

[illegible]

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

肝炎の処置のための医薬の製造におけるアルギニン分解酵素の使用。

【請求項 2】

前記酵素が、単離され実質的に精製された組換えアルギナーゼである、請求項 1 に記載の使用。

【請求項 3】

前記組換えアルギナーゼの純度が 80 ~ 100 % である、請求項 1 に記載の使用。

【請求項 4】

前記組換えアルギナーゼがヒトアルギナーゼ I である、請求項 3 に記載の使用。

10

【請求項 5】

前記組換えアルギナーゼがアルギニンデイミナーゼである、請求項 3 に記載の使用。

【請求項 6】

前記酵素が配列番号 1 または配列番号 2 に示すものと実質的に同じ核酸配列を含み、前記核酸配列が配列番号 3 に示すものと実質的に同じアミノ酸配列を含む、請求項 4 に記載の使用。

【請求項 7】

前記酵素が 250 I . U . / m g の比活性を有する、請求項 4 に記載の使用。

【請求項 8】

前記酵素が、十分な安定性および少なくとも約 3 日間のインビトロ血漿半減期を有することをもたらす修飾を含む、請求項 4 に記載の使用。

20

【請求項 9】

前記酵素がペグ化されている、請求項 8 に記載の使用。

【請求項 10】

前記ペグ化が、カップリング剤を用いた前記アルギナーゼへの少なくとも 1 種類のポリエチレングリコール (P E G) 部分の共有結合により生じる、請求項 9 に記載の使用。

【請求項 11】

前記カップリング剤が、2, 4, 6 - トリクロロ - s - トリアジン (塩化シアヌル、C C) またはスクシニミドプロピオン酸 (S P A) である、請求項 9 に記載の使用。

【請求項 12】

前記ヒトアルギナーゼ I が、そのアミノ末端に結合した 6 個のヒスチジンを含む、請求項 4 に記載の使用。

30

【請求項 13】

前記肝炎が B 型肝炎である、請求項 1 に記載の使用。

【請求項 14】

アルギニン分解酵素を含む医薬組成物。

【請求項 15】

前記酵素が、単離され実質的に精製された組換えアルギナーゼである、請求項 14 に記載の医薬組成物。

【請求項 16】

前記組換えアルギナーゼの純度が 80 ~ 100 % である、請求項 15 に記載の医薬組成物。

40

【請求項 17】

前記組換えアルギナーゼがヒトアルギナーゼ I である、請求項 15 に記載の医薬組成物。

【請求項 18】

前記組換えアルギナーゼがアルギニンデイミナーゼである、請求項 15 に記載の医薬組成物。

【請求項 19】

前記酵素が配列番号 1 または配列番号 2 に示すものと実質的に同じ核酸配列を含み、前

50

記核酸配列が配列番号 3 に示すものと実質的に同じアミノ酸配列を含む、請求項 17 に記載の医薬組成物。

【請求項 20】

前記酵素が 250 I . U . / m g の比活性を有する、請求項 17 に記載の医薬組成物。

【請求項 21】

前記酵素が、患者血漿中で少なくとも 3 日間の半減期を有する、請求項 17 に記載の医薬組成物。

【請求項 22】

前記酵素が、患者血漿中で少なくとも 1 日間の半減期を有する、請求項 17 に記載の医薬組成物。

【請求項 23】

前記酵素がベグ化によって修飾されている、請求項 17 に記載の医薬組成物。

【請求項 24】

前記ヒトアルギナーゼ I が、そのアミノ末端に結合した 6 個のヒスチジンを含む、請求項 17 に記載の医薬組成物。

【請求項 25】

前記酵素が患者の生理学的アルギニンレベルを低下させる、請求項 14 に記載の医薬組成物。

【請求項 26】

前記酵素が肝炎を調節する、請求項 14 に記載の医薬組成物。

【請求項 27】

前記肝炎が B 型肝炎である、請求項 24 に記載の医薬組成物。

【請求項 28】

前記組成物が、固形物、溶液、エマルジョン、分散液、ミセルまたはリボソームの形態にさらに製造され得る、請求項 14 に記載の医薬組成物。

【請求項 29】

前記組成物が経口使用または注射に好適である、請求項 14 に記載の医薬組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

発明の分野

本発明は、医薬組成物およびその使用に関する。好ましい一実施形態では、本発明は、肝炎を処置することができる医薬組成物に関する。

【背景技術】

【0002】

発明の背景

肝炎の処置のための抗ウイルス性薬物は多数あり、以下のものは、最も高頻度で使用されている：(1) インターフェロン：細胞が、ウイルスを直接死滅または抑制するのではなく、細胞表面受容体に対する反応によってその自身の抗ウイルス性タンパク質を産生し、したがって、B 型および C 型肝炎ウイルスの複製の抑制をもたらすように誘導する広域抗ウイルス剤。同時に、これは、NK 細胞、マクロファージおよび T リンパ球の活性を刺激し、免疫系を調節し、抗ウイルス能力を増強する。(2) インターロイキン - 2：免疫系を調節し、抗ウイルスおよび抗腫瘍能力を有する T 細胞成長因子。(3) ヌクレオシド：例えば、アシクロビルは、種々の DNA ウイルスの複製を抑制する非環式プリンヌクレオシドである。(4) アラビノシド：インビボおよびインビトロの両方で B 型肝炎に対して潜在的に有効であることが示されている。一部の患者は、処置中、異常な生化学および肝臓生検材料の改善を伴う HBV DNA ポリメラーゼ潜在 (latency) を示す。(5) その他：肝細胞成長促進因子 (PHGF)、サイモシン、抗 B 型肝炎リボ核酸、リバピリン、レバミゾール、レンチナン、ポテンリン (potenline)、フィトヘマグルチニンなど。しかしながら、前述の薬物の有効性は、満足のいくものではなく、こ

10

20

30

40

50

れらは、有害な副作用を容易に誘導する。

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0003】

発明の概要

前述の背景に鑑み、本発明の目的は、肝炎を処置するためのより有効な医薬組成物を提供することである。

【課題を解決するための手段】

【0004】

好ましい一実施形態では、医薬組成物は、肝炎の処置において患者のアルギニンレベルを選択的に低下させるために提供される。

10

【0005】

したがって、一態様において、アルギニンを分解する酵素（アルギニン分解酵素）が医薬の調製のために提供される。好ましい一実施形態では、アルギニン分解酵素はアルギナーゼまたはアルギニンデイミナーゼである。また別の実施形態では、アルギニン分解酵素は、単離され実質的に精製された組換えアルギナーゼである。より好ましい実施形態では、本発明のアルギナーゼはヒトアルギナーゼIである。また別のより好ましい実施形態では、本発明のヒトアルギナーゼIは、配列番号1または配列番号2に示すものと同じ核酸配列を含み、前記核酸配列は、配列番号3に示すものと同じアミノ酸配列を含む。また別の実施形態では、本発明の組換えヒトアルギナーゼIは80～100%純度である。より好ましい実施形態では、本発明の組換えヒトアルギナーゼIは90～100%純度である。

20

【0006】

また別の好ましい実施形態では、本発明のアルギナーゼは、患者において少なくとも3日間、「十分なアルギニン奪取」（以下、本明細書において「AAD」という）を維持するのに十分に高い酵素活性および安定性を有するように修飾される。修飾の好ましい方法の一例は、6ヒスチジンのアミノ末端タグである。また別の好ましい修飾は、酵素の安定性を増大させるため、および患者によって惹起される免疫反応性を最小限に抑えるためのペグ化である。別のより好ましい実施形態では、ペグ化は、少なくとも1種類のポリエチレングリコールに共有結合されたカップリング剤を含む。最も好ましい実施形態では、カップリング剤は、2, 4, 6-トリクロロ-s-トリアジン（塩化シアヌル、CC）またはスクシニミドプロピオン酸（SPA）である。修飾アルギナーゼは、少なくとも250 I.U./mgの比活性を有する。好ましい一実施形態では、比活性は少なくとも300～350 I.U./mgである。最も好ましい実施形態では、比活性は少なくとも500 I.U./mgである。別の好ましい実施形態では、前記アルギナーゼは、十分な安定性を有するように、および少なくとも約3日間の血漿または血清半減期を有するように修飾される。

