



(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公告本

(11)證書號數：TW I878212 B

(45)公告日：中華民國 114 (2025) 年 04 月 01 日

(21)申請案號：107143773

(22)申請日：中華民國 107 (2018) 年 12 月 05 日

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

A61K47/60 (2017.01)

(30)優先權：2017/12/05 美國

62/594,747

2018/08/31 美國

62/725,612

2018/10/12 美國

62/745,000

(71)申請人：瑞典商伊梅爾迪卡製藥公司(瑞典) IMMEDICA PHARMA AB (SE)

瑞典

(72)發明人：羅林森 史考特 W ROWLINSON, SCOTT W. (US)；昆恩 安東尼 G QUINN,

ANTHONY G. (US)

(74)代理人：陳長文；張哲倫；劉君怡

審查人員：簡正芳

申請專利範圍項數：13 項 圖式數：10 共 105 頁

(54)名稱

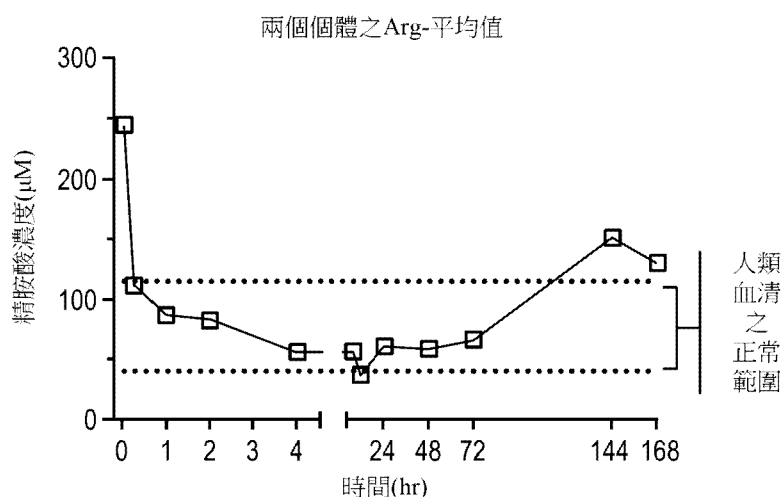
用於治療精胺酸酶 1 缺乏症之方法及組合物

(57)摘要

本發明係關於一種方法及組合物，其用於治療患有精胺酸酶 1 (ARG1)缺乏症(ARG1-D)之個體且用於快速降低該個體中之精胺酸及/或胍基化合物中之至少一者的量。

A method and composition to treat a subject with arginase 1 (ARG1) deficiency (ARG1-D) and to rapidly reduce the levels of at least one of arginine and/or a guanidino compound in the subject.

指定代表圖：



【圖1A】



公告本

I878212

【發明摘要】

【中文發明名稱】

用於治療精胺酸酶1缺乏症之方法及組合物

【英文發明名稱】

METHOD AND COMPOSITION FOR TREATING ARGINASE 1
DEFICIENCY

【中文】

本發明係關於一種方法及組合物，其用於治療患有精胺酸酶1 (ARG1)缺乏症(ARG1-D)之個體且用於快速降低該個體中之精胺酸及/或胍基化合物中之至少一者的量。

【英文】

A method and composition to treat a subject with arginase 1 (ARG1) deficiency (ARG1-D) and to rapidly reduce the levels of at least one of arginine and/or a guanidino compound in the subject.

【指定代表圖】

圖1A

【代表圖之符號簡單說明】

無

【發明說明書】

【中文發明名稱】

用於治療精胺酸酶1缺乏症之方法及組合物

【英文發明名稱】

METHOD AND COMPOSITION FOR TREATING ARGINASE 1
DEFICIENCY

【技術領域】

【先前技術】

【0001】 揭示治療患者之精胺酸酶1缺乏症之方法及用於治療患者之精胺酸酶1缺乏症(ARG1-D)之組合物。

【0002】 精胺酸酶1缺乏症(亦稱為高精胺酸血症或精胺酸血症)係由精胺酸酶1蛋白之活性缺乏或損失所導致，該缺乏或損失歸因於例如精胺酸酶1 (*ARG1*)基因中之突變。 *ARG1*為將精胺酸轉化成鳥胺酸之尿素循環酶。 *ARG1-D*為罕見及進展性疾病。已估計其在每300,000至1,000,000個個體中出現一次。 *ARG1-D*為導致精胺酸及其他胍基化合物(GC)之毒性累積之體染色體隱性尿素循環病症。 *ARG1-D*之臨床特點通常表現於兒童早期但可能在一些受影響嬰兒出生之後不久出現。疾病表現包括痙攣、發育遲緩、癲癇、蛋白質迴避(protein avoidance)、陣發性高氨血症、噁心及嘔吐。在伴以疾病進展之青春期中，患者可能損失活動性，不能說話或理解，遭受營養不良及維生素D缺乏症。疾病及其相關症狀之另一進展包括如由升高轉胺酶及肝纖維化、嚴重痙攣及肌肉攣縮、精神遲滯及有限生命期證明之肝損傷。不幸地，膳食限制及除氮劑已不足以預防由精胺酸及其他胍基化合物之慢性顯著升高及陣發性高氨血症所致之疾病進展。

【0003】 當向患有ARG1-D之患者提供低蛋白質膳食時，精胺酸量可降低至約265-300 $\mu\text{mol/L}$ (Schlune等人, 「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)。受膳食蛋白質攝入影響之從頭精胺酸合成占約5-15%血漿精胺酸合成，且主要精胺酸來源為身體組織更新(Wu, G.等人, 「Arginine metabolism: nitric oxide and beyond」, *Biochem J*, 336 (Pt 1), 1-17, 1998)。因此，膳食蛋白質限制對血漿精胺酸量之影響有限且個體中之精胺酸之循環位準由於降解過量精胺酸之不可能性而仍保留較高。

【0004】 ARG1-D動物模型中之大部分療法之非臨床研究尚未顯示對甚至伴以血漿精胺酸量降低之疾病結果具有實質性影響。在此等方法之大部分不解決疾病之根本原因，亦即校正肝中之細胞溶質ARG1缺乏症之條件下，美國食品藥物管理局(U . S . Food and Drug Administration , FDA)已質疑血漿精胺酸酶量增強是否可甚至具有與校正細胞內ARG1活性相同之總體作用，包括精胺酸衍生之胍基化合物之減少，這可能促進疾病發病機制。儘管文獻證明膳食精胺酸限制可降低血漿精胺酸量，但膳食方法對疾病表現之有益影響由於遠高於生理學正常範圍以及醫學規範之血漿精胺酸量之慢性顯著升高而為有限的。不管膳食治療及血漿精胺酸減少如何，此觀點受到描述11名患者中之4名之痙攣中之進展的群組支持(Prasad等人, 「Argininemia: a treatable genetic cause of progressive spastic diplegia simulating cerebral palsy - case reports and literature review」 *J. Child Neurol.* 12: 301-309, 1997)。與此理論基礎一致，其他人已提出諸如精胺酸(argininic acid)、胍乙酸、 β -胍丙酸、 β -胍丁酸及N-

α -乙醯精胺酸之高量精胺酸代謝物可在ARG1缺乏型患者之神經後遺症之因果關係中為重要的(Deignan等人, 「Increased plasma and tissue guanidine compounds in a mouse model of hyperargininemia」, *Mol. Genet. Metab.* 93: 172-178, 2008 ; Segawa等人, 「A long-term survival case of arginase deficiency with severe multicystic white matter and compound mutations」, *Brain Dev.* 33: 45-48, 2011 ; Wyse等人, 「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) 。在ARG1-D中之胍基化合物之潛在重要性之條件下, 已研究低精胺酸膳食減少此等潛在神經毒性代謝物之能力(Lambert等人, 「Hyperargininemia: intellectual and motor improvement related to changes in biochemical data」, *J. Pediatr.*, 1991, 118(3): 420-4) 。儘管Lambert等人能夠說明低精胺酸膳食能夠在遵循嚴格膳食控制之約一個月內降低血液精胺酸量, 但胍乙酸酯及 α -酮- δ -胍戊酸(GVA)之量不變化, 這表明膳食似乎不具有快速控制GC量作為治療性干預之潛能。在病症及複雜基礎機制之條件下, 需要用於快速降低及控制患者之高量精胺酸之新型治療來解決此未滿足之醫學需要。

【發明內容】

【0005】 此處新揭示內容為較佳獲得患者之快速反應之用於治療ARG1-D患者之方法、化合物及組合物, 其中患者為人類且可為成人、兒童或嬰兒。

【0006】 提供治療個體之精胺酸酶1 (ARG1)缺乏症(ARG1-D)之方法, 其包含向個體投與呈足以在初始投與精胺酸酶之後約2至約4天內將個

體之精胺酸血漿量降低至低於200 $\mu\text{mol/L}$ 之量的精胺酸酶。個體之精胺酸血漿量可在初始投與精胺酸酶之後降低至處於40 $\mu\text{mol/L}$ 至115 $\mu\text{mol/L}$ 範圍內。個體可為患有ARG1-D之人類成人、人類兒童或人類嬰兒(例如小於12個月年齡)。

【0007】 精胺酸酶可為野生型精胺酸酶I (例如SEQ ID NO: 2)或精胺酸酶II (例如SEQ ID NO: 1)。精胺酸酶可為聚乙二醇化精胺酸酶1，且其可具有代替錳金屬輔因子之鈷金屬輔因子。聚乙二醇化精胺酸酶1可為聚乙二醇化精胺酸酶(pegzilarginase)。

【0008】 所揭示之治療方法可進一步需要投與，其中在初始投與之後少於7天、3天、2天及/或1天內在個體中將N- α -乙醯精胺酸(NAArg)、精胺酸(ArgA)、GVA、胍乙酸(GAA)及精胺酸中之至少一者之血漿量降低至正常量至少一次。使用精胺酸酶之治療方法可為使得在投與之後GAA血漿量達至正常量之治療方法。一種方法可為使得足以降低個體中之精胺酸血漿量之量改善諸如靜息痙攣、痙攣相關性腿痛性痙攣、適應行為及患者報導結果量測資訊系統(Patient-Reported Outcomes Measurement Information System, PROMIS)身體功能分數之一或多個特徵的方法。

【0009】 治療方法考慮投與約0.005至約1.00 mg/kg患者體重之靜脈內劑量。用於靜脈內投與之其他範圍或用量可包括0.01至0.5 mg/kg、0.01至0.2 mg/kg、0.015至0.25 mg/kg及0.015至0.075 mg/kg，且亦考慮敘述範圍之間之每0.005增量。

【0010】 治療方法考慮投與約0.01至約1.50 mg/kg患者體重之皮下劑量。用於靜脈內投與之其他範圍或用量可包括0.015至0.75 mg/kg、

0.015至0.30 mg/kg、0.015至0.25 mg/kg及0.015至0.075 mg/kg，且亦考慮敘述範圍之間之每0.005增量。

【0011】 另一方法考慮以足以將個體中之至少一種選自由ArgA、NAArg、GVA、GAA及精胺酸組成之群之化合物的血漿量降低至少2倍的劑量向個體投與精胺酸酶，其中在投與之後約24至48小時檢定血漿量。另一方法考慮所投與之劑量將NAArg血漿量降低至少3倍。另一方法考慮所投與之劑量將GAA血漿量降低至少2倍。可將所揭示之治療方法之精胺酸酶靜脈內或皮下或兩者之組合投與至患者。可向個體每天、每週、每兩月或每月一次投與精胺酸酶。

【0012】 亦可向個體投與除氮劑。所揭示之具有精胺酸酶之組合物可包含除氮劑。可向個體投與所揭示之使用精胺酸酶之治療方法以及除氮劑，且個體可視情況進一步進行低精胺酸膳食。用精胺酸酶治療個體之另一方法包括投與可操作地連接於腺病毒載體以用於遞送至個體中之核酸，且在投與至個體時核酸在個體中產生精胺酸酶。藉由腺病毒載體遞送產生之精胺酸酶之量可治療上有效地將個體中之至少一種選自由ArgA、NAArg、GVA、GAA及精胺酸組成的群的化合物的血漿量降低至少2倍，其中在投與精胺酸酶之後約24至48小時檢定血漿量。

【0013】 另一方法考慮在初始投與精胺酸酶之後改善神經運動功能。神經運動功能可為以下中之一或多者但不限於以下：步進、步行、痙攣及/或機警。另一方法考慮與在投與精胺酸酶之前之痙攣、行為及PROMIS T-分數中之至少一者相比，個體展現在初始投與精胺酸酶之後之較少靜息痙攣、較少痙攣相關性腿痛性痙攣、適應行為及改善的PROMIS T-分數中的至少一者。一種方法考慮對用精胺酸酶進行治療以

使得將一或多種毒性代謝物(例如GAA)降低至正常量或將其清除起急性反應。

【0014】 該方法考慮向個體投與將精胺酸血漿量降低至低於200 $\mu\text{mol/L}$ 之至少一種重複劑量之量的精胺酸酶。精胺酸血漿量可在至少30週及/或至少40週內降低至低於200 $\mu\text{mol/L}$ 之量。在接受八次至少一種重複劑量之後，個體可展現以下中之至少一者中之改善：(a)活動性或(b)適應行為，此係相對於療法之前之個體之該活動性或適應行為的基線而言的。NAArg、ArgA、GVA、GAA或精胺酸中之至少一者之血漿量可相較於個體中之基線血漿量而言降低。另一方法考慮個體在9天治療之後之最小臨床重要差異(minimal clinically important difference, MCID)大於1。精胺酸血漿量與MCID相關。

【0015】 亦考慮包含聚乙二醇化精胺酸酶及醫藥學上可接受之緩衝劑之組合物。除了所需量之聚乙二醇化精胺酸酶或其他精胺酸酶之外，組合物可包含約10%甘油且醫藥學上可接受之緩衝劑可為磷酸鹽緩衝鹽水。

【0016】 亦考慮精胺酸酶，諸如在紅血球殘骸中調配聚乙二醇化精胺酸酶。

【0017】 一種用於將患有精胺酸酶1 (ARG1)缺乏症(ARG1-D)之個體中之至少一種選自由精胺酸、N- α -乙醯精胺酸(NAArg)、精胺酸(ArgA)、 α -酮- δ -胍戊酸(GVA)、胍乙酸(GAA)組成之群的化合物的血漿量快速降低至正常量的方法，其包含向個體投與包含治療有效量之聚乙二醇化精胺酸酶之組合物，其中聚乙二醇化精胺酸酶起初係以0.005 mg/kg至1.00 mg/kg靜脈內投與至個體，且其後每週一次皮下或靜脈內投與至個體。另一方法考慮起初以0.005 mg/kg至0.50 mg/kg靜脈內投與聚乙二醇

化精胺酸酶。另一方法考慮起初以0.005 mg/kg至0.20 mg/kg靜脈內投與聚乙二醇化精胺酸酶。另一方法考慮聚乙二醇化精胺酸酶為聚乙二醇化精胺酸酶。另一方法考慮在初始投與聚乙二醇化精胺酸酶之後少於3天、2天及/或1天內將個體中之至少一種選自由ArgA、NAArg、GVA、GAA及精胺酸組成之群之化合物之血漿量降低至正常量。另一方法考慮投與至個體之聚乙二醇化精胺酸酶之劑量足以將至少一種來自選自ArgA、NAArg、GVA、GAA及精胺酸之群之化合物的血漿量降低至少2倍，其中在投與聚乙二醇化精胺酸酶之後約24至48小時檢定血漿量。

【0018】 一種用於將患有精胺酸酶1 (ARG1)缺乏症(ARG1-D)之個體中之至少一種選自由精胺酸、N- α -乙醯精胺酸(NAArg)、精胺酸(ArgA)、 α -酮- δ -胍戊酸(GVA)、胍乙酸(GAA)組成之群的化合物的血漿量快速降低至正常量的方法，其包含向個體投與包含治療有效量之聚乙二醇化精胺酸酶之組合物，其中聚乙二醇化精胺酸酶起初係以0.01 mg/kg至1.50 mg/kg皮下投與至個體，且其後每週一次皮下或靜脈內投與至個體。另一方法考慮起初以0.015 mg/kg至0.75 mg/kg皮下投與聚乙二醇化精胺酸酶。另一方法考慮起初以0.015 mg/kg至0.30 mg/kg皮下投與聚乙二醇化精胺酸酶。另一方法考慮在初始投與聚乙二醇化精胺酸酶之後少於3天、2天及/或1天內將個體中之至少一種選自由ArgA、NAArg、GVA、GAA及精胺酸組成之群之化合物之血漿量降低至正常量。另一方法考慮投與至個體之聚乙二醇化精胺酸酶之劑量足以將至少一種選自由ArgA、NAArg、GVA、GAA及精胺酸組成之群之化合物的血漿量降低至少2倍，其中在投與聚乙二醇化精胺酸酶之後約24至48小時檢定血漿量。

【圖式簡單說明】

【0019】

圖1.圖1A精胺酸、圖1B 精胺酸(ArgA)、圖1C GVA及圖1D N- α -乙醯精胺酸(NAArg)之血漿濃度。精胺酸量為使用經驗證(優良實驗室操作，亦即GLP)檢定之獲自兩名經0.03 mg聚乙二醇化精胺酸酶/kg治療之ARG1-D患者之值的平均值。用使用來自相同之兩名經0.03 mg聚乙二醇化精胺酸酶/kg治療之ARG1-D患者之混合樣品進行的非GLP檢定來檢定ArgA、GVA及NAArg量。人類中之正常範圍由「*」表示。人類血清中之精胺酸之正常範圍為40 $\mu\text{mol/L}$ 至115 $\mu\text{mol/L}$ 。參見例如Lüneburg, N.等人, 「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)。ArgA之正常範圍為<0.025 $\mu\text{mol/L}$ 至0.100 $\mu\text{mol/L}$ ；GVA之正常範圍為<0.050；且NAArg之正常範圍為<0.025 $\mu\text{mol/L}$ 至0.255 $\mu\text{mol/L}$ 。參見例如Marescau等人, 「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)。

圖2.顯示圖2A精胺酸及圖2B高精胺酸(HArg)之血漿濃度。精胺酸量為使用經驗證(GLP)檢定之獲自兩名經0.03 mg聚乙二醇化精胺酸酶/kg治療之ARG1-D患者之值的平均值。用使用來自相同之兩名經0.03 mg聚乙二醇化精胺酸酶/kg治療之ARG1-D患者之混合樣品進行的非GLP檢定獲得HArg值。「*」指示人類血清中之正常範圍，對於精胺酸，如Lüneburg, N.等人, (2011)中所描述，或對於胍基化合物，如Marescau等人, (1990)中所描述。HArg之正常範圍為<0.500 $\mu\text{mol/L}$ 至2.80 $\mu\text{mol/L}$ 。

圖3.圖3A精胺酸、圖3B 精胺酸(ArgA)、圖3C GVA及圖3D N- α -乙醯精胺酸(NAArg)之血漿濃度。精胺酸量為使用經驗證(GLP)檢定之獲自兩名經0.015 mg聚乙二醇化精胺酸酶/kg (「●」)及0.03 mg聚乙二醇化精胺酸酶/kg (「□」)治療之ARG1-D患者之值的平均值。ArgA、GVA及NAArg量係使用使用來自相同之兩名經0.015 mg聚乙二醇化精胺酸酶/kg及0.03 mg聚乙二醇化精胺酸酶/kg治療之ARG1-D患者之混合樣品進行的非GLP檢定而獲得的。「*」指示人類血清中之正常範圍，對於精胺酸，如Lüneburg, N.等人, (2011)中所描述，或對於胍基化合物，如Marescau等人, (1990)中所描述。

圖4A及4B顯示針對經聚乙二醇化精胺酸酶治療之前(例如在篩檢時)及之後兩名患者亦即患者120-101 (圖4A)及患者120-102 (圖4B)中之GAA之資料。在兩種情況下，顯示在篩檢時及在部分1及2之給藥期間針對GAA量之資料。「FUP」指示後續。GAA之正常範圍為0.400 $\mu\text{mol/L}$ 至3.00 $\mu\text{mol/L}$ 。參見例如Marescau等人, (1990)。

圖5A.在利用單劑量之臨床研究之部分1中檢查精胺酸酶治療對精胺酸及GC之血漿量之作用(NAA係指NAArg)。**圖5B**描繪在包括重複劑量之臨床研究之部分2中檢查精胺酸酶治療對精胺酸及GC之血漿量之作用。所顯示之針對部分2之資料包括根據臨床方案之伴以所投與之所有八(8)個劑量之患者。對於圖5A及圖5B，「a」指示患者之基線精胺酸量，「b」指示給藥後天底點，「c」指示給藥後第7天之量，「d」指示精胺酸之給藥前量，「e」指示全部給藥後，「f」指示健康患者之精胺酸之血漿量之正常範圍，40 $\mu\text{mol/L}$ 至115 $\mu\text{mol/L}$ ，如Lüneburg, N.等人, (2011)中所描述，且「n」表示患者數量。給藥後天底點為遵循部分1給藥之最低值；部分2中

之「全部給藥後」包括除在臨下一給藥前之值以外的全部給藥後值。

圖6.顯示在基線、在劑量8、在劑量20及在劑量32下之三名患者亦即患者1 (「a」)、2 (「b」)及5 (「c」)之6分鐘步行測試之結果(資料不可供用於在劑量20及32下之患者5 (「c」)。劑量8、20及32來自重複劑量之起點。

圖7.提供1/2期研究及開放標記延伸之綜述。

圖8.針對部分2及開放標記延伸患者之伴以重複給藥有聚乙二醇化精胺酸酶之血漿精胺酸中之時間依賴性改善。「BL」為基線；「F/U」為後續；「OLE」為開放標記延伸，且「n」為各時間點處之患者數量。期望將患者血漿中之精胺酸維持在 $\leq 200 \mu\text{mol/L}$ 下。100% (5/5)完成部分2之患者已達成低於建議規範之經減少精胺酸之一致量。精胺酸減少伴有血漿GC (GVA、ArgA、NAA及GAA)中之持續降低。

圖9.利用聚乙二醇化精胺酸酶進行之治療在僅8個重複劑量之後改善相對於基線之臨床結果。圖9中之各分數表示針對一名患者之一項評估。有利評估經實心圓「●」指示，而中性評估經空心圓「○」指示。

圖10顯示基於患者之MCID改善之對聚乙二醇化精胺酸酶治療起反應之患者(反應者)及不對聚乙二醇化精胺酸酶治療起反應之彼等患者(非反應者)在九週時間段內的精胺酸濃度。高於醫學規範之血漿中之精胺酸之範圍為 $\geq 200 \mu\text{mol/L}$ ；精胺酸之人類正常範圍為 $40 \mu\text{mol/L}$ 至 $115 \mu\text{mol/L}$ ，如Lüneburg, N.等人, (2011)中所描述。如下文所描述測定MCID。反應者可為具有 >1 MCID之個體；非反應者可為具有 <1 MCID之個體。非反應者資料點由閉合菱形指示；反應者資料點經開放菱形指示。非反應者資料點之平均值由線「a」指示，且反應者資料點之平均值由線

「b」指示。

【實施方式】

【0020】

相關申請之交叉參考

本申請主張2017年12月5日申請之美國臨時申請第62/594,747號、2018年8月31日申請之美國臨時申請第62/725,612號及2018年10月12日申請之美國臨時申請第62/745,000號之優先權，該等案之全部內容以引用之方式併入本文中。

【0021】

序列表之參考

本申請相關序列表係以電子格式經由EFS網申請且在此以全文引用之方式併入本說明書中。含有序列表之正文檔案之名稱為218107-0011-00-TW_ST25。正文檔案之大小為6,247位元組，且正文檔案係在2018年12月4日產生。

【0022】 在尋求下文實例中所揭示之研究之批准時，美國食品藥物管理局(FDA)咸信科學文獻不支持經由膳食精胺酸限制降低血漿精胺酸量與ARG1-D患者之疾病進展中之目標改善之間的清晰且一致關係。起初，FDA斷言其可能未見到來自在ARG1-D患者中投與聚乙二醇化精胺酸酶之直接臨床效益之前景。FDA產生關於聚乙二醇化精胺酸酶及其類似藥物解決ARG1-D患者之基礎酶缺乏之能力的擔憂。FDA查詢含有精胺酸酶之醫藥之周邊循環是否應對肝內精胺酸量之代謝及相關精胺酸代謝物之產生具有任何真實影響。因此，FDA起初延遲小兒患者之測試直至成人患者之治療可發生在准許繼續小兒患者之測試之前。

【0023】 已出乎意料地發現之內容為用於在3天內將精胺酸量及胍基化合物(NAArg)中之至少一者量快速降低至在正常量內之治療ARG1缺乏患者之方法(圖1)。

【0024】

定義

如本文所使用之術語「治療(treating/to treat/treatment)」包括抑制、減緩、終止、減輕、改善或逆轉現有ARG1-D相關症狀、病症、病況或疾病之進展或嚴重程度。可防治性地或治療性地施加治療。

【0025】 如所使用之術語「有效量」係指應具有所需作用而投與之野生型精胺酸酶或諸如聚乙二醇化精胺酸酶之聚乙二醇化精胺酸酶之量，諸如降低以下中之一或多者之血漿量：精胺酸、精胺酸(ArgA)、GVA、N- α -乙醯精胺酸(NAArg)、GAA及高精胺酸(HArg)。有效量可隨諸如患者體重之因素變化。舉例而言，用於靜脈內投與聚乙二醇化精胺酸酶之患者之有效量可在0.005與1.00 mg/kg患者體重之間之範圍內(包括彼等範圍之間之每0.005值)。用於向ARG1-D患者皮下(s.c.)投與聚乙二醇化精胺酸酶之有效量包括0.01至1.50 mg/kg患者體重(包括彼等範圍之間之每0.01值)。一個實例應為投與化合物以達成等效於不遭受ARG1缺乏症之正常人類中之各化合物之正常量的範圍精胺酸、ArgA、GVA、GAA及/或NAArg。有效量亦可改善肌肉強度、患者可走動能力(亦即，跑步、步行、騎腳踏車、無支撐爬樓梯之能力)，且改善認知能力(例如韋氏兒童智力量表(Wechsler Intelligence Scale for Children，WISC)測試改善)及/或適應行為(例如適應行為評估量表(Adaptive Behavior Assessment Scale，ABAS)或文蘭德適應行為量表(Vineland Adaptive Behavior Scale，

VABS)測試改善) (Lopata等人, 「Comparison of Adaptive Behavior Measures for Children with HFASDs」, *Autism Research and Treatment*, 第2013卷, 第1-10頁, (2013))。胍基化合物之正常量提供於下表中。精胺酸之正常量由Lüneburg, N.等人, (2011)描述。

