



공개특허 10-2020-0122298



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2020-0122298
(43) 공개일자 2020년10월27일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 38/50 (2006.01) *A61K 38/51* (2006.01)
A61K 9/00 (2006.01) *A61P 3/00* (2006.01)
C12N 15/52 (2006.01) *C12N 9/78* (2006.01)

(52) CPC특허분류
A61K 38/50 (2013.01)
A61K 38/51 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2020-7019283

(22) 출원일자(국제) 2018년12월05일
심사청구일자 없음

(85) 번역문제출일자 2020년07월03일

(86) 국제출원번호 PCT/US2018/063982

(87) 국제공개번호 WO 2019/113157

국제공개일자 2019년06월13일

(30) 우선권주장

62/745,000 2018년10월12일 미국(US)

(뒷면에 계속)

(71) 출원인
에어레이즈, 임크.
미국 78746 텍사스주 오스틴 스위트 250 바턴 오
크스 플라자 원 에스. 모팩 익스프레스웨이 901

(72) 발명자
로울린슨, 스캇 더블유.
미국 78746 텍사스주 오스틴 그레이 폭스 트레이
700

퀸, 안토니 지.
미국 01930 매사추세츠주 글로스터 포트 힐 에비
뉴 21

(74) 대리인
최은선

전체 청구항 수 : 총 50 항

(54) 발명의 명칭 아르기나제 1 결핍을 치료하기 위한 방법 및 조성물

(57) 요 약

아르기나제 1(ARG1) 결핍(ARG1-D)이 있는 대상체를 치료하고, 대상체의 아르기닌 및/또는 구아니디노 화합물 중 적어도 하나의 수준을 신속히 감소시키는 방법 및 조성물.

(52) CPC특허분류

A61K 9/0019 (2013.01)
A61P 3/00 (2018.01)
C12N 15/52 (2013.01)
C12N 9/78 (2013.01)
C12Y 305/03001 (2013.01)

(30) 우선권주장

62/725,612 2018년08월31일 미국(US)
62/594,747 2017년12월05일 미국(US)

명세서

청구범위

청구항 1

대상체의 아르기나제 1(ARG1) 결핍(ARG1-D)을 치료하는 방법으로, 상기 대상체의 아르기닌 혈장 수준을, 아르기나제의 초기 투여 후 약 2일 내지 약 4일 이내에 $200 \mu\text{mol}/\text{L}$ 미만으로 감소시키기에 충분한 양으로 상기 대상체에게 상기 아르기나제를 투여하는 단계를 포함하는 방법.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 대상체의 아르기닌 혈장 수준은, 상기 아르기나제의 초기 투여 이후 $40 \mu\text{mol}/\text{L}$ 내지 $115 \mu\text{mol}/\text{L}$ 의 범위 내로 감소되는, 방법.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 아르기나제는 폐질화된 아르기나제 1인, 방법.

청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 아르기나제는 망간 금속 보조 인자 대신 코발트 금속 보조 인자를 갖는, 방법.

청구항 5

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 아르기나제는 폐질아르기나제인, 방법.

청구항 6

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, N- α -아세틸아르기닌 (NAAArg), 아르기닌 산 (ArgA), α -케토- δ -구아니디노발레르 산 (GVA), 구아니디노아세트 산 (GAA), 및 아르기닌으로 이루어진 군으로부터 선택된 적어도 하나의 화합물의 혈장 수준이, 상기 아르기나제의 초기 투여 이후 7일 이내에 상기 대상체에게서 적어도 1회 정상 수준으로 감소되는, 방법.

청구항 7

제6항에 있어서, ArgA, NAAArg, GVA, GAA, 및 아르기닌으로 이루어진 군으로부터 선택된 적어도 하나의 화합물의 혈장 수준이, 상기 아르기나제의 초기 투여 이후 3일 이내에 상기 대상체에게서 적어도 1회 정상 수준으로 감소되는, 방법.

청구항 8

제6항에 있어서, ArgA, NAAArg, GVA, GAA, 및 아르기닌으로 이루어진 군으로부터 선택된 적어도 하나의 화합물의 혈장 수준이, 상기 아르기나제의 초기 투여 이후 2일 이내에 상기 대상체에게서 적어도 1회 정상 수준으로 감소되는, 방법.

청구항 9

제6항에 있어서, ArgA, NAAArg, GVA, GAA, 및 아르기닌으로 이루어진 군으로부터 선택된 적어도 하나의 화합물의 혈장 수준이, 상기 아르기나제의 초기 투여 이후 1일 이내에 상기 대상체에게서 적어도 1회 정상 수준으로 감소되는, 방법.

청구항 10

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 대상체의 아르기닌 혈장 수준을 감소시키기에 충분한 양이, 휴식 경직, 경직과 관련된 다리 경련, 적응 행동, 및 환자 보고 결과 측정 정보 시스템(PROMIS)의 신체 기능 점수로 이루어진 군으로부터 선택된 특성을 향상시키는 방법.

청구항 11

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 대상체의 구아니디노아세트 산(GAA)의 혈장 수준이 정상 수준에 도달하는, 방법.

청구항 12

제1항 내지 제11항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 아르기나제는 정맥내 또는 피하로 상기 대상체에게 투여되는, 방법.

청구항 13

제1항 내지 제12항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 아르기나제는 약 0.005 내지 약 1.00 mg/kg(대상체 체중)의 투여량으로 상기 대상체에게 정맥내 투여되는, 방법.

청구항 14

제13항에 있어서, 상기 아르기나제는 약 0.005 내지 약 0.50 mg/kg(대상체 체중)의 투여량으로 상기 대상체에게 정맥내 투여되는, 방법.

청구항 15

제14항에 있어서, 상기 아르기나제는 약 0.005 내지 약 0.20 mg/kg(대상체 체중)의 투여량으로 상기 대상체에게 정맥내 투여되는, 방법.

청구항 16

제1항 내지 제11항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 아르기나제는 약 0.01 내지 약 1.50 mg/kg(대상체 체중)의 투여량으로 상기 대상체에게 피하 투여되는, 방법.

청구항 17

제16항에 있어서, 상기 아르기나제는 약 0.015 내지 약 0.75 mg/kg(대상체 체중)의 투여량으로 상기 대상체에게 피하 투여되는, 방법.

청구항 18

제17항에 있어서, 상기 아르기나제는 약 0.015 내지 약 0.30 mg/kg(대상체 체중)의 투여량으로 상기 대상체에게 피하 투여되는, 방법.

청구항 19

제1항 내지 제11항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 대상체의 ArgA, NAAArg, GVA, GAA 및 아르기닌으로 이루어진 군으로부터 선택된 적어도 하나의 화합물의 혈장 수준의 적어도 2배 정도를 감소시키기에 충분한 투여량으로 상기 대상체에게 아르기나제를 투여하되, 상기 혈장 수준은 투여 후 약 24 내지 48 시간에 분석되는, 방법.

청구항 20

제19항에 있어서, 상기 투여된 투여량이 NAAArg의 혈장 수준을 적어도 3배 감소시키는, 방법.

청구항 21

제19항에 있어서, 상기 투여된 투여량이 GAA 혈장 수준을 적어도 2배 감소시키는, 방법.

청구항 22

제1항 내지 제21항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 아르기나제는 상기 대상체에게 매일, 매주, 격월, 또는 매월 투여되는, 방법.

청구항 23

제1항 내지 제22항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 대상체에게 질소 제거제를 투여하는 단계를 포함하는 방법.

청구항 24

제1항에 있어서, 상기 아르기나제는, 상기 대상체에게 전달하기 위해 아데노바이러스 벡터에 작동 가능하게 결합된 핵산으로서 투여되고, 상기 대상체에게 투여시 상기 대상체에게서 아르기나제를 생성하는, 방법.

청구항 25

아르기닌, N- α -아세틸 아르기닌(NAArg), 아르기닌 산(ArgA), α -케토- δ -구아니디노발레르 산(GVA), 구아니디노아세트 산(GAA)으로 이루어진 군으로부터 선택된 적어도 하나의 화합물의 혈장 수준을, 아르기나제 1(ARG1) 결핍을 갖는 대상체에게서 정상 수준으로, 빠르게 감소시키는 방법으로서, 치료 유효량의 폐길화된 아르기나제를 포함하는 조성물을 상기 대상체에게 투여하는 단계를 포함하되, 상기 폐길화된 아르기나제는 초기에 0.005 mg/kg 내지 1.00 mg/kg의 투여량으로 정맥내 투여되고, 이후 매주 상기 대상체에게 피하 또는 정맥내 투여되는, 방법.

청구항 26

제25항에 있어서, 상기 폐길화된 아르기나제는 초기에 0.005 mg/kg 내지 0.50 mg/kg의 투여량으로 정맥내 투여되고, 이후 매주 상기 대상체에게 피하 또는 정맥내 투여되는, 방법.

청구항 27

제26항에 있어서, 상기 폐길화된 아르기나제는 초기에 0.005 mg/kg 내지 0.20 mg/kg의 투여량으로 정맥내 투여되고, 이후 매주 상기 대상체에게 피하 또는 정맥내 투여되는, 방법.

청구항 28

제25항 내지 제27항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 폐길화된 아르기나제는 페질아르기나제인, 방법.

청구항 29

제25항 내지 제28항 중 어느 한 항에 있어서, ArgA, NAArg, GVA, GAA, 및 아르기닌으로 이루어진 군으로부터 선택된 적어도 하나의 화합물의 혈장 수준이, 상기 폐길화된 아르기나제의 초기 투여 이후 3일 이내에 상기 대상체에게서 정상 수준으로 감소되는, 방법.

청구항 30

제25항 내지 제28항 중 어느 한 항에 있어서, ArgA, NAArg, GVA, GAA, 및 아르기닌으로 이루어진 군으로부터 선택된 적어도 하나의 화합물의 혈장 수준이, 상기 폐길화된 아르기나제의 초기 투여 이후 2일 이내에 상기 대상체에게서 정상 수준으로 감소되는, 방법.

청구항 31

제25항 내지 제28항 중 어느 한 항에 있어서, ArgA, NAArg, GVA, GAA, 및 아르기닌 중 적어도 하나의 혈장 수준이, 상기 폐길화된 아르기나제의 초기 투여 이후 1일 이내에 상기 대상체에게서 정상 수준으로 감소되는, 방법.

청구항 32

제25항 내지 제28항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 대상체에게 투여된, 폐길화된 아르기나제의 투여량이 ArgA, NAArg, GVA, GAA, 또는 아르기닌으로부터 선택된 군으로부터 적어도 하나의 화합물의 혈장 수준의 적어도 2배 정도를 감소시키기에 충분하되, 상기 혈장 수준은 상기 폐길화된 아르기나제의 투여 후 약 24 내지 48 시간에 분석되는, 방법.

청구항 33

아르기닌, N- α -아세틸 아르기닌(NAArg), 아르기닌 산(ArgA), α -케토- δ -구아니디노발레르 산(GVA), 구아니디노아세트 산(GAA)으로 이루어진 군으로부터 선택된 적어도 하나의 화합물의 혈장 수준을, 아르기나제 1(ARG1) 결핍을 갖는 대상체에게서 정상 수준으로 빠르게 감소시키는 방법으로서, 치료 유효량의 폐길화된 아르기나제를

포함하는 조성물을 상기 대상체에게 투여하는 단계를 포함하되, 상기 폐길화된 아르기나제는 초기에 0.01 mg/kg 내지 1.50 mg/kg으로 피하로 투여되고, 이후 매주 피하 또는 정맥내 투여되는, 방법.

청구항 34

제33항에 있어서, 상기 폐길화된 아르기나제는 초기에 0.015 mg/kg 내지 0.75 mg/kg으로 피하 투여되고, 이후 매주 피하 또는 정맥내 투여되는, 방법.

청구항 35

제34항에 있어서, 상기 폐길화된 아르기나제는 초기에 0.015 mg/kg 내지 0.30 mg/kg으로 피하 투여되고, 이후 매주 피하 또는 정맥내 투여되는, 방법.

청구항 36

제33항 내지 제35항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 폐길화된 아르기나제는 펩질아르기나제인, 방법.

청구항 37

제33항 내지 제36항에 있어서, ArgA, NAAArg, GVA, GAA, 및 아르기닌으로 이루어진 군으로부터 선택된 적어도 하나의 화합물의 혈장 수준이, 상기 폐길화된 아르기나제의 초기 투여 이후 3일 이내에 상기 대상체에게서 정상 수준으로 감소되는, 방법.

청구항 38

제33항 내지 제36항 중 어느 한 항에 있어서, ArgA, NAAArg, GVA, GAA, 및 아르기닌으로 이루어진 군으로부터 선택된 적어도 하나의 화합물의 혈장 수준이, 상기 폐길화된 아르기나제의 초기 투여 이후 2일 이내에 상기 대상체에게서 정상 수준으로 감소되는, 방법.

청구항 39

제33항 내지 제36항 중 어느 한 항에 있어서, ArgA, NAAArg, GVA, GAA, 및 아르기닌으로 이루어진 군으로부터 선택된 적어도 하나의 화합물의 혈장 수준이, 상기 폐길화된 아르기나제의 초기 투여 이후 1일 이내에 상기 대상체에게서 정상 수준으로 감소되는, 방법.

청구항 40

제33항 내지 제36항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 대상체에게 투여된 상기 폐길화된 아르기나제의 투여량이 ArgA, NAAArg, GVA, GAA, 또는 아르기닌으로부터 선택된 군으로부터 적어도 하나의 화합물의 혈장 수준의 적어도 2배 정도를 감소시키기에 충분하되, 상기 혈장 수준은 상기 폐길화된 아르기나제의 투여 후 약 24 내지 48 시간에 분석되는, 방법.

청구항 41

제22항에 있어서, 상기 아르기닌 혈장 수준을 200 $\mu\text{mol/L}$ 미만으로 감소시키는 상기 아르기나제의 양을 적어도 하나의 반복 용량으로 상기 대상체에게 투여하는, 방법.

청구항 42

제41항에 있어서, 상기 아르기닌 혈장 수준이 적어도 30주 동안 200 $\mu\text{mol/L}$ 미만으로 감소되는, 방법.

청구항 43

제42항에 있어서, 상기 아르기닌 혈장 수준이 적어도 40주 동안 200 $\mu\text{mol/L}$ 미만으로 감소되는, 방법.

청구항 44

제43항에 있어서, 상기 적어도 하나의 반복 용량으로 8회를 투여받은 이후, 상기 대상체는, (a) 이동성 또는 (b) 적응 행동 중 적어도 하나의 개선을, 치료 전 상기 대상자의 상기 이동성 또는 적응 행동에 대한 기준선에 비해 나타내는, 방법.

청구항 45

제22항에 있어서, NAAArg, ArgA, GVA, GAA, 및 아르기닌으로 이루어진 군으로부터 선택된 적어도 하나의 화합물의 혈장 수준이, 상기 대상체의 기준선 혈장 수준과 비교시 감소되는, 방법.

청구항 46

제25항 내지 제41항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 대상체가 치료 9일 이후에 1 이상의 최소 임상 중요도 차이 (MCID)를 갖는, 방법.

청구항 47

제46항에 있어서, 상기 아르기닌 혈장 수준은 상기 MCID와 상관 관계가 있는, 방법.

청구항 48

펩질아르기나제 및 제약상 허용 가능한 완충액을 포함한 조성물.

청구항 49

제48항에 있어서, 약 10%의 글리세롤을 추가로 포함하되, 상기 제약상 허용 가능한 완충액은 인산 완충 식염수인 방법.

청구항 50

제49항에 있어서, 상기 펩질아르기나제는 적혈구 유령 세포에서 제형화되는, 방법.

발명의 설명**기술 분야**

[0001]

관련 출원에 대한 상호 참조

[0002]

본 출원은 2017년 12월 5일 출원된 미국 가출원 번호 제62/594,747호, 2018년 8월 31일 출원된 미국 가출원 번호 제62/725,612호, 2018년 10월 12일 출원된 미국 가출원 번호 제62/745,000호의 우선권을 주장하며, 전체 내용은 본원에 참조로 포함된다.

[0003]

서열 목록에 대한 참조

[0004]

본 출원과 연관된 서열 목록은 EFS-Web을 통해 전자 파일 포맷으로 출원되고, 본원에 그 전체가 명세서에 참조로 포함된다. 서열 목록을 포함한 텍스트 파일의 이름은 218107-0011-00-W0_ST25이다. 텍스트 파일의 크기는 6,247 바이트이고, 2018년 12월 4일 생성되었다.

배경 기술

[0005]

환자의 아르기나제 1 결핍을 치료하기 위한 방법 및 환자의 아르기나제 1 결핍(ARG1-D)을 치료하기 위한 조성물을 개시한다.

[0006]

아르기나제 1 결핍(또한 파아르기닌혈증 또는 아르기닌혈증으로 알려짐)은, 예를 들어 아르기나제 1(ARG1) 유전자의 돌연변이로 인해 아르기나제 1 단백질의 결핍 또는 활성 손실에 의해 유발된다. ARG1은 요소 회로 효소로, 아르기닌을 오르니틴으로 전환시킨다. ARG1-D은 희귀 진행성 병이다. 매 300,000 내지 1,000,000명마다 1명에게 일어나는 것으로 추정되고 있다. ARG1-D은 요소 회로 상염색체 열성 질환으로, 아르기닌과 기타 구아니디노 화합물(GC)의 독성 물질 축적을 생성한다. ARG1-D의 임상 특징은 전형적으로 초기 아동에게 발현하나 영향 받은 일부 유아에게서 태어난 후 바로 발생할 수 있다. 질병 증상은 경직, 발달 지연, 발작, 단백질 회피, 간헐적 고암모니아혈증, 구역 및 구토를 포함한다. 질병이 진행 중인 청소년기의 환자는 이동성을 잃거나, 말할 수 없거나 이해할 수 없고, 영양 실조와 비타민 D 결핍으로 고통 받을 수 있다. 상기 질병의 진행과 이와 연관된 증상은, 높은 트랜스아미나제 및 간 섬유화에 의해 증명된 바와 같이 간 손상, 심한 경직 및 근육 수축, 정신 지체 및 제한된 수명을 포함한다. 불행히, 식이 제한과 질소 제거제는, 아르기닌과 기타 구아니디노 화합물의 만성적이고 현저한 상승과 간헐적인 고암모니아혈증으로 인해, 질병 진행을 막기에 불충분했다.

[0007] ARG1-D 환자에게 저 단백질 식이 요법을 제공하는 경우, 아르기닌 수준은 265~300 $\mu\text{mol/L}$ 로 감소되었다 (Schlune *et al.*, "Hyperargininemia due to arginase 1 deficiency: the original patients and their natural history, and a review of the literature," *Amino Acids* 47:1751-1762, 2015). 식이 요법 단백질 섭취에 의해 영향을 받는 신규 아르기닌 합성이 혈장 아르기닌 합성의 약 5 내지 15%를 설명하고, 아르기닌의 주 공급원은 신체 조직 회전률이다 (Wu, G. *et al.*, "Arginine metabolism: nitric oxide and beyond," *Biochem J*, 336 (Pt 1), 1-17, 1998). 따라서, 식이 요법 단백질 제한이 혈장 아르기닌 수준에 미치는 영향이 제한되고, 과량의 아르기닌을 분해할 수 없기 때문에 대상체의 아르기닌 순환 수준은 높게 유지된다.

[0008] ARG1-D 동물 모델에서 대부분의 요법에 대한 비임상 연구는, 혈장 아르기닌 수준이 감소하더라도 질병 결과에 대해 실질적인 영향을 미치는 것을 보여주지 않았다. 이를 접근법의 대부분이 질병의 근본 원인을 해결하지 못하고, 즉 ARG1의 세포질 결핍을 간에서 바로 잡을 수 없기에, 미국 식품 의약국(FDA)은, 혈장 아르기나제 수준의 향상이, 질병 발병 기전에 기여할 수 있는 아르기닌-유도 구아니디노 화합물의 감소를 포함하여 세포내 ARG1 활성을 교정하는 것과 동일한 총 효과를 가질 수 있는지 여부에 의문을 제기했다. 식이 요법의 아르기닌 제한이 혈장 아르기닌 수준을 감소시킬 수 있다는 문헌적 증거가 있지만, 질병 발현에 대한 식이 요법 접근의 유익한 영향은 제한되며, 이는 생리학적 정상 범위뿐만 아니라 의학적 지침선 모두 그 이상으로 혈장 아르기닌 수준이 만성적이고 현저하게 상승하기 때문이다. 이것은 식이 요법 치료와 혈장 아르기닌 감소에도 불구하고 11명의 환자 중 4명이 경직이 진행되었음을 기술한 그룹에 의해 뒷받침되었다 (Prasad *et al.*, "Argininemia: a treatable genetic cause of progressive spastic diplegia simulating cerebral palsy - case reports and literature review" *J. Child Neurol.* 12:301-309, 1997). 이 이론적 근거와 마찬가지로, 다른 그룹은 높은 수준의 아르기닌 대사 물질, 예컨대 아르기닌 산, 구아니디노아세트 산, 베타-구아니디노프로피온 산, 베타-구아니디노부티르 산 및 N- α -아세틸아르기닌이 ARG1 결핍 환자의 신경학적 후유증의 원인에 중요할 수 있음을 제시했다 (Deignan *et al.*, "Increased plasma and tissue guanidine compounds in a mouse model of hyperargininemia," *Mol. Genet. Metab.* 93: 172-178, 2008; Segawa *et al.*, "A long-term survival case of arginase deficiency with severe multicystic white matter and compound mutations," *Brain Dev.* 33: 45-48, 2011; Wyse *et al.*, "In vitro stimulation of oxidative stress in cerebral cortex of rats by the guanidino compounds accumulating in hyperargininemia," *Brain Res.* 2001, 923(1-2): 50-7). ARG1-D에서 구아니디노 화합물의 잠재적 중요성을 고려하여, 이를 잠재적인 신경 독성 대사 물질을 감소시키는 저 아르기닌 식이 요법의 능력을 조사하였다 (Lambert *et al.*, "Hyperargininemia: intellectual and motor improvement related to changes in biochemical data," *J. Pediatr.*, 1991, 118(3): 420-4). Lambert 등은, 저 아르기닌 식이 요법이, 염격한 식이 요법 조절 후 약 1 개월 이내에 혈액 아르기닌 수준을 감소시킬 수 있었고, 구아니디노아세테이트 및 α -케토- δ -구아니디노발레르 산 (GVA)의 수준은 변하지 않았음을 나타낼 수 있었고, 이는 식이 요법이 치료적 개입으로서 GC 수준을 빠르게 제어할 가능성이 없음을 나타낸다. 장애 및 복잡한 기저 메커니즘을 고려할 때, 이렇게 미충족된 의학적 요구를 해결하기 위해, 환자에게서 높은 수준의 아르기닌을 신속하게 감소시키고 제어하기 위한 새로운 치료법이 요구된다.

발명의 내용

[0009] 본원에 새로 개시된 것은 ARG1-D 환자를 치료하기 위한 방법, 화합물, 및 조성물로, 이는 환자에게서 신속한 반응을 바람직하게 얻으며, 여기서 환자는 인간이고 성인, 소아 또는 유아일 수 있다.

[0010] 대상체의 아르기나제 1(ARG1) 결핍(ARG1-D)을 치료하는 방법이 제공되며, 아르기나제의 초기 투여 후 약 2일 내지 약 4일 이내에 상기 대상체의 아르기닌의 혈장 수준을 200 $\mu\text{mol/L}$ 미만으로 감소시키기에 충분한 양으로 상기 대상체에게 아르기나제를 투여하는 단계를 포함한다. 상기 대상체의 아르기닌 혈장 수준은, 아르기나제의 초기 투여 이후 40 $\mu\text{mol/L}$ 내지 115 $\mu\text{mol/L}$ 의 범위 내로 감소될 수 있다. 상기 대상체는 ARG1-D를 갖는 성인, 소아 또는 유아(예, 12개월 미만)일 수 있다.

[0011] 상기 아르기나제는 야생형 아르기나제 I(예, 서열 식별 번호: 2) 또는 아르기나제 II(예, 서열 식별 번호: 1)일 수 있다. 상기 아르기나제는 폐질화된 아르기나제 1일 수 있고, 망간 금속 보조 인자 대신에 코발트 금속 보조 인자를 가질 수 있다. 상기 폐질화된 아르기나제 1은 광활아르기나제일 수 있다.

[0012] 개시된 치료 방법은 투여를 추가로 수반할 수 있고, 여기서 N- α -아세틸아르기닌 (NAArg), 아르기닌 산 (ArgA), GVA, 구아니디노아세트 산 (GAA) 및 아르기닌 중 적어도 하나의 혈장 수준은 초기 투여 이후 7일, 3일, 2일 및/ 또는 1일 이내에 대상체에게서 적어도 한 번 정상 수준으로 감소된다. 아르기나제를 사용한 치료 방법은, 투여 후 GAA의 혈장 수준이 정상 수준에 도달하도록 할 수 있다. 방법은, 상기 대상체의 아르기닌 혈장 수준 감소에

충분한 양이, 하나 이상의 특성, 예컨대 휴식 경직, 경직과 관련된 다리 경련, 적응 행동, 및 환자 보고 결과 측정 정보 시스템(PROMIS)의 신체 기능 점수를 향상시키도록 할 수 있다.

[0013] 치료 방법은, 약 0.005 내지 약 1.00 mg/kg(환자 체중)의 정맥내 투여량을 투여하는 것을 고려한다. 정맥내 투여에 대한 기타 범위 및 사용은, 0.01 내지 0.5 mg/kg, 0.01 내지 0.2 mg/kg, 0.015 내지 0.25 mg/kg, 및 0.015 내지 0.075 mg/kg을 포함할 수 있고, 상기 범위 내에서 0.005씩 증분되는 것 또한 고려된다.

[0014] 치료 방법은, 약 0.01 내지 약 1.50 mg/kg(환자 체중)의 피하 투여량을 투여하는 것을 고려한다. 정맥내 투여에 대한 기타 범위 및 사용은, 0.015 내지 0.75 mg/kg, 0.015 내지 0.30 mg/kg, 0.015 내지 0.25 mg/kg, 및 0.015 내지 0.075 mg/kg을 포함할 수 있고, 상기 범위 내에서 0.005씩 증분되는 것 또한 고려된다.

[0015] 다른 방법은, 상기 대상체의 ArgA, NAAArg, GVA, GAA 및 아르기닌으로 이루어진 군으로부터 선택된 적어도 하나의 화합물의 혈장 수준의 적어도 2배 정도를 감소시키기에 충분한 투여량으로 상기 대상체에게 아르기나제를 투여하는 것을 고려하되, 상기 혈장 수준은 투여 후 약 24 내지 48 시간에 분석된다. 다른 방법은 투여된 투여량이 NAAArg의 혈장 수준을 적어도 3배 감소시키는 것을 고려한다. 다른 방법은 투여된 투여량이 GAA 혈장 수준을 적어도 2배 감소시키는 것을 고려한다. 개시된 치료 방법의 아르기나제는 정맥내 또는 피하로 또는 이들의 조합으로 상기 환자에게 투여될 수 있다. 상기 아르기나제는 상기 대상체에게 매일, 매주, 격월 또는 매월 투여될 수 있다.

[0016] 질소 제거제 역시 상기 대상체에게 투여될 수 있다. 아르기나제를 갖는 개시 조성물은 질소 제거제를 포함할 수 있다. 아르기나제를 사용하는 상기 개시된 치료 방법은, 대상체에게 질소 제거제와 함께 투여될 수 있고, 선택적으로 상기 대상체는 저 아르기닌 식이 요법을 추가로 할 수 있다. 아르기나제로 상기 대상체를 치료하는 다른 방법은, 상기 대상체에게 전달하기 위해 아데노바이러스 벡터에 작동 가능하게 결합된 핵산을 투여하는 단계를 포함하고, 상기 아르기나제는 상기 대상체 투여시 상기 대상체 내에 아르기나제를 생성한다. 아데노바이러스 벡터 전달에 의해 생성된 아르기나제의 양은, 상기 대상체의 ArgA, NAAArg, GVA, GAA 및 아르기닌으로 이루어진 군으로부터 선택된 적어도 하나의 화합물의 혈장 수준의 적어도 2배 정도를 감소시키기에 치료 효과가 있을 수 있되, 상기 혈장 수준은 상기 아르기나제의 투여 후 약 24 내지 48 시간에 분석된다.

[0017] 다른 방법은, 상기 아르기나제의 초기 투여 후 신경 운동 기능의 개선을 고려한다. 상기 신경 운동 기능은 제한 없이 스텝, 보행, 경직 및/또는 민첩성 중 하나 이상일 수 있다. 다른 방법은, 상기 대상체가 상기 아르기나제의 투여 전 경직, 행동, 및 PROMIS T-점수 중 적어도 하나와 비교하면, 상기 아르기나제의 투여 후 휴식 경직이 덜하고, 경직과 관련된 다리 경련이 적고, 적응 행동, 및 개선된 PROMIS T-점수 중 적어도 하나를 나타내는 것을 고려한다. 본 방법은, 하나 이상의 독성 대사 물질(예, GAA)이 정상 수준으로 감소되거나 제거되도록 상기 아르기나제로 치료되는 것에 대한 급성 반응을 고려한다.

[0018] 상기 방법은, 대상체에게 아르기닌의 혈장 수준을 200 $\mu\text{mol/L}$ 미만으로 감소시키는 아르기나제의 양을 적어도 하나의 반복 용량으로 투여하는 것을 고려한다. 아르기닌의 혈장 수준은 적어도 30주 및/또는 적어도 40주 동안 200 $\mu\text{mol/L}$ 미만의 수준으로 감소될 수 있다. 적어도 하나의 반복 용량으로 8회 투여받은 후, 대상체는 다음 중 적어도 하나의 개선을 보일 수 있다: (a) 이동성 또는 (b) 적응 행동, 치료 전 대상체에 대한 상기 이동성 또는 적응 행동에 대한 기준선과 비교됨. NAAArg, ArgA, GVA, GAA, 또는 아르기닌 중 적어도 하나의 혈장 수준은 대상체의 기준선 혈장 수준에 비해 감소될 수 있다. 다른 방법은, 대상체가, 치료 9일차 이후, 1 이상의 최소 임상 중요도 차이(MCID)를 갖는 것을 고려한다. 상기 아르기닌 혈장 수준은 상기 MCID와 상관 관계가 있다.

[0019] 페질아르기나제 및 제약상 허용 가능한 완충액을 포함한 조성물을 또한 고려한다. 상기 조성물은 약 10% 글리세롤을 포함할 수 있고, 상기 제약상 허용 가능한 완충액은 원하는 양의 페질아르기나제 또는 다른 아르기나제 이외에 인산 완충된 식염수일 수 있다. ARG1-D의 치료를 위한 의약품의 제조에서, 아르기나제(예, 페질아르기나제) 또는 아르기나제를 코딩하는 핵산을 포함하는, 조성물의 사용이 제공된다.

[0020] 적혈구 유령 세포에서 제형화된 페질아르기나제와 같은 아르기나제도 또한 고려된다.

