

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第6612316号
(P6612316)

(45) 発行日 令和1年11月27日(2019.11.27)

(24) 登録日 令和1年11月8日(2019.11.8)

(51) Int.Cl.

F 1

C 12 N 15/52	(2006.01)	C 12 N	15/52	Z N A Z
C 12 N 9/52	(2006.01)	C 12 N	9/52	
C 12 N 1/15	(2006.01)	C 12 N	1/15	
C 12 N 1/19	(2006.01)	C 12 N	1/19	
C 12 N 1/21	(2006.01)	C 12 N	1/21	

請求項の数 13 (全 67 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2017-501094 (P2017-501094)
 (86) (22) 出願日 平成27年3月18日 (2015.3.18)
 (65) 公表番号 特表2017-513516 (P2017-513516A)
 (43) 公表日 平成29年6月1日 (2017.6.1)
 (86) 國際出願番号 PCT/US2015/021189
 (87) 國際公開番号 WO2015/143006
 (87) 國際公開日 平成27年9月24日 (2015.9.24)
 審査請求日 平成30年3月16日 (2018.3.16)
 (31) 優先権主張番号 61/954,929
 (32) 優先日 平成26年3月18日 (2014.3.18)
 (33) 優先権主張国・地域又は機関
 米国(US)

(73) 特許権者 516278953
 ティーディーダブリュ グループ
 T D W G R O U P
 台湾 11492 タイペイ ネイフディ
 ストリクト ルイグアンロード ナンバー
 631 4階
 (74) 代理人 100107984
 弁理士 廣田 雅紀
 (74) 代理人 100102255
 弁理士 小澤 誠次
 (74) 代理人 100096482
 弁理士 東海 裕作
 (74) 代理人 100188352
 弁理士 松田 一弘

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】操作されたキメラPEG化ADI及び使用方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

第1微生物に由来するADIタンパク質の触媒ドメイン及び第2微生物に由来するADIタンパク質のヘリックスドメインを含む、組換えキメラアルギニンデイミナーゼ(ADI)であって、

前記第1微生物がM. gallinarumであり、前記第2微生物がM. columbinumであるか、

前記第1微生物がM. gallinarumであり、前記第2微生物がM. inersであるか、

前記第1微生物がM. columbinumであり、前記第2微生物がM. inersであるか、

前記第1微生物がM. inersであり、前記第2微生物がM. columbinumであるか、

前記第1微生物がM. columbinumであり、前記第2微生物がM. gallinarumであるか、又は

前記第1微生物がM. inersであり、前記第2微生物がM. gallinarumであり、

前記組換えキメラADIが、アルギニンデイミナーゼ活性を有する、前記組換えキメラアルギニンデイミナーゼ。

【請求項2】

10

20

組換えキメラ A D I が、ヘキサヒスチジンタグを有する、又は有しない配列番号：55、56、35、58、34若しくは59のいずれか1つに示すアミノ酸配列、又はそれと少なくとも98%の配列同一性を有するバリアントを含み、前記組換えキメラ A D I 又はバリアントが、アルギニンデイミナーゼ活性を有する、請求項1に記載の組換えキメラ A D I。

【請求項3】

少なくとも1つのリジン残基が、アミノ酸置換により修飾されている、又は、少なくとも5つ、少なくとも10、少なくとも15、若しくは少なくとも20のリジン残基が、アミノ酸置換により修飾されており、かつ、アルギニンデイミナーゼ活性を有する、請求項1に記載の組換えキメラ A D I。

10

【請求項4】

生体適合性リンカーにより、1又は2以上のポリエチレングリコール分子、又は1~10のポリエチレングリコール分子、又は5±3のPEG分子に結合する、請求項1~3のいずれかに記載の組換えキメラ A D I。

【請求項5】

ポリエチレングリコールが、1,000~40,000、又は10,000~30,000の総重量平均分子量を有する、請求項4に記載の組換えキメラ A D I。

【請求項6】

生体適合性リンカーが、スクシニル基、アミド基、イミド基、カルバメート基、エステル基、エポキシ基、カルボキシル基、ヒドロキシル基、炭水化物、チロシン基、システイン基、ヒスチジン基、メチレン基、又はこれらの組み合わせを含む、請求項4に記載の組換えキメラ A D I。

20

【請求項7】

スクシニル基の供給源が、スクシンイミジルスクシネートである、請求項6に記載の組換えキメラ A D I。

【請求項8】

請求項1~3のいずれかに記載の組換えキメラ A D Iをコードするポリヌクレオチド。

【請求項9】

請求項8に記載のポリヌクレオチドを含むベクター。

【請求項10】

30

請求項9に記載のベクターを含む単離宿主細胞。

【請求項11】

請求項1~7のいずれかに記載の組換えキメラ A D I及び生理学的に許容される担体を含む組成物。

【請求項12】

癌を処置する、その症状を改善させる、又はその進行を阻害するための薬剤の製造における、請求項11に記載の組成物の使用。

【請求項13】

癌が、黒色腫、脾臓癌、前立腺癌、小細胞肺癌、中皮腫、リンパ性白血病、慢性骨髓性白血病、リンパ腫、肝細胞癌、肉腫、白血病、急性骨髓性白血病、再発性急性骨髓性白血病、乳癌、卵巣癌、結腸直腸癌、胃癌、神経膠腫、多形性膠芽腫、非小細胞肺癌（NSCLC）、腎臓癌、膀胱癌、子宮癌、食道癌、脳癌、頭頸部癌、子宮頸癌、精巣癌、及び胃癌から成る群から選択される、請求項12に記載の使用。

40

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願の相互参照

本出願は、米国特許法第119条（e）の下で2014年3月18日に出願された米国特許出願第61/954,929号明細書に基づく優先権を主張し、その内容全体が参照によって組み込まれる。

50

【0002】

配列表に関する記載

本出願に関連する配列表は、紙コピーの代わりにテキスト形式で提供され、参照によって本明細書に組み込まれる。配列表を含有するテキストファイルの名称は、T D W G _ 0 0 2 _ 0 2 W O _ S T 2 5 . t x t である。テキストファイルは約 2 0 0 K B で、2 0 1 5 年 3 月 1 1 日に作成されたものであり、E F S - W e b により電子的に提出されている。

【背景技術】

【0003】

技術分野

本発明は一般に、操作された A D I 、特に抗原性を減少させるように操作された組換えキメラ A D I タンパク質に関する。このような操作されたキメラ A D I タンパク質は、癌などのアルギニン依存性疾患の処置に有用である。 10

【0004】

関連技術の記載

アミノ酸欠乏療法は、一部の癌型の効果的な処置であり得る。今日までに、このアプローチに関する既知の臨床例が 1 つ存在し、これはアスパラギナーゼを利用してアスパラギンの循環レベルを低下させ、タンパク質合成を阻害するものである。この処置は、急性リンパ芽球性白血病に特に効果的である (Avramis 2005, Viera Pinheiro 2004)。急性リンパ芽球性白血病細胞は、成長及び増殖のためにアミノ酸のアスパラギンを必要とする。対照的に、正常なヒト細胞の多くはアスパラギンを合成することができ、アスパラギン枯渇による影響を受けない。したがって、アスパラギナーゼで血清アスパラギンを減少させることにより、正常な細胞、組織、及び宿主を害することなく癌細胞を選択的に殺傷することができる。アスパラギナーゼの E . c o l i 由来形態は、ヒトへの使用が承認されている。しかしながら、アスパラギナーゼは微生物においてのみ見出され；ヒトでは免疫原性が高く、注射後の血清半減期も短い (Avramis 2005)。アスパラギナーゼをより効果的な薬物にするために、E . c o l i 由来のアスパラギナーゼを、ポリエチレングリコール (P E G) を用いて製剤化し、この酵素の免疫原性及び関連するアレルギー反応を減少させることにより、これらの欠点を最小限に抑えた。加えて、P E G はアスパラギナーゼの循環半減期を大幅に延長するので、処置頻度及び総治療費の両方を減少させる。P E G 製剤化アスパラギナーゼの使用は承認されており、O n c a s p a r (登録商標) の商標名で販売されている (Oncaspars (登録商標) 2011, Avramis 2005, Viera Pinheiro 2004, Fu 2007, Zeidan 2008)。 20

【0005】

アルギニンは、ヒト及びマウスの別の非必須アミノ酸である（概説については、R o g e r s 1994 を参照のこと）。ヒトでは、アルギニンは、シトルリンからクレブス（尿素）回路の酵素であるアルギニノコハク酸シンテターゼ (A S S 、 L - シトルリン : L - アスパラギン酸リガーゼ [A M P 形成] 、 E C 6 . 3 . 4 . 5) 及びアルギニノコハク酸リアーゼ (A S L 、 L - アルギニノコハク酸アルギニンリアーゼ、 E C 4 . 3 . 2 .) を介して 2 段階で合成され得る (Haines 2011, Wu 2009, Morris 2006, Husson 2003, Tapiero 2002, Rogers 1994)。A S S は、シトルリン及びアスパラギン酸のアルギニノコハク酸塩への変換を触媒し、次いで、これが A S L によりアルギニン及びフマル酸へと変換される。 40

【0006】

A D I - P E G 2 0 での処置は、ある期間にわたって複数回の用量を必要とする。多数回の処置後に、その継続的な効力を制限する場合もある抗 A D I - P E G 2 0 抗体が発生し得る。したがって、アルギニン枯渇療法の有効性を改善及び延長するように操作された A D I が、当該技術分野において必要である。

【0007】

参考文献：Oncaspars F D A L a b e l , R e v i s e d 7 , 2 0 0 6 ; 2 50

011年4月5日にFDAウェブサイトからダウンロードした；Avramis VI, Panosyan EH. 2005. Clin Pharmacokinet 44:367-393; Fu CH, Sakamoto KM. 2007. Expert Opin Pharmacother 8:1977-1984; Haines RJ, et al. 2011. Int J Biochem Mol Biol 2:8-23; Husson A, et al. 2003. Eur J Biochem 270:1887-1899; Morris SM Jr. 2006. Am J Clin Nutr 83(Suppl):598S-512S; Viera Pinheiro JP, Boos J. 2004. Br J Haematol 125:117-127; Wu G, et al. 2009. Amino Acids 37:153-168; Zeidan A, et al. 2008. Expert Opin Biol Ther 9:111-119; Rogers QR. Special Publication 86, Agriculture Experiment Station, University of Illinois, April 4-5, 1994:9-21; Tapiero H, Mathe G, Couvreur P, Tew KD (2002) I. Arginine. Biomed Pharmacother 56:439-445; Wheatley DN (2004) Anticancer Drugs 15(9):825-833; Feun LG, et al, British Journal of Cancer, 2012, 106, 1481-1485; Dillon BJ, et al, Cancer, 2004, 100(4), 826-33。 10 20

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0008】

【非特許文献1】Oncaspar FDA Label, Revised 7, 2006; 2011年4月5日にFDAウェブサイトからダウンロードした

【非特許文献2】Avramis VI, Panosyan EH. 2005. Clin Pharmacokinet 44:367-393

【非特許文献3】Fu CH, Sakamoto KM. 2007. Expert Opin Pharmacother 8:1977-1984

【非特許文献4】Haines RJ, et al. 2011. Int J Biochem Mol Biol 2:8-23 30

【非特許文献5】Husson A, et al. 2003. Eur J Biochem 270:1887-1899

【非特許文献6】Morris SM Jr. 2006. Am J Clin Nutr 83(Suppl):598S-512S

【非特許文献7】Viera Pinheiro JP, Boos J. 2004. Br J Haematol 125:117-127

【非特許文献8】Wu G, et al. 2009. Amino Acids 37:153-168

【非特許文献9】Zeidan A, et al. 2008. Expert Opin Biol Ther 9:111-119 40

【非特許文献10】Rogers QR. Special Publication 86, Agriculture Experiment Station, University of Illinois, April 4-5, 1994:9-21

【非特許文献11】Tapiero H, Mathe G, Couvreur P, Tew KD (2002) I. Arginine. Biomed Pharmacother 56:439-445

【非特許文献12】Wheatley DN (2004) Anticancer Drugs 15(9):825-833

【非特許文献13】Feun LG, et al, British Journal o 50

f Cancer, 2012, 106, 1481-1485

【非特許文献14】Dillon BJ, et al, Cancer, 2004, 100 (4), 826-33

【発明の概要】

【0009】

本発明の一態様は、第1微生物に由来するADIタンパク質の触媒ドメイン及び第2微生物に由来するADIタンパク質のヘリックスドメインを含む、組換えキメラアルギニンデイミナーゼ(ADI)を提供する。一実施形態では、第1微生物は、Mycoplasma属、Clostridium属、Bacillus属、Borrelia属、Enterococcus属、Streptococcus属、Lactobacillus属、及びGiardia属から選択される。さらなる実施形態では、第1微生物は、Mycoplasma pneumonia、Mycoplasma hominis、Mycoplasma arginini、Mycoplasma arthritidis、Streptococcus pyogenes、streptococcus pneumonia、Borrelia burgdorferi、Borrelia afzelii、Giardia intestinalis、Clostridium perfringens、Bacillus licheniformis、及びEnterococcus faecalisから成る群から選択される。さらに別の実施形態では、第1微生物は、M. arginini、M. arthritidis、M. hominis、Mycoplasma pneumonia、Mycoplasma phocicerebrale、Mycoplasma orale、Mycoplasma gateae、Mycoplasma phocidae、Mycoplasma columbinum、Mycoplasma iowae、Mycoplasma crocodyli、Mycoplasma fermentans、Mycoplasma gallinarum、Mycoplasma iners、Mycoplasma penetrans、Mycoplasma gallisepticum、Mycoplasma alligatoris、Mycoplasma mobile、及びMycoplasma capricolumから成る群から選択される。一実施形態では、第2微生物は場合により第1微生物とは異なり、Mycoplasma属、Clostridium属、Bacillus属、Borrelia属、Enterococcus属、Streptococcus属、Lactobacillus属、及びGiardia属から選択される。別の実施形態では、第2微生物は場合により第1微生物とは異なり、Mycoplasma pneumonia、Mycoplasma hominis、Mycoplasma arginini、Mycoplasma arthritidis、Streptococcus pyogenes、streptococcus pneumonia、Borrelia burgdorferi、Borrelia afzelii、Giardia intestinalis、Clostridium perfringens、Bacillus licheniformis、及びEnterococcus faecalisから成る群から選択される。さらに別の実施形態では、第2微生物は場合により第1微生物とは異なり、M. arginini、M. arthritidis、M. hominis、Mycoplasma pneumonia、Mycoplasma phocicerebrale、Mycoplasma orale、Mycoplasma gateae、Mycoplasma phocidae、Mycoplasma columbinum、Mycoplasma iowae、Mycoplasma crocodyli、Mycoplasma fermentans、Mycoplasma gallinarum、Mycoplasma iners、Mycoplasma penetrans、Mycoplasma gallisepticum、Mycoplasma alligatoris、Mycoplasma mobile、及びMycoplasma capricolumから成る群から選択される。

【0010】

一実施形態では、第1微生物は、*Mycoplasma gallinarum*、*Mycoplasma iners*、及び*Mycoplasma columbinum*から成る群から選択され、第2微生物は、*Mycoplasma gallinarum*、*Mycoplasma iners*、及び*Mycoplasma columbinum*から成る群から選択されて、第1及び第2微生物は場合により異なる微生物である。

【0011】

さらなる実施形態では、第1微生物は*M. arginini*であり、第2微生物は*M. arthritidis*であり、その他の特定の実施形態では、第1微生物は*M. arginini*であり、第2微生物は*M. hominis*である、または第1微生物は*M. arthritidis*であり、第2微生物は*M. arginini*である。ある種の実施形態では、第1微生物は*M. gateae*であり、第2微生物は*M. arthritidis*である。ある種の実施形態では、第1微生物は*M. gateae*であり、第2微生物は*M. columbinum*である。いくつかの実施形態では、第1微生物は*M. gateae*であり、第2微生物は*M. phocicerebrale*である。いくつかの実施形態では、第1微生物は*M. gateae*であり、第2微生物は*M. phocidae*である。特定の実施形態では、第1微生物は*M. phocicerebrale*であり、第2微生物は*M. arginini*である。ある種の実施形態では、第1微生物は*M. phocidae*であり、第2微生物は*M. arthritidis*である。ある種の実施形態では、第1微生物は*M. phocidae*であり、第2微生物は*M. columbinum*である。特定の実施形態では、第1微生物は*M. phocidae*であり、第2微生物は*M. gateae*である。いくつかの実施形態では、第1微生物は*M. gallinarum*であり、第2微生物は*M. columbinum*である。ある種の実施形態では、第1微生物は*M. gallinarum*であり、第2微生物は*M. iners*である。いくつかの実施形態では、第1微生物は*M. iners*であり、第2微生物は*M. gallinarum*である。

【0012】

例示的な組換えキメラADI分子は、配列番号：4～13もしくは22～59のいずれか1つに示すアミノ酸配列、または配列番号：4～13もしくは22～59のいずれかと少なくとも80%もしくは90%の配列同一性を有するそのバリエントを含む、それから成る、またはそれから本質的に成る。

【0013】

本明細書に記載される組換えキメラADIのある種の実施形態では、組換えキメラADIは、少なくとも1つのPEG化部位を除去するように修飾されている。本明細書に記載される組換えキメラADIの別の実施形態では、少なくとも1つのリジン残基が、アミノ酸置換により修飾されている。本明細書に記載される組換えキメラADIのある種の実施形態では、少なくとも5つのリジン残基がアミノ酸置換により修飾され、少なくとも10のリジン残基がアミノ酸置換により修飾され、少なくとも15のリジン残基がアミノ酸置換により修飾され、または少なくとも20のリジン残基がアミノ酸置換により修飾されている。本明細書に記載されるような例示的な組換えキメラADI分子は、配列番号：10～13のいずれか1つに示すアミノ酸配列を含む。

【0014】

本明細書に記載される組換えキメラADIの別の実施形態では、ADIは、生体適合性リ

10

20

30

40

50

ンカーによりポリエチレングリコールに共有結合する。この点に関して、アルギニンデミナーゼは、2つ以上のポリエチレングリコール分子に共有結合してよく、ある種の実施形態では、約1～約10のポリエチレングリコール分子に、特定の一実施形態では、5±3のPEG分子に共有結合してよい。本明細書に記載されるようなADIに共有結合するPEG分子は、直鎖または分岐鎖PEG分子であってよく、約1,000～約40,000の総重量平均分子量、一実施形態では、約10,000～約30,000の総重量平均分子量を有してよい。

【0015】

本明細書に記載される組換えキメラADIのある種の実施形態では、生体適合性リンカーは、スクシニル基、アミド基、イミド基、カルバメート基、エステル基、エポキシ基、カルボキシル基、ヒドロキシル基、炭水化物、チロシン基、システイン基、ヒスチジン基、メチレン基、またはこれらの任意の組み合わせを含む。一実施形態では、スクシニル基の供給源は、スクシンイミジルスクシネートである。

10

【0016】

本発明のその他の態様は、本明細書に記載される組換えキメラADIをコードするポリヌクレオチド、ポリヌクレオチドを含むベクター及びこのようなベクターを含む単離宿主細胞を提供する。

【0017】

プロモーター配列、終結配列、ポリアデニル化配列、エンハンサー配列、マーカー遺伝子及び適宜その他の配列を含む、適切な調節配列を含有する好適なベクターを選択または構築することができる。ベクターは、適宜プラスミド、ウイルスの、例えばファージ、またはファージミドであってよい。さらなる詳細については、例えば、Molecular Cloning: a Laboratory Manual: 2nd edition, Sambrook et al., 1989, Cold Spring Harbor Laboratory Pressを参照のこと。例えば、核酸構築物の調製における核酸の操作、DNAの突然変異誘発、配列決定、細胞への導入及び遺伝子発現、ならびにタンパク質分析のための多くの既知の技術及びプロトコールは、Current Protocols in Molecular Biology, Second Edition, Ausubel et al. eds., John Wiley & Sons, 1992、または以後のその最新版に詳述されている。

20

【0018】

当業者によって理解されるように、天然に存在しないコドンを有する、ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を作製することが、いくつかの場合において有利な場合がある。例えば、特定の原核生物宿主または真核生物宿主に好まれるコドンを選択して、タンパク質の発現率を増加させる、または天然に存在する配列から生じた転写産物の半減期よりも長い半減期などの、望ましい特性を有する組換えRNA転写産物を作製することができる。このようなポリヌクレオチドは、一般に「コドン最適化されている」と称される。本明細書に記載されるポリヌクレオチドのいずれかは、コドン最適化された形態で利用してよい。ある種の実施形態では、ポリヌクレオチドは、E. coliなどの特定の細菌またはS. cerevisiaeなどの酵母で使用するためにコドン最適化され得る（例えば、Burgess-Brown et al., Protein Expr Purif. 59: 94-102, 2008を参照のこと）。

30

【0019】

種々の異なる宿主細胞におけるタンパク質のクローニング及び発現のための系は、周知である。好適な宿主細胞としては、哺乳動物細胞、細菌、酵母、及びバキュロウイルス系が挙げられる。異種ポリペプチド発現のために当該技術分野で使用可能な哺乳動物細胞系としては、チャイニーズハムスター卵巣(CHO)細胞、HeLa細胞、ベビーハムスター腎臓細胞、HEK-293細胞、ヒト線維肉腫細胞系HT-1080（例えば、Moran, Nat. Biotechnol. 28: 1139-40, 2010を参照のこと）、NSOマウス黒色腫細胞及び多くのその他の細胞が挙げられる。有用な哺乳動物宿主細胞

40

50

系の追加の例としては、SV40により形質転換されたサル腎臓CV1系(COS-7、ATCC CRL1651)；ヒト胎児腎臓系(293細胞または懸濁培養での成長用にサブクローニングした293細胞、Graham et al., J. Gen. Virol. 1. 36: 59 (1977))；ベビーハムスター腎臓細胞(BHK、ATCC CCL10)；マウスセルトリ細胞(TM4、Mather, Biol. Reprod. 23: 243-251 (1980))；サル腎臓細胞(CV1 ATCC CCL70)；アフリカミドリザル腎臓細胞(VERO-76、ATCC CRL-1587)；ヒト子宮頸癌細胞(HELA、ATCC CCL2)；イヌ腎臓細胞(MDCK、ATCC CCL34)；バッファローラット肝臓細胞(BRL 3A、ATCC CRL1442)；ヒト肺細胞(W138、ATCC CCL75)；ヒト肝臓細胞(Hep G2、HB80 10 65)；マウス乳房腫瘍(MMT 060562、ATCC CCL51)；TR1細胞(Mather et al., Annals N. Y. Acad. Sci. 383: 44-68 (1982))；MRC5細胞；FS4細胞；及びヒト肝細胞癌系(Hep G2)が挙げられる。その他の有用な哺乳動物宿主細胞系としては、DHFR-CHO細胞を含むチャイニーズハムスター卵巣(CHO)細胞(Urlaub et al., PNAS USA 77: 4216 (1980))；ならびに骨髄腫細胞系、例えばNSO及びSp2/0などが挙げられる。ポリペプチド産生に好適なある種の哺乳動物宿主細胞系の概説については、例えば、Yazaki and Wu, Methods in Molecular Biology, Vol. 248 (B. K. C. Lo, ed., Humana Press, Totowa, N. J., 2003), pp. 255-268を参考のこと。ある種の好ましい哺乳動物細胞発現系としては、CHO細胞及びHEK293細胞に基づく発現系が挙げられる。哺乳動物発現系は、当該技術分野において既知の中でも、例えばT-フラスコ、ローラーボトル、もしくはセルファクトリー中の付着細胞系、または例えば1L及び5Lのスピナー、5L、14L、40L、100L及び200Lの攪拌タンクバイオリアクター、もしくは20/50L及び100/200LのWAVEバイオリアクター中の懸濁培養を利用することができる。

【0020】

一般的な細菌宿主は、*E. coli*である。*E. coli*などの原核細胞におけるタンパク質の発現は、当該技術分野で十分に確立されている。概説については、例えば、Pluckthun, A. Bio/Technology. 9: 545-551 (1991)を参考のこと。培養下の真核細胞における発現も、ポリペプチドの組換え産生の選択肢として当業者によって使用可能である(Ref, Curr. Opinion Biotech. 4: 573-576, 1993；及びTrill et al., Curr. Opinion Biotech. 6: 553-560, 1995を参考のこと)。特定の実施形態では、タンパク質発現は、T7RNAポリメラーゼにより制御され得る(例えば、pETベクターシリーズ)。これらの及び関連する実施形態では、発現宿主株BL21(DE3)、すなわちBL21のDE3溶原菌を利用する場合があり、これはT7媒介発現を支持し、標的タンパク質の安定性を改善するためにlonプロテアーゼ及びompTプロテアーゼを欠損している。また、*E. coli*ではほとんど使用されないtRNAをコードするプラスミドを含有する発現宿主株、例えばRosetta(商標)(DE3)及びRosetta2(DE3)株なども含まれる。細胞溶解及びサンプルの取り扱いも、試薬、例えばBenzonase(登録商標)ヌクレアーゼ及びBug Buster(登録商標)Protein Extraction Reagentなどを使用して改善され得る。細胞培養については、自動誘導培地により、ハイスループットな発現系を含む多くの発現系の効率を改善することができる。この種類の培地(例えば、Overnight Express(商標)Autoinduction System)は、IPTGなどの人工の誘導剤を添加することなく、代謝シフトによりタンパク質発現を徐々に誘発する。特定の実施形態では、ヘキサヒスチジンタグ(His-Tag(登録商標)融合など)、続く固定化金属アフィニティークロマトグラフィー(IMAC)精製、または関連する技術を用いる。しかしながら、ある種の態様では、臨床グレードのタンパク質を、アフ 20 40 50

イニティータグを使用して、または使用することなく *E. coli* 封入体から単離することができる（例えば、Shimp et al., Protein Expr Purif. 50: 58 - 67, 2006 を参照のこと）。さらなる例として、ある種の実施形態では、低温ショック誘導性 *E. coli* 高収率産生系を用いてよく、その理由とは、*Escherichia coli* における低温でのタンパク質の過剰発現が、それらの溶解度及び安定性を改善するからである（例えば、Qing et al., Nature Biotechnology. 22: 877 - 882, 2004 を参照のこと）。

【0021】

加えて、宿主細胞株は、挿入配列の発現を調節するその能力、または所望の様式で発現タンパク質をプロセシングするその能力によって選択されてよい。このようなポリペプチドの修飾としては、翻訳後修飾、例えばアセチル化、カルボキシル化、グリコシル化、リン酸化、脂質化、及びアシル化などが挙げられるが、これらに限定されない。「プレプロ」形態のタンパク質を切断する翻訳後プロセシングを使用して、正確な挿入、フォールディング及び／または機能を促進してもよい。細菌細胞に加えて、このような翻訳後活性のための特定の細胞機構及び特徴的な機序を有する、あるいはそれらを欠く様々な宿主細胞、例えば酵母、CHO、HeLa、MDCK、HEK293、及びW138などを選択して、関心対象のタンパク質の正確な修飾及びプロセシングを確実に行ってよい。

【0022】

長期間にわたる組換えタンパク質の高収率産生のためには、安定発現が一般に好ましい。例えば、関心対象のポリヌクレオチドを安定発現する細胞系は、ウイルスの複製起点及び／または内因性発現エレメントならびに選択マーカー遺伝子を、同じまたは別のベクター上に含有する場合がある発現ベクターを使用して形質転換してよい。ベクターの導入後、細胞を強化培地中で約1～2日間成長させてから、それらを選択培地に切り替えてよい。選択可能マーカーの目的は、選択に対して耐性を付与することであり、その存在により、導入配列の発現に成功している細胞の成長及び回収が可能となる。安定に形質転換された細胞の耐性クローニングは、細胞型に適した組織培養技術を使用して増殖させてよい。一過性トランスフェクションまたは感染などによる一過性の産生を用いることもできる。一過性の産生に好適な例示的哺乳動物発現系としては、HEK293及びCHOに基づく系が挙げられる。

【0023】

関心対象のポリヌクレオチド配列で形質転換した宿主細胞は、タンパク質の発現及び細胞培養からの回収に好適な条件下で培養してよい。ある種の特定の実施形態では、無血清細胞発現系を利用する。例としては、無血清培地で成長可能なHEK293細胞及びCHO細胞が挙げられる（例えば、Rosser et al., Protein Expr Purif. 40: 237 - 43, 2005；及び米国特許第U.S. 6,210,922号明細書を参照のこと）。

【0024】

組換え細胞により産生された1種以上のタンパク質を、当該技術分野において既知の様々な技術に従って精製し、特徴付けることができる。タンパク質精製の実施及びタンパク質純度の分析のための例示的なシステムとしては、高速タンパク質液体クロマトグラフィー（FPLC）（例えば、AKTA及びBio-Rad FPLCシステム）、高圧液体クロマトグラフィー（HPLC）（例えば、Beckman及びWaters HPLC）が挙げられる。精製のための例示的な化学現象としては、当該技術分野において既知のものの中でも、イオン交換クロマトグラフィー（例えば、Q、S）、サイズ排除クロマトグラフィー、塩勾配、アフィニティー精製（例えば、Ni、Co、FLAG、マルトース、グルタチオン、プロテインA/G）、ゲル濃過、逆相、セラミックHyperD（登録商標）イオン交換クロマトグラフィー、及び疎水性相互作用カラム（HIC）が挙げられる。分析方法、例えばSDS-PAGE（例えば、クーマシー染色、銀染色）、免疫プロット、Bradford法、及びELISAなども含まれ、これらは典型的に、タンパク質組成物の純度を測定するために、産生または精製工程の任意の段階において利用してよい

10

20

30

40

50

。

【 0 0 2 5 】

組換え産生タンパク質、例えばキメラ A D I タンパク質を濃縮する方法も含まれる。例としては凍結乾燥が挙げられ、これは典型的に、溶液が関心対象のタンパク質以外の可溶性成分をほとんど含有しない場合に用いられる。凍結乾燥は、多くの場合 H P L C 実行後に実施され、混合物から揮発性成分の大部分またはすべてを除去することができる。限外濾過技術も含まれ、この技術では典型的に、タンパク質溶液を濃縮するために 1 種以上の選択的透過膜を用いる。この膜は、水及び小分子を通過させてタンパク質を保持する；すなわち溶液を、その他の技術の中でも機械式ポンプ、ガス圧力、または遠心分離によって膜に押し付けることができる。

10

【 0 0 2 6 】

ある種の実施形態では、キメラ A D I タンパク質は、当該技術分野の日常的な技術に従って測定した場合、少なくとも約 9 0 % の純度を有する。ある種の実施形態、例えば診断用組成物またはある種の治療用組成物などでは、キメラ A D I タンパク質は、少なくとも約 9 5 % の純度を有する。特定の実施形態、例えば治療用組成物または医薬組成物などでは、キメラ A D I タンパク質は、少なくとも約 9 7 % または 9 8 % または 9 9 % の純度を有する。その他の実施形態、例えば参考試薬または研究試薬として使用される場合などでは、タンパク質は、より低純度であり得、少なくとも約 5 0 %、6 0 %、7 0 %、または 8 0 % の純度を有してよい。全体の純度、またはその他のタンパク質などの選択成分に対する純度、例えばタンパク質ベースの純度を測定することができる。

20

【 0 0 2 7 】

ある種の実施形態では、本明細書に記載される組成物は、ほぼ実質的にエンドトキシンフリーであり、例えば約 9 5 % エンドトキシンフリー、好ましくは約 9 9 % エンドトキシンフリー、より好ましくは約 9 9 . 9 9 % エンドトキシンフリーを含む。エンドトキシンの存在は、本明細書に記載されるような、当該技術分野の日常的な技術に従って検出され得る。特定の実施形態では、キメラ A D I タンパク質は、実質的に無血清の培地で真核細胞、例えば哺乳動物細胞またはヒト細胞などから作製される。

【 0 0 2 8 】

本発明の別の態様は、本明細書に記載される組換えキメラ A D I のうち 1 種以上及び生理学的に許容される担体を含む組成物を提供する。一実施形態では、組成物は、オートファジー調節剤をさらに含んでよい。オートファジー調節剤としては、クロロキン、3 - メチルアデニン、ヒドロキシクロロキン、バフィロマイシン A 1 、5 - アミノ - 4 - イミダゾールカルボキサミドリボシド (A I C A R) 、オカダ酸、N 6 - メルカブトプリンリボシド、ビンプラスチン、ワートマニン、ラバマイシン、エベロリムス、メトホルミン、ペリホシン、レスペラトロール、及びタモキシフェンが挙げられるが、これらに限定されない。別の実施形態では、本明細書に記載される組換えキメラ A D I を含む組成物は、化学療法剤、例えばこれらに限定されないが、ドセタキセル、カルボプラチニン、シクロホスファミド、ゲムシタビン、シスプラチニン、ソラフェニブ、スニチニブもしくはエベロリムス、またはこれらの組み合わせなどをさらに含んでよい。

