



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2017-0132293
(43) 공개일자 2017년12월01일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 9/10 (2006.01) A61K 38/45 (2006.01)
C07K 1/16 (2006.01) C07K 1/18 (2006.01)
C07K 1/30 (2006.01) C07K 1/36 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12N 9/1096 (2013.01)
A61K 38/45 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2017-7031382
(22) 출원일자(국제) 2016년03월31일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2017년10월30일
(86) 국제출원번호 PCT/IL2016/050346
(87) 국제공개번호 WO 2016/157190
국제공개일자 2016년10월06일
(30) 우선권주장
62/140,492 2015년03월31일 미국(US)

(71) 출원인
예다 리서치 앤드 디벨롭먼트 캄파니 리미티드
이스라엘 레호보트 7610002 피오 박스 95 앳 더
웨이즈만 인스티튜트 오브 사이언스
(72) 발명자
미렐만, 데이비드
이스라엘 라마트-에팔 5296000 하더프 스트리트 5
라빈코프, 아론
이스라엘 레호보트 7610002 피오 박스 95 앳 더
웨이즈만 인스티튜트 오브 사이언스 예다 리서치
앤드 디벨롭먼트 캄파니 리미티드 내
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
특허법인다나

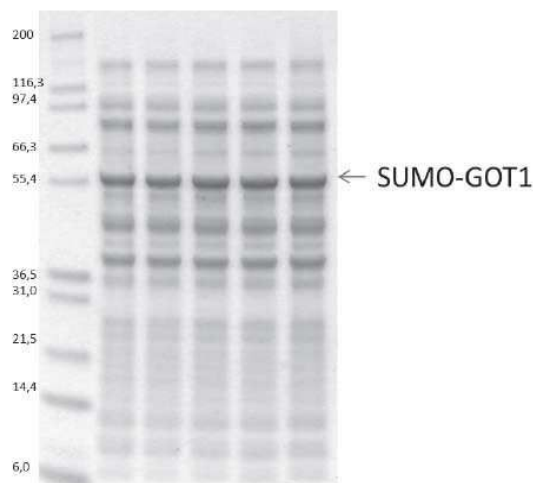
전체 청구항 수 : 총 36 항

(54) 발명의 명칭 글루타메이트 옥살로아세테이트 트랜스아미나제 1 (GOT1) 제제와 이의 제조방법 및 용도

(57) 요약

글루타메이트 옥살로아세테이트 트랜스아미나제 1(GOT1) 폴리펩타이드 분자를 포함하는 단백질 제제가 개시되어 있으며, 상기 GOT1은 그 서열이 사람의 혈청에 존재하는 것과 동일하다. 상기 제제 내 GOT1 폴리펩타이드 분자의 100%는 GOT1 폴리펩타이드의 1번 위치에 알라닌을 갖는다. GOT1 폴리펩타이드 분자는 상기 제제 내 단백질의 95% 이상을 구성한다. 이의 생성 방법 및 용도가 또한 개시된다.

대표도 - 도3



(52) CPC특허분류

C07K 1/165 (2013.01)

C07K 1/18 (2013.01)

C07K 1/303 (2013.01)

C07K 1/36 (2013.01)

C12Y 206/01001 (2013.01)

(72) 발명자

루반, 안젤라

이스라엘 레호보트 7610002 피오 박스 95 앳 더 웨
이즈만 인스티튜트 오브 사이언스 예다 리서치 앤
드 디벨롭먼트 캄파니 리미티드 내

요나, 길

이스라엘 레호보트 7610002 피오 박스 95 앳 더 웨
이즈만 인스티튜트 오브 사이언스 예다 리서치 앤
드 디벨롭먼트 캄파니 리미티드 내

하쭈, 엘리

이스라엘 레호보트 7610002 피오 박스 95 앳 더 웨
이즈만 인스티튜트 오브 사이언스 예다 리서치 앤
드 디벨롭먼트 캄파니 리미티드 내

부멜리스, 블라다스

이스라엘 레호보트 7610002 피오 박스 95 앳 더 웨
이즈만 인스티튜트 오브 사이언스 예다 리서치 앤
드 디벨롭먼트 캄파니 리미티드 내

마카우스카스, 네리저스

이스라엘 레호보트 7610002 피오 박스 95 앳 더 웨
이즈만 인스티튜트 오브 사이언스 예다 리서치 앤
드 디벨롭먼트 캄파니 리미티드 내

수드지우비엔느, 사울레

이스라엘 레호보트 7610002 피오 박스 95 앳 더 웨
이즈만 인스티튜트 오브 사이언스 예다 리서치 앤
드 디벨롭먼트 캄파니 리미티드 내

나르몬데이트, 엘레나

이스라엘 레호보트 7610002 피오 박스 95 앳 더 웨
이즈만 인스티튜트 오브 사이언스 예다 리서치 앤
드 디벨롭먼트 캄파니 리미티드 내

명세서

청구범위

청구항 1

글루타메이트 옥살로아세테이트 트랜스아미나제 1(GOT1) 폴리펩타이드 분자를 포함하는 단백질 제제로서, GOT1 폴리펩타이드 분자의 100%가 GOT1 폴리펩타이드의 1번 위치에 알라닌을 갖고, GOT1 폴리펩타이드 분자가 상기 제제 내 단백질의 적어도 95% 이상을 구성하는, 단백질 제제.

청구항 2

제 1 항에 있어서,

상기 단백질은 상기 제제 내 분자의 적어도 98% 이상을 구성하는 단백질 제제.

청구항 3

제 1 항 또는 제 2 항의 단백질 제제를 활성제 및 약제학적으로 허용 가능한 담체로 포함하는 약제학적 조성물.

청구항 4

제 1 항 또는 제 3 항에 있어서,

상기 GOT1은 서열번호 2와 적어도 90% 이상의 상동성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 것인 제제 또는 약제학적 조성물.

청구항 5

제 1 항 또는 제 3 항에 있어서,

상기 GOT1은 서열번호 2에 기재된 바와 같은 아미노산 서열로 이루어진 것인 제제 또는 약제학적 조성물.

청구항 6

목적 폴리펩타이드 및 소형 유비퀴틴 유사 조절자(Small Ubiquitin-Like Modifier, SUMO)를 포함하는 융합 단백질로서, 목적 폴리펩타이드의 N 말단은 SUMO의 C 말단에 번역 융합되고, 상기 융합 단백질은 이중 친화성 태그(heterologous affinity tag)를 갖지 않는, 융합 단백질.

청구항 7

글루타메이트 옥살로아세테이트 트랜스아미나제 1(GOT1) 및 소형 유비퀴틴 유사 조절자(SUMO)를 포함하는 GOT1 융합 단백질로서, GOT1의 N 말단은 SUMO의 C 말단에 번역 융합되고, 상기 융합 단백질은 이중 친화성 태그(heterologous affinity tag)를 갖지 않는, GOT1 융합 단백질.

청구항 8

제 7 항에 있어서,

상기 GOT1은 1번 위치에 알라닌을 포함하는 융합 단백질.

청구항 9

제 6 항 또는 제 7 항에 있어서,

상기 친화성 태그는 폴리히스티딘 태그인 융합 단백질.

청구항 10

제 7 항에 있어서,

상기 GOT1의 아미노산 서열은 서열번호 2와 적어도 90% 이상의 상동성을 갖는 것인 융합 단백질.

청구항 11

제 6 항 또는 제 7 항에 있어서,

상기 SUMO의 아미노산 서열은 서열번호 5와 적어도 90% 이상의 상동성을 갖는 것인 융합 단백질.

청구항 12

제 7 항에 있어서,

서열번호 1과 적어도 90% 이상의 상동성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 융합 단백질.

청구항 13

제 7 항에 있어서,

서열번호 1에 기재된 아미노산 서열로 이루어진 것인 융합 단백질.

청구항 14

제 6 항 또는 제 7 항에 있어서,

상기 SUMO는 효모 SUMO인 융합 단백질.

청구항 15

제 14 항에 있어서,

상기 효모 SUMO는 사카로마이세스 세레비시아(*Saccharomyces cerevisiae*) Smt3(suppressor of mif two 3)인 융합 단백질.

청구항 16

제 6 항 내지 제 15 항 중 어느 한 항의 융합 단백질을 코딩하는 단리된 폴리뉴클레오타이드.

청구항 17

제 16 항에 있어서,

서열번호 3과 적어도 90% 이상의 상동성을 갖는 핵산 서열을 포함하는 단리 된 폴리뉴클레오타이드.

청구항 18

제 16 항 또는 제 17 항의 단리된 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 핵산 구조체.

청구항 19

제 1 항 내지 제 5 항 중 어느 한 항의 치료학적 유효량의 제제 또는 약제학적 조성물을 대상체에게 투여하여 질환 또는 증상을 치료하는 것을 포함하는, 치료를 필요로 하는 대상체에게 글루타메이트의 과잉과 관련된 질환 또는 증상을 치료하는 방법.

청구항 20

제 1 항에있어서,

글루타메이트의 과잉과 관련된 질환 또는 증상을 치료하는 용도를 위한 단백질 제제.

청구항 21

제 3 항에 있어서,

글루타메이트의 과잉과 관련된 질환 또는 증상을 치료하는 용도를 위한 약제학적 조성물.

청구항 22

제 19 항 내지 제 21 항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 질환 또는 증상이 뇌 질환 또는 증상인 방법, 제제 또는 조성물.

청구항 23

제 19 항 내지 제 21 항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 뇌 질환은 중추 신경계의 암인 방법, 제제 또는 조성물.

청구항 24

제 23 항에 있어서,

상기 암이 교모세포종인 방법, 제제 또는 조성물.

청구항 25

제 22 항에 있어서,

상기 뇌 증상이 뇌경색인 방법, 제제 또는 조성물.

청구항 26

제 19 항 내지 제 21 항 중 어느 한 항에 있어서,
상기 질환이 신경 퇴행성 질환인 방법, 제제 또는 조성물.

청구항 27

다음을 포함하는 폴리펩타이드의 정제 방법;

- (a) 숙주 세포에서 폴리펩타이드와 SUMO를 포함하는 융합 단백질을 발현시키는 단계;
- (b) 상기 융합 단백질로부터 SUMO를 제거하는 단계; 및
- (c) 상기 폴리펩타이드를 숙주 세포로부터 분리하여 폴리펩타이드를 정제하는 단계,

여기서 상기 폴리펩타이드의 N 말단이 SUMO의 C 말단에 번역 융합되고, 상기 융합 단백질은 이중 친화성 태그를 갖지 않는다.

청구항 28

제 27 항에 있어서,
상기 단계 (b)는 단계 (c) 전에 실시되는 방법.

청구항 29

제 27 항에 있어서,
상기 폴리펩타이드는 GOT1인 방법.

청구항 30

제 27 항 또는 제 29 항에 있어서,
상기 제거는 SUMO 프로테아제를 사용하여 실시되는 방법.

청구항 31

제 27 항에 있어서,
상기 분리는 열 침전, 염 유도 침전, 혼합 모드 크로마토그래피, 양이온 교환 크로마토그래피 및 음이온 교환 크로마토그래피로 구성된 군으로부터 선택된 기술을 사용하여 실시되는 방법.

청구항 32

제 31 항에 있어서,
상기 분리는 열 침전, 염 유도 침전, 혼합 모드 크로마토그래피, 양이온 교환 크로마토그래피 및 음이온 교환 크로마토그래피를 사용하여 실시되는 방법.

청구항 33

제 29 항에 있어서,

상기 분리는 다음에 의해 실시되는 방법:

- (a) 열 처리에 의해 GOT1을 정제하는 단계;
- (b) 염으로 유도된 침전에 의해 GOT1을 정제하는 단계;
- (c) 혼합 모드 크로마토그래피에 의해 GOT1을 정제하는 단계;
- (d) 양이온 교환 크로마토그래피에 의해 GOT1을 정제하는 단계; 및
- (e) 음이온 교환 크로마토그래피에 의해 GOT1을 정제하는 단계,

상기 단계 (e)는 단계 (d) 후에 수행하고, 단계 (d)는 단계 (c) 후에 수행하고, 단계 (c)는 단계 (b) 후에 수행하고, 단계 (b)는 단계 (a) 후에 수행한다.

청구항 34

제 31 항 내지 제 33 항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 염-유도 침전은 암모늄 설페이트 유도된 침전을 포함하는 방법.

청구항 35

제 27 항 내지 제 34 항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 숙주 세포는 박테리아, 효모, 포유류 세포 및 곤충 세포로 구성된 군에서 선택되는 방법.

청구항 36

제 35 항에 있어서,

상기 숙주 세포는 박테리아 세포인 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 이의 일부 구현예에 있어서 정제된 글루타메이트 옥살로아세테이트 트랜스아미나제 1(GOT1) 제제 및 이를 제조하는 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 글루타메이트 옥살로아세테이트 트랜스아미나제 1(GOT1)은 알파-케토 글루타레이트로 변환하여 글루타메이트의 혈중 농도를 조절하는 혈청 효소이다. 동물 모델에서, 재조합 글루타메이트 옥살로아세테이트 트랜스아미나제 1(rGOT)의 전신 투여는 허혈성 뇌졸중, 외상성 뇌 손상 및 신경 교종 뇌종양을 포함하는 뇌에서의 글루타메이트의 과잉 방출로 알려져 있는 많은 의학적 적응증에 따라 뇌에 축적되는 과잉 흥분독성(excitotoxic) 글루타메이트의 소거를 가능하게 함을 보여주었다.

[0003] 뇌에서 글루타메이트의 과잉은 신경학적 손상의 주요 원인 중 하나이다. 다형성 아교 모세포종(Glioblastoma Multiforme, GBM) 유형 뇌종양의 침입성 및 빠른 성장은 치료가 불가능한 것으로 간주된다. 이의 급속한 성장 및 질병과 관련된 신경 손상의 이유 중 하나는 GBM 세포가 흥분독성 글루타메이트 분자를 지속적으로 분비한다. 이는 뇌에 축적되어 종양에 인접한 정상적인 뇌 세포의 죽음을 초래한다. 또한, 이는 차례로 빠른 종양 확장에

필요한 두개 내(intracranial) 공간을 만든다.

- [0004] GBM 마우스 모델에서 rGOT1과 표준 치료제인 테모졸로미드(Temozolomide, TMZ)를 함께 투여하면 종양 성장이 유의하게 지연되었고, TMZ 치료만 받은 그룹에 비해 수명이 45일에서 76일로 연장되었다(Ruban A, et al., Invest New Drugs (2012) 30 (6) : 2226-2235).
- [0005] 이전에, 허혈성 뇌졸중 랫드 모델에서 rGOT1의 투여에 의해 유발된 혈중 글루타메이트 수준이 감소하면 뇌에 축적된 과잉 흥분독성 글루타메이트 분자가 혈액 뇌 장벽을 통해 혈류로 빠르게 유출(15분 이내)되는 것으로 보고되었다(F. Campos, et al., Journal of Cereb. Blood Flow Metabol. 2011, 31, 1387, M. Perez-Mato, et al., Cell Death & Dis. 2014, 5, e992).
- [0006] 추가적인 배경 기술은 Prakash et al. Microbial Cell Factories 2012, 11:92; Marblestone et al., Protein Sci. 2006 Jan; 15(1): 182-189 및 미국 특허 출원 제 20100021987호를 포함한다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0007] 본 발명은 글루타메이트 옥살로아세테이트 트랜스아미나제 1(GOT1) 제제 및 이를 제조하는 방법을 제공하는 것으로 목적으로 한다.

과제의 해결 수단

- [0008] 발명의 요약
- [0009] 본 발명의 일부 구현예들의 양태에 따르면, 글루타메이트 옥살로아세테이트 트랜스아미나제 1(GOT1) 폴리펩타이드 분자를 포함하는 단백질 제제로서, GOT1 폴리펩타이드 분자의 100%가 GOT1 폴리펩타이드의 1번 위치에 알라닌을 갖고, GOT1 폴리펩타이드 분자가 상기 제제 내 단백질의 적어도 95% 이상을 구성하는, 단백질 제제를 제공한다.
- [0010] 본 발명의 일부 구현예들의 양태에 따르면, 활성제 및 약제학적으로 허용 가능한 담체로 본원에 기술된 단백질 제제를 포함하는 약제학적 조성물을 제공한다.
- [0011] 본 발명의 일부 구현예들의 양태에 따르면, 목적 폴리펩타이드 및 소형 유비퀴틴 유사 조절자(Small Ubiquitin-Like Modifier, SUMO)를 포함하는 융합 단백질을 제공하며, 상기 목적 폴리펩타이드의 N 말단은 SUMO의 C 말단에 번역 융합되고, 상기 융합 단백질은 이중 친화성 태그(heterologous affinity tag)를 갖지 않는다.
- [0012] 본 발명의 일부 구현예들의 양태에 따르면, GOT1 및 소형 유비퀴틴 유사 조절자(SUMO)를 포함하는 글루타메이트 옥살로아세테이트 트랜스아미나제 1(GOT1) 융합 단백질을 제공하며, 상기 GOT1의 N 말단은 SUMO의 C 말단에 번역 융합되고, 상기 융합 단백질은 이중 친화성 태그(heterologous affinity tag)를 갖지 않는다.
- [0013] 본 발명의 일부 구현예들의 양태에 따르면, 본원에 기술된 융합 단백질을 코딩하는 단리된 폴리뉴클레오타이드를 제공한다.
- [0014] 본 발명의 일부 구현예들의 양태에 따르면, 본원에 기술된 상기 단리된 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 핵산 구조체를 제공한다.
- [0015] 본 발명의 일부 구현예들의 양태에 따르면, 본원에 기술된 치료학적 유효량의 제제 또는 약제를 대상체에게 투여하여 질환 또는 증상을 치료하는 것을 포함하는, 치료를 필요로 하는 대상체에게 글루타메이트의 과잉과 관련된 질환 또는 증상을 치료하는 방법을 제공한다.
- [0016] 본 발명의 일부 구현예들의 양태에 따르면, 다음을 포함하는 폴리펩타이드의 정제 방법을 제공한다:
- [0017] (a) 숙주 세포에서 폴리펩타이드와 SUMO를 포함하는 융합 단백질을 발현시키는 단계, 여기서 상기 폴리펩타이드의 N 말단이 SUMO의 C 말단에 번역 융합되고, 상기 융합 단백질은 이중 친화성 태그를 갖지 않는다;
- [0018] (b) 상기 융합 단백질로부터 SUMO를 제거하는 단계; 및
- [0019] (c) 상기 폴리펩타이드를 숙주 세포로부터 분리하여 폴리펩타이드를 정제하는 단계.
- [0020] 본 발명의 일부 구현예들에 따르면, 상기 단백질은 상기 제제 내 분자의 적어도 98% 이상을 구성한다.

- [0021] 본 발명의 일부 구현예들에 따르면, 상기 GOT1은 서열번호 2와 적어도 90% 이상의 상동성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다.
- [0022] 본 발명의 일부 구현예들에 따르면, 상기 GOT1은 서열번호 2에 기재된 바와 같은 아미노산 서열로 이루어진다.
- [0023] 본 발명의 일부 구현예들에 따르면, 상기 GOT1은 1번 위치에 알라닌을 포함한다.
- [0024] 본 발명의 일부 구현예들에 따르면, 상기 친화성 태그는 폴리히스티딘 태그이다.
- [0025] 본 발명의 일부 구현예들에 따르면, 상기 GOT1의 아미노산 서열은 서열번호 2와 적어도 90% 이상의 상동성을 갖는다.
- [0026] 본 발명의 일부 구현예들에 따르면, 상기 SUMO의 아미노산 서열은 서열번호 5와 적어도 90% 이상의 상동성을 갖는다.
- [0027] 본 발명의 일부 구현예들에 따르면, 상기 융합 단백질은 서열번호 1과 적어도 90% 이상의 상동성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다.
- [0028] 본 발명의 일부 구현예들에 따르면, 상기 아미노산 서열은 서열번호 1에 기재된 바와 같다.
- [0029] 본 발명의 일부 구현예들에 따르면, 상기 SUMO는 효모 SUMO이다.
- [0030] 본 발명의 일부 구현예들에 따르면, 상기 효모 SUMO는 사카로마이세스 세레비시애(*Saccharomyces cerevisiae*) Smt3(suppressor of mif two 3)이다.
- [0031] 본 발명의 일부 구현예들에 따르면, 상기 단리된 폴리뉴클레오타이드는 SEQ ID NO: 3과 적어도 90% 이상의 상동성을 갖는 핵산 서열을 포함한다.
- [0032] 본 발명의 일부 구현예들에 따르면, 상기 질환 또는 증상은 뇌 질환 또는 증상이다.
- [0033] 본 발명의 일부 구현예들에 따르면, 상기 뇌 질환은 중추 신경계의 암이다.
- [0034] 본 발명의 일부 구현예들에 따르면, 상기 암은 교모세포종(glioblastoma)이다.
- [0035] 본 발명의 일부 구현예들에 따르면, 상기 뇌 상태는 뇌경색이다.
- [0036] 본 발명의 일부 구현예들에 따르면, 상기 질환은 신경 퇴행성 질환이다.
- [0037] 본 발명의 일부 구현예들에 따르면, 상기 단계 (b)는 단계 (c) 전에 실시된다.
- [0038] 본 발명의 일부 구현예들에 따르면, 상기 폴리펩타이드는 GOT1이다.
- [0039] 본 발명의 일부 구현예들에 따르면, 상기 제거는 SUMO 프로테아제를 사용하여 실시된다
- [0040] 본 발명의 일부 구현예들에 따르면, 상기 분리는 열 침전, 염 유도 침전, 혼합 모드 크로마토그래피, 양이온 교환 크로마토그래피 및 음이온 교환 크로마토그래피로 구성된 군으로부터 선택된 기술을 사용하여 실시된다
- [0041] 본 발명의 일부 구현예들에 따르면, 상기 분리는 열 침전, 염 유도 침전, 혼합 모드 크로마토그래피, 양이온 교환 크로마토그래피 및 음이온 교환 크로마토그래피를 사용하여 실시된다.
- [0042] 본 발명의 일부 구현예들에 따르면, 상기 분리는 다음에 의해 실시된다:
- [0043] (a) 열 처리에 의해 GOT1을 정제하는 단계;
- [0044] (b) 염으로 유도된 침전에 의해 GOT1을 정제하는 단계;
- [0045] (c) 혼합 모드 크로마토그래피에 의해 GOT1을 정제하는 단계;
- [0046] (d) 양이온 교환 크로마토그래피에 의해 GOT1을 정제하는 단계; 및
- [0047] (e) 음이온 교환 크로마토그래피에 의해 GOT1을 정제하는 단계,
- [0048] 상기 단계 (e)는 단계 (d) 후에 수행하고, 단계 (d)는 단계 (c) 후에 수행하고, 단계 (c)는 단계 (b) 후에 수행하고, 단계 (b)는 단계 (a) 후에 수행한다.
- [0049] 열 침전, 염-유도 침전은 암모늄 설페이트 유도된 침전을 포함한다.

