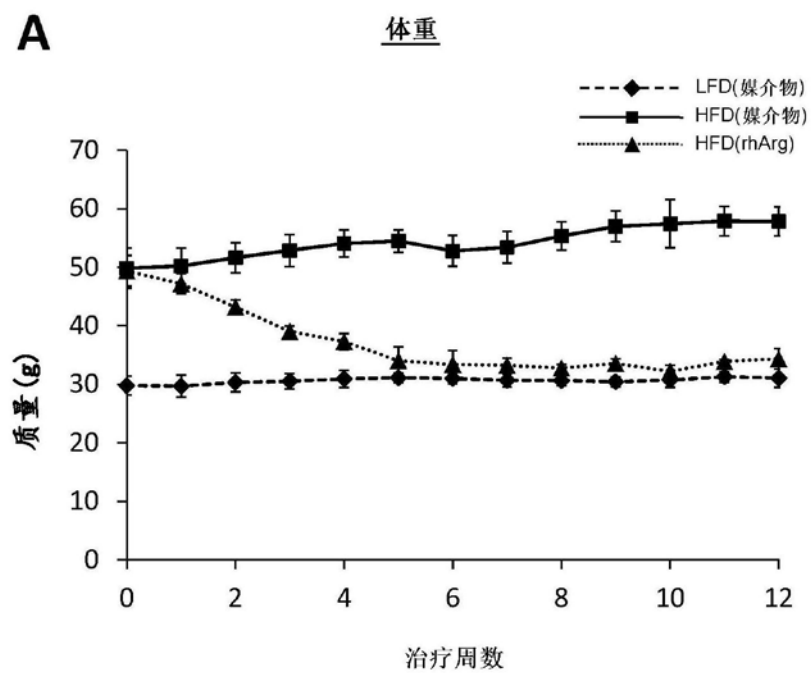


图37

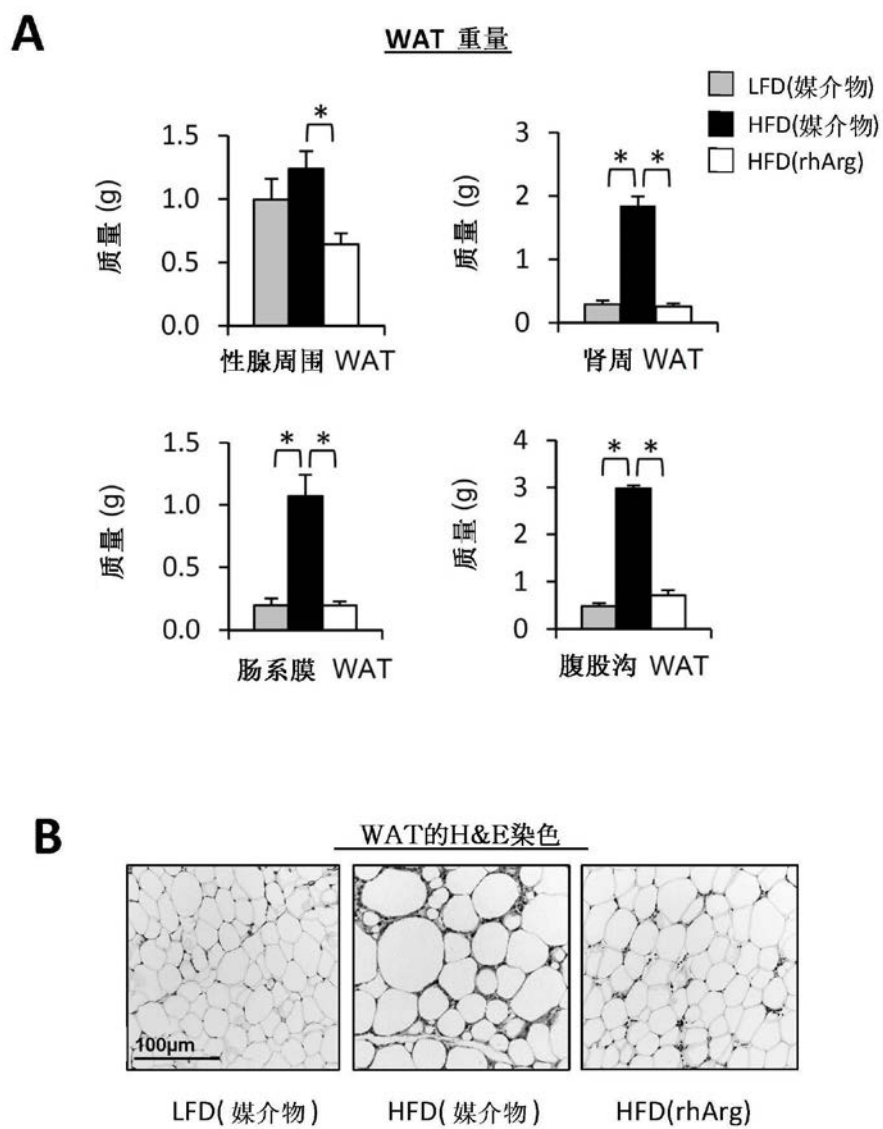


图38

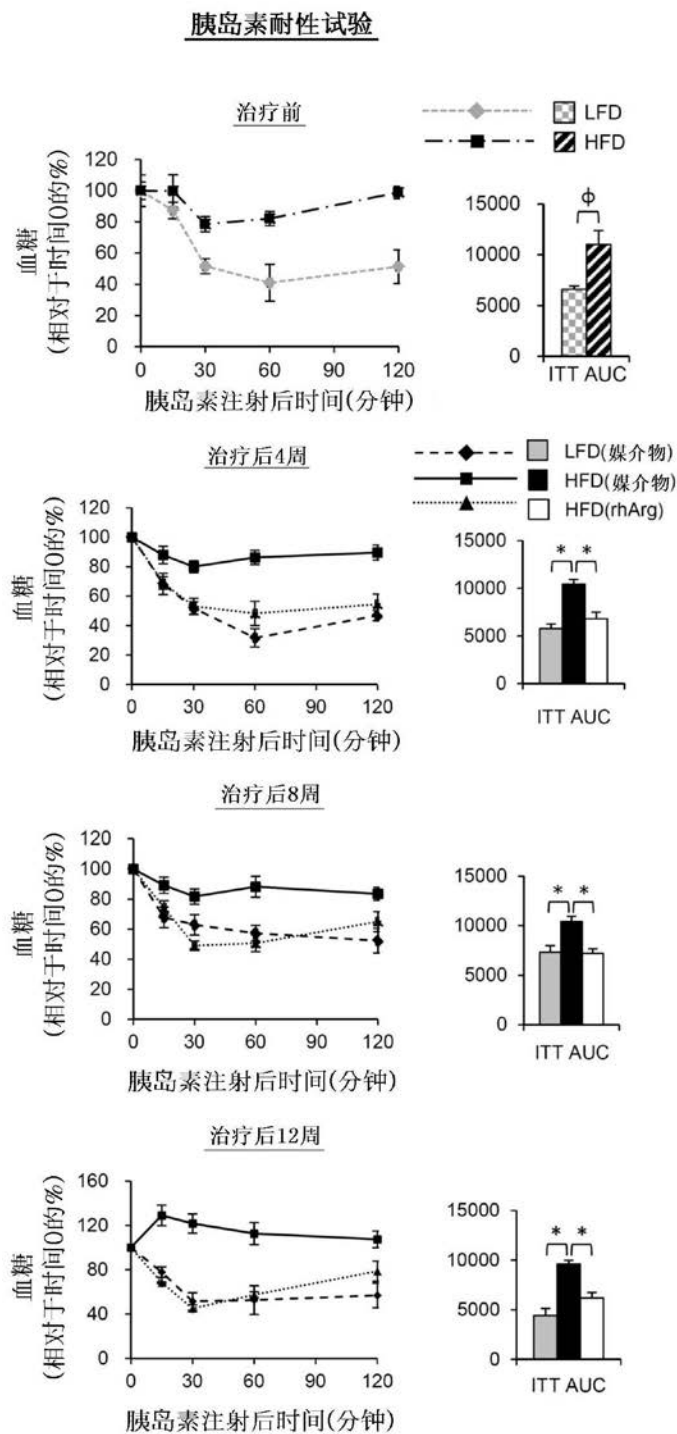


图39

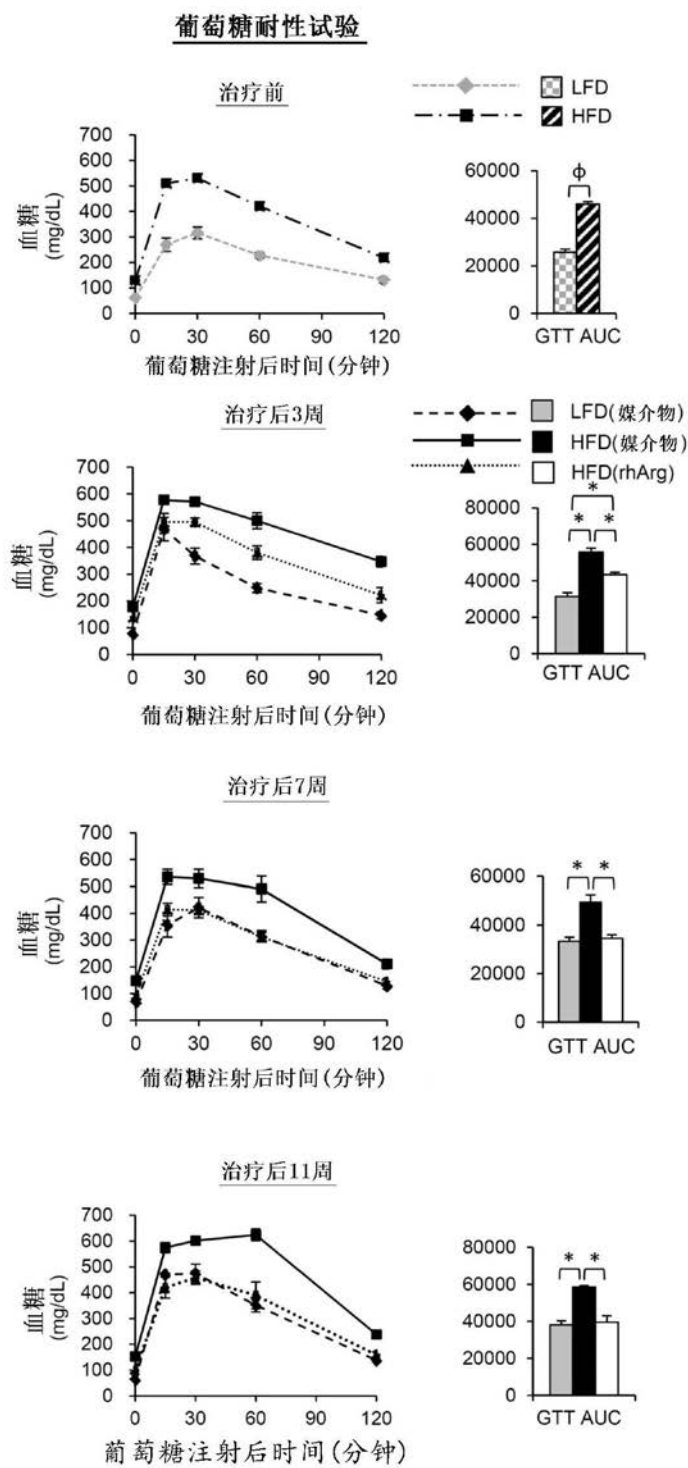