30

【 0 0 2 9 】

本発明のさらに別の態様は、癌を処置する、その症状を改善させる、またはその進行を阻害する方法であって、それを必要とする患者に、本明細書に記載される組換えキメラ A D I のうち 1 種以上及び生理学的に許容される担体を含む治療有効量の組成物を投与し、それによって癌を処置する、その症状を改善させる、またはその進行を阻害することを含む方法を提供する。この点に関して、癌としては、黒色腫、膵臓癌、前立腺癌、小細胞肺癌、中皮腫、リンパ性白血病、慢性骨髓性白血病、リンパ腫、肝細胞癌、肉腫、白血病、急性骨髓性白血病、再発性急性骨髓性白血病、乳癌、卵巣癌、結腸直腸癌、胃の癌、神経膠腫、多形性膠芽腫、非小細胞肺癌 (N S C L C) 、腎臓癌、膀胱癌、子宮癌、食道癌、脳癌、頭頸部癌、子宮頸癌、精巣癌、及び胃癌を挙げることができるが、これらに限定されない。

40

50

【0030】

配列の簡単な説明

配列番号：1は、野生型*M. hominis*のADIのアミノ酸配列である。

【0031】

配列番号：2は、野生型*M. arginini*のADIのアミノ酸配列である。

【0032】

配列番号：3は、野生型*M. arthritidis*のADIのアミノ酸配列である。

【0033】

配列番号：4は、DS1組換えキメラADIタンパク質のアミノ酸配列である。

【0034】

配列番号：5は、DS2組換えキメラADIタンパク質のアミノ酸配列である。

10

【0035】

配列番号：6は、DS3組換えキメラADIタンパク質のアミノ酸配列である。

【0036】

配列番号：7は、DS4組換えキメラADIタンパク質のアミノ酸配列である。

【0037】

配列番号：8は、*M. hominis Phoenix*（配列番号：14を参照のこと；加えてリジン置換）（触媒ドメイン）及び*M. arginini*（ヘリックスドメイン）に由来する組換えキメラADIのアミノ酸配列である。

【0038】

配列番号：9は、*M. hominis Phoenix*（配列番号：14を参照のこと）（触媒ドメイン）及び*M. arthritidis*（ヘリックスドメイン）に由来する組換えキメラADIのアミノ酸配列である。

20

【0039】

配列番号：10は、組換えキメラADIタンパク質のDS1-1リジン減少変異体のアミノ酸配列である（表E3を参照のこと）。

【0040】

配列番号：11は、組換えキメラADIタンパク質のDS1-2リジン減少変異体のアミノ酸配列である（表E3を参照のこと）。

【0041】

配列番号：12は、組換えキメラADIタンパク質のDS1-3リジン減少変異体のアミノ酸配列である（表E3を参照のこと）。

30

【0042】

配列番号：13は、組換えキメラADIタンパク質のDS1-4リジン減少変異体のアミノ酸配列である（表E3を参照のこと）。

【0043】

配列番号：14は、ADI *Phoenix*配列のアミノ酸配列である。このADI配列は、K112E及びP210S置換を除いて、*M. hominis*のADIと同一である。

【0044】

40

配列番号：15は、*M. alligatoris*のADIのアミノ酸配列である。

【0045】

配列番号：16は、*M. columbium*のADIのアミノ酸配列である。

【0046】

配列番号：17は、*M. gallinarum*のADIのアミノ酸配列である。

【0047】

配列番号：18は、*M. gatea*のADIのアミノ酸配列である。

【0048】

配列番号：19は、*M. iners*のADIのアミノ酸配列である。

【0049】

50

配列番号：20は、*M. phocicerabrale*のADIのアミノ酸配列である。

【0050】

配列番号：21は、*M. phocidae*のADIのアミノ酸配列である。

【0051】

配列番号：22～59は、キメラADIタンパク質のアミノ酸配列である。

【発明を実施するための形態】

【0052】

本発明は一般に、キメラADIタンパク質、例えば対応する野生型ADI分子と比較して、減少した抗原性を有するように操作されたキメラADIタンパク質に関する。本発明はまた、癌及びその他の障害を、キメラADI、特にキメラADI-PEG20で処置する方法にも関する。

10

【0053】

正常な細胞は、ASS及びASLにより触媒される2段階工程でシトルリンからアルギニンを合成することができるので、成長のためにアルギニンを必要としない。対照的に、ある種の癌はASSを発現しない。ある種の癌はASLを発現せず、その他の癌は、ASS及び/またはASLの発現が減少している場合がある、またはそれらを発現しない場合がある。したがって、これらの癌はアルギニンに対して栄養要求性である。この代謝の違いを、これらの癌型を処置する安全かつ効果的な療法を開発するために活用してよい。ADIは、アルギニンジヒドロラーゼ経路を介してアルギニンからシトルリンへの変換を触媒し、それゆえアルギニンを排除するために使用してよい。

20

【0054】

本発明の実施には、特にそれとは反対の具体的な指示がない限り、当業者の技能範囲内のウイルス学、免疫学、微生物学、分子生物学及び組換えDNA技術の従来方法を用い、その多くが例証の目的で以下に記載される。このような技術は、文献内で十分に説明される。例えば、*Current Protocols in Protein Science*, *Current Protocols in Molecular Biology* or *Current Protocols in Immunology*, John Wiley & Sons, New York, N.Y. (2009); Ausubel et al., *Short Protocols in Molecular Biology*, 3rd ed., Wiley & Sons, 1995; Sambrook and Russell, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (3rd Edition, 2001); Maniatis et al. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (1982); *DNA Cloning: A Practical Approach*, vol. I & II (D. Glover, ed.); *Oligonucleotide Synthesis* (N. Gait, ed., 1984); *Nucleic Acid Hybridization* (B. Hames & S. Higgins, eds., 1985); *Transcription and Translation* (B. Hames & S. Higgins, eds., 1984); *Animal Cell Culture* (R. Freshney, ed., 1986); *Perbal, A Practical Guide to Molecular Cloning* (1984)及びその他の同様の参考文献を参照のこと。

30

【0055】

本明細書及び添付の特許請求の範囲において使用される場合、単数形「a」、「an」及び「the」は、その内容に別段の明確な指示がない限り、複数の指示対象を含む。

【0056】

本明細書の全体を通して、文脈から別の意味に解釈すべき場合を除き、単語「comprise」、または「comprises」もしくは「comprising」などの変化形は、記述される要素もしくは整数、または要素もしくは整数の群を包含することを示唆するが、その他のあらゆる要素もしくは整数、または要素もしくは整数の群を除外するこ

40

50

とは示唆しないと理解されるだろう。

【0057】

「約」とは、参照する分量、レベル、値、数、頻度、パーセンテージ、寸法、サイズ、量、重量または長さに対して、30、25、20、15、10、9、8、7、6、5、4、3、2または1%も変動する分量、レベル、値、数、頻度、パーセンテージ、寸法、サイズ、量、重量または長さを意味する。

【0058】

「統計的に有意」とは、結果が偶然に生じたという可能性が低かったことを意味する。統計的有意性は、当該技術分野において既知の任意の方法により決定され得る。一般に使用される有意性の尺度としてはp値が挙げられ、これは帰無仮説が真実であった場合に、観察された事象が生じるであろう頻度または確率である。得られたp値が有意水準よりも小さい場合は、帰無仮説が棄却される。単純な場合では、有意水準は、0.05以下のp値で定義される。

【0059】

本明細書における各実施形態は、別段の明確な記述がない限り、その他のあらゆる実施形態に準用されるものとする。

【0060】

標準的な技術を、組換えDNA、オリゴヌクレオチド合成、ならびに組織培養及び形質転換（例えば、エレクトロポレーション法、リポフェクション法）のために使用してよい。酵素反応及び精製技術は、製造業者の仕様書に従って、または当該技術分野で一般に行われるよう、または本明細書に記載されるように実施してよい。これらの及び関連する技術及び手順は一般に、当該技術分野において周知の従来方法に従って、ならびに本明細書の全体を通して引用及び議論される様々な一般的及びより具体的な参考文献に記載されるように実施してよい。特定の定義が提供されていない限り、本明細書に記載される分子生物学、分析化学、合成有機化学、ならびに医薬品化学及び薬化学に関連して利用される専門用語、ならびにそれらの実験室手順及び技術は、当該技術分野において周知であり、一般に使用されているものである。標準的な技術を、組換え技術、分子生物学的、微生物学的、化学的な合成、化学分析、医薬調製、製剤化、及び送達、ならびに患者の処置に使用してよい。

【0061】

「患者」は動物を指し、ある種の実施形態では哺乳動物を指し、特定の実施形態ではヒトを指す。

【0062】

「生体適合性」は、生物学的機能に対して一般に有害ではなく、アレルギー状態及び疾患状態を含む許容できない毒性度合いを一切もたらさないだろう、材料または化合物を指す。

【0063】

「参照配列」という用語は一般に、別の配列と比較している、核酸をコードする配列、またはアミノ酸配列を指す。本明細書に記載されるすべてのポリペプチド及びポリヌクレオチド配列が参照配列として含まれ、名称が記載されているもの、ならびに表及び配列表に記載されているものを含む。

【0064】

本開示の全体を通して、以下の略語を使用してよい：PEG、ポリエチレングリコール；ADI、アルギニンデイミナーゼ；SS、スクシンイミジルスクシネット；SSA、スクシンイミジルスクシンイミド；SPA、スクシンイミジルプロピオネット；NHS、N-ヒドロキシ-スクシンイミド；ASS1またはASS、アルギニノコハク酸シンテーゼ；ASL、アルギニノコハク酸リアーゼ。

【0065】

ある種の実施形態では、本明細書に記載されるようなキメラADI酵素は、M. hominisに由来するベンチマークADI-PEG20分子と比較される。本明細書で使用す

10

20

30

40

50

る場合、「ADI-PEG20」は、当該技術分野において既知のADI分子を指し、例えば、US6183738; US6635462; Ascierito PA, et al. (2005) PEGylated arginine deiminase treatment of patients with metastatic melanoma: results from phase I and II studies. J Clin Oncol 23(30):7660-7668; Izzo F, et al. (2004) PEGylated arginine deiminase treatment of patients with unresectable hepatocellular carcinoma: results from phase I/II studies. J Clin Oncol 22(10):1815-1822; Holtsberg FW, et al. (2002), Poly(ethylene glycol) (PEG) conjugated arginine deiminase: effects of PEG formulations on its pharmacological properties. J Control Release 80(1-3):259-271; Kelly et al., (2012) British Journal of Cancer 106, 324-332に記載されている。当業者によって認識されるように、この分子は、*M. hominis*に由来するPEG化(PEG20,000)ADI酵素であり、野生型*M. hominis*のADI酵素と比較して2つの置換(K112E; P210S)を有する。

【0066】

「ポリペプチド」、「タンパク質」及び「ペプチド」ならびに「酵素」という用語は、同じ意味で使用され、特定の長さに一切限定されないアミノ酸のポリマーを意味する。この用語は、修飾、例えばシグナル配列のミリストイル化、硫酸化、グリコシリ化、リン酸化及び付加または欠失などを除外しない。「ポリペプチド」もしくは「タンパク質」または「酵素」という用語は、アミノ酸の1つ以上の鎖を意味し、各鎖は、ペプチド結合により共有結合しているアミノ酸を含み、ポリペプチドまたはタンパク質は、ペプチド結合により互いに非共有結合及び/または共有結合している複数の鎖であって、天然タンパク質、すなわち天然に存在する、特に非組換え細胞により產生されたタンパク質の配列、または遺伝子操作された細胞もしくは組換え細胞により產生されたタンパク質の配列を有する鎖を含み、天然タンパク質のアミノ酸配列を有する分子、または天然配列の1つ以上のアミノ酸からの欠失、アミノ酸への付加、及び/もしくはアミノ酸の置換を有する分子を含むことができる。「ポリペプチド」及び「タンパク質」という用語は、本開示のキメラADI酵素、またはキメラADI酵素の1つ以上のアミノ酸からの欠失、アミノ酸への付加、及び/もしくはアミノ酸の置換を有する配列を特に包含する。ある種の実施形態では、ポリペプチドは、1つ以上の組換えDNA分子を含む組換え細胞により产生される「組換え」ポリペプチドであり、このDNA分子は典型的に、異種ポリヌクレオチド配列またはさもなければ細胞で見られることのないポリヌクレオチド配列の組み合わせから作製される。

【0067】

本明細書で言及される「単離タンパク質」という用語は、本タンパク質が、(1)典型的には天然に見られるだろう少なくともいくつかのその他のタンパク質を含まないこと、(2)同じ供給源から、例えば同種からのその他のタンパク質を本質的に含まないこと、(3)異なる種の細胞で発現すること、(4)天然で関連するポリヌクレオチド、脂質、炭水化物、またはその他の材料の少なくとも約50パーセントから分離されていること、(5)「単離タンパク質」が天然で関連するタンパク質の一部と(共有または非共有結合性相互作用によって)関連しないこと、(6)天然で関連しないポリペプチドと(共有または非共有結合性相互作用によって)機能的に関連すること、または(7)天然に存在しないことを意味する。このような単離タンパク質は、合成起源であってよいゲノムDNA、cDNA、mRNAもしくはその他のRNA、またはこれらの任意の組み合わせによりコードされ得る。ある種の実施形態では、単離タンパク質は、その使用(治療用、診断用、

予防用、研究用または別の用途)に干渉するだろう、その天然の環境に見られるタンパク質もしくはポリペプチドまたはその他の混入物を実質的に含まない。

【0068】

本発明では、キメラADIまたはキメラADIをコードするポリヌクレオチドは、例えば、微生物を含む任意の供給源、組換えバイオテクノロジーまたはこれらの任意の組み合わせから誘導、クローニングまたは產生されてよい。例えば、アルギニンデイミナーゼは、*Mycoplasma*属、*Clostridium*属、*Bacillus*属、*Borreli*a属、*Enterococcus*属、*Streptococcus*属、*Lactobacillus*属、*Giardia*属の微生物からクローニングされてよい。ある種の実施形態では、アルギニンデイミナーゼは、*Mycoplasma pneumoniae* 10、*Mycoplasma hominis*、*Mycoplasma arginini*、*Mycoplasma arthritidis*、*Mycoplasma phocicerebrale*、*Mycoplasma orale*、*Mycoplasma gaterae*、*Mycoplasma phocidae*、*Mycoplasma columbinum*、*Mycoplasma iowae*、*Mycoplasma crocodyl* i、*Mycoplasma fermentans*、*Mycoplasma penetrans*、*Mycoplasma gallisepticum*、*Mycoplasma gallinarum*、*Mycoplasma iners*、*Mycoplasma alligatoris*、*Mycoplasma mobile*、及び*Mycoplasma capricolum*、*Streptococcus pyogenes*、*Streptococcus pneumoniae*、*Borreli*a *burgdorferi*、*Borreli*a *afzelii*、*Giardia intestinalis*、*Clostridium perfringens*、*Bacillus licheniformis*、*Enterococcus faecalis*、*Lactobacillus sake*、またはこれらの任意の組み合わせからクローニングされる。これらのアルギニンデイミナーゼのいくつかのアミノ酸配列を、以下の表A1に提供する。

【0069】

【表1】

表A1. キメラADIクローニングのための例示的なADI配列		
供給源	配列	配列番号:
M. hominis	MSVFDKFNGIHVYSEIGELETVLVHEPGREIDYITPARLDELLFSAIL ESHDARKEHQSFVKIMKDRGINVVELDLVAETYDLASKAAKEEFIGETF LEETVPVLTEANKEAVRAFLLSKPTHEMVFMSGITKYELGVESENEL IVDPMPNLYFTRDPFASVNGVTIHFMRYIVRRRETLFARFVFRNHPKL VKTPWYYDPAMKMSIEGGDVFIFYNNETLUVGVSERTDLLTITLLAKNI ANKEVEFKRIVAINVPKWTNLMHLDWTLMKDKNKFLYSPIANDVFKFW DYDLVNGGAEPQPQLNGLPLDKLLASIINKPVLIPIGGAGATEMEIAR ETNFDGTYLAIKPGLVIGYDRNEKTNAAALKAAAGITVLPFHGNQLSLGM GNARCMMSPLSRKDVKW	1
M. arginini	MSVFDKFKGIHVYSEIGELESVLVHEPGREIDYITPARLDELLFSAIL ESHDARKEHKQFVAELKANDINVVELIDLVAETYDLASQEAKDKLIEEF LEDSEPVLSSEEHKVVVRNFLKAKKTSRELVEIMMAGITKYDLGIEADHE LIVDPMPNLYFTRDPFASVNGVTIHFMRYKVRQRETLFSRFVFSNHPK LINTPWYYDPSLCLSIEGGDVFIFYNNETLUVGVSERTDLQTVTLLAKNI VANKESEFKRIVAINVPKWTNLMHLDWTLMKDKNKFLYSPIANDVFKF WDYDLVNGGAEPQPVENGLPLEGLLQSIINKPVLIPAGEGASQMEIE RETHFDGTYLAIRPGVIVGYSRNEKTNAALEAAGIKVLPFHGNQLSLG MGNARCMMSPLSRKDVKW	2
M. arthritidis	msvfdskfkighvyseigeletvlvhepgkeidyitparldellfsail eshdarkehkefvaelkkrginvvelvdilivetydlaskeakekllieef 1ddsvpvldehratvkkflqsqkstrslveymiagitkhdlkiesdle livdpmpnlyftrdpfasvngvtihymrykvrqretdlfsrfvsnhpk 1vntpwydpaegltieggdsvfifynnetlvgvsertdlqtitllakni kankesefkrivainvpkwtlmlhldtwltmldkdkflyspiandvfkf wdydlvngdapqpvdn1pledllksiigkkptlipiagagasqidie rethfdgtnylavapgivigyarnektnaaaleaagitvlpfrgnqlslg mgnarcmmsplsrkdvkw	3
M. alligatoris	MSKINVYSEVGRLKEVLVHTPGDEIRRISPTRLEELLFSAILPDTAIE EHKRFVLNVLEKNGIKAIQLDELVAQTYDQVDQKIKDEFIDQWLQEAKPV LNDQLKKLVKNYLLKSQKEFSTKKMVRIMMAGIDKKEINIDLDRDLVVD PMPNLYFTRDPFASVNGGISLHNMKYQTRKRETIFAQFIFKYNKDYKTT PHWFDRFDHGSIEGGDVFVYTKDTLVIGISERTTKEAVLNIAKKIKANT DSKFKKIVAINVPPMPNLMHLDWTITMDHDKFLYSPNMMKSLFWLID LSKEIKMVELEESLSNMLEAIIGKKPILIPIAKGKNASQLDIDIETHFDG TNYLTIAPIGVVVGYSRNKLTQKALEDAGVKVLSFDGNQLSLGMGSARCM SMPLVREDIK	15

10

20

30

40

<i>M. colombinum</i>	MSKINVYSEIGELKEVLVHTPGDEIRRISSRLDELLFSAILEPNEAIK EHKGFLKILQDKGIKVIQLSDLVAETYTYHATQKEREAFIEKWLDEAEP ALTKDLRAKVKSYVLSKEGTPVAMVRTMMAGVSKQELNVESETELVVDP MPNLYFTRDPFASAGNGISLNNMKYVTRKRETIFAEFIFATHPDYKTP HWFDRLDEGNIEGGDVFIYNKDTLIVGVSETRNKEAIIKIACKKNNKE AKFKKIVAINVPPMPNLMHLDTWLTMVDKDKFLYSPNMLSVLKWEIDL SKEIEMVETNKPLADVLESIIGVKPVLIPAGKGATQLDIDIETHFDGT NYLTIAPGVVVGYSRNIKTEAALRAAGVTVLSFEGNQLSLGMGSARCMS MPLVREDVK	16	10
<i>M. gallinarum</i>	MSKIRVYSEIGNLKKVLVHTPGDEIRRISSRLLELLFSAVLEPNAIAE EHKRFVLKLEDRGIQAIQLSDLVAETYVKYATAEQKAAFIEKYLDEATP ALSAENRERAKKYILSLEMQPVKMIRTMMAGLSKYELNVESNIELIIDP MPNLYFTRDPFASAGNGISLNNMKYVVRKRETIFAEFIFAIHPEYKTP HWFDRLDHGSIEGGDVFVYNKDTLIVGVSETRNKEAIIKIACKHQDNKE AEFKKIVAINVPPMPNLMHLDTWLTMVDKKNFIIYSPNMLSVLKWEIDL AKPIEMVESNKSLETEVLESIIGEKPLIPIAGEGEGASQLDIDIETHFDGT NYLTIAPGVVVGYSRNEKTEKALKAAGITVLSFEGNQLSLGMGSARCMS MPLVREDVK	17	20
<i>M. gatea</i>	MSVFDKFNGIHVYSEIGELESVLVHEPGREIDYITPARLDELLFSAIL ESHDARKEHKLVSELKANDINVVELDLVTETYDLASQEAKDNLIEEF LEDSEPVLTEELKSVVRTYLKSIKSTRELIQMMAGITKYDLGIEADHE LIVDPMPNLYFTRDPFASVGNVTIHYMRVKVRQRETLFSRFVFSNHPK LVNTPWYYDPSLCLSIEGGDVFIYNNTLVGVSETRDLETVTLLAKNI VANKECEFKRIVAINVPKWTNLHMHLDTWLTMVDKDKFLYSPIANDFKF WDYDLVNGGEQPQPVENGLPLEGLLESIINKPILIPAGKGATQLDIDIETHFDGT RETHFDGTNYLAIRPGVVIIGYSRNEKTNAALEAAGIKVLPFHGNQLSLG MGNARCMMSPLSRKDVK	18	30
<i>M. iners</i>	MSKINVYSEIGVLKEVLVHTPGDEIRRIAPSRLDELLFSAILEPSAAIQ EHKSFLKILQDRGIKTIQLSDLVAETYKHYASEAEKEAFIEKYLDEATP VLSKDMRAKVKNYILSMQGEPVKMVRTMMAGVSKQELNVESEVELIVDP MPNLYFTRDPFASAGNGISLNNMKYVVRKRETIFAEFIFSIHPEYKTP HWFDRLDNGSIEGGDVFIYNKDTLIVGVSETRNKEAIIKIACKHQDNKE AQFKKIVAINVPPMPNLMHLDTWLTMVDKKNFIIYSPNMLSVLKWEIDL SKPIEMVETNKPLAEVLESIIGEKPLIPIAGKGATQLDIDIETHFDGT NYLTIAPGVVVGYSRNVKTEAALRAAGVTVLSFEGNQLSLGMGSARCMS MPLVREDVK	19	
<i>M. phociceralbre</i>	MSVFDKFNGIHVYSEIGELETVLVHEPGREIDYITPARLDELLFSAIL ESHDARKEHQSFVKQLKDNGINVVELDLVAETFDLASKEEKEKLIIEEF LEDSEPVLEAHKTAVRKFLTSRKSTREMVEFMMAGITKYDLGIEADHE LIVDPMPNLYFTRDPFASVGNVTIHYMRVKVRQRETLFSRFVFSNHPK LVKTPWYYDPMKMSIEGGDVFIYNNTLVGVSETRDLETITLLAKNI KANKEVEFKRIVAINVPKWTNLHMHLDTWLTMVDKDKFLYSPIANDFKF	20	40

	WDYDLVNGGAEPQPKENGLPLEGLLQSIINKPVLIPIAGNNASHIDIE RETHFDGTYLAIKPGVIGYARNEKTNAALAAAGIKVLPFHGNQLSLG MGNARCMMSMPLSRKDVKW	
M. phocidae	MSVFDSKFNGIHVYSEIGELQTVLVHEPGREIEYITPARLDELLSAIL ESHDARKEHQEFVAELKNNINVVELTDLVSETYDMVSKEKQEKLIEEF LEDSEPVLEEHKGLVRKFLKSLKSSKELIQYMMAGITKHDNLIEADHE LIVDPMPNLYFTRDPFASVGNVTIHMYRKYVRQRETLFSRFIFANHPK LMNTPLYYNPDMKLSIEGGDVFVYNNETLVVGVSERTDLDTITLLAKNI KANKEREFKRIVAINVPKWTNLMHLDTWLTMLDKDKFLYSPANDVFKF WDYDLVNGGDEPQPKVNGLPLEKLLESIINKPILIPAGTSASNIDVE RETHFDGTYLAIAPGVIGYSRNVKTNEALEAAGIKVLPFKGNQLSLG MGNARCMMSMPLSRKDVKW	21

10

【0070】

したがって、いくつかの実施形態では、キメラ A D I で使用される A D I は、表 A 1 からのアミノ酸配列（配列番号：1～3 または 15～21 のいずれか 1 つ）、もしくは A D I 活性（例えば、アルギニンをシトルリン及びアンモニアに代謝できる）を有するそのバリエントもしくは A D I 活性を有するその断片、または A D I 活性を有するその操作されたキメラを含んでよい。

20

【0071】

例示的なキメラ A D I の配列を、以下の表 A 2 に提供する。

【0072】

【表2】

表A2. キメラADI		
名称	配列	配列番号:
DS1	MSVFDSKFKGIHVYSEIGELESLVHEPGREIDYITPARLDELLSAILESHDAR KEHKQFVAELKANDINVVELVDLIVETYDLASKEAKEKLLEFLDDSVPLSDEH RATVKKFLQSQKSTRSLVEYMIAGITKHDLKIESDLELIVDPMPNLYFTRDPFAS VGNGVTIHYMRYKVRQRETLFSRFVFSNHPKLINTPWYDPSLKLISIEGGDVFY NNDTLVVGVSERTDLQTVTLLAKNIVANKESEFKRIVAINVPKWTNLMHLDTWLT MLDKDKFLYSPIANDVFKFWDYDLVNGGAEPQPVENGLPLEGLLQSIINKPVLI PIAGEGASQMEIERETHFDGTYLAIRPGVIVGYSRNEKTNAALEAAGIKVLPFH GNQLSLGMGNARCMSPSRKDVKW	4 10
DS2	MSVFDSKFKGIHVYSEIGELESLVHEPGREIDYITPARLDELLSAILESHDAR KEHKQFVAELKANDINVVELTDLVAETYDLASRAAKEFIELTFLEETVPVLTEAN REAVRAFLLSKPTHEMVEFMSGITKYELGVESENELIVDPMPNLYFTRDPFASV GNGVTIHYMRYKVRQRETLFSRFVFSNHPKLINTPWYDPSLKLISIEGGDVFY NNDTLVVGVSERTDLQTVTLLAKNIVANKESEFKRIVAINVPKWTNLMHLDTWLT LDKDKFLYSPIANDVFKFWDYDLVNGGAEPQPVENGLPLEGLLQSIINKPVLI IAGEGASQMEIERETHFDGTYLAIRPGVIVGYSRNEKTNAALEAAGIKVLPFH NQLSLGMGNARCMSPSRKDVKW	5 20
DS3	MSVFDSKFKGIHVYSEIGELETVLVHEPGKEIDYITPARLDELLSAILESHDAR KEHKEFVAELKKRGINVVELIDLVAETYDLASQEAKDKLIEEFLEDSEPVLEEH KVVVRNFLKAKKTSRELVEIMMAGITKYDLGIEADHELIVDPMPNLYFTRDPFAS VGNGVTIHYMRYKVRQRETLFSRFVFSNHPKLVNTPWYDPAEGLTIEGGDVFY NNDTLVVGVSERTDLQTIITLLAKNIKANESEFKRIVAINVPKWTNLMHLDTWLT MLDKDKFLYSPIANDVFKFWDYDLVNGGDAPQPVDNGLPLEDLKSIIGKKPTLI PIAGAGASQIDIERETHFDGTYLAVAPGIVIGYARNEKTNAALEAAGITVLPFR GNQLSLGMGNARCMSPSRKDVKW	6 30
DS4	MSVFDSKFKGIHVYSEIGELETVLVHEPGKEIDYITPARLDELLSAILESHDAR KEHKEFVAELKKRGINVVELTDLVAETYDLASRAAKEFIELTFLEETVPVLTEAN REAVRAFLLSKPTHEMVEFMSGITKYELGVESENELIVDPMPNLYFTRDPFASV GNGVTIHYMRYKVRQRETLFSRFVFSNHPKLVNTPWYDPAEGLTIEGGDVFY NNDTLVVGVSERTDLQTIITLLAKNIKANESEFKRIVAINVPKWTNLMHLDTWLT LDKDKFLYSPIANDVFKFWDYDLVNGGDAPQPVDNGLPLEDLKSIIGKKPTLI IAGAGASQIDIERETHFDGTYLAVAPGIVIGYARNEKTNAALEAAGITVLPFRG NQLSLGMGNARCMSPSRKDVKW	7
C2DS1	MSVFDSKFKGIHVYSEIGELESLVHEPGREIDYITPARLDELLSAILESHDAR KEHKQFVAELKANDINVVELDELVAQTYDQVDQKIKDEFIDQWLQEAKPVLNDQL KKLVKNYLLKSQKEFSTKMMVRIMMAGIDKKEINIDLDRDLVDPMPNLYFTRDP FASVGNGVTIHYMRYKVRQRETLFSRFVFSNHPKLINTPWYDPSLKLISIEGGDV	22 40

	FIYNNDTLVVGVSERTDLQTVTLLAKNIVANKESEFKRIVAINVPKWTNLMHLD WLTMLDKDFLYSPIANDVFKFWDYDLVNGGAEPQPVENGLPLEGLLQSIINKP VLIPPIAGEGASQMEIERETHFDGTYLAIRPGVIVIGYSRNEKTNAALEAAGIKVL PFHGNQLSLGMGNARCMMSMPLSRKDVKW	
C2DS3	MSVFDKFKGIGHVYSEIGELESVLVHEPGREIDYITPARLDELLFSAILESHDAR KEHKQFVAELKANDINVVELVDLIVETYDLASKEAKEKLLEFLDDSVPLSDEH RATVKKFLQSQKSTRSLVEYMIAGITKHDLKIESDLEIVDPMPNLYFTRDPFAS VGNGVTIHYMRVKVRQRETLFSRFVFSNHPKLINTPWYYDPSLKLISIEGGDVFY NNDTLVVGVSERTDLQTVTLLAKNIVANKESEFKRIVAINVPKWTNLMHLDTWLT MLDKDFLYSPIANDVFKFWDYDLVNGGAEPQPVENGLPLEGLLQSIINKPVL PIAGEGASQMEIERETHFDGTYLAIRPGVIVIGYSRNEKTNAALEAAGIKVLPF GNQLSLGMGNARCMMSMPLSRKDVKW	23
C2DS4	MSVFDKFKGIGHVYSEIGELESVLVHEPGREIDYITPARLDELLFSAILESHDAR KEHKQFVAELKANDINVVELSDLVAETYTYHATQKEREAFIEKWLD LRAVKVSYVLSKEGTPVAMVRTMMAGVSKQELNVESETELVVDPM ASVGNGVTIHYMRVKVRQRETLFSRFVFSNHPKLINTPWYYDPSLKLISIEGGDVF IYNNNDTLVVGVSERTDLQTVTLLAKNIVANKESEFKRIVAINVPKWTNLMHLD LTMLDKDFLYSPIANDVFKFWDYDLVNGGAEPQPVENGLPLEGLLQSIINKP LIPIAGEGASQMEIERETHFDGTYLAIRPGVIVIGYSRNEKTNAALEAAGIKVLP FHGNQLSLGMGNARCMMSMPLSRKDVKW	24
C2DS5	MSVFDKFKGIGHVYSEIGELESVLVHEPGREIDYITPARLDELLFSAILESHDAR KEHKQFVAELKANDINVVELTDLV TETYDLASQEAKDNLIEEFLEDSEPV LTEL KSVVRTYLSKSIKSTRELIQMMAGITKYD LGIEADHELIVDPMPNLYFTRDPFAS VGNGVTIHYMRVKVRQRETLFSRFVFSNHPKLINTPWYYDPSLKLISIEGGDVFY NNDTLVVGVSERTDLQTVTLLAKNIVANKESEFKRIVAINVPKWTNLMHLD MLDKDFLYSPIANDVFKFWDYDLVNGGAEPQPVENGLPLEGLLQSIINKP PIAGEGASQMEIERETHFDGTYLAIRPGVIVIGYSRNEKTNAALEAAGIKVLP GNQLSLGMGNARCMMSMPLSRKDVKW	25
C2DS6	MSVFDKFKGIGHVYSEIGELESVLVHEPGREIDYITPARLDELLFSAILESHDAR KEHKQFVAELKANDINVVELTDLVAETFDLASKEE QEKLIEEFLEDSEPV LEAH KTAVRKFLTSRKSTREM VEFMMAGITKYD LGIEADHELIVDPMPNLYFTRDPFAS VGNGVTIHYMRVKVRQRETLFSRFVFSNHPKLINTPWYYDPSLKLISIEGGDVFY NNDTLVVGVSERTDLQTVTLLAKNIVANKESEFKRIVAINVPKWTNLMHLD MLDKDFLYSPIANDVFKFWDYDLVNGGAEPQPVENGLPLEGLLQSIINKP PIAGEGASQMEIERETHFDGTYLAIRPGVIVIGYSRNEKTNAALEAAGIKVLP GNQLSLGMGNARCMMSMPLSRKDVKW	26
C2DS7	MSVFDKFKGIGHVYSEIGELESVLVHEPGREIDYITPARLDELLFSAILESHDAR KEHKQFVAELKANDINVVELTDLVSETYDM SKEKQEK QEKLIEEFLEDSEPV LEEH KGLVRKFLKSLKSS KELIQYMMAGITKHD LNIEADHELIVDPMPNLYFTRDPFAS VGNGVTIHYMRVKVRQRETLFSRFVFSNHPKLINTPWYYDPSLKLISIEGGDVFY NNDTLVVGVSERTDLQTVTLLAKNIVANKESEFKRIVAINVPKWTNLMHLD MLDKDFLYSPIANDVFKFWDYDLVNGGAEPQPVENGLPLEGLLQSIINKP PIAGEGASQMEIERETHFDGTYLAIRPGVIVIGYSRNEKTNAALEAAGIKVLP GNQLSLGMGNARCMMSMPLSRKDVKW	27

