



등록특허 10-2730989



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2024년11월14일
(11) 등록번호 10-2730989
(24) 등록일자 2024년11월12일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 38/50 (2006.01) *A61K 45/06* (2006.01)
A61K 47/60 (2017.01) *C12N 9/78* (2006.01)
- (52) CPC특허분류
A61K 38/50 (2013.01)
A61K 45/06 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2017-7010232
- (22) 출원일자(국제) 2015년09월16일
심사청구일자 2020년09월16일
- (85) 번역문제출일자 2017년04월14일
- (65) 공개번호 10-2017-0104986
- (43) 공개일자 2017년09월18일
- (86) 국제출원번호 PCT/US2015/050354
- (87) 국제공개번호 WO 2016/044376
국제공개일자 2016년03월24일

(30) 우선권주장
62/051,182 2014년09월16일 미국(US)

(56) 선행기술조사문헌

US20120148559 A1*

INFECTION AND IMMUNITY, Jan. 1993, p.
329~331*arginine deiminase [Mycoplasmopsis
iners](NCBI Reference Sequence:
WP_029512517.1)*

*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

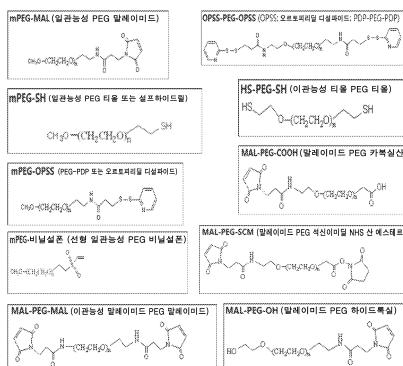
전체 청구항 수 : 총 15 항

심사관 : 조경주

(54) 발명의 명칭 암 치료용 ADI-PEG 20 항체에 대한 감소된 교차-반응성을 갖는 아르기닌 테이미나아제

(57) 요약

본 발명은 일반적으로, ADI-PEG 20과 비교하여, 항-ADI-PEG 20 항체로 감소된 교차-반응성을 갖는, 그러나 ADI-PEG 20과 비교할만한 또는 더 나은 기능적 특징을 가질 수 있는, 단리된 아르기닌 테이미나아제 (ADI) 단백질, 상기 ADI 단백질을 포함한 조성물, 및 아르기닌-의존성 질환 또는 관련 질환 예컨대 암의 관련된 치료 방법에 관한 것이다.

대 표 도 - 도1ca

(52) CPC특허분류

A61K 47/60 (2017.08)

C12N 9/78 (2013.01)

C12Y 305/03006 (2013.01)

(72) 발명자

톰슨 제임스 에이

미국 92123 캘리포니아주 샌 디에이고 해이브터 웨
이 8931

시슨 웨스

미국 92127 캘리포니아주 샌 디에이고 에스코바 플
레이스 11459

시아 웨이종

미국 92126 캘리포니아주 샌 디에이고 티샤 씨클
10248

첸 리창

미국 92121 캘리포니아주 샌 디에이고 노벨 드라이
브 3717 아파트먼트 1116

리 양

미국 92122 캘리포니아주 샌 디에이고 코스타 베르
데 블러바드 8510

명세서

청구범위

청구항 1

암의 치료, 암의 증상 완화, 또는 암의 진행 억제에 사용하기 위한, 단리된 폐길화된(PEGylated) 아르기닌 데이미나아제(arginine deiminase, ADI), 및 약제학적으로 허용가능한 담체를 포함한 치료적 조성물로서,

상기 치료적 조성물이 이를 필요로 하는 환자에 투여되고,

상기 단리된 폐길화된 아르기닌 데이미나아제가 서열 번호: 9, 서열 번호: 10 또는 서열 번호: 22에서 제시된 아미노산 서열을 포함하고,

상기 단리된 폐길화된 아르기닌 데이미나아제가 환자 항-ADI-PEG 20 항체와의 감소된 교차-반응성을 갖고,

상기 단리된 폐길화된 아르기닌 데이미나아제가 링커를 통해 PEG 분자에 공유 결합되는, 치료적 조성물.

청구항 2

삭제

청구항 3

삭제

청구항 4

제 1 항에 있어서, 상기 단리된 폐길화된 아르기닌 데이미나아제가 ADI-PEG 20의 것과 비교할만한 또는 보다 더 나은 하나 이상의 특성을 갖는, 치료적 조성물.

청구항 5

제 1 항에 있어서, 상기 단리된 폐길화된 아르기닌 데이미나아제가 M. 호미니스 아르기닌 데이미나아제와 비교하여 적어도 20개의 표면 잔기 변화를 갖는, 치료적 조성물.

청구항 6

제 5 항에 있어서, 상기 단리된 폐길화된 아르기닌 데이미나아제가 M. 호미니스 아르기닌 데이미나아제와 비교하여 40 내지 100개의 표면 잔기 변화를 갖는, 치료적 조성물.

청구항 7

삭제

청구항 8

삭제

청구항 9

삭제

청구항 10

삭제

청구항 11

삭제

청구항 12

삭제

청구항 13

제 1 항에 있어서, 상기 아르기닌 데이미나아제가 1 내지 10개의 PEG 분자에 공유 결합되는, 치료적 조성물.

청구항 14

제 1 항에 있어서, 상기 PEG가 1,000 내지 40,000의 총 중량 평균 분자량을 갖는, 치료적 조성물.

청구항 15

제 1 항에 있어서, 상기 텅커가 석시닐 기, 아미드 기, 이미드 기, 카바메이트 기, 에폭시 기, 카복실 기, 하이드록실 기, 탄수화물, 티로신 기, 시스테인 기, 히스티딘 기, 메틸렌 기, 또는 이들의 임의의 조합인, 치료적 조성물.

청구항 16

삭제

청구항 17

삭제

청구항 18

삭제

청구항 19

삭제

청구항 20

삭제

청구항 21

삭제

청구항 22

삭제

청구항 23

삭제

청구항 24

삭제

청구항 25

삭제

청구항 26

삭제

청구항 27

삭제

청구항 28

삭제

청구항 29

삭제

청구항 30

삭제

청구항 31

삭제

청구항 32

삭제

청구항 33

삭제

청구항 34

제 1 항에 있어서, 화학치료제를 추가로 포함하는, 치료적 조성물.

청구항 35

제 34 항에 있어서, 상기 화학치료제가 도세탁셀, 카보플라틴, 사이클로포스파미드, 켐시타빈, 시스플라틴, 소라페닙, 수니티닙 및 에버롤리무스로 이루어진 군으로부터 선택되는, 치료적 조성물.

청구항 36

제 1 항에 있어서, 제 1 항의 치료적 조성물의 치료적 유효량을 암의 치료, 증상 완화, 또는 진행 억제를 필요로 하는 환자에게 투여하고, 이로써 암을 치료하거나, 암의 증상을 완화하거나, 암의 진행을 억제하는 단계를 포함하는, 암의 치료, 증상 완화, 또는 진행 억제에 사용하기 위한, 치료적 조성물.

청구항 37

제 36 항에 있어서, 암의 치료, 증상 완화, 또는 진행 억제를 필요로 하는 상기 환자가 항-ADI-PEG 20 항체를 갖는 것으로 결정된, 치료적 조성물.

청구항 38

제 36 항에 있어서, 상기 암이 간세포암종, 흑색종, 전이성 흑색종, 췌장암, 전립선암, 소세포 폐암, 중피종, 림프구 백혈병, 만성적 골수성 백혈병, 림프종, 간종양, 육종, 백혈병, 급성 골수 백혈병, 재발한 급성 골수 백혈병, 유방암, 난소암, 결장직장암, 위암, 신경아교종, 다형성 교아종, 비소세포 폐암 (NSCLC), 신장암, 방광암, 자궁암, 식도암, 뇌암, 두경부 암, 자궁경부암, 고환암, 및 위암으로 이루어진 군으로부터 선택되는, 치료적 조성물.

청구항 39

제 1 항에 있어서, ADI-PEG 20을 포함한 조성물의 치료적 유효량을 암의 치료, 증상 완화, 또는 진행 억제를 필요로 하는 환자에게 투여하는 단계, 및 일정 기간 후, 제 1 항의 치료적 조성물을 상기 환자에게 투여하고, 이로써 암을 치료하거나, 암의 증상을 완화하거나, 암의 진행을 억제하는 단계를 포함하는, 암의 치료, 암의 증상 완화, 또는 암의 진행 억제에 사용하기 위한, 치료적 조성물.

청구항 40

제 39 항에 있어서, 상기 기간이 상기 환자에서의 항-ADI-PEG 20 항체의 소정의 수준 검출에 의해 결정되고, 상기 치료적 조성물이 상기 항-ADI-PEG 20 항체의 상기 소정의 수준의 검출 이후 투여되는, 치료적 조성물.

청구항 41

제 39 항에 있어서, 상기 기간이 상기 환자에서의 ADI 활성 검출에 의해 결정되고, 상기 치료적 조성물이 소정의 또는 감소된 수준의 ADI 활성의 검출 이후 투여되는, 치료적 조성물.

청구항 42

삭제

청구항 43

삭제

청구항 44

삭제

청구항 45

삭제

청구항 46

삭제

청구항 47

삭제

청구항 48

삭제

청구항 49

삭제

청구항 50

삭제

청구항 51

삭제

청구항 52

삭제

청구항 53

삭제

청구항 54

삭제

청구항 55

삭제

청구항 56

삭제

청구항 57

삭제

청구항 58

삭제

청구항 59

삭제

청구항 60

삭제

청구항 61

삭제

청구항 62

삭제

청구항 63

삭제

청구항 64

삭제

청구항 65

삭제

청구항 66

삭제

청구항 67

삭제

청구항 68

삭제

발명의 설명

기술 분야

[0001] 관련 출원에 대한 교차-참조

[0002] 본 출원은, 그 전체가 참고로 편입된, 2014년 9월 16일 출원된, 미국 출원 번호 62/051,182에 대하여 35 U.S.C. § 119(e)하에 우선권을 주장한다.

[0003] 서열 목록에 관한 진술

[0004] 본 출원과 관련된 서열 목록은 종이 사본 대신 텍스트 포맷으로 제공되고, 이로써 명세서에 참고로 편입된다. 서열 목록을 함유한 텍스트 파일의 이름은 POLA_005_01WO_SeqList_ST25.txt이다. 텍스트 파일은 약 97 KB이고, 2015년 9월 15일 작성되었고, EFS-Web을 통해 전자적으로 제출된다.

배경기술

기술 분야

[0006] 본 발명은, ADI-PEG 20 항체로 감소된 교차-반응성을 갖는 ADI 단백질을 포함한, 일반적으로 아르기닌 데아미나 아제 (ADI) 단백질에 관한 것이다. 상기 ADI 단백질은 아르기닌-의존성 또는 관련된 질환 예컨대 암에 대한 치료에 유용하다.

관련 기술의 설명

[0008] 아미노산 차단 요법은 일부 형태의 암의 유효한 치료일 수 있다. 현재까지, 아스파라긴의 순환 수준을 저하시키기 위해 및 단백질 합성을 억제시키기 위해 아스파라기나아제를 이용하는 상기 접근법에 관련된 하나의 공지된 임상 예이다. 상기 치료는 급성 림프아구성 백혈병에 특히 유효하다 (Avramis 2005, Viera Pinheiro 2004). 급성 림프아구성 백혈병 세포는 성장 및 증식을 위하여 아미노산 아스파라긴을 필요로 한다. 그에 반해서, 대부분의 정상 인간 세포는 아스파라긴을 합성할 수 있고 아스파라긴 고갈에 의해 영향받지 않는다. 따라서, 아스파라기나아제를 이용한 혈청 아스파라긴 감소는 정상 세포, 조직, 및 숙주의 가해 없이 암 세포를 선택적으로 사멸시킬 수 있다. 아스파라기나아제의 *E. coli* 유도된 형태는 인간 용도를 위하여 승인되었다. 그러나, 아스파라기나아제는 미생물에서만 발견되고; 이는 인간에게서 고 면역원성이고 또한 주사 이후 짧은 혈청 반감기를 갖는다 (Avramis 2005). 아스파라기나아제를 더 효과적인 약물로 만들기 위해, 이들 단점은 *E. coli* 유도된 아스파라기나아제를 폴리에틸렌 글리콜 (PEG)과 제형화함으로써 최소화되어 상기 효소의 면역원성 및 관련된 알러지성 반응을 감소시켰다. 또한, PEG는 아스파라기나아제의 순환 반감기를 크게 연장시키고, 이는 치료의 빈도 및 요법의 총 비용을 감소시킨다. PEG 제형화된 아스파라기나아제는 사용에 승인되고 상표명 Oncaspar® (Oncaspar® 2011, Avramis 2005, Viera Pinheiro 2004, Fu 2007, Zeidan 2008)로 시판된다.

[0009] 아르기닌은 인간 및 마우스에 대한 또 다른 비-필수적인 아미노산이다 (검토를 위하여 참조 Rogers 1994). 인간에 있어서, 아르기닌은 크렙스 (우레아) 사이클 효소 아르기니노석시네이트 합성효소 (ASS, L-시트룰린:L-아스파르테이트 리가아제 [AMP-형성], EC 6.3.4.5) 및 아르기니노석시네이트 분해효소 (ASL, L-아르기니노석시네이트 아르기닌-분해효소, EC 4.3.2.)를 통해 2 단계로 시트룰린으로부터 합성될 수 있다 (Haines 2011, Wu 2009, Morris 2006, Husson 2003, Tapiero 2002, Rogers 1994). ASS는 시트룰린 및 아스파르트산의 아르기니노석시네이트로의 전환을 촉매화하고, 그 다음 ASL에 의해 아르기닌 및 푸마르산으로 전환된다. 인간에 있어서 아르기닌 결핍된 디아이어트는 고암모니아혈증, 오로트산뇨증을 유발하지 않고, 성인 인간에 있어서 전체의 바디 산화질소 (NO) 합성의 속도를 변경하지 않는다 (Tapiero 2002, Castillo 1995, Rogers 1994, Carey 1987, Barbul 1986, Snyderman 1959, Rose 1949). 초기 영아가 아르기닌이 필요하지 않은 것처럼 보여도 (Wu 2004), 아르기닌 수준은 영아, 소아 및 청소년 중에서 연령과 상관하지 않는다 (Luecke 2007). 1992년에, Takaku 및 Sugimura는 인간 흑색종 및 간세포 암종 (HCC) 세포주가 성장을 위하여 아르기닌이 필요한 것처럼 보이는 것을 별도로 보고하였다. 다른 연구는 폐질화된 ADI가 역효과가 거의 없는 흑색종 및 간종양의 치료에 유효하였음을 보여주었다.

[0010] ADI-PEG 20 치료는 일정 기간에 걸쳐 다중 용량을 필요로 한다. 수많은 치료 이후, 그의 계속된 유효성을 제한할 수 있는 항-ADI-PEG 20 항체는 발전할 수 있다. 따라서, 아르기닌 고갈 요법의 효능을 확장하기 위해 및 개선하기 위해 치료에서 사용을 위하여 항-ADI-PEG20 항체에 대한 감소된 교차-반응성을 갖는 ADI에 대하여 당해 기술에서 필요성이 있다. 본 발명은 암의 치료를 위하여 상기 및 다른 이점을 제공한다.

[0011] 참조: Avramis VI, Panosyan EH. 2005. Clin Pharmacokinet 44:367-393; Barbul A. 1986. J Parenteral Enteral Nutr 10:227-238; Carey GP, et al. 1987. J Nutr 117:1734-1739; Castillo L, et al. 1995. Am J Physiol 268 (Endocrinol Metab 31):E360-367; 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; Lücke T, et al. 2007. Clin Chem Lab Med 45:1525-1530; Morris SM Jr. 2006. Am J Clin Nutr 83(Suppl):598S-512S; Rogers QR. 1994. In Proceedings from a Symposium Honoring Willard J. Visek - from Ammonia to Cancer and Gene Expression. Special Publication 86 - April, 1994, Agriculture Experiment Station, University of Illinois, 211 Mumford Hall, Urbana, IL 61801, pp. 9-21; Tapiero H,

et al. 2002. Biomed Pharmacother 56:439– 445, 2002; Viera Pinheiro JP, Boos J. 2004. Br J Haematol 125: 117-127; Wu G, *et al.* 2009. Amino Acids 37:153-168; Wu G, *et al.* 2004. J Nutr Biochem 15:442-451; Zeidan A, *et al.* 2008. Expert Opin Biol Ther 9:111-119).

발명의 내용

[0012]

간단한 요약

[0013]

특정 구현예는 단리된 아르기닌 데이미나아제에 관한 것이고, 여기에서 단리된 아르기닌 데이미나아제는 환자 항-ADI-PEG 20 항체로 감소된 교차-반응성을 갖는다. ADI 활성을 갖는 단리된 아르기닌 데이미나아제 또는 이의 단편, 및 약제학적으로 허용가능한 담체를 포함한 치료적 또는 약학적 조성물이 또한 포함된다. 특정 구현예에서, 조성물은 멸균되고/되거나 실질적으로 발열원 예컨대 내독소가 없다. 일부 구현예에서, 환자 항-ADI-PEG 20 항체로 감소된 교차-반응성을 갖는 단리된 아르기닌 데이미나아제는 *M. 호미니스* 유래의 것이 아니다. 일부 구현예에서, 환자 항-ADI-PEG 20 항체로 감소된 교차-반응성을 갖는 단리된 아르기닌 데이미나아제는 표 1에서 열거된 유기체 유래의 것이다.

[0014]

특정 구현예에서 환자 항-ADI-PEG 20 항체로 감소된 교차-반응성을 갖는 단리된 아르기닌 데이미나아제는 ADI-PEG 20의 것과 비교할만한 또는 보다 더 나은 하나 이상의 특성을 갖는다. 이와 관련하여, 하나 이상의 특성은, 비제한적으로, Kcat, Km, pH 최적, 안정성, 생체내 단백분해 안정성, 또는 혈액에 이미 존재하지 않은 보조인자 또는 이온에 대한 무 요건, 또는 이들의 임의의 조합을 포함한다. 일부 구현예에서, 환자 항-ADI-PEG 20 항체로 감소된 교차-반응성을 갖는 단리된 아르기닌 데이미나아제는 *M. 호미니스* 아르기닌 데이미나아제와 비교하여 적어도 5, 10, 15, 또는 20 표면 잔기 변화를 갖는다. 특정 구현예에서, 환자 항-ADI-PEG 20 항체로 감소된 교차-반응성을 갖는 단리된 아르기닌 데이미나아제는 *M. 호미니스* 아르기닌 데이미나아제와 비교하여 약 20 내지 135 표면 잔기 변화, 약 40 내지 100 표면 잔기 변화, 약 30 내지 60 표면 잔기 변화, 약 80 내지 100 표면 잔기 변화, 또는 약 100 내지 120 표면 잔기 변화를 갖는다.

[0015]

특정 구현예에서, 환자 항-ADI-PEG 20 항체로 감소된 교차-반응성을 갖는 단리된 아르기닌 데이미나아제는 하기 유래의 것이다: 마이코플라스마 살비바리움, 마이코플라스마 스투만스, 마이코플라스마 카나덴세, 마이코플라스마 아우리스, 마이코플라스마 하이오사이노비애, 마이코플라스마 클로아칼레, 마이코플라스마 안세리스, 마이코플라스마 알칼레스센스, 마이코플라스마 오랄레, 마이코플라스마 이네르스, 마이코플라스마 멜레아그리디스, 마이코플라스마 알비, 마이코플라스마 페네트란스, 마이코플라스마 갈리나룸, 마이코플라스마 피룸, 마이코플라스마 프리마룸, 마이코플라스마 페르멘坦스, 마이코플라스마 리포파시엔스, 마이코플라스마 펠리파우시움, 마이코플라스마 이미탄스, 마이코플라스마 오펠레스센스, 마이코플라스마 모아트시이, 마이코플라스마 엘레판티스, 마이코플라스마 뉴모니애, 마이코플라스마 테스투디니스, 마이코플라스마 *sp. CAG:877*, 또는 마이코플라스마 *sp. CAG:472*. 환자 항-ADI-PEG 20 항체로 감소된 교차-반응성을 갖는 예증적인 아르기닌 데이미나아제는 서열 번호:2-28에서 제시된 임의의 하나 이상의 아미노산 서열을 포함한다.

[0016]

일부 구현예에서, 환자 항-ADI-PEG 20 항체로 감소된 교차-반응성을 갖는 단리된 아르기닌 데이미나아제는 적어도 하나의 폐길화 부위를 제거하기 위해 변형되었다. 환자 항-ADI-PEG 20 항체로 감소된 교차-반응성을 갖는 아르기닌 데이미나아제의 특정 구현예에서, 적어도 하나의 라이신 잔기는 아미노산 치환에 의해 변형되었다. 이와 관련하여, 특정 구현예에서, 적어도 약 5 라이신 잔기, 적어도 약 10 라이신 잔기, 또는 적어도 약 20 라이신 잔기는 아미노산 치환에 의해 변형되었다.

[0017]

일부 구현예에서, 환자 항-ADI-PEG 20 항체로 감소된 교차-반응성을 갖는 아르기닌 데이미나아제는 PEG 분자에 링커를 통해 공유 결합된다. 이와 관련하여, 환자 항-ADI-PEG 20 항체로 감소된 교차-반응성을 갖는 아르기닌 데이미나아제는 하나 이상의 PEG 분자, 예컨대 약 1 내지 약 10 또는 약 2 내지 약 8 PEG 분자에 공유 결합될 수 있다. PEG 분자는 직쇄 또는 분지쇄 PEG 분자일 수 있고 약 1,000 내지 약 40,000의 총 중량 평균 분자량, 또는 약 10,000 내지 약 30,000의 총 중량 평균 분자량을 가질 수 있다. 일부 구현예에서, PEG가 링커를 통해 본원에서 기재된 ADIr에 공유 결합되는 경우, 링커는 석시닐 기, 아미드 기, 이미드 기, 카바메이트 기, 에스테르 기, 에폭시 기, 카복실 기, 하이드록실 기, 탄수화물, 티로신 기, 시스테인 기, 히스티딘 기, 메틸렌 기, 또는 이들의 임의의 조합을 포함할 수 있다. 특이적 구현예에서, 석시닐 기의 공급원은 석신이미딜 석시네이트이다.

[0018]

본원에서 기재된 단리된 아르기닌 데이미나아제를 암호화한 폴리뉴클레오티드, 폴리뉴클레오티드를 포함한 백터, 및 백터를 포함한 단리된 숙주 세포가 또한 포함된다.

[0019] 특정 구현예는 본원에서 기재된 바와 같이 환자 항-ADI-PEG 20 항체로 감소된 교차-반응성을 갖는 단리된 아르기닌 데이미나아제, 및 생리적으로 허용가능한 담체를 포함한 조성물에 관한 것이다. 특정 구현예에서, 조성물은 추가로 화학치료제를 포함한다. 예시적인 화학치료제는, 비제한적으로, 도세탁셀, 카보플라틴, 사이클로포스파미드, 켐시타빈, 시스플라틴, 소라페닙, 수니티닙, 및 에버롤리무스를 포함한다.

[0020] 본원에서 기재된 환자 항-ADI-PEG 20 항체로 감소된 교차-반응성을 갖는 단리된 아르기닌 데이미나아제 및 생리적으로 허용가능한 담체를 포함한 조성물의 치료적 유효량을 이들이 필요한 환자에 투여하고, 그렇게 함으로써 암을 치료, 암의 증상을 완화, 또는 암의 진행을 억제하는 것을 포함하는 암 치료, 암의 증상 완화, 또는 암의 진행 억제 방법이 또한 포함된다. 특정 구현예에서, 이들이 필요한 환자는 항-ADI-PEG 20 항체를 갖도록 결정되었다. 일부 구현예에서, 암은 간세포 암종, 전이성 흑색종을 포함한 흑색종, 궤장암, 전립선암, 소세포 폐암, 중피종, 림프구 백혈병, 만성적 골수성 백혈병, 림프종, 간종양, 육종, 백혈병, 급성 골수 백혈병, 재발한 급성 골수 백혈병, 유방암, 난소암, 결장직장암, 위암, 신경아교종, 다형성 교아종, 비소세포 폐암 (NSCLC), 신장암, 방광암, 자궁암, 식도암, 뇌암, 두경부 암, 자궁경부암, 고환암, 및 위암으로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0021] 일부 구현예는 ADI-PEG 20을 포함한 조성물의 치료적 유효량을 이들이 필요한 환자에 투여하고, 일정 기간 이후, 본원에서 기재된 바와 같이 환자 항-ADI-PEG 20 항체로 감소된 교차-반응성을 갖는 단리된 아르기닌 데이미나아제 및 생리적으로 허용가능한 담체를 포함한 조성물을 환자에 투여하고, 그렇게 함으로써 암을 치료, 암의 증상을 완화, 또는 암의 진행을 억제하는 것을 포함하는 암 치료, 암의 증상 완화, 또는 암의 진행 억제 방법을 포함한다. 기간은, 예를 들어, 환자에서 항-ADI-PEG 20 항체의 소정의 수준의 검출 및/또는 환자에서 ADI 활성의 측정 또는 다르게는 관찰에 의해 결정될 수 있고, 여기에서 환자 항-ADI-PEG 20 항체로 감소된 교차-반응성을 갖는 단리된 아르기닌 데이미나아제를 포함한 조성물은 상기 항-ADI-PEG 20 항체의 소정의 수준의 검출 및/또는 환자에서 ADI 활성의 소정의 수준의 측정 또는 관찰 이후 투여된다.

[0022] 암 치료, 암의 증상 완화, 또는 암의 진행 억제를 위한 약제의 조합 또는 제조에서 사용을 위하여 본원에서 기재된 단리된 아르기닌 데이미나아제 단백질이 또한 포함된다.

도면의 간단한 설명

[0023] 도 1a-1d는 본원에서 기재된 ADIr 효소에 접합될 수 있는 다양한 시스테인-반응성 PEG 분자를 예증한다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0024] 본 발명의 구현예는, 일부 구현예에서 링커, 예를 들면, 안정한 링커를 통해 PEG에 접합되는, 선택된 ADI 효소에 관한 것이다. 일부 구현예에서, ADI 효소는, 예를 들어, 야생형 서열 또는 참조 서열에 비하여, 작은 또는 다르게는 감소된 수의 표면 라이신 잔기를 갖도록 조작 또는 선택된다 (참조, 예를 들면, 표 1). 선택된 ADI 효소는, 그의 유익한 특성에 기반하여, 상이한 유기체로부터, 다수의 ADI 효소로부터 선택된다. 이를 특성은 아르기닌의 시트룰린 및 암모니아로의 ADI 전환을 통해 인간 혈액에서 낮은 아르기닌 농도를 정착 및 유지시키기 위해 효소의 능력을 포함한다. 일부 구현예에서, 선택된 ADI 분자는 ADI-PEG 20과 비교하여 항-ADI-PEG 20 항체에 대해 감소된 교차-반응성을 갖고, 상기 항체는 가능하게는 ADI-PEG 20을 이용한 환자의 이전의 치료에서 비롯된다.

[0025] 특정 구현예에서, ADI 효소는 신장 청소능 및 단백질분해에 대한 보호, 뿐만 아니라 감소된 면역원성 또는 항원성을 제공하기 위해 폐길화된다. 폐길화의 유효성을 증가시키기 위해, 효소에 대한 변형은 표면 라이신 잔기의 수를 감소시키기 위해 및 따라서 이용가능한 PEG 부착 부위의 수를 제한하기 위해 조작될 수 있다. 일부 경우에서, 라이신 잔기의 수 감소는 잔여 라이신 부착 잔기에서 더욱 완벽한 및 균일한 폐길화를 제공한다.

[0026] 일부 구현예에서, ADI에 메톡시-PEG를 부착시키기 위해 선택된 PEG 링커는 화학적으로-안정한 연결을 제공한다. 안정한 링커가 분자의 생물활성 수명을 증가시킬 것이 예상된다. 화학적으로 안정한 링커는 또한 가수분해를 제거할 것이고 효소 표면에 부착된 탈-폐길화된 링커에 발생할 수 있는 면역 반응을 감소시킬 것이다.

[0027] 이를 누적 명세는 환자의 혈액으로부터 아르기닌을 효과적으로 제거하는 하나 이상의 분자를 초래하고 이전의 아르기닌 고갈 요법으로부터 항-ADI-PEG 20 항체에 의해 중화되지 않거나 또는 청소되지 않는다. 분자는 그들 자체 면역원성 때문에 중화 및 청소능을 자연시키기 위해 폐길화된다. 이를 인자는 아르기닌 고갈 요법을 확장하기 위해 및 따라서 항-암 치료제로서 아르기닌 고갈 치료의 유효성을 증가시키기 위해 (예를 들면, 후속 약물로서) ADI-PEG 20 대신 또는 ADI-PEG 20에 더하여 그의 용도를 허용할 것이다.

- [0028] 정상 세포가 성장을 위하여 아르기닌을 필요로 하지 않는 것은, 이들이 ASS 및 ASL에 의해 촉매화된 2-단계 공정에서 시트룰린으로부터 아르기닌을 합성할 수 있기 때문이다. 그에 반해서, 특정 암은 ASS를 발현시키지 않는다. 특정 암은 ASL을 발현시키지 않고, 다른 암은 ASS 및/또는 ASL의 줄어든 발현을 가질 수 있거나, 또는 ASS 및/또는 ASL을 발현시키지 않을 수 있다. 따라서, 이들 암은 아르기닌에 대하여 영양요구성이이다. 상기 대사성 차이는 이들 형태의 암을 치료하기 위한 안전한 및 유효한 요법을 개발하는데 짐중될 수 있다. ADI는 아르기닌 디히드롤라아제 경로를 통해 아르기닌의 시트룰린으로의 전환을 촉매화하고, 따라서 아르기닌을 제거하는데 사용될 수 있다.
- [0029] 본 발명의 실시는, 반대로 특이적으로 지시하지 않는 한, 그 분야의 기술 내에서 바이러스학, 면역학, 미생물학, 분자 생물학 및 재조합 DNA 기법의 종래의 방법을 사용할 것이고, 이들 다수는 예증의 목적으로 아래 기재된다. 상기 기술은 문헌에서 완전히 설명된다. 참조, 예를 들면, *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) 및 기타 유사 참조문헌.
- [0030] 표준 기술은 재조합 DNA, 올리고뉴클레오티드 합성, 및 조직 배양 및 형질전환 (예를 들면, 전기천공, 리포렉션)에 사용될 수 있다. 효소 반응 및 정제 기술은 제조자의 명세에 따라 수행될 수 있거나 또는 당해 기술에서 또는 본원에서 기재된 바와 같이 통상적으로 달성될 수 있다. 이들 및 관련된 기술 및 절차는 당해 기술에서 잘 알려진 종래의 방법에 따라 그리고 본 명세서 전반에 걸쳐 인용 및 논의된 각종 일반적 및 더욱 구체적 참조문헌에서 기재된 바와 같이 일반적으로 수행될 수 있다. 구체적 정의가 제공되지 않는 한, 본원에서 기재된 분자 생물학, 분석 화학, 합성 유기 화학, 및 약효 및 약학 화학과 관련된 명명법, 및 이들의 실험실 절차 및 기술은 당해 기술에서 공지된 및 통상적으로 사용된 것이다. 표준 기술은 재조합 기술, 분자 생물학적, 미생물학적, 화학 합성, 화학 분석, 약학적 제조, 제형, 및 전달, 및 환자의 치료에 사용될 수 있다.
- [0031] 본 명세서 및 첨부된 청구항에서 사용된 바와 같이, 단수 형태는 내용이 명확히 다르게는 지시하지 않는 한 복수의 참조를 포함한다.
- [0032] "약"은 참조 양, 수준, 값, 숫자, 빈도, 백분율, 치수, 크기, 양, 중량 또는 길이에 대해 30, 25, 20, 15, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 또는 1% 만큼 다양한 양, 수준, 값, 숫자, 빈도, 백분율, 치수, 크기, 양, 중량 또는 길이를 의미한다.
- [0033] 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "아미노산"은 모든 천연 발생 및 비-천연 아미노산 뿐만 아니라 아미노산 유사체 및 모방체를 포함한다. 천연 발생 아미노산은 단백질 생합성 동안 이용된 L-아미노산 뿐만 아니라 다른 것 예컨대 D-아이드록시프롤린, 하이드록실리신, 데스모신, 이소데스모신, 호모시스테인, 시트룰린 및 오르니틴을, 예를 들어 포함한다. 비-천연 아미노산은, 당해 분야의 숙련가에 공지된, 예를 들어, 노르류신, 노르발린, p-플루오로페닐알라닌, 에티오닌, 등등을 포함한다. 아미노산 유사체는 천연 및 비-천연 아미노산의 변형된 형태를 포함한다. 상기 변형은, 예를 들어, 아미노산에서 또는 아미노산의 유도체화에 의해 화학 기 및 모이어티의 치환 또는 대체를 포함할 수 있다. 아미노산 모방체는, 예를 들어, 참조 아미노산의 기능적으로 유사한 특성 예컨대 전하 및 전하 간격 특징을 나타내는 유기 구조를 포함한다. 예를 들어, 아르기닌 (Arg 또는 R)을 모방한 유기 구조는 유사한 분자 공간에 위치한 및 천연 발생 Arg 아미노산의 측쇄의 e-아미노 기로서 동일한 정도의 이동도를 갖는 양전하 모이어티를 가질 것이다. 모방체는 또한 아미노산 또는 아미노산 관능기의 최적의 간격 및 전하 상호작용을 유지하기 위해 구속된 구조를 포함한다. 당해 분야의 숙련가는 구조가 기능적으로 등가 아미노산 유사체 및 아미노산 모방체를 구성하는지를 알거나 또는 결정할 수 있다.
- [0034] 본 명세서 전반에 걸쳐, 맥락이 다르게는 필요하지 않는 한, 단어 "포함하다", 또는 변화 예컨대 "포함한다" 또는 "포함하는"은, 언급된 요소 또는 정수 혹은 요소 또는 정수의 그룹의 포함을 암시하는 것으로 이해될 것이지만 임의의 다른 요소 또는 정수 혹은 요소 또는 정수의 그룹의 배제를 암시하지 않을 것이다.
- [0035] "생체적합성"은 생물학적 기능에 일반적으로 해롭지 않은 그리고 알려지 항원성 및 질환 상태를 포함하여 임의의

정도의 허용될 수 없는 독성을 초래하지 않을 물질 또는 화합물을 언급한다.

[0036] 용어 "내독소 없는" 및 "실질적으로 내독소 없는"은 일반적으로 내독소의 많아야 미량 (예를 들면, 대상체에 임상적으로 부정적인 생리적 효과를 갖지 않는 양), 및 바람직하게는 내독소의 검출불가능한 양을 함유하는 조성물, 용매, 및/또는 용기에 관련한다. 비록 내독소가 그램-양성 박테리아, 예컨대 리스테리아 모노사이토게네스에서 발견될 수 있어도, 내독소는 특정 박테리아, 전형적으로 그램-음성 박테리아와 관련된 독소이다. 가장 보편적인 내독소는 다양한 그램-음성 박테리아의 외막에서 발견된 리포폴리사카라이드 (LPS) 또는 리포-올리고-사카라이드 (LOS)이고, 질환을 유발시키는 이들 박테리아의 능력에서 중심 병원성 특징을 나타낸다. 인간에 있어서 소량의 내독소는 다른 부정적인 생리적 효과 중에서 열병, 혈압의 저하, 및 염증 및 응고의 활성화를 생산할 수 있다.

[0037] 따라서, 약학적 생산에서, 의약품 및/또는 약물 컨테이너로부터 대부분의 또는 모든 미량의 내독소를 제거하는 것이 종종 바람직한 것은, 심지어 소량이 인간에 있어서 역효과를 유발할 수 있기 때문이다. 300°C 초파의 온도가 대부분의 내독소를 파괴하기 위해 전형적으로 요구됨에 따라, 발열원제거 오븐은 이러한 목적을 위해 사용될 수 있다. 예를 들면, 1차 포장재 예컨대 주사기 또는 바이알에 기반하여, 250°C의 유리 온도와 30 분의 지속 시간의 조합은 내독소 수준에서 3 로그 감소를 달성하는데 종종 충분하다. 본원에서 기재된 및 당해 기술에서 공지된 바와 같이, 예를 들어, 크로마토그래피 및 여과 방법을 포함하여, 내독소의 다른 제거 방법이 고려된다. 본 발명의 조성물에 존재한 내독소의 위험을, 제거하지 않는다면, 감소시키기 위해 전핵 세포 예컨대 포유동물 세포에서 폴리펩티드 생산 방법 및 이들 세포로부터의 폴리펩티드 단리 방법이 또한 포함된다. 무혈청 세포에서 폴리펩티드 생산 방법 및 이들 세포로부터의 폴리펩티드의 단리 방법이 포함된다.

