

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2019-520392

(P2019-520392A)

(43) 公表日 令和1年7月18日(2019.7.18)

(51) Int.Cl.	F 1	テーマコード (参考)
A 61 K 38/43 (2006.01)	A 61 K 38/43	4 C 076
A 61 P 13/02 (2006.01)	A 61 P 13/02	Z N A 4 C 084
A 61 P 39/02 (2006.01)	A 61 P 39/02	4 C 085
A 61 K 47/60 (2017.01)	A 61 K 47/60	4 C 086
A 61 K 47/68 (2017.01)	A 61 K 47/68	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 38 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2019-500316 (P2019-500316)	(71) 出願人	500039463 ボード・オブ・リージェンツ, ザ・ユニバ ーシティ・オブ・テキサス・システム アメリカ合衆国 テキサス 78701, オースティン, ウエスト 7ティーエイチ ストリート 210
(86) (22) 出願日	平成29年7月6日 (2017.7.6)	(74) 代理人	100102978 弁理士 清水 初志
(85) 翻訳文提出日	平成31年2月18日 (2019.2.18)	(74) 代理人	100102118 弁理士 春名 雅夫
(86) 國際出願番号	PCT/US2017/040897	(74) 代理人	100160923 弁理士 山口 裕孝
(87) 國際公開番号	W02018/009663	(74) 代理人	100119507 弁理士 刑部 俊
(87) 國際公開日	平成30年1月11日 (2018.1.11)		
(31) 優先権主張番号	62/359,018		
(32) 優先日	平成28年7月6日 (2016.7.6)		
(33) 優先権主張国	米国(US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】ヒト酵素媒介性シスチン枯渴

(57) 【要約】

L - シスチン / システイン分解酵素活性を有するタンパク質の操作に関する方法及び組成物について記載する。例えば、特定の態様において、1つ以上のアミノ酸置換を含み、L - シスチン / システインを分解することができる、改変シスタチオニン - - リアーゼが開示され得る。更に、本発明の特定の態様は、開示したタンパク質または核酸を使用する、L - シスチン / システインによるがんの治療のための組成物及び方法を提供する。

【選択図】図 1

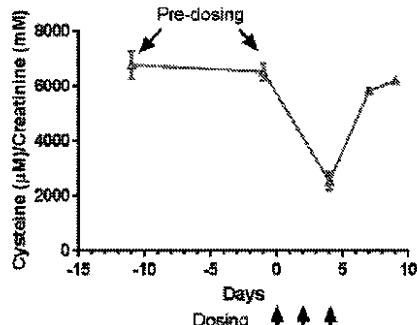


FIG. 1

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

シスチン尿症を有する、またはシスチン尿症の発症リスクを有する対象を治療する方法であって、

天然靈長類シスタチオニン - - リアーゼ (C G L) のアミノ酸配列（配列番号：1 及び 7 ~ 10 を参照）と比較して、前記天然靈長類 C G L 配列の 59 位のスレオニン及び 339 位のバリンを含む少なくとも 2 つの置換を有する、単離された改変靈長類 C G L 酵素、または

前記単離された改変靈長類シスタチオニン - - リアーゼ (C G L) 酵素をコードするヌクレオチド配列を含む核酸

を含む治療上有効量の製剤を前記対象に投与することを含む、前記方法。

【請求項 2】

前記酵素が、異種ペプチドセグメントを更に含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

前記異種ペプチドセグメントが、 X T E N ペプチド、 I g G F c 、アルブミン、またはアルブミン結合ペプチドである、請求項 2 に記載の方法。

【請求項 4】

前記酵素が、ポリエチレン glycole (P E G) に結合している、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 5】

前記酵素が、1 つ以上のリジンまたはシスチン残基を介して P E G に結合している、請求項 4 に記載の方法。

【請求項 6】

前記対象が、 L - シスチン及び / または L - システインを制限した食事に維持される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 7】

前記対象が、メチオニンを制限した食事に維持される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 8】

前記対象が、通常の食事に維持される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 9】

前記対象がヒト患者である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 10】

前記対象が齧歯類である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 11】

前記製剤が、静脈内投与、皮内投与、動脈内投与、腹腔内投与、病巣内投与、頭蓋内投与、関節内投与、前立腺内投与、胸膜内投与、気管内投与、眼内投与、鼻腔内投与、硝子体内投与、腔内投与、直腸内投与、筋肉内投与、皮下投与、結膜下投与、小胞内投与、粘膜投与、心膜内投与、臍帶内投与、経口投与、吸入、注射、注入、連続注入、標的細胞を直接浸漬する局所灌流、カテーテルを介した投与、または洗浄を介した投与により投与される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 12】

前記対象が以前にシスチン尿症の治療を受けており、シスチン尿症の再発を予防するために前記酵素が投与される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 13】

少なくとも第 2 のシスチン尿症療法を前記対象に施すことを更に含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 14】

前記第 2 のシスチン尿症治療法が、外科療法または衝撃波療法である、請求項 13 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

10

20

30

40

50

【技術分野】**【0001】**

本出願は、2016年7月6日に出願された、米国特許仮出願第62/359,018号の優先権の恩典を主張し、その出願の内容全体は、参照により本明細書に組み入れられる。

【0002】**共同研究の同意の当事者**

本明細書で開示及び特許請求されている本発明は、Aegelea Biotherapeutics, Inc. と The Board of Regents of The University of Texas Systemとの共同研究の範囲内で進められた。10

【0003】**1. 発明の分野**

本発明は概して、医学及び生物学分野に関する。より具体的には、本発明は、ヒトの治療法に好適な、高いシステイン／シスチン分解活性及び安定性を有する靈長類酵素の操作に関する。更により具体的には、本発明は、L-シスチン及びL-システインの両方を枯渇させる酵素を用いてシスチン尿症を治療するための組成物及び方法に関する。

【背景技術】**【0004】****2. 関連技術の説明**

シスチン尿症は、腎臓の近位尿細管にあるシスチン及び二塩基性アミノ酸トランスポーターをコードするSLC3A1及びSLC7A9遺伝子における変異により引き起こされる遺伝性疾患であり、シスチン（アミノ酸であるシステインのジスルフィド形態）の異常排泄、及び尿路中でのシスチン結晶／結石の形成をもたらす。欠陥性腎臓トランスポーターが、腎濾過中にシスチンを再取り込みすることができない遺伝性疾患であるシスチン尿症を患う患者が利用可能な治療薬は、ほとんど存在しない。アミノ酸L-システインのジスルフィド形態であるシスチンは、非常に不溶性であり、シスチン尿症患者においては、尿路内で高濃度に達し、シスチン結晶及び結石の形成をもたらす。循環するシスチン量を減少させる既存の治療法は、尿路での結石の形成を部分的に予防するが、それらの使用を制限する著しい副作用を有する。20

【発明の概要】**【0005】**

本発明は、腎臓及び尿路でのシスチン蓄積及び結石の形成を予防することによりシスチン尿症患者を治療するのに好適な治療法となるような、シスチンをシステイン-ペルスルフィド（その後崩壊して遊離システイン及びH₂Sになる）に効率的に転換する操作されたヒトシスタチオニン-ガンマ-リアーゼ酵素の利用方法に関する。シスチンは、大部分の細胞により通常産生される非必須アミノ酸であるため、動物モデルでは、長期のシスチン枯渇により毒性が誘発されることはない。同様に、この酵素はヒト配列で構成されているため、免疫学的な有害反応を誘発する可能性は低い。シスチン分解治療薬が、循環シスチンの総量を無毒的に除去する能力は、それが既存の治療レジメンよりも、シスチン結石形成を予防するための優れた実施形態であることを示す。30

【0006】

本発明は、靈長類シスタチオニン-ガンマ-リアーゼ(CGL)酵素の、L-シスチン及びL-システインの両方(本明細書では「L-シスチン／システイン」と呼ぶ)が血清から効率的に分解可能であるような操作、改変CGL酵素を、ヒトのがん治療に好適である製剤で提供することに関する。天然酵素と比較して、低K_M及び高触媒活性k_{cat}を示す酵素を開発するために、発明者らは、選択したアミノ酸を、劇的に改善した酵素特性を示す酵素がもたらされるように改変することにより、天然酵素を操作した。そのため、本明細書に記載のとおりに改変したCGL酵素は、天然酵素と比較して、L-シスチン／システイン分解触媒活性を有するヒトまたは靈長類ポリペプチド配列を含む新規の酵素を40

10

20

30

40

50

提供することにより、当該技術分野における主要な欠点を克服している。そのため、これらの改変酵素は、がん治療に好適であり得、低免疫原性及び改善された血清安定性を有し得る。

【0007】

したがって、一実施形態では、改変ポリペプチド、特に、シスタチオニン - - リアーゼ (C G L) 酵素に関連する靈長類酵素に由来する L - シスチン / システイン分解活性を有する酵素バリアントが提供される。例えば、酵素バリアントは、配列番号： 2 ~ 6 からなる群から選択されるアミノ酸配列を有し得る。例えば、バリアントは、ヒト C G L などのヒト酵素に由来することができる。特定の態様において、L - シスチン / システインを分解可能な、改変靈長類 C G L を含むポリペプチドが存在してよい。いくつかの実施形態において、ポリペプチドは、生理的条件下で L - シスチン / システインを分解可能であつてよい。例えば、ポリペプチドは、L - シスチン / システインに対して、少なくとも、または約 10 、 20 、 30 、 40 、 50 、 60 、 70 、 80 、 90 、 100 、 200 、 300 、 400 、 500 、 600 、 700 、 800 、 900 、 1000 、 2000 、 3000 、 4000 、 5000 、 6000 、 7000 、 8000 、 9000 、 10^4 、 10^5 、 10^6 s⁻¹ M⁻¹ 、またはこれらから導き出される任意の範囲の触媒効率 (k_{cat} / K_M) を有してよい。

10

【0008】

未改変ポリペプチドは天然 C G L 、特にヒトアイソフォームまたは他の靈長類アイソフォームであつてよい。例えば、天然ヒト C G L は、配列番号： 1 の配列を有してよい。他の天然靈長類 C G L の非限定例としては、スマトラオランウータン (Pongo abelii) C G L (Genbank ID : NP_001124635 . 1 ; 配列番号 : 7) 、カニクイザル (Macaca fascicularis) C G L (Genbank ID : AAW71993 . 1 ; 配列番号 : 8) 、チンパンジー (Pan troglodytes) C G L (Genbank ID : XP_513486 . 2 ; 配列番号 : 9) 、及びボノボ (Pan paniscus) C G L (Genbank ID : XP_003830652 . 1 ; 配列番号 : 10) が挙げられる。例示的な天然ポリペプチドは、配列番号 : 1 または 7 ~ 10 に対して約、少なくとも 60% 、 65% 、 70% 、 75% 、 80% 、 85% 、 90% 、 95% 、 96% 、 97% 、 98% 、 99% 、または 100% の同一性 (またはこれらから導き出される任意の範囲) を有する配列、あるいはその断片を含む。例えば、天然ポリペプチドは、配列番号 : 1 または 7 ~ 10 の配列の、少なくとも、または最大約 10 、 20 、 30 、 40 、 50 、 60 、 70 、 80 、 90 、 100 、 150 、 200 、 250 、 300 、 350 、 400 、 405 残基 (またはこれらから導き出される任意の範囲) を含んでよい。

20

【0009】

いくつかの実施形態において、天然 C G L は、 1 つ以上の他の改変、例えば化学修飾、置換、挿入、欠失、及び / または切斷により改変されてよい。特定の実施形態では、天然 C G L は、置換により改変されてよい。例えば、置換の数は 1 、 2 、 3 、 4 、またはそれ以上であつてよい。更なる実施形態では、天然 C G L は、基質認識部位、または基質特異性に影響を及ぼし得る任意の場所が改変されてよい。例えば、改変ポリペプチドは、配列番号 : 1 または 7 ~ 10 のアミノ酸位置 59 及び / または 339 に対応するアミノ酸位置における、少なくとも 1 つのアミノ酸置換を有し得る。これらの例においては、各配列の最初のメチオニンは、アミノ酸位置 1 に対応し、各アミノ酸はこのアミノ酸から連続して符番される。

30

【0010】

特定の実施形態において、アミノ酸位置 59 及び / または 339 における置換は、スレオニン (T) またはバリン (V) である。特定の実施形態では、改変は、 59T 及び 339V からなる群から選択される 1 つ以上の置換である。更なる実施形態において、置換は 59T 置換を含んでよい。依然として更なる実施形態において、置換は、 339V の更なる置換を含んでよい。

40

50

【0011】

いくつかの実施形態において、天然CGLはヒトCGLであってよい。特定の実施形態では、置換は、ヒトCGL（例えば、配列番号：2のアミノ酸配列を有する改変ポリペプチド、その断片またはホモログ）のE59T及びE339Vの組み合わせを含むことができる。更なる実施形態では、改変ポリペプチドは、スマトラオランウータンCGL-TV変異体（配列番号：3）、カニクイザルCGL-TV変異体（配列番号：4）、チンパンジーCGL-TV変異体（配列番号：5）、またはボノボCGL-TV変異体（配列番号：6）であってよい。

【0012】

上述した改変ポリペプチドは、未改変ポリペプチド（例えば、天然ポリペプチド）、または本明細書にて開示した任意のポリペプチド配列と比較して、特定の割合の同一性を有することを特徴としてよい。例えば、未改変ポリペプチドは、天然靈長類CGL（即ち、スマトラオランウータン、カニクイザル、チンパンジー、またはボノボCGL）の少なくとも、または最大約10、20、30、40、50、60、70、80、90、100、150、200、250、300、350、400、405残基（またはこれらから導き出される任意の範囲）を含んでよい。改変ポリペプチドの未改変部分（即ち、アミノ酸59及び/または339における任意の置換を除外した、改変ポリペプチドの配列）と、対応する天然ポリペプチドとの同一性（%）は、約、少なくとも60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%（またはこれらから導き出される任意の範囲）であってよい。上述した同一性のパーセンテージは、ポリペプチドの未改変部分と比較して、ポリペプチドの特定の改変領域に関係し得ることもまた想定される。例えば、ポリペプチドは、同じ種からの、または種と種にまたがる未改変または変異体CGLのアミノ酸配列に対する、CGLの、改変されたかまたは変異体である基質認識部位のアミノ酸配列の同一性に基づいて特徴付けられる、CGLの、改変されたかまたは変異体である基質認識部位を含有してよい。例えば、未改変CGLに対して少なくとも90%の同一性を有するものとして特徴付けられる、改変または変異体ヒトポリペプチドとは、その改変または変異体ヒトポリペプチドにおけるアミノ酸の少なくとも90%が、未改変ポリペプチドのアミノ酸と同一であることを意味する。

【0013】

いくつかの態様では、本発明は、異種アミノ酸配列に結合した改変CGLを含むポリペプチドもまた想定する。例えば、改変CGLは、融合タンパク質として異種アミノ酸配列に連結させてもよい。特定の実施形態では、改変CGLは、アミノ酸配列、例えばIgGFc、アルブミン、アルブミン結合ペプチド、またはインビボ半減期を増加させるためのXTENポリペプチドに連結させてもよい。

【0014】

血清安定性を増加させるために、改変CGLは、1つ以上のポリエーテル分子に連結させてもよい。特定の実施形態では、ポリエーテルはポリエチレングリコール（PEG）であってよい。改変ポリペプチドは、特定のアミノ酸残基、例えばリジンまたはシステインを介してPEGに連結させてもよい。治療用投与のために、改変CGLを含むこのようなポリペプチドを製薬上許容できる担体に分散させることができる。

