

(19)日本国特許庁(JP)

**(12)特許公報(B2)**

(11)特許番号  
**特許第7091248号**  
**(P7091248)**

(45)発行日 令和4年6月27日(2022.6.27)

(24)登録日 令和4年6月17日(2022.6.17)

(51)国際特許分類

C 1 2 N	9/82 (2006.01)	F I	C 1 2 N	9/82
C 1 2 N	15/63 (2006.01)		C 1 2 N	15/63
C 1 2 N	1/15 (2006.01)		C 1 2 N	1/15
C 1 2 N	1/19 (2006.01)		C 1 2 N	1/19
C 1 2 N	1/21 (2006.01)		C 1 2 N	1/21

請求項の数 41 (全43頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2018-545838(P2018-545838)  
 (86)(22)出願日 平成29年3月1日(2017.3.1)  
 (65)公表番号 特表2019-509041(P2019-509041  
 A)  
 (43)公表日 平成31年4月4日(2019.4.4)  
 (86)国際出願番号 PCT/US2017/020090  
 (87)国際公開番号 WO2017/151707  
 (87)国際公開日 平成29年9月8日(2017.9.8)  
 審査請求日 令和2年2月12日(2020.2.12)  
 (31)優先権主張番号 62/446,026  
 (32)優先日 平成29年1月13日(2017.1.13)  
 (33)優先権主張国・地域又は機関  
 米国(US)  
 (31)優先権主張番号 62/301,806  
 (32)優先日 平成28年3月1日(2016.3.1)

最終頁に続く

(73)特許権者 513016884  
 ザ ボード オブ トラスティーズ オブ  
 ザ ユニヴァーシティ オブ イリノイ  
 THE BOARD OF TRUSTE  
 ES OF THE UNIVERSITY  
 OF ILLINOIS  
 アメリカ合衆国 イリノイ州 61801  
 アーバナ エス ライト ストリート 50  
 6 ヘンリー アドミニストレーション  
 ビルディング 352  
 (73)特許権者 519070644  
 アメリカ合衆国  
 THE UNITED STATES OF  
 AMERICA  
 アメリカ合衆国、コロンビア特別区 2

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 低減されたL-グルタミナーゼ活性および増強された安定性を有するL-アスパラギナーゼ変異体および融合タンパク質

**(57)【特許請求の範囲】****【請求項1】**

配列番号1の非置換のエルウィニア・クリサンセミ(*Erwinia chrysanthemi*)のL-アスパラギナーゼ(ErA)と比較して、低減または減少されたL-グルタミナーゼ活性を有するErA変異体であって、ここで前記ErA変異体は、配列番号1の31位でのアミノ酸置換を含み、ここで前記31位でのアミノ酸置換は、イソロイシン、バリン、ロイシン、またはトレオニンである、前記ErA変異体。

**【請求項2】**

配列番号1の63位および/または254位でのアミノ酸置換をさらに含み、ここで前記63位でのアミノ酸置換は、グルタミン、アスパラギン、またはアスパラギン酸であり、および前記254位でのアミノ酸置換は、アスパラギンまたはグルタミンである、請求項1に記載のErA変異体。

**【請求項3】**

配列番号2、配列番号3、配列番号4、配列番号5、配列番号6または配列番号7に示されたアミノ酸配列を含む、請求項1または2に記載のErA変異体。

**【請求項4】**

最小で野生型ErA酵素の75%のアスパラギナーゼ反応速度(k<sub>cat</sub>)を示す、請求項1～3のいずれか一項に記載のErA変異体。

**【請求項5】**

L-アスパラギンについて250μM未満のK<sub>m</sub>を示す、請求項1～4のいずれか一項に

記載の E r A 変異体。

【請求項 6】

野生型 E r A 酵素の 60 % 未満のグルタミナーゼ反応速度 ( $k_{cat}$ ) を示す、請求項 1 ~ 5 のいずれか一項に記載の E r A 変異体。

【請求項 7】

L - グルタミンについて 3 mM より大きい  $K_m$  を示す、請求項 1 ~ 6 のいずれか一項に記載の E r A 変異体。

【請求項 8】

ヒスチジンタグ、SUMO タグ、アルブミン結合ドメイン、またはそれらの組み合わせをさらに含む、請求項 1 ~ 7 のいずれか一項に記載の E r A 変異体。 10

【請求項 9】

PEG 化されている、請求項 1 ~ 8 のいずれか一項に記載の E r A 変異体。

【請求項 10】

72、76、79、84、85、206、210、215、216、235、239、240、261、264、265、268、269、318、322 位またはそれらの組み合わせの位置でシステイン残基をさらに含む、請求項 9 に記載の E r A 変異体。

【請求項 11】

TRAIL の 3 つのタンデム可溶性ドメインをさらに含む、請求項 1 ~ 10 のいずれか一項に記載の E r A 変異体。

【請求項 12】

TRAIL の可溶性ドメインが、ヒト TRAIL の残基 115 ~ 281 を含む、請求項 1 1 に記載の E r A 変異体。 20

【請求項 13】

TRAIL の 3 つのタンデム可溶性ドメインが、1 ~ 8 個のアミノ酸残基を含むペプチド結合基を介して互いに結合されている、請求項 1 に記載の E r A 変異体。

【請求項 14】

TRAIL の 3 つのタンデム可溶性ドメインが、1 ~ 20 個のアミノ酸残基を含むペプチド結合基を介して E r A 変異体に結合されている、請求項 1 に記載の E r A 変異体。

【請求項 15】

アミノ酸残基がグリシンおよびセリンから選択される、請求項 1 3 または 1 4 に記載の E r A 変異体。 30

【請求項 16】

請求項 1 ~ 1 5 のいずれか一項に記載の E r A 変異体をコードする、核酸分子。

【請求項 17】

請求項 1 6 に記載の核酸分子を含む、発現ベクター。

【請求項 18】

請求項 1 6 に記載の核酸分子を含む、宿主細胞。

【請求項 19】

請求項 1 ~ 1 5 のいずれか一項に記載の E r A 変異体および薬学的に許容可能な賦形剤を含む、医薬組成物。 40

【請求項 20】

TRAIL の安定な形態をさらに含む、請求項 1 9 に記載の医薬組成物。

【請求項 21】

TRAIL の安定な形態が、FOLDON 配列 G Y I P E A P R D G Q A Y V R K D G E W V L L S T F L (配列番号 31) を含む、請求項 2 0 に記載の医薬組成物。

【請求項 22】

がんを処置するための、請求項 1 9 に記載の医薬組成物。

【請求項 23】

がんが、非ホジキンリンパ腫、白血病、急性リンパ性白血病、急性骨髓性白血病、B 細胞リンパ腫、バーキットリンパ腫、慢性骨髓性白血病、慢性リンパ性白血病、およびヘアリ 50

一細胞白血病から選択される、請求項 2\_2に記載の医薬組成物。

【請求項 2\_4】

T R A I L の安定な形態をさらに含む、請求項 2\_2に記載の医薬組成物。

【請求項 2\_5】

T R A I L の安定な形態が、F O L D O N 配列 G Y I P E A P R D G Q A Y V R K D G E W V L L S T F L (配列番号 3\_1) を含む、請求項 2\_4に記載の医薬組成物。

【請求項 2\_6】

T R A I L の 3 つのタンデム可溶性ドメインに結合されている請求項 1\_15 のいずれか一項に記載のE r A 変異体を含む、融合タンパク質。

【請求項 2\_7】

T R A I L の可溶性ドメインが、ヒト T R A I L の残基 115 ~ 281 を含む、請求項 2\_6に記載の融合タンパク質。

10

【請求項 2\_8】

T R A I L の 3 つのタンデム可溶性ドメインが、1 ~ 8 個のアミノ酸残基を含むペプチド結合基を介して互いに結合されている、請求項 2\_6に記載の融合タンパク質。

【請求項 2\_9】

アミノ酸残基がグリシンおよびセリンから選択される、請求項 2\_8に記載の融合タンパク質。

【請求項 3\_0】

T R A I L の 3 つのタンデム可溶性ドメインが、1 ~ 20 個のアミノ酸残基を含むペプチド結合基を介して L - アスパラギナーゼに結合されている、請求項 2\_6に記載の融合タンパク質。

20

【請求項 3\_1】

アミノ酸残基がグリシンおよびセリンから選択される、請求項 3\_0に記載の融合タンパク質。

【請求項 3\_2】

エルウィニア・クリサンセミの L - アスパラギナーゼが、配列番号 1 の 3\_1、6\_3 および 2\_5\_4 位の 1 以上でアミノ酸置換を含む変異体である、請求項 2\_9に記載の融合タンパク質。

【請求項 3\_3】

P E G 化されている、請求項 2\_6に記載の融合タンパク質。

30

【請求項 3\_5】

L - アスパラギナーゼが、7\_2、7\_6、7\_9、8\_4、8\_5、2\_0\_6、2\_1\_0、2\_1\_5、2\_1\_6、2\_3\_5、2\_3\_9、2\_4\_0、2\_6\_1、2\_6\_4、2\_6\_5、2\_6\_8、2\_6\_9、3\_1\_8、3\_2\_2 位またはそれらの組み合わせの位置でシステイン残基を含むエルウィニア・クリサンセミ由来の L - アスパラギナーゼである、請求項 3\_4に記載の融合タンパク質。

【請求項 3\_6】

請求項 2\_6に記載の融合タンパク質をコードする、核酸分子。

40

【請求項 3\_7】

請求項 3\_6に記載の核酸分子を含む、発現ベクター。

【請求項 3\_8】

請求項 3\_6に記載の核酸分子を含む、宿主細胞。

【請求項 3\_9】

請求項 2\_6に記載の融合タンパク質および薬学的に許容可能な賦形剤を含む、医薬組成物。

【請求項 4\_0】

がんを処置するための、請求項 3\_9に記載の医薬組成物。

【請求項 4\_1】

50

がんが、非ホジキンリンパ腫、白血病、急性リンパ性白血病、急性骨髓性白血病、B細胞リンパ腫、バーキットリンパ腫、慢性骨髓性白血病、慢性リンパ性白血病、およびヘアリーニー細胞白血病から選択される、請求項40に記載の医薬組成物。

**【発明の詳細な説明】**

**【技術分野】**

**【0001】**

**緒言**

本願は、2016年3月1日に出願された米国仮出願第62/301,806号、2016年6月8日に出願された第62/347,376号、および2017年1月13日に出願された第62/446,026号の優先権の利益を主張し、その内容はその全体が参照によりここに組み込まれる。

10

**【0002】**

本発明は、国立衛生研究所によって授与された助成金番号RO1 EB013685および復員軍人援護局によって授与された助成金番号I01BX001919の下での政府の支援によってなされた。政府は、発明に一定の権利を有する。

**【背景技術】**

**【0003】**

**背景**

急性リンパ性白血病（ALL）などの一定のがんは、かかるがんにおけるアスパラギン合成酵素の欠如／低発現に最も一般的に起因する因子である、Asnの血液からのスカベンジングに依存する。したがって、L-アスパラギナーゼは、これらのがんの処置において重要な成分として同定されている。L-アスパラギナーゼは、二重の活性を有する酵素である。主たる活性であるL-アスパラギナーゼ活性は、アミノ酸であるL-アスパラギン（Asn）をL-アスパラギン酸（Asp）およびアンモニアに加水分解する。第2の活性は、L-グルタミナーゼ活性であり、これはL-グルタミン（Gln）をL-グルタミン酸（Glu）およびアンモニアに加水分解する。例えば、ELSPAR（登録商標）（大腸菌（Escherichia coli）から得られる酵素）およびERWINAZE（登録商標）（エルウィニア・クリサンセミ（Erwinia chrysanthemi）から得られる酵素）などの、FDAに認可された酵素については、L-グルタミナーゼ活性は、第1のL-アスパラギナーゼ活性の2～10%の範囲に及ぶ。これらの薬のL-アスパラギナーゼ活性の重要性が受け入れられる一方、白血病細胞を殺す際のL-グルタミナーゼ活性の重要性について相反する報告がある。さらに、L-グルタミナーゼ活性は、L-アスパラギナーゼの臨床的な毒性の多くに関連している。事実、L-アスパラギナーゼ処置の有毒な副作用は、この抗がん薬の使用を厳しく限定する。

20

**【0004】**

ALLの処置においてL-アスパラギナーゼを使用する治療上の利点があれば、これらの酵素のより有効な変異体（variant）が探求される。この目的のために、AspまたはGluとの複合体中におけるエルウィニア・クリサンセミのL-アスパラギナーゼの結晶構造が解明された。この分析は、最も活性な部位の残基（Glu63、Thr95、Asp96、およびLys168）の位置がリガンドの性質に感受性でないことを示す（Asp対Glu）。対照的に、Thr15の立体配置はリガンドの種類に感受性である（Nguyen, et al. (2016) Biochemistry 55(8):1246-53）。以前の研究では、エルウィニア・クリサンセミ（ErA）の2つの活性部位の残基Glu63およびSer254が、グルタミナーゼ活性と相關すると仮定されており、ここで、GlnおよびAsnによるそれらの置換は、それぞれ最小のL-グルタミナーゼ活性をもたらすと示唆された（Aghaiyoun, et al. (2001) Biochemistry 40(19):5655-5664）。

30

**【0005】**

突然変異分析は、Asp133のバリンまたはロイシンによる置換が、ErAのL-アスパラギナーゼに対する熱安定性を付与することを示す（Kotzia & Labrou (2009) FEBS J. 276(6):1750-61）。バシラス・サブティリス（Bacillus subtilis）のL-アスパラ

40

50

ギナーゼの A s n 1 3 3 および V a l 1 4 3 の変異もまた、 L - アスパラギナーゼ活性を増加させることが示されている (CN104371993)。さらに、大腸菌の L - アスパラギナーゼのアスパラギンエンドペプチダーゼ耐性変異体 (A s n 2 4 A 1 a ) は、界面変異 (T y r 2 5 0 L e u ) と組み合わされると、最小の L - グルタミナーゼ活性、低減された細胞毒性、および野生型酵素と比較して 2 4 3 % の全 I C 5 0 を有する酵素を提供する (Offman, et al. (2011) Blood 117:1614-21)。さらに、Parmentier, et al. ((2015) Leuk. Res. 39(7):757-62 は、野生型 L - アスパラギナーゼ活性および減少した L - グルタミナーゼ活性を有するヘリコバクター・ピロリ (*Helicobacter pylori*) の L - アスパラギナーゼ二重変異体 (M e t 1 2 1 C y s / T h r 1 6 9 M e t ) を記載し、これはヒト白血病細胞株に対して低減された活性を示した。さらに、WO 2015/038639 は、5 10 8 および 5 9 位で置換を有する大腸菌由来の改変された L - アスパラギナーゼ酵素を開示し、これは低減された L - グルタミナーゼ活性を示した。US 2013/0330316 は、パイロコッカス・フリオサス (*Pyrococcus furiosus*) 由来の L - アスパラギナーゼの変異体を記載し、これは、L y s 2 7 4 G l u 、 T h r 5 3 G l n 、および T h r 5 3 G l n / L y s 2 7 4 G l u の置換を含み、高い熱安定性、p H 安定性を有し、 L - グルタミナーゼ活性を有さない。

#### 【 0 0 0 6 】

L - アスパラギナーゼの翻訳後改変バージョンもまた記載されている。例えば、L - アスパラギナーゼは、L - アスパラギナーゼ処置の免疫副作用を低減し、治療中の酵素の半減期を延長するために、ポリエチレングリコールに結合されている (P E G - アスパラギナーゼ)。US 2010/0143324 および US 2012/0100121 を参照されたい。L - アスパラギナーゼへのアルブミン結合ペプチドの融合もまた、この酵素の半減期の増加における使用について示唆されている。US 2012/0009123 および US 2016/0213759 を参照されたい。

#### 【 0 0 0 7 】

L - アスパラギナーゼを使用してがんを処置するための他のアプローチは、L - アスパラギナーゼの、T N F 関連アポトーシス誘導リガンド (T R A I L ) アゴニストまたは T R A I L 受容体アゴニスト、例えば 3 つの可溶性 T R A I L ドメインおよび抗体フラグメントなどの追加の機能ドメインとの、共投与を含む。US 2015/0337027、US 2009/013 1317 および WO 2012/170640 を参照されたい。この点において、L - アスパラギナーゼは、B c 1 - 2 / B c 1 - x L 阻害剤 A B T 2 6 3 によって誘導された内因性アポトーシスおよび L - アスパラギナーゼ単一処置に対して耐性であるグリオーマ細胞における T R A I L によって媒介された外因性アポトーシスの両方に対する耐性を克服することが示されている (Karpel-Massler, et al. (2016) Onco 標的化 7(23):33512-28)。

#### 【 発明の概要 】

#### 【 0 0 0 8 】

##### 発明の概要

この発明は、配列番号 1 の 3 1 、 6 3 および 2 5 4 位の 1 以上でアミノ酸置換を有するエルウィニア・クリサンセミの L - アスパラギナーゼ (E r A ) 変異体を提供する。いくつかの態様において、3 1 位でのアミノ酸置換は、イソロイシン、バリン、ロイシン、またはトレオニンを含み、6 3 位でのアミノ酸置換は、グルタミン、アスパラギン、またはアスパラギン酸を含み、2 5 4 位でのアミノ酸置換は、アスパラギンまたはグルタミンを含む。一定の態様において、E r A 変異体は、配列番号 2 、配列番号 3 、配列番号 4 、配列番号 5 、配列番号 6 または配列番号 7 に示されたアミノ酸配列を有する。理想的には、E r A 変異体は、最小で野生型 E r A 酵素の 7 5 % の L - アスパラギナーゼ反応速度 (k c a t ) を、A s n について 2 5 0 μ M 未満の K m を、野生型 E r A 酵素の 6 0 % 未満の L - グルタミナーゼ反応速度 (k c a t ) を、および / または、G l n について 3 mM より大きい K m を示す。さらなる態様において、E r A 変異体は、ヒスチジンタグ、S U M O タグ、アルブミン結合ドメイン、P E G 化、および / または T R A I L の 3 つのタンデム可溶性ドメインをさらに含む。特定の態様において、T R A I L の可溶性ドメインは、ヒ

10

20

30

40

50

ト T R A I L の残基 115 ~ 281、例えばグリシンおよびセリンから選択される 1 ~ 8 個のアミノ酸残基を含むペプチド結合基を介して互いに結合されている T R A I L の 3 つのタンデム可溶性ドメイン、および / または、例えばグリシンおよびセリンから選択される 1 ~ 20 個のアミノ酸残基を含むペプチド結合基を介して E r A 変異体に結合されている T R A I L の 3 つのタンデム可溶性ドメインを含む。いくつかの態様において、P E G 化は、72、76、79、84、85、206、210、215、216、235、239、240、261、264、265、268、269、318、322 位またはそれらの組み合わせの位置でシステイン残基を有する E r A 変異体によって達成される。

#### 【0009】

発明は、T R A I L の 3 つのタンデム可溶性ドメインに結合された L - アスパラギナーゼから構成される融合タンパク質も提供する。いくつかの態様において、T R A I L の可溶性ドメインは、ヒト T R A I L の残基 115 ~ 281 を、例えばグリシンおよびセリンから選択される 1 ~ 8 個のアミノ酸残基を含むペプチド結合基を介して互いに結合されている T R A I L の 3 つのタンデム可溶性ドメインを、および / または、例えばグリシンおよびセリンから選択される 1 ~ 20 個のアミノ酸残基を含むペプチド結合基を介して E r A 変異体に結合されている T R A I L の 3 つのタンデム可溶性ドメインを含む。他の態様において、融合タンパク質の L - アスパラギナーゼは、エルヴィニア・クリサンセミまたは大腸菌由来の L - アスパラギナーゼである。一定の態様において、E . クリサンセミの L - アスパラギナーゼ ( E r A ) は、配列番号 1 の 31、63 および 254 位の 1 以上にアミノ酸置換を有する変異体である。さらに、融合タンパク質は、ヒスチジンタグ、S U M O タグ、アルブミン結合ドメイン、および / または P E G 化をさらに含む。いくつかの態様において、P E G 化 L - アスパラギナーゼは、72、76、79、84、85、206、210、215、216、235、239、240、261、264、265、268、269、318、322 位またはそれらの組み合わせの位置でシステイン残基を有するエルヴィニア・クリサンセミ由来の L - アスパラギナーゼである。