[0038] 내독소는 당해 기술에서 공지된 일상적인 기술을 이용하여 검출될 수 있다. 예를 들어, 투구제로부터 혈액을 이용하는, *Limulus Amoebocyte Lysate* 검정은 내독소의 존재 검출을 위한 고 감수성 검정이다. 상기 시험에서, 매우 낮은 수준의 LPS는 상기 반응을 증폭시키는 강력한 효소 캐스케이드 때문에 리물루스 용해물의 검출가능한 응고를 유발시킬 수 있다. 내독소는 또한 효소-연결된 면역흡착 검정 (ELISA)에 의해 정량화될 수 있다. 실질적으로 내독소 없기 위해, 내독소 수준은 약 0.001, 0.005, 0.01, 0.02, 0.03, 0.04, 0.05, 0.06, 0.08, 0.09, 0.1, 0.5, 1.0, 1.5, 2, 2.5, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 또는 10 EU/ml 미만일 수 있다. 전형적으로, 1 ng 리포폴리사카라이드 (LPS)는 약 1-10 EU에 상응한다.

[0039] 폴리펩티드의 "반감기"는, 유기체의 혈청 또는 조직 속으로 투여 시간에서 상기 활성에 비하여, 또는 임의의 다른 정의된 시점에 비하여, 폴리펩티드가 그의 약리학적, 생리적, 또는 다른 활성의 절반을 잃는데 걸리는 시간을 언급할 수 있다. "반감기"는 또한, 유기체의 혈청 또는 조직 속으로 투여 시간에서 상기 양 또는 농도에 비하여, 또는 임의의 다른 정의된 시점에 비하여, 폴리펩티드의 양 또는 농도가 유기체의 혈청 또는 조직 속으로 투여된 개시 양의 절반만큼 감소되는데 걸리는 시간을 언급할 수 있다. 반감기는 혈청 및/또는 임의의 하나 이상의 선택된 조직에서 측정될 수 있다.

[0040] "상동성"은 동일하거나 또는 보존적 치환을 구성하는 아미노산의 백분율수를 언급한다. 상동성은, 본원에서 참고로 편입된, 서열 비교 프로그램 예컨대 GAP (Deveraux et al., Nucleic Acids Research. 12, 387-395, 1984)을 이용하여 결정될 수 있다. 이런 식으로 본원에서 인용된 것과 유사한 또는 실질적으로 상이한 길이의 서열은 정렬 속으로 캡의 삽입에 의해 비교될 수 있고, 상기 캡은, 예를 들어, GAP에 의해 사용된 비교 알고리즘으로 결정된다.

[0041] 용어 "조절하는" 및 "변경하는"은, 대조군에 비하여 전형적으로 통계적으로 유의미한 또는 생리적으로 유의미한 양 또는 정도로, "증가하는", 항상시키는" 또는 "자극하는", 뿐만 아니라 "감축하는" 또는 "감소하는"을 포함한다. "증가된", "자극된" 또는 "항상된" 양은 전형적으로 "통계적으로 유의미한" 양이고, 무 조성물 (예를 들면, 제제의 부재) 또는 대조군 조성물에 의해 생산된 양의 1.1, 1.2, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 30 배 이상 (예를 들면, 500, 1000 배) (예를 들면, 1.5, 1.6, 1.7, 1.8, 등의 사이에서 모든 정수 및 범위 포함)인 증가를 포함할 수 있다. "감축된" 또는 "감소된" 양은 전형적으로 "통계적으로 유의미한" 양이고, 무 조성물 (예를 들면, 제제의 부재) 또는 대조군 조성물에 의해 생산된 양에서 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 11%, 12%, 13%, 14%, 15%, 16%, 17%, 18%, 19%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 또는 100% 감축 (이들 사이에서 모든 정수 및 범위 포함)을 포함할 수 있다. 비교 및 "통계적으로 유의미한" 양의 예는 본원에서 기재된다.

[0042] "환자" 또는 "대상체"는 동물, 특정 구현예에서 포유동물, 및 특이적 구현예에서, 인간을 언급한다.

- [0043] 특정 구현예에서, 조성물내 임의의 주어진 제제 (예를 들면, ADIr, ADIr-PEG)의 "순도"는 특이적으로 정의될 수 있다. 예를 들면, 특정 조성물은, 예를 들어 및 결코 제한 없이, 화합물을 분리, 확인, 및 정량화하기 위한 생화학 및 분석 화학에서 빈번하게 사용된 칼럼 크로마토그래피의 공지된 형태인, 고성능 액체 크로마토그래피 (HPLC)로 측정된 바와 같이, 이들 사이에서 모든 소수 및 범위를 포함하여, 적어도 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 또는 100% 순수한 제제를 포함할 수 있다.
- [0044] 용어 "참조 서열"은 핵산 암호화 서열, 또는 아미노산 서열을 일반적으로 언급하고, 여기에 또 다른 서열은 비교된다. 본원에서 기재된 모든 폴리펩티드 및 폴리뉴클레오티드 서열은, 표 및 서열 목록에서 기재된 것 및 이를 통해 의해 기재된 것을 포함하여, 참조 서열로서 포함된다.
- [0045] 용어 "서열 동일성" 또는, 예를 들어, 본원에서 사용된 바와 같이, "50% 동일한 서열"을 포함한 용어는 서열이 비교의 윈도우에 걸쳐 연속해서 뉴클레오티드 기반 또는 연속해서 아미노산 기반으로 동일한 정도를 언급한다. 따라서, "서열 동일성의 백분율"은, 비교의 윈도우에 걸쳐 2개의 최적으로 정렬된 서열의 비교, 동일한 핵산 염기 (예를 들면, A, T, C, G, I) 또는 동일한 아미노산 잔기 (예를 들면, Ala, Pro, Ser, Thr, Gly, Val, Leu, Ile, Phe, Tyr, Trp, Lys, Arg, His, Asp, Glu, Asn, Gln, Cys 및 Met)가 모든 서열에서 발생하여 매칭된 위치의 수를 산출하는 위치의 수 결정, 매칭된 위치의 수를 비교의 윈도우에서 위치의 총 수 (즉, 윈도우 크기)로 나누셈, 및 그 결과를 100 곱셈하여 서열 동일성의 백분율 산출로 산출될 수 있다.
- [0046] 2 이상의 폴리펩티드 사이에서 서열 관계를 기재하기 위해 사용된 용어들은 "참조 서열", "비교 윈도우", "서열 동일성", "서열 동일성의 백분율" 및 "실질적인 동일성"을 포함한다. "참조 서열"은, 길이로, 적어도 12 그러나 빈번하게 15 내지 18 및 종종 적어도 25 모노머 단위의 뉴클레오티드 및 아미노산 잔기일 수 있다. 2개의 폴리펩티드가 각각 (1) 2개 폴리펩티드 사이에서 유사한 서열 (즉, 완벽한 폴리펩티드 서열의 단지 일부), 및 (2) 2 개 폴리펩티드 사이에서 엇갈리는 서열을 포함할 수 있기 때문에, 2개 (또는 초과) 폴리펩티드 사이에서 서열 비교는 서열 유사성의 국부 영역을 확인 및 비교하기 위해 "비교 윈도우"에 걸쳐 2개 폴리펩티드의 서열 비교로 전형적으로 수행된다. "비교 윈도우"는 2개 서열이 최적으로 정렬된 이후 서열이 인접 위치의 동일한 수의 참조 서열과 비교된 적어도 6 인접 위치, 일반적으로 약 50 내지 약 100, 더욱 일반적으로 약 100 내지 약 150의 개념상 분절을 언급한다. 비교 윈도우는 2개 서열의 최적의 정렬에 대하여 (부가 또는 결실을 포함하지 않는) 참조 서열과 비교하여 약 20% 이하의 부가 또는 결실 (즉, 갭)을 포함할 수 있다. 비교 윈도우 정렬을 위하여 서열의 최적의 정렬은 알고리즘의 컴퓨터화된 실행 (GAP, BESTFIT, FASTA, and TFASTA in the Wisconsin Genetics Software Package Release 7.0, Genetics Computer Group, 575 Science Drive Madison, WI, USA)에 의해 또는 선택된 임의의 다양한 방법으로 생성된다 (즉, 비교 윈도우에 걸쳐 최고 백분율 상동성을 초래하는) 최상의 정렬 및 점검에 의해 수행될 수 있다. 예를 들어 Altschul et al. (Nucl. Acids Res. 25:3389, 1997)에 의해 개시된 바와 같이 BLAST 패밀리의 프로그램이 또한 참조될 수 있다. 서열 분석의 상세한 논의는 아래에서 발견될 수 있다: Unit 19.3 of Ausubel et al. ("Current Protocols in Molecular Biology," John Wiley & Sons Inc, 1994-1998, Chapter 15).
- [0047] 서열 사이에서 서열 유사성 또는 서열 동일성 (용어는 본원에서 상호교환적으로 사용된다)의 산출은 아래와 같이 수행될 수 있다. 2개아미노산 서열, 또는 2개 핵산 서열의 동일성 퍼센트를 결정하기 위하여, 서열은 최적의 비교 목적을 위하여 정렬될 수 있다 (예를 들면, 갭은 최적의 정렬을 위하여 제1 및 제2 아미노산 또는 핵산 서열의 한쪽 또는 양쪽에서 도입될 수 있고 비-상동성 서열은 비교 목적을 위하여 무시될 수 있다). 특정 구현예에서, 비교 목적을 위하여 정렬된 참조 서열의 길이는 참조 서열의 길이의 적어도 30%, 바람직하게는 적어도 40%, 더욱 바람직하게는 적어도 50%, 60%, 및 더더욱 바람직하게는 적어도 70%, 80%, 90%, 또는 100%이다. 상응하는 아미노산 위치 또는 뉴클레오티드 위치에서 아미노산 잔기 또는 뉴클레오티드는 그 다음 비교된다. 제1 서열에서 위치가 제2 서열에서 상응하는 위치로서 동일한 아미노산 잔기 또는 뉴클레오티드에 의해 점거된 경우, 문자는 그 위치에서 동일하다.
- [0048] 2개 서열 사이에서 동일성 퍼센트는, 2개 서열의 최적의 정렬을 위하여 도입될 필요가 있는, 갭의 수, 및 각 갭의 길이를 고려하여, 서열에 의해 공유된 동일한 위치의 수의 함수이다.
- [0049] 서열의 비교 및 2개 서열 사이에서 동일성 퍼센트의 결정은 수학적 알고리즘을 이용하여 달성될 수 있다. 일부 구현예에서, 2개 아미노산 서열 사이에서 동일성 퍼센트는, Blossum 62 매트릭스 또는 PAM250 매트릭스, 및 16, 14, 12, 10, 8, 6, 또는 4의 갭 중량 및 1, 2, 3, 4, 5, 또는 6의 길이 중량을 이용한, GCG 소프트웨어 패키지에서 GAP 프로그램에 편입되는 Needleman and Wunsch 알고리즘 (J. Mol. Biol. 48: 444-453, 1970)을 이용하여 결정된다. 일부 구현예에서, 2개 뉴클레오티드 서열 사이에서 동일성 퍼센트는, NWSgapdn.CMP 매트릭스 및 40,

50, 60, 70, 또는 80의 갭 중량 및 1, 2, 3, 4, 5, 또는 6의 길이 중량을 이용한, GCG 소프트웨어 패키지에서 GAP 프로그램을 이용하여 결정된다. 또 다른 예시적인 세트의 파라미터 (및 다르게 구체화되지 않는 한 사용될 수 있는 것)는 갭 페널티 12, 갭 확장 페널티 4, 및 프레임 이동 갭 페널티 5를 갖는 Blossum 62 평점 매트릭스를 포함한다. 2개 아미노산 또는 뉴클레오티드 서열 사이에서 동일성 퍼센트는 또한, PAM120 중량 잔기 표, 갭 길이 페널티 12 및 갭 페널티 4를 이용한, ALIGN 프로그램 (버전 2.0)에 편입되는 E. Meyers 및 W. Miller의 알고리즘 (Cabios. 4:11-17, 1989)을 이용하여 결정될 수 있다.

[0050] 용어 "용해도"는 액체 용매에서 용해하고 균질한 용액을 형성하기 위해 본원에서 제공된 ADIr 효소의 특성을 언급한다. 용해도는 용질의 질량 / 용매의 단위 용적 (용질의 g / 용매의 kg, g / dL (100 mL), mg/ml, 등), 몰 농도, 몰랄농도, 몰 분율 또는 농도의 다른 유사한 설명에 의해, 농도로서 전형적으로 표현된다. 용매의 양 당 용해할 수 있는 용질의 최대 평형 양은, 온도, 압력, pH, 및 용매의 성질을 포함한, 명시된 조건하에 그 용매에서 그 용질의 용해도이다. 특정 구현예에서, 용해도는 생리적 pH, 또는 다른 pH, 예를 들어, pH 5.0, pH 6.0, pH 7.0, pH 7.2, pH 7.4, pH 7.6, pH 7.8, 또는 pH 8.0에서 측정된다. 특정 구현예에서, 용해도는 물 또는 생리적 버퍼 예컨대 PBS 또는 NaCl (NaP 있거나 없이) 또는 본원에서 기재된 다른 버퍼/조성물에서 측정된다. 특이적 구현예에서, 용해도는 상대적으로 더 낮은 pH (예를 들면, pH 6.0) 및 상대적으로 더 높은 염 (예를 들면, 500mM NaCl 및 10mM NaP)에서 측정된다. 특정 구현예에서, 용해도는 생체액 (용매) 예컨대 혈액 또는 혈청에서 측정된다. 특정 구현예에서, 온도는 약 실온 (예를 들면, 약 20, 21, 22, 23, 24, 25°C) 또는 약 체온 (37°C)일 수 있다. 특정 구현예에서, ADIr 효소는 실온에서 또는 37°C에서 적어도 약 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 0.9, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 또는 30 mg/ml의 용해도를 갖는다.

[0051] "실질적으로" 또는 "본질적으로"는 거의 완전히 또는 완전히, 예를 들면, 일부 주어진 양의 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 이상을 의미한다.

[0052] "통계적으로 유의미한"은, 결과가 우연히 발생할 것 같지 않은 것을 의미한다. 통계적 유의도는 당해 기술에서 공지된 임의의 방법에 의해 결정될 수 있다. 유의성의 통상적으로 사용된 측정은, 귀무 가설이 사실이라면, 판측된 이벤트가 발생할 빈도 또는 개연성이, p-값을 포함한다. 수득된 p-값이 유의 수준보다 더 작으면, 귀무 가설은 거부된다. 단순 사례에서, 유의 수준은 0.05 이하의 p-값에서 정의된다.

[0053] 본 명세서에서 각 구현예는 다르게는 명확히 언급되지 않는 한 모든 다른 구현예까지 필요한 부분만 약간 수정하여 적용된다.

[0054] 본 개시내용 전반에 걸쳐, 하기 약어는 사용될 수 있다: PEG, 폴리에틸렌 글리콜; ADI, 아르기닌 데이미나아제; SS, 석신이미딜 석시네이트; SSA, 석신이미딜 석신이미드; SPA, 석신이미딜 프로피오네이트; NHS, N-하이드록시-석신이미드; ASS1 또는 ASS, 아르기니노석시네이트 합성효소; ASL, 아르기니노석시네이트 분해효소.

[0055] ADI 효소를 암호화한 폴리뉴클레오티드는, 예를 들어, 미생물, 재조합 생명공학 또는 이들의 임의의 조합을 포함하여, 임의의 공급원으로부터 유도, 클로닝, 단리, 합성 또는 생산될 수 있다. 예를 들어, 아르기닌 데이미나아제는 속 마이코플라스마의 미생물로부터 클로닝될 수 있다. 특정 구현예에서, 아르기닌 데이미나아제는 하기로부터 클로닝된다: 마이코플라스마 살비바리움, 마이코플라스마 스투만스, 마이코플라스마 카나덴세, 마이코플라스마 아우리스, 마이코플라스마 하이오사이노비애, 마이코플라스마 클로아칼레, 마이코플라스마 안세리스, 마이코플라스마 알칼레스센스, 마이코플라스마 오랄레, 마이코플라스마 이네르스, 마이코플라스마 멜레아그리디스, 마이코플라스마 알비, 마이코플라스마 페네트란스, 마이코플라스마 갈리나룸, 마이코플라스마 피룸, 마이코플라스마 브리마툼, 마이코플라스마 페르멘坦스, 마이코플라스마 리포파시엔스, 마이코플라스마 웰리파우시움, 마이코플라스마 이미탄스, 마이코플라스마 오팔레스센스, 마이코플라스마 모아트시이, 마이코플라스마 엘레판티스, 마이코플라스마 뉴모니애, 마이코플라스마 테스투디니스, 마이코플라스마 *sp. CAG:877*, 또는 마이코플라스마 *sp. CAG:472*, 또는 이들의 임의의 조합. 일부 구현예에서, 아르기닌 데이미나아제는 표 1에서 열거된 종으로부터 클로닝된다. 특정한 구현예에서, ADI는 ADI 활성을 갖는 (예를 들면, 아르기닌을 시트룰린 및 암모니아로 대사작용할 수 있는), 서열 번호: 2-28의 임의의 하나의 아미노산 서열, 또는 이들의 변이체 또는 단편 또는 신장물(extension)을 포함한다. 상기 ADI 효소는 공지된 기술을 이용하여 제조 또는 합성될 수 있다.

[0056] 특정 구현예에서, 본원에서 기재된 바와 같이 ADI 효소는 *M. 호미니스* 유래의 유도된 기준점 ADI-PEG 20 문자와 비교된다. 본원에서 사용된 바와 같이, "ADI-PEG 20"는 당해 기술에서 공지된 및 예를 들어 미국 특허 번호 6,183,738 및 6,635,462에 기재된 ADI 문자를 언급한다; 참조 또한 Ascierto et al., 2005. 전이성 흑색종을

갖는 환자의 폐길화된 아르기닌 데이미나아제 치료: 상 I 및 II 연구로부터의 결과. *J Clin Oncol* 23(30): 7660-7668; Izzo F, et al. (2004) 절제 불가능한 간세포 암종을 갖는 환자의 폐길화된 아르기닌 데이미나아제 치료: 상 I/II 연구로부터의 결과. *J Clin Oncol* 22(10): 1815-1822; Holtsberg FW, et al. (2002), 폴리(에틸렌 글리콜) (PEG) 접합된 아르기닌 데이미나아제: 그의 약리적 특성에 관한 PEG 제형의 효과. *J Control Release* 80 (1-3): 259-271; Kelly et al., (2012) *British Journal of Cancer* 106, 324 - 332. 숙련가에 의해 기술적으로 인식되는 바와 같이, 상기 분자는 *M. 호미니스*로부터 유도된 폐길화된 (PEG 20,000) ADI 효소이고, 야생형 *M. 호미니스* ADI 효소에 비하여 2개 치환 (K112E; P210S)을 갖는다.

[0057] 본원에서 기재된 바와 같이 아르기닌 데이미나아제 효소는 다수의 ADI 효소로부터 스크리닝되고 환자로부터 항-ADI-PEG 20 항체로 감소 수준의 반응성 및/또는 다른 유익한 특성을 갖는 것으로 여겨진다. 항-ADI-PEG 20 항체는 ADI-PEG 20으로 치료된 대상체에서 나타날 수 있고 공지된 방법론을 이용하여 측정될 수 있다. 항-ADI-PEG 20 항체에 대한 반응성은 예를 들어 숙련가에 공지된 ELISA 또는 다른 유사한 검정을 이용하여 결정될 수 있다.

[0058] 이와 관련하여, ADI-PEG 20은 환자 항-ADI-PEG 20 항체에 대한 교차-반응성 수준을 사정하기 위한 비교로서 사용될 수 있다. 환자 항-ADI-PEG 20 항체에 대한 ADI-PEG 20의 것보다 통계적으로 유의미하게 더 낮은 교차-반응성 수준은 본원에서 유용할 수 있다. 특정 구현예에서, 본원에서 기재된 바와 같이 아르기닌 데이미나아제 효소는 항-ADI-PEG 20 항체에 낮은 또는 무 교차-반응성을 갖는다. 특정 구현예에서, ADI-PEG 20을 갖는 반응성에 비교하여 항-ADI-PEG 20 항체에 대한 반응성에서 임의의 감소는 그와 같은 ADI 효소가 아르기닌 고갈 요법이 필요한 환자에 대하여 치료 옵션을 개선함에 따라 유익할 수 있다. 따라서, 일부 구현예에서, 본원에서 기재된 바와 같이 아르기닌 데이미나아제 효소는 상기 항체에 대한 ADI-PEG 20 반응성과 비교하여 환자 항-ADI-PEG 20 항체에 대한 감소된 교차-반응성을 갖는다.

[0059] "ADIr"은 상기 항체에 대한 ADI-PEG 20 반응성과 비교하여 항-ADI-PEG 20 항체에 대한 감소된 교차-반응성을 갖는 본 발명의 ADI 효소를 언급하기 위해 본원에서 사용된다. "ADIr" 명명법은 당해 기술에서 공지된 바와 같이 ADI 및 ADI-PEG 20으로부터 본원에서 확인된 분자를 식별하기 위해 사용된다. ADIr 효소의 예는 서열 번호: 2-28, 및 서열 번호: 1과 아미노산 서열이 상이한 이들의 변이체 또는 ADI-PEG 20을 포함한다.

[0060] 일부 구현예에서, 본 발명의 ADIr 효소는, 유효한 암 치료를 위하여 낮은 혈액 아르기닌 수준을 감소 및 유지하기 위해, ADI-PEG 20의 것과 비교할만한 또는 더 나은 특징 또는 특성을 갖는다. 상기 특성의 예는 Kcat, Km, pH 최적, 안정성, 생체내 단백분해 안정성 및 혈액에서 이미 존재하지 않은 보조인자 또는 이온에 대한 요건의 부족, 또는 이들의 임의의 조합을 포함한다. 특정 구현예에서, 본원에서 기재된 바와 같이 ADIr은 ADI-PEG 20의 비교할만한 특성의 약 또는 적어도 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 이상인 특성을 갖는다. 일부 구현예에서 본원에서 기재된 ADIr은 비교된 ADI-PEG 20의 특이적 특성의 약 또는 적어도 약 100%, 105%, 110%, 120%, 140%, 150%, 160%, 180%, 200%, 220%, 240%, 250%, 260%, 280%, 300%, 320%, 340, 350%, 360%, 400%, 420%, 450%, 460%, 500%, 520%, 550% 이상인 특성을 갖는다.

[0061] 따라서, 특정 구현예에서, ADIr은 ADI-PEG 20의 Kcat의 약 또는 적어도 약 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 더 나은 Kcat를 갖는다. 특정 구현예에서, ADIr은 ADI-PEG 20 Kcat의 약 또는 적어도 약 100%, 105%, 110%, 120%, 125%, 140%, 150%, 160%, 180%, 200%, 220%, 240%, 250%, 260%, 280%, 300%, 320%, 340, 350%, 360%, 400%, 420%, 450%, 460%, 500%, 520%, 550% 이상인 Kcat를 갖는다. 특정 구현예에서, 본원에서 기재된 ADIr 효소, 또는 동일한 것을 포함한 조성물의 Kcat는 약 0.5 sec^{-1} 내지 약 15 sec^{-1} , 약 1 sec^{-1} 내지 약 12 sec^{-1} , 약 1 sec^{-1} 내지 약 10 sec^{-1} , 약 1.5 sec^{-1} 내지 약 9 sec^{-1} , 약 2 sec^{-1} 내지 약 8 sec^{-1} 또는 약 2.5 sec^{-1} 내지 약 7 sec^{-1} 이다. 특정 구현예에서, 조성물내 ADIr 또는 ADIr-PEG는 약 2.5 sec^{-1} 내지 약 7.5 sec^{-1} 의 Kcat를 갖는다. 일부 구현예에서, 조성물내 ADIr 또는 ADIr-PEG는 약 2.5 sec^{-1} , 약 3 sec^{-1} , 약 3.5 sec^{-1} , 약 4 sec^{-1} , 약 4.5 sec^{-1} , 약 5 sec^{-1} , 약 5.5 sec^{-1} , 약 6 sec^{-1} , 약 6.5 sec^{-1} , 약 7 sec^{-1} , 약 7.2 sec^{-1} , 약 7.5 sec^{-1} , 약 8 sec^{-1} , 약 10 sec^{-1} , 약 15 sec^{-1} , 약 20 sec^{-1} , 약 25 sec^{-1} , 약 30 sec^{-1} , 약 35 sec^{-1} , 약 40 sec^{-1} , 약 45 sec^{-1} , 약 50 sec^{-1} , 약 55 sec^{-1} , 약 60 sec^{-1} , 약 65 sec^{-1} , 약 70 sec^{-1} , 약 75 sec^{-1} , 약 80 sec^{-1} , 약 85 sec^{-1} , 약 90 sec^{-1} , 약 95 sec^{-1} , 또는 약 100 sec^{-1} 의 Kcat를 갖는다.

- [0062] 특정 구현예에서, ADIr은 ADI-PEG 20의 Km의 약 또는 적어도 약 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 더 나은 Km을 갖는다. 특정 구현예에서, ADIr은 ADI-PEG 20의 Km의 약 또는 적어도 약 100%, 105%, 110%, 120%, 130%, 140%, 150%, 160%, 180%, 200%, 220%, 240%, 또는 250%인 Km을 갖는다. 특정한 구현예에서, ADIr, 또는 이들의 폐길화된 제형은 약 0.5 μm 내지 약 50 μM , 또는 약 1.6 μm 내지 약 48 μM , 또는 약 0.5 μm 내지 약 15 μM , 약 1 μm 내지 약 12 μM , 약 1 μm 내지 약 10 μM , 약 1.5 μm 내지 약 9 μM , 약 1.5 μm 내지 약 8 μM , 또는 약 1.5 μm 내지 약 7 μM 의 Km을 갖는다. 특정 구현예에서, 조성물내 ADIr 또는 ADIr-PEG는 약 1.5 μm 내지 약 6.5 μM 의 Km을 갖는다. 일부 구현예에서, ADIr 또는 이들의 폐길화된 제형은 약 1.5 μM , 약 1.6 μM , 약 2 μM , 약 2.5 μM , 약 3 μM , 약 3.5 μM , 약 4 μM , 약 4.5 μM , 약 5 μM , 약 5.5 μM , 약 6 μM , 약 6.5 μM , 약 7 μM , 약 8 μM , 약 9 μM , 약 10 μM , 약 12 μM , 약 14 μM , 약 15 μM , 약 16 μM , 약 18 μM 약 20 μM , 약 22 μM , 약 24 μM , 약 25 μM , 약 26 μM , 약 28 μM , 약 30 μM , 약 32 μM , 약 34 μM , 약 35 μM , 약 36 μM , 약 38 μM , 약 40 μM , 약 42 μM , 약 44 μM , 약 45 μM , 약 46 μM , 약 48 μM , 또는 약 50 μM 의 Km을 갖는다.
- [0063] 특정 구현예에서, ADIr은 인간 혈액의 생리적 pH에 근접한 pH에서 기능한다. 따라서, 일부 구현예에서, ADIr은 약 4 내지 약 10.8, 또는 약 6 내지 약 8, 또는 약 6.5 내지 약 7.5의 pH에서 기능한다. 특정 구현예에서, ADIr은 약 pH 7.4에서 양호한 효소 활성을 갖는다.
- [0064] 특정 구현예에서, ADIr은 장기간 보관 동안 안정성 및 인간 몸체에서 치료 동안 온도 및 단백분해 안정성을 갖는다. 일부 구현예에서, ADIr은 혈액에서 이미 존재하지 않은 활성에 대한 보조인자 또는 이온을 필요로 하지 않는다.
- [0065] 특정 구현예에서, 본원에서 기재된 ADIr은 일반적으로 *M. 호미니스*와 충분히 상이한 아미노산 서열을 가져서 이로써 항-ADI-PEG 20 항체에 대하여 항원성 부위를 감소 또는 제거할 표면 잔기 변화가 있다. 일부 구현예에서, 대상체내 선택된 ADIr 분자와 현존하는 항-ADI-PEG 20 항체 사이에서 교차 반응성은 없을 것이고 (예를 들면, 통계적으로 유의미한 교차-반응성 없음), *M. 호미니스* ADI에 대한 현존하는 반응의 성숙보다는 완전히 신규 면역 반응이 대상체에서 생성될 것이다. 따라서, 일부 구현예에서, 본원에서 기재된 바와 같이 ADIr은 서열 번호:1에서 제시된 바와 같이 *M. 호미니스* ADI에 20% - 85% 서열 동일성을 갖는다. 특정 구현예에서, 본원에서 기재된 바와 같이 ADIr은 *M. 호미니스* ADI에 심지어 더 낮은 퍼센트 서열 동일성, 예컨대 10% 또는 15% 동일성을 갖는다. 특정 구현예에서, 본원에서 기재된 바와 같이 ADIr은 *M. 호미니스* ADI에 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%, 51%, 52%, 53%, 54%, 55%, 56%, 57%, 58%, 59%, 60%, 61%, 62%, 63%, 64%, 65%, 66%, 67%, 68%, 69%, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82% 또는 심지어 83% 동일성을 갖고, 여전히 항-ADI-PEG 20 항체에 대해 감소된 교차-반응성을 갖는다.
- [0066] 특정 구현예에서, 본원에서 기재된 바와 같이 ADIr은 *M. 호미니스* ADI와 비교하여 약 10-140, 15-140, 또는 25-140 표면 잔기 변화를 갖는다. 표면 잔기는 *M. 호미니스* ADI의 결정 구조로부터 확인될 수 있고 다른 유기체 유래의 ADI용 표면 잔기는 서열 상동성에 의해 결정될 수 있다. 본원에서 기재된 바와 같이 ADIr은 *M. 호미니스* ADI에 비교하여 약 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138, 139, 또는 약 140 표면 잔기 변화를 가질 수 있다 (참조 서열 번호:1).
- [0067] 일부 구현예에서, 본원에서 기재된 바와 같이 ADIr은 *M. 호미니스* ADI에 비교하여 약 10-140, 15-140, 또는 25-140 잔기 변화를 갖는다. 상기 잔기 변화는 단지 표면 아미노산 잔기일 필요는 없다. 상기 잔기 변화 (또는 부가 또는 결실)은 분자의 말단에서 일 수 있거나 또는 ADI의 임의의 잔기에서 일 수 있어서, 이로써 변형된 ADI는 본원에서 기재된 바와 같이 원하는 ADI 활성을 갖는다. 변화된 잔기는 *M. 호미니스* ADI의 결정 구조로부터 확인될 수 있고 다른 유기체 유래의 ADI용 잔기는 서열 상동성에 의해 결정될 수 있다. 본원에서 기재된 바와 같이 ADIr은 *M. 호미니스* ADI에 비교하여 약 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138, 139, 또는 약 140 아미노산 잔기 변화를 가질 수 있다 (참조 서열 번호:1).

- [0068] 다수의 ADI 효소로부터, 표 1은 *M. 호미니스* ADI에 비하여 27 ADIr 효소 및 그의 퍼센트 서열 동일성을 열거한다.
- [0069] 특정 구현예에서, 수많은 선택된 종 유래의 본원에서 확인된 ADIr 효소는 한정된 수의 표면 라이신 잔기 (특정 구현예에서, 예를 들면, 최대 30 이상)를 갖는다. 항-ADI-PEG 20 항체로 감소된 교차-반응성을 갖는 본원에서 확인된 특정한 ADIr 효소는, 그 사이에서 모든 범위를 포함한, 약, 적어도 약, 또는 약 0, 1, 2, 3, 4, 5, 10, 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, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 또는 60 이하의 표면 라이신 잔기를 갖는다.
- [0070] 용어 "폴리펩티드", "단백질" 및 "펩티드"는 상호교환적으로 사용되고 임의의 특정한 길이로 제한되지 않은 아미노산의 폴리머를 의미한다. 용어 "효소"는 폴리펩티드 또는 단백질 촉매를 포함하고, ADIr에 대해 단백질, 폴리펩티드, 또는 웨프티드와 상호교환적으로 사용된다. 용어는 변형 예컨대 미리스토일화, 황산화, 당화, 인산화 및 신호 서열의 부가 또는 결실을 포함한다. 용어 "폴리펩티드" 또는 "단백질"은 아미노산의 하나 이상의 사슬을 의미하고, 여기에서 각 사슬은 웨프티드 결합에 의해 공유 결합된 아미노산을 포함하고, 여기에서 상기 폴리펩티드 또는 단백질은, 원상태 단백질, 즉, 천연 발생 및 특이적으로 비-재조합 세포, 또는 유전자 상으로-조작된 또는 재조합 세포에 의해 생산된 단백질의 서열을 갖는, 웨프티드 결합에 의해 함께 비-공유 및/또는 공유 결합된 복수의 사슬을 포함할 수 있고, 원상태 단백질의 아미노산 서열을 갖는 문자, 또는 원상태 서열의 하나 이상의 아미노산의 결실, 부가, 및/또는 치환을 갖는 문자를 포함할 수 있다. 용어 "폴리펩티드" 및 "단백질"은 특이적으로 본원에서 기재된 ADIr 효소/단백질, 또는 ADIr 단백질의 하나 이상의 아미노산의 결실, 부가, 및/또는 치환을 갖는 서열을 포함한다. 특정 구현예에서, 폴리펩티드는, 다르게는 세포에서 발견되지 않을 이종성 폴리뉴클레오티드 서열 또는 폴리뉴클레오티드 서열의 조합으로 전형적으로 제조되는, 하나 이상의 재조합 DNA 분자를 포함하는 재조합 세포에 의해 생산된, "재조합" 폴리펩티드이다.
- [0071] 본원에서 참조된 용어 "단리된 단백질"은 대상체 단백질이 (1) 자연에서 전형적으로 발견될 적어도 일부 다른 단백질이 없는, (2) 동일한 공급원 유래의, 예를 들면, 동일한 종 유래의 다른 단백질이 본질적으로 없는, (3) 상이한 종 유래의 세포에 의해 발현된, (4) 폴리뉴클레오티드, 지질, 탄수화물, 또는 자연에서 관련되는 다른 물질의 적어도 약 50 퍼센트로부터 분리된, (5) "단리된 단백질"이 자연에서 관련되는 단백질의 일부와 (공유 또는 비-공유 상호작용에 의해) 관련되지 않은, (6) 자연에서 관련되지 않은 폴리펩티드와 (공유 또는 비-공유 상호작용에 의해) 작동가능하게 관련된, 또는 (7) 자연에서 발생하지 않는 것을 의미한다. 그와 같은 단리된 단백질은 계놈 DNA, cDNA, mRNA 또는 다른 RNA에 의해 암호화될 수 있고, 합성 기원, 또는 이의 임의의 조합일 수 있다. 특정 구현예에서, 단리된 단백질은 그의 용도 (치료적, 진단적, 예방적 연구 또는 다르게는)를 방해할 그의 천연 환경에서 발견되는 단백질 또는 폴리펩티드 또는 다른 오염물질이 실질적으로 없다.
- [0072] 용어 "변이체"는 하나 이상의 치환, 결실, 부가 및/또는 삽입에 의해 본원에서 특이적으로 개시된 참조 폴리펩티드와 상이한 폴리펩티드 (예를 들면, 서열 번호:1-28)를 포함한다. 변이체 폴리펩티드는 생물학적 활성이다, 즉, 이들은 참조 폴리펩티드의 효소 또는 결합 활성을 계속해서 보유한다. 상기 변이체는, 예를 들어, 유전적 다양성에서 및/또는 인간 조작에서 비롯될 수 있다.
- [0073] 많은 사례에서, 생물학적 활성 변이체는 하나 이상의 보존적 치환을 함유할 것이다. "보존적 치환"은 아미노산이 유사한 특성을 갖는 또 다른 아미노산으로 치환된 것으로, 이로써 웨프티드 화학의 당해 분야의 숙련가는 폴리펩티드의 2차 구조 및 수치요법 성질이 실질적으로 변함없는 것을 예상할 것이다. 상기에서 기재된 바와 같이, 변형은 본원에서 기재된 폴리뉴클레오티드 및 폴리펩티드의 구조에서 제조될 수 있고 여전히 바람직한 특징을 갖는 유도체 폴리펩티드 또는 변이체를 암호화하는 기능적 분자를 수득한다.
- [0074] 예를 들어, 특정 아미노산은 구조 예컨대, 예를 들어, 항체의 항원-결합 영역 또는 기질 분자상의 결합 부위와 상호작용성 결합능의 주목할 만한 손실 없이 단백질 구조에서 다른 아미노산으로 치환될 수 있다. 단백질의 생물학적 기능적 활성을 한정하는 단백질의 성질 및 상호작용성 수용력이 있기 때문에, 특정 아미노산 서열 치환은 단백질 서열, 및, 물론, 그의 기저 DNA 암호화 서열에서 실시될 수 있고, 그럼에도 불구하고 유사 특성을 갖는 단백질을 수득한다. 다양한 변화가 개시된 조성물의 웨프티드 서열, 또는 그의 유용성의 주목할 만한 손실 없이 상기 웨프티드를 암호화하는 상응하는 DNA 서열에서 실시될 수 있는 것이 따라서 고려된다.
- [0075] 상기 변화시에, 아미노산의 소수성 지수는 고려될 수 있다. 단백질에 상호작용성 생물학적 기능 부여에서 수치요법 아미노산 지수의 중요성은 당해 기술에서 일반적으로 이해된다 (Kyte & Doolittle, 1982, 본원에서 참고로 편입됨). 아미노산의 상대적 수치요법 특성이 수득한 단백질의 2차 구조에 기여하는 것이 허용되고, 이는 차례

로 다른 분자, 예를 들어, 효소, 기질, 수용체, DNA, 항체, 항원, 등등과 단백질의 상호작용을 한정한다. 각 아미노산은 그의 소수성 및 전하 특징을 기준으로 하여 소수성 지수가 배정되고 있다 (Kyte & Doolittle, 1982). 이를 값은 하기이다: 이소류신 (+4.5); 발린 (+4.2); 류신 (+3.8); 페닐알라닌 (+2.8); 시스테인 (+2.5); 메티오닌 (+1.9); 알라닌 (+1.8); 글리신 (-0.4); 트레오닌 (-0.7); 세린 (-0.8); 트립토판 (-0.9); 티로신 (-1.3); 프롤린 (-1.6); 히스티딘 (-3.2); 글루타메이트 (-3.5); 글루타민 (-3.5); 아스파르테이트 (-3.5); 아스파라긴 (-3.5); 라이신 (-3.9); 및 아르기닌 (-4.5). 특정 아미노산이 유사한 소수성 지수 또는 스코어를 갖는 다른 아미노산에 의해 치환될 수 있고 여전히 유사한 생물학적 활성을 갖는 단백질을 초래한다, 즉, 여전히 생물학 기능적으로 등가 단백질을 수득하는 것은 당해 기술에서 공지된다. 상기 변화시에, 수치요법 지수가 ±2 이내인 아미노산의 치환이 바람직하고, ±1 이내인 것이 특히 바람직하고, ±0.5 이내인 것이 더욱더 특히 바람직하다.