30

【0007】

また別の好ましい実施形態では、本発明によって調製される医薬は、肝炎を処置するために提供される。より好ましい実施形態では、本発明によって調製される医薬は、B型肝炎を処置するために提供される。

40

【0008】

別の実施において、単離され実質的に精製された組換えアルギナーゼを含む医薬組成物がさらに提供される。好ましい一実施形態では、80～100%純度を有する組換えアルギナーゼを含む医薬組成物が本明細書において提供される。また別の好ましい実施形態では、組換えヒトアルギナーゼは、任意のアルギニン分解酵素、例えば、アルギニンデイミナーゼまたはヒトアルギナーゼIである。最も好ましい実施形態では、前記酵素は、配列番号1または配列番号2に示すものと同じアミノ酸配列で本質的に構成され、前記アミノ酸コード配列は、配列番号3に示すものと同じアミノ酸配列を含む。好ましい一実施形態では、前記アルギナーゼは、患者の血漿または血清半減期において、約3日間高い比活性

50

および十分な安定性を有するように修飾される。別の好ましい修飾は、酵素の安定性を増大させ、免疫反応性を最小限に抑えるためのペグ化である。

【0009】

本発明のまた別の態様では、医薬組成物は、患者のアルギニンレベルを低下させるために提供される。好ましい一実施形態では、本発明は、肝炎を調節するためのものである。より好ましい実施形態では、本発明により、B型肝炎を処置することができる。別の実施形態では、本発明の医薬組成物は、固形物、液状物、エマルジョン、懸濁液、小アルブミン凝集体 (small albumin aggregate) (SAA) またはリボソームの形態で調製される。また別の好ましい実施形態では、本発明の医薬組成物は、経口または静脈内投与するのに好適である。

10

【発明を実施するための最良の形態】

【0010】

好ましい実施形態の詳細な説明

本明細書で用いる場合、用語「ペグ化されたアルギナーゼ」は、酵素の安定性を増大させるため、および免疫反応性を最小限に抑えるためにペグ化 (WO 2004/001048を参照) によって修飾された本発明のアルギナーゼ I をいう。

【0011】

本明細書で用いる場合、語句「実質的に同じ」は、DNA のヌクレオチド配列、RNA のリボヌクレオチド配列、またはタンパク質のアミノ酸配列のいずれに関して用いる場合も、本明細書に開示する実際の配列に由来する、軽微で重大でない配列バリエーションを伴う配列をいう。実質的に同じ配列を有する種は、開示した配列と均等であるとみなし、したがって、添付の特許請求の範囲の範囲に含まれる。これに関連して、「軽微で重大でない配列バリエーション」は、本明細書に開示および/または特許請求の範囲に記載した DNA、RNA またはタンパク質と実質的に同じである配列は、本明細書に開示および/または特許請求の範囲に記載した配列と機能的に等価であることを意味する。機能的に等価な配列は、実質的に同様に機能し、本明細書に開示および特許請求の範囲に記載した核酸およびアミノ酸組成物と実質的に同じ組成物を産生させる。特に、機能的に等価な DNA は、本明細書に開示したものと同一タンパク質、または保存的アミノ酸バリエーション (例えば、別の非極性残基での非極性残基の置換または同様の荷電残基での荷電残基の置換など) を有するタンパク質をコードする。これらの変化としては、当業者によって認識されるものであって、該タンパク質の3次構造を実質的に改変しないものが含まれる。用語「十分に高い酵素活性」は、少なくとも 250 I.U./mg、好ましくは少なくとも 300 ~ 350 I.U./mg、より好ましくは少なくとも 500 I.U./mg の組換えヒトアルギナーゼの酵素比活性をいう。好ましい実施形態では、アルギナーゼは、500 ~ 600 I.U./mg の比活性を有する。用語「安定性」は、アルギナーゼのインビトロ安定性をいう。より好ましくは、該安定性は、インビボ安定性をいう。酵素活性の減少速度は、単離され精製された組換えヒトアルギナーゼの血漿中安定性に反比例する。この関係は、血漿中のヒトアルギナーゼの半減期に反映される。

20

30

【0012】

本明細書で用いる場合、用語「十分なアルギニン奪取」(AAD) は、10 μ M 以下のインビボアルギニンレベルをいう。用語「半減期」(1/2期) は、ヒト血漿中のアルギナーゼの濃度がインビトロで半分に低下するのに必要とされ得る時間をいう。

40

【0013】

技術的専門知識および本明細書で用いる用語に関する他のすべての情報は、WO 2004/001048 および WO 2004/000349 に見られ得る。

【0014】

アルギナーゼの抗 B 型肝炎ウイルス効果を調べるため、本発明では、B 型肝炎ウイルス遺伝子でトランスフェクトしたヒト肝臓癌細胞株 2.2.15 を用いて、アルギナーゼの細胞毒性、アルギナーゼによる HBsAg および HBeAg 分泌の抑制、ならびにアルギナーゼによる HBV-DNA の抑制を試験する。ラミブジン (GlaxoWellcom

50

e, UK) を陽性コントロールとして用い、比較を行なう。結果は、8日間のCPE法の薬物添加後、ペグ化された組換えアルギナーゼのTC50は40 IU/mlであり、TC0は 20 ± 0 IU/mlであることを示す。TC0 = 20 IU/mlを用いた実験の2つのバッチでのHBeAg分泌の抑制割合、IC50およびSIは、それぞれ 68.69 ± 8.89 、 6.37 ± 0.45 IU/ml、 6.30 ± 0.45 である。HBsAg分泌の抑制割合、IC50およびSIは、それぞれ 29.81 ± 27.35 、 10.72 IU/ml (実験の一方のバッチのもの) および 3.73 (実験の一方のバッチのもの) である。培養培地の上清みでのHBV-DNAドットプロットのIC50は 13.18 ± 0.45 IU/mlであり、選択指数(SI)は 3.19 ± 0.98 である。細胞におけるHBV-DNA Southern Blot SumのIC50は 19.79 ± 7.95 IU/mlであり、選択指数は 2.91 ± 0.88 である。細胞におけるHBV-DNA Southern Blot In LaneのIC50は、 20.06 ± 1.96 IU/mlであり、選択指数は 2.00 ± 0.20 である。陽性コントロールラミブジンのTC50およびTC0は、それぞれ 1198.97 ± 97.50 および 800 ± 0 μ g/mlである。2.2.15細胞のHBeAgおよびHBsAg分泌は、TC0 800 μ g/mlのラミブジンとの8日間のインキュベーション後、有意に抑制されない。培養培地の上清みにおけるHBV-DNAドットプロットのIC50は 113.76 μ g/mlであり、選択指数は 10.54 である。細胞におけるHBV-DNA Southern Blot SumのIC50は 88.78 ± 6.37 μ g/mlであり、選択指数は 13.54 ± 0.97 である。複数の実験結果は、公開された文献と一致し、実験は信頼性があることを示す。結果は、アルギナーゼが、HBsAgおよびHBeAgの分泌を有意に抑制し、細胞内でHBV-DNAを低減させることを示す。

10

20

30

40

50

【実施例1】

【0015】

材料の調製

1.1 試験対象の薬物

名称：ペグ化組換えヒトアルギナーゼ(BC T-100) (以下、本明細書において「アルギナーゼ」という)。このアルギナーゼは、図1A、1Bおよび1Cに示す核酸配列ならびにその対応するアミノ酸配列を含む。

【0016】

調製：WO2004/001048の明細書中の実施例1~8を参照されたい。組換えヒトアルギナーゼは、イケモトマサキ教授の研究室(京都大学;住所:日本国606-8507京都府京都市左京区聖護院川原町53)から、WO2004/001048の最も早い出願日前に入手可能である。アルギナーゼは、表示した投薬群に従ってMEM培地で調製する。

