



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 118105471 A

(43) 申请公布日 2024.05.31

(21) 申请号 202410244176.5

A61K 45/06 (2006.01)

(22) 申请日 2018.05.24

A61P 3/00 (2006.01)

A61P 7/00 (2006.01)

(30) 优先权数据

1708288.4 2017.05.24 GB

1800867.2 2018.01.19 GB

(62) 分案原申请数据

201880049768.4 2018.05.24

(71) 申请人 托埃瑞斯有限责任公司

地址 奥地利维也纳

(72) 发明人 塔玛拉·尼科尔森

(74) 专利代理机构 北京安信方达知识产权代理

有限公司 11262

专利代理师 王玮玮 郑霞

(51) Int. Cl.

A61K 38/53 (2006.01)

权利要求书1页 说明书29页 附图10页

(54) 发明名称

谷氨酰胺合成酶用于治疗高氨血症的用途

(57) 摘要

本发明涉及谷氨酰胺合成酶用于治疗高氨血症的用途。本发明涉及谷氨酰胺合成酶作为用于治疗高氨血症的蛋白质疗法(诸如酶替代蛋白质疗法)的用途。特别地,本发明涉及谷氨酰胺合成酶的全身施用。谷氨酰胺合成酶可以以缀合或融合形式提供,以增加其在循环中的半衰期。还提供了包含谷氨酰胺合成酶的药物组合物。本发明还涉及包括谷氨酰胺合成酶蛋白和降氨剂诸如氮清除剂的组合的用途、方法和组合物。

1. 谷氨酰胺合成酶(GS)蛋白用于制备用于通过向受试者全身非口服施用治疗或预防高氨血症的组合物的用途。
2. 根据权利要求1所述的用途,其中所述蛋白用于与降氨剂组合使用。
3. 降氨剂与GS蛋白的组合用于制备用于治疗或预防高氨血症的组合物的用途。
4. 根据权利要求1至3中任一项所述的用途,其中所述高氨血症由于尿素循环障碍(UCD)和/或谷氨酰胺合成酶缺乏引起。
5. 根据权利要求1至4中任一项所述的用途,其中所述高氨血症与器官衰竭相关联。
6. 根据权利要求1至5中任一项所述的用途,其中所述高氨血症由于非酒精性脂肪肝病引起。
7. 根据权利要求1至5中任一项所述的用途,其中所述高氨血症由于急性肝衰竭、肝硬化和/或肾功能障碍和/或肾衰竭引起。
8. 根据任一项前述权利要求所述的用途,其中所述GS蛋白包含与以SEQ ID NO.1列出的氨基酸序列至少50%相同的氨基酸序列,或者是所述氨基酸序列的酶活性片段。
9. 根据任一项前述权利要求所述的用途,其中所述GS蛋白以药物组合物的形式施用。
10. 根据任一项前述权利要求所述的用途,其中所述GS蛋白以胃肠外营养组合物的形式施用。

谷氨酰胺合成酶用于治疗高氨血症的用途

[0001] 本申请是申请日为2018年5月24日,申请号为201880049768.4,发明名称为“谷氨酰胺合成酶用于治疗高氨血症的用途”的申请的分案申请。

技术领域

[0002] 本发明涉及谷氨酰胺合成酶作为用于治疗高氨血症的蛋白质疗法(诸如酶替代蛋白质疗法)的用途,并特别地涉及谷氨酰胺合成酶的全身施用。谷氨酰胺合成酶因此以蛋白或多肽施用,目的是增加谷氨酰胺合成酶的循环水平。谷氨酰胺合成酶可以以缀合或融合形式被提供,以增加其在循环中的半衰期。还提供了包含谷氨酰胺合成酶的药物组合物。本发明还涉及包括谷氨酰胺合成酶蛋白和降氨剂诸如氮清除剂的组合的用途、方法和组合物。

背景技术

[0003] 高氨血症是一种以血液中增加的或过量的氨为特征的代谢状况。它是一种危险的状况,主要因为它可能导致氨进入大脑增加,这进而导致神经病学紊乱和神经精神病学异常,这可能非常严重,除其他外,导致脑损伤、癫痫发作、发育迟缓、昏迷和甚至死亡。事实上,脑病是高氨血症常见且危险的并发症。虽然脑病/脑损伤的确切机制尚未被理解,但氨增加引起的星形细胞的渗透胁迫被认为起一定作用,导致脑水肿和颅内压升高。高氨血症可能是先天性或获得性的,并且可能是原发性或继发性的。

[0004] 原发性(先天性)高氨血症是由各种先天性代谢缺陷引起的,其特征是尿素循环的任何酶或转运蛋白的活性降低。事实上,这种先天性代谢缺陷形成一组称为尿素循环障碍(UCD)的疾病。氨(NH_3)是蛋白质和其他含氮化合物分解代谢的产物,取决于pH,其可能与其带电荷的形式铵(NH_4^+)共存于体内。在被肾脏排泄到尿液中之前,它被尿素循环的酶转化为毒性较小的物质尿素。尿素循环也作为体内某些氨基酸(精氨酸、瓜氨酸和鸟氨酸)产生的唯一来源起作用,其包括6种酶、5种催化酶氨甲酰磷酸合成酶I(CPS1)、鸟氨酸氨甲酰转移酶(OTC)或精氨基琥珀酸合成酶(ASS1)、精氨基琥珀酸裂解酶(ASL)和精氨酸酶(ARG),以及辅因子产生酶N-乙酰基谷氨酸合成酶(NAGS)和2种转运蛋白鸟氨酸转位酶(ORNT1)和柠檬素。缺陷可能出现在这8种蛋白质的任何一种或更多种中。前四种酶或NAGS酶中任何一种的活性的严重缺乏或完全缺失导致在生命的最初几天中氨和其他前体代谢物的积累。患有严重UCD的婴儿出生时是正常的,但迅速发展脑水肿以及以下的相关的体征:嗜睡、厌食、通气过度或不足、高热、癫痫发作、神经病学姿势和昏迷。UCD的严重程度受有缺陷的酶在途径中的位置和酶的缺陷的严重程度的影响。通过快速识别和当前的治疗策略,高氨血症新生儿的存活在过去几十年中已显著提高,但智力通常受到损害。这些酶的轻度或部分缺乏和ARG缺乏的氨积累在生命的几乎任何时候可能由疾病或压力被引发。在这些疾病中,血浆氨浓度的升高和症状常常比新生儿出现的UCD更难以捉摸,并且首次确认的临床发作可能持续几个月或几十年不会出现。

[0005] 继发性高氨血症是由中间代谢的先天缺陷引起,其特征为不是尿素循环的一部分

的酶/蛋白的活性降低,例如丙酸血症、甲基丙二酸血症、半乳糖血症、脂肪酸氧化障碍和线粒体障碍,或者由对氮代谢和/或更一般地对氮代谢起主要贡献的(例如肝脏)细胞的功能障碍引起。

[0006] 获得性高氨血症通常由肝病引起,包括急性和慢性肝功能衰竭,诸如病毒性肝炎或过量酒精消耗。受损的肝功能或肝脏的血管旁路,造成肝脏中血液的滤过减少,导致高氨血症。高氨血症引起的肝性脑病是肝病的常见并发症。

[0007] 高氨血症也可能因其他原因而发生,包括肾脏的功能障碍(即功能障碍)和/或衰竭、药物毒性(例如由于丙戊酸或环磷酰胺)、免疫抑制或细胞毒性疗法后的特发性高氨血症综合征、尿潴留和尿路感染中的尿素分解,或必需氨基酸全肠胃外营养。

[0008] 目前对高氨血症的治疗被设计为降低血液和/或脑中的氨水平,例如通过血液透析(通常用于新生儿)或通过施用如下化合物进行:增加氮废物的去除的化合物,例如不可吸收的二糖(例如乳果糖)或抗生素(例如利福昔明(rifaxamin));或将氮转化为尿素以外的随后被排泄的产物的化合物,例如化合物诸如苯甲酸钠、精氨酸、卡哥鲁酸(carglumic acid)、苯乙酸或后来的苯丁酸或L-鸟氨酸L-天冬氨酸(LOLA)或L-鸟氨酸苯乙酸(OP)。

[0009] 该状况的管理还可以包括饮食控制,以限制蛋白质摄入并确保足够的营养摄入,包括蛋白质和/或氮摄入以及肠胃外卡路里摄入的管理。

[0010] 然而,尽管在状况的治疗和管理方面有所改进,但目前的疗法是非特异性的,并不总能成功地管理状况。特别是在UCD情况中,目前的疗法不能阻止许多氨升高事件,并且具有严重形式的该疾病的患者常常在5岁左右进行肝移植评估。因此,存在对用于高氨血症的另外的或改进的疗法的持续需求。

发明内容

[0011] 本发明试图解决此需求,并且基于以下的概念:使用谷氨酰胺合成酶通过将氨转化为无毒产物谷氨酰胺来将氨解毒。特别地,本发明系统地提出施用谷氨酰胺合成酶作为蛋白质疗法,以降低血液中氨的水平。

[0012] 谷氨酰胺合成酶(GS)催化以下反应:

[0013] 谷氨酸(Glutamate)+ATP+NH₃→谷氨酰胺+ADP+磷酸。

[0014] 谷氨酰胺合成发生在身体的许多器官中,并可能在器官和全身氮平衡中发挥作用。最近,基于骨骼肌中GS过度表达的基因治疗已被提议用于急性高氨血症的治疗(Torres-Vega等人, Gene Therapy 2015, 22, 58-64),这种治疗的原理是替代或增强肝病患者肌肉中普遍地有缺陷的GS,从而旨在增加肌肉中这种酶对氨的清除。然而,基因治疗已被证明在临床实践中难以成功施用,并且并非所有患者都适合它(例如儿童,基于干细胞的基因疗法除外)、或者可能基因疗法难治(例如由于免疫原因)的患者。此外,这种疗法将在肌肉中产生主要局部化的效应。因此,仍然存在对更普遍适用的疗法的需求。

[0015] GS作为蛋白的全身施用可以有助于达到这样一种更普遍的效果。我们已经示出,GS特别是人类GS,可以成功地被表达和纯化,并且可以以未修饰的形式和缀合到聚合配偶体诸如聚乙二醇的修饰的形式保持或显示GS活性。此外,动物研究示出了,通过全身施用可以实现GS的高循环水平,并且向动物施用的修饰和未修饰的GS均保持血液和其他组织(例如肝脏)中的活性。因此,可以通过全身性(例如肠胃外)施用GS蛋白来达到GS的治疗水平。

[0016] 此外,发明人还出乎意料地发现了,GS蛋白和降氨剂(诸如氮清除剂,例如苯乙酸的药学上可接受的盐,诸如苯乙酸钠)的组合使用具有协同作用,并且可以进一步提高GS蛋白治疗或预防高氨血症的活性。因此,在一个方面,本发明提供一种谷氨酰胺合成酶(GS)蛋白,该GS蛋白用于在通过向受试者全身非口服施用治疗或预防高氨血症中使用。

[0017] 在一个合适的实施方案中,用于治疗或预防高氨血症的GS蛋白可以用于与降氨剂组合使用。

[0018] 在另一方面,本发明提供一种用于与GS蛋白组合使用的降氨剂,用于治疗或预防高氨血症。

[0019] 本发明的相关方面还提供GS蛋白用于制造组合物(例如药物组合物或营养组合物,例如药物或补充剂)的用途,该组合物用于通过向受试者全身非口服施用治疗或预防高氨血症。

[0020] 在合适的实施方案中,该组合物可以与降氨剂组合使用。

[0021] 本发明的另外的方面还提供降氨剂用于制造组合物的用途,该组合物用于与GS组合使用治疗或预防高氨血症。

[0022] 在另外的方面中,本发明提供GS蛋白和降氨剂用于制造组合物的用途,该组合物用于高氨血症的治疗或预防。

[0023] 在另外的方面中,本发明提供一种治疗或预防受试者中的高氨血症的方法,所述方法包括向所述受试者(更特别地,向有相应需要的受试者)全身性且非口服地施用GS蛋白。在合适的实施方案中,该方法还包括施用降氨剂。

[0024] 还提供了一种包含GS蛋白的组合物,该组合物用于通过向受试者全身非口服施用治疗或预防高氨血症。

[0025] 合适地,包含GS蛋白的组合物可以是药物组合物或营养组合物,例如药物或补充剂。合适地,该组合物可以还包含降氨剂。

[0026] 本发明还涉及用于治疗或预防高氨血症的包含降氨剂的组合物。合适地,包含降氨剂的组合物可以是药物组合物或营养组合物,例如药物或补充剂。

[0027] 本发明还涉及包含GS蛋白和降氨剂的组合物。

[0028] 合适地,该组合物可以是药物组合物或营养组合物。合适地,该组合物可用于治疗或预防高氨血症。

[0029] 术语“GS蛋白”可以可选地表述为“具有谷氨酰胺合成酶(GS)活性的蛋白”。如下文更详细描述,术语“蛋白”在本文中广泛使用以包括任何蛋白质的分子,包括肽和多肽,以及蛋白质或多肽片段;GS蛋白不必须是或对应于自然界中出现的全长GS酶(例如天然或野生型GS)并且包括截短的或其他变体。也如下文更详细描述,还包括了GS蛋白与其他分子的缀合物或融合物。

[0030] 术语“高氨血症”包括任何下述状况:该状况中血液中的(或如在任何血液衍生产物或样品例如血浆中测量或确定的)氨与没有该状况的受试者(例如健康受试者或没有导致或引起高氨血症的潜在状况的受试者)中的氨水平相比升高。在健康方面,氨的运输和代谢受到严格的调控,以维持低血浆/血液浓度(正常范围10-40 $\mu\text{mol/L}$)。因此,血浆(或血液)氨浓度>40、60或70或80 $\mu\text{mol/L}$ 或更高,例如41、42、45、50、55、60、70或80 $\mu\text{mol/L}$ 或更高可被视作指示高氨血症。例如,血浆氨浓度>100 $\mu\text{mol/L}$,以及特别地150 $\mu\text{mol/L}$ 或更高,其中与正

常阴离子间隙和正常血浆葡萄糖浓度相关联,可以指示高氨血症,或者更特别地,指示UCD的存在。

[0031] 高氨血症可能由上文讨论的任何原因或状况引起,即如上所讨论的,它可能是先天的或获得性的、原发性的或继发性的。因此,在一个实施方案中,高氨血症可能是由于尿素循环障碍(UCD)引起(或与之相关)。如上所讨论的,UCD可能源自尿素循环中任何一种或更多种蛋白的缺陷,这可能使蛋白失活或降低蛋白的活性。

[0032] 在另外的实施方案中,高氨血症可能由于影响不是尿素循环的一部分但是影响体内的氮代谢和/或氮平衡,并导致血液中氨的量增加的蛋白(例如酶)的先天性代谢障碍而引起。适当地,这种先天性代谢障碍可能是谷氨酰胺合成酶缺乏。

[0033] 在又另外的实施方案中,高氨血症可以是获得性的,并且可以由于参与氮代谢和/或氮平衡例如参与含氮分子或物质的分解代谢和/或排泄的身体器官或组织(例如肝脏或肾脏)的疾病或损伤而引起。

[0034] 因此,任何类型的肝脏损伤或疾病,包括慢性或急性肝功能衰竭两者,例如由于过量酒精消耗或由于药物(无论娱乐性的或药用的)导致的肝脏损伤、由于任何原因导致的肝硬化、非酒精性脂肪性肝病、肝脏感染或对肝脏的损伤,可能导致高氨血症。

[0035] 类似地,如上文已对肝脏描述的任何类型的肾脏的损伤或疾病,也可能导致高氨血症。因此,影响身体多个器官的任何状况(例如多器官衰竭),诸如例如败血症、损伤引起的器官损伤(无论外部损伤例如创伤,或内部损伤例如来自自身免疫紊乱),或者任何全身感染,可能导致高氨血症。

[0036] 取决于潜在的原因,高氨血症可以基于临床、生化和/或分子遗传数据进行检测或诊断。因此,例如,它可以根据本领域公知和使用的技术,通过评估或监测血液中氨的水平(例如,在血浆或血清或任何血液衍生样品中)进行检测。存在于血液(血浆或血清等)中的氨基酸和/或其浓度(例如精氨酸或瓜氨酸)的分析,或血液或其他体液或组织中的其他代谢物(例如尿液中的乳清酸)的分析也可以帮助鉴定涉及UCD,和/或将确定其确切性质(即所涉及的特定蛋白质/酶的缺陷)。这种确定和分析可以与临床评估相联合,例如神经病学和神经精神病学评估,包括生理(例如MRI或其他成像)测试和/或行为/反应测试等,肝和/或肾或其他器官功能测试等。在疑似UCD的情况下,也可以进行家族史调查和/或分子遗传学测试和/或尿素循环酶的酶活性评估。

[0037] 如本文所用的,提及用于根据本发明使用的谷氨酰胺合成酶或GS蛋白包括提及所有形式的酶活性GS以及酶活性变体,所述酶活性GS包括人类GS和来自非人类动物(如小鼠、牛(cow)、兔、大鼠、猴、黑猩猩和狗等)的GS,或来自其他来源,包括例如真菌、植物或细菌。因此,代表性的GS蛋白包括与以下具有至少50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更多的序列同一性的那些或其酶活性片段:以SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:4(人类GS,分别为前体、成熟和N末端加标签的形式)列出的GS多肽或以SEQ ID NO.6(来自嗜酸乳杆菌(*Lactobacillus acidophilus*)菌株30SC的GS)或SEQ ID NO.7(来自玉米(corn),玉米(*Zea Mays*)的GS)列出的GS多肽。例如,提及GS还可以包括N末端和/或C末端截短的多肽或氨基酸修饰的蛋白质(例如翻译后修饰,诸如腺苷酸化或其他修饰,诸如可能影响蛋白质的结构或活性的氨基酸多态性)。GS也可以包括蛋白质的多聚体。因此,术语“GS”包括保留GS酶活性的所有天然形