【0026】 精胺酸及/或胍基化合物之血漿量可降低至正常範圍或正常量，這可意謂在投與初始劑量及/或重複劑量之精胺酸酶之後之一些點時，精胺酸及/或一或多種胍基化合物之血漿量之值在下表中所提供之範圍內或對於精胺酸為40 μmol/L至115 μmol/L，如Lüneburg, N.等人, (2011)所描述。舉例而言，在經如本文所揭示之精胺酸酶治療期間，患者之精胺酸及/或胍基化合物中之一或多種之血漿量可在正常範圍內及正常範圍外振盪。此患者視為具有降低至正常量或在正常範圍內之血漿量之經檢定精胺酸及/或胍基化合物。作為另一實例，在接受一或多種劑量之如本文所揭示之精胺酸酶之後，患者可具有在正常範圍(例如，如下表中所提供或對於精胺酸為40-115 μmol/L，如Lüneburg, N.等人, (2011)所描述)內之平均量之血漿量之精胺酸及/或一或多種胍基化合物。因此，本文所揭示之組合物及方法可在接受初始劑量及/或重複劑量之精胺酸酶之後將個體的精胺酸及/或胍基化合物的血漿量降低至正常量或至正常範圍至少一次。在一些患者中，觀測到精胺酸及/或胍基化合物之血漿量可根據本文所揭示之方法維持為平均、在正常量下或在正常範圍內。

【0027】 表1：人類血清、尿液及腦脊髓液(CSF)中之胍基化合物之正常範圍

胍基化合物	血清(μM) (n=107)	尿液 (μmol/g肌酐) (n=30)	CSF (μM) (n=45)
α-酮-δ-胍戊酸	<0.050	<DL*-30	<0.025
胍丁二酸	0.100-0.500	15-160	0.020-0.150

肌酸	10-200	75-28000	35-90
胍乙酸	0.400-3.00	100-2050	0.015-0.10
N- α -乙醯精胺酸	<0.025-0.255	10-100	0.030-0.20
精胺酸	<0.025-0.100	1-30	<0.013
高精胺酸	<0.500-2.80	<DL-20	0.120-0.600

*=偵測極限。量論述於Marescau等人, (1990)中。

【0028】 野生型精胺酸酶可基於人類精胺酸酶I或精胺酸酶II。野生型人類精胺酸酶II具有以下序列(Uniprot P78540)：

MSLRGSLSRLLQTRVHSILKKS VHSVAVIGAPFSQGQKRKGVEHGPAAIREAGLMKRLS
SLGCHLKDFGDL SFTPVPKDDLYNNLIVNPRSVGLANQELAEVVSRVSDGYSCVTLGG
DHSLAIGTISGHARHCPDLCVWVDAHADINTPLTTSSGNLHGQPVSFLLRELQDKVPQ
LPGFSWIKPCISSASIVYIGLRDVPPEHFILKNYDIQYFSMRDIDRLGIQKVMERTFD
LLIGKRQRPIHLSFDIDAFDPTLAPATGTPVVGGLTYREGMYIAEEIHNTGLLSALDLV
EVNPQLATSEEEAKTTANLAVDVIASSFGQTREGGHIVYDQLPTPSSPDESENQARVRI

(SEQ ID NO: 1)。

【0029】 野生型人類精胺酸酶I序列具有以下序列(Uniprot/P05089)：

MSAKSRTIGIIGAPFSKGQPRGGVEEGPTVLRKAGLLEKLKEQECVDVKDYGDLPFADIP
NDSPFQIVKNPRSVGKASEQLAGKVAEVKKNGRISLVLGGDHSLAIGSISGHARVHPDL
GVIWVDAHTDINTPLTTTSGNLHGQPVSFLLKELKGKIPDVPGFWSVTPCISAKDIVYI
GLRDVDPGEHYILKTLGIKYFSMTVDRLGIGKVMEE TLSYLLGRKKRPIHLSFDVDGL
DPSFTPATGTPVVGGLTYREGLYITEEIIYKTGLLSGLDIMEVNPSLGKTPPEVTRTVNT

AVAITLACFGLAREGNHKPIDYLNPPK (SEQ ID NO: 2)。

【0030】 此處所揭示之聚乙二醇化精胺酸酶具有精胺酸酶I之序列 SEQ ID NO: 2，且具有代替錳金屬輔因子之鈷金屬輔因子。聚乙二醇化精胺酸酶亦如美國專利8,440,184中所描述為聚乙二醇化的。

【0031】 「投與」意謂注射治療有效量之化合物及含有所揭示之該化合物之組合物。例如但不限於，投與可為血管內(i.v.)或皮下(s.c.)。本發明之組合物亦可肌內(i.m.)投與。

【0032】 術語「約」應為一般熟習此項技術者理解，且將視使用其

之情形而定在一定程度上變化。如本文所使用之「約」意圖涵蓋 $\pm 10\%$ 、 $\pm 5\%$ 或 $\pm 1\%$ 之變量。

【0033】術語「聚乙二醇化」係指與聚乙二醇(PEG)之綴合，在其高度生物相容性及修飾容易性之條件下其已廣泛地用作藥物載劑(參見例如Harris等人, *Clin. Pharmacokinet.* 40(7): 539-51, 2001)。PEG可經由鏈端部處之羥基及經由其他化學方法偶合(例如共價連接)至活性劑；然而，每分子之PEG自身限於至多兩種活性劑。在不同方法中，已探索PEG及胺基酸之共聚物作為應保留PEG之生物相容性質但應每分子具有多個連接點之添加優勢(提供更大藥物負載)的新穎生物材料。

【0034】可根據已知方法調配聚乙二醇化精胺酸酶變異體以製備醫藥學上有用之組合物。ARG1-D患者可與天然地含有錳金屬輔因子之野生型精胺酸酶蛋白(精胺酸酶I或精胺酸酶II)或已經聚乙二醇化且含有錳金屬輔因子之野生型精胺酸酶蛋白一起投與。在另一實例中，ARG1-D患者可投與精胺酸酶，其具有鈷金屬輔因子代替天然錳金屬輔因子。含有鈷金屬輔因子之精胺酸酶可進一步經聚乙二醇化，且示例性形式為Co-ArgI-PEG(在本文中亦稱為AEB1102，聚乙二醇化精胺酸酶，或Co-hArgI)，諸如以引用之方式併入本文中之美國專利第8,440,184號中所描述之彼形式。諸如聚乙二醇化精胺酸酶之示例性形式具有約十二個5 K (5000道爾頓) PEG單元/連接至存在於聚乙二醇化精胺酸酶之蛋白質序列中之一或多種離胺酸之單體。所需調配物為用適當高純度之稀釋劑或水溶液與視情況選用之醫藥學上可接受之載劑、防腐劑、賦形劑或穩定劑復原的穩定凍乾產物(參見Remington, *The Science and Practice of Pharmacy*, 第19版, Gennaro, 編, Mack Publishing Co., Easton, PA 1995)。藥物可調配成在

紅血球殘骸(亦稱為工程化紅血球)中遞送。另一方法應為經由i.m.、s.c.或i.v或使用所描述之紅血球殘骸向ARG1-D患者投與精胺酸脫亞胺酶(ADI)-PEG 20 (Polaris Pharma)。

【0035】 如本文所使用之術語「部分」在參考蛋白質(如在「給定蛋白質之一部分」中)時係指精胺酸酶片段，其中該片段具有尿素循環中之精胺酸酶活性。

【0036】 如本文所使用之術語「蛋白質」及「多肽」係指包含經由肽鏈接合之胺基酸之化合物且可互換使用。

【0037】 如本文所使用之術語「融合蛋白質」係指含有接合(或可操作地連接)至外生蛋白質片段(由非精胺酸酶蛋白質組成之融合搭配物)之所關注蛋白質(亦即人類精胺酸酶或其變異體)的嵌合蛋白質。融合搭配物可增強血清半衰期、溶解度或兩者。其亦可提供親和標籤(例如His標籤)以允許由宿主細胞或培養物上清液或兩者純化重組融合蛋白質。

【0038】 術語「以可操作組合形式」、「以可操作次序」及「可操作地連接」係指核酸序列之鍵以使得核酸分子能夠引導給定基因之轉錄及/或所需蛋白質分子之合成的方式產生。術語亦指胺基酸序列之鍵以此類方式以使得產生功能蛋白。

【0039】 如本文所使用之術語「 K_m 」係指針對酶之米曼氏常數(Michaelis-Menton constant)且定義為給定酶在酶催化反應中產生其最大速度之二分之一處的特異性受質的濃度。

【0040】 如本文所使用之術語「 k_{cat} 」係指轉換數或各酶位點受質分子轉化成產物之數量/單位時間，且其中酶以最大效率工作。

【0041】 如本文所使用之術語「 K_{cat}/K_m 」為特異性常數，其為酶如

何有效地將受質轉化成產物之量度。

【0042】 術語「Mn-hArgI」係指具有Mn (II)金屬輔因子之人類精胺酸酶I。術語「Co-hArgI」係指具有Co (II)金屬輔因子之人類精胺酸酶I (突變體或天然體)。

【0043】 術語「IC₅₀」為半最大(50%)抑制性濃度(IC)且因此為有效性之量度。

【0044】 術語「基因」係指包含生產諸如精胺酸酶之多肽或其前驅體必需之控制序列及編碼序列之DNA序列。多肽由全長編碼序列或由編碼序列之任何部分編碼，只要保留用於將精胺酸還原成鳥胺酸之精胺酸酶之所需酶活性即可。

【0045】 術語「個體」係指動物，諸如哺乳動物，包括人類。

【0046】 術語「野生型」係指基因或基因產物，其具有當自天然產生之來源分離時彼基因或基因產物之特徵。野生型基因為群體中最頻繁觀測到之彼基因，且因此任意指定為「正常」或「野生型」形式之該基因。相比之下，術語「經修飾」或「變異體」或「突變體」係指當與野生型基因或基因產物相比時呈現序列及/或功能性質(亦即經更改特徵)中之修改的基因或基因產物。應注意，可分離天然產生之突變體；當與野生型基因或基因產物相比時，此等突變體由其具有經更改特徵之事實來識別。

【0047】 本文中使用的縮寫：

縮寫

ADA	抗藥物抗體
ARG或Arg	精胺酸
ARG1-D	精胺酸酶1缺乏型

Arg1 -/-小鼠	精胺酸酶缺乏型小鼠
ArgA	精胺酸
AUC	血漿濃度-時間曲線下面積
BQL	低於量化極限
Co-ArgI-PEG	鈷取代且聚乙二醇化精胺酸酶1
EOI	輸注結束
F/U	後續
GC	胍基化合物
GLP	優良實驗室操作
GVA	α -酮- δ -胍戊酸
GAA	胍乙酸
HArg	高精胺酸
i.v.	血管內或血管內地(IV)
K ₂ EDTA血漿	用於預防凝血之二鉀乙二胺四乙酸治療管
LC-MS/MS	液相層析法-串聯式質譜法
NAArg	N-乙醯基-精胺酸
PEG	聚乙二醇
s.c.	皮下、皮下地或SC
SOI	輸注開始
wt	野生型

【0048】 研究聚乙二醇化精胺酸酶亦即產生於大腸桿菌(*E. coli*)中之重組人類精胺酸酶以查看其是否可將新生滑鼠成年滑鼠ARG1缺乏症模型中之精胺酸量降低至正常範圍。聚乙二醇化精胺酸酶為穩定性及半衰期

而進行聚乙二醇化且具有代替錳金屬輔因子之鈷金屬輔因子。鈷金屬輔因子增加催化活性且改善精胺酸酶穩定性。雖然利用聚乙二醇化精胺酸酶進行之治療確實減少血漿精胺酸及全腦精胺酸，但藥物投與未能治療小鼠中之高氨血症。理論上，肝組織中之精胺酸量降低之缺失具有可能性，因為所投與之酶聚乙二醇化精胺酸酶不進入肝中。在成年滑鼠ARG1-D模型中，聚乙二醇化精胺酸酶投與未能改善動物存活率。在作為滑鼠模型中之人類疾病之最接近模擬之新生精胺酸酶I缺乏型小鼠(Arg1^{-/-}小鼠)中測試聚乙二醇化精胺酸酶(Burrage等人, 「Human recombinant arginase enzyme reduces plasma arginine in mouse models of arginase deficiency」, *Hum. Mol. Genetics* 24(22): 6417-27 (2015))。多劑量研究引起血漿及腦部精胺酸量降低至正常範圍；然而，肝精胺酸量未受到有益影響，且與未經治療之Arg1^{-/-}小鼠相比，存活率無改善，這種情況為出乎意料的。

【0049】不同於人類臨床精胺酸酶I缺乏症演示，Arg1^{-/-}小鼠具有負責其過早死亡之嚴重高氨血症(參見例如Carvalho, D.R.,等人, 「Clinical features and neurologic progression of hyperargininemia」, *Pediatr. Neurol.*, 46(6): 369-74 (2012))。高氨血症為併發症，其在患有此病症之人類患者中不太嚴重。在升高血漿精胺酸而非高氨血症可能在患有精胺酸酶I缺乏症之人類患者中為主要治療挑戰之條件下，一些人假定Co-ArgI-PEG可具有治療性效用，但效用程度及反應無法合理地預測且即使假設回到1995年，仍未執行或發展測試或治療模型。參見例如Uchino, T.,等人, 「Molecular basis of phenotypic variation in patients with argininemia」, *Hum. Genet.* 96(3): 255-60 (1995)。

【0050】

I. 精胺酸酶

野生型精胺酸酶為含錳酶。其為尿素循環之最終酶。精胺酸酶為尿素循環中之第五且最終步驟，該尿素循環亦即在此期間身體安置有害氮之哺乳動物中之一系列生物物理學反應。特定言之，精胺酸酶將L-精胺酸轉化成L-鳥胺酸及尿素。

【0051】 L-精胺酸為用於氧化氮合成酶(NOS)之供氮受質，產生L-瓜胺酸及氧化氮(NO)。儘管已報導精胺酸酶之 K_M (2-5 mM)比用於L-精胺酸之NOS之 K_M (2-20 μ M)高得多，但精胺酸酶亦可在調節NOS活性中起作用。在某些條件下，精胺酸酶I經Cys-S-亞硝基化，產生用於L-精胺酸之更高親和力及用於NOS之降低受質可用性。

【0052】 精胺酸酶為具有 α/β -摺疊之由數個螺旋環繞之平行八股 β 層之高三聚酶。酶含有與產生氫氧化物以用於親核攻擊L-精胺酸之鈷碳一體化之二核金屬簇。用於精胺酸酶之天然金屬輔因子為 Mn^{2+} 。此等 Mn^{2+} 離子配位水，定向及穩定分子且允許水充當親核試劑且攻擊L-精胺酸，將其水解成鳥胺酸及尿素。

【0053】 哺乳動物具有兩種催化L-精胺酸水解成尿素及L-鳥胺酸之精胺酸酶同功酶(EC 3.5.3.1)。精胺酸酶I基因位於染色體6 (6q23)上，高度表現於肝細胞之細胞溶質中，且在氮移除中起尿素循環之最終步驟作用。發現精胺酸酶II基因在染色體14 (14q24.1)上。精胺酸酶II線粒體位於諸如腎、腦及骨骼肌肉之組織中，在該等組織中認為其提供用於脯胺酸之L-鳥胺酸供應及多胺生物合成(Lopez等人, *FEBS J.* 272: 4540-48, 2005)。

【0054】 已研究精胺酸酶作為用於降解細胞外L-精胺酸之方法近乎

50年(Dillon等 人, 「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))。當已在數分鐘內自循環中清除天然精胺酸酶(Savoca等人, *Cancer Biochem. Biophys.* 7: 261-268, 1984)時, 大鼠中之PEG-精胺酸酶MW 5,000之單次注射足以在約3天內達成接近完全之精胺酸耗乏(Cheng等人, *Cancer Res.* 67: 309-17, 2007)。

【0055】 已活體外測試水解呈現優良動力學及穩定性之酶ADI之細菌精胺酸。不幸地, ADI為細菌酶, 且因此其誘發大部分患者之強力免疫反應及不利影響, 且不適用於需要有規律投與之ARG1-D患者之長期投與。

【0056】 對於患有ARG1-D之患者之臨床使用, 使精胺酸酶工程化以允許其在循環中保持長時間(例如數天)為基本的。在不存在任何修飾之情況下, 在循環中人類精胺酸酶之半衰期僅為幾分鐘, 此主要因為其尺寸不足夠大而能夠避免過濾通過腎。未經修飾之人類精胺酸酶極易受血清中之失活影響, 且其在僅四小時之半衰期內降解。

【0057】

II. 精胺酸酶變異體PEG化

在本發明之某些態樣中, 揭示聚乙二醇化精胺酸酶相關方法及組合物。特定言之, 在工程化半胱胺酸殘基處之精胺酸酶PEG化(例如取代N端之第三殘基)可用於產生均質聚乙二醇化精胺酸酶組合物。亦揭示基於暫時性聚合破壞之用於分離聚乙二醇化精胺酸酶之方法。

【0058】 PEG化為PEG聚合物鏈共價連接至另一分子之過程, 該分

子通常為藥物或治療蛋白。「PEG化」可藉由使PEG之反應性衍生物與目標大分子一起培育來達成。藉由減少腎清除作用進行之延長循環時間之藥物或治療蛋白之流體動力尺寸(於溶液中之尺寸)增加。PEG化亦可向疏水性藥物及蛋白質提供水溶性。

【0059】 PEG化中之第一步可為在蛋白質之一個或兩個最終結構域處或在內部PEG聚合物合適地官能化成諸如離胺酸之胺基酸。在具有相同反應性部分之各端處活化之PEG物稱為「同型雙官能」PEG物，然而若所存在之官能團為不同的，則隨後PEG衍生物稱為「異雙官能」或「雜官能」PEG衍生物。PEG聚合物之化學上活性或活化衍生物製備成將PEG連接至所需分子。

【0060】 用於PEG衍生物之合適的官能團之選擇係基於偶合至PEG之分子上之可用反應基的類型。對於蛋白質，典型之反應性胺基酸包括離胺酸、半胱胺酸、組胺酸、精胺酸、天冬胺酸、麩胺酸、絲胺酸、蘇胺酸及酪胺酸。N端胺基及C端羧酸亦可用於將PEG連接至多肽。

【0061】 用於形成PEG衍生物之技術包括使PEG聚合物與可與羥基反應之基團反應，該PEG聚合物通常為酐、酸氯化物、氯甲酸酯及碳酸酯。PEG化化學反應亦可使用為綴合而提供之諸如醛、酯、醯胺等之官能團。異雙官能PEG極可用於連接兩個實體，其中需要親水性、可撓性及生物相容性間隔物。用於異雙官能PEG之較佳端基為順丁烯二醯亞胺、乙烯基砜、吡啶基二硫化物、胺、羧酸及H-羥基丁二醯亞胺(NHS)酯。

【0062】 最常見修飾劑或連接子係基於甲氧基PEG (mPEG)分子。其活性視添加蛋白質修飾基團至醇端中而定。聚乙二醇(PEG二醇)可用作前驅體分子；隨後在兩端修飾二醇以便製成雜或高二聚PEG連接分子(如

具有PEG雙乙炔基磺之實例中所示)。

【0063】 蛋白質一般在諸如未質子化硫醇(半胱胺醯基殘基)或胺基之親核性位點處進行聚乙二醇化。半胱胺醯基特異性修飾試劑之實例包括PEG順丁烯二醯亞胺、PEG碘乙酸酯、PEG硫醇及PEG乙炔基磺。全部四個實例在溫和條件下均具有強烈半胱胺醯基特異性且具有中性至略微鹼性pH但各自具有一些缺點。由順丁烯二醯亞胺形成之醯胺可在鹼性條件下在某種程度上為不穩定的，因此可能對具有此連接子之調配物選項存在一些限制。由碘-PEG形成之醯胺鍵為更穩定的，但自由碘可在一些條件下修飾酪胺酸殘基。PEG硫醇與蛋白質硫醇一起形成二硫鍵，但此鍵亦可在鹼性條件下為不穩定的。PEG-乙炔基磺反應性相較於順丁烯二醯亞胺及碘-PEG而言相對慢；然而，所形成之硫醚鍵非常穩定。其較慢反應速率亦可使PEG-乙炔基磺反應更易於控制。

【0064】 天然半胱胺醯基殘基處之位點特異性PEG化很少進行，此係因為此等殘基通常呈二硫鍵形式或為生物活性所需。在另一方面，定點突變誘發可用於合併半胱胺醯基PEG化位點以用於硫醇特異性連接子。半胱胺酸突變必須設計成使得其可接近PEG化試劑且在PEG化之後仍具有生物學活性。

【0065】 胺特異性修飾劑包括PEG NHS酯、PEG三氟乙磺酸酯、PEG醛、PEG異硫氰酸酯及數種其他物質。此等胺特異性劑一般在溫和條件下反應且對胺基極具特異性。

【0066】 由於大部分蛋白質上之多個離胺酸殘基，所以位點特異性PEG化可能為挑戰。幸而，因為此等試劑與未質子化胺基反應，所以藉由在較低pH下執行反應使PEG化導向低碳數pK胺基為有可能的。一般而

言， α 胺基之pK比離胺酸殘基之 ϵ -胺基低1-2個pH單位。藉由在pH 7或低於pH 7下PEG化分子，通常可獲得針對N端之高選擇性。然而，此僅在蛋白質之N端部分不為生物活性所需時為可行的。又，來自PEG化之藥物動力學益處通常勝過活體外生物活性之顯著損失，產生具有無關於PEG化化學反應之高得多的活體內生物活性的產物。

【0067】

III. 蛋白質及肽

在某些實施例中，本發明涉及包含至少一種蛋白質或肽之組合物，諸如穩定精胺酸酶多聚體。此等肽可包含於融合蛋白質中或與試劑綴合。

A. 蛋白質及肽

如本文所使用，蛋白質或肽一般係指但不限於具有大於約200種胺基酸、長達自基因中轉譯之全長序列之蛋白質；具有大於約100種胺基酸之多肽；及/或具有約3至約100種胺基酸之肽。為方便起見，術語「蛋白質」、「多肽」及「肽」在本文中可互換使用。

【0068】 如本文所使用，「胺基酸殘基」係指此項技術中已知之天然產生之胺基酸、任何胺基酸衍生物或任何胺基酸模擬物。蛋白質或肽之例示性殘基為連續的，且無任何非胺基酸間雜胺基酸殘基之序列。其他例示性序列可包含一或多種非胺基酸部分。舉例而言，蛋白質或肽之殘基之序列可間雜有一或多種非胺基酸部分。

【0069】 因此，術語「蛋白質或肽」涵蓋包含天然產生之蛋白質中所見之20種常見胺基酸中之至少一種的胺基酸序列，且可包含至少一種經修飾或不常見胺基酸，包括但不限於顯示於下文中之彼等胺基酸：

縮寫字	全名
Aad	2-胺基己二酸
Baad	3-胺基己二酸
Bala	β -丙胺酸， β -胺基-丙酸
Abu	2-胺基丁酸
4Abu	4-胺基丁酸，哌啶酸
Acp	6-胺基己酸
Ahe	2-胺基庚酸
Aib	2-胺基異丁酸
Baib	3-胺基異丁酸
Apm	2-胺基庚二酸
Dbu	2,4-二胺基丁酸
Des	鎖鏈素
Dpm	2,2'-二胺基庚二酸
Dpr	2,3-二胺基丙酸
EtGly	N-乙基甘胺酸
EtAsn	N-乙基天冬醯胺
Hyl	羥基離胺酸
AHyl	別-羥基離胺酸
3Hyp	3-羥基脯胺酸
4Hyp	4-羥基脯胺酸
Ide	異鎖鏈素
Alle	別-異白胺酸
MeGly	N-甲基甘胺酸，肌胺酸
Melle	N-甲基異白胺酸
MeLys	6-N-甲基離胺酸
MeVal	N-甲基纈胺酸
Nva	正纈胺酸
Nle	正白胺酸
Orn	鳥胺酸

【0070】

IV. 核酸及載體

編碼所關注精胺酸酶多肽之核酸序列可為穩定多聚精胺酸酶。視使用何種表現系統而定，可基於習知方法選擇核酸序列。舉例而言，人類精胺酸酶I及II含有可能干擾表現之很少用於大腸桿菌中之多個密碼子；因

此，各別基因或其變異體可為最佳化以用於大腸桿菌表現之密碼子，如例如美國專利第8,440,184號中所描述。各種載體亦可用於表現所關注蛋白質，諸如融合多聚精胺酸酶或半胱胺酸取代之精胺酸酶。例示性載體包括但不限於質體載體、病毒載體、轉位子、殘骸紅血球或基於脂質體之載體。

【0071】

V. 宿主細胞

較佳真核細胞之宿主細胞可用於轉型以允許精胺酸酶及其融合多聚體之表現及分泌。宿主細胞可為細菌、哺乳動物細胞、酵母或絲狀真菌。各種細菌包括艾氏菌屬(*Escherichia*)及芽孢桿菌屬(*Bacillus*)。屬於酵母菌(*Saccharomyces*)屬、克魯維酵母(*Kluyveromyces*)屬、漢森酵母(*Hansenula*)屬或畢赤酵母(*Pichia*)屬之酵母可用作宿主細胞。絲狀真菌之各種物種可用作包括以下屬之表現宿主：麴菌屬(*Aspergillus*)、木黴菌屬(*Trichoderma*)、紅黴菌屬(*Neurospora*)、青黴菌屬(*Penicillium*)、頭孢菌屬(*Cephalosporium*)、棉黴屬(*Achlya*)、柄孢殼菌屬(*Podospora*)、疫病黴屬(*Endothia*)、白黴菌屬(*Mucor*)、旋孢腔菌屬(*Cochliobolus*)及梨孢黴屬(*Pyricularia*)。

【0072】 可用細菌宿主生物體之實例包括例如大腸桿菌MC1061、枯草桿菌(*Bacillus subtilis*) BRB1之衍生物、金黃色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*) SAI123或青紫鏈球菌(*Streptococcus lividans*)。可用作宿主細胞之例示性酵母包括例如啤酒酵母菌(*Saccharomyces cerevisiae*) AH22及粟酒裂殖酵母(*Schizosaccharomyces pombe*)；例示性絲狀真菌，例如小巢狀麴菌(*Aspergillus nidulans*)、泡盛麴菌(*Aspergillus*

awamori)及里氏木菌(*Trichoderma reesei*)。

【0073】 公開可用之哺乳動物宿主細胞之實例包括中國倉鼠卵巢細胞(CHO-K1；美國菌種保存中心(American Type Culture Collection，ATCC)第CCL61號)、大鼠垂體細胞(GH₁；ATCC CCL82)、海拉S3細胞(ATCC CCL2.2)、大鼠肝腫瘤細胞(H-4-II-E；ATCC CRL 1548)、SV40轉型猴腎細胞(COS-1；ATCC CRL 1650)及鼠類胚細胞(NIH-3T3；ATCC CRL 1658)。多種可能性宿主生物體之說明性但非限制性之前述內容在此項技術中已知。