【0017】

保存：4 の冷蔵庫内で保存。

1.2 陽性コントロール：ラミブジン(GlaxoWellcome(UK)製)。バッチ番号：B008923、錠剤1錠あたり100mg、実験中、薬物を培地中に浸漬および溶解させ、遠心分離して沈殿物を除去し、MEM培地で表示した投薬群に従って調製する。保存：4 の冷蔵庫内で保存。

【0018】

1.3 2.2.15細胞：B型肝炎ウイルスでトランスフェクトしたヒト肝臓癌細胞(Hep G2)の2.2.15細胞株(Mount Sinai Medical Centerにより構築)。輸入し、本発明者らの研究所で培養。

【0019】

1.4 試薬：イーグルMEM粉末、G-418(ジェネティシン)、酵母t-RNA、プロテイナーゼ-K(Gibco, U.S.A.);ウシ胎児血清(Hyclone Lab, U.S.A.);L-グルタミン(Jingke Chemical Reagent Company; HBsAg、HBeAgラジオイムノアッセイ(China

I s o t o p e C o r p o r a t i o n B e i f a n g I m m u n o r e a g e n t R e s e a r c h C e n t e r) ; カナマイシン (N o r t h C h i n a P h a r m a c e u t i c a l G r o u p C o r p o r a t i o n) ; ポリエチレングリコール (F l u k a , スウェーデン) ; D M S O (S i g m a) ; d - ³ ² p - d C T P (B e i j i n g Y a h u i B i o M e d i c a l E n g i n e e r i n g C o m p a n y) 。

【 0 0 2 0 】

1 . 5 器具 : 培養ボトル (T u n c l o n T M , デンマーク) ; 9 6 ウェル、2 4 ウェルおよび 6 ウェルプレート (C o r n i n g , U . S . A .) ; 二酸化炭素インキュベータ (S h e l - L a b , U . S . A .) ; 計数装置 (B e c k m a n , ドイツ) ; スキャナー (M i c r o t e k) ; G e l - P r o 解析ソフトウェア (M E D I A C y b e m e t i c e (登録商標)) 。

10

【 0 0 2 1 】

1 . 6 細胞培養培地および試薬

M E M 培地 1 0 0 m l : ウシ胎児血清 1 0 % 、グルタミン 0 . 0 3 % 、 G 4 1 8 3 8 0 μ g / m l 、カナマイシン 5 0 μ g / m l 含有

1 . 7 2 . 2 . 1 5 細胞培養物 : 0 . 2 5 % トリプシンを、充分成長させた 2 . 2 . 1 5 細胞の入った培養ボトル内に添加し、1 0 分間 3 7 ° で消化させ、培地を添加して分散させる。1 : 3 継代培養、1 0 日後、充分成長

20

【 実施例 2 】

【 0 0 2 2 】

細胞に対するアルギナーゼ毒性の試験

実験をコントロール群および異なる薬物濃度の試験群に分ける。細胞を消化し、2 0 0 , 0 0 0 細胞 / m l に希釈し、培養プレートに移し (9 6 ウェルプレートに 1 0 0 μ l / ウェル) 、2 4 時間、5 % C O ₂ 下で 3 7 ° にてインキュベートし、細胞が単層に成長したときを実験準備完了とする。アルギナーゼを培養培地で 4 0 I U / m l に希釈し、2 0 、1 0 、5 、2 . 5 I U / m l に連続希釈し、9 6 ウェルプレート内に添加し (全部で 5 種類の異なる濃度、1 つの濃度あたり 3 ウェル) 、アルギナーゼ溶液を 4 日毎に交換する (元の同じ濃度で) 。細胞病理学的変化を 8 日間または 4 日間、顕微鏡下で観察する。完全な破壊を 4 ; 7 5 % 破壊を 3 ; 5 0 % 破壊を 2 , 2 5 % 破壊を 1 ; 変化なしを 0 とする。R e e d - M u e n c h 法にしたがって T C 5 0 および T C 0 を計算する。

30

【 0 0 2 3 】

【 数 1 】

$$T C 5 0 = A n t i l o g \left(B + \frac{5 0 - B}{A - B} \times C \right)$$

A = log > 5 0 % 薬物濃度 B = log < 5 0 % 薬物濃度 C = log 希釈回数

40

【 実施例 3 】

【 0 0 2 4 】

H B e A g および H B s A g のアルギナーゼ抑制に関する試験

実験は、H B s A g および H B e A g 陽性コントロール群、陰性コントロール群、細胞コントロール群および異なる薬物濃度の試験群を有するように設計する。2 0 0 0 0 0 細胞 / m l の 2 . 2 . 1 5 細胞を 2 4 ウェルプレート上 (1 m l / ウェル) で成長させ、2 4 時間 5 % C O ₂ 下で 3 7 ° にてインキュベートする。T C 0 薬物溶液を、各薬物について 5 段階の希釈液に連続希釈し (アルギナーゼでは 2 0 、1 0 、5 、2 . 5 、1 . 2 5 I U / m l ; ラミブジンでは 8 0 0 、4 0 0 、2 0 0 、1 0 0 、5 0 μ g / m l 、1 つの濃度あたり 4 ウェル) 、5 % C O ₂ 下で 3 7 ° にてインキュベートし、薬物溶液を 4 日毎に

50

交換し（同じ濃度で）、第8日に培養培地を取り出し、-20℃で保存する。実験を2バッチで繰り返し、HBsAgおよびHBeAgについて別々に試験する。各ウェルについて計数装置を用いてcpm値を確認する。

【0025】

薬物有効性の計算：細胞対照群および異なる薬物濃度群のcpmの平均および標準偏差、P/N値ならびに抑制割合IC50およびSIを計算する。

【0026】

【数2】

$$\text{① 抗原抑制割合 (\%)} = \frac{\text{コントロール細胞cpm} - \text{薬物群のcpm}}{\text{コントロール細胞cpm}} \times 100 \quad 10$$

② 抗原の薬物抑制のIC50を計算

$$IC50 = \text{Antilog} \left(B + \frac{50 - B}{A - B} \times C \right)$$

$$A = \log > 50\% \text{薬物濃度} \quad B = \log < 50\% \text{薬物濃度} \quad C = \log \text{希釈回数} \quad 20$$

③ HBsAgおよびHBeAgに対する2.2.15細胞培養物におけるアルギナーゼのSI、細胞病理学的毒性による細胞の病理学的変化に従って計算

$$SI = \frac{\text{細胞病理学的毒性 TC50}}{IC50}$$

④ 異なる希釈物およびコントロール群におけるHBsAgおよびHBeAg間のcpm差をt-検定によって計算 30

【実施例4】

【0027】

2.2.15細胞DNAのアルギナーゼ抑制に関する試験

2.2.15細胞上清みからのHBV-DNAの抽出：200000細胞/mlの2.2.15細胞を24ウェルプレート上（1ml/ウェル）で成長させ、24時間のインキュベーション後に薬物を添加し、薬物溶液を4日毎に交換し（同じ濃度で）、薬物を培養物に添加した日から数えて8日間のインキュベーション後の細胞培養物から上清みを回収し、ポリエチレングリコールで沈殿させ、プロテイナーゼKで消化し、フェノール：クロロホルム：イソペンタノールで抽出し、無水エタノールによる核酸沈殿などの手順を行ない、真空乾燥し、TEバッファー中に再溶解して試料とする。 40

【0028】

ドットプロット：ドットの配置：20μl試料（25μg DNA含有）を採取し、変性させ、中和し、20×SSCバッファーで1：8希釈までニトロセルロース膜上で連続希釈し、オープン乾燥し、予備ハイブリダイズさせ、ハイブリダイズさせ、膜を洗浄し、放射能自己曝露（radioactive self exposure）などの手順を行なう。慣用法によりX線フィルムを現像する。現像したフィルムをスキャナーでスキャンし、Gel-Proソフトウェアにより密度を測定し、抑制率（rate）およびIC50を計算する。