[0021] 아르기닌, N- α -아세틸 아르기닌(NAAArg), 아르기닌 산(ArgA), α -케토- δ -구아니디노발레르 산(GVA), 구아니디노아세트 산(GAA)으로 이루어진 군으로부터 선택된 적어도 하나의 화합물의 혈장 수준을, 아르기나제 1(ARG1) 결핍을 갖는 대상체에게서 정상 수준으로 빠르게 감소시키는 방법은, 치료 유효량의 페질화된 아르기나제를 포함한 조성물을 상기 대상체에게 투여하는 단계를 포함하되, 상기 페질화된 아르기나제는 초기에 0.005 mg/kg 내지 1.00 mg/kg으로 정맥내 투여되고, 이후 매주 상기 대상체에게 피하 또는 정맥내 투여된다. 다른 방법은, 페질화된 아르기나제가 초기에 0.005 mg/kg 내지 0.50 mg/kg으로 정맥내 투여되는 것을 고려한다. 다른 방법은,

폐길화된 아르기나제가 초기에 0.005 mg/kg 내지 0.20 mg/kg으로 정맥내 투여되는 것을 고려한다. 다른 방법은, 폐길화된 아르기나제가 페질아르기나제인 것을 고려한다. 다른 방법은, ArgA, NAAArg, GVA, GAA, 또는 아르기닌으로 이루어진 군으로부터 선택된 적어도 하나의 화합물의 혈장 수준이, 폐길화된 아르기나제의 초기 투여 이후 3일, 2일, 및/또는 1일 이내에 상기 대상체에게서 정상 수준으로 감소되는 것을 고려한다. 다른 방법은, 상기 대상체에게 투여된 폐길화된 아르기나제의 투여량이 ArgA, NAAArg, GVA, GAA, 또는 아르기닌으로부터 선택된 군으로부터 적어도 하나의 화합물의 혈장 수준의 적어도 2배 정도를 감소시키기에 충분한 것을 고려하되, 상기 혈장 수준은 폐길화된 아르기나제의 투여 후 약 24 내지 48 시간에 분석된다.

[0022]

아르기닌, N- α -아세틸 아르기닌(NAAArg), 아르기닌 산(ArgA), α -케토- δ -구아니디노발레르 산(GVA), 구아니디노아세트 산(GAA)으로 이루어진 군으로부터 선택된 적어도 하나의 화합물의 혈장 수준을, 아르기나제 1(ARG1) 결핍을 갖는 대상체에게서 정상 수준으로 빠르게 감소시키는 방법은, 치료 유효량의 폐길화된 아르기나제를 포함한 조성물을 상기 대상체에게 투여하는 단계를 포함하되, 상기 폐길화된 아르기나제는 초기에 0.01 mg/kg 내지 1.50 mg/kg으로 페하로 투여되고, 이후 매주 상기 대상체에게 페하 또는 정맥내 투여된다. 다른 방법은, 상기 폐길화된 아르기나제가 초기에 0.015 mg/kg 내지 0.75 mg/kg으로 페하로 투여되는 것을 고려한다. 다른 방법은, 상기 폐길화된 아르기나제가 초기에 0.015 mg/kg 내지 0.30 mg/kg으로 페하로 투여되는 것을 고려한다. 다른 방법은, ArgA, NAAArg, GVA, GAA, 또는 아르기닌으로 이루어진 군으로부터 선택된 적어도 하나의 화합물의 혈장 수준이, 상기 폐길화된 아르기나제의 초기 투여 이후 3일, 2일, 및/또는 1일 이내에 상기 대상체에게서 정상 수준으로 감소되는 것을 고려한다. 다른 방법은, 상기 대상체에게 투여된 상기 폐길화된 아르기나제의 투여량이 ArgA, NAAArg, GVA, GAA, 또는 아르기닌으로 이루어진 군으로부터 적어도 하나의 화합물의 혈장 수준의 적어도 2배 정도를 감소시키기에 충분한 것을 고려하되, 상기 혈장 수준은 상기 폐길화된 아르기나제의 투여 후 약 24 내지 48 시간에 분석된다.

도면의 간단한 설명

[0023]

도 1. 도 1a 아르기닌의 혈장 농도, 도 1b 아르기닌 산(ArgA)의 혈장 농도, 도 1c GVA의 혈장 농도, 및 도 1d N- α -아세틸아르기닌(NAAArg)의 혈장 농도. 아르기닌 수준은 검증된(우수 실험실 운영 기준, 즉 GLP) 분석을 사용하여 0.03 mg/kg 페질아르기나제로 치료된 두 명의 ARG1-D 환자로부터 얻은 값의 평균이다. 0.03 mg/kg 페질아르기나제로 치료된 동일한 두 명의 ARG1-D 환자로부터 풀링된 샘플을 사용하여 비 GLP 분석으로 ArgA, GVA 및 NAAArg 수준을 분석하였다. 인간의 정상 범위는 “*”로 표시된다. 인간 혈청에서 아르기닌의 정상 범위는 40 μ mol/L 내지 115 μ mol/L이다. 예를 들어, Luneburg, N. et al., “Reference intervals for plasma L-arginine and the L-arginine:asymmetric dimethylarginine ratio in the Framingham Offspring Cohort.” *J. Nutr.* 141(12): 2186-2190 (2011)를 참조하기 바란다. ArgA의 정상 범위는 0.025 μ mol/L 내지 0.100 μ mol/L이고, GVA의 정상 범위는 0.050 미만이고, NAAArg의 정상 범위는 0.025 μ mol/L 내지 0.255 μ mol/L이다. 예를 들어, Marescau et al., “Guanidino compound analysis as a complementary diagnostic parameter for hyperargininemia: Follow-up of guanidino compound levels during therapy,” *Pediatric. Res.* 27(3):297-303 (1990)를 참조하기 바란다.

도 2. 도 2a 아르기닌의 혈장 농도, 도 2b 호모-아르기닌(HArg)의 혈장 농도를 나타낸다. 아르기닌 수준은 검증된(GLP) 분석을 사용하여 0.03 mg/kg 페질아르기나제로 치료된 두 명의 ARG1-D 환자로부터 얻은 값의 평균이다. 0.03 mg/kg 페질아르기나제로 치료된 동일한 두 명의 ARG1-D 환자로부터 풀링된 샘플을 사용하여 비 GLP 분석으로 HArg 값을 얻었다. “*”는 인간 혈청에서의 정상 범위를 표시하고, 아르기닌의 경우 Luneburg, N. 등(2011) 또는 구아니디노 화합물의 경우 Marescau 등(1990)에 기술된 바와 같다. HArg의 정상 범위는 0.500 μ mol/L 내지 2.80 μ mol/L이다.

도 3. 도 3a 아르기닌의 혈장 농도, 도 3b 아르기닌 산(ArgA)의 혈장 농도, 도 3c GVA의 혈장 농도, 및 도 3d N- α -아세틸아르기닌(NAAArg)의 혈장 농도. 아르기닌 수준은 검증된(GLP) 분석을 사용하여 0.015 mg/kg (“●”) 및 0.03 mg/kg (“□”) 페질아르기나제로 치료된 두 명의 ARG1-D 환자로부터 얻은 값의 평균이다. 0.015 mg/kg과 0.03 mg/kg 페질아르기나제로 치료된 동일한 두 ARG1-D 환자로부터 풀링된 샘플을 사용하여 비 GLP 분석으로 ArgA, GVA 및 NAAArg 값을 얻었다. “*”는, 아르기닌의 경우 Luneburg, N. 등(2011) 또는 구아니디노 화합물의 경우 Marescau 등(1990)에 기술된 바와 같이 인간 혈청에서의 정상 범위를 표시한다.

도 4a 및 **4b**는 페질아르기나제로 치료하기 전(예, 선별시) 및 후에, 환자 120-101(도 4a)과 환자 120-102(도 4b) 두 명의 환자의 GAA에 대한 데이터를 나타낸다. 두 경우 모두에서, 데이터는 선별시, 그리고 파트 1과 파트 2로 투여 중의 GAA 수준을 나타낸다. “FUP”는 추적 검사를 표시한다. GAA의 정상 범위는 0.400 μ mol/L 내지

3.00 $\mu\text{mol/L}$ 이다. 예를 들어, Marescau 등(1990)을 참조하기 바란다.

도 5a. 아르기닌과 GC의 혈장 수준에 대한 아르기나제 치료의 효과를 임상 연구의 파트 1에 조사하였고, 이는 일회 투여를 사용한다(NAA는 NAAArg를 지칭함). **도 5b**는 아르기닌과 GC의 혈장 수준에 대한 아르기나제 치료의 효과를 임상 연구의 파트 2에 조사하였고, 이는 반복 투여를 포함한다. 파트 2에 나타낸 데이터는, 임상 프로토콜에 따라 8회 용량 모두가 투여된 환자를 포함한다. 도 5a 및 도 5b에 있어서, "a"는 환자 아르기닌 수준의 기준선을 표시하고, "b"는 투여후의 최하점을 표시하고, "c"는 투여후 7일 시점의 수준을 표시하고, "d"는 아르기닌의 투여전 수준을 표시하고, "e"는 모든 투여후를 표시하고, "f"는 건강한 환자의 아르기닌에 대한 혈장 수준의 정상 범위, Luneburg, N 등(2011)에 서술된 바와 같이 40 $\mu\text{mol/L}$ 내지 115 $\mu\text{mol/L}$ 를 표시하고, "n"은 환자 수를 표시한다. 투여후의 최하점은 파트 1 투여를 따르는 최저값이고, 파트 2에서 "모든 투여후"는 다음 투여 이전의 바로 그 값을 제외한 모든 투여후 값을 포함한다.

도 6. 세 명의 환자, 환자 1("a"), 환자 2("b"), 및 환자 5("c")에 대해 기준선에서, 투여 8에서, 투여 20에서, 및 투여 32에서의 6분 보행 테스트의 결과가 나타나 있다(투여 20 및 투여 32에서의 환자 5("c")의 데이터는 없음). 투여 8, 20, 및 32는 반복 투여의 시작점이다.

도 7. 이는 임상 제 1/2 상 시험과 연장된 개방 실험에 대한 개요를 제공한다.

도 8. 파트 2 및 연장된 개발 실험의 환자에 대해 페질아르기나제로 반복 투여함에 따른 혈장 아르기닌의 시간의존적 개선. "BL"은 기준선이고, "F/U"는 추석 검사이고, "OLE"는 연장된 개방 실험이고, "n"은 각각의 시점에서 환자의 수이다. 환자 혈장 내에서 200 $\mu\text{mol/L}$ 이하로 아르기닌을 유지하는 것이 바람직하다. 파트 2를 완료한 환자의 100%(5/5)가 권장 지침선 미만이고 감소된 아르기닌 수준을 일정하게 달성했다. 아르기닌 감소는 혈장 GC(GVA, ArgA, NAA, 및 GAA)의 지속적인 감소를 동반하였다.

도 9. 페질아르기나제의 치료는 겨우 8회만의 반복 투여 이후 기준선으로부터 임상 결과를 향상시켰다. 도 9의 각 점은 환자 1명에 대한 평가를 나타낸다. 우수 평가는 채워진 원 "●"으로 표시되는 반면, 중립 평가는 채워지지 않은 원 "○"으로 표시된다.

도 10은 환자의 MCID 향상에 기초하여, 페질아르기나제 치료에 반응한 환자(반응자)와 페질아르기나제 치료에 반응하지 않는 환자(미반응자)에 대해서 9주 기간에 걸친 아르기닌 농도를 나타낸다. 의료 지침선 이상의 혈장 아르기닌 범위는 200 $\mu\text{mol/L}$ 이상이고, 아르기닌에 대한 인간의 정상 범위는 Luneburg, N. 등(2011)에 의해 기술된 바와 같이 40 $\mu\text{mol/L}$ 내지 115 $\mu\text{mol/L}$ 이다. MCID는 아래에 기술된 바와 같이 결정된다. 반응자는 1 MCID를 초과하는 개인일 수 있고, 비반응자는 1 MCID 미만인 개인일 수 있다. 비반응자 데이터 포인트는 채워진 다이아몬드로 표시되고, 반응자 데이터 포인트는 채워지지 않은 다이아몬드로 표시된다. 비반응자 데이터 포인트의 평균은 "a" 선으로 표시되고, 반응자 데이터 포인트의 평균은 "b" 선으로 표시된다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0024] 아래 실시예에 개시된 연구의 승인을 구할 때, 미국 식품의약국(FDA)은, 식이 요법으로 아르기닌의 제한을 통해 혈장 아르기닌 수준을 저하시키는 것과 ARG1-D 환자에서의 질병의 객관적 개선 사이에 명확하고 일관된 관계를 과학 문헌이 뒷받침하지 않는다고 믿었다. 초기에, FDA는 ARG1-D 환자에서 페질아르기나제를 투여하여 바로 임상적 혜택을 기대할 수 없다고 주장했다. FDA는, ARG1-D 환자의 근본적인 효소 결함을 해결하기 위해 페질아르기나제 및 이와 같은 약물의 능력에 대해 우려하였다. FDA는, 약제를 함유한 아르기나제의 말초 순환이 간내 아르기닌 수준의 대사와 관련 아르기닌 대사 물질의 생성에 실질적으로 영향을 미치는지 여부를 질문했다. 결과적으로, FDA는 초기에 소아 환자에서 테스트를 계속하는 것을 허용하기 전에 성인 환자의 치료가 이루어질 때까지 소아 환자의 테스트를 지연시켰다.

[0025] 놀랍게도 발견한 것은, 아르기닌 및 구아니디노 화합물 중 적어도 하나(NAAArg)의 수준을 3일 이내에 정상 수준대로 신속하게 감소시키도록 ARG1 결핍 환자를 치료하는 방법이다(도 1).

정의

[0027] 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "치료하는", "치료하기 위한", 또는 "치료"는 ARG1-D와 관련된 기준 증상, 장애, 상태 또는 질병의 진행 또는 중증도의 억제, 둔화, 중지, 감소, 개선 또는 역전을 포함한다. 치료는 예방적으로 또는 치료적으로 적용될 수 있다.

[0028] 사용된 용어 "유효량"은, 원하는 효과, 예컨대 다음 중 하나 이상의 혈장 수준을 감소시키도록 투여될, 약생형

아르기나제 또는 폐길화된 아르기나제, 예컨대 페질아르기나제의 양을 지칭한다: 아르기닌, 아르기닌 산(ArgA), GVA, N- α -아세틸아르기닌(NAAArg), GAA, 및 호모아르기닌(HArg). 유효량은 환자의 체중과 같은 인자에 따라 달라질 수 있다. 예를 들어, 유효량은 폐길화된 아르기나제의 정맥내 투여에 대해 0.005 내지 1.00 mg/kg(환자 체중)의 범위일 수 있다(이들 범위 내에서 매 0.005씩 값을 포함함). ARG1-D 환자에게 폐길화된 아르기나제를 피하(s.c) 투여하기 위한 유효량은 0.01 내지 1.50 mg/kg(환자 체중)을 포함한다(이들 범위 내에서 매 0.01씩 값을 포함함). 일 실시예는, ARG1 결핍으로 고생하지 않는 정상적인 사람에게서 각 화합물의 정상 수준과 동등한 범위의 아르기닌, ArgA, GVA, GAA, 및/또는 NAAArg 범위를 달성하기 위해 화합물을 투여한다. 유효량은 또한 근력, 환자의 보행 능력(즉, 달리기, 보행, 자전거 타기, 지원 없이 계단을 오르는 능력)을 향상시키고 인지 능력(예, Wechsler Intelligence Scale for Children (WISC) testing improvement) 및/또는 적응 행동(예, 적응 행동 평가 척도(ABAS) 또는 바인랜드 적응 행동 척도(VABS) 테스트 향상)을 향상시킬 수 있다(Lopata *et al.*, "Comparison of Adaptive Behavior Measures for Children with HFASDs," *Autism Research and Treatment*, Vol. 2013, pp. 1-10, (2013)). 구아니디노 화합물의 정상 수준은 아래 표에 제공된다. 아르기닌의 정상 수준은 Luneburg, N. 등(2011)에 의해 기술된다.

[0029]

아르기닌 및/또는 구아니디노 화합물의 혈장 수준은 정상 범위 또는 정상 수준으로 감소될 수 있고, 이는 아르기나제의 초기 용량 및/또는 반복 용량의 투여 이후의 일부 시점에서, 아르기닌 및/또는 하나 이상의 구아니디노 화합물의 혈장 수준이 아래 표에 제공된 범위 내의 값 또는 Luneburg, N. 등(2011)에 의해 기술된 대로 아르기닌에 대해 40 μ mol/L 내지 115 μ mol/L를 가짐을 의미할 수 있다. 예를 들어, 아르기닌 및/또는 하나 이상의 구아니디노 화합물에 대한 환자의 혈장 수준은, 본원에 개시된 바와 같은 아르기나제로 치료하는 동안 정상 범위 내외로 진동할 수 있다. 이 환자는 정상 수준 또는 정상 범위로 감소된 아르기닌 및/또는 구아니디노 화합물의 분석된 혈장 수준을 갖는 것으로 간주된다. 다른 예로서, 본원에 개시된 아르기나제의 하나 이상의 투여량을 투여받은 후, 환자는 (예를 들어, Luneburg, N. 등(2011)에 의해 기술된 바와 같이 아르기닌에 대해 40~115 μ mol/L 또는 아래 표에 제공된 바와 같이) 정상 범위 내에 있는 아르기닌 및/또는 하나 이상의 구아니디노 화합물의 평균량의 혈장 수준을 가질 수 있다. 따라서, 본원에 개시된 조성물 및 방법은 아르기닌 및/또는 구아니디노 화합물의 대상체 혈장 수준을 아르기나제의 초기 투여량 및/또는 반복 투여량을 투여받은 후 적어도 1회 정상 수준 또는 정상 범위로 감소시킬 수 있다. 일부 환자에서, 아르기닌 및/또는 구아니디노 화합물의 혈장 수준은 본원에 개시된 방법에 따라 평균적으로 정상 수준 또는 정상 범위 내에서 유지될 수 있는 것으로 관찰되었다.

표 1

인간 혈청, 소변, 및 뇌척수액(CSF)에서 구아니디노 화합물의 정상 범위

구아니디노 화합물	혈청 (μ M) (n=107)	소변 (μ mol/g 크레아티닌) (n=30)	CSF (μ M) (n=45)
α -케토- δ -구아니디노발레르 산	<0.050	<DL*-30	<0.025
구아니디노숙신 산	0.100~0.500	15~160	0.020~0.150
크레아틴	10~200	75~28000	35~90
구아니디노아세트 산	0.400~3.00	100~2050	0.015~0.10
N- α -아세틸아르기닌	<0.025~0.255	10~100	0.030~0.20
아르기닌 산	<0.025~0.100	1~30	<0.013
호모아르기닌	<0.500~2.80	<DL-20	0.120~0.600

* = 검출 제한. Marescau 등(1990)에 논의된 양

[0030]

[0031] 야생형 아르기나제는 인간 아르기나제 I 또는 아르기나제 II에 기초할 수 있다. 야생형 인간 아르기나제 II는 다음의 서열(Uniprot P78540)을 갖는다:

MSLRGSLSRLLQTRVHSILKKSVHSVAVIGAPFSQGQKRKGVEHGPAAIREAGLMKRLSSLGCHLKDFGDLSTFPVPKDDLYNNLIVNPRSVGLANQELAEV
VSRAVSDGYSCVTI LGGDHSLAIGTI SGHARHCPDLCVVWDAHADINTPLTTSSGNLHGQPVSFLREI QDKVPQLPGFSWIKPCISSASIVYIGLRDVDPPEH
EHFILK NYDIQYFSMRDIDRLGIQKVMERTFDLLIGKRQRPIHLSFDIDAFDPTLAPATGTPVVGGLTYREGMYIAEEIHNTGLLSALDLVEVNPQLATSEE

EAKTTANLAVDVIASSFGQTREGGHIVYDQLPTPSSPDESENQARVRI (서열 식별 번호: 1).

[0033] 야생형 인간 아르기나제 I는 다음의 서열(Uniprot/P05089)을 갖는다:

MSAKSRTIGIIGAPFSKGQPRGGVEEGPTVLRKAGLLEKLKEQECDVKDYGDLPFADIPNDSPFQIVKNPRSVGKASEQLAGKVAEVKKNGRISLVGGDHS
LAIGSISGHARVHPDLGIWVDAHTDINTPLTTSGNLHGQPVSFLKELKGKIPDVPGFSWVTPCISAKDIVYIGLRVDPGEHYILKTLGIKYFSMTEVD
RLGIGKVMEEETSYLLGRKKRPIHLSFDVDGLDPSFTPATGTPVVGGLTYREGLYITEEYKTGLLSGLDIMEVNPSLGTKPEEVTRTVNTAVAITLACFGL
AREGNHKPIDYLNPPK (서열 식별 번호: 2).

[0035] 본원에 개시된 페질아르기나제는 아르기나제 I, 서열 식별 번호: 2를 갖고, 망간 금속 보조 인자 대신 코발트 금속 보조 인자를 갖는다. 페질아르기나제는 또한 미국 특허 제 8,440,184호에 기술된 대로 또한 페길화된다.

[0036] "투여"는, 화합물의 치료 유효량과 개시된 상기 화합물을 함유한 조성물의 주입을 의미한다. 예를 들어, 제한 없이 투여는 정맥내(i.v.) 또는 피하(s.c.)일 수 있다. 본 발명의 조성물은 또한 근육내(i.m.) 투여될 수 있다.

[0037] "약"이라는 용어는 당업자에 의해 이해될 것이며, 그것이 사용되는 문맥에 따라 어느 정도 변할 것이다. 본원에 사용되는 바와 같이, "약"은 $\pm 10\%$, $\pm 5\%$, 또는 $\pm 1\%$ 의 변화를 포함하는 것을 의미한다.

[0038] 용어 "페길화"는 높은 생체 적합성 및 변형 용이성을 고려하여 약물 담체로서 널리 사용되는 폴리에틸렌 글리콜(PEG)과의 결합을 지칭한다(예를 들어, Harris *et al.*, Clin. Pharmacokinet. 40(7): 539-51, 2001). PEG는 사슬의 말단에서 헤드록실 기를 통해 그리고 다른 화학적 방법을 통해 활성제에 결합(예, 공유 연결)될 수 있으나, PEG 자체는 분자당 최대 2개의 활성제로 제한된다. 다른 접근법에서, PEG 및 아미노산의 공중합체는 PEG의 생체 적합성 특성을 유지하지만 분자당 다수의 부착점(약물 로딩을 더 많이 제공함)의 부가적인 이점을 갖는 신규 생체 물질로서 탐구되어 왔다.

[0039] 페길화된 아르기나제 변이체는, 공지된 방법에 따라 제형화되어 제약상 유용한 조성물을 제조할 수 있다. ARG1-D 환자는 천연적으로 망간 금속 보조 인자를 함유한 야생형 아르기나제 단백질(아르기나제 I 또는 아르기나제 II) 또는 페길화되고 망간 금속 보조 인자를 함유한 야생형 아르기나제 단백질을 투여 받을 수 있다. 다른 예에서, ARG1-D 환자는 천연 망간 금속 보조 인자 대신 코발트 금속 보조 인자를 갖는 아르기나제를 투여 받을 수 있다. 코발트 금속 보조 인자 함유 아르기나제는 추가로 페길화될 수 있고, 예시적인 형태는 본원에 참조로 포함된 미국 특허 제8,440,184호에 설명된 바와 같이 Co-ArgI-PEG(또한 본원에서는 AEB1102, 페질아르기나제, 또는 Co-hArgI로 지칭됨)이다. 페질아르기나제와 같은 예시적인 형태는, 페질아르기나제의 단백질 서열에 존재하는 하나 이상의 리신에 부착된 단량체당 대략 12개의 5K(5000 달톤) PEG 단위를 갖는다. 바람직한 제형은 임의의 제약상 허용 가능한 담체, 보존제, 부형제 또는 안정화제를 사용하여 적절한 희석제 또는 고순도의 수용액으로 재구성된 안정한 동결 건조 생성물이다(Remington, The Science and Practice of Pharmacy, 19th ed., Gennaro, ed., Mack Publishing Co., Easton, PA 1995를 참조하기 바람). 약물은 적혈구 유령 세포(또는 엔지니어링된 적혈구 세포라고도 지칭됨)로 전달되도록 제형화될 수 있다. 다른 접근 방법은 아르기닌 디이미나제(ADI)-PEG 20(Polaris Pharma)을 ARG1-D 환자에게 i.m., s.c., 또는 i.v를 통해 또는 서술한 적혈구 유령 세포를 사용하여 투여하는 것이다.

[0040] 본원에 사용된 바와 같이 ("소정 단백질의 부분"에서와 같이) 단백질을 참조하는 경우, 용어 "부분"은 아르기나제 단편을 지칭하되, 상기 단편은 요소 사이클에서 아르기나제 활성을 갖는다.

[0041] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "단백질" 및 "폴리펩티드"는 펩티드 결합을 통해 결합된 아미노산을 포함하고 상호 교환적으로 사용되는 화합물을 지칭한다.

[0042] 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "융합 단백질"은, 외인성 단백질 단편(비 아르기나제 단백질로 이루어진 융합 파트너)에 결합된 (또는 작동 가능하게 연결된) 관심 단백질(즉, 인간 아르기나제 또는 이의 변이체)을 함유한 키메라 단백질을 지칭한다. 융합 파트너는 혈청 반감기, 용해도, 또는 둘 다를 향상시킬 수 있다. 이는 또한 숙주 세포 또는 배양 상청액 또는 둘 다로부터 재조합 융합 단백질을 정제시킬 수 있는 친화성 태그(예, His-tag)를 제공할 수 있다.

[0043] 용어 "작동 가능한 조합으로", "작동 가능한 순서로", 및 "작동 가능하게 결합된"은, 주어진 유전자의 전사 및/ 또는 희망 단백질 분자의 합성을 지시할 수 있는 핵산 분자가 생성되도록 하는 방식으로 핵산 서열의 연결을 지칭한다. 상기 용어는 또한 기능성 단백질이 생성되는 방식으로 아미노산 서열의 연결을 지칭한다.

[0044] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 " K_m "은 효소에 대한 Michaelis-Menton 상수를 지칭하고, 주어진 효소가 효소-촉

매 반응에서 최대 속도의 절반을 생성하는 곳에서의 특정 기질 농도로서 정의된다.

[0045] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 " K_{cat} "은 각 효소 부위가 단위 시간당 생성물로 전환되는 수 또는 턴 오버 수를 지칭하고, 여기서 상기 효소는 최대 효율로 작동한다.

[0046] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 " K_{cat}/K_m "은 특이성 상수이고, 이는 효소가 기질을 생성물로 얼마나 효율적으로 전환시키는지를 측정한 것이다.

[0047] 용어 "Mn-hArgI"는, Mn (II) 금속 보조 인자를 갖는 인간 아르기나제 I을 지칭한다. 용어 "Co-hArgI"는, Co (II) 금속 보조 인자를 갖는 인간 아르기나제 I(돌연변이 또는 천연)을 지칭한다.

[0048] 용어 " IC_{50} "은 최대치의 절반(50%) 억제 농도(IC)이고, 따라서 효과의 척도이다.

[0049] 용어 "유전자"는 DNA 서열을 지칭하고, 이는 아르기나제와 같은 폴리펩티드, 또는 이의 전구체의 제조에 필요한 제어 및 코딩 서열을 포함한다. 아르기닌을 오르니틴으로 환원시키기 위한 아르기나제의 원하는 효소 활성이 유지되는 한, 폴리펩티드는 전장 코딩 서열 또는 코딩 서열의 임의의 부분에 의해 암호화된다.

[0050] 용어 "대상체"는 인간을 포함한 포유류와 같은 동물을 지칭한다.

[0051] 용어 "야생형"은 천연 공급원으로부터 분리되는 경우, 그 유전자 또는 유전자 생성물의 특성을 갖는 유전자 또는 유전자 생성물을 지칭한다. 야생형 유전자는, 집단에서 가장 빈번하게 관찰되는 것이며, 따라서 유전자의 "정상" 또는 "야생형" 형태로 임의로 지정된다. 대조적으로, 용어 "변형된" 또는 "변이체" 또는 "돌연변이"는 야생형 유전자 또는 유전자 생성물과 비교할 때 서열 및/또는 기능적 특성(즉, 변경된 특성)으로 변형을 나타내는 유전자 또는 유전자 생성물을 지칭한다. 천연 돌연변이는 분리될 수 있고, 이들은 야생형 유전자 또는 유전자 생성물과 비교할 때 특성이 변경되었다는 사실에 의해 확인됨을 언급한다.

[0052] 다음의 약어가 본원에 사용된다.

