(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2007-0100875
(43) 공개일자 2007년10월12일

(51) Int. Cl.
A61K 38/46(2006.01) *A61P 1/16*(2006.01)
(21) 출원번호 10-2007-7007829
(22) 출원일자 2007년04월05일
심사청구일자 없음
번역문제출일자 2007년04월05일
(86) 국제출원번호 PCT/CN2005/001411
국제출원일자 2005년09월06일
(87) 국제공개번호 WO 2006/026915
국제공개일자 2006년03월16일
(30) 우선권주장
200410076854.4 2004년09월08일 중국(CN)

(71) 출원인
바이오-캔서 트리트먼트 인터내셔널 리미티드
홍콩 엔티 샤틴 홍콩 싸이언스 파크 2 싸이언스 파크 웨스트 애비뉴 바이오 인포매틱스 센터 5/에프 룸 512-513
(72) 발명자
쳉 닝 만
중국 홍콩 12 메이 로드 클로벨리 코트 블럭 1 플랫 6비
(74) 대리인
리앤목특허법인

전체 청구항 수 : 총 29 항

(54) 약학 조성물 및 아르기나제로 간염을 치료하는 방법

(57) 요 약

본 발명은 폴리에틸렌글리콜에 의해 변형된 인간 아르기나제 I로 인간을 치료하는 방법 및 의약을 제조하기 위한 그 용도를 개시한다.

대표도 - 도1a

```
   1 gaattgtacg tcaaagagat gaagcagaaa aacgtcgtcg agaagaagct gaacgacaaa
  61 aagtgaaatg cgagggaagt ccaagaaatg gtgattatga gggtgtctat ttcaccaaaa
 121 acggagaata tttattggaa ttaagagtct ctgggactgc tcttgtaaat gctccttgta
 181 atttaaagga tattgacata acgaaatggt tgtgtaaaac agggagatta tatcttgata
 241 aggttaagaa atttgaaata gttactattc tttcccatga cgtagaaaat caaaagatta
 301 taacagaatg ggagtcactc cccagagagg ctttacccga acaatttgat tcataagaac
 361 taattagtag cgcttttcaa tggaggcgct tttttatttg ggtagttgca taccactaaa
 421 gatgttcagg tgcacatgag cattggagga aaggaacgct ttagggggaa gggaaacctt
 481 taaacagtct taatccccct tgatttttatg ttctctgtaa actgcgtccg gtaaatctca
 541 ggatagacaa tcggcggtta acggcttgag tgcgggggca gtttagaaag aatatgattg
 601 gagggattca tagatgcatc accatcacca tcatatgagc gccaagtcca gaaccatagg
 661 gattattgga gctcctttct caaagggaca gccacgagga ggggtggaag aaggccctac
 721 agtattgaga aaggctggtc tgcttgagaa acttaaagaa caagagtgtg atgtgaagga
 781 ttatgggggac ctgccctttg ctgacatccc taatgacagt ccctttcaaa ttgtgaagaa
 841 tccaaggtct gtgggaaaag caagcgagca gctggctggc aaggtggcac aagtcaagaa
 901 gaacggaaga atcagcctgg tgctgggcgg agaccacagt ttggcaattg gaagcatctc
 961 tggccatgcc agggtccacc ctgatcttgg agtcatctgg gtggatgctc acactgatat
1021 caacactcca ctgacaacca caagtggaaa cttgcatgga caacctgtat ctttcctcct
1081 gaaggaacta aaaggaaaga ttcccgatgt gccaggattc tcctgggtga ctcctgtat
1141 atctgccaag gatattgtgt atattggctt gagagacgtg gaccctgggg aacactacat
1201 tttgaaaact ctaggcatta aatactttc aatgactgaa gtggacagac taggaattgg
1261 caaggtgatg gaagaaacac tcagctatct actaggaaga aagaaaaggc caattcatct
1321 aagttttgat gttgacggac tggacccatc tttcacacca gctactggca caccagtggt
1381 gggaggtctg acatacagag aaggtctcta catcacagaa gaaatctaca aaacagggct
1441 actctcagga ttagatataa tggaagtgaa cccatccctg gggaagacac cagaagaagt
1501 aactcgaaca gtgaacacag cagttgcaat aaccttggct tgtttcggac ttgctcggga
1561 gggtaatcac aagcctattg actaccttaa cccacctaag taaatgtgga aacatccgat
1621 ataaatctca tagttaatgg cataattaga aagctaatca ttttcttaag catagagtta
1681 tccttctaaa gacttgttct ttcagaaaaa tgtttttcca attagtataa actctacaaa
1741 ttccctcttg gtgtaaaatt caagatgtgg aaattctaac ttttttgaaa tttaaaagct
1801 tatatttttct aacttggcaa aagacttatc cttagaaaga gaagtgtaca ttgatttcca
1861 attaaaaatt tgctggcatt aaaaataagc acacttacat aagcccccat acatagagtg
1921 ggactcttgg aatcaggaga caaagctacc acatgtggaa aggtactatg tgtccatgtc
1981 attcaaaaaa tgtgattcta ga
```

특허청구의 범위

청구항 1

간염 치료용 의약의 제조에 있어서 아르기닌 분해 효소의 용도.

청구항 2

제 1 항에 있어서, 상기 효소는 분리되고 실질적으로는 정제된 재조합 아르기나제인 것을 특징으로 하는 용도.

청구항 3

제 1 항에 있어서, 상기 재조합 아르기나제의 순도는 80-100%인 것을 특징으로 하는 용도.

청구항 4

제 3 항에 있어서, 상기 재조합 아르기나제는 인간 아르기나제 I인 것을 특징으로 하는 용도.

청구항 5

제 3 항에 있어서, 상기 재조합 아르기나제는 아르기닌 디이미나제(deiminase)인 것을 특징으로 하는 용도.

청구항 6

제 4 항에 있어서, 상기 효소는 SEQ ID NO: 1 또는 SEQ ID NO: 2에 나타낸 것과 실질적으로 동일한 핵산 서열을 포함하고, 상기 핵산 서열은 SEQ ID NO: 3에 나타낸 것과 실질적으로 동일한 아미노산 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 용도.

청구항 7

제 4 항에 있어서, 상기 효소는 비활성(specific activity)이 250 I.U./mg인 것을 특징으로 하는 용도.

청구항 8

제 4 항에 있어서, 상기 효소는 충분한 안정성을 갖고 시험관내(in vitro) 혈장 반감기가 약 3 일 이상이 되도록 하는 변형을 포함하는 것을 특징으로 하는 용도.

청구항 9

제 8 항에 있어서, 상기 효소는 PEG화된 것을 특징으로 하는 용도.

청구항 10

제 9 항에 있어서, 상기 PEG화는 커플링제를 이용하여 상기 아르기나제에 하나 이상의 폴리에틸렌 글리콜(PEG) 모이어티를 공유결합으로 부착시키는 것으로부터 기인하는 것을 특징으로 하는 용도.

청구항 11

제 9 항에 있어서, 상기 커플링제는 2,4,6-트리클로로-s-트리아진(시아누릭 클로라이드, CC) 또는 숙신이미드 프로피온산(SPA)인 것을 특징으로 하는 용도.

청구항 12

제 4 항에 있어서, 상기 인간 아르기나제 I는 그의 아미노 말단에 부착된 6 개의 히스티딘을 포함하는 것을 특징으로 하는 용도.

청구항 13

제 1 항에 있어서, 상기 간염은 B형 간염이 것을 특징으로 하는 용도.

청구항 14

아르기닌 분해효소를 포함하는 약학 조성물.

청구항 15

제 14 항에 있어서, 상기 효소는 분리되고 실질적으로는 정제된 재조합 아르기나제인 것을 특징으로 하는 약학 조성물.

청구항 16

제 15 항에 있어서, 상기 재조합 아르기나제의 순도는 80-100%인 것을 특징으로 하는 약학 조성물.

청구항 17

제 15 항에 있어서, 상기 재조합 아르기나제는 인간 아르기나제 I인 것을 특징으로 하는 약학 조성물.

청구항 18

제 15 항에 있어서, 상기 재조합 아르기나제는 아르기닌 디이미나제(deiminase)인 것을 특징으로 하는 약학 조성물.

청구항 19

제 17 항에 있어서, 상기 효소는 SEQ ID NO: 1 또는 SEQ ID NO: 2에 나타낸 것과 실질적으로 동일한 핵산 서열을 포함하고, 상기 핵산 서열은 SEQ ID NO: 3에 나타낸 것과 실질적으로 동일한 아미노산 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 약학 조성물.

청구항 20

제 17 항에 있어서, 상기 효소는 비활성이 250 I.U./mg인 것을 특징으로 하는 약학 조성물.

청구항 21

제 17 항에 있어서, 상기 효소는 환자의 혈장에서 3 일 이상의 반감기를 갖는 것을 특징으로 하는 약학 조성물.

청구항 22

제 17 항에 있어서, 상기 효소는 환자의 혈장에서 1 일 이상의 반감기를 갖는 것을 특징으로 하는 약학 조성물.

청구항 23

제 17 항에 있어서, 상기 효소는 PEG화에 의해 변형된 것을 특징으로 하는 약학 조성물.

청구항 24

제 17 항에 있어서, 상기 인간 아르기나제 I는 그의 아미노 말단에 부착된 6 개의 히스티딘을 포함하는 것을 특징으로 하는 약학 조성물.

청구항 25

제 14 항에 있어서, 상기 효소는 환자의 생리학적 아르기닌 수준을 감소시키는 것을 특징으로 하는 약학 조성물.

청구항 26

제 14 항에 있어서, 상기 효소는 간염을 조절하는 것을 특징으로 하는 약학 조성물.

청구항 27

제 24 항에 있어서, 상기 간염은 B형 간염인 것을 특징으로 하는 약학 조성물.

청구항 28

제 14 항에 있어서, 상기 조성물은 고체, 용액제, 유제, 분산제, 미셀, 또는 리포좀의 형태로 더 제조될 수 있

는 것을 특징으로 하는 약학 조성물.

청구항 29

제 14 항에 있어서, 상기 조성물은 경구 또는 주사용에 적합한 것을 특징으로 하는 약학 조성물.

명 세 서

기 술 분 야

<1> 본 발명은 약학 조성물 및 그 용도에 관한 것이다. 바람직한 구현예에서, 본 발명은 간염을 치료할 수 있는 약학 조성물에 관한 것이다.

