

(43) 공개일자 2025년06월24일

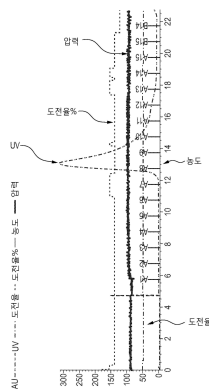
- 전체 청구항 수 : 총 81 항

(54) 발명의 명칭 **고암모니아혈증을 치료하기 위한 글루타민 합성효소의 용도**

(57) 요약

본 발명은 고암모니아혈증 치료를 위한 단백질 요법(예컨대, 효소 대체 단백질 요법)으로서의 글루타민 합성효소의 용도에 관한 것이다. 특히, 본 발명은 글루타민 합성효소의 전신 투여에 관한 것이다. 글루타민 합성효소는 순환에서의 이의 반감기를 증가시키기 위하여 접합 또는 융합 형태로 제공될 수 있다. 또한, 글루타민 합성효소를 포함하는 약학 조성물이 제공된다. 본 발명은 또한 글루타민 합성효소 단백질과 암모니아 저하제, 예컨대 질소 스캐빈저의 조합을 포함하는 용도, 방법 및 조성물에 관한 것이다.

대표도



(52) CPC특허분류

A61K 45/06 (2013.01)

A61K 47/60 (2017.08)

A61P 3/00 (2018.01)

A61P 7/00 (2018.01)

C12N 9/93 (2013.01)

C12Y 603/01002 (2013.01)

A61K 2300/00 (2023.05)

명세서

청구범위

청구항 1

대상체에 대한 전신 비경구 투여에 의해 고암모니아혈증(hyperammonemia)을 치료 또는 예방하는데 사용하기 위한, 글루타민 합성효소(glutamine synthetase, GS) 단백질.

청구항 2

제1항에 있어서,

단백질은 암모니아 저하제(ammonia lowering agent)와 조합하여 사용하기 위한 것인, 단백질.

청구항 3

고암모니아혈증을 치료 또는 예방하는데 사용하기 위한, GS 단백질과 조합하여 사용하기 위한 암모니아 저하제.

청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서,

고암모니아혈증은 요소 회로 장애(urea cycle disorder, UCD) 및/또는 글루타민 합성효소 결핍증(glutamine synthetase deficiency)으로 인해 발생하는 것인, 단백질 또는 암모니아 저하제.

청구항 5

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서,

고암모니아혈증은 장기부전(organ failure)과 관련이 있는 것인, 단백질 또는 암모니아 저하제.

청구항 6

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서,

고암모니아혈증은 비알코올성 지방간 질환(non-alcoholic fatty liver disease)으로 인해 발생하는 것인, 단백질 또는 암모니아 저하제.

청구항 7

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서,

고암모니아혈증은 급성 간부전(acute liver failure), 간 경화(liver cirrhosis), 및/또는 신장 기능이상(dysfunction) 및/또는 부전(failure)으로 인해 발생하는 것인, 단백질 또는 암모니아 저하제.

청구항 8

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서,

GS 단백질은 서열번호 1에 기재된 아미노산 서열과 적어도 50% 동일한 아미노산 서열을 포함하거나 이의 효소적 활성 단편인 것인, 단백질 또는 암모니아 저하제.

청구항 9

제1항 내지 제8항 중 어느 한 항에 있어서,

GS 단백질은 약학 조성물의 형태로 투여되는 것인, 단백질 또는 암모니아 저하제.

청구항 10

제1항 내지 제9항 중 어느 한 항에 있어서,

GS 단백질은 비경구 영양 조성물의 형태로 투여되는 것인, 단백질 또는 암모니아 저하제.

청구항 11

제1항 내지 제10항 중 어느 한 항에 있어서,

GS 단백질은 모이어티(moiety)에 연결되는 것인, 단백질 또는 암모니아 저하제.

청구항 12

제1항 내지 제11항 중 어느 한 항에 있어서,

모이어티는 단백질, 펩티드, 비단백질 중합체 또는 친화성 태그로부터 선택되는 것인, 단백질 또는 암모니아 저하제.

청구항 13

제1항 내지 제12항 중 어느 한 항에 있어서,

모이어티는 폴리에틸렌 글리콜(polyethylene glycol, PEG)인 것인, 단백질 또는 암모니아 저하제.

청구항 14

제1항 내지 제13항 중 어느 한 항에 있어서,

PEG는 단백질의 N 말단에서 GS 단백질에 연결되는 것인, 단백질 또는 암모니아 저하제.

청구항 15

제1항 내지 제14항 중 어느 한 항에 있어서,

GS 단백질은 펩티드 링커 또는 화학적 연결을 통해 모이어티에 연결되는 것인, 단백질 또는 암모니아 저하제.

청구항 16

제1항 내지 제15항 중 어느 한 항에 있어서,

GS 단백질은 공유결합을 통해 모이어티에 연결되는 것인, 단백질 또는 암모니아 저하제.

청구항 17

제1항 내지 제16항 중 어느 한 항에 있어서,

GS 단백질은 대상체에 대한 비경구 투여에 적합한 형태인 것인, 단백질 또는 암모니아 저하제.

청구항 18

제1항 내지 제17항 중 어느 한 항에 있어서,

GS 단백질은 대상체에 대한 피하 투여에 적합한 형태인 것인, 단백질 또는 암모니아 저하제.

청구항 19

제1항 내지 제18항 중 어느 한 항에 있어서,

GS 단백질은 단백질의 다량체 형태를 포함하는 제제로서 제공되는 것인, 단백질 또는 암모니아 저하제.

청구항 20

제1항 내지 제19항 중 어느 한 항에 있어서,

GS 단백질은 단량체 형태로 제공되는 것인, 단백질 또는 암모니아 저하제.

청구항 21

제2항 내지 제20항 중 어느 한 항에 있어서,

암모니아 저하제는 질소 스캐빈저(nitrogen scavenger), 이온 교환 수지(예를 들어, 리랩사(Relapsa)), 암모니아 흡수제(예컨대, 리포숨 기반 암모니아 흡수제, 예를 들어 베르산티스(Versantis)), 암모니아를 제거하는 조작된 마이크로비움(예를 들어, 신로직(Synlogic)), 리팍시민(Rifaximin) 및 락툴로스(Lactulose)로 이루어지는 군으로부터 선택되는 것인, 단백질 또는 암모니아 저하제.

청구항 22

제21항에 있어서,

질소 스캐빈저는 페닐아세트산의 약학적으로 허용 가능한 염 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 전구약물, 페닐부티르산의 약학적으로 허용 가능한 염 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 전구약물, 페닐부티르산 글리세롤 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 전구약물, 벤조산의 약학적으로 허용 가능한 염 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 전구약물, 및 암모니아 결합 수지로 이루어지는 군으로부터 선택되는 것인, 단백질 또는 질소 스캐빈저.

청구항 23

제22항에 있어서,

페닐아세트산의 약학적으로 허용 가능한 염은 페닐아세트산 나트륨인 것인, 단백질 또는 질소 스캐빈저.

청구항 24

대상체에 대한 전신 비경구 투여에 의해 고암모니아혈증을 치료 또는 예방하기 위한 조성물의 제조를 위한, GS 단백질의 용도.

청구항 25

고암모니아혈증을 치료 또는 예방하기 위해 GS 단백질과 조합하여 사용하기 위한 조성물의 제조를 위한, 암모니아 저하제의 용도.

청구항 26

고암모니아혈증을 치료 또는 예방하는데 사용하기 위한 조성물의 제조를 위한, GS 단백질 및 암모니아 저하제의 용도.

청구항 27

제24항 또는 제26항에 있어서,

고암모니아혈증은 제4항 내지 제7항에 정의된 바와 같은 것인, GS 단백질 및/또는 암모니아 저하제의 용도.

청구항 28

제24항 내지 제27항 중 어느 한 항에 있어서,

GS 단백질은 제8항 내지 제20항에 정의된 바와 같은 것인, GS 단백질 및/또는 암모니아 저하제의 용도.

청구항 29

제24항 내지 제28항 중 어느 한 항에 있어서,

암모니아 저하제는 질소 스캐빈저, 이온 교환 수지(예를 들어, 리랩사), 암모니아 흡수제(예컨대, 리포숨 기반 암모니아 흡수제, 예를 들어 베르산티스), 암모니아를 제거하는 조작된 마이크로비움(예를 들어, 신로직), 리팍시민 및 락툴로스로 이루어지는 군으로부터 선택되는 것인, GS 단백질 및/또는 암모니아 저하제의 용도.

청구항 30

제24항 내지 제29항 중 어느 한 항에 있어서,

질소 스캐빈저는 제22항 또는 제23항에 정의된 바와 같은 것인, GS 단백질 및/또는 암모니아 저하제의 용도.

청구항 31

대상체에서 고암모니아혈증을 치료 또는 예방하는 방법으로서, 상기 방법은
상기 대상체에게 GS 단백질을 전신으로 및 비경구로 투여하는 단계를 포함하는 방법.

청구항 32

제31항에 있어서,
암모니아 저하제를 투여하는 단계를 추가로 포함하는, 방법

청구항 33

제31항 또는 제32항에 있어서,
고암모니아혈증은 제4항 내지 제7항에 정의된 바와 같은 것인, 방법.

청구항 34

제31항 내지 제33항 중 어느 한 항에 있어서,
GS 단백질은 제8항 내지 제20항에 정의된 바와 같은 것인, 방법.

청구항 35

제32항 내지 제34항 중 어느 한 항에 있어서,
암모니아 저하제는 질소 스캐빈저, 이온 교환 수지(예를 들어, 리랩사), 암모니아 흡수제(예컨대, 리포솜 기반 암모니아 흡수제, 예를 들어 베르산티스), 암모니아를 제거하는 조작된 마이크로비움(예를 들어, 신로직), 리팍시민 및 락툴로스로 이루어지는 군으로부터 선택되는 것인, 방법.

청구항 36

제35항에 있어서,
질소 스캐빈저는 제22항 또는 제23항에 정의된 바와 같은 것인, 방법.

청구항 37

고암모니아혈증을 치료 또는 예방하는 데 사용하기 위한 GS 단백질을 포함하는 조성물로서,
조성물은 전신 비경구 투여에 적합한 형태인 조성물.

청구항 38

고암모니아혈증을 치료 또는 예방하는데 사용하기 위한 GS 단백질과 조합하여 사용하기 위한, 암모니아 저하제를 포함하는 조성물.

청구항 39

GS 단백질 및 암모니아 저하제를 포함하는 조성물.

청구항 40

제39항에 있어서,
고암모니아혈증을 치료 또는 예방하는 데 사용하기 위한 것인, 조성물.

청구항 41

제37항 내지 제40항 중 어느 한 항에 있어서,
약학 조성물 또는 영양 조성물인 것인, 조성물.

청구항 42

제37항 내지 제41항 중 어느 한 항에 있어서,
적어도 하나의 약학적으로 허용 가능한 담체 또는 부형제를 포함하는, 조성물.

청구항 43

제38항 내지 제42항 중 어느 한 항에 있어서,
전신 비경구 투여에 적합한 형태인 것인, 조성물.

청구항 44

제37항 내지 제43항 중 어느 한 항에 있어서,
피하 투여에 적합한 형태인 것인 조성물.

청구항 45

제37항 내지 제44항 중 어느 한 항에 있어서,
추가 치료제를 포함하는 조성물.

청구항 46

제37항 내지 제45항 중 어느 한 항에 있어서,
고암모니아혈증은 제4항 내지 제7항에 정의된 바와 같은 것인, 조성물.

청구항 47

제37항 내지 제46항 중 어느 한 항에 있어서,
GS 단백질은 제8항 내지 제20항에 정의된 바와 같은 것인, 조성물.

청구항 48

제38항 내지 제47항 중 어느 한 항에 있어서,
암모니아 저하제는 질소 스캐빈저, 이온 교환 수지(예를 들어, 리랩사), 암모니아 흡수제(예컨대, 리포솜 기반 암모니아 흡수제, 예를 들어 베르산티스), 암모니아를 제거하는 조작된 마이크로비움(예를 들어, 신로직), 리팍시민 및 락툴로스로 이루어지는 군으로부터 선택되는 것인, 조성물.

청구항 49

제48항에 있어서,
질소 스캐빈저는 제22항 또는 제23항에 정의된 바와 같은 것인, 조성물.

청구항 50

전신 비경구 투여를 위한 GS 단백질 및 추가 치료제를 포함하는 키트.

청구항 51

제50항에 있어서,
추가 치료제는 고암모니아혈증에 대해 효과적인 것인, 키트.

청구항 52

제50항 또는 제51항에 있어서,
추가 치료제는 암모니아 저하제 또는 아미노산 또는 요소 회로 중간체 또는 이의 유사체인 것인, 키트.

청구항 53

제52항에 있어서,

암모니아 저하제는 질소 스캐빈저, 이온 교환 수지(예를 들어, 리랩사), 암모니아 흡수제(예컨대, 리포숨 기반 암모니아 흡수제, 예를 들어 베르산티스), 암모니아를 제거하는 조작된 마이크로비옴(예를 들어, 신로직), 리팍 시민 및 락툴로스로 이루어지는 군으로부터 선택되는 것인, 키트.

청구항 54

제53항에 있어서,

질소 스캐빈저는 제22항 또는 제23항에 정의된 바와 같은 것인, 키트.

청구항 55

제50항 내지 제54항 중 어느 한 항에 있어서,

고암모니아혈증은 제4항 내지 제7항에 정의된 바와 같은 것인, 키트.

청구항 56

제50항 내지 제55항 중 어느 한 항에 있어서,

GS 단백질은 제8항 내지 제20항에 정의된 바와 같은 것인, 키트.

청구항 57

고암모니아혈증을 치료 또는 예방하는데 있어서 개별, 동시 또는 순차적 사용을 위한 조합 제제(combined preparation)로서, 전신 비경구 투여를 위한 GS 단백질 및 추가 치료제를 포함하는 제품.

청구항 58

제57항에 있어서,

추가 치료제는 암모니아 저하제 또는 아미노산 또는 요소 회로 중간체 또는 이의 유사체인 것인, 제품.

청구항 59

제58항에 있어서,

암모니아 저하제는 질소 스캐빈저, 이온 교환 수지(예를 들어, 리랩사), 암모니아 흡수제(예컨대, 리포숨 기반 암모니아 흡수제, 예를 들어 베르산티스), 암모니아를 제거하는 조작된 마이크로비옴(예를 들어, 신로직), 리팍 시민 및 락툴로스로 이루어지는 군으로부터 선택되는 것인, 제품.

청구항 60

제59항에 있어서,

질소 스캐빈저는 제22항 또는 제23항에 정의된 바와 같은 것인, 제품.

청구항 61

제57항 내지 제60항 중 어느 한 항에 있어서,

고암모니아혈증은 제4항 내지 제7항에 정의된 바와 같은 것인, 제품.

청구항 62

제57항 내지 제61항 중 어느 한 항에 있어서,

GS 단백질은 제8항 내지 제20항에 정의된 바와 같은 것인, 제품.

청구항 63

고암모니아혈증을 치료 또는 예방하는데 사용하기 위한, 글루타민 합성효소 또는 이의 생물학적 활성 단편 또는

변이체를 암호화하는 발현 벡터로서,
벡터는 전신 투여를 위한 것인 발현 벡터.

청구항 64

제63항에 있어서,
암모니아 저하제를 추가로 암호화하는, 발현 벡터.

청구항 65

고암모니아혈증을 치료 또는 예방하는데 사용하기 위한, 암모니아 저하제와 조합하여 사용하기 위한, 글루타민 합성효소 또는 이의 생물학적 활성 단편 또는 변이체를 암호화하는 발현 벡터.

청구항 66

고암모니아혈증을 치료 또는 예방하는데 사용하기 위한, 글루타민 합성효소 또는 이의 생물학적 활성 단편 또는 변이체를 암호화하는 발현 벡터와 조합하여 사용하기 위한 암모니아 저하제.

청구항 67

제63항 내지 제66항에 정의된 바와 같이 사용하기 위한 발현 벡터를 포함하는 세포.

청구항 68

고암모니아혈증을 치료 또는 예방하기 위한 조성물의 제조를 위한, 글루타민 합성효소 또는 이의 생물학적 활성 단편 또는 변이체를 암호화하는 발현 벡터의 용도로서,

조성물은 전신 투여를 위한 것인 용도.

청구항 69

고암모니아혈증을 치료 또는 예방하기 위한, 암모니아 저하제와 조합하여 사용하기 위한 조성물의 제조를 위한, 글루타민 합성 효소 또는 이의 생물학적 활성 단편 또는 변이체를 암호화하는 발현 벡터의 용도.

청구항 70

고암모니아혈증을 치료 또는 예방하는데 사용하기 위한, 글루타민 합성효소 또는 이의 생물학적 활성 단편 또는 변이체를 암호화하는 발현 벡터와 조합하여 사용하기 위한 조성물의 제조를 위한, 암모니아 저하제의 용도.

청구항 71

대상체에서 고암모니아혈증을 치료 또는 예방하는 방법으로서, 상기 방법은

글루타민 합성효소 또는 이의 생물학적 활성 단편 또는 변이체를 암호화하는 발현 벡터의 전신 투여를 포함하는 방법.

청구항 72

대상체에서 고암모니아혈증을 치료 또는 예방하는 방법으로서, 상기 방법은

글루타민 합성효소 또는 이의 생물학적 활성 단편 또는 변이체를 암호화하는 발현 벡터 및 암모니아 저하제의 투여를 포함하는 방법.

청구항 73

고암모니아혈증을 치료 또는 예방하는데 사용하기 위한, 글루타민 합성효소 또는 이의 생물학적 활성 단편 또는 변이체를 암호화하는 발현 벡터를 포함하는 조성물로서,

전신 투여를 위한 것인 조성물.

청구항 74

제73항에 있어서,

암모니아 저하제를 더 포함하는 조성물.

청구항 75

고암모니아혈증을 치료 또는 예방하는데 사용하기 위한, 암모니아 저하제와 조합하여 사용하기 위한, 글루타민 합성효소 또는 이의 생물학적 활성 단편 또는 변이체를 암호화하는 발현 벡터를 포함하는 조성물.

청구항 76

고암모니아혈증을 치료 또는 예방하는데 사용하기 위한, 글루타민 합성효소 또는 이의 생물학적 활성 단편 또는 변이체를 암호화하는 발현 벡터와 조합하여 사용하기 위한, 암모니아 저하제를 포함하는 조성물.

청구항 77

글루타민 합성효소 또는 이의 생물학적 활성 단편 또는 변이체를 암호화하는 발현 벡터 및 추가 치료제를 포함하는 키트.

청구항 78

제77항에 있어서,

추가 치료제는 고암모니아혈증에 대해 효과적인 작용제(agent)일 수 있는 것인, 키트.

청구항 79

제78항에 있어서,

고암모니아혈증에 대해 효과적인 작용제는 암모니아 저하제 또는 아미노산 또는 이의 요소 회로 중간체인 것인, 키트.

청구항 80

고암모니아혈증을 치료 또는 예방하는데 있어서 개별, 동시 또는 순차적 사용을 위한 조합 제제로서, 글루타민 합성효소 또는 이의 생물학적 활성 단편 또는 변이체를 암호화하는 발현 벡터 및 추가 치료제를 포함하는 제품.

청구항 81

제80항에 있어서,

추가 치료제는 제78항 또는 제79항에 정의된 바와 같은 것인, 제품.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 고암모니아혈증(hyperammonemia) 치료를 위한 단백질 요법(예를 들어, 효소 대체 단백질 요법)으로서의 글루타민 합성효소(glutamine synthetase)의 용도, 특히 글루타민 합성효소의 전신 투여에 관한 것이다. 따라서, 글루타민 합성효소는 글루타민 합성효소의 순환 수준을 증가시키기 위한 목적으로 단백질 또는 폴리펩티드로서 투여된다. 글루타민 합성효소는 순환에서 이의 반감기를 증가시키기 위하여 접합(conjugated) 또는 융합(fusion) 형태로 제공될 수 있다. 또한, 글루타민 합성효소를 포함하는 약학 조성물이 제공된다. 본 발명은 또한 글루타민 합성효소 단백질과 암모니아 저하제(ammonia lowering agent), 예를 들어 질소 스캐빈저(nitrogen scavenger)의 조합을 포함하는 용도, 방법 및 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 고암모니아혈증은 혈액에서의 암모니아의 증가 또는 과잉을 특징으로 하는 대사적 상태이다. 고암모니아혈증은 주로 뇌로의 암모니아 유입의 증가를 초래하기 때문에 위험한 상태이며, 이는 그 중에서도 뇌손상(brain damage), 발작(seizure), 지체(retardation), 혼수상태(coma) 및 심지어 사망을 초래하는, 매우 심각할 수 있는 신경계 장애 및 신경정신병적 이상을 유발할 수 있다. 실제로, 뇌병증(encephalopathy)은 고암모니아혈증의

흔하고 위험한 합병증이다. 뇌병증/뇌손상에 대한 정확한 기전은 아직 이해되지 않았지만, 증가된 암모니아로 인한 성상세포(astrocytic) 삼투압 스트레스가 뇌 부종(cerebral oedema) 및 두개내압 증가를 유발하는 역할을 하는 것으로 여겨진다. 고암모니아혈증은 선천적(congenital)이거나 후천적(acquired)일 수 있으며, 1차적이거나 2차적일 수 있다.

[0003] 1차적(선천적) 고암모니아혈증은 요소 회로(urea cycle)의 효소 또는 수송체 단백질 중 어느 하나의 감소된 활성을 특징으로 하는 다양한 선천적 이상(inborn error)으로부터 발생한다. 실제로, 물질대사의 이러한 선천적 이상은 요소 회로 장애(urea cycle disorder, UCD)라 불리는 질환군을 형성한다. pH에 따라 하전된 형태인 암모늄(NH_4^+)과 함께 체내에 공존할 수 있는 암모니아(NH_3)는 단백질 및 기타 질소 화합물의 이화작용(catabolism)의 산물이다. 이는 신장에 의해 소변으로 배설되기 전에 요소 회로의 효소에 의해 독성이 더 적은 물질로 전환된다. 체내에서 특정 아미노산(아르기닌, 시트룰린 및 오르니틴)의 유일한 생산원으로도 작용하는 요소 회로는 6종의 효소, 즉 5종의 촉매 효소인 카르바모일 인산염 합성효소 I(carbamoyl phosphate synthetase I, CPS1), 오르니틴 카르바밀전달효소(ornithinetranscarbamylase, OTC) 또는 아르기노숙신산 합성효소(argininosuccinic acid synthetase, ASS1), 아르기노숙신산 분해효소(arginosuccinic acid lyase, ASL) 및 아르기나제(arginase, ARG), 및 보조인자 생산 효소(co-factor producing enzyme)인 N-아세틸글루탐산염 합성효소(N-acetylglutamate synthetase, NAGS), 및 2종의 수송체 단백질(transporter protein)인 오르니틴 전위효소(ornithine translocase, ORNT1) 및 시트린(citrin)을 포함한다. 이들 8종의 단백질 중 임의의 하나 이상에서 결함이 발생할 수 있다. 처음 4종의 효소 중 어느 하나 또는 NAGS의 중증 결핍 또는 전체 활성의 부재는 생후 처음 며칠 동안 암모니아 및 다른 전구체 대사산물의 축적을 초래한다. 중증 UCD를 앓고 있는 영아는 출생 시 정상이지만, 뇌부종 및 무기력(lethargy), 식욕 부진(anorexia), 과호흡(hyperventilation) 또는 호흡 저하(hypoventilation), 이상 고열(hyperthermia), 발작(seizure), 신경학적 자세(neurologic posturing) 및 혼수 상태(coma)와 관련된 징후가 빠르게 발생한다. UCD의 중증도는 경로에서 결함 있는 효소의 위치와 효소 결함의 중증도에 의해 영향을 받는다. 빠른 식별 및 현재의 치료 전략으로, 고암모니아혈증을 나타내는 신생아의 생존은 지난 수십 년 동안 극적으로 향상되었지만, 지적 능력이 전형적으로 손상된다. 이들 효소의 경미하거나 부분적인 결핍 및 ARG 결핍에서, 암모니아 축적은 거의 모든 생애에서 질병 또는 스트레스에 의해 유발될 수 있다. 이들 장애에서 혈장 암모니아 농도의 상승 및 증상은 종종 UCD의 신생아 유형(neonatal presentation)에서보다 미묘하며, 처음 인식되는 임상 에피소드가 수 개월 또는 수십 년 동안 발생하지 않을 수 있다.

