



(19) 中華民國智慧財產局

(12) 發明說明書公告本

(11) 證書號數：TW I577386 B

(45) 公告日：中華民國 106 (2017) 年 04 月 11 日

(21) 申請案號：101119399

(22) 申請日：中華民國 101 (2012) 年 05 月 30 日

(51) Int. Cl. : A61K38/50 (2006.01)

A61K47/48 (2006.01)

(30) 優先權：2012/04/04 美國

61/620,368

(71) 申請人：普拉瑞斯集團 (開曼群島) POLARIS GROUP (KY)

臺北市內湖區瑞光路 631 號 4 樓

(72) 發明人：波瑪拉斯基 約翰 S BOMALASKI, JOHN S. (US) ; 吳伯文 WU, BOR-WEN (US)

(74) 代理人：陳長文

(56) 參考文獻：

CANCER RESEARCH 62, 5443-5450, October 1, 2002

CANCER RESEARCH: April 15, 2011; Volume 71, Issue 8, Supplement 1

審查人員：俞樹生

申請專利範圍項數：51 項 圖式數：16 共 116 頁

(54) 名稱

利用精胺酸去亞胺酶之治療方法

METHODS OF TREATMENT WITH ARGININE DEIMINASE

(57) 摘要

本發明概言之係關於利用精胺酸去亞胺酶且特別是聚乙二醇化精胺酸去亞胺酶治療癌症之方法。

The present invention relates generally to methods of treating cancer with arginine deiminase, and in particular pegylated arginine deiminase.

指定代表圖：

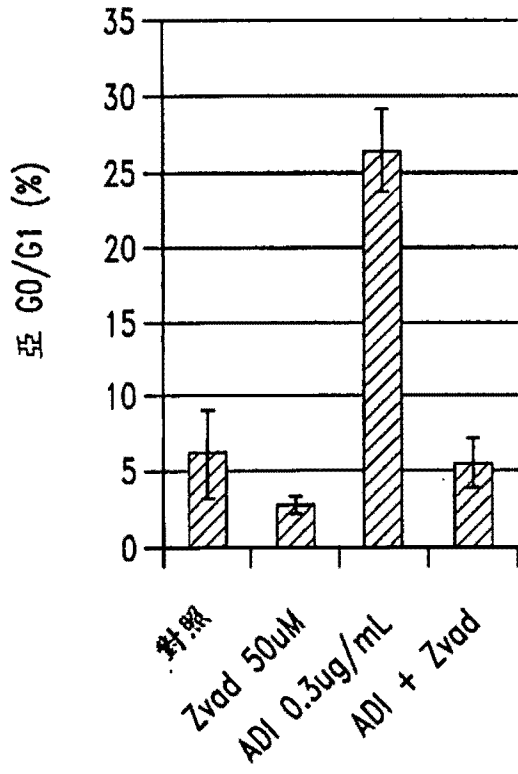


圖 2A

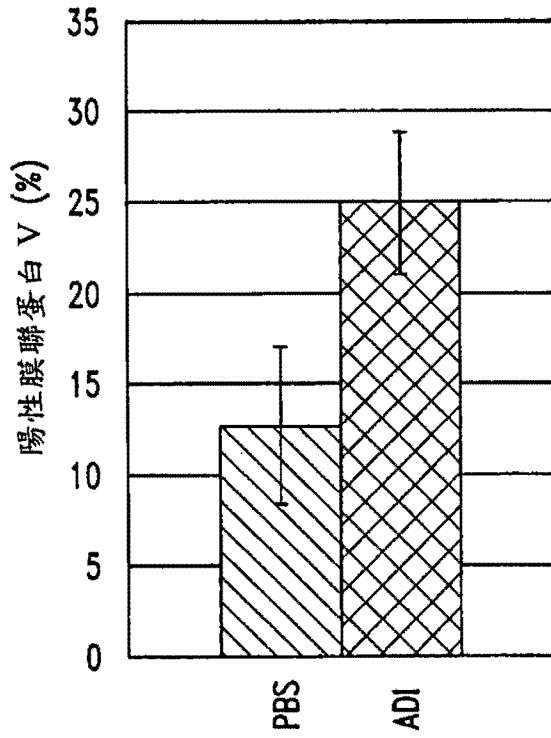


圖 2B

發明專利說明書

(本說明書格式、順序及粗體字，請勿任意更動，※記號部分請勿填寫)

※ 申請案號： 101119399

※ 申請日： 101.5.30

※IPC 分類： A61K38/50 (2006.01)

A61K 47/48 (2006.01)

A61P 35/02 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

一、發明名稱：(中文/英文)

利用精胺酸去亞胺酶之治療方法

METHODS OF TREATMENT WITH ARGININE DEIMINASE

二、中文發明摘要：

本發明概言之係關於利用精胺酸去亞胺酶且特別是聚乙二醇化精胺酸去亞胺酶治療癌症之方法。

三、英文發明摘要：

The present invention relates generally to methods of treating cancer with arginine deiminase, and in particular pegylated arginine deiminase.

四、指定代表圖：

(一)本案指定代表圖為：第 (2A及 2B) 圖。

(二)本代表圖之元件符號簡單說明：

(無元件符號說明)

五、本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式：

(無)

六、發明說明：

【發明所屬之技術領域】

本發明概言之係關於利用精胺酸去亞胺酶(ADI)且特定而言利用聚乙二醇化ADI (ADI-PEG)治療癌症之方法。

相關申請案之交互參照

本申請案主張於2012年4月4日提出申請之美國臨時申請案第61/620,368號之優先權，該申請案之全部內容以引用方式併入本文中。

【先前技術】

胺基酸抽離療法可有效治療一些癌症形式。迄今為止，存在一個與此途徑有關之已知臨床實例，其利用天門冬醯胺酶降低天門冬醯胺酸之循環含量並抑制蛋白質合成。此治療尤其有效地用於急性成淋巴細胞性白血病(Avramis 2005, Viera Pinheiro 2004)。急性成淋巴細胞性白血病細胞需要胺基酸天門冬醯胺酸進行生長及增殖。與之相比，大部分正常人類細胞能夠合成天門冬醯胺酸且不受天門冬醯胺酸空乏影響。因此，使用天門冬醯胺酶降低血清天門冬醯胺酸可選擇性地殺死癌細胞而不會危害正常細胞、組織及宿主。天門冬醯胺酶之大腸桿菌(*E. coli*)衍生形式已批准用於人類應用中。然而，天門冬醯胺酶僅發現於微生物中；此使得其在人類中具有高免疫原性且亦在注射後具有短血清半衰期(Avramis 2005)。為使天門冬醯胺酶成為更有效之藥物，藉由使用聚乙二醇(PEG)調配大腸桿菌衍生之天門冬醯胺酶以減小此酶之抗原性及相關過敏性反應

來將該等缺點降至最低。此外，PEG極大地延長了天門冬醯胺酶之循環半衰期，此減小了治療頻率及療法之總成本二者。已批准使用PEG調配之天門冬醯胺酶且以商品名 Oncaspar® 出售 (Oncaspar® 2011, Avramis 2005, Viera Pinheiro 2004, Fu 2007, Zeidan 2008)。

精胺酸係用於人類及小鼠之另一非必需胺基酸(其綜述參見Rogers 1994)。在人類中，可自瓜胺酸在兩個步驟中經由克氏(Krebs)(尿素)循環酶精胺琥珀酸合成酶(ASS, L-瓜胺酸:L-天門冬胺酸連接酶[形成AMP], EC 6.3.4.5)及精胺琥珀酸裂解酶(ASL, L-精胺琥珀酸精胺酸裂解酶, EC 4.3.2)來合成精胺酸。(Haines 2011, Wu 2009, Morris 2006, Husson 2003, Tapiero 2002, Rogers 1994)。ASS催化瓜胺酸及天門冬胺酸轉化成精胺琥珀酸鹽，精胺琥珀酸鹽然後由ASL催化轉化成精胺酸及富馬酸(圖1)。人類中缺少精胺酸之飲食並不誘發高血胺症、乳清酸尿症，且亦並不改變成人中全身一氧化氮(NO)合成之速率(Tapiero 2002, Castillo 1995, Rogers 1994, Carey 1987, Barbul 1986, Snyderman 1959, Rose 1949)。儘管早產兒似乎需要精胺酸(Wu 2004)，但精胺酸含量並不與嬰兒、兒童及青少年之年齡相關(Lücke 2007)。在1992年，Takaku及Sugimura分別報導，人類黑素瘤及肝細胞癌(HCC)細胞系似乎需要精胺酸以用於生長。其他研究展示，聚乙二醇化ADI可有效治療黑素瘤及肝細胞癌且具有較少不良效應。

主要使用三類療法：手術、輻射及化學療法中之一者或其組合來治療癌症。對於不能使用諸如手術、輻射及栓塞

等局部療法治療之癌症而言，全身性化學療法係唯一之治療選擇。然而，傳統化學療法不能區分正常細胞及癌細胞，此會引起顯著毒性及受限之效能。新一代全身性療法靶向經設計以藉由利用正常細胞及癌細胞之間之差異選擇性殺死癌細胞之療法。本發明提供治療癌症之此優點及其他優點。

參考文獻：Avramis VI, Panosyan EH. 2005。Clin Pharmacokinet 44:367-393；Barbul A. 1986. J Parenteral Enteral Nutr 10:227-238；Carey GP等人，1987. J Nutr 117:1734-1739；Castillo L等人，1995. Am J Physiol 268 (Endocrinol Metab 31):E360-367；Fu CH, Sakamoto KM. 2007. Expert Opin Pharmacother 8:1977-1984；Haines RJ等人，2011. Int J Biochem Mol Biol 2:8-23；Husson A等人，2003. Eur J Biochem 270:1887-1899；Lücke T等人，2007. Clin Chem Lab Med 45:1525-1530；Morris SM Jr. 2006. Am J Clin Nutr 83(增刊): 598S-512S；Rogers QR. 1994. In Proceedings from a Symposium Honoring Willard J. Visek-from Ammonia to Cancer and Gene Expression. Special Publication 86-1994年4月，Agriculture Experiment Station, University of Illinois, 211 Mumford Hall, Urbana, IL 61801，第9-21頁；Tapiero H等人，2002. Biomed Pharmacother 56:439- 445, 2002；Viera Pinheiro JP, Boos J. 2004. Br J Haematol 125: 117-127；Wu G等人，2009. Amino Acids 37:153-168；Wu G等人，2004. J Nutr

Biochem 15:442-451 ; Zeidan A 等人，2008. Expert Opin Biol Ther 9:111-119)。

【發明內容】

本發明之一態樣提供治療患者之白血病之方法，其包括向患者投與包括經由連接基團共價結合至聚乙二醇之ADI之化合物。在一實施例中，白血病係急性骨髓性白血病或復發性急性骨髓性白血病。在另一實施例中，白血病並非淋巴細胞性白血病或慢性骨髓性白血病。然而，在其他實施例中，白血病可包含淋巴細胞性白血病或慢性骨髓性白血病。在另一實施例中，精胺酸去亞胺酶共價結合至 5 ± 1.5 個直鏈PEG分子且將化合物調配成包括小於約0.5%原始ADI、小於約5%游離PEG或二者之組合物；其中每週一次以約 160 IU/m^2 至約 640 IU/m^2 之劑量投與精胺酸去亞胺酶；且其中白血病展現減小之ASS表現。

本發明之另一態樣提供治療患者之癌症之方法，其包括向患者投與自體吞噬抑制劑及包括經由連接基團共價結合至聚乙二醇之ADI之化合物，其中癌症係胰腺癌或小細胞肺癌。就此而言，自體吞噬抑制劑係選自由以下組成之群：氯喹(chloroquine)、3-甲基腺嘌呤、羥基氯喹、巴弗洛黴素A1(bafilomycin A1)、5-胺基-4-咪唑甲醯胺核苷(AICAR)、岡田酸(okadaic acid)、N6-巰基嘌呤核苷、渥曼青黴素(wortmannin)及長春鹼(vinblastine)。涵蓋業內已知之其他自體吞噬抑制劑以用於本文之方法中。在某些實施例中，ADI及自體吞噬抑制劑以加和方式或協同方式發揮

作用。在另一實施例中，精胺酸去亞胺酶共價結合至 5 ± 1.5 個直鏈PEG分子且將化合物調配成包括小於約0.5%原始ADI、小於約5%游離PEG或二者之組合物；其中每週一次以約 160 IU/m^2 至約 640 IU/m^2 之劑量投與精胺酸去亞胺酶；且其中癌症展現減小之ASS表現。

本發明之一態樣提供治療患者之癌症之方法，其包括向患者投與包括經由連接基團共價結合至聚乙二醇之ADI之化合物，其中癌症係選自由以下組成之群：乳癌、卵巢癌、結腸直腸癌、胃癌(gastric cancer)、神經膠質瘤、多形性膠質母細胞瘤、非小細胞肺癌(NSCLC)、腎癌、膀胱癌、子宮癌、食道癌、腦癌、頭頸癌、子宮頸癌、睪丸癌及胃癌(stomach cancer)。在一實施例中，精胺酸去亞胺酶共價結合至 5 ± 1.5 個直鏈PEG分子且將化合物調配成包括小於約0.5%原始ADI、小於約5%游離PEG或二者之組合物；其中每週一次以約 160 IU/m^2 至約 640 IU/m^2 之劑量投與精胺酸去亞胺酶；且其中癌症展現減小之ASS表現。

本發明之一態樣提供治療患者之黑素瘤之方法，其包括向患者投與包括經由連接基團共價結合至聚乙二醇之ADI之化合物與順鉑(cisplatin)之組合。在一實施例中，精胺酸去亞胺酶共價結合至 5 ± 1.5 個直鏈PEG分子且將化合物調配成包括小於約0.5%原始ADI、小於約5%游離PEG或二者之組合物；其中每週一次以約 160 IU/m^2 至約 640 IU/m^2 之劑量投與精胺酸去亞胺酶；且其中黑素瘤展現減小之ASS表現。

本發明之另一態樣提供治療患者之癌症之方法，其包括向患者投與包括經由連接基團共價結合至聚乙二醇之ADI之化合物，其中癌症並非黑素瘤、胰腺癌、前列腺癌、小細胞肺癌、間皮瘤、淋巴細胞性白血病、慢性骨髓性白血病、淋巴瘤、肝癌及肉瘤。在一實施例中，精胺酸去亞胺酶共價結合至 5 ± 1.5 個直鏈PEG分子且將化合物調配成包括小於約0.5%原始ADI、小於約5%游離PEG或二者之組合物；其中每週一次以約 160 IU/m^2 至約 640 IU/m^2 之劑量投與精胺酸去亞胺酶；且其中癌症展現減小之ASS表現。

本揭示內容之另一態樣提供治療患者之非小細胞肺癌、頭頸癌或前列腺癌之方法，其包括投與治療有效量之包括經由連接基團共價結合至聚乙二醇之精胺酸去亞胺酶之化合物與多西他賽(docetaxel)之組合。在一實施例中，精胺酸去亞胺酶共價結合至 5 ± 1.5 個直鏈PEG分子且將化合物調配成包括小於約0.5%原始ADI、小於約5%游離PEG或二者之組合物；其中每週一次以約 160 IU/m^2 至約 640 IU/m^2 之劑量投與精胺酸去亞胺酶；且其中非小細胞肺癌、頭頸癌或前列腺癌展現減小之ASS表現。

本揭示內容之另一態樣提供治療患者之腎細胞癌瘤之方法，其包括投與治療有效量之包括經由連接基團共價結合至聚乙二醇之精胺酸去亞胺酶之化合物與雷帕黴素(rapamycin)之組合。在一實施例中，精胺酸去亞胺酶共價結合至 5 ± 1.5 個直鏈PEG分子且將化合物調配成包括小於約0.5%原始ADI、小於約5%游離PEG或二者之組合物；其中

每週一次以約160 IU/m²至約640 IU/m²之劑量投與精胺酸去亞胺酶；且其中癌症展現減小之ASS表現。

在本發明之某些實施例中，ADI共價結合至一個以上聚乙二醇分子或至約9個至約12個聚乙二醇分子。在本發明之另一實施例中，聚乙二醇具有約1,000至約40,000之總重量平均分子量，具有約10,000至約30,000之總重量平均分子量，且在某些實施例中，聚乙二醇具有20,000之分子量。

在本揭示內容之某些實施例中，連接基團係琥珀醯亞胺基團。在某些實施例中，琥珀醯亞胺基團可為琥珀酸琥珀醯亞胺基酯、丙酸琥珀醯亞胺基酯、琥珀醯亞胺基羧甲基化物、琥珀醯亞胺基琥珀醯胺、N-羥基琥珀醯亞胺或其組合。在一實施例中，琥珀醯亞胺基團係琥珀酸琥珀醯亞胺基酯、丙酸琥珀醯亞胺基酯或其組合。

在本揭示內容之某些實施例中，ADI並非自精胺酸支原體(*Mycoplasma arginini*)分離。在其他實施例中，ADI係自人型支原體(*Mycoplasma hominis*)分離。在一特定實施例中，ADI經修飾以在SEQ ID NO:1之位置112、374、405或408處不含至少一種離胺酸，且在另一實施例中，ADI包括SEQ ID NO:2中所闡述之胺基酸序列。在一實施例中，精胺酸去亞胺酶共價結合至 5 ± 1.5 個PEG分子，且在某些實施例中，PEG係直鏈PEG。

在本方法之一些實施例中，以約每週兩次至約每2週一次來投與ADI，且在一特定實施例中，每週一次投與

ADI。

在一實施例中，以介於約80 IU/m²與約640 IU/m²之間之劑量投與ADI，且在一特定實施例中以約160 IU/m²之劑量投與。在另一實施例中，每週一次以約160 IU/m²之劑量投與ADI。

在一實施例中，將本文所闡述方法中使用之化合物(包括經由連接基團共價結合至聚乙二醇之精胺酸去亞胺酶)調配成包括小於約05%原始ADI、小於約5%游離PEG或二者之組合物。

本發明之另一態樣提供治療患者之GVHD之方法，其包括向患者投與包括經由連接基團共價結合至聚乙二醇之ADI之化合物。

本發明之另一態樣提供治療患者之癌症之方法，其包括向患者投與包括經由連接基團共價結合至聚乙二醇之ADI之化合物，其中癌症展現減小之ASS表現。在一實施例中，癌症係選自由以下組成之群：白血病、急性骨髓性白血病、復發性急性骨髓性白血病、乳癌、卵巢癌、結腸直腸癌、胃癌、神經膠質瘤、多形性膠質母細胞瘤、非小細胞肺癌(NSCLC)、腎癌、膀胱癌、子宮癌、食道癌、腦癌、頭頸癌、子宮頸癌、睪丸癌及胃癌。在另一實施例中，減小之ASS表現係由精胺琥珀酸合成酶啟動子之甲基化造成的。在另一實施例中，減小之ASS表現係由DNA突變或缺失造成的。在一特定實施例中，減小之ASS表現係由9q34基因座(作為「費城染色體(Philadelphia

chromosome)」之一部分)之缺失或轉位造成的。在某些實施例中，癌症展現減小之ASS表現。

本發明之另一態樣提供治療患者之癌症之方法，其包括向患者投與包括經由連接基團共價結合至聚乙二醇之ADI之化合物，其中癌症展現減小之精胺琥珀酸裂解酶表現。在一實施例中，癌症係選自由以下組成之群：白血病、急性骨髓性白血病、復發性急性骨髓性白血病、乳癌、卵巢癌、結腸直腸癌、胃癌、神經膠質瘤、多形性膠質母細胞瘤、非小細胞肺癌(NSCLC)、腎癌、膀胱癌、子宮癌、食道癌、腦癌、頭頸癌、子宮頸癌、睪丸癌及胃癌。在一實施例中，減小之ASL表現係由精胺琥珀酸裂解酶啟動子之甲基化造成的。在某些實施例中，減小之ASL表現係由DNA突變或缺失造成的。在一特定實施例中，癌症係ASL陰性。

在本發明之某些實施例中，ADI-PEG治療在活體內抑制NO合成、抑制血管生成、誘導腫瘤細胞中之細胞凋亡或其組合。在某些實施例中，該治療產生疾病穩定狀態(stable disease)。在其他實施例中，該治療增加患者中之無進展存活時間。在另一實施例中，血漿精胺酸空乏至少一個月或2個月以上。

在某些實施例中，本文所闡述之方法進一步包括投與治療劑，例如化學治療劑，包含但不限於環磷醯胺(cyclophosphamide)、吉西他濱(gemcitabine)、順鉑、索拉非尼(sorafenib)、舒尼替尼(sunitinib)及依維莫司

(everolimus)。在某些實施例中，ADI及化學治療劑以加和方式或協同方式發揮作用。

SEQ ID NO:1係野生型人型支原體ADI蛋白之胺基酸序列。

SEQ ID NO:2係經修飾人型支原體ADI蛋白之胺基酸序列。

SEQ ID NO:3及4係用於擴增精胺琥珀酸合成酶cDNA之PCR引物。

【實施方式】

本發明概言之係關於使用ADI且特定而言使用ADI-PEG治療癌症之方法。

正常細胞並不需要精胺酸進行生長，此乃因其可在藉由ASS及ASL催化之兩步驟過程中自瓜胺酸合成精胺酸(參見圖1)。與之相比，某些癌症並不表現ASS。某些癌症並不表現ASL，且其他癌症可具有減小之ASS及/或ASL表現，或可並不表現ASS及/或ASL。因此，該等癌症對於精胺酸而言營養缺陷。可利用此代謝差異來研發治療該等癌症形式之安全及有效療法。ADI催化精胺酸經由精胺酸雙水解酶路徑轉化成瓜胺酸，且可由此用於消除精胺酸。

