(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7667931号
(P7667931)

(45)発行日　令和7年4月24日(2025.4.24)

(24)登録日　令和7年4月16日(2025.4.16)

(51)国際特許分類

Ａ６１Ｋ　38/50　(2006.01)	Ａ６１Ｋ	38/50	
Ａ６１Ｐ　43/00　(2006.01)	Ａ６１Ｐ	43/00	１１１
Ａ６１Ｋ　47/60　(2017.01)	Ａ６１Ｋ	47/60	
Ａ６１Ｋ　47/10　(2017.01)	Ａ６１Ｋ	47/10	
Ａ６１Ｋ　47/42　(2017.01)	Ａ６１Ｋ	47/42	

ＦＩ

請求項の数　12　（全42頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2021-521133(P2021-521133)
(86)(22)出願日　令和1年10月18日(2019.10.18)
(65)公表番号　特表2022-512733(P2022-512733A)
(43)公表日　令和4年2月7日(2022.2.7)
(86)国際出願番号　PCT/US2019/057027
(87)国際公開番号　WO2020/081994
(87)国際公開日　令和2年4月23日(2020.4.23)
審査請求日　令和4年10月18日(2022.10.18)
(31)優先権主張番号　62/747,837
(32)優先日　平成30年10月19日(2018.10.19)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)
前置審査

(73)特許権者　523170297
イメディカ・ファーマ・アー・ベー
ＩＭＭＥＤＩＣＡ ＰＨＡＲＭＡ ＡＢ
スウェーデン、１１３ ６３ ストックホルム、ソルナベーゲン、３・ホー
(74)代理人　110002077
園田・小林弁理士法人
(72)発明者　クイン， アンソニー
アメリカ合衆国 マサチューセッツ ０１９３０， グロスター， フォート ヒル アヴェニュー ２１
(72)発明者　シュルツ， アンドレアス
カナダ国 オンタリオ エム５ジー １エックス８， トロント， ユニバーシティ アヴェニュー ５５５

最終頁に続く

(54)【発明の名称】　ＧＡＭＴ欠損症の治療のためのアルギニン枯渇療法

(57)【特許請求の範囲】

【請求項１】

グアニジノ酢酸メチルトランスフェラーゼ（ＧＡＭＴ）活性の欠損を有する対象におけるグアニジノ酢酸（ＧＡＡ）毒性の影響の治療における使用のための医薬組成物であって、治療量のアルギニン枯渇酵素を含み、前記アルギニン枯渇酵素が、ヒトアルギナーゼＩ酵素である、医薬組成物。

【請求項２】

前記ヒトアルギナーゼＩ酵素が、コバルトを含む置換金属補因子で操作されている、請求項１に記載の使用のための医薬組成物。

【請求項３】

前記アルギニン枯渇酵素が、自己赤血球ゴースト中で投与される、請求項１に記載の使用のための医薬組成物。

【請求項４】

前記ＧＡＭＴ活性の欠損が、前記対象におけるグアニジノ酢酸メチルトランスフェラーゼ酵素をコードする遺伝子の遺伝的欠損に関連する、請求項１に記載の使用のための医薬組成物。

【請求項５】

前記ヒトアルギナーゼＩ酵素が、安定化剤との会合によって安定化される、請求項１に記載の使用のための医薬組成物。

【請求項６】

前記安定化剤が、ポリエチレングリコール（ＰＥＧ）、合成タンパク質ポリマー、ポリシアル酸、Ｆｃ融合物およびアルブミンからなる群から選択される、請求項５に記載の使用のための医薬組成物。
【請求項７】
前記ヒトアルギナーゼＩ酵素がＰＥＧ化されている、請求項１又は２に記載の使用のための医薬組成物。
【請求項８】
前記対象がヒトである、請求項１～７のいずれか一項に記載の使用のための医薬組成物。
【請求項９】
前記ヒトアルギナーゼＩ酵素が、インビトロで測定した場合、ｐＨ７．４かつ３７℃で４００ｍＭ$^{-1}$ ｓ$^{-1}$～４，０００ｍＭ$^{-1}$ ｓ$^{-1}$のアルギニンの加水分解に対するk_{cat}/K_Mを示す、請求項１に記載の使用のための医薬組成物。
【請求項１０】
前記ヒトアルギナーゼＩ酵素が、アルギナーゼに対して２μｇＣｏ／ｍｇアルギナーゼ～３μｇＣｏ／ｍｇアルギナーゼの割合でコバルトを含む、請求項２に記載の使用のための医薬組成物。
【請求項１１】
前記ヒトアルギナーゼＩ酵素が、アルギナーゼアポ酵素をコバルトまたはコバルトイオンと３０℃～５５℃の温度で１５分～６０分間接触させることによって生成される、請求項２に記載の使用のための医薬組成物。
【請求項１２】
コバルト補因子を含むＰＥＧ化ヒトアルギナーゼＩ酵素の治療量が約０．０５ｍｇ／ｋｇ～約５ｍｇ／ｋｇである、請求項２に記載の使用のための医薬組成物。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
配列表
２１８１０７＿００１３＿００＿ＷＯ＿５９４０７３＿ＳＴ２５．ｔｘｔと題された、９，１１０バイトを有する２０１９年１０月１８日の日付の配列表が明細書と共に提出され、明細書に組み込まれる。
【背景技術】
【０００２】
グアニジノ酢酸メチルトランスフェラーゼ（ＧＡＭＴ）欠損症（ＭＩＭ ６０１２４０）は、クレアチン合成の常染色体劣性先天性エラーであり、クレアチンの欠損ならびに脳および体液中のグアニジノ酢酸（ＧＡＡ）の顕著な蓄積を生化学的に反映し、全般的発達遅延／知的障害（ＤＤ／ＩＤ）てんかん、運動障害、発話または言語遅延、および行動上の問題などのいくつかの身体的または精神的障害をもたらす。罹患した個体は、表出性原語の著しい障害、自閉症的特徴、ならびにてんかんおよび運動障害を含む様々な神経学的徴候を示す（Ｓｔｏｃｋｌｅｒ－Ｉｐｓｉｒｏｇｌｕ，Ｓ．ｅｔ ａｌ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｇｅｎｅｔｉｃｓ ａｎｄ Ｍｅｔａｂｏｌｉｓｍ １１１（２０１４）１６－２５；Ｄｈａｒ ＳＵ ｅｔ ａｌ．，Ｍｏｌ．Ｇｅｎｅｔ．Ｍｅｔａｂ．，２００９）。現在推奨されている治療は、以下に基づく。
（ａ）クレアチンの経口補充（クレアチン一水和物として投与される）を使用して、脳クレアチンレベルを増加させる。脳内のクレアチン／ホスホクレアチン（Ｃｒ／ＰＣｒ）の増加に加えて、経口クレアチン補充によって体液および脳内のＧＡＡを減少させることができるが、ＧＡＡレベルはほとんどの患者で著しく上昇したままである。数ヶ月の治療後でさえ、またクレアチン補充の薬理学的用量（０．３５～２．０ｇ／ｋｇ／日）にもかかわらず、患者の脳内のＣｒ／ＰＣｒ濃度は正常範囲を有意に下回ったままである。Ｃｒ補充に加えて、Ｃｒ治療は、ＣｒによるＡＧＡＴ酵素の阻害によってＧＡＡ形成の減少をもたらす。Ｃｒを単独で補充することによって、体液中のＧＡＡの約５０％の減少を達成す

ることができる。Ｃｒ治療後の脳内のＣｒ／ＰＣｒ補充に関する公開データに基づいて、ＧＡＭＴ－Ｄ患者とＡＧＡＴ－Ｄ患者との間の同じ用量のＣｒによる脳Ｃｒ補充の勾配を予備的に比較すると、後者の群におけるＣｒ／ＰＣｒのより速い上昇およびより完全な補充が明らかになった。ＧＡＭＴＤとは対照的に、ＧＡＡはＡＧＡＴ－Ｄにおいて増加しない（Ｓｃｈｕｌｔｚｅ、Ｒｅｓｅａｒｃｈ　Ｇａｔｅ、２００５年３月）。

（ｂ）グアニジノ酢酸（ＧＡＡ）レベルを低下させる戦略には、アルギニン制限治療食による基質欠乏、ならびに高用量Ｌ－オルニチン補充によるアルギニングリシンアミジノトランスフェラーゼ（ＡＧＡＴ）活性の競合的阻害が含まれる。ＡＧＡＴは、ＧＡＡ合成を担う酵素である。

（ｃ）神経毒であると考えられる罹患患者のＧＡＡレベルを低下させるための競合的阻害および基質欠乏アプローチには、経口投与されるＬ－オルニチン（Ｌ－オルニチンアスパラギン酸またはＬ－オルニチン塩酸塩）およびアルギニン摂取量の減少を目的とした治療食の使用が含まれる。

【０００３】

アルギニン摂取量を減少させ、全身アルギニン利用可能性を低下させることを目的とする治療食は、ＧＡＡレベルを低下させ、高ＧＡＡレベルに関連する疾患症状を改善するのに有効であることが示されているが、必要な治療食は、いくつかの理由で問題がある。そのような治療食は、タンパク質制限を必要とするため受け入れ難く、目標は、多くの場合、各人の必要栄養量および年齢要件に基づいて経時的に変更する必要がある。タンパク質摂取量を計算および追跡することは、タンパク質およびアルギニン食事制限中の人にとっては困難で面倒な作業である可能性がある。治療食は、患者の生活の質および応諾に影響を及ぼす嗜好性および味覚の問題を有することが多い。全身アルギニンの高比率は組織代謝回転の結果であり、したがって食事制限の影響を受けないので、食事制限の影響は限定される。（Ｃｒｏｍｂｅｚ，ＥＡ，ａｎｄ　Ｃｅｄｅｒｂａｕｍ，ＳＤ，Ｍｏｌ．Ｇｅｎｅｔ．Ｍｅｔａｂ．２００５；Ｂｕｒｒａｇｅ，Ｌ．Ｃ．，ｅｔ　ａｌ．，Ｈｕｍ．Ｍｏｌ．Ｇｅｎｅｔ．２０１５；Ｃａｒｖａｌｈｏ，Ｄ．Ｒ．，ｅｔ　ａｌ．，Ｐｅｄ．Ｎｅｕｒｏｌ．２０１２；Ｓｔｏｃｋｌｅｒ－Ｉｐｓｉｒｏｇｌｕ，Ｓ．ｅｔ　ａｌ．，２０１４；Ｖｉａｕ，Ｋ．Ｓ．ｅｔ　ａｌ．，Ｍｏｌ．Ｇｅｎｅｔ．Ｍｅｔａｂ．２０１３；Ｍｅｒｃｉｍｅｋ－Ｍａｈｍｕｔｏｇｌｕ，Ｓ．ｅｔ　ａｌ．，Ｇｅｎｅ，２０１５）

【発明の概要】

【０００４】

本明細書では、対象におけるグアニジノ酢酸メチルトランスフェラーゼ（ＧＡＭＴ）活性の欠損を治療する、またはグアニジノ酢酸（ＧＡＡ）毒性を治療するアルギニン枯渇酵素を投与するための化合物、組成物および方法が提供される。化合物および組成物は、対象のアルギニンレベルを低下させることができ、同時にアルギニンのアルギナーゼ媒介代謝からオルニチンを提供する。

【０００５】

したがって、対象におけるグアニジノ酢酸メチルトランスフェラーゼ（ＧＡＭＴ）活性の欠損を治療する方法は、治療量のアルギニン枯渇酵素を含む医薬組成物を前記対象に投与することを含む。アルギニン枯渇酵素は、哺乳動物または細菌アルギナーゼ酵素であり得る。アルギニン枯渇酵素は、ヒトアルギニン枯渇酵素であり得る。アルギニン枯渇酵素は、ヒトアルギナーゼ酵素、ヒトアルギニンデイミナーゼ酵素、またはこれらの酵素の組み合わせであり得る。企図される酵素はまた、ヒトアルギナーゼ酵素またはヒトアルギニンデイミナーゼ酵素の酵素変異体を含むことができ、酵素変異体は、酵素のアミノ酸配列における置換、欠失、挿入、もしくは切断、またはそれらの組み合わせによって修飾されている。ヒトアルギナーゼ酵素は、ヒトアルギナーゼＩ酵素またはヒトアルギナーゼＩＩ酵素であり得る。ヒトアルギナーゼ酵素は、ＰＥＧ化され、アミノ末端メチオニンを欠くCo^{+2}の金属補因子を有するアルギナーゼ１（配列番号３）であり得る。さらに、それは、ポリペプチド配列中に１つ以上の置換または変異を有するアルギナーゼ１であり得る。

【０００６】

本明細書に記載の治療／使用方法はまた、コバルトを含む置換非天然金属補因子で操作された、ヒト、細菌または哺乳動物のアルギナーゼＩ酵素を企図する。

【０００７】

記載される方法は、アルギニン枯渇酵素を投与するための自己赤血球ゴーストを使用することができる。

【０００８】

ＧＡＭＴ活性の欠損の治療方法は、対象におけるグアニジノ酢酸メチルトランスフェラーゼ酵素をコードする遺伝子の遺伝的欠損に関連する。

【０００９】

これらの方法に使用される酵素、例えばヒトアルギナーゼ酵素またはヒトアルギニンデイミナーゼ酵素は、安定化剤との会合によって安定化することができる。安定剤は、ポリエチレングリコール（ＰＥＧ）、合成タンパク質ポリマー、ポリシアル酸、Ｆｃ融合物およびアルブミンからなる群から選択される。ヒトアルギナーゼ酵素またはヒトアルギニンデイミナーゼ酵素は、さらにＰＥＧ化することができる。ＰＥＧのサイズは、１ｋＤ～１０ｋＤ、その間の任意の整数であり得る。方法および組成物に使用するためのヒトアルギナーゼ酵素は、ＰＥＧ化ヒトアルギナーゼＩ酵素であり得る。

【００１０】

治療または医薬の使用の方法は、哺乳動物、例えばヒト用であり得る。

【００１１】

別の態様では、インビトロで測定した場合、ｐＨ７．４および３７℃で４００ｍM^{-1} s^{-1}～４，０００ｍM^{-1} s^{-1}のアルギニンの加水分解のためのk_{cat}/K_Mを有するヒトアルギナーゼＩ酵素を有する化合物または組成物を使用して、対象のグアニジノ酢酸メチルトランスフェラーゼ（ＧＡＭＴ）活性の欠損を治療するか、またはグアニジノ酢酸（ＧＡＡ）毒性を治療する方法が企図される。ヒトアルギナーゼＩ酵素およびアルギナーゼ１酵素は、コバルトを、アルギナーゼＩ酵素に対して２μｇ　Ｃｏ／ｍｇアルギナーゼ～３μｇ　Ｃｏ／ｍｇアルギナーゼの比率で含み得ることも企図される。アルギナーゼＩ酵素およびアルギナーゼ１酵素は、３０℃～５５℃の温度で１５分～６０分、アポ酵素形態をコバルトまたはコバルトイオンと接触させることにより生成することができる。

【００１２】

グアニジノ酢酸メチルトランスフェラーゼ（ＧＡＭＴ）活性が欠損した対象におけるグアニジノ酢酸（ＧＡＡ）毒性の影響を治療する方法であって、コバルト補因子を含むＰＥＧ化ヒトアルギナーゼＩ酵素を含む治療量の医薬組成物を、前記対象に投与する工程を含む方法も企図される。医薬組成物の治療量は、対象が身体的または神経学的状態の改善を示すまでの期間継続することができる。企図される身体的または神経学的状態の種類は、全般的発達遅延／知的障害（ＤＤ／ＩＤ）、てんかん、運動障害、発話または言語遅延、および行動障害からなる群から選択される状態を含み得る。本方法は、コバルト補因子を含み得るＰＥＧ化ヒトアルギナーゼＩまたはＩＩ酵素（例えば、ＡＥＢ１１０２などのＰＥＧ化アルギナーゼ１酵素）の治療量が、約０．０１ｍｇ／ｋｇ～約７．５ｍｇ／ｋｇ、約０．０５ｍｇ／ｋｇ～約５ｍｇ／ｋｇ、または約０．１ｍｇ／ｋｇ～約５ｍｇ／ｋｇであることを企図する。組成物の治療量は、局所、静脈内、皮内、動脈内、腹腔内、病変内、頭蓋内、関節内、前立腺内、胸膜内、気管内、眼内、鼻腔内、硝子体内、膣内、直腸内、筋肉内、皮下、結膜下、小胞内、粘膜、心膜内、臍下、経口、吸入、注射、注入、連続注入、標的細胞の直接的な局所灌流浴によって、カテーテルを介して、または洗浄液を介して投与することができる。一態様では、方法は、対象への皮下投与に適合させた医薬組成物の投与を企図する。皮下製剤の場合、例示的な医薬組成物は、リン酸カリウム、ＮａＣｌ、スクロースおよびｐＨ６．７のＰＳ８０中の治療用量のアルギナーゼを含むことができる。静脈内投与の場合、例示的な医薬組成物は、ＰＥＧ化ヒトアルギナーゼＩまたはＩＩ酵素、生理食塩水、およびｐＨ７．４のグリセロールを含むことができる。この方法は、対象における血清アルギニン含有量を少なくとも５０％～９９％、または９０％～９９％、または９０％～９９％減少させるのに十分な医薬組成物を投与することを意図する

。この方法は、対象における血清アルギニン含有量を５０％～９９％、または９０％～９９％、または９０％～９９％減少させるのに十分であり得る医薬組成物を投与することを意図する。この方法はまた、患者の血清ＧＡＡレベルを、ＧＡＡレベルを枯渇させることができる程度まで、少なくとも２５％、少なくとも３０％、少なくとも３５％、少なくとも４０％、少なくとも５０％、またはそれ以上低下させるのに十分な量で医薬組成物を投与することを企図する。この方法は、血漿中の濃度が単回投与後２０～２８時間で最大レベルに達するか、または単回投与後約２４時間で最大レベルに達する濃度の医薬組成物を使用することができる。

【００１３】

企図される別の方法には、グアニジノ酢酸（ＧＡＡ）毒性の影響を治療する方法であって、アルギニン枯渇酵素を含む医薬組成物の治療量を、それを必要とする対象に投与することを含む方法が含まれる。アルギニン枯渇酵素は、アルギナーゼまたはアルギニンデイミナーゼ酵素であり得る。対象におけるグアニジノ酢酸メチルトランスフェラーゼ（ＧＡＭＴ）活性の欠損を治療する方法であって、オルニチン補充と組み合わせて治療量のアルギニン枯渇酵素を含む医薬組成物を前記対象に投与する工程を含む方法も企図される。この方法は、アルギナーゼまたはアルギニンデイミナーゼ酵素であり得るアルギニン枯渇酵素を使用することを企図する。この方法はまた、高用量のＬ－オルニチンをさらに補充する医薬組成物を企図する。この方法の医薬組成物中のＬ－オルニチンは、Ｌ－オルニチンアスパラギン酸塩またはＬ－オルニチン塩酸塩として経口投与することができる。

【００１４】

対象におけるグアニジノ酢酸メチルトランスフェラーゼ（ＧＡＭＴ）活性の欠損の治療、または対象におけるグアニジノ酢酸（ＧＡＡ）毒性の影響の治療において使用する医薬として使用するための、治療量のアルギニン枯渇酵素を含む医薬組成物も企図される。

【００１５】

対象におけるグアニジノ酢酸メチルトランスフェラーゼ（ＧＡＭＴ）活性の欠損の治療、または対象におけるグアニジノ酢酸（ＧＡＡ）毒性の影響の治療において使用するための、治療量のアルギニン枯渇酵素を含む医薬組成物も企図される。

【００１６】

以下の図面は、本明細書の一部を形成し、組成物および組成物の使用方法の特定の態様をさらに実証するために含まれる。

【図面の簡単な説明】

【００１７】

【図１】マウスモデルにおける血清Ｌ－アルギニン枯渇を示すグラフである。Ｃｏ－ｈＡｒｇＩの単回ＩＰ用量で治療したＢａｌｂ／ｃマウスの血清Ｌ－Ａｒｇ濃度を３日間にわたって３～４μＭ以下に維持する。

【図２】ヒトアルギナーゼＩの触媒活性に対するコバルト担持の効果を示すグラフである。

【図３】単回０．５ｍｇ／ｋｇ　ＩＶ投与後の雄サルにおけるＡＥＢ１１０２の平均（±ＳＤ）濃度時間プロファイルのグラフである。

【図４】単回０．５ｍｇ／ｋｇ　ＳＣ投与後の雄サルにおけるＡＥＢ１１０２の平均（±ＳＤ）濃度時間プロファイルのグラフである。ＡＥＢ１１０２は、Ｎ末端メチオニンを欠く配列番号３の配列を有し、金属補因子としてCo^{+2}を有するＰＥＧ化ヒトアルギナーゼＩである。

【図５Ａ】ＡＥＢ１１０２の単回０．５ｍｇ／ｋｇ　ＩＶ投与後の雄サルにおける平均（±ＳＤ）薬力学的プロファイルのグラフである。

【図５Ｂ】ＡＥＢ１１０２の単回０．５ｍｇ／ｋｇ　ＳＣ投与後の雄サルにおける平均（±ＳＤ）薬力学的プロファイルのグラフである。

【発明を実施するための形態】

【００１８】

アルギニン枯渇およびＧＡＡ減少または枯渇のためのアルギナーゼ療法が本明細書に記載される。開示された方法は、少なくとも向上した基質欠乏の有効性、全身アルギニンレ

ベルに対する実質的により大きな影響、およびＧＡＡレベルのより良好な減少または枯渇を含む、現在の技術水準を超える一定の利点を提供する。さらに、このアプローチは、アルギニンの食事制限が患者の生活の質および健康に悪影響を及ぼすことを考慮すると、患者に多くの利点を提供する。