[0004] 2차적 고암모니아혈증은 요소 회로의 일부가 아닌 효소/단백질의 감소된 활성을 특징으로 하는 중간 대사(intermediary metabolism)의 선천적 이상, 예를 들어 프로피온산증(propionic acidemia), 메틸말론산증(methyl malonic acidemia), 갈락토스혈증(galactosaemia), 지방산 산화 장애(fatty acid oxidation disorder) 및 미토콘드리아 장애(mitochondrial disorder)에 의해, 또는 암모니아 대사 및/또는 질소 대사에 더욱 일반적으로 크게 기여하는 세포(예를 들어, 간)의 기능 장애에 의해 유발된다.

[0005] 후천적 고암모니아혈증은 보통 바이러스성 간염이나 과도한 알코올 섭취와 같은 급성 및 만성 간부전(liver failure)을 포함하는 간 질환에 의해 유발된다. 손상된 간 기능 또는 간의 혈관 우회(vascular bypass)는 간에서 혈액 여과를 감소시켜 고암모니아혈증을 가져온다. 고암모니아혈증으로 인한 간성 뇌병증(hepatic encephalopathy)은 간 질환의 흔한 합병증이다.

[0006] 고암모니아혈증은 또한 신장 기능 장애를 포함하는 다른 이유, 예를 들어 신장 기능이상 및/또는 신부전, 예를 들어 발프로산 또는 시클로포스파미드로 인한 약물 독성, 면역억제 또는 세포독성 요법 후의 특발성(idiopathic) 고암모니아혈증 증후군, 정제된 소변과 요로 감염에서의 요소 분해(ureolysis), 또는 필수 아미노산 완전 비경구 영양(total parenteral nutrition)으로 인해 발생할 수 있다.

[0007] 현재의 고암모니아혈증 치료는 예를 들어, 혈액투석(전형적으로 신생아에서 사용됨)에 의하거나, 또는 질소 노폐물의 제거를 증가시키는 화합물, 예를 들어 비흡수성 이당류(예를 들어, 락툴로스) 또는 항생제(예를 들어, 리팍사민), 또는 질소를 요소 이외의 생성물로 전환하여 배출시키는 화합물, 예를 들어 벤조산나트륨, 아르기닌, 카르글루산, 페닐아세테이트 또는 더욱 최근에는 페닐부티레이트, 또는 L-오르니틴 L-아스파르트산(LOLA) 또는 L-오르니틴 페닐아세트산(OP)과 같은 화합물을 투여함으로써, 혈액 및/또는 뇌의 암모니아 수준을 감소시키도록 설계된다.

[0008] 상태의 관리는 또한 단백질 섭취를 제한하고, 단백질 및/또는 질소 섭취의 관리 및 비경구 칼로리 섭취를 포함하는 적절한 영양 섭취를 보장하기 위한 식이 조절을 포함할 수 있다.

[0009] 그러나 상태의 치료 및 관리의 개선에도 불구하고, 현재의 치료법은 비특이적이며, 상태를 성공적으로 관리하는데 있어서 항상 성공하지는 않는다. 특히 UCD의 경우, 현재의 치료법은 많은 높아진 암모니아 사건을 예방하지 못할 수 있으며, 중증 형태의 질환을 앓는 환자는 종종 5세 경에 간 이식에 대해 평가된다. 따라서 고암모니아 혈증에 대한 추가 또는 개선된 치료법이 계속 요구되고 있다.

[0010] 본 발명은 이러한 필요성을 해결하고자 한 것으로, 글루타민 합성 효소를 사용하여 암모니아를 무독성 생성물인 글루타민으로 전환시킴으로써 암모니아를 해독한다는 개념에 기초하고 있다. 특히, 본 발명은 혈액에서 암모니아 수준을 감소시키기 위한 단백질 요법으로서 글루타민 합성 효소를 전신적으로 투여하는 것을 제안한다.

[0011] 글루타민 합성 효소(GS)는 다음 반응을 촉진한다:

[0012] $\text{글루탐산} + \text{ATP} + \text{NH}_3 \rightarrow \text{글루타민} + \text{ADP} + \text{인산}$.

[0013] 글루타민 합성은 신체의 여러 기관에서 발생하며, 기관 및 전 신체의 질소 균형에서 역할을 할 수 있다. 최근, 골격근에서의 GS의 과발현에 기초한 유전자 요법이 급성 고암모니아혈증의 치료를 위하여 제안되었으며(Torres-Vega et al, Gene Therapy 2015, 22, 58-64), 이 치료요법의 근거는 일반적으로 간 질환 환자의 근육에서 결핍되는 GS를 대체하거나 증강(augment)시켜 근육에서 이 효소에 의한 암모니아의 제거를 증가시키는 것을 목표로 한다. 그러나 유전자 요법은 임상 실습에서 성공적으로 투여하기가 어려운 것으로 입증되었고, 모든 환자가 이에 적합한 것은 아니며(예를 들어, 어린이, 줄기세포 기반 유전자 요법은 제외), 또는 환자가 유전자 요법에 불응성일 수 있다(예를 들어, 면역상의 이유로). 또한, 이러한 치료법은 근육에서 주로 국소적 효과를 나타낼 것이다. 따라서, 보다 일반적으로 적용 가능한 치료법이 여전히 필요하다.

발명의 내용

[0014] 단백질로서 GS를 전신적으로 투여하면 이러한 보다 일반적인 효과를 달성하는 데 도움이 될 수 있다. 본 발명자들은 GS, 특히 인간 GS가 성공적으로 발현되고 정제될 수 있으며, 폴리에틸렌 글리콜과 같은 중합체 파트너에 접합된, 비변형 및 변형된 형태로 GS 활성을 보유하거나 보일 수 있음을 보여주었다. 또한, 동물 연구는 전신 투여에 의해 GS의 높은 순환 수준이 달성될 수 있고, 동물에 투여된 변형 및 비변형 GS 둘 다 혈액 및 다른 조직(예를 들어, 간)에서 활성을 보유함을 보여주었다. 따라서, 치료적 수준의 GS는 GS 단백질의 전신(예를 들어, 비경구) 투여에 의해 달성될 수 있다.

[0015] 또한, 본 발명자들은 놀랍게도 GS 단백질과 암모니아 저하제(예컨대, 질소 스캐빈저, 예를 들어 페닐아세트산 나트륨과 같은 페닐아세트산의 약학적으로 허용 가능한 염)의 조합 사용이 상승효과를 나타내며, 고암모니아혈증을 치료 또는 예방하는 GS 단백질의 능력을 추가로 증가시킬 수 있음을 발견하였다. 따라서, 일 양태에서, 본 발명은 대상체에 대한 전신 비경구 투여에 의해 고암모니아혈증을 치료 또는 예방하는데 사용하기 위한 글루타민 합성효소(GS) 단백질을 제공한다.

[0016] 적합한 구현예에서, 고암모니아혈증의 치료 또는 예방에 사용하기 위한 GS 단백질은 암모니아 저하제와 조합하여 사용하기 위한 것일 수 있다.

[0017] 또 다른 양태에서, 본 발명은 고암모니아혈증 치료 또는 예방에 사용하기 위한, GS 단백질과 조합하여 사용하기 위한 암모니아 저하제를 제공한다.

[0018] 본 발명의 관련된 양태는 또한 대상체에 대한 전신 비경구 투여에 의한 고암모니아혈증의 치료 또는 예방을 위한 조성물(예를 들어, 약학 또는 영양 조성물, 예를 들어 약제(medicament) 또는 보충제(supplement))의 제조를 위한 GS 단백질의 용도를 제공한다.

[0019] 적합한 구현예에서, 조성물은 암모니아 저하제와 조합하여 사용하기 위한 것일 수 있다.

[0020] 본 발명의 추가 양태는 또한 고암모니아혈증의 치료 또는 예방용 GS 단백질과 조합하여 사용하기 위한 조성물의 제조를 위한 암모니아 저하제의 용도를 제공한다.

[0021] 추가 양태에서, 본 발명은 고암모니아혈증의 치료 또는 예방에 사용하기 위한 조성물 제조를 위한 GS 단백질 및 암모니아 저하제의 용도를 제공한다.

[0022] 추가 양태에서, 본 발명은 대상체에서 고암모니아혈증을 치료 또는 예방하는 방법을 제공하며, 상기 방법은 상기 대상체(더욱 특별하게는 이를 필요로 하는 대상체)에게 GS 단백질을 전신 및 비경구로 투여하는 단계를 포함한다. 적합한 구현예에서, 방법은 암모니아 저하제를 투여하는 단계를 더 포함한다.

- [0023] 또한, 대상체에 대한 전신 비경구 투여에 의한 고암모니아혈증 치료 또는 예방에 사용하기 위한, GS 단백질을 포함하는 조성물이 제공된다.
- [0024] 적합하게는, GS 단백질을 포함하는 조성물은 약학 또는 영양 조성물, 예를 들어 약제 또는 보충제일 수 있다. 적합하게는, 조성물은 암모니아 저하제를 더 포함할 수 있다.
- [0025] 본 발명은 또한 고암모니아혈증을 치료 또는 예방하는 데 사용하기 위한, 암모니아 저하제를 포함하는 조성물에 관한 것이다. 적합하게는, 암모니아 저하제를 포함하는 조성물은 약학 또는 영양 조성물, 예를 들어 약제 또는 보충제일 수 있다.
- [0026] 본 발명은 또한 GS 단백질 및 암모니아 저하제를 포함하는 조성물에 관한 것이다.
- [0027] 적합하게는, 조성물은 약학 또는 영양 조성물일 수 있다. 적합하게는, 조성물은 고암모니아혈증을 치료 또는 예방하는 데 사용하기 위한 것일 수 있다.
- [0028] 용어 "GS 단백질"은 대안적으로 "글루타민 합성효소(GS) 활성을 가지는 단백질"로 표현될 수 있다. 용어 "단백질"은 본원에서 단백질 또는 폴리펩티드 단편뿐만 아니라 펩티드와 폴리펩티드를 포함하는 임의의 단백질성 분자도 포함하기 위하여 광범위하게 사용되며; GS 단백질은 자연계에서 나타나는 바와 같이(예를 들어, 천연 또는 야생형 GS) 전장 GS 효소이거나 이에 상응할 필요는 없고, 아래에서 더욱 상세히 기술되는 바와 같이 절단(truncated) 및 기타 변이체가 포함된다. 또한, 아래에서 더욱 상세히 기술되는 바와 같이, 다른 분자와 GS 단백질의 접합체 또는 융합체도 포함된다.
- [0029] 용어 "고암모니아혈증"은 혈액 중 암모니아(또는 임의의 혈액 유래 생성물 또는 샘플, 예를 들어 혈장에서 측정 또는 결정되는 바와 같은 혈액 중 암모니아)가 상태가 없는 대상체, 예를 들어 건강한 대상체 또는 고암모니아혈증으로 이어지거나 이를 유발하는 기저 상태가 없는 대상체의 암모니아 수준과 비교하여 높아진 임의의 상태를 포함한다. 건강 상태에서, 암모니아 수송 및 대사는 낮은 혈장/혈액 농도를 유지하도록 엄격하게 조절된다(정상 범위 10 내지 40 $\mu\text{mol/L}$). 따라서, > 40, 60 또는 70 또는 80 $\mu\text{mol/L}$ 이상, 예를 들어 41, 42, 45, 50, 55, 60, 70 또는 80 $\mu\text{mol/L}$ 이상의 혈장(또는 혈액) 암모니아 농도는 고암모니아혈증을 나타내는 것으로 간주될 수 있다. 예를 들어, 정상 음이온 갭(gap) 및 정상 혈장 포도당 농도와 관련되는, > 100 $\mu\text{mol/L}$, 및 특히 150 $\mu\text{mol/L}$ 이상의 혈장 암모니아 농도는 고암모니아혈증을 나타낼 수 있거나, 또는 보다 구체적으로, UCD의 존재를 나타낼 수 있다.
- [0030] 고암모니아혈증은 위에서 논의된 원인 또는 상태 중 어느 하나로부터 발생할 수 있으며, 즉 고암모니아혈증은 위에서 논의된 바와 같이, 선천적 또는 후천적, 1차적 또는 2차적일 수 있다. 따라서, 일 구현예에서, 고암모니아혈증은 요소 회로 장애(urea cycle disorder, UCD)로 인해 발생(또는 이와 관련)할 수 있다. 위에서 논의된 바와 같이, UCD는 요소 회로의 단백질 중 임의의 하나 이상의 결함으로부터 발생할 수 있고, 이는 단백질의 활성을 불활성화시키거나 감소시킬 수 있다.
- [0031] 추가 구현예에서, 고암모니아혈증은 요소 회로의 일부는 아니지만 질소 대사 및/또는 신체 내 균형에 영향을 미치며, 혈액 중 암모니아의 양을 증가시키는, 단백질(예를 들어, 효소)에 영향을 미치는 선천적 이상으로 인해 발생할 수 있다. 적합하게는, 이러한 선천적 이상은 글루타민 합성효소 결핍증(glutamine synthetase deficiency)일 수 있다.
- [0032] 추가 구현예에서, 고암모니아혈증은 후천적일 수 있고, 질소 대사 및/또는 균형, 예를 들어 이화작용 및/또는 질소 함유 분자 또는 물질의 배설에 관여하는 신체의 기관 또는 조직, 예를 들어 간 또는 신장에 질환 또는 손상을 유발할 수 있다.
- [0033] 따라서, 만성 또는 급성 간부전, 예를 들어 과도한 알코올 섭취 또는 약물(레크리에이션 약(recreational) 또는 약제)로 인한 간 손상, 임의의 원인으로 인한 간 경화, 비알코올성 지방간 질환, 간 감염 또는 간에 대한 외상을 포함한 임의의 종류의 간 손상 또는 질환은 고암모니아혈증을 초래할 수 있다.
- [0034] 유사하게는, 위에 간에 대한 신장의 임의의 종류의 손상 또는 질환이 기술되어 있으며, 이 또한 고암모니아혈증을 초래할 수 있다. 따라서, 예를 들어 패혈증(sepsis), 부상(외부적 부상, 예를 들어 외상이거나 내적 부상, 예를 들어 자가면역 장애로 인한 부상에 관계없음)으로 인한 장기 손상, 또는 임의의 전신 감염과 같은 신체의 여러 기관에 영향을 미치는 임의의 상태(예를 들어, 다발성 장기 부전)가 고암모니아혈증을 유발할 수 있다.
- [0035] 고암모니아혈증은 기저 원인에 따라, 임상적, 생화학적 및/또는 분자 유전학적 데이터를 기초로 검출 또는 진단될 수 있다. 따라서, 고암모니아혈증은 예를 들어, 당해 분야에서 잘 알려져 있고 사용되는 기술에 따라 (예를

들어, 혈장 또는 혈청 또는 임의의 혈액 유래 샘플에서) 암모니아의 혈액 수준을 평가 또는 모니터링함으로써 검출될 수 있다. 혈액(혈장 또는 혈청 등)에 존재하는 아미노산 및/또는 이의 농도(예를 들어, 아르기닌 또는 시트룰린), 또는 혈액 또는 기타 체액 또는 조직에 있는 다른 대사 산물(예를 들어, 소변의 오르토산)의 분석은 UCD가 관련되어 있음을 확인하는 데 도움을 줄 수도 있고/있거나, 이의 정확한 속성(nature)(즉, 관련된 특정 단백질/효소 결함)을 결정할 것이다. 이러한 결정 및 분석은 신체(예를 들어, MRI 또는 기타 영상화) 및/또는 행동/응답 검사 등, 간 및/또는 신장 또는 다른 장기 기능 검사 등을 포함하는, 임상 평가, 예를 들어 신경학적 및 신경정신학적 평가와 조합될 수 있다. UCD가 의심되는 경우에, 가족력 조사 및/또는 분자 유전학적 검사 및/또는 요소 회로 효소의 효소 활성의 평가도 수행될 수 있다.

[0036] 본원에 사용되는 바와 같이, 본 발명에 따라 사용하기 위한 글루타민 합성효소 또는 GS 단백질에 대한 언급은 인간 GS 및 비인간 동물(예컨대, 마우스, 소, 토끼, 랫트, 원숭이, 침팬지 및 개 등)로부터의 GS, 또는 예를 들어, 균류, 식물 또는 박테리아뿐만 아니라 효소적 활성 변이체를 포함하는 다른 공급원으로부터의 GS를 포함하는, 효소적 활성 GS의 모든 형태에 대한 언급을 포함한다. 따라서, 대표적인 GS 단백질은 서열번호 1 또는 2 또는 4(각각 인간 GS, 전구체, 성숙 및 N 말단 태그된 형태)에 기재된 GS 폴리펩티드 또는 서열번호 6(락토바실러스 애시도필루스(*Lactobacillus acidophilus*) 균주 30SC로부터의 GS) 또는 서열번호 7(옥수수인 Zea Mays로부터의 GS)에 기재된 GS 폴리펩티드와 적어도 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 이상의 서열 동일성(identity)을 가지는 것, 또는 이의 효소적 활성 단편을 포함한다. 예를 들어, GS에 대한 언급은 또한 N 및/또는 C 말단이 절단된 폴리펩티드 또는 아미노산 변형 단백질(예를 들어, 번역 후 변형, 예컨대 아세틸화, 또는 단백질의 구조 또는 활성에 영향을 미칠 수 있는 아미노산 다형성과 같은 기타 변형)도 포함할 수 있다. 이는 또한 단백질의 다량체를 포함할 수 있다. 따라서, 용어 "GS"는 GS 효소 또는 폴리펩티드의 모든 천연 형태뿐만 아니라, GS 효소 활성을 보유하는 하나 이상의 아미노산 치환, 첨가(삽입 및 연장 포함) 또는 결실을 가지는 합성 유래 및 변형 폴리펩티드를 포함하는 이의 효소적 활성 단편 또는 변이체도 포함한다.

[0037] 따라서, GS는 효소 분류 EC 6.3.1.2.에 포함되는 임의의 효소일 수 있거나 이로부터 유래될 수 있다. 이는 GS 활성을 가지는 임의의 폴리펩티드 또는 펩티드일 수 있다. GS 활성은 예를 들어, 위에 기재된 반응식에 따라, 글루탐산과 암모니아를 글루타민으로 전환시키는 능력으로 정의될 수 있다. GS 활성은 당해 분야에 공지되고 문헌에 기술된 바와 같은 분석 또는 검사(예를 들어, 기능 활성 분석)를 이용하여 평가되거나 결정될 수 있다. 예를 들어, GS 효소 활성 분석은 문헌[Listrom et al, Biochem. J. 1997, 328, 159-163]에 기술되어 있다. GS 활성에 대한 분석은 아래 실시예에도 기술되어 있다(실시예 2와 4 참조).

[0038] 이 용어는 또한 GS의 전구약물(pro-drug), 즉 그 자체로는 GS 활성을 나타내지 않지만 대상체에게 투여 시 활성 GS로 전환될 수 있는 형태를 포함한다.

[0039] 따라서, 본원에 사용되는 바와 같이, GS 단백질 또는 폴리펩티드와 관련하여 "효소적 활성(enzymatically-active)"은 글루탐산과 암모니아의 글루타민으로의 전환을 촉매할 수 있는 GS 단백질 또는 폴리펩티드를 지칭한다. 전형적으로, 효소적 활성 GS 단백질 또는 폴리펩티드는 서열번호 1, 2, 4, 6 또는 7에 기재된 바와 같은 GS 폴리펩티드의 효소 활성의 적어도 또는 약 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99%를 나타낸다.

[0040] 본원에 사용되는 용어 "대상체(subject)"는 임의의 인간 또는 비인간 동물을 포함하며, 특히 예를 들어, 인간, 영장류, 가축(예를 들어, 양, 돼지, 소, 말, 당나귀), 실험실 실험동물(예를 들어, 마우스, 토끼, 랫트, 기니피그), 반려동물(예를 들어, 개, 고양이) 및 포획 야생 동물(예를 들어, 여우, 캥거루, 사슴)을 포함하는 포유동물을 지칭한다. 바람직하게는, 포유동물은 인간 또는 실험실 실험동물이다. 훨씬 더 바람직하게는, 포유동물은 인간이다.

[0041] 본원에 사용되는 용어 "치료하는(treating)", "치료(treatment)", "예방하는(preventing)" 및 "예방(prevention)"은 상태 또는 증상을 치료하거나 개선하고, 상태 또는 질환의 확립을 예방하거나, 또는 그렇지 않으면 상태 또는 질환 또는 어떠한 식으로든 기타 바람직하지 않은 증상의 진행을 예방(prevent), 방해(hinder), 지연(retard), 감소(reduce) 또는 역전(reverse)시키는 일체의 용도를 지칭한다. 따라서, 용어 "치료하는" 및 "예방하는" 등은 이들의 가장 넓은 맥락에서 고려되어야 한다. 예를 들어, 치료가 반드시 환자가 완전 회복할 때까지 치료되는 것을 의미하는 것은 아니지만, 환자 또는 대상체의 상태, 또는 질환 또는 상태의 증상의 임의의 향상(improvement) 또는 개선(amelioration)을 포함한다. 따라서, 예를 들어 UCD의 경우, 본 발명에 따른 치료는 물론 근본적인 유전적 장애를 치료하는 것이 아니라, 고암모니아혈증의 임상적 상태를 치료한다. 여러

증상을 나타내거나 여러 증상을 특징으로 하는 상태에서, 치료 또는 예방은 반드시 상기 증상 전부를 치료, 개선, 예방, 방해, 지연, 감소 또는 역전시킬 필요는 없으나, 상기 증상 중 하나 이상을 치료, 개선, 방지, 방해, 지연, 감소 또는 역전시킬 수 있다. 적합한 구현예에서, 본 발명에 따른 "치료"는 혈액 중 암모니아 수준을 예를 들어, 정상 또는 건강한 수준, 예를 들어 10 내지 40 $\mu\text{mol/L}$ 의 범위로 감소시킨다. 따라서, 치료는 정상 또는 건강한 암모니아 수준의 회복을 포함한다. 유사하게는, 본 발명에 따른 예방은 위에 나타난 바와 같이, 임의의 정상 또는 건강한 범위에서 혈장/혈액 암모니아 수준의 유지를 포함할 수 있다.

[0042] 적합한 구현예에서, 본 발명에 따른 "치료"는 대상체 조직에서 예를 들어, 정상 또는 건강한 수준으로의 글루타민 합성효소 수준 및/또는 활성의 증가를 포함할 수 있다. 이러한 증가는 임의의 적합한 조직(예를 들어, 간 및/또는 근육)에서 있을 수 있다. 글루타민 합성효소 수준 및/또는 활성의 증가는 대상체에서 예를 들어, 글루타민의 수준, 글루탐산의 수준을 측정하고/하거나 글루타민의 수준과 글루탐산의 수준 사이의 비율(ration)을 결정함으로써 결정될 수 있다. 정상 또는 건강한 수준의 글루타민 및/또는 글루탐산은 이들이 측정되는 샘플에 따라 달라질 수 있음을 이해할 것이다. 또한, 정상 또는 건강한 수준의 글루타민 및/또는 글루탐산은 대상체 특이적일 수 있고, 대상체의 체중, 식이, 성별 및 연령과 같은 인자에 의존할 수 있음을 이해할 것이다. 정상 또는 건강한 수준의 글루타민 및/또는 글루탐산은 당업자에게 공지될 것이다.