除非明確指明相反之情形，否則本發明之實踐將採用熟習此項技術者所熟知之病毒學、免疫學、微生物學、分子生物學及重組DNA技術之習用方法，許多方法出於闡釋目的闡述於下文中。該等技術充分闡釋於參考文獻中。例如，參見 *Current Protocols in Protein Science*, *Current*

Protocols in Molecular Biology or *Current Protocols in Immunology*, John Wiley & Sons, New York, N.Y.(2009); Ausubel等人, *Short Protocols in Molecular Biology*, 第3版, Wiley & Sons, 1995; Sambrook及Russell, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (第3版, 2001); Maniatis等人, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (1982); DNA Cloning: A Practical Approach, 第I及II卷(D. Glover編輯); *Oligonucleotide Synthesis* (N. Gait編輯, 1984); *Nucleic Acid Hybridization* (B. Hames & S. Higgins編輯, 1985); *Transcription and Translation* (B. Hames & S. Higgins編輯, 1984); *Animal Cell Culture* (R. Freshney編輯, 1986); Perbal, *A Practical Guide to Molecular Cloning* (1984)及其他類似參考文獻。

除非上下文另外明確指定, 否則本說明書及隨附申請專利範圍中所用之單數形式「一(a、an)」及「該」包含複數個指示物。

在本說明書通篇中, 除非上下文另有要求, 否則詞語「包括(comprise)」或諸如「包括(comprises)」或「包括(comprising)」等變化形式應理解為暗示納入所述要素或整數或要素或整數之群, 但不排除任何其他要素或整數或要素或整數之群。

除非另外明確闡述, 否則本說明書中之每一實施例可應用於(已作必要之修正)每一另一實施例。

重組DNA、寡核苷酸合成及組織培養及轉化(例如, 電

穿孔、脂質轉染)可使用標準技術。酶反應及純化技術可根據製造商之說明書實施，或如業內貫常方法實施，或如本文所述實施。該等及相關技術及程序通常可根據業內熟知之習用方法來實施，且如本說明書通篇引用及論述之各種一般及較具體參考文獻中所闡述來實施。除非提供具體定義，否則結合利用之命名及本文所闡述實驗室程序及分子生物學、分析化學、合成有機化合物及醫學及藥物化學技術已為彼等熟習此項技術者所熟知且常用於業內。重組技術、分子生物學、微生物學、化學合成、化學分析、藥物製備、調配及遞送及患者治療可使用標準技術。

「患者」係指動物，在某些實施例中係指哺乳動物，且在一具體實施例中係指人類。

「生物相容」係指通常對生物功能無害且不會引起任何程度之不可接受毒性(包含過敏原性及疾病狀態)之材料或化合物。

在本揭示內容通篇中，可使用下列縮寫：PEG，聚乙二醇；ADI，精胺酸去亞胺酶；SS，琥珀酸琥珀醯亞胺基酯；SSA，琥珀醯亞胺基琥珀醯胺；SPA，丙酸琥珀醯亞胺基酯；NHS，N-羥基-琥珀醯亞胺；ASS1或ASS，精胺琥珀酸合成酶；ASL，精胺琥珀酸裂解酶。

在本發明中，ADI基因可衍生、選殖或產生自任一來源，包含(例如)微生物、重組生物技術或其任一組合。舉例而言，可自以下屬之微生物選殖精胺酸去亞胺酶：支原體屬(*Mycoplasma*)、梭菌屬(*Clostridium*)、芽孢桿菌屬

(*Bacillus*)、疏螺旋體屬 (*Borrelia*)、腸球菌屬 (*Enterococcus*)、鏈球菌屬 (*Streptococcus*)、乳桿菌屬 (*Lactobacillus*)、賈第蟲屬 (*Giardia*)。在某些實施例中，自以下選殖精胺酸去亞胺酶：肺炎支原體 (*Mycoplasma pneumoniae*)、人型支原體、精胺酸支原體、醱膿鏈球菌 (*Streptococcus pyogenes*)、肺炎鏈球菌 (*Streptococcus pneumoniae*)、伯格多弗疏螺旋體 (*Borrelia burgdorferi*)、包柔氏疏螺旋體 (*Borrelia afzelii*)、腸賈第蟲 (*Giardia intestinalis*)、產氣莢膜梭菌 (*Clostridium perfringens*)、蘚樣芽胞桿菌 (*Bacillus licheniformis*)、糞腸球菌 (*Enterococcus faecalis*)、清酒乳桿菌 (*Lactobacillus sake*) 或其任一組合。特定而言，本發明中所使用之ADI可包括 SEQ ID NO: 1或2之胺基酸序列或具有ADI活性(例如，能夠使精胺酸代謝成瓜胺酸及氫)之其變體或具有ADI活性之其片段。

在本發明之某些實施例中，自支原體屬之微生物選殖ADI。在其他實施例中，自人型支原體、關節炎支原體 (*Mycoplasma arthritides*)或其任一組合選殖ADI且並不衍生自精胺酸支原體。特定而言，本發明中所使用之ADI可具有SEQ ID NO: 1或2中所闡述之胺基酸序列或具有ADI活性(例如，能夠使精胺酸代謝成瓜胺酸及氫)之其變體或具有ADI活性之其片段。

原始ADI可發現於微生物中且係抗原性，並在患者中藉由循環快速清除。可藉由修飾ADI來克服該等問題。因

此，本揭示內容提供藉由修飾劑(包含但不限於大分子聚合物、蛋白質、肽、多糖或其他化合物)修飾之ADI。精胺酸去亞胺酶及修飾劑可藉由共價鍵或非共價相互作用連接以形成穩定偶聯物或穩定組合物而達成期望效應。在某些實施例中，經修飾ADI保留ADI之生物活性且較未修飾ADI具有較長活體內半衰期及較低抗原性。在某些實施例中，經修飾ADI保留未修飾ADI之生物活性之至少70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或更多。

在一實施例中，修飾劑可為生物相容且可增加血液中ADI之半衰期之聚合物或蛋白質或其片段。修飾劑可以化學方式偶合至ADI或若適宜經由融合蛋白表現連接至ADI。

大分子聚合物可包含非肽大分子聚合物，其在某些實施例中可自身具有生物活性。適宜聚合物包含但不限於聚烯醇化合物、聚醚化合物、聚乙烯基吡咯啉酮、聚胺基酸、二乙烯基醚及馬來酸酐之共聚物、N-(2-羥丙基)-甲基丙烯醯胺、多糖、聚氧乙基化多元醇、肝素或其片段、聚烷基-乙二醇及其衍生物、聚烷基-乙二醇及其衍生物之共聚物、聚(乙烯基乙基醚)、 α ,P-聚[(2-羥乙基)-DL-天門冬醯胺]、聚羧酸酯、聚氧乙烯-氧基亞甲基、聚丙烯醯基嗎啉、胺基化合物及氧烯烴(oxyolefin)之共聚物、聚透明質酸、聚環氧乙烷、乙二酸及丙二酸之共聚物、聚(1,3-二氧雜環戊烷)、乙烯及馬來醯共聚物、聚唾液酸、環糊精等。在某些實施例中，聚合物係聚乙二醇。

本文所使用之聚烯醇化合物包含但不限於聚乙二醇(包含單甲氧基聚乙二醇、單羥基聚乙二醇)、聚乙烯醇、聚烯丙基醇、聚丁烯醇及諸如此類及其衍生物(例如脂質)。

聚醚化合物包含但不限於聚伸烷基二醇($\text{HO}((\text{CH}_2)_x\text{O})_n\text{H}$)、聚丙二醇、聚氧乙烯($\text{HO}((\text{CH}_2)_2\text{O})_n\text{H}$)、聚乙烯醇($((\text{CH}_2\text{CHOH})_n)$)。

聚胺基酸包含但不限於一種類型胺基酸之聚合物或兩種或更多種類型胺基酸之共聚物，例如，聚丙胺酸或聚離胺酸或其嵌段共聚物。

多糖包含但不限於葡聚糖及其衍生物(例如硫酸右旋糖酐)、纖維素及其衍生物(包含甲基纖維素及羧甲基纖維素)、澱粉及其衍生物、聚蔗糖等。

在本發明之一具體實施例中，藉由與蛋白質或肽偶合來修飾ADI，其中一或多種蛋白質或肽直接或間接連接至ADI。蛋白質可為天然存在之蛋白質或其片段，包含但不限於天然存在之人類血清蛋白或其片段，例如甲狀腺素結合蛋白質、轉甲狀腺素蛋白、 α 1-酸糖蛋白、轉鐵蛋白、纖維蛋白原、免疫球蛋白、Ig Fc reguis、白蛋白及其片段。「片段」意指蛋白質中小於全蛋白但保留蛋白質之期望功能之任一部分。ADI可直接或經由共價鍵間接連接至蛋白質。直接連接意指ADI之一個胺基酸經由肽鍵或二硫橋鍵直接連接至修飾蛋白之一個胺基酸。間接連接係指ADI與修飾蛋白質間經由其間最初存在之化學基團或經由生物或化學方式增加之特定化學基團達成之鏈接，或上述

鏈接之組合。

在一特定實施例中，藉由使用 PEG 之共價附接來修飾 ADI。使用 PEG 共價修飾之 ADI（具有或不具有連接基團）可在下文中稱為「ADI-PEG」。與原始 ADI 相比，ADI-PEG 保留其大部分酶活性，具有極小抗原性，具有大大延長之循環半衰期，且可更有效地治療腫瘤。

「聚乙二醇」或「PEG」係指環氧乙烷之縮合聚合物與水之混合物，其為具支鏈或直鏈且由通式 $H(OCH_2CH_2)_nOH$ 代表，其中 n 至少為 4。「聚乙二醇」或「PEG」與數值後綴組合使用以指示其近似重量平均分子量。舉例而言，PEG5,000 係指總重量平均分子量約為 5,000 之 PEG；PEG12,000 係指總重量平均分子量約為 12,000 之 PEG；且 PEG20,000 係指總重量平均分子量約為 20,000 之 PEG。

在本發明之一實施例中，PEG 之總重量平均分子量約為 1,000 至約 50,000；在一實施例約為 3,000 至約 40,000，且在另一實施例中約為 5,000 至約 30,000；在某些實施例中約為 8,000 至約 30,000；在其他實施例中約為 11,000 至約 30,000；在其他實施例中約為 12,000 至約 28,000；在其他實施例中約為 16,000 至約 24,000；且在其他實施例中約為 18,000 至約 22,000；在另一實施例中為 19,000 至約 21,000，且在一實施例中，PEG 之總重量平均分子量約為 20,000。通常，分子量為 30,000 或更大之 PEG 難以溶解，且調配產物之產率大大減小。PEG 可為具支鏈或直鏈，或在某些實

施例中為直鏈。通常，增加PEG之分子量會降低ADI之免疫原性。具有此實施例中所闡述分子量之PEG可結合ADI及視情況生物相容之連接基團使用以治療癌症，包含(例如)急性骨髓性白血病(例如復發性急性骨髓性白血病)、乳癌、卵巢癌、結腸直腸癌、胃癌、神經膠質瘤、多形性膠質母細胞瘤、非小細胞肺癌(NSCLC)、腎癌、膀胱癌、子宮癌、食道癌、腦癌、頭頸癌、子宮頸癌、睪丸癌、胃癌及食道癌。

在本發明之另一實施例中，PEG之總重量平均分子量約為1,000至約50,000；在某些實施例中約為3,000至約30,000；在其他實施例中約為3,000至約20,000；在一實施例中約為4,000至約12,000；在其他實施例中約為4,000至約10,000；在其他實施例中約為4,000至約8,000；在其他實施例中約為4,000至約6,000，且在另一實施例中約為5,000。PEG可為具支鏈或直鏈，且在某些實施例中為直鏈。具有此實施例中所闡述分子量之PEG可結合ADI及視情況生物相容之連接基團使用以治療移植物抗宿主病(GVHD)或癌症。

儘管ADI-PEG係本文所闡述之闡釋性經修飾ADI，但熟習此項技術者應認識到，可使用其他聚合物或適當分子修飾ADI以獲得期望效應，尤其用於減小免疫原性及增加血清半衰期。

可在使用或不使用連接基團之情形下將ADI共價結合至修飾劑(例如PEG)，但較佳實施例利用連接基團。

用於將ADI共價附接至修飾劑(例如PEG)之連接基團可為任一生物相容之連接基團。如上所述,「生物相容」指示化合物或基團無毒且可利用於活體外或活體內且不會引起損傷、病況、疾病或死亡。修飾劑(例如PEG)可(例如)經由醚鍵、酯鍵、硫醇鍵或醯胺鍵結合至連接基團。適宜之生物相容之連接基團包含(例如)酯基團、醯胺基團、亞醯胺基團、胺基甲酸酯基團、羧基、羥基、碳水化合物、琥珀醯亞胺基團(包含(例如)琥珀酸琥珀醯亞胺基酯(SS)、丙酸琥珀醯亞胺基酯(SPA)、琥珀醯亞胺基羧甲基化物(SCM)、琥珀醯亞胺基琥珀醯胺(SSA)或N-羥基琥珀醯亞胺(NHS))、環氧化物基團、氧基羰基咪唑基團(包含(例如)羰基二咪唑(CDI))、硝基苯基(包含(例如)碳酸硝基苯基酯(NPC)或碳酸三氯苯基酯(TPC))、三氯乙基磺酸酯(trysylate)基團、醛基團、異氰酸酯基團、乙烯基砜基團、酪胺酸基團、半胱胺酸基團、組胺酸基團或一級胺。在一實施例中,生物相容之連接基團係酯基團及/或琥珀醯亞胺基團。在另一實施例中,連接基團係SS、SPA、SCM、SSA或NHS;在某些實施例中,更佳係SS、SPA或NHS,且在其他實施例中,最佳係SS或SPA。

另一選擇為,ADI可經由胺基、氫硫基、羥基或羧基直接偶合至修飾劑(例如PEG)(亦即,並無連接基團)。

可經由生物相容之連接基團使用業內已知之方法將ADI共價結合至PEG,如(例如)以下中所闡述:Park等人, *Anticancer Res.*, 1:373-376 (1981); 及 Zaplisky 及 Lee,

Polyethylene Glycol Chemistry: Biotechnical and Biomedical Applications, J. M. Harris編輯，Plenum Press, NY, 第21章(1992)，其揭示內容之全部內容以引用方式併入本文中。

PEG與ADI之附接增加了ADI之循環半衰期。通常，PEG附接至ADI之一級胺。藉由蛋白質之活性結構域內各位點之作用來確定ADI上PEG或其他修飾劑之附接位點的選擇，如熟習此項技術者所已知。可在酶活性並無實質性損失之情形下將PEG附接至ADI之一級胺。舉例而言，自精胺酸支原體、關節炎支原體及人型支原體選殖之ADI具有約17個可藉由此程序修飾之離胺酸。換言之，17個離胺酸係ADI可經由生物相容之連接基團(例如SS、SPA、SCM、SSA及/或NHS)附接至PEG之所有可能點。PEG亦可附接至ADI上之其他位點，如熟習此項技術者根據本揭示內容所顯而易見。

1至約30個PEG分子可共價結合至ADI。在某些實施例中，使用一個PEG分子修飾ADI。在其他實施例中，使用一個以上之PEG分子修飾ADI。在一實施例中，使用約7至約15個PEG分子修飾ADI，在一實施例中使用約9至約12個PEG分子修飾ADI。在另一實施例中，使用2、3、4、5、6、7、8、9、10、11或12個PEG分子修飾ADI。在一具體實施例中，使用4.5-5.5個PEG分子/ADI修飾ADI。在另一實施例中，使用 5 ± 1.5 個PEG分子修飾ADI。

在另一實施例中，使用PEG修飾ADI中約30%至約70%之

一級胺基，使用PEG修飾精胺酸去亞胺酶中(在一實施例中)約40%至約60%或(在某些實施例中)約45%至約55%及(在其他實施例中)約50%之一級胺基。在PEG共價結合至ADI之末端時，可期望僅利用1個PEG分子。增加ADI上PEG單元之數量會增加酶之循環半衰期。然而，增加ADI上PEG單元之數量會降低酶之特異性活性。因此，需要在此二者之間達到平衡，如熟習此項技術者根據本揭示內容所顯而易見。

在本發明中，生物相容之連接基團之常見特徵在於，其經由馬來醯亞胺基團附接至精胺酸去亞胺酶之一級胺。與ADI偶合後，SS-PEG具有鄰近PEG之酯鏈接，此可使得此位點對血清酯酶敏感，血清酯酶可在機體內自ADI釋放PEG。SPA-PEG及PEG2-NHS並不具有酯鏈接，從而其對血清酯酶並不敏感。

在本發明中，特定連接基團似乎並不影響ADI-PEG之循環半衰期或其特異性酶活性。然而，在某些實施例中，在本發明中使用生物相容之連接基團。附接至蛋白質之PEG可為直鏈(例如SS-PEG、SPA-PEG及SC-PEG)，或可使用PEG之具支鏈鏈(例如PEG2-NHS)。

在某些實施例中，可如美國專利第6,635,462號中所闡述來修飾本揭示內容之ADI。特定而言，ADI(尤其來自人型支原體)之一或多個天然胺基酸殘基之修飾可提供更容易複性及調配之酶，由此改良用於製造ADI及包括其之治療性組合物之現有技術。在一實施例中，對本揭示內容之

ADI進行修飾以去除一或多個離胺酸殘基(例如，可使用另一胺基酸取代離胺酸)。特定而言，在一實施例中，ADI經修飾而在SEQ ID NO:1之位置112、374、405或408處不含離胺酸。

在某些實施例中，修飾與ADI有關且位於酶之催化區域處或毗鄰該區域之聚乙二醇化位點。出於本發明目的，片語「聚乙二醇化」可定義為ADI中可使用聚乙二醇共價修飾之任一位點或位置。「聚乙二醇化」可視為位於酶之催化區域處或毗鄰該區域，其中該位點之聚乙二醇化使得酶之催化活性顯著減小。該等位點之聚乙二醇化通常導致酶失活。舉例而言，來自人型支原體之ADI在112位處具有離胺酸，112位可視為位於酶之催化區域處或毗鄰該區域。PEG與此離胺酸在112位處之附接可使酶失活。此外，來自人型支原體之ADI在397位處具有半胱胺酸，397位可視為位於酶之催化區域處或毗鄰該區域。397位置處半胱胺酸之胺基酸取代可使酶失活。特定而言，使用丙胺酸、組胺酸、精胺酸、絲胺酸、離胺酸或酪胺酸取代397位處之半胱胺酸可導致損失所有可檢測之酶活性。來自人型支原體之ADI亦具有三個位於此保守半胱胺酸(尤其Lys374、Lys405及Lys408)附近之離胺酸。PEG與Lys374、Lys405、Lys408或其組合之附接可使酶失活。

應理解，衍生自其他有機體之ADI亦可具有對應於來自人型支原體之ADI之112位的聚乙二醇化位點。舉例而言，來自釀膿鏈球菌之ADI在104位處具有離胺酸，來自肺炎支

原體之ADI在106位處具有離胺酸，且來自腸賈第蟲之ADI在114位處具有離胺酸。此外，來自一些有機體之ADI可具有對應於與來自人型支原體之ADI中112位相同之一般位置的離胺酸。來自該等有機體之ADI中之離胺酸位置已為熟習此項技術者所習知且闡述於美國專利第6,635,462號中。

因此，在一實施例中，本發明提供ADI之多肽鏈中之某些胺基酸取代。該等胺基酸取代提供在藉由修飾劑修飾後(例如，在聚乙二醇化後)損失較少活性之經修飾ADI。藉由消除位於酶之催化區域處或毗鄰該區域之聚乙二醇化位點或其他已知修飾位點，可達成最佳修飾(例如，聚乙二醇化)且並不損失活性。

應理解，本發明之其他實施例係基於以下認識：在經由重組技術產生時，精胺酸去亞胺酶之某些結構特性可防止或干擾精胺酸去亞胺酶之合理及快速複性。特定而言，該等結構特性妨礙或防止該酶在重組產生期間呈現活性構形。出於本發明目的，片語「活性構形」可定義為容許未修飾或經修飾精胺酸去亞胺酶具有酶活性之三維結構。特定而言，可能需要活性構形以催化精胺酸至瓜胺酸之轉化。片語「結構特性」可定義為多肽鏈中源於特定胺基酸或胺基酸組合之任一特點、品質或性質。舉例而言，精胺酸去亞胺酶可含有導致正常肽鏈彎曲或扭結並由此妨礙該酶在酶複性期間呈現活性構形之胺基酸。特定而言，來自人型支原體之精胺酸去亞胺酶在210位處具有可導致肽鏈彎曲或扭結從而使得該酶在重組產生期間更加難以複性之

