



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2014년06월20일
 (11) 등록번호 10-1408062
 (24) 등록일자 2014년06월10일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 1/21 (2006.01) *C12N 9/82* (2006.01)
C12N 15/31 (2006.01) *C12N 15/63* (2006.01)
 (21) 출원번호 10-2008-7028792
 (22) 출원일자(국제) 2007년06월08일
 심사청구일자 2012년05월24일
 (85) 번역문제출일자 2008년11월25일
 (65) 공개번호 10-2009-0033175
 (43) 공개일자 2009년04월01일
 (86) 국제출원번호 PCT/US2007/070706
 (87) 국제공개번호 WO 2008/011234
 국제공개일자 2008년01월24일
 (30) 우선권주장
 60/817,817 2006년06월30일 미국(US)
 (56) 선행기술조사문헌
 GenBank Accession # M34277 (1993. 04. 26.)*
 Applied Biochemistry and Biotechnology
 Vol.95(2):93-101 (2001)*
 *는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
 시그마-타우 레어 디지즈, 에스.에이.
 포르투갈, 풍샬, 9000-082, 넘버 260, 루아도스페
 헤이루스
 (72) 발명자
 필푸라, 데이비드 알.
 미국, 뉴저지주 08854, 피스카타웨이, 칼튼 클럽
 드라이브 269
 왕, 마오리앙
 미국, 뉴저지주 08816, 이스트 브린즈윅, 라이스
 런 54
 (74) 대리인
 이원희

전체 청구항 수 : 총 14 항

심사관 : 안규정

(54) 발명의 명칭 **L-아스파라기나아제 II 제조를 위한 재조합 숙주**

(57) 요약

본 발명은 대장균 L-아스파라기나아제 II 효소의 제조용 재조합 대장균 숙주세포를 제공한다. 상기 숙주세포는 대장균 염색체, 및 적어도 하나의 카피를 갖는 비염색체성 재조합 벡터의 포함하고, 상기 비염색체성 재조합 벡터는 상기 L-아스파라기나아제 II 효소를 암호화하고, 또한 상기 숙주세포 염색체는 상기 동일한 L-아스파라기나아제 II 효소를 암호화하고, 및 상기 숙주 염색체는 L-아스파라기나아제 II의 모든 다른 아형을 암호화하지 않는다.

특허청구의 범위

청구항 1

대장균(*Escherichia coli*) 염색체, 및 적어도 하나 이상의 카피(copy)를 갖는 재조합 염색체 외(extrachromosomal) 벡터를 포함하는 대장균 L-아스파라기나아제(asparaginase) II 효소의 제조용 재조합 대장균 숙주세포에 있어서, 상기 염색체 외(extrachromosomal) 재조합 벡터는 상기 L-아스파라기나아제 II 효소의 서브유닛(subunit)을 암호화하고, 상기 숙주세포 염색체 역시 상기 L-아스파라기나아제 II 효소의 상기 동일한 서브유닛을 암호화하며, 상기 숙주 염색체는 L-아스파라기나아제 II의 어떠한 아형(isoform)도 암호화하지 않고, 상기 암호화 된 L-아스파라기나아제 II 서브유닛은 서열번호 1로 구성되며, 서열번호 2로 구성된 DNA 분자로 구성되는 재조합 염색체 외 벡터를 포함하는 것을 특징으로 하는 재조합 대장균 숙주세포.

청구항 2

제 1항에 있어서, 상기 염색체 외(extrachromosomal) 벡터는 플라스미드(plasmid)인 것을 특징으로 하는 재조합 대장균 숙주세포.

청구항 3

제 1항에 있어서, 상기 DNA 분자는 적당한 프로모터(promoter)에 작동가능하게 연결된 것을 특징으로 하는 재조합 대장균 숙주세포.

청구항 4

삭제

청구항 5

삭제

청구항 6

제 1항에 있어서, 상기 재조합 염색체 외(extrachromosomal) 벡터는 추가로 작동자(operator), 리보솜 결합 영역(ribosome binding site), 신호 서열(signal sequence), 전사 종결자(transcriptional terminator), 항생제 선별 마커(antibiotic selection marker), 복제 기점(origin of replication), 및 조절된 억제자의 카피(regulated copy of the repressor)를 포함하는 것을 특징으로 하는 재조합 대장균 숙주세포.

청구항 7

삭제

청구항 8

제 3항에 있어서, 상기 염색체는 서열번호 3으로 기재된 DNA 분자로 구성되는 것을 특징으로 하는 재조합 대장균 숙주세포.

청구항 9

서열번호 1로 기재된 L-아스파라기나아제 II 효소 아단위를 암호화하고, 서열번호 2 및 서열번호 3으로 구성된 군으로부터 선택된 핵산으로 구성된 분리된 핵산분자(nucleic acid molecule).

청구항 10

서열번호 2로 구성되고, L-아스파라기나아제 II 효소의 아단위를 암호화하는 재조합 염색체 외 벡터.

청구항 11

제 10항에 있어서, 상기 벡터는 플라스미드인 것을 특징으로 하는 염색체 외 벡터.

청구항 12

제 11항에 있어서, 상기 벡터는 플라스미드 pEN537인 것을 특징으로 하는 염색체 외 벡터.

청구항 13

제 11항의 플라스미드를 포함하는, EN538로 명명되고 ATCC 번호 PTA 7490으로 기탁된 대장균 숙주세포.

청구항 14

제 13항의 숙주세포를 배양하는 단계 및 제조된 L-아스파라기나아제 II 효소를 분리하는 단계를 포함하는, 다른 L-아스파라기나아제 II 아형(isomer)이 없는 재조합 L-아스파라기나아제 II 효소를 생산하는 방법.

청구항 15

삭제

청구항 16

삭제

청구항 17

삭제

청구항 18

서열번호 2를 포함하는, L-아스파라기나아제 II 효소의 서브유닛을 암호화하는 분리된 DNA 분자.

청구항 19

삭제

청구항 20

제 10항에 있어서, 상기 서열번호 2는 적당한 프로모터(promoter)에 작동가능하게 연결된 것을 특징으로 하는 염색체 외(extrachromosomal) 벡터.

청구항 21

제 20항에 있어서, 상기 프로모터는 T7, araB, P_R/P_L, phoA, trc, 및 trp 프로모터로 이루어진 군으로부터 선택 되는 것을 특징으로 하는 염색체 외(extrachromosomal) 벡터.

명세서

기술분야

[0001] 본 출원은 2006년 6월 30일에 제출된 미국 가출원 번호 60/817,817의 우선권을 청구하며, 이들의 내용은 참고로 본 명세서에 포함되어 있다.

[0002] 본 발명은 균등한 순도의 특이적 재조합 대장균(*E. coli*) L-아스파라기나아제 II 효소의 제조용 신규의 벡터, 숙주세포 및 방법에 관한 것이다.

배경기술

[0003] L-아스파라기나아제는 L-아스파라긴을 L-아스파르트산 및 암모니아로 가수분해하는 효소로, 즉 탈아미노화 효소이다. 대장균에는 두 개의 아스파라기나아제 동질효소가 존재한다: L-아스파라기나아제 I 및 L-아스파라기나

아제 II. L-아스파라기나아제 I은 세포질에 존재하고, 아스파라긴에 대한 친화도가 낮다. L-아스파라기나아제 II는 원형질에 존재하고, 아스파라긴에 대한 친화도가 높다.

[0004] L-아스파라기나아제 II는 세포의 아스파라긴을 제거함으로써, 단백질 합성에 대해 L-아스파라긴 의존성인 종양 및 암 치료에 유용하다. 특히 급성림프구성백혈병(ALL: Acute lymphoblastic leukemia)과 같은 백혈병 치료에 유용하다. L-아스파라기나아제는 특정 임상 상황에서 단독으로 사용될 수 있더라도, 일반적으로 다른 항종양 또는 제암성 치료와 함께 조합하여 사용된다. L-아스파라기나아제는 원래 대장균("E. coli") 및 어위니아 카로토보라(*Erwinia carotovora*)를 포함하는 몇몇 유기체로부터 정제되었다. L-아스파라기나아제 II는 포유동물 중에서 기니피그[카비오이디아 상과(superfamily Caviioidea)] 및 특정 광비원류(New World monkeys)에서만 미량 이상으로 존재한다.

[0005] 대장균 L-아스파라기나아제 II는 우수한 k_{cat} 및 K_m 을 나타내는 동일한 서브유닛의 4량체이다. 대장균 L-아스파라기나아제 II(또한 당염계에 L-아스파라긴 아미도하이드롤라아제(amidohydrolase), 유형 EC-2, EC 3.5.1.1로 알려진)는 Elspar[®](Merck & Co. 사)로 상업적으로 구입가능하고, 또한 Kyowa Hakko Kogyo 사에서도 구입가능하다.

[0006] L-아스파라기나아제 II는 그 자체로 환자에 외래 단백질의 고비율의 정리와 같은 단백질 치료제의 통상의 불리한 조건 및 이 효소로 치료된 환자의 면역 반응 유도에 대한 잠재성으로 문제점이 있었다. 이러한 결점을 처리하기 위하여, 폴리에틸렌 글리콜이 연결된 L-아스파라기나아제 II의 유도체가 개발되었고, Enzon Pharmaceuticals 사에서 페가스파가제 (Pegaspargase) 또는 Oncaspar[®]로 판매되고 있다. 페가스파가제는 Merck사에 의해 공급되는 대장균에서 추출된 L-아스파라기나아제 II를 사용하여 생성된다. 페가스파가제(또는 모노메톡시 폴리에틸렌 글리콜 숙시니미딜 L-아스파라기나아제)는 실질적으로 비항원성인 이점이 있고 순환에서 감소된 정리 비율을 나타낸다.

[0007] 그러나 이러한 성공에도, 대장균 L-아스파라기나아제 II 단백질이, 예를들면 플라스미드와 같은 적당한 비염색체성 발현백터를 채택하는 재조합 숙주세포에 의해 생산될 수 있던 경우에 여전히 더욱 능률적이고 경제적인 것이다. 그러한 발현백터는 야생형 대장균 숙주에서 생산될 수 있는 단백질보다 더욱 능률적인 생산을 위해 유전자조작될 수 있다. 그런 재조합 생산의 잠재적인 이점에도, 지금까지는 상기 상업적인 L-아스파라기나아제 II 효소에 대해 정확히 공개된 폴리펩티드 서열 및 상기 효소를 암호화하는 폴리뉴클레오티드에 대한 공개된 핵산 서열이 없는 것으로 여겨졌다. 예를들면 L-아스파라기나아제 II 펩티드 서열은 이전에 Maita 외, 1980, *Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem.* 361(2), 105-117, 및 Maita 외, 1974, *J. Biochem.* 76, 1351-1354 [Tokyo]에서 보고되었다. 그러나 상기에서 논의된 바와 같이 초기 작업은 수많은 서열분석시 오류로 고생했다.

[0008] L-아스파라기나아제 II 효소 서브유닛의 플라스미드 발현에 대한 또 다른 잠재적인 장애는 숙주세포로 채택될 수 있는 가능성이 있는 대장균 숙주의 염색체에 본래의 L-아스파라기나아제 II 서브유닛을 암호화하는 유전자가 존재하는 것이다. 따라서 비염색체성 발현백터를 운반하는 대장균 숙주세포에서 수득한 L-아스파라기나아제 II 가 하나 이상의 L-아스파라기나아제의 아형을 대표하는 서브유닛을 포함할 수 있던 것에 관심사가 있다. 임상 및 조절 목적에 대해, 잘 특성화된 효소 산물의 필요에 의해, 상기 가능성은 대장균 L-아스파라기나아제 II 단백질의 제조의 효율성 향상에 대해 지금까지는 심각한 기술적인 도전을 의미했다.

발명의 상세한 설명

[0009] **발명의 요약**

[0010] 또한 차선책의 L-아스파라기나아제 II 아형의 검출가능한 양이 없는 Oncaspar[®]로 판매되는 대장균 L-아스파라기나아제 II 단백질로서 동일한 펩티드 구조를 갖는 효소 제품이 제공될 지라도, 본 발명은 재조합 형태에서 능률적 및 경제적으로 생성된 대장균 L-아스파라기나아제 II에 대한 상기 언급된 필요를 충족시킨다.

[0011] 따라서, 본 발명은 대장균 염색체, 및 적어도 하나 이상의 카피를 갖는 비염색체성 재조합 백터를 포함하는 대장균 숙주세포를 제공하고, 상기 비염색체성 백터는 상기 L-아스파라기나아제 II 단백질의 서브유닛을 암호화하고, 상기 대장균 숙주세포 염색체 역시 상기 L-아스파라기나아제 단백질의 상기 동일한 서브유닛을 암호화하며, 상기 대장균 숙주 염색체는 L-아스파라기나아제 II의 다른 아형을 암호화하지 않는 것을 특징으로 한다. 상기 비염색체성 백터는 바람직하게는 대장균에서 복제 및 발현이 적당한 플라스미드이다.

- [0012] 바람직하게는 상기 발현된 L-아스파라기나아제 단백질은 Oncaspar[®]의 제조에 이용되는 L-아스파라기나아제 II 효소의 서브유닛의 서열에 대응하는, 서열번호 1로 기재되는 폴리펩티드 서열을 갖는 네 개의 서브유닛 및 적당한 프로모터에 작동가능하게 연결된, 상기 L-아스파라기나아제 단백질의 서브유닛을 암호화하는 핵산 분자를 포함하는 플라스미드 벡터를 포함한다. 상기 프로모터는 적당한 모든 프로모터이고, T7, araB, trp, tac, lac, λP_L, λP_R, aroH 및 phoA 프로모터로 구성된 그룹으로부터 선택적으로 선택된다. 상기 플라스미드 벡터는 선택적으로 능률적인 발현 및/또는 산물 정제를 위해 필요할 수 있는 추가의 벡터 구성요소를 포함하고, 이는 L-아스파라기나아제의 열린 해독틀(open reading frame) 및/또는 상기 프로모터에 작동가능하게 연결된다. 상기 벡터 구성요소는, 예를들면, 호환 가능한 작동자 서열, 리보솜 결합 영역, 전사 종결자, 신호 서열, 약제 저항성 마커 및 복제 기점을 포함한다. 또한 적절한 억제자 유전자, 예를들면, lacI의 카피를 포함하는 플라스미드가 존재할 수 있다.
- [0013] 바람직하게는, 상기 L-아스파라기나아제 II 단백질의 서브유닛을 암호화하는 플라스미드 DNA 분자는 서열번호 2를 포함하고 있고, 상기 L-아스파라기나아제 II 단백질을 암호화하는 상기 염색체 DNA 분자는 서열번호 3을 포함하고 있다.
- [0014] **발명의 상세한 설명**
- [0015] 그러므로, Oncaspar[®] 및 Kyowa Hapkkko의 L-아스파라기나아제에 상응하는 L-아스파라기나아제 II의 제조에 있어서 원하는 향상을 제공하기 위하여, 상기 효소를 암호화하는 벡터를 수득하고, 또한 오직 L-아스파라기나아제 II의 단일 아형만을 발현하는 숙주세포를 제공하는 것이 필요하다. 따라서, Kyowa Hakko Kogyo 사로부터 수득한 L-아스파라기나아제 II 효소 뿐만 아니라, Merck & Co. 사의 L-아스파라기나아제 II 효소의 서열을 분석하였고, 상기 결과를 본 명세서에 참고로 포함된 Jennings 외, 1990 *J Bacteriol* 172: 1491-1498에서 보고한 것처럼, 대장균 K-12로부터 수득한 L-아스파라기나아제 II 효소의 서열과 비교하였다. K12 L-아스파라기나아제 II 효소는 ansB 유전자(GeneBank 번호 M34277, 참고로 본명세서에 포함되어 있다)에 의해 암호화된다.
- [0016] 상기 언급된대로, 당업자는 L-아스파라기나아제 II 효소가 동일한 4개의 서브유닛을 포함한다고 인식할 것이다. 따라서, 효소 및 효소 단백질 서열을 암호화하는 유전자 또는 DNA 분자에 대한 참조는 상기 동일한 서브유닛 중의 하나를 암호화하는 유전자를 참고로 한다.
- [0017] 펩티드 서열 분석은 하기 실시예 1에 의해 요약된 바와 같이 당해 표준 방법으로 수행되었다. 의외로 Merck & Co. 사 및 Kyowa Hakko Kogyo 사 둘다의 서브유닛의 단백질 서열이 동일한 것을 발견하였다(서열번호 1 참조). 상기 자료를 이용하여, Maita 외 1980 *Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem.* 361(2), 105-117, 및 Maita 외 1974, *J. Biochem.* 76, 1351-1354 [Tokyo]에 의한 Merck L-아스파라기나아제의 서열에 대한 이전 보고에는 실제로 많은 오류가 포함된 것으로 인식될 수 있다.
- [0018] 또한 K12 L-아스파라기나아제 II 효소의 서브유닛 구조와 수득한 서열을 비교하였다. K12 L-아스파라기나아제 II 효소 서브유닛이 Merck & Co. 사 L-아스파라기나아제 II 효소 서브유닛과 네 개의 특이적 잔기 위치에서 다르다는 것이 발견되었다. Merck 사의 L-아스파라기나아제 II 효소에 비례하여, K12 효소 서브유닛은 Ala₂₇ 위치에 Val₂₇을, Asp₆₄ 위치에 Asn₆₄를, Thr₂₅₂ 위치에 Ser₂₅₂를, Asn₂₆₃ 위치에 Thr₂₆₃을 갖는다.
- [0019] 위와 같이, L-아스파라기나아제 II의 다른 아형이 비염색체성 벡터, 즉 플라스미드에 의해 발현되는 것보다 대장균 숙주세포의 염색체에 의해 L-아스파라기나아제 II의 다른 아형을 발현하지 않는 것이 바람직하다. 상기 바람직한 결과는 여러가지 차선의 전략 중 하나에 의해 달성될 수 있다. 예를들면, 대장균 숙주 염색체에 존재하는 L-아스파라기나아제 II의 어떤 유전자든지 완전히 또는 부분적으로 결실 또는 낙아웃될 수 있었다. 차선책으로, 숙주 염색체에 존재하는 L-아스파라기나아제 II 유전자의 모든 차선의 발현은 비염색체성 벡터에 의해 암호화되는 L-아스파라기나아제 II의 아형의 발현을 돕는 동일한 배양 조건하에서 발현되지 않도록 하는 것들과 함께 자연적 프로모터의 고유의 조절 특성에 의해 억제될 수 있다. 그러나 L-아스파라기나아제 II 효소의 동일한 아형을 발현하는 염색체 및 비염색체성 L-아스파라기나아제 II 유전자를 갖는 것이 바람직하다.
- [0020] 이런 목적으로, 여러가지 이용 가능한 대장균 숙주에 의해 제조된 L-아스파라기나아제 II 효소의 서브유닛의 서열을 분석하였고, 상업적인 효소 제품과 비교하였다. 의외로 대장균 BLR(DE3) 균주[Novagen 사로부터 구입; 제품 번호 69208-3]가 상업적으로 이용가능한 효소와 구조가 동일한, 염색체상에 암호화된 L-아스파라기나아제 II