[0043] 적합한 구현예에서, 본 발명에 따른 "치료"는 부종(oedema)의 감소를 포함할 수 있다. 본원에 사용되는 용어 "부종"은 대상체의 장액(serous fluid)의 비정상적인 축적을 지칭한다. 적합한 구현예에서, 부종은 뇌 부종, 폐 부종, 말초 부종 및/또는 황반 부종일 수 있다. 적합하게는, 본 발명의 맥락에서, "치료"는 예를 들어, 전전두엽 피질(prefrontal cortex)에서의 뇌 부종의 감소를 지칭할 수 있다. 예로서, 부종은 CT 스캔, MRI 및/또는 X-선에 의해 평가될 수 있다. 기타 부종을 평가하는 방법은 당업자에게 공지될 것이다.

[0044] 적합한 구현예에서, 본 발명에 따른 "치료"는 신경심리학적(neuropsychological), 신경정신학적(neuropsychiatric) 및 신경인지적(neurocognitive) 기능의 향상을 포함할 수 있다. 용어 "신경심리학적, 신경정신학적 및 신경인지적 기능"은 예를 들어, 기억(memory), 주의(attention), 인지(cognition), 정신운동 활성(psychomotor activity), 조정(coordination) 및 기분(mood)을 조절하는 뇌의 기능을 지칭한다. GS 단백질 및 암모니아 저하제의 조합을 포함하는 본 발명의 용도, 방법 및 조성물은 이러한 구현예에서 특히 유용할 수 있다. 신경 기능을 평가하는 다양한 방법이 당업자에게 공지될 것이다. 신경 기능 상태는 뇌파 검사, 컴퓨터 검사, 지필 검사 및 신경심리학자에 의한 평가를 이용하여 평가될 수 있다.

[0045] 적합한 구현예에서, 본 발명에 따른 "치료"는 근육감소증(sarcopenia) 및 신체 기능의 향상을 포함할 수 있다. 용어 "근육감소증"은 근육 질량이 감소되는 것을 지칭한다. 용어 "신체 기능"은 대상체의 힘, 특히 근육 힘을 지칭한다. 근육감소증의 증증도는 임상 도구, 영양 도구, 신체 성분(body composition)의 측정 또는 영상화를 이용하여 결정될 수 있다. 신체 기능은 예를 들어, 산소 전달과 소비의 평가, 운동 검사 및 손잡기(hand-grip) 검사, 및/또는 피로 수준 및/또는 면역계 기능의 향상에 의해 평가될 수 있다.

[0046] 본원에 사용되는 "개선(amelioration)"은 상태 또는 질환의 적어도 하나의 지표(indicator) 또는 증상의 증증도의 감소를 지칭한다. 특정 구현예에서, 개선은 상태 또는 질환의 하나 이상의 지표의 진행의 지연 또는 둔화를 포함한다. 지표의 증증도는 주관적 또는 객관적 척도에 의해 결정될 수 있으며, 이는 당업자에게 공지되어 있다.

[0047] 본원에 사용되는 용어 "관련된(associated with)"은 높아진 암모니아의 수준과 "관련된" 질환 또는 상태의 맥락에서 사용될 때, 질환 또는 상태가 높아진 암모니아의 수준으로부터 발생하거나, 이를 야기하거나, 이를 특징으로 하거나, 그렇지 않으면 관련이 있을 수 있음을 의미한다. 따라서, 질환 또는 상태와 높아진 암모니아 수준 사이의 관련성은 직접적이거나 간접적일 수 있고, 일시적으로 분리될 수 있다.

[0048] 암모니아 수준 결정을 위한 적절한 샘플은 암모니아가 발생할 수 있는 임의의 적절한 또는 바람직한 샘플을 포함한다. 같은 이유로, 글루타민 합성효소 수준 및/또는 글루타민 합성효소 활성의 결정을 위한 적절한 샘플은 글루타민 합성효소, 글루타민 및/또는 글루탐산이 존재할 수 있는 임의의 적절한 또는 바람직한 샘플을 포함한다. 이들은 임의의 적절한 또는 바람직한 조직 또는 체액 샘플일 수 있다. 적합한 조직의 예는 간 및/또는 근육 조직이다. 편리하게는, 샘플은 임의의 체액 샘플일 수 있고, 전형적으로 혈액 또는 임의의 혈액 유래 샘플, 예를 들어 혈장 또는 혈청 등일 것이지만, 이는 임의의 다른 체액, 예를 들어 소변, 뇌척수액, 또는 대변 또는 조직 샘플 등, 예를 들어 생검 샘플 또는 세정 또는 세척액 샘플 등일 수 있다. 이는 물론 치료될 상태의 정확한 속성 등에 따를 수 있다.

- [0049] 본원에 사용되는 용어 "유효량(effective amount)"은 이의 의미 내에서 맥락에 따라 비독성이지만 원하는 효과를 제공하기에 충분한 GS 단백질 및/또는 암모니아 저하제의 양 또는 용량을 포함한다. 단백질 및/또는 암모니아 저하제의 유효량은 상이할 수 있음을 이해할 것이다. 예시적인 치료학적 유효량은 본원의 다른 곳에 명시되어 있다.
- [0050] 요구되는 정확한 양 또는 용량(dose)은 치료될 종, 대상체의 연령과 일반적인 상태, 치료될 상태의 중증도, 투여될 특정 FM03 및 투여 방식 등과 같은 인자들에 따라 대상체마다 다를 것이다. 따라서, 정확한 "유효량"을 특정하는 것은 적절하지 않다. 그러나 임의의 주어진 경우에, 적절한 "유효량"은 통상적인 실험만을 이용하여 당업자에 의해 결정될 수 있다.
- [0051] 인간 GS는 373개 아미노산의 폴리펩티드(서열번호 1에 나타난 바와 같음)로서 발현된다. 이는 발현됨에 따라 바와 같은 완전(full) "전구체(precursor)" 단백질을 나타내며, 이어서 아미노산 2~373을 갖는 성숙한 형태로 추가 처리된다(N 말단 메티오닌만이 제거되어 생체 내에서 서열번호 2에 나타난 바와 같은 372개 아미노산의 성숙 단백질이 수득됨). 서열번호 3에 기재된 예시적인 폴리뉴클레오티드는 서열번호 1의 폴리펩티드를 암호화하는 cDNA를 나타낸다. 서열번호 4는 아래 실시예에서 제조되고 사용되는 바와 같이, N 말단 His 태그와 링커 서열이 구비된, 서열번호 1의 GS 폴리펩티드를 포함하는 변형된 인간 GS 단백질을 나타낸다. 서열번호 5는 아래 실시예에서 사용되는 바와 같이, 박테리아에서의 발현을 위해 코돈 최적화된, 서열번호 4의 폴리펩티드를 암호화하는 cDNA 서열이다.
- [0052] 인간 GS는 잘 특성화되어 있다(예를 들어, 위의 문헌[Listrom et al., 1997] 참조). 식물 및 박테리아를 포함하는 다른 유기체로부터의 GS 효소 또한 확인된 바 있으며, 이러한 다른 GS 효소의 핵산 및 아미노산 서열은 당해 분야에 잘 알려져 있고, 예를 들어, NCBI(National Center for Biotechnology Information) 뉴클레오티드(ncbi.nlm.nih.gov/nucore) 및 단백질(ncbi.nlm.nih.gov/protein) 데이터베이스와 같은 자유롭게 이용할 수 있는 데이터베이스에 제공된다. 식물 또는 박테리아 GS 효소와 인간 GS 사이의 서열 동일성은 낮을 수 있으나, 구조적 및 기능적 유사성은 높다. 따라서, 식물 또는 박테리아 GS, 또는 사실은 다른 유기체로부터의 GS, 또는 이의 아미노산 서열 변이체가 사용될 수 있다. 대표적인 예로서, 서열번호 6은 락토바실루스 애시도필루스 균주 30SC로부터의 GS의 아미노산 서열을 기재하고 있으며, 이는 인간 GS와 23.8% 서열 동일성 및 락토바실루스 카세이(*Lactobacillus casei*)로부터의 GS와 61.9%의 서열 동일성을 가지며, 서열번호 7은 옥수수(*Zea Mays*)로부터의 GS의 아미노산 서열을 기재하고 있으며, 이는 인간 GS와 55.7%의 서열 동일성을 갖는다.
- [0053] GS는 일반적으로 다수의(즉, 2개 이상의) 단량체 서브유닛을 포함하는 다량체로서 발생한다. 예를 들어, 위에 제공되는 GS 아미노산 서열은 이러한 단량체 서브유닛을 나타낸다. 인간 GS는 12량체(12개 서브유닛)로서 가장 빈번하게 보고된다. 본원에 사용되는 바와 같이, GS는 단량체로서 및/또는 다량체로서 제공될 수 있다. 다량체는 2개 이상의 단량체 서브유닛, 예를 들어 2 내지 20, 2 내지 16, 2 내지 15, 2 내지 14, 또는 2 내지 12개 서브유닛을 포함할 수 있다.
- [0054] 사실, 본 발명의 놀라운 특징은 12개 서브유닛 다량체에 대해 문헌에 보고된 바와는 달리, 인간 GS가 단량체 형태도 포함하는 다수의 상이한 유형의 다량체의 혼합물로서 발현 및/또는 수득될 수 있다는 점이다. 단량체 형태는 활성이 있는 것으로 밝혀졌다. 따라서, 본 발명에 따르면, GS는 단량체로서 및/또는 다량체로서 사용될 수 있으며, 다량체는 단일 다량체 형태로서, 또는 단량체를 포함할 수 있거나 포함하지 않을 수 있는 상이한 다량체 형태의 혼합물로서 제공될 수 있다. 아래 실시예에서 보고되는 바와 같이, 4개 이상, 예를 들어 4 내지 10, 예를 들어 5 내지 8개의 다량체 형태가 수득될 수 있다. 다량체는 크기가 2 내지 20개 서브유닛 범위일 수 있다.
- [0055] 본원에 제공되는 방법에 사용되는 GS 단백질은 제조합 방법, 단백질 분리 및 정제 방법 및 화학적 합성 방법과 같은 당해 분야에 공지된 임의의 방법에 의해 수득될 수 있으며, 생성된 GS는 효소 활성을 나타낸다. 따라서, GS는 제조합 GS, 조직으로부터 분리된 천연 GS 또는 화학적으로 합성된 GS일 수 있다.
- [0056] 본원에 제공된 방법에 사용하기 위하여 효소적 활성 GS 변이체를 생성하기 위해 서열번호 1에 기재된 폴리펩티드와 같은 GS 폴리펩티드를 변형하는 것은 당업자의 능력 범위 내에 충분히 해당한다. 예를 들어, 당업자는 기질 결합과 관련된 위치, 또는 활성 부위에서의 변형이 이들 결정적 영역(critical region) 바깥의 위치에서의 변형보다 내약성이 낮을 수 있음을 이해할 것이다. 임의의 GS 폴리펩티드가 글루탐산과 암모니아의 글루타민으로의 전환을 촉매하는 GS 폴리펩티드의 능력을 평가하기 위하여 아래 실시예에 기술된 것들과 같은 당해 분야에 잘 알려져 있는 방법을 이용하여 검사될 수 있다.

- [0057] 일부 실시예에서, 본원의 본 발명에 따라 사용되는 GS는 당해 분야에 잘 알려져 있는 원핵생물 또는 진핵생물 발현 시스템을 이용하여 생산되는 재조합 GS이다. 예시적인 원핵생물 발현 시스템은 대장균 발현 시스템을 포함하나 이에 한정되지 않으며, 예시적인 진핵생물 발현 시스템은 효모, 곤충 세포 및 포유동물 세포 발현 시스템을 포함하나 이에 한정되지 않는다.
- [0058] GS를 암호화하는 핵산은 간 RNA의 RT-PCR 및 합성적 뉴클레오타이드 합성을 포함하나 이에 한정되지 않는 임의의 적합한 방법에 의해 획득될 수 있다. 증폭을 위한 프라이머는 위에 기재된 것과 같은 공지된 GS 서열에 기초하여 설계될 수 있다. GS의 핵산 및 아미노산 서열은 당해 분야에 잘 알려져 있고, 예를 들어, NCBI(National Center for Biotechnology Information) 뉴클레오타이드(ncbi.nlm.nih.gov/nucore) 및 단백질(ncbi.nlm.nih.gov/protein) 데이터베이스와 같은 자유롭게 이용할 수 있는 데이터베이스에 제공된다.
- [0059] 서열번호 3에 기재된 서열을 갖는 핵산과 같은, GS 폴리펩티드를 암호화하는 핵산은 선택되는 발현 시스템에 적합한 발현 벡터 내로 클로닝될 수 있다. 일부 예에서, 핵산은 특정 시스템에서의 발현을 위하여 코돈 최적화된다. 예를 들어, GS 폴리펩티드를 암호화하는 핵산은 대장균에서의 발현을 위하여 코돈 최적화될 수 있다. 대장균에서의 발현을 위하여 GS를 암호화하는 예시적인 코돈 최적화된 핵산은 서열번호 5에 기재되어 있으며, 이는 (서열번호 4에 기재된 바와 같이) GGGGS 링커를 통하여 부착된 His 태그를 포함하는 GS 폴리펩티드를 암호화한다.
- [0060] 전형적으로, GS를 암호화하는 핵산은 이종(heterologous) 핵산 분자의 발현을 용이하게 하는 조절 서열(regulatory sequence)에 작동 가능하게 연결된 발현 벡터 내로 클로닝된다. GS의 발현에 적합한 많은 발현 벡터가 이용 가능하며, 당업자에게 공지되어 있다. 발현 벡터의 선택은 숙주 발현 시스템의 선택에 의해 영향 받는다. 이러한 선택은 당업자의 기술 수준 내에 충분히 해당된다. 일반적으로, 발현 벡터는 전사 프로모터(transcriptional promoter) 및 선택적으로 인핸서(enhancer), 번역 신호(translational signal), 및 전사 및 번역 종결 신호(terminal signal)를 포함할 수 있다. 안정적인 형질전환에 사용되는 발현 벡터는 전형적으로 형질전환된 세포의 선별 및 유지를 가능하게 하는 선별 마커(selectable marker)를 갖는다. 일부 경우에, 복제 원점(origin of replication)은 세포에서 벡터의 카피 수를 증폭시키기 위하여 사용될 수 있다.
- [0061] GS 폴리펩티드는 또한 단백질 융합체로서 발현될 수 있다. 예를 들어, 융합체는 폴리펩티드에 추가의 기능성을 부가하기 위하여 생성될 수 있다. 융합 단백질의 예는 GS 및 정제를 위한 친화도 태그(예를 들어, his 태그, 예를 들어 his6, MYC, FLAG, HA 또는 GST 태그), 리더 서열(예컨대 pelB 리더 서열), 단백질 분비를 유도하기 위한 서열, 또는 GS를 안정화 및/또는 가용화하기 위한 단백질(예를 들어, 말토스 결합 단백질(maltose-binding protein, MBP)), 또는 생체 내 반감기를 증가시키기 위한 단백질(예를 들어, 알부민 또는 Fc 도메인, 또는 이의 단편)을 함유하는 융합체를 포함하나 이에 한정되지 않는다.
- [0062] 원핵생물, 특히 대장균은 대량의 GS를 생산하기 위한 시스템을 제공한다. 대장균의 형질전환은 당업자에게 잘 알려져 있는 간단하고 신속한 기술이다. 대장균을 위한 발현 벡터는 높은 수준의 단백질 발현을 유도하고 숙주 세포에 약간의 독성을 나타내는 단백질을 발현시키는 데 유용한 유도성 프로모터를 함유할 수 있다. 유도성 프로모터의 예는 lac 프로모터, trp 프로모터, 하이브리드 tac 프로모터, T7 및 SP6 RNA 프로모터 및 온도 조절된 λ PL 프로모터를 포함한다.
- [0063] 다른 예에서, 배콜로바이러스 발현 시스템과 같은 진핵생물 발현 시스템이 GS를 생성하는 데 사용된다. 일반적으로, 발현 벡터는 고수준의 발현을 위하여 배콜로바이러스의 폴리헤드린 프로모터와 같은 프로모터를 사용한다. 일반적으로 사용되는 배콜로바이러스 시스템은 오토그라파 캘리포르니카 핵 다각체병 바이러스(*Autographa californica nuclear polyhedrosis virus*, AcNPV) 및 봄빅스 모리 핵 다각체병 바이러스(*Bombyx mori nuclear polyhedrosis virus*, BmNPV)와 같은 배콜로바이러스 및 스포도프테라 프루기페르다(*Spodoptera frugiperda*), 슈달레티아 유니푀타(*Pseudaletia unipuncta*)(A7S) 및 다나우스 플렉시푸스(*Danaus plexippus*)(DpNI)에서 유래된 Sf9와 같은 곤충 세포주를 포함한다. 높은 수준의 발현을 위하여, GS의 뉴클레오타이드 서열은 바이러스의 폴리헤드린 개시 코돈의 바로 하류에 융합된다.
- [0064] 사카로미세스 세레비시애(*Saccharomyces cerevisiae*), 스킴조사카로미세스 · 폼베(*Schizosaccharomyces pombe*), 야로위아 리폴리티스(*Yarrowia lipolytica*), 클루이베로마이세스 락티스(*Kluyveromyces lactis*) 및 피키아 파스토리스(*Pichia pastoris*)와 같은 효모도 GS의 발현 숙주로 사용될 수 있다. 효모는 에피솜 복제 벡터로 또는 상동 재조합에 의한 안정적인 염색체 통합에 의해 형질전환될 수 있다. 전형적으로, GAL1, GAL7 및 GAL5를 포함하는 것과 같은 유도성 프로모터가 유전자 발현을 조절하는 데 사용된다. 효모 발현 벡터는 종종 형질전환된

DNA의 선별 및 유지를 위하여 LEU2, TRP1, HIS3 및 URA3과 같은 선별 마커를 포함한다.

[0065] 포유동물 발현 시스템 또한 GS를 발현시키기 위하여 사용될 수 있다. 발현 구조물은 아데노바이러스와 같은 바이러스 감염에 의해, 또는 리포솜, 인산 칼슘, DEAE-덱스트란과 같은 직접 DNA 전달에 의해, 및 전기천공법 및 미세주입법과 같은 물리적 수단에 의해 포유동물 세포로 전달될 수 있다. 포유동물 세포를 위한 발현 벡터는 전형적으로 mRNA 캡 부위, TATA 박스, 번역 개시 서열(Kozak 공통 서열) 및 폴리아데닐화 요소를 포함한다. 이러한 벡터는 종종 높은 수준의 발현을 위한 전사 프로모터-인핸서, 예를 들어 SV40 프로모터-인핸서, 인간 사이토메갈로바이러스(CMV) 프로모터 및 라우스 육종 바이러스(RSV)의 긴 말단 반복부를 포함한다. 포유동물 발현에 이용 가능한 예시적인 세포주는 마우스, 랫트, 인간, 원숭이, 및 닭 및 햄스터 세포, 예를 들어 BHK, 293-F, CHO, Balb/3T3, HeLa, MT2, 마우스 NSO(비분비) 및 다른 골수종 세포주, 하이브리도마 및 이중 하이브리도마 세포주, 림프구, 섬유모세포, Sp2/0, COS, NIH3T3, HEK293, 293S, 293T, 2B8 및 HKB 세포를 포함하나 이에 한정되지 않는다.

[0066] 발현 후, GS는 SDS-PAGE, 크기 분획 및 크기 배제 크로마토그래피, 황산암모늄 침전법, 킬레이트 크로마토그래피, 이온 교환 크로마토그래피 및 친화도 크로마토그래피를 포함하나 이에 한정되지 않는 당업자에게 공지된 임의의 방법을 이용하여 정제될 수 있다. 친화도 정제 기술은 효율 및 제제의 순도를 향상시키는 데 사용될 수 있다. 예를 들어, GS와 결합하는 항체 및 기타 분자가 친화도 정제에 사용될 수 있다. 위에서 논의된 바와 같이, 발현 구조물은 GS에 his, myc, FLAG 또는 HA 태그 또는 GST 모이어티와 같은 친화도 태그를 첨가하도록 조작될 수 있으며, 이어서 이들은 각각 Ni-수지, myc 항체, HA 항체, FLAG 항체 또는 글루타티온 수지로 친화도 정제될 수 있다. 순도는 겔 전기영동 및 염색 및 분광광도계 기술, 예를 들어 SDS page 및 크기 배제 크로마토그래피(SEC)를 포함하는 당해 분야에 공지된 임의의 방법에 의해 평가될 수 있다.

[0067] 본 발명에 따른 용도를 위하여, 친화도 태그(예를 들어, his 태그 등)는 제거될 수 있지만, 이는 반드시 필요한 것은 아니며, GS 폴리펩티드는 태그가 부착된 채로 사용될 수 있다.

[0068] 태그 또는 다른 융합 파트너는 당해 분야에 잘 알려져 있는 원리에 따라, 임의의 적합한 링커일 수 있는 링커를 통해 GS에 부착될 수 있다. 이러한 링커는 전형적으로 그리고 편리하게는 짧은(예를 들어, 2 내지 10, 2 내지 8 또는 2 내지 6량체) 펩티드일 수 있다. 예로서, 링커 GGSG가 언급될 수 있지만, 임의의 적합한 아미노산으로 구성될 수 있다. 아미노산 링커는 재조합 수단에 의해 융합 단백질을 제조할 수 있게 하지만, 다시 당해 분야에 잘 알려져 있고 문헌에 기술된 원리 및 기술에 따라, 비아미노산계 링커도 사용될 수 있다. 링커는 절단 가능하거나(예를 들어, 효소적으로) 절단 불가능할 수 있다.

[0069] GS 폴리펩티드는 네이키드(naked) 폴리펩티드 사슬, 또는 추가 모이어티 또는 화학 기 또는 기질에 결합 또는 접합시킴으로써 변형된 변형 폴리펩티드로서 제조될 수 있다. 예시적인 변형은 폐길화, 알부민화 또는 다른 공지된 변형을 포함하나 이에 한정되지 않는다. 예를 들어, 일부 예에서, 기술된 방법에 사용하기 위한 GS 폴리펩티드는 당해 분야에 주지된 표준 방법을 사용하여 폐길화된다. 이는 예를 들어, 순환에서 GS 단백질의 반감기를 향상시키는 작용을 할 수 있다. 따라서, 본 발명의 바람직한 구현예에서, GS 단백질은 폴리에틸렌 글리콜(PEG) 또는 다당류 또는 올리고당과 같은 중합체와의 접합체로서 제공될 수 있다. PEG와의 접합체가 특히 바람직하다. 위에 나타낸 바와 같이, 이러한 접합체 제조는 당해 분야에 잘 알려져 있고, 문헌에 기술되어 있다. 따라서, 다양한 크기, 예를 들어 100 달톤 내지 100 kD, 그러나 더욱 종종 5 kD 내지 100 kD, 예를 들어 12 또는 15 kD 내지 60 또는 80 kD, 예를 들어 15 내지 50, 15 내지 40, 또는 15 내지 30 kD 범위의 PEG가 접합체 제조에 사용될 수 있다. 또한, PEG는 다양한 방식으로 GS 단백질에 부착되거나 연결될 수 있고, 1개 초과 PEG가 각각의 단일 단백질에 부착될 수 있다. 이는 위에 기술된 융합 단백질에 대해, 예를 들어 기술된 바와 같은 링커를 통해 또는 링커 기능을 제공할 수 있는 임의의 분자 기 또는 화학 기에 의해, 직접적으로 또는 간접적으로 연결될 수 있다. 따라서, PEG는 N 또는 C 말단 중 하나 또는 둘 다에서, 또는 GS 분자에서 내부적으로, 예를 들어 GS 단백질 분자에서 하나 이상의 리신 잔기의 아미노 기에서 또는 단백질 분자에서 임의의 다른 화학적 모이어티 또는 잔기에서 연결될 수 있다. PEG와 같은 중합체를 단백질에 결합 또는 접합시키는 방법은 당해 분야에 잘 알려져 있고, 문헌에 기술되어 있다(예를 들어, 문헌 [Roberts et al. 2012, Advanced Drug Delivery Reviews, 64 (supplement) 116-127] 및 [Veronese 2001, Biomaterials 22, 405-417] 참조). 아래 실시예에 제시된 데이터는 PEG를 N 말단에 연결시켜 제조된 PEG 접합체가 예를 들어, 다양한 접합체를 투여한 동물의 간 용해물의 활성 분석에서 특히 효과적임을 보여준다. 따라서, GS 단백질의 N 말단에 연결된 PEG를 포함하는 PEG 접합체는 본 발명의 바람직한 일 구현예를 나타낸다. GS 단백질은 단량체 및/또는 다량체 형태로 폐길화될 수 있다. 따라서, 편의상 단량체 및 다양한 다량체 형태의 GS 둘 다를 포함하는 제제는 폐길화 처리될 수 있다.