【0029】

【数 3】

IOD-TIOD

$$2.2.15 \text{細胞培養物培地中におけるHBV-DNA抑制} = \frac{\text{IOD-TIOD}}{\text{CIOD}} \times 100\%$$

【0030】

サザンブロット：2.2.15細胞からのHBV-DNAの抽出：薬物を添加して2.2.15細胞を8日間インキュベートし、培地を除去して細胞を回収し、細胞を溶解溶液により溶解し、等量のフェノール：クロロホルム：イソペンタノールで2回抽出し、無水エタノールを添加して核酸を沈殿させ、真空乾燥し、20μl TEバッファーに再溶解し、DNA試料バッファーを添加し、試料をアガロースゲルに置いて電気泳動させる。電気泳動後、変性させ、中和し、膜に移す。オープン乾燥し、ハイブリダイズさせ、同じ回数 (the same time) ドットブロットに曝露する。現像したフィルムをスキナーでスキャンし、Gel-Proソフトウェアにより相対密度を解析し、抑制率およびIC50を計算する。

10

【0031】

結果

TC50およびTC0を、Reed-Muench法により計算する。上記の式に従ってHBsAgおよびHBeAg抑制を計算する。HBV-DNAのアガロースゲル電気泳動の相対密度を解析することにより、抑制率およびIC50を計算する。

20

【0032】

1. 2.2.15細胞培養物におけるアルギナーゼ毒性

B型肝炎ウイルス遺伝子でトランスフェクトしたヒト肝臓癌2.2.15細胞に対するアルギナーゼ毒性を観察するため、連続希釈した薬物溶液を、24時間のインキュベーション後の細胞培養物中に添加する。40IU/mlから開始し、続いて20、10、5、2.5IU/mlとし、薬物溶液を4日毎に8日間まで交換し、細胞病理学的変化を顕微鏡下で観察し、CPEを顕微鏡で確認する。結果：CPE法（8日間の薬物投与）によるB型肝炎ウイルス遺伝子でトランスフェクトしたヒト肝臓癌細胞2.2.15細胞におけるアルギナーゼ毒性：2つのバッチ実験において、TC50は40IU/mlであり、TC0は20±0μg/mlである。ラミブジン陽性コントロールでは、TC50は1198.97±97.50μg/mlであり、TC0は800±0μg/mlである（表1A参照）。

30

【0033】

2. HBeAgおよびHBsAgのアルギナーゼ抑制

TC0濃度のアルギナーゼおよびラミブジンを2.2.15細胞に添加し、8日後のHBsAgおよびHBeAgのcpm値を確認し、薬物抑制の有効性を計算する。実験結果については表2を参照のこと。

【0034】

2.1. HBeAgのアルギナーゼ抑制割合

2つのバッチでのアルギナーゼ実験：TC0 20IU/mlを10、5、2.5および1.25IU/mlに連続希釈し、各濃度の2.2.15細胞を8日間インキュベートする。上清みにおけるHBeAgの平均抑制割合は、20IU/mlで68.69±8.89%抑制；10IU/mlで60.73±17.49%抑制；5IU/mlで53.96±20.36%抑制；2.5IU/mlで51.83±14.16%抑制；1.25IU/mlで37.34%抑制である。平均IC50は6.37±0.45IU/mlであり、SIは6.30±0.45である。

40

【0035】

2.2 HBsAgのアルギナーゼ抑制割合

第1のバッチでのアルギナーゼ実験：20、10、5、2.5、1.25IU/mlの

50

濃度での 8 日間のインキュベーション後の 2 . 2 . 1 5 細胞培養物の細胞培養上清みにおける H B s A g の抑制割合は、それぞれ 4 9 . 1 6 %、4 7 . 9 7 %、4 2 . 2 9 % および 3 7 . 1 8 % である。I C 5 0 は 1 0 . 7 2 I U / m l であり、S I は 3 . 7 . 3 である。しかしながら、抑制割合は、第 2 のパッチでは低い。H B s A g に対する抑制割合は 5 0 % 未満であり、T C 0 濃度は 2 0 I U / m l に等しく、I C 5 0 > 2 0 I U / m l である。

【 0 0 3 6 】

2 . 3 . H B s A g および H B e A g に対するラミブジンの効果

ラミブジンを T C 0 濃度 8 0 0 μ g / m l から、それぞれ 4 0 0、2 0 0、1 0 0 および 5 0 μ g / m l まで連続希釈し、2 . 2 . 1 5 細胞に添加し、8 日間のインキュベーション後の H B s A g および H B e A g の力価を確認し、抑制の効果を計算する（表 1 B 参照）。

10

【 0 0 3 7 】

2 . 4 . H B e A g のラミブジン抑制割合

8 0 0、4 0 0、2 0 0、1 0 0 および 5 0 μ g / m l の濃度のラミブジンとの 8 日間のインキュベーション後の 2 . 2 . 1 5 細胞培養物の細胞培養上清みにおける H B s A g の平均抑制割合は、8 . 2 3 \pm 3 . 0 2 %、1 2 . 9 9 \pm 0 . 4 6 %、1 7 . 8 3 \pm 2 . 0 9 %、1 5 . 8 4 \pm 2 . 3 3 %、1 4 . 1 0 \pm 1 . 2 7 % である。有意な抑制は示されていない。

【 0 0 3 8 】

20

2 . 5 . H B s A g のラミブジン抑制割合

8 0 0、4 0 0、2 0 0、1 0 0 および 5 0 μ g / m l の濃度のラミブジンとの 8 日間のインキュベーション後の 2 . 2 . 1 5 細胞の細胞培養上清みにおける H B e A g の平均抑制割合は、4 . 6 5 \pm 6 . 5 8 %、4 . 0 5 \pm 5 . 7 3 %、5 . 6 7 \pm 4 . 7 0 %、8 . 6 0 \pm 4 . 8 8 %、3 . 4 5 \pm 3 . 9 5 % である。有意な抑制は示されていない。

【 0 0 3 9 】

【表 1】

表1A. 2. 2. 15細胞におけるHBsAgおよび(ad)HBeAgのアルギナーゼ抑制(%)

薬物	実験バッチ	薬物添加 日数	薬物濃度 IU/ml	HBeAg (CPM)			HBsAg (CPM)		
				抑制%	IC50 IU/ml	SI	抑制%	IC50 IU/ml	SI
アルギナーゼ	1	8	20	74.9808	6.69	5.98	49.1558	10.72	3.73
			10	73.0985			47.9651		
			5	68.3484			42.2871		
			2.5	61.8387			37.1787		
	2	8	20	62.4033	6.05	6.61	10.4731	>20.00-	-
			10	48.3596			6.0761		
			5	39.5618			1.4739		
			2.5	41.8149			2.6703		
			1.25	37.3426			4.463		
	2つのバッチの平均		20	68.69±8.89	6.37±0.45	6.30±0.45	29.81±27.35	第1のバッチ 10.72	第2のバッチ >20 等しくない
			10	60.73±17.49			27.02±29.62		
			5	53.96±20.36			21.88±28.86		
			2.5	51.83±14.16			19.92±24.40		
			1.25	37.34			4.46		

表1B. 2. 2. 15細胞におけるHBsAgおよびHBeAgのラミブジン抑制(%)

薬物	実験バッチ	薬物添加 日数	薬物濃度 μg/ml	HBeAg (CPM)			HBsAg (CPM)		
				抑制%	IC50 μg/ml	SI	抑制%	IC50 μg/ml	SI
ラミブジン	1	8	800	6.10	>800		0	>800	
			400	12.67			8.10		
			200	16.35			2.35		
			100	17.48			12.05		
			50	13.20			6.24		
	2	8	800	10.37	>800		9.299	>800	
			400	13.32			0		
			200	19.31			8.99		
			100	14.19			5.15		
			50	14.99			0.65		
	2つのバッチの平均	8	800	8.23±3.02	>800±0 TC0 800 μg/ml 有意な抑制は 示されず		4.65±6.58	>800±0 TC0 800 μg/ml 有意な抑制は 示されず	
			400	12.99±0.46			4.05±5.73		
			200	17.83±2.09			5.67±4.7		
			100	15.84±2.33			8.6±4.88		
			50	14.10±1.27			3.45±3.95		