효소를 생산하는 것으로 발견되었고, 반면, 또한 검사된 대장균 GX1210 및 대장균 GX6712 숙주가 L-아스파라기나아제 II 효소의 상이한 아형을 생산하는 것으로 발견되었다.

- [0021] 바람직한 대장균 숙주의 확인으로, 비염색체성 발현벡터, 즉 비염색체성 실체물로 존재하는, 염색체 복제와 독립적으로 복제되는 벡터가 제조될 수 있다. 대장균에서 사용하기에 적당한 비염색체성 벡터에는 예를들면, 플라스미드 유래의 pUC 또는 pBR322가 포함된다. 이들에는 T7, araBAD, phoA, trc, O_L, O_R, P_L, P_R으로부터의 발현 구성요소를 갖는 다양한 플라스미드 뿐만 아니라, pET 및 pBAD와 같은 플라스미드를 포함한다.
- [0022] 벡터에서, L-아스파라기나아제 II 효소 서브유닛을 암호화하는 핵산 서열은 적당한 프로모터 서열에 작동가능하게 연결된다. 적당한 프로모터는, 예를들면, T7, araBAD, phoA, trc, O_L, O_R, P_L 및 P_R 프로모터를 포함한다. 바람직하게는 프로모터는 T7 바이러스성 프로모터이다.
- [0023] 적당한 유도제 구성요소는 몇 가지를 예를들면, 아라비노오즈, 락토오즈, 또는 열유도, 인산 결핍, 트립토판 결핍을 포함한다. 바람직하게는 상기 유도제 성분은 이소프로필 티오갈락토시드(isopropyl thiogalactoside; "IPTG")에 유도성인 Lac 오페론이다.
- [0024] 적당한 신호 서열(신호 펩티드)은 pelB, fd pIII, 또는 ompA로부터 유래할 수 있다. 바람직한 신호 펩티드는 ansB로부터 유래한다.
- [0025] 적당한 항생제 선별 마커는 당업계에 잘 알려져 있고, 예를들면, 다른 것들 중에서도 암피실린, 카나마이신, 클로람페니콜(chloramphenicol), 리팜피신(rifampicin), 또는 테트라사이클린(tetracycline) 저항성을 제공하는 것들을 포함한다.
- [0026] 적당한 복제 기점 서열에는 하기 플라스미드에서 찾아낸 것들을 포함한다: pUC19, pACYC177, pUB110, pE194, pAMB1, pIJ702, pBR322, pBR327, 및 pSC101.
- [0027] 적당한 종결 서열은 예를들면, 파아지 fd 주요 종결자, TF, 및 rrnB를 포함한다.
- [0028] 일반적으로 플라스미드는 대장균에서 사용하기에 바람직하다. 전통적인 플라스미드 벡터는 바람직하게는, 외인성 DNA 서열, 항생제 선별 유전자, 숙주세포에서 자가 증폭되기 위한 복제 기점, 및 재조합 삽입 DNA를 포함하는 클론의 구별 또는 선별을 위한 유전자의 삽입에 적당한 효소 인식 영역으로 유전자조작된 이중 가닥 환형 DNA 분자이다. 유효한 플라스미드 벡터는, 예를들면, pET3, pET9, pET11 및 증보된 pET 시리즈(Novagen 사에 의해 분류됨), pBAD, trc, phoA, trp, 및 O_{L/R}/P_{L/R} 플라스미드를 포함한다.
- [0029] 하기에서 예시한 것처럼, pET 27b+와 같은 pET 발현 시스템의 플라스미드가 바람직하다. 효소의 능률적이고 통제되는 발현을 위하여, 발현 벡터는 또한 프로모터, 작동자, 리보솜 결합 영역, 신호 서열, 전사 종결자, 복제 기점, 조절된 카피수의 억제자 유전자(예를들면, lacI)를 포함한다.
- [0030] 숙주 대장균 균주에는 그것의 염색체에 호환가능한 조절 요소가 있을 것이다. 예를들면, BLR(DE3) 세포에 lacUV5 프로모터에 의해 조절되는 T7 RNA 중합효소에 대한 유전자가 존재한다. 상기 균주는 박테리오파지 DE3의 용원균(lysogen)이다. BLR(DE3)의 배양액에 IPTG의 추가는, pET 플라스미드 상에서 표적 유전자를 번역하도록 T7 RNA 중합효소를 유도한다. 또한 BLR(DE3)는 비염색체성 플라스미드에서 유전자의 더 좋은 안정성을 제공할 수 있는 recA-이다.
- [0031] Merck 사 및 Kyowa Hakko Kogyo 사의 효소를 암호화하는 핵산분자를 얻기 위하여, 유효한 L-아스파라기나아제 II는 적당한 방법으로 변형될 수 있다. 대장균 K-12 ansB의 326개의 성숙한 아미노산 서열 L-아스파라기나아제 II 서브유닛은 Jennings MP와 Beacham IR(1990 *J Bacteriol* 172: 1491-1498; GeneBank 번호 M34277)에 의해 보고되는 것과 같은 978개의 염기쌍 단편으로 암호화된다. 성숙단백질의 앞에 있는 22개 아미노산의 신호 펩티드를 암호화하는, ansB 유전자는 다른 대장균 K-12 균주(GX1210; Genex 사에서 수득)로부터 전통적인 중합효소 연쇄반응(PCR) 방법으로 클로닝하였다. 대장균 K-12 ansB L-아스파라기나아제 II 서브유닛을 암호화하는 ansB 유전자는 하기의 염기치환을 만들기 위하여 위에서 논의했던 잔기가 치환된 L-아스파라기나아제 II를 발현하기 위하여 위치지정돌연변이에 의해 (예를들면, Amersham Sculptor 방법과 더불어) 조정되었다. 530번째 염기에서 T를 C로; 640번째 염기에서 A를 G로; 1205번째 염기에서 T를 A로, 및 1239번째 염기에서 C를 A로. 자릿수는 GeneBank 번호 M34277에 근거를 두고, 본 명세서에 참고로 포함되어 있다. 코돈 변화 결과[대응하는 위치에서 GTG를 GCG로; AAT를 GAT로; TCT를 ACT로, 및 ACC를 AAC로]는 ansB 유전자를 Merck & Co. 사 및 Kyowa Hakko Kogyo 사에서 구입한 것과 동일한 L-아스파라기나아제 II 효소 서브유닛을 발현하는 변형된 유전자(이하 ansB*;

서열번호 2)로 전환하였다.

- [0032] ansB* 유전자는 상기 논의된 것과 같이 대장균에서 효과적인 단백질 발현에 적당한 모든 비염색체성 벡터에 삽입될 수 있다. 특히, ansB* 플라스미드를 운반하고, Merck 사의 L-아스파라기나아제 II와 일치하는 동일한 아형으로서 L-아스파라기나아제 II 서브유닛을 발현하는 대장균을 제공하기 위해, ansB* 유전자는 플라스미드 pET-27b+(Novagen 사)로 삽입되었고, 하기 제공된 실시예에서 자세히 설명된대로 전기충격법에 의해 대장균 균주 BLR(DE3)로 도입되었다.
- [0033] 바람직하게는, 실시예에 의해 EN538 속주(ATCC 번호 PTA 7490로 기탁된)로 확인된 클론이 채택되었고, 대장균에 적당한 것으로 알려진 모든 방법을 채택하여 배양되었다. 적당한 배양 시스템은 배지 배양법, 유가배양법 및 연속 배양법을 포함한다. 배양 배지는 대장균에 대해 최적화된 당업계에 알려진 배지로부터 선택된다. 일단 배양액이 대략 OD₆₆₀이 20 내지 대략 OD₆₆₀이 200의 범위로 충분한 밀도에 도달하면, IPTG와 같은 적절한 유도제를 배양 배지에 첨가한다. 대략 0.5 시간에서 대략 20 시간의 범위로 충분한 기간 경과 후에, 제조된 L-아스파라기나아제 II는 배양 배지 및/또는 배양액으로부터 수집된 세포량(cell mass)으로부터 표준 방법에 의해 정제된다.
- [0034] 세포량은 원심분리 및/또는 여과법에 의해 수집되었고, 당해 기술에서 알려진 방법으로 용해되었다. 세포체의 용해는 삼투성 용해, 동결-해동 반복, 소니케이션, 기계적 파괴[예를들면 미세유동화(microfluidization)], 용해제 및 유사체의 이용에 선행되는 효소적 세포벽 분해를 포함하는 방법에 의해 달성될 수 있고, 수용성 단백질 성분으로부터 분해된 세포량을 분리하기 위하여 여과 및/또는 원심분리될 수 있다. 용해, 세척 및 분리의 여러 차례의 순환은 회수를 최적화하기 위해 채택될 수 있다.
- [0035] 황산암모늄 침전법(ammonium sulfate precipitation), 산 추출법(acid extraction), 크로마토포커싱(chromatofocusing), 음이온 또는 양이온 교환 크로마토그래피(anion or cationic exchange chromatography), 인산셀룰로오스 크로마토그래피(phosphocellulose chromatography), 소수성 결합 크로마토그래피(hydrophobic-interaction chromatography), 친화도 크로마토그래피(affinity chromatography), 수산화인회석 크로마토그래피(hydroxyapatite chromatography), FPLC[®](고속 단백질 액체 크로마토그래피; fast protein liquid chromatography), 고성능 액체 크로마토그래피(high performance liquid chromatography), 및 이와 유사한 방법을 포함하는 잘 알려진 정제 방법에 의해, 효소는 상등액 및/또는 배양 배지로부터 회수 및 정제될 수 있다.
- [0036] 발효 처리의 여러 매개변수는 아스파라기나아제 발현을 최적화하거나 원형질로부터 성장 배지로 단백질의 누출량을 조절하기 위해 조정될 수 있다. 상기 변수는 배지 성분(예를들면, 탄소와 질소 근원 및 추가된 아미노산 또는 다른 영양소), 온도, pH, 유도제 농도 및 발현의 기간을 포함한다. 또한 대장균의 전체 유전자계통(유전자형)은 발현과 산물 누출에도 영향을 미칠수 있다. 단백질 발현의 결과 및 숙주세포로부터의 누출량에 따라서 세포(원형질)에서만, 또는 배지에서만, 또는 총 배양 성분에서 아스파라기나아제 산물을 수확하는 것이 바람직할 수 있다.

[0037] **중합체-L-아스파라기나아제 결합체**

[0038] 본 발명에 따라 제조된 L-아스파라기나아제 II 효소의 바람직한 유용물은 중합체가 연결된 효소의 형태이다. 본 발명의 L-아스파라기나아제-중합체 연결체는 일반적으로 화학식(I)로 기재된다:



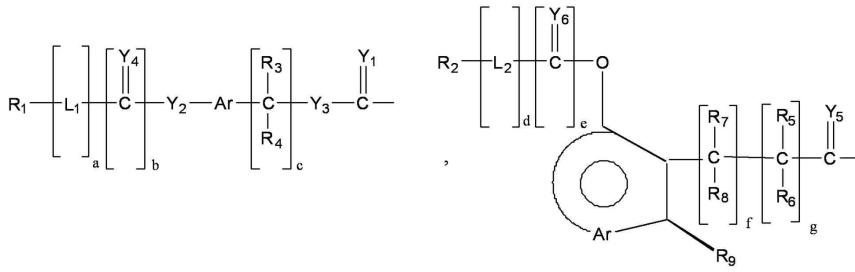
[0040] (ASN)은 L-아스파라기나아제 또는 이의 유도체 또는 단편을 나타내고;

[0041] NH-는 중합체에 부착하기 위한 ASN에서 발견된 아미노산의 아미노 작용기, 이의 유도체 또는 단편이고;

[0042] z는 양의 정수이고, 바람직하게는 대략 1 내지 대략 80이고; 및

[0043] R은 방출 또는 비방출 형태로 ASN에 부착되는 실질적으로 비-항원성인 중합체 잔기이다.