#### 【0010】

E r A 変異体または融合タンパク質を含有する核酸分子、発現ベクター、宿主細胞および医薬組成物もまた提供され、処置を必要とする対象に E r A 変異体または融合タンパク質の有効量を、任意に T R A I L の安定な形態と組み合わせて投与することによって、がんを処置する方法もまた提供される。

#### 図面の簡潔な説明

##### 【図面の簡単な説明】

##### 【0011】

【図 1】図 1 A および 1 B は、ルシフェラーゼを発現する L O U C Y ( ヒト T - A L L ; 図 1 A ) および S U P - B 15 ( ヒト B - A L L ; 図 1 B ) 細胞株を使用することにより、低減された L - グルタミナーゼ活性を有する L - アスパラギナーゼが A L L 動物のがん細胞の数を急速に減少させることを示す。

##### 【0012】

【図 2】図 2 は、L O U C Y ( ヒト T - A L L ) 細胞を接種し、野生型および E r A 変異体 ( E r A - E 63 Q および E r A - E 63 Q - S 254 N ( E r A - D M 1 ) ) を投与した動物の体重減少が、L - グルタミナーゼ活性と相関し、ここで、より高い L - グルタミナーゼ活性は、より多くの体重減少をもたらしたことを示す。S U P - B 15 ( ヒト B - A L L ) 細胞を接種した動物についても同様な結果が得られた。体重減少は毒性の指標であるため、低 L - グルタミナーゼ E r A 変異体で処置した動物の低減された体重減少は、これらの酵素が低減された毒性をもつことを示す。

##### 【0013】

【図 3】図 3 は、エルヴィニア・クリサンセミ ( A ; UniProt エントリ P06608 ; 配列番号 1 ) 、E . カロトボーラ ( E. carotovora ) ( B ; UniProt エントリ Q6Q4F4 ; 配列番号 8 ) 、大腸菌 ( C ; UniProt エントリ P00805 ; 配列番号 9 ) 、ヘリコバクター・ピロリ ( D ; UniProt エントリ O25424 ; 配列番号 10 ) 、ウォリネラ・サクシノゲネス ( W

10

20

30

40

50

*olinella succinogenes*) (E ; UniProtエントリP50286 ; 配列番号11)、およびキヤビア・ポルセルス (*Cavia porcellus*) (モルモット) (F ; UniProtエントリH0WOT5 ; 配列番号12) 由来のL - アスパラギナーゼの配列アラインメントを示す。厳密に保存された残基は下線で示される。L - グルタミナーゼ活性を低減させる目的で変異誘発のために選択された4つの部位が示される。E . クリサンセミ、E . カロトボーラおよび大腸菌の酵素は、アラインメントに含まれていないN末端シグナルペプチドを含有する。モルモットの酵素については、そのN末端L - アスパラギナーゼドメイン中の残基のみが示される。

#### 【0014】

【図4】図4は、超低L - グルタミナーゼErA - TM2変異体が、高L - グルタミナーゼErA - WTと同様に効果的にT - ALL LOUCY細胞を排除することを示す。4週間前にルシフェラーゼを発現するLOUCY細胞を尾静脈注射した雌マウスを、ビヒクル (n = 3)、ErA - WT (n = 4)、およびErA - TM (n = 4)で14日間毎日処置した(薬用量50IU /マウス/日、腹腔内)。各群について、示された代表的な動物は、処置の0日目に最高の生物発光イメージングシグナルを有した。

10

#### 【0015】

【図5】図5は、急性骨髄性白血病(AML)マウスモデルにおけるTRAIL三量体-ErA - TM2融合タンパク質の抗がん活性を示す。

#### 【0016】

##### 発明の詳細な説明

20

エルウィニア・クリサンセミのL - アスパラギナーゼ(ErA)のL - グルタミナーゼ活性に起因する有毒な副作用は、ErA酵素のアミノ酸残基31、63および254の1以上の変異によって減少され得ることが現在見出されている。さらに、L - アスパラギナーゼのin vivo循環時間は、ヒスチジンタグ、SUMOタグ、および/またはアルブミン結合ドメインのNまたはC末端付加によって増加され得る。さらに、L - アスパラギナーゼのTRAILの3つのタンデム可溶性ドメインとの融合は、アポトーシスに必要なシグナルを提供すること(L - アスパラギナーゼ)、および、アポトーシスのプロセスを誘導すること(TRAIL)の両方によって細胞死を促進することが現在実証されている。したがって、この発明は、Ansの外部供給の存在に依存するリンパ腫および白血病などのがんの処置における使用のための、L - アスパラギナーゼ変異体およびL - アスパラギナーゼを含有する融合タンパク質ならびにそれらの組み合わせを提供する。本L - アスパラギナーゼの改善された安全性は、現在の患者集団(例えば、小児ALLを有する患者)および他の患者集団(例えば、成人ALL、AML、および他のがん)における長期にわたる使用に利益をもたらす。

30

#### 【0017】

当該技術分野で知られているように、L - アスパラギナーゼ(L - アスパラギンアミノヒドロラーゼ、E.C.3.5.1.1)は、Ansにおけるアミド結合をAspおよびアンモニアに加水分解するアミダーゼである(Kumar & Verma (2012) Asian J. Biochem. Pharma Res. 3:197-205)。この発明における使用のL - アスパラギナーゼは、動物、微生物または植物を含む任意の適切な生物から得ることができる。理想的には、L - アスパラギナーゼは、細菌、真菌、酵母、放線菌または藻類などの微生物から得られる。本L - アスパラギナーゼを得ることができる細菌種は、大腸菌(Cedar & Schwartz (1968) J. Bacteriol. 96:2043-8 ; UniProtエントリP00805も参照されたい)、エルウィニア・カロトボーラ(*Erwinia carotovora*) (Kotzia & Labrou (2005) J. Bacteriol. 119:309-323)、シュードモナス・スツッツェリ(*Pseudomonas stutzeri*) (Manna, et al. (1995) Curr. Microbiol. 30:291-8)、シュードモナス・アシドボラス(*Pseudomonas acidovorans*) (Davis, et al. (1977) J. Bacteriol. 129:1379-86)、エルウィニア・アロイデ(*Erwinia aroideae*) (Peterson & Ciegler (1969) Appl. Microbiol. 18:64-7)、サーマス・サーモフィルス(*Thermus thermophilus*) (Pritsa, et al. (2001) Anticancer Drugs 12:137-42)、サーマス・アクアチカス(*Thermus aquaticus*)

40

50

(Curran, et al. (1985) Arch. Biochem. Biophys. 241:571-6)、スタフィロコッカス・アウレウス (Staphylococcus aureus) (Rozalska & Mikucki (1992) Acta Microbiol. Pol. 41:145-50)、ビブリオ・サクシノゲネス (Vibrio succinogenes) (Kafkewitz & Goodman (1974) Appl. Microbiol. 27:206-9)、シトロバクター・フレーディー (Citrobacter freundii) (Davison, et al. (1977) Biochim. Biophys. Acta 480:282-94)、プロテウス・ブルガリ (Proteus vulgaris) (Tosa, et al. (1972) J. Biochem. 11:217-22)、ザイモモナス・モビリス (Zymomonas mobilis) (Pinheiro, et al. (2001) Biomater. Diagn. 6:243-4)、バシラス・サブティリス (Fisher & Wray (2002) J. Bacteriol. 184:2148-54)、バシラス・リケニホルミス (Bacillus licheniformis) (Golden & Bernlohr (1985) J. Bacteriol. 164:938-40)、バシラス・サーキュランス (Bacillus circulans) MTCC 8574 (Hymavathi, et al. (2009) Appl. Biotech. Biotechnol. 159:191-98)、エンテロバクター・エアロゲネス (Enterobacter aerogenes) (Mukherjee, et al. (2000) Appl. Microbiol. Biotechnol. 53:180-4)、セラチア・マルセセンス (Serratia marcescens) (Khan, et al. (1970) Biochem. Biophys. Res. Commun. 41:525-33)、ウォリネラ・サクシノゲネス (UniProtエントリP50286を参照されたい)、ヘリコバクター・ピロリ (UniProtエントリQ25424を参照されたい)、およびキャビア・ポルセルス (モルモット) (UniProtエントリH0W0T5を参照されたい) を含むが、これらに限定されない。アスペルギルス・タマリ (Aspergillus tamari)、アスペルギルス・テレウス (Aspergillus terreus)、アスペルギルス・アワモリ (Aspergillus awamori)、シロンドロカルボン・オブツシスポラム (Cylindrocarpon obtusisporum)、フザリウム・ローズム (Fusarium roseum)、フザリウム・サロニ (Fusarium saloni)、サッカロマイセス・セレビシエ (Saccharomyces cerevisiae)、カンジダ・ユティリス (Candida utilis)、カンジダ・ギリエルモンディ (Candida guilliermondii) およびロドスボリジウム・トルロイド (Rhodosporodium toruloids) などの真菌および酵母種もまた、本L-アスパラギナーゼの供給源になり得る。

#### 【0018】

最も広く使用され、市販されているL-アスパラギナーゼは、大腸菌またはエルヴィニア種に由来する。エルヴィニア種のうち、E.クリサンセミおよびE.カロトボーラに由来する酵素が知られており、E.クリサンセミNCPPB 1066 (UniProtKBアクセション番号P06608を参照されたい)、E.クリサンセミ3937 (GENBANKアクセション番号AAS67028を参照されたい)、E.クリサンセミNCPPB 1125 (GENBANKアクセション番号CAA31239を参照されたい)、E.カロトボーラ亞種アトロセプチカ (atroseptica) (GENBANKアクセション番号AAS67027またはUniProtKBアクセション番号Q6Q4F4を参照されたい) およびE.カロトボーラ (GENBANKアクセション番号AAP92666を参照されたい) から単離された酵素を含むが、これらに限定されない。したがって、ここで使用されるL-アスパラギナーゼは、大腸菌、E.クリサンセミまたはE.カロトボーラに由来することが好ましい。特に、L-アスパラギナーゼはE.クリサンセミから得られることが好ましい。一定の態様において、ここで使用されるL-アスパラギナーゼは、N末端のリーダー配列を欠き、N末端メチオニン残基を有する。例示的なE.クリサンセミのL-アスパラギナーゼは、配列番号1に示されたアミノ酸配列を有する。

#### 【0019】

「ErA変異体」は、L-アスパラギナーゼ活性を示し、L-グルタミナーゼ活性を低減または減少させ、安定性を増加させ、および/または野生型ErA酵素と比較したErAのin vivo循環時間を増加させる、少なくとも1つの変異または改変を含む、ErA酵素の任意の天然に存在しない形態を指す。これと比較して、「野生型」L-アスパラギナーゼは、天然に存在する供給源から単離されたときの典型的なL-アスパラギナーゼの形態を指す。野生型は、天然の集団において最も頻繁に観察されるものであり、したがって、任意に正常または野生型の形態と呼ばれる。

#### 【0020】

ここで実証されるように、E.クリサンセミのL-アスパラギナーゼ (ErA ; 配列番号50

1) の 31、63 および 254 位の 1 以上の変異は、低減または減少した L - グルタミナーゼ活性を有する酵素を提供する(表7を参照されたい)。特に、E r A 変異体の L - グルタミナーゼ活性は、野生型 E r A 活性の、0% と 65%との間、0% と 50%との間、0% と 35%との間、0% と 25%との間、0% と 20%との間、0% と 15%との間、または 0% と 10%との間まで低減される。理想的には、発明の E r A 変異体は、野生型 E r A 酵素の L - グルタミナーゼ反応速度( $k_{cat}$ )の 60%、50%、40%、30% または 20%未満の L - グルタミナーゼ  $k_{cat}$  を示す。さらに、E r A 変異体は、2、3、5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75 または 80 mM より大きい、Gln の Km を示すことが好ましい。特に、発明は、2 ~ 100 mM、3 ~ 100 mM、10 ~ 100 mM、または 20 ~ 100 mM の範囲で Gln の Km を示す E r A 変異体を含む。

#### 【0021】

E r A 変異体は、配列番号 1 の 31、63 および / または 254 位で変異を有するタンパク質を含む。したがって、E r A 変異体は、配列番号 1 の 31 位、63 位、254 位、31 および 63 位、31 および 254 位、63 および 254 位、および 31、63 および 254 位で変異を含む。E r A 変異体タンパク質における変異は、Ala 31 のイソロイシン、バリン、ロイシン、またはトレオニンによる置換、Glu 63 のグルタミン、アスパラギン、またはアスパラギン酸による置換、および / または Ser 254 のアスパラギンまたはグルタミンによる置換を含む。配列番号 1 の 31、63 および 254 位の 1 以上で変異を有する例示的な E r A 変異体タンパク質は、配列番号 2 (E 63 Q)、配列番号 3 (E 63 Q - S 254 N)、配列番号 4 (A 31 I - E 63 Q)、配列番号 5 (E 63 Q - S 254 Q)、配列番号 6 (A 31 I - E 63 Q - S 254 Q) および配列番号 7 (A 31 I - E 63 Q - S 254 N) の下で提供される。

#### 【0022】

E r A に加えて、他の L - アスパラギナーゼにおける対応する位置での変異もまた作製され得る。用語「対応する」は、あるポリペプチド配列中の同等のアミノ酸を他のポリペプチド配列と比較、アラインメントまたは同定する文脈で使用されるとき、他のポリペプチド配列とアラインメントしたときに最も高いパーセントの同一性を生じる比較またはアラインメントを指す。例えば、E . カロトボーラ (UniProtエントリQ6Q4F4) 由来の L - アスパラギナーゼにおける E r A の残基 31、63 および 254 の対応する位置は、配列番号 8 の 29、61 および 252 位に位置する。

#### 【0023】

有利なことに、この発明の E r A 変異体は、野生型 E r A のものに匹敵する L - アスパラギナーゼ活性を有する。特に、E r A 変異体は、野生型 E r A 酵素の最小で 70% の L - アスパラギナーゼ反応速度( $k_{cat}$ )を示す。理想的には、E r A 変異体は、野生型 E r A 酵素の  $k_{cat}$  の 50 ~ 150%、60 ~ 140%、70 ~ 130%、または 80 ~ 125% の範囲で L - アスパラギナーゼ  $k_{cat}$  を示す。さらに、E r A 変異体は、250、200、150、140、130、120、110、100、90、80、70、60、50 または 40 μM 未満の Asn に対する Km を示すことが好ましい。特に、発明は、10 ~ 250 μM、20 ~ 200 μM、30 ~ 190 μM、または 50 ~ 150 μM の範囲で Asn に対する Km を示す E r A 変異体を含む。

#### 【0024】

ここで開示される L - アスパラギナーゼ(野生型アスパラギナーゼおよび融合タンパク質を含む)の in vivo 循環時間を増加させるために、この発明は、変異体、特に、ヒスチジンタグ(His)、SUMOタグ(SUMO)、アルブミン結合ドメイン(ABD)、またはそれらの組み合わせを有する E r A 変異体も提供する。L - アスパラギナーゼ変異体は、その C 末端および / または N 末端にヒスチジンタグ、SUMOタグおよび / またはアルブミン結合ドメインを含み得る。例として、L - アスパラギナーゼ変異体は、SUMO - アスパラギナーゼ - ABD、His - SUMO - ABD - アスパラギナーゼ、His - SUMO - アスパラギナーゼ - ABD、His - SUMO - アスパラギナーゼ、His - A

10

20

30

40

50

B D - アスパラギナーゼ、A B D - アスパラギナーゼ、A B D - S U M O - アスパラギナーゼなどのN C末端構造を有し得る。H i s、S U M OまたはA B Dをコードする核酸は、L - アスパラギナーゼをコードする核酸の5'または3'のいずれかにインフレームで挿入され得、それにより融合タンパク質を作製することができる。

#### 【0025】

理想的には、ヒスチジンタグ、S U M Oタグ、アルブミン結合ドメイン、またはそれらの組み合わせの1以上の包含は、L - アスパラギナーゼのin vivo循環時間を著しく増加させる。代替的に言えば、変異体は、同等のタンパク質用量で投与される野生型L - アスパラギナーゼよりも長いt<sub>1/2</sub>を有する。ここで使用される場合、用語「t<sub>1/2</sub>」または「半減期」は、L - アスパラギナーゼまたはその変異体または融合タンパク質の濃度がin vitroまたはin vivoで（例えば哺乳動物における注射後に）半減するのに必要な時間を指す。特に、変異体は、約50 μg / kgの用量（タンパク質含量基準）で、少なくとも約50、52、54、56、58、59、60、61、62、63、64または65時間のt<sub>1/2</sub>を有する。代替的には、変異体は、約10 μg / kgの用量で（タンパク質含量基準）、少なくとも約30、32、34、36、37、38、39、または40時間のt<sub>1/2</sub>を有する。他の態様において、変異体は、約10,000～約15,000IU / m<sup>2</sup>（約20～30mgタンパク質 / m<sup>2</sup>）の範囲に及ぶ用量で、少なくとも約100～約200時間のt<sub>1/2</sub>を有する。L - アスパラギナーゼの有効性が薬のin vivo半減期に関連することを考えると、この発明の変異体は、白血病およびリンパ腫などのがんの処置に特に有用である。

10

#### 【0026】

ここで使用される場合、「ヒスチジンタグ」は、少なくとも6つのヒスチジン（H i s）残基から構成されるアミノ酸モチーフを指す。ヒスチジンタグは、6（ヘキサヒスチジンタグ、6 × H i sタグ、またはH i s<sub>6</sub>タグ）、7、8、9、10、または20のヒスチジン残基までのポリヒスチジンを含む。

20

#### 【0027】

「S U M Oタグ」は、目的のタンパク質の溶解性 / 安定性を増強するための、S U M O（低分子ユビキチン様修飾因子）タンパク質の目的のタンパク質との融合を指す。S U M Oタグの包含は、CHAMPION pET SUMO expression system ( Invitrogen )、EXPRESSO T7 SUMO cloning and expression system ( Lucigen )、またはpET His6 SUMO TEV LIC cloning vector ( Addgene )などの既知の発現系を使用して達成され得る。S U M Oタグに加えて、U b、R u b 1、H u b 1、I S G 15、U b i - L ( M N S F )、F A T 1 0、A p g 1 2、A p g 8およびU r m 1を含むが、これらに限定されない、他のU b 1タンパク質が使用され得ることが企図される ( Larsen & Wang (2002) J. Proteome Res. 1(5):411-9 )。US 7,655,413（参照によりその全体がここに組み込まれる）も参照されたい。

30

#### 【0028】

「アルブミン結合ドメイン」は、in vivoまたはin vitroでアルブミンに結合し、治療剤の血清半減期および生体内分布を増強するポリペプチドを指す。アルブミンは、任意の動物種、例えばヒト、サル、またはげっ歯類に由来し得る。アルブミン結合ドメインは、例えば、US 6,267,964、WO 1991/19741、WO 2005/097202、WO 2001/45746、WO 2013/043071およびUS 2004/0001827に記載されている。さらに、US 9,156,887は、この発明で使用され得る非天然のアルブミン結合ドメインを開示している。いくつかの態様において、アルブミン結合ドメインは、配列番号13、配列番号14または配列番号15に示されたアミノ酸配列を有する。

40

#### 【0029】

ここで開示されるL - アスパラギナーゼ（野生型L - アスパラギナーゼ、E r A変異体および融合タンパク質を含む）のP E G化もまた、in vivo循環時間を増加させるために使用され得る。用語「P E G化され」または「P E G化」は、L - アスパラギナーゼのポリエチレンゲリコール（P E G）とのコンジュゲーションを指す。P E Gは、化学的方法を介