图40

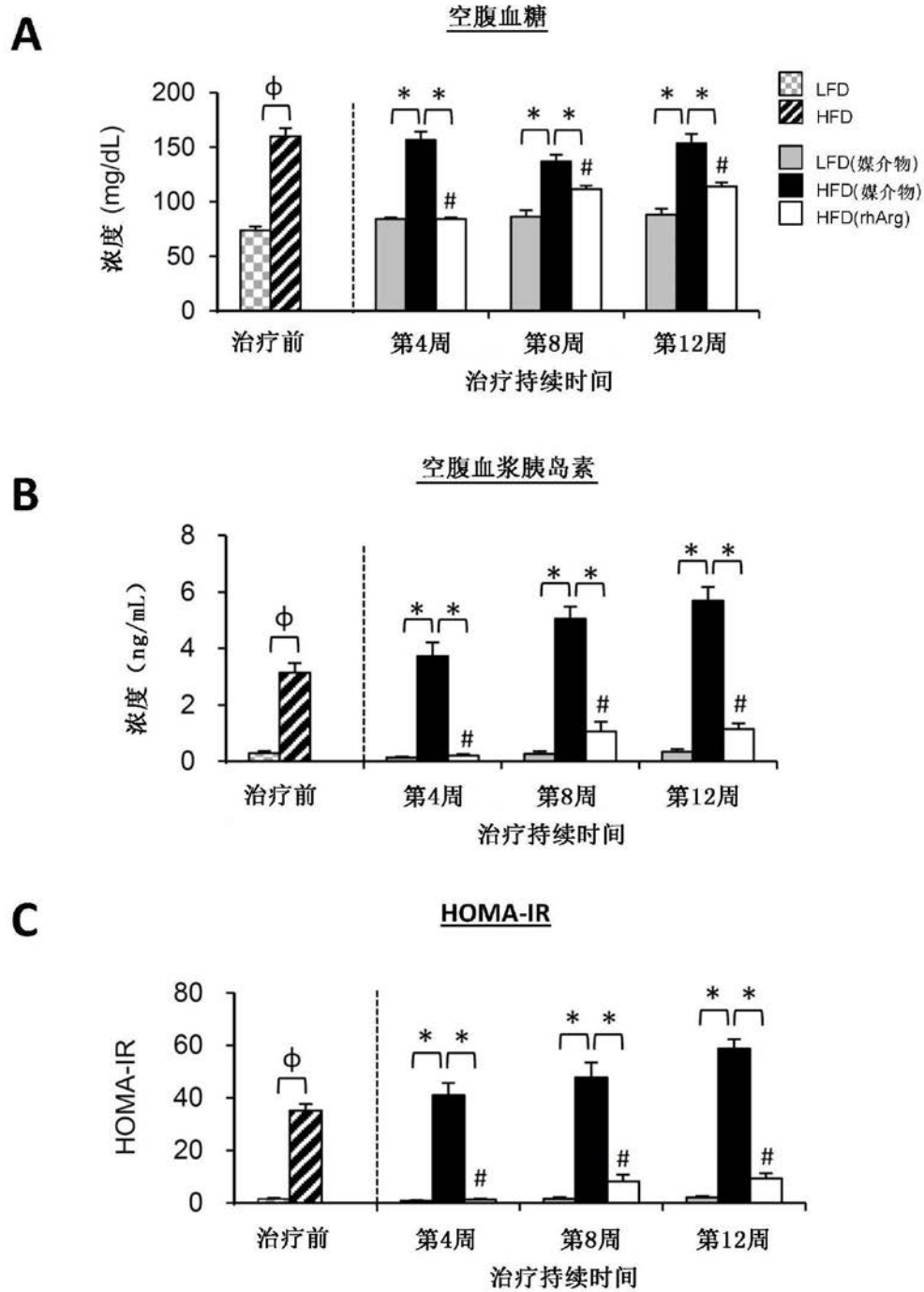


图41

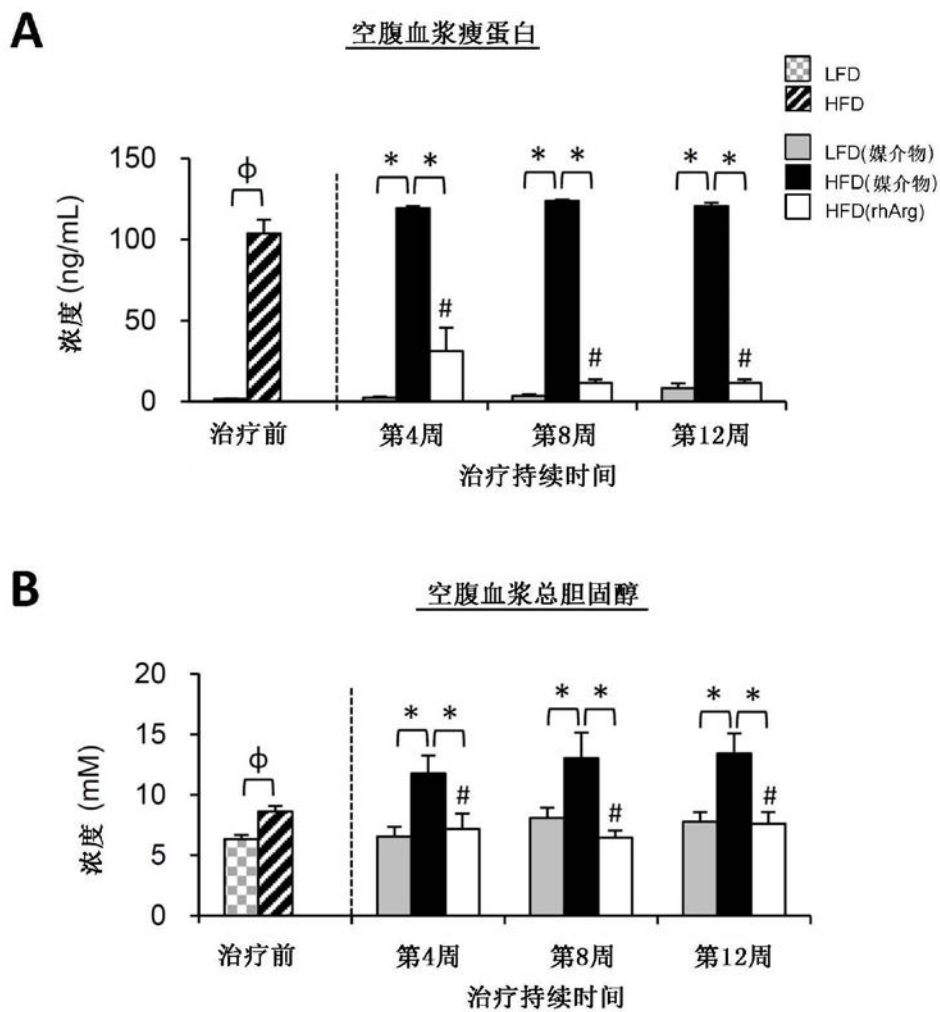


图42

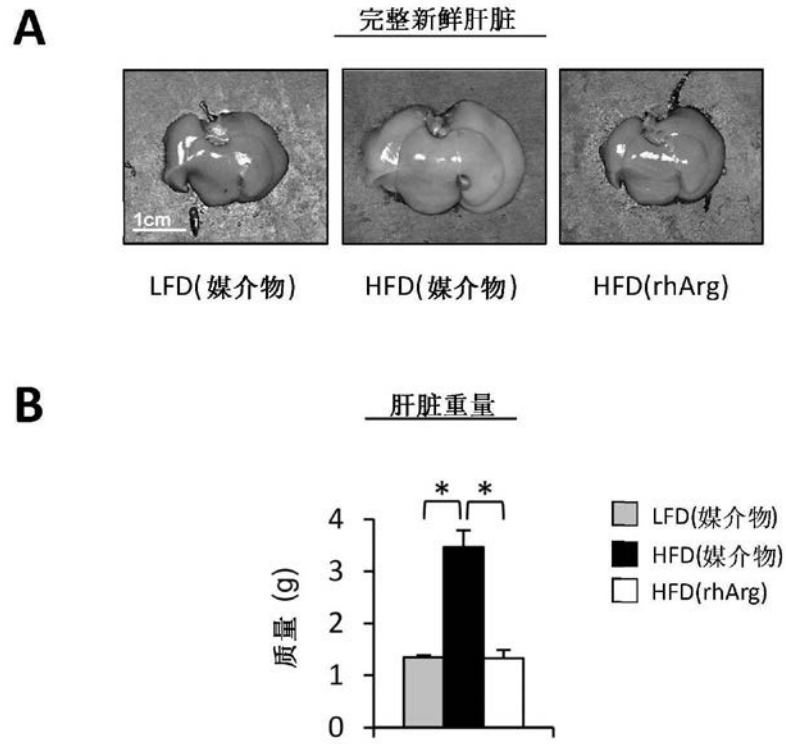


图43

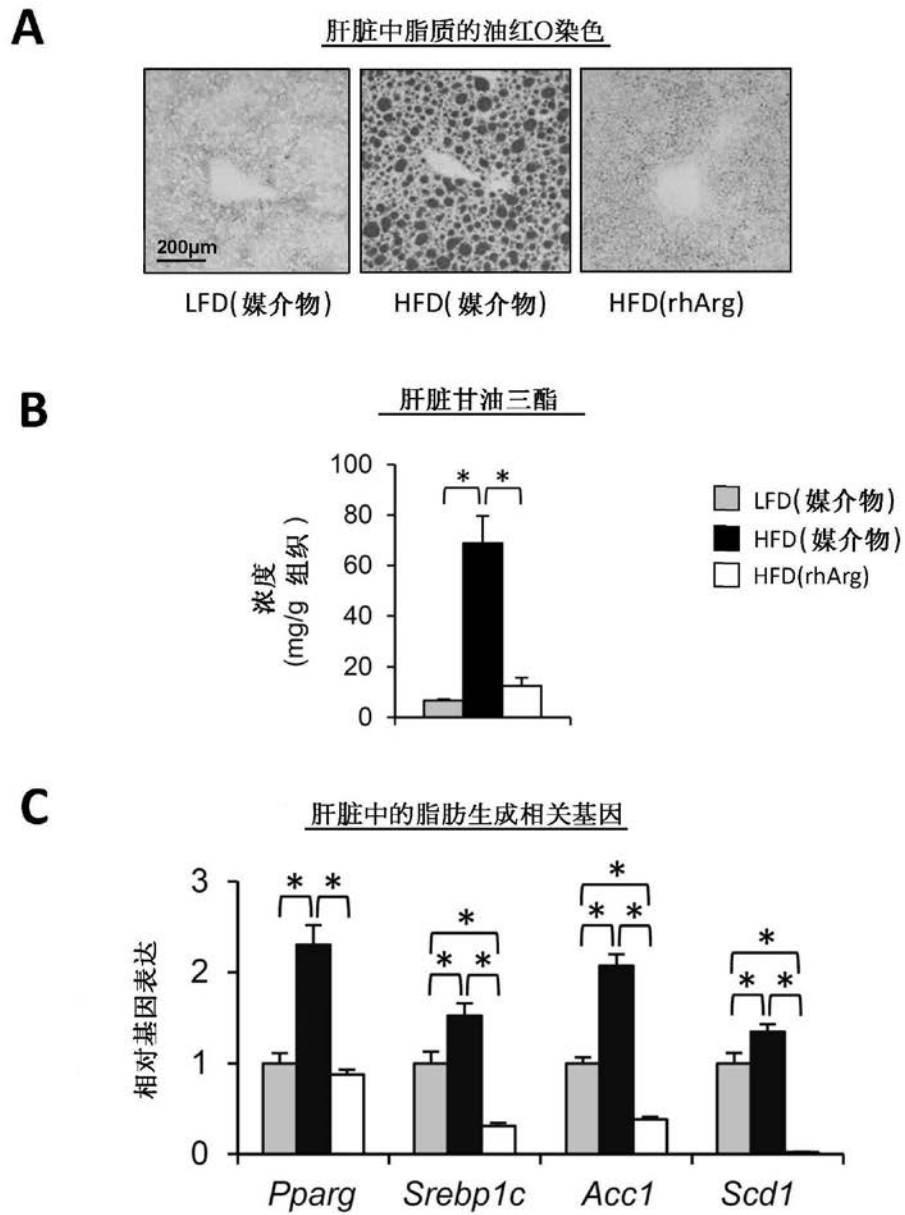