[0076] 유사 아미노산의 치환이 친수성을 기준으로 하여 효과적으로 실시될 수 있음이 당해 기술에서 또한 이해된다. (그 전체가 참고로 본원에서 구체적으로 편입된) 미국 특히 4,554,101은, 단백질의 국부 평균 친수성이, 그의 인접한 아미노산의 친수성에 의해 지배되는 바와 같이, 단백질의 생물학적 특성과 상관한다는 것을 진술한다. 미국 특히 4,554,101에서 상세한 바와 같이, 하기 친수성 값을 아미노산 잔기에 배정되었다: 아르기닌 (+3.0); 라이신 (+3.0); 아스파르테이트 (+3.0±1); 글루타메이트 (+3.0±1); 세린 (+0.3); 아스파라긴 (+0.2); 글루타민 (+0.2); 글리신 (0); 트레오닌 (-0.4); 프롤린 (-0.5±1); 알라닌 (-0.5); 히스티딘 (-0.5); 시스테인 (-1.0); 메티오닌 (-1.3); 발린 (-1.5); 류신 (-1.8); 이소류신 (-1.8); 티로신 (-2.3); 페닐알라닌 (-2.5); 트립토판 (-3.4). 아미노산이 유사한 친수성 값을 갖는 또 다른 것으로 치환될 수 있고 여전히 생물학적으로 등가물, 및 특히, 면역학적으로 등가 단백질을 수득하는 것이 이해된다. 상기 변화에서, 친수성 값이 ±2 이내인 아미노산의 치환이 바람직하고, ±1 이내인 것이 특히 바람직하고, ±0.5 이내인 것이 더욱더 특히 바람직하다.

[0077] 상기 개괄된 바와 같이, 아미노산 치환은 따라서 일반적으로 아미노산 측쇄 치환체의 상대적 유사성, 예를 들어, 그의 소수성, 친수성, 전하, 크기, 등등에 기반된다. 다양한 전술한 특징을 고려하는 예시적인 치환은 당해 분야의 숙련가에 잘 알려지고 하기를 포함한다: 아르기닌 및 라이신; 글루타메이트 및 아스파르테이트; 세린 및 트레오닌; 글루타민 및 아스파라긴; 및 발린, 류신 및 이소류신.

[0078] 아미노산 치환은 극성, 전하, 용해도, 소수성, 친수성 및/또는 잔기의 양친매성 성질에서 유사성을 기준으로 하여 추가로 실시될 수 있다. 예를 들어, 음으로 하전된 아미노산은 아스파르트산 및 글루탐산을 포함하고; 양으로 하전된 아미노산은 라이신 및 아르기닌을 포함하고; 유사한 친수성 값을 갖는 미하전된 극성 헤드 기를 갖는 아미노산은 류신, 이소류신 및 발린; 글리신 및 알라닌; 아스파라긴 및 글루타민; 및 세린, 트레오닌, 페닐알라닌 및 티로신을 포함한다. 보존적 변화를 나타낼 수 있는 아미노산의 다른 기는 하기를 포함한다: (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; 및 (5) phe, tyr, trp, his.

[0079] 변이체는 또한, 또는 대안적으로, 비-보존적 변화를 함유할 수 있다. 바람직한 구현예에서, 변이체 폴리펩티드는 약 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 미만의 아미노산, 또는 심지어 1 아미노산의 치환, 결실 또는 부가에 의해 원상태 서열과 상이하다. 변이체는 또한, (또는 대안적으로), 예를 들어, 면역원성, 2차 구조, 효소 활성, 및/또는 폴리펩티드의 수치요법 성질에 관해 최소 영향을 갖는 아미노산의 결실 또는 부가에 의해 변형될 수 있다.

[0080] 일반적으로, 변이체는 참조 폴리펩티드 서열 (예를 들면, 서열 번호:1-28)에 대해 약 또는 적어도 약 30%, 40%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 유사성 또는 서열 동일성 또는 서열 상동성을 나타낼 것이다. 게다가, 약 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100 이상의 아미노산의 부가 (예를 들면, C-말단 부가, N-말단 부가, 모두), 결실, 절단, 삽입, 또는 치환에 의해 원상태 또는 모 서열과 상이한 그러나 모 또는 참조 폴리펩티드 서열의 특성 또는 활성을 보유한 서열은 고려된다.

[0081] 일부 구현예에서, 변이체 폴리펩티드는 적어도 하나만큼 그러나 50, 40, 30, 20, 15, 10, 8, 6, 5, 4, 3 또는 2 미만의 아미노산 잔기(들)만큼 참조 서열과 상이하다. 일부 구현예에서, 변이체 폴리펩티드는 약 또는 적어도 0.5% 또는 1%만큼 그러나 잔기의 20%, 15%, 10% 또는 5% 미만만큼 참조 서열과 상이하다. (만일 상기 비교가 정렬을 요구하면, 서열은 최대 유사성으로 정렬되어야 한다. 결실 또는 삽입, 또는 불일치로부터 "고리제거된" 서열은 차이가 고려된다.).

[0082] 일부 구현예에서, ADIr은, 그 사이에서 모든 정수 및 범위를 포함한, 길이로 약 300 내지 약 500 아미노산일 수 있다. 특이적 구현예에서, ADIr은, 그 사이에서 모든 정수 및 범위를 포함한, 길이로 약 300, 305, 310, 315,

320, 325, 330, 335, 340, 345, 350, 355, 360, 365, 370, 375, 380, 385, 390, 395, 400, 405, 410, 415, 420, 425, 430, 435, 440, 445, 450, 455, 460, 465, 470, 475, 480, 485, 490, 495, 또는 500 아미노산일 것이다.

[0083] 용어 "폴리펩티드 단편"은 아미노-말단 결실, 카복실-말단 결실, 및/또는 천연 발생 또는 제조함으로-생산된 폴리펩티드의 내부 결실 또는 치환을 갖는 폴리펩티드를 언급한다. 특정 구현예에서, 폴리펩티드 단편은 적어도 5 내지 약 400 아미노산 길이의 아미노산 사슬을 포함할 수 있다. 특정 구현예에서, 단편이 적어도 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, 150, 200, 250, 300, 350, 또는 400 아미노산 길이인 것이 인정될 것이다. 특히 유용한 폴리펩티드 단편은, 본원에서 기재된 ADIr의 촉매적 ADI 도메인을 포함한, 기능적 도메인을 포함한다. ADIr의 경우에서, 유용한 단편은, 비제한적으로, 촉매적 도메인 및 α -나선 도메인을 포함한다.

[0084] 많은 활성화된 PEGs는 라이신 잔기에 공유결합된 ADI에 대한 콘주케이션으로 사용하였다. 라이신 잔기보다 ADI에 부착된 보통 다수의 더 작은 PEG 분자가 있다. 부착의 양쪽 수 및 분포는 분자에서 분자까지 이종일 수 있다. 임의의 특정한 라이신 잔기는 ADI 분자의 단지 작은 분획에서 변형될 것이다. 상기 부위 변형 이종성 및 낮은 PEG 점유는 항원성 부위에서 PEG 차폐의 유효성 및 약물 특성규명 양쪽으로 문제를 초래할 수 있다. 따라서, 특정 구현예에서, 본원에서 기재된 바와 같이 선택된 ADIr 효소는 라이신 잔기의 수를 감소시키기 위해 다른 잔기 유형으로 라이신 대체에 의해 변형된다. 이는 더욱 균일하게 폐길화된 단백질을 생산하고 잔여 라이신 잔기에서 PEG 점유를 증가시킨다. 다른 잔기로 변화되도록 선택된 특이적 라이신 잔기는 효소 활성을 보존하기 위해 선택될 것이다. 상기 더욱 균일한 폐길화는 혈액에서 단백질분해에 대해 증가된 보호 및 환자 항체로부터 항원성 부위의 증가된 차폐를 제공하도록 예상된다.

[0085] 특정 구현예에서, ADIr 효소는 미국 특허 번호 6,635,462에 기재된 바와 같이 변형된다. 특히, ADIr의 천연 발생 아미노산 잔기의 하나 이상의 변형은 더욱 쉽게 재생되고 제형화되어 그렇게 함으로써 ADIr 및 동일한 것을 포함한 치료적 조성물의 제조를 개선하는 효소에 대하여 제공할 수 있다. 일부 구현예에서, ADIr 효소는 하나 이상의 라이신 잔기를 제거하기 위해 변형된다 (예를 들면, 라이신은 또 다른 아미노산 또는 이들의 유사체, 또는 비-천연 아미노산으로 치환될 수 있다). 특히, 일부 구현예에서, ADIr 효소는 서열 번호:1 (*M. 호미니스* ADI)의 112, 374, 405 또는 408과 등가인 위치, 또는 이들 위치의 하나 이상의 조합에서 라이신이 없도록 변형된다. 일부 구현예에서, ADIr 효소는 하나 이상의 라이신 잔기가 없도록 변형되고, 예를 들어, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21 이상의 라이신 잔기는, 이들이 존재해야 한다면, 또 다른 아미노산 또는 이들의 유사체, 또는 비-천연 아미노산으로 치환될 수 있다. 특이적 구현예에서, ADIr 효소는, 예를 들어, 서열 번호: 1의 위치 7, 88, 137, 209, 및 380과 등가인 위치에서 치환된 5개 라이신 잔기를 갖는다. 일부 구현예에서, ADIr 효소는, 예를 들어, 서열 번호: 1의 위치 7, 9, 59, 88, 115, 116, 137, 178, 209, 및 380과 등가인 위치에서 치환된 10개 라이신 잔기를 갖는다. 특정 구현예에서, ADIr 효소는, 예를 들어, 서열 번호: 1의 위치 7, 9, 59, 66, 88, 91, 93, 115, 116, 137, 141, 178, 209, 279와 등가인 위치에서, 및 위치 380에서 치환된 15개 라이신 잔기를 갖는다. 일부 구현예에서, ADIr 효소는, 예를 들어, 서열 번호: 1의 위치 7, 9, 56, 59, 66, 88, 91, 93, 96, 115, 116, 137, 141, 178, 209, 254, 279, 325, 326, 380, 및 406과 등가인 위치에서 치환된 21개 라이신 잔기를 갖는다.

[0086] 일부 경우에서, 원상태 ADIr은 미생물에서 발견될 수 있고 따라서 면역원성이고 환자내 순환으로부터 빠르게 청소된다. 이들 문제는 "변형된 ADIr" 효소를 창출하기 위해 ADIr을 변경함으로써 극복될 수 있다. 따라서, 특정 구현예는 "변형제"를 포함하는 ADIr 효소를 포함하고, 이의 예는 비제한적으로 거대분자 폴리머, 단백질, 웹티드, 다당류, 및 다른 화합물을 포함하였다. ADIr 효소 및 변형제는 원하는 효과를 달성하기 위해 안정한 콘주케이트 또는 안정한 조성물을 형성하도록 공유 결합 또는 비-공유 상호작용에 의해 연결될 수 있다. 특정 구현예에서, 변형된 ADIr은 (예를 들면, 동일한 또는 유사한 서열의) 상응하는 비변형된 ADIr의 생물학적 활성을 보유하고 생체내 더 긴 반감기 및 상응하는 비변형된 ADIr보다 더 낮은 항원성을 갖는다. 특정 구현예에서, 변형된 ADIr은 상응하는 비변형된 ADIr의 생물학적 활성의 적어도 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 이상을 보유한다. 일반적으로, 변형된 ADIr은 치료적 용도에 충분한 생물학적 활성을 보유한다.

[0087] 일부 구현예에서, 변형제는 생체적합성이고 혈액에서 ADIr의 반감기를 증가시킬 수 있는 폴리머 또는 단백질 또는 이의 단편일 수 있다. 변형제는 ADIr에 화학적으로 커플링될 수 있거나 또는 해당하는 경우, 융합 단백질 발

현을 통해 ADIr에 연결될 수 있다.

[0088] 거대분자 폴리머는, 특정 구현예에서, 그의 자체 생물활성을 가질 수 있는 비-펩티드 거대분자 폴리머를 포함할 수 있다. 적합한 폴리머는, 비제한적으로, 하기를 포함한다: 폴리에놀 화합물, 폴리에테르 화합물, 폴리비닐피롤리돈, 폴리 아미노산, 디비닐 에테르와 말레산 무수물의 코폴리머, N-(2-하이드록시프로필)-메타크릴아미드, 다당류, 폴리옥시에틸레이트화된 폴리올, 헤파린 또는 그의 단편, 폴리-알킬-에틸렌 글리콜 및 그의 유도체, 폴리-알킬-에틸렌 글리콜의 코폴리머 및 그의 유도체, 폴리(비닐 에틸 에테르), a,P-폴리[(2-하이드록시에틸)-DL-아스파르트아미드], 폴리카복실레이트, 폴리 옥시에틸렌-옥시메틸렌, 폴리아크릴로일 모폴린, 아미노 화합물과 옥시올레핀의 코폴리머, 폴리 하이알루론산, 폴리옥이시란, 에탄디오이산과 말론산의 코폴리머, 폴리 (1,3-디옥솔란), 에틸렌 및 말레산 하이드라자이드 코폴리머, 폴리 시알산, 사이클로덱스트린, 등. 특정 구현예에서, 폴리머는 폴리에틸렌 글리콜이다.

[0089] 본원에서 사용된 바와 같이 폴리에놀 화합물은, 비제한적으로, 폴리에틸렌 글리콜 (모노메톡시 폴리에틸렌 글리콜, 모노하이드록실 폴리에틸렌 글리콜 포함), 폴리비닐 알코올, 폴리알릴 알코올, 폴리부텐을 등등, 및 그의 유도체, 예컨대 지질을 포함한다.

[0090] 폴리에테르 화합물은, 비제한적으로 폴리 알킬렌 글리콜 ($\text{HO}((\text{CH}_2)_x\text{O})_n\text{H}$), 폴리프로필렌 글리콜, 폴리옥시레힐렌 ($\text{HO}((\text{CH}_2)_y\text{O})_n\text{H}$), 폴리비닐 알코올 ($(\text{CH}_2\text{CHOH})_n$)을 포함한다.

[0091] 폴리 아미노산은, 비제한적으로, 아미노산의 1개 유형의 폴리머 또는 아미노산의 2 이상의 유형의 코폴리머, 예를 들어, 폴리알라닌 또는 폴리라이신, 또는 이들의 블록 코-폴리머를 포함한다.

[0092] 다당류는 비제한적으로, 글루코산 및 그의 유도체, 예를 들어 덱스트란, 셀룰로오스 및 그의 유도체 (메틸 셀룰로오스 및 카복시메틸 셀룰로오스 포함), 전분 및 그의 유도체, 폴리수크로오스, 등을 포함한다.

[0093] 특이적 구현예에서, ADIr은 단백질(들) 또는 웨პ티드(들)과 커플링에 의해 변형되고, 여기에서 하나 이상의 단백질 또는 웨პ티드는 ADIr에 직접적으로 또는 간접적으로 연결된다. 단백질은, 비제한적으로 천연 현존하는 인간 혈청 단백질 또는 그의 단편을 포함하여, 천연-현존하는 단백질 또는 그의 단편, 예컨대 티록신-결합 단백질, 트랜스티레틴, a1-산 당단백질, 트랜스페린, 피브리노겐, 면역글로불린, Ig Fc 영역, 알부민, 및 이들의 단편일 수 있다. "단편"은 전체의 단백질보다 더 작은 그러나 단백질의 원하는 기능을 보유하는 단백질의 임의의 부분이 의미된다. 본원에서 기재된 바와 같이 ADIr은 공유 결합을 통해 단백질에 직접적으로 또는 간접적으로 연결될 수 있다. 직접적인 연결은, ADIr의 1개 아미노산이 웨პ티드 결합 또는 디설파이드 브릿지를 통해, 변경하는 단백질의 1개 아미노산에 직접적으로 연결되는 것을 의미한다. 간접적인 연결은, 이들 사이에서 본래 현존하는 화학 기 또는 생물학적 또는 화학 수단을 통해 부가된 특이적 화학 기, 또는 상기-언급된 연결기의 조합을 통해, ADIr과 변경하는 단백질 사이에서 연결기를 언급한다.

[0094] 특정한 구현예에서, ADIr은 하나 이상의 PEG 분자에 공유 결합에 의해 변형된다. (링커 있거나 없이) PEG로 공유 변형된 ADIr은 이하에서 "ADIr-PEG"로 언급될 수 있다. 비변형된 ADIr과 비교하여, ADIr-PEG는 대부분의 그의 효소 활성을 보유하고, 훨씬 덜 면역원성 또는 항원성이고, 매우 확장된 순환 반감기를 갖고, 종양의 치료에서 더욱 유효하다.

[0095] "폴리에틸렌 글리콜" 또는 "PEG"는, 일반 식 $\text{H}(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n\text{OH}$ (여기에서 n은 적어도 4이다)로 나타낸, 분지쇄 또는 직쇄에서, 에틸렌 옥사이드와 물의 축합 폴리머의 혼합물을 언급한다. "폴리에틸렌 글리콜" 또는 "PEG"는 이들의 근사 중량 평균 분자량을 지시하기 위해 숫자 접미사와 조합으로 사용된다. 예를 들어, PEG5,000은 약 5,000의 총 중량 평균 분자량을 갖는 PEG를 언급하고; PEG12,000은 약 12,000의 총 중량 평균 분자량을 갖는 PEG를 언급하고; PEG20,000은 약 20,000의 총 중량 평균 분자량을 갖는 PEG를 언급한다.

[0096] 일부 구현예에서, PEG는 약 1,000 내지 약 50,000; 약 3,000 내지 약 40,000; 약 5,000 내지 약 30,000; 약 8,000 내지 약 30,000; 약 11,000 내지 약 30,000; 약 12,000 내지 약 28,000; 약 16,000 내지 약 24,000; 약 18,000 내지 약 22,000; 또는 약 19,000 내지 약 21,000의 총 중량 평균 분자량을 갖는다. 일부 구현예에서, PEG는 약 1,000 내지 약 50,000; 약 3,000 내지 약 30,000; 약 3,000 내지 약 20,000; 약 4,000 내지 약 12,000; 약 4,000 내지 약 10,000; 약 4,000 내지 약 8,000; 약 4,000 내지 약 6,000; 또는 약 5,000의 총 중량 평균 분자량을 갖는다. 특이적 구현예에서, PEG는 약 20,000의 총 중량 평균 분자량을 갖는다. 일반적으로, 30,000 이상의 분자량을 갖는 PEG는 용해하기 어렵고, 제형화된 생성물의 수율은 감소될 수 있다. PEG는 분지쇄 또는 직쇄일 수 있다. 일반적으로, PEG의 분자량 증가는 ADIr의 면역원성을 감소시킨다. PEG는 분지쇄 또는 직

쇄일 수 있고, 특정 구현예에서 직쇄이다. 본원에서 기재된 분자량을 갖는 PEG는, 본원에서 기재된 다른 암 종에서, 예를 들어, 간세포 암종, 급성 골수 백혈병, 예컨대 재발한 급성 골수 백혈병, 유방암, 난소암, 결장직장암, 위암, 신경아교종, 다형성 교아종, 비소 세포 폐암 (NSCLC), 신장암, 방광암, 자궁암, 식도암, 뇌암, 두경부 암, 자궁경부암, 고환암, 위암, 또는 식도암을 포함하여, 이식편 대 속주 질환 (GVHD) 또는 암을 치료하기 위해, ADIr, 및 선택적으로, 생체적합성 링커와 조합으로 사용될 수 있다.

[0097] 특정 구현예는 티올, 설프하이드릴, 또는 시스테인-반응성 PEG(들)을 사용한다. 일부 구현예에서, 티올, 설프하이드릴, 또는 시스테인-반응성 PEG(들)은 하나 이상의 천연 발생 시스테인 잔기, 하나 이상의 도입된 시스테인 잔기 (예를 들면, 시스테인 잔기(들)로 하나 이상의 야생형 잔기의 치환), 하나 이상의 시스테인 잔기의 삽입), 또는 이들의 임의의 조합 (참조, 예를 들면, Doherty et al., *Bioconjug Chem.* 16:1291-98, 2005)에 부착된다. 특정 구현예에서, 특정한 야생형 ADI 시스테인 잔기는 야생형 시스테인에 PEG 폴리머의 부착을 예방하기 위해, 예를 들어, 다르게는 바람직한 생물학적 활성의 봉피로부터 PEG(들)을 예방하기 위해 또 다른 아미노산으로 먼저 치환될 수 있다. 일부 구현예는 시스테인 대신 하나 이상의 비-천연 시스테인 유도체 (예를 들면, 호모시스테인)를 사용한다.

[0098] 티올, 설프하이드릴, 또는 시스테인-반응성 PEGs의 비-제한적인 예는 메톡시 PEG 말레이미드 (M-PEG-MAL) (예를 들면, MW 2000, MW 5000, MW 10000, MW 20000, MW 30000, MW 40000)을 포함한다. M-PEG-MALs는 단백질 및 펩티드내 시스테인 측쇄상에서 티올 기와 반응하여 안정한 3-티오석신이미딜 에테르 연결을 발생시킨다. 상기 반응은 매우 선택적이고 다른 관능기의 존재하에 약 pH 5.0-6.5에서 온화한 조건하에 발생할 수 있다. 상업적으로-이용가능한 티올, 설프하이드릴, 또는 시스테인-반응성 PEG 분자의 특정한 예는 도 1A-1D에서 실증된다. 따라서, 특정 구현예에서, ADIr 효소는 본원에서 기재된 임의의 하나 이상의 티올, 설프하이드릴, 또는 시스테인-반응성 PEG 분자에 접합된다.

[0099] 비록 바람직한 구현예가 링커를 사용하여도, ADIr은, 링커 있거나 없이, 변형제, 예컨대 PEG에 공유 결합될 수 있다. ADIr은, 예를 들어, Park et al, *Anticancer Res.*, 1:373-376 (1981); and Zalipsky and Lee, *Polyethylene Glycol Chemistry: Biotechnical and Biomedical Applications*, J. M. Harris, ed., Plenum Press, NY, Chapter 21 (1992) (그의 개시내용은 이로써 본원에서 그 전체가 참고로 편입됨)에 의해 기재된 바와 같이, 당해 기술에서 공지된 방법을 이용하여 생체적합성 링커를 통해 PEG에 공유 결합될 수 있다. 일부 경우에서, ADIr은, 예를 들어, 아미노 기, 설프하이드릴 기, 하이드록실 기, 카복실 기, 또는 다른 기를 통해 변형제 예컨대 PEG에 직접적으로 (즉, 링커 없이) 커플링될 수 있다.

[0100] 변형제 (예를 들면 PEG)에 ADIr을 공유 부착하기 위해 사용된 링커는 임의의 생체적합성 링커일 수 있다. 상기에서 논의된 바와 같이, "생체적합성"은 화합물 또는 기가 비독성이고 부상, 병, 질환, 또는 사망 유발 없이 시험관내 또는 생체내 이용될 수 있음을 지시한다. 변형제 예컨대 PEG는, 예를 들어, 에테르 결합, 티올 결합, 아미드 결합, 또는 다른 결합을 통해 링커에 결합될 수 있다.

[0101] 일부 구현예에서, 적합한 링커는 약 1-100 원자, 1-80 원자, 1-60 원자, 1-40 원자, 1-30 원자, 1-20 원자, 또는 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 또는 20 원자의 전체 사슬 길이를 가질 수 있고, 예를 들어, 여기에서 사슬내 원자는 C, S, N, P, 및/또는 O를 포함한다. 특정 구현예에서, 링커는 선택적이고, 예를 들면, PEG 접합된 ADIr 효소는 링커를 포함하지 않는다. 일부 경우에서, 링커 기는, 예를 들어, 석시닐 기, 아미드 기, 이미드 기, 카바메이트 기, 에스테르 기, 에폭시 기, 카복실 기, 하이드록실 기, 탄수화물, 티로신 기, 시스테인 기, 히스티딘 기, 메틸렌 기, 및 이들의 조합을 포함한다. 안정한 링커의 특정한 예는 석신이미드, 프로피온산, 카복시메틸레이트 연결기, 에테르, 카바메이트, 아미드, 아민, 카바마이드, 이미드, 지방족 C-C 결합, 및 티오 에테르를 포함한다. 특정 구현예에서, 생체적합성 링커는 석신이미딜 석시네이트 (SS) 기이다.

[0102] 다른 적합한 링커는 옥시카보닐이미다졸 기 (예를 들어, 카보닐이미다졸 (CDI) 포함), 니트로 폐닐 기 (예를 들어, 니트로페닐 카보네이트 (NCP) 또는 트리클로로페닐 카보네이트 (TCP) 포함), 트리실레이트 기, 알데하이드 기, 이소시아네이트 기, 비닐설폰 기, 또는 1차 아민을 포함한다. 특정 구현예에서, 링커는 SS, SPA, SCM, 또는 NHS로부터 유도되고; 특정 구현예에서, SS, SPA, 또는 NHS는 사용되고, 일부 구현예에서, SS 또는 SPA는 사용된다. 따라서, 특정 구현예에서, 포텐셜 링커는 메톡시-PEG 석신이미딜 석시네이트(SS), 메톡시-PEG 석신이미딜 글루타레이트(SG), 메톡시-PEG 석신이미딜 카보네이트 (SC), 메톡시-PEG 석신이미딜 카복시메틸 에스테르 (SCM), 메톡시-PEG2 N-하이드록시 석신이미드 (NHS), 메톡시-PEG 석신이미딜 부타노에이트 (SBA), 메톡시-PEG 석신이미딜 프로피오네이트 (SPA), 메톡시-PEG 석신이미딜 글루타르아미드, 및/또는 메톡시-PEG 석신이미딜 석

신이미드로부터 형성될 수 있다.

[0103]

링커의 추가의 예는, 비제한적으로, 하나 이상의 하기를 포함한다: -O-, -NH-, -S-, -C(O)-, C(O)-NH, NH-C(O)-NH, O-C(O)-NH, -C(S)-, -CH₂-, -CH₂-CH₂-, -CH₂-CH₂-CH₂-, -CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-, -O-CH₂-, -CH₂-O-, -O-CH₂-CH₂-, -CH₂-O-CH₂-, -CH₂-CH₂-O-, -O-CH₂-CH₂-CH₂-, -CH₂-O-CH₂-CH₂-, -CH₂-CH₂-O-CH₂-, -CH₂-CH₂-CH₂-O-, -O-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-, -CH₂-O-CH₂-CH₂-, -CH₂-CH₂-O-CH₂-CH₂-, -CH₂-CH₂-CH₂-O-CH₂-, -CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-O-, -C(O)-NH-CH₂-, -C(O)-NH-CH₂-CH₂-, -CH₂-C(O)-NH-CH₂-CH₂-, -CH₂-CH₂-C(O)-NH-CH₂-, -CH₂-CH₂-CH₂-C(O)-NH-, -C(O)-NH-CH₂-CH₂-CH₂-, -CH₂-C(O)-NH-CH₂-CH₂-, -CH₂-CH₂-C(O)-NH-CH₂-CH₂-, -CH₂-CH₂-CH₂-C(O)-NH-CH₂-CH₂-, -CH₂-CH₂-CH₂-C(O)-NH-CH₂-, -CH₂-CH₂-CH₂-C(O)-NH-CH₂-CH₂-, -CH₂-CH₂-CH₂-C(O)-NH-CH₂-, -CH₂-CH₂-CH₂-C(O)-NH-CH₂-, -CH₂-CH₂-CH₂-C(O)-NH-CH₂-CH₂-, -CH₂-CH₂-CH₂-C(O)-NH-CH₂-, -NH-C(O)-CH₂-CH₂-, -CH₂-NH-C(O)-CH₂-, -CH₂-CH₂-NH-C(O)-CH₂-, -NH-C(O)-CH₂-CH₂-, -CH₂-NH-C(O)-CH₂-, -O-C(O)-NH-CH₂-CH₂-, -NH-CH₂-, -NH-CH₂-CH₂-, -CH₂-NH-CH₂-, -CH₂-CH₂-NH-CH₂-, -CH₂-CH₂-CH₂-C(O)-NH-CH₂-CH₂-NH-, 2가 사이클로알킬 기, -N(R₆)- (R₆은 H 또는 알킬, 치환된 알킬, 알케닐, 치환된 알케닐, 알키닐, 치환된 알키닐, 아릴 및 치환된 아릴로 이루어진 군으로부터 선택되는 유기 라디칼이다). 추가로, 본원에서 기재된 임의의 링커 모이어티는 1 내지 20 에틸렌 옥사이드 모노머 단위 [즉, -(CH₂CH₂O)₁₋₂₀-]를 포함한 에틸렌 옥사이드 올리고머 사슬을 추가로 포함할 수 있다. 즉, 에틸렌 옥사이드 올리고머 사슬은 링커 이전 또는 이후, 및 선택적으로 2 이상의 원자로 구성된 링커 모이어티의 임의의 2개 원자 사이에서 발생할 수 있다. 또한, 만일 올리고머가 폴리머 분절에 인접하고 단지 폴리머 분절의 확대를 나타내면 올리고머 사슬은 링커 모이어티의 일부로 고려되지 않을 것이다.

[0104]

특이적 예시적인 PEG 분자 및 링커는 아래 표 A에서 기재된다.

표 A. PEG 및 링커		
PEG	링커	주석
메톡시-PEG 이미딜 헥사노에이트	아미드	pH 7-8, 더 낮은 반응성
메톡시-PEG 이미딜 부타노에이트 (SBA)	아미드	pH 7-8, SPA보다 더 오랜 가수분해 시간 (~23 min)
메톡시-PEG 이미딜 프로페오네이트 (SPA)	아미드	Tan, 1998, Metase; Basu, IFN; Games, Phe Am. Lyase; SCM보다 더 양호 (~16 min)
메톡시-PEG 이미딜 카복시메틸 에스테르 (SCM)	아미드	pH 7-8, RT, 1 hr rxn 시간, 극도로 반응성, 0.75 min pH 8에서, 25°C, 아르기나 아제
메톡시-PEG 이미딜 글루타르드	아미드	pH 7-8, RT, 90% 완결
메톡시-PEG 이미딜 석신드	아미드	pH 7-8, RT, 95% 완결
메톡시PEG2 NHS		Gamez, Phe Am. Lyase; Basu, IFNa2a40K, Nulasta (G-CSF), pegfilgrastim (G-CSF)
메톡시-PEG 이미딜 카보네이트 (SC)	우레탄	SCM보다 1/2 더 긴 가수분해, Wang, 2006, M. art. ADI, Basu, IFNa2b, 느린 방출
메톡시-PEG 이미딜 글루타레이트 (SG)	에스테르	Yang, 2004, Metase
메톡시-PEG 이미딜 석시네이트 (SS)	에스테르	아데노신 테아미나아제, 아스파르기나아제, ADI-PEG 20
PEG-말레이미드		
PEG-비닐설포		
PEG-아이오도아세트드		
오르토페리딜 디설파이드-PEG		

[0105]

특정 구현예에서, ADIr 효소는 본원에서 기재된 바와 같이 (예를 들면, 표 A에서) 하나 이상의 PEG 분자 및/또는 링커를 포함한다.

[0106]

ADIr에 PEG의 부착은 ADIr의 순환 반감기를 증가시킨다. 일반적으로, PEG는 ADIr의 1차 아민에 부착된다. ADIr 상에서, PEG, 또는 다른 변형체의 부착 부위의 선택은, 숙련가에 공지된 바와 같이, 단백질의 활성 도메인 내에서 각각의 부위의 역할에 의해 결정된다. PEG는 효소 활성의 실질적인 손실 없이 ADIr의 1차 아민에 부착될 수 있다. 예를 들어, ADIr에 존재한 라이신 잔기는 본원에서 기재된 바와 같이 ADIr이 생체적합성 링커, 예컨대 SS, SPA, SCM, SSA 및/또는 NHS를 통해 PEG에 부착될 수 있는 모두 가능한 지점이다. PEG는 또한, 본 개시내용

의 관점에서 당해 분야의 숙련가에 명백한 바와 같이, ADIr상의 다른 부위에 부착될 수 있다.

[0108] 1 내지 약 30 PEG 분자는 ADIr에 공유 결합될 수 있다. 특정 구현예에서, ADIr은 1개 PEG 문자로 변형된다 (즉, 포함한다). 일부 구현예에서, ADIr은 1 초과의 PEG 문자로 변형된다. 특정한 구현예에서, ADIr은 약 1 내지 약 10, 또는 약 7 내지 약 15 PEG 문자, 또는 약 2 내지 약 8 또는 약 9 내지 약 12 PEG 문자로 변형된다. 일부 구현예에서, ADIr은 약 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 또는 15 PEG 문자로 변형된다. 특이적 구현예에서, ADIr은 4.5 - 5.5 PEG 문자 / ADIr로 변형된다. 일부 구현예에서, ADIr은 5 ± 1.5 PEG 문자로 변형된다.

[0109] 특정 구현예에서, ADIr에서 1차 아미노 기의 약 15% 내지 약 70%는 PEG로 변형된다. 일부 구현예에서 약 20% 내지 약 65%, 약 25% 내지 약 60%, 또는 특정 구현예에서 약 30% 내지 약 55%, 또는 45% 내지 약 50%, 또는 일부 구현예에서 아르기닌 데이미나아제내 약 50%의 1차 아미노 기가 PEG로 변형된다. PEG가 ADIr의 종료 말단에 공유 결합되는 경우, 이용된 단지 1개 PEG 문자를 갖는 것이 바람직할 수 있다. ADIr 상에서 PEG 단위체의 수 증가는 효소의 순환 반감기를 증가시킨다. 그러나, ADIr 상에서 PEG 단위체의 수 증가는 효소의 특이적 활성을 감소시킨다. 따라서, 본 개시내용의 관점에서 당해 분야의 숙련가에 명백한 바와 같이, 밸런스가 둘 사이에서 달성될 필요가 있다.

[0110] 일부 구현예에서, 생체적합성 링커의 공통의 특징은 이들이 석신이미드 기를 통해 아르기닌 데이미나아제의 1차 아민에 부착하는 것이다. 일단 ADIr과 커플링되면, SS-PEG는 PEG 옆에서 에스테르 연결을 갖고, 혈청 에스테라아제에 감수성이도록 상기 부위를 만들 수 있고, 바디에서 ADIr로부터 PEG를 방출시킬 수 있다. SPA-PEG 및 PEG2-NHS는 에스테르 연결을 가지지 않아서, 이들이 혈청 에스테라아제에 감수성이지 않다.

[0111] 단백질에 부착되는 PEG는 SS-PEG, SPA-PEG 및 SC-PEG와 같이 직쇄일 수 있거나, 또는 PEG의 분지쇄는 PEG2-NHS와 같이 사용될 수 있다.

[0112] 특정 구현예에서, 효소의 촉매적 영역에서 또는 이에 인접하여 위치한 ADIr과 관련된 폐길화 부위는 변형된다. 특정 구현예에서, 어구 "폐길화 부위"는 폴리에틸렌 글리콜로 공유 변형될 수 있는 ADI 또는 ADIr의 임의의 부위 또는 위치로서 정의된다. 부위의 폐길화가 효소의 촉매적 활성에서 유의미한 감소를 초래하는 효소의 촉매적 영역에서 또는 이에 인접하여 위치한 "폐길화 부위"는 고려될 수 있다. 상기 부위의 폐길화는 효소의 불활성화를 전통적으로 초래하였다. 예를 들어, 마이코플라스마 호미니스 유래의 ADI는 효소의 촉매적 영역에 있는 또는 이에 인접한 것으로 고려될 수 있는 112 위치에서 라이신을 갖는다. 112 위치에서 상기 라이신에 PEG의 부착은 효소를 불활성화시킬 수 있다. 또한, 마이코플라스마 호미니스 유래의 ADI는 효소의 촉매적 영역에 있는 또는 이에 인접한 것으로 고려될 수 있는 397 위치에서 시스테인을 갖는다. 397 위치에서 시스테인에 대한 아미노산 치환은 효소를 불활성화시킬 수 있다. 특히, 397 위치에서 시스테인에 대한 알라닌, 히스티딘, 아르기닌, 세린, 라이신 또는 티로신 치환은 모든 검출가능한 효소 활성의 손실을 초래할 수 있다. 마이코플라스마 호미니스 유래의 ADI는 또한 상기 보존된 시스테인, 특히 Lys374, Lys405 및 Lys408 근처에 위치한 3개의 라이신 잔기를 갖는다. Lys374, Lys405, Lys408 또는 이들의 조합에 PEG의 부착은 효소를 불활성화시킬 수 있다.