	PIAGEGASQMEIERETHFDGTYLAIRPGVIGYSRNEKTNAALEAAGIKVLPFH GNQLSLGMGNARCMSPSRKDVKW	
C4DS1	MSKINVYSEIGELKEVLVHTPGDEIRRISPSRLDELLFSAILEPNEAIKEHKGFL KILQDKGIKVIQLDELVAQTYDQVDQKIKDEFIDQWLQEAKPVLNDQLKKLVNY LLKSQKEFSTKMRIMMAGIDKKEINIDLDRLVVDPMPNLYFTRDPFASAGNG ISLNNMKYVTRKRETIFAEFIFATHPDYKTPHWFDRLEDEGNIEGGDVFYIYNKDT LVIGVSERTNKEAILTIAKKIKNNKEAKFKKIVAINVPPMPNLMHLDTWLTMVDK DKFLYSPNMLSVLKWEIDLSEEKPLADVLESIIGVKPVLIPAGKGA TQLDIDIETHFDGTYNYLTIAPIGVVVVGYSRNIKTEAALRAAGVTVLSFEGNQLSLG MGSARCMSPMPLVREDVK	28
C4DS2	MSKINVYSEIGELKEVLVHTPGDEIRRISPSRLDELLFSAILEPNEAIKEHKGFL KILQDKGIKVIQLIDLVAETYDLASQEAKDKLIEEFLEDSEPVLEEHKVVVRNF LKAKKTSRELVEIMMAGITKYDLGIEADHELIVDPMPNLYFTRDPFASAGNGISL NNMKYVTRKRETIFAEFIFATHPDYKTPHWFDRLEDEGNIEGGDVFYIYNKDTLVI GVSERTNKEAILTIAKKIKNNKEAKFKKIVAINVPPMPNLMHLDTWLTMVDKDKF LYSPNMLSVLKWEIDLSEEKPLADVLESIIGVKPVLIPAGKATQL DIDIETHFDGTYNYLTIAPIGVVVVGYSRNIKTEAALRAAGVTVLSFEGNQLSLGMS ARCMSPMPLVREDVK	29
C4DS3	MSKINVYSEIGELKEVLVHTPGDEIRRISPSRLDELLFSAILEPNEAIKEHKGFL KILQDKGIKVIQLVDLIVETYDLASKEAKEKLLEEFLDDSPVLSDEHRATVKKF LQSQKSTRSLVEYMIAGITKHDLKIESDLELIVDPMPNLYFTRDPFASAGNGISL NNMKYVTRKRETIFAEFIFATHPDYKTPHWFDRLEDEGNIEGGDVFYIYNKDTLVI GVSERTNKEAILTIAKKIKNNKEAKFKKIVAINVPPMPNLMHLDTWLTMVDKDKF LYSPNMLSVLKWEIDLSEEKPLADVLESIIGVKPVLIPAGKATQL DIDIETHFDGTYNYLTIAPIGVVVVGYSRNIKTEAALRAAGVTVLSFEGNQLSLGMS ARCMSPMPLVREDVK	30
C4DS5	MSKINVYSEIGELKEVLVHTPGDEIRRISPSRLDELLFSAILEPNEAIKEHKGFL KILQDKGIKVIQLTDLVTETYDLASQEAKDNLIEEFLEDSEPVLEELKSVVRTY LKSIKSTRELIQMMAGITKYDLGIEADHELIVDPMPNLYFTRDPFASAGNGISL NNMKYVTRKRETIFAEFIFATHPDYKTPHWFDRLEDEGNIEGGDVFYIYNKDTLVI GVSERTNKEAILTIAKKIKNNKEAKFKKIVAINVPPMPNLMHLDTWLTMVDKDKF LYSPNMLSVLKWEIDLSEEKPLADVLESIIGVKPVLIPAGKATQL DIDIETHFDGTYNYLTIAPIGVVVVGYSRNIKTEAALRAAGVTVLSFEGNQLSLGMS ARCMSPMPLVREDVK	31
C4DS6	MSKINVYSEIGELKEVLVHTPGDEIRRISPSRLDELLFSAILEPNEAIKEHKGFL KILQDKGIKVIQLTDLVAETFDLASKEEQEKLIEEFLEDSEPVLEAHKTAVRKF LTSRKSTREMFMMAGITKYDLGIEADHELIVDPMPNLYFTRDPFASAGNGISL NNMKYVTRKRETIFAEFIFATHPDYKTPHWFDRLEDEGNIEGGDVFYIYNKDTLVI GVSERTNKEAILTIAKKIKNNKEAKFKKIVAINVPPMPNLMHLDTWLTMVDKDKF LYSPNMLSVLKWEIDLSEEKPLADVLESIIGVKPVLIPAGKATQL DIDIETHFDGTYNYLTIAPIGVVVVGYSRNIKTEAALRAAGVTVLSFEGNQLSLGMS ARCMSPMPLVREDVK	32

10

20

30

40

C4DS7	MSKINVYSEIGELKEVLVHTPGDEIRRISPSRLDELLFSAILEPNEAIKEHKGFL KILQDKGIKVIQLTDLVSETYDMVSKKEQKELIIEFLEDSEPVLS EELKSLKSSKELIQYMMAGITKHDLNIEADHELIVDPMPNLYFTRDPFASAGNGISL NNMKYVTRKRETIFAEFIFATHPDYKTPHWFDRLEGNIEGGDVF IYNKDTLVI GVSERTNKEAILTIACKKIKNNKEAKFKKIVAINVPPMPNLMHLD TWLTMVVDKDF LYSPNMLSVLKWEIDL SKEIEMVETNKPLADV LESIIGVKPVL IAGKGATQL DIDIETHFDGTYL TIA PGVVVGYSRNI KTEA ALRAAGV TVLS FEGNQL SLGMGS ARCMSMPLV REDVK	33	10
C4DS8	MSKINVYSEIGELKEVLVHTPGDEIRRISPSRLDELLFSAILEPNEAIKEHKGFL KILQDKGIKVIQLSDLVAETYVKYATAEQKA AFIEKYLDEATP ALSAENRERAKK YILSLEM QPVKMIRTM MAGLSKYEL NVESNIELI IDP MPNLYFTRDP FASAGNGI SLNNMKYVTRKRETIFAEFIFATHPDYKTPHWFDRLEGNIEGGDVF IYNKDTL VIG VSERTNKEAILTIACKKIKNNKEAKFKKIVAINVPPMPNLMHLD TWLTMVVDKDF KFLYSPNMLSVLKWEIDL SKEIEMVETNKPLADV LESIIGVKPVL IAGKGAT QLD DIDIETHFDGTYL TIA PGVVVGYSRNI KTEA ALRAAGV TVLS FEGNQL SLGM GSARCMSMPLV REDVK	34	
C4DS9	MSKINVYSEIGELKEVLVHTPGDEIRRISPSRLDELLFSAILEPNEAIKEHKGFL KILQDKGIKVIQLSDLVAETYKHYASEAEKEAFIEKYLDEATP VLSKDMRAKVN YILSMQGE PVKMVRT MMAGVSKQ ELNVE SEVEL IDP MPNLYFTRDP FASAGNGI SLNNMKYVTRKRETIFAEFIFATHPDYKTPHWFDRLEGNIEGGDVF IYNKDTL VIG VSERTNKEAILTIACKKIKNNKEAKFKKIVAINVPPMPNLMHLD TWLTMVVDKDF KFLYSPNMLSVLKWEIDL SKEIEMVETNKPLADV LESIIGVKPVL IAGKGAT QLD DIDIETHFDGTYL TIA PGVVVGYSRNI KTEA ALRAAGV TVLS FEGNQL SLGM GSARCMSMPLV REDVK	35	20
C5DS1	MSVFDKFNGIH VYSEIGE LESVL VHEP GREIDY ITPAR LDELL FSAILE SHDAR KEH KLF VSEL KAND INV VEL DEL VAQ TYD QV DQ K K DEF ID QWL QEAK PV LND Q KK LV KN YL L KS Q KE F ST KK M R IM MAG ID K KE IN ID L R D L V D P M P N L YF TRDP F AS VG NG VT I H Y M R Y K V R Q R E T L F S R F V F S N H P K L V N T P W Y D P S L K L S I E G G D V F I Y F I Y N N N N T L V V G V S E R T D L E T V T L A K N I V A N K E C E F K R I V A I N V P K W T N L M H L D T W L T M L D K D K F L Y S P I A N D V F K F W D Y D L V N G G E E P Q P V E N G L P L E G L L E S I I N K K P I L I P I A G E G A S Q I D I E R E T H F D G T N Y L A I R P G V V I G Y S R N E K T N A A L E A A G I K V L P F H G N Q L S L G M G N A R C M S M P L S R K D V K W	36	30
C5DS2	MSVFDKFNGIH VYSEIGE LESVL VHEP GREIDY ITPAR LDELL FSAILE SHDAR KEH KLF VSEL KAND INV VEL IDL VAETY DLAS QEAK DKL IEF LED SEPV L SEE H K V V R N F L K A K K T S R E L V E I M M A G I T K Y D L G I E A D H E L I V D P M P N L Y F T R D P F A S V G N G V T I H Y M R Y K V R Q R E T L F S R F V F S N H P K L V N T P W Y D P S L K L S I E G G D V F I Y F I Y N N N T L V V G V S E R T D L E T V T L A K N I V A N K E C E F K R I V A I N V P K W T N L M H L D T W L T M L D K D K F L Y S P I A N D V F K F W D Y D L V N G G E E P Q P V E N G L P L E G L L E S I I N K K P I L I P I A G E G A S Q I D I E R E T H F D G T N Y L A I R P G V V I G Y S R N E K T N A A L E A A G I K V L P F H G N Q L S L G M G N A R C M S M P L S R K D V K W	37	40
C5DS3	MSVFDKFNGIH VYSEIGE LESVL VHEP GREIDY ITPAR LDELL FSAILE SHDAR KEH KLF VSEL KAND INV VEL VDL I V E T Y D L A S K E A K L L E E F L D D S P V L S D E H	38	

	RATVKKFLQSQKSTRSLVEYMIAGITKHDLKIESDLELIVDPMPNLYFTRDPFAS VGNGVTIHMYKVRQRETLFSRFVFSNHPKLVNTPWYYDPSLKLSIEGGDVFY NNNTLVGVSERTDLETVTLLAKNIVANKECEFKRIVAINVPKWTNLMHLDWT MLDKDKFLYSPIANDFKFWDYDLVNGGEQPVENGLPLEGLLESIINKKPI PIAGEGASQIDIERETHFDGTYLAIRPGVIVGYSRNEKTNAALEAAGIKVLPFH GNQLSLGMGNARCMSPSRKDVKW	
C5DS4	MSVFDKFNGIHVSEIGELESVLVHEPGREIDYITPARLDELLFSAILSHDAR KEHKLFLVSELKANDINVVELSDLVAETTYTYHATQKEREAFIEKWLDDEAPALT LRAVKVSYVLSKEGTPVAMVRTMMAGVSKQELNVESETELVVDPMPNLYFTRDPF ASVGNGVTIHMYKVRQRETLFSRFVFSNHPKLVNTPWYYDPSLKLSIEGGDVF IYNNNTLVGVSERTDLETVTLLAKNIVANKECEFKRIVAINVPKWTNLMHLDWT LTMLDKDKFLYSPIANDFKFWDYDLVNGGEQPVENGLPLEGLLESIINKKPI LIPIAGEGASQIDIERETHFDGTYLAIRPGVIVGYSRNEKTNAALEAAGIKVLP FHGNQLSLGMGNARCMSPSRKDVKW	39
C5DS6	MSVFDKFNGIHVSEIGELESVLVHEPGREIDYITPARLDELLFSAILSHDAR KEHKLFLVSELKANDINVVELTDLVAETFDLASKEEQUEKLIIEFLEDSEPV KTAVRKFLTSRKSTREMVEFMMAGITKYDLGIEADHELIVDPMPNLYFTRDPFAS VGNGVTIHMYKVRQRETLFSRFVFSNHPKLVNTPWYYDPSLKLSIEGGDVFY NNNTLVGVSERTDLETVTLLAKNIVANKECEFKRIVAINVPKWTNLMHLDWT MLDKDKFLYSPIANDFKFWDYDLVNGGEQPVENGLPLEGLLESIINKKPI PIAGEGASQIDIERETHFDGTYLAIRPGVIVGYSRNEKTNAALEAAGIKVLPFH GNQLSLGMGNARCMSPSRKDVKW	40
C5DS7	MSVFDKFNGIHVSEIGELESVLVHEPGREIDYITPARLDELLFSAILSHDAR KEHKLFLVSELKANDINVVELTDLVSETYDMVSKKEQKLIIEFLEDSEPV KGLVRKFLKSLKSSKELIQYMMAGITKHDNLIEADHELIVDPMPNLYFTRDPFAS VGNGVTIHMYKVRQRETLFSRFVFSNHPKLVNTPWYYDPSLKLSIEGGDVFY NNNTLVGVSERTDLETVTLLAKNIVANKECEFKRIVAINVPKWTNLMHLDWT MLDKDKFLYSPIANDFKFWDYDLVNGGEQPVENGLPLEGLLESIINKKPI PIAGEGASQIDIERETHFDGTYLAIRPGVIVGYSRNEKTNAALEAAGIKVLPFH GNQLSLGMGNARCMSPSRKDVKW	41
C6DS1	MSVFDKFNGIHVSEIGELETVLVHEPGREIDYITPARLDELLFSAILSHDAR KEHQSFVKQLKDNGINVVELDELVAQTYDQVDQKIKDEFIDQWLQEAKPV KKLVKNYLLKSQKEFSTKMKVRIMMAGIDKKEINIDLDRDLVVDPM FASVGNGVTIHMYKVRQRETLFSRFVFSNHPKLVKTPWYYDPM FIYNNNTLVGVSERTDLETITLLAKNIKANKEVEFKRIVAINVPKWT WLTMLDKDKFLYSPIANDFKFWDYDLVNGGAEPQP VLIPLAGNNASHIDIERETHFDGTYLAIKPGVIVGYSRNEKTNA PFHGNQLSLGMGNARCMSPSRKDVKW	42
C6DS2	MSVFDKFNGIHVSEIGELETVLVHEPGREIDYITPARLDELLFSAILSHDAR KEHQSFVKQLKDNGINVVELIDLVAETYD KVVVRNFLKAKKTSRELVEIMMAGITKYDLGIEADHELIVDP VGNGVTIHMYKVRQRETLFSRFVFSNHPKLVKTPWYYDPM 43	40

	NNDTLVGVSERTDLETITLLAKNIKANKEVEFKRIVAINVPKWTNLMHLDTWLT MLDKDKFLYSPIANDFKFWDYDLVNGGAEPQPKENGLPLEGLLQSIINKPVLI PIAGNNASHIDIERETHFDGTYLAIKPGVVIYARNEKTNAALAAAGIKVLPFH GNQLSLGMGNARCMSPSRKDVKW	
C6DS3	MSVFDKFNGIHVYSEIGELETVLVHEPGREIDYITPARLDELLSAILESHDAR KEHQSFVKQLKDNGINVVELVDLIVETYDLASKEAKEKLLEEFLDDSVPLSDEH RATVKKFLQSQKSTRSLVEYMIAGITKHDLKIESDLEIVDPMPNLYFTRDPFAS VGNGVTIHMYKVRQRETLFSRFVFSNHPKLVKTPWYYDPAMKMSIEGGDVFY NNDTLVGVSERTDLETITLLAKNIKANKEVEFKRIVAINVPKWTNLMHLDTWLT MLDKDKFLYSPIANDFKFWDYDLVNGGAEPQPKENGLPLEGLLQSIINKPVLI PIAGNNASHIDIERETHFDGTYLAIKPGVVIYARNEKTNAALAAAGIKVLPFH GNQLSLGMGNARCMSPSRKDVKW	44
C6DS4	MSVFDKFNGIHVYSEIGELETVLVHEPGREIDYITPARLDELLSAILESHDAR KEHQSFVKQLKDNGINVVELSDLVAETYTYHATQKEREAFIEKWLDAAEPALTKD LRAVKVSYVLSKEGTPVAMVRTMMAGVSKQELNVESETELVVDPMPLYFTRDPF ASVGNGVTIHMYKVRQRETLFSRFVFSNHPKLVKTPWYYDPAMKMSIEGGDVF IYNNDTLVGVSERTDLETITLLAKNIKANKEVEFKRIVAINVPKWTNLMHLDTW LTMLDKDKFLYSPIANDFKFWDYDLVNGGAEPQPKENGLPLEGLLQSIINKPV LIPIAGNNASHIDIERETHFDGTYLAIKPGVVIYARNEKTNAALAAAGIKVLP FHGNQLSLGMGNARCMSPSRKDVKW	45
C6DS5	MSVFDKFNGIHVYSEIGELETVLVHEPGREIDYITPARLDELLSAILESHDAR KEHQSFVKQLKDNGINVVELTDLVETDYLASQEAQDNLIEEFLEDSEPVLT KSVVRTYLKSIKSTRELIQMMAGITKYDLCIEADHELIVDPMPLYFTRDPFAS VGNGVTIHMYKVRQRETLFSRFVFSNHPKLVKTPWYYDPAMKMSIEGGDVFY NNDTLVGVSERTDLETITLLAKNIKANKEVEFKRIVAINVPKWTNLMHLDTWLT MLDKDKFLYSPIANDFKFWDYDLVNGGAEPQPKENGLPLEGLLQSIINKPVLI PIAGNNASHIDIERETHFDGTYLAIKPGVVIYARNEKTNAALAAAGIKVLPFH GNQLSLGMGNARCMSPSRKDVKW	46
C6DS7	MSVFDKFNGIHVYSEIGELETVLVHEPGREIDYITPARLDELLSAILESHDAR KEHQSFVKQLKDNGINVVELTDLVSETYDMVSKQEKQELIIEEFLEDSEPVLEEH KGLVRKFLKSLKSSKELIQYMMAGITKHDLNIEADHELIVDPMPLYFTRDPFAS VGNGVTIHMYKVRQRETLFSRFVFSNHPKLVKTPWYYDPAMKMSIEGGDVFY NNDTLVGVSERTDLETITLLAKNIKANKEVEFKRIVAINVPKWTNLMHLDTWLT MLDKDKFLYSPIANDFKFWDYDLVNGGAEPQPKENGLPLEGLLQSIINKPVLI PIAGNNASHIDIERETHFDGTYLAIKPGVVIYARNEKTNAALAAAGIKVLPFH GNQLSLGMGNARCMSPSRKDVKW	47
C7DS1	MSVFDKFNGIHVYSEIGELETVLVHEPGREIEYITPARLDELLSAILESHDAR KEHQEFVAELKKNNINVVELDELVAQTYDQVDQKIKDEFIDQWLQEAKPVLNDQL KKLVKNYLLKSQKEFSTKKMVRIMMAGIDKKEINIDLDRDLVVDPMPLYFTRDP FASVGNGVTIHMYKVRQRETLFSRFIFANHPKLMNTPLYYNPDMKLSIEGGD FVYNNETLVGVSERTDLDTITLLAKNIKANKEREFKRIVAINVPKWTNLMHLD WLTMLDKDKFLYSPIANDFKFWDYDLVNGGDEPQPKVNGLPLEKLLESINKKP	48

	ILIPPIAGTSASNIDVERETHFDGTYLAIAPIGVVIGYSRNVKTNEALEAAGIKVL PFGNQLSLGMGNARCMSPSRKDVKW	
C7DS2	MSVFDKFNGIHVYSEIGELQTVLVHEPGREIEYITPARLDELLSAILESHDAR KEHQEFVAELKNNINVVELDLVAETYDLASQEAKDKLIEEFLEDSEPVLSDEH KVVVRNFLKAKKTSRELVEIMMAGITKYDLGIEADHELIVDPMPNLYFTRDPFAS VGNGVTIHYMRYKVRQRETLFSRFIFANHPKLMNTPLYYNPDMKLSIEGGDVFVY NNETLVGVSETDLLTITLLAKNIKANKEREFKRVAINVPKWTNLMHLDTWLT MLDKDKFLYSPIANDVFKFDYDLVNGGDEPQPKVNGLPLEKLLESIINKPILI PIAGTSASNIDVERETHFDGTYLAIAPIGVVIGYSRNVKTNEALEAAGIKVLPFK GNQLSLGMGNARCMSPSRKDVKW	49 10
C7DS3	MSVFDKFNGIHVYSEIGELQTVLVHEPGREIEYITPARLDELLSAILESHDAR KEHQEFVAELKNNINVVELVDLIVETYDLASKEAKEKLLEEFLDDSPVLSDEH RATVKKFLQSQKSTRSLVEYMIAGITKHDLKIESDLELIVDPMPNLYFTRDPFAS VGNGVTIHYMRYKVRQRETLFSRFIFANHPKLMNTPLYYNPDMKLSIEGGDVFVY NNETLVGVSETDLLTITLLAKNIKANKEREFKRVAINVPKWTNLMHLDTWLT MLDKDKFLYSPIANDVFKFDYDLVNGGDEPQPKVNGLPLEKLLESIINKPILI PIAGTSASNIDVERETHFDGTYLAIAPIGVVIGYSRNVKTNEALEAAGIKVLPFK GNQLSLGMGNARCMSPSRKDVKW	50 20
C7DS4	MSVFDKFNGIHVYSEIGELQTVLVHEPGREIEYITPARLDELLSAILESHDAR KEHQEFVAELKNNINVVELSDLVAETYTYHATQKEREAFIEKWLEAEPALTKD LRAKVKSYVLSKEGTPVAMVRTMMAGVSKQELNVESETELVVDPMPLNYFTRDPF ASVGNGVTIHYMRYKVRQRETLFSRFIFANHPKLMNTPLYYNPDMKLSIEGGDVF VYNNETLVGVSETDLLTITLLAKNIKANKEREFKRVAINVPKWTNLMHLDTW LTMLDKDKFLYSPIANDVFKFDYDLVNGGDEPQPKVNGLPLEKLLESIINKPILI PIAGTSASNIDVERETHFDGTYLAIAPIGVVIGYSRNVKTNEALEAAGIKVLPFK FKGNQLSLGMGNARCMSPSRKDVKW	51
C7DS5	MSVFDKFNGIHVYSEIGELQTVLVHEPGREIEYITPARLDELLSAILESHDAR KEHQEFVAELKNNINVVELTDLVETYDLASQEAKDNLIEEFLEDSEPVLT KSVVRTYLSIKSTRELQMMAGITKYDLGIEADHELIVDPMPNLYFTRDPFAS VGNGVTIHYMRYKVRQRETLFSRFIFANHPKLMNTPLYYNPDMKLSIEGGDVFVY NNETLVGVSETDLLTITLLAKNIKANKEREFKRVAINVPKWTNLMHLDTWLT MLDKDKFLYSPIANDVFKFDYDLVNGGDEPQPKVNGLPLEKLLESIINKPILI PIAGTSASNIDVERETHFDGTYLAIAPIGVVIGYSRNVKTNEALEAAGIKVLPFK GNQLSLGMGNARCMSPSRKDVKW	52 30
C7DS6	MSVFDKFNGIHVYSEIGELQTVLVHEPGREIEYITPARLDELLSAILESHDAR KEHQEFVAELKNNINVVELTDLVAETFDLASKEEKEKLIEEFLEDSEPVLS KTAVRKFLTSRKSTREMVEFMMAGITKYDLGIEADHELIVDPMPNLYFTRDPFAS VGNGVTIHYMRYKVRQRETLFSRFIFANHPKLMNTPLYYNPDMKLSIEGGDVFVY NNETLVGVSETDLLTITLLAKNIKANKEREFKRVAINVPKWTNLMHLDTWLT MLDKDKFLYSPIANDVFKFDYDLVNGGDEPQPKVNGLPLEKLLESIINKPILI PIAGTSASNIDVERETHFDGTYLAIAPIGVVIGYSRNVKTNEALEAAGIKVLPFK GNQLSLGMGNARCMSPSRKDVKW	53 40

C8DS3	MSKIRVYSEIGNLKKVLVHTPGDEIRRISPSRLEELLFSAVLEPNAAIEHKR ¹⁰ FV KLLEDRGIQAIQLVDLIVETYDLASKEAKEKLLEELDDSPVLSDEHRATVKF LQSQKSTRSLVEYMIAGITKHDLKIESDLELIVDPMPNLYFTRDPFASAGNGI SL NNMKYVVRKRETIFAFIAHFIAHPEYKETPHWFDRLDHGSIEGDFVYNKDTLVI GV ²⁰ VGSERTNKEAIITIAKHIQDNKEAEFKKIVAINVPPMPNLMHLDTWLTMDKNF IYSPNMLSVLKIWEIDLAKPIEMVESNKSLS TEVLESIIGEKPILIPAGEGASQL DIDIETHFDGTYLTIAPGVVVGYSRNEKTEKALKAAAGITVLSFEGNQLSLGMGS ARCMMSPLVREDVK	54
C8DS4	MSKIRVYSEIGNLKKVLVHTPGDEIRRISPSRLEELLFSAVLEPNAAIEHKR ¹⁰ FV KLLEDRGIQAIQLSDLVAETTYHATQKEREAFIEKWLDEAEPALT KDLRAKVKS YVLSKEGTPVAMVRTMMAGVSKQELNVESETELVVDPM ⁵⁵ PMPNLYFTRDPFASAGNGI SLNNMKYVVRKRETIFAFIAHFIAHPEYKETPHWFDRLDHGSIEGDFVYNKDTL VIGV ²⁰ GSERTNKEAIITIAKHIQDNKEAEFKKIVAINVPPMPNLMHLDTWLTMDKN KFIYSPNMLSVLKIWEIDLAKPIEMVESNKSLS TEVLESIIGEKPILIPAGEGAS QLDIDIETHFDGTYLTIAPGVVVGYSRNEKTEKALKAAAGITVLSFEGNQLSLGM GSARCMMSPLVREDVK	55
C8DS9	MSKIRVYSEIGNLKKVLVHTPGDEIRRISPSRLEELLFSAVLEPNAAIEHKR ²⁰ FV KLLEDRGIQAIQLSDLVAETYKHYASEAEKEAFIEKYLDEATPVL SKDMRAKVKN YILSMQGEPVKMVRTMMAGVSKQELNVESEVELIVDPMPNLYFTRDPFASAGNGI SLNNMKYVVRKRETIFAFIAHFIAHPEYKETPHWFDRLDHGSIEGDFVYNKDTL VIGV ⁵⁶ GSERTNKEAIITIAKHIQDNKEAEFKKIVAINVPPMPNLMHLDTWLTMDKN KFIYSPNMLSVLKIWEIDLAKPIEMVESNKSLS TEVLESIIGEKPILIPAGEGAS QLDIDIETHFDGTYLTIAPGVVVGYSRNEKTEKALKAAAGITVLSFEGNQLSLGM GSARCMMSPLVREDVK	56
C9DS3	MSKINVYSEIGVLKEVLVHTPGDEIRRIAPSRLDELLFSAILEPSAAI ³⁰ QEHK ⁵⁷ SFL KILQDRGIKTIQLVDLIVETYDLASKEAKEKLLEELDDSPVLSDEHRATVKF LQSQKSTRSLVEYMIAGITKHDLKIESDLELIVDPMPNLYFTRDPFASAGNGI SLNNMKYVVRKRETIFAFIFSIHPEYKKT ⁵⁸ PHWFDRLDNGSIEGDFV ⁴⁰ IYNKDTLVI GV ²⁰ VGSERTNKEAIITIAKHIQDNKEAQFKKIVAINVPPMPNLMHLDTWLTMDKNF LYSPNMLSVLKVWEIDL ⁵⁹ SKPIEMVETNKPLAEVLESIIGEKPILIPAGKDATQL DIDIETHFDGTYLTIAPGVVVGYSRNVKTEAALRAAGTVLSFEGNQLSLGMGS ARCMMSPLVREDVK	57
C9DS4	MSKINVYSEIGVLKEVLVHTPGDEIRRIAPSRLDELLFSAILEPSAAI ³⁰ QEHK ⁵⁸ SFL KILQDRGIKTIQLSDLVAETYTYHATQKEREAFIEKWLDEAEPALT KDLRAKVKS YVLSKEGTPVAMVRTMMAGVSKQELNVESETELVVDPM ⁵⁸ PMPNLYFTRDPFASAGNGI SLNNMKYVVRKRETIFAFIFSIHPEYKKT ⁴⁰ PHWFDRLDNGSIEGDFV ⁵⁹ IYNKDTL VIGV ²⁰ GSERTNKEAIITIAKHIQDNKEAQFKKIVAINVPPMPNLMHLDTWLTMDKN KFLYSPNMLSVLKVWEIDL ⁵⁹ SKPIEMVETNKPLAEVLESIIGEKPILIPAGKDAT QLDIDIETHFDGTYLTIAPGVVVGYSRNVKTEAALRAAGTVLSFEGNQLSLGM GSARCMMSPLVREDVK	58
C9DS8	mskinvyseigvlkevlvhtpgdeirriapsrldeLLfsailepsaa ⁴⁰ iqehksf1 kilqdrgiktiqlsdlvaetvkyataeqkaafiekyldeatpalsaenrerakk	59

	yilslemqpvmirtmmaglskyelnvesnieliidpmpnlyftrdpfasagngi slnnmkyvvrkretifaefifsihpeykkphwfdrldngsieggdviyinkdtl vigvsertnkeaiitiakhiqdnkeaqfkkivainvppmpnlmhldtwltmvdkn kflyspnmlsvlkvweidlspiemvetnkplaeavlesiigekpilipiagkdat qldididethfdgtnyltiapgvvvgysrnvkteaalraagtvlsfegnqlslgm gsarcmsmplvredvk	
--	---	--

10

【0073】

したがって、いくつかの実施形態では、キメラ A D I は、表 A 2 からの例示的なキメラ配列（配列番号：4～13 または 22～59）、または A D I 活性を有するそのバリアントもしくは断片を含む、それから成る、またはそれから本質的に成る。

【0074】

ある種の実施形態は、本明細書に記載される、すなわち名称が記載されている、または配列識別子の参照（例えば、表 A 1～A 2）によって記載されている参照 A D I ポリペプチド配列のバリアントを含む。「バリアント」配列は、この用語を本明細書で使用する場合、1 つ以上の置換、欠失（例えば、切断）、付加、及び／または挿入により、本明細書に開示される参照配列とは異なるポリペプチド配列またはポリヌクレオチド配列を指す。したがって、ある種のバリアントは、本明細書に記載される参照配列の断片を含む。バリアントポリペプチドは生物学的に活性であり、すなわち、それらは参照ポリペプチドの酵素活性または結合活性を有し続けている。このようなバリアントは、例えば、遺伝的多型により及び／または人為的操作によりもたらされてよい。

20

【0075】

多くの場合には、生物学的に活性なバリアントは、1 つ以上の保存的置換を含有するだろう。「保存的置換」とは、アミノ酸が類似の特性を有する別のアミノ酸に置換されるものであり、その結果、ペプチド化学の当業者は、ポリペプチドの二次構造及び疎水性親水性が実質的に不变であると予想するだろう。上記のように、修飾を、本発明のポリヌクレオチド及びポリペプチドの構造で行ってよく、所望の特徴を有するバリアントポリペプチドまたは誘導体ポリペプチドをコードする機能性分子がなお得られる。ポリペプチドのアミノ酸配列を変更して、本発明のポリペプチドの同等な、あるいは改善されたバリアントまたは一部を作製することが望ましい場合、当業者は典型的に、コードする D N A 配列のコドンのうち 1 つ以上を変化させるだろう。