图44

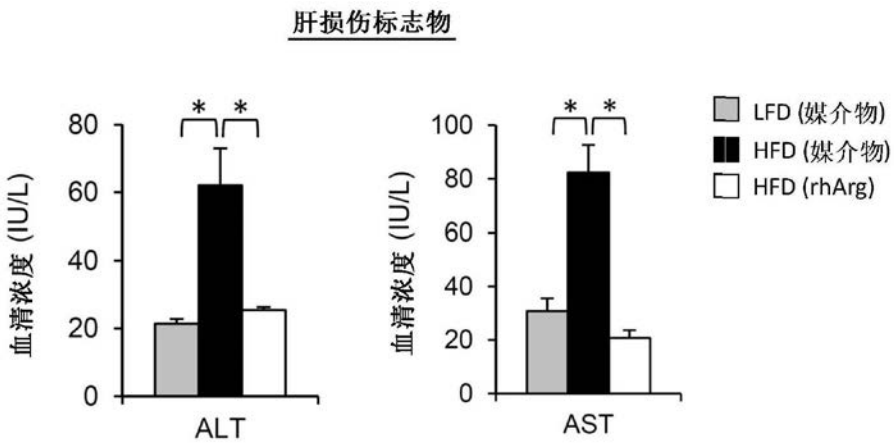


图45

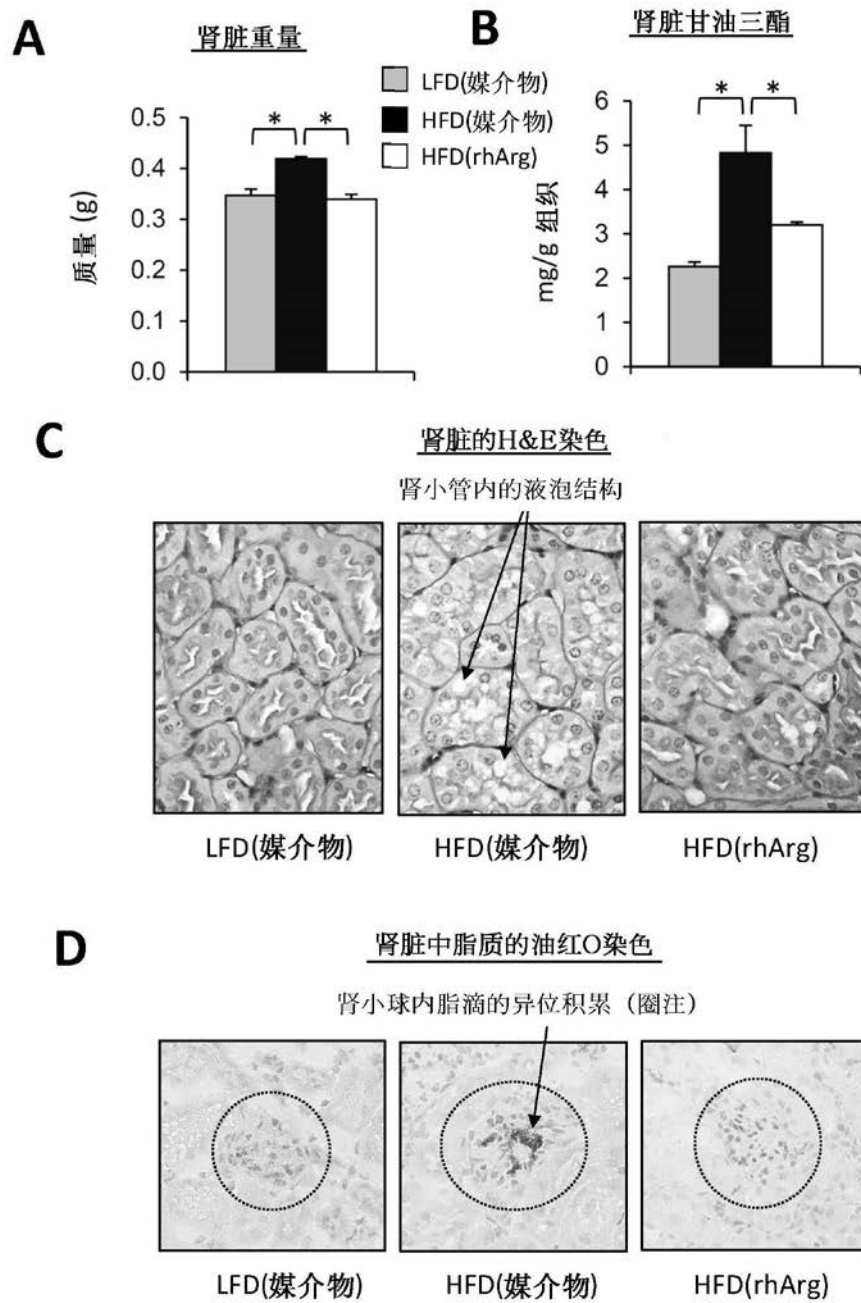


图46

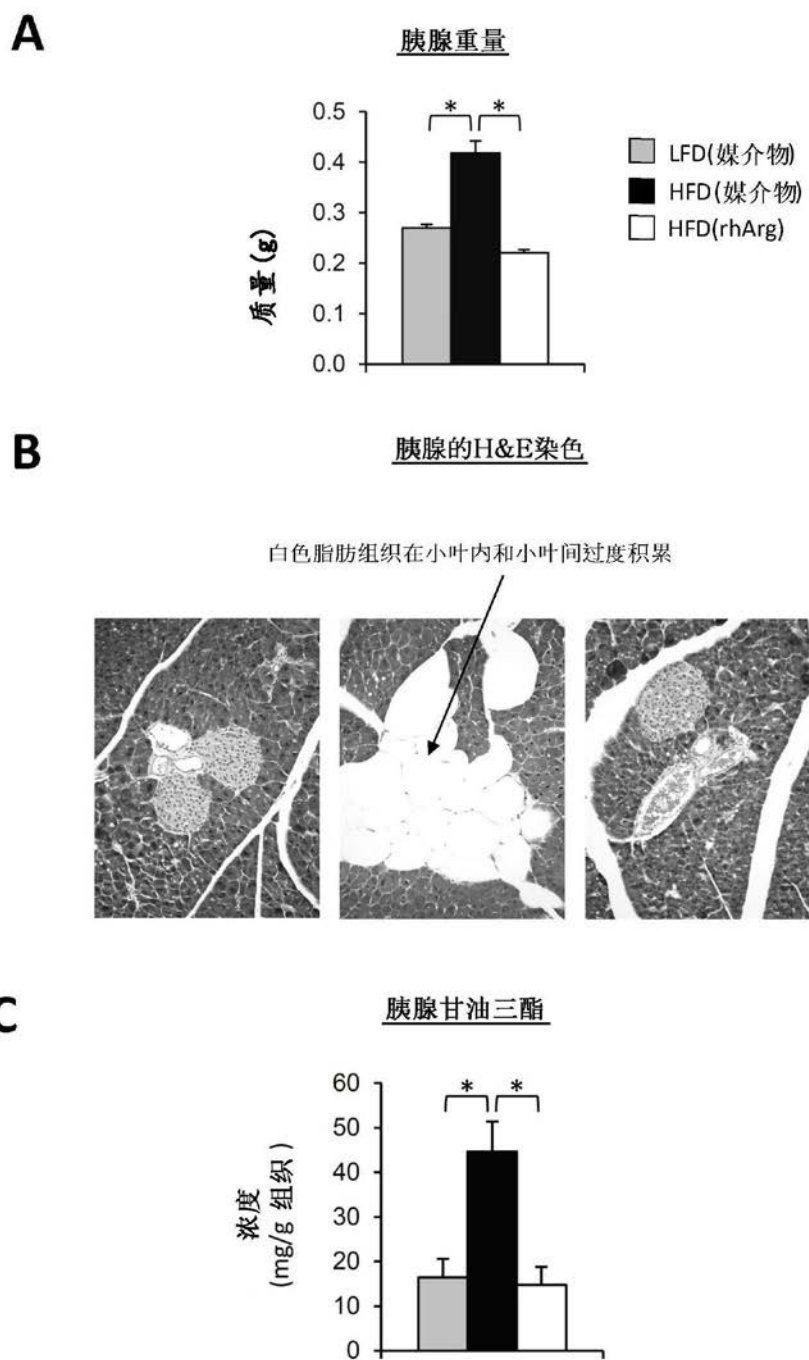


图47

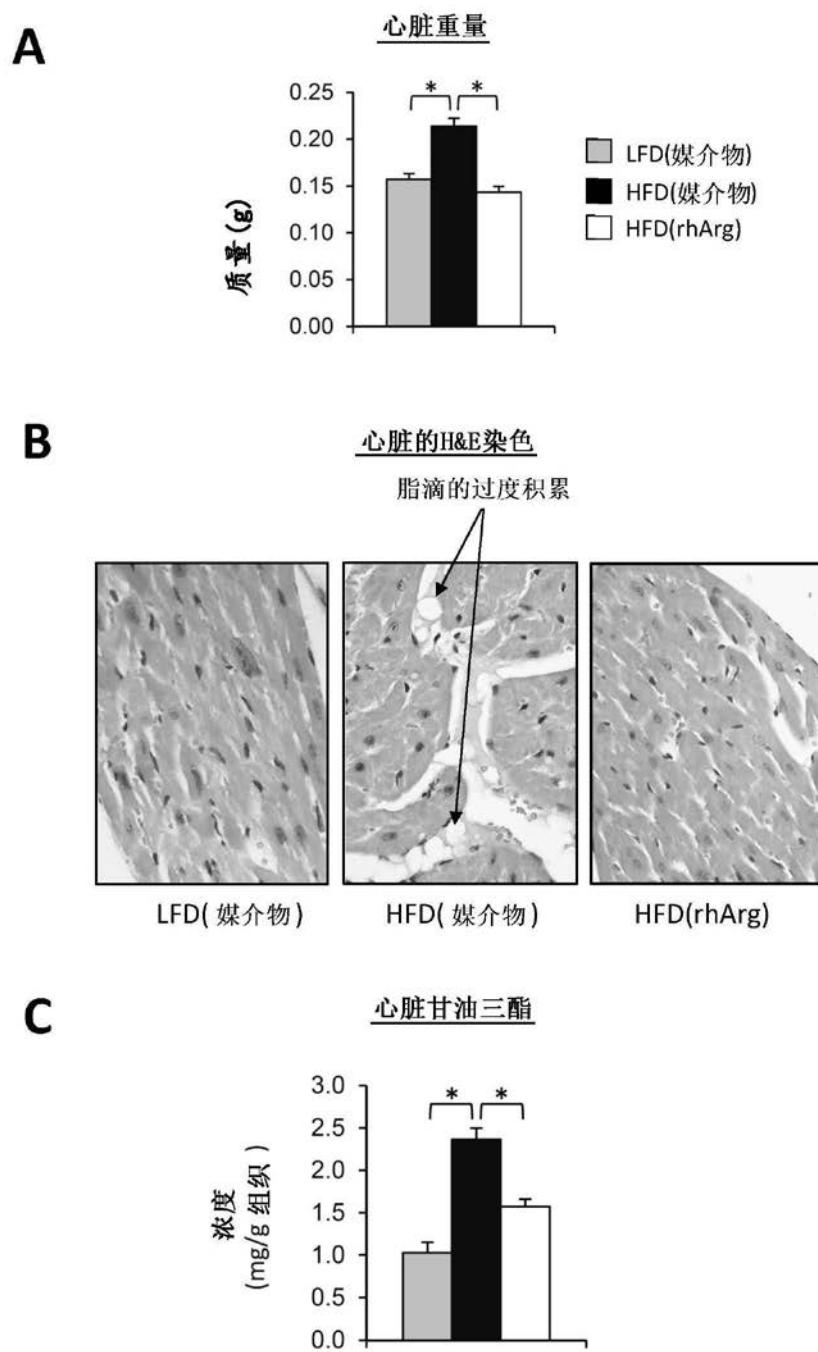