[0050] 열 침전, 숙주 세포는 박테리아, 효모, 포유류 세포 및 곤충 세포로 구성된 군에서 선택된다.

[0051] 본 발명의 일부 구현예들에 따르면, 상기 숙주 세포는 박테리아 세포이다.

[0052] 달리 정의하지 않는 한, 본원에 사용된 모든 기술 및/또는 과학 용어는 그 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자에 의해 일반적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 가진다. 비록 본원에 기술된 것들과 유사하거나 동등한 방법들 및 물질들이 본 발명의 구현들의 실시 또는 테스트에 사용될 수 있다 할지라도, 예시적 방법/또는 물질들을 아래에 설명한다. 갈등시, 정의들을 포함하여 본 특허 명세서는 조절될 것이다. 게다가, 물질들, 방법들 및 실시예들은 단지 예시적일 뿐이며, 반드시 한정하는 것으로 의도된 것이 아니다.

발명의 효과

[0053] 본 발명은 글루타메이트 옥살로아세테이트 트랜스아미나제 1(GOT1) 제제 및 이를 제조하는 방법과 이의 용도를 제공할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0054] 본 발명의 일부 구현예들은 첨부된 도면들을 참조하여 단지 예의 형태로만 본원에 기술된다. 이제 특히 도면들을 상세하게 참조하여, 자세한 사항들은 사례를 들어, 발명의 구현들의 예시적 논의를 위한 것임이 강조된다. 이점과 관련하여, 도면을 예로 들은 설명은 당업자들에게 본 발명의 구현예들이 어떻게 실시될 수 있는지 명백하게 해준다.

도면에서:

도 1은 SUMO-GOT 생합성 과정의 전체 도식을 보여준다.

도 2 생합성 동안 발효조에서 pH, pO₂, 교반기, 온도, 기류 및 배양 광학 밀도 모니터링을 보여준다.

도 3은 화학적으로 규정된 배지 및 고밀도에서 얻어진 바이오매스의 전형적인 SDS-PAGE이다.

도 4는 정제 과정의 흐름도이다.

도 5는 PPA 하이퍼 셀(Hyper Cel)의 전형적인 크로마토그래피 프로파일을 도시한다.

도 6은 CM 세파로스(Sephacrose) FF의 전형적인 크로마토그래피 프로파일을 도시한다.

도 7은 Q 세파로스 FF의 전형적인 크로마토그래피 프로파일을 도시한다.

도 8은 SDS-PAGE 적정의 사진이다. 라인 3- 2.5 μ g; 라인 5-5.0 μ g; 라인 7-10.0 μ g; 라인 9- 20 μ g.

도 9는 최종 GOT1 용액의 전형적인 RP-HPLC 크로마토그래피 프로파일을 도시한다.

도 10은 최종 GOT1 용액의 전형적인 SEC-HPLC 크로마토그래피 프로파일을 도시한다.

도 11은 대조군과 GOT1 샘플 펩타이드 맵핑의 크로마토그램을 오버레이한 것이다.

도 12는 등전위 포커싱(Isoelectric Focusing)에 의해 불순물을 나타내는 쿠마시 염색된 겔의 사진이다[1 - 넓은 범위의 pI 마커; 2 - 기준 용액 A; 3 - 기준 용액 B; 4 - 배치(Batch) 1; 5 - 배치 2; 6 - 배치 3; 7 - 배치 4; 8 - 배치 5; 9 - 넓은 범위의 pI 마커].

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0055] 본 발명은 이의 일부 구현예에 있어서 정제된 글루타메이트 옥살로아세테이트 트랜스아미나제 1(GOT1) 제제 및 이를 제조하는 방법에 관한 것이다.

[0056] 본 발명의 적어도 하나의 구현예를 상세히 설명하기 전에, 본 발명은 반드시 다음의 설명에 기재되거나 실시예에 의해 예시된 세부 사항들에 대한 이의 적용으로 한정되지 않는다는 것으로 이해되어야 할 것이다. 본 발명은 다른 구현예들일 수 있거나 다양한 방식으로 실시되거나 수행될 수 있다.

[0057] 혈중 글루타메이트 소거는 교모세포종(Glioblastoma Multiforme, GBM) 및 허혈성 뇌 손상을 포함하는 다양한 질환 중에 방출되는 세포 외 글루타메이트의 흥분독성 효과를 감소시키는 매력적인 보호 전략이다.

[0058] 현재까지, 재조합 인간 rGOT는 재조합 단백질의 편리한 직접 친화성 정제에 전형적으로 사용되는 히스티딘-6 태

그를 포함하는 대장균 시스템에서 제조되었다. His-태그가 포함된 제조합 단백질은 면역학적 영향 때문에 인간에게 사용할 수 없기 때문에 N-말단 위치에 알라닌 모이어티를 갖는 인간 효소와 동일한 rGOT 1 체제를 제조할 필요가 있었다(JM, Doyle et al. The amino acid sequence of cytosolic aspartate aminotransferase from human liver. Biochem. J. 1990, 270: 651-7).

- [0059] 제조합 박테리아 발현 시스템은 N-말단 메티오닌을 포함하는 제조합 폴리펩타이드를 생성한다. 이 아미노산은 다음 5개의 N-말단 아미노산의 서열에 따라 메티오닌 아미노 펩타시다제(MAP2)에 의해 절단될 수 있다. 그러나, MAP2 박테리아 효소를 사용하여 rGOT1로부터 N-말단 메티오닌을 절단하는 동안에, 이 효소에 의해 N-말단 메티오닌이 절단될 뿐만 아니라 다음 3개의 아미노산(알라닌-프롤린-프롤린)이 메티오닌 절단 후에 노출되었음도 밝혀졌다. 따라서, N-말단 알라닌을 포함하는 일부 멤버로 이중 단백질 집단이 생성되는 반면, 다른 멤버는 제2 또는 제3의 N-말단 아미노산에서 절단되었다. 이러한 이중 단백질 체제는 인간 치료에 적합하지 않다.
- [0060] 이 문제를 해결하기 위하여, 본 발명자들은 GOT1 유전자를 SUMO 개체(Smt3, 효모 *S.cerevisiae* 기원)를 코딩하는 유전자와 완벽하게 융합시킴으로써 키메라 단백질을 생성시켰다. 박테리아 시스템에서의 발현, 융합 단백질로부터의 SUMO 개체의 절단 및 상기 rGOT1의 생화학적 정제에 이어서, 본 발명자들은 하기 도 11, 도 12 및 표 6에 예시된 바와 같이 95% 이상의 순도를 갖는 생물학적으로 활성인 rGOT1 체제를 수득하였다.
- [0061] 따라서, 본 발명의 제 1 양태에 따르면, 다음을 포함하는 폴리펩타이드의 정제 방법을 제공한다,
- [0062] (a) 숙주 세포에서 폴리펩타이드와 SUMO를 포함하는 융합 단백질을 발현시키는 단계로서, 상기 폴리펩타이드의 N 말단이 SUMO의 C 말단에 번역 융합되고, 상기 융합 단백질은 이중 친화성 태그를 갖지 않는다;
- [0063] (b) 상기 융합 단백질로부터 SUMO를 제거하는 단계; 및
- [0064] (c) 상기 폴리펩타이드를 숙주 세포로부터 분리하여 폴리펩타이드를 정제하는 단계.
- [0065] 용어 "융합 단백질"은 하나 이상의 부모 단백질 또는 폴리펩타이드로부터 유래된 폴리펩타이드 성분을 포함하는 단백질을 지칭한다.
- [0066] 본 발명의 이 양태의 융합 단백질은 하나의 목적 단백질로부터 폴리펩타이드 서열을 코딩하는 뉴클레오타이드 서열이 프레임 내 (그리고 링커 없이) SUMO의 폴리펩타이드 서열을 코딩하는 뉴클레오타이드 서열로 첨부된 융합 유전자로부터 발현된다. 이후, 본원에서 후술되는 바와 같이, 상기 융합 유전자는 단일 단백질로서 제조합 숙주 세포에 의해 발현될 수 있다.
- [0067] 본 발명의 일부 구현예들의 양태에 따르면, 상기 융합 단백질은 하기에 더 상세히 설명되는 바와 같이 이중 친화성 정제 태그를 갖지 않는다.
- [0068] 본원에서 사용된 용어 "SUMO"는 소형 유비퀴틴 유사 조절제(SUMO) 단백질 부류의 멤버인 폴리펩타이드를 지칭한다. SUMO 단백질은 전형적으로 작다; 대부분은 길이가 약 100 아미노산이고 질량은 12 kDa이다. 정확한 길이와 질량은 SUMO 부류 멤버와 단백질이 어느 유기체에서 유래하는지에 따라 다르다. 상기 SUMO는 효모 SUMO (예 : smt3(*Saccharomyces cerevisiae* suppressor of mif two 3), 인간 SUMO-1, 인간 SUMO-2, 인간 SUMO-3, 애기장대(*Arabidopsis thaliana*) SUMO-1 내지 SUMO-8 중 어느 하나, 토마토 SUMO, 제노푸스 라에비스(*Xenopus laevis*) SUMO-1 내지 SUMO-3 중 어느 하나, 노랑초파리(*Drosophila melanogaster*) Smt3, 예쁜꼬마선충(*Caenorhabditis elegans*) SMO-1, 스키포사카로마이세스 폼베(*Schizosaccharomyces pombe*) Pmt3, 말라리아 원충 악성 말라리아 원충(*Plasmodium falciparum*) SUMO, 곰팡이 아스페르길루스 니둘란스 (*Aspergillus nidulans*) SUMO일 수 있다.
- [0069] 본 발명의 특정 구현예에 따르면, SUMO 단백질은 사카로마이세스세레비지에 SUMO(Smt3)이고, NCBI의 표준 단백질-단백질 BLAST[blastp] 소프트웨어를 사용하여 측정된 바와 같이, 서열번호 5로 표시되는 아미노산 서열과 적어도 90% 이상의 상동성, 적어도 91% 이상의 상동성, 적어도 92% 이상의 상동성, 적어도 93% 이상의 상동성, 적어도 94% 이상의 상동성, 적어도 95% 이상의 상동성, 적어도 96% 이상의 상동성, 적어도 97% 이상의 상동성, 적어도 98% 이상의 상동성, 적어도 99% 이상의 상동성, 더욱 바람직하게는 100% 상동성이 있다.
- [0070] 본 발명의 이러한 양태에 있어서, 상기 융합 단백질의 제2 폴리펩타이드 (또는 목적 폴리펩타이드)는, 예를 들어, 치료제, 백신, 진단학, 바이오 연료 및 기타 관심 분야의 적용에 대한 연구 및 산업 환경에서 사용되는 임의의 폴리펩타이드일 수 있다.
- [0071] 상기 폴리펩타이드는 세포 내 폴리펩타이드(예를 들어, 세포질 단백질), 막관통 폴리펩타이드 또는 분비된 폴리

펩타이드일 수 있다. 상기 폴리펩타이드는 전장 폴리펩타이드 또는 이의 단편일 수 있다. 일 구현예에 따르면, 상기 폴리펩타이드는 10개 미만의 아미노산, 20개 미만의 아미노산, 50개 미만의 아미노산 또는 100개 미만의 아미노산이다.

[0072] 특정 구현예에 따르면, 상기 폴리펩타이드는 인간 폴리펩타이드이고, NCBI의 표준 단백질-단백질 BLAST[blastp] 소프트웨어를 사용하여 측정된 바와 같이, 야생형 단백질아미노산 서열과 적어도 95% 이상의 상동성, 보다 바람직하게는 적어도 96% 이상의 상동성, 적어도 97% 이상의 상동성, 적어도 98% 이상의 상동성, 적어도 99% 이상의 상동성, 더욱 바람직하게는 100% 상동성을 갖는다.

[0073] 본 발명의 조성물 및 방법을 사용함으로써 생산될 수 있는 예시적인 치료용 단백질은 특정의 천연 및 재조합 인간 호르몬(예, 인슐린, 성장 호르몬, 인슐린 유사 성장 인자 1, 난포 자극 호르몬 및 융모성 성선자극 호르몬), 조혈 단백질(예, 에리스로포이에틴, C-CSF, GM-CSF 및 IL-11), 혈전 및 지혈 단백질(예, 조직 플라스미노겐 활성제 및 활성화된 단백질 C), 면역 단백질(예, 사이토카인, 케모카인, 림포카인), 항체 및 기타 효소(예, 데옥시리보뉴클레아제 I)를 포함하나 이에 제한되지 않는다. 본 발명의 조성물 및 방법을 사용함으로써 생산될 수 있는 예시적인 백신은 다양한 인플루엔자 바이러스(예, A형, B형 및 C형 및 A형 인플루엔자 바이러스용 H5N2, H1N1, H3N2와 같은 각 유형에 대한 다양한 혈청형), HIV, 간염 바이러스(예, A형, B형, C형 또는 D형 간염), 라임병 및 인간 유두종 바이러스(HPV)에 대한 백신을 포함하나, 이에 제한되지 않는다. 이중 생성 단백질 진단의 예로는 세크린, 갑상선 자극 호르몬(TSH), HIV 항원 및 C형 간염 항원을 포함하나, 이에 제한되지 않는다.

[0074] 특정 폴리펩타이드 또는 단백질의 예로는 과립구 대식 세포 콜로니 자극 인자 (GM-CSF), 과립구 콜로니 자극 인자(G-CSF), 대식세포 콜로니 자극 인자(M-CSF), 콜로니 자극 인자(CSF), 인터페론 베타(IFN-beta), 인터페론 감마(IFN-gamma), 인터페론 감마 유도 인자 I(IGIF), 형질전환 성장 인자 베타(TGF-beta), RANTES(regulated upon activation, normal T-cell expressed and presumably secreted), 대식세포 염증 단백질(예, MIP-1-알파 및 MIP-1-베타), LEIF(Leishmania elongation initiating factor), 혈소판 유래 증식인자(PDGF), 종양 괴사 인자(TNF), 성장 인자, 예, 상피 성장 인자(EGF), 혈관 내피 성장 인자(VEGF), 섬유아세포 성장 인자(FGF), 신경 성장 인자(NGF), 뇌 유도 신경 영양 인자(BDNF), 뉴로트로핀-2(NT-2), 뉴로트로핀-3(NT-3), 뉴로트로핀-4(NT-4), 뉴로트로핀-5(NT-5), 신경교세포주 유도 신경 영양 인자(GDNF), 섬모 신경 영양 인자(CNTF), TNF 알파 타입 II 수용체, 에리스로포이에틴(EPO), 인슐린 및 가용성 당단백질, 예, gp120 및 gp160 당단백질을 포함하나, 이에 제한되지 않는다. 다른 예로는 세크린, 네시리티드(인간 B형 나트륨 이노 펩타이드(hBNP)) 및 GYP-I을 포함한다.

[0075] 다른 예시적인 폴리펩타이드는 미국 특허 출원 제2012032909호에 개시되어 있으며, 그 내용은 본원에 참고로 인용되어 있다.

[0076] 특정 구현예에서, 이중 생성 단백질은 효소 또는 이의 생물학적 활성 단편이다. 적합한 효소는 산화 환원 효소, 트랜스퍼라제, 가수분해 효소, 리아제, 이소머라제 및 리가아제를 포함하나, 이에 제한되지 않는다. 특정 구현예에서, 상기 이중 생성 단백질은 효소위원회(EC) 1등급의 효소, 예를 들어 EC 1.1 내지 1.21 또는 1.97 중 어느 하나의 효소이다. 상기 효소는 또한 EC 클래스 2, 3, 4, 5 또는 6으로부터의 효소일 수 있다. 예를 들어, 상기 효소는 EC 2.1 내지 2.9, EC 3.1 내지 3.13, EC 4.1 내지 4.6, EC 4.99, EC 5.1 내지 5.11, EC 5.99 또는 EC 6.1 내지 6.6으로부터 선택될 수 있다.

[0077] 특정 구현예에 따르면, 상기 폴리펩타이드는 글루타메이트 옥살로아세테이트 트랜스아미나제 1(GOT1; NM_002079.2; P17174)이다. 이 효소는 EC No. 2.6.1.1을 갖는 피리독살 포스페이트(PLP) 의존성 세포질 효소이다. GOT1은 아미노산 대사 및 우레아와 트리카복실산 사이클에서 역할을 한다. 상기 아스파테이트 아미노트랜스퍼라제 활성은 발달 중 그리고 지방세포 글리세롤 신생과정에서 간 글루코오스 합성에 관여한다. GOT1은 또한 혈청 글루타메이트 수준의 중요한 조절 인자이다. 상기 정상적인 뇌는 혈액 순환에 존재하는 높은 수준의 글루타메이트(약 40 마이크로몰)와 달리 매우 낮은 수준의 세포 외 글루타메이트(약 1 마이크로몰)를 가진다. 상기 소량의 뇌 글루타메이트는 척추 중추 신경계의 신경전달물질로서 중요한 역할을 한다.

[0078] 본 발명의 이러한 양태에 있어서, 상기 융합 단백질의 GOT1은 혈청 GOT1의 아미노산 서열(즉, 이의 N 말단(단백질 서열의 1번 위치)에 알라닌을 포함함)을 가진다.

[0079] 바람직하게는, 상기 GOT1은 NCBI의 표준 단백질-단백질 BLAST[blastp] 소프트웨어(여기서 단백질의 첫 번째 아미노산은 알라닌이고 메티오닌이 아님)를 사용하여 측정된 바와 같이, 서열번호 2로 표시된 아미노산 서열과 적어도 90% 이상의 상동성, 적어도 91% 이상의 상동성, 적어도 92% 이상의 상동성, 적어도 93% 이상의 상동성, 적

어도 94% 이상의 상동성, 적어도 95% 이상의 상동성, 적어도 96% 이상의 상동성, 적어도 97% 이상의 상동성, 적어도 98% 이상의 상동성, 적어도 99% 이상의 상동성, 더욱 바람직하게는 100% 상동성을 갖는다.

- [0080] 특정 구현예에 따르면, 상기 GOT1은 서열번호 2에 기재된 서열로 이루어진다.
- [0081] 바람직하게는, 상기 SUMO-GOT1 융합 단백질은 NCBI의 표준 단백질-단백질 BLAST[blastp] 소프트웨어를 사용하여 측정된 바와 같이, 서열번호 1로 표시되는 아미노산 서열과 적어도 90% 이상의 상동성, 적어도 91% 이상의 상동성, 적어도 92% 이상의 상동성, 적어도 93% 이상의 상동성, 적어도 94% 이상의 상동성, 적어도 95% 이상의 상동성, 적어도 96% 이상의 상동성, 적어도 97% 이상의 상동성, 적어도 98% 이상의 상동성, 적어도 99% 이상의 상동성, 더욱 바람직하게는 100% 상동성을 갖는다.
- [0082] 다른 구현예에 따르면, 상기 SUMO-GOT1 융합 단백질은 서열번호 1에 기재된 아미노산 서열로 이루어진다.
- [0083] 재조합 기술을 사용하여 SUMO 융합 단백질(예, SUMO-GOT1 융합 단백질)을 생산하기 위해, 이러한 폴리펩타이드를 코딩하는 핵산 서열을 포함하는 단리된 폴리뉴클레오타이드를 사용할 수 있다. 예시적인 핵산 서열은 서열번호 3에 기재되어 있다.
- [0084] 용어 "핵산 서열"은 자연 발생 염기, 당 및 공유 뉴클레오타이드 간의 결합(예, 골격) 뿐만 아니라 각각의 자연 발생 부위와 유사하게 기능하는 비자연 발생 부위를 갖는 올리고뉴클레오타이드를 포함하는 데옥시리보뉴클레오타이드 서열을 의미한다. 이러한 변형은 재조합 발현이 여전히 허용된다면 본 발명에 의해 가능해진다.
- [0085] 본 발명의 이러한 양태에 따른 융합 단백질의 핵산 서열은 상보적 폴리뉴클레오타이드 서열(cDNA), 게놈 폴리뉴클레오타이드 서열 및/또는 복합 폴리뉴클레오타이드 서열(예, 상기 조합)일 수 있다.
- [0086] 본원에서 사용된 "상보적인 폴리뉴클레오타이드 서열"이란 어구는 역전사 효소 또는 임의의 다른 RNA 의존성 DNA 중합 효소를 사용하여 메신저 RNA의 역전사에 기인하는 서열을 의미한다. 이러한 서열은 DNA 의존성 DNA 중합효소를 사용하여 *in vivo* 또는 *in vitro*에서 연속적으로 증폭될 수 있다.
- [0087] 본원에서 사용된 "게놈 폴리뉴클레오타이드 서열"이라는 어구는 염색체로부터 유래된(단리된) 서열을 말하며, 따라서 이는 염색체의 인접 부분을 나타낸다.
- [0088] 본원에서 사용된 "복합 폴리뉴클레오타이드 서열"이라는 어구는 적어도 부분적으로 상보적이고 적어도 부분적으로 게놈인 서열을 지칭한다. 복합 서열은 본 발명의 폴리펩타이드를 코딩하는데 필요한 일부 엑손 서열뿐만 아니라 그 사이에 삽입된 일부 인트론 서열을 포함할 수 있다. 상기 인트론 서열은 다른 유전자를 포함하는 임의의 소스일 수 있으며, 전형적으로 보존된 스플라이싱 신호 서열을 포함할 것이다. 이러한 인트론 서열은 시스 작용(cis acting) 발현 조절 요소를 추가로 포함할 수 있다.
- [0089] SUMO를 코딩하는 폴리뉴클레오타이드 서열과 목적 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오타이드 서열의 연결은 PCR, 연결 효소 및 제한 효소의 사용을 포함하는 표준 분자 생물학 기술을 이용하여 수행될 수 있다. N 말단에서 SUMO와 C 말단에서 목적 폴리펩타이드로 융합 단백질이 생성되도록 SUMO의 5' 말단이 목적 단백질을 코딩하는 유전자의 3' 말단에 연결되는 것을 알 수 있다.
- [0090] 상기 융합 단백질을 코딩하는 생성된 폴리뉴클레오타이드는 전형적으로 이중 친 화성 태그를 코딩하는 임의의 서열을 갖지 않는다.
- [0091] 본원에 사용된 어구 "이중 친화성 태그"는 융합 단백질 또는 목적 폴리펩타이드를 친화성 정제하는데 사용될 수 있는 SUMO 또는 목적 폴리펩타이드(즉, 야생형 서열)에 자연적으로 포함되지 않은 아미노산 서열을 지칭한다.
- [0092] 따라서, 예를 들어, 본 발명의 이러한 양태에 있어서, 상기 단리된 폴리뉴클레오타이드는 폴리히스티딘 태그, 폴리알기닌 태그, 글루타티온-S-트랜스퍼라제, 말토스 결합 단백질, S-태그, 인플루엔자 바이러스 HA 태그, 티오레독신, 포도상구균 단백질 A 태그, FLAG™ 에피토프, AviTag 에피토프 및 c-myc 에피토프를 코딩하는 핵산 서열을 갖지 않는다.
- [0093] 재조합 기술을 사용하여 본 발명의 융합 단백질을 생성시키기 위해, 상기 폴리뉴클레오타이드 서열은 시스-조절 서열(예, 프로모터 서열)의 전사 조절 하에 있도록 핵산 발현 벡터 내로 연결된다.
- [0094] 다양한 원핵 세포 또는 진핵 세포는 본 발명의 폴리펩타이드를 발현하는 숙주 발현 시스템으로 사용될 수 있다. 이들은 폴리펩타이드 코딩 서열을 포함하는 재조합 박테리오파지 DNA, 플라스미드 DNA 또는 코스미드 DNA 발현 벡터로 형질전환된 박테리아와 같은 미생물; 폴리펩타이드 코딩 서열을 포함하는 재조합 효모 발현 벡터로 형질

전환된 효모; 재조합 바이러스 발현 벡터(예, 콜리플라워 모자이크 바이러스, CaMV; 담배 모자이크 바이러스, TMV)로 감염되거나 폴리펩타이드 코딩 서열을 포함하는 재조합 플라스미드 발현 벡터, 예컨대 Ti 플라스미드로 형질전환된 식물 세포 시스템을 포함하나, 이에 제한되지 않는다.