30

【0076】

例えば、ある種のアミノ酸は、構造、例えば抗体の抗原結合領域または基質分子上の結合部位などで相互作用的結合能を顕著に失うことなく、タンパク質構造においてその他のアミノ酸に置換されてよい。タンパク質の生物学的機能活性を定義するのは、タンパク質の相互作用能及び性質であるので、ある種のアミノ酸配列置換を、タンパク質配列、及び当然のことながらその基礎となる D N A コード配列で行うことができ、それにもかかわらず同様の特性を有するタンパク質を得ることができる。したがって、様々な変化を、開示された組成物のペプチド配列、またはペプチドをコードする対応する D N A 配列で、それらの実用性を顕著に失うことなく行ってよいことが意図される。

40

【0077】

このような変化を行うには、アミノ酸の疎水性親水性指標を考慮してよい。タンパク質に相互作用的生物学的機能を付与する際の疎水性親水性アミノ酸指標の重要性は、一般に当該技術分野において理解されている（K y t e & D o o l i t t l e , 1 9 8 2 、参照によって本明細書に組み込まれる）。アミノ酸の相対的な疎水性親水性の特徴が、得られるタンパク質の二次構造に寄与し、それによりタンパク質とその他の分子、例えば酵素、基質、受容体、D N A、抗体、抗原などとの相互作用を定義すると認められている。各アミ

50

ノ酸には、その疎水性及び電荷性に基づいて疎水性親水性指標が割り当てられている (Kyte & Doolittle, 1982)。これらの値は、イソロイシン (+4.5) ; バリン (+4.2) ; ロイシン (+3.8) ; フェニルアラニン (+2.8) ; システイン (+2.5) ; メチオニン (+1.9) ; アラニン (+1.8) ; グリシン (-0.4) ; トレオニン (-0.7) ; セリン (-0.8) ; トリプトファン (-0.9) ; チロシン (-1.3) ; プロリン (-1.6) ; ヒスチジン (-3.2) ; グルタミン酸塩 (-3.5) ; グルタミン (-3.5) ; アスパラギン酸塩 (-3.5) ; アスパラギン (-3.5) ; リジン (-3.9) ; 及びアルギニン (-4.5) である。ある種のアミノ酸を、類似した疎水性親水性指標またはスコアを有するその他のアミノ酸で置換しても、なお類似した生物学的活性を有するタンパク質をもたらす、すなわち、なお生物学的機能性が同等のタンパク質を得る場合もあることが、当該技術分野において既知である。このような変化を行うには、疎水性親水性指標が ± 2 以内であるアミノ酸の置換が好ましく、 ± 1 以内のものが特に好ましく、 ± 0.5 以内のものがさらに特に好ましい。

【0078】

同様のアミノ酸の置換が、親水性に基づいて効果的に行われ得ることも、当該技術分野においてさらに理解される。米国特許第 4,554,101 号明細書 (その内容全体が参照によって本明細書に特に組み込まれる) は、隣接するアミノ酸の親水性によって決まるようなタンパク質の親水性の最大局所平均が、タンパク質の生物学的特性と相關することを記述している。米国特許第 4,554,101 号明細書に詳述されているように、以下の親水性値がアミノ酸残基に割り当てられている。アルギニン (+3.0) ; リジン (+3.0) ; アスパラギン酸塩 (+3.0 \pm 1) ; グルタミン酸塩 (+3.0 \pm 1) ; セリン (+0.3) ; アスパラギン (+0.2) ; グルタミン (+0.2) ; グリシン (0) ; トレオニン (-0.4) ; プロリン (-0.5 \pm 1) ; アラニン (-0.5) ; ヒスチジン (-0.5) ; システイン (-1.0) ; メチオニン (-1.3) ; バリン (-1.5) ; ロイシン (-1.8) ; イソロイシン (-1.8) ; チロシン (-2.3) ; フェニルアラニン (-2.5) ; トリプトファン (-3.4)。アミノ酸は、類似した親水性値を有する別のアミノ酸に置換されても、生物学的に同等の、特に免疫学的に同等のタンパク質をなお得ることができると理解される。このような変化では、親水性値が ± 2 以内であるアミノ酸の置換が好ましく、 ± 1 以内のものが特に好ましく、 ± 0.5 以内のものがさらに特に好ましい。

【0079】

上で概略を述べたように、したがって、アミノ酸置換は一般に、アミノ酸側鎖置換基の相対的類似性、例えば、それらの疎水性、親水性、電荷、サイズなどの類似性に基づく。様々な前述の特徴を考慮する例示的な置換が当業者には周知であり、このような置換としては、アルギニン及びリジン；グルタミン酸塩及びアスパラギン酸塩；セリン及びトレオニン；グルタミン及びアスパラギン；ならびにバリン、ロイシン及びイソロイシンが挙げられる。

【0080】

アミノ酸置換は、残基の極性、電荷、溶解度、疎水性、親水性及び / または両親媒性の類似性に基づいてさらに行われてよい。例えば、負荷電アミノ酸としては、アスパラギン酸及びグルタミン酸が挙げられ；正荷電アミノ酸としては、リジン及びアルギニンが挙げられ；類似した親水性値を有する非荷電極性頭部基を有するアミノ酸としては、ロイシン、イソロイシン及びバリン；グリシン及びアラニン；アスパラギン及びグルタミン；ならびにセリン、トレオニン、フェニルアラニン及びチロシンが挙げられる。保存的変化を表す場合があるアミノ酸のその他の群としては、(1) ala、pro、gly、glu、asp、gln、asn、ser、thr；(2) cys、ser、tyr、thr；(3) val、ile、leu、met、ala、phe；(4) lys、arg、his；及び(5) phe、tyr、trp、his が挙げられる。

【0081】

バリエントはさらに、またはあるいは非保存的変化を含有してよい。好ましい実施形態で

10

20

30

40

50

は、バリエントポリペプチドは、約10、9、8、7、6、5、4、3、2未満のアミノ酸、あるいは1つのアミノ酸の置換、欠失または付加により、天然配列または参照配列とは異なる。バリエントはさらに(またはあるいは)、ポリペプチドの免疫原性、二次構造、酵素活性、及び/または疎水性親水性に対して最小限の影響を有するアミノ酸の、例えば欠失または付加により修飾されてよい。

【0082】

ある種の実施形態では、ポリペプチド配列は、約、少なくとも約、または最大約5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、110、120、130、140、150、160、170、180、190、200、210、220、230、240、250、260、270、280、290、300、310、320、330、340、350、360、370、380、390、400、410、420、430、440、450、460、470、480、490、500、510、520、530、540、550、560、570、580、590、600、610、620、630、640、650、660、670、680、690、700である。700、710、720、730、740、750、760、770、780、790、800、800、810、820、830、840、850、860、870、880、890、900、900、910、920、930、940、950、960、970、980、990、1000またはそれを超える連続アミノ酸長であり、その間のすべての整数を含み、参照配列のすべてまたは一部を含んでよい(例えば、配列表を参照のこと)。

【0083】

その他の特定の実施形態では、ポリペプチド配列は、約または約5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、110、120、130、140、150、160、170、180、190、200、210、220、230、240、250、260、270、280、290、300、310、320、330、340、350、360、370、380、390、400、410、420、430、440、450、460、470、480、490、500、510、520、530、540、550、560、570、580、590、600、610、620、630、640、650、660、670、680、690、700、710、720、730、740、750、760、770、780、790、800以下から成る。800、810、820、830、840、850、860、870、880、890、900、900、910、920、930、940、950、960、970、980、990、1000またはそれを超える連続アミノ酸であり、その間のすべての整数を含み、参照配列のすべてまたは一部を含んでよい(例えば、配列表を参照のこと)。

【0084】

さらにその他の特定の実施形態では、ポリペプチド配列は、約10～1000、10～900、10～800、10～700、10～600、10～500、10～400、10～300、10～200、20～1000、20～900、20～800、20～700、20～600、20～500、20～400、20～300、20～200、20～100、20～50、20～40、20～30、50～1000、50～900、50～800、50～700、50～600、50～500、50～400、50～300、50～200、50～100、100～1000、100～900、100～800、100～700、100～600、100～500、100～400、100～300、100～200、200～

1 0 0 0 、 2 0 0 ~ 9 0 0 、 2 0 0 ~ 8 0 0 、 2 0 0 ~ 7 0 0 、 2 0 0 ~ 6 0 0 、 2 0 0 ~ 5 0 0 、 2 0 0 ~ 4 0 0 、 または 2 0 0 ~ 3 0 0 の連続アミノ酸であり、その間のすべての範囲を含み、参照配列のすべてまたは一部を含む。ある種の実施形態では、切断ポリペプチドが参照ポリペプチドの結合特性及び / または結合活性を保持する限り、任意の参照ポリペプチドの C 末端領域または N 末端領域は、約 1 、 2 、 3 、 4 、 5 、 6 、 7 、 8 、 9 、 1 0 、 1 5 、 2 0 、 2 5 、 3 0 、 3 5 、 4 0 、 4 5 、 5 0 、 6 0 、 7 0 、 8 0 、 9 0 、 1 0 0 、 1 1 0 、 1 2 0 、 1 3 0 、 1 4 0 、 1 5 0 、 1 6 0 、 1 7 0 、 1 8 0 、 1 9 0 、 2 0 0 、 2 5 0 、 3 0 0 、 3 5 0 、 4 0 0 、 4 5 0 、 5 0 0 、 5 5 0 、 6 0 0 、 6 5 0 、 7 0 0 、 7 5 0 、 もしくは 8 0 0 もしくはそれを超えるアミノ酸で、または約 1 0 ~ 5 0 、 2 0 ~ 5 0 、 5 0 ~ 1 0 0 、 1 0 0 ~ 1 5 0 、 1 5 0 ~ 2 0 0 、 2 0 0 ~ 2 5 0 、 2 5 0 ~ 3 0 0 、 3 0 0 ~ 3 5 0 、 3 5 0 ~ 4 0 0 、 4 0 0 ~ 4 5 0 、 4 5 0 ~ 5 0 0 、 5 0 0 ~ 5 5 0 、 5 5 0 ~ 6 0 0 、 6 0 0 ~ 6 5 0 、 6 5 0 ~ 7 0 0 、 7 0 0 ~ 7 5 0 、 7 5 0 ~ 8 0 0 もしくはそれを超えるアミノ酸（その間のすべての整数及び範囲（例えば、1 0 1 、 1 0 2 、 1 0 3 、 1 0 4 、 1 0 5 ）を含む）で切断されてよい。典型的には、生物学的に活性な断片は、それが由来する生物学的に活性な参照ポリペプチドの約 1 % 、約 5 % 、約 1 0 % 、約 2 5 % 、または約 5 0 % 以上の活性を有する。

【 0 0 8 5 】

一般に、バリエントは、参照ポリペプチド配列に対して少なくとも約 3 0 % 、 4 0 % 、 5 0 % 、 5 5 % 、 6 0 % 、 6 5 % 、 7 0 % 、 7 5 % 、 8 0 % 、 8 5 % 、 9 0 % 、 9 1 % 、 9 2 % 、 9 3 % 、 9 4 % 、 9 5 % 、 9 6 % 、 9 7 % 、 9 8 % 、 9 9 % の類似性または配列同一性または配列相同性を示すだろう。さらに、約 1 、 2 、 3 、 4 、 5 、 6 、 7 、 8 、 9 、 1 0 、 1 1 、 1 2 、 1 3 、 1 4 、 1 5 、 1 6 、 1 7 、 1 8 、 1 9 、 2 0 、 2 1 、 2 2 、 2 3 、 2 4 、 2 5 、 2 6 、 2 7 、 2 8 、 2 9 、 3 0 、 3 1 、 3 2 、 3 3 、 3 4 、 3 5 、 3 6 、 3 7 、 3 8 、 3 9 、 4 0 、 4 1 、 4 2 、 4 3 、 4 4 、 4 5 、 4 6 、 4 7 、 4 8 、 4 9 、 5 0 、 5 5 、 6 0 、 6 5 、 7 0 、 7 5 、 8 0 、 8 5 、 9 0 、 9 5 、 または 1 0 0 アミノ酸（その間のすべての整数及び範囲を含む）の付加（例えば、C 末端付加、N 末端付加、その両方）、欠失、切断、挿入、または置換（例えば、保存的置換）によって天然配列または親配列とは異なるが、親ポリペプチド配列または参照ポリペプチド配列の特性または活性を保持する配列が意図される。

【 0 0 8 6 】

いくつかの実施形態では、バリエントポリペプチドは、少なくとも 1 つであるが、 5 0 、 4 0 、 3 0 、 2 0 、 1 5 、 1 0 、 8 、 6 、 5 、 4 、 3 または 2 未満のアミノ酸残基で参照配列とは異なる。その他の実施形態では、バリエントポリペプチドは、少なくとも 1 % であるが、 2 0 % 、 1 5 % 、 1 0 % または 5 % 未満の残基で参照配列とは異なる。（この比較がアラインメントを必要とする場合、配列は、最大の類似性で整列されるべきである。欠失もしくは挿入、またはミスマッチによる「ループ」アウト配列が、差と考えられる。）

【 0 0 8 7 】

配列間の配列類似性または配列同一性（これらの用語は、本明細書において同じ意味で使用される）の計算を、以下の通りに実施する。2 つのアミノ酸配列、または 2 つの核酸配列の同一率を決定するために、最適な比較を目的として配列を整列する（例えば、第 1 及び第 2 アミノ酸配列または核酸配列の一方または両方に、最適なアラインメントのためにギャップを導入することができ、比較のために非相同配列を無視することができる）。ある種の実施形態では、比較のために整列させた参照配列の長さは、参照配列の長さの少なくとも 3 0 % 、好ましくは少なくとも 4 0 % 、より好ましくは少なくとも 5 0 % 、 6 0 % 、さらにより好ましくは少なくとも 7 0 % 、 8 0 % 、 9 0 % 、 1 0 0 % である。次いで、対応するアミノ酸位置またはヌクレオチド位置でアミノ酸残基またはヌクレオチドを比較する。第 1 配列における位置が、第 2 配列中の対応する位置と同じアミノ酸残基またはヌクレオチドによって占められる場合には、分子はその位置で同一である。

【 0 0 8 8 】

10

20

30

40

50

2つの配列間での同一率は、2つの配列の最適なアライメントのために導入する必要があるギャップの数、及び各ギャップの長さを考慮した、これらの配列によって共有される同一位置の数の関数である。

【0089】

配列の比較及び2つの配列間での同一率の決定を、数学的アルゴリズムを使用して行うことができる。好ましい実施形態では、2つのアミノ酸配列間での同一率を、GCGソフトウェアパッケージ内のGAPプログラム内に組み込まれたNeedleman and Wunsch (J. Mol. Biol. 48: 444-453, 1970) アルゴリズムを使用し、Blossum62マトリックスまたはPAM250マトリックスのいずれか、ならびにギャップ加重16、14、12、10、8、6、または4及び長さ加重1、2、3、4、5、または6を使用して決定する。さらに別の好ましい実施形態では、2つのヌクレオチド配列間での同一率を、GCGソフトウェアパッケージ内のGAPプログラムを使用し、NWGapDNA.CMPマトリックスならびにギャップ加重40、50、60、70、または80及び長さ加重1、2、3、4、5、または6を使用して決定する。特に好ましいパラメータセット（及び別段の指定がない限り使用すべきセット）は、ギャップペナルティ12、ギャップ伸長ペナルティ4、及びフレームシフトギャップペナルティ5を用いたBlossum62スコアリングマトリックスである。

【0090】

2つのアミノ酸配列またはヌクレオチド配列間での同一率を、ALIGNプログラム（バージョン2.0）内に組み込まれたE. Meyers and W. Millerのアルゴリズム (Cabisos. 4: 11-17, 1989) を使用し、PAM120加重残基表、ギャップ長ペナルティ12及びギャップペナルティ4を使用して決定することができる。

【0091】

本明細書に記載される核酸配列及びタンパク質配列を、公開データベースを検索するための「クエリー配列」として使用し、例えば、その他のファミリーメンバーまたは関連配列を同定することができる。このような検索は、Altschulら (1990, J. Mol. Biol., 215: 403-10) のNBLASTプログラム及びXBLASTプログラム（バージョン2.0）を使用して実施することができる。BLASTヌクレオチド検索を、NBLASTプログラム、スコア=100、ワード長=12を用いて実施し、本発明の核酸分子と相同なヌクレオチド配列を得ることができる。BLASTタンパク質検索を、XBLASTプログラム、スコア=50、ワード長=3を用いて実施し、本発明のタンパク質分子と相同なアミノ酸配列を得ることができる。比較のためのギャップアライメントを得るために、Gapped BLASTを、Altschulら (Nucleic Acids Res. 25: 3389-3402, 1997) に記載されているように利用することができる。BLASTプログラム及びGapped BLASTプログラムを利用する場合、各プログラム（例えば、XBLAST及びNBLAST）のデフォルトパラメータを使用することができる。

【0092】

一実施形態では、上述の通り、ポリヌクレオチド及び/またはポリペプチドを、BLASTアライメントツールを使用して評価することができる。ローカルアライメントは単純に一対の配列セグメントから成り、対は比較されている各配列からのものである。Smith-WatermanアルゴリズムまたはSeeliersアルゴリズムの修正により、伸長またはトリミングによってそのスコアを改善できないすべてのセグメント対（高スコアリングセグメント対（HSP）と呼ばれる）を見出すだろう。BLASTアライメントの結果は、偶然によってのみBLASTスコアを期待できるという可能性を示すための統計的尺度を含む。

【0093】

生スコアSを、整列させた各配列に関連するギャップ数及び置換数から計算し、類似性スコアが高いほど、より有意なアライメントを示す。置換スコアは、参照表から得られる

10

20

30

40

50

(PAM、BLOSUMを参照のこと)。

【0094】

ギャップスコアを、典型的にはG(ギャップ開始ペナルティ)及びL(ギャップ伸長ペナルティ)の和として計算する。長さnのギャップについては、ギャップコストが $G + L n$ となるだろう。ギャップコスト、G及びLの選択は経験的であるが、Gについては高値(10~15)、例えば11、及びLについては低値(1~2)、例えば1を選択するのが通例である。

【0095】

ビットスコアS'は生アラインメントスコアSから導き出し、これは使用したスコアリングシステムの統計的特性が考慮されている。ビットスコアをスコアリングシステムに対して正規化し、それゆえ、このスコアを使用して異なる検索からのアラインメントスコアを比較することができる。「ビットスコア」及び「類似性スコア」という用語は、同じ意味で使用される。ビットスコアはアラインメントの良好度を示し、このスコアが高いほどアラインメントが良好である。

10

【0096】

E値、すなわち期待値は、類似したスコアを有する配列が、データベース中に偶然生じるだろう可能性について記載する。これは、データベース検索中に偶然生じると期待されるSと同等の、またはSよりも良好なスコアを有する異なるアラインメント数の予想である。E値が小さいほど、アラインメントはより有意である。例えば、 e^{-117} のE値を有するアラインメントは、類似したスコアを有する配列が全く偶然に生じるという可能性が極めて低いことを意味する。さらに、アミノ酸のランダム対のアラインメントに対する期待スコアは負である必要があり、さもなければ長いアラインメントは、整列させたセグメントが関連していたかとは無関係に高スコアを有する傾向があるだろう。さらに、BLASTアルゴリズムは、適切な置換マトリックス、ヌクレオチドまたはアミノ酸を使用し、ギャップアラインメントについてはギャップ生成ペナルティ及びギャップ伸長ペナルティを使用する。例えば、ポリペプチド配列のBLASTアラインメント及び比較を、典型的にはBLOSUM62マトリックス、ギャップ存在ペナルティ11及びギャップ伸長ペナルティ1を使用して行う。

20

【0097】

一実施形態では、配列類似性スコアを、BLOSUM62マトリックス、ギャップ存在ペナルティ11及びギャップ伸長ペナルティ1を使用して行ったBLAST分析から報告する。

30

【0098】

特定の実施形態では、本明細書で提供される配列同一性/類似性スコアは、以下のパラメータを使用したGAP Version 10 (GCG, Accelrys、サンディエゴ、カリフォルニア州)を使用して得られた値を指す：ギャップ加重50及び長さ加重3、ならびにnwsgap dna . cmpスコアリングマトリックスを使用した、ヌクレオチド配列についての同一性%及び類似性%；ギャップ加重8及び長さ加重2、ならびにBLOSUM62スコアリングマトリックスを使用した、アミノ酸配列についての同一性%及び類似性%(Henikoff and Henikoff, PNAS USA. 89: 10915-10919, 1992)。ギャップには、Needleman and Wunschのアルゴリズム(J Mol Biol. 48: 443-453, 1970)を使用して、マッチ数を最大にし、かつギャップ数を最小にする2つの完全な配列のアラインメントを見出す。

40

【0099】

特定の一実施形態では、バリアントポリペプチドは、場合により参照ポリペプチド配列(例えば、配列表を参照のこと)と整列させて、少なくとも約50、60、70、80、90、100、100、110、120、130、140、150、160、170、180、190、200、210、220、230、240、250、260、270、280、290、300、310、320、330、340、350、360、370、380、390、400、410、420、430、440、450、460、470、480、490、500、510、520、530、540、550、560、570、580、590、600、610、620、630、640、650、660、670、680、690、700、710、720、730、740、750、760、770、780、790、800、810、820、830、840、850、860、870、880、890、900、910、920、930、940、950、960、970、980、990、1000、1010、1020、1030、1040、1050、1060、1070、1080、1090、1100、1110、1120、1130、1140、1150、1160、1170、1180、1190、1200、1210、1220、1230、1240、1250、1260、1270、1280、1290、1300、1310、1320、1330、1340、1350、1360、1370、1380、1390、1400、1410、1420、1430、1440、1450、1460、1470、1480、1490、1500、1510、1520、1530、1540、1550、1560、1570、1580、1590、1600、1610、1620、1630、1640、1650、1660、1670、1680、1690、1700、1710、1720、1730、1740、1750、1760、1770、1780、1790、1800、1810、1820、1830、1840、1850、1860、1870、1880、1890、1900、1910、1920、1930、1940、1950、1960、1970、1980、1990、2000、2010、2020、2030、2040、2050、2060、2070、2080、2090、2100、2110、2120、2130、2140、2150、2160、2170、2180、2190、2200、2210、2220、2230、2240、2250、2260、2270、2280、2290、2300、2310、2320、2330、2340、2350、2360、2370、2380、2390、2400、2410、2420、2430、2440、2450、2460、2470、2480、2490、2500、2510、2520、2530、2540、2550、2560、2570、2580、2590、2600、2610、2620、2630、2640、2650、2660、2670、2680、2690、2700、2710、2720、2730、2740、2750、2760、2770、2780、2790、2800、2810、2820、2830、2840、2850、2860、2870、2880、2890、2900、2910、2920、2930、2940、2950、2960、2970、2980、2990、3000、3010、3020、3030、3040、3050、3060、3070、3080、3090、3100、3110、3120、3130、3140、3150、3160、3170、3180、3190、3200、3210、3220、3230、3240、3250、3260、3270、3280、3290、3300、3310、3320、3330、3340、3350、3360、3370、3380、3390、3400、3410、3420、3430、3440、3450、3460、3470、3480、3490、3500、3510、3520、3530、3540、3550、3560、3570、3580、3590、3600、3610、3620、3630、3640、3650、3660、3670、3680、3690、3700、3710、3720、3730、3740、3750、3760、3770、3780、3790、3800、3810、3820、3830、3840、3850、3860、3870、3880、3890、3900、3910、3920、3930、3940、3950、3960、3970、3980、3990、4000、4010、4020、4030、4040、4050、4060、4070、4080、4090、4010、4020、4030、4040、4050、4060、4070、4080、4090、4100、4110、4120、4130、4140、4150、4160、4170、4180、4190、4200、4210、4220、4230、4240、4250、4260、4270、4280、4290、4300、4310、4320、4330、4340、4350、4360、4370、4380、4390、4400、4410、4420、4430、4440、4450、4460、4470、4480、4490、4500、4510、4520、4530、4540、4550、4560、4570、4580、4590、4600、4610、4620、4630、4640、4650、4660、4670、4680、4690、4700、4710、4720、4730、4740、4750、4760、4770、4780、4790、4710、4720、4730、4740、4750、4760、4770、4780、4790、4800、4810、4820、4830、4840、4850、4860、4870、4880、4890、4810、4820、4830、4840、4850、4860、4870、4880、4890、4900、4910、4920、4930、4940、4950、4960、4970、4980、4990、5000、5010、5020、5030、5040、5050、5060、5070、5080、5090、5010、5020、5030、5040、5050、5060、5070、5080、5090、5100、5110、5120、5130、5140、5150、5160、5170、5180、5190、5110、5120、5130、5140、5150、5160、5170、5180、5190、5200、5210、5220、5230、5240、5250、5260、5270、5280、5290、5210、5220、5230、5240、5250、5260、5270、5280、5290、5300、5310、5320、5330、5340、5350、5360、5370、5380、5390、5310、5320、5330、5340、5350、5360、5370、5380、5390、5400、5410、5420、5430、5440、5450、5460、5470、5480、5490、5410、5420、5430、5440、5450、5460、5470、5480、5490、5500、5510、5520、5530、5540、5550、5560、5570、5580、5590、5510、5520、5530、5540、5550、5560、5570、5580、5590、5600、5610、5620、5630、5640、5650、5660、5670、5680、5690、5610、5620、5630、5640、5650、5660、5670、5680、5690、5700、5710、5720、5730、5740、5750、5760、5770、5780、5790、5710、5720、5730、5740、5750、5760、5770、5780、5790、5800、5810、5820、5830、5840、5850、5860、5870、5880、5890、5810、5820、5830、5840、5850、5860、5870、5880、5890、5900、5910、5920、5930、5940、5950、5960、5970、5980、5990、5910、5920、5930、5940、5950、5960、5970、5980、5990、6000、6010、6020、6030、6040、6050、6060、6070、6080、6090、6010、6020、6030、6040、6050、6060、6070、6080、6090、6100、6110、6120、6130、6140、6150、6160、6170、6180、6190、6110、6120、6130、6140、6150、6160、6170、6180、6190、6200、6210、6220、6230、6240、6250、6260、6270、6280、6290、6210、6220、6230、6240、6250、6260、6270、6280、6290、6300、6310、6320、6330、6340、6350、6360、6370、6380、6390、6310、6320、6330、6340、6350、6360、6370、6380、6390、6400、6410、6420、6430、6440、6450、6460、6470、6480、6490、6410、6420、6430、6440、6450、6460、6470、6480、6490、6500、6510、6520、6530、6540、6550、6560、6570、6580、6590、6510、6520、6530、6540、6550、6560、6570、6580、6590、6600、6610、6620、6630、6640、6650、6660、6670、6680、6690、6610、6620、6630、6640、6650、6660、6670、6680、6690、6700、6710、6720、6730、6740、6750、6760、6770、6780、6790、6710、6720、6730、6740、6750、6760、6770、6780、6790、6800、6810、6820、6830、6840、6850、6860、6870、6880、6890、6810、6820、6830、6840、6850、6860、6870、6880、6890、6900、6910、6920、6930、6940、6950、6960、6970、6980、6990、6910、6920、6930、6940、6950、6960、6970、6980、6990、7000、7010、7020、7030、7040、7050、7060、7070、7080、7090、7010、7020、7030、7040、7050、7060、7070、7080、7090、7100、7110、7120、7130、7140、7150、7160、7170、7180、7190、7110、7120、7130、7140、7150、7160、7170、7180、7190、7200、7210、7220、7230、7240、7250、7260、7270、7280、7290、7210、7220、7230、7240、7250、7260、7270、7280、7290、7300、7310、7320、7330、7340、7350、7360、7370、7380、7390、7310、7320、7330、7340、7350、7360、7370、7380、7390、7400、7410、7420、7430、7440、7450、7460、7470、7480、7490、7410、7420、7430、7440、7450、7460、7470、7480、7490、7500、7510、7520、7530、7540、7550、7560、7570、7580、7590、7510、7520、7530、7540、7550、7560、7570、7580、7590、7600、7610、7620、7630、7640、7650、7660、7670、7680、7690、7610、7620、7630、7640、7650、7660、7670、7680、7690、7700、7710、7720、7730、7740、7750、7760、7770、7780、7790、7710、7720、7730、7740、7750、7760、7770、7780、7790、7800、7810、7820、7830、7840、7850、7860、7870、7880、7890、7810、7820、7830、7840、7850、7860、7870、7880、7890、7900、7910、7920、7930、7940、7950、7960、7970、7980、7990、7910、7920、7930、7940、7950、7960、7970、7980、7990、8000、8010、8020、8030、8040、8050、8060、8070、8080、8090、8010、8020、8030、8040、8050、8060、8070、8080、8090、8100、8110、8120、8130、8140、8150、8160、8170、8180、8190、8110、8120、8130、8140、8150、8160、8170、8180、8190、8200、8210、8220、8230、8240、8250、8260、8270、8280、8290、8210、8220、8230、8240、8250、8260、8270、8280、8290、8300、8310、8320、8330、8340、8350、8360、8370、8380、8390、8310、8320、8330、8340、8350、8360、8370、8380、8390、8400、8410、8420、8430、8440、8450、8460、8470、8480、8490、8410、8420、8430、8440、8450、8460、8470、8480、8490、8500、8510、8520、8530、8540、8550、8560、8570、8580、8590、8510、8520、8530、8540、8550、8560、8570、8580、8590、8600、8610、8620、8630、8640、8650、8660、8670、8680、8690、8610、8620、8630、8640、8650、8660、8670、8680、8690、8700、8710、8720、8730、8740、8750、8760、8770、8780、8790、8710、8720、8730、8740、8750、8760、8770、8780、8790、8800、8810、8820、8830、8840、8850、8860、8870、8880、8890、8810、8820、8830、8840、8850、8860、8870、8880、8890、8900、8910、8920、8930、8940、8950、8960、8970、8980、8990、8910、8920、8930、8940、8950、8960、8970、8980、8990、9000、9010、9020、9030、9040、9050、9060、9070、9080、9090、9010、9020、9030、9040、9050、9060、9070、9080、9090、9100、9110、9120、9130、9140、9150、9160、9170、9180、9190、9110、9120、9130、9140、9150、9160、9170、9180、9190、9200、9210、9220、9230、9240、9250、9260、9270、9280、9290、9210、9220、9230、9240、9250、9260、9270、9280、9290、9300、9310、9320、9330、9340、9350、9360、9370、9380、9390、9310、9320、9330、9340、9350、9360、9370、9380、9390、9400、9410、9420、9430、9440、9450、9460、9470、9480、9490、9410、9420、9430、9440、9450、9460、9470、9480、9490、9500、9510、9520、9530、9540、9550、9560、9570、9580、9590、9510、9520、9530、9540、9550、9560、9570、9580、9590、9600、9610、9620、9630、9640、9650、9660、9670、9680、9690、9610、9620、9630、9640、9650、9660、9670、9680、9690、9700、9710、9720、9730、9740、9750、9760、9770、9780、9790、9710、9720、9730、9740、9750、9760、9770、9780、9790、9800、9810、9820、9830、9840、9850、9860、9870、9880、9890、9810、9820、9830、9840、9850、9860、9870、9880、9890、9900、9910、9920、9930、9940、9950、9960、9970、9980、9990、9910、9920、9930、9940、9950、9960、9970、9980、9990、10000、10010、10020、10030、10040、10050、10060、10070、10080、10090、10010、10020、10030、10040、10050、10060、10070、10080、10090、10100、10110、10120、10130、10140、10150、10160、10170、10180、10190、10110、10120、10130、10140、10150、10160、10170、10180、10190、10200、10210、10220、10230、10240、10250、10260、10270、10280、10290、10210、10220、10230、10240、10250、10260、10270、10280、10290、10300、10310、10320、10330、10340、10350、10360、10370、10380、10390、10310、10320、10330、10340、10350、10360、10370、10380、10390、10400、10410、10420、10430、10440、10450、10460、10470、10480、10490、10410、10420、10430、10440、10450、10460、10470、10480、10490、10500、10510、10520、10530、10540、10550、10560、10570、10580、10590、10510、10520、10530、10540、10550、10560、10570、10580、10590、10600、10610、10620、10630、10640、10650、10660、10670、10680、10690、10610、10620、10630、10640、10650、10660、10670、10680、10690、10700、10710、10720、10730、10740、10750、10760、10770、10780、10790、10710、10720、10730、10740、10750、10760、10770、10780、10790、10800、10810、10820、10830、10840、10850、10860、10870、10880、10890、10810、10820、10830、10840、10850、10860、10870、10880、10890、10900、10910、10920、10930、10940、10950、10960、10970、10980、10990、10910、10920、10930、10940、10950、10960、10970、10980、10990、11000、11010、11020、11030、11040、11050、11060、11070、11080、11090、11010、11020、11030、11040、11050、11060、11070、11080、11090、11100、11110、11120、11130、11140、11150、11160、11170、11180、11190、11110、11120、11130、11140、11150、11160、11170、11180、11190、11200、11210、11220、11230、11240、11250、11260、11270、11280、11290、11210、11220、11230、11240、11250、11260、11270、11280、11290、11300、11310、11320、11330、11340、11350、11360、11370、11380、11390、11310、11320、11330、11340、11350、11360、11370、11380、11390、11400、11410、11420、11430、11440、11450、11460、11470、11480、11490、11410、11420、11430、11440、11450、11460、11470、11480、11490、11500、11510、11520、11530、11540、11550、11560、11570、11580、11590、11510、11520、11530、11540、11550、11560、11570、11580、11590、11600、11610、11620、11630、11640、11650、11660、11670、11680、11690、11610、11620、11630、11640、11650、11660、11670、11680、11690、11700、11710、11720、11730、11740、11750、11760、11770、11780、11790、11710、11720、11730、11740、11750、11760、11770、11780、11790、11800、11810、11820、11830、11840、11850、11860、11870、11880、11890、11810、11820、11830、11840、11850、11860、11870、11880、11890、11900、11910、11920、11930、11940、11950、11960、11970、11980、11990、11910、11920、11930、11940、11950、11960、11970、11980、11990、12