【００１９】

開示された方法は、ＧＡＭＴ患者の基質減少にどのようにアプローチするかにおけるパラダイムの転換を表す。それは、基質としてのアルギニンの利用可能性を下げるのにより効果的であることに加えて、食事によるアルギニン制限の必要条件を軽減しながら、ＧＡＭＴ欠損患者のＧＡＡ産生を抑制できる可能性を有する。したがって、開示された方法は、治療食の複雑さおよび不快感によって不利に影響される活動遂行での困難を取り除くことによって、生活の質を改善する。

【００２０】

血清中のＬ－アルギニンを枯渇させる酵素、すなわちアルギニン枯渇酵素によるＧＡＭＴ欠乏症および／またはＧＡＡ毒性の治療のための組成物および方法が提供される。天然の金属補因子（Mn^{2+}）が別の金属で置き換えられているアルギナーゼ酵素およびその変異体の使用も企図される。例示的なアルギナーゼ酵素は、ヒトアルギナーゼＩのアミノ酸配列またはヒトアルギナーゼＩＩのアミノ酸配列および非天然金属補因子を含む。ヒトアルギナーゼＩおよびヒトアルギナーゼＩＩのヌクレオチド配列（それぞれ配列番号１および２）ならびにヒトアルギナーゼＩおよびヒトアルギナーゼＩＩのアミノ酸配列（それぞれ配列番号３および４）を以下に提供する（「Ｘ」はメチオニンまたはナッシングであり得る）。

ＧＡＴＡＴＡＣＣＡＴＧＧＧＴＴＣＴＴＣＴＣＡＣＣＡＴＣＡＴＣＡＣＣＡＣＣＡＣＡＧＣＴＣＴＧＧＣＧＡＧＡ

ＡＣＣＴＧＴＡＣＴＴＣＣＡＧＴＣＴＧＣＧＡＡＧＡＧＣＣＧＴＡＣＧＡＴＣＧＧＣＡＴＴＡＴＴＧＧＴＧＣＧＣＣＧＴＴ

ＣＴＣＴＡＡＡＧＧＴＣＡＧＣＣＡＣＧＣＧＧＴＧＧＴＧＴＧＧＡＡＧＡＧＧＧＴＣＣＧＡＣＧＧＴＴＣＴＧＣＧＴＡＡ

ＧＧＣＣＧＧＴＴＴＡＴＴＡＧＡＡＡＡＧＣＴＧＡＡＡＧＡＧＣＡＧＧＡＧＴＧＣＧＡＣＧＴＴＡＡＧＧＡＣＴＡＣＧＧ

ＴＧＡＣＴＴＡＣＣＡＴＴＣＧＣＧＧＡＣＡＴＣＣＣＧＡＡＴＧＡＴＡＧＣＣＣＧＴＴＣＣＡＡＡＴＣＧＴＴＡＡＧＡＡＴ

ＣＣＧＣＧＣＴＣＴＧＴＧＧＧＴＡＡＡＧＣＡＡＧＣＧＡＧＣＡＧＴＴＡＧＣＡＧＧＴＡＡＧＧＴＧＧＣＣＧＡＧＧＴＣ

ＡＡＧＡＡＡＡＡＣＧＧＴＣＧＴＡＴＴＡＧＣＣＴＧＧＴＴＴＴＡＧＧＣＧＧＴＧＡＴＣＡＴＡＧＣＴＴＡＧＣＡＡＴＴＧ

ＧＣＴＣＴＡＴＣＴＣＴＧＧＴＣＡＴＧＣＣＣＧＴＧＴＧＣＡＣＣＣＡＧＡＴＴＴＡＧＧＴＧＴＣＡＴＴＴＧＧＧＴＴＧＡＣ

ＧＣＣＣＡＴＡＣＧＧＡＴＡＴＣＡＡＴＡＣＧＣＣＡＴＴＡＡＣＧＡＣＣＡＣＣＡＧＣＧＧＣＡＡＴＣＴＧＣＡＴＧＧＣ

ＣＡＧＣＣＧＧＴＴＡＧＣＴＴＣＴＴＡＣＴＧＡＡＧＧＡＧＣＴＧＡＡＧＧＧＴＡＡＡＡＴＴＣＣＡＧＡＴＧＴＴＣＣＧＧ

ＧＣＴＴＴＡＧＣＴＧＧＧＴＣＡＣＧＣＣＡＴＧＴＡＴＴＴＣＴＧＣＣＡＡＧＧＡＴＡＴＣＧＴＧＴＡＣＡＴＴＧＧＣＴＴ

ＡＣＧＴＧＡＣＧＴＣＧＡＣＣＣＡＧＧＴＧＡＧＣＡＣＴＡＣＡＴＣＴＴＡＡＡＧＡＣＣＣＴＧＧＧＴＡＴＣＡＡＧＴＡ

ＴＴＴＣＡＧＣＡＴＧＡＣＧＧＡＡＧＴＧＧＡＣＣＧＣＴＴＡＧＧＣＡＴＣＧＧＣＡＡＧＧＴＧＡＴＧＧＡＧＧＡＧＡＣ

ＧＣＴＧＡＧＣＴＡＴＣＴＧＣＴＧＧＧＣＣＧＴＡＡＧＡＡＡＣＧＴＣＣＡＡＴＣＣＡＴＣＴＧＡＧＣＴＴＣＧＡＴＧＴＴ

ＧＡＣＧＧＣＴＴＡＧＡＣＣＣＧＡＧＣＴＴＴＡＣＧＣＣＡＧＣＣＡＣＣＧＧＣＡＣＧ

CCGGTCGTTGGTGGTT
TAACGTATCGCGAAGGCCTGTATATCACGGAGGAAATCT
ATAAGACGGGTTTAC
TGAGCGGTCTGGACATTATGGAGGTTAATCCAAGCTTAG
GTAAGACGCCGGAAG
AAGTTACCCGTACCGTTAACACGGCGGTCGCGATCACGT
TAGCATGTTTCGGTTT
AGCCCGCGAGGGCAACCATAAACCAATTGATTATCTGAA
TCCACCGAAGTGAGG
ATCCGAATTCG（配列番号１）
GATATACCATGGGCAGCAGCCATCATCACCACCATCACA
GCTCTGGTGAAAACTT
ATACTTCCAAAGCGTCCATAGCGTCGCAGTGATTGGTGC
CCCGTTTAGCCAAGGT
CAAAAAACGCAAGGGTGTTGAACATGGTCCGGCAGCGATC
CGCGAAGCAGGTTTA
ATGAAGCGTTTAAGCAGCTTAGGCTGTCACTTAAAGGAT
TTCGGTGATTTAAGCT
TT ACGCCGGTCCCAAAGGATGATTT ATAC AAT AATC
TGATCGTT AACCC ACGCTC
TGTGGGTCTGGCGAACCAGGAGCTGGCGGAGGTCGTGTC
TCGTGCAGTCAGCGA
CGGTTATAGCTGCGTTACGCTGGGCGGTGATCATAGCTT
AGCCATTGGTACGATT
TCTGGTCATGCCCGCCATTGCCCGGATCTGTGTGTTGTG
TGGGTTGATGCGCACG
CGGATATCAATACGCCACTGACCACGTCTAGCGGTAATT
TACACGGCCAGCCGGT
TAGCTTCTTATTACGTGAGCTGCAAGACAAGGTCCCGCA
GTTACCAGGCTTCTCT
TGGATCAAACCATGTATCAGCAGCGCATCTATTGTCTAC
ATTGGCCTGCGTGATG
TCGACCCACCGGAGCACTTCATCCTGAAGAATTATGACA
TCCAGTATTTCAGCAT
GCGTGACATCGACCGTCTGGGTATCCAAAAAGTTATGGA
GCGCACGTTCGATCTG
TTAATCGGCAAGCGCCAGCGTCCGATTCACCTGAGCTTT
GACATTGACGCCTTTG
ACCCGACCCTGGCCCCAGCAACGGGCACGCCAGTGGTTG
GTGGTTTAACCTACC
GTGAGGGT ATGT AT ATTGCAGAAG AGATCCAT AAT
ACCGGCCTGTT ATCTGCCCT
GGATCTGGTTGAAGTCAATCCGCAGCTGGCAACCTCTGA
GGAGGAAGCGAAGAC
GACCGCCAACCTGGCGGTGGACGTCATCGCCTCTTCTTT
CGGCCAGACGCGTGAA
GGTGGCCATATCGTGTATGACCAATTACCAACGCCATCT
AGCCCGGACGAATCTG
AGAACCAAGCACGTGTCCGTATTTGAGGATCCGAATTCG
（配列番号２）

ＸＳＡＫＳＲＴＩＧＩＩＧＡＰＦＳＫＧＱＰＲＧＧＶＥＥＧＰＴＶＬＲＫＡＧＬＬＥＫＬＫＥＱＥＣＤＶＫＤＹＧＤＬＰＦＡＤＩ
ＰＮＤＳＰＦＱＩＶＫＮＰＲＳＶＧＫＡＳＥＱＬＡＧＫＶＡＥＶＫＫＮＧＲＩＳＬＶＬＧＧＤＨＳＬＡＩＧＳＩＳＧＨＡＲＶＨＰ
ＤＬＧＶＩＷＶＤＡＨＴＤＩＮＴＰＬＴＴＴＳＧＮＬＨＧＱＰＶＳＦＬＬＫＥＬＫＧＫＩＰＤＶＰＧＦＳＷＶＴＰＣＩＳＡＫＤＩ
ＶＹＩＧＬＲＤＶＤＰＧＥＨＹＩＬＫＴＬＧＩＫＹＦＳＭＴＥＶＤＲＬＧＩＧＫＶＭＥＥＴＬＳＹＬＬＧＲＫＫＲＰＩＨＬＳＦＤ
ＶＤＧＬＤＰＳＦＴＰＡＴＧＴＰＶＶＧＧＬＴＹＲＥＧＬＹＩＴＥＥＩＹＫＴＧＬＬＳＧＬＤＩＭＥＶＮＰＳＬＧＫＴＰＥＥＶＴ
ＲＴＶＮＴＡＶＡＩＴＬＡＣＦＧＬＡＲＥＧＮＨＫＰＩＤＹＬＮＰＰＫ（配列番号３）（ヒトアルギナーゼＩ）
ＳＶＨＳＶＡＶＩＧＡＰＦＳＱＧＱＫＲＫＧＶＥＨＧＰＡＡＩＲＥＡＧＬＭＫＲＬＳＳＬＧＣＨＬＫＤＦＧＤＬＳＦＴＰＶＰＫ
ＤＤＬＹＮＮＬＩＶＮＰＲＳＶＧＬＡＮＱＥＬＡＥＶＶＳＲＡＶＳＤＧＹＳＣＶＴＬＧＧＤＨＳＬＡＩＧＴＩＳＧＨＡＲＨＣＰ
ＤＬＣＶＶＷＶＤＡＨＡＤＩＮＴＰＬＴＴＳＳＧＮＬＨＧＱＰＶＳＦＬＬＲＥＬＱＤＫＶＰＱＬＰＧＦＳＷＩＫＰＣＩＳＳＡＳＩ
ＶＹＩＧＬＲＤＶＤＰＰＥＨＦＩＬＫＮＹＤＩＱＹＦＳＭＲＤＩＤＲＬＧＩＱＫＶＭＥＲＴＦＤＬＬＩＧＫＲＱＲＰＩＨＬＳＦＤＩ
ＤＡＦＤＰＴＬＡＰＡＴＧＴＰＶＶＧＧＬＴＹＲＥＧＭＹＩＡＥＥＩＨＮＴＧＬＬＳＡＬＤＬＶＥＶＮＰＱＬＡＴＳＥＥＥＡＫ　ＴＴＡＮＬＡＶＤＶＩＡＳＳＦＧＱＴＲＥＧＧＨＩＶＹＤＱＬＰＴＰＳＳＰＤＥＳＥＮＱＡＲＶＲＩ（配列番号：４）（ヒトアルギナーゼＩＩ）

【００２１】

いくつかの実施形態では、非天然金属はコバルト（Co^{2+}）である。ヒトアルギナーゼＩおよびＩＩタンパク質は、それらの天然の金属補因子として２つのＭｎ（ＩＩ）部位を有する。Ｍｎ部位のいずれかまたは両方を非天然金属補因子で置換して、非天然金属補因子を有する修飾アルギナーゼＩまたはＩＩタンパク質を生成することができる。したがって、本明細書で使用される場合、「非天然金属補因子」は、マンガン以外の金属である。タンパク質は、ｐＨ７．４で４００mM^{-1} s^{-1}を超えるk_{cat}/K_Mを示すことができる。例示的なアルギナーゼ酵素は、ｐＨ７．４で４００mM^{-1} s^{-1}～４，０００mM^{-1} s^{-1}のk_{cat}/K_Mを示すことができる。別の例示的なアルギナーゼ酵素は、３７℃、ｐＨ７．４において４００mM^{-1} s^{-1}～２，５００mM^{-1} s^{-1}のk_{cat}/K_Mを示すことができる。ヒトアルギナーゼＩまたはＩＩのアミノ酸配列および非天然金属補因子を含むアルギナーゼ酵素も企図され、前記タンパク質は、３７℃、ｐＨ７．４で４００mM^{-1} s^{-1}を超えるk_{cat}/K_Mを示す。

【００２２】

特定の実施形態では、ヒトアルギナーゼＩもしくはＩＩ酵素または他のアルギニン枯渇酵素は、患者の血清中の酵素の半減期を延長するために、安定化剤との会合によって安定化される。本明細書で使用される場合、「会合」は、限定されないが、共有結合または非共有結合を含む多くの種類の会合のいずれかを含むことができ、また、水素結合または疎水性相互作用および当業者に公知の他のものから操作された核酸構築物から発現されるタンパク質融合を含むことができる。

【００２３】

開示された方法で使用する安定化剤としては、例えば、限定されないが、Ａｓｃｅｎｄｉｓ　Ｐｈａｒｍａから市販されているＴｒａｎｓＣｏｎリンカー技術を含む、種々のＰＥＧ化ポリマーおよびリンカーを含む、しばしばＰＥＧ化と呼ばれるポリエチレングリコール（ＰＥＧ）、エクステニレーション（ｅｘｔｅｎｙｌａｔｉｏｎ）と呼ばれ、商品名Ｘｔｅｎ（登録商標）で市販されている、１つ以上の均質な合成タンパク質ポリマーへの

コンジュゲート、Ｘｅｎｅｔｉｃ Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓによって ＰＳＡｙｌａｔｉｏｎまたはＰｏｌｙｘｅｎとして市販されているポリシアリル化、ＸＬ－ＰｒｏｔｅｉｎＧｍｂＨからＰＡＳｙｌａｔｉｏｎ（登録商標）として市販されている、１つ以上のＦｃ断片または、例えばアルブミンなどの血清タンパク質へのコンジュゲート挙げられるが、これらに限定されない。例えば、参照により本明細書に組み込まれる米国特許第８，６７９，４７９号および第９，０５０，３４０号を参照されたい。アルギナーゼＰＥＧ化の好ましい範囲は、１，０００～１万ダルトンおよびその間の任意の値域、例えば５，０００ダルトンである。

【００２４】

この方法の実施に有用なアルギニン枯渇酵素には、アルギナーゼ酵素、アルギニンデイミナーゼ酵素またはそれらの組み合わせが含まれ得る。酵素は、哺乳動物の酵素、例えば、ヒトまたは霊長類の酵素、組換えヒト酵素、操作されたヒト酵素、または他の種、哺乳動物もしくは、例えば限定されないが、マイコプラズマを含む細菌のいずれかの酵素であり得る。非ヒトアルギニン枯渇酵素は、例えば、自己赤血球ゴーストによって送達され得る。赤血球ゴーストは、操作された赤血球または赤血球微粒子（ＲＢＣ ＭＰ）とも呼ばれる。例えば、本明細書で論じる酵素のための送達剤としてのそのような粒子の使用に関する、Ｖｉｌｌａ，Ｃ．Ｈ．，ｅｔ ａｌ．，（２０１６）、およびピッツバーグ大学の米国特許第１０，００４，７６４号を参照されたい。

【００２５】

アルギナーゼなどの天然（野生型）アルギニン枯渇酵素は、金属補因子の置換によって修飾することができる。アルギナーゼ酵素は、置換、欠失、挿入、切断、またはＰＥＧ化など、安定化タンパク質もしくはポリマーへのコンジュゲートによる安定化などの他の修飾に加えて、金属補因子の置換によって修飾することができる。例示的なアルギニン枯渇酵素は、ヒト（または霊長類）アルギナーゼＩまたはＩＩの天然（野生型）アミノ酸配列および非天然金属補因子を含み得る。アミノ酸配列はまた、天然配列の一部を欠いていてもよい。アルギナーゼのための非天然金属補因子は、コバルトであり得る。

【００２６】

企図される組成物において活性薬剤として使用するためのアルギナーゼは、野生型配列の一部を欠くことができる。例えば、アミノ酸配列は、切断型アルギナーゼＩまたはアルギナーゼＩＩ配列であり得る。別の例では、アルギナーゼは、野生型配列の最初の２１アミノ酸を欠くアルギナーゼＩＩであり得る。開示される組成物で使用するための別のアルギナーゼ（野生型または操作された変異体）は、Ｎ末端メチオニンを欠くことができる（例えば、配列番号３）。

【００２７】

別の態様では、アルギナーゼ酵素またはアルギニンデイミナーゼ酵素などのアルギニン枯渇酵素は、少なくとも１つのアミノ酸置換を含むことができる。例示的なアルギナーゼ酵素について、酵素は、天然（野生型）ヒトアルギナーゼＩまたはＩＩタンパク質と比較した場合、生理学的条件下、特にヒト血清のｐＨ（ｐＨ７．４）で増加した触媒活性を示す。いくつかの実施形態では、アルギナーゼ酵素または変異体は、ヒトアルギナーゼＩタンパク質またはヒトアルギナーゼＩＩタンパク質、例えば参照により本明細書に組み込まれる米国特許第９，０５０，３４０号に記載されているものである。アルギナーゼ酵素は、アルギナーゼポリペプチド配列中に１、２、３、４、５、６、７、８、９または１０個のアミノ酸の挿入、欠失または置換を含むことができる。検討対象のアルギナーゼ酵素はまた、アミノ末端が切断されているか、またはアミノ末端メチオニンが除去されている（例えば、配列番号３）か、またはこれらの変異の組み合わせを有することができる。別の例示的なアルギナーゼは、非天然金属補因子をさらに含む。特定の実施形態では、非天然金属補因子はCo^{+2}である。Mn^{+2}補因子をCo^{+2}で置換すると、触媒活性が著しく増加し、生理学的ｐＨでＫｍが劇的に減少する。

【００２８】

融合タンパク質は、アルギニン枯渇酵素との使用も企図される。融合タンパク質は、ア

ルギニン枯渇酵素および非アルギニン枯渇酵素を含むことができる。非アルギニン枯渇酵素配列は、例えば、患者に投与した場合に血清中のアルギナーゼの半減期を延長させるために、例えば免疫グロブリンのＦｃ領域の少なくとも一部を含むことができる。Ｆｃ領域またはその一部は、任意の適切なＦｃ領域であり得る。特定の実施形態では、Ｆｃ領域またはその一部は、ＩｇＧ　Ｆｃ領域である。アルギナーゼ枯渇活性を有するアミノ酸配列は、天然または変異アルギニンデイミニナーゼ酵素、ヒトアルギナーゼＩ（例えば、アルギニン１）の天然または変異アミノ酸配列、およびヒトアルギナーゼＩＩ酵素または当技術分野で公知の他のアルギニン枯渇酵素の天然または変異アミノ酸配列からなる群から選択される。特定の実施形態では、二量体Ｆｃ－アルギナーゼ融合タンパク質、アルブミン、または合成タンパク質コンジュゲートが企図される。

【００２９】

融合タンパク質中のアルギニン枯渇酵素は、天然、変異、および／または他の方法で修飾されていてもよく、例えば、金属補因子修飾アルギナーゼ酵素であってもよい。アルギニン枯渇酵素は、欠失、置換、切断またはそれらの組み合わせを含み得る。一例では、アルギナーゼがアルギナーゼＩである、融合タンパク質を含有するＦｃ－アルギナーゼが企図される。さらなる実施形態では、アルギニン枯渇酵素は、野生型配列の一部を欠く。アルギニン枯渇酵素は、Ｎ末端メチオニンを欠くアルギナーゼＩまたはアルギナーゼＩＩであり得、アルギナーゼＩＩは、野生型アルギナーゼＩＩ配列の最初の２１アミノ酸を欠く。あるいは、アルギナーゼ酵素は、非天然金属補因子を含み得る。これらの実施形態では、一方または両方の部位を置換して、ヒトアルギナーゼＩまたはＩＩのアミノ酸配列および非天然金属補因子を含む融合タンパク質を生成することができる。いくつかの実施形態では、非天然金属補因子はコバルトである。いくつかの実施形態では、アルギナーゼは、アミノ酸置換、欠失、挿入、または切断、またはそれらの組み合わせの形態のポリペプチド配列中の変異を含む。本開示で使用するための例示的なアルギナーゼ酵素は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる米国特許第８，４４０，１８４号により十分に記載されている。