- [0095] 상기 융합 단백질을 발현하는데 사용될 수 있는 예시적인 박테리아 세포는 대장균 단백질 결핍 균주, 예컨대 대장균 BL21 또는 로제타 가미-2, 가장 바람직하게는 대장균 BL21과 같은 대장균이다.
- [0096] 상기 융합 단백질을 발현하는데 사용될 수 있는 예시적인 효모 세포는 *K. lactis* 또는 *S. cerevisiae*이다.
- [0097] 본 발명의 이러한 구현예로 사용하기에 적합한 기본구성 프로모터는 대부분의 환경 조건 및 거대 세포 바이러스(CMV) 및 러스 육종 바이러스(RSV)와 같은 대부분 유형의 세포 하에서 기능적(즉, 전사를 지시할 수 있는) 서열을 포함한다.
- [0098] 본 발명의 이러한 구현예로 사용하기에 적합한 유도성 프로모터는 예를 들어 테트라사이클린-유도성 프로모터(Srouf, M.A., et al., 2003. Thromb. Haemost. 90: 398-405) 또는 lac 오퍼레이터를 포함한다. 후자의 경우, 유전자 발현은 이소프로필 β -D-1-티오갈락토포라노사이드(IPTG)를 사용하여 20~30 °C(예, 25 °C)의 온도에서 0.1 mM - 1 mM 사이의 농도로 유도된다.
- [0099] 본 발명의 이러한 구현예에 따른 발현 벡터는 이 벡터를 원핵생물, 진핵생물 또는 바람직하게는 둘 모두(예, 서브미크로)에서 복제 및 통합에 적합하게 하는 추가의 서열을 포함할 수 있다. 전형적인 클로닝 벡터는 전사 및 번역 개시 서열(예, 프로모터, 인핸서) 및 전사와 번역 터미네이터(예, 폴리아데닐화 신호)를 포함한다.
- [0100] 진핵 세포 프로모터는 전형적으로 두 가지 유형의 인식 서열인 TATA 박스와 상향조절(upstream) 프로모터 요소를 포함한다.
- [0101] 상기 전사 개시 부위의 상향(upstream) 25-30 bp에 위치한 TATA 박스는 RNA 합성을 시작하기 위해 RNA 중합효소 디렉팅과 관련이 있다고 여겨진다. 다른 상향조절(upstream) 프로모터 요소는 전사가 시작되는 속도를 결정한다.
- [0102] 인핸서 요소는 연결된 동종 또는 이종 프로모터로부터 최대 1,000 배까지의 전사를 자극할 수 있다. 인핸서는 전사 개시 부위로부터 하향(downstream) 또는 상향(upstream)에 위치할 때 활성화된다. 바이러스로부터 유래된 많은 인핸서 요소는 광범위한 숙주 범위를 가지며 다양한 조직에서 활성화된다. 예를 들어, SV40 초기 유전자 인핸서는 많은 세포 유형에 적합하다. 본 발명에 적합한 다른 인핸서/프로모터 조합은 폴리오마 바이러스, 인간 또는 마우스 사이토메갈로바이러스(CMV), 쥐 백혈병 바이러스, 쥐 또는 라우스 육종 바이러스 및 HIV와 같은 다양한 레트로바이러스로부터 장기간 반복에서 유래된 것을 포함한다. 본원의 참고문헌으로 인용되는 Enhancers and Eukaryotic Expression, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, N.Y. 1983을 참조하십시오.
- [0103] 본 발명의 발현벡터로부터 발현된 폴리펩타이드의 번역 효율을 증가시키기 위하여, 발현벡터에 폴리아데닐화 서열을 첨가할 수도 있다. 정확하고 효율적인 폴리아데닐화를 위해 2개의 별도 서열 요소가 필요하다: 폴리아데닐화 부위로부터 하향에 위치하는 GU 또는 U 풍부 서열 및 11-30 뉴클레오타이드 상향에 위치한 고도로 보존된 6개 뉴클레오타이드 서열인 AAUAAA. 본 발명에 적합한 종결 및 폴리아데닐화 시그널은 SV40으로부터 유래된 것을 포함한다.
- [0104] 이미 기술된 요소 외에도, 본 발명의 발현 벡터는 전형적으로 복제된 핵산의 발현 수준을 증가시키거나 또는 재조합 DNA를 운반하는 세포의 확인을 용이하게 하는 다른 특별화된 요소를 함유할 수 있다. 예를 들어, 많은 동물 바이러스는 허용 세포 유형에서 바이러스 게놈의 여분의 염색체 복제를 촉진하는 DNA 서열을 포함한다. 플라스미드 상에 또는 숙주 세포의 게놈과 함께 운반되는 유전자에 의해 적절한 인자가 제공되는 한, 이러한 바이러스성 레플리콘을 갖는 플라스미드는 에피솜으로 복제된다.
- [0105] 상기 벡터는 진핵생물 레플리콘을 포함하거나 포함하지 않을 수 있다. 진핵생물 레플리콘이 존재하는 경우, 상기 벡터는 적절한 선별 마커를 사용하여 진핵 세포에서 증폭될 수 있다. 상기 벡터가 진핵생물 레플리콘을 포함하지 않는다면, 에피솜 증폭은 가능하지 않다. 대신에, 상기 재조합 DNA는 조작된 세포의 게놈에 통합되며, 상기 프로모터는 원하는 핵산의 발현을 지시한다.
- [0106] 본 발명에 적합한 박테리아 발현 벡터의 예는 pET21b+, pBR322 또는 pET28+를 포함하지만, 이에 제한되지 않는다.
- [0107] 포유동물 발현 벡터의 예로는 Invitrogen로부터 입수 가능한 pcDNA3, pcDNA3.1(+/-), pGL3, pZeoSV2(+/-),

pSecTag2, pDisplay, pEF/myc/cyto, pCMV/myc/cyto, pCR3.1, pSinRep5, DH26S, DHBB, pNMT1, pNMT41, pNMT81, Promega로부터 입수 가능한 pCI, Strategene로부터 입수 가능한 pMbac, pPbac, pBK-RSV 및 pBK-CMV, Clontech로부터 입수 가능한 pTRES 및 이들의 유도체를 포함하지만, 이에 제한되지 않는다.

[0108] 레트로바이러스와 같은 진핵생물 바이러스로부터의 조절 요소를 포함하는 발현 벡터도 본 발명에 의해 사용될 수 있다. SV40 벡터는 pSVT7 및 pMT2를 포함한다. 소 유두종 바이러스 유래 벡터는 pBV-1MTHA를 포함하고, 엡스타인 바 바이러스 유래 벡터는 pHEB0 및 p205를 포함한다. 다른 예시적인 벡터는 pMSG, pAV009/A⁺, pMT010/A⁺, pMAMneo-5, 바콜로바이러스 pDSVE 및 SV-40 초기 프로모터, SV-40 후기 프로모터, 메탈로티오네인 프로모터, 쥐 유방 종양 바이러스 프로모터, 라우스 육종 바이러스 프로모터, 폴리헤드린 프로모터 또는 진핵세포에서의 발현에 효과적인 다른 프로모터의 지시 하에서 단백질 발현을 허락하는 임의의 다른 벡터를 포함한다.

[0109] 다양한 방법이 본 발명의 발현 벡터를 세포로 도입하기 위해 사용될 수 있다. 이러한 방법은 일반적으로 Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Springs Harbor Laboratory, New York (1989, 1992), Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley and Sons, Baltimore, Md. (1989), Chang et al., Somatic Gene Therapy, CRC Press, Ann Arbor, Mich. (1995), Vega et al., Gene Targeting, CRC Press, Ann Arbor Mich. (1995), Vectors: A Survey of Molecular Cloning Vectors and Their Uses, Butterworths, Boston Mass. (1988) 및 Gilboa et al. [Biotechniques 4 (6): 504-512, 1986]에 기술되어 있으며, 예를 들어 안정적 또는 일시적 형질 감염, 리포펙션, 전기 천공 및 재조합 바이러스 벡터에 의한 감염을 포함한다. 또한, 양성-음성 선택 방법에 대하여 미국 특허 제5,464,764호 및 제5,487,992호를 참조하시오.

[0110] 형질전환된 세포는 다량의 재조합 폴리펩타이드의 발현을 허용하는 효과적인 조건 하에서 배양된다. 효과적인 배양 조건은 단백질 생성을 허용하는 효과적인 배지, 생물반응기, 온도, pH 및 산소 조건을 포함하나, 이에 제한되지 않는다. 효과적인 배지는 세포가 배양되어 본 발명의 재조합 폴리펩타이드를 생산하는 임의의 배지를 의미한다. 이러한 배지는 전형적으로 동화할 수 있는 탄소, 질소와 포스페이트 공급원, 및 적절한 염, 무기질, 금속과 기타 영양소(예, 비타민)를 갖는 수용액을 포함한다.

[0111] 본 발명의 세포는 통상의 발효 생물반응기, 진탕 플라스크, 시험관, 미세역가 접시 및 페트리 접시에서 배양될 수 있다. 배양은 재조합 세포에 적합한 온도, pH 및 산소 함량으로 수행될 수 있다. 이러한 배양 조건은 당업자의 전문 기술 내에 있다.

[0112] 생산에 사용된 벡터 및 숙주 시스템에 따라, 본 발명의 생성된 폴리펩타이드는 재조합 세포 내에 남아있거나, 발효 배지로 분비되거나, 대장균 내 세포질 공간과 같은 2개의 세포막 사이의 공간으로 분비되거나, 또는 세포 또는 바이러스 멤브레인의 외부 표면 상에 유지될 수 있다.

[0113] 배양에서 예정된 시간 후에, 재조합 융합 단백질의 회수가 수행된다.

[0114] 상기 융합 단백질이 세포에서 발현되는 경우, 융합 단백질을 유리시키기 위해 세포막을 파괴하는 것이 바람직하다.

[0115] 세포 파괴는 균질화를 포함하여 당업계에 공지된 방법을 사용하여 수행될 수 있다.

[0116] 융합 단백질은 SUMO 프로테아제(EC 3.4.22.68)의 첨가에 의해 탈SUMO화(desumoylate)된다.

[0117] 탈SUMO화(Desumoylation)는 정제 과정의 어느 단계에서나 수행될 수 있다. 특정 구현예에 따르면, 이러한 절차는 열 변성 후, 그리고 하기에 기술된 바와 같이 염 침전 및/또는 교환 크로마토그래피 전에 수행된다.

[0118] 상기 SUMO 프로테아제는 사카로마이세스 세레비시에 유래 사카로마이세스 세레비시에 ULP1(Ub1-특이적 프로테아제 1), Ulp2, 인간 SENP1, 인간 SENP2, 인간 SENP3, 인간 SENP5, 인간 SENP6, 인간 SENP7, 마우스 SENP1, 마우스 SENP2, 마우스 SENP3, 마우스 SENP5, 마우스 SENP6, 마우스 SENP7, 또는 애기장대 Ulp1a 내지 Ulp1d 중 어느 하나, 애기장대 Ulp2a 내지 Ulp2h 중 어느 하나, 애기장대 ESD4, 예쁜꼬마선충 Ulp1, 예쁜꼬마선충 ULP-2, 노랑초파리 ULP1, 스킨조사카로마이세스 폼베 Ulp1, 스킨조사카로마이세스 폼베 ULP2, 아스퍼질러스 니들란스 Ulp, 아프리카발톱개구리 XSENP1a, 아프리카발톱개구리 XSENP1b, 크산토모나스 캄페스트리스 XopD, 클루이베로마이세스 락티스 Ulp1, 열대열말라리아원충 Ulp, 이의 균등물, 이의 동족체, 이의 촉매 도메인 또는 이의 조합물을 포함할 수 있다.

[0119] 상기 융합 단백질은 열 변성, 염 유도 침전, 혼합 모드 크로마토그래피, 양이온 교환 크로마토그래피 및 음이온 교환 크로마토그래피를 포함하지만, 이에 제한되지 않는 당 업계에 공지된 임의의 방법을 사용하여 정제될 수

있다.

열 변성:

상당한 단백질은 고온에서 상당한 안정성을 가지며, 표적 단백질이 오염 단백질보다 더 큰 열 안정성을 갖는 경우, 고온에서 몇 분에서 수 시간의 시간 동안 인큐베이션하면 종종 원하지 않는 단백질이 침전되고, 원심분리로 제거될 수 있다. 상승된 온도에서 표적 단백질의 안정성은 경우에 따라 기질 또는 그의 폴딩을 강화시키는 다른 특정 리간드의 존재에 의해 강화될 수 있다. 알파-케토글루타레이트(예, 10mM) 및 피리독살 5-포스페이트(예, 20 μ M)의 존재 하에 GOT1은 70 °C에서 열 안정성을 갖는다. 따라서, 온도를 약 70 °C로 증가시키면, 변성된 단백질이 침전될 수 있다.

염 유도 침전:

단백질의 용해도는 용액의 이온 강도에 따라 그리고 이러한 이유로 염 농도에 따라 다르다. 2가지 별개 효과가 관찰된다: 저염 농도에서, 염용이라 불리는 효과로, 염 농도 증가(즉, 이온 강도의 증가)로 단백질의 용해도가 증가한다. 염 농도(이온 강도)가 추가로 증가함에 따라, 단백질의 용해도가 감소되기 시작한다. 충분히 높은 이온 강도에서, 단백질은 용액으로부터 거의 완전히 침전될 것이다(염석). 상기 단백질은 높은 이온 강도에서 용해도가 현저하게 다르므로 염석(또는 염 유도 침전)은 주어진 단백질의 정제를 돕는데 매우 유용한 절차이다. 일반적으로 사용되는 염은 암모늄 설페이트이며 매우 수용성이기 때문에 호프마이스터 시리즈에서 두 개의 이온을 형성하고 효소 활성에 악영향을 미치지 않는다. 이는 포화 용액의 백분율 농도(100% 용액)로 표현되는, 요구 농도로 희석된 포화 수용액으로 일반적으로 사용된다.

크로마토그래피 수치:

용어 "크로마토그래피 수치" 또는 "크로마토그래피 매질"은 본원에서 상호 교환 적으로 사용되며, 목적 분석물(예, 목적 폴리펩타이드 또는 본 발명의 융합 단백질)을 혼합물에 존재하는 다른 분자로부터 분리하는 고체상의 임의의 종류를 지칭한다. 일반적으로, 목적 분석물은 혼합물의 개별 분자가 이동상의 영향 하에 고정된 고체 상을 통해 이동하는 속도 또는 결합 및 용리 공정의 차이의 결과로서 다른 분자로부터 분리된다. 비제한적인 예로는 양이온 교환 수치, 음이온 교환 수치 및 혼합 모드 수치를 포함한다. 상기 수치의 부피, 사용되는 컬럼의 길이 및 직경, 뿐만 아니라 동적 용량 및 유속은 처리될 유체의 부피, 본 발명의 공정에 수행될 유체 내의 단백질의 농도와 같은 몇몇 매개변수들에 따라 달라질 수 있다. 각 단계에 대한 이들 매개변수의 측정은 당업자의 평균 기술 범위 내에 있다.

혼합 모드 크로마토그래피:

혼합 모드 크로마토그래피는 크로마토그래피 리간드의 혼합 모드를 이용하는 크로마토그래피이다. 특정 구현예에서, 이러한 리간드는 결합될 물질과 상호 작용하는 적어도 2개의 상이한, 그러나 협력적(co-operative) 부위를 제공할 수 있는 리간드를 지칭한다. 이들 부위 중 하나는 리간드와 목적 물질 사이에 매력적인 유형의 전하-전하 상호 작용을 제공한다. 다른 부위는 전형적으로 전자 수용체-공여체 상호 작용 및/또는 소수성 및/또는 친수성 상호 작용을 제공한다. 전자 공여체-수용체 상호 작용은 수소 결합, π - π 결합, 양이온- π , 전하 이동, 쌍극자-쌍극자, 유도된 쌍극자 등과 같은 상호 작용을 포함한다.

특정 구현예에서, 혼합 모드 크로마토그래피 매질은 유기 또는 무기 지지체에 결합된 혼합 모드 리간드로 구성되며, 때로는 기본 매트릭스로 표시되거나 직접 또는 스페이서를 통해 표시된다. 상기 지지체는 본질적으로 구형인 입자, 모놀리스, 필터, 막, 표면, 모세관 등과 같은 입자의 형태일 수 있다. 특정 구현예에서, 상기 지지체는 가교 결합된 탄수화물 물질, 예컨대 아가로스, 아가, 셀룰로오스, 텍스트란, 키토산, 곤약, 카라기난, 젤란, 알기네이트 등과 같은 천연 폴리머로부터 제조된다. 높은 흡착능을 얻기 위해, 상기 지지체는 다공성일 수 있고, 이어서 리간드는 기공 표면 뿐만 아니라 외부 표면에도 결합된다. 이러한 천연 폴리머 지지체는 역 현탁 겔화(inverse suspension gelation)와 같은 표준 방법에 따라 제조될 수 있다(S Hjerten: Biochim Biophys Acta 79(2), 393-398 (1964)). 그 대신에, 상기 지지체는 가교 결합된 합성 폴리머, 예, 스티렌 또는 스티렌 유도체, 디비닐벤젠, 아크릴아미드, 아크릴레이트 에스테르, 메타크릴레이트 에스테르, 비닐 에스테르, 비닐 아미드 등과 같은 합성 폴리머로부터 제조될 수 있다. 이러한 합성 폴리머는 표준 방법, 예를 들면, "현탁 중합에 의해 개발된 스티렌계 폴리머 지지체"(R Arshady: Chimica e L'Industria 70(9), 70-75 (1988)) 참조에 따라 제조될 수 있다. 다공성 천연 또는 합성 폴리머 지지체는 스웨덴 옘살라(Uppsala) GE 헬스케어 (GE healthcare)와 같은 상업적 공급원으로부터 입수 가능하다.

특정 구현예에서, 혼합 모드 수치는 음이온 교환 및 소수성 상호 작용이 가능한 관능기를 포함한다. 이러한 수

지의 예로는 부틸-세파로스, 옥틸-세파로스, 페닐-세파로스(예, pH 7-9 범위), MEP 하이퍼셀, PPA 하이퍼셀(예, pH 4.0-8.0 범위), HEA 하이퍼셀(모두 Pall Corp.에서 제조), Capto Adhere 또는 Capto를 포함하나 이에 제한되지 않는다.

[0130] **양이온 교환 크로마토그래피:**

[0131] 분리를 수행함에 있어서, 단백질 혼합물은 배치 정제 기술 또는 크로마토그래피 기술을 사용하는 다양한 기법 중 임의의 기법을 사용함으로써 양이온 교환 물질과 접촉시킬 수 있다. 단백질의 pI 미만의 pH를 갖는 버퍼 중에 존재할 때 전반적인 양전하를 갖는 단백질은 음으로 하전된 작용기를 함유하는 양이온 교환 물질에 잘 결합할 것이다. 용출은 일반적으로 버퍼의 이온 강도(즉, 전도도)를 증가시켜 이온 교환 매트릭스의 하전된 부위에 대한 용질과 경쟁하는 것에 의해 달성된다. pH를 변화시킴으로써 용질의 전하를 변화시키는 것은 용질의 용출을 달성하는 또 다른 방법이다. 전도도 또는 pH의 변화는 점진적(구배 용출) 또는 단계별(단계 용출)일 수 있다. 양이온성 치환체는 크로마토그래피용 양이온 지지체를 형성하기 위해 매트릭스에 부착될 수 있다. 양이온 교환 치환기의 비제한적인 예는 카르복시메틸(CM), 설포에틸(SE), 설포프로필(SP), 포스페이트(P) 및 설포네이트(S)를 포함한다.

[0132] 바람직하게는, CEX 수지는 CM 작용기를 포함한다.

[0133] DE23™, DE32™, DE52™, CM-23™, CM-32™, 및 CM-52™과 같은 셀룰로오스 이온 교환 수지는 Whatman Ltd. Maidstone, Kent, U.K.로부터 입수할 수 있다. SEPHADEX®계 및 가교 결합된 이온 교환제가 또한 공지되어 있다. 예를 들면, DEAE-, QAE-, CM-, 및 SP- SEPHADEX®, 그리고 DEAE-, Q-, CM- 및 S-SEPHAROSE® 및 SEPHAROSE® Fast Flow는 모두 Pharmacia AB에서 구입할 수 있다. 또한, TOYOPEARL™ DEAE-650S 또는 M 및 TOYOPEARL™ CM-650S 또는 M과 같은 에틸렌글리콜-메타크릴레이트 코폴리머로 유도된 DEAE 및 CM 모두는 Tosoh, Philadelphia, PA로부터 입수 가능하다.

[0134] 또한, TOYOPEARL™ DEAE-650S 또는 M 및 TOYOPEARL™ CM-650S 또는 M과 같은 에틸렌글리콜-메타크릴레이트 코폴리머로 유도된 DEAE 및 CM 모두는 Tosoh, Philadelphia, PA로부터 또는 Nuvia S 및 U OSphere™ S는 BioRad, Hercules, CA로부터, Eshmuno® S는 EMD Millipore, Billerica, CA.로부터 입수 가능하다.