- [0070] GS는 대상체에게 투여하기 위한 약학 조성물로서 제형화될 수 있다. GS는 선택된 양의 GS를 하나 이상의 생리적 또는 약학적으로 허용 가능한 담체 또는 부형제와 혼합함으로써 임의의 통상적인 방식으로 제형화될 수 있다.
- [0071] 따라서, 본 발명의 추가 양태는 GS 단백질 및 하나 이상의 약학적으로 허용 가능한 담체 또는 부형제를 포함하는 약학 조성물을 제공하며, 여기에서 이 조성물은 비경구 전신 투여를 위한 것이다.
- [0072] 담체 또는 부형제의 선택은 투여 전문가의 기술 내에 있으며, 투여 방식과 같은 다수의 파라미터에 의존할 수 있다. 일부 예에서, GS는 유체로서 제공된다. 다른 예에서, GS는 건조(desiccated) 또는 동결 건조(freeze-dried) 형태와 같은 건조된 형태로 제공된다. 이러한 건조된 형태는 물, 완충액, 식염수 또는 다른 적합한 용액과 같은 적합한 용액을 첨가함으로써 투여 전에 재수화될 수 있다. 본원에 제공되는 GS는 직접 투여를 위하여 제형화될 수 있거나 희석 또는 다른 변형을 위하여 제형화될 수 있다. 따라서, GS는 단일(또는 단위) 투여량 형태 또는 다중 투여량 형태로 제형화될 수 있다. 단일 용량 형태의 예에는 앰플 및 주사기가 포함된다. 다중 용량 형태의 예에는 다중 단위 용량을 함유하는 바이알 및 병이 포함된다.
- [0073] 제형 중 GS의 농도는 투여 시 글루탐산의 존재 하에 암모니아를 글루타민으로 전환시키기에 효과적인 GS의 양의 전달에 효과적이다. 농도 및 양은 대상체에서의 기질의 수준 및 투여 방식을 비롯한 여러 요인에 따라 달라질 수 있으며, 경험적으로 결정될 수 있다. 본원에 제공되는 조성물 중 GS의 예시적 농도는 약 0.1, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 0.9, 1, 5, 10, 15, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 200, 300, 400, 500, 1000, 2000, 3000, 4000 또는 5000 mg/mL GS 이상의 농도를 포함하나, 이에 한정되지 않는다.
- [0074] GS 조성물을 제형화하기 위하여, 일 구현예에서 GS의 중량 분획은 선택된 비히클에 원하는 농도로 용해, 현탁, 분산 또는 다른 방법으로 혼합된다. 생성된 혼합물은 용액, 현탁액, 에멀전 및 다른 이러한 혼합물이며, 용액, 현탁액, 페이스트, 겔, 에어로졸, 스프레이 또는 임의의 다른 전신 투여에 적합한 제형을 포함하나 이에 한정되지 않는, 비수성 또는 수성 혼합물로서 제형화될 수 있다.
- [0075] 일반적으로, GS 조성물은 규제 기관으로부터의 승인의 관점에서 제조되거나, 그렇지 않으면 동물 및 인간에서 사용하기 위하여 일반적으로 인정되는 약전에 따라 제조된다. GS 조성물은 희석제, 부형제 또는 비히클과 같은 담체를 포함할 수 있다. 이러한 약제학적 담체는 물 및 오일과 같은 멸균 액체일 수 있다. 식염수 용액 및 수성 텍스트로스와 글리세롤 용액 또한 특히 주사 가능한 용액을 위한, 액체 담체로서 사용될 수 있다. 조성물은 활성 성분과 함께, 락토스, 수크로스, 인산이칼슘 또는 카복시메틸셀룰로스와 같은 희석제; 스테아르산 마그네슘, 스테아르산 칼슘 및 활석과 같은 윤활제; 및 전분, 검 아카시아 젤라틴과 같은 천연 검, 글루코스, 당밀, 폴리비닐피롤리딘, 셀룰로스 및 이의 유도체, 포비돈, 크로스포비돈 및 당업자에게 공지된 다른 이러한 결합제와 같은 결합제를 함유할 수 있다. 적합한 약학적 부형제에는 전분, 글루코스, 락토스, 수크로스, 젤라틴, 맥아, 쌀, 밀가루, 초크, 실리카겔, 스테아르산 나트륨, 글리세롤 모노스테아레이트, 활석, 염화나트륨, 건조 탈지유, 글리세롤, 프로필렌, 글리콜, 물 및 에탄올이 포함된다. 원하는 경우, GS 조성물은 소량의 습윤제 또는 유화제, 또는 pH 완충제, 예를 들어 아세트산염, 시트르산 나트륨, 시클로텍스트린 유도체, 소르비탄 모노라우레이트, 트리에탄올아민 아세트산 나트륨, 트리에탄올아민 올레이트 및 기타 이러한 제제도 함유할 수 있다. 적합한 약학적 담체의 예는 E. W. Martin의 "Remington's Pharmaceutical Sciences"에 기술되어 있다.
- [0076] 조직 표적화된 리포솜을 포함하는 리포솜 현탁액 또한 약학적으로 허용 가능한 담체로서 적합할 수 있다. 이들은 당업자에게 공지된 방법에 따라 제조될 수 있다. 리포솜 전달은 또한 콜라겐 겔 및 피브로넥틴으로 변형된 리포솜과 같은 약학적 매트릭스를 포함하는, 서방형 제형을 포함할 수 있다.
- [0077] 약학 조성물에서와 마찬가지로, GS는 또한 다른 방식, 예를 들어 식이 보충제와 같은 영양 조성물, 예를 들어 비경구 영양 조성물(예를 들어, 단독으로 또는 다른 보충제 성분과 함께)로 제형화되거나 투여될 수 있다. 이는 폴리펩티드(예를 들어, 정제된 효소)로서 또는 발현 숙주 세포 또는 유기체의 일부로서 이러한 식품에 포함될 수 있다. 따라서, 예를 들어 미생물(예를 들어, 효모 또는 박테리아 또는 진균) 숙주 세포 또는 식물(식물 세포 포함)은 GS를 발현하도록 조작될 수 있고, 이와 같이, 예를 들어 전체 세포 또는 추출물 또는 (효소 활성이 유지될 수 있는) 다른 가공된 생성물로서 투여될 수 있거나, 또는 영양 조성물에 포함될 수 있다. 따라서, 예를 들어, 인간 또는 비인간 동물 소비에 적합한 박테리아 또는 효모 세포는 GS를 발현하도록 (즉, GS를 암호화하는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 핵산 분자의 도입에 의해) 조작될 수 있다. 대안적으로, 식물은 유사한 방식으로 조작될 수 있고, 적절한 식물 부분 등(예를 들어, 종자, 잎, 덩이줄기 등)이 투여를 위하여 제공될 수 있다. 어떤 미생물(예를 들어, 효모, 박테리아, 조류 또는 진균)이 인간 또는 다른 동물 소비에 적합한지는 당해 분야에 공지되어 있고, 이러한 많은 유기체가 현재, 예를 들어 프로바이오틱 제형에 사용된다. 예를 들어, 비피도박테리움 또는 락토바실러스 종(예를 들어, L. 애시도필루스) 등과 같은 젖산 박테리아에 기초한, 임의의 이러한 프

로바이오틱 유기체 또는 제형이 사용될 수 있다. 따라서, 본 발명에 따르면, 이러한 유기체 또는 제제는 GI 관을 위하여 제형화되고, 예를 들어 주사 또는 주입, 또는 관장 또는 직장 투여 등에 의해 GI 관으로 직접 투여될 수 있다. 대상체에게 투여되는 GS의 정확한 양 또는 용량은 GS의 활성, 투여 경로, 치료될 질환 또는 상태, 투여되는 투여량의 수, 및 대상체의 체중, 연령 및 일반적인 상태와 같은 다른 고려 사항에 의존한다. 구체적인 투여량 및 투여 프로토콜은 경험적으로 결정될 수 있거나, 예를 들어 동물 모델에서의 연구로부터 외삽될(extrapolated) 수 있다. 예시적인 GS의 치료적 효효 용량은 1일당 체중 1 kg당 약 1 μ g 내지 약 1000 μ g, 또는 1일당 체중 1 kg당 약 10 μ g 내지 약 100 μ g을 포함하는, 1일당 체중 1 kg당 약 0.1 μ g 내지 1일당 체중 1 kg당 약 10000 μ g을 포함하나, 이에 한정되지 않는다. 따라서, 예를 들어, 대상체에게 1일당 체중 1 kg당 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 1, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 200, 400, 600, 800, 1000, 2000, 4000, 6000, 8000, 10000, 또는 20000 μ g 이상의 GS가 투여될 수 있다.

[0078] GS가 전신으로, 그러나 비경구로 투여된다는 점이 본 발명의 특징이다. "경구로(orally)"는 구강을 통한 전달을 의미한다. 따라서, 비경구는 GS 단백질이 입을 통한 섭취에 의해 투여되지 않음을 의미한다. GS 단백질을 장 또는 더욱 일반적으로는 위장관(GI)에 전달하는 다른 투여 수단이 포함될 수 있지만(예를 들어, 직장투여, 또는 관장에 의해, 또는 GI 관으로의 직접 투여에 의해), 특정 구현예에서 이들은 배제된다. 따라서, 특정 구현예에서 본 발명은 장내 투여를 포함하지만, 다른 구현예에서는 그렇지 않다. 추가 구현예에서, 본 발명은 근육, 특히 골격근에 대한 투여를 포함하지 않는다. 따라서, 이러한 구현예에서, 투여는 근육을 대상으로 하지 않으며, 즉 비근육을 대상으로 하는 치료법이다.

[0079] 따라서, GS는 GS 단백질을 신체에 전신적으로 전달하지만 경구 투여를 포함하지 않는 임의의 방법 및 경로로 투여될 수 있다. 특정 구현예에서, GS 단백질은 비경구로 투여될 수 있다. 당업자는 각각의 투여 경로에 적합한 방식으로 제형화된, 정맥 내, 근육 내, 피내, 경피, 피하 또는 복강 내 투여뿐만 아니라 이의 둘 이상의 임의의 조합도 포함하지만 이에 한정되지 않는, 적절한 투여 또는 전달 방식을 쉽게 이해하고 선택할 수 있을 것이다. 일부 예에서, 본원에 기술된 GS 조성물은 피하 투여된다. 다른 예에서, GS 조성물은 정맥 내 투여될 수 있다. 예를 들어, GS 조성물은 주사 또는 주입, 예컨대 정맥 내 볼루스에 의해, 정맥 내 투여될 수 있다.

[0080] GS 단백질은 또한 다른 치료제 또는 활성 작용제, 특히 고암모니아혈증을 (예를 들어, 향상시키기 위하여) 치료할 수 있는 제2 또는 추가 치료제와 함께 또는 조합하여 투여될 수 있다. 고암모니아혈증을 치료하기 위하여 활성인 제2 또는 추가 치료제는 대안적으로 항고암모니아혈증제 또는 고암모니아혈증에 대한 작용제로서 정의될 수 있다. 제2 또는 추가 작용제는 전형적으로 질소 스캐빈저(또는 암모니아 스캐빈저)와 같은 암모니아 저하제 또는 대체 아미노산 또는 요소 회로 중간체, 또는 이의 유사체일 수 있다. 따라서, 이러한 작용제는 아미노산, 예를 들어 아르기닌, 글루탐산, 시트룰린 및/또는 오르니틴, 및/또는 N-아세틸 글루탐산 및/또는 유사 분자 카바밀 글루탐산(카바글루(Carbaglu®))을 포함할 수 있다. 더욱 적합하게는, 제2 또는 추가 작용제는 암모니아 저하제, 더욱 적합하게는 질소 스캐빈저이다. 이러한 구현예는 본 발명의 특정 양태를 발생시킨다.

[0081] 용어 "암모니아 저하제(ammonia lowering agent)"는 암모니아를 제거하고/제거하거나 암모니아 생성을 감소시키거나 억제하는 화합물을 지칭한다. 암모니아 저하제는 질소 스캐빈저, 이온 교환 수지(예를 들어, 리렙사(Relapsa)), 암모니아 흡수제(예컨대, 리포숨 기반 암모니아 흡수제, 예를 들어 베르산티스(Versantis)), 암모니아를 제거하는 조작된 마이크로비옴(microbiome)(예를 들어, 신로직(Synlogic)), 리팍시민(Rifaximin) 및 락툴로스(Lactulose)로 이루어지는 군으로부터 선택될 수 있다.

[0082] 본원에 사용되는 용어 "질소 스캐빈저(nitrogen scavenger)"는 암모니아를 제거함으로써 대상체에서 질소 및/또는 암모니아의 수준을 감소시키는 화합물을 지칭한다. 적합한 구현예에서, 질소 스캐빈저는 나중에 소변으로 배설될 수 있는 페닐아세틸 글루타민으로 대사됨으로써 대상체에서 질소 및/또는 암모니아의 양을 감소시킨다.

[0083] 적합한 구현예에서, 질소 스캐빈저는 페닐아세트산의 약학적으로 허용 가능한 염(본원에서 페닐아세트산염으로도 지칭됨), 페닐부티르산의 약학적으로 허용 가능한 염(본원에서 페닐부티르산염으로도 지칭됨), 페닐부티르산 글리세롤, 벤조산의 약학적으로 허용 가능한 염, 이의 약학적으로 허용 가능한 전구약물, 및 암모니아 결합 수지로 이루어지는 군으로부터 선택될 수 있다. 다른 질소 스캐빈저는 당업자에게 잘 알려져 있다.

[0084] 본원에 사용되는 용어 "약학적으로 허용 가능한 염(pharmaceutically-acceptable salt)"은 예를 들어, 충분히 염기성인 페닐아세트산의 산 부가염, 예를 들어 무기 또는 유기산, 예를 들어 염산, 브롬화수소산, 황산, 인산, 트리플루오로아세트산, 포름산, 시트르산, 메탄 술폰산 또는 말레산과의, 예를 들어 산 부가염을 포함한다. 또한, 충분히 산성인 페닐아세트산의 적합한 약학적으로 허용 가능한 염은 알칼리 금속 염, 예를 들어 나트륨 또는 칼륨 염, 알칼리 토금속 염, 예를 들어 칼슘 또는 마그네슘 염, 암모늄 염 또는 약학적으로 허용 가능한 양

이온을 제공하는 유기 염기와 염, 예를 들어 메틸아민, 디메틸아민, 트리메틸아민, 피페리딘, 모르폴린 또는 트리스-(2-하이드록시에틸)아민과의 염이다.

- [0085] 적합한 구현예에서, 페닐아세트산의 약학적으로 허용 가능한 염은 페닐아세트산 나트륨, 페닐아세트산 칼륨, 페닐아세트산 오르니틴으로 이루어지는 군으로부터 선택될 수 있다.
- [0086] 적합한 구현예에서, 페닐부티르산의 약학적으로 허용 가능한 염은 페닐부티르산 나트륨 및 페닐아세트산 칼륨으로 이루어지는 군으로부터 선택될 수 있다.
- [0087] 적합한 구현예에서, 벤조산의 약학적으로 허용 가능한 염은 벤조산 나트륨 및 벤조산 칼륨으로 이루어지는 군으로부터 선택될 수 있다.
- [0088] 암모니아 저하제는 용매화된 형태뿐만 아니라 비용매화된 형태, 예를 들어 수화된 형태로도 존재할 수 있음을 이해해야 한다. 본 발명의 맥락에서 모든 이러한 용매화 및 비용매화된 형태가 포함되는 것으로 이해되어야 한다.
- [0089] 본원에 사용되는 용어 "전구약물(pro-drug)"은 암모니아 저하제(예컨대, 질소 스캐빈저)보다 화학적 또는 생물학적 모이어티에 의해 덜 활성적이지만 대사되거나 생체 내 가수분해를 거쳐 암모니아 저하제를 형성하는 작용제를 지칭한다.
- [0090] 특히, 순환으로부터 글루타민을 제거하는 작용을 하는 페닐아세트산염 또는 페닐부티르산염 화합물과 같은 작용제가 바람직하다(글루타민은 GS의 작용에 의해 형성됨). 암모니아 저하제와 같은 제2 또는 추가 작용제는 동일한 제형 또는 조성물에, 또는 별도의 조성물 또는 제형에 포함되어, GS 단백질과 개별적으로, 순차적으로 또는 동시에 투여될 수 있다.
- [0091] 따라서, 추가 양태에서, 본 발명은 고암모니아혈증 치료 또는 예방에서 개별, 동시 또는 순차적 사용을 위한 조합 제제로서, 전신 비경구 투여를 위한 GS 단백질 및 추가 치료제를 포함하는 제품을 제공한다.
- [0092] 제2 또는 추가 작용제는 동일한 투여 경로 또는 경구를 포함하는 다른 투여 경로에 의해 투여될 수 있다. 따라서, 예시적인 일 구현예에서, 암모니아 저하제와 같은 제2 또는 추가 작용제는 경구로, 또는 다른 전신 수단으로 투여될 수 있고, GS는 비경구 전신 수단으로 투여될 수 있다.
- [0093] 암모니아 저하제, 예를 들어 질소 스캐빈저(페닐아세트산 나트륨, 페닐아세트산 오르니틴, 페닐부티르산 나트륨, 또는 벤조산 나트륨 포함)는 예를 들어, 급성 관리를 위하여, 정맥 내 주입에 의해, 및/또는 예를 들어, 장기적 유지를 위하여, 경구로 투여될 수 있다. i.v. 주입은 말초적일 수 있으나, 중심(central) i.v. 주입이 바람직하다. 유사하게는 아르기닌과 같은 아미노산은 경구로 또는 i.v., 예를 들어, 중심 i.v. 주입에 의해 투여될 수 있다.
- [0094] 따라서, 본 발명의 추가 양태는 고암모니아혈증 치료 또는 예방에서 개별, 동시 또는 순차적 사용을 위한 조합 제제로서, 전신 비경구 투여를 위한 GS 단백질 및 추가 치료제를 포함하는 제품(예를 들어, 조합 제품)을 제공한다. 적합한 구현예에서, 이러한 추가 치료제는 암모니아 저하제일 수 있다. 더욱 적합하게는 암모니아 저하제는 질소 스캐빈저일 수 있다. 더욱 적합하게는, 질소 스캐빈저는 페닐아세트산의 약학적으로 허용 가능한 염, 더욱 적합하게는 페닐아세트산 나트륨일 수 있다.
- [0095] 대안적으로 보면, 본 발명의 이러한 양태는 또한 (a) 전신 비경구 투여를 위한 GS 단백질 및 (b) 추가 치료제를 포함하는 키트를 제공한다. 적합하게는, 추가 치료제는 고암모니아혈증에 대해 효과적일 수 있다. 적합하게는, 추가 치료제는 암모니아 저하제, 더욱 적합하게는 질소 스캐빈저이다.
- [0096] 따라서, 추가 양태에서 본 발명은 (a) 전신 비경구 투여를 위한 GS 단백질 및 (b) 질소 스캐빈저를 포함하는 키트를 제공한다. 적합하게는, 질소 스캐빈저는 페닐아세트산의 약학적으로 허용 가능한 염, 더욱 적합하게는 페닐아세트산 나트륨일 수 있다.
- [0097] 이러한 키트는 고암모니아혈증을 치료 또는 예방하는 데 사용하기 위하여 제공될 수 있다. 키트의 성분은 하나 이상의 약학적으로 허용 가능한 담체 또는 부형제와 함께 해당 작용제(들)를 포함하는 별도의 약학 조성물로 제공될 수 있다. 본 발명의 조성물(들)은 1회 이상 투여될 수 있다. 조성물(들)이 1회를 초과하여 투여되는 경우, 이들은 규칙적인 간격으로 또는 필요에 따라, 예를 들어 임상의에 의해 결정된 바와 같이, 투여될 수 있다. 규칙적인 간격은 예를 들어, 대략 매일, 매주, 격주, 매월 또는 임의의 다른 간격을 포함할 수 있다. 치료 프로토콜을 선택하는 것은 당업자의 기술 수준 내에 있다. 예를 들어, 프로토콜은 동물 모델에서의 연구에 기초하여

결정될 수 있다. 다른 예에서, 혈액 중 암모니아 수준이 미리 결정된 수준을 초과하는 경우, 반복 용량의 조성물(들)이 대상체에게 투여될 수 있다.

[0098] 본 발명에 따른 GS 단백질의 용도 또는 GS 단백질과 조합한 암모니아 저하제의 용도는 유전자 요법이 적합하지 않거나 적절하지 않은 대상체, 예를 들어 소아 또는 유전자 요법에 불응성인 대상체의 치료에 유리하다. 이러한 불응성 대상체는 예를 들어, 유전자 요법의 전달에 사용되는 바이러스 벡터에 이미 노출되었거나 면역 반응을 나타냈던 대상체를 포함할 수 있다.

[0099] 유리하제는, 치료제로서 단백질의 사용은 고용량의 활성 단백질이 대상체에게 전달되고 용량이 대상체에 따라 그리고 필요에 따라 조정될 수 있게 한다. 또한, 유전자 요법과 비교하여 단백질 요법은 훨씬 더 빠른 반응을 가능하게 하므로, 응급 사용에 더욱 적합하다.

[0100] 언급된 바와 같이, 본 발명의 일 양태는 고암모니아혈증 치료 또는 예방에 사용하기 위한 GS 단백질과 조합하여 사용하기 위한, 암모니아 저하제를 포함하는 약학 조성물에 관한 것이다. 암모니아 저하제는 대상체에게 투여하기 위한 약학 조성물로서 제형화될 수 있다. 암모니아 저하제는 선택된 양의 질소 스캐빈저를 하나 이상의 생리적 또는 약학적으로 허용 가능한 담체 또는 부형제와 혼합함으로써 임의의 통상적인 방식으로 제형화될 수 있다. 적합하게는, 조성물은 비경구 전신 투여, 또는 경구 투여를 위한 것일 수 있다. 약학 조성물은 GS 단백질도 포함할 수 있음을 이해할 것이다. 이러한 구현예에서, 조성물은 비경구 전신 투여를 위하여 제형화될 수 있다.

[0101] 담체 또는 부형제의 선택은 투여 전문가의 기술 내에 있으며, 투여 방식과 같은 다수의 파라미터에 의존할 수 있다. 일부 예에서, 암모니아 저하제는 유체로서 제공된다. 다른 예에서, 암모니아 저하제는 건조 형태로 제공된다. 이러한 건조된 형태는 물, 완충액, 식염수 또는 다른 적합한 용액과 같은 적합한 용액을 첨가함으로써 투여 전에 재수화될 수 있다. 암모니아 저하제는 직접 투여를 위하여 제형화될 수 있거나, 희석 또는 다른 변형을 위하여 제형화될 수 있다. 따라서, 암모니아 저하제는 단일(또는 단위) 투여량 형태 또는 다중 투여량 형태로 제형화될 수 있다. 단일 용량 형태의 예에는 앰플 및 주사기가 포함된다. 다중 용량 형태의 예에는 다중 단위 용량을 함유하는 바이알 및 병이 포함된다.