[0053] 약어

[0054] ADA 약물 대항 항체

[0055] ARG 또는 Arg 아르기닌

[0056] ARG1-D 아르기나제 1 결핍

[0057] Arg1 $-/-$ mice 아르기나제 결핍 마우스

[0058] ArgA 아르기닌 산

[0059] AUC 혈장 농도-시간 곡선의 아래 면적

[0060] BQL 정량 한계 이하

[0061] Co-ArgI-PEG 코발트 치환 및 폐길화된 아르기나제 1

[0062] EOI 주입 끝

[0063] F/U 추적 검사

[0064] GC 구아니디노 화합물

[0065] GLP 우수 실험실 운영 기준

[0066] GVA α -케토- δ -구아니디노발레르 산

[0067] GAA 구아니디노아세트 산

[0068] HArg 호모아르기닌

[0069] i.v. 정맥내 또는 정맥내로 (IV)

[0070] K₂EDTA 혈장 응집을 방지하기 위해 디포타슘

[0071] 에틸렌이디아민테트라아세트 산 처리된 투브

- [0072] LC-MS/MS 액체 크로마토그래피-직열 질량 분석법
- [0073] NAAArg N-아세틸-아르기닌
- [0074] PEG 폴리에틸렌 글리콜
- [0075] s.c. 피하, 피부 밑으로, 또는 SC
- [0076] SOI 주입 시작
- [0077] wt 야생형
- [0078] 대장균에서 제조된 재조합 인간 아르기나제 효소인 페질아르기나제는, 신생아 마우스 어른 마우스 ARG1 결핍 모델에서 아르기닌 수준을 정상 범위로 감소시킬 수 있는지 알아보기 위해 연구되었다. 페질아르기나제는 안정성 및 반감기를 위해 폐길화되고, 망간 금속 보조 인자 대신에 코발트 금속 보조 인자를 갖는다. 코발트 금속 보조 인자는 촉매 활성을 증가시키고, 아르기나제의 안정성을 향상시킨다. 페질아르기나제로 치료하면 혈장 아르기닌과 전체 뇌 아르기닌이 감소했지만, 약물 투여는 마우스에서 고암모니아혈증을 치료하지 못했다. 간 조직에서 아르기닌 수준 감소의 부족은 아마도 투여된 효소 페질아르기나제가 간으로 들어 가지 않기 때문인 것으로 이론화되었다. ARG1-D의 어른 마우스 모델에서, 페질아르기나제의 투여는 동물 생존을 개선시키는데 실패하였다. 페질아르기나제는 신생아 아르기나제 I 결핍 마우스(Arg1-/-mice)에서 테스트되었으며, 이는 마우스 모델에서 인간 질병에 가장 가까운 시뮬레이션이다(Burrage *et al.*, "Human recombinant arginase enzyme reduces plasma arginine in mouse models of arginase deficiency," *Hum. Mol. Genetics* 24(22): 6417-27 (2015)). 다중 투여 연구로 혈장 및 뇌 아르기닌 수준이 정상 범위로 감소했으나, 간 아르기닌 수준은 유리하게 영향을 받지 않았으며, 치료되지 않은 아르기나제 1 결핍 마우스와 비교하여 생존의 개선이 없었으며, 이는 예상치 못한 것이었다.
- [0079] 아르기나제 I 결핍의 인간 임상 프레젠테이션과 달리, 아르기나제 1 결핍 마우스는 조기 사망의 원인이 되는 심각한 고암모니아혈증을 갖는다(예를 들어, Carvalho, D.R. *et al.*, "Clinical features and neurologic progression of hyperargininemia," *Pediatr. Neurology*, 46(6): 369-74 (2012)를 참조하기 바란다). 고암모니아혈증은 이 장애를 가진 인간 환자에서 덜 심각한 합병증이다. 고암모니아혈증보다는 상승된 혈장 아르기닌이 아르기나제 I 결핍증을 갖는 환자에게 주요 치료 과제일 수 있는 점을 고려할 때, 일부는 Co-ArgI-PEG가 치료적 유용성을 가질 수 있다고 추정하지만, 유용성 및 반응성의 정도는 합리적으로 예측할 수 없고, 비록 1995년에 가설을 세웠지만 테스트 또는 치료 모델은 수행되거나 개발되지 않았다. 예를 들어, Uchino, T. *et al.*, "Molecular basis of phenotypic variation in patients with argininemia," *Hum. Genet.* 96(3): 255-60 (1995)을 참조하기 바란다.
- [0080] **I. 아르기나제**
- [0081] 야생형 아르기나제는 망간을 함유한 효소이다. 이는 요소 회로의 최종 효소이다. 아르기나제는 포유류의 일련의 생물리학적 반응인 요소 회로에서 제5 및 최종 단계로, 상기 회로 동안에 신체는 해로운 암모니아를 배출한다. 특히, 아르기나제는 L-아르기닌을 L-오르니틴과 요소로 전환시킨다.
- [0082] L-아르기닌은 질소 산화물 신타아제(NOS)를 위한 질소 공여 기질이고, L- 시트룰린 및 질소 산화물(NO)을 생성한다. 아르기나제(2~5 mM)의 K_m 이 L-아르기닌(2~20 μ M)에 대한 NOS의 것보다 훨씬 높은 것으로 보고되었지만, 아르기나제는 또한 NOS 활성을 조절하는 데 역할을 할 수 있다. 특정 조건 하에서, 아르기나제 I은 Cys-S-니트로실화되어, L-아르기닌에 대한 친화성은 높아지고 NOS에 대한 기질의 이용 가능성을 감소된다.
- [0083] 아르기나제는 여러 개의 나선으로 둘러싸인 평행한 8 가닥 β -시트의 α / β -주름을 갖는 호모-삼량체 효소이다. 효소는, L-아르기닌의 구아니디늄 탄소에 대한 친핵성 공격을 위한 수산화물을 생성하는 데 필수적인 이핵 금속 클러스터를 포함한다. 아르기나제에 대한 친연 금속 보조 인자는 Mn^{2+} 이다. 이들 Mn^{2+} 이온은 물과 배위 결합하여 분자를 배향시키고 안정화 시키며 물을 친핵체로서 작용시키고 L- 아르기닌을 공격하여 오르니틴 및 요소로 가수 분해한다.
- [0084] 포유류는, L- 아르기닌을 요소 및 L-오르니틴으로의 가수 분해를 촉매하는 2개의 아르기나제 동종 효소(EC 3.5.3.1)를 갖는다. 아르기나제 I 유전자는 염색체 6(6q23)에 위치하고, 간세포의 세포질액에서 높게 발현되며, 요소 회로의 최종 단계로서 질소 제거 역할을 한다. 아르기나제 II 유전자는 염색체 14(14q24.1) 상에서 발견된다. 아르기나제 II는 신장, 뇌 및 골격근과 같은 조직에 미토콘드리아로 위치하고, 여기서 프롤린 및 폴리아민

생합성을 위한 L-오르니틴의 공급을 제공하는 것으로 생각된다(Lopez *et al.*, *FEBS J.* 272: 4540-48, 2005).

[0085] 세포외 L-아르기닌을 분해하는 방법으로 거의 50년 동안 아르기나제를 조사했다(Dillon *et al.*, "Biochemical characterization of the arginine degrading enzymes arginase and arginine deiminase and their effect on nitric oxide production," *Med. Sci. Monit.*, 8(7):BR248-253 (2002)). 천연 아르기나제는 몇 분 내에 순환에서 제거되지만(Savoca *et al.*, *Cancer Biochem. Biophys.* 7: 261-268, 1984), 래트에서 PEG-아르기나제 MW 5,000의 일회 주사는 약 3일 동안 거의 완전한 아르기닌의 고갈을 달성하기에 충분하였다(Cheng *et al.*, *Cancer Res.* 67: 309-17, 2007).

[0086] 우수한 동역학 및 안정성을 나타내는 박테리아 아르기닌 가수 분해 효소인 ADI를 시험관내에서 테스트하였다. 불행히도, ADI는 박테리아 효소이므로 대부분의 환자에서 강력한 면역 반응과 부작용을 유발하므로 정기적으로 투여해야 하는 ARG1-D 환자의 장기 투여에는 적합하지 않다.

[0087] ARG1-D 환자에게 임상적으로 사용하기 위해서는, 아르기나제가 순환하는 동안 긴 시간(예, 수 일) 지속시킬 수 있도록 조작된 것이 필수적이다. 변형이 없는 경우, 인간 아르기나제는 순환 중에 겨우 수 분의 반감기를 갖는데, 그 이유는 그 크기가 신장을 통한 여과를 피하기에 충분히 크지 않기 때문이다. 미변형 인간 아르기나제는 혈청에서 불활성화에 매우 민감하여, 단지 4 시간의 반감기로 분해된다.

II. 아르기나제 변이체의 PEG화

[0089] 본 발명의 특정 양태에서, PEG화된 아르기나제와 관련된 방법 및 조성물이 개시된다. 구체적으로, 조작된 시스테인 잔기(예, N-말단의 제3 잔기를 치환함)에서 아르기나제의 PEG화는, 균질하게 폐길화된 아르기나제 조성물을 생성하기 위해 사용될 수 있다. 일시적인 중합 중단에 기초한 폐길화된 아르기나제의 분리 방법이 또한 개시되어 있다.

[0090] PEG화는, 다른 분자, 일반적으로 약물 또는 치료 단백질에 PEG 중합체 사슬을 공유 부착하는 공정이다. "PEG화"는 표적 거대 분자와 PEG의 반응성 유도체를 인큐베이션함으로써 달성될 수 있다. 약물 또는 치료 단백질의 유체 역학적 크기(용액에서의 크기)의 증가는, 신장 청소율을 감소시켜 순환 시간을 연장시킨다. PEG화는, 또한 소수성 약물 및 단백질에 대한 물 용해도를 제공할 수 있다.

[0091] PEG화의 제1 단계는, 단백질 말단 도메인의 하나 또는 둘 모두에서 PEG 중합체를 적절하게 작용기화하는 것일 수 있거나 리신과 같은 아미노산에 대해 내부적으로 PEG 중합체를 적절하게 작용기화하는 것일 수 있다. 각각의 말단에서 동일한 반응성 모이어티로 활성화된 PEG는 "호모이기능성"으로 알려져 있는 반면, 존재하는 작용기가 다르면 그 때 PEG 유도체는 "헤테로이기능성" 또는 "이종작용성"으로 지칭된다. PEG 중합체의 화학적 활성 또는 활성화된 유도체는, PEG를 원하는 분자에 부착시키기 위해 제조된다.

[0092] PEG 유도체에 적합한 작용기의 선택은, PEG에 결합될 분자에서 이용 가능한 반응성 기의 유형에 기초한다. 단백질의 경우, 전형적인 반응성 아미노산은 리신, 시스테인, 히스티딘, 아르기닌, 아스파르트산, 글루탐산, 세린, 트레오닌 및 티로신을 포함한다. N-말단 아미노기 및 C-말단 카르복실 산은, 또한 PEG를 폴리펩티드에 부착시키기 위해 사용될 수 있다.

[0093] PEG 유도체를 형성하기 위해 사용되는 기술은, 히드록실기, 전형적으로 무수물, 산 염화물, 클로로포름물 및 탄산염과 반응성인 기와 PEG 중합체를 반응시키는 것을 포함한다. PEG화 화학 물질은, 또한 결합에 이용 가능한 알데히드, 에스테르, 아미드 등과 같은 작용기를 사용할 수 있다. 헤테로이기능성 PEG는 두 실체를 결합하는데 매우 유용하고, 여기서 친수성, 가요성 및 생체 적합성 스페이서가 필요하다. 헤테로이기능성 PEG에 바람직한 말단기는 말레이미드, 비닐술폰, 퍼리딜 디설파이드, 아민, 카르복실 산 및 H-히드록시 숙신이미드(NHS) 에스테르이다.

[0094] 가장 일반적인 변형체 또는 연결체는 메톡시 PEG(mPEG) 분자를 기반으로 한다. 그들의 활성은 단백질 변형기를 알코올 말단에 첨가하는 것에 의존한다. 폴리에틸렌 글리콜(PEG 디올)은 전구체 분자로서 사용될 수 있고, 디올은 후속으로 (PEG 비스-비닐술폰을 갖는 예시에 나타낸 바와 같이) 헤테로- 또는 호모-이량체 PEG 결합된 분자를 만들기 위해 양 말단에서 변형된다.

[0095] 단백질은, 비양성자화된 티올(시스테인 잔기) 또는 아미노기와 같은 친핵성 부위에서 일반적으로 PEG화된다. 시스테인-특이적 변형 시약의 예는, PEG 말레이미드, PEG 요오드아세테이트, PEG 티올, 및 PEG 비닐술폰을 포함한다. 4가지 모두는, 온화한 조건 하에서 그리고 중성 내지 약알칼리성 pH에서 시스테인-특이적이지만, 각각은 약간의 단점을 갖는다. 말레이미드로 형성된 아미드는, 알칼리성 조건 하에서 다소 불안정할 수 있으므로 이 연결

제를 사용한 제형 옵션에 약간의 제한이 있을 수 있다. 요오드-PEG로 형성된 아미드 연결은 보다 안정적이지만, 유리된 요오드는 일부 조건 하에서 티로신 잔기를 변형시킬 수 있다. PEG 티올은 단백질 티올과 이황화 결합을 형성하지만, 이러한 연결은 또한 알칼리성 조건 하에서 불안정할 수 있다. PEG-비닐술폰 반응성은 말레이미드 및 요오드-PEG에 비해 비교적 느리나, 형성된 티오에테르 연결은 상당히 안정적이다. 또한 반응 속도가 느리면, PEG-비닐술폰 반응을 보다 쉽게 제어할 수 있다.

[0096] 천연 시스테인 잔기에서 부위-특이적 PEG화는 거의 수행되지 않는데, 그 이유는 이를 잔기는 일반적으로 이황화 결합 형태이거나 생물학적 활성에 필요하기 때문이다. 한편, 부위 유도된 돌연변이 유발은, 티올-특이적 연결제를 위한 시스테인 PEG화 부위를 포함시키기 위해 사용될 수 있다. 시스테인 돌연변이는, 그것이 PEG화 시약에 접근 가능하고 PEG화 후에 여전히 생물학적으로 활성이 되도록 설계되어야 한다.

[0097] 아민-특이적 변형제는, PEG NHS 에스테르, PEG 트레실레이트, PEG 알데히드, PEG 이소티오시아네이트, 및 몇몇 다른 것을 포함한다. 이들 아민-특이적 변형제는, 일반적으로 온화한 조건 하에서 반응하고 아미노기에 대해 매우 특이적이다.

[0098] 대부분의 단백질에서 다수의 리신 잔기로 인해, 부위-특이적 PEG화가 어려울 수 있다. 다행히도, 이를 시약은 비양성자화된 아미노기와 반응하기 때문에, 낮은 pH에서 반응을 수행함으로써 PEG화를 pK가 낮은 아미노기로 유도하는 것이 가능하다. 일반적으로, 알파-아미노기의 pK는 리신 잔기의 엡실론-아미노기보다 1-2 pH 단위가 더 낮다. pH 7 이하에서 분자를 PEG화함으로써, 종종 N-말단에 대한 높은 선택성이 달성될 수 있다. 그러나, 이는 단백질의 N-말단 부분이 생물학적 활성에 필요하지 않은 경우에만 실현 가능하다. 그럼에도 불구하고, PEG화로 부터의 약물동태학적 이점은 종종 시험관내 생체 활성의 현저한 손실을 능가하여, PEG화 화학 물질에 관계 없이 생체내 생체 활성을 더 많이 갖는 생성물을 생성한다.

III. 단백질 및 웨티드

[0100] 특정 구현예에서, 본 발명은 적어도 하나의 단백질 또는 웨티드, 예컨대 안정화된 아르기나제 다량체를 포함한 조성물에 관한 것이다. 이들 웨티드는 융합 단백질에 포함될 수 있거나 물질에 결합될 수 있다.

A. 단백질 및 웨티드

[0102] 본원에 사용된 바와 같이, 단백질 또는 웨티드는 일반적으로 유전자로부터 전사된 전체 길이의 서열까지 약 200 개 초과의 아미노산의 단백질; 약 100개 초과의 아미노산의 폴리웨티드; 및/또는 약 3 내지 약 100개의 아미노산의 웨티드를 지칭하나 이에 제한되지 않는다. 편의상, 용어 "단백질", "폴리웨티드", 및 "웨티드"는 본원에서 상호 교환적으로 사용된다.

[0103] 본원에 사용된 바와 같이, "아미노산 잔기"는 당업계에 공지된 임의의 천연 아미노산, 임의의 아미노산 유도체 또는 임의의 아미노산 모방체를 지칭한다. 단백질 또는 웨티드의 예시적인 잔기는 순차적이며, 아미노산 잔기의 서열을 방해하는 임의의 비 아미노산은 없다. 다른 예시적인 서열은 하나 이상의 비 아미노산 모이어티를 포함할 수 있다. 예를 들어, 단백질 또는 웨티드의 잔기 서열은 하나 이상의 비 아미노산 모이어티에 의해 중단될 수 있다.

[0104] 따라서, 용어 "단백질 또는 웨티드"는 천연 단백질에서 발견되는 20개의 공통 아미노산 중 적어도 하나를 포함하는 아미노산 서열을 포함하고, 하기에 나타낸 것을 포함하지만 이에 제한되지 않는 적어도 하나의 변형되거나 특이한 아미노산을 포함할 수 있다:

[0105] 약어 의미

[0106] Aad 2-아미노아디프 산

[0107] Baad 3-아미노아디프 산

[0108] Bala β -알라닌, β -아미노-프로피온 산

[0109] Abu 2-아미노뷰티르 산

[0110] 4Abu 4-아미노뷰티르 산, 피페리딘 산

[0111] Acp 6-아미노카프로 산

[0112] Ahe 2-아미노헵탄 산

[0113]	Aib 2-아미노이소뷰티르 산
[0114]	Baib 3-아미노이소뷰티르 산
[0115]	Apm 2-아미노피멜 산
[0116]	Dbu 2,4-디아미노뷰티르 산
[0117]	Des 테스모신
[0118]	Dpm 2,2' -디아미노피멜 산
[0119]	Dpr 2,3-디아미노프로파온 산
[0120]	EtGly N-에틸글리신
[0121]	EtAsn N-에틸아스파라긴
[0122]	Hy1 히드록시리신
[0123]	AHy1 알로-히드록시리신
[0124]	3Hyp 3-히드록시프롤린
[0125]	4Hyp 4-히드록시프롤린
[0126]	Ide 이소데스모신
[0127]	Alle 알로-이]소류신
[0128]	MeGly N-메틸글리신, 사르코신
[0129]	MeIle N-메틸이소류신
[0130]	MeLys 6-N-메틸리신
[0131]	MeVal N-메틸발린
[0132]	Nva 노르발린
[0133]	N1e 노르류신
[0134]	Orn 오르니틴

IV. 핵산 및 벡터

[0135] 관심있는 아르기나제 폴리펩티드를 암호화하는 핵산 서열은, 안정화된 다량체 아르기나제일 수 있다. 사용될 발현 시스템에 따라, 핵산 서열은 통상적인 방법에 기초하여 선택될 수 있다. 예를 들어, 인간 아르기나제 I 및 II는, 발현을 방해할 수 있는 대장균에서 거의 사용되지 않는 다수의 코돈을 함유하고, 따라서, 각각의 유전자 또는 이의 변이체는 예를 들어 미국 특허 제8,440,184호에 설명된 바와 같이 대장균 발현에 대해 코돈 최적화될 수 있다. 융합 다량체 아르기나제 또는 시스테인 치환된 아르기나제와 같은 관심 단백질을 발현시키기 위해 다양한 벡터를 사용할 수 있다. 예시적인 벡터는, 플라스미드 벡터, 바이러스 벡터, 트랜스포손, 적혈구 유령 세포, 또는 리포좀 계열 벡터를 포함하나, 이에 제한되지 않는다.

V. 숙주 세포

[0136] 숙주 세포, 바람직하게는 진핵 세포는 아르기나제 및 이의 융합 다량체의 발현 및 분비를 허용하도록 형질 전환하기 위해 사용될 수 있다. 숙주 세포는 박테리아, 포유 동물 세포, 효모 또는 사상균일 수 있다. 다양한 박테리아는 대장균을 포함한다. 사카로마이세스(Saccharomyces), 클루이베로마이세스(Kluyveromyces), 한센눌라(Hansenula) 또는 피키아 (Pichia) 속에 속하는 효모가 숙주 세포로 사용될 수 있다. 사상균의 다양한 종은 아래의 속을 포함하는 발현 숙주로서 사용될 수 있다: 아스페르길루스(Aspergillus), 트리코데르마(Trichoderma), 뉴로스포라(Neurospora), 푸른 곰팡이(penicillium), 세팔로스포름(cephalosporium), 아클리아균(Achlya), 포도스포라(Podospora), 엔도티아(Endothia), 모균(mucor), 코클리오볼루스(Cochliobolus), 및 페리클라리아(pyricularia).

[0137] 사용 가능한 박테리아 숙주 유기체의 예시는, 예를 들어 대장균 MC1061, 고초균(Bacillus subtilis) BRB1의 유

도체, 황색포도상구균(*Staphylococcus aureus*) SAI123, 또는 스트렙토코커스 리비단스(*Streptococcus lividans*)를 포함한다. 숙주 세포로서 사용될 수 있는 예시적인 효모는, 예를 들어 출아형효모(*Saccharomyces cerevisiae*) AH22 및 분열효모(*Schizosaccharomyces pombe*); 예시적인 사상균, 예를 들어 위소성국균(*Aspergillus nidulans*), 흑국균(*Aspergillus awamori*) 및 트리코더마 레세이(*Trichoderma reesei*)를 포함할 수 있다.

[0140] 공개적으로 이용 가능한 포유 동물 숙주 세포의 예는 중국 햄스터 난소 세포(CHO-K1; 미국 유형 배양 수집 ATCC) 번호 CCL61), 래트 뇌하수체 세포(GH1; ATCC CCL82), HeLa S3 세포(ATCC CCL2.2), 래트 간암 세포(H-4-II-E; ATCC CRL 1548), SV40- 변형 원숭이 신장 세포(COS-1; ATCC CRL 1650) 및 젖과 배아 세포(NIH-3T3; ATCC CRL 1658)를 포함한다. 전술한 것은 예시적이지만, 당업계에 공지된 가능한 많은 숙주 유기체에 제한되지 않는다.

[0141] 아르기나제 및/또는 그들의 융합 다량체를 발현하는 포유 동물 숙주 세포는, 모 세포주를 배양하기 위해 전형적으로 사용되는 조건 하에 있을 수 있다. 일반적으로, 세포는 생리 식염 및 영양소, 예컨대 표준 로스웰 파크 메모리얼 인스티튜트(Roswell Park Memorial Institute) 배지(RPMI), 최소 필수 배지(MEM), 개선된 최소 필수 배지(IMEM) 또는 둘베코(Dulbecco)의 최소 필수 배지 (DMEM)를 함유한 표준 포유 동물 세포 배지에서 배양되고, 전형적으로 5~10% 혈청, 예컨대 태아 소 혈청(fetal bovine serum, FBS)이 보충된다. 배양 조건은 또한 표준이며, 예를 들어 배양은 원하는 수준의 단백질이 달성될 때까지 정지형 또는 롤러형 배양기에서 37°C로 인큐베이션된다.

VII. 단백질 정제

[0143] 관심 있는 단백질 또는 폴리펩티드는, 달리 명시되지 않는 한, 크로마토그래피 및 전기 영동 기술을 사용하여 부분적으로 또는 완전한 정제(또는 동질 수준으로 정제)를 달성하도록 추가로 정제될 수 있다. 순수한 웨티드의 제조에 특히 적합한 분석 방법은, 이온-교환 크로마토그래피, 겔 배제 크로마토그래피, 폴리아크릴아미드 겔 전기 영동, 친화성 크로마토그래피, 면역친화성 크로마토그래피 및 등전점 전기 영동이다. 웨티드를 정제하는 데 특히 효율적인 방법은, 고속 성능 액체 크로마토그래피(FPLC) 또는 심지어 고성능 액체 크로마토그래피(HPLC)이다.

[0144] 정제된 단백질 또는 웨티드는 다른 성분으로부터 분리할 수 있는 조성물을 의미하고, 상기 단백질 또는 웨티드는 그것의 천연적으로 획득 가능한 상태와 비교하여 임의의 정도로 정제된다. 따라서, 분리되거나 정제된 단백질 또는 웨티드는, 또한 천연적으로 발생할 수 있는 환경으로부터 자유로운 단백질 또는 웨티드를 지칭한다. 일반적으로, "정제된"은 다양한 다른 성분을 제거하기 위해 부분 분리를 받은 단백질 또는 웨티드 조성물을 지칭할 것이며, 이 조성물은 그의 발현된 생물학적 활성을 실질적으로 유지한다. 용어 "실질적으로 정제된"이 사용되는 경우, 이러한 명칭은 단백질 또는 웨티드가 조성물의 주요 성분, 예컨대 조성물 중 약 50%, 약 60%, 약 70%, 약 80%, 약 90%, 약 95% 또는 그 이상의 단백질을 형성한 조성물을 지칭할 것이다.

[0145] 예시적인 단백질 정제 기술은, 황산 암모늄, PEG, 항체 등을 사용하거나 열 변성 이후 원심 분리; 이온 교환, 겔 여과, 역상, 히드록실아파타이트 및 친화성 크로마토그래피와 같은 크로마토그래피 단계; 등전점 전기 영동; 겔 전기 영동; 및 이들 기술과 다른 기술의 조합에 의한 것을 포함한다.

VII. 제약 조성물

[0147] 본원에 설명된 아르기나제는 전신적으로 또는 국소적으로 투여될 수 있다. 이들을 포함하는 아르기나제 및 조성물은 정맥내, 척수내, 피하, 근육내, 종양내 및/또는 복강내 또는 이들의 조합으로 투여될 수 있다. 본원에 설명된 것을 포함한 화합물 및 조성물은, 단독으로 또는 아르기닌 제거제 및/또는 아르기닌 감소 식이 요법과 함께 투여될 수 있다.

[0148] 아르기나제 또는 이의 부분을 함유한 조성물은 생리학적으로 허용 가능한 액체, 겔 또는 고체 담체, 희석제 및 부형제와 함께하는 제형으로 제공될 수 있다. 이러한 조성물은 전형적으로 주사 가능한 액체 용액 또는 혼탁액으로 제조된다. 적합한 희석제 및 부형제는, 예를 들어 물, 식염수, 텍스트로스, 글리세롤 등 및 이들의 조합이다. 또한 원하는 경우, 조성물은 소량의 보조 물질, 예컨대 습윤제 또는 유화제, 안정화제 또는 pH 완충제를 함유할 수 있다. 임상 적용이 고려되는 경우, 제약 조성물-발현 박터, 바이러스 스톡, 단백질, 항체 및 약물-을 의도된 적용에 적합한 형태로 제조하는 것이 필요할 수 있다. 일반적으로, 본 발명의 제약 조성물은, 하나 이상의 아르기나제 변이체 또는 제약상 허용되는 담체에 용해되거나 분산된 추가 물질의 유효량을 포함한다.

[0149] "제약학적 또는 약리학적으로 허용 가능한"이란 어구는 사람과 같은 대상체에게 적절하게 투여되는 경우, 부정

적이거나, 알레르기성 또는 다른 뜻밖의 반응을 일으키지 않는 분자 실체 및 조성물을 지칭한다. 본원에 개시된 방법에 의해 분리된 PEG화된 아르기나제 또는 안정화된 다량체 아르기나제와 같이 적어도 하나의 아르기나제 변이체, 또는 추가의 활성 성분을 함유한 제약 조성물의 제조는, Remington의 Pharmaceutical Sciences, 18th Ed., 1990에 의해 예시된 바와 같이, 본 개시에 비추어 당업자에게 공지될 것이다. 더욱이, 동물(예, 인간) 투여의 경우, 제조는 FDA 생물학 표준 국(Office of Biological Standards)에 의해 요구되는 무균성, 발열원성, 일반적인 안전성 및 순도 표준을 충족시켜야 함을 이해할 것이다.

[0150] 본원에 사용된 바와 같이, "제약상 허용 가능한 담체"는 임의의 및 모든 용매, 분산 배지, 코팅, 계면 활성제, 항산화제, 방부제(예, 항균제, 항진균제), 등장제, 흡수 지연제, 염, 방부제, 약물, 약물 안정제, 겔, 결합제, 부형제, 분해제, 윤활제, 염료, 이와 같은 유사 물질 및 이들의 조합을 포함하며 당업자에게 공지된 바와 같다 (예를 들어, 레밍顿의 Pharmaceutical Sciences, 18th Ed., 1990를 참고하기 바람). 임의의 통상적인 담체가 활성 성분과 양립할 수 없는 경우를 제외하고, 제약학적 조성물에서는 이의 용도를 고려한다.

[0151] 아르기나제를 함유한 제약 조성물은, 그것이 고체, 액체 또는 에어로졸 형태로 투여되어야 하는지의 여부, 및 주사와 같은 투여 경로에 대해 멸균될 필요성에 따라 상이한 유형의 담체를 포함할 수 있다. 본 발명은 정맥내, 피내, 경피, 수막강내, 동맥내, 복강내, 근육내, 피하, 종양내, 국소, 주사, 주입, 연속 주입, 카테터를 통해, 지질 조성물(예, 리포좀), 또는 다른 방법 또는 전술한 것의 임의 조합에 의해 투여될 수 있고, 이는 당업자 누구에게나 공지된 것이다(예를 들어, 레밍턴의 Pharmaceutical Sciences을 참조하기 바람).

[0152] 아르기나제 변이체는, 유리된 염기, 중성 또는 염 형태의 조성물로 제형화될 수 있다. 제약학적으로 허용 가능한 염은, 산 첨가 염, 예를 들어 단백질성 조성물의 유리된 아미노기로 형성된 것들, 또는 무기산, 예컨대 염산 또는 인산, 또는 유기산, 예컨대 아세트산, 옥살산, 타르타르산, 또는 만델산으로 형성된 것들을 포함한다. 유리된 카르복실기로 형성된 염은, 또한 무기 염기, 예컨대 나트륨, 칼륨, 암모늄, 칼슘 또는 수산화철(III); 또는 유기 염기, 예컨대 이소프로필아민, 트리메틸아민, 히스티딘 또는 프로카인으로부터 유도될 수 있다. 제형화시, 용액은 투여 제형과 양립 가능한 방식으로 그리고 치료 유효량으로 투여될 수 있다. 제형은 다양한 투여 형태로, 예컨대 주사용 용액 또는 폐로 전달하기 위한 에어로졸과 같이 비경구 투여로 제형화되거나, 약물 방출 캡슐 등과 같은 소화관 투여를 위해 제형화되는 것과 같이 용이하게 투여된다.

[0153] 투여용 조성물은, 불활성 희석제가 있거나 없이 제약학적으로 허용 가능한 담체로 제공될 수 있다. 담체는 동화될 수 있어야 하며 액체, 반고체, 즉 페이스트 또는 고체 담체를 포함한다. 임의의 통상적인 배지, 물질, 희석제 또는 담체가 수용자 또는 그 안에 함유된 조성물의 치료 효과에 해를 끼치지 않는 경우를 제외하고, 본 발명의 방법을 실시하는 데 사용하기 위한 투여 가능한 조성물에서의 사용은 적합하다. 담체 또는 희석제의 예시는 지방, 오일, 물, 식염수 용액, 지질, 리포좀, 수지, 결합제, 충진제 등 또는 이들의 조합을 포함한다. 조성물은 또한 하나 이상의 성분의 산화를 자연시키기 위해 다양한 항산화제를 포함할 수 있다. 또한, 파라벤(예, 메틸파라벤, 프로필파라벤), 클로로부탄올, 페놀, 소르브산, 티메로살 또는 이들의 조합을 포함하지만 이에 제한되지 않는 다양한 항박테리아제 및 항진균제와 같은 보존제의 사용은, 제약학적 조성물의 수명을 향상시킬 수 있다.

[0154] 조성물은 임의의 편리하고 실용적인 방식으로, 즉 용액, 혼탁액, 유화, 혼합물, 캡슐, 흡수 등에 의해 담체와 조합 될 수 있다. 이러한 과정은 당업자에게 있어서 일상적인 것이다.

[0155] 아르기나제 변이체를 포함한 조성물에는 제약학적 지질 운반체가 사용될 수 있다. 지질 운반체 조성물은 하나 이상의 지질 및 수성 용매를 포함할 수 있다. 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "지질"은, 물에 특성적으로 불용성이고 유기 용매로 추출할 수 있는 임의의 광범위한 물질을 포함하는 것으로 정의될 것이다. 예시는 화합물을 포함하고, 이는 긴 사슬의 지방족 탄화수소 및 이들의 유도체를 함유한다. 지질은 천연적으로 발생하거나 합성될(즉, 사람에 의해 설계되거나 제조될) 수 있다. 그러나, 지질은 보통 생물학적 물질이다. 생물학적 지질은, 예를 들어 중성 지방, 인지질, 포스포글리세리드, 스테로이드, 테르펜, 리소지질, 당스핑고지질, 당지질, 술파타이드, 에테르 및 에스테르 결합된 지방산을 갖는 지질 및 중합성 지질, 및 이들의 조합을 포함한다. 물론, 당업자가 지질로서 이해한 본원에 구체적으로 기재된 것 이외의 화합물도, 본 발명의 조성물 및 방법에 또한 포함된다.

[0156] 본원에 기재된 아르기나제를 포함한 조성물을 환자에게 실제 투여량은, 환자의 체중, 상태의 중증도, 치료될 질환의 유형, 이전 또는 동시 치료적 개입, 특발증과 같은 신체적 및 생리학적 요인 그리고 투여 경로에 의해 결정될 수 있다. 투여량 및 투여 경로에 따라, 바람직한 투여량 및/또는 유효량의 투여 횟수는 대상체에 따라 달라질 수 있다. 투여량은 환자가 다음 중 적어도 하나의 정상 수준을 달성하기 위해 필요한 양에 따라 달라질 것이다: 아르기나제, HArg, ArgA, GVA, GAA, 및 NAAArg. 이들 5개 화합물 중 하나 이상의 ARG1-D 환자 수준은, 일

반적으로 환자의 혈장에서 정상 범위를 얻을 때까지 평가된다. 5개 화합물의 조직 수준이 또한 평가될 수 있지만, 혈장 수준 테스트보다 필요하지 않거나 덜 빈번하게 수행될 수 있다.