脯胺酸。應理解，衍生自其他有機體之精胺酸去亞胺酶亦可具有對應於來自人型支原體之精胺酸去亞胺酶之210位的位點。

本發明由此同樣提供精胺酸去亞胺酶之多肽鏈中之某些胺基酸取代。該等胺基酸取代可消除精胺酸去亞胺酶之肽鏈中之有問題結構特性。該等胺基酸取代提供經修飾精胺酸去亞胺酶之改良複性。該等胺基酸取代使得使用較少量緩衝劑之經修飾精胺酸去亞胺酶可快速複性。該等胺基酸取代亦可增加複性經修飾精胺酸去亞胺酶之產率。在本發明之一實施例中，經修飾精胺酸去亞胺酶在P210處具有單一胺基酸取代。如上所述，衍生自人型支原體之精胺酸去亞胺酶具有位於210位處之胺基酸脯胺酸。儘管並不限制本發明，但在本文中認為，210位處胺基酸脯胺酸之存在導致正常多肽鏈發生彎曲或扭結，從而增加了使精胺酸去亞胺酶複性(亦即，再摺疊)之難度。取代210位處之脯胺酸使得使用較少量緩衝劑之經修飾精胺酸去亞胺酶可快速複性。取代210位處之脯胺酸亦可增加複性經修飾精胺酸去亞胺酶之產率。在一較佳實施例中，使用絲胺酸取代210位處之脯胺酸。應理解，根據本發明之此態樣，可進行210位處之其他取代。其他取代之實例包含Pro210至Thr210、Pro210至Arg210、Pro210至Asn210、Pro210至Gln210或Pro210至Met210。藉由消除彼等與野生型精胺酸去亞胺酶之210位之胺基酸有關之結構特性，可達成酶之合理再摺疊。

本發明方法可涉及活體外或活體內應用。在活體外應用(包含細胞培養應用)之情形下，可將本文所述之化合物添加至培養液之細胞中且然後培育。使用業內熟知之抗體產生技術，本發明化合物亦可用於促進單株及/或多株抗體之產生。然後單株及/或多株抗體可用於多種診斷應用中，如熟習此項技術者所顯而易見。

本發明化合物之活體內投與方式將視所欲應用而變化。可經由投與類似用途之藥劑之任一接受方式來投與本文所述之ADI組合物(呈純形式或適當醫藥組合物形式)。可藉由組合ADI(例如ADI-PEG、ADI-PEG 20)與適當生理上可接受之載劑、稀釋劑或賦形劑來製備醫藥組合物，且可調配成固體、半固體、液體或氣態形式之製劑，例如錠劑、膠囊、粉末、顆粒、軟膏、溶液、栓劑、注射劑、吸入劑、凝膠、微球體及氣溶膠。此外，其他醫藥活性成份(包含本文另外闡述之其他抗癌藥)及/或適宜賦形劑(例如鹽、緩衝劑及穩定劑)可(但非必需)存在於組合物內。可藉由各種不同途徑(包含經口、非經腸、經鼻、靜脈內、皮內、皮下或局部)進行投與。投與方式取決於擬治療或預防病狀之性質。因此，可藉由以下方式投與ADI-PEG(例如ADI-PEG 20)：經口、經鼻內、經腹膜內、非經腸、經靜脈內、經淋巴管內、經瘤內、經肌內、經間質、經動脈內、經皮下、經眼內、經滑囊腔內、經上皮及經皮。在投與後，減小、抑制、預防或延遲癌症之進展及/或轉移之量視為有效量。在某些實施例中，本文之ADI組合物以統

計學顯著量增加患者之中值存活時間。在一個實施例中，本文所闡述之ADI治療增加患者之中值存活時間4週、5週、6週、7週、8週、9週、10週、15週、20週、25週、30週、40週或更長時間。在某些實施例中，ADI治療增加患者之中值存活時間1年、2年、3年或更長時間。在一個實施例中，本文所闡述之ADI治療增加無進展存活時間2週、3週、4週、5週、6週、7週、8週、9週、10週或更長時間。在某些實施例中，本文所闡述之ADI治療增加無進展存活時間1年、2年、3年或更長時間。

在某些實施例中，投與量足以得到腫瘤消退，如藉由活腫瘤量之統計學顯著降低所指示，例如，腫瘤質量降低至少50%，或掃描尺寸有所改變(例如，具有統計學顯著性之降低)。在某些實施例中，投與量足以穩定疾病。在其他實施例中，投與量足以使得熟練臨床醫師已知之特定疾病症候之症狀發生臨床相關性減小。

在某些實施例中，投與量足以抑制NO合成、抑制血管生成及/或足以誘導腫瘤細胞中之細胞凋亡或其任一組合。可使用業內已知之方法量測NO合成、血管生成及細胞凋亡，例如參見 *Current Protocols in Immunology* 或 *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, New York, N.Y.(2009及其更新)；Ausubel等人，*Short Protocols in Molecular Biology*，第3版，Wiley & Sons, 1995；及其他類似參考文獻。在一特定實施例中，投與量抑制NO合成並抑制黑素瘤之生長，且與本文所闡

述之其他化學療法(例如順鉑)協同作用。因此，本揭示內容之一實施例提供藉由投與ADI-PEG 20與順鉑之組合來治療黑素瘤之方法，其中該治療使內源性一氧化氮(NO)空乏。

治療之精確劑量及持續時間隨所治療疾病而變化，且可根據經驗使用已知測試方案或藉由測試業內已知之模型系統中之組合物並自其外推測得。亦可實施受控之臨床試驗。劑量亦可隨擬減輕病狀之嚴重程度而有所變化。通常調配醫藥組合物並投與以施加治療有用效應，同時將不期望副作用降至最低。可一次性投與組合物，或可分成諸多較小劑量以一定時間間隔投與。對於任一特定個體而言，可根據個體需要隨時間流逝來調節具體劑量方案。

ADI組合物可單獨投與或與其他已知癌症治療(例如輻射療法、化學療法、移植、免疫療法、激素療法、光動力療法等)組合投與。組合物亦可與抗生素組合投與。

投與該等及相關醫藥組合物之典型途徑由此包含但不限於經口、局部、經真皮、吸入、非經腸、舌下、經頰、經直腸、經陰道及鼻內。本文所用之術語「非經腸」包含皮下注射、靜脈內注射、肌內注射、胸骨內注射或輸注技術。調配本發明之某些實施例之醫藥組合物，從而使得其中所含之活性成份在將該組合物投與患者後具有生物可用性。投與個體或患者之組合物可採用一或多個劑量單位之形式，其中(例如)錠劑可為單一劑量單位，且本文所闡述氣溶膠形式之ADI組合物之容器可容納複數個劑量單位。

彼等熟習此項技術者已知製備該等劑型之實際方法，或顯而易見；舉例而言，參見 Remington: The Science and Practice of Pharmacy，第 20 版 (Philadelphia College of Pharmacy and Science, 2000)。在任何情況下，擬投與組合物含有治療有效量之本揭示內容之 ADI-PEG (例如 ADI-PEG 20) 以用於根據本文之教示內容治療目標疾病或病狀。

醫藥組合物可呈固體或液體之形式。在一實施例中，載劑係粒子，從而組合物 (例如) 呈錠劑或粉末形式。載劑可為液體，且組合物係 (例如) 口服油、可注射液體或氣溶膠，其可用於 (例如) 吸入式投與。在意欲經口投與時，醫藥組合物通常係固體或液體形式，其中半固體、半液體、懸浮液及凝膠形式包含於本文視為固體或液體之形式內。

對於用於經口投與之固體組合物而言，可將醫藥組合物調配成粉末、微粒、壓製錠劑、丸劑、膠囊、口香糖、糯米紙囊劑或諸如此類。此一固體組合物通常含有一或多種惰性稀釋劑或可食用載劑。此外，可存在下列物質中之一或多者：黏合劑。例如羧甲基纖維素、乙基纖維素、微晶纖維素、黃耆膠或明膠；賦形劑，例如澱粉、乳糖或糊精；崩解劑，例如海藻酸、海藻酸鈉、澱粉羥基乙酸鈉、玉米澱粉及諸如此類；潤滑劑，例如硬脂酸鎂或斯特羅特 (Sterotex)；滑動劑，例如膠質二氧化矽；甜味劑，例如蔗糖或糖精；矯味劑，例如薄荷、水楊酸甲酯或橙味矯味劑；及著色劑。在醫藥組合物呈膠囊 (例如，明膠膠囊) 之形式時，其除上述類型材料外亦可含有液體載劑，例如聚

乙二醇或油。

醫藥組合物可呈液體形式，例如，醃劑、糖漿、溶液、乳液或懸浮液。液體可用於經口投與或用於藉由注射遞送（作為兩個實例）。在意欲經口投與時，除本發明化合物外，較佳組合物亦含有甜味劑、防腐劑、染料/著色劑及鮮味增強劑中之一或多者。在意欲藉由注射投與之組合物中，可包含表面活性劑、防腐劑、潤濕劑、分散劑、懸浮劑、緩衝劑、穩定劑及等滲劑中之一或多者。

不論呈溶液、懸浮液抑或其他類似形式，液體醫藥組合物可包含下列佐劑中之一或多者：無菌稀釋劑，例如注射用水、鹽水溶液、（在某些實施例中）生理鹽水、林格氏溶液（Ringer's solution）、等滲氯化鈉；不揮發性油，例如可用作溶劑或懸浮介質之合成單或二甘油酯、聚乙二醇、甘油、丙二醇或其他溶劑；抗細菌劑，例如苜基醇或對羥基苯甲酸甲酯；抗氧化劑，例如抗壞血酸或亞硫酸氫鈉；螯合劑，例如乙二胺四乙酸；緩衝劑，例如乙酸酯、檸檬酸酯或磷酸酯及用於調節張力之試劑（例如氯化鈉或右旋糖）。非經腸製劑可封裝於由玻璃或塑膠製成之安瓿（ampoule）、一次性注射器或多劑量小瓶中。生理鹽水係較佳佐劑。可注射醫藥組合物較佳地無菌。

意欲非經腸或經口投與之液體醫藥組合物應含有一定量之如本文所揭示之ADI（例如ADI-PEG 20），從而獲得適宜劑量。通常，此量為至少組合物之0.01%之ADI。在意欲經口投與時，此量可在組合物之0.1重量%與約70重量%之

間有所變化。某些經口醫藥組合物含有約4%至約75%之ADI-PEG。在某些實施例中，製備本發明之醫藥組合物及製劑從而非經腸劑量單位在稀釋前含有0.01重量%至10重量%之間之ADI-PEG。

可意欲局部投與醫藥組合物，在該情形下，載劑可適宜地包括溶液、乳液、軟膏或凝膠基質。舉例而言，基質可包括下列物質中之一或多者：礦脂、羊毛脂、聚乙二醇、蜂蠟、礦物油、稀釋劑(例如水及醇)及乳化劑及穩定劑。醫藥組合物中可存在增稠劑以用於局部投與。若意欲經真皮投與，則組合物可包含經真皮貼片或離子電滲裝置。醫藥組合物可意欲以(例如)栓劑形式經直腸投與，其在直腸中融化並釋放藥物。用於經直腸投與之組合物可含有油性基質作為適宜非刺激性賦形劑。該等基質包含但不限於羊毛脂、可可油及聚乙二醇。

醫藥組合物可包含各種材料以修飾固體或液體劑量單位之物理形式。舉例而言，組合物可包含在活性成份周圍形成包衣殼之材料。形成包衣殼之材料通常為惰性，且可選自(例如)糖、蟲膠及其他腸溶包衣試劑。另一選擇為，活性成份可封閉於明膠膠囊中。呈固體或液體形式之醫藥組合物可包含結合至ADI-PEG並由此有助於遞送化合物之試劑。可具有此能力之適宜試劑包含單株或多株抗體、一或多種蛋白質或脂質體。醫藥組合物可基本上由可以氣溶膠形式投與之劑量單位組成。術語氣溶膠用於表示自彼等具有膠質性質者至由加壓包裝組成之系統之各種系統。可藉

由液化或壓縮氣體或藉由分配活性成份之適宜幫浦系統來進行遞送。可以單相、雙相或三相系統來遞送氣溶膠以遞送活性成份。氣溶膠之遞送包含必需之容器、活化器、閥門、子容器及諸如此類，其可一起形成套組。熟習此項技術者無需過多實驗即可確定較佳氣溶膠。

可藉由醫藥技術中熟知之方法來製備醫藥組合物。舉例而言，可藉由以下方式來製備意欲藉由注射投與之醫藥組合物：組合包括如本文所闡述之ADI-PEG及視情況鹽、緩衝劑及/或穩定劑中之一或多者之組合物與無菌蒸餾水以形成溶液。可添加表面活性劑以促進形成均質溶液或懸浮液。表面活性劑係並不以共價方式與ADI-PEG組合物相互作用之化合物，從而促進ADI-PEG在水性遞送系統中之溶解或均質懸浮。

可以治療有效量投與組合物，該治療有效量端視包含以下之各種因素而有所變化：所採用具體化合物(例如，ADI-PEG)之活性；化合物之代謝穩定性及作用時間長度；患者之年齡、體重、一般健康狀況、性別及飲食；投與之模式及時間；排泄速率；藥物組合；特定病症或病狀之嚴重程度；及實施療法之個體。

治療有效量之一種本發明化合物係有效抑制腫瘤生長之量。通常，以較小劑量開始治療，過多較小劑量可以較小增量增加直至達成該等情形下之最佳效應為止。通常，本發明化合物之治療劑量可為約1 mg/kg至約200 mg/kg(每週兩次至約每兩週一次)。舉例而言，劑量可為約1 mg/kg(每

週一次，以 2 ml 靜脈內注射形式)至約 20 mg/kg(每 3 天一次)。在另一實施例中，劑量可為約 50 IU/m²至約 700 IU/m²且以以下形式投與：約每 3 天一次、約每週一次、約每週兩次或約每 2 週一次。在某些實施例中，劑量可為約 50 IU/m²、60 IU/m²、70 IU/m²、80 IU/m²、90 IU/m²、100 IU/m²、110 IU/m²、120 IU/m²、130 IU/m²、140 IU/m²、150 IU/m²、160 IU/m²、170 IU/m²、180 IU/m²、190 IU/m²、200 IU/m²、210 IU/m²、220 IU/m²、230 IU/m²、240 IU/m²、250 IU/m²、260 IU/m²、270 IU/m²、280 IU/m²、290 IU/m²、300 IU/m²、310 IU/m²、約 320 IU/m²、約 330 IU/m²、340 IU/m²、約 350 IU/m²、360 IU/m²、370 IU/m²、380 IU/m²、390 IU/m²、400 IU/m²、410 IU/m²、420 IU/m²、430 IU/m²、440 IU/m²、450 IU/m²、500 IU/m²、550 IU/m²、600 IU/m²、620 IU/m²、630 IU/m²、640 IU/m²、650 IU/m²、660 IU/m²、670 IU/m²、680 IU/m²、690 IU/m²或約 700 IU/m²且以以下形式投與：約每 3 天一次、約每週一次、約每週兩次或約每 2 週一次。在個體可建立抗 ADI 免疫反應之某些實施例中，熟練臨床醫師可視需要修改劑量。

ADI-SS-PEG5,000 之最佳劑量可為約每週兩次，而 ADI-SS-PEG20,000 之最佳劑量可為約每週一次至約每兩週一次。在某些實施例中，ADI-SS-PEG20,000 之最佳劑量可為約每週兩次。

可在注射前混合 ADI-PEG 與磷酸酯緩衝鹽水溶液或彼等

熟習此項技術者已知之任一其他適當溶液。在一實施例中，包括ADI-PEG之液體組合物包括約10 mg至約12 mg ADI、約20 mg至約40 mg聚乙二醇、1.27 mg +5%磷酸二氫鈉(USP)；約3 mg +5%磷酸氫二鈉(USP)；7.6 mg +5%氯化鈉(USP)；其pH約為6.6至約7；且具有適當量之注射用水(例如、約1 ml或約2 ml)。在一實施例中，包括ADI-PEG之液體組合物包括組胺酸-HCl，且在某些實施例中，組合物緩衝劑為約0.0035 M組胺酸-HCl至約0.35 M組胺酸-HCl。在一特定實施例中，在包括0.035 M組胺酸-HCl(pH 6.8)與0.13 M氯化鈉之緩衝劑中調配組合物。在另一實施例中，在包括0.02 M磷酸鈉緩衝劑(pH 6.8)與0.13 M氯化鈉之緩衝劑中調配組合物。

在一實施例中，包括ADI或ADI-PEG之組合物具有約5至約9、約6至約8或約6.5至約7.5之pH。在一些實施例中，包括ADI之組合物具有約 6.8 ± 1.0 之pH。

在一實施例中，包括ADI-PEG之組合物中之游離PEG介於1-10%之間，且在另一實施例中，總PEG小於7%、小於6%、小於5%、小於4%、小於3%、小於2%或小於1%。在某些實施例中，包括ADI-PEG之組合物中之原始ADI小於約1%、0.9%、0.8%、0.7%、0.6%、0.5%、0.4%、0.3%、0.2%或小於0.1%。通常，包括ADI-PEG之組合物具有小於或等於約4%、3%、2%、1.5%、1%或0.5%之總雜質。

在一實施例中，包括ADI或ADI-PEG之組合物中之游離氫硫基大於約90%。在一些實施例中，包括ADI或ADI-PEG

之組合物中之游離氫硫基為約91%、約92%、約93%、約94%或約95%、約96%、約97%、約98%約99%或更高。

在一實施例中，組合物中之ADI或ADI-PEG之 K_m 為約0.5 μM 至約15 μM ，且在另一實施例中， K_m 為約1 μM 至約12 μM 、約1 μM 至約10 μM 、約1.5 μM 至約9 μM 、約1.5 μM 至約8 μM 或約1.5 μM 至約7 μM 。在某些實施例中，組合物中之ADI或ADI-PEG之 K_m 為約1.5 μM 至約6.5 μM 。在一些實施例中，組合物中之ADI或ADI-PEG之 K_m 為約1.5 μM 、約2 μM 、約2.5 μM 、約3 μM 、約3.5 μM 、約4 μM 、約4.5 μM 、約5 μM 、約5.5 μM 、約6 μM 、約6.5 μM 或約7 μM 。

在一實施例中，組合物中之ADI或ADI-PEG之 K_{cat} 為約0.5 sec^{-1} 至約15 sec^{-1} ，且在另一實施例中， K_{cat} 為約1 sec^{-1} 至約12 sec^{-1} 、約1 sec^{-1} 至約10 sec^{-1} 、約1.5 sec^{-1} 至約9 sec^{-1} 、約2 sec^{-1} 至約8 sec^{-1} 或約2.5 sec^{-1} 至約7 sec^{-1} 。在某些實施例中，組合物中之ADI或ADI-PEG之 K_{cat} 為約2.5 sec^{-1} 至約7.5 sec^{-1} 。在一些實施例中，組合物中之ADI或ADI-PEG之 K_{cat} 為約2.5 sec^{-1} 、約3 sec^{-1} 、約3.5 sec^{-1} 、約4 sec^{-1} 、約4.5 sec^{-1} 、約5 sec^{-1} 、約5.5 sec^{-1} 、約6 sec^{-1} 、約6.5 sec^{-1} 、約7 sec^{-1} 約7.5 sec^{-1} 或約8 sec^{-1} 。

在一實施例中，組合物中之ADI或ADI-PEG之電導率(在業內亦稱為比電導)為約5 mS/cm 至約20 mS/cm ，且在其他實施例中，電導率為約5 mS/cm 至約15 mS/cm 、約7 mS/cm 至約15 mS/cm 、約9 mS/cm 至約15 mS/cm 或約10 mS/cm 至

約 15 mS/cm。在一些實施例中，組合物中之 ADI 或 ADI-PEG 之電導率為約 9 mS/cm、約 10 mS/cm、約 11 mS/cm、約 12 mS/cm 或約 13 mS/cm、約 14 mS/cm 或約 15 mS/cm。在某些實施例中，組合物中之 ADI 或 ADI-PEG 之電導率為約 13 mS/cm \pm 1.0 mS/cm。

在一實施例中，組合物中之 ADI 或 ADI-PEG 之滲透壓為約 50 mOsm/kg 至約 500 mOsm/kg、約 100 mOsm/kg 至約 400 mOsm/kg、約 150 mOsm/kg 至約 350 mOsm/kg、約 200 mOsm/kg 至約 350 mOsm/kg 或約 250 mOsm/kg 至約 350 mOsm/kg。在某些實施例中，組合物中之 ADI 或 ADI-PEG 之滲透壓為約 300 \pm 30 mOsm/kg。

本揭示內容之包括 ADI-PEG 之組合物亦可與投與一或多種其他治療劑同時、在之前或在之後投與。該組合療法可包含投與含有本發明化合物及一或多種其他活性劑之單一醫藥劑量調配物，以及投與包括呈其自身單獨醫藥劑量調配物之本發明 ADI-PEG (例如，ADI-PEG 20) 及每一活性劑之組合物。舉例而言，如本文所闡述之 ADI-PEG 及其他活性劑可以單一口服劑量組合物形式(例如錠劑或膠囊)一起投與患者，或以單獨口服劑量調配物形式投與每一藥劑。類似地，如本文所闡述之 ADI-PEG 及其他活性劑可以單一非經腸劑量組合物形式(例如以鹽水溶液或其他生理上可接受之溶液形式)一起投與患者，或以單獨非經腸劑量調配物形式投與每一藥劑。在使用單獨劑量調配物之情形下，可在基本上相同時間(亦即，同時)或在分別錯開之時