[0135] **음이온 교환 크로마토그래피:**

[0136] 다양한 음이온 교환 크로마토그래피 지지체가 사용될 수 있고 하기로 구성된 군에서 선택될 수 있다: DEAE-세파로스 CL-6B, DEAE-세파로스 FF, Q-세파로스 FF, Q-세파로스 HP, Q-세파로스 XL, DEAE-세파셀, DEAE-세파텍스, QAE-세파텍스, DEAE-토요피알(Toyopearl), QAE-토요피알, 미니-Q, 모노-Q, 모노-P, 소스 15Q, 소스 30Q, ANX-세파로스 등. 바람직하게는, 음이온 교환 크로마토그래피는 Q-세파로스 또는 DEAE-세파로스(예, pH 4.0~9.0 범위) 상에서 수행된다.

[0137] 특정 구현예에 따르면, 단백질이 GOT1일 때, 정제는 개시된 바와 같은 순서로 하기 기술에 의해 수행된다:

[0138] (a) 열 처리(예, 65-70 °C에서 10분)에 의해 GOT1을 정제하는 단계;

[0139] (b) 염 유도 침전(예, 암모늄 설페이트 침전)에 의해 GOT1을 정제하는 단계;

[0140] (c) 혼합 모드 크로마토그래피(예, pH 4.0-8.0 범위에서 PPA 하이퍼셀)에 의해 GOT1을 정제하는 단계;

[0141] (d) 양이온 교환 크로마토그래피(예, pH 4.0-7.0의 범위에서 SP-세파로스 또는 CM-세파로스)에 의해 GOT1을 정제하는 단계; 및

[0142] (e) 음이온 교환 크로마토그래피(예, pH 4.0-9.0의 범위에서 Q-세파로스 또는 DEAE-세파로스)에 의해 GOT1을 정제하는 단계.

[0143] 본원에 기술된 방법을 사용하여, 본 발명자는 단백질의 1번 위치에 알라닌(메티오닌이 아님)을 갖는 고도로 정제된 GOT1의 단백질 제제를 생성하였다.

[0144] 그러므로 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, GOT1 폴리펩타이드 분자의 100%가 GOT1 폴리펩타이드의 1번 위치에 알라닌을 가지고, GOT1 폴리펩타이드 분자가 제조 중 단백질의 적어도 95% 이상을 구성하는, 글루타메이트 옥살로아세테이트 트랜스아미나제 1(GOT1) 폴리펩타이드 분자를 포함하는 단백질 제제를 제공한다.

[0145] 본원에서 사용된 어구 "단백질 제제"는 적어도 하나의 단백질의 액체 혼합물을 의미하며, 상기 단백질은 예를 들어 세포 용해물, 본래 세포에 존재하는 모든 단백질을 포함하지 않는 부분 세포 용해물 또는 여러 세포 용해

물의 조합을 포함한다. 용어 "단백질 제제"는 또한 용해된 정제 단백질을 포함한다. 전형적으로, 단백질 제제는 지질, 지방, 핵산 등과 같은 다른 세포 성분을 갖지 않는다.

- [0146] 상기 GOT1 폴리펩타이드는 상기 단백질 제제 내 가용화된 상태로 존재한다.
- [0147] 일 구현예에 따르면, 제제 내 단백질의 적어도 90% 이상이 GOT1 폴리펩타이드 분자이다.
- [0148] 일 구현예에 따르면, 제제 내 단백질의 적어도 91% 이상이 GOT1 폴리펩타이드 분자이다.
- [0149] 일 구현예에 따르면, 제제 내 단백질의 적어도 92% 이상이 GOT1 폴리펩타이드 분자이다.
- [0150] 일 구현예에 따르면, 제제 내 단백질의 적어도 93% 이상이 GOT1 폴리펩타이드 분자이다.
- [0151] 일 구현예에 따르면, 제제 내 단백질의 적어도 94% 이상이 GOT1 폴리펩타이드 분자이다.
- [0152] 일 구현예에 따르면, 제제 내 단백질의 적어도 95% 이상이 GOT1 폴리펩타이드 분자이다.
- [0153] 일 구현예에 따르면, 제제 내 단백질의 적어도 96% 이상이 GOT1 폴리펩타이드 분자이다.
- [0154] 일 구현예에 따르면, 제제 내 단백질의 적어도 97% 이상이 GOT1 폴리펩타이드 분자이다.
- [0155] 일 구현예에 따르면, 제제 내 단백질의 적어도 98% 이상이 GOT1 폴리펩타이드 분자이다.
- [0156] 일 구현예에 따르면, 제제 내 단백질의 적어도 99% 이상이 GOT1 폴리펩타이드 분자이다.
- [0157] 일 구현예에 따르면, 제제 내 단백질의 100%는 GOT1 폴리펩타이드 분자이다.
- [0158] 상기 단백질 제제 내 GOT1 폴리펩타이드는 N 말단(단백질의 1번 위치)에 알라닌을 갖는다.
- [0159] 본 발명의 이러한 양태에 따르면, 메티오닌이 메티오닌 아미노 펩티다아제를 사용하여 절단되는 박테리아 세포에서 발현된 재조합 GOT1 단백질 제제와 비교할 때, 단백질의 1번 위치에 알라닌을 갖는 제제 내 GOT1 단백질의 비율은 더 높다.
- [0160] 따라서, 본 발명의 이러한 양태의 제제 내 GOT1 단백질의 비율은, 메티오닌이 메티오닌 아미노 펩티다아제를 사용하여 절단되는 박테리아 세포에서 발현된 재조합 GOT1 단백질 제제와 비교할 때, 1%, 2%, 3%, 4%, 5% 또는 그 이상 더 높을 수 있다.
- [0161] 본 발명의 이러한 양태에 따르면, GOT1 분자의 적어도 99.9% 이상은 1번 위치에 알라닌을 포함하고, GOT1 분자의 적어도 99.99% 이상은 1번 위치에 알라닌을 포함하고, GOT1 분자의 적어도 99.999% 이상은 1번 위치에 알라닌을 포함하고, 바람직하게는 GOT1 분자의 적어도 99.9999% 이상 또는 100%는 1번 위치에 알라닌을 포함한다.
- [0162] 본원에 기재된 재조합 GOT1 폴리펩타이드는 글루타메이트의 과잉과 관련된 질환 또는 증상을 치료하는데 사용될 수 있다
- [0163] 글루타메이트의 과잉과 관련된 질환의 예로는 뇌 무산소증, 뇌졸중, 분만기 뇌손상, 외상성 뇌 손상, 박테리아 뇌수막염, 지주막하 출혈, 간질, 급성 간부전, 녹내장, 루게릭병, HIV, 치매, 근위축성 측방 경화증(ALS), 경련 상태, 심장 절개 수술, 동맥 수술, 관상 동맥 우회술 및 알츠하이머병이 포함되나, 이에 제한되지 않는다.
- [0164] 특정 구현예에 따르면, 상기 질환은 중추 신경계의 암이다
- [0165] 본원에 사용된 어구 "중추 신경계의 암"은 일반적으로 글루타메이트가 인접한 건강한 신경 세포에 흥분독성을 발휘할 수 있는 수준에서 글루타메이트를 방출하는 뇌종양(1차 또는 2차)을 의미한다. 따라서, 중추 신경계의 암은 신경아교세포, 신경 세포, 슈반 세포, 송과체 세포, 뇌수막종 및 흑색종의 1차 종양 뿐만 아니라 육종, 림프종 및 뇌에서 전이하는 다발성 악성 종양(multiple systemic malignancies)을 포함한다.
- [0166] 특정 예는 성상 세포종 및 아교 모세포종 및 이들의 관련된 신경 및 신경 교종 종양, 신경 교종(예, 1급 및 2급 포함), 핏돌기 신경교종, 신경세포종, 이형성 신경 상피 종양, 원시신경외배엽 종양 및 신경절신경종을 포함하나, 이에 제한되지 않는다.
- [0167] GOT-1로 치료될 수 있는 추가적인 증상으로는 외상성 뇌 손상과 뇌진탕, 재발성 편두통, 뇌성마비, 소생법 및 질식, 재발성 간질 발작, 근위축성 측방 경화증(ALS), 박테리아 뇌수막염 및 파킨슨병을 포함한다.
- [0168] 상기 GOT1 폴리펩타이드는 그 자체로 또는 약제학적 조성물의 일부로서 제공될 수 있다. 본원에 사용된 어구 "약제학적 조성물"은 생리학적으로 적합한 담체, 부형제 및 침투제와 같은 다른 성분들과 함께 본원에 기술된 하

나 또는 그 이상의 활성 성분(active ingredient)의 제제를 말한다. 상기 약제학적 조성물의 목적은 생물체에 화합물의 투여를 용이하게 하는 것이다.

[0169] 본원에서 용어 "활성 성분"은 생물학적 효과(예, GOT1)에 대해 설명할 수 있는 제제를 말한다.

[0170] 이후, 상호교환적으로 사용될 수 있는 어구 "생리학적으로 허용 가능한 담체(physiologically acceptable carrier)" 및 "약제학적으로 허용 가능한 담체(pharmaceutically acceptable carrier)"는 유기체에 유의한 자극을 유발하지 않고, 투여된 화합물의 생물학적 활성 및 특성을 배제하지 않는 담체 또는 희석제를 말한다. 이러한 어구에는 보조제가 포함되어 있다. 상기 약제학적으로 허용 가능한 담체에 포함된 성분 중 하나는 예를 들어 유기 및 수성 매질 모두에서 광범위한 용해도를 갖는 생체적합성 폴리머인 폴리에틸렌글리콜(PEG)일 수 있다 (Mutter et al. (1979)).

[0171] 본원에서 용어 "부형제(excipient)"는 활성 성분의 투여를 더 용이하게 하기 위해 약제학적 조성물에 첨가되는 비활성 물질을 말한다. 제한 없이, 부형제의 예는 칼슘 카보네이트(calcium carbonate), 칼슘 포스페이트(calcium phosphate), 다양한 당 및 전분의 형태, 셀룰로오스 유도체(cellulose derivatives), 젤라틴, 식물성 오일 및 폴리에틸렌 글리콜(polyethylene glycols)을 포함한다.

[0172] 약물의 제형화 및 투여 기술은 "Remington's Pharmaceutical Sciences." Mack Publishing Co., Easton, PA, 최신판에 기재되어 있으며, 이는 본원에 참고로 포함된다.

[0173] 본 발명의 약제학적 조성물의 적합한 투여 경로는 예를 들어, 경구(oral), 직장(rectal), 점막관통(transmucosal), 특히 척추강내(intrathecal), 직접적인 심실내(intraventricular), 정맥내(intravenous), 복강내(intraperitoneal), 비강내(intranasal), 골수 내(intraosseus) 및 안구내(intraocular) 주입뿐만 아니라, 근육내(intramuscular), 피하(subcutaneous) 및 골수내강(intramedullary) 주입을 포함하는 경비(transnasal), 장내(intestinal) 또는 비경구적(parenteral) 전달도 포함할 수 있다.

[0174] 특정 구현예에 따르면, 상기 경로는 전신적(systemic) 모드이고, 투여는 혈중(혈장) 글루타메이트 수준을 감소시키고 뇌에서 혈중(brain-to-blood) 글루타메이트 수준을 향상시킨다.

[0175] 투여 모드는, 또한 환자의 상태에 따라 달라질 수 있다. 예를 들어, 발작의 경우, 골수 내 투여 또는 정맥 내 투여가 선호될 수 있다.

[0176] 본 발명의 약제학적 조성물은 예를 들어 통상적인 혼합, 용해, 과립화, 드라제화(dragee-making), 부양화(levigating), 에멀전화, 캡슐화, 트랩핑(entrapping) 또는 동결 건조 공정의 수단으로 당업계에 공지된 방법에 의해 제조될 수 있다.

[0177] 본 발명에 부합되게 사용하기 위한 약제학적 조성물은 제제로의 활성 성분의 가공을 용이하게 하며, 약제학적으로 사용될 수 있는 부형제 및 보조제를 포함하는 하나 또는 그 이상의 생리학적으로 허용 가능한 담체를 사용하여 기존의 방식으로 제형화될 수 있다. 적절한 제형화는 선택된 투여 루트에 의존한다.

[0178] 주입을 위해, 본 발명의 활성 성분은 수용액, 바람직하게는 헵크 용액(Hank's solution), 링거액(Ringer's solution)과 같은 생리학적으로 서로 섞이는 완충액(physiologically compatible buffers) 또는 생리학적 염 완충액(physiological salt buffer)로 제형화될 수 있다. 점막관통 투여를 위해서, 침투되는 장벽(barrier)에 적합한 침투제(penetrant)가 제형화에 사용된다. 이러한 침투제는 당업계에 일반적으로 공지되어 있다.

[0179] 경구 투여를 위해, 화합물은 당업계에 잘 알려져 있는 약제학적으로 허용 가능한 담체와 함께 활성 화합물을 조합함으로써 용이하게 제형화될 수 있다. 이러한 담체는 본 발명의 화합물이 환자에 의한 경구 섭취(oral ingestion)를 위해, 정제(tablets), 알약(pills), 당의정(dragees), 캡슐(capsules), 액체(liquids), 젤(gels), 시럽(syrups), 슬러리(slurries), 현탁제(suspensions) 등으로 제형화될 수 있게 한다. 경구용 약제학적 제제는 원한다면 적합한 보조제를 첨가한 후 고체 부형제를 사용하고, 임의로 생성된 혼합물을 분쇄(grinding)하고, 과립의 혼합물을 가공하여 정제 또는 당의정 핵(core)으로 만들어질 수 있다. 적합한 부형제는 특히 락토오스, 수크로오스, 만니톨 또는 소르비톨을 포함하는 당과 같은 충전제(fillers); 예를 들어, 옥수수 전분(maize starch), 밀 전분, 쌀 전분, 감자 전분, 젤라틴, 검 트래거캔스(gum tragacanth), 메틸 셀룰로오스(methyl cellulose), 히드록시프로필메틸-셀룰로오스(hydroxypropylmethyl-cellulose), 소듐 카복시메틸셀룰로오스(sodium carboxymethylcellulose); 및/또는 폴리비닐피롤리돈(polyvinylpyrrolidone, PVP)과 같은 생리학적으로 허용 가능한 폴리머이다. 원한다면, 가교결합된 폴리비닐피롤리돈, 한천(agar) 또는 알긴산, 또는 소듐 알기네이트(sodium alginate)와 같은 이들의 염과 같은 붕해제가 첨가될 수 있다.

- [0180] 당의정 핵은 적당한 코팅물로 제공된다. 이러한 목적으로, 농축된 당 용액이 사용될 수 있으며, 임의로 검 아라빅(gum arabic), 탈크, 폴리비닐 피롤리돈, 카르보폴 겔(carbopol gel), 폴리에틸렌 글리콜, 티타늄 디옥사이드, 래커액(lacquer solutions) 및 적절한 유기 용매 또는 용매 혼합액이 포함될 수 있다. 활성 화합물 투여량(dose)의 상이한 조합을 확인하거나 특성화하기 위해, 정제 또는 당의정 코팅물에 염료(dyestuffs) 또는 안료(pigments)가 첨가될 수 있다.
- [0181] 경구용으로 사용될 수 있는 약제학적 조성물은 젤라틴과 글리세롤 또는 소르비톨과 같은 가소제로 제조된 연질의 밀봉(soft, sealed) 캡슐뿐만 아니라 젤라틴으로 제조된 푸쉬-핏(push-fit) 캡슐도 포함한다. 상기 푸쉬-핏 캡슐은 락토오스와 같은 필러, 전분과 같은 결합제, 탈크 또는 마그네슘 스테아레이트와 같은 활택제 및 임의로 안정화제를 포함한 혼합물(admixture)에 활성 성분을 포함할 수 있다. 연질 캡슐에서, 활성 성분은 지방유(fatty oils), 액체 과라핀 또는 액체 폴리에틸렌 글리콜과 같은 적당한 액체에 용해되거나 현탁될 수 있다. 또한, 안정화제도 첨가될 수 있다. 모든 경구 투여용 제형화는 선택된 투여 루트에 적합한 용량 내에 있어야 한다.
- [0182] 구강 투여를 위해, 상기 조성물은 기존의 방식으로 제형화된 정제 또는 마름모꼴 캔디(lozenges)의 형태를 취할 수 있다.
- [0183] 비강 흡입에 의한 투여를 위해, 본 발명에 따라 사용하기 위한 활성 성분은 적당한 추진제, 예를 들어, 디클로로디플루오로메탄, 트리클로로플루오로메탄, 디클로로테트라플루오로에탄 또는 이산화탄소를 사용하여 가압 팩 또는 네브라이저(nebulizer)로부터 에어로졸 분무 프리젠테이션(aerosol spray presentation)의 형태로 편리하게 전달된다. 가압 에어로졸의 경우, 투여량 단위(dosage unit)는 계량된 양(metered amount)을 전달하기 위한 밸브(valve)를 제공함으로써 결정될 수 있다. 디스펜서(dispenser)에서 사용하기 위해, 젤라틴과 같은 캡슐 및 카트리지(cartridges)는 화합물과 락토오스 또는 전분과 같은 적합한 분말 기재(powder base)의 분말 혼합물을 함유하도록 제형화될 수 있다.
- [0184] 본원에 기술된 제제는 예를 들어, 급속주입(bolus injection) 또는 연속주입(continuous infusion)에 의한 비경구 투여용으로 제형화될 수 있다. 주사용 제제는 단위 투여 형태(unit dosage form)로, 예를 들어 앰플(ampoules) 또는 다회용 저장용기(multi-dose containers)에 임의로 방부제가 첨가되어 제공될 수 있다. 상기 조성물은 유성 또는 수성 비히클에 녹인 현탁액, 용액 또는 에멀전일 수 있고, 현탁제, 안정화제 및/또는 분산제와 같은 제형화제(formulatory agent)를 포함할 수 있다.
- [0185] 비경구 투여용 약제학적 조성물은 수용성 형태로 활성 제제의 수용액을 포함한다. 또한, 활성 성분의 현탁액은 적절한 유성 또는 수성 기반의 주사 현탁액으로 제조될 수 있다. 적합한 친유성 용매 또는 비히클은 참기름과 같은 지방성 오일, 또는 에틸 올리에이트, 트리글리세라이드 또는 리포솜과 같은 합성 지방산 에스테르를 포함한다. 수성 주사 현탁액은 소듐 카복시메틸 셀룰로오스, 소르비톨 또는 텍스트란과 같은 현탁액의 점도를 증가시키는 물질을 포함할 수 있다. 임의로, 현탁액은 또한 고농축 용액을 제조할 수 있게 활성 성분의 용해도를 증가시키는 적절한 안정화제 또는 약제를 포함할 수 있다.
- [0186] 대안적으로, 상기 활성 성분은 사용하기 전에 적절한 비히클, 예를 들어 멸균, 발열원이 없는 수계 용액(sterile, pyrogen-free water based solution)과 함께 구성되기 위한 분말 형태일 수 있다.
- [0187] 본 발명의 약제학적 조성물은 또한 예를 들어, 코코아 버터 또는 기타 글리세리드와 같은 종래의 좌약 기재(suppository base)를 사용하여 좌약 또는 정제 관장제(retention enema)와 같은 직장 조성물로 제형화될 수 있다.
- [0188] 본 발명과 관련하여 사용하기에 적합한 약제학적 조성물은 활성 성분이 의도된 목적을 달성하는데 효과적인 양으로 포함되는 조성물을 포함한다. 더욱 상세하게는, 치료학적 유효량은 질환의 증상을 예방, 경감 또는 완화시키거나 치료되는 대상체의 생존을 연장시키는데 유효한 활성 성분의 양을 의미한다.
- [0189] 치료학적 유효량의 결정은 당업자들의 능력 범위 내에 있다.
- [0190] 본 발명의 치료 방법에 의해 사용되는 임의의 약제학적 조성물에 대해, 치료학적 유효량 또는 투여량(dose)은 초기에 시험관 내 분석으로부터 추정될 수 있다. 예를 들면, 투여량은 동물 모델에서 투여량을 제형화할 수 있으며 이러한 정보는 인간에게 유용한 투여량을 더욱 정확하게 결정하기 위해 사용될 수 있다.
- [0191] 본원에 기술된 활성 성분의 독성 및 치료학적 효능은 시험관 내, 세포 배양 또는 실험 동물에서 표준 약제학적 절차에 의해 측정될 수 있다. 이러한 시험관 내 및 세포 배양 검정법 및 동물 실험으로부터 얻어진 데이터는 인

간에게 사용하기 위한 투여의 범위를 정하는데 사용될 수 있다. 투여량은 사용된 투여 형태 및 투여 경로에 따라 달라질 수 있다. 정확한 제형, 투여 경로 및 투여량은 환자의 상태를 고려하여 개개인의 의사에 의해 선택될 수 있다(예를 들어, Fingl, et al., 1975, in "The Pharmacological Basis of Therapeutics", Ch. 1 p.1을 참조).