[0157] ARG1-D 환자의 경우, 초기 투여는 환자 kg당 0.005 내지 1.00 mg/kg의 아르기나제의 투여량뿐만 아니라, 0.005 내지 1.00 mg/kg(환자 체중)의 범위에서 0.005씩 임의의 값으로, 예컨대 0.02 mg/kg 또는 0.035 mg/kg에서 정맥내에서 이루어질 수 있다. 예시적인 아르기나제의 정맥내 투여는 매일, 매주, 격월 또는 매월 투여될 수 있다. 대안적으로, 아르기나제 조성물은 초기에 또는 피하로만 또는 정맥내 또는 피하 투여의 임의의 조합으로 투여될 수 있다. 피하 또는 근육내 투여는 아르기나제의 0.01 내지 1.50 mg/kg(환자 체중)의 투여량뿐만 아니라, 0.01 내지 1.50 mg/kg(환자 체중) 범위 사이에서 0.01의 양으로, 예컨대 0.08 mg/kg일 수 있다. 피하 또는 근육내 투여는 매일, 매주, 격월 또는 매월일 수 있다.

[0158] 제약 조성물은, 예를 들어 적어도 약 0.1%의 활성 화합물을 포함할 수 있다. 다른 구현예에서, 활성 화합물은 단위 체중의 약 2% 내지 약 75%, 또는 약 25% 내지 약 60%, 및 예를 들어 그 안에 유도될 수 있는 임의의 범위를 포함할 수 있다. 당연히, 각각 치료적으로 유용한 조성물에서 활성 화합물(들)의 양은, 임의의 주어진 단위 용량의 화합물에서 적합한 투여량이 수득되도록 하는 방식으로 제조될 수 있다. 용해도, 생체 이용률, 생물학적 반감기, 투여 경로, 제품 저장 수명 및 기타 약리학적 고려 사항과 같은 요인은, 이러한 제약학적 제형의 제조 분야의 숙련자에 의해 고려될 것이고, 이로서 다양한 투여량 및 치료 요법이 바람직할 수 있다. 페질아르기나제의 예시적 제형은 pH가 7.4에서 5 mM 인칼륨, 50 mM 염화나트륨, 및 1.5% 글리세롤 (w/v/)의 완충액에서 제형화된다.

VIII. 치료 방법

[0160] 아르기나제 단백질을 ARG1-D 환자에게 투여하는 것 이외에, 다른 치료 방법도 또한 고려된다. 예를 들어, 환자는 유전자 치료 벡터, 예컨대 야생형 아르기나제를 포함한 아데노바이러스 기반 유전자 전달 벡터를 경유해 치료될 수 있다. 야생형 단백질은 특정 기관, 예컨대 간으로 유도될 수 있다. 예를 들어, 미국 특허 제8,398,968 호에 설명된 바와 같이, 유전자 치료에 의해 환자에게 단백질을 재도입하기 위한 다양한 바이러스 패키징 시스템이 개발되었다.

[0161] ARG1-D 환자를 치료하는 다른 방법은, 크리스퍼(CRISPR) 시스템을 사용하는 것으로, 염색체 상의 결합 유전자는 오류를 편집하기 위해 조작되어 환자가 정상적인 양의 야생형 아르기나제를 제조할 수 있도록 한다. 전술한 바와 같이, 편집될 필요가 있을 수 있는, 상이한 염색체 상에 위치한 2개의 아르기나제 유전자가 있다. CRISP 개놈 조작은, 예를 들어 미국 공개 특허 제20170240922호; 제20170283830호; 제20170224843호; 및 제20170191078호에 설명되어 있다.

[0162] 아르기나제를 전달하는 다른 방법은, 환자에게 투여될 수 있는 재봉합된 적혈구 세포(RBC)에 아르기나제 단백질을 캡슐화하는 것이다. 아르기나제를 캡슐화하는 것은 미국 공개 특허 제20160095884호 및 제20140154797호에 기술된 바와 같이 일반적으로 수행될 수 있다. 아르기나제를 함유한 적혈구를 제조하기 위한 용해/재봉합 공정은, 1°C 내지 8°C에서 냉장하면서 65% 이상의 적혈구 용적을 수준을 갖는 등장성 용액의 혼탁액에 구형 농축물을 배치하는 단계; 동일한 구상 농축물로부터의 적혈구 샘플, 바람직하게는 혼탁액 샘플에 기초하여 삼투압 측정을 측정하는 단계; 동일한 챔버 내에서 약 1°C 내지 8°C로 유지되는 온도로 활성 성분(즉, 아르기나제)의 용해 및 내재화 과정은, 적혈구 용적을 수준이 65% 이상인 적혈구 혼탁액과 1°C 내지 8°C에서 냉장된 저장성 용해 용액을, 투석 카트리지 내에서 순환시키는 것을 포함하는 단계; 용해 파라미터는 이전에 측정된 삼투압 측정에 따라 조정되는 단계; 및 고장성 용액에 의해 30°C 내지 40°C의 온도에서 제2 챔버 내에 재봉합하는 단계를 포함한다.

실시예

[0164] 개방 실험 임상 1/2 상 연구에서, ARG1-D로 진단된 12명의 성인 및 소아 환자(7명의 소아와 5명의 성인 환자)를 등록했다. 파트 1에서, 환자는 2주 간격으로 페질아르기나제의 일회 상승 용량을 투여받았다. 파트 2에서, 환자는 8주 동안 매주 간격으로 페질아르기나제(AEB1102)를 정맥내(IV)로 투여받았다.

[0165] 안전성, 약물동태학, 약역학(혈장 아르기닌 및 GC(예, GVA, ArgA, NAA, GAA)), 및 표준화된 임상 측정(예, 6분 보행 테스트(6MWT), 베르그 균형 척도(BBS), 대동작 기능 측정 66 항목(GMFM-66) 및 PROMIS에 대한 평가를 했다. GMFM-66은 파트 A에서 파트 E까지의 대동작 기능의 다양한 양태를 평가하는 도구이다. 페질아르기나제를 투여하기 이전과 페질아르기나제를 투여한 이후에 환자에 대한 페질아르기나제의 치료 효과를 평가하기 위해 구아니디노 화합물(GC)을 분석하였다. 환자 분석을 위해 선택된 GC는 혈장에서 α-케토-δ-구아니디노발레스 산

(GVA), 아르기닌 산(ArgA), 호모아르기닌, N- α -아세틸아르기닌(NAAArg), 및 GAA를 포함했다.

[0166] 방법. 환자의 K₂EDTA 혈장으로부터 GC(GAA, GVA, ArgA 및 NAAArg)의 측정을 위한 생체 분석 절차를 만들었다. 환자의 혈장 단백질을 10% 트리클로로아세트 산 용액으로 침전시키고 Imtakt Intrada 아미노산 50 x 2 mm (PN: WAA22) 컬럼을 사용하여 Shimadzu Nexera[®]로 분리했다. Applied Biosystems/MDS Sciex API 5500TM을 사용하여 LC-MS/MS에 의해 분석물이 검출되었다. 각 GC의 동위 원소 표지 표준을 사용하여 각 혈장 샘플의 정량화를 가능하도록 하였다. 상세한 방법의 프로토콜은 이 실시예의 끝에 제공된다.

[0167] 2명의 성인 여성 환자 연구 결과

[0168] 24살 및 25살 2명의 성인 여성 환자는 매주 펙질아르기나제를 IV로 8주 동안 치료 받았다. 두 환자 모두 경직을 포함하여 중등도에서 중증의 신경인지 및 신경운동 결핍을 갖는다. 두 환자 모두 펙질아르기나제 투여 과정 내내, 표준적인 사전 펙질아르기나제 치료를 계속하였다. 매주 펙질아르기나제 0.04 mg/kg의 정맥내(IV) 투여를 잘 견뎌냈다. 펙질아르기나제로 치료한 후, 혈장 아르기닌의 예상된 감소 이외에, 분석된 GC(예, ArgA, NAAArg 및 GVA)의 농도가 시간에 따라 감소하는 것이 관찰되었다(도 1). ArgA, NAAArg 및 GVA 혈장 수준의 감소는 최초 주입 후 24시간 이내에 발생하였고, 각 환자가 받은 8주의 투여를 통해 기준선 수준 이하로 계속 유지되었다.

[0169] 임상 1상 연구의 일회 상승 용량 부분(펙질아르기나제-101A)에서 아르기닌/오르니틴 샘플 분석용으로 원래 사용된 두 환자의 혈장 샘플을 풀링하여, GC 방법 개발 동안의 분석 범위 설정을 보조하였다. 이어서, 풀링된 샘플을 사용하여 방법 개발 단계가 완료된 후 GC를 정량화하였다. 두 환자 모두는 0.015 mg/kg 및 0.03 mg/kg(환자 체중)의 일회 용량으로 펙질아르기나제를 투여받았고, 두 투여 사이에 2주 관찰 기간을 가졌다.

[0170] 앞서 기술된 비GLP 분석(실시예의 끝에 제공된 상세한 방법)에서 이들 풀링된 환자 샘플을 사용하여, 0.03 mg/kg의 펙질아르기나제로 치료된 ARG1-D 환자로부터 시간 의존적 감소가 ArgA의 농도에서 (약 3배), GVA에서 (약 4배), NAAArg에서 (약 2배) 관찰되었다. 혈장 아르기닌의 감소와 평행한 GC 수준의 감소는, GLP 분석을 사용하여 측정되었다(도 1a 내지 도 1d).

[0171] 도 3a 내지 도 3d에 반영된 바와 같이, 2명의 환자(즉, 120-101 및 120-102)에게 0.015 mg/kg(환자 체중) 또는 0.03 mg/kg/(환자 체중)으로 펙질아르기나제를 투여하였고, 혈장 중의 아르기닌 및 구아나디노 화합물 수준은 다음과 같이 측정되었다.

표 2

0.015 mg/kg(환자 체중)의 투여량에서 두 환자의 GC 수준

시점 (hr)	아르기닌 (μ M)*	아르기닌 산 (μ M)**	α -K- δ -구아나디노발레드 산 (μ M)**	호모아르기닌 (μ M)**	α -N-아세틸아르기닌 (μ M)**
0	240	3.11	3.92	19.1	2.22
0.25	193	2.45	4.69	17.7	0.588
1	194	2.98	6.31	18.6	0.716
2	151				
4	131	3.45	7.96	21.1	0.994
8	82.7				
12	101				
24	111				
48	110				
72	122	2	2.58	22.2	0.603
144	176				
168	170	2.48	4.29	22.5	0.85

*두 대상체의 평균; **두 대상체로부터의 풀링된 샘플. 표 2 및 표 3에 나열된 값이 없는 경우, 환자는 그 시점에 분석이 고가여서 테스트를 받지 못했고, 일반적으로 혈중 수준이 그렇게 신속하게 변하리라 믿지 않았기 때문이다.

표 3

0.03 mg/kg(환자 체중)의 투여량에서 두 환자의 GC 수준

시점 (hr)	아르기닌 (μ M)*	아르기닌 산 (μ M)**	α -K- δ -구아니디노발레르 산(μ M)**	호모아르기닌 (μ M)**	α -N- 아세틸아르기닌(μ M)**
0	294	3.55	7.6	14.9	0.619
0.25	144	3.47	7.54	13	0.653
1	118	4.07	5.78	12	0.503
2	96.5				
4	76.4	2.89	3.86	9.83	0.308
8	67.7				
12	52.3				
24	78.1				
48	68.3				
72	76.3	1.08	1.51	18.9	0.225
144	165				
168	151	2.5	4.94	11.3	0.502

*두 대상체의 평균, **두 대상체로부터의 풀링된 샘플.

[0173]

표 4

투여량 및 농도의 테스트는 다음과 같이 일어났다:

대상체	연구 파트	주	샘플 설명	실제 샘플링 날짜	실제 샘플링 시간	회색 인자	아르기닌 농도 pM
선별							
120-101	증량	0	선별 1	25-Aug-2016	10:34:00	1	484
120-101	증량	0	선별 2	29-Aug-2016	8:52:00	1	408
120-101	증량	0	선별 3	30-Aug-2016	8:00:00	1	496
증량 투여 1 - 0.015 mg/kg							
120-101	증량	1	투여전 12~18 시간	12-Sep-2016	08:55:00	1	419
120-101	증량	1	투여전	13-Sep-2016	09:20:00	1	390
120-101	증량	1	SOI + 15 분	13-Sep-2016	10:54:00	1	260
120-101	증량	1	SOI + 1 시간	13-Sep-2016	11:36:00	1	295
120-101	증량	1	SOI + 2 시간	13-Sep-2016	12:39:00	1	289
120-101	증량	1	SOI + 4 시간	13-Sep-2016	14:36:00	1	206
120-101	증량	1	SOI + 8 시간	13-Sep-2016	18:50:00	1	213
120-101	증량	1	SOI + 12 시간	13-Sep-2016	22:39:00	1	238
120-101	증량	1	SOI + 24 시간	14-Sep-2016	10:36:00	1	250
120-101	증량	1	SOI + 48 시간	15-Sep-2016	11:18:00	1	174
120-101	증량	1	SOI + 72 시간	16-Sep-2016	11:10:00	1	235
120-101	증량	1	SOI + 120 시간	19-Sep-2016	11:00:00	1	284
120-101	증량	2	2 주차 1 일	20-Sep-2016	09:45:00	1	285
증량 투여 2 - 0.03 mg/kg							
120-101	증량	3	투여전 12~18 시간	26-Sep-2016	14:15:00	1	306
120-101	증량	3	투여전	27-Sep-2016	08:56:00	1	294
120-101	증량	3	SOI + 15 분	27-Sep-2016	10:30:00	1	144
120-101	증량	3	SOI + 1 시간	27-Sep-2016	11:11:00	1	118
120-101	증량	3	SOI + 2 시간	27-Sep-2016	12:10:00	1	96.5
120-101	증량	3	SOI + 4 시간	27-Sep-2016	14:10:00	1	76.4
120-101	증량	3	SOI + 8 시간	27-Sep-2016	18:08:00	1	67.7
120-101	증량	3	SOI + 12 시간	27-Sep-2016	22:09:00	1	52.3
120-101	증량	3	SOI + 24 시간	28-Sep-2016	10:11:00	1	78.1
120-101	증량	3	SOI + 48 시간	29-Sep-2016	09:40:00	1	68.3
120-101	증량	3	SOI + 72 시간	30-Sep-2016	08:40:00	1	76.3
120-101	증량	3	SOI + 120 시간	03-Oct-2016	09:45:00	1	165
120-101	증량	4	4 주차 1 일	04-Oct-2016	08:40:00	1	151

대상체	연구 파트	주	샘플 설명	실제 챔플링 날짜	실제 챔플링 시간	희석 인자	아르기닌 농도 μM
증량 투여 3 - 0.06 mg/kg							
120-101	증량	5	투여전 12~18 시간	10-Oct-2016	15:43:00	1	235
120-101	증량	5	투여전	11-Oct-2016	09:27:00	1	268
120-101	증량	5	SOI + 15 분	11-Oct-2016	10:37:00	1	49.5
120-101	증량	5	SOI + 1 시간	11-Oct-2016	11:24:00	1	46.6
120-101	증량	5	SOI + 2 시간	11-Oct-2016	12:24:00	1	32.8
120-101	증량	5	SOI + 4 시간	11-Oct-2016	14:50:00	1	9.96
120-101	증량	5	SOI + 8 시간	11-Oct-2016	18:20:00	1	18.3
120-101	증량	5	SOI + 12 시간	11-Oct-2016	20:31:00	1	20
120-101	증량	5	SOI + 24 시간	12-Oct-2016	10:21:00	1	23.9
120-101	증량	5	SOI + 48 시간	13-Oct-2016	10:53:00	1	25.4
120-101	증량	5	SOI + 72 시간	14-Oct-2016	09:31:00	1	40.7
120-101	증량	5	SOI + 120 시간	17-Oct-2016	10:14:00	1	134
120-101	증량	6	6 주차 1 일	20-Oct-2016	10:17:00	1	201
120-101	증량	7	투여전 12~18 시간	24-Oct-2016	10:27:00	1	230
120-101	증량	7	투여전	25-Oct-2016	09:25:00	1	206
120-101	증량	10	10 주차 1 일	08-Nov-2016	09:05:00	1	262
다중-투여 기준선							
120-101	다중-투여	0	기준선 1	16-Aug-2017	09:03:00	1	353
120-101	다중-투여	0	기준선 2	17-Aug-2017	09:10:00	1	377
120-101	다중-투여	0	기준선 3	18-Aug-2017	08:45:00	1	383
다중-투여 투여 1 - 0.04 mg/kg							
120-101	다중-투여	1	투여전	22-Aug-2017	09:10:00	1	306
120-101	다중-투여	1	주입 끝	22-Aug-2017	10:57:00	1	123
120-101	다중-투여	1	EOI + 4 시간	22-Aug-2017	14:39:00	1	91.6
120-101	다중-투여	1	EOI + 8 시간	22-Aug-2017	18:34:00	1	77.4
120-101	다중-투여	1	EOI + 24 시간	23-Aug-2017	10:05:00	1	7.96
120-101	다중-투여	1	EOI + 48 시간	24-Aug-2017	09:27:00	1	34.8
다중-투여 투여 2 - 0.04 mg/kg (일회 투여전 측정)							
120-101	다중-투여	2	2 주차 1 일	27-Aug-2017	09:50:00	1	149
다중-투여 투여 3 - 0.04 mg/kg (일회 투여전 측정)							
120-101	다중-투여	3	3 주차 1 일	05-Sep-2017	09:28:00	1	117
선행							
120-102	증량	0	선행 1	25-Aug-2016	10:34:00	1	325

대상체	연구 파트	주	샘플 설명	실제 샘플링 날짜	실제 샘플링 시간	회석 인자	아르기닌 농도 μM
120-102	증량	0	선별 2	29-Aug-2016	08:52:00	1	362
120-102	증량	0	선별 3	30-Aug-2016	08:00:00	1	300
증량 투여 1 - 0.015 mg/kg							
120-102	증량	1	투여전 12~18 시간	12-Sep-2016	09:00:00	1	231
120-102	증량	1	투여전	13-Sep-2016	09:50:00	1	249
120-102	증량	1	SOI + 15 분	13-Sep-2016	11:35:00	1	193
120-102	증량	1	SOI + 1 시간	13-Sep-2016	12:20:00	1	194
120-102	증량	1	SOI + 2 시간	13-Sep-2016	13:21:00	1	151
120-102	증량	1	SOI + 4 시간	13-Sep-2016	15:13:00	1	131
120-102	증량	1	SOI + 8 시간	13-Sep-2016	19:16:00	1	82.7
120-102	증량	1	SOI + 12 시간	13-Sep-2016	23:18:00	1	101
120-102	증량	1	SOI + 24 시간	14-Sep-2016	11:28:00	1	111
120-102	증량	1	SOI + 48 시간	15-Sep-2016	11:29:00	1	110
120-102	증량	1	SOI + 72 시간	16-Sep-2016	11:20:00	1	122
120-102	증량	1	SOI + 120 시간	19-Sep-2016	11:05:00	1	176
120-102	증량	2	2 주차 1 일	20-Sep-2016	09:58:00	1	170
증량 투여 2 - 0.03 mg/kg							
120-102	증량	3	투여전 12~18 시간	26-Sep-2016	14:25:00	1	227
120-102	증량	3	투여전	27-Sep-2016	08:26:00	1	195
120-102	증량	3	SOI + 15 분	27-Sep-2016	09:50:00	1	79.2
120-102	증량	3	SOI + 1 시간	27-Sep-2016	10:35:00	1	55
120-102	증량	3	SOI + 2 시간	27-Sep-2016	11:35:00	1	69.8
120-102	증량	3	SOI + 4 시간	27-Sep-2016	13:44:00	1	36.5
120-102	증량	3	SOI + 8 시간	27-Sep-2016	17:28:00	1	45.9
120-102	증량	3	SOI + 12 시간	27-Sep-2016	21:22:00	1	22.6
120-102	증량	3	SOI + 24 시간	28-Sep-2016	09:17:00	1	44.4
120-102	증량	3	SOI + 48 시간	29-Sep-2016	09:34:00	1	50.5
120-102	증량	3	SOI + 72 시간	30-Sep-2016	09:30:00	1	56.9
120-102	증량	3	SOI + 120 시간	03-Oct-2016	10:00:00	1	138
120-102	증량	4	4 주차 1 일	04-Oct-2016	08:36:00	1	110
120-102	증량	5	투여전 12~18 시간	10-Oct-2016	15:15:00	1	177
120-102	증량	5	투여전	11-Oct-2016	08:45:00	1	158

대상체	연구 파트	주	샘플 설명	실제 샘플링 날짜	실제 샘플링 시간	회적 인자	아르기닌 농도 μM
120-102	증량	1 0	10 주차 1 일	25-Oct-2016	09:55:00	1	228
다중-투여 기준선							
120-102	다중-투여	0	기준선 1	16-Aug-2017	08:55:00	1	307
120-102	다중-투여	0	기준선 2	17-Aug-2017	09:20:00	1	376
120-102	다중-투여	0	기준선 3	18-Aug-2017	08:50:00	1	314
다중-투여 투여 1 - 0.04 mg/kg							
120-102	다중-투여	1	투여전	22-Aug-2017	09:19:00	1	263
120-102	다중-투여	1	주입 끝	22-Aug-2017	10:25:00	1	100
120-102	다중-투여	1	EOI + 4 시간	22-Aug-2017	14:07:00	1	53
120-102	다중-투여	1	EOI + 8 시간	22-Aug-2017	18:10:00	1	42.6
120-102	다중-투여	1	EOI + 24 시간	23-Aug-2017	09:45:00	1	45.4
120-102	다중-투여	1	EOI + 48 시간	24-Aug-2017	09:17:00	1	40.6
다중-투여 투여 2 - 0.04 mg/kg (일회 투여전 측정)							
120-102	다중-투여	2	2 주차 1 일	29-Aug-2017	09:48:00	1	141
다중-투여 투여 3 - 0.04 mg/kg (일회 투여전 측정)							
120-102	다중-투여	3	3 주차 1 일	05-Sep-2017	09:13:00	1	155

환자 스케줄로 인해 120 시간으로 계획된 샘플이 실제 144 시간 소요되었음.

[0177]

표 5

PK 농도(시험의 용량 증량 부분에 유효한 농도 데이터); 두 환자의 PK 데이터

는 다음과 같다:

대상체	주	시점	데이터 수집 날짜	데이터 수집 시작	부분 표본 인자	농도 ($\mu\text{g/mL}$)
증량 투여 1 - 0.015 mg/kg						
120-101	1 주차	투여전	9/12/2016	8:58	1	BQL
120-101	1 주차	투여전	9/13/2016	9:20	1	BQL
120-101	1 주차	15 분	9/13/2016	10:51	1	0.407
120-101	1 주차	1 시간	9/13/2016	1:36	1	0.357
120-101	1 주차	2 시간	9/13/2016	12:39	1	0.355
120-101	1 주차	4 시간	9/13/2016	14:36	1	0.306
120-101	1 주차	8 시간	9/13/2016	18:50	1	0.297
120-101	1 주차	12 시간	9/13/2016	22:39	1	BQL
120-101	1 주차	24 시간	9/14/2016	10:36	1	BQL
120-101	1 주차	48 시간	9/15/2016	11:11	1	BQL

[0178]

대상체	주	시점	데이터 수집 날짜	데이터 수집 시각	부분 표본 인자	농도 (µg/mL)
120-101	1 주차	72 시간	9/16/2016	11:10	1	BQL
120-101	1 주차	120 시간	9/19/2016	11:00	1	BQL
120-101	2 주차	방문 중	9/20/2016	9:45	1	BQL
증량 투여 2 - 0.03 mg/kg						
120-101	3 주차	투여전	9/26/2016	14:15	1	BQL
120-101	3 주차	투여전	9/27/2016	8:56	1	BQL
120-101	3 주차	15 분	9/27/2016	10:30	1	0.993
120-101	3 주차	1 시간	9/27/2016	11:10	1	0.962
120-101	3 주차	2 시간	9/27/2016	12:10	1	0.847
120-101	3 주차	4 시간	9/27/2016	14:10	1	0.728
120-101	3 주차	8 시간	9/27/2016	18:08	1	0.740
120-101	3 주차	12 시간	9/27/2016	22:09	1	0.622
120-101	3 주차	48 시간	9/28/2016	9:34	1	0.253
120-101	3 주차	24 시간	9/28/2016	10:11	1	0.467
120-101	3 주차	72 시간	9/29/2016	9:36	1	BQL
120-101	3 주차	120 시간	10/3/2016	9:45	1	BQL
120-101	4 주차	방문 중	10/4/2016	8:40	1	BQL
증량 투여 3 - 0.06 mg/kg						
120-101	5 주차	투여전	10/10/2016	15:43	1	BQL
120-101	5 주차	투여전	10/11/2016	9:25	1	BQL
120-101	5 주차	15 분	10/11/2016	10:37	1	1.98
120-101	5 주차	1 시간	10/11/2016	11:24	1	1.88
120-101	5 주차	2 시간	10/11/2016	12:24	1	1.86
120-101	5 주차	4 시간	10/11/2016	14:50	1	1.68
120-101	5 주차	8 시간	10/11/2016	18:15	1	1.54
120-101	5 주차	12 시간	10/11/2016	22:31	1	1.34
120-101	5 주차	24 시간	10/12/2016	10:21	1	1.02
120-101	5 주차	48 시간	10/13/2016	10:53	1	0.598
120-101	5 주차	72 시간	10/14/2016	9:31	1	0.388
120-101	5 주차	120 시간	10/17/2016	10:14	1	BQL
120-101	6 주차	방문 중	10/20/2016	10:17	1	BQL
120-101	7 주차	투여전	10/24/2016	10:27	1	BQL
120-101	7 주차	1 시간	10/25/2016	9:25	1	BQL
120-101	10 주차	방문 중	11/8/2016	9:05	1	BQL
증량 투여 1 - 0.015 mg/kg						
120-102	1 주차	투여전	9/12/2016	9:00	1	BQL
120-102	1 주차	투여전	9/13/2016	9:50	1	BQL
120-102	1 주차	15 분	9/13/2016	11:35	1	0.331

대상체	주	시점	데이터 수집 날짜	데이터 수집 시작	부분 표본 인자	농도 (μg/mL)
120-102	1 주차	1 시간	9/13/2016	12:20	1	0.366
120-102	1 주차	2 시간	9/13/2016	13:20	1	0.329
120-102	1 주차	4 시간	9/13/2016	15:13	1	0.301
120-102	1 주차	8 시간	9/13/2016	19:16	1	0.252
120-102	1 주차	12 시간	9/13/2016	23:18	1	BQL
120-102	1 주차	24 시간	9/14/2016	11:28	1	BQL
120-102	1 주차	48 시간	9/15/2016	11:20	1	BQL
120-102	1 주차	72 시간	9/16/2016	11:20	1	BQL
120-102	1 주차	120 시간	9/19/2016	11:05	1	BQL
120-102	2 주차	방문 중	9/20/2016	9:58	1	BQL
증량 투여 2 - 0.03 mg/kg						
120-102	3 주차	투여전	9/26/2016	14:25	1	BQL
120-102	3 주차	투여전	9/27/2016	8:34	1	BQL
120-102	3 주차	15 분	9/27/2016	9:50	1	0.904
120-102	3 주차	1 시간	9/27/2016	10:35	1	0.918
120-102	3 주차	2 시간	9/27/2016	11:35	1	0.829
120-102	3 주차	4 시간	9/27/2016	13:44	1	0.767
120-102	3 주차	8 시간	9/27/2016	17:28	1	0.671
120-102	3 주차	12 시간	9/27/2016	21:22	1	0.577
120-102	3 주차	24 시간	9/28/2016	9:17	1	0.373
120-102	3 주차	48 시간	9/28/2016	9:40	1	BQL
120-102	3 주차	72 시간	9/29/2016	9:30	1	BQL
120-102	3 주차	120 시간	10/3/2016	10:00	1	BQL
120-102	4 주차	방문 중	10/4/2016	8:36	1	BQL
120-102	5 주차	투여전	10/10/2016	15:15	1	BQL
120-102	5 주차	투여전	10/11/2016	8:38	1	BQL
120-102	10 주차	방문 중	10/25/2016	9:55	1	BQL

[0180]

[0181] 환자 스케줄로 인해 120시간으로 계획된 샘플이 실제 144시간 소요되었음을 참조 바란다. 추가적으로 서로 다른 업체가 PK 및 약역학(PD) 데이터를 제공하였고, 따라서 두 데이터 세트의 포맷은 상이하다.

표 6

일회 IV 주입 이후 과아르기닌혈증 환자의 펙질아르기나제에 대한 개별 및 평균 PK 파라미터(데이터는 용량 증량에 대해서만 유효)

용량 (mg/kg)	대상체	R ²	T _{1/2} (hr)	T _{max} (hr)	C _{max} (μ g/ mL)	T _{last} (hr)	AUC ₀₋₁ (hr ² μ g/ mL)	AUC ₀₋₁₆₈ (hr ² μ g/m L)	AUC ₀₋₂₄ (hr ² μ g/m L)	AUC Extrap. (%)	CL (mL/ hr/kg)	V _d (mL/ kg)
0.015	120-101	0.813	24.6	0.25	0.407	8.0	2.56	12.9	12.9	80.1	1.17	41.4
	120-102	1.00	15.6	1.0	0.366	8.0	2.38	8.05	8.05	70.4	1.86	42.0
	N		2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
	평균값	20.1	0.63	0.387	8.0	2.47	10.5	10.5	10.5	75.3	1.51	41.7
	표준편차	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR
	최소값	15.6	0.25	0.366	8.0	2.38	8.05	8.05	8.05	70.4	1.17	41.4
	증간값	20.1	0.63	0.387	8.0	2.47	10.5	10.5	10.5	75.3	1.51	41.7
	최대값	24.6	1.0	0.407	8.0	2.56	12.9	12.9	12.9	80.1	1.86	42.0
	CV%	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR
0.03	120-101	1.00	27.7	0.25	0.993	48	23.9	33.5	34.0	29.8	0.883	34.9
	120-102	1.00	18.9	1.0	0.918	24	14.2	24.4	24.4	41.7	1.23	33.6
	N		2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
	평균값	23.3	0.625	0.956	36	19.0	28.9	29.2	35.7	1.06	34.3	
	표준편차	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR
	최소값	18.9	0.250	0.918	24	14.2	24.4	24.4	29.8	0.883	33.6	
	증간값	23.3	0.625	0.956	36	19.0	28.9	29.2	35.7	1.06	34.3	
	최대값	27.7	1.0	0.993	48	23.9	33.5	34.0	41.7	1.23	34.9	
	CV%	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR
0.06	120-101	0.997	33.4	0.25	1.98	72	64.0	80.0	82.2	22.2	0.730	34.6
	N		1	1	1	1	1.0	1.0	1	1	1	1
	평균값	33.4	0.25	1.98	72	64.0	80.0	82.2	22.2	0.730	34.6	
	표준편차	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR
	최소값	33.4	0.25	1.98	72	64.0	80.0	82.2	22.2	0.730	34.6	
	증간값	33.4	0.25	1.98	72	64.0	80.0	82.2	22.2	0.730	34.6	
	최대값	33.4	0.25	1.98	72	64.0	80.0	82.2	22.2	0.730	34.6	
	CV%	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR

CV: 변화 계수; NR: 미보고 (N<3).

