



**(19) 대한민국특허청(KR)**  
**(12) 등록특허공보(B1)**

(45) 공고일자 2013년08월09일  
 (11) 등록번호 10-1292379  
 (24) 등록일자 2013년07월26일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
 C12N 15/53 (2006.01) C12N 15/68 (2006.01)  
 C12N 15/74 (2006.01) C12N 9/02 (2006.01)  
 (21) 출원번호 10-2011-7026447  
 (22) 출원일자(국제) 2010년04월08일  
 심사청구일자 2011년11월07일  
 (85) 번역문제출일자 2011년11월07일  
 (65) 공개번호 10-2011-0135990  
 (43) 공개일자 2011년12월20일  
 (86) 국제출원번호 PCT/US2010/030404  
 (87) 국제공개번호 WO 2010/118240  
 국제공개일자 2010년10월14일  
 (30) 우선권주장  
 61/167,676 2009년04월08일 미국(US)  
 (56) 선행기술조사문헌  
 US07420079 B2  
 W02005106011 A2  
 전체 청구항 수 : 총 7 항

(73) 특허권자  
 브리스틀-마이어스 스킵 컴퍼니  
 미합중국 뉴저지주 08540 프린스턴 루트 206 앤드  
 프로빈스 라인 로드  
 (72) 발명자  
 바슈, 조나단  
 미국 13214 뉴저지주 데위트 웰링턴 로드 216  
 프란체스키니, 토마스  
 미국 13039 뉴저지주 키케로 허니콤 패스 8635  
 (뒷면에 계속)  
 (74) 대리인  
 이귀동, 양영준

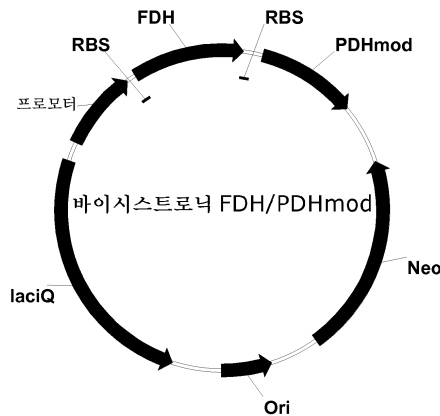
심사관 : 최준호

(54) 발명의 명칭 PDH 및 FDH 효소를 발현하는 유전적으로 안정한 플라스미드

**(57) 요약**

포르메이트 데히드로게나제 (FDH) 및 변형된 페닐알라닌 데히드로게나제 (PDHmod)의 발현에 사용되는 바이시스트로닉 플라스미드가 제공된다.

**대표도 - 도1**



(72) 발명자

리우, 수오, 원

미국 13104 뉴저지주 만리우스 파이어썬 서클 4997

치앙, 슈-젠

미국 13104 뉴저지주 만리우스 옛지워스 드라이브

4884

---

**특허청구의 범위**

**청구항 1**

- (a) 서열 1의 뉴클레오티드 서열을 포함하는 단리된 핵산 서열; 또는
- (b) 서열 4의 폴리펩티드 및 서열 5의 폴리펩티드를 코딩하는 서열을 포함하는 단리된 핵산 분자.

**청구항 2**

제1항에 있어서, 서열 4의 폴리펩티드 및 서열 5의 폴리펩티드를 코딩하는 서열이 단일 프로모터 영역을 추가로 포함하는 것인 단리된 핵산 분자.

**청구항 3**

서열 2의 뉴클레오티드 서열을 포함하는 단리된 핵산 분자.

**청구항 4**

제1항의 핵산 분자를 포함하는 플라스미드.

**청구항 5**

제4항의 플라스미드를 포함하는 단리된 숙주 세포.

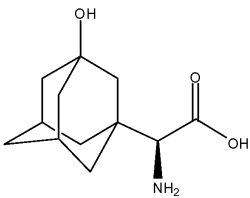
**청구항 6**

제5항에 있어서, 원핵 세포인 숙주 세포.

**청구항 7**

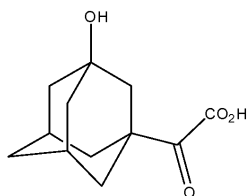
- (a) 서열 1의 핵산 분자에 의해 코딩되는 폴리펩티드의 발현에 적합한 조건 하에 제6항의 숙주 세포를 배양하는 단계;
- (b) 상기 폴리펩티드를 포함하는 효소 농축물을 부분적으로 정제하는 단계; 및
- (c) 하기 화학식 III:

<화학식 III>



의 (αS)-α-아미노-3-히드록시트리시클로[3.3.1.1<sup>3,7</sup>]데칸-1-아세트산을 생성시키는 조건 하에서 배양 단리물을 소정량의 하기 화학식 II:

<화학식 II>

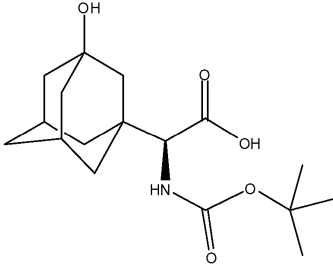


의 3-히드록시- $\alpha$ -옥소트리시클로-[3.3.1.1<sup>3,7</sup>]데칸-1-아세트산과 접촉시키는 단계; 및

(d) ( $\alpha$ S)- $\alpha$ -[[[(1,1-디메틸에톡시)카르복실]-아미노]-3-히드록시트리시클로[3.3.1.1<sup>3,7</sup>]데칸-1-아세트산을 생성시키는 조건 하에서 ( $\alpha$ S)- $\alpha$ -아미노-3-히드록시트리시클로[3.3.1.1<sup>3,7</sup>]데칸-1-아세트산을 소정량의 디-tert-부틸 디카르보네이트와 접촉시키는 단계

를 포함하는, 하기 화학식 I:

<화학식 I>



의 ( $\alpha$ S)- $\alpha$ -[[[(1,1-디메틸에톡시)카르복실]-아미노]-3-히드록시트리시클로[3.3.1.1<sup>3,7</sup>]데칸-1-아세트산을 제조하는 방법.

**청구항 8**

삭제

**청구항 9**

삭제

**명세서**

**기술분야**

- [0001] <관련 기술>
- [0002] 본 출원은 2009년 4월 8일에 출원된 미국 가출원 제61/167,676호에 관한 것으로서 이는 상기 미국 가출원을 우선권 주장하며, 이 가출원의 개시 내용은 본원에 참고로 포함된다.
- [0003] 서열 목록은 단지 전자 포맷 (컴퓨터 판독가능한 형태)으로 본 출원과 함께 출원되며, 이는 본원에 참고로 포함된다. 서열 목록 텍스트 파일, "09-203-SEQ\_LIST" [크기: 22,343바이트]가 2010년 4월 7일에 생성되었다.

**배경 기술**

- [0004] <발명의 분야>
- [0005] 본 발명은 포르메이트 데히드로게나제 (FDH) 및 변형된 페닐알라닌 데히드로게나제(PDHmod)의 발현에 사용되는 핵산 분자, 플라스미드 (예를 들어, 바이시스트로닉 (bi-cistronic) 플라스미드), 숙주 세포 및 방법에 관한 것이다.
- [0006] <발명의 배경>
- [0007] 디펩티딜 펩티다제 IV는 장, 간, 폐 및 신장을 포함하지만 이에 한정되는 것은 아닌 다양한 조직에 위치하는 막 결합형의 비-고전적 세린 아미노펩티다제이다. 이 효소는 순환 T-림프구 상에도 위치하며, 이는 CD-26으로 칭해진다. 디펩티딜 펩티다제 IV는 생체내에서 내인성 펩티드 GLP-1(7-36) 및 글루카곤의 대사적 절단에 책임이 있으며, 시험관내에서 GHRH, NPY, GLP-2 및 VIP와 같은 다른 펩티드에 대하여 단백질 분해 활성을 보여주었다.
- [0008] GLP-1(7-36)은 소장에서 프로글루카곤의 번역 후 프로세싱으로부터 유도된 29개 아미노산 펩티드이다. 이 펩티드는 생체내에서 다수의 작용을 갖는다. 예를 들어, GLP-1(7-36)은 인슐린 분비를 촉진하며 글루카곤 분비를 저해한다. 또한 이 펩티드는 포만을 촉진하며 위 배출을 늦춘다. 연속 주입을 통한 GLP-1(7-36)의 외인성 투

여는 당뇨 환자에 있어서 유효한 것으로 밝혀졌다. 그러나, 상기 외인성 펩티드는 연속 요법 용도에 있어서 너무 급속하게 분해된다.

[0009] 디펩티딜 펩티다제 IV의 저해제는 GLP-1(7-36)의 내인적 수준을 높이도록 개발되었다. 미국 특허 제6,395,767호에는 디펩티딜 펩티다제 IV의 시클로프로필-융합 피롤리딘-기체의 저해제가 개시되어 있다. 이들 저해제의 화학적 합성 방법이 당해 문헌뿐만 아니라 미국 특허 제6,395,767호에도 개시되어 있다. 예를 들어, 문헌 [Sagnard et al., Tetr.Lett. 1995 36:3148-3152]; [Tverezovsky et al., Tetrahedron 1997 53:14773-14792]; 및 [Hanessian et al., Bioorg. Med. Chem. Lett. 1998 8:2123-2128]을 참조한다. 미국 특허 제6,395,767호에 개시된 저해제의 예로는 유리 염기, (1S, 3S, 5S)-2-[(2S)-2-아미노-2-(3-히드록시-트리시클로[3.3.1.1<sup>3,7</sup>]-데스-1-일)-1-옥소에틸]-2-아자비시클로-[3.1.0]헥산-3-카르보니트릴이 있다.

[0010] 이러한 디펩티딜 펩티다제 IV 저해제의 제조에 사용되는 중간체의 제조 방법이 유럽 특허 제0 808 824 A2호에 개시되어 있다. 문헌[Imashiro and Kuroda Tetrahedron Letters 2001 42:1313-1315], [Reetz et al., Chem. Int. Ed. Engl. 1979 18:72], [Reetz and Heimbach Chem. Ber. 1983 116:3702-3707], [Reetz et al., Chem. Ber. 1983 116:3708-3724]을 또한 참조한다.

[0011] 효소 포르메이트 데히드로게나제 (FDH) (예를 들어, 피키아 파스토리스 (*Pichia pastoris*) (ATCC 20864)로부터 유래) 및 페닐알라닌 데히드로게나제 (PDH) (예를 들어, 서모악티노마이세스 인터메디스 (*Thermoactinomyces intermedius*) (ATCC 33205)로부터 유래)의 재조합적 발현이 3-히드록시- $\alpha$ -옥소트리시클로-[3.3.1.1<sup>3,7</sup>]데칸-1-아세트산의 ( $\alpha$ S)- $\alpha$ -아미노-3-히드록시트리시클로[3.3.1.1<sup>3,7</sup>] 데칸-1-아세트산 - 이는 그 후 DPPIV 저해제인 삭사글립틴의 합성에 있어서의 출발 물질인 ( $\alpha$ S)- $\alpha$ -[[[(1,1 디메틸에톡시)카르보닐]아미노]-3-히드록시트리시클로[3.3.1.1<sup>3,7</sup>] 데칸-1-아세트산으로 화학적으로 전환된 - 으로의 생물변환에 사용될 수 있다. 발현을 추진시키기 위하여 2개의 동일한 탠덤 (tandem) 프로모터 (각각의 효소에 대하여 하나의 프로모터)를 포함하는 단일 플라스미드를 사용하여 FDH 및 PDH를 발현시키려는 이전의 시도는 성공이 제한적이었다. 특히, 종래의 시도들은 세균 세포의 2가지 상이한 집단을 보유하고 있는 세균 배양물을 생성한 것으로 보이는데, 하나는 온전한 플라스미드를 함유하고 또 다른 것은 FDH 유전자를 함유하는 플라스미드의 당해 부분이 프로세싱된 (절단된) 것으로 보인다. 플라스미드의 프로세싱은 각각의 세포 세대에서 증가한 것으로 보인다.

[0012] 따라서, 생물변환법이 복합 화학 전구체의 생성 방법으로 확인되었지만, 상기에 논의된 생합성 공정은 유전적 불안정성 때문에 생성물 수율 감소를 겪는다. 따라서, 화학적 화합물, 예컨대 삭사글립틴의 궁극적인 제조에 있어서의 합성 전구체 분자의 제조를 위한 대안적인 재조합 서열 및 방법이 필요하다.

### 발명의 내용

[0013] <발명의 개요>

[0014] 일 측면에서, 본 발명은

[0015] (a) 서열 1과 95% 동일한 뉴클레오티드 서열을 포함하는 단리된 핵산 서열; 또는

[0016] (b) 서열 4의 폴리펩티드 및 서열 5의 폴리펩티드를 코딩하는 서열

[0017] 을 포함하는 단리된 핵산 분자에 관한 것이다.

[0018] 일 측면에서, 본 발명은 서열 1의 뉴클레오티드 서열을 포함하는 단리된 핵산 분자에 관한 것이다.

[0019] 일 측면에서, 본 발명은 엄격한 혼성화 조건 하에서 서열 1의 뉴클레오티드 서열의 상보체에 혼성화되는 서열을 포함하는 단리된 핵산 분자에 관한 것이다.

[0020] 일 측면에서, 본 발명은 서열 2의 뉴클레오티드 서열을 포함하는 단리된 핵산 분자에 관한 것이다.

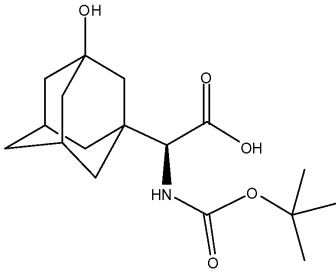
[0021] 일 측면에서, 본 발명은 서열 1을 포함하는 핵산 분자를 포함하는 플라스미드에 관한 것이다.

[0022] 일 측면에서, 본 발명은 서열 1을 포함하는 핵산 분자를 포함하는 단리된 숙주 세포에 관한 것이다.

[0023] 일 측면에서, 본 발명은 서열 2를 포함하는 핵산 분자를 포함하는 단리된 숙주 세포에 관한 것이다.