[0044] 상기 결합체 (R)의 상기 비-항원성 중합체 잔기 부분은 하기와 같은 중합체 기반 시스템의 제한되지 않은 목록으로부터 선택될 수 있다:

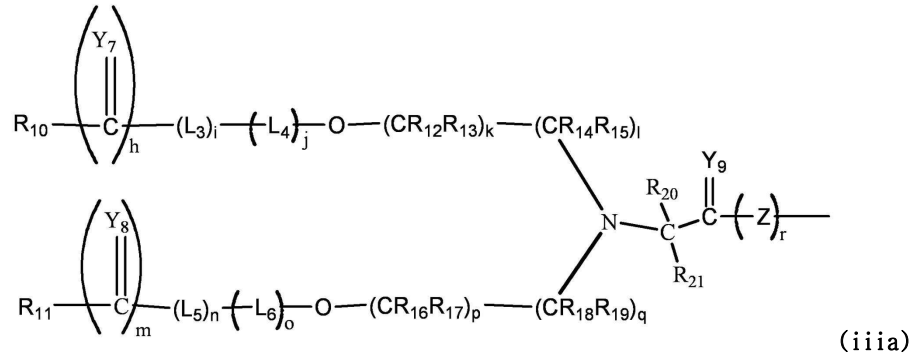


[0045]

[0046]

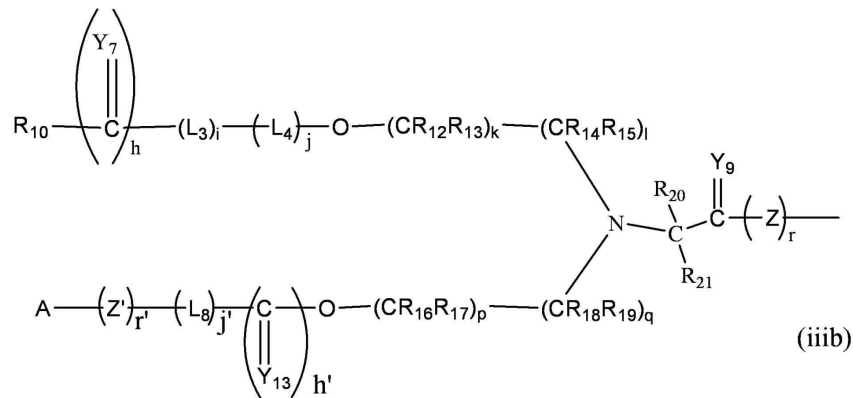
(i)

(ii)



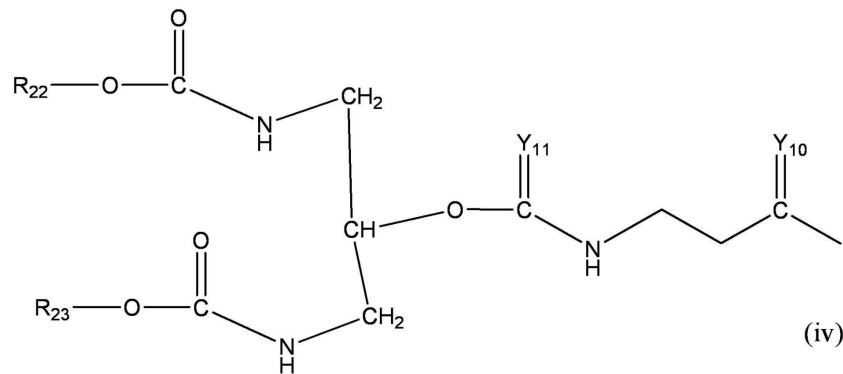
[0047]

(iia)



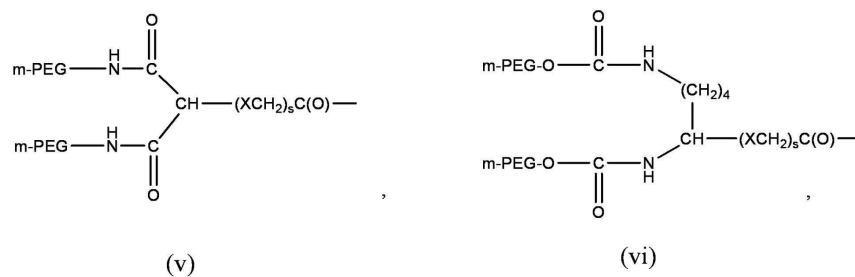
[0048]

(iib)



[0049]

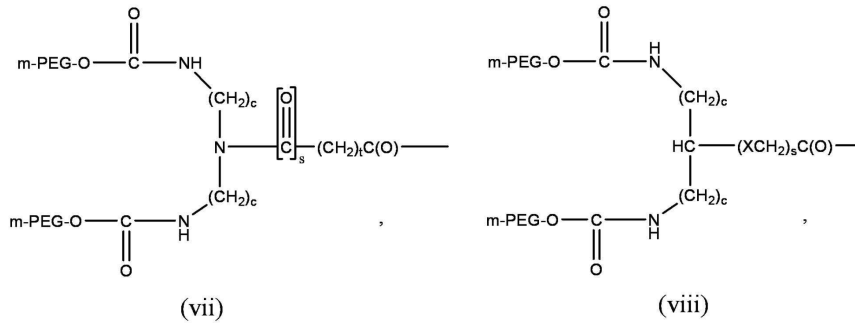
(iv)



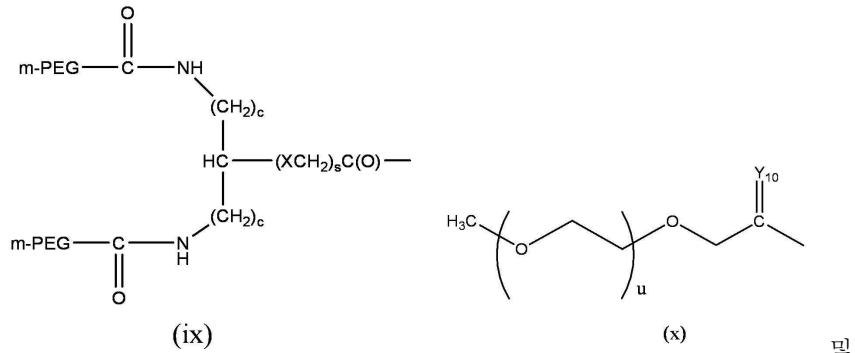
[0050]

(v)

(vi)



[0051]



[0052]

[0053]

[0054]

[0055]

R₁₋₂, R₁₀₋₁₁, 및 R₂₂₋₂₃은 동일하거나 다를 수 있고, 비-항원성 중합체 잔기로부터 독립적으로 선택될 수 있고;

[0056]

R₃₋₉, R₁₂₋₂₁ 및 R₂₄(하기 참조)는 동일하거나 다를 수 있고, 수소, C₁₋₆ 알킬, C₃₋₁₂ 분지화된 알킬, C₃₋₈ 싸이클로알킬(cycloalkyls), C₁₋₆ 치환된 알킬, C₃₋₈ 치환된 싸이클로알킬, 아릴(aryls), 치환된 아릴, 아랄킬(aralkyls), C₁₋₆ 헤테로알킬(heteroalkyls), 치환된 C₁₋₆ 헤테로알킬, C₁₋₆ 알콕시(alkoxy), 페녹시(phenoxy) 및 C₁₋₆ 헤테로알콕시(heteroalkoxys) 중에서 선택될 수 있고;

[0057]

Ar은 다가-치환 방향족 탄화수소 또는 다가-치환 헤테로방향족 그룹을 형성하는 방향족 모이어티(moieties)이고;

[0058]

Y₁₋₁₁ 및 Y₁₃은 동일하거나 다를 수 있고, O, S 및 NR₂₄로부터 독립적으로 선택될 수 있고;

[0059]

A는 수소, 알킬기, 표적화 모이어티, 이탈기(leaving groups), 작용기(functional groups), 진단약(diagnostic agents), 및 생물학적 활성 모이어티로부터 선택될 수 있고;

[0060]

X는 O, NQ, S, SO 또는 SO₂이고; Q는 H, C₁₋₈ 알킬, C₁₋₈ 분지화 알킬, C₁₋₈ 치환된 알킬, 아릴 또는 아랄킬이고;

[0061]

Z는 활발히 표적 세포로 수송되는 모이어티, 소수성 모이어티, 이중기능성 링커 모이어티(bifunctional linker moieties) 및 이들의 조합으로부터 선택되고;

[0062]

L₁₋₆ 및 L₈은 동일하거나 다를 수 있고, 선택된 이중기능성 링커 그룹으로부터 독립적으로 선택되고;

[0063]

a, c, d, f, g, i, j, j', k, l, n, o, p, q 및 t는 동일하거나 다를 수 있고, 바람직하게는 대부분의 양상에서 독립적으로 0 또는 양의 정수이고;

[0064]

b, e, r, r', s, h, h' 및 m은 동일하거나 다를 수 있고, 독립적으로 0 또는 1이고;

[0065]

mPEG는 H₃CO(-CH₂CH₂O)_u- 이고 및

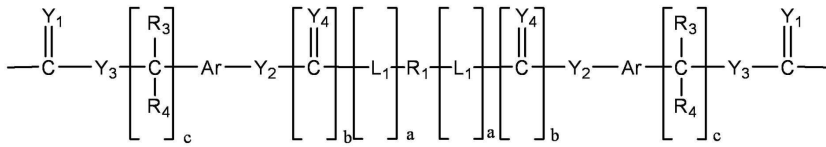
[0066]

u는 양의 정수이고, 바람직하게는 대략 10 내지 대략 2,300이고, 및 더욱 바람직하게는 대략 200 내지 대략

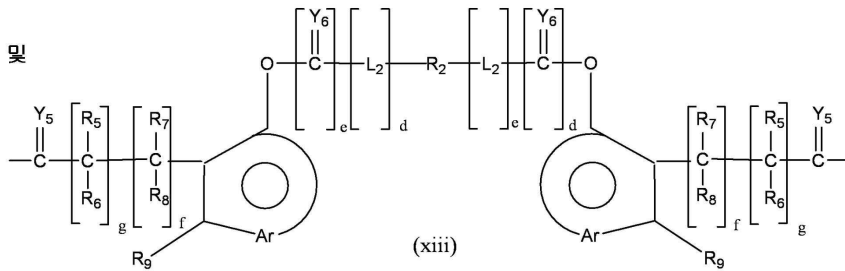
1000이다.

[0067] 상기에서, Y₁₋₁₁ 및 Y₁₃은 0이고, R₃₋₈, R₁₂₋₂₁ 및 R₂₄은 독립적으로 수소 또는 가장 바람직한 알킬인 메틸 또는 에틸을 갖는 C₁₋₆ 알킬 중 하나이고, R₉은 바람직하게는 CH₃인 것이 바람직하다.

[0068] 본 발명의 추가의 양상에서, 상기 결합체의 상기 중합체 부분은 L-아스파라기나아제에 대해 다가의 부착 지점을 수여하는 것일 수 있다. 상기 시스템의 제한되지 않은 목록은 하기를 포함하고:



[0069]



[0070]

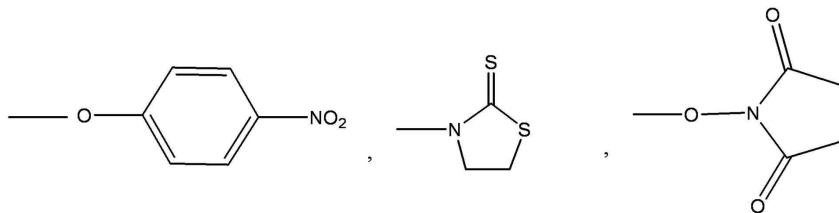
[0071] 상기 모든 변이체는 상기 언급된 바와 동일하다.

[0072] L-아스파라기나아제 결합체를 만들기 위하여 채택될 수 있는 활성화된 중합체는 당연히 상기 기술된 중합체 부분과 직접적으로 대응한다. 주요한 차이점은 L-아스파라기나아제에서 찾아낸 아민기에서 중합체 시스템의 방출 가능한 부착을 촉진하는, 이탈기 또는 활성기가 존재하는 것이다. 따라서, 화합물 (i) - (xiii)는 하기와 같은 이탈기 또는 활성기를 포함한다: p-니트로페녹시(p-nitrophenoxy), 티아졸리디닐 티온(thiazolidinyl thione), N-하이드록시숙신이미딜(N-hydroxysuccinimidyl)

[0070]

[0071]

[0072]



[0073]

[0074] 또는 N-하이드록시벤조트리아졸릴(N-hydroxybenzotriazolyl), 할로겐, N-하이드록시프탈리미딜((N-hydroxyphthalimidyl), 이미다졸릴(imidazolyl), O-아실 우레아(O-acyl ureas), 펜타플로로페놀(pentafluorophenol) 또는 2,4,6-트리-클로로페놀(2,4,6-tri-chlorophenol)과 같은 그 외의 적당한 이탈기 또는 활성기 또는 결합 반응 이후에 L-아스파라기나아제가 결합한 곳에서 발견되는, 당업자에게 자명한 그 외의 적당한 이탈기.

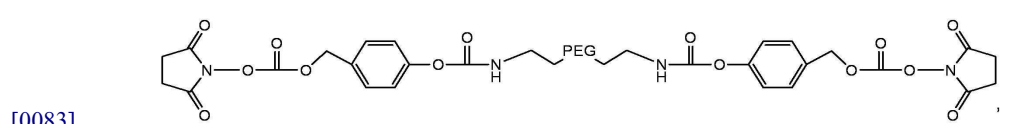
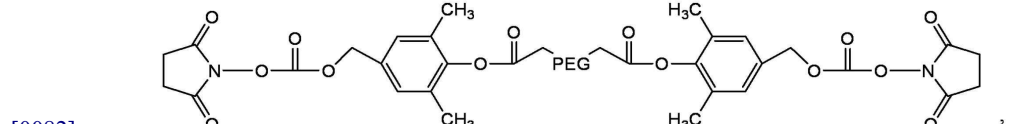
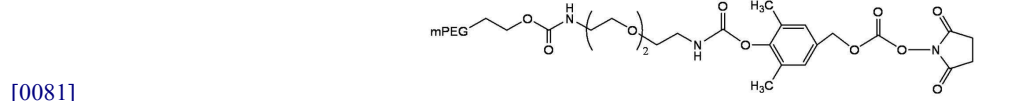
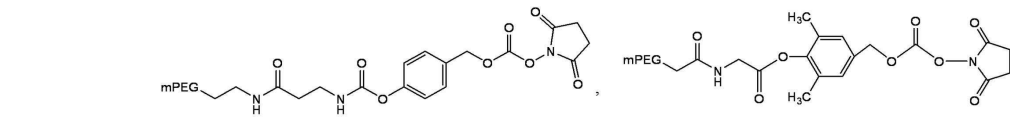
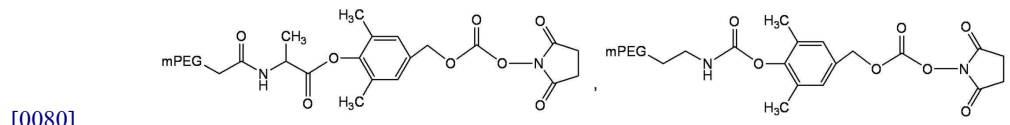
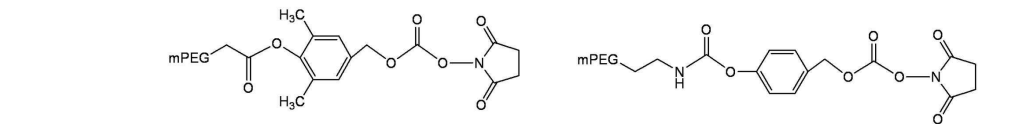
[0075] 몇몇 바람직한 활성화된 PEG는 미국 등록특허 번호 5,122,614, 5,324,844, 5,612,460 및 5,808,096에 공통적으로 기재된 것을 포함하고, 이들의 내용이 참고에 의해 본 명세서에 통합된다. 당업자에게 평가되는 바와 같이, 이러한 결합 반응은 일반적으로 활성화된 PEG의 여러 몰라 배의 과량을 이용하여 적당한 완충용액에서 실행된다. 상기 언급된 SC-PEG와 유사한 선형 PEG로 구성된 몇몇 바람직한 결합체는 평균적으로, 효소당 대략 20 내지 대략 80개의 PEG 가닥을 포함할 수 있다. 따라서 이들을 위해, 수 백배, 예를 들면 200-1000x 몰라의 과량이 적용될 수 있다. 분지화 중합체 및 상기 효소에 부착된 중합체에서 사용하기 위한 몰라의 과잉량은 더 적을 수 있고, 본 발명 및 하기에서 언급된 동일한 내용을 기술하는 특허 출원에서 기술된 기술을 이용하여 결정될 수 있다.

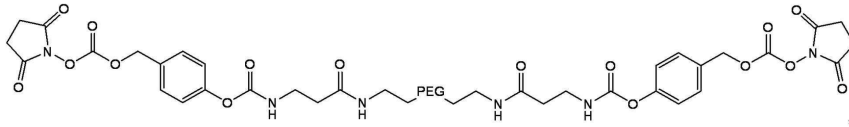
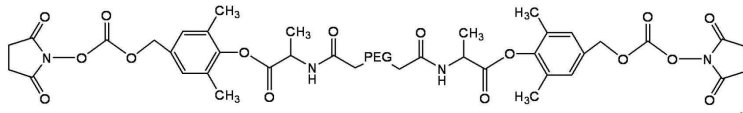
[0076] 본 발명의 목적을 위하여, 이탈기는 L-아스파라기나아제, 예를 들면 Lys에서 찾아낸 아민기(nucleophile; 친핵체)와 작용할 수 있는 그룹들로 이해될 것이다.