[0113] 다른 유기체로부터 유도된 ADIr이 또한 마이코플라스마 호미니스 유래의 ADI의 112 위치에 상응하는 폐길화 부위를 갖는 것이 이해되어야 한다. 또한, 일부 유기체 유래의 ADI는 마이코플라스마 호미니스 유래의 ADI의 112 위치와 동일한 일반적인 위치에 상응하는 라이신 잔기를 가질 수 있다. 상기 유기체 유래의 ADI에서 라이신의 위치는 숙련가에 공지되고 미국 특허 번호 6,635,462에서 기재되어 있다.

[0114] 따라서, 일부 구현예는 ADIr의 폴리펩티드 사슬에서 특정 아미노산 치환을 제공한다. 이들 아미노산 치환은 변형제에 의해 변형된 경우, 예를 들면, 폐길화시 더 적은 활성을 손실하는 변형된 ADIr을 제공한다. 효소의 촉매적 영역에서 또는 이에 인접해서, 폐길화 부위, 또는 다른 공지된 변형 부위를 제거함으로써, 최적의 변형, 예를 들면, 폐길화는 활성의 손실 없이 달성될 수 있다.

[0115] 일부 구현예에서, 예를 들어, 전술한 바와 같이, 아미노산 치환은 PEG 또는 다른 변형제에 대한 콘주케이션으로 비-천연 아미노산을 사용한다 (참조, 예를 들면, de Graaf et al., Bioconjug Chem. 20:1281-95, 2009). 특정 구현예는 따라서 하나 이상의 비-천연 아미노산을 통해 하나 이상의 PEGs에 접합되는 ADIr 효소를 포함한다. 일부 구현예에서 비-천연 아미노산은 하기로 이루어진 군으로부터 선택되는 관능기를 갖는 측쇄를 포함한다: 알킬, 아릴, 아릴 할라이드, 비닐 할라이드, 알킬 할라이드, 아세틸, 케톤, 아지리딘, 니트릴, 니트로, 할라이드, 아실, 케토, 아지도, 하이드록실, 하이드라진, 시아노, 할로, 하이드라자이드, 알케닐, 알키닐, 에테르, 티오 에테르, 에폭사이드, 셜폰, 붕산, 보로네이트 에스테르, 보란, 페닐붕산, 티올, 셀레노, 셜포닐, 보레이트,

보로네이트, 포스포, 포스포노, 포스핀, 헤테로사이클릭-, 피리딜, 나프틸, 벤조페논, 구속된 고리 예컨대 사이클로옥틴, 티오에스테르, 에논, 이민, 알데하이드, 에스테르, 티오산, 하이드록실아민, 아미노, 카복실산, 알파-케토 카복실산, 알파 또는 베타 불포화된 산 및 아미드, 글리وك실 아미드, 및 유기실란 기. 일부 구현예에서, 비-천연 아미노산은 하기로 이루어진 군으로부터 선택된다: p-아세틸-L-페닐알라닌, O-메틸-L-티로신, L-3-(2-나프틸)알라닌, 3-메틸-페닐알라닌, O-4-알릴-L-티로신, 호모시스테인, 4-프로필-L-티로신, 트리-O-아세틸-GlcNAc β -세린, β -O-GlcNAc-L-세린, 트리-O-아세틸-GalNAc- α -트레오닌, α -GalNAc-L-트레오닌, L-Dopa, 불소화된 페닐알라닌, 이소프로필-L-페닐알라닌, p-아지도-L-페닐알라닌, p-아실-L-페닐알라닌, p-벤조일-L-페닐알라닌, L-포스포세린, 포스포노세린, 포스포노티로신, p-아이오도-페닐알라닌, p-브로모페닐알라닌, p-아미노-L-페닐알라닌, 및 이소프로필-L-페닐알라닌.

[0116] ADIr-PEG가 본원에서 기재된 예증적인 변형된 ADIr인 반면, 숙련가에 의해 기술적으로 인식된 바와 같이 ADIr은 원하는 효과, 특히 항원성 감소 및 혈청 반감기 증가를 위하여 다른 폴리머 또는 적절한 분자로 변형될 수 있다.

[0117] 아르기닌 데이미나아제의 특정 구조적 특징이 재조합 기술을 통해 생산된 적절한 및 급속 복원을 예방 또는 방해할 수 있다는 조건에 일부 구현예가 기반된다는 것이 이해되어야 한다. 특히, 이들 구조적 특징은 재조합 생산 동안 활성 형태 추정으로부터 효소를 방해 또는 예방한다. 일부 구현예에서, 용어 "활성 형태"는 비변형된 또는 변형된 아르기닌 데이미나아제에 의해 효소 활성을 허용하는 3차원 구조로서 정의된다. 활성 형태는, 특히, 아르기닌의 시트룰린으로의 전환 촉매화에 필요할 수 있다. 용어 "구조적 특징"은 특정한 아미노산 또는 아미노산의 조합에서 비롯된 폴리펩티드 사슬의 임의의 특성, 품질 또는 특성으로서 정의될 수 있다. 예를 들면, 아르기닌 데이미나아제는 정상 웨პ티드 사슬에서 굴곡 또는 비틀림을 초래하고 따라서 효소의 복원 동안 활성 형태 추정으로부터 효소를 방해하는 아미노산을 함유할 수 있다. 특히, 마이코플라스마 호미니스 유래의 아르기닌 데이미나아제는, 재조합 생산 동안 효소를 재생하기를 더욱 어렵게 하는, 웨პ티드 사슬에서 굴곡 또는 비틀림을 초래할 수 있는 210 위치에서 프롤린을 갖는다. 다른 유기체로부터 유도된 아르기닌 데이미나아제가 또한, 마이코플라스마 호미니스 유래의 아르기닌 데이미나아제의 210 위치에 상응하는 부위를 가질 수 있음이 이해되어야 한다.

[0118] 일부 구현예는 따라서 야생형 아르기닌 데이미나아제의 폴리펩티드 사슬에서 특정 아미노산 치환을 제공한다. 그 예는 아르기닌 데이미나아제의 웨პ티드 사슬에서 문제있는 구조적 특징을 제거하는 치환을 포함한다. 변형된 아르기닌 데이미나아제의 개선된 복원을 제공하는 치환이 또한 포함된다. 이들 아미노산 치환은 감소된 양의 베퍼를 이용한 변형된 아르기닌 탈이민효소의 급속 복원을 가능하게 한다. 이들 아미노산 치환은 또한 재생 변형된 아르기닌 데이미나아제의 증가된 수율을 제공할 수 있다. 일부 구현예에서, 변형된 아르기닌 데이미나아제는 P210에서 아미노산 치환 또는 등가 잔기를 갖는다. 상기에서 언급된 바와 같이, 마이코플라스마 호미니스로부터 유도된 아르기닌 데이미나아제는 210 위치에서 위치한 아미노산 프롤린을 갖는다. 본 발명을 제한하지 않으면서, 위치 210에서 아미노산 프롤린의 존재가 특정 아르기닌 데이미나아제 효소 재생 (즉, 리풀딩)의 어려움을 증가시키는 정상 폴리펩티드 사슬에서 굴곡 또는 비틀림을 초래한다고 여겨진다. 위치 210에서 프롤린에 대한 치환은 감소된 양의 베퍼를 이용한 변형된 아르기닌 데이미나아제의 급속 복원을 가능하게 한다. 위치 210에서 프롤린 (또는 동등 잔기)에 대한 치환은 또한 재생 변형된 아르기닌 데이미나아제의 증가된 수율을 제공할 수 있다. 일부 구현예에서, 위치 210에서 프롤린 (또는 동등 잔기)은 세린으로 치환된다. 다른 치환의 비-제한적인 예는 Pro210 내지 Thr210, Pro210 내지 Arg210, Pro210 내지 Asn210, Pro210 내지 Gln210 또는 Pro210 내지 Met210을 포함한다. 야생형 아르기닌 데이미나아제의 위치 210의 아미노산과 관련된 상기 구조적 특징을 제거함으로써, 효소의 최적의 리풀딩이 달성될 수 있다.

[0119] 본원에서 제공된 방법은 시험관내 또는 생체내 적용을 포함할 수 있다. 세포 배양 적용을 포함한, 시험관내 적용의 경우에서, 본원에서 기재된 화합물은 배양액내 세포에 부가될 수 있고 그 다음 인큐베이션될 수 있다. 본원에서 기재된 화합물은 또한, 당해 기술에서 잘 알려진 항체 생산 기술을 이용하여, 단클론성 및/또는 다클론성 항체의 생산을 용이하게 하기 위해 사용될 수 있다. 단클론성 및/또는 다클론성 항체는 그 다음 당해 분야의 숙련가에 명백한 바와 같이 다양한 진단 적용에서 사용될 수 있다.

[0120] 본원에서 기재된 화합물 또는 조성물의 생체내 투여 수단은 의도된 적용에 따라 다양할 것이다. 본원에서 기재된 ADIr 조성물의 투여는, 순수한 형태로 또는 적절한 약학적 조성물로, 유사한 유용성 작용을 위하여 제제의 임의의 허용된 투여 방식을 통해 수행될 수 있다. 약학적 조성물은 적절한 생리적으로 허용 가능한 담체, 희석제 또는 부형제와 ADIr, 예를 들면, ADIr-PEG, ADIr-PEG 20을 조합시킴으로써 제조될 수 있고, 고체, 반-고체, 액체 또는 기체성 형태, 예컨대 정제, 캡슐, 분말, 과립, 연고, 용액, 죠약, 주사, 흡입제, 젤, 마이크로구체,

및 에어로졸로 제제 속으로 제형화될 수 있다. 또한, (본원에서 다른 곳에 기재된 바와 같이 다른 항-암 제제를 포함한) 다른 약제학적으로 활성 성분 및/또는 적합한 부형제 예컨대 염, 베피 및 안정제는 조성물내에 존재할 수 있지만, 존재할 필요는 없다.

[0121] 투여는 경구, 비경구, 비강, 정맥내, 진피내, 피하 또는 국소를 포함하여 다양한 상이한 경로에 의해 달성될 수 있다. 투여 방식은 치료된 또는 예방된 상태의 본성에 의존한다. 따라서, ADIr 효소 (예를 들면, ADIr-PEG, ADIr-PEG 20)는 경구로, 비강내로, 복강내로, 비경구로, 정맥내로, 럼프내로, 종양내로, 근육내로, 사이질로, 동맥내로, 피하로, 안구내로, 활막내, 경상피, 및 경피로 투여될 수 있다. 투여 이후, 암의 진행 및/또는 전이를 감소, 억제, 예방 또는 지연하는 양은 유효하게 고려된다. 특정 구현예에서, 본원에서 기재된 ADIr 조성물은 통계적으로 유의미한 양만큼 환자의 중앙 생존 시간을 증가시킨다. 일부 구현예에서, 본원에서 기재된 ADIr 치료는 4 주, 5 주, 6 주, 7 주, 8 주, 9 주, 10 주, 15 주, 20 주, 25 주, 30 주, 40 주 이상만큼 환자의 중앙 생존 시간을 증가시킨다. 특정 구현예에서, ADIr 치료는 1년, 2년, 3년 이상만큼 환자의 중앙 생존 시간을 증가시킨다. 일부 구현예에서, 본원에서 기재된 ADIr 치료는 2주, 3주, 4주, 5주, 6주, 7주, 8주, 9주, 10주 이상만큼 무진행 생존을 증가시킨다. 특정 구현예에서, 본원에서 기재된 ADIr 치료는 1년, 2년, 3년 이상만큼 무진행 생존을 증가시킨다.

[0122] 특정 구현예에서, 투여된 양은 생존가능 종양의 양에서 통계적으로 유의미한 감소, 예를 들어, 종양 질량에서 적어도 10%, 20%, 30%, 40%, 50% 이상 감소에 의해, 또는 변경된 (예를 들면, 통계적 유의도로 감축된) 스캔 치수에 의해 지시된 바와 같이, 종양 퇴화를 초래하기에 충분하다. 특정 구현예에서, 투여된 양은 안정한 질환을 초래하기에 충분하다. 특정 구현예에서, 투여된 양은 숙련된 임상의에 공지된 특정한 질환 징후의 증상에서 임상적으로 관련된 감소를 초래하기에 충분하다.

[0123] 특정 구현예에서 투여된 양은 NO 합성을 억제, 혈관신생을 억제하기에 충분하고, 및 또는 종양 세포 또는 이들의 임의의 조합에서 세포자멸사를 유도하기에 충분하다. NO 합성, 혈관신생 및 세포자멸사는 당해 기술에서 공지된 방법을 이용하여 측정될 수 있다, 참조, 예를 들면, *Current Protocols in Immunology or Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, New York, N.Y.(2009 and updates thereto); Ausubel et al., *Short Protocols in Molecular Biology*, 3rd ed., Wiley & Sons, 1995; 및 다른 유사 참조문헌. 일부 구현예에서 투여된 양은 NO 합성을 억제하고 흑색종 및 보체의 성장을 억제하고, 본원에서 기재된 바와 같이 다른 화학요법, 예컨대 시스플라틴에 부가, 또는 이를 상승작용시킨다. 따라서, 일부 구현예는 시스플라틴과 조합으로 ADIr-PEG 20 투여에 의해 흑색종 치료 방법을 제공하고, 여기에서 치료는 내인성 산화질소 (NO)를 고갈시킨다.

[0124] 치료의 정확한 복용량 및 지속시간은 치료받는 질환의 함수이고 공지된 시험 프로토콜을 이용하여 또는 당해 기술에서 공지된 모델 시스템에서 조성물을 시험하고 이로부터 외삽함으로써 실험적으로 결정될 수 있다. 제어된 임상시험은 또한 수행될 수 있다. 복용량은 또한 완화되는 증상의 중증도로 다양할 수 있다. 약학적 조성물은 바람직하지 않은 부작용을 최소화하면서 치료적으로 유용한 효과를 발휘하기 위해 일반적으로 제형화 및 투여된다. 조성물은 1회 투여될 수 있거나, 또는 시간의 간격에서 투여되도록 수많은 더 작은 용량으로 분할될 수 있다. 임의의 특정한 대상체에 대하여, 특이적 복용량 요법은 개별적인 필요성에 따라 경시적으로 조정될 수 있다.

[0125] ADIr (예를 들면, ADIr-PEG) 조성물은 다른 공지된 암 치료, 예컨대 방사선 요법, 화학요법, 이식, 면역요법, 호르몬 요법, 광역학적 요법, 등과 조합으로 또는 단독으로 투여될 수 있다. 조성물은 또한 항생제와 조합으로 투여될 수 있다.

[0126] ADIr 조성물은 또한 단독으로 또는 ADI-PEG 20 요법과 조합으로 투여될 수 있다. 특정 구현예에서, 본원에서 기재된 바와 같이 ADIr은 ADI-PEG 20으로 처리되고 항-ADI-PEG 20 항체를 개발한 환자에서 사용된다. 효소가 항체에 의해 중화됨에 따라 상기 환자는 ADI-PEG 20 치료로부터 더이상 유익하지 않다. 따라서, 특정 구현예에서, 본 발명은 ADI-PEG 20을 포함한 조성물의 치료적 유효량을 이들이 필요한 환자에 투여하고, 일정 기간 이후, 본원에서 기재된 바와 같이 ADIr을 포함한 조성물을 환자에 투여하고, 그렇게 함으로써 암을 치료, 암의 증상을 완화, 또는 암의 진행을 억제하는 것을 포함하는 암의 치료, 암의 증상의 완화, 또는 암의 진행의 억제 방법을 제공한다.

[0127] 방법의 일부 구현예에서, 기간은 환자내 항-ADI-PEG 20 항체의 소정의 수준을 검출함으로써 결정되고, 여기에서 ADIr을 포함한 조성물은 상기 항-ADI-PEG 20 항체의 소정의 수준의 검출 이후 투여된다. 특정 구현예에서, 본원에서 기재된 ADI-PEG 20 및 ADIr 효소로 치료받은 환자에서 항-ADI-PEG 20 항체의 역치 수준(들) 또는 소정의

수준은 확립될 수 있다. 항-ADI-PEG 20 항체의, 또는 때때로 소정의 컷오프로서 언급된, (또한 "소정의 수준" 또는 "소정의 컷-오프 값"으로서 언급된) "소정의 역치 수준"은 당해 기술에서 공지된 방법을 이용하여, 예를 들어, 리시버 오퍼레이터 특징적 곡선 또는 "ROC" 곡선을 이용하여 확립될 수 있다. 일부 구현예에서, 심지어 매우 낮은 수준의 항-ADI-PEG 20 항체는 본원에서 기재된 ADI-PEG 20에서 ADIr-PEG로의 스위칭 치료를 보증하기에 충분한 것으로 간주된다. 특정 구현예에서, ADI-PEG 20 치료를 종료하기 위한 및 본원에서 기재된 ADIr 조성물로 치료를 시작하기 위한 시간을 결정할 항-ADI-PEG 20의 적절한 수준은 숙련된 임상의에 의해 결정될 수 있다.

[0128] 일부 구현예에서, 기간은 환자에서 ADI 활성을 검출함으로써 또는 다르게는 관찰함으로써 결정되고, 여기에서 조성물은 ADI 활성의 소정의 수준의 검출 또는 관찰 이후 투여된다. 특정한 구현예에서, 조성물은 환자에서 감소 수준의 ADI 활성의 검출 또는 관찰 이후 투여된다. ADI 활성은 직접적으로, 예를 들어, ADI 활성의 적어도 하나의 인디케이터용 생물학적 샘플을 검정함으로써, 또는 간접적으로, 예를 들어, ADI-PEG 20 치료의 원하는 또는 의도된 효과를 관찰함으로써 측정될 수 있다. 특정 구현예에서, ADI-PEG 20 치료를 종결하기 위한 및 본원에서 기재된 ADIr-PEG로 치료를 시작하기 위한 시간을 결정할 ADI 활성의 적절한 수준은 숙련된 임상의에 의해 결정될 수 있다.

[0129] 이들 및 관련된 약학적 조성물의 전형적인 투여 경로는 따라서, 비제한적으로, 경구, 국소, 경피, 흡입, 비경구, 설하, 구강, 직장, 젤, 및 비강내를 포함한다. 본원에서 사용된 바와 같이 용어 비경구는 피하 주사, 정맥내, 근육내, 흉골내 주사 또는 주입 기술을 포함한다.

[0130] 특정 약학적 조성물은 환자에 조성물의 투여시 생체이용가능해지도록 그안에 함유된 활성 성분을 허용하기 위해 제형화된다. 대상체 또는 환자에 투여될 조성물은 하나 이상의 복용 단위의 형태를 취할 수 있고, 예를 들어, 정제는 단일 복용 단위일 수 있고, 에어로졸 형태로 본원에서 기재된 ADIr 조성물의 컨테이너는 복수의 복용 단위를 수용할 수 있다. 상기 복용 형태의 실제의 제조 방법은 공지되거나, 또는 당업자에 명백할 것이다; 예를 들어, 참조 Remington: *The Science and Practice of Pharmacy*, 20th Edition (Philadelphia College of Pharmacy and Science, 2000). 투여되는 조성물은, 임의의 경우에, 본원에서 교시에 따라 해당 질환 또는 증상의 치료를 위하여, 본원에서 기재된 ADIr-PEG, 예컨대 ADIr-PEG 20의 치료적 유효량을 함유할 수 있다. 특정 구현예에서, 약학적 또는 치료적 조성물은 멸균되고/되거나 무발열원이다.

[0131] 약학적 조성물은 고체 또는 액체의 형태일 수 있다. 일부 구현예에서, 담체(들)은 미립자이고, 이로써 조성물은, 예를 들어, 정제 또는 분말 형태이다. 담체(들)은 액체일 수 있고, 조성물은, 예를 들어, 아노랄 오일, 주사가능 액체 또는 에어로졸이고, 예를 들어, 흡입 투여에 유용하다. 경구 투여를 의도한 경우, 약학적 조성물은 일반적으로 고체 또는 액체 형태이고, 여기에서 반-고체, 반-액체, 혼탁액 및 젤 형태는 고체 또는 액체로서 본원에서 고려된 형태내에 포함된다.

[0132] 경구 투여용 고체 조성물로서, 약학적 조성물은 분말, 과립, 압축 정제, 알약, 캡슐, 씹는 검, 웨이퍼 등등으로 제형화될 수 있다. 그와 같은 고체 조성물은 전형적으로 하나 이상의 불활성 희석제 또는 식용 담체를 함유할 것이다. 또한, 하나 이상의 하기가 존재할 수 있다: 결합제 예컨대 카복시메틸셀룰로오스, 에틸 셀룰로오스, 미세결정성 셀룰로오스, 트라가칸쓰검 또는 젤라틴; 부형제 예컨대 전분, 락토오스 또는 텍스트린, 붕해제 예컨대 알긴산, 나트륨 알기네이트, 프리모겔, 옥수수 전분 등등; 윤활제 예컨대 마그네슘 스테아레이트 또는 스테로텍스; 활윤제 예컨대 콜로이드성 실리콘 디옥사이드; 감미제 예컨대 수크로오스 또는 사카린; 풍미제 예컨대 박하, 메틸 살리실레이트 또는 오렌지 풍미제; 및 착색제. 약학적 조성물이 캡슐, 예를 들어, 젤라틴 캡슐의 형태인 경우, 상기 유형의 물질에 더하여, 액체 담체 예컨대 폴리에틸렌 글리콜 또는 오일을 함유할 수 있다.

[0133] 약학적 조성물은 액체의 형태, 예를 들어, 엘릭시르, 시럽, 용액, 에멀젼 또는 혼탁액일 수 있다. 액체는 2개 예로서 경구 투여용 또는 주사에 의한 전달용일 수 있다. 경구 투여를 의도한 경우, 바람직한 조성물은, 본 화합물에 더하여, 하나 이상의 감미제, 보존제, 염료/착색제 및 풍미제 인핸서를 함유한다. 주사로 투여되도록 의도된 조성물에서, 하나 이상의 계면활성제, 보존제, 습윤제, 분산제, 혼탁화제, 베페, 안정제 및 등장제는 포함될 수 있다.

[0134] 액체 약학적 조성물은, 이들이 용액, 혼탁액 또는 다른 유사 형태이든, 하나 이상의 하기 보조제를 포함할 수 있다: 멸균된 희석제 예컨대 주사용 물, 염수 용액, 특정 구현예에서, 생리적 염수, 링거액, 등장의 염화나트륨, 고정유 예컨대 용매 또는 분산매로서 작용할 수 있는 합성 모노 또는 디글리세라이드, 폴리에틸렌 글리콜, 글리세린, 프로필렌 글리콜 또는 다른 용매; 항균제 예컨대 벤질 알코올 또는 메틸 파라벤; 항산화제 예컨대 아스코르브산 또는 중아황산나트륨; 퀼레이트제 예컨대 에틸렌디아민테트라아세트산; 베페 예컨대 아세

테이트, 시트레이트 또는 포스페이트 및 장성 조정용 제제 예컨대 염화나트륨 또는 텍스트로오스. 비경구 제제는 유리 또는 플라스틱으로 제조된 앰풀, 일회용 주사기 또는 다중 용량 바이알에 봉입될 수 있다. 생리적 염수는 바람직한 보조제이다. 주사가능 약학적 조성물은 바람직하게는 멸균된다.

[0135] 비경구 또는 경구 투여용으로 의도된 액체 약학적 조성물은 본원에서 개시된 바와 같이 ADIr (예를 들면, ADIr-PEG, ADIr-PEG 20)의 양을 함유해야 하여 이로써 적합한 복용량이 수득될 것이다. 전형적으로, 상기 양은 조성물에서 ADIr의 적어도 0.01%이다. 경구 투여를 의도한 경우, 상기 양은 조성물의 중량의 0.1 내지 약 70% 이도록 다양할 수 있다. 특정 경구 약학적 조성물은 ADIr의 약 4% 내지 약 75%를 함유한다. 특정 구현예에서, 약학적 조성물 및 제제는 제조되어 이로써 비경구 복용 단위가 희석에 앞서 ADIr의 0.01 내지 10 중량%를 함유한다.

[0136] 약학적 조성물은 국소 투여용으로 의도될 수 있고, 이 경우에 담체는 적합하게 용액, 에멀젼, 연고 또는 젤 베이스를 포함할 수 있다. 베이스는, 예를 들어, 하나 이상의 하기를 포함할 수 있다: 바셀린, 라놀린, 폴리에틸렌 글리콜, 밀랍, 광유, 희석제 예컨대 물 및 알코올, 및 유화제 및 안정제. 중점제는 국소 투여용 약학적 조성물에서 존재할 수 있다. 경피 투여용으로 의도되면, 조성물은 경피 패치 또는 이온침투요법 디바이스를 포함할 수 있다. 약학적 조성물은, 직장에서 용융할 및 약물을 방출할, 예를 들어, 좌약의 형태로, 직장 투여용으로 의도될 수 있다. 직장 투여용 조성물은 적합한 무자극 부형제로서 지질생산성 베이스를 함유할 수 있다. 상기 베이스는, 비제한적으로, 라놀린, 코코아 버터 및 폴리에틸렌 글리콜을 포함한다.

[0137] 약학적 조성물은, 고체의 물리적 형태 또는 액체 복용 단위를 변형하는, 다양한 물질을 포함할 수 있다. 예를 들어, 조성물은 활성 성분 주위에 코팅 쉘을 형성하는 물질을 포함할 수 있다. 코팅 쉘을 형성하는 물질은 전형적으로 불활성이고, 예를 들어, 당, 셀락, 및 다른 장의 코팅제로부터 선택될 수 있다. 대안적으로, 활성 성분은 젤라틴 캡슐에 싸일 수 있다. 고체 또는 액체 형태의 약학적 조성물은 ADIr (예를 들면, ADIr-PEG)에 결합하는 및 그렇게 함으로써 화합물의 전달에서 일조하는 제제를 포함할 수 있다. 상기 수용력으로 작용할 수 있는 적합한 제제는 단클론성 또는 다클론성 항체, 하나 이상의 단백질 또는 리포좀을 포함한다. 약학적 조성물은 에어로졸로서 투여될 수 있는 복용 단위로 본질적으로 이루어질 수 있다. 용어 에어로졸은 콜로이드성 성질의 것부터 가압된 패키지로 이루어진 시스템까지 범위의 다양한 시스템을 나타내기 위해 사용된다. 전달은 액화된 또는 압축된 가스에 의할 수 있거나 또는 활성 성분을 분산시키는 적합한 펌프 시스템에 의할 수 있다. 에어로졸은 활성 성분(들)을 전달하기 위해 단일 상, 2상, 또는 3-상 시스템으로 전달될 수 있다. 에어로졸의 전달은, 함께 키트를 형성할 수 있는, 필요한 컨테이너, 활성제, 밸브, 하위-컨테이너, 등을 포함한다. 당해 분야의 숙련가는, 과도한 실험과정 없이 바람직한 에어로졸을 결정할 수 있다.

[0138] 약학적 조성물은 약학 분야에서 잘 알려진 방법론에 의해 제조될 수 있다. 예를 들어, 주사로 투여되도록 의도된 약학적 조성물은 용액을 형성하기 위해 본원에서 기재된 바와 같이 ADIr (예를 들면, ADIr-PEG) 및 선택적으로, 하나 이상의 염, 버퍼 및/또는 안정제를 포함하는 조성물을, 멸균된, 중류수와 함께 조합시킴으로써 제조될 수 있다. 계면활성제는 균질한 용액 또는 혼탁액의 형성을 용이하게 하기 위해 부가될 수 있다. 계면활성제는 수성 전달 시스템에서 ADIr (예를 들면, ADIr-PEG)의 용해 또는 균질한 혼탁을 용이하게 하기 위해 ADIr (예를 들면, ADIr-PEG) 조성물과 비-공유 상호작용하는 화합물이다.

[0139] 조성물은, 하기를 포함한 다양한 인자에 따라 다양할, 치료적 유효량으로 투여될 수 있다: 이용된 특이적 화합물 (예를 들면, ADIr-PEG)의 활성; 화합물의 대사성 안정성 및 작용의 길이; 환자의 연령, 체중, 일반적인 건강, 성별, 및 다이어트; 방식 및 투여 시간; 배출 속도; 약물 조합; 특정한 장애 또는 증상의 중증도; 및 상기 대상체 진행중 요법.

[0140] 본원에서 기재된 화합물의 치료적 유효량은 종양 성장을 억제하는데 유효하다. 일반적으로, 치료는 상황하에서 최적의 효과가 달성될 때까지 작은 증분씩 증가될 수 있는 작은 복용량으로 개시된다. 일반적으로, 화합물의 치료적 복용량은 약 1 내지 약 200 mg/kg 2회 1 주 내지 약 1회 매 2 주일 수 있다. 예를 들어, 복용량은 2 ml 정맥내 주사로서 약 1 mg/kg 1회 1 주 내지 약 20 mg/kg 1회 매 3 일일 수 있다. 일부 구현예에서, 용량은, 약 1 회 매 3 일, 약 1회 1 주, 약 2회 1 주, 또는 약 1회 매 2 주 투여된, 약 50 IU/m² 내지 약 700 IU/m²일 수 있다. 특정 구현예에서, 용량은 약 1회 매 3 일, 약 1회 1 주, 약 2회 1 주, 또는 약 1회 매 2 주 투여된 약 50 IU/m², 60 IU/m², 70 IU/m², 80 IU/m², 90 IU/m², 100 IU/m², 110 IU/m², 120 IU/m², 130 IU/m², 140 IU/m², 150 IU/m², 160 IU/m², 170 IU/m², 180 IU/m², 190 IU/m², 200 IU/m², 210 IU/m², 220 IU/m², 230 IU/m², 240 IU/m², 250 IU/m², 260 IU/m², 270 IU/m², 280 IU/m², 290 IU/m², 300 IU/m², 310 IU/m², 약 320 IU/m², 약 330 IU/m²,

340 IU/m² 약 350 IU/m², 360 IU/m², 370 IU/m², 380 IU/m², 390 IU/m², 400 IU/m², 410 IU/m², 420 IU/m², 430 IU/m², 440 IU/m², 450 IU/m², 500 IU/m², 550 IU/m², 600 IU/m², 620 IU/m², 630 IU/m², 640 IU/m², 650 IU/m², 660 IU/m², 670 IU/m², 680 IU/m², 690 IU/m², 또는 약 700 IU/m²일 수 있다. 특정 구현예에서, 용량은 숙련된 임상의에 의해 바라던 대로 변형될 수 있다.

[0141] 일부 경우에서, ADIr-SS-PEG5,000을 갖는 최적의 복용량은 약 2회 1 주일 수 있고, 반면에 ADIr-SS-PEG20,000을 이용한 최적의 복용량은 약 1회 1 주 내지 약 1회 매 2 주일 수 있다. 특정 구현예에서, ADIr-SS-PEG20,000을 갖는 최적의 복용량은 약 2회 1 주일 수 있다.

[0142] ADIr (예를 들면, ADIr-PEG)는 주사에 앞서 포스페이트 완충된 염수 용액, 또는 당해 분야의 숙련가에 공지된 임의의 다른 적절한 용액과 혼합될 수 있다. 일부 구현예에서, ADIr-PEG를 포함한 액체 조성물은 하기를 포함한다: 약 10 내지 약 12 mg의 ADIr; 약 20 내지 약 40 mg의 폴리에틸렌 글리콜; 약 1.27 mg ±5% 1염기성 인산나트륨, USP; 약 3 mg ±5% 2염기성 인산나트륨, USP; 약 7.6 mg ±5% 염화나트륨, USP; 약 6.6 내지 약 7의 pH에서; 주사용 물의 적절한 양으로 (예를 들면, 약 1 mL 또는 약 2 mL).

[0143] 일부 구현예에서, ADIr-PEG를 포함한 액체 조성물은 히스티딘-HCl을 포함하고, 특정 구현예에서, 조성물 버퍼는 약 0.0035 M 히스티딘-HCl 내지 약 0.35 M 히스티딘-HCl이다. 하나의 특정한 구현예에서, 조성물은 0.13 M 염화나트륨과 pH 6.8에서 0.035 M 히스티딘-HCl을 포함한 버퍼에서 제형화된다. 특정 구현예에서, 조성물은 0.13 M 염화나트륨과 pH 6.8에서 0.02 M 나트륨 인산염 버퍼를 포함한 버퍼에서 제형화된다. 일부 구현예에서, ADIr-PEG를 포함한 액체 조성물은 하기를 포함한다: 약 10 내지 약 12 mg의 ADIr; 약 20 내지 약 40 mg의 폴리에틸렌 글리콜; 약 5.4 mg ±5% 히스티딘, USP; 약 7.6 mg ±5% 염화나트륨, USP; 약 6.6 내지 약 7의 pH에서; 주사용 물의 적절한 양으로 (예를 들면, 약 1 mL 또는 약 2 mL).

[0144] 일부 구현예에서, ADIr (예를 들면, ADIr-PEG)을 포함한 조성물은 약 5 내지 약 9, 약 6 내지 약 8, 또는 약 6.5 내지 약 7.5의 pH를 갖는다. 일부 구현예에서, ADIr을 포함한 조성물은 약 6.8 ± 1.0의 pH를 갖는다.

[0145] 일부 구현예에서, ADIr (예를 들면, ADIr-PEG)을 포함한 조성물에서 유리 PEG는 1-10%이다. 일부 구현예에서, 총 PEG의 7% 미만, 6% 미만, 5% 미만, 4% 미만, 3% 미만, 2% 미만 또는 1% 미만이다. 특정 구현예에서, ADIr (예를 들면, ADIr-PEG)을 포함한 조성물에서 비변형된 ADIr은 약 1%, 0.9%, 0.8%, 0.7%, 0.6%, 0.5%, 0.4%, 0.3%, 0.2% 미만 또는 0.1% 미만이다. 일반적으로, ADIr-PEG를 포함한 조성물은 약 4%, 3%, 2%, 1.5%, 1% 또는 0.5% 이하의 총 불순물을 갖는다. 일부 구현예에서, 내독소 제한은 USP에서 언급된 요건, 즉, ≤ 50 EU/mL를 충족시킨다.

[0146] 일부 구현예에서, ADIr (예를 들면, ADIr-PEG)을 포함한 조성물에서 유리 설프하이드릴은 약 90% 초파이다. 일부 구현예에서, ADIr 또는 ADIr-PEG를 포함한 조성물에서 유리 설프하이드릴은 약 91%, 약 92%, 약 93%, 약 94% 또는 약 95%, 약 96% 약 97%, 약 98% 약 99% 이상이다.

[0147] 일부 구현예에서, 조성물내 ADIr (예를 들면, ADIr-PEG)은 약 0.1 μM 또는 0.5 μM 내지 약 15 μM의 Km을 갖거나, 또는 약 1 μM 내지 약 12 μM, 약 1 μM 내지 약 10 μM, 약 1.5 μM 내지 약 9 μM, 약 1.5 μM 내지 약 8 μM 또는 약 1.5 μM 내지 약 7 μM이다. 특정 구현예에서, 조성물내 ADIr (예를 들면, ADIr-PEG)은 약 1.0 μM 내지 약 10 μM 또는 약 1.5 μM 내지 약 6.5 μM의 Km을 갖는다. 일부 구현예에서, 조성물내 ADIr 또는 ADIr-PEG는 약, 적어도 약, 또는 약 0.1 μM, 약 0.5 μM, 약 1.0 μM, 약 1.5 μM, 약 2 μM, 약 2.5 μM, 약 3 μM, 약 3.5 μM, 약 4 μM, 약 4.5 μM, 약 5 μM, 약 5.5 μM, 약 6 μM, 약 6.5 μM, 또는 약 7 μM, 또는 약 8 μM, 또는 약 9 μM, 또는 약 10 μM 미만의 Km을 갖는다.