[0024] 일 측면에서, 본 발명은 하기 화학식 I:

[0025] <화학식 I>



[0026]

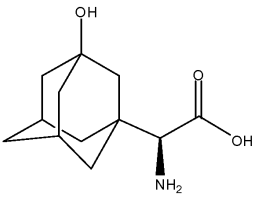
[0027] 의 (αS)-α-[[[(1,1-디메틸에톡시)카르복실]-아미노]-3-히드록시트리시클로[3.3.1.1<sup>3,7</sup>]데칸-1-아세트산의 제조 방법에 관한 것이며, 본 방법은

[0028] (a) 서열 1의 핵산 분자에 의해 코딩되는 폴리펩티드의 발현에 적합한 조건 하에 청구항 제8항의 숙주 세포를 배양하는 단계;

[0029] (b) 상기 폴리펩티드를 포함하는 효소 농축물을 부분적으로 정제하는 단계; 및

[0030] (c) 하기 화학식 III:

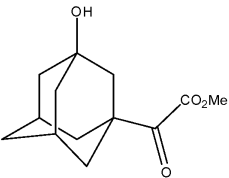
[0031] <화학식 III>



[0032]

[0033] 의 (αS)-α-아미노-3-히드록시트리시클로[3.3.1.1<sup>3,7</sup>]데칸-1-아세트산을 생성시키는 조건 하에서 배양 단리물을 소정량의 하기 화학식 II:

[0034] <화학식 II>



[0035]

[0036] 의 3-히드록시-α-옥소트리시클로-[3.3.1.1<sup>3,7</sup>]데칸-1-아세트산과 접촉시키는 단계; 및

[0037] (d) 화학식 I의 (αS)-α-[[[(1,1-디메틸에톡시)카르복실]-아미노]-3-히드록시트리시클로[3.3.1.1<sup>3,7</sup>]데칸-1-아세트산을 생성시키는 조건 하에서 (αS)-α-아미노-3-히드록시트리시클로[3.3.1.1<sup>3,7</sup>]데칸-1-아세트산을 소정량의 디-tert-부틸 디카르보네이트와 접촉시키는 단계

[0038] 를 포함한다.

[0039] 일 측면에서, 본 발명은 페닐알라닌 데히드로게나제 (PDH) 및 포르메이트 데히드로게나제 (FDH)의 부분 정제된 효소 농축물을 제조하는 방법에 관한 것이며, 여기서, 본 방법은 본원에 기술된 핵산 분자 또는 플라스미드를 함유하는 세포를 포함하는 발효 브로스를 제조하는 단계를 포함한다.

[0040] 상기 측면들뿐만 아니라 다른 측면 및 실시양태도 하기 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용을 고려하면 당업계의 숙련자에게 자명해질 것이다.

**도면의 간단한 설명**

[0041] 도 1에는 바이시스트로닉 FDH/PDHmod 플라스미드의 개략도가 도시되어 있다.

도 2에는 FDH/PDHmod 바이시스트로닉 플라스미드의 핵산 서열 (서열 2)이 예시되어 있다. FDH (서열 8), 리보솜 결합 부위 (서열 3) 및 PDHmod (서열 9)를 코딩하는 영역은 볼드체로서 밑줄이 그어져 있다 (서열 1).

도 3에는 바이시스트로닉 FDH/PDHmod 플라스미드의 EcoRI 제한효소 절단의 결과가 예시되어 있다.

**발명을 실시하기 위한 구체적인 내용**

- [0042] 일반적인 의미에서, 본 발명은 바람직한 화학적 화합물 (예를 들어, 약물 제품, 예컨대 DPPIV 저해제, 식사글립틴)의 제조에 있어서 유용한 합성 전구체 분자 및/또는 중간체로서의 화학 분자의 생물변환을 제공하는 핵산 분자, 플라스미드, 벡터, 숙주 세포 및 방법에 관한 것이다. 핵산 분자는 벡터, 예컨대 발현 벡터 또는 플라스미드 내로 포함될 수 있으며, 숙주 세포 (예를 들어, 세균 세포)에서 유전적으로 안정한 재조합 구축물을 제공한다. 본 세포 및 플라스미드는 포르메이트 데히드로게나제 및 페닐알라닌 데히드로게나제 활성을 포함하는 방법에서 그 용도가 발견된다.
- [0043] 정의
- [0044] 본 발명의 다양한 측면 및 실시양태를 상세하게 기술하기 전에 다수의 용어가 정의된다. 본원에서 사용될 때, 단수형 ("a", "an", 및 "the")은 그 문맥이 다르게 명백하게 진술하지 않으면 복수형의 지시 대상을 포함한다. 예를 들어, "핵산"에 대한 언급은 하나 이상의 핵산을 의미한다.
- [0045] "바람직하게는", "보통" 및 "전형적으로"와 같은 용어는 특허청구되는 본 발명의 범주를 한정하거나 특정한 특징이 특허청구되는 본 발명의 구조 또는 기능에 결정적이거나, 필수적이거나, 심지어 중요함을 내포하기 위하여 본원에서 이용되는 것이 아님이 주목된다. 오히려, 이들 용어의 임의의 사용은 단지 특정 실시양태에서 이용될 수 있거나 이용될 수 없는 대안적인 특징 또는 추가의 특징을 강조하고자 한다.
- [0046] 일부 예에서, 본 발명에서는 임의의 정량적 비교, 값, 측정치 또는 기타 표시에 기여할 수 있는 고유의 불확실성 정도를 나타내기 위하여 "실질적으로" 또는 "약"이라는 용어가 사용될 수 있다. 상기 용어는 정량적 표시가 당해 주제의 기본적 기능 변화를 초래하지 않고서 진술된 언급에서 달라질 수 있는 정도를 또한 나타낼 수 있다.
- [0047] 본원에서 사용될 때, "폴리뉴클레오티드", "뉴클레오티드", "올리고뉴클레오티드" 및 "핵산 분자"라는 용어는 DNA, RNA, 그의 유도체, 또는 그의 조합을 포함하는 핵산 분자를 나타내기 위하여 상호교환가능하게 사용될 수 있다.
- [0048] 생물 물질, 예컨대 핵산 분자, 폴리펩티드, 숙주 세포 등과 관련하여 사용될 경우 "자연 발생" 또는 "천연"이라는 용어는 자연에서 발견되며 인간에 의해 조작되지 않은 물질을 나타낸다. 이와 유사하게, 본원에서 사용될 때 "자연 비-발생" 또는 "비천연"은 자연에서 발견되지 않거나, 인간에 의해 합성되었거나 구조적으로 변형된 물질을 나타낸다. 뉴클레오티드와 관련하여 사용될 때, "자연 발생" 또는 "천연"은 아데닌 (A), 시토신 (C), 구아닌 (G), 티민 (T) 및 우라실 (U) 염기를 나타낸다. 아미노산과 관련하여 사용될 때, "자연 발생" 및 "천연"이라는 용어는 20가지의 아미노산인 알라닌 (A), 시스테인 (C), 아스파르트산 (D), 글루탐산 (E), 페닐알라닌 (F), 글리신 (G), 히스티딘 (H), 이소류신 (I), 리신 (K), 류신 (L), 메티오닌 (M), 아스파라긴 (N), 프롤린 (P), 글루타민 (Q), 아르기닌 (R), 세린 (S), 트레오닌 (T), 발린 (V), 트립토판 (W), 및 티로신 (Y)을 나타낸다.
- [0049] "페닐알라닌 데히드로게나제" 또는 "PDH"라는 용어는 페닐알라닌 데히드로게나제 활성을 갖는 단백질뿐만 아니라 그의 효소적 활성 단편 및 변이체도 의미한다. PDH의 비제한적 예로는 페닐알라닌 데히드로게나제 활성을 갖는 서열 5뿐만 아니라 서열 5의 효소적 활성 단편 및 변이체도 포함하는 "PDHmod"가 있다.
- [0050] "포르메이트 데히드로게나제" 또는 "FDH"라는 용어는 포르메이트 데히드로게나제 활성을 갖는 단백질뿐만 아니라 그의 효소적 활성 단편 및 변이체도 의미한다. FDH의 비제한적 예로는 포르메이트 데히드로게나제 활성을 갖는 서열 4뿐만 아니라 서열 4의 효소적 활성 단편 및 변이체도 포함한다.
- [0051] 핵산, 플라스미드 및 숙주 세포
- [0052] 본원에서 사용되는 재조합 DNA법은 일반적으로 문헌[Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989)] 및/또는 [Current Protocols in Molecular Biology, Ausubel et al., eds., Green Publishers Inc. and Wiley and Sons 1994]에 개시된 것이다.

- [0053] 일 측면에서, 본 발명은 서열 1, 또는 기능적 포르메이트 데히드로게나제 및 기능적 페닐알라닌 데히드로게나제를 코딩하는 서열을 포함하는 단리된 핵산 분자를 제공한다. 실시양태들에서 포르메이트 데히드로게나제 (FDH)는 임의의 특정 종 유래의 임의의 FDH 서열, 또는 그의 기능적 단편을 포함할 수 있다. 실시양태들에서 페닐알라닌 데히드로게나제 (PDH)는 임의의 특정 종 유래의 임의의 PDH 서열 또는 그의 기능적 단편일 수 있다. 일 실시양태에서, FDH 서열은 서열 4 또는 그의 기능적 단편 또는 변이체를 포함한다. 일 실시양태에서 PDH 서열은 서열 5 또는 그의 기능적 단편 또는 변이체를 포함한다. 일 실시양태에서, 핵산 분자는 서열 1의 뉴클레오티드 서열을 포함한다.
- [0054] 실시양태들에서, 핵산 분자는 FDH 및 PDH를 코딩하는 영역의 발현을 추진하는 단일 프로모터 영역을 포함하며, 여기서, 상기 프로모터 영역은 본원에서 하기에 기술된 바와 같다.
- [0055] 실시양태들에서, 핵산 분자는 FDH 및 PDH를 코딩하는 분자의 부분 사이의 영역을 포함한다. 실시양태들에서, 상기 영역은 약 10 내지 약 100개 뉴클레오티드 (예를 들어, 약 10, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 또는 100개의 뉴클레오티드 염기)의 길이를 포함한다. 실시양태들에서, 상기 영역은 본원에서 하기에 기술된 바와 같이 리보솜 결합 부위를 포함한다.
- [0056] "단리된 핵산 분자"라는 용어는 (1) 전체 핵산이 세포원으로부터 단리될 경우 자연적으로 함께 발견되는 단백질, 지질, 탄수화물 또는 기타 물질 약 50% 이상으로부터 분리되었거나, (2) "단리된 핵산 분자"가 자연에서는 연결된 폴리뉴클레오티드의 전부 또는 일부분에 연결되어 있지 않거나, (3) 자연에서는 연결되어 있지 않는 폴리뉴클레오티드에 작동가능하게 연결되어 있거나, (4) 보다 큰 폴리뉴클레오티드 서열의 일부로서 자연에서는 나타나지 않는 핵산 분자를 나타낸다. 따라서, 다양한 실시양태들에서, 단리된 핵산 분자에는 폴리펩티드 생성 또는 그의 치료, 진단, 예방 또는 연구 용도에 있어서 그의 사용을 간섭하는, 그의 자연적인 환경에서 발견되는 임의의 기타 오염 핵산 분자(들) 또는 기타 오염물질이 실질적으로 없다. 특정 실시양태에서, 단리된 핵산 분자가 세포 내에 포함된다.
- [0057] "핵산 서열" 또는 "핵산 분자"라는 용어는 DNA 또는 RNA 서열을 나타낸다. 상기 용어는 4-아세틸시토신, 8-히드록시-N6-메틸아데노신, 아지리딘-시토신, 슈도이소시토신, 5-(카르복시히드록실메틸) 우라실, 5-플루오로우라실, 5-브로모우라실, 5-카르복시메틸아미노메틸-2-티오우라실, 5-카르복시-메틸아미노메틸우라실, 디히드로우라실, 이노신, N6-이소-펜테닐아데닌, 1-메틸아데닌, 1-메틸슈도우라실, 1-메틸구아닌, 1-메틸이노신, 2,2-디메틸-구아닌, 2-메틸아데닌, 2-메틸구아닌, 3-메틸시토신, 5-메틸시토신, N6-메틸아데닌, 7-메틸구아닌, 5-메틸아미노메틸우라실, 5-메톡시아미노-메틸-2-티오우라실, 베타-D-만노실큐에오신, 5'-메톡시카르보닐-메틸우라실, 5-메톡시우라실, 2-메틸티오-N6-이소펜테닐아데닌, 우라실-5-옥시아세트산 메틸에스테르, 우라실-5-옥시아세트산, 옥시부톡소신, 슈도우라실, 큐에오신, 2-티오시토신, 5-메틸- 2-티오우라실, 2-티오우라실, 4-티오우라실, 5-메틸우라실, N-우라실-5-옥시 아세트산 메틸에스테르, 우라실-5-옥시아세트산, 슈도우라실, 큐에오신, 2-티오시토신, 및 2,6-디아미노퓨린과 같은 그러나 이에 한정되는 것은 아닌 DNA 및 RNA의 임의의 공지된 염기 유사체로부터 형성된 분자를 포함한다.
- [0058] 일 측면에서, 본 발명은 서열 1과 95% 동일한 뉴클레오티드 서열을 포함하는 단리된 핵산 서열을 제공한다.
- [0059] 당업계에 공지된 바와 같이, "동일성"이라는 용어는 2가지 이상의 폴리펩티드 분자 또는 2가지 이상의 핵산 분자의 서열들 사이의 관계를 나타내며, 이는 상기 서열들의 비교에 의해 결정되는 바와 같다. 당업계에서, "동일성"은 2가지 이상의 뉴클레오티드 또는 2가지 이상의 아미노산의 서열의 스트링(string) 사이의 매치에 의해 결정되는 경우가 그러할 수 있듯이 핵산 분자들 또는 폴리펩티드들 사이의 서열 관련 정도를 또한 의미한다. "동일성"은 특정한 수학적 모델 또는 컴퓨터 프로그램 (즉, "알고리즘")에 의해 검토되는 겹 정렬 (만약 있다면)에 의한 2가지 이상의 서열들 중 더 작은 것들 사이의 동일한 매치의 %를 측정한다.
- [0060] 일 실시양태에서, 단리된 핵산 서열은 50% 포름아미드, 5X SSC (0.75 M NaCl, 0.075 M 시트르산나트륨), 50 mM 인산나트륨 (pH 6.8), 0.1% 피로인산나트륨, 0.1% SDS 및 10% 텍스트란 술페이트를 포함하는 혼성화 완충액에서 42°C에서, 그리고 그 후 0.2X SSC 및 0.1% SDS를 포함하는 혼성화 세척 완충액에서 42°C에서 서열 1의 뉴클레오티드 서열의 상보체에 혼성화하는 뉴클레오티드 서열을 포함한다.
- [0061] "고도로 엄격한 조건"이라는 용어는 서열이 고도로 상보성인 DNA 가닥들의 혼성화는 가능케 하고 유의하게 미스 매치된 DNA의 혼성화는 배제하도록 고안된 조건을 나타낸다. 혼성화 엄격도는 변성제, 예컨대 포름아미드의 농도, 이온 강도 및 온도에 의해 주로 결정된다. 혼성화 및 세척에 있어서 "고도로 엄격한 조건"의 예로는 0.015

M 염화나트륨, 0.0015 M 시트르산나트륨, 65-68°C 또는 0.015 M 염화나트륨, 0.0015 M 시트르산나트륨 및 50% 포름아미드, 42°C가 있다. 문헌[Sambrook, Fritsch & Maniatis, Molecular Cloning: A Laboratory Manual (2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory, 1989)]; [Anderson et al., Nucleic Acid Hybridisation: A Practical Approach Ch. 4 (IRL Press Limited)]을 참조한다.