式的GS酶或多肽及其酶活性片段或变体,包括具有一个或更多个氨基酸取代、添加(包括插入和延伸)或缺失的合成衍生的多肽和修饰的多肽。

[0038] 因此,GS可以是或可以衍生自落入酶分类EC 6.3.1.2的任何酶。它可以是具有GS活性的任何多肽或肽。GS活性可以定义为将谷氨酸和氨转化为谷氨酰胺的能力,例如根据上述反应方案。GS活性可以使用本领域已知的并在文献中描述的测定或测试(例如功能活性测定)进行评估或确定。例如,在Listrom等,Biochem.J.1997,328,159-163中描述了GS酶活性测定。在下文的实施例(见实施例2和4)中也对GS活性的测定进行了描述。

[0039] 该术语还包括GS的前药,它是一种本身不显示GS活性的形式,但其在施用至受试者后可被转化为活性GS。

[0040] 因此,如本文所用,提及GS蛋白或多肽的“酶活性”指能够催化谷氨酸和氨转化为谷氨酰胺的GS蛋白或多肽。典型地,酶活性GS蛋白或多肽显示出以SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:6或SEQ ID NO:7列出的GS多肽的酶活性的至少或大约30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、96%、97%、98%或99%。

[0041] 如本文使用的术语“受试者”包括任何人类或非人类的动物,以及特别指哺乳动物,包括例如人类、灵长类动物、家畜动物(例如绵羊、猪、牛(cattle)、马、驴)、实验室实验动物(例如小鼠、兔、大鼠、豚鼠)、伴侣动物(例如狗、猫)和圈养野生动物(例如狐狸、袋鼠、鹿)。优选地,该哺乳动物是人类或实验室实验动物。甚至更优选地,该哺乳动物是人类。

[0042] 如本文使用的,术语“治疗(treating)”、“治疗(treatment)”、“预防(preventing)”和“预防(prevention)”指的是补救或改善状况或症状,阻止状况或疾病的形成,或以无论任何方式另外阻止、阻碍、减缓、减少或逆转状况或疾病或其他不期望的症状的进展的任何和所有使用。因此,术语“治疗(treating)”和“预防(preventing)”及类似的术语应在其最广泛的范围内加以考虑。例如,治疗不一定意味着患者接受治疗直到完全康复,而是包括患者或受试者的状况、或疾病或状况的症状的任何改进(improvement)或改善(amelioration)。因此,例如在UCD的情况下,根据本发明的治疗当然不治疗潜在的遗传障碍,而是治疗所导致的高氨血症的临床状况。在显示多种症状或以多种症状为特征的状况中,治疗或预防不一定需要补救、改善、阻止、阻碍、减缓、减少或逆转所有的所述症状,而是可以补救、改善、阻止、阻碍、减缓、减少或逆转一种或更多种所述症状。在合适的实施方案中,根据本发明的“治疗”可以包括血液中氨的水平降低至例如正常或健康水平,例如至10-40 $\mu\text{mol/L}$ 的范围。因此,治疗包括恢复正常或健康的氨水平。类似地,根据本发明的预防可以包括保持血浆/血液的氨水平在如上所述的任何正常或健康范围内。

[0043] 在合适的实施方案中,根据本发明的“治疗”可以包括将受试者组织中谷氨酰胺合成酶水平和/或活性增加至例如正常或健康水平。这种增加可以在任何合适的组织中(例如肝脏和/或肌肉)。谷氨酰胺合成酶水平和/或活性的增加可以例如通过测量受试者的谷氨酰胺的水平、谷氨酸的水平,和/或通过确定谷氨酰胺的水平与谷氨酸的水平之间的比值来确定。应当理解,谷氨酰胺和/或谷氨酸的正常或健康水平可以根据在哪个样品中测量它们而变化。还应当理解,谷氨酰胺和/或谷氨酸的正常或健康水平可以是受试者特有的,并且取决于诸如受试者的体重、饮食、性别和年龄等因素。谷氨酰胺和/或谷氨酸的正常或健康的水平将是本领域技术人员已知的。

[0044] 在合适的实施方案中,根据本发明的“治疗”可以包括水肿的减少。本文使用的术

语“水肿”是指患者体内浆液的异常积累。在合适的实施方案中,水肿可以是脑水肿、肺水肿、外周水肿和/或黄斑水肿。合适地,在本发明的上下文中,“治疗”可以指脑水肿的减少,例如在前额皮质。作为实例,水肿可以通过CT扫描、MRI和/或x射线评估。其他评估水肿的方法对本领域技术人员将是熟知的。

[0045] 在合适的实施方案中,根据本发明的“治疗”可以包括神经心理功能、神经精神病学功能和神经认知功能的改善。术语“神经心理功能、神经精神病学功能和神经认知功能”指的是大脑控制例如记忆、注意力、认知、精神性运动活动、协调和情绪的功能。涉及GS蛋白和降氨剂的组合的本发明的用途、方法和组合物在这种实施方案中可以特别有用。用于评估神经功能的多种方法将是本领域技术人员已知的。神经元功能状态可以用脑电图、计算机测试、纸笔测试和神经心理学家的评估进行评估。

[0046] 在一个合适的实施方案中,根据本发明的“治疗”可以包括肌少症和身体机能的改善。术语“肌少症”指的是肌肉质量减少。术语“身体机能”指的是受试者的力量,尤其是肌肉力量。肌少症的严重程度可以通过使用临床工具、营养工具、身体成分的测量或成像来确定。身体机能可以通过例如氧气输送和消耗的评估、锻炼测试和握力测试、和/或疲劳的水平改善和/或免疫系统功能来评估。

[0047] 如本文使用的,“改善”指的是状况或疾病的至少一种指标或症状的严重性的减轻。在某些实施方案中,改善包括状况或疾病的一个或更多个指标的进展的延迟或减慢。指标的严重性可以通过本领域技术人员已知的主观或客观的度量确定。

[0048] 如本文使用的,术语“与…关联(associated with)”当用于疾病或状况的上下文中时,“与”氨水平升高“关联”意指该疾病或状况可以由氨水平升高产生、导致氨水平升高、以其为特征或以其他方式与其关联。因此,疾病或状况与氨水平升高之间的关联可以是直接的或间接的,并且可以是时间上分离的。

[0049] 用于确定氨水平的合适样品包括氨可能在其中出现的任何合适的或期望的样品。同样地,用于确定谷氨酰胺合成酶水平和/或谷氨酰胺合成酶活性的合适的样品包括其中可能存在谷氨酰胺合成酶、谷氨酰胺和/或谷氨酸的任何合适的或期望的样品。这些可以是任何合适的或期望的组织或体液样品。合适的组织的一个实例是肝脏和/或肌肉组织。便利地,样品可以是任何体液样品,并且通常将是血液或任何血液衍生样品,例如血浆或血清等,但是它可以是任何其他体液,例如尿液、脑脊液或粪便或组织样品等,例如活检样品或灌洗液或冲洗液样品等。当然这可以取决于待治疗状况的确切性质等。

[0050] 如本文使用的,术语“有效量”在其含义内包括无毒但足以提供期望的效果的GS蛋白和/或降氨剂(取决于上下文)的量或剂量。应当理解,蛋白质和/或降氨剂的有效量可以是不同的。示例性治疗有效量在本说明书的其他地方进行具体说明。

[0051] 所需的确切的量或剂量将随受试者不同而变化,取决于诸如被治疗的物种、受试者的年龄和一般状况、被治疗状况的严重性、被施用的特定GS和施用的模式等等。因此,明确规定确切的“有效量”是不合适的。然而,对于任何给定的病例,适当的“有效的量”可由本领域普通技术人员仅使用例行实验确定。

[0052] 人类GS被表达为373个氨基酸的多肽(如SEQ ID NO.1所示)。这代表表达的完整的“前体”蛋白质,随后进一步加工成具有2-373个氨基酸的成熟形式(仅N末端甲硫氨酸被去除以在体内产生372个氨基酸的成熟蛋白质,如以SEQ ID NO.2所示)。以SEQ ID NO.3列出

的示例性多核苷酸代表编码多肽SEQ ID NO.1的cDNA。如下文实施例中所制备和使用的,SEQ ID NO.4代表修饰的人类GS蛋白,包含带有N末端His标签和接头序列的GS多肽SEQ ID NO.1。如以下实施例中所使用的,SEQ ID NO.5是编码多肽SEQ ID NO.4的cDNA序列,针对细菌中的表达进行了密码子优化。

[0053] 人类GS已进行了很好的表征(见例如Listrom等,1997,同上)。来自其他生物体(包括植物和细菌)的GS酶也已被鉴定,并且此类其他GS酶的核酸和氨基酸序列是本领域公知的,并且在可随意获得的数据库中提供,诸如,例如美国国家生物技术信息中心(National Center for Biotechnology Information,NCBI)核苷酸(ncbi.nlm.nih.gov/nucore)和蛋白质(ncbi.nlm.nih.gov/protein)数据库。尽管植物或细菌GS酶和人类GS酶之间的序列同一性可能低,但结构和功能相似性高。因此,植物或细菌GS、或者实际上来自其他生物体的GS、或者其氨基酸序列变体可以被使用。作为代表性的实例,SEQ ID NO.6列出了来自嗜酸乳杆菌菌株30SC的GS的氨基酸序列,其与人类GS具有23.8%的序列同一性,与干酪乳杆菌(*Lactobacillus casei*)的GS具有61.9%的序列同一性,并且SEQ ID NO.7列出了来自玉米(corn)(玉米(maize),玉米(*Zea Mays*))的GS的氨基酸序列,其与人类GS具有55.7%的序列同一性。

[0054] GS通常以包含多个(即2个或更多个)单体亚基的多聚体出现。例如,上文提供的GS氨基酸序列代表这样的单体亚基。人类GS最常被报道为十二聚体(12个亚基)。如本文使用的,GS可以作为单体和/或多聚体提供。多聚体可以包含2个或更多个单体亚基,例如2至20、2至16、2至15、2至14或2至12个亚基。

[0055] 事实上,本发明的一个出乎意料特征是,与文献中报道的12-亚基多聚体相反,人类GS蛋白可以作为多种不同类型多聚体(也包括单体形式)的混合物表达和/或获得。单体形式被示出是有活性的。因此,根据本发明,GS可以作为单体和/或作为多聚体被使用,并且多聚体可以作为单一多聚体形式提供,或者作为不同多聚体形式的混合物(其可以包括或不包括该单体)提供。如下文实施例所报告,可以获得4种或更多种,例如4至10种,例如5至8种多聚体形式。多聚体可能的尺寸范围为2至20个亚基。

[0056] 在本文提供的方法中使用的GS蛋白,可以通过本领域已知的任何方法获得,诸如重组方法、蛋白分离和纯化方法以及化学合成方法,提供显示酶活性的所得的GS。因此,所述GS可以是重组GS、从组织分离的天然GS、或化学合成的GS。

[0057] 修饰GS多肽,诸如以SEQ ID NO:1列出的多肽,以产生在本文提供的方法中使用的酶活性GS变体完全在本领域技术人员的能力范围内。例如,本领域技术人员应理解,在参与底物结合的位置或在活性位点的修饰,与在这些关键区域以外的位置的修饰相比被容许的可能性较小。任何GS多肽可以使用本领域公知的方法进行测试,诸如下文实施例中描述的那些,以评估GS多肽催化谷氨酸和氨转化为谷氨酰胺的能力。

[0058] 在一些实施例中,根据本文的本发明使用的GS是使用本领域公知的原核或真核表达系统产生的重组GS。示例性原核表达系统包括但不限于大肠杆菌(*Escherichia coli*)表达系统,并且示例性真核表达系统包括但不限于酵母、昆虫细胞和哺乳动物细胞表达系统。

[0059] 编码GS的核酸可以通过任何合适的方法获得,包括但不限于,肝脏RNA的RT-PCR和合成核苷酸的合成。诸如上文所列出的,用于扩增的引物可以基于已知的GS序列来设计。GS的核酸和氨基酸序列在本领域中是公知的,并且在可随意获得的数据库中提供,诸如,例如

美国国家生物技术信息中心 (NCBI) 核苷酸 (ncbi.nlm.nih.gov/nuccore) 和蛋白质 (ncbi.nlm.nih.gov/protein) 数据库。

[0060] 编码GS多肽的核酸,诸如具有以SEQ ID NO.3列出的序列的核酸,可以被克隆到适合所选表达系统的表达载体中。在某些情况下,核酸是针对在特定系统中的表达被密码子优化的。例如,编码GS多肽的核酸可以针对在大肠杆菌中的表达被密码子优化。示例性的用于在大肠杆菌中表达的编码GS的密码子优化的核酸以SEQ ID NO 5列出,其编码包含通过GGGGS接头附接的His标签的GS多肽(如SEQ ID NO.4中列出的)。

[0061] 通常,编码GS的核酸被克隆到表达载体中,可操作地连接到促进异源核酸分子表达的调节序列。许多适合GS的表达的载体是可获得的,并且为本领域技术人员已知的。表达载体的选择受宿主表达系统的选择影响。这种选择完全在本领域技术人员的技能水平范围之内。通常,表达载体可以包括转录启动子和任选的增强子、翻译信号、以及转录和翻译终止信号。用于稳定转化的表达载体通常具有允许转化细胞的选择和维持的选择性标记。在某些情况下,复制起点可被用于扩增细胞中载体的拷贝数。

[0062] GS多肽也可以被表达为蛋白质融合物。例如,融合物可以被产生以向多肽增加额外功能。融合蛋白的实例包括但不限于,含有GS和用于纯化的亲和标签(例如his标签例如his6、MYC、FLAG、HA或GST标签)、前导序列(诸如pelB前导序列)、用于指导蛋白分泌的序列、或用于稳定和/或溶解GS的蛋白(例如麦芽糖结合蛋白(MBP))或用于增加体内半衰期的蛋白(例如白蛋白或Fc结构域、或其片段)的融合物。

[0063] 原核生物,尤其是大肠杆菌,提供了用于产生大量GS的系统。大肠杆菌的转化是本领域技术人员公知的简单而快速的技术。用于大肠杆菌的表达载体可以含有诱导型启动子,其对于诱导高水平的蛋白质表达和对于表达对宿主细胞显示一定毒性的蛋白质是有用的。诱导型启动子的实例包括lac启动子、trp启动子、杂合tac启动子、T7和SP6 RNA启动子和温度调节的 λ PL启动子。

[0064] 在其他实例中,真核表达系统被用于产生GS,诸如杆状病毒表达系统。通常,表达载体使用启动子诸如用于高水平表达的杆状病毒的多角体蛋白启动子。常用的杆状病毒系统包括杆状病毒诸如苜蓿银纹夜蛾(*Autographa californica*)核型多角体病毒(AcNPV),和家蚕(*Bombyx mori*)核型多角体病毒(BmNPV)和昆虫细胞系诸如源自草地贪夜蛾(*Spodoptera frugiperda*)的Sf9、一星粘虫(*Pseudaletia unipuncta*) (A7S)和君主斑蝶(*Danaus plexippus*) (DpN1)。为了高水平表达,GS的核苷酸序列紧接地在病毒多角体蛋白起始密码子的下游融合。

[0065] 酵母诸如酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)、粟酒裂殖酵母(*Schizosaccharomyces pombe*)、解脂亚罗酵母(*Yarrowia lipolytica*)、乳酸克鲁维酵母(*Kluyveromyces lactis*)、和巴斯德毕赤酵母(*Pichia pastoris*)也可以用作GS的表达宿主。酵母可以用附加型复制载体进行转化或通过以同源重组的稳定染色体整合进行转化。通常,诱导型启动子,诸如包括GAL1、GAL7和GAL5,被用于调节基因表达。酵母表达载体通常包括选择标记,诸如LEU2、TRP1、HIS3和URA3,用于选择和维持转化的DNA。

[0066] 哺乳动物表达系统也可被用来表达GS。表达构建体可以通过病毒感染(诸如腺病毒)或通过直接DNA转移(诸如脂质体、磷酸钙、DEAE-葡聚糖)和通过物理方法(诸如电穿孔和显微注射)被转移到哺乳动物细胞。用于哺乳动物细胞的表达载体通常包括mRNA加帽位

点、TATA盒、翻译起始序列(Kozak共有序列)和多聚腺苷酸化元件。这种载体通常包括用于高水平表达的转录启动子-增强子,例如SV40启动子-增强子、人类巨细胞病毒(CMV)启动子,以及劳氏肉瘤病毒(Rous sarcoma virus,RSV)的长末端重复序列。可用于哺乳动物表达的示例性细胞系包括但不限于,小鼠、大鼠、人、猴、和鸡和仓鼠的细胞,诸如BHK、293-F、CHO、Balb/3T3、HeLa、MT2、小鼠NS0(非分泌型)和其他骨髓瘤细胞系、杂交瘤和异杂交瘤(heterohybridoma)细胞系、淋巴细胞、成纤维细胞、Sp2/0、COS、NIH3T3、HEK293、293S、293T、2B8和HKB细胞。

[0067] 表达后,GS可以使用本领域技术人员已知的任何方法进行纯化,所述方法包括但不限于,SDS-PAGE、尺寸分级和尺寸排阻层析、硫酸铵沉淀、螯合层析、离子交换层析和亲和层析。亲和纯化技术可被用来提高制备物的功效和纯度。例如,抗体和其他结合GS的分子可以在亲和纯化中使用。如上所讨论的,表达构建体可被工程化以添加亲和标签诸如his、myc、FLAG或HA标签或GST部分至GS,然后其可分别用Ni树脂、myc抗体、HA抗体、FLAG抗体或谷胱甘肽树脂进行亲和纯化。纯度可以通过本领域已知的任何方法进行评估,包括凝胶电泳和染色以及分光光度技术,诸如SDS-PAGE和尺寸排阻层析(SEC)。