50

して P E G鎖の末端のヒドロキシ基を通じて活性剤に結合（例えば、共有結合）され得る。発明の L - アスパラギナーゼを P E G化するために使用され得る P E G化の方法は、例えば、US 4,179,337、US 5,766,897、US 2002/0065397、およびUS 2009/0054590に提供されている。代替的に、ここに開示されるように、L - アスパラギナーゼは、アミノ酸置換によって L - アスパラギナーゼのアミノ酸配列中に導入される 1 個と 5 個との間のシステイン残基の部位特異的な P E G化によって P E G化され得る。例 6 を参照されたい。いくつかの態様において、L - アスパラギナーゼは、72、76、79、84、85、206、210、215、216、235、239、240、261、264、265、268、269、318、322位またはそれらの組み合わせの位置でシステイン残基を有する E . クリサンセミ由来の L - アスパラギナーゼ（野生型、変異体または融合タンパク質）である。特定の態様において、この発明の L - アスパラギナーゼの P E G化は、野生型 L - アスパラギナーゼ（例えば、配列番号 1 の E r A）、L - アスパラギナーゼ変異体（例えば、配列番号 2、配列番号 3、配列番号 4、配列番号 5、配列番号 6 または配列番号 7 の変異体）、またはその融合タンパク質の A s p 84 のシステインによる置換によって達成され、それによって、マレイミドベースの L - アスパラギナーゼの P E G化に特異的な部位を提供する。

### 【 0 0 3 0 】

ここに開示される L - アスパラギナーゼ（すなわち、野生型および E r a 変異体）の増強された細胞傷害活性は、L - アスパラギナーゼを T R A I L の 3 つのタンデム可溶性ドメインにコンジュゲートまたは融合させることによって、または L - アスパラギナーゼを T R A I L の安定な形態とともに共投与することによって達成され得る。ここで実証されるように、得られた融合タンパク質は、T R A I L の 3 つのタンデム可溶性ドメインを欠く L - アスパラギナーゼと比較して、I C 50 値の少なくとも 25 倍の減少を提供することが見出された。したがって、ここに開示される融合タンパク質は、がん、特に L - アスパラギナーゼに非感受性のがんの処置に特に有用である。

### 【 0 0 3 1 】

「融合タンパク質」は、非天然の様式で作動可能に結合されたタンパク質またはタンパク質フラグメント（例えば、L - アスパラギナーゼまたはその変異体）を含有するキメラタンパク質を指す。この発明の融合タンパク質によれば、T R A I L の 3 つのタンデム可溶性ドメイン（T R A I L 三量体）は、L - アスパラギナーゼ（例えば、エルヴィニア・クリサンセミまたは大腸菌の L - アスパラギナーゼ）またはその変異体（例えば、E r A 変異体）とインフレームで融合される。融合タンパク質は、その C 末端または N 末端で T R A I L を含み得る。例として、融合タンパク質は、T R A I L - アスパラギナーゼまたはアスパラギナーゼ - T R A I L の N - C 末端構造を有し得る。タグまたは改変と組み合わせて使用されるとき、融合タンパク質は、S U M O - T R A I L - アスパラギナーゼ - A B D、H i s - S U M O - A B D - T R A I L - アスパラギナーゼ、H i s - S U M O - T R A I L - アスパラギナーゼ - A B D、H i s - S U M O アスパラギナーゼ - T R A I L、H i s - A B D - T R A I L - アスパラギナーゼ、A B D - アスパラギナーゼ - T R A I L、A B D - S U M O - T R A I L - アスパラギナーゼなどの構造を有し得る。T R A I L、特に T R A I L 三量体をコードする核酸は、L - アスパラギナーゼをコードする核酸の 5' または 3' のいずれかにインフレームで挿入され得、それによって融合タンパク質を作製する。

### 【 0 0 3 2 】

好ましくは、T R A I L の可溶性ドメインは、哺乳動物、特に、対立遺伝子変異体および / またはその誘導体を含むヒト T R A I L に由来する。可溶性ドメインは、膜局在化ドメインなしの受容体結合ドメインを含む T R A I L の細胞外部分を含む。T N F スーパーファミリーの他のタンパク質と同様に、T R A I L は、15 ~ 30 アミノ酸の N 末端部分、いわゆるストーク領域を介して膜に固定される。ストーク領域は、三量体化に寄与し、細胞膜に対して一定の距離を提供する。しかしながら、ストーク領域は受容体結合ドメイン（R B D）の部分ではない。したがって、可溶性 T R A I L ドメインは、ストーク領域由

来の任意のアミノ酸を欠く T R A I L の受容体結合ドメインを含むことが好ましい ( U S 2 015/0337027 を参照されたい ) 。

### 【 0 0 3 3 】

可溶性 T R A I L ドメインは、配列番号 1 6 に示されたヒト T R A I L に由来し得る。好ましくは、可溶性 T R A I L ドメインは、特にアミノ酸 1 1 5 ~ 1 2 2 から出発するヒト T R A I L に由来し、配列番号 1 6 のアミノ酸残基 1 1 5 ~ 2 8 1 、 1 2 0 ~ 2 8 1 、 1 2 1 ~ 2 8 1 または 1 2 2 ~ 2 8 1 を含む。一定の態様において、各々の T R A I L の可溶性ドメイン三量体は、ヒト T R A I L ( 配列番号 1 6 ) の残基 1 1 5 ~ 2 8 1 から構成される。ヒト T R A I L の残基 1 1 5 ~ 2 8 1 は、ここで配列番号 1 7 に示されている。

### 【 0 0 3 4 】

細胞死受容体結合 T R A I L ドメインの誘導体および変異体はすべて企図されており、それらのアミノ酸配列を置換、付加および / または欠失 / 切断によって変更することによって、または、機能的に同等のポリペプチドをもたらす化学的改変を導入することによって作製され得る。任意のポリペプチドの配列中の一定のアミノ酸が、ポリペプチドの活性に悪影響を及ぼすことなく他のアミノ酸に置換され得ることは、当業者に理解されるであろう。

### 【 0 0 3 5 】

ここで開示される T R A I L ドメインは、開示される配列中の 1 以上のアミノ酸の置換を含む。当業者は、周知の技術を使用して、ここに示されるペプチドの好適な配列変異体を決定し得るであろう。一定の態様において、当業者は、活性にとって重要でないと考えられる領域を標的化することによって、活性を破壊することなく変化し得る分子の好適な領域を同定し得る。他の態様において、当業者は、同様なポリペプチド間で保存されている分子の残基および部分を同定し得る。さらなる態様において、生物学的活性または構造にとって重要なアミノ酸残基さえも、その生物学的活性を破壊することなく、またはペプチド構造に悪影響を及ぼさずに、保存的アミノ酸置換を受け得る。

### 【 0 0 3 6 】

3 つの T R A I L の可溶性ドメインは、好ましくは、1 ~ 8 個のアミノ酸残基から構成されるペプチド結合基を介して互いに連結される。同様に、 T R A I L 三量体は、1 ~ 2 0 個のアミノ酸残基から構成されるペプチド結合基を介して L - アスパラギナーゼに結合されていることが好ましい。用語「ペプチド結合基」または「リンカー」は、2 つの異なる分子を一緒に作動可能に結合する分子架橋として作用するペプチド部分を指すことを意味する。望ましくは、この発明のリンカーは、グリシンまたはセリン、またはそれらの組み合わせから構成される。特定の態様において、各々の T R A I L の可溶性ドメイン三量体は、好ましくは、単一のグリシンまたは単一のセリン残基によって互いに結合される。3 つの可溶性 T R A I L ドメインの間の単一のグリシン残基を含む、例示的な T R A I L 三量体は、ここで配列番号 1 8 に示される。 T R A I L 三量体と L - アスパラギナーゼとの間に位置するペプチド結合基に関して、このリンカーは柔軟なリンカーであることが望ましい。柔軟なリンカーは、好ましくは、1 ~ 2 0 のアミノ酸残基の長さ、特に 6 、 9 、 1 2 、 1 5 または 1 8 のアミノ酸残基の長さを有する。柔軟なリンカーは、好ましくは、グリシン / セリンリンカー、すなわち主にグリシンおよびセリンのアミノ酸から構成されるペプチドリンカーである。特定の態様において、 T R A I L 三量体と L - アスパラギナーゼとの間のリンカーは、 ( G G G S )  $n$  リンカー ( 配列番号 1 9 ) であり、ここで、  $n$  は 1 ~ 4 である、または、例えば G G G S ( G G G G S )  $n$  ( 配列番号 2 0 ) 、ここで、  $n$  は 1 ~ 4 である、を含むその順列である。一定の態様において、 T R A I L 三量体と L - アスパラギナーゼとの間のリンカーは、配列番号 2 1 に示されたアミノ酸配列を有する。3 つの可溶性 T R A I L ドメインの間に単一のグリシン残基を、 T R A I L 三量体と L - アスパラギナーゼとの間にグリシン / セリンリンカーを含む T R A I L 三量体を有する例示的な T R A I L 三量体 - E r A 変異体 ( T M 2 ) 融合タンパク質は、ここで配列番号 2 2 に示される。

### 【 0 0 3 7 】

10

20

30

40

50

T R A I L の安定な形態は、三量体化を促進する T R A I L の形態を指すことが意図される。特に、T R A I L の三量体化を促進するために、小さな三量体化ドメインである F O L D O N 配列 ( G Y I P E A P R D G Q A Y V R K D G E W V L L S T F L ; 配列番号 3 1 ) は、T R A I L の安定性および生物学的活性を 3 7 で少なくとも 4 8 時間維持することが示されている (Kouno, et al. (2013) J. Invest. Dermatol. 133(9):2212-2220)。したがって、FOLDONペプチドは、His - SUMOタグとT R A I L のN末端との間に挿入されて His - SUMO - FOLDON - T R A I L 融合タンパク質をもたらす。融合タンパク質は発現させ、細菌培養において > 10 mg / L の融合タンパク質の収量が得られた。タンパク質は極めて安定しており、FOLDONの包含が、T R A I L の安定な形態をもたらすことを示した。したがって、L - アスパラギナーゼの細胞傷害活性を増強するために、T R A I L の安定な形態は、L - アスパラギナーゼとともに医薬組成物中に共投与および / または組み合わせられ得る。

#### 【 0 0 3 8 】

T R A I L および T R A I L - アスパラギナーゼ融合タンパク質の安定な形態は、ヒスチジンタグ、SUMOタグ、アルブミン結合ドメイン、PEG化、またはそれらの組み合わせを含むようにさらに改変され得る。N末端にポリヒスチジンタグおよびSUMOタグをさらに含む例示的な T R A I L - E r A 変異体 (TM2) 融合タンパク質は、ここで配列番号 2 3 に示される。さらに、例示的な T R A I L の安定な形態は、構造：His - SUMO - FOLDON - T R A I L を有し得る。

#### 【 0 0 3 9 】

ここで開示される変異体および融合タンパク質は、従来の組み換えタンパク質技術によって容易に調製され得、ここで、組み換え宿主細胞は、変異体または融合タンパク質をコードする核酸分子を含む発現コンストラクトまたはベクターによって形質転換または形質導入され、組み換え宿主細胞は、好適な条件下で増殖させて変異体または融合タンパク質の発現を提供し、続いて変異体または融合タンパク質は単離され、任意には精製されてもよい。したがって、この発明は、E r A 変異体 (すなわち、配列番号 1 の 3 1 、 6 3 および 2 5 4 位の 1 以上にアミノ酸置換を有し、および / または、ヒスチジンタグ、SUMOタグ、アルブミン結合ドメイン、またはそれらの組み合わせを含む E r A ) 、または融合タンパク質 (すなわち、T R A I L の 3 つのタンデム可溶性ドメインに結合された L - アスパラギナーゼ ) 、ならびにそれらを含有する発現カセットおよび / または発現ベクターをコードする核酸分子も提供する。理想的には、発現カセットおよび発現ベクターは、目的の宿主細胞における発現を促進するために必要な調節配列 (例えば、プロモーター、ターミネーターなど) を含有する。E r A 変異体または融合タンパク質をコードする核酸分子を含む宿主細胞もまた、この発明の範囲内に含まれる。宿主細胞は、真核細胞 (例えば、哺乳動物、真菌または酵母細胞) または原核細胞 (例えば、大腸菌) を含み得る。

#### 【 0 0 4 0 】

発明の E r A 変異体および / または融合タンパク質は、生産および単離 / 精製後、薬学的に許容可能な賦形剤を含有する医薬組成物としてそのまま使用され得、または処方され得る。ここで提供される医薬組成物は、固体または液体の形態での静脈内投与用または静脈内注射用に特別に処方され得る。最適な医薬組成物は、例えば、意図される投与経路、送達形態、および所望の投与量に依存して、当業者によって決定され得る。例えば、Remington's Pharmaceutical Sciences (第19版、1995) を参照されたい。

#### 【 0 0 4 1 】

E r A 変異体および / または融合タンパク質は、注射可能な処方などの従来の全身投与形態に組み込まれ得る。投与形態は、必要な生理学的に許容可能な担体材料、賦形剤、潤滑剤、バッファー、界面活性剤、抗菌剤、(マンニトールなどの) 増量剤、抗酸化剤 (アスコルビン酸または亜硫酸水素ナトリウム) なども含み得る。

#### 【 0 0 4 2 】

医薬組成物中の主な担体または賦形剤は、性質上水性または非水性のいずれかであり得る。例えば、好適な担体または賦形剤は、注射用水、生理食塩水または人工脳脊髄液であり

10

20

30

40

50

得、場合によっては、非経口投与のための組成物に一般的な他の材料で補充され得る。中性緩衝食塩水または血清アルブミンと混合された食塩水は、さらなる例示的なビヒクルである。医薬組成物は、約 pH 7.0 ~ 8.5 の Tris バッファー、または約 pH 4.0 ~ 5.5 の酢酸バッファーを含み得、ソルビトールまたはそのための好適な代替物をさらに含み得る。発明の医薬組成物は、所望の純度を有する選択された組成物を、凍結乾燥された固体 (cake) または水溶液の形態の任意の处方剤と混合することによって、保存用に調製され得る (Remington's Pharmaceutical Sciences, 1d.)。さらに、発明の ErA 変異体または融合タンパク質は、スクロースまたはグリシンなどの適切な賦形剤を使用して凍結乾燥物として処方され得る。

#### 【 0 0 4 3 】

発明の ErA 変異体、融合タンパク質、または医薬組成物の投与経路は、静脈内、腹腔内、脳内（実質内）、脳室内、筋肉内、眼内、動脈内、門脈内、または病巣内の経路による注射；徐放性システムまたは移植デバイスによるものを含む。組成物は、ボーラス注射によって投与され得、または、注入または移植デバイスによって連続的に投与され得る。組成物はまた、所望の分子が吸収または封入された膜、スポンジまたは別の適切な材料の移植を介して局所的に投与され得る。移植デバイスが使用される場合、デバイスは、任意の好適な組織または器官に移植され得、所望の分子の送達は、放散、徐放ボーラス、または連続投与を介するものであり得る。

#### 【 0 0 4 4 】

発明の組成物は、非経口的に送達され得る。非経口投与が企図されるとき、この発明における使用のための治療上の組成物は、薬学的に許容可能なビヒクル中に発明のスクリーニング方法で同定された所望の化合物を含む発熱物質を含まない非経口的に許容可能な水溶液の形態であり得る。非経口注射のための特に好適なビヒクルは、発明のスクリーニング方法で同定された化合物が適切に保存された滅菌等張溶液として処方される滅菌蒸留水である。調製には、注射可能なマイクロスフィア、生体分解可能な粒子、ポリマー化合物（ポリ乳酸またはポリグリコール酸など）、ビーズまたはリポソームなどの剤との、所望の分子の処方が関与し得、これは、産物の制御または徐放を提供し得、次いでデポー注射を介して送達され得る。ヒアルロン酸による処方は、循環における持続期間を促進する効果を有する。移植可能な薬送達デバイスを使用して、所望の分子を導入し得る。

#### 【 0 0 4 5 】

組成物はまた、吸入のために処方され得る。これらの態様において、ErA 変異体または融合タンパク質は、吸入のための乾燥粉末として処方されるか、または吸入溶液はまた、噴霧などによるエアロゾル送達のための噴射剤とともに処方され得る。肺投与は、化学的に改変されたタンパク質の肺送達を記載する WO 1994/020069 にさらに記載されている。

#### 【 0 0 4 6 】

発明の組成物は、経口などの消化管を通じて送達され得る。かかる薬学的に許容可能な組成物の調製は、当業者の知識の範囲内である。この様式で投与される発明の ErA 変異体または融合タンパク質は、錠剤およびカプセルなどの固体剤形の調合において慣用的に使用される担体を用いて、または用いずに処方され得る。カプセルは、バイオアベイラビリティが最大化され、全身の (pre-systemic) 分解が最小化されるときに、胃腸管中の点で処方の活性部分を放出するように設計され得る。ここで開示される発明のペプチドの吸収を促進するために、追加の剤が含まれ得る。希釈剤、香味料、低融点ワックス、植物油、滑沢剤、懸濁化剤、錠剤崩壊剤、および結合剤が用いられ得る。

#### 【 0 0 4 7 】

これらの組成物はまた、保存剤、湿潤剤、乳化剤および分散剤などのアジュバントを含有し得る。微生物の作用の防止は、例えばパラベン、クロロブタノール、フェノールソルビン酸などの様々な抗菌剤および抗真菌剤の包含によって確実にされ得る。また、糖、塩化ナトリウムなどの等張剤を含むことは望ましいものであり得る。注射可能な医薬形態の延長された吸収は、モノステアリン酸アルミニウムおよびゼラチンなどの吸収を遅らせる剤

10

20

30

40

50

の包含によってもたらされ得る。

**【 0 0 4 8 】**

発明の E r A 変異体および / または融合タンパク質は、アスパラギンの枯渇によって処置可能な疾患または状態の処置に特に有用である。したがって、この発明はまた、処置を必要とする対象に E r A 変異体または融合タンパク質の有効量を投与することによって、疾患、特にがんを処置するための方法を提供する。ここで使用される「有効量」は、( a ) 障害の重篤度を低減すること ; ( b ) 処置される障害（単数または複数）に特徴的な症状の発症を限定または防止すること ; ( c ) 処置される障害（単数または複数）に特徴的な症状の悪化を阻害すること ; ( d ) 障害を以前に有していた患者における障害（単数または複数）の再発を限定または防止すること ; ( e ) 以前に障害（単数または複数）の徵候があった患者の症状の再発を限定または防止すること ; ( f ) 疾患または障害の発生後の死亡率の低減 ; ( g ) 治癒 ; および ( h ) 疾患の予防という意図された目的を達成するのに十分な活性成分の量を指す。各々の個々の場合における有効量は、当該技術分野において確立された方法にしたがって当業者によって経験的に決定され得る。発明の文脈で使用される場合、「投与する」は、個体への *in vivo* 投与、ならびに細胞または組織への *in vitro* または *ex vivo* 直接投与を含む。E r A 変異体または融合タンパク質の有効量は、一般に、アポトーシスを誘導し、対象のがん細胞または腫瘍において循環する L - アスパラギンを低減させ得るものである。臨床医は、最適な治療上の効果を得るために投与量または投与経路を力価測定し得る。