- [0062] 더욱 엄격한 조건 (예컨대 더욱 높은 온도, 더욱 낮은 이온 강도, 더욱 높은 포름아미드 또는 기타 변성제)이 또한 사용될 수 있지만, 혼성화 속도가 영향을 받는다. 다른 에이전트가 비-특이적 및/또는 배경 혼성화를 감소시킬 목적으로 혼성화 및 세척 완충액에 포함될 수 있다. 예로는 0.1% 소 혈청 알부민, 0.1% 폴리비닐-피롤리돈, 0.1% 피로인산나트륨, 0.1% 소듐 도데실설페이트, NaDodSO<sub>4</sub>, (SDS), 피콜, 덴하트액 (Denhardt's solution), 초음파 처리된 연어 정자 DNA (또는 또 다른 비-상보성 DNA) 및 텍스트란 설페이트가 있지만, 다른 적합한 에이전트도 사용될 수 있다. 이들 첨가제의 농도 및 유형은 혼성화 조건의 엄격도에 상당한 영향을 주지 않고서 변화될 수 있다. 혼성화 실험은 일반적으로 pH 6.8-7.4에서 실시되지만, 전형적인 이온 강도 조건에서 혼성화 속도는 pH와는 거의 관계가 없다. 문헌[Anderson et al., Nucleic Acid Hybridisation: A Practical Approach Ch. 4 (IRL Press Limited)]을 참조한다.
- [0063] DNA 이중가닥의 안정성에 영향을 주는 인자는 염기의 조성, 길이 및 염기쌍 미스매치 정도를 포함한다. 혼성화 조건은 이들 변수를 배려하고 상이한 서열 관련성의 DNA들이 하이브리드를 형성하게 하기 위하여 당업계의 숙련자에 의해 조정될 수 있다. 완벽하게 매치된 DNA 이중가닥의 용융 온도는 하기 등식에 의해 계산될 수 있다:
- [0064]  $T_m (^{\circ}C) = 81.5 + 16.6(\log[Na^{+}]) + 0.41(\%G+C) - 600/N - 0.72 (\%포름아미드)$
- [0065] 여기서, N은 형성된 이중가닥의 길이이며, [Na<sup>+</sup>]는 혼성화 또는 세척 용액 중 나트륨 이온의 몰 농도이고, %G+C는 하이브리드 중 (구아닌+시토신) 염기의 백분율이다.
- [0066] 불완전하게 매치된 하이브리드에 있어서, 용융 온도는 각각의 1% 미스매치에 대하여 대략 1°C만큼 감소된다.
- [0067] "중등도의 엄격한 조건"이라는 용어는 "고도로 엄격한 조건" 하에서 나타날 수 있는 것보다 더 큰 정도의 염기쌍 미스매치를 갖는 DNA 이중가닥이 형성될 수 있는 조건을 나타낸다. 전형적인 "중등도의 엄격한 조건"의 예로는 0.015 M 염화나트륨, 0.0015 M 시트르산나트륨, 50-65°C 또는 0.015 M 염화나트륨, 0.0015 M 시트르산나트륨 및 20% 포름아미드, 37-50°C가 있다. 예로서, 0.015 M 나트륨 이온 중에서의 50°C의 "중등도의 엄격한 조건"은 약 21% 미스매치를 허용한다.
- [0068] 당업계의 숙련자라면 "고도로 엄격한 조건"과 "중등도의 엄격한 조건" 사이에는 절대적인 구별이 없음을 인식할 것이다. 예를 들어, 0.015 M의 나트륨 이온에서 (포름아미드는 없음), 바람직하게 매치된 긴 DNA의 용융 온도는 약 71°C이다. (동일한 이온 강도에서의) 65°C에서의 세척에 의해 이는 대략 6%의 미스매치를 허용한다. 더욱 멀리 관련된 서열들의 포착을 위하여 당업계의 숙련자는 단순히 온도를 낮추거나 이온 강도를 상승시킬 수 있다.
- [0069] 최대 약 20 nt까지의 올리고뉴클레오타이드에 있어서 1 M NaCl\*에서의 용융 온도의 우수한 개선은 하기에 의해 주어진다:
- [0070]  $T_m = A-T \text{ 염기쌍당 } 2^{\circ}C + G-C \text{ 염기쌍당 } 4^{\circ}C$
- [0071] \*6X 염 시트르산나트륨 (SSC) 중 나트륨 이온 농도는 1 M이다. 문헌[Suggs et al., Developmental Biology Using Purified Genes 683 (Brown and Fox, eds., 1981)]을 참조한다.
- [0072] 올리고뉴클레오타이드에 있어서 높은 엄격도의 세척 조건은 일반적으로 6X SSC, 0.1% SDS에서 올리고뉴클레오타이드의 T<sub>m</sub>보다 0-5°C 더 낮은 온도에서의 것이다.
- [0073] 일 측면에서, 본 발명은 서열 1의 핵산 분자를 포함하는 플라스미드를 제공한다.
- [0074] 또 다른 측면에서, 본 발명은 서열 4의 폴리펩티드 및 서열 5의 폴리펩티드를 코딩하는 서열을 포함하는 플라스미드를 제공한다.
- [0075] "플라스미드"라는 용어는 코딩 정보를 숙주 세포에 전달하는 데 사용되는 임의의 분자 (예를 들어, 핵산, 벡터 또는 바이러스)를 나타내기 위하여 사용된다.
- [0076] "발현 플라스미드"라는 용어는 숙주 세포의 형질전환에 적합하고 삽입된 비상동성 핵산 서열의 발현을 추진 및/또는 제어하는 핵산 서열을 포함하는 플라스미드를 나타낸다. 발현은 전사, 번역 및 인트론이 존재할 경우 RNA

스플라이싱과 같은 과정을 포함하지만, 이에 한정되는 것은 아니다. 일반적으로, 플라스미드 분자 (예를 들어, 발현 벡터, 숙주 벡터 등)는 당업계에 공지되어 있으며, 구매가능하다.

- [0077] 실시양태들에서, 플라스미드는 본원에서 기술된 핵산을 포함하도록 고안되며, 여기서, FDH 및 PDH의 발현은 단일 프로모터의 제어 하에 있다.
- [0078] 다양한 실시양태들에서, 임의의 숙주 세포에서 사용되는 발현 플라스미드는 플라스미드의 유지를 위한 그리고 외인성 뉴클레오티드 서열의 클로닝 및 발현을 위한 서열을 포함할 수 있다. 그러한 서열은 특정 실시양태에서 "측면 서열"로 통칭되는 것으로서, 전형적으로 하기 뉴클레오티드들 중 하나 이상을 포함한다: 프로모터, 복제 기점, 전사 종결 서열, 분비가능한 단백질의 발현의 경우 분비를 위한 리더 (leader) 서열, 리보솜 결합 부위, 발현시킬 폴리펩티드를 코딩하는 핵산을 삽입하기 위한 폴리링커 (polylinker) 영역, 및 선발가능한 마커 요소.
- [0079] 임의로, 플라스미드는 "태그" 서열, 즉, FDH 또는 PDHmod 폴리펩티드 코딩 서열의 5' 또는 3' 말단에 위치하는 올리고뉴클레오티드 분자를 포함할 수 있으며, 상기 올리고뉴클레오티드 분자는 polyHis (예컨대 핵사His), 또는 기타 "태그", 예컨대 FLAG, HA (헤마글루티닌 인플루엔자 바이러스 (hemagglutinin Influenza virus)) 또는 myc - 이에 대해서는 구매가능한 항체가 존재함 - 를 코딩한다. 이 태그는 폴리펩티드의 발현시 폴리펩티드에 융합될 수 있으며, 숙주 세포로부터의 PHDmod 또는 FDH 폴리펩티드의 친화성 정제를 위한 수단으로서의 역할을 할 수 있다. 친화성 정제는 예를 들어 친화성 매트릭스로서 태그에 대한 항체를 사용하여 컬럼 크로마토그래피에 의해 성취될 수 있다. 임의로, 태그는 절단을 위한 특정한 펩티다제의 사용과 같은 다양한 수단에 의해 정제 PHDmod 또는 FDH 폴리펩티드로부터 후속적으로 제거될 수 있다.
- [0080] 전사 종결 서열은 전형적으로 폴리펩티드 코딩 영역의 3' 말단에 위치하며, 전사를 종결시키는 역할을 한다. 일반적으로, 원핵 세포에서의 전사 종결 서열은 G-C 풍부 단편에 이은 폴리-T 서열이다. 이 서열은 라이브리리로부터 용이하게 클로닝되거나 심지어 플라스미드의 일부로서 상업적으로 구매되는 반면, 이것은 또한 상기에 기술된 것과 같은 핵산 합성 방법을 이용하여 쉽게 합성될 수 있다.
- [0081] 본원에서 "작동가능하게 연결된"이라는 용어는 측면 서열의 배열을 나타내기 위하여 사용되며, 여기서, 이렇게 기술된 측면 서열은 그의 일반적인 기능을 수행하도록 구성되거나 조립된다. 따라서, 코딩 서열에 작동가능하게 연결된 측면 서열은 코딩 서열의 복제, 전사 및/또는 번역의 초래가 가능할 수 있다. 예를 들어, 코딩 서열은 프로모터가 그 코딩 서열의 전사를 추진할 수 있는 경우 프로모터에 작동가능하게 연결되는 것이다. 측면 서열은 이것이 올바르게 기능하기만 한다면 코딩 서열에 인접할 필요가 없다. 따라서, 예를 들어 번역되지 않지만 전사되는 개체 서열이 프로모터 서열과 코딩 서열 사이에 존재할 수 있으며, 프로모터 서열은 여전히 코딩 서열에 "작동가능하게 연결된" 것으로 간주될 수 있다.
- [0082] 일 측면에서, 본 발명은 바이시스트로닉 플라스미드를 포함하는 단리된 숙주 세포를 제공하며, 여기서, 플라스미드는 FDH 및 PDHmod를 코딩한다. 숙주 세포는 임의의 적합한 숙주 세포일 수 있으며, 요망되는 응용 (예를 들어, 증폭 및/또는 폴리펩티드 발현용)에 기초하여 숙련자에 의해 선택될 수 있다.
- [0083] "숙주 세포"라는 용어는 형질전환된 세포 또는 핵산 서열로 형질전환될 수 있고 그 후 선택된 관심 유전자를 발현할 수 있는 세포를 나타내기 위하여 사용된다. 이 용어는 자손이 형태 면에서 또는 유전자 메이크업 (make-up) 면에서 원래 부모와 동일하든지 동일하지 않든지 간에, 선택된 유전자가 존재하기만 한다면 모 세포의 자손을 포함한다.
- [0084] 본원에서 사용될 때, "형질전환"이라는 용어는 세포의 유전적 특징의 변화를 나타내며, 세포는 이것이 새로운 DNA를 포함하도록 변형되었을 경우 형질전환되었다. 예를 들어, 세포는 이것이 그의 천연 상태에서부터 유전적으로 변형될 경우 형질전환된다. 형질감염 또는 형질도입 후, 형질전환 DNA는 세포의 염색체 내로의 물리적 통합에 의해 세포의 것과 재조합될 수 있거나, 복제 없이 에피솜 요소로서 일시적으로 유지될 수 있거나, 플라스미드로서 독립적으로 복제될 수 있다. 세포는 DNA가 세포 분열과 함께 복제될 경우 안정하게 형질전환된 것으로 간주된다.
- [0085] "형질감염"이라는 용어는 세포에 의한 외래 또는 외인성 DNA의 흡수를 나타내기 위하여 사용되며, 세포는 외인성 DNA가 세포막 내부로 도입되었을 때 "형질감염"되었다. 다수의 형질감염 기술이 당업계에 공지되어 있으며, 본원에 개시되어 있다. 예를 들어, 문헌[Graham et al., 1973, Virology 52:456]; [Sambrook et al., Molecular Cloning, A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Laboratories, 1989)]; [Davis et al., Basic Methods in Molecular Biology (Elsevier, 1986)]; 및 [Chu et al., 1981, Gene 13:197]을 참조한다. 그러한 기술은 하나 이상의 외인성 DNA 모이어티 (moiety)를 적합한 숙주 세포 내로 도입하는 데 사용될 수 있다.