[0068] 对于根据本发明的用途,亲和标签(例如,his标签等)可以被去除,但是这不是必需的,并且GS多肽可以与所附的标签一起使用。

[0069] 根据本领域公知的原理,标签或其他融合配偶体可以通过接头附接到GS,接头可以是任何合适的接头。这种接头通常地和方便地可以是短(例如2至10、2至8或2至6个单体单元)肽。作为实例,接头GGSG可被提及,但是可以由任何合适的氨基酸组成。同样根据本领域公知的和文献中描述的原理和技术,氨基酸接头使得能够通过重组方式制备融合蛋白,但是基于非氨基酸的接头也可以被使用。接头可以是可裂解的(即酶解的)或不可裂解的。

[0070] GS多肽可以被制备为裸多肽链,或制备为修饰的多肽,其通过偶联或缀合到另外的部分或化学基团或物质被修饰。示例性的修饰包括但不限于,聚乙二醇化、白蛋白化或其他已知修饰。例如,在某些情况下,使用本领域公知的标准方法将用于在所述方法中使用的GS多肽进行聚乙二醇化。例如,这可能有助于提高GS蛋白在循环中的半衰期。因此,在本发明的一个优选实施方案中,GS蛋白可以作为与聚合物诸如聚乙二醇(PEG)或多糖或寡糖的缀合物被提供。与PEG的缀合物是特别优选的。如上所述的,这种缀合物的制备是本领域公知的并在文献中被描述。因此,各种尺寸的PEG可被用于制备缀合物,例如从100道尔顿至100kD,但更经常地从5kD至100kD,例如12或15kD至60或80kD,例如15kD至50kD、15kD至40kD、或15kD至30kD的范围。此外,PEG可以以各种方式附接或连接到GS蛋白,并且多于一个PEG可以被附接到每个单独的蛋白。可以将它直接地或间接地连接,例如对于上述融合蛋白通过所述的接头,或者通过任何可以提供接头功能的分子或化学基团。因此,PEG可以被连接在N末端或C末端的一个或两个上,或者被连接在GS分子内部,例如在GS蛋白质分子中的一个或多个赖氨酸残基的氨基,或者在蛋白质分子中的任何其他化学部分或残基。用于偶联或缀合聚合物诸如PEG到蛋白质的方法在本领域是公知的,并在文献中被描述(参见例如Roberts等2012,Advanced Drug Delivery Reviews,64(增刊)116-127,和Veronese 2001,Biomaterials 22,405-417)。下文实施例中提供的数据示出,通过连接PEG到N末端制备的PEG缀合物特别有效,例如在来自施用各种缀合物的动物的肝脏裂解物的活性测定中。因此,包含将PEG连接到GS蛋白N末端的PEG缀合物,代表本发明的一个优选实施方案。GS蛋

白可以以单体和/或多聚体形式被聚乙二醇化。因此,为了方便,包含单体形式和各种多聚体形式两者的GS的制备物可以经历聚乙二醇化。

[0071] GS可以被配制成药物组合物,用于向受试者施用。通过混合选定量的GS与一种或更多种生理学上或药学上可接受的载体或赋形剂,可以将GS以任何常规方式配制。

[0072] 因此,本发明的另外的方面提供了一种药物组合物,其包含GS蛋白和一种或更多种药学上可接受的载体或赋形剂,其中该组合物用于非口服全身施用。

[0073] 载体或赋形剂的选择在用药从业者的技能范围内,并可取决于许多参数,诸如施用的模式。在一些例子中,GS作为流体被提供。在其他情况下,GS以干燥的形式提供,诸如脱水干燥或冷冻干燥形式。可以将这种干燥的形式通过添加合适的溶液,诸如水、缓冲液、盐水或其它合适的溶液在施用前再水合。本文提供的GS可以被配制用于直接施用,或可以配制用于稀释或其它调整。因此,GS可以以单(或单位)剂量形式或多个剂量形式被配制。单剂量形式的实例包括安瓿和注射器。多剂量形式的实例包括含有多个单位剂量的小瓶(vial)和瓶(bottle)。

[0074] 制剂中GS的浓度对于递送一定量的GS是有效的,该量在施用后,在谷氨酸的存在下对转化胺为谷氨酰胺是有效的。浓度和量将取决于几个因素,包括受试者中底物的水平和施用的模式,并且可以凭经验确定。本文提供的组合物中GS的示例性浓度包括但不限于,以下或约以下的浓度:0.1、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1、5、10、15、20、30、40、50、60、70、80、90、100、200、300、400、500、1000、2000、3000、4000或5000mg/mL GS或更多。

[0075] 为了配制该GS组合物,在一个实施方案中,将重量分数的GS以期望的浓度溶解、悬浮、分散或以其他方式混合在选定的媒介物中。得到的混合物是溶液、悬浮液、乳液和其它这样的混合物,并且可以被配制为非水性或水性混合物,包括但不限于,溶液、悬浮液、糊剂、凝胶、气雾剂、喷雾剂或任何其它适用于全身施用的制剂。

[0076] 通常,GS组合物根据监管机构的批准被制备,或者根据公认的用于动物和人类的药典以其他方式制备。GS组合物可以包括载体,诸如稀释剂、赋形剂或媒介物。这种药物载体可以是无菌液体,诸如水和油。盐水溶液和水性右旋糖和甘油溶液也可被用作液体载体,特别是用于可注射溶液。组合物可以还含有活性成分:稀释剂诸如乳糖、蔗糖、磷酸二钙或羧甲基纤维素;润滑剂,诸如硬脂酸镁、硬脂酸钙和滑石;以及粘合剂,诸如淀粉、天然树胶(诸如阿拉伯树胶)、葡萄糖、糖蜜、聚乙烯吡咯烷酮、纤维素及其衍生物、聚维酮、交联聚维酮和本领域技术人员已知的其它此类粘合剂。适合的药物赋形剂包括淀粉、葡萄糖、乳糖、蔗糖、明胶、麦芽、稻米、面粉、白垩、硅胶、硬脂酸钠、单硬脂酸甘油酯、滑石、氯化钠、脱脂乳粉、甘油、丙二醇、水和乙醇。如果需要,GS组合物也可以含有少量的润湿剂或乳化剂,或pH缓冲剂,例如醋酸盐、柠檬酸钠、环糊精衍生物、脱水山梨醇单月桂酸酯、三乙醇胺醋酸钠、三乙醇胺油酸酯和其它此类剂。合适的药物载体的实例由E.W.Martin在“Remington's Pharmaceutical Sciences”中描述。

[0077] 脂质体悬浮液(包括组织靶向的脂质体),也可以适合作为药学上可接受的载体。这些可以根据本领域技术人员已知的方法进行制备。脂质体递送也可以包括缓释制剂,包括药物基质,诸如胶原凝胶和用纤连蛋白修饰的脂质体。

[0078] 除了在药物组合物中,还可以将GS以其他方式配制或施用,例如在营养组合物诸如膳食补充剂中,例如胃肠外营养组合物(例如单独或与其他补充成分一起)。GS可以作为

多肽(例如纯化的酶)或作为表达宿主细胞或生物体的一部分被包括在这些食品中。因此,例如微生物(例如酵母或细菌或真菌)宿主细胞或植物(包括植物细胞)可以被工程化以表达GS并且可以这样施用,例如整个细胞或提取物或其他加工的产物(其中酶活性可以被保留),或者可以掺入营养组合物中。因此,例如,适合人类或非人类动物消耗的细菌或酵母细胞可以被工程化以表达GS(即通过包含编码GS的核苷酸序列的核酸分子的引入)。可选地,植物可以以类似的方式被工程化,并且可以提供合适的植物部分等(例如种子、叶子、块茎等)用于施用。本领域已知哪些微生物(例如酵母、细菌、藻类或真菌)适合人类或其他动物消耗,并且许多这类生物现在,例如在益生制剂中被使用。任何这样的益生生物体或制剂可以被使用,例如基于乳酸菌,诸如双歧杆菌属种(*Bifidobacterium* sp.)或乳杆菌属种(*Lactobacillus* sp.) (例如嗜酸乳杆菌)等。因此,根据本发明,这类生物体或制备物可以被配制用于并直接施用到胃肠道中,例如通过注射或输注、或灌肠或直肠施用等。向受试者施用的GS的精确的量或剂量取决于GS的活性、施用途径、被治疗的疾病或状况、施用的剂量的数量、以及其他考虑因素,诸如受试者的体重、年龄和一般状态。特定的剂量和施用方案可以根据经验确定或从例如动物模型中的研究进行推断。GS的示例性治疗有效剂量包括但不限于,从每天0.1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 体重或从约每天0.1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 体重至或至约每天10000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 体重,包括从每天1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 体重或从每天约1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 体重至或至约每天1000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 体重,或从每天10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 体重或从约每天10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 体重至或至约每天100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 体重。因此,例如受试者可以每天被施用0.1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 体重、0.2 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 体重、0.3 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 体重、0.4 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 体重、0.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 体重、1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 体重、5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 体重、10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 体重、20 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 体重、30 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 体重、40 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 体重、50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 体重、60 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 体重、70 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 体重、80 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 体重、90 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 体重、100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 体重、200 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 体重、400 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 体重、600 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 体重、800 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 体重、1000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 体重、2000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 体重、4000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 体重、6000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 体重、8000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 体重、10000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 体重或20000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 体重或更多GS。

[0079] 本发明的一个特征是GS为全身施用,但是非口服。“口服”意指由口服递送。因此,非口服意指GS蛋白不是通过口腔摄入施用。尽管可以包括递送GS蛋白至肠道或更通常地胃肠(GI)道的其它施用方式(例如经直肠地、通过灌肠或直接施用至胃肠道内),但在某些实施方案中,它们被排除在外。因此,在某些实施方案中,本发明包括肠内施用,但在另一个实施方案中不包括。在另外的实施方案中,本发明不包括施用至肌肉,特别是施用至骨骼肌。因此,在这样的实施方案中,施用不是针对肌肉的,即,是非针对肌肉(non-muscle directed)的疗法。

[0080] 因此,GS可以通过将GS蛋白全身性地递送至身体的任何方法和途径被施用,但不涉及口服施用。在某些实施方案中,可以将GS蛋白肠胃外施用。本领域技术人员将容易理解并能够选择合适的施用或递送模式,包括但不限于,静脉内、肌肉内、皮内、透皮、皮下或腹膜内施用,以及通过其任何两种或更多种的任何组合,配制以适合每种施用途径的方式进行。在一些情况下,本文所述的GS组合物是皮下施用的。在其他情况下,GS组合物可以静脉内施用。例如,GS组合物可以通过注射或输注静脉内施用,诸如通过静脉推注。

[0081] GS蛋白也可以与其它治疗剂或活性剂联合或组合施用,尤其是可以治疗(例如改善)高氨血症的第二种或另外的治疗剂。对治疗高氨血症有活性的第二种或另外的治疗剂可以可选地定义为抗高氨血症剂(anti-hyperammonemia agent)或抗高氨血症的剂(agent against hyperammonemia)。第二种剂或另外的剂通常可以是降氨剂诸如氮清除剂(或氨清

除剂)或替代氨基酸或尿素循环的中间体或其类似物。因此,这类剂可以包括氨基酸,例如精氨酸、谷氨酸、瓜氨酸和/或鸟氨酸,和/或N-乙酰谷氨酸和/或类似物分子氨基甲酰谷氨酸(Carbaglu®)。更合适的,第二或另外的剂是降氨剂,更合适的是氮清除剂。这样的实施方案产生了本发明的某些方面。

[0082] 术语“降氨剂”是指去除氨和/或减少或抑制氨产生的化合物。降氨剂可以选自由以下组成的组:氮清除剂、离子交换树脂(例如Relapsa)、氨吸收剂(诸如基于脂质体的氨吸收剂,例如Versantis)、去除氨的工程化的微生物组(例如Synlogic)、利福昔明和乳果糖。

[0083] 本文使用的术语“氮清除剂”是指通过去除氨降低受试者体内氮和/或氨的水平化合物。在合适的实施方案中,氮清除剂通过被代谢为苯乙酰谷氨酰胺减少受试者中氮和/或氨的量,苯乙酰谷氨酰胺可以随后在尿液中被排出。

[0084] 在合适的实施方案中,氮清除剂可以选自由以下组成的组:苯乙酸的药学上可接受的盐(本文也称为苯乙酸盐)、苯基丁酸的药学上可接受的盐(本文也称为苯基丁酸盐)、甘油苯基丁酸盐、苯甲酸的药学上可接受的盐、其药学上可接受的前药和氨结合树脂。其他氮清除剂将是本领域技术人员公知的。

[0085] 如本文所使用的,术语“药学上可接受的盐”包括,例如,足够碱性的苯乙酸的酸-加成盐,例如与以下的酸-加成盐:例如无机酸或有机酸,例如盐酸、氢溴酸、硫酸、磷酸、三氟乙酸、甲酸、柠檬酸、甲烷磺酸盐或马来酸。此外,足够酸性的苯乙酸的合适的药学上可接受的盐是碱金属盐,例如钠盐或钾盐,碱土金属盐,例如钙盐或镁盐,铵盐或与提供药学上可接受的阳离子的有机碱的盐,例如与甲胺、二甲胺、三甲胺、哌啶、吗啉或三-(2-羟乙基)胺的盐。

[0086] 在合适的实施方案中,苯乙酸的药学上可接受的盐可选自由以下组成的组:苯乙酸钠、苯乙酸钾、苯乙酸鸟氨酸。

[0087] 在合适的实施方案中,苯基丁酸的药学上可接受的盐可以选自由苯基丁酸钠和苯基丁酸钾组成的组。

[0088] 在合适的实施方案中,苯甲酸的药学上可接受的盐可以选自由苯甲酸钠和苯甲酸钾组成的组。

[0089] 应当理解,降氨剂可以以溶剂化和非溶剂化形式诸如,例如水合形式存在。应当理解,在本发明的上下文中,包括所有这些溶剂化和非溶剂化的形式。

[0090] 本文使用的术语“前药”是指通过化学或生物部分使其活性低于降氨剂(诸如除氮剂)的剂,但其代谢为降氨剂或经历体内水解以形成降氨剂。

[0091] 特别地,优选诸如苯乙酸盐或苯丁酸盐化合物的剂,其作用以从循环中除去谷氨酰胺(谷氨酰胺是通过GS的作用形成)。第二种或另外的剂,诸如降氨剂,可以与GS蛋白单独施用、依次施用或同时施用,包括在相同的制剂或组合物中,或在单独的组合物或制剂中。

[0092] 因此,在另外的方面,本发明提供了包含用于全身非口服施用的GS蛋白和另外的治疗剂的产物,该产物作为组合的制备物在治疗或预防高氨血症中单独使用、同时使用或依次使用。

[0093] 第二种或另外的剂可以通过相同的施用途径或通过不同的施用途径被施用,包括口服。因此,在一个示例性实施方案中,第二种或另外的剂,诸如降氨剂,可以口服施用,或者通过其他全身性方式施用,并且GS可以通过非口服全身性方式施用。

[0094] 降氨剂,诸如氮清除剂(包括苯乙酸钠、鸟氨酸苯乙酸、苯丁酸钠或苯甲酸钠),可以通过静脉内输注施用例如用于急性处理,和/或口服施用例如用于长期维持。静脉内(i.v.)输注可以是外周的,但中心i.v.输注是优选的。类似地,氨基酸诸如精氨酸可以口服或i.v.施用,例如通过中心i.v.输注。

[0095] 因此,本发明的又另一方面提供了产物(例如,组合产物),该产物包含用于全身非口服施用的GS蛋白和另外的治疗剂,该产物作为组合的制备物用于单独、同时或相继在治疗或预防高氨血症中使用。在合适的实施方案中,这种另外的治疗剂可以是降氨剂。更合适地,该降氨剂可以是氮清除剂。更合适地,该氮清除剂可以是苯乙酸的药学上可接受的盐,更合适地是苯乙酸钠。

[0096] 可选地,认为本发明的此方面还提供了试剂盒,该试剂盒包含(a)用于全身非口服施用的GS蛋白和(b)另外的治疗剂。合适地,另外的治疗剂可以对高氨血症有效。合适地,另外的治疗剂是降氨剂,更合适地是氮清除剂。

[0097] 因此,在另外的方面,本发明提供了一种试剂盒,该试剂盒包含(a)用于全身非口服施用的GS蛋白和(b)氮清除剂。合适地,氮清除剂可以是苯乙酸的药学上可接受的盐,更合适地是苯乙酸钠。

[0098] 这种试剂盒可以被提供用于治疗或预防高氨血症。该试剂盒的组分可以作为单独的药物组合物提供,该药物组合物包含所讨论的剂和一种或更多种药学上可接受的载体或赋形剂一起。本发明的组合物可以被施用一次或多于一次。如果组合物被施用超过一次,它们可以按规律的间隔或按需要被施用,例如由临床医生确定。规律的间隔可以包括,例如,大约每天、每周、每两周、每月或任何其他间隔。选择治疗方案完全在技术人员的技能水平之内。例如,方案可以基于动物模型中的研究来确定。在其他实例中,如果血液中的氨水平高于预定水平,可以向受试者施用重复剂量的组合物。

[0099] GS蛋白的用途,或与GS蛋白组合的降氨剂的用途,根据本发明对于治疗基因治疗不适合(suitable)或不适当(appropriate)的受试者是有利的,例如儿童或基因治疗难治的受试者。这种难治的受试者可以包括例如先前已暴露于用于递送基因疗法的病毒载体、或已对用于递送基因疗法的病毒载体具有免疫反应的那些受试者。