間(亦即，依序且以任一順序)投與包括ADI-PEG及一或多種其他活性劑之組合物；組合療法應理解為包含所有該等方案。

因此，在某些實施例中，亦涵蓋投與本揭示內容之ADI組合物與一或多種其他治療劑之組合。該等治療劑可在業內接受作為用於如本文所闡述之特定疾病狀態(例如特定癌症或GVHD)之標準治療。所涵蓋之實例性治療劑包含細胞因子、生長因子、類固醇、NSAID、DMARD、抗發炎藥、化學治療劑、放射治療劑、自體吞噬抑制劑或其他活性及輔助藥劑。

在某些實施例中，本文所揭示之ADI組合物可結合任一數量之化學治療劑投與。化學治療劑之實例包含烷基化劑，例如噻替派(thiotepa)及環磷醯胺(CYTOXAN™)；磺酸烷基酯，例如白消安(busulfan)、英丙舒凡(improsulfan)及哌泊舒凡(piposulfan)；氮丙啶，例如苯佐替派(benzodopa)、卡波醯(carboquone)、美妥替派(meturedopa)及烏瑞替派(uredopa)；伸乙基亞胺及甲基嘧胺，包含六甲嘧胺(altretamine)、三伸乙基嘧胺、三伸乙基磷醯胺、三伸乙基硫代磷醯胺及三羥甲基嘧胺；氮芥，例如苯丁酸氮芥(chlorambucil)、萘氮芥(chlornaphazine)、氯磷醯胺(cholophosphamide)、雌莫司汀(estramustine)、異環磷醯胺(ifosfamide)、雙氯乙基甲胺(mechlorethamine)、氯氯酸氧氮芥(mechlorethamine oxide hydrochloride)、美法倉(melphalan)、新氮芥(novembichin)、苯乙酸氮芥膽甾醇酯

(phenesterine)、潑尼莫司汀(prednimustine)、曲磷胺(trofosfamide)、尿嘧啶氮芥(uracil mustard)；亞硝基脲，例如卡莫司汀(carmustine)、氯脲菌素(chlorozotocin)、福莫司汀(fotemustine)、羅氮芥(lomustine)、尼莫司汀(nimustine)、雷莫司汀(ranimustine)；抗生素，例如阿克拉黴素類(aclacinomysins)、放線菌素(actinomycin)、歐洛黴素(authramycin)、偶氮絲胺酸(azaserine)、博萊黴素類(bleomycins)、放線菌素c(cactinomycin)、卡奇黴素(calicheamicin)、卡柔比星(carabycin)、卡波黴素(carminomycin)、嗜癌黴素(carzinophilin)、色黴素類(chromomycins)、更生黴素(dactinomycin)、柔紅黴素(daunorubicin)、地托比星(detorubicin)、6-重氮-5-側氧基-L-正白胺酸、多柔比星、表柔比星(epirubicin)、依索比星(esorubicin)、伊達比星(idarubicin)、麻西羅黴素(marcellomycin)、絲裂黴素類(mitomycins)、黴酚酸(mycophenolic acid)、諾拉黴素(nogalamycin)、橄欖黴素(olivomycins)、培洛黴素(peplomycin)、普非洛黴素(potfiromycin)、嘌呤黴素(puromycin)、三鐵阿黴素(quelamycin)、羅多比星(rodorubicin)、鏈黑菌素(streptonigrin)、鏈脲菌素(streptozocin)、殺結核菌素(tubercidin)、烏苯美司(ubenimex)、淨司他丁(zinostatin)、佐柔比星(zorubicin)；抗代謝物，例如甲胺蝶呤(methotrexate)及5-氟尿嘧啶(5-FU)；葉酸類似物，例如二甲葉酸(denopterin)、甲胺蝶呤、蝶羅呤

(pteropterin)、三甲曲沙(trimetrexate)；嘧啶類似物，例如氟達拉濱(fludarabine)、6-巰基嘧啶、硫咪嘧啶(thiamiprine)、硫鳥嘧啶(thioguanine)；嘧啶類似物，例如安西他濱(ancitabine)、阿紫胞苷(azacitidine)、6-阿紫尿苷(6-azauridine)、卡莫氟(carmofur)、阿糖胞苷(cytarabine)、二去氧尿苷(dideoxyuridine)、去氧氟尿苷(doxifluridine)、依諾他濱(enocitabine)、氟尿苷(floxuridine)、5-FU；雄激素類，例如卡普甾酮(calusterone)、丙酸甲雄烷酮(dromostanolone propionate)、環硫雄醇(epitiostanol)、美雄烷(mepitiostane)、辜內酯(testolactone)；抗腎上腺試劑，例如胺魯米特(aminogluthimide)、米托坦(mitotane)、曲洛司坦(trilostane)；葉酸補充劑，例如亞葉酸；醋葡醛內酯(aceglatone)；醛磷醯胺糖苷(aldophosphamide glycoside)；胺基酮戊酸(aminolevulinic acid)；安吡啶(amsacrine)；貝斯特氮芥(bestrabucil)；比生群(bisantrene)；依達曲沙(edatraxate)；地磷醯胺(defofamine)；秋水仙胺(demecolcine)；地吡醌(diaziquone)；伊爾福尼辛(elformithine)；依利醋銨(elliptinium acetate)；依託格魯(etoglucid)；硝酸鎂；羥基脲；香菇多糖；氯尼達明(lonidamine)；米托胍脲(mitoguazone)；米托蒽醌(mitoxantrone)；莫哌達醇(mopidamol)；硝胺丙吡啶(nitracrine)；噴司他丁(pentostatin)；蛋胺氮芥(phenamet)；吡柔比星

(pirarubicin) ; 鬼白酸 ; 2-乙基醯肼 ; 丙卡巴肼 (procarbazine) ; PSK.RTM ; 雷佐生 (razoxane) ; 西佐喃 (sizofiran) ; 鍺螺胺 (spirogermanium) ; 替奴佐酸 (tenuazonic acid) ; 三亞胺醯 ; 2, 2',2"-三氯三乙胺 ; urethan(烏拉坦) ; 長春地辛 (vindesine) ; 達卡巴嗪 (dacarbazine) ; 甘露莫司汀 (mannomustine) ; 二溴甘露醇 (mitobronitol) ; 二溴衛矛醇 (mitolactol) ; 哌泊溴烷 (pipobroman) ; 加賽特辛 (gacytosine) ; 阿糖胞苷 (arabinoside) (「Ara-C」) ; 環磷醯胺 ; 噻替派 (thiotepa) ; 紫杉烷類 , 例如紫杉醇 (paclitaxel)(TAXOL® , Bristol-Myers Squibb Oncology , Princeton , N.J.) 及多西他賽 (docetaxel)(TAXOTERE® , Rhne-Poulenc Rorer, Antony , 法國) ; 苯丁酸氮芥 ; 吉西他濱 (gemcitabine) ; 6-硫鳥嘌呤 ; 巯基嘌呤 ; 甲胺蝶呤 ; 鉑類似物 , 例如順鉑及卡鉑 (carboplatin) ; 長春鹼 (vinblastine) ; 鉑 ; 依託泊苷 (etoposide) (VP-16) ; 異環磷醯胺 ; 絲裂黴素 C (mitomycin C) ; 米托蒽醯 ; 長春新鹼 (vincristine) ; 長春瑞濱 (vinorelbine) ; 諾維本 (navelbine) ; 諾安托 (novantrone) ; 替尼泊苷 (teniposide) ; 道諾黴素 (daunomycin) ; 胺基蝶呤 ; 希羅達 (xeloda) ; 伊班膦酸鹽 (ibandronate) ; CPT-11 ; 拓撲異構酶抑制劑 RFS 2000 ; 二氟甲基鳥胺酸 (DMFO) ; 視黃酸衍生物 , 例如 Targretin™ (貝沙羅汀 (bexarotene)) 、 Panretin™ (阿利維a酸 (alitretinoin)) ; ONTAK™ (地尼白介素 2 (denileukin diftitox)) ; 埃斯波黴素類 (esperamicins) ;

卡培他濱(capecitabine)；及任一上述藥劑之醫藥上可接受之鹽、酸或衍生物。此定義亦包含用於調節或抑制對於腫瘤之激素作用之抗激素劑，例如抗雌激素，包含(例如)他莫昔芬(tamoxifen)、雷洛昔芬(raloxifene)、抑制4(5)-咪唑之芳香酶、4-羥基他莫昔芬(4-hydroxytamoxifen)、曲沃昔芬(trioxifene)、雷洛昔芬(keoxifene)、LY117018、奧那司酮(onapristone)及托瑞米芬(toremifene)(Fareston)；及抗雄激素，例如氟他胺(flutamide)、尼魯米特(nilutamide)、比卡魯胺(bicalutamide)、亮丙瑞林(leuprolide)及戈舍瑞林(goserelin)；其他化學治療劑包含索拉非尼及其他蛋白質激酶抑制劑，例如阿法替尼(afatinib)、阿昔替尼(axitinib)、貝伐單抗(bevacizumab)、西妥昔單抗(cetuximab)、克唑替尼(crizotinib)、達沙替尼(dasatinib)、埃羅替尼(erlotinib)、福他替尼(fostamatinib)、吉非替尼(gefitinib)、伊馬替尼(imatinib)、拉帕替尼(lapatinib)、來瓦替尼(lenvatinib)、木利替尼(mubritinib)、尼羅替尼(nilotinib)、帕尼單抗(panitumumab)、帕唑帕尼(pazopanib)、哌加他尼(pegaptanib)、蘭尼單抗(ranibizumab)、魯索利替尼(ruxolitinib)、曲司佐單抗(trastuzumab)、凡德他尼(vandetanib)、威羅菲尼(vemurafenib)及舒尼替尼；西羅莫司(sirolimus)(雷帕黴素)、依維莫司及其他mTOR抑制劑。任一上述藥劑之醫藥上可接受之鹽、酸或衍生物亦涵蓋用於本文中。

在某些實施例中，本文所揭示之ADI組合物可結合任一數量之自體吞噬抑制劑投與。在一些較佳實施例中，自體吞噬抑制劑係選自由以下組成之群：氯喹、3-甲基腺嘌呤、羥基氯喹(Plaquenil.TM.)、巴弗洛黴素A1、5-胺基-4-咪唑甲醯胺核苷(AICAR)、岡田酸、抑制2A型或1型蛋白磷酸酶之自體吞噬阻抑性海藻毒素、cAMP之類似物及增加cAMP含量之藥物、腺苷、N6-巰基嘌呤核苷、渥曼青黴素及長春鹼。此外，亦可使用抑制自體吞噬所必需之蛋白質(例如ATG5)之表現之反義物或siRNA。

在一實施例中，ADI-PEG與一或多種治療劑之組合以加和方式或協同方式發揮作用。就此而言，本文闡述協同劑，其包含能夠如本文所提供之ADI-PEG以協同方式作用之治療劑(例如，化學治療劑、自體吞噬抑制劑、mTOR抑制劑或用於治療如本文所闡述之癌症、GVHD或發炎性腸病之任一其他治療劑)，其中該協同作用表現為可檢測效應，該可檢測效應之大小大於(亦即，相對於適當對照條件以統計學顯著方式)在存在化學治療劑但不存在ADI-PEG組合物時及/或在存在ADI-PEG但不存在化學治療劑時可檢測到之效應。業內已知量測協同作用之方法(例如參見Cancer Res，2010年1月15日，70；440)。

如本文所闡述之包括ADI及視情況其他治療劑之組合物可用於治療癌症之治療方法及預防癌症轉移之方法中。因此，本發明提供治療各種不同癌症、改善其症狀或抑制其進展或預防該等癌症之方法。在另一實施例中，本揭示內

容提供治療GVHD、改善其症狀或抑制其進展之方法。特定而言，本揭示內容提供治療患者之癌症或GVHD、改善其症狀或抑制其進展的方法，其包括向患者投與治療有效量之如本文所闡述之ADI組合物，由此治療癌症或GVHD、改善其症狀或抑制其進展。因此，可將本文所闡述之ADI組合物投與患有以下疾病之個體：發炎性腸病(例如，克羅恩氏病(Crohn's disease)；潰瘍性結腸炎)；GVHD或癌症，包含但不限於白血病(例如急性骨髓性白血病及復發性急性骨髓性白血病)、黑素瘤、肉瘤(包含但不限於轉移性肉瘤、子宮平滑肌肉瘤)、胰腺癌、前列腺癌(例如但不限於激素難治性前列腺癌)、間皮瘤、淋巴細胞性白血病、慢性骨髓性白血病、淋巴瘤、小細胞肺癌、乳癌、卵巢癌、結腸直腸癌、胃癌(包含但不限於胃腺癌)、神經膠質瘤、多形性膠質母細胞瘤、視網膜母細胞瘤、神經母細胞瘤、非小細胞肺癌(NSCLC)、腎癌(包含但不限於腎細胞癌)、膀胱癌、子宮癌、食道癌、腦癌、頭頸癌(包含但不限於頭頸鱗狀細胞癌、舌癌)、子宮頸癌、睪丸癌、膽囊癌、膽管上皮癌及胃癌。

在一實施例中，本揭示內容提供藉由投與治療有效量之ADI-PEG 20來治療骨髓性白血病(例如但不限於急性骨髓性白血病(AML))、改善其症狀或抑制其進展之方法。在某些實施例中，骨髓性白血病(例如AML)缺少ASS、ASL或缺少二者。在另一實施例中，骨髓性白血病(例如，AML)並不包括移位t(15; 17)。在另一實施例中，本揭示內容提

供治療AML之方法，其包括約每3天一次、約每週一次、約每週兩次或約每2週一次投與ADI-PEG 20。在某些實施例中，投與用於治療AML之ADI-PEG 20之劑量介於約160 IU/m²與約360 IU/m²之間，且在其他實施例中劑量為約160 IU/m²、約170 IU/m²、180 IU/m²、190 IU/m²、200 IU/m²、210 IU/m²、220 IU/m²、230 IU/m²、240 IU/m²、250 IU/m²、260 IU/m²、270 IU/m²、280 IU/m²、290 IU/m²、300 IU/m²、310 IU/m²、約320 IU/m²、約330 IU/m²、340 IU/m²、約350 IU/m²、約360 IU/m²、約370 IU/m²、380 IU/m²、390 IU/m²、400 IU/m²、410 IU/m²、420 IU/m²、430 IU/m²、440 IU/m²、450 IU/m²、500 IU/m²、550 IU/m²、600 IU/m²、640 IU/m²或約700 IU/m²。在某些實施例中，其中使用ADI-PEG治療AML會誘導針對ADI之免疫反應，本揭示內容提供治療AML之方法，其中將ADI之劑量加倍且可增加至640 IU/m²/週或更高。在一特定實施例中，使用3.5-6.5個或在一實施例中4.5-5.5個PEG分子/ADI修飾用於治療AML之ADI。在另一實施例中，本揭示內容提供藉由投與包括ADI-PEG 20之組合物來治療AML之方法，其中該組合物包括使用5±1.5個PEG分子及在一實施例中5±1.5個直鏈PEG分子修飾之ADI，且在某些實施例中，該組合物包括小於約0.5%之原始ADI（亦即，未使用PEG修飾）及/或小於約5%之游離PEG。在另一實施例中，組合物包括組胺酸-HCL緩衝劑。

在一實施例中，本揭示內容提供藉由投與治療有效量之 ADI-PEG 20 來治療肉瘤(包含但不限於轉移性肉瘤)、改善其症狀或抑制其進展之方法。在某些實施例中，肉瘤缺少 ASS、ASL 或缺少二者。在另一實施例中，本揭示內容提供治療肉瘤之方法，其包括約每3天一次、約每週一次、約每週兩次或約每2週一次投與 ADI-PEG 20。在某些實施例中，投與用於治療 AML 之 ADI-PEG 20 之劑量介於約 160 IU/m² 與約 360 IU/m² 之間，且在其他實施例中劑量為約 160 IU/m²、約 170 IU/m²、180 IU/m²、190 IU/m²、200 IU/m²、210 IU/m²、220 IU/m²、230 IU/m²、240 IU/m²、250 IU/m²、260 IU/m²、270 IU/m²、280 IU/m²、290 IU/m²、300 IU/m²、310 IU/m²、約 320 IU/m²、約 330 IU/m²、340 IU/m²、約 350 IU/m²、約 360 IU/m²、約 370 IU/m²、380 IU/m²、390 IU/m²、400 IU/m²、410 IU/m²、420 IU/m²、430 IU/m²、440 IU/m²、450 IU/m²、500 IU/m²、550 IU/m²、600 IU/m²、640 IU/m² 或約 700 IU/m²。在某些實施例中，其中使用 ADI-PEG 治療肉瘤會誘導針對 ADI 之免疫反應，本揭示內容提供治療肉瘤之方法，其中將 ADI 之劑量加倍且可增加至 640 IU/m²/週或更高。在一特定實施例中，使用 3.5-6.5 個或在一實施例中 4.5-5.5 個 PEG 分子/ADI 修飾用於治療 AML 之 ADI。在另一實施例中，本揭示內容提供藉由投與包括 ADI-PEG 20 之組合物來治療肉瘤之方法，其中該組合物包括使用 5±1.5 個 PEG 分子及在一實施例中 5±1.5 個直鏈 PEG 分子修飾之

ADI，且在某些實施例中，該組合物包括小於約0.5%之原始ADI（亦即，未使用PEG修飾）及/或小於約5%之游離PEG。在另一實施例中，組合物包括組胺酸-HCL緩衝劑。

在一實施例中，本揭示內容提供藉由投與治療有效量之ADI-PEG 20與自體吞噬抑制劑之組合來治療胰腺癌、改善其症狀或抑制其進展的方法，該自體吞噬抑制劑係（例如）但不限於氣喹、3-甲基腺嘌呤、羥基氣喹、巴弗洛黴素A1、5-氨基-4-咪唑甲醯胺核苷(AICAR)、岡田酸、N6-巰基嘌呤核苷、渥曼青黴素及長春鹼。在某些實施例中，胰腺癌缺少ASS、ASL或缺少二者。在另一實施例中，本揭示內容提供治療胰腺癌之方法，其包括約每3天一次、約每週一次、約每週兩次或約每2週一次投與ADI-PEG 20與治療有效量之自體吞噬抑制劑（氣喹）之組合。就此而言，氣喹之治療有效劑量可為約600 mg基質之初始劑量，隨後額外300 mg基質，且在之後連續兩天之每一天中為300 mg基質之單一劑量。此代表在三天內2.5 g磷酸氣喹或1.5 g基質之總劑量。在其他實施例中，劑量可為約300 mg基質。可根據需要由熟練臨床醫師使用業內已知之劑量來修改氣喹或其他自體吞噬抑制劑之劑量。如熟習此項技術者所理解，自體吞噬抑制劑可在包括ADI-PEG 20之組合物之前、同時或在之後投與。在某些實施例中，投與用於治療胰腺癌之ADI-PEG 20之劑量介於約160 IU/m²與約360 IU/m²之間，且在其他實施例中劑量為約160 IU/m²、約170

IU/m²、180 IU/m²、190 IU/m²、200 IU/m²、210 IU/m²、220 IU/m²、230 IU/m²、240 IU/m²、250 IU/m²、260 IU/m²、270 IU/m²、280 IU/m²、290 IU/m²、300 IU/m²、310 IU/m²、約320 IU/m²、約330 IU/m²、340 IU/m²、約350 IU/m²、約360 IU/m²、約370 IU/m²、380 IU/m²、390 IU/m²、400 IU/m²、410 IU/m²、420 IU/m²、430 IU/m²、440 IU/m²、450 IU/m²、500 IU/m²、550 IU/m²、600 IU/m²、640 IU/m²或約700 IU/m²。在某些實施例中，其中使用ADI-PEG與氣喹之組合治療胰腺癌會誘導針對ADI之免疫反應，本揭示內容提供治療胰腺癌之方法，其中將ADI之劑量加倍且可增加至640 IU/m²/週或更高。在一特定實施例中，使用3.5-6.5個或在一實施例中4.5-5.5個PEG分子/ADI修飾用於治療胰腺癌之ADI。在另一實施例中，本揭示內容提供藉由投與氣喹或其他適當自體吞噬抑制劑與包括ADI-PEG 20之組合物之組合來治療胰腺癌之方法，其中該組合物包括使用5±1.5個PEG分子及在一實施例中5±1.5個直鏈PEG分子修飾之ADI，且在某些實施例中，該組合物包括小於約0.5%之原始ADI（亦即，未使用PEG修飾）及/或小於約5%之游離PEG。在另一實施例中，組合物包括組胺酸-HCL緩衝劑。