[0182]

데이터. 혈장 아르기닌과 ArgA, GVA 및 NAAArg 농도 사이의 관계는 일반적으로 단백질 제한 식이 요법으로 유지된 환자의 분석에서 Marescau 등(1990)이 발표한 데이터와 일치한다. Marescau 등(1990)의 연구에서, GC 수준은 아르기닌 수준의 감소와 동시에 감소했다.

[0184]

본원에 제시된 데이터의 경우, ArgA, GVA 및 NAAArg 수준뿐만 아니라 호모아르기닌(HArg) 수준을 분석하였다. HArg 수준을 자세히 보았는데, 그 이유는 Marescau 등(1990)의 연구에서 HArg가 ARG1-D 환자의 혈청에서 상당히 상승하였기 때문이다. HArg 수준은 펙질아르기나제로 처리된 ARG1-D 환자에게는 조절되지 않는 것처럼 보였다 (도 2) 이 결과는 Marescau 등(1990)에 의해 보고된 데이터와 혈청 HArg 수준이 단백질 제한 식이 요법을 유지한 환자에게서 감소하지 않았던 점에서 일치한다. 환자 치료로 평가할 수 있는 추가 조건은, 근력 향상, 환자의 보행 능력(즉, 달리기, 걷기, 자전거 타기, 지지 없이 계단 오르기 가능), 인지 능력 향상(예, WISC 테스트 개선) 또는 적응 행동의 변화(예: ABAS 또는 VABS 테스트)이다.

[0185]

또한, 저 용량의 펙질아르기나제 0.015 mg/kg(환자 체중)으로 치료된 2명의 성인 환자로부터 얻은, 풀링된 혈장 샘플로부터 GC 데이터를 생성하였다. 펙질아르기나제 투여를 낮추면 혈장 아르기닌 농도의 감소가 관찰되었다. 그러나, 이 감소는 0.03 mg/kg 투여량에서 관찰된 혈장 아르기닌의 감소만큼 뚜렷하지 않았다.

[0186]

상기 제공된 이들 2명의 환자에 대한 발견을 감안할 때, 매주 환자에게 0.04 mg/kg의 투여량으로 정맥내 투여된 펙질아르기나제가 성인 ARG1-D 환자에게서 잘 견디는 것으로 결론 내렸다. 환자는 아르기닌 수준 감소와 비슷한 GC의 현저한 감소를 나타냈다. 이들 두 성인 환자에 근거하여 아르기닌 및 GC 수준에 대한 효과는, 엄격한 식이 요법 아르기닌 제한으로 과거에 달성되었던 효과보다 더 과학적으로 실질적인 것으로 보인다. 상기 연구에서 한 ARG1-D 환자는 0.2 mg/kg으로 성공적으로 투여되었다. 고령 종양 최대 허용 용량(MTD)은 0.33 mg/kg 그리고 최

대 0.48 mg/kg 용량으로 설정되었다.

[0187] 물론, 아르기닌 수준이 높은(예, 600 내지 800 μ M 아르기닌) 환자는 0.50 mg/kg의 페질아르기나제보다 높은 용량으로 치료될 수 있다. 아르기닌 수준이 높은 환자는 0.005 내지 1.00 mg/kg(대상체 체중) 범위의 아르기나제 투여가 필요할 수 있다. 0.005 mg/kg 내지 0.50 mg/kg 및/또는 0.005 내지 0.20 mg/kg(대상체 체중)의 투여 범위도 또한 고려된다.

[0188] 약물의 생체 이용률은 IV 및/또는 피하 주사로부터 특정 기간에 걸쳐 혈액 내 약물의 양을 측정함으로써 결정될 수 있다. 계산하기 위해, 정맥내로 투여되는 약물의 100%가 혈류로 들어가는 것으로 가정되는 반면, 피하로 투여되는 모든 약물이 피하 공간으로부터 혈액으로 들어가지는 않는다. 생체 이용률은 피하 총합을 IV 총합으로 나누어 결정될 수 있다. 피하 투여된 페질아르기나제의 생체 이용률은 시노몰구스 원숭이에서의 정맥내 및 피하 투여의 비교에 기초하여 IV 투여의 대략 60%인 것으로 결정되었다. 따라서, 아르기닌 수준이 높은 환자는 1.5 mg/kg의 아르기나제로 성공적으로 치료될 수 있다. 생체 이용률 데이터에 기초하여, 페질아르기나제의 피하 투여를 위한 용량 범위는 예를 들어 0.01 내지 약 1.5 mg/kg(대상체 체중); 0.015 mg/kg 내지 0.75 mg/kg; 및/또는 0.015 mg/kg 내지 약 0.30 mg/kg(대상체 체중)이 사용된다.

[0189] 도 4a 및 4b는 페질아르기나제로 치료하기 전(예, 선별시) 및 후에, 환자 120-101(도 4a)와 환자 120-102(도 4b) 두 환자에서의 GAA에 대한 데이터를 나타낸다. 두 경우 모두에서, 데이터는 선별시, 그리고 파트 1과 파트 2로 투여 중의 GAA 수준을 나타낸다. 두 환자 모두에서, 0.015 mg/kg(대상체 체중)의 투여 후 GAA가 감소되었고, 더 높은 용량에서 더 큰 효과가 관찰되었다. 특히, 페질아르기나제의 투여 이후 GAA의 급격한 감소가 즉시 관찰되었다. 또한, 초기 치료는 투여 후 24 시간 이내 두 환자 모두를 GAA의 혈장 수준 정상 범위로 만들었다. 예를 들어, 도 4b에서 14일 차에 환자의 GAA 수준은 4,350 nM인데, 이 값이 아르기나제의 투여후 24시간 이내 1,350 nM로 감소하였다. 따라서, 아르기나제로 치료하면 GAA 또는 GVA와 같은 독성 대사 물질을 신속히 제거할 수 있고, 급성 치료에 유용하다. 페질아르기나제는 아르기닌 감소 식이 요법 단독보다는 더 빠른 속도로 표시된 독성 대사 물질을 제거한다.

환자 특성 및 안정성

[0191] 임상 1/2상 연구에서 환자에 대한 기준선 평가를 수행하였다. 아래 표에 제공된 기준선 평가는, 상기 연구에 있어서 상기 환자에게 상당한 질병 부담을 보여주고 있다. 환자는 단백질 제한 식이 요법을 받았다.

[0192] 베르그 균형에 있어서, 균형 부족은 중간 또는 높은 낙상 위험으로서 정의된다(즉, 점수 \leq 40). 6MWT에 있어서, 정상적인 개인에 대한 나이 조절 범위 아래인 경우 부족하다고 정의한다(Geiger *et al.*, "Six-minute walk test in children and adolescents," *J. Pediatr.*, 2007 Apr; 150(4):395-399, 및 Enright *et al.*, "Reference equations for the six-minute walk in healthy adults," *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 1998 Nov.; 158(5 Pt 1):1384-1387). GMFM 파트 E에 있어서, 최소 임상 중요도 차이(MCID)에 기반하여 68 미만인 경우를 부족하다고 정의한다(Oeffinger *et al.*, "Outcome tools used for ambulatory children with cerebral palsy: responsiveness and minimum clinically important differences," *Dev. Med. Child Neurol.*, 2008 50(12): 918-925). 다중 기준선 실험실 평가가 이용 가능한 경우, 투여 직전에 즉시 평가를 보고한다. PROMIS의 경우, 부족 기준선은 T-점수가 40 미만인 것으로 정의한다.

표 7

임상 1/2상 연구에서 환자에 대해 수행된 기준선 평가.

특성/평가(N = 12)	중간값 (범위) 또는 n (%)	부족 기준선 (%)
질병 특징 및 의료 이력		
나이 (세)	16.5 (5-31)	
여성	8 (67%)	
경직 이력(≥ 중등도)	7 (58%)	
발작 이력	7 (58%)	
고암모니아혈증 이력	6 (50%)	
성장 지연	8 (67%)	
암모니아 제거제	11 (92%)	
기준선 질병 발현		
아르기닌 ($\mu\text{mol/L}$)	397 (203 내지 531)	100%
기준선 알라닌 트랜스아미나제 (ALT) (U/L)	37.5 (21 내지 171)	58%
기준선 암모니아 ($\mu\text{mol/L}$)	37 (9 내지 77)	50%
키 백분위수(질병 관리센터 성장 차트에 기반함)	4.4% (0.1% 내지 22.9%)	92%
6MWT (m)	266.5 (102 내지 602)	92%
베르그 균형 (점수 0-56)	47 (11 내지 56)	42%
GMFM 파트 E (점수 0-72)	48.5 (12 내지 72)	67%
PROMIS 신체 기능 도메인	38 (28.3 내지 57.1)	58%

[0193]

[0194] 최대 치료 관련 부작용("AE")은 다음 표에 나타낸 바와 같이 경증이었다. 2명 이상의 환자에서 발생한 치료 관련 AE는 과민증 (n = 3, 모두 중등도), 소양증 (n = 3, 모두 경증) 및 건성 피부 (n = 2, 둘 다)였다. 요약하면, 본 연구에서 모든 환자들에게 130회 이상의 주입이 투여되었다. 3명의 환자에서 네 곳의 중등도의 과민 반응(두 곳은 심각한 부작용(SAE)으로 간주됨)이 관찰되었다. 이를 AE는 주입 속도 조절 및 항히스타민제의 투여 및 일부 경우에는 코르티코스테로이드로 관리되었다. 펙질아르기나제 치료와 관련이 없는 것으로 평가된 고암모니아혈증의 SAE 하나가 있었다.

표 8

부작용

환자 구분	파트 1 (n=12)	파트 2 (n=4)
임의 관련 부작용(AE)	6 (50%)	3 (75%)
임의 심각한 부작용	3 (25%)	0
임의 관련 심각한 부작용(SAE)	2 (17%)	0

[0195]

페질아르기나제 ADA 효과를 연구하였다. 래트, 원숭이 및 인간 혈청에서 AEB1102 (Co-ArgI-PEG)에 대한 항체를 검출하기 위해 MSD(Meso Scale Discovery) 전기-화학 발광 방법을 사용한 브리지 분석을 검증하였다. 상기 방법은, ADA 및 루테늄 표지된 AEB1102(Ru-AEB1102 또는 Ru-Co-ArgI-PEG)를 포획하여 항체를 검출하도록, 비오틴화된 AEB1102(B-AEB1102 또는 B-Co-ArgI-PEG)를 사용하였다.

[0197]

검증하는 동안, B-Co-ArgI-PEG 및 Ru-Co-ArgI-PEG의 마스터 믹스(MM)를 1.0 μ g/mL B-AEB1102 및 1.0 μ g/mL Ru-AEB1102의 최종 농도로 분석 완충액에서 제조하였다. 희석된 샘플 및 대조군을 스트렙타비딘으로 코팅된 플레이트의 웰에서 마스터 믹스에 첨가하였다. 배양 및 세척 이후, (Meso Scale Discovery의) 150 μ L의 2X Read Buffer T를 각 웰에 추가하였다. Sector Imager 6000에서 샘플을 판독하였다. 이 분석법은 선별, 역가 및 확인에 사용되었으며, 확증 분석은 150 μ g/mL AEB1102(약물)와 사전 인큐베이션되었다는 점을 알렸다. 고, 중, 저 농도의 양성 대조군 및 음성 대조군을 각 실행에 포함시켰다. 컷 포인트, 선별, 및 확인을 통계적으로 할당하여, 대략 5% 및 1%의 긍정 오류 비율을 각각 얻었다. 양성 대조군은, 항-Co-ArgI-PEG 친화성 정제된 달ローン 항체이고 음성 대조군(NC)은, 풀링된 정상 래트, 시노몰구스 원숭이 또는 인간 혈청으로 부분 표본화되었다. 양성 및 비특이적 결합(NSB) 대조군을 사용하여 분석 성능을 모니터링하였다.

[0198]

AEB1102로 투여한 후 기준에 존재하거나 치료로 출현할 수 있는 항-PEG 항체를 검출할 수 있도록 PEG에 대한 항체를 검출하기 위하여 직접 결합 분석법을 검증하였다.

[0199]

Starwell C8 Maxisorp(96개 웰 형태 플레이트)의 웰을, 2 μ g/mL 모노-페길화된 소 혈청 알부민(BSA)(BSA-mPEG) 5 kDa (Life Diagnostics), 또는 탄산염 코팅 완충액 (BioWorld) 내 500 ng/mL 인간 IgG (Jackson ImmunoResearch Laboratories) 또는 500 ng/mL 인간 IgM (Jackson ImmunoResearch Laboratories)의 100 μ L로 코팅하였다. 희석 완충액에서 50배의 최소 요구 희석법(MRD)으로 희석된 대조군 및 샘플을 플레이트에 이중으로 첨가하였다(100 μ L/웰). 희석 완충액은 1x 인산염 완충 식염수(PBS) 내 4%의 소 감마 글로불린을 포함한다. 100 μ L의 검출 항체를 적절한 웰에 첨가하였다. 마우스 항-PEG 항체(Jackson ImmunoResearch Laboratories)는 1:5,000으로 희석된 염소 항-마우스 IgG-Fc-HRP(Jackson ImmunoResearch Laboratories)를 사용하여 검출되었고, 항-인간 항체는, 희석 완충액에 1:30,000으로 희석되고 적절한 웰에 첨가 된 토끼 항-인간 IgG/A/M(Jackson ImmunoResearch Laboratories)을 사용하여 검출되었다. 3,3',5,5'-테트라메틸벤지딘(TMB) 기질을 웰당 100 μ L 첨가한 후, 웰당 정지 용액을 100 μ L 첨가하여 약 10 내지 20분 후에 반응을 정지시켰다. 플레이트(들)는 450(검출) 및 620(백그라운드)에서 Synergy 2 플레이트 판독기에서 판독되었다. 컷 포인트, 선별, 및 확인을 통계적으로 할당하여, 대략 5 및 1%의 긍정 오류 비율을 각각 얻었다. 이 분석법은 선별, 역가 및 확인에 사용되었다. 역가될 샘플을 음성 풀링된 인간 혈청에서 최소 7회 2배 연속 희석으로 처리하였다.

[0200]

일시적인 저역가 항-PEG ADA(항-약물 항체)가 환자 연구의 파트 1 부분에서 검출되었다(아래 표 참조). 반복 투여 시작시, 7명의 환자 중 6명에서 검출 가능한 ADA가 검출되지 않았다. 페질아르기나제에 대한 면역내성 유도는 하기 표 9에 나타낸 바와 같이 예기치 않게 빨랐다.

표 9

페질아르기나제 및 PEG에 대한 ADA 평가

ADA 유형	파트 1 치료 이전 (n = 10)	파트 1 치료로 나타난(n = 10)	파트 2 의 시작 시 ADA (n = 7*)	역가 범위
항-PEG	10%	40%	14%	50-400
항- 페질아르기나제	10%	30%	0	10-160

* 치료 전에 항-PEG ADA를 가진 환자 1명은 파트 1 동안 역가가 감소하였고, 최종 파트 1 투여에서 검출 가능한 ADA는 없었다. 그러나, 이 환자는 본 연구와 무관한 이유로 본 연구의 파트 2에서 계속되지 않았고, 이 환자는 n= 7에 포함되지 않았다.

[0201]

[0202] 도 5a 및 도 5b는 아르기닌과 GC의 결과를 나타낸다. GAA는 ARG1-D 환자에게서 높았다. 이들 환자의 GAA 수준은 페질아르기나제의 치료에 의해 낮아졌다. 도 5b에 나타낸 반복 투여 그래프는 파트 2에서 8회 용량을 모두 투여 받은 환자를 포함한다. GC에 대한 정상 상한치(UNL)는 건강한 어른의 GC 연구에 기초한다. 페질아르기나제는 일회 투여 및 반복 투여(도 5b)의 정상 범위 내로 아르기닌 수준을 낮추는 것에 상당히 효과적이다. ARG1-D 환자에게서 높은 GAA 수준은, 또한 페질아르기나제의 치료에 의해 낮아진다. 시간에 따라 GVA, ArgA, GAA, 및 NAA의 농도 감소는 페질아르기나제로 IV QW(매주)로 치료한 이후 관찰되었다. GVA, ArgA, GAA, 및 NAA 수준의 감소는 제1 주입후 24시간 내에 일어났고, 기준선 수준으로부터의 감소는 8주 투여 내내 유지되었다. 혈청 페질아르기나제 수준을 투여 1 및 투여 8 근처의 다중 시점에 결정하였다.

[0203]

도 6은 세 명의 환자에 대한 6분 보행 테스트의 결과를 제공한다(환자 5("c")의 경우 투여 20 및 투여 32에서 데이터가 없음). 신경 운동 결과는 아래 표에 나와 있다. 투여 8, 20 및 32는 반복 투여의 시작(제2 투여)으로부터 측정된다. PROMIS는 구체적으로 PROMIS의 신체적 기능 도메인이다. 6MWT(6분 보행 테스트), BBS (베르그 균형 척도), GMFM 파트 E 및 PROMIS에 대한 아래 표의 데이터는, 기준선의 원시값으로 표시되며 다른 시점의 기준선으로부터 변한다. 6MWT에 대한 MCID는, Schrover *et al.*, "Minimal clinically important difference for the 6-min walk test: literature review and application to Morquio A syndrome," *Orphanet. J. Rare Dis.*, 2017 Apr 26; 12(1):78의 분석으로부터 정의되고, BBS에 대한 MCID는, Downs *et al.*, "The Berg Balance Scale," *J. Physiother.*, 2015 Jan; 61(1): 46의 분석에 의해 정의되고, GMFM에 대한 MCID는, Oeffinger *et al.*, 2008의 분석으로부터 정의되고, PROMIS에 대한 MCID는 0.5 표준 편차 또는 T-점수상 5 점을 갖는 물리적 기능에 기반한다. 아래 표와 도 6은 페질아르기나제 투여 후 환자에 대한 개선된 신경 운동 기능을 입증한다. 신경 운동 기능은 근육 또는 신경 기능을 지칭할 수 있고, 예를 들어 PROMIS, 6MWT, BBS 및 GMFM을 사용하여 환자를 임상 적으로 평가할 수 있다. 신경 운동 기능의 예는 제한 없이, 계단 오르기, 보행, 경직 및 민첩성을 포함한다. 예를 들어, 고통받는 환자는 정상적으로(뒤꿈치로부터 발가락으로) 걷는 대신 발끝으로 걸을 수 있다. 개선된 신경 운동 기능은, 발끝 대신 정상적으로 걷거나 잘 걷는 이러한 환자의 능력을 지칭할 수 있다. 개선된 신경 운동 기능은 보행 보조기 (예, "보행기" 또는 지팡이)의 사용을 더 이상 필요로 하지 않거나 덜 사용하는 것과 같은 향상된 이동성을 지칭할 수 있다. 개선된 신경 운동 기능은 개선된 자세 및/또는 개선된 의사 소통/사회화를 지칭할 수 있다.

표 10

신경 운동 기능 평가

환자 나이 (세)	내과의사/평가자 관찰	시점	6MWT (m)	BBS MCID + 7	GMFM 파트 E MCID 변화	PROMIS T-점수 MCID + 5
#1 25	<ul style="list-style-type: none"> 보행 중 개선된 스텝 품질 및 자신감 휴식 경직 덜 함 	기준선	102	17/56	29/72	35.6
		투여 8	122	30	32	33.3
		투여 20	134	35	35	
		투여 32	139	28	36	
				MCID: + 1.8		
#2 24	<ul style="list-style-type: none"> 현재까지 기록할 만한 의미있는 관찰은 없음 	기준선	261	54/56	63/72	40.4
		투여 8	298	54	66	48
		투여 20	322	53	64	
		투여 32	302	53	64	
				MCID: + 4.0		
#5 19	<ul style="list-style-type: none"> 보행 중 개선된 자신감 및 자세 향상 환자는 보다 활기차고 민첩한 것으로 나타남 	기준선	174	31/56	27/72	36.7
		투여 8	168	30	29	41.8
				MCID: + 2.8		

[0204]

[0205] GAA는 GAMT(구아니디노아세테이트 메틸트랜스퍼라제) 결핍 환자의 발작과 연결되어 있다(Stockler-Ipsiroglu *et al.*, “Guanidinoacetate methyltransferase(GAMT) deficiency: outcomes in 48 individuals and recommendations for diagnosis, treatment and monitoring,” *Mol. Genet. Metab.*, 2014; 111(1): 16-25) 결과는, 페질아르기나제를 사용한 치료가 혈장 아르기닌 및 관련 GC를 감소시킬 뿐만 아니라 환자의 GAA 수준을 낮추었음을 입증한다. GAA(예를 들어 도 5b를 참조 바람)와 같은 하나 이상의 구아니디노 화합물의 수준은, 아르기나제의 투여후 24 내지 48시간 내에 감소되거나 제거된다. 따라서, 아르기나제는 환자 내의 독성 대사 물질을 감소시키거나 제거하기 위한 급성 치료로서 사용 가능하다. 임상적인 개선은 8주 이후 페질아르기나제의 반복 용량 투여를 이용해 관찰되었다. 페질아르기나제는 일반적으로 환자에 의해 잘 견뎌졌다. 대부분의 관련 AE는 경증이고 표준 조치로 관리 가능했다.

[0206]

페질아르기나제로 치료하면, 예기치 않고 빠르게 ARG1-D 환자에서 고아르기닌혈증의 증상을 감소시켰다. 이들 개선은 생화학적 수준에서 나타났다. 아르기나제의 초기 및/또는 반복 투여에 기초하여, 아르기닌 및 구아니디노 화합물 중 하나 이상의 혈장 수준을 정상 수준으로 감소시킬 수 있다. 또한, 아르기나제의 투여는, ARG1-D

환자의 적응 행동 및/또는 신경 운동 기능을 개선시켰다. 연구의 모든 환자는 연구하는 동안 고아르기닌혈증에 대한 표준 또는 통상적인 치료를 받았거나 받고 있었다. 이러한 표준 또는 통상적인 치료는, 아르기닌 수준을 증가시킬 수 있는 단백질의 섭취를 제한하기 위한 식이 요법 제한 및 질소 제거 약물의 사용을 포함한다. 이들 표준 치료에도 불구하고, 모든 환자는 여전히 높은 아르기닌 수준을 가졌다. 아르기나제로 치료하면, 아르기닌 및 다른 구아니디노 화합물 중 하나 이상의 혈장 수준을 빠르고 지속적으로 감소시킨다. 아르기나제(예, 펩질아르기나제)에 의한 치료 효과는 투여후 24 내지 48시간 내에 예기치 않게 빠르게 나타났다. 대조적으로 고아르기닌혈증에 대한 표준 또는 통상적인 치료는 2년 동안 어느 개선도 나타낼 수 없다(Marescau *et al.*, 1990; Marescau *et al.*, "The pathobiochemistry of uremia and hyperargininemia further demonstrates a metabolic relationship between urea and guanidinosuccinic acid," 1992 41(9):1021-1024). 또한, 펩질아르기나제로 치료받은 환자는, 아르기닌의 감소로 인해 보다 자유로운 식이 요법을 가질 수 있고, 이에 따라 더 많은 단백질을 가질 수 있다.

[0207] 아르기닌 고갈제를 이용해 혈장 아르기닌을 감소시켜 ARG1-D 관련 질환 발현의 개선을 나타낸 2상 임상 데이터

파트 1과 2를 갖는 상기의 개방 실험 임상 1/2상 연구를 계속하여 연장된 개방 실험을 했다. 도 7에 나타낸 대로, 1/2상은 파트 1에서 16명의 환자를 대상으로 하였고, 이들은 전술한 바와 같이 격주로 정맥내 펩질아르기나제의 일회 상승 용량을 4 내지 10 주 동안 투여받았다. 파트 2에서, 전술한 바와 같이 펩질아르기나제의 반복 용량(매주 8회 투여)을 10주 동안 정맥내 투여하였다. 파트 2를 시작한 9명의 환자와 반복 투여를 완료한 6명의 환자가 있었다. 연장된 공개 실험에서, 펩질아르기나제의 정맥내 투여는 3명의 환자에게 시작되었다.

아래 표는 환자 특성을 보여주고 연구에서 환자의 질병 부담과 연장된 공개 실험을 나타낸다. 중간값 혈장 아르기닌은, 각 환자에 대한 제1 투여 이전의 모든 혈장 아르기닌 값의 평균값을 계산하고 이를 값의 중간값을 결정하는 것에 기초하였다. 표는, 16명의 환자 모두가 상승된 기준선 혈장 아르기닌을 가졌음을 보여준다. 10명의 환자 중 7명은 이동성과 적응 행동 모두에 결함이 있었다. 중간값 혈장 아르기닌은 각 환자에 대한 제1 투여 이전의 모든 혈장 아르기닌 값의 평균값에 기초하였다. 다른 생화학적 파라미터의 경우, 투여 직전에 평가를 하였다. 실험실 평가에서 비정상은 기준 범위를 벗어난 것으로 정의된다. 키 백분위수에 대해, CDC에 의해 제공된 바와 같이, 결핍은 정상의 $\leq 10\%$ 로 정의하였다. 6MWT의 경우, 베르그 균형, GMFM 파트 E, 및 PROMIS가 전술한 바와 같이 적용된다. 제3판 적응 행동 평가 시스템(ABAS)의 경우, 결핍은 실용적, 사회적, 개념적 또는 종합적 기준에서 표준 점수 <85로 정의한다. MCDI(도 9 참조)는, 6MWT에 대해 기준선으로부터 9% 변화로서 정의하였고, GMFM 파트 E에 대해 1.8 내지 4.0 점 변화로서 개인 환자 총 운동 기능 분류 시스템 수준에 따라 정의하였고, BBS에 대해 7 점 변화로서 정의하였고, ABAS에 대해 일반 적응 복합(GAC) 표준 점수 7.5 점의 변화로서 정의하였고, PROMIS에 대해 5점의 변화로서 정의하였다.

표 11

임상 1/2상 연구에서 환자에 대해 수행된 기준선 평가.

특성/평가(N = 16)	중간값(범위) 또는 n (%)	결핍 기준선 (%)
질병 특성 및 의료 이력		
중간값 나이(범위)	15 세 (5-31)	
여성	11 (69%)	
경직 이력(≥ 중등도)	9 (56%)	
발작 이력	7 (44%)	
고암모니아혈증 이력	7 (44%)	
성장 지연	9 (56%)	
암모니아 제거제	15 (94%)	
기준선 평가		
실험실		
아르기닌 ($\mu\text{mol/L}$, 제 1 투여 평가 이전)	389 (238 내지 566)	100%
알라닌 트랜스아미나제(ALT) (U/L)	34 (15 내지 171)	44%
암모니아 ($\mu\text{mol/L}$)	38 (9 내지 77)	44%
이동성		
6MWT (m), N = 15	349 (102 내지 602)	87%
PROMIS 신체적 기능/이동성, N=14	38 (28.3 내지 57.1)	57%
GMFM 파트 E (점수 0-72)	65.5 (5 내지 72)	50%
베르그 균형 (점수 0-56)	52.5 (7 내지 56)	38%
적응 행동		
ABAS, N = 10	79.5 (49 내지 90)	80%
성장		
키 (CDC 백분위수)	4.8% (0.1% 내지 56%)	88%

[0210]

[0211] 도 8은 파트 2 및 연장된 개발 실험 환자를 위해 반복 투여함에 따라 혈장 아르기닌의 시간 의존적 개선을 보여준다. BL은 기준선이고, F/U는 추석 검사이고, n은 각각의 시점에서 환자의 수이다. 모든 환자에 대한 중간값 아르기닌 수준은 각각의 시점에 표시되어 있다. Haberle *et al.*, “Suggested guidelines for the diagnosis and management of urea cycle disorders,” *Orphanet. J. Rare Dis.*, 2012 7:32에 기술된 치료 지침에 따라, 혈장 아르기닌 수준을 $\leq 200 \mu\text{mol/L}$ 로 유지하는 것이 바람직하다. 도 8은, 파트 2를 종료한 환자의 100%(6/6)가 권장 지침선 미만이고 감소된 아르기닌 수준을 일정하게 달성했음을 나타낸다. 아르기닌 감소의 혈장 수준의 감소는 GC(GVA, ArgA, NAA, GAA)의 혈장 수준의 현저하고 지속적인 감소를 동반했다.

[0212]

펩질아르기나제를 사용한 치료는, 도 9에 나타낸 바와 같이, 8회 반복 투여 이후 기준선으로부터 임상 결과를 또한 개선시켰다. 도 9의 각 점은 환자 1명에 대한 평가를 나타낸다. 우수 평가는 채워진 원 “●”으로 표시되

는 반면, 중립 평가는 채워지지 않은 원 “○”으로 표시된다. 환자 67%(4/6)는 께질아르기나제로 단 8주의 반복 투여 이후 이동성 및/또는 적응 행동에 대한 시험에서 MCID 이상의 개선을 나타냈다. 이들 테스트의 표준은 6MWT, 베르그 균형 척도, GMFM 파트 E, PROMIS 및 ABAS에 대한 것으로 이전에 설명되었다. 평가의 33%가 MCID를 유리하게 초과한 반면, 어느 것도 MCID를 불리하게 초과하지는 않았다. ABAS 평가의 1/3은 MCID를 초과했으며, 2/3는 8주차에 개선 추세였다.

표 12

평가자에 의한 연구에서 환자 일부의 관찰 결과를 요약.

환자	장소/평가자로부터의 관찰	시점
1	<ul style="list-style-type: none"> 보행 중 개선된 스텝 품질 및 자신감 기준선보다 휴식 경직 덜함 1 분 동안 지지 없이 서서 있을 수 있음 지지대를 이용해 여러 스텝을 걸음 개선된 스쿼트 능력 및 바닥으로부터 물건을 들어올릴 수 있는 능력 	파트 2 투여 8
2	<ul style="list-style-type: none"> 보다 편안하게 보임 보다 편안한 태도와 대화 의지 한쪽 다리로 서서 있는 것은 통상 매우 어려우나 첫 번째 시도에서 달성할 수 있음 	파트 2 F/U
5	<ul style="list-style-type: none"> 보행 중 개선된 자신감 및 자세 향상 보다 활기차고 민첩한 것으로 나타남 보다 복잡한 질문을 물어봄 	파트 1 투여 3
6	<ul style="list-style-type: none"> 더 잘 대화할 수 있음 개선된 의사 소통 적절하게 걸을 수 있으며, 발가락으로 걷지 않음 	<p>파트 1 투여 1(처음 두 번 관찰): 패트 1 투여 4(세 번째 관찰)</p>
7	<ul style="list-style-type: none"> 개선된 식욕 및 활동성 매주 3 내지 4 번 약 1/2 마일 보행, 개 산책 총아리에 근육 발전 보임 보다 말이 많아지고 가게에 다녀옴 보행 능력 향상됨 행복해 보임 	파트 1, F/U
9	<ul style="list-style-type: none"> 다리 경련 좋아짐 보다 빨리 걷고 덜 힘들어 함 	파트 1, 투여 3

[0213]

[0214] 께질아르기나제 투여는 일반적으로 경증 AE를 초래하였다. 께질아르기나제의 180회 주입이 모든 환자에 걸쳐 투여되었다. 패트 1의 16명 환자중 6명에서 역가가 낮고 치료가 응급한 ADA가 발견되었다. 패트 2에서 모든 환자는 다섯 번째 투여까지 ADA 수준이 검출되지 않았다. 적어도 중등도를 갖는 2명의 치료 관련 AE는 과민증(3 환자에게서 4가지 부작용; 3가지는 조사자에 의해 중대한 부작용(SAE)로 간주됨)을 포함하였으며, 이는 항히스타민제 투여, 및 일부 경우에서 코르티코스테로이드의 투여와 같은 주입 속도 조절 및 약물 투여로 관리되었다.