- [0086] 특정 실시양태에서, 선발 압력은 배지 중 선발제의 농도를 연속적으로 변화시킴으로써 선발 유전자와, PDHmod 및 FDH 폴리펩티드를 코딩하는 DNA 둘 모두를 증폭시키는 조건 하에 형질전환 세포를 배양함으로써 가해진다. 그 결과, 증가된 양의 PDHmod 및 FDH 폴리펩티드가 증폭 DNA로부터 합성된다.
- [0087] PDHmod 및 FDH 폴리펩티드의 발현 플라스미드로 선택된 숙주 세포를 형질전환시키거나 형질감염시키는 것은 염화칼슘법, 전기천공법, 미세주입법, 리포펙션법 (lipofection method), 또는 DEAE-텍스트란핀과 같은 방법을 포함하는 공지된 방법에 의해 성취될 수 있다. 선택된 방법은 부분적으로는 사용할 숙주 세포의 유형의 함수일 것이다. 이들 방법 및 기타 적합한 방법이 당업계에 공지되어 있으며, 예를 들어, 샘브룩 (Sambrook) 등의 상기 문헌에 개시되어 있다.
- [0088] 선발가능한 마커 유전자 요소는 선발 배양 배지에서 성장시킨 숙주 세포의 생존 및 성장에 필요한 단백질을 코딩한다. 전형적인 선발 마커 유전자는 (a) 원핵 숙주 세포에 있어서 항생제 또는 기타 독소, 예를 들어 암피실린, 테트라시클린 또는 카나마이신에 대한 내성을 부여하거나, (b) 상기 세포의 영양요구 결핍을 보완하거나, (c) 복합 배지로부터 입수가가능하지 않은 결정적인 영양소를 공급하는 단백질을 코딩한다. 선발가능한 마커의 예로는 카나마이신 내성 유전자, 암피실린 내성 유전자 및 테트라시클린 내성 유전자가 있다. 네오마이신 내성 유전자가 원핵 및 진핵 숙주 세포에서의 선발에 또한 사용될 수 있다.
- [0089] PDH 또는 PHDmod 및 FDH 폴리펩티드를 코딩하는 핵산 분자는 표준 라이게이션 기술을 이용하여 적절한 발현 플라스미드 내로 삽입된다. 플라스미드는 이용되는 특정 숙주 세포에서 기능성이 되도록 선택될 수 있다 (즉, 플라스미드는 숙주 세포 기구와 양립가능하여 유전자의 증폭 및/또는 유전자의 발현이 일어날 수 있게 함).
- [0090] 추가의 실시양태에서, 핵산 분자는 원핵 숙주 세포에서 증폭 및/또는 발현될 수 있다. 숙주 세포는 원핵 숙주 세포 (예컨대, 이. 콜라이 (*E. coli*))일 수 있다. 적절한 조건 하에 배양될 경우 숙주 세포는 PDHmod 및 FDH 폴리펩티드를 합성하며, 후속적으로 상기 폴리펩티드는 그를 생산하는 숙주 세포로부터 직접적으로 수집될 수 있다. 적절한 숙주 세포의 선택은 다양한 인자, 예컨대 요망되는 발현 수준, 활성화 바람직하거나 필요한 폴리펩티드 변형, 예컨대 글리코실화 또는 포스포릴화, 및 생물학적 활성 분자로서의 폴딩 (folding)의 용이성에 따라 달라진다.
- [0091] 세균 세포는 본원에 기술된 바와 같이 핵산 분자 및/또는 플라스미드에 적합한 숙주 세포로서 유용하다. 다양한 실시양태에서, 숙주 세포는 이. 콜라이의 임의의 다양한 주 (예를 들어, JM110, HB101, DH5, DH10, 및 MC1061)를 포함할 수 있다. 실시양태들에서, 핵산 또는 플라스미드를 포함하는 세포 (즉, 형질전환되거나 형질감염됨)는 당업계에 공지된 표준 배지를 이용하여 배양될 수 있다. 배지는 일반적으로 세포의 성장 및 생존에 필요한 모든 영양소를 포함한다. 이. 콜라이 세포의 배양에 적합한 배지는 예를 들어 루리아 브로쓰 (Luria Broth, LB) 및/또는 테리픽 브로쓰 (Terrific Broth, TB)이다. 몇몇 실시양태들에서, 형질감염 또는 형질전환된 세포의 선택적 성장에 유용한 항생제 또는 기타 화합물이 배지에의 보충제로서 첨가된다. 사용할 화합물은 숙주 세포를 형질전환시키는 플라스미드 상에 존재하는 선발가능한 마커 요소에 의해 결정된다. 예를 들어, 선발가능한 마커 요소가 카나마이신 내성일 경우, 배양 배지에 첨가되는 화합물은 카나마이신이다. 선택적 성장을 위한 다른 화합물은 암피실린, 테트라시클린 및 네오마이신을 포함한다.
- [0092] 일부 실시양태에서, 리보솜 결합 부위 (RBS)는 원핵생물에서 mRNA의 번역을 개시할 수 있으며, 샤인-달가노 (Shine-Dalgarno) 서열을 특징으로 한다. 실시양태들에서, RBS는 발현시킬 PDH 및 FDH 폴리펩티드의 코딩 서열에 대하여 5'에 그리고 프로모터에 대하여 3'에 위치할 수 있다. 비융합 상태의 천연 단백질의 발현은 리보솜이 번역을 개시할 수 없도록 mRNA 시작 코돈 및/또는 샤인-달가노 서열을 포함하는 영역에 의해 국소적 2차 구조가 형성됨에 의해 저해될 수 있다. 실시양태들에서, 플라스미드를 이용하여 진핵 서열을 포함하는 mRNA의 이러한 번역 저해를 극복할 수 있다 (문헌[Yero et al., Biotechnol. Appl. Biochem., 44:27-34, (2006)]; [Schoner et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 83:8506-8510 (1986)]).
- [0093] 다양한 실시양태에서, 발현 및 클로닝 플라스미드는 FDH 폴리펩티드를 코딩하는 분자에 작동가능하게 연결되고 숙주 유기체에 의해 인식되는 프로모터를 포함한다. 프로모터는 구조 유전자의 시작 코돈의 상류 (즉, 5')에 위치한 미번역 서열 (일반적으로 약 100 내지 1000 bp 이내)로서 구조 유전자의 전사를 제어한다. 프로모터는 통상적으로 유도성 프로모터 및 구성적 프로모터의 두 가지 부류 중 하나로 분류된다. 유도성 프로모터는 영양소 또는 온도 변화의 존재 또는 부재와 같은 배양 조건의 몇몇 변화에 응답하여 그의 제어 하에서 DNA로부터 증가된 수준의 전사를 개시한다. 다양한 잠재적인 숙주 세포에 의해 인식되는 다수의 프로모터가 공지되어 있다. 이들 프로모터는 제한 효소 절단에 의한 DNA원으로부터의 프로모터의 제거 및 요망되는 프로모터 서열의 플라스미드 내로의 삽입에 의해 FDH 폴리펩티드를 코딩하는 DNA에 작동가능하게 연결된다. 천연 FDH 프로모터 서열을

사용하여 FDH 및 PDHmod DNA의 증폭 및/또는 발현을 추진할 수 있다. 비상동성 프로모터가 천연 프로모터와 비교하여 발현 단백질의 더욱 많은 전사 및 더욱 큰 수율을 가능케 할 경우, 그리고 이것이 사용을 위하여 선택된 숙주 세포 시스템과 양립가능할 경우 비상동성 프로모터가 특정 실시양태에서 사용될 수 있다.

[0094] 원핵 숙주에서 사용하기에 적합한 프로모터는 베타-락타마제 (문헌[Villa- Kamaroff et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 75:3727-31 (1978)]) 및 락토스 프로모터 시스템; 알칼리 포스파타제, 트립토판 (trp) 프로모터 시스템; 및 하이브리드 프로모터, 예컨대 tac 프로모터 (문헌[DeBoer et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 80:21-25 (1983)])를 포함한다. 다른 공지된 세균 프로모터가 또한 적합하다. 그들의 서열은 공개되었으며, 당업계에 공지되어 있다. 이들 서열은 임의의 필요한 제한 부위의 공급에 필요할 때 링커 또는 어댑터를 사용하여 요망되는 DNA 서열에 라이게이션될 수 있다.

[0095] 세균 숙주와 양립가능한 몇몇 플라스미드가 다양한 실시양태에서 사용될 수 있다. 그러한 플라스미드는 특히 pCRII, pCR3, 및 pcDNA3.1 (인비트로젠 (Invitrogen), 미국 캘리포니아주 샌디에고), pBSII (스트라타젠 (Stratagene), 미국 캘리포니아주 라 줄라 소재), pET15 (노바젠 (Novagen), 미국 위스콘신주 매디슨), pGEX (파마시아 바이오테크 (Pharmacia Biotech), 미국 뉴저지주 피스카타웨이)를 포함한다. 재조합 분자는 형질전환, 형질감염, 감염, 전기천공 또는 기타 공지된 기술을 통하여 숙주 세포 내로 도입될 수 있다.

[0096] 폴리펩티드 제조

[0097] 다양한 실시양태에서 사용되는 FDH (서열 4) 및 PDHmod (서열 5) 효소는 NAD-의존성 산화 반응을 촉매하는 옥시리덕타제 효소이다.

[0098] 일 측면에서, 본 발명은 서열 4 및 서열 5의 폴리펩티드를 제조하는 방법을 제공하며, 이는 상기 폴리펩티드들을 발현시키기 위해 적합한 조건 하에 본원에 기술된 플라스미드를 포함하는 숙주 세포를 배양하는 단계를 포함한다.

[0099] 일 실시양태에서, 본 발명은 페닐알라닌 데히드로게나제 (PDH) 및 포르메이트 데히드로게나제 (FDH)의 부분 정제된 효소 농축물을 제조하는 방법을 제공하며, 여기서, 본 방법은 본원에 기술된 핵산 분자 또는 플라스미드를 포함하는 세포를 함유하는 발효 브로쓰를 제조하는 단계; 상기 발효 브로쓰의 온도를 약 4°C 내지 30°C로 유지하면서 발효 브로쓰를 미세유동화하여 PDH 및 FDH를 함유하는 미세유동 발효 브로쓰를 형성하는 단계; 발효 브로쓰를 응집제로 처리하여 세포 잔해를 응결시키고 DNA 및 원하지 않는 단백질을 제거함으로써 미세유동 발효 브로쓰를 청정시킴으로써 청정 브로쓰를 형성하는 단계; 청정 브로쓰를 여과하여 여과물을 생성하는 단계; 및 임의로, 여과물을 농축시켜 상기 부분 정제 효소 농축물을 생성하는 단계를 포함하고, 상기 농축물은 약 400 IU/ml 내지 약 1000 IU/ml의 PDH 활성 및 약 20 IU/ml 내지 약 200 IU/ml의 FDH 활성을 포함한다. 실시양태들에서, 효소 농축물은 케토-함유 화합물을 키랄 아민-함유 화합물로 환원에 의해 아미노화할 수 있으며, 여기서, 상기 키랄 아민-함유 화합물은, 효소 농축물로부터의 단리 없이 BOC-보호될 수 있다. 실시양태들에서, 청정 단계는 미세유동 브로쓰를 구조도와 접촉시키는 것을 임의로 포함할 수 있고, 여과 단계는 상기 구조도를 필터 프레스 (filter press)로 여과하는 것을 포함한다.

[0100] 실시양태들에서, 세포는 서열 1과 95% 동일한 서열을 포함하는 핵산 분자를 포함한다. 실시양태들에서, 세포는 서열 1을 포함하는 핵산 분자를 포함한다. 실시양태들에서, 세포는 서열 4의 폴리펩티드 및 서열 5의 폴리펩티드를 코딩하는 서열을 갖는 핵산 분자를 포함한다. 실시양태들에서, 세포는 50% 포름아미드, 5X SSC (0.75 M NaCl, 0.075 M 시트르산나트륨), 50 mM 인산나트륨 (pH 6.8), 0.1% 피로인산나트륨, 0.1% SDS 및 10% 텍스트란 술페이트를 포함하는 혼성화 완충액에서 42°C에서, 그리고 그 후 0.2X SSC 및 0.1% SDS를 포함하는 혼성화 세척 완충액에서 42°C에서 서열 1의 뉴클레오티드 서열의 상보체에 혼성화하는 서열을 포함하는 핵산 분자를 포함한다. 실시양태들에서, 세포는 서열 2를 포함하는 핵산 분자를 포함한다.

[0101] 본 방법은 예를 들어 대략 약 12,000로부터 약 20,000 psi까지의 범위의 압력과 같이, 발효 브로쓰의 미세유동을 위한 임의의 유효한 범위의 압력을 포함할 수 있다. 본 방법은 세포의 전체적인 건강 및/또는 PDH 및 FDH 효소의 활성의 유지에 효과적인 임의의 온도를 포함할 수 있다. 온도 범위가 당업계의 숙련자에 의해 결정될 수 있지만, 온도의 비제한적 예는 약 4°C 내지 25°C 또는 약 8°C 내지 25°C를 포함한다. 본 방법에 사용되는 세포는 안정하게 본원에 기술된 핵산 분자 및/또는 플라스미드를 보유하고 적절한 조건 하에서 PDH 및 FDH를 발현할 수 있는 임의의 세포일 수 있다. 실시양태들에서, 세포는 에스케리키아 콜라이 (*Escherichia coli*) JM110이다.

[0102] 본 방법은 예를 들어 한외여과 막 또는 카세트를 이용한 한외여과와 같이 당업계에 공지된 임의의 효과적인 여

과 방법을 포함할 수 있다. 이와 유사하게, 본 방법은 (예를 들어 세포 잔해의 응결에 의해) DNA 및 원하지 않는 단백질을 제거하기에 효과적인 응집제 및/또는 탈색제를 포함할 수 있는 임의의 청정 공정 단계를 포함할 수 있다.

[0103] "단리된 폴리펩티드"라는 용어는 (1) 세포원으로부터 단리될 경우 자연적으로 함께 발견되는 폴리뉴클레오티드, 지질, 탄수화물 또는 기타 물질 약 50% 이상으로부터 분리되었거나, (2) "단리된 폴리펩티드"가 자연에서는 연결된 폴리펩티드의 전부 또는 일부분에 (공유적 상호작용 또는 비공유적 상호작용에 의해) 연결되어 있지 않거나, (3) 자연에서는 연결되어 있지 않는 폴리펩티드에 (공유적 또는 비공유적 상호작용에 의해) 작동가능하게 연결되어 있거나, (4) 자연에서는 나타나지 않는 폴리펩티드를 나타낸다. 바람직하게는, 단리된 폴리펩티드에는 그의 치료, 진단, 예방 또는 연구 용도를 간섭하는, 그의 자연적인 환경에서 발견되는 임의의 기타 오염 폴리펩티드 또는 기타 오염물질이 실질적으로 없다.

[0104] 숙주 세포에 의해 생성되는 PDHmod 및 FDH 폴리펩티드의 양은 당업계에서 공지된 표준 방법을 이용하여 평가될 수 있다. 그러한 방법은 한정됨이 없이 웨스턴 블롯 (Western blot) 분석법, SDS-폴리아크릴아미드 겔 전기영동법, 비-변성 겔 전기영동법, HPLC 분리법, 면역침전법 및/또는 활성 분석법, 예컨대 DNA 결합 겔 이동 분석법을 포함한다.

[0105] PDHmod 및 FDH 폴리펩티드는 다양한 기술을 이용하여 용액으로부터 정제될 수 있다. 폴리펩티드가 합성되어서 이것이 태그, 예컨대 핵사히스티딘 또는 기타 작은 펩티드, 예컨대 FLAG (이스트맨 코닥 컴퍼니 (Eastman Kodak Co.)), 미국 코네티컷주 뉴 하벤) 또는 myc (인비트로젠)를 그의 카르복실 또는 아미노 말단 중 어느 하나에서 포함할 경우, 본질적으로 이것은 컬럼 매트릭스가 태그에 대하여 높은 친화도를 갖거나 폴리펩티드에 대하여 직접적으로 높은 친화도를 갖는 (즉, PDHmod 또는 FDH 폴리펩티드를 특이적으로 인식하는 단클론 항체) 친화성 컬럼에 당해 용액을 통과시킴으로써 1단계 공정에서 정제될 수 있다. 예를 들어, 폴리히스티딘은 니켈에 큰 친화성 및 특이성으로 결합하며, 따라서 니켈의 친화성 컬럼 (예를 들어, 퀴아젠 (QIAGEN)<sup>®</sup> 니켈 컬럼)이 FDH 또는 PDHmod 폴리펩티드/폴리His의 정제에 사용될 수 있다. 예를 들어, 문헌[Current Protocols in Molecular Biology § 10.11.8 (Ausubel et al., eds., John Wiley & Sons 1993)]을 참조한다.

[0106] FDH 또는 PDH 폴리펩티드가 태그 부착 없이 제조되고 항체가 이용가능하지 않을 경우, 다른 공지된 정제 절차가 이용될 수 있다. 그러한 절차는 한정됨이 없이 이온 교환 크로마토그래피, 분자체 크로마토그래피, 황산암모늄 침전에 의한 분획화, HPLC, 겔 용출과 조합된 천연 겔 전기영동, 및 예비 등전 집중 ("이소프라이미 (Isoprime)") 기계/기술, 호퍼 사이언티픽 (Hofer Scientific))을 포함한다. 몇몇 경우, 이들 기술 중 2가지 이상을 조합하여 순도 증가를 달성할 수 있다.