在一實施例中，本揭示內容提供藉由投與治療有效量之ADI-PEG 20與自體吞噬抑制劑之組合來治療小細胞肺癌、改善其症狀或抑制其進展的方法。在某些實施例中，小細

胞肺癌缺少 ASS、ASL 或缺少二者。在另一實施例中，本揭示內容提供治療小細胞肺癌之方法，其包括約每3天一次、約每週一次、約每週兩次或約每2週一次投與 ADI-PEG 20 與治療有效量之自體吞噬抑制劑(氣喹)之組合。就此而言，氣喹之治療有效劑量可為初始劑量約 600 mg 基質之初始劑量，隨後額外 300 mg 基質，且在之後連續兩天之每一天中為 300 mg 基質之單一劑量。此代表在三天內之 2.5 g 磷酸氣喹或 1.5 g 基質之總劑量。在其他實施例中，劑量可為約 300 mg 基質。可根據需要由熟練臨床醫師使用業內已知之劑量來修改氣喹之劑量。如熟習此項技術者所理解，自體吞噬抑制劑可在包括 ADI-PEG 20 之組合物之前、同時或在之後投與。在某些實施例中，投與用於治療小細胞肺癌之 ADI-PEG 20 之劑量介於約 160 IU/m² 與約 360 IU/m² 之間，且在其他實施例中劑量為約 160 IU/m²、約 170 IU/m²、180 IU/m²、190 IU/m²、200 IU/m²、210 IU/m²、220 IU/m²、230 IU/m²、240 IU/m²、250 IU/m²、260 IU/m²、270 IU/m²、280 IU/m²、290 IU/m²、300 IU/m²、310 IU/m²、約 320 IU/m²、約 330 IU/m²、340 IU/m²、約 350 IU/m²、約 360 IU/m²、約 370 IU/m²、380 IU/m²、390 IU/m²、400 IU/m²、410 IU/m²、420 IU/m²、430 IU/m²、440 IU/m²、450 IU/m²、500 IU/m²、550 IU/m²、600 IU/m²、640 IU/m² 或約 700 IU/m²。在某些實施例中，其中使用 ADI-PEG 與氣喹之組合治療小細胞肺癌會誘導針對 ADI 之免疫反應，本揭示內容提供治療小細胞肺癌之方

法，其中將ADI之劑量加倍且可增加至640 IU/m²/週或更高。在一特定實施例中，使用3.5-6.5個或在一實施例中4.5-5.5個PEG分子/ADI修飾用於治療小細胞肺癌之ADI。在另一實施例中，本揭示內容提供藉由投與氣喹與包括ADI-PEG 20之組合物之組合來治療小細胞肺癌之方法，其中該組合物包括使用5±1.5個PEG分子及在一實施例中5±1.5個直鏈PEG分子修飾之ADI，且在某些實施例中，該組合物包括小於約0.5%之原始ADI（亦即，未使用PEG修飾）及/或小於約5%之游離PEG。在另一實施例中，組合物包括組胺酸-HCL緩衝劑。

在一實施例中，本揭示內容提供藉由投與治療有效量之ADI-PEG 20與自體吞噬抑制劑之組合來治療肉瘤（包含但不限於轉移性肉瘤）、改善其症狀或抑制其進展之方法。在某些實施例中，肉瘤缺少ASS、ASL或缺少二者。在另一實施例中，本揭示內容提供治療肉瘤之方法，其包括約每3天一次、約每週一次、約每週兩次或約每2週一次投與ADI-PEG 20與治療有效量之自體吞噬抑制劑（氣喹）之組合。就此而言，氣喹之治療有效劑量可為約600 mg基質之初始劑量，隨後額外300 mg基質，且在之後連續兩天之每一天中為300 mg基質之單一劑量。此代表在三天內2.5 g磷酸氣喹或1.5 g基質之總劑量。在其他實施例中，劑量可為約300 mg基質。可根據需要由熟練臨床醫師使用業內已知之劑量來修改氣喹之劑量。如熟習此項技術者所理解，自體吞噬抑制劑可在包括ADI-PEG 20之組合物之前、同時或

在之後投與。在某些實施例中，投與用於治療肉瘤之ADI-PEG 20之劑量介於約160 IU/m²與約360 IU/m²之間，且在其他實施例中劑量為約160 IU/m²、約170 IU/m²、180 IU/m²、190 IU/m²、200 IU/m²、210 IU/m²、220 IU/m²、230 IU/m²、240 IU/m²、250 IU/m²、260 IU/m²、270 IU/m²、280 IU/m²、290 IU/m²、300 IU/m²、310 IU/m²、約320 IU/m²、約330 IU/m²、340 IU/m²、約350 IU/m²、約360 IU/m²、約370 IU/m²、380 IU/m²、390 IU/m²、400 IU/m²、410 IU/m²、420 IU/m²、430 IU/m²、440 IU/m²、450 IU/m²、500 IU/m²、550 IU/m²、600 IU/m²、640 IU/m²或約700 IU/m²。在某些實施例中，其中使用ADI-PEG與氣嗒之組合治療肉瘤會誘導針對ADI之免疫反應，本揭示內容提供治療肉瘤之方法，其中將ADI之劑量加倍且可增加至640 IU/m²/週或更高。在一特定實施例中，使用3.5-6.5個或在一實施例中4.5-5.5個PEG分子/ADI修飾用於治療肉瘤之ADI。在另一實施例中，本揭示內容提供藉由投與氣嗒與包括ADI-PEG 20之組合物之組合來治療肉瘤之方法，其中該組合物包括使用5±1.5個PEG分子及在一實施例中5±1.5個直鏈PEG分子修飾之ADI，且在某些實施例中，該組合物包括小於約0.5%之原始ADI（亦即，未使用PEG修飾）及/或小於約5%之游離PEG。在另一實施例中，組合物包括組胺酸-HCL緩衝劑。

在一實施例中，本揭示內容提供藉由投與治療有效量之ADI-PEG 20與多西他賽之組合來治療黑素瘤、改善其症狀或抑制其進展之方法。在某些實施例中，黑素瘤缺少

ASS、ASL或缺少二者。在另一實施例中，本揭示內容提供治療黑素瘤之方法，其包括約每3天一次、約每週一次、約每週兩次或約每2週一次投與ADI-PEG 20與治療有效量之多西他賽之組合。就此而言，治療有效之多西他賽劑量可包括約每3週一次經30分鐘至1小時經靜脈內投與75 mg/m²或100 mg/m²。如熟練臨床醫師所理解，可端視疾病症候及/或先前治療修改多西他賽之劑量，且多西他賽可在包括ADI-PEG 20之組合物之前、同時或在之後投與。在某些實施例中，投與用於治療黑素瘤之ADI-PEG 20之劑量介於約160 IU/m²與約360 IU/m²之間，且在其他實施例中劑量為約160 IU/m²、約170 IU/m²、180 IU/m²、190 IU/m²、200 IU/m²、210 IU/m²、220 IU/m²、230 IU/m²、240 IU/m²、250 IU/m²、260 IU/m²、270 IU/m²、280 IU/m²、290 IU/m²、300 IU/m²、310 IU/m²、約320 IU/m²、約330 IU/m²、340 IU/m²、約350 IU/m²、約360 IU/m²、約370 IU/m²、380 IU/m²、390 IU/m²、400 IU/m²、410 IU/m²、420 IU/m²、430 IU/m²、440 IU/m²、450 IU/m²、500 IU/m²、550 IU/m²、600 IU/m²、640 IU/m²或約700 IU/m²。在某些實施例中，其中使用ADI-PEG與多西他賽之組合治療黑素瘤會誘導針對ADI之免疫反應，本揭示內容提供治療黑素瘤之方法，其中將ADI之劑量加倍且可增加至640 IU/m²/週或更高。在一特定實施例中，使用3.5-6.5個或在一實施例中4.5-5.5個PEG分子/ADI修飾用於治療黑素瘤之ADI。在另一實施例中，本揭示內容提供

藉由投與氣喹與包括 ADI-PEG 20 之組合物之組合來治療黑素瘤之方法，其中該組合物包括使用 5 ± 1.5 個 PEG 分子及在一實施例中 5 ± 1.5 個直鏈 PEG 分子修飾之 ADI，且在某些實施例中，該組合物包括小於約 0.5% 之原始 ADI (亦即，未使用 PEG 修飾) 及 / 或小於約 5% 之游離 PEG。在另一實施例中，組合物包括組胺酸-HCL 緩衝劑。

在一實施例中，本揭示內容提供藉由投與治療有效量之 ADI-PEG 20 與順鉑之組合來治療黑素瘤、改善其症狀或抑制其進展之方法。在某些實施例中，黑素瘤缺少 ASS、ASL 或缺少二者。在另一實施例中，本揭示內容提供治療黑素瘤之方法，其包括約每 3 天一次、約每週一次、約每週兩次或約每 2 週一次投與 ADI-PEG 20 與治療有效量之順鉑之組合。就此而言，治療有效之順鉑劑量可包括投與每循環 (每 3-4 週) 一次以 $50-100 \text{ mg/m}^2$ 進行投與，或對於總共 100 mg/m^2 / 循環經 5 天每日進行投與。如熟練臨床醫師所理解，可端視疾病症候、個別患者及 / 或先前治療修改順鉑之劑量，且順鉑可在包括 ADI-PEG 20 之組合物之前、同時或在之後投與。在某些實施例中，投與用於治療黑素瘤之 ADI-PEG 20 之劑量介於約 160 IU/m^2 與約 360 IU/m^2 之間，且在其他實施例中劑量為約 160 IU/m^2 、約 170 IU/m^2 、 180 IU/m^2 、 190 IU/m^2 、 200 IU/m^2 、 210 IU/m^2 、 220 IU/m^2 、 230 IU/m^2 、 240 IU/m^2 、 250 IU/m^2 、 260 IU/m^2 、 270 IU/m^2 、 280 IU/m^2 、 290 IU/m^2 、 300 IU/m^2 、 310 IU/m^2 、約 320 IU/m^2 、約 330 IU/m^2 、 340 IU/m^2 、約 350 IU/m^2 、約

360 IU/m²、約 370 IU/m²、380 IU/m²、390 IU/m²、400 IU/m²、410 IU/m²、420 IU/m²、430 IU/m²、440 IU/m²、450 IU/m²、500 IU/m²、550 IU/m²、600 IU/m²、640 IU/m² 或約 700 IU/m²。在某些實施例中，其中使用 ADI-PEG 與順鉑之組合治療黑素瘤會誘導針對 ADI 之免疫反應，本揭示內容提供治療黑素瘤之方法，其中將 ADI 之劑量加倍且可增加至 640 IU/m²/週或更高。在一特定實施例中，使用 3.5-6.5 個或在一實施例中 4.5-5.5 個 PEG 分子/ADI 修飾用於治療黑素瘤之 ADI。在另一實施例中，本揭示內容提供藉由投與順鉑與包括 ADI-PEG 20 之組合物之組合來治療黑素瘤之方法，其中該組合物包括使用 5±1.5 個 PEG 分子及在一實施例中 5±1.5 個直鏈 PEG 分子修飾之 ADI，且在某些實施例中，該組合物包括小於約 0.5% 之原始 ADI (亦即，未使用 PEG 修飾) 及 / 或小於約 5% 之游離 PEG。在另一實施例中，組合物包括組胺酸-HCL 緩衝劑。

在一實施例中，本揭示內容提供藉由投與治療有效量之 ADI-PEG 20 與 mTOR 抑制劑 (例如但不限於雷帕黴素、替西羅莫司 (temsirolimus)、依維莫司及地磷莫司 (ridaforolimus)) 之組合來治療腎細胞癌、改善其症狀或抑制其進展之方法。在某些實施例中，腎細胞癌缺少 ASS、ASL 或缺少二者。在另一實施例中，本揭示內容提供治療腎細胞癌之方法，其包括約每 3 天一次、約每週一次、約每週兩次或約每 2 週一次投與 ADI-PEG 20 與治療有效量之 mTOR 抑制劑 (例如雷帕黴素) 之組合。可根據需

要由熟練臨床醫師使用業內已知之劑量來測定雷帕黴素或其他mTOR抑制劑之劑量。如熟習此項技術者所理解，mTOR抑制劑可在包括ADI-PEG 20之組合物之前、同時或在之後投與。在某些實施例中，投與用於治療腎細胞癌瘤之ADI-PEG 20之劑量介於約160 IU/m²與約360 IU/m²之間，且在其他實施例中劑量為約160 IU/m²、約170 IU/m²、180 IU/m²、190 IU/m²、200 IU/m²、210 IU/m²、220 IU/m²、230 IU/m²、240 IU/m²、250 IU/m²、260 IU/m²、270 IU/m²、280 IU/m²、290 IU/m²、300 IU/m²、310 IU/m²、約320 IU/m²、約330 IU/m²、340 IU/m²、約350 IU/m²、約360 IU/m²、約370 IU/m²、380 IU/m²、390 IU/m²、400 IU/m²、410 IU/m²、420 IU/m²、430 IU/m²、440 IU/m²、450 IU/m²、500 IU/m²、550 IU/m²、600 IU/m²、640 IU/m²或約700 IU/m²。在某些實施例中，其中使用ADI-PEG與氫喹之組合治療腎細胞癌瘤會誘導針對ADI之免疫反應，本揭示內容提供治療腎細胞癌瘤之方法，其中將ADI之劑量加倍且可增加至640 IU/m²/週或更高。在一特定實施例中，使用3.5-6.5個或在一實施例中4.5-5.5個PEG分子/ADI修飾用於治療腎細胞癌瘤之ADI。在另一實施例中，本揭示內容提供藉由投與雷帕黴素或其他適當mTOR抑制劑與包括ADI-PEG 20之組合物之組合來治療腎細胞癌瘤之方法，其中該組合物包括使用5±1.5個PEG分子及在一實施例中5±1.5個直鏈PEG分子修飾之ADI，且在某些實施例中，該組合物包括小於約0.5%之原

始 ADI (亦即, 未使用 PEG 修飾) 及 / 或小於約 5% 之游離 PEG。在另一實施例中, 組合物包括組胺酸-HCL 緩衝劑。

在某些實施例中, 本揭示內容提供治療患者之癌症、改善其症狀或抑制其進展之方法, 其包括向患者投與如本文所闡述之包括 ADI 之組合物, 其中該癌症並非黑素瘤、胰腺癌、前列腺癌、小細胞肺癌、間皮瘤、淋巴細胞性白血病、慢性骨髓性白血病、淋巴瘤、肝瘤或肉瘤。

本揭示亦提供治療患者之發炎病症、改善其症狀或抑制其進展之方法, 其包括向患者投與如本文所述之包括 ADI (例如 ADI-PEG, 特別是 ADI-PEG 20) 單獨或與一或多種其他治療劑組合之組合物。在一個實施例中, 本揭示亦提供治療患者之發炎腸病、改善其症狀或抑制其進展之方法, 其包括向患者投與如本文所述之包括 ADI (例如 ADI-PEG, 特別是 ADI-PEG 20) 單獨或與一或多種其他治療劑組合之組合物。就此而言, 本揭示提供治療患者之克羅恩氏病或潰瘍性結腸炎、改善其症狀或抑制其進展之方法, 其包括向患者投與如本文所述之包括 ADI (例如 ADI-PEG, 特別是 ADI-PEG 20) 單獨或與一或多種其他治療劑組合之組合物。

在另一實施例中, 本揭示提供一種治療患者之癌症、改善其症狀或抑制其進展之方法, 其包括向患者投與如本文所述之包括 ADI 及視情況一或多種其他治療劑之組合物, 其中該癌症缺少 ASS、ASL 或二者。就此而言, ASS 或 ASL

缺少可為表現減小(如 mRNA 表現或蛋白質表現所測量)，或可為蛋白質活性減小，且通常包括在統計學上顯著之表現或活性減小(如熟習此項技術者所測定)。與已知無癌症之適當對照試樣中之表現或活性相比，減小之 ASS 或 ASL 表現或活性可為表現或活性減小約 5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70% 或更高。在某些實施例中，ASS 或 ASL 表現或活性與無癌症對照試樣中之表現或活性相比降低至少二倍。

在某些實施例中，ASS 或 ASL 表現或活性之減小係由 ASS 或 ASL 啟動子之甲基化造成。在另一實施例中，ASS 或 ASL 之表現或活性減小係由 DNA 突變(例如一或多個點突變、小缺失、插入及諸如此類)或導致基因缺失之染色體異常造成。在一個實施例中，癌症係 ASS 或 ASL 陰性，意即觀察不到表現或活性。

可使用業內已知之任一方法量測 ASS 或 ASL 表現或活性之減小，例如但不限於定量 PCR、免疫組織化學、酶活性分析(例如，量測瓜胺酸至精胺琥珀酸鹽之轉化或精胺琥珀酸鹽至精胺酸及富馬酸鹽之轉化之分析；例如，參見圖 1)及諸如此類。

因此，本發明提供治療患者之癌症、改善其症狀或抑制其進展之方法，其包括向患者投與如本文所闡述之包括 ADI 之組合物，其中該癌症展現減小 ASS 或 ASL 或二者之表現或活性，其中該癌症包含但不限於白血病(例如急性骨髓性白血病及復發性急性骨髓性白血病)、黑素瘤、肉

瘤(包含但不限於轉移性肉瘤、子宮平滑肌肉瘤)、胰腺癌、前列腺癌(例如但不限於激素難治性前列腺癌)、間皮瘤、淋巴細胞性白血病、慢性骨髓性白血病、淋巴瘤、小細胞肺癌、乳癌、卵巢癌、結腸直腸癌、胃癌(包含但不限於胃腺癌)、神經膠質瘤、多形性膠質母細胞瘤、視網膜母細胞瘤、神經母細胞瘤、非小細胞肺癌(NSCLC)、腎癌(包含但不限於腎細胞癌)、膀胱癌、子宮癌、食道癌、腦癌、頭頸癌(包含但不限於頭頸鱗狀細胞癌、舌癌)、子宮頸癌、睪丸癌、膽囊癌、膽管上皮癌及胃癌。

參考文獻中之各種研究已展示，下列腫瘤中缺少ASS：

表1：缺少ASS之腫瘤

腫瘤類型	ASS缺少(%)
前列腺癌	88/88 (100%)
腎癌	98/98 (100%) 41/45 (91%) 31/31 (100%)
淋巴瘤	511/532 (96%)
肉瘤	619/701 (88%)
胰腺癌	41/47 (87%)
急性髓性白血病	46/53 (87%)
小細胞肺癌	7/16 (44%)
HCC	33/44 (75%) 20/20 (100%)
黑素瘤	119/119 (100%) 24/29 (83%) 17/27 (63%)

腫瘤類型	ASS缺少(%)
	20/20 (100%)
膀胱癌	31/48 (65%) 133/242 (55%)
間皮瘤	52/82 (63%)
胃癌	68/121 (56%)
乳癌	46/111 (41%)
非小細胞肺癌	28/90 (31%)
膠質母細胞瘤	39/55 (71%)
結腸直腸癌	31 (3%)
卵巢癌	診斷，23/54 (43%) 復發，25/34 (74%)

因此，具體而言，本文涵蓋單獨或與其他治療組合使用 ADI-PEG 20 治療該等缺少 ASS 之癌症。

本發明進一步提供治療患者之癌症、改善其症狀或抑制其進展之方法，其包括向患者投與如本文所闡述之包括 ADI (例如 ADI-PEG 及特定而言 ADI-PEG 20) 與自體吞噬抑制劑之組合之組合物。在一實施例中，本發明提供治療患者之癌症之方法，其包括向患者投與治療有效量如本文所闡述之包括 ADI 與自體吞噬抑制劑之組合之組合物，其中該癌症係胰腺癌或小細胞肺癌。

在某些實施例中，本發明提供一種治療方法，其中投與本文所闡述之包括 ADI 之組合物使得血漿中之精胺酸空乏至少一個月、2 個月、3 個月、4 個月、5 個月、6 個月或更長時間。

實例

實例 1

精胺酸去亞胺酶減小缺少精胺琥珀酸合酶之急性骨髓性 白血細胞之存活率

急性骨髓性白血病(AML)係成人中之最常見白血病及兒童中之第二最常見白血病，其導致健康護理成本佔有顯著份額且每年僅在美國即發生一萬個病例。呈天門冬醯胺酶形式之基於酶之療法已使急性成淋巴細胞性白血病之治療發生革命性變化，且愈加關注利用AML中之類似易處理代謝缺陷。因缺少用於精胺酸產生之限速酶精胺琥珀酸合成酶(ASS)產生之精胺酸營養缺陷型腫瘤易受精胺酸降解酶影響。

在此實例中，使用AML細胞系及原發性AML試樣測定ASS陰性是否可預測聚乙二醇化精胺酸去亞胺酶(ADI-PEG 20)之效能。在7種白血細胞系中之三種(K562、Kasumi及KG-1)中及在來自患有細胞遺傳學正常及異常核型AML之患者之所有9種試樣中鑑別出缺乏ASS蛋白。ASS啟動子之甲基化與ASS mRNA之含量減小及ASS表現之不存在有關。來自患有AML之患者之骨髓環鑽揭示，87% (46/53)之試樣不存在ASS蛋白(藉由免疫組織化學)，此表明ASS表現可在活體內用作對於ADI-PEG 20之反應之生物標記物。在具有移位t (15;17)之急性前髓細胞性白血病中看到增加之ASS mRNA含量及可檢測ASS蛋白表現。

顯著地，ADI-PEG 20減小ASS陰性AML細胞系之存活

率，而ASS陽性對照細胞系Fujioka及U937抵抗藥物誘導之精胺酸抽離。已在NOD/SCID小鼠中鑑別出具有良好移植物植入之原發性ASS陰性AML試樣，且開始使用此原發性AML異種移植物模型研究ADI-PEG 20之效能。基於本文所闡述之結果及人類中低毒性精胺酸抽離之潛在效能，已計劃在患有復發性AML之患者中進行ADI-PEG 20之階段II試驗。

實例 2

抑制自體吞噬會增加缺乏精胺琥珀酸合酶之胰腺癌細胞之精胺酸去亞胺酶誘導之細胞死亡

自體吞噬之作用及其對於細胞死亡之貢獻備受爭議。據猜測，自體吞噬在精胺酸抽離設計中具有保護作用且藉由羥基氯喹(ChQ)抑制自體吞噬會增加細胞死亡。

在活體外及活體內單獨使用聚乙二醇化精胺酸去亞胺酶(ADI-PEG)或在ChQ存在下處理人類胰腺癌細胞系MIA-PaCa2。藉由碘化丙錠(PI)-FACS量測細胞死亡以測定亞-G₁ DNA含量，且藉由膜聯蛋白V-PI流式細胞術來評估細胞凋亡。藉由西方印跡(western blot)及ELISA來評估卡斯特蛋白酶3(caspase 3)之裂解。藉由使用西方印跡及ELISA評估LC3及核膜孔蛋白p62(p62)之表現程度來量測自體吞噬。