[0215] 도 10은 파트 2에 참여한 환자에 대해 수행된 임상 반응에 의한 아르기닌 평균값의 분석을 보여준다. 환자의 아르기닌 평균 수준은, 신경 운동 또는 적응 행동 평가($n = 2$)에서 <1 MCID로 개선된 환자보다는, 신경 운동 또는 적응 행동 평가($n = 4$)에서 > 1 MCID 개선의 임상 반응을 갖는 환자에 대해 환자의 평균 아르기닌 수준이 더 낮은 것으로 밝혀졌다.

[0216] 결론적으로, 이 질병의 진행성은, 상당한 식이 요법 단백질 제한을 이용하고 질병 증상만을 해결하기 위해 암모니아 제거제를 사용하는 표준화된 질병 관리 접근법에도 불구하고, 현재 표준 질병 관리로 달성할 수 있는 것보다 아르기닌 수준을 낮추는 약리 요법에 대한 의학적 필요성이 미충족되었음을 강조하고, 따라서 ARG1-D 환자에서 관찰된 신경 운동, 신경인지 및/또는 적응 행동 악화의 진행을 늦추거나 중단시킬 가능성을 제공한다. 조작된 인간 아르기나제 1, 즉 페질아르기나제는 ARG1-D 환자에게서 혈장 아르기닌 및 관련 GC 수준을 현저하고 지속적으로 감소시키는 직접적인 증거를 보여주었으며, 일부 환자에게서는 신경 운동 기능 및/또는 적응 행동의 개선을 동반하였다.

[0217] 전술한 연구의 임상 1/2상에서 관찰된 ARG1-D 환자에 대한 페질아르기나제 투여로부터의 개선은, 연장된 공개 실험에서 지속되었다. 페질아르기나제는 상승된 혈장 아르기닌을 지속 가능하게 낮추는 데 매우 효과적이었으며, 이는 ARG1-D 증상의 병리의 기초가 되는 것으로 여겨진다. 혈장 아르기닌 감소는, 단 8주의 반복 투여 후 이동성 및 적응 행동의 개선을 동반하였다. 페질아르기나제는 환자들에 의해 잘 견뎌졌다. 대부분의 치료 관련 AE는 경미했고, 과민 반응은 표준 방법으로 관리할 수 있었고 모든 환자는 연구 치료를 계속했다. ARG1-D 환자의 포괄적인 기준선 프로파일은, 94%(15/16)의 환자에게서 이동성 및/또는 적응 행동의 정량적 결함을 보여 주었다.

[0218] *LC-MS/MS에 의한 K₂EDTA 인간 혈장 내의 a-K-δ-GVA, (R,S)-ArgA, 호모아르기닌 HCl, 및 Na 아세틸-L-아르기닌 분석 방법.*

분석 물질/대사 물질 이름:	a-K-δ-GVA (GVA) (R,S)-ArgA (ArgA) 호모아르기닌 HCl (HArg) Na 아세틸-L-아르기닌 (NAAArg) 구아니디노아세트 산 (GAA)
내부 표준 이름:	a-K-d-GVA- ¹³ C ₆ HCl (GVA- ¹³ C ₆) ¹³ C ₆ -(R,S)-ArgA (ArgA- ¹³ C ₆) L- 호모아르기닌-d4 디히드로클로라이드 (HArg-d4) Na 아세틸-L-아르기닌- ¹³ C ₆ (NAAArg- ¹³ C ₆)

[0219]

	구아니디노아세트-[¹³ C ₂] 산 (GAA-[¹³ C ₂])
종/매트릭스:	치료된 인간 혈장
항응고제:	K ₂ EDTA
샘플 부피:	0.050 mL
커브 범위:	25.0 내지 5000 nM (GVA, ArgA) 200 내지 40,000 nM (HArg) 50.0 내지 10,000 (NAAArg) 3,000 내지 100,000 (GAA)
회귀 유형:	GVA: 선형, 1/x ² ArgA: 선형, 1/x ² NAAArg: 이차형, 1/x ² GAA: 이차형, 1/x ²
반응: 피크 영역 비율:	GVA/GVA- ¹³ C ₆ ArgA/ ArgA- ¹³ C ₆ HArg/ HArg-d4 NAAArg/ NAAArg- ¹³ C ₆ GAA/ GAA-[¹³ C ₂])
추출 유형:	단백질 침전
기기/검출:	UHPLC-MS/MS (API 5500, ESI+)
작동 시간:	5.50분
샘플 준비 온도:	습윤 얼음
샘플 보관 온도:	-70°C
특별 보관/처리 요구 사항	QC 샘플은 펙질아르기나제(AEB1102), 노르-NOHA(N- 히드록시-노르-L-아르기닌) 억제제, 및 만니톨로 처리된 산성화 및 비산성화 플라즈마에서 제조된다.

[0220]

참조 물질 및 매트릭스는 아래와 같은 것이 사용된다:
GVA (EAG Laboratories)
ArgA (EAG Laboratories)
HArg (Tokyo Chemical Industry CO, Part No. H1172, Chemical Abstracts Service (CAS) No. 483-01-8)
NAAArg (Sigma-Aldrich, Part No. A3133, CAS No. 155-84-0)
GAA (Sigma-Aldrich, Part No. G11608)
GVA- ¹³ C ₆ (EAG Laboratories)

[0221]

ArgA- ¹³ C ₆ (EAG Laboratories)
HArg-d ₄ (Santa Cruz Biotechnology, Part No. sc-280882, CAS No. 1332075-41-8)
NAAArg- ¹³ C ₆ (Aeglea BioTherapeutics)
GAA- ¹³ C ₂ (Santa Cruz Biotechnology, Part No. sc-211572 S)
AEB1102 Co-ArgI-PEG 약 물질 (5.1 mg/mL) (펙질아르기나제) (Aeglea BioTherapeutics)
K ₂ EDTA 인간 혈장 (Bioreclamation)
K ₂ EDTA 인간 전혈 (Bioreclamation)

[0222]

[0223]

상업적 시약은 아래와 같은 것이 사용된다:

ACN	-	아세토니트릴, Omnisolv, EMD
C ₃ H ₆ O	-	아세톤, Sigma-Aldrich
FA	-	포름산, Omnisolv, EMD
GLA	-	빙초산, Acros Organics
1 N HCl	-	1N 염산, Fisher Scientific
IPA	-	이소프로필 알코올, Omnisolv, EMD
C ₆ H ₁₄ O ₆	-	만니톨, Sigma-Aldrich
MeOH	-	메탄올, Omnisolv, EMD
MQ	-	Milli-Q 정제수 or 탈이온수
NH ₄ HCO ₃	-	포름산암모늄, Sigma-Aldrich
노르-NOHA	-	노르-NOHA, Cayman Chemical
PBS	-	인산 완충 식염수(1X 용액), Fisher Scientific
PFHx	-	C ₆ HF ₁₁ O ₂
TCA	-	트리클로로아세트 산

[0224]

[0225]

치료된 인간 혈장[THP]. 20.0 mL의 K₂EDTA 인간 혈장에 0.059 mL의 AEB1102를 추가한다. 약 -70° C에서 폴리프로필렌 바이알(PPV)에 보관한다. 유효 기간은 사용된 혈장의 유효 기간이다.

[0226]

치료된 인간 지방질 혈장[TLP]. 20.0 mL의 K₂EDTA 인간 지방질 혈장에 0.059 mL의 페질아르기나제를 추가한다. 약 -70° C에서 PPV에 보관한다. 유효 기간은 사용된 혈장의 유효 기간이다.

[0227]

치료된 인간 전혈[THB]. 20.0 mL의 K₂EDTA 인간 전혈에 0.059 mL의 페질아르기나제를 추가한다. 약 4° C에서 PPV에 보관한다. 유효 기간은 사용된 혈장의 유효 기간이다.

[0228]

1 mg/mL 노르-NOHA [NOHA]

[0229]

5 mg 바이알의 노르-NOHA의 전체 내용물을 5.00 mL의 MQ로 용해한다. 약 -70° C에서 PPV에 최대 1개월 보관한다.

[0230]

10% 만니톨 용액 (w/v) [MT1]

[0231]

약 1.00 g의 만니톨을 계량하고 10 mL MQ로 용해한다. 용해하기 위해 교반한다. 실온에서 최대 1 개월 동안 보관한다.

[0232]

비산성화된 매트릭스[NM1]

[0233]

3500 rcf에서 5분 동안 20 mL의 K₂EDTA 인간 혈장을 원심 분리한다. 피펫을 사용하여 0.059 mL AEB1102를 혈장에 추가한다. 혈장을 약 3 시간 동안 37° C에서 인큐베이션한다. 혈장 바이알에 0.180 mL 노르-NOHA를 첨가한다. 만니톨 0.1%(v/v)에 도달하기 위해 0.200 mL의 MT1을 처리된 혈장에 첨가한다(이 단계는 혈장을 사용하기 직전에 수행될 수 있음). 잘 혼합한다. 혈장 성분의 최대 유효 기간까지 약 -70° C에서 PPV에 보관한다.

[0234]

산성화된 매트릭스[AM1]

[0235]

3500 rcf(상대적 원심력)에서 5분 동안 20 mL의 K₂EDTA 인간 혈장을 원심 분리한다. 피펫을 사용하여 0.059 mL AEB1102를 혈장에 추가한다. 혈장을 약 3 시간 동안 37° C에서 인큐베이션한다. 혈장 바이알에 0.400 mL GLA를 첨가한다. 혈장 바이알에 0.180 mL 노르-NOHA를 첨가한다. 만니톨 0.1%(v/v)에 도달하기 위해 0.200 mL의 MT1을 처리된 혈장에 첨가한다(이 단계는 혈장을 사용하기 직전에 수행될 수 있음). 잘 혼합한다. 혈장 성분의 최대 유효 기간까지 약 -70° C에서 PPV에 보관한다.

[0236]

10% (w/v) TCA [BAC-359]. TCA 약 50g을 용매 병에 칭량하여 투입한다. 눈금 실린더를 사용하여 500 mL MQ를 추가한다. 용해하기 위해 교반한다. 용액은 실온에서 최대 1 개월 동안 보관할 수 있다. 이 용액은 단백질 침전

용액으로 사용된다. 이 용액은 샘플 추출에 사용하기 전에 얼음에 냉각된다.

- [0237] **MQ 내 0.1% FA 및 0.05% PFHx [BAC-360].** 눈금 실린더를 사용하여 1000 mL의 MQ를 측정하고 용매 보관 병에 추가한다. 피펫을 사용하여 1 mL FA 및 0.5 mL PFHx를 첨가한다. 잘 혼합한다. 용액은 실온에서 최대 1 개월 동안 보관할 수 있다. 이 용액은 이동상 A(MPA)로 사용된다. 이 용액은 1 L 테플론 용기에서 만들어져야 한다.
- [0238] **ACN 내 0.1% FA 및 0.05% PFHx [BAC-361].** 눈금 실린더를 사용하여 1000 mL의 ACN을 측정하고 용매 보관 병에 추가한다. 피펫을 사용하여 1 mL FA 및 0.5 mL PFHx를 첨가한다. 잘 혼합한다. 이 용액은 실온에서 최대 1 개월 동안 보관할 수 있다. 이 용액은 이동상 B(MPB)로 사용된다. 이 용액은 1 L 테플론 용기에서 만들어져야 한다.
- [0239] **80:20:0.3 (v/v/v) MeOH:MQ:FA [BAC-409]**
- [0240] 눈금 실린더를 사용하여 800 mL MeOH(메탄올) 및 200 mL MQ를 용매 보관 병에 첨가한다. 피펫을 사용하여 3.00 mL의 FA를 첨가한다. 잘 혼합한다. 실온에서 최대 1 개월 동안 보관한다. 이 용액은 이동상 A(MPA)로 사용될 수 있다.
- [0241] **MQ 내 100 mM 포름산암모늄 [BAC-409]**
- [0242] 눈금 실린더를 사용하여 1000 mL의 MQ를 측정한다. 약 6.306 g의 포름산암모늄을 영점화된 계량 보트에 칭량한다. MQ를 행군 용매 보관 병에 포름산암모늄을 옮긴다. 남은 MQ를 병에 옮긴다. 용해하기 위해 교반한다. 실온에서 최대 1 개월 동안 보관한다. 이 용액은 이동상 B(MPB)을 제조하기 위해 사용될 수 있다.
- [0243] **70:30 (v/v) 100 mM 포름산암모늄:MeOH [BAC-410]**
- [0244] 눈금 실린더를 사용하여 700 mL BAC-408 및 300 mL MeOH를 용매 보관 병에 첨가한다. 잘 혼합한다. 실온에서 BAC-408의 최대 유효 기간까지 보관한다. 이 용액은 이동상 B(MPB)로 사용될 수 있다.
- [0245] **1000:1(v/v) MQ:FA [BAC-001].**
- [0246] 눈금 실린더를 사용하여 1000 mL MQ를 용매 병에 추가한다. 피펫을 사용하여 1 mL의 FA를 첨가한다. 잘 혼합한다. 이 용액은 실온에서 최대 1 개월 동안 보관할 수 있다. 이 용액은 R0 용액으로 사용될 수 있다.
- [0247] **40:10:50:0.05 (v/v/v/v) IPA:아세톤:CAN:FA [BAC-083]**
- [0248] 눈금 실린더를 사용하여 400 mL IPA, 100 mL 아세톤, 및 500 mL ACN을 적당한 크기의 용매 보관 병에 첨가한다. 혼합하기 위해 교반한다. 피펫을 사용하여 0.500 mL FA를 병에 옮긴다. 잘 혼합한다. 실온에서 최대 1 개월 동안 보관한다. 대안적으로 구입한 용액을 준비한 용액 대신으로 사용할 수 있다. 구입한 용액을 사용하는 경우, 표준 절차에 따라 실온에 보관한다. 이 용액은 R3 용액으로 사용될 수 있다.
- [0249] **50:25:25 (v/v/v) IPA:MQ:MeOH [BAC-011].** 눈금 실린더를 사용하여 500 mL IPA, 250 mL ACN, 250 mL MeOH를 용매 보관 병에 첨가한다. 잘 혼합한다. 용액은 실온에서 최대 1 개월 동안 보관할 수 있다. 이 용액은 강력한 바늘 세척으로 사용된다.
- [0250] **저장 용액의 제조.** 저장 용액은 이중으로 제조되고, 사용 전에 비교된다. 비례에 따라 제조된 양이 변경될 수 있고, 최종 농도는 유지되고 문서화된다.
- [0251] **GVA 저장 용액 (10,000 μ M) [S01].** 호박색 유리 바이알에 보정 계수를 적용한 후의 3 mg 해당 GVA (MW 173.17)의 양을 칭량한다. MQ로 용해하고 10,000 μ M로 희석한다. 잘 혼합한다. 용액을 0.075 mL 분취액으로 나누고 대략 -70° C에서 PPV에 용액을 보관한다. 사용하기 전에 습윤 얼음 위에서 저장 용액을 해동한다.
- [0252] **ArgA 저장 용액 (10,000 μ M) [S02].** 호박색 유리 바이알에 보정 계수를 적용한 후의 3 mg 해당 ArgA (MW 175.19)의 양을 칭량한다. MQ로 용해하고 10,000 μ M로 희석한다. 잘 혼합한다. 저장 용액을 약 10분 동안 초음파 처리한다. 용액을 0.075 mL 분취액으로 나누고 대략 -70° C에서 PPV에 용액을 보관한다. 사용하기 전에 습윤 얼음 위에서 저장 용액을 해동한다.
- [0253] **HArg 저장 용액 (40,000 μ M) [S03].** 호박색 유리 바이알에 보정 계수를 적용한 후의 15 mg 해당 HArg (MW 224.69)의 양을 칭량한다. MQ로 용해하고 40,000 μ M로 희석한다. 잘 혼합한다. 용액을 0.100 mL 분취액으로 나누고 대략 -70° C에서 PPV에 용액을 보관한다. 사용하기 전에 습윤 얼음 위에서 저장 용액을 해동한다.
- [0254] **NAAArg 저장 용액 (20,000 μ M) [S04].** 호박색 유리 바이알에 보정 계수를 적용한 후의 6 mg 해당 NAAArg MW 216.24)의 양을 칭량한다. MQ로 용해하고 20,000 μ M로 희석한다. 잘 혼합한다. 용액을 0.075 mL 분취액으로 나

누고 대략 -70°C 에서 PPV에 용액을 보관한다. 사용하기 전에 습윤 얼음 위에서 저장 용액을 해동한다.

[0255] GAA 저장 용액 (40,000 μM) [S05]

호박색 유리 바이알에 보정 계수를 적용한 후의 14 mg 해당 GVA (MW 117.11)의 양을 칭량한다. [BAC-009]로 용해하고 40,000 μM 로 희석한다. 잘 혼합한다. 용액을 0.150 mL 분취액으로 나누고 대략 -70°C 에서 PPV에 빛으로부터 보호되는(PFL) 용액을 보관한다. 사용하기 전에 습윤 얼음 위에서 저장 용액을 해동한다.

[0257] 내부 표준(IS) 용액의 제조. 비례에 따라 제조된 양이 변경될 수 있고, 최종 농도는 유지되고 문서화된다.

[0258] GVA- $^{13}\text{C}_6$ IS 저장 용액 (4,150 μM) [I01]. 호박색 유리 바이알에 보정 계수를 적용한 후의 3 mg 해당 GVA- $^{13}\text{C}_6$ (MW 215.65)의 양을 칭량한다. MQ로 용해하고 4150 μM 로 희석한다. 잘 혼합한다. 용액을 0.050 mL 분취액으로 나누고 대략 -70°C 에서 PPV에 용액을 보관한다. 사용하기 전에 습윤 얼음 위에서 저장 용액을 해동한다.

[0259] ArgA- $^{13}\text{C}_6$ IS 저장 용액 (5,000 μM) [I02]. 호박색 유리 바이알에 보정 계수를 적용한 후의 3 mg 해당 ArgA- $^{13}\text{C}_6$ (MW 181.14)의 양을 칭량한다. MQ로 용해하고 5,000 μM 로 희석한다. 잘 혼합한다. 용액을 0.050 mL 분취액으로 나누고 대략 -70°C 에서 PPV에 용액을 보관한다. 사용하기 전에 습윤 얼음 위에서 저장 용액을 해동한다.

[0260] HArg-d4 IS 저장 용액 (5,000 μM) [I03]. 호박색 유리 바이알에 보정 계수를 적용한 후의 3 mg 해당 HArg-d4 (MW 265.17)의 양을 칭량한다. MQ로 용해하고 5000 μM 로 희석한다. 잘 혼합한다. 용액을 0.050 mL 분취액으로 나누고 대략 -70°C 에서 PPV에 용액을 보관한다. 사용하기 전에 습윤 얼음 위에서 저장 용액을 해동한다.

[0261] NAArg- $^{13}\text{C}_6$ IS 저장 용액 (5,000 μM) [I04]. 호박색 유리 바이알에 보정 계수를 적용한 후의 3 mg 해당 NAArg- $^{13}\text{C}_6$ (MW 222.19)의 양을 칭량한다. MQ로 용해하고 5,000 μM 로 희석한다. 잘 혼합한다. 용액을 0.050 mL 분취액으로 나누고 대략 -70°C 에서 PPV에 용액을 보관한다. 사용하기 전에 습윤 얼음 위에서 저장 용액을 해동한다.

[0262] GAA-13C2 IS 저장 용액 (5,000 μM) [I05]

호박색 유리 바이알에 보정 계수를 적용한 후의 3 mg 해당 GVA- $^{13}\text{C}_2$ (MW 119.09)의 양을 칭량한다. [BAC-009]로 용해하고 5,000 μM 로 희석한다. 잘 혼합한다. 용액을 0.050 mL 분취액으로 나누고 대략 -70°C 에서 PPV에 용액 PFL을 보관한다. 사용하기 전에 습윤 얼음 위에서 저장 용액을 해동한다.

[0264] Heavy IS 작업 용액 (2.075 μM I01; 2.50 μM I02, I04) [HI06]

피펫을 이용하여 [I01], [I02], 및 [I04] 각각 0.020 mL를 39.940 mL의 [1 N HC1]로 PPV에 첨가한다. 잘 혼합한다. 용액을 습윤 얼음 상에 준비한다. 사용후 용액을 폐기한다.

[0266] IS 작업 용액 (5,000 nM) [I05]. 피펫을 이용하여 [I01][I02], [I04], 및 [I05] 각각 0.020 mL를 39.920 mL의 [1 N HC1]로 PPV에서 첨가한다. 잘 혼합한다. 용액을 습윤 얼음 상에 준비한다. 사용 후 용액을 폐기한다.

[0267] 저장 비교 용액의 준비.

아래 표에 보이는 바와 같이, 피펫을 사용하여 습윤 얼음 상에 비교 용액을 PPV에서 준비한다. 잘 혼합한다. 냉장 보관한다. 안정성을 확립하기 위해 사용된 저장 비교 용액은, 확립된 피처리 샘플 안정성 윈도우 내에서 평가되어야 한다. 비례에 따라 제조된 양이 변경될 수 있고, 최종 농도는 유지되고 문서화된다.

용액 ID	공급원 용액 ID	공급원 용액 농도 (μ M)	공급원 용액 부피 (mL.)	사용된 희석 용액 (mL.)	희석 부피 (mL.)	최종 부피 (mL.)	최종 농도 (μ M)
DS1	I06	*2.50	8.000	BAC-359	32.000	40.000	*0.500
DS2	HI06	*2.50	4.000	BAC-359	16.000	20.000	*0.500
DS3	S01	10,000	0.010	DS1	1.990	2.000	50.0
SC1	DS3	50.0	0.020	DS1	1.980	2.000	0.500
DS4	S02	10,000	0.010	DS1	1.990	2.000	50.0
SC2	DS4	50.0	0.020	DS1	1.980	2.000	0.500
DS5	S04	20,000	0.010	DS1	1.990	2.000	100
SC4	DS5	100	0.010	DS1	1.990	2.000	0.500
DS6	S05	40,000	0.010	DS1	1.990	2.000	200
SC5	DS6	200	0.010	DS1	3.990	4.000	0.500
DS7	I05	5,000	0.020	DS2	1.980	2.000	50.0
SC6	DS7	50.0	0.020	DS2	1.980	2.000	0.500

[0269]

[0270] SC6은, 단기 저장 용액 비교를 위한 SST 또는 장기 저장 용액 비교를 위한 SLT라고 지칭될 수 있다. SC6을 사용하여 I05 저장 용액 준비를 비교할 수 있다. (*) 하나만의 농도가 나열되는 경우, GVA-¹³C₆ 농도는 나타낸 값에 0.83을 곱한다.

[0271]

샘플 추출.

[0272]

1. 각각의 교정, 품질 관리(QC), 블랭크 및 실험 샘플 0.050 mL를 습윤 얼음 상의 96-웰 플레이트에 옮긴다. 희석된 샘플은 샘플 처리 전에 적절한 희석 계수를 이용해 1X PBS로 희석해야 한다.

[0273]

2. 0.100 mL [1 N HCl]를 각각의 매트릭스 블랭크 샘플에 첨가한다.

[0274]

3. 0.100 mL [I05]를 각각의 교정, QC, IS를 갖는 블랭크 및 실험 샘플에 첨가한다. GQC(GAA LLOQ (정량 하한치) QC) 샘플(있는 경우)에는 [I06]을 첨가하지 않는다.

[0275]

4. 1600 rpm에서 5분 와동 혼합한다.

[0276]

5. 얼음처럼 차가운 [BAC-359] 0.400 mL를 각각의 샘플에 첨가한다.

[0277]

6. 1000 rpm에서 5분 와동 혼합한다.

[0278]

7. 3500 rcf에서 5분 원심 분리한다.

[0279]

8. TomTec 또는 다분할 피펫을 사용하여 깨끗한 96-웰 플레이트에 상청액 0.300 mL를 옮긴다.

[0280]

9. 3500 rcf에서 5분 원심 분리한다.

[0281]

10. LC 기기의 샘플 보관실에서 처리된 샘플을 약 4° C로 보관하거나 분석할 때까지 냉장고에 보관한다.

[0282]

초 고성능 액체 크로마토그래피(UHPLC) 셋업.

UHPLC:	오토 샘플링 기능이 있는 Shimadzu Nexera®
컬럼:	Imtakt Intrada 아미노 산 50 x 2 mm (PN: WAA22)
컬럼 온도:	40°C
작동 시간:	5.50분
오토 샘플링 온도	4°C
권장 주입 부피:	2 내지 8 μ L
이동상:	A: 80:20:0.3 (v/v/v) MeOH:MQ:FA [BAC-409] B: 70:30 (v/v) 100 mM 포름산암모늄:MeOH [BAC-410]
R0 헹굼 용액	1000:1(v/v) MQ:FA [BAC-001]
R3 헹굼 용액	40:10:50:0.05 (v/v/v/v) IPA:아세톤:CAN:FA [BAC-083]

구배 프로그램:

시간(분)	흐름 속도 (mL/분)	이동상 A (%)	이동상 B (%)
초기	0.400	95	5
1.00	0.400	95	5
3.00	0.400	55	45
4.00	0.400	0	100
5.00	0.400	0	100
5.10	0.400	95	5
5.50	0.400	95	5

[0283]

[0284]

질량 분석기 파라미터. 질량 분석기, 인터페이스, 및 스캔 모드를 제외한 파라미터는 최적 성능을 얻기 위해 변경될 수 있다. 4중 극자 질량 분석기의 단위 분해능 때문에, 정확한 질량 전이가 기기마다 약간 다를 수 있다.

질량 분석기:	Applied Biosystems/MDS Sciex API 5500™
인터페이스:	Turbo Spray, positive-ion mode
스캔 모드:	다중 반응 모니터링 (MRM)
커튼 가스 (CUR):	25 psi
가스 설정 (GS1):	40 psi
가스 설정 (GS2):	40 psi
이온화 전압 (IS):	5500 v
온도 (TEM):	500°C
충돌 가스 설정 (CAD):	중간 또는 8 psi
입구 전위 (EP)	10 v
출구 전위 (CXP)	10 v

분석물	모 이온	팔 이온	체류 시간 (msec)	충돌 에너지 (CE) (v)	디-클러스터링 전위 (DP) (v)
GVA	174.0	96.0	50	30	45
ArgA	176.0	130.0	50	23	38
HArg	189.0	144.0	50	24	38
NAAArg	217.0	70.0	50	44	50
GAA	118.1	75.8	50	25	100
GVA-13C6	180.1	119.1	50	22	50
ArgA-13C6	182.0	135.0	50	23	38
HArg-d4	193.0	148.0	50	24	38
NAARG-13C6	223.2	163.1	50	25	60
GAA-13C2	120.1	78.0	50	25	100

[0285]

[0286] 인간 혈청 내 PEG에 대한 항체의 검출을 위한 직접 결합식 ELISA

[0287] A. 시약/완충액

[0288] 희석 완충액/분석 완충액 (1X PBS 내 4% 소 카모 글로불린 (BGG))

[0289] 100 mL의 1X PBS에 4 g의 BGG를 첨가하여, 분석용 희석액을 제조하였다. 용액을 0.22 μ M 필터를 통해 여과하고 2 내지 8°C에서 최대 2주 동안 보관하였다. 필요에 따라 부피를 조정하였다.

[0290] 경쟁 완충액 (분석 완충액 + 100 μ g/mL PEG)

[0291] 분석 완충액 1 mL당 100 μ g의 PEG를 첨가하여, 경쟁 완충액을 준비하였다. 경쟁 완충액은 분석 당일 신선하게 제조되었다. 필요에 따라 부피를 조정하였다.

[0292] 정지 용액 (1 M H_3PO_4)

[0293] 21.4 mL의 85% (11.7 M) H_3PO_4 를 228.6 mL의 DI(탈이온) H_2O 에 첨가하여 잘 혼합하고 최대 1년까지 산 캐비넷에 보관하였다. 필요에 따라 부피를 조정하였다.

[0294]

추가 시약 (아래 표 참조)

시약	공급원	CAT 번호	배치/로트 번호
Mono-Pegylated BSA (MPEG 5kDa)	Life Diagnostics	PBSA-02	C-H0212A
항-PEG SPC (통계 공정 대조군)	Life Diagnostics	9B5-6- 25-7	C-C1912A
SPC High 양성 대조군 (마우스) (HPC-m 1000 ng/mL)	BioAgilytix	N/A	RP06Jun16kml01
SPC Low 양성 대조군 (LPC-m, 200 ng/mL)	BioAgilytix	N/A	RP06Jun16kml02
음성 대조군 (NC, BRH1095944)	BioAgilytix	N/A	RP06Jun16kml03
*High 양성 대조군 (인간) HPC-h BRH1182029	개발 중에 높은 시그널을 갖고 PEG에 의해 고도로 억제되는 것으로 보여진 Bioreclamation의 개별 샘플	HMSRM	RP08Jul16JHJ01 (BRH1182029)
*Low 양성 대조군 (인간) LPC-h	p-NHS 내 상기의 1:1 희석	N/A	RP08Jul16JHJ02
풀링된 정상 인간 혈청 (p- NHS)	Bioreclamation	HMSRM	BRH1095944
AEB1102 (일명, Co- Arg1 PEG)	Aeglea/KBI BioPharma	N/A	15-0390
염소 항-마우스 IgG-Fc- HRP	Jackson	115-035- 008	125494
토끼 항-인간 IgG/A/M - HRP	Jackson	309-035- 064	120556

[0295]

시약	공급원	Cat 번호	배치/롯트 번호
탄산염 코팅한 완충액 희석 완충액/분석 완충액 (4% BGG in 1X PBS)	BioWorld BioAgilytix	40320016-1 N/A	L16020109JC RP08Jul16JHJ04, RP13Jul16MB01, RP11Jul16JHJ02, RP18Jul16JHJ01
소 감마 글로불린 세척 완충액 (1X PBS)	Millipore BioAgilytix	82-041 N/A	1269 RP11Jul16JHJ01, RP12Jul16MBM01, RP13Jul16JHJ01, RP18Jul16JHJ02, RP08Jul16JHJ03
폴리프로필렌 플레이트 Nunc Immuno Starwell C8 Maxisorp 플레이트	Costar Thermo	3365 441653	09516000 125663
TMB Microwell 프록시다아제 키트 KPL 정지 용액 (1 M H ₃ PO ₄)	KPL BioAgilytix	50-76-00 N/A	10158819 RP08Jul16MBM01, RP26May16kml03, RP18Jul16MBM01
인간 IgG	Jackson	009-000-003	126258
인간 IgM	Jackson	009-000-012	124517

[0296]

B. 선별 분석 절차

[0297]

Starwell C8 Maxisorp(96- 웰 포맷 플레이트)의 웰을, 코팅 플레이트 맵에 따라, 탄산염 코팅한 완충액에서 100 μ L의 2 μ g/mL BSA mPEG 5K (5,000 달톤), 또는 500 ng/mL 인간 IgG 또는 500 ng/mL 인간 IgM으로 코팅하였다 (이들 대조군은 포스트-컷 포인트 런에서 제외됨). 플레이트(들)를 밀봉하고 ~450 rpm으로 잠깐 동안 흔들어 웰 전체에 걸친 분포를 보장하고, 37°C에서 대략 1 시간 동안 인큐베이션하였다. 인큐베이션 후, 웰을 1X PBS로 3 회 세척하였다. 세척기 프로그램은 흡기 설정과 함께 오버플로, 스타 웰 플레이트의 완전한 세척을 보장하기 위해 각 디스펜스(프로그램 29_Wash_Shake)후 10초의 흔들림을 포함하였다. 이 프로그램은 이 절차에서 모든 세척 단계에 사용되었다.