图48

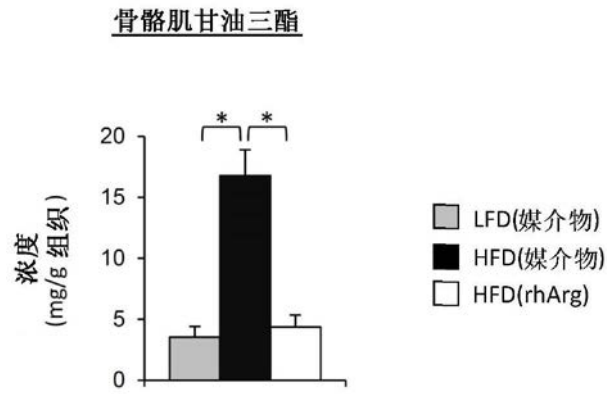


图49

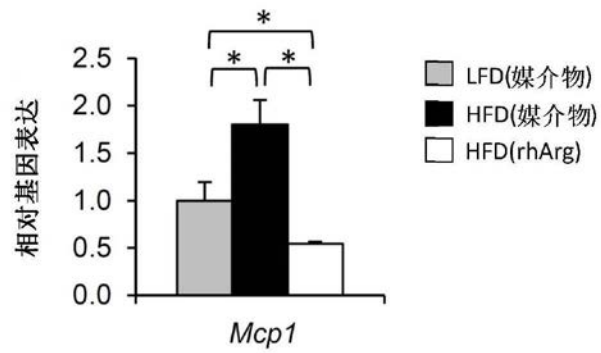
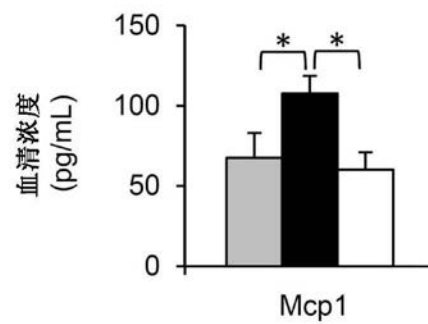
A内脏WAT中的促炎性脂肪因子**B**血清中的促炎细胞因子