배 경 기 술

<2> 간염을 치료하기 위한 많은 항바이러스제가 있으며, 하기 항바이러스제가 가장 많이 이용된다: (1) 인터페론: 바이러스를 직접적으로 죽이거나 억제하기보다는 세포 표면 수용체에 대한 작용을 통해서 세포가 그들 자신의 항바이러스 단백질을 생산하도록 유도하여, B형 간염 및 C 형 간염 바이러스의 복제를 억제하는 광범위 스펙트럼 항바이러스제. 동시에 그것은 NK 세포, 마크로파지, 및 T-림프구의 활성을 끌어올리고, 면역계를 조절하며, 항바이러스 능력을 증진시킨다. (2) 인터류킨-2: T-세포 성장인자로서 면역계를 조절하고 항바이러스 및 항종양 능력을 갖는다. (3) 뉴클레오사이드: 예를 들어 아시클로버는 다양한 DNA 바이러스의 복제를 억제하는 고리가 아닌(acyclic) 퓨린 뉴클레오시드이다. (4) 아라비노사이드: in vivo 및 in vitro에서 모두 B형 간염에 매우 효과적인 것으로 입증되었다. 몇몇 환자들은 치료동안 향상된 비정상적인 생화학 및 간생검과 함께 HBV DNA 폴리머라제 잠복기를 나타낸다. (5) 기타: 간세포 증식 촉진 인자(pHGF), 싸이모신(thymosin), 항-B형 간염 리보핵산(ribonucleic acid), 리바비린, 레바미솔(levamisole), 렌티난(lentinan), 포텐린(potenline), 파이토헤마글루티닌(phytohemagglutinin) 등. 그러나, 상기 약물의 효과는 만족스럽지 못하며, 불리한 부작용을 유발하기 쉽다.

발명의 상세한 설명

<3> **발명의 요약**

<4> 상기 배경기술의 관점에서, 본 발명의 목적은 보다 효과적인 간염 치료용 약학 조성물을 제공하는 것이다. 바람직한 구현예에서, 약학 조성물은 간염의 치료에서 환자의 아르기닌 수준을 선택적으로 감소시키기 위해 제공된다.

<5> 따라서, 본 발명의 일 측면에서, 본 발명은 의약의 제조를 위해 아르기닌을 분해 효소(아르기닌 분해 효소)를 제공한다. 바람직한 구현예에서, 아르기닌 분해 효소는 아르기나제 또는 아르기닌 디이미나제(deaminase)이다. 또 다른 바람직한 구현예에서, 아르기닌 분해 효소는 분리되고 실질적으로는 정제된 재조합 아르기나제이다. 더 바람직한 구현예에서, 본 발명의 아르기나제는 인간 아르기나제 I이다. 또 다른 보다 바람직한 구현예에서, 본 발명의 인간 아르기나제 I는 SEQ ID NO: 1 또는 SEQ ID NO: 2에 나타낸 것과 동일한 핵산 서열을 실질적으로 포함하고, 상기 핵산 서열은 SEQ ID NO: 3에 나타낸 것과 동일한 아미노산 서열을 포함한다. 또 다른 구현예에서, 본 발명의 재조합 인간 아르기나제 I는 80-100%의 순도를 갖는다. 보다 바람직한 구현예에서, 본 발명의 재조합 인간 아르기나제 I는 90-100% 순도를 갖는다.

<6> 또 다른 바람직한 구현예에서, 본 발명의 아르기나제는 적어도 3일 동안 환자에서 "적절한 아르기닌 고갈"(이하, "AAD"라고 한다)을 유지할 정도로 충분히 높은 효소 활성 및 안정성을 갖도록 변형된다. 바람직한 변형 방법은 아미노 말단의 6개의 히스티딘 태그이다. 또 다른 바람직한 변형은 효소의 안정성을 증가시키고 환자에 의해 유발되는 면역반응을 최소화하기 위한 PEG화 이다. 또 다른 바람직한 구현예에서, PEG화는 적어도 하나의 폴리에틸렌글리콜에 공유적으로 결합되는 커플링제를 포함한다. 바람직한 구현예에서, 커플링제는 2,4,6-트리클로로-s-트리아진(시아누릭 클로라이드, CC) 또는 숙신이미드 프로피온산(SPA)이다. 변형된 아르기나제는 적어도 250 I.U. /mg의 비활성(specific acitivity)을 갖는다. 바람직한 일 구현예에서, 비활성은 적어도 300-350 I.U./mg이다. 가장 바람직한 일 구현예에서, 비활성은 적어도 500 I.U./mg이다. 또 다른 바람직한 구현예에서, 상기 아르기나제는 충분한 안정성을 갖도록 그리고, 적어도 약 3일간의 혈장 또는 혈청 반감기를 갖도록 변형된다.

<7> 또 다른 바람직한 구현예에서, 본 발명에 의해 제조된 의약은 간염을 치료하기 위해 제공된다. 보다 바람직한

구현예에서, 본 발명에 의해 제조된 의약은 B형 간염을 치료하기 위해 제공된다.

<8> 또 다른 실시에 있어서, 본 발명은 분리되고 실질적으로 순수한 재조합 아르기나제를 포함하는 약학 조성물을 제공한다. 바람직한 일 구현예에서, 본 발명이 제공하는 약학 조성물은 80-100% 순도의 재조합 아르기나제를 포함한다. 또 다른 바람직한 구현예에서, 재조합 인간 아르기나제는 임의의 아르기닌 분해 효소, 예를 들어 아르기닌 디이미나제 또는 인간 아르기나제 I이다. 가장 바람직한 구현예에서, 상기 효소는 필수적으로 SEQ ID NO: 1 또는 SEQ ID NO: 2에 나타낸 것과 동일한 아미노산 서열을 필수적으로 포함하고, 상기 아미노산 암호화 서열은 SEQ ID NO: 3에 나타낸 것과 동일한 아미노산 서열을 포함한다. 바람직한 구현예에서, 상기 아르기나제는 약 3일간의 환자의 혈장 또는 혈청 반감기에서 높은 비활성 및 충분한 안정성을 갖도록 변형된다. 또 다른 바람직한 변형은 효소의 안정성을 증가시키고 면역반응성을 최소화하기 위한 PEG화이다.

<9> 본 발명의 또 다른 측면에서, 본 발명은 환자의 아르기닌 수준을 낮추는 약제학적 조성물을 제공한다. 바람직한 일 구현예에서, 본 발명은 간염을 조절하는 것이다. 보다 바람직한 일 구현예에서, 본 발명은 B형 간염을 치료할 수 있다. 또 다른 일 구현예에서, 본 발명의 약제학적 조성물은 고체, 용액제, 유제, 현탁제, 작은 알부민 응집체(Serum Albumin Aggregate: SAA), 또는 리포좀의 형태로 제조된다. 또 다른 바람직한 일 구현예에서, 본 발명의 약제학적 조성물은 경구로 또는 정맥내로 투여하기에 적절하다.

<10> **바람직한 구현예의 상세한 설명**

<11> 본 명세서에서, 용어 "PEG화 아르기나제"는 효소의 안정성을 증가시키고 면역 반응을 최소화하기 위해 PEG화(WO 2004/001048)에 의해 변형된 본 발명의 아르기나제 I를 말한다.

<12> 본 명세서에서, DNA의 뉴클레오티드 서열, RNA의 리보뉴클레오티드 서열, 또는 단백질의 아미노산 서열을 언급하면서 사용된 어구 "실질적으로 동일한"이란 본 명세서에서 개시된 실제 서열에서 약간의 그리고 비간접적인 서열 변이가 이루어진 서열을 말한다. 실질적으로 동일한 서열을 갖는 종류는 개시된 서열과 동등한 것으로 인정되고 그 자체는 첨부된 청구항의 범위 내에 해당된다. 이와 관련하여, "약간의 그리고 비간접적인 서열 변이"는 본 명세서에서 개시되고/거나 청구된 DNA, RNA, 또는 단백질과 실질적으로 동일한 서열이 본 명세서에서 개시되고/거나 청구된 서열과 기능적으로 동등하다는 것을 의미한다. 기능적으로 동등한 서열은 실질적으로 동일한 방식으로 작용하여, 본 명세서에서 개시되고 청구된 핵산 및 아미노산 조성물과 실질적으로 동일한 조성물을 생성할 것이다. 특히, 기능적으로 동등한 DNA는 본 명세서에 개시된 것과 동일한 단백질, 또는 비극성 잔기의 또 다른 비극성 잔기 치환, 또는 하전된 잔기의 유사하게 하전된 잔기의 치환과 같은 보존적 아미노산 변이를 갖는 단백질을 암호화 한다. 이러한 변화는 단백질의 4차 구조를 실질적으로 변화시키지 않는 것으로 당업자에게 알려져 있는 것을 포함한다. 용어 "충분히 높은 효소 활성"이란 재조합 인간 아르기나제의 효소 비활성이 적어도 250 I.U./mg, 바람직하게는 300-350 I.U./mg, 보다 바람직하게는 적어도 500 I.U./mg인 것을 말한다. 바람직한 구현예에서, 아르기나제는 500 I.U./mg이 비활성을 갖는다. 용어 "안정성"은 아르기나제의 in vitro 안정성을 의미한다. 보다 바람직하게는, 안정성은 in vivo 안정성을 의미한다. 효소 활성의 감소 속도는 분리, 정제된 재조합 인간 아르기나제의 혈장내 안정성을 반비례한다. 이러한 관계는 혈장에서의 인간 아르기나제의 반감기에 반영된다.

<13> 본 명세서에 사용된 용어 "적절한 아르기닌 고갈"(AAD)는 10 μM 이하의 in vivo 아르기닌 수준을 의미한다. 용어 "반감기"(1/2-life)는 in vitro 인간 혈장에서 아르기나제의 농도가 절반으로 떨어지는데 필요한 시간을 의미한다.

<14> 본 명세서에서 사용된 기술적 노하우에 관한 모든 다른 정보 및 용어는 WO 2004/001048 및 WO 2004/000349에서 발견될 수 있다.