- [0192] 신경계의 암에 대한 동물 모델을 쉽게 이용할 수 있다.
- [0193] 따라서, 이중 이식 모델은 전임상 요법의 투여량 반응 특성을 평가하고, 치료 반응에 대한 종양 부위의 영향을 평가하는데 매우 적합하다.
- [0194] Weissenberger et al J. Neurosurg. 2007 April; 106(4):652-9에서는 성상 세포종을 형성하는 GFAP 프로모터로부터 v-src를 발현하는 (성상 세포로 발현을 제한) 형질전환 유전자의 생식선 삽입을 일으켰다. V-src는 인간의 신경교종에서도 활성화되는 몇 가지 신호 전달 경로를 활성화시킨다. 이러한 GFAP/v-src 신경교종은 주로 저등급 또는 역형성이지만 어떤 경우에는 교모세포종의 조직학적 특징을 얻는다.
- [0195] Guha et al. Am J Pathol. 2005 September; 167(3):859-67에서는 GFAP 프로모터로부터 발암성 H-Ras를 과발현하는 형질전환 마우스를 개발하였다. 이 마우스의 상이한 파운더(founder) 라인은 다양한 수준의 발암성 Ras를 발현한다. H-Ras의 최고 생산자(producer)는 교모세포종의 모든 특징을 가진 성상 세포종을 발병한다. 온전한 H-Ras 발현자는 생식기 전염(germline transmission)에 이르며 생후 3개월까지 높은 발병률을 보이는 저등급 및 역형성 성상세포종을 발병한다.
- [0196] Reilly et al. Nat. Genet. 2000 September; 26(1):109-13에서는 NF-1과 p53의 결합된 결실을 갖는 성상세포 특성의 신경교종을 생성하였다. Nf-1은 Ras 활성을 하향 조절하는 RasGAP 단백질이기 때문에, Nf-1의 소실은 상승된 Ras 활성을 초래한다. 홀로, 마우스 내의 모든 세포에서 Nf-1의 돌연변이는 신경교종종을 유발하지만 신경교종 형성을 초래하지는 않는다; 그러나, p53의 돌연변이와 결합할 때, 마우스는 인간에서 아교모세포종의 특징을 갖는 성상세포 종양을 발생시킨다. PDGF-B의 체세포로의 레트로바이러스 벡터 유전자 전달은 Uhrbom et al Nat. Med. 2004 November; 10(11):1257-60에 의해 성상교세포를 생성하는데 사용되어 왔다. 이러한 실험에서, 복제 가능 MMLV 벡터 시스템은 다양한 CNS 종양 형태의 형성을 초래한다. 이 실험에서 보이는 가장 빈번한 조직학은 아교모세포종의 특징을 가진 고급 신경교종이다. 조직 특이적 ALV 기반 RCAS 레트로 바이러스 벡터를 갖는 체세포 유전자 전달은 또한 마우스에서 아교모세포종의 형성을 보여준다. 이러한 종양은 활성화된 Ras 및 Akt를 코딩하는 유전자의 결합된 유전자 전달 후 네스틴을 발현하는 CNS 전구체로 발생한다. 이 시스템에서, Ras 나 Akt 만으로는 아교모세포종의 생성에는 충분하지 않다. 인간 WHO 등급 III 성상세포종의 특징을 가진 형질전환 마우스 모델은 pRb과 관련 단백질, p107 및 p130의 성상세포 특이적 비활성화(Xiao et al., 2002)에 의해 개발되었다. 이는 GFAP 프로모터에 의해 구동되는 T121 유전자의 단일 카피본의 발현에 의해 달성되었다. T121은 SV40 T 항원의 121 아미노산 N 말단 단편으로 pRb 단백질을 우세하게 비활성화하지만 p53 기능을 저해하지는 않는다. TgG(Z) T121 마우스의 100%는 생후 약 6개월에 고급 성상세포종을 발생시킨다. 인간 질병과 유사한 조직학적 특징은 뉴런 및 혈관계에 대한 부착을 포함한다.
- [0197] 치료될 증상의 심각도 및 민감성에 따라, 투여(dosing)는 수일 내지는 수 주로 이어지는 치료 과정에 따라, 또는 치유가 되거나 질병 상태 또는 증상의 감소가 일어날 때까지 단일 또는 복수의 투여일 수 있다.
- [0198] 투여되는 약제학적 조성물의 양은 물론 치료되는 대상체, 고통의 심각도, 투여 방식, 처방 의사의 판단 등에 따라 좌우될 것이다.
- [0199] 혼화성(compatible)의 약제학적 담체로 제형화된 본 발명의 제제를 포함하는 조성물 또한 제조되어 적절한 용기에 보관될 수 있고, 나타난 증상의 치료용 라벨링을 할 수 있다.
- [0200] 본 발명의 조성물은, 원한다면 활성 성분을 포함하는 하나 또는 그 이상의 단위 투여 형태를 포함할 수 있는, FDA 승인 키트와 같은 팩 또는 디스펜서 장치로 제공될 수 있다. 상기 팩은 예를 들어, 환자에 의한 개인 일일 주사를 위해 미리 충전된 용량을 갖는 블리스터 팩(blister pack)과 자동 주사기(PEN)와 같은 금속 또는 플라스틱 호일(foil)을 포함할 수 있다. 상기 팩 또는 디스펜서 장치에는 투여를 위한 지시사항이 첨부될 수 있다. 상기 팩 또는 디스펜서 장치는 또한 의약품의 제조, 사용 또는 판매를 규제하는 정부 기관에 의해 규정된 형태의 용기와 관련된 주의사항을 수반할 수 있고, 이러한 주의사항은 조성물 형태 또는 인간 또는 가축 투여 형태의 기관에 의한 승인을 반영한다. 이러한 주의사항은 예를 들어, 처방약 또는 승인된 제품 첨가물(insert)의 미국 식품의약국(U.S. Food and Drug Administration)에 의해 승인된 라벨일 수 있다.
- [0201] 본 발명의 약제는 위치, 세포 유형 및 악성 등급에 기초하여 선택된 뇌종양에 대한 다른 치료 방식과 함께 (보

조 요법으로서) 제공될 수 있음을 이해할 것이다. 기존의 치료법에는 수술, 방사선 요법 및 화학 요법이 포함된다. 테모졸로마이드 (Temozolomide)는 혈액-뇌 장벽을 효과적으로 통과할 수 있고 치료에 사용되는 화학 요법 약물이다. 재발성 고급 아교모세포종의 경우, 최근 연구에서 베바시주맙과 같은 혈관신생 차단제를 기존 화학 요법과 병행하여 사용하면 좋은 결과를 얻을 수 있다. 기타 약제로는 테모달, 니트로소우레아스, 카르무스틴 및 시스-플라틴 뿐만 아니라 항체 기반 약물, 예, 세특시맙을 포함하나, 이에 제한되지 않는다.

[0202] 본 발명의 약제와 함께 투여될 수 있는 기타 항암제로는 아시바이신; 아클라루비신; 아코다졸 하이드로클로라이드; 아크로닌; 아드리아마이신; 아도젤레신; 알테스레우킨; 알트레타민; 암보마이신; 아메탄트론 아세테이트; 아미노글루테티미드; 암사크린; 아나스트로졸; 안트라마이신; 아스파라기나제; 아스피린; 아자시타딘; 아제테파; 아조토마이신; 바티마스타트; 벤조테파; 비칼루타미드; 비산트렌 하이드로클로라이드; 비스나파이드 다메실레이트; 비젤레신; 블레오마이신 설페이트; 브레퀴나르 소듐; 브로 피리딘; 부설판; 키티노마이신; 칼루스테론; 카라세미드; 카르베티머; 카보플라틴; 카르무스틴; 카루비신 하이드로클로라이드; 카르젤레신; 세데핀 골(Cedefingol); 클로람부실; 시롤레마이신; 시스플라틴; 클라드리빈; 크리스나톨 메실레이트; 사이클로포스파미드; 시타라빈; 다카르바진; 닥티노마이신; 다우노루비신 하이드로클로라이드; 데시타빈; 텍소르마플라틴; 데자구아닌; 데자구아닌 메실레이트; 디아지퀴논; 도세탁셀; 독소루비신; 독소루비신 하이드로클로라이드; 드록시펜; 드록시펜 시트레이트; 드로모스타놀론 프로피오네이트; 두아조마이신; 에다트렉세이트; 에플로르니틴 하이드로클로라이드; 엘사미트루신; 엔로플라틴; 엔프로메이트; 에피프로피딘; 에피루비신 하이드로클로라이드; 에르볼로졸; 에소루비신 하이드로클로라이드; 에스트라무스틴; 에스트라무스틴 포스페이트 소듐; 에타니다졸; 에토포시드; 에토포시드 포스페이트; 에토프린; 파드로졸 하이드로클로라이드; 파자라빈; 펜레티나이드; 플록수리딘; 플루다라빈 포스페이트; 플루오로우라실; 플루오로시타빈; 포스퀴돈; 포스트리에신 소듐; 켈시타빈; 켈시타빈 하이드로클로라이드; 하이드록시우레아; 이다루비신 하이드로클로라이드; 이폭스파마이드; 아일모포신; 인터페론 알파-2a; 인터페론 알파-2b; 인터페론 Alfa-n1; 인터페론 Alfa-n3; 인터페론 베타-I a; 인터페론 감마-I b; 아이프로플라틴; 아이리노테칸 하이드로클로라이드; 란레오티드 아세테이트; 레트로졸; 레우프롤라이드 아세테이트; 리아로졸 하이드로클로라이드; 로메트렉솔 소듐; 로무스틴; 로속산트론 하이드로클로라이드; 마소프로콜; 마이탄신; 메클로레타민 하이드로클로라이드; 메게스트롤 아세테이트; 멜렌제스트롤 아세테이트; 멜팔란; 메노자릴; 머캅토퍼린; 메토트렉세이트; 메토트렉세이트 소듐; 메토프린; 메투레데파; 미티노마이드; 미토카신; 미토크로민; 미토질린; 미토말신; 미토마이신; 미토스페르; 미토탄; 미톡산트론 하이드로클로라이드; 마이코페놀릭산; 노코다졸; 노갈라마이신; 오르마플라틴; 옥시수란; 파클리탁셀; 페가스파가세; 펠리오마이신; 펜타무스틴; 페폴로마이신 설페이트; 피포스파이드; 피포프로만; 피포설판; 피록산트론 하이드로클로라이드; 플리카마이신; 플로메스틴; 포르피머 소듐; 포르피로마이신; 프레드니무스틴; 프로카르바진 하이드로클로라이드; 푸로마이신; 푸로마이신 하이드로클로라이드; 피라조푸린; 리보프린; 로글레티미드; 사핀골; 사핀골 하이드로클로라이드; 세무스틴; 심트라젠; 스파포세이트 소듐; 스파소마이신; 스피로제르마늄 하이드로클로라이드; 스피로무스틴; 스피로플라틴; 스트렙토니그린; 스트렙토조신; 솔로페누르; 탈리소마이신; 탁솔; 테코갈란 소듐; 테가푸르; 텔록산트론 하이드로클로라이드; 테모포프린; 테니포사이드; 테록시론; 테스토라톤; 티아미프린; 티오구아닌; 티오테파; 티아줄푸이린; 티라파자민; 토포테칸 하이드로클로라이드; 토레미펜 시트레이트; 트레스톨론 아세테이트; 트리시리빈 포스페이트; 트리메트렉세이트; 트리메트렉세이트 글루쿠로네이트; 트립토텔린; 투블로졸 하이드로클로라이드; 우라실 무스타드; 우레데파; 바프레오티드; 베르테포프린; 빈블라스틴 설페이트; 빈크리스틴 설페이트; 빈데신; 빈데신 설페이트; 비네피딘 설페이트; 빈글리시네이트 설페이트; 빈레우로신 설페이트; 비노렐빈 타르트레이트; 빈로시딘 설페이트; 빈줄리딘 설페이트; 보로졸; 제니플라틴; 지노스타틴; 조루비신 하이드로클로라이드를 포함하나, 이에 제한되지 않는다. 추가적인 항종양제로는 항종양제 (Paul Calabresi and Bruce A. Chabner)의 챕터 52, 그리고 Goodman 및 Gilman's "The Pharmacological Basis of Therapeutics", 8번째 개정판의 서론에 기술된 것들을 포함한다.

[0203] 본원에 사용된 용어 "약"은 $\pm 10\%$ 를 의미한다.

[0204] 용어 "포함하다(comprises or includes)", "포함하는(comprising or including)", "가지는(having)" 및 그것들의 활용은 "포함하지만 이에 한정되지 않는(including but not limited to)"을 의미한다.

[0205] 용어 "이루어지는(consisting of)"은 "포함하며 그것으로 한정되는(including and limited to)"을 의미한다.

[0206] 용어 "필수적으로 이루어지는(consisting essentially of)"은 부가 구성요소, 단계 및/또는 부분들이 청구된 조성물, 방법 또는 구조의 기본적인 그리고 신규한 특성을 실질적으로(materially) 변경하지 않는 경우에만, 그 조성물, 방법 또는 구조가 부가 구성요소, 단계 및/또는 부분을 포함할 수 있다.

- [0207] 본 명세서 전체에 걸쳐, 본 발명의 다양한 구현들은 범위 형식(range format)으로 개시될 수 있다. 범위 형식에 대한 설명은 단순히 편의성과 간결함을 위함이며, 본 발명의 권리 범위를 완고하게 한정하는 것으로 해석되어서는 안된다는 것을 이해하여야 한다. 따라서, 범위에 대한 설명은 상기 범위 내의 개별적인 절대값들(numerical value) 뿐만 아니라 구체적으로 개시된 모든 가능한 하위 범위(subranges)를 포함하는 것으로 고려되어야 한다. 예를 들어, 1 내지 6과 같은 범위의 설명은 예를 들어, 1, 2, 3, 4, 5 및 6과 같은 상기 범위 내의 개별적인 값들뿐만 아니라 구체적으로 개시된 1 내지 3, 1 내지 4, 1 내지 5, 2 내지 4, 2 내지 6, 3 내지 6 등과 같은 하위 범위들을 포함하는 것으로 고려되어야 한다. 이는 상기 범위의 폭과는 관계없이 적용된다.
- [0208] 본원에 사용된 것과 같은 용어 "방법(method)"은 화학, 약리학, 생물학, 생화학 및 의학적 분야의 종사자들에게 알려졌거나 그들에 의해 공지된 방식들, 수단들, 기술들 및 절차들로부터 용이하게 개발된 방식들, 수단들, 기술들 및 절차들을 포함하나 이에 제한되지 않는, 주어진 임무를 수행하기 위한 방식들, 수단들, 기술들 및 절차들을 말한다.
- [0209] 본원에 사용된 것과 같은 용어 "치료(treating)"는 증상의 진행을 끝내고(abrogating), 실질적으로 억제하고(inhibiting), 지연(slowing) 또는 역전(reversing)시키고, 증상의 임상학적 또는 심미적 증상을 실질적으로 개선하거나, 증상의 임상학적 또는 심미적 증상의 출현을 실질적으로 예방하는 것을 포함한다.
- [0210] 본 발명의 양태에 따라 치료될 수 있는 대상체는 포유동물 대상체-예, 인간 대상체를 포함한다.
- [0211] 명확성을 위해 별도의 구현예의 맥락에서 기술된 본 발명의 특정 특징들은 또한 단일의 구현예로 조합하여 제공될 수도 있다. 반대로, 간결성을 위해 단일 구현예의 맥락에서 기술된 본 발명의 다양한 특징들은 또한 별도로 또는 본 발명의 임의의 적절한 하위조합(subcombination)으로 또는 본 발명의 임의의 다른 기술된 구현예에 적합하게 제공될 수 있다. 다양한 구현예들의 맥락에서 기술된 특정 특징은 그 구현예가 그러한 요소들 없이 작동하지 않는 한, 그 구현예들의 본질적인 특징으로 고려되지 않는다.
- [0212] 본원에 상술되고 아래의 청구범위에 청구된 바와 같은 본 발명의 다양한 구현예들 및 양태들은 하기의 실시예들에서 실험적 근거를 찾는다.
- [0213] **실시예**
- [0214] 이제 하기의 실시예들을 참고하여, 상기 명세서와 함께 제한적이지 않는 방식으로 본 발명의 일부 구현예들을 설명한다.
- [0215] 일반적으로, 본원에 사용된 명명법 및 본 발명에 사용된 실험실 절차들은 분자, 생화학, 미생물학 및 재조합 DNA 기술을 포함한다. 이러한 기술들은 문헌들에 자세하게 설명되어 있다(예를 들면, "Molecular Cloning: A laboratory Manual" Sambrook et al., (1989); "Current Protocols in Molecular Biology" Volumes I-III Ausubel, R. M., ed. (1994); Ausubel et al., "Current Protocols in Molecular Biology", John Wiley and Sons, Baltimore, Maryland (1989); Perbal, "A Practical Guide to Molecular Cloning", John Wiley & Sons, New York (1988); Watson et al., "Recombinant DNA", Scientific American Books, New York; Birren et al. (eds) "Genome Analysis: A Laboratory Manual Series", Vols. 1-4, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York (1998); 미국 특허 번호 4,666,828; 4,683,202; 4,801,531; 5,192,659 및 5,272,057에서 제기된 방법론들; "Cell Biology: A Laboratory Handbook", Volumes I-III Cellis, J. E., ed. (1994); "Culture of Animal Cells - A Manual of Basic Technique" by Freshney, Wiley-Liss, N. Y. (1994), Third Edition; "Current Protocols in Immunology" Volumes I-III Coligan J. E., ed. (1994); Stites et al. (eds), "Basic and Clinical Immunology" (8th Edition), Appleton & Lange, Norwalk, CT (1994); Mishell and Shiigi (eds), "Selected Methods in Cellular Immunology", W. H. Freeman and Co., New York (1980); 이용 가능한 번역 측정법은 특허 및 과학 문헌에 광범위하게 기재되어 있으며, 예를 들면, U.S. 특허 번호 3,791,932; 3,839,153; 3,850,752; 3,850,578; 3,853,987; 3,867,517; 3,879,262; 3,901,654; 3,935,074; 3,984,533; 3,996,345; 4,034,074; 4,098,876; 4,879,219; 5,011,771 및 5,281,521; "Oligonucleotide Synthesis" Gait, M. J., ed. (1984); "Nucleic Acid Hybridization" Hames, B. D., and Higgins S. J., eds. (1985); "Transcription and Translation" Hames, B. D., and Higgins S. J., eds. (1984); "Animal Cell Culture" Freshney, R. I., ed. (1986); "Immobilized Cells and Enzymes" IRL Press, (1986); "A Practical Guide to Molecular Cloning" Perbal, B., (1984) and "Methods in Enzymology" Vol. 1-317, Academic Press; "PCR Protocols: A Guide To Methods And Applications", Academic Press, San Diego, CA (1990); Marshak et al., "Strategies for Protein Purification and Characterization - A Laboratory Course Manual" CSHL Press

(1996)를 참조; 이들 모두는 본원에 모두 설명된 것처럼 참조로서 본원에 포함된다. 다른 일반적인 참조들도 이 문서 전체에 걸쳐 제공된다. 그 안에 들어있는 절차들은 당업계에 잘 알려져 있는 것으로 생각되며, 독자의 편의를 위해 제공된다. 여기에 포함된 모든 정보들은 참조로서 본원에 포함된다.

[0216] **일반 재료 및 방법**

[0217] **환원 및 비환원 조건에서의 SDS-PAGE 순도:** rGOT1의 순도 측정은 환원 및 비환원 조건 하에서 계면활성제 소듐 도데실 설페이트(SDS)의 존재 내 프리캐스트 폴리아크릴아미드 겔에서 수직 전기영동으로 수행되었다. 환원 및 비환원 단백질의 샘플을 폴리아크릴아미드 겔 플레이트 상에서 분자 크기에 따라 분리하였다.

[0218] rGOT1 DS 샘플의 전기영동 분리를 위해, MES 버퍼와 함께 NuPAGE™ 4-12% 비스-트리스 겔은 환원성 SDS-Page용 실행 버퍼 및 비환원성 SDS-PAGE용 MOPS 버퍼로서 사용되었다. 상기 샘플은 Invitrogen로부터 구입한 LDS NuPAGE™ 샘플 버퍼(4x)로 희석되었다. 상기 환원성 SDS-PAGE용 샘플은 0.5M DTT에 의해 환원되었다. 오리지널 샘플과 준비된 로딩 샘플을 약하게 흔들고 가열하였다. 환원성 및 비환원성 SDS-PAGE 분석은 별개의 겔 상에서 서로 별도로 수행되었다.

[0219] 전기영동 후 겔을 PageBlue™ 염색 시약으로 염색하고 밴드의 이동성을 측정하였다.

[0220] 단백질 순도를 측정하기 위해, 정량적 이미지 분석용 TotalLab 소프트웨어에 의한 모든 밴드에 관하여 각 밴드의 강도를 평가하였다.

[0221] **SE-HPLC에 의한 응집:** rGOT1 다이머(dimer) 형태는 성분 분자의 상이한 형태를 기반으로 크기 배제 고속 액체 크로마토그래피(SE-HPLC)에 의해 고분자량 및 모노머(monomer)의 관련된 불순물로부터 분리되었다.

[0222] 시험 용액의 샘플을 0.3M NaCl, 이동상과 214nm에서의 검출을 포함하는 0.05M 포스페이트 버퍼의 등용매 흐름(isocratic flow)을 이용하여 10,000 내지 500,000 Da 분자량 간격으로 글로불린을 분획하는데 적합한 5 μ m 크기의 친수성화된 실리카 겔 입자로 충전하면서, 길이 300mm, 내경 7.8mm의 스테인리스 스틸 컬럼 상에서 크로마토그래피 하였다.

[0223] 시험 용액에서 rGOT1 응집 형태를 측정하기 위해, 모든 집적된 피크 면적에 대해 다이머 피크 보다 더 짧은 체류 시간을 갖는 모든 피크의 합계 면적의 퍼센트를 평가하였다.

[0224] **RP-HPLC에 의한 순도 및 관련 단백질:** 이들의 소수성이 상이한 rGOT1 관련 단백질, 즉 rGOT1 산화/환원 및 탈아미드 형태 및 기타 미지의 관련 종에 대한 rGOT1의 순도는 역상 고성능 액체 크로마토그래피(RP-HPLC)에 의해 측정되었다. 시험 용액 및 기준 용액의 샘플을 아세트오니트릴 중 0.1 % 트리플루오로아세트산의 구배 및 215 nm에서의 검출을 이용하여 30 nm의 기공을 갖는 부틸 실리카 겔(입자 크기 5 μ m)이 충전된 컬럼(250 mm x 4.6 mm) 상에서 크로마토그래피를 수행하였다. 시험 용액 내 rGOT1 순도 및 이의 관련 물질의 양을 측정하기 위해, 모든 집적된 피크 면적에 대해 모든 성분 피크 면적의 퍼센트를 평가하였다.

[0225] **등전위 포커싱에 의한 불순물:**

[0226] 등전위 포커싱(Isoelectric focusing, IEF)은 등전점에 따라 단백질을 분리하는 전기영동법이다. 양쪽성 전해질(양쪽성 물질)의 혼합물을 포함하는 폴리아크릴아미드 또는 아가로스 겔의 슬랩에서 분리를 수행하였다. 전기장이 가해지면 상기 양쪽성 전해질이 겔 내로 이동하여 pH 구배를 생성한다. 일부의 경우에, 겔 제조 동안 겔 네트워크의 특정 영역에 약산 및 염기를 혼입함으로써 제조된 고정화된 pH 구배를 포함하는 겔을 사용하였다. 적용된 단백질이 등전점(pI)과 동일한 pH를 갖는 겔 분획에 도달하면, 그 전하가 중화되고 이동이 중단된다.

[0227] 표준 pI 마커가 급격하게 집중될 때까지 샘플을 GE 헬스케어의 프리캐스트 겔 상에서 최소 1.25시간 동안 일정한 힘으로 작동시켰다. 플레이트를 쿠마시 브릴리언트 블루 염료로 염색하였다.

[0228] **자외선에 의한 단백질 함량:** 단백질 농도는 280 nm에서 배합된 물질의 광학 밀도를 측정하면서 UV 분광광도법으로 측정하였다. 단백질 농도의 계산을 위해 특정 흡광 계수($1.461 \mu\text{g mg}^{-1} \text{cm}^{-1}$)를 사용하였다.

[0229] Labelguard™ Microliter cell을 측정에 사용하였다. 이는 단백질 농도 측정을 위한 혁신적인 광학 경로이다. 상기 세포는 희석되지 않은 샘플의 0.7 μ l~10 μ l 범위의 서브마이크로리터 샘플 용량으로 최적의 측정 결과를 얻도록 설계되었다.