图50

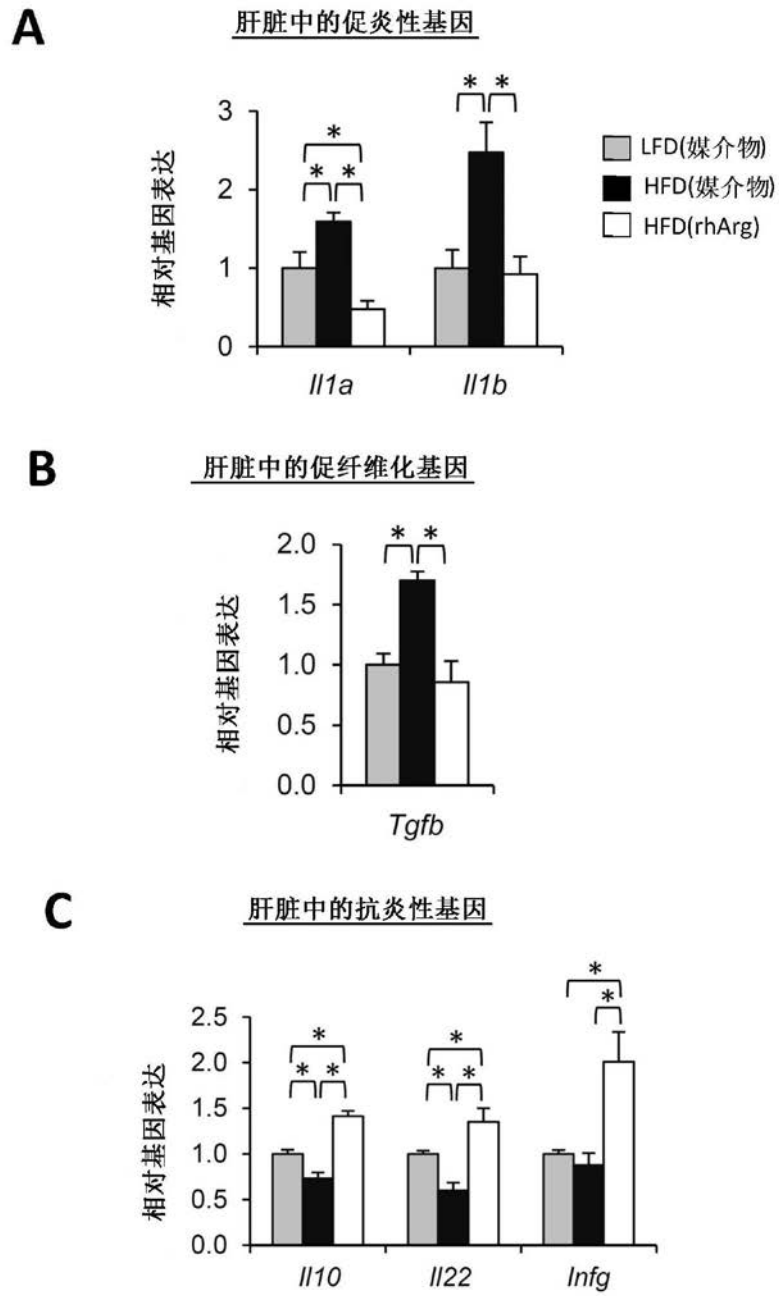


图51

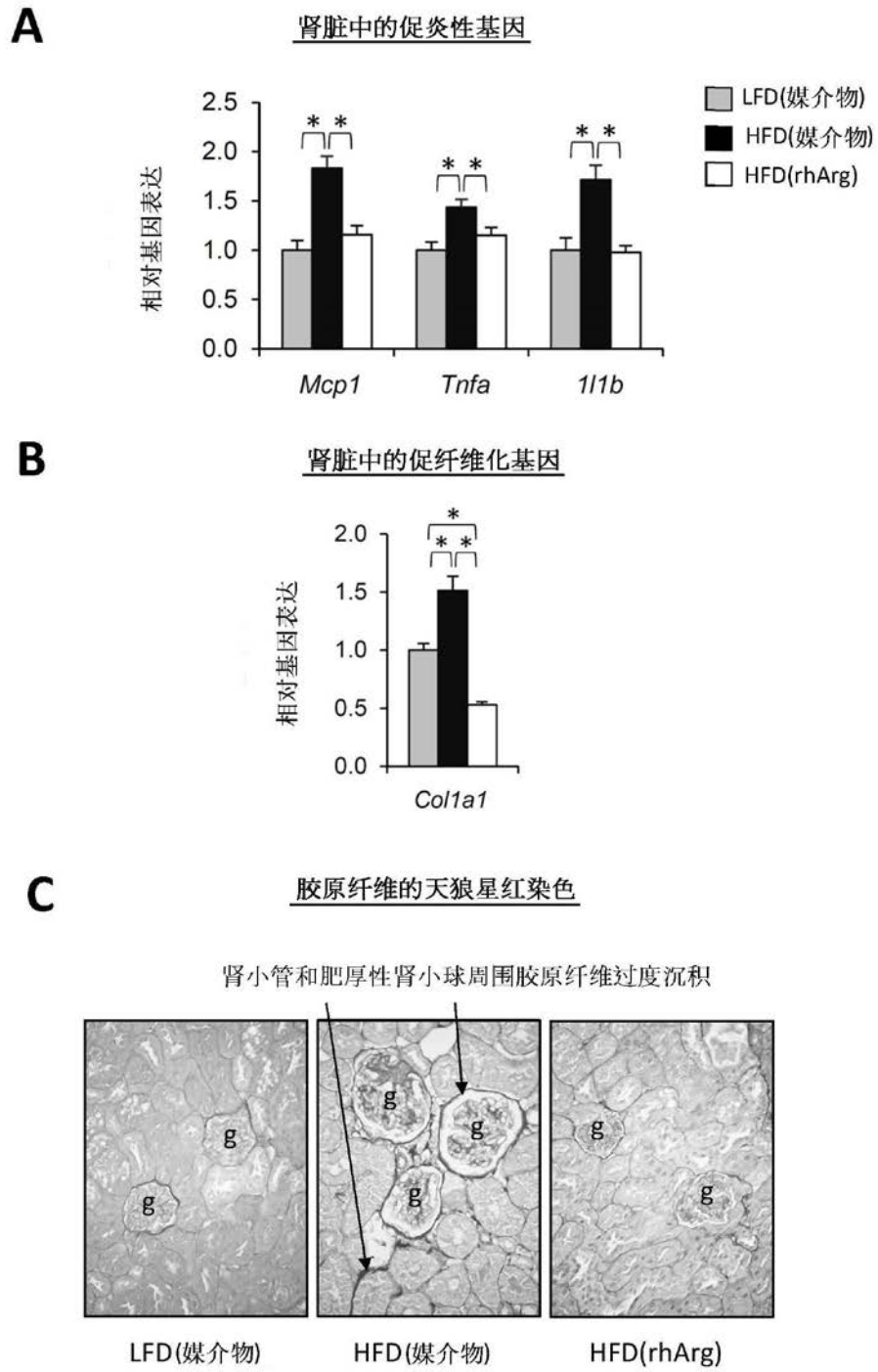


图52

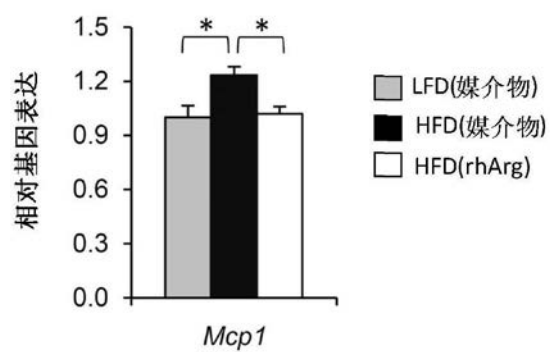
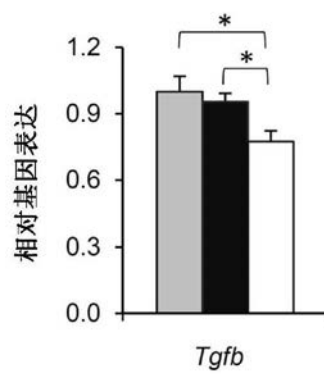
A胰腺中的促炎性基因**B**胰腺中的促纤维化基因