<15> 아르기나제의 항-B형 간염 바이러스 효과를 조사하기 위해, 본 발명은 아르기나제의 세포독성, 아르기나제에 의한 HBsAg 및 HBeAg 분비의 억제, 및 아르기나제에 의한 HBV-DNA의 억제를 시험하기 위해서, B형 간염 바이러스 유전자로 트랜스펙션된 간암 세포주 2.2.15를 이용하였다. 양의 대조군으로서 영국의 GlaxoWellcome사의 라미부딘을 이용하여 비교 실험을 수행하였다. 시험 결과, CPE 법 약물 부가를 8 일간 수행한 후의 PEG화 재조합 아르기나제의 TC50은 40 IU/mL, TCO은 20±0 IU/mL이다. TCO= 20 IU/mL를 이용하는 두 가지 배치의 실험으로부터, HBeAg 분비의 % 억제, IC50, 및 SI는 각각 68.69±8.89, 6.37±0.45 IU/mL, 6.30±0.45이다. HBsAg 분비의 %억제, IC50, 및 SI는 각각 29.81±27.35, 10.72 IU/mL(하나의 배치의 실험으로부터), 및 3.73(하나의 배치의 실험으로부터)이다. 배양 배지의 상청액에서의 HBV-DNA 도트 블랏팅의 IC50은 13.18±0.45 IU/mL이고, 선택적 지수(SI)는 3.19±0.98이다. 세포에서의 HBV-DNA 서던 블랏 합계(Sum)의 IC50은 19.79±7.95 IU/mL이고,

선택적 지수는 2.91±0.88이다. 세포에서 HBV-DNA 레인 상의 서던 블랏 인 레인(Southern Blot In Lane)의 IC50은 20.06±1.96 IU/mL이고, 선택적 지수는 2.00±0.20이다. 양의 대조군 라미부딘의 TC50 및 TC0은 각각 1198.97±97.50 및 800±0 ㎍/mL 이다. 2.2.15 세포의 HBeAg 및 HBsAg 분비는 8 일동안 TC0 800 ㎍/mL의 라미부딘과 함께 배양한 후에 현저하게 억제되지는 않는다. 배양 배지의 상청액에서의 HBV-DNA 도트 블랏팅의 IC50은 113.76 ㎍/mL이고, 선택적 지수는 10.54이다. 세포에서의 HBV-DNA 서던 블랏 합계의 IC50은 88.78±6.37 ㎍/mL이고, 선택적 지수는 13.54±0.97이다. 여러 실험 결과는 공개된 문헌과 일치하고, 이는 실험이 신빙성이 있다는 것을 나타낸다. 실험 결과에 따르면, 아르기나제는 HBsAg 및 HBeAg의 분비를 현저하게 억제하고 세포에서의 HBV-DNA를 감소시키는 것으로 나타났다.

실 시 예

<20> **실시예 1**

<21> **물질의 제조**

<22> **1.1. 시험용 약물**

<23> 명칭: PEG화 재조합 인간 아르기나제(BCT-100), 이하 "아르기나제"라고 한다. 상기 아르기나제는 도 1a, 1b, 및 1c에 나타낸 핵산 서열 및 그의 해당 아미노산 서열을 포함한다.

<24> 제조: WO 2004/001048의 명세서의 실시예 1-8을 참조하길 바란다. 재조합 인간 아르기나제는 WO 2004/001048의 가장 이른 출원일 이전에는 Ikemoto Masaki 교수의 실험실로부터 얻을 수 있었다(교토대; 주소: 53 Kawahara-cho, Shogoin, Sakyo-ku, Kyoto-shi, Kyoto 606-8507 Japan). 아르기나제는 지정된 투여 그룹에 따라 MEM 배지로 제조하였다.

<25> 보관: 4℃ 냉장고에서 보관하였다.

<26> **1.2 양의 대조군**

<27> 라미부딘, 영국 GlaxoWellcome 사 제조, 배치 번호: B008923, 정제당 100 mg, 약물을 배지에 스며들게 하고 녹이고, 원심분리하여 침전물을 제거하고, 실험 동안 지정된 투여 그룹에 따라 MEM 배지로 제조하였다.

<28> 보관: 4℃ 냉장고에서 보관하였다.

<29> **1.3. 2.2.15 세포**

<30> Mount Sinai Medical Center가 제작한 B형 간염 바이러스로 트랜스펙션된 인간의 간암 세포(Hep G2)의 2.2.15 세포주. 본 발명의 발명자의 실험실에서 수입하여 배양하였다.

<31> **1.4 시약**

<32> Eagles MEM 분말, G-418(Geneticin), 이스트 t-RNA, 프로티나제-K, 미국 Gibco; 우태아혈청, 미국의 Hyclone Lab; L-글루타민, Jingke Chemical Reagent Company; HBsAg, HBeAg 방사면역어세이, China Isotope Corporation Beifang Immunoreagent Research Center; 가나마이신, North China Pharmaceutical Group Corporation; 폴리에틸렌글리콜, Fluka, Sweden; DMSO, Sigma; d-^{32}p-dCTP, Beijing Yahui Bio Medical Engineering Company.

<33> **1.5. 기구**

<34> 배양 보틀, Tunclon TM, 덴마크; 96-웰, 24-웰, 및 6-웰 플레이트, 미국 Corning; 이산화탄소 배양기, 미국 Shel-Lab; γ-카운터, 독일 Beckman; 스캐너, Microtek; 겔-프로 분석기 소프트웨어, MEDIA Cybemetice®.

<35> **1.6. 세포 배양 배지 및 시약**

<36> MEM 배지 100 mL: 우태아혈청 10%, 글루타민 0.03%, G418 380 ㎍/mL, 가나마이신 50 ㎍/mL 함유.

<37> **1.7. 2.2.15 세포 배양**

<38> 충분하게 증식된 2.2.15 세포가 있는 배양 보틀 내에 0.25%의 트립신을 부가하고, 37℃에서 10 분간 분해하고, 배지를 가하여 분산시키고, 1:3 계대배양하여 10 일 후에 충분히 증식되었다.

<39> **실시예 2**

<40> **아르기나제의 세포 독성 시험**

<41> 실험을 대조군 및 서로 다른 약물 농도를 갖는 시험군으로 나누었다. 세포를 분리하여 200,000 세포/mL로 희석하고 배양 플레이트에 옮기고 96-웰 플레이트의 웰당 100 ㎕를 가하고, 37℃에서 5% CO_2 하에서 24 시간 동안 배양하여, 세포가 단일층으로 증식하면 실험 준비가 완료된 것으로 하였다. 아르기나제를 배양배지로 40 IU/mL로 희석하고, 20, 10, 5, 2.5 IU/mL로 계열희석하여, 96-웰 플레이트에 각 농도당 3 개의 웰씩, 5 개의 서로 다른 농도로 가하였으며, 4 일마다 동일한 원래의 농도로 아르기나제 용액을 갈아주었다. 그런 다음, 세포병리학적 변화를 8일 또는 4일 현미경으로 관찰한 결과, 모두 사멸된 것은 4: 75% 사멸된 것은 3; 50% 사멸된 것은 2, 25% 사멸된 것은 1; 아무런 변화가 없는 것은 0 이었다. TC50 및TC0을 Reed-Muench 방법에 따라 계산하였다:

<42> $$TC50=Antilog\left(B+\frac{50-B}{A-B}xC\right)$$

<43> A= log > 50% 약물 농도; B= log < 50% 약물 농도; C = 희석 배수의 log 값

<44> **실시예 3**

<45> **아르기나제의 HBeAg 및 HBsAg 억제 시험**

<46> HBsAg 및 HBeAg 양의 대조군, 음의 대조군, 세포 대조군, 및 서로 다른 약물 농도의 시험군을 갖도록 실험을 디자인 하였다. 24 웰 플레이트에 1 웰당 1 mL로 하고, 37℃에서 5% CO_2 하에서 24 시간 배양하여, 2.2.15 세포를 200000 세포/mL로 증식시켰다. 각각의 약물에 대해 TC0 약물 용액을 5 희석으로 계열희석하여, 아르기나제의 경우는 20, 10, 5, 2.5, 1.25 IU/mL; 라미부딘에 대해서는 800, 400, 200, 100, 50 ㎍/mL로 하였다. 각 농도당 4 개의 웰씩, 37℃에서 5% CO_2 하에서 배양하고, 약물 용액을 동일한 농도로 4일마다 갈아주고, 배양 배지를 8일째에 회수하고, -20℃에서 보관하였다. 2 개의 배치에 대해 실험을 반복하고, HBsAg 및 HBeAg 각각에 대해 시험하였다. γ-카운터를 이용하여 각각의 웰에 대해 cpm 값을 체크하였다.

<47> 약물의 효과 계산: 세포 대조군 및 서로 다른 약물 농도의 그룹으로부터 cpm의 평균 및 표준편차, P/N 값, 및 % 억제, IC50 및 SI를 계산하였다.

<48> ①

<49> $$\%항원억제(\%)=\frac{세포대조군cpm-약물투여군cpm}{세포대조군cpm}x100$$

<50> ② 약물의 항원 억제에 대한 IC50 계산

<51> $$TC50=Antilog\left(B+\frac{50-B}{A-B}xC\right)$$

<52> A= log > 50% 약물 농도; B= log < 50% 약물 농도; C = 희석 배수의 log 값

<53> ③ 세포 병리학적 독성으로 인한 세포의 병리학적 변화에 따라 계산된 HBsAg 및 HBeAg에 대한 2.2.15 세포 배양에서의 아르기나제의 SI

<54> $$SI=\frac{세포병리학적독성TC50}{IC50}$$

<55> ④ 서로 다른 희석 및 대조군에서의 HBsAg 및 HBeAg 간의 t-테스트에 의한 cpm 차이 계산.

<56> **실시예 4**

<57> **2.2.15 세포 DNA의 아르기나제 억제 시험**

<58> 2.2.15 세포 상청액으로부터 HBV-DNA의 추출: 2.2.15 세포를 24-웰 플레이트에서 웰당 1 mL를 가하고 200000 세포/mL로 증식시키고, 배양 24 시간 후에 약물을 부가하고, 약물 용액을 4 일마다 동일한 농도로 갈아주고, 약

물을 배양물에 부가한 날로부터 계산하여 배양 8일 후에 세포 배양물로부터 상청액을 수집하고, 폴리에틸렌글리콜로 침전시키고, 프로틴키나제 K로 분해하고, 페놀:클로로포름;이소펜타놀로 추출하고, 무수 에탄올로 핵산을 침전시키는 등의 과정을 수행하고, 진공건조하고, 샘플로서 TE 완충용액 중에 다시 용해하였다.

<59> 도트 블랏: 도트 배치: 20 ㎕의 샘플(DNA 25 ㎍ 함유)을 취하고, 변성시키고, 중화하고, 니트로셀룰로오스 멤브레인 상에서 20X SSC 완충용액으로 1:8로 계열희석하고, 오븐 건조하고, 예비혼성화하고, 혼성화하고, 멤브레인을 세척하고, 방사능 자가 노출 등의 과정을 수행하였다. X-선 필름을 종래의 방법으로 현상하였다. 스캐너로 스캔하여 필름을 현상하고, 겔-프로 소프트웨어로 밀도를 측정하고, 억제율 및 IC50을 계산하였다.

<60> $$2.2.15\text{세포배양배지에서의}\ HBV\text{-}DNA\text{억제} = \frac{IOD - TIOD}{CIOD} \times 100\%$$

<61> 서던 블랏: 2.2.15 세포로부터의 HBV-DNA의 추출: 약물을 부가하여 2.2.15 세포를 8 일간 배양하고, 배지를 제거한 다음, 세포를 회수하고, 세포를 용해액(lysis solution)으로 용해하고, 동일한 부피의 페놀:클로로포름:이소펜타놀로 2 회 추출하고, 무수 에탄올을 가하여 핵산을 추출하고, 진공건조하고, TE 완충용액 20 ㎕ 중에 재용해하고, DNA 샘플 완충용액을 부가하고, 전기영동을 위해 샘플들을 아가로오스 겔에 넣었다. 전기영동 후에, 변성, 중화, 및 멤브레인으로의 이동을 수행하였다. 오븐 건조하고, 혼성화하고, 동시에 도트 블랏팅으로 노출하였다. 스캐너로 스캔하여 필름을 현상하고, 겔-프로 소프트웨어로 밀도를 측정하고, 억제율 및 IC50을 계산하였다.