藉由在無胸腺小鼠中生成皮下異種移植物隨後腹膜腔內注射PBS、ADI-PEG、ChQ或ADI-PEG及ChQ之組合來實施活體內實驗。在屠宰時，取出腫瘤以用於分析。藉由西方

印跡分析腫瘤裂解物之卡斯蛋白酶3及p62。亦實施針對活化卡斯蛋白酶3及DNA碎裂(TUNEL)之免疫組織化學染色分析。

為確定ADI是否以卡斯蛋白酶依賴性方式誘導細胞凋亡及自體吞噬，將細胞與ADI-PEG或ADI-PEG及ZVAD-fmk(泛卡斯蛋白酶抑制劑)之組合一起培育。如圖2A中所展示，與ADI-PEG一起培育會增加亞-G₀/G₁中之細胞數量，且此效應使用泛卡斯蛋白酶抑制劑ZVAD-fmk進行共培育時可逆。在活體外將胰腺癌細胞與ADI-PEG (0.3 µg/mL)一起培育72小時會誘導膜聯蛋白V去極化，此係另一細胞凋亡指示(圖2B)。進一步顯示，ADI在72小時內以劑量依賴性方式誘導卡斯蛋白酶裂解及LC3B與PE之偶合。該等結果表明，ADI在活體外誘導卡斯蛋白酶依賴性細胞凋亡及自體吞噬。

為確定抑制自體吞噬是否增強ADI誘導之細胞凋亡，將細胞與ADI-PEG (0.3 µg/mL)在使用或不使用ChQ (5 µM)之情形下一起培養72小時。西方印跡分析揭示藉由ADI可誘導細胞凋亡，如藉由卡斯蛋白酶3裂解所量測(圖3)。藉由西方印跡分析量測p62、LC3B-I及LC3B-II之含量以檢驗自體吞噬通量。添加ChQ會減小自體吞噬通量，如藉由p62含量之增加及LC3B-I與LC3B-II二者積累之增加所展示(圖3)。該等結果顯示，ChQ在活體外增強ADI誘導之細胞凋亡並抑制自體吞噬通量。

為檢驗在與ADI組合使用時ChQ是否改變細胞凋亡或非

細胞凋亡性細胞死亡之量，將細胞與單獨 ADI-PEG 或 ADI-PEG 及 ChQ 之組合一起培育。向細胞培養物中添加 ChQ 使得亞-G₀/G₁ 中之細胞百分比有所增加(圖 4B)。與之相比，與 ADI-PEG 及 ADI-PEG 與 ChQ 一起培育之培養物展示類似之膜聯蛋白 V 陽性細胞百分比(圖 4A)。因此，該等結果表明，ChQ 在活體外增強非細胞凋亡性細胞死亡。

為評價 ChQ 對於 ADI 依賴性腫瘤生長阻抑之效應，在無胸腺小鼠中確立 MIA PaCa-2 之皮下異種移植物。然後使用 PBS、ADI-PEG、ChQ 或 ADI-PEG + ChQ 在長達 7 週內治療小鼠。每週一次量測腫瘤體積兩次。如圖 5 中所展示，使用 ADI-PEG + ChQ 治療之小鼠之腫瘤體積顯著小於單獨使用 ADI-PEG 治療之小鼠。在實施無痛處死後，將腫瘤保存於 10% 福爾馬林(formalin)中並針對細胞凋亡標記物(包含活性卡斯蛋白酶 3、增加之 p62 及 DNA 裂解物)進行染色(圖 6)。該等結果顯示，ADI-PEG 及 ChQ 之組合展現對於腫瘤生長之協同阻抑。

總而言之，精胺酸抽離會誘導缺少 ASS 之細胞系中之自體吞噬及細胞死亡。其展示自體吞噬在用於胰腺癌細胞之精胺酸抽離中發揮保護性作用，且藉由羥基氣嗒使自體吞噬失活使得在活體內增強腫瘤阻抑。

實例 3

精胺酸去亞胺酶抑制缺乏精胺琥珀酸合酶之小細胞肺癌
腫瘤生長

小細胞肺癌(SCLC)之特徵在於對於化學療法具有強烈初

始反應，但大部分患者會繼續復發(Dowell, Am J med Sci 339(1):68-76, 2010 ; Rodriguez及Lilenbaum, Curr Oncol Rep 12(5):327-334, 2010)。在一線化學療法失敗之彼等患者中，對二級治療產生反應之機會維持在約為10%，且該等患者中之總存活率僅為3-4個月。另外，當前治療缺乏腫瘤特異性且產生許多毒性，且可由此將治療劑投與限於最大有效劑量以下(Demedts等人, Eur Respir J 35(1):202-215, 2010 ; Dowell, Am J med Sci 339(1):68-76, 2010 ; Rodriguez及Lilenbaum, Curr Oncol Rep 12(5):327-334, 2010)。此情形突出顯示了需要繼續研發具有高治療指數之有效抗癌藥。

此實例闡述SCLC中之精胺酸營養缺陷程度及ADI-PEG 20精胺酸療法在此疾病中之有效性。

細胞系、抗體及化學試劑

自路德維格癌症研究所(Ludwig Institute for Cancer Research) (紀念斯隆-凱特琳癌症中心紐約分支機構(New York Branch at Memorial Sloan-Kettering Cancer Center, MSKCC))之細胞庫獲得一組10例SCLC。在MSKCC處確立細胞或自美國典型培養物保藏中心(American Type Culture Collection) (ATCC ; Manassas, VA, 美國)購買。在補充有10% v/v胎牛血清、5% w/v青黴素(penicillin)/鏈黴素(streptomycin)(5000單位 ml^{-1} 青黴素G/5000 mg ml^{-1} 硫酸鏈黴素)及1% L-麩醯胺酸之RPMI-1640培養基中生長細胞。藉由西方印跡使用抗ASS抗體(Clone 25, BD Biosciences,

San Jose, CA, 美國) 評價精胺琥珀酸合成酶(ASS)之細胞表現。根據製造商說明書使用 LC3B (Cell Signaling, Danvers, MA, 美國)、活性卡斯蛋白酶-3 (Cell Signaling)、總卡斯蛋白酶-3 (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, 美國)及肌動蛋白(GeneTex, Irvine, CA, 美國)。自 Axxora (San Diego, CA, 美國)獲得鹽酸拓撲替康(topotecan hydrochloride)且自 Sigma-Aldrich (St Louis, MO, 美國)獲得氣喹。

免疫組織化學

使用抗ASS抗體195-21-1 (LICR, New York, NY, 美國)將腫瘤及正常組織染色，如 Jungbluth 等人 (Mod Pathol 23(增刊1):387A, 2010)中所詳述。

西方印跡分析

在RIPA裂解緩衝劑(50 mM Tris-HCl、0.05% SDS、0.5% 去氧膽酸鈉、150 mM NaCl、5 mM EDTA加蛋白酶抑制劑混合劑緩衝劑(Roche Applied Science, Indianapolis, IN, 美國))中製備SCLC細胞系之全細胞裂解物。使用Pierce BCA蛋白質分析(Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL, 美國)測定蛋白質之量，且藉由SDS-PAGE使用4-12%凝膠(NuPAGE, Invitrogen Life Technologies)拆分相等量蛋白質。將蛋白質轉移至PVDF膜(Millipore, Billerica, MA, 美國)中，使用5% BSA阻斷並使用適當抗體在4°C下過夜探測。在洗滌後，然後使用適當二級抗體探測膜，隨後最終使用ECL試劑(Perkin-Elmer, Fremont CA, 美國)使蛋白質

可視化。

定量即時PCR

對於RNA提取而言，將細胞沈澱物溶於600 μ l TRI試劑溶液(Ambion, Austin, TX, 美國)中，且然後添加60 μ l 溴氯丙烷。然後向試管中添加大約兩滴最佳切割溫度化合物(Miles公司, Elkhart, IN, 美國)且將混合物渦旋並在室溫下靜置2 min。在以14,000 r.p.m.離心10 min之後，將上清液取至新試管中，其中添加相等體積之100%異丙醇以使RNA沈澱。在以14,000 r.p.m.離心後，在75%乙醇中洗滌RNA沈澱物並再次離心，然後再懸浮於50 μ l溫水中。使用奈米光度計(Implen公司, Westlake Village, CA, 美國)測定RNA濃度。

對於cDNA之擴增而言，將1.5 μ g RNA添加至總體積為20 μ l之包括10X反應緩衝劑(Qiagen, Valencia, CA, 美國)、5 mM dNTPase (Qiagen)、Oligo DT (Qiagen)、逆轉錄酶 (Invitrogen Life Technologies) 及 RNase Out (Invitrogen)之cDNA反應混合物中。對於定量即時(qRT)-PCR反應而言，使1.5 μ l cDNA與總反應體積為10 μ l之含有5 μ l SYBRGreen (Invitrogen)、0.02 μ l Rox、0.2 μ l引物及水之反應混合物混合。對於ASS而言，引物係F: 5'-TTTAAGCAGACTAAGGGG-3' (SEQ ID NO:3)及R: 5'-CCATCCCAGGTTATAAGCACA-3' (SEQ ID NO:4)。使用7500快速即時PCR系統(Applied Biosystems, Carlsbad, CA, 美國)實施qRT-PCR分析，其中使用GAPDH進行表現之正規化。

使用公式 $2^{(-\Delta\Delta CT)}$ 測定基因表現之相對量化(靶RNA之相對量)。

增殖分析

為評價 ADI-PEG 20 對於黏附細胞之抗增殖性效應，以 2×10^3 個細胞/孔之密度將細胞平鋪於 96 微孔組織培養板中並使其黏附過夜。第二天，使用介於 0 至 10 mIU ml⁻¹ 之間之 ADI-PEG 20 (DesignRx Pharmaceuticals Vacaville, CA, 美國，其係 Polaris Group, San Diego, CA, 美國之子公司) 處理細胞。在培育 120 h 之後，使用 (3-(4,5-二甲基噻唑-2-基)-5-(3-羧基甲氧基苯基)-2-(4-磺苯基)-2H-四唑鎬) (MTS, CellTiter 96 AQueous One Solution, Promega, Madison, WI, 美國) 根據製造商方案測定細胞存活率。將 20 微升 MTS 試劑添加至適當對照及分析孔中，然後將板在 37°C 下培育 2 h 並在 490 nm 下讀取吸光度。藉由減去背景 MTS 吸光度來測定每一處理之絕對吸光度，且計算平均及標準偏差。使用 MTS 分析評價自體吞噬抑制劑 氯喹 (Sigma) 對於細胞增殖之效應。

為評價 ADI-PEG 20 在非黏附細胞中之活性，以 1×10^5 個細胞/孔之密度將細胞平鋪於 24 孔組織培養板中。然後添加含有 ADI-PEG 20 (最終濃度介於 0-10 mIU ml⁻¹ 之間) 之其他培養基。為量測在與 ADI-PEG 20 一起培育 120 h 後之增殖變化，收集細胞，洗滌並在 RIPA 緩衝劑中裂解。然後使用 BSA 蛋白質分析測定每一處理之總蛋白質作為總細胞數量之量度。至少一式三份實施所有處理。

用於亞-G1染色之碘化丙錠染色

藉由碘化丙錠染色細胞之FACS量測細胞凋亡，如Riccardi等人(Riccardi及Nicoletti, Nat Protoc 1(3):1458-1461, 2006)所詳述。將細胞平鋪於24孔板中並使用ADI-PEG 20處理120 h。然後收穫細胞，洗滌並固定於70%乙醇中。然後使用含有 $10 \mu\text{gml}^{-1}$ 無DNase之RNase A之 $20 \mu\text{gml}^{-1}$ 碘化丙錠(Sigma-Aldrich)將DNA染色。然後在BD FACSCalibur (BD Biosciences)上讀取細胞並使用Flow Jo軟體(Tree Star, Ashland, OR, 美國)進行分析。

ASS之小干擾RNA下調

為進一步評價因應ADI-PEG 20處理之細胞ASS表現之重要性，經由使用ASS特異性siRNA沉默ASS之表現。自Integrated DNA technologies (IDT, Coralville, IA, 美國)針對編碼ASS之區域獲得小干擾RNA構造體。僅選擇不與任何其他轉錄物匹配之siRNA構造體用於進一步實驗。

以 6×10^5 個細胞/培養皿之密度將精胺琥珀酸合成酶陽性SW1222平鋪於100 mm組織培養皿中之8 ml培養基中並使其黏附過夜。對於轉染而言，將 $10 \mu\text{l}$ $10 \mu\text{M}$ ASS siRNA添加至 $990 \mu\text{l}$ Opti-MEM培養基中，且在 $980 \mu\text{l}$ Opti-MEM培養基 (Invitrogen Life Technologies) 中稀釋 $20 \mu\text{l}$ Lipofectamine 2000試劑。將該等混合物在室溫下培育5 min，然後混合並在室溫下進一步培育20 min。然後將轉染混合物添加至細胞中並在 37°C 下培育24 h。此時，自培養皿取出轉染細胞之製劑，並平鋪於96孔板中以評價ADI-

PEG 20對於轉染細胞之生長之效應。將額外細胞進一步培育72 h，然後加以處理以用於PCR及西方印跡分析。

精胺酸去亞胺酶-PEG20之活體內效能研究

發現ASS陰性SCLC SK-LC-13具有致瘤性且隨後使用其測定ADI-PEG 20在活體內之效能。亦在具有ASS陽性NCI-H69 SCLC異種移植物之小鼠中評價ADI-PEG 20之活性。在重約20 g之3-4週齡雌性BALB/c裸小鼠(Charles River Labs, Wilmington, MA, 美國)中確立小細胞肺癌異種移植物。為確立腫瘤，將存於培養基中之 10×10^6 個細胞以1:1與高濃度基質膠(Matrigel High Concentration)(BD Biosciences)混合並經皮下注射至小鼠之腹部區域中。定期量測腫瘤生長並使用式($TV = (\text{長度} \times \text{寬度}^2) / 2$)計算腫瘤體積。所研究之所有動物皆由MSKCC協會動物護養與用途委員會(Institutional Animal Care and Use Committee)批准。在腫瘤達到 $1,000 \text{ mm}^3$ 之近似體積時，將小鼠無痛處死。

在具有中等或較大SK-LC-13 SCLC異種移植物之小鼠中同時評價ADI-PEG 20之抗腫瘤效能。在第一研究中，在腫瘤達到 125 mm^3 之平均大小後開始治療。在大異種移植物研究中，在腫瘤達到 500 mm^3 之平均大小後開始治療。以1 IU/動物、2 IU/動物及5 IU/動物之劑量每5天一次經20天(5個劑量)投與精胺酸去亞胺酶-PEG20。為評價持續投藥之效應，使使用所有劑量值之其他組($n=5$)接受每5天一次連續投與ADI-PEG 20直至腫瘤進展至 $1,000 \text{ mm}^3$ 大小之限值

為止。另外，在具有 ASS 陽性 NCI-H69 異種移植物之小鼠中評價 ADI-PEG 20 之效能。此時，在腫瘤達到 150 mm^3 之平均大小後，使小鼠在 20 天內接受 2 IU ADI-PEG 20 之劑量。在所有研究中，藉由腹膜腔內注射投與精胺酸去亞胺酶-PEG20。在該等研究中所使用之 ADI-PEG 20 之特異性活性為 9 IU mg^{-1} 蛋白質。因此，1 IU ADI-PEG 20/20 g 小鼠等效於 160 IU m^{-2} 。

血清精胺酸及瓜胺酸之量測

為測定 ADI-PEG 20 治療對於全身性精胺酸含量之效應，使用高效液相層析 (HPLC) 分析小鼠血清。使用 Pickering 實驗室之 PCX 5200 柱後衍生儀器 (Pickering 實驗室，Mountain View, CA，美國) (在 39°C 反應溫度下) 及螢光檢測器拆分 L-精胺酸及 L-瓜胺酸。所有試劑 (包含緩衝劑及管柱) 皆係根據 Pickering 實驗室所建議來使用。藉由 ELISA 量測總 ADI-PEG 20 含量，如先前所述 (Holtsberg 等人，J Control Release 80(1-3):259-271, 2002)。

統計學分析

在對照組結束時，藉助使用不成對雙尾 *t*-測試利用 GraphPad Prism (Version 5.0, GraphPad Software 公司，La Jolla, CA，美國) 比較對照組及治療組之平均值來評價 ADI-PEG 20 治療之活體內效能。使用 95% 之置信水準，其中若 $P < 0.05$ ，則宣佈平均腫瘤體積具有顯著性差異。

結果

SCLC 通常缺乏 ASS 表現

因 ASS 表現之缺乏通常與對於 ADI 之敏感性有關，故在人類 SCLC 腫瘤中評價其表現。如圖 7C 中所展示，人類 SCLC 腫瘤之初始免疫組織化學 (IHC) 分析揭示，一些 SCLC 幾乎完全缺乏 ASS 表現。在此初始分析中，大約 45% (7/16) 之腫瘤顯示較少或沒有 ASS 表現。與之相反，ASS 之強烈表現在正常組織 (例如皮膚，圖 7A) 及其他癌症 (例如結腸癌，圖 7B；Jungbluth 等人，Mod Pathol 23(增刊 1):387A, 2010) 中顯而易見。

因初始免疫組織化學分析已展示 ASS 表現在 SCLC 人類腫瘤中之頻繁損失，故評價一組 SCLC 細胞系中 ASS 之表現狀態。西方印跡分析揭示，5/10 (50%) 之所測試 SCLC 細胞系在蛋白質水準上缺乏顯著之 ASS 表現 (圖 7D)。如藉由西方免疫印跡所檢測之 ASS 之細胞表現與使用純系 25 及 195-21-1 抗 ASS 抗體者類似 (數據未展示)。使用 qRT-PCR 之 mRNA 含量分析顯示，在 ASS mRNA 與蛋白質表現程度之間具有常見關聯 (圖 7E)。

精胺酸去亞胺酶-PEG20 在活體外抑制 ASS 陰性 SCLC 細胞系之增殖

在 ASS 陽性 SCLC 細胞及彼等缺乏酶表現者中評價 ADI-PEG 20 對於細胞增殖之活體外效應。在該等實驗中包含具有黏附及非黏附生長組織培養特性之細胞。在黏附 ASS 陰性 SCLC 細胞系 SK-LC-13 及 SW1271 中發現增殖之顯著劑量依賴性降低。顯而易見，對於黏附 ASS 陽性結腸癌細胞系 SW1222 之生長並無效應 (圖 8A)。對於非黏附細胞而言，

ASS陽性細胞顯示幾乎完全抵抗ADI-PEG 20之抗增殖性效應，而在ADI-PEG 20處理後在缺少ASS之細胞中同樣觀察到相對增殖降低(圖8B)。在將ADI-PEG 20敏感性細胞系SK-LC-13確定為致瘤性時，選擇其作為用於隨後之活體外及活體內實驗之模型細胞系。

精胺酸去亞胺酶-PEG20誘導自體吞噬及卡斯蛋白酶獨立性細胞凋亡

對於更為常見之營養素限制而言，觀察到藉由ADI使細胞內精胺酸空乏以誘導代謝逆境及隨後細胞自體吞噬(Kim等人，Cancer Res 69(2):700-708, 2009；Savaraj等人，Curr Mol Med 10(4):405-412, 2010)。使用用於自體吞噬相關性蛋白LC3-II形成之分析來評價是否ADI-PEG 20分析能夠在SCLC中誘導細胞自體吞噬。儘管在SK-LC-13中觀察到LC3-II表現之一些基礎表現，但ADI-PEG 20分析使得蛋白質之可檢測細胞含量顯著增加(圖9E)。氯喹係自體吞噬之已知抑制劑，其破壞正常溶酶體功能並由此導致LC3-II之細胞含量有所增加。隨後，使用氯喹作為陽性對照處理之細胞顯示LC3-II之極強烈表現。使用ADI-PEG 20及氯喹組合處理細胞使得相對於個別處理存活率較小但顯著($P=0.008$)較低，從而表明抑制自體吞噬可增強ADI-PEG 20之效能(圖14)。

為測定ADI-PEG 20之抗增殖性效應之可能機制，實施細胞凋亡(藉由亞-G₁ DNA含量)之FACS分析。在實施分析之前將細胞處理72 h。在未處理細胞中可檢測到較少細胞凋

亡，而觀察到25 nM拓撲替康(用作陽性對照)會導致約45%之SK-LC-13細胞發生細胞凋亡(圖9A及B)。儘管不如拓撲替康有效，但與1.0及10 mIU ml⁻¹ ADI-PEG 20一起培育會分別誘導約6%及16%之細胞發生細胞凋亡(圖9C及D)。儘管藉由亞-G₁ DNA含量發現細胞凋亡顯而易見，但在使用ADI-PEG 20處理細胞後與經拓撲替康處理之細胞相比未觀察到卡斯蛋白酶活化(圖9F)。