[0148] 일부 구현예에서, 조성물내 ADIr (예를 들면, ADIr-PEG)은 약 0.5 sec⁻¹ 내지 약 80 sec⁻¹, 또는 약 0.5 sec⁻¹ 내지 약 70 sec⁻¹, 또는 약 0.5 sec⁻¹ 내지 약 60 sec⁻¹, 또는 약 0.5 sec⁻¹ 내지 약 50 sec⁻¹, 또는 약 0.5 sec⁻¹ 내지 약 40 sec⁻¹, 또는 약 0.5 sec⁻¹ 내지 약 30 sec⁻¹, 또는 약 0.5 sec⁻¹ 내지 약 20 sec⁻¹, 또는 약 0.5 sec⁻¹ 내지 약 15 sec⁻¹의 Kcat를 갖거나, 또는 약 0.5 sec⁻¹ 내지 약 80 sec⁻¹, 또는 약 1 sec⁻¹ 내지 약 80 sec⁻¹, 또는 약 5 sec⁻¹ 내지 약 80 sec⁻¹, 또는 약 10 sec⁻¹ 내지 약 80 sec⁻¹, 또는 약 20 sec⁻¹ 내지 약 80 sec⁻¹, 또는 약 30 sec⁻¹ 내지 약 80 sec⁻¹, 또는 약 40 sec⁻¹ 내지 약 80 sec⁻¹, 또는 약 50 sec⁻¹ 내지 약 80 sec⁻¹, 또는 약 60 sec⁻¹ 내지 약 80 sec⁻¹, 또는 약 70 sec⁻¹ 내지 약 80 sec⁻¹, 또는 약 1 sec⁻¹ 내지 약 12 sec⁻¹, 약 1 sec⁻¹

내지 약 10 sec^{-1} , 약 1.5 sec^{-1} 내지 약 9 sec^{-1} , 약 2 sec^{-1} 내지 약 8 sec^{-1} 또는 약 2.5 sec^{-1} 내지 약 7 sec^{-1} 이다. 특정 구현예에서, 조성물내 ADIr (예를 들면, ADIr-PEG)은 약 2.5 sec^{-1} 내지 약 7.5 sec^{-1} 의 Kcat를 갖는다. 일부 구현예에서, 조성물내 ADIr 또는 ADIr-PEG는 약 또는 적어도 약 2.5 sec^{-1} , 약 3 sec^{-1} , 약 3.5 sec^{-1} , 약 4 sec^{-1} , 약 4.5 sec^{-1} , 약 5 sec^{-1} , 약 5.5 sec^{-1} , 약 6 sec^{-1} , 약 6.5 sec^{-1} , 약 7 sec^{-1} , 약 7.5 sec^{-1} 또는 약 8 sec^{-1} , 약 10 sec^{-1} , 약 15 sec^{-1} , 약 20 sec^{-1} , 약 25 sec^{-1} , 약 30 sec^{-1} , 약 35 sec^{-1} , 약 40 sec^{-1} , 약 45 sec^{-1} , 약 50 sec^{-1} , 약 55 sec^{-1} , 약 60 sec^{-1} , 약 65 sec^{-1} , 약 70 sec^{-1} , 약 75 sec^{-1} , 약 80 sec^{-1} , 약 85 sec^{-1} , 약 90 sec^{-1} , 약 95 sec^{-1} , 또는 약 100 sec^{-1} 의 Kcat를 갖는다.

[0149] 일부 구현예에서, 조성물내 ADIr (예를 들면, ADIr-PEG)은 약 5 mS/cm 내지 약 20 mS/cm , 또는 약 5 mS/cm 내지 약 15 mS/cm , 약 7 mS/cm 내지 약 15 mS/cm , 약 9 mS/cm 내지 약 15 mS/cm 또는 약 10 mS/cm 내지 약 15 mS/cm 의 (또한 당해 기술에서 도전율로서 언급된) 전도도를 갖는다. 일부 구현예에서, 조성물내 ADIr (예를 들면, ADIr-PEG)은 약 9 mS/cm , 약 10 mS/cm , 약 11 mS/cm , 약 12 mS/cm 또는 약 13 mS/cm , 약 14 mS/cm 또는 약 15 mS/cm 의 전도도를 갖는다. 특정 구현예에서, 조성물내 ADIr (예를 들면, ADIr-PEG)은 약 $13\text{ mS/cm} \pm 1.0\text{ mS/cm}$ 의 전도도를 갖는다.

[0150] 일부 구현예에서, 조성물내 ADIr (예를 들면, ADIr-PEG)은 약 50 mOsm/kg 내지 약 500 mOsm/kg , 약 100 mOsm/kg 내지 약 400 mOsm/kg , 약 150 mOsm/kg 내지 약 350 mOsm/kg , 약 200 mOsm/kg 내지 약 350 mOsm/kg 또는 약 250 mOsm/kg 내지 약 350 mOsm/kg 의 오스몰농도를 갖는다. 특정 구현예에서, 조성물내 ADIr (예를 들면, ADIr-PEG)은 약 $300 \pm 30\text{ mOsm/kg}$ 의 오스몰농도를 갖는다.

[0151] 일부 구현예에서, 단백질 농도는 약 $11.0 \pm 1.0\text{ mg/mL}$ 이다. 특정 구현예에서, 단백질 농도는 약 8 내지 약 15 mg/mL 이다. 특정 구현예에서, 단백질 농도는 약 $8, 9, 10, 10.5, 11, 11.5, 12, 12.5, 13, 13.5, 14$, 또는 15 mg/mL 이다.

[0152] 일부 구현예에서, 특이적 효소 활성은 약 5.0 내지 90 IU/mg 또는 약 5 내지 55 IU/mg 이고, 여기에서 1 IU 는 37°C 에서 1 분에 $1\text{ }\mu\text{mol}$ 의 아르기닌을 $1\text{ }\mu\text{mol}$ 의 시트룰린 및 $1\text{ }\mu\text{mol}$ 의 암모니아로 전환시키는 효소의 양으로서 정의되고 효력은 $100 \pm 20\text{ IU/mL}$ 이다. 특정 구현예에서, 특이적 효소 활성은 약 $5.5, 6, 6.5, 7, 7.5, 8, 8.5, 9.0, 9.5, 10, 10.5, 11, 11.5, 12, 12.5, 13, 13.5, 14, 14.5, 15, 15.5, 16, 16.5, 17, 17.5, 18, 18.5, 19, 19.5, 20, 20.5, 21, 21.5, 22, 22.5, 23, 23.5, 24, 24.5, 25, 25.5, 26, 26.5, 27, 27.5, 28, 28.5, 29, 29.5, 30, 30.5, 35, 40, 45, 50, 55, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95$, 또는 $100 \pm 2.0\text{ IU/mg}$ 이다. 하나의 특정한 구현예에서, 특이적 효소 활성은 $9 \pm 2.0\text{ IU/mg}$ 이다.

[0153] 본원에서 기재된 ADIr (예를 들면, ADIr-PEG)을 포함한 조성물은, ADI-PEG 20을 포함한, 하나 이상의 다른 치료적 제제의 투여와 동시에, 투여 이전에, 또는 투여 이후에 투여될 수 있다. 상기 조합 요법은 본 발명의 화합물 및 하나 이상의 추가의 활성제를 함유하는 단일 약학적 복용 제형의 투여, 뿐만 아니라 본원에서 기재된 ADIr (예를 들면, ADIr-PEG) 및 그의 자체 별도 약학적 복용 제형에서 각 활성제를 포함한 조성물의 투여를 포함할 수 있다. 예를 들어, ADIr (예를 들면, ADIr-PEG) 및 다른 활성제는 단일 경구 복용량 조성물 예컨대 정제 또는 캡슐에서 함께 환자에 투여될 수 있거나, 또는 각 제제는 별도의 경구 복용 제형에서 투여될 수 있다. 유사하게, ADIr (예를 들면, ADIr-PEG) 및 다른 활성제는 단일 비경구 복용량 조성물에서 예컨대 염수 용액 또는 다른 생리적으로 허용가능한 용액에서 함께 환자에 투여될 수 있거나, 또는 각 제제는 별도의 비경구 복용 제형에서 동일한 또는 상이한 경로로 (예를 들면, 주사에 의한 것, 경구에 의한 것) 투여될 수 있다. 별도의 복용 제형이 사용된 경우, ADIr (예를 들면, ADIr-PEG) 및 하나 이상의 추가의 활성제를 포함한 조성물은 본질적으로 동일한 시간에, 즉, 동반하여, 또는 분리하여 엇갈린 시간에, 즉, 순차적으로 및 임의의 순서로 투여될 수 있고; 조합 요법은 모든 이를 레지멘을 포함한다고 여겨진다.

[0154] 따라서, 특정 구현예에서, 하나 이상의 다른 치료적 제제와 조합으로 본 개시내용의 ADIr 조성물의 투여가 또한 고려된다. 상기 치료적 제제는 본원에서 기재된 바와 같이 특정한 질환 상태, 예컨대 특정한 암 또는 GVHD에 대하여 표준 치료로서 당해 기술에서 허용될 수 있다. 고려된 예시적인 치료적 제제는 사이토카인, 성장 인자, 스테로이드, NSAIDs, DMARDs, 항-염증제, 화학치료제, 방사선요법, 자가포식 저해제, 또는 다른 활성 및 보조적인 제제를 포함한다.

[0155] 특정 구현예에서, 본원에서 개시된 ADIr (예를 들면, ADIr-PEG) 조성물은 임의의 수의 화학치료제와 함께 투여

될 수 있다. 화학치료제의 예는 하기를 포함한다: 알킬화제 예컨대 티오테파 및 사이클로포스파미드 (CYTOXANTM); 알킬 설포네이트 예컨대 부설판, 임프로설판 및 피포설판; 아지리딘 예컨대 벤조도파, 카보쿠온, 메투레도파, 및 우레도파; 알트레타민, 트리에틸렌멜라민, 트리에틸렌포스포르아미드, 트리에틸렌티오포스파오르아미드 및 트리메틸롤로멜라민을 포함한 에틸렌이민 및 메틸아멜라민; 질소 머스타드 예컨대 클로르암부실, 클로르나파진, 클로포스파마이드, 에스트라무스틴, 이포스파마이드, 메클로르에타민, 메클로르에타민 옥사이드 하이드로클로라이드, 멜팔란, 노벰비친, 펜에스테린, 프레드니무스틴, 트로포스파마이드, 우라실 머스타드; 나이트로수레아 예컨대 카르무스틴, 클로로조토신, 포테무스틴, 로무스틴, 니무스틴, 라니무스틴; 항생제 예컨대 아클라시노마이신, 악티노마이신, 오트라마이신, 아자세린, 블레오마이신, 캐티노마이신, 칼리키아마이신, 카라비신, 카르미노마이신, 카르지노필린, 크로모마이신, 닉티노마이신, 다우노루비신, 데토루비신, 6-디아조-5-옥소-L-노르류신, 독소루비신, 에피루비신, 에소루비신, 이다루비신, 마르셀로마이신, 미토마이신, 마이코페놀산, 노갈라마이신, 올리보마이신, 페플로마이신, 포트파로마이신, 퓨로마이신, 쿠엘라마이신, 로도루비신, 스트렙토니그린, 스트렙토조신, 투베르시딘, 우베니멕스, 지노스타틴, 조루비신; 항-대사물 예컨대 메토트렉세이트 및 5-플루오로우라실 (5-FU); 엽산 유사체 예컨대 데노프테린, 메토트렉세이트, 프테로프테린, 트리메트렉세이트; 퓨린 유사체 예컨대 플루다라빈, 6-머캅토퓨린, 티아미프린, 티오구아닌; 괴리미딘 유사체 예컨대 안시타빈, 아자시티딘, 6-아자우리딘, 카모푸르, 사이타라빈, 디데옥시우리딘, 독시플루리딘, 에노시타빈, 플록수리딘, 5-FU; 안드로겐 예컨대 칼루스테론, 드로모스타놀론 프로피오네이트, 에피티오스타놀, 메피티오스탄, 테스토락톤; 항-부신 예컨대 아미노글루테티미드, 미토탄, 트릴로스탄; 엽산 보충물 예컨대 프롤린산; 아세글라تون; 알도포스파마이드 글리코사이드; 아미노래별린산; 암사크린; 베스트라부실; 비스안트렌; 에다트락세이트; 데포파민; 데메콜신; 디아지쿠온; 엘포르미틴; 엘립티늄 아세테이트; 에토글루루시드; 갈륨 니트레이트; 하이드록시우레아; 렌티난; 놀니다민; 미토구아존; 미톡산트론; 모피다몰; 니트라크린; 펜토스타틴; 페나메트; 피라루비신; 포도필린산; 2-에틸하이드라자이드; 프로카바진; PSK; 라족산; 시조피란; 스피로게르마늄; 테누아진산; 트리아지쿠온; 2, 2', 2"-트리클로로트리에틸아민; 우레탄; 빈데신; 다카바진; 만노무스틴; 미토브로니톨; 미토락톨; 피포브로만; 가시토신; 아라비노시드 ("Ara-C"); 사이클로포스파미드; 티오테파; 탁소이드, 예를 들면 파클리탁셀 (TAXOL®, Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, N.J.) 및 도세탁셀 (TAXOTERE®, Rhne-Poulenc Rorer, Antony, France); 클로르암부실; 챔시타빈; 6-티오구아닌; 머캅토퓨린; 메토트렉세이트; 백금 유사체 예컨대 시스플라틴 및 카보플라틴; 빈블라스틴; 백금; 에토포시드 (VP-16); 이포스파마이드; 미토마이신 C; 미톡산트론; 빙크리스틴; 비노렐빈; 나벨빈; 노반트론; 테니포시드; 다우노마이신; 아미노프테린; 젤로다; 이반드로네이트; CPT-11; 토포이소머라제 저해제 RFS 2000; 디플루오로메틸오미틴 (DMFO); 레티노산 유도체 예컨대 TargretinTM (백사로텐), PanretinTM (알리트레티노인); ONTAKTM (데닐류킨 디프티톡스); 에스페라마이신; 카페시타빈; 및 상기 중 임의의 치료적으로 허용가능한 염, 산 또는 유도체. 종양에서 호르몬 작용을 조절 또는 억제하기 위해 작용하는 항-호르몬 예컨대 예를 들어 타목시펜, 랄록시펜을 포함한 항-에스트로겐, 4(5)-이미다졸을 억제하는 방향화효소, 4-하이드록시타목시펜, 트리옥시펜, 케녹시펜, LY117018, 오나프리스톤, 및 토레미펜 (Fareston); 및 항-안드로겐 예컨대 플루타미드, 널루타마이드, 바이칼루타마이드, 류프롤라이드, 및 고세렐린이 상기 정의에 또한 포함된다. 추가로 화학치료제는 소라페닙 및 다른 단백질 키나제 저해제 예컨대 아파티닙, 악시티닙, 베바시주맙, 세툭시맙, 크리조티닙, 다사티닙, 에를로티닙, 포스타마티닙, 게피티닙, 이마티닙, 라파티닙, 렌바티닙, 무브리티닙, 널로티닙, 파니투무맙, 파조파닙, 폐갑타닙, 라니바이주맙, 륙솔리티닙, 트라스투주맙, 반데타닙, 베무라페닙, 및 수니티닙; 시롤리무스 (라파마이신), 에버롤리무스 및 다른 mTOR 저해제를 포함한다. 상기 임의의 치료적으로 허용가능한 염, 산 또는 유도체는 본원에서 사용을 위하여 또한 고려된다.

[0156] 특정 구현예에서, 본원에서 개시된 ADIr (예를 들면, ADIr-PEG) 조성물은 임의의 수의 자가포식 저해제와 함께 투여될 수 있다. 일부 바람직한 구현예에서, 자가포식 저해제는 하기로 이루어진 군으로부터 선택된다: 클로로퀸, 3-메틸아데닌, 하이드록시클로로퀸 (Plaquinol.TM.), 바필로마이신 A1, 5-아미노-4-이미다졸 카복사마이드 리보사이드 (AICAR), 오카다 산, 2A형 또는 1형의 단백질 포스파타제를 억제하는 자가포식-억제성 조류 독소, cAMP의 유사체, 및 cAMP 수준을 상승시키는 약물, 아데노신, N6-머캅토퓨린 리보사이드, 보르트만닌, 및 빈블라스틴. 또한, 자가포식에 필수적인 단백질, 예컨대 예를 들어 ATG5의 발현을 억제하는 안티센스 또는 siRNA가, 또한, 사용될 수 있다.

[0157] 일부 구현예에서, 하나 이상의 치료적 제제와 ADIr (예를 들면, ADIr-PEG)의 조합은 상보적, 부가적, 또는 상승적 작용한다. 이와 관련하여, 본원에서 제공된 바와 같이 ADIr-PEG와 상보적 또는 상승적 작용할 수 있는 치료적 제제 (예를 들면, 화학치료제, 자가포식 저해제, mTOR 저해제, 또는 본원에서 기재된 바와 같이 암, GVHD, 또는 염증성 장 질환의 치료에 사용된 임의의 다른 치료적 제제)를 포함하는, 상보적 또는 상승화 제제는 본원

에서 기재되고, 여기에서 상기 상보성 또는 시너지효과는 화학치료제가 존재하지만 ADIr (예를 들면, ADIr-PEG) 조성물이 부재인 경우, 및/또는 ADIr (예를 들면, ADIr-PEG)이 존재하지만 화학치료제가 부재인 경우 검출될 수 있는 효과보다 규모로 더 큰 (즉, 적절한 대조군 조건에 비하여 통계적으로 유의미한 방식으로) 검출가능한 효과로서 나타난다. 시너지효과 및 상보성 측정 방법은 당해 기술에 공지되어 있다 (참조 예를 들면, Cancer Res January 15, 2010 70; 440).

[0158] 본원에서 기재된 바와 같이, ADIr (예를 들면, ADIr-PEG) 및 선택적으로 다른 치료적 제제를 포함한 조성물은 암 치료용 치료적 방법 및 암의 전이 예방 방법에서 사용될 수 있다. 따라서, 일부 구현예는 다양한 상이한 암의 치료, 이의 증상 완화, 또는 이의 진행 억제 또는 예방 방법을 포함한다. 일부 구현예는 GVHD의 치료, 이의 증상 완화, 또는 이의 진행 억제 방법을 포함한다. 특정한 구현예는, ADI-PEG 20의 치료 이후, 특히 환자가 항-ADI-PEG 20 항체를 발전시키는 경우, 선택적으로, 본원에서 기재된 바와 같이 ADIr 조성물의 치료적 유효량을 환자에 투여하고, 그렇게 함으로써 암 또는 GVHD를 치료, 이들의 증상을 완화, 또는 이들의 진행을 억제하는 것을 포함하는 환자에서 암 또는 GVHD의 치료, 이들의 증상 완화, 또는 이들의 진행 억제 방법을 포함한다. 따라서, 본원에서 기재된 ADIr 조성물은 하기로 괴로운 개체에 투여될 수 있다: 염증성 장 질환 (예를 들면, 크론병; 궤양성 대장염), GVHD 또는 비제한적으로 간세포 암종을 포함한 암, 백혈병 (예를 들면 급성 골수 백혈병 및 재발한 급성 골수 백혈병), 전이성 흑색종을 포함한 흑색종, 육종 (비제한적으로, 전이성 육종, 자궁 평활근육종 포함), 췌장암, 전립선암 (예컨대, 비제한적으로, 호르몬 난치의 전립선암), 중피종, 림프 백혈병, 만성적 골수성 백혈병, 림프종, 소세포 폐암, 유방암, 난소암, 결장직장암, 위암 (비제한적으로, 위 선암종 포함), 신경아교종, 다형성 교아종, 망막모세포종, 신경교세포종, 비소세포 폐암 (NSCLC), 신장암 (비제한적으로 신장 세포 암종 포함), 방광암, 자궁암, 식도암, 뇌암, 머리 및 목암 (비제한적으로, 머리 및 목의 편평상피 세포 암종; 혀의 암), 자궁경부암, 고환암, 담낭, 담관암종, 및 위암.

[0159] 본원에서 기재된 바와 같이, ADIr (예를 들면, ADIr-PEG), 및 선택적으로 하나 이상의 다른 치료적 제제를 포함한 조성물을 환자에 투여하는 것을 포함하는 환자에서 암의 치료, 암의 증상 완화, 또는 암의 진행 억제 방법이 또한 포함되고, 여기에서 암은 ASS, ASL, 또는 양쪽이 결핍된다. 이와 관련하여, ASS 또는 ASL 결핍은 mRNA 발현 또는 단백질 발현에 의해 측정된 바와 같이 발현에서의 감소일 수 있거나, 또는 단백질 활성에서의 감소일 수 있고, 일반적으로 숙련가에 의해 결정된 바와 같이 발현 또는 활성에서 통계적으로 유의미한 감소를 포함한다. 감소된 ASS 또는 ASL 발현 또는 활성은, 암이 없도록 공지된 적절한 대조군 샘플에서의 발현 또는 활성과 비교하여, 약 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70% 이상의 발현 또는 활성에서의 감소일 수 있다. 특정 구현예에서, ASS 또는 ASL 발현 또는 활성은 비-암 대조군 샘플에서의 발현 또는 활성과 비교하여 적어도 2배만큼 감소된다.

[0160] 특정 구현예에서, ASS 또는 ASL의 감소된 발현 또는 활성은 ASS 또는 ASL 프로모터의 메틸화 또는 ASS 또는 ASL 프로모터의 저해에서 비롯된다. 일부 구현예에서 ASS 또는 ASL의 발현 또는 활성에서의 감소는 DNA 돌연변이 (예를 들면, 하나 이상의 점 돌연변이, 작은 결실, 삽입, 등등) 또는 유전자의 결실을 초래한 염색체 비정상에서 비롯된다. 일부 구현예에서, 암은 ASS 또는 ASL 음성이고, 발현 또는 활성이 관측되지 않음을 의미한다.

[0161] ASS 또는 ASL 발현 또는 활성에서의 감소는 당해 기술에서 공지된 임의의 방법, 예컨대 비제한적으로, 정량적 PCR, 면역조직화학, 효소 활성 검정 (예를 들면, 시트룰린의 아르기니노석시네이트로의 전환 또는 아르기니노석시네이트의 아르기닌 및 푸마레이트로의 전환을 측정하기 위한 검정), 등을 이용하여 측정될 수 있다.

[0162] 따라서, 특정 구현예는 본원에서 기재된 바와 같이 ADIr (예를 들면, ADIr-PEG)을 포함한 조성물을 환자에 투여하는 것을 포함하는 환자에서 암의 치료, 암의 증상 완화, 또는 암의 진행 억제 방법을 포함하고, 여기에서 암은 ASS 또는 ASL, 또는 양쪽의 감소된 발현 또는 활성을 나타내고, 여기에서 암은, 비제한적으로 간세포 암종, 백혈병 (예를 들면 급성 골수 백혈병 및 재발한 급성 골수 백혈병), 전이성 흑색종을 포함한 흑색종, 육종 (비제한적으로, 전이성 육종, 자궁 평활근육종 포함), 췌장암, 전립선암 (예컨대, 비제한적으로, 호르몬 난치의 전립선암), 중피종, 림프 백혈병, 만성적 골수성 백혈병, 림프종, 소세포 폐암, 유방암, 난소암, 결장직장암, 위암 (비제한적으로, 위 선암종 포함), 신경아교종, 다형성 교아종, 망막모세포종, 신경교세포종, 비소세포 폐암 (NSCLC), 신장 암 (비제한적으로 신장 세포 암종 포함), 방광암, 자궁암, 식도암, 뇌암, 두경부 암 (비제한적으로, 머리 및 목의 편평상피 세포 암종; 혀의 암 포함), 자궁경부암, 고환암, 담낭, 담관암종, 및 위암을 포함한다.

[0163] 문헌에서 다양한 연구는 ASS가 하기 종양에서 결핍된 것을 보여주었다: 급성 골수성 백혈병 (AML), 방광, 유방, 대장, 위, 교모세포종, HCC, 림프종, 흑색종, 중피종, 비소세포 폐, 난소, 췌장, 전립선, 신장, 육종, 및 소세

포 폐. 따라서, 이들 ASS-결핍된 암의 치료는, ADI-PEG 20으로 최초 치료를 포함하여, ADIr-PEG 단독 또는 다른 치료와 조합으로, 본원에서 특이적으로 고려된다.

[0164] 자가포식 저해제와 조합으로, 본원에서 기재된 바와 같이 ADIr (예를 들면, ADIr-PEG, ADIr-PEG 20)을 포함한 조성물을 환자에 투여하는 것을 포함하는 환자에서 암의 치료, 암의 증상 완화, 또는 암의 진행 억제 방법이 또한 포함된다. 일부 구현예는 자가포식 저해제와 조합으로 본원에서 기재된 바와 같이 ADIr을 포함한 조성물의 치료적 유효성을 환자에 투여하는 것을 포함하는 환자에서 암의 치료 방법을 포함하고, 여기에서 암은 췌장암 또는 소세포 폐암이다.

[0165] 일부 구현예는 본원에서 기재된 ADIr을 포함한 조성물의 투여가 적어도 1 개월, 2 개월, 3 개월, 4 개월, 5 개월, 6 개월 이상 동안 혈장에서 아르기닌을 고갈시키는 치료 방법을 포함한다. 특정 구현예는 본원에서 기재된 ADIr을 포함한 조성물의 투여가 ADI-PEG 20으로 치료 종결 그 다음 항-ADI-PEG 20 항체의 검출 이후 적어도 1 개월, 2 개월, 3 개월, 4 개월, 5 개월, 6 개월 이상 혈장에서 아르기닌을 고갈시키는 치료 방법을 포함한다.

[0166] 실시예

[0167] 실시예 1

[0168] 환자 항-ADI-PEG 20 항체로 낮은 교차-반응성을 갖는 ADI 효소의 스크리닝 및 선택

[0169] 본 실시예는 환자 항-ADI-PEG 20 항체로 낮은 교차-반응성을 갖는 ADI 효소의 스크리닝 및 선택을 기재한다.

[0170] 다수의 ADI 효소로부터, 표 1은 M. 호미니스 ADI에 비하여 그의 서열 동일성 퍼센트로 선택된 27 ADI 효소를 열거한다.

표 1

[0171] 표 1: M. 호미니스 ADI에 대한 유사성의

다양한 정도를 갖는 선택된 ADI 서열

유기체	퍼센트 동일성	서열 접근 번호	서열 번호:
마이코플라스마 호미니스	100.0	gi 728876	1
마이코플라스마 살비바리움	81.95	gi 639205998	2
마이코플라스마 스푸만스	81.51	gi 652844751	3
마이코플라스마 카나렌세	81.22	gi 780004832	20
마이코플라스마 아우리스	78.54	gi 490558584	4
마이코플라스마 하이오사이노비애	78.78	gi 738491959	5
마이코플라스마 클로아칼레	78.97	gi 657216914	6
마이코플라스마 안세리스	78.73	gi 697347301	21
마이코플라스마 알칼레스센스	77.67	gi 488970417	7
마이코플라스마 오랄레	79.27	gi 551316378	8
마이코플라스마 이네르스	60.20	gi 657715567	9
마이코플라스마 말레아그리디스	59.1	gi 803632330	22
마이코플라스마 알비	58.46	gi 697091625	23
마이코플라스마 페네트란스	58.1	gi 768722109	24
마이코플라스마 갈리나룸	58.06	gi 653082428	10
마이코플라스마 피룸	56.05	gi 652846075	11
마이코플라스마 프리마툼	56.86	gi 657716867	12
마이코플라스마 페르멘탄스	56.11	gi 753838319	25
마이코플라스마 리포파시엔스	55.64	gi 652840093	13
마이코플라스마 웰리파우시움	55.85	gi 653084388	14
마이코플라스마 이미탄스	53.85	gi 652843200	15
마이코플라스마 오필레스센스	54.25	gi 659858924	16
마이코플라스마 모아트시이	50.24	gi 551314758	17
마이코플라스마 엘레판티스	52.63	gi 653084064	18
마이코플라스마 뉴모니애	51.97	gi 12643471	26
마이코플라스마 테스투디니스	49.50	gi 652838532	19

마이코플라스마 <i>sp.</i> CAG:877	39.28	gi 524101565	27
마이코플라스마 <i>sp.</i> CAG:472	38.07	gi 524735679	28

[0172] 다양한 유기체 유래의 수많은 ADI 효소는, 효소가 심지어 항-ADI-PEG 20 항체의 존재하에, 환자 혈액에서 아르기닌의 저농도를 제거 및 유지하도록 예상되는 것을 결정하기 위해 특성화되었다. 아래 상세한 바와 같이, 이들 연구는, 서열 동일성에 기반된, *M. 호미니스*에 밀접하게 관련된 수많은 종으로부터 ADI가 다양한 온도 및 pH에서 측정된 충분히 양호한 효소 촉매적 특성을 갖고, 또한 항-ADI-PEG 20 항체로 감소된 교차-반응성을 갖는 것을 보여준다.

[0173] ADI 제조. 재조합 ADI 효소는, 예를 들어, 하기의 기재된 바와 같이, 표준 프로토콜에 따라 시험을 위하여 클로닝, 발현, 및 정제되었다: 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; 및 Sugimura et al., Infection and Immunity. 58:2510-2515, 1990.

[0174] 인간 항-ADI-PEG20 항체 정제. 항-ADI-PEG20 항체는 임상 연구 동안 ADI-PEG20을 받았던 환자의 혈장 샘플로부터 정제되었다. 예를 들어, 총 60 mL의 혈장은 ELISA 검정에 의해 결정된 바와 같이 ADI-PEG20에 대해 고역가 (역가 $>/= 4$)를 도달한 8명의 상이한 환자로부터 풀링되었다. 2-단계 정제, 단백질 "A" 크로마토그래피 (GE Healthcare) 그 다음 ADI 친화성 크로마토그래피가 사용되었다. 약 20 mg의 정제된 항체는 수득되었고 필요할 때까지 분액에 -80°C에서 보관되었다.

[0175] ADI 효소 검정. 아르기닌 테이미나아제 (ADI)는 L-아르기닌 및 암모니아로의 전환을 촉매화시킨다. L-시트룰린의 양은 비색 종료점 검정 (참조, 예를 들어, Knipp and Vasak, Analytical Biochem. 286:257-264, 2000)에 의해 검출될 수 있고 단백질의 IU/mg으로 표현된 ADI의 특이적 활성을 산출하기 위해 L-시트룰린의 공지된 양의 표준 곡선에 비교될 수 있다. 1 IU의 효소 활성을 시험된 pH 및 온도에서 1 μmol의 시트룰린 / 분을 생산하는 효소의 양으로서 정의되었다. 표준 검정 조건은 생리적 HEPES 버퍼 (PHB) 50 mM HEPES, 160 mM NaCl pH 7.4 (Lang and Zander, Clin Chem Lab Med. 37:563-571, 1999) 플러스 0.1% BSA에 37°C에서 수행되었다. 모든 샘플 및 표준은 조건이 허용되는 경우 이중 또는 삼중으로 실시되었다.

[0176] Km 및 Kcat 값은 상기 기재된 활성 검정의 변화를 이용함으로써 결정되었다. 활성 검정에서와 같이 (또는 다르게 명시되지 않는 한), 모든 반응은 PHB 플러스 0.1% BSA에 37°C에서 실시되었다. 효소 농도, 반응 시간, 및 기질 농도 범위는 활성에서 그의 차이를 설명하기 위해 각각의 ADI 또는 ADIr 작제물에 대하여 조정되었다. 일반적으로, 2 nM 효소, 5 분 반응 시간, 및 0 - 160 μM 아르기닌은 출발 조건으로서 사용되었다. 조건 최적화 경우, 반응에 부가된 총 기질의 백분율로서 소비된 기질의 양에 대하여 특정한 주의력은 기울여졌다. 전형적으로, 검출의 하한은 약 1 μM의 시트룰린이고 정량화의 하한은 약 2 μM이었다. A 시트룰린 표준 곡선은 모든 플레이트 상에서 실시 및 사용되어 효소 반응에 의해 생산된 시트룰린을 정량화시켰다.

[0177] 활성 검정은 항-ADI-PEG20 (항체 중화 프로파일)의 존재하에 효소 활성을 사정하기 위해 또한 수행되었다. 이들 검정은 상기에서 기재된 바와 같이 및 640 nM, 320 nM, 160 nM, 80 nM, 40 nM, 20 nM, 10 nM, 및 0 nM의 항-ADI-PEG20 항체의 존재하에 수행되었다.

[0178] 산출. 각 반응 웰에서 생산된 시트룰린 농도 (μM)는 시트룰린 표준 곡선을 이용하여 산출 및 평균되었다. 각 반응의 속도는 그 다음 μM/min/50 nM ADI로 산출되었다. 특이적 활성 (IU/mg 또는 μmols 생성물/min/mg ADI)은 상기 값을 "IU" 인자 (IU 인자는 ADI의 분자량 및 반응 용적으로부터 산출되었다)로 곱셈함으로써 산출되었다.

[0179] 데이터는 아래 표 2-7에서 보여진다.

표 2

표 2. 선택된 천연형 ADI 서열 및 특성			
유기체	특이적 활성 (IU/mg)	Kcat (s-1)	Km (μM)
마이코플라스마 <i>호미니스</i>	+	+	+
마이코플라스마 <i>살비바리움</i>	++	++	+
마이코플라스마 <i>스푸만스</i>	+++	+++	+

마이코플라스마 카나덴세	+	+	+
마이코플라스마 클로아칼레	++	+	+
마이코플라스마 하이오사이노비애	-	-	+
마이코플라스마 안세리스	+	-	+
마이코플라스마 아우리스	+	-	+
마이코플라스마 알칼레스센스	++	++	-
마이코플라스마 이네르스	++++	++++	+
마이코플라스마 말레아그리디스	+++	++	+
마이코플라스마 페네트란스	++	++	-
마이코플라스마 갈리나룸	++++	+++	+
마이코플라스마 프리마툼	+++	+++	+
마이코플라스마 페르멘坦스	-	-	ND
마이코플라스마 리포파시엔스	-	-	ND
마이코플라스마 오팔레스센스	++	++	-
마이코플라스마 이미탄스	-	ND	ND
마이코플라스마 sp. CAG:877	-	ND	ND
마이코플라스마 sp. CAG:472	-	ND	ND

표 3

표 3. 선택된 PEG-ADI 서열 및 특성			
유기체	특이적 활성 (IU/mg)	Kcat (s-1)	Km (uM)
마이코플라스마 호미니스	+	+	+
마이코플라스마 살비바리움	++	++	+
마이코플라스마 스푸만스	+++	+++	+
마이코플라스마 카나덴세	++	++	-
마이코플라스마 클로아칼레	++	++	+
마이코플라스마 하이오사이노비애	-	+	ND
마이코플라스마 안세리스	++	++	-
마이코플라스마 아우리스	++	++	-
마이코플라스마 알칼레스센스	-	+	ND
마이코플라스마 이네르스	++++	++++	+
마이코플라스마 말레아그리디스	+++	++	+
마이코플라스마 페네트란스	+	+	-
마이코플라스마 갈리나룸	++++	++++	+
마이코플라스마 프리마툼	+++	+++	+
마이코플라스마 오팔레스센스	-	ND	ND

표 4

유기체	지시된 α -ADI Ab의 농도에서 특이적 활성 (nM)*							
	640	320	160	80	40	20	10	0
마이코플라스마 호미니스	ND	33	39	59	76	86	94	100
마이코플라스마 살비바리움	25	49	69	84	92	96	96	100
마이코플라스마 스푸만스	42	59	76	87	95	96	98	100
마이코플라스마 카나덴세	27	56	89	104	121	122	113	100
마이코플라스마 클로아칼레	24	50	72	85	95	98	98	100
마이코플라스마 하이오사이노비애	22	47	72	83	101	100	91	100

마이코플라스마 안세리스	39	60	90	99	109	106	106	100
마이코플라스마 아우리스	45	64	81	90	95	99	100	100
마이코플라스마 알칼레스센스	27	48	71	83	92	94	95	100
마이코플라스마 이네르스	63	80	89	93	96	98	99	100
마이코플라스마 말레아그리디스	64	90	104	101	110	101	112	100
마이코플라스마 페네트란스	67	86	91	90	89	106	100	100
마이코플라스마 갈리나룸	67	82	89	94	96	96	97	100
마이코플라스마 프리마툼	64	79	89	94	98	99	99	100
마이코플라스마 오플레스센스	66	91	95	102	106	106	104	100

*무 항체 (0 nM)의 활성에 비하여 백분율 (%) 특이적 활성 (IU/mg)으로서 지시됨

표 5

유기체	지시된 α-ADI Ab의 농도에서 특이적 활성 (nM)*							
	640	320	160	80	40	20	10	0
마이코플라스마 호미니스	ND	53	64	77	89	93	94	100
마이코플라스마 살비바리움	43	59	77	85	91	94	95	100
마이코플라스마 스푸만스	58	72	83	91	97	97	99	100
마이코플라스마 카나덴세	42	62	79	94	91	92	95	100
마이코플라스마 클로아칼레	31	52	72	82	93	95	95	100
마이코플라스마 안세리스	41	59	71	91	93	93	99	100
마이코플라스마 아우리스	56	70	82	88	93	95	96	100
마이코플라스마 알칼레스센스	42	59	78	87	92	97	98	100
마이코플라스마 이네르스	65	84	92	94	98	99	94	100
마이코플라스마 말레아그리디스	56	79	93	101	106	105	107	100
마이코플라스마 페네트란스	69	85	93	101	104	104	105	100
마이코플라스마 갈리나룸	62	77	87	91	94	99	100	100
마이코플라스마 프리마툼	65	80	86	91	93	96	98	100

*무 항체 (0 nM)의 활성에 비하여 백분율 (%) 특이적 활성 (IU/mg)으로서 지시됨

표 6

유기체	시된 온도에서 특이적 활성*							
	20°C	24°C	28°C	32°C	37°C	40°C	44°C	48°C
마이코플라스마 호미니스	37	50	66	85	100	105	103	80
마이코플라스마 살비바리움	20	32	46	69	100	120	147	168
마이코플라스마 스푸만스	25	38	53	75	100	118	135	135
마이코플라스마 카나덴세	21	32	43	74	100	127	160	185
마이코플라스마 클로아칼레	17	28	44	65	100	124	147	180
마이코플라스마 하이오사이노비아	16	26	41	64	100	104	126	124
마이코플라스마 안세리스	17	23	44	60	100	128	159	179
마이코플라스마 아우리스	18	29	44	67	100	122	157	174
마이코플라스마 알칼레스센스	20	31	45	67	100	119	146	160

마이코플라스마 이네르스	36	52	63	78	100	125	142	191
마이코플라스마 말레아그리디스	40	49	60	75	100	95	58	20
마이코플라스마 페네트란스	53	52	67	74	100	108	118	114
마이코플라스마 갈리나룸	41	51	67	81	100	119	145	171
마이코플라스마 프리마툼	31	46	60	79	100	116	124	128
마이코플라스마 오플레스센스	29	35	47	66	100	106	135	132

* 37° C에서 활성에 비하여 백분율 (%) 특이적 활성 (IU/mg)으로서 지시됨

표 7

유기체	지시된 pH에서 특이적 활성*											
	2.4	3.2	4	4.8	5.6	6.4	7	7.6	8.4	9.2	10	10.4
마이코플라스마 호미니스	5	6	17	66	94	71	88	58	17	26	18	5
마이코플라스마 살비바리움	1	1	1	55	124	132	114	82	46	59	40	10
마이코플라스마 스푸만스	1	1	1	58	117	119	108	84	44	62	45	10
마이코플라스마 카나덴세	0	1	1	67	148	149	144	96	47	67	49	20
마이코플라스마 클로아칼레	0	0	0	43	126	130	113	86	46	64	46	13
마이코플라스마 하이오사이노비에	0	1	1	22	124	132	117	85	41	39	26	6
마이코플라스마 안세리스	0	0	1	51	159	171	135	108	55	82	59	22
마이코플라스마 아우리스	0	1	1	1	87	92	98	87	50	69	48	4
마이코플라스마 알칼레스센스	0	0	0	38	113	123	106	78	38	53	35	7
마이코플라스마 이네르스	0	1	15	32	76	83	84	78	45	66	55	26
마이코플라스마 말레아그리디스	0	3	3	6	84	90	103	98	46	55	40	5
마이코플라스마 페네트란스	0	0	7	41	123	130	129	100	42	64	51	14
마이코플라스마 갈리나룸	0	1	18	36	91	90	104	92	50	69	56	26
마이코플라스마 프리마툼	0	1	0	27	81	94	99	92	50	76	60	17
마이코플라스마 오플레스센스	0	1	1	2	83	97	115	93	51	84	65	23

* pH 7.4에서 활성에 비하여 백분율 (%) 특이적 활성 (IU/mg)으로서 지시됨

[0186]

이들 데이터는, 특히, M. 호미니스 ADI에 매우 상동성 (약 50-100 동일성 퍼센트)인 원상태 및 폐길화된 ADI 효소가 다양한 pH (표 6) 및 온도-정의된 (표 7) 조건을 포함하여 탁월한 촉매적 활성 (표 2-4)을 유지하였음을 보여준다. 이들은 또한, 예를 들어, 마이코플라스마 호미니스의 것에 비하여 항-ADI-PEG 20 항체 (표 4-5)의 존재하에 (증가된) 효소 활성에 의해 측정된 바와 같이 환자 항-ADI-PEG 20 항체에 대하여 감소된 친화도를 보여주었다. 따라서, 이들 ADI 효소는, 아르기닌 고갈 요법의 유효성을 확장 및/또는 증가시키기 위해, 단독 또는 ADI-PEG 20 치료 이후, 암의 치료를 위한 요법에서 사용을 위하여 치료적 유용성을 가질 수 있다.