[0107] 몇몇 경우, FDH 또는 PDHmod 폴리펩티드는 단리시에 생물학적 활성을 갖지 않을 수도 있다. 당해 폴리펩티드를 그의 3차 구조로 "재폴딩"하거나 전환시키고 디설피드 결합을 생성하는 다양한 방법을 이용하여 생물학적 활성을 복구할 수 있다. 그러한 방법은 가용화 폴리펩티드를 특정 농도의 카오트로프 (chaotrope)의 존재 하에 일반적으로 7 초과의 pH에 노출시키는 것을 포함한다. 카오트로프의 선택은 붕입체 가용화에 사용되는 선택과 매우 유사하지만, 일반적으로 카오트로프는 더욱 낮은 농도로 사용되며, 상기 가용화에 사용되는 카오트로프와 반드시 동일할 필요는 없다. 대부분의 경우, 재폴딩/산화 용액은 또한 산화제 또는 산화제 + 그의 산화된 형태를 특정 비로 포함하여 특정 산화환원 전위를 생성하여서 단백질의 시스테인 가교체의 형성에서 디설피드 셔플링 (shuffling)이 일어나게 한다. 보통 사용되는 산화환원쌍 중 몇몇은 시스테인/시스테인, 글루타티온 (GSH)/디티오비스 GSH, 염화제2구리, 디티오프레이탈 (DTT)/디티안 DTT, 및 2-메르캅토에탄올 (bME)/디티오-b(ME)를 포함한다. 다수의 경우에, 재폴딩의 효율의 증가를 위하여 공용매가 사용될 수 있거나, 필요할 수 있으며, 이 목적에 사용되는 더욱 일반적인 시약은 글리세롤, 다양한 분자량의 폴리에틸렌 글리콜, 아르기닌 등을 포함한다.

[0108] FDH 또는 PDHmod 폴리펩티드의 발현시에 붕입체가 상당한 정도로 형성되지 않을 경우, 상기 폴리펩티드들은 세포 균질화물의 원심분리 후 상청액에서 주로 발견되며, 이는 하기에 개시된 것과 같은 방법을 이용하여 상청액으로부터 추가로 단리될 수 있다.

[0109] FDH 또는 PDHmod 폴리펩티드를 부분 정제 또는 완전 정제하여 이것에 부분적으로 또는 실질적으로 오염물질이 없도록 하는 것이 바람직한 상황에서, 당업계의 숙련자에게 공지된 표준 방법이 사용될 수 있다. 그러한 방법은, 한정됨이 없이 전기영동, 이어서 전기용출에 의한 분리, 다양한 유형의 크로마토그래피 (친화성, 면역친화성, 분자체 및/또는 이온 교환), 및 황산암모늄 침전에 의한 분획화 및/또는 고압 액체 크로마토그래피를 포함한다. 몇몇 경우에, 완전한 정제를 위하여 이들 방법 중 하나 초과를 이용하는 것이 바람직할 수 있다.

- [0110] "유사성"이라는 용어는 동일성에 관련된 개념이지만, "동일성"과는 대조적으로 "유사성"은 동일한 매치 및 보존적 치환 매치 둘 모두를 포함하는 연관성의 척도를 나타낸다. 두 폴리펩티드 서열이 예를 들어 20개 중 10개의 동일한 아미노산을 가지며, 나머지는 모두 비-보존적 치환체라면, 동일성 및 유사성 퍼센트는 둘 모두 50%이다. 동일한 예에서, 보존적 치환체가 있는 위치가 5개 더 있다면, 동일성 퍼센트는 여전히 50%인 채 있지만 유사성 퍼센트는 75%이다 (15/20). 따라서, 보존적 치환이 있을 경우, 두 폴리펩티드 사이의 유사성 퍼센트는 그 두 폴리펩티드 사이의 동일성 퍼센트보다 더 크다.
- [0111] 핵산 서열의 차이는 서열 4 또는 서열 5 중 어느 하나의 아미노산 서열과 관련하여 아미노산 서열의 보존적 및/또는 비-보존적 변형을 초래할 수 있다.
- [0112] 서열 4 또는 서열 5 (및 코딩 뉴클레오티드들에 대한 상응하는 변경)의 아미노산 서열에 대한 보존적 변경은 FDH 또는 PDHmod 폴리펩티드의 것과 유사한 기능적 특징 및 화학적 특징을 갖는 폴리펩티드를 생성한다. 이와는 대조적으로, FDH 또는 PDHmod 폴리펩티드의 기능적 및/또는 화학적 특징의 상당한 변경은 (a) 치환 영역 내의 분자 골격의 구조를 예를 들어 시트형 또는 나선형 형태로 유지하거나, (b) 표적 부위에서의 분자의 전하 또는 소수성을 유지하거나, (c) 측쇄의 벌크를 유지하는 것에 대한 영향이 유의하게 상이한, 서열 4 또는 서열 5의 아미노산 서열에서의 치환체를 선택함으로써 성취될 수 있다.
- [0113] 예를 들어, "보존적 아미노산 치환"은 그 위치에서 아미노산 잔기의 극성 또는 전하에 영향을 거의 미치지 않거나 전혀 미치지 않도록 천연 아미노산 잔기를 비천연 잔기로 치환하는 것을 포함할 수 있다. 더욱이, 폴리펩티드 내의 임의의 천연 잔기는 또한 알라닌으로 치환될 수 있으며, 이는 이전에 "알라닌 스캐닝 돌연변이 유발"에 대하여 기술된 바와 같다.
- [0114] 보존적 아미노산 치환은 또한 생물학적 시스템에서의 합성에 의한 것이라기보다는 오히려 화학적 펩티드 합성에 의해 전형적으로 혼입된 비천연 아미노산 잔기를 포함한다. 이들은 펩티드 모방체, 및 다른 반대로 된 형태의 또는 역위 형태의 아미노산 모이어티를 포함한다.
- [0115] 천연 잔기는 공통적인 측쇄 특성을 기초로 하여 하기 부류로 나눌 수 있다:
- [0116] 1) 소수성: 노르류신, Met, Ala, Val, Leu, He;
- [0117] 2) 중성 친수성: Cys, Ser, Thr;
- [0118] 3) 산성: Asp, Glu;
- [0119] 4) 염기성: Asn, Gln, His, Lys, Arg;
- [0120] 5) 사슬 배향에 영향을 주는 잔기: Gly, Pro; 및
- [0121] 6) 방향족: Trp, Tyr, Phe.
- [0122] 예를 들어, 비-보존적 치환은 이들 부류들 중 하나의 구성원을 또 다른 부류로부터의 구성원으로 교환하는 것을 포함할 수 있다.
- [0123] 그러한 변화를 만드는 데 있어서, 아미노산의 히드로패틱 인덱스 (hydropathic index)가 고려될 수 있다. 각각의 아미노산은 그의 소수성 및 전하 특징에 기초하여 히드로패틱 인덱스가 할당되었다. 히드로패틱 인덱스는 이소류신 (+4.5); 발린 (+4.2); 류신 (+3.8); 페닐알라닌 (+2.8); 시스테인/시스틴 (+2.5); 메티오닌 (+1.9); 알라닌 (+1.8); 글리신 (-0.4); 트레오닌 (-0.7); 세린 (-0.8); 트립토판 (-0.9); 티로신 (-1.3); 프롤린 (-1.6); 히스티딘 (-3.2); 글루타메이트 (-3.5); 글루타민 (-3.5); 아스파테이트 (-3.5); 아스파라긴 (-3.5); 리신 (-3.9); 및 아르기닌 (-4.5)이다.
- [0124] 상호작용적 생물학적 기능을 단백질에 부여하는 데 있어서의 아미노산 히드로패틱 인덱스의 중요성은 일반적으로 당업계에서 이해된다 (문헌[Kyte et al., 1982, J. Mol. Biol. 157:105-31]). 특정 아미노산이 유사한 히드로패틱 인덱스 또는 점수를 갖는 다른 아미노산으로 치환되고 유사한 생물학적 활성을 여전히 보유할 수 있음이 공지되어 있다. 히드로패틱 인덱스에 기초하여 변화를 만드는 데 있어서, 특정 실시양태에서 아미노산의 치환체는 히드로패틱 인덱스가  $\pm 2$  이내,  $\pm 1$  이내 및  $\pm 0.5$  이내인 것이다.
- [0125] 유사한 아미노산들의 치환은, 특히 생물학적으로 기능적으로 등가인 그에 의해 생성된 단백질 또는 펩티드가 본 발명의 경우에서와 같이 면역학적 실시양태에서 사용하고자 하는 것일 경우, 친수성을 기초로 하여 효과적으로 행해질 수 있음이 당업계에서 또한 이해된다. 소정 단백질의 최대의 국소적 평균 친수성은, 그의 인접 아미노

산의 친수성에 의해 좌우되는 바와 같이, 그의 면역원성 및 항원성, 즉, 그 단백질의 생물학적 특성과 연관된다.

[0126] 하기 친수성 값을 이들 아미노산 잔기에 할당하였다: 아르기닌 (+3.0); 리신 (+3.0); 아스파테이트 (+3.0 ± 1); 글루타메이트 (+3.0 ± 1); 세린 (+0.3); 아스파라긴 (+0.2); 글루타민 (+0.2); 글리신 (0); 트레오닌 (-0.4); 프롤린 (-0.5 ± 1); 알라닌 (-0.5); 히스티딘 (-0.5); 시스테인 (-1.0); 메티오닌 (-1.3); 발린 (-1.5); 류신 (-1.8); 이소류신 (-1.8); 티로신 (-2.3); 페닐알라닌 (-2.5); 및 트립토판 (-3.4). 유사한 친수성 값을 기초로 하여 변화를 만드는 데 있어서, 특정 실시양태에서 아미노산의 치환체는 친수성 값이 ±2 이내, ±1 이내 및 ±0.5 이내인 것이다.

[0127] 친수성에 기초하여 1차 아미노산 서열로부터 에피토프를 또한 확인할 수 있다. 이들 영역은 "에피토프 코어 영역"으로도 칭해진다.

[0128] 요망되는 아미노산 치환 (보존적이든지 비-보존적이든지 간에)은 그러한 치환이 요망되는 시점에 당업계의 숙련자에 의해 결정될 수 있다. 예를 들어, 본원에 기술된 FDH 또는 PDHmod 폴리펩티드의 중요한 잔기들을 확인하기 위하여 아미노산 치환을 이용할 수 있다. 예시적인 아미노산 치환체가 표 I에 개시되어 있다.

[0129] [표 I]

아미노산 치환	
원래 잔기	예시적인 치환
Ala	Val, Leu, Ile
Arg	Lys, Gln, Asn
Asn	Gln
Asp	Glu
Cys	Ser, Ala
Gln	Asn
Glu	Asp
Gly	Pro, Ala
His	Asn, Gln, Lys, Arg
Ile	Leu, Val, Met, Ala, Phe, 노르류신
Leu	노르류신, Ile, Val, Met, Ala, Phe
Lys	Arg, 1,4 디아미노-부티르산, Gln, Asn
Met	Leu, Phe, Ile
Phe	Leu, Val, Ile, Ala, Tyr
Pro	Ala
Ser	Thr, Ala, Cys
Thr	Ser
Trp	Tyr, Phe
Tyr	Trp, Phe, Thr, Ser
Val	Ile, Met, Leu, Phe, Ala, 노르류신

[0130]

[0131] 당업자라면 공지된 기술을 이용하여 서열 4 또는 서열 5 중 어느 하나에 개시된 폴리펩티드의 적합한 변이체를 결정할 수 있다. 생물학적 활성을 파괴하지 않고서 변화시킬 수 있는 분자의 적합한 영역을 확인하기 위하여, 당업계의 숙련자는 활성에 중요하지 않을 것으로 여겨지는 영역을 표적화할 수 있다. 예를 들어, 동일한 종 또는 다른 종 유래의, 유사한 활성을 갖는 유사한 폴리펩티드들이 공지되어 있을 경우, 당업계의 숙련자는 FDH 또는 PDHmod 폴리펩티드의 아미노산 서열을 그러한 유사 폴리펩티드와 비교할 수 있다. 그러한 비교에 의해, 유사 폴리펩티드들 사이에서 보존된 분자의 잔기 및 부분을 확인할 수 있다. 그러한 유사 펩티드에 비하여 보존되지 않은 FDH 또는 PDHmod 분자의 영역에서의 변화는 FDH 또는 PDHmod 폴리펩티드의 생물학적 활성 및/또는 구조에 악영향을 미칠 가능성이 덜함인 인정된다. 당업계의 숙련자라면, 심지어 비교적 보존된 영역에서도 활성을 보유하면서 천연 잔기를 화학적 유사 아미노산으로 치환할 수 있음을 또한 안다 (보존적 아미노산 잔기 치환). 따라서, 심지어 생물학적 활성 또는 구조에 중요할 수 있는 영역도 생물학적 활성을 파괴하지 않고서 또는 폴리펩티드 구조에 악영향을 미치지 않고서 보존적 아미노산 치환에 처해질 수 있다.