<62> **결과**

<63> Reed-Muench 법에 따라 TC50 및 TC0을 계산하였다. HBsAg 및 HBeAg 억제를 상기 나타낸 식에 따라서 계산하였다. HBV-DNA의 아가로오스 겔 전기영동의 상대적 밀도를 분석함으로써 억제율 및 IC50을 계산하였다.

<64> **1. 2.2.15 세포 배양물에서의 아르기나제 독성**

<65> B형 간염 바이러스 유전자가 트랜스펙션된 인간 간암 세포 2.2.15 세포에 대한 아르기나제 독성을 관찰하기 위해, 배양 24 시간 후에 계열 희석된 약물 용액을 세포 배양물에 부가하였다. 40 IU/mL로부터 시작하여 순차적으로 20, 10, 5, 2.5 IU/mL로 하여, 약물 용액을 4일 마다 8일까지 갈아주고, 현미경으로 세포 독성 변화를 관찰하고 현미경으로 CPE에 대해 체크하였다. 결과: B형 간염 바이러스가 트랜스펙션된 인간 간암 세포 2.2.15 세포에서의 CPE 법(8일 약물 투여)에 의한 아르기나제 독성: 두 개 배치의 실험에서 TC50은 40 IU/mL이고 TC0은 20±0 ㎍/mL 이다. 양의 라미부딘 대조군의 TC50은 1198.97±97.50 ㎍/mL이고, TC0은 800±0 ㎍/mL 였다(표 1a 참조).

<66> **2. 아르기나제에 의한 HBeAg 및 HBsAg 억제**

<67> 2.2.15 세포에 TC0 농도의 아르기나제 및 라미부딘을 가하고, 8일 후에 HBsAg 및 HBeAg의 cpm 값을 체크하고, 약물 억제 효과를 계산하였다. 실험결과를 표 2에 나타내었다.

<68> **2.1. 아르기나제에 의한 HBeAg 억제%**

<69> 두 가지 배치의 아르기나제 실험: TC0 20 IU/mL를 10, 5, 2.5 및 1.25 IU/mL로 계열 희석하고, 2.2.15 세포를 각각의 농도로 8 일간 배양한 결과, 상청액에서의 HBeAg의 평균 억제%는 20 IU/mL, 68.69±8.89% 억제; 10 IU/mL, 60.73±17.49% 억제; 5 IU/mL, 53.96±20.36% 억제; 2.5 IU/mL, 51.83±14.16% 억제; 1.25 IU/mL, 37.34% 억제. 평균 IC50은 6.37±0.45 IU/mL, SI는 6.30±0.45 이다.

<70> **2.2 아르기나제에 의한 HBsAg 억제%**

<71> 제 1 배치의 아르기나제 실험: 20, 10, 5, 2.5, 1.25 IU/mL의 농도로 8 일간 배양한 후 2.2.15 세포 배양물의 세포 배양 상청액에서의 HBsAg의 억제율은 각각 49.16%, 47.97%, 42.29%, 및 37.18% 였다. IC50은 10.72 IU/mL이고, SI는 3.7.3 이었다. 그러나, % 억제는 제 2의 배치에서는 낮았다. HBsAg의 억제율은 20 IU/mL인 TC0 농도에서 50% 미만이었으며, 따라서 IC50> 20 IU/mL 이다.

<72> **2.3. HBsAg 및 HBeAg에 대한 라미부딘의 효과**

<73> 라미부딘을 TC0 농도인 800 ㎍/mL로부터, 400, 200, 100, 및 50 ㎍/mL로 각각 계열희석하고, 2.2.15 세포에 가하고, 배양 8 일 후에 HBsAg 및 HBeAg 역가를 체크하고, 억제 효과를 계산하였다(표 1b 참조).

<74> **2.4. 라미부딘에 의한 HBeAg 억제%**

<75> 800, 400, 200, 100, 및 50 μg/mL의 농도의 라미부딘으로 8 일간 배양한 후 2.2.15 세포 배양물의 세포 배양 상청액에서의 HBsAg의 평균 억제%는 8.23±3.02%, 12.99±0.46%, 17.83±2.09%, 15.84±2.33%, 14.10±1.27% 였다. 현저한 억제는 전혀 관찰되지 않았다.

<76> **2.5. 라미부딘에 의한 HBsAg %억제**

<77> 800, 400, 200, 100, 및 50 μg/mL의 농도의 라미부딘으로 8 일간 배양한 후 2.2.15 세포의 세포 배양 상청액에서의 HBeAg의 평균 억제%는 4.65±6.58%, 4.05±5.73%, 5.67±4.70%, 8.60±4.88%, 3.45±3.95% 였다. 현저한 억제는 전혀 관찰되지 않았다.

【표 1a】

아르기나제에 의한 2.2.15 세포에서의 HBsAg 및 HBeAg의 억제(%)

약물	실험 배치	약물 부가 일	약물농도 IU/ml	HBeAg (CPM)			HBsAg (CPM)		
				% 억제	IC50 IU/ml	SI	% 억제	IC50 IU/ml	SI
아르기나제	1	8	20	74.9808	6.69	5.98	49.1558	10.72	3.73
			10	73.0985			47.9651		
			5	68.3484			42.2871		
			2.5	61.8387			37.1787		
	2	8	20	62.4033	6.05	6.61	10.4731	>20.00-	
			10	48.3596			6.0761		
			5	39.5618			1.4739		
			2.5	41.8149			2.6703		
			1.25	37.3426			4.463		
	두 배치의 평균		20	68.69±8.89	6.37±0.45	6.30±0.45	29.81±27.35	제1배치 10.72 제2배치 >20 불균일	
			10	60.73±17.49			27.02±29.62		
			5	53.96±20.36			21.88±28.86		
			2.5	51.83±14.16			19.92±24.40		
			1.25	37.34			4.46		

<78>

【표 1b】

라미부딘에 의한 2.2.15 세포에서의 HBsAg 및 HBeAg의 억제 (%)

약물	실험 배치	약물 부가 일	약물 농도 μg/ml	HBeAg (CPM)			HBsAg (CPM)		
				억제 %	IC50 μg/ml	SI	억제%	IC50 μg/ml	SI
라미부딘	1	8	800	6.10	>800		0	>800	
			400	12.67			8.10		
			200	16.35			2.35		
			100	17.48			12.05		
			50	13.20			6.24		
	2	8	800	10.37	>800		9.299	>800	
			400	13.32			0		
			200	19.31			8.99		
			100	14.19			5.15		
			50	14.99			0.65		
	두 배치의 평균	8	800	8.23±3.02	>800±0 TC0 800μg/ml 현저한 억제가 전혀 나타나지 않음		4.65±6.58	>800±0 TC0 800μg/ml 현저한 억제가 전혀 나타나지 않음	
			400	12.99±0.46			4.05±5.73		
			200	17.83±2.09			5.67±4.7		
			100	15.84±2.33			8.6±4.88		
			50	14.10±1.27			3.45±3.95		

<79>

<80> **3. 아르기나제 및 라미부딘에 의한 2.2.15 세포 배양물의 상청액에서의 HBV-DNA 억제**

<81> **3.1. 2.2.15 세포 배양물의 상청액의 HBV-DNA에서의 아르기나제 도트 블랏팅**

<82> 2.2.15 세포 배양물의 상청액에서의 HBV-DNA에 대한 아르기나제의 효과: 8 일간 배양한 후의 HBV-DNA에 대한 두 배치의 시험용액의 IC50은 각각 16.04, 10.31 IU/mL 이고, 평균 IC50은 13.18±4.05 IU/mL이고, SI는 2.49, 3.88이고, 평균은 3.19±0.98 이었다. 결과를 표 2에 나타내었다.

【표 2】

2.2.15 세포 배양물의 상청액에서의 HBV-DNA에 대한 아르기나제의 효과

배치	약물 부가 일	약물 농도 (μg/ml)	세포배양 상청액에서의 HBV-DNA의 희석 인자/% 억제			
			원액 (IOD)	% 억제	IC50(μg/ml)	SI
1	8	20	1643.3	30.8113	16.04	2.49
		10	1680.6	29.2409		
		5	2090.38	11.9877		
		2.5	1783.34	24.9152		
		대조군	2375.1			
2	8	20	2430.14	47.7577	10.31	3.88
		10	2881.48	38.0549		
		5	2613.11	43.8243		
		2.5	4118.31	11.466		
		1.25	3917.78	15.7769		
		대조군	4651.67			
두 배치의 평균					13.18±4.05	3.19±0.98

<83>

<84> **3.2 2.2.15 세포 배양물의 상청액에서의 HBV-DNA에 대한 라미부딘의 효과**

<85> 제 1 배치 실험의 2.2.15 세포 배양물의 상청액에서의 HBV-DNA에 대한 라미부딘의 효과: IC50은 113.76 μg/mL이고, TC50은 1198.97±97.50 μg/mL이고, SI는 10.54 였다. 결과를 표 3에 나타내었다.

<86>

【표 3】

2.2.15 세포 배양물의 상청액에서의 HBV-DNA에 대한 라미부딘의 효과

약물	약물 부가일	약물 농도 (μg/ml)	세포배양 상청액에서의 HBV-DNA의 희석 인자/% 억제			
			CPM	% 억제	IC50 (μg/ml)	SI
라미부딘	8	800	663.013	82.5905	113.76	10.54
		400	795.628	79.1083		
		200	1080.03	71.6404		
		100	1465.31	61.5237		
		50	2831.21	25.6576		
		대조군	3808.34			

<87>

<88> **3.3. 아르기나제 및 라미부딘에 의한 2.2.15 세포에서의 HBV-DNA 서던 블랏의 억제**

<89> **3.3.1 아르기나제에 의한 2.2.15 세포에서의 HBV-DNA 서던 블랏의 억제**

<90> 결과는 다음과 같이 나타났다: 2.2.15 세포에서의 총 HBV-DNA 서던 블랏의 결과는 아르기나제를 부가하여 8일간

배양한 후에 완전히 억제되었다: 두 배치의 실험에서 IC50은 각각 25.42, 14.17 IU/mL, 평균 IC50은 19.79±7.95이고, SI는 각각 1.57 및 2.82 였고, 평균은 2.19±0.88 이었다. 2.2.15 세포에서의 총 HBV-DNA 서던 블랏 인 레인의 결과: 두 배치의 실험에서 IC50은 각각 21.45, 18.67 IU/mL이고, 평균은 20.06±1.96 IU/mL이고, SI는 각각 1.86, 2.14이고, 평균은 2.00±0.20 이었다. 결과를 표 4에 나타내었다.