【００３０】

本開示は、融合タンパク質を含む製剤を患者に投与することを含む、ヒトＧＡＭＴ患者を治療する方法を含み、ここで融合タンパク質は、アルギニン枯渇酵素活性およびヒト免疫グロブリンのＦｃ領域の少なくとも一部を有するアミノ酸配列を含む。記載された製剤は、生理学的条件で天然ヒトアルギナーゼ酵素またはヒトアルギニンデイミナーゼ酵素によって示されるものよりも高いヒトアルギナーゼ活性を有し、１つ以上の結合したポリエチレングリコール鎖をさらに含むアミノ酸配列を含むことができる。製剤は、上記のアルギニン枯渇酵素のいずれか、例えばアルギナーゼ酵素、および薬学的に許容される賦形剤を含む医薬製剤であり得る。そのような薬学的に許容される賦形剤は、当業者に周知である。記載されるすべてのアルギニン枯渇酵素は、ヒト治療に有用であることが企図される。

【００３１】

いくつかの状況では、製剤は、局所、静脈内、皮内、動脈内、腹腔内、病変内、頭蓋内、関節内、前立腺内、胸膜内、気管内、眼内、鼻腔内、硝子体内、膣内、直腸内、筋肉内、皮下、結膜下、小胞内、粘膜、心膜内、臍下、経口、吸入、注射、注入、連続注入、標的細胞の直接的な局所灌流浴によって、カテーテルを介して、または洗浄液を介して投与することができる。

【００３２】

上記のアルギニン枯渇酵素（例えば、アルギナーゼおよびアルギニンデイミナーゼ酵素ならびにその変異体酵素）はすべて、精製または単離されたタンパク質、好ましくは単量体タンパク質として好ましい実施形態で企図される。

【００３３】

本明細書で使用される「治療的に有効」という用語は、治療効果を達成するために対象を治療する方法、例えば対象において治療されている状態の少なくとも１つの症状が少なくとも改善される方法で使用される活性剤および／または治療用もしくは医薬組成物（治

療用ポリヌクレオチドおよび／または治療用ポリペプチドなど）の量を指す。治療効果はまた、対象におけるアルギニンおよび／またはＧＡＡのレベルの低下または枯渇を含み得る。

【００３４】

本明細書で使用される「治療する」という用語は、特定の状態または疾患の改善、阻害、予防、回復、逆転または他の有益な効果を目的とした、対象への医学的または他の療法の投与を指す。この用語は、本質的にいかなる特定の結果も必要としない。

【００３５】

記載される方法および組成物の他の目的、特徴および利点は、以下の詳細な説明から明らかになるであろう。しかしながら、詳細な説明および具体例は、例示的な実施形態を示しているが、単なる例示として与えられることを理解されたい。なぜなら説明された組成物および方法の精神および範囲内で、様々な変更および修正がこの詳細な説明から当業者に明らかになるからである。

【００３６】

グアニジノ酢酸メチルトランスフェラーゼ酵素をコードする、またはグアニジノ酢酸メチルトランスフェラーゼ酵素の発現に影響を及ぼす遺伝子の遺伝的欠損と関連付けられる、グアニジノ酢酸メチルトランスフェラーゼ（ＧＡＭＴ）活性の欠損の治療またはＧＡＡ毒性の治療のための、Ｌ－アルギニンを枯渇させる酵素を用いた組成物および方法が本明細書に記載される。天然および変異または操作された酵素の両方、ならびに修飾金属補因子を有する酵素、他のポリペプチドに融合された酵素、ならびに血清持続性を増加させるポリマー、例えば高分子量ポリエチレングリコールまたはポリシアル酸にコンジュゲートされた酵素が企図される。

【００３７】

Ｉ．アルギニン枯渇酵素

本明細書で企図されるアルギニン枯渇酵素には、アルギナーゼ酵素、アルギナーゼＩおよびＩＩ、ならびにアルギニンデイミナーゼ酵素、ならびにそれらの変異体が含まれる。

【００３８】

アルギニンデイミナーゼは、酵素クラスＬ－アルギニンイミノヒドロラーゼである。他の同義語としては、アルギニンジヒドロラーゼ、シトルリンイミナーゼおよびＬ－アルギニンデイミナーゼが挙げられる。マイコバクテリウムアルギニンデイミナーゼは、ＮＣＢＩ Ｒｅｆｅｒｅｎｃｅ Ｓｅｑｕｅｎｃｅ ＷＰ＿００３４０５１６９．１に開示されているように、Ｌ－アルギニンからのＬ－シトルリンの形成を触媒する。ホモサピエンアルギニンデイミナーゼ酵素には、ペプチジルアルギニンデイミナーゼ３（ＰＡＤ３としても知られている；ＰＤＩ３、ＵＨＳ１）およびペプチジルアルギニンデイミナーゼ１（ＨＰＡＤ１０、ＰＡＤ１、ＰＤＩ、およびＰＤＩ１とも呼ばれる）が含まれる。

【００３９】

アルギナーゼは、マンガン含有酵素である。これは、尿素サイクルの最後の酵素である。アルギナーゼは、体が有害なアンモニアを処理する哺乳動物における一連の生物物理的反応である、尿素サイクルの第５番目かつ最終工程である。具体的には、アルギナーゼは、Ｌ－アルギニンをＬ－オルニチンおよび尿素に変換する。

【００４０】

Ｌ－アルギニンは一酸化窒素合成酵素（ＮＯＳ）のための窒素供与基質であり、Ｌ－シトルリンおよびＮＯを産生する。アルギナーゼのK_M（２～５ｍＭ）は、Ｌ－アルギニンに対するＮＯＳのそれ（２～２０μＭ）よりはるかに高いことが報告されているが、アルギナーゼはＮＯＳ活性の調節にも役割を果たすことができる。ある条件下では、アルギナーゼＩはＣｙｓ－Ｓ－ニトロシル化され、Ｌ－アルギニンに対するより高い親和性およびＮＯＳに対する基質の利用可能性の低下をもたらす。

【００４１】

アルギナーゼは、いくつかのヘリックスで囲まれた平行な８本鎖βシートのα／βフォールドを有する、ホモ三量体酵素である。この酵素は、Ｌ－アルギニンのグアニジニウム

炭素を求核攻撃するための水酸化物を生成するのに不可欠な、二核金属クラスターを含有する。アルギナーゼの天然金属補因子は、Mn^{2+}である。これらのMn^{2+}イオンは水を配位し、分子を配向および安定化し、水を求核試薬として作用させてＬ－アルギニンを攻撃させ、それを加水分解してオルニチンおよび尿素にする。

【００４２】

哺乳動物は、Ｌ－アルギニンの尿素およびＬ－オルニチンへの加水分解を触媒する、２つのアルギナーゼアイソザイム（ＥＣ３．５．３．１）を有する。アルギナーゼＩ遺伝子は第６染色体（６ｑ．２３）上に位置し、肝細胞のサイトゾルで高度に発現し、尿素サイクルの最終工程として窒素除去において機能する。アルギナーゼＩＩ遺伝子は、第１４染色体（１４ｑ２４．１）に存在する。アルギナーゼＩＩは、腎臓、脳、および骨格筋などの組織のミトコンドリアに局在し、プロリンおよびポリアミン生合成のためのＬ－オルニチンの供給をすると考えられている（Ｌｏｐｅｚ　ｅｔ　ａｌ．，２００５）。

【００４３】

アルギナーゼは、細胞外Ｌ－アルギニンを分解する方法として５０年間近く研究されてきた（Ｄｉｌｌｏｎ　ｅｔ　ａｌ．、２００２）いくつかの有望な臨床結果は、経肝動脈塞栓術によってアルギナーゼを導入することによって達成されており、その後、数名の患者は、ＨＣＣの部分的寛解を経験した（Ｃｈｅｎｇ　ｅｔ　ａｌ．、２００５）。しかしながら、アルギナーゼは高いK_M（約２～５ｍＭ）を有し、生理学的ｐＨ値で非常に低い活性を示すので、患者の化学療法目的には高い投与量が必要である（Ｄｉｌｌｏｎ　ｅｔ　ａｌ．、２００２）。天然のアルギナーゼは数分以内に循環から除去されるが（Ｓａｖｏｃａ　ｅｔ　ａｌ．、１９８４）、ラットにおけるＰＥＧ－アルギナーゼＭＷ　５，０００の単回注射は、約３日間のほぼ完全なアルギニン枯渇を達成するのに十分であった（Ｃｈｅｎｇ　ｅｔ　ａｌ．、２００７）。

【００４４】

Ｃｈｅｎｇ　ｅｔ　ａｌ．は、多くのヒトＨＣＣ細胞株が（アルギニノコハク酸シンテターゼ、ＡＳＳに加えて）オルニチントランスカルバミラーゼ（ＯＴＣ）を発現せず、したがってヒトＨＣＣ細胞がＰＥＧ－アルギナーゼに感受性であるという驚くべき観察結果を報告した（Ｃｈｅｎｇ　ｅｔ　ａｌ．、２００７）。Ｈｅｐ３ｂ肝細胞癌細胞を移植したマウスでは、ＰＥＧ－アルギナーゼの毎週の投与によって腫瘍増殖が遅延し、これは５－フルオロウラシル（５－ＦＵ）の同時投与によって強調された。しかしながら、ＰＥＧ－アルギナーゼは、そのＰＥＧ－アルギナーゼの低い生理学的活性を反映して、ヒト治療での使用には実用的ではない非常に高い用量で使用された。

【００４５】

これらの問題に対処するために、良好な動態および安定性を示す細菌アルギニン加水分解酵素、アルギニンデイミナーゼまたはＡＤＩがインビトロおよび臨床で試験されている。残念なことに、ＡＤＩは細菌酵素であり、したがってＡＤＩはほとんどの患者において強い免疫応答および有害作用を誘導する。しかしながら、有意な有害反応を発症しない患者については、驚くべき割合が安定した疾患または寛解を示す。

【００４６】

臨床使用のために、アルギナーゼは、循環中で長期間（例えば、数日）の持続が可能になるように操作されるべきである。いかなる修飾も存在しない場合、ヒトアルギナーゼの循環中の半減期はわずか数分であり、この主な原因は、そのサイズが腎臓でのろ過を避けるほど大きくないことである。非修飾ヒトアルギナーゼは、血清中で非常に不活性化されやすく、わずか４時間の半減期で分解される。

【００４７】

Ｌ－アルギニンは一酸化窒素合成酵素（ＮＯＳ）のための唯一の基質であり、Ｌ－シトルリンおよびＮＯを産生する。アルギナーゼのK_M（２～５ｍＭ）は、Ｌ－アルギニンに対するＮＯＳのそれ（２～２０μＭ）よりはるかに高いことが報告されているが、アルギナーゼはＮＯＳ活性の調節にも役割を果たすことができる（Ｄｕｒａｎｔｅ　ｅｔ　ａｌ．、２００７）。ある条件下では、アルギナーゼＩはＣｙｓ－Ｓ－ニトロシル化され、Ｌ－

アルギニンに対するより高い親和性およびＮＯＳに対する基質の利用可能性の低下をもたらす（Ｓａｎｔｈａｎａｍ　ｅｔ　ａｌ．，２００７）。アルギナーゼは、いくつかのヘリックスで囲まれた平行な８本鎖βシートのα／βフォールドを有する、ホモ三量体酵素である。この酵素は、Ｌ－アルギニンのグアニジニウム炭素を求核攻撃する水酸化物を生成するのに不可欠な、二核金属クラスターを含有する（Ｃａｍａ　ｅｔ　ａｌ．，２００３；Ｄｏｗｌｉｎｇ　ｅｔ　ａｌ．，２００８）。アルギナーゼの天然金属はMn^{2+}である。天然金属補因子（Mn^{2+}）を有するアルギナーゼ酵素は、最適ｐＨの９を示す。生理学的ｐＨでは、酵素は、Ｌ－アルギニンの加水分解において１／１０より低いk_{cat}/K_Mを示す。天然Mn^{2+}アルギナーゼ酵素を含む天然ヒトアルギナーゼが示す低い触媒活性は、非実用的な用量の酵素を使用して、血漿のＬ－アルギニンレベルの治療上適切な低下を達成しなければならない可能性があることを意味するので、ヒト治療にとって問題となる。

【００４８】

いくつかの態様では、天然金属補因子（Mn^{2+}）が別の金属で置き換えられている天然および変異アルギナーゼが企図される。ヒトアルギナーゼにおける金属補因子の置換は、天然の金属補因子含む天然のヒトアルギナーゼと比較した場合、生理学的条件下でのＬ－アルギニンの加水分解速度および安定性に有益な効果を及ぼすことが見出された。天然金属（Mn^{2+}）の他の二価カチオンによる置換を利用して、酵素の最適ｐＨをより低い値にシフトさせ、したがって生理学的条件下で高速のＬ－アルギニン加水分解を達成することができる。ヒトアルギナーゼＩおよびＩＩタンパク質は、２つのＭｎ（ＩＩ）部位を有するので、いずれかまたは両方の部位を、非天然金属補因子を有する変異アルギナーゼＩまたはＩＩタンパク質を生成するように置換することができる。適切な非天然金属は、コバルトである。

【００４９】

アルギナーゼ酵素のための非天然金属は、コバルト（Co^{2+}）であり得る。Mn^{2+}の代わりにCo^{2+}をヒトアルギナーゼＩまたはヒトアルギナーゼＩＩの組み込むと、生理学的ｐＨで劇的に高い活性が得られる。Co^{2+}を含有するヒトアルギナーゼＩ酵素（「Ｃｏ－ｈＡｒｇｌ」）は、Mn^{2+}を含有するヒトアルギナーゼＩ（「Ｍｎ－ｈＡｒｇｌ」）と比較して、ｐＨ７．４でインビトロでk_{cat}/K_Mの１０倍の増加を示し、これは次にＨＣＣ細胞毒性では１５倍の増加、およびメラノーマ細胞毒性では１３倍の増加に変換されることが分かった。Ｃｏ－ｈＡｒｇの薬理学的調製物は、マウスにおいて単回注射で３日間にわたって血清Ｌ－Ａｒｇを除去することができることも見出された。さらに、Ｃｏ－ｈＡｒｇｌの薬理学的調製物は、ヌードマウスのＨＣＣ腫瘍異種移植片を縮小させることができるが、Ｍｎ－ｈＡｒｇｌ（Mn^{+2}含有ヒトアルギナーゼＩ酵素）は、腫瘍増殖を遅らせるだけであることが見出された（Ｅｎｓｏｒ　ｅｔ　ａｌ．、２００２）。参照により本明細書に組み込まれる、米国特許第９，０５０，３４０号および第８，６７９，４７９号も参照されたい。

【００５０】

ＰＥＧ化ヒトアルギナーゼＩおよびＩＩ酵素を含む、ＰＥＧ化アルギナーゼ酵素およびアルギニンデイミナーゼ酵素に関連する方法および組成物が開示される。具体的には、操作されたシステイン残基におけるアルギナーゼのＰＥＧ化（例えば、Ｎ末端の３番目の残基を置換）を用いて、均質なＰＥＧ化アルギナーゼ組成物を生成することができる。重合の一時的な中断に基づくＰＥＧ化アルギナーゼの単離方法もまた開示される。

【００５１】

例示的なヒトアルギナーゼＩ酵素は、配列番号３を含むか、または場合により、Ｈｉｓ１０１、Ａｓｐ１２４、Ｈｉｓ１２６、Ａｓｐ１２８、Ａｓｐ２３２、Ａｓｐ２３４、Ｔｒｐ１２２、Ａｓｐ１８１、Ｓｅｒ２３０、Ｈｉｓ１２０、Ａｓｐ１４３、Ｈｉｓ１４５、Ａｓｐ１４７、Ａｓｐ２５１、Ａｓｐ２５３、Ｔｒｐ１４１、Ａｓｐ２００、Ｓｅｒ２４９、Ｃｙｓ３０３もしくはＧｌｕ２５６におけるアミノ酸置換のうちの１つ以上をさらに含み得る。あるいは、天然の金属補因子を有するか、またはコバルトなどの別の金属補

因子を使用する、本パラグラフに示される変異の１つ以上を有する天然のアルギナーゼＩであり得る。多くの変異は、触媒活性を増加させ、生理学的条件下でＬ－アルギニンのK_mを劇的に低下させることが見出されている。場合により、本明細書に記載のアルギナーゼＩタンパク質および変異体の置換変異は、以下の１つまたは複数からなる群から選択することができる。Ａｓｐ１８１Ｓｅｒ、Ｓｅｒ２３０Ｃｙｓ、Ｓｅｒ２３０Ｇｌｙ、Ｃｙｓ３０３Ｐｈｅ、Ｃｙｓ３０３Ｉｌｅ、Ｇｌｕ２５６Ｇｌｎ、Ａｓｐ１８１ＧｌｕおよびＳｅｒ２３０Ａｌａ。いくつかの態様では、本発明は、２つ以上の変異がヒトアルギナーゼＩ酵素に導入される実施形態を提供する。ヒトアルギナーゼＩ酵素は、少なくとも２つのアミノ酸置換を含むことができる。ヒトアルギナーゼＩ酵素は、Ａｓｐ１８１ＧｌｕおよびＳｅｒ２３０Ａｌａに置換を有することができる。これらの変異体はまた、Ｎ末端メチオニンを有するかまたは欠くことが考えられる。アルギナーゼ１は、例えば、配列番号３の配列を有するヒトアルギナーゼＩであり、ここでＮ末端メチオニンは欠損しており、補因子はコバルトであり、ＰＥＧ化されている。

【００５２】

ＰＥＧ化は、ポリ（エチレングリコール）ポリマー鎖を別の分子、通常は薬物または治療用タンパク質に共有結合させるプロセスである。「ＰＥＧ化」は、通常、ＰＥＧの反応性誘導体を標的高分子とインキュベートすることによって達成される。薬物または治療用タンパク質へのＰＥＧの共有結合は、宿主の免疫系から薬剤を「マスキング」し（免疫原性および抗原性の低下）、腎クリアランスを減少させることによってその循環時間を延長する薬剤の流体力学的サイズ（溶液中のサイズ）を増大させることができる。ＰＥＧ化はまた、疎水性薬物およびタンパク質に水溶性を与えることもできる。

【００５３】

ＰＥＧ化の第１の工程は、一方または両方の末端でのＰＥＧポリマーの適切な官能化である。同じ反応性部分を有する各末端で活性化されるＰＥＧは「ホモ二官能性」として知られているが、存在する官能基が異なる場合、ＰＥＧ誘導体は「ヘテロ二官能性」または「ヘテロ官能性」と称される。ＰＥＧポリマーの化学的に活性なまたは活性化された誘導体を調製して、ＰＥＧを所望の分子に結合させる。

【００５４】

ＰＥＧ誘導体のための好適な官能基の選択は、ＰＥＧに結合されるであろう分子上の利用可能な反応基のタイプに基づく。タンパク質について、典型的な反応性アミノ酸としては、リジン、システイン、ヒスチジン、アルギニン、アスパラギン酸、グルタミン酸、セリン、トレオニン、チロシンが挙げられる。Ｎ末端アミノ基およびＣ末端カルボン酸を使用することもできる。

【００５５】

第一世代ＰＥＧ誘導体を形成するために使用される技術は、一般にＰＥＧポリマーを、ヒドロキシル基、典型的には無水物、酸塩化物、クロロホルメート、およびカルボナートと反応する基と反応させることである。第二世代ＰＥＧ化化学作用では、アルデヒド、エステル、アミドなどのより効率的な官能基がコンジュゲートために利用可能である。

【００５６】

ＰＥＧ化の用途がますます発展および複雑化するにつれて、コンジュゲートのためのヘテロ二官能性ＰＥＧの必要性が増加している。これらのヘテロ二官能性ＰＥＧは、親水性、柔軟性、および生体適合性スペーサーが必要とされる２つの実体を連結するのに有用である。ヘテロ二官能性ＰＥＧの好ましい末端基は、マレイミド、ビニルスルホン、ピリジルジスルフィド、アミン、カルボン酸、およびＮＨＳ（Ｎ－ヒドロキシスクシンイミド）エステルである。

【００５７】

最も一般的な修飾剤またはリンカーは、メトキシＰＥＧ（ｍＰＥＧ）分子に基づく。これらの活性は、アルコール末端にタンパク質修飾基を付加することに依存している。いくつかの例では、ポリエチレングリコール（ＰＥＧジオール）が前駆体分子として使用される。その後、ジオールは、ヘテロまたはホモ二量体ＰＥＧ結合分子を作製するために両端