- [0132] 추가로, 당업계의 숙련자라면 활성 또는 구조에 중요한 유사 폴리펩티드들 내의 잔기를 확인하는 구조-기능 연구를 리뷰할 수 있다. 그러한 비교를 고려하면, 유사 폴리펩티드들에서 활성 또는 구조에 중요한 아미노산 잔기에 상응하는 FDH 또는 PDHmod 폴리펩티드 내의 아미노산 잔기의 중요성을 예측할 수 있다. 당업계의 숙련자라면 FDH 또는 PDHmod 폴리펩티드의 그러한 예측된 중요한 아미노산 잔기에 대한 화학적 유사 아미노산 치환 쪽을 택할 수 있다.
- [0133] 또한 당업계의 숙련자는 유사 폴리펩티드들에서의 구조와 관련하여 3차원 구조 및 아미노산 서열을 분석할 수 있다. 그러한 정보를 고려하면, 당업계의 숙련자는 FDH 또는 PDHmod 폴리펩티드의 아미노산 잔기들의 정렬을 그의 3차원 구조와 관련하여 예측할 수 있다. 당업계의 숙련자는 단백질의 표면 상에 있을 것으로 예측되는 아미노산 잔기를 근본적으로 변화시키지 않도록 선택할 수 있으며, 그 이유는 그러한 잔기가 다른 분자와의 중요한 상호작용에 연루될 수 있기 때문이다. 게다가, 당업계의 숙련자는 각각의 아미노산 잔기에서 단일한 아미노산 치환을 포함하는 시험 변이체를 생성할 수 있다. 변이체는 당업계의 숙련자에게 공지된 활성 분석법을 이용하여 스크리닝될 수 있다. 그러한 변이체를 이용하여 적합한 변이체에 관한 정보를 모을 수 있다. 예를 들어, 특정 아미노산 잔기에 대한 변화에 의해 활성이 파괴되거나, 바람직하지 못하게 감소되거나 부적당해지게 됨을 발견할 경우, 그러한 변화를 갖는 변이체는 회피된다. 환언하면, 그러한 일상적인 실험으로부터 모아진 정보에 기초하여 당업자는 단독의 또는 다른 돌연변이와 조합된 추가의 치환이 회피되어야 하는 경우 아미노산을 쉽게 결정할 수 있다.
- [0134] 다수의 과학 간행물이 2차 구조의 예측에 제공되었다. 문헌[Moult, 1996, *Curr. Opin. Biotechnol.* 7:422-27]; [Chou et al., 1974, *Biochemistry* 13:222-45]; [Chou et al., 1974, *Biochemistry* 113:211-22]; [Chou et al., 1978, *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.* 47:45-48]; [Chou et al., 1978, *Ann. Rev. Biochem.* 47:251-276]; 및 [Chou et al., 1979, *Biophys. J.* 26:367-84]을 참조한다. 게다가, 2차 구조의 예측을 돕기 위하여 컴퓨터 프로그램이 현재 이용가능하다. 2차 구조를 예측하는 한 가지 방법은 상동성 모델링에 기초한다. 예를 들어, 서열 동일성이 30% 초과이거나 유사성이 40% 초과인 두 폴리펩티드 또는 단백질은 흔히 유사한 구조적 토폴로지 (topology)를 갖는다. 단백질 구조 데이터베이스 (protein structural database, PDB)의 최근의 성장은 2차 구조의 예측가능성 증가를 제공하였는데, 이는 폴리펩티드 또는 단백질의 구조 내의 폴드의 잠재적인 수를 포함한다. 문헌[Holm et al., 1999, *Nucleic Acids Res.* 27:244-47]을 참조한다. 주어진 폴리펩티드 및 단백질 내의 폴드의 수가 한정되어 있고, 일단 결정적인 수의 구조가 해상되었으면 구조 예측은 극적으로 더욱 정확해짐이 제안되었다 (문헌[Brenner et al., 1997, *Curr. Opin. Struct. Biol.* 7:369-76]).
- [0135] 2차 구조를 예측하는 추가의 방법은 "스레딩 (threading)" (문헌[Jones, 1997, *Curr. Opin. Struct. Biol.* 7:377-87]; [Sippl et al., 1996, *Structure* 4:15-19]), "프로필 분석법" (문헌[Bowie et al., 1991, *Science*, 253:164-70]; [Gribskov et al., 1990, *Methods Enzymol.* 183:146-59]; [Gribskov et al., 1987, *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* 84:4355-58]), 및 "진화적 연관" (홀름 (Holm) 등의 상기 문헌 및 브레너 (Brenner) 등의 상기 문헌 참조)을 포함한다.
- [0136] 관련 핵산 분자 및 폴리펩티드의 동일성 및 유사성은 공지된 방법에 의해 쉽게 계산된다. 그러한 방법은 문헌 [Computational Molecular Biology (A.M. Lesk, ed., Oxford University Press 1988)]; [Biocomputing: Informatics and Genome Projects (D.W. Smith, ed., Academic Press 1993)]; [Computer Analysis of Sequence Data (Part 1, A.M. Griffin and H. G. Griffin, eds., Humana Press 1994)]; [G. von Heijne, *Sequence Analysis in Molecular Biology* (Academic Press 1987)]; [Sequence Analysis Primer (M. Gribskov and J. Devereux, eds., M. Stockton Press 1991)]; 및 [Carillo et al., 1988, *SIAM J. Applied Math.*, 48:1073]에 기술된 것을 포함하지만, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0137] 동일성 및/또는 유사성을 결정하는 특정한 방법은 검사할 서열들 사이의 최대 매치를 제공하도록 고안된다. 동일성 및 유사성을 결정하는 방법은 공식적으로 이용가능한 컴퓨터 프로그램에서 설명된다. 두 서열들 사이의 동일성 및 유사성을 결정하는 특정한 컴퓨터 프로그램에 의한 방법은 BLASTP, BLASTN, FASTA (문헌[Altschul et al., 1990, *J. Mol. Biol.* 215:403-10]) 및 GAP (문헌[Devereux et al., 1984, *Nucleic Acids Res.* 12:387]; 제네틱스 컴퓨터 그룹 (Genetics Computer Group), 미국 위스콘신주 매디슨 유니버시티 오브 위스콘신 (University of Wisconsin))를 포함하는 GCG 프로그램 패키지를 포함하지만, 이에 한정되는 것은 아니다. BLASTX 프로그램은 NCBI (National Center for Biotechnology Information) 및 기타 공급처 (문헌[Altschul et al., *BLAST Manual*] (NCB NLM NIH, 미국 매릴랜드주 베데스다); 상기 문헌[Altschul et al., 1990])로부터 공식적으로 입수가 가능하다. 공지된 스미스 워터맨 (Smith Waterman) 알고리즘이 동일성 결정에 또한 사용될 수 있

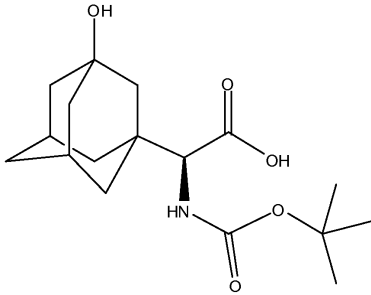
다.

- [0138] 두 아미노산 서열을 정렬하는 특정한 정렬 방법에 의해 상기 두 서열의 단지 짧은 영역의 매칭이 생성될 수 있으며, 이 작은 정렬 영역은 상기 두 전장 서열 사이에 유의한 관계가 없음에도 불구하고 서열 동일성이 매우 높을 수 있다. 따라서, 일 실시양태에서, 선택된 정렬 방법 (GAP 프로그램)은 특허청구된 폴리펩티드의 50개 이상의 인접 아미노산에 걸쳐 있는 정렬을 생성한다.
- [0139] 예를 들어, 컴퓨터 알고리즘 GAP (제네틱스 컴퓨터 그룹, 미국 위스콘신주 매디슨 유니버시티 오브 위스콘신)를 사용하여, 서열 동일성 %를 결정할 두 폴리펩티드를 이들의 각각의 아미노산의 최적 매치를 위하여 정렬한다 (알고리즘에 의해 결정되는 "매칭 스펜"). 갭 개방 페널티 (이는 3X 평균 다이아고날 (diagonal)로 계산됨; "평균 다이아고날"은 사용되는 비교 매트릭스의 다이아고날의 평균이며, "다이아고날"은 특정 비교 매트릭스에 의한 각각의 완벽한 아미노산 매치에 할당된 점수 또는 수임) 및 갭 연장 페널티 (이는 일반적으로 0.1X 갭 개방 페널티임)뿐만 아니라 비교 매트릭스, 예컨대 PAM 250 또는 BLOSUM 62가 상기 알고리즘과 함께 이용된다. 표준 비교 매트릭스가 상기 알고리즘에 의해 또한 이용된다 (문헌[Dayhoff et al., 5 Atlas of Protein Sequence and Structure (Supp. 3 1978)](PAM250 비교 매트릭스); [Henikoff et al., 1992, Proc. Natl. Acad. Sci USA 89:10915-19] (BLOSUM 62 비교 매트릭스) 참조).
- [0140] 폴리펩티드 서열 비교에 사용될 수 있는 파라미터는 하기를 포함한다:
- [0141] 알고리즘: 문헌[Needleman and Wunsch, 1970, J. Mol. Biol 48:443-53];
- [0142] 비교 매트릭스: BLOSUM 62 (헤니코프 (Henikoff) 등의 상기 문헌);
- [0143] 갭 페널티: 12
- [0144] 갭 길이 페널티: 4
- [0145] 유사성의 역치: 0
- [0146] GAP 프로그램이 상기 파라미터에서 유용하다. 전술한 파라미터는 GAP 알고리즘을 이용한 폴리펩티드 비교 (말단 갭에 대해서는 페널티가 없는 것과 함께)를 위한 디폴트 파라미터이다.
- [0147] 핵산 분자 서열 비교에 사용될 수 있는 파라미터는 하기를 포함한다:
- [0148] 알고리즘: 니들맨 (Needleman) 및 분쉬 (Wunsch)의 상기 문헌;
- [0149] 비교 매트릭스: 매치 = +10, 미스매치 = 0
- [0150] 갭 페널티: 50
- [0151] 갭 길이 페널티: 3
- [0152] GAP 프로그램은 상기 파라미터에서 또한 유용하다. 전술한 파라미터는 핵산 분자 비교를 위한 디폴트 파라미터이다. 다른 예시적인 알고리즘, 갭 개방 페널티, 갭 연장 페널티, 비교 매트릭스 및 유사성 역치가 사용될 수 있으며, 이는 문헌[Program Manual, Wisconsin Package, Version 9, September, 1997]에 개시된 것을 포함한다. 행해야 할 특정 선택은 당업계의 숙련자에게 자명하며, 행해야 할 특정 비교, 예컨대 DNA-DNA, 단백질-단백질, 단백질-DNA에 따라, 그리고 추가로 비교가 주어진 쌍의 서열들 사이에서인지 (이 경우 GAP 또는 BestFit이 사용될 수 있음), 또는 하나의 서열과 서열들의 큰 데이터베이스 사이인지 (이 경우 FASTA 또는 BLAST가 사용될 수 있음)에 따라 달라진다.
- [0153] 일 측면에서, 본 발명은 삭사글립틴의 전구체를 제조하는 방법에 관한 것이며, 이는 FDH 및 PDHmod를 발현시키기기에 적합한 조건 하에서 본원에 기술된 핵산 분자 및/또는 플라스미드 (예를 들어, 바이시스트로닉 플라스미드)를 포함하는 숙주 세포를 배양하는 단계; 상기 폴리펩티드들을 배양물로부터 단리하는 단계; 및 단리된 폴리펩티드들을 환원적 아미노화 반응에 사용하는 단계를 포함한다.
- [0154] 본원에 개시된 플라스미드는 9회의 연속적인 세대배양 (대략 60-70세대) 후 여전히 유전적으로 안정한 채로 있으며, 이는 냉동된 세포 은행 바이알로부터의 생산 발효 마지막 (대략 15-20세대)까지의 것보다 더욱 광범위하다.
- [0155] 일 측면에서, 본 발명은 (αS)-α-[[[(1,1-디메틸에톡시)카르복실]-아미노]-3-히드록시트리시클로[3.3.1.1<sup>3,7</sup>]데칸-1-아세트산의 제조 방법을 제공하며, 이는 본 폴리펩티드들을 발현시키기기에 적합한 조건 하에서 본원에 기술

된 숙주 세포를 배양하는 단계; 폴리펩티드들을 포함하는 배양 단리물을 단리하는 단계; 및 배양 단리물을 ( $\alpha$ S)- $\alpha$ -[[1,1-디메틸에톡시]카르복실]-아미노]-3-히드록시트리시클로[3.3.1.1<sup>3,7</sup>]데칸-1-아세트산을 생성시키는 조건 하에서 소정량의 3-히드록시- $\alpha$ -옥소트리시클로[3.3.1.1<sup>3,7</sup>]데칸-1-아세트산 및 소정량의 디-tert-부틸 디카르보네이트와 접촉시키는 단계를 포함한다.

[0156] 일 실시양태에서, 본 방법은 하기 화학식 I:

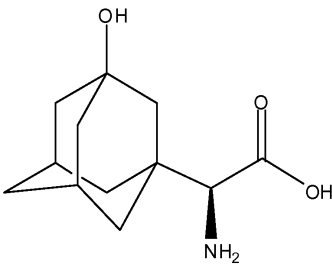
[0157] <화학식 I>



[0158]

[0159] 의 ( $\alpha$ S)- $\alpha$ -[[1,1-디메틸에톡시]카르복실]-아미노]-3-히드록시트리시클로[3.3.1.1<sup>3,7</sup>]데칸-1-아세트산을 제조하는 것을 포함하며, 이는 FDH 및 PDH 폴리펩티드를 발현시키기에 적합한 조건 하에 본원에 기술된 숙주 세포를 배양하는 단계; 상기 폴리펩티드들을 포함하는 배양 단리물을 단리하는 단계; 및 하기 화학식 III:

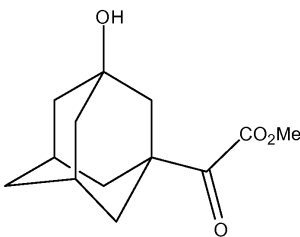
[0160] <화학식 III>



[0161]

[0162] 의 ( $\alpha$ S)- $\alpha$ -아미노-3-히드록시트리시클로[3.3.1.1<sup>3,7</sup>]데칸-1-아세트산을 생성시키는 조건 하에서 배양 단리물을 소정량의 하기 화학식 II:

[0163] <화학식 II>



[0164]

[0165] 의 3-히드록시- $\alpha$ -옥소트리시클로[3.3.1.1<sup>3,7</sup>]데칸-1-아세트산과 접촉시키는 단계; 및 ( $\alpha$ S)- $\alpha$ -[[1,1-디메틸에톡시]카르복실]-아미노]-3-히드록시트리시클로[3.3.1.1<sup>3,7</sup>]데칸-1-아세트산을 생성시키는 조건 하에서 ( $\alpha$ S)- $\alpha$ -아미노-3-히드록시트리시클로[3.3.1.1<sup>3,7</sup>]데칸-1-아세트산을 소정량의 디-tert-부틸 디카르보네이트와 접촉시키는 단계를 포함한다. 본원에 기술된 방법에서 사용될 수 있는 다양한 반응 조건이 다른 곳에 상술되어 있으며, 이는 일반적으로 당업계에 공지되어 있다. 미국 특허 제7,420,079호를 참조한다. 하기 실시예는 본 발명의 특정 실시양태 및 그의 다양한 용도를 예시하는 것이다. 실시예는 설명 목적으로만 개시되며, 첨부된 특허 청구범위에 상술된 본 발명을 한정하는 것으로 취해져서는 안된다. 본원에 참조된 모든 특허 및 비-특허 문헌의 참고문헌은 그 전문이 참고로 포함된다.