【0040】

3. 2. 2. 15細胞培養物の上清みにおけるHBV-DNAのアルギナーゼおよびラミブジン抑制

3. 1 2. 2. 15細胞培養物の上清みにおけるHBV-DNAにおけるアルギナーゼドットプロット

2.2.15 細胞培養物の上清みにおけるHBV-DNAに対するアルギナーゼの効果、8日間のインキュベーション後のHBV-DNAに対する試験溶液の2つのバッチのIC50は、16.04、10.31 IU/mlである。平均IC50は13.18±4.05 IU/mlであり、SIは2.49、3.88であり、平均は3.19±0.98である。結果については表2を参照のこと。

【0041】

【表2】

表2. 2.2.15細胞培養物の上清みにおけるHBV-DNAに対するアルギナーゼの効果

バッチ	薬物添 加日数	薬物濃度 ($\mu\text{g/ml}$)	希釈係数/細胞培養上清みにおけるHBV-DNAの抑制割合			
			原液 (IOD)	抑制%	IC50($\mu\text{g/ml}$)	SI
1	8	20	1643.3	30.8113	16.04	2.49
		10	1680.6	29.2409		
		5	2090.38	11.9877		
		2.5	1783.34	24.9152		
		コントロール	2375.1			
2	8	20	2430.14	47.7577	10.31	3.88
		10	2881.48	38.0549		
		5	2613.11	43.8243		
		2.5	4118.31	11.466		
		1.25	3917.78	15.7769		
		コントロール	4651.67			
2つのバッチの平均					13.18 \pm 4.05	3.19 \pm 0.98

10

20

【0042】

3.2 2.2.15 細胞培養物の上清みにおけるHBV-DNAに対するラミブジンの効果

30

第1のバッチ実験の2.2.15細胞培養物の上清みにおけるHBV-DNAに対するラミブジンの効果：IC50は113.76 $\mu\text{g/ml}$ であり、TC50は1198.97±97.50 $\mu\text{g/ml}$ であり、SIは10.54である。表3の結果を参照のこと。

【0043】

【表 3】

薬物	薬物添加 日数	薬物濃度 ($\mu\text{g/ml}$)	希釈係数/細胞培養上清みにおけるHBV-DNAの抑制割合			
			CPM	抑制%	IC50 ($\mu\text{g/ml}$)	SI
ラミブジン	8	800	663.013	82.5903	113.76	10.54
		400	795.628	79.1083		
		200	1080.03	71.6404		
		100	1465.31	61.5237		
		50	2831.21	25.6576		
		コントロール	3808.34			

表3. 2. 2. 15細胞培養物の上清みにおけるHBV-DNAに対するラミブジンの効果

【0044】

3. 3. 2. 2. 15細胞におけるHBV-DNA Southern Blotのアルギナーゼおよびラミブジン抑制

3. 3. 1 アルギナーゼによる2. 2. 15細胞におけるHBV-DNA Southern Blotの抑制

結果は、2. 2. 15細胞における全HBV-DNA Southern Blotの結果は、添加したアルギナーゼとの8日間のインキュベーション後、完全に抑制されることを示す：実験の2つのバッチのIC50は、25.42、14.17 IU/mlであり、平均IC50は19.79 \pm 7.95であり、SIはそれぞれ1.57および2.82であり、平均は2.19 \pm 0.88である。2. 2. 15細胞における全HBV-DNA Southern Blot In Laneの結果：実験の2つのバッチのIC50は21.45、18.67 IU/mlであり、平均は20.06 \pm 1.96 IU/mlであり、SIは1.86、2.14であり、平均は2.00 \pm 0.20である。表4の結果を参照のこと。

【0045】

【表 4】

表4. 2. 2. 15細胞におけるHBV-DNA Southern Blotのアルギナーゼ抑制

バッチ	薬物 添加 日数	薬物濃度 IU/ml	合計 (IOD)	抑制%	IC50 $\mu\text{g/ml}$	SI	In Lane (IOD)	抑制%	IC50 IU/ml	SI
1	8	20	25011	14.9893	25.42	1.57	31436	25.2982	21.45	1.86
		10	24234	17.6303			32499	22.7722		
		5	20104	31.6679			28796	31.5717		
		2.5	21650	26.4131			28762	31.6525		
		コントロール	29421				42082			
2	8	20	34433	47.9416	14.17	2.82	46760	38.6255	18.67	2.14
		10	46884	29.1172			66241	13.0559		
		5	46283	30.0259			61655	19.0752		
		2.5	68619	0			88350	38.6255		
		コントロール	66143				76188			

【0046】

3.3.2 ラミブジンによる2.2.15細胞におけるHBV-DNA Southern Blotの抑制

結果は、ラミブジンによる2.2.15細胞における全HBV-DNA Southern Blotの抑制効果を示す：実験の2つのバッチのIC50は84.27、93.28 $\mu\text{g}/\text{ml}$ であり、平均は88.78 \pm 6.37 $\mu\text{g}/\text{ml}$ であり、TC50は1198.97 $\mu\text{g}/\text{ml}$ であり、SIはそれぞれ14.23および12.85であり、平均は13.54 \pm 0.97である（表5参照）。

【0047】

【表5】

表5. 2.2.15細胞におけるHBV-DNA Southern Blotのラミブジン抑制

バッチ	薬物添 加日数	薬物濃度 ($\mu\text{g/ml}$)	合計 (IOD)	抑制%	IC50 $\mu\text{g/ml}$	SI
1	8	800 $\mu\text{g/ml}$	143.91	90.50	84.27	14.23
		400	317.332	70.04		
		200	366.35	75.80		
		100	491.77	67.52		
		50	748.91	50.54		
		コントロール	1514.08			
2	8	800 $\mu\text{g/ml}$	509.85	79.01	93.28	12.85
		400	804.63	66.87		
		200	589.01	75.75		
		100	1002.21	58.74		
		50	710.239	70.76		
		コントロール	2428.92			
2つのバッチの平均					88.78 \pm 6.37	13.54 \pm 0.97

【0048】

考察

実験により、8日間の添加薬物のインキュベーション後、B型肝炎ウイルスでトランスフェクトしたヒト肝臓癌細胞2.2.15細胞株に対するアルギナーゼおよび抗B型肝炎ウイルス陽性コントロール薬物ラミブジンの毒性、細胞培養上清みにおけるHBsAgおよびHBeAg分泌（and）の抑制、ならびに細胞におけるHBV-DNAの抑制が観察される。概要については表6を参照のこと。

【0049】

【表 6】

表6. 2. 2. 15細胞におけるHBV-DNAに対するアルギナーゼおよびラミブジンの効果の概要

薬物	細胞毒性		HBeAg		HBsAg		細胞培養上清み HBV-DNA		細胞HBV-DNA サザンブロット			
	TC50	TC0	IC50 IU/ml	SI	IC50 IU/ml	SI	IC50 μg/ml	SI	IC50 μg/ml	SI	IC50 μg/ml	SI
アルギナーゼ	40	20±0	6.37± 0.45	6.30± 0.45	①10.72 ②> 20	①3.73 ②≦1	13.18± 4.05	3.19± 0.98	19.79± 7.95	2.19± 0.88	20.06± 1.96	2.00± 0.20
ラミブジン	1198.97 ±97.50	800± 0 μg/ml	>800 μg/ml		-		>800 μg/ml	-	113.76	10.54	88.78± 6.37	13.54± 0.97