【표 4】

아르기나제에 의한 2.2.15 세포에서의 HBV-DNA 서던 블랏의 억제

배치	약물 투여일	약물 농도 IU/ml	합계 (IOD)	% 억제	IC50 μg/ml	SI	In Lane (IOD)	% 억제	IC50 IU/ml	SI
1	8	20	25011	14.9893	25.42	1.57	31436	25.2982	21.45	1.86
		10	24234	17.6303			32499	22.7722		
		5	20104	31.6679			28796	31.5717		
		2.5	21650	26.4131			28762	31.6525		
		대조군	29421				42082			
2	8	20	34433	47.9416	14.17	2.82	46760	38.6255	18.67	2.14
		10	46884	29.1172			66241	13.0559		
		5	46283	30.0259			61655	19.0752		
		2.5	68619	0			88350	38.6255		
		대조군	66143				76188			

<91>

<92> **3.3.2 라미부딘에 의한 2.2.15 세포에서의 HBV-DNA 서던 블랏의 억제**

<93> 결과는 다음과 같이 나타났다: 라미부딘에 의한 2.2.15 세포에서의 총 HBV-DNA 서던 블랏의 억제 효과: 두 배치의 실험에서 IC50은 각각 84.27, 93.28 μg/mL, 평균은 88.78±6.37 μg/mL이고, TC50은 1198.97 μg/mL, SI는 각각 14.23 및 12.85 였고, 평균은 13.54±0.97 이었다(표 5 참조).

【표 5】

라미부딘에 의한 2.2.15 세포에서의 HBV-DNA 서던 블랏의 억제

배치	약물 투여일	약물 농도 (μg/ml)	합계 (IOD)	%억제	IC50 μg/ml	SI
1	8	800μg/ml	143.91	90.50	84.27	14.23
		400	317.332	70.04		
		200	366.35	75.80		
		100	491.77	67.52		
		50	748.91	50.54		
		대조군	1514.08			
2	8	800μg/ml	509.85	79.01	93.28	12.85
		400	804.63	66.87		
		200	589.01	75.75		
		100	1002.21	58.74		
		50	710.239	70.76		
		대조군	2428.92			
두 배치의 평균					88.78±6.37	13.54±0.97

<94>

<95> **토의**

<96> 실험에서는, B형 간염 바이러스가 트랜스펙션된 인간 간암 세포 2215 세포주에에 대한, 아르기나제 및 항-B형 간염 바이러스 양의 대조군 약물인 라미부딘의 독성을 약물을 부가하고 8 일간 배양한 후에 관찰하였으며, 세포 배양물 상청액에서의 HBsAg 및 HBeAg 분비의 억제 및 세포에서의 HBV-DNA의 억제를 관찰하였다. 표 6에 이를 요약하였다.

【표 6】

2.2.15 세포의 HBV-DNA에 대한 아르기닌 및 라미부딘의 효과 요약

약물	세포 독성 IU/ml		HBeAg		HBsAg		세포 상청액 HBV-DNA		세포 HBV-DNA 서던 블랏			
	TC50	TC0	IC50 IU/ml	SI	IC50 IU/ml	SI	IC50 μg/ml	SI	IC50 μg/ml	SI	IC50 μg/ml	SI
아르기나제	40	20±0	6.37± 0.45	6.30± 0.45	①10.72 ②>20	①3.73 ②≦1	13.18± 4.05	3.19± 0.98	19.79± 7.95	2.19± 0.88	20.06± 1.96	2.00± 0.20
라미부딘	1198.97 ±97.50	800± 0 μg/ml	>800 μg/ml		-		>800 μg/ml	-	113.76	10.54	88.78± 6.37	13.54± 0.97

注: ① 제 1 배치, ② 제 2 배치

<97>

<98> **1. 2.2.15 세포에 대한 아르기나제 독성**

<99> 아르기나제의 TC50은 40 IU/mL이고, TC0은 20±0 IU/mL 이다.

<100> 양의 대조군 라미부딘의 TC50은 1198.97±97.50 μg/mL이고; TC0은 800±0 μg/mL이다.

<101> **2. 아르기나제 및 라미부딘에 의한 2.2.15 세포에서의 HBsAg 및 HBeAg의 분비 억제**

<102> TCO 20 IU/mL를 계열희석한 4 가지 농도의 아르기나제를 2.2.15 세포에 부가하고 8 일간 배양한 다음, 두 배치의 실험에서의 HBeAg 분비에 대한 평균 억제율은 68.69±8.89% 이고, HBeAg에 대한 IC50은 6.37±0.45 IU/mL이고, SI는 6.30±0.45이다. HBsAg의 억제율은 29.81±27.35%이고, HBsAg에 대한 IC50은 제 1 배치는 10.72 IU/mL이고, SI는 3.73이고, 제 2 배치는 20 IU/mL 이다.

<103> 억제율은 50% 미만이고, IC50>20 IU/mL, SI:≤1이다. 두 배치의 실험에서 평균을 구하지 않았다.

<104> 라미부딘 TCO 800 ㎍/mL를 2.2.15 세포 배양물에 부가하고 8 일간 배양한 결과, HBeAg 및 HBsAg에 대한 현저한 억제 작용이 나타나지 않았다. 절반의 유효농도 및 SI는 계산할 수 없었다.

<105> **3. 아르기나제 및 라미부딘에 의한 2.2.15 세포에서의 HBV-DNA 억제**

<106> 결과는 다음과 같이 나타났다: 약물을 부가하고 8 일간 배양한 후의 세포 배양물의 상청액으로부터의 HBV-DNA 도트 블랏에서의 아르기나제의 IC50은 13.18±4.05 IU/mL이고, SI는 3.19±0.98이다. 8일 후의 HBV-DNA 서던 블랏에서의 IC50은 19.79±7.95 IU/mL이고, SI는 2.19±0.88이다. 8일 후에 약물이 부가된 레인에서의(In Lane) HBV-DNA 도트 블랏에서의 IC50은 20.06±1.96 ㎍/mL이고, SI는 2.00±0.20이다.

<107> HBV-DNA 도트 블랏에서의 라미부딘의 IC50은 113.76 ㎍/mL이고, SI는 10.54이다. 서던 블랏의 억제에서, 두 배치 실험의 IC50은 각각 84.27 및 93.28 ㎍/mL이고, 평균은 88.78±6.37 ㎍/mL이고, TC50은 1198.97 ㎍/mL이고, SI는 각각 14.23 및 12.85이고, 평균은 13.54±0.97이다.

<108> 본 명세서 및 첨부된 청구범위에서 사용된 "a" 및 "the"는 문맥상 명백히 달리 나타내지 않는다면 복수를 포함한다. 따라서, 예를 들어 "약제학적 제제"에 대한 언급은 서로 다른 제제들의 혼합을 포함하고, "치료방법"에 대한 언급은 동등한 단계 및 당해 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 공지된 방법 등에 대한 언급을 포함한다.

<109> 달리 정의하지 않는다면, 본 명세서에 사용된 모든 기술적인 용어 및 과학적 용어는 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자가 통상적으로 알고 있는 것과 동일한 의미를 갖는다. 본 명세서에 기재된 것과 유사하거나 동등한 임의의 방법 및 물질이 본 발명의 실시 또는 시험에 사용될 수 있다고 할지라도, 바람직한 방법 및 물질은 본 명세서에 기재된 것이다. 본 명세서에 기재된 모든 문헌은 참고로 본 명세서에 통합되어, 참고로 하는 구체적인 정보를 기재하고 개시하고 있다. 본 발명은 충분히 설명되었기 때문에, 본 발명의 범위 내에 해당하는 변형은 당해 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 명백할 것이다. 그러한 모든 변형은 본 발명의 범위 내에 해당한다.

<110> 본 발명의 약제학적 조성물의 제제는 고체, 용액제, 유제, 분산제, 미셀, 리포좀 등의 형태로 이용될 수 있으며, 여기에서 그 결과 생성된 제제는 활성성분으로서 본 발명의 실시에서 하나 이상의 변형된 인간 아르기나제를, 경구 또는 비경구 적용에 적절한 유기 또는 무기 담체 또는 부형제와 함께 함유한다. 활성성분은 아르기나제일 수 있으며, 예를 들어 정제, 펠렛, 캅셀, 좌제, 용액제, 유제, 현탁제 및 제제를 제조하는데 이용하기에 적절한 다른 임의의 형태에 통상적인 비독성의 약제학적으로 허용 가능한 담체와 함께, 고체, 반고체, 또는 액체 형태로 제조될 수 있다. 또한, 부형제, 안정화제, 점증제, 및 착색제와 방향제가 이용될 수 있다. 하나 이상의 아르기나제 활성성분이 표적 과정, 상태, 또는 질병에 원하는 효과를 생성시키기에 충분한 양으로 약제학적 제제에 포함된다.

<111> 본 명세서에서 고안된 활성성분을 포함하는 약제학적 조성물은 경구적 사용에 적절한 형태, 예를 들어 정제, 트로키, 로젠지, 수성 또는 유상 현탁제, 분산 가능한 산제 또는 과립제, 유제, 경질 캅셀 또는 연질 캅셀, 또는 시럽이나 엘릭실제일 수 있다. 경구적 사용을 위한 제제는 약제학적 제제의 제조에 관해 당해 기술분야에 공지된 임의의 방법에 따라 제조될 수 있다. 정제는 코팅되지 않을 수도 있고, 위장관에서의 붕해 및 흡수를 지연시킴으로써 더 오랜 시간동안 지속적인 작용을 제공하기 위해 공지된 방법에 의해 코팅될 수도 있다. 정제는 또한 제어된 방출을 위한 삼투압 치료 정제를 형성하기 위해 코팅될 수도 있다.

<112> 어떤 경우에, 경구 제제는 활성성분을 불활성의 고체 희석제, 예를 들어 탄산칼슘, 인산칼슘, 카올린 등과 같은 불활성의 고체 희석제와 함께 혼합하여, 경질 젤라틴 캅셀의 형태로 이용될 수 있다. 경구 제제는 또한 활성성분을 물 또는 오일 매질, 예를 들어 땅콩유, 액상 파라핀, 또는 올리브유와 혼합하여 연질 젤라틴 캅셀의 형태로 이용될 수 있다.

<113> 약제학적 제제는 또한 멸균의 주사 가능한 용액제 또는 현탁제의 형태일 수 있다. 현탁제는 적절한 분산제 또

는 습윤제, 및 현탁화제를 이용하여 공지된 방법에 따라 제제화될 수 있다. 멸균의 주사 가능한 제제는 또한 비독성의 주사에 적합한 희석제 또는 용매 중의 멸균의 주사 가능한 용액제 또는 현탁제, 예를 들어 1,4-부탄디올 중의 용액일 수 있다. 멸균의 비휘발성 오일이 통상적으로 용매 또는 현탁화 매질로서 이용된다. 이러한 목적을 위해, 임의의 비자극성인 비휘발성 오일이 이용될 수 있으며, 이러한 오일로는 합성 모노- 또는 디글리세라이드, 지방산(올레산 포함), 천연 식물유(예: 참기름, 코코넛 오일, 땅콩유, 면실유), 또는 합성 지방 매체(예: 에틸 올레에이트) 등이 포함된다. 완충제, 덱스트로오스 용액 보존제, 항산화제 등이 필요로 하는 용해 가능한 효소를 녹이기 위한 용질로서 통합되거나 이용될 수 있다.