[0077] 본 발명의 목적을 위하여, 상기는 또한 활성화된 중합체 링커로 불린다. 상기 중합체 잔기는 바람직하게는 폴리알킬렌 옥사이드(Polyalkylene oxide)를 기반으로 하고, 더욱 바람직하게는 폴리에틸렌 글리콜(PEG)을 기반으로 하고, 상기 PEG는 선형 또는 분지화된 것이다.

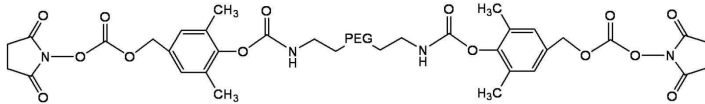
[0078] 현재 상기 기술된 활성화된 중합체에 대하여, Ar은 다가-치환된 방향족 탄화수소 또는 다가 치환된 헤테로방향족 그룹을 형성하는 모이어티인 것으로 나타낼 수 있다. 주요 특징은 Ar 모이어티가 자연상에서 방향족이라는 것이다. 일반적으로 방향족이 되기 위하여, π (π) 전자는 주기적인 분자의 평면의 상하의 "구름" 안에 공유되어야 한다. 게다가, π 전자의 수는 Huckle 규칙($4n+2$)을 만족시켜야 한다. 당업자들은 무수한 모이어티들이 상기 모이어티의 방향족의 필요조건을 만족할 것이고, 따라서 당업자라면 당업계에서 일반적으로 이해된 대로 본 발명에서 할로겐(들) 및/또는 결사슬과 함께 사용하기에 적당한 것을 알 수 있을 것이다.

[0079] 본 발명의 몇몇 바람직한 양상에서, 상기 활성화된 중합체 링커는 바람직하게는 일반적으로 할당된 미국 등록특허 번호 6,180,095, 6,720,306, 5,965,119, 6624,142 및 6,303,569에 따라 제조되고, 내용은 본 명세서에서 참조로 통합된다. 상기 상황에서, 상기 활성화된 중합체 링커가 바람직하다:





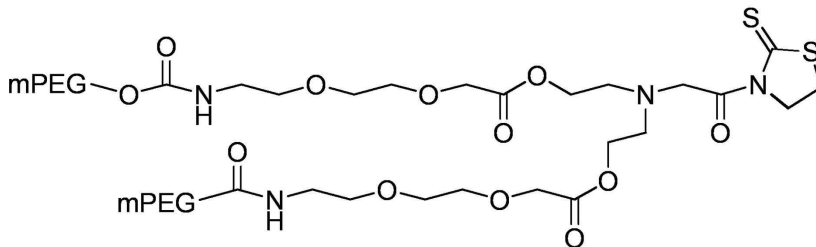
및



[0084]

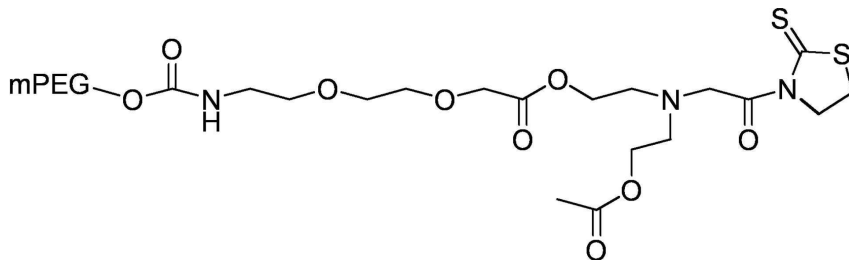
[0085]

본 발명의 하나의 차선택의 양상에서, L-아스파라기나아제 중합체 결합체는 일반적으로 할당된 미국 등록 특허 번호 7,122,189 및 7087,229 및 미국 출원 번호 10/557,522, 11/502,108, 및 11/011,818에서 기술된 것과 같은 특정 분지화 또는 바이신(bicine) 중합체 잔기를 사용하여 만들어진다. 상기 각 특허 출원의 내용은 참고에 의해 본 명세서에 통합된다. 바람직한 활성화된 중합체의 일부는 하기를 포함한다:



[0086]

및



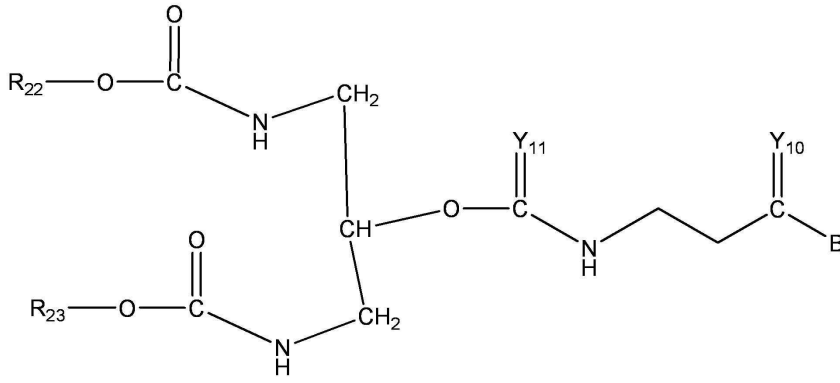
[0087]

[0088]

상기 나타낸 이탈기는 단지 적당한 그룹의 하나이고, 또한 본 명세서에서 언급된 다른 것들도 과도한 실험 없이 사용될 수 있다는 것이 이해되어야 한다.

[0089]

차선택의 양상에서, 활성화된 중합체 링커는 일반적으로 할당된 미국 등록 특허 번호 5,643,575; 5,919,455 및 6,113,906 및 6,566,506에서 기술된 것과 같은 분지화된 중합체 잔기를 이용하여 제조되고, 이들의 내용은 본 명세서에 참조로 통합된다. 상기 활성화된 중합체는 하기에서 대표되는 중합체 시스템 (v) - (ix)에 대응한다:



[0090]
 [0091] B는 L-아스파라기나아제 II이고, 모든 다른 변이체는 이미 정의되었다.

[0092] 실질적으로 비-항원성인 중합체

[0093] 상기 언급된 바와 같이, R₁₋₂, R₁₀₋₁₁, 및 R₂₂₋₂₃는 바람직하게는 폴리알킬렌 옥사이드(PAO) 및 더욱 바람직하게는 mPEG와 같은 폴리에틸렌 글리콜과 같은 바람직하게는 실질적으로 비-항원성인 물 수용성 중합체 잔기이다. 구체적으로 설명하지만 제한되지 않는 목적으로, R₁₋₂, R₁₀₋₁₁, 및 R₂₂₋₂₃의 상기 폴리에틸렌 글리콜(PEG) 잔기 부분은 하기로부터 선택될 수 있다:

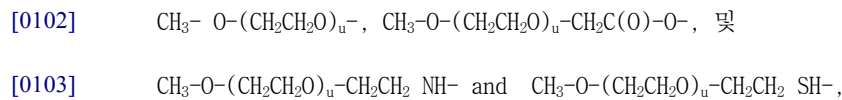


[0098] u는 중합도로, 즉, 대략 10 내지 대략 2,300이고;

[0099] R₂₅는 수소, C₁₋₆ 알킬, C₂₋₆ 알케닐(alkenyls), C₂₋₆ 알키닐(alkynyls), C₃₋₁₂ 분지화 알킬, C₃₋₈ 사이클로알킬, C₁₋₆ 치환된 알킬, C₂₋₆ 치환된 알케닐, C₂₋₆ 치환된 알키닐, C₃₋₈ 치환된 사이클로알킬, 아릴, 치환된 아릴, 아랄킬, C₁₋₆ 헤테로알킬, 치환된 C₁₋₆ 헤테로알킬, C₁₋₆ 알콕시, 페녹시 및 C₁₋₆ 헤테로알콕시 중에서 선택되고, 및

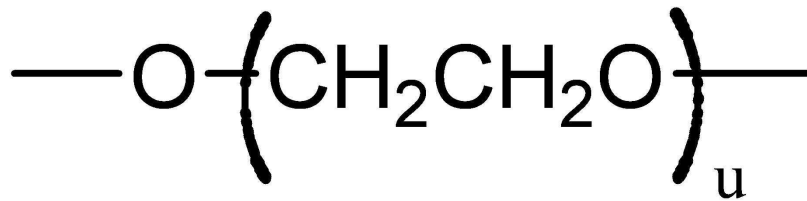
[0100] J는 캡핑기(capping group), 즉, 상기 중합체의 말단에서 발견되는 그룹이고, 어떤 측면에서, NH₂, OH, SH, CO₂H, C₁₋₆ 알킬, 바람직하게는 메틸, 또는 당업자에 의해 이해되는 그러한 그룹으로서 그 외의 PEG 말단 활성화기(activating groups) 중의 어느 것으로든 선택될 수 있다 .

[0101] 하나의 바람직한 구체화에서, R₁₋₂, R₁₀₋₁₁, 및 R₂₂₋₂₃ 은 하기로부터 선택되고,



[0104] u는 양의 정수이고, 바람직하게는 무게가 대략 200 내지 대략 80,000 Da의 분자량을 평균으로 하는 것으로부터 선택된다. 더욱 바람직하게는 R₁₋₂, R₁₀₋₁₁, 및 R₂₂₋₂₃은 독립적으로 평균 분자량이 대략 2,000 Da 내지 대략 42,000 Da이고, 가장 바람직하게는 평균 분자량이 대략 5,000 Da 내지 대략 40,000 Da이다. 그 외의 분자량은 또한 당업계의 필요에 충족시키기 위하여 예측된다.

[0105] PEG는 일반적으로 하기 구조에 의해 대표되고:

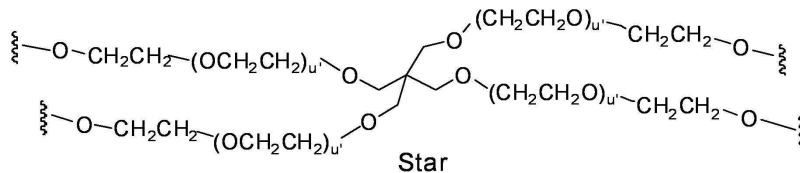


[0106]

[0107] 그리고 R₁₋₂, R₁₀₋₁₁, 및 R₂₂₋₂₃은 바람직하게는 상기 화학식의 잔기를 포함한다. 중합체에 대한 중합도는 중합체 사슬에 있는 반복 단위의 수를 대표하고 이는 중합체의 분자량에 따라 다르다.

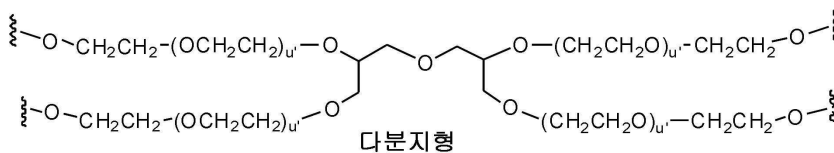
[0108] 또한 일반적으로 할당된 미국 등록 특허 번호 5,643,575('575 특허)에 기재된 것과 같은 폴리프로필렌 글리콜, 분지형 PEG 유도체, 및 Shearwater 사의 2001년 카달로그 "Polyethylene Glycol and Derivatives for Biomedical Application"에서 기술된 바와 같은 "star-PEG" 및 다분지형 PEG(multi-armed PEG)가 유용하다. 상기 각각의 내용은 본 명세서에 참조로 통합된다. '575 특허에 의한 분지화는 단일 부착지점에서 생물학적 활성 분자에 중합체 선적을 증가하는 방법으로 이차 또는 삼차 분지화를 허용한다. 물-수용성 중합체가 과도한 실험 없이 이중기능성 기에 부착하기 위해 필요하면 기능화될 수 있다는 것이 이해될 것이다.

[0109] 예를 들면, 본 발명의 결합체는 이 본 명세서에 참고로 통합된 NOF 사의 약 전달 시스템(Drug Delivery System) 카달로그, Ver. 8, April 2006에서 기술된 것과 같은 다분지형 PEG-OH 또는 "star-PEG" 산물을 전술한 '614 또는 '096 특허에서 기술된 활성화 기술을 이용하여, 적당히 활성화된 중합체로 개조하는 것을 포함하는 방법에 의해 제조될 수 있다. 특히 PEG는 하기의 화학식일 수 있다:



[0110]

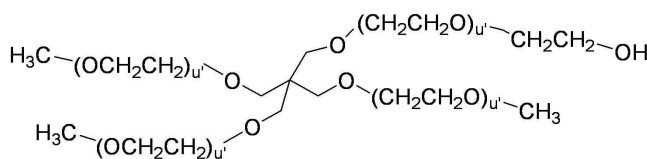
[0111] 또는



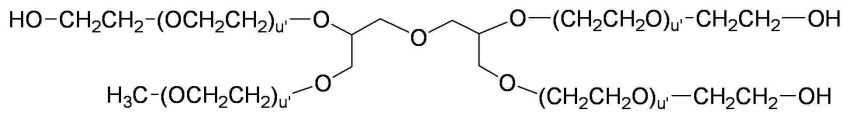
[0112]

[0113] u'은 바람직하게는 전체 분자량이 5,000 내지 40,000인 중합체를 제공하는, 4 내지 455의 양의 정수이고, 및 잔기의 3 개의 말단 부분까지가 메틸 또는 그 외의 저가 알킬로 썬워져 있다.

[0114] 어떤 바람직한 구체화에서, 상기 PEG의 모든 네 개의 분지는 재조합 단백질에 부착하는 것을 용이하게 하기 위하여 적당한 이탈기, 즉, N-하이드록시숙신이미딜 카보네이트(N-hydroxysuccinimidyl carbonate; SC) 등으로 전환된다. 전환에 앞서, 상기 화합물들은 하기를 포함한다



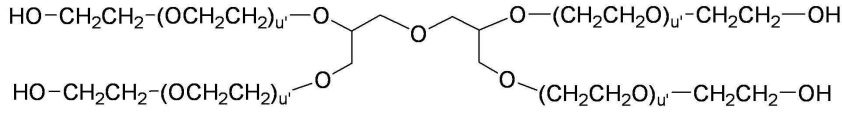
[0115]



[0125]

[0126]

및



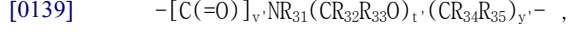
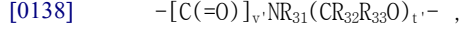
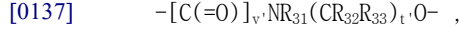
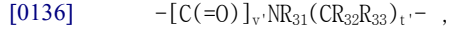
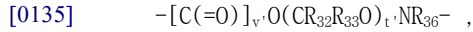
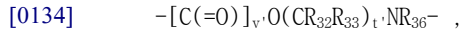
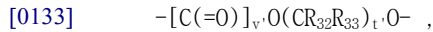
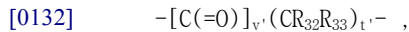
[0127]