【0015】

いくつかの態様では、このような改変CGLをコードする核酸が想定される。一態様では、核酸は、細菌内での発現のためにコドン最適化されている。特定の実施形態では、細菌は大腸菌（E.coli）である。別の態様において、核酸は、菌類（例えば、酵母菌）、昆虫細胞、または哺乳類細胞内での発現のためにコドン最適化されている。本発明は、このような核酸を含有するベクター、例えば発現ベクターを更に想定する。特定の実施形態では、改変CGLをコードする核酸は、異種プロモーターを含むがこれらに限定されないプロモーターに作用可能に結合している。一実施形態では、改変CGLは、ベクター（例えば、遺伝子治療ベクター）により標的細胞に送達されることができる。このような

10

20

30

40

50

ウイルスは、組み換えDNA技術により改変され、標的細胞内での改変CGLをコードする核酸の発現が可能となっている。これらのベクターは、非ウイルス性（例えば、プラスミド）、またはウイルス性（例えば、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス、レトロウイルス、レンチウイルス、ヘルペスウイルス、もしくはワクシニアウイルス）起源のウイルスに由来することができる。非ウイルス性ベクターは、細胞膜を超えてDNAが進入することを容易にするために、作用物質と複合体を形成するのが好ましい。このような非ウイルスベクター複合体の例としては、DNA及び脂質ベースの送達システムの簡略化を容易にするポリカチオン性剤との製剤が挙げられる。脂質ベースの送達システムの例としては、リポソームベースの核酸送達が挙げられる。

【0016】

10

依然として更なる態様においては、本発明は、このようなベクターを含む宿主細胞を更に想定する。宿主細胞は、細菌（例えば、大腸菌）、真菌細胞（例えば、酵母菌）、昆虫細胞、または哺乳類細胞であってよい。

【0017】

いくつかの実施形態において、ベクターは、改変CGLを発現するために宿主細胞に導入される。タンパク質は、任意の好適な方法で発現することができる。一実施形態では、タンパク質は、グリコシリ化されるように宿主細胞内で発現する。別の実施形態では、タンパク質は、非グリコシリ化されるように宿主細胞内で発現する。

【0018】

20

いくつかの実施形態において、ポリペプチドまたは核酸は、製薬上許容できる担体を含む医薬製剤中に存在する。ポリペプチドは、天然靈長類CGLポリペプチドまたは改変CGLポリペプチドであってよい。核酸は、天然靈長類CGLポリペプチドまたは改変CGLポリペプチドをコードしてよい。

【0019】

30

一実施形態では、シスチン尿症を有する、またはシスチン尿症の発症リスクを有する対象を治療する方法であって、天然靈長類CGLのアミノ酸配列（配列番号：1及び7～10を参照）と比較して、前記天然靈長類CGL配列の59位のスレオニン及び339位のバリンを含む少なくとも2つの置換を有する、単離された改変靈長類シスタチオニン-リーゼ（CGL）酵素、または、前記単離された改変靈長類シスタチオニン-リーゼ（CGL）酵素をコードするヌクレオチド配列を含む核酸を含む治療上有効量の製剤を前記対象に投与することを含む、前記方法が提供される。いくつかの態様では、酵素は、異種ペプチドセグメント、例えばXENペプチド、IgGFc、アルブミン、またはアルブミン結合ペプチドを更に含む。いくつかの態様では、酵素はポリエチレングリコール（PEG）に結合している。いくつかの態様では、酵素は、1つ以上のリジンまたはシスチン残基を介してPEGに結合している。

【0020】

対象は、任意の動物、例えばマウスであってよい。例えば、対象は、哺乳類、特に靈長類、そしてより詳細にはヒト患者であってよい。特定の態様において、対象または患者は、メチオニンを制限した食事、または通常の食事に維持され得る。

40

【0021】

いくつかの態様では、対象は以前にシスチン尿症の治療を受けており、シスチン尿症の再発を予防するために酵素が投与される。いくつかの態様では、方法は、少なくとも第2のシスチン尿症治療法を対象に投与することを更に含む。いくつかの態様では、第2のシスチン尿症治療法は、外科療法または衝撃波療法である。

【0022】

50

本発明の特定の態様は、天然靈長類CGLペプチド、遺伝子治療ベクターにおける天然靈長類CGLペプチドをコードする核酸、改変CGLペプチド、遺伝子治療ベクターにおける改変CGLをコードする核酸、または本発明の製剤を投与することによる治療法、特に、腫瘍細胞またはがんを有する対象の治療法もまた想定する。対象は、任意の動物、例えばマウスであってよい。例えば、対象は、哺乳類、特に靈長類、そしてより詳細にはヒ

ト患者であってよい。いくつかの実施形態において、方法は、がんを患う患者を選択することを含んでよい。特定の態様において、対象または患者は、L-시스チン／システインを制限した食事、または通常の食事に維持され得る。

【0023】

いくつかの実施形態において、がんは、L-시스チン／システイン枯渇に感受性の任意のがんである。一実施形態では、本発明は、このようなポリペプチドを含む製剤を投与することを含む、腫瘍細胞またはがん患者の治療法を想定する。いくつかの実施形態において、投与は、がん細胞の少なくとも一部が殺傷されるような条件下で行われる。別の実施形態では、製剤は、生理学的条件にてL-시스チン／システイン分解活性を有し、かつ、結合したポリエチレングリコール鎖を更に含むような改変CGLを含む。いくつかの実施形態においては、製剤は、上述したCGLバリエントのいずれか、及び製薬上許容できる賦形剤を含む医薬製剤である。このような製薬上許容できる賦形剤は、当業者には周知である。上記CGLバリエントは全て、ヒトの治療法に有用であると想定され得る。

10

【0024】

更なる実施形態において、L-시스チン／システイン分解活性を有する非細菌性（哺乳類、例えば、靈長類またはマウス）の改変CGL、またはそれをコードする核酸を含む製剤を投与することを含む、腫瘍細胞を処置する方法もまた提供され得る。

20

【0025】

腫瘍細胞は、L-시스チン／システインについて栄養培地に左右されるため、投与または治療は、細胞の栄養源に向けられる場合があり、必ずしも細胞自体に向けられるわけではない。したがって、インビオ適用において、腫瘍細胞を治療することには、腫瘍細胞集団用の栄養培地を、操作された（即ち、改変）CGLと接触させることを含む。本実施形態において、培地は、血液、リンパ液、脊髄液等の、L-시스チン／システインの枯渇が所望される体液ができる。

30

【0026】

本発明の特定の態様に従うと、改変CGLを含有するこのような製剤は、静脈内投与、皮内投与、動脈内投与、腹腔内投与、病巣内投与、頭蓋内投与、関節内投与、前立腺内投与、胸膜内投与、滑液包内投与、気管内投与、鼻腔内投与、硝子体内投与、腔内投与、直腸内投与、腫瘍内投与、筋肉内投与、皮下投与、結膜下投与、小胞内投与、粘膜投与、心膜内投与、臍帶内投与、眼内投与、経口投与、局所投与、吸入、注入、連続注入、局所灌流、カテーテルを介した投与、洗浄を介した投与、脂質組成物（例えば、リポソーム）中に入れての投与、または、当業者に知られている他の方法、もしくは前述の任意の組み合わせによる投与を行うことができる。

30

【0027】

更なる実施形態において、方法は、少なくとも第2の抗がん治療法を対象に投与することもまた含むことができる。第2の抗がん治療法は、外科療法、化学療法、放射線療法、凍結療法、ホルモン療法、免疫療法、またはサイトカイン療法であってよい。

40

【0028】

一実施形態では、改変CGL、または改変CGLをコードする核酸を含む組成物が、対象の腫瘍治療での使用のために提供される。別の実施形態では、腫瘍治療のための薬剤の製造における、改変CGL、または改変CGLをコードする核酸の使用が提供される。上記改変CGLは、実施形態の任意の改変CGLであってよい。

【0029】

本発明の方法及び／または組成物の文脈で論じた実施形態を、本明細書に記載する任意の他の方法または組成物に対して使用することができる。したがって、ある方法または組成物に関する実施形態を、本発明の別 の方法及び組成物にも同様に適用してよい。

【0030】

本明細書で使用する場合、核酸に関連した「コードする（encode）」または「コードする（encoding）」という用語は、当事者が本発明を速やかに理解できるようするために使用されるが、これらの用語はそれぞれ、「含む」または「含む」と互換

50

的に用いられ得る。

【0031】

本明細書で使用する場合、明記した構成成分の観点での「実質的に含まない」は、本明細書において、明記した構成成分が組成物中に、意図的に全く配合されていない、及び／または汚染物質としてのみ、もしくは微量でのみ存在することを意味するために使用される。組成物の任意の意図しない汚染によりもたらされる、明記した構成成分の総量はそれ故、多くても0.05%未満、好ましくは0.01%未満である。標準的な分析法を用いて、明記した構成成分が全く検出されない組成物が、最も好ましい。

【0032】

本明細書の発明明細書で使用する場合、「1つ(a)」または「1つ(an)」は、1つ以上を意味することができる。本明細書において、特許請求の範囲(複数可)で使用される場合、単語「～を含む(comprising)」と共に使用される場合、単語「1つ(a)」または「1つ(an)」は、1つ、または2つ以上を意味することができる。

【0033】

特許請求の範囲における用語「または」の使用は、代替のみへの言及が明示的に示されない限り、または代替が相互に除外されない限り、「及び／または」を意味するが、本開示は、代替のみ、及び「及び／または」に言及する定義を支持する。本明細書で使用する場合、「別の」とは、少なくとも第2、またはそれ以上を意味することができる。

【0034】

本出願を通して、用語「約」は、値が、その値を測定するために用いられるデバイス、方法についての固有の誤差の変動、または、研究対象間で存在する変動を含むことを示すために使用される。

【0035】

本発明の他の目的、特徴、及び利点が、以下の詳細の説明から明らかとなるであろう。しかし、本発明の趣旨及び範囲内の様々な変化及び変更が、この詳細の説明から当業者には明らかとなるであろうため、詳細の説明及び具体的な実施例は、本発明の好ましい実施形態を示しているものの、実例としてのみ与えられることが理解されなければならない。

【図面の簡単な説明】

【0036】

以下の図面は、本明細書の一部を形成し、本発明の特定の態様を更に示すために含まれる。本発明は、本明細書で開示する特定の実施形態の詳細の説明と組み合わせて、これらの図面の1つ以上を参照することでよりよく理解することができる。

【図1】投薬スケジュールにわたる、回収した少量の尿におけるシスチン結晶の数の分析。

【図2】投薬前及び投与後の、回収した少量の尿におけるシスチン結晶の数の分析。

【図3】投薬スケジュールにわたる、泌尿器でのシステイン／クレアチニン量の分析。

【発明を実施するための形態】

【0037】

例示的実施形態の説明

システインは、酵素シスタチオニン- - シンターゼ(CBS)及びシスタチオニン- - リアーゼ(CGL)を含む硫黄転換作用経路により、必須アミノ酸であるL-メチオニンに由来するホモシステインから合成することができるため、非必須アミノ酸と考えられている。したがって、無傷の硫黄転換作用経路によるシステインの枯渇は、通常組織に対しても比較的無毒であると予想される。

【0038】

シスチン尿症は、腎臓の近位尿細管にあるシスチン及び二塩基性アミノ酸トランスポーターをコードするSLC3A1及びSLC7A9遺伝子における変異により引き起こされる、遺伝性疾患であり、シスチン(アミノ酸であるシステインのジスルフィド形態)の異常排泄、及び尿路中のシスチン結晶／結石の形成をもたらす。SLC7A9ノックアウトマウス、SLC3A1ノックアウトマウス、D140G SLC3A1変異体マウス、

10

20

30

40

50

及び E 3 8 3 K S l c 3 a 1 変異体マウス (F e l i u b a d a l o et al . , 2 0 0 3 ; E r c o l a n i et al . , 2 0 1 0 ; P e t e r s et al . , 2 0 0 3 ; L i v r o z e t et al . , 2 0 1 4 、これらそれぞれの全体が本明細書に参照により組み込まれる) を含む、シスチン尿症のいくつかのマウスモデルが入手可能である。 1 2 9 S 2 / S v P a s C r 1 からの S l c 3 a 1 ゲノム D N A の配列分析により、 1 2 9 S 2 / S v P a s C r 1 マウスのエクソン 7 における、ホモ接合変異が明らかになった。点 A 1 2 3 2 G 変異は、高度に保存された配列内での、ミスセンス変異 (c . 1 2 3 2 G > A) である。結果的に、位置 3 8 3 のグルタミンは、リジンで置換される (p . E 3 8 3 K) 。この置換は、 r B A T の細胞外部分に存在し、 1 2 9 S 2 / S v P a s C r 1 マウスにおける r B A T 発現、及びシスチン尿症の喪失をになっている (L i v r o z e t et al . , 2 0 1 4) 。位置 3 8 3 におけるグルタミンは、様々な種間で高度に保存されている。

10

【 0 0 3 9 】

シスチン尿症を患う患者は、低い生活の質、人生にわたるシスチン結石形成のリスク、腎機能障害を有し、多くの場合、外科的介入を繰り返し必要とする。シスチン尿症には、既存の根治療法が存在せず、治療は、シスチンの溶解性を増加させ、泌尿器内でのシスチン濃度を低下させることに向けられている。利尿過多は一般的な治療であるが、これには、毎日 4 リットルを超える水の消費、及び 3 リットルを超える尿体積が必要となり、達成及び維持は困難である。チオール小分子などの他の薬剤治療は、シスチンと反応させて、シスチンより溶解性の高い混合ジスルフィドを形成することにより機能するが、白血球減少症、発疹、発熱、蛋白尿、及び腎炎症候群などの深刻な毒性を有し、それらの使用が制限される。

20

【 0 0 4 0 】

本発明は、 L - シスチン / システインを分解する、操作した治療用酵素を使用してシスチン尿症などの疾患を治療する方法を提供する。本方法では、シスチンを循環から取り除き、このことは、シスチン尿症患者での腎臓及び泌尿器でのシスチン結石形成の発生を低下させることができることが臨床的に示されている。本明細書で記載する方法は、現在のシスチン尿症薬に関連する副作用を伴わずに、循環するシスチンを検出量未満まで低下させることができる。

30

【 0 0 4 1 】

I . 定義

本明細書で使用する場合、用語「タンパク質」及び「ポリペプチド」は、ペプチド結合を介して結合したアミノ酸を含む化合物を意味し、互換的に用いられる。

【 0 0 4 2 】

本明細書で使用する場合、用語「融合タンパク質」とは、非天然の方法で作用可能に結合したタンパク質またはタンパク質断片を含有するキメラタンパク質を意味する。

【 0 0 4 3 】

本明細書で使用する場合、用語「半減期」(1 / 2 期) とは、ポリペプチドの濃度が、例えば哺乳類への注射後、インビトロまたはインビボで半分に減るまでに必要とされる時間を意味する。

40

【 0 0 4 4 】

用語「作用可能な組み合わせで」、「作用可能な順番で」、及び「作用可能に結合した」とは、そのように記述される構成要素が、意図する方法で機能することを可能にする関係にある結合、例えば、所与の遺伝子の転写及び / もしくは所望のタンパク質分子の合成を核酸分子が指揮することが可能な様式での核酸配列の結合、または、融合タンパク質が產生される様式でのアミノ酸配列の結合を意味する。

【 0 0 4 5 】

用語「リンカー」とは、リンカーの 1 つの部分が第 1 の分子に作用可能に結合し、リンカーの別の部分が第 2 の分子に作用可能に結合した、 2 つの異なる分子を作用可能に結合する分子ブリッジとして作用する、化合物または部位を指すことを意味する。