ASS表現之沉默誘導對於ADI-PEG 20之敏感性

在使用ASS特異性siRNA轉染後，使用即時PCR評價ASS陽性細胞系中之ASS之相對表現。如圖10A中所展示，使用ASS siRNA進行轉染在72 h培育之後使ASS mRNA含量減小約90%。同時之西方印跡分析顯示，使用ASS特異性siRNA處理之細胞中之ASS蛋白之表現程度大大減小(圖10B)。然而，ASS之一些表現在該等條件下得以保持。使用MTS分析來檢驗細胞存活率顯示，使用ASS siRNA處理之ASS陽性細胞對ADI-PEG 20誘導之精胺酸抽離變得敏感，從而導致細胞存活率減小，而在對照或經混亂的siRNA處理之細胞中觀察到存活率並未降低(圖10C)。

精胺酸去亞胺酶-PEG20抑制SCLC異種移植物之生長

在具有人類SCLC異種移植物之BALB/c裸小鼠中評價使用ADI-PEG 20進行全身性治療之活體內抗腫瘤效能。在開始治療時，在具有約125 mm³之確立腫瘤之小鼠及具有較大(約500 mm³)腫瘤之小鼠中實施單獨研究。在具有中等大小SK-LC-13異種移植物(124.6±37.1 mm³)之小鼠中，

ADI-PEG 20使得腫瘤生長相對於對照小鼠發生顯著及劑量依賴性之減小(圖 11A-C)。因具有過大腫瘤體積，在第33天時將對照小鼠無痛處死，此時對照小鼠之平均腫瘤體積顯著大於經ADI-PEG 20治療之小鼠組中之彼等平均腫瘤體積，不論劑量或治療方案如何(對於所有治療組而言， $P > 0.0001$ ；圖 11D)。在完成研究時，藉由每5天一次連續投用5 IU ADI-PEG 20處理之腫瘤顯著小於彼等僅在20天內每5天一次進行投藥者($P=0.0063$)。然而，在1 IU及2 IU劑量值下並未觀察到此效應，此乃因在接受短期及持續投藥之組中，腫瘤繼續以可比速率生長。隨後，在由於過度腫瘤體積而使各別短期投藥組結束時，接受短期或持續ADI-PEG 20投藥之小鼠之平均腫瘤體積並無顯著性差異(1 IU: $P=0.251$ ；2 IU: $P=0.084$)。使用ADI-PEG 20處理ASS陽性NCI-H69 SCLC異種移植物對於腫瘤生長並不產生任何效應(圖 12)。

在初始投用ADI-PEG 20之前(第0天)、期間(第12天)及在之後(第40天)來分析來自該等小鼠之血清揭示，ADI-PEG 20血清含量具有劑量依賴性(圖 11E)。在僅在至多第20天時投與ADI-PEG 20之小鼠中，觀察到酶之血清含量在第40天時返回基線值，此與小鼠中ADI-PEG 20之約7天半衰期一致(Ensor等人，*Cancer Res* 62(19):5443-5450, 2002；Holtsberg等人，*J Control Release* 80(1-3):259-271, 2002)。另外，如所預計，此短期治療過程僅暫時性地使血清精胺酸空乏，在並不進一步投用ADI-PEG 20之情形

下，血清精胺酸隨後在最後劑量之後第20天時(第40天)返回正常含量(圖11F)。瓜胺酸含量以針對精胺酸之劑量依賴性關係上升，且較短ADI-PEG 20過程與瓜胺酸含量返回基線有關(圖11G)。瓜胺酸含量隨著以1 IU水準長期投藥而增加，此與全身性精胺酸保持並代謝成瓜胺酸一致，儘管精胺酸血清含量低於檢測限值。在以2 IU及5 IU劑量水準持續投藥時，觀察到瓜胺酸含量之增加較小。

在ADI-PEG 20之第二活體內研究中，在腫瘤生長至 $473.4 \pm 161.0 \text{ mm}^3$ 之相對較大大小時，開始治療。同樣觀察到腫瘤生長之劑量依賴性抑制(圖13A-C)，但此不如在具有較小異種移植物之動物中所觀察到者一般顯著。在此研究之第32天，在對照小組結束時比較腫瘤體積(圖13D)。使用1 IU ADI-PEG 20繼續治療能夠相對於對照小鼠顯著減小腫瘤體積($P=0.007$)，而短程治療不會使得腫瘤大小發生統計學顯著減小($P=0.07$)。另外，觀察到持續投藥會使得腫瘤體積相對於短程治療發生中等顯著($P=0.26$)之減小，如在第39天結束短期治療組時所評價。在較高劑量之ADI-PEG 20下，在使用2 IU濃度下之短期($P=0.004$)及持續($P=0.0007$)投與以及5 IU濃度下之短期($P=0.0003$)及持續($P=0.0001$)方案時，觀察到腫瘤體積相對於未處理對照顯著減小。然而，在該等劑量下，持續投藥相對於短程治療並不顯著改良反應。

總而言之，此實例顯示，大部分SCLC缺乏ASS表現，且ASS陰性SCLC對精胺酸抽離療法敏感。儘管ASS缺少之頻

率並非如黑素瘤中所報導等於幾乎完全沒有表現，但每年在美國報導之近30,000個新SCLC病例中仍有50%可能易受精胺酸抽離療法之影響。

使用缺少黏附及非黏附ASS之SCLC細胞系之活體外研究顯示，ADI-PEG 20引起劑量依賴性抗增殖性效能。本文所闡述之結果表明，ASS蛋白之損失與ADI-PEG 20在原本相同之細胞中之抗增殖性效應有關，且進一步驗證了在具有不同ASS表現之SCLC癌症中所觀察到之相對敏感性。因抑制細胞保護性自體吞噬可賦予ADI-PEG 20之抗增殖性效應，故在活體外評價ADI-PEG 20與25 mM自體吞噬抑制劑氣喹之組合(Kim等人，Cancer Res 69(2):700-708, 2009)。然而，該組合僅誘導在SCLC細胞中ADI-PEG 20之抗增殖性效應發生中等但顯著($P=0.008$)之增加(圖14)。使用ADI-PEG 20處理SCLC使得在使用碘化丙錠染色後亞-G₁峰中之細胞群體發生中等增加，從而表明該等細胞已發生細胞凋亡。西方印跡分析揭示，ADI-PEG 20並不在SK-LC-13 SCLC細胞中引起卡斯蛋白酶活化。不期望受限於理論，SCLC細胞中藉由ADI-PEG 20誘導之對於精胺酸抽離之總細胞反應似乎經由複雜機制發揮作用，該複雜機制涉及在誘導自體吞噬時看到之初始代謝反應，隨後係卡斯蛋白酶獨立性細胞死亡。

小鼠中之活體內研究揭示，ADI-PEG 20以劑量依賴性方式使SK-LC-13異種移植物之生長消失。在1 IU、2 IU及5 IU劑量/動物劑量下觀察到顯著抗腫瘤活性。重要的是，

儘管在具有較小(約 120 mm^3)確立腫瘤之小鼠中觀察到腫瘤生長之強烈抑制，但ADI-PEG 20亦顯示在具有大(約 500 mm^3)異種移植物之小鼠中具有顯著抗腫瘤效能。儘管難以與其他腫瘤類型進行直接比較，但在SCLC異種移植物中使用ADI-PEG 20觀察到之抗腫瘤效能較為類似，且可能優於在不同腫瘤類型(包含腎及前列腺癌異種移植物)中使用相等劑量ADI-PEG 20所觀察到者。

實例4

精胺酸去亞胺酶抑制缺少ASS之轉移性肉瘤之生長

儘管肉瘤係稀少之腫瘤群，但對於當前臨床方案之不良反應代表了腫瘤學中之重要未滿足需求。需要更好到在治療學上理解肉瘤生長之生物學及代謝以研發新穎療法來治療患有此腫瘤群之患者。精胺酸去亞胺酶(ASS)係瓜胺酸至精胺酸之轉化中之限速酶。在未表現ASS時，精胺酸變為必須自飲食遞送之癌細胞之必需胺基酸。

代表45個肉瘤亞型之701個患者樣品之免疫組織化學分析顯示，在超過85%之肉瘤(701個患者試樣中之619個)中並未表現ASS。此表明肉瘤對於使用聚乙二醇化精胺酸去亞胺酶(ADI-PEG 20)之精胺酸抽離療法敏感。

在ASS表現較低時，使用ADI-PEG 20處理一組平滑肌肉瘤、骨肉瘤、泡狀軟組織肉瘤、惡性周邊神經鞘腫瘤及尤因氏肉瘤(Ewing's sarcoma)細胞系產生細胞循環停滯但並不產生細胞凋亡，而高ASS之骨肉瘤細胞系MG63繼續分

裂。肉瘤細胞系中之反應依賴於ASS表現，舉例而言，骨肉瘤、軟組織肉瘤、複雜細胞遺傳學肉瘤及移位依賴性肉瘤皆在使用ADI-PEG 20處理後顯示細胞循環抑制。在具有低ASS表現之敏感細胞系中，使用ADI-PEG 20處理之細胞系之IC50介於0.02-0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 之間。

使用ADI-PEG 20處理缺乏ASS之肉瘤會誘導自體吞噬。在與氯喹(自體吞噬抑制劑)組合時，在缺少ASS之肉瘤中藉由ADI-PEG 20使精胺酸空乏會誘導細胞死亡，如藉由膜聯蛋白V所量測。

將低ASS表現之骨肉瘤細胞系MNNG異種移植至裸小鼠中隨後使用ADI-PEG 20進行治療顯示，腫瘤生長速率顯著慢於PBS治療之對照。

對於上述實例而言，應注意，在腎細胞癌異種移植物模型中，觀察到ADI-PEG 20加自體吞噬抑制劑羥基氯喹不會得到加和效應。因此，不能預測ADI-PEG 20加自體吞噬抑制劑在任一特定癌症中之效應，此進一步突出顯示了本揭示內容之令人吃驚之效應。

實例6

與順鉑組合之ADI-PEG 20在活體內顯著增強抗腫瘤活性亦實施異種移植物測試以評估ADI-PEG 20與順鉑之組合之活體內效能。在活體內評估ADI-PEG 20之治療效能，其中ADI-PEG 20係以單一藥劑或與順鉑之組合形式來治療裸

小鼠中之兩種不同人類黑素瘤異種移植物模型。順鉑劑量為 6 mg/kg 或 18 mg/m² (Km=3)，其係每 6 天×3 個劑量經腹腔內 (IP) 給予。此相同劑量 (外推至人類) 為 40 mg/m² (Km=40) 或 3 週內 120 mg/m² 之總劑量。以 53.3 IU/kg 每 6 天 IM×4 個劑量給予 ADI-PEG 20。此相同 ADI-PEG 20 劑量 (外推至人類) 為 160 IU/m² 或 18 mg/m²。如圖 15 中所展示，使用 ADI-PEG 20 及順鉑組合進行治療展示活性較任一單獨藥劑顯著有所增強。因此，異種移植物數據展示，即使在受限時間段內投與順鉑時，ADI-PEG 20 及順鉑之組合亦使得缺少 ASS 之黑素瘤細胞中之腫瘤活性有所增強。

實例 7

與多西他賽組合之 ADI-PEG 20 之階段 I 人類研究

開始單中心開放標記階段 I 劑量遞增研究以測定 ADI-PEG 20 與多西他賽之組合之最大耐受劑量及劑量限制性毒性 (MTD 及 DLT)，該組合係每三週一次經靜脈內 (IV) 投與患有晚期實體腫瘤之患者。患者每週一次以遞增劑量經肌內 (IM) 接受 ADI-PEG 20，在 1 小時後 (第 1 天) 接受 75 mg/m² 多西他賽 (IV)。循環長度為 21 天。自始至終以每週 IM 注射形式繼續施加 ADI-PEG 20。使用標準之 3+3 設計實施劑量遞增。在最後一名個體進入前一小組 21 天之後，每一新劑量水準小組進入。18 mg/m² 大約等效於 160 IU/m²。

投藥方案匯總於下表 2 中。

表 2：多西他賽+ADI-PEG 20之投藥方案

劑量值	多西他賽Docetaxel (mg/m ²)	ADI-PEG 20 (mg/m ²)
-1*	75	2.2
1	75	4.5
2	75	9
3	75	18
4	75	36

*以劑量值1開始試驗且若觀察到DLT則遞減至劑量值-1。

治療方案匯總於下表3中。

表 3：治療方案

	第1天 循環1 ¹	第8天 循環1 ¹	第15天 循環1	第22天 循環2+
多西他賽 ²	X			X
ADI-PEG 20 ³	X	X	X	X

1：1個循環等於21天

2：在每一循環之第一天IV投與多西他賽(經30 min.輸注)

3：每週一次經肌內給予ADI-PEG 20

此研究之初始結果匯總於下表4中。特定而言，在迄今為止治療之具有可用資訊之8名個體中，客觀臨床效應結果如下：

表 4：研究結果之匯總

腫瘤	最佳反應	治療持續時間
非小細胞肺癌	穩定疾病	33週
非小細胞肺癌	穩定疾病	12週
舌癌(頭頸癌)	穩定疾病	12週
舌癌(頭頸癌)	部分反應(待證實)	12週
前列腺癌	穩定疾病	8週

因此，迄今為止招生之 8 名患者中之 6 名 (75%) 具有臨床益處 (穩定疾病 + 部分反應 + 完全反應)。

此研究中所使用之劑量係低劑量，此乃因 18 mg/m² 已用於階段 3 肝細胞癌研究中，且 36 mg/m² 已在黑素瘤中展示有效性。因此，此早期數據相當令人鼓舞 (考慮到即使在此低劑量下亦具有陽性反應) 且表明 ADI-PEG 20 與多西他賽之組合係有效癌症治療。特定而言，多西他賽在美國經批准用於治療乳癌、非小細胞肺癌、激素難治性前列腺癌、胃腺癌及頭頸癌之鱗狀細胞癌瘤中之腫瘤。另外，其已用於治療肉瘤 (尤其子宮平滑肌肉瘤) 及卵巢癌。因此，本文具體涵蓋使用多西他賽與 ADI-PEG 20 之組合來治療該等癌症。

實例 8

ADI-PEG 20 加雷帕黴素在腎細胞癌瘤之活體內異種移植
物模型中顯示協同效應

使用小鼠異種移植模型研究單獨之 ADI-PEG 20 及其與

雷帕黴素之組合在治療腎細胞癌中之效應。

在具有 Caki-1 (ATCC 編號：HTB-46TM) 異種移植植物之小鼠中評價 ADI-PEG 20 之活性。在體重為 20 g 之 3-4 週齡雌性 BALB/c 裸小鼠 (SLAC, Shanghai, China) 中確立腎細胞癌 Caki-1 異種移植植物。為確立腫瘤，將存於培養基中之 5×10^6 個細胞以 1:1 與高濃度基質膠 (BD Biosciences) 混合並經皮下注射至小鼠之腹部區域中。定期量測腫瘤生長並使用式 ($TV = (\text{長度} \times \text{寬度}^2) / 2$) 計算腫瘤體積。在腫瘤達到 125 mm^3 之近似體積時，以 160 IU/m^2 、 320 IU/m^2 及 640 IU/m^2 之劑量值每週一次經 4 週藉由肌內注射投與 ADI-PEG 20。每一研究基團具有 9 隻小鼠。在腫瘤達到 1100 mm^3 之近似體積時，將小鼠無痛處死。結果表明，ADI-PEG 20 以劑量依賴性方式抑制腫瘤生長。在使用 640 IU/m^2 時，達成大於 80 % 之腫瘤抑制。

在其他實驗中，在具有 Caki-1 異種移植植物之小鼠中評價 ADI-PEG 20 (以單一藥劑形式或與雷帕黴素之組合形式) 之活性。在重約 20 g 之 3-4 週齡雌性 BALB/c 裸小鼠 (SLAC, Shanghai, China) 中確立腎細胞癌異種移植植物。為確立腫瘤，將存於培養基中之 5×10^6 個細胞以 1:1 與高濃度基質膠 (BD Biosciences) 混合並經皮下注射至小鼠之腹部區域中。定期量測腫瘤生長並使用式 ($TV = (\text{長度} \times \text{寬度}^2) / 2$) 計算腫瘤體積。在 Caki-1 異種移植植物達到 125 mm^3 之近似體積時，將小鼠隨機分成 6 組 (每組 8 隻動物) 並根據下列方案開始治療：組 1 每週一次經 4 週藉由肌內注射接受 $40 \mu\text{L}$

PBS，組2每週一次經4個劑量藉由肌內注射接受ADI-PEG 20 (320 IU/m^2)，組3每天一次經21天藉由腹膜腔內注射接受雷帕黴素 (0.5 mg/kg)，組4每天一次經21天藉由腹膜腔內注射接受雷帕黴素 (0.2 mg/kg)，組5接受ADI-PEG 20 (320 IU/m^2 ，每週一次，經4週)及雷帕黴素 (0.5 mg/kg ，每天一次，經21天)之組合，組6接受ADI-PEG 20 (320 IU/m^2 ，每週一次，經4週)及雷帕黴素 (0.2 mg/kg ，每天一次，21天)。在腫瘤達到 2500 mm^3 之近似體積時，將小鼠無痛處死。

如圖16中所展示，結果表明，與單獨之ADI-PEG 20或雷帕黴素相比，ADI-PEG 20及雷帕黴素之組合以協同方式增強腫瘤抑制。

對於ADI-PEG 20與自體吞噬抑制劑或與mTOR抑制劑(例如雷帕黴素)之組合之效應而言，參考文獻中之數據在不同癌症類型中並不一致。因此，不能預測ADI-PEG 20與雷帕黴素之組合以協同方式發揮作用以抑制腎細胞癌腫瘤。該等結果表明，熟習此項技術者不能預測與ADI-PEG 20之任一特定組合是否可有效地用於治療癌症、尤其用於腎細胞癌。

可組合上述各實施例以提供其他實施例。本說明書中所提及及/或本申請案資料清單中所列示之所有美國專利、美國專利申請公開案、美國專利申請案、外國專利、外國專利申請案及非專利出版物皆係全文以引用方式併入本文中。若需要，可修改各實施例之各態樣以採用不同專利、

申請案及公開案之概念來提供其他實施例。

可根據上文之詳細說明對實施例作出該等及其他修改。一般而言，在下列申請專利範圍中，所用術語不應理解為將申請專利範圍限制於說明書及申請專利範圍中所揭示之具體實施例，而應理解為包含所有可能實施例以及屬於該等申請專利範圍之等效內容之全部範圍。因此，申請專利範圍並不受限於揭示內容。

【圖式簡單說明】

圖1係經由克氏(尿素)循環之精胺酸代謝之圖式。

圖2展示藉由ADI在活體外誘導胰腺癌細胞之卡斯蛋白酶依賴性細胞凋亡及自體吞噬。圖2A係展示在與泛卡斯蛋白酶抑制劑ZVAD-fmk(「Zvad」)及/或ADI-PEG一起培育後發生細胞死亡之細胞之百分比之條形圖。圖2B係展示在與ADI-PEG一起培育72小時後與PBS對照相比膜聯蛋白V陽性細胞之百分比之條形圖。

圖3展示在將人類胰腺癌細胞與羥基氯喹(「ChQ」)及/或ADI-PEG一起培育後裂解卡斯蛋白酶3、p62及LC3B之表現程度。

圖4A及4B展示在將人類胰腺癌細胞與ChQ及/或ADI-PEG一起培育後膜聯蛋白V陽性細胞及亞-G0/G1細胞之百分比。

圖5展示在使用氯喹(CQ)及/或ADI-PEG治療後小鼠中之腫瘤體積。在無胸腺小鼠中確立人類胰腺癌細胞系MIA PaCa-2之皮下異種移植植物。

圖 6 展示在使用 氯喹 及 / 或 ADI-PEG 治療後 MIA PaCa-2 腫瘤之組織病理學。第一行展示 H&E 染色，第二行展示活性卡斯蛋白酶 3 之染色，第三行展示經由 TUNEL 分析 DNA 碎裂之染色，且第四行展示 p62 之染色。

圖 7 展示小細胞肺癌人類腫瘤及細胞系中之 ASS 之表現。使用抗 ASS 抗體 195-21-1 檢測正常皮膚 (圖 7A)、結腸癌 (圖 7B) 及小細胞肺癌 (圖 7C) 中之 ASS 蛋白表現。圖 7D 展示與陽性對照 SW1222 結腸癌細胞相比一組小細胞肺癌細胞系中之 ASS 蛋白之表現 (藉由西方印跡)。圖 7E 展示如藉由西方印跡所量測之 ASS 蛋白表現與藉由 qRT-PCR 測定之 mRNA 表現之關聯。

圖 8 展示藉由 ADI-PEG 20 抑制 ASS 陰性小細胞肺癌細胞之活體外增殖。使用 ADI-PEG 20 將黏附 (圖 8A) 及非黏附 (圖 8B) 細胞處理 120 小時，然後使用 MTS 分析 (對於黏附細胞而言) 或 BCA 總蛋白質分析 (對於非黏附細胞而言) 分析增殖。

圖 9 展示 ADI 在 ASS 陰性 SK-LC-13 小細胞肺癌細胞中誘導細胞凋亡及自體吞噬。對於顯示細胞凋亡之亞-G₁ DNA 含量之螢光活化細胞分選分析而言，將細胞在對照培養基 (圖 9A)、25 nM 拓撲替康 (圖 9B)、1.0 mIU ml⁻¹ ADI-PEG 20 (圖 9C) 及 10 mIU ml⁻¹ ADI-PEG 20 (圖 9D) 中培育 72 小時，然後使用碘化丙錠 (PI) 將 DNA 染色。圖 9E 展示在與 ADI-PEG 20 或 氯喹 (「CQ」) 陽性對照一起培育 24 小時後之 LC3-I 及 LC3-II 蛋白含量。圖 9F 展示 SK-LC-13 細胞中藉由西方