- [0166] 실시예 1: 바이시스트로닉 FDH/PDHmod 플라스미드의 구축
- [0167] PDHmod 유전자 및 그의 상응하는 프로모터를 제거한 pBMS2000-PPFDH-PDHmod 플라스미드 내로 5' 리보솜 결합 서열을 갖는 PDHmod 유전자 (서열 3)를 포함하는 PCR 증폭 단편을 삽입함으로써 바이시스트로닉 FDH/PDHmod 플라스미드를 구축하였다. pBMS2000-PPFDH-PDHmod 플라스미드는 원래 미국 특허 제7,420,079호에 개시되었으며, 그의 전구체인 pBMS2000 플라스미드는 원래 미국 특허 제6,068,991호에 개시되었다. 이들 특허 둘 모두는 본원에 참고로 포함된다.
- [0168] pBMS2000-PPFDH-PDHmod 플라스미드를 BamHI 및 NotI 제한 효소로 절단하여 PDHmod 유전자 및 그의 프로모터를 제거하였다. 절단된 DNA를 아가로스 겔 상에서 분리하고, 5.5 Kb 단편을 퀴아젠<sup>®</sup> 겔 추출 절차를 이용하여 분리하였다.
- [0169] 정방향 프라이머, pdhmod1f (5'-AAGCGAGATCTGCGCACGACTG-3'; 서열 6)는 벡터의 BamHI 부위를 이용한 라이게이션을 위한 BglIII 부위 및 5' 리보솜 결합 부위를 갖는 PDHmod 서열을 증폭시키도록 고안하였다. 역방향 프라이머, pdhmod3r (5'-AATTAATTCGCGGCCCGCGGCTCG-3'; 서열 7)은, PCR 생성물의 BglIII/NotI 이중 절단물이 절단 벡터 내의 FDH 서열에 대하여 바로 3'에 삽입될 수 있는 단편을 생성하도록, 주형인 플라스미드 pBMS2000-PDHmod 내의 NotI 부위에 대하여 3'으로 고안하였다. 제조업자의 프로토콜에 따라 10 pmole의 각각의 정방향 및 역방향 프라이머, 벡터 주형, pBMS2000-PDHmod, 및 HF 폴리머라제 효소 (클론테크 (CLONTECH)<sup>®</sup>)를 이용하여 PCR 반응을 수행하였다. 반응은 9700 서모사이클러 (thermocycler) (어플라이드 바이오시스템즈 (APPLIED BIOSYSTEMS)<sup>®</sup>)에서 수행하였다. PCR 생성물을 퀴아젠<sup>®</sup> PCR 클린업 (clean-up) 컬럼을 이용하여 정제하고, 50  $\mu$ L의 TE에서 용출시켰다. PCR 생성물을 BglIII 및 NotI 제한 효소로 절단하고, 아가로스 겔 상에서 분리하고, 약 1.2 kb의 밴드를 잘라내고, 퀴아젠<sup>®</sup> 겔 추출 키트를 이용하여 정제하였다.
- [0170] PDHmod 유전자를 포함하는 BglIII/NotI 절단 PCR 단편을 T4 DNA 리가제를 사용하여 FDH 유전자 서열 및 프로모터를 포함하는 BamHI/NotI 절단 플라스미드에 라이게이션시켰다. 1  $\mu$ L의 라이게이션으로 MachI 적격 세포 (인비트로젠<sup>®</sup>)를 형질전환시키고, 30  $\mu$ g/mL의 카나마이신을 포함하는 루리아 브로쓰 (LB) 플레이트에 도말하였다. 플라스미드 미니프렙 (miniprep)을 수행하고, 기대되는 크기의 플라스미드를 아가로스 겔 분석에 의해 확인하였다.
- [0171] 염색제-테옥시 종결 화학 (dye-deoxy terminator chemistry) (어플라이드 바이오시스템즈<sup>®</sup>)을 이용하여 플라스미드 DNA의 서열을 결정하였다. 프라이머는 전체 삽입 PCR 단편 (BglIII/NotI 단편) 및 절단된 벡터 서열을 포함하는 연결부를 서열결정하도록 고안하였다. FDH 유전자의 종결서열과 PDHmod 서열의 시작서열 사이의 유전자간 서열은 기대된 바와 같았다. 바이시스트로닉 FDH/PDHmod 플라스미드로 이. 콜라이 발현 숙주 JM110을 형질전환시켰다.
- [0172] 실시예 2: 바이시스트로닉 FDH/PDHmod 플라스미드의 안정성의 확인
- [0173] 바이시스트로닉 플라스미드로 형질전환시킨 이. 콜라이 숙주 JM110의 하나의 냉동 바이알을 얼음 상에서 해동시키고, 30  $\mu$ g/mL의 카나마이신을 포함하는 20 mL의 LB 배지에 100  $\mu$ L를 접종하고, 30°C, 250 rpm에서 하룻밤 인큐베이션하였다. 배양물을 신선한 20 mL 부피의 LB + 30  $\mu$ g/mL 카나마이신으로 추가로 9회 옮기고, 30°C, 250 rpm에서 8-20시간 인큐베이션하였다. 플라스미드 DNA를 퀴아젠<sup>®</sup> 미디 (midi) 플라스미드 키트를 사용하여 최종 20 mL의 배양물로부터 분리하였다. 플라스미드를 EcoRI 제한 효소로 절단하고, 아가로스 겔 상에서 분석하였다 (도 3). 6 Kb 분자량 마커와 7 Kb 분자량 마커 사이의 단일 밴드가 관찰되었으며, 이는 온전한 선형화 플라스미드의 기대되는 크기였다. 다른 밴드는 겔 상에서 관찰되지 않았으며, 이는 플라스미드가 유전적으로 안정함을 나타내는 것이었다.
- [0174] 실시예 3: 바이시스트로닉 FDH/PDHmod 플라스미드를 포함하는 이. 콜라이 형질전환체의 발효
- [0175] pBMS2000-FDH/PDHmod로 이. 콜라이 JM110을 형질전환시키고, 플라스미드 DNA를 추출하고, 올바른 제한 효소 절단 패턴을 이용하여 확인하였다. JM110(pBMS2000-FDH/PDHmod)<sup>+</sup>를 BMS 배지 (0.5% 효모 추출물, 0.22% 글루코스, 0.7% 인산칼륨 (2염기성), 0.1% 시트르산 1수화물, 0.17% 황산암모늄, 0.003% 황산제1철 7수화물, 0.23% 황산마그네슘 7수화물 및 30  $\mu$ g/mL의 카나마이신 황산염)에서 발효시켰다. 4,000-L 발효기에 있어서, 접종물을 하기와 같이 준비하였다: 1 mL의 냉동 JM110(pBMS2000-FDH/PDHmod)<sup>+</sup>를 해동시키고, 30  $\mu$ g/ml의 카나

마이신을 포함하는 400 L BMS 배지를 포함하는 600-L 발효기에 첨가하였다. 발효기는 교반을 150 rpm (분당 회전수 (revolution per minute))으로 하고, 통기를 80 Lpm (분당 리터 (liter per minute))으로 하고, 헤드 압력을 7 psi로 하여 30°C에서 21시간 동안 작동시켰다. OD<sub>600</sub>이 대략 1.1에 도달하였을 때, 75 L의 배양물을 1,700 L BMS 배지를 함유하는 4,000-L 발효기로 옮겼다. 처음에 발효물은 교반 범위를 105-150 rpm으로 하고, 통기 범위를 1,000-2,000 Lpm으로 하고, 헤드 압력을 7 psi로 하여 30°C에서 성장시켰다. 온도 및 압력은 상기 실행 동안 여전히 일정하게 있었다. CO<sub>2</sub>가 오프가스 (offgas) 중에서 0.3% 초과일 때 영양소 공급 (10% 효모 추출물 및 20% 글루코스)을 시작하였다. OD<sub>600</sub>이 20-25에 도달하였을 때, 필터-살균한 1 M 이소프로필티오-β-D 갈락토포라노시드 (IPTG)를 30 μM의 최종 농도로 첨가함으로써 둘 모두의 유전자의 발현을 유도하고, 발효를 총 48시간 동안 계속하였다.

[0176] 실시예 4: 단리한 (부분 정제한) PDH/FDH 유전자 농축물을 사용한 (αS)-α-아미노-3-히드록시트리시클로 [3.3.1.1<sup>3,7</sup>] 데칸-1-아세트산을 통한 3-히드록시-α-옥소트리시클로-[3.3.1.1<sup>3,7</sup>] 데칸-1-아세트산로부터의 (αS)-α-[[[(1,1-디메틸에톡시)카르보닐]아미노]-3-히드록시트리시클로-[3.3.1.1<sup>3,7</sup>] 데칸-1-아세트산의 단축 제조

[0177] PDH/FDH 효소 농축물의 단리

[0178] 에스캐리키아 콜라이 JM110(pBMS2000-FDH/PDHmod)<sup>+</sup>의 발효 브로쓰 (30 L)를 4,000-L 발효로부터 수득하고 (실시에 3과 유사한 절차를 이용하여 제조), 브로쓰의 온도를 40°C 미만으로 유지하면서 미세유동기 (마이크로플루이딕스 (Microfluidics) 모델 M-110Y, 작동 압력: 12,000-20,000 psi)에 통과시켜 (1회 통과) 세포로부터 활성을 방출시켰다. 미세유동 브로쓰의 PDH/FDH 활성은 PDH의 경우 32 IU/mL이고 FDH의 경우 8 IU/mL이었다.

[0179] 전 브로쓰의 청징을 위하여, 4.5 kg의 셀라이트 (Celite)를 잘 교반시킨 브로쓰에 첨가하였다. 그 후 0.201 L의 30% 수성 폴리에틸렌이민을 첨가하고, 30분 동안 혼합하였다. 그 후 혼합물을 필터 프레스 (에르텔 알슘 (Ertel Alsup) 모델 8-ESSC-10)를 이용하여 여과시키고, 18 L의 여과물을 수득하였다. 필터 케이크를 12 L의 물로 세척하여 부피가 다시 30 L가 되게 하였다. 이 단계의 수율은 8 IU/mL의 활성의 FDH 및 31 IU/mL의 활성을 갖는 PDH의 97% 활성 회수율이었다.

[0180] 청징 브로쓰를 100,000 MWC 필터 카세트 (밀리포어 펠리콘 (Millipore Pellicon) 2 유닛, 폴리에테르술폰 저 단백질 결합성 카세트, 0.5 m<sup>2</sup>의 필터 면적)를 통하여 한외여과하였다. 펌프의 순환 속도는 400 mL/min이었다. 청징 여과물을 1.5 L로 농축시키고, 567 IU/mL의 PDH 역가 및 136 IU/mL의 FDH 역가를 갖는 효소 농축물을 생성하였다. 투과물을 분석하였으며, 활성은 발견되지 않았다. 농축물에서의 전체 효소 활성 회수율은 84%였다.

[0181] 환원적 아미노화

[0182] 3-히드록시-α-옥소트리시클로-[3.3.1.1<sup>3,7</sup>] 데칸-1-아세트산 (1.00 Kg; 4.46 mol), 이어서 물 (5 L)을 20-L 용기에 첨가하였다. 이 혼합물을 교반시키고, pH를 10 N NaOH로 대략 8로 조정하여 용액을 생성하였다. 다코 (Darco) KBB 카본 (100 g)을 첨가하고, 이 혼합물을 5분 동안 교반시키고, 그 후 5 μ 여과지를 이용하여 뷔흐너 (Buchner) 깔때기를 통하여 여과시켰다. 필터를 물 1 L로 2회 세척하고, 여과물 및 세척물을 합하여 투명한 용액을 생성하였다.

[0183] 교반하면서 포름산암모늄 (0.562 Kg; 8.92 mol)을 첨가하고, pH를 10 N NaOH를 이용하여 대략 7.5로 제조정하였다. 니코틴아미드 아데닌 디뉴클레오티드 (2.65 g) 및 디티오프레이톨 (1.54 g)을 첨가하였다. 고형물이 용해되었을 때, PDH/FDH 효소 농축물을 첨가하였다 (1.03 L; 500,000 IU의 PDH). 주위 온도에서 pH를 10 N NaOH를 이용하여 대략 8.0으로 제조정하였다.

[0184] 그 후 이 혼합물을 대략 40°C로 가온하고, 물을 이용하여 10 L의 최종 부피로 희석시켰다. 42시간에 걸쳐 교반하면서 pH를 7.7-8.3에서 유지하였다. 생성된 용액은 0.955 Kg (95.1%)의 생성물 (αS)-α-아미노-3-히드록시트리시클로[3.3.1.1<sup>3,7</sup>] 데칸-1-아세트산을 함유하였다.

[0185] BOC-보호

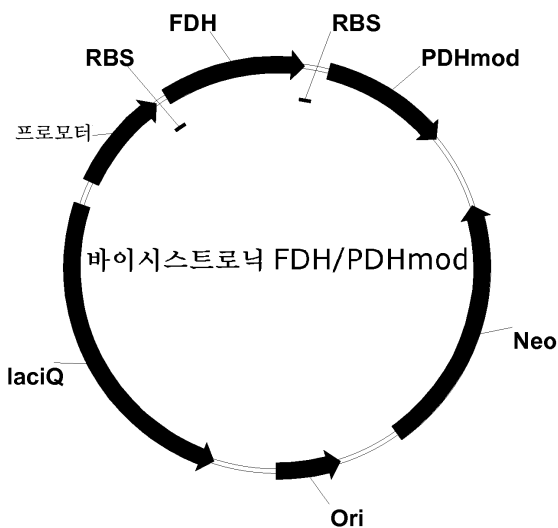
[0186] 디-tert-부틸 디카르보네이트 (1.022 Kg; 4.68 mol)를 (αS)-α-아미노-3-히드록시트리시클로[3.3.1.1<sup>3,7</sup>] 데칸-1-아세트산 (477.5 g; 2.12 mol) 용액의 일부분에 첨가하였다. 이 혼합물을 주위 온도에서 교반시키고, pH는 10 N NaOH를 이용하여 전위차 적정기 (pH stat titrator)로 10으로 조정하여 10에서 유지하였다. 1.0% 미만의

출발 물질이 남았을 때 Boc<sub>2</sub>O를 첨가한지 4시간 후에 반응이 완료되었다.