0、390、400、410、420、430、440、450、460、470、480、490、500、510、520、530、540、550、560、570、580、590、600、610、620、630、640、650、660、670、680、690、700、710、720、730、740、750、760、770、780、790、800、810、820、830、840、850、860、870、880、890、900、910、920、930、940、950、960、970、980、990、1000、またはそれを超える（その間のすべての整数及び範囲を含む）B LAST ビットスコアまたは配列類似性スコアを生成することができるアミノ酸配列を含み、BLAST アラインメントには BLOSUM62 マトリックス、ギャップ存在ペナルティ 11、及びギャップ伸長ペナルティ 1 を使用した。

10

【0100】

上述の通り、参照ポリペプチドは、アミノ酸置換、欠失、切断、付加、及び挿入を含む様々な方法で変更されてよい。このような操作方法は一般に、当該技術分野において既知である。例えば、参照ポリペプチドのアミノ酸配列バリエントは、DNA の突然変異によって調製され得る。突然変異誘発方法及びヌクレオチド配列の変更方法は、当該技術分野において周知である。例えば、Kunkel (PNAS USA. 82: 488-492, 1985); Kunkel et al., (Methods in Enzymol. 154: 367-382, 1987), 米国特許第 U.S. 4,873,192 号明細書, Watson, J. D. et al., ("Molecular Biology of the Gene," Fourth Edition, Benjamin/Cummings, Menlo Park, Calif., 1987) 及び当該文献で引用された参考文献を参照のこと。関心対象のタンパク質の生物学的活性に影響を及ぼすことのない適切なアミノ酸置換に関する指針は、Dayhoff et al., (1978) *Atlas of Protein Sequence and Structure* (Nat'l. Biomed. Res. Found., Washington, D. C.) のモデルに見出されてよい。

20

【0101】

このような修飾により作製されたコンビナトリアルライブラリーの遺伝子産物をスクリーニングする方法、及び選択された特性を有する遺伝子産物について cDNA ライブラリーをスクリーニングする方法は、当該技術分野において既知である。このような方法は、参照ポリペプチドのコンビナトリアル突然変異誘発によって生成される遺伝子ライブラリーの迅速なスクリーニングに適応可能である。一例として、ライブラリーにおける機能的変異体の頻度を高める技術である、再帰的アンサンブル突然変異誘発 (REM) を、スクリーニングアッセイと組み合わせて使用し、ポリペプチドバリエントを同定することができる (Arkin and Yourvan, PNAS USA 89: 7811-7815, 1992; Delgrave et al., Protein Engineering. 6: 327-331, 1993)。

30

【0102】

天然ADIは微生物で見出される場合があり、免疫原性であって患者の循環から迅速に除去される。これらの問題は、ADIを操作してその抗原性を減少させることにより、例えばキメラADI分子を操作することなどにより克服され得る。一実施形態では、キメラADIは、標準的な分子生物学的技術、またはタンパク質合成技術を使用して、異なるADIタンパク質からの異なるドメイン（例えば、触媒ドメイン及びヘリックスドメイン）を組み合わせることにより構築される。一実施形態では、*M. arginini* または *M. arthritidis* からの触媒ドメインを、*M. hominis* の ヘリックスドメインと組み合わせる。別の実施形態では、*M. arginini* の触媒ドメインを、*M. arthritidis* の ヘリックスドメインと組み合わせる。さらなる実施形態では、*M. arthritidis* の触媒ドメインを、*M. arginini* の ヘリックスドメインと組み合わせる。当業者によって認識されるように、触媒ドメイン及びヘリックスドメインのその他の組み合わせは、その他の種に、例えば、*Mycoplasma*

40

50

pneumoniae、*Streptococcus pyogenes*、*Streptococcus pneumoniae*、*Borrelia burgdorferi*、*Borrelia afzelii*、*Giardia intestinalis*、*Clostridium perfringens*、*Bacillus licheniformis*、*Enterococcus faecalis*、及び *Lactobacillus sake* などに由来する ADI タンパク質から構築され得る。

【0103】

抗原性の問題はまた、キメラ ADI を修飾することにより克服され得る。したがって、本開示は、巨大分子ポリマー、タンパク質、ペプチド、多糖、またはその他の化合物を含むが、これらに限定されない修飾剤により修飾されるキメラ ADI を提供する。本明細書に記載されるようなアルギニンデイミナーゼまたはそのキメラ及び修飾剤は、共有結合または非共有結合性相互作用のいずれかにより連結され、安定した複合体または安定した組成物を形成して所望の効果を達成する場合がある。ある種の実施形態では、修飾キメラ ADI は、非修飾キメラ ADI の生物学的活性を保持しながら、非修飾キメラ ADI よりも長いインビボ半減期及び低い抗原性を有する。ある種の実施形態では、修飾キメラ ADI は、非修飾キメラ ADI の少なくとも 20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99% またはそれを超える生物学的活性を保持する。

10

【0104】

一実施形態では、修飾剤は、生体適合性であるポリマーもしくはタンパク質またはそれらの断片であり得、血液中のキメラ ADI の半減期を増加させ得る。修飾剤は、キメラ ADI に化学的に結合されるか、または適用可能な場合、融合タンパク質発現によりキメラ ADI に連結され得る。

20

【0105】

巨大分子ポリマーとしては、非ペプチド巨大分子ポリマーを挙げてよく、ある種の実施形態では、それ自体で生物活性を有する場合がある。好適なポリマーとしては、ポリエノール化合物、ポリエーテル化合物、ポリビニルピロリドン、ポリアミノ酸、ジビニルエーテルと無水マレイン酸のコポリマー、N - (2 - ヒドロキシプロピル) - メタクリリアミド、多糖、ポリオキシエチル化ポリオール、ヘパリンまたはその断片、ポリ - アルキル - エチレングリコール及びその誘導体、ポリ - アルキル - エチレングリコールとその誘導体のコポリマー、ポリ(ビニルエチルエーテル)、a, P - ポリ [(2 - ヒドロキシエチル) - DL - アスパルトアミド]、ポリカルボン酸塩、ポリオキシエチレン - オキシメチレン、ポリアクリロイルモルホリン、アミノ化合物とオキシオレフィンのコポリマー、ポリヒアルロン酸、ポリオキシラン、エタン二酸とマロン酸のコポリマー、ポリ(1,3 - ジオキソラン)、エチレンとマレイン酸ヒドラジドのコポリマー、ポリシアル酸、シクロデキストリンなどが挙げられるが、これらに限定されない。ある種の実施形態では、ポリマーはポリエチレングリコールである。

30

【0106】

本明細書で使用する場合、ポリエノール化合物としては、ポリエチレングリコール(モノメトキシポリエチレングリコール、モノヒドロキシルポリエチレングリコールを含む)、ポリビニルアルコール、ポリアリルアルコール、ポリブテノールなど、及び脂質などのこれらの誘導体が挙げられるが、これらに限定されない。

40

【0107】

ポリエーテル化合物としては、ポリアルキレングリコール($\text{HO}((\text{CH}_2)_x\text{O})_n\text{H}$)、ポリプロピレングリコール、ポリオキシエチレン($\text{HO}((\text{CH}_2)_2\text{O})_n\text{H}$)、ポリビニルアルコール($(\text{CH}_2\text{CHOH})_n$)が挙げられるが、これらに限定されない。

【0108】

ポリアミノ酸としては、1種類のアミノ酸のポリマーまたは2種類以上のアミノ酸のコポリマー、例えば、ポリアラニンもしくはポリリジン、またはこれらのブロックコポリマー

50

が挙げられるが、これらに限定されない。

【0109】

多糖としては、グルコサン及びその誘導体、例えば硫酸デキストラン、セルロース及びその誘導体（メチルセルロース及びカルボキシメチルセルロースを含む）、デンプン及びその誘導体、ポリスクロースなどが挙げられるが、これらに限定されない。

【0110】

本発明の特定の一実施形態では、キメラADIは、タンパク質またはペプチドと結合することにより修飾され、1種以上のタンパク質またはペプチドが、キメラADIに直接的または間接的に連結される。タンパク質は、天然に存在するヒト血清タンパク質またはそれらの断片、例えば、チロキシン結合タンパク質、トランスサイレチン、a1-酸性糖タンパク質、トランスフェリン、フィブリノゲン、免疫グロブリン、IgFc領域、アルブミン、及びそれらの断片などを含むが、これらに限定されない天然に存在するタンパク質またはそれらの断片のいずれかであり得る。「断片」とは、タンパク質全体よりも小さいが、タンパク質の所望の機能を保持するタンパク質の任意の部分を意味する。操作されたキメラADIは、共有結合によってタンパク質に直接的または間接的に連結されてよい。直接連結は、キメラADIの1つのアミノ酸が、ペプチド結合またはジスルフィド架橋によって修飾タンパク質の1つのアミノ酸に直接的に連結されることを意味する。間接連結は、その間に元々存在する化学基、もしくは生物学的手段もしくは化学的手段により付加された特定の化学基、または上述した連結の組み合わせによる、キメラADIと修飾タンパク質との間の連結を指す。

10

【0111】

特定の一実施形態では、キメラADIは、PEGとの共有結合により修飾される。PEGにより（リンカーを用いて、または用いずに）共有結合的に修飾されるキメラADIは、以後キメラ「ADI-PEG」と称される場合がある。非修飾キメラADIと比較した場合、キメラADI-PEGは、その酵素活性の大部分を保持し、抗原性がはるかに低く、循環半減期が大幅に延長されて、腫瘍の処置にいっそう有効である。

20

【0112】

「ポリエチレングリコール」または「PEG」は、分岐鎖または直鎖の、エチレンオキシドと水の縮合ポリマーの混合物を指し、一般式 $H(OCH_2CH_2)_nOH$ で表され、式中、nは少なくとも4である。「ポリエチレングリコール」または「PEG」は、数字の接尾辞と組み合わせて使用し、そのおよその重量平均分子量を示す。例えば、PEG5,000は、約5,000の総重量平均分子量を有するPEGを指し；PEG12,000は、約12,000の総重量平均分子量を有するPEGを指し；PEG20,000は、約20,000の総重量平均分子量を有するPEGを指す。

30

【0113】

本発明の一実施形態では、PEGは、約1,000～約50,000；一実施形態では、約3,000～約40,000、別の実施形態では、約5,000～約30,000；ある種の実施形態では、約8,000～約30,000；その他の実施形態では、約11,000～約30,000；追加の実施形態では、約12,000～約28,000；さらにその他の実施形態では、約16,000～約24,000；その他の実施形態では、約18,000～約22,000；別の実施形態では、19,000～約21,000の総重量平均分子量を有し、一実施形態では、PEGは、約20,000の総重量平均分子量を有する。一般に、30,000以上の分子量を有するPEGは溶解させるのが難しく、製剤化生成物の収率が低下する場合がある。PEGは、分岐鎖または直鎖であってよい。一般に、PEGの分子量が増加すると、ADIまたはキメラADIの抗原性が減少する。この実施形態に記載される分子量を有するPEGを、キメラADI、及び場合により生体適合性リンカーと組み合わせて使用し、例えば、再発性急性骨髓性白血病などの急性骨髓性白血病、乳癌、卵巣癌、結腸直腸癌、胃の癌、神経膠腫、多形性膠芽腫、非小細胞肺癌（NSCLC）、腎臓癌、膀胱癌、子宮癌、食道癌、脳癌、頭頸部癌、子宮頸癌、精巣癌、胃癌及び食道癌を含む癌を処置してよい。

40

50

【0114】

本発明の別の実施形態では、PEGは、約1,000～約50,000；ある種の実施形態では、約3,000～約30,000；その他の実施形態では、約3,000～約20,000；一実施形態では、約4,000～約12,000；さらにその他の実施形態では、約4,000～約10,000；追加の実施形態では、約4,000～約8,000；なおさらなる実施形態では、約4,000～約6,000；別の実施形態では、約5,000の総重量平均分子量を有する。PEGは、分岐鎖または直鎖であってよく、ある種の実施形態では、直鎖である。この実施形態に記載される分子量を有するPEGを、キメラADI、及び場合により生体適合性リンカーと組み合わせて使用し、移植片対宿主病(GVHD)または癌を処置してよい。

10

【0115】

キメラADI-PEGは、本明細書に記載される例示的な修飾キメラADIであるが、当業者によって認識されるように、キメラADIは所望の効果のために、特に抗原性を減少させ、血清半減期を増加させるために、その他のポリマーまたは適切な分子により修飾されてよい。

【0116】

キメラADIは、リンカーを用いて、または用いずにPEGなどの修飾剤に共有結合されてよいが、好ましい実施形態では、リンカーを利用する。

【0117】

キメラADIを修飾剤、例えばPEGに共有結合させるために使用されるリンカーは、任意の生体適合性リンカーであってよい。上述のように、「生体適合性」は、化合物または基が非毒性であり、損傷、病気、疾患、または死亡を引き起こすことなくインピトロまたはインピボで利用されてよいことを示す。PEGなどの修飾剤は、例えば、エーテル結合、チオール結合、またはアミド結合によってリンカーに結合され得る。リンカー基としては、例えば、スクシニル基、アミド基、イミド基、カルバメート基、エステル基、エポキシ基、カルボキシル基、ヒドロキシル基、炭水化物、チロシン基、システイン基、ヒスチジン基、メチレン基、及びこれらの組み合わせが挙げられる。一実施形態では、生体適合性リンカーの供給源は、スクシンイミジルスクシネート(SS)である。リンカーのその他の好適な供給源としては、オキシカルボニルイミダゾール基(例えば、カルボニルジイミダゾール(CDI)を含む)、ニトロフェニル基(例えば、ニトロフェニルカーボネット(NCP)またはトリクロロフェニルカーボネット(TCP)を含む)、トリシレート基、アルデヒド基、イソシアネート基、ビニルスルホン基、または第1級アミンを挙げてよい。別の実施形態では、リンカーは、SS、SPA、SCM、またはNHSに由来し；ある種の実施形態では、SS、SPA、またはNHSを使用し、その他の実施形態では、SSまたはSPAを使用する。したがって、ある種の実施形態では、可能なリンカーは、メトキシ-PEGスクシンイミジルスクシネート(SS)、メトキシ-PEGスクシンイミジルグルタレート(SG)、メトキシ-PEGスクシンイミジルカーボネット(SC)、メトキシ-PEGスクシンイミジルカルボキシメチルエステル(SCM)、メトキシ-PEG2N-ヒドロキシスクシンイミド(NHS)、メトキシ-PEGスクシンイミジルブタノエート(SBA)、メトキシ-PEGスクシンイミジルプロピオネート(SPA)、メトキシ-PEGスクシンイミジルグルタルアミド、及びメトキシ-PEGスクシンイミジルスクシンイミドから形成され得る。

20

30

40

【0118】

あるいは、キメラADIは、アミノ基、スルフヒドリル基、ヒドロキシル基またはカルボキシル基によって、PEGなどの修飾剤に直接的に(すなわち、リンカーを用いずに)結合されてよい。

【0119】

キメラADIは、例えば、Park et al, *Anticancer Res.*, 1:373-376(1981)；及びZapolsky and Lee, *Polyethylene Glycol Chemistry: Biotechnical and*

50

d Biomedical Applications, J. M. Harris, ed., Plenum Press, NY, Chapter 21 (1992) (これらの開示は、その内容全体が参照によって本明細書に組み込まれる)に記載されているような、当該技術分野において既知の方法を使用して、生体適合性リンカーによりPEGに共有結合されてよい。

【0120】

キメラADIへのPEGの結合は、キメラADIの循環半減期を増加させる。一般に、PEGは、キメラADIの第1級アミンに結合される。キメラADI上のPEG、またはその他の修飾剤の結合部位の選択は、当業者には既知であるように、タンパク質の活性ドメイン内での各々の部位の役割により決定される。PEGは、酵素活性を実質的に失うことなくキメラADIの第1級アミンに結合される場合がある。例えば、Mycoplasma arginini、Mycoplasma arthritidis及びMycoplasma hominisからクローニングしたADIは、この手順によって修飾されてよい多数のリジン残基を有する。換言すれば、リジンのうち1つ以上またはそのすべては、本明細書に記載されるようなADI及びADIのキメラ形態が、生体適合性リンカー、例えばSS、SPA、SCM、SSA及び/またはNHSなどによって、PEGに結合され得る可能な地点である。PEGは、本開示の観点から当業者には明らかであるように、本明細書に記載されるようなADI及びADIのキメラ形態上のその他の部位に結合されてもよい。

【0121】

1～約30のPEG分子が、キメラADIに共有結合されてよい。ある種の実施形態では、キメラADIは、1つのPEG分子により修飾される。その他の実施形態では、キメラADIは、2つ以上のPEG分子により修飾される。一実施形態では、キメラADIは、約1～約10のPEG分子、一実施形態では、約2～約8のPEG分子、別の実施形態では、約9～約12のPEG分子により修飾される。別の実施形態では、キメラADIは、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、または12のPEG分子により修飾される。特定の一実施形態では、キメラADIは、ADI当たり4.5～5.5のPEG分子により修飾される。別の実施形態では、キメラADIは、5±1.5のPEG分子により修飾される。

【0122】

別の実施形態では、キメラADIの約15%～約70%の第1級アミノ基がPEGにより修飾され、一実施形態では、約20%～約65%、約25%～約60%、またはある種の実施形態では、約30%～約55%、もしくは45%～約50%、及びその他の実施形態では、アルギニンデイミナーゼの約20%または30%または40%または50%の第1級アミノ基が、PEGにより修飾される。当業者によって理解されるように、第1級アミノ基の範囲は、除去に成功したリジンの多さに依存する。ある種の実施形態では、すべてのリジンが除去されてよく、分子のN末端がPEG化される。PEGがキメラADIの末端に共有結合される場合、利用するPEG分子を1つだけ有することが望ましい場合もある。キメラADI上のPEG単位数の増加は、酵素の循環半減期を増加させる。しかしながら、キメラADI上のPEG単位数の増加は、酵素の比活性を減少させる。したがって、本開示の観点から当業者には明らかであるように、この2つの間でバランスをとる必要がある。

【0123】

本発明において、生体適合性リンカーの共通の特徴は、それらがスクシニル基によってアルギニンデイミナーゼの第1級アミンに結合することである。一旦キメラADIと結合すると、SS-PEGは、PEGに隣接してエステル結合を有し、このことがこの部位に血清エステラーゼに対する感受性を付与する場合があり、体内でキメラADIからPEGを放出させる場合もある。SPA-PEG及びPEG2-NHSは、エステル結合を有しないので、それらは血清エステラーゼに対する感受性がない。

【0124】

10

20

30

40

50

ある種の実施形態では、生体適合性リンカーを本発明で使用する。タンパク質に結合されるPEGは、SS-PEG、SPA-PEG及びSC-PEGのように直鎖であってよく、またはPEG2-NHSのようにPEGの分岐鎖のいずれかを使用してよい。

【0125】

ある種の実施形態では、本開示のキメラADIは、米国特許第U.S.6,635,462号明細書に記載されているように修飾されてよい。特に、ADI及びADIのキメラ分子、特に*Mycoplasma hominis*、*M. arthritidis*及び*M. arginini*に由来する分子の天然に存在するアミノ酸残基のうち1つ以上の修飾は、より容易に再生及び製剤化される酵素を提供し、それによってキメラADI及びそれを含む治療用組成物の製造に関する既存の技術を改善することができる。一実施形態では、本開示のキメラADIは、1つ以上のリジン残基を除去するように修飾される（例えば、リジンは、別のアミノ酸もしくはその類似体、または非天然アミノ酸により置換され得る）。特に、一実施形態では、キメラADIは、配列番号：1（*M. hominis*のADI）の位置112、374、405もしくは408に、またはこれらの位置のうち1つ以上の組み合わせにリジンを含まないように修飾される。さらなる実施形態では、キメラADIは、1つ以上のリジン、例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、またはそれを超えるリジン残基を含まないように修飾され、もしリジンが存在するならば、別のアミノ酸もしくはその類似体、または非天然アミノ酸により置換され得る。一実施形態では、キメラADIは、例えば、配列番号：4の位置7、88、137、209、及び380で置換される5つのリジンを有する。別の実施形態では、キメラADIは、例えば、配列番号：4の位置7、9、59、88、115、116、137、178、209、及び380で置換される10のリジンを有する。さらに別の実施形態では、キメラADIは、例えば、配列番号：4の位置7、9、59、66、88、91、93、115、116、137、141、178、209、279、及び位置380で置換される15のリジンを有する。一実施形態では、キメラADIは、例えば、配列番号：4の位置7、9、56、59、66、88、91、93、96、115、116、137、141、178、209、254、279、325、326、380、及び406で置換される21のリジンを含む。リジン置換を有する例示的なキメラADI分子は、配列番号：10～13に示す。

【0126】

ある種の実施形態では、酵素の触媒領域に位置する、または隣接するADIと関連するPEG化部位が修飾される。本発明の目的のために、「PEG化部位」という語句は、ポリエチレングリコールにより共有結合的に修飾されてよいADIまたはキメラADIの任意の部位または位置と定義されてよい。「PEG化部位」は、酵素の触媒領域に位置する、または隣接すると考えられ得、部位のPEG化は、酵素の触媒活性に有意な減少をもたらす。このような部位のPEG化は、従来より酵素の不活性化をもたらしてきた。例えば、*Mycoplasma hominis*からのADIは、酵素の触媒領域にある、または隣接すると考えられ得る112位にリジンを有する。112位のこのリジンへのPEG結合は、酵素を不活性化し得る。加えて、*Mycoplasma hominis*からのADIは、酵素の触媒領域にある、または隣接すると考えられ得る397位にシステインを有する。397位のシステインのアミノ酸置換は、酵素を不活性化し得る。特に、397位のシステインをアラニン、ヒスチジン、アルギニン、セリン、リジンまたはチロシンで置換すると、検出可能なすべての酵素活性の損失をもたらし得る。*Mycoplasma hominis*からのADIはまた、この保存システインの近傍に位置する3つのリジン、特にLys374、Lys405及びLys408を有する。Lys374、Lys405、Lys408またはこれらの組み合わせに対するPEGの結合は、酵素を不活性化し得る。

【0127】

その他の生物に由来するADIも、*Mycoplasma hominis*からのADIの112位に対応するPEG化部位を有する場合があることを理解すべきである。例えば

10

20

30

40

50

、*Streptococcus pyogenes*からのADIは104位にリジンを有し、*Mycoplasma pneumoniae*からのADIは106位にリジンを有し、*Giardia intestinalis*からのADIは114位にリジンを有する。加えて、いくつかの生物からのADIは、*Mycoplasma hominis*からのADIの112位と同じ一般位置に対応するリジンを有する場合がある。このような生物からのADIにおけるリジンの位置は、当業者には既知であり、米国特許第U.S. 6,35,462号明細書に記載されている。

【0128】

したがって、一実施形態では、本発明は、ADIのポリペプチド鎖においてある種のアミノ酸置換を提供する。これらのアミノ酸置換は、修飾剤により修飾される場合、例えばPEG化される場合でも、あまり活性を失わない修飾ADIを提供する。酵素の触媒領域の、または領域に隣接するPEG化部位、またはその他の既知の修飾部位を排除することにより、最適な修飾、例えばPEG化が、活性を失うことなく達成され得る。

【0129】

本発明のその他の実施形態は、アルギニンデイミナーゼのある種の構造的特徴が、組換え技術により產生される場合に、適切かつ迅速な再生を妨げる、またはそれに干渉する場合があるという理解に基づいていることを理解すべきである。特に、これらの構造的特徴は、組換え產生中に酵素が活性立体配座をとることを妨害する、または妨げる。本発明のために、「活性立体配座」という語句は、非修飾または修飾アルギニンデイミナーゼまたはキメラアルギニンデイミナーゼによる酵素活性を可能にする三次元構造と定義されてよい。活性立体配座は、特にアルギニンからシトルリンへの変換を触媒するために必要な場合がある。「構造的特徴」という語句は、特定のアミノ酸またはアミノ酸の組み合わせから得られるポリペプチド鎖の任意の形質、品質または特性と定義されてよい。例えば、アルギニンデイミナーゼは、正常なペプチド鎖に折り曲げまたはねじれをもたらして、それゆえ酵素產生中に、酵素が活性立体配座をとることを妨害するアミノ酸を含有する場合がある。特に、*Mycoplasma hominis*からのアルギニンデイミナーゼは、ペプチド鎖に折り曲げまたはねじれをもたらす場合があるプロリンを210位に有し、これにより組換え產生中に酵素を再生することをより困難にしている。その他の生物に由来するアルギニンデイミナーゼも、*Mycoplasma hominis*からのアルギニンデイミナーゼの210位に対応する部位を有することを理解すべきである。

【0130】

したがって、本発明は、野生型アルギニンデイミナーゼ及びそれらに由来するキメラアルギニンデイミナーゼのポリペプチド鎖に、ある種のアミノ酸置換をさらに提供する。このようなアミノ酸置換は、アルギニンデイミナーゼのペプチド鎖において問題となる構造的特徴を排除することができる。このようなアミノ酸置換は、修飾アルギニンデイミナーゼの改善した再生を提供する。これらのアミノ酸置換は、量を減らした緩衝液を使用して、修飾キメラアルギニンデイミナーゼの迅速な再生を可能にする。これらのアミノ酸置換は、再生される修飾キメラアルギニンデイミナーゼの収率増加も提供する場合がある。本発明の一実施形態では、修飾キメラアルギニンデイミナーゼは、P210または同等の残基にアミノ酸置換を有する。前述のように、*Mycoplasma hominis*に由来するアルギニンデイミナーゼは、210位に位置するアミノ酸のプロリンを有する。本発明に限定されることなく、位置210のアミノ酸プロリンの存在は、アルギニンデイミナーゼの再生（すなわち、リフォールディング）の困難さを増加させる折り曲げまたはねじれを、正常なポリペプチド鎖にもたらすと現在考えられている。位置210のプロリンの置換は、量を減らした緩衝液を使用して、修飾アルギニンデイミナーゼ及びそれに由来するキメラの迅速な再生を可能にする。位置210のプロリンの置換は、再生される修飾キメラアルギニンデイミナーゼの収率増加も提供する場合がある。一実施形態では、位置210のプロリンはセリンにより置換される。本発明のこの態様によると、位置210でその他の置換が行われてよいことを理解すべきである。その他の置換の例としては、Pro

10

20

30

40

50

210をThr210に、Pro210をArg210に、Pro210をAsn210に、Pro210をGln210に、またはPro210をMet210にする置換が挙げられる。野生型アルギニンデイミナーゼ及びそれに由来するキメラの位置210のアミノ酸に関連するこれらの構造的特徴を排除することにより、酵素の適切なリフォールディングが達成され得る。

【0131】

本発明の方法は、インビトロ用途またはインビボ用途のいずれかを含み得る。細胞培養用途を含むインビトロ用途の場合、本明細書に記載される化合物を培養物中の細胞に添加し、次いでインキュベートすることができる。本発明の化合物を、当該技術分野において周知の抗体産生技術を使用して、モノクローナル抗体及び/またはポリクローナル抗体の產生を促進するために使用してもよい。次いでモノクローナル抗体及び/またはポリクローナル抗体を、当業者には明らかであるように、多種多様な診断用途に使用することができる。

【0132】

本発明の化合物を投与するインビボ手段は、目的の用途に応じて変化するだろう。本明細書に記載されるキメラADI組成物の投与は、純粋形態で、または適切な医薬組成物で、類似した実用性を与えるための、薬剤の認められている投与方法のいずれかにより実施され得る。医薬組成物は、キメラADI、例えばキメラADI-P EG、キメラADI-P EG20を、適切な生理学的に許容される担体、希釈剤または賦形剤と組み合わせることにより調製され得、固体、半固体、液体または気体形態の、例えば錠剤、カプセル剤、散剤、顆粒剤、軟膏剤、液剤、坐剤、注射剤、吸入剤、ゲル剤、微粒子剤、及びエアゾール剤などの調製物へと製剤化されてよい。加えて、その他の薬学的活性成分（本明細書内の他の箇所に記載されているような、その他の抗癌剤を含む）ならびに/または好適な賦形剤、例えば塩、緩衝液及び安定剤などが、組成物内に存在する場合もあるが、必ずしもその必要はない。投与は、経口、非経口、経鼻、静脈内、皮内、皮下または局所を含む、種々の異なる経路により達成されてよい。投与方法は、処置または予防される状態の性質に依存する。したがって、キメラADI-P EG、例えばキメラADI-P EG20は、経口、鼻腔内、腹腔内、非経口、静脈内、リンパ管内、腫瘍内、筋肉内、間質内、動脈内、皮下、眼球内、滑液囊内、経上皮、及び経皮的に投与されてよい。投与後に、癌の進行及び/または転移を減少、阻害、予防または遅延させる量が、効果的であると考えられる。ある種の実施形態では、本明細書のキメラADI組成物は、統計的に有意な量で患者の生存期間の中央値を増加させる。一実施形態では、本明細書に記載されるキメラADI処置は、4週間、5週間、6週間、7週間、8週間、9週間、10週間、15週間、20週間、25週間、30週間、40週間、またはそれよりも長く、患者の生存期間の中央値を増加させる。ある種の実施形態では、キメラADI処置は、1年間、2年間、3年間、またはそれよりも長く、患者の生存期間の中央値を増加させる。一実施形態では、本明細書に記載されるキメラADI処置は、2週間、3週間、4週間、5週間、6週間、7週間、8週間、9週間、10週間またはそれよりも長く、無増悪生存期間を増加させる。ある種の実施形態では、本明細書に記載されるキメラADI処置は、1年間、2年間、3年間、またはそれよりも長く、無増悪生存期間を増加させる。

【0133】

ある種の実施形態では、投与される量は、生存腫瘍量の統計的に有意な減少、例えば腫瘍質量の少なくとも50%の減少によって、または走査寸法の変更（例えば、統計的有意性のある減少）によって示されるように腫瘍退縮をもたらすのに十分である。ある種の実施形態では、投与される量は、安定した疾患をもたらすのに十分である。その他の実施形態では、投与される量は、熟練した臨床医に既知の特定の疾患適応症の症状に、臨床的に関連する減少をもたらすのに十分である。

【0134】

ある種の実施形態では、投与される量は、NO合成を阻害する、血管新生を阻害するのに十分である、及びもしくは腫瘍細胞にアポトーシスを誘導するのに十分である、またはこ

10

20

30

40

50

れらの任意の組み合わせである。NO合成、血管新生及びアポトーシスは、当該技術分野において既知の方法を使用して測定されてよく、例えば、Current Protocols in Immunology or Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, New York, N.Y. (2009及びその最新版) ; Ausubel et al., Short Protocols in Molecular Biology, 3rd ed., Wiley & Sons, 1995 ; 及びその他の同様の参考文献を参照のこと。特定の一実施形態では、投与される量は、NO合成を阻害し、黒色腫の成長を阻害し、シスプラチンなどの本明細書に記載されるようなその他の化学療法と相乗作用する。したがって、本開示の一実施形態は、キメラADI-PEG20をシスプラチンと組み合わせて投与することにより、黒色腫を処置する方法を提供し、この処置は内因性一酸化窒素(NO)を枯渇させる。

【0135】

正確な投与量及び処置期間は、処置される疾患の関数であり、既知の試験プロトコールを使用して経験的に、または当該技術分野において既知のモデル系で組成物を試験し、そこから推定することにより決定されてよい。対照臨床試験を実施してもよい。投与量は、緩和されるべき状態の重症度によっても変動する場合がある。医薬組成物は一般に、治療上有用な効果を発揮しながら、望ましくない副作用を最小限に抑えるように製剤化及び投与される。組成物は、一度に投与されてよい、または時間間隔を置いて投与される多数の小用量に分割されてよい。任意の特定の対象には、特定の投与レジメンを個人の必要性に従って経時的に調整してよい。

【0136】

キメラADI組成物は、単独でまたは既知のその他の癌処置法、例えば放射線療法、化学療法、移植、免疫療法、ホルモン療法、光力学療法などと組み合わせて投与されてよい。組成物はまた、抗生物質と組み合わせて投与されてもよい。