[0100] 有利地,蛋白质作为治疗剂的用途允许将更高剂量的活性蛋白质递送至受试者,并且允许根据受试者和根据需求调整剂量。此外,与基因疗法相比,蛋白质疗法允许更快的响应,并因此更适合应急使用。

[0101] 如上所述,本发明的一个方面涉及包含降氨剂的药物组合物,该药物组合物与用于治疗或预防高氨血症的GS蛋白组合使用。降氨剂可以被配制为用于向受试者施用的药物组合物。通过将选定量的氮清除剂与一种或更多种生理学上或药学上可接受的载体或赋形剂混合,可以将降氨剂以任何常规方式配制。合适地,组合物可以用于非口服全身施用、或口服施用。应当理解,药物组合物也可以包含GS蛋白。在这样的实施方案中,组合物将被配制用于非口服全身施用。

[0102] 载体或赋形剂的选择在用药从业者的技能范围内,并可取决于许多参数,诸如施用的模式。在某些例子中,降氨剂被作为流体提供。在其他情况下,降氨剂被以干燥的形式提供。可以将这种干燥的形式通过添加合适的溶液,诸如水、缓冲液、盐水或其它合适的溶液在施用前再水合。降氨剂可以被配制用于直接施用,或可以配制用于稀释或其它调整。因

此,降氨剂可以以单(或单位)剂量形式或多个剂量形式被配制。单剂量形式的实例包括安瓿和注射器。多个剂量形式的实例包括含有多个单位剂量的小瓶和瓶。

[0103] 制剂中降氨剂的浓度对于递送一定量的降氨剂是有效的,该量在施用后,对于从循环中去除氮和/或铵,或者减少或抑制氮的产生是有效的。浓度和量将取决于几个因素,包括受试者中底物的水平和施用模式,并且可以凭经验确定。本文提供的组合物中降氨剂的示例性浓度包括但不限于,以下或约以下的浓度:0.1、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1、5、10、15、20、30、40、50、60、70、80、90、100、200、300、400、500、1000、2000、3000、4000或5000mg/mL的降氨剂或更多。

[0104] 为了配制降氨剂组合物,在一个实施方案中,将重量分数的降氨剂以期望的浓度溶解、悬浮、分散或以其他方式混合在选定的媒介物中。得到的混合物是溶液、悬浮液、乳液和其它这样的混合物,并且可以被配制为非水性或水性混合物,包括但不限于,溶液、悬浮液、糊剂、凝胶、气雾剂、喷雾剂或任何其它合适用于全身施用的制剂。

[0105] 通常,降氨剂根据监管机构的批准被制备,或者根据公认用于动物和人类的药典以其他方式制备。该组合物可以包括载体,诸如稀释剂、赋形剂或媒介物。这种药物载体可以是无菌液体,诸如水和油。盐水溶液和水性右旋糖和甘油溶液也可被用作液体载体,特别是用于可注射溶液。组合物可以还含有活性成分:稀释剂诸如乳糖、蔗糖、磷酸二钙或羧甲基纤维素;润滑剂,诸如硬脂酸镁、硬脂酸钙和滑石;以及粘合剂,诸如淀粉、天然树胶(诸如阿拉伯树胶)、葡萄糖、糖蜜、聚乙烯吡咯烷酮、纤维素及其衍生物、聚维酮、交联聚维酮和本领域技术人员已知的其它此类粘合剂。合适的药物赋形剂包括淀粉、葡萄糖、乳糖、蔗糖、明胶、麦芽、稻米、面粉、白垩、硅胶、硬脂酸钠、单硬脂酸甘油酯、滑石、氯化钠、脱脂乳粉、甘油、丙二醇、水和乙醇。如果需要,苯乙酸或其药学上可接受的盐组合物也可以含有少量的润湿剂或乳化剂,或pH缓冲剂,例如醋酸盐、柠檬酸钠、环糊精衍生物、脱水山梨醇单月桂酸酯、三乙醇胺醋酸钠、三乙醇胺油酸酯和其它此类剂。合适药物载体的其他实例将对本领域技术人员是已知的。

[0106] 降氨剂可以通过向身体递送化合物的任何方法和途径被施用。在某些实施方案中,降氨剂可以被肠胃外施用。本领域技术人员将容易理解并能够选择合适的施用或递送模式,包括但不限于,口服、静脉内、肌肉内、皮内、透皮、皮下或腹膜内施用,以及通过其任何两种或更多种的任何组合施用,配制以适合每种施用途径的方式进行。

[0107] 如同在药物组合物中,还可以将降氨剂以其他方式配制或施用,例如在营养组合物如膳食补充剂中,例如胃肠外营养组合物(例如单独或与其他补充成分一起)。合适地,这种组合物可以用于口服或非口服施用。

[0108] 如所提到的,降氨剂用于与GS蛋白组合施用。应当理解,降氨剂可以与GS蛋白单独施用、依次施用或同时施用,包括在相同的制剂或组合物中,或在单独的组合物或制剂中。因此,在一个示例性实施方案中,降氨剂可以口服施用,或者通过其他全身性方式施用,并且GS可以通过非口服全身性方式施用。

[0109] 降氨剂的示例性治疗有效剂量包括但不限于,从约每天1mg/kg体重至或至约每天2000mg/kg体重,包括从或从约每天10mg/kg体重至或至约1000mg/kg体重,或从或从约每天100mg/kg至或至约500mg/kg体重。因此,例如,受试者可以每天被施用1mg/kg体重、2mg/kg体重、3mg/kg体重、4mg/kg体重、5mg/kg体重、10mg/kg体重、20mg/kg体重、30mg/kg体重、

40mg/kg体重、50mg/kg体重、60mg/kg体重、70mg/kg体重、80mg/kg体重、90mg/kg体重、100mg/kg体重、150mg/kg体重、200mg/kg体重、250mg/kg体重、300mg/kg体重、350mg/kg体重、400mg/kg体重、450mg/kg体重、500mg/kg体重、550mg/kg体重、600mg/kg体重、650mg/kg体重、700mg/kg体重、750mg/kg体重、800mg/kg体重、850mg/kg体重、900mg/kg体重、950mg/kg体重、1000mg/kg体重或2000mg/kg体重或更多的降氨剂。降氨剂的其他示例性治疗有效剂量,包括但不限于,从约1g/天至约50g/天。因此,例如,受试者可以每天被施用1克、2克、3克、4克、5克、10克、20克、30克、40克、或50克或更多的降氨剂。应当理解,有效剂量可以根据降氨剂而变化。如果需要,GS组合物和/或包含降氨剂的组合物或包含非降氨剂的另外的剂的组合物可以在包装、在试剂盒或分配装置中提供,诸如带有针头的注射器、或小瓶和带有针头的注射器,其可以包含一种或更多种单位剂量形式。试剂盒或分配装置可以附有施用说明。在GS组合物和包含降氨剂的组合物是单独的实施方案中,试剂盒可以包含GS组合物和包含降氨剂的组合物。合适地,在这样的实施方案中,试剂盒可以包含GS组合物和氮清除剂。合适地,在这样的实施方案中,试剂盒可以包含GS组合物,和包含苯乙酸,例如苯乙酸钠的组合物。组合物可以包装为含有包装材料、组合物和标签的制品,该标签指示组合物用于向受试者施用用于高氨血症或与高氨血症相关的疾病或状况的治疗。

[0110] 在另外的方面,本发明提供了编码谷氨酰胺合成酶或其生物活性片段或变体的表达载体,用于治疗或预防高氨血症,其中该载体用于全身施用。

[0111] 在合适的实施方案中,该载体还编码降氨剂。

[0112] 在另一方面,本发明提供了编码谷氨酰胺合成酶或其生物活性片段或变体的表达载体,该表达载体用于与降氨剂组合使用,该表达载体用于在高氨血症的治疗或预防中使用。

[0113] 在另一方面,本发明提供了与编码谷氨酰胺合成酶或其生物活性片段或变体的表达载体组合使用的降氨剂,该降氨剂用于在高氨血症的治疗或预防中使用。

[0114] 在另一方面,本发明提供了一种细胞,其包含选自以下组成的组的表达载体:用于治疗高氨血症的编码谷氨酰胺合成酶或其生物活性片段或变体的表达载体、以及与降氨剂组合使用,用于治疗或预防高氨血症的编码谷氨酰胺合成酶或其生物活性片段或变体的表达载体。

[0115] 在另一方面,本发明提供了编码谷氨酰胺合成酶或其生物活性片段或变体的表达载体用于制造用于治疗或预防高氨血症的组组合物的用途,其中该组合物用于全身施用。

[0116] 在另一方面,本发明提供了编码谷氨酰胺合成酶或其生物活性片段或变体的表达载体用于制造组组合物的用途,该组合物用于与降氨剂组合使用,用于高氨血症的治疗或预防。

[0117] 在另一方面,本发明提供了降氨剂用于制造组组合物的用途,该组合物用于与编码谷氨酰胺合成酶或其生物活性片段或变体的表达载体组合使用,用于在高氨血症的治疗或预防中使用。

[0118] 在另一方面,本发明提供了治疗或预防受试者中高氨血症的方法,所述方法包括全身施用编码谷氨酰胺合成酶或其生物活性片段或变体的表达载体。

[0119] 在另一方面,本发明提供了一种治疗或预防受试者中高氨血症的方法,所述方法包括施用编码谷氨酰胺合成酶或其生物活性片段或变体的表达载体、以及降氨剂。

[0120] 在另一方面,本发明提供了包含编码谷氨酰胺合成酶或其生物活性片段或变体的表达载体的组合物,该组合物用于在高氨血症的治疗或预防中使用,其中该组合物用于全身施用。

[0121] 在一个合适的实施方案中,该组合物可以还包含降氨剂。

[0122] 在另一方面,本发明提供了包含编码谷氨酰胺合成酶或其生物活性片段或变体的表达载体的组合物,该组合物用于与降氨剂组合使用,用于在高氨血症的治疗或预防中使用。

[0123] 在另一方面,本发明提供了包含降氨剂的组合物,该组合物用于与编码谷氨酰胺合成酶或其生物活性片段或变体的表达载体组合使用,用于在高氨血症的治疗或预防中使用。

[0124] 在另一方面,本发明提供了包含具有编码谷氨酰胺合成酶或其生物活性片段或变体的表达载体、以及另外的治疗剂的试剂盒。合适地,另外的治疗剂可以是对高氨血症有效的剂。合适地,对高氨血症有效的剂是降氨剂或氨基酸或其尿素循环的中间体。

[0125] 在另一方面,本发明提供了包含编码谷氨酰胺合成酶或其生物活性片段或变体的表达载体以及另外的治疗剂的产物,所述产物作为组合的制备物用于在治疗或预防高氨血症中单独使用、同时使用或依次使用。合适地,另外的治疗剂可以是对高氨血症有效的剂。合适地,对高氨血症有效的剂是降氨剂或氨基酸或其尿素循环的中间体。更合适地,另外的治疗剂是氮清除剂。

[0126] 在合适的实施方案中,该表达载体可以是病毒的或非病毒的。作为实例,合适的病毒表达载体可以来源于选自由以下组成的组的病毒:副粘病毒、逆转录病毒、腺病毒、慢病毒、痘病毒、甲病毒属和疱疹病毒。其他合适的病毒载体将是本领域技术人员已知的。

[0127] 合适的非病毒表达载体可以选自由以下组成的组:无机颗粒表达载体(诸如磷酸钙、二氧化硅和金)、基于脂质的颗粒表达载体(例如阳离子脂质、脂质纳米乳液和固体脂质纳米颗粒)和基于聚合物的颗粒表达载体(例如肽、聚乙烯亚胺、壳聚糖和树状大分子)。其他合适的非病毒表达载体将是本领域技术人员已知的。

[0128] 合适的全身施用方法将是本领域技术人员已知的。作为实例,全身施用可以通过肠胃外施用途径实现,诸如静脉内或皮下途径。应当理解,“全身施用”允许将表达载体的产物(诸如谷氨酰胺合成酶或其生物片段)在患者中的多个部位内表达。在本发明的上下文中,全身施用不包括肌肉内施用。

[0129] 术语“生物活性”是指编码显示出将谷氨酸根转化为谷氨酰胺的能力的谷氨酰胺合成酶(SEQ ID NO:1)的核酸的片段或变体。根据SEQ ID NO:1的蛋白由根据SEQ ID NO:2的核酸序列编码。因此,应当理解,载体可以包含编码谷氨酰胺合成酶的生物活性片段或变体的SEQ ID NO:2的片段或变体。

[0130] 本文使用的术语“变体”是指包含多肽SEQ ID NO:1的一级结构的改变的多肽。合适地,变体可以与多肽SEQ ID NO:1共享70%或更多的同一性;与多肽SEQ ID NO:1共享80%或更多的同一性;与多肽SEQ ID NO:1共享90%或更多的同一性;与多肽SEQ ID NO:1共享95%或更多的同一性;与多肽SEQ ID NO:1共享96%或更多的同一性;与多肽SEQ ID NO:1共享97%或更多的同一性;与多肽SEQ ID NO:1共享98%或更多的同一性;或者与多肽SEQ ID NO:1共享甚至99%或更多的同一性。参考根据SEQ ID NO:1的序列,变体可以以1%

或更多、2%或更多、3%或更多、4%或更多、5%或更多、10%或更多、20%或更多、或甚至30%或更多区别于多肽SEQ ID NO:1。

[0131] 本文使用的术语“片段”是指包含多肽SEQ ID NO:1的一级结构长度改变的多肽。合适的片段可以包含SEQ ID NO:1全长的至少60%、至少65%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、或至少95%。事实上,合适的变体可以包含SEQ ID NO:1的至少96%、至少97%、至少98%、或至少99%。

[0132] 应当理解(除非上下文另有要求),参照用于预防高氨血症的GS蛋白、用于与降氨剂组合使用的GS蛋白、用于与GS蛋白组合使用的降氨剂,它们的用途、治疗方法、组合物、试剂盒和产物描述的实施方案,将通常可适用于本发明的其余方面。

附图说明

[0133] 现在,参考以下的非限制性实施例和附图将进一步描述本发明,在附图中:

[0134] 图1示出了如实施例1中制备的人类GS蛋白的20kDa N末端醛PEG缀合物在Superose 12柱上的尺寸排阻层析(SEC)的结果。该图示出了多聚体被洗脱在级分8和级分9中,而单体被洗脱在级分10中;

[0135] 图2示出了各种GS候选物的体外GS活性的比较:PEG-缀合的变体(Trin GS1、Trin GS2、Trin GS3、Trin GS4)与非缀合的GS(wt GS)和阴性对照。谷氨酰胺合成酶活性以根据Acosta等,2009,World J.Gastroenterol.,15(23),2893-2899的测定的OD 570nm显示。Trin GS1—(N末端Ald单体);Trin GS2—Nof-20;Trin GS3—Nof-30,Trin GS4—N末端Ald多聚体;

[0136] 图3示出在(A)基线、(B)给药后24小时和(C)给药后72小时,各种缀合物的雄性野生型(wt)CD1小鼠给药前和给药后血浆PEG ELISA的结果。(Trin GS1—N末端醛缀合GS单体;Trin GS2—Nof-20 GS缀合多聚体;Trin GS3—Nof-30缀合GS多聚体;Trin GS4—N末端醛缀合PEG多聚体);

[0137] 图4示出了,如实施例3描述的,在以2.5mg/kg给药后3天的给药的wtCD1小鼠中,肝脏裂解物中的GS活性(OD 535nm)结果。

[0138] 图5A示出了肝脏GS活性测定结果。图5B示出了血浆GS活性测定结果。在用GS蛋白、以及GS蛋白与氮清除剂治疗的BDL大鼠中,测定肝脏和血浆两者的GS活性。

[0139] 图6显示在用GS蛋白、以及GS蛋白与氮清除剂治疗的BDL大鼠中测量的血氨水平。

[0140] 图7显示示出了在用GS蛋白或GS蛋白与氮清除剂治疗的BDL大鼠中,前额皮质中水肿的百分比的图。

[0141] 图8示出了在用GS蛋白、或GS蛋白与氮清除剂治疗的BDL大鼠中转棒握力试验(rotarod grip test)的结果。

[0142] 图9示出了用GS蛋白、或GS蛋白与氮清除剂(SP-苯乙酸钠)治疗的OTC小鼠中氨水平的图。

[0143] 图10示出了用GS蛋白或GS蛋白与氮清除剂(SP-苯乙酸钠)治疗的OTC小鼠中血浆中氨水平和肝脏GS活性的结果。

具体实施方式

[0144] 实施例1

[0145] GS蛋白和GS蛋白-PEG缀合物的产生和纯化

[0146] 人类谷氨酰胺合成酶(GS)的产生:将含有人类GS(SEQ ID NO.5,包含编码His标签的5'序列和位于GS的N末端的接头GGGGS,并针对细菌中的表达密码子优化)基因的pET30a+载体用于大肠杆菌表达系统。质粒构建后,用宽范围的诱导(IPTG)和表达温度进行对GS的表达的评估。根据SDS-PAGE检测,人类GS在构建体中可溶地表达。裂解缓冲液(50mM Tris pH 8.0、10%甘油、0.1% Triton X-100,100ug/ml溶菌酶、1mM PMSF、3单位DNA酶、2mM MgCl₂)用于从细胞提取可溶性蛋白质。离心后提取可溶性蛋白质。表达研究后,发现了对于BL21(DE3)细胞的最佳条件,用0.1mM IPTG在25℃培养和诱导16小时。尝试过的其他条件包括使用各种IPTG诱导(从0.01M至0.1M IPTG),各种培养温度(范围为16℃-37℃),以及4至16小时的诱导培养时间。

[0147] 表达的GS的纯化:表达的蛋白的第一步纯化包括用Ni-NTA珠的His标签纯化,用20mM咪唑洗涤,并用300mM咪唑洗脱。

[0148] 蛋白质PEG缀合:在还原条件下(使用20mM氰基硼氢化钠)将GS蛋白缀合到20kDa的N末端醛PEG持续16小时(Reddy博士的20kDa N末端醛PEG)。