【0074】 表現精胺酸酶及/或其融合多聚體之哺乳動物宿主細胞可在通常用於培養親代細胞株之條件下。一般而言，細胞係在含有生理學鹽及養分之標準哺乳動物細胞培養基中培養，該培養基諸如標準洛斯維·帕克紀念研究所(Roswell Park Memorial Institute)培養基(RPMI)、最低必需培養基(MEM)、改良最低必需培養基(IMEM)或杜氏最低必需培養基(DMEM)，其通常補充有5-10%血清，諸如胎牛血清(FBS)。培養條件亦為標準培養條件，例如在37℃下在靜止或滾動培養物中培育培養物直至達成蛋白質之所需量。

【0075】

VI. 蛋白質純化

除非另外規定，否則可使用層析及電泳技術進一步純化所關注蛋白質或多肽以達成部分或完全純化(或純化成均質性)。特別適合於製備純肽之分析方法為離子交換層析法、凝膠排斥層析法、聚丙烯醯胺凝膠電泳、親和層析法、免疫親和層析法及等電聚焦。特別有效之純化肽方法為快效液相層析法(FPLC)或甚至高效液相層析法(HPLC)。

【0076】 純化蛋白質或肽意指可自其他組分分離之組合物，其中相對於其天然地可獲得之狀態而言，將蛋白質或肽純化至任何程度。因此，分離或純化蛋白質或肽亦指脫離其中其可天然產生之環境的蛋白質或肽。一般而言，「純化」係指已經受分級以移除多種其他組分之蛋白質或肽組合物，且該組合物實質上保留其所表現之生物活性。在使用術語「實質上純化」之情況下，此名稱係指其中蛋白質或肽形成組合物之主要組分之組合物，諸如蛋白質在該組合物中占約50%、約60%、約70%、約80%、約90%、約95%或更高。

【0077】 例示性蛋白質純化技術包括使用硫酸銨、PEG、抗體及其類似物，或藉由熱變性，隨後：離心；層析步驟，諸如離子交換、凝膠過濾、逆相、羧磷灰石及親和層析法；等電聚焦；凝膠電泳；及此等技術之組合以及其他技術。

【0078】

VII. 醫藥組合物

本文所描述之精胺酸酶可進行全身性或局部投與。精胺酸酶及包含其之組合物可進行靜脈內、鞘內、皮下、肌內、瘤內及/或腹膜內投與或其組合。本文所描述之該化合物及包含其之組合物可單獨或與精胺酸清除劑及/或精胺酸減少膳食組合投與。

【0079】 含有精胺酸酶或其部分之組合物可提供於調配物以及生理學上可容許之液體、凝膠或固體載劑、稀釋劑及賦形劑中。該等組合物通常製備為液體溶液或懸浮液，製備為可注射劑。合適的稀釋劑及賦形劑為例如水、鹽水、右旋糖、甘油或其類似物及其組合。另外，視需要，組合物可含有少量輔助物質，諸如潤濕劑或乳化劑、穩定劑或pH緩衝劑。在

考慮臨床應用之情況下，可能有必要製備醫藥組合物--表現載體、病毒原料、蛋白質、抗體及藥物--呈適合於預期應用之形式。一般而言，本發明之醫藥組合物包含有效量之一或多種精胺酸酶變異體或溶解或分散於醫藥學上可接受之載劑中之額外的試劑。

【0080】 片語「醫藥學上或藥理學上可接受之」係指在按需要向諸如人類之個體投與時不產生不良、過敏或其他不適當反應之分子實體及組合物。依據本發明，含有至少一種諸如穩定多聚精胺酸酶或藉由本文所揭示之方法分離之聚乙二醇化精胺酸酶之精胺酸酶變異體或額外的活性成分的醫藥組合物的製備應為熟習此項技術者所已知，如由REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES, 第18版, 1990所例示。此外，對於動物(例如人類)投與，應理解製備物應滿足如FDA生物標準辦公室(FDA Office of Biological Standards)所要求之無菌性、發熱性、一般安全性及純度標準。

【0081】 如本文所使用之「醫藥學上可接受之載劑」包括任何及全部溶劑、分散介質、包衣、界面活性劑、抗氧化劑、防腐劑(例如抗細菌劑、抗真菌劑)、等張劑、吸收延遲劑、鹽、防腐劑、藥物、藥物穩定劑、凝膠、黏合劑、賦形劑、崩解劑、潤滑劑、染料、諸如此類材料及其組合，如一般熟習此項技術者所已知(參見例如REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES, 第18版, 1990)。除非任何習知載劑與活性成分不相容，否則考慮將其用於醫藥組合物中。

【0082】 含有精胺酸酶之醫藥組合物可包含不同類型之載劑，這視其待要以固體、液體抑或氣溶膠形式投與及其是否需要具有無菌性以用於諸如注射之投與途徑而定。本發明可進行靜脈內、皮內、經皮、鞘內、動

脈內、腹膜內、肌內、皮下、瘤內、局部、注射、輸注、連續輸注、經由導管、於脂質組合物(例如脂質體)中投與或藉由其他方法投與或前述方式之任何組合，如一般熟習此項技術者所已知(參見例如REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES)。

【0083】 精胺酸酶變異體可調配成呈自由鹼、中性或鹽形式之組合物。醫藥學上可接受之鹽包括酸加成鹽，例如由蛋白質組合物之自由胺基形成之彼等酸加成鹽，或由諸如氫氯酸或磷酸之無機酸或諸如乙酸、草酸、酒石酸或杏仁酸之有機酸形成之彼等酸加成鹽。由自由羧基形成之鹽亦可衍生自無機鹼，諸如氫氧化鈉、氫氧化鉀、氫氧化銨、氫氧化鈣或氫氧化鐵；或有機鹼，諸如異丙胺、三甲胺、組胺酸或普魯卡因(procaine)。在調配時，可以與劑量調配物相容之方式且以治療有效之量投與溶液。該等調配物易於以各種劑型投與，諸如經調配以用於非經腸投與，諸如可注射溶液或氣溶膠以用於遞送至肺中，或經調配以用於消化投與，諸如藥物釋放膠囊及其類似物。

【0084】 用於投與之組合物可提供於具有或不具有惰性稀釋劑之醫藥學上可接受之載劑中。載劑應為能夠同化的且包括液體、半固體，亦即糊劑或固體載劑。除非任何習知介質、試劑、稀釋劑或載劑對受體或對其中所含之組合物之治療有效性不利，否則將其用於可投與組合物以用於實踐本發明之方法為適當的。載劑或稀釋劑之實例包括脂肪、油、水、鹽水溶液、脂質、脂質體、樹脂、黏合劑、填充劑及其類似者或其組合。該組合物亦可包含各種抗氧化劑以扼止一或多種組分氧化。另外，使用防腐劑可改善醫藥組合物之壽命，該等防腐劑諸如各種抗細菌劑及抗真菌劑，包括但不限於對羥苯甲酸酯(例如對羥苯甲酸甲酯、對羥苯甲酸丙酯)、氯丁

醇、苯酚、山梨酸、乙基汞硫代水楊酸鈉或其組合。

【0085】該組合物可與載劑以任何方便且實用之方式組合，亦即藉由溶解、懸浮、乳化、混合、囊封、吸收及其類似者。該等程序對於熟習此項技術者為常規的。

【0086】醫藥脂質媒劑可用於包括精胺酸酶變異體之組合物。脂質媒劑組合物可包含一或多種脂質及水溶劑。如本文所使用之術語「脂質」應定義為包括特徵性地不溶於水且可用有機溶劑萃取之寬範圍物質中之任一種。實例包括含有長鏈脂族烴及其衍生物之化合物。脂質可為天然產生的或合成的(亦即，由人設計或生產的)。然而，脂質通常為生物物質。生物脂質包括例如中性脂肪、磷脂、磷甘油酯、類固醇、萜烯類、溶血脂質、糖神經鞘脂質、糖脂、硫脂、具有醚及酯連接之脂肪酸的脂質及可聚合脂質以及其組合。當然，本發明之組合物及方法亦涵蓋除本文所專門描述之彼等化合物以外之由熟習此項技術者理解為脂質之化合物。

【0087】給予患者之包含本文所描述之精胺酸酶之組合物的實際劑量可藉由物理及生理因素來測定，諸如體重、病況嚴重程度、所治療之疾病類型、先前或並行之治療性干預、患者特發病及投與途徑。視劑量及投與途徑而定，較佳劑量及/或有效量之投與數量可隨個體變化。劑量應視為達成以下中之至少一或多者之正常量患者所需之量而定：精胺酸、HArg、ArgA、GVA、GAA及NAArg。一般評估ARG1-D患者此等五(5)種化合物中之一或多者之量直至在患者血漿中獲得正常範圍。亦可評估五(5)種化合物之組織量，但可能不為必需的或可不比血漿量測試執行得頻繁。

【0088】對於ARG1-D患者，初始投與之靜脈內劑量可為0.005至

1.00 mg/kg精胺酸酶/kg患者，以及在0.005至1.00 mg/kg患者體重範圍之間之任一0.005量，諸如以0.02 mg/kg或0.035 mg/kg。例示性靜脈內劑量或精胺酸酶可每天、每週、每兩月或每月一次投與。可替代地，可初始投與或僅皮下投與或以靜脈內或皮下投與之任何組合形式投與精胺酸酶組合物。皮下或肌肉內投與可以0.01至1.50 mg精胺酸酶/kg患者體重以及以在0.01及1.50 mg/kg患者體重範圍之間之0.01量諸如以0.08 mg/kg的劑量進行。皮下或肌肉內給藥可每天、每週、每兩月或每月一次進行。

【0089】醫藥組合物可包含例如至少約0.1%活性化合物。在其他實施例中，舉例而言，活性化合物可占在約2%至約75%單位重量之間或在約25%至約60%單位重量之間，及可於其中導出之任何範圍。自然地，該量之各治療上之有用之組合物中之一或多種活性化合物可以使得在任何給定單位劑量之化合物中獲得合適劑量的方式來製備。製備該等醫藥調配物之熟習此項技術者應考慮諸如溶解度、生物可用性、生物半衰期、投與途徑、產品存放期及其他藥理學考慮因素之因素，且如此，可能需要各種劑量及治療療程。聚乙二醇化精胺酸酶之例示性調配物係在7.4 pH下之包含5 mM鉀磷光體、50 mM氯化鈉及1.5%甘油(w/v)之緩衝劑中調配。

【0090】

VIII. 治療方法

除了向ARG1-D患者投與精胺酸酶蛋白之外，亦考慮其他治療方法。舉例而言，可經由諸如包含野生型精胺酸酶之基於腺病毒之基因遞送載體的基因療法載體治療患者。可將野生型蛋白質導向至特定器官，諸如肝。已生產各種病毒封裝系統以用於藉由例如如美國專利第8,398,968號中所描述之基因療法將蛋白質再引入患者中。

【0091】 治療ARG1-D患者之另一方法應為藉由使用CRISPR (成簇規律間隔短回文重複序列)系統，其中操控染色體上之缺陷基因以編輯錯誤以使得患者可產生呈正常量之野生型精胺酸酶。如所論述，存在位於可能需要待編輯之不同染色體上之兩種精胺酸酶基因。CRISPR基因組工程化描述於例如美國專利公開第20170240922號；第20170283830號；第20170224843號；及第20170191078號中。

【0092】 遞送精胺酸酶之另一方法應為將精胺酸酶蛋白囊封於可向患者投與之再密封紅血球(RBC)中。囊封精胺酸酶可一般如美國專利公開第20160095884號及第20140154797號中所描述來執行。用於製備含有精胺酸酶之紅血球之溶解/再密封方法包含將於懸浮液中之球形濃縮物置放於血容比位準等於或大於65%之等張溶液中，且在1℃至8℃下冷凍；量測滲透脆性基於來自彼相同球形濃縮物之紅血球樣品，較佳基於懸浮液樣品；在維持在約1℃至8℃下之溫度下在相同腔室內部之活性成分(亦即精胺酸酶)之溶解及內化程序包含允許血容比位準等於或大於65%之紅血球懸浮液及在1℃至8℃下冷凍之低滲透壓溶解溶液在滲析濾筒中循環；根據先前所量測之滲透脆性調節溶解參數；且在30℃至40℃之溫度下藉助於高張溶液再密封第二腔室。

【0093】

實例

在開放標記1/2期研究中，研究註冊12名診斷患有ARG1-D之成人及小兒患者(7名小兒患者及5名成人患者)。在部分1中，患者每隔2週接受單次遞增劑量之聚乙二醇化精胺酸酶。在部分2中，患者每隔一週靜脈內(IV)接受聚乙二醇化精胺酸酶(AEB1102)，持續8週。

【0094】 對安全性、藥物動力學、藥力學(血漿精胺酸及GC (例如 GVA、ArgA、NAA、GAA))及標準化臨床量度(例如6分鐘步行測試(6MWT)、伯格氏平衡量表(Berg Balance Scale, BBS)、粗大運動功能量度66項(Gross Motor Function Measure 66 item, GMFM-66)及PROMIS)作出評估。GMFM-66為評估部分A至部分E之粗大運動功能之各個態樣的工具。在給藥聚乙二醇化精胺酸酶之前及在聚乙二醇化精胺酸酶給藥之後均分析胍基化合物(GC)以評估聚乙二醇化精胺酸酶對患者之治療效果。來自患者之針對分析所選擇之GC包括 α -酮- δ -胍戊酸(GVA)、精胺酸(ArgA)、高精胺酸、N- α -乙醯精胺酸(NAAArg)及於血漿中之GAA。

【0095】 方法。發展生物分析程序以用於測定來自患者之K₂EDTA血漿之GC (GAA、GVA、ArgA及NAAArg)。將來自患者之血漿蛋白質用10%三氯乙酸溶液沈澱且在Shimadzu Nexera[®]上使用Imtakt Intrada胺基酸50×2 mm (PN:WAA22)管柱分離。藉由LC-MS/MS使用Applied Biosystems/MDS Sciex API 5500™偵測分析物。各GC之同位素標記之標準物用於致能各血漿樣品之量化。在此實例末尾處提供詳細方法方案。

【0096】

兩名成年女性患者之研究結果

藉由IV使兩名年齡24歲及25歲之成年女性患者經聚乙二醇化精胺酸酶治療每週一次，持續8週。兩名患者均具有中度至重度神經認知及神經運動缺陷，包括痙攣。兩名患者均在整個聚乙二醇化精胺酸酶投與過程中繼續其預聚乙二醇化精胺酸酶治療標準護理。0.04 mg聚乙二醇化精胺酸酶/kg之每週一次靜脈內(IV)劑量具有良好耐受性。在經聚乙二醇化精胺酸酶治療之後，除了血漿精胺酸之預期減少之外，觀測到經檢定GC (例如

ArgA、NAArg及GVA)之濃度之時間依賴性降低(圖1)。 ArgA、NAArg及GVA血漿量之降低出現在首次輸注24小時內且在各患者所接受之8週給藥內繼續維持低於基線量。

【0097】 將原先用於1期研究(聚乙二醇化精胺酸酶-101A)之單次遞增劑量部分中之精胺酸/鳥胺酸樣品分析之來自兩名患者的血漿樣品混合以輔助在GC方法發展期間設定檢定範圍。隨後此等混合樣品用於在方法發展期完成之後定量GC。兩名患者均接受呈0.015 mg/kg及0.03 mg/kg患者體重之單劑量之聚乙二醇化精胺酸酶，其中在劑量之間具有2週觀測週期。

【0098】 在前述非GLP檢定(在實例末尾處提供之詳細方法)中使用此等混合患者樣品，觀測到來自經0.03 mg聚乙二醇化精胺酸酶/kg治療之ARG1-D患者之以下之濃度的時間依賴性降低：ArgA (約3倍)、GVA (約4倍)及NAArg (約2倍)。 GC量之降低平行於使用GLP檢定測定之血漿精胺酸之減少(圖1A-D)。

【0099】 如圖3A-D中所反映，向兩名患者(亦即120-101及120-102)以0.015 mg/kg患者體重或以0.03 mg/kg患者體重投與聚乙二醇化精胺酸酶，且血漿中之精胺酸量及胍基化合物量量測如下：

表2：在0.015 mg/kg患者體重劑量下之兩名患者之GC量.

時間點 (hr)	精胺酸 (μM)*	精胺酸 (μM)**	α-K-δ-胍戊酸(μM)**	高精胺酸 (μM)**	α-N-乙醯精胺酸 (μM)**
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

時間點 (hr)	精胺酸 (μM)*	精胺酸 (μM)**	α-K-δ-肌戊酸(μM)**	高精胺酸 (μM)**	α-N-乙醯精胺酸 (μM)**
144	176				
168	170	2.48	4.29	22.5	0.85

*兩個個體之平均值；**來自兩個個體之混合樣品。若表2及3中未列舉值，則患者在彼時間點未進行測試，因為檢定為昂貴的，且一般咸信血液量不快速改變彼值。

表3：在0.03 mg/kg患者體重劑量下之兩名患者之GC量.

時間點 (hr)	精胺酸 (μM)*	精胺酸 (μM)**	α-K-δ-肌戊酸 (μM)**	高精胺酸 (μM)**	α-N-乙醯精胺酸 (μM)**
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

*兩個個體之平均值，**來自兩個個體之混合樣品。

表4：劑量及濃度測試發生如下：

個體	研究部分	週	樣品描述	實際抽樣 日期	實際抽樣 時間	稀釋因 子	精胺酸濃度 μM
篩檢							
120-101	累增	0	篩檢1	2016-08-25	10:34:00	1	484
120-101	累增	0	篩檢2	2016-08-29	08:52:00	1	408
120-101	累增	0	篩檢3	2016-08-30	08:00:00	1	496
累增劑量1-0.015 mg/kg							
120-101	累增	1	給藥前12-18 小時	2016-09-12	08:55:00	1	419
120-101	累增	1	給藥前	2016-09-13	09:20:00	1	390
120-101	累增	1	SOI + 15分 鐘	2016-09-13	10:54:00	1	260

個體	研究部分	週	樣品描述	實際抽樣日期	實際抽樣時間	稀釋因子	精胺酸濃度 μM
120-101	累增	1	SOI + 1小時	2016-09-13	11:36:00	1	295
120-101	累增	1	SOI + 2小時	2016-09-13	12:39:00	1	289
120-101	累增	1	SOI + 4小時	2016-09-13	14:36:00	1	206
120-101	累增	1	SOI + 8小時	2016-09-13	18:50:00	1	213
120-101	累增	1	SOI + 12小時	2016-09-13	22:39:00	1	238
120-101	累增	1	SOI + 24小時	2016-09-14	10:36:00	1	250
120-101	累增	1	SOI + 48小時	2016-09-15	11:18:00	1	174
120-101	累增	1	SOI + 72小時	2016-09-16	11:10:00	1	235
120-101	累增	1	SOI + 120小時	2016-09-19	11:00:00	1	284
120-101	累增	2	第2週第1天	2016-09-20	09:45:00	1	285
累增劑量2-0.03 mg/kg							
120-101	累增	3	給藥前12-18小時	2016-09-26	14:15:00	1	306
120-101	累增	3	給藥前	2016-09-27	08:56:00	1	294
120-101	累增	3	SOI + 15分鐘	2016-09-27	10:30:00	1	144
120-101	累增	3	SOI + 1小時	2016-09-27	11:11:00	1	118
120-101	累增	3	SOI + 2小時	2016-09-27	12:10:00	1	96.5
120-101	累增	3	SOI + 4小時	2016-09-27	14:10:00	1	76.4
120-101	累增	3	SOI + 8小時	2016-09-27	18:08:00	1	67.7
120-101	累增	3	SOI + 12小時	2016-09-27	22:09:00	1	52.3
120-101	累增	3	SOI + 24小時	2016-09-28	10:11:00	1	78.1
120-101	累增	3	SOI + 48小時	2016-09-29	09:40:00	1	68.3
120-101	累增	3	SOI + 72小時	2016-09-30	08:40:00	1	76.3
120-101	累增	3	SOI + 120小時	2016-10-03	09:45:00	1	165

個體	研究部分	週	樣品描述	實際抽樣日期	實際抽樣時間	稀釋因子	精胺酸濃度 μM
120-101	累增	4	第4週第1天	2016-10-04	08:40:00	1	151
累增劑量3-0.06 mg/kg							
120-101	累增	5	給藥前12-18小時	2016-10-10	15:43:00	1	235
120-101	累增	5	給藥前	2016-10-11	09:27:00	1	268
120-101	累增	5	SOI + 15分鐘	2016-10-11	10:37:00	1	49.5
120-101	累增	5	SOI + 1小時	2016-10-11	11:24:00	1	46.6
120-101	累增	5	SOI + 2小時	2016-10-11	12:24:00	1	32.8
120-101	累增	5	SOI + 4小時	2016-10-11	14:50:00	1	9.96
120-101	累增	5	SOI + 8小時	2016-10-11	18:20:00	1	18.3
120-101	累增	5	SOI + 12小時	2016-10-11	20:31:00	1	20
120-101	累增	5	SOI + 24小時	2016-10-12	10:21:00	1	23.9
120-101	累增	5	SOI + 48小時	2016-10-13	10:53:00	1	25.4
120-101	累增	5	SOI + 72小時	2016-10-14	09:31:00	1	40.7
120-101	累增	5	SOI + 120小時	2016-10-17	10:14:00	1	134
120-101	累增	6	第6週第1天	2016-10-20	10:17:00	1	201
120-101	累增	7	給藥前12-18小時	2016-10-24	10:27:00	1	230
120-101	累增	7	給藥前	2016-10-25	09:25:00	1	206
120-101	累增	10	第10週 第1天	2016-11-08	09:05:00	1	262
多劑量基線							
120-101	多劑量	0	基線1	2017-08-16	09:03:00	1	353
120-101	多劑量	0	基線2	2017-08-17	09:10:00	1	377
120-101	多劑量	0	基線3	2017-08-18	08:45:00	1	383
多劑量給藥1-0.04 mg/kg							
120-101	多劑量	1	給藥前	2017-08-22	09:10:00	1	306

個體	研究部分	週	樣品描述	實際抽樣日期	實際抽樣時間	稀釋因子	精胺酸濃度 μM
120-101	多劑量	1	輸注結束	2017-08-22	10:57:00	1	123
120-101	多劑量	1	EOI + 4小時	2017-08-22	14:39:00	1	91.6
120-101	多劑量	1	EOI + 8小時	2017-08-22	18:34:00	1	77.4
120-101	多劑量	1	EOI + 24小時	2017-08-23	10:05:00	1	7.96
120-101	多劑量	1	EOI + 48小時	2017-08-24	09:27:00	1	34.8
多劑量給藥2-0.04 mg/kg (單次給藥前量測)							
120-101	多劑量	2	第2週第1天	2017-08-27	09:50:00	1	149
多劑量給藥3-0.04 mg/kg (單次給藥前量測)							
120-101	多劑量	3	第3週第1天	2017-09-05	09:28:00	1	117
篩檢							
120-102	累增	0	篩檢1	2016-08-25	10:34:00	1	325
120-102	累增	0	篩檢2	2016-08-29	08:52:00	1	362
120-102	累增	0	篩檢3	2016-08-30	08:00:00	1	300
累增劑量1-0.015 mg/kg							
120-102	累增	1	給藥前12-18小時	2016-09-12	09:00:00	1	231
120-102	累增	1	給藥前	2016-09-13	09:50:00	1	249
120-102	累增	1	SOI + 15分鐘	2016-09-13	11:35:00	1	193
120-102	累增	1	SOI + 1小時	2016-09-13	12:20:00	1	194
120-102	累增	1	SOI + 2小時	2016-09-13	13:21:00	1	151
120-102	累增	1	SOI + 4小時	2016-09-13	15:13:00	1	131
120-102	累增	1	SOI + 8小時	2016-09-13	19:16:00	1	82.7
120-102	累增	1	SOI + 12小時	2016-09-13	23:18:00	1	101
120-102	累增	1	SOI + 24小時	2016-09-14	11:28:00	1	111
120-102	累增	1	SOI + 48小時	2016-09-15	11:29:00	1	110
120-102	累增	1	SOI + 72小時	2016-09-16	11:20:00	1	122

個體	研究部分	週	樣品描述	實際抽樣日期	實際抽樣時間	稀釋因子	精胺酸濃度 μM
			時				
120-102	累增	1	SOI + 120小時	2016-09-19	11:05:00	1	176
120-102	累增	2	第2週第1天	2016-09-20	09:58:00	1	170
累增劑量2-0.03 mg/kg							
120-102	累增	3	給藥前12-18小時	2016-09-26	14:25:00	1	227
120-102	累增	3	給藥前	2016-09-27	08:26:00	1	195
120-102	累增	3	SOI + 15分鐘	2016-09-27	09:50:00	1	79.2
120-102	累增	3	SOI + 1小時	2016-09-27	10:35:00	1	55
120-102	累增	3	SOI + 2小時	2016-09-27	11:35:00	1	69.8
120-102	累增	3	SOI + 4小時	2016-09-27	13:44:00	1	36.5
120-102	累增	3	SOI + 8小時	2016-09-27	17:28:00	1	45.9
120-102	累增	3	SOI + 12小時	2016-09-27	21:22:00	1	22.6
120-102	累增	3	SOI + 24小時	2016-09-28	09:17:00	1	44.4
120-102	累增	3	SOI + 48小時	2016-09-29	09:34:00	1	50.5
120-102	累增	3	SOI + 72小時	2016-09-30	09:30:00	1	56.9
120-102	累增	3	SOI + 120小時	2016-10-03	10:00:00	1	138
120-102	累增	4	第4週第1天	2016-10-04	08:36:00	1	110
120-102	累增	5	給藥前12-18小時	2016-10-10	15:15:00	1	177
120-102	累增	5	給藥前	2016-10-11	08:45:00	1	158
120-102	累增	10	第10週 第1天	2016-10-25	09:55:00	1	228
多劑量基線							
120-102	多劑量	0	基線1	2017-08-16	08:55:00	1	307
120-102	多劑量	0	基線2	2017-08-17	09:20:00	1	376
120-102	多劑量	0	基線3	2017-08-18	08:50:00	1	314