图53

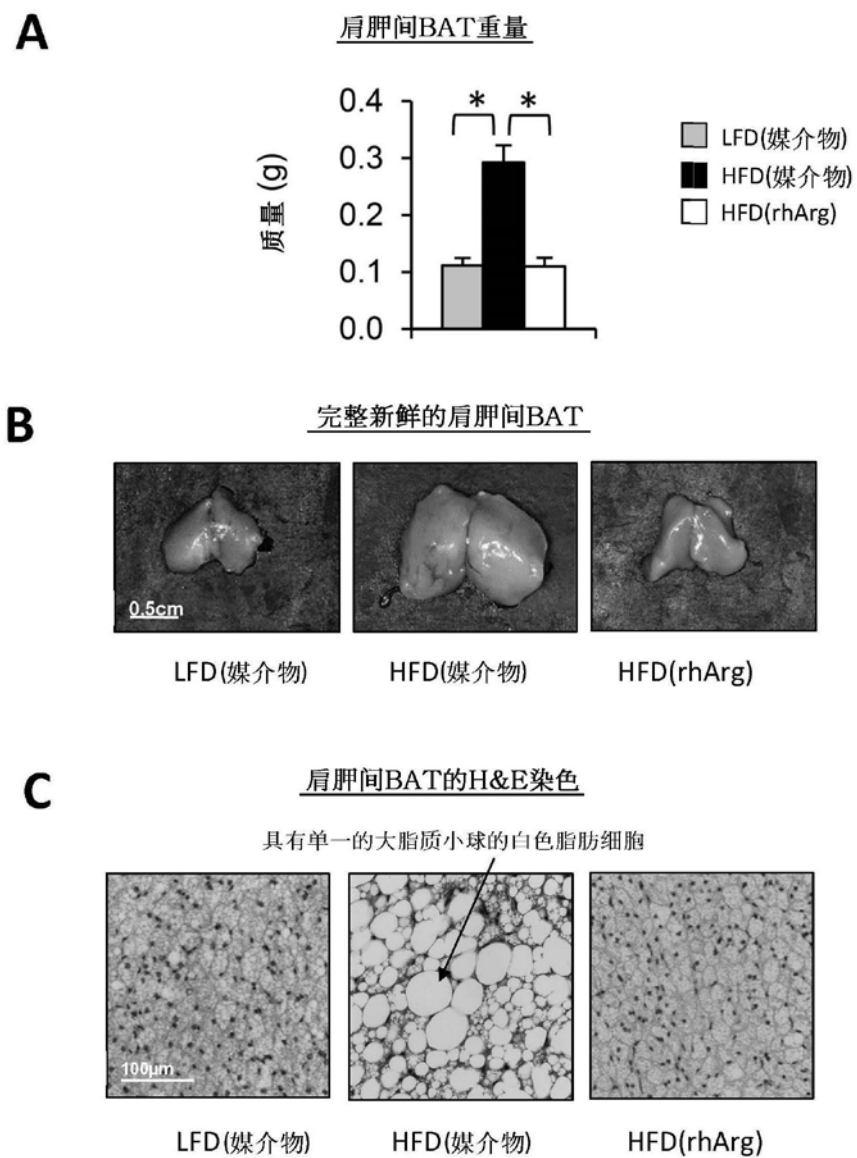


图54

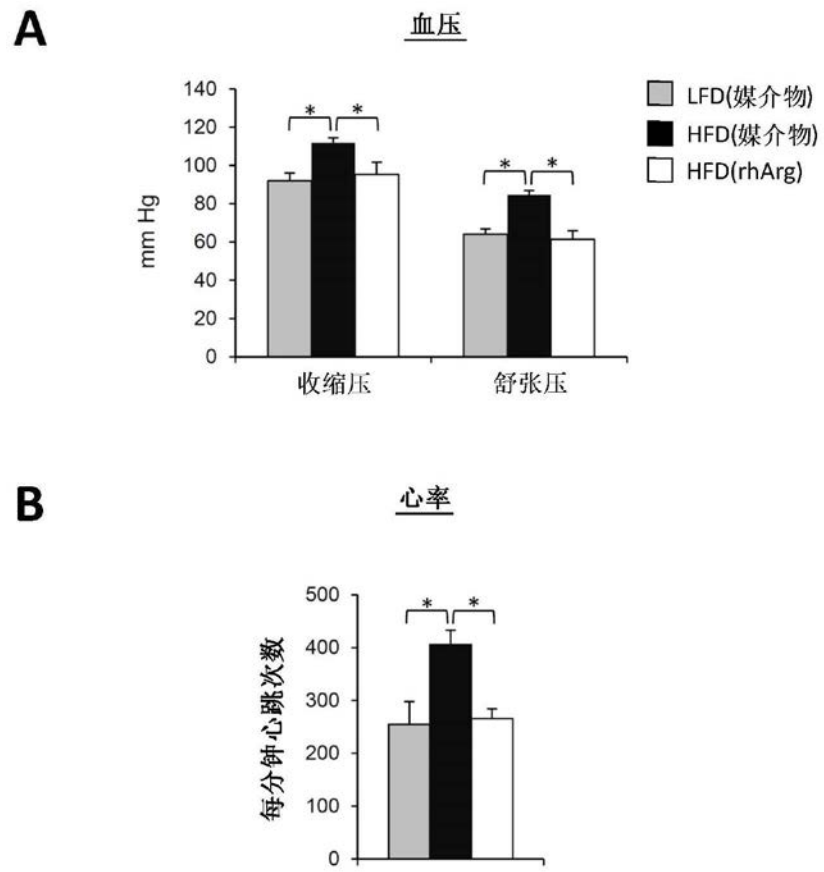


图55

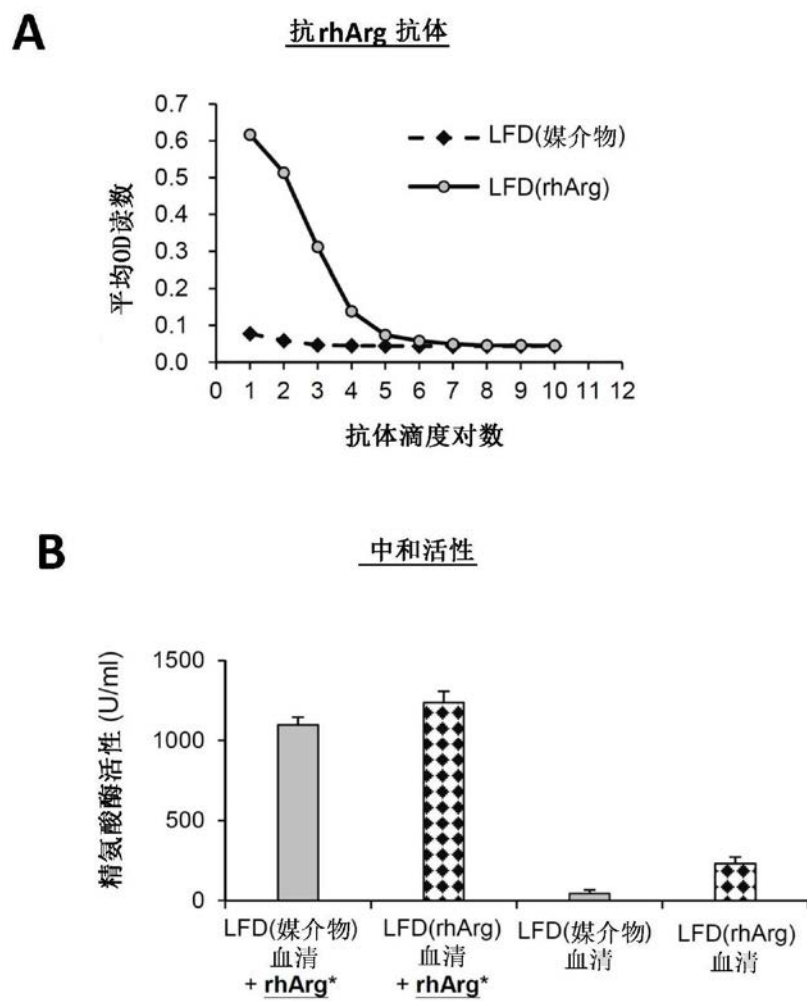


图56

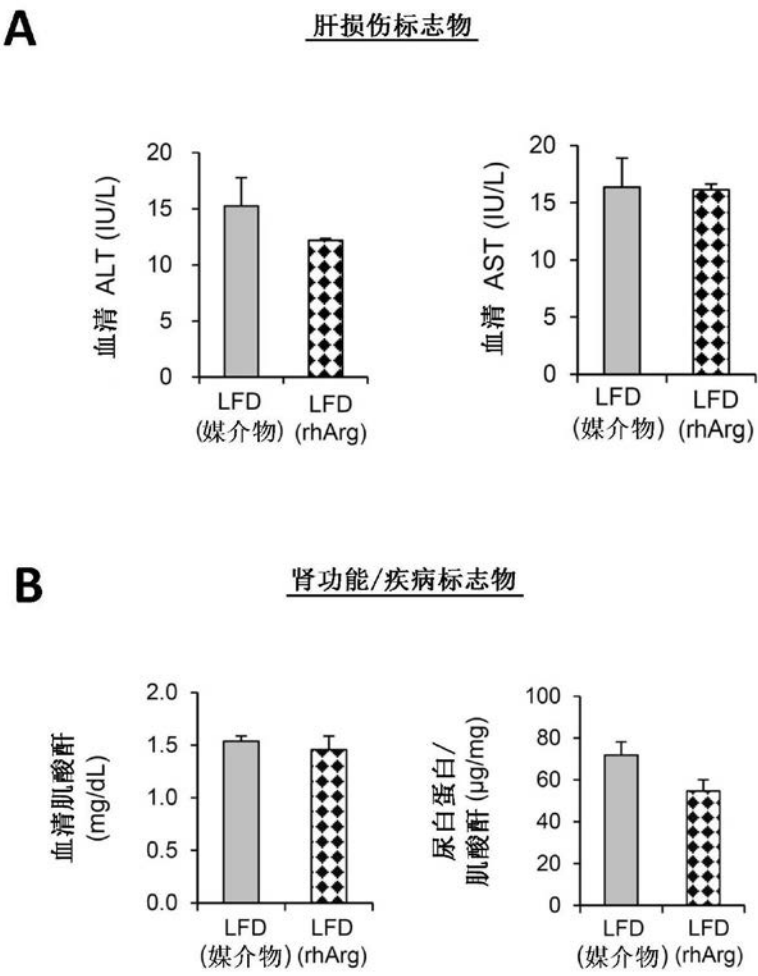


图57