[0149] 最终纯化:将缀合的蛋白用SEC层析进一步纯化。使用Superose 6或Superose 12柱(见图1)。在级分8+9中发现多聚体。Superose 12中的级分10包含(稀释的)多聚体。在Superose 6中,在级分8+9中发现多聚体,在级分12/13中发现单体。

[0150] 制备了pH 7.4的含海藻糖和蔗糖的PBS中GS的最终制剂。

[0151] 实施例2

[0152] GS制备物的活性

[0153] 使用Acosta等人,2009(同上)的测定测试了根据实施例1制备的各种GS制备物和PEG缀合物的GS活性,Acosta等人,2009(同上)的测定是从Ehrenfeld等人,1963, J.Biol.Chem.238(11),3711-3716中描述的原始测定修改而来的。

[0154] 将100ug纯化的蛋白样品添加到以下反应缓冲液中:将150μL储备溶液(100mmol/L咪唑-HCl缓冲液[pH 7.1]、40mmol/L MgCl₂、50mmol/Lβ-巯基乙醇、20mmol/L ATP、100mmol/L谷氨酸和200mmol/L羟胺,调整至pH 7.2)。将试管在37℃孵育15分钟。通过添加0.6mL[2x浓度]氯化铁试剂(0.37mol/L FeCl₃、0.67mol/L HCl和0.20mol/L三氯乙酸)停止反应。样品被放置在冰上持续5分钟。通过在10,000g离心除去沉淀的蛋白质,并且在535-570nm相对于试剂空白读取上清液的吸光度。结果在图2中示出。Trin GS1-(20kD尺寸的N末端醛单体PEG,获得自Reddy博士);Trin GS2-Nof-20缀合的GS蛋白,用从NOF corporation获得的单官能团线性20kD PEG(NHS活性酯)与GS蛋白缀合;Trin GS3-Nof-30,用单官能团线性30kD PEG(NHS活性酯,获得自NOF corporation)与GS蛋白缀合;Trin4-N末端Ald,GS多聚体)。Trin GS4(N末端Ald多聚体)显示出最好的活性,具有与wt GS(非缀合的)相比非常相似的活性谱,然而其他缀合物的活性是相似的。

[0155] 实施例3

[0156] GS蛋白给药至小鼠—GS蛋白-PEG缀合物对血浆水平的作用

[0157] 用如实施例1中描述制备的各种GS蛋白和PEG缀合物(Trin GS1—N末端醛缀合的

GS单体;Trin GS2—Nof-20 GS缀合的多聚体;Trin GS3—Nof-30缀合的GS多聚体;Trin GS4—N末端醛缀合的PEG多聚体)皮下(s.c)给药,向雄性野生型(wt)CD1小鼠进行2.5mg/kg的给药。ELISA根据制造商概述的方案进行(Abcam PEG ELISA试剂盒,ab133065)。如图3所示,血浆ELISA的结果示出,在所有时间点如所预期的,未缀合的wt GS的水平非常低或者不可检测。24小时后,发现几种候选物在血浆中处于高水平;然而,给药后72小时之后,Trin-GS 4(N末端醛缀合的PEG GS多聚体)示出最高的存在。N=每组中2只动物。因此,此实验示出了,GS蛋白的全身施用可以被成功用于获得GS-PEG缀合物的高循环水平,并且特别是治疗有效的或活性的水平。

[0158] 实施例4

[0159] GS蛋白给药至小鼠—肝脏裂解物的GS活性水平

[0160] 活性测定如实施例2中描述的进行,除了在适当情况下将500 μ g肝脏裂解物(来自从实施例3实验处死的小鼠)添加到每个反应以外。结果在图4中示出。给药后3天肝脏裂解物中的GS活性结果表明,最佳候选物是N末端醛缀合的PEG GS多聚体,它是显示出与媒介物(盐水给药)对照相比高于基线的显著活性的唯一候选物。N=每组中2只动物。

[0161] 实施例5

[0162] 尿素循环障碍Otc^{spf-ash}小鼠模型(Otc缺乏)被用于示出GS和GS+SP的作用。所使用的小鼠的详情可以在[https://www.jax.org/strain/001811\(B6EiC3Sn a/A-Otc^{spf-ash}/J\)](https://www.jax.org/strain/001811(B6EiC3Sn a/A-Otc^{spf-ash}/J))找到。它们用正常食物喂养。年龄从约10周到23周不等,各组匹配良好。所有动物都是雄性半合子的(因为Otc是X连锁的,它只存在于雄性的X染色体上,因此小鼠是敲除的)。

[0163] 将所有组(媒介物、GS和GS+SP;其中GS=谷氨酰胺合成酶,GS+SP=谷氨酰胺合成酶+苯乙酸钠)进行如下治疗:

[0164] 实验从周二进行直至下一个周三(8天)。

[0165] 将SP i.p.给药350mg/kg,每天两次;在前4天,将GS在所有治疗组中给药(i.p.@40mg/kg,每天一次),然后休息2天[周末],以及另外3天用GS@40mg/kg i.p.给药。

[0166] 在第8天将小鼠处死,并抽取血液,离心以分离血浆,并将血浆用于氨定量(见下文的方法)。

[0167] 基因分型使用文献中描述的标准方法进行。

[0168] 材料和方法

[0169] 所有实验均根据1986年动物(科学程序)法案(Animals(Scientific Procedures) Act)进行,该法案根据欧洲指令2010/63/EU进行了修订。根据实验动物护理和使用指南(Guide for the Care and Use of Laboratory Animals)(美国国立卫生研究院(National Institutes of Health)出版物86-23;1985年修订)中概述的标准,所有动物都得到人道护理。这些实验中使用的所有动物是雄性Sprague-Dawley大鼠(在实验开始时,体重250g),获得自Charles River Laboratories(Kent,UK)并被分成5组:胆管结扎动物+氨+盐水血清(BDL+HA+SS,n=6)、胆管结扎动物+氨+苯乙酸钠(BDL+HA+SP,n=6)、胆管结扎动物+氨+苯乙酸钠+谷氨酰胺合成酶(BDL+HA+SP+GS,n=5)、胆管结扎动物+氨+谷氨酰胺合成酶(BDL+HA+GS,n=6)、假手术动物+谷氨酰胺合成酶(SHAM+GS,n=5)。包含SP和GS的治疗可称为“COMBO”。

[0170] 胆管结扎手术

[0171] 在全身麻醉下(100%氧气中5%异氟醚用于诱导,空气中2%异氟醚用于维持),大鼠接受胆管三重结扎(小开腹手术的方法)以诱导慢性肝损伤,并在手术后28天进行研究。在麻醉下制造了一个中线腹部切口。在BDL组种,将胆总管分离,用3-0丝三重结扎,并在结扎之间切开。假手术组进行了同样的手术,没有结扎之间的切开。在BDL之后,所有动物继续增重,并与假对照相当。两组中的总死亡率小于10%并且发生在手术的36小时内。

[0172] 非肝硬化高氨血症状况

[0173] 23只大鼠被施用高氨血症(HA)饮食。在约100g的一份中使用的氨基酸配方是:15g亮氨酸、7.7g苯丙氨酸、7g谷氨酸、10g丙氨酸、4.4g脯氨酸、5.8g苏氨酸、11g天冬氨酸、5g丝氨酸、4.8g甘氨酸、3.3g精氨酸、9.6g赖氨酸、8.4g组氨酸、3g酪氨酸、1.5g色氨酸和10.6g缬氨酸。25g的此混合物(与标准啮齿动物食物粉末以1:5混合)每天新鲜制备并且大鼠自由获取该混合物持续5天。该配方近似于啮齿动物血红蛋白的氨基酸组成[1],模拟已知会导致全身高氨血症的胃肠道出血的作用[2]。

[0174] 苯乙酸钠条件

[0175] 将11只大鼠施用苯乙酸钠(SP)饮食。每天0.3g/kg,持续5天,与食物粉混合,并每天新鲜制备。

[0176] 谷氨酰胺合成酶条件

[0177] 用GS每两天(第1天和第3天)腹腔注射16只大鼠。注射的总体积为3ml i.p.,其允许18-22mg/kg的GS。

[0178] 血液取样和生化

[0179] 在所有组中在不同的时间点从腿部静脉采集血浆样品。在用谷氨酰胺合成酶治疗后,在如下时间点进行计数:6小时、24小时、48小时和5天。使用Cobas Integra 400多功能生化分析仪(multi-analyser)与合适的试剂盒(Roche-diagnostics,Burgess Hill,West Sussex,UK),在每个时间点用200 μ l相应的血浆对血浆氨水平进行分析。

[0180] 脑水肿

[0181] 这使用如先前[3,4]所述的干重技术测量。简要地,用灵敏的电子秤称量烘干的Eppendorf,然后将每只动物的前额皮质、纹状体、海马、小脑和皮质放入每个分别标记的Eppendorf中并重新称重;所有样品中差异在0.1mg以内。将装填有单独脑样品的Eppendorf在烘箱中以60 $^{\circ}$ C干燥持续7天后,确定干重。然后将组织水分含量计算为%H₂O=(1-干重/湿重)X100%。

[0182] 用于评估自主活动的测试:转棒-accelerod试验

[0183] 这种由电机驱动旋转棒组成的运动机能测试使我们能够评估运动协调性和抗疲劳性(Jones和Roberts,1968)。Ugo Basile(Ugo Basile Biological Research Apparatus,Italy)的加速转棒7750被用于大鼠。所遵循的程序具有两个部分。在第一部分中,将动物放置在仪器中,并且将速度保持恒定在2rpm持续60秒。在第二部分中,在accelerod试验阶段对大鼠进行5分钟的评估,其间转速不断增加,直到其达到20rpm。记录1小时治疗后所有组在治疗前和治疗后条件下从棒上掉落的时延和实际转速。

[0184] 使用TCA直接法进行血液中氨的确定

[0185] 在论文(Clin Chim Acta.1968Oct;22(2)183-86)中描述的方法被用于测量血浆氨浓度,如下。

[0186] 原理

[0187] 在碱性溶液中,铵离子与次氯酸盐反应以生成一氯胺。在苯酚和过量次氯酸盐的存在下,当硝普盐用作催化剂时,一氯胺将形成蓝色化合物靛酚。铵的浓度在630nm进行分光光度确定。

[0188] 方法

[0189] 将3.5g苯酚和0.04g硝普钠溶于100ml蒸馏水中以制备试剂A。

[0190] 将1.8g氢氧化钠溶于48ml蒸馏水中,并添加4ml的1M次氯酸钠溶液以制备试剂B。

[0191] 向每个50 μ l的血浆样品中添加150 μ l的5% TCA,并在4 $^{\circ}$ C以10,000RPM离心10分钟。取50 μ l的上清液,并放入其中添加了50 μ l的试剂A和B两者的96孔板。

[0192] 用于校准曲线的标准氯化铵浓度通过将氯化铵溶解在蒸馏水中并连续稀释至得到范围从400 μ mol至3 μ mol的浓度而制备。蒸馏水被用作空白。

[0193] 将孔板避光,并在50 $^{\circ}$ C孵育60分钟。使用分光光度计在630nm处测量吸光度,以确定氨浓度。

[0194] 结果

[0195] GS蛋白给药至大鼠—肝脏和血液中GS活性水平

[0196] 活性测定按照上述材料和方法部分所述进行。结果在图5A和图5B中示出。在第5天测量的大鼠肝脏中的结果示出SHAM+GS组中GS活性为最佳。此外,从图5A可以看出,GS和GS+SP治疗增加已经历BDL的大鼠肝脏中的GS活性。当在血液中测量时,结果示出GS活性在BDL+GS组中为最佳。此外,从图5B可以看出血液中的GS活性随着时间的推移(甚至给药后24小时和48小时)是一致的。

[0197] GS蛋白给药至大鼠—BDL大鼠中的氨浓度

[0198] 如图6所见,氨水平在BDL大鼠中是最高的。用GS、GS+SP和SP治疗分别导致血液中的氨水平显著降低。2个剂量之后,GS降低了氨水平。用GS+SP治疗最显著地降低了氨水平,表明协同效应。

[0199] GS蛋白给药至大鼠—BDL大鼠中的脑肿胀

[0200] 在前额皮质中测量脑水肿。与用SP治疗和甚至SP+GS治疗相比,GS治疗被发现最显著地减少了脑水肿(图7)。与对照(即没有治疗的BDL大鼠)相比,用SP治疗没有统计学上显著减少肿胀。

[0201] GS蛋白给药至大鼠—BDL大鼠的脑和身体功能

[0202] 图8显示了转棒握力试验的结果。令人惊讶的是,在所有受试大鼠组中,发现GS的给药提高性能。单独使用SP治疗未产生统计学上显著的效果,但使用GS+SP治疗显示最佳改进,显示出协同作用。

[0203] OTC缺乏小鼠的治疗

[0204] 如图9所示,氨在治疗组中非常显著地减少。

[0205] 在图10中,可以看出,在用GS或GS&SP治疗的OTC小鼠中,血浆GS活性从媒介物组中的0.2增加到仅GS组中的0.8和GS&SP组中的~1.1。肝脏GS活性从媒介物组中的~0.175增加到仅GS组中的~2.8和GS&SP组中的~2.5。

[0206] 结果概述

[0207] 总之,施用的GS是生物相容的、安全的,并且改善血液和肝脏GS活性。它还导致减

少氨和脑水肿,并改善神经认知和/或身体功能。此外,这些数据表明,用SP和GS治疗可能有协同效应。

[0208] 参考文献

[0209] [1]Riggs A.The amino acid composition of some mammalian hemoglobins: mouse,guinea pig,and elephant.J Biol Chem 1963;238:2983-2987.

[0210] [2]Balata S,Olde Damink SW,Ferguson K,Marshall I,Hayes PC,Deutz NE, Williams R,Wardlaw J,Jalan R.Induced hyperammonemia alters neuropsychology, brain MR spectroscopy and magnetization transfer in cirrhosis.Hepatology2003; 37:931-939.

[0211] [3]Stewart-Wallace AM.A biochemical study of cerebral tissue,and of changes in cerebral oedema.Brain 1939;62:426-38.

[0212] [4]Traber PG,Ganger DR,Blei AT.Brain edema in rabbits with galactosamine-induced fulminant hepatitis.Regional differences and effects on intracranial pressure.Gastroenterology 1986;91:1347-56.

[0213] 序列:

[0214] SEQ ID NO.1[完整人类蛋白]

MTTSASSHLNKGIKQVYMSLPQGEKVQAMYIWIDGTGEGLRCKTRTLDSEP
 KCVEELPEWNFDGSSTLQSEGSNSDMYLVPAAMFRDPFRKDPNKLVLCEVF
 KYNRRPAETNLRHTCKRIMDMVSNQHPWFGMEQEYTLMGTDGHPFGWPS
 NGFPGPQGPYYCGVGADRAYGRDIVEAHYRACLYAGVKIAGTNAEVMPAQ
 WEFQIGPCEGISMGDHLWVARFILHRVCEDFGVIA TFDPKPIPGNWNGAGCH
 TNFSTKAMREENGLKYIEEAIEKLSKRHQYHIRAYDPKGGLDNARRLTGFHE
 TSNINDFSAGVANRSASIRIPRTVGQEKKGYFEDRRPSANCDPFSVTEALIRT
 CLLNETGDEPFQYKN

[0216] SEQ ID NO.2 (仅甲硫氨酸被裂解用于体内成熟蛋白):

TTSASSHLNKGIKQVYMSLPQGEKVQAMYIWIDGTGEGLRCKTRTLDSEPK
 CVEELPEWNFDGSSTLQSEGSNSDMYLVPAAMFRDPFRKDPNKLVLCEVFK
 YNRRPAETNLRHTCKRIMDMVSNQHPWFGMEQEYTLMGTDGHPFGWPSN
 GFPGPQGPYYCGVGADRAYGRDIVEAHYRACLYAGVKIAGTNAEVMPAQ
 WEFQIGPCEGISMGDHLWVARFILHRVCEDFGVIA TFDPKPIPGNWNGAGCH
 TNFSTKAMREENGLKYIEEAIEKLSKRHQYHIRAYDPKGGLDNARRLTGFHE
 TSNINDFSAGVANRSASIRIPRTVGQEKKGYFEDRRPSANCDPFSVTEALIRT
 CLLNETGDEPFQYKN