個體	研究部分	週	樣品描述	實際抽樣日期	實際抽樣時間	稀釋因子	精胺酸濃度 μM
多劑量給藥1-0.04 mg/kg							
120-102	多劑量	1	給藥前	2017-08-22	09:19:00	1	263
120-102	多劑量	1	輸注結束	2017-08-22	10:25:00	1	100
120-102	多劑量	1	EOI + 4小時	2017-08-22	14:07:00	1	53
120-102	多劑量	1	EOI + 8小時	2017-08-22	18:10:00	1	42.6
120-102	多劑量	1	EOI + 24小時	2017-08-23	09:45:00	1	45.4
120-102	多劑量	1	EOI + 48小時	2017-08-24	09:17:00	1	40.6
多劑量給藥2-0.04 mg/kg (單次給藥前量測)							
120-102	多劑量	2	第2週第1天	2017-08-29	09:48:00	1	141
多劑量給藥3-0.04 mg/kg (單次給藥前量測)							
120-102	多劑量	3	第3週第1天	2017-09-05	09:13:00	1	155

注意，由於患者排程，所以實際上在144小時後獲取規劃120小時之樣品。

表5：PK濃度(可供用於試驗之劑量累增部分之濃度資料)；用於兩名患者之PK資料如下：

個體	週	時間點	收集日期	收集時間	等分因子	濃度 (μg/mL)
累增劑量1-0.015 mg/kg						
120-101	第1週	給藥前	9/12/2016	8:58	1	BQL
120-101	第1週	給藥前	9/13/2016	9:20	1	BQL
120-101	第1週	15 min	9/13/2016	10:51	1	0.407
120-101	第1週	1 hr	9/13/2016	11:36	1	0.357
120-101	第1週	2 hr	9/13/2016	12:39	1	0.355
120-101	第1週	4 hr	9/13/2016	14:36	1	0.306
120-101	第1週	8 hr	9/13/2016	18:50	1	0.297
120-101	第1週	12 hr	9/13/2016	22:39	1	BQL
120-101	第1週	24 hr	9/14/2016	10:36	1	BQL
120-101	第1週	48 hr	9/15/2016	11:11	1	BQL
120-101	第1週	72 hr	9/16/2016	11:10	1	BQL
120-101	第1週	120 hr	9/19/2016	11:00	1	BQL
120-101	第2週	在訪視期間	9/20/2016	9:45	1	BQL
累增劑量2-0.03 mg/kg						

個體	週	時間點	收集日期	收集時間	等分因子	濃度 (µg/mL)
120-101	第3週	給藥前	9/26/2016	14:15	1	BQL
120-101	第3週	給藥前	9/27/2016	8:56	1	BQL
120-101	第3週	15 min	9/27/2016	10:30	1	0.993
120-101	第3週	1 hr	9/27/2016	11:10	1	0.962
120-101	第3週	2 hr	9/27/2016	12:10	1	0.847
120-101	第3週	4 hr	9/27/2016	14:10	1	0.728
120-101	第3週	8 hr	9/27/2016	18:08	1	0.740
120-101	第3週	12 hr	9/27/2016	22:09	1	0.622
120-101	第3週	48 hr	9/28/2016	9:34	1	0.253
120-101	第3週	24 hr	9/28/2016	10:11	1	0.467
120-101	第3週	72 hr	9/29/2016	9:36	1	BQL
120-101	第3週	120 hr	10/3/2016	9:45	1	BQL
120-101	第4週	在訪視期間	10/4/2016	8:40	1	BQL
累增劑量3-0.06 mg/kg						
120-101	第5週	給藥前	10/10/2016	15:43	1	BQL
120-101	第5週	給藥前	10/11/2016	9:25	1	BQL
120-101	第5週	15 min	10/11/2016	10:37	1	1.98
120-101	第5週	1 hr	10/11/2016	11:24	1	1.88
120-101	第5週	2 hr	10/11/2016	12:24	1	1.86
120-101	第5週	4 hr	10/11/2016	14:50	1	1.68
120-101	第5週	8 hr	10/11/2016	18:15	1	1.54
120-101	第5週	12 hr	10/11/2016	22:31	1	1.34
120-101	第5週	24 hr	10/12/2016	10:21	1	1.02
120-101	第5週	48 hr	10/13/2016	10:53	1	0.598
120-101	第5週	72 hr	10/14/2016	9:31	1	0.388
120-101	第5週	120 hr	10/17/2016	10:14	1	BQL
120-101	第6週	在訪視期間	10/20/2016	10:17	1	BQL
120-101	第7週	給藥前	10/24/2016	10:27	1	BQL
120-101	第7週	1 hr	10/25/2016	9:25	1	BQL
120-101	第10週	在訪視期間	11/8/2016	9:05	1	BQL
累增劑量1-0.015 mg/kg						
120-102	第1週	給藥前	9/12/2016	9:00	1	BQL
120-102	第1週	給藥前	9/13/2016	9:50	1	BQL
120-102	第1週	15 min	9/13/2016	11:35	1	0.331
120-102	第1週	1 hr	9/13/2016	12:20	1	0.366
120-102	第1週	2 hr	9/13/2016	13:20	1	0.329
120-102	第1週	4 hr	9/13/2016	15:13	1	0.301
120-102	第1週	8 hr	9/13/2016	19:16	1	0.252
120-102	第1週	12 hr	9/13/2016	23:18	1	BQL
120-102	第1週	24 hr	9/14/2016	11:28	1	BQL
120-102	第1週	48 hr	9/15/2016	11:20	1	BQL
120-102	第1週	72 hr	9/16/2016	11:20	1	BQL

個體	週	時間點	收集日期	收集時間	等分因子	濃度 (µg/mL)
120-102	第1週	120 hr	9/19/2016	11:05	1	BQL
120-102	第2週	在訪視期間	9/20/2016	9:58	1	BQL
累增劑量2-0.03 mg/kg						
120-102	第3週	給藥前	9/26/2016	14:25	1	BQL
120-102	第3週	給藥前	9/27/2016	8:34	1	BQL
120-102	第3週	15 min	9/27/2016	9:50	1	0.904
120-102	第3週	1 hr	9/27/2016	10:35	1	0.918
120-102	第3週	2 hr	9/27/2016	11:35	1	0.829
120-102	第3週	4 hr	9/27/2016	13:44	1	0.767
120-102	第3週	8 hr	9/27/2016	17:28	1	0.671
120-102	第3週	12 hr	9/27/2016	21:22	1	0.577
120-102	第3週	24 hr	9/28/2016	9:17	1	0.373
120-102	第3週	48 hr	9/28/2016	9:40	1	BQL
120-102	第3週	72 hr	9/29/2016	9:30	1	BQL
120-102	第3週	120 hr	10/3/2016	10:00	1	BQL
120-102	第4週	在訪視期間	10/4/2016	8:36	1	BQL
120-102	第5週	給藥前	10/10/2016	15:15	1	BQL
120-102	第5週	給藥前	10/11/2016	8:38	1	BQL
120-102	第10週	在訪視期間	10/25/2016	9:55	1	BQL

注意，由於患者排程，所以實際上在144小時後獲取規劃120小時之樣品。另外，PK及藥力學(PD)資料由不同供應商提供，因此兩個資料集之格式化應不同。

表6：單次IV灌注之後之用於高精胺酸血症患者之聚乙二醇化精胺酸酶的個別及平均PK參數(僅可供用於劑量累增之資料).

劑量 (mg/kg)	個體	R ²	T _{1/2} (hr)	T _{最大值} (hr)	C _{最大值} (µg/mL)	T _{最後} (hr)	AUC ₀₋₁ (hr*µg/mL)	AUC ₀₋₁₆₈ (hr*µg/mL)	AUC _{0-∞} (hr*µg/mL)	AUC 外推 (%)	CL (mL/ hr/kg)	V _{ss} (mL/ kg)
0.015	120-101	0.81 3	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
	平均值		20.1	0.63	0.387	8.0	2.47	10.5	10.5	75.3	1.51	41.7
	SD		NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR
	最小值		15.6	0.25	0.366	8.0	2.38	8.05	8.05	70.4	1.17	41.4
	中值		20.1	0.63	0.387	8.0	2.47	10.5	10.5	75.3	1.51	41.7
	最大值		24.6	1.0	0.407	8.0	2.56	12.9	12.9	80.1	1.86	42.0

劑量 (mg/kg)	個體	R ²	T _{1/2} (hr)	T _{最大値} (hr)	C _{最大値} (μg/mL)	T _{最後} (hr)	AUC ₀₋₁ (hr*μg/ mL)	AUC ₀₋₁₆₈ (hr*μg/mL)	AUC _{0-∞} (hr*μg/ mL)	AUC 外推 (%)	CL (mL/ hr/kg)	V _{ss} (mL/ kg)
	CV%		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
	平均值		23.3	0.625	0.956	36	19.0	28.9	29.2	35.7	1.06	34.3
	SD		NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR
	最小值		18.9	0.250	0.918	24	14.2	24.4	24.4	29.8	0.883	33.6
	中值		23.3	0.625	0.956	36	19.0	28.9	29.2	35.7	1.06	34.3
	最大值		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
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
	平均值		33.4	0.25	1.98	72	64.0	80.0	82.2	22.2	0.730	34.6
	SD		NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR
	最小值		33.4	0.25	1.98	72	64.0	80.0	82.2	22.2	0.730	34.6
	中值		33.4	0.25	1.98	72	64.0	80.0	82.2	22.2	0.730	34.6
	最大值		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

CV：變異係數；NR：未報導(N<3)。

【0100】 資料。在血漿精胺酸濃度與ArgA、GVA及NAArg濃度之間所觀測之關係一般與由Marescau等人(1990)在其維持蛋白質限制膳食之患者之分析中所公開的資料一致。在Marescau等人(1990)研究中，GC量伴隨精胺酸量降低而降低。

【0101】 對於本文中所呈現之資料，不僅檢定ArgA、GVA及NAArg量，而且檢定高精胺酸(HArg)量。檢查HArg量，此係因為在Marescau等人(1990)研究中ARG1-D患者之血清中之HArg顯著地升高。在經聚乙二醇化精胺酸酶治療之ARG1-D患者中似乎不調變HArg量(圖2)。此結果與由Marescau等人(1990)所報導之資料一致，因為維持蛋白質

限制膳食之患者之血清HArg量不降低。可評估患者治療之額外的條件為改善的肌肉強度、患者可走動能力(亦即，跑步、步行、騎腳踏車、無支撐爬樓梯能力)、改善的認知能力(例如WISC測試改善)或適應行為變化(例如在ABAS或VABS測試情況下)。

【0102】 GC資料亦由獲自經0.015 mg/kg患者體重之較低劑量之聚乙二醇化精胺酸酶治療之兩(2)名成人患者的混合血漿樣品產生。在較低聚乙二醇化精胺酸酶給藥下觀測血漿精胺酸濃度之降低；然而，此降低不如在0.03 mg/kg劑量下所觀測之血漿精胺酸減少一樣明顯。

【0103】 在針對上文所提供之此等兩名患者之發現條件下，得出結論：以0.04 mg/kg之劑量每週一次靜脈內投與至患者之聚乙二醇化精胺酸酶在成人ARG1-D患者中具有良好耐受性。患者具有平行於精胺酸量降低之顯著的GC減少。對精胺酸及GC量之作用似乎基於此等兩名成人患者，其比歷史上用嚴格的膳食精胺酸限制達成之作用更具有科學實質性。成功地以0.2 mg/kg給藥一名該研究中之ARG1-D患者。實體腫瘤最大耐受劑量(MTD)建立在0.33 mg/kg下且劑量高達0.48 mg/kg。

【0104】 當然，具有高精胺酸量(例如600-800 μ M精胺酸)之患者可經比0.50 mg/kg更高之劑量之聚乙二醇化精胺酸酶治療。具有高精胺酸量之患者可能需要投與在0.005至1.00 mg/kg個體體重範圍內之精胺酸酶。亦考慮0.005 mg/kg至0.50 mg/kg及/或0.005至0.20 mg/kg個體體重之給藥範圍。

【0105】 藥物之生物可用性可藉由量測在指定時間週期內來自IV及/或皮下注射之血液中之藥物的量來測定。出於計算之目的，假設100%靜脈內投與之藥物進入血流中，但並非所有皮下投與之藥物均自皮下空間進

入血液中。生物可用性可藉由將總皮下除以總IV來測定。基於食蟹獼猴中之靜脈內投與與皮下投與之比較，皮下投與之聚乙二醇化精胺酸酶之生物可用性測定為IV投與之約60%。因此，具有高量精胺酸之患者可成功地經多達1.5 mg精胺酸酶/kg治療。基於生物可用性資料，針對聚乙二醇化精胺酸酶之皮下投與之給藥範圍可為例如0.01至約1.5 mg/kg個體體重；使用0.015 mg/kg至0.75 mg/kg；及/或0.015 mg/kg至約0.30 mg/kg個體體重。

【0106】 圖4A及4B顯示針對經聚乙二醇化精胺酸酶治療之前(例如在篩檢時)及之後兩名患者亦即患者120-101 (圖4A)及患者120-102 (圖4B)中之GAA之資料。在兩種情況下，顯示在篩檢時及在部分1及2之給藥期間針對GAA量之資料。在兩名患者中，在投與0.015 mg/kg個體體重之後減少GAA，且在更高劑量下觀測到更大作用。值得注意地，在與聚乙二醇化精胺酸酶一起投與之後不久觀測到GAA之快速減少。此外，初始治療使兩名患者在投與之後24小時時間段內在GAA血漿量之正常範圍內。舉例而言，在圖4B中，在第14天，患者之GAA量為4,350 nM，其在投與精胺酸酶之後24小時內降低低至1,350 nM。因此，利用精胺酸酶進行之治療可快速清除諸如GAA或GVA之毒性代謝物且適用作急性治療。聚乙二醇化精胺酸酶以比單獨的精胺酸減少膳食快得多之速率清除所指示之毒性代謝物。

【0107】

患者特徵及安全性

執行針對1/2期研究中之患者之基線評估。提供於下表中之基線評估顯示針對該研究中之患者之大量疾病負荷。患者經受蛋白質限制膳食。

【0108】 對於伯格氏平衡，缺陷平衡定義為中等或高下降風險(亦即，分數≤40)。對於6MWT，在Geiger等人，「Six-minute walk test in children and adolescents」, *J. Pediatr.*, 2007年4月; 150(4):395-399，及Enright等人，「Reference equations for the six-minute walk in healthy adults」, *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 1998年11月; 158(5 Pt 1):1384-1387中，缺陷定義為低於針對正常個體之年齡調節範圍。對於GMFM部分E，在Oeffinger等人，「Outcome tools used for ambulatory children with cerebral palsy: responsiveness and minimum clinically important differences」, *Dev. Med. Child Neurol.*, 2008 50(12): 918-925中，基於最小臨床重要差異(MCID)，缺陷定義為<68。若多個基線實驗室評估為可用的，則報導臨給藥之前之評估。對於PROMIS，缺陷基線定義為T-分數<40。

表7：針對1/2期研究中之患者所執行之基線評估.

特徵/評估(N = 12)	中值(範圍)或n (%)	缺陷基線(%)
疾病特徵及病史		
年齡(歲)	16.5 (5-31)	
女性	8 (67%)	
痙攣史(≥中度)	7 (58%)	
癲癇史	7 (58%)	
高氨血症史	6 (50%)	
發育遲緩	8 (67%)	
除氨劑	11 (92%)	
基線疾病表現		
精胺酸(μmol/L)	397 (203至531)	100%
基線 丙胺酸轉胺酶(ALT) (U/L)	37.5 (21至171)	58%
基線氨(μmol/L)	37 (9至77)	50%
高度百分位數(基於疾病控制與預防中心(Centers for Disease Control and Prevention)生長表)	4.4% (<0.1%至22.9%)	92%

特徵/評估(N = 12)	中值(範圍)或n (%)	缺陷基線(%)
6MWT (m)	266.5 (102至602)	92%
伯格氏平衡(分數0-56)	47 (11至56)	42%
GMFM部分E (分數0-72)	48.5 (12至72)	67%
PROMIS身體功能結構域	38 (28.3至57.1)	58%

【0109】 大部分治療相關不良事件(「AE」)如下表中所示為輕度的。≥2名患者中出現之治療相關AE為過敏症(n=3，全部為中度)、搔癢症(n=3，全部為輕度)及皮膚乾燥(n=2，均為輕度)。總之，在該研究中之全部患者中投與超過130次輸注。在三名患者中觀測到四個中度過敏症反應(2個視為嚴重不良事件(SAE))。用輸注速率調節及抗組織胺且在一些情況下皮質類固醇投與來管理此等AE。存在一項評估為與利用聚乙二醇化精胺酸酶進行之治療無關之高氨血症SAE。

表8：不良事件.

伴以下之患者	部分1 (n=12)	部分2 (n=4)
任何相關AE	6 (50%)	3 (75%)
任何SAE	3 (25%)	0
任何相關SAE	2 (17%)	0

【0110】 研究聚乙二醇化精胺酸酶 ADA效果。驗證採用Meso Scale Discovery電化學發光方法之橋接檢定以偵測針對大鼠、猴及人類血清中之AEB1102 (Co-Arg1-PEG)之抗體。該方法使用生物素標記之AEB1102 (B-AEB1102或B-Co-ArgI-PEG)以捕獲ADA及鈎標記之AEB1102 (Ru-AEB1102或Ru-Co-ArgI-PEG)以偵測抗體。

【0111】 在驗證期間，在分析緩衝劑中製備B-Co-ArgI-PEG與Ru-Co-ArgI-PEG之主混合物(MM)至1.0 µg/mL B-AEB1102及1.0 µg/mL Ru-AEB1102之最終濃度。將稀釋樣品及對照添加至經抗生蛋白鏈菌素塗佈之盤之孔中的主混合物中。在培育及洗滌之後，將150 µL 2×讀取緩衝劑

T (來自Meso Scale Discovery)添加至各孔中。在Sector Imager 6000上讀取樣品。此方法用於篩檢、滴定及確認，注意將確認檢定與150 µg/mL AEB1102 (藥物)一起預培育。各輪中均包括高、中、低濃度之陽性對照及陰性對照。以統計方式分配分割點、篩檢及確認以分別提供約5%及1%假陽性率。陽性對照為抗Co-ArgI-PEG親和力純化多株抗體且陰性對照(NC)為等分混合正常大鼠、食蟹獼猴或人類血清。陽性對照及非特異性結合(NSB)對照用於監測檢定效能。

【0112】 驗證直接結合檢定以偵測針對PEG之抗體，以允許偵測可預先存在之抗PEG抗體或在與AEB1102一起投與之後出現之治療。

【0113】 使Starwell C8 Maxisorp (96孔格式盤)之孔塗佈有100 µL於碳酸酯包衣緩衝劑(BioWorld)中之2 µg/mL單聚乙二醇化牛血清白蛋白(BSA) (BSA-mPEG) 5 kDa (Life Diagnostics)，或500 ng/mL人類IgG (Jackson ImmunoResearch Laboratories)，或500 ng/mL人類IgM (Jackson ImmunoResearch Laboratories)。將對照及於稀釋劑緩衝劑中稀釋至50倍最低所需稀釋(MRD)之樣品一式兩份添加至該盤中(100 µL/孔)。稀釋劑緩衝劑包含於1×磷酸鹽緩衝鹽水(PBS)中之4%牛γ球蛋白。將100 µL偵測抗體添加至適當孔中。使用1:5,000稀釋之山羊抗滑鼠IgG-Fc-HRP (Jackson ImmunoResearch Laboratories)偵測滑鼠抗PEG抗體 (Jackson ImmunoResearch Laboratories)，且使用於稀釋劑緩衝劑中1:30,000稀釋之兔子抗人類IgG/A/M (Jackson ImmunoResearch Laboratories)偵測抗人類抗體，且將該等人類抗體添加至適當孔中。隨後，添加100 µL/孔3,3',5,5'-四甲基聯苯胺(TMB)受質，在約10至20分鐘之後藉由每孔添加100 µL停止溶液停止反應。在Synergy 2盤讀取器上以

450 (偵測)及620 (背景)讀取一或多個盤。以統計方式分配分割點、篩檢及確認以分別提供約5%及1%假陽性率。此方法用於篩檢、滴定及確認。使待滴定之樣品在陰性混合人類血清中進行最低七次2倍連續稀釋。

【0114】 在患者研究之部分1部分中偵測瞬時、低滴定度抗PEG ADA (抗藥物抗體) (參見下表)。在重複給藥開始時在6/7名患者中未偵測到可偵測ADA。如下表9中所述，針對聚乙二醇化精胺酸酶之耐受性出乎意料地快。

表9：針對聚乙二醇化精胺酸酶及PEG之ADA評估。

ADA類型	治療前之部分1 (n = 10)	治療出現之部分1 (n = 10)	部分2開始時之 ADA (n= 7*)	滴定度 範圍
抗PEG	10%	40%	14%	50-400
抗聚乙二醇化精胺 酸酶	10%	30%	0	10-160

*一名在治療前具有抗PEG ADA之患者在部分1期間具有降低滴定度且在最終部分1劑量下不具有可偵測ADA。然而，出於與該研究不相關之原因，此患者在該研究之部分2中不繼續；此患者不包括於n=7中。

【0115】 圖5A及圖5B顯示精胺酸及GC之效果。在ARG1-D患者中GAA升高。藉由用聚乙二醇化精胺酸酶進行治療降低此等患者之GAA量。圖5B中所示之重複劑量圖包括接受部分2中之全部8個劑量之患者。用於GC之正常值上限(ULN)基於健康成人之GC研究。聚乙二醇化精胺酸酶高度有效地以單劑量及以重複給藥將精胺酸量降低至正常範圍內(圖5B)。亦藉由用聚乙二醇化精胺酸酶進行治療來降低在ARG1-D患者中升高之GAA。在利用聚乙二醇化精胺酸酶進行之IV QW (每週一次)治療之後，觀測到GVA、ArgA、GAA及NAA之濃度之時間依賴性降低。GVA、ArgA、GAA及NAA量之降低發生在首次輸注24小時內，且在整個

8週給藥中維持自基線量之降低。在劑量1及劑量8周圍之多個時間點時測定血清聚乙二醇化精胺酸酶量。

【0116】圖6規定針對三名患者之6分鐘步行測試之結果(資料不可供用於在劑量20及32下之患者5 (「c」))。神經運動結果提供於下表中。自重複劑量(第二劑量)開始時量測劑量8、20及32。PROMIS確切地為PROMIS身體功能結構域。下表中之針對6MWT (6分鐘步行測試)、BBS (伯格氏平衡量表)、GMFM部分E及PROMIS之資料呈現為基線原始值及其他時間點之相對於基線之變化。對於6MWT, MCID由Schrover等人, 「Minimal clinically important difference for the 6-min walk test: literature review and application to Morquio A syndrome」, *Orphanet. J. Rare Dis.*, 2017年4月26日; 12(1): 78之分析定義; 對於BBS, MCID由Downs等人, 「The Berg Balance Scale」, *J. Physiother.*, 2015年1月; 61(1): 46之分析定義; 對於GMFM, MCID由Oeffinger等人, 2008年之分析定義; 且對於PROMIS, MCID基於具有0.5標準差或5分T-分數之身體功能。下表及圖6展現在與聚乙二醇化精胺酸酶一起投與之後患者之改善的神經運動功能。神經運動功能可指肌肉或神經功能, 且可使用例如PROMIS、6MWT、BBS及GMFM於患者中臨床上評估。神經運動功能之實例包括但不限於爬升階梯、步行、痙攣及機警。舉例而言, 患病患者可能用尖端腳趾步行而不能正常步行(腳跟至腳趾)。改善的神經運動功能可指此類患者更好步行或正常步行而非用尖端腳趾步行之能力。改善的神經運動功能可指增強之活動性, 諸如不再需要使用或需要較少使用步行輔助件(例如「助行器」或扶杖)。改善的神經運動功能可指改善的姿勢及/或改善的交流/社會化。

表10：神經運動功能評估.