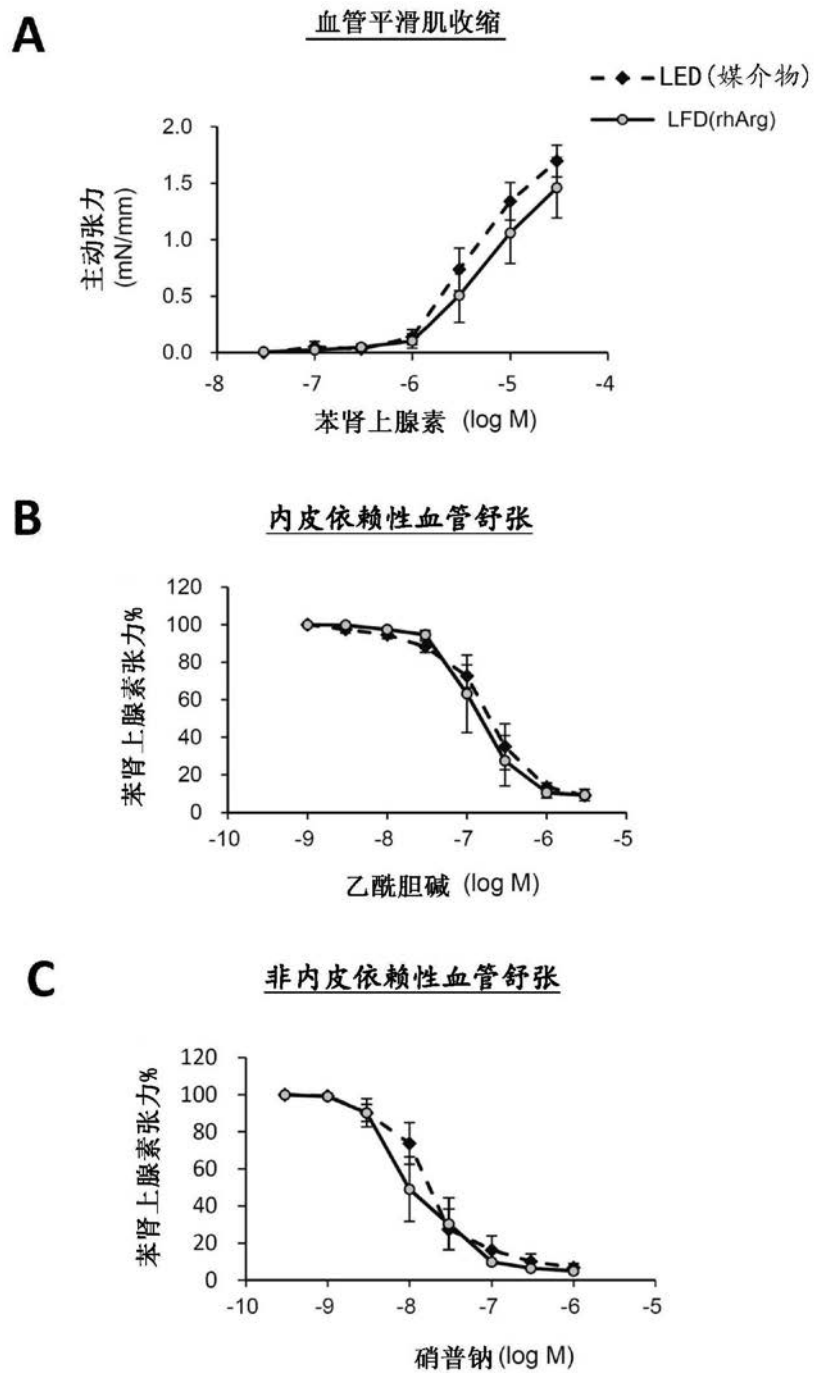


图58

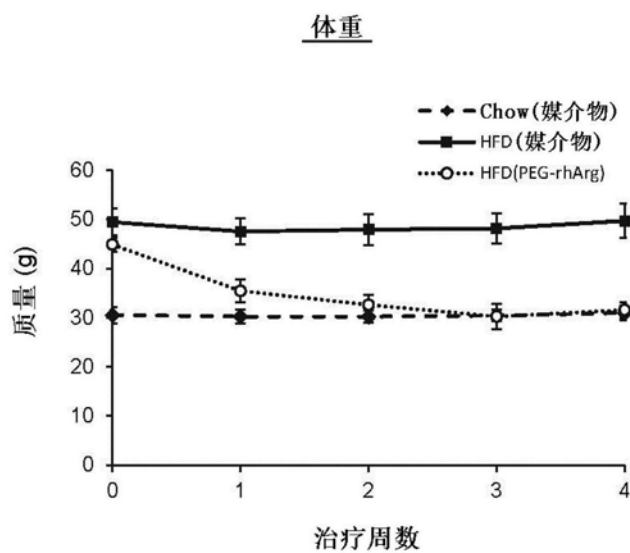


图59

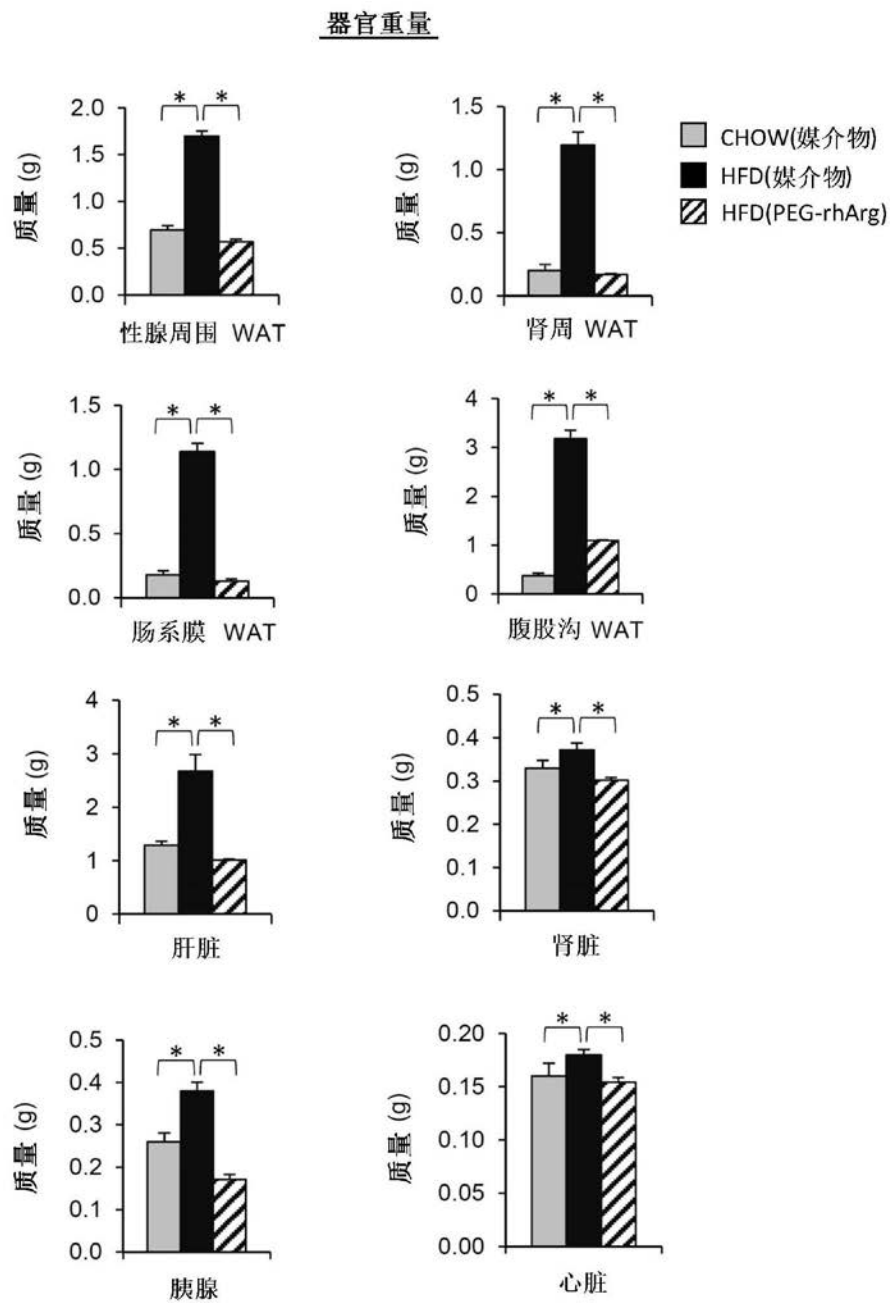


图60

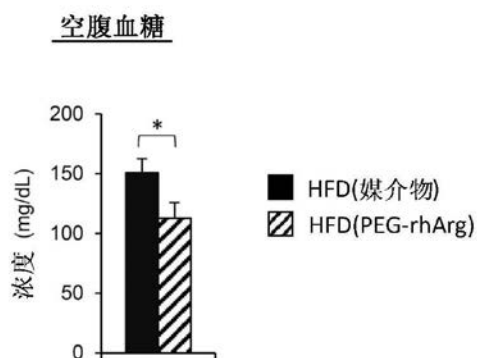
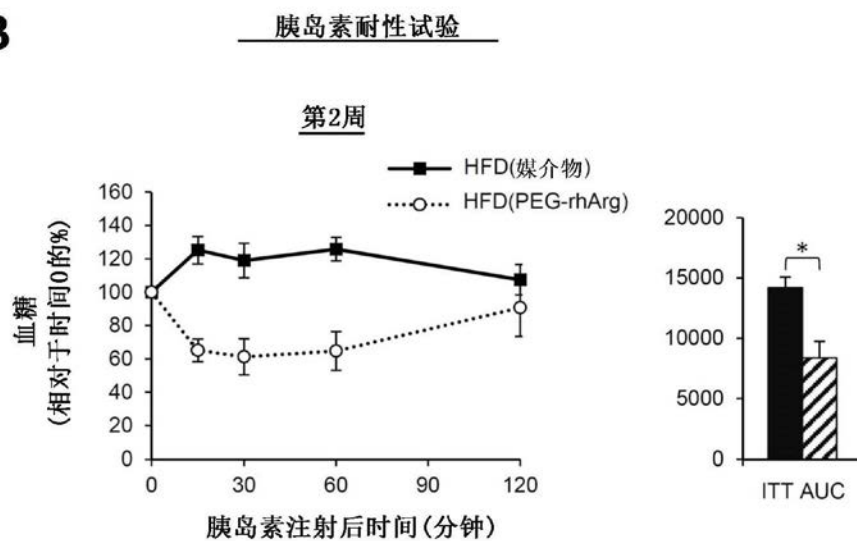
A**B**