が修飾される（ＰＥＧビス－ビニルスルホンを用いた実施例に示されるように）。
【００５８】
本明細書で企図されるアルギニン枯渇酵素およびその変異体は、一般に、非プロトン化チオール（システイニル残基）またはアミノ基などの求核性部位でＰＥＧ化される。システイニル特異的修飾試薬の例として、ＰＥＧマレイミド、ＰＥＧヨード酢酸、ＰＥＧチオール、およびＰＥＧビニルスルホンが挙げられる。４つは全て、温和な条件下および中性～弱アルカリ性のｐＨ下において強いシステイニル特異性を示すが、それぞれいくつかの欠点がある。マレイミドで形成されたアミドは、アルカリ性条件下では幾分不安定であり得るため、このリンカーを用いた配合オプションにはいくつかの制限があり得る。ヨードＰＥＧで形成されるアミド結合はより安定であるが、遊離ヨウ素は、いくつかの条件下においてチロシン残基を修飾できる。ＰＥＧチオールはタンパク質チオールとジスルフィド結合を形成するが、この結合もまた、アルカリ条件下で不安定であり得る。ＰＥＧ－ビニルスルホン反応性は、マレイミドおよびヨードＰＥＧと比べて比較的遅い。しかしながら、形成されるチオエーテル結合は極めて安定である。反応速度が遅いとまた、ＰＥＧ－ビニルスルホン反応の制御も容易になる。
【００５９】
天然のシステイニル残基での部位特異的ＰＥＧ化は、これらの残基が通常ジスルフィド結合の形態であるか、または生物活性に必要であるため、ほとんど行われない。一方で、部位特異的突然変異誘発法は、チオール特異的リンカーのシステイニルＰＥＧ化部位を取り込むために使用できる。システイン変異は、それがＰＥＧ化試薬に利用可能であり、かつＰＥＧ化後もなお生物学的に活性であるように設計されなければならない。
【００６０】
アミン特異的修飾剤には、ＰＥＧ　ＮＨＳエステル、ＰＥＧトレシレート、ＰＥＧアルデヒド、ＰＥＧイソチオシアネート、およびいくつかの他のものが含まれる。すべて穏やかな条件下で反応し、アミノ基に非常に特異的である。ＰＥＧ　ＮＨＳエステルは、おそらくより反応性の高い薬剤の１つである。しかしながら、その高い反応性は、ＰＥＧ化反応の大規模な制御を困難にする可能性がある。ＰＥＧアルデヒドは、アミノ基とイミンを形成し、次いで、シアノ水素化ホウ素ナトリウムで第二級アミンに還元される。水素化ホウ素ナトリウムとは異なり、シアノ水素化ホウ素ナトリウムはジスルフィド結合を還元しない。しかしながら、この化学物質は毒性が高く、特にｐＨの低下で揮発性になり、慎重に取り扱わなければならない。
【００６１】
ほとんどのタンパク質には複数のリシン残基があるため、部位特異的なＰＥＧ化は困難となり得る。幸いなことに、これらの試薬はプロトン化されていないアミノ基と反応するので、より低いｐＨで反応を行うことによって、ＰＥＧ化をより低いｐＫアミノ基に向けることが可能である。一般に、α－アミノ基のｐＫは、リシン残基のε－アミノ基より１～２ｐＨ単位低い。ｐＨ７以下で分子をＰＥＧ化することによって、Ｎ末端に対する高い選択性をしばしば達成することができる。しかしながら、これは、タンパク質のＮ末端部分が生物活性に必要でない場合にのみ可能である。それでもなお、ＰＥＧ化による薬物動態学的利益はインビトロ生物活性の有意な損失を上回ることができるため、結果として、ＰＥＧ化の化学的性質に関わらず、はるかに大きなインビボ生物活性を有する生成物が得られる。
【００６２】
ＰＥＧ化手順を開発する場合、考慮すべきいくつかのパラメータがある。幸いなことに、通常、４つまたは５つ以下のパラメータがある。ＰＥＧ化条件を最適化するための「実験の設計」アプローチは、非常に有用であり得る。チオール特異的ＰＥＧ化反応の場合、考慮すべきパラメータには、タンパク質濃度、ＰＥＧ対タンパク質比（モル基準）、温度、ｐＨ、反応時間、および場合によっては酸素の排除が含まれる。酸素は、タンパク質による分子間ジスルフィド形成の原因になり得、ＰＥＧ化生成物の収率を低下させるであろう。アミン特異的修飾については、特にＮ末端アミノ基を標的とする場合、ｐＨがさらに

より重要になり得ることを除いて、同じ因子が考慮されるべきである（酸素を除く）。

【００６３】

アミン特異的修飾およびチオール特異的修飾の両方について、反応条件は、タンパク質の安定性に影響を及ぼし得る。これにより、温度、タンパク質濃度、およびｐＨが限定され得る。加えて、ＰＥＧリンカーの反応性は、ＰＥＧ化反応を開始する前に知るべきである。例えば、ＰＥＧ化剤の活性が７０％のみである場合、使用されるＰＥＧの量は、活性なＰＥＧ分子のみがタンパク質対ＰＥＧ反応の化学量論において計数されることを保証すべきである。ＰＥＧの反応性および品質の決定方法については後述する。

【００６４】

ＩＩ．タンパク質およびペプチド

少なくとも１つのタンパク質またはペプチド、例えば安定化アルギナーゼ多量体を含む組成物が提供される。これらのポリペプチドは、融合タンパク質中にあってもよく、または本明細書に記載の薬剤にコンジュゲートされていてもよい。

【００６５】

本明細書中で使用される場合、タンパク質またはペプチドとは、一般に、限定されるものではないが、遺伝子から翻訳された全長配列までの約２００を超えるアミノ酸のタンパク質、約１００を超えるアミノ酸のポリペプチド、および／または約３～約１００のアミノ酸のペプチドを指す。便宜上、用語「タンパク質」、「ポリペプチド」、および「ペプチド」は、本明細書中では互換的に使用される。タンパク質またはポリペプチドという用語は、特に明記しない限り、酵素と互換的に使用される。

【００６６】

特定の実施形態では、少なくとも１つのタンパク質またはペプチドのサイズは、限定されないが、１、２、３、４、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、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、８３、８４、８５、８６、８７、８８、８９、９０、９１、９２、９３、９４、９５、９６、９７、９８、９９、１００、約１１０、約１２０、約１３０、約１４０、約１５０、約１６０、約１７０、約１８０、約１９０、約２００、約２１０、約２２０、約２３０、約２４０、約２５０、約２７５、約３００、約３２５、約３５０、約３７５、約４００、約４２５、約４５０、約４７５、約５００、約５２５、約５５０、約５７５、約６００、約６２５、約６５０、約６７５、約７００、約７２５、約７５０、約７７５、約８００、約８２５、約８５０、約８７５、約９００、約９２５、約９５０、約９７５、約１０００、約１１００、約１２００、約１３００、約１４００、約１５００、約１７５０、約２０００、約２２５０、約２５００またはそれ以上のアミノ酸残基を含み得る。

【００６７】

本明細書中で使用される場合、「アミノ酸残基」とは、天然に存在するあらゆるアミノ酸、あらゆるアミノ酸誘導体、または当技術分野において公知のあらゆるアミノ酸模倣物を指す。特定の実施形態では、タンパク質またはペプチドの残基は連続的であり、アミノ酸残基の配列を中断するいかなる非アミノ酸も含まない。他の実施形態では、配列は、１つ以上の非アミノ酸部分を含み得る。タンパク質またはペプチドの残基の配列はまた、１つ以上の非アミノ酸部分によって中断され得る。

【００６８】

したがって、用語「タンパク質またはペプチド」は、天然に存在するタンパク質に見られる２０個の一般的なアミノ酸の少なくとも１つ、または以下の表１に示されるものを含むがこれらに限定されない、少なくとも１つの修飾もしくは異常アミノ酸を含むアミノ酸配列を包含する。

【表１】

修飾アミノ酸および異常アミノ酸	
略語	アミノ酸
Ａａｄ	２－アミノアジピン酸
Ｂａａｄ	３－アミノアジピン酸
Ｂａｌａ	β－アラニン、β－アミノ－プロピオン酸
Ａｂｕ	２－アミノ酪酸
４Ａｂｕ	４－アミノ酪酸、ピペリジン酸
Ａｃｐ	６－アミノカプロン酸
Ａｈｅ	２－アミノヘプタン酸
Ａｉｂ	２－アミノイソ酪酸
Ｂａｉｂ	３－アミノイソ酪酸
Ａｐｍ	２－アミノピメリン酸
Ｄｂｕ	２，４－ジアミノ酪酸
Ｄｅｓ	デスモシン
Ｄｐｍ	２，２’－ジアミノピメリン酸
Ｄｐｒ	２，３－ジアミノプロピオン酸
ＥｔＧｌｙ	Ｎ－エチルグリシン
ＥｔＡｓｎ	Ｎ－エチルアスパラギン
Ｈｙｌ	ヒドロキシリジン
ＡＨｙｌ	アロ－ヒドロキシリジン
３Ｈｙｐ	３－ヒドロキシプロリン
４Ｈｙｐ	４－ヒドロキシプロリン
Ｉｄｅ	イソデスモシン
Ａｌｌｅ	アロイソロイシン
ＭｅＧｌｙ	Ｎ－メチルグリシン、サルコシン
Ｍｅｌｌｅ	Ｎ－メチルイソロイシン
ＭｅＬｙｓ	６－Ｎ－メチルリシン
ＭｅＶａｌ	Ｎ－メチルバリン
Ｎｖａ	ノルバリン
Ｎｌｅ	ノルロイシン
Ｏｍ	オルニチン

【００６９】

タンパク質またはペプチドは、当業者に公知の任意の技術、例えば、標準的な分子生物学的技術によるタンパク質、ポリペプチドもしくはペプチドの発現、天然源からのタンパク質もしくはペプチドの単離、またはタンパク質もしくはペプチドの化学合成などによって作製され得る。様々な遺伝子に対応するヌクレオチドおよびタンパク質、ポリペプチドおよびペプチド配列は、以前に開示され、当業者に公知のコンピュータ化されたデータベースで見出すことができる。そのようなデータベースとしては、Ｎａｔｉｏｎａｌ Ｃｅｎｔｅｒ ｆｏｒ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ ＩｎｆｏｒｍａｔｉｏｎのＧｅｎｂａｎｋおよびＧｅｎＰｅｐｔデータベース（ワールドワイドウェブのｎｃｂｉ．ｎｌｍ．ｎｉｈ．ｇｏｖで利用可能）が挙げられる。既知の遺伝子のコード領域は、本明細書に開示される技術を使用して、または当業者に知られているように増幅および／または発現され得る。あるいは、タンパク質、ポリペプチドおよびペプチドの様々な市販の調製物が当業者に

公知である。
【００７０】
ＩＩＩ．核酸およびベクター
安定化された多量体アルギナーゼなど、本明細書で論じられるアルギニン枯渇酵素のための融合タンパク質をコードする核酸配列も企図される。使用される発現系に応じて、核酸配列は、従来の方法に基づいて選択することができる。例えば、ヒトアルギナーゼＩおよびＩＩは、発現を妨害し得る大腸菌（Ｅ．ｃｏｌｉ）タンパク質合成においてまれに利用される複数のコドンを含有し、したがって、それぞれの遺伝子またはその変異体は、大腸菌（Ｅ．ｃｏｌｉ）発現のためにコドンを最適化することができる。種々のベクターを用いて、融合多量体アルギナーゼまたはシステイン置換アルギナーゼのような目的のタンパク質を発現させることもできる。例示的なベクターは、限定されるものではないが、プラスミドベクター、ウイルスベクター、トランスポゾン、またはリポソームベースのベクターを含む。
【００７１】
ＩＶ．宿主細胞
本明細書で論じられるアルギニン枯渇酵素およびその酵素変異体を産生するのに有用な宿主細胞、好ましくは真核細胞は、アルギナーゼおよびその融合多量体の発現および分泌を可能にするように形質転換され得る任意のものである。宿主細胞は、細菌、哺乳動物細胞、酵母、また糸状菌であり得る。種々の細菌には、エシェリキア属（Ｅｓｃｈｅｒｉｃｈｉａ）およびバチルス属（Ｂａｃｉｌｌｕｓ）が含まれる。サッカロミセス属（Ｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ）、クルイベロミセス属（Ｋｌｕｙｖｅｒｏｍｙｃｅｓ）、ハンゼヌラ属（Ｈａｎｓｅｎｕｌａ）、またはピチア属（Ｐｉｃｈｉａ）に属する酵母は、適切な宿主細胞としての使用を見出す。以下の属を含む様々な種類の糸状菌を発現宿主として使用することができる。アスペルギルス（Ａｓｐｅｒｇｉｌｌｕｓ）、トリコデルマ（Ｔｒｉｃｈｏｄｅｒｍａ）、アカパンカビ（Ｎｅｕｒｏｓｐｏｒａ）、青カビ（Ｐｅｎｉｃｉｌｌｉｕｍ）、セファロスポリウム（Ｃｅｐｈａｌｏｓｐｏｒｉｕｍ）、ワタカビ（Ａｃｈｌｙａ）、ポドスポラ（Ｐｏｄｏｓｐｏｒａ）、エンドチア（Ｅｎｄｏｔｈｉａ）、ケカビ（Ｍｕｃｏｒ）、コクリオボルス（Ｃｏｃｈｌｉｏｂｏｌｕｓ）、およびピロクラリア（Ｐｙｒｉｃｕｌａｒｉａ）。
【００７２】
使用可能な宿主生物の例としては、細菌、例えば、大腸菌（Ｅｓｃｈｅｒｉｃｈｉａ ｃｏｌｉ）ＭＣ１０６１、枯草菌（Ｂａｃｉｌｌｕｓ ｓｕｂｔｉｌｉｓ）ＢＲＢ１の誘導体（Ｓｉｂａｋｏｖ ｅｔ ａｌ．，１９８４），黄色ブドウ球菌（Ｓｔａｐｈｙｌｏｃｏｃｃｕｓ ａｕｒｅｕｓ）ＳＡＩ１２３（Ｌｏｒｄａｎｅｓｃｕ，１９７５）またはストレプトコッカス・リビダンス（Ｓｔｒｅｐｔｏｃｏｃｃｕｓ ｌｉｖｉｄａｎｓ）（Ｈｏｐｗｏｏｄ ｅｔ ａｌ．，１９８５）；酵母、例えば、出芽酵母（Ｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅ）ＡＨ ２２（Ｍｅｌｌｏｒ ｅｔ ａｌ．，１９８３）および分裂酵母（Ｓｃｈｉｚｏｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ ｐｏｍｂｅ）￥糸状菌、例えば、アスペルギルス・ニデュランス（Ａｓｐｅｒｇｉｌｌｕｓ ｎｉｄｕｌａｎｓ）、アスペルギルス・アワモリ（Ａｓｐｅｒｇｉｌｌｕｓ ａｗａｍｏｒｉ）（Ｗａｒｄ，１９８９），トリコデルマ・リーゼイ（Ｔｒｉｃｈｏｄｅｒｍａ ｒｅｅｓｅｉ）（Ｐｅｎｔｔｉｌａ ｅｔ ａｌ．，１９８７；Ｈａｒｋｋｉ ｅｔ ａｌ，１９８９）、が挙げられる。
【００７３】
哺乳動物宿主細胞の例としては、チャイニーズハムスター卵巣細胞（ＣＨＯ－Ｋ１；ＡＴＣＣ ＣＣＬ６１）、ラット下垂体細胞（ＧＨ$_1$、ＡＴＣＣ ＣＣＬ８２）、ＨｅＬａＳ３細胞（ＡＴＣＣ ＣＣＬ２．２）、ラット肝癌細胞（Ｈ－４－ＩＩ－Ｅ；ＡＴＣＣＣＲＬ１５４８）、ＳＶ４０形質転換サル腎臓細胞（ＣＯＳ－１、ＡＴＣＣ ＣＲＬ１６５０）、およびマウス胚細胞（ＮＩＨ－３Ｔ３；ＡＴＣＣ ＣＲＬ １６５８）が挙げられる。上記例は、当技術分野で知られている多くの可能な宿主生物を例示するものであるが、限定

するものではない。原則として、原核生物であろうと真核生物であろうと、分泌することができるすべての宿主を使用することができる。

【００７４】

アルギナーゼおよび／またはそれらの融合多量体を発現する哺乳動物宿主細胞は、親細胞株を培養するために典型的に使用される条件下で培養される。一般に、細胞は、典型的にはウシ胎児血清などの５～１０％血清が補充された、標準ＲＰＭＩ、ＭＥＭ、ＩＭＥＭまたはＤＭＥＭなどの生理学的塩および栄養素を含有する標準培養培地中で培養される。培養条件もまた標準的であり、例えば、タンパク質の所望のレベルが達成されるまで、培養物を定置またはローラー培養物中において３７℃でインキュベートする。

【００７５】

Ｖ．タンパク質精製

タンパク質精製技術は、当業者に周知である。これらの技術は、１つのレベルで、細胞、組織または器官のポリペプチド画分および非ポリペプチド画分への均質化および粗分画を必要とする。目的のタンパク質またはポリペプチドは、特に明記しない限り、部分的または完全な精製（または、均一にするための精製）を達成するために、クロマトグラフィー技術および電気泳動技術を用いて更に精製することができる。純粋なペプチドの調製に特に適した分析方法は、イオン交換クロマトグラフィー、ゲル排除クロマトグラフィー、ポリアクリルアミドゲル電気泳動、アフィニティークロマトグラフィー、イムノアフィニティークロマトグラフィー、および等電点電気泳動である。ペプチドを精製する特に効率的な方法は、高速液体クロマトグラフィー（ｆａｓｔ ｐｅｒｆｏｒｍａｎｃｅ ｌｉｑｕｉｄ ｃｈｒｏｍａｔｏｇｒａｐｈｙ、ＦＰＬＣ）、または更には、高性能液体クロマトグラフィー（ｈｉｇｈ ｐｅｒｆｏｒｍａｎｃｅ ｌｉｑｕｉｄ ｃｈｒｏｍａｔｏｇｒａｐｈｙ、ＨＰＬＣ）である。

【００７６】

本明細書に記載のアルギニン枯渇酵素またはその変異体を有する精製タンパク質またはペプチドは、他の成分から単離可能な組成物を指すこともでき、ここでタンパク質またはペプチドは、その天然に得られる状態に対して任意の程度まで精製される。したがって、単離または精製されたタンパク質またはペプチドはまた、それが天然に存在し得る環境から遊離したタンパク質またはペプチドも指す。一般的に、「精製された」とは、種々の他の成分を除去するために分画に供され、その発現された生物活性を保持するタンパク質またはペプチド組成物を指す。用語「実質的に精製された」が使用される場合、この呼称は、タンパク質またはペプチドが組成物の主要成分を形成する組成物、例えばタンパク質が組成物の約５０％、約６０％、約７０％、約８０％、約９０％、約９５％、またはそれ以上を構成する組成物を指す。

【００７７】

タンパク質精製での使用に適した様々な技術は、当業者に周知である。これらには、例えば、硫酸アンモニウム、ＰＥＧ、および抗体などを用いた、または熱変性による沈殿、その後の遠心分離；イオン交換、ゲルろ過、逆相、ヒドロキシルアパタイトおよびアフィニティークロマトグラフィーなどのクロマトグラフィー工程；等電点電気泳動；ゲル電気泳動；およびにこれらの技術と他の技術との組合せを含む。当技術分野で一般的に知られているように、様々な精製工程を行う順序を変更してもよく、または特定の工程を省略してもよく、それでも結果として、実質的に精製されたタンパク質またはペプチドの調製に適した方法になる、と考えられる。

【００７８】

タンパク質またはペプチドの精製度を定量するための様々な方法は、本開示に照らして当業者に公知である。これらには、例えば、活性画分の比活性を決定すること、またはＳＤＳ／ＰＡＧＥ分析によって画分内のポリペプチドの量を評価することが含まれる。画分の純度を評価するための好ましい方法は、画分の比活性を計算し、それを初期抽出物の比活性と比較し、したがって「－倍の精製値」によって評価されるその中の純度を計算することである。活性の量を表すために使用される実際の単位は、もちろん、精製後に選択さ

れる特定のアッセイ技術、および発現されたタンパク質またはペプチドが検出可能な活性を示すか否かに依存する。

【００７９】

タンパク質またはペプチドが常にそれらの最も精製された状態で提供されるという一般的な要件はない。実際、特定の実施形態では、実質的にあまり精製されていない生成物が有用であり得ると考えられる。部分精製は、組み合わせてより少ない精製工程を使用することによって、または同じ一般的な精製スキームの異なる形態を利用することによって達成され得る。例えば、ＨＰＬＣ装置を利用して行われるカチオン交換カラムクロマトグラフィーは、一般に、低圧クロマトグラフィーシステムを利用する同じ技術よりも大きな「倍数」の精製をもたらすことが理解される。より低い相対精製度を示す方法は、タンパク質産物の全回収において、または発現されたタンパク質の活性の維持において利点を有し得る。

【００８０】

特定の実施形態では、タンパク質またはペプチドは、例えば安定化アルギナーゼ多量体融合タンパク質、またはＰＥＧ化の前もしくは後のアルギナーゼを単離または精製されてもよい。例えば、精製を容易にするために、そのようなアルギナーゼ変異体にＨｉｓタグまたは親和性エピトープを含めることができる。アフィニティークロマトグラフィーは、単離されるべき物質とそれが特異的に結合することができる分子との間の特異的親和性に依存するクロマトグラフィー手順である。これは、受容体－リガンド型相互作用である。カラム材料は、結合パートナーの１つを不溶性マトリックスに共有結合させることによって合成される。次いで、カラム材料は、溶液から物質を特異的に吸着することができる。溶出は、条件を結合が起こらないものに変更することによって起こる（例えば、ｐＨ、イオン強度、温度などの変更）。マトリックスは、それ自体が分子を有意な程度まで吸着せず、広範囲の化学的、物理的および熱的安定性を有する物質でなければならない。リガンドは、その結合特性に影響を及ぼさないように結合されるべきである。リガンドはまた、比較的強固な結合を提供すべきである。さらに、サンプルまたはリガンドを破壊することなく物質を溶出することが可能でなければならない。

【００８１】

サイズ排除クロマトグラフィー（ＳＥＣ）は、溶液中の分子がそれらのサイズ、またはより技術的な用語ではそれらの流体力学的体積に基づいて分離されるクロマトグラフィー法である。それは通常、タンパク質および工業用ポリマーなどの大きな分子または高分子複合体に適用される。典型的には、水溶液を使用してサンプルをカラムを通して輸送する場合、この技術は、有機溶媒を移動相として使用する場合に使用されるゲル浸透クロマトグラフィーという名称に対して、ゲル濾過クロマトグラフィーとして知られている。