10

**【 0 0 4 9 】**

一定の態様において、E r A 変異体または融合タンパク質は、成人および小児の両方における急性リンパ性白血病（ALL）ならびにアスパラギン枯渇が有用な効果を有することが期待される他の状態の処置における使用のための医薬品の処置または製造において有用である。かかる状態は、血液悪性腫瘍、非ホジキンリンパ腫、NK リンパ腫、脾臓がん、ホジキン病、急性骨髓性白血病、急性骨髓单球性白血病、慢性リンパ性白血病、リンパ肉腫、細網肉腫、および黒色肉腫を含むが、これらに限定されない、悪性腫瘍またはがんを含むが、これらに限定されない。アスパラギン枯渇に応答する代表的な非悪性血液疾患は、免疫システムに媒介される血液疾患（例えば、HIV 感染によって引き起こされるもの（すなわち、AIDS）などの感染疾患）を含む。アスパラギン依存症に関連する非血液疾患は、自己免疫疾患（例えば、関節リウマチ、SLE、自己免疫、コラーゲン血管疾患、AIDS など）を含む。他の自己免疫疾患は、骨関節炎、アイザックス症候群、乾癬、インスリン依存性真性糖尿病、多発性硬化症、硬化性全脳炎、全身性エリテマトーデス、リウマチ熱、炎症性腸疾患（例えば、潰瘍性大腸炎およびクロhn病）、原発性胆汁性肝硬変、慢性活動性肝炎、糸球体腎炎、重症筋無力症、尋常性天疱瘡、およびグレーブス病を含む。特定の態様において、E r A 変異体または融合タンパク質は、非ホジキンリンパ腫、白血病、急性リンパ性白血病、急性骨髓性白血病、B 細胞リンパ腫、バーキットリンパ腫、慢性骨髓性白血病、慢性リンパ性白血病、およびヘアリー細胞白血病の処置において使用される。

20

**【 0 0 5 0 】**

疾患を引き起こすことが疑われる細胞は、任意の好適な *in vitro* または *in vivo* アッセイ（例えば、増殖培地がアスパラギンを欠いている *in vitro* アッセイ）においてアスパラギン依存性について試験され得る。したがって、一側面において、発明は、発明のコンジュゲートの有効量を患者に投与することを含む、患者において処置可能な疾患を処置する方法に関する。特定の態様において、疾患は ALL である。特定の態様において、アスパラギン枯渇により処置可能な疾患の処置において使用される E r A 変異体または融合タンパク質は、エルウィニア種、より具体的にはエルウィニア・クリサンセミに由来する L - アスパラギナーゼを含む。

30

**【 0 0 5 1 】**

E r A 変異体または融合タンパク質は、1週間に約3回から1ヶ月に約一度までの範囲に及ぶスケジュール、典型的には、1週間に一度または隔週に一度、単一剤（例えば、単剤

40

50

治療)として、または、グルココルチコイド、コルチコステロイド、抗がん化合物、または他の剤(メトレキサート、デキサメタゾン、プレドニゾン、プレドニゾロン、ビンクリスチン、シクロホスファミド、およびアントラサイクリンを含むが、これらに限定されない)を含むがこれらに限定されない化学治療薬の組み合わせの部分として、投与され得る。一例として、ALLを有する患者は、誘導、強化または増強、および維持を含む3つの化学治療の段階の間に、多剤化学治療の成分として、発明のErA変異体または融合タンパク質を投与されるであろう。特定の例において、ErA変異体または融合タンパク質は、アスパラギン合成酵素阻害剤と共に投与されない(例えば、WO 2007/103290を参照されたい)。別の特定の例において、ErA変異体または融合タンパク質は、アスパラギン合成酵素阻害剤と共に投与されないが、他の化学治療薬と共に投与される。ErA変異体または融合タンパク質は、多剤化学治療レジメンの部分として、他の化合物の前、後、または同時に投与され得る。

#### 【0052】

特定の態様において、方法には、約1U/kg～約1000U/kgの量で発明のErA変異体または融合タンパク質を投与することが関与する。より特定の態様において、ErA変異体または融合タンパク質は、約20、50、60、70、100、200、300、400、500および600U/kgからなる群から選択される量で投与される。別の特定の態様において、ErA変異体または融合タンパク質は、約1000IU/m<sup>2</sup>～約20000IU/m<sup>2</sup>の範囲に及ぶ用量(例えば、1000IU/m<sup>2</sup>、2000IU/m<sup>2</sup>、3000IU/m<sup>2</sup>、4000IU/m<sup>2</sup>、5000IU/m<sup>2</sup>、6000IU/m<sup>2</sup>、7000IU/m<sup>2</sup>、8000IU/m<sup>2</sup>、9000IU/m<sup>2</sup>、10000IU/m<sup>2</sup>、11000IU/m<sup>2</sup>、12000IU/m<sup>2</sup>、13000IU/m<sup>2</sup>、14000IU/m<sup>2</sup>、15000IU/m<sup>2</sup>、16000IU/m<sup>2</sup>、17000IU/m<sup>2</sup>、18000IU/m<sup>2</sup>、19000IU/m<sup>2</sup>、または20000IU/m<sup>2</sup>)で投与される。別の特定の態様において、ErA変異体または融合タンパク質は、約3日～約10日(例えば、3、4、5、6、7、8、9、または10日)の期間、単一投与で、検出不能なレベルまでAsnを枯渇させる用量で投与される。別の態様において、方法には、野生型L-アスパラギナーゼと比較して単一投与後により長いin vivo循環半減期を有する発明のErA変異体または融合タンパク質を投与することが関与する。

#### 【0053】

以下の非限定的な例は、本発明をさらに説明するために提供される。

#### 【0054】

##### 例1：材料および方法

ErA遺伝子クローニングおよび変異誘発。最初の21アミノ酸残基のシグナルペプチドを欠いているErA(UniProtエントリP06608)のアミノ酸配列に対応するコドン最適化合成遺伝子を、以前に記載されたようにGenscriptにより合成した(Schalk, et al. (2014) J. Biol. Chem. 289:33175-33186)。合成遺伝子をNdeIおよびBamHI-HF制限酵素で消化し、ゲル精製し、Instant Sticky End DNA ligase(New England Biolabs)を使用してHis6-SUMO-pET14bベクター(ここで、His6タグの後に酵母タンパク質SUMO(低分子ユビキチン様修飾因子、Smt3p)がある)に連結し、His6-SUMO-ErA-WTプラスミドを生成した。このプラスミドを、その後、以下の13種のErA単一変異体を作製するためのテンプレートとして使用した:Ala31Ser(A31S)、Ala31Ile(A31I)、Ala31Leu(A31L)、Ala31Met(A31M)、Ala31Asn(A31N)、Ala31Thr(A31T)、Ala31Val(A31V)、Glut63Leu(E63L)、Glut63Gln(E63Q)、Pro123Ser(P123S)、Pro123Asn(P123N)、Ser254Asn(S254N)、Ser254Pro(S254P)。次いで変異体E63Qを有するプラスミドをテンプレートとして使用してErA二重変異体(A31T-E63Q、A31I-E63Q、S254N-E63QおよびS254Q-E63Q)を作製し、他方で変異体S254Nを使用して2つの他の二重

10

20

30

40

50

変異体（A31I - S254NおよびA31T - S254N）を生成した。二重変異体A31I - E63Qを有するプラスミドをテンプレートとして使用して2つの三重変異体（A31I - E63Q - S254NおよびA31I - E63Q - S254Q）を作製した。

#### 【0055】

E<sub>r</sub>Aタンパク質の発現および精製。タンパク質の発現および精製は以前に記載されたように行なった（Schalk, et al. (2014) J. Biol. Chem. 289:33175-33186）。簡潔には、野生型E<sub>r</sub>A（E<sub>r</sub>A-WT）または変異挿入（シーケンシングにより確認された）に対応するプラスミドを発現のために大腸菌BL21（DE3）C41細胞に形質転換した。単一のコロニーを拾い、2×YT培地で37℃で増殖させた。培養物が0.6~0.8の光学密度（600nm）に達したときに、0.3mMのイソプロピル-D-1-チオガラクトピラノシド（IPTG）でタンパク質発現を誘導した。次いで、インキュベーション温度を低減し、18℃で次の12時間維持した。細胞を超音波処理により破壊し、破片を4℃で20,000gで30分間遠心分離することによって除去した。上清を5mLのHISTRAP nickel affinity column（GE Healthcare）に充填した。その後、カラムを25mMのTris-HCl、pH8.5、500mMのNaCl、および25、50および75mMのイミダゾールからなるバッファーで洗浄した。結合したタンパク質を同じバッファー（ただし500mMのイミダゾールを含有）で溶出した。N末端His6-SUMOタグをSUMOプロテアーゼで切断し、タンパク質溶液をニッケルアフィニティーカラムに戻してタグを分離した。精製された酵素を含有するフロースルーパーフレーバー画分を25mMのTris、pH8.5、100mMのNaClに透析し、20~80mg/mlに濃縮し、分注し、液体窒素中で急速凍結し、-80℃で保存した。  
10

#### 【0056】

TRAIL遺伝子のクローニングおよび変異誘発。ヒトTRAIL（UniProtエントリP50591）の3つの反復を含有する（大腸菌におけるタンパク質発現のためにコドン最適化された）合成遺伝子をGenscriptにより合成した。各反復は、TRAIL（配列番号17）のアミノ酸残基115~281を含んでいた。単一のグリシンまたは単一のセリン残基を、第1および第2の反復と第2および第3の反復の間に挿入した。さらに、GGGS（GGGGS）<sub>3</sub>リンクー（配列番号21）をコードする57bpのオリゴヌクレオチド（5' - GGC GGT GGC AGC GGT GGA GGA GGC TCT GGT GGA G GC GGT AGC GGA GGC GGA GGG TCG - 3'；配列番号24）を、制限部位BglIIとNdeIとの間の第3の反復の末端に附加した。得られた遺伝子をpUC57ベクターに挿入した。  
20

#### 【0057】

部位特異的な変異誘発およびプライマーHano-203:5' - CGA ATG CAT C TA GAT CTC GAG cgt gag cgt g - 3'（配列番号25）およびHano-204:5' - cac gct cac gCT CGA GAT CTA GAT GCA T TC G - 3'（配列番号26）を使用して、BglII-TRAIL<sub>1</sub>-G-TRAIL<sub>2</sub>-G-TRAIL<sub>3</sub>-リンクー-NdeIを含有するベクターpUC57のユニークなBglII部位をXhoI部位に変更してサブクローニングを促進した。次いで、得られたプラスミドをXhoIおよびNdeI制限酵素で消化し、ゲル精製して二重消化し精製した挿入物XhoI-TRAIL<sub>1</sub>-G/S-TRAIL<sub>2</sub>-G/S-TRAIL<sub>13</sub>-リンクー-NdeIを生成した。  
30

#### 【0058】

E<sub>r</sub>AのA31I - E63Q - S254Q三重変異体（TM2）をコードするベクターHis6-SUMO-NdeI-E<sub>r</sub>A-TM2-pET14bを、プライマーHano-201:5' - gaa cag att ggt ggt CTC GAG gga gga att cCA TAT Gga taa act g - 3'（配列番号27）およびHano-202:5' - cag tt atc CAT ATG gaa ttccctc CCT CGA Gac c ac caatctgtt c - 3'（配列番号28）を使用して增幅し、それにより、XhoI部位を作製した。His6-SUMO-XhoI-NdeI-E<sub>r</sub>A-TM2を含  
40

有する得られた p E T 1 4 b プラスミドを X h o I および N d e I 制限酵素で消化し、ゲル精製して、二重消化かつ精製したベクター p E T 1 4 b - H i s 6 - S U M O - X h o I - N d e I - E r A - T M 2 を生成した。

#### 【 0 0 5 9 】

二重消化かつ精製した挿入物 X h o I - T R A I L 1 - G / S - T R A I L 2 - G / S - T R A I L 3 - リンカー - N d e I を、 Instant Sticky End DNA ligase ( New England BioLabs ) と使用して、二重消化かつ精製したベクター p E T 1 4 b - H i s 6 - S U M O - X h o I - N d e I - E r A - T M 2 に連結し、 p E T 1 4 b - H i s 6 - S U M O - X h o I - T R A I L 1 - G / S - T R A I L 2 - G / S - T R A I L 3 - リンカー - N d e I - E r A - T M 2 プラスミドを生成した。正確な配列を D N A 配列分析によって確認した。プライマー H a n o - 2 1 1 : 5 ' - g c a c g c t a t a t c a c c a t g a c g a a c g c t t c g a c c - 3 ' ( 配列番号 2 9 ) および H a n o - 2 1 2 : 5 ' - g g t c g a a g c g t t c g t c a t g g t g a t a t a g c g t g c - 3 ' ( 配列番号 3 0 ) を使用して、このプラスミドをテンプレートとして使用して、不活性な変異体 p E T 1 4 b - H i s 6 - S U M O - X h o I - T R A I L 1 - G - T R A I L 2 - G - T R A I L 3 - リンカー - N d e I - E r A - T M 2 - K 1 6 8 M を生成させた。

10

#### 【 0 0 6 0 】

融合タンパク質の発現および精製。 p E T 1 4 b - H i s 6 - S U M O - X h o I - T R A I L 1 - G / S - T R A I L 2 - G / S - T R A I L 3 - リンカー - N d e I - E r A - T M 2 および p E T 1 4 b - H i s 6 - S U M O - X h o I - T R A I L 1 - G / S - T R A I L 2 - G / S - T R A I L 3 - リンカー - N d e I - E r A - T M 2 - K 1 6 8 M プラスミドを、発現のために大腸菌 B L 2 1 ( D E 3 ) C 4 1 細胞に別々に形質転換した。得られたタンパク質はここではそれぞれ T R A I L 三量体 - E r A - T M 2 および T R A I L 三量体 - E r A - T M 2 - K 1 6 8 M を指す。単一のコロニーを拾い、 2 Y T 培地で 3 7 ℃ で終夜増殖させた。同様な高い産物収量に向けてタンパク質を発現させるために 2 つのプロトコルを確立した。

20

#### 【 0 0 6 1 】

第 1 のプロトコルにおいて、終夜の培養物を新鮮な 2 Y T 培地に移し、培養物が 0 . 6 ~ 0 . 8 の光学密度 ( 6 0 0 n m ) に達するまで 3 7 ℃ で増殖させた。タンパク質の発現を、細胞を収穫する前に、 3 7 ℃ で 4 ~ 5 時間、 0 . 1 m M の I P T G で誘導した。

30

#### 【 0 0 6 2 】

第 2 のプロトコルにおいて、終夜の培養物を、 1 L の Z Y 当たり、 2 0 m L の滅菌した 5 0 × M ( 1 . 2 5 M の N a 2 H P O 4 、 1 . 2 5 M の K H 2 P O 4 、 2 . 5 M の N H 4 C l および 0 . 2 5 M の N a 2 S O 4 ) 、 2 0 m L の滅菌した 5 0 × 5 0 5 2 ( 2 5 % のグリセロール、 2 . 5 % のグルコースおよび 1 0 % の β - ラクトース - 水和物 ) 、 1 m L の滅菌した 2 M の M g S O 4 、および 0 . 1 ~ 1 m L の滅菌した 1 0 0 0 × 金属混合物 ( 5 0 m M の F e C l 3 × 6 H 2 O ; 2 0 m M の C a C l 2 × 2 H 2 O ; 1 0 m M の M n C l 2 ; 1 0 m M の Z n S O 4 × 7 H 2 O ; 2 m M の C o C l 2 × 6 H 2 O ; 2 m M の C u C l 2 ; 2 m M の N i C l 2 × 6 H 2 O ; 2 m M の N a 2 M o O 4 × 2 H 2 O ; 2 m M の N a 2 S e O 3 ; 2 m M の H 2 B O 3 ) で補充した新鮮な Z Y 培地 ( 1 % の N - Z - アミンまたはトリプトン + 0 . 5 % の酵母抽出物 ) に移した。次いで、インキュベーション温度を低減させ、細胞を収穫する前に、 2 0 ℃ で終夜維持した。

40

#### 【 0 0 6 3 】

第 1 または第 2 のプロトコルによって得られた細胞を超音波処理により破壊し、破片を 4 で 2 0 , 0 0 0 g で 3 0 分間遠心分離することによって除去した。上清を、 5 m l の H I S T R A P nickel affinity column ( GE Healthcare ) に充填した。その後、カラムを、 2 5 m M の T r i s - H C l 、 p H 8 . 5 、 5 0 0 m M の N a C l 、および 2 5 、 5 0 、または 7 5 m M のイミダゾールのいずれかからなるバッファーで洗浄した。結合したタンパク質を同じバッファー ( ただし 5 0 0 m M のイミダゾールを含有 ) で溶出した。 N 末端 H

50

*his6-SUMO*タグを、*His6*タグSUMOプロテアーゼにより切断した。精製された酵素を含有するフロースルーフィルター画分をダルベッコのリン酸緩衝生理食塩水(DPBS, Mediatech)に透析した。 $97\text{ kDa}$ の融合タンパク質の純度をSDS-PAGEにより確認した。

#### 【0064】

反応速度アッセイ。L-アスパラギナーゼ活性を、以前に記載されたように連続分光酵素結合アッセイ(continuous spectroscopic enzyme-coupled assay)(Schalk, et al. (2014) J. Biol. Chem. 289:33175-33186)を使用して決定した。簡潔には、アッセイは、還元されたNADHの1:1酸化を通じてL-アスパラギン酸の生産を測定する。NADHのNAD<sup>+</sup>への変換は、37°で340nmにおける吸光度の減少として分光光度的に測定した。すべての測定を三重に行った。SIGMAPLOT software(Systat Software Inc.)を使用して、ミカエリス-メンテン式に速度をフィッティングさせた。特に、融合タンパク質TRAIL三量体-ErA-TM2は、1mg当たり約10国際単位(IU)の比活性を有した;一方、不活性な融合タンパク質TRAIL三量体-ErA-TM2-K168Mは、1mg当たり0.2IUしか有さなかった。

10

#### 【0065】

L-グルタミナーゼ活性を決定するための従来のアッセイ(Gella & Pascual (1982) Anal. Biochem. 127:322-5)をいくつかの改変を加えて使用した。精製した酵素を、50mMのTris-HCl、pH 8.5、1mg/mlのBSA、7UのGDH(グルタミン酸デヒドロゲナーゼ、Sigma-Aldrich)、3mMのINT(塩化ヨードニトロテトラゾリウム、Sigma-Aldrich)、100mMのPMS(フェナジンメト硫酸塩、Sigma-Aldrich)、および100mMのNAD<sup>+</sup>を含有する溶液に混合した。異なる濃度のL-グルタミンを添加することにより、アンモニアおよびL-グルタミン酸を生産する最初の反応が引き起こされた。後者は、NAD<sup>+</sup>の存在下、GDHの触媒下で、-ケトグルタル酸およびアンモニアにさらに分解される。この第2の反応によって生産されたNADHは、INTとともに、第3の反応へのインプットとして役立ち、PMSの触媒下でのINT-ホルマザンの形成は、500nmでの吸光度の増加として分光光度的に追跡することができる。すべての反応を37°で行った。1IUの酵素は、37°で1分間に1マイクロモルの産物を生産するために使用される酵素の量として定義される。

20

#### 【0066】

細胞の培養。LOUCY細胞株は、マイコプラズマフリーであることが確認され、Global Bioresource Center ATCCからの対応するSTR(Short Tandem Repeat)プロファイルデータと100%一致することを確認した。細胞を、10%のFBS(Hyclone)および1×ペニシリン-ストレプトマイシン溶液(Invitrogen)で補充した RPMI 1640培地を使用して、湿潤雰囲気(5%CO<sub>2</sub>、37°)で培養した。L-グルタミンを細胞培養物に直接2mMの最終濃度まで添加した。

30

#### 【0067】

細胞生存率-増殖アッセイ。DPBS(ダルベッコのリン酸緩衝生理食塩水、Mediatech)またはL-アスパラギナーゼのいずれかの10μLの存在下で、細胞懸濁液の90μLの分量(1mL当たり $2.5 \times 10^5$ 個の細胞)を、丸底96ウェルマイクロタイプラート中で、0.0001~1IU/mlの範囲に及ぶ最終濃度まで、三重で培養した。5%のCO<sub>2</sub>を含有する加湿空气中でプレートを37°で4日間インキュベートした後、Alamar Blue(Invitrogen)を10%v/vの最終濃度まで加え、プレートをさらに4時間インキュベートし、続いて、蛍光シグナルを読んだ。白血病細胞の生存率は、L-アスパラギナーゼの存在下での蛍光カウントの、DPBS対照における蛍光カウントに対するパーセンテージとして計算した。