注釈:①第1のバッチ, ②第2のバッチ

【0050】

1. 2. 2. 15細胞に対するアルギナーゼ毒性

アルギナーゼのTC50は40IU/mlであり、TC0は20±0IU/mlである。

【0051】

陽性コントロールラミブジンのTC50は1198.97±97.50μg/mlであり、TC0は800±0μg/mlである。

【0052】

2. 2. 2. 15細胞におけるHBsAgおよびHBeAgの分泌のアルギナーゼおよびラミブジン抑制

TC0 20IU/mlアルギナーゼの4つの濃度を連続希釈し、2. 2. 15細胞に添加して8日間インキュベートする。HBeAg分泌に関する実験の2つのバッチの平均抑制割合は68.69±8.89%であり、HBeAgに対するIC50は6.37±0.45IU/mlであり、SIは6.30±0.45である。HBsAgの抑制割合は29.81±27.35%であり、HBsAgに対するIC50は、第1のバッチで10.72IU/mlであり、SIは3.73であり第2のバッチで20IU/mlである。

【0053】

抑制割合は50%未満であり、IC50>20IU/mlであり、SI: 1である。実験の2つのバッチの平均はとらなかった。

【0054】

HBeAgおよびHBsAgについて、2. 2. 15細胞培養物にTC0 800μg/mlのラミブジンを添加して8日間インキュベートすることによる有意な抑制作用はない。有効濃度の半分およびSIは、計算することができない。

【0055】

3. 2. 2. 15細胞におけるHBV-DNAのアルギナーゼおよびラミブジン抑制結果は、薬物を添加して8日間インキュベーションした後の細胞培養物の上清みのHBV-DNA Dot BlotにおけるアルギナーゼのIC50は13.18±4.05IU/mlであり、SIは3.19±0.98であること、8日後のHBV-DNA Southern BlotにおけるIC50は19.79±7.95IU/mlであり、SIは2.19±0.88であること、薬物を添加して8日後のHBV-DNA Dot Blot In LaneにおけるIC50は20.06±1.96μg/mlであり、SIは2.00±0.20であることを示す。

【0056】

HBV-DNA Dot BlotにおけるラミブジンのIC50は113.76μg/mlであり、SIは10.54である。Southern blotの抑制において、

10

20

30

40

50

実験の両方のバッチのIC50は84.27および93.28 $\mu\text{g}/\text{ml}$ であり、平均は88.78 \pm 6.37 $\mu\text{g}/\text{ml}$ であり、TC50は1198.97 $\mu\text{g}/\text{ml}$ であり、SIは、それぞれ14.23および12.85であり、平均は13.54 \pm 0.97である。

【0057】

本明細書で用いる場合および添付の特許請求の範囲において、単数形態「a」および「the」は、本文中で特に明白な記載のない限り、複数の指示対象物を含むことに留意されたい。したがって、例えば、「単数形の医薬調製物 (a pharmaceutical preparation)」に対する言及は、異なる調製物の混合物を含み、「処置方法 (the method of treatment)」に対する言及は、当業者などにはわかる均等な工程および方法に対する言及を含む。

10

【0058】

特に記載のない限り、本明細書で用いるすべての科学技術用語は、本発明が属する技術分野の当業者が一般に理解するものと同じ意味を有する。本明細書に記載したものの類似または同等な任意の方法および材料が本発明の実施または試験において使用され得るが、好ましい方法および材料を以下に記載する。本明細書に挙げたすべての刊行物は、引用により本明細書に組み込まれ、具体的な情報を記載および開示する。これらの参考文献は、該情報との関連で本明細書に挙げた。本発明を十分に記載したが、その範囲内に含まれる修正は当業者に自明である。かかる修正はすべて、本発明の範囲内に含まれる。

20

【0059】

本発明の医薬組成物の製剤は、固形物、溶液、エマルジョン、分散液、ミセル、リポソームなどの形態で使用され得、ここで、得られる製剤は、1種類または複数の修飾ヒトアルギナーゼを本発明の実施における活性成分として、経腸または非経口適用に適した有機系または無機系の担体または賦形剤との混合物で含有する。活性成分は、アルギナーゼであり得、例えば、錠剤、ペレット剤、カプセル、坐剤、液剤、乳剤、懸濁剤、および固形、半固形または液状形態の調製物の製造における使用に適した任意の他の形態のための通常の無毒性の医薬的に許容され得る担体を伴い得る。助剤に加え、安定剤、増粘剤および着色剤ならびに香料が使用され得る。1種類または複数のアルギナーゼ活性成分が医薬製剤内に、標的となるプロセス、症状または疾患に対して所望の効果をもたらすのに十分な量で含まれる。

30

【0060】

本明細書において想定する活性成分を含有する医薬製剤は、経口使用に適した形態、例えば、錠剤、トローチ剤、舐剤、水性もしくは油状懸濁剤、分散性の粉剤もしくは顆粒剤、乳剤、硬質もしくは軟質カプセル、またはシロップ剤もしくはエリキシル剤などであり得る。経口使用が意図される製剤は、医薬製剤の製造のための当該技術分野で知られた任意の方法に従って調製され得る。錠剤は、コーティングがなくてもよく、胃腸管内での崩壊および吸収を遅延させ、それにより、長時間にわたる持続作用を提供するために、公知の手法によってコーティングしてもよい。該錠剤はまた、制御放出のための浸透圧性治療用錠剤を形成するためにコーティングされ得る。

40

【0061】

場合によっては、経口使用のための製剤は、活性成分が不活性固体希釈剤、例えば、炭酸カルシウム、リン酸カルシウム、カオリンなどと混合された硬質ゼラチンカプセルの形態であり得る。該錠剤はまた、活性成分が水または油媒体、例えば、ピーナッツ油、液状パラフィンもしくはオリーブ油と混合された軟質ゼラチンカプセルの形態であり得る。

【0062】

医薬製剤はまた、滅菌された注射用の溶液または懸濁液の形態であり得る。この懸濁液は、適当な分散剤または湿潤剤および懸濁剤を用い、公知の方法に従って製剤化され得る。また、滅菌された注射用調製物は、無毒性の非経口用に許容され得る希釈剤または溶媒中での滅菌された注射用の溶液または懸濁液、例えば、1, 4-ブタンジオールの溶液であり得る。滅菌された固定油は、溶媒または懸濁媒体として慣用的に使用されているもの

50

である。この目的のため、任意のブランド固定油が使用され得、合成のモノ - もしくはジグリセリド、脂肪酸（オレイン酸など）、天然に存在する植物油、例えば、ゴマ油、ココナッツ油、ピーナッツ油、綿実油など、または合成脂肪族ビヒクル、例えば、オレイン酸エチルなどが挙げられる。緩衝剤、デキストロース溶液、保存剤、抗酸化剤などが、必要に応じて、可溶性酵素を溶解するために溶質として組み込まれるか、または使用され得る。

【 0 0 6 3 】

医薬製剤はまた、他の化学療法剤と併用する付加処置であり得る。

【図面の簡単な説明】

【 0 0 6 4 】

【図 1 A】図 1 A、1 B および 1 C は、ヒトアルギナーゼ I の核酸配列および対応するアミノ酸配列である。図 1 A は、プラスミド p A B 1 0 1 の E c o R I / M u n I 部位から X b a I 部位までの核酸配列（配列番号 1）である。核酸（n t）1 ~ 6 は E c o R I / M u n I 部位；n t 4 8 1 ~ 4 8 6 はプロモーター 1 の 3 5 までの領域；n t 5 0 4 ~ 5 0 9 はプロモーター 1 の 1 0 までの領域；n t 5 4 4 ~ 5 4 9 はプロモーター 2 の 3 5 までの領域；n t 5 6 6 ~ 5 7 1 はプロモーター 2 の 1 0 までの領域；n t 6 0 0 ~ 6 0 5 はリボソーム結合部位；n t 6 1 4 ~ 6 1 6 は開始コドン；n t 6 3 2 ~ 6 3 7 は N d e I 部位；n t 1 6 0 1 ~ 1 6 0 3、停止コドン；n t 1 9 9 7 ~ 2 0 0 2 は X b a I 部位。