【００８２】

ＳＥＣの基本原理は、異なるサイズの粒子が異なる速度で固定相を通って溶出（フィルタにかける）することである。これにより、サイズに基づいて粒子の溶液が分離される。すべての粒子が同時にまたはほぼ同時に装填されるならば、同じサイズの粒子は一緒に溶出するはずである。各サイズ排除カラムは、分離することができる分子量の範囲を有する。排除限界は、この範囲の上端の分子量を定義する、分子が大きすぎて固定相に捕捉されない箇所である。透過限界は、分離範囲の下端の分子量を定義し、十分に小さいサイズの分子が固定相の細孔に完全に浸透することができ、この分子質量未満のすべての分子が非常に小さいため、単一のバンドとして溶出する箇所である。

【００８３】

高速液体クロマトグラフィー（または高圧液体クロマトグラフィー、ＨＰＬＣ）は、化合物を分離、同定、および定量するために生化学および分析化学で頻繁に使用されるカラムクロマトグラフィーの一形態である。ＨＰＬＣは、クロマトグラフィー用充填剤（固定相）を保持するカラム、移動相をカラム内で移動させるポンプ、および分子の保持時間を示す検出器を利用する。保持時間は、固定相、分析される分子、および使用される溶媒の間の相互作用に応じて変化する。

【００８４】
ＶＩ．医薬組成物
アルギニン枯渇酵素およびその変異体、例えば、アルギニンデイミナーゼ酵素および／またはアルギナーゼ酵素は、静脈内（ｉ．ｖ．）、髄腔内、および／または腹腔内（ｉ．ｐ．）または皮下のいずれかで全身投与され得る組成物中にあることが企図される。それらは、単独で、またはＧＡＡ毒性に関連する他の治療と組み合わせて投与することができる。
【００８５】
企図される組成物は、生理学的に許容される液体、ゲルまたは固体担体、希釈剤、および賦形剤と共に製剤化することができる。これらの治療（医薬）調製物は、他の治療用生物学的薬剤と同様の方法でヒトにおける臨床使用のために投与することができる。一般に、治療有効性に必要な投与量は、使用のタイプおよび投与様式、ならびに個々の対象の特定の要件に応じて変動する。
【００８６】
このような組成物は、典型的には、注射剤としての液体溶液または懸濁液として調製される。好適な希釈剤および賦形剤は、例えば、水、生理食塩水、デキストロース、グリセロール、およびＦＤＡ承認の他の希釈剤、およびこれらの組合せである。さらに、所望であれば、組成物は少量の補助物質、例えば湿潤剤または乳化剤、安定化剤またはｐＨ緩衝剤を含有してもよい。
【００８７】
臨床応用が企図される場合には、意図された応用に適切な形態で、医薬組成物、すなわち発現ベクター、ウイルスストック、タンパク質、抗体、および薬物を調製することが必要であり得る。一般に、本明細書で論じられる「医薬組成物」および「医薬製剤」は、薬学的に許容される担体に溶解または分散された１つ以上の有効量のアルギナーゼ変異体または追加の薬剤を含む。語句「薬学的または薬理学的に許容される」とは、適宜動物、例えば、ヒトに投与された場合に、有害なアレルギー性反応または他の不都合な反応を引き起こさない分子実態および組成物を指す。本明細書に開示された方法によって単離された安定化多量体アルギナーゼもしくはＰＥＧ化アルギナーゼなどの少なくとも１つのアルギナーゼ酵素もしくはその変異体、または追加の有効成分を含有する医薬組成物の調製は、参照により本明細書に組み込まれるＲｅｍｉｎｇｔｏｎ’ｓ Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌ Ｓｃｉｅｎｃｅｓ、１８thＥｄ．、（１９９０年）によって例示されるように、本開示に照らして当業者に公知である。更に、動物（例えば、ヒト）への投与について、調製物は、ＦＤＡ Ｏｆｆｉｃｅ ｏｆ Ｂｉｏｌｏｇｉｃａｌ Ｓｔａｎｄａｒｄｓが要求する無菌性、発熱性、全般的安全性、および純度の基準を満たすべきであることが理解される。
【００８８】
本明細書中で使用される場合、「薬学的に許容される担体」には、当業者に知られているあらゆる全ての溶媒、分散媒、コーティング剤、界面活性剤、酸化防止剤、防腐剤（例えば、抗菌剤、抗真菌剤）、等張剤、吸収遅延剤、塩類、防腐剤、薬物、薬物安定剤、ゲル、結合剤、賦形剤、崩壊剤、潤滑剤、甘味剤、香味剤、染料、同様の材料、およびそれらの組合せが含まれる（例えば、Ｒｅｍｉｎｇｔｏｎ’ｓ Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌ Ｓｃｉｅｎｃｅｓ、１８thＥｄ．（１９９０年）を参照されたい）。いずれかの従来の担体が有効成分と不適合である場合を除き、医薬組成物におけるその使用が企図される。
【００８９】
本明細書に記載される検討対象のアルギニンデイミナーゼ酵素およびアルギナーゼ酵素およびそれらの変異体の組成物は、固体、液体またはエアロゾル形態で投与されるかどうか、および注射のような投与経路のために滅菌される必要があるかどうかに応じて、担体と共に製剤化することができる。医薬組成物は、静脈内投与、皮内投与、経皮投与、髄腔内投与、動脈内投与、腹腔内投与、鼻腔内投与、膣内投与、直腸内投与、局所投与、筋肉内投与、皮下投与、粘膜投与、経口投与、局所（ｔｏｐｉｃａｌｌｙ）投与、局所（ｌｏ

ｃａｌｌｙ）投与、吸入（例えば、エアロゾル吸入）、注射、注入、連続注入、標的細胞の直接的な局所灌流浴、カテーテルを介して、洗浄液を介して、脂質組成物（例えば、リポソーム）中で、または当業者に公知であるような他の方法もしくは前述の方法の任意の組み合わせによって投与することができる（例えば、参照により本明細書に組み込まれるＲｅｍｉｎｇｔｏｎ’ｓ Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌ Ｓｃｉｅｎｃｅｓ，１８thＥｄ．（１９９０年）を参照されたい）。

【００９０】

アルギニン枯渇酵素は、遊離塩基、中性または塩の形態で組成物に配合され得る。薬学的に許容される塩には、酸付加塩、例えばタンパク質性組成物の遊離アミノ基と形成されるもの、または無機酸、例えば塩酸もしくはリン酸などと、または有機酸、例えば酢酸、シュウ酸、酒石酸、もしくはマンデル酸などと形成されるものが含まれる。遊離カルボキシル基と形成される塩類を、無機塩基、例えばナトリウム、カリウム、アンモニウム、カルシウム、もしくは第二鉄の水酸化物、またはイソプロピルアミン、トリメチルアミン、ヒスチジン、もしくはプロカインなどの有機塩基から誘導することもできる。製剤化すると、溶液は、投与製剤と適合する様式で、かつ治療上有効な量で投与される。製剤は、注射剤のような非経口投与のための、もしくは肺への送達用のエアロゾルための製剤、または消化管投与用の薬物放出カプセルなどの製剤といった種々の剤形で容易に投与される。

【００９１】

投与に適した検討対象の組成物は、不活性希釈剤を含むまたは含まない薬学的に許容される担体中で提供される。担体は同化可能であるべきであり、液体、半固体、すなわちペースト、または固体担体を含む。任意の従来の媒体、薬剤、希釈剤または担体は、レシピエントまたは組成物に含有されるその治療有効性に有害である場合を除いて、記載される治療および使用方法を実施する際に使用するための投与可能な組成物でそれを使用する。担体または希釈剤の例には、脂肪、油、水、生理食塩水、脂質、リポソーム、樹脂、結合剤、および増量剤など、またはその組合せが含まれる。組成物はまた、１つ以上の成分の酸化を遅らせるための種々の抗酸化剤を含むこともできる。さらに、微生物の活動は、種々の抗菌剤および抗真菌剤などの防腐剤、例えば、これらに限定されないがパラベン（例えば、メチルパラベン、プロピルパラベン）、クロロブタノール、フェノール、ソルビン酸、チメロサールまたはそれらの組み合わせなどによって防止することができる。

【００９２】

検討される組成物は、任意の簡便かつ実用的な様式で、すなわち、溶液、懸濁液、乳化、混和、カプセル化、吸収などによって担体と組み合わせることができる。そのような手順は、当業者にとって慣例である。

【００９３】

組成物は、半固体または固体担体と組み合わせるか、または完全に混合することができる。混合は、粉砕などの任意の簡便な方法で行うことができる。組成物を治療活性の喪失、すなわち胃における変性から保護するために、安定剤を混合プロセス中に添加することもできる。組成物に使用するための安定剤の例としては、緩衝剤、グリシンおよびリジンなどのアミノ酸、デキストロース、マンノース、ガラクトース、フルクトース、ラクトース、スクロース、マルトース、ソルビトール、マンニトールなどの炭水化物が挙げられる。

【００９４】

医薬用脂質ビヒクルは、アルギナーゼ変異体、１つ以上の脂質、および水性溶媒を含む組成物に使用することができる。本明細書中で使用される場合、用語「脂質」とは、水に特徴的に不溶性であり、かつ有機溶媒で抽出可能である、広範囲の物質のいずれかを含むように定義される。この広範なクラスの化合物は当業者に周知であり、「脂質」という用語が本明細書で使用される場合、それはいかなる特定の構造にも限定されない。例として、長鎖脂肪族炭化水素およびその誘導体を含有する化合物が挙げられる。脂質には天然のものまたは合成のもの（すなわち、人間によって設計されるかまたは生産される）があり得る。しかしながら、脂質は通常、生体物質である。生体脂質は当技術分野で周知であり、例えば、中性脂肪、リン脂質、ホスホグリセリド、ステロイド、テルペン、リソリピド

、スフィンゴ糖脂質、糖脂質、スルファチド、エーテル結合脂肪酸およびエステル結合脂肪酸を有する脂質、重合性脂質、ならびにそれらの組合せが挙げられる。もちろん、脂質として当業者によって理解される本明細書に具体的に記載されるもの以外の化合物も、本明細書に記載される組成物および方法に包含される。

【００９５】

当業者は、脂質ビヒクル中に組成物を分散させるために使用できる技術の範囲に精通しているであろう。例えば、安定化された多量体またはＰＥＧ化アルギナーゼは、当業者に公知の任意の手段によって、脂質を含有する溶液中に分散されてもよく、脂質と溶解されてもよく、脂質と乳化されてもよく、脂質と混合されてもよく、脂質と組み合わされてもよく、脂質に共有結合されてもよく、脂質中に懸濁液として含有されてもよく、ミセルまたはリポソームで含有または複合体化されてもよく、あるいは脂質または脂質構造と会合されてもよい。分散によってリポソームが形成されてもよく、またはされなくてもよい。

【００９６】

動物患者に投与することができる、本明細書に記載の組成物、医薬組成物、または活性剤の実際の投与量は、患者の体重、状態の重症度、治療される疾患のタイプ、過去または現在の治療的介入、突発性疾患、および投与経路などの物理的および生理学的要因によって決定することができる。投与量および投与経路に応じて、好ましい投与量および／または有効量の投与回数は、対象の応答に従って変動してもよい。投与を担当する医師は、いずれにせよ、組成物中の有効成分の濃度および個々の対象に対する適切な用量を決定するであろう。

【００９７】

特定の実施形態では、医薬組成物は、例えば、少なくとも約０．１％の活性化合物を含み得る。他の実施形態では、活性化合物は、例えば、単位の重量の約２％～約７５％、または約２５％～約６０％、およびそこで誘導可能なあらゆる範囲を含んでもよい。当然ながら、各治療的に有用な組成物中の活性化合物の量は、化合物のあらゆる所与の単位用量において好適な用量が得られるように調製してもよい。溶解性、バイオアベイラビリティ、生物学的半減期、投与経路、製品の貯蔵寿命、ならびに他の薬理学的考慮事項などの要因は、そのような医薬製剤を調製する当業者によって企図され、そのようなものとして、種々の投与量および治療レジメンが望ましい場合がある。

【００９８】

他の非限定的な例では、用量はまた、投与１回当たり約１マイクログラム／ｋｇ／体重、約５マイクログラム／ｋｇ／体重、約１０マイクログラム／ｋｇ／体重、約５０マイクログラム／ｋｇ／体重、約１００マイクログラム／ｋｇ／体重、約２００マイクログラム／ｋｇ／体重、約３５０マイクログラム／ｋｇ／体重、約５００マイクログラム／ｋｇ／体重、約１ミリグラム／ｋｇ／体重、約５ミリグラム／ｋｇ／体重、約１０ミリグラム／ｋｇ／体重、約５０ミリグラム／ｋｇ／体重、約１００ミリグラム／ｋｇ／体重、約２００ミリグラム／ｋｇ／体重、約３５０ミリグラム／ｋｇ／体重、約５００ミリグラム／ｋｇ／体重から約１０００ｍｇ／ｋｇ／体重またはそれ以上まで、およびそこから導き出せる任意の範囲を含み得る。本明細書に列挙した数値から導き出せる範囲の非限定的な例では、上記の数値に基づいて、約５ｍｇ／ｋｇ／体重～約１００ｍｇ／ｋｇ／体重、約５マイクログラム／ｋｇ／体重～約５００ミリグラム／ｋｇ／体重などの範囲で投与することができる。

【００９９】

アルギナーゼ１（配列番号３であるが、Ｎ末端メチオニンを欠き、補因子としてコバルトを有し、ＰＥＧ化されている）を含む医薬組成物の場合、対象への投与のための例示的な量は、０．０１ｍｇ／ｋｇ～７．５ｍｇ／ｋｇ対象体重、または０．０５ｍｇ／ｋｇ～５．０ｍｇ／ｋｇ、または０．１ｍｇ／ｋｇ～５．０ｍｇ／ｋｇ（および０．１ｍｇ／ｋｇ～５．０ｍｇ／ｋｇの任意の０．１値）の範囲であり得る。

【０１００】

本明細書で企図される状態に対する神経筋機能の改善のための治療有効性は、アルギニ

ンおよび／またはＧＡＡ低下剤の初回投与後に決定される。神経筋機能は、これらに限定されないが、患者による足踏みの改善、患者による歩行、患者の痙縮の軽減、および／または注意力の向上のうちの１つまたは複数であり得る。別の方法は、対象が、アルギナーゼ投与前の痙縮、行動、およびＰＲＯＭＩＳ－Ｔスコアのうちの少なくとも１つと比較して、アルギニン枯渇酵素（例えば、アルギナーゼおよびアルギニンデイミナーゼ）の初回投与後に、安静時痙縮の減少、痙縮に関連する下肢痙攣の減少、適応行動、およびＰＲＯＭＩＳ－Ｔスコアの改善のうちの少なくとも１つを示すことを企図する。アルギナーゼによる治療に応答して、１つ以上の毒性代謝産物（例えば、ＧＡＡ）がそれらの当初のレベルから少なくとも３０％、４０％、５０％、６０％、７０％、８０％低下して正常レベルになるか、または除去される。

【０１０１】

対象を治療する方法は、アルギニン枯渇酵素組成物を反復用量で投与することである。複数回の投与を受けた後、患者は、（ａ）運動性または（ｂ）適応行動の少なくとも１つにおいて、治療前の対象の前記運動性または適応行動のベースラインと比較して、改善を示し得る。

【０１０２】

患者に投与される場合の治療有効量はまた、筋力、患者の歩行能力（すなわち、走る、歩く、自転車に乗る、支えなしで階段を上る能力）を改善し、かつ認知能力（例えば、ウェクスラー児童知能（Ｗｅｃｈｓｌｅｒ Ｉｎｔｅｌｌｉｇｅｎｃｅ Ｓｃａｌｅ ｆｏｒ Ｃｈｉｌｄｒｅｎ、ＷＩＳＣ）検査の改善）および／または適応行動（例えば、適応行動評価スケール（Ａｄａｐｔｉｖｅ Ｂｅｈａｖｉｏｒ Ａｓｓｅｓｓｍｅｎｔ Ｓｃａｌｅ、ＡＢＡＳ）もしくはヴァインランド適応行動スケール（Ｖｉｎｅｌａｎｄ Ａｄａｐｔｉｖｅ Ｂｅｈａｖｉｏｒ Ｓｃａｌｅ、ＶＡＢＳ）検査の改善）を改善することができる（Ｌｏｐａｔａｅｔ ａｌ．、「Ｃｏｍｐａｒｉｓｏｎ ｏｆ Ａｄａｐｔｉｖｅ Ｂｅｈａｖｉｏｒ Ｍｅａｓｕｒｅｓ ｆｏｒ Ｃｈｉｌｄｒｅｎ ｗｉｔｈ ＨＦＡＳＤｓ」、Ａｕｔｉｓｍ Ｒｅｓｅａｒｃ ａｎｄ Ｔｒｅａｔｍｅｎｔ、Ｖｏｌ．２０１３、１～１０頁（２０１３年））。

【０１０３】

ＶＩＩ．定義

「ａａ」という用語は、アミノ酸を指す。アミノ酸置換は、文字コードを使用した分子中のアミノ酸位置、例えば３０３で表される（数字の前の文字は置換されるアミノ酸を示し、数字の後の文字は導入されるアミノ酸を示す）。

【０１０４】

特許請求の範囲における「または」という用語の使用は、代替物のみを指すように明示的に示されない限り、または代替物が相互に排他的でない限り、「および／または」を意味するために使用されるが、本開示は、代替物および「および／または」のみを指す定義を支持する。

【０１０５】

本出願を通して、「約」という用語は、値が値を決定するために使用されている組成、装置または方法の誤差の標準偏差を含むことを示すために使用される。

【０１０６】

長期にわたる特許法に従い、特許請求の範囲または明細書において「含む（ｃｏｍｐｒｉｓｉｎｇ）」という単語と組み合わせて使用される場合の「１つの（ａ）」および「１つの（ａｎ）」という単語は、特に明記しない限り、１つまたは複数を意味する。

【０１０７】

本明細書中で使用される用語「部分（ｐｏｒｔｉｏｎ）」は、タンパク質に関する場合（「所与のタンパク質の一部分」のように）、そのタンパク質の断片を指す。断片のサイズは、４アミノ酸残基から、１アミノ酸を引いたアミノ酸配列全体までの範囲であり得る。

【０１０８】

本明細書中で使用される場合、用語「タンパク質」および「ポリペプチド」とは、ペプ

チド結合を介して結合されたアミノ酸を含む化合物を指し、交換可能に使用される。本明細書で論じられるタンパク質およびポリペプチドは、アルギニンデイミナーゼ酵素などのアルギニン枯渇酵素、またはアルギナーゼＩもしくはＩＩ酵素などのアルギナーゼ、またはアルギニン枯渇酵素に融合される融合タンパク質であり得る。タンパク質は、細菌または哺乳動物であり得る。哺乳動物酵素には、げっ歯類、ヒト、霊長類などが含まれ得る。これらのタンパク質は、天然タンパク質または遺伝子修飾組換えタンパク質であり得る。例示的なタンパク質には、アミノ末端もしくはカルボキシ末端が切断されているか、または本明細書に記載されるように他の方法で遺伝子修飾された変異体であるアルギニン枯渇酵素が含まれる。

【０１０９】

本明細書で使用される場合、用語「融合タンパク質」は、外因性タンパク質断片（非アルギナーゼ酵素または非アルギニンデイミナーゼからなる融合パートナー）に結合された（または操作可能に連結された）目的のタンパク質（すなわち、ヒトアルギナーゼまたはその変異体）を含むキメラタンパク質を指す。融合パートナーは、血清の半減期、溶解性、またはこれら両方を増強し得る。これはまた、宿主細胞または培養上清、またはその両方からの組換え融合タンパク質の精製を可能にする親和性タグ（例えば、Ｈｉｓタグ）を提供し得る。

【０１１０】

用語「操作可能な組み合わせで」、「操作可能な順序で」、および「操作可能に連結される」とは、所与の遺伝子の転写および／または所望のタンパク質分子の合成を指示することができる核酸分子が産生されるような様式での、核酸配列の連結を指す。この用語はまた、機能性タンパク質が産生されるような様式でのアミノ酸配列の連結を指す。

【０１１１】

本明細書中で使用される場合、用語「K_m」とは、酵素のミカエリス・メンテン定数（Ｍｉｃｈａｅｌｉｓ－Ｍｅｎｔｅｎ　ｃｏｎｓｔａｎｔ）を指し、酵素触媒反応において所定の酵素がその最大速度の半分を生じる特定の基質の濃度として定義される。

【０１１２】

本明細書中で使用される場合、用語「k_{cat}」とは、酵素が最大効率で作用している単位時間当たりに各酵素部位が生成物に変換する、ターンオーバー数または基質分子の数を指す。

【０１１３】

本明細書中で使用される場合、用語「$K_{cat}／K_m$」とは、特異性定数であって、これは、酵素がいかに効率的に基質を生成物へと変換するかの尺度である。

【０１１４】

用語「Ｍｎ－ｈＡｒｇＩ」とは、Ｍｎ（ＩＩ）補因子を有するヒトアルギナーゼＩを指す。用語「Ｃｏ－ｈＡｒｇＩ」とは、Ｃｏ（ＩＩ）補因子を有するヒトアルギナーゼＩ（変異または天然）を指す。

【０１１５】

用語「ＩＣ５０」は、最大半量（５０％）の阻害濃度（ＩＣ）であり、したがって有効性の尺度である。

【０１１６】

用語「ＰＥＧ化」とは、高度の生体適合性および修飾の容易さを考慮して、薬物担体として広く使用されているポリエチレングリコール（ＰＥＧ）とのコンジュゲートを指す（Ｈａｒｒｉｓ　ｅｔ　ａｌ．，２００１）。様々な薬物、タンパク質およびリポソームへの付着は、滞留時間を改善し、毒性を減少させることが示されている（Ｇｒｅｅｎｗａｌｄ　ｅｔ　ａｌ．、２０００；Ｚａｌｉｐｓｋｙ　ｅｔ　ａｌ．、１９９７）ＰＥＧは、鎖の末端のヒドロキシル基を介して、および他の化学的方法によって活性剤に結合（例えば、共有結合）することができる。しかしながら、ＰＥＧ自体は、１分子当たり最大で２つの活性剤に限定される。異なるアプローチでは、ＰＥＧとアミノ酸のコポリマーは、ＰＥＧの生体適合性特性を保持するが、分子あたりの多数の結合点（より多い薬物充填量をもたら