【0137】

したがって、これらの及び関連する医薬組成物を投与する典型的な経路としては、経口、局所、経皮、吸入、非経口、舌下、頬側、直腸内、腔内、及び鼻腔内が挙げられるが、これらに限定されない。本明細書で使用する場合、非経口という用語は、皮下注射、静脈内、筋肉内、胸骨内注射、または注入技術を含む。本発明のある種の実施形態による医薬組成物は、その組成物に含有される活性成分が、患者への組成物の投与時に生物学的に利用可能であることを可能にするように製剤化される。対象または患者に投与されるだろう組成物は、1回以上の投与単位の形態をとってよく、例えば、錠剤は単回投与単位であってよく、エアゾール形態の本明細書に記載されるキメラADI組成物の容器は、複数回の投与単位を保持してよい。このような剤形を調製する実際の方法は、当業者には既知である、または当業者には明らかであろう。例えば、Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 20th Edition (Philadelphia College of Pharmacy and Science, 2000) を参照のこと。投与される組成物は、いずれにせよ、治療有効量の本開示のキメラADI-PEG、例えばキメラADI-PEG20などを、本明細書の教示に従って関心対象の疾患または状態を処置するために含有するだろう。

【0138】

医薬組成物は、固体または液体の形態であってよい。一実施形態では、1種以上の担体が粒状であり、それゆえ組成物は、例えば錠剤または散剤形態である。1種以上の担体は液体であってよく、組成物は、例えばアノーラル油、注射用液またはエアゾールであり、例えば吸入投与に有用である。経口投与を目的とする場合、医薬組成物は一般に、固体または液体形態のいずれかであり、半固体、半液体、懸濁液及びゲル形態が、本明細書において固体または液体のいずれかと考えられる形態内に含まれる。

【0139】

経口投与用の固体組成物として、医薬組成物は、散剤、顆粒剤、圧縮錠剤、丸剤、カプセル

ル剤、チューインガム剤、ウェハ剤などへと製剤化されてよい。このような固体組成物は、典型的には1種以上の不活性希釈剤または食用担体を含有するだろう。加えて、以下のうち1種以上が存在してよい：結合剤、例えばカルボキシメチルセルロース、エチルセルロース、微結晶セルロース、トラガカントガムまたはゼラチンなど；賦形剤、例えばデンプン、ラクトースまたはデキストリンなど、崩壊剤、例えばアルギン酸、アルギン酸ナトリウム、Primogel、トウモロコシデンプンなど；滑沢剤、例えばステアリン酸マグネシウムまたはSterotexなど；流動化剤、例えばコロイド状二酸化ケイ素など；甘味剤、例えばスクロースまたはサッカリンなど；香味剤、例えばペパーミント、サリチル酸メチルまたはオレンジ香味料など；及び着色剤。医薬組成物がカプセル剤、例えばゼラチンカプセル剤の形態である場合、上記種類の材料に加えて、液体担体、例えばポリエチレングリコールまたは油などを含有してよい。

【0140】

医薬組成物は、液体の形態、例えばエリキシル剤、シロップ剤、液剤、乳剤または懸濁液であってよい。液体は、2つの例として、経口投与または注射による送達用であってよい。経口投与を目的とする場合、好ましい組成物は、本発明の化合物に加えて、甘味剤、防腐剤、染料／着色剤及び香味増強剤のうち1種以上を含有する。注射による投与を目的とする組成物では、界面活性剤、防腐剤、湿潤剤、分散剤、懸濁化剤、緩衝液、安定剤及び等張化剤のうち1種以上を含んでよい。

【0141】

液体医薬組成物としては、それらが液剤、懸濁液またはその他の同様の形態であろうとなかろうと、以下のアジュvantのうち1種以上を挙げてよい：滅菌希釈剤、例えば注射用水、食塩水、ある種の実施形態では生理食塩水、リングル液、等張塩化ナトリウムなど、固定油、例えば溶媒もしくは懸濁媒体として機能する場合もある合成モノもしくはジグリセリド、ポリエチレングリコール、グリセリン、プロピレングリコールまたはその他の溶媒など；抗菌剤、例えばベンジルアルコールまたはメチルパラベンなど；酸化防止剤、例えばアスコルビン酸または重亜硫酸ナトリウムなど；キレート剤、例えばエチレンジアミン四酢酸など；緩衝液、例えば酢酸塩、クエン酸塩またはリン酸塩など、及び張度調整用の薬剤、例えば塩化ナトリウムまたはデキストロースなど。非経口調製物は、ガラスまたはプラスチック製のアンプル、使い捨てシリンジまたは多用量バイアル内に密閉され得る。生理食塩水が、好ましいアジュvantである。注射用医薬組成物は、好ましくは滅菌である。

【0142】

非経口または経口投与のいずれかを目的とする液体医薬組成物は、本明細書に開示されるようなキメラADI、例えばキメラADI-P EG 20などの量を含有すべきであり、その結果、好適な投与量が得られるだろう。典型的には、この量は、組成物中において少なくとも0.01%のキメラADIである。経口投与を目的とする場合、この量は、組成物の0.1～約70重量%の間で変動する場合がある。ある種の経口医薬組成物は、約4%～約75%のキメラADI-P EGを含有する。ある種の実施形態では、本発明による医薬組成物及び調製物は、非経口投与単位が希釈前に0.01～10重量%のキメラADI-P EGを含有するように調製される。

【0143】

医薬組成物は局所投与を目的としてよく、その場合に担体は、好適には液剤、乳剤、軟膏剤またはゲル剤の基剤を含んでよい。基剤は、例えば、以下のうち1種以上を含んでよい：ペトロラタム、ラノリン、ポリエチレングリコール、蜜蠟、鉛油、希釈剤、例えば水及びアルコールなど、ならびに乳化剤ならびに安定剤。増粘剤が、局所投与用の医薬組成物中に存在してよい。経皮投与を目的とする場合、組成物は、経皮パッチまたはイオン導入装置を含んでよい。医薬組成物は、例えば坐剤の形態での直腸投与を目的としてよく、それは直腸内で融解し、薬物を放出するだろう。直腸投与用組成物は、好適な非刺激性賦形剤として油脂性基剤を含有してよい。このような基剤としては、ラノリン、ココアバター及びポリエチレングリコールが挙げられるが、これらに限定されない。

10

20

30

40

50

【0144】

医薬組成物は、固体または液体投与単位の物理的形態を修飾する様々な材料を含んでよい。例えば、組成物は、活性成分の周りにコーティングシェルを形成する材料を含んでよい。コーティングシェルを形成する材料は、典型的には不活性であり、例えば、糖、シェラック、及びその他の腸溶性コーティング剤から選択されてよい。あるいは、活性成分をゼラチンカプセル内に入れてよい。固体または液体形態の医薬組成物は、キメラADI-P EGに結合し、それによって化合物の送達を助ける薬剤を含んでよい。この能力で作用する場合もある好適な薬剤としては、モノクローナル抗体もしくはポリクローナル抗体、1種以上のタンパク質またはリポソームが挙げられる。医薬組成物は、エアゾール剤として投与され得る投与単位から本質的に成ってよい。エアゾール剤という用語は、コロイド性の系から、加圧包装で構成される系までの範囲の様々な系を示すために使用される。送達は、液化ガスもしくは圧縮ガスによるもの、または活性成分を分配する好適なポンプ系によるものであってよい。エアゾール剤は、1種以上の活性成分を送達するために、単相、二相、または三相系で送達されてよい。エアゾール剤の送達には、必須の容器、活性化剤、バルブ、副容器などを含み、それら全体でキットを形成してよい。当業者は、過度な実験をすることなく好ましいエアゾール剤を決定してよい。

【0145】

医薬組成物は、医薬技術分野において周知の手法により調製されてよい。例えば、注射により投与されることを目的とする医薬組成物は、本明細書に記載されるようなキメラADI-P EG、ならびに場合により塩、緩衝液及び/または安定剤のうち1種以上を含む組成物を、滅菌蒸留水と組み合わせて液剤を形成することにより調製され得る。界面活性剤を添加して、均一な液剤または懸濁液の形成を促進してよい。界面活性剤は、キメラADI-P EG組成物と非共有結合的に相互作用して、水性送達系においてキメラADI-P EGの溶解または均一な懸濁を促進する化合物である。

【0146】

組成物は治療有効量で投与されてよく、この量は、用いられる特定の化合物（例えば、キメラADI-P EG）の活性；化合物の代謝安定性及び作用の長さ；患者の年齢、体重、全身の健康状態、性別、及び食事；投与方法及び投与時期；排出速度；薬物の組み合わせ；特定の障害または状態の重症度；ならびに療法を受けている対象を含む、様々な要因に応じて変動するだろう。

【0147】

本発明の化合物のうち1種の治療有効量は、腫瘍成長を阻害するのに効果的な量である。一般に、処置は少量の投与量で開始して、その状況下で最適な効果が得られるまで少量ずつ増加させることができる。一般に、本発明の化合物の治療投与量は、約1～約200mg/kgを1週間に2回～2週間に約1回であってよい。例えば、投与量は、2mlの静脈内注射として約1mg/kgを1週間に1回～約20mg/kgを3日に1回であってよい。さらなる実施形態では、用量は、約50IU/m²～約8,000IU/m²であり、3日に約1回、1週間に約1回、1週間に約2回、または2週間に約1回投与されてよい。ある種の実施形態では、用量は、約50IU/m²、60IU/m²、70IU/m²、80IU/m²、90IU/m²、100IU/m²、110IU/m²、120IU/m²、130IU/m²、140IU/m²、150IU/m²、160IU/m²、170IU/m²、180IU/m²、190IU/m²、200IU/m²、210IU/m²、220IU/m²、230IU/m²、240IU/m²、250IU/m²、260IU/m²、270IU/m²、280IU/m²、290IU/m²、300IU/m²、310IU/m²、約320IU/m²、約330IU/m²、340IU/m²、約350IU/m²、360IU/m²、370IU/m²、380IU/m²、390IU/m²、400IU/m²、410IU/m²、420IU/m²、430IU/m²、440IU/m²、450IU/m²、500IU/m²、550IU/m²、600IU/m²、620IU/m²、630IU/m²、640IU/m²、650IU/m²、660IU/m²、670IU/m²、680IU/m²、690IU/m²、700IU/m²、710IU/m²、720IU/m²、730IU/m²、740IU/m²、750IU/m²、760IU/m²、770IU/m²、780IU/m²、790IU/m²、800IU/m²、810IU/m²、820IU/m²、830IU/m²、840IU/m²、850IU/m²、860IU/m²、870IU/m²、880IU/m²、890IU/m²、900IU/m²、910IU/m²、920IU/m²、930IU/m²、940IU/m²、950IU/m²、960IU/m²、970IU/m²、980IU/m²、990IU/m²、1000IU/m²、1010IU/m²、1020IU/m²、1030IU/m²、1040IU/m²、1050IU/m²、1060IU/m²、1070IU/m²、1080IU/m²、1090IU/m²、1100IU/m²、1110IU/m²、1120IU/m²、1130IU/m²、1140IU/m²、1150IU/m²、1160IU/m²、1170IU/m²、1180IU/m²、1190IU/m²、1200IU/m²、1210IU/m²、1220IU/m²、1230IU/m²、1240IU/m²、1250IU/m²、1260IU/m²、1270IU/m²、1280IU/m²、1290IU/m²、1300IU/m²、1310IU/m²、1320IU/m²、1330IU/m²、1340IU/m²、1350IU/m²、1360IU/m²、1370IU/m²、1380IU/m²、1390IU/m²、1400IU/m²、1410IU/m²、1420IU/m²、1430IU/m²、1440IU/m²、1450IU/m²、1460IU/m²、1470IU/m²、1480IU/m²、1490IU/m²、1500IU/m²、1510IU/m²、1520IU/m²、1530IU/m²、1540IU/m²、1550IU/m²、1560IU/m²、1570IU/m²、1580IU/m²、1590IU/m²、1600IU/m²、1610IU/m²、1620IU/m²、1630IU/m²、1640IU/m²、1650IU/m²、1660IU/m²、1670IU/m²、1680IU/m²、1690IU/m²、1700IU/m²、1710IU/m²、1720IU/m²、1730IU/m²、1740IU/m²、1750IU/m²、1760IU/m²、1770IU/m²、1780IU/m²、1790IU/m²、1800IU/m²、1810IU/m²、1820IU/m²、1830IU/m²、1840IU/m²、1850IU/m²、1860IU/m²、1870IU/m²、1880IU/m²、1890IU/m²、1900IU/m²、1910IU/m²、1920IU/m²、1930IU/m²、1940IU/m²、1950IU/m²、1960IU/m²、1970IU/m²、1980IU/m²、1990IU/m²、2000IU/m²、2010IU/m²、2020IU/m²、2030IU/m²、2040IU/m²、2050IU/m²、2060IU/m²、2070IU/m²、2080IU/m²、2090IU/m²、2100IU/m²、2110IU/m²、2120IU/m²、2130IU/m²、2140IU/m²、2150IU/m²、2160IU/m²、2170IU/m²、2180IU/m²、2190IU/m²、2200IU/m²、2210IU/m²、2220IU/m²、2230IU/m²、2240IU/m²、2250IU/m²、2260IU/m²、2270IU/m²、2280IU/m²、2290IU/m²、2300IU/m²、2310IU/m²、2320IU/m²、2330IU/m²、2340IU/m²、2350IU/m²、2360IU/m²、2370IU/m²、2380IU/m²、2390IU/m²、2400IU/m²、2410IU/m²、2420IU/m²、2430IU/m²、2440IU/m²、2450IU/m²、2460IU/m²、2470IU/m²、2480IU/m²、2490IU/m²、2500IU/m²、2510IU/m²、2520IU/m²、2530IU/m²、2540IU/m²、2550IU/m²、2560IU/m²、2570IU/m²、2580IU/m²、2590IU/m²、2600IU/m²、2610IU/m²、2620IU/m²、2630IU/m²、2640IU/m²、2650IU/m²、2660IU/m²、2670IU/m²、2680IU/m²、2690IU/m²、2700IU/m²、2710IU/m²、2720IU/m²、2730IU/m²、2740IU/m²、2750IU/m²、2760IU/m²、2770IU/m²、2780IU/m²、2790IU/m²、2800IU/m²、2810IU/m²、2820IU/m²、2830IU/m²、2840IU/m²、2850IU/m²、2860IU/m²、2870IU/m²、2880IU/m²、2890IU/m²、2900IU/m²、2910IU/m²、2920IU/m²、2930IU/m²、2940IU/m²、2950IU/m²、2960IU/m²、2970IU/m²、2980IU/m²、2990IU/m²、3000IU/m²、3010IU/m²、3020IU/m²、3030IU/m²、3040IU/m²、3050IU/m²、3060IU/m²、3070IU/m²、3080IU/m²、3090IU/m²、3100IU/m²、3110IU/m²、3120IU/m²、3130IU/m²、3140IU/m²、3150IU/m²、3160IU/m²、3170IU/m²、3180IU/m²、3190IU/m²、3200IU/m²、3210IU/m²、3220IU/m²、3230IU/m²、3240IU/m²、3250IU/m²、3260IU/m²、3270IU/m²、3280IU/m²、3290IU/m²、3300IU/m²、3310IU/m²、3320IU/m²、3330IU/m²、3340IU/m²、3350IU/m²、3360IU/m²、3370IU/m²、3380IU/m²、3390IU/m²、3400IU/m²、3410IU/m²、3420IU/m²、3430IU/m²、3440IU/m²、3450IU/m²、3460IU/m²、3470IU/m²、3480IU/m²、3490IU/m²、3500IU/m²、3510IU/m²、3520IU/m²、3530IU/m²、3540IU/m²、3550IU/m²、3560IU/m²、3570IU/m²、3580IU/m²、3590IU/m²、3600IU/m²、3610IU/m²、3620IU/m²、3630IU/m²、3640IU/m²、3650IU/m²、3660IU/m²、3670IU/m²、3680IU/m²、3690IU/m²、3700IU/m²、3710IU/m²、3720IU/m²、3730IU/m²、3740IU/m²、3750IU/m²、3760IU/m²、3770IU/m²、3780IU/m²、3790IU/m²、3800IU/m²、3810IU/m²、3820IU/m²、3830IU/m²、3840IU/m²、3850IU/m²、3860IU/m²、3870IU/m²、3880IU/m²、3890IU/m²、3900IU/m²、3910IU/m²、3920IU/m²、3930IU/m²、3940IU/m²、3950IU/m²、3960IU/m²、3970IU/m²、3980IU/m²、3990IU/m²、4000IU/m²、4010IU/m²、4020IU/m²、4030IU/m²、4040IU/m²、4050IU/m²、4060IU/m²、4070IU/m²、4080IU/m²、4090IU/m²、4100IU/m²、4110IU/m²、4120IU/m²、4130IU/m²、4140IU/m²、4150IU/m²、4160IU/m²、4170IU/m²、4180IU/m²、4190IU/m²、4200IU/m²、4210IU/m²、4220IU/m²、4230IU/m²、4240IU/m²、4250IU/m²、4260IU/m²、4270IU/m²、4280IU/m²、4290IU/m²、4300IU/m²、4310IU/m²、4320IU/m²、4330IU/m²、4340IU/m²、4350IU/m²、4360IU/m²、4370IU/m²、4380IU/m²、4390IU/m²、4400IU/m²、4410IU/m²、4420IU/m²、4430IU/m²、4440IU/m²、4450IU/m²、4460IU/m²、4470IU/m²、4480IU/m²、4490IU/m²、4500IU/m²、4510IU/m²、4520IU/m²、4530IU/m²、4540IU/m²、4550IU/m²、4560IU/m²、4570IU/m²、4580IU/m²、4590IU/m²、4600IU/m²、4610IU/m²、4620IU/m²、4630IU/m²、4640IU/m²、4650IU/m²、4660IU/m²、4670IU/m²、4680IU/m²、4690IU/m²、4700IU/m²、4710IU/m²、4720IU/m²、4730IU/m²、4740IU/m²、4750IU/m²、4760IU/m²、4770IU/m²、4780IU/m²、4790IU/m²、4800IU/m²、4810IU/m²、4820IU/m²、4830IU/m²、4840IU/m²、4850IU/m²、4860IU/m²、4870IU/m²、4880IU/m²、4890IU/m²、4900IU/m²、4910IU/m²、4920IU/m²、4930IU/m²、4940IU/m²、4950IU/m²、4960IU/m²、4970IU/m²、4980IU/m²、4990IU/m²、5000IU/m²、5010IU/m²、5020IU/m²、5030IU/m²、5040IU/m²、5050IU/m²、5060IU/m²、5070IU/m²、5080IU/m²、5090IU/m²、5100IU/m²、5110IU/m²、5120IU/m²、5130IU/m²、5140IU/m²、5150IU/m²、5160IU/m²、5170IU/m²、5180IU/m²、5190IU/m²、5200IU/m²、5210IU/m²、5220IU/m²、5230IU/m²、5240IU/m²、5250IU/m²、5260IU/m²、5270IU/m²、5280IU/m²、5290IU/m²、5300IU/m²、5310IU/m²、5320IU/m²、5330IU/m²、5340IU/m²、5350IU/m²、5360IU/m²、5370IU/m²、5380IU/m²、5390IU/m²、5400IU/m²、5410IU/m²、5420IU/m²、5430IU/m²、5440IU/m²、5450IU/m²、5460IU/m²、5470IU/m²、5480IU/m²、5490IU/m²、5500IU/m²、5510IU/m²、5520IU/m²、5530IU/m²、5540IU/m²、5550IU/m²、5560IU/m²、5570IU/m²、5580IU/m²、5590IU/m²、5600IU/m²、5610IU/m²、5620IU/m²、5630IU/m²、5640IU/m²、5650IU/m²、5660IU/m²、5670IU/m²、5680IU/m²、5690IU/m²、5700IU/m²、5710IU/m²、5720IU/m²、5730IU/m²、5740IU/m²、5750IU/m²、5760IU/m²、5770IU/m²、5780IU/m²、5790IU/m²、5800IU/m²、5810IU/m²、5820IU/m²、5830IU/m²、5840IU/m²、5850IU/m²、5860IU/m²、5870IU/m²、5880IU/m²、5890IU/m²、5900IU/m²、5910IU/m²、5920IU/m²、5930IU/m²、5940IU/m²、5950IU/m²、5960IU/m²、5970IU/m²、5980IU/m²、5990IU/m²、6000IU/m²、6010IU/m²、6020IU/m²、6030IU/m²、6040IU/m²、6050IU/m²、6060IU/m²、6070IU/m²、6080IU/m²、6090IU/m²、6100IU/m²、6110IU/m²、6120IU/m²、6130IU/m²、6140IU/m²、6150IU/m²、6160IU/m²、6170IU/m²、6180IU/m²、6190IU/m²、6200IU/m²、6210IU/m²、6220IU/m²、6230IU/m²、6240IU/m²、6250IU/m²、6260IU/m²、6270IU/m²、6280IU/m²、6290IU/m²、6300IU/m²、6310IU/m²、6320IU/m²、6330IU/m²、6340IU/m²、6350IU/m²、6360IU/m²、6370IU/m²、6380IU/m²、6390IU/m²、6400IU/m²、6410IU/m²、6420IU/m²、6430IU/m²、6440IU/m²、6450IU/m²、6460IU/m²、6470IU/m²、6480IU/m²、6490IU/m²、6500IU/m²、6510IU/m²、6520IU/m²、6530IU/m²、6540IU/m²、6550IU/m²、6560IU/m²、6570IU/m²、6580IU/m²、6590IU/m²、6600IU/m²、6610IU/m²、6620IU/m²、6630IU/m²、6640IU/m²、6650IU/m²、6660IU/m²、6670IU/m²、6680IU/m²、6690IU/m²、6700IU/m²、6710IU/m²、6720IU/m²、6730IU/m²、6740IU/m²、6750IU/m²、6760IU/m²、6770IU/m²、6780IU/m²、6790IU/m²、6800IU/m²、6810IU/m²、6820IU/m²、6830IU/m²、6840IU/m²、6850IU/m²、6860IU/m²、6870IU/m²、6880IU/m²、6890IU/m²、6900IU/m²、6910IU/m²、6920IU/m²、6930IU/m²、6940IU/m²、6950IU/m²、6960IU/m²、6970IU/m²、6980IU/m²、6990IU/m²、7000IU/m²、7010IU/m²、7020IU/m²、7030IU/m²、7040IU/m²、7050IU/m²、7060IU/m²、7070IU/m²、7080IU/m²、7090IU/m²、7100IU/m²、7110IU/m²、7120IU/m²、7130IU/m²、7140IU/m²、7150IU/m²、7160IU/m²、7170IU/m²、7180IU/m²、7190IU/m²、7200IU/m²、7210IU/m²、7220IU/m²、7230IU/m²、7240IU/m²、7250IU/m²、7260IU/m

U / m²、700IU / m²、750IU / m²、800IU / m²、850IU / m²、900IU / m²、950IU / m²、1,000IU / m²、1,100IU / m²、1,200IU / m²、1,300IU / m²、1,400IU / m²、1,500IU / m²、1,600IU / m²、1,700IU / m²、1,800IU / m²、1,900IU / m²、2,000IU / m²、2,100IU / m²、2,200IU / m²、2,300IU / m²、2,400IU / m²、2,500IU / m²、2,600IU / m²、2,700IU / m²、2,800IU / m²、2,900IU / m²、3,000IU / m²、3,100IU / m²、3,200IU / m²、3,300IU / m²、3,400IU / m²、3,500IU / m²、3,600IU / m²、3,700IU / m²、3,800IU / m²、3,900IU / m²、4,000IU / m²、4,100IU / m²、4,200IU / m²、4,300IU / m²、4,400IU / m²、4,500IU / m²、4,600IU / m²、4,700IU / m²、4,800IU / m²、4,900IU / m²、5,000IU / m²、5,100IU / m²、5,200IU / m²、5,300IU / m²、5,400IU / m²、5,500IU / m²、5,600IU / m²、5,700IU / m²、5,800IU / m²、5,900IU / m²、6,000IU / m²、6,100IU / m²、6,200IU / m²、6,300IU / m²、6,400IU / m²、6,500IU / m²、6,600IU / m²、6,700IU / m²、6,800IU / m²、6,900IU / m²、7,000IU / m²、7,100IU / m²、7,200IU / m²、7,300IU / m²、7,400IU / m²、7,500IU / m²、7,600IU / m²、7,700IU / m²、7,800IU / m²、7,900IU / m²、または約8,000IU / m²であり、3日に約1回、1週間に約1回、1週間に約2回、または2週間に約1回投与されてよい。いくつかの実施形態では、用量は、約1mg / m²、2mg / m²、3mg / m²、4mg / m²、5mg / m²、6mg / m²、7mg / m²、8mg / m²、9mg / m²、10mg / m²、15mg / m²、20mg / m²、25mg / m²、30mg / m²、35mg / m²、40mg / m²、45mg / m²、50mg / m²、55mg / m²、60mg / m²、65mg / m²、70mg / m²、75mg / m²、または約80mg / m²であり、3日に約1回、1週間に約1回、1週間に約2回、または2週間に約1回投与されてよい。ある種の実施形態では、用量は、熟練した臨床医によって所望に応じて修正されてよい。いくつかの実施形態では、

【0148】

キメラADI-SS-PEG5,000による最適な投与は、1週間に約2回であってよいが、キメラADI-SS-PEG20,000による最適な投与は、1週間に約1回～2週間に約1回であってよい。ある種の実施形態では、キメラADI-SS-PEG20,000による最適な投与は、1週間に約2回であってよい。

【0149】

キメラADI-PEGを、リン酸緩衝食塩水と、または当業者に既知の任意のその他の適切な溶液と、注射前に混合してよい。一実施形態では、キメラADI-PEGを含む液体組成物は、約10～約12mgのキメラADI、約20～約40mgのポリエチレングリコール、1.27mgの+5%一塩基性リン酸ナトリウム、USP；約3mgの+5%二塩基性リン酸ナトリウム、USP；7.6mgの+5%塩化ナトリウム、USPを；約6.6～約7のpHで；適切な量の注射用水（例えば、約1mLまたは約2mL）中に含む。一実施形態では、キメラADI-PEGを含む液体組成物は、ヒスチジン-HClを含み、ある種の実施形態では、組成物緩衝液は、約0.0035Mのヒスチジン-HCl～約0.35Mのヒスチジン-HClである。特定の一実施形態では、組成物は、pH6.8で0.035Mのヒスチジン-HClを、0.13Mの塩化ナトリウムと共に含む緩衝液中で製剤化される。別の実施形態では、組成物は、pH6.8で0.02Mのリン酸ナトリウム緩衝液を、0.13Mの塩化ナトリウムと共に含む緩衝液中で製剤化される。

【0150】

一実施形態では、キメラADIまたはキメラADI-PEGを含む組成物は、約5～約9

10

20

30

40

50

の pH、約 6 ~ 約 8 の pH、または約 6 . 5 ~ 約 7 . 5 の pH を有する。いくつかの実施形態では、キメラ A D I を含む組成物は、約 6 . 8 ± 1 . 0 の pH を有する。

【 0 1 5 1 】

一実施形態では、キメラ A D I - P E G を含む組成物中の遊離 P E G は 1 ~ 1 0 % であり、さらなる実施形態では、総 P E G の 7 % 未満、6 % 未満、5 % 未満、4 % 未満、3 % 未満、2 % 未満または 1 % 未満である。ある種の実施形態では、キメラ A D I - P E G を含む組成物中の非修飾キメラ A D I は、約 1 % 未満、0 . 9 % 未満、0 . 8 % 未満、0 . 7 % 未満、0 . 6 % 未満、0 . 5 % 未満、0 . 4 % 未満、0 . 3 % 未満、0 . 2 % 未満または 0 . 1 % 未満である。一般に、キメラ A D I - P E G を含む組成物は、約 4 % 以下、3 % 以下、2 % 以下、1 . 5 % 以下、1 % 以下または 0 . 5 % 以下の総不純物を有する。一実施形態では、エンドトキシン規格値は、U S P に記述されている要件を満たす、すなわち、5 0 E U / m L である。

【 0 1 5 2 】

一実施形態では、キメラ A D I またはキメラ A D I - P E G を含む組成物中の遊離スルフヒドリルは、約 9 0 % 超である。いくつかの実施形態では、キメラ A D I またはキメラ A D I - P E G を含む組成物中の遊離スルフヒドリルは、約 9 1 %、約 9 2 %、約 9 3 %、約 9 4 % もしくは約 9 5 %、約 9 6 %、約 9 7 %、約 9 8 %、約 9 9 % またはそれを超える。

【 0 1 5 3 】

一実施形態では、組成物中のキメラ A D I またはキメラ A D I - P E G は、約 0 . 5 μ M ~ 約 1 5 μ M の K m を有し、さらなる実施形態では、約 1 μ M ~ 約 1 2 μ M、約 1 μ M ~ 約 1 0 μ M、約 1 . 5 μ M ~ 約 9 μ M、約 1 . 5 μ M ~ 約 8 μ M または約 1 . 5 μ M ~ 約 7 μ M である。ある種の実施形態では、組成物中のキメラ A D I またはキメラ A D I - P E G は、約 1 . 5 μ M ~ 約 6 . 5 μ M の K m を有する。いくつかの実施形態では、組成物中のキメラ A D I またはキメラ A D I - P E G は、約 1 . 5 μ M、約 2 μ M、約 2 . 5 μ M、約 3 μ M、約 3 . 5 μ M、約 4 μ M、約 4 . 5 μ M、約 5 μ M、約 5 . 5 μ M、約 6 μ M、約 6 . 5 μ M、または約 7 μ M の K m を有する。一実施形態では、組成物中のキメラ A D I またはキメラ A D I - P E G は、組成物中の野生型 A D I または野生型 A D I - P E G と比較して、減少した K m を有する。

【 0 1 5 4 】

一実施形態では、組成物中のキメラ A D I またはキメラ A D I - P E G は、約 0 . 5 秒⁻¹ ~ 約 1 5 秒⁻¹ の K c a t を有し、さらなる実施形態では、約 1 秒⁻¹ ~ 約 1 2 秒⁻¹、約 1 秒⁻¹ ~ 約 1 0 秒⁻¹、約 1 . 5 秒⁻¹ ~ 約 9 秒⁻¹、約 2 秒⁻¹ ~ 約 8 秒⁻¹ または約 2 . 5 秒⁻¹ ~ 約 7 秒⁻¹ である。ある種の実施形態では、組成物中のキメラ A D I またはキメラ A D I - P E G は、約 2 . 5 秒⁻¹ ~ 約 7 . 5 秒⁻¹ の K c a t を有する。いくつかの実施形態では、組成物中のキメラ A D I またはキメラ A D I - P E G は、約 2 . 5 秒⁻¹、約 3 秒⁻¹、約 3 . 5 秒⁻¹、約 4 秒⁻¹、約 4 . 5 秒⁻¹、約 5 秒⁻¹、約 5 . 5 秒⁻¹、約 6 秒⁻¹、約 6 . 5 秒⁻¹、約 7 秒⁻¹、約 7 . 5 秒⁻¹ または約 8 秒⁻¹ の K c a t を有する。一実施形態では、組成物中のキメラ A D I またはキメラ A D I - P E G は、組成物中の野生型 A D I または野生型 A D I - P E G よりも高い K c a t を有する。

【 0 1 5 5 】

一実施形態では、組成物中のキメラ A D I またはキメラ A D I - P E G は、約 5 m S / c m ~ 約 2 0 m S / c m の伝導率（当該技術分野において比導電率とも称される）、さらなる実施形態では、約 5 m S / c m ~ 約 1 5 m S / c m、約 7 m S / c m ~ 約 1 5 m S / c m、約 9 m S / c m ~ 約 1 5 m S / c m または約 1 0 m S / c m ~ 約 1 5 m S / c m の伝導率を有する。いくつかの実施形態では、組成物中のキメラ A D I またはキメラ A D I - P E G は、約 9 m S / c m、約 1 0 m S / c m、約 1 1 m S / c m、約 1 2 m S / c m または約 1 3 m S / c m、約 1 4 m S / c m または約 1 5 m S / c m の伝導率を有する。ある種の実施形態では、組成物中のキメラ A D I またはキメラ A D I - P E G は、約 1 3 m

10

20

30

40

50

S / cm \pm 1.0 mS / cm の伝導率を有する。

【0156】

一実施形態では、組成物中のキメラADIまたはキメラADI-PEGは、約50mOs m / kg ~ 約500mOs m / kg、約100mOs m / kg ~ 約400mOs m / kg、約150mOs m / kg ~ 約350mOs m / kg、約200mOs m / kg ~ 約350mOs m / kgまたは約250mOs m / kg ~ 約350mOs m / kgのオスモル濃度を有する。ある種の実施形態では、組成物中のキメラADIまたはキメラADI-PEGは、約300 \pm 30 mOs m / kgのオスモル濃度を有する。

【0157】

一実施形態では、タンパク質濃度は、約11.0 \pm 1.0 mg / mLである。ある種の実施形態では、タンパク質濃度は、約8 ~ 約15 mg / mLである。別の実施形態では、タンパク質濃度は、約8、9、10、10.5、11、11.5、12、12.5、13、13.5、14、または15 mg / mLである。