40

#### 【0068】

結晶化、X線データ収集、および精密化。ハンガードロップ蒸気拡散法を使用してErA変異体の結晶を285Kで成長させた。2.5~10mg/mlの酵素の2μLを1~4μLのリザーバー緩衝液と混合した。リザーバー溶液は、0.1MのHEPES、pH 7

50

.5および24%のPEG MME 2000から構成された。

【0069】

データ収集の前に、結晶を、0.1MのHEPES、pH 7.5および24%のPEG MME 2000において、10mMのL-アスパラギン酸(Sigma-Aldrich)または25 mMのL-グルタミン酸(Sigma-Aldrich)とともに5分間浸漬した。次いで浸漬した結晶をそれぞれ同じ溶液に移したが、凍結保護のために25%のグリセロールを補充した。

【0070】

回折データは、アルゴンヌ国立研究所に位置するライフサイエンス共同アクセスチーム( LS-CAT )ビームライン21-ID-Fで収集した。データをXDSパッケージ(Kabsch (2010) Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr. 66:133-144)で処理した。構造は、原子分解構造(PDBエントリ1O7J)を検索モデルとして使用して、MOLREP(Roberts (1976) J. Biol. Chem. 251:2119-2123)による分子置換によって決定した。精密化はREFMAC(Steckel, et al. (1983) Biochem. Pharmacol. 32:971-977)を使用して行い、モデル構築はCoot(Steckel, et al. (1983) Biochem. Pharmacol. 32:971-977)を使用して行った。データ収集および精密統計を表1に示す。構造は、PyMOL Molecular Graphics System(バージョン1.6.0、Schrodinger)を用いて調製した。

10

【0071】

電子密度の検査は、活性部位における浸漬したAspの存在を示した。対照的に、浸漬したGluの電子密度は観察されなかった。

20

30

40

50

【表 1】

表 1

構造	E63Q+Asp	ErA-A31I-E63Q+Asp	ErA-E63Q-S254Q+Asp
PDBコード	5I3Z	5I3Z	5I3Z
データ収集統計			
X線源および検出器	LS-CAT ID-D MARCCD 300	LS-CAT ID-F MARCCD 225	LS-CAT ID-D MARCCD 300
波長(Å)	1.008264	0.97872	1.008264
温度(K)	100	100	100
解像度 <sup>a</sup> (Å)	1.008264	1.008264	1.60 (1.69-1.60)
反射の回数			
観察	437716 (49641)	1278167 (118300)	682869 (105570)
ユニーク	74069 (10093)	183230 (23339)	122786 (19113)
完全性(%)	97.2 (83.5)	95.7 (76.2)	98.2 (95.7)
R <sub>sym</sub> (%)	12.6 (53.7)	5.5 (60.8)	10.1 (61.6)
平均 I/σ(I)	16.88 (4.08)	23.09 (3.01)	14.71 (3.36)
スペース群	P2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub>	P2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub>	I222
単位セル(Å): a, b, c	77.89, 87.89, 175.99	77.19, 87.69, 175.11	76.98, 123.12, 198.44
ウィルソンB因子(Å <sup>2</sup> )	16.5	16.6	17.1
精密統計			
精密プログラム	REFMAC5	REFMAC5	REFMAC5
R <sub>cryst</sub> (%)	17.39	12.02	15.43
R <sub>free</sub> (%)	20.93	17.06	18.28
解像度範囲(Å)	30.00-2.05	30.0-1.5	30.0-1.6
a.u.当たりのタンパク質分子	4	4	3
原子の数:			
タンパク質 <sup>b</sup>	2455, 2455, 2464, 2463	2487, 2481, 2466, 2487	2521, 2499, 2503
H <sub>2</sub> O分子	976	1004	954
Asp分子	4	4	3
R.m.s. 理想からの逸脱			
結合の長さ(Å)	0.0135	0.0226	0.0193
結合の角度(°)	1.5853	1.9611	1.9204
平均B因子(Å <sup>2</sup> )			
タンパク質 <sup>b</sup>	21.0 22.1, 20.0, 19.9, 20.4	20.0 18.7, 19.9, 21.4, 19.4	16.0 14.9, 15.1, 16.5
水分子	27.4	30.9	26.7
Asp分子	21.3, 22.6, 18.8, 22.1	17.5	16.3, 16.6, 16.4
最も好ましい領域	96.81	96.67	97.38
さらに許可された領域	2.88	3.01	2.29
異常値領域	0.31	0.32	0.33

<sup>a</sup> 括弧内は高解像度シェル。<sup>b</sup> ProtA, protB, protC, protD.

## 【0072】

例2：高L-グルタミナーゼ共活性は、L-アスパラギナーゼのin vivo有効性に必要ではない

高L-アスパラギナーゼおよび低L-グルタミナーゼ活性を有するErA変異体の設計および特性評価。L-アスパラギナーゼがALLの処置に成功するには、酵素が、可能な限り高いL-アスパラギナーゼ活性（がん細胞を殺すため）であり、可能な限り低いL-グルタミナーゼ活性（有毒な副作用を最小化するため）であることが必要であると仮定された。2つのFDAに認可された細菌のL-アスパラギナーゼのうち、E.クリサンセミ(ErA)由来のものは、大腸菌(EcA)由来のものよりも高いL-アスパラギナーゼ活

10

20

30

40

50

性を有する。表 2 を参照されたい。

【表 2】

表 2

酵素名	$k_{cat}$ (秒 <sup>-1</sup> )	K <sub>m</sub> (μM)	$k_{cat}/K_m$ (秒 <sup>-1</sup> μM <sup>-1</sup> )	$k_{obs} @ 50 \mu M$ (秒 <sup>-1</sup> )
<i>ErA</i> -WT	194.9±2.5	44.2±1.6	4.41	105.3
<i>ErA</i> -E63Q-S254Q (DM3)	147.3±1.0	179.1±5.6	0.82	36.3
<i>ErA</i> -E63Q	179.9±1.4	48.1±1.1	3.74	92.2
<i>ECA</i> -WT	44.4±0.3	15.0±0.5	2.96	41.3

10

## 【0073】

かかる酵素薬のアスパラギン枯渇力を定義するパラメータは重要である。反応の速度 ( $k_{cat}$ ) は重要であるが (遅い酵素は ASN を枯渇させるには非効率的である)、おそらく K<sub>m</sub> 値はより重要である。必要とされる低マイクロモル濃度の血液 ASN を達成するために、酵素はこの範囲の K<sub>m</sub> 値を有さなければならない。酵素学者は、しばしば、これらの 2 つのパラメータを、酵素の効率を表すと考えられる単一の値 ( $k_{cat}/K_m$ ) に組み合わせる。ヒト血液は約 50 μM の ASN を含有するため、この正確な基質濃度での酵素による ASN 加水分解の速度もまた、L - アスパラギナーゼの臨床的適合性を知らせるパラメータである。表 2 は、FDA に認可された野生型 ErA および ECA (すなわち、ErA-WT および ECA-WT) についてのこれらの値を示す。これらの数値は、ASN の生理学的濃度の下で ASN を加水分解する際に、ErA-WT が ECA-WT より約 2 倍良好であることを示す。したがって、ErA 酵素を低 L - グルタミナーゼ活性を有する変異体を開発するために選択した。

20

## 【0074】

ErA-WT は、優れた L - アスパラギナーゼ活性に加えて、より高い L - グルタミナーゼ活性をも有する (表 3)。

【表 3】

表 3

酵素名	$k_{cat}$ (秒 <sup>-1</sup> )	K <sub>m</sub> (mM)	$k_{cat}/K_m$ (秒 <sup>-1</sup> mM <sup>-1</sup> )	$k_{obs} @ 50 mM$ (秒 <sup>-1</sup> )
ErA-WT	26.84±0.26	0.36±0.02	74.56	15.87
ErA-E63Q-S254Q (DM3)	2.93±0.03	15.8±0.3	0.19	0.11
ErA-E63Q	8.33±0.16	3.86±0.23	3.68	0.74
ECA-WT	0.89±0.01	1.38±0.09	0.64	0.22

30

## 【0075】

野生型 ErA は、0.5 mM の Gln の生理学的濃度で、ECA-WT と比較して > 70 倍高い L - グルタミナーゼ活性を有する。その高い L - アスパラギナーゼ活性を維持しながら内因性 L - グルタミナーゼ活性を低下させる ErA 工学的努力の結果は、表 3 に列挙される上位 2 つの変異体とともに、これらの基準を満たすいくつかの変異体をもたらした。

40

## 【0076】

Glu63 のグルタミンへの単一の変異は、L - グルタミナーゼ活性を > 21 倍低減させた。E63Q に加えて、Ser254 のアスパラギンへの変異は、L - グルタミナーゼ活性のさらに 7 倍の低減を伴う二重変異体 (ErA-DM1) をもたらした。両方の ErA 変異体が ErA-WT と比較して L - グルタミナーゼ活性を著しく低減させただけでなく、ErA-DM1 は ECA-WT のそれに比べてさらに低かった (表 3)。しかしながら

50

、*E r A - D M 1* の L - アスパラギナーゼ活性は、*E c A - W T* のレベルと同様のレベルまで低減した（表 2 の  $k_{obs}$  @ 50  $\mu$ M Asn を参照されたい）。

#### 【 0 0 7 7 】

臨床的有用性のために、L - アスパラギナーゼ対 L - グルタミナーゼの相対的な比が重要である。したがって、生理学的な基質濃度（Asnについて 50  $\mu$ M、Glnについて 500  $\mu$ M）および IU（臨床的に、L - アスパラギナーゼは国際単位に基づいて投与される）で観察された速度に基づいて、この比を計算した。両方の比は、*E r A - D M 2* が *E r A - W T* に対して優れた酵素であることを示す（表 4）。注目すべきことに、*E r A - D M 1* は、内因的に低い L - グルタミナーゼ活性を有する酵素である*E c A - W T* と比較しても、より低い L - グルタミナーゼ活性を示した。この点は、表 4 に列挙される酵素の L - グルタミナーゼ速度を理解するために使用した NMR 分光法を使用して確認した。10

#### 【表 4】

表 4

酵素名	$K_{obs} [Asn_{phs}] / K_{obs} [Gln_{phs}]$	比活性 (Asn) / 比活性 (Gln)
<i>ErA-WT</i>	6.6	7.3
<i>ErA-DM1</i>	330	59.9
<i>ErA-E63Q</i>	124.6	21.6
<i>ECA-WT</i>	187.7	49.9

20

#### 【 0 0 7 8 】

これらの実験は、設計された *E r A* 変異体についての低減された L - グルタミナーゼ速度および *E r A - D M 1* の非常に低い L - グルタミナーゼ活性を実証する。

#### 【 0 0 7 9 】

L - アスパラギナーゼの *in vitro* 試験。マウス白血病 L 5 1 7 8 Y 細胞の増殖のための外因性 Asn への依存性により (Haley, et al. (1961) Cancer Res. 21:532-536)、この細胞株は L - アスパラギナーゼ活性を評価するための有用なモデルとなった。したがって、この細胞株を使用して、*E r A - W T* および *E c A - W T* と比較した *E r A - E 6 3 Q* 変異体の活性を評価した。従来の細胞培養条件下では、これらの細胞の増殖を防止するのに 3 つの酵素すべてが効率的であることが観察された（表 5）。30

#### 【表 5】

表 5

酵素名	IC <sub>50</sub> (IU/mL)		増加倍数
	-Gln	+Gln	
<i>ErA-WT</i>	0.0036	0.0538	14.94
<i>ErA-E63Q</i>	0.0223	0.4259	19.10
<i>ECA-WT</i>	0.0174	0.4114	23.64

30

40

#### 【 0 0 8 0 】

酵素の細胞を殺す力の指標として IC<sub>50</sub> 値を使用すると、*E r A - W T* は、*E c A - W T* または *E r A - E 6 3 Q* よりも効率的（すなわち、より低い IC<sub>50</sub> 値）であった。この順序は、これらの酵素の相対的な L - グルタミナーゼ活性を反映しているため (*E r A - W T* > *E c A - W T* > *E r A - E 6 3 Q*)、この IC<sub>50</sub> の差異は主としてこの酵素の副活性 (side activity) によるものであると推測された。これを試験するために、用量応答実験を繰り返したが、今回は細胞培養培地に Gln を補充した。実際、IC<sub>50</sub> 値は増加した（表 5）。観察された IC<sub>50</sub> 値に対する Gln 补充の効果は、約 15 ~ 25 倍の範囲の増加に及び劇的であった（表 5）。最も低い L - グルタミナーゼの副活性を有する酵素50

がGln補充によって最も良好に保護されていることが注目された。言い換えれば、高いL-グルタミナーゼ活性を有する酵素（例えば、ErA-WT）は、減少したL-グルタミナーゼ活性を有する酵素（例えば、ErA-E63Q）と比較してGln補充を大幅に克服する。これはおそらく、追加のGlnを加水分解する高L-グルタミナーゼ活性の酵素によるものである。

#### 【0081】

L-アスパラギナーゼのL-グルタミナーゼ副活性の役割に取り組む以前の研究は、実験モデルとしての細胞培養に依存していた。培養で増殖した細胞株はいずれもGlnを必要とするため、高いL-グルタミナーゼ活性を有する酵素がより良好な殺作用を示すことは明らかである。しかしながら、これはL-アスパラギナーゼ薬のこの副活性が臨床的有効性に必要であることを必ずしも意味しない。実際、極端な場合、低L-アスパラギナーゼ活性であるが高L-グルタミナーゼ活性である酵素は、細胞培養において極めて有効であるように見えるが、外因性Asnに依存するALLなどのがんの処置に臨床的に関連性はないであろう。したがって、L-アスパラギナーゼ中に存在するL-グルタミナーゼ副活性の重要性を試験するために、好ましくはin vivoモデルを使用する。

10

#### 【0082】

L-アスパラギナーゼ変異体の評価のためのALLのヒト異種移植モデルの開発。過去の研究者は、L-アスパラギナーゼのin vivo評価のためにL5178Yマウス細胞株を使用した（例えば、Abuchowski, et al. (1984) Cancer Biochem. Biophys. 7:175-186; Kwon, et al. (2009) J. Control Rel. 139:182-189）。ヒト起源ではないこの細胞株を別として、この同系ALLマウスモデルの追加の欠点は、動物の疾患負担を定量的に追跡不能であることである。これは、異なるL-アスパラギナーゼ調製物を正確に評価することを困難にする。したがって、ルシフェラーゼを発現するLOUCY（ヒトT-ALL）およびSUP-B15（ヒトB-ALL）細胞株を使用してALLの定量的in vivoモデルを開発した。これらのシステムの利点は、移植されたルシフェラーゼ発現細胞によって産生される生物発光シグナルが疾患負荷の定量的尺度として作用するin vivoイメージングを使用可能であることである。

20

#### 【0083】

最初に、ErAおよびECAの野生型バージョンおよび低L-グルタミナーゼErA変異体に対するこれらのヒトALL細胞株のin vitroでの感受性を決定した。この分析は、両方の細胞株がL-アスパラギナーゼ投与に感受性であることを示した。それらのより高いL-グルタミナーゼ活性から予想されるように、ErA-WTおよびECA-WTについての培養で決定されたIC<sub>50</sub>値は、低L-グルタミナーゼErA変異体（表6）と比較して50~100%低いと決定された。

30

#### 【表6】

表 6

酵素名	IC <sub>50</sub> (IU/mL)	
	LOUCY	SUP-B15
ErA-WT	0.00033	0.00016
ErA-E63Q	0.00055	0.00024
ErA-DM1	0.00065	0.00031
ECA-WT	0.00035	0.00022

40

#### 【0084】

ヒトALL細胞株のL-アスパラギナーゼ感受性を確認した後、これらの細胞をマウスに移植することができることを確認した。経時的な生物発光シグナルの増加に基づいて、細胞の増殖および疾患負担の増加を実証する。

50

## 【0085】

T - A L L および B - A L L マウスモデルにおける E r A - W T および E r A 変異体の in vivo 試験。E r A - W T 中に存在する極めて高い内因性 L - グルタミナーゼ活性が臨床的有効性に必要であるかどうかを試験するために、L O U C Y または S U P - B 1 5 細胞を移植したマウスを F D A に認可された L - アスパラギナーゼで処置し、活性をここに記載の低 L - グルタミナーゼ変異体と比較した。酵素の酵素パラメータに加えて、他の変数が in vivo 応答に影響を与えることに注目することが重要である。例えば、長い in vivo 安定性を有する酵素は、短い半減期を有するものと比較して、血液 A s n を枯渇させる上でより効率的であろう。ヒトでは、E r A - W T は、E c A - W T よりもはるかに短い半減期を有することが知られている（0.65 日対 1.24 日；Asselin, et al. (1993) J. C. lin. Oncol. 11:1780-1786）。E r A - W T を用いた最初の実験の間、腫瘍細胞の増殖の減少は観察されなかった。これは、マウスにおける E r A - W T の低い安定性によるものと仮定され、ヒトにおける観察を反映した。これを試験するために、E r A - W T の N 末端に SUMO タグを付加して、酵素特性に悪影響を及ぼすことなく安定性を増加させた。実際、SUMO - E r A - W T で処置したマウスは、腫瘍負荷の顕著な減少を示した。したがって、以下の in vivo 研究において使用されるすべての E r A 酵素は、この安定性タグを含んでいた。

## 【0086】

L O U C Y T - A L L 細胞を移植したマウスを 50 I U / マウスの用量で腹腔内注射（i. p.）により 14 日間毎日 L - アスパラギナーゼで処置した。この用量は、ヒトに与えられる E r A - W T 用量の約 1 / 3 と同等であるが、ヒトにおいては、週に 3 回投与され、筋肉内または静脈内で与えられる。動物モデルにおける有効性は、それを循環させる薬の量によって影響され得るため、投与様式におけるこの差異が注目される。換言すれば、目的は in vivo でのがんの増殖を制限する L - グルタミナーゼ E r A 変異体の能力を試験することであるが、in vivo 有効性を決定する他の因子が存在し得る。しかしながら、比較がほぼ同一の酵素（E r A - W T および E r A 変異体）の間であったため、これらの酵素は極めて類似した薬物動態特性を有するであろうと推定された。

## 【0087】

高 L - グルタミナーゼ E r A - W T 、低 L - グルタミナーゼ E r A - E 6 3 Q および極低 L - グルタミナーゼ E r A - D M 2 は、動物におけるがん細胞の数を急速に減少させた（図 1 A）。E r A - D M 1 で観察されたルシフェラーゼシグナルのわずかに遅い減少は、この変異体のより高い A s n K m に起因し得る。それにもかかわらず、処置終了までに、すべての E r A 変異体に由来するルシフェラーゼシグナルのレベルは背景に近く、これらの細胞の極めて強力な殺作用を実証した。

## 【0088】

これらの実験を B - A L L S U P - B 1 5 細胞株で繰り返した。これらの酵素は L - グルタミナーゼ活性の点で極端であるため（E r A - W T で最も高く、E r A - D M 2 で最も低い）、今回は、E r A - W T および E r A - D M 1 のみを比較した。T - A L L L O U C Y 細胞株で見られるように、E r A - W T および E r A - D M 1 の両方は、マウスのがん細胞の数を劇的に低減させた（図 1 B）。