[0102] 제형 내 암모니아 저하제의 농도는 투여 시 질소 및/또는 암모늄을 순환으로부터 제거하거나, 또는 암모니아 생성을 감소 또는 억제하기에 효과적인 양의 암모니아 저하제의 전달에 효과적이다. 농도 및 양은 대상체에서의 기질의 수준 및 투여 방식을 비롯한 여러 요인에 따라 달라질 수 있으며, 경험적으로 결정될 수 있다. 본원에 제공되는 조성물 중 암모니아 저하제의 예시적 농도는 약 0.1, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 0.9, 1, 5, 10, 15, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 200, 300, 400, 500, 1000, 2000, 3000, 4000 또는 5000 mg/mL 이상의 암모니아 저하제의 농도를 포함하나, 이에 한정되지 않는다.

[0103] 암모니아 저하제 조성물을 제형화하기 위하여, 일 구현예에서 암모니아 저하제의 중량 분획은 선택된 비히클에 원하는 농도로 용해, 현탁, 분산 또는 다른 방법으로 혼합된다. 생성된 혼합물은 용액, 현탁액, 에멀전 및 다른 이러한 혼합물이며, 용액, 현탁액, 페이스트, 겔, 에어로졸, 스프레이 또는 임의의 다른 전신 투여에 적합한 제형을 포함하나 이에 한정되지 않는, 비수성 또는 수성 혼합물로서 제형화될 수 있다.

[0104] 일반적으로, 암모니아 저하제는 규제 기관으로부터의 승인의 관점에서 제조되거나 그렇지 않으면 동물 및 인간에서 사용하기 위하여 일반적으로 인정되는 약전에 따라 제조된다. 조성물은 희석제, 부형제 또는 비히클과 같은 담체를 포함할 수 있다. 이러한 약학적 담체는 물 및 오일과 같은 멸균 액체일 수 있다. 식염수 용액 및 수성 텍스트로스 및 글리세롤 용액 또한 특히 주사 가능한 용액을 위한, 액체 담체로서 사용될 수 있다. 조성물은 활성 성분과 함께, 락토스, 수크로스, 인산이칼슘 또는 카복시메틸셀룰로스와 같은 희석제; 스테아르산 마그네슘, 스테아르산 칼슘 및 활석과 같은 윤활제; 및 전분, 검 아카시아 젤라틴과 같은 천연 검, 글루코스, 당밀, 폴리비닐피롤리딘, 셀룰로스 및 이의 유도체, 포비돈, 크로스포비돈 및 당업자에게 공지된 다른 이러한 결합제와 같은 결합제를 함유할 수 있다. 적합한 약학적 부형제에는 전분, 글루코스, 락토스, 수크로스, 젤라틴, 맥아, 쌀, 밀가루, 초크, 실리카겔, 스테아르산 나트륨, 글리세롤 모노스테아레이트, 활석, 염화나트륨, 건조 탈지유, 글리세롤, 프로필렌, 글리콜, 물 및 에탄올이 포함된다. 원하는 경우, 페닐아세트산 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염 조성물은 소량의 습윤제 또는 유화제 또는 pH 완충제, 예를 들어 아세트산염, 시트르산 나트륨, 시클로텍스트린 유도체, 소르비탄 모노라우레이트, 트리에탄올아민 아세트산 나트륨, 트리에탄올아민 올레이트 및 다른 이러한 작용제도 함유할 수 있다. 기타 적합한 약학적 담체의 예는 당업자에게 공지될 것이다.

- [0105] 암모니아 저하제는 화합물을 신체에 전달하는 임의의 방법 및 경로에 의해 투여될 수 있다. 특정 구현예에서, 암모니아 저하제는 비경구로 투여될 수 있다. 당업자는 각각의 투여 경로에 적합한 방식으로 제형화된, 경구, 정맥 내, 근육 내, 피내, 경피, 피하 또는 복강 내 투여뿐만 아니라 이의 둘 이상의 임의의 조합도 포함하지만 이에 한정되지 않는, 적절한 투여 또는 전달 방식을 쉽게 이해하고 선택할 수 있을 것이다.
- [0106] 약학 조성물에서와 마찬가지로, 암모니아 저하제는 또한 다른 방식, 예를 들어 식이 보충제와 같은 영양 조성물, 예를 들어 비경구 영양 조성물(예를 들어, 단독으로 또는 다른 보충제 성분과 함께)로 제형화되거나 투여될 수 있다. 적합하게는, 이러한 조성물은 경구 또는 비경구 투여를 위한 것일 수 있다.
- [0107] 언급된 바와 같이, 암모니아 저하제는 GS 단백질과의 병용 투여를 위한 것이다. 암모니아 저하제가 동일한 제형 또는 조성물에, 또는 별도의 조성물 또는 제형에 포함되어, GS 단백질과 개별적으로, 순차적으로 또는 동시에 투여될 수 있음을 이해할 것이다. 따라서, 예시적인 일 구현예에서, 암모니아 저하제는 경구로, 또는 다른 전신 수단으로 투여될 수 있고, GS는 비경구 전신 수단으로 투여될 수 있다.
- [0108] 예시적인 암모니아 저하제의 치료적 유효 용량은 1일당 체중 1 kg당 약 10 mg 내지 약 1000 mg, 또는 1일당 체중 1 kg당 약 100 mg 내지 약 500 mg을 포함하는, 1일당 체중 1 kg당 약 1 mg 내지 1일당 체중 1 kg당 약 2000 mg을 포함하나, 이에 한정되지 않는다. 따라서, 예를 들어, 대상체에게 1일당 체중 1 kg당 1, 2, 3, 4, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 550, 600, 650, 700, 750, 800, 850, 900, 950, 1000 또는 2000 mg 이상의 암모니아 저하제가 투여될 수 있다. 다른 예시적인 암모니아 저하제의 치료적 유효 용량은 1일당 약 1 g 내지 약 50 g을 포함하나, 이에 한정되지 않는다. 따라서, 예를 들어 대상체에게 1일당 1, 2, 3, 4, 5, 10, 20, 30, 40 또는 50 그램 이상의 암모니아 저하제가 투여될 수 있다. 유효 용량은 암모니아 저하제에 따라 다를 수 있음을 이해할 것이다. GS 조성물, 및/또는 암모니아 저하제를 포함하는 조성물 또는 암모니아 저하제가 아닌 추가 작용제를 포함하는 조성물은 필요에 따라, 패키지, 키트 또는 바늘이 달린 주사기 같은 디스펜서 장치 또는 바이알 및 바늘이 달린 주사기에 제공될 수 있으며, 패키지, 키트 또는 디스펜서 장치는 하나 이상의 단위 투여량 형태를 함유할 수 있다. 키트 또는 디스펜서 장치는 투여 설명서가 첨부될 수 있다. GS 조성물과 암모니아 저하제를 포함하는 조성물이 분리된 구현예에서, 키트는 GS 조성물 및 암모니아 저하제를 포함하는 조성물을 포함할 수 있다. 적합하게는, 이러한 구현예에서, 키트는 GS 조성물, 및 질소 스캐빈저를 포함할 수 있다. 적합하게는, 이러한 구현예에서, 키트는 GS 조성물, 및 페닐아세트산염, 예를 들어 페닐아세트산 나트륨을 포함하는 조성물을 포함할 수 있다. 조성물은 포장 재료, 조성물, 및 조성물이 고암모니아혈증 또는 고암모니아혈증과 관련된 질환 또는 상태의 치료를 위하여 대상체에게 투여하기 위한 것임을 나타내는 라벨을 포함하는 제조 물품으로서 포장될 수 있다.
- [0109] 추가 양태에서, 본 발명은 고암모니아혈증 치료 또는 예방에 사용하기 위한, 글루타민 합성효소 또는 이의 생물학적 활성 단편 또는 변이체를 암호화하는 발현 벡터를 제공하며, 이때 벡터는 전신 투여를 위한 것이다.
- [0110] 적합한 구현예에서, 벡터는 암모니아 저하제를 추가로 암호화한다.
- [0111] 또 다른 양태에서, 본 발명은 고암모니아혈증 치료 또는 예방에 사용하기 위한, 암모니아 저하제와 조합하여 사용하기 위한, 글루타민 합성효소 또는 이의 생물학적 활성 단편 또는 변이체를 암호화하는 발현 벡터를 제공한다.
- [0112] 또 다른 양태에서, 본 발명은 고암모니아혈증 치료 또는 예방에 사용하기 위한, 글루타민 합성효소 또는 이의 생물학적 활성 단편 또는 변이체를 암호화하는 발현 벡터와 조합하여 사용하기 위한 암모니아 저하제를 제공한다.
- [0113] 또 다른 양태에서, 본 발명은 다음으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 발현 벡터를 포함하는 세포를 제공한다: 고암모니아혈증 치료에 사용하기 위한, 글루타민 합성효소 또는 이의 생물학적 활성 단편 또는 변이체를 암호화하는 발현 벡터, 및 고암모니아혈증의 치료 또는 예방에 사용하기 위한, 암모니아 저하제와 조합하여 사용하기 위한, 글루타민 합성효소 또는 이의 생물학적 활성 단편 또는 변이체를 암호화하는 발현 벡터.
- [0114] 또 다른 양태에서, 본 발명은 고암모니아혈증 치료 또는 예방용 조성물 제조를 위한, 글루타민 합성효소 또는 이의 생물학적 활성 단편 또는 변이체를 암호화하는 발현 벡터의 용도를 제공하며, 이때, 조성물은 전신 투여를 위한 것이다.
- [0115] 또 다른 양태에서, 본 발명은 고암모니아혈증 치료 또는 예방을 위하여 암모니아 저하제와 조합하여 사용하기 위한 조성물 제조를 위한 글루타민 합성 효소 또는 이의 생물학적 활성 단편 또는 변이체를 암호화하는 발현 벡

터의 용도를 제공한다.

- [0116] 또 다른 양태에서, 본 발명은 고암모니아혈증 치료 또는 예방에 사용하기 위한, 글루타민 합성효소 또는 이의 생물학적 활성 단편 또는 변이체를 암호화하는 발현 벡터와 조합하여 사용하기 위한, 조성물의 제조를 위한 암모니아 저하제의 용도를 제공한다.
- [0117] 또 다른 양태에서, 본 발명은 대상체의 고암모니아혈증 치료 또는 예방 방법을 제공하며, 상기 방법은 글루타민 합성효소 또는 이의 생물학적 활성 단편 또는 변이체를 암호화하는 발현 벡터의 전신 투여를 포함한다.
- [0118] 또 다른 양태에서, 본 발명은 대상체의 고암모니아혈증 치료 또는 예방 방법을 제공하며, 상기 방법은 글루타민 합성효소 또는 이의 생물학적 활성 단편 또는 변이체를 암호화하는 발현 벡터, 및 암모니아 저하제의 투여를 포함한다.
- [0119] 또 다른 양태에서, 본 발명은 고암모니아혈증 치료 또는 예방에 사용하기 위한, 글루타민 합성효소 또는 이의 생물학적 활성 단편 또는 변이체를 암호화하는 발현 벡터를 포함하는 조성물을 제공하며, 여기에서 조성물은 전신 투여를 위한 것이다.
- [0120] 적합한 구현예에서, 조성물은 암모니아 저하제를 더 포함할 수 있다.
- [0121] 또 다른 양태에서, 본 발명은 고암모니아혈증 치료 또는 예방에 사용하기 위한, 암모니아 저하제와 조합하여 사용하기 위한, 글루타민 합성효소 또는 이의 생물학적 활성 단편 또는 변이체를 암호화하는 발현 벡터를 포함하는 조성물을 제공한다.
- [0122] 또 다른 양태에서, 본 발명은 고암모니아혈증 치료 또는 예방에 사용하기 위한, 글루타민 합성효소 또는 이의 생물학적 활성 단편 또는 변이체를 암호화하는 발현 벡터와 조합하여 사용하기 위한 암모니아 저하제를 포함하는 조성물을 제공한다.
- [0123] 또 다른 양태에서, 본 발명은 글루타민 합성효소 또는 이의 생물학적 활성 단편 또는 변이체를 암호화하는 발현 벡터 및 추가 치료제를 포함하는 키트를 제공한다. 적합하게는, 추가 치료제는 고암모니아혈증에 대해 효과적인 작용제일 수 있다. 적합하게는 고암모니아혈증에 대해 효과적인 작용제는 암모니아 저하제 또는 아미노산 또는 이의 요소 회로 중간체이다.
- [0124] 또 다른 양태에서, 본 발명은 고암모니아혈증 치료 또는 예방에서 개별, 동시 또는 순차적 사용을 위한 조합 제제로서, 글루타민 합성효소 또는 이의 생물학적 활성 단편 또는 변이체를 암호화하는 발현 벡터 및 추가 치료제를 포함하는 제품을 제공한다. 적합하게는, 추가 치료제는 고암모니아혈증에 대해 효과적인 작용제일 수 있다. 적합하게는, 고암모니아혈증에 대해 효과적인 작용제는 암모니아 저하제 또는 아미노산 또는 이의 요소 회로 중간체이다. 더욱 적합하게는, 추가 치료제는 질소 스캐빈저이다.
- [0125] 적합한 구현예에서, 발현 벡터는 바이러스성 또는 비바이러스성일 수 있다. 예로서, 적합한 바이러스 발현 벡터는 파라믹소바이러스(paramyxovirus), 레트로바이러스(retrovirus), 아데노바이러스(adenovirus), 렌티바이러스(lentivirus), 수두 바이러스(pox virus), 알파바이러스(alphavirus) 및 헤르페스 바이러스(herpes virus)로 이루어지는 군으로부터 선택되는 바이러스로부터 유래될 수 있다. 기타 적합한 바이러스 벡터는 당업자에게 공지될 것이다.
- [0126] 적합한 비바이러스성 발현 벡터는 무기 입자 발현 벡터(예컨대, 인산칼슘, 실리카 및 금), 지질 기반 입자 발현 벡터(예를 들어, 양이온성 지질, 지질 나노 에멀전 및 고체 지질 나노입자) 및 중합체 기반 입자 발현 벡터(예를 들어, 펩티드, 폴리에틸렌이민, 키토산 및 덴드리머)로 이루어지는 군으로부터 선택될 수 있다. 기타 적합한 비바이러스성 발현 벡터는 당업자에게 공지될 것이다.
- [0127] 적합한 전신 투여 방법은 당업자에게 공지될 것이다. 예로서, 전신 투여는 비경구 투여, 예컨대 정맥 내 또는 피하 경로에 의해 달성될 수 있다. "전신 투여(systemic administration)"가 발현 벡터의 생성물(예컨대, 글루타민 합성효소 또는 이의 생물학적 단편)이 환자의 여러 부위 내에서 발현될 수 있게 하였음을 이해할 것이다. 본 발명의 맥락에서, 전신 투여는 근육 내 투여를 포함하지 않는다.
- [0128] 용어 "생물학적 활성(biologically active)"은 글루탐산을 글루타민으로 전환하는 능력을 나타내는 글루타민 합성효소(서열번호 1)를 암호화하는 핵산의 단편 또는 변이체를 지칭한다. 서열번호 1에 따른 단백질은 서열번호 2에 따른 핵산 서열에 의해 암호화된다. 따라서, 벡터가 글루타민 합성효소의 생물학적 활성 단편 또는 변이체를 암호화하는 서열번호 2의 단편 또는 변이체를 포함할 수 있음을 이해할 것이다.

- [0129] 본원에 사용되는 용어 "변이체(variant)"는 서열번호 1의 폴리펩티드의 1차 구조의 변경을 포함하는 폴리펩티드를 지칭한다. 적합하게는, 변이체는 서열번호 1의 펩티드와 70% 이상의 동일성; 서열번호 1의 펩티드와 80% 이상의 동일성; 서열번호 1의 펩티드와 90% 이상의 동일성; 서열번호 1의 펩티드와 95% 이상의 동일성; 서열번호 1의 펩티드와 96% 이상의 동일성; 서열번호 1의 펩티드와 97% 이상의 동일성; 서열번호 1의 펩티드와 98% 이상의 동일성; 또는 서열번호 1의 펩티드와 심지어 99% 이상의 동일성을 공유할 수 있다. 변이체는 서열번호 1에 따른 서열과 관련하여 1% 이상, 2% 이상, 3% 이상, 4% 이상, 5% 이상, 10% 이상, 20% 이상, 또는 심지어 30% 이상 서열번호 1의 폴리펩티드와 상이할 수 있다.
- [0130] 본원에 사용되는 용어 "단편(fragment)"은 서열번호 1의 폴리펩티드의 1차 구조의 길이에 대한 변경을 포함하는 폴리펩티드를 지칭한다. 적합한 단편은 서열번호 1의 전체 길이의 적어도 60%, 적어도 65%, 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 또는 적어도 95%를 포함할 수 있다. 실제로, 적합한 변이체는 서열번호 1의 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 또는 적어도 99%를 포함할 수 있다.
- [0131] (문맥에서 달리 요구하는 경우를 제외하고) 고암모니아혈증 치료에 사용하기 위한 GS 단백질, 암모니아 저하제와 조합하여 사용하기 위한 GS 단백질, GS 단백질과 조합하여 사용하기 위한 암모니아 저하제, 이들의 용도, 치료 방법, 조성물, 키트 및 제품과 관련하여 기술된 구현에는 본 발명의 나머지 양태에 일반적으로 적용될 수 있을 것임을 이해할 것이다.
- [0132] 이제, 본 발명을 다음의 비제한적인 실시예 및 도면을 참조하여 추가로 설명한다.

도면의 간단한 설명

- [0133] 도 1은 실시예 1에서 제조된 바와 같은 인간 GS 단백질의 20 kDa N-말단 알데히드 PEG 접합체의 Superose 12 컬럼에서의 크기 배제 크로마토그래피(SEC)의 결과를 나타낸 것이다. 그래프는 다량체가 분획 8과 분획 9에서 용출되고, 단량체가 분획 10에서 용출되었음을 보여준다.
- 도 2는 다양한 GS 후보물질의 시험관 내(*in-vitro*) GS 활성의 비교를 나타낸 것이다: PEG 접합 변이체(Trin GS1, Trin GS2, Trin GS3, Trin GS4) 대 비접합 GS(wt GS) 및 음성 대조군. 글루타민 합성효소 활성은 문헌 [Acosta *et al.*, 2009, World J. Gastroenterol., 15(23), 2893-2899]의 분석에 따라 OD 570 nm로서 나타내었다. Trin GS1-(N 말단 알데히드 단량체); Trin GS2-Nof-20; Trin GS3-Nof-30, Trin GS4-N 말단 알데히드 다량체.
- 도 3은 (A) 기준선, (B) 투약 24시간 후 및 (C) 투약 72시간 후에 다양한 접합체의 수컷, 야생형(wt) CD1 마우스의 투약 전과 투약 후 혈장 대한 PEG ELISA 결과를 나타낸 것이다. (Trin1 - N 말단 알데히드 접합된 GS 단량체; Trin2 - Nof-20 GS 접합된 다량체; Trin3 - Nof-30 접합된 GS 다량체; Trin4 - N 말단 알데히드 접합된 PEG 다량체);
- 도 4는 실시예 3에 기술된 바와 같이, 투약 3일 후에 2.5 mg/kg으로 투약된 wtCD1 마우스의 간 용해물에서의 GS 활성(OD 535 nm) 결과를 보여준다.
- 도 5a는 간 GS 활성 분석 결과를 나타낸 것이다. 도 5b는 혈장 GS 활성 분석 결과를 나타낸 것이다. 간 및 혈장 GS 활성 둘 다 GS 단백질, 그리고 질소 스캐빈저와 GS 단백질로 처리된 BLD 랫트에서 분석되었다.
- 도 6은 GS 단백질, 그리고 질소 스캐빈저와 GS 단백질로 처리된 BLD 랫트에서 측정된 암모니아 혈액 수준을 도시한 것이다.
- 도 7은 GS 단백질, 또는 질소 스캐빈저와 GS 단백질로 처리된 BLD 랫트의 전전두엽 피질의 부종의 백분율을 보여주는 그래프를 도시한 것이다.
- 도 8은 GS 단백질, 또는 질소 스캐빈저와 GS 단백질로 처리된 BLD 랫트에서의 로타로드 그립 검사(rotarod grip test)의 결과를 나타낸 것이다.
- 도 9는 GS 단백질, 또는 질소 스캐빈저(SP-페닐아세트산 나트륨)와 GS 단백질로 처리된 OTC 마우스에서 암모니아 수준을 보여주는 그래프이다.
- 도 10은 GS 단백질 또는 질소 스캐빈저(SP-페닐아세트산 나트륨)와 GS 단백질로 처리된 OTC 마우스에서 혈장 및 간 GS 활성의 암모니아 수준의 결과를 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0134] 실시예 1

[0135] GS 단백질 및 GS 단백질-PEG 접합체의 생산 및 정제

[0136] 인간 글루타민 합성 효소(GS)의 생산: 인간 GS 유전자(His-태그를 암호화하는 5' 서열 및 GS의 N 말단부에 링커 GGGGS를 포함하며, 박테리아에서의 발현을 위하여 코돈 최적화된 서열번호 5)를 함유하는 pET30a+ 벡터를 대장균 발현 시스템에 사용하였다. 플라스미드 제작 후, GS의 발현에 대한 평가를 광범위한 유도(IPTG) 및 발현 온도를 사용하여 수행하였다. 인간 GS는 SDS-PAGE에 의해 검출된 바와 같이 구조물에서 가용성으로 발현되었다. 용해 완충액(50 mM Tris pH 8.0, 10% 글리세롤, 0.1% 트리톤(Triton) X-100, 100 ug/ml 리소자임, 1 mM PMSF, 3 유닛 DNase, 2 mM MgCl)을 사용하여 세포로부터 가용성 단백질을 추출하였다. 원심분리 후 가용성 단백질을 추출하였다. 발현 연구 후, 최상의 조건이 BL21(DE3) 세포를 이용하여 발견되었고, 25°C에서 16시간 동안 0.1 mM IPTG로 배양 및 유도하였다. 시험한 다른 조건에는 다양한 IPTG 유도(0.01 M 내지 0.1 M IPTG), 다양한 항온처리 온도(16°C 내지 37°C 범위) 및 4 내지 16시간의 유도 항온처리 시간을 사용하는 것이 포함되었다.

[0137] 발현된 GS의 정제: 발현된 단백질의 제1 단계 정제는 Ni-NTA 비드에 의한 His 태그 정제, 20 mM 이미다졸로 세척, 및 300 mM 이미다졸로 용출을 포함하였다.

[0138] 단백질 PEG 접합: GS 단백질을 환원 조건(20 mM 시아노 붕화수소나트륨을 사용) 하에 16시간 동안 N 말단 알데히드 20 kDa peg에 접합시켰다(Dr Reddy의 20 kDa N 말단 알데히드 PEG).

[0139] 최종 정제: 접합된 단백질을 SEC 크로마토그래피를 사용하여 추가 정제하였다. Superose 6 또는 Superose 12 컬럼(도 1 참조)을 사용하였다. 다량체는 분획 8±9에서 발견되었다. Superose 12의 분획 10은 (희석된) 다량체를 포함하였다. Superose 6에서, 다량체는 분획 8+9에서, 단량체는 분획 12/13에서 발견되었다.

[0140] 트레할로스 및 수크로스를 함유하는 PBS 중 GS의 최종 제형(pH 7.4)을 제조하였다.

[0141] 실시예 2

[0142] GS 제제의 활성

[0143] 실시예 1에 따라 제조된 다양한 GS 제제 및 PEG 접합체를 문헌[Ehrenfeld et al., 1963, J. Biol. Chem. 238(11), 3711-3716]에 기술된 본래의 분석법으로부터 변형된 위의 문헌[Acosta et al., 2009]의 분석법을 이용하여 GS 활성에 대해 시험하였다.