患 者 年 齡(歲)	醫師/評估員觀測 結果	時間點	6MWT (m)	BBS MCID +7	GMFM部分 E MCID變化	PROMIS T-分數 MCID +5
#1 25	• 改善的步進品 質及步行時自 信 • 較少靜息痙攣	基線	102	17/56	29/72	35.6
		劑量8	122	30	32	33.3
		劑量20	134	35	35	
		劑量32	139	28	36	
					MCID : +1.8	
#2 24	• 迄今為止未記 載有意義之觀 測結果。	基線	261	54/56	63/72	40.4
		劑量8	298	54	66	48
		劑量20	322	53	64	
		劑量32	302	53	64	
					MCID : +4.0	
#5 19	• 改善姿勢及增 加步行時自信 • 患者記錄為更 有生氣且更加 機警	基線	174	31/56	27/72	36.7
		劑量8	168	30	29	41.8
					MCID : +2.8	

【0117】 GAA已與GAMT (胍乙酸酯甲基轉移酶)缺乏症患者之癲癇有關(Stockler-Ipsiroglu等 人, 「Guanidinoacetate methyltransferase (GAMT) deficiency: outcomes in 48 individuals and recommendations for diagnosis, treatment and monitoring」, *Mol. Genet. Metab.*, 2014; 111(1): 16-25)。結果證實，利用聚乙二醇化精胺酸酶進行之治療降低患者之GAA量以及減少血漿精胺酸及相關GC。一或多種胍基化合物諸如GAA之量(參見例如圖5B)在精胺酸酶投與後24至48小時內降低或清除。

因此，精胺酸酶適用作急性治療以減少或清除患者之毒性代謝物。在8週之後重複劑量投與聚乙二醇化精胺酸酶之情況下觀測到臨床改良。聚乙二醇化精胺酸酶一般為患者所良好耐受。大部分相關AE為輕度且可經標準量測管理的。

【0118】 利用聚乙二醇化精胺酸酶進行之治療出乎意料地且快速地減少ARG1-D患者之高精胺酸血症之症狀。此等改善以生物化學量表現。基於精胺酸酶之初始及/或重複投與，精胺酸及胍基化合物中之一或多者之血漿量可降低至正常量。另外，精胺酸酶投與改善患有ARG1-D之患者之適應行為及/或神經運動功能。該研究中之全部患者均在研究期間已接受及正在接受標準或習知之高精胺酸血症治療。該等標準或習知之治療涉及對可能增加精胺酸量之蛋白質極限攝入之膳食限制及除氮藥之使用。不管此等標準治療如何，全部患者仍均具有高精胺酸量。利用精胺酸酶進行之治療快速且持續地降低精胺酸及其他胍基化合物中之一或多者之血漿量。利用精胺酸酶(例如聚乙二醇化精胺酸酶)進行之治療之效果出乎意料地快，其出現在投與後24-48小時內。相比之下，針對高精胺酸血症之標準或習知之治療可能在兩年內不顯示任何改善(Marescau等人, 1990；Marescau等人, 「The pathobiochemistry of uremia and hyperargininemia further demonstrates a metabolic relationship between urea and guanidinosuccinic acid」, 1992 41(9): 1021-1024)。此外，經聚乙二醇化精胺酸酶治療之患者可由於精胺酸減少而具有更自由之膳食，且可由此具有更多蛋白質。

【0119】

在精胺酸耗乏試劑情況下血漿精胺酸減少之後顯示ARG1-D相關疾病表現

之改善之2期臨床資料

自具有部分1及2之以上繼續開放標記1/2期研究，實行開放標記延伸。如圖7中所說明，1/2期具有16名部分1中之患者，該等患者每隔一週靜脈內接受如上文所描述之單次遞增劑量之聚乙二醇化精胺酸酶，持續4至10週。在部分2中，如前所描述，靜脈內投與重複劑量(每週一次8劑量)之聚乙二醇化精胺酸酶，持續10週。存在九名起始部分2之患者及6名完成重複劑量之患者。在開放標記延伸中，三名患者起始聚乙二醇化精胺酸酶之靜脈內投與。

【0120】 下表顯示患者特徵且指示該研究及開放標記延伸中之患者之疾病負荷。中值血漿精胺酸係基於計算在各患者第一次給藥之前之全部血漿精胺酸值之平均值且測定此等值之中值。該表顯示全部16名患者均具有經升高基線血漿精胺酸。十名患者中之七名具有活動性及適應行為缺陷。中值血漿精胺酸係基於在各患者第一次給藥之前之全部血漿精胺酸值之平均值。對於其他生物化學參數，使用臨給藥之前之評估。對於實驗室評估，異常定義為超出參考範圍。對於高度百分位數，缺陷定義為 $\leq 10\%$ 如CDC所提供之正常。對於6MWT，如前所描述，應用伯格氏平衡、GMFM部分E及PROMIS。對於第三版適應行為評估系統(ABAS)，缺陷定義為實際、社會、概念或複合之標準分數 < 85 。MCID (參見圖9)對於6MWT定義為9%相對於基線之變化；對於GMFM部分E，視個體患者粗大運動功能分類系統層級而定，定義為1.8至4.0分之變化；對於BBS，定義為7分變化；對於ABAS，定義為7.5分一般適應複合(GAC)標準分數中之變化；且對於PROMIS，定義為5分變化。

表11：針對1/2期研究中之患者所執行之基線評估。

特徵/評估(N = 16)	中值(範圍)或n (%)	缺陷基線(%)
疾病特徵及病史		
中值年齡(範圍)	15歲(5-31)	
女性	11 (69%)	
痙攣史(≥中度)	9 (56%)	
癲癇史	7 (44%)	
高氨血症史	7 (44%)	
發育遲緩	9 (56%)	
除氨劑	15 (94%)	
基線評估		
實驗室		
精胺酸(μmol/L，在首次劑量評估之前)	389 (238至566)	100%
丙胺酸轉胺酶(ALT) (U/L)	34 (15至171)	44%
氨(μmol/L)	38 (9至77)	44%
活動性		
6MWT (m)，N = 15	349 (102至602)	87%
PROMIS身體功能/活動性，N=14	38 (28.3至57.1)	57%
GMFM部分E (分數0-72)	65.5 (5至72)	50%
伯格氏平衡(分數0-56)	52.5 (7至56)	38%
適應行為		
ABAS，N = 10	79.5 (49至90)	80%
生長		
高度(CDC百分位數)	4.8% (<0.1%至56%)	88%

【0121】 圖8顯示針對部分2及開放標記延伸患者之在重複給藥情況下之血漿精胺酸之時間依賴性改善。 BL為基線；F/U為後續；且n為各時間點之患者數量。指示各時間點之全部患者之中值精胺酸量。根據 Häberle等人, 「Suggested guidelines for the diagnosis and management of urea cycle disorders」, *Orphanet. J. Rare Dis.*, 2012 7: 32中所描述之治療規範，期望維持血漿精胺酸量在≤200 μmol/L下。圖8顯示100% (6/6) 完成部分2之患者已達成低於建議規範之一致量之經減少精胺酸。精胺酸減少之血漿量之降低伴有GC (GVA、ArgA、NAA、GAA)血漿量之顯著且持續之降低。

【0122】 如圖9中所說明，利用聚乙二醇化精胺酸酶進行之治療亦

在8個重複劑量之後改善相對於基線之臨床結果。圖9中之各分數表示針對一名患者之一項評估。有利評估由實心圓「●」指示，而中性評估由空心圓「○」指示。67% (4/6)患者展示在僅8週重複給藥有聚乙二醇化精胺酸酶之後針對活動性及/或適應行為測試中之超過MCID之改善。先前針對6MWT、伯格氏平衡量表、GMFM部分E、PROMIS及ABAS描述針對此等測試之標準。33%評估有利地超出MCID，同時無評估不利地超出MCID。1/3 ABAS評估有利地超出MCID，且2/3傾向於8週改善。

表12：由評估員概括來自該研究中之患者中的一些之觀測結果。

患者	來自位點/評估員之觀測結果	時間點
1	• 改善的步進品質及步行時自信 • 低於基線之靜息痙攣 • 能夠無支撐站立1分鐘 • 有支撐步行數個階梯 • 改善的髋坐能力及自地板向上拾取物件之能力	部分2，劑量8
2	• 表現為更加舒適 • 更鬆弛之行為及講話意願 • 1條腿站立通常極困難，能夠首次嘗試實現	部分2 F/U
5	• 改善的姿勢及增加的步行時自信 • 記錄為更有生氣及機警 • 詢問更複雜之問題	部分1，劑量3
6	• 能夠更好地談話 • 交流改善 • 可適當地不以尖端腳趾步行	部分1，劑量1 (前兩項觀測結果)； 部分1，劑量4 (第三項觀測結果)
7	• 增加的食慾及活動 • 每週3-4次步行約1/2哩，帶狗步行 • 小腿中記錄肌肉發育 • 更加善談，去商店 • 步行能力改善 • 似乎更加歡樂	部分1，F/U
9	• 腿部痛性痙攣得到解決 • 步行更快且不太吃力	部分1，劑量3

【0123】 若存在，聚乙二醇化精胺酸酶投與一般導致輕度AE。跨全部患者投與180次聚乙二醇化精胺酸酶輸注。在部分1中之6/16名患者中偵測到低滴定度、治療出現之ADA。部分2中之全部患者均藉由第五劑量而

具有不可偵測之ADA量。至少中等嚴重程度之 ≥ 2 名患者之治療相關AE包括過敏症(3名患者中4項事件；3項由研究人員視為嚴重不良事件(SAE))，其係經輸注速率調節及諸如抗組織胺投與及在一些情況下皮質類固醇投與之藥物治療管理。

【0124】圖10顯示對參與部分2之患者進行臨床反應之平均精胺酸值之分析。相比其改善為神經運動或適應行為評估($n = 2$)中之 <1 MCID改善之患者之患者平均精胺酸量，發現具有神經運動或適應行為評估($n = 4$)中之 >1 MCID改善之臨床反應之患者的患者平均精胺酸量較低。

【0125】總之，儘管標準化疾病管理方法利用重度膳食蛋白質限制及除氨劑僅解決疾病症狀之用途，此疾病之進展性性質強調對藥理學療法之大量未滿足醫學需求，該療法降低超過彼等可用現行標準疾病管理實現之精胺酸量之精胺酸量且因此提供減緩或停止於ARG1-D患者中所觀測之神經運動、神經認知及/或適應行為退化進展的潛能。聚乙二醇化精胺酸酶亦即工程化人類精胺酸酶1已直接證明，患有ARG1-D之患者之血漿精胺酸及相關GC量顯著且持續降低，伴以一些患者之神經運動功能及/或適應行為改善。

【0126】於先前所描述之研究之1/2期組中觀測之ARG1-D患者的來自聚乙二醇化精胺酸酶投與的改善保持在開放標記延伸中。聚乙二醇化精胺酸酶高度有效地持續降低經升高血漿精胺酸，咸信該經升高血漿精胺酸為ARG1-D症狀之病理學基礎。在僅8週重複給藥之後，血漿精胺酸減少伴有活動性及適應行為改善。聚乙二醇化精胺酸酶為患者良好耐受。大部分治療相關AE為輕度的；過敏症反應可經標準量測管理且全部患者均繼續研究治療。患有ARG1-D之患者之全面基線剖析證實94% (15/16)患者

之活動性及/或適應行為中之可量化缺陷。

用於藉由LC-MS/MS分析於K₂EDTA人類血漿中之α-K-δ-GVA、(R,S)-ArgA、高精胺酸HCl及Nα乙醯基-L-精胺酸之方法

分析物/代謝物名稱：	α-K-δ-GVA (GVA) (R,S)-ArgA (ArgA) 高精胺酸HCl (HArg) Nα乙醯基-L-精胺酸(NAArg) 胍乙酸(GAA)
內標物名稱：	a-K-d-GVA- ¹³ C ₆ HCl (GVA- ¹³ C ₆) ¹³ C ₆ -(R,S)-ArgA (ArgA- ¹³ C ₆) L-高精胺酸-d4二鹽酸鹽(HArg-d4) Nα乙醯基-L-精胺酸- ¹³ C ₆ (NAArg- ¹³ C ₆) 胍乙酸-[¹³ C ₂] (GAA-[¹³ C ₂])
物種/基質：	經處理人類血漿
抗凝血劑：	K ₂ EDTA
樣品體積：	0.050 mL
曲線範圍：	25.0至5000 nM (GVA, ArgA) 200至40,000 nM (HArg) 50.0至10,000 (NAArg) 3,000至100,000 (GAA)
回歸類型：	GVA：線性，1/x ² ArgA：線性，1/x ² NAArg：二次，1/x ² GAA：二次，1/x ²
反應:峰面積比：	GVA/GVA- ¹³ C ₆ ArgA/ ArgA- ¹³ C ₆ HArg/ HArg-d4 NAArg/ NAArg- ¹³ C ₆ GAA/ GAA-[¹³ C ₂])
萃取類型：	蛋白質沈澱
檢測/偵測：	UHPLC-MS/MS (API 5500，ESI+)
運作時間：	5.50分鐘
樣品製備溫度：	濕冰
樣品儲存溫度：	-70°C
特殊儲存/治療要求：	QC樣品係在酸化及非酸化經聚乙二醇化精胺酸酶 (AEB1102)處理之血漿、去甲基-NOHA (N-羥基-去甲基-L-精胺酸)抑制劑及甘露醇中製備。

所用參考材料及基質如下：	
GVA (EAG Laboratories)	
ArgA (EAG Laboratories)	
HArg (Tokyo Chemical Industry CO, 伴號H1172, 化學文摘社(Cheical Abstracts Service , CAS) 編號483-01-8)	
NAArg (Sigma-Aldrich, 伴號A3133, CAS編號155-84-0)	
GAA (Sigma-Aldrich, 伴號G11608)	
GVA- ¹³ C ₆ (EAG Laboratories)	
ArgA- ¹³ C ₆ (EAG Laboratories)	
HArg-d ₄ (Santa Cruz Biotechnology, 伴號sc-280882, CAS編號1332075-41-8)	
NAArg- ¹³ C ₆ (Aeglea BioTherapeutics)	
GAA- ¹³ C ₂ (Santa Cruz Biotechnology, 伴號sc-211572 S)	
AEB1102 Co-ArgI-PEG藥物物質(5.1 mg/mL) (聚乙二醇化精胺酸酶)(Aeglea BioTherapeutics)	
K ₂ EDTA人類血漿(Bioreclamation)	
K ₂ EDTA人類全血(Bioreclamation)	

所用商業試劑如下：

ACN	-	乙腈, Omnisolv, EMD
C ₃ H ₆ O	-	丙酮, Sigma-Aldrich
FA	-	甲酸, Omnisolv, EMD
GLA	-	冰醋酸, Acros Organics
1 N HCl	-	1N鹽酸, Fisher Scientific
IPA	-	異丙醇, Omnisolv, EMD
C ₆ H ₁₄ O ₆	-	甘露醇, Sigma-Aldrich
MeOH	-	甲醇, Omnisolv, EMD
MQ	-	Milli-Q純化水或去離子水
NH ₄ HCO ₂	-	甲酸銨, Sigma-Aldrich
去甲基-NOHA	-	去甲基-NOHA, Cayman Chemical
PBS	-	磷酸鹽緩衝鹽水(1×溶液), Fisher Scientific
PFHx	-	全氟己酸
TCA	-	三氯乙酸

【0127】 經處理人類血漿[THP]。將0.059 mL AEB1102添加至20.0 mL K2EDTA人類血漿中。儲存在約-70℃下於聚丙烯小瓶(PPV)中。期滿為所用血漿之彼期滿。

【0128】 經處理人類血脂血漿[TLP]。將0.059 mL聚乙二醇化精胺酸酶添加至20.0 mL K2EDTA血脂人類血漿中。儲存在約-70℃下於PPV中。期滿為所用血漿之彼期滿。

【0129】 經處理人類全血[THB]。將0.059 mL聚乙二醇化精胺酸酶

添加至20.0 mL K₂EDTA人類全血中。儲存在約4℃下於PPV中。期滿為所用全血之彼期滿。

【0130】

1 mg/mL去甲基-NOHA [NOHA]

將5 mg去甲基-NOHA小瓶之整個內容物與5.00 mL MQ溶解在一起。儲存在約-70℃下於PPV中高達1個月。

【0131】

10%甘露醇溶液(w/v) [MT1]

稱重約1.00 g甘露醇且將其與10 mL MQ溶解在一起。攪拌以溶解。儲存在室溫下長達1個月。

【0132】

非酸化基質[NM1]

將20 mL K₂EDTA人類血漿以3500 rcf離心5分鐘。使用吸液管將0.059 mL AEB1102添加至血漿中。將血漿在37℃下培育約3小時。將0.180 mL去甲基-NOHA添加至血漿小瓶中。將0.200 mL MT1添加至經處理血漿中以便達至0.1% (v/v)甘露醇(可在臨用血漿前執行此步驟)。充分混合。儲存在約-70℃下於PPV中直至血漿組分之期滿日期。

【0133】

酸化基質[AM1]

將20 mL K₂EDTA人類血漿以3500 rcf (相對離心力)離心5分鐘。使用吸液管將0.059 mL AEB1102添加至血漿中。將血漿在37℃下培育約3小時。將0.400 mL GLA添加至血漿小瓶中。將0.180 mL去甲基-NOHA添加至血漿小瓶中。將0.200 mL MT1添加至經處理血漿中以便達至0.1%

(v/v)甘露醇(可在臨用血漿前執行此步驟)。充分混合。儲存在約-70℃下於PPV中直至血漿組分之期滿日期。

【0134】 10% (w/v) TCA [BAC-359]。稱出約50 g TCA，放入溶劑瓶中。使用量筒添加500 mL MQ。攪拌以溶解。可將溶液儲存在室溫下長達1個月。此溶液用作蛋白質沈澱溶液。在用於樣品萃取之前在冰上冷卻此溶液。

【0135】 於MQ中之0.1% FA及0.05% PFHx [BAC-360]。使用量筒量測1000 mL MQ且將其添加至溶劑儲存瓶中。使用吸液管添加1 mL FA及0.5 mL PFHx。徹底混合。可將溶液儲存在室溫下長達1個月。此溶液用作移動相A (MPA)。此溶液必須於1-L Teflon容器中製成。

【0136】 於ACN中之0.1% FA及0.05% PFHx [BAC-361]。使用量筒量測1000 mL ACN且將其添加至溶劑儲存瓶中。使用吸液管添加1 mL FA及0.5 mL PFHx。徹底混合。可將此溶液儲存在室溫下長達1個月。此溶液用作移動相B (MPB)。此溶液必須於1-L Teflon容器中製成。

【0137】

80:20:0.3 (v/v/v) MeOH:MQ:FA [BAC-409]

在溶劑儲存瓶中使用量筒組合800 mL MeOH (甲醇)及200 mL MQ。使用吸液管添加3.00 mL FA。徹底混合。儲存在室溫下長達1個月。此溶液可用作移動相A (MPA)。

【0138】

於MQ中之100 mM甲酸銨[BAC-409]

使用量筒量測1000 mL MQ。在配衡稱重皿中稱重約6.306 g甲酸銨。將甲酸銨轉移至用MQ沖洗之溶劑儲存瓶中。將剩餘MQ轉移至瓶

中。攪拌以溶解。儲存在室溫下長達一個月。此溶液可用於製備移動相B (MPB)。

【0139】

70:30 (v/v) 100 mM 甲酸銨:MeOH [BAC-410]

在溶劑儲存瓶中使用量筒組合700 mL BAC-408及300 mL MeOH。徹底混合。儲存在室溫下直至BAC-408之期滿日期。此溶液可用作移動相B (MPB)。

【0140】

1000:1 (v/v) MQ:FA [BAC-001]。

使用量筒將1000 mL MQ添加至溶劑瓶中。使用吸液管添加1 mL FA。徹底混合。可將此溶液儲存在室溫下長達1個月。此溶液可用於R0溶液中。

【0141】

40:10:50:0.05 (v/v/v/v) IPA:丙酮:CAN:FA [BAC-083]

使用量筒組合400 mL IPA、100 mL 丙酮及500 mL ACN且將其轉移至適當尺寸之溶劑儲存瓶中。攪拌以混合。使用吸液管將0.500 mL FA轉移至瓶中。徹底混合。儲存在室溫下長達1個月。可替代地，可使用購買溶液代替製備溶液。若所用購買溶液，則根據標準程序將溶液儲存在室溫下。此溶液可用於R3。

【0142】 50:25:25 (v/v/v) IPA:ACN:MeOH [BAC-011]。在溶劑瓶中使用量筒組合500 mL IPA、250 mL ACN及250 mL MeOH。徹底混合。可將溶液儲存在室溫下長達1個月。此溶液用作強力針洗液。

【0143】 製備儲備溶液。一式兩份製備儲備溶液且在使用之前進行

比較。可更改所製備量，其限制條件為維持且記載比例及最終濃度。

【0144】 GVA儲備溶液(10,000 μ M) [S01]。在將校正因子施加至琥珀色玻璃瓶中之後，稱重等效於3 mg之量之GVA (MW 173.17)。與MQ一起溶解且稀釋至10,000 μ M。徹底混合。將溶液劃分成0.075 mL等分試樣且將溶液儲存在約-70°C下於PPV中。在使用之前，在濕冰上解凍儲備液。

【0145】 ArgA儲備溶液(10,000 μ M) [S02]。在將校正因子施加至琥珀色玻璃瓶中之後，稱重等效於3 mg之量之ArgA (MW 175.19)。與MQ一起溶解且稀釋至10,000 μ M。徹底混合。音波處理儲備溶液約10分鐘。將溶液劃分成0.075 mL等分試樣且將溶液儲存在約-70°C下於PPV中。在使用之前，在濕冰上解凍儲備液。

【0146】 HArg儲備溶液(40,000 μ M) [S03]。在將校正因子施加至琥珀色玻璃瓶中之後，稱重等效於15 mg之量之HArg (MW 224.69)。與MQ一起溶解且稀釋至40,000 μ M。徹底混合。將溶液劃分成0.100 mL等分試樣且將溶液儲存在約-70°C下於PPV中。在使用之前，在濕冰上解凍儲備液。

【0147】 NAArg儲備溶液(20,000 μ M) [S04]。在將校正因子施加至琥珀色玻璃瓶中之後，稱重等效於6 mg之量之NAArg (MW 216.24)。與MQ一起溶解且稀釋至20,000 μ M。徹底混合。將溶液劃分成0.075 mL等分試樣且將溶液儲存在約-70°C下於PPV中。在使用之前，在濕冰上解凍儲備液。

【0148】

GAA儲備溶液(40,000 μ M) [S05]

在將校正因子施加至琥珀色玻璃瓶中之後，稱重等效於14 mg之量之GAA (MW 117.11)。與[BAC-009]一起溶解且稀釋至40,000 μM 。徹底混合。將溶液劃分成0.150 mL等分試樣且將溶液避光(PFL)儲存在約-70°C下於PPV中。在使用之前，在濕冰上解凍儲備液。

【0149】 製備內標(IS)溶液。可更改所製備量，其限制條件為維持且記載比例及最終濃度。

【0150】 GVA- $^{13}\text{C}_6$ IS儲備溶液(4,150 μM) [I01]。在將校正因子施加至琥珀色玻璃瓶中之後，稱重等效於3 mg之量之GVA- $^{13}\text{C}_6$ (MW 215.65)。與MQ一起溶解且稀釋至4150 μM 。徹底混合。將溶液劃分成0.050 mL等分試樣且將溶液儲存在約-70°C下於PPV中。在使用之前，在濕冰上解凍儲備液。

【0151】 ArgA- $^{13}\text{C}_6$ IS儲備溶液(5,000 μM) [I02]。在將校正因子施加至琥珀色玻璃瓶中之後，稱重等效於3 mg之量之ArgA- $^{13}\text{C}_6$ (MW 181.14)。與MQ一起溶解且稀釋至5,000 μM 。徹底混合。將溶液劃分成0.050 mL等分試樣且將溶液儲存在約-70°C下於PPV中。在使用之前，在濕冰上解凍儲備液。

【0152】 HArg-d4 IS儲備溶液(5,000 μM) [I03]。在將校正因子施加至琥珀色玻璃瓶中之後，稱重等效於3 mg之量之HArg-d4 (MW 265.17)。與MQ一起溶解且稀釋至5000 μM 。徹底混合。將溶液劃分成0.050 mL等分試樣且將溶液儲存在約-70°C下於PPV中。在使用之前，在濕冰上解凍儲備液。

【0153】 NAArg- $^{13}\text{C}_6$ IS儲備溶液(5,000 μM) [I04]。在將校正因子施加至琥珀色玻璃瓶中之後，稱重等效於3 mg之量之NAArg- $^{13}\text{C}_6$ (MW

222.19)。與MQ一起溶解且稀釋至5,000 μM 。徹底混合。將溶液劃分成0.050 mL等分試樣且將溶液儲存在約-70°C下於PPV中。在使用之前，在濕冰上解凍儲備液。

【0154】

GAA-13C₂ IS儲備溶液(5,000 μM) [I05]

在將校正因子施加至琥珀色玻璃瓶中之後，稱重等效於3 mg之量之GAA-¹³C₂ (MW 119.09)。與[BAC-009]一起溶解且稀釋至5,000 μM 。徹底混合。將溶液劃分成0.050 mL等分試樣且將溶液PFL儲存在約-70°C下於PPV中。在使用之前，在濕冰上解凍儲備液。

【0155】 重質IS使用溶液(2.075 μM I01；2.50 μM I02，I04)

[HI06]

【0156】 在PPV中使用吸液管組合0.020 mL [I01]、[I02]及[I04]中之每一者與39.940 mL [1 N HCl]。徹底混合。在濕冰上製備溶液。在使用之後捨棄溶液。

【0157】 IS使用溶液(5,000 nM) [I05]。在PPV中使用吸液管組合0.020 mL [I01]、[I02]、[I04]及[I05]中之每一者及39.920 mL [1 N HCl]。徹底混合。在濕冰上製備溶液。在使用之後捨棄溶液。

【0158】

製備儲備比較溶液。

如下表中所示，在濕冰上在PPV中使用吸液管製備比較溶液。徹底混合。冷凍儲存。用於建立穩定性之儲備比較溶液應於所建立之經處理樣品穩定窗內評估。可更改所製備量，其限制條件為維持且記載比例及最終濃度。

溶液ID	源 溶 液 ID	源 溶 液 濃 度 (μM)	源 溶 液 體 積 (mL)	所用 稀 釋 劑 溶 液(mL)	稀 釋 劑 體 積 (mL)	最 終 體 積(mL)	最 終 濃 度(μM)
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

【0159】 SC6可稱作SST以用於短期儲備液比較或可稱作SLT以用於長期儲備液比較。 SC6可用於比較I05儲備溶液製備。(*)當僅列舉一種濃度時，GVA-¹³C₆濃度為所示0.83×值。

【0160】

樣品萃取.