<114> 본 발명의 약제학적 제제는 다른 화학요법제와 함께 보조적인 치료로서 이용될 수도 있다.

<115>

도면의 간단한 설명

<16> 도 1a, 1b, 및 1c는 인간 아르기나제 I의 핵산 서열 및 해당 아미노산 서열이다.

<17> 도 1a는 플라스미드 pAB101의 EcoRI/MunI 내지 XbaI 위치의 핵산 서열(SEQ ID NO: 1)이다. EcoRI/MunI 위치, 핵산 (nt)1-6; 프로모터 1의 -35 부위, nt 481-486; 프로모터 1의 -10 부위, nt 504-509; 프로모터 2의 -35 부위, nt 544-549; 프로모터 2의 -10 부위, nt 566-571; 리보솜 결합 부위, nt 600-605; 개시 코돈, nt 614-616; NdeI 부위, nt 632-637; 종결 코돈, nt 1601-1603; XbaI 부위, nt 1997-2002.

<18> 도 1b는 변형된 인간 핵산 아르기나제의 핵산 서열(SEQ ID NO: 2) 및 그것의 해당 아미노산 서열(SEQ ID NO: 3)이다. 도 1a에서의 핵산 614-1603은 변형된 아르기나제 아미노산 서열의 암호화 부위이다. N-말단에서의 6 개의 히스티딘(SEQ ID NO: 4)는 밑줄을 그어 나타내었다. 변역 종결 코돈은 *로 표시하였다.

<19> 도 1c는 정상적인 인간 아르기나제 I의 핵산 서열(SEQ ID NO: 8) 및 그의 해당 아미노산 서열(SEQ ID NO: 9)이다.

도면

도면1a

```
   1 gaattgtacg tcaaagagat gaagcagaaa aacgtcgtcg agaagaagct gaacgacaaa
  61 aagtgaaatg cgagggaagt ccaagaaatg gtgattatga gggtgtctat ttcaccaaaa
 121 acggagaata tttattggaa ttaagagtct ctgggactgc tcttgtaaat gctccttgta
 181 atttaaagga tattgacata acgaaatggt tgtgtaaaac agggagatta tatcttgata
 241 aggttaagaa atttgaaata gttactattc tttcccatga cgtagaaaat caaaagatta
 301 taacagaatg ggagtcactc cccagagagg ctttacccga acaatttgat tcataagaac
 361 taattagtag cgctttccaa tggaggcgct tttttatttg ggtagttgca taccactaaa
 421 gatgttcagg tgcacatgag cattggagga aaggaacgct ttaggggaa gggaaacctt
 481 taaacagtct taatcccccc tgattttatg ttctctgtaa actgcgtccg gtaaatctca
 541 ggatagacaa tcggcggtta acggcttgag tgcgggggca gtttagaaag aatatgattg
 601 gagggattca tagatgcatc accatcacca tcatatgagc gccaagtcca gaaccatagg
 661 gattattgga gctcctttct caaagggaca gccacgagga ggggtggaag aaggccctac
 721 agtattgaga aaggctggtc tgcttgagaa acttaaagaa caagagtgtg atgtgaagga
 781 ttatggggac ctgccctttg ctgacatccc taatgacagt ccctttcaaa ttgtgaagaa
 841 tccaaggtct gtgggaaaag caagcgagca gctggctggc aaggtggcac aagtcaagaa
 901 gaacggaaga atcagcctgg tgctgggcgg agaccacagt ttggcaattg gaagcatctc
 961 tggccatgcc agggtccacc ctgatcttgg agtcatctgg gtggatgctc acactgatat
1021 caacactcca ctgacaacca caagtggaaa cttgcatgga caacctgtat ctttcctcct
1081 gaaggaacta aaaggaaaga ttcccgatgt gccaggattc tcctgggtga ctccctgtat
1141 atctgccaag gatattgtgt atattggctt gagagacgtg gaccctgggg aacactacat
1201 tttgaaaact ctaggcatta aatacttttc aatgactgaa gtggacagac taggaattgg
1261 caaggtgatg gaagaaacac tcagctatct actaggaaga aagaaaaggc caattcatct
1321 aagttttgat gttgacggac tggacccatc tttcacacca gctactggca caccagtcgt
1381 gggaggtctg acatacagag aaggtctcta catcacagaa gaaatctaca aaacagggct
1441 actctcagga ttagatataa tggaagtgaa cccatccctg gggaagacac cagaagaagt
1501 aactcgaaca gtgaacacag cagttgcaat aaccttggct tgtttcggac ttgctcggga
1561 gggtaatcac aagcctattg actaccttaa cccacctaag taaatgtgga aacatccgat
1621 ataaatctca tagttaatgg cataattaga aagctaatca ttttcttaag catagagtta
1681 tccttctaaa gacttgttct ttcagaaaaa tgtttttcca attagtataa actctacaaa
1741 ttccctcttg gtgtaaaatt caagatgtgg aaattctaac ttttttgaaa tttaaaagct
1801 tatattttct aacttggcaa aagacttatc cttagaaaga gaagtgtaca ttgatttcca
1861 attaaaaatt tgctggcatt aaaaataagc acacttacat aagccccccat acatagagtg
1921 ggactcttgg aatcaggaga caaagctacc acatgtggaa aggtactatg tgtccatgtc
1981 attcaaaaaa tgtgattcta ga
```

도면1b

```
                      1  atgcatcaccatcaccatcat
                         M  H  H  H  H  H  H
 22 atgagcgccaagtccagaaccatagggattattggagctcctttc
    M  S  A  K  S  R  T  I  G  I  I  G  A  P  F
 67 tcaaagggacagccacgaggaggggtggaagaaggccctacagta
    S  K  G  Q  P  R  G  G  V  E  E  G  P  T  V
112 ttgagaaaggctggtctgcttgagaaacttaaagaacaagagtgt
    L  R  K  A  G  L  L  E  K  L  K  E  Q  E  C
157 gatgtgaaggattatggggacctgccctttgctgacatccctaat
    D  V  K  D  Y  G  D  L  P  F  A  D  I  P  N
202 gacagtccctttcaaattgtgaagaatccaaggtctgtgggaaaa
    D  S  P  F  Q  I  V  K  N  P  R  S  V  G  K
247 gcaagcgagcagctggctggcaaggtggcacaagtcaagaagaac
    A  S  E  Q  L  A  G  K  V  A  Q  V  K  K  N
292 ggaagaatcagcctggtgctgggcggagaccacagtttggcaatt
    G  R  I  S  L  V  L  G  G  D  H  S  L  A  I
337 ggaagcatctctggccatgccagggtccaccctgatcttggagtc
    G  S  I  S  G  H  A  R  V  H  P  D  L  G  V
382 atctgggtggatgctcacactgatatcaacactccactgacaacc
    I  W  V  D  A  H  T  D  I  N  T  P  L  T  T
427 acaagtggaaacttgcatggacaacctgtatctttcctcctgaag
    T  S  G  N  L  H  G  Q  P  V  S  F  L  L  K
472 gaactaaaaggaaagattcccgatgtgccaggattctcctgggtg
    E  L  K  G  K  I  P  D  V  P  G  F  S  W  V
517 actccctgtatatctgccaaggatattgtgtatattggcttgaga
    T  P  C  I  S  A  K  D  I  V  Y  I  G  L  R
562 gacgtggaccctggggaacactacattttgaaaactctaggcatt
    D  V  D  P  G  E  H  Y  I  L  K  T  L  G  I
607 aaatacttttcaatgactgaagtggacagactaggaattggcaag
    K  Y  F  S  M  T  E  V  D  R  L  G  I  G  K
652 gtgatggaagaaacactcagctatctactaggaagaaagaaaagg
    V  M  E  E  T  L  S  Y  L  L  G  R  K  K  R
697 ccaattcatctaagttttgatgttgacggactggacccatctttc
    P  I  H  L  S  F  D  V  D  G  L  D  P  S  F
742 acaccagctactggcacaccagtcgtgggaggtctgacatacaga
    T  P  A  T  G  T  P  V  V  G  G  L  T  Y  R
787 gaaggtctctacatcacagaagaaatctacaaaacagggctactc
    E  G  L  Y  I  T  E  E  I  Y  K  T  G  L  L
832 tcaggattagatataatggaagtgaacccatccctggggaagaca
    S  G  L  D  I  M  E  V  N  P  S  L  G  K  T
877 ccagaagaagtaactcgaacagtgaacacagcagttgcaataacc
    P  E  E  V  T  R  T  V  N  T  A  V  A  I  T
922 ttggcttgtttcggacttgctcgggagggtaatcacaagcctatt
    L  A  C  F  G  L  A  R  E  G  N  H  K  P  I
967 gactaccttaacccacctaagtaa 990
    D  Y  L  N  P  P  K  *
```