50

【0046】

用語「PEG化」とは、ポリエチレンジリコール(PEG)とのコンジュゲーションを意味し、その高い生体適合度、及び改変の容易さから、薬剤担体として幅広く使用されている。PEGは、化学的方法により、PEG鎖の末端にてヒドロキシ基を介して活性薬剤に結合(例えば、共有結合)させることができるが、PEG自体は1分子当たり、最大で2つの活性剤に制限される。異なるアプローチにおいては、PEGとアミノ酸とのコポリマーが、PEGの生体適合性を維持する新規のバイオマテリアルとして発見されており、このコポリマーは、1分子当たり多くの結合点を持つという更なる利点を有し(それ故、より多くの薬剤装入量を提供する)、多様な用途に適合するように合成によって設計することが可能である。

10

【0047】

用語「遺伝子」とは、ポリペプチドまたはその前駆体の產生に必要な制御配列及びコード配列を含むDNA配列を意味する。ポリペプチドは、所望の酵素活性が維持されるよう、完全長コード配列により、またはコード配列の任意の部分により、コードすることができる。

20

【0048】

用語「天然」とは、自然起源から単離した際の、遺伝子、遺伝子産物の典型的な形態、またはその遺伝子もしくは遺伝子産物の特性を意味する。天然形態とは、自然集団において最も頻繁に観察される形態であり、それ故、通常または野生型形態を任意に指す。対照的に、用語「改変」、「バリエント」、または「変異体」とは、天然の遺伝子または遺伝子産物と比較した際の、配列及び機能的性質における改変(即ち、変化した特徴)を示す遺伝子または遺伝子産物を意味する。

30

【0049】

用語「ベクター」とは、核酸配列を、それが複製可能である細胞内への導入のために挿入することができる、担体核酸分子を指すために使用される。核酸配列は「外因性」であり得、これは、ベクターが導入される細胞に対して外来性である、または、配列が細胞内の配列に相同であるが、その配列が元々見出されない宿主細胞核酸内の位置に存在することを意味する。ベクターとしては、プラスミド、コスミド、ウイルス(バクテリオファージ、動物ウイルス、及び植物ウイルス)、ならびに人工染色体(例えば、YAC)が挙げられる。当業者は、標準的な組み換え技術によりベクターを構築するのに十分な装備を有する(例えば、共に参照により本明細書に組み込まれている、Maniatis et al., 1988及びAusubel et al., 1994を参照のこと)。

40

【0050】

用語「発現ベクター」とは、転写可能なRNAをコードする核酸を含む、任意の種類の遺伝子構築物を意味する。場合によっては、次に、RNA分子がタンパク質、ポリペプチド、またはペプチドに翻訳される。他の場合、例えば、アンチセンス分子またはリボザイムの产生においては、これらの配列は翻訳されない。発現ベクターは、様々な「調節配列」を含有することができ、これは、特定の宿主細胞内の作用可能に結合したコード配列の転写、そして場合により翻訳に必要な核酸配列を意味する。転写及び翻訳を管理する調節配列に加えて、ベクター及び発現ベクターは、他の機能も同様に果たす、以下で記述する核酸配列を含有してよい。

【0051】

本明細書で使用する場合、用語「治療上有効量」とは、治療効果を達成するために方法で用いられる、治療用組成物(例えば、治療用ポリヌクレオチド及び/または治療用ポリペプチド)の量を意味する。本出願を通して用いられる用語「治療的効果」または「治療的に有効な」とは、本状態での医療的治療に関して、対象の健康状態を促進する、または向上させるあらゆるものを意味する。これには、疾患のサインまたは症状の頻度または重症度の低下が挙げられるが、これに限定されない。例えば、シスチン尿症の治療には、例えば、シスチン結石のサイズの低下、シスチン結石の除去、または、シスチン結石の形成予防が含まれ得る。

50

【0052】

本明細書で使用する場合、用語「 K_M 」とは、酵素に対するミカエリス・メンテン定数を意味し、所与の酵素が、酵素触媒反応においてその最大速度の半分となる特異的な基質の濃度として定義される。本明細書で使用する場合、用語「 k_{cat} 」とは、代謝回転数、即ち、各酵素部位が単位時間当たりで生成物に転換し、酵素が最大効率で作用する、基質分子の数を意味する。本明細書で使用する場合、用語「 k_{cat}/K_M 」は、特異性定数であり、これは、酵素がどれほど効率的に、基質を生成物に転換するかの尺度である。

【0053】

用語「シスタチオニン - - リアーゼ」(CGL、またはシスタチオナーゼ)とは、シスタチオニンのシステインへの加水分解を触媒する任意の酵素を意味する。例えば、これは、靈長類形態のシスタチオニン - - リアーゼ、または特には、ヒト形態のシスタチオニン - - リアーゼを含む。10

【0054】

「治療」及び「治療すること」とは、対象に治療薬を投与または適用すること、あるいは、疾患または健康関連状態の治療的効果を得る目的での、対象での処置または方式の実施を意味する。例えば、治療としては、薬学上有効量のシスチナーゼ / システイナーゼの投与を挙げてもよい。

【0055】

「対象」及び「患者」とは、ヒトまたは非ヒトのいずれか、例えば靈長類、哺乳類、及び脊椎動物を意味する。特定の実施形態では、対象はヒトである。20

【0056】

I I . シスタチオニン - - リアーゼ

リアーゼは、様々な化学結合を破壊し、多くの場合、新しい二重結合または新しい環状構造を形成することを触媒する酵素である。例えば、この反応：ATP → CAMP + PP_i を触媒する酵素はリアーゼである。リアーゼは、1方向での反応では1つの基質のみを、しかし逆反応では2つの基質を必要とするという点で他の酵素とは異なる。

【0057】

多数の5'リン酸ピリドキサール(PLP)依存性酵素が、システイン、ホモシステイン、及びメチオニンの代謝に関与し、これらの酵素は、Cys/Met代謝PLP依存性酵素として示される、進化上関連するファミリーを形成する。これらの酵素は、約400アミノ酸のタンパク質であり、PLP基は、ポリペプチドの中心位置に位置するリジン残基に結合している。このファミリーのメンバーとしては、シスタチオニン - - リアーゼ(CGL)、シスタチオニン - - シンターゼ(CGS)、シスタチオニン - - リアーゼ(CBL)、メチオニン - - リアーゼ(MGL)、O-アセチルホモセリン(OAH)/O-アセチル-セリン(OAS)、スルフヒドリラーゼ(OSHS)が挙げられる。これら全てに共通することは、ミカエリス複合体を形成して、外部基質のアルジミンをもたらすことである。反応の更なる過程は、特定の酵素の基質特異性により決定される。30

【0058】

例えば、発明者らは、特定の変異をPLP依存性リアーゼファミリーメンバーであるシスタチオニン - - リアーゼに導入し、基質特異性を変化させた。このようにして、L-시스チン及びL-システインの両方を分解する新規の能力を有するバリアントが产生された。別の実施形態において、新規のL-시스チン / システイン分解活性を产生するための他のPLP依存性酵素の改変もまた、想定することができる。40

【0059】

シスタチオニン - - リアーゼ(CGL、またはシスタチオナーゼ)は、シスタチオニンをシステインと - - ケトブチラーゼに分解する酵素である。ピリドキサールリン酸は、この酵素の補欠分子族である。プロテイン・エンジニアリングを使用して、L-システイン及びL-시스チンの分解に対して弱い活性しか持たないシスタチオナーゼを、これらのアミノ酸を高速で分解可能な酵素に転換した(米国特許出願番号第14/472,779号、その全体が本明細書に参照により組み込まれる)。50

【0060】

I I I . シスチナーゼ / システイナーゼの操作

非ヒトタンパク質治療薬の使用で臨床的に見られる、免疫原性の好ましくない効果により、発明者らは、治療的に関係あるシスチン / システイン分解活性をヒト酵素に組み入れる（即ち、シスチン / システインに対して高 k_{cat} 及び低 K_M 値を有し、好ましい特異性を示すように酵素を操作する）ことを追及した。ヒトは、シスタチオニン - - リアーゼ (h C G L) と呼ばれる酵素を有し、この機能は、哺乳類の硫黄転換作用経路 (R a o e t a l . , 1 9 9 0) の最終工程、即ち、L - シスタチオニンの L - システイン、アルファ - ケトブチレート、及びアンモニアへの転換を触媒することである。ヒト C G L はまた、L - システイン及びそのジスルフィド形態である L - シスチンをわずかに分解することができ、L - システインを、操作の理想的候補とする。構造的に、及び系統学的に誘導される突然変異誘発を用いて、h C G L バリアントを、L - システイン及びL - シスチンの両方を効率的に加水分解するように操作した。

【0061】

いくつかの実施形態は、改変タンパク質及びポリペプチドに関する。特定の実施形態は、未改変版に匹敵する少なくとも1つの機能活性、好ましくはL - シスチン / システイン分解活性を示す、改変タンパク質またはポリペプチドに関する。更なる態様では、血清安定性を増加させるために、タンパク質またはポリペプチドが更に改変され得る。したがって、本出願が、「改変タンパク質」または「改変ポリペプチド」の機能または活性に言及する場合、これには、例えば、未改変タンパク質またはポリペプチドを超える更なる利点、例えばL - シスチン / システイン分解活性を有するタンパク質またはポリペプチドが含まれることを、当業者は理解するであろう。特定の実施形態において、未改変タンパク質またはポリペプチドは天然 C G L 、好ましくはヒト C G L である。「改変タンパク質」に関する実施形態は「改変ポリペプチド」に対しても行われ得、その逆も同様であることが、具体的に想定される。

【0062】

活性の測定は、当業者に知られている特にタンパク質の活性に関するアッセイを使用して達成することができ、比較目的のために、例えば、改変または未改変のタンパク質またはポリペプチドのいずれかの、天然及び / または組み換え版の使用を含むことができる。例えば、ヒト C G L は、L - システインをピルベート、アンモニア、及び H₂S に徐々に分解し、L - シスチンをピルベート、アンモニア、及びチオシスティンに転換する (k_{cat} / K_M は、それぞれ約 0 . 2 s⁻¹ mM⁻¹ 、及び 0 . 5 s⁻¹ mM⁻¹) 。チオシスティンは更に、酵素を用いずに L - シスチン及び H₂S に分解される。したがって、L - シスチン / システイン分解活性は、L - シスチン及び / またはL - システインの分解により得られる任意の基質の産生を検出するためのアッセイ、例えば、3 - メチル - 2 - ベンゾチアゾリノンヒドラゾン (M B T H) を使用したピルベートの検出 (T a k a k u r a e t a l . , 2 0 0 4) により測定することができる。

【0063】

特定の実施形態において、改変ポリペプチド、例えば改変 C G L を、L - シスチン / システイン分解活性における増加に基づいて同定することができる。例えば、未改変ポリペプチドの基質認識部位を同定することができる。この同定は、構造分析または相同性分析に基づくことができる。このような基質認識部位の改変を含む変異体の集団を、作製することができる。更なる実施形態において、L - シスチン / システイン分解活性が増加した変異体を、変異体の集団から選択することができる。所望の変異体の選択は、L - シスチン / システイン分解による副産物または生成物の検出を含み得る。

【0064】

改変タンパク質は、アミノ酸の欠失及び / または置換を有し得る。したがって、欠失を有するタンパク質、置換を有するタンパク質、ならびに、欠失及び置換を有するタンパク質は、改変タンパク質である。いくつかの実施形態において、これらの改変タンパク質は、挿入または追加されたアミノ酸、例えば融合タンパク質、またはリンカーを有するタン

10

20

30

40

50

パク質などを更に含んでもよい。「改変欠失タンパク質」は、天然タンパク質の1つ以上の残基を欠いているが、天然タンパク質の特異性及び／または活性を有し得る。「改変欠失タンパク質」は、低下した免疫原性または抗原性もまた有してよい。改変欠失タンパク質の例は、少なくとも1つの抗原領域、即ち、例えば改変タンパク質が投与され得る生物体の種類などの特定の生物体において抗原性であると判定されたタンパク質の領域からアミノ酸残基が欠失したタンパク質である。

【0065】

置換または置き換えバリアントは通常、タンパク質内の1つ以上の部位にて、あるアミノ酸が別のアミノ酸と交換されており、ポリペプチドの1つ以上の性質、特に、そのエフェクター機能及び／または生物学的利用能を制御するように設計され得る。置換は、保存的、即ち、1つのアミノ酸が、類似の形状及び電荷を有するアミノ酸で置き換えられているものであっても、またはそうでなくてもよい。保存的置換は当該技術分野において周知であり、例えば、アラニンからセリンへの、アルギニンからリジンへの、アスパラギンからグルタミンまたはヒスチジンへの、アスパルテートからグルタメートへの、システインからセリンへの、グルタミンからアスパラギンへの、グルタメートからアスパルテートへの、グリシンからプロリンへの、ヒスチジンからアスパラギンまたはグルタミンへの、イソロイシンからロイシンまたはバリンへの、ロイシンからバリンまたはイソロイシンへの、リジンからアルギニンへの、メチオニンからロイシンまたはイソロイシンへの、フェニルアラニンからチロシン、ロイシン、またはメチオニンへの、セリンからスレオニンへの、スレオニンからセリンへの、トリプトファンからチロシンへの、チロシンからトリプトファンまたはフェニルアラニンへの、及び、バリンからイソロイシンまたはロイシンへの変化が挙げられる。

10

20

30

40

50

【0066】

欠失または置換に加えて、改変タンパク質は残基の挿入を有してよく、これは通常、ポリペプチドへの少なくとも1つの残基の追加を伴う。これは、ターゲティングペプチドもしくはポリペプチドの挿入、または単に1つの残基の挿入を含んでよい。融合タンパク質と呼ばれる末端付加を、以下で論じる。

【0067】

用語「生物学的に機能が等価な」は、当該技術分野において十分に理解されており、本明細書では更に詳しく定義する。すなわち、タンパク質の生物活性が維持される条件では、対照ポリペプチドのアミノ酸と同一、または機能的に等価なアミノ酸の約70%～約80%、または約81%～約90%、または更に、約91%～約99%を有する配列が含まれる。改変タンパク質は、特定の態様において、天然の対応物と生物学的に機能が等価であり得る。

【0068】

アミノ酸及び核酸配列は、追加の残基、例えば追加のN末端もしくはC末端アミノ酸、または5'もしくは3'配列を含み得るが、しかし依然として、タンパク質発現が関係する生物学的タンパク質活性の維持を含む上述の基準を満たす限り、本明細書にて開示した配列の1つで説明されるものと事実上同じであることもまた理解されよう。末端配列の付加は特に、コード領域の5'もしくは3'部分のいずれかに隣接する、様々な非コード配列を含み得る、または、様々な内部配列、即ち、遺伝子内で生じることが知られているイントロンを含み得る核酸配列に適用される。

【0069】

L-シスチン及びL-システインの両方を分解する最も高い触媒活性を有するものとして同定される、ある特定のバリアントは、以下の変異を有することが見出された：E59T、R119Rの同義コドン変化、及びE339V。このバリアントはhCGL-TVと呼ばれ、上述したものと同様の、1mLスケールのMBTHアッセイを使用して、pH7.3、及び37°Cにて100mMのPBS緩衝液中でL-シスチン／システインを分解するその能力に関して特徴付けられた。これらの条件下において、hCGL-TVバリアントは、L-シスチンを $1.0 \pm 0.05 \text{ s}^{-1}$ の k_{cat} 、 $0.16 \pm 0.02 \text{ mM}$ のK

M 、及び $6.3 \pm 1.0 s^{-1} mM^{-1}$ の k_{cat}/K_M で分解することが発見された。
hCGL-TVバリアントは、L-시스チンを分解するために、 $0.8 \pm 0.03 s^{-1}$ の K_{cat} 、 $0.25 \pm 0.04 mM$ の K_M 、及び $3.2 \pm 0.6 s^{-1} mM^{-1}$ の k_{cat}/K_M を有することが更に発見された。hCGL-TVバリアントは、 228 ± 6 時間にて見かけの $T_{0.5}$ を有し、ヒト血清中で非常に高い安定性を有することが発見された。加えて、hCGL-TVは、DU145及びPC3前立腺腫瘍細胞の両方に対して、約 $60 nM$ の見かけの IC_{50} 値を有することが発見された。