- [0187] 혼합물의 pH를 35% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>를 이용하여 대략 8로 조정하고, i-PrOAc (5.0 L)를 상기 혼합물에 첨가하였다. 그 후 혼합물의 pH를 35% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>를 이용하여 2.0으로 조정하고, 이 pH에서 5-10분 동안 유지하였다. 디칼라이트 (Dicalite) (250 g)를 첨가하고, 이 혼합물을 대략 10분 동안 교반시키고, 그 후 뷔흐너 깔때기 내의 여과지 상의 디칼라이트 (250 g)의 패드를 통하여 여과시켰다. 디칼라이트 패드를 2.5 L의 i-PrOAc로 추가로 세척하였다.
- [0188] 여과물을 10 N NaOH를 이용하여 pH 8로 조정하였다. 1시간 동안 침강시킨 후, 계면을 포함하는 유기층을 버렸다. 수성층에 i-PrOAc (7.5 L)를 첨가하였다. 이 혼합물을 35% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>를 이용하여 대략 2의 pH로 산성화하고, 그 후 온화하게 교반하면서 대략 40℃로 가열하고 4시간 동안 대략 40℃에서 유지하였다. 층들을 분리하고, 유기 추출물을 모아두었다. 계면을 포함하는 수성층을 i-PrOAc (3.75 L)로 추출하고, 40℃에서의 2시간 후 층들을 다시 분리하였다. 계면을 포함하는 수성층을 i-PrOAc (3.75 L)로 다시 추출하고, 40℃에서의 2시간 후 층들을 분리하였다.
- [0189] 합한 유기 추출물 (대략 15 L)을 대략 4.5 L로의 증류에 의해 농축시켰다. 그 후, 온도를 대략 82-89℃에서 유지하면서 이 용액에 헵탄 (대략 10 L)을 10-15분에 걸쳐 첨가하였다. 반응기 재킷 온도를 70℃가 되도록 설정하고, 이 온도에서 1시간 동안 유지하였다. 냉각 직후 결정화가 일어났다. 그 후 반응기 재킷 온도를 40℃로 설정하고, 이 온도에서 30분 동안 유지하였다.
- [0190] 현탁물을 주위 온도로 냉각시키고, 그 후 0-5℃로 추가로 냉각시켰다. 0-5℃에서의 1시간의 교반 후, 생성물을 여과하였다. 생성물을 헵탄 (2.5 L)으로 세척하고, 그 후 40℃에서 진공 하에 건조시켜 607.0 g (88% 수율)의 (αS)-α-[[[(1,1-디메틸에톡시)카르보닐]아미노]-3-히드록시트리시클로[3.3.1.1<sup>3,7</sup>] 테칸-1-아세트산을 생성하였다.
- [0191] 전술한 개시내용은 특정한 구체적 실시양태들을 강조하며, 그에 대한 모든 변형 또는 대안 등가물이 첨부된 특허청구범위에 개시된 바와 같이 본 발명의 사상 및 범주 이내임을 이해하여야 한다.

**도면**

**도면1**



도면2a

aagcttactc cccatccccc tgttgacaat taatcatcgg ctcgtataat gtgtggaatt 60  
 gtgagcggat aacaatttca cacaggaaac aggatctcca tggatattcg tccatgcat 120  
 gatcgcggtga tctgcaagcg taagaaggt gaaactaaat ctgctggcgg catcgttctg 180  
 accggctctg cagcggctaa atccaccccg ggcgaagtgc tggctgtcgg caatggccgt 240  
 atccttgaaa atggcgaagt gaagcgcgtg gatgtgaaag ttggcgcacat cgttattttc 300  
 aacgatggct acggtgtgaa atctgagaag atcgacaatg aagaagtgtt gatcatgtcc 360  
 gaaagcgaca ttctggcaat tgttgaagcg taatccgcgc acgacactga acatacgaat 420  
 ttaaggaata aagatcatga aaatcgttct cgtttttgtac tccgctggta agcaacggcg 480  
cgatgaacca aagttgatg gttgtatcg aatgaattg ggtattagac aatggcttga 540  
gaaggcggcg catgaattg ttactacac agacaagag ggtgaaaact ctgagttaga 600  
aaagcacatt cctgacgctg atgtgattat ttccactcca ttccatccag cctacatcac 660  
gaaggagaga atccaaaaag ccaagaagct gaagtgttg gtcggttctg gtgtcgggtc 720  
cgaccacatt gacttggact acattgaaca aaatggccta gatattcgg tctagaggt 780  
tactggttcc aacgttgttt cagtggctga gcatgtcgtt atgactatat tgaacttgg 840  
gagaaacttt gttccagctc acgagcaaat tgttaaccac ggcgtggagc ttgctgccat 900  
gcceaaggac gctacgata tgaaggtaa gaccatcgca acaattggtg ctggaagaat 960  
tgtttacaga gtcttagaga gacttgggc ttccaacct aaggaattgt ttaactacga 1020  
ctaccaaggt cttccaaaag agcccgagga aaaagtgtt gccagaagag tgcacactgt 1080  
cgaggagctg gttgctcaag ccgatgttgt taccgtcaat gccccactgc acgcaggta 1140  
taagggttta gttacaag agcttctgtc caagtcaag aagggtgctt gttggttaa 1200  
cacagccaga ggtccatct gcaatgctca agatgtcgt gatgcccgtt catctggtca 1260  
attgagaggt tacggtggtg acgtctggtt cctcagcca gctccaaagg acctccatg 1320  
gagagatag agaaacaagt acggatacgg aaacgccatg actcctcatt actcaggtac 1380  
cactttggac gccaggtca gatatgccga aggtaccaag aacatcttga actcattcct 1440  
taccaagaag tttgactaca gacctcaaga tqtattott ttgaacggta agtacaagac 1500  
caagccttat ggtaatgaca aaaagctgc ataaggtat gcgcacgaca ctgaacatac 1560  
gaatttaagg aataaacata tgcgcgacgt tttgaaaat atggaccgct atggccacga 1620  
gcaggtcatt tttgctcgc atccgcaaac cggctcctca gcatcactg ccttgcataa 1680  
tacaaccgcg gggccgctt tgggtggatg ccgcatgac ccgtatgctt cgaccgacga 1740  
agcctggag gatgtttgc ggtgttcaa agcctgacc tataaatgca gtctggcggg 1800  
tgtgacttt ggcgggggaa aaatggttat catcgccgat ccgaaaaag ataaatccc 1860  
ggagtgttt cgcgtgatg gccgtttgt gggcgggta aacggccgtt totataccgg 1920  
aaccgacatg ggaaccaatc cggaaagatt tgtccatgcc gccagggaat cgaaatcttt 1980  
tgcggattg ccgacatcgt acggcgggag cggggacaca tccattocca cgcgctcgg 2040  
ggtgtttcac ggaatgccc ccaccgccg gtttttatgg gggaccgac agctgaaaag 2100  
cgtgtggtt gccatccaag gqtcggcaa ggtgggagag cgtttgttc agcttttgg 2160  
cgagtgggg gcttactgca aaattgccga catcgattcg gtgcgatgag aacagctgaa 2220  
agaaaagtat ggcgacaag tccaattgtt ggtatgtaac cggattcaca aggagagttg 2280  
cgatatttcc tgccttgcg ccaaaggcgg cgtggtcaat gatgacacca ttgacgagtt 2340  
ccgttgcctg gccattgtcg gatccgcaa caaccaactg gtggaagacc ggcattgggg 2400  
actgcttcaa aaacggagca tttggtatg acccgattat ctggtgaatg ccggcgggct 2460  
gattcaagtg cctgatgaac tggaggcctt ccatgaagag agagtgcctg ccaaaaccga 2520  
agcgtattat gacatggtcc tggatatttt tcaccggcg aaaaatgaga atattaccac 2580  
ttgtgaggca gggaccgga tctgtatgga cgtttgaaa aagttaaccg atattcggc 2640  
gatcttggg gaggatcccc gcaacagccc gtaggggtac ctcgagccc ggcggcccgg 2700  
aattaattcg ccttagacat gactgttctt cagttcaagt tgggcaacta cgagaagacc 2760  
ggtcttgcga gcccggggtg ggcgaagaac tccagcatga gatccccgcg ctggaggatc 2820  
atccagccgg cgtccccgaa aacgattccg aagcccaacc tttcatagaa ggcggcggg 2880  
gaatcgaaat ctcgtgatg caggttgggc gtcctgtgtt cgtcatttcc gaacccaga 2940  
gtcccgtca gaagaactcg tcaagaagc gatagaagc gatgctgctg gaatcgggag 3000  
cggcgatacc gtaaagcag aggaagcggc cagccattc gccccaagc tcttcagcaa 3060  
tatcacgggt agccaacgct atgtcctgat agcggctccg cacaccagc cggccacagt 3120  
cgatgaaatc agaaaagcgg ccattttcca ccatgatatt cggcaagcag gcatcggcgt 3180  
gggtcacgac gagatcctg ccgtcgggca tgcgcgctt gagcctggc aacagttcgg 3240

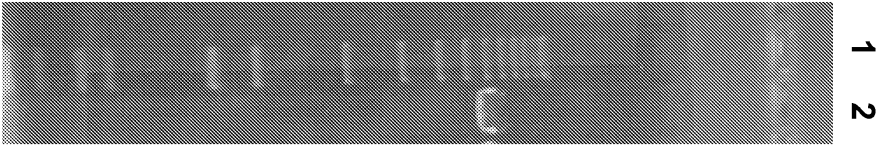
도면2b

ctggcgcgag ccctgatgc tcttcgtcca gatcatcctg atcgacaaga cggcttcca 3300  
 tccagtaacg tgctcgtcgc atgcgatggt tcgcttggtg gtcgaatggg caggtagccg 3360  
 gatcaagcgt atgcagccgc cgcattgcat cagccatgat ggatacttcc tcggcaggag 3420  
 caaggtgaga tgacaggaga tcctgcccgc gcaactcggc caatagcagc cagtccttcc 3480  
 ccgcttcagt gacaacgtcg agcacagctg cgcaaggaa ccccgctcgtg gccagccacg 3540  
 atagccgcgc tgcctcgtcc tgcagttcat tcagggcacc ggacaggtcg gtcttgacaa 3600  
 aaagaaccgg gcgccctcgc gctgacagcc ggaacacggc ggcatcagag cagccgattg 3660  
 tctgttgctg ccagtcacag ccgaatagcc tctccacca agcggccgga gaacctgcgt 3720  
 gcaatccatc ttgttcaatc atgcgaaacg atcctcatcc tgtctcttga tcagatcttg 3780  
 atcccctgog ccatcagatc cttggcggca agaaaagccat ccagtttact ttgcagggtt 3840  
 ccaaacctta ccagagggcg ccccagctgg caattccggt tcgcttgctg tccataaaac 3900  
 cgcccagctc agctatcgcc atgtaagccc actgcaagct acctgcttcc tctttgcgct 3960  
 tgcgttttcc cttgtccaga tagcccagta gctgacattc atcccgggtc agcaccgttt 4020  
 ctgcccagctg gctttctacg tgttcocgct cctttagcag cccttgccgc ctgagtgctt 4080  
 ggcggcagct gaagctagct tggcaatggc aacaacgttg cgcaaacat taactggcga 4140  
 actacttact ctagcttccc ggcaacaatt aatagactgg atggaggcgg ataaagtgc 4200  
 aggaccactc ctgcccctgc cccttcggc ttgctgggtt attgctgata aatctggagc 4260  
 cggtagcgtg gggctcgcgc gtatcattgc agcaactggg ccagatggtg agccctcccg 4320  
 tatcgtagtt atctacacga cggggagtca ggcaactat gatgaacgaa atagacagat 4380  
 cgctgagata ggtgcctcac tggatgaagca ttggtaactg tcagaccaag ttactcata 4440  
 tatactttag attgatttaa aacttcattt ttaatttaa aggatctagg tgaagatcct 4500  
 ttttgataat ctcatgcatg accaaaatcc cttaacgtga gttttcgctt cactgagcgt 4560  
 cagaccccgat agaaaagatc aaaggatctt cttgagatcc ttttttctg cgcgtaactc 4620  
 gctgcttgca aacaaaaaaa ccaccgctac cagcgggtgt ttgtttgcgc gatcaagaga 4680  
 taccactctc ttttccgaag gtaactggct tcagcagagc gcagatacca aatactgtcc 4740  
 ttctagtgtg gcogtagtta ggccaccact tcaagaactc tgtagcaccg cctacatacc 4800  
 tcgctcgtct aatcctgtta ccagtgctg ctgccagtgg cgataagtcg tgtcttaccg 4860  
 ggtggactca agacgatagt taccggataa ggcgcagcgg tcgggctgaa cggggggttc 4920  
 gtgcacacag ccagccttg agcgaacgac ctacaccgaa ctgagatacc taacagcgtg 4980  
 agctatgaga aagcggccag cttcccgaag ggagaaaggc ggacaggtat ccgtaagcg 5040  
 gcagggctcg aacaggagag cgcacagggg agcttccagg gggaacgcc ttgtatcttt 5100  
 atagctcgtg cgggtttcgc cacctctgac ttgagcgtcg atttttgtga tgcctcgtcag 5160  
 gggggcggag cctatggaag aacgccagca acgcccctt tttacggtc ctggcctttt 5220  
 gctggccttt tgcctcacatg ttctttcctg cgttatcccc tgattctgtg gataaccgta 5280  
 ttaccgctt tgagtgagct gataccgctc gccgcagccg aacgaccgag cgcagcagat 5340  
 cagtgagcga ggaagcggaa gagcgcctga tgcggatatt tctccttaog catctgtgcg 5400  
 gtatttcaca ccgcatagga attcgctaga gtcggaagca taaaagtga aagcctgggg 5460  
 tgctaatga gtgagctaac tcacatttaa ttgcgttgcg ctcaactccc gctttccagt 5520  
 cgggaaacct gtcgtgccaag ctgcattaat gaatcggcca acgcccgggg agagggcgtt 5580  
 tgcgtattgg gcgccaggtt ggtttttctt ttcaccagtg agacgggcaa cagctgattg 5640  
 cccttaccgg cctggcccctg agagagttgc agcaagcgtt ccacgtggt ttgcccagc 5700  
 aggcgaaaaat cctgtttgat ggtgggtgac ggcgggatat aacatgagct gtcttcggtg 5760  
 tgcctcgtatc ccaactaccga gatatccgca ccaacgcgca gcccgactc ggtaatggcg 5820  
 cgattggcg ccagcggcat ctgatcgttg gcaaccagca tcgcagtggg aacgatgccc 5880  
 tcattcagca tttgatgggt ttgttgaaaa ccggacatgg cactccagtc gccttcccgt 5940  
 tccgctatcg gctgaatttg attgagagtg agatatttat gccagccagc cagacgcaga 6000  
 cgcgccgaga cagaacttaa tgggcccgct aacagcgcga tttgctgggt acccaatgcg 6060  
 accagatgct ccacgccag tgcgctaccg tcttcatggg agaaaataat actgttgatg 6120  
 ggtgtctggt cagagacatc aagaaataac gccggaacat tagtgacggc agcttccaca 6180  
 gcaatggcat cctggtcatc cagcggatag ttaatgatca gccactgac gcgttgccgc 6240  
 agaagattgt gcaccggcg tttacaggct tcgacggcgc ttctgtctac catcgacacc 6300  
 accacgctgg caccagttg atcggcgca gatttaatcg ccgcgacaat ttgcgacggc 6360  
 gcgtgcaagg ccagactgga ggtggcaacg ccaatcagca acgactgttt gccggcagat 6420  
 tgttggtgca cgcgggtggg aatgtaattc agctccgca tcgcccgttc cactttttcc 6480

도면2c

cgcttttccg cggaacgtg gctggcctgg ttcaccagc gggaaacggt ctgataagag 6540  
 acaccggcat actctgcgac atcgtataac gttactgggt tcacattcac caccctgaat 6600  
 tgactctctt ccgggcgcta tcatgccata ccgcaaaagg ttttgccca ttogatgggt 6660  
 tcggcatgc (서열 2) 6669

도면3



레인	샘플
1	1 Kb + 분자량 마커
2	EcoRI으로 절단된 JM110 플라스미드 DNA

서열목록

[서열목록 전자파일 첨부](#)