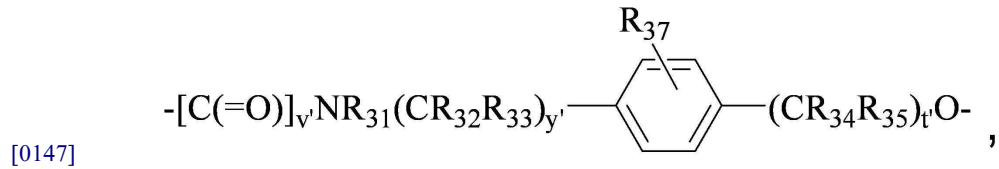
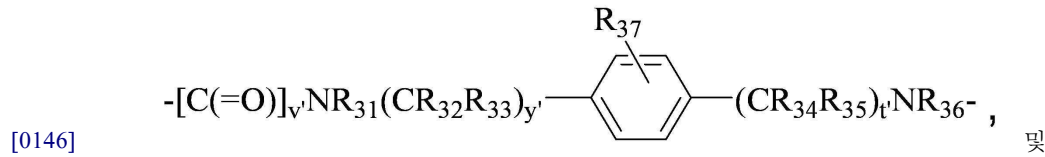
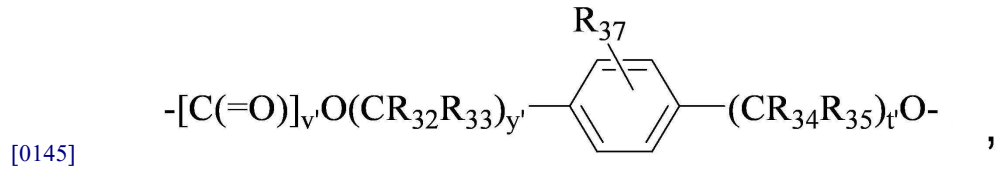
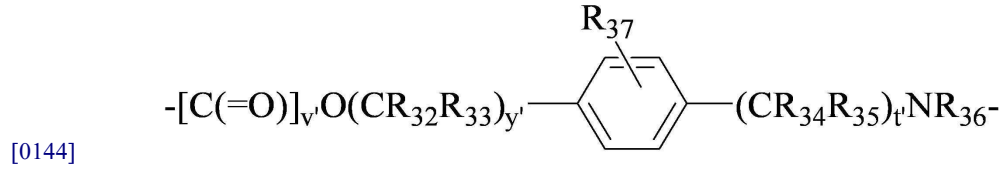
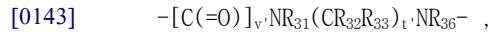
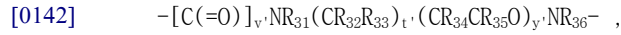
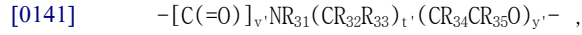
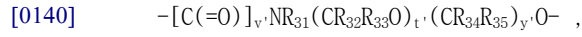
[0128] 본 명세서에 포함된 중합체 물질은 바람직하게는 실온에서 물 수용성이다. 그런 중합체의 제한되지 않은 목록은 폴리에틸렌 글리콜(PEG) 또는 폴리프로필렌 글리콜과 같은 폴리알킬렌 옥사이드 단일 중합체, 폴리옥시에틸렌네이티드 폴리올스(polyoxyethyleneated polyols), 이의 공중합체 및 이의 블록 공중합체(block copolymers)를 포함하고, 상기 블록 공중합체의 물 수용성이 유지된 형태로 제공된다.

[0129] 추가의 구체화에서, 및 PAO-기반 중합체의 차선책으로, R₁₋₂, R₁₀₋₁₁, 및 R₂₂₋₂₃은 텍스트란, 폴리비닐 알코올, 탄수화물 기반 중합체, 하이드록시프로필(메타)-아크릴아마이드[hydroxypropylmeth-acrylamide, HPMA], 폴리알킬렌 옥사이드, 및/또는 이의 공중합체와 같은 하나 이상의 효과적인 비-항원성 물질로부터 각각 선택적으로 선정된다. 또한 일반적으로 할당된 미국 등록 특허 번호 6,153,655를 참조하고, 이의 내용은 본 명세서에 참조로 통합된다. 동일한 유형의 활성화 PEG와 같은 PAO에 관해서, 본 명세서에서 기술된 것처럼 적용되는 것은 당업자에 의해 이해될 수 있을 것이다. 당업자들은 또한 전술한 목록이 단지 설명하기 위한 것이고, 본 명세서에서 기술된 성질을 갖는 모든 중합 물질들이 예상되고, 또한 폴리프로필렌 글리콜과 같은 다른 폴리알킬렌옥사이드 유래물들도 예상되는 것을 알 수 있을 것이다.

[0130] 이중기능성 링커 그룹(BIFUNCTIONAL LINKER GROUPS):

[0131] 본 발명의 많은 양상에서는, L₁₋₆ 및 L₈은 중합체 가닥, 예를 들면, R₁₋₂, R₁₀₋₁₁, 및/또는 R₂₂₋₂₃의 부착을 촉진하는 연결 그룹이다. 제공된 연결은 직접적으로 또는 당업자에게 알려진 추가의 연결 그룹(coupling group)일 수 있다. 본 발명의 상기 양상에서, L₁₋₆ 및 L₈은 동일하거나 다를 수 있고, 이중기능성 및 이중이작용기성(heterobifunctional) 지방족(aliphatic) 및 방향족-지방족 그룹, 아미노산 등과 같은 당업자에게 잘 알려진 넓은 다양한 그룹으로부터 선택될 수 있다. 따라서 L₁₋₆ 및 L₈은 동일하거나 다를 수 있고, 하기와 같은 그룹을 포함하고:





[0148] R₃₁-R₃₇은 수소, 아미노, 치환된 아미노, 아지도(azido), 카복시, 시아노(cyano), 할로(halo), 하이드록실(hydroxyl), 니트로(nitro), 시릴에테르(silyl ether), 술포닐(sulfonyl), 머캡토(mercapto), C₁₋₆ 알킬머캡토, 아릴머캡토, 치환된 아릴머캡토, 치환된 C₁₋₆ 알킬티오(alkylthio), C₁₋₆ 알킬, C₂₋₆ 알케닐, C₂₋₆ 알키닐, C₃₋₁₉ 분지화 알킬, C₃₋₈ 사이클로알킬, C₁₋₆ 치환된 알킬, C₂₋₆ 치환된 알케닐, C₂₋₆ 치환된 알키닐, C₃₋₈ 치환된 사이클로알킬, 아릴, 치환된 아릴, 헤테로아릴, 치환된 헤테로아릴, C₁₋₆ 헤테로알킬, 치환된 C₁₋₆ 헤테로알킬, C₁₋₆ 알콕시, 아릴옥시(aryloxy), C₁₋₆ 헤테로알콕시, 헤테로아릴옥시, C₂₋₆ 알카노일(alkanoyl), 아릴카르보닐(arylcabonyl), C₂₋₆ 알콕시카르보닐, 아릴옥시카르보닐, C₂₋₆ 알카노일옥시, 아릴카르보닐옥시, C₂₋₆ 치환된 알카노일, 치환된 아릴카르보닐, C₂₋₆ 치환된 알카노일옥시, 치환된 아릴옥시카르보닐, C₂₋₆ 치환된 알카노일옥시, 치환된 및 아릴카르보닐옥시로 이루어진 군으로부터 독립적으로 선택되고,

[0149] 상기 치환은 아실, 아미노, 아미도, 아미딘(amidine), 아라알킬(araalkyl), 아릴, 아지도, 알킬머캡토, 아릴머캡토, 카르보닐, 카르복시산염(carboxylate), 시아노, 에스테르, 에테르, 포르밀(formyl), 할로젠, 헤테로아릴, 헤테로사이클로알킬, 수산기, 이미노(imino), 니트로(nitro), 티오카르보닐(thiocarbonyl), 티오에스테르(thioester), 티오아세테이트(thioacetate), 티오포메이트(thioformate), 알콕시, 포스포릴(phosphoryl), 포스포네이트(phosphonate), 포스피네이트(phosphinate), 시릴, 설프히드릴(Sulfhydryl), 황산염, 술포산염, 설파모일(sulfamoyl), 술포아미드(sulfonamide), 및 술포닐로 이루어진 군으로부터 선택되고;

[0150] (t') 및 (y')는 0 또는 양의 정수로부터 독립적으로 선택되고, 바람직하게는 1 내지 6이며; 및

[0151] (v')는 0 또는 1이다.

[0152] 바람직하게는 L₁₋₆ 및 L₈은 하기로부터 선택된다:

- [0153] $-C(O)CH_2OCH_2C(O)-$;
- [0154] $-C(O)CH_2NHCH_2C(O)-$;
- [0155] $-C(O)CH_2SCH_2C(O)-$;
- [0156] $-C(O)CH_2CH_2CH_2C(O)-$, 및
- [0157] $-C(O)CH_2CH_2C(O)-$.
- [0158] 차선책으로, 적당한 아미노산 잔기는 알려진 자연 발생 L-아미노산, 몇 가지를 예를 들면, 알라닌, 발린, 류신 등 및/또는 이의 조합으로부터 선택될 수 있다. 또한, L₁₋₆ 및 L₈은 예를 들면, 대략 2 내지 대략 10개의 아미노산 잔기 길이 범위의 펩티드를 포함할 수 있다.
- [0159] 또한 각종 기술에 의하여 알려지는 비자연발생 아미노산(D 또는 L) 뿐만 아니라, 소수성 또는 비 소수성의 자연 발생 아미노산의 유도체 및 유사체는 본 발명의 범위내에서 예상된다.
- [0160] 모이어티
- [0161] 1. 이탈기 또는 활성화기
- [0162] A가 활성화기인 양상에서, 적당한 모이어티는 제한 없이 N-하이드록시벤조트리아졸릴(N-hydroxybenzotriazolyl), 할로젠, N-하이드록시프탈이미딜(N-hydroxyphthalimidyl), p-니트로페녹실, 이미다졸릴(imidazolyl), N-하이드록시숙신이미딜(N-hydroxysuccinimidyl); 티아졸리디닐 티오네(thiazolidinyl thione), O-아실 우레아(O-acyl ureas), 펜타플루로페놀실(pentafluorophenoxy), 2,4,6-트리클로로페놀시(2,4,6-trichlorophenoxy) 또는 당업자에게 명백한 그 외의 적당한 이탈기와 같은 그룹을 포함한다.
- [0163] 본 발명의 목적을 위해, 이탈기는 원하는 표적, 즉 생물학적으로 활성인 모이어티, 진단약, 표적화 모이어티, 이중기능성 스페이서, 중간물질 등에서 발견되는 친핵체와 반응할 수 있는 그러한 그룹으로 이해될 것이다. 따라서 표적은 단백질, 펩티드, 효소, 독소루비신(doxorubicin)과 같은 자연적 또는 화학적으로 합성된 치료 분자, 모노 프로텍티드 디아민(mono-protected diamines)과 같은 스페이서에서 발견되는 NH₂그룹과 같은 치환용 그룹을 포함한다. A로 선택된 그 모이어티가 또한 생물학적으로 활성인 친핵체 외에 다른 모이어티와 작용할 수 있는 것도 이해될 것이다.
- [0164] 2. 작용기
- [0165] 또한 A는 작용기일 수 있다. 그런 작용기의 제한되지 않은 예로는 말레이미딜(maleimidyl), 비닐, 술폰의 잔기, 수산기, 아미노, 카복실, 머캅토, 하이드라지드(hydrazide), 카르바제이트(carbazate) 및 아민을 포함하는 스페이서를 통해 바이신(bicine) 부분에 부착될 수 있는 유사체를 포함한다. 바이신 부분에 한번 부착되면, 작용기[예를 들면, 말레이미드(maleimide)]는 폴리펩티드, 아미노산 또는 펩티드 스페이서 등의 시스테인 잔기와 같은 표적에 바이신 중합체를 부착하기 위해 사용될 수 있다.
- [0166] 3. 알킬기
- [0167] A가 알킬기인 화학식 (I)의 그 양상에서, 제한되지 않은 적당한 그룹의 목록은 C₁₋₆ 알킬, C₂₋₆ 알케닐, C₂₋₆ 알키닐, C₃₋₁₉ 분지화 알킬, C₃₋₈ 사이클로알킬, C₁₋₆ 치환된 알킬, C₂₋₆ 치환된 알케닐, C₂₋₆ 치환된 알키닐, C₃₋₈ 치환된 사이클로알킬, 아랄킬, C₁₋₆ 헤테로알킬, 및 치환된 C₁₋₆ 헤테로알킬로 구성된다.
- [0168] Z 모이어티 및 이들의 기능
- [0169] 본 발명의 하나의 양상에서 Z는 L₇-C(=Y₁₂)이고, L₇은 L₁₋₆으로 정의된 그룹으로부터 선택되는 이중기능성 링커이고, Y₁₂는 Y₁으로 정의된 것과 동일한 그룹으로부터 선택된다. 본 발명의 상기 양상에서, Z 그룹은 중합체 전달 시스템의 L-아스파라기나아제와 잔여물 사이의 결합의 역할을 수행한다. 본 발명의 다른 양상에서, Z는 표적 세포로 활발히 수송되는 모이어티, 소수성 모이어티, 또는 이들의 조합이다. 이중기능성 링커의 역할을 수행할

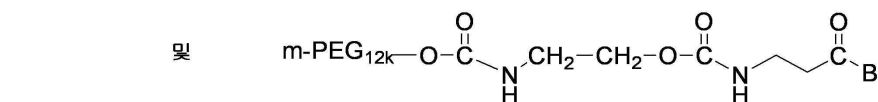
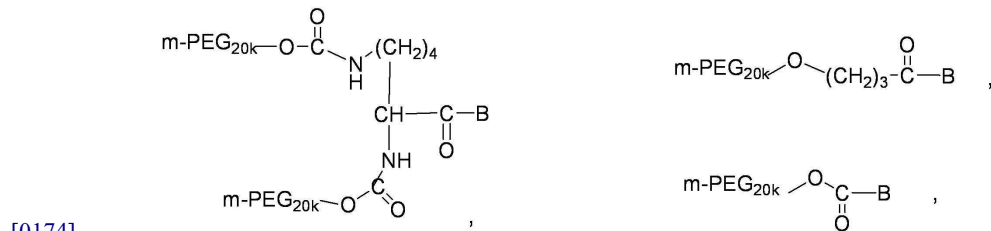
수 있다. Z가 존재한다면, 이중기능성 링커, 표적 세포로 활발히 수송되는 모이어티, 소수성 모이어티, 또는 이들의 조합의 역할을 수행할 수 있다.

[0170] 본 발명의 상기 양상에서, Z 모이어티에 여전히 연결되었는 동안 생체내 가수분해작용은 L-아스파라기나아제로부터 중합체를 절단하고, 세포밖 유체로 상기 효소를 방출하도록 하는 방출가능한 중합체 시스템이 제조되었다. 예를들면, 하나의 잠재적인 Z-B 조합은 류신-L-아스파라기나아제 이다.

[0171] **L-아스파라기나아제 결합체의 제조**

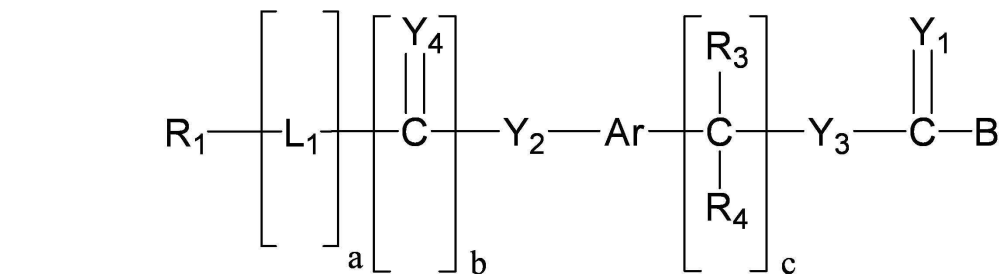
[0172] 예시를 위해, 적합한 결합 반응은 본 명세서에 기술된 적당한 활성 중합체 시스템과 L-아스파라기나아제를 반응하는 단계를 포함한다. 상기 반응은 바람직하게는 대략 6.5-8.5의 pH 범위의 PBS 완충용액 시스템 등의 사용을 포함하여 단백질 수정에 대한 당업자에게 잘 알려진 조건을 이용하여 수행된다. 대부분의 경우에서, 활성화된 중합체의 초과량은 L-아스파라기나아제와 작용할 것으로 여겨진다.