[0298]

세척 후, 플레이트(들)를 뒤집어 흡수 종이 상에서 두드려 건조시켰다. 이어서, 300 μ L의 희석 완충액을 플레이트(들)의 모든 웰에 첨가하였다. 희석 완충액에는 4% BGG가 포함되어 있으므로 "차단 완충액"으로 간주된다. 플레이트(들)를 덮고 실온에서 흔들면서(~450 rpm) 최소 1 시간 내지 3 시간 이하 동안 배양하였다.

[0299]

차단 인큐베이션 기간 후, 플레이트(들)를 세척하고, 뒤집고 흡수 종이 상에서 두드려 건조하였다. 희석 완충액 중 50 배의 최소 요구 희석(MRD)으로 희석된 샘플 및 대조군을, 플레이트 맵에 따라 플레이트에 이중으로 (100 μ L/웰) 첨가하였다. 이어서 플레이트를 밀봉하고, 흔들면서(~450 rpm), 실온에서 대략 1시간 동안 인큐베이션하였다.

[0300]

플레이트(들)를 세척하고, 뒤집고, 흡수 종이 상에서 두드려 건조시키고, 플레이트 맵에 따라 100 μ L의 검출 항체를 적절한 웰에 첨가하였다. 마우스 항-PEG 항체는, 1:5,000으로 희석된 염소 항-마우스 IgG-Fc-HRP를 사용하여 검출되었고, 항-인간 항체는, 희석 완충액에 1:30,000으로 희석되고 적절한 웰에 첨가된 토끼 항-인간 IgG/A/M을 사용하여 검출되었다. 플레이트(들)를 밀봉하고 흔들면서(~450 rpm), 실온에서 대략 1 시간 동안 인큐베이션하였다. 플레이트(들)를 세척하고, 뒤집고 흡수성 종이 상에서 두드려 건조하고, TMB 기질의 웰당 100 μ L를 첨가하였다. 이어서 플레이트(들)를 덮고, 흔들면서(~450 rpm), 실온에서 대략 10 내지 20시간 동안 인큐베이션하였다. 반응은 웰당 정지 용액 100 μ L을 추가함으로써 정지되었다. 플레이트(들)은 보장하기 위해 간단히 흔들렸다.

[0301]

C. 확인 분석 절차

[0302]

아래 플레이트 맵에 따라, Starwell C8 Maxisorp 플레이트의 웰을 탄산염 코팅한 완충액에서 100 μ L의 2 μ

g/mL BSA mPEG 5K, 또는 500 ng/mL 인간 IgG 또는 500 ng/mL 인간 IgM으로 코팅하였다(이들 대조군은 포스트-컷 포인트 런에서 제외됨). 플레이트(들)를 밀봉하고 ~450 rpm으로 잠깐 동안 혼들여 웰 전체에 걸친 분포를 보장하고, 37°C에서 대략 1 시간 동안 인큐베이션하였다.

[0304] 인큐베이션 후, Starwell 플레이트의 완벽한 세척을 보장하기 위해, 웰을 프로그램 29 Wash Shake 프로그램을 사용하여 (1X PBS)로 3회 세척하였다. 이 프로그램은 이 절차에서 모든 세척 단계에 사용되었다. 세척 후, 플레이트(들)를 뒤집어 흡수 종이 상에서 두드려 건조시켰다. 이어서, 300 μ L의 회석 완충액을 차단 단계로서 플레이트(들)의 모든 웰에 첨가하였다. 플레이트(들)를 덮고 실온에서 혼들면서(~450 rpm) 최소 1 시간 내지 3 시간 이하 동안 인큐베이션하였다.

[0305] Starwell 플레이트(들)가 차단되는 동안, 샘플 및 대조군은 폴리프로필렌 플레이트에서 100 μ g/mL로 PEG를 함유한 회석 완충액 및 경쟁 완충액에서 50배의 MRD로 회석되었다. 회석된 샘플 및 대조군을 혼들면서(~450 rpm) 실온에서 약 1시간 동안 인큐베이션하였다.

[0306] 차단 인큐베이션 기간 후, star-well 플레이트(들)를 세척하고, 뒤집고 흡수 종이 상에서 두드려 건조하였다. PEG 유무로 미리 인큐베이션된 대조군 및 샘플을 플레이트 맵에 따라 이중으로 플레이트에 첨가하였다(100 μ L/웰). 이어서 플레이트를 밀봉하고, 혼들면서(~450 rpm), 실온에서 대략 1시간 동안 인큐베이션하였다.

[0307] 세척한 후, 플레이트(들)를 뒤집고, 흡수 종이 상에서 두드려 건조시키고, 플레이트 맵에 따라 100 μ L의 검출 항체를 적절한 웰에 첨가하였다. 마우스 항-PEG 항체는, 1:5,000으로 회석된 (염소 항-마우스 IgG-Fc-HRP)를 사용하여 검출되었고, 항-인간 항체는, 회석 완충액에 1:30,000으로 회석되고 적절한 웰에 첨가된 (토끼 항-인간 IgG/A/M)을 사용하여 검출되었다. 플레이트(들)를 밀봉하고 혼들면서(~450 rpm), 실온에서 대략 1 시간 동안 인큐베이션하였다. 플레이트(들)를 세척하고, 뒤집고 흡수성 종이 상에서 두드려 건조하고, TMB 기질의 웰당 100 μ L를 첨가하였다. 플레이트(들)를 덮고, 혼들면서(~450 rpm), 실온에서 대략 10 내지 20시간 동안 인큐베이션하였다. 반응은 웰당 정지 용액 100 μ L을 추가함으로써 정지되었다. 플레이트(들)은 적절한 혼합을 보장하기 위해 잠깐 동안 혼들렸고, 그 다음 Synergy 2 plate reader로 450 (검출) 620 (백그라운드)로 판독되었다.

D. 역가법 절차

[0308] 역가 분석법은 선별 분석과 동일한 절차를 따랐다. 역가될 샘플을 음성 풀링된 인간 혈청에서 최소 7회 2배 연속 회석으로 처리하였다. 정상 인간 풀은 자격 검증 과정에서 선별되었으며, 검증에서 음성 풀로 사용하기 위해 최소 백그라운드를 갖는 사람을 선택했다. 이들 역가 회석액을 회석 완충액을 사용하여 50배 최소 요구 회석법으로 회석하고, 플레이트 맵에 따라 플레이트에 이중으로 첨가하였다(100 μ L/웰).

E. 방법 검증

[0310] 방법 검증은 특이성 평가, 분석 감도, 선택도/매트릭스 간섭, 약물 내성, 프로존(후크) 효과, 적정 분석 선형성, 분석내 및 분석간 정밀성, 단기 및 동결 및 해동 안정성, 선별 확립, 확인 및 적정 컷 포인트를 포함했다.

[0311] 대조군 두 세트가 분석 검증을 위해 사용되었다. 첫 번째 세트는 풀링된 정상 인간 혈청(NC)에 스파이킹된 마우스 항-PEG 대용 양성 대조군을 사용하여 제조되어, 분석시 고(HPC-m) 및 저(LPC-m) 시그널을 수득하였다. 두 번째 세트는, 선별 분석시 고 항-PEG 반응을 갖고 확인 분석에서 높은 억제를 갖는, 인간 샘플을 사용하여 제조되었다. 이 샘플은 예상대로 미리 존재한 항-PEG 샘플과 일치하였다. 식별된 고 시그널의 인간 샘플을 음성 대조군 혈청으로 회석하여 분석시 저(LPC-h) 시그널을 생성하는 샘플을 생성함으로써, 인간 항-PEG 저 대조군을 제조하였다. 회석되지 않은 고 인간 샘플을 HPC-h로 사용하였다. 두 대조군 세트가 적용될 수 있는 각 실행에 포함되었다. 대조군은 그들 수준에 비례하여 시그널을 나타내야 하고, 즉 고 시그널의 샘플이 저 시그널의 샘플보다 시그널이 크고, 저 시그널의 샘플이 컷 포인트보다 시그널이 크다. 검출 항체 칵테일의 성능을 검증하기 위해 면역 글로불린 대조군 (플레이트 상에 코팅된 인간 IgM 및 인간 IgG)을 컷 포인트 실행에 또한 포함시켰다.

F. 컷 포인트 분석

[0312] 마우스 항-PEG 선별 컷 포인트. 마우스 항-PEG SPC를 사용하여 데이터를 평가하기 위해, 선별 컷 포인트는 검증 동안 생성된 모든 음성 대조군 샘플($n = 55$ 플레이트)의 평균값의 표준 편차의 2X를 사용하여 설정되었다. 이 계산은 0.01467의 보정 계수를 생성하였고, 이는 마우스 항-PEG SPC 샘플에 특이적인 컷 포인트를 생성하기 위해 각 플레이트 상의 NC의 평균값에 추가되었다.

[0313] 인간 선별 분석 컷 포인트. 98개의 개별 정상 인간 혈청 샘플을 사용하여 선별 분석 컷 포인트를 확립하였다.

최소 7회 실행에 걸쳐 3명의 분석가가 각 샘플에 대해 6회의 측정을 했다. SAS JMP® 소프트웨어(버전 12 이상)를 사용하여 데이터를 평가하고 통계적 특이치를 제거하고 분산을 결정하고 첫 포인트를 설정했다. 통계적 특이치의 결정을 위해, 샘플에 대한 평균 시그널을, 각 플레이트에 대한 항-인간 NC 샘플의 평균값으로 나누어 반응을 표준화하였다.

[0316] *G. 첫 포인트 결정*

[0317] 인간 항-PEG 선별 첫 포인트. 파라미터 및 비파라미터 선별 부동 첫 포인트 인수는 정규화된 값을 사용하여 결정하였다. 먼저, Tukey의 쌍가중치 절차를 사용한 파라미터 방법을 사용하여 특이치를 제외한 후 비율의 평균값 및 표준 편차(SD)에 대한 탄탄한 추정값을 계산했다. 그 다음 5% 긍정 오류 비율에서의 파라미터 부동 첫 포인트 인수는 SD 값에 t-분포의 95 번째 변위치를 곱하고(자유도는 비율값의 수에서 1을 뺀 값임) 그 곱한 값을 평균값에 더했다. 비파라미터 5% 오류 비율 첫 포인트 인수는, 비율값에 대한 실험적인 95 번째 백분위 수의 계산에 의해 결정되었다.

[0318] 인간 확인 첫 포인트. 확인 첫 포인트 값은, Shankar G 등에 의해 권장된 절차에 의해 1% 긍정 오류 비율로 설정하였다. 첫 포인트 값은, 생물학적 특이점으로서 선별 첫 포인트 할당에서 배제된 14 개의 샘플을 사용하여 특정 억제의 하한치를 할당함으로써 결정하였다. 이를 샘플은, 음성으로 선별된 샘플보다 일관되게 더 높은 억제율(%) 값을 가졌다. 스파이킹되지 않은 샘플로부터의 변화의 백분율은, 다음 방정식을 사용하여 각 샘플에 대해 계산하였다:

$$\text{억제율(%)} = \left(1 - \frac{\text{PEG를 갖는 샘플의 시그널}}{\text{단독 샘플 시그널}} \right) \times 100$$

[0319] [0320] 파라미터 확인 첫 포인트는, 먼저 분석에 저장된 모든 억제율(%) 값의 평균 및 SD에 대한 Tukey의 쌍가중치 추정값을 계산하여 결정하였다. 그 다음, 첫 포인트 값은 SD 값에 t-분포의 첫 번째 변위치와 동일한 인수를 각각 곱하고(자유도는 억제값의 수에서 1을 뺀 값) 그 곱한 값을 평균값에 빼서 계산했다. 비파라미터 첫 포인트 값은, 또한 실험적인 첫 번째 백분위수에 기반하여 결정하였다.

[0321] *G. 특이성*

[0322] 인간 IgG를 높은 수준으로 첨가하는 경우, 스파이킹되지 않은 샘플과 비교하면 분석시 생성된 시그널에 영향을 미치지 않았다.

[0323] *H. PEG 내성*

[0324] HPC-m 및 LPC-m과 동등한 항-PEG 대용 양성 대조군의 농도, 및 인간 항-PEG HPC-h 및 LPC-h의 존재 하에서 100 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도로 시작하여 PEG의 2배 연속 희석을 수행함으로써 분석 간섭을 평가하였다. PEG가 없는 각각의 대조군으로 구성된 제로 스파이크 대조군도 또한 실행되었다. 이 작업은 최소 2명의 분석가에 의해 최소 2회에 걸쳐 이중으로 실행되었다. 인간 특이적 선별 첫 포인트를 사용하여 이들 분석 실행에서의 내성을 결정하였다. HPC-m, HPC-h 및 LPC-h는 최대 100 $\mu\text{g/mL}$ 까지 시험된 모든 농도의 PEG에 내성이 있었다.

[0325] *I. 펩질아르기나제의 약물 내성*

[0326] HPC-m 및 LPC-m과 동등한 항-PEG 대용 양성 대조군의 농도, 및 인간 항-PEG HPC-h 및 LPC-h의 존재 하에서 150 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도로 시작하여 펩질아르기나제의 2배 연속 희석을 수행함으로써 분석 간섭을 평가하였다. PEG가 없는 각각의 대조군으로 구성된 제로 스파이크 대조군도 또한 실행되었다. 항-인간 특이적 첫 포인트를 사용하여 약물 내성의 평가를 수행하였다. 첫 번째 실행에서 HPC-m은 9.38 $\mu\text{g/mL}$ 에 대해 내성이 있었고, 두 번째 실행에서 23.4 $\mu\text{g/mL}$ 의 평균 약물 내성으로 37.5 $\mu\text{g/mL}$ 까지 허용되었다. 첫 번째 실행에서 LPC-m은 Co-Arg1 PEG에 대해 내성이 없었고, 두 번째 실행에서 2.34 $\mu\text{g/mL}$ 까지 내성이 있었다. 첫 번째 실행에서 HPC-h는 9.38 $\mu\text{g/mL}$ 에 대해 내성이 있었고, 두 번째 실행에서 14.1 $\mu\text{g/mL}$ 의 평균 약물 내성으로 18.8 $\mu\text{g/mL}$ 까지 허용되었다. 첫 번째 실행에서 LPC-h는 4.69 $\mu\text{g/mL}$ 에 대해 내성이 있었고, 두 번째 실행에서 7.04 $\mu\text{g/mL}$ 의 평균 약물 내성으로 9.38 $\mu\text{g/mL}$ 까지 허용되었다.

[0327] *신경운동 및 신경인지 테스트 방법*

[0328] 신체 검사는 6MWT, GMFM, Berg Balance Scale, Modified Ashworth Scale 및 Purdue Pegboard Test를 포함하나 이에 제한되지 않는 신경학적 및 신경 운동 기능 평가로 완료된다. 평가는 하루 이상 진행될 수 있다. 평가는

기준선 시점에서 그리고 그 이후의 시점에 기록될 수 있다.

[0329] 6MWT는 수많은 질병 상태에서 심혈관, 폐 및 신경 근육 시스템을 광범위하게 평가하기 위해 임상 연구에서 널리 사용되고 있다. 이는 6분 안에 평평한 표면에서 환자가 걸을 수 있는 거리를 측정한다. 미국 흉부 학회(ATS)는 본 테스트를 수행하기 위해 표준 방법론(ATS Statement Guidelines for the Six-Minute Walk; *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 166: 111-117, 2002 참조)을 출간하였고, 이는 투여하기가 간단하고 잘 견딜만 하다. 6MWT의 경우 이 절차를 따랐다. 방법론의 변경은 스폰서의 승인을 받아 환자의 질병 상태뿐만 아니라 검사 장소의 수급 고려 사항을 책임질 수 있다. 외래 환자는 6MWT를 받지 않았다. 6MWT의 결과는 미터 단위로 완료된 거리와 기준선으로부터의 백분율 변화로 기록된다.

[0330] Berg Balance Scale은 특정 기능 작업에서 수행 능력을 평가하여 균형 기능 장애가 있는 환자의 균형을 측정한다. 균형의 특정 양태, 예컨대 앉고 서있는 자세, 이동, 회전 및 한 발로 서있는 것을 평가하는 14 가지 작업이 있다. 또한 대부분의 작업은 특정 시간 동안 위치를 유지해야 한다.

[0331] GMFM은 눕기, 구르기, 걷기, 달리기 및 점프와 같은 다양한 활동을 살펴 보는 총 운동 기능의 변화를 평가하도록 설계된 임상 측정 방법이다. GMFM의 각 항목에 대해 4점 점수 시스템을 사용하여, 사람이 5가지 측면(A에서 E까지)을 다루는 움직임을 시작하고 완료할 수 있는 정도를 결정한다. A : 눕고 구르기, B : 앉기, C : 기어 가기 및 무릎 끊기, D : 서있기 및 E : 걷기, 뛰기 및 점프.

[0332] Modified Ashworth Scale은 중추 신경계(CNS) 병변이 있는 환자의 경직을 평가하기 위해 개발되었으며 경직으로 인한 관절 주위의 수동적 움직임에 대한 저항을 측정하기 위해 사용된다. 상기 Scale은 잘 참을 수 있고 수행하기 쉽다. 상기 Scale은 경직과 연조직 강성을 구별할 수 없다. 상기 Scale은 아래 표에 표시된 대로 6개의 점수 중에서 선택하여 0 (경직 없음)에서 4 (완전 강직)까지의 점수 척도를 사용한다.

점수	Modified Ashworth
0	톤 증가 없음
1	구부리거나 확장할 때 움직임 범위(ROM)의 끝에서 캐치 및 릴리즈 또는 최소 저항으로 발현되는 약간의 톤 증가
1+	캐치 이후 ROM의 나머지(절반 미만)에 걸친 최소 저항에 의해 발현되는 약간의 톤 증가
2	대부분의 ROM에서 톤이 더 뚜렷하게 증가하지만 그 영향을 받는 부분은 쉽게 이동
3	상당한 톤의 증가; 수동적 동작 어려움
4	굽힘 또는 확장시 사지 경직

[0333]

[0334] Purdue Pegboard Test는, 신체의 양쪽을 활용하는 미세한 운동 과제에서 성능 속도를 측정하는, 조작 능숙성 및 양방향 조정의 테스트이다(Tiffin et al., 1948). 본 테스트는 두 가지 능력을 포함한다: (1) 팔, 손, 손가락의 총체적인 움직임과 (2) 최대 미세한 운동 (지문 감각 능숙성이라고 칭함). Pegboard 수행 능력의 불량은, 기저 혈과 관련된 회로에 의해 조정될 수 있는 복잡하고 시각적으로 안내되거나 조정된 움직임의 결함을 나타낸다.

[0335]

아래 표는, 시간이 지남에 따라 개선을 평가하기 위해 치료를 받는 환자에 대해 수행할 수 있는 추가적인 신경 인지, 발달 및 삶의 질(QOL) 평가를 보여 준다.

평가 영역	테스트 이름	설명	나이 범위	소요 대략 시간
지능	Wechsler Adult Intelligence IV	언어 및 수행 능력 지능 지수(IQ)가 산출되고 전체 척도의 IQ가 측정될 수 있다. 처리 속도 능력과 기억력도 측정된다. 처리 속도 능력과 기억력 테스트 없이, 전체 척도의 IQ의 단축 버전인 GAI(General Ability Index)를 사용할 수 있다.	16세 이상	30 내지 40분
	Wechsler Adult Intelligence IV	언어 및 수행 능력 IQ가 산출되고 전체 척도의 IQ가 측정될 수 있다. 처리 속도 능력과 기억력도 측정된다. 처리 속도 능력과 기억력 테스트 없이, 전체 척도의 IQ의 단축 버전(GAI)을 사용할 수 있다.	6 내지 16세	45 내지 65분
	Wechsler Preschool and Primary Scale of Intelligence IV	언어 및 수행 능력 IQ가 산출될 뿐만 아니라 전체 척도의 IQ가 산출된다. 처리 속도 능력과 기억력도 측정된다. 처리 속도 능력과 기억력 테스트 없이, 전체 척도의 IQ의 단축 버전(GAI)을 사용할 수 있다.	3 내지 6세	30 내지 40분
	Bayley Scales of Infant Development III	2세 내지 3.5세 사이의 인지 능력에 대한 발달 테스트, 인지 척도와 정신 발달 지수는 마지막에 포함된다. 정신 발달 지수는 점수이다. 운동 구성 부분은 포함될 것이다. 언어 척도도 제공해야 하지만 탐구적일 뿐이다.	2 내지 3.5세	40분

평가 영역	테스트 이름	설명	나이 범위	소요 대략 시간
		이는 4 세 미만의 어린이에게 유일한 직접 측정이다.		
기억력	Rey Auditory Verbal Learning Test (RAVLT)	관련이 없는 15개의 단어 목록을 소리내어 읽는다. 3번의 각각 시도와 30분 지연 이후 기억된 단어 수를 기록한다.	6세 이상	40 내지 45분
	Atlantis Subtest on Kauffman Assessment Battery for Children (KABC) II	그림 세트와 말도 안되는 단어가 짹을 이룬다; 아동은, 학습 및 지연 반응 시험시 단어와 짹을 이룬 그림을 인지해야 한다.	3 내지 8세	20분
주의력	Test of Variables of Attention (TOVA) version 9	본 테스트는, 어린이/성인이 키보드, 상의 버튼이나 키로, 화면에서 깜박이는 소정의 자극에 반응하거나 다른 자극에 반응하지 않아야 한다. 속도, 정확성 및 일관성이 측정된다.	6세 내지 어른	22분
성장 발달	CDC로부터의 성별 및 나이별 성장 차트	나이별 키 및 나이별 체중 차트가 수집될 것이고, 키에 대한 체중은 2세 내지 5세의 환자의 경우에 추가로 수집될 것이다. 나이에 적당한 머리 크기 측정도 수집될 것이다.	2세 내지 18세	가변
환자 또는 부모 보고 결과				
적응 행동	Vineland Adaptive Behavior Scales II	인터뷰 형식에 따른 학부모 관찰 측정이 사용될 것이다. 복합 척도, 대화, 일상 생활 기술, 사회화 및 운동 기술을 포함한다.	전 연령	30 내지 60분
삶의 질	PROMIS Parent Proxy	어른 및 아이 자체 QOL 평가; 부모 대용 QOL 평가		15분

평가 영역	테스트 이름	설명	나이 범위	소요 대략 시간
	Profile v2.0; PROMIS Pediatric Profile v2.0; PROMIS-29 v2.0 ^a			
	PedsQL Measurement Model for the Pediatric Quality of Life Inventory ^a	QOL 평가	2 내지 18세	5 내지 10분
	36-Item Short Form Health Survey (SF- 36)	8 가지 척도 점수: 활력, 신체 기능, 신체 통증, 일반적인 건강 인식, 신체 기능, 정서 기능, 사회적 기능 및 정신 건강. 점수가 높을수록 건강이 더 좋음	18세 이상	10분
	Short Form Zarit Burden Interview (ZBI-12)	보모/보호자 자체 QOL 평가	전 연령	30분

^a PROMIS (PROMIS 평가를 사용하여 임상 1/2상 연구를 시작한 환자의 경우) 또는
PedsQL Measurement Model for the Pediatric Quality of Life Inventory
(PROMIS 평가를 사용하여 임상 1/2상 연구에 있지 않는 환자의 경우).

[0338]

참조 문헌 목록

[0340]

ATS Statement Guidelines for the Six-Minute Walk, *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 166: 111-117, 2002

[0341]

Burrage *et al.*, "Human recombinant arginase enzyme reduces plasma arginine in mouse models of arginase deficiency," *Hum. Mol. Genetics* 24(22): 6417-27(2015)

[0342]

Carvalho, D.R., *et al.*, "Clinical features and neurologic progression of hyperargininemia," *Pediatr. Neurol.*, 46(6): 369-74(2012)

[0343]

Cheng *et al.*, *Cancer Res.* 67. 309-17, 2007

[0344]

Deignan *et al.*, "Increased plasma and tissue guanidine compounds in a mouse model of hyperargininemia," *Mol. Genet. Metab.* 93. 172-178, 2008

[0345]

Dillon *et al.*, "Biochemical characterization of the arginine degrading enzymes arginase and arginine deiminase and their effect on nitric oxide production," *Med. Sci. Monit.*, 8(7): BR248-253 (2002)

[0346]

Downs *et al.*, "The Berg Balance Scale," *J. Physiother.*, 2015 61(1):46

[0347]

Enright *et al.*, "Reference equations for the six-minute walk in healthy adults," *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 1998 158(5 Pt 1): 1384-1387

[0348]

Geiger *et al.*, "Six-minute walk test in children and adolescents," *J. Pediatr.*, 2007, 150(4): 395-399

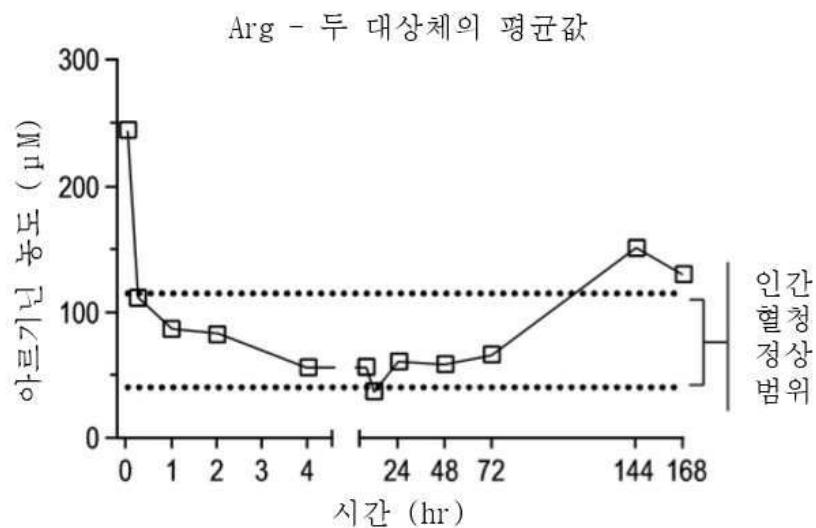
[0349]

Ha berle *et al.*, "Suggested guidelines for the diagnosis and management of urea cycle disorders," *Orphanet. J. Rare Dis.*, 2012 7: 32

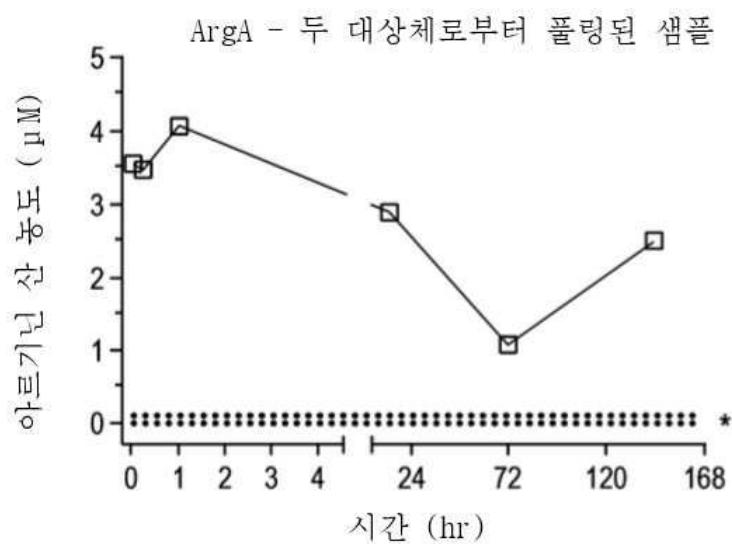
- [0350] Harris *et al.*, *Clin. Pharmacokinet.* 40(7) 539-51, 2001
- [0351] Lambert *et al.*, "Hyperargininemia: intellectual and motor improvement related to changes in biochemical data," *J. Pediatr.*, 1991, 118(3): 420-4
- [0352] Lopez *et al.*, *FEBS J.* 272: 4540-48, 2005
- [0353] Luneburg, N. *et al.*, "Reference intervals for plasma L-arginine and the L-arginine:asymmetric dimethylarginine ratio in the Framingham Offspring Cohort." *J. Nutr.* 141(12) 2186-2190(2011).
- [0354] Marescau *et al.* "Guanidino compound analysis as a complementary diagnostic parameter for hyperargininemia: Follow-up of guanidino compound levels during therapy," *Pediatric. Res.* 27(3) 297-303(1990)
- [0355] Marescau *et al.*, "The pathobiochemistry of uremia and hyperargininemia further demonstrates a metabolic relationship between urea and guanidinosuccinic acid," 1992 41(9): 1021-1024
- [0356] Oeffinger *et al.*, "Outcome tools used for ambulatory children with cerebral palsy: responsiveness and minimum clinically important differences," *Dev. Med. Child Neurol.*, 2008; 50(12): 918-925
- [0357] Prasad *et al.*, "Argininemia: a treatable genetic cause of progressive spastic diplegia simulating cerebral palsy - case reports and literature review" *J. Child Neurol.* 12. 301-309, 1997
- [0358] Remington, *The Science and Practice of Pharmacy*, 19th ed., Gennaro, ed., Mack Publishing Co., Easton, PA 1995
- [0359] Savoca *et al.*, *Cancer Biochem. Biophys.* 7. 261-268, 1984
- [0360] Schrover *et al.*, "Minimal clinically important difference for the 6-min walk test: literature review and application to Morquio A syndrome," *Orphanet. J. Rare Dis.*, 2017 12(1):78
- [0361] Schlune *et al.*, "Hyperargininemia due to arginase 1 deficiency: the original patients and their natural history, and a review of the literature," *Amino Acids* 47: 1751-1762, 2015
- [0362] Segawa *et al.*, "A long-term survival case of arginase deficiency with severe multicystic white matter and compound mutations," *Brain Dev.* 33: 45-48, 2011
- [0363] Stockler-Ipsiroglu *et al.*, "Guanidinoacetate methyltransferase (GAMT) deficiency: outcomes in 48 individuals and recommendations for diagnosis, treatment and monitoring," *Mol. Genet. Metab.*, 111(1): 16-25, 2014
- [0364] Uchino, T., *et al.*, "Molecular basis of phenotypic variation in patients with argininemia," *Hum. Genet.* 96(3) 255-60 (1995)
- [0365] Wu, G. *et al.*, "Arginine metabolism: nitric oxide and beyond," *Biochem. J.*, 336 (Pt 1), 1-17, 1998
- [0366] Wyse *et al.*, "In vitro stimulation of oxidative stress in cerebral cortex of rats by the guanidino compounds accumulating in hyperargininemia," *Brain Res.* 2001, 923(1-2): 50-7
- [0367] 및 미국 특허 문현: 미국 공개 20170240922; 미국 공개 20170283830; 미국 공개 20170224843; 미국 공개 20170191078; 미국 공개 20160095884; 미국 특허 8,398,968; 미국 특허 8,440,184; 미국 공개 20160095884; 및 미국 공개 20140154797.