## 【0089】

低 L - グルタミナーゼ E r A 変異体の低減した毒性の兆候。ここに示されるデータは、極めて低い L - グルタミナーゼ活性のみを含有する L - アスパラギナーゼが in vivo での A L L 増殖の強力な阻害剤であることを実証する。さらに、動物の体重は薬の投与によって劇的に影響を受け、これは相対的な L - グルタミナーゼ活性と相關する効果であることが注目された。薬の L - グルタミナーゼ活性が高ければ高いほど、体重減少はより大きくなる（図 2）。注目すべきは、体重減少は疾患負担と相關がなかったことである。実際、ビヒクルで処置したマウス（最も病弱なコホート）は、最小の体重減少を受けた。これは、観察された体重減少が、（E r A - W T について予想されるように）より大きな枯渇をもたらす酵素による G l n 枯渇によるものであり、最も大きな体重減少をもたらすことを示す

10

20

30

40

50

。逆に、最小の G 1 n 枯渇をもたらすと予想される酵素、すなわち E r A - D M 2 で処置したマウスは、最も少ない量の体重減少を与えた。

#### 【 0 0 9 0 】

E r A - W T 、 E r A - D M 1 、および E c A - W T の活性の間の差異をさらに調べるために、N M R を使用して、3 7 で溶液中の時間の関数としてアスパラギンおよびグルタミンのレベルを追跡した。これらの実験のために、細胞培養実験に存在する濃度を、これらのアミノ酸の出発濃度として選択した（すなわち、2 . 0 5 m M の G 1 n および 0 . 3 7 5 m M の A s n ）。注目すべきことに、ヒト血液は約 0 . 6 m M の G 1 n および約 0 . 0 5 m M の A s n を含有する。0 . 5 I U / m l の用量で添加されたすべての酵素について、最初の時点がとられた時間までに、A s n のすべてが A s p に加水分解されていた。これは、試験した酵素が A s n を枯渇させる能力の点で極めて類似していたことを示す。

10

#### 【 0 0 9 1 】

これと比較して、G 1 n 枯渇を評価するとき、酵素は極めて異なる特性を示した。その反応速度特性から予想されるように、E r A - W T は G 1 n を枯渇させるのに非常に効率的であった；4 8 時間の時点で、G 1 n のすべてが G 1 u に加水分解されていた。2 4 時間後でさえ、G 1 n レベルは、E r A - W T によって約 2 m M ~ 約 0 . 1 m M に低減していた。L - アスパラギナーゼを評価する細胞培養研究では、しばしば細胞を 7 2 時間または 9 6 時間でさえ、薬とともにインキュベートするため、細胞は必須の G 1 n を極めて長い時間奪われるであろうから、E r A - W T が極めて強力な細胞殺作用を実証したことは驚くべきことではなかった。E c A - W T は、内因的に低い L - グルタミナーゼ活性を有するが、2 4 時間および 4 8 時間の時点で E r A - W T と同じ G 1 n 枯渇を示した（その遅い L - グルタミナーゼ活性は 5 時間の時点で顕著であった）。

20

#### 【 0 0 9 2 】

最も重要なことに、E r A - D M 1 変異体は G 1 n 枯渇を著しく低減させた。2 4 時間の時点で、この酵素とともにインキュベートした溶液の G 1 n レベルは依然として約 0 . 4 m M であり、4 8 時間で約 0 . 1 m M であった。7 2 時間の時点でのみ、G 1 n は E r A - D M 1 によって完全に枯渇した。注目すべきことに、G 1 n は自発的な加水分解を受け、使用した実験条件下で、著しい G 1 n が実験の 4 日間のインキュベーション期間中に加水分解された。したがって、後の時間での G 1 n 枯渇の量は、L - アスパラギナーゼによって触媒された加水分解および自発的な加水分解の組み合わせである。したがって、無視できる自発的な G 1 n 加水分解が発生している 2 4 時間の時点で分析を限定する場合、E r A - D M 1 が E r A - W T または E c A - W T と比較してはるかに少ない G 1 n 枯渇を引き起こすことは極めて明らかである。

30

#### 【 0 0 9 3 】

高 L - アスパラギナーゼ活性および付随する L - グルタミナーゼ活性の減少に照らして、ここに記載の E r A 変異体は、特に、P E G 化された融合タンパク質の形態において、A L L などのがんの処置において in vivo 半減期を増加させるために容易に使用され得る。

#### 【 0 0 9 4 】

例 3 : 操作された E r A の低 L - グルタミナーゼ活性の構造的な根拠

変異誘発のための残基の選択。4 つの残基 A 1 a 3 1 、 G 1 u 6 3 、 P r o 1 2 3 、および S e r 2 5 4 を、L - グルタミナーゼ / L - アスパラギナーゼ比に影響を及ぼし得る候補部位として同定した。触媒作用におけるそれらの役割のために、L - アスパラギナーゼ / L - グルタミナーゼスーパーファミリー（図 3 のアスタリスクで示され、T 1 2 G G T 1 5 、 H 9 3 G T D T 9 7 、 S 6 2 、 K 1 6 8 を含む）間のコンセンサスモチーフに存在する残基を、変異の検討から除外した。代わりに、活性部位を取り囲み、必ずしも基質と相互作用しない非保存残基を標的化した。多重配列アラインメント（図 3 ）に基づき、産物 A s p および G 1 u との複合体中の E r A の結晶構造の分析と組み合わせて、A 1 a 3 1 、 G 1 u 6 3 、 P r o 1 2 3 および S e r 2 5 4 を変異誘発のための 4 つの潜在的な候補部位として同定した。興味深いことに、これらの 4 つの残基のうち、ただ 1 つの G 1 u 6 3 のみが基質と直接相互作用する。

40

50

### 【 0 0 9 5 】

部位 1、A 1 a 3 1 は、活性部位のリガンドの存在下で閉鎖し、整えられる柔軟な N 末端ループの部分である。整えられるとき、A 1 a 3 1 は基質結合ポケットの入口に位置する。好ましい基質 A s n と直接相互作用しないが、それはアミノ酸の C 原子の 4 以内である。より大きな基質 G 1 n を有する E r A 構造において、このアミノ酸に存在する余分なメチレン原子は A 1 a 3 1 の方向にねじれていることが観察された。A s n の収容を維持するが G 1 n を排除するために、小さいアラニン側鎖をよりかさ張ったものに置換することによって、空洞を立体的に拘束することが目的であった。すなわち、この設計は、余分な G 1 n メチレン基を立体的に排除するためになされた。モデリング研究に基づいて、バリン、イソロイシン、ロイシンおよびメチオニンに存在する側鎖が最も適切であると同定された。さらに、配列アラインメント（図 3）に示すように、A 1 a 3 1 は、大腸菌およびヘリコバクター・ピロリ L - アスパラギナーゼの場合、それぞれバリンまたはセリンで置換されている。E r A と比較して、これらの酵素は、L - グルタミナーゼ活性がより低いかまたは無視できる程度であると報告されている（Parmentier, et al. (2015) Leuk. Res. 39:757-762; Cappelletti, et al. (2008) Biochem. Biophys. Res. Commun. 377:1222-1226）。したがって、A 1 a 3 1 を、セリンまたはトレオニン（後者はバリンを模倣するがセリンのヒドロキシル基は保持する）のいずれかと置換した。

10

### 【 0 0 9 6 】

部位 2、G 1 u 6 3 は、アミノ酸基質の - アミノ基と直接相互作用する残基である。A s p および G 1 u との複合体における E r A の構造分析は、より大きな G 1 u を収容するために、基質が、小さな A s p によって採用された結合位置に対して G 1 u 6 3 の方向にシフトすることを示した。この G 1 n の再配置を不利にするために、G 1 u 6 3 をグルタミンに置換した。この変異の選択は、低 L - グルタミナーゼのヘリコバクター・ピロリおよび大腸菌の L - アスパラギナーゼの G 1 u 6 3 の対応部分がグルタミンであるという事実によって補強された。グルタミン酸およびグルタミンの両方の側鎖は、A s n または G 1 n のいずれかの - アミノ基の結合に関与し得る酸素原子を含有する。しかしながら、グルタミン側鎖中に存在するアミノ基は、（グルタミン酸中の第 2 の酸素原子とは対照的に）G 1 n の収容にあまり好ましくないものであり得ると仮定された。E 6 3 Q 変異体に加えて、E 6 3 L 変異もまた、高 L - アスパラギナーゼ活性を示す Q 5 9 L E r A 変異体の同定にしたがって作製した（Chan, et al. (2014) Blood 123:3596-3606）。

20

### 【 0 0 9 7 】

変異誘発のために選択された第 3 の部位は P r o 1 2 3 であった。この残基は、いずれも低 L - グルタミナーゼ活性を示すウォリネラ・サクシノゲネスの L - アスパラギナーゼおよびヘリコバクター・ピロリの L - アスパラギナーゼのそれぞれのセリンまたはアスパラギンのいずれかであるため（図 3）、この部位を選択した。P r o 1 2 3 の位置に基づいて、この残基は G 1 n に対する A s n の選好を増加させる間接的な役割を果たし得ることが予想された。これを実証するために、P 1 2 3 S および P 1 2 3 N E r A 変異体を調製した。

30

### 【 0 0 9 8 】

改変のための部位 4、残基 S e r 2 5 4 は、基質結合ポケットの入口に位置し、隣接するプロトマーに由来する。したがって、A 1 a 3 1 について上記で合理化されたように、このセリンをより大きな側鎖を有する残基で置換することは G 1 n を排除すると仮定された。多重配列アラインメント（図 3）は、大腸菌およびモルモット酵素（L - グルタミナーゼ活性が低いものから同活性がないものまで）におけるこの残基の対応部分がそれぞれアスパラギンおよびプロリンであることを明らかにした。したがって、変異体 S 2 5 4 N および S 2 5 4 P を作製して、L - グルタミナーゼ / L - アスパラギナーゼ選好に対するこの部位の効果を調べた。

40

### 【 0 0 9 9 】

E r A 変異体の反応速度の特性評価。E r A - W T に加えて、表 7 に挙げた 18 種の E r A 変異体を発現させ、精製した。

50

【表7】

表7

酵素	%Gln アーゼ 対 ErA-WT	%Asn アーゼ 対 ErA-WT	% (Gln アーゼ /Asn アーゼ) 同一タンパク質内 <sup>a</sup>
ErA-WT	100%	100%	14%
ErA-A31V	72%	81%	13%
ErA-A31S	124%	110%	16%
ErA-A31T	18%	28%	9%
ErA-A31N	3%	33%	1%
ErA-A31M	7%	26%	3%
ErA-A31I	65%	85%	12%
ErA-A31L	6%	12%	4%
ErA-E63L	0%	12%	0%
ErA-E63Q <sup>b</sup>	31%	90%	5%
ErA-P123S	2%	3%	11%
ErA-P123N	1%	2%	6%
ErA-S254N	34%	40%	12%
ErA-S254P <sup>b</sup>	0%	120%	0%
ErA-A31T + E63Q	8%	15%	7%
ErA-A31I + E63Q <sup>b</sup>	22%	60%	5%
ErA-S254N + E63Q <sup>b</sup>	0%	82%	0%
ErA-S254N + A31T	9%	18%	7%
ErA-S254N + A31I	22%	25%	12%
EcA-WT	100%	100%	2%

<sup>a</sup> 20mM の Gln および 5nM の酵素で測定した観察された Gln アーゼ速度; 2mM の Asn および 0.5nM の酵素で測定した観察された Asn アーゼ速度。

<sup>b</sup>  $k_{cat}$  および  $K_m$  パラメータの決定のために選択された変異体。

10

20

30

## 【0100】

比色酵素結合アッセイを使用して、酵素の L - アスパラギナーゼおよび L - グルタミナーゼ活性を決定した。飽和基質濃度での速度を測定したことを保証するために、10 mM の Gln および 2 mM の Asn を、それぞれ L - グルタミナーゼアッセイおよび L - アスパラギナーゼアッセイの基質として使用した。18種の変異体のうち 17種が L - グルタミナーゼ活性を低減させた（表7）。しかしながら、ほとんどの変異体について、この減少は L - アスパラギナーゼ活性の低下と付随していた。（i）60% の保持された L - アスパラギナーゼ活性（Erw - WT に対して）および（ii）5% の L - グルタミナーゼ対 L - アスパラギナーゼ活性の基準を使用して、変異体 ErA - E63Q、ErA - S254P、ErA - A31I + E63Q および ErA - S254N + E63Q をさらなる研究のために選択した。

40

## 【0101】

飽和基質濃度での最初の変異体スクリーニングから、单一変異体 ErA - S245P は、最も望ましい特性を有するようであった： L - グルタミナーゼ活性はアッセイ条件の検出感度未満であったが、L - アスパラギナーゼ活性は野生型酵素に対して 120% であった（表7）。変異体の L - アスパラギナーゼ活性のさらなる反応速度の特性評価により、Asn による高い代謝回転速度を確認した。しかしながら、それは Asn の  $K_m$  値において（ErA - WT に対して）25倍の増加も明らかにした（表8）。

50

## 【表 8】

表 8

酵素	Km (μM)	k <sub>obs</sub> @50 μM (秒 <sup>-1</sup> )	k <sub>obs</sub> @20 μM (秒 <sup>-1</sup> )
ErA-WT	47.5±3.5	105.3	50.7
ErA-S254P	1154.2±25.5	10.5	4.5
ErA-E63Q	50.7±2.0	92.2	46.3
ErA-A31I-E63Q (DM2)	36.9±2.2	69.7	38.8
ErA-E63Q-S254N (DM1)	185.3±5.5	36.3	18.9
ErA-E63Q-S254Q (DM3)	179.1±5.6	30.8	14.2
ErA-A31I-E63Q-S254Q (TM2)	95.0±3.5	89.1	40.8
ECA-WT	15.0±0.5	41.3	28.3

## 【0102】

L - アスパラギナーゼの臨床的な使用は、血液 A s n レベルの完全な枯渇を必要とするため、有効であるためには酵素の K m は低いマイクロモル範囲でなければならない。したがって、L - グルタミナーゼ活性を大部分排除するという目標が達成されたが、ErA - S 245P 変異体は、L - アスパラギナーゼ反応における A s n の K m 値の許容できない増加を考慮して、さらなる分析のために選択しなかった。

## 【0103】

最初のスクリーニング（表 7）からの変異体の特性をさらに調べたところ、3つの次に最も有望な変異体は E 6 3 Q ( ErA - E 6 3 Q ) 単一変異体および A 3 1 I - E 6 3 Q ( ErA - D M 2 ) および E 6 3 Q - S 2 5 4 N ( ErA - D M 1 ) 二重変異体であることが示された。これらの変異体のさらなる反応速度の特性評価により、基質 A s n の臨界 ( critical ) K m 値は ErA - W T の K m 値に匹敵することが明らかになった（表 8 および 9）。実際、ErA - D M 2 は、ErA - W T よりも低い A s n K m を獲得した（37 対 48 μM）。対照的に、ErA - D M 1 変異体は、A s n K m において 4 倍の増加を示した。野生型 k c a t に近いもの（ErA - W T の 60 ~ 90 % の範囲）とともに、これらの変異体は、A s n を血液から効率的に枯渇させるのに必要な基準を満たす。

10

20

30

40

50

【表9】

表9

酵素名	$k_{cat}$ (秒 <sup>-1</sup> )	Km (μM)	$k_{cat}/Km$ (秒 <sup>-1</sup> μM <sup>-1</sup> )	$k_{obs}$ @50 μM (秒 <sup>-1</sup> )	$k_{obs}$ @20 μM (秒 <sup>-1</sup> )	比活性 (IU/mg) <sup>a</sup>
<i>ErA</i> -WT	207.5±3.6	47.5±3.5	4.37	105.3	50.7	353.2±6.1
<i>ErA</i> -E63Q	186.8±1.7	50.7±2.0	3.68	92.2	46.3	317.8±2.9
<i>ErA</i> -A31I-E63Q (DM2)	123.0±1.8	36.9±2.2	3.33	69.7	38.8	209.1±3.1
<i>ErA</i> -E63Q-S254N (DM1)	169.8±1.5	185.3±5.5	0.92	36.3	18.9	288.8±2.6
<i>ErA</i> -S254P	250.0±2.8	1154.2±25.5	0.22	10.5	4.5	425.4±4.8
<i>ECA</i> -WT	44.4±0.3	15.0±0.5	2.96	41.3	28.3	76.3±0.5
<i>ErA</i> -E63Q-S254Q (DM3)	147.3±1.0	179.1±5.6	0.82	30.8	14.2	250.4±1.7
<i>ErA</i> -A31I-E63Q-S254N (TM1)	109.7±0.8	124.2±4.3	0.89	29.2	16.4	186.4±1.4
<i>ErA</i> -A31I-E63Q-S254Q (TM2)	261.2±2.8	95.0±3.5	2.75	89.1	40.8	443.5±4.8

<sup>a</sup> 1 IUの酵素は、37°Cで1分間に1マイクロモルの産物を生産するために使用される酵素の量として定義される。

## 【0104】

その後、望ましくないL-グルタミナーゼ活性の正確な反応速度パラメータを決定した。この研究は、これらの変異体の低減したL-グルタミナーゼ活性が、*ErA*-WTと比較して、低減した $k_{cat}$ (3~9倍低い)および非常に増加したKm(8~44倍高い)のためであることを確立した(表10および11)。

【表10】

表10

酵素	Km (μM)	$k_{obs}$ @500 μM (秒 <sup>-1</sup> )	$k_{obs}$ @100 μM (秒 <sup>-1</sup> )
<i>ErA</i> -WT	360±20	15.06	6.118
<i>ErA</i> -E63Q	3860±230	0.72	0.098
<i>ErA</i> -A31I-E63Q (DM2)	2730±20	0.73	0.105
<i>ErA</i> -E63Q-S254N (DM1)	15800±300	0.07	0.019
<i>ErA</i> -E63Q-S254Q (DM3)	84000±560	0.02	0.009
<i>ErA</i> -A31I-E63Q-S254Q (TM2)	47500±700	0.0083	0.0045
<i>ECA</i> -WT	1380±90	0.22	0.047

10

20

30

40

50

【表 11】

表 11

酵素名	$k_{cat}$ (秒 <sup>-1</sup> )	Km ( $\mu M$ )	$k_{cat}/Km$ (秒 <sup>-1</sup> $\mu M^{-1}$ )	$k_{obs}$ @1 mM (秒 <sup>-1</sup> )	$k_{obs}$ @0.5 mM (秒 <sup>-1</sup> )	比活性 (IU/mg) <sup>a</sup>
<i>ErA</i> -WT	26.84 ± 0.26	360 ± 20	74.56 × 10 <sup>-3</sup>	19.22	15.87	45.68 ± 0.44
<i>ErA</i> -E63Q	8.33 ± 0.16	3,860 ± 230	3.68 × 10 <sup>-3</sup>	2.16	0.74	14.17 ± 0.27
<i>ErA</i> -A31I-E63Q (DM2)	6.01 ± 0.13	2,730 ± 200	2.2 × 10 <sup>-3</sup>	2.20	0.83	10.22 ± 0.22
<i>ErA</i> -E63Q-S254N (DM1)	2.93 ± 0.03	15,800 ± 300	0.19 × 10 <sup>-3</sup>	0.18	0.11	4.98 ± 0.05
<i>ECA</i> -WT	0.89 ± 0.01	1,380 ± 90	0.64 × 10 <sup>-3</sup>	0.36	0.22	1.53 ± 0.02
<i>ErA</i> -E63Q-S254Q (DM3)	7.17 ± 0.64	84,000 ± 12,000	0.85 × 10 <sup>-3</sup>	0.19	0.0226	12.17 ± 1.19
<i>ErA</i> -A31I-E63Q-S254N (TM1)	5.6 ± 0.2	28,200 ± 2,300	0.19 × 10 <sup>-3</sup>	0.33	0.11	9.51 ± 0.34
<i>ErA</i> -A31I-E63Q-S254Q (TM2)	1.836 ± 0.11	47,460 ± 695	0.04 × 10 <sup>-3</sup>	-	0.0083	3.12 ± 0.02