[0173] 이러한 종류의 반응은 종종 L-아스파라기나아제에 부착된 하나 이상의 중합체를 포함하는 결합체를 형성할 것이다. 평가될 것과 같이, 때때로 각종 분획물 분리하고 균질한 산물을 제공하는 것이 바람직할 것이다. 본 발명의 대부분의 양상에서, 반응 혼합물을 수집하여 적당한 컬럼 수지에 적재하였고, 완충용액의 수준을 증가시키면서 원하는 분획물을 연속적으로 용리하였다. 분획물은 추가로 가공되기 전에 결합 단백질의 순도를 결정하기 위하여 적당한 분석 장치를 이용하여 분석된다. 합성 경로 및 선택된 활성화 중합체에 관계 없이, 상기 결합체는 본 명세서에서 정의된 바와 같이 화학식(I)로 기재될 것이다. 본 명세서에서 기술된 합성 기술로부터 유래한 바람직한 화합물의 일부는 하기를 포함하고:



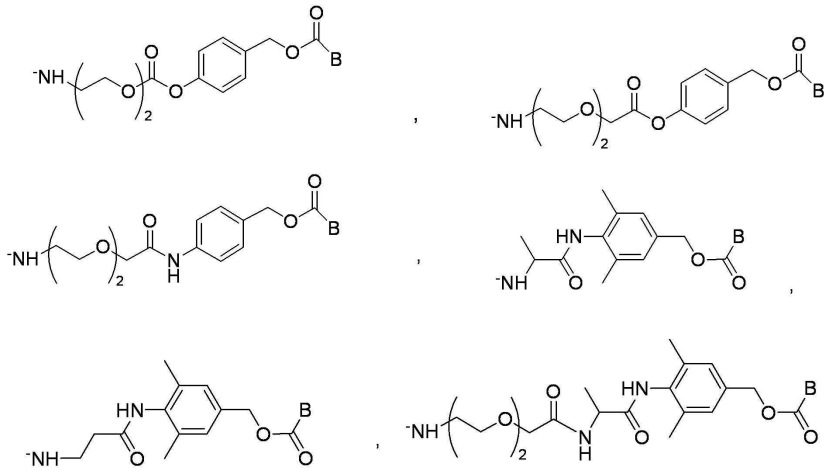
[0175] B는 L-아스파라기나아제이다.
 [0176]

[0177] 더욱더 본 발명에 따른 결합체는 하기를 포함하고:

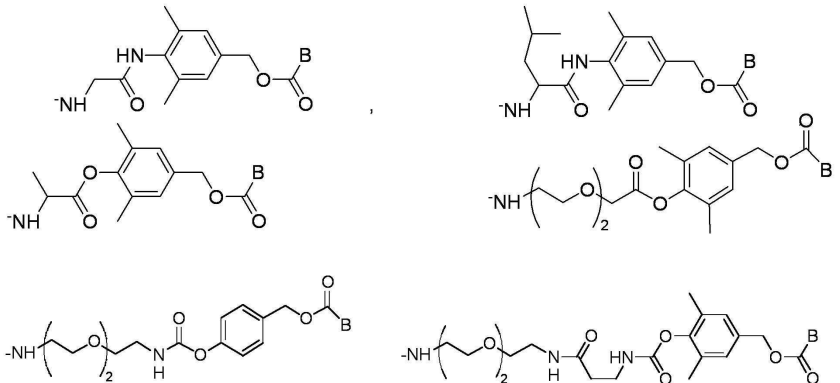


[0179] 상기 모든 변이체는 상기 언급된 바와 동일하다. 예를 들면, 일부의 구체화는 하기로 구성된 군으로부터 선택되는 결합체를 포함하고:

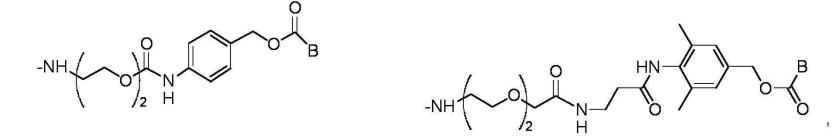
[0180]



[0181]



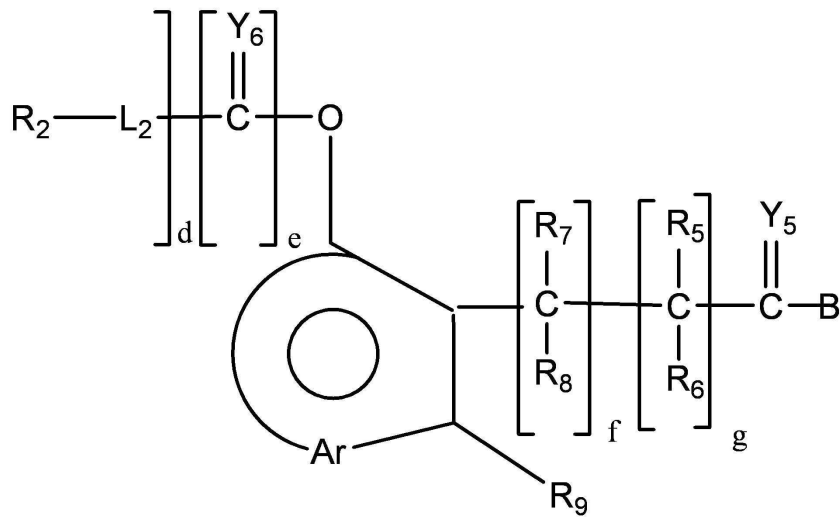
[0182]



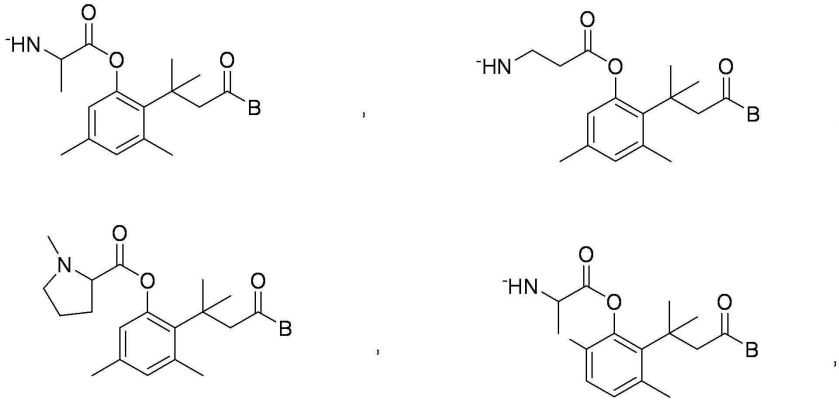
[0183] B는 L-아스파라기나아제이다.

[0184] 추가의 결합체는 하기를 포함하고:

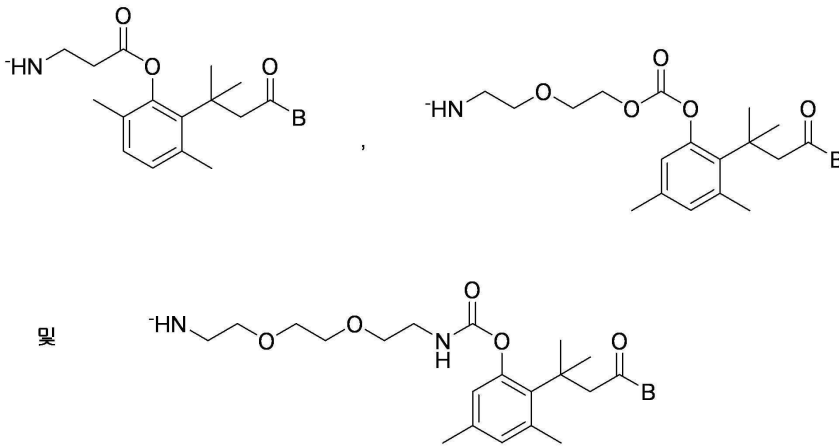
[0185]



[0186] B는 L-아스파라기나아제이다. 상기 결합체에서 채택된 비제한된 목록은 하기 중에 있고:



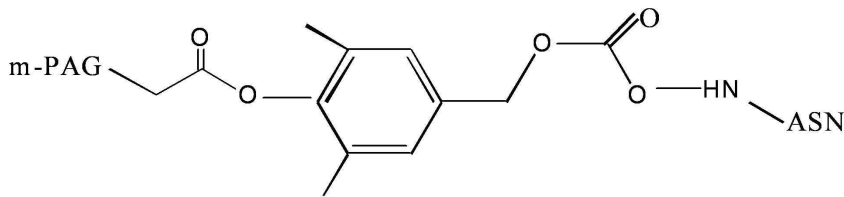
[0187]



[0188]

[0189] B는 L-아스파라기나아제이다.

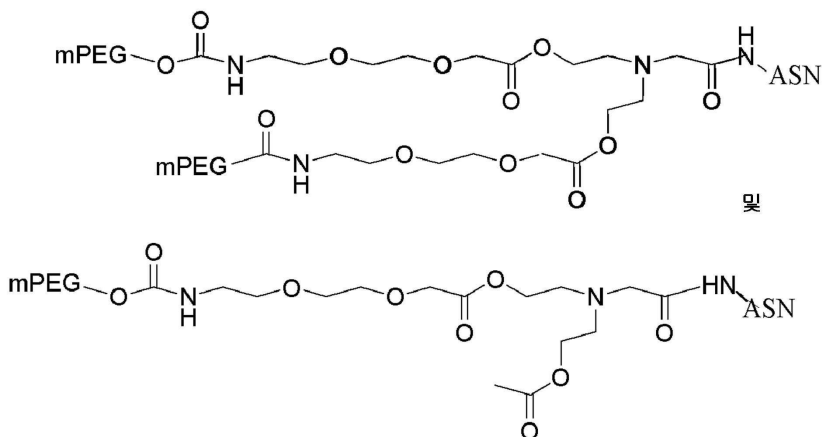
[0190] 특히 바람직한 결합체는



[0191]

[0192] 이고: mPEG의 분자량은 대략 10,000 내지 대략 40,000이다.

[0193] 바이신-기반 중합체 시스템이 사용될 때, 두 개의 바람직한 결합체는:



[0194]

[0195] 이고, 상기 mPEG의 분자량은 상기와 동일하다.

[0196] L-아스파라기나아제의 페그화(PEGylation)는 단백질 당 전체 PEG 부착, PEG 중합체 크기 및 PEG 링커 설계에 대해 실험적으로 최적화 될 것이 주의된다. 페그화 최적화의 평가를 위한 페그화된 L-아스파라기나아제의 중요한 특성은 생체의 분석실험(예를들면, 효소 활성과 안정성)과 생체내 분석실험(예를들면, 약물 동력학과 약력학)을 둘다 포함한다.

[0197] **치료 방법**

[0198] 본 명세서 기술된 DNA, 벡터 및 숙주세포에 의해 제조한 L-아스파라기나아제는 이미 당업계에서 Elspar® (Merck & Co. 사) 및 Oncaspar® (Enzon Pharmaceuticals 사)으로 알려진 모든 방법 및 조치에 유용하다. 따라서 본 발명의 L-아스파라기나아제 II 효소는, 폴리알킬렌 옥사이드가 결합됐거나 비결합형 단백질이든간에, 질병 또는 장애 또는 그런 치료에 반응하는 그외의 상태의 치료에 유효한 양으로 이러한 치료가 필요한 환자에게 투약된다. 당업자는 적당한 투여량, 경로 및 Elspar® 및 Oncaspar®의 알려진 특성으로부터 추정된 투약 계획을 올바르게 인식할 것이다.

[0200] **실시예**

[0200] 하기 제한되지 않은 실시예는 본 발명의 더 나은 이해를 위해 제공된다.

[0201] 실시예 1

[0202] L-아스파라긴 아미도하이드롤라아제, 유형 EC-2, EC 3.5.1.1의 서열 분석; 대장균 L-아스파라기나아제 II 단백질

[0203] Merck & Co. 사 및 Kyowa Hakko Kogyo사에서 각각 상업적으로 구입가능한 상기 L-아스파라기나아제 II 효소의 아미노산 서열을 취득하기 위하여, 상기 단백질들의 단백질 서열을 분석하였고, 공개된 대장균 K-12 ansB 유전자(GenBank 접근 번호 M34277)의 서열과 비교하였다.

[0204] L-아스파라기나아제 II는 다음과 같이 서열분석되었다. L-아스파라기나아제 II(80 mg/mL; Merck 사) 2 mL을 5.0 mg/mL의 단백질 농도로 시약 등급의 물에 희석하였다. 단백질 서열 분석을 하기 전에 미생물 존재량을 감소시키기 위해, 상기 희석액을 0.22 μm 여과기로 여과한 후 용기에 담았다. 유사하게, L-아스파라기나아제 II(Kyowa Hakko Kogyo 사) 100 mg을 20 mL의 시약 등급의 물에 희석하여 5.6 mg/mL의 농도로 희석한 후, 여과 멸균하였다. 상기 두 개의 단백질의 완전한 서열을 결정하기 위해 아미노산 정량 분석, N-말단 서열 결정, 펩티드 맵핑, 및 질량 분석이 사용되었다. 트립신 다이제스트, 키모트립신 다이제스트, Lys-C 다이제스트 및 브롬화 시아노겐(cyanogen bromide; CnBr) 단편이 제조되었고, 고압 액체 크로마토그래피("HPLC")로 분리되었고, 상기 분리된 펩티드를 이용하여 질량 분석 및 아미노산 서열 분석이 수행되었다. 상기 완료된 분석은 상기 두 개의 상업적인 L-아스파라기나아제 II 효소 사이에 명백한 서열 일치를 나타냈다. 그러나 대장균 K-12의 아스파라기나아제의 유전자 서열과 4개의 아미노산 위치가 달랐다. 상기 4개의 다른 위치는 하기 표 1에 나타내었다.