す）の追加された利点を有し、様々な用途に適合するように合成的に設計することができる新規の生体材料として研究されている（Ｎａｔｈａｎ　ｅｔ　ａｌ．、１９９２；Ｎａｔｈａｎ　ｅｔ　ａｌ．、１９９３）。一態様では、アルギナーゼは、１，０００～１０，０００ダルトン、例えば５，０００ダルトンのポリエチレングリコールでＰＥＧ化される。例えば、参照により本明細書に組み込まれる米国特許第８，６７９，４７９号を参照されたい。

【０１１７】

用語「遺伝子」とは、ポリペプチドまたはその前駆体の産生に必要な制御およびコード配列を含む、ＤＮＡ配列を指す。所望の酵素活性が保持されている限り、ポリペプチドは、全長コード配列によって、またはコード配列のいずれかの部分によってコードされ得る。

【０１１８】

用語「対象」とは、ヒトを含む動物を指す。対象はまた、小児ヒト患者であり得る。

【０１１９】

用語「野生型」または「天然」とは、天然に存在する供給源から単離された場合にその遺伝子または遺伝子産物の特徴を有する、遺伝子または遺伝子産物を指す。野生型遺伝子は、集団において最も頻繁に観察されるものであり、したがって、遺伝子の「正常」または「野生型」形態と任意に呼ばれる遺伝子である。対照的に、用語「修飾された」または「変異体」または「変異」とは、野生型の遺伝子または遺伝子産物と比較した場合に、配列および／または機能的特性における修飾（すなわち、特性の変化）を示す、遺伝子または遺伝子産物を指す。天然に存在する変異体を単離することができることに留意されたい。これらは、野生型の遺伝子または遺伝子産物と比較した場合に、特性が変化しているという事実によって同定される。「天然」は、マンガンであるアルギナーゼの金属補因子を指すこともできる。

【０１２０】

ＶＩＩＩ．キット

治療用キットなどのキットも提供される。例えば、キットは、本明細書中に記載されるような１つ以上の医薬組成物、および場合により、それらの使用説明書を含み得る。キットはまた、そのような組成物の投与を達成するための１つ以上の装置を含み得る。例えば、表題のキットは、場合により医薬品として製剤化されるか、または例えば送達装置での使用のために凍結乾燥された、安定化多量体アルギナーゼまたは単離されたＰＥＧ化アルギナーゼを予め充填したアンプル、または対象へ組成物を皮下または静脈内注射するためのプレロードシリンジを含み得る。

【０１２１】

キットは、ラベルを有する容器を含み得る。適切な容器には、例えば、ボトル、バイアル、および試験管が含まれる。容器は、ガラスまたはプラスチックなどの様々な材料から形成されてもよい。容器は、上記のような治療用途または非治療用途に有効な抗体を含む組成物を保持することができる。容器上のラベルは、組成物が特定の治療または非治療的用途に使用されることを示すことができ、また、インビボまたはインビトロのいずれかでの使用のための指示、例えば上述の指示なども示すこともできる。例示的なキットは、上記の容器と、緩衝液、希釈剤、フィルタ、針、シリンジ、および使用説明書付きの添付文書を含む、商業的観点および使用者の観点から望ましい材料を含む１つ以上の他の容器とを含むことができる。

【実施例】

【０１２２】

以下の実施例は、化合物、組成物、医薬組成物および使用方法の特定の態様を説明するのに役立ち、その範囲を限定するものと解釈されるべきではない。以下の実験の開示では、以下の略語が適用される。ｅｑ（当量）；Ｍ（モル）；μＭ（マイクロモル）；μＭ（ミリモル）；Ｎ（正常）；ｍｏｌ（モル）；ｍｍｏｌ（ミリモル）；μｍｏｌ（マイクロモル）；ｎｍｏｌ（ナノモル）；ｇ（グラム）；ｍｇ（ミリグラム）；μｇ（マイクログラム）；Ｌ（リットル）；ｍｌ（ミリリットル）；μｌ（マイクロリットル）；ｃｍ（セ

ンチメートル）；ｍｍ（ミリメートル）；μｍ（マイクロメートル）；ｎｍ（ナノメートル）；ＥＣ（摂氏）；ＭＷ（分子量）；ＰＢＳ（リン酸緩衝生理食塩水）；ｍｉｎ（分）。

【０１２３】

［実施例１］

アルギナーゼＩへの金属含有量の組み込みおよび決定

Mn^{2+}およびCo^{2+}の組み込みは、アルギナーゼの精製、続いて１０ｍＭ金属と共に５０℃で１０分間インキュベートする工程によって達成することができる。アルギナーゼ調製物の最終的な金属含有量および同一性を決定するために、Ｍｎ－ｈＡｒｇＩ（１４５μＭ）、Ｃｏ－ｈＡｒｇＩ（１８２μＭ）および関連する透析緩衝液（１００ｍＭ Ｈｅｐｅｓ、ｐＨ７．４）のタンパク質サンプルを２％硝酸で希釈し、誘導結合プラズマ質量分析（ＩＣＰ－ＭＳ，Ｄｅｐａｒｔｍｅｎｔ ｏｆ Ｇｅｏｌｏｇｉｃａｌ Ｓｃｉｅｎｃｅｓ，テキサス大学、オースティン校）によって分析して、最終的なタンパク質サンプルの金属濃度から透析緩衝液中に見出される金属の濃度を差し引いてタンパク質濃度で割ることにより、タンパク質のコバルト、鉄、マンガンおよび亜鉛含有量を定量化した。タンパク質濃度を決定するために、アミノ酸配列に基づいてｈＡｒｇｌについて吸光係数を計算した（ＧｉｌｌおよびＶｏｎ Ｈｉｐｐｅｌ，１９８９）。アルギナーゼＩの全タンパク質濃度を、６Ｍグアニジニウム塩酸塩、２０ｍＭリン酸緩衝液、ｐＨ６．５の最終緩衝液濃度における計算されたε_{280}＝２４，１８０$M^{-1}cm^{-1}$に基づいて計算した。比較のために、アルギナーゼ濃度もまた、ＢＳＡの希釈液を基準として使用するＢＣＡアッセイによって計算した。この方法を使用して、Co^{2+}と共にインキュベートしたアルギナーゼサンプルは、２．１±０．５当量のＣｏおよび０．４±０．１当量のＦｅを含有し、検出可能な量のＺｎまたはＭｎを含有しないことが分かった。Mn^{2+}とインキュベートしたサンプルは、１．５±０．２当量のＭｎおよび０．４±０．１当量のＦｅを含有し、検出可能な量のＺｎまたはＣｏを含有しない。したがって、熱インキュベーションは、コバルトを組み込むための効率的な方法である。

【０１２４】

コバルト担持のさらなる研究は、より高い割合のコバルト担持が達成可能であり、より高い比活性をもたらすことを実証した。これらの研究の結果を以下の表および図３に示す。

【表２】

Ｃｏ－アルギナーゼＩコバルト担持

識別	Ｃｏ（ｍＭ）	温度（℃）	時間（分）	総Ｃｏ（μｇ／ｍｇアルギナーゼ）	総Ｍｎ（μｇ／ｍｇアルギナーゼ）	特異的活性（Ｕ／ｍｇ）
ＡＰＯ－アルギナーゼＩ*	ＮＡ	ＮＡ	ＮＡ	＜０．０２５	０．００８	２４
ＡＰＯ担持１*	０．１	５	１５	０．３	ＮＤ	１１７
Ｃｏｈ－Ａｒｇ Ｉ*	１０	２０	６０	２	０．０６	４１０
ＡＰＯ担持２*	１	５	１５	２．４	ＮＤ	３９５
ＡＰＯ担持３*	１０	２０	１５	２．８	ＮＤ	４９３
ＡＰＯ担持４*	１０	２０	６０	２．９	ＮＤ	４８９
ＡＰＯ 担持 ５	１０	３７	１５	２．８	ＮＤ	ＮＴ
ＡＰＯ 担持 ６	１０	５３	１５	２．６	ＮＤ	ＮＴ
Ｃｏ－Ａｒｇｌ－ＰＥＧ	１０	５３	１５	３	ＮＤ	５００
理論値				３．４		

＊グラフ化－星印のデータを図２に示す。

【０１２５】
［実施例２］
インビボ半減期を延長するためのＦｃ－アルギナーゼ融合タンパク質の操作
ＩｇＧ　Ｆｃドメインへの融合は、ＴＮＦ－α阻害剤エタネルセプト（Ｅｎｂｒｅｌ（登録商標））などの治療用ポリペプチドのインビボ半減期を延長するために広く用いられている。Ｆｃドメインは、血管内皮および他の多くの組織上に発現されるＦｃγＲｎ受容体に結合する（ＲｏｏｐｅｎｉａｎおよびＡｋｉｌｅｓｈ、２００７年）。ＩｇＧ　Ｆｃドメインに対するＦｃγＲｎの親和性は、ｐＨ依存性が強い。結合はエンドソーム区画の酸性ｐＨで起こり、タンパク質が細胞表面に再利用され、したがってタンパク質分解から逃れることを可能にする。細胞表面では、結合親和性が生理学的ｐＨでは非常に低いため、ＦｃγＲｎからＦｃドメインが放出される。ＦｃγＲｎを介したエンドソーム再利用は、ヒトにおいて免疫グロブリンの血清半減期を少なくとも４～７倍、約７～１４日に延長すると推定される。Ｆｃ融合は、この特性を利用して、短命分子に長い半減期を与える。しかしながら、ヒトアルギナーゼはホモ三量体であり、したがって、それ自体が二量体であるＩｇＧ　Ｆｃに融合された場合、得られたＦｃ－アルギナーゼポリペプチドは、高分子量凝集体を形成する可能性が高い。
【０１２６】
この問題は、二量体化を中断し、単量体形態で安定なアルギナーゼの変異型を使用することによって回避された。アルギナーゼＩの二量体化およびサブユニット界面は、ある程度詳細に研究されている（Ｌａｖｕｌｏ　ｅｔ　ａｌ．、２００１）。Ｇｌｕ２５６Ｇｌｎでの単一アミノ酸置換は、二量体化を中断し、単量体アルギナーゼＩ酵素の形成をもたらすことが示されている（Ｓａｂｉｏ　ｅｔ　ａｌ．、２００１）。この変異体の発現および精製後、定常状態速度論分析により、１，３２０s^{-1} mM^{-1}のk_{cat}/K_Mを有するＣｏ－ｈＡｒｇｌと比較してほぼ同一の活性が明らかになった。
【０１２７】
次いで、この構築物をＦｃ発現ベクターにクローニングした。Ｆｃ発現ベクターは、ＤｓｂＡリーダー配列に続いてＩｇＧ　Ｆｃコード領域、ＥｃｏＲＩ制限部位および終止コドンを含むｐＴＲＣ９９ａプラスミド（Ａｍｅｒｓｈａｍ）に基づく構築物である。単量体アルギナーゼ遺伝子を、ベクターおよび遺伝子の両方をＥｃｏＲＩで消化することによってＦｃコード領域の後方にインフレームで配置し、その後、配列決定および発現のために大腸菌（Ｅ．ｃｏｌｉ）（ＢＬ２１）にライゲーションおよび形質転換した。ＩｇＧ　Ｆｃは通常、グリコシル化タンパク質であるので、組換えＩｇＧまたはＦｃ融合物の発現はこれまで、細菌とは異なり、Ｎ結合型グリコシル化が可能な組換え哺乳動物細胞で行われてきた。しかしながら、Ａｓｎ２９７でのグリコシル化は、活性化および阻害性Ｆｅｙ受容体（ヒトにおけるＦｃγＲＩ－ＩＩＩ）への結合に重要であるが、ＦｃγＲｎに対する親和性またはｐＨ依存性結合に顕著な影響を及ぼさない（ＴａｏおよびＭｏｒｒｉｓｏｎ、１９８９；Ｓｉｍｍｏｎｓ　ｅｔ　ａｌ．、２００２）。したがって、細菌において発現されるアグリコシル化ＩｇＧ抗体は、霊長類において、哺乳動物細胞において発現される完全グリコシル化抗体の血清中残留性とほとんど区別できない血清中残留性を示す（Ｓｉｍｍｏｎｓ　ｅｔ　ａｌ．、２００２）。一般的な以前の概念とは対照的に、ＩｇＧ抗体およびＦｃタンパク質は、発酵槽中においてｇ／Ｌレベルまで大腸菌（Ｅ．ｃｏｌｉ）中で効率的に発現され得る。大腸菌（Ｅ．ｃｏｌｉ）発現は、技術的にはるかに単純で迅速である。さらに、得られたタンパク質はアグリコシル化されているので、治療用糖タンパク質の発現における重要な問題であるグリカン不均一性を示さない（Ｊｅｆｆｅｒｉｓ、２００７）。融合タンパク質をＰｒｏｔｅｉｎ　Ａクロマトグラフィーによって精製し、二量体化できないポリペプチドに対する、正確に折り畳まれた二量体Ｆｃ－アルギナーゼ融合物の収率をＦＰＬＣゲル濾過クロマトグラフィーによって定量化する。この製剤は、インビボ試験に適した高活性で非常に安定な形態のヒトアルギナーゼをもたらした。
【０１２８】
［実施例３］

アルギナーゼのＰＥＧ化

アルギナーゼＩ（配列番号３）を精製し、次いで、Ｃ０Ｃｌ２で１０ｍＭにし、５０℃で１０分間加熱した。遠心分離して沈殿を除去した後、ＰＥＧ－５０００アルギナーゼを１００，０００ＭＷＣＯ濾過装置（Ａｍｉｃｏｎ）を使用して広範囲に緩衝液交換し（１０％グリセロールを含むＰＢＳ）、０．２ミクロンのシリンジフィルタ（ＶＷＲ）で滅菌した。全てのＰＥＧ化酵素を、Ｌｉｍｕｌｕｓ Ａｍｅｂｏｃｙｔｅ Ｌｙｓａｔｅ（ＬＡＬ）キット（Ｃａｐｅ Ｃｏｄ Ｉｎｃｏｒｐｏｒａｔｅｄ）を使用してリポ多糖（ＬＰＳ）含有量について分析した。

【０１２９】

ＰＥＧ化Ｃｏ－ｈＡｒｇＩは、野生型酵素とほぼ同一の血清安定性を有することが見出され、１６９０±２９０ $s^{-1}mM^{-1}$のk_{cat}/K_M値を示した。

【０１３０】

コバルトと組み合わせたＰＥＧ化アルギナーゼＩ調製物は、参照により本明細書に組み込まれる米国特許第８，６７９，４７９号にさらに記載されている。

【０１３１】

［実施例４］

マウスモデルにおけるＬ－Ａｒｇの血清枯渇

Ｂａｌｂ／ｃマウスを、５００μｇの薬理学的に調製されたＰＥＧ化Ｃｏ－ｈＡｒｇＩまたは等容積のＰＢＳによる単回ＩＰ注射によって処置した。マウスを、０時間、４８時間、７２時間および９６時間の時点で、採血のために心臓静脈穿刺によって絶命させた。血液サンプルを直ちに５０：５０（ｖ／ｖ）で４００ｍＭのｐＨ４クエン酸ナトリウム緩衝液と混合し、３０分間凝固させ、血清分離のために遠心分離した。次いで、得られた血清を、大きなタンパク質および沈殿物を除去するために１０，０００ＭＷＣＯ装置（Ａｍｉｃｏｎ）でフィルタにかけ、分析のためにフロースルーを収集した。Ｌ－アルギニン標準、対照マウス血清および実験サンプルをＯＰＡ（Ａｇｉｌｅｎｔ）で誘導体化し、より良好なピーク分離を得るために流速を１／２低下し、捕捉時間を２倍にすることによるわずかな分離プロトコルの変更を除いて、本質的にＡｇｉｌｅｎｔ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ（出版番号：５９８０－３０８８）に記載されたように、Ｃ１８逆相ＨＰＬＣカラム（Ａｇｉｌｅｎｔ）（５μｍ，４．６ｘ１５０ｍｍ）で分離した。血清Ｌ－Ａｒｇレベルを定量化するために、Ｌ－Ａｒｇピーク面積を濃度に対してプロットすることによってＬ－アルギニン標準曲線を構成した。薬理学的に調製されたＣｏ－ｈＡｒｇＩの単回用量は、３日間にわたってＬ－Ａｒｇを検出限界以下に維持するのに十分であった（図１）。

【０１３２】

［実施例５］

アルギナーゼの皮下および静脈内投与

単回静脈内（ＩＶ）または皮下（ＳＣ）投与量のＡＥＢ１１０２（配列番号３のＮ末端メチオニンを欠き、補因子としてコバルトを有する、ＰＥＧ化されたアルギナーゼ１）を雄カニクイザルに投与した。この研究の目的は、修飾アルギナーゼＩ（ＡＥＢ１１０２）の薬物動態（ＰＫ）および薬力学（ＰＤ）を、ＩＶ投与後対ＳＣ投与後で特徴付けることであった。

【０１３３】

０．５ｍｇ／ｋｇ用量でのＩＶ投与後、ＡＥＢ１１０２への曝露を達成した。観察された分布容積（Ｖｓｓ）はサル血清容積（４５ｍＬ／ｋｇ）と同様であり、得られた半減期（Ｔ１／２）は３７．０±１．７９時間であった。０．５ｍｇ／ｋｇのＡＥＢ１１０２の静脈内投与は、投与の２４時間後に最大のアルギニン抑制をもたらした。定量化限界未満（ＢＱＬ）レベルのアルギニンは、この投与群の３匹の動物のうち２匹においてのみ達成された。アルギニンの回復は、７．２５±０．４３３μｇ／ｍＬの平均（±ＳＤ）濃度未満に低下するＡＥＢ１１０２レベルと一致するように見えた。投与前レベルのアルギニンへの回復は、投与後１６８時間で不完全であった。

【０１３４】

２つの別個の製剤における０．５ｍｇ／ｋｇ用量のＡＥＢ１１０２のＳＣ投与後、平均濃度プロファイルは第２群および第３群で重複していたが、第３群では２４時間濃度がわずかに高くなる傾向があり、この群では吸収がわずかに速く見えた。Ｔｍａｘの中央値は、両群で同じ２４時間であった。ＳＣ　Ｔ１／２推定値は、第２群（４６．５±３．０５時間）に対して第３群（３８．１±１．００時間）でわずかに短く見えた。０．５ｍｇ／ｋｇのＳＣ投与は、第２群および第３群のＡＥＢ１１０２の両製剤について顕著なアルギニン抑制をもたらした。アルギニンの最大の（不完全な）抑制が、投与後２４時間でほとんどのＳＣ動物において達成された。アルギニンの回復は、約３．６～約４．６μｇ／ｍＬ未満に低下するＡＥＢ１１０２レベルと一致するように見えた。投与前レベルのアルギニンへの回復は、投与後１６８時間で不完全であった。

【０１３５】

第１群については、試験物は、１０％グリセロールを含むリン酸緩衝生理食塩水（ＰＢＳ）中３ｍｇ／ｍＬの公称濃度、ｐＨ７．４で予め製剤化され（ＧＭＰロット０２）、受け取ったまま使用した。第２群の試験物は、２０ｍＭリン酸カリウム、３７．５ｍＭ　ＮａＣｌ、５．６％スクロースおよび０．０２％　ＰＳ８０、ｐＨ６．７中の、予め製剤化された７０ｍｇ／ｍＬのストック溶液として受け取った（ロット番号１４４３５０－０００４）。このストックを、投与前に２０ｍｇ／ｍＬ（ＰＢＳ中）に希釈した。第３群の試験物は、５６２．５ｍｇ／ｍＬのトリアセチン、約３８７ｍｇ／ｍＬのスクロース、および２０．７ｍｇ／ｍＬのＡＥＢ１１０２（活性；ロット番号１７０３１５Ｐ２４）を含有する溶液を含むプレフィルドシリンジで受け取った。シリンジは受け取ったまま使用した。

【表３】

実験設計

群	試験項目	雄の数	投与経路	用量（ｍｇ／ｋｇ）	用量容積（ｍＬ／ｋｇ）	ビヒクル
１	ＡＥＢ１１０２	３	ＩＶ	０．５	０．１６７	Ａ
２＊	ＡＥＢ１１０２ 生理食塩水 対照	３	ＳＣ	０．５ ０	０．０２５ ０．０２５	Ｃ
３＊	ＡＥＢ１１０２ 生理食塩水 対照	３	ｓｃ	０．５ ０	０．０２５ ０．０２５	Ｂ

＊：第２群および第３群については、各動物に、それぞれの投与間隔で２回のＳＣ注射、すなわち試験物の投与および注射用０．５％塩化ナトリウムＵＳＰの投与を別々の部位で行った。両方の注射部位に印を付けた。試験品および対照は、４週間連続して週１回投与した。