1. 將0.050 mL各校準樣品、品質對照(QC)樣品、空白樣品及實驗樣品轉移至濕冰上之96孔盤中。在樣品處理之前，必須將稀釋樣品用具有適當稀釋因子之1×PBS稀釋。

【0161】 2. 將0.100 mL [1 N HCl]添加至各基質空白樣品中。

【0162】 3. 將0.100 mL [I05]添加至各校準樣品、QC樣品、具有IS之空白樣品及實驗樣品中。不將[I06]添加至GQC (GAA LLOQ (量化下限) (QC)樣品中(若存在)。

【0163】 4. 以1600 rpm渦旋混合5分鐘。

【0164】 5. 將0.400 mL [BAC-359]添加至各樣品中。

【0165】 6. 以1000 rpm渦旋混合5分鐘。

【0166】 7. 以3500 rcf離心5分鐘。

【0167】 8. 使用TomTec或多注式吸液管將0.300 mL上清液轉移至潔淨96孔盤中。

【0168】 9. 以3500 rcf離心5分鐘。

【0169】 10. 將經處理樣品儲存在約4℃下於LC儀器之樣品隔室中或於冷凍機中直至進行分析。

【0170】

超高效液相層析法(UHPLC)裝置。

- UHPLC：
- 管柱：
- 管柱溫度：
- 運作時間：
- 自動取樣器溫度：
- 建議注射體積：
- 移動相：
- R0沖洗溶液：
- R3沖洗溶液：
- 配備有自動取樣器之Shimadzu Nexera®
- Imtakt Intrada胺基酸50×2 mm (PN：WAA22)
- 40℃
- 5.50分鐘
- 4℃
- 2至8 μL
- A：80:20:0.3 (v/v/v) MeOH:MQ:FA [BAC-409]
- B：70:30 (v/v) 100 mM甲酸銨:MeOH [BAC-410]
- 1000:1 (v/v) MQ:FA [BAC-001]
- 40:10:50:0.05 (v/v/v/v) IPa:丙 酮:ACN:FA [BAC-083]

梯度程式：

時間(分鐘)	流動速率(毫升/分鐘)	移動相A (%)	移動相B (%)
初始	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

【0171】 質譜儀參數。除了質譜儀以外，可修改參數、介面及掃描模式以獲得最佳效能。精確質量轉變可由於四極質譜儀之單元分解在儀器與儀器之間略微地變化。

質譜儀：
介面：
掃描模式：
氣簾(CUR)：
氣體設定(GS1)：
氣體設定(GS2)：
電離電壓(IS)：
溫度(TEM)：
碰撞氣體設定(CAD)：
入口電位(EP)：
出口電位(CXP)

Applied Biosystems/MDS Sciex API 5500™
Turbo Spray，陽離子模式
多重反應監測(MRM)
25 psi
40 psi
40 psi
5500 v
500℃
平均數或8 psi
10 v
10 v

分析物	母離子	子離子	停留時間 (msec)	碰撞能量 (CE) (v)	去簇聚電 位(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
NAArg	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

【0172】

用於偵測針對人類血清中之PEG之抗體之直接結合ELISA

A. 試劑/ 緩衝劑

稀釋劑緩衝劑/檢定緩衝劑(於1×PBS中之4%牛γ球蛋白(BGG))

藉由將4 g BGG添加至100 mL 1×PBS中來製備檢定稀釋劑。將溶液經由0.22 μM過濾器過濾且儲存在2-8℃下長達2週。視需要按比例調整體積。

【0173】

競爭緩衝劑(檢定緩衝劑+100 μg/mL PEG)

藉由每1毫升檢定緩衝劑添加100 μg PEG來製備競爭緩衝劑。在檢定之日新制競爭緩衝劑。視需要按比例調整體積。

【0174】

停止溶液(1 M H₃PO₄)

將21.4 mL 85% (11.7 M) H₃PO₄添加至228.6 mL dI (去離子) H₂O中，充分混合且儲存於酸箱中長達1年。視需要按比例調整體積。

額外的試劑(參見下表)

試劑	來源	Cat編號	批次/批號
單聚乙二醇化BSA (MPEG 5kDa)	Life Diagnostics	PBSA-02	C-H0212A
抗PEG SPC (統計過程控制)	Life Diagnostics	9B5-6-25-7	C-C1912A
SPC高陽性對照(滑鼠) (HPC-m 1000 ng/mL)	BioAgilytix	N/A	RP06Jun16kml01
SPC低陽性對照(LPC-m，200 ng/mL)	BioAgilytix	N/A	RP06Jun16kml02
陰性對照(NC，BRH1095944)	BioAgilytix	N/A	RP06Jun16kml03
*高陽性對照(人類) HPC-h BRH1182029	來自Bioreclamation之個別樣品在發展期間顯示具有高信號且受PEG高度抑制	HMSRM	RP08Jul16JHJ01 (BRH1182029)
*低陽性對照(人類) LPC-h	p-NHS中之上述物質1:1稀釋	N/A	RP08Jul16JHJ02
混合正常人類血清(p-NHS)	Bioreclamation	HMSRM	BRH1095944
AEB1102 (aka，Co-Arg1 PEG)	Aeglea/KBI BioPharma	N/A	15-0390
山羊抗滑鼠IgG-Fc-HRP	Jackson Immunoresearch	115-035-008	125494
兔子抗人類IgG/A/M-HRP	Jackson Immunoresearch	309-035-064	120556

試劑	來源	Cat編號	批次/批號
碳酸酯包衣緩衝劑	BioWorld	40320016-1	L16020109JC
稀釋劑緩衝劑/檢定緩衝劑	BioAgilytix	N/A	RP08Jul16JHJ04
(於1×PBS中之4%BGG)			RP13Jul16MB01,
			RP11Jul16JHJ02,
			RP18Jul16JHJ01
牛γ球蛋白	Millipore	82-041	1269
洗滌緩衝劑(1×PBS)	BioAgilytix	N/A	RP11Jul16JHJ01,
			RP12Jul16MBM01,
			RP13Jul16JHJ01,

聚丙烯盤	Costar	3365	RP18Jul16JHJ02,
Nunc Immuno	Thermo	441653	RP08Jul16JHJ03
Starwell C8			09516000
Maxisorp盤			125663
TMB微孔過氧化物酶	KPL	50-76-00	10158819
試劑盒			
停止溶液(1 M H ₃ PO ₄)	BioAgilytix	N/A	RP08Jul16MBM01,
			RP26May16kml03,
			RP18Jul16MBM01
人類IgG	Jackson	009-000-003	126258
	Immunoresearch		
人類IgM	Jackson	009-000-012	124517

【0175】

免疫研究

B. 篩檢檢定程序

根據盤圖，使Starwell C8 Maxisorp (96孔格式盤)之孔塗佈有100 µL 於碳酸酯包衣緩衝劑中之2 µg/mL BSA mPEG 5K (5,000道爾頓)或500 ng/mL人類IgG或500 ng/mL人類IgM (分割點運作後不包括此等對照)。將一或多個盤密封，以~450 rpm短暫搖晃以確保跨孔分佈，且在37°C下培育約1 hr。在培育之後，將孔用1×PBS洗滌3次。洗滌器程式含有在抽吸裝置情況下之溢流，及在各實施(程式29_洗滌_搖晃)之後之10次二級搖晃以確保完成星形孔盤之洗滌。此程式用於此程序中之全部洗滌步驟。

【0176】 在洗滌之後，將一或多個盤倒置且在吸水紙上輕拍乾燥。隨後，將300 µL稀釋劑緩衝劑添加至一或多個盤之全部孔中。稀釋劑緩衝劑含有4% BGG，因此亦視為「阻斷緩衝劑」。將一或多個盤覆蓋且在室溫下在搖晃(~450 rpm)情況下培育最低1小時但不超過3小時。

【0177】 在阻斷培育期之後，將一或多個盤洗滌、倒置且在吸水紙上輕拍乾燥。根據盤圖，將於稀釋劑緩衝劑中稀釋至50倍最低所需稀釋

(MRD)之對照及樣品一式兩份添加至盤中(100 μ L/孔)。隨後，將一或多個盤密封且在室溫下在搖晃(~450 rpm)情況下培育約1小時。

【0178】 將一或多個盤洗滌、倒置且在吸水紙上輕拍乾燥，且遵循盤圖將100 μ L偵測抗體添加至適當孔中。使用經1:5,000稀釋之山羊抗滑鼠IgG-Fc-HRP偵測滑鼠抗PEG抗體，且使用於稀釋劑緩衝劑中1:30,000稀釋之兔子抗人類IgG/A/M偵測抗人類抗體且將該等抗體添加至適當孔中。將一或多個盤密封且在室溫下在搖晃(~450 rpm)情況下培育約1小時。將一或多個盤洗滌、倒置且在吸水紙上輕拍乾燥，隨後添加100 μ L TMB受質/孔。將一或多個盤覆蓋且在室溫下在搖晃(~450 rpm)情況下培育約10-20分鐘。藉由每孔添加100 μ L停止溶液來停止反應。短暫搖晃一或多個盤以確保適當混合。

【0179】

C. 確認檢定程序

根據下文盤圖，使Starwell C8 Maxisorp盤之孔塗佈有100 μ L於碳酸酯包衣緩衝劑中之2 μ g/mL BSA-mPEG 5K或500 ng/mL人類IgG或500 ng/mL人類IgM (分割點運作後不包括此等對照)。將一或多個盤密封，以~450 rpm短暫搖晃以確保跨孔分佈，且在37°C下培育約1 hr。

【0180】 在培育之後，將孔用(1×PBS)使用程式29_洗滌_搖晃洗滌3次以確保完成Starwell盤之洗滌。此程式用於此程序中之全部洗滌步驟。在洗滌之後，將一或多個盤倒置且在吸水紙上輕拍乾燥。隨後，將300 μ L稀釋劑緩衝劑添加至一或多個盤之全部孔中作為阻斷步驟。將一或多個盤覆蓋且在室溫下在搖晃(~450 rpm)情況下培育最低1小時但不超過3小時。

【0181】 當一或多個Starwell盤受到阻斷時，在聚丙烯盤中將樣品

及對照於稀釋劑緩衝劑中及於含有PEG之競爭緩衝劑中以100 µg/mL稀釋50倍MRD。將稀釋樣品及對照在室溫下在搖晃(~450 rpm)情況下培育約1小時。

【0182】 在阻斷培育期之後，將一或多個星形孔盤洗滌、倒置且在吸水紙上輕拍乾燥。根據盤圖，將與PEG一起預培育及不與PEG一起預培育之對照及樣品一式兩份添加至盤中(100 µL/孔)。隨後，將一或多個盤密封且在室溫下在搖晃(~450 rpm)情況下培育約1小時。

【0183】 在洗滌之後，將一或多個盤倒置且在吸水紙上輕拍乾燥，且遵循盤圖將100 µL偵測抗體添加至適當孔中。使用經1:5,000稀釋之(山羊抗滑鼠IgG-Fc-HRP)偵測滑鼠抗PEG抗體，且使用於稀釋劑緩衝劑中1:30,000稀釋之(兔子抗人類IgG/A/M)偵測抗人類抗體且將該等抗體添加至適當孔中。將一或多個盤密封且在室溫下在搖晃(~450 rpm)情況下培育約1小時。將一或多個盤洗滌、倒置且在吸水紙上輕拍乾燥，隨後添加100 µL TMB受質/孔。將一或多個盤覆蓋且在室溫下在搖晃(~450 rpm)情況下培育約10-20分鐘。藉由每孔添加100 µL停止溶液來停止反應。短暫搖晃一或多個盤以確保適當混合且隨後在Synergy 2盤讀取器上以450 (偵測)、620 (背景)進行讀取。

【0184】

D. 滴定方法程序

滴定度檢定遵循與篩檢檢定之程序相同之程序。使待滴定之樣品在陰性混合人類血清中進行最低七次2倍連續稀釋。在檢核期間篩檢正常人類集合體且選擇具有最低背景質之一者以用作驗證中之陰性集合體。將此等滴定稀釋液使用稀釋劑緩衝劑稀釋至50倍最低所需稀釋，且根據盤圖一

式兩份添加至盤中(100 μ L/孔)。

【0185】

E. 方法驗證

方法驗證包括特異性、檢定敏感性、選擇性/基質干擾、藥物耐受性、前帶(卡鉤)效果、滴定度檢定線性、檢定內及檢定間精確度、短期及凍結及解凍穩定性之評估以及篩檢、確認及滴定分割點之建立。

【0186】 兩組對照用於檢定驗證中。使用摻料至混合正常人類血清(NC)中之滑鼠抗PEG代替陽性對照製備一組，得到檢定中之高(HPC-m)信號及低(LPC-m)信號。使用具有篩檢檢定中之高抗PEG反應及確認檢定中之高抑制之人類樣品製備第二組。此樣品應與預期的預先存在之抗PEG樣品一致。藉由將經識別高人類樣品稀釋至陰性對照血清中以生成產生檢定中之低(LPC-h)信號之樣品來製備人類抗PEG低對照。未經稀釋高人類樣品用作HPC-h。在適用情況下，兩組對照均包括於各運作中。對照應顯示與其量成比例之信號，亦即高大於低，且低大於分割點。免疫球蛋白對照(塗佈於盤上之人類IgG及人類IgM)亦包括於分割點運作中以驗證偵測抗體混合液之效能。

【0187】

F. 分割點分析

滑鼠抗PEG篩檢分割點。對於使用滑鼠抗PEG SPC進行之資料評估，使用2 $\times$ 在驗證(n=55盤)期間所產生之全部陰性對照樣品之平均值之標準差設定篩檢分割點。此計算產生0.01467校正因子，將該校正因子添加至各盤上之NC之平均值中以生成對滑鼠抗PEG SPC樣品具有特異性之分割點。

【0188】 人類篩檢檢定分割點。使用98個個別正常人類血清樣品建立篩檢檢定分割點。在最少7次運作中由3個分析員作出六個針對各樣品之測定。使用SAS JMP®軟體(12版或後續版)評估資料，排除統計離群值，測定方差且建立分割點。對於統計離群值之測定，藉由將樣品之平均值信號除以各盤之抗人類NC樣品之平均值來正規化反應。

【0189】

G. 分割點測定

人類抗PEG篩檢分割點。使用正規化值測定參數及非參數篩檢浮動分割點因子。首先，具有杜凱氏雙權程序(Tukey's biweight procedure)之參數方法用於在排除離群值之後計算比率之平均值及標準差(SD)之穩健估值。隨後，藉由將SD值乘以t-分佈(其中自由度等於比率值之數減1)之第95分位數且將乘積添加至均值中來測定在5%錯誤肯定錯誤率下之參數浮動分割點因子。藉由計算比率值之經驗第95百分位來測定非參數5%錯誤率分割點因子。

【0190】 人類確認分割點。藉由由Shankar G等人建議之程序以1%錯誤肯定錯誤率建立確認分割點值。藉由使用不包括於篩檢分割點分配中之14個樣品作為生物離群值分配特異性抑制之下限來測定分割點值。此等樣品一致地具有比篩檢為陰性之樣品之%抑制值更高之%抑制值。使用以下等式針對各樣品計算相對於未摻料樣品之變化百分比：

$$\% \text{ 抑制} = \left(1 - \frac{\text{具有PEG之樣品之信號}}{\text{單獨樣品之信號}} \right) \times 100$$

【0191】 藉由首先計算保留於分析中之全部%抑制值之平均值及SD之杜凱氏雙權估值來測定參數確認分割點。隨後，藉由各別地將SD值乘以等於t-分佈(其中自由度等於抑制值之數減1)之第1分位數之因數且將乘

積減去均值來計算分割點值。亦基於經驗第1百分位測定非參數分割點值。

【0192】

G. 特異性

與未摻料樣品相比，高量人類IgG之添加確實不影響檢定中所產生之信號。

【0193】

H. PEG 耐受性

藉由在抗PEG代替陽性對照之濃度等效於HPC-m及LPC-m及人類抗PEG HPC-h及LPC-h之濃度存在之情況下執行以100 $\mu\text{g/mL}$ 濃度起始的PEG 2倍連續稀釋來評估檢定干擾。亦運作由各無PEG對照組成之零摻料對照。在最少2次運作內由最少2個分析員一式兩份執行此步驟。人類特異性篩檢分割點用於確定此等檢定運作中之耐受性。HPC-m、HPC-h及LPC-h耐受高達100 $\mu\text{g/mL}$ 之經測試PEG全部濃度。

【0194】

I. 聚乙二醇化精胺酸酶之藥物耐受性

藉由在抗PEG代替陽性對照之濃度等效於HPC-m及LPC-m及人類抗PEG HPC-h及LPC-h之濃度存在之情況下執行以150 $\mu\text{g/mL}$ 濃度起始的聚乙二醇化精胺酸酶2倍連續稀釋來評估檢定干擾。亦運作由各無PEG對照組成之零摻料對照。使用抗人類特異性分割點執行藥物耐受性之評估。對於23.4 $\mu\text{g/mL}$ 平均藥物耐受性，在一個運作中，HPC-m耐受9.38 $\mu\text{g/mL}$ ，且在第二運作中，耐受高達37.5 $\mu\text{g/mL}$ 。在一個運作中，LPC-m不耐受Co-Arg1 PEG，且在第二運作中，耐受2.34 $\mu\text{g/mL}$ 。對於14.1

μg/mL平均藥物耐受性，在一個運作中，HPC-h耐受9.38 μg/mL，且在第二運作中，耐受高達18.8 μg/mL。對於7.04 μg/mL平均藥物耐受性，在一個運作中，LPC-h耐受4.69 μg/mL，且在第二運作中，耐受9.38 μg/mL。

【0195】

神經運動及神經認知測試方法

用神經及神經運動功能評估完成身體檢查，該等評估包括但不限於6MWT、GMFM、伯格氏平衡量表、修正阿胥渥茲量表(Modified Ashworth Scale)及普度釘板測試(Purdue Pegboard Test)。評估可進行超過一天。可在基線及在其後之後續時間點記錄評估。

【0196】 6MWT已廣泛地用於臨床研究以全局評估多種疾病病況中之心臟血管、肺及神經肌肉系統。其量測患者可在6分鐘內在扁平表面上步行之距離。美國胸腔學會(ATS)公開標準化方法(參見，ATS Statement Guidelines for the Six-Minute Walk; *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 166: 111-117, 2002)以用於執行該測試，其為良好耐受的且易於投與。對於6MWT，遵循此程序。在主持者批准之情況下，方法修改可允許解釋患者疾病狀態以及測試位置之邏輯考慮因素。非可走動患者不具有所施用之6MWT。6MWT結果記錄為以公尺完成之距離及相對於基線之百分比變化。

【0197】 伯格氏平衡量表藉由評估某些功能性任務中之效能來量測具有平衡功能減弱之患者之平衡。存在14項評估平衡之某些態樣諸如坐至站立、轉移、轉向及一隻腳站立之任務。另外，大部分任務需要個體維持位置達特定時間。

【0198】 GMFM為設計成評估在諸如躺、滾、步行、跑步及跳躍之

一系列活動下觀察之粗大運動功能中之變化的臨床量測。4分計分系統用於GMFM之各項以確定個人可起始及完成動作之程度，覆蓋五種尺度(A至E)：A：躺及滾，B：坐，C：爬行及跪地，D：站立，及E：步行、跑步及跳躍。

【0199】 修正阿胥渥茲量表發展為評估患有中樞神經系統(CNS)病變之患者之痙攣且用於量測由於痙攣所致之關節周圍消極移動阻力。量表具有良好耐受性且易於執行。量表無法區分痙攣與軟組織僵硬。量表利用0 (無痙攣)至4 (總僵硬)之計分量表及如下表中所指示之6個計分選項：

分數	修正阿胥渥茲
0	張力無增加
1	在彎曲或伸展移動時，張力略微增加係藉由捕集及釋放或藉由一系列運動(ROM)結束時之最低阻力來表現
1+	張力略微增加由捕集表現，隨後由在整個ROM之剩餘部分(少於一半)中之最低阻力表現
2	張力之更顯著增加貫通大部分ROM，但受影響部分易於移動
3	張力大量增加；消極移動困難
4	四肢彎曲或伸展僵硬

【0200】 普度釘板測試為量測利用身體兩側進行之精細運動任務中之執行速度的操作靈巧性及雙手協調性測試(Tiffin等人, 1948)。測試涉及兩種不同能力：(1)手臂、手及手指之粗大移動，及(2)精細運動極限，亦稱為「指紋」靈巧性。不良釘板效能為複雜、視覺上導引或協調移動之缺陷之標誌，該等移動有可能由涉及基底神經節之迴路介導。

【0201】 下表顯示可對進行治療之患者執行以評估隨時間推移之改善之額外的神經認知、發育及生存品質(QOL)評估。

所評估區域	測試名稱	描述	年齡範圍	大致所需時間
智力	韋氏成人智力IV	產生語文及行為智商(IQ)且可量測全量表IQ。亦量測處理速度及記憶。可使用縮短版無稱為一般能力指數(GAI)之處理速度及工作記	16歲及更大	30至40分鐘

所評估區域	測試名稱	描述	年齡範圍	大致所需時間
		憶之全量表IQ。		
	韋氏成人智力V	產生語文及行為IQ且可量測全量表IQ。亦量測處理速度及記憶。可使用縮短版無處理速度及工作記憶(GAI)之全量表IQ。	6至16歲	45至65分鐘
	韋氏學齡前及小學智力量表IV	產生語文及行為IQ以及全量表IQ。亦量測處理速度及記憶。可使用縮短版無處理速度及工作記憶(GAI)之全量表IQ。	3至6歲	30至40分鐘
	貝裏嬰兒發育量表III (Bayley Scales of Infant Development III)	年齡2至3.5歲之認知能力發育測試。認知量表及精神發育指數應作為端點包括在內。精神發展指數為分數。運動組分應包括在內。應亦給出語言量表，但其應僅為探索性的。 此應為小於4歲兒童之唯一直接量測	2至3.5歲	40分鐘
記憶	雷伊聽覺語文學習測試(Rey Auditory Verbal Learning Test, RAVLT)	大聲讀出15個不相關單詞之列表。在3項試驗中之每一者之後回顧單詞數量且記錄30分鐘延遲。	6歲及更大	40至45分鐘
	考夫曼兒童評估組合(KABC) II之亞特蘭蒂斯分測試(Atlantis Subtest on Kaufman Assessment Battery for Children (KABC) II)	一組圖片與無意義單詞配對；在學習及延遲反應試驗中兒童必須識別與單詞配對之圖片。	3至8歲	20分鐘
注意力	第9版注意力多項參數測試(Test of Variables of Attention, TOVA)	測試需要兒童/成人用鍵盤上之按鈕或按鍵對篩檢中快閃之指定刺激作出反應且不對其他刺激作出反應。量測速度、準確度及一致性。	6歲至成人	22分鐘
發育	來自CDC之性	收集年齡對應身材及年齡對	≥ 2至< 18歲	變化

所評估區域	測試名稱	描述	年齡範圍	大致所需時間
	別及年齡特異性生長表	應體重表，且應另外收集2至5歲患者之身材對應體重。應收集年齡適當之頭圍量度。		
患者或父母所報導之結果				
適應行為	文蘭適應行為量表II (Vineland Adaptive Behavior Scales II)	應使用呈會見格式之父母觀測量測。包括複合分數、交流、日常生活技能、社會化及運動技能。	所有年齡	30至60分鐘
生存品質	PROMIS 父母代理概況2.0版；PROMIS 小兒概況2.0版；PROMIS-29 2.0版 ^a	成人及兒童QOL自評；父母代理QOL評定		15分鐘
	針對小兒生存品質測定量表之PedsQL量測模型 ^a	QOL評定	2至18歲	5至10分鐘
	36項健康調查簡表(SF-36)	八個量表分數：活力、身體功能、身體疼痛、一般健康感知、身體功能、情緒功能、社會功能及精神健康。更高分數表示更佳健康。	18歲或更大	10分鐘
	沙氏負荷簡式量表(Short Form Zarit Burden Interview) (ZBI-12)	父母/照護者QOL自評。	所有年齡	30分鐘

^a PROMIS (針對開始利用PROMIS評估進行之1/2期研究之患者)或針對小兒生存品質測定量表之PedsQL量測模型(針對不在利用PROMIS評估進行之1/2期研究中之患者)。

【0202】

參考文獻列表

ATS Statement Guidelines for the Six-Minute Walk, *Am. J. Respir.*

Crit. Care Med., 166: 111-117, 2002

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

Carvalho, D.R.,等 人, 「Clinical features and neurologic progression of hyperargininemia」, *Pediatr. Neurol.*, 46(6): 369-74 (2012)

Cheng等人, *Cancer Res.* 67: 309-17, 2007

Deignan等人, 「Increased plasma and tissue guanidine compounds in a mouse model of hyperargininemia」, *Mol. Genet. Metab.* 93: 172-178, 2008

Dillon等 人, 「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)

Downs等人, 「The Berg Balance Scale」, *J. Physiother.*」, 2015 61(1):46

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

Geiger等人, 「Six-minute walk test in children and adolescents」, *J. Pediatr.*, 2007, 150(4): 395-399

Häberle等 人, 「Suggested guidelines for the diagnosis and management of urea cycle disorders」, *Orphanet. J. Rare Dis.*, 2012 7:

Harris等人, *Clin. Pharmacokinet.* 40(7): 539-51, 2001

Lambert等 人, 「Hyperargininemia: intellectual and motor improvement related to changes in biochemical data」, *J. Pediatr.*, 1991, 118(3): 420-4

Lopez等人, *FEBS J.* 272: 4540-48, 2005

Lüneburg, N.等人, 「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).