[0218] SEQ ID NO.3cDNA

CGAGAGTGGGAGAAGAGCGGAGCGTGTGAGCAGTACTGCGGCCTCCTCTCCTCCTAAC
CTGCTCTCGCGGCCTACCTTTACCCGCCCGCCTGCTCGGCGACCAGAACACCTTCCACCA
TGACCACCTCAGCAAGTTCCCACTTAAATAAAGGCATCAAGCAGGTGTACATGTCCCTGC
CTCAGGGTGAGAAAGTCCAGGCCATGTATATCTGGATCGATGGTACTGGAGAAGGACTGC
GCTGCAAGACCCGGACCTTGACAGTGAGCCCAAGTGTGTGGAAGAGTTGCCTGAGTGGAA
ATTTTCGATGGCTCCAGTACTTTACAGTCTGAGGGTTCCAACAGTGACATGTATCTCGTGC
CTGCTGCCATGTTTTCGGGACCCCTTCCGTAAGGACCCTAACAAGCTGGTGTATGTGAAG
TTTTCAAGTACAATCGAAGGCCCTGCAGAGACCAATTTGAGGCACACCTGTAAACGGATAA
TGGACATGGTGTAGCAACCAGCACCCCTGGTTTTGGCATGGAGCAGGAGTATACCCCTCATGG
GGACAGATGGGCACCCCTTTGGTTGGCCTTCCAACGGCTTCCCAGGGCCCCAGGGTCCAT
ATTACTGTGGTGTGGGAGCAGACAGAGCCTATGGCAGGGACATCGTGGAGGCCATTACC
[0219] GGGCTGCTTGTATGCTGGAGTCAAGATTGCGGGGACTAATGCCGAGGTATGCCTGCC
AGTGGGAATTTTCAGATTGGACCTTGTGAAGGAATCAGCATGGGAGATCATCTCTGGGTGG
CCCGTTTCATCTTGCATCGTGTGTGTGAAGACTTTGGAGTGATAGCAACCTTTGATCCTA
AGCCCATTCCTGGGAACTGGAATGGTGCAGGCTGCCATACCAACTTCAGCACCAAGGCCA
TGCGGGAGGAGAATGGTCTGAAGTACATCGAGGAGGCCATTGAGAACTAAGCAAGCGGC
ACCAGTACCACATCCGTGCCATGATCCCAAGGGAGGCCGGACAATGCCCGACGTCTAA
CTGGATTCCATGAAACCTCCAACATCAACGACTTTTCTGGTGGTGTAGCCAATCGTAGCG
CCAGCATACGCATTCCTCCGACTGTTGGCCAGGAGAAGAAGGGTTACTTTGAAGATCGTC
GCCCCCTGCCAACTGCGACCCCTTTTCGGTGACAGAAGCCCTCATCCGCACGTGTCTTC
TCAATGAAACCGGCATGAGCCCTTCCAGTACAAAAATTAAGTGGACTAGACCTCCAGCT
GTTGAGCCCTCCTAGTTCTTCATCCCACTCCAACCTTCCCCCTCTCCCAGTTGTCCCG
ATTGTAAC TCAAAGGGTGAATATCAAGGTCGTTTTTTTTTCATTCC

[0220] SEQ ID NO.4:细菌中生长的GS蛋白,用于实施例1中

MGSSHHHHHHGGGGSMTTSSASSHLNKGIKQVYMSLPQGEKVQAMYIWIDG
TGEGLRCKTRTL DSEPKCVEELPEWNFDGSSTLQSEGSNSDMYLVPAAMFR
DPFRKDPNKLVLCEVFKYNRRPAETNLRHTCKRIMDMVSNQHPWFGMEQE
[0221] YTLMGTDGHPFGWPSNGFPGPQGPYYCGVGADRAYGRDIVEAHYRACLYA
GVKIAGTNAEVMPAQWEFQIGPCEGISMGDHLWVARFILHRVCEDFGVIAT
FDPKPIGNWNGAGCHTNFSTKAMREENGLKYIEEAIEKLSKRHQYHIRAYD
PKGGLDNARRLTGFHETSNINDFSAGVANRSASIRIPRTVQGEKKGYFEDRR
PSANCDPFSVTEALIRTCLLNETGDEPFQYKN

[0222] SEQ ID NO.5cDNA(用于实施例1中的细菌优化的cDNA)。

[0223] ATGGGCAGCAGCCACCACCATCACCACCACGGCGGGCGGGTATGCATGA
 CCACCTCGGCAAGCAGCCACCTGAATAAAGGCATCAAACAGGTGTATAT
 GTCTCTGCCGCAAGGTTGAAAAAGTTCAAGCCATGTACATTTGGATCGAT
 GGCACCGGTGAAGGCCTGCGTTGCAAAACCCGCACGCTGGACTCAGAAC
 CGAAATGTGTGGAAGAACTGCCGGAATGGAACTTTGATGGTAGCTCTAC
 GCTGCAGTCGGAAGGCAGTAATCCGACATGTATCTGGTTCCGGCGGCC
 ATGTTTCGTGATCCGTTCCGCAAAGACCCGAACAACTGGTGCTGTGCG
 AAGTTTTTAAATAACAACCGTCGCCC GGCGGAAACCAATCTGCGTCATAC
 GTGTAAACGCATTATGGATATGGTCAGCAACCAGCACCCGTGGTTCGGT
 ATGGAACAAGAATATAACCCTGATGGGTACGGATGGCCATCCGTTTGTT
 GGCCGAGCAATGGTTTCCCGGGTCCGCAGGGTCCGTATTACTGCGGTGTC
 GGCGCAGATCGTGCTTACGGTCGCGACATTGTGGAAGCACACTATCGTG
 CTTGTCTGTACGCGGGTGTAAAATCGCCGGCACCAATGCAGAAGTCAT
 GCCGGCTCAGTGGGAATTTCAAATTGGCCCGTGCGAAGGTATCAGCATG
 GGCGATCATCTGTGGGTTGCTCGTTTCATCCTGCACCGCGTCTGTGAAGA
 TTTTGGTGTGATTGCGACCTTCGACCCGAAACCGATCCC GGCAACTGGA
 ATGGTGCTGGCTGCCATACCAACTTTAGCACGAAAGCGATGCGTGAAGA
 AAATGGCCTGAAATACATCGAAGAAGCAATCGAAAAACTGTCTAAACGT
 CATCAGTATCACATTCGCGCCTACGATCCGAAAGGCGGTCTGGACAACG
 CACGTCGCCTGACCGGTTTTACGAAACGAGCAACATCAATGATTTCTCT
 GCGGGCGTTGCCAATCGCTCAGCCTCGATTTCGTATCCCGCGCACCGTCGG
 TCAAGAGAAAAAAGGCTATTTTGAAGATCGTCGCCC GAGTGCAAACGTG
 GACCCGTTCTCCGTGACGGAAGCCCTGATCCGCACCTGTCTGCTGAATGA
 AACCGGCGATGAACCGTTCCAATACAAAAAT

[0224] SEQ ID NO.6[嗜酸乳杆菌菌株30SCGS]

[0225] >tr|F0TG87|F0TG87_LACA3谷氨酰胺合成酶OS=嗜酸乳杆菌(菌株30SC)

[0226] MSKQYTTEEIRKEVADKDVRFLRLCFTDINGTEKAVEVPTSQLDKVLTNDIR
 FDGSSIDGFVRLEESDMVLYPDFSTWSVLPWGDEHGGKIGRLICSVHMTDG
 KPFA GDPRN LKRVLGEMKEAGFDTFDIGFEMEFHLFKLDENGNWTTTEVPD
 HASYFDMTSDDEGARCRREIVETLEEIGFEVEAAHHEVGDGQQEIDFRFDDA
 LTTADRCQTFKMVARHIARKHGLFATFMAKPVEGQAGNGMHNNMSLFKN
 KHN VFYDKDGEFHL SNTALYFLNGILEHARAITAIGNPTVNSYKRLIPGFEAP
 VYIAWAAKNRSP LVRIPSAGEINTRLEMRSADPTANPYLLLAACL TAGLKGI
 KEQKMPMPVEENIFEMTEEERA EHGKPLPTTLHNAIKAFKEDDLIKSALG
 EHLTHSFIESKELEWSKYSQSVSDWERQRYMNW

[0227] SEQ ID NO.7[玉米(ZeaMays)GS](玉米(corn)/玉米(Maize)GS)

[0228] >tr|B4G1P1|B4G1P1_玉米谷氨酰胺合成酶

[0229] MACLTDLVN LNSDNTEKIIAEYIWIGGSGMDLR SKARTLSGPVTDPSKLPK
 WNYDGSSTGQAPGEDSEVILYPQAIKDPFRRGNILVMDCYTPAGEPIPT
 NKRYNAAKIFSSPEVA AEEPWYGIEQEY TLLQKDTNWPLGWPIGGFPGPQG
 PYYCGIGA EKSFGRDIVDAHYKACLYAGINISGINGEVM PGQWEFQVGPSV
 GISSGDQVWVARYILERITEIAGVVVTFDPKPIPGDWNGAGAHTNYSTESMR
 KEGGYEVIKAAIEK LKRHREHIAAYGEGNERRLTGRHETADINTFSWGVA
 NRGASVRVGRETEQNGKGYFEDRRPASNMDPYVVVTSMIAETTIIWKP

[0230] 本申请还提供以下内容:

[0231] 1.一种谷氨酰胺合成酶(GS)蛋白,所述谷氨酰胺合成酶蛋白用于在通过向受试者

全身非口服施用治疗或预防高氨血症中使用。

[0232] 2. 根据项目1所述的用于使用的蛋白,其中所述蛋白用于与降氨剂组合使用。

[0233] 3. 一种用于与GS蛋白组合使用的降氨剂,所述降氨剂用于在治疗或预防高氨血症中使用。

[0234] 4. 根据项目1至3中任一项所述的用于使用的蛋白或降氨剂,其中所述高氨血症由于尿素循环障碍(UCD)和/或谷氨酰胺合成酶缺乏引起。

[0235] 5. 根据项目1至4中任一项所述的用于使用的蛋白或降氨剂,其中所述高氨血症与器官衰竭相关联。

[0236] 6. 根据项目1至5中任一项所述的用于使用的蛋白质或降氨剂,其中所述高氨血症由于非酒精性脂肪肝病引起。

[0237] 7. 根据项目1至5所述的用于使用的蛋白质或降氨剂,其中所述高氨血症由于急性肝衰竭、肝硬化和/或肾功能障碍和/或肾衰竭引起。

[0238] 8. 根据任一项前述项目所述的用于使用的蛋白质或降氨剂,其中所述GS蛋白包含与SEQ ID NO.1列出的氨基酸序列至少50%相同的氨基酸序列,或者是所述氨基酸序列的酶活性片段。

[0239] 9. 根据任一项前述项目所述的用于使用的蛋白质或降氨剂,其中所述GS蛋白以药物组合物的形式施用。

[0240] 10. 根据前述项目中任一项所述的用于使用的蛋白质或降氨剂,其中所述GS蛋白以胃肠外营养组合物的形式施用。

[0241] 11. 根据前述项目中任一项所述的用于使用的蛋白质或降氨剂,其中所述GS蛋白被连接到部分。

[0242] 12. 根据前述项目中任一项所述的用于使用的蛋白质或降氨剂,其中所述部分选自蛋白、肽、非蛋白聚合物或亲和标签。

[0243] 13. 根据前述项目中任一项所述的用于使用的蛋白质或降氨剂,其中所述部分是聚乙二醇(PEG)。

[0244] 14. 根据前述项目中任一项所述的用于使用的蛋白质或降氨剂,其中所述PEG在所述蛋白质的N末端被连接至所述GS蛋白。

[0245] 15. 根据前述项目中任一项所述的用于使用的蛋白质或降氨剂,其中所述GS蛋白质经由肽接头或化学键被连接至所述部分。

[0246] 16. 根据前述项目中任一项所述的用于使用的蛋白质或降氨剂,根据项目8至12中任一项所述的用于使用的蛋白质或降氨剂,其中所述GS蛋白质经由共价键被连接至所述部分。

[0247] 17. 根据前述项目中任一项所述的用于使用的蛋白质或降氨剂,其中所述GS蛋白呈适合向受试者胃肠外施用的形式。

[0248] 18. 根据前述项目中任一项所述的用于使用的蛋白质或降氨剂,其中所述GS蛋白呈适合向受试者皮下施用的形式。

[0249] 19. 根据前述项目中任一项所述的用于使用的蛋白质或降氨剂,其中所述GS蛋白以包含多聚体形式的所述蛋白的制备物被提供。

[0250] 20. 根据任一前述项目所述的用于使用的蛋白质或降氨剂,其中所述GS蛋白以单

体形式被提供。

[0251] 21. 根据项目2至20中任一项所述的用于使用的蛋白质或降氨剂,其中所述降氨剂选自由以下组成的组:氮清除剂、离子交换树脂(例如Relapsa)、氨吸收剂(诸如基于脂质体的氨吸收剂例如Versantis)、去除氨的工程化的微生物组(例如Synlogic)、利福昔明和乳果糖。

[0252] 22. 根据项目21所述的用于使用的蛋白质或氮清除剂,其中所述氮清除剂选自由以下组成的组:苯乙酸的药学上可接受的盐或其药学上可接受的前药、苯丁酸的药学上可接受的盐或其药学上可接受的前药、甘油苯丁酸或其药学上可接受的前药、苯甲酸的药学上可接受的盐或其药学上可接受的前药、以及氨结合树脂。

[0253] 23. 根据项目22所述的用于使用的蛋白质或氮清除剂,其中所述苯乙酸的药学上可接受的盐是苯乙酸钠。

[0254] 24. GS蛋白用于制造组合物的用途,所述组合物通过向受试者全身非口服施用用于治疗或预防高氨血症。

[0255] 25. 降氨剂用于制造组合物的用途,所述组合物用于与GS蛋白组合使用治疗或预防高氨血症。

[0256] 26. GS蛋白和降氨剂用于制造组合物的用途,所述组合物用于高氨血症的治疗或预防。

[0257] 27. 根据项目24或26所述的GS蛋白和/或降氨剂的用途,其中所述高氨血症如项目4至7中所定义。

[0258] 28. 根据项目24至27中任一项所述的GS蛋白和/或降氨剂的用途,其中所述GS蛋白如项目8至20中所定义。

[0259] 29. 根据项目24至28中任一项所述的GS蛋白和/或降氨剂的用途,其中所述降氨剂选自由以下组成的组:氮清除剂、离子交换树脂(例如Relapsa)、氨吸收剂(诸如基于脂质体的氨吸收剂,例如Versantis)、去除氨的工程化的微生物组(例如Synlogic)、利福昔明和乳果糖。

[0260] 30. 根据项目24至29中任一项所述的GS蛋白和/或降氨剂的用途,其中所述氮清除剂如项目22或23中所定义。

[0261] 31. 一种治疗或预防受试者中的高氨血症的方法,所述方法包括向所述受试者全身且非口服施用GS蛋白。

[0262] 32. 根据项目31所述的方法,还包括施用降氨剂。

[0263] 33. 根据项目31或32所述的方法,其中所述高氨血症如项目4至7中所定义。

[0264] 34. 根据项目31至33所述的方法,其中所述GS蛋白如项目8至20中所定义。

[0265] 35. 根据项目32至34所述的方法,其中所述降氨剂选自由以下组成的组:氮清除剂、离子交换树脂(例如Relapsa)、氨吸收剂(诸如基于脂质体的氨吸收剂,例如Versantis)、去除氨的工程化的微生物组(例如Synlogic)、利福昔明和乳果糖。

[0266] 36. 根据项目35所述的方法,其中所述氮清除剂如项目22或23中所定义。

[0267] 37. 一种组合物,所述组合物包含GS蛋白,用于治疗或预防高氨血症,其中所述组合物呈适合全身非口服施用的形式。

[0268] 38. 一种组合物,所述组合物包含降氨剂,用于与GS蛋白组合使用,所述组合物用

于在治疗或预防高氨血症中使用。

[0269] 39. 一种组合物, 所述组合物包含GS蛋白和降氨剂。

[0270] 40. 根据项目39所述的组合物, 其中所述组合物用于在治疗或预防高氨血症中使用。

[0271] 41. 根据项目37至40中任一项所述的组合物, 其中所述组合物是药物组合物或营养组合物。

[0272] 42. 根据项目37至41中任一项所述的组合物, 其中所述组合物包含至少一种药学上可接受的载体或赋形剂。

[0273] 43. 根据项目38至42中任一项所述的组合物, 其中所述组合物呈适合全身非口服施用的形式。

[0274] 44. 根据项目37至43中任一项所述的组合物, 其中所述组合物呈适合皮下施用的形式。

[0275] 45. 根据项目37至44中任一项所述的组合物, 其中所述组合物包含另外的治疗剂。

[0276] 46. 根据项目37至45中任一项所述的组合物, 其中所述高氨血症如项目4至7中所定义。

[0277] 47. 根据项目37至46中任一项所述的组合物, 其中所述GS蛋白如项目8至20中所定义。

[0278] 48. 根据项目38至47中任一项所述的组合物, 其中所述降氨剂选自自由以下组成的组: 氮清除剂、离子交换树脂(例如Relapsa)、氨吸收剂(诸如基于脂质体的氨吸收剂, 例如Versantis)、去除氨的工程化的微生物组(例如Synlogic)、利福昔明和乳果糖。

[0279] 49. 根据项目48所述的组合物, 其中所述氮清除剂如项目22或23中所定义。

[0280] 50. 一种试剂盒, 所述试剂盒包含用于全身非口服施用的GS蛋白和另外的治疗剂。

[0281] 51. 根据项目50所述的试剂盒, 其中所述另外的治疗剂是对高氨血症有效的。

[0282] 52. 根据项目50或51所述的试剂盒, 其中所述另外的治疗剂是降氨剂或氨基酸或尿素循环的中间体或其类似物。

[0283] 53. 根据项目52所述的试剂盒, 其中所述降氨剂选自自由以下组成的组: 氮清除剂、离子交换树脂(例如Relapsa)、氨吸收剂(诸如基于脂质体的氨吸收剂, 例如Versantis)、去除氨的工程化的微生物组(例如Synlogic)、利福昔明和乳果糖。

[0284] 54. 根据项目53所述的试剂盒, 其中所述氮清除剂如项目22或23中所定义。

[0285] 55. 根据项目50至54中任一项所述的试剂盒, 其中所述高氨血症如项目4至7中所定义。

[0286] 56. 根据项目50至55中任一项所述的试剂盒, 其中所述GS蛋白如项目8至20中所定义。

[0287] 57. 一种产物, 所述产物包含用于全身非口服施用的GS蛋白和另外的治疗剂, 所述产物作为组合的制备物用于在治疗或预防高氨血症中单独使用、同时使用或依次使用。

[0288] 58. 根据项目57所述的产物, 其中所述另外的治疗剂是降氨剂或氨基酸或尿素循环的中间体或其类似物。

[0289] 59. 根据项目58所述的产物, 其中所述降氨剂选自自由以下组成的组: 氮清除剂、离子交换树脂(例如Relapsa)、氨吸收剂(诸如基于脂质体的氨吸收剂, 例如Versantis)、去除