[0205] **표 1**

잔기 위치	27	64	252	263
Merck 사 및 KH 사	Ala	Asp	Thr	Asn
K12 AnsB	Val	Asn	Ser	Thr

[0206] 실시예 2

- [0207] 제조합 L-아스파라기나아제 II를 발현하는 대장균 숙주 EN538의 제조
- [0208] 대장균 K-12 ansB L-아스파라기나아제 II를 암호화하는 유전자는 실시예 1의 표 1에서 설명된 잔기가 치환된 L-아스파라기나아제 II를 발현하도록 하기 방법으로 변형되었다. 대장균 K-12 ansB의 326개의 성숙한 아미노산 서열의 L-아스파라기나아제 II는 Jennings MP 및 Beacham IR(1990 *J Bacteriol* 172: 1491-1498; GeneBank 번호 M34277)에 의해 보고된 978개의 염기쌍 단편으로 암호화된다. 성숙 단백질 앞의 22개 아미노산의 신호 펩티드를 포함하는, ansB 유전자는 다른 대장균 K-12 균주(GX1210; Genex 사에서 구입)로부터 일반적인 중합효소 연쇄 반응(PCR) 반응에 의해 복제되었다. 특히, 상기 올리고뉴클레오티드
- [0209] 5'-TACTGAATTCATGGAGTTTTTCAAAAAGACGGCA-3'(서열번호 4) 및
- [0210] 5'-ACAGTAAGCTTAGTACTGATTGAAGATCTGCTG-3'(서열번호 5)를 프라이머로 하고, Perkin Elmer Gene Amp 9600 PCR 기계, Taq 중합효소, 및 표준 시약을 이용하여, 하기 조건으로 PCR을 수행하였다: 30 초 94°C, 30 초 40°C, 1 분 72°C, 25 회 반복.
- [0211] 상기 증폭된 1 kb 이상의 밴드를 TBE 아가로오즈 겔 전기영동으로 분리하여 Eco RI 및 Hind III로 처리한 후 박테리오파지 벡터 M13mp8에 클로닝 하였다. 상기 ansB 유전자의 DNA 서열[GeneBank 번호 M34277]은 수동 DNA 디옥시 염기서열 분석 방법에 의해 검증되었다. 상기 클로닝된 ansB 유전자는 ansB 유전자의 네 개의 코돈 상기 교대의 아미노산[Val27Ala; Asn64Asp; Ser252Thr; Thr263Asn]을 암호화하도록 변경하기 위해[530번째 염기에서 GTG를 GCG로; 640번째 염기에서 AAT를 GAT로; 1205번째 염기에서 TCT를 ACT로, 및 1239번째 염기에서 ACC를 AAC로], Whitlow 및 Filpula[Single Chain Fvs, In Tumour Immunology. A Practical Approach, Ed. G. Gallagher, R.C. Rees, and C.W. Reynolds, 1993, Oxford University Press, pp 279-291]에 의해 기술된 Amersham RPN 1523 버전 2 돌연변이 키트를 이용한 위치지정 돌연변이에 사용되었다
- [0212] 특히, 채택된 올리고뉴클레오티드는
- [0213] Val27Ala 변형에 대해 5'-CAACTTACCCGCTGTGTAGTTAG-3'(서열번호 6);
- [0214] Asn64Asp 변형에 대해 5'-CAGCCAGACATCATCGTTCATGTC-3'(서열번호 7);
- [0215] Ser252Thr 변형에 대해 5'-GTCGAACACAGTTTTATACAGGTTGC-3'(서열번호 8);
- [0216] Thr263Asn 변형에 대해 5'-CTGCAGTACCGTTTTTCGCGCGCG-3'(서열번호 9) 이었다. 모든 네 가지 변형은 단일 배치법으로 수행되었고, 변형된 ansB 유전자 서열은 DNA 염기서열분석으로 검증되었다[본 명세서에서 ansB* 유전자(서열번호 2)로 지정].
- [0217] 플라스미드 pET-27b+(Novagen 사)로 상기 ansB* 유전자의 클로닝은 PCR 증폭에 의해 유전자의 5' 및 3' 말단에 각각 측면 제한효소 영역, *NdeI* 및 *BamHI*를 도입하여서 달성되었다. 합성 DNA를 제한효소 *NdeI* 및 *BamHI*로 처리한 다음, 상기 1 킬로베이스 유전자는, 역시 상기 두 가지 효소로 처리된 플라스미드 벡터 pET-27b(+) 플라스미드로 T4 DNA 리가제를 통해 연결되었다. 상기 제조합 플라스미드는 제조사의 지시에 따라 BTX Electro Cell Manipulator 600을 이용하여 전기충격법에 의해 대장균 숙주 BLR(DE3)로 도입되었다.
- [0218] 상기 pET 벡터 제조는 IPTG 추가에 유도성인 T7 프로모터의 뒤에 ansB* 유전자를 위치한다. IPTG는 lacUV5 프로모터의 관리하에 염색체 T7 RNA 중합효소유전자의 발현을 유도하고, 그 후에 상기 T7 RNA 중합효소는 ansB* 단백질 산물의 발현량을 높이는 ansB* 유전자를 번역한다.
- [0219] 상기 형질전환 혼합물은 플라스미드 pET-27b(+)/ansB*를 포함하는 콜로니의 선별이 가능하도록, 카나마이신(15 µg/ml)을 포함하는 LB 한천배지에 도말되었다. 이것은 플라스미드 pEN537로 명명되었고, 도 1에서 설명되었다. 분리된 콜로니를 도말함으로써 추가로 분리하였고, Novagen pET System Manual Ninth Edition에서 기술된 표준 방법에 의해 IPTG 유도성 유전자 발현에 대해 분석되었다. 상기 유전자 서열은 Applied Biosystems Prism310 Genetic Analyzer를 이용하여 확인되었다.
- [0220] 실시예 3

- [0221] 재조합 L-아스파라기나아제 II의 발현 및 상기 효소의 부분적인 특성
- [0222] 숙주 EN538은 37°C에서 카나마이신(15 µg/ml)을 포함하는 LB 배지에서 배양되었다. OD₆₀₀가 대략 0.8에 도달하면, IPTG(1 mM)을 배양액에 첨가하였고, 유전자 발현의 유도가 2, 3, 또는 4 시간 동안 수행되도록 하였다. 배양액의 SDS-PAGE 분석을 통해 34.6 kDa ansB* 폴리펩티드의 과발현을 확인했다. 항-대장균 아스파라기나아제 II 래빗 다클론 항체를 이용한 웨스턴블랏을 통해 SDS-PAGE 상에서 가장 많이 유도된 단백질 밴드가 L-아스파라기나아제 II인 것을 확인했다.
- [0223] L-아스파라기나아제 II는 일반적으로 다음 원형질 공간으로 분비된 다음 신호 펩티드가 제거되기 때문에, 세포 또는 배지에 있는 아스파라기나아제의 위치를 시험하기 위하여 추가로 실험되었다. 상기 배양액을 원심분리 하였고, 상기 펠렛화된 세포는 수용성 및 불용성 세포 관련 단백질 및 더하여 배양기간 동안 성장 배지로 분비된 상기 단백질을 SDS-PAGE로 시험하기 전에 상기 세포 벽을 파괴하기 위한 라이소자임 용액에 재현탁되었다.
- [0224] 상기 분석은 37°C에서 3시간 또는 4시간 동안의 유도로 총 세포 단백질의 대략 30%의 최대에 가까운 ansB* 발현을 제공한다는 것을 설명했다. 아스파라기나아제의 적어도 70%는 라이소자임 처리에 의해 세포 펠릿으로부터 용해될 수 있다. 배양 기간 동안 성장 배지로 방출된 아스파라기나아제 양은 발현된 총 아스파라기나아제의 대략 25%이다.
- [0225] 라이소자임 처리를 거쳐 원형질로부터 방출된 수용성 아스파라기나아제는 기질인 아스파라진으로부터 상기 아스파라기나아제 반응의 산물인, 아스파르트산을 측정하는 RP-HPLC 분석실험을 사용하여 효소 활성에 대해 추가로 시험되었다. 비유도된 배양액에서 제조한 시료의 효소 활성은 단지 대략 2 IU/mg이었으나, IPTG에 의하여 유도된 시료의 크루드 추출물의 효소 활성은 대략 60 IU/mg이었다. 이 단계에서는 상기 단백질은 대략 20%만 순수하기 때문에, 이것은 순수한 아스파라기나아제 II(~250-300 IU/mg)의 보고된 특이적 활성과 잘 비교한다. 또한 상기 아스파라기나아제 제조의 N-말단 서열 분석은 Applied BioSystems PROCISE 단백질 서열분석기를 이용하여 수행되었다. N-말단 서열 LPNITILATGGTIAGGGDSA(서열번호 10)는 성숙한 수정된 아스파라기나아제의 예측된 N-말단 단백질 서열과 정확하게 일치한다. 상기 시료에 대해 LC-MS 분석(Jupiter C-18 역상컬럼)도 수행되었다. 상기 주요한 단백질 종은 성숙한 ansB* 아스파라기나아제로 예측된 질량과 정확하게 일치하는 34,592의 질량을 나타냈다. 노르류신(norleucine) 치환을 포함하는 단백질 종에 대한 아무런 기록도 관찰되지 않았다.
- [0226] **실시예 4**
- [0227] pEN537 플라스미드 및 대장균 BLR 염색체로부터 L-아스파라기나아제 II (ANSB & ANSB* 유전자)의 단백질 암호화 서열.
- [0228] 염색체 DNA는 대장균 BLR (DE3)[Novagen 사에서 구입; 제품 번호 69208-3]에서 준비되었다. 37°C에서 카나마이신(15 µg/ml)을 포함하는 LB 배지에서 배양된 BLR의 배양액 2 ml을 2분동안 마이크로퓨지(microcentrifuge)에서 원심분리 하였고, 세포 펠렛은 0.5 ml의 STET 완충용액에 재현탁되었다. 페놀/클로로포름(0.5 ml)을 첨가하였고, 혼합물을 볼텍싱한 후, 실온에서 5분동안 원심분리하였다. 상기 상등액을 수집하여 50 µl의 3 M 나트륨 아세테이트 및 1 ml의 에탄올을 혼합하였다. 10분동안 얼음에서 인큐베이션 한 후, 원심분리에 의해 DNA는 펠렛화되었고, 100 µl의 물에 재현탁되었다. 염색체 ansB 유전자를 분리하기 위해, 상기 시료에 대해 PCR이 수행되었다. 상기 PCR 반응 혼합물은 5 µl의 10x 고충실도(High Fidelity) PCR 완충용액, 5 µl의 10 mM dNTP 혼합물, 1 µl의 50 mM MgSO₄, 0.5 µl(50 pmol)의 올리고뉴클레오티드
- [0229] 5'-GATCCATATGGAGTTTTTCAAAAAGACGGCAC-3'(서열번호 11),
- [0230] 0.5 µl(50 pmol)의 올리고뉴클레오티드
- [0231] 5'-GTACGGATCCTCATTAGTACTGATTGAAGATC-3'(서열번호 12),
- [0232] 1 µl의 BLR DNA, 36 µl의 증류수, 및 1 µl의 Platinum Taq 고충실도 중합효소를 포함하였다. 상기 PCR 산물은 Invitrogen 사에서 구입한 상업적으로 이용되는 TOPO 클로닝 시스템을 이용하여 클로닝 되었고, 제조자의 설명에 따라 수행되었다.

- [0233] 상기 PCR 산물 및 TOPO TA 벡터를 이용한 클로닝 반응은 30분동안 실온에서 6 μ l로 수행되었다. 상기 반응의 라이제이션 산물은 형질전환용 TOP10 대장균 세포에 형질도입되었고, 카나마이신 선택용 LB 한천 배지에 도말되었다. 상기 클로닝된 ansB BLR 염색체 유전자 및 pEN537 ansB* 유전자의 DNA 서열 분석은 Applied Biosystems Prism 310 Genetic Analyzer를 이용하여 상기 플라스미드에 대해 수행되었다. 두 가닥의 염기서열이 분석되었다. 상기 BLR ansB 유전자 및 pEN537 ansB* 유전의 암호화 서열은 성숙한 단백질 암호화 서열의 29개의 불일치한 염기 지정과 상이한다. 그러나 상기 염기 치환중 어떤 것도 코돈 퇴보 때문에 아미노산 서열이 변경되지 않았다. BLR에서 암호화 된 ansB 단백질 및 pEN537에서 암호화 된 ansB* 단백질은 아미노산 서열이 동일한 것이 확인되었다. 모든 326개의 위치는 이러한 두 종류의 아스파라기나아제 단백질에서 동일한 것으로 나타났다.
- [0234] **실시예 5**
- [0235] 세포 및 배양 배지로부터 정제
- [0236] 하기 과정은 Harms 외., 1991 *Protein Expression and Purification 2*: 144-150에서 변형되었다.
- [0237] 상기 기술된 바와 같이 대장균 균주 EN538의 배양은 37°C의 교반 배양기에서 카나마이신(15 μ g/ml)이 포함된 LB(Luria broth) 배지에서 수행되었다. OD₆₆₀이 0.8에 도달하면, 최종 1 mM의 농도로 IPTG를 첨가하였고, 추가로 4 시간 동안 이어서 배양하였다. 원심분리하여 세포들을 수확하였다. 분석 목적을 위해 2-ml의 배양액이 사용되었다.
- [0238] 세포 추출물을 수득하기 위해, 상기 세포는 1 ml의 파괴 완충용액[50 mM KPO, pH 7.5, 1 mM EDTA, 0.5 mM 디티오트레이톨(dithiothreitol)]에 현탁되었고, 미세유동화(microfluidization) 기법에 의해 파괴되었다. 세포 파편을 원심분리로 제거하였고, 상기 상등 액체는 L-아스파라기나아제 II 활성에 대해 분석되었고, 또한 폴리아크릴아마이드 젤 전기영동법(SDS PAGE)에 의해 효소 제조를 평가하기 위하여 이용되었다. 삼투성 충격 분류법은 Boyd 외, 1987, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84:8525-8529에 기술된 대로 수행되었고, 이들의 내용은 참고로 본 명세서에 포함되어 있다. 간략하게, 상기 펠렛은 2 ml의 스페로블라스트(spheroblast) 완충용액(0.1 M Tris-HCl, pH 8.0, 0.5 M 수크로오스, 0.5 mM EDTA)에 현탁되었고, 5분동안 얼음에서 인큐베이션 된 후, 원심분리되었다. 상기 펠렛은 실온으로 온도를 높힌 후, 0.3 ml의 얼음수에 재현탁하였고, 5분 동안 얼음에서 인큐베이션 한 후, 다시 원심분리되었다. 상기 상등액 원형질 분획물은 추가의 처리과정 없이 활성 결정 및 전기영동에 사용되었다.
- [0239] **효소 정제**
- [0240] 대규모 L-아스파라기나아제 II 제조를 위해, 세포를 배치배양법(10 리터)으로 배양하였고, 상기 삼투성 충격을 가하였다. 배양액 1 리터당 50-100 ml의 스페로블라스트 완충용액 및 30-40 ml의 물이 사용되었다. 하기 프로토콜은 2리터의 배양액으로부터 수득한 원형질 추출물로부터 시작되었다. 모든 단계는 5-10°C에서 실행되었다.
- [0241] **황산 암모늄 분류법**
- [0242] 100 ml의 상등 액체에 대해 29.5 g의 고품 황산 암모늄이 첨가되어 50% 포화상태가 되었다. 2 시간 후, 원심분리로 침전물을 제거하였고, 상기 펠렛을 버렸다. 상기 상등액은 황산 암모늄으로 90% 포화상태(100 ml에 27.2 g)가 되었다. 상기 펠렛을 밤새 정치배양한 후, 원심분리로 수집하여 pH 5.5, 25 mM 피페라진(piperazine)-HCl 완충용액의 약간의 밀리리터에 용해되었고, 동일한 완충용액에 대해 투석되었다. 상기 동일한 과정은 또한 분비된 L-아스파라기나아제 II를 회수하기 위하여 잔류하는 세포 배양 배지에서도 수행되었다.
- [0243] **크로마토포커싱(Chromatofocusing)**
- [0244] 1 x 30-cm 컬럼의 다가-완충용액 교환기 PBE 94를 200 ml의 상기 피페라진-HCl 완충용액(시작 완충용액)으로 평형화하였다. 시료 용액(10 ml)을 적재한 후, 상기 컬럼을 200 ml의 용리 완충용액(다가 완충용액 74, H₂O로 10

배 희석되었고, HCl로 pH 4.0으로 조정됨)으로 30 ml/h의 유속으로 용리하였다. 2 ml의 분획을 수집하여 20 µl의 시료를 적당히 희석한 후, L-아스파라기나아제 II 활성을 분석하였다. 상기 아스파라기나아제를 포함하는 분획물을 합쳐서, 포화된 황산 암모늄 용액으로 투석하였다. 상기 효소 펠렛은 90% 황산 암모늄으로 세척하였고, 상기 보존액에 현탁된 채로 저장하였다.

[0245] **실시예 6**

[0246] 세포 및 배양 배지로부터 정제

[0247] 상기 기술된 바와 같이 대장균 숙주 EN538의 배양은 카나마이신(15 µg/ml)이 포함된 배양배지[예를들면, Filpula, D., McGuire, J. 및 Whitlow, M. (1996) Production of single-chain Fv monomers and multimers, In Antibody Engineering: A Practical Approach (J. McCafferty, H. Hoogenboom, and D.J. Chiswell, eds.; Oxford University Press, Oxford, UK) pp. 253-268에서 기술된]에서 25°C 내지 37°C의 배양기에서 배양하였다. OD₆₆₀이 20 내지 200에 도달하면, 최종 0.1 내지 1 mM의 농도로 IPTG를 첨가하였고, 이어서 추가로 1 내지 12 시간 동안 배양하였다. 원심분리하여 세포들을 수집하였고, Manton-Gaulin 세포 호모게나이저에 통과시켰다. 상기 세포 용해물을 30분동안 6°C에서 24,300 g로 원심분리하였고, 상기 상등액을 수집하여 한외여과/정용여과(ultrafiltration/diafiltration)하였고, 상기 전도율을 3 mS로 조정하였다. 25% 초산을 이용하여 상기 분리물의 pH를 4.1로 조정하였고, 5 mM 초산 나트륨, 25 mM NaCl, pH 4.1의 완충용액으로 투석여과하였다.

[0248] 아스파라기나아제는 S-세파로오스 양이온 교환 컬럼 크로마토그래피법에 의해 포획되었다. 상기 결합된 아스파라기나아제는 12.5 mM 인산 칼륨, 25 mM NaCl, pH 6.4(NK64 완충용액)으로 용리되었다.