Marescau等人 「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)

Marescau等 人, 「The pathobiochemistry of uremia and hyperargininemia further demonstrates a metabolic relationship between urea and guanidinosuccinic acid」, 1992 41(9): 1021-1024

Oeffinger等人, 「Outcome tools used for ambulatory children with cerebral palsy: responsiveness and minimum clinically important differences」, *Dev. Med. Child Neurol.*, 2008; 50(12): 918-925

Prasad等人, 「Argininemia: a treatable genetic cause of progressive spastic diplegia simulating cerebral palsy - case reports and literature review」 *J. Child Neurol.* 12: 301-309, 1997

Remington, *The Science and Practice of Pharmacy*, 第19版,
Gennaro, 編, Mack Publishing Co., Easton, PA 1995

Savoca等人, *Cancer Biochem. Biophys.* 7: 261-268, 1984

Schrover等人, 「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

Schlune等人, 「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

Segawa等人, 「A long-term survival case of arginase deficiency with severe multicystic white matter and compound mutations」, *Brain Dev.* 33: 45-48, 2011

Stockler-Ipsiroglu等 人, 「Guanidinoacetate methyltransferase (GAMT) deficiency: outcomes in 48 individuals and recommendations for diagnosis, treatment and monitoring」, *Mol. Genet. Metab.*, 111(1): 16-25, 2014

Uchino, T.,等人, 「Molecular basis of phenotypic variation in patients with argininemia」, *Hum. Genet.* 96(3): 255-60 (1995)

Wu, G.等人, 「Arginine metabolism: nitric oxide and beyond」, *Biochem. J.*, 336 (Pt 1), 1-17, 1998

Wyse等人, 「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

以 及 美 國 專 利 公 開 ： 美 國 公 開20170240922； 美 國 公 開
20170283830； 美 國 公 開20170224843； 美 國 公 開20170191078； 美 國 公
開20160095884； 美 國 專 利8,398,968； 美 國 專 利8,440,184； 美 國 公 開
20160095884； 及 美 國 公 開20140154797。

【序列表】

<110> 美商艾瑞思有限公司
<120> 用於治療精胺酸酶1缺乏症之方法及組合物
<130> 218107-0011-00-TW-582022
<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> PatentIn version 3.5
<210> 1
<211> 354
<212> PRT
<213> 智人

<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 80
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
145 150 155 160

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
225 230 235 240

Lys Arg Glu 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> 智人

<400> 2

Met Ser Ala Lys Ser Arg Thr Ile Gly Ile 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 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

【發明申請專利範圍】

【請求項1】

一種人類精胺酸酶1之用途，其用於製造治療人類患者之精胺酸酶1 (ARG1)缺乏症(ARG1-D)之藥劑，其中該人類精胺酸酶1具有代替錳金屬輔因子之鈷金屬輔因子，其中該藥劑係用於每週一次投與，且其中該藥劑係用於以約0.005至約0.2 mg/kg患者體重之劑量向該人類患者靜脈內投與該人類精胺酸酶1或以約0.01至約0.25 mg/kg患者體重之劑量向該人類患者肌內或皮下投與該人類精胺酸酶1。

【請求項2】

如請求項1之用途，其中該人類精胺酸酶1係以野生型人類精胺酸酶1之胺基酸序列表現。

【請求項3】

如請求項2之用途，其中該人類精胺酸酶1包含SEQ ID NO: 2之胺基酸序列。

【請求項4】

如請求項1至3中任一項之用途，其中該人類精胺酸酶1為聚乙二醇化精胺酸酶1。

【請求項5】

如請求項1至3中任一項之用途，其中該藥劑係用於以約0.01至約0.075 mg/kg患者體重之劑量向該人類患者靜脈內投與該人類精胺酸酶1。

【請求項6】

如請求項5之用途，其中該藥劑係用於以約0.015、約0.03、約0.04或約0.06 mg/kg患者體重之劑量向該人類患者靜脈內投與該人類精胺酸酶

1。

【請求項7】

如請求項1至3中任一項之用途，其中該藥劑係以約0.01至約0.075 mg/kg患者體重之劑量向該人類患者皮下投與該人類精胺酸酶1。

【請求項8】

如請求項7之用途，其中該藥劑係以約0.015、約0.03、約0.04或約0.06 mg/kg患者體重之劑量向該人類患者皮下投與該人類精胺酸酶1。

【請求項9】

如請求項1至3中任一項之用途，其中該藥劑係用於起初以約0.005至約0.2 mg/kg患者體重之劑量靜脈內投與該人類精胺酸酶1，且其後每週一次皮下或靜脈內投與。

【請求項10】

如請求項9之用途，其中該藥劑係用於起初以約0.015、約0.03、約0.04或約0.06 mg/kg患者體重之劑量靜脈內投與該人類精胺酸酶1，且其後每週一次皮下或靜脈內投與。

【請求項11】

如請求項1至3中任一項之用途，其中該藥劑係用於起初以約0.01至約0.25 mg/kg患者體重之劑量皮下投與該人類精胺酸酶1，且其後每週一次皮下或靜脈內投與。

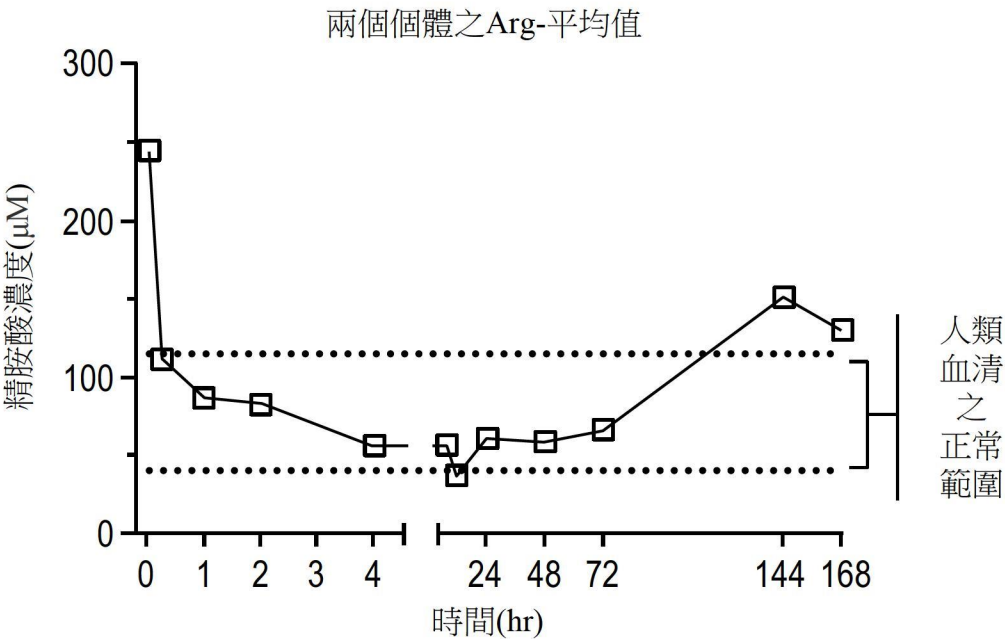
【請求項12】

如請求項11之用途，其中該藥劑係用於起初以約0.015、約0.03、約0.04或約0.06 mg/kg患者體重之劑量皮下投與，且其後每週一次皮下或靜脈內投與。

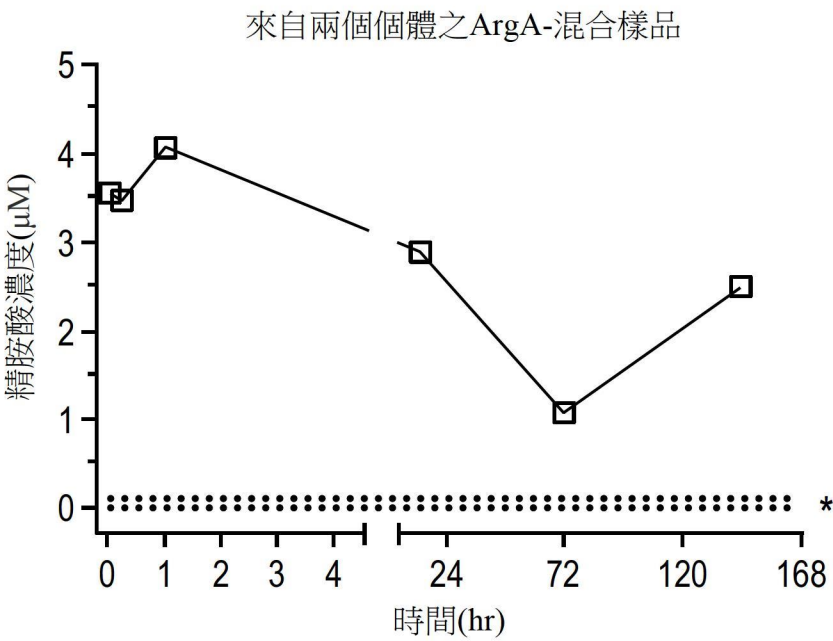
【請求項13】

如請求項1至3中任一項之用途，其中該人類精胺酸酶1係經聚乙二醇化，且係配置於在pH 7.4下包含5 mM磷酸鉀、50 mM氯化鈉及1.5%甘油(w/v)之緩衝劑中。

【發明圖式】

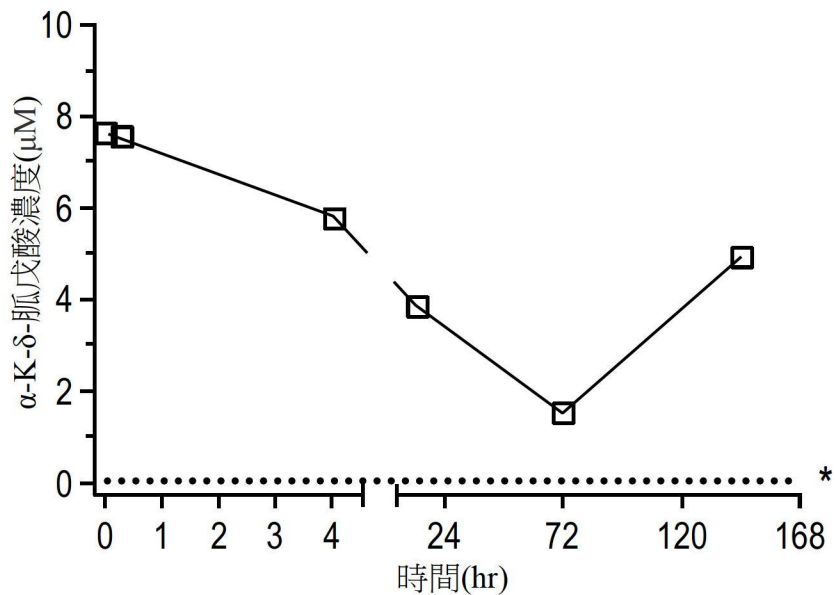


【圖1A】



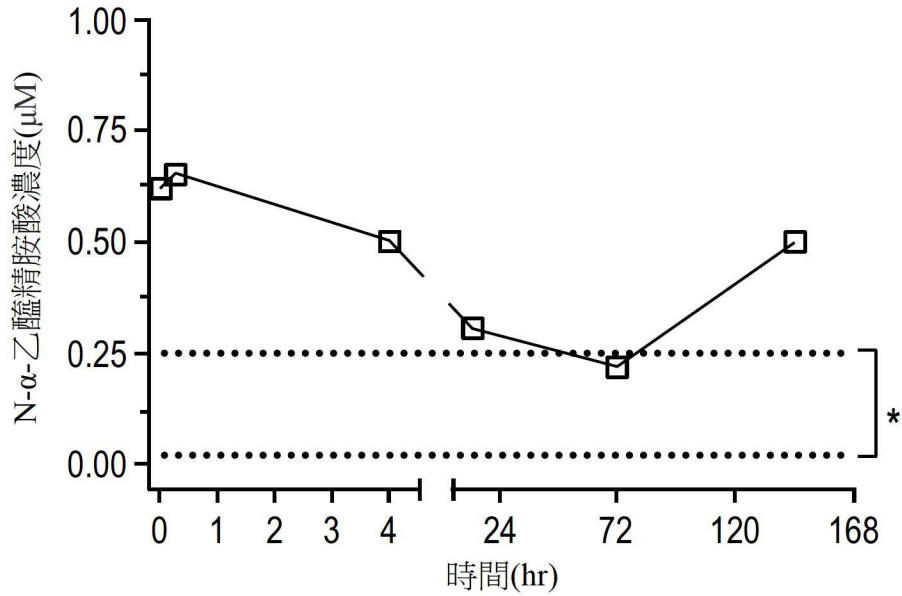
【圖1B】

來自兩個個體之GVA-混合樣品

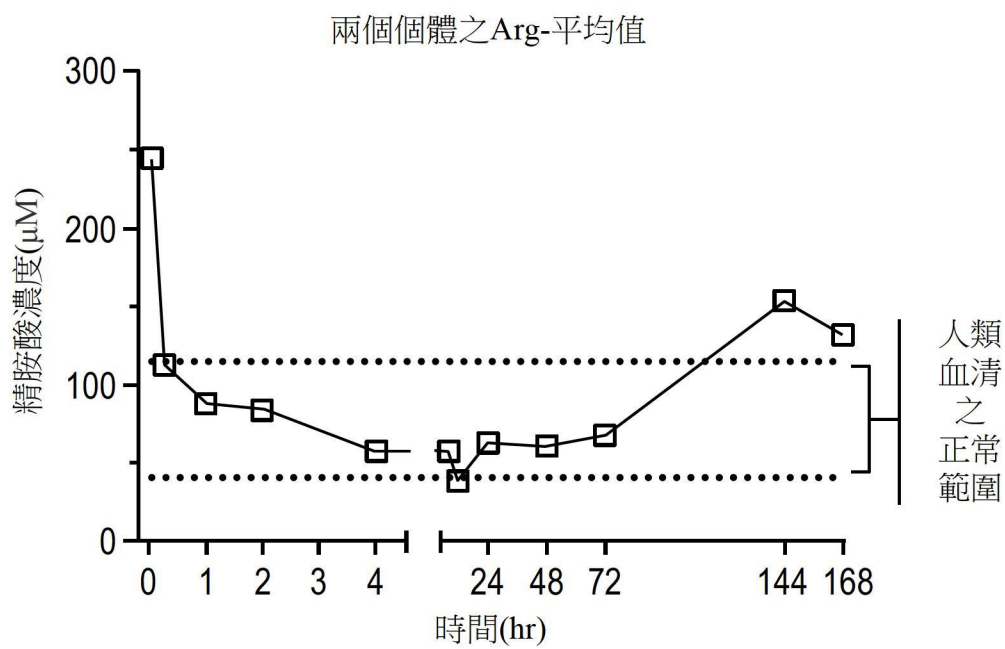


【圖1C】

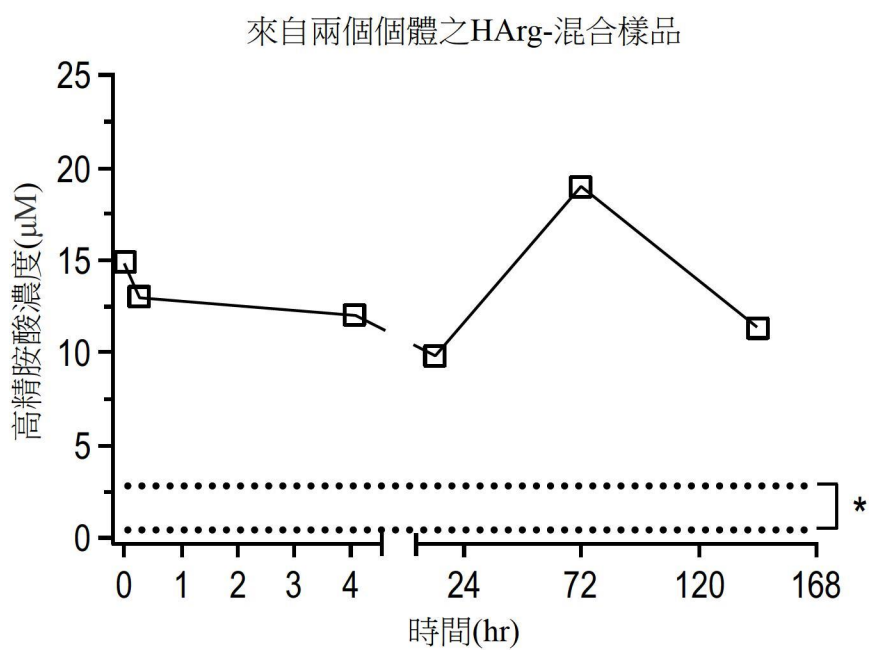
來自兩個個體之NAArg-混合樣品



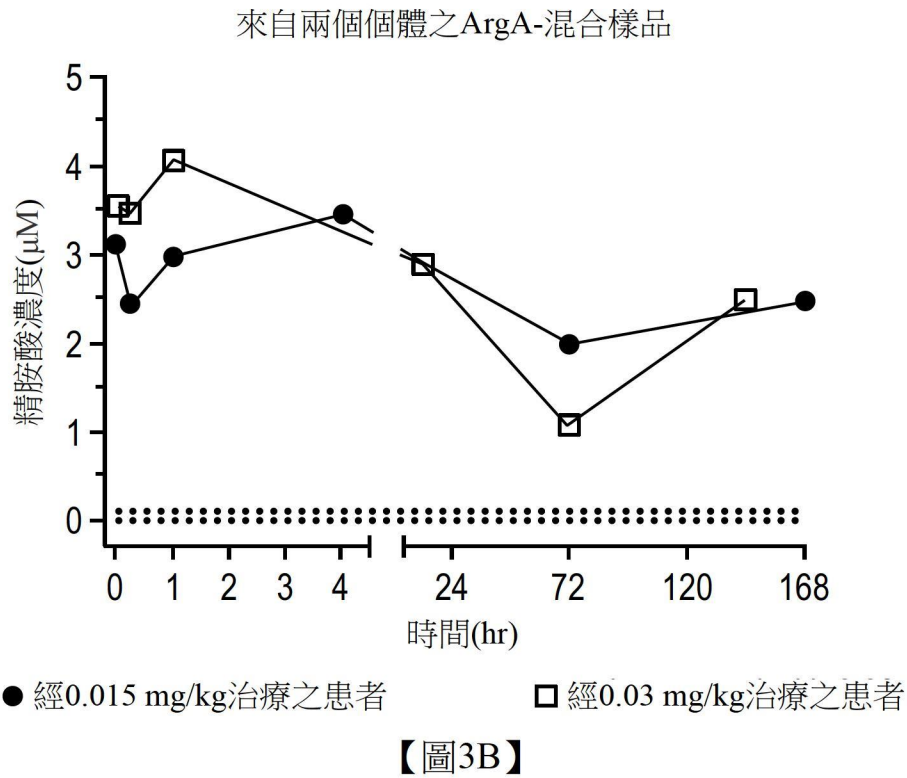
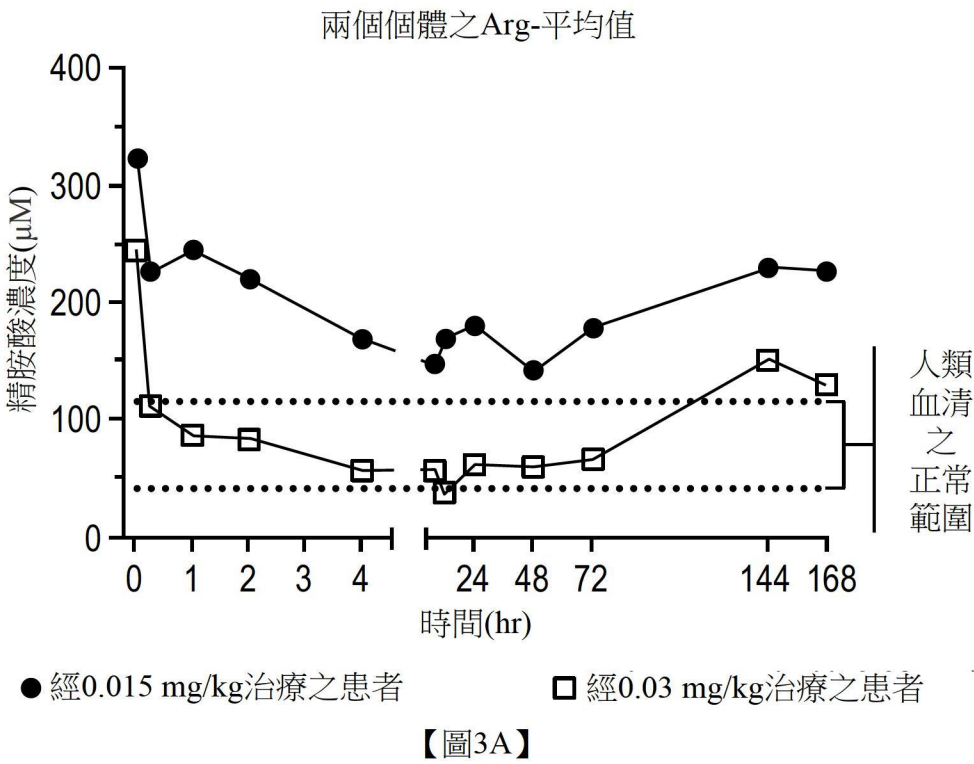
【圖1D】