Ａ：ＰＢＳ中１０％グリセロール、ｐＨ７．４；

Ｂ：製剤１ｍＬあたり５６２．５ｍｇのトリアセチン、３８６．８９ｍｇのスクロースおよび５０．６１ｍｇのＡＥＢ１１０２（活性物質２０．７ｍｇ）；および

Ｃ：２０ｍＭリン酸カリウム、３７．５ｍＭ　ＮａＣｌ、５．６％スクロース、および０．０２％　ＰＳ８０、ｐＨ６．７。

【０１３６】

群１の動物に、単回ＩＶ用量を投与した。これらの用量は、伏在（または他の適切な）静脈を介したボーラス注射として投与した。カテーテルを投与に使用した場合、投与後直ちに、約１ｍＬの滅菌注射用塩化ナトリウムＵＳＰを流してカテーテルを洗浄した。

【０１３７】

第２群および第３群の動物に、４週間連続して週に１回、ＡＥＢ１１０２のＳＣ用量を投与した。さらに、これらの動物の別の部位に、試験物と同じ投与頻度および投与量で対照生理食塩水をＳＣ注射で投与した。ＳＣ用量を各動物の背部の肩甲骨領域の、皮膚と組織の下層との間にボーラス注射として投与した。投与後に注射部位に印を付け、必要に応じて印を付け直した。

【０１３８】
ＰＫおよびＰＤ血液サンプルを投与前、投与後１、４、８、２４、４８、７２、９６、１２０、１４４および１６８時間で採取した。ＰＫ用の血液（１ｍＬ／時点）を大腿静脈／動脈（または他の適切な静脈）から抗凝固剤を含まないチューブに採取した。サンプルを室温で凝固させ、遠心分離後、血清サンプルを２つのアリコートに分割し、分析まで凍結保存した（－６０～－９０℃）。ＰＤ用の血液（１ｍＬ／時点）を大腿静脈／動脈（または他の適切な静脈）から予め冷却したＥＤＴＡ　ＳＣＡＴチューブに採取し、直ちに氷上に置いた。冷蔵条件下で遠心分離した後、得られた血漿（０．４ｍＬ）に８μＬの酢酸を添加し、チューブを反転させてアリコートを混合した。アリコートあたりの血漿容積が０．４ｍＬ未満であった場合（２アリコートを目標とした）、酢酸の添加容積を調整して、少なくとも２％（ｖ／ｖ）酢酸の最終濃度を達成した。アリコートを分析まで凍結保存した（－６０から－９０℃）。
【０１３９】
定量化アッセイ：
非ヒト霊長類血清で実証された酵素活性アッセイ（生物分析手順番号ＢＰＡＥＢ１１０２Ｄ）を使用して、Ｉｎｔｅｒｔｅｋ　Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌ　Ｓｅｒｖｉｃｅｓにおいて血清ＡＥＢ１１０２濃度の分析を行った。定量化下限（ＬＬＯＱ）は、１００％血清中０．１２５μｇ／ｍＬであった。非ヒト霊長類血漿で実証されたＬＣ－ＭＳ／ＭＳアッセイ（生物分析手順番号ＢＰＡＲＧＮ１）を使用して、Ｉｎｔｅｒｔｅｋ　Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌ　Ｓｅｒｖｉｃｅｓにおいて血漿アルギニン濃度の分析も行った。ＬＬＯＱは、１００％血漿中１μＭであった。薬物動態学的分析
【０１４０】
Ｉｎｔｅｒｔｅｋ　Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌ　Ｓｅｒｖｉｃｅｓからマイクロソフトエクセル（Ｅｘｃｅｌ；Ｍｉｃｒｏｓｏｆｔ　Ｃｏｒｐ．，Ｓｅａｔｔｌｅ，ＷＡ）スプレッドシートで得られた血清ＡＥＢ１１０２濃度時間データを、ＩＶボーラスまたは血管外投与モデルを適宜使用して、Ｐｈｏｅｎｉｘ（商標）ＷｉｎＮｏｎｌｉｎ（登録商標）バージョン７．０（ＷｉｎＮｏｎｌｉｎ；Ｃｅｒｔａｒａ　ＵＳＡ，Ｉｎｃ．，Ｍｏｕｎｔａｉｎ　Ｖｉｅｗ，Ｃａｌｉｆｏｒｎｉａ）によるノンコンパートメント解析（ＮＣＡ）によって分析した。ＮＣＡでは公称用量および採血時間を使用した。
【０１４１】
ＩＶ投与群については、全てのＢＱＬ濃度を欠測に設定した。この慣例により、注射直後の血清濃度（Ｃ０）のより正確な逆外挿（ｂａｃｋ－ｅｘｔｒａｐｏｌａｔｉｏｎ）および計算が可能になった。ＳＣ投与群については、Ｃｍａｘ前のＢＱＬ濃度を０に設定し、Ｃｍａｘ後のＢＱＬ濃度をＰＫ分析から除外した。
【０１４２】
時間ゼロから最後の測定可能な濃度までの曲線下面積（ＡＵＣ０－ｔ）を、線形アップ／対数ダウン法（ｌｉｎｅａｒ　ｕｐ／ｌｏｇ　ｄｏｗｎ　ｍｅｔｈｏｄ）によって計算した。最後の３つ以上の時点（Ｔｍａｘを除く）を通した対数／線形回帰を用いて、消失定数（λｚ）を推定した。終末相半減期（Ｔ１／２）および時間０から無限大までのＡＵＣ（ＡＵＣ　０－∞）を、以下の式を使用して計算した。

$$T1/2 = \ln(2)/\lambda z$$

$$AUC0-\infty = AUC0-t + Ct,pred/\lambda z$$

式中、Ｃｔ，ｐｒｅｄは、ＷｉｎＮｏｎｌｉｎによって選択された終末相の勾配によって予測される最後の濃度である。報告されたＰＫパラメータを簡潔な定義と共に以下の表に列挙する。
【０１４３】
パラメータの説明：
Ｃｍａｘ：投与後に測定された薬物の最大観察濃度。
Ｔｍａｘ：投与後、薬物の最大観察濃度が観察された時間。
Ｔｌａｓｔ：最後の測定可能な濃度の薬物が観察された投与後の時間。

ＡＵＣ０－ｔ：時間０から薬物の最後の測定可能な濃度が観察された投与後の時間までの薬物濃度時間曲線下面積。

【０１４４】

データが許す場合、各濃度時間曲線の最終消失相の勾配を対数／線形回帰によって決定し、以下に列挙する追加のパラメータも推定した。回帰直線の勾配の適合度（Ｒ２）は、終末相に依存する以下のデータを報告するために０．８以上でなければならなかった。

【０１４５】

追加パラメータ：

Ｔ１／２：見かけ上の最終消失半減期。

ＡＵＣ　０－ｉｎｆ（またはＡＵＣ　０－∞）：時間０から無限大までの濃度時間曲線下面積。

ＣＬ：単回ＩＶ投与後に薬物が除去された単位時間当たりの血清の容積。

ＣＬ／Ｆ：単回ＳＣ投与後に薬物が除去された単位時間当たりの血清の見かけ上の容積。Ｖｓｓ：ＩＶ投与後の定常状態における分布容積

Ｖｚ：ＩＶ投与後の終末期分布容積

Ｖｚ／Ｆ：ＳＣ投与後の見かけ上の終末期分布容積

Ｆ：ＳＣ投与後のバイオアベイラビリティまたは吸収される投与量の割合

【０１４６】

ＳＣ投与後のバイオアベイラビリティ（Ｆ）を以下の式を用いて評価した。

Ｆ＝１００％＊（ＡＵＣ０－∞，ＳＣ／ＤｏｓｅＳＣ）／（ＡＵＣ０－∞，ＩＶ／ＤｏｓｅｌＶ）

【０１４７】

薬力学的分析：

アルギニンの濃度時間データをＩｎｔｅｒｔｅｋ　Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌ　Ｓｅｒｖｉｃｅｓからエクセルスプレッドシートで得て、ＧｒａｐｈＰａｄ　Ｐｒｉｓｍバージョン７．０（ＧｒａｐｈＰａｄ　Ｓｏｆｔｗａｒｅ、Ｌａ　Ｊｏｌｌａ，ＣＡ）を使用して対応するＡＥＢ１１０２濃度と共にプロットした。

【０１４８】

統計分析

ＰＫパラメータおよび濃度データについての要約統計［Ｎ、平均、標準偏差（ＳＤ）、最小値（Ｍｉｎ）、中央値（Ｍｅｄ）、最大値（Ｍａｘ）、変動係数（ＣＶ）］をＷｉｎＮｏｎｌｉｎを用いて調製した。測定可能な濃度を有するサルが５０％未満の場合、ＭｉｎおよびＭｅｄはＢＱＬとして表示され、Ｍａｘは測定可能な最高濃度であったが、平均、ＳＤおよび％ＣＶは報告されなかった。少なくとも５０％のサルが測定可能な濃度を有する場合、要約統計は測定可能な濃度のみを基にした。対象の全てがＢＱＬ濃度を有する場合、平均、Ｍｉｎ、Ｍｅｄ、およびＭａｘはＢＱＬとして表示され、ＳＤおよび％ＣＶは報告されなかった。ＧｒａｐｈＰａｄ　Ｐｒｉｓｍ（Ｗｉｎｄｏｗｓ用バージョン７．００、ＧｒａｐｈＰａｄ　Ｓｏｆｔｗａｒｅ、San　Ｄｉｅｇｏ　Ｃａｌｉｆｏｒｎｉａ）を用いてグラフを作成した。

【０１４９】

ＡＥＢ１１０２を０．５ｍｇ／ｋｇでＩＶ投与すると、投与の２４時間後にアルギニン抑制が最大となった。アルギニンのＢＱＬレベルは、この投与群の３匹の動物のうち２匹においてのみ達成された。アルギニンの回復は、７．２５±０．４３３μｇ／ｍＬの平均（±ＳＤ）濃度未満に低下するＡＥＢ１１０２レベルと一致するように見えた。投与前レベルのアルギニンへの回復は、投与後１６８時間で不完全であった。

【０１５０】

２つの別個の製剤におけるＡＥＢ１１０２のＳＣ投与後、平均濃度プロファイルは第２群および第３群で重複していたが、第３群では２４時間濃度がわずかに高くなる傾向があり、この群では吸収がわずかに速く見えた。Ｔｍａｘの中央値は、両群で同じ２４時間であった。ＳＣ　Ｔ１／２推定値は、第２群（４６．５±３．０５時間）に対して第３群（

３８．１±１．００時間）でわずかに短く見えた。

【０１５１】

０．５ｍｇ／ｋｇのＳＣ投与は、第２群および第３群のＡＥＢ１１０２の両製剤について顕著なアルギニン抑制をもたらした。アルギニンの最大の（不完全な）抑制が、投与後２４時間でほとんどのＳＣ動物において達成された。アルギニンの回復は、約３．６～約４．６μｇ／ｍＬ未満に低下するＡＥＢ１１０２レベルと一致するように見えた。ここでも、アルギニンの投与前レベルへの回復は、投与後１６８時間で不完全であった。

【０１５２】

薬物動態：

ＡＥＢ１１０２のＩＶ投与後の雄サルにおける平均ＰＫパラメータを表４に要約し、平均血清濃度時間プロファイルを図３に示す。

【表４】

単回０．５ｍｇ／ｋｇのＩＶ投与後の雄サルにおけるＡＥＢ１１０２の平均（±ＳＤ）ＰＫパラメータ

統計パラメータ	$T_{1/2}$（時）	T_{max} 1（時）	C_{max}（μｇ／ｍＬ）	AUC_{0-t}（ｈｒ＊μｇ／ｍＬ）	$AUC_{0-\infty}$（ｈｒ＊μｇ／ｍＬ）	Ｖｚ（ｍＬ／ｋｇ）	ＣＬＣＬ（ｍＬ／時／ｋｇ）
Ｎ	３	３	３	３	３	３	３
平均	３７．０	１．０	１１．９	５７６	６０４	４４．２	０．８２９
ＳＤ	１．７９	１．０，１．０	０．２６５	１９．１	２７．４	０．１４２	０．０３６９
ＣＶ％	４．９	ＮＡ	２．２	３．３	４．５	０．３	４．４

１：中央値および値域（最小、最大）を提示；ＮＡ：該当なし

【０１５３】

ＡＥＢ１１０２のＳＣ投与後の雄サルにおける平均ＰＫパラメータを表５に要約し、平均血清濃度時間プロファイルを図４に示す。

【表５】

単回０．５ｍｇ／ｋｇ　ＳＣ投与後の雄サルにおけるＡＥＢ１１０２の平均（±ＳＤ）ＰＫパラメータ

群	統計パラメータ	Ｔ１／２（時）	Ｔｍａｘ１（時）	Ｃｍａｘ（μｇ／ｍＬ）	ＡＵＣ０－ｔ（ｈｒ＊μｇ／ｍＬ）	ＡＵＣ０－∞（ｈｒ＊μｇ／ｍＬ）	Ｖｚ／Ｆ（ｍＬ／ｋｇ）	ＣＬ／ＦＣＬ（ｍＬ／時／ｋｇ）	Ｆ（％）
２	Ｎ	３	３	３	３	３	３	３	３
２	平均	４６．５	２４	３．３８	３３１	３７５	９６．４	１．４２	６２．０
２	ＳＤ	３．０５	２４，４８	１．３９	１０６	１０８	３７．４	０．４５４	１７．８
２	ＣＶ％	６．６	ＮＡ	４１．２	３２．０	２８．８	３８．７	３２．０	２８．７
３	Ｎ	３	３	３	３	３	３	３	３
３	平均	３８．１	２４	３．９２	３５１	３７９	７３．６	１．３４	６２．７
３	ＳＤ	１．００	２４，４８	０．３８２	５３．４	５９．３	８．９６	０．１９４	９．８２
３	ＣＶ％	２．６	ＮＡ	９．７	１５．２	１５．７	１２．２	１４．５	１５．６

１：中央値および値域（最小、最大）を提示；ＮＡ：該当なし

【０１５４】

図３と図４との比較は、皮下経路と比較した静脈内投与におけるアルギナーゼ１（ＡＥＢ１１０２）酵素レベルの違いを実証する。図３では、ＩＶ投与時、薬物はわずか１時間後にその最高濃度にあるが、ＳＣ投与のＴｍａｘは、ＳＣ群については２４時間である。

ＩＶ投与による薬物レベルの非常に急速な増加は、対象、特に小児対象における有害事象の原因となり得ると考えられる。

【０１５５】

薬力学

ＩＶまたはＳＣでの０．５ｍｇ／ｋｇの単回投与後の雄サルにおける平均薬力学プロファイルを図５に示す。

【０１５６】

図５の左側パネルは、最初の１時間以内に約９８％までのアルギニンレベルの急速な低下を示し、２４時間まで定量化下限を下回り続ける。対照的に、ＳＣ投与は、投与後の最初の数時間であまり劇的でないアルギニンレベルの低下をもたらし得、ＩＶ投与よりも高い最小濃度に到達し、より長い治療有効性ウィンドウも提供する。

【０１５７】

［実施例６］

アルギナーゼによるＧＡＡレベル低下についてのＧＡＭＴ－／－マウスモデルにおけるインビボ実験

実験の目的は、ＡＥＢ１１０２がＧＡＭＴ－／－マウスモデルにおいてＧＡＡレベルを低下させることができるかどうかを確認し、それによってＧＡＭＴ欠損患者の治療のためのアルギニン枯渇酵素の使用を裏付ける証拠を提供することである。

【０１５８】

ＧＡＭＴ－／－および野生型Ｃ５７ＢＬ／６Ｊマウスにクレアチン欠乏食を継続した。マウスには、腹腔内投与経路によって２ｍｇ／ｋｇのＰＢＳまたはＡＥＢ１１０２のいずれかを投与した。７２時間後、マウスを絶命させて、その血液をＮｏｒ－ＮＯＨＡ含有チューブに回収した。ＧＡＡ、オルニチンおよびアルギニンレベルをＴｒａｎ　ｅｔ　ａｌ．（２０１４）に従って測定した。

【０１５９】

アルギナーゼｉ．ｐ．治療により、ＧＡＭＴ－／－マウスモデルにおいてアルギニンが減少し（例えば、７５．６μＭから２６．２μＭまで）、同時に野生型マウスおよびＧＡＭＴ－／－マウスの両方においてオルニチンが増加する。予想通り、ＧＡＡレベルは野生型マウスでは非常に低下した（１．９から０．０μＭまで）が、以下の表に示すようにＧＡＭＴ－／－マウスでは著しく上昇した。ＡＥＢ１１０２治療によって、平均ＧＡＡ血漿レベルが陰性対照動物に対しておよそ３０μＭ低下した（平均では６７．３から３８．６まで）。データは、平均±ＳＥＭを表す。各群の動物の数を「ｎ」で示し、ＳＥＭは平均の標準誤差である。

【表６】

マウスＧＡＭＴ－／－モデルからのデータの表示（値をμＭで示す）

マウス型	治療	アルギニン（平均）	アルギニン（ＳＥＭ）	オルニチン（平均）	オルニチン（ＳＥＭ）	ＧＡＡ（平均）	ＧＡＡ（ＳＥＭ）
ＧＡＭＴ－／－	ＰＢＳ（ｎ＝３）	７５．６	１４．７	３２．３	９．２	６７．３	９．３
	ＡＥＢ１１０２（ｎ＝５）	２６．２	１８．９	７７．４	１１．０	３８．６	３．９
野生型	ＰＢＳ（ｎ＝３）	８７．６	５．６	４９．２	７．９	１．９	０．０
	ＡＥＢ１１０２（ｎ＝５）	９．６	１．７	８２．２	１２．８	０．７	０．１

【０１６０】

本明細書に開示および特許請求される組成物および使用方法はすべて、本開示に照らして過度の実験をすることなく作製および実行することができる。組成物および方法は、好ましいまたは例示的な実施形態に関して記載されているが、記載された材料および方法の

概念、精神および範囲から逸脱することなく、本明細書に記載された組成物および方法、および方法の工程または工程の順序に変形が適用され得ることは、当業者には明らかであろう。より具体的には、同じまたは類似の結果が達成される場合、化学的および生理学的の両方に関連する特定の薬剤が、本明細書に記載の薬剤の代わりになり得ることは明らかであろう。当業者に明らかなすべてのそのような類似の置換および修正は、添付の特許請求の範囲にさらに記載される組成物および方法の精神、範囲および概念の範囲内にあるとみなされる。

【０１６１】

１．対象におけるグアニジノ酢酸メチルトランスフェラーゼ（ＧＡＭＴ）活性の欠損を治療する方法であって、治療量のアルギニン枯渇酵素を含む医薬組成物を前記対象に投与することを含む方法。

【０１６２】

２．前記アルギニン枯渇酵素が、哺乳動物または細菌アルギナーゼ酵素である、請求項１に記載の方法。

【０１６３】

３．前記アルギニン枯渇酵素が、ヒトアルギニン枯渇酵素である、請求項１に記載の方法。

【０１６４】

４．前記アルギニン枯渇酵素が、ヒトアルギナーゼ酵素、ヒトアルギニンデイミナーゼ酵素、またはそれらの組み合わせである、請求項１に記載の方法。

【０１６５】

５．前記ヒトアルギナーゼ酵素またはヒトアルギニンデイミナーゼ酵素の１つまたは複数が、前記酵素のアミノ酸配列における置換、欠失、挿入、または切断によって修飾される、４の方法。

【０１６６】

６．前記医薬組成物が、ヒトアルギナーゼＩ酵素またはヒトアルギナーゼＩＩ酵素を含む、請求項１に記載の方法。

【０１６７】

７．前記アルギニン枯渇酵素が、ヒトアルギナーゼＩ酵素である、請求項１に記載の方法。

【０１６８】

８．前記ヒトアルギナーゼＩ酵素が、コバルトを含む置換金属補因子で操作されている、請求項６または７のいずれかに記載の方法。

【０１６９】

９．前記アルギニン枯渇酵素が、赤血球ゴースト中で投与される、請求項２に記載の方法。

【０１７０】

１０．前記ＧＡＭＴ活性の欠損が、前記対象におけるグアニジノ酢酸メチルトランスフェラーゼ酵素をコードする遺伝子の遺伝的欠損に関連する、請求項１に記載の方法。

【０１７１】

１１．前記ヒトアルギナーゼ酵素またはヒトアルギニンデイミナーゼ酵素が、安定化剤との会合によって安定化される、請求項４に記載の方法。

【０１７２】

１２．前記安定化剤が、ポリエチレングリコール（ＰＥＧ）、合成タンパク質ポリマー、ポリシアル酸、Ｆｃ融合物およびアルブミンからなる群から選択される、請求項１１に記載の方法。