[0144] 100 ug의 정제된 단백질 샘플을 다음의 반응 완충액에 첨가하였다: 150 µL 스톱 용액(100 mmol/L 이미다졸-HCl 완충액 [pH7.1], 40 mmol/L MgCl₂, 50 mmol/L, β-메르캅토에탄올, 20 mmol/L ATP, 100 mmol/L, 글루탐산 및 200 mmol/L 하이드록실아민, pH 7.2로 조정됨). 튜브를 37°C에서 15분 동안 항온처리하였다. 0.6 mL[2배 농도]의 염화철 시약(0.37 mol/L FeCl₃, 0.67 mol/L HCl 및 0.20 mol/L 트리클로로아세트산)을 첨가하여 반응을 중지시켰다. 샘플을 얼음 위에 5분 동안 두었다. 침전된 단백질을 10,000 g에서 원심분리에 의해 제거하고, 상청액의 흡광도를 시약 블랭크에 대해 535 내지 570 nm에서 판독하였다. 결과를 도 2에 나타내었다. Trin1 - (Dr Reddy로부터 수득된, 20 kD 크기의 N 말단 알데히드 다량체 PEG); Trin2 - Nof-20 접합된 GS(NOF 코포레이션으로부터 입수한 단일 작용기의 선형 20 kD PEG, NHS 활성 에스테르로 GS 단백질에 접합됨); Trin 3 - Nof-30 (NOF 코포레이션으로부터 입수한 단일 작용기의 선형 30 kD PEG, NHS 활성 에스테르로 GS 단백질에 접합됨) Trin4 - N 말단 알데히드, GS 다량체). 다른 접합체의 활성은 비슷하였으나, wt GS(비접합)와 비교하여 Trin 4(N 말단 알데히드 다량체)는 매우 유사한 활성 프로파일을 가지고, 가장 우수한 활성을 보여주었다.

[0145] 실시예 3

[0146] 마우스에 대한 GS 단백질의 투여 - 혈장 수준에 미치는 GS 단백질-PEG 접합체의 영향

[0147] 수컷, 야생형(wt) CD1 마우스에게 실시예 1에 기술된 바와 같이 제조된 다양한 GS 단백질 및 PEG 접합체를 2.5 mg/kg으로 피하(sc) 투여로 투여하였다(Trin1 - N 말단 알데히드 접합된 GS 다량체; Trin2 - Nof-20 GS 접합된 다량체; Trin3 - Nof-30 접합된 GS 다량체; Trin4 - N 말단 알데히드 접합된 PEG 다량체). 제조사(Abcam PEG ELISA 키트, ab133065)에 의해 개략된 프로토콜에 따라 ELISA를 수행하였다. 도 3에 도시된 바와 같이, 혈장 ELISA의 결과는 모든 시점에서 예상된 바와 같이, 비접합 wt GS에 대해 매우 낮거나 검출할 수 없는 수준을 보여준다. 24시간 후, 여러 후보물질이 혈장에서 높은 수준인 것으로 밝혀졌다. 그러나 투약 72시간 후, Trin-

GS4(N-말단 알데히드 접합된 PEG GS 다량체)가 가장 높은 존재율을 나타내었다. 각 군에서 N = 2마리 동물. 따라서, 이 실험은 GS 단백질의 전신 투여가 높은 순환 수준의 GS PEG 접합체를, 특히 치료적으로 유효하거나 활성일 수 있는 수준으로 획득하기 위하여 성공적으로 사용될 수 있음을 보여준다.

[0148] 실시예 4

[0149] 마우스에 대한 GS 단백질의 투여 - 간 용해물의 GS 활성 수준

[0150] 적절한 경우 500 μ g의 (실시예 3의 실험으로부터 도태된 마우스로부터의) 간 용해물을 각 반응물에 첨가하였다는 점을 제외하고는, 실시예 2에 기술된 바와 같이 활성 분석을 수행하였다. 결과를 도 4에 나타내었다. 투약 후 3일의 간 용해물에서의 GS 활성 결과는 우수한 후보가 N 말단 알데히드 접합된 PEG GS 다량체로, 이것이 비히클(식염수 투여된) 대조군과 비교하여 기준선을 초과하는 유의미한 활성을 보여주는 유일한 후보였음을 입증한다. 각 군에서 N = 2마리 동물.

[0151] 실시예 5

[0152] GS 및 GS+SP의 효과를 보여주기 위하여 요소 회로 장애(OTC 결핍증)의 $otc^{spf-ash}$ 마우스 모델을 사용하였다. 사용된 마우스의 세부 사항은 <https://www.jax.org/strain/001811> (B6EiC3Sn a/A- $Otc^{spf-ash}$ /J)에서 찾을 수 있다. 이들은 정상적인 먹이를 먹는다. 연령은 약 10주에서 23주까지 다양하였으며, 군을 잘 매칭하였다. 모든 동물은 수컷 반접합성(hemizygous)이다(OTC는 X 연관형이기 때문에 수컷의 X 염색체에만 존재하므로, 마우스는 녹아웃 마우스임).

[0153] 모든 군(비히클, GS 및 GS+SP; 여기서 GS = 글루타민 합성효소, GS + SP = 글루타민 합성효소 + 페닐아세트산 나트륨)을 다음과 같이 처리하였다: 실험은 화요일부터 다음 수요일까지 진행하였다(8일). SP는 1일 2회 i.p. 350 mg/kg으로 투여하였고, GS는 모든 치료군에서 처음 4일 동안 투여하였으며(1일 1회 i.p. 40mg/kg으로), 그 후 2일[주말]은 휴약하였고, 40 mg/kg의 GS를 i.p.로 3일 더 투여하였다.

[0154] 제8일에 마우스를 도태시키고, 혈액을 추출하고, 스피ندا운시켜 혈장을 획득하고, 이 혈장을 암모니아 정량화에 사용하였다(아래 방법 참조).

[0155] 유전자형 분석은 문헌에 기재된 표준 방법을 사용하여 수행하였다.

[0156] 재료 및 방법

[0157] 모든 실험은 European Directive 2010/63/EU에 따라 개정된 1986년 동물(과학 절차)법에 따라 수행하였다. 모든 동물은 실험실 동물의 관리 및 사용 가이드(Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, National Institutes of Health Publication 86-23; 1985년 개정)에 개략된 기준에 따라 인도주의적 치료를 받았다. 이들 실험에 사용된 모든 동물은 Charles River Laboratories(영국 켄트 소재)로부터 입수한 수컷 Sprague-Dawley 랫트(체중, 실험 시작 시 250 g)였으며, 5개 군으로 분류하였다: 담관 결찰 동물 + 암모니아 + 식염수 혈청(BDL+HA+SS, n = 6), 담관 결찰 동물 + 암모니아 + 페닐아세트산 나트륨(BDL+HA+SP, n = 6), 담관 결찰 동물 + 암모니아 + 페닐아세트산 나트륨 + 글루타민 합성효소(BDL+HA+SP+GS, n = 5), 담관 결찰 동물 + 암모니아 + 글루타민 합성효소(BDL+HA+GS, n = 6), 모의 수술 동물 + 글루타민 합성효소(SHAM+GS, n = 5). SP 및 GS를 포함하는 치료는 "콤보"로 지칭될 수 있다.

[0158] 담관 결찰 수술

[0159] 일반 마취(유도를 위해 100% 산소 중 5% 이소플루란, 유지를 위해 공기 중 2% 이소플루란) 하에 랫트를 담관을 3회 결찰(작은 개복술 방식)을 수행하여 만성 간 손상을 유도하였고, 수술 후 28일 동안 연구하였다. 중앙선 복부 절개를 마취 하에 수행하였다. BDL 군에서, 공통 담관을 분리하여, 3-0 실크로 3회 결찰하고, 결찰사(ligature) 사이를 절개하였다. 모의(sham) 수술군은 결찰사 사이의 절개 없이 동일한 절차를 수행하였다. BDL 후 모든 동물은 계속하여 체중이 증가하였고, 모의 대조군과 비슷하였다. 두 군의 전체 사망률은 10% 미만이었고, 수술 36시간 이내에 발생하였다.

[0160] 비경화성 고암모니아혈증 조건

[0161] 23마리의 랫트에게 고암모니아혈증(HA) 식이를 투여하였다. 대략 100 g의 스톡에 사용된 아미노산 레시피는 다음과 같았다: 15 g 류신, 7.7 g 페닐알라닌, 7 g 글루탐산, 10 g 알라닌, 4.4 g 프롤린, 5.8 g 트레오닌, 11 g 아스파르트산, 5 g 세린, 4.8 g 글리신, 3.3 g 아르기닌, 9.6 g 리신, 8.4 g 히스티딘, 3 g 티로신, 1.5 g 트

립토판, 및 10.6 g 발린. 25 g의 이 혼합물(표준 설치류 먹이 분말과 1:5 혼합됨)을 매일 새로 제조하여 5일 동안 랫트가 자유롭게 접근할 수 있게 하였다. 이 레시피는 설치류 헤모글로빈의 아미노산 조성과 가까우며, 전신 고암모니아혈증을 초래하는 것으로 알려져 있는[2] 위장관 출혈의 효과를 모방한 것이다[1].

[0162] **페닐아세트산 나트륨 조건**

[0163] 11마리의 랫트에게 페닐아세트산 나트륨(SP) 식이를 투여하였다. 5일 동안 1일 kg당 0.3 g을 먹이 분말과 혼합하였고, 매일 새롭게 제조하였다.

[0164] **글루타민 합성효소 조건**

[0165] 16마리의 랫트에 이틀마다 복강 내로 GS를 주사하였다(1일째 및 3일째). 주입된 총 부피는 3 ml i.p.였고, 이는 18 내지 22 mg/kg의 GS를 허용한다.

[0166] **채혈 및 생화학**

[0167] 모든 군에서 상이한 시점에 다리 정맥으로부터 혈장 샘플을 수집하였다. 시점을 다음과 같이 글루타민 합성효소 처리 후 계산하였다: 6시간, 24시간, 48시간 및 5일. 적절한 키트(Roche-diagnostics, Burgess Hill, 영국 웨스트서섹스 소재)와 함께 Cobas Integra 400 다중 분석기를 이용하여 200 μ l의 각각의 혈장을 이용하여 모든 시점에서 혈장 암모니아 수준에 대해 분석을 수행하였다.

[0168] **뇌 부종**

[0169] 이전에 기술된 바와 같이[3, 4] 건조 중량 기술을 사용하여 이를 측정하였다. 간략하게는, 오븐 건조된 에펜도르프를 민감한 전자 저울로 칭량한 다음, 각 동물의 전전두엽 피질, 선조체, 해마, 소뇌 및 피질을 각각 라벨링된 에펜도르프에 넣고 재칭량하였다; 모든 샘플은 0.1 mg 차이 이내였다. 7일 동안 60°C의 오븐에서 건조시킨 개별 뇌 샘플을 에펜도르프에 로딩한 후 건조 중량을 측정하였다. 그런 다음, 조직 수분 함량을 %H₂O = (1 - 건조 중량/습식 중량) \times 100%로 계산하였다.

[0170] **운동 활동량 평가를 위한 검사: 로타로드-엑셀러로드(RotaRod-accelerod) 검사**

[0171] 이 운동 수행 검사는 운동 협응 및 피로 저항을 평가할 수 있게 하는 운동 유발 회전 로드로 구성된다(Jones and Roberts 1968). Ugo Basile(Ugo Basile Biological Research Apparatus, 이탈리아)의 가속 로타로드 7750을 랫트에 사용하였다. 이어진 절차는 두 부분으로 구성된다. 첫 번째 부분에서, 동물을 장치에 놓고, 속도를 60초 동안 2 rpm으로 일정하게 유지시켰다. 두 번째 부분에서는, 엑셀러로드 검사 세션에서 5분 동안 랫트를 평가하였으며, 이때 회전 속도는 20 rpm에 도달할 때까지 꾸준히 증가하였다. 1시간 처리 후, 모든 군에 대한 처리 전 및 처리 후 조건에서 로드에서 떨어지기까지의 대기시간과 실제 회전 속도를 기록하였다.

[0172] **TCA 직접 방법을 이용한 혈액 중 암모니아 측정**

[0173] 논문(Clin Chim Acta. 1968 Oct;22(2) 183-86)에 기술된 방법을 사용하여 다음과 같이 혈장 암모니아 농도를 측정하였다.

[0174] **원리**

[0175] 알칼리 용액에서 암모늄 이온은 차아염소산염과 반응하여 모노클로라민을 형성한다. 페놀 및 과량의 차아염소산염의 존재 하에서, 니트로프로시드가 촉매로 사용될 때 모노클로라민은 청색 화합물인 인도페놀을 형성할 것이다. 암모늄의 농도는 630 nm에서 분광광도법으로 결정된다.

[0176] **방법**

[0177] 증류수 100 ml에 3.5 g의 페놀과 0.04 g의 니트로프로시드 나트륨을 용해시켜 시약 A를 제조한다.

[0178] 증류수 48 ml에 1.8 g의 수산화나트륨을 용해시키고, 1 M 차아염소산 나트륨 용액 4 ml를 첨가하여 시약 B를 제조한다.

[0179] 50 μ l의 각각의 혈장 샘플에 150 μ l의 5% TCA를 첨가하고, 10분 동안 4°C에서 10,000 RPM에서 원심분리한다. 50 μ l의 상층액을 취하고, 50 μ l의 두 시약 A와 B가 첨가된 96웰 플레이트에 넣는다.

[0180] 증류수에 염화암모늄을 용해시키고 연속 희석하여 400 μ mol 내지 3 μ mol 범위의 농도로 만들어 검정 곡선을 위한 표준 염화암모늄 농도를 제조하였다. 증류수를 블랭크로 사용한다. 빛으로부터 웰 플레이트를 가리고, 60분 동안 50°C에서 항온처리하였다.

- [0181] 암모니아 농도를 결정하기 위하여 분광광도계를 사용하여 630 nm에서 흡광도를 측정한다.
- [0182] **결과**
- [0183] 마우스에 대한 GS 단백질의 투여 - 간과 혈액에서의 GS 활성 수준
- [0184] 위의 재료 및 방법 섹션에 기재된 바와 같이 활성 분석을 수행하였다. 결과는 도 5a 및 도 5b에 나타내었다. 5 일째에 측정된 랫트 간에서의 결과는 GS 활성이 SHAM+GS군에서 최고임을 보여준다. 또한, 도 5a로부터 GS 및 GS+SP 처리가 BDL을 수행한 마우스의 간에서 GS 활성을 증가시키는 것을 알 수 있다. 혈액에서 측정시, 결과는 BDL+GS군에서 GS 활성이 최고임을 보여준다. 또한, 도 5b로부터, 혈액 내 GS 활성은 시간이 경과함에 따라, 심지어 투약 24시간 및 48시간 후에도 일정함을 알 수 있다.
- [0185] **마우스에 대한 GS 단백질의 투여 - BDL 랫트에서의 암모니아 농도**
- [0186] 도 6에서 보는 바와 같이, 암모니아 수준은 BDL 랫트에서 가장 높다. GS, GS+SP 및 SP로의 치료는 각각 혈액 중 암모니아 수준의 유의미한 감소를 초래하였다. GS는 2회 투여 후 암모니아 수준을 감소시켰다. GS+SP로의 처리는 암모니아 수준을 가장 유의미하게 감소시켜, 상승효과를 시사하였다.
- [0187] **마우스에 대한 GS 단백질의 투여 - BDL 랫트에서의 뇌 부종**
- [0188] 뇌 부종은 전전두엽 피질에서 측정되었다. GS로의 치료는 SP로의 치료, 그리고 심지어 SP+GC로의 치료와 비교하여 뇌 부종을 가장 유의미하게 감소시키는 것으로 나타났다(도 7). SP로의 처리는 대조군(즉, 처리되지 않은 BDL 마우스)과 비교하여 부종을 통계적으로 유의미하게 감소시키지 않았다.
- [0189] **마우스에 대한 GS 단백질의 투여 - BDL 랫트에서의 뇌와 신체 기능**
- [0190] 도 8은 로타로드 그림 검사 결과를 보여준다. 놀랍게도, GS 투여는 모든 시험한 마우스군에서 수행력을 개선시키는 것으로 밝혀졌다. SP 단독으로의 치료는 통계적으로 유의미한 영향을 초래하지 않았지만, GS+SP로의 치료는 가장 개선된 효과를 보여주어, 상승 효과를 시사한다.
- [0191] **OTC 결핍증 마우스의 치료**
- [0192] 도 9에 나타난 바와 같이, 암모니아는 처리군에서 매우 유의미하게 감소된다.
- [0193] 도 10에서, GS 또는 GS & SP로 처리된 OTC 마우스에서, 혈장 GS 활성은 비히클군에서 0.2에서 GS 단독군에서 0.8까지, 그리고 GS & SP군에서 약 1.1까지 증가한 것으로 나타났다. 간 GS 활성은 비히클군에서 약 0.175에서, GS 단독군에서 약 2.8까지, GS & SP군에서 약 2.5까지 증가하였다.
- [0194] **결과 요약**
- [0195] 요약하면, 투여된 GS는 생체적합성이며, 안전하고, 혈액 및 간 GS 활성을 향상시킨다. 또한, 암모니아 및 뇌 부종의 감소를 초래할 뿐만 아니라, 신경인지 및/또는 신체 기능을 향상시킨다. 또한, 데이터는 SP 및 GS로의 처리가 상승 효과를 가질 수 있음을 시사한다.
- [0196] **참고문헌**
- [0197] [1] Riggs A. The amino acid composition of some mammalian hemoglobins: mouse, guinea pig, and elephant. J Biol Chem 1963;238:2983-2987.
- [0198] [2] Balata S, Olde Damink SW, Ferguson K, Marshall I, Hayes PC, Deutz NE, Williams R, Wardlaw J, Jalan R. Induced hyperammonemia alters neuropsychology, brain MR spectroscopy and magnetization transfer in cirrhosis. Hepatology 2003;37:931-939.
- [0199] [3] Stewart-Wallace AM. A biochemical study of cerebral tissue, and of changes in cerebral oedema. Brain 1939; 62: 426-38.
- [0200] [4] Traber PG, Ganger DR, Blei AT. Brain edema in rabbits with galactosamine-induced fulminant hepatitis. Regional differences and effects on intracranial pressure. Gastroenterology 1986; 91: 1347-56.
- [0201] **서열:**

[0202] 서열번호 1 [전체 인간 단백질]

MTTSASSHLNKGIKQVYMSLPQGEKVQAMYIWIDGTGEGLRCKTRTLDSEP
KCVEELPEWNFDGSSTLQSEGSNSDMYLVPAAMFRDPFRKDPNKLVLCEVF
KYNRRPAETNLRHTCKRIMDMVSNQHPWFGMEQEYTLMGTDGHPFGWPS
NGFPGPQGPYYCGVGADRAYGRDIVEAHYRACLYAGVKIAGTNAEVMPAQ
WEFQIGPCEGISMGDHLWVARFILHRVCEDFGVIATFDPKPIPGNWNGAGCH
TNFSTKAMREENGLKYIEEAIEKLSKRHQYHIRAYDPKGGLDNARRLTGFHE
TSNINDFSAGVANRSASIRIPRTVGQEKKGYPEDRRPSANCDPFSVTEALIRT
CLLNETGDEPFQYKN

[0203]

[0204] 서열번호 2 (생체 내에서 성숙 단백질을 위하여 메티오닌만 절단됨):

TTSASSHLNKGIKQVYMSLPQGEKVQAMYIWIDGTGEGLRCKTRTLDSEPK
CVEELPEWNFDGSSTLQSEGSNSDMYLVPAAMFRDPFRKDPNKLVLCEVFK
YNRRPAETNLRHTCKRIMDMVSNQHPWFGMEQEYTLMGTDGHPFGWPSN
GFGPGPQGPYYCGVGADRAYGRDIVEAHYRACLYAGVKIAGTNAEVMPAQ
WEFQIGPCEGISMGDHLWVARFILHRVCEDFGVIATFDPKPIPGNWNGAGCH
TNFSTKAMREENGLKYIEEAIEKLSKRHQYHIRAYDPKGGLDNARRLTGFHE
TSNINDFSAGVANRSASIRIPRTVGQEKKGYPEDRRPSANCDPFSVTEALIRT
CLLNETGDEPFQYKN

[0205]

[0206] 서열번호 3 cDNA

CGAGAGTGGGAGAAGAGCGGAGCGTGTGAGCAGTACTGCGGCCTCCTCTCCTCTCCTAAC
CTGCTCTCGCGGCCTACCTTTACCCGCCCCGCTGCTCGGCGACCAGAACACCTTCCACCA
TGACCACCTCAGCAAGTTCCCACCTTAAATAAAGGCATCAAGCAGGTGTACATGTCCCTGC
CTCAGGGTGAGAAAGTCCAGGCCATGTATATCTGGATCGATGGTACTGGAGAAGGACTGC
GCTGCAAGACCCGACCCCTGGACAGTGAGCCCAAGTGTGTGGAAGAGTTGCCTGAGTGGA
ATTTTCGATGGCTCCAGTACTTTACAGTCTGAGGGTTCCAACAGTGACATGTATCTCGTGC
CTGCTGCCATGTTTTCGGGACCCCTTCCGTAAGGACCCTAACAAGCTGGTGTATGTGAAG
TTTTCAAGTACAATCGAAGGCCTGCAGAGACCAATTTGAGGCACACCTGTAAACGGATAA
TGGACATGGTGAGCAACCAGCACCCCTGGTTTTGGCATGGAGCAGGAGTATACCCTCATGG
GGACAGATGGGCACCCCTTTGGTTGGCCTTCCAACGGCTTCCCAGGGCCCCAGGGTCCAT
ATTACTGTGGTGTGGGAGCAGACAGAGCCTATGGCAGGGACATCGTGGAGGCCATTACC
GGGCTGCTTGTATGCTGGAGTCAAGATTGCGGGGACTAATGCCGAGGTCATGCCTGCCC
AGTGGGAATTTTCAGATTGGACCTTGTGAAGGAATCAGCATGGGAGATCATCTCTGGGTGG
CCCGTTTCATCTTGCATCGTGTGTGAAGACTTTGGAGTGATAGCAACCTTTGATCCTA
AGCCCCATTCTGGGAACCTGGAATGGTGCAGGCTGCCATACCAACTTCAGCACCAAGGCCA
TGCGGGAGGAGAAATGGTCTGAAGTACATCGAGGAGGCCATTGAGAACTAAGCAAGCGGC
ACCAGTACCACATCCGTGCCTATGATCCCCAAGGAGGCCTGGACAATGCCCGACGTCTAA
CTGGATTCCATGAAACCTCCAACATCAACGACTTTTCTGGTGGTGTAGCCAATCGTAGCG
CCAGCATACGATTTCCCGGACTGTTGGCCAGGAGAAGAAGGGTTACTTTGAAGATCGTC
GCCCCCTCTGCCAACTGCGACCCCTTTTCGGTGACAGAAGCCCTCATCCGCACGTGTCTTC
TCAATGAAACCGGCGATGAGCCCTTCCAGTACAAAAATTAAGTGGACTAGACCTCCAGCT
GTTGAGCCCCCTCCTAGTTCTTCATCCCACTCCAACCTCTTCCCCCTCTCCAGTTGTCCCG
ATTGTAACCTCAAAGGGTGGAATATCAAGGTCGTTTTTTTTTTCATTCC

[0207]

[0208] 서열번호 4: 실시예 1에서 사용된, 박테리아에서 성장시킨 GS 단백질

MGSSHHHHHHGGGGSMTTSASSHLNKGIKQVYMSLPQGEKVQAMYIWIDG
TGEGLRCKTRTLDSEPKCVEELPEWNFDGSSTLQSEGSNSDMYLVPAAMFR
DPFRKDPNKLVLCEVFKYNRRPAETNLRHTCKRIMDMVSNQHPWFGMEQE
YTLMGTDGHPFGWPSNGFPGPQGPYYCGVGADRAYGRDIVEAHYRACLYA
GVKIAGTNAEVMPAQWEFQIGPCEGISMGDHLWVARFILHRVCEDFGVIAT
FDPKPIPGNWNGAGCHTNFSTKAMREENGLKYIEEAIEKLSKRHQYHIRAYD
PKGGLDNARRLTGFHETSNINDFSAGVANRSASIRIPRTVGQEKKGYPEDRR
PSANCDPFSVTEALIRTCLLNETGDEPFQYKN

[0209]

[0210] 서열번호 5 cDNA (실시예 1에서 사용된 박테리아 최적화된 cDNA).