[0187]

상기 기재된 다양한 구현예는 추가 구현예를 제공하기 위해 조합될 수 있다. 본 명세서에서 참조된 및/또는 출원 데이터 시트에서 열거된 모든 미국 특히, 미국 특허 출원 공개, 미국 특허 출원, 해외 특히, 해외 특허 출원 및 비-특허 공개는 그 전체가 본원에서 참고로 편입된다. 구현예의 측면은 또 다른 추가 구현예를 제공하기 위해 다양한 특히, 출원 및 공개의 개념을 사용하도록 필요하면 변형될 수 있다.

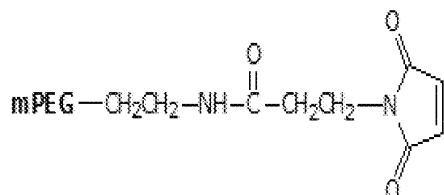
[0188]

이들 및 다른 변화는 상기-상세한 설명의 면에서 구현예에 실시될 수 있다. 일반적으로, 하기 청구범위에서, 사용된 용어는 명세서 및 청구범위에서 개시된 특이적 구현예에 청구범위를 제한하기 위해 해석되지 않아야 하지

만, 상기 청구범위가 언급되는 등가물의 전체 범위에 따라 모든 가능한 구현예를 포함하도록 해석되어야 한다. 따라서, 청구범위는 개시내용에 의해 제한되지 않는다.

도면

도면 1a

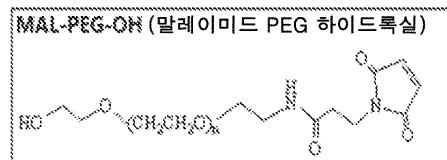
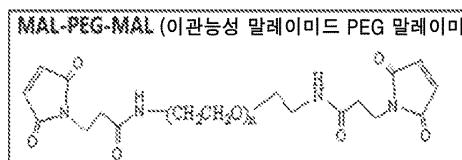
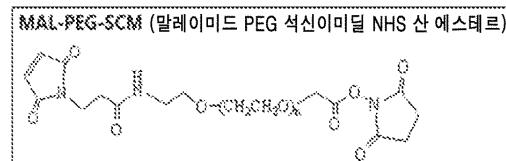
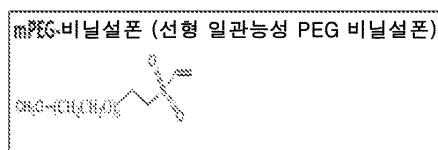
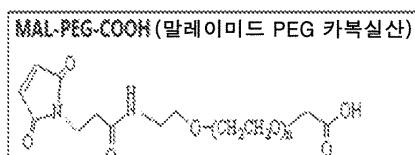
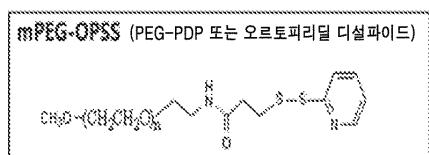
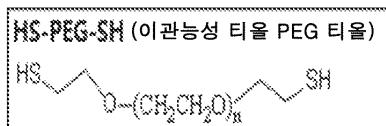
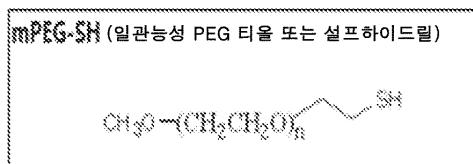
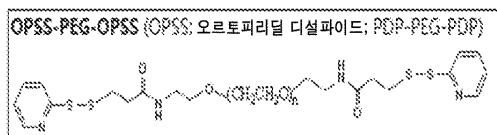
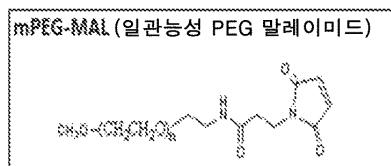


항목 코드	항목 번호	항목 설명
A3073-1	M-MAL-2000, 1g	메톡시 PEG 말레이미드, MW 2000
A3073-10	M-MAL-2000, 10g	메톡시 PEG 말레이미드, MW 2000
A3014-1	M-MAL-5000, 1g	메톡시 PEG 말레이미드, MW 5000
A3014-10	M-MAL-5000, 10g	메톡시 PEG 말레이미드, MW 5000
A3045-1	M-MAL-10K, 1g	메톡시 PEG 말레이미드, MW 10000
A3045-10	M-MAL-10K, 10g	메톡시 PEG 말레이미드, MW 10000
A3002-1	M-MAL-20K, 1g	메톡시 PEG 말레이미드, MW 20000
A3002-10	M-MAL-20K, 10g	메톡시 PEG 말레이미드, MW 20000
A3046-1	M-MAL-30K, 1g	메톡시 PEG 말레이미드, MW 30000
A3046-10	M-MAL-30K, 10g	메톡시 PEG 말레이미드, MW 30000
A3042-1	M-MAL-40K, 1g	메톡시 PEG 말레이미드, MW 40000
A3042-10	M-MAL-40K, 10g	메톡시 PEG 말레이미드, MW 40000

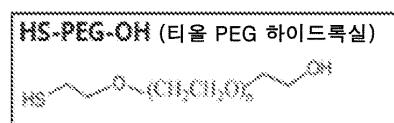
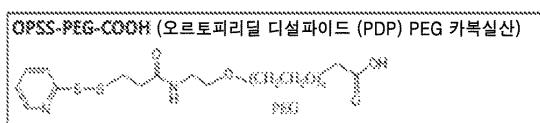
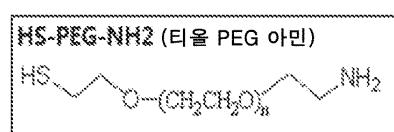
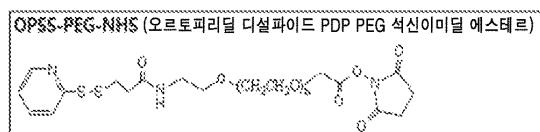
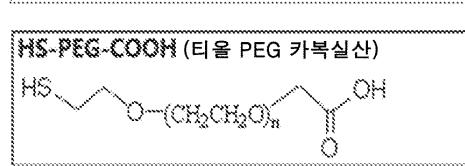
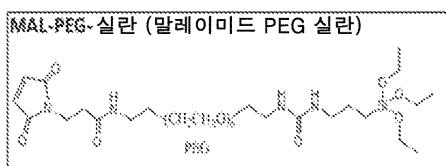
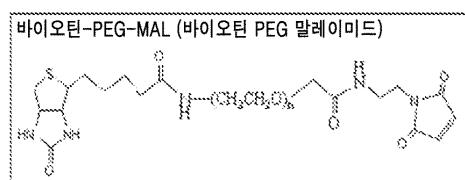
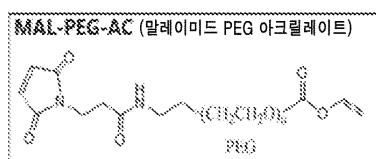
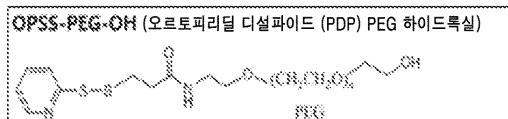
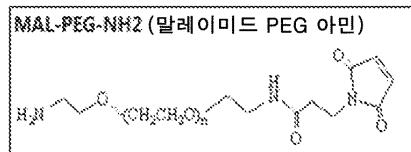
도면 1b

SUNBRIGHT® MA 시리즈 (말레이미드 PEGs)		
C2 유형		
<chem>CH2O-(CH2CH2O)n-CH2CH2CH2NHC(=O)CH2-N1C(=O)CC1</chem>		
생성물 명칭		MW
SUNBRIGHT ME-020MA		2,000
SUNBRIGHT ME-050MA		5,000
SUNBRIGHT ME-100MA New		10,000
SUNBRIGHT ME-120MA		12,000
SUNBRIGHT ME-200MA		20,000
SUNBRIGHT ME-300MA		30,000
SUNBRIGHT ME-400MA		40,000
C5 유형		
<chem>CH2O(CH2CH2O)n-(CH2)3NH-C(=O)(CH2)5-N1C(=O)CC1</chem>		
생성물 명칭	관능기	MW
SUNBRIGHT ME-050MA3 New		5,000
SUNBRIGHT ME-120MA3 New	말레이미드	12,000
SUNBRIGHT ME-200MA3 New	-{CH2}-NHCO-{CH2}-말레이미드	20,000
SUNBRIGHT ME-400MA3 New		40,000
SUNBRIGHT® IA 시리즈 (아이오도아세트아미드·PEG)		
<chem>CH2O(CH2CH2O)n-CH2CH2CH2-N=C(=O)CH3</chem>		
생성물 명칭		MW
SUNBRIGHT ME-200IA		20,000
SUNBRIGHT ME-300IA		30,000
SUNBRIGHT ME-400IA		40,000

도면1ca

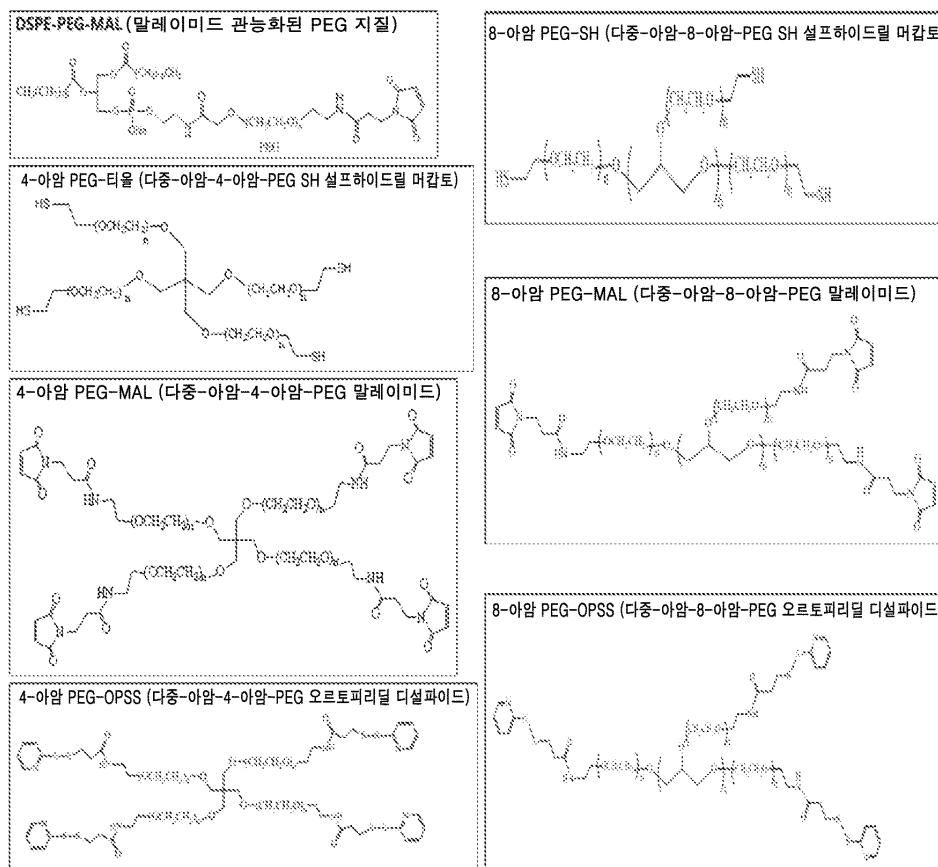


도면 1cb



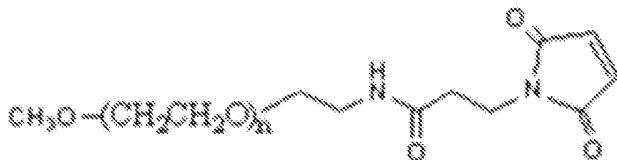
(계속)

도면1cc



(계속)

도면 1d

mPEG-MAL (일관능성 PEG 말레이미드)

PSB-230	mPEG-MAL, MW 30k
PJK-231	mPEG-MAL, MW 20k
PSB-233	mPEG-MAL, MW 10k
PLS-234	mPEG-MAL, MW 5k
PSB-235	mPEG-MAL, MW 2k
PSB-236	mPEG-MAL, MW 1k
PSB-237	mPEG-MAL, MW 550

서 열 목 록

SEQUENCE LISTING

<110> Polaris Group

Showalter, Richard E.

Almassy, Robert

Thomson, James A.

Sisson, Wes

Shia, Wei-Jong

Chen, Li-Chang

Lee, Yang

<120> ARGININE DEIMINASE WITH REDUCED CROSS-REACTIVITY TOWARD ADI - PEG

20 ANTIBODIES FOR CANCER TREATMENT

<130> POLA-005/01W0

<150> US 62,051,182

<151> 2014-09-16

<160> 28

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 409

<212> PRT

<213> Mycoplasma hominis

<400> 1

Met Ser Val Phe Asp Ser Lys Phe Asn Gly Ile His Val Tyr Ser Glu

1 5 10 15

Ile Gly Glu Leu Glu Thr Val Leu Val His Glu Pro Gly Arg Glu Ile

20 25 30

Asp Tyr Ile Thr Pro Ala Arg Leu Asp Glu Leu Leu Phe Ser Ala Ile

35 40 45

Leu Glu Ser His Asp Ala Arg Lys Glu His Gln Ser Phe Val Lys Ile

50 55 60

Met Lys Asp Arg Gly Ile Asn Val Val Glu Leu Thr Asp Leu Val Ala

65 70 75 80

Glu Thr Tyr Asp Leu Ala Ser Lys Ala Ala Lys Glu Glu Phe Ile Glu

85 90 95

Thr Phe Leu Glu Glu Thr Val Pro Val Leu Thr Glu Ala Asn Lys Lys

100 105 110

Ala Val Arg Ala Phe Leu Leu Ser Lys Pro Thr His Glu Met Val Glu

115 120 125

Phe Met Met Ser Gly Ile Thr Lys Tyr Glu Leu Gly Val Glu Ser Glu

130 135 140

Asn Glu Leu Ile Val Asp Pro Met Pro Asn Leu Tyr Phe Thr Arg Asp

145 150 155 160

Pro Phe Ala Ser Val Gly Asn Gly Val Thr Ile His Phe Met Arg Tyr

165 170 175

Ile Val Arg Arg Glu Thr Leu Phe Ala Arg Phe Val Phe Arg Asn

180 185 190

His Pro Lys Leu Val Lys Thr Pro Trp Tyr Tyr Asp Pro Ala Met Lys

195 200 205

Met Pro Ile Glu Gly Gly Asp Val Phe Ile Tyr Asn Asn Glu Thr Leu

210 215 220

Val Val Gly Val Ser Glu Arg Thr Asp Leu Asp Thr Ile Thr Leu Leu

225 230 235 240

Ala Lys Asn Ile Lys Ala Asn Lys Glu Val Glu Phe Lys Arg Ile Val

245 250 255

Ala Ile Asn Val Pro Lys Trp Thr Asn Leu Met His Leu Asp Thr Trp

260 265 270

Leu Thr Met Leu Asp Lys Asn Lys Phe Leu Tyr Ser Pro Ile Ala Asn

275 280 285

Asp Val Phe Lys Phe Trp Asp Tyr Asp Leu Val Asn Gly Ala Glu

290 295 300

Pro Gln Pro Gln Leu Asn Gly Leu Pro Leu Asp Lys Leu Leu Ala Ser

305 310 315 320

Ile Ile Asn Lys Glu Pro Val Leu Ile Pro Ile Gly Gly Ala Gly Ala

325 330 335

Thr Glu Met Glu Ile Ala Arg Glu Thr Asn Phe Asp Gly Thr Asn Tyr

340 345 350

Leu Ala Ile Lys Pro Gly Leu Val Ile Gly Tyr Asp Arg Asn Glu Lys

355 360 365

Thr Asn Ala Ala Leu Lys Ala Ala Gly Ile Thr Val Leu Pro Phe His

370 375 380

Gly Asn Gln Leu Ser Leu Gly Met Gly Asn Ala Arg Cys Met Ser Met

385 390 395 400

Pro Leu Ser Arg Lys Asp Val Lys Trp

405

<210> 2

<211> 410

<212> PRT

<213> Mycoplasma salivarium

<400> 2

Met Ser Val Phe Ser Ser Lys Phe Asn Gly Ile His Val Tyr Ser Glu

1	5	10	15
Ile	Gly	Leu	Glu
			Thr
		Val	Leu
			Val
			His
			Glu
			Pro
			Gly
			Lys
			Glu
			Ile
20		25	
			30
Asp Tyr Ile Thr Pro Ser Arg Leu Asp Glu Leu Leu Phe Ser Ala Ile			
35	40	45	
Leu	Glu	Ser	His
			Asp
			Ala
			Arg
			Lys
			Glu
			His
			Gln
			Glu
			Phe
			Val
			Ala
			Thr
50	55	60	
Leu	Lys	Lys	Glu
			Lys
			Ile
			Asn
			Val
			Val
			Glu
			Leu
			Thr
			Asp
			Leu
			Val
			Asp
			Gln
			Lys
			Thr
			Lys
			Asp
			Lys
			Leu
			Ile
			Asp
85	90	95	
Glu Phe Leu Glu Asp Ser Glu Pro Val Leu Thr Ala Glu Leu Lys Ala			
100	105	110	
Thr	Val	Lys	Lys
			Phe
			Leu
			Lys
			Ser
			Phe
			Lys
			Glu
			Thr
			Arg
			Lys
			Leu
			Ile
115	120	125	
Glu	Val	Met	Met
			Ala
			Gly
			Ile
			Thr
			Tyr
			Asp
			Leu
			Gly
			Ile
			Lys
			Ala
130	135	140	
Asp	Arg	Glu	Leu
			Ile
			Val
			Asp
			Pro
			Met
			Pro
			Asn
			Leu
			Tyr
			Phe
			Thr
			Arg
145	150	155	160
Asp Pro Phe Ala Ser Val Gly Asn Gly Val Thr Ile His Tyr Met Arg			
165	170	175	
Tyr	Lys	Val	Arg
			Gln
			Arg
			Glu
			Thr
			Leu
			Phe
			Ser
			Arg
			Phe
			Ile
			Phe
			Asn
			Asn
			Asn
			Asp
			Thr
180	185	190	
Asn	His	Pro	Lys
			Leu
			Val
			Lys
			Thr
			Pro
			Trp
			Tyr
			Tyr
			Asp
			Pro
			Ala
			Met
195	200	205	
Lys	Met	Ser	Ile
			Glu
			Gly
			Asp
			Val
			Phe
			Ile
			Tyr
			Asn
			Asn
			Asp
			Thr
210	215	220	
Leu	Val	Val	Gly
			Val
			Ser
			Glu
			Arg
			Thr
			Asp
			Leu
			Asp
			Thr
			Ile
225	230	235	240
Leu	Ala	Lys	Asn
			Ile
			Lys
			Ala
			Asn
			Lys
			Glu
			Cys
			Glu
			Phe
			Lys
			Arg
			Ile
245	250	255	

Val Ala Ile Asn Val Pro Lys Trp Thr Asn Leu Met His Leu Asp Thr
 260 265 270
 Trp Leu Thr Met Leu Asp Lys Asp Lys Phe Leu Tyr Ser Pro Ile Ala
 275 280 285

Asn Asp Ile Phe Lys Phe Trp Asp Tyr Asp Leu Val Asn Gly Gly Ala
 290 295 300
 Asn Pro Gln Pro Lys Asp Asn Gly Leu Pro Leu Asp Lys Leu Leu Lys
 305 310 315 320
 Ser Ile Ile Gly Lys Glu Pro Val Leu Ile Pro Ile Ala Gly His His
 325 330 335
 Ala Thr Glu Ile Glu Val Ala Arg Glu Thr His Phe Asp Gly Thr Asn
 340 345 350

Tyr Leu Ala Ile Arg Pro Gly Val Val Ile Gly Tyr Ala Arg Asn Glu
 355 360 365
 Lys Thr Asn Glu Ala Leu Lys Asp Ala Gly Ile Thr Val Leu Pro Phe
 370 375 380
 Lys Gly Asn Gln Leu Ser Leu Gly Met Gly Asn Ala Arg Cys Met Ser
 385 390 395 400
 Met Pro Leu Ser Arg Lys Asp Val Lys Trp
 405 410
 <210> 3
 <211> 411
 <212> PRT

<213> Mycoplasma spumans
 <400> 3
 Met Ser Val Phe Asp Ser Lys Phe Lys Gly Ile His Val Tyr Ser Glu
 1 5 10 15
 Ile Gly Glu Leu Glu Ser Val Leu Val His Glu Pro Gly Arg Glu Ile
 20 25 30
 Asp Tyr Ile Thr Pro Ala Arg Leu Asp Glu Leu Leu Phe Ser Ala Ile
 35 40 45
 Leu Glu Ser His Asp Ala Arg Lys Glu His Lys Gly Phe Val Ala Glu

50	55	60
Leu Lys Lys Gln Asn Val Asn Val Ile Glu Leu Thr Asp Leu Val Ala		
65	70	75
Glu Thr Tyr Glu Leu Ala Ser Lys Glu Ala Gln Ala Lys Leu Ile Glu		
85	90	95
Asp Phe Ile Glu Asp Ser Glu Pro Val Leu Asn Ala Glu Glu Ala Gln		
100	105	110
Ala Val Arg Lys Phe Leu Ser Glu Arg Lys Ser Thr Arg Glu Met Val		
115	120	125
Glu Tyr Met Met Ser Gly Leu Thr Lys Tyr Glu Leu Gly Leu Glu Ser		
130	135	140
Ala Asp Arg Glu Leu Ile Val Asp Pro Met Pro Asn Leu Tyr Phe Thr		
145	150	155
Arg Asp Pro Phe Ala Ser Val Gly Asn Gly Val Thr Ile His Tyr Met		
165	170	175
Lys Tyr Lys Val Arg Gln Arg Glu Thr Leu Phe Ala Lys Phe Val Phe		
180	185	190
Ser Asn His Pro Lys Leu Val Asn Thr Pro Arg Tyr Tyr Asp Pro Ser		
195	200	205
Met Lys Leu Pro Ile Glu Gly Asp Val Phe Ile Tyr Asn Asn Glu		
210	215	220
Thr Leu Val Val Gly Cys Ser Glu Arg Thr Glu Leu Glu Thr Ile Thr		
225	230	235
Leu Leu Ala Lys Asn Ile Lys Ala Asn Lys Glu Val Glu Phe Lys Arg		
245	250	255
Ile Val Ala Ile Asn Val Pro Lys Trp Thr Asn Leu Met His Leu Asp		
260	265	270
Thr Trp Leu Thr Met Leu Asp Lys Asp Lys Phe Leu Tyr Ser Pro Ile		
275	280	285
Ala Asn Asp Val Phe Lys Phe Trp Asp Tyr Asp Leu Val Asn Gly Gly		
290	295	300

Glu Glu Pro Gln Pro Val Glu Asn Gly Leu Pro Leu Glu Glu Leu Leu
 305 310 315 320

Ala Ser Ile Ile Asn Lys Lys Pro Thr Leu Ile Pro Ile Ala Gly Glu
 325 330 335

Gly Ala Thr His Ile Asp Val Glu Arg Glu Thr His Phe Asp Gly Thr
 340 345 350

Asn Tyr Leu Ala Ile Ala Pro Ala Leu Ile Ile Gly Tyr Ser Arg Asn
 355 360 365

Glu Lys Thr Asn Ala Ala Leu Glu Lys Ala Gly Ile Thr Val Leu Pro
 370 375 380

Phe His Gly Asn Gln Leu Ser Leu Gly Met Gly Asn Ala Arg Cys Met
 385 390 395 400

Ser Met Pro Leu Ser Arg Lys Asp Val Lys Trp
 405 410

<210> 4

<211> 410

<212> PRT

<213> Mycoplasma auris

<400> 4

Met Ser Val Phe Asp Ser Lys Phe Lys Gly Ile His Val Tyr Ser Glu
 1 5 10 15

Ile Gly Glu Leu Glu Thr Val Leu Val His Glu Pro Gly Arg Glu Ile
 20 25 30

Asp Tyr Ile Thr Pro Lys Arg Leu Asp Glu Leu Leu Phe Ser Ala Ile
 35 40 45

Leu Glu Ser His Glu Ala Arg Lys Glu His Lys Gln Phe Val Ala Glu
 50 55 60

Leu Lys Ala Asn Asp Ile Asn Val Val Glu Leu Thr Asp Leu Val Ala
 65 70 75 80

Glu Thr Tyr Asp Leu Val Ser Gln Glu Leu Lys Asp Lys Leu Ile Glu
 85 90 95

Glu Phe Leu Asp Asp Ser Tyr Pro Val Leu Thr Glu Glu His Lys Lys

100 105 110

Ala Val Arg Ser Phe Leu Lys Ser Arg Ser Ser Thr Arg Glu Leu Ile

115 120 125

Glu Tyr Met Met Ala Gly Ile Thr Lys Tyr Asp Leu Gly Ile Glu Ala

130 135 140

Glu Gly Asp Leu Ile Val Asp Pro Met Pro Asn Leu Tyr Phe Thr Arg

145 150 155 160

Asp Pro Phe Ala Ser Val Gly Asn Gly Val Thr Ile His Tyr Met Arg

165 170 175

Tyr Lys Val Arg Gln Arg Glu Thr Leu Phe Ser Arg Phe Ile Phe Asp

180 185 190

Asn His Pro Lys Leu Val Asn Thr Pro Arg Tyr Tyr Asp Pro Ser Leu

195 200 205

Lys Leu Ser Ile Glu Gly Asp Val Phe Ile Tyr Asn Asn Asp Thr

210 215 220

Leu Val Met Gly Val Ser Glu Arg Thr Asp Leu Glu Thr Val Thr Leu

225 230 235 240

Leu Ala Lys Asn Ile Val Ala Asn Lys Glu Cys Glu Phe Lys Arg Ile

245 250 255

Val Ala Ile Asn Val Pro His Trp Thr Asn Leu Met His Leu Asp Thr

260 265 270

Trp Leu Thr Met Leu Asp Lys Asp Lys Phe Leu Tyr Ser Pro Ile Ala

275 280 285

Asn Asp Tyr Phe Lys Phe Trp Asp Tyr Asp Leu Val Asn Gly Gly Ala

290 295 300

Glu Pro Gln Pro Val Val Asn Glu Leu Pro Leu Asp Lys Leu Leu Glu

305 310 315 320

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

325 330 335

Ala Ser Gln Ile Asp Leu Glu Arg Glu Thr His Phe Asp Gly Thr Asn

340	345	350
-----	-----	-----

Tyr Leu Val Leu Arg Pro Gly Val Val Val Gly Tyr Ala Arg Asn Glu

355	360	365
-----	-----	-----

Lys Thr Asn Ala Ala Leu Glu Ala Val Gly Ile Lys Val Leu Pro Phe

370	375	380
-----	-----	-----

Tyr Gly Asn Gln Leu Ser Leu Gly Met Gly Asn Ser Arg Cys Met Ser

385	390	395	400
-----	-----	-----	-----

Met Pro Leu Ser Arg Lys Asp Val Lys Trp

405	410
-----	-----

<210> 5

<211> 410

<212> PRT

<213> Mycoplasma hyosynoviae

<400> 5

Met Ser Val Phe Asn Ser Lys Phe Lys Gly Ile His Val Tyr Ser Glu

1	5	10	15
---	---	----	----

Ile Gly Asp Leu Glu Ser Val Leu Val His Glu Pro Gly Lys Glu Ile

20	25	30
----	----	----

Asp Tyr Ile Thr Pro Ser Arg Leu Asp Glu Leu Leu Phe Ser Ala Ile

35	40	45
----	----	----

Leu Glu Ser Asn Asp Ala Arg Lys Glu His Lys Glu Phe Val Glu Ile

50	55	60
----	----	----

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

65	70	75	80
----	----	----	----

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

85	90	95
----	----	----

Glu Tyr Ile Glu Asp Ser Glu Pro Val Val Asp Ala Lys Val Lys Pro

100	105	110
-----	-----	-----

Leu Val Lys Lys Leu Leu Gly Ile Lys Asp Thr Lys Glu Leu Val

115	120	125
-----	-----	-----

Lys Leu Met Met Ala Gly Ile Thr Lys Tyr Asp Leu Glu Ile Glu Ser

130	135	140													
Glu	Lys	Glu	Leu	Ile	Ile	Asp	Pro	Met	Pro	Asn	Leu	Tyr	Phe	Thr	Arg
145		150			155			160							
Asp	Pro	Phe	Ala	Ser	Val	Gly	Asn	Gly	Val	Thr	Ile	His	Tyr	Met	Arg
165		170			175										
Tyr	Lys	Val	Arg	Gln	Arg	Glu	Thr	Leu	Phe	Ser	Arg	Phe	Val	Phe	Arg
180		185			190										
Asn	His	Pro	Lys	Leu	Thr	Ser	Thr	Pro	Trp	Tyr	Tyr	Asp	Pro	Ala	Met
195		200			205										
Lys	Leu	Ser	Ile	Glu	Gly	Gly	Asp	Val	Phe	Ile	Tyr	Asn	Asn	Asp	Thr
210		215			220										
Leu	Val	Val	Gly	Val	Ser	Glu	Arg	Thr	Asp	Leu	Asp	Thr	Ile	Thr	Leu
225		230			235			240							
Leu	Ala	Lys	Asn	Ile	Lys	Ala	Asn	Lys	Glu	Cys	Glu	Phe	Lys	Arg	Ile
245		250			255										
Val	Ala	Ile	Asn	Val	Pro	Lys	Trp	Thr	Asn	Leu	Met	His	Leu	Asp	Thr
260		265			270										
Trp	Leu	Thr	Met	Leu	Asp	Lys	Asp	Lys	Phe	Leu	Tyr	Ser	Pro	Ile	Ala
275		280			285										
Asn	Asp	Ile	Phe	Lys	Phe	Trp	Asp	Tyr	Asp	Leu	Val	Asn	Gly	Gly	Ser
290		295			300										
Glu	Pro	Gln	Pro	Lys	Asp	Asn	Gly	Leu	Pro	Leu	Glu	Lys	Leu	Leu	Glu
305		310			315			320							
Ser	Ile	Ile	Gly	Lys	Lys	Pro	Val	Leu	Ile	Pro	Ile	Ala	Gly	Cys	Cys
325		330			335										
Ala	Ser	Asp	Ile	Glu	Ile	Ala	Arg	Glu	Thr	His	Phe	Asp	Gly	Thr	Asn
340		345			350										
Tyr	Leu	Ala	Ile	Lys	Pro	Gly	Val	Val	Ile	Gly	Tyr	Ala	Arg	Asn	Glu
355		360			365										
Lys	Thr	Asn	Lys	Ala	Leu	Glu	Lys	Ala	Gly	Ile	Lys	Val	Leu	Pro	Phe
370		375			380										

Lys Gly Asn Gln Leu Ser Leu Gly Met Gly Asn Ala Arg Cys Met Ser
 385 390 395 400
 Met Pro Leu Ser Arg Lys Asp Val Lys Trp
 405 410

<210> 6

<211> 409

<212> PRT

<213> Mycoplasma cloacale

<400> 6

Met Ser Val Phe Asp Lys Arg Phe Lys Gly Ile His Val Tyr Ser Glu
 1 5 10 15
 Ile Gly Glu Leu Gln Thr Val Leu Val His Glu Pro Gly Arg Glu Ile
 20 25 30

Asp Tyr Ile Thr Pro Ala Arg Leu Asp Glu Leu Leu Phe Ser Ala Ile
 35 40 45

Leu Glu Ser His Asp Ala Arg Lys Glu His Lys Glu Phe Val Lys Ile
 50 55 60

Leu Glu Ser Gln Gly Ile Asn Val Val Glu Leu Thr Asp Leu Ile Ala
 65 70 75 80
 Glu Thr Tyr Glu Leu Ala Ser Glu Glu Ala Lys Asp Asn Leu Ile Glu
 85 90 95

Glu Phe Leu Asp Glu Ser Glu Pro Val Leu Ser Glu Glu His Arg Ile
 100 105 110

Leu Val Arg Asn Phe Leu Lys Gly Ile Thr Lys Thr Lys Glu Leu Val
 115 120 125

Lys Met Met Met Ala Gly Ile Thr Lys Tyr Asp Leu Gly Ile Glu Ala
 130 135 140

Asp Arg Glu Leu Ile Val Asp Pro Met Pro Asn Leu Tyr Phe Thr Arg
 145 150 155 160

Asp Pro Phe Ala Ser Val Gly Asn Gly Val Thr Ile His Tyr Met Arg
 165 170 175

Tyr Lys Val Arg Gln Arg Glu Thr Leu Phe Ser Arg Phe Ile Phe Glu

180	185	190
Asn His Pro Lys Leu Val Ser Thr Pro Ile Tyr Tyr His Pro Ser Gln		
195	200	205
Gly Leu Ser Ile Glu Gly Gly Asp Val Phe Ile Tyr Asn Asn Asp Thr		
210	215	220
Leu Val Val Gly Val Ser Glu Arg Thr Asp Leu Gln Thr Ile Thr Leu		
225	230	235
Leu Ala Lys Asn Ile Lys Ala Asn Glu Glu Cys Glu Phe Lys Arg Ile		
245	250	255
Val Ala Ile Asn Val Pro Lys Trp Thr Asn Leu Met His Leu Asp Thr		
260	265	270
Trp Leu Thr Met Leu Asp Lys Asn Lys Phe Leu Tyr Ser Pro Ile Ala		
275	280	285
Asn Asp Val Phe Lys Phe Trp Asp Tyr Asp Leu Val Asn Gly Gly Asp		
290	295	300
Glu Pro Gln Pro Val Asp Asn Gly Leu Pro Leu Asn Glu Leu Leu Ala		
305	310	315
Ser Ile Ile Gly Glu Glu Pro Val Leu Val Pro Ile Ala Gly Glu Gly		
325	330	335
Ala Ser Lys Met Asp Ile Glu Arg Glu Thr His Phe Asp Gly Thr Asn		
340	345	350
Tyr Leu Ala Ile Ala Pro Gly Val Val Val Gly Tyr Ser Arg Asn Glu		
355	360	365
Lys Thr Asn Ala Ala Leu Glu Lys Ala Gly Ile Lys Val Leu Pro Phe		
370	375	380
Lys Gly His Gln Leu Ser Leu Gly Met Gly Asn Ala Arg Cys Met Ser		
385	390	395
Met Pro Leu Tyr Arg Lys Asp Val Lys		
405		
<210> 7		
<211> 412		
<212> PRT		