【0070】

IV. 治療のための、酵素L-시스チン/시스ティン分解

特定の態様において、ポリペプチドは、L-시스チン及び/またはL-시스ティンを枯渇させる新規の酵素を用いた、시스チン尿症などの疾患の治療に使用することができる。本発明は、L-시스チン/시스ティン分解活性を有する改変CGLを使用する治療方法について具体的に開示する。本発明の特定の実施形態は、治療効果が増加した、L-시스チン/시스ティン分解活性を有する新規の酵素を提供する。

【0071】

本発明の特定の態様は、疾患を治療するための、L-시스チン/시스ティン分解活性を有する改変CGLを提供する。一実施例において、改変ポリペプチドはヒトポリペプチド配列を有してよく、それ故、ヒト患者でのアレルギー反応を防ぎ、反復投与を可能にし、及び治療効果を増加させ得る。

【0072】

一例として、PEG-hCGL-TVは、96時間にわたって血清시스チン量($>95\%$)を、及び48時間にわたって시스ティン量(80%)を、大幅に減少させることができる。これを測定するために、オスFVBマウスに、 $50 mg/kg$ のPEG-hCGL-TVを腹腔内注射し、血液及び血清回収のため、0、1、2、4、及び6日目に犠死させた($n=1$ 群当たり5匹)。血清サンプルを、10ピコモルの重水素化시스チン及び시스ティンの内標準混合物と混合し、NANOSEP(登録商標)OMEGA(商標)遠心分離装置、3kDaでのカットオフを使用して限外濾過した(Pall Life Sciences)(Tiziani et al., 2008; Tiziani et al., 2013)。逆相BEH C18、 $1.7 \mu m$ 、 $2.1 \times 150 mm$ カラム(THERMO SCIENTIFIC(商標)ACCELA(登録商標)1250 UPLC, Waters Corporation, USA)を使用して、濾過した極性画分をクロマトグラフ処理し、エレクトロスプレーイオン化装置と一体化したEXACTIVE(商標)Plus ORBITRAP(商標)質量分析計(Thermo Fisher Scientific, San Jose, CA)に導入した。データを、機器に備え付けられているXCALIBUR(商標)ソフトウェアを用いて、重心MSモードで $50 \sim 700 m/z$ 質量範囲から得た。시스チン及び시스ティンの相対濃度を、平均値±SEMとして報告する。

【0073】

加えて、PEG-hCGL-TVは、約23時間で吸収 $T_{1/2}$ 、及び 40 ± 7 時間で脱離 $T_{1/2}$ を示した。これを測定するために、ドットプロットデンシトメトリー技術を使用し、ここでは、サンプルを抗-hCGL抗体(ウサギ抗CTH Sigma # C8248)でプローブし、続いて、TYPHOON(商標)スキヤナー(GE Health care)で488nmにて励起して可視化するために、抗ウサギIgG-FITC(Santa Cruz Biotechnology # sc-2012)を添加した。ImageJソフトウェア(Schneider et al., 2012)を使用して、サンプルのデンシトメトリーバンドを、同じプロット内の既知量のPEG-hCGL-TVの滴定と比較して、検量線を構築し、相対的な血清PEG-hCGL-TVレベルを計算した。データは、血管外投与モデルに一致した(Foye et al., 2007; Stone et al., 2012)。

【0074】

10

20

30

40

50

枯渇は、哺乳類の循環の場合はインビボで、組織培養または他の生物学的培地内のL-시스チン及び／またはL-システイン枯渇が所望される場合はインビトロで、そして、生物学的流体、細胞、または組織が体外で処理され、その後患者哺乳類の体内に戻される場合はエクスビボ手順で、行うことができる。治療される材料に到達可能なL-시스チン及び／またはL-システインの量を低下させるために、循環、培地、生物学的流体、または細胞からのL-시스チン及び／またはL-システインの枯渇が行われ、それ故これは、接触した材料において周囲のL-시스チン及び／またはL-システインを分解するために、L-시스チン及び／またはL-システイン分解条件下で、枯渇させる材料に、L-시스チン及び／またはL-システインを分解する量の操作された靈長類シスチナーゼ／システィナーゼを接触させることを含む。

10

【0075】

L-시스チン及び／またはL-システイン分解効率は、用途に応じて幅広く変化することができ、典型的には、材料中に存在するL-시스チン及び／またはL-システインの量、所望の枯渇速度、及び、材料の、シスチナーゼ／システィナーゼへの曝露耐性に左右される。材料中のL-시스チン及び／またはL-システイン量、及びそれ故、材料からのL-시스チン及び／またはL-システイン枯渇速度は、当該技術分野において周知の様々な化学的及び生化学的方法により、速やかに監視することができる。例示的な、L-시스チン及び／またはL-システインを分解する量は、本明細書で更に記載されており、治療される材料1ミリリットル(mL)当たり、0.001～100単位(U)の操作されたシスチナーゼ／システィナーゼ、好ましくは、約0.01～10U、及びより好ましくは、約0.1～5Uの操作されたシスチナーゼ／システィナーゼの範囲であることができる。

20

【0076】

L-시스チン及び／またはL-システイン分解条件は、CGL酵素の生物活性と適合性のある緩衝液及び温度条件であり、適度な温度、塩、及び、酵素と適合性のあるpH条件、例えば生理学的条件が挙げられる。例示的な条件としては、約4～40、約0.05～0.2M NaClに等しいイオン強度、及び約5～9のpHが挙げられ、生理学的条件が含まれる。

30

【0077】

一実施形態では、インビボで接触させることは、本発明の操作されたシスチナーゼ／システィナーゼを含む治療上有効量の生理学的に許容される組成物を静脈内注射または腹腔内注射によって患者に投与することにより達成され、それにより、患者に存在する、循環しているL-시스チン及び／またはL-システインを枯渇させる。

30

【0078】

治療上有効量の操作されたシスチナーゼ／システィナーゼとは、所望の効果を達成する、即ち、患者の循環内でのL-시스チン及び／またはL-システインを枯渇させるために計算された所定量である。したがって、本発明の操作されたシスチナーゼ／システィナーゼを投与するための用量範囲は、所望の効果を生み出すのに十分大きい範囲である。用量は、例えば、過粘稠度症候群、肺水腫、うっ血性心不全などの、副作用を引き起こすほど多いものであってはならない。一般的に、用量は、患者の年齢、状態、性別、及び疾患の程度で変化し、当業者によって決定されることができる。用量は、任意の合併症が発生する場合、個々の医師により調節されることができる。

40

【0079】

例えば、操作されたシスチナーゼ／システィナーゼの治療上有効量は、生理学的に許容される組成物の状態で投与される場合、1mL当たり約0.001～約100単位(U)、好ましくは約0.1U超、そしてより好ましくは、1mL当たり1Uを超える操作されたシスチナーゼ／システィナーゼである、血管内(血漿)または局所濃度を達成するのに十分であるような量であってよい。典型的な用量は、体重に基づいて投与することができ、約5～1000U/キログラム(kg)/日、好ましくは約5～100U/kg/日、より好ましくは約10～50U/kg/日、そしてより好ましくは約20～40U/kg/日の範囲である。

50

【0080】

操作されたシスチナーゼ／システィナーゼは、注射により、または経時的に徐々に注入することにより非経口投与することができる。操作されたシスチナーゼ／システィナーゼは、静脈内投与、腹腔内投与、経口投与、筋肉内投与、皮下投与、腔内投与、経皮的投与、経皮投与することが可能であり、蠕動手段により送達することができ、尿路に直接注入することができ、または、潜在的な生体内感知装置もしくはL-시스チン／システインを含有し得るカテーテルに接続したポンプにより投与することができる。

【0081】

操作されたシスチナーゼ／システィナーゼを含有する治療用組成物は、例えば、単位用量を注射することにより、従来のように静脈内投与される。治療用組成物に言及して使用する場合、用語「単位用量」とは、各単位が、必要な希釈剤、即ち担体またはビヒクルと共同して所望の治療効果を生み出すように計算された所定量の活性物質を含有する、対象への一体型投与に好適な、物理的に個別の単位を意味する。

10

【0082】

組成物は、投薬形態と適合性のある方法で、治療上有効量で投与される。投与される量は、治療される対象、対象の系の、活性成分を利用する能力、及び、所望の治療効果の程度に左右される。投与される必要のある活性成分の正確な量は、施術者の判断に左右され、各個体に特有である。しかし、全身適用のために好適な用量範囲は、本明細書にて開示されており、投与経路に左右される。初回投与及び追加投与に好適なレジメンもまた想定され、初回投与とそれに続く注射または他の投与による1時間以上の間隔での反復投与が典型的である。例示的な複数投与が本明細書に記載されており、これらは、操作されたシスチナーゼ／システィナーゼの高い血清及び組織レベルを持続的維持すること、及び逆に、L-시스チン／システインの低い血清及び組織レベルを維持することが特に好まれる。あるいは、インビボ療法に関して明記した範囲で、血液中の濃度を維持するのに十分な連続静脈内注射が想定される。

20

【0083】

V. コンジュゲート

本発明の組成物及び方法は、例えば、異種ペプチドセグメントまたはポリマー、例えばポリエチレンギリコールとのコンジュゲート形成による、操作されたシスチナーゼ／システィナーゼを含む。更なる態様において、操作されたシスチナーゼ／システィナーゼは酵素の流体力学的半径を増加させるためにPEGに結合させてもよく、それ故、血清の持続性を増加させることができる。特定の態様において、開示したポリペプチドを、任意のターゲティング物質、例えば、標的細胞上の外部レセプターまたは結合部位に特異的かつ安定して結合する能力を有するリガンドとコンジュゲートさせてもよい（例えば、米国特許公開第2009/0304666号）。

30

【0084】

A. 融合タンパク質

本発明の特定の実施形態は、融合タンパク質に関する。これらの分子は、N末端またはC末端にて異種ドメインに連結した改変シスタチオナーゼを有してよい。例えば、融合は、異種宿主におけるタンパク質の組み換え発現を可能にするために、他の種由来のリーダー配列も利用することができる。別の有用な融合としては、融合タンパク質の精製を容易にできる、タンパク質親和性タグ、例えば血清アルブミン親和性タグまたは6個のヒスチジン残基、あるいは、免疫活性ドメイン、例えば、好ましくは切断可能な抗体エピトープの付加が挙げられる。非限定的親和性タグとしては、ポリヒスチジン、キチン結合タンパク質(CBP)、マルトース結合タンパク質(MBP)、及び、グルタチオン-S-トランスフェラーゼ(GST)が挙げられる。

40

【0085】

特定の実施形態では、シスチナーゼ／システィナーゼは、インビボ半減期を増加させるペプチド、例えば、XTENポリペプチド(Schellenberger et al., 2009)、IgG Fcドメイン、アルブミン、またはアルブミン結合ペプチドに

50

連結され得る。

【0086】

融合タンパク質の生成方法は当業者に周知である。このようなタンパク質は、例えば、完全な融合タンパク質のデノボ合成により、または、異種ドメインをコードするDNA配列を結合させて、その後インタクトな融合タンパク質を発現させることにより、产生することができる。

【0087】

親タンパク質の機能的活性を回復する融合タンパク質の产生は、タンデムに接続されたポリペプチド間でスプライシングされたペプチドリンカーをコードする架橋DNAセグメントに遺伝子を接続することにより、容易になり得る。リンカーは、得られる融合タンパク質の適切な折り畳みを可能にするのに十分な長さである。

【0088】

B. リンカー

特定の実施形態において、操作されたシスチナーゼ／システイナーゼは、二官能性架橋試薬を使用して化学的にコンジュゲートすることができ、または、ペプチドリンカーを用いてタンパク質レベルで融合させることができる。

【0089】

二官能性架橋試薬は、アフィニティーマトリックスの調製、様々な構築物の改変及び安定化、リガンド及びレセプター結合部位の識別、ならびに構造研究を含む、様々な目的のために広範に使用されている。操作されたシスチナーゼ／システイナーゼを連結するために、好適なペプチドリンカーを使用することもでき、例えば Gly - Ser リンカー等である。

【0090】

2つの同一の官能基を有するホモ二官能性試薬は、巨大分子における、同一及び異なる巨大分子またはサブユニット間の架橋の誘発、ならびに、ポリペプチドリガンドの、特異的結合部位への結合において非常に効率が高いことが証明された。ヘテロ二官能性試薬は、2つの異なる官能基を含有する。2つの異なる官能基の異なる反応性を利用することにより、架橋を、選択的かつ連続的に制御することができる。二官能性架橋試薬は、その官能基の特異性、例えばアミノ特異性基、スルフヒドリル特異性基、グアニジン特異性基、インドール特異性基、カルボキシル特異性基に従って分けることができる。これらのうち、アミノ基を遊離させることを目的とする試薬が、その商業的入手可能性、合成の容易さ、及び、適用可能な穏やかな反応条件故に、特に人気のあるものとなっている。

【0091】

ヘテロ二官能性架橋試薬の大部分は、第一級アミン反応性基及びチオール反応性基を含有する。別の例において、ヘテロ二官能性架橋試薬、及びその架橋試薬を使用する方法が記載されている（米国特許出願第5,889,155号、その全体が本明細書に参照により具体的に組み込まれる）。架橋試薬は、求核性ヒドラジド残基を救電子性マレイミド残基と組み合わせ、一例においては、アルデヒドの遊離チオールへのカップリングを可能にする。架橋試薬を改変して、様々な官能基を架橋させることができる。

【0092】

更に、当業者に既知の任意の他の結合／カップリング物質及び／または機構を使用して、靈長類の操作されたシスチナーゼ／システイナーゼを結合させることができ、例えば、抗体 - 抗原相互作用、アビジンビオチン結合、アミド結合、エステル結合、チオエステル結合、エーテル結合、チオエーテル結合、リン酸エステル結合、ホスホラミド結合、無水物結合、ジスルフィド結合、イオン性及び疎水性相互作用、二重特異性抗体及び抗体断片、またはこれらの組み合わせなどである。

【0093】

血液中で妥当な安定性を有する架橋剤を用いることが好ましい。ターゲティング物質、及び治療／予防物質をコンジュゲートするのに首尾よく利用できる、様々な種類のジスルフィド結合含有リンカーが知られている。立体障害型ジスルフィド結合を含有するリンカ

10

20

30

40

50

ーは、インビボでより大きな安定性を付与することを示し得る。これらのリンカーはそれ故、結合物質のうちの1つの群である。

【0094】

ヒンダード架橋剤に加えて、非ヒンダードリンカーもまた、本明細書に従い用いることができる。保護ジスルフィドを含有する、または生成することは考えられない、他の有用な架橋剤としては、SATA、SPDP、及び2-イミノチオランが挙げられる (Wawrzyniczak and Thorpe, 1987)。このような架橋剤の使用は、当該技術分野において十分に理解されている。別の実施形態は、柔軟なリンカーの使用に関する。

【0095】

化学的にコンジュゲートされると、ペプチドは一般に精製され、コンジュゲート化していない作用物質、及び他の汚染物質からコンジュゲートを分離する。多数の精製技術を、十分な精製度のコンジュゲートをもたらすことにおいて、それらを臨床的に有用とするために使用するのに利用することができる。

【0096】

サイズ分離に基づく精製法、例えばゲル濾過、ゲル浸透、または高速液体クロマトグラフィーが通常、大部分で使用される。別のクロマトグラフ技術、例えばブルーセファロース分離もまた使用可能である。弱い洗剤、例えばN-ラウロイル-サルコシンナトリウム (SLS) を使用するなどの、融合タンパク質を封入体から精製する従来の方法が有用であり得る。