도면

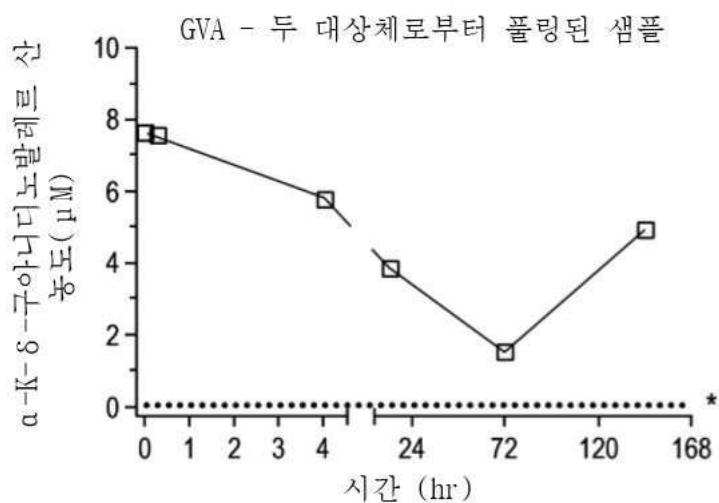
도면 1a



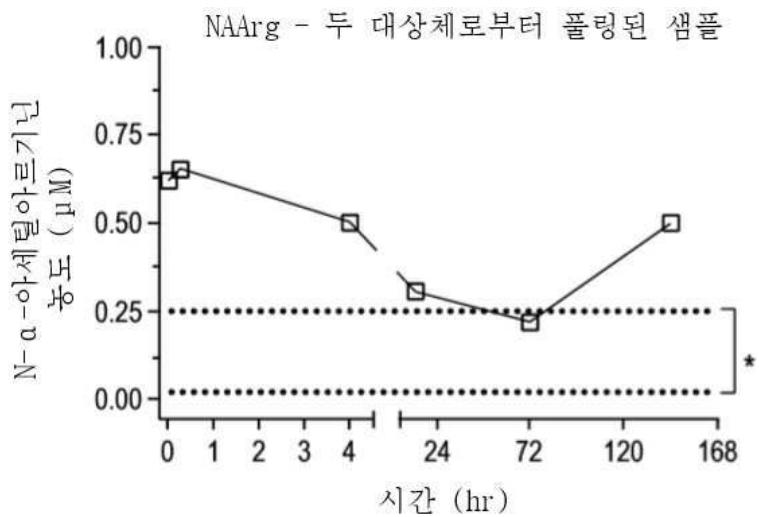
도면 1b



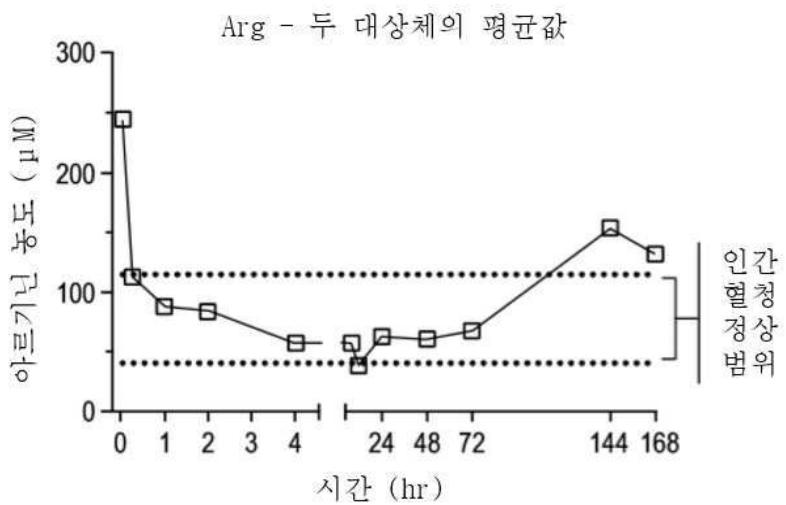
도면1c



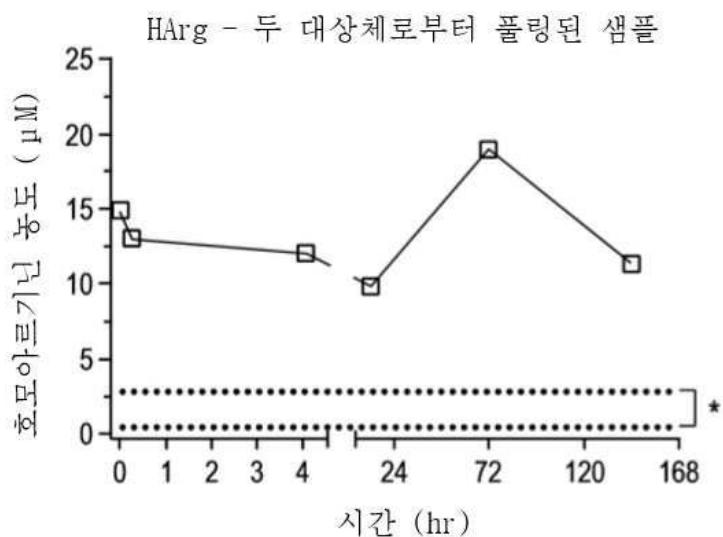
도면1d



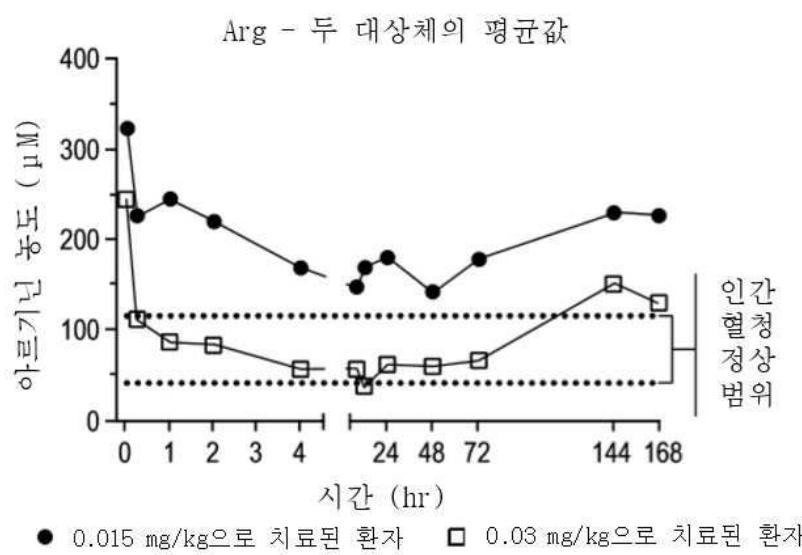
도면2a



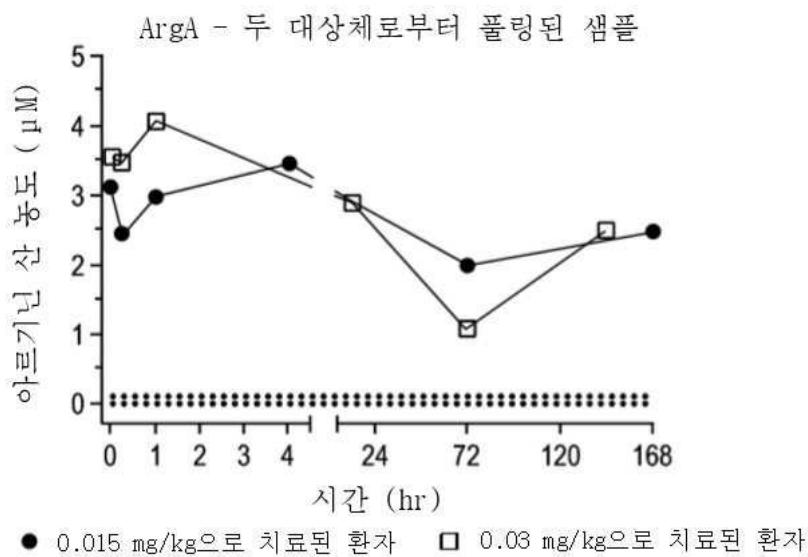
도면2b



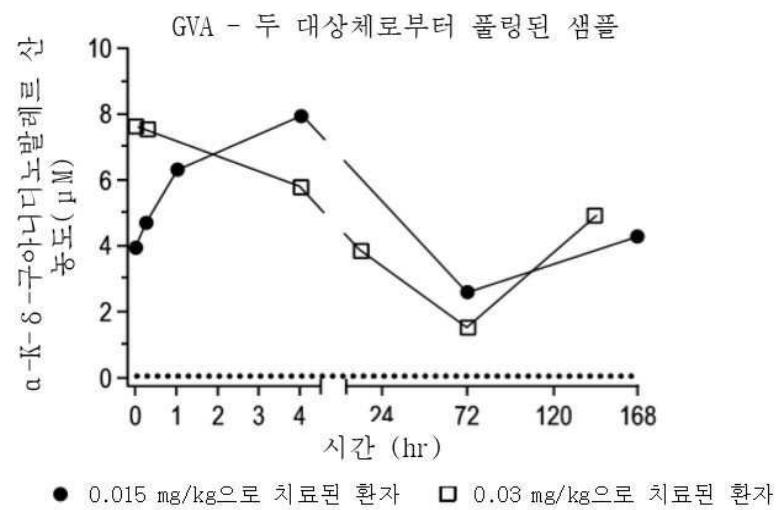
도면3a



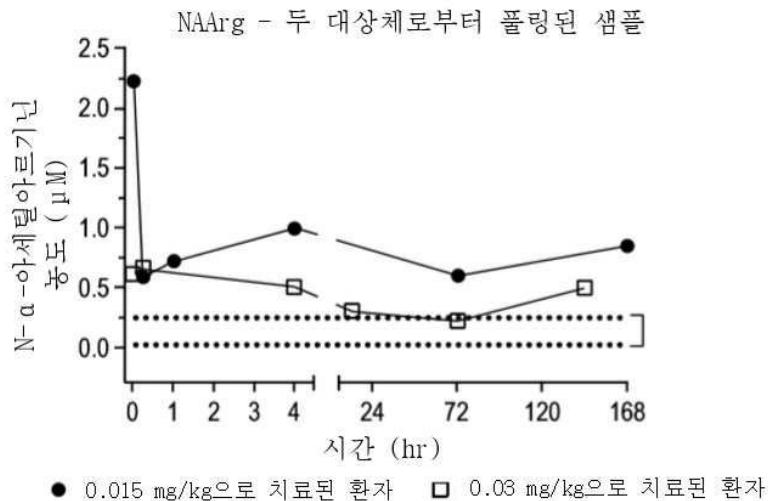
도면3b



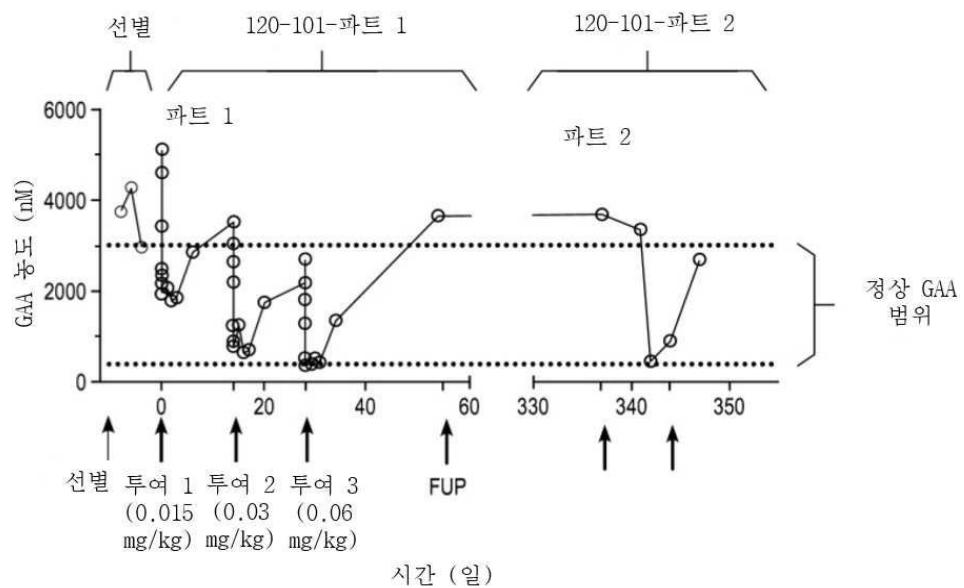
도면3c



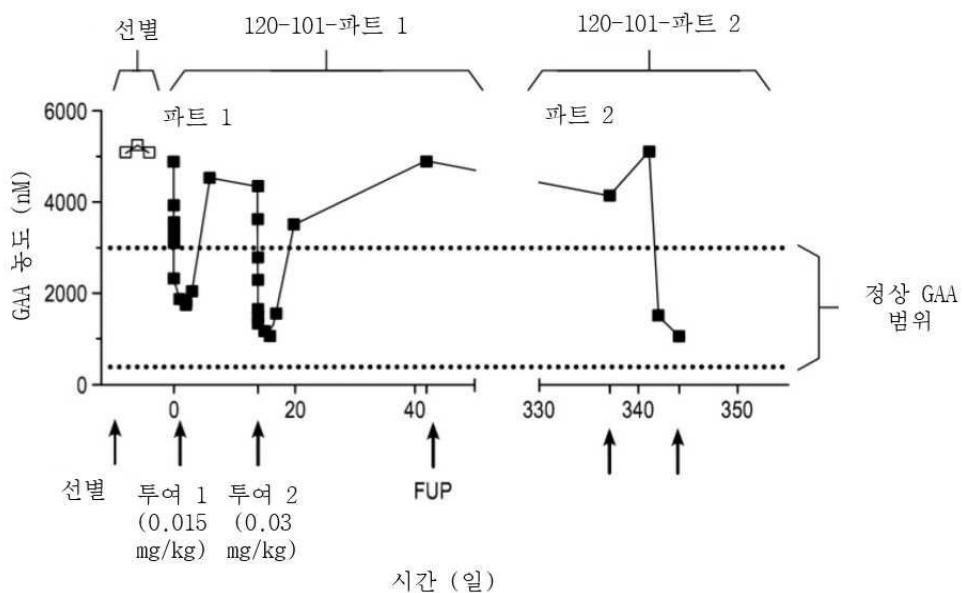
도면3d



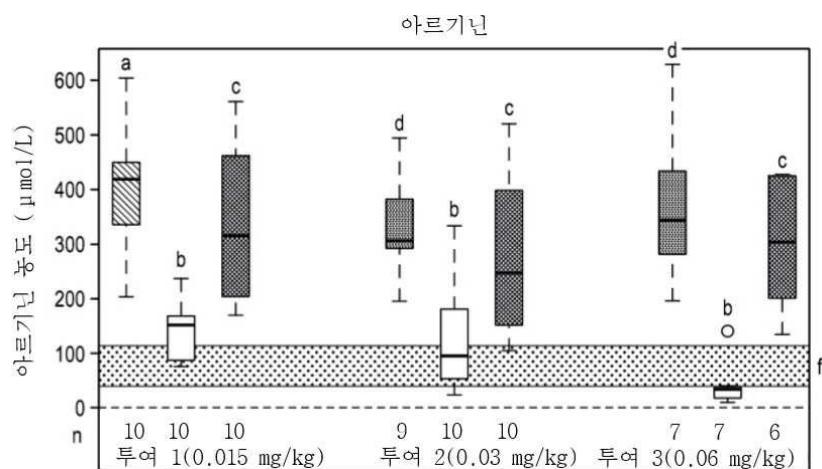
도면4a



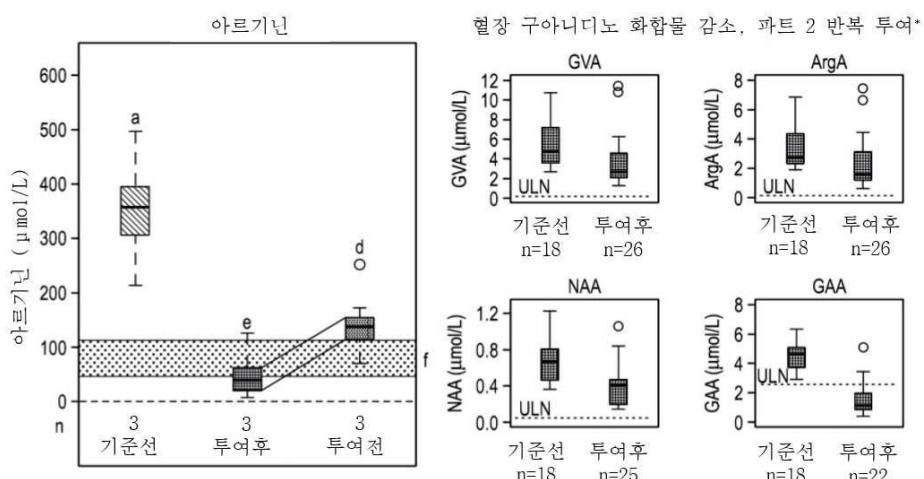
도면4b



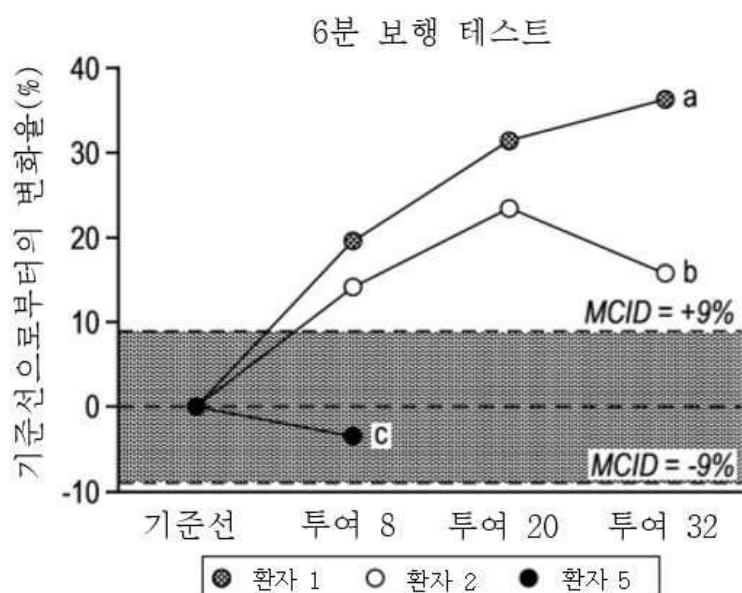
도면5a



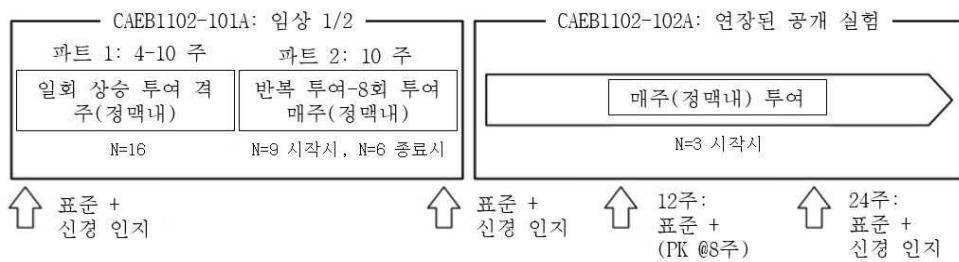
도면5b



도면6

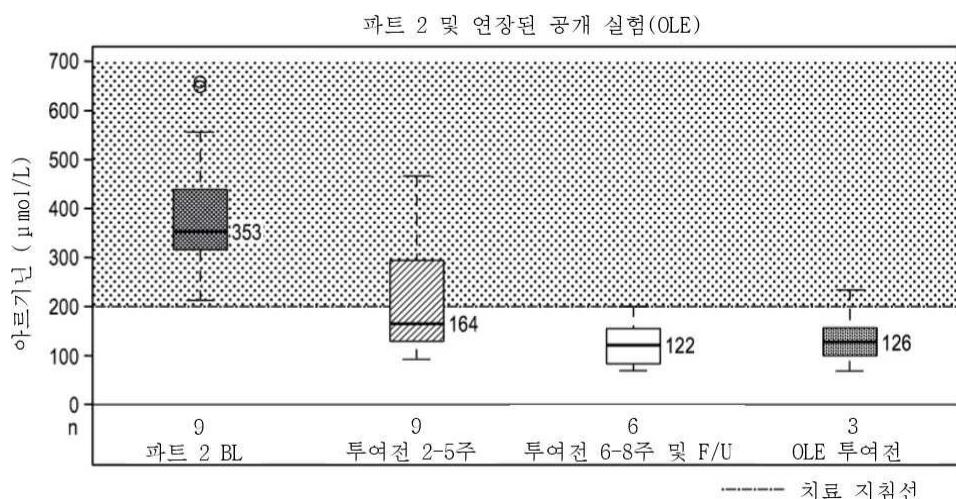


도면7

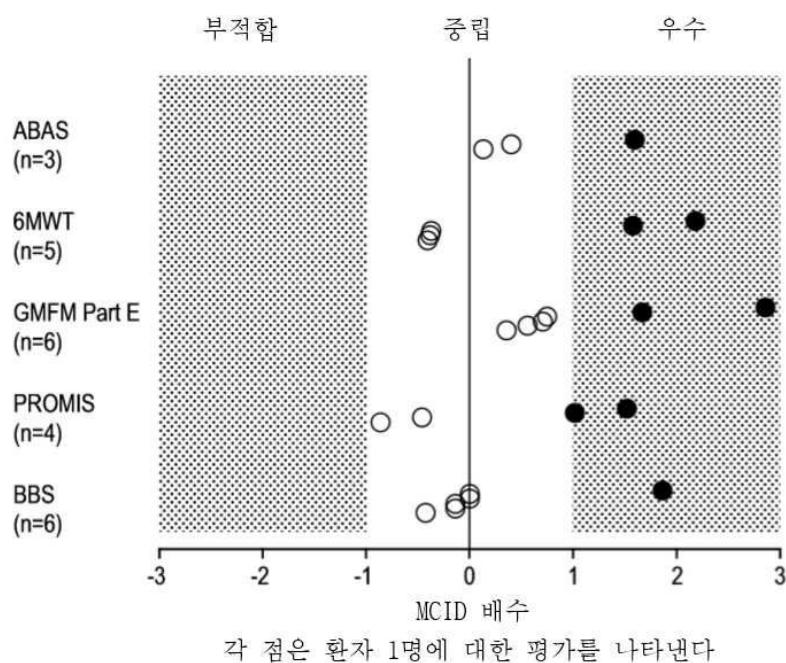


표준 평가는 안전성, 아르기닌, 구아니디노 화합물, 신경 운동(6MWT, BBS, GMFM-66), PROMIS, 적응 행동(ABAS), 및 약물동태학을 포함한다. 파트 1에서 일회 상승 투여는 0.015 mg/kg 내지 0.20 mg/kg의 범위이다. 파트 2에서의 투여와 연장된 개방 실험은 혈장 아르기닌 대조군에 기반한다.

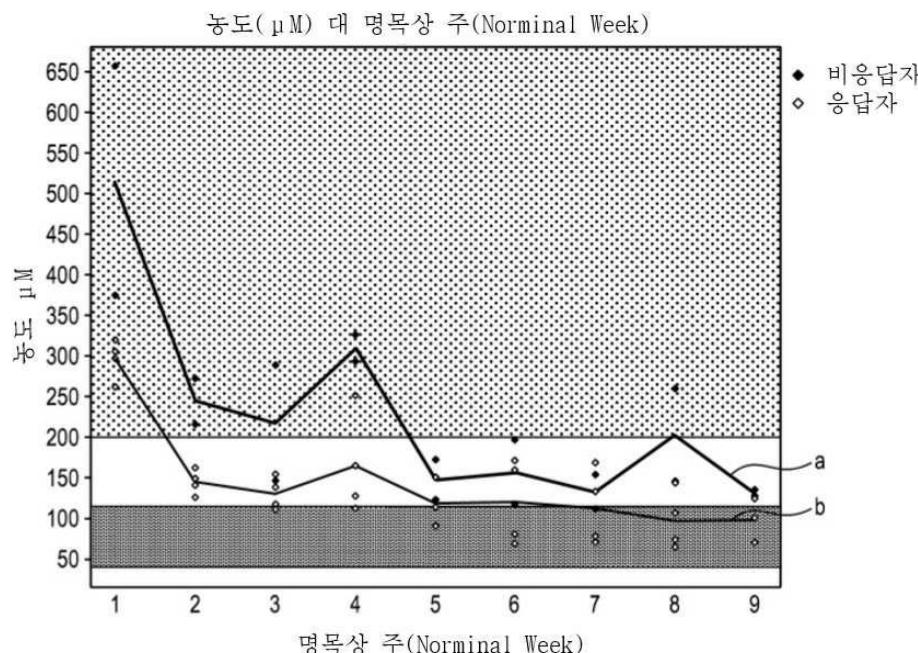
도면8



도면9



도면10



서 열 목 록

- <110> AERASE, INC.
- <120> METHOD AND COMPOSITION FOR TREATING ARGINASE 1 DEFICIENCY
- <130> AER20P-0001-KR
- <150> US 62/745,000
- <151> 2018-10-12
- <150> US 62/725,612
- <151> 2018-08-31
- <150> US 62/594,747
- <151> 2017-12-05
- <160> 2
- <170> KoPatent In 3.0
- <210> 1
- <211> 354
- <212> PRT
- <213> Homo sapiens
- <400> 1

Met Ser Leu Arg Gly Ser Leu Ser Arg Leu Leu Gln Thr Arg Val His

1 5 10 15

Ser Ile Leu Lys Lys Ser Val His Ser Val Ala Val Ile Gly Ala Pro

20	25	30
Phe Ser Gln Gly Gln Lys Arg Lys Gly Val Glu His Gly Pro Ala Ala		
35	40	45
Ile Arg Glu Ala Gly Leu Met Lys Arg Leu Ser Ser Leu Gly Cys His		
50	55	60
Leu Lys Asp Phe Gly Asp Leu Ser Phe Thr Pro Val Pro Lys Asp Asp		
65	70	75
Leu Tyr Asn Asn Leu Ile Val Asn Pro Arg Ser Val Gly Leu Ala Asn		
85	90	95
Gln Glu Leu Ala Glu Val Val Ser Arg Ala Val Ser Asp Gly Tyr Ser		
100	105	110
Cys Val Thr Leu Gly Gly Asp His Ser Leu Ala Ile Gly Thr Ile Ser		
115	120	125
Gly His Ala Arg His Cys Pro Asp Leu Cys Val Val Trp Val Asp Ala		
130	135	140
His Ala Asp Ile Asn Thr Pro Leu Thr Thr Ser Ser Gly Asn Leu His		
145	150	155
Gly Gln Pro Val Ser Phe Leu Leu Arg Glu Leu Gln Asp Lys Val Pro		
165	170	175
Gln Leu Pro Gly Phe Ser Trp Ile Lys Pro Cys Ile Ser Ser Ala Ser		
180	185	190
Ile Val Tyr Ile Gly Leu Arg Asp Val Asp Pro Pro Glu His Phe Ile		
195	200	205
Leu Lys Asn Tyr Asp Ile Gln Tyr Phe Ser Met Arg Asp Ile Asp Arg		
210	215	220
Leu Gly Ile Gln Lys Val Met Glu Arg Thr Phe Asp Leu Leu Ile Gly		
225	230	235
Lys Arg Gln Arg Pro Ile His Leu Ser Phe Asp Ile Asp Ala Phe Asp		
245	250	255
Pro Thr Leu Ala Pro Ala Thr Gly Thr Pro Val Val Gly Gly Leu Thr		
260	265	270
Tyr Arg Glu Gly Met Tyr Ile Ala Glu Glu Ile His Asn Thr Gly Leu		

275 280 285

Leu Ser Ala Leu Asp Leu Val Glu Val Asn Pro Gln Leu Ala Thr Ser

290 295 300

Glu Glu Glu Ala Lys Thr Thr Ala Asn Leu Ala Val Asp Val Ile Ala

305 310 315 320

Ser Ser Phe Gly Gln Thr Arg Glu Gly Gly His Ile Val Tyr Asp Gln

325 330 335

Leu Pro Thr Pro Ser Ser Pro Asp Glu Ser Glu Asn Gln Ala Arg Val

340 345 350

Arg Ile

<210> 2

<211> 322

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Met Ser Ala Lys Ser Arg Thr Ile Gly Ile Gly Ala Pro Phe Ser

1 5 10 15

Lys Gly Gln Pro Arg Gly Gly Val Glu Glu Gly Pro Thr Val Leu Arg

20 25 30

Lys Ala Gly Leu Leu Glu Lys Leu Lys Glu Gln Glu Cys Asp Val Lys

35 40 45

Asp Tyr Gly Asp Leu Pro Phe Ala Asp Ile Pro Asn Asp Ser Pro Phe

50 55 60

Gln Ile Val Lys Asn Pro Arg Ser Val Gly Lys Ala Ser Glu Gln Leu

65 70 75 80

Ala Gly Lys Val Ala Glu Val Lys Lys Asn Gly Arg Ile Ser Leu Val

85 90 95

Leu Gly Gly Asp His Ser Leu Ala Ile Gly Ser Ile Ser Gly His Ala

100 105 110

Arg Val His Pro Asp Leu Gly Val Ile Trp Val Asp Ala His Thr Asp

115 120 125

Ile Asn Thr Pro Leu Thr Thr Ser Gly Asn Leu His Gly Gln Pro
 130 135 140
 Val Ser Phe Leu Leu Lys Glu Leu Lys Gly Lys Ile Pro Asp Val Pro
 145 150 155 160

 Gly Phe Ser Trp Val Thr Pro Cys Ile Ser Ala Lys Asp Ile Val Tyr
 165 170 175
 Ile Gly Leu Arg Asp Val Asp Pro Gly Glu His Tyr Ile Leu Lys Thr
 180 185 190
 Leu Gly Ile Lys Tyr Phe Ser Met Thr Glu Val Asp Arg Leu Gly Ile
 195 200 205
 Gly Lys Val Met Glu Glu Thr Leu Ser Tyr Leu Leu Gly Arg Lys Lys
 210 215 220
 Arg Pro Ile His Leu Ser Phe Asp Val Asp Gly Leu Asp Pro Ser Phe

 225 230 235 240
 Thr Pro Ala Thr Gly Thr Pro Val Val Gly Gly Leu Thr Tyr Arg Glu
 245 250 255
 Gly Leu Tyr Ile Thr Glu Glu Ile Tyr Lys Thr Gly Leu Leu Ser Gly
 260 265 270
 Leu Asp Ile Met Glu Val Asn Pro Ser Leu Gly Lys Thr Pro Glu Glu
 275 280 285
 Val Thr Arg Thr Val Asn Thr Ala Val Ala Ile Thr Leu Ala Cys Phe
 290 295 300

 Gly Leu Ala Arg Glu Gly Asn His Lys Pro Ile Asp Tyr Leu Asn Pro
 305 310 315 320
 Pro Lys