<sup>a</sup> 1 IUの酵素は、37°Cで1分間に1マイクロモルの産物を產生するために使用される酵素の量として定義される。

## 【0105】

$k_{cat}/Km$ パラメータによって示されるように、変異体のL-グルタミナーゼ効率は約20~400倍低減した。同様に、0.5 mMの生理学的な血液濃度で観察したL-グルタミナーゼ速度は、ErA-WTに対して95~99%低減した。この分析は、これらの3つの変異体が、L-グルタミナーゼ活性が著しく損なわれているがErA-WTのL-アスパラギナーゼ活性に近い設計基準を大いに満たすことを実証する。

## 【0106】

改善されたL-アスパラギナーゼ選択性の分子的な根拠。上記で論じた変異体の設計に構造上の考慮が組み込まれたが、増加したAsn選択性のメカニズムが確認された。したがって、ErA-E63Q、ErA-DM1、およびErA-DM2酵素の変異体は、AspまたはGluのいずれかを用いて結晶化した（それぞれ、L-アスパラギナーゼおよびL-グルタミナーゼ反応の産物）。高分解能回折データをAspおよびGluの両方の浸漬した結晶で収集した。Aspの浸漬した結晶について（データ収集および精密統計については表1を参照）、酵素の活性部位での電子密度の調査は、明らかにリガンドの存在を示した。しかしながら、異なる浸漬条件（例えば、浸漬時間の増加、Glu濃度の増加）下でのいくつかの試みにもかかわらず、浸漬したGluの電子密度は観察されなかった。代わりに、Gluの浸漬した結晶の活性部位は、結晶化溶液の成分であるHEPESバッファーの電子密度を有していた。HEPESの分子は、同じ条件を使用して結晶化されたアポErA-WTの活性部位に結合していることが以前に観察された。注目すべきことに、ErA-WTについては、浸漬したAspおよびGluの両方が、活性部位からバッファー分子を置換することができる。対照的に、ここで論じた3つのErA変異体については、結合したHEPES分子を完全に置換するのに成功したのはAsp（しかしGluではない）のみであった。浸漬したGluがErA変異体の結晶中のバッファー分子を置換することができないことは、野生型酵素と比較してGln Km値が非常に増加したことと相関する。

10

20

30

40

50

## 【0107】

E r A 変異体の全体構造。E r A - W T は、活性部位におけるA s p / G l u の存在または非存在にかかわらず、二量体 - 二量体から構成される四量体を構築する。しかしながら、A s p / G l u の非存在下では、N末端領域（残基18～34）は明確な電子密度を欠いている。このいわゆる柔軟なN末端ループは、A s p またはG l u のいずれかがE r A - W T に結合すると、整えられ、活性部位に接近することが観察された。ここで解析された3種類のE r A 変異体（E r A - E 6 3 Q、E r A - D M 1、E r A - D M 2）について、四量体構成が維持され、柔軟なN末端ループが電子密度を明確に示し、閉鎖された立体配置を採用した。E r A - E 6 3 Q - A s p、E r A - D M 1 - A s p、およびE r A - D M 2 - A s p 構造は、それぞれ2.05、1.50 および1.60 の分解能で解明され（表1）、すべてE r A - W T - A S P 構造（PDB ID 5F52；0.09～0.135 のr m s d）に極めて同様である。

10

## 【0108】

E r A - E 6 3 QへのA S Pの結合。示されるように、野生型酵素において、G l u 6 3 は、アミノ酸リガンド（A s p またはG l u）の - アミノ基と直接相互作用する。E r A - W T - A s p の特定の場合、その相互作用距離は2.8 である。G l u 6 3 をグルタミンで置換することは、G l u 6 3 が基質の - アミノ基と塩橋を形成するのに対し、G l n 6 3 はH結合を形成するため、より距離感受性である相互作用をもたらすであろうと仮定された。この相互作用の距離感受性の増加は、G l n の結合に影響を与えるがA s n の結合には影響しないことが予測された。G l n 6 3 側鎖の配向（カルボニル酸素原子対アミド窒素原子）の割り当ては、G l n 6 3 （H結合供与体）のアミド窒素原子がリガンド（これもまたH結合供与体）の - アミノ基からさらに遠い側にあるであろうという化学的推論に基づいてなされた。

20

## 【0109】

分析は、E r A - E 6 3 Q - A s p 構造において、リガンド（A s p）の - アミノ基とG l n 6 3 のグルタミン側鎖のカルボニル部分との間の相互作用距離が3.0 に増加したことを示した。重要なことに、G l n 6 3 のアミド窒素原子とA S P リガンドの - アミノ基との間の距離は、3.9 で許容できるほど長いものであった。換言すれば、L - アスパラギナーゼ反応に悪影響を及ぼさないように、A S P の場合（そして基質A s n についても当てはまる）、これらのH結合供与体部分の間に十分な分離が存在した。これは、なぜこの変異体が高いL - アスパラギナーゼ活性を維持するのかを説明する。

30

## 【0110】

A s p のE r A - D M 1への結合。その後、A s p (E r A - D M 2 - A s p)との複合体中のA 3 1 I - E 6 3 Q二重変異体（E r A - D M 2）の結晶構造を決定した。E r A - D M 2 に対するE 6 3 Q変異の最小の効果は、E r A - E 6 3 Qについて見られたものと同様であった。対照的に、A 3 1 I変異の効果は、より重要であり、柔軟なN末端ループの立体配置に影響を与えた。依然として閉鎖しているが、このループは、E r A - W T - A s p 複合体構造に見られるものとは異なる立体配置を採用した。より小さなアラニンを置換した31位のイソロイシンは、N末端の柔軟なループのこの部分が基質結合部位に近づくのを妨げた。E r A - W T - A s pにおいて、31位のアラニンは、それぞれ、結合したA s p のC およびC 原子から4.1 および5.3 離れていた。A l a 3 1 がより大きなイソロイシンに置き換えられたとき、E r A - D M 2 - A s p 中のイソロイシンの先端がA S P からほぼ同じ距離になるように（4.2 および5.3 ）、柔軟なN末端ループの位置が調整された。したがって、この構造は、変異体がそのL - アスパラギナーゼ活性を維持するためにどのように適合するかを明らかにした。

40

## 【0111】

A s p のE r A - D M 1への結合。S e r 2 5 4 のアスパラギンへの単一置換は、L - アスパラギナーゼおよびL - グルタミナーゼ活性の同等の減少を伴う変異体をもたらした（表7）。興味深いことに、S 2 5 4 N変異をE 6 3 Q変異と組み合わせると（E r A - D M 1）、A s n に対して高度に選択的な変異体が得られた（表8および表10）。この現

50

象を理解するために、A s pとの複合体中のE r A - D M 1 ( E r A - D M 1 - A s p )の結晶構造を解明した。再び、E 6 3 Q変異のわずかな効果は、以前に論じたものと同様であった。第2の変異の部位である残基254は、四量体酵素の隣接するプロトマーに由來した(数字の後にプライムで示される)。E r A - W Tにおいて、S e r 2 5 4'は、結合したA S Pと直接相互作用しなかったが(A s pの-アミノ基に対して4.0の距離)、保存されたA s p 9 6の側鎖を位置付けるように機能した(S e r 2 5 4'ヒドロキシルとA s p 9 6の側鎖との間の2.7の距離)。S e r 2 5 4'がアスパラギンに変異した場合、より大きな側鎖は結合したA S Pに近づき(A s pの-アミノ基に対して3.5)、A s p 9 6との位置的相互作用(positioning interaction)を維持した(3.1)。A s n 2 5 4'側鎖アミド窒素原子(H結合供与体)がA s p 9 6(H結合受容体)のカルボン酸部分に面するように、A s n 2 5 4'の配向はA s p 9 6によって指示された。これは重要な点であり、なぜなら、A s p 2 5 4'の側鎖アミド窒素原子は、A s p 9 6によって配置されているため、A s nまたはG 1 nの-アミノ基に対する反発を生じるからである。これは、なぜE r A - S 2 5 4 Nの単一変異体がA s nおよびG 1 nの両方で活性を減少させたのかを説明する(表7)。

#### 【0112】

S 2 5 4 N変異がE 6 3 Q変異と組み合わされたとき(すなわちE r A - D M 1)、酵素の反応速度特性は著しく異なった。以前のE 6 3 Q含有変異体と同様に、63位の側鎖とA s pとの間のE r A - D M 1 - A s p構造中の距離は3.0に増加した。この距離の増加は小さいが、A s n 2 5 4'に基質A s nとの分離を3.5に増加させた。A s pの位置のこのシフト(E 6 3 Q変異による)は、A s n 2 5 4'の側鎖との反発相互作用を軽減することを可能にした。換言すれば、E 6 3 Q変異は、リガンド-アミノ基(H結合供与体)とA s n 2 5 4'アミド窒素原子(これもまたH結合供与体)との間の反発相互作用を制限するように、リガンドを十分に置換した。これにより、E r A - D M 1は高いL-アスパラギナーゼ活性を維持することができる。

#### 【0113】

E r A変異体へのG 1 u結合様式のモデル化。前述の構造分析は、変異とA s nとの酵素活性の適合性を実証する。したがって、変異とG 1 nの加水分解との不適合性の根拠が探求された。しかしながら、G 1 uが浸漬した変異体酵素の結晶がアミノ酸に結合できなかつたため、変異体がどのようにしてG 1 nに結合するかについての直接的な実験的見解は不可能であった。したがって、E r A - W T - G 1 uを変異体構造と重ね合わせた。理論に縛られるわけではないが、この種類の分析では、G 1 uがE r A - W Tに観察されたものと同じように変異体酵素に結合すると仮定された。この分析は、変異体に対する潜在的なG 1 u結合様式の洞察を提供する。

#### 【0114】

E 6 3 Q変異は、高L-アスパラギナーゼ/低L-グルタミナーゼ特性を有する、これまでに論じた3つの変異体すべてに存在するため、A s nとG 1 nとの間の差別化において重要な役割を果たすに違いない。E r A - W T - G 1 uとE r A - E 6 3 Qの構造の重ね合わせは、E r A - E 6 3 Qへの推定されるG 1 u結合様式を提供し、G 1 u-アミノ基とG 1 n 6 3アミド窒素原子との間の短い距離(3.5)を明らかにした。これらの部分の両方がH結合供与体であるため、かかる近接性はこのアミノ酸の結合に有害であろう。論じたように、より小さいサイズでG 1 n 6 3から離れて位置を変えることができるA S Pの場合、類似のH結合:H結合距離は3.9であり、したがってあまり有害ではなかった。野生型酵素では、アミド窒素の代わりに、H結合受容体であるG 1 u 6 3側鎖カルボキシレートの第2の酸素原子が存在し、これはなぜG 1 nがE r A - W Tの比較的良好な基質であるのかを説明する。G 1 u側鎖カルボキシレート(およびA s pのそれ)がT h r 9 5によって固定されているため、A S PはG 1 n 6 3のアミド窒素原子との距離を増加させるため、G 1 uは再配置しない。このトレオニンは、T h r 1 5と組み合わせて、A s nおよびG 1 nの酵素的加水分解にとって重要である。したがって、E 6 3 Q変異は、この大きなアミノ酸がG 1 u 6 3 / G 1 n 6 3の方向にシフトすることによって

10

20

30

40

50

活性部位に収まるという要件を利用することによって Gln を区別し、次に、Gln - アミノ基を Gln 63 アミド窒素原子に好ましくない近接度で設置する（ただし、野生型 Glu 63 と適合する）。

#### 【0115】

A31I (Era - DM2 に存在する) は、Gln に対する差異を増加させるように働くのではなく、むしろ Asn の Km を低減させる (Era - E63Q の 51 μM から Era - DM2 の 37 μM まで)。この変異は Gln の Km をも低減させる。Era - DM1 - Asp 構造により、この変異が柔軟な N 末端ループを野生型酵素によって採用されたものとは異なる閉鎖した立体配置を強制的にとらせることを明らかにした。これがどのようにして Asn Km 値を低減させるかは構造からは明らかではない。この変異はループの閉鎖のダイナミクスに影響を及ぼし、最終的に基質 Km 値に影響を及ぼすことが推測された。10

#### 【0116】

S254N 変異 (Era - DM1 に存在する) は、Asn と Gln との間の選択性を増加させ、E63Q 変異と同様の様式でそれを行う。すなわち、この変異は、Gln - アミノ基に近接した H - 結合供与体を導入する。Era - WT - Glu および Era - DM1 - Asp の重ね合わせは、変異体酵素に結合したときに Glu が採用するであろう位置を明らかにした。この重ね合わせにより、Asn 254' に向かって移動することにより、より大きな Glu が、H - 結合基間の好ましくない短い (3.2') 分離をもたらすであろうことが明らかになった。より小さい基質 Asn がこの変異によって著しい程度まで影響を受けない理由は（その Km もまた Era - E63Q の 51 μM から Era - DM1 の 185 まで増加したが）、これらの H 結合供与基間のより大きな分離 (3.5') によるものであった。20

#### 【0117】

改善された第 2 世代の変異体を開発するための構造分析の利用。以前の研究は、63 位および 254 位を Asn / Gln 選択性のための「ホットスポット」として同定し、基質 Km 値を低減させるための 31 位を同定した。したがって、3つすべてのホットスポットにおける置換を有する変異体が改善された特性を有するか否かを決定した。三重変異体 Era - A31I - E63Q - S254N (Era - TM1) は実際に Asn に対してより低い Km を有したが (Era - DM1 については 110 対 170 μM、表 9)、その L - グルタミナーゼ速度は増加した (表 11)。Era - TM1 は、以前の最も良好な変異体である Era - DM1 よりもわずかに良好であった。30

#### 【0118】

Era - DM1 - Asp の構造は、254 位のグルタミンが Gln に対してより良好に識別し得ることを示した。実際に、Era - E63Q - S254Q (Era - DM3) 変異体は、Era - DM1 と比較してさらに高い Gln Km を与えられた (84 対 15.8 mM) (表 8)。重要なことに、Era - DM3 の L - アスパラギナーゼ活性は、Ser 254 をアスパラギン (Era - DM1 の場合) からグルタミンに変えることによって悪影響を受けなかった (表 8)。

#### 【0119】

非常に高い Gln Km 値を有する変異体 (Era - DM3) を同定したため、この変異体に A31A 変異を加えた。この変異体に A31A 変異を加える利点は、Asn Km 値の低減を含んだ。実際に、Era - A31I - E63Q - S254Q (Era - TM2) は、Era - DM3 の Asn Km 値の約半分である Asn Km 値を有していた (95 対 17.9 μM、表 8)。Gln の Km 値もまた低減したが (47.5 対 84 mM)、この低減にもかかわらず、生理学的血液 Gln 濃度よりも 100 倍高いままであった。したがって、Era 三重変異体 A31I - E63Q - S254Q (Era - TM2) は、高 L - アスパラギナーゼ / 低 L - グルタミナーゼ特性の最も良好な組合せを有していた (表 12)。40

10

20

30

40

50

【表 12】

表 12

酵素名	$k_{obs} [Asn_{50}] / k_{obs} [Gln_{500}]^a$	比活性 (Asn) / 比活性 (Gln) <sup>b</sup>
<i>ErA</i> -WT	6.6	7.3
<i>ErA</i> -E63Q	125	22
<i>ErA</i> -E63Q-S254N (DM1)	330	60
<i>ErA</i> -A31I-E63Q- S254Q (TM2)	8910	142
<i>ECA</i> -WT	188	50

<sup>a</sup> Asn @ 50 μM の  $k_{obs}$  、 Gln @ 500 μM の  $k_{obs}$ 。<sup>b</sup> 比活性 (IU/mg の単位) を、飽和基質濃度 (Asn または Gln) で決定した。

10

## 【0120】

超低 L - グルタミナーゼ *ErA* - TM2 変異体は、細胞殺作用特性を維持する。この研究は、高 L - アスパラギナーゼおよび低 L - グルタミナーゼ活性を有するいくつかの *ErA* 変異体を、超低 L - グルタミナーゼ特性を有する 2 つの変異体 (*ErA* - DM3 および *ErA* - TM2) で設計および特性評価した。超低 L - グルタミナーゼ活性を有する変異体が ALL 細胞を殺す能力を維持しているかどうかを試験するために、ヒト T - ALL LOUCY 細胞株を漸増濃度の *ErA* - TM2 に暴露し、この酵素の IC<sub>50</sub> 値を決定した。この分析は、*ErA* - TM2 が *ErA* - WT の IC<sub>50</sub> 値 (0.00033 IU/mL) に匹敵する IC<sub>50</sub> 値 (0.00061 IU/mL) を有することを示した。

20

## 【0121】

マウスにおける超低 L - グルタミナーゼ *ErA* - TM2 の有効性。雌マウスに、ルシフェラーゼ発現 LOUCY 細胞を尾静脈注射した。4 週間後、マウスをビヒクル (n = 3)、*ErA* - WT (n = 4)、または *ErA* - TM2 (n = 4) で 14 日間毎日処置した (薬用量 50 IU/マウス/日; 腹腔内)。生物発光シグナルを 0 日目、7 日目および 14 日目に測定した。14 日目の相対的な生物発光イメージング (BLI) フラックスを評価し、ビヒクル処置マウスの 0 日目に対して 10 倍増加することが見出された。両方の処置群 (*ErA* - WT および *ErA* - TM2) について、ビヒクル対照と比較してフラックスは劇的に減少し (p 値 < 0.0001)、14 日目までに背景レベルに戻り、処置群間に有意差はなかった。末梢血 % huCD45+ レベルは、処置開始の 1 週間前 (-7 日目)、処置開始 (0 日目)、および処置の終了 (14 日目) に決定した。% huCD45+ > 8% で示されるように、0 日目にすべての動物に高度に生着した。14 日目までに、ビヒクル処置マウスでは、% huCD45+ は 40 ~ 60% に増加したが、両方の処置群では、% huCD45+ は検出できなかった (ビヒクル処置群と酵素処置群との間の p 値 < 0.0001)。0 日目に、処置に使用されたものと同様な BLI フラックスを有する 3 匹のマウスにおける骨髄 % huCD45+ の評価は、高い生着を示した。14 日目に、骨髄 % huCD45+ はビヒクル処置マウスでは高いままであったが、両方の酵素処置群では検出できなかった (ビヒクル処置群と酵素処置群との間の p 値 < 0.0001)。ビヒクル処置マウスの脾臓は非常に拡大していたが、*ErA* - WT および *ErA* - TM2 群の脾臓は正常なマウス脾臓と大きさが似ていた。ビヒクル処置マウス、*ErA* - WT 処置マウスおよび *ErA* - TM2 処置マウスからの肝臓の H & E 染色されたパラフィン切片は、ビヒクル処置動物がリンパ芽球性白血病細胞の沈着物で満たされた肝臓を有することを示した。対照的に、*ErA* - WT または *ErA* - TM2 で処置したマウスの肝臓には、検出可能な白血病細胞は存在しなかった。殺作用活性に関して、この分析の結果は、*ErA* - TM2 による ALL 細胞の著しい殺作用効果を示した (図 4)。特に、超低 L - グルタミナ-

30

30

40

50

ゼ E r A - T M 2 は、高 L - グルタミナーゼ E r A - W T と同様に効果的に T - A L L L O U C Y 細胞を排除する。さらに、毒性の指標として体重減少（グラム、0 日目に対して）を使用すると、E r A - W T 処置マウスは顕著な毎日の体重減少を示したが、体重減少は E r A - T M 2 処置群で 0 . 2 9 g / 日改善したことを観察した（p 値 < 0 . 0 0 0 1 ）。

#### 【 0 1 2 2 】

L - グルタミナーゼ活性および毒性をさらに相関させるために、C D - 1 マウスに急性の単一用量の漸増毒性試験を行った。各群は、E r A - T M 2 の不足のために 4 匹の動物（3 匹の雌、1 匹の雄）のみを有する群 6 を除いて、3 匹の雄および 3 匹の雌を有していた。E r A - W T を投与した動物は有意な身体的および行動的症状を示したが、E r A - T M 2 を投与した動物はかかる症状がほとんどなかった（表 13）。 10