【0097】

C. PEG化

本発明の特定の態様において、操作されたシスチナーゼ / システイナーゼのPEG化に関連する方法及び組成物が開示される。例えば、操作されたシスチナーゼ / システイナーゼは、本明細書で開示される方法に従いPEG化することができる。

【0098】

PEG化は、ポリ(エチレングリコール)ポリマー鎖の、別の分子(通常、薬剤または治療用タンパク質)への共有結合プロセスである。PEG化は、PEGの反応誘導体の、標的的巨大分子とのインキュベーションにより、日常的に達成される。PEGの、薬剤または治療用タンパク質への共有結合により、作用物質を宿主免疫系(免疫原性及び抗原性が低下している)から「マスク」する、または作用物質の流体力学サイズ(溶液中のサイズ)を増加させることができ、これは、腎クリアランスを低下させることにより、その循環時間を延長する。PEG化は、疎水性薬剤及びタンパク質への水溶性もまた付与することができる。

【0099】

PEG化の第1工程は、PEGポリマーの、一端または両端における好適な官能基化である。各末端で、同じ反応性部位により活性化されたPEGは「ホモ二官能性」として知られているが、存在する官能基が異なる場合、PEG誘導体は「ヘテロ二官能性」または「ヘテロ官能性」と呼ばれる。PEGポリマーの化学活性誘導体、または化学活性化誘導体を調製して、PEGを所望の分子に結合させる。

【0100】

PEG誘導体に対する好適な官能基の選択は、PEGに結合する分子上で利用可能な反応性基の種類に基づく。タンパク質に関しては、典型的な反応性アミノ酸としては、リジン、システイン、ヒスチジン、アルギニン、アスパラギン酸、グルタミン酸、セリン、スレオニン、及びチロシンが挙げられる。N末端アミノ基及びC末端カルボン酸もまた、使用することができる。

【0101】

第1世代のPEG誘導体を形成するために使用する技術は通常、PEGポリマーを、ヒドロキシリル基、通常は無水物、酸塩化物、クロロホルム、及びカーボネートと反応性である基と反応させることである。第2世代のPEG化化学反応では、より効率的な官能

10

20

30

40

50

基、例えばアルデヒド、エステル、アミドなどが、コンジュゲーションに利用可能となる。

【0102】

PEG化の用途は一層進化して洗練されてきているため、コンジュゲーションのためのヘテロ二官能性PEGの必要性が増加してきている。これらのヘテロ二官能性PEGは、親水性の可撓性かつ生体適合性スペーサーが必要とされる、2つの要素の結合において非常に有用である。ヘテロ二官能性PEGに対する好ましい末端基は、マレイミド、ビニルスルホン、ビリジルジスルフィド、アミン、カルボン酸、及びNHSエステルである。

【0103】

最も一般的な改変物質、またはリンカーは、メトキシPEG(mPEG)分子をベースにする。これらの活性は、タンパク質改変基の、アルコール末端への付加に左右される。場合によっては、ポリエチレングリコール(PEGジオール)を前駆体分子として使用する。ジオールは、ヘテロまたはホモ二量体PEG結合分子を作製するために、後で両端が改変される。

【0104】

タンパク質は通常、求核性部位、例えば非プロトン化チオール(システイニル残基)またはアミノ基にてPEG化される。システイニル特異的改変試薬の例としては、PEGマレイミド、PEGヨードアセテート、PEGチオール、及びPEGビニルスルホンが挙げられる。これら4つ全ては、穏やかな条件下にて非常にシステイニル特異的であり、中性からわずかにアルカリ性のpHであるが、それぞれ、いくつかの欠点を有する。マレイミドを用いて形成されるチオエーテルは、アルカリ性条件下でいくぶん不安定となり得、これにより、このリンカーを用いる製剤化オプションには若干の制限が存在し得る。ヨードPEGを用いて形成したカルバモチオエート結合はより安定しているが、遊離ヨウ素がいくつかの条件下でチロシン残基を改変する可能性がある。PEGチオールはタンパク質チオールとジスルフィド結合を形成するが、この結合もまた、アルカリ性条件下にて不安定となり得る。PEG-ビニルスルホン反応性は、マレイミド及びヨードPEGと比較して遅いが、形成されるチオエーテル結合は極めて強力である。この、より遅い反応速度によってもまた、PEG-ビニルスルホン反応の制御を一層容易にすることができます。

【0105】

天然のシステイニル残基における部位特異的PEG化は滅多に行われないが、これは、これらの残基が通常、ジスルフィド結合形態となっているか、または生物活性が必要とされるためである。他方では、部位特異的突然変異誘発を使用して、チオール特異的リンカーのためにシステイニルPEG化部位を組み込むことができる。システイン変異は、PEG化試薬が到達可能であり、かつPEG化後も依然として生物学的に活性であるように設計されなければならない。

【0106】

アミン特異的改変物質としては、PEG-NHSエステル、PEGトレシレート、PEGアルデヒド、PEGイソチオシアネート、及びいくつかの他の試薬が挙げられる。これらは全て、穏やかな条件下で反応し、アミノ基に対して非常に特異的である。PEG-NHSエステルは恐らく、より反応性の高い試薬の1つであるが、その高反応性により、大規模ではPEG化反応の制御が困難となり得る。PEGアルデヒドは、アミノ基とイミンを形成し、これは次いで、シアノ水素化ホウ素ナトリウムにより二級アミンに還元される。ホウ化水素ナトリウムとは異なり、シアノ水素化ホウ素ナトリウムはジスルフィド結合を還元しない。しかし、この化学物質は非常に毒性があり、特に揮発性となる低pHにおいては、注意深く取り扱わなければならぬ。

【0107】

大部分のタンパク質に存在する複数のリジン残基により、部位特異的PEG化は困難であり得る。幸運なことに、これらの試薬は、非プロトン化アミノ基と反応するため、低いpHにて反応を実施することにより、PEG化を低pKアミノ基に向けることが可能である。一般的に、アルファアミノ基のpKは、リジン残基のエプシロンアミノ基よりも1~

10

20

30

40

50

2 pH 単位低い。pH 7 以下で分子をPEG化することにより、N末端に対する高選択性を頻繁に得ることができる。しかし、このことは、タンパク質のN末端部分が生物活性のために必要とされない場合にのみ実行可能である。依然、PEG化による薬物動態上の利点は往々にして、インビトロ生物活性の著しい損失を上回り、PEG化化学反応に関係なく、はるかに大きいインビボ生物活性を有する生成物をもたらす。

【0108】

PEG化手順を開発する際には、考えるべきいくつかのパラメーターが存在する。幸運なことに、鍵となるパラメーターは通常、4個または5個以下である。PEG化条件の最適化のための「実験の設計」アプローチは、非常に有用である可能性がある。チオール特異的PEG化反応に関しては、考慮すべきパラメーターとしては、タンパク質濃度、PEG : タンパク質の比(モル基準)、温度、pH、反応時間、及び場合によっては、酸素の除外が挙げられる。(酸素は、タンパク質による分子間ジスルフィド形成に寄与する可能性があり、これにより、PEG化生成物の収率が低下する。)特にN末端アミノ基を標的とする場合には、更に一層pHが重要となり得ることを除いて、アミン特異的改変についても同じ因子(酸素は除外)が考慮されなければならない。

10

【0109】

アミン特異的及びチオール特異的改変の両方に関して、反応条件はタンパク質の安定性に影響を及ぼし得る。これは温度、タンパク質濃度、及びpHを制限し得る。加えて、PEGリinkerの反応性は、PEG化反応を開始する前に知られていなければならない。例えば、PEG化剤が70%のみ活性である場合、使用するPEGの量は、タンパク質 - PEG反応での化学量論において活性なPEG分子のみが計算されるようにしなければならない。

20

【0110】

V I . タンパク質及びペプチド

特定の実施形態において、本発明は、少なくとも1種類のタンパク質またはペプチド、例えば操作されたシスチナーゼ / システイナーゼを含む新規組成物に関する。これらのペプチドを融合タンパク質に含めてよい、または、上述した作用物質とコンジュゲートさせてよい。

【0111】

本明細書で使用する場合、タンパク質またはペプチドは通常、遺伝子から翻訳された、約200アミノ酸超~完全長配列以下のタンパク質、約100アミノ酸を超えるポリペプチド、及び/または約3~約100アミノ酸のペプチドを意味するが、これらに限定されない。便宜上、用語「タンパク質」、「ポリペプチド」、及び「ペプチド」は、本明細書では互換的に用いられる。

30

【0112】

本明細書で使用する場合、「アミノ酸残基」とは、任意の自然に生じるアミノ酸、任意のアミノ酸誘導体、または、当該技術分野において公知の任意のアミノ酸模倣物を意味する。特定の実施形態において、タンパク質またはペプチドの残基は、アミノ酸残基の配列を中断するあらゆる非アミノ酸が存在せず、連続している。別の実施形態において、配列は、1つ以上の非アミノ酸部位を含んでよい。特定の実施形態では、タンパク質またはペプチドの残基の配列は、1つ以上の非アミノ酸部位により中断されてよい。

40

【0113】

したがって、用語「タンパク質またはペプチド」は、自然に生じるタンパク質に見出される、20種類の共通のアミノ酸のうち少なくとも1つ、または、少なくとも1種類の改変もしくは普通でないアミノ酸を含むアミノ酸配列を包含する。

【0114】

タンパク質またはペプチドは、標準的な分子生物学技術による、タンパク質、ポリペプチド、もしくはペプチドの発現、タンパク質もしくはペプチドの天然源からの単離、または、タンパク質もしくはペプチドの化学合成を含む、当業者に既知の任意の技術により作製することができる。様々な遺伝子に対応するヌクレオチド及びタンパク質、ポリペプチ

50

ド、ならびにペプチド配列は以前に開示されており、当業者に知られている、コンピュータ化されたデータベースにて発見することができる。このようなデータベースの1つは、国立生物工学情報センターのGenbank及びGenPeptデータベース（ワールドワイドウェブでncbi.nlm.nih.govにて利用可能）である。既知の遺伝子のコード領域を、本明細書にて開示した技術、または当業者に既知の技術を使用して増幅及び／または発現することができる。あるいは、タンパク質、ポリペプチド、及びペプチドの様々な商業的調製が、当業者に既知である。

【0115】

VII. 核酸及びベクター

本発明の特定の態様において、操作されたシスチナーゼ／システイナーゼ、または改変シスチナーゼ／システイナーゼを含有する融合タンパク質をコードする核酸配列が開示され得る。使用する発現系に応じて、核酸配列を、従来の方法に基づいて選択することができる。例えば、操作されたシスチナーゼ／システイナーゼが靈長類CGLに由来し、かつ大腸菌ではほとんど利用されない複数のコドンを含有する場合、このことは、発現を妨げる場合がある。したがって、対応する遺伝子またはそのバリエントは、大腸菌発現のためにコドン最適化されていてよい。対象のタンパク質、例えば操作されたシスチナーゼ／システイナーゼを発現させるために、様々なベクターを使用することもできる。例示的なベクターとしては、プラスミドベクター、ウイルスベクター、トランスポゾン、またはリポソーム系ベクターが挙げられるが、これらに限定されない。

【0116】

VIII. 宿主細胞

宿主細胞は、操作されたシスチナーゼ／システイナーゼ及びそのコンジュゲートの発現及び分泌を可能にするために形質転換され得る任意のものであってよい。宿主細胞は細菌、哺乳類細胞、酵母菌、または糸状菌であってよい。様々な細菌としては、エシェリキア属(*Escherichia*)及びバチルス属(*Bacillus*)が挙げられる。サッカロミセス属(*Saccharomyces*)、クリベロマイセス属(*Kiuyveromyces*)、ハンゼヌラ属(*Hansenula*)、またはピチア属(*Pichia*)に属する酵母菌は、適切な宿主細胞としての使用が見出される。以下の属を含む様々な種の糸状菌を、発現宿主として使用してよい：アスペルギルス属(*Aspergillus*)、トリコデルマ属(*Trichoderma*)、アカパンカビ属(*Neurospora*)、ペニシリウム属(*Penicillium*)、セファロスポリウム属(*Cephalosporium*)、アクリヤ属(*Achlya*)、ポドスポラ属(*Podospora*)、エンドティア属(*Endothia*)、ケカビ属(*Mucor*)、コクリオボルス属(*Cochliobolus*)、及びピリクラリア属(*Pyricularia*)。

【0117】

利用可能な宿主生物の例としては、細菌、例えば、大腸菌(*Escherichia coli*)MC1061、バシラス・サチリス(*Bacillus subtilis*)BRB1の誘導体(*Sibakov et al.*, 1984)、黄色ブドウ球菌(*Staphylococcus aureus*)SAI123(*Lordanescu*, 1975)、またはストレプトコッカス・リビダンス(*Streptococcus lividans*)(*Hopwood et al.*, 1985)；酵母菌、例えば、サッカロマイセス・セレビシエ(*Saccharomyces cerevisiae*)AH22(*Mellor et al.*, 1983)、またはシゾサッカロミセス・ポンベ(*Schizosaccharomyces pombe*)；及び糸状菌、例えば、アスペルギルス・ニズランス(*Aspergillus nidulans*)、アスペルギルス・アワモリ(*Aspergillus awamori*)(*Ward*, 1989)、またはトリコデルマ・リーゼイ(*Trichoderma reesei*)(*Penttila et al.*, 1987; *Harkki et al.*, 1989)が挙げられる。

【0118】

哺乳類宿主細胞の例としては、チャイニーズハムスター卵巣細胞(CHO-K1; AT

10

20

30

40

50

C C C C L 6 1) 、 ラット下垂体細胞 (G H 1 ; A T C C C C L 8 2) 、 HeLa S 3 細胞 (A T C C C C L 2 . 2) 、 ラット肝癌細胞 (H - 4 - I I - E ; A T C C C R L 1 5 4 8) 、 S V 4 0 形質転換サル腎臓細胞 (C O S - 1 ; A T C C C R L 1 6 5 0) 、 及びマウス胚細胞 (N I H - 3 T 3 ; A T C C C R L 1 6 5 8) が挙げられる。前述のものは例示的なものであり、当該技術分野において公知の多くの可能な宿主生物を制限するものではない。原則として、分泌可能な全ての宿主は、原核細胞であれ真核細胞であれ使用可能である。

【 0 1 1 9 】

操作されたシスチナーゼ / システイナーゼ、及び / またはこれらの融合タンパク質を発現する哺乳動物の宿主細胞を、通常は親細胞株を培養するために用いる条件下にて培養する。概して、細胞は、5 % ~ 10 % の血清、例えばウシ胎児血清を一般に補充した、標準的な R P M I 、 M E M 、 I M E M 、または D M E M などの、生理学的塩及び栄養素を含有する標準的な培地で培養される。培養条件もまた標準的である、例えば、培養物は、所望のレベルのタンパク質がもたらされるまで、静止培養液またはローラー培養液にて 37 度インキュベーションされる。

10

【 0 1 2 0 】

IX . タンパク質精製

タンパク質精製技術は当業者に周知である。これらの技術は、あるレベルにおいて、細胞、組織または臓器の、ポリペプチド及び非ポリペプチド画分への、均質化及び粗分画を伴う。別途記載のない限り、対象の対象ポリペプチドを、クロマトグラフ及び電気泳動技術を使用して更に精製し、部分的または完全な精製（または、精製による均質化）をもたらすことができる。純粋なペプチドの調製に特に適している分析方法は、イオン交換クロマトグラフィー、ゲル排除クロマトグラフィー、ポリアクリルアミドゲル電気泳動、アフィニティークロマトグラフィー、イムノアフィニティークロマトグラフィー、及び等電点電気泳動である。ペプチドの精製に特に効率的な方法は、中高圧液体クロマトグラフィー (F P L C) 、または更には高速液体クロマトグラフィー (H P L C) である。