<

213> Mycoplasma alkalescens

<400> 7

Met Ser Val Phe Asp Ser Lys Phe Lys Gly Ile His Val Tyr Ser Glu

1 5 10 15

Ile Gly Glu Leu Glu Ser Val Leu Val His Glu Pro Gly His Glu Ile

20 25 30

Asp Tyr Ile Thr Pro Ser Arg Leu Asp Glu Leu Leu Phe Ser Ala Met

35 40 45

Leu Glu Ser His Asp Ala Arg Lys Glu His Lys Gln Phe Val Ala Glu

50 55 60

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

65 70 75 80

Glu Thr Tyr Asp Leu Ala Ser Gln Glu Ala Lys Asp Lys Leu Ile Glu

85 90 95

Glu Phe Leu Glu Asp Ser Glu Pro Val Leu Ser Glu Glu Asn Lys Ile

100 105 110

Ala Val Arg Asp Phe Leu Lys Ser Arg Lys Thr Thr Arg Glu Leu Ile

115 120 125

Glu Val Met Met Ala Gly Ile Thr Lys Tyr Asp Leu Gly Ile Lys Asn

130 135 140

Cys Lys Cys Gln Asp Leu Val Val Asp Pro Met Pro Asn Leu Tyr Phe

145 150 155 160

Thr Arg Asp Pro Phe Ala Ser Val Gly Asn Gly Ile Thr Ile His Tyr

165 170 175

Met Arg Tyr Lys Val Arg Gln Arg Glu Thr Leu Phe Ser Arg Phe Ile

180 185 190

Phe Ala Asn His Pro Lys Leu Val Asn Thr Pro Ile Tyr Tyr His Pro

195 200 205

Ser Leu Lys Leu Ser Ile Glu Gly Asp Val Phe Ile Tyr Asn Asn

210 215 220

Asp Thr Leu Val Val Gly Val Ser Glu Arg Thr Asp Leu Glu Thr Ile

225 230 235 240

Thr Leu Leu Ala Lys Asn Ile Val Ala Asn Lys Glu Cys Glu Phe Lys

245 250 255

Arg Ile Val Ala Ile Asn Val Pro Lys Trp Thr Asn Leu Met His Leu

260 265 270

Asp Thr Trp Leu Thr Met Leu Asp Lys Asp Lys Phe Leu Tyr Ser Pro

275 280 285

Ile Ala Asn Asp Val Phe Lys Phe Trp Asp Tyr Asp Leu Val Asn Gly

290 295 300

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

305 310 315 320

Leu Glu Ser Ile Ile His Lys Lys Pro Ile Leu Ile Pro Ile Gly Gly

325 330 335

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

340 345 350

Thr Asn Tyr Leu Ala Ile Arg Pro Gly Val Val Ile Gly Tyr Ser Arg

355 360 365

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

370 375 380

Pro Phe His Gly Asn Gln Leu Ser Leu Gly Met Gly Asn Ala Arg Cys

385 390 395 400

Met Ser Met Pro Leu Ser Arg Lys Asp Val Lys Trp

405 410

<210> 8

<211> 410

<212> PRT

<213> Mycoplasma orale

<400> 8

Met Ser Val Phe Ser Asp Lys Phe Asn Gly Ile His Val Tyr Ser Glu

1 5 10 15

Ile Gly Asp Leu Glu Ser Val Leu Val His Glu Pro Gly Lys Glu Ile

20	25	30
----	----	----

Asp Tyr Ile Thr Pro Ala Arg Leu Asp Glu Leu Leu Phe Ser Ala Ile

35	40	45
----	----	----

Leu Glu Ser Thr Asp Ala Arg Lys Glu His Lys Glu Phe Val Glu Ile

50	55	60
----	----	----

Leu Lys Lys Gln Gly Ile Asn Val Val Glu Leu Val Asp Leu Val Val

65	70	75	80
----	----	----	----

Glu Thr Tyr Asn Leu Val Asp Lys Lys Thr Gln Glu Lys Leu Leu Lys

85	90	95
----	----	----

Asp Phe Leu Asp Asp Ser Glu Pro Val Leu Ser Pro Glu His Arg Lys

100	105	110
-----	-----	-----

Ala Val Glu Lys Phe Leu Lys Ser Leu Lys Ser Thr Lys Glu Leu Ile

115	120	125
-----	-----	-----

Gln Tyr Met Met Ala Gly Ile Thr Lys Tyr Asp Leu Gly Ile Lys Ala

130	135	140
-----	-----	-----

Asp Lys Glu Leu Ile Val Asp Pro Met Pro Asn Leu Tyr Phe Thr Arg

145	150	155	160
-----	-----	-----	-----

Asp Pro Phe Ala Ser Val Gly Asn Gly Val Thr Ile His Tyr Met Arg

165	170	175
-----	-----	-----

Tyr Lys Val Arg Gln Arg Glu Thr Leu Phe Ser Lys Phe Ile Phe Thr

180	185	190
-----	-----	-----

Asn His Pro Lys Leu Val Lys Thr Pro Trp Tyr Tyr Asp Pro Ala Met

195	200	205
-----	-----	-----

Lys Leu Ser Ile Glu Gly Gly Asp Val Phe Ile Tyr Asn Asn Asp Thr

210	215	220
-----	-----	-----

Leu Val Val Gly Val Ser Glu Arg Thr Asp Leu Glu Thr Ile Thr Leu

225	230	235	240
-----	-----	-----	-----

Leu Ala Lys Asn Ile Lys Ala Asn Lys Glu Cys Glu Phe Lys Arg Ile

245	250	255
-----	-----	-----

Val Ala Ile Asn Val Pro Lys Trp Thr Asn Leu Met His Leu Asp Thr

260	265	270
-----	-----	-----

Trp Leu Thr Met Leu Asp Lys Asp Lys Phe Leu Tyr Ser Pro Ile Ala

275 280 285

Asn Asp Val Phe Lys Phe Trp Asp Tyr Asp Leu Val Asn Gly Gly Ser

290 295 300

Asn Pro Glu Pro Val Val Asn Gly Leu Pro Leu Asp Lys Leu Leu Glu

305 310 315 320

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

325 330 335

Ala Thr Glu Ile Glu Thr Ala Val Glu Thr His Phe Asp Gly Thr Asn

340 345 350

Tyr Leu Ala Ile Lys Pro Gly Val Val Val Gly Tyr Ser Arg Asn Val

355 360 365

Lys Thr Asn Ala Ala Leu Glu Ala Asn Gly Ile Lys Val Leu Pro Phe

370 375 380

Lys Gly Asn Gln Leu Ser Leu Gly Met Gly Asn Ala Arg Cys Met Ser

385 390 395 400

Met Pro Leu Ser Arg Lys Asp Val Lys Trp

405 410

<210> 9

<211> 401

<212> PRT

<213> Mycoplasma iners

<400> 9

Met Ser Lys Ile Asn Val Tyr Ser Glu Ile Gly Val Leu Lys Glu Val

1 5 10 15

Leu Val His Thr Pro Gly Asp Glu Ile Arg Arg Ile Ala Pro Ser Arg

20 25 30

Leu Asp Glu Leu Leu Phe Ser Ala Ile Leu Glu Pro Ser Ala Ala Ile

35 40 45

Gln Glu His Lys Ser Phe Leu Lys Ile Leu Gln Asp Arg Gly Ile Lys

50 55 60

Thr Ile Gln Leu Ser Asp Leu Val Ala Glu Thr Tyr Lys His Tyr Ala
 65 70 75 80
 Ser Glu Ala Glu Lys Glu Ala Phe Ile Glu Lys Tyr Leu Asp Glu Ala
 85 90 95
 Thr Pro Val Leu Ser Lys Asp Met Arg Ala Lys Val Lys Asn Tyr Ile
 100 105 110
 Leu Ser Met Gln Gly Glu Pro Val Lys Met Val Arg Thr Met Met Ala
 115 120 125

 Gly Val Ser Lys Gln Glu Leu Asn Val Glu Ser Glu Val Glu Leu Ile
 130 135 140
 Val Asp Pro Met Pro Asn Leu Tyr Phe Thr Arg Asp Pro Phe Ala Ser
 145 150 155 160
 Ala Gly Asn Gly Ile Ser Leu Asn Asn Met Lys Tyr Val Val Arg Lys
 165 170 175
 Arg Glu Thr Ile Phe Ala Glu Phe Ile Phe Ser Ile His Pro Glu Tyr
 180 185 190

 Lys Lys Thr Pro His Trp Phe Asp Arg Leu Asp Asn Gly Ser Ile Glu
 195 200 205
 Gly Gly Asp Val Phe Ile Tyr Asn Lys Asp Thr Leu Val Ile Gly Val
 210 215 220
 Ser Glu Arg Thr Asn Lys Glu Ala Ile Ile Thr Ile Ala Lys His Ile
 225 230 235 240
 Gln Asp Asn Lys Glu Ala Gln Phe Lys Lys Ile Val Ala Ile Asn Val
 245 250 255

 Pro Pro Met Pro Asn Leu Met His Leu Asp Thr Trp Leu Thr Met Val
 260 265 270
 Asp Lys Asn Lys Phe Leu Tyr Ser Pro Asn Met Leu Ser Val Leu Lys
 275 280 285
 Val Trp Glu Ile Asp Leu Ser Lys Pro Ile Glu Met Val Glu Thr Asn
 290 295 300
 Lys Pro Leu Ala Glu Val Leu Glu Ser Ile Ile Gly Glu Lys Pro Ile

305	310	315	320
-----	-----	-----	-----

Leu Ile Pro Ile Ala Gly Lys Asp Ala Thr Gln Leu Asp Ile Asp Ile

325	330	335
-----	-----	-----

Glu Thr His Phe Asp Gly Thr Asn Tyr Leu Thr Ile Ala Pro Gly Val

340	345	350
-----	-----	-----

Val Val Gly Tyr Ser Arg Asn Val Lys Thr Glu Ala Ala Leu Arg Ala

355	360	365
-----	-----	-----

Ala Gly Val Thr Val Leu Ser Phe Glu Gly Asn Gln Leu Ser Leu Gly

370	375	380
-----	-----	-----

Met Gly Ser Ala Arg Cys Met Ser Met Pro Leu Val Arg Glu Asp Val

385	390	395	400
-----	-----	-----	-----

Lys

<210> 10

<211> 401

<212> PRT

<213> *Mycoplasma gallinarum*

<400> 10

Met Ser Lys Ile Arg Val Tyr Ser Glu Ile Gly Asn Leu Lys Lys Val

1	5	10	15
---	---	----	----

Leu Val His Thr Pro Gly Asp Glu Ile Arg Arg Ile Ser Pro Ser Arg

20	25	30
----	----	----

Leu Glu Glu Leu Leu Phe Ser Ala Val Leu Glu Pro Asn Ala Ala Ile

35	40	45
----	----	----

Glu Glu His Lys Arg Phe Val Lys Leu Leu Glu Asp Arg Gly Ile Gln

50	55	60
----	----	----

Ala Ile Gln Leu Ser Asp Leu Val Ala Glu Thr Tyr Val Lys Tyr Ala

65	70	75	80
----	----	----	----

Thr Ala Glu Gln Lys Ala Ala Phe Ile Glu Lys Tyr Leu Asp Glu Ala

85	90	95
----	----	----

Thr Pro Ala Leu Ser Ala Glu Asn Arg Glu Arg Ala Lys Lys Tyr Ile

100	105	110
Leu Ser Leu Glu Met Gln Pro Val Lys Met Ile Arg Thr Met Met Ala		
115	120	125
Gly Leu Ser Lys Tyr Glu Leu Asn Val Glu Ser Asn Ile Glu Leu Ile		
130	135	140
Ile Asp Pro Met Pro Asn Leu Tyr Phe Thr Arg Asp Pro Phe Ala Ser		
145	150	155
Ala Gly Asn Gly Ile Ser Leu Asn Asn Met Lys Tyr Val Val Arg Lys		
165	170	175
Arg Glu Thr Ile Phe Ala Glu Phe Ile Phe Ala Ile His Pro Glu Tyr		
180	185	190
Lys Glu Thr Pro His Trp Phe Asp Arg Leu Asp His Gly Ser Ile Glu		
195	200	205
Gly Gly Asp Val Phe Val Tyr Asn Lys Asp Thr Leu Val Ile Gly Val		
210	215	220
Ser Glu Arg Thr Asn Lys Glu Ala Ile Ile Thr Ile Ala Lys His Ile		
225	230	235
Gln Asp Asn Lys Glu Ala Glu Phe Lys Lys Ile Val Ala Ile Asn Val		
245	250	255
Pro Pro Met Pro Asn Leu Met His Leu Asp Thr Trp Leu Thr Met Val		
260	265	270
Asp Lys Asn Lys Phe Ile Tyr Ser Pro Asn Met Leu Ser Val Leu Lys		
275	280	285
Ile Trp Glu Ile Asp Leu Ala Lys Pro Ile Glu Met Val Glu Ser Asn		
290	295	300
Lys Ser Leu Thr Glu Val Leu Glu Ser Ile Ile Gly Glu Lys Pro Ile		
305	310	315
Leu Ile Pro Ile Ala Gly Glu Gly Ala Ser Gln Leu Asp Ile Asp Ile		
325	330	335
Glu Thr His Phe Asp Gly Thr Asn Tyr Leu Thr Ile Ala Pro Gly Val		
340	345	350

Val Val Gly Tyr Ser Arg Asn Glu Lys Thr Glu Lys Ala Leu Lys Ala

355	360	365
Ala Gly Ile Thr Val Leu Ser Phe Glu Gly Asn Gln Leu Ser Leu Gly		
370	375	380
Met Gly Ser Ala Arg Cys Met Ser Met Pro Leu Val Arg Glu Asp Val		
385	390	395
Lys		400

<210> 11

<211> 405

<212> PRT

<213> Mycoplasma pirum

<400> 11

Met Asn Ser Asn Gln Lys Gly Ile His Val Tyr Ser Glu Ile Gly Lys

1	5	10	15
---	---	----	----

Leu Lys Glu Val Leu Val His Arg Pro Gly Arg Glu Leu Asp Phe Leu

20	25	30
----	----	----

Asp Pro Thr Arg Leu Asp Glu Leu Leu Phe Ala Ala Thr Leu Glu Ala

35	40	45
----	----	----

Glu Thr Ala Arg Leu Glu His Asp Asn Phe Thr Asn Ala Leu Lys Asn

50	55	60
----	----	----

Gln Gly Val Thr Val Ile Glu Leu Ala Asp Leu Val Ala Gln Thr Tyr

65	70	75	80
----	----	----	----

Ser Ser Ser Thr Pro Thr Ile Lys Ala Ala Phe Ile Asn Lys Tyr Leu

85	90	95
----	----	----

Asp Glu Ala Thr Pro Ala Leu Thr Thr Lys Leu Arg Thr Leu Val Lys

100	105	110
-----	-----	-----

Asp Phe Leu Thr Lys Gln Lys Ser Val Arg Lys Met Val Asp Tyr Met

115	120	125
-----	-----	-----

Ile Gly Gly Ile Leu Ser Thr Asp Leu Asn Ile Lys Gly Lys Pro Glu

130	135	140
-----	-----	-----

Leu Ile Val Glu Pro Met Pro Asn Ala Tyr Phe Thr His Asp Pro Phe
 145 150 155 160
 Ala Ser Val Gly Asn Gly Val Thr Leu His Tyr Met Lys His Asn Val
 165 170 175
 Arg Arg Arg Glu Val Leu Phe Ser Glu Phe Ile Phe Asn Asn Asn Glu
 180 185 190
 Arg Phe Gln Asn Thr Pro Arg Tyr Ile Val Pro Thr Lys Gly Leu Asp
 195 200 205

Ile Glu Gly Gly Asp Val Phe Val Tyr Asn Lys Asn Thr Leu Val Val
 210 215 220
 Gly Val Ser Glu Arg Thr Lys Met Val Thr Ile Lys Glu Leu Ala Lys
 225 230 235 240
 Asn Ile Leu Lys Asn Lys Glu Cys Leu Phe Lys Lys Ile Tyr Ala Ile
 245 250 255
 Asn Val Pro Lys Met Pro Asn Leu Met His Leu Asp Thr Trp Leu Thr
 260 265 270

Met Leu Asp His Asn Lys Phe Leu Tyr Ser Pro Asn Met Leu Ser Val
 275 280 285
 Leu Lys Ile Trp Glu Ile Asp Ile Ser Ser Gly Lys Ser Ile Ser Ser
 290 295 300
 Pro Lys Glu Leu Asn Met Asp Leu Ser Lys Ala Leu Ser Ile Ile Ile
 305 310 315 320
 Gly Lys Lys Pro Ile Leu Ile Pro Val Ala Gly Glu Asn Ala Ser Gln
 325 330 335

Ile Asp Ile Asn Ile Glu Thr Asn Phe Asp Ala Thr Asn Tyr Leu Val
 340 345 350
 Thr Gln Pro Gly Val Val Gly Tyr Ser Arg Asn Lys Lys Thr Glu
 355 360 365
 Ala Ala Leu Ile Lys Ala Gly Ile Glu Val Ile Pro Phe Gln Gly Asn
 370 375 380
 Gln Leu Ser Leu Gly Met Gly Ser Ala Arg Cys Met Ser Met Pro Leu

385	390	395	400
-----	-----	-----	-----

Ile Arg Glu Asp Val

405

<210> 12

<211> 404

<212> PRT

<213> Mycoplasma primatum

<400> 12

Met Ser Lys Ser Lys Ile Asn Val Tyr Ser Glu Tyr Gly Asn Leu Lys

1	5	10	15
---	---	----	----

Glu Val Leu Val His Thr Pro Gly Asp Glu Ile Arg Arg Ile Thr Pro

20	25	30
----	----	----

Ser Arg Leu Asp Glu Leu Leu Phe Ser Ala Ile Leu Glu Pro Lys Ser

35	40	45
----	----	----

Ala Ile Ala Glu His Lys Ser Phe Cys Gln Ile Leu Lys Asn Lys

50	55	60
----	----	----

Val Lys Ala Ile Gln Leu Asp Glu Leu Val Ala Ala Thr Tyr Lys Gly

65	70	75	80
----	----	----	----

Val Ser Glu Ser Val Gln Asn Ser Phe Val Glu Arg Trp Leu Asp Glu

85	90	95
----	----	----

Cys Glu Pro Lys Leu Glu Asn Asn Val Arg Pro Ile Val Lys Glu Tyr

100	105	110
-----	-----	-----

Leu Leu Lys Ala Ala Glu Gln Ser Val Lys Lys Met Ile Arg Ile Met

115	120	125
-----	-----	-----

Met Ala Gly Ile Asp Lys Arg Glu Ile Gly Val Glu Ser Glu Val Asp

130	135	140
-----	-----	-----

Phe Ile Val Asp Pro Met Pro Asn Leu Tyr Phe Thr Arg Asp Pro Phe

145	150	155	160
-----	-----	-----	-----

Ala Ser Val Gly Asn Gly Ile Thr Leu His His Met Lys Tyr Val Val

165	170	175
-----	-----	-----

Arg Gln Arg Glu Thr Leu Phe Ser Glu Phe Ile Phe Asp Asn His Pro

180	185	190
Asp Tyr Lys Phe Val Pro Arg Tyr Phe Asp Arg Asp Asp Glu Gly Lys		
195	200	205
Ile Glu Gly Gly Asp Val Phe Ile Tyr Asn Ser Lys Thr Leu Val Val		
210	215	220
Gly Ile Ser Glu Arg Thr Asn Lys Asp Ala Ile Arg Ile Val Ala Lys		
225	230	235
Lys Ile Gln Ala Asn Ala Asp Ala Lys Phe Glu Lys Ile Phe Ala Ile		
245	250	255
Asn Val Pro Pro Met Pro Asn Leu Met His Leu Asp Thr Trp Leu Thr		
260	265	270
Met Leu Asp Ser Asn Lys Phe Leu Tyr Ser Pro Asn Met Leu Ser Val		
275	280	285
Leu Lys Val Trp Glu Ile Asn Leu Asp Asp Pro Ala Leu Glu Trp Lys		
290	295	300
Glu Ile Ser Gly Ser Leu Glu Glu Ile Leu Thr Tyr Ile Ile Gly Lys		
305	310	315
320		
Lys Pro Ile Leu Ile Pro Ile Ala Gly Lys Gly Ala Ser Gln Phe Glu		
325	330	335
Ile Asp Ile Glu Thr His Phe Asp Gly Thr Asn Tyr Leu Ala Ile Ala		
340	345	350
Pro Ser Val Val Ile Gly Tyr Ser Arg Asn Glu Leu Thr Glu Lys Ala		
355	360	365
Leu Lys Lys Ala Gly Val Lys Val Leu Ser Leu Asp Gly Asn Gln Leu		
370	375	380
Ser Leu Gly Met Gly Ser Ala Arg Cys Met Ser Met Pro Leu Ile Arg		
385	390	395
400		
Glu Asp Val Lys		

<210> 13

<211> 401

<212> PRT

<213> Mycoplasma lipofaciens

<400> 13

Met Ser Lys Ile Asn Val Tyr Ser Glu Val Gly Val Leu Lys Glu Val

1 5 10 15

Leu Val His Thr Pro Gly Asp Glu Ile Arg Arg Val Ala Pro Ser Arg

20 25 30

Leu Asp Glu Leu Leu Phe Ser Ala Ile Leu Glu Pro Gln Asp Ala Ile

35 40 45

Ala Glu His Lys Arg Phe Ile Lys Ile Leu Glu Asp Asn Asn Ile Lys

50 55 60

Val Ile Gln Leu Asp Glu Leu Val Ser Glu Thr Trp Glu Lys Ala Thr

65 70 75 80

Ala Glu Gln Arg Asp Ala Phe Ile Glu Lys Trp Leu Asp Glu Ala Glu

85 90 95

Pro Val Leu Asp Ala Lys Leu Arg Glu Thr Val Lys Tyr Leu Leu

100 105 110

Ser Leu Asn Pro Val Lys Lys Met Val Arg Thr Met Met Ala Gly Ile

115 120 125

Asp Lys Lys Glu Leu Lys Ile Glu Leu Asp Arg Asp Leu Val Val Asp

130 135 140

Pro Met Pro Asn Leu Tyr Phe Thr Arg Asp Pro Phe Ala Ser Ala Gly

145 150 155 160

Asn Gly Ile Ser Leu Asn Asn Met Lys Tyr Val Thr Arg Lys Arg Glu

165 170 175

Thr Ile Phe Ala Glu Phe Ile Phe Asn Ile His Pro Asp Tyr Lys Thr

180 185 190

Thr Pro His Trp Phe Asp Arg Leu Asp Lys Gly Asn Ile Glu Gly Gly

195 200 205

Asp Val Phe Ile Tyr Asn Lys Asp Thr Leu Val Leu Gly Val Ser Glu

210 215 220

Arg Thr Asn Lys Asp Ala Val Met Thr Ile Ala Lys His Ile Gln Ser

225	230	235	240
Asn Glu Gln Ala Lys Phe Lys Lys Leu Val Ala Ile Asn Val Pro Pro			
245	250	255	
Met Pro Asn Leu Met His Leu Asp Thr Trp Leu Thr Met Val Asp His			
260	265	270	
Asp Lys Phe Leu Tyr Ser Pro Asn Met Leu Ser Val Leu Lys Ile Trp			
275	280	285	
Glu Ile Asp Leu Thr Pro Gly Glu Ile Glu Met Val Glu Ser Thr			
290	295	300	
Lys Ser Leu Ser Asp Met Leu Glu Ser Ile Ile Gly Lys Lys Pro Val			
305	310	315	320
Leu Ile Pro Ile Ala Gly Lys Asp Ala Ser Gln Leu Asp Ile Asp Ile			
325	330	335	
Glu Thr His Phe Asp Gly Thr Asn Tyr Leu Thr Ile Arg Pro Gly Val			
340	345	350	
Val Val Gly Tyr Ser Arg Asn Cys Leu Thr Glu Gln Ala Leu Lys Asp			
355	360	365	
Ala Gly Val Thr Val Leu Ser Phe Asp Gly Asn Gln Leu Ser Leu Gly			
370	375	380	
Met Gly Ser Ala Arg Cys Met Ser Met Pro Leu Val Arg Glu Asp Ile			
385	390	395	400

Lys

<210> 14

<211> 405

<212> PRT

<213> *Mycoplasma felifaucium*

<400> 14

Met Asn Lys Ile Asn Val Tyr Ser Glu Ile Gly Lys Leu Lys Glu Val

1	5	10	15
---	---	----	----

Leu Val His Thr Pro Gly Asn Glu Ile Arg Arg Ile Ser Pro Ser Arg

20	25	30
----	----	----

Leu Asp Glu Leu Leu Phe Ser Ala Leu Leu Glu Pro Asn Phe Ala Ala

35 40 45

Lys Glu His Thr Ala Phe Cys Glu Ile Leu Lys Glu Asn Gly Ile Lys

50 55 60

Ala Ile Gln Leu Val Asp Leu Val Ser Asp Thr Trp Arg Ile Ala Ser

65 70 75 80

Glu Lys Ala Lys Thr Glu Phe Ile Glu Arg Trp Leu Asp Glu Cys Glu

85 90 95

Pro Lys Leu Asp Ser Asn Leu Arg Glu Ile Val Arg Lys His Ile Tyr

100 105 110

Ala Ile Glu Lys Arg Ser Val Lys Arg Met Val Lys Thr Met Met Ala

115 120 125

Gly Ile Glu Arg Arg Glu Leu Pro Val Thr Ser Lys Glu Val Ala Arg

130 135 140

Glu Leu Val Val Asp Pro Met Pro Asn Leu Tyr Phe Thr Arg Asp Pro

145 150 155 160

Phe Ala Ser Val Gly Asn Gly Ile Ser Leu His His Met Lys Tyr Val

165 170 175

Thr Arg Gln Arg Glu Thr Ile Phe Ala Glu Phe Val Phe Gly Asn His

180 185 190

Pro Asp Tyr Ile Asp Thr Pro Arg Trp Phe Asp Arg Ser Asp Asp Gly

195 200 205

Arg Ile Glu Gly Gly Asp Val Phe Ile Tyr Gly Ser Lys Thr Leu Val

210 215 220

Ile Gly Val Ser Glu Arg Thr Asn Lys Glu Ala Ile Lys Val Met Ala

225 230 235 240

Lys Lys Ile Gln Ala Asn Lys Glu Ala Thr Phe Glu Lys Ile Tyr Ala

245 250 255

Ile Asn Val Pro Pro Met Pro Asn Leu Met His Leu Asp Thr Trp Leu

260 265 270

Thr Met Leu Asp Lys Asn Lys Phe Leu Tyr Ser Pro Asn Met Leu Ala

275

280

285

Val Leu Gln Val Trp Glu Ile Asp Leu Lys Asp Pro Glu Leu Thr Trp

290

295

300

His Glu Leu Ser Gly Ser Leu Glu Glu Ile Leu His Lys Ile Ile Gly

305 310 315 320

Arg Lys Pro Ile Leu Ile Pro Ile Ala Gly His Gly Ala Gln Gln Ile

325

330

335

Asp Ile Asp Ile Glu Thr His Phe Asp Gly Thr Asn Tyr Leu Ala Ile

340

345

350

Ala Pro Gly Val Val Val Gly Tyr Asn Arg Asn Val Leu Thr Glu Arg

355

360

365

Ala Leu Lys Lys Ala Gly Ile Lys Val Leu Ser Phe Glu Gly Asn Gln

370

375

380

Leu Ser Leu Gly Met Gly Ser Ala Arg Cys Met Ser Met Pro Leu Ile

385 390 395 400

Arg Glu Asn Leu Lys

405

<210> 15

<211> 404

<212> PRT

<213> Mycoplasma imitans

<400> 15

Met Phe Asn Lys Ile Lys Val Tyr Ser Glu Ile Gly Arg Leu Arg Lys

1 5 10 15

Val Leu Val His Thr Pro Gly Lys Glu Leu Glu Tyr Val Thr Pro Gln

20

25

30

Arg Leu Asp Glu Leu Leu Phe Ser Ser Leu Leu Asn Pro Val Lys Ala

35

40

45

Arg Gln Glu His Glu Ala Phe Ile Lys Ile Leu Gln Asp Gln Gly Val

50

55

60

Glu Cys Val Gln Leu Thr Thr Leu Thr Ala Gln Thr Phe Gln Ser Ala

65 70 75 80

Thr Ser Glu Val Lys Glu Lys Phe Ile Asn Arg Trp Leu Asp Glu Cys

85 90 95

Leu Pro Lys Leu Ser Asp Asp Asn Arg Ile Lys Val Tyr Ala Tyr Leu

100 105 110

Lys Asp Leu Ser Ser Asp Pro Glu Val Met Ile Arg Lys Met Met Ser

115 120 125

Gly Ile Leu Ala Lys Glu Val Asn Val Gln Ser Asp Val Glu Leu Ile

130 135 140

Ala Asp Pro Met Pro Asn Leu Tyr Phe Thr Arg Asp Pro Phe Ala Ser

145 150 155 160

Ile Gly Gly Val Thr Leu His Ser Met Phe His Pro Thr Arg Lys

165 170 175

Arg Glu Thr Ile Phe Ala Asp Phe Val Phe Ser His His Pro Glu Tyr

180 185 190

Lys Gln Thr Pro Lys Tyr Tyr Ser Arg Leu Asn Glu Tyr Ser Ile Glu

195 200 205

Gly Gly Asp Leu Phe Val Tyr Asp Asp Lys Thr Leu Val Ile Gly Val

210 215 220

Ser Glu Arg Thr Glu Lys Lys Ala Ile Gln Phe Leu Ala Glu Lys Leu

225 230 235 240

Arg Glu Asn Tyr Glu Thr Thr Phe Glu Lys Ile Tyr Ala Ile Asn Val

245 250 255

Pro Lys Met Ser Asn Leu Met His Leu Asp Thr Trp Leu Thr Met Leu

260 265 270

Asp Tyr Asp Lys Phe Leu Tyr Ser Pro Asn Met Met Gly Val Leu Lys

275 280 285

Ile Trp Glu Ile Asp Leu Thr His Glu Gln Leu Ser Trp Arg Glu Leu

290 295 300

Asn Glu Ser Leu Glu Glu Phe Leu Ser Met Val Ile Gly Lys Lys Ala

305 310 315 320

Thr Thr Ile Pro Val Ala Gly Glu Asp Ser Thr Gln Ile Glu Ile Asp

325 330 335

Val Glu Thr Asn Phe Asp Ala Thr Asn Phe Leu Val Ile Gln Pro Gly

340 345 350

Val Val Val Gly Tyr Asp Arg Asn Tyr Lys Thr Asn Gln Ala Leu Val

355 360 365

Asn Ala Gly Ile Lys Val Leu Ser Trp Asn Gly Asp Gln Leu Ser Leu

370 375 380

Gly Met Gly Ser Ala Arg Cys Met Ser Met Pro Leu Tyr Arg Asp Pro

385 390 395 400

Ile Lys Lys Gly

<210> 16

<211> 401

<212> PRT

<213> Mycoplasma opalescens

<400> 16

Met Ser Lys Ile Asn Val Tyr Ser Glu Ile Gly Thr Leu Lys Glu Val

1 5 10 15

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

20 25 30

Leu Asp Glu Leu Leu Phe Ser Ala Ile Leu Glu Pro Asn His Ala Ile

35 40 45

Ala Glu His Lys Ala Phe Ile Lys Ile Leu Glu Asp Asn Gly Ile Lys

50 55 60

Val Ile Gln Leu Asp Glu Leu Val Val Gln Thr Trp Asn Gln Val Asp

65 70 75 80

Glu Ala Thr Arg Lys Ala Phe Val Thr Lys Trp Leu Asp Glu Cys Glu

85 90 95

Pro Lys Leu Glu Ser Asn Val Arg Val Glu Val Glu Lys Tyr Ile Tyr

100 105 110

Ser Leu Ala Lys Glu Pro Lys Lys Met Val Arg Thr Met Met Ala Gly

115 120 125

Ile Ser Lys Glu Glu Leu Pro Leu Asn Val Asn Arg Pro Leu Val Val

130 135 140

Asp Pro Met Pro Asn Leu Tyr Phe Thr Arg Asp Pro Phe Ala Ser Val

145 150 155 160

Gly Thr Gly Ile Ser Leu His His Met Lys Tyr Val Thr Arg Gln Arg

165 170 175

Glu Thr Ile Phe Ala Gln Phe Val Phe Asp Asn His Lys Asp Tyr Asn

180 185 190

Thr Val Pro Arg Trp Phe Asp Asn Lys Asp Gln Gly Arg Ile Glu Gly

195 200 205

Gly Asp Val Phe Ile Tyr Asn Thr Lys Thr Leu Val Ile Gly Val Ser

210 215 220

Glu Arg Thr Asp Lys Asp Ala Ile Lys Ile Met Ala Lys Lys Ile Gln

225 230 235 240

Ala Asp Lys Asn Cys Lys Phe Glu Lys Ile Phe Ala Ile Asn Val Pro

245 250 255

Pro Met Pro Asn Leu Met His Leu Asp Thr Trp Leu Thr Met Val Asp

260 265 270

Arg Asn Lys Phe Leu Tyr Ser Pro Asn Met Leu Ser Val Leu Lys Val

275 280 285

Trp Glu Ile Asp Leu Lys Asp Ala Ser Leu Ala Trp Lys Glu Ile Glu

290 295 300

Gly Ser Leu Ser Gln Ile Leu Glu Lys Ile Ile Gly Glu Lys Pro Ile

305 310 315 320

Leu Ile Pro Ile Ala Gly Glu Asn Ala Ser Gln Leu Asp Ile Asp Ile

325 330 335

Glu Thr His Phe Asp Gly Thr Asn Tyr Leu Thr Ile Ala Pro Gly Val

340 345 350

Val Val Gly Tyr Ser Arg Asn Val Lys Thr Glu Gln Ala Leu Lys Ala

355 360 365

Ala Gly Val Lys Val Leu Ser Phe Glu Gly Asn Gln Leu Ser Leu Gly

370	375	380	
Met Gly Ser Ala Arg Cys Met Ser Met Pro Leu Ile Arg Glu Asp Leu			
385	390	395	400
Lys			

<210> 17

<211> 431

<212> PRT

<213> Mycoplasma moatsii

<400> 17

Met Gly Ile Lys Lys Ile Met Lys Lys Asn Ala Ile Asn Val Tyr Ser			
1	5	10	15
Glu Ile Gly Lys Leu Lys Lys Val Leu Val His Arg Pro Gly Asp Glu			
20	25	30	