【図 1 B】図 1 A、1 B および 1 C は、ヒトアルギナーゼ I の核酸配列および対応するアミノ酸配列である。図 1 B は、修飾ヒトアルギナーゼの核酸配列（配列番号 2）およびその対応するアミノ酸配列（配列番号 3）である。図 1 A の核酸 6 1 4 ~ 1 6 0 3 は、修飾アルギナーゼアミノ酸配列のコード領域である。N 末端上の 6 個のヒスチジン（配列番号 4）を下線で示す。翻訳停止コドンに * を付す。

【図 1 C】図 1 A、1 B および 1 C は、ヒトアルギナーゼ I の核酸配列および対応するアミノ酸配列である。図 1 C は、通常のヒトアルギナーゼ I の核酸配列（配列番号 8）およびその対応するアミノ酸配列（配列番号 9）である。

10

20

【図 1 A】

```

1 gaattgtacg toaaagagat gaagcagana aacgtgtcgt agaagaagot gaaagcaaaa
61 aagtgaatg cgaggaagat coaagaatg ggtgattga ggtgtctat ttcaacaaa
121 acggagaata ttatctgaa taaagatct cgggactgc tcttgtaat gctcttgtta
181 atttaagga tatgtacata acpaataggt tgtgtaaac agggagatta tatcttgtta
241 aggttaagaa atttgaata gtatactatt cttccatga cgtgaasaat caaagaatta
301 taacagaatg ggaatcact cccagagag ctttacccga acaatitgat toataagaac
361 taatagttag ogctttccaa tggagagcgt tctttattcg gttagttaga tacaactaaa
421 gatgttcagg tgcacatag catgtgagga aggaagcgt ttaggggga gggaaacctt
481 taacacgtct taatccctct tgaatttag tctctgttaa actggtctcg gtaaatctca
541 ggtatgacaa togcgcgtta acggctttag ttccgggggca gtttagaag aaatatgattg
601 agggatttca tagatgctca acatcccca tcatatgag gccaaatgcca gaacctaggy
661 gattattgga gctccttctt caaaggagca gccacagaga ggtgtggaag aagccctacg
721 agtattgaga aaggtgtgtc tgcctgaga aattaagaag caagagtgtg atgtgaagga
781 tataggggac ctgcctcttg ctgacatcca taatgacagt ccccttccaa ttgtgaagaa
841 tccaggtct ctgaggaaag caagcagcga gctggtgtgc aaggtggcac aagtcagaa
901 gaacggagaa atcagcctgy tgcctgggcy agaccaagat ttggcaattg gaacatctc
961 tggcaatgco aggttccaco ctgctcttgg agtcatctgy gtcgatctgc acaatgatat
1021 caacatcca ctgcaacaa caagtggaaa ctgcaatgga caacctgtat cttaactct
1081 gaaggaacta aaaggaaga ttccagatgt gccagatgc tccctgggga ctccctgtat
1141 atctgccaa gatatgtgtg atattggttt gagagacgtg gaacctgggy aaactacat
1201 ttgaaacact ctaggacta aatacttctt aatgactgaa gtcgacagac taggaattg
1261 caagttgatg gaagaaacac toagctatct actggaaga aagaagaagg caatctctt
1321 aagtttgtat gttgaggaac tgaaccatc tttaacaca gctactgga caacagtgt
1381 gggaggtctg acatacagag aaggtctcta catcacaga gaaatctaca aaacaggtct
1441 actctcagga ttgatataa tgaagtgaa ccaatcctgt gggagagcca cagaagaagt
1501 aactcagaa ctgcaacacag cagtgcact aacctggct tgtttggac ttgtcggga
1561 ggtbaatcac aagctattg actacctaa cccactaag taagtgtga aaactccagt
1621 ataaactctt agttatag cctaattaga agtatacca ttctcttag catagagta
1681 tccctctcaa gacttgtct ttcaagaaa ttttttcca atagtataa actctacaa
1741 ttccctcttg gttgaasat caagtgtgy aaattcaac tttttgaaa tttaaaagt
1801 tatattttct aacttgcga aagctatct cttgaaga gaagtgtaca ttgatttca
1861 ataaactt ttgtgtgttt aaataaag acaattact agccctcat aatagatg
1921 ggaactcttg aatcaggaga caagctacc acatgtgaa aggtatctg ttgtccatgt
1981 attcaaaaaa tgtgattcta ga

```

図 1A

【図 1 B】

```

1 atgcatcaccatccacatcat
M N H H H S H
22 atgagcgccaggtccagacccataggtatttgagctccttc
M S A K S R T I G I I G A P F
67 toaaagggacagccagagaggggtggaagaagccctacagta
S K S Q P R G G V E E G P T V
112 ttggaagaaggtctcgtctgttggaacattaaagacaaagagtg
L R K A G L L E K L K E Q E C
157 gatgtgaaggtatttggaagctgccttctgtgacatccat
D V K D Y G D L P F A D I P N
202 gacagtccttccaaattgtgaagaatccaaggtctgtgggaaa
D S P F Q I V K N P R S V G K
247 gcaagcgagcagctggctggcaagtgccacaaagtcagaagaac
A S E Q L A G K V A Q V Y K N
292 ggaagaatcagcctgggtgtggcggaagacacagtttgcaatt
G R I S L V L G G D H S L A I
337 ggaagcatctctgacctgcagaggtccacctgattctggagtc
G S I S G H A R V H P D L G V
382 atctgggtggtatgctacactgatatacaactccactgacaccc
I M V D A H T D I N T P L T T
427 acagtggaactgcatggaacacactgatcttctctctgaag
T S G N L H G Q P V S F L L K
472 gaactaaaggaagattcccgatgtccagagttctctcgggtg
E L K G M I P D V P G F S W V
517 actccctgtatctgcacaggtatgtgtatatttgcttgaga
T P C I S A K D I V Y I G L R
562 gacgtggacctgggaacactactttgaaactctaggatt
D V D P G S H Y I L K T L G I
607 aatactttcaatgactgaagtgaagactaggaattggcaag
K Y F S M T E V D R L G I G K
652 gctgtggaagaactccagctatctctggaagaaagaagg
V M E E T L S Y L L G R K K R
697 caaattcatatagtttgtatgtgacgactggacctcttctt
P I H L S F D V D G L D P S F
742 acacacactactggaacacagctgtggaggtctgacatcaga
T P A T G T P V V G G L T Y R
787 gaaggtctctacatcagaagaactatcaaaacagggctactc
H G L Y I T E E I Y K T G L L
832 cagagattagataaagggaagtcacacactccctgggaagaca
S G L D I M E V N P S L G K T
877 ccagagaagatgactggaagtcgaacagcagctgtgaataacc
P E E V T R T V N T A V A I T
922 ttgctgtgttgcagcttctcgtggggaggtaatcagaagcctatt
L A C F G L A R E G N H K P I
967 gactacattaacccctaatgtaa 990
D Y L N P P K *