【表 13】

表 13

基	ErA-WT			ErA-TM2		
	1	2	3	4	5	6
用量 (IU/g)	40	80	160	40	80	160
円背 (hunched) 姿勢	6 (2-4)	6 (2-4)	6 (1-4)	0*	0*	4(1)
減少した活 性	0	6(3)	0	0	0*	0
くぼんだ目	1 (2-3)	6 (2-3)	6 (1-4)	0	0*	0*
ラフコート (Rough coat)	6 (1-4)	6 (1-4)	6 (1-4)	4 (1-2)	0*	0*

症状を呈する動物の数（合計 6 匹のうちの数）を示す。括弧内には、症状が観察された日（単数または複数）が記されている。群 3 の 1 匹の雄には 136 IU/g を投与し、群 5 の雌には 60 IU/g を投与した。\* p < 0 . 0 5 、フィッシャー直接検定による分析：（群 1 対群 4、群 2 対群 5、群 3 対群 6）。 \* p < 0 . 0 5 、マン・ホイットニー U 検定による分析：（群 1 対群 4、群 2 対群 5、群 3 対群 6）。 20 30

#### 【 0 1 2 3 】

##### 例 4 : T R A I L - E r A 融合タンパク質

T R A I L ( TNF 関連アポトーシス誘導リガンド ) は、アポトーシスによって細胞死を誘導するタンパク質である。したがって、T R A I L - アスパラギナーゼ融合タンパク質は、これら 2 つのタンパク質の活性を組み合わせるために作製した。この融合タンパク質を使用して、L - アスパラギナーゼ成分は細胞にアポトーシスを起こさせ、T R A I L 成分は細胞死を誘導する。 40

#### 【 0 1 2 4 】

ヒト A M L 細胞に対する融合タンパク質 T R A I L 三量体 - E r A - T M 2 の有効性。 1 0 % F B S ( Hyclone ) および 1 × ペニシリン - ストレプトマイシン溶液 ( Invitrogen ) を補充した R P M I 1 6 4 0 培地 ( L - グルタミンを含む ) を使用して、ヒト急性骨髄性白血病 M V 4 ; 1 1 細胞を湿潤雰囲気 ( 5 % C O 2 、 3 7 ) で培養した。 0 . 0 0 0 1 ~ 2 . 5 I U / m l の範囲の最終濃度までの D P B S または T R A I L 三量体 - E r A - T M 2 のいずれかの 1 0 μ L の存在下、細胞懸濁液の 9 0 μ L アリコート ( 1 m L あたり 2 . 5 × 1 0 5 細胞 ) を丸底 9 6 ウェルマイクロタイプレートで三重に培養した。プレートを 5 % C O 2 を含有する加湿空気中 3 7 で 4 日間インキュベートした後、 Alamar 50

Blue ( Invitrogen ) を 10 % v / v の最終濃度まで加え、プレートをさらに 4 時間インキュベートした後、蛍光シグナルの読み出しを行った。白血病細胞の生存率は、D P B S 対照における蛍光カウントに対する L - アスパラギナーゼの存在下での蛍光カウントのパーセンテージとして計算した。この分析は、L - アスパラギナーゼ E r A - T M 2 単独 ( I C 5 0 = 1 . 6 3 1 I U / m L ) と比較して、活性 T R A I L 三量体 - E r A - T M 2 融合タンパク質が M V 4 ; 1 1 細胞株に対して著しく良好な殺作用特性をもつことを示した ( I C 5 0 = 0 . 0 6 4 I U / m L ) 。

#### 【 0 1 2 5 】

T R A I L 三量体 - E r A - T M 2 のより良好な抗がん効果が、T R A I L 三量体と L - アスパラギナーゼの両方の同調に由来し、T R A I L 三量体単独の活性に由来しないことを確認するために、T R A I L 三量体 - E r A - T M 2 を、同量の不活性な変異体 T R A I L 三量体 - E r A - T M 2 - K 1 6 8 M で置換した。この分析の結果、L - アスパラギナーゼ活性が損なわれると、融合 T R A I L 三量体 - E r A - T M 2 - K 1 6 8 M タンパク質はその M V 4 ; 1 1 細胞の殺作用効果を失うことが実証された。

10

#### 【 0 1 2 6 】

マウスにおけるヒト A M L 細胞に対する融合タンパク質 T R A I L 三量体 - E r A - T M 2 の有効性。4 匹の非肥満糖尿病 / 重症複合免疫不全 ( N S G ) マウス ( The Jackson Laboratory ) に 6 週齢で  $5 \times 10^6$  ルシフェラーゼ陽性 M V 4 ; 1 1 細胞を含有する 1 5 0  $\mu$  L の D P B S を静脈内注射した。定期的な時点で、IVIS Lumina II imaging system ( PerkinElmer ) を使用して生物発光を測定した。生着後 ( 0 日目 ) 、マウスを T R A I L 三量体 - E r A - T M 2 の 1 5 I U / マウスの腹腔内注射で 1 週間毎日処置した。生物発光シグナルを 0 日目および 7 日目に測定した。この分析の結果は、T R A I L 三量体 - E r A - T M 2 による M V 4 ; 1 1 細胞の著しい殺作用効果を示した ( 図 5 ) 。

20

#### 【 0 1 2 7 】

例 5 : in vivo 半減期を増加させるためのタグ

L - アスパラギナーゼの有効性は、薬の in vivo 半減期に関連する ; 半減期が長ければ長いほど、酵素は血液アスパラギンを加水分解するようにより長く作用する。したがって、L - アスパラギナーゼならびにここに開示される変異体および融合タンパク質の in vivo 半減期を増加させるために、タグを L - アスパラギナーゼの N 末端に融合させた。タグは、H i s 6 - 酵母 S U M O タグ、H i s 6 - ヒト S U M O タグおよびアルブミン結合ペプチド S A 2 1 タグを含んでいた。各タグは、L - アスパラギナーゼ酵素の循環時間を増加させた。さらに、タグの組み合わせを試験した。特に、S A 2 1 および酵母 S U M O タグを組み合わせて、さらに長期にわたる半減期を有する変異体を得た。

30

#### 【 0 1 2 8 】

ヒスチジンタグ。一連の 6 ~ 9 個のヒスチジン残基を特定する D N A 配列は、組み換えタンパク質の生産のためのベクターにおいて頻繁に使用される。結果は、その N 末端または C 末端に融合された  $6 \times$  H i s またはポリ - H i s タグを有する組み換えタンパク質の発現である。

#### 【 0 1 2 9 】

発現された H i s タグ化タンパク質は、容易に精製および検出され得、タンパク質特異的抗体またはプローブなしで組み換えタンパク質を特異的に精製または検出する手段を提供する。キットは H i s タグタンパク質について市販されている。

40

#### 【 0 1 3 0 】

S U M O 改変。N 末端融合パートナーとしての S U M O は、著しく改善されたタンパク質安定性および溶解性に基づいて、原核および真核の発現系における機能的タンパク質の生産を増強することが見出されている。

#### 【 0 1 3 1 】

融合タンパク質の発現および精製に続いて、S U M O タグは、in vitro でエンドペプチダーゼ活性を介して特異的 ( S U M O ) プロテアーゼによって切断されて、放出されたタンパク質パートナーの所望の N 末端を生成することができる。S U M O タグ発現系は市販さ

50

れている。いくつかの態様では、SUMOタグは、酵母SUMOタグ（例えば、Sm t 3）である。他の態様では、SUMOタグは、ヒトSUMOタグ（例えば、SUMO - 1、SUMO - 2またはSUMO - 3）である。

#### 【0132】

His-SUMO改変。ポリヒスチジン（例えば、6×His）タグとSUMO改変を組み合わせることにより、効率的な精製、増加した発現および溶解性、ならびにL-アスパラギナーゼの増加した半減期が提供される。目的のタンパク質にHis-SUMO改変を提供するための発現系は市販されている。例えば、CHAMPION pET SUMO protein expression system (Invitrogen) を参照されたい。

#### 【0133】

アルブミン結合ドメイン。アルブミン結合ドメインは、グラム陽性細菌によって発現される様々な表面タンパク質に見られる小さな3ヘリックスのタンパク質ドメインである。かかるアルブミン結合領域は、タンパク質精製または固定化に使用されている。例示的なアルブミン結合ドメインには、SA20 (QRLIEDICLPRWGCCLWEDDF；配列番号13)、SA21 (RLIEDICLPRWGCCLWEDD；配列番号14) およびSA31 (RLIEDICLPRWGCCLW；配列番号15) を含むが、これらに限定されない。

#### 【0134】

さらに、かかるドメインを治療上のタンパク質に融合させることによって、アルブミンとの非共有結合による薬物動態の改善に成功したことが示されている。Dennis, et al. (2002) J. Biol. Chem. 277(38):35035-35043 ; US 2016/0185874 ; およびUS 2004/0001827を参照されたい。

20

#### 【0135】

##### 例6：部位特異的なPEG化

PEGの機能は、L-アスパラギナーゼをタンパク質分解および宿主免疫システムから保護することである。L-アスパラギナーゼのマレイミドベースのPEG化を可能にするために、様々なアミノ酸残基をシステイン残基に変異させて、酵素活性にほとんどまたはまったく影響を及ぼさない好適な位置を同定した。注目すべきことに、ErA-WTおよびErA-TM2はシステイン残基を含有しない。したがって、このアミノ酸残基の導入は、折りたたみまたは活性を破壊しないように、酵素の適切な位置になければならなかった。したがって、ErA-TM2の構造を分析して、システインに変異し得る残基の領域を同定した。（1）表面に位置し、（2）オリゴマー化界面から適切な距離にあり（ErA-TM2は四量体であるため、界面付近の残基をPEG化することは酵素の活性に有害であり得る）、（3）外側を指している残基を含む、5つのかかる領域を同定した（表14）。

30

40

50

【表 14】

表 14

領域	残基
1	K72
	R76
	E79
	D84
	D85
2	R206
	D210
	T215
	S216
3	D235
	Q239
	H240
4	A261
	R264
	K265
	E268
	K269
5	K318
	E322

10

20

30

40

## 【0136】

部位特異的なPEG化のための部位としての表14のアミノ酸残基の使用を実証するためには、ErA-TM2の残基Asp84をシステインに変異させた。得られたErA-TM2-D84Cタンパク質を発現させ、精製し、mPEG-10KでPEG化した。SDS-PAGE分析に基づいて、ErA-TM2-D84Cタンパク質の分子量の測定可能な増加によって証明されるように、ErA-TM2-D84CをPEG化した。

## 【0137】

続いて、D84C変異およびそのPEG化バージョンが酵素活性に負の影響を及ぼさないことを確認した。ErA-TM2、ErA-TM2-D84C、およびPEG化-ErA-TM2-D84Cの活性を比較すると、各酵素の計算した速度は同等であることを観察

50

した。ここで、ErA-TM2-D84CのPEG化により、ErA-TM2と比較して活性は10%未満低減した(表15)。

【表15】

表15

変異体	2mM Asnでの $k_{obs}$ (1/秒)	% 対 ErA-TM2
ErA-TM2	178.8	100
ErA-TM2-D84C	172.8	97
10K PEG化-ErA-TM2-D84C	163.4	91

10

## 【0138】

これらのデータに照らせば、PEG化のためのシステイン残基の組み込みを含むように標的化することができるここに開示されるL-アスパラギナーゼの5つの領域(表14)が存在する。本発明によれば、PEG5K、PEG10K、PEG20K、PEG40Kなどの大きな分子量のPEG分子とのシステイン残基のマレイミドベースのコンジュゲーションにより、直鎖または分枝PEG分子のいずれかとして、PEG化を達成することができる。1、2、3、4または5個のシステイン残基が表14に示される位置に組み込まれ、それにより1~5個のPEG付着部位が提供され得ることが企図される。

20

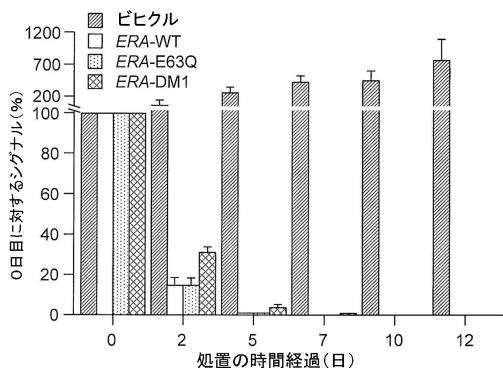
30

40

50

【四面】

【図1】



1A

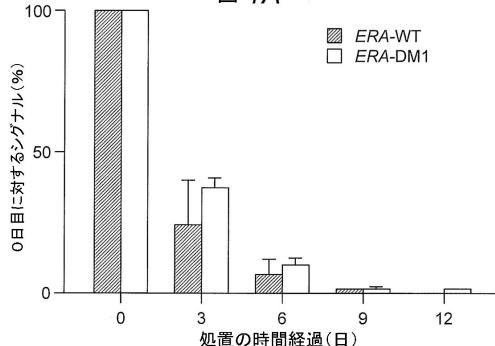
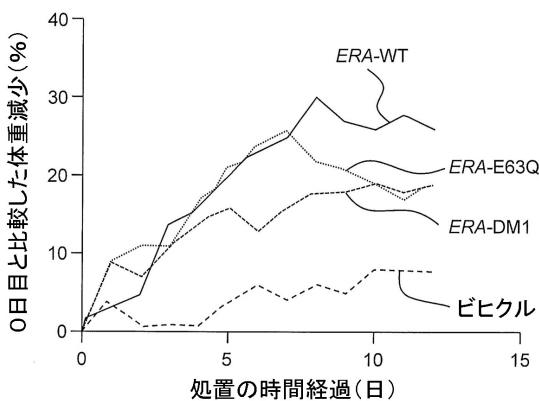


図 1B

【 図 2 】



四

( 义 3 )

3  
四

( 4 )

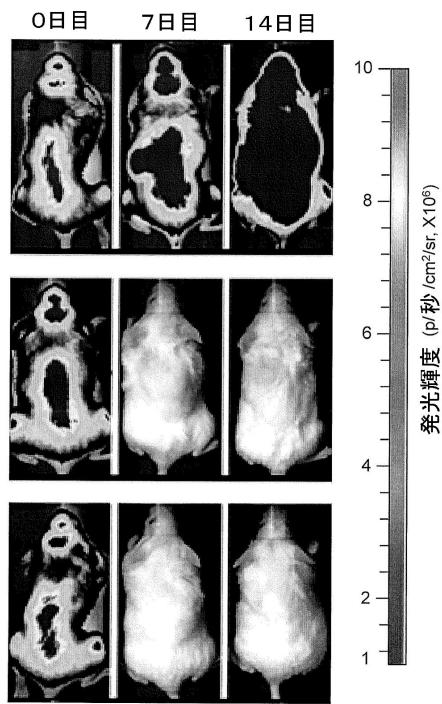


図 4

【図 5】

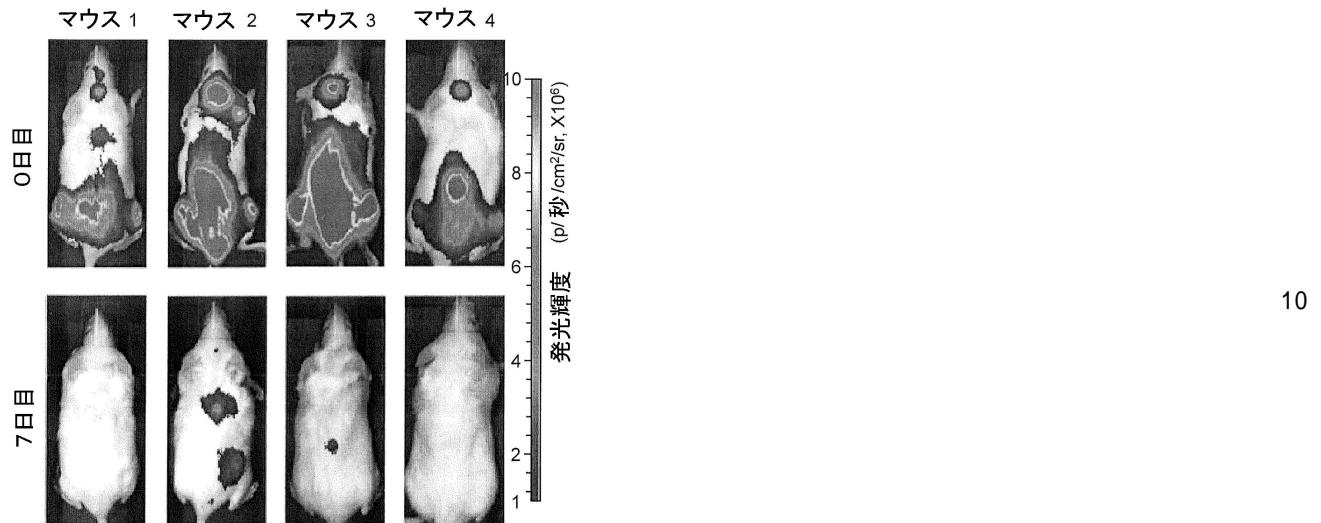


図 5

20

## 【配列表】

0007091248000001.app

30

40

50

## フロントページの続き

## (51)国際特許分類

	F I		
C 1 2 N	5/10 (2006.01)	C 1 2 N	5/10
C 0 7 K	19/00 (2006.01)	C 0 7 K	19/00
C 1 2 N	15/62 (2006.01)	C 1 2 N	15/62
C 1 2 N	15/55 (2006.01)	C 1 2 N	15/55
A 6 1 K	38/48 (2006.01)	A 6 1 K	38/48
A 6 1 P	35/02 (2006.01)	A 6 1 P	35/02
A 6 1 K	35/741 (2015.01)	A 6 1 K	35/741
A 6 1 P	43/00 (2006.01)	A 6 1 P	43/00 105
A 6 1 K	47/60 (2017.01)	A 6 1 K	47/60
C 0 7 K	14/00 (2006.01)	C 0 7 K	14/00
C 0 7 K	14/525 (2006.01)	C 0 7 K	14/525

## (33)優先権主張国・地域又は機関

米国(US)

(31)優先権主張番号 62/347,376

(32)優先日 平成28年6月8日(2016.6.8)

## (33)優先権主張国・地域又は機関

米国(US)

## 前置審査

0 4 2 0 、ワシントン、ノースウェスト バーモント アベニュー 8 1 0  
 8 1 0 V e r m o n t A v e n u e N W , W a s h i n g t o n , D i s t r i c t o f  
 C o l u m b i a 2 0 4 2 0 , U . S . A .

(74)代理人 100102842

弁理士 葛和 清司

(72)発明者 ラヴィエ, アーノン

アメリカ合衆国 イリノイ州 6 0 6 0 7 、シカゴ、サウス ラフリン ストリート 6 1 2 、ユニット ディー

(72)発明者 グエン, ヒエン - アイン

アメリカ合衆国 イリノイ州 6 0 6 0 7 、シカゴ、サウス ラフリン ストリート 9 2 9

審査官 太田 雄三

(56)参考文献 特表 2 0 1 1 - 5 2 8 7 0 6 ( J P , A )

Nguyen, H. et al. , Structural Insight into Substrate Selectivity of Erwinia chrysanthemi L-Asparaginase , Biochemistry , 2016年02月08日 , Vol. 55 , p. 1246-1253

Kouno, M., et al. , Targeted Delivery of Tumor Necrosis Factor-Related Apoptosis-Inducing Ligand to Keratinocytes with a Pemphigus mAb , Journal of Investigative Dermatology , 2013年 , Vol. 133 , p. 2212-2220

(58)調査した分野 (Int.Cl. , D B 名)

C 1 2 N 1 5 / 0 0

C 1 2 N 5 / 0 0

J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 ( J D r e a m I I I )

C a p l u s / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S ( S T N )

G e n B a n k / E M B L / D D B J / G e n e S e q