[0230] **카르멘 방법에 의한 효소 활성:** rGOT1의 효소 활성은 NADH가 25 °C에서 NAD+로 산화되면서, 말레이트 디하이드

로제나제(MD)를 지표 반응으로 사용하여 결합된 효소 반응을 통합하고 340 nm에서 흡광도의 변화를 지속적으로 모니터링하는 카르멘 방법(Karmen A, Wroblewski F, La Due JS. Transaminase activity in human blood. J Clin Invest. 1955;34:126-31)의 원리에 기초한다. 반응의 pH가 8.3이다.

[0231] 효소 활성 단위는 25 °C에서 1분당 옥살로아세트산 1 μmol을 생성하는 효소의 양으로 정의된다.

[0232] **펩타이드 맵핑:** rGOT1 샘플을 엔도프로티나제 Glu-C로 소화시키기 위해 준비하였다. 상기 단백질을 펠치기 위해 변성시키고, 디설파이드 결합을 절단한 다음 단백질 재접힘을 방지하기 위해 알킬화시켰다. 소화 후, 물 중 0.1% 트리플루오로아세트산 및 90% 아세토니트릴/물 중 0.1% 트리플루오로아세트산으로 이루어진 이동상으로 구배 용출을 사용하여 100Å의 공극 크기를 갖는 옥타데실 실리카 겔(입자 크기 5 μm)로 충전된 컬럼에서 크로마토그래피 분리를 수행하였다. UV 검출은 2개의 동시 파장에 대해 설정된다: 215 nm 및 280 nm.

[0233] 펩타이드 피크의 체류 시간, 피크의 수 및 전체 용출 패턴의 시각적 평가가 수행되었다. 둘째, 모든 통합된 피크 면적에 대한 성분 피크 면적의 백분율 및 모든 통합 피크 높이의 합에 대한 각 피크 높이의 백분율로서 샘플 및 기준 표준에서의 펩타이드의 수치 비교를 평가하였다.

[0234] **페닐히드라진 법에 의한 PLP:** 피리독살 5'-포스페이트(PLP)는 비타민 B6의 활성 형태이며, 코엔자임으로 GOT1에 존재한다. PLP 측정법은 피리독살 또는 피리독살 5'-포스페이트 중 어느 하나가 페닐 히드라진으로 처리될 때 강한 노란색 히드라진의 형성에 기초한다(Wada H and Snell E. Journal of Biological Chemistry, 1961; 236(7), 2089-95). 형성된 히드라진은 410nm에서 UV 광을 흡수한다. rGOT1 샘플에서 PLP의 양을 측정하기 위해, PLP의 0-25 μM 범위에서 검정 곡선을 얻어야 한다. rGOT1을 검정 곡선의 흡광도의 선형 범위에 맞게 희석하여 계산하였다.

[0235] **ESI-MS에 의한 분자 질량:** rGOT1 단백질 샘플은 PD MiniTrap G25 컬럼을 사용하여 10 mM 아세트산 용액으로 탈염시켜 제조하였다. MS 분석을 위해, 상기 탈염된 샘플을 40% 아세토니트릴, 0.25% 포름산 용액으로 제형화하여 5배 희석시켰다.

[0236] 분석을 위해, 아폴로 소스 (ESI) 이온화 소스가 있는 MicroTOF, Bruker 질량 분석기를 사용하였다. 상기 물질의 분자 질량은 디컨볼루션(deconvoluted) 질량 스펙트럼으로부터 계산되었다. 단백질 N-말단의 균질성을 모든 피크 강도에 대한 특정 성분 피크 강도의 백분율로서 평가하였다.

[0237] **에드만 분해에 의한 단백질 N-말단 아미노산 측정:** 페닐이소티오시아네이트와 N-말단 잔기의 유리 아미노기와 반응에 기초한 펩타이드의 주기적인 분해는 아미노산이 한 번에 하나씩 제거되고 페닐티오히단토인 유도체로 확인된다. 페닐티오히단토인(PTH)-아미노산은 270nm에서의 검출을 위해 역상 C-18 컬럼으로 옮겨진다. 또한, 19 PTH-아미노산(도 5)의 표준 혼합물은 (보통 서열 분석 실행의 첫 번째 주기로) 분리를 위해 컬럼에 주입되었다. 이 크로마토그램은 각각의 에드먼 분해 사이클 크로마토그램과 비교하기 위해 아미노산의 표준 체류 시간을 제공한다. HPLC 크로마토그램은 컴퓨터 데이터 분석 시스템을 사용하여 수집되었다. 특정 잔기 번호에 존재하는 아미노산을 결정하기 위해, 하나를 다른 것 위에 겹치게 함으로써 목적의 잔기로부터 크로마토그램을 이전 잔기의 크로마토그램과 비교하였다. 이로부터, 특정 잔기의 아미노산을 결정하였다.

[0238] **생합성:** 공급된 공기와 순수 산소 혼합물을 사용하여 Applikon 생물반응기에서 생합성을 수행하여 필요한 수준의 용존 산소 포화도를 유지한다. 상기 생합성은 미세요소/탄소원 용액을 연속적 적응 공급과 함께 제어된 온도와 pH에서 수행되었다. 배양(Cultivation)은 고밀도 공정을 보장하기에 충분한 혼합을 제공하면서 화학적으로 규정된 배지에서 수행되었다.

[0239] **실시예 1**

[0240] **SUMO-GOT1의 발현**

[0241] 대장균 BL21 (DE3) pET28/GOT1(Δhis) 유래 작제물을 GOT1 유전자 증폭용 주요 매트릭스로 사용하였다. 프라이머는 개시-메티오닌을 코딩하는 초기 ATG 코돈을 제외한 전체 유전자(서열번호 4)가 증폭되는 방식으로 디자인되었다. 프라이머 서열은 다음과 같다: 정방향 SUMO2: 5'-GCACCTCCGTCAGTCTTTG-3' 서열번호 6; 역방향 SUMO2: 3'-CTACTGGATTTTGGTGACTGCTTCATGGAT-5' 서열번호 7.

[0242] 상기 유전자는 Taq DNA 증합효소를 사용하여 다음 조건 하에서 증폭시켰다: 95 °C-5분; 그런 다음, 95 °C-1분, 56 °C-30초, 72 °C-1분의 30 사이클을 반복하였다. 72 °C-10분 최종 홀딩하였다. 증폭된 서열은 길이가 1293 bp 이고 (SUMO 개체와의 융합을 위해 제한 엔도뉴클레아제 타겟을 포함하는 GOT1 유전자를 코딩함) 상당한 양의 아가로오스 전기영동 겔 상에서 가시화되었다. 이어서, PCR 생성물을 T4 DNA 리가제를 사용하여 pET-SUMO 플라스

미드에 연결하고, 배향 및 크기에 대한 양성 클론을 PCR의 2번째 라운드의 매트릭스로 사용하기 위해 선택하였다. 2번째 PCR을 프라이머 서열을 사용하여 수행하였다: SUMO-FOR-NCOI: AAA CCA TGG GAC GGA CTT AGA AGT CAA TCA A - 서열번호 8 및 REV-GOT1: AAA AAG CTT CTA CTG GAT TTT GGT GAC TGC TTC A - 서열번호 9 (5'→3' orientation). 2번째 PCR을 상기 조건 하에서 Pfu DNA 중합효소를 사용하여 수행하였다: 95 °C-5분; 그런 다음, 95 °C-1분, 58 °C-80초, 72°C-1분의 30 사이클을 반복하였다. 72 °C-10분 최종 홀딩하였다. 수득된 PCR 산물은 길이가 1549 bp이고 pET28 플라스미드로 클로닝하기 위한 NcoI 및 HindIII 제한 부위를 포함하였다. PCR의 2번째 라운드는 특정 제한 부위뿐만 아니라 GOT1 서열에 SUMO 개체를 추가하였다.

[0243] 이러한 PCR 산물에는 pET-SUMO 플라스미드(His, MYKD 등)에 존재하는 친화성 태그가 포함되어 있지 않으며, GOT1 재조합 서열에 완벽하게 융합된 SUMO 개체를 엄격히 코딩한다. 상기 산물을 적절하게 다이제스트된 pET28b+ 플라스미드(Novagen)에 클로닝하고, 초기 클론을 선택하기 위해 일시적 대장균 JM109 균주로 형질전환시켰다. 시퀀싱 및 제한효소 소화에 의해 확인된 정확한 구조를 갖는 클론을 발현 균주 대장균 BL21 (DE3)(Novagen로부터 구입)로 형질전환시켰다. 확인된 클론으로부터 최종 부피의 10% 글리세롤을 포함하는 리서치 세포 은행을 제조하고 추가 공정 개발을 위해 사용하였다.

[0244] 대장균 BL21 (DE3) pET28/SUMO-GOT1(his) 균주를 하기 조성(g/L)을 갖는 배지에서 배양하였다 :

[0245] a) 플라스크에서 접종 준비(배양)용 (g/L): 디소듐 하이드로젠 포스페이트 (17.0), 포타슘 디하이드로젠 포스페이트 (1.82), 암모늄 설페이트 (3.0), 마그네슘 설페이트 헵타하이드레이트 (0.5), D(+)-글루코스 모노하이드레이트 (15.0) 및 미세요소 저장 용액 (0.16 mL);

[0246] b) 발효용 (g/L): 암모늄 포스페이트 디베이직 (4.0), 마그네슘 설페이트 헵타하이드레이트 (0.5), 포타슘 디하이드로젠 포스페이트 (13.3), 시트르산 모노하이드레이트 (1.6), D(+)-글루코스 모노하이드레이트 (30.0) 및 미세요소 저장 용액 e) (0.25 mL);

[0247] c) 공급 용액 A (g/L): D(+)-글루코스 모노하이드레이트 (700.0), 마그네슘 설페이트 헵타하이드레이트 (20.7) 및 미세요소 저장 용액 e) (2.2 mL/L);

[0248] d) 공급 용액 B (g/L): 암모늄 포스페이트 디베이직 (360.0) 및 포타슘 디하이드로젠 포스페이트 (306.7); 및

[0249] e) 미세요소(미량원소) 저장 용액 (g/L): 아이언(III) 클로라이드 헥사하이드레이트 (30.0), 칼슘 클로라이드 디하이드레이트 (4.05), 징크 (II) 설페이트 헵타하이드레이트 (6.75), 망가네이즈 (II) 설페이트 모노하이드레이트 (1.5), 구리 (II) 설페이트 펜타하이드레이트 (3.0), 코발트 (II) 클로라이드 헥사하이드레이트 (1.14), 소듐 몰리브데이트 디하이드레이트 (0.3) 및 붕산 (0.69).

[0250] 도 1은 SUMO-GOT 생합성 과정의 전체 도식을 나타낸다.

[0251] **접종물 준비:** 플라스크 [a)]에서 배양하기 위한 멸균 배지 500 mL를 함유하는 삼각 플라스크에 저장 배양 WCB (작업 세포 은행) 대장균 BL21 (DE3) pET28/SUMO-GOT1 (Δ his) 0.20 mL를 접종하였다. 그 후, 상기 플라스크를 회전 진탕기를 이용하여 교반 속도 300 rpm, 30 °C에서 18시간 동안 배양하였다. 배양 후 광학 밀도는 4.50 o.u 이상이어야 한다. (광학 단위) [$\lambda=595$ nm].

[0252] **발효:** 리서치 세포 은행으로부터 재조합 유기체 대장균 SUMO-GOT1/ Δ His/pET28/E.coli BL21 (DE3)을 0.5L의 성장 배지를 함유하는 1L 삼각 플라스크에서 17-19시간 동안 성장시킨다. 상기 플라스크를 30 ± 2 °C 및 300 ± 50 rpm의 진탕 속도로 진탕 배양기에서 배양하였다. 그런 다음, 600 nm 파장에서 접종물의 광학 밀도를 측정하고 발효조에서 약 0.5 A.U. 세포 밀도를 얻기 위해 파종량(seeding volume)을 재계산하였다(12 L 작업 부피 (15 L 총 부피) Applikon 발효기). 배양 순도용 샘플을 취하여 영양 배지에 도말하여 시험하였다.

[0253] 7.7 L의 발효 배지를 준비하고 15 L 발효조와 함께 오토클레이브하였다. 700 mL의 글루코오스 및 포스페이트 용액을 준비하고 별도로 오토클레이브하여 발효 전에 무균 상태로 발효조로 옮겼다. pH 유지용 염기성 용액과 거품 조절용 소포제 용액을 별도로 준비하고 생합성 전에 발효조 시스템에 연결하였다. 포스페이트 공급 용액 및 글루코오스 공급 용액을 제조하고 생합성 전에 오토클레이브하였다. 생합성 동안 SUMO-GOT1 세포 유도용 IPTG 용액을 준비하고 사용 직전에 멸균 0.2 μ m 필터를 사용하여 멸균하였다. 계산된 접종물의 부피로 접종하기 전, pH, 온도, 교반 및 용존 산소 제어가 확립되었다.

[0254] 발효 매개 변수의 설정 포인트는: 재킷식 발효조에서 제어된 물 흐름에 의해 보장되는 37 °C (유도 지점까지) 및 25 °C (유도 지점 이후) 온도; 암모니아 용액으로 pH 6.8로 조정; 20% O₂ 농도는 공기 및 산소 가스 흐름과

함께 유지된다. 멸균 IPTG 용액을 첨가하여 세포 광학 밀도가 65-85 A.U.로 도달할 때까지 상기 배양을 37 °C에서 성장시켰다. 유도 후, 상기 배양을 새로운 온도에서 3.5시간 동안 성장시켰다. 세포 밀도가 20 A.U에 도달한 후 30분마다 그리고 세포 밀도가 60-70 A.U에 도달한 후 15분마다 글루코오스 농도(공급점에서 17.0 g/L로 유지)를 측정하였다. 탄소 공급은 성장 배지 내 글루코오스 농도를 측정함에 따라 수행되었다. 발효 중에 4종의 포스페이트 공급 용액을 첨가하였다. 첫 번째는 세포 밀도가 60-70 A.U에 도달했을 때 추가되었고 나머지는 시간에 따라 첨가되었다: 유도 후 1시간, 1.5시간 및 2시간. 발효 후 바이오매스를 수확하고 원심 분리를 수행하였다. 발효 직후 샘플을 영양 배지에 도달하여 배양 온도 시험을 수행하였다.

[0255] 발효조로부터의 바이오매스를 원심분리 병으로 옮기고 12227×g, 4 °C에서 20분 동안 원심분리하였다. 그런 다음 바이오매스를 원심분리기 볼에서 꺼내고 추가 저장을 위해 플라스틱 백으로 옮겼다. 상기 백을 -33 °C의 냉고에 넣었다.

[0256] 상기 샘플은 12시간의 동결 저장 후 더 일찍 취하지 아니하였고 총 단백질 농도 (Lowry), SDS-PAGE 분석 및 SUMO-GOT1 양의 겔 스캐닝(도 3)을 테스트하였다.

[0257] 실시예 2

[0258] 1차 정제 과정의 설명

[0259] 바이오매스(1570-1830 g)의 냉동 조각을 백에서 꺼냈다. 세포를 4-8 °C에서 버퍼 용액 W-A02 3 ml/세포 페이스트 g으로 용기(vessel)에서 재구성하였다. 고압 균질 기(high pressure homogenizer)를 사용하여 900 bar 압력에서 3회 세포를 파괴시켰다. 현탁액을 원심분리하고, 침전물을 버리고 단백질 용액을 다음 단계에 사용하였다. 상기 현탁액을 수조에서 교반하면서 가열하고 온도가 50 °C에 도달할 때 알파-케토글루타레이트(alfa-ketoglutarate) 및 피리독살 5-포스페이트 하이드레이트를 10 mM (알파-케토글루타레이트) 및 20 μM (피리독살 5-포스페이트)의 최종 농도로 첨가하였다. 온도를 65-70 °C로 증가시키고 상기 용액을 10 ± 1 분 동안 항온 배양하였다. 2 내지 10 °C로 냉각시킨 후, 변성된 물질을 원심분리에 의해 제거하였다. 상기 상층액을 옮겨 부어 수집하였다. 가열 처리 후 1 mM의 DTT를 단백질 용액에 첨가하였다. 100,000U의 SUMO 프로테아제를 첨가하고 절단 온도를 4 내지 10 °C에서 10 내지 24시간 동안 유지하였다. 탈SUMO화(deSUMOylation) 후, 고체 암모늄 설페이트를 단백질 용액에 300g/L의 농도로 첨가하였다. 이 용액을 실온에서 20분 동안 교반하고 원심분리하였다. 펠렛을 버리고 연속적인 교반 하에서 추가량의 암모늄 설페이트(130 g/L)를 상층액에 첨가하였다. 4-10 °C에서 20분간 저장한 후, 최종 펠렛을 원심분리에 의해 수집하고 PBS 완충액 20ml/펠렛 g에 용해시켰다.

[0260] 실시예 3

[0261] 정제 과정의 설명

[0262] 3가지 크로마토그래피 단계를 이용하여 rGOT1 중간 물질을 정제하였다: 중형 PPA 하이퍼 셀 수지 (베드 높이 15.3-15.8 cm)를 사용한 혼합 모드 상호 작용, CM-세파로스 FF (베드 높이 9.4-9.9 cm) 및 Q 세파로스 FF (베드 높이 9.2-10.2 cm)를 사용하는 이온 교환 크로마토그래피.

[0263] **혼합 모드 - PPA 하이퍼 셀:** 펠렛을 용해시킨 후, PPA 하이퍼 셀 크로마토그래피를 수행하였다. 단백질 용액의 pH를 7.30-7.50으로 조정하고, 저(low) pH 완충 용액(pH 3.95 - 4.05)으로 용기에 직접 용출시켰다. 광학 밀도가 80 mAU(상)와 45 mAU(하) 사이의 분획을 수집하였다 (도 5).

[0264] **양이온 교환 크로마토그래피 CM-세파로스 FF:** 혼합 모드 크로마토그래피 후 용출된 단백질을 넣고 깨끗한 용기에 pH가 증가함에 따라(W-E02) 용출시켰다. 단백질 분획을 80 mAU(상)에서 35 mAU(하)까지 수집하였고, pH는 5.90-6.10으로 조정하고 전도도는 2.0-2.2 mS/cm로 조정하였다 (도 6).

[0265] **음이온 크로마토그래피 Q 세파로스 FF:** 단백질 분획을 전도도가 <2mS/cm 될 때까지 희석하고 pH는 pH 6.00으로 조정하고 컬럼에 넣었다. 통과 액 내 단백질 분획을 35 mAU(상)에서 30 mAU(하: 도 7)까지 수집하였다.

[0267] 실시예 4

[0268] 제형화

[0269] 음이온 교환 크로마토그래피로부터 얻은 단백질 용액을 30kDa 막을 사용하여 15-20 mg/ml로 농축시켰다. 20 mM 소듐 아세테이트 pH 5.0로의 버퍼 교환을 위해 100 투석여과 부피를 사용하였다. 최종 단백질 농도는 10±2

mg/ml였다. 막관통 압력은 0.3 내지 0.6였다. 순도는 >99%인 것으로 밝혀졌고, 제형화된 GOT를 환원 조건 및 비 환원 조건(도 8) 하에서, RP-HPLC (도 9) 및 SE-HPLC (도 10) 모두 SDS-PAGE에 의해 분석하였다. RP-HPLC 분석 결과는 하기 표 1에 요약되어 있다.

표 1

[0270]

	이름	RT (분)	면적	% 면적	SN	대칭 인자	EP 플레이트 카운트	GOT1 관련된 단백질
1	BTPH_031	25,8	3215267 4	99,79	825,5	1	84949	0,21
2	BTPH_031	25,8	3163447 3	99,77	825,6	1	86047	0,23
3	BTPH_031	25,8	3229611 7	99,77	825,9	1	83607	0,23
표준편차		0	348061, 4	0,01				0
평균		25,8	3202775 4	99,78	825,7	1	84867,8	0,2
% RSD		0	1,1	0,01				5,5

[0271]

SE-HPLC 분석 결과는 하기 표 2 내지 5에 요약되어 있다.

표 2

[0272]

다이머									
	이름	RT (분)	면적	% 면적	RT_비율	SN	대칭 인자	EP 플레이트 카운트	채널 설명
1	다이머	15,9	19976316	99,66	1	19194 8,7	1,2	10856	W2489 ChA 214nm
2	다이머	15,9	20060097	99,64	1	18212 9,7	1,2	10738	W2489 ChA 214nm
3	다이머	15,9	20096245	99,66	1	16419 0,7	1,2	10859	W2489 ChA 214nm
표준편차		0.0	61520,6	0,01	0				
평균		15,9	2004421 9,5	99,65	1	179423	1,2	10817,9	
% RSD		0.0	0,3	0,01	0				

표 3

[0273]

이름: 모노머							
	이름	RT (분)	면적	% 면적	RT_비율	SN	채널 설명
1	모노머	17,9	27892	0,14	1,124	237,6	W2489 ChA 214nm
2	모노머	17,9	27304	0,14	1,124	224,2	W2489 ChA 214nm
3	모노머	17,9	27665	0,14	1,124	202,4	W2489 ChA 214nm
표준편차		0	296.5	0	0		
평균		17,9	27620,2	0,14	1,124	221,4	
% RSD		0	1,1	1,28	0		

표 4

[0274]

RRT 0.9							
	이름	RT (분)	면적	% 면적	RT_비율	SN	채널 설명
1	RRT 0.9	14	24818	0,12	0,877	141,4	W2489 ChA 214nm
2	RRT 0.9	14	24465	0,12	0,877	119,1	W2489 ChA 214nm
3	RRT 0.9	14	25841	0,13	0,876	137,9	W2489 ChA 214nm

표준편차		0	714.4	0	0		
평균		14	25041,2	0,12	0,877	132,8	
% RSD		0	2,9	2,86	0,015		

표 5

이름: 총 HMW							
	이름	RT (분)	면적	% 면적	RT_비율	SN	채널 설명
1	총 HMW	13,1	45055	0,22	0,823	246,7	W2489 ChA 214nm
2	총 HMW	13,1	40421	0,2	0,822	207,2	W2489 ChA 214nm
3	총 HMW	12,5	41077	0,2	0,783	261,1	W2489 ChA 214nm
표준편차		0	2507,5	0,01	0,023		
평균		12,9	42184,3	0,21	0,809	238,3	
% RSD		0	5,9	5,91	2,817		

[0275]

[0276]

펩타이드 맵핑의 결과를 도 11에 나타내었다. 등전점 포커싱 연구의 결과를 도 12에 나타내었다. 정제의 균형을 하기 표 6에 나타내었다.