20

【 0 1 2 1 】

精製タンパク質またはペプチドは、そのタンパク質またはペプチドが、自然に入手可能な状態に対して任意の程度で精製されている、他の成分から単離可能な組成物を意味することを意図している。それ故、単離または精製タンパク質またはペプチドは、自然に発生し得る環境には存在しないタンパク質またはペプチドも意味する。一般的に、「精製した」とは、分画を行い、様々な他の成分を取り除き、発現した生物活性を実質的に保持している、タンパク質またはペプチド組成物を意味する。用語「実質的に精製した」が用いられる場合、この標記は、タンパク質またはペプチドが組成物の主たる構成成分を形成する、例えば、組成物中で約 50 % 、約 60 % 、約 70 % 、約 80 % 、約 90 % 、約 95 % 、またはそれ以上のタンパク質を構成する組成物を意味する。

30

【 0 1 2 2 】

タンパク質精製での使用に好適な様々な技術は、当業者には周知である。これらとしては、例えば、硫酸アンモニウム、 P E G 、抗体などによる沈殿、または熱変性とそれに続く遠心分離による精製；イオン交換、ゲル濾過、逆相、ヒドロキシアパタイト、及びアフィニティークロマトグラフィーなどのクロマトグラフィー工程；等電点電気泳動；ゲル電気泳動；ならびに、これら及び他の技術の組み合わせが挙げられる。当該技術分野において一般に公知であるように、様々な精製工程を行う順序は変更可能であり、または、特定の工程を省略することが可能であり、かつ、依然として、実質的に精製したタンパク質またはペプチドの調製を行うのに好適な方法がもたらされると考えられている。

40

【 0 1 2 3 】

タンパク質またはペプチドの精製度を定量化するための様々な方法は、本開示の観点から、当業者に既知である。これらとしては、例えば、活性画分の特異的活性の測定、または、 S D S / P A G E 分析による、画分内でのポリペプチドの量の評価が挙げられる。画分の精度の評価をするための好みしい方法は、画分の特異的活性を計算すること、それを

50

最初の抽出物の特異的活性と比較すること、及びしたがって、「~倍の精製数」として評価される精製度を計算することである。活性量を示すために使用される実際の単位は当然ながら、精製後に選択される特定のアッセイ技術、及び、発現したタンパク質またはペプチドが検出可能な活性を示すか否かに左右される。

【0124】

タンパク質またはペプチドが常に、最も精製された状態で提供されるという、一般的な必要条件は存在しない。実際、実質的に精製されていない生成物のほうが、特定の実施形態においては実用性を有し得ると想定される。部分精製は、組み合わせにより、より少ない精製工程を使用することにより、または、同じ通常の精製スキームの異なる形態を利用することにより、達成することができる。例えば、HPLC装置を利用して実施するカチオン交換カラムクロマトグラフィーは通常、低圧クロマトグラフィー系を利用する同じ技術よりも、より大きな「~倍の」精製をもたらすと理解されている。相対的に低い精製度を示す方法は、タンパク質生成物の全回収、または、発現タンパク質の活性の維持において利点を有し得る。

10

【0125】

特定の実施形態において、タンパク質またはペプチドを単離または精製することができ、例えば、操作されたシスチナーゼ／システィナーゼ、操作されたAADを含有する融合タンパク質、またはPEG化後の操作されたシスチナーゼ／システィナーゼであることができる。例えば、Hisタグまたは親和性エピトープが、精製を容易にするために、このような操作されたシスチナーゼ／システィナーゼに含まれ得る。アフィニティーコロマトグラフィーは、単離される物質と、その物質が特異的に結合可能な分子との特異的親和性に依存するクロマトグラフ手順である。これは、レセプター-リガンド型の相互作用である。カラム材料は、結合パートナーの1つを、不溶性マトリックスに共有結合させることにより合成される。次に、カラム材料は溶液から物質を特異的に吸着することができる。条件を、結合が生じないものに変更すること（例えば、pH、イオン強度、温度などの変更）により、溶出が生じる。マトリックスは、分子を任意の有意の程度に吸着せず、かつ広範囲の化学安定性、物理安定性、及び熱安定性を有する物質でなければならない。リガンドは、結合特性に影響を与えないような方法で結合されなければならない。リガンドは比較的強固な結合も、もたらさなければならない。サンプルまたはリガンドを破壊することなく、物質を溶出可能でなければならない。

20

【0126】

SSEC（サイズ排除クロマトグラフィー）は、溶液中の分子が、サイズ、またはより専門的な用語では、流体力学体積に応じて分離されるクロマトグラフ法である。この方法は通常、大型分子または巨大分子複合体、例えばタンパク質及び工業用ポリマーに適用される。通常、水溶液を使用してサンプルをカラム内で輸送する場合、この技術は、有機溶媒を移動相として使用する場合に用いられるゲル透過クロマトグラフィーという名称に対して、ゲル濾過クロマトグラフィーとして知られている。

30

【0127】

SSECの基本原理は、異なるサイズの粒子が、異なる速度で固定相を溶出（濾過）するというものである。これは、サイズに基づき、粒子の溶液を分離する。全ての粒子が同時に、またはほぼ同時に負荷された場合、同じサイズの粒子は一緒に溶出するはずである。各サイズ排除カラムは、分離可能な、様々な分子量を有する。排除限界は、この範囲の上限における分子量を定義し、これは、分子が大きすぎて固定相にトラップできない点である。透過限界は、分離範囲の下端における分子量を定義し、これは、十分小さいサイズの分子が、固定相の孔を完全に貫通することができる点であり、この分子量を下回る分子全ては、単一のバンドとして溶出するほど小さい。

40

【0128】

高性能液体クロマトグラフィー（または、高圧液体クロマトグラフィー、HPLC）は、化合物を分離、同定、及び定量化するために、生化学及び分析化学にて頻繁に使用されるカラムクロマトグラフィーの形態である。HPLCは、クロマトグラフ充填材料を保持

50

するカラム（固定相）、カラムを通して移動相（複数可）を移動させるポンプ、及び、分子の保持時間を示す検出器を利用する。保持時間は、固定相と、分析する分子と、使用する溶媒（複数可）との相互作用に応じて変化する。

【0129】

一例として、クローニングを簡略化するために、各構築物は、N末端NcoI制限酵素切断部位、インフレームN末端His₆タグ、及びC末端EcoRI部位を含有してよい。¹⁰ pET28aベクター（Novagen）にクローニングした後、適切なhCGL発現ベクターを含有する大腸菌（BL21）を、OD₆₀₀が約0.5～0.6に到達するまで増殖させてよい。この時点で、培養物を25℃での振盪器に移し替え、0.5mM IPTGで誘発し、更に12時間でタンパク質を発現させることができる。次に、細胞ペレットを遠心分離により回収し、IMAC緩衝液（10mM NaPO₄/10mMイミダゾール/300mM NaCl、pH8）中に再懸濁させてよい。フレンチプレス細胞による細胞溶解の後、溶解物を、20,000×gで20分間、4℃にて遠心分離してよく、得られる上清をニッケルIMACカラムにアプライし、10～20カラム体積のIMAC緩衝液で洗浄し、IMAC溶出緩衝液（50mM NaPO₄/250mMイミダゾール/300mM NaCl、pH8）で溶出した。次に、酵素を含有する画分を、10mMピリドキサールリン酸（PLP）で1時間、25℃でインキュベーションしてよい。²⁰ 次いで、10,000MWCO遠心分離フィルターデバイス（AMICON（商標））を使用して、タンパク質を100mM PBS、10%グリセロール、pH7.3溶液に、何度かにわたり緩衝液交換してよい。hCGL酵素またはhCGLバリアント酵素のアリコートは液体窒素中で急速冷凍し、-80℃で保管することができる。この方法で精製したhCGLまたはhCGL-バリアント酵素は、SDS-PAGE及びクマシ染色により評価すると、>95%相同性であり得る。

【0130】

X. 医薬組成物

新規のシスチナーゼ/システイナーゼは、全身投与または局所投与可能であることが意図される。これらは、静脈内投与、髄腔内投与、及び/または腹腔内投与することができる。

【0131】

本発明が、治療用調製物の特定の性質により限定されることは意図されない。例えば、このような組成物は、生理学的に許容される液体、ゲル、または固体担体、希釈剤、及び賦形剤とともに製剤中に提供することができる。これらの治療用調製物は、他の治療薬に類似の方法で、獣医学用の家畜などの哺乳類、及び、ヒトでの臨床的用途で投与することができる。一般に、治療効果のために必要な用量は、使用の種類及び投与方法、ならびに、個々の対象での特定の必要条件に従い変化する。³⁰

【0132】

このような組成物は通常、注射液として、溶液または懸濁液として調製される。好適な希釈剤及び賦形剤は、例えば、水、生理食塩水、デキストロース、グリセロールなど、及びこれらの組み合わせである。加えて、所望する場合、組成物は、微量の補助物質、例えば湿潤剤もしくは乳化剤、安定化剤、またはpH緩衝剤を含有してよい。⁴⁰

【0133】

臨床用途を想定する場合、目的の用途に適切な形態でタンパク質、抗体、及び薬剤を含む医薬組成物を調製することが必要であり得る。一般的に、医薬組成物は、製薬上許容できる担体に溶解または分散した、有効量の1種類以上のCGLバリアントまたは追加の作用物質を含んでよい。語句「薬学上または薬理学上許容される」とは、動物、例えばヒトに適切に投与された場合に、副反応、アレルギー反応、または他の副作用を生み出さない分子要素及び組成物を意味する。本明細書にて開示した方法により単離した少なくとも1種類のCGLバリアント、または追加の活性成分を含有する医薬組成物の調製は、本開示の観点から、参照により本明細書に組み込まれている、Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th Ed., 1990に例示されて

10

20

30

40

50

いるように、当業者には既知である。更に、動物（例えば、ヒト）投与に関して、調製物は、FDAの生物学標準により必要とされる、生殖不能性、発熱原性、一般的な安全性、及び純度規格を満たさなければならないことが理解されよう。

【0134】

本明細書で使用する場合、「製薬上許容できる担体」としては、当業者に既知である、あらゆる全ての溶媒、分散媒、コーティング剤、界面活性剤、酸化防止剤、防腐剤（例えば、抗菌剤、抗カビ剤）、等張剤、吸収遅延剤、塩、防腐剤、薬剤、薬剤安定剤、ゲル、結合剤、賦形剤、崩壊剤、潤滑剤、甘味剤、香料添加剤、染料、同様の材料、及びこれらの組み合わせが挙げられる（例えば、参照により本明細書に組み込まれているRemington's Pharmaceutical Sciences, 18th Ed., 1990を参照のこと）。任意の従来の担体が活性成分と非相溶性である場合を除いて、医薬組成物での使用が想定される。10

【0135】

本発明の特定の実施形態は、固体、液体、またはエアゾール形態のどれで投与されるのか、そして、注射などの投与経路に対して滅菌する必要があるのか否かに応じて、異なる種類の担体を含んでよい。組成物は、静脈内投与、皮内投与、経皮投与、髄腔内投与、動脈内投与、腹腔内投与、鼻腔内投与、腔内投与、直腸内投与、筋肉内投与、皮下投与、粘膜投与、経口投与、局所（topically）投与、局所（locally）投与、吸入（例えば、エアゾール吸入）、注射、注入、連続注入、標的細胞を直接浸漬する局所灌流、カテーテルを介した投与、洗浄を介した投与、脂質組成物（例えば、リポソーム）に入れての投与、または、当業者に既知の他の方法、または前述のいずれかの組み合わせにより、投与することができる（例えば、参照により本明細書に組み込まれているRemington's Pharmaceutical Sciences, 18th Ed., 1990を参照のこと）。20

【0136】

改変ポリペプチドを、遊離塩基、中性、または塩形態で組成物中に製剤化することができる。製薬上許容できる塩としては、酸付加塩、例えば、タンパク様組成物の遊離アミノ基と形成したもの、または、無機酸、例えば、塩酸もしくはリン酸、または、有機酸、例えば酢酸、シュウ酸、酒石酸、もしくはマンデル酸と形成したものが挙げられる。遊離カルボキシル基と形成した塩もまた、例えば、ナトリウム、カリウム、アンモニウム、カルシウム、もしくは水酸化第二鉄などの無機塩基、または、イソプロピルアミン、トリメチルアミン、ヒスチジン、もしくはプロカインなどの有機塩基から誘導することができる。製剤化の際、溶液は、投薬形態と適合性のある方法で、そして、治療的に有効な量で投与される。製剤は、様々な投薬形態で容易に投与される、例えば、非経口的投与用に、例えば、注射用溶液、もしくは肺送達用のエアゾールに製剤化される、または、消化管投与用に、例えば薬物放出カプセルなどに製剤化される。30

【0137】

本発明の特定の態様に更に従うと、投与に好適な組成物は、不活性希釈剤を用いてまたは用いずに、製薬上許容できる担体中に提供されてよい。担体は同化可能でなければならず、液体、半固体、即ち、ペースト、または固体担体を含む。任意の従来の媒体、作用物質、希釈剤、または担体がレシピエントに対して、または含有される組成物の治療効果に対して有害である場合を除いて、本方法の実践に使用するために、投与可能な組成物においてそれらを使用することは、適切である。担体または希釈剤の例としては、脂肪、油類、水、食塩水、脂質、リポソーム、樹脂、結合剤、フィラーなど、またはこれらの組み合わせが挙げられる。組成物は、1種類以上の構成成分の酸化を遅延させるための、様々な酸化防止剤もまた含むことができる。更に、微生物の作用の防止を、パラベン（例えば、メチルパラベン、プロピルパラベン）、クロロブタノール、フェノール、ソルビン酸、チメロサール、またはこれらの組み合わせを含むがこれらに限定されない、様々な抗菌及び抗カビ剤などの防腐剤によりもたらすことができる。40

【0138】

10

20

30

40

50

本発明の特定の態様に従うと、組成物を、任意の従来の、そして実践的な方法で、即ち、溶解、懸濁、乳化、混合、封入、吸収などにより、担体と組み合わせる。このような手順は、当業者には日常的なものである。

【0139】

本発明の特定の実施形態においては、組成物を、半固体または固体担体と、完全に組み合わせる、または混合する。任意の従来の方法、例えば粉碎により、混合を実施することができる。治療活性の喪失、即ち胃での変性から組成物を保護するために、安定化剤もまた、混合プロセスに追加することができる。組成物中で使用するための安定剤の例としては、緩衝剤、アミノ酸（グリシン及びリジンなど）、炭化水素（例えば、デキストロース、マンノース、ガラクトース、フルクトース、ラクトース、スクロース、マルトース、ソルビトール、マニトールなど）が挙げられる。10

【0140】

更なる実施形態では、本発明は、CGLバリエント、1種類以上の脂質、及び水性溶媒を含む薬剤用脂質ビヒクル組成物の使用に関し得る。本明細書で使用する場合、用語「脂質」は、性質的に非水溶性であり、有機溶媒で抽出可能な、広範囲の物質のいずれかを含むように定義される。この広い分類の化合物は当業者に公知であり、用語「脂質」を本明細書で使用する場合、これは任意の特定の構造に限定されない。例としては、長鎖脂肪族炭化水素及びその誘導体を含有する化合物が挙げられる。脂質は、自然発生または合成（即ち、人により設計もしくは作製される）であってよい。しかし、脂質は通常、生物学的物質である。生物学的脂質は当該技術分野において周知であり、例えば、中性脂肪、リン脂質、ホスホグリセリド、ステロイド、テルペン、リゾ脂質、グリコスフィンゴリピド、糖脂質、サルファタイド、エーテル及びエステル結合脂肪酸を有する脂質、重合性脂質、ならびにこれらの組み合わせが挙げられる。もちろん、当業者により脂質として理解される、本明細書で具体的に記載するもの以外の化合物もまた、組成物及び方法に包含される。20