Leu Lys Tyr Val Thr Pro Gln Arg Met Asp Glu Leu Leu Met Ser Ala

35	40	45	
----	----	----	--

Ile Ile Glu Leu Glu Gln Ala Lys Glu Glu His Asp Ala Phe Thr Lys

50	55	60	
----	----	----	--

Ile Leu Arg Asp Asn Gly Val Glu Val Ile Glu Leu Ala Asp Leu Thr

65	70	75	80
----	----	----	----

Ala Glu Met Tyr Asp Ser Leu Thr Pro Ser Glu Lys Asp Ala Phe Leu

85	90	95	
----	----	----	--

Asn Gln Trp Val Lys Glu Ala Ser Trp Gly Lys Lys Ser Ser Ile Asp

100	105	110	
-----	-----	-----	--

Ala Leu Lys Ile Lys Lys Asn Leu Ser Lys Lys Val Phe Asp Tyr Val

115	120	125	
-----	-----	-----	--

Lys Ser Ile Lys Pro Thr Arg Lys Met Ile Asp Lys Leu Met Ala Gly

130	135	140	
-----	-----	-----	--

Val Leu Leu Ser Glu Ile Gly Glu Lys Ser Ile Ile Leu Asn Lys Asp

145	150	155	160
-----	-----	-----	-----

Lys Lys Asn Glu Met Val Ile Asp Leu Val Val Asp Pro Met Pro Asn

165 170 175

Leu Tyr Phe Thr Arg Asp Pro Phe Ala Ser Val Gly Asn Gly Ile Thr

180 185 190

Leu His Asn Met Lys Tyr Pro Thr Arg Lys Arg Glu Thr Ile Phe Ala

195 200 205

Gln Trp Ile Phe Asn Lys His Pro Glu Tyr Lys Asp Val Pro Gln Phe

210 215 220

Ile Ser Lys Arg Asp Gly Lys Glu Thr Ile Glu Gly Gly Asp Val Phe

225 230 235 240

Ile Tyr Thr Lys Asp Val Leu Ala Ile Gly Val Ser Glu Arg Thr Asn

245 250 255

Met Glu Ala Ile Leu Arg Ile Ala Thr Asn Ile Lys Lys Asp Lys Asn

260 265 270

Cys Glu Phe Lys Lys Ile Val Ala Ile Asn Val Pro Pro Met Gly Asn

275 280 285

Leu Met His Leu Asp Thr Trp Leu Thr Met Leu Asp Lys Asp Leu Phe

290 295 300

Leu Tyr Ser Gly Asn Ile Lys Ser Ala Leu Lys Val Trp Glu Ile Asp

305 310 315 320

Leu Thr Lys Pro Ile Thr Pro Lys Ser Pro Lys Leu Ser Thr Ala Lys

325 330 335

Leu Ala Asp Ile Leu Ala Lys Ile Val Gly Lys Lys Val Arg Met Ile

340 345 350

Pro Ile Gly Gly Lys Asp Gly Asn Gln Met Asp Ile Asp Ile Glu Thr

355 360 365

His Phe Asp Gly Thr Asn Tyr Leu Ala Ile Ala Pro Gly Val Val Val

370 375 380

Gly Tyr His Arg Asn Arg Lys Thr Gln Lys Ala Leu Glu Glu Ala Gly

385 390 395 400

Val Lys Val Leu Ala Phe Gln Gly Asn Gln Leu Ser Leu Gly Met Gly

405 410 415

Ser Ala Arg Cys Met Ser Met Pro Leu Val Arg Glu Glu Val Lys

420 425 430

<210> 18

<211> 399

<212> PRT

<213> Mycoplasma elephantis

<400> 18

Met Ser Gln Ile Asn Val Phe Ser Glu Ile Gly Gln Leu Lys Glu Val

1 5 10 15

Leu Val His Thr Pro Gly Asp Glu Ile Arg Arg Ile Ser Pro Lys Arg

20 25 30

Tyr Asn Glu Leu Leu Phe Ser Ala Ile Leu Glu Ala Asp Val Ala Ile

35 40 45

Lys Glu His Lys Ser Phe Val Lys Ile Leu Glu Glu Asn Asn Val Lys

50 55 60

Val Ile Gln Leu Lys Asp Ile Leu Leu Glu Thr Trp Asn Ile Cys Ser

65 70 75 80

Lys Glu Ala Lys Asn Ile Phe Ile Asn Lys Trp Ile Glu Glu Ala Gln

85 90 95

Pro Val Ile His Ser Ser Leu Lys Glu Lys Ile Lys Leu Phe Leu

100 105 110

Lys Ser Lys Thr Pro Leu Glu Ile Ile Asp Ile Met Met Lys Gly Ile

115 120 125

Leu Lys Gln Glu Leu Gly Ile Glu Tyr Lys His Glu Leu Ile Ile Asp

130 135 140

Pro Met Pro Asn Leu Tyr Phe Thr Arg Asp Pro Phe Thr Ser Met Gly

145 150 155 160

Ser Gly Ile Thr Ile Asn Asn Met Lys Tyr Gln Thr Arg Lys Arg Glu

165 170 175

Thr Ile Phe Ser Glu Phe Ile Phe Asn Asn His Pro Lys Tyr Lys Asn

180	185	190
Thr Pro Arg Trp Phe Asp Arg Phe Asp Ser Gly Asn Ile Glu Gly Gly		
195	200	205
Asp Leu Phe Val Tyr Thr Lys Glu Thr Ile Val Val Gly Val Ser Glu		
210	215	220
Arg Thr Lys Lys Ala Ile Leu Lys Ile Ala Lys Asn Ile Gln Glu		
225	230	235
Asn Asn Asn Ser Phe Lys Lys Ile Val Val Ile Lys Val Pro Ile Met		
245	250	255
Gln Asn Leu Met His Leu Asp Thr Trp Ile Val Met Val Asp Phe Asp		
260	265	270
Lys Phe Ile Tyr Ser Pro Asn Val Thr Lys Ser Leu Lys Phe Trp Glu		
275	280	285
Ile Asp Leu Thr Lys Pro Lys Phe Ile Gln Leu Lys Asn Glu Thr		
290	295	300
Leu Glu Asp Val Leu Tyr Arg Val Ile Gly Lys Lys Pro Ile Leu Ile		
305	310	315
Pro Val Ala Gly Glu Asn Ala Asn Gln Ile Asp Ile Asp Val Glu Thr		
325	330	335
His Phe Asp Ala Thr Asn Tyr Leu Thr Ile Arg Pro Gly Val Val Val		
340	345	350
Gly Tyr Ser Arg Asn Lys Lys Thr Glu Glu Ala Leu Ile Asn Ala Gly		
355	360	365
Val Lys Val Tyr Ala Phe Glu Gly Asn Gln Leu Ser Leu Gly Met Gly		
370	375	380
Ser Ala Arg Cys Met Ser Met Pro Leu Ile Arg Glu Asp Ile Ile		
385	390	395
<210> 19		
<211> 399		
<212> PRT		
<213> Mycoplasma testudinis		
<400> 19		

Met Lys Asn Ile Asn Val Tyr Ser Glu Val Gly Lys Leu Lys Glu Val

1 5 10 15

Val Val His Thr Pro Gly Glu Glu Leu His Asn Val Ala Pro Ser Arg

20 25 30

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

35 40 45

Lys Glu His Leu Lys Phe Ile Lys Ile Leu Asn Asp Tyr Gly Val Lys

50 55 60

Val Ile Gln Ile Val Asp Leu Ile Thr Glu Thr Tyr Glu Ala Val Asp

65 70 75 80

Ser Asn Lys Lys Glu Ala Phe Ile Asn Asn Trp Leu Asp Asn Ser Val

85 90 95

Pro Lys Leu Thr Asp Lys Asn Arg Met Ile Leu Arg Asn Tyr Leu Thr

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

Met Pro Asn Leu Cys Phe Ala Arg Asp Thr Phe Ala Cys Val Gly Ser

145 150 155 160

Ala Ile Ser Leu Ser Thr Met Lys His Pro Thr Arg Arg Glu Ala

165 170 175

Leu Leu Thr Glu Phe Ile Phe Gln Asn His Pro Lys Tyr Lys Asp Val

180 185 190

Ile Lys Tyr Phe Asp Ser Lys Asn Ser Lys Ala Thr Ile Glu Gly Gly

195 200 205

Asp Ile Phe Val Tyr Asn Pro Lys Thr Leu Val Val Gly Asn Ser Glu

210 215 220

Arg Thr Asn Met Gln Ala Cys Leu Leu Leu Ala Lys Lys Ile Gln Ser

225 230 235 240

Asn Pro Asn Asn Lys Phe Glu Lys Ile Val Ile Val Asn Val Pro Pro

245 250 255

Leu Pro His Leu Met His Leu Asp Thr Trp Leu Thr Met Val Asp Tyr

260 265 270

Asp Lys Phe Ile Tyr Ser Pro Asn Ile Leu His Thr Leu Lys Phe Trp

275 280 285

Val Ile Asp Leu Lys Lys Arg Lys Leu Glu Ala Val Glu Lys His Asn

290 295 300

Thr Leu Lys Ala Met Leu Arg Met Ile Ile Lys Lys Glu Pro Ile Leu

305 310 315 320

Ile Pro Val Gly Asp Val Gly Ala Asp Gln Leu Asp Ile Asp Leu Glu

325 330 335

Thr His Phe Asp Ala Thr Asn Tyr Leu Ala Leu Ala Pro Gly Val Val

340 345 350

Val Gly Tyr Asp Arg Asn Ile Lys Thr Gln Arg Ala Leu Glu Lys Ala

355 360 365

Gly Val Lys Val Leu Ser Phe Ser Gly Asn Gln Leu Ser Leu Ala Met

370 375 380

Gly Ser Ala Arg Cys Leu Ser Met Pro Leu Ile Arg Glu Glu Asn

385 390 395

<210> 20

<211> 410

<212> PRT

<213> Mycoplasma canadense

<400> 20

Met Ser Val Phe Asp Ser Lys Phe Lys Gly Ile His Val Tyr Ser Glu

1 5 10 15

Ile Gly Glu Leu Glu Ser Val Leu Val His Glu Pro Gly Arg Glu Ile

20 25 30

Asp Tyr Ile Thr Pro Ala Arg Leu Asp Glu Leu Leu Phe Ser Ala Ile

35 40 45

Leu Glu Ser His Asp Ala Arg Lys Glu His Lys Gln Phe Val Ser Glu

50	55	60
Leu Lys Ala Asn Asp Ile Asn Val Val Glu Leu Thr Asp Leu Val Ala		
65	70	75
Glu Thr Tyr Asp Leu Ala Ser Gln Glu Ala Lys Asp Lys Leu Ile Glu		
85	90	95
Glu Phe Leu Glu Asp Ser Glu Pro Val Leu Ser Glu Glu His Lys Ala		
100	105	110
Ile Val Arg Lys Tyr Leu Lys Gly Ile Gln Pro Thr Arg Lys Leu Ile		
115	120	125
Glu Met Met Met Ala Gly Ile Thr Lys Tyr Asp Leu Gly Ile Glu Ala		
130	135	140
Asp His Glu Leu Ile Val Asp Pro Met Pro Asn Leu Tyr Phe Thr Arg		
145	150	155
Asp Pro Phe Ala Ser Val Gly Asn Gly Val Thr Ile His Tyr Met Arg		
165	170	175
Tyr Lys Val Arg Gln Arg Glu Thr Leu Phe Ser Arg Phe Val Phe Ser		
180	185	190
Asn His Pro Lys Leu Val Asn Thr Pro Trp Tyr Tyr Asp Pro Ser Leu		
195	200	205
Lys Leu Ser Ile Glu Gly Asp Val Phe Val Tyr Asn Asn Asp Thr		
210	215	220
Leu Val Val Gly Val Ser Glu Arg Thr Asp Leu Gln Thr Val Thr Leu		
225	230	235
Leu Ala Lys Asn Ile Val Ala Asn Lys Glu Cys Glu Phe Lys Arg Ile		
245	250	255
Val Ala Ile Asn Val Pro Lys Trp Thr Asn Leu Met His Leu Asp Thr		
260	265	270
Trp Leu Thr Met Leu Asp Lys Asp Lys Phe Leu Tyr Ser Pro Ile Ala		
275	280	285
Asn Asp Val Phe Lys Phe Trp Asp Tyr Asp Leu Val Asn Gly Gly Ser		
290	295	300

Glu Pro Gln Pro Val Glu Asn Gly Leu Pro Leu Glu Gly Leu Leu Glu

305 310 315 320

Ser Ile Ile Asn Lys Lys Pro Ile Leu Ile Pro Ile Ala Gly Glu Gly

325 330 335

Ala Ser Gln Met Glu Ile Glu Arg Glu Thr His Phe Asp Gly Thr Asn

340 345 350

Tyr Leu Ala Ile Arg Pro Gly Val Val Ile Gly Tyr Ser Arg Asn Glu

355 360 365

Lys Thr Asn Ala Ala Leu Glu Ala Ala Gly Ile Lys Val Leu Pro Phe

370 375 380

His Gly Asn Gln Leu Ser Leu Gly Met Gly Asn Ala Arg Cys Met Ser

385 390 395 400

Met Pro Leu Ser Arg Lys Asp Val Lys Trp

405 410

<210> 21

<211> 409

<212> PRT

<213> Mycoplasma anseris

<400> 21

Met Ser Val Phe Asp Lys Arg Phe Lys Gly Ile His Val Tyr Ser Glu

1 5 10 15

Ile Gly Glu Leu Gln Thr Val Leu Val His Glu Pro Gly Arg Glu Ile

20 25 30

Asp Tyr Ile Thr Pro Ala Arg Leu Asp Glu Leu Leu Phe Ser Ala Ile

35 40 45

Leu Glu Ser His Asp Ala Arg Ala Glu His Lys Lys Phe Val Ala Thr

50 55 60

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

65 70 75 80

Glu Thr Tyr Asp Leu Ala Ser Gln Glu Ala Arg Asp Asn Leu Leu Glu

85 90 95

Glu Phe Leu Asp Asp Ser Ala Pro Val Leu Ser Glu Glu His Lys Glu
 100 105 110
 Ile Val Arg Thr Tyr Leu Lys Gly Ile Lys Gly Thr Arg Lys Leu Ile
 115 120 125
 Glu Thr Met Met Ala Gly Ile Thr Lys Tyr Asp Leu Gly Ile Glu Ala
 130 135 140
 Glu Gln Glu Leu Ile Val Asp Pro Met Pro Asn Leu Tyr Phe Thr Arg
 145 150 155 160
 Asp Pro Phe Ala Ser Val Gly Asn Gly Val Thr Ile His Tyr Met Arg
 165 170 175
 Tyr Lys Val Arg Gln Arg Glu Thr Leu Phe Ser Arg Phe Ile Phe Ser
 180 185 190
 Asn His Pro Gln Leu Val Asn Thr Pro Trp Tyr Tyr Asn Pro Ala Glu
 195 200 205
 Gly Leu Ser Ile Glu Gly Asp Val Phe Ile Tyr Asn Asn Asp Thr
 210 215 220
 Leu Val Val Gly Val Ser Glu Arg Thr Asp Leu Gln Thr Ile Thr Leu
 225 230 235 240
 Leu Ala Lys Asn Ile Lys Ala Asn Glu Glu Cys Glu Phe Lys Arg Ile
 245 250 255
 Val Ala Ile Asn Val Pro Lys Trp Thr Asn Leu Met His Leu Asp Thr
 260 265 270
 Trp Leu Thr Met Leu Asp Thr Asn Lys Phe Leu Tyr Ser Pro Ile Ala
 275 280 285
 Asn Asp Val Phe Lys Phe Trp Asp Tyr Asp Leu Val Asn Gly Gly Asp
 290 295 300
 Glu Pro Gln Pro Val Asp Asn Gly Leu Pro Leu Asn Glu Leu Leu Lys
 305 310 315 320
 Ser Ile Ile Gly Glu Pro Ile Leu Ile Pro Ile Ala Gly Asp Gly
 325 330 335
 Ala Thr Gln Ile Glu Ile Glu Arg Glu Thr His Phe Asp Gly Thr Asn

340	345	350
Tyr Leu Ala Ile Ala Pro Gly Val Val Ile Gly Tyr Ser Arg Asn Glu		
355	360	365
Lys Thr Asn Ala Ala Leu Glu Ala Ala Gly Ile Lys Val Leu Pro Phe		
370	375	380
Lys Gly His Gln Leu Ser Leu Gly Met Gly Asn Ala Arg Cys Met Ser		
385	390	395
Met Pro Leu Tyr Arg Lys Asp Val Lys		
405		

<210> 22
<211> 401
<212> PRT
<213> Mycoplasma meleagridis
<400> 22

Met Ser Lys Ile Asn Val Tyr Ser Glu Ile Gly Val Leu Lys Glu Val		
1	5	10
Leu Val His Thr Pro Gly Asp Glu Ile Arg Arg Ile Ser Pro Ser Arg		
20	25	30
Leu Asp Glu Leu Leu Phe Ser Ala Ile Leu Gln Pro Glu Gln Ala Ile		
35	40	45
Lys Glu His Gln Ser Phe Val Lys Ile Leu Gln Asp Arg Gly Ile Lys		

50	55	60
Val Ile Gln Leu Ser Asp Leu Val Ala Glu Thr Tyr Val Lys Tyr Ala		
65	70	75
Thr Ser Lys Glu Lys Ser Phe Ile Glu Lys Trp Leu Asp Glu Ala		
85	90	95
Thr Pro Ala Leu Asn Ser Glu Asn Arg Ala Arg Val Lys Asn Tyr Ile		
100	105	110
Thr Ala Met Gln Gly Gln Pro Val Lys Met Val Arg Ala Met Met Ala		

115	120	125
Gly Val Ser Lys Gln Glu Leu Asn Ile Glu Ser Asp Val Glu Leu Ile		
130	135	140

Val Asp Pro Met Pro Asn Leu Tyr Phe Thr Arg Asp Pro Phe Ala Ser
 145 150 155 160
 Ala Gly Asn Gly Ile Ser Leu Asn Asn Met Lys Tyr Val Val Arg Lys
 165 170 175
 Arg Glu Thr Ile Phe Ala Glu Phe Ile Phe Ser Ile His Pro Glu Tyr
 180 185 190
 Lys Gln Thr Pro His Trp Phe Asp Arg Leu Asp Lys Gly Asn Ile Glu
 195 200 205
 Gly Gly Asp Val Phe Ile Tyr Asn Lys Asp Thr Leu Val Ile Gly Val
 210 215 220
 Ser Glu Arg Thr Asn Lys Glu Ala Ile Leu Thr Ile Ala Glu His Ile
 225 230 235 240
 Lys Asn Asn Lys Glu Ala Lys Phe Lys Lys Ile Val Ala Ile Asn Val
 245 250 255
 Pro Pro Met Pro Asn Leu Met His Leu Asp Thr Trp Leu Thr Met Val
 260 265 270
 Asp Lys Asn Lys Phe Leu Tyr Ser Pro Asn Met Leu Ser Val Leu Lys
 275 280 285
 Ile Trp Glu Ile Asp Leu Ser Lys Glu Ile Lys Met Val Glu Thr Ser
 290 295 300
 Lys Pro Leu Ala Asp Val Leu Glu Ser Ile Ile Gly Glu Lys Pro Ile
 305 310 315 320
 Leu Ile Pro Ile Ala Gly Glu Asn Ala Ser Gln Leu Asp Ile Asp Ile
 325 330 335
 Glu Thr His Phe Asp Gly Thr Asn Tyr Leu Thr Ile Ala Pro Gly Val
 340 345 350
 Val Val Gly Tyr Ser Arg Asn Val Lys Thr Glu Ala Ala Leu Lys Ala
 355 360 365
 Ala Gly Val Thr Val Tyr Ser Phe Asp Gly Asn Gln Leu Ser Leu Gly
 370 375 380
 Met Gly Ser Gly Arg Cys Met Ser Met Pro Leu Val Arg Glu Asp Val

385 390 395 400

Lys

<210> 23

<211> 404

<212> PRT

<213> Mycoplasma alvi

<400> 23

Met Ser Ile Lys Glu Asn Gly Ile His Val Tyr Ser Glu Ile Gly Lys

1 5 10 15

Leu Arg Asp Val Leu Val His Arg Pro Gly Arg Glu Leu Asn Phe Leu

20 25 30

Asp Pro Ser Arg Leu Asp Glu Leu Leu Phe Ala Ala Thr Leu Glu Pro

35 40 45

Glu Thr Ala Arg Leu Glu His Asp Asn Phe Thr Thr Val Leu Lys Asn

50 55 60

Gln Gly Val Asn Val Ile Glu Leu Ala Asp Leu Val Ser Gln Thr Tyr

65 70 75 80

Ser Lys Val Asp Ser Lys Val Lys Lys Glu Phe Ile Asp Gln Tyr Leu

85 90 95

Asn Glu Ala Thr Pro Lys Leu Thr Ser Glu Leu Ser Lys Lys Val Tyr

100 105 110

Asp Phe Leu Thr Lys Gln Lys Ser Asn Arg Glu Met Val Asp Phe Met

115 120 125

Met Gly Gly Ile Leu Ser Ser Asp Leu Asn Ile Lys Gly Gln Pro Tyr

130 135 140

Leu Ile Val Glu Pro Met Pro Asn Leu Tyr Phe Thr Arg Asp Pro Phe

145 150 155 160

Ala Ser Val Gly Asn Gly Ala Thr Ile His Trp Met Lys His Asn Val

165 170 175

Arg Arg Arg Glu Val Leu Phe Ala Asn Phe Ile Phe Lys Tyr Asn Glu

180 185 190

Arg Phe Gln Asn Thr Pro Lys Tyr Ile Thr Pro Thr Lys Gly Leu Asp
 195 200 205
 Ile Glu Gly Gly Asp Val Phe Val Tyr Asn Lys Lys Thr Leu Val Val
 210 215 220

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

Leu Lys Val Trp Glu Ile Asn Ile Ser Asn Asn Val Ser Ala Pro
 290 295 300
 Lys Glu Leu Asn Val Asn Leu Glu Lys Ala Leu Ser Met Ile Ile Gly
 305 310 315 320
 Lys Lys Pro Ile Leu Ile Pro Val Ala Gly Ala Asn Ala Ser Gln Ile
 325 330 335
 Asp Ile Asn Ile Glu Thr Asn Phe Asp Ala Thr Asn Tyr Leu Val Ile
 340 345 350

Glu Pro Gly Val Val Val Gly Tyr Ser Arg Asn Lys Lys Thr Glu Glu
 355 360 365
 Ala Leu Val Lys Ala Gly Ile Lys Val Leu Pro Phe His Gly Asn Gln
 370 375 380
 Leu Ser Leu Gly Met Gly Ser Ala Arg Cys Met Ser Met Pro Leu Tyr
 385 390 395 400
 Arg Glu Asp Val

<210> 24
 <211> 410
 <212> PRT
 <213> Mycoplasma penetrans

<400> 24

Met Ser Ser Ile Asp Lys Asn Ser Leu Gly Asn Gly Ile Asn Val Tyr

1 5 10 15

Ser Glu Ile Gly Glu Leu Lys Glu Val Leu Val His Thr Pro Gly Asp

20 25 30

Glu Ile Arg Tyr Thr Ala Pro Ser Arg Leu Glu Glu Leu Leu Phe Ser

35 40 45

Ala Val Leu Lys Ala Asp Thr Ala Ile Glu Glu His Lys Gly Phe Val

50 55 60

Lys Ile Leu Gln Asn Asn Gly Ile Lys Val Ile Gln Leu Cys Asp Leu

65 70 75 80

Val Ala Glu Thr Tyr Glu Leu Cys Ser Lys Glu Val Arg Asn Ser Phe

85 90 95

Ile Glu Gln Tyr Leu Asp Glu Ala Leu Pro Val Leu Lys Lys Glu Ile

100 105 110

Arg Pro Val Val Lys Asp Tyr Leu Leu Ser Phe Pro Thr Val Gln Met

115 120 125

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

130 135 140

Gln Asp Asn Pro Leu Ile Ile Asp Gly Met Pro Asn Leu Tyr Phe Thr

145 150 155 160

Arg Asp Pro Phe Ala Ser Met Gly Asn Gly Val Ser Ile Asn Cys Met

165 170 175

Lys Tyr Pro Thr Arg Lys Arg Glu Val Ile Phe Ser Arg Phe Val Phe

180 185 190

Thr Asn Asn Pro Lys Tyr Lys Asn Thr Pro Arg Tyr Phe Asp Ile Val

195 200 205

Gly Asn Asn Gly Thr Ile Glu Gly Asp Ile Phe Ile Tyr Asn Ser

210 215 220

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

225 230 235 240

Glu Ser Val Ala Lys Asn Ile Gln Ala Asn Lys Asp Cys Thr Phe Glu

245 250 255

Arg Ile Val Val Ile Asn Val Pro Pro Met Pro Asn Leu Met His Leu

260 265 270

Asp Thr Trp Leu Thr Met Leu Asp Tyr Asp Lys Phe Leu Tyr Ser Pro

275 280 285

Asn Met Met Asn Val Leu Lys Ile Trp Glu Ile Asp Leu Asn Val Lys

290 295 300

Pro Val Lys Phe Val Glu Lys Lys Gly Thr Leu Glu Glu Val Leu Tyr

305 310 315 320

Ser Ile Ile Asp Lys Lys Pro Ile Leu Ile Pro Ile Ala Gly Lys Gly

325 330 335

Ala Asn Gln Leu Asp Ile Asp Ile Glu Thr His Phe Asp Gly Thr Asn

340 345 350

Tyr Leu Thr Ile Ala Pro Gly Val Val Val Gly Tyr Glu Arg Asn Glu

355 360 365

Lys Thr Gln Lys Ala Leu Val Glu Ala Gly Ile Lys Val Leu Ser Phe

370 375 380

Asn Gly Ser Gln Leu Ser Leu Gly Met Gly Ser Ala Arg Cys Met Ser

385 390 395 400

Met Pro Leu Ile Arg Glu Asn Leu Lys Lys

405 410

<210> 25

<211> 404

<212> PRT

<213> Mycoplasma fermentans

<400> 25

Met Lys Lys Ile Asn Val Tyr Ser Glu Tyr Gly Lys Leu Lys Glu Val

1 5 10 15

Leu Val His Thr Pro Gly Asp Glu Ile Arg Arg Ile Ala Pro Ser Arg

20 25 30

Leu Asp Glu Leu Leu Phe Ser Ala Ile Leu Glu Pro Asp Ser Ala Ile
 35 40 45
 Ala Glu His Lys Arg Phe Val Gln Leu Leu Lys Asp Asn Gly Ile Lys
 50 55 60
 Val Ile Gln Leu Asp Glu Leu Phe Ala Lys Thr Phe Asp Leu Val Ser
 65 70 75 80
 Glu Ser Val Lys Gln Ser Phe Ile Glu Arg Trp Leu Asp Glu Cys Glu
 85 90 95

 Pro Lys Leu Asp Ala Thr Leu Arg Ala Lys Val Lys Glu Tyr Ile Leu
 100 105 110
 Glu Leu Lys Ala Lys Ser Ser Lys Lys Met Val Arg Val Met Met Ala
 115 120 125
 Gly Ile Asp Lys Lys Glu Leu Gly Ile Glu Leu Asp Arg Asp Leu Val
 130 135 140
 Val Asp Pro Met Pro Asn Leu Tyr Phe Thr Arg Asp Pro Phe Ala Ser
 145 150 155 160

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

 Ser Glu Arg Thr Asn Lys Glu Ala Ile Asn Val Met Ala Arg Lys Ile
 225 230 235 240
 Ala Ala Asp Lys Glu Val Lys Phe Lys Arg Ile Tyr Ala Ile Asn Val
 245 250 255
 Pro Pro Met Pro Asn Leu Met His Leu Asp Thr Trp Leu Thr Met Leu
 260 265 270
 Asp Lys Asn Lys Phe Leu Tyr Ser Pro Asn Met Leu Ser Val Leu Lys

275

280

285

Val Trp Arg Ile Asp Leu Asn Asp Pro Asp Phe Val Trp His Glu Ile

290

295

300

Glu Gly Ser Leu Glu Glu Ile Leu Glu Gln Ile Ile Gly Met Lys Pro

305 310 315 320

Ile Leu Ile Pro Ile Ala Gly Lys Gly Ala Ser Gln Leu Asp Ile Asp

325

330

335

Ile Glu Thr His Phe Asp Gly Thr Asn Tyr Leu Thr Ile Ala Pro Ser

340

345

350

Val Val Val Gly Tyr Ser Arg Asn Glu Lys Thr Glu Lys Ala Leu Lys

355

360

365

Ala Ala Lys Val Lys Val Leu Ser Phe Glu Gly Asn Gln Leu Ser Leu

370

375

380

Gly Met Gly Ser Ala Arg Cys Met Ser Met Pro Leu Ile Arg Glu Asp

385 390 395 400

Ile Lys Lys Lys

<210> 26

<211> 404

<212> PRT

<213> Mycoplasma pneumoniae

<400> 26

Met Lys Tyr Asn Ile Asn Val His Ser Glu Ile Gly Gln Leu Gln Thr

1 5 10 15

Val Leu Val His Thr Pro Gly Asn Glu Ile Arg Arg Ile Ser Pro Arg

20

25

30

Arg Leu Asp Asp Leu Leu Phe Ser Ala Val Ile Glu Pro Asp Thr Ala

35

40

45

Ile Gln Glu His Gln Thr Phe Cys Gln Leu Leu Gln Glu Gln Asn Ile

50

55

60

Glu Val Val Gln Leu Thr Asp Leu Thr Ala Thr Thr Phe Asp Lys Ala

65	70	75	80
Asn Ala Thr Ala Gln Asn Gln Phe Ile Glu Thr Trp Leu Asp Gln Ala			
85	90	95	
Glu Pro Lys Leu Thr Pro Glu His Arg Lys Val Ala Lys Gln Tyr Leu			
100	105	110	
Leu Glu Gln Lys Ala Lys Ser Thr Leu Ser Met Val Arg Ser Met Met			
115	120	125	
Gly Gly Ile Asp Lys Arg Lys Val Ala Ala Asn Thr Ile Asn Gly			
130	135	140	
Asp Phe Leu Val Asp Pro Met Pro Asn Leu Tyr Phe Thr Arg Asp Pro			
145	150	155	160
Phe Ala Ser Ile Gly His Gly Ile Ser Ile Asn Arg Met Lys Tyr Leu			
165	170	175	
Thr Arg Arg Arg Glu Thr Leu Phe Ala Ser Phe Ile Phe Ala Asn His			
180	185	190	
Pro Ile Ile Ala Ala Arg Lys Phe Tyr Phe Lys Pro Ile Asp Met Gly			
195	200	205	
Thr Ile Glu Gly Gly Asp Ile Phe Val Tyr Asp Gln Gln Thr Val Val			
210	215	220	
Met Gly Leu Ser Glu Arg Thr Thr Glu Ala Ala Ile Asn Val Leu Ala			
225	230	235	240
Lys Lys Ile Gln Gln Asp Ser Ser Thr Ser Phe Lys Arg Ile Phe Val			
245	250	255	
Ile Asn Val Pro Gln Leu Pro Asn Leu Met His Leu Asp Thr Trp Leu			
260	265	270	
Thr Met Leu Asp Arg Asn Lys Phe Leu Tyr Ser Pro Asn Met Leu Ala			
275	280	285	
Val Leu Lys Ala Trp Arg Ile Asp Phe Thr Asp Pro Ala Leu Lys Trp			
290	295	300	
Asn Glu Ile Ala Gly Asp Leu Ser Thr Ile Leu His Thr Ile Ile Gly			
305	310	315	320

Leu Ser Leu Gly Met Gly Ser Ala Arg Cys Met Ser Met Pro Leu Val
 385 390 395 400
 Arg Lys Pro Leu

<210> 27

<211> 414

<212> PRT

<213> Mycoplasma sp.

<400> 27

Met	Glu	Lys	Ile	His	Val	Thr	Ser	Glu	Ile	Gly	Pro	Leu	Lys	Lys	Val
1															
	5														15
Leu	Leu	His	Arg	Pro	Gly	Asn	Glu	Leu	Leu	Asn	Leu	Thr	Pro	Asp	Thr
	20														30
Leu	Ser	Arg	Leu	Leu	Phe	Asp	Asp	Ile	Pro	Tyr	Leu	Pro	Asp	Ala	Ile

35 40 45

Lys Glu His Asp Glu Phe Ala Asp Ala Leu Arg Ala Asn Gly Val Glu
50 55 60

Val Val Tyr Leu Glu Asn Leu Met Ala Asp Val Leu Asp Leu Ser Asp
65 70 75 80

Arg Thr Pro Lys Tyr Lys Tyr Leu Val Phe Asp Tyr Leu Asp Gln Ile

100 105 110

Thr Asn Ser Lys Lys Leu Val Leu Lys Thr Met Glu Gly Ile Gln Ile

115 120 125

Ser Asp Ile Pro Arg Arg Lys Arg Glu Ile Glu Lys Ser Leu Val Asp

130 135 140

Leu Ile Glu Thr Glu Asp Glu Phe Ile Ala Asp Pro Met Pro Asn Leu

145 150 155 160

Tyr Phe Thr Arg Asp Pro Phe Ala Ser Val Gly Glu Gly Ile Ser Leu

165 170 175

Asn Lys Met Tyr Ser Val Thr Arg Asn Arg Glu Thr Ile Tyr Ala Glu

180 185 190

Tyr Ile Phe Lys Tyr His Pro Asp Tyr Lys Asp Gln Ala Arg Leu Tyr

195 200 205

Tyr Asp Arg Tyr Asn Pro Tyr His Ile Glu Gly Gly Asp Val Leu Asn

210 215 220

Ile Asn Asp His Val Leu Ala Ile Gly Ile Ser Gln Arg Thr Thr Ala

225 230 235 240

Glu Ala Ile Asp Gln Ile Ala Lys Asn Leu Phe Lys Asp Pro Glu Cys

245 250 255

Lys Ile Asp Thr Ile Leu Ala Phe Asn Ile Pro Glu Ser Arg Ala Phe

260 265 270

Met His Leu Asp Thr Val Phe Thr Gln Val Asp Tyr Asp Lys Phe Thr

275 280 285

Tyr His Pro Gly Ile Met Gly Thr Leu Gln Val Phe Glu Ile Thr Glu

290 295 300

Gly Asp Asp Pro Asn Ser Asp Glu Asp Leu Thr Val Thr Glu Ile Asn

305 310 315 320

Ala Pro Leu Glu Glu Ile Leu Thr Lys Tyr Val Gly Arg Lys Val Thr

325 330 335

Leu Ile Pro Cys Ala Gly Gly Asp Lys Val Ser Ala Glu Arg Glu Gln

340 345 350

Trp Asn Asp Gly Ser Asn Thr Leu Cys Ile Ala Pro Gly Val Val Val

355 360 365

Val Tyr Asp Arg Asn Asn Leu Thr Asn Ala Val Leu Arg Ser Tyr Gly
 370 375 380
 Leu Lys Val Ile Glu Ile His Gly Ala Glu Leu Ser Arg Gly Arg Gly
 385 390 395 400
 Gly Pro Arg Cys Met Ser Met Pro Leu Val Arg Glu Asp Ile
 405 410
 <210> 28
 <211> 408
 <212> PRT
 <213> Mycoplasma sp.
 <400
 > 28
 Met His Val Thr Ser Glu Ile Lys Lys Leu Lys Lys Val Leu Val His
 1 5 10 15
 Arg Pro Gly Lys Glu Leu Leu Asn Leu Thr Pro Asp Thr Leu Gly Arg
 20 25 30
 Leu Leu Phe Asp Asp Ile Pro Tyr Leu Lys Asp Ala Ile Leu Glu His
 35 40 45
 Asp Glu Phe Cys Gln Ile Leu Arg Asp Asn Asp Val Glu Val Val Tyr
 50 55 60

 Leu Glu Asp Leu Met Ala Glu Thr Leu Asp Glu Asn Pro Gln Val Lys
 65 70 75 80
 Pro Ser Phe Ile Arg Gln Phe Ile Tyr Glu Ala Gly Val Arg Thr Pro
 85 90 95
 Lys Tyr Lys Asp Leu Leu Phe Asp Tyr Leu Met Ser Tyr Thr Asn Asn
 100 105 110
 Lys Glu Leu Val Leu Lys Thr Met Glu Gly Ile Lys Val Ser Glu Val
 115 120 125

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

165	170	175
His Ser Val Thr Arg Ser Arg Glu Thr Ile Tyr Ala Tyr Tyr Ile Phe		
180	185	190
Asn Tyr His Pro Asp Tyr Met Asp Lys Val Pro Lys Tyr Tyr Asp Arg		
195	200	205
Glu Asn Pro Phe Ser Ile Glu Gly Gly Asp Val Leu Asn Leu Asn Glu		
210	215	220
His Thr Leu Ala Ile Gly Ile Ser Gln Arg Thr Ser Ala Glu Ala Ile		
225	230	235
Asp Leu Val Ala Lys Asn Met Phe Asn Asp Glu Lys Cys Asn Ile Asp		
245	250	255
Thr Ile Leu Ala Phe Lys Ile Pro Glu Cys Arg Ala Phe Met His Leu		
260	265	270
Asp Thr Val Phe Thr Gln Ile Asp Ile Asp Lys Phe Thr Tyr His Pro		
275	280	285
Gly Ile Met Asp Thr Leu Glu Val Phe Glu Ile Thr Lys Asn Glu Asp		
290	295	300
Asp Leu Asp Glu Val Arg Val Ile Lys Lys Glu Gly Ser Leu Glu Asn		
305	310	315
Ile Leu Glu Glu Tyr Leu Gly Ile Asp Ile Thr Leu Ile Pro Cys Ala		
325	330	335
Gly Gly Asp Lys Ile Ala Ser Glu Arg Glu Gln Trp Asn Asp Gly Thr		
340	345	350
Asn Thr Leu Cys Ile Ala Pro Gly Val Val Val Val Tyr Asn Arg Asn		
355	360	365
Asn Ile Thr Asn Glu Val Leu Arg Glu Lys Gly Ile Lys Val Ile Glu		
370	375	380
Met Asn Ser Ala Glu Leu Ser Arg Gly Arg Gly Gly Pro Arg Cys Met		
385	390	395
Ser Met Pro Leu Glu Arg Glu Asp		
405		