氨的工程化的微生物组(例如Synlogic)、利福昔明和乳果糖。

[0290] 60. 根据项目59所述的产物,其中所述氮清除剂如项目22或23中所定义。

[0291] 61. 根据项目57至60中任一项所述的产物,其中所述高氨血症如项目4至7中所定义。

[0292] 62. 根据项目57至61中任一项所述的产物,其中所述GS蛋白如项目8至20中所定义。

[0293] 63. 一种表达载体,所述表达载体编码谷氨酰胺合成酶或其生物活性片段或变体,所述表达载体用于在治疗或预防高氨血症中使用,其中所述载体用于全身施用。

[0294] 64. 根据项目63所述的用于使用的表达载体,所述表达载体还编码降氨剂。

[0295] 65. 一种表达载体,所述表达载体编码谷氨酰胺合成酶或其生物活性片段或变体,所述表达载体用于与降氨剂组合在高氨血症的治疗或预防中使用。

[0296] 66. 一种降氨剂,所述降氨剂用于与编码谷氨酰胺合成酶或其生物活性片段或变体的表达载体组合在高氨血症的治疗或预防中使用。

[0297] 67. 一种细胞,所述细胞包含用于如项目63至66中所定义的用途的表达载体。

[0298] 68. 编码谷氨酰胺合成酶或其生物活性片段或变体的表达载体用于制造用于治疗或预防高氨血症的组合物的用途,其中所述组合物用于全身施用。

[0299] 69. 编码谷氨酰胺合成酶或其生物活性片段或变体的表达载体用于制造组合物的用途,所述组合物用于与降氨剂组合使用,用于高氨血症的治疗或预防。

[0300] 70. 降氨剂用于制造组合物的用途,所述组合物用于与编码谷氨酰胺合成酶或其生物活性片段或变体的表达载体组合使用,用于在高氨血症的治疗或预防中使用。

[0301] 71. 一种治疗或预防受试者中的高氨血症的方法,所述方法包括全身施用编码谷氨酰胺合成酶或其生物活性片段或变体的表达载体。

[0302] 72. 一种治疗或预防受试者中的高氨血症的方法,所述方法包括施用编码谷氨酰胺合成酶或其生物活性片段或变体的表达载体、以及降氨剂。

[0303] 73. 一种组合物,所述组合物包含编码谷氨酰胺合成酶或其生物活性片段或变体的表达载体,所述组合物用于在高氨血症的治疗或预防中使用,其中所述组合物用于全身施用。

[0304] 74. 根据项目73所述的组合物,其中所述组合物还包含降氨剂。

[0305] 75. 一种组合物,所述组合物包含编码谷氨酰胺合成酶或其生物活性片段或变体的表达载体,所述组合物用于与降氨剂组合使用,用于在高氨血症的治疗或预防中使用。

[0306] 76. 一种组合物,所述组合物包含降氨剂,所述组合物用于与编码谷氨酰胺合成酶或其生物活性片段或变体的表达载体组合使用,用于在高氨血症的治疗或预防中使用。