ATGGGCAGCAGCCACCACCATCACCACCACGGCGGGCGGCGGTAGCATGA
CCACCTCGGCAAGCAGCCACCTGAATAAAGGCATCAAACAGGTGTATAT
GTCTCTGCCGCAGGGTGAAAAAGTTCAAGCCATGTACATTTGGATCGAT
GGCACCGGTGAAGGCCTGCGTTGCAAAACCCGCACGCTGGACTCAGAAC
CGAAATGTGTGGAAGAACTGCCGGAATGGAACTTTGATGGTAGCTCTAC
GCTGCAGTCGGAAGGCAGTAATTCCGACATGTATCTGGTTCCGGCGGCC
ATGTTTTCTGTGATCCGTTCCGCAAAGACCCGAACAACTGGTGCTGTGCG
AAGTTTTTAAATACAACCGTCGCCCCGGCGGAAACCAATCTGCGTCATAC
GTGTAAACGCATTATGGATATGGTCAGCAACCAGCACCCGTGGTTCCGGT
ATGGAACAAGAATATACCTGATGGGTACGGATGGCCATCCGTTTGGTT
GGCCGAGCAATGGTTTCCCGGGTCCGCAGGGTCCGTATTACTGCGGTGTG
GGCGCAGATCGTGCTTACGGTCGCGACATTGTGGAAGCACACTATCGTG
CTTGTCTGTACGCGGGTGTTAAAATCGCCGGCACCAATGCAGAAGTCAT
GCCGGCTCAGTGGAATTTCAAATTGGCCCGTGCGAAGGTATCAGCATG
GGCGATCATCTGTGGGTGTGCTCGTTTCATCCTGCACCGCGTCTGTGAAGA
TTTTGGTGTGATTGCGACCTTCGACCCGAAACCGATCCCGGGCAACTGGA
ATGGTGCTGGGTGCCATACCAACTTTAGCACGAAAGCGATGCGTGAAGA
AAATGGCCTGAAATACATCGAAGAAGCAATCGAAAAACTGTCTAAACGT
CATCAGTATCACATTTCGCGCCTACGATCCGAAAGGCGGTCTGGACAACG
CACGTCGCCTGACCGGTTTTACGAAACGAGCAACATCAATGATTTCTCT
GCGGGCGTTGCCAATCGCTCAGCCTCGATTTCGTATCCCGCGCACCGTCGG
TCAAGAGAAAAAAGGCTATTTTGAAGATCGTCGCCCCGAGTGCAAACGTG
GACCCGTTCTCCGTGACGGAAGCCCTGATCCGCACCTGTCTGCTGAATGA
AACCGGCGATGAACCGTTCCAATACAAAAAT

[0211]

[0212] 서열번호 6 [락토바실루스 애시도필루스 균주 30SC GS1]

[0213] >tr|F0TG87|F0TG87_LACA3 글루타민 합성효소 OS=락토바실루스 애시도필루스(균주 30SC)

MSKQYTTEEIRKEVADKDVRLRLCFTDINGTEKAVEVPTSQLDKVLTNDIR
FDGSSIDGFVRLSESDMVLYPDFSTWSVLPWGDEHGGKIGRLICSVHMTDG
KPFAGDPRNKLKRVLGEMKEAGFDTFDIGFEMEFHLFKLDENGNTTEVPD
HASYFDMTSDDEGARCRREIVETLEEIGFEVEAAHHEVGDGQQEIDFRFDDA
LTTADRCQTFKMVARHIARKHGLFATFMAKPVEGQAGNGMHNNMSLFKN
KHNVFYDKDGEFHLNNTALYFLNGILEHARAITAIGNPTVNSYKRLIPGFEAP
VYIAWAAKNRSPLVRIPSAGEINTRLEMRSADPTANPYLLLAACLTAGLKGI
KEQKMPMKPVEENIFEMTEEERAHEHGIKPLPTTLHNAIKAFKEDDLIKSALG
EHLTHSFIESKELEWSKYSQSVSDWERQRYMNW

[0214]

[0215] 서열번호 7 [Zea Mays GS](옥수수 GS)

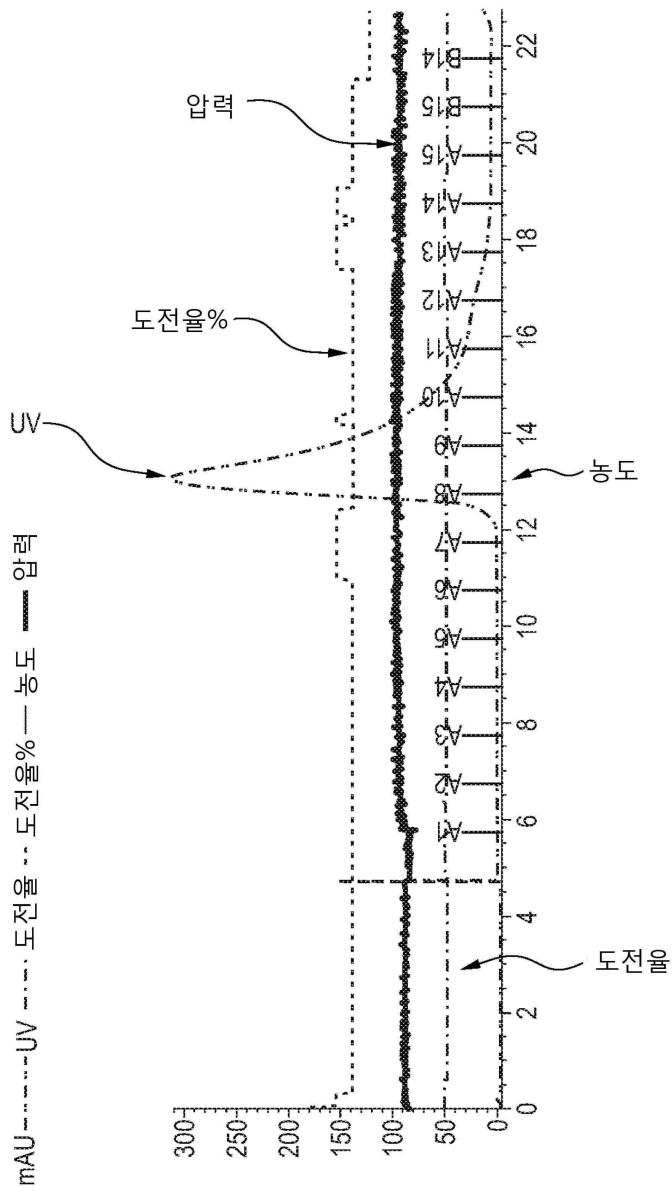
[0216] >tr|B4G1P1|B4G1P1_MAIZE 글루타민 합성효소

MACLTDLVNLNLSDNTEKIIAEYIWIGSGMDLRSKARTLSGPVTDPSKLPK
WNYDGSSTGQAPGEDSEVILYPQAIKDPFRRGNILVMCDCYTPAGEPIPT
NKRYNAAKIFSSPEVAAEEPWYGIEQEYTLQKDTNWPLGWPIGGFPGPQG
PYYCGIGAEEKSFRDIVDAHYKACLYAGINISGINGEVMPGQWEFQVGPSV
GISSGDQVWVARYILERITEIAGVVVTFDPKPIPGDWNGAGAHTNYSTESMR
KEGGYEVIIKAAIEKLKLHREHIAAYGEGNERRLTGRHETADINTFSWGVA
NRGASVRVGRETEQNGKGYFEDRRPASNMDPYVVTSMIAETTHWKP

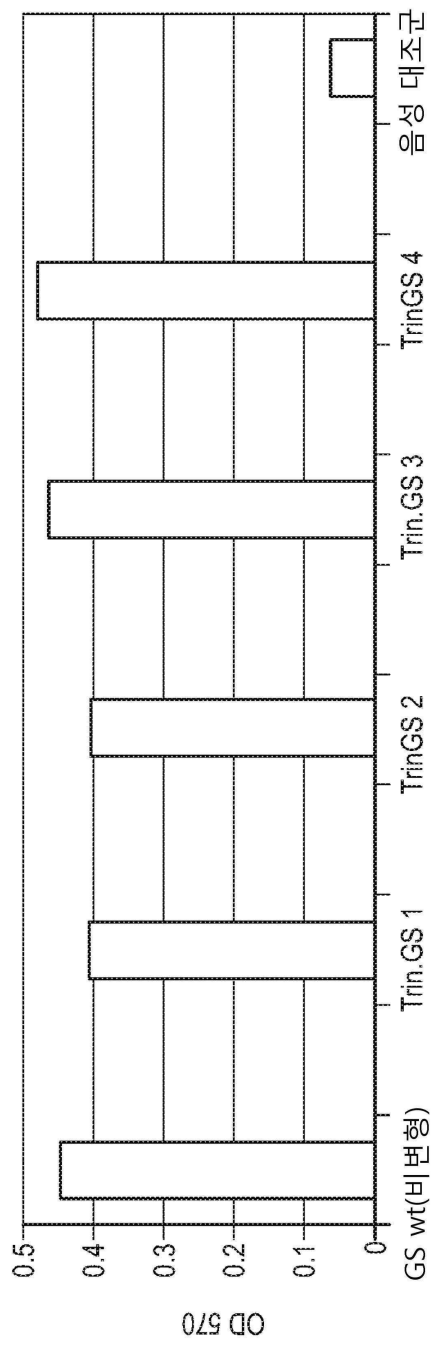
[0217]