[0249] S-세파로오스 크로마토그래피에 의해 수집한 아스파라기나아제 피크 분획물들을 혼합하였고, 0.1% Tween80을 첨가하여 실온에서 20분동안 인큐베이션 하였다. NK64 완충용액과 동일한 양을 첨가한 후, 상기 시료를 Q-세파로오스 컬럼에 적재하였다. 상기 Q 컬럼을 Q-25 완충용액(25 mM NaCl, 10 mM 인산 칼륨 pH 6.4)으로 세척한 후, 상기 아스파라기나아제를 Q-135 완충용액(135 mM NaCl in 10 mM 인산 칼륨 pH 6.4)으로 용리하였다.

[0250] 상기 혼합된 효소 분획물에 최종농도 0.25 M으로 황산마그네슘 분말을 혼합하였고, 사전에 pH 7.8의 10 mM 인산 칼륨에 포함된 0.25 M MgSO₄으로 평형화된 페닐 소수성 결합 컬럼에 적재하였다. 아스파라기나아제는 유체 통과 분획법(flow through fraction)에 의해 수집되었고, 75 mM NaCl, 1 mM 인산 칼륨, pH 7.2의 완충용액으로 30 kDa 분자량 컷-오프의 폴리술폰(polysulfone) 멤브레인을 이용하여 Filtron 단위에서 투석여과하였다.

[0251] 상기 아스파라기나아제 분획물을 같은 부피의 물로 투석한 후, 수산화인회석(hydroxyapatite) 컬럼에 적재하였다. 불순물은 H15 완충용액(50 mM NaCl, 15 mM 인산 칼륨, pH 7.8)으로 용리하여 제거하였다. 상기 정제된 아스파라기나아제는 H150 완충용액(50 mM NaCl, 150 mM 인산 칼륨, pH 7.8)으로 용리하였다.

[0252] **실시예 7**

[0253] 세포 및 배양 배지로부터 정제

[0254] 대장균 숙주 EN538을 실시예 6에서 기술한 바와 같이 배양, 유도 및 호모게나이징 하였고, 산물의 8배의 부피의 20 mM 초산 나트륨, 40 mM NaCl, pH 4.6에 대해 50 kDa Microgon 중공사(hollow fiber)를 이용하여 유속 2.9 L/min, 16 psi으로, A₂₈₀이 0.1 이하이고, 전도성은 5 mS이 이를때까지 투석 여과하였다. 상기 산물은 0.22 µm 멤브레인을 이용하여 여과되었다.

[0255] 양이온 교환 크로마토그래피는 Poros-HS 컬럼으로 수행되었다. 상기 컬럼을 20 mM 초산 나트륨, pH 4.6, 40 mM NaCl으로 평형화하였다. 투석여과된 명백한 배지는 0.5 컬럼 부피(column volume; CV)/분의 속도로 적재되었고, 상기 컬럼을 5 CV의 20 mM 초산 나트륨, pH 4.6, 40 mM NaCl으로 세척하였다. 상기 아스파라기나아제는 20 mM 초산 나트륨, pH 4.6, 135 mM NaCl으로 용리되었다.

[0256] 상기 산물에 0.2 M 제이인산나트륨, pH 9.2를 첨가하여 pH 6.3으로 조정하였다. 이후 상기 시료를 10 mM 인산

나트륨, pH 6.3에 대해 50 kDa Microgon 중공사를 이용하여 유속 0.74 L/min, 16.5 psi로 투석 여과하였다.

[0257] 음이온 교환 크로마토그래피는 TMAE Fractogel에서 수행되었다. 상기 컬럼을 10 mM 초산 나트륨, pH 6.4로 평형화하였다. 상기 여과투석된 음이온 교환 컬럼 용출액은 0.5 CV/분의 속도로 적재되었고, 상기 컬럼을 5 CV의 10 mM 초산 나트륨, pH 6.4로 세척하였다. 상기 컬럼을 추가로 5 CV의 10 mM 초산 나트륨, pH 6.4, 25 mM NaCl으로 세척하였다. 상기 아스파라기나아제는 10 mM 초산 나트륨, pH 6.4, 100 mM NaCl으로 용리되었다.

[0258] 상기 산물을 10 mM 인산 나트륨, pH 7.5에 대해 50 kDa Microgon 중공사를 이용하여 40 mg/ml의 농도로 투석 여과하였고, 0.22 μm 멤브레인으로 여과되었다.

[0259] **기탁 설명**

[0260] 특허절차상 미생물 기탁의 국제적 승인에 관한 부다페스트 조약(the Budapest Treaty on the International Recognition of the Deposit of Microorganisms for the Purposes of Patent Procedur)의 필요조건을 만족시키는 조건 하에서, 하기 생물학적 재료의 배양액을 하기 국제 기탁기관(ies)에 기탁하였다:

[0261] American Type Culture Collection(ATCC)

[0262] 미국, 20110-2209, 버지니아, 매너서스, 불러바드 대학교, 10801

[0263] (10801 University Boulevard, Manassas, Va. 20110-2209, U.S.A.)

[0264] 국제 기탁 번호

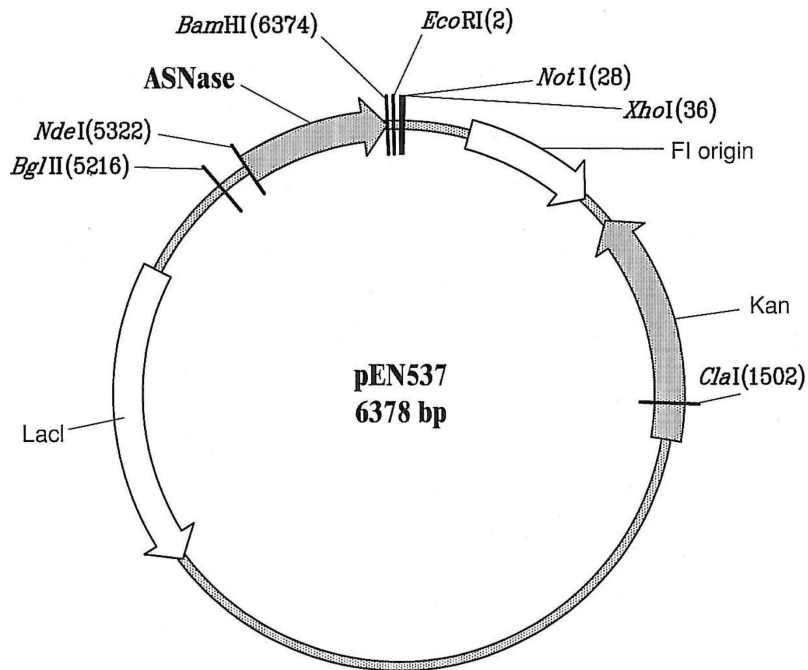
[0265]	<u>생물체/백터</u>	<u>ATCC 번호</u>	<u>기탁일</u>
[0266]	대장균/EN538	PTA 7490	2006년 4월 11일

도면의 간단한 설명

[0199] 도 1은 플라스미드 백터 pEN537의 개열지도이다.

도면

도면1



서열목록

<110> Filpula, David R.
Maoliang, Wang R.

<120> RECOMBINANT HOST FOR PRODUCING L-ASPARAGINASE II

<130> 8fpi-11-01

<150> 60/817,817

<151> 2006-06-30

<160> 12

<170> PatentIn version 3.4

<210> 1

<211> 326

<212> PRT

<213> Escherichia coli

<400> 1

Leu Pro Asn Ile Thr Ile Leu Ala Thr Gly Gly Thr Ile Ala Gly Gly
 1 5 10 15

Gly Asp Ser Ala Thr Lys Ser Asn Tyr Thr Ala Gly Lys Val Gly Val
 20 25 30

Glu Asn Leu Val Asn Ala Val Pro Gln Leu Lys Asp Ile Ala Asn Val
 35 40 45

Lys Gly Glu Gln Val Val Asn Ile Gly Ser Gln Asp Met Asn Asp Asp
 50 55 60

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

Asp Gly Phe Val Ile Thr His Gly Thr Asp Thr Met Glu Glu Thr Ala
 85 90 95

Tyr Phe Leu Asp Leu Thr Val Lys Cys Asp Lys Pro Val Val Met Val
 100 105 110

Gly Ala Met Arg Pro Ser Thr Ser Met Ser Ala Asp Gly Pro Phe Asn
 115 120 125

Leu Tyr Asn Ala Val Val Thr Ala Ala Asp Lys Ala Ser Ala Asn Arg
 130 135 140

Gly Val Leu Val Val Met Asn Asp Thr Val Leu Asp Gly Arg Asp Val
 145 150 155 160

Thr Lys Thr Asn Thr Thr Asp Val Ala Thr Phe Lys Ser Val Asn Tyr
 165 170 175

Gly Pro Leu Gly Tyr Ile His Asn Gly Lys Ile Asp Tyr Gln Arg Thr
 180 185 190

Pro Ala Arg Lys His Thr Ser Asp Thr Pro Phe Asp Val Ser Lys Leu
 195 200 205

Asn Glu Leu Pro Lys Val Gly Ile Val Tyr Asn Tyr Ala Asn Ala Ser
 210 215 220

Asp Leu Pro Ala Lys Ala Leu Val Asp Ala Gly Tyr Asp Gly Ile Val
 225 230 235 240

Ser Ala Gly Val Gly Asn Gly Asn Leu Tyr Lys Thr Val Phe Asp Thr
 245 250 255

Leu Ala Thr Ala Ala Lys Asn Gly Thr Ala Val Val Arg Ser Ser Arg
 260 265 270

Val Pro Thr Gly Ala Thr Thr Gln Asp Ala Glu Val Asp Asp Ala Lys
 275 280 285

Tyr Gly Phe Val Ala Ser Gly Thr Leu Asn Pro Gln Lys Ala Arg Val
 290 295 300

Leu Leu Gln Leu Ala Leu Thr Gln Thr Lys Asp Pro Gln Gln Ile Gln
 305 310 315 320

Gln Ile Phe Asn Gln Tyr
 325

<210> 2

<211> 1530

<212> DNA

<213> Escherichia coli

<400> 2

aaatgggcgc gaaagcggcg ctgaaaagcg gcgtaacc attacagaat gtgctgggaa 60

gcctgggaag cctggggggg ctgcaatcct caatccaaac cgagtggaaa aagcaggaaa 120

aagatttcca gcagtttggc aaagatgttt gtagccgct tgtgactctg gaagatagcc 180

gcaaagccct ggtcgggaat taaaataat cctctatfff aagacggcat aatactffff 240

tatgccgttt aattcttctg tttgttacct gcctctaact ttgtagatct caaaatata 300

ttcacgttgt aaattgttta acgtcaaatt tccatacag agctaagga taatgcgtag 360

cgttcacgta actggaggaa tgaatggag tttttcaaaa agacggcact tgccgcactg 420

gttatgggtt ttagtgggtg agcattggca ttaccaata tcaccatfff agcaaccggc 480

gggaccattg ccggtggtgg tgactccgca accaaatcta actacacagc gggtaaagtt 540

ggcgtagaaa atctggttaa tgcggtgccg caactaaaag acattgcgaa cgttaaaggc 600

gagcaggtag tgaatatcgg ctcccaggac atgaacgatg atgtctggct gacactggcg 660

aaaaaaatta acaccgactg cgataagacc gacggcttcg tcattacca cggtagcgac 720

acgatggaag aaactgctta cttcctcgac ctgacggtga aatgcgacaa accggtggtg 780

atggtcggcg caatgctcc gtccacgtct atgagcgcag acggtccatt caacctgtat 840

aacgcggtag tgaccgcagc tgataaagcc tccccaacc gtggcgtgct ggtagtgatg 900

aatgacaccg tgcttgatgg ccgtgacgtc accaaaacca acaccaccga cgtagcgacc 960

ttcaagtctg ttaactacgg tcctctgggt tacattcaca acggtaaagt tgactaccag 1020

cgtaccccg cagtaagca taccagcgac acgccattcg atgtctctaa gctgaatgaa 1080

ctgccgaaag tggcattgt ttataactac gctaacgcat ccgatcttc ggctaaagca 1140

ctggtagatg cgggctatga tggcatcgtt agcgtcgggt tgggtaacgg caacctgtat 1200

aaaactgtgt tcgacacgct ggcgaccgcc gcgaaaaacg gtactgcagt cgtgcgttct 1260

tcccgcgtac cgacgggcgc taccactcag gatgccgaag tggatgatgc gaaatacggc 1320

ttcgtgcct ctggcacgct gaaccgcaa aaagcgcgcg ttctgctgca actggctctg 1380

acgcaaacca aagatccgca gcagatccag cagatcttca atcagtacta atcgcctcgc 1440

cccgtatcg tgccggggt tttcacttc agactcacgt ccattgcaa ttttaattac 1500

cctaatagata atcaccgaa taaattattt 1530

<210> 3
 <211> 1044
 <212> DNA

<213> Escherichia coli

<400> 3

atggagtttt tcaaaaagac ggcacttgcc gcaactggtta tgggttttag tggcagca 60

ttggcattac ccaatatcac catttagca accggcggga ccattgccgg tggcgtgac 120

tccgaacca aatctaacta cacagcgggt aaagtggcg tagaaatct ggttaatgcg 180

gtgccgaac tgaaggacat tgcgaacgtt aaaggcgagc aggtagttaa tattgctcc 240

caggacatga acgatgatgt ctggctgaca ctggcgaaaa aaattaacac cgactcgat 300

aaaactgacg gcttcgtcat taccacgggt accgacacga tggaaagaac cgcttacttc 360

ctcgacctga cggtaaatg cgacaaccg gtggtgatgg tcggtgcaat gcgtccgtcc 420

acgtctatga ggcagacgg tccattcaac ctgtataacg cggtagtgac tgcagctgat 480

aaagcctccg ctaatcgtgg cgtactggta gtgatgaacg acaccgtgct tgatggccgt 540

gatgtcacca aaaccaacac caccgatgta gcgacctca agtctgttaa ctacgctcct 600

ctgggttaca ttcacaacgg taagattgac taccaacgta ccccgccagc taagcacacc 660

agcgacacgc cgttcgatgt ctctaagctg aatgaactgc cgaaagtcgg cattgtttat 720

aactacgcta acgcatccga tcttccgct aaagcactgg tagatgcggg ctatgatggc 780

atcgttagcg ctggcgtggg taacggcaac ctgtataaaa ccgtatttga cacccttgca 840

accgctgcga aaaacggcac tgcagtagtg cgttcttccc gcgtaccgac gggcgtacc 900

actcaggatg ccgaagtgga tgatcgaaa tacggcttcg tcgcctctgg cacgttgaac 960

ccgcaaaaag cgcgcgttct gctgcaactg gctctgacgc aaactaaga tccgcagcag 1020

atccagcaga tcttcaatca gtac 1044

<210>	4	
<211>	34	
<212>	DNA	
<213>	oligonucleotide primer	
<400>	4	
	tactgaattc atggagtttt tcaaaaagac ggca	34
<210>	5	
<211>	33	
<212>	DNA	
<213>	oligonucleotide primer	
<400>	5	
	acagtaagct tagtactgat tgaagatctg ctg	33
<210>	6	
<211>	24	
<212>	DNA	
<213>	oligonucleotide primer	
<400>	6	
	caactttacc cgctgtgtag ttag	24
<210>	7	
<211>	24	
<212>	DNA	
<213>	oligonucleotide primer	
<400>	7	
	cagccagaca tcatcgttca tgtc	24
<210>	8	
<211>	26	
<212>	DNA	
<213>	oligonucleotide primer	
<400>	8	
	gtcgaacaca gttttatata ggttgc	26

<210> 9
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> oligonucleotide primer

<400> 9
 ctgcagtacc gtttttcgcg gcgg 24

<210> 10
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Escherichia coli

<400> 10
 Leu Pro Asn Ile Thr Ile Leu Ala Thr Gly Gly Thr Ile Ala Gly Gly
 1 5 10 15

Gly Asp Ser Ala
 20

<210> 11
 <211> 32
 <212> DNA
 <213> oligonucleotide primer

<400> 11
 gatccatg gagttttca aaaagacggc ac 32

<210> 12
 <211> 32
 <212> DNA
 <213> oligonucleotide primer

<400> 12
 gtacggatcc tcattagtac tgattgaaga tc 32