표 6

단계	농도 g/mL	부피 ml	양 mg	단계, %	총, %	총 활성, U	단계, %	총, %	비활 성 U/mg	단 계 별 정 제 배수	정 제 인자	순도 acc SDS-P AGE, %	순도 acc, RP-HPL C, %
파괴(disruption) 후	62,9	4530	284691	100	100,0	1810374	100	100	6	1	1	24	-
열 처리 후	14,7	3559	52389	18	18,4	1647259	91	91	31	4,9	5	63	-
탈SUMO화 후	14,6	3559	51878	99	18,2	1458489	89	81	28	0,9	4	42	-
AmSO4 frac I 후	4,9	4440	21762	42	7,6	1227998	84	68	56	2,0	9	67	-
펠렛 용해	4,9	1533	7533	35	2,6	981013	80	54	130	2,3	20	67	-
PPA 후	3,2	1040	3306	44	1,2	-	-	-	-	-	-	82	91,9
CM 후	1,6	1504	2476	75	0,9	402451	100	22	163	-	26	86	94,7
Q 후	1,0	2094	2120	86	0,7	404518	100	22	191	1,2	30	99	99,4
TFF 후	12,4	132	1633	77	0,6	413397	100	22	253	1,3	40	99	99,8

[0278]

카르멘 방법을 사용하여 측정된 효소의 비활성(specific activity)은 200U/mg으로 나타났다.

[0279]

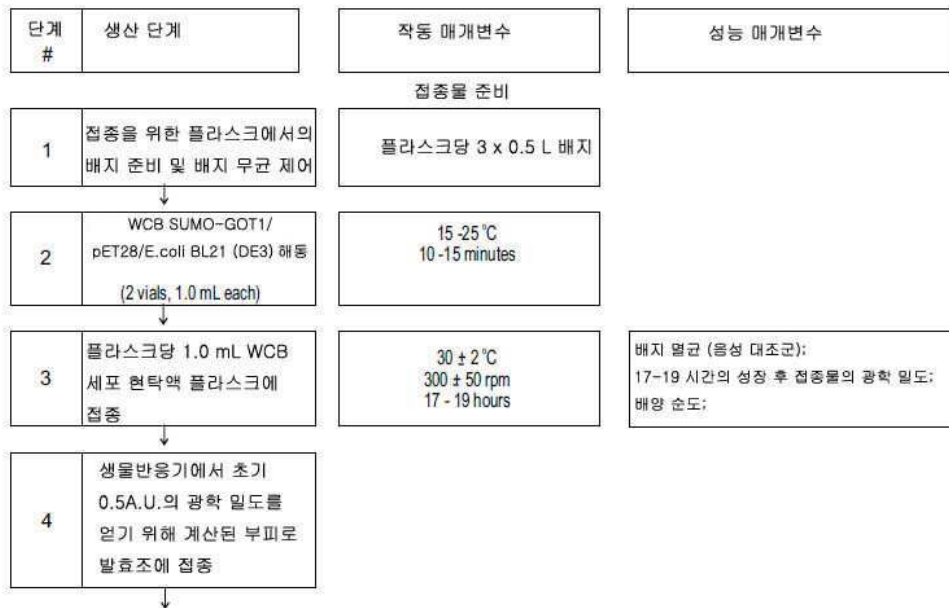
비록 본 발명은 그것들의 특정 구현들과 함께 기술하였지만, 많은 대안, 변경 및 변형이 당업자들에게 명백하다는 것은 분명하다. 따라서, 첨부된 청구범위의 사상 및 넓은 범위 내에 있는 모든 이러한 대안, 변경 및 변형까지도 포함하는 것으로 의도된다.

[0280]

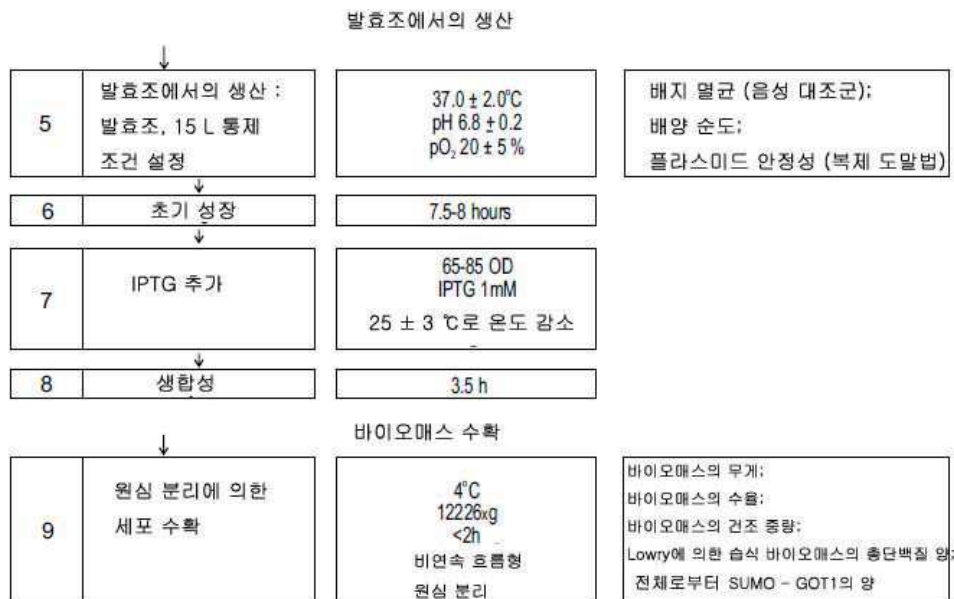
본 명세서에 언급된 모든 간행물, 특허 및 특허 출원은 각 개별적인 간행물, 특허 및 특허 출원이 구체적으로 그리고 개별적으로 참조로 본원에 포함되는 것으로 나타내는 바와 같은 정도로, 명세서 내에 참조로서 그것의 전체 내용이 본원에 포함된다. 또한, 본원 출원에서 임의의 참조문헌의 인용 또는 식별은 이러한 참조를 본 발명에 대한 선행기술로 이용할 수 있다고 인정하는 것으로 해석되어서는 안된다. 섹션의 제목이 사용되는 한, 반드시 한정하는 것으로 해석되어서는 안된다.

도면

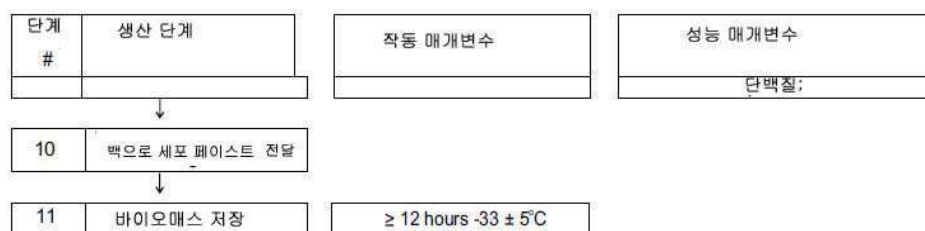
도면1a



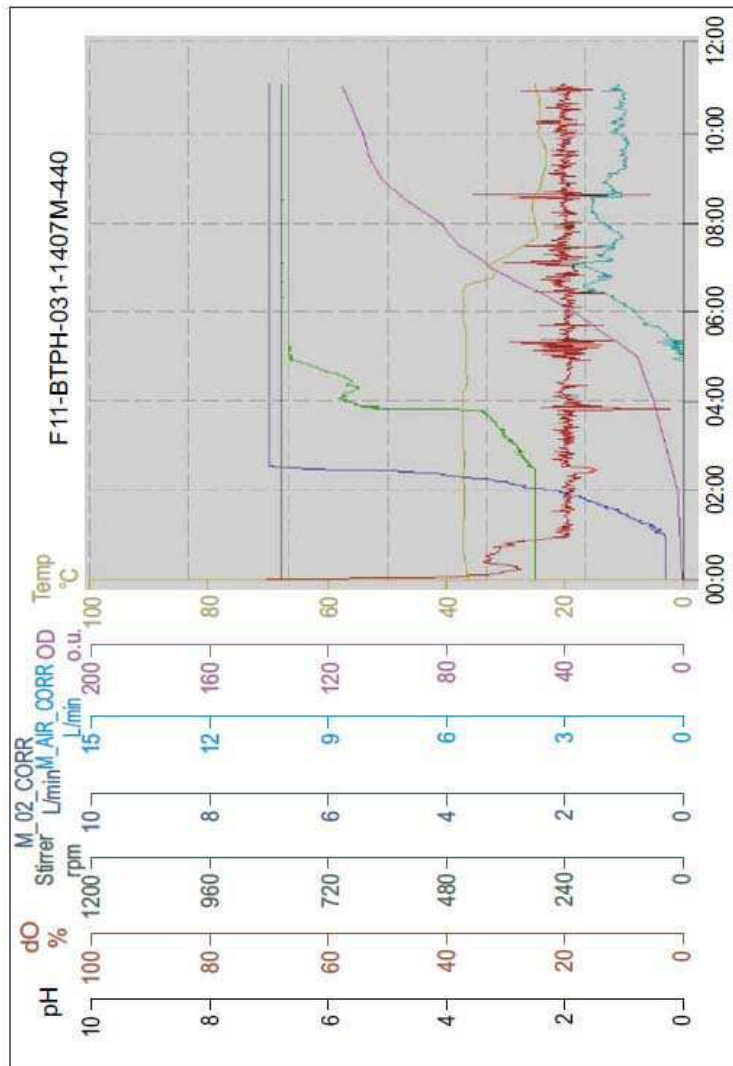
도면1b



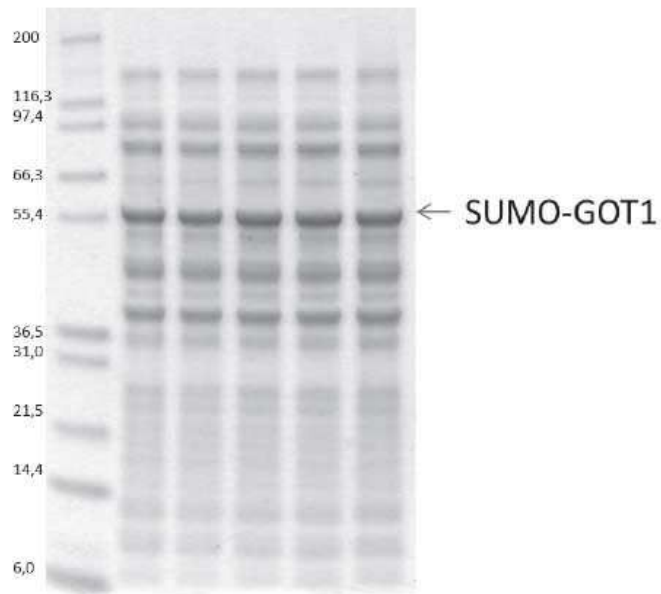
도면1c



도면2



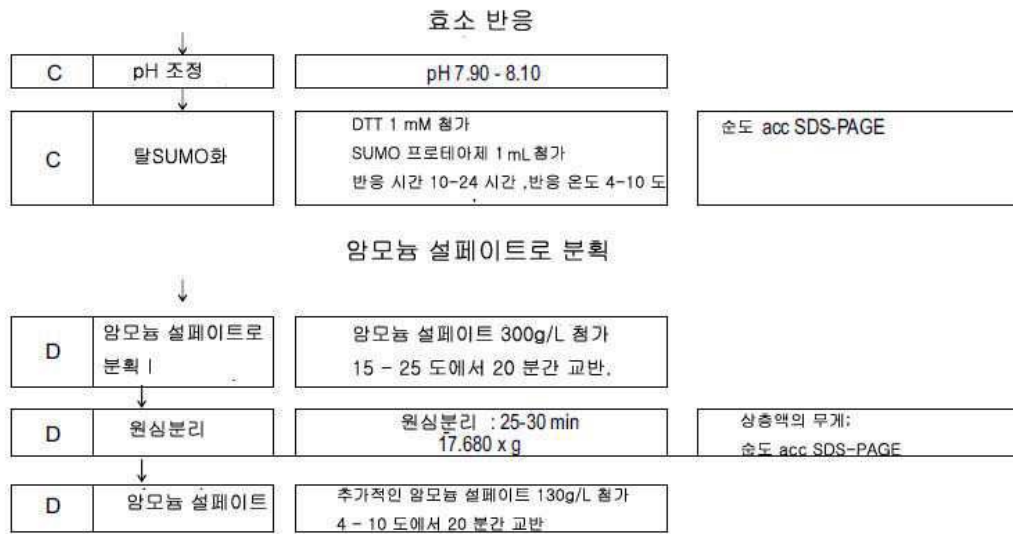
도면3



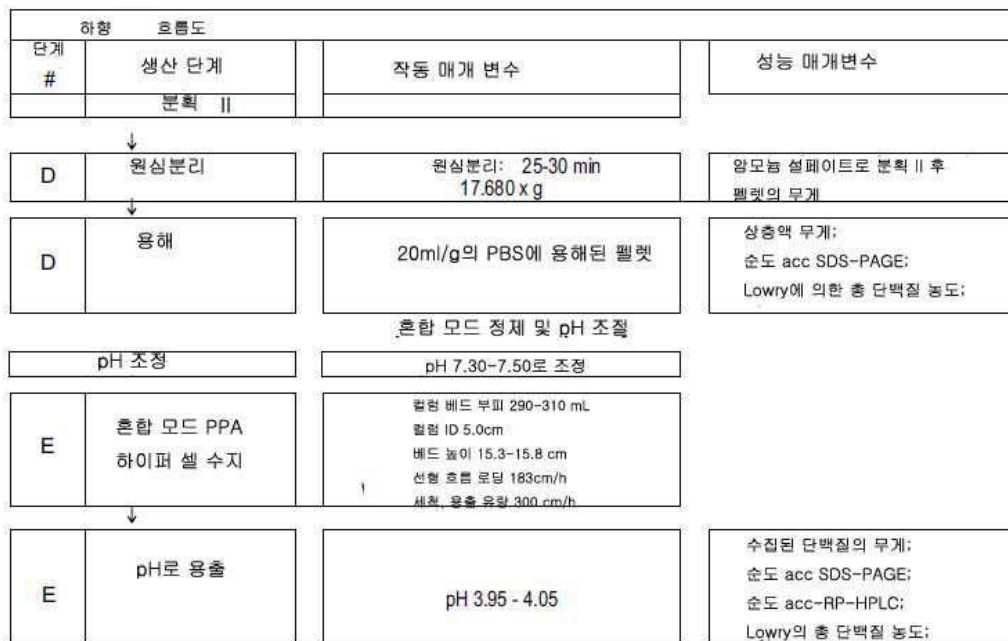
도면4a

하형		흐름도	
단계 #	생산 단계	작동 매개변수	성능 매개변수
1차 정제			
A	바이오매스 해동 및 재부유	바이오매스 1570-1830 g 4-8°C >10 min pH 7.30 - 7.50	
↓			
A	세포 파괴	2 - 8°C 850-950 bar 3 cycles	
↓			
A	원심분리	원심분리: 25-30 min 17.680 x g	상층액 무게: 순도 acc SDS-PAGE:
↓			
B	열 처리	50 도까지 가열 알파 케토 글루타레이트의 10mM 최종 농도까지 첨가 피리독살 포스페이트의 20mM 최종 농도까지 첨가 65-70 도까지 가열하고 10분 동안 유지 단백질 용액 2 ~ 10 °C로 냉각	
↓			
B	원심분리	원심분리: 25-30 min 17.680 x g	상층액 무게: 순도 acc SDS-PAGE:

도면4b



도면4c



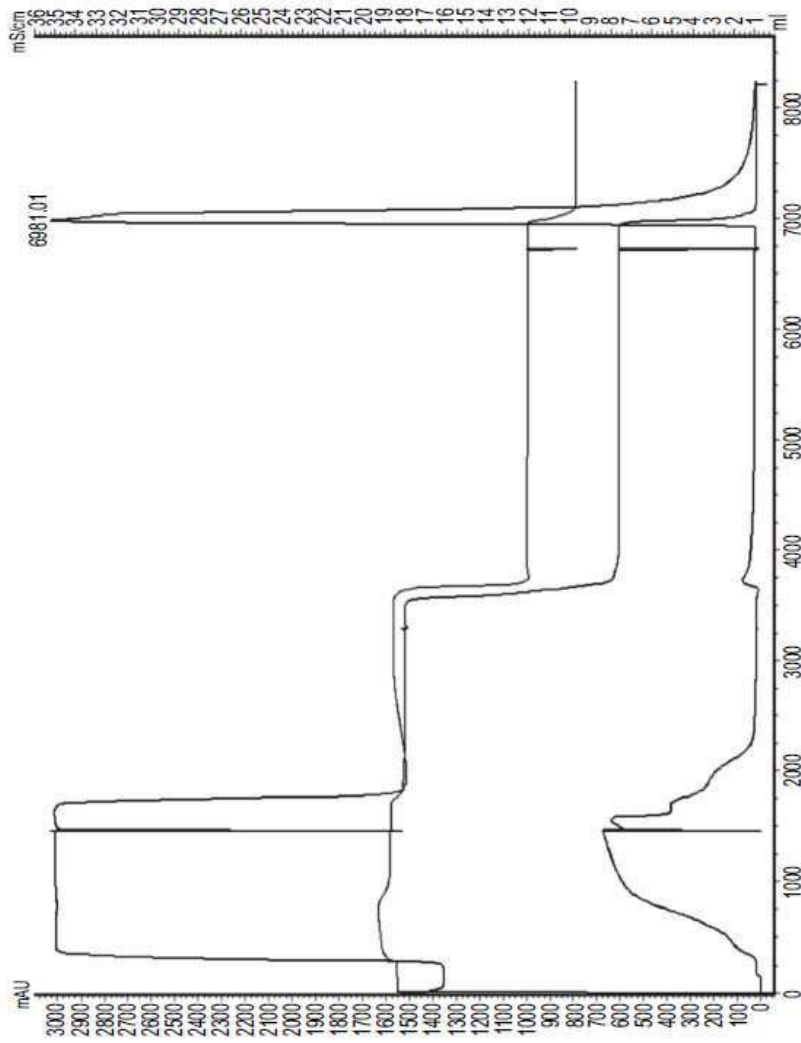
도면4d



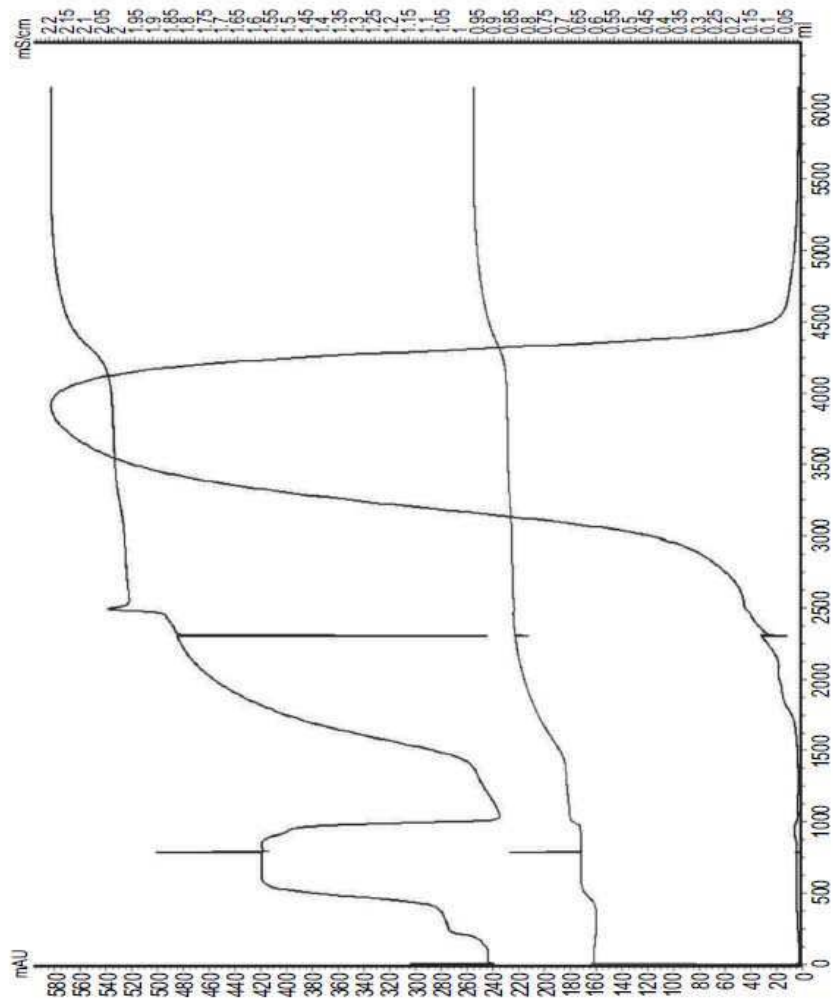
도면4e



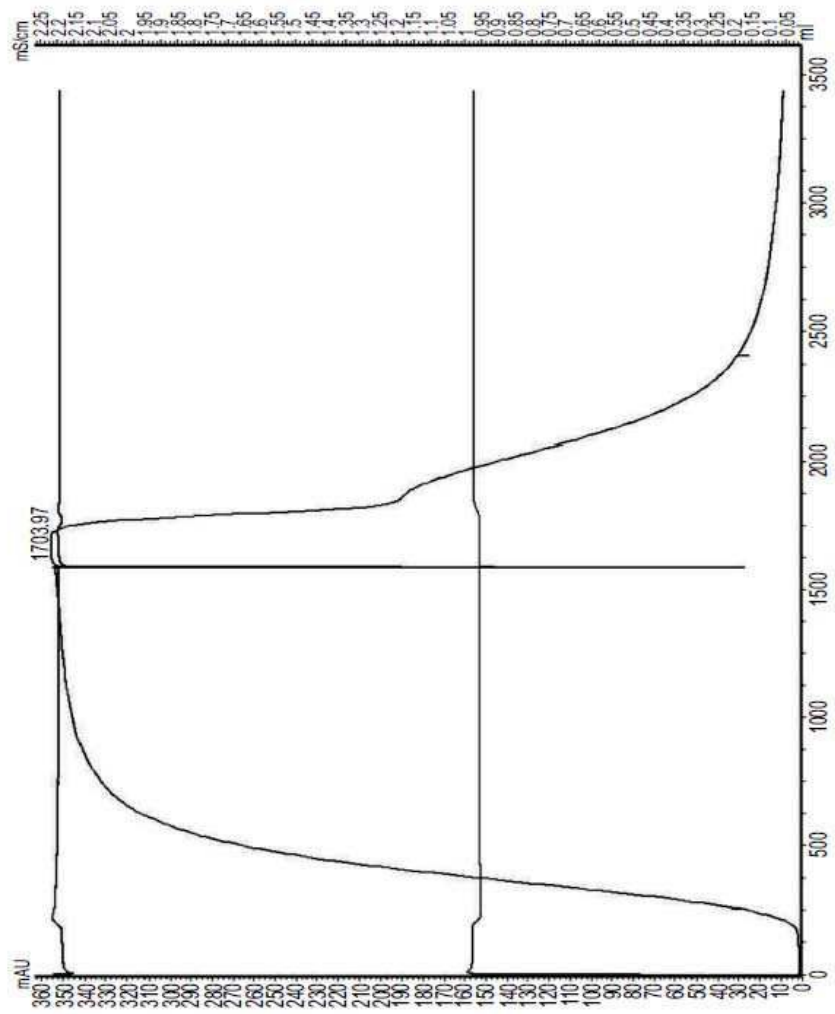
도면5



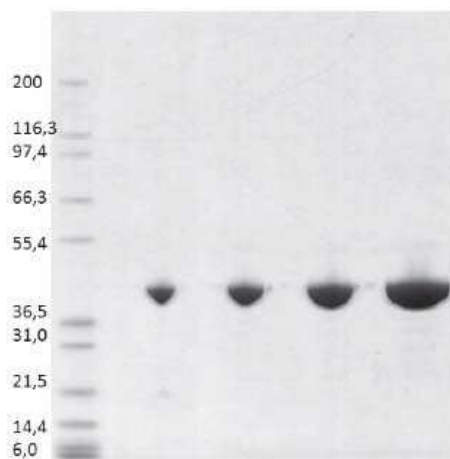
도면6



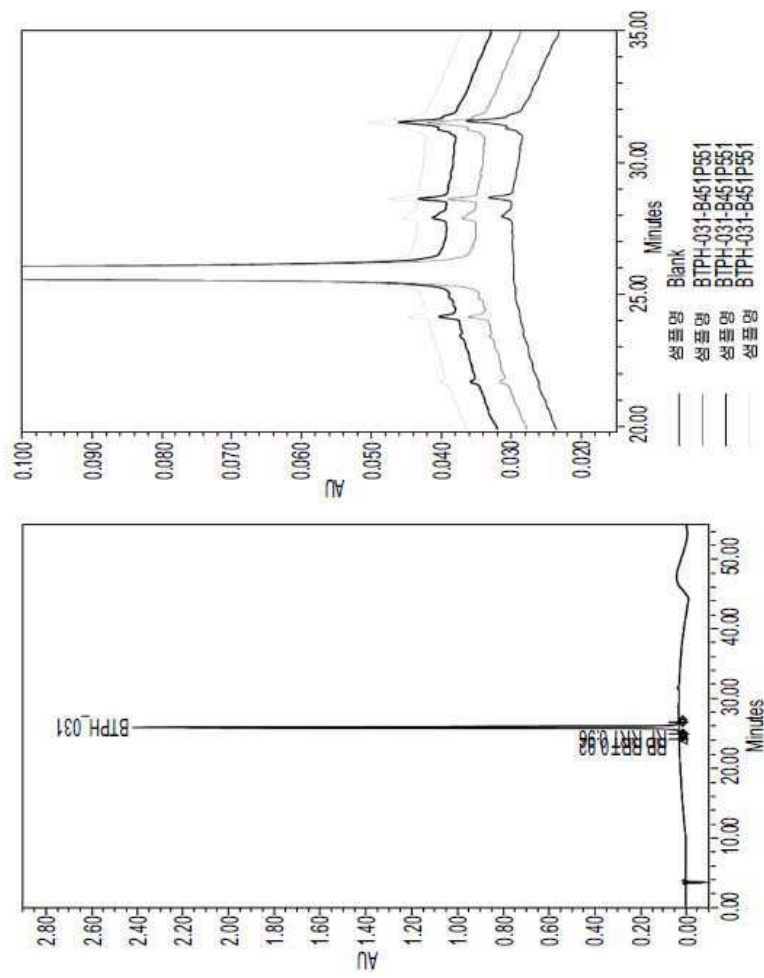
도면7



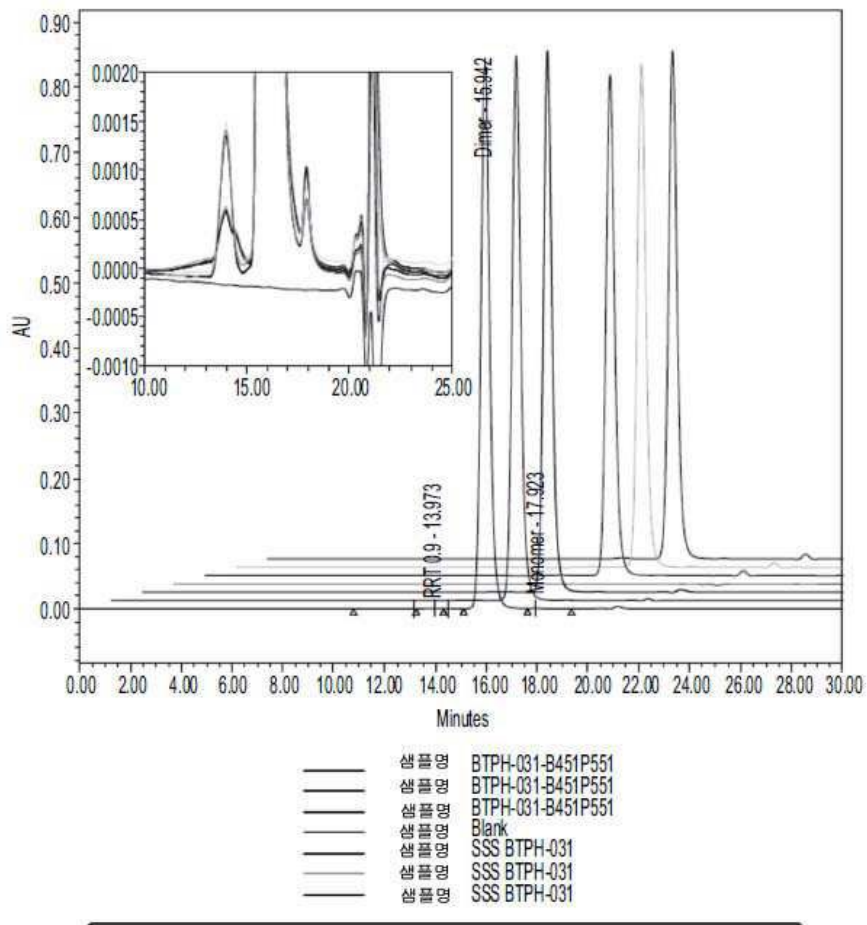
도면8



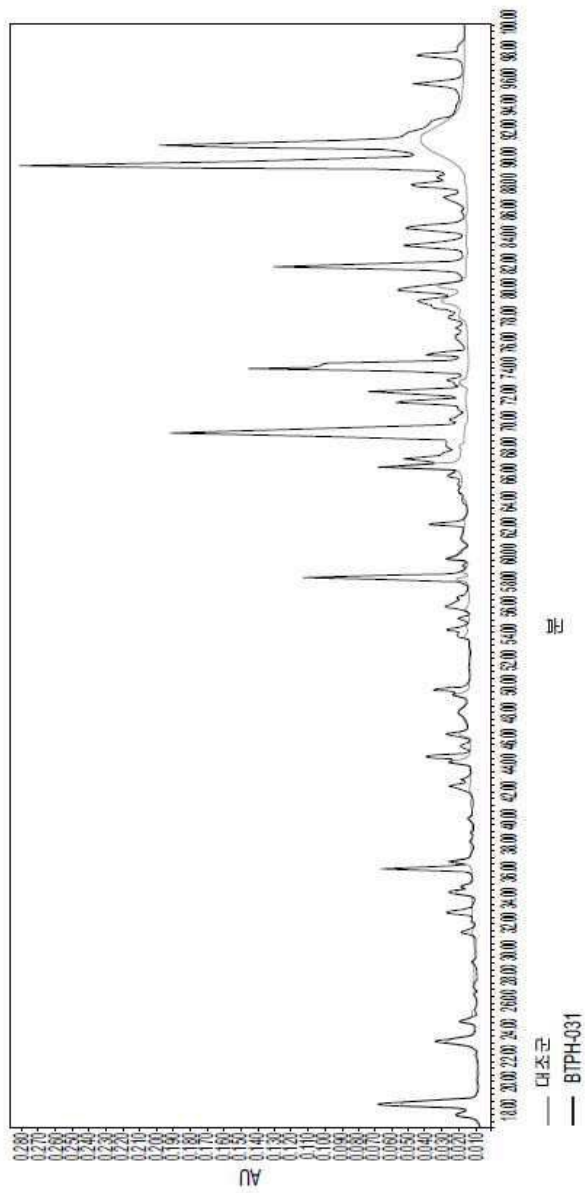
도면9



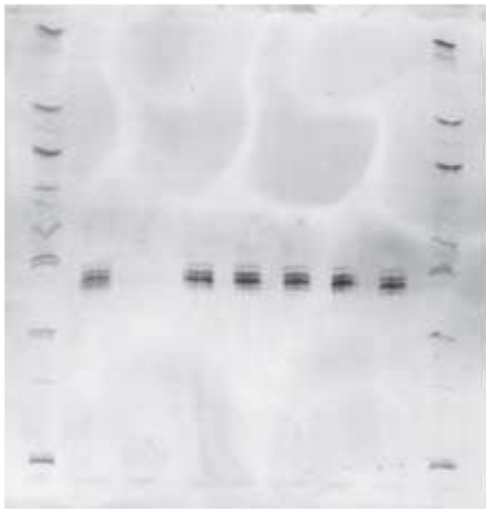
도면10



도면11



도면12



서열 목록

- <110> Yeda Research And Development Co. Ltd.
MIRELMAN, David
RABINKOV, Aharon
RUBAN, Angela
JONA, Ghil
HAZUM, Eli
BUMELIS, Vladas
MAKAUSKAS, Nerijus
SUDZIUVIENE, Saule
NARMONTAITE, Elena
- <120> GLUTAMATE OXALOACETATE TRANSAMINASE 1 (GOT1), PREPARATIONS AND
METHODS OF GENERATING SAME AND USES THEREOF
- <130> 65360
- <150> US 62/140,492
- <151> 2015-03-31
- <160> 5
- <170> PatentIn version 3.5
-
- <210> 1
- <211> 511
- <212> PRT
- <213> Artificial Sequence

<220><223> amino acids sequence encoding SUMO-GOT1 fusion protein

<400> 1

Met Gly Ser Asp Ser Glu Val Asn Gln Glu Ala Lys Pro Glu Val Lys

1 5 10 15

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

20 25 30

Ser Ser Glu Ile Phe Phe Lys Ile Lys Lys Thr Thr Pro Leu Arg Arg

35 40 45

Leu Met Glu Ala Phe Ala Lys Arg Gln Gly Lys Glu Met Asp Ser Leu

50 55 60

Arg Phe Leu Tyr Asp Gly Ile Arg Ile Gln Ala Asp Gln Thr Pro Glu

65 70 75 80

Asp Leu Asp Met Glu Asp Asn Asp Ile Ile Glu Ala His Arg Glu Gln

85 90 95

Ile Gly Gly Ala Pro Pro Ser Val Phe Ala Glu Val Pro Gln Ala Gln

100 105 110

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

115 120 125

Pro Arg Lys Val Asn Leu Gly Val Gly Ala Tyr Arg Thr Asp Asp Cys

130 135 140

His Pro Trp Val Leu Pro Val Val Lys Lys Val Glu Gln Lys Ile Ala

145 150 155 160

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

165 170 175

Glu Phe Arg Ser Cys Ala Ser Arg Leu Ala Leu Gly Asp Asp Ser Pro

180 185 190

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

195 200 205

Gly Ala Leu Arg Ile Gly Ala Asp Phe Leu Ala Arg Trp Tyr Asn Gly

210 215 220

Thr Asn Asn Lys Asn Thr Pro Val Tyr Val Ser Ser Pro Thr Trp Glu

225 230 235 240

Asn His Asn Ala Val Phe Ser Ala Ala Gly Phe Lys Asp Ile Arg Ser
 245 250 255
 Tyr Arg Tyr Trp Asp Ala Glu Lys Arg Gly Leu Asp Leu Gln Gly Phe
 260 265 270
 Leu Asn Asp Leu Glu Asn Ala Pro Glu Phe Ser Ile Val Val Leu His
 275 280 285
 Ala Cys Ala His Asn Pro Thr Gly Ile Asp Pro Thr Pro Glu Gln Trp
 290 295 300
 Lys Gln Ile Ala Ser Val Met Lys His Arg Phe Leu Phe Pro Phe Phe
 305 310 315 320
 Asp Ser Ala Tyr Gln Gly Phe Ala Ser Gly Asn Leu Glu Arg Asp Ala
 325 330 335
 Trp Ala Ile Arg Tyr Phe Val Ser Glu Gly Phe Glu Phe Phe Cys Ala
 340 345 350
 Gln Ser Phe Ser Lys Asn Phe Gly Leu Tyr Asn Glu Arg Val Gly Asn
 355 360 365
 Leu Thr Val Val Gly Lys Glu Pro Glu Ser Ile Leu Gln Val Leu Ser
 370 375 380
 Gln Met Glu Lys Ile Val Arg Ile Thr Trp Ser Asn Pro Pro Ala Gln
 385 390 395 400
 Gly Ala Arg Ile Val Ala Ser Thr Leu Ser Asn Pro Glu Leu Phe Glu
 405 410 415
 Glu Trp Thr Gly Asn Val Lys Thr Met Ala Asp Arg Ile Leu Thr Met
 420 425 430
 Arg Ser Glu Leu Arg Ala Arg Leu Glu Ala Leu Lys Thr Pro Gly Thr
 435 440 445
 Trp Asn His Ile Thr Asp Gln Ile Gly Met Phe Ser Phe Thr Gly Leu
 450 455 460
 Asn Pro Lys Gln Val Glu Tyr Leu Val Asn Glu Lys His Ile Tyr Leu
 465 470 475 480
 Leu Pro Ser Gly Arg Ile Asn Val Ser Gly Leu Thr Thr Lys Asn Leu

485 490 495
 Asp Tyr Val Ala Thr Ser Ile His Glu Ala Val Thr Lys Ile Gln
 500 505 510
 <210> 2
 <211> 412
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> amino acids sequence encoding GOT1
 <400> 2
 Ala Pro Pro Ser Val Phe Ala Glu Val Pro Gln Ala Gln Pro Val Leu
 1 5 10 15

 Val Phe Lys Leu Thr Ala Asp Phe Arg Glu Asp Pro Asp Pro Arg Lys
 20 25 30
 Val Asn Leu Gly Val Gly Ala Tyr Arg Thr Asp Asp Cys His Pro Trp
 35 40 45
 Val Leu Pro Val Val Lys Lys Val Glu Gln Lys Ile Ala Asn Asp Asn
 50 55 60
 Ser Leu Asn His Glu Tyr Leu Pro Ile Leu Gly Leu Ala Glu Phe Arg
 65 70 75 80
 Ser Cys Ala Ser Arg Leu Ala Leu Gly Asp Asp Ser Pro Ala Leu Lys

 85 90 95
 Glu Lys Arg Val Gly Gly Val Gln Ser Leu Gly Gly Thr Gly Ala Leu
 100 105 110
 Arg Ile Gly Ala Asp Phe Leu Ala Arg Trp Tyr Asn Gly Thr Asn Asn
 115 120 125
 Lys Asn Thr Pro Val Tyr Val Ser Ser Pro Thr Trp Glu Asn His Asn
 130 135 140
 Ala Val Phe Ser Ala Ala Gly Phe Lys Asp Ile Arg Ser Tyr Arg Tyr
 145 150 155 160

 Trp Asp Ala Glu Lys Arg Gly Leu Asp Leu Gln Gly Phe Leu Asn Asp
 165 170 175
 Leu Glu Asn Ala Pro Glu Phe Ser Ile Val Val Leu His Ala Cys Ala

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

 225 230 235 240
 Arg Tyr Phe Val Ser Glu Gly Phe Glu Phe Phe Cys Ala Gln Ser Phe
 245 250 255
 Ser Lys Asn Phe Gly Leu Tyr Asn Glu Arg Val Gly Asn Leu Thr Val
 260 265 270
 Val Gly Lys Glu Pro Glu Ser Ile Leu Gln Val Leu Ser Gln Met Glu
 275 280 285
 Lys Ile Val Arg Ile Thr Trp Ser Asn Pro Pro Ala Gln Gly Ala Arg
 290 295 300

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

 370 375 380
 Gly Arg Ile Asn Val Ser Gly Leu Thr Thr Lys Asn Leu Asp Tyr Val
 385 390 395 400
 Ala Thr Ser Ile His Glu Ala Val Thr Lys Ile Gln
 405 410

<210> 3

<211> 1530

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> nucleic acid sequence encoding SUMO-GOT1 fusion protein

<400> 3

ggatcggact cagaagtcaa tcaagaagct aagccagagg tcaagccaga agtcaagcct 60

gagactcaca tcaatttaaa ggtgtccgat ggatcttcag agatcttctt caagatcaaa 120

aagaccactc cttaagaag gctgatggaa gcgttcgcta aaagacaggg taaggaaatg 180

gactccttaa gattcttgta cgacggtatt agaattcaag ctgatcagac ccctgaagat 240

ttggacatgg aggataacga tattattgag gctcacagag aacagattgg tgggtcacct 300

ccgtcagtct ttgccgaggt tccgcaggcc cagcctgtcc tggcttctca gctcactgcc 360

gacttcaggg aggatccgga cccccgcaag gtcaacctgg gagtgggagc atatcgcacg 420

gatgactgcc atccctgggt ttgtccagta gtgaagaaag tggagcagaa gattgctaata 480

gacaatagcc taaatcacga gtatctgcc aatcctgggcc tggctgagtt ccggagctgt 540

gcttctcgtc ttgcccttgg ggatgacagc ccagcactca aggagaagcg ggtaggaggt 600

gtgcaatctt tggggggaac aggtgcactt cgaattggag ctgatttctt agcgcgttgg 660

tacaatggaa caaacaacaa gaacacacct gtctatgtgt cctcaccaac ctgggagaat 720

cacaatgctg tgttttccgc tgcctggttt aaagacattc ggtcctatcg ctactgggat 780

gcagagaaga gaggattgga cctccagggc ttctgaaatg atctggagaa tgctcctgag 840

ttctccattg ttgtcctcca cgctgtgca cacaacccaa ctgggattga cccaactccg 900

gagcagtgga agcagattgc ttctgtcatg aagcacgggt ttctgttccc ctcttttgac 960

tcagcctatc agggcttcgc atctggaaac ctggagagag atgcctgggc cattcgtctat 1020

tttgtgtctg aaggcttcga gttcttctgt gccagtcct tctccaagaa cttcgggctc 1080

tacaatgaga gagtccggaa tctgactgtg gttggaaaag aacctgagag catcctgcaa 1140

gtcctttccc agatggagaa gatcgtgcgg attacttggg ccaatcccc cgcccaggga 1200

gcacgaattg tggccagcac cctctctaac cctgagctct ttgaggaatg gacaggtaat 1260

gtgaagacaa tggctgaccg gattctgacc atgagatctg aactcagggc acgactagaa 1320

gccctcaaaa ccctgggac ctggaaccac atcactgac aaattggcat gttcagcttc 1380

actgggttga accccaagca ggttgagtat ctgggtcaatg aaaagcacat ctacctgctg 1440

ccaagtggtc gaatcaacgt gagtggctta accacaaaa atctagatta cgtggccacc 1500

tccatccatg aagcagtcac caaaatccag 1530

<210> 4

<211> 1239

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> nucleic acid sequence encoding GOT1 protein

<400> 4

atggcacctc cgtcagtcctt tgccgagggtt ccgcaggccc agcctgtcct ggtcttcaag 60

ctcactgccg acttcaggga ggatccggac ccccgcaagg tcaacctggg agtgggagca 120

tatcgcacgg atgactgcc a tccctgggtt ttgccagtag tgaagaaagt ggagcagaag 180

attgctaagt acaatagcct aaatcacgag tatctgccaa tcttgggcct ggctgagttc 240

cggagctgtg ctctctgtct tgcccttggg gatgacagcc cagcactcaa ggagaagcgg 300

gtaggagggtg tgcaatcttt ggggggaaca ggtgcacttc gaattggagc tgatttctta 360

gcgcgttgggt acaatggaac aaacaacaag aacacacctg tctatgtgtc ctcaccaacc 420

tgggagaatc acaatgtgtg gttttccgct gctggtttta aagacattcg gtcctatcgc 480

tactgggatg cagagaagag aggattggac ctccagggtt tcctgaatga tctggagaat 540

gtctctgagt tctccattgt tgtctctccac gctgtgtcac acaaccaaac tgggattgac 600

ccaactccgg agcagtggaa gcagattgct tctgtcatga agcaccgggtt tctgttcccc 660

ttctttgact cagcctatca gggcttcgca tctggaaacc tggagagaga tgcctgggcc 720

attcgctatt ttgtgtctga aggtctcgag ttcttctgtg cccagtcctt ctccaagaac 780

ttcgggctct acaatgagag agtcgggaat ctgactgtgg ttggaaaaga acctgagagc 840

atctgcaag tcttttccca gatggagaag atcgtgcgga ttacttggtc caatccccc 900

gcccaggag cagcaattgt ggccagcacc ctctctaacc ctgagctctt tgaggaatgg 960

acaggtaatg tgaagacaat ggctgaccgg attctgacca tgagatctga actcagggca 1020

cgactagaag cctcaaaaac ccctgggacc tggaaccaca tcaactgatca aattggcatg 1080

ttcagcttca ctgggttgaa cccaagcag gttgagtatc tggatcaatga aaagcacatc 1140

tacctgtctc caagtggctg aatcaactg agtggcttaa ccaccaaaaa tctagattac 1200

gtggccacct ccatccatga agcagtcacc aaaatccag 1239

<210> 5

<211> 99

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> amino acids sequence encoding SUMO

<400> 5

Met Gly Ser Asp Ser Glu Val Asn Gln Glu Ala Lys Pro Glu Val Lys
1 5 10 15
Pro Glu Val Lys Pro Glu Thr His Ile Asn Leu Lys Val Ser Asp Gly
20 25 30
Ser Ser Glu Ile Phe Phe Lys Ile Lys Lys Thr Thr Pro Leu Arg Arg
35 40 45
Leu Met Glu Ala Phe Ala Lys Arg Gln Gly Lys Glu Met Asp Ser Leu
50 55 60
Arg Phe Leu Tyr Asp Gly Ile Arg Ile Gln Ala Asp Gln Thr Pro Glu
65 70 75 80
Asp Leu Asp Met Glu Asp Asn Asp Ile Ile Glu Ala His Arg Glu Gln
85 90 95
Ile Gly Gly