【0141】

当業者は、脂質ビヒクル中に組成物を分散させるのに使用可能な技術の範囲に精通している。例えば、操作されたシスチナーゼ／システィナーゼまたはその融合タンパク質は、脂質を含有する溶液に分散、脂質で溶解、脂質で乳化、脂質と混合、脂質と化合、脂質に共有結合、脂質中に懸濁液として含有、ミセルもしくはリポソームを含有もしくはこれらと複合体化、または別様において、当業者に既知の任意の方法により、脂質もしくは脂質構造と結合され得る。分散体はリポソームの形成をもたらしても、もたらさなくてよい。30

【0142】

動物患者に投与される組成物の実際の投与量は、物理的及び生理学的因素、例えば、体重、状態の深刻度、治療中の疾患の種類、以前または同時発生の治療的介入、患者の突発性疾患、及び投与経路により決定することができる。用量及び投与経路に応じて、好ましい用量の投与数及び／または有効量は、対象の応答によって変化し得る。投与の責任を負う施術者はいずれにせよ、組成物中での活性成分（複数可）の濃度、及び、個体対象に対する適切な投与量（複数可）を決定する。40

【0143】

特定の実施形態において、医薬組成物は例えば、少なくとも約0.1%の活性化合物を含んでよい。別の実施形態において、活性化合物は、例えば、単位の重量の約2%～約75%、または約25%～約60%、及びこれらから導き出される任意の範囲を占めてよい。当然、治療上有用な各組成物の活性化合物（複数可）の量は、好適な用量が化合物の任意の所与の単位用量で得られるように調製され得る。溶解度、生物学的利用能、生物学的半減期、投与経路、生成物の貯蔵寿命、及び他の薬理学的考慮などの因子が、このような医薬製剤を調製する当業者により想定され、そのために、様々な用量及び治療レジメンが望ましい場合がある。

【0144】

10

20

30

40

50

他の非限定例において、投与量は、1投与当たり、約1マイクログラム/kg/体重、約5マイクログラム/kg/体重、約10マイクログラム/kg/体重、約50マイクログラム/kg/体重、約100マイクログラム/kg/体重、約200マイクログラム/kg/体重、約350マイクログラム/kg/体重、約500マイクログラム/kg/体重、約1ミリグラム/kg/体重、約5ミリグラム/kg/体重、約10ミリグラム/kg/体重、約50ミリグラム/kg/体重、約100ミリグラム/kg/体重、約200ミリグラム/kg/体重、約350ミリグラム/kg/体重、約500ミリグラム/kg/体重～約1000ミリグラム/kg/体重、またはそれ以上、及び、そこから導き出される任意の範囲もまた含めてよい。本明細書で列挙する数から導き出される範囲の非限定例において、上記の数に基づいて、約5ミリグラム/kg/体重～約100ミリグラム/kg/体重、約5マイクログラム/kg/体重～約500ミリグラム/kg/体重などの範囲を投与することができる。10

【0145】

一例として、hCGL-TV酵素は、サンプル中に0.1% TRITON(商標)114を含有するIMAC緩衝液を用いて、結合したIMACカラムを広範に(90～100カラム体積)洗浄することにより精製することができる。サンプルを再び、10～20カラム体積のIMAC緩衝液で洗浄し、続いて、IMAC溶出緩衝液(50mM NaPO₄/250mMイミダゾール/300mM NaCl、pH8)を用いて溶出してよい。TRITON(商標)114での洗浄は、内毒素の除去のために用いることができる。20
10,000MWCO濾過デバイス(AMICON(登録商標))を使用して、精製タンパク質を、pH8.3において100mM NaPO₄緩衝液への緩衝液交換に供してよい。その後、PLPを10mMの濃度で添加し、タンパク質を1時間25にてインキュベーションしてよい。メトキシPEGスクシンイミジルカルボキシメチルエステル5000MW(JenKem Technology)を次に、hCGL-TVに80:1のモル比で添加して、一定速度で攪拌させながら1時間25にて、反応させることができる。30
100,000MWCO濾過デバイス(AMICON(登録商標))を使用して、得られた混合物を全体的に緩衝液交換し(10%グリセロールを含むPBS)、0.2マイクロメートルシリングフィルター(VWR)により滅菌してよい。Limus Amebocyte Lysate(LAL)キット(Cape Cod Incorporated)を使用して、PEG化酵素を全て、リポ多糖体(LPS)含量に関して分析してよい。

【0146】

X I .併用治療

特定の実施形態において、本実施形態の組成物及び方法は、第2の、または追加の治療法と組み合わせた시스チナーゼ/システイナーゼの投与を伴う。このような治療法は、시스チン/システイン依存性に関連する、任意の疾患の治療に適用することができる。例えば、疾患は시스チン尿症であってよい。

【0147】

併用療法を含む方法及び組成物は、治療効果もしくは予防効果を高め、かつ/または別の治療の治療効果を増加させる。治療及び予防方法及び組成物を、所望の効果、例えば尿路中のシステイン結石の除去を達成するのに有効な組み合わせた量で提供することができる。本プロセスには、시스チナーゼ/システイナーゼ及び第2の治療法の両方を投与することを伴ってよい。組織、臓器、もしくは細胞を、1種類以上の作用物質(即ち、시스チナーゼ/システイナーゼもしくは第2の作用物質)を含む、1種類以上の組成物もしくは薬理学的製剤(複数可)に曝露することができ、または、組織、臓器、及び/もしくは細胞を、2種類以上の異なる組成物もしくは製剤と接触させることができ、ここで、1つの組成物は、(1)시스チナーゼ/システイナーゼ、(2)第2の作用物質、または(3)시스チナーゼ/システイナーゼと第2の作用物質の両方を提供する。または、このような併用療法を、衝撃波療法または外科療法と組み合わせて使用すると想定されている。4050

【0148】

細胞に適用される場合の用語「接触した」及び「曝露された」は、本明細書で、治療用構築物が標的の臓器に送達される、または標的細胞のすぐ近くに配置されるプロセスを説明するために使用される。結石の溶解を達成するために、例えば、両方の作用物質を、結石の溶解、または結石の形成もしくは再形成を予防するのに有効な、組み合わせた量で細胞に送達する。

【0149】

シスチナーゼ／システイナーゼを、第2のシスチン尿症治療の前、間、後、または、治療に関係する様々な組み合わせで投与することができる。投与は、同時～数分、数日、または数週間の範囲の間隔で行われ得る。シスチナーゼ／システイナーゼが、第2のシスチン尿症剤とは別に患者に提供される実施形態において、通常は、2つの治療が依然として、患者において有利に組み合わされた効果を発揮することができるよう、各送達の時間の間に、著しい期間が開かないことを確実にしなければならない。このような例において、患者に、シスチナーゼ／システイナーゼ及び第2のシスチン尿症治療法が、互いに約12～24、または72時間以内、より詳細には、互いに約6～12時間以内に提供され得ることが意図されている。場合によっては、それぞれの投与の間に数日（2、3、4、5、6、または7日）～数週間（1、2、3、4、5、6、7、または8週間）の経過があるように、治療の期間を著しく延ばすことが望ましい場合がある。

10

【0150】

特定の実施形態において、治療の過程は、1～90日、またはそれ以上続く（このような範囲は間の日も含む）。シスチナーゼ／システイナーゼは、1日目～90日目（このような範囲は間の日も含む）のうちの任意の日またはこれらの任意の組み合わせに投与され得、別の治療は、1日目～90日目（このような範囲は間の日も含む）のうちの任意の日またはこれらの任意の組み合わせに投与されることが意図される。1日（24時間の期間）以内に、患者に1つまたは複数の治療（複数可）の投与がなされてよい。更に、治療の過程後、治療が投与されない期間が存在することが意図される。この期間は、患者の状態、例えば予後、強度、健康状態などに応じて、1～7日、及び／または1～5週間、及び／または1～12か月、またはそれ以上（このような範囲は間の日も含む）続き得る。治療サイクルは必要に応じて繰り返されると予想される。

20

【0151】

様々な組み合わせを用いることができる。以下の例において、シスチナーゼ／システイナーゼは「A」であり、第2のシスチン尿症療法は「B」である：
A/B/A B/A/B B/B/A A/A/B A/B/B B/A/A A/B/B/B B/A/B/B

30

B/B/B/A B/B/A/B A/A/B/B A/B/A/B A/B/B/A B/B/A/A

B/A/B/A B/A/A/B A/A/A/B B/A/A/A A/B/A/A A/A/B/A

【0152】

本実施形態の任意の化合物または治療法の患者への投与は、存在する場合、作用物質の毒性を考慮して、このような化合物の投与の一般的プロトコルに従う。したがって、いくつかの実施形態では、併用療法に起因する毒性を監視する工程が存在する。

40

【0153】

A. 手術

シスチン結石を除去する最も一般的な方法の1つは、経皮腎切石術であり、この方法では、鍵穴型の切り込みを背中に作り、腎孟鏡を使用して結石を破壊し除去する。この手順は、観血手術よりも侵襲性が低いものの、2、3日の入院、及び数週間の回復時間と共に、標準の麻酔または脊髄麻酔が通常必要である。

【0154】

B. 衝撃波療法

シスチン尿症患者は多くの場合、生涯において結石形成の症状再発、及び手術を有する。結石の分解のために高エネルギーの衝撃波を使用する衝撃波碎石術を、1.5cm未満

50

のシスチン結石の治療に使用することができる。シスチン結石は、全ての泌尿器結石で最も頑強であり、碎石術は通常、これらの破壊には効果がない。しかし、より高いエネルギーでより高頻度の衝撃を使用することができるため、より小さなシスチン結石は、碎石術により分解することができる。

【0155】

C. 薬物療法

薬物療法は、チオール含有薬剤、例えばD-ペニシラミン、L-メルカプトプロピオニルグリシン(Thiola)、及びカプトブリルを使用して、シスチンジスルフィド結合を破壊し、より可溶性の混合ジスルフィドを形成することを伴う。しかし、これらの薬剤は頻繁に、胃腸の不耐性、発疹、及び関節痛などの様々な不快な副作用を患者に与えてしまう(Sakhaee and Sutton, 1996)。

10

【0156】

D. その他の方法

追加の治療の過程は通常、泌尿器のシスチン量を管理して、結石形成のリスクを低下させることを含む。これらの管理法としては、水分摂取量の実質的な増加(それにより、尿体積、及び可溶化できるシスチンの量を増加させる)、シスチンの代謝前駆体であるメチオニン、及びナトリウムの食事制限、ならびに、クエン酸カリウムを経口投与することにより尿のpHを増加させることによる、シスチンの溶解度の増加が挙げられる。

20

【0157】

非外科的及び低侵襲性手段である、シスチン結石の治療のための追加の方法は、化学溶解(chemical dissolution)としても知られている結石の化学的溶解のために腎造瘻術用カテーテルを介して化学溶液を腎臓に送達することを含む。pH 10で、シスチン結石を溶解させる強アルカリ性環境をもたらすようにどちらも作用する、重炭酸ナトリウムと有機緩衝液であるトリス-ヒドロキシメチレン-アミノメタン(トロメタミン-E)とを含む様々な化学分解剤が、この技術で使用されている。アセチルシステインもまた、化学溶解では頻繁に使用され、シスチンジスルフィドを破壊し、より安定したジスルフィドを形成することにより、D-ペニシラミン及びThiolaと類似した様式で結石を溶解する。しかし、これらの化学分解剤は非常にゆっくり作用し、通常は、結石を溶解するのに数週間~数ヶ月かかるため、この溶解法は、シスチン結石の治療では役割が限定されている(Ng and Stream, 2001)。

30

【0158】

XII. キット

本発明の特定の態様は、治療用キットなどのキットを提供してよい。例えば、キットは、本明細書に記載した1種類以上の医薬組成物、及び場合により、それらの使用のための取扱説明書を含んでよい。キットは、このような組成物の投与を成し遂げるための、1種類以上のデバイスを更に含んでよい。例えば、対象キットは、組成物を尿路に直接静脈内注射することを達成するための、医薬組成物及びカテーテルを含んでよい。別の実施形態において、対象キットは、送達デバイスと共に使用するために、操作されたシスチナーゼ/システイナーゼが予め充填された、場合により薬剤として製剤化された、または凍結乾燥したアンプルを含んでよい。

40

【0159】

キットは、ラベルを付けた容器を含んでよい。好適な容器としては、例えば、ボトル、バイアル瓶、及び試験管が挙げられる。容器を、ガラスまたはプラスチックなどの様々な材料から形成することができる。容器は、上述したものなどの、治療用途または非治療用途に効果的な操作されたシスチナーゼ/システイナーゼを含む組成物を保持することができる。容器のラベルは、組成物が特定の治療法、または非治療用途に使用されることを示してよく、前述したもののような、インビポまたはインビトロ使用のいずれかのための指示も示すことができる。本発明のキットは通常、上述の容器、ならびに緩衝剤、希釈剤、フィルター、針、シリング、及び使用説明書が付いた添付文書を含む商業的に及び使用者の立場から望ましい材料を含む、1つ以上の他の容器を含む。

50

【実施例】

【0160】

X III. 実施例

以下の実施例は、本発明の好ましい実施形態を例証するために含まれる。後に続く実施例で開示した技術は、発明者により発見された技術が、本発明の実施に際して十分機能することを示し、それ故、その実施のための好ましい方式を構成すると考えることができるということが、当業者により理解されなければならない。しかし、当業者は、本開示の観点から、開示されている特定の実施形態において、多くの変更を加えることができ、依然として、本発明の精神及び範囲から逸脱することなしに同様の、または類似の結果を得ることができることを理解しなければならない。

10

【0161】

実施例 1 - ヒトシスチナーゼ / システイナーゼ酵素を用いた、シスチン尿症のマウスモデルの治療

尿路中で結石形成を予防するまたは逆行させる h C G L - T V の能力は、以前、膀胱中でシスチン結石を発症させ、腎臓では、さほどでないにせよ発症させることができた（Ercolani et al., 2010）、S1c3a1ノックアウトマウスで評価された。この研究プロジェクトのために使用した S1c3a1 マウスモデルは、Regeneron Pharmaceuticals, Inc. により産生された ES 細胞クローニング 16054A-G2 から作製され、University of California Davis (U42RR024244) の KOMP Repository (www.komp.org) により、マウスにクローニングされた。この系統を更に繁殖させ、D T C C コンソーシアムの一部としての Charles River 研究室による KOMP2 プロジェクトの一部として、KOMP Repository (www.komp.org) に提供した。

20

【0162】

それぞれ 16 週齢及び 9 週齢の C 57 B L / 6 N バックグラウンドの 2 匹の S c 1 3 a 1 オスマウスに、50 mg / kg の P E G 化 h C G L - T V を、1 週間に 3 回、2 週間にわたって、腹腔内投与した。動物試験を、A e g l e a B i o T h e r a p e u t i c s, Inc. I A C U C に従い実施する。治療開始前 (-11 及び 0 日目)、ならびに治療中 (4、7、9 日目) に少量の尿サンプルを回収し、h C G L - T V の投与が、マウスにおいてシスチン結石形成を予防または改善したかを判定する。40 × の倍率で、明視野観察法によりシスチン結晶を評価し、各サンプルにおいて均一な、対象となる代表的領域から、結晶の数を計数する。図 2 及び 3 は、可視化された六角形結晶の数をグラフにより表す。酸化チオールの総含量及びタンパク質沈殿物の減少後の高速液体クロマトグラフィー (HPLC)、その後の、7-フルオロベンゾフラザン-4-スルホン酸アンモニウム塩による、減少したチオール総含量の導出により、尿中の全システインの濃度を測定する。Sigma-Aldrich から入手したクレアチニンアッセイ (MAK079) を使用し、メーカーが推奨する手順に従って、泌尿器クレアチニンを測定する。クレアチニンレベルを使用して、泌尿器におけるシステイン総量を正規化する。図 1 及び表 1 は、投薬スケジュールにわたるシステイン / クレアチニン総量を示す。