도면1c

```
  1 atgagcgccaagtccagaaccatagggattattggagctcctttc
    M  S  A  K  S  R  T  I  G  I  I  G  A  P  F
 46 tcaaagggacagccacgaggaggggtggaagaaggccctacagta
    S  K  G  Q  P  R  G  G  V  E  E  G  P  T  V
 91 ttgagaaaggctggtctgcttgagaaacttaaagaacaagagtgt
    L  R  K  A  G  L  L  E  K  L  K  E  Q  E  C
136 gatgtgaaggattatggggacctgccctttgctgacatccctaat
    D  V  K  D  Y  G  D  L  P  F  A  D  I  P  N
181 gacagtccctttcaaattgtgaagaatccaaggtctgtgggaaaa
    D  S  P  F  Q  I  V  K  N  P  R  S  V  G  K
226 gcaagcgagcagctggctggcaaggtggcacaagtcaagaagaac
    A  S  E  Q  L  A  G  K  V  A  Q  V  K  K  N
271 ggaagaatcagcctggtgctgggcggagaccacagtttggcaatt
    G  R  I  S  L  V  L  G  G  D  H  S  L  A  I
316 ggaagcatctctggccatgccagggtccaccctgatcttggagtc
    G  S  I  S  G  H  A  R  V  H  P  D  L  G  V
361 atctgggtggatgctcacactgatatcaacactccactgacaacc
    I  W  V  D  A  H  T  D  I  N  T  P  L  T  T
406 acaagtggaaacttgcatggacaacctgtatctttcctcctgaag
    T  S  G  N  L  H  G  Q  P  V  S  F  L  L  K
451 gaactaaaaggaaagattcccgatgtgccaggattctcctgggtg
    E  L  K  G  K  I  P  D  V  P  G  F  S  W  V
496 actccctgtatatctgccaaggatattgtgtatattggcttgaga
    T  P  C  I  S  A  K  D  I  V  Y  I  G  L  R
541 gacgtggaccctggggaacactacattttgaaaactctaggcatt
    D  V  D  P  G  E  H  Y  I  L  K  T  L  G  I
586 aaatacttttcaatgactgaagtggacagactaggaattggcaag
    K  Y  F  S  M  T  E  V  D  R  L  G  I  G  K
631 gtgatggaagaaacactcagctatctactaggaagaaagaaaagg
    V  M  E  E  T  L  S  Y  L  L  G  R  K  K  R
676 ccaattcatctaagttttgatgttgacggactggacccatctttc
    P  I  H  L  S  F  D  V  D  G  L  D  P  S  F
721 acaccagctactggcacaccagtcgtgggaggtctgacatacaga
    T  P  A  T  G  T  P  V  V  G  G  L  T  Y  R
766 gaaggtctctacatcacagaagaaatctacaaaacagggctactc
    E  G  L  Y  I  T  E  E  I  Y  K  T  G  L  L
811 tcaggattagatataatggaagtgaacccatccctggggaagaca
    S  G  L  D  I  M  E  V  N  P  S  L  G  K  T
856 ccagaagaagtaactcgaacagtgaacacagcagttgcaataacc
    P  E  E  V  T  R  T  V  N  T  A  V  A  I  T
901 ttggcttgtttcggacttgctcgggagggtaatcacaagcctatt
    L  A  C  F  G  L  A  R  E  G  N  H  K  P  I
946 gactaccttaacccacctaagtaa 969
    D  Y  L  N  P  P  K  *
```

서열목록

<110> 영댐努浪옰세唐掘무鰱(BIO-CANCER TREATMENT INTERNATIONAL LIMITED)
練퀼췽 (CHENG, Ning M)

<120> Pharmaceutical Composition and Method of Treating Hepatitis with Arginases

<130> UP-050371-59

<140> PCT/CN2005/001411

<141> 2005-09-06

<160> 9

<170> PatentIn version 3.2

<210> 1

<211> 2002

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 1
gaattgtacg tcaaagagat gaagcagaaa aacgtcgtcg agaagaagct gaacgacaaa 60

aagtgaaatg cgagggaagt ccaagaaatg gtgattatga gggtgtctat ttcaccaaaa 120

acggagaata tttattggaa ttaagagtct ctgggactgc tcttgtaaat gctccttgta 180

atttaaagga tattgacata acgaaatggt tgtgtaaaac agggagatta tatcttgata 240

aggttaagaa atttgaaata gttactattc tttcccatga cgtagaaaat caaaagatta 300

taacagaatg ggagtcactc cccagagagg ctttacccga acaatttgat tcataagaac 360

taattagtag cgctttccaa tggaggcgct tttttatttg ggtagttgca taccactaaa 420

gatgttcagg tgcacatgag cattggagga aaggaacgct ttaggggggaa gggaaacctt 480

taaacagtct taatcccccct tgattttatg ttctctgtaa actgcgtccg gtaaatctca 540

ggatagacaa tcggcggtta acggcttgag tgcgggggca gtttagaaag aatatgattg 600

gagggattca tagatgcatc accatcacca tcatatgagc gccaagtcca gaaccatagg 660

gattattgga gctcctttct caaagggaca gccacgagga ggggtggaag aaggccctac 720

agtattgaga aaggctggtc tgcttgagaa acttaaagaa caagagtgtg atgtgaagga 780

ttatggggac ctgccctttg ctgacatccc taatgacagt ccctttcaaa ttgtgaagaa 840

tccaaggtct gtgggaaaag caagcgagca gctggctggc aaggtggcac aagtcaagaa 900

gaacggaaga atcagcctgg tgctgggcgg agaccacagt ttggcaattg gaagcatctc 960

tggccatgcc agggtccacc ctgatcttgg agtcatctgg gtggatgctc acactgatat 1020

caacactcca ctgacaacca caagtggaaa cttgcatgga caacctgtat ctttcctcct 1080

gaaggaacta aaaggaaaga ttcccgatgt gccaggattc tcctgggtga ctccctgtat 1140

atctgccaag gatattgtgt atattggctt gagagacgtg gaccctgggg aacactacat 1200

tttgaaaact ctaggcatta aatacttttc aatgactgaa gtggacagac taggaattgg 1260

caaggtgatg gaagaaacac tcagctatct actaggaaga aagaaaaggc caattcatct 1320

aagttttgat gttgacggac tggacccatc tttcacacca gctactggca caccagtcgt 1380

gggaggtctg acatacagag aaggtctcta catcacagaa gaaatctaca aaacagggct 1440

actctcagga ttagatataa tggaagtgaa cccatccctg gggaagacac cagaagaagt 1500

aactcgaaca gtgaacacag cagttgcaat aaccttggct tgtttcggac ttgctcggga 1560

gggtaatcac aagcctattg actaccttaa cccacctaag taaatgtgga aacatccgat 1620

ataaatctca tagttaatgg cataattaga aagctaatca ttttcttaag catagagtta 1680

tccttctaaa gacttgttct ttcagaaaaa tgtttttcca attagtataa actctacaaa 1740

ttccctcttg gtgtaaaatt caagatgtgg aaattctaac ttttttgaaa tttaaaagct 1800

tatattttct aacttggcaa aagacttatc cttagaaaga gaagtgtaca ttgatttcca 1860

attaaaaatt tgctggcatt aaaaataagc acacttacat aagcccccat acatagagtg 1920

ggactcttgg aatcaggaga caaagctacc acatgtggaa aggtactatg tgtccatgtc 1980

attcaaaaaa tgtgattcta ga 2002

<210> 2

<211> 990

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>
<221> CDS

<222> (1)..(990)

<400> 2

```
atg cat cac cat cac cat cat atg agc gcc aag tcc aga acc ata ggg      48
Met His His His His His His Met Ser Ala Lys Ser Arg Thr Ile Gly
1               5                  10                  15

att att gga gct cct ttc tca aag gga cag cca cga gga ggg gtg gaa      96
Ile Ile Gly Ala Pro Phe Ser Lys Gly Gln Pro Arg Gly Gly Val Glu
            20                  25                  30

gaa ggc cct aca gta ttg aga aag gct ggt ctg ctt gag aaa ctt aaa     144
Glu Gly Pro Thr Val Leu Arg Lys Ala Gly Leu Leu Glu Lys Leu Lys
        35                  40                  45

gaa caa gag tgt gat gtg aag gat tat ggg gac ctg ccc ttt gct gac     192
Glu Gln Glu Cys Asp Val Lys Asp Tyr Gly Asp Leu Pro Phe Ala Asp
    50                  55                  60

atc cct aat gac agt ccc ttt caa att gtg aag aat cca agg tct gtg     240
Ile Pro Asn Asp Ser Pro Phe Gln Ile Val Lys Asn Pro Arg Ser Val
65                  70                  75                  80

gga aaa gca agc gag cag ctg gct ggc aag gtg gca caa gtc aag aag     288
Gly Lys Ala Ser Glu Gln Leu Ala Gly Lys Val Ala Gln Val Lys Lys
                85                  90                  95

aac gga aga atc agc ctg gtg ctg ggc gga gac cac agt ttg gca att     336
```

```
Asn Gly Arg Ile Ser Leu Val Leu Gly Gly Asp His Ser Leu Ala Ile
            100                 105                 110

gga agc atc tct ggc cat gcc agg gtc cac cct gat ctt gga gtc atc      384
Gly Ser Ile Ser Gly His Ala Arg Val His Pro Asp Leu Gly Val Ile
        115                 120                 125

tgg gtg gat gct cac act gat atc aac act cca ctg aca acc aca agt      432
Trp Val Asp Ala His Thr Asp Ile Asn Thr Pro Leu Thr Thr Thr Ser
    130                 135                 140

gga aac ttg cat gga caa cct gta tct ttc ctc ctg aag gaa cta aaa      480
Gly Asn Leu His Gly Gln Pro Val Ser Phe Leu Leu Lys Glu Leu Lys
145                 150                 155                 160

gga aag att ccc gat gtg cca gga ttc tcc tgg gtg act ccc tgt ata      528

Gly Lys Ile Pro Asp Val Pro Gly Phe Ser Trp Val Thr Pro Cys Ile
                165                 170                 175

tct gcc aag gat att gtg tat att ggc ttg aga gac gtg gac cct ggg      576
Ser Ala Lys Asp Ile Val Tyr Ile Gly Leu Arg Asp Val Asp Pro Gly
            180                 185                 190

gaa cac tac att ttg aaa act cta ggc att aaa tac ttt tca atg act      624
Glu His Tyr Ile Leu Lys Thr Leu Gly Ile Lys Tyr Phe Ser Met Thr
        195                 200                 205

gaa gtg gac aga cta gga att ggc aag gtg atg gaa gaa aca ctc agc      672
Glu Val Asp Arg Leu Gly Ile Gly Lys Val Met Glu Glu Thr Leu Ser
    210                 215                 220

tat cta cta gga aga aag aaa agg cca att cat cta agt ttt gat gtt      720
Tyr Leu Leu Gly Arg Lys Lys Arg Pro Ile His Leu Ser Phe Asp Val
225                 230                 235                 240

gac gga ctg gac cca tct ttc aca cca gct act ggc aca cca gtc gtg      768
Asp Gly Leu Asp Pro Ser Phe Thr Pro Ala Thr Gly Thr Pro Val Val
                245                 250                 255

gga ggt ctg aca tac aga gaa ggt ctc tac atc aca gaa gaa atc tac      816
Gly Gly Leu Thr Tyr Arg Glu Gly Leu Tyr Ile Thr Glu Glu Ile Tyr
            260                 265                 270
```

```
aaa aca ggg cta ctc tca gga tta gat ata atg gaa gtg aac cca tcc      864
Lys Thr Gly Leu Leu Ser Gly Leu Asp Ile Met Glu Val Asn Pro Ser
        275                 280                 285

ctg ggg aag aca cca gaa gaa gta act cga aca gtg aac aca gca gtt      912
Leu Gly Lys Thr Pro Glu Glu Val Thr Arg Thr Val Asn Thr Ala Val
    290                 295                 300

gca ata acc ttg gct tgt ttc gga ctt gct cgg gag ggt aat cac aag      960
Ala Ile Thr Leu Ala Cys Phe Gly Leu Ala Arg Glu Gly Asn His Lys
305                 310                 315                 320

cct att gac tac ctt aac cca cct aag taa                             990
Pro Ile Asp Tyr Leu Asn Pro Pro Lys
                325
```