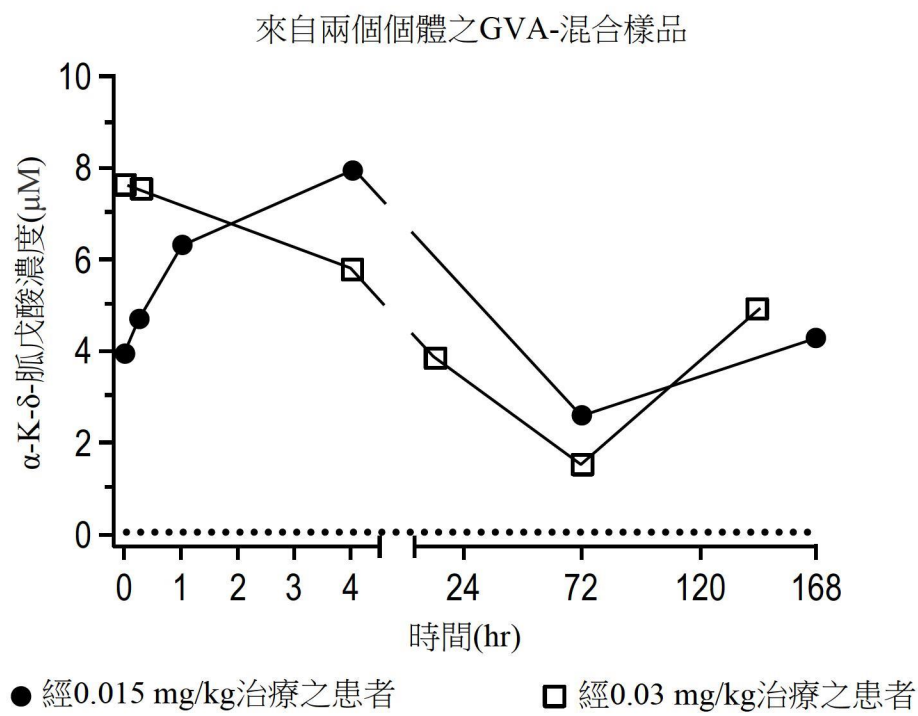


【圖2A】

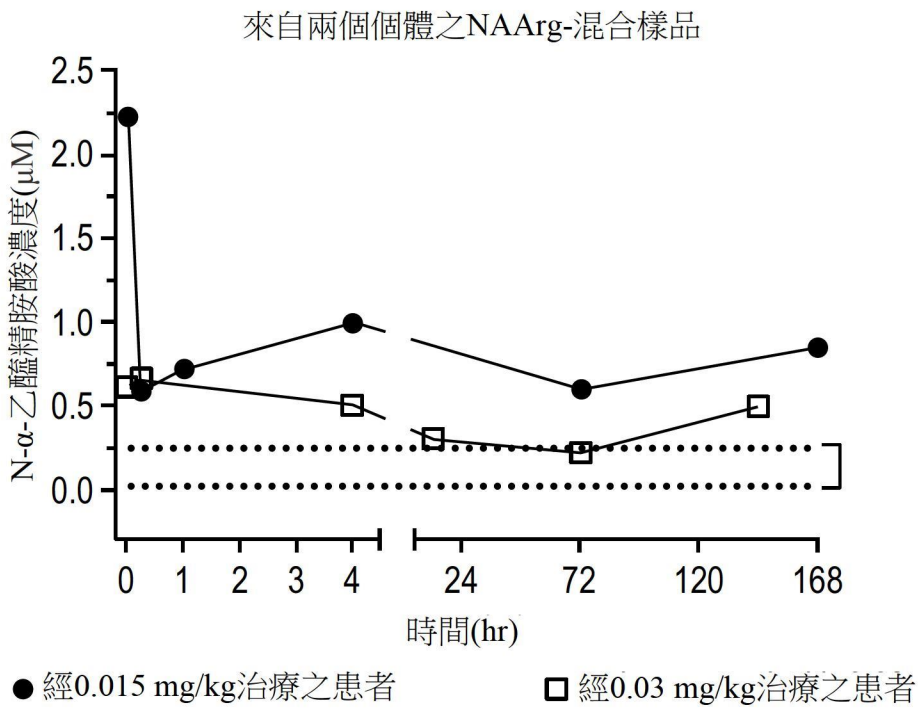


【圖2B】

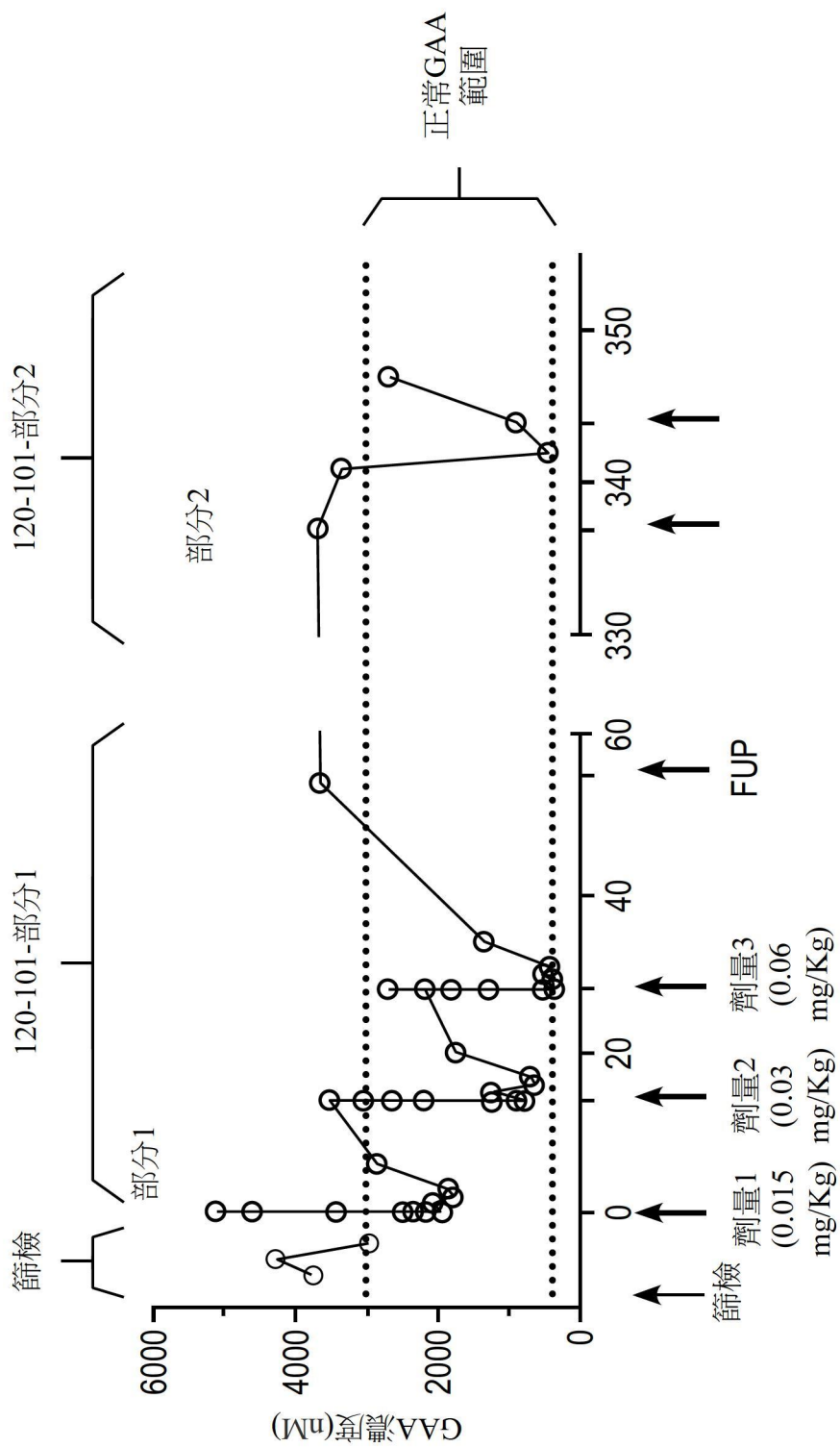




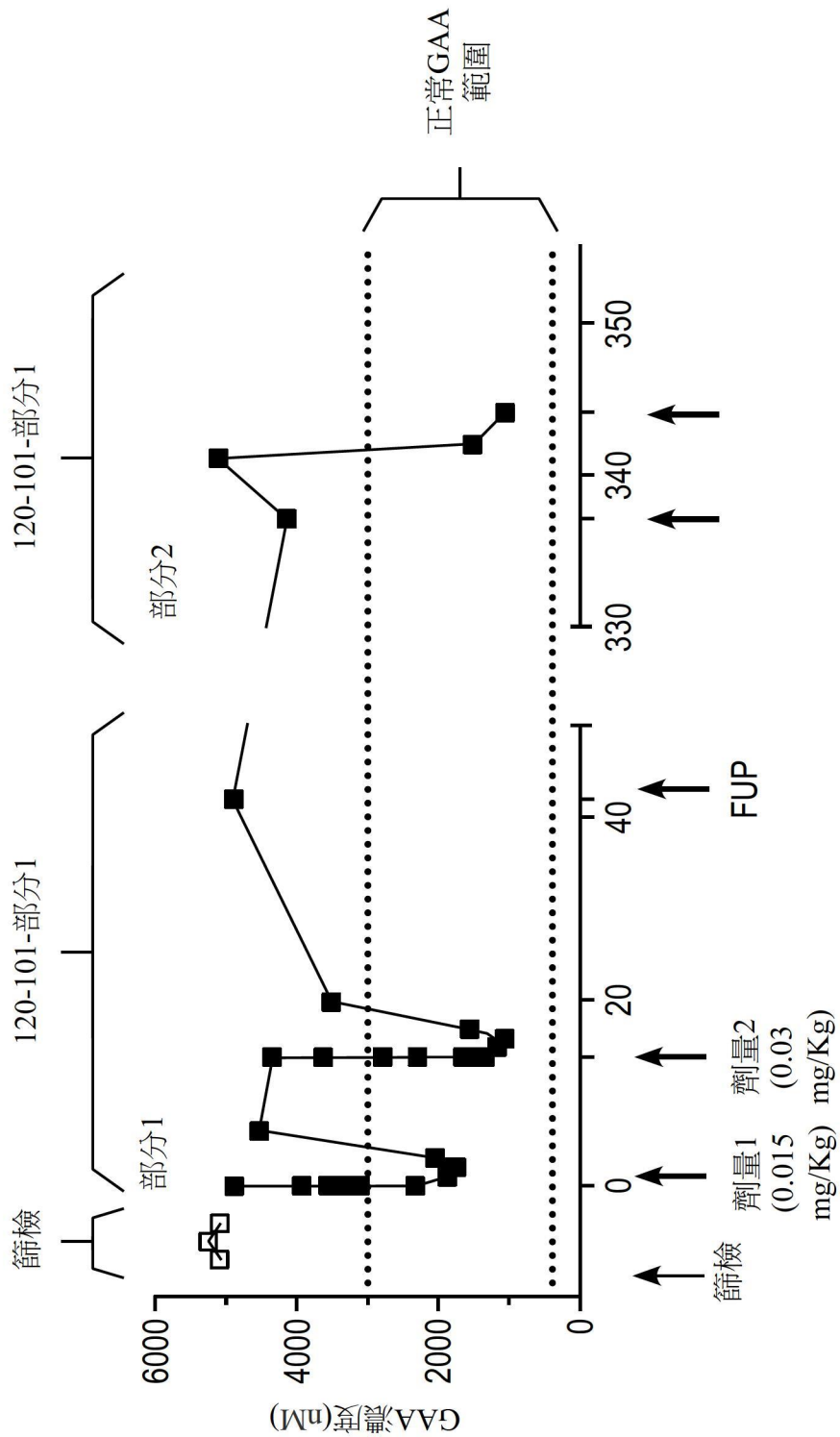
【圖3C】



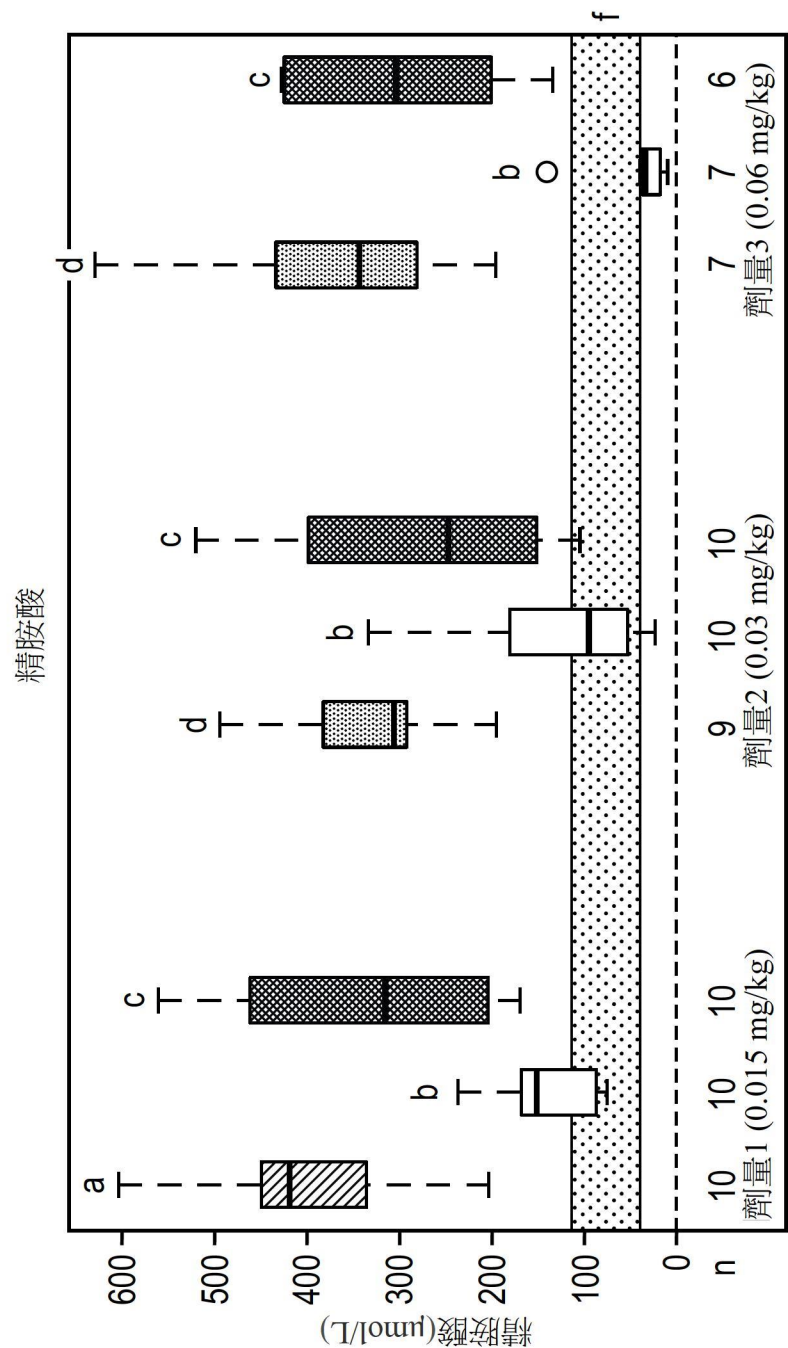
【圖3D】



時間(天)
【圖4A】

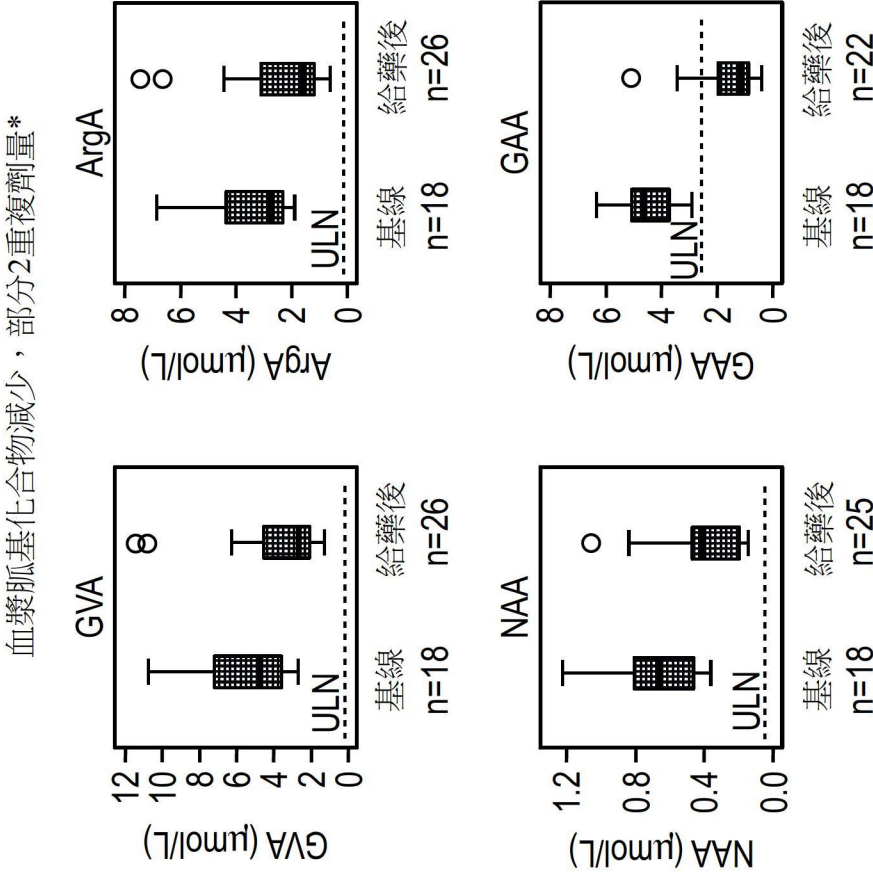


時間(天)
【圖4B】

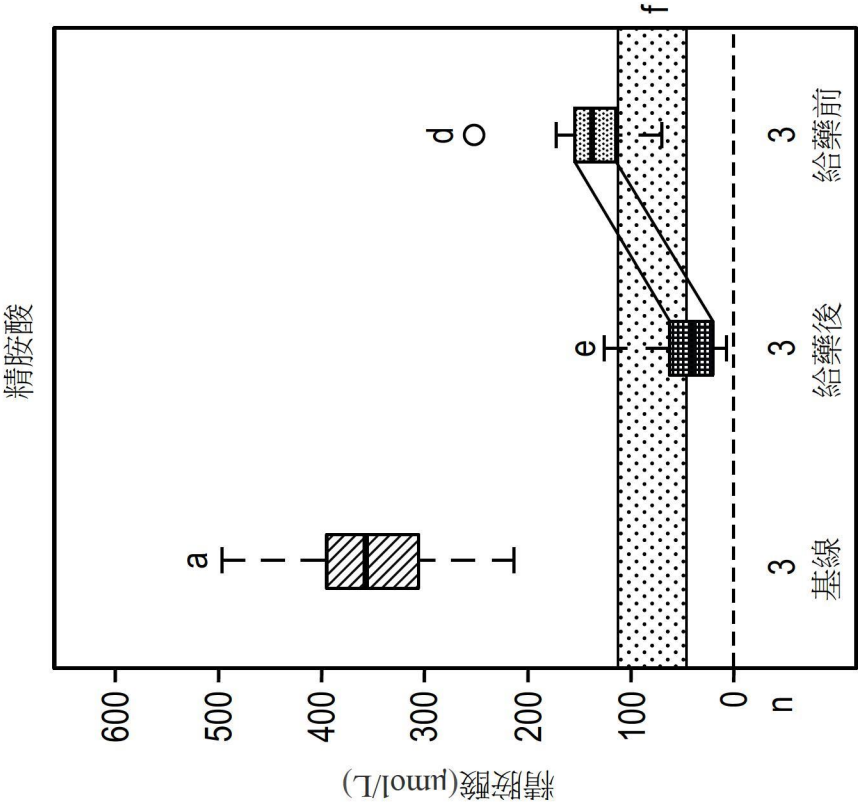


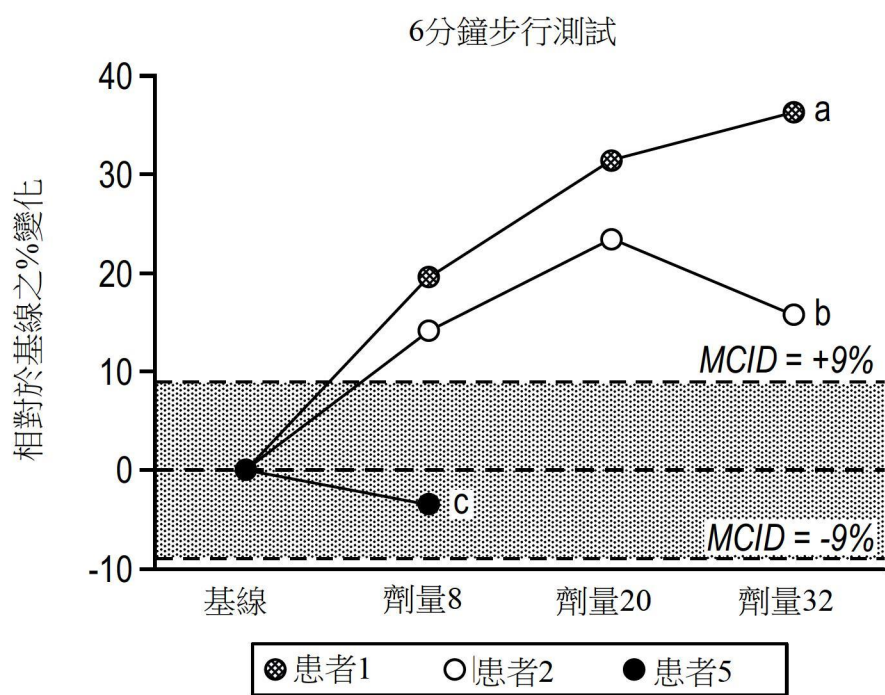
【圖 5A】

血漿胍基化合物減少，部分2重複劑量*

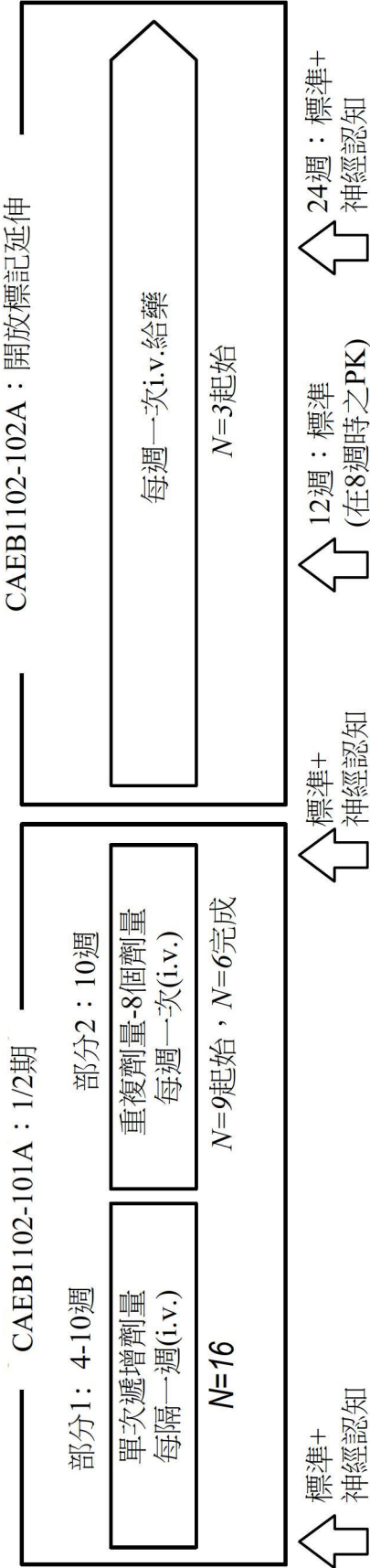


【圖5B】



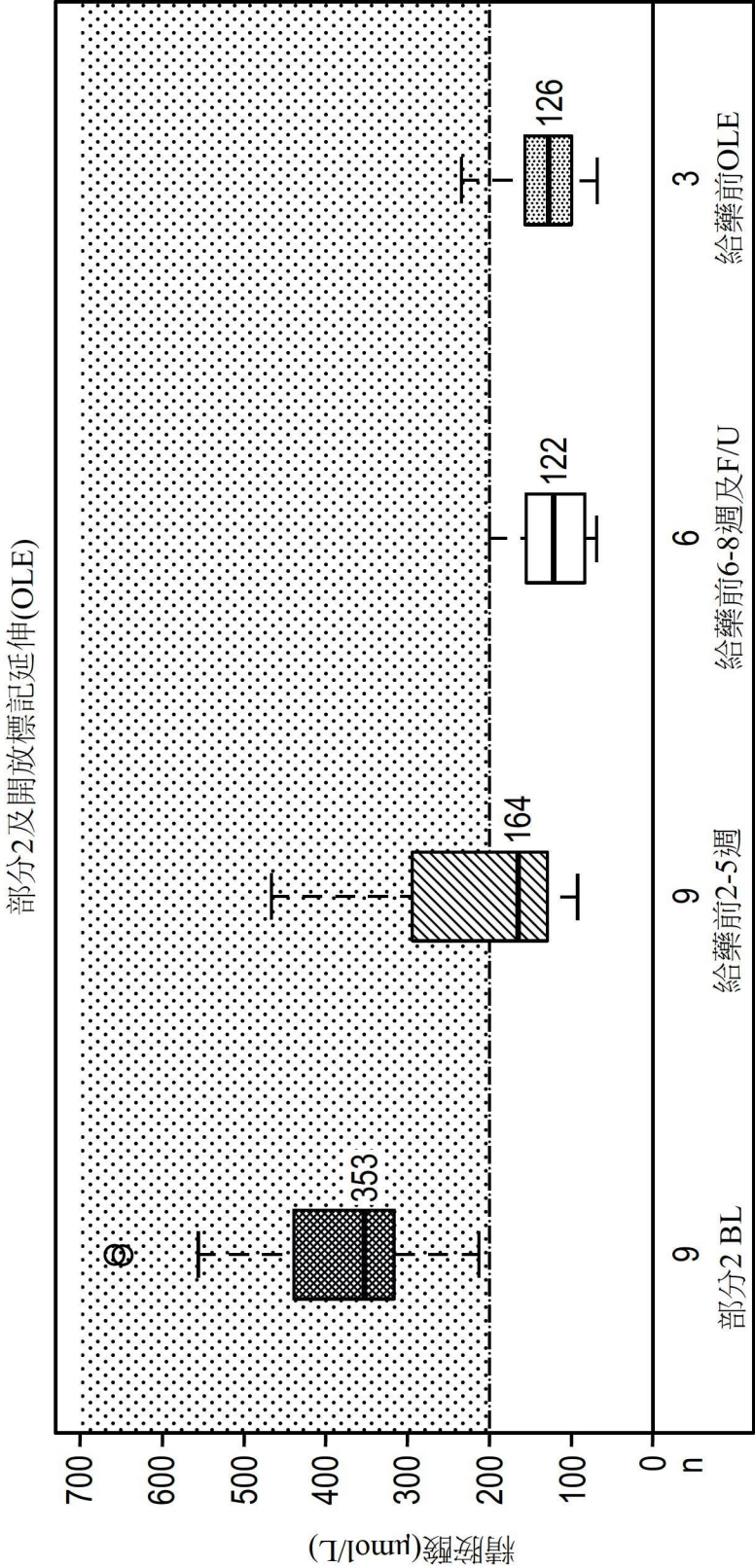


【圖6】

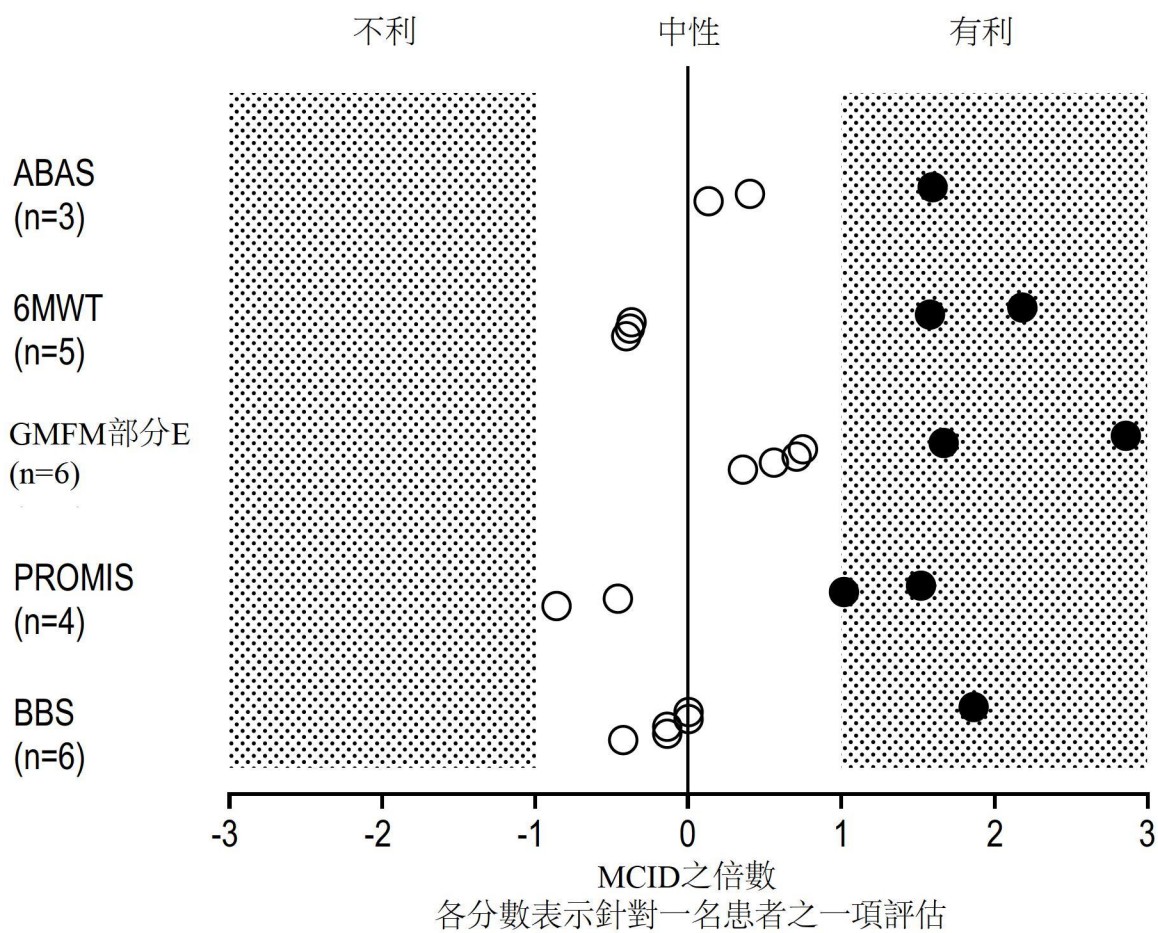


標準評估包括安全性、精胺酸、胍基化合物、神經運動(6MWT、BBS、GMFM-66)、PROMIS、適應行為(ABAS)及藥物動力學。部分1中之單次遞增劑量在0.015 mg/kg至0.20 mg/kg範圍內。部分2及開放標記延伸中之劑量基於血漿精胺酸控制。

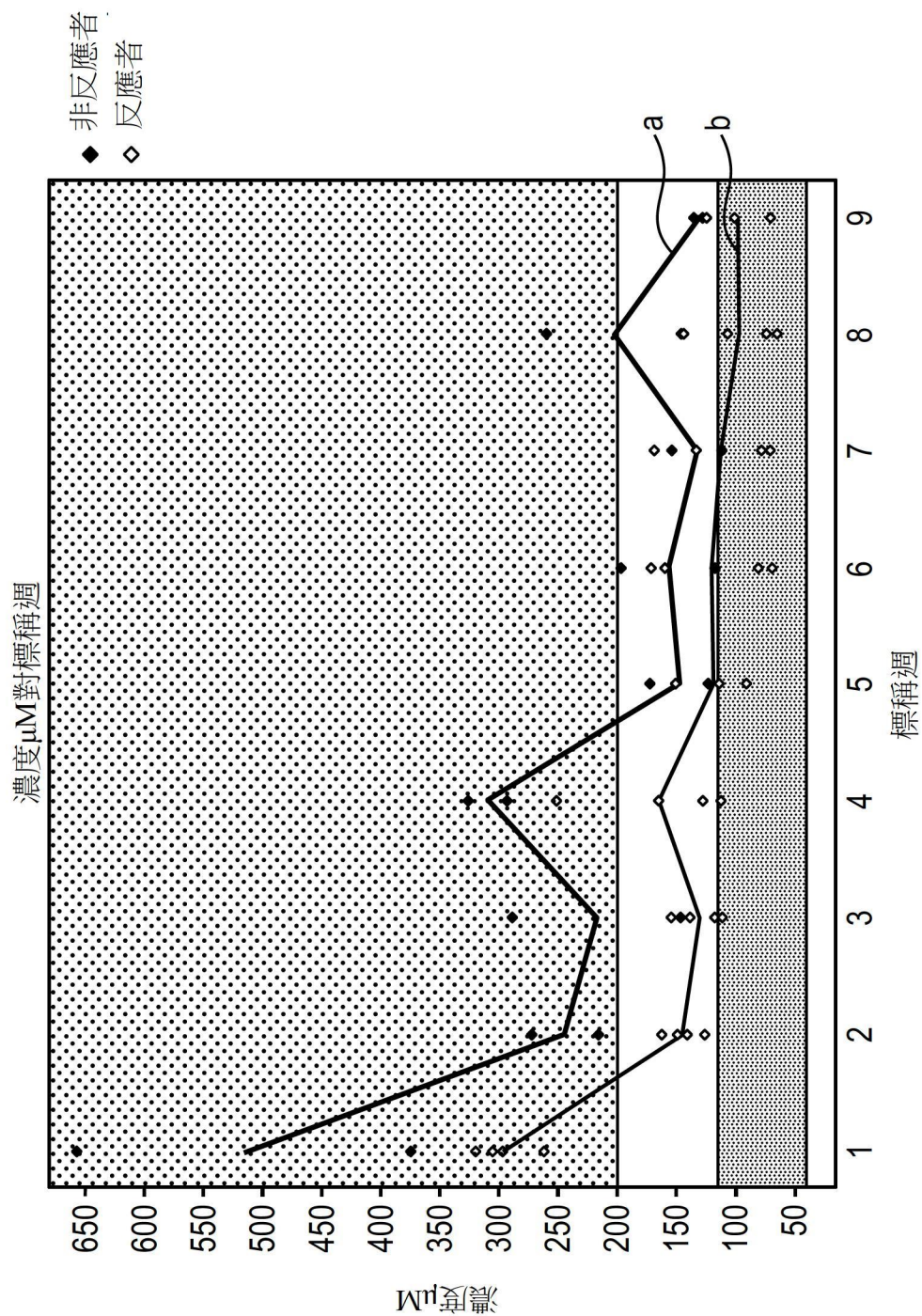
【圖7】



【圖8】



【圖9】



【圖10】