[0307] 77. 一种试剂盒,所述试剂盒包含编码谷氨酰胺合成酶或其生物活性片段或变体的表达载体、以及另外的治疗剂。

[0308] 78. 根据项目77所述的试剂盒,其中所述另外的治疗剂可以是对高氨血症有效的剂。

[0309] 79. 根据项目78所述的试剂盒,其中所述对高氨血症有效的剂是降氨剂或氨基酸或其尿素循环的中间体。

[0310] 80. 一种产物,所述产物包含编码谷氨酰胺合成酶或其生物活性片段或变体的表

达载体以及另外的治疗剂,所述产物作为组合的制备物用于在治疗或预防高氨血症中单独使用、同时使用或依次使用。

[0311] 81. 根据项目80所述的产物,其中所述另外的治疗剂如项目78或79中所定义。

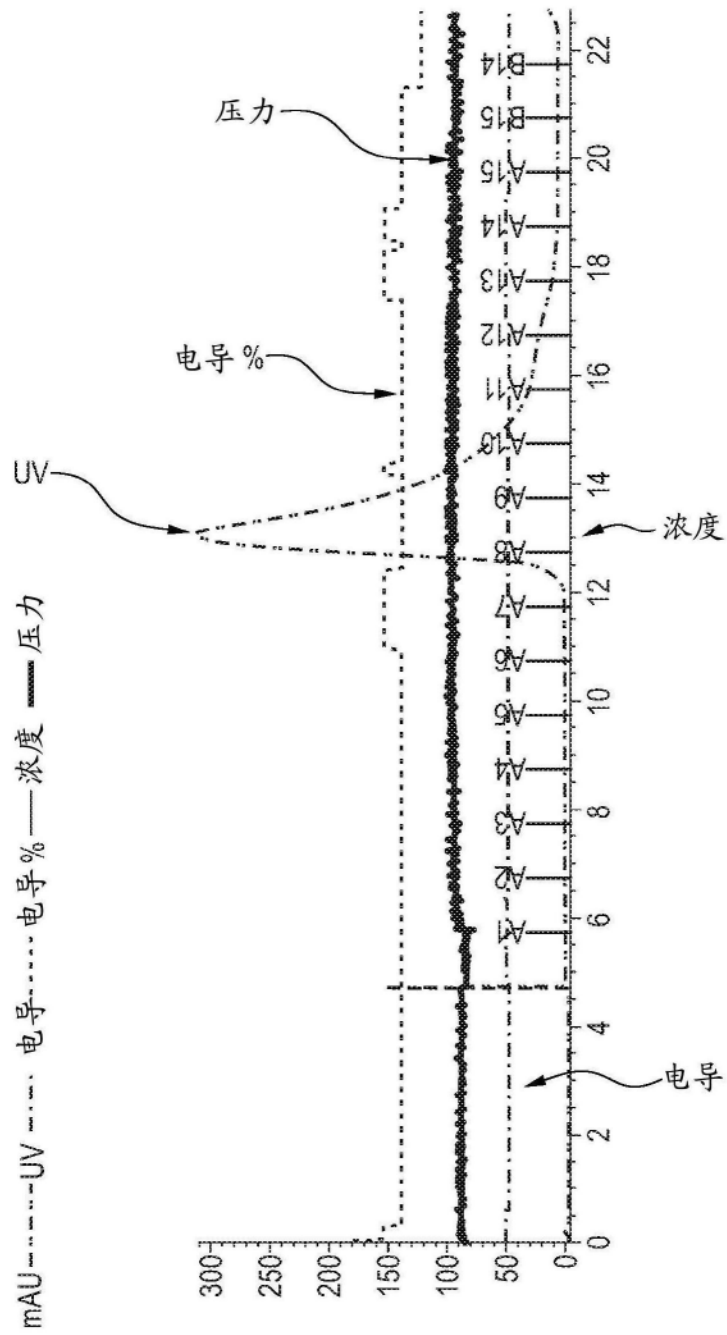


图1

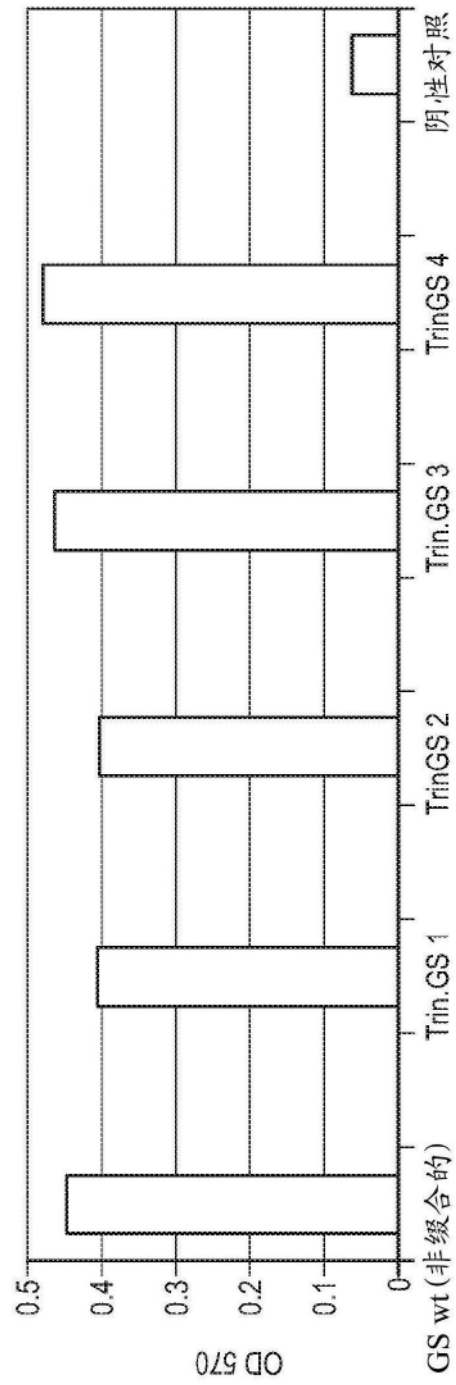


图2

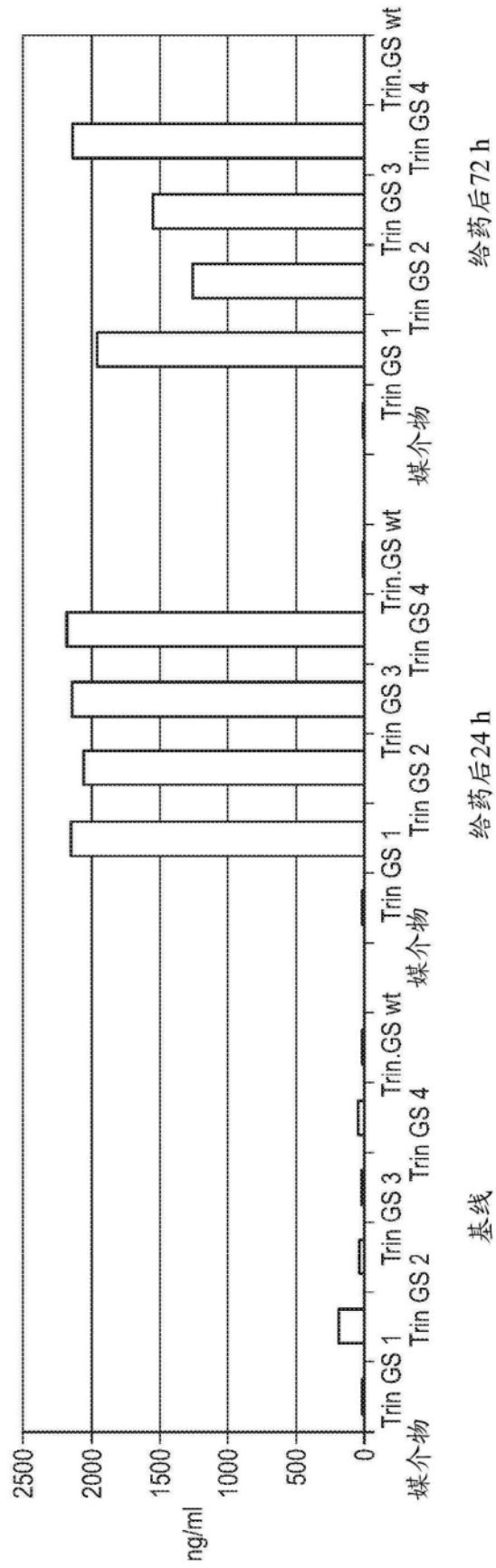


图3

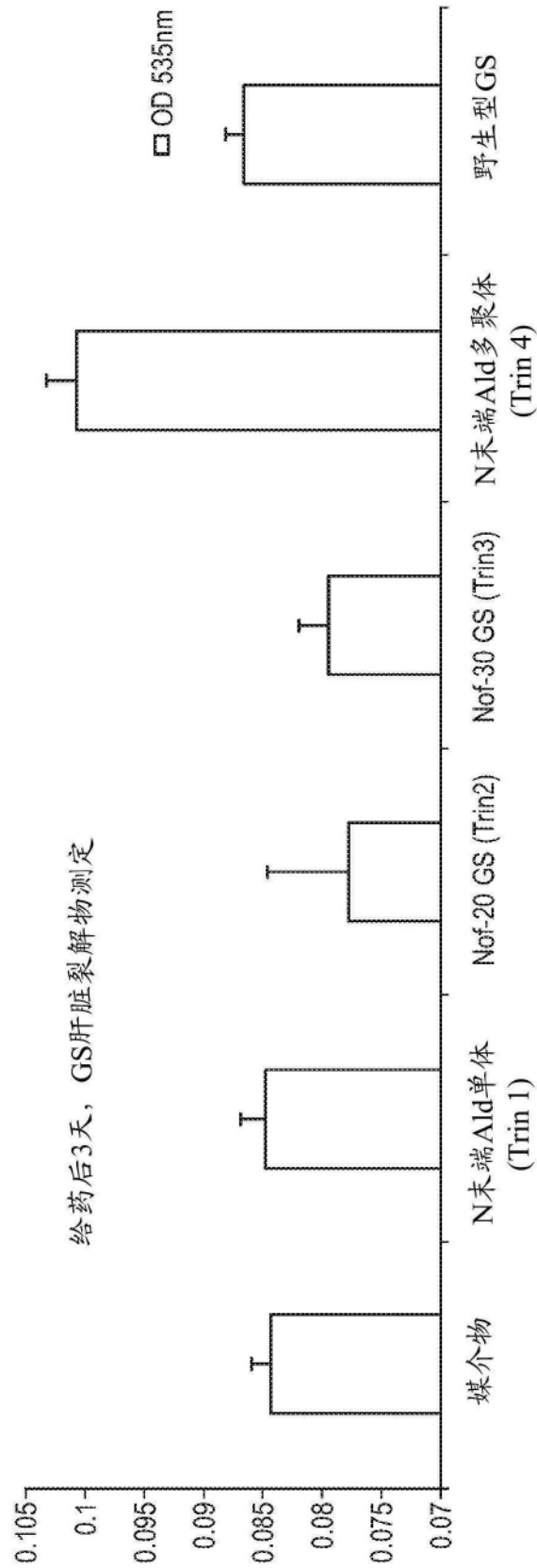


图4

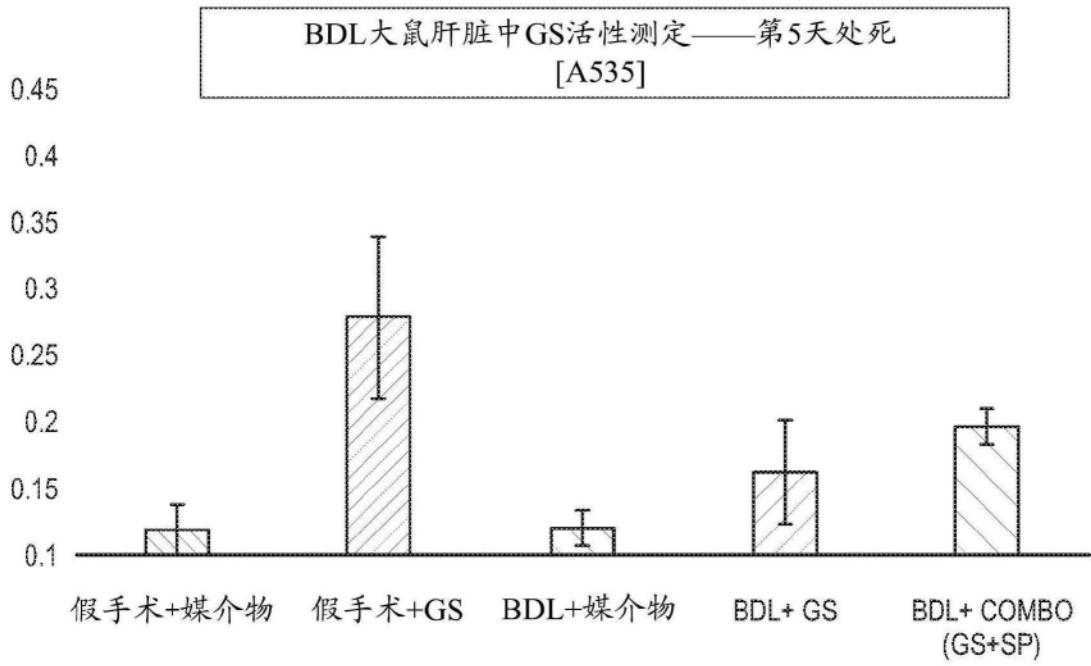


图5A

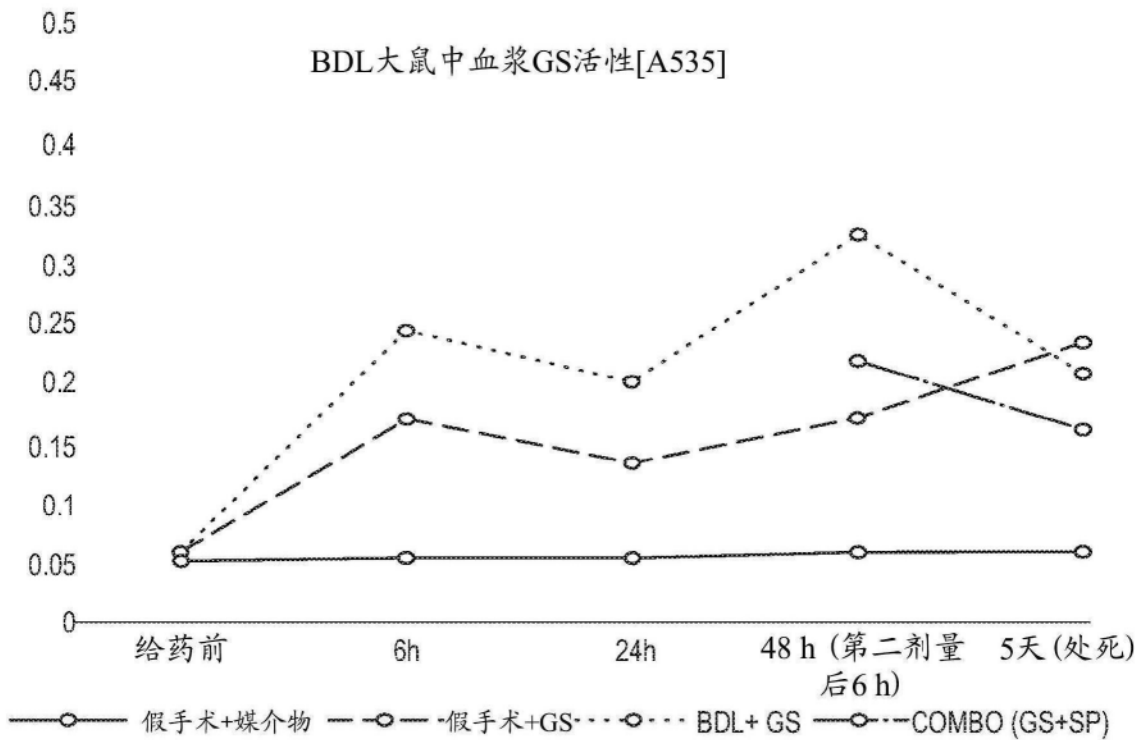


图5B

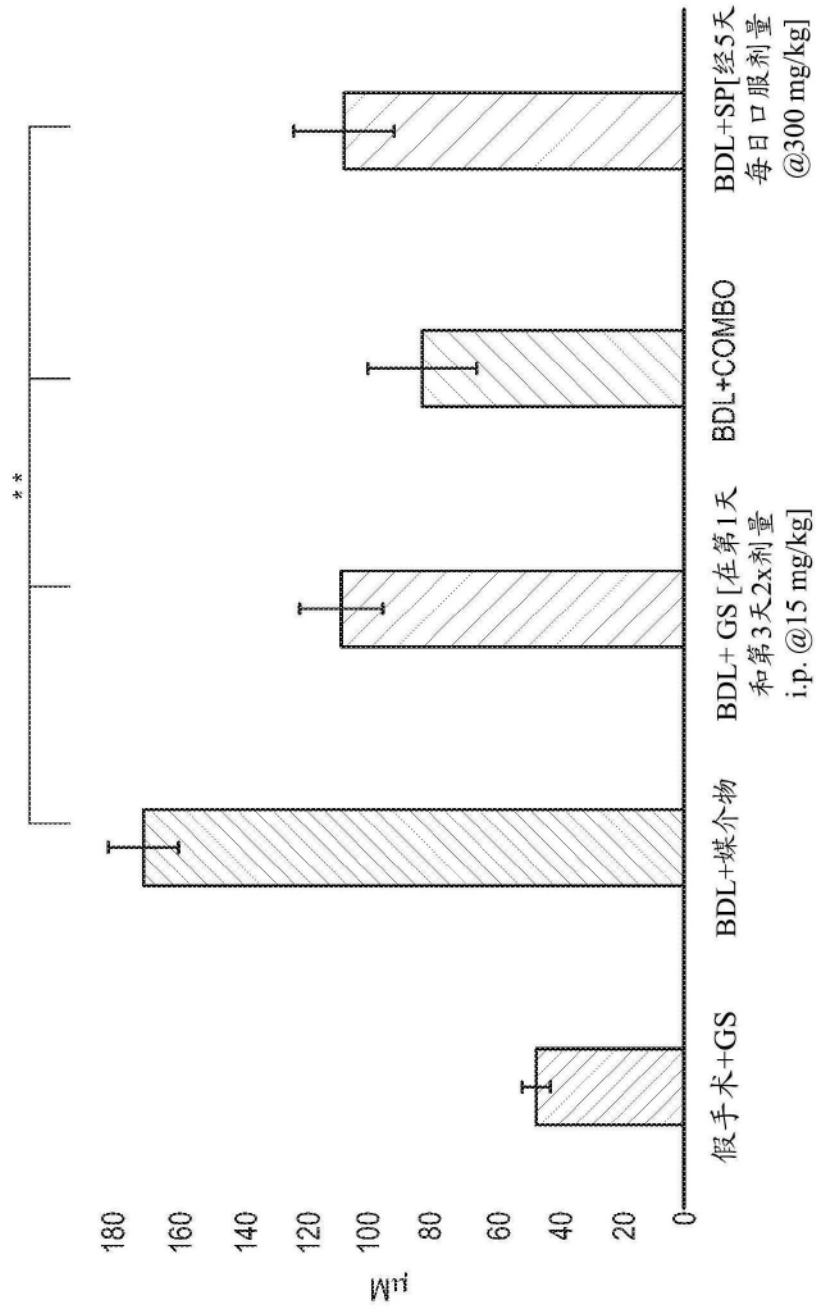


图6

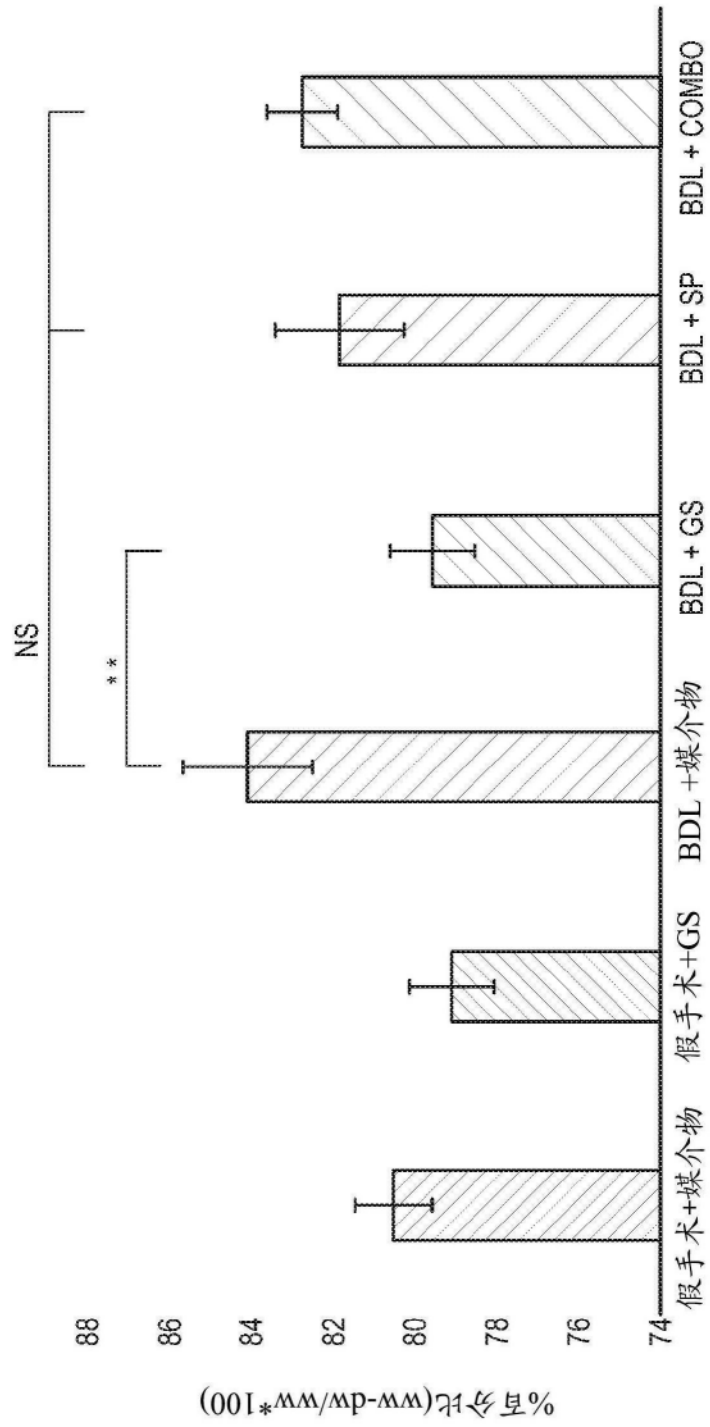


图7

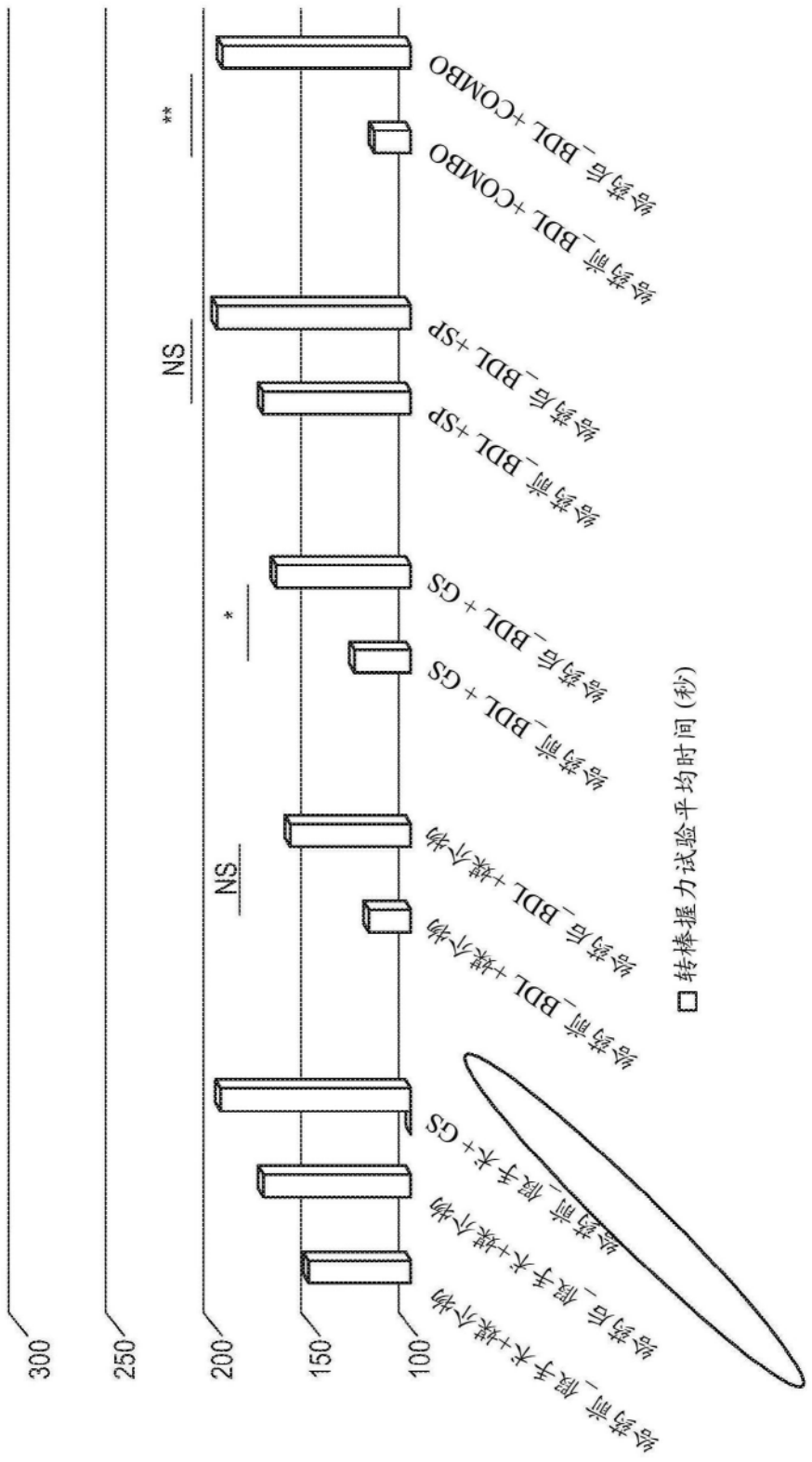


图8

OTC小鼠氨测定-TCA法,
22-12-2017(重复的)

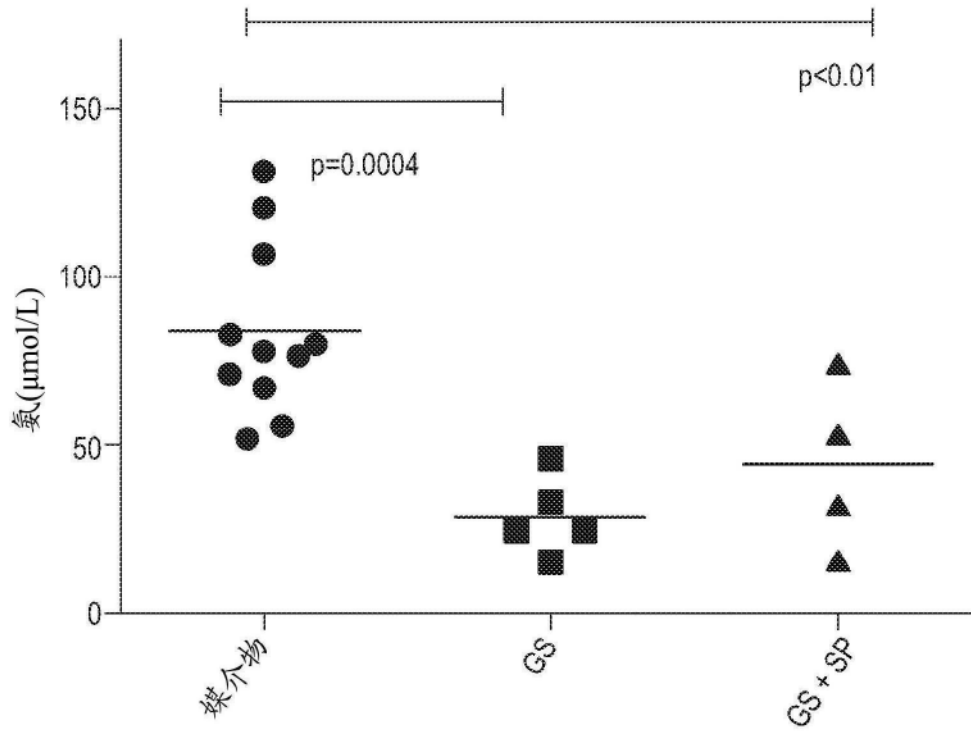


图9

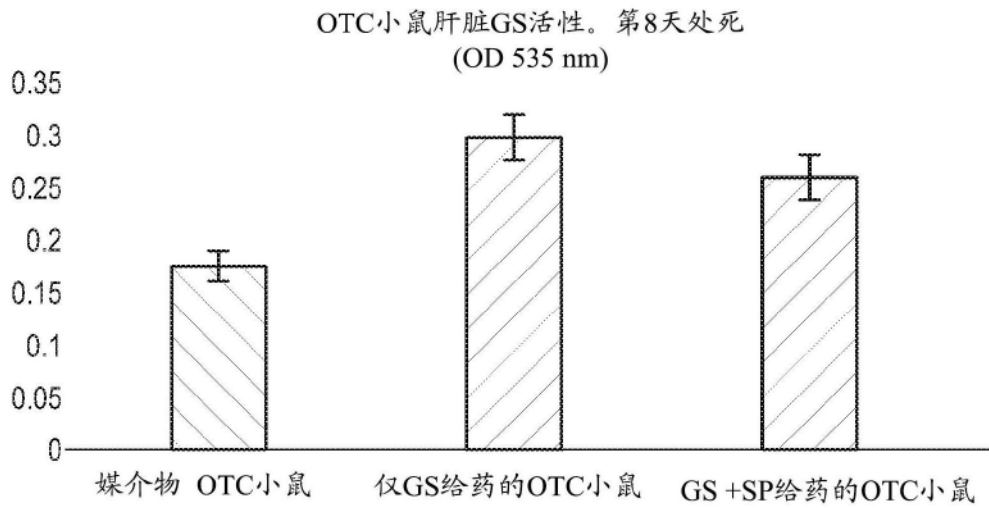
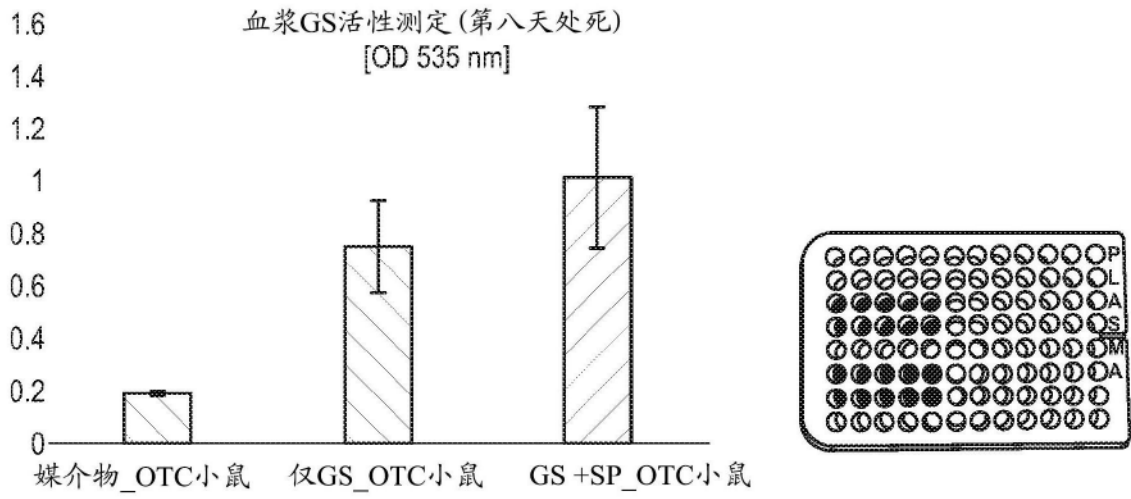


图10