【0158】

一実施形態では、比酵素活性は5.0 ~ 150 IU / mgであり、1 IUは、37で1分間に1 μ molのアルギニンを1 μ molのシトルリンと1 μ molのアンモニアへと変換する酵素の量と定義され、活性は100 \pm 20 IU / mgである。別の実施形態では、比酵素活性は、約5.5、6、6.5、7、7.5、8、8.5、9.0、9.5、10、10.5、11、11.5、12、12.5、13、13.5、14、14.5、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、105、110、115、120、125、130、135、140、145、または約150 \pm 2.0 IU / mgである。特定の一実施形態では、比酵素活性は、100 \pm 10.0 IU / mgである。

【0159】

本開示のキメラADI-PEGを含む組成物はまた、1種以上のその他の治療剤の投与と同時に、投与前に、または投与後に投与されてもよい。このような併用療法としては、本発明の化合物及び1種以上の追加の活性剤を含有する単一の医薬投与製剤の投与、ならびに本発明のキメラADI-PEG（例えば、キメラADI-PEG 20）を含む組成物及び各活性剤の、それぞれ別個の医薬投与製剤による投与を挙げてよい。例えば、本明細書に記載されるようなキメラADI-PEG及び他方の活性剤を、単一の経口投与組成物、例えば錠剤もしくはカプセル剤などで一緒に患者に投与することができる、または各薬剤を別個の経口投与製剤で投与することができる。同様に、本明細書に記載されるようなキメラADI-PEG及び他方の活性剤を、単一の非経口投与組成物で、例えば食塩水もしくはその他の生理学的に許容される溶液などで一緒に患者に投与することができる、または各薬剤を別個の非経口投与製剤で投与することができる。別個の投与製剤を使用する場合、キメラADI-PEGを含む組成物及び1種以上の追加の活性剤を、本質的に同時に、すなわち並行して、または別々に時間差で、すなわち連続して任意の順番で投与することができ；併用療法は、これらすべてのレジメンを含むと理解される。

【0160】

したがって、ある種の実施形態では、1種以上のその他の治療剤と組み合わせた、本開示のキメラADI組成物の投与も意図される。このような治療剤は、本明細書に記載されるような特定の疾患状態、例えば特定の癌またはGVHDなどの標準的な処置として当該技術分野において認められる場合がある。意図される例示的な治療剤としては、サイトカイン、成長因子、ステロイド、NSAID、DMARD、抗炎症薬、化学療法薬、放射線療法薬、オートファジー調節剤、またはその他の活性剤及び補助剤が挙げられる。

【0161】

ある種の実施形態では、本明細書に開示されるキメラADI組成物を、任意の数の化学療法剤と組み合わせて投与してよい。化学療法剤の例としては、アルキル化剤、例えばチオテバ及びシクロホスファミド（CYTOXAN（商標））など；スルホン酸アルキル、例

10

20

30

40

50

えばブスルファン、インプロスルファン及びピポスルファンなど；アジリジン、例えはベンゾドーパ、カルボコン、メツレドーパ、及びウレドーパなど；アルトレタミン、トリエチレンメラミン、トリエチレンホスホラミド、トリエチレンチオホスホラミド及びトリメチロールメラミンを含むエチレンイミン及びメチルメラミン；ナイトロジエンマスターード、例えはクロラムブシル、クロルナファジン、コロホスファミド、エストラムスチン、イホスファミド、メクロレタミン、メクロレタミンオキシドヒドロクロリド、メルファラン、ノベンピチン、フェネステリン、プレドニムスチン、トロホスファミド、ウラシルマスターードなど；ニトロソウレア、例えはカルムスチン、クロロゾトシン、フォテムスチン、ロムスチン、ニムスチン、ラニムスチンなど；抗生物質、例えはアクラシノマイシン、アクチノマイシン、アントラマイシン、アザセリン、ブレオマイシン、カクチノマイシン、カリケアマイシン、カラビシン、カルミノマイシン、カルジノフィリン、クロモマイシン、ダクチノマイシン、ダウノルビシン、デトルビシン、6-ジアゾ-5-オキソ-L-ノルロイシン、ドキソルビシン、エピルビシン、エソルビシン、イダルビシン、マルセロマイシン、マイトマイシン、ミコフェノール酸、ノガラマイシン、オリボマイシン、ペプロマイシン、ポトフィロマイシン、ピューロマイシン、ケラマイシン、ロドルビシン、ストレプトニグリン、ストレプトゾシン、ツベルシジン、ウベニメクス、ジノスタチン、ゾルビシンなど；代謝拮抗剤、例えはメトトレキサート及び5-フルオロウラシル(5-FU)など；葉酸類似体、例えはデノブテリン、メトトレキサート、ブテロブテリン、トリメトレキサートなど；プリン類似体、例えはフルダラビン、6-メルカプトプリン、チアミプリン、チオグアニンなど；ピリミジン類似体、例えはアンシタビン、アザシチジン、6-アザウリジン、カルモフル、シタラビン、ジデオキシウリジン、ドキシフルリジン、エノシタビン、フロクスウリジン、5-FUなど；アンドロゲン、例えはカルステロン、プロピオン酸ドロモスタノロン、エピチオスタノール、メピチオスタン、テストラクトンなど；抗副腎剤、例えはアミノグルテチミド、ミトタン、トリロスタンなど；葉酸補充剤、例えはフォリン酸など；アセグラトン；アルドホスファミドグリコシド；アミノレブリニ酸；アムサクリン；ベストラブシル；ビサントレン；エダトレキサート；デフォファミン；デメコルシン；ジアジコン；エフロルニチン；酢酸エリプチニウム；エトグルシド；硝酸ガリウム；ヒドロキシ尿素；レンチナン；ロニダミン；ミトグアゾン；ミトキサントロン；モピダモール；ニトラクリン；ペントスタチン；フェナメット；ピラルビシン；ポドフィリン酸；2-エチルヒドラジド；プロカルバジン；PSK(登録商標)；ラゾキサン；シゾフィラン；スピロゲルマニウム；テヌアゾン酸；トリアジコン；2,2',2''-トリクロロトリエチルアミン；ウレタン；ビンデシン；ダカルバジン；マンノムスチン；ミトプロニトール；ミトラクトール；ピポプロマン；ガシトシン；アラビノシド('Ara-C')；シクロホスファミド；チオテバ；タキソイド、例えはパクリタキセル(TAXOL(登録商標)、Bristol-Myers Squibb Oncology、プリンストン、ニュージャージー州)及びドセタキセル(TAXOTERE(登録商標)、Rhône-Poulenc Rorer、アントニー、フランス)；クロラムブシル；ゲムシタビン；6-チオグアニン；メルカプトプリン；メトトレキサート；白金類似体、例えはシスプラチン及びカルボプラチンなど；ビンプラスチン；白金；エトポシド(VP-16)；イホスファミド；マイトマイシンC；ミトキサントロン；ビンクリスチン；ビノレルビン；ナベルビン；ノバントロン；テニポシド；ダウノマイシン；アミノブテリン；ゼローダ；イバンドロネート；CPT-11；トボイソメラーゼ阻害剤RFS2000；ジフルオロメチルオルニチン(DMFO)；レチノイン酸誘導体、例えはTargretin(商標)(ベキサロテン)、Panretin(商標)(アリトレチノイン)など；ONTAK(商標)(デニロイキンジフチトクス)；エスペラマイシン；カペシタビン；ならびに上記のいずれかの薬学的に許容される塩、酸または誘導体が挙げられる。腫瘍に対するホルモン作用を調節または阻害するように機能する抗ホルモン剤、例えは抗エストロゲン剤、例えはタモキシフェン、ラロキシフェン、アロマターーゼ阻害4(5)-イミダゾール、4-ヒドロキシタモキシフェン、トリオキシフェン、ケオキシフェン、LY117018、オナプリストン、及びトレミフェン(Fareston)を含み；なら

10

20

30

40

50

びに抗アンドロゲン剤、例えばフルタミド、ニルタミド、ビカルタミド、ロイプロリド、及びゴセレリンなども、この定義に含まれる。さらなる化学療法剤としては、ソラフェニブ、ならびにその他のタンパク質キナーゼ阻害剤、例えばアファチニブ、アキシチニブ、ベバシズマブ、セツキシマブ、クリゾチニブ、ダサチニブ、エルロチニブ、フォスタマチニブ、ゲフィチニブ、イマチニブ、ラパチニブ、レンバチニブ、ムブリチニブ、ニロチニブ、パニツムマブ、パゾパニブ、ペガプラニブ、ラニビズマブ、ルキソリチニブ、トラスツズマブ、バンデタニブ、ベムラフェニブ、及びスニチニブなど；シロリムス（ラパマイシン）、エベロリムス及びその他のmTOR阻害剤が挙げられる。上記のいずれかの薬学的に許容される塩、酸または誘導体もまた、本明細書での使用が意図される。

【0162】

10

ある種の実施形態では、本明細書に開示されるキメラADI組成物を、任意の数のオートファジー阻害剤と組み合わせて投与してよい。いくつかの好ましい実施形態では、オートファジー阻害剤は、クロロキン、3-メチルアデニン、ヒドロキシクロロキン（P1aquenil（商標））、バフィロマイシンA1、5-アミノ-4-イミダゾールカルボキサミドリボシド（AICAR）、オカダ酸、2A型または1型のタンパク質ホスファターゼを阻害するオートファジー抑制藻類毒素、cAMPの類似体、及びcAMPレベルを上昇させる薬物、アデノシン、N6-メルカブトプリンリボシド、ワートマニン、ならびにビンプラスチンから成る群から選択される。加えて、オートファジーに必須のタンパク質、例えばATG5などの発現を調節するアンチセンスまたはsiRNAを使用してもよい。

20

【0163】

一実施形態では、キメラADI-P EGと1種以上の治療剤との組み合わせは、相加的または相乗的に作用する。この点に関して、相乗作用剤が本明細書に記載され、この剤としては、本明細書で提供されるようなキメラADI-P EGと相乗的に作用できる治療剤（例えば、本明細書に記載されるような化学療法剤、オートファジー阻害剤、mTOR阻害剤、または癌、GVHD、もしくは炎症性腸疾患の処置に使用される任意の他の治療剤）が挙げられ、このような相乗効果は、化学療法剤は存在するが、ADI-P EG組成物が存在しない場合に、及び/またはADI-P EGは存在するが、化学療法剤が存在しない場合に検出され得る効果よりも大きな（すなわち、適切な対照条件と比較して統計的に有意である）検出可能な効果として現れる。相乗効果を測定する方法は、当該技術分野において既知である（例えば、Cancer Res January 15, 2010 70; 440を参照のこと）。

30

【0164】

本明細書に記載されるようなキメラADIを含む組成物、及び場合により他の治療剤は、癌を処置する処置方法及び癌の転移を予防する方法に使用されてよい。したがって、本発明は、種々の異なる癌を処置する、それらの症状を改善させる、またはそれらの進行を阻害する、またはそれらを予防する方法を提供する。別の実施形態では、本開示は、GVHDを処置する、その症状を改善させる、またはその進行を阻害する方法を提供する。特に、本開示は、患者の癌またはGVHDを処置する、その症状を改善させる、またはその進行を阻害する方法であって、患者に、治療有効量の本明細書に記載されるようなキメラADI組成物を投与し、それによって癌またはGVHDを処置する、その症状を改善させる、またはその進行を阻害することを含む方法を提供する。したがって、本明細書に記載されるキメラADI組成物は、炎症性腸疾患（例えば、クローン病；潰瘍性大腸炎）、GVHDまたは癌、例えば白血病（例えば、急性骨髓性白血病及び再発性急性骨髓性白血病）、黒色腫、肉腫（転移性肉腫、子宮平滑筋肉腫を含むが、これらに限定されない）、膀胱癌、前立腺癌（ホルモン不応性前立腺癌などであるが、これに限定されない）、中皮腫、リンパ性白血病、慢性骨髓性白血病、リンパ腫、小細胞肺癌、乳癌、卵巣癌、結腸直腸癌、胃の癌（胃腺癌を含むが、これに限定されない）、神経膠腫、多形性膠芽腫、網膜芽細胞腫、神経芽細胞腫、非小細胞肺癌（NSCLC）、腎臓癌（腎細胞癌を含むが、これに限定されない）、膀胱癌、子宮癌、食道癌、脳癌、頭頸部癌（頭頸部の扁平上皮癌；

40

50

舌の癌を含むが、これらに限定されない)、子宮頸癌、精巣癌、胆嚢、胆管癌、及び胃癌を含むが、これらに限定されない癌に罹患した個人に投与されてよい。

【0165】

一実施形態では、本開示は、治療有効量のキメラADI-P EG 20を投与することにより、骨髓性白血病、例えばこれに限定されないが、急性骨髓性白血病(AML)などを処置する、その症状を改善させる、またはその進行を阻害する方法を提供する。ある種の実施形態では、AMLなどの骨髓性白血病は、ASS、ASL、またはその両方を欠損している。さらなる実施形態では、本開示は、キメラADI-P EG 20を、3日に約1回、1週間に約1回、1週間に約2回、または2週間に約1回投与することを含む、AMLを処置する方法を提供する。ある種の実施形態では、AMLの処置のために投与されるキメラADI-P EG 20の用量は、約50IU/m²～約8,000IU/m²であり、その他の実施形態では、約50IU/m²、約100IU/m²、150IU/m²、200IU/m²、250IU/m²、300IU/m²、350IU/m²、400IU/m²、450IU/m²、500IU/m²、550IU/m²、600IU/m²、650IU/m²、700IU/m²、750IU/m²、800IU/m²、約900IU/m²、約1,000IU/m²、1,500IU/m²、約2,000IU/m²、約2,500IU/m²、約3,000IU/m²、3,500IU/m²、4,000IU/m²、4,500IU/m²、5,000IU/m²、5,500IU/m²、6,000IU/m²、6,500IU/m²、7,000IU/m²、7,500IU/m²、または約8,000IU/m²である。特定の実施形態では、AMLの処置のために投与されるキメラADI-P EG 20の用量は、約1mg/m²～約80mg/m²であり、その他の実施形態では、約1mg/m²、2mg/m²、3mg/m²、4mg/m²、5mg/m²、6mg/m²、7mg/m²、8mg/m²、9mg/m²、10mg/m²、15mg/m²、20mg/m²、25mg/m²、30mg/m²、35mg/m²、40mg/m²、45mg/m²、50mg/m²、55mg/m²、60mg/m²、65mg/m²、70mg/m²、75mg/m²、または約80mg/m²である。ある種の実施形態では、本開示はAMLを処置する方法を提供し、キメラADIの用量を2倍にして、1週間当たり640IU/m²まで、またはそれを超えて増加させてよい。特定の一実施形態では、AMLの処置のためのキメラADIは、キメラADI当たり3.5～6.5のPEG分子で、または一実施形態では、キメラADI当たり4.5～5.5のPEG分子により修飾される。別の実施形態では、本開示は、キメラADI-P EG 20を含む組成物を投与することによりAMLを処置する方法を提供し、組成物は、5±1.5のPEG分子、一実施形態では、5±1.5の直鎖PEG分子により修飾されるキメラADIを含み、ある種の実施形態では、組成物は、約0.5%未満の天然キメラADI(すなわち、PEGにより修飾されていない)及び/または約5%未満の遊離PEGを含む。さらなる実施形態では、組成物は、ヒスチジン-HCL緩衝液を含む。

【0166】

一実施形態では、本開示は、治療有効量のキメラADI-P EG 20を投与することにより、転移性肉腫を含むが、これに限定されない肉腫を処置する、その症状を改善させる、またはその進行を阻害する方法を提供する。ある種の実施形態では、肉腫は、ASS、ASL、またはその両方を欠損している。さらなる実施形態では、本開示は、キメラADI-P EG 20を、3日に約1回、1週間に約1回、1週間に約2回、または2週間に約1回投与することを含む、肉腫を処置する方法を提供する。ある種の実施形態では、肉腫の処置のために投与されるキメラADI-P EG 20の用量は、約50IU/m²～約8,000IU/m²であり、その他の実施形態では、約50IU/m²、約100IU/m²、150IU/m²、200IU/m²、250IU/m²、300IU/m²、350IU/m²、400IU/m²、450IU/m²、500IU/m²、550IU/m²、600IU/m²、650IU/m²、700IU/m²、750IU/m²、800IU/m²、約900IU/m²、約1,000IU/m²、1,500IU/m²、約2,000IU/m²、約2,500IU/m²、約3,000IU/m²、3,500IU/m²、4,000IU/m²、4,500IU/m²、5,000IU/m²、5,500IU/m²、6,000IU/m²、6,500IU/m²、7,000IU/m²、7,500IU/m²、8,000IU/m²、約9,000IU/m²、約10,000IU/m²である。

10

20

30

40

50

0 0 I U / m²、4,000 I U / m²、4,500 I U / m²、5,000 I U / m²、5,500 I U / m²、6,000 I U / m²、6,500 I U / m²、7,000 I U / m²、7,500 I U / m²、または約8,000 I U / m²である。特定の実施形態では、肉腫の処置のために投与されるキメラ A D I - P E G 2 0 の用量は、約1 m g / m² ~ 約80 m g / m²であり、その他の実施形態では、約1 m g / m²、2 m g / m²、3 m g / m²、4 m g / m²、5 m g / m²、6 m g / m²、7 m g / m²、8 m g / m²、9 m g / m²、10 m g / m²、15 m g / m²、20 m g / m²、25 m g / m²、30 m g / m²、35 m g / m²、40 m g / m²、45 m g / m²、50 m g / m²、55 m g / m²、60 m g / m²、65 m g / m²、70 m g / m²、75 m g / m²、または約80 m g / m²である。ある種の実施形態では、本開示は肉腫を処置する方法を提供し、キメラ A D I の用量を2倍にして、1週間当たり640 I U / m²まで、またはそれを超えて増加させてよい。特定の一実施形態では、A M L の処置のためのキメラ A D I は、キメラ A D I 当たり3.5 ~ 6.5のP E G 分子で、または一実施形態では、キメラ A D I 当たり4.5 ~ 5.5のP E G 分子により修飾される。別の実施形態では、本開示は、キメラ A D I - P E G 2 0 を含む組成物を投与することにより、転移性肉腫を含む肉腫を処置する方法を提供し、組成物は、5 ± 1.5のP E G 分子、一実施形態では、5 ± 1.5の直鎖P E G 分子により修飾されるキメラ A D I を含み、ある種の実施形態では、組成物は、約0.5%未満の天然キメラ A D I (すなわち、P E G により修飾されていない)及び/または約5%未満の遊離P E G を含む。さらなる実施形態では、組成物は、ヒスチジン - H C L 緩衝液を含む。
10
20

【0167】

一実施形態では、本開示は、治療有効量のキメラ A D I - P E G 2 0 を、場合によりオートファジー阻害剤、例えばこれらに限定されないが、クロロキン、3-メチルアデニン、ヒドロキシクロロキン、バフィロマイシンA 1、5-アミノ-4-イミダゾールカルボキサミドリボシド(A I C A R)、オカダ酸、N 6 - メルカブトプリンリボシド、ワートマニン、及びビンプラスチンなどと組み合わせて投与することにより、膵臓癌を処置する、その症状を改善させる、またはその進行を阻害する方法を提供する。ある種の実施形態では、膵臓癌は、A S S、A S L、またはその両方を欠損している。さらなる実施形態では、本開示は、A D I - P E G 2 0 を、3日に約1回、1週間に約1回、1週間に約2回、または2週間に約1回；場合により、治療有効量のオートファジー阻害剤、例えばクロロキンなどと組み合わせて投与することを含む、膵臓癌を処置する方法を提供する。この点に関して、治療有効用量のクロロキンは、約600 m g 塩基、続いて300 m g 塩基を追加する初期用量、及び2日連続で各日300 m g 塩基の単回用量であってよい。このことは、3日間の総用量が2.5 g のリン酸クロロキンまたは1.5 g 塩基であることを表す。さらなる実施形態では、用量は約300 m g 塩基であってよい。クロロキン、またはその他のオートファジー阻害剤の用量は、当該技術分野において既知の投与量を使用して、熟練した臨床医によって必要に応じて修正されてよい。当業者によって理解されるように、オートファジー阻害剤は、A D I - P E G 2 0 を含む組成物の前に、それと同時に、またはその後に投与されてよい。ある種の実施形態では、膵臓癌の処置のために投与されるA D I - P E G 2 0 の用量は、約50 I U / m² ~ 約8,000 I U / m²であり、その他の実施形態では、約50 I U / m²、約100 I U / m²、150 I U / m²、200 I U / m²、250 I U / m²、300 I U / m²、350 I U / m²、400 I U / m²、450 I U / m²、500 I U / m²、550 I U / m²、600 I U / m²、650 I U / m²、700 I U / m²、750 I U / m²、800 I U / m²、約900 I U / m²、約1,000 I U / m²、1,500 I U / m²、約2,000 I U / m²、約2,500 I U / m²、約3,000 I U / m²、3,500 I U / m²、4,000 I U / m²、4,500 I U / m²、5,000 I U / m²、5,500 I U / m²、6,000 I U / m²、6,500 I U / m²、または約8,000 I U / m²である。特定の実施形態では、膵臓癌の処置のために投与されるA D I - P E G 2 0 の用量は、約1 m g / m² ~ 約80 m g / m²であり、そ
30
40
50

の他の実施形態では、約 1 mg / m²、2 mg / m²、3 mg / m²、4 mg / m²、5 mg / m²、6 mg / m²、7 mg / m²、8 mg / m²、9 mg / m²、10 mg / m²、15 mg / m²、20 mg / m²、25 mg / m²、30 mg / m²、35 mg / m²、40 mg / m²、45 mg / m²、50 mg / m²、55 mg / m²、60 mg / m²、65 mg / m²、70 mg / m²、75 mg / m²、または約 80 mg / m² である。ある種の実施形態では、本開示は膵臓癌を処置する方法を提供し、キメラ A D I の用量を 2 倍にして、1 週間当たり 640 I U / m² まで、またはそれを超えて増加させてよい。特定の一実施形態では、膵臓癌の処置のためのキメラ A D I は、キメラ A D I 当たり 3.5 ~ 6.5 の P E G 分子で、または一実施形態では、キメラ A D I 当たり 4.5 ~ 5.5 の P E G 分子により修飾される。別の実施形態では、本開示は、キメラ A D I - P E G 10 20 を含む組成物を、場合によりクロロキン、またはその他の適切なオートファジー阻害剤と組み合わせて投与することにより膵臓癌を処置する方法を提供し、組成物は、5 ± 1.5 の P E G 分子、一実施形態では、5 ± 1.5 の直鎖 P E G 分子により修飾されるキメラ A D I を含み、ある種の実施形態では、組成物は、約 0.5 % 未満の天然キメラ A D I (すなわち、P E G により修飾されていない) 及び / または約 5 % 未満の遊離 P E G を含む。さらなる実施形態では、組成物は、ヒスチジン - H C L 緩衝液を含む。

【 0 1 6 8 】

一実施形態では、本開示は、治療有効量の A D I - P E G 2 0 を、場合によりオートファジー阻害剤と組み合わせて投与することにより、小細胞肺癌を処置する、その症状を改善させる、またはその進行を阻害する方法を提供する。ある種の実施形態では、小細胞肺癌は、A S S、A S L、またはその両方を欠損している。さらなる実施形態では、本開示は、キメラ A D I - P E G 2 0 を、3 日に約 1 回、1 週間に約 1 回、1 週間に約 2 回、または 2 週間に約 1 回；場合により、治療有効量のオートファジー阻害剤、例えばクロロキンなどと組み合わせて投与することを含む、小細胞肺癌を処置する方法を提供する。この点に関して、治療有効用量のクロロキンは、約 600 mg 塩基、続いて 300 mg 塩基を追加する初期用量、及び 2 日連続で各日 300 mg 塩基の単回用量であってよい。このことは、3 日間の総用量が 2.5 g のリン酸クロロキンまたは 1.5 g 塩基であることを表す。さらなる実施形態では、用量は約 300 mg 塩基であってよい。クロロキンの用量は、当該技術分野において既知の投与量を使用して、熟練した臨床医によって必要に応じて修正されてよい。当業者によって理解されるように、オートファジー阻害剤は、キメラ A D I - P E G 2 0 を含む組成物の前に、それと同時に、またはその後に投与されてよい。ある種の実施形態では、小細胞肺癌の処置のために投与されるキメラ A D I - P E G 2 0 の用量は、約 50 I U / m² ~ 約 8,000 I U / m² であり、その他の実施形態では、約 50 I U / m²、約 100 I U / m²、150 I U / m²、200 I U / m²、250 I U / m²、300 I U / m²、350 I U / m²、400 I U / m²、450 I U / m²、500 I U / m²、550 I U / m²、600 I U / m²、650 I U / m²、700 I U / m²、750 I U / m²、800 I U / m²、約 900 I U / m²、約 1,000 I U / m²、1,500 I U / m²、約 2,000 I U / m²、約 2,500 I U / m²、約 3,000 I U / m²、3,500 I U / m²、4,000 I U / m²、4,500 I U / m²、5,000 I U / m²、5,500 I U / m²、6,000 I U / m²、6,500 I U / m²、7,000 I U / m²、7,500 I U / m²、8,000 I U / m²、または約 8,000 I U / m² である。特定の実施形態では、小細胞肺癌の処置のために投与されるキメラ A D I - P E G 2 0 の用量は、約 1 mg / m² ~ 約 80 mg / m² であり、その他の実施形態では、約 1 mg / m² 及び約 80 mg / m² であり、その他の実施形態では、約 1 mg / m²、2 mg / m²、3 mg / m²、4 mg / m²、5 mg / m²、6 mg / m²、7 mg / m²、8 mg / m²、9 mg / m²、10 mg / m²、15 mg / m²、20 mg / m²、25 mg / m²、30 mg / m²、35 mg / m²、40 mg / m²、45 mg / m²、50 mg / m²、55 mg / m²、60 mg / m²、65 mg / m²、70 mg / m²、75 mg / m²、または約 80 mg / m² である。ある種の実施形態では、本開示は小細胞肺癌を処置する方法を提供し、キメラ A D I の用量を 2 倍にして、1 週間当 50

たり 640 IU / m² まで、またはそれを超えて増加させてよい。特定の一実施形態では、小細胞肺癌の処置のためのキメラ A D I は、キメラ A D I 当たり 3.5 ~ 6.5 の P E G 分子で、または一実施形態では、キメラ A D I 当たり 4.5 ~ 5.5 の P E G 分子により修飾される。別の実施形態では、本開示は、キメラ A D I - P E G 20 を含む組成物を、場合によりクロロキンと組み合わせて投与することにより小細胞肺癌を処置する方法を提供し、組成物は、5 ± 1.5 の P E G 分子、一実施形態では、5 ± 1.5 の直鎖 P E G 分子により修飾されるキメラ A D I を含み、ある種の実施形態では、組成物は、約 0.5 % 未満の天然キメラ A D I (すなわち、P E G により修飾されていない) 及び / または約 5 % 未満の遊離 P E G を含む。さらなる実施形態では、組成物は、ヒスチジン - H C L 緩衝液を含む。

10

【 0169 】

一実施形態では、本開示は、治療有効量のキメラ A D I - P E G 20 を、場合によりオートファジー阻害剤と組み合わせて投与することにより、肉腫 (転移性肉腫を含むが、これに限定されない) を処置する、その症状を改善させる、またはその進行を阻害する方法を提供する。ある種の実施形態では、肉腫は、A S S 、A S L 、またはその両方を欠損している。さらなる実施形態では、本開示は、キメラ A D I - P E G 20 を、3 日に約 1 回、1 週間に約 1 回、1 週間に約 2 回、または 2 週間に約 1 回 ; 場合により、治療有効量のオートファジー阻害剤、例えばクロロキンなどと組み合わせて投与することを含む、肉腫を処置する方法を提供する。この点に関して、治療有効用量のクロロキンは、約 600 mg 塩基、続いて 300 mg 塩基を追加する初期用量、及び 2 日連続で毎日 300 mg 塩基の単回用量であってよい。このことは、3 日間の総用量が 2.5 g のリン酸クロロキンまたは 1.5 g 塩基であることを表す。さらなる実施形態では、用量は約 300 mg 塩基であってよい。クロロキンの用量は、当該技術分野において既知の投与量を使用して、熟練した臨床医によって必要に応じて修正されてよい。当業者によって理解されるように、オートファジー阻害剤は、A D I - P E G 20 を含む組成物の前に、それと同時に、またはその後に投与されてよい。ある種の実施形態では、肉腫の処置のために投与される A D I - P E G 20 の用量は、約 50 IU / m² ~ 約 8,000 IU / m² であり、その他の実施形態では、約 50 IU / m² 、約 100 IU / m² 、150 IU / m² 、200 IU / m² 、250 IU / m² 、300 IU / m² 、350 IU / m² 、400 IU / m² 、450 IU / m² 、500 IU / m² 、550 IU / m² 、600 IU / m² 、650 IU / m² 、700 IU / m² 、750 IU / m² 、800 IU / m² 、約 900 IU / m² 、約 1,000 IU / m² 、1,500 IU / m² 、約 2,000 IU / m² 、約 2,500 IU / m² 、約 3,000 IU / m² 、3,500 IU / m² 、4,000 IU / m² 、4,500 IU / m² 、5,000 IU / m² 、5,500 IU / m² 、6,000 IU / m² 、6,500 IU / m² 、7,000 IU / m² 、7,500 IU / m² 、または約 8,000 IU / m² である。ある種の実施形態では、肉腫の処置のために投与される A D I - P E G 20 の用量は、約 1 mg / m² ~ 約 80 mg / m² であり、その他の実施形態では、約 1 mg / m² 、2 mg / m² 、3 mg / m² 、4 mg / m² 、5 mg / m² 、6 mg / m² 、7 mg / m² 、8 mg / m² 、9 mg / m² 、10 mg / m² 、15 mg / m² 、20 mg / m² 、25 mg / m² 、30 mg / m² 、35 mg / m² 、40 mg / m² 、45 mg / m² 、50 mg / m² 、55 mg / m² 、60 mg / m² 、65 mg / m² 、70 mg / m² 、75 mg / m² 、または約 80 mg / m² である。ある種の実施形態では、本開示は肉腫を処置する方法を提供し、キメラ A D I の用量を 2 倍にして、1 週間当たり 640 IU / m² まで、またはそれを超えて増加させてよい。特定の一実施形態では、肉腫の処置のためのキメラ A D I は、キメラ A D I 当たり 3.5 ~ 6.5 の P E G 分子で、または一実施形態では、キメラ A D I 当たり 4.5 ~ 5.5 の P E G 分子により修飾される。別の実施形態では、本開示は、キメラ A D I - P E G 20 を含む組成物を、場合によりクロロキンと組み合わせて投与することにより肉腫を処置する方法を提供し、組成物は、5 ± 1.5 の P E G 分子、一実施形態では、5 ± 1.5 の直鎖 P E G 分子により修飾されるキメラ A D I を含み、ある種の実施形態では、組成物は、約 0.5

20

30

40

50

%未満の天然キメラA D I (すなわち、P E Gにより修飾されていない)及び/または約5%未満の遊離P E Gを含む。さらなる実施形態では、組成物は、ヒスチジン-H C L緩衝液を含む。