【０１７３】

１３．前記ヒトアルギナーゼＩ酵素がＰＥＧ化されている、請求項６～８のいずれか一項に記載の方法。

【０１７４】

１４．前記対象がヒトである、請求項１～１３のいずれか一項に記載の方法。
【０１７５】
１５．前記ヒトアルギナーゼＩ酵素が、インビトロで測定した場合、ｐＨ７．４かつ３７℃で４００ｍＭ$^{-1}$ ｓ$^{-1}$～４，０００ｍＭ$^{-1}$ ｓ$^{-1}$のアルギニンの加水分解に対するk_{cat}/K_Mを示す、請求項７に記載の方法。
【０１７６】
１６．前記ヒトアルギナーゼＩ酵素が、アルギナーゼに対して２μｇＣｏ／ｍｇアルギナーゼ～３μｇＣｏ／ｍｇアルギナーゼの割合でコバルト含む、請求項８に記載の方法。
【０１７７】
１７．前記ヒトアルギナーゼＩ酵素が、アルギナーゼアポ酵素をコバルトまたはコバルトイオンと３０℃～５５℃の温度で１５分～６０分間接触させることによって生成される、請求項８に記載の方法。
【０１７８】
１８．グアニジノ酢酸メチルトランスフェラーゼ（ＧＡＭＴ）活性が欠損した対象におけるグアニジノ酢酸（ＧＡＡ）毒性の影響を治療する方法であって、コバルト補因子を含むＰＥＧ化ヒトアルギナーゼＩ酵素を含む治療量の医薬組成物を、前記対象に投与することを含む方法。
【０１７９】
１９．前記対象が身体的または神経学的状態の改善を示すまで投与を継続する、請求項１８に記載の方法。
【０１８０】
２０．前記身体的または神経学的状態が、全般的発達遅延／知的障害（ＤＤ／ＩＤ）、てんかん、運動障害、発話または言語遅延、および行動障害からなる群から選択される状態の少なくとも１つを含む、請求項１９に記載の方法。
【０１８１】
２１．コバルト補因子を含む前記ＰＥＧ化ヒトアルギナーゼＩ酵素の治療量が約０．０１ｍｇ／ｋｇ～約７．５ｍｇ／ｋｇである、請求項１８記載の方法。
【０１８２】
２２．コバルト補因子を含む前記ＰＥＧ化ヒトアルギナーゼＩ酵素の治療量が約０．０５ｍｇ／ｋｇ～約５ｍｇ／ｋｇである、請求項１８記載の方法。
【０１８３】
２３．コバルト補因子を含む前記ＰＥＧ化ヒトアルギナーゼＩ酵素の治療量が約０．１ｍｇ／ｋｇ～約５ｍｇ／ｋｇである、請求項１８記載の方法。
【０１８４】
２４．前記医薬組成物が前記対象に非経口投与される、請求項１８に記載の方法。
【０１８５】
２５．前記医薬組成物が、局所、静脈内、皮内、動脈内、腹腔内、病変内、頭蓋内、関節内、前立腺内、胸膜内、気管内、眼内、鼻腔内、硝子体内、膣内、直腸内、筋肉内、皮下、結膜下、小胞内、粘膜、心膜内、臍下、経口、吸入、注射、注入、連続注入、標的細胞の直接的な局所灌流浴によって、カテーテルを介して、または洗浄液を介して投与される、請求項１８に記載の方法。
【０１８６】
２６．前記医薬組成物が、前記対象への皮下投与に適合している、請求項１８に記載の方法。
【０１８７】
２７．前記医薬組成物が、リン酸カリウム、ＮａＣｌ、スクロースおよびｐＨ６．７のＰＳ８０中に治療用量のアルギナーゼを含む、請求項２６に記載の方法。
【０１８８】
２８．請求項１８に記載の方法で使用するためのキットであって、トリアセチン、スクロース、および皮下投与に適合した前記ＰＥＧ化ヒトアルギナーゼＩ酵素を含む溶液を含

有するシリンジを含むキット。
【０１８９】
２９．前記医薬組成物が静脈内投与に適合している、請求項１８に記載の方法。
【０１９０】
３０．前記医薬組成物が、前記ＰＥＧ化ヒトアルギナーゼＩ酵素、生理食塩水、およびｐＨ７．４のグリセロールを含む、請求項２９に記載の方法。
【０１９１】
３１．前記医薬組成物の投与により、前記患者の血清アルギニンが５０％～９９％減少する、請求項２６に記載の方法。
【０１９２】
３２．前記医薬組成物の投与により、前記患者の血清アルギニンが９０％～９９％減少する、請求項２６に記載の方法。
【０１９３】
３３．前記医薬組成物の投与により、前記患者の血清ＧＡＡが少なくとも２５％～５０％減少する、請求項２６に記載の方法。
【０１９４】
３４．血漿中の前記医薬組成物の濃度が、単回投与の２０～２８時間後に最大レベルに達する、請求項２６に記載の方法。
【０１９５】
３５．血漿中の前記医薬組成物の濃度が、単回投与の約２４時間後に最大レベルに達する、請求項２６に記載の方法。
【０１９６】
３６．グアニジノ酢酸（ＧＡＡ）毒性の影響を治療する方法であって、アルギニン枯渇酵素を含む治療量の医薬組成物を、それを必要とする対象に投与することを含む方法。
【０１９７】
３７．前記アルギニン枯渇酵素がアルギナーゼまたはアルギニンデイミナーゼ酵素である、請求項３６に記載の方法。
【０１９８】
３８．対象におけるグアニジノ酢酸メチルトランスフェラーゼ（ＧＡＭＴ）活性欠損症を治療する方法であって、オルニチン補充と組み合わせて治療量のアルギニン枯渇酵素を含む医薬組成物を前記対象に投与することを含む方法。
【０１９９】
３９．前記アルギニン枯渇酵素がアルギナーゼまたはアルギニンデイミナーゼ酵素である、請求項３８に記載の方法。
【０２００】
４０．前記医薬組成物が高用量Ｌ－オルニチン補充を含む、請求項３８に記載の方法。
【０２０１】
４１．Ｌ－オルニチンアスパラギン酸塩またはＬ－オルニチン塩酸塩を経口投与することを含む、請求項３８に記載の方法。
【０２０２】
４２．対象におけるグアニジノ酢酸メチルトランスフェラーゼ（ＧＡＭＴ）活性欠損症の治療、または対象におけるグアニジノ酢酸（ＧＡＡ）毒性の影響の治療において使用する医薬として使用するための、治療量のアルギニン枯渇酵素を含む医薬組成物。
【０２０３】
４３．対象におけるグアニジノ酢酸メチルトランスフェラーゼ（ＧＡＭＴ）活性欠損症の治療または対象におけるグアニジノ酢酸（ＧＡＡ）毒性の影響の治療に使用するための、治療量のアルギニン枯渇酵素を含む医薬組成物。
【０２０４】
４４．前記アルギニン枯渇酵素が哺乳動物または細菌アルギナーゼ酵素である、請求項４２および４３のいずれか一項に記載の医薬組成物。

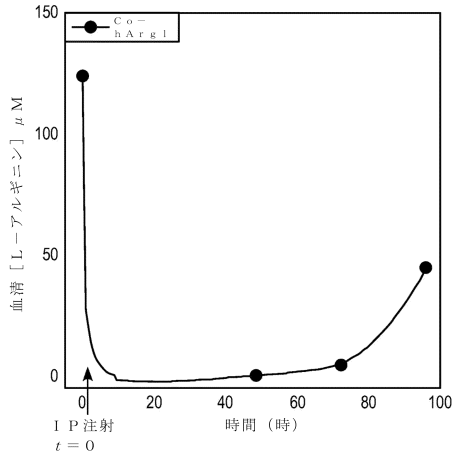
【０２０５】
４５．前記アルギニン枯渇酵素がヒトアルギニン枯渇酵素である、請求項４２および４３のいずれか一項に記載の医薬組成物。
【０２０６】
４６．前記ヒトアルギニン枯渇酵素が、ヒトアルギナーゼ酵素、ヒトアルギニンデイミナーゼ酵素、またはそれらの組み合わせである、請求項４２および４３のいずれかに記載の医薬組成物。
【０２０７】
４７．前記ヒトアルギナーゼ酵素またはアルギニンデアミナーゼ酵素の一つ以上が、前記ヒトアルギナーゼ酵素またはアルギニンデアミナーゼ酵素のアミノ酸配列の置換、欠失、挿入、または切断によって修飾される、請求項４６に記載の医薬組成物。
【０２０８】
４８．ヒトアルギナーゼＩ酵素またはアルギナーゼＩＩ酵素を含む、請求項４２および４３のいずれか一項に記載の医薬組成物。
【０２０９】
４９．前記アルギニン枯渇酵素がヒトアルギナーゼＩ酵素を含む、請求項４２および４３のいずれか一項に記載の医薬組成物。
【０２１０】
５０．前記アルギニン枯渇酵素が、コバルトを含む置換金属補因子で操作されたヒトアルギナーゼＩ酵素を含む、請求項４８または４９のいずれか一項に記載の医薬組成物。
【０２１１】
５１．前記アルギニン枯渇酵素が自己赤血球ゴースト中で投与される、請求項４４に記載の医薬組成物。
【０２１２】
５２．前記ＧＡＭＴ活性の欠損が、グアニジノ酢酸メチルトランスフェラーゼ酵素をコードする遺伝子の遺伝的欠損に関連する、請求項４２および４３のいずれか一項に記載の医薬組成物。
【０２１３】
５３．前記ヒトアルギナーゼ酵素またはヒトアルギニンデイミナーゼ酵素が、安定化剤との会合によって安定化される、請求項４６に記載の医薬組成物。
【０２１４】
５４．前記安定化剤が、ポリエチレングリコール（ＰＥＧ）、合成タンパク質ポリマー、ポリシアル酸、Ｆｃ融合物、およびアルブミンからなる群から選択される、請求項５３に記載の医薬組成物。
【０２１５】
５５．前記ヒトアルギナーゼＩ酵素がＰＥＧ化されている、請求項５８～６０のいずれか一項に記載の医薬組成物。
【０２１６】
５６．前記対象がヒトである、請求項４２～５５のいずれかに記載の医薬組成物。
【０２１７】
５７．前記ヒトアルギナーゼＩ酵素が、インビトロで測定した場合、ｐＨ７．４かつ３７℃で４００ｍＭ$^{-1}$ ｓ$^{-1}$～４，０００ｍＭ$^{-1}$ ｓ$^{-1}$のアルギニンの加水分解に対するk_{cat}/K_Mを示す、請求項４９に記載の医薬組成物。
【０２１８】
５８．前記ヒトアルギナーゼＩ酵素が、アルギナーゼに対して２μｇＣｏ／ｍｇアルギナーゼ～３μｇＣｏ／ｍｇアルギナーゼの割合でコバルトを含む、請求項５０に記載の医薬組成物。
【０２１９】
５９．前記ヒトアルギナーゼＩ酵素が、アルギナーゼアポ酵素をコバルトまたはコバルトイオンと３０℃～５５℃の温度で１５分～６０分間接触させることによって生成される

、請求項５０に記載の方法。
【０２２０】
参考文献
以下の参考文献は、本明細書に記載のものを補足する例示的な手順または他の詳細を提供する限りにおいて、参照により本明細書に具体的に組み込まれる。
Ｃａｍａ ｅｔ ａｌ．，Ｂｉｏｃｈｅｍｉｓｔｒｙ，４２：７７４８－７７５８，２００３．
Ｃｈｅｎｇ ｅｔ ａｌ．，Ｃａｎｃｅｒ Ｌｅｔｔ．，２２４：６７－８０，２００５．
Ｃｈｅｎｇ ｅｔ ａｌ．，Ｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓ．，６７：３０９，２００７．
Ｃｈｅｎｇ ｅｔ ａｌ．，Ｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓ．，６７：４８６９－４８７７，２００７．
Ｄｉｌｌｏｎ ｅｔ ａｌ．，Ｍｅｄ．Ｓｃｉ．Ｍｏｎｉｔ．，８：ＢＲ２４８－２５３，２００２．
Ｄｏｗｌｉｎｇ ｅｔ ａｌ．，Ｃｅｌｌ Ｍｏｌ．Ｌｉｆｅ．Ｓｃｉ．，６５（１３）：２０３９－５５，２００８．
Ｄｕｒａｎｔｅ ｅｔ ａｌ．，Ｃｌｉｎ．Ｅｘｐ．Ｐｈａｒｍａｃｏｌ．Ｐｈｙｓｉｏｌ．，３４：９０６－９１１，２００７．
Ｅｎｓｏｒ ｅｔ ａｌ．，Ｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓ．，６２：５４４３－５４５０，２００２．
Ｇｉｌｌおよびｖｏｎ Ｈｉｐｐｅｌ、Ａｎａｌ．Ｂｉｏｃｈｅｍ．、１８２：３１９－３２６，１９８９．
Ｇｒｅｅｎｗａｌｄ ｅｔ ａｌ．，Ｃｒｉｔ．Ｒｅｖ．Ｔｈｅｒａｐ．Ｄｒｕｇ Ｃａｒｒｉｅｒ Ｓｙｓｔ．，、１７：１０１－１６１、２０００．
Ｈａｒｋｋｉ ｅｔ ａｌ．，ＢｉｏＴｅｃｈｎｏｌｏｇｙ，７：５９６－６０３，１９８９．
Ｈａｒｒｉｓ ｅｔ ａｌ．，Ｃｌｉｎ．Ｐｈａｒｍａｃｏｋｉｎｅｔ．，４０（７）：５３９－５１，２００１．
Ｈｏｐｗｏｏｄ ｅｔ ａｌ．、Ｉｎ：Ｇｅｎｅｔｉｃ Ｍａｎｉｐｕｌａｔｉｏｎ ｏｆ Ｓｔｒｅｐｔｏｍｙｃｅｓ，Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ，Ｔｈｅ Ｊｏｈｎ Ｉｎｎｅｓ Ｆｏｕｎｄａｔｉｏｎ，Ｎｏｒｗｉｃｈ，Ｃｏｎｎ。、１９８５．
Ｊｅｆｆｅｒｉｓ，Ｒ．，Ｅｘｐｅｒｔ Ｏｐｉｎ．Ｂｉｏｌ．Ｔｈｅｒ．，７：１４０１－１４１３，２００７．
Ｌａｖｕｌｏ ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．，２７６：１４２４２－１４２４８，２００１．
Ｌｏｐｅｚ ｅｔ ａｌ．，ＦＥＢＳＪ．，２７２：４５４０－４５４８，２００５．
Ｌｏｒｄａｎｅｓｃｕ，Ｊ．Ｂａｃｔｅｒｉｏｌ，１２：５９７ ６０１，１９７５．
Ｍａｒｅｓｃａｕ，Ｂ．，ｅｔ ａｌ．，’’Ｇｕａｎｉｄｉｎｏ ｃｏｍｐｏｕｎｄ ａｎａｌｙｓｉｓ ａｓ ａ ｃｏｍｐｌｅｍｅｎｔａｒｙ ｄｉａｇｎｏｓｔｉｃ ｐａｒａｍｅｔｅｒ ｆｏｒ ｈｙｐｅｒａｒｇｉｎｉｎｅｍｉａ：ｆｏｌｌｏｗ－ｕｐ ｏｆ ｇｕａｎｉｄｉｎｏ ｃｏｍｐｏｕｎｄ ｌｅｖｅｌｓ ｄｕｒｉｎｇ ｔｈｅｒａｐｙ，’’Ｐｅｄｉａｔｒ．Ｒｅｓ．２７：２９７－３０３，１９９０．
Ｍｅｌｌｏｒ ｅｔ ａｌ．，Ｇｅｎｅ，２４：１－１４，１９８３．
Ｎａｔｈａｎ ｅｔ ａｌ．，Ｂｉｏｃｏｎｊ．Ｃｈｅｍ．，４：５４－６２，１９９３．
Ｎａｔｈａｎ ｅｔ ａｌ．，Ｍａｃｒｏｍｏｌｅｃｕｌｅｓ，２５：４４７６－４４８４，１９９２．
Ｐｅｎｔｔｉｌａｅｔ ａｌ．，Ｇｅｎｅ，６１：１５５－１６４，１９８７．
Ｒｅｍｉｎｇｔｏｎ’ｓ Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌ Ｓｃｉｅｎｃｅｓ，１８ｔｈ Ｅｄ．Ｍａｃｋ Ｐｒｉｎｔｉｎｇ Ｃｏｍｐａｎｙ，１２８９－１３２９，１９９０．
ＲｏｏｐｅｎｉａｎおよびＡｋｉｌｅｓｈ，Ｎａｔ．Ｒｅｖ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．，７：７１５－７２５，２００７．

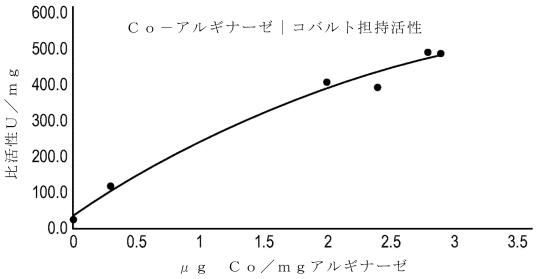
Sabio et al., FEBS Lett., 501:161-165, 2001.
Santhanam et al., Circ. Res., 101:692-702, 2007.
Savoca et al., Cancer Biochem. Biophys., 7:261-268, 1984.
Schulze, A. et al.,「Improving treatment of guanidinoacetate methyltransferase deficiency: reduction of guanidinoacetic acid in body fluids by arginine restriction and ornithine supplementation,」Mol. Genet. Metab. 74:413-419, 2001.
Sibakov et al., Eur. J. Biochem., 145:567-572, 1984.
Simmons et al., J. Immunol. Methods, 263:133-147, 2002.
Tao et al., J. Immunol., 143:2595-2601, 1989.
Tran, C., et al.,「Stable isotope dilution microquantification of creatine metabolites in plasma, whole blood and dried blood spots for pharmacological studies in mouse models of creatine deficiency,」Clin. Chim. Acta 436C:160-168, 2014.
Villa, C., et al.,「Red blood cells: Supercarriers for drugs, biologicals, and nanoparticles and inspiration for advanced delivery systems,」Adv. Drug Deliv. Rev. 106(Pt A):88-103, 2016. Ward, Embo-Alko Workshop on Molecular Biology of Filamentous Fungi, Helsinki, 119-128, 1989.
Zalipsky et al., Bioconjug. Chem., 8:111-118, 1997.

【図面】

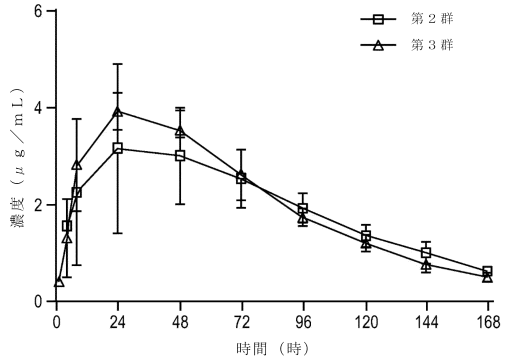
【図１】



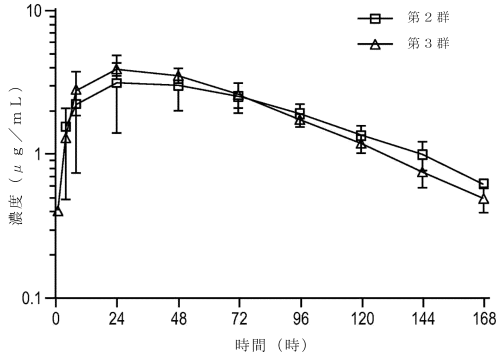
【図２】



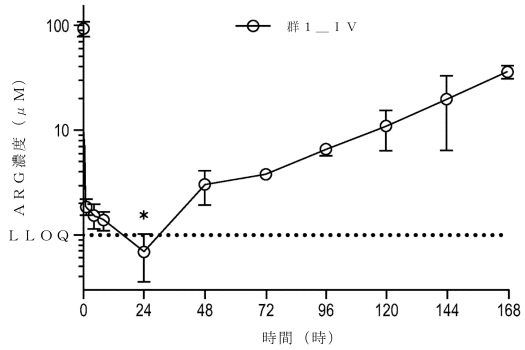
【図３】



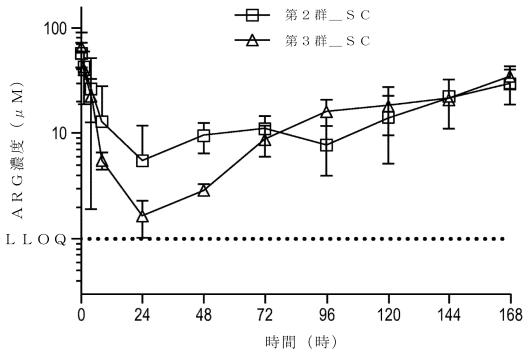
【図４】



【図５Ａ】



【図５Ｂ】



【配列表】

0007667931000001.app

フロントページの続き

(51)国際特許分類			FI		
A61K	*47/64*	*(2017.01)*	A61K	47/64	
A61K	*47/61*	*(2017.01)*	A61K	47/61	
A61K	*47/36*	*(2006.01)*	A61K	47/36	
A61K	*47/68*	*(2017.01)*	A61K	47/68	
A61P	*25/00*	*(2006.01)*	A61P	25/00	
A61P	*25/08*	*(2006.01)*	A61P	25/08	
A61P	*25/14*	*(2006.01)*	A61P	25/14	
A61K	*47/02*	*(2006.01)*	A61K	47/02	
A61K	*47/26*	*(2006.01)*	A61K	47/26	
A61K	*47/34*	*(2017.01)*	A61K	47/34	
A61K	*31/198*	*(2006.01)*	A61P	43/00	121
A61K	*9/08*	*(2006.01)*	A61K	31/198	
A61K	*47/14*	*(2017.01)*	A61K	9/08	
C12N	*9/80*	*(2006.01)*	A61K	47/14	
C12N	*15/12*	*(2006.01)*	C12N	9/80	ZNA
C12N	*15/55*	*(2006.01)*	C12N	15/12	
			C12N	15/55	

(72)発明者　ローリンソン， スコット
アメリカ合衆国 テキサス ７８７４６， オースティン， グレー フォックス コート ７００

審査官　伊藤 良子

(56)参考文献　Developmental Medicine & Child Neurology，2014年，Vol.56，p.1021-1024
Human Molecular Genetics，2015年，Vol.24, No.22，p.6417-6427

(58)調査した分野　(Int.Cl.，ＤＢ名)
Ａ６１Ｋ
Ａ６１Ｐ
Ｃ１２Ｎ
ＣＡｐｌｕｓ／ＭＥＤＬＩＮＥ／ＥＭＢＡＳＥ／ＢＩＯＳＩＳ（ＳＴＮ）
ＰｕｂＭｅｄ