图61

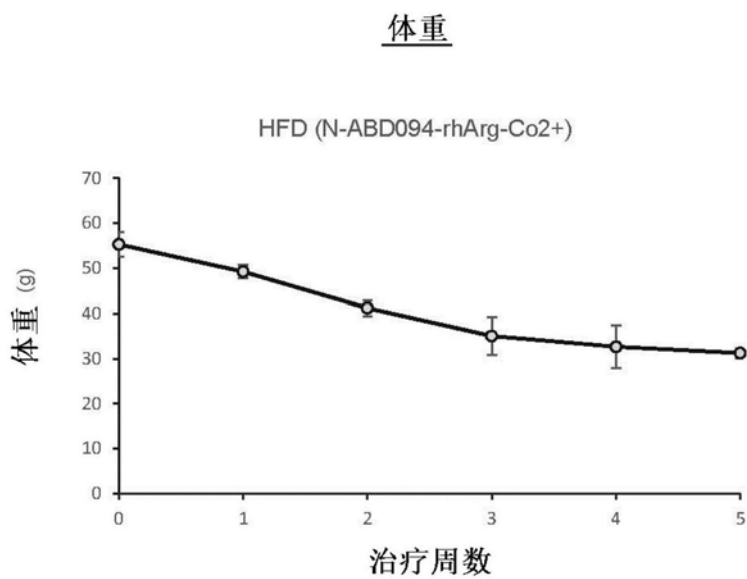


图62

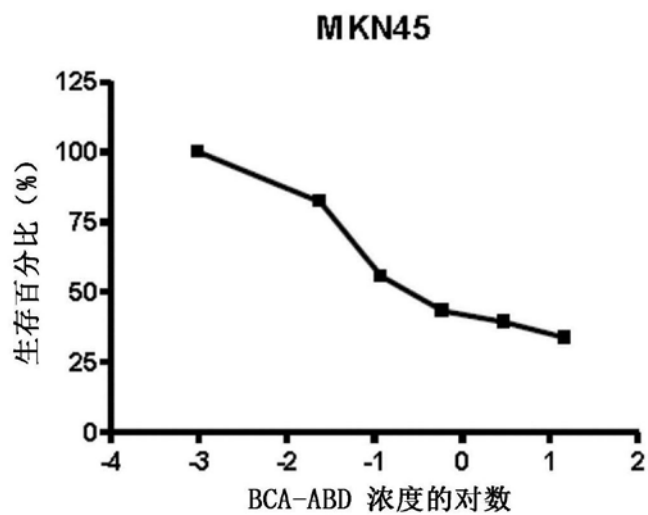


图63

肿瘤体积

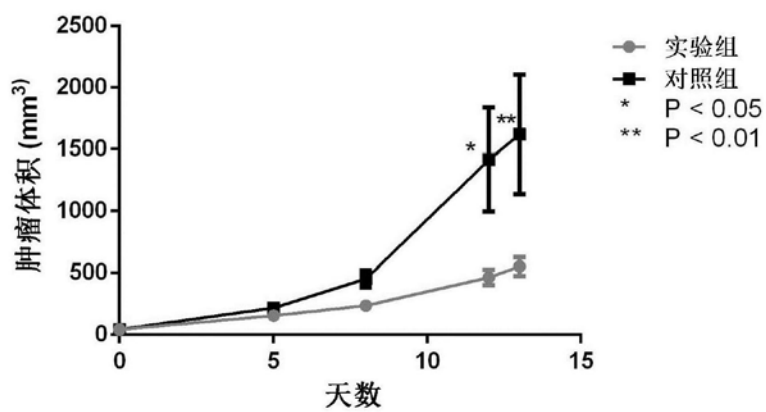


图64

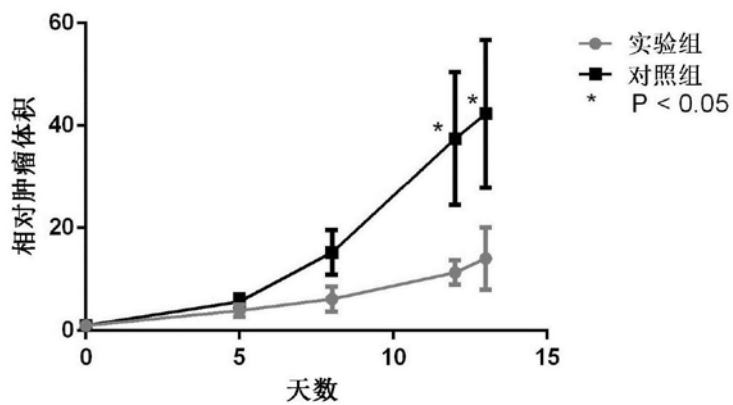
相对肿瘤体积

图65

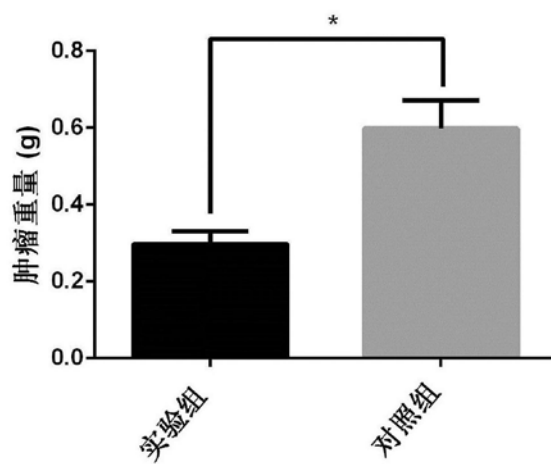
肿瘤重量

图66

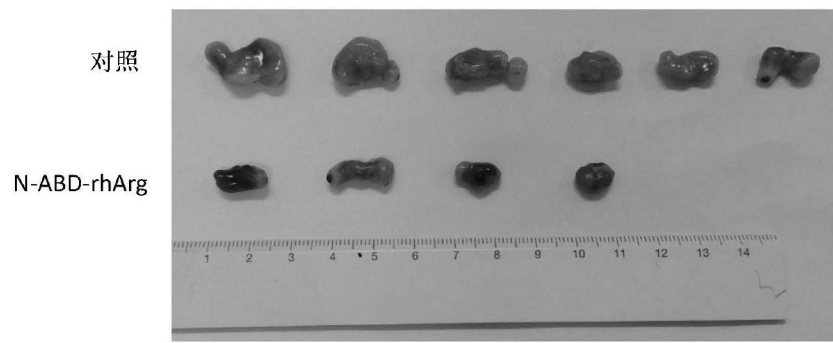
分离的肿瘤

图67

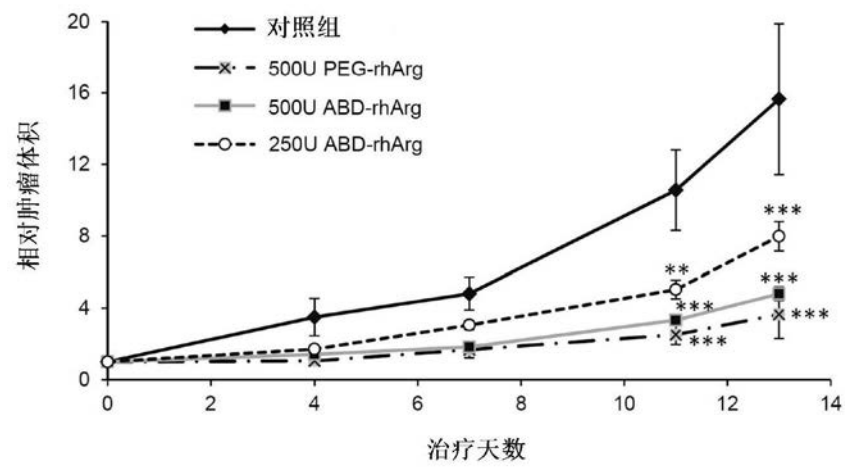
相对肿瘤体积

图68

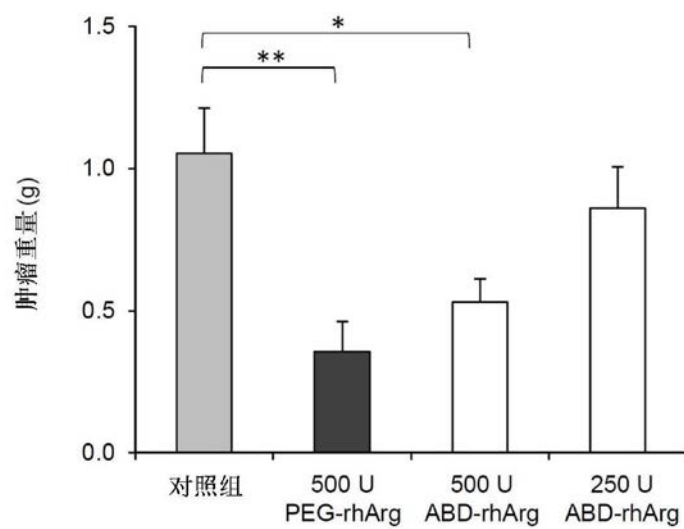
肿瘤重量

图69

