(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(51) Int. Cl.[6]
C12N 15/70