【0170】

一実施形態では、本開示は、治療有効量のキメラA D I - P E G 2 0を、場合によりドセタキセルと組み合わせて投与することにより、黒色腫を処置する、その症状を改善させる、またはその進行を阻害する方法を提供する。ある種の実施形態では、黒色腫は、A S S、A S L、またはその両方を欠損している。さらなる実施形態では、本開示は、キメラA D I - P E G 2 0を、3日に約1回、1週間に約1回、1週間に約2回、または2週間に約1回；場合により、治療有効量のドセタキセルと組み合わせて投与することを含む、黒色腫を処置する方法を提供する。この点に関して、治療有効用量のドセタキセルは、約3週間ごとに30分～1時間にわたって静脈内に投与される75m g / m²または100m g / m²を含んでよい。熟練した臨床医によって理解されるように、ドセタキセルの用量は、疾患適応症及び/またはこれまでの処置に応じて修正されてよく、ドセタキセルは、キメラA D I - P E G 2 0を含む組成物の前に、それと同時に、またはその後に投与されてよい。ある種の実施形態では、黒色腫の処置のために投与されるキメラA D I - P E G 2 0の用量は、約50I U / m²～約8,000I U / m²であり、その他の実施形態では、約50I U / m²、約100I U / m²、150I U / m²、200I U / m²、250I U / m²、300I U / m²、350I U / m²、400I U / m²、450I U / m²、500I U / m²、550I U / m²、600I U / m²、650I U / m²、700I U / m²、750I U / m²、800I U / m²、約900I U / m²、約1,000I U / m²、1,500I U / m²、約2,000I U / m²、約2,500I U / m²、約3,000I U / m²、3,500I U / m²、4,000I U / m²、4,500I U / m²、5,000I U / m²、5,500I U / m²、6,000I U / m²、6,500I U / m²、6,500I U / m²、7,000I U / m²、7,500I U / m²、または約8,000I U / m²である。黒色腫の処置のために投与されるキメラA D I - P E G 2 0の用量は、約1m g / m²～約80m g / m²であり、その他の実施形態では、約1m g / m²、2m g / m²、3m g / m²、4m g / m²、5m g / m²、6m g / m²、7m g / m²、8m g / m²、9m g / m²、10m g / m²、15m g / m²、20m g / m²、25m g / m²、30m g / m²、35m g / m²、40m g / m²、45m g / m²、50m g / m²、55m g / m²、60m g / m²、65m g / m²、70m g / m²、75m g / m²、または約80m g / m²である。ある種の実施形態では、本開示は黒色腫を処置する方法を提供し、キメラA D Iの用量を2倍にして、1週間当たり640I U / m²まで、またはそれを超えて増加させてよい。特定の一実施形態では、黒色腫の処置のためのキメラA D Iは、キメラA D I当たり3.5～6.5のP E G分子で、または一実施形態では、キメラA D I当たり4.5～5.5のP E G分子により修飾される。別の実施形態では、本開示は、場合によりドセタキセルと組み合わせて、キメラA D I - P E G 2 0を含む組成物により黒色腫を処置する方法を提供し、組成物は、5±1.5のP E G分子、一実施形態では、5±1.5の直鎖P E G分子により修飾されるキメラA D Iを含み、ある種の実施形態では、組成物は、約0.5%未満の天然キメラA D I(すなわち、P E Gにより修飾されていない)及び/または約5%未満の遊離P E Gを含む。さらなる実施形態では、組成物は、ヒスチジン-H C L緩衝液を含む。

【0171】

一実施形態では、本開示は、治療有効量のキメラA D I - P E G 2 0を、場合によりシスプラチニンと組み合わせて投与することにより、黒色腫を処置する、その症状を改善させる、またはその進行を阻害する方法を提供する。ある種の実施形態では、黒色腫は、A S S、A S L、またはその両方を欠損している。さらなる実施形態では、本開示は、キメラA D I - P E G 2 0を、3日に約1回、1週間に約1回、1週間に約2回、または2週間に約1回；場合により、治療有効量のシスプラチニンと組み合わせて投与することを含む、黒色腫を処置する方法を提供する。この点に関して、治療有効用量のシスプラチニンは、1サ

10

20

30

40

50

イクル当たり(3~4週間ごとに)1回50~100mg/m²の投与、または5日間毎日投与して1サイクル当たり合計100mg/m²となる投与のいずれかを含んでよい。熟練した臨床医によって理解されるように、シスプラチンの用量は、疾患適応症、個々の患者、及び/またはこれまでの処置に応じて修正されてよく、シスプラチンは、キメラADI-P EG 20を含む組成物の前に、それと同時に、またはその後に投与されてよい。ある種の実施形態では、黒色腫の処置のために投与されるキメラADI-P EG 20の用量は、約50IU/m²~約8,000IU/m²であり、その他の実施形態では、約50IU/m²、約100IU/m²、150IU/m²、200IU/m²、250IU/m²、300IU/m²、350IU/m²、400IU/m²、450IU/m²、500IU/m²、550IU/m²、600IU/m²、650IU/m²、700IU/m²、750IU/m²、800IU/m²、約900IU/m²、約1,000IU/m²、1,500IU/m²、約2,000IU/m²、約2,500IU/m²、約3,000IU/m²、3,500IU/m²、4,000IU/m²、4,500IU/m²、5,000IU/m²、5,500IU/m²、6,000IU/m²、6,500IU/m²、7,000IU/m²、7,500IU/m²、または約8,000IU/m²である。ある種の実施形態では、黒色腫の処置のために投与されるキメラADI-P EG 20の用量は、約1mg/m²~約80mg/m²であり、その他の実施形態では、約1mg/m²、2mg/m²、3mg/m²、4mg/m²、5mg/m²、6mg/m²、7mg/m²、8mg/m²、9mg/m²、10mg/m²、15mg/m²、20mg/m²、25mg/m²、30mg/m²、35mg/m²、40mg/m²、45mg/m²、50mg/m²、55mg/m²、60mg/m²、65mg/m²、70mg/m²、75mg/m²、または約80mg/m²である。ある種の実施形態では、本開示は黒色腫を処置する方法を提供し、キメラADIの用量を2倍にして、1週間当たり640IU/m²まで、またはそれを超えて増加させてよい。特定の一実施形態では、黒色腫の処置のためのキメラADIは、キメラADI当たり3.5~6.5のPEG分子で、または一実施形態では、キメラADI当たり4.5~5.5のPEG分子により修飾される。別の実施形態では、本開示は、キメラADI-P EG 20を含む組成物を、場合によりシスプラチンと組み合わせて投与することにより黒色腫を処置する方法を提供し、組成物は、5±1.5のPEG分子、一実施形態では、5±1.5の直鎖PEG分子により修飾されるキメラADIを含み、ある種の実施形態では、組成物は、約0.5%未満の天然キメラADI(すなわち、PEGにより修飾されていない)及び/または約5%未満の遊離PEGを含む。さらなる実施形態では、組成物は、ヒスチジン-HCL緩衝液を含む。

【0172】

一実施形態では、本開示は、治療有効量のキメラADI-P EG 20を、場合によりmTOR阻害剤、例えばこれらに限定されないが、ラパマイシン、テムシロリムス、エベロリムス、及びリダフォロリムスなどと組み合わせて投与することにより、腎細胞癌を処置する、その症状を改善させる、またはその進行を阻害する方法を提供する。ある種の実施形態では、腎細胞癌は、ASS、ASL、またはその両方を欠損している。さらなる実施形態では、本開示は、キメラADI-P EG 20を、3日に約1回、1週間に約1回、1週間に約2回、または2週間に約1回；場合により、治療有効量のmTOR阻害剤、例えばラパマイシンなどと組み合わせて投与することを含む、腎細胞癌を処置する方法を提供する。ラパマイシン、またはその他のmTOR阻害剤の用量は、当該技術分野において既知の投与量を使用して、熟練した臨床医によって必要に応じて決定されてよい。当業者によつて理解されるように、mTOR阻害剤は、キメラADI-P EG 20を含む組成物の前に、それと同時に、またはその後に投与されてよい。ある種の実施形態では、腎細胞癌の処置のために投与されるキメラADI-P EG 20の用量は、約50IU/m²~約8,000IU/m²であり、その他の実施形態では、約50IU/m²、約100IU/m²、150IU/m²、200IU/m²、250IU/m²、300IU/m²、350IU/m²、400IU/m²、450IU/m²、500IU/m²、550IU/m²、

m^2 、600IU/ m^2 、650IU/ m^2 、700IU/ m^2 、750IU/ m^2 、800IU/ m^2 、約900IU/ m^2 、約1,000IU/ m^2 、1,500IU/ m^2 、約2,000IU/ m^2 、約2,500IU/ m^2 、約3,000IU/ m^2 、3,500IU/ m^2 、4,000IU/ m^2 、4,500IU/ m^2 、5,000IU/ m^2 、5,500IU/ m^2 、6,000IU/ m^2 、6,500IU/ m^2 、7,000IU/ m^2 、7,500IU/ m^2 、または約8,000IU/ m^2 である。ある種の実施形態では、黒色腫の処置のために投与されるキメラADI-P EG 20の用量は、約1mg/ m^2 、2mg/ m^2 、3mg/ m^2 、4mg/ m^2 、5mg/ m^2 、6mg/ m^2 、7mg/ m^2 、8mg/ m^2 、9mg/ m^2 、10mg/ m^2 、15mg/ m^2 、20mg/ m^2 、25mg/ m^2 、30mg/ m^2 、35mg/ m^2 、40mg/ m^2 、45mg/ m^2 、50mg/ m^2 、55mg/ m^2 、60mg/ m^2 、65mg/ m^2 、70mg/ m^2 、75mg/ m^2 、または約80mg/ m^2 である。ある種の実施形態では、本開示は腎細胞癌を処置する方法を提供し、キメラADIの用量を2倍にして、1週間当たり640IU/ m^2 まで、またはそれを超えて増加させてよい。特定の一実施形態では、腎細胞癌の処置のためのキメラADIは、キメラADI当たり3.5~6.5のPEG分子で、または一実施形態では、キメラADI当たり4.5~5.5のPEG分子により修飾される。別の実施形態では、本開示は、キメラADI-P EG 20を含む組成物を、場合によりラパマイシン、またはその他の適切なm TOR阻害剤と組み合わせて投与することにより腎細胞癌を処置する方法を提供し、組成物は、5±1.5のPEG分子、一実施形態では、5±1.5の直鎖PEG分子により修飾されるキメラADIを含み、ある種の実施形態では、組成物は、約0.5%未満の天然キメラADI（すなわち、PEGにより修飾されていない）及び/または約5%未満の遊離PEGを含む。さらなる実施形態では、組成物は、ヒスチジン-HCL緩衝液を含む。
10

【0173】

本開示はまた、患者に、本明細書に記載されるようなキメラADI（例えば、キメラADI-P EG、特にキメラADI-P EG 20）を含む組成物を、単独でまたは1種以上の他の治療剤と組み合わせて投与することを含む、患者の炎症性障害を処置する、その症状を改善させる、またはその進行を阻害する方法も提供する。一実施形態では、本開示はまた、患者に、本明細書に記載されるようなキメラADI（例えば、キメラADI-P EG、特にキメラADI-P EG 20）を含む組成物を、単独でまたは1種以上の他の治療剤と組み合わせて投与することを含む、患者の炎症性腸疾患を処置する、その症状を改善させる、またはその進行を阻害する方法も提供する。この点に関して、本開示は、患者に、本明細書に記載されるようなキメラADI（例えば、キメラADI-P EG、特にキメラADI-P EG 20）を含む組成物を、単独でまたは1種以上の他の治療剤と組み合わせて投与することを含む、患者のクローニング病または潰瘍性大腸炎を処置する、その症状を改善させる、またはその進行を阻害する方法を提供する。
20

【0174】

別の実施形態では、本開示は、患者に、本明細書に記載されるようなキメラADIを含む組成物、及び場合により1種以上の他の治療剤を投与することを含む、患者の癌を処置する、その症状を改善させる、またはその進行を阻害する方法を提供し、癌はASS、ASL、またはその両方を欠損している。この点に関して、ASSまたはASLの欠損は、mRNA発現もしくはタンパク質発現により測定されるような発現の減少である場合があり、またはタンパク質活性の減少である場合もあり、一般に、当業者によって決定されるような発現または活性の統計的に有意な減少を含む。減少したASSまたはASLの発現または活性は、癌を含まないと分かっている適切な対照サンプルにおける発現または活性と比較して、約5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、またはそれを超える発現または活性の減少であってよい。ある種の実施形態では、ASSまたはASLの発現または活性は、非癌対照サンプルにおける発現または活性と比較して少なくとも2倍減少する。
30

【0175】

ある種の実施形態では、A S S または A S L の減少した発現または活性は、A S S または A S L プロモーターのメチル化に起因する。別の実施形態では、A S S または A S L の発現または活性の減少は、D N A 突然変異（例えば、1つ以上の点突然変異、小さな欠失、挿入など）または遺伝子の欠失をもたらす染色体異常に起因する。一実施形態では、癌は、A S S または A S L 陰性であり、これは観察される発現または活性がないことを意味する。

【 0 1 7 6 】

A S S または A S L の発現または活性の減少は、当該技術分野において既知の任意の方法、例えばこれらに限定されないが、定量P C R、免疫組織化学、酵素活性アッセイ（例えば、シトルリンからアルギニノコハク酸塩への変換またはアルギニノコハク酸塩からアルギニン及びフマル酸塩への変換を測定するアッセイ）などを使用して測定されてよい。10

【 0 1 7 7 】

したがって、本発明は、患者に、本明細書に記載されるようなキメラA D Iを含む組成物を投与することを含む、患者の癌を処置する、その症状を改善させる、またはその進行を阻害する方法を提供し、癌は、A S S もしくは A S L 、またはその両方の減少した発現または活性を示し、癌としては、白血病（例えば、急性骨髄性白血病及び再発性急性骨髄性白血病）、黒色腫、肉腫（転移性肉腫、子宮平滑筋肉腫を含むが、これらに限定されない）、肺臓癌、前立腺癌（ホルモン不応性前立腺癌などであるが、これに限定されない）、中皮腫、リンパ性白血病、慢性骨髄性白血病、リンパ腫、小細胞肺癌、乳癌、卵巣癌、結腸直腸癌、胃の癌（胃腺癌を含むが、これに限定されない）、神経膠腫、多形性膠芽腫、網膜芽細胞腫、神経芽細胞腫、非小細胞肺癌（N S C L C）、腎臓癌（腎細胞癌を含むが、これに限定されない）、膀胱癌、子宮癌、食道癌、脳癌、頭頸部癌（頭頸部の扁平上皮癌；舌の癌を含むが、これらに限定されない）、子宮頸癌、精巣癌、胆嚢、胆管癌、及び胃癌が挙げられるが、これらに限定されない。20

【 0 1 7 8 】

文献の様々な研究では、以下の腫瘍でA S S が欠損していることを示している：

【 0 1 7 9 】

【表3】

表1：ASS欠損腫瘍	
腫瘍型	ASS欠損 (%)
前立腺	88/88 (100%)
腎臓	98/98 (100%) 41/45 (91%) 31/31 (100%)
リンパ腫	511/532 (96%)
肉腫	619/701 (88%)
膵臓	41/47 (87%)
急性骨髓性白血病	46/53 (87%)
小細胞肺	7/16 (44%)
HCC	33/44 (75%) 20/20 (100%)
黒色腫	119/119 (100%) 24/29 (83%) 17/27 (63%) 20/20 (100%)
膀胱	31/48 (65%) 133/242 (55%)
中皮腫	52/82 (63%)
胃	68/121 (56%)
乳房	46/111 (41%)
非小細胞肺	28/90 (31%)
膠芽腫	39/55 (71%)
結腸直腸	31 (3%)
卵巢	23/54 (43%) 診断時 25/34 (74%) 再発時

10

20

30

【0180】

したがって、これらのASS欠損癌の処置は、キメラADI-PAGEを単独でまたはその他の処置と組み合わせて用いることが、本明細書では特に意図される。

【0181】

本発明は、患者に、本明細書に記載されるようなキメラADI（例えば、キメラADI-PAGE、特にキメラADI-PAGE20）を含む組成物を、オートファジー阻害剤と組み合わせて投与することを含む、患者の癌を処置する、その症状を改善させる、またはその進行を阻害する方法をさらに提供する。一実施形態では、本発明は、患者に、治療有効量の本明細書に記載されるようなキメラADIを含む組成物を、オートファジー阻害剤と組み合わせて投与することを含む、患者の癌を処置する方法を提供し、癌は膵臓癌または小細胞肺癌である。

40

【0182】

ある種の実施形態では、本発明は、本明細書に記載されるキメラADIを含む組成物の投与が、血漿中のアルギニンを少なくとも1か月間、2か月間、3か月間、4か月間、5か月間、6か月間またはそれを超えて枯渇させる処置方法を提供する。

50

【実施例】

【0183】

実施例1

キメラADI酵素は、活性でありながら、患者の抗ADI-P EG20抗体との交差反応性が低い。

本実施例は、(1)アルギニンデイミナーゼ酵素活性を有するタンパク質、(2)抗ADI-P EG20抗体との減少した交差反応性、(3)減少したリジン残基数、及び/または(4)化学的に安定したリンカーによるPEG結合から構成される、人為的に操作されたキメラADI酵素の生成について記載する。

【0184】

10

ADIの調製。組換えキメラADI酵素を、例えば、Gallego et al., PLOS One, 7(10):e47886, 2012; Monstadt and Hollendorf, Biochem. J. 273:739-745, 1990; Joo Noh et al., Molecules and Cells. 13:137-143, 2002; 及び Sugimura et al., Infection and Immunity. 58:2510-2515, 1990に記載されているような標準的なプロトコールにより、試験のためにクローニング、発現、及び精製した。キメラADI酵素のアミノ酸配列については、表A1を参照のこと。

【0185】

20

ヒト抗ADI-P EG20抗体の精製。抗ADI-P EG20抗体を、臨床研究中にADI-P EG20を受けた患者の血漿サンプルから精製した。合計60mlの血漿を、ELISAアッセイにより決定した場合、ADI-P EG20に対する力価がより高くなつた(力価>/=4)8人の異なる患者からプールした。2段階精製、すなわちプロテイン「A」クロマトグラフィー(GE Healthcare)、続いてADIアフィニティークロマトグラフィーを使用した。約20mgの精製抗体を得て、必要になるまでアリコートにして-80で保存した。

【0186】

30

ADI酵素アッセイ。アルギニンデイミナーゼ(ADI)は、L-アルギニンからL-シトルリン及びアンモニアへの変換を触媒する。タンパク質のIU/mgとして表されるADIの比活性を計算するために、L-シトルリンの量を比色終点アッセイ(例えば、Kripp and Vasak, Analytical Biochem. 286:257-264, 2000を参照のこと)によって検出し、L-シトルリンの既知量の検量線と比較することができる。1IUの酵素活性は、試験されるpH及び温度で、1分当たり1μmolのシトルリンを産生する酵素の量と定義される。標準的アッセイ条件を、生理的HEPES緩衝液(PHB)、すなわちpH7.4の50mMのHEPES、160mMのNaCl(Lang and Zander, Clin Chem Lab Med. 37:563-571, 1999)、加えて0.1%のBSA中において37で実施した。すべてのサンプル及び基準を、条件が許す場合には2回または3回反復して実施した。

【0187】

40

Km値及びKcat値を、上記活性アッセイの変化量を使用することにより決定した。活性アッセイと同様に、すべての反応をPHB、加えて0.1%BSA中において37で実施した。酵素濃度、反応時間、及び基質濃度範囲を、ADIまたはADIr構築物の各々について調整し、それらの活性の差を明らかにした。一般に、2nMの酵素、5分間の反応時間、及び0~160μMのアルギニンを出発条件として使用した。条件を最適化する場合、反応に添加する総基質のパーセンテージとして、消費される基質の量に対し特に注意を払った。検出の下限値は1μMのシトルリンであり、定量の下限値は2μMである。シトルリン検量線を、すべてのプレート上で実施し、これを使用して酵素反応により產生されたシトルリンを定量化した。

【0188】

50

計算。各反応ウェルで産生されたシトルリンの濃度 (μ M) を、シトルリン検量線を使用して計算及び平均化した。次いで、各反応速度を、 μ M / 分 / 50 nM の A D I で計算した。比活性 (I U / mg または μ mol 生成物 / 分 / mg の A D I) を、この値に「 I U 」因数を掛けて計算した (I U 因数は、 A D I の分子量及び反応体積から計算した) 。

【 0189 】

アルギニンデイミナーゼ酵素活性。 A D I 酵素アッセイの結果を、表 E 1 に示す。

【 0190 】

【表4】

表E1. キメラAD I酵素.				
名称	配列番号:	触媒ドメイン	α ヘリックスドメイン	比活性
M. hominis	1	M. hominis	M. hominis	+++
DS1	4	M. arginini (1-74, 153-410)	M. arthritidis (75-152)	+++
DS2	5	M. arginini (1-74, 153-410)	M. hominis (75-151)	+++
DS3	6	M. arthritidis (1-74, 153-410)	M. arginini (75-152)	+++
DS4	7	M. arthritidis (1-74, 153-410)	M. hominis (75-151)	+++
C2DS1	22	M. arginini (1-74, 153-410)	M. alligatoris (71-148)	+
C2DS3	23	M. arginini (1-74, 153-410)	M. arthritidis (75-152)	+++
C2DS4	24	M. arginini (1-74, 153-410)	M. columbinum (68-147)	+++
C2DS5	25	M. arginini (1-74, 153-410)	M. gateae (75-152)	+++
C2DS6	26	M. arginini (1-74, 153-410)	M. phocicerebrale (75-152)	+++
C2DS7	27	M. arginini (1-74, 153-410)	M. phocidae (75-152)	+++
C4DS1	28	M. columbinum (1-67, 148-401)	M. alligatoris (71-148)	不検出
C4DS2	29	M. columbinum (1-67, 148-401)	M. arginini (75-152)	不検出
C4DS3	30	M. columbinum (1-67, 148-401)	M. arthritidis (75-152)	+++
C4DS5	31	M. columbinum (1-67, 148-401)	M. gateae (75-152)	+++
C4DS6	32	M. columbinum (1-67, 148-401)	M. phocicerebrale (75-152)	++
C4DS7	33	M. columbinum (1-67, 148-401)	M. phocidae (75-152)	不検出
C4DS8	34	M. columbinum (1-67, 148-401)	M. gallinarum (68-147)	++++

10

20

30

40

表E 1. キメラ AD I 酵素.

名称	配列番号:	触媒ドメイン	α ヘリックスドメイン	比活性
C4DS9	35	<i>M. columbinum</i> (1-67, 148-401)	<i>M. iners</i> (68-147)	++++
C5DS1	36	<i>M. gateae</i> (1-74, 153-410)	<i>M. alligatoris</i> (71-148)	+++
C5DS2	37	<i>M. gateae</i> (1-74, 153-410)	<i>M. arginini</i> (75-152)	+++
C5DS3	38	<i>M. gateae</i> (1-74, 153-410)	<i>M. arthritidis</i> (75-152)	+++
C5DS4	39	<i>M. gateae</i> (1-74, 153-410)	<i>M. columbinum</i> (68-147)	+++
C5DS6	40	<i>M. gateae</i> (1-74, 153-410)	<i>M. phocicerebrale</i> (75-152)	+++
C5DS7	41	<i>M. gateae</i> (1-74, 153-410)	<i>M. phocidae</i> (75-152)	+++
C6DS1	42	<i>M. phocicerebrale</i> (1-74, 153-410)	<i>M. alligatoris</i> (71-148)	不検出
C6DS2	43	<i>M. phocicerebrale</i> (1-74, 153-410)	<i>M. arginini</i> (75-152)	++++
C6DS3	44	<i>M. phocicerebrale</i> (1-74, 153-410)	<i>M. arthritidis</i> (75-152)	+
C6DS4	45	<i>M. phocicerebrale</i> (1-74, 153-410)	<i>M. columbinum</i> (68-147)	不検出
C6DS5	46	<i>M. phocicerebrale</i> (1-74, 153-410)	<i>M. gateae</i> (75-152)	+++
C6DS7	47	<i>M. phocicerebrale</i> (1-74, 153-410)	<i>M. phocidae</i> (75-152)	+++
C7DS1	48	<i>M. phocidae</i> (1-74, 153-410)	<i>M. alligatoris</i> (71-148)	不検出
C7DS2	49	<i>M. phocidae</i> (1-74, 153-410)	<i>M. arginini</i> (75-152)	++++
C7DS3	50	<i>M. phocidae</i> (1-74, 153-410)	<i>M. arthritidis</i> (75-152)	+++
C7DS4	51	<i>M. phocidae</i> (1-74, 153-410)	<i>M. columbinum</i> (68-147)	+++
C7DS5	52	<i>M. phocidae</i> (1-74, 153-410)	<i>M. gateae</i> (75-152)	+++
C7DS6	53	<i>M. phocidae</i> (1-74, 153-410)	<i>M. phocicerebrale</i> (75-152)	++++

10

20

30

40

表E1. キメラADI酵素.

名称	配列番号:	触媒ドメイン	α ヘリックスドメイン	比活性
C8DS3	54	M. gallinarum (1-67, 148-401)	M. arthritidis (75-152)	不検出
C8DS4	55	M. gallinarum (1-67, 148-401)	M. columbinum (68-147)	++++
C8DS9	56	M. gallinarum (1-67, 148-401)	M. iners (68-147)	++++
C9DS3	57	M. iners (1-67, 148-401)	M. arthritidis (75-152)	不検出
C9DS4	58	M. iners (1-67, 148-401)	M. columbinum (68-147)	++++
C9DS8	59	M. iners (1-67, 148-401)	M. gallinarum (68-147)	+++

キメラ分子は、M. arginini (配列番号: 2)、M. arthritidis (配列番号: 3)、及びM. hominis (修飾を加えた、配列番号: 14 に示すPhoenix配列) から操作した。挿入した数字は、ドメインを形成するために使用される、天然酵素からのアミノ酸残基を指定する。C末端トリプトファンを、公開されているM. arthritidis配列に添加し、突然変異C251SをM. arginini及びM. arthritidis用に作製した。これらの非PEG化酵素のADI比活性 (IU/mg) を、ADI-PEG20 (++) と比較して示す。

10

20

30

【0191】

表E1の結果は、本明細書に記載される操作されたキメラADI酵素が、効率的な触媒活性を有することを示す。これらの酵素の触媒パラメータであるKm及びkcatは、アルギニンを除去し、血中のアルギニン濃度を低く維持するのに十分である。これらのパラメータは、好ましくはそれぞれ20 μ M未満及び1秒 $^{-1}$ 超である。最適pHは、血中で効率的な触媒活性を維持するように、およそ7.4である。酵素安定性、加えて共有結合したPEGの安定性は、長期間の保存及び患者の処置中に37 $^{\circ}$ Cで維持されなければならない。

【0192】

抗ADI-PEG20抗体との減少した交差反応性。ADIは、2つのドメイン、すなわち触媒ドメイン及びヘリックスドメインから構成される。本発明は、ADI活性を有する、操作された酵素、人工酵素、キメラ酵素、組換え酵素を部分的に対象とする。各々、2つのドメインから構成され、各ドメインは多数の可能な種から選択される。ドメイン境界は、M. hominis及びM. argininiからのADIのX線結晶構造検査により決定し、これをその他のMycoplasma ADI酵素に相同性により伸長させる。

40

【0193】

ADI酵素の異なる種からのドメインの使用は、多数の表面残基を変化させても、触媒活性を維持し得る。これらの表面残基のいくつかは、ADI-PEG20による患者の処置中に発現する抗ADI-PEG20抗体に対するエピトープを形成する。それらの置換は、抗ADI-PEG20抗体に対する抗原性を減少させ、それゆえ抗ADI-PEG20

50

抗体の中和及び修飾薬物のクリアランスを減少させることができる。これを表E2に示し、抗ADI-P EG20抗体の2つの調製物が、M. hominisのADIと比較して、DS1、DS2、DS3、及びDS4抗原との結合性がより低いことを示した。このことは、これらの抗原の表面上における残基変化に起因し得、これによりエピトープを変更して、抗体-抗原結合相互作用を妨害する。

【0194】

【表5】

表E2. ADI-P EG20と比較した、ADI抗原との抗ADI-P EG20抗体結合の減少

抗体	濃度	抗原			
		DS1	DS2	DS3	DS4
	μg/mL	1μg/mL	1μg/mL	1μg/mL	1μg/mL
ヒト抗ADI-P EG20 IgG (力価3)	10.0	有り	無し	有り	無し
ヒト抗ADI-P EG20 IgG (力価3)	25.0	有り	無し	有り	無し
ヒト抗ADI-P EG20 IgG (力価3)	50.0	有り	有り	有り	有り
ヒト抗ADI-P EG20 IgG (力価4)	0.5	有り	無し	有り	無し
ヒト抗ADI-P EG20 IgG (力価4)	1.0	有り	無し	有り	無し
ヒト抗ADI-P EG20 IgG (力価4)	5.0	有り	有り	有り	有り

10

20

30

【0195】

表面リジン残基含有数の減少。M. arginini (触媒ドメイン) - M. arthritidis (ヘリックスドメイン) キメラを、表面リジン残基をリジン以外のアミノ酸残基で置換し、ADI活性をモニターすることによりさらに修飾した。4つの変異体を作製し(表E3)、それらのADI活性を決定した。

【0196】

【表6】

リジン残基		表E3. DS1のADIリジン置換変異体 (M. argininini (触媒) : M. arthritidis (α ヘリックス))																			
		7	9	5	5	6	8	9	9	9	1	1	1	1	2	2	2	3	3	3	4
DS1	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K
DS1-1	H	K	K	K	K	R	K	K	K	K	R	K	K	R	K	K	K	K	T	K	10
DS1-2	H	N	K	Q	K	R	K	K	K	R	N	R	K	I	R	K	K	K	T	K	
DS1-3	H	N	K	Q	R	R	Q	N	K	R	N	R	G	I	R	K	R	K	K	T	K
DS1-4	H	N	T	Q	R	R	Q	N	L	R	N	R	G	I	R	R	R	R	R	T	R

DS1リジン置換変異体は、各群5または6で作製した。

【0197】

表E4は、DS1(M. argininini - M. arthritidis)酵素及び4つのリジン置換変異体のADI活性を示す。リジンを減少させて、可能なPEG化部位数を減少させた。

【0198】

【表7】

表E4. ADI酵素活性		
ADI酵素の収率及び活性		
酵素	Lys残基の数	ADIの比活性
DS1	29	+++
DS1-1	24	+++
DS1-2	19	+++
DS1-3	14	+++
DS1-4	8	+++

【0199】

およそ30の可能なPEG化部位により、PEG占有率は、各部位で一般に小さい。可能なPEG化部位数の減少は、より高いPEG占有率、及び残存する各部位でより完全な遮蔽をもたらすだろう。このことは、タンパク質分解保護を増加させ、これまでの処置により親和性成熟した抗ADI-PEG20抗体に対する免疫交差反応性を減少させると予想する。このことはまた、より均一な薬物を作製するだろう。

【0200】

要約すると、本実施例は、操作されたADI酵素について記載し、この酵素は優れたADI活性を有し、抗ADI-PEG20抗体のエピトープを除去して、抗体の中和及びクリアランスを減少させ、PEG化によりタンパク質分解及び腎クリアランスから保護される。

【0201】

上記の様々な実施形態を組み合わせて、さらなる実施形態を提供することができる。本明細書で言及される、及び/または出願データシートに列挙される米国特許、米国特許出願公開公報、米国特許出願、外国特許、外国特許出願及び非特許公報はすべて、それらの内

容全体が参照によって本明細書に組み込まれる。様々な特許、出願及び公開公報の構想を用いる必要があれば、実施形態の態様を修正して、なおさらなる実施形態を提供することができる。

【0202】

これらの及びその他の変化を、上記の詳細説明に鑑みて、実施形態に対して行うことができる。一般に、以下の特許請求の範囲において、使用される用語は、特許請求の範囲を明細書及び特許請求の範囲に開示される特定の実施形態に限定すると解釈されるべきではなく、このような特許請求の範囲が権利を有する等価物のすべての範囲と共に、すべての可能な実施形態を含むと解釈されるべきである。したがって、特許請求の範囲は、本開示により制限されることはない。

10

【配列表】

0006612316000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/10
A 6 1 K 38/43 (2006.01)	A 6 1 K 38/43
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 P 35/00

(74)代理人 100131093
弁理士 堀内 真
(74)代理人 100150902
弁理士 山内 正子
(74)代理人 100141391
弁理士 園元 修一
(74)代理人 100198074
弁理士 山村 昭裕
(74)代理人 100145920
弁理士 森川 聰
(74)代理人 100096013
弁理士 富田 博行
(72)発明者 ウー ボー - ウエン
アメリカ国 カリフォルニア 92131 サンディエゴ ギンスタークート 12275
(72)発明者 オルマシー ロバート
アメリカ国 カリフォルニア 92081 ヴィスタ アパートメント 38 ポメロドライブ 32
0
(72)発明者 ヒー ウェイ
アメリカ国 カリフォルニア 92129 サンディエゴ メサクレストプレイス 13127
(72)発明者 ショーウォルター リチャード イー.
アメリカ国 カリフォルニア 92021 エルカホン レガシーレーン 14271
(72)発明者 ヒー ジャオジュアン
中華人民共和国 シーエヌ 201201 シャンハイ プードンディストリクト サンチャオロード レーン 306 ナンバー 9 ルーム 502
(72)発明者 グオ ユンウン
中華人民共和国 シーエヌ 201201 シャンハイ プードンディストリクト チュアンシャ
チェンフェンロード レーン 212 ナンバー 4 ルーム 601
(72)発明者 トムソン ジェームス エー.
アメリカ国 カリフォルニア 92123 サンディエゴ ヘーブチャーウェイ 8931

審査官 川合 理恵

(56)参考文献 特表2001-524836 (JP, A)
特表2003-533186 (JP, A)
国際公開第2014/151982 (WO, A1)
特表2006-515281 (JP, A)
"arginine deiminase [Mycoplasma columbinum SF7]" [08-AUG-2011] Retrieved from GenBank [online] Accession no. EGV00288.1 [retrieved on 24 Jan 2019] URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/343128488]

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C 1 2 N 15 / 00 - 15 / 90
J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 (J D r e a m I I I)

CAplus / MEDLINE / EMBASE / BIOSIS / WPIDS (STN)
GenBank / EMBL / DDBJ / GeneSeq
UniProt / GeneSeq
PubMed