30

【0163】

(表 1) 少量の回収尿中の総システイン及びクレアチニンの測定

日	総システイン (μM)		クレアチニン (mM)		総システイン / クレアチニン比率の平均 (μM/mM)
	マウス #1	マウス #2	マウス #1	マウス #2	
-11	2622.393	4567.356	0.361	0.728	6769.044
0	3068.229	4922.726	0.450	0.791	6520.854
4	1805.064	1986.336	0.631	0.900	2533.840
7	3482.205	3286.022	0.585	0.577	5823.750
9	3762.806	4735.066	0.619	0.750	6196.134

40

50

【 0 1 6 4 】

本明細書で開示及び特許請求する全ての方法は、本開示の見地から、過度な実験をすることなく作製及び実行することができる。好ましい実施形態の観点から、本発明の組成物及び方法が記載されているものの、本発明の構想、精神及び範囲を逸脱することなく、変更を、本明細書に記載する方法、及び、それらの工程または連続した工程に適用することができることが、当業者には明らかとなろう。より具体的には、化学的及び生理学的の両方に関連する特定の作用物質を、本明細書で記載される作用物質で置き換えることができるが、同一または類似の結果が達成されるであろうことが明らかとなろう。当業者に明らかな、全てのこののような同様の置き換えは、添付の特許請求の範囲により定義される、本発明の精神、範囲及び構想の範囲内であると見なされる。

10

【 0 1 6 5 】**参考文献**

以下の参考文献は、本明細書で説明する内容を補完する、例示的手順、または他の詳細を提供する限りにおいて、参照により本明細書に具体的に組み込まれている。

U.S. Pat. No. 4,870,287

U.S. Pat. No. 5,739,169

U.S. Pat. No. 5,760,395

U.S. Pat. No. 5,801,005

U.S. Pat. No. 5,824,311

U.S. Pat. No. 5,830,880

U.S. Pat. No. 5,846,945

U.S. Pat. No. 5,889,155

U.S. Pat. Publn. 2009/0304666

10

Austin-Ward and Villaseca, *Revista Medica de Chile*, 126(7):838-845, 1998.

Ausubel *et al.*, Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing Associates and Wiley Interscience, N.Y., 1994.

Bukowski *et al.*, *Clinical Cancer Res.*, 4(10):2337-2347, 1998.

Christodoulides *et al.*, *Microbiology*, 144(Pt 11):3027-3037, 1998.

20

Davidson *et al.*, *J. Immunother.*, 21(5):389-398, 1998.

Doxsee *et al.*, Sulfasalazine-induced cystine starvation: Potential use for prostate cancer therapy. *The Prostate*, 67(2):162-171, 2007.

Ercolani et al., Bladder outlet obstruction in male cystinuria mice. *Int Urol Nephrol* 42: 57-63, 2010.

Feliubadalo *et al.*, Slc7a9-deficient mice develop cystinuria non-I and cystine urolithiasis. *Hum Mol Genet*, 12: 2097-2108, 2003.

Foye *et al.*, Foye's Principles of Medicinal Chemistry, Lippincott Williams & Wilkins, 2007.

30

Gill and von Hippel, Calculation of protein extinction coefficients from amino acid sequence data. *Anal Biochem*, 182(2):319-326, 1989.

Glode *et al.*, Cysteine auxotrophy of human leukemic lymphoblasts is associated with decreased amounts of intracellular cystathionase protein. *Biochemistry*, 20(5):1306-1311, 1981.

- Guan *et al.*, The x c– cystine/glutamate antiporter as a potential therapeutic target for small-cell lung cancer: use of sulfasalazine. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 64(3):463-472, 2009.
- Hanibuchi *et al.*, *Int. J. Cancer*, 78(4):480-485, 1998.
- Harkki *et al.*, *BioTechnology*, 7:596-603, 1989.
- Hellstrand *et al.*, *Acta Oncologica*, 37(4):347-353, 1998.
- Hollander, *Front. Immun.*, 3:3, 2012.
- Hopwood *et al.*, In: *Genetic Manipulation of Streptomyces*, A Laboratory Manual, The John Innes Foundation, Norwich, Conn., 1985. 10
- Hoover *et al.*, The structure of human macrophage inflammatory protein-3alpha /CCL20. Linking antimicrobial and CC chemokine receptor-6-binding activities with human beta-defensins. *J Biol Chem*, 277(40):37647-37654, 2002.
- Kim *et al.*, Expression of cystathionine β -synthase is downregulated in hepatocellular carcinoma and associated with poor prognosis. *Oncology Reports*, 21(6):1449-1454, 2009. 20
- Hui and Hashimoto, *Infection Immun.*, 66(11):5329-5336, 1998.
- Ito *et al.*, *J. Biochem.*, 79:1263, 1976.
- Link *et al.*, Cystathionase: a potential cytoplasmic marker of hematopoietic differentiation. *Blut*, 47(1):31-39, 1983.
- Livrozet *et al.*, An animal model of Type A Cystinuria due to spontaneous mutation in 129S2/SvPasCrl Mice. *PLoS One* 9:e102700, 2014.
- Lordanescu, *J. Bacteriol*, 12:597 601, 1975.
- Maniatis *et al.*, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1988. 30
- Mellor *et al.*, *Gene*, 24:1-14, 1983.
- Penttila *et al.*, *Gene*, 61:155-164, 1987.
- Peters et al., A mouse model for cystinuria type I. *Hum Mol Genet* 12: 2109–2120, 2003.
- Qin *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95(24):14411-14416, 1998.
- Rao *et al.*, Role of the Transsulfuration Pathway and of {gamma}-Cystathionase Activity in the Formation of Cysteine and Sulfate from Methionine in Rat Hepatocytes. *Journal of Nutrition*, 120(8):837, 1990. 40
- Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th Ed. Mack Printing Company, 1289-1329, 1990.
- Schneider *et al.*, 671 nih image to imageJ: 25 years of image analysis. *Nature Methods*, 9:2012.

Sibakov *et al.*, *Eur. J. Biochem.*, 145:567-572, 1984.

Stone *et al.*, Strategies for optimizing the serum persistence of engineered human arginase I for cancer therapy. *Journal of Controlled Release*, 158:171-179, 2012.

Takakura *et al.*, Assay method for antitumor L-methionine -lyase: comprehensive kinetic analysis of the complex reaction with L-methionine. *Analytical Biochemistry*, 327(2):233-240, 2004.

Tiziani *et al.*, Optimized metabolite extraction from blood serum for ^1H nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Analytical Biochemistry*, 377:16-23, 2008.

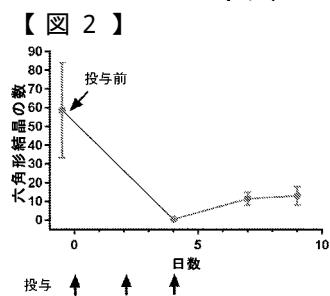
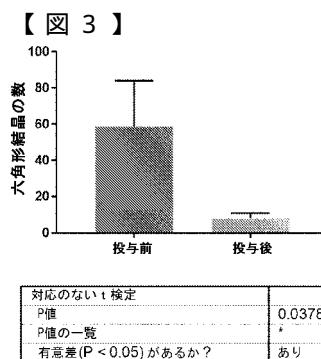
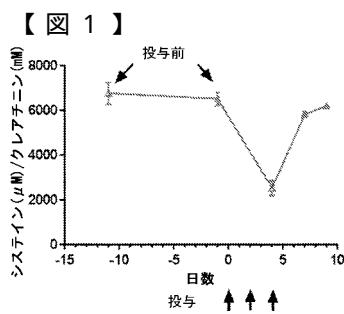
Tiziani *et al.*, Metabolomics of the tumor microenvironment in pediatric acute lymphoblastic leukemia. *PLoS One*, 8:e82859, 2013.

Ward, Proc, Embo-Alko Workshop on Molecular Biology of Filamentous Fungi, Helsinki, 119-128, 1989.

Wawrzynszak and Thorpe, In: *Immunoconjugates, Antibody Conjugates In Radioimaging And Therapy Of Cancer*, Vogel (Ed.), NY, Oxford University Press, 28, 1987.

Zhang *et al.*, Stromal control of cystine metabolism promotes cancer cell survival in chronic lymphocytic leukaemia. *Nature Cell Biology*, 14(3):276-286, 2012.

Zhao *et al.*, Frequent Epigenetic Silencing of the Folate-Metabolising Gene Cystathione-Beta-Synthase in Gastrointestinal Cancer. *PLoS One*, 7(11):e49683, 2012.



10

20

【配列表】2019520392000001.app**【手続補正書】**【提出日】平成31年3月7日(2019.3.7)**【手続補正2】**【補正対象書類名】明細書【補正対象項目名】0035【補正方法】変更**【補正の内容】**【0035】[本発明1001]

シスチン尿症を有する、またはシスチン尿症の発症リスクを有する対象を治療する方法であって、

天然靈長類シスタチオニン - - リアーゼ (C G L) のアミノ酸配列 (配列番号 : 1 及び 7 ~ 10 を参照) と比較して、前記天然靈長類 C G L 配列の 59 位のスレオニン及び 339 位のバリンを含む少なくとも 2 つの置換を有する、単離された改変靈長類 C G L 酵素、または前記単離された改変靈長類シスタチオニン - - リアーゼ (C G L) 酵素をコードするスクレオチド配列を含む核酸

を含む治療上有効量の製剤を前記対象に投与することを含む、前記方法。

[本発明1002]

前記酵素が、異種ペプチドセグメントを更に含む、本発明1001の方法。

[本発明1003]

前記異種ペプチドセグメントが、 X T E N ペプチド、 I g G F c 、アルブミン、またはアルブミン結合ペプチドである、本発明1002の方法。

[本発明1004]

前記酵素が、ポリエチレンギリコール (P E G) に結合している、本発明1001の方法。

[本発明1005]

前記酵素が、1つ以上のリジンまたはシスチン残基を介して P E G に結合している、本発明1004の方法。

[本発明1006]

前記対象が、 L - シスチン及び / または L - システインを制限した食事に維持される、本発明1001の方法。

[本発明1007]

前記対象が、メチオニンを制限した食事に維持される、本発明1001の方法。

[本発明1008]

前記対象が、通常の食事に維持される、本発明1001の方法。

[本発明1009]

前記対象がヒト患者である、本発明1001の方法。

[本発明1010]

前記対象が齧歯類である、本発明1001の方法。

[本発明1011]

前記製剤が、静脈内投与、皮内投与、動脈内投与、腹腔内投与、病巣内投与、頭蓋内投与、関節内投与、前立腺内投与、胸膜内投与、気管内投与、眼内投与、鼻腔内投与、硝子体内投与、腔内投与、直腸内投与、筋肉内投与、皮下投与、結膜下投与、小胞内投与、粘膜投与、心膜内投与、臍帯内投与、経口投与、吸入、注射、注入、連続注入、標的細胞を直接浸漬する局所灌流、カテーテルを介した投与、または洗浄を介した投与により投与される、本発明1001の方法。

[本発明1012]

前記対象が以前にシスチン尿症の治療を受けており、シスチン尿症の再発を予防するために前記酵素が投与される、本発明1001の方法。

[本発明1013]

少なくとも第2のシスチン尿症療法を前記対象に施すことを更に含む、本発明1001の方
法。

[本発明1014]

前記第2のシスチン尿症治療法が、外科療法または衝撃波療法である、本発明1013の方
法。

本発明の他の目的、特徴、及び利点が、以下の詳細の説明から明らかとなるであろう。しかし、本発明の趣旨及び範囲内の様々な変化及び変更が、この詳細の説明から当業者には明らかとなるであろうため、詳細の説明及び具体的な実施例は、本発明の好ましい実施形態を示しているものの、実例としてのみ与えられることが理解されなければならない。

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US17/40897
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC - A61K 45/06, 38/51; C12Q 1/68, 1/527; C12N 9/88, 15/60, 15/11, 15/09, 15/52 (2017.01) CPC - A61K 45/06, 38/51; C12Y 404/01001; C12Q 1/68, 1/527, C12N 9/88, 15/09, 15/11, 15/52		
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) See Search History document		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched See Search History document		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) See Search History document		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	US 2006/0275279 A1 (ROZZELL, JD et al.) 7 December 2006; paragraphs [0011]-[0012], [0014]-[0015], [0044], [0052], [0057]	1-14
Y	US 2015/0064160 A1 (BOARD OF REGENTS, THE UNIVERSITY OF TEXAS SYSTEM) 5 March 2015; paragraphs [0008], [0014]-[0015], [0020], [0086]	1-14
Y	US 2015/0064159 A1 (BOARD OF REGENTS, THE UNIVERSITY OF TEXAS SYSTEM) 05 March 2015; paragraph [0022]	7
Y	(KNOLL, T et al.) Cystinuria in childhood and adolescence: recommendations for diagnosis, treatment, and follow-up. <i>Pediatric Nephrology</i> . 25 November 2004; Vol. 20, pages 19-24; page 19, column 1, 1st paragraph	14
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input 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		
Date of the actual completion of the international search 30 August 2017 (30.08.2017)	Date of mailing of the international search report 10 OCT 2017	
Name and mailing address of the ISA/ Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-8300	Authorized officer Shane Thomas PCT Helpdesk: 571-272-4300 PCT OSP: 571-272-7774	

フロントページの続き

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	Y
A 6 1 K 31/7088 (2006.01)	A 6 1 K 31/7088	
A 6 1 K 38/38 (2006.01)	A 6 1 K 38/38	
A 6 1 K 38/17 (2006.01)	A 6 1 K 38/17	1 0 0
A 6 1 K 48/00 (2006.01)	A 6 1 K 48/00	

(81)指定国 AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,MK,MT,NL,NO,PL,PT,R0,RS,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,KM,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BN,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DJ,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IR,IS,JO,JP,KE,KG,KH,KN,KP,KR,KW,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RU,RW,SA,SC,SD,SE,SG,SK,SL,SM,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT

(74)代理人 100142929
弁理士 井上 隆一
(74)代理人 100148699
弁理士 佐藤 利光
(74)代理人 100128048
弁理士 新見 浩一
(74)代理人 100129506
弁理士 小林 智彦
(74)代理人 100205707
弁理士 小寺 秀紀
(74)代理人 100114340
弁理士 大関 雅人
(74)代理人 100114889
弁理士 五十嵐 義弘
(74)代理人 100121072
弁理士 川本 和弥
(72)発明者 ストーン エベレット

アメリカ合衆国 7 8 7 3 1 テキサス州 オースティン ハート レーン 7 5 0 3

F ターム(参考) 4C076 AA93 BB01 BB11 BB13 BB14 BB15 BB16 BB21 BB24 BB25
BB29 BB30 CC17 EE23E EE23M EE23Q EE41 EE59E EE59M EE59Q
FF31 FF63 FF68
4C084 AA01 AA02 AA13 BA01 BA08 BA22 BA23 CA18 CA53 DA36
DA39 DC26 MA13 MA17 MA52 MA56 MA58 MA59 MA60 MA66
NA14 ZA811 ZA812 ZC371 ZC372
4C085 AA33 BB11 BB36 BB42 CC21 CC22 EE01 GG01 GG02 GG03
GG04 GG05 GG06 GG08
4C086 AA01 AA02 EA16 MA01 MA04 MA13 MA17 MA52 MA56 MA58
MA59 MA60 MA66 NA14 ZA81 ZC37