<210> 3

<211> 329

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 3

```
Met His His His His His His Met Ser Ala Lys Ser Arg Thr Ile Gly
1               5                   10                  15

Ile Ile Gly Ala Pro Phe Ser Lys Gly Gln Pro Arg Gly Gly Val Glu
            20                  25                  30

Glu Gly Pro Thr Val Leu Arg Lys Ala Gly Leu Leu Glu Lys Leu Lys
        35                  40                  45

Glu Gln Glu Cys Asp Val Lys Asp Tyr Gly Asp Leu Pro Phe Ala Asp
    50                  55                  60

Ile Pro Asn Asp Ser Pro Phe Gln Ile Val Lys Asn Pro Arg Ser Val
65                  70                  75                  80
```

Gly Lys Ala Ser Glu Gln Leu Ala Gly Lys Val Ala Gln Val Lys Lys
85 90 95

Asn Gly Arg Ile Ser Leu Val Leu Gly Gly Asp His Ser Leu Ala Ile
100 105 110

Gly Ser Ile Ser Gly His Ala Arg Val His Pro Asp Leu Gly Val Ile
115 120 125

Trp Val Asp Ala His Thr Asp Ile Asn Thr Pro Leu Thr Thr Thr Ser
130 135 140

Gly Asn Leu His Gly Gln Pro Val Ser Phe Leu Leu Lys Glu Leu Lys
145 150 155 160

Gly Lys Ile Pro Asp Val Pro Gly Phe Ser Trp Val Thr Pro Cys Ile
165 170 175

Ser Ala Lys Asp Ile Val Tyr Ile Gly Leu Arg Asp Val Asp Pro Gly
180 185 190

Glu His Tyr Ile Leu Lys Thr Leu Gly Ile Lys Tyr Phe Ser Met Thr
195 200 205

Glu Val Asp Arg Leu Gly Ile Gly Lys Val Met Glu Glu Thr Leu Ser
210 215 220

Tyr Leu Leu Gly Arg Lys Lys Arg Pro Ile His Leu Ser Phe Asp Val
225 230 235 240

Asp Gly Leu Asp Pro Ser Phe Thr Pro Ala Thr Gly Thr Pro Val Val
245 250 255

Gly Gly Leu Thr Tyr Arg Glu Gly Leu Tyr Ile Thr Glu Glu Ile Tyr
260 265 270

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

275 280 285

Leu Gly Lys Thr Pro Glu Glu Val Thr Arg Thr Val Asn Thr Ala Val
290 295 300

Ala Ile Thr Leu Ala Cys Phe Gly Leu Ala Arg Glu Gly Asn His Lys
305 310 315 320

Pro Ile Asp Tyr Leu Asn Pro Pro Lys
325

<210> 4

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial

<220>
<223> His Tag

<220>
<221> MISC_FEATURE

<222> (2)..(7)

<223> 6x HIS TAG

<400> 4

Met His His His His His His
1 5

<210> 5

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> primer

<220>
<221> misc_feature

<223> PCR primer

<400> 5
ccaaaccata tgagcgccaa gtccagaacc ata 33

<210> 6

<211> 39

<212> DNA

<213> Artificial

<220>
<223> primer

<220>
<221> misc_feature

<223> PCR primer

<400> 6
ccaaactcta gaatcacatt ttttgaatga catggacac 39

<210> 7

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial

<220>
<223> primer

<220>
<221> misc_feature

<223> sequencing primer

<400> 7
ctctggccat gccagggtcc accc 24

<210> 8

<211> 969

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>
<221> CDS

<222> (1)..(969)

<400> 8
atg agc gcc aag tcc aga acc ata ggg att att gga gct cct ttc tca 48
Met Ser Ala Lys Ser Arg Thr Ile Gly Ile Ile Gly Ala Pro Phe Ser
1 5 10 15

aag gga cag cca cga gga ggg gtg gaa gaa ggc cct aca gta ttg aga 96
Lys Gly Gln Pro Arg Gly Gly Val Glu Glu Gly Pro Thr Val Leu Arg
20 25 30

aag gct ggt ctg ctt gag aaa ctt aaa gaa caa gag tgt gat gtg aag 144
Lys Ala Gly Leu Leu Glu Lys Leu Lys Glu Gln Glu Cys Asp Val Lys
35 40 45

gat tat ggg gac ctg ccc ttt gct gac atc cct aat gac agt ccc ttt 192
Asp Tyr Gly Asp Leu Pro Phe Ala Asp Ile Pro Asn Asp Ser Pro Phe
50 55 60

caa att gtg aag aat cca agg tct gtg gga aaa gca agc gag cag ctg 240
Gln Ile Val Lys Asn Pro Arg Ser Val Gly Lys Ala Ser Glu Gln Leu
65 70 75 80

gct ggc aag gtg gca caa gtc aag aag aac gga aga atc agc ctg gtg 288
Ala Gly Lys Val Ala Gln Val Lys Lys Asn Gly Arg Ile Ser Leu Val
85 90 95

ctg ggc gga gac cac agt ttg gca att gga agc atc tct ggc cat gcc 336
Leu Gly Gly Asp His Ser Leu Ala Ile Gly Ser Ile Ser Gly His Ala

```
            100                 105                 110

agg gtc cac cct gat ctt gga gtc atc tgg gtg gat gct cac act gat      384
Arg Val His Pro Asp Leu Gly Val Ile Trp Val Asp Ala His Thr Asp
        115                 120                 125

atc aac act cca ctg aca acc aca agt gga aac ttg cat gga caa cct      432
Ile Asn Thr Pro Leu Thr Thr Thr Ser Gly Asn Leu His Gly Gln Pro
    130                 135                 140

gta tct ttc ctc ctg aag gaa cta aaa gga aag att ccc gat gtg cca      480
Val Ser Phe Leu Leu Lys Glu Leu Lys Gly Lys Ile Pro Asp Val Pro
145                 150                 155                 160

gga ttc tcc tgg gtg act ccc tgt ata tct gcc aag gat att gtg tat      528
Gly Phe Ser Trp Val Thr Pro Cys Ile Ser Ala Lys Asp Ile Val Tyr
                165                 170                 175

att ggc ttg aga gac gtg gac cct ggg gaa cac tac att ttg aaa act      576
Ile Gly Leu Arg Asp Val Asp Pro Gly Glu His Tyr Ile Leu Lys Thr
            180                 185                 190

cta ggc att aaa tac ttt tca atg act gaa gtg gac aga cta gga att      624
Leu Gly Ile Lys Tyr Phe Ser Met Thr Glu Val Asp Arg Leu Gly Ile
        195                 200                 205

ggc aag gtg atg gaa gaa aca ctc agc tat cta cta gga aga aag aaa      672
Gly Lys Val Met Glu Glu Thr Leu Ser Tyr Leu Leu Gly Arg Lys Lys
    210                 215                 220

agg cca att cat cta agt ttt gat gtt gac gga ctg gac cca tct ttc      720
Arg Pro Ile His Leu Ser Phe Asp Val Asp Gly Leu Asp Pro Ser Phe
225                 230                 235                 240

aca cca gct act ggc aca cca gtc gtg gga ggt ctg aca tac aga gaa      768
Thr Pro Ala Thr Gly Thr Pro Val Val Gly Gly Leu Thr Tyr Arg Glu
                245                 250                 255

ggt ctc tac atc aca gaa gaa atc tac aaa aca ggg cta ctc tca gga      816
Gly Leu Tyr Ile Thr Glu Glu Ile Tyr Lys Thr Gly Leu Leu Ser Gly
            260                 265                 270

tta gat ata atg gaa gtg aac cca tcc ctg ggg aag aca cca gaa gaa      864
Leu Asp Ile Met Glu Val Asn Pro Ser Leu Gly Lys Thr Pro Glu Glu
```

275 280 285

gta act cga aca gtg aac aca gca gtt gca ata acc ttg gct tgt ttc 912
Val Thr Arg Thr Val Asn Thr Ala Val Ala Ile Thr Leu Ala Cys Phe
290 295 300

gga ctt gct cgg gag ggt aat cac aag cct att gac tac ctt aac cca 960

Gly Leu Ala Arg Glu Gly Asn His Lys Pro Ile Asp Tyr Leu Asn Pro
305 310 315 320

cct aag taa 969
Pro Lys

<210> 9

<211> 322

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 9

Met Ser Ala Lys Ser Arg Thr Ile Gly Ile Ile Gly Ala Pro Phe Ser
1 5 10 15

Lys Gly Gln Pro Arg Gly Gly Val Glu Glu Gly Pro Thr Val Leu Arg
20 25 30

Lys Ala Gly Leu Leu Glu Lys Leu Lys Glu Gln Glu Cys Asp Val Lys
35 40 45

Asp Tyr Gly Asp Leu Pro Phe Ala Asp Ile Pro Asn Asp Ser Pro Phe
50 55 60

Gln Ile Val Lys Asn Pro Arg Ser Val Gly Lys Ala Ser Glu Gln Leu
65 70 75 80

Ala Gly Lys Val Ala Gln Val Lys Lys Asn Gly Arg Ile Ser Leu Val
85 90 95

Leu Gly Gly Asp His Ser Leu Ala Ile Gly Ser Ile Ser Gly His Ala
100 105 110

Arg Val His Pro Asp Leu Gly Val Ile Trp Val Asp Ala His Thr Asp
115 120 125

Ile Asn Thr Pro Leu Thr Thr Thr Ser Gly Asn Leu His Gly Gln Pro
130 135 140

Val Ser Phe Leu Leu Lys Glu Leu Lys Gly Lys Ile Pro Asp Val Pro
145 150 155 160

Gly Phe Ser Trp Val Thr Pro Cys Ile Ser Ala Lys Asp Ile Val Tyr
165 170 175

Ile Gly Leu Arg Asp Val Asp Pro Gly Glu His Tyr Ile Leu Lys Thr
180 185 190

Leu Gly Ile Lys Tyr Phe Ser Met Thr Glu Val Asp Arg Leu Gly Ile
195 200 205

Gly Lys Val Met Glu Glu Thr Leu Ser Tyr Leu Leu Gly Arg Lys Lys
210 215 220

Arg Pro Ile His Leu Ser Phe Asp Val Asp Gly Leu Asp Pro Ser Phe
225 230 235 240

Thr Pro Ala Thr Gly Thr Pro Val Val Gly Gly Leu Thr Tyr Arg Glu
245 250 255

Gly Leu Tyr Ile Thr Glu Glu Ile Tyr Lys Thr Gly Leu Leu Ser Gly
260 265 270

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

275 280 285

Val Thr Arg Thr Val Asn Thr Ala Val Ala Ile Thr Leu Ala Cys Phe
290 295 300

Gly Leu Ala Arg Glu Gly Asn His Lys Pro Ile Asp Tyr Leu Asn Pro
305 310 315 320

Pro Lys