```

図 1B

【図 1 C】

```

1 atgagcgccaggtccagacccataggtatttgagctccttctc
M S A K S R T I G I I G A P F
46 toaaagggacagccagagaggggtggaagaagccctacagta
S K S Q P R G G V E E G P T V
91 ttggaagaaggtctcgtctgttggaacattaaagacaaagagtg
L R K A G L L E K L K E Q E C
136 gatgtgaaggtatttggaagctgccttctgtgacatccat
D V K D Y G D L P F A D I P N
181 gacagtccttccaaattgtgaagaatccaaggtctgtgggaaa
D S P F Q I V K N P R S V G K
226 gcaagcgagcagctggctgcagagtgccacagtcagaagaac
A S E Q L A G K V A Q V Y K N
271 ggaagaatcagcctgggtgtggcggaagacacagtttgcaatt
G R I S L V L G G D H S L A I
316 ggaagatctctgccaagtcgaaggtccacctgatctcggagtc
G S I S G H A R V H P D L G V
361 atctgggtggtatgctacactgatctcaactccactgacaccc
I M V D A H T D I N T P L T T
406 acagtggaactgcatggaacacactgatcttctctctgaag
T S G N L H G Q P V S F L L K
451 gaactaaaggaagattcccgatgtgcagagttctcctcgggtg
E L K G K I P D V P G F S W V
496 actccctgtatctgcacaggtatgtgtatatttgcttgaga
T P C I S A K D I V Y I G L R
541 gaagtggaacctgggaacactaatttgaacactcaggatct
D V D P G S H Y I L K T L G I
586 aaatactttctaatgactgaagtggacagactaggaattggcaag
K Y F S M T E V D R L G I G K
631 gttgtggaagaacactccagctatctctcagggaagaagaagg
V M E E T L S Y L L G R K K R
676 caaattcatatagtttgtatgtgacgactggacctcttctt
P I H L S F D V D G L D P S F
721 acacacactactggaacacagctgtggaggtctgacatcaga
T P A T G T P V V G G L T Y R
766 gaaggtctctacatcagaagaactatcaaaacagggctactc
E G L Y I T E E I Y K T G L L
811 cagagattagataaagggaagtcacacactccctgggaagaca
S G L D I M E V N P S L G K T
856 ccagagaagatgactggaagtcgaacagcagctgtgaataacc
P R E V T R T V N T A V A I T
901 ttgctgtgttgcagcttctcgtggggaggtaatcagaagcctatt
L A C F G L A R E G N H K P I
946 gactacattaacccctaatgtaa 969
D Y L N P P K *


```

図 1C

【配列表】

2008512399000001.app

【 国际調查報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/CN2005/001411
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
IPC7:A61K38/46,A61P1/16		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)		
IPC7: A61K38, A61P1		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
CNKI, MEDLINE, CA		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)		
CNPAT, CNKI and keywords: ARGINASE, HEPATITIS WPI, EPODOC, PAJ, MEDLINE, CA and keywords: ARGINASE, HEPATITIS GENEBANK: sequence search based on SEQ ID NO: 3		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO2004001048A1 (BIO-CANCER TREATMENT INTERNATIONAL LIMITED (CHINA)) 31.DEC 2003 (31.12.2003) claims, sequences list.	15-17,19-24
A	CN1140588A (HAO,Wenxue (CHINA)) 22.JAN 1997 (22.01.1997) all the text	2-4,6-13
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim (S) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 16.NOV 2005(16.11.2005)		Date of mailing of the international search report 08 · DEC 2005 (08 · 12 · 2005)
Name and mailing address of the ISA/CN The State Intellectual Property Office, the P.R.China 6 Xitucheng Rd., Jimen Bridge, Haidian District, Beijing, China 100088 Facsimile No. 86-10-62019451		Authorized officer  Telephone No. (86-10)62085090

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2005/001411

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☒ Claims Nos.: 1, 5, 14, 18, 25-29
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
these claims relate to the use or pharmaceutical compositions of arginine degradative enzyme or arginine deiminase. However the tests in description are only based on arginase. These enzymes don't have just the same character as that of arginase. So the results of these enzymes can't be deduced from the description. Thus claims 1,5,14,18,25-29 are not supported by the description and don't meet the criterion mentioned in article 6 PCT.

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:


1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fees, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

International application No.
PCT/CN2005/001411

Patent Documents referred in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
WO2004001048	31.12.2003	AU2002325782 A1	06.01.2004

国际检索报告		国际申请号 PCT/CN2005/001411
A. 主题的分类 IPC7: A61K38/46, A61P1/16 按照国际专利分类表(IPC)或者同时按照国家分类和 IPC 两种分类		
B. 检索领域 检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号) IPC7: A61K38, A61P1		
包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献 CNKI, MEDLINE, CA		
在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称, 和使用的检索词(如使用)) CNPAT, CNKI 和关键词: 精氨酸酶, 肝炎 WPI, EPODOC, PAJ, MEDLINE, CA 和关键词: ARGINASE, HEPATITIS GENE BANK: 根据氨基酸序列 SEQ ID NO: 3 的序列检索		
C. 相关文件		
类 型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求
X	WO2004001048A1 (BIO-CANCER TREATMENT INTERNATIONAL LIMITED (中国)) 31.12 月 2003 (31.12.2003) 权利要求, 序列表	15-17, 19-24
A	CN1140588A (郝文学 (中国)) 22.1月 1997 (22.01.1997) 全文	2-4, 6-13
<input type="checkbox"/> 其余文件在 C 栏的续页中列出。 <input checked="" type="checkbox"/> 见同族专利附件。		
* 引用文件的具体类型: "A" 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件 "E" 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利 "L" 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件 "O" 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件 "P" 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件 "T" 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了理解发明之理论或原理的在后文件 "X" 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性 "Y" 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性 "&" 同族专利的文件		
国际检索实际完成的日期 16.11 月 2005 (16.11.2005)		国际检索报告邮寄日期 08.12月2005 (08.12.2005)
中华人民共和国国家知识产权局(ISA/CN) 中国北京市海淀区衙门桥西土城路 6 号 100088 传真号: (86-10)62019451		受权官员  电话号码: (86-10)62085090

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2005/001411

第II栏 关于某些权利要求不能作为检索主题的意见(接第1页第2项)

按条约 17(2)(a)对某些权利要求未作国际检索报告的理由如下:

1. ☐ 权利要求:

因为它们涉及到不要求本国际检索单位进行检索的主题,即:

2. ☒ 权利要求: 1, 5, 14, 18, 25-29

因为它们涉及到国际申请中不符合规定的要求的部分,以致不能进行任何有意义的国际检索,

具体地说:

这些权利要求涉及精氨酸降解酶和精氨酸脱亚胺酶的用途或药物组合物,说明书仅仅对精氨酸酶进行了试验,而这些酶的性质与精氨酸酶不完全相同,从说明书中不能推出这些酶的效果,因此,权利要求 1, 5, 14, 18, 25-29 得不到说明书的支持,不符合 PCT6 的规定。

3. ☐ 权利要求:

因为它们是从属权利要求,并且没有按照细则 6.4(a)第 2 句和第 3 句的要求撰写。

第III栏 关于缺乏发明单一性时的意见(接第1页第3项)

本国际检索单位在该国际申请中发现多项发明,即:

1. ☐ 由于申请人按时缴纳了被要求缴纳的全部附加检索费,本国际检索报告针对全部可作检索的权利要求。2. ☐ 由于无需付出有理由要求附加费的劳动即能对全部可检索的权利要求进行检索,本国际检索单位未通知缴纳任何附加费。3. ☐ 由于申请人仅按时缴纳了部分被要求缴纳的附加检索费,本国际检索报告仅涉及已缴费的那些权利要求。具体地说,是权利要求:4. ☐ 申请人未按时缴纳被要求的附加检索费。因此,本国际检索报告仅涉及权利要求中首次提及的发明;包含该发明的权利要求是:关于异议的说明: ☐ 申请人缴纳了附加检索费,同时提交了异议书,缴纳了异议费。☐ 申请人缴纳了附加检索费,同时提交了异议书,但未缴纳异议费。☐ 缴纳附加检索费时未提交异议书。

国际申请号
PCT/CN2005/001411

检索报告中引用的 专利文件	公布日期	同族专利	公布日期
WO2004001048	31.12.2003	AU2002325782 A1	06.01.2004

フロントページの続き

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW

(74)代理人 100109162

弁理士 酒井 將行

(72)発明者 鄭 寧 民

中華人民共和国香港梅道 1 2 号嘉富麗苑 1 座 6 楼 B 室

F ターム(参考) 4B024 AA01 BA11 CA02 EA04

4B050 CC02 CC03 DD11 GG05 JJ10 LL01

4C084 AA02 AA03 BA01 BA02 BA22 BA23 BA37 BA42 CA53 DC22

MA17 MA21 MA22 MA24 MA34 MA52 MA66 NA13 NA14 ZA752