印跡檢測之活性卡斯蛋白酶3 (圖 9F)。

圖 10 展示使用 siRNA 沉默 ASS 表現。圖 10A 展示使用 ASS siRNA 處理之 SW1222 細胞中藉由 RT-PCR 測得之 ASS mRNA 表現之相對表現。圖 10B 展示使用 ASS siRNA 處理之 SW1222 細胞中藉由西方印跡評價之 ASS 蛋白之相對表現。圖 10C 展示如藉由 MTS 增殖分析所量測之經 ADI-PEG 20 處理之細胞之增殖。

圖 11 展示藉由與 20,000 m.w. PEG 調配之 ADI (ADI-PEG 20) 來抑制 BALB/c 裸小鼠中中等大小 SK-LC-13 小細胞肺癌異種移植物之生長。展示接受以下物質之小鼠之腫瘤體積之生長曲線：PBS 媒劑 (填充圓)、20 天短程 (每 5 天一次進行投藥) ADI-PEG 20 (填充正方形) 或持續投藥 (每 5 天一次直至該組結束為止) ADI-PEG 20 (空心正方形，劑量為 1 IU/小鼠 (圖 11A)、2 IU/小鼠 (圖 11B) 及 5 IU/小鼠 (圖 11C))。在第 33 天對照組結束時之腫瘤體積展示於圖 11D 中。展示在研究之第 0、12 及 40 天時 ADI-PEG 20 (圖 11E)、精胺酸 (圖 11F) 及瓜胺酸 (圖 11G) 之血清含量。在第 0 及 12 天時，短期及長期投藥小組中之值相同，此乃因延長投藥僅始於第 20 天。

圖 12 展示在 BALB/c 裸小鼠中 ASS 陽性 NCI-H69 小細胞肺癌異種移植物之腫瘤體積之生長曲線。小鼠接受 PBS 媒劑或 2 IU ADI-PEG 20/小鼠 (黑色箭頭)。

圖 13 展示在 BALB/c 裸小鼠中較大 SK-LC-13 小細胞肺癌異種移植物之抑制。展示接受以下物質之小鼠之腫瘤體積

之生長曲線：PBS媒劑(圓)、20天短程ADI-PEG 20 (黑色箭頭)(正方形)或持續投藥ADI-PEG 20)(灰色箭頭)(三角形，劑量為1 IU/小鼠(圖13A)、2 IU/小鼠(圖13B)及5 IU/小鼠(圖13C))。在第32天對照組結束時之腫瘤體積展示於圖13D中。

圖14展示相對於使用ADI-PEG 20及自體吞噬抑制劑氯喹之各別活體外治療之相對細胞存活率。

圖15展示異種移植物數據之圖形，其顯示ADI-PEG 20及順鉑之組合使得缺少ASS之黑素瘤細胞中之抗腫瘤活性有所增強。

圖16展示異種移植物數據之圖形，其顯示ADI-PEG 20及雷帕黴素之組合使得針對異種移植之Caki-1腎細胞癌瘤細胞系之抗腫瘤活性有所增強。

序列表

<110>

<120>利用精胺酸去亞胺酶之治療方法

<130> POLA-001/01TW

<140> 101119399

<141> 2012/05/30

<150> 61/620,368

<151> 2012/04/04

<160> 4

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 409

<212> PRT

<213> 人型支原體

<400> 1

Met Ser Val Phe Asp Ser Lys Phe Asn Gly Ile His Val Tyr Ser Glu
1 5 10 15

Ile Gly Glu Leu Glu Thr Val Leu Val His Glu Pro Gly Arg Glu Ile
20 25 30

Asp Tyr Ile Thr Pro Ala Arg Leu Asp Glu Leu Leu Phe Ser Ala Ile
35 40 45

Leu Glu Ser His Asp Ala Arg Lys Glu His Gln Ser Phe Val Lys Ile
50 55 60

Met Lys Asp Arg Gly Ile Asn Val Val Glu Leu Thr Asp Leu Val Ala
65 70 75 80

Glu Thr Tyr Asp Leu Ala Ser Lys Ala Ala Lys Glu Glu Phe Ile Glu
85 90 95

Thr Phe Leu Glu Glu Thr Val Pro Val Leu Thr Glu Ala Asn Lys Lys
100 105 110

Ala Val Arg Ala Phe Leu Leu Ser Lys Pro Thr His Glu Met Val Glu
115 120 125

Phe Met Met Ser Gly Ile Thr Lys Tyr Glu Leu Gly Val Glu Ser Glu
130 135 140

Asn Glu Leu Ile Val Asp Pro Met Pro Asn Leu Tyr Phe Thr Arg Asp
145 150 155 160

Pro Phe Ala Ser Val Gly Asn Gly Val Thr Ile His Phe Met Arg Tyr
165 170 175

Ile Val Arg Arg Arg Glu Thr Leu Phe Ala Arg Phe Val Phe Arg Asn
180 185 190

His Pro Lys Leu Val Lys Thr Pro Trp Tyr Tyr Asp Pro Ala Met Lys
195 200 205

Met Pro Ile Glu Gly Gly Asp Val Phe Ile Tyr Asn Asn Glu Thr Leu
210 215 220

Val Val Gly Val Ser Glu Arg Thr Asp Leu Asp Thr Ile Thr Leu Leu
225 230 235 240

Ala Lys Asn Ile Lys Ala Asn Lys Glu Val Glu Phe Lys Arg Ile Val
245 250 255

Ala Ile Asn Val Pro Lys Trp Thr Asn Leu Met His Leu Asp Thr Trp
260 265 270

Leu Thr Met Leu Asp Lys Asn Lys Phe Leu Tyr Ser Pro Ile Ala Asn
275 280 285

Asp Val Phe Lys Phe Trp Asp Tyr Asp Leu Val Asn Gly Gly Ala Glu
290 295 300

Pro Gln Pro Gln Leu Asn Gly Leu Pro Leu Asp Lys Leu Leu Ala Ser
305 310 315 320

Ile Ile Asn Lys Glu Pro Val Leu Ile Pro Ile Gly Gly Ala Gly Ala
325 330 335

Thr Glu Met Glu Ile Ala Arg Glu Thr Asn Phe Asp Gly Thr Asn Tyr
340 345 350

Leu Ala Ile Lys Pro Gly Leu Val Ile Gly Tyr Asp Arg Asn Glu Lys
355 360 365

Thr Asn Ala Ala Leu Lys Ala Ala Gly Ile Thr Val Leu Pro Phe His
370 375 380

Gly Asn Gln Leu Ser Leu Gly Met Gly Asn Ala Arg Cys Met Ser Met
385 390 395 400

Pro Leu Ser Arg Lys Asp Val Lys Trp
405

<210> 2
<211> 409
<212> PRT
<213> 人型支原體

<400> 2

Met Ser Val Phe Asp Ser Lys Phe Asn Gly Ile His Val Tyr Ser Glu
1 5 10 15

Ile Gly Glu Leu Glu Thr Val Leu Val His Glu Pro Gly Arg Glu Ile
20 25 30

Asp Tyr Ile Thr Pro Ala Arg Leu Asp Glu Leu Leu Phe Ser Ala Ile
35 40 45

Leu Glu Ser His Asp Ala Arg Lys Glu His Gln Ser Phe Val Lys Ile
50 55 60

Met Lys Asp Arg Gly Ile Asn Val Val Glu Leu Thr Asp Leu Val Ala
65 70 75 80

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

370

375

380

Gly Asn Gln Leu Ser Leu Gly Met Gly Asn Ala Arg Cys Met Ser Met
 385 390 395 400

Pro Leu Ser Arg Lys Asp Val Lys Trp
 405

<210> 3
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> 智人

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(18)
 <223> 用於擴增精胺琥珀酸合成酶 cDNA 之正向 PCR 引物

<400> 3 18
 tttaagcaga ctaagggg

<210> 4
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> 智人

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(21)
 <223> 用於擴增精胺琥珀酸合成酶 cDNA 之反向 PCR 引物

<400> 4 21
 ccatcccagg ttataagcac a

七、申請專利範圍：

1. 一種包括精胺酸去亞胺酶經由連接基團共價結合至聚乙二醇之化合物之用途，其係用於製備用以治療缺乏精胺琥珀酸合成酶（argininosuccinate synthetase, ASS）之胰腺癌或缺乏ASS之小細胞肺癌（SCLC）之藥物。
2. 如請求項1之用途，其中該藥物係用於治療缺乏ASS之胰腺癌。
3. 如請求項1之用途，其中該藥物係用於治療缺乏ASS之SCLC。
4. 一種包括精胺酸去亞胺酶經由連接基團共價結合至聚乙二醇之化合物之用途，其與自體吞噬抑制劑組合用於製備用以治療患者癌症之藥物，其中該癌症係胰腺癌、肉瘤或小細胞肺癌。
5. 如請求項4之用途，其中該自體吞噬抑制劑係選自由以下組成之群：氯喹(chloroquine)、3-甲基腺嘌呤、羥基氯喹、巴弗洛黴素A1 (bafilomycin A1)、5-胺基-4-咪唑甲醯胺核苷(AICAR)、岡田酸(okadaic acid)、N6-巰基嘌呤核苷、渥曼青黴素(wortmannin)及長春鹼(vinblastine)。
6. 一種包括精胺酸去亞胺酶經由連接基團共價結合至聚乙二醇之化合物之用途，其與順鉑(cisplatin)組合用於製備用以治療患者黑素瘤之藥物。
7. 一種包括精胺酸去亞胺酶經由連接基團共價結合至聚乙二醇之化合物之用途，其與多西他賽(docetaxel)組合用

於製備用以治療患者非小細胞肺癌、頭頸癌或前列腺癌之藥物。

8. 一種包括精胺酸去亞胺酶經由連接基團共價結合至聚乙二醇之化合物之用途，其與雷帕黴素(rapamycin)組合用於製備用以治療患者腎細胞癌瘤之藥物。
9. 如請求項1、4及6至8中任一項之用途，其中該精胺酸去亞胺酶共價結合至一個以上聚乙二醇分子。
10. 如請求項1、4及6至8中任一項之用途，其中該精胺酸去亞胺酶共價結合至約9至約12個聚乙二醇分子。
11. 如請求項1、4及6至8中任一項之用途，其中該精胺酸去亞胺酶共價結合至 5 ± 1.5 個PEG分子。
12. 如請求項11之用途，其中該等PEG分子係直鏈PEG分子。
13. 如請求項1、4及6至8中任一項之用途，其中該聚乙二醇之總重量平均分子量為約1,000至約40,000。
14. 如請求項1、4及6至8中任一項之用途，其中該聚乙二醇之總重量平均分子量為約10,000至約30,000。
15. 如請求項1、4及6至8中任一項之用途，其中該聚乙二醇之分子量為20,000。
16. 如請求項14之用途，其中該聚乙二醇係直鏈聚乙二醇。
17. 如請求項1、4及6至8中任一項之用途，其中該連接基團係琥珀醯亞胺基團。
18. 如請求項17之用途，其中該琥珀醯亞胺基團係琥珀酸琥珀醯亞胺基酯、丙酸琥珀醯亞胺基酯、琥珀醯亞胺基羧

甲基化物(carboxymethylate)、琥珀醯亞胺基琥珀醯胺、N-羥基琥珀醯亞胺或其組合。

19. 如請求項17之用途，其中該琥珀醯亞胺基團係琥珀酸琥珀醯亞胺基酯、丙酸琥珀醯亞胺基酯或其組合。
20. 如請求項1之用途，其中該精胺酸去亞胺酶並非分離自精胺酸支原體(*Mycoplasma arginini*)。
21. 如請求項1、4及6至8中任一項之用途，其中該精胺酸去亞胺酶係分離自人型支原體(*Mycoplasma hominis*)。
22. 如請求項21之用途，其中該精胺酸去亞胺酶已經修飾不含至少一個於SEQ ID NO:1之位置112、374、405或408之離胺酸。
23. 如請求項1、4及6至8中任一項之用途，其中該化合物調配於包括小於約0.5%原始ADI、小於約5%游離PEG或二者之組合物中。
24. 如請求項21之用途，其中該精胺酸去亞胺酶包括SEQ ID NO:2中所述之胺基酸序列。
25. 如請求項1、4及6至8中任一項之用途，其中該精胺酸去亞胺酶係以約每週兩次至約每2週一次之方式投與。
26. 如請求項1、4及6至8中任一項之用途，其中該精胺酸去亞胺酶係以每週一次之方式投與。
27. 如請求項1、4及6至8中任一項之用途，其中該精胺酸去亞胺酶係以約80 IU/m²至約650 IU/m²之劑量投與。
28. 如請求項27之用途，其中該精胺酸去亞胺酶係以約160 IU/m²之劑量投與。

29. 如請求項1、4及6至8中任一項之用途，其中該精胺酸去亞胺酶係以約 160 IU/m^2 之劑量每週一次投與。
30. 如請求項1之用途，其中該ASS缺乏係由精胺琥珀酸合成酶啟動子之甲基化造成。
31. 如請求項1之用途，其中該ASS缺乏係由DNA突變或缺失造成。
32. 如請求項31之用途，其中該癌症係精胺琥珀酸合成酶陰性。
33. 如請求項1、4及6至8中任一項之用途，其中該治療在活體內抑制NO合成、抑制血管生成、誘導腫瘤細胞之細胞凋亡或其組合。
34. 如請求項1、4及6至8中任一項之用途，其中該治療使得疾病穩定。
35. 如請求項1、4及6至8中任一項之用途，其中該治療增加該患者之無進展存活時間。
36. 如請求項1、4及6至8中任一項之用途，其中使血漿精胺酸空乏至少一個月。
37. 如請求項1、4及6至8中任一項之用途，其中使血漿精胺酸空乏2個月以上。
38. 如請求項4之用途，其中該精胺酸去亞胺酶及該自體吞噬抑制劑協同作用。
39. 如請求項1、4、7及8中任一項之用途，其進一步包括化學治療劑之投與。
40. 如請求項39之用途，其中該化學治療劑係選自由以下組

成之群：環磷醯胺 (cyclophosphamide)、吉西他濱 (gemcitabine)、順鉑、索拉非尼 (sorafenib)、舒尼替尼 (sunitinib) 及依維莫司 (everolimus)。

41. 如請求項 1、4 及 6 至 8 中任一項之用途，其中：

(a) 其中該精胺酸去亞胺酶共價結合至 5 ± 1.5 個直鏈 PEG 分子且該化合物調配於包括小於約 0.5% 原始 ADI、小於約 5% 游離 PEG 或二者之組合物中；

(b) 其中該精胺酸去亞胺酶係以約 160 IU/m^2 至約 640 IU/m^2 之劑量每週一次投與；且

(c) 其中該癌症展現減小之 ASS 表現。

42. 一種無菌之液體醫藥組合物，其包含約 10 mg 至約 12 mg ADI-PEG 20 及組胺酸-HCl 緩衝液，其中該組合物之 pH 為約 6.6 至約 7.0。

43. 如請求項 42 之無菌之液體醫藥組合物，其包含約 0.0035 M 組胺酸-HCl 至約 0.35 M 組胺酸-HCl。

44. 如請求項 43 之無菌之液體醫藥組合物，其包含約 0.035 M 組胺酸-HCl。

45. 如請求項 42 至 44 中任一項之無菌之液體醫藥組合物，其進一步包含 7.6 mg +5% 氯化鈉。

46. 一種如請求項 42 至 45 中任一項之無菌之液體醫藥組合物之用途，其係用於製備用以治療缺乏精胺琥珀酸合成酶 (ASS) 之癌症之藥物。

47. 如請求項 46 之用途，其中該缺乏 ASS 之癌症係選自肝細胞癌 (HCC)、急性髓性白血病 (AML)、胰腺癌、小細

胞肺癌、轉移性肉瘤、黑素瘤及腎細胞癌。

48. 如請求項46之用途，其中該藥物係用於與自體吞噬抑制劑組合，其中該缺乏ASS之癌症係胰腺癌、肉瘤或小細胞肺癌。
49. 如請求項46之用途，其中該藥物係用於與順鉑(cisplatin)組合，其中該缺乏ASS之癌症係黑素瘤。
50. 如請求項46之用途，其中該藥物係用於與多西他賽(docetaxel)組合，其中該缺乏ASS之癌症係非小細胞肺癌、頭頸癌或前列腺癌。
51. 如請求項46之用途，其中該藥物係用於與雷帕黴素(rapamycin)組合，其中該缺乏ASS之癌症係腎細胞癌。

八、圖式：

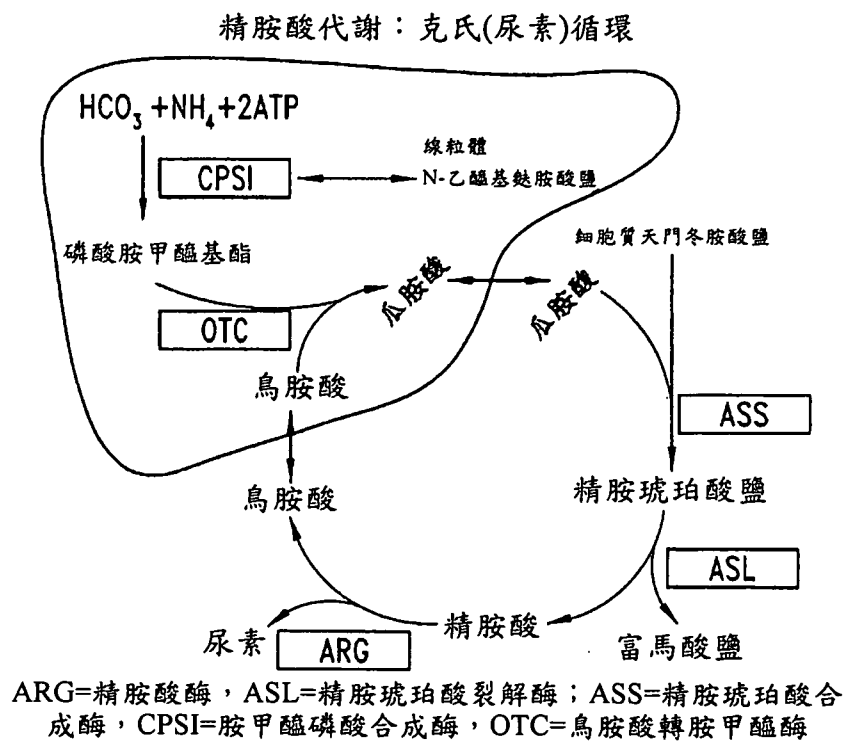


圖 1

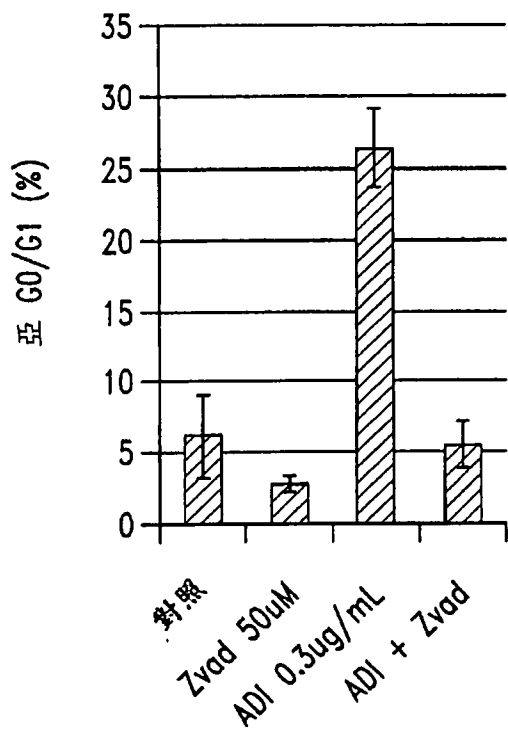


圖 2A

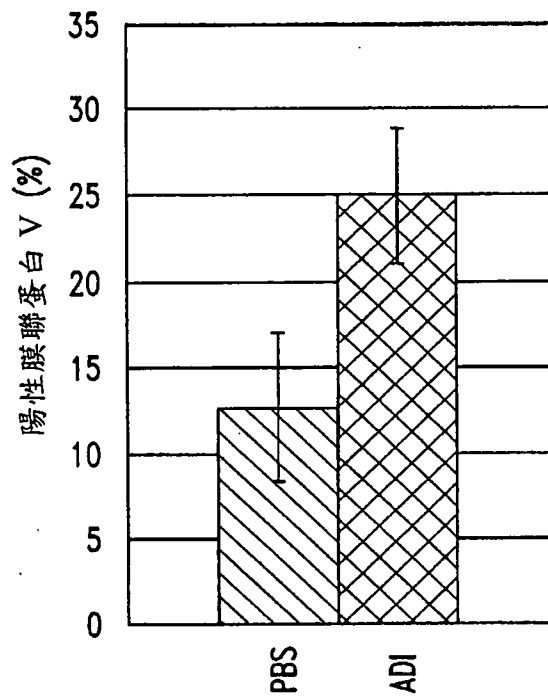


圖 2B