도면

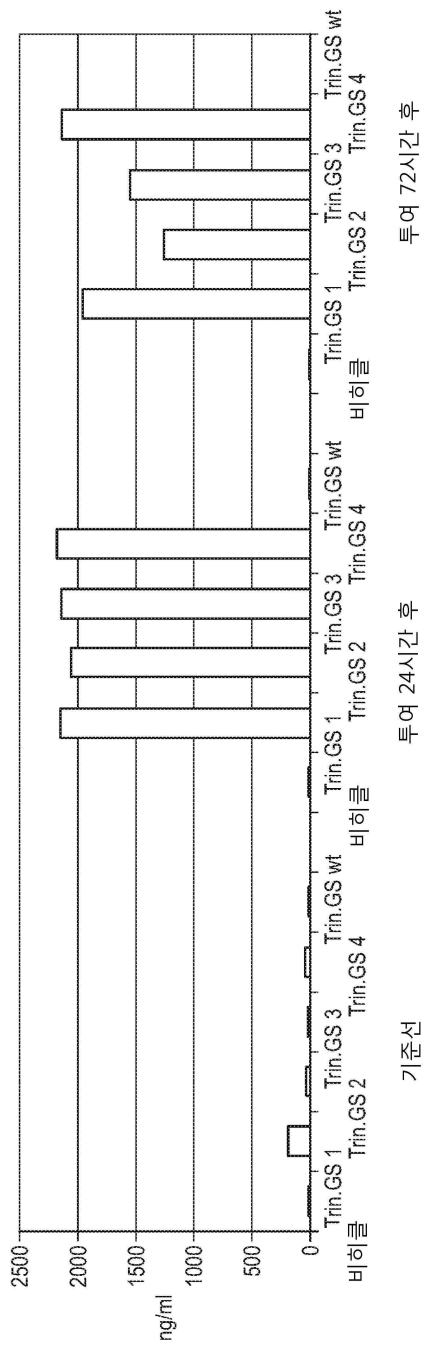
도면1



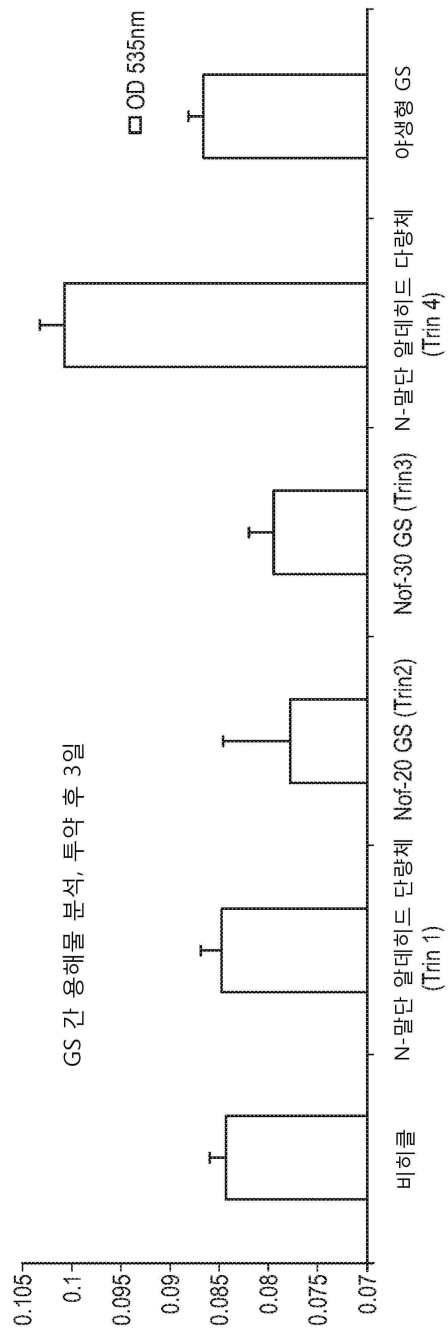
도면2



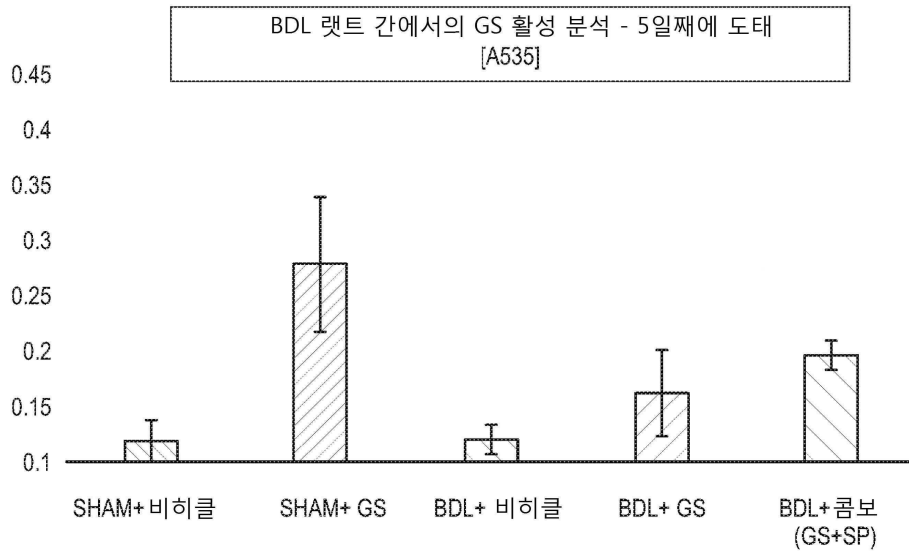
도면3



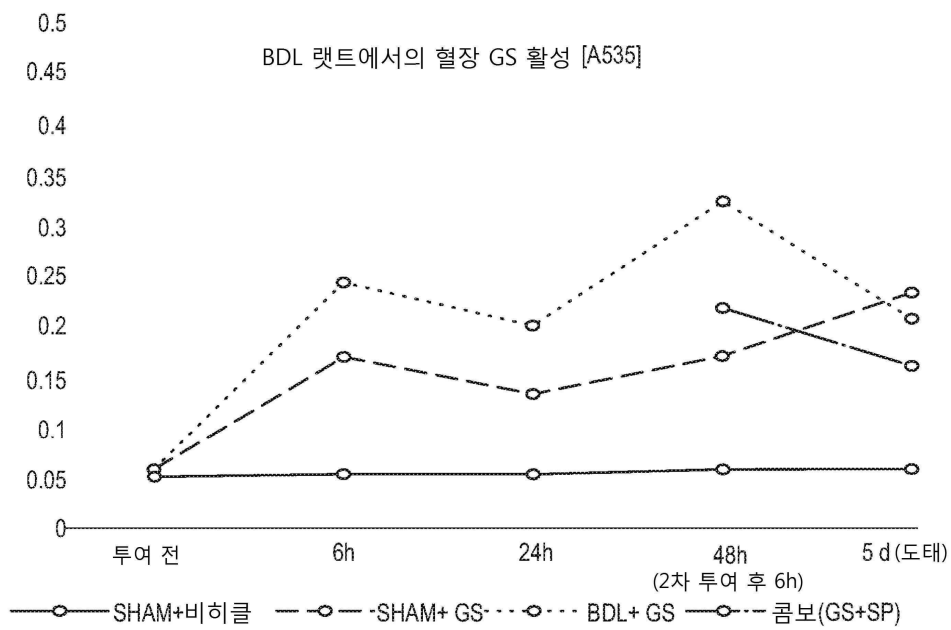
도면4



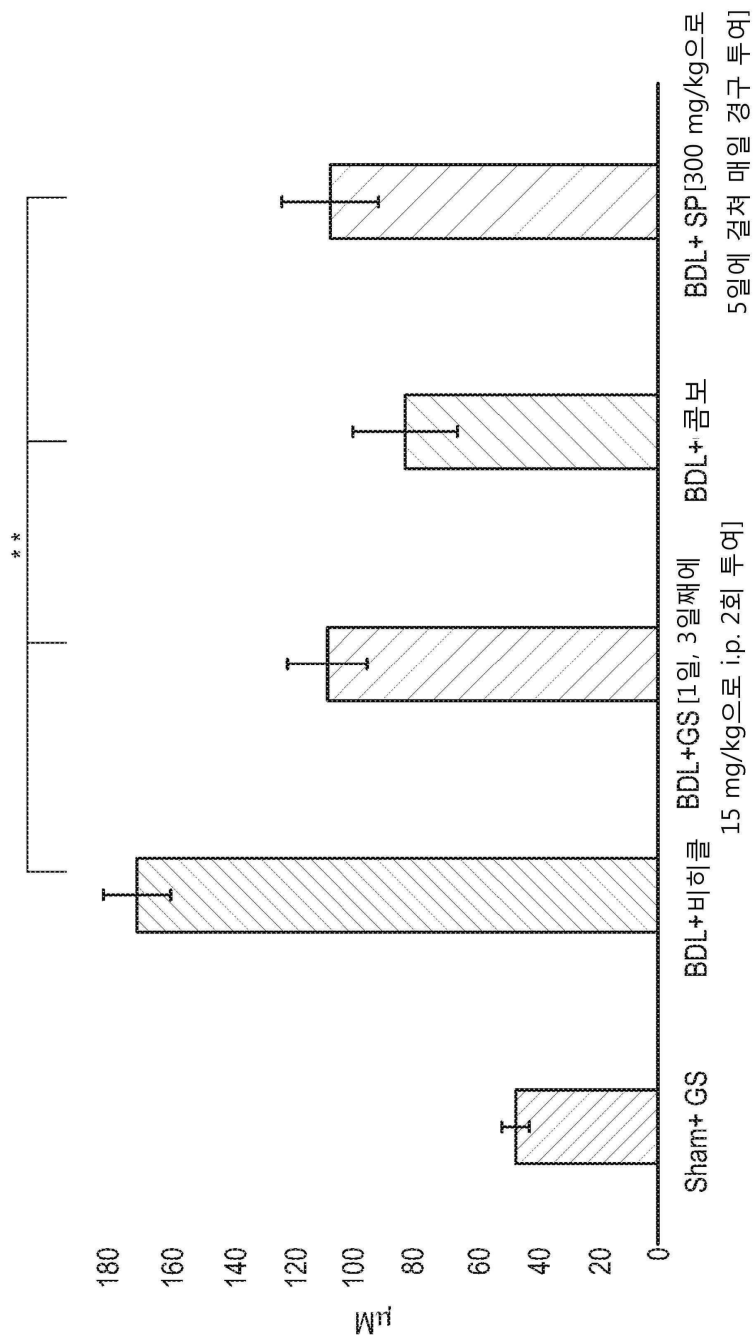
도면5a



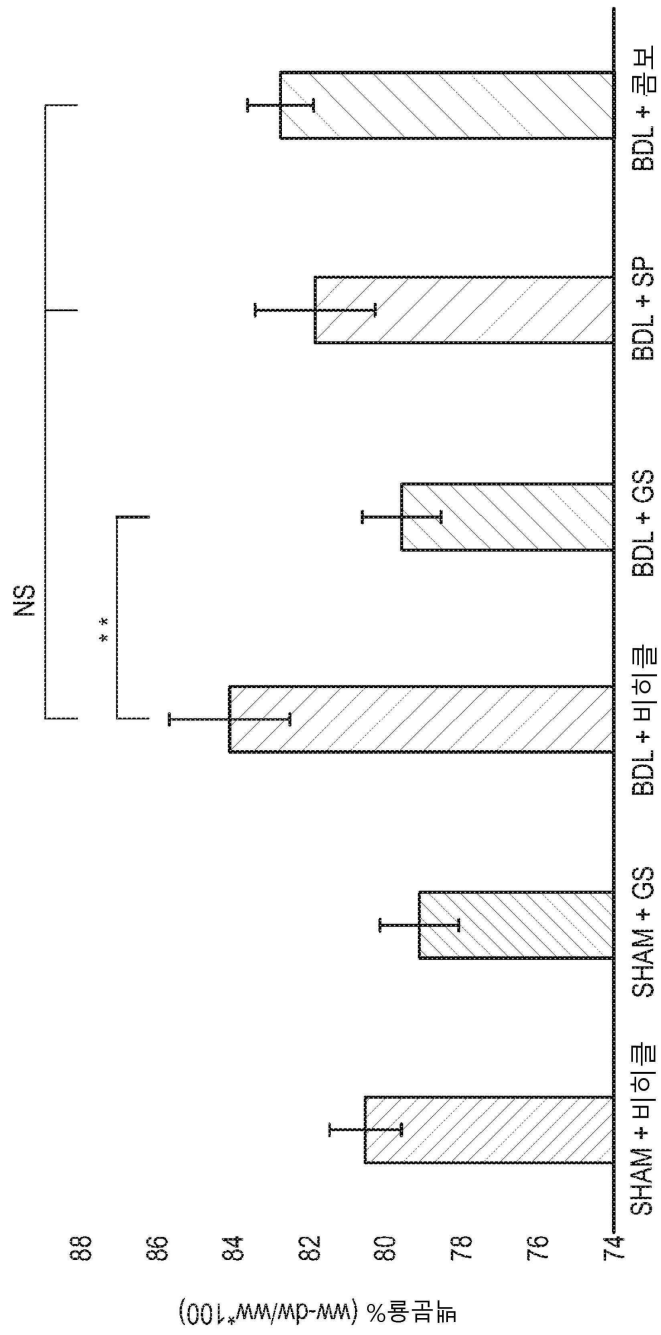
도면5b



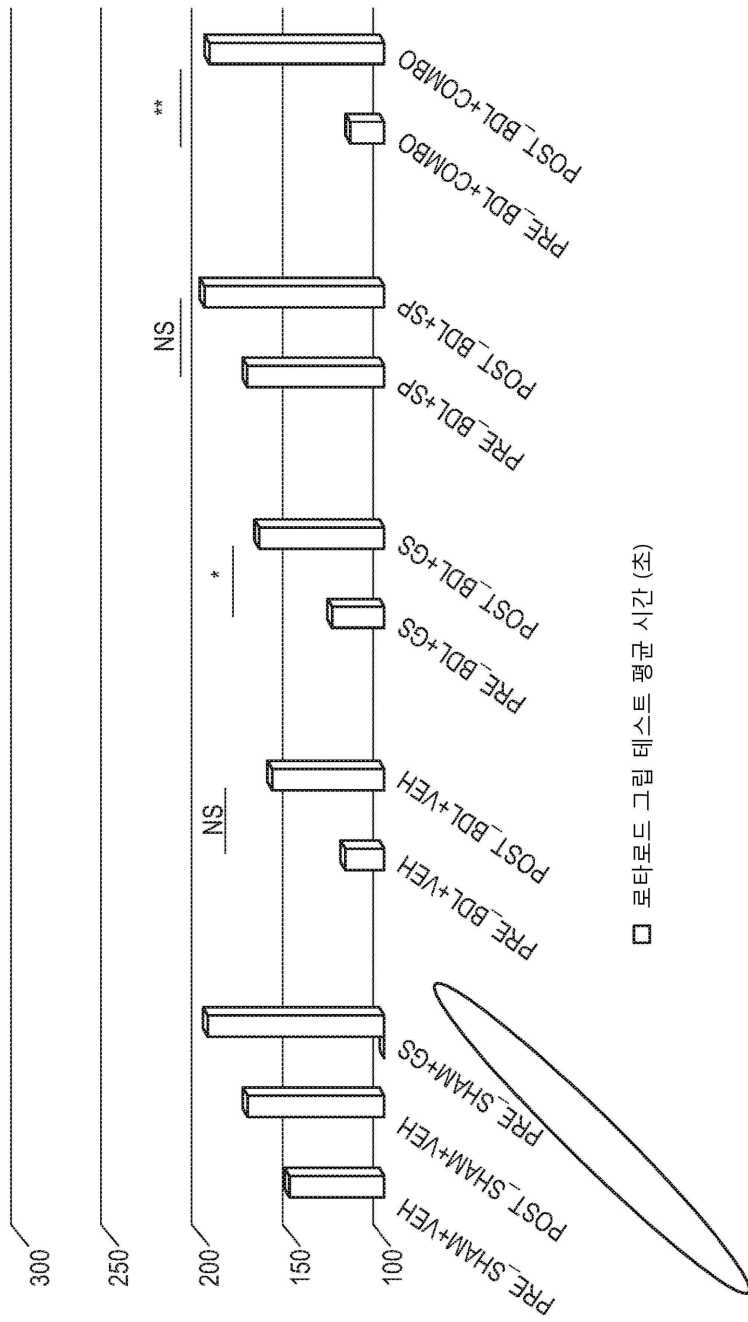
도면6



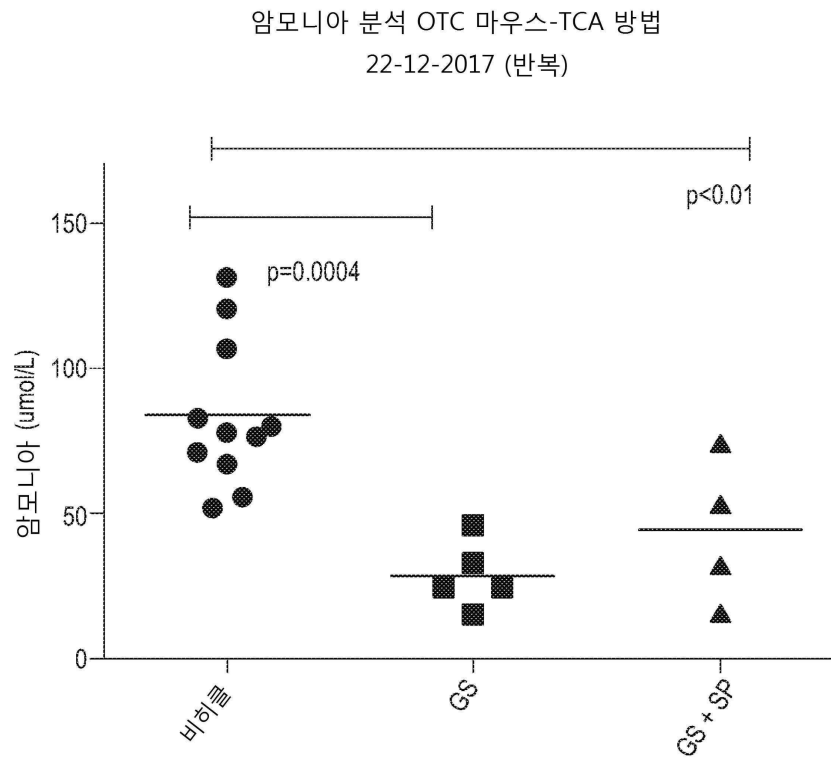
도면7



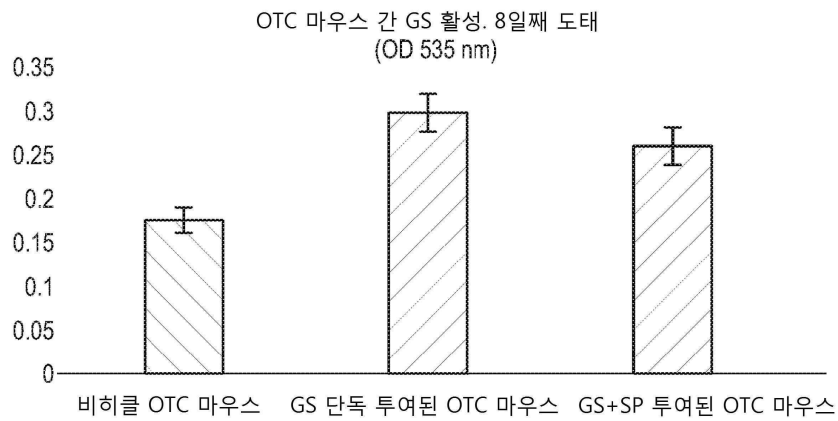
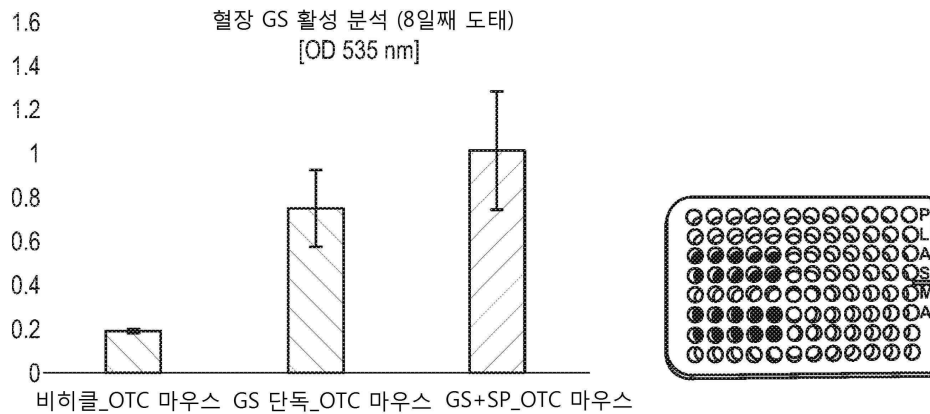
도면8



도면9



도면10



서열 목록

SEQUENCE LISTING

<110> Ammun Limited

<120> Use of glutamine synthetase for treating hyperammonemia

<130> P19-120-INP-HGF

<140> GB 1800867.2

<141> 2018-01-19

<160> 7

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 373

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

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

1 5 10 15

Tyr Met Ser Leu Pro Gln Gly Glu Lys Val Gln Ala Met Tyr Ile Trp

20 25 30

Ile Asp Gly Thr Gly Glu Gly Leu Arg Cys Lys Thr Arg Thr Leu Asp

35 40 45

Ser Glu Pro Lys Cys Val Glu Glu Leu Pro Glu Trp Asn Phe Asp Gly

50 55 60

Ser Ser Thr Leu Gln Ser Glu Gly Ser Asn Ser Asp Met Tyr Leu Val

65 70 75 80

Pro Ala Ala Met Phe Arg Asp Pro Phe Arg Lys Asp Pro Asn Lys Leu

85 90 95

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

100 105 110

Leu Arg His Thr Cys Lys Arg Ile Met Asp Met Val Ser Asn Gln His

115 120 125

Pro Trp Phe Gly Met Glu Gln Glu Tyr Thr Leu Met Gly Thr Asp Gly

130 135 140

His Pro Phe Gly Trp Pro Ser Asn Gly Phe Pro Gly Pro Gln Gly Pro

145 150 155 160

Tyr Tyr Cys Gly Val Gly Ala Asp Arg Ala Tyr Gly Arg Asp Ile Val

165 170 175

Glu Ala His Tyr Arg Ala Cys Leu Tyr Ala Gly Val Lys Ile Ala Gly

180 185 190

Thr Asn Ala Glu Val Met Pro Ala Gln Trp Glu Phe Gln Ile Gly Pro

195 200 205

Cys Glu Gly Ile Ser Met Gly Asp His Leu Trp Val Ala Arg Phe Ile

210 215 220

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

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

Glu Ala Leu Ile Arg Thr Cys Leu Leu Asn Glu Thr Gly Asp Glu Pro
 355 360 365
 Phe Gln Tyr Lys Asn
 370

<210> 2

<211> 372

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

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

Asp Gly Thr Gly Glu Gly Leu Arg Cys Lys Thr Arg Thr Leu Asp Ser
 35 40 45
 Glu Pro Lys Cys Val Glu Glu Leu Pro Glu Trp Asn Phe Asp Gly Ser

50 55 60
 Ser Thr Leu Gln Ser Glu Gly Ser Asn Ser Asp Met Tyr Leu Val Pro
 65 70 75 80
 Ala Ala Met Phe Arg Asp Pro Phe Arg Lys Asp Pro Asn Lys Leu Val
 85 90 95

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

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

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

 Pro Lys Gly Gly Leu Asp Asn Ala Arg Arg Leu Thr Gly Phe His Glu
 290 295 300

Thr Ser Asn Ile Asn Asp Phe Ser Ala Gly Val Ala Asn Arg Ser Ala
 305 310 315 320
 Ser Ile Arg Ile Pro Arg Thr Val Gly Gln Glu Lys Lys Gly Tyr Phe
 325 330 335
 Glu Asp Arg Arg Pro Ser Ala Asn Cys Asp Pro Phe Ser Val Thr Glu
 340 345 350

Ala Leu Ile Arg Thr Cys Leu Leu Asn Glu Thr Gly Asp Glu Pro Phe
 355 360 365
 Gln Tyr Lys Asn
 370

<210> 3

<211> 1366

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 3

cgagagtggg agaagagcgg agcgtgtgag cagtactgcg gcctcctctc ctctcctaac	60
ctgctctcgc ggcttacctt taccgcccgc cctgctcggc gaccagaaca cttccacca	120
tgaccacctc agcaagtcc cacttaaata aaggcatcaa gcaggtgtac atgtccctgc	180
ctcaggtga gaaagtccag gccatgtata tctggatcga tggtagtga gaaggactgc	240
gctgcaagac ccggaccctg gacagtgagc ccaagtgtgt ggaagagttg cctgagtga	300
atttcgatgg ctccagtact ttacagtctg aggggttcaa cagtacatg tatctcgtgc	360
ctgctgccat gtttcgggac cccctccgta aggaccctaa caagctggtg ttatgtgaag	420
ttttcaagta caatcgaagg cctgcagaga ccaatttgag gcacacctgt aaacggataa	480
tggacatggt gagcaaccag caccctggt ttggcatgga gcaggagtat accctcatgg	540
ggacagatgg gcaccccttt gggtggcctt ccaacggctt cccagggccc cagggtccat	600
attactgtgg tgtgggagca gacagagcct atggcaggga catcgtggag gccattacc	660
gggcctgctt gtatgctgga gtcaagattg cggggactaa tgccgaggtc atgctgccc	720
agtgggaatt tcagattgga ctttgtgaag gaatcagcat gggagatcat ctctgggtgg	780
cccgtttcat ctgcatcgt gtgtgtgaag actttggagt gatagcaacc ttgatccta	840
agccattcc tgggaactgg aatggtgcag gctgccatac caacttcagc accaaggcca	900
tgcgggagga gaatggtctg aagtacatcg aggaggccat tgagaaacta agcaagcggc	960
accagtacca catccgtgcc tatgatcca agggaggcct ggacaatgcc cgacgtctaa	1020

ctggattcca tgaaacctcc aacatcaacg acttttctgg tgggttagcc aatcgtagcg 1080

ccagcatagc cattccccgg actgttggcc aggagaagaa gggttacttt gaagatcgtc 1140

gccccctctgc caactgcgac cccctttcgg tgacagaagc cctcatccgc acgtgtcttc 1200

tcaatgaaac cggcgatgag cccctccagt acaaaaatta agtggactag acctccagct 1260

gttgagcccc tctagtctct tcatccact ccaactcttc cccctctccc agttgtcccg 1320

attgtaacte aaaggtgga atatcaaggt cgtttttttt cattcc 1366

<210> 4

<211> 388

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Modified human GS protein

<400> 4

Met Gly Ser Ser His His His His His His Gly Gly Gly Gly Ser Met

1 5 10 15

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

20 25 30

Met Ser Leu Pro Gln Gly Glu Lys Val Gln Ala Met Tyr Ile Trp Ile

35 40 45

Asp Gly Thr Gly Glu Gly Leu Arg Cys Lys Thr Arg Thr Leu Asp Ser

50 55 60

Glu Pro Lys Cys Val Glu Glu Leu Pro Glu Trp Asn Phe Asp Gly Ser

65 70 75 80

Ser Thr Leu Gln Ser Glu Gly Ser Asn Ser Asp Met Tyr Leu Val Pro

85 90 95

Ala Ala Met Phe Arg Asp Pro Phe Arg Lys Asp Pro Asn Lys Leu Val

100 105 110

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

115 120 125

Arg His Thr Cys Lys Arg Ile Met Asp Met Val Ser Asn Gln His Pro

130 135 140

Trp Phe Gly Met Glu Gln Glu Tyr Thr Leu Met Gly Thr Asp Gly His

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

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

 260 265 270
 Thr Lys Ala Met Arg Glu Glu Asn Gly Leu Lys Tyr Ile Glu Glu Ala
 275 280 285
 Ile Glu Lys Leu Ser Lys Arg His Gln Tyr His Ile Arg Ala Tyr Asp
 290 295 300
 Pro Lys Gly Gly Leu Asp Asn Ala Arg Arg Leu Thr Gly Phe His Glu
 305 310 315 320
 Thr Ser Asn Ile Asn Asp Phe Ser Ala Gly Val Ala Asn Arg Ser Ala

 325 330 335
 Ser Ile Arg Ile Pro Arg Thr Val Gly Gln Glu Lys Lys Gly Tyr Phe
 340 345 350
 Glu Asp Arg Arg Pro Ser Ala Asn Cys Asp Pro Phe Ser Val Thr Glu
 355 360 365
 Ala Leu Ile Arg Thr Cys Leu Leu Asn Glu Thr Gly Asp Glu Pro Phe
 370 375 380
 Gln Tyr Lys Asn
 385

<210> 5

<211> 1164

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> pET30a+ vector, containing the gene for human GS

<400> 5

```

atgggcagca gccaccacca tcaccaccac ggccggcggcg gtagcatgac cacctcggca      60
agcagccacc tgaataaagg catcaaacag gtgtatatgt ctctgccga gggtagaaaa      120
gttcaagcca tgiacatttg gatcgatggc accggtgaag gcctgcgttg caaaacccgc      180
acgctggact cagaaccgaa atgtgtggaa gaactgccgg aatggaactt tgatggtagc      240
tctacgtgc agtcggaagg cagtaattcc gacatgtatc tggttccggc ggccatgttt      300

cgtgatccgt tccgcaaaga cccgaacaaa ctggtgctgt gcgaagtttt taaatacaac      360
cgtcgcccgg cggaaccaa tctgcgtcat acgtgtaaac gcattatgga tatggtcagc      420
aaccagcacc cgtggttcgg tatggaacaa gaatatacce tgatgggtac ggatggccat      480
ccgtttgggt ggccgagcaa tggtttcccg ggtccgcagg gtccgtatta ctgcggtgtc      540
ggcgcagatc gtgcttacgg tcgcgacatt gtggaagcac actatcgtgc ttgtctgtac      600
gcgggtgtta aaatcgccgg caccaatgca gaagtcatgc cggtcagtg ggaatttcaa      660
attggcccgt gcgaaggtat cagcatgggc gatcatctgt gggttgctcg tttcatcctg      720

caccgcgtct gtgaagattt tgggtgtgatt gcgaccttcg acccgaaacc gatcccgggc      780
aactggaatg gtgctggctg ccataccaac tttagcacga aagcgatgcg tgaagaaaat      840
ggcctgaaat acatcgaaga agcaatcgaa aaactgtcta aacgcatca gtatcacatt      900
cgcgctacg atccgaaagg cggctcggac aacgcacgtc gcctgaccgg ttttcacgaa      960
acgagcaaca tcaatgattt ctctcggggc gttgccaatc gtcagcctc gattcgtatc     1020
ccgcgcaccg tcggtcaaga gaaaaaaggc tattttgaag atcgtcgccc gagtgc aaac     1080
tgtgaccgt tctccgtgac ggaagccctg atccgcacct gtctgctgaa tgaaaccggc     1140

gatgaaccgt tccaatacaa aaat                                             1164

```

<210> 6

<211> 445

<212> PRT

<213> Lactobacillus acidophilus

<400> 6

Met Ser Lys Gln Tyr Thr Thr Glu Glu Ile Arg Lys Glu Val Ala Asp
1 5 10 15
Lys Asp Val Arg Phe Leu Arg Leu Cys Phe Thr Asp Ile Asn Gly Thr
20 25 30
Glu Lys Ala Val Glu Val Pro Thr Ser Gln Leu Asp Lys Val Leu Thr
35 40 45
Asn Asp Ile Arg Phe Asp Gly Ser Ser Ile Asp Gly Phe Val Arg Leu
50 55 60
Glu Glu Ser Asp Met Val Leu Tyr Pro Asp Phe Ser Thr Trp Ser Val
65 70 75 80
Leu Pro Trp Gly Asp Glu His Gly Gly Lys Ile Gly Arg Leu Ile Cys
85 90 95
Ser Val His Met Thr Asp Gly Lys Pro Phe Ala Gly Asp Pro Arg Asn
100 105 110
Asn Leu Lys Arg Val Leu Gly Glu Met Lys Glu Ala Gly Phe Asp Thr
115 120 125
Phe Asp Ile Gly Phe Glu Met Glu Phe His Leu Phe Lys Leu Asp Glu
130 135 140
Asn Gly Asn Trp Thr Thr Glu Val Pro Asp His Ala Ser Tyr Phe Asp
145 150 155 160
Met Thr Ser Asp Asp Glu Gly Ala Arg Cys Arg Arg Glu Ile Val Glu
165 170 175
Thr Leu Glu Glu Ile Gly Phe Glu Val Glu Ala Ala His His Glu Val
180 185 190
Gly Asp Gly Gln Gln Glu Ile Asp Phe Arg Phe Asp Asp Ala Leu Thr
195 200 205
Thr Ala Asp Arg Cys Gln Thr Phe Lys Met Val Ala Arg His Ile Ala
210 215 220
Arg Lys His Gly Leu Phe Ala Thr Phe Met Ala Lys Pro Val Glu Gly
225 230 235 240
Gln Ala Gly Asn Gly Met His Asn Asn Met Ser Leu Phe Lys Asn Lys

245 250 255
 His Asn Val Phe Tyr Asp Lys Asp Gly Glu Phe His Leu Ser Asn Thr
 260 265 270
 Ala Leu Tyr Phe Leu Asn Gly Ile Leu Glu His Ala Arg Ala Ile Thr
 275 280 285
 Ala Ile Gly Asn Pro Thr Val Asn Ser Tyr Lys Arg Leu Ile Pro Gly
 290 295 300

 Phe Glu Ala Pro Val Tyr Ile Ala Trp Ala Ala Lys Asn Arg Ser Pro
 305 310 315 320
 Leu Val Arg Ile Pro Ser Ala Gly Glu Ile Asn Thr Arg Leu Glu Met
 325 330 335
 Arg Ser Ala Asp Pro Thr Ala Asn Pro Tyr Leu Leu Leu Ala Ala Cys
 340 345 350
 Leu Thr Ala Gly Leu Lys Gly Ile Lys Glu Gln Lys Met Pro Met Lys
 355 360 365

 Pro Val Glu Glu Asn Ile Phe Glu Met Thr Glu Glu Glu Arg Ala Glu
 370 375 380
 His Gly Ile Lys Pro Leu Pro Thr Thr Leu His Asn Ala Ile Lys Ala
 385 390 395 400
 Phe Lys Glu Asp Asp Leu Ile Lys Ser Ala Leu Gly Glu His Leu Thr
 405 410 415
 His Ser Phe Ile Glu Ser Lys Glu Leu Glu Trp Ser Lys Tyr Ser Gln
 420 425 430

 Ser Val Ser Asp Trp Glu Arg Gln Arg Tyr Met Asn Trp
 435 440 445

 <210> 7
 <211> 356
 <212> PRT
 <213> Zea mays
 <400> 7
 Met Ala Cys Leu Thr Asp Leu Val Asn Leu Asn Leu Ser Asp Asn Thr
 1 5 10 15

Glu Lys Ile Ile Ala Glu Tyr Ile Trp Ile Gly Gly Ser Gly Met Asp
 20 25 30
 Leu Arg Ser Lys Ala Arg Thr Leu Ser Gly Pro Val Thr Asp Pro Ser
 35 40 45

 Lys Leu Pro Lys Trp Asn Tyr Asp Gly Ser Ser Thr Gly Gln Ala Pro
 50 55 60
 Gly Glu Asp Ser Glu Val Ile Leu Tyr Pro Gln Ala Ile Phe Lys Asp
 65 70 75 80
 Pro Phe Arg Arg Gly Asn Asn Ile Leu Val Met Cys Asp Cys Tyr Thr
 85 90 95
 Pro Ala Gly Glu Pro Ile Pro Thr Asn Lys Arg Tyr Asn Ala Ala Lys
 100 105 110

 Ile Phe Ser Ser Pro Glu Val Ala Ala Glu Glu Pro Trp Tyr Gly Ile
 115 120 125
 Glu Gln Glu Tyr Thr Leu Leu Gln Lys Asp Thr Asn Trp Pro Leu Gly
 130 135 140
 Trp Pro Ile Gly Gly Phe Pro Gly Pro Gln Gly Pro Tyr Tyr Cys Gly
 145 150 155 160
 Ile Gly Ala Glu Lys Ser Phe Gly Arg Asp Ile Val Asp Ala His Tyr
 165 170 175

 Lys Ala Cys Leu Tyr Ala Gly Ile Asn Ile Ser Gly Ile Asn Gly Glu
 180 185 190
 Val Met Pro Gly Gln Trp Glu Phe Gln Val Gly Pro Ser Val Gly Ile
 195 200 205
 Ser Ser Gly Asp Gln Val Trp Val Ala Arg Tyr Ile Leu Glu Arg Ile
 210 215 220
 Thr Glu Ile Ala Gly Val Val Val Thr Phe Asp Pro Lys Pro Ile Pro
 225 230 235 240

 Gly Asp Trp Asn Gly Ala Gly Ala His Thr Asn Tyr Ser Thr Glu Ser
 245 250 255
 Met Arg Lys Glu Gly Gly Tyr Glu Val Ile Lys Ala Ala Ile Glu Lys

260 265 270
 Leu Lys Leu Arg His Arg Glu His Ile Ala Ala Tyr Gly Glu Gly Asn
 275 280 285
 Glu Arg Arg Leu Thr Gly Arg His Glu Thr Ala Asp Ile Asn Thr Phe
 290 295 300

 Ser Trp Gly Val Ala Asn Arg Gly Ala Ser Val Arg Val Gly Arg Glu
 305 310 315 320
 Thr Glu Gln Asn Gly Lys Gly Tyr Phe Glu Asp Arg Arg Pro Ala Ser
 325 330 335
 Asn Met Asp Pro Tyr Val Val Thr Ser Met Ile Ala Glu Thr Thr Ile
 340 345 350
 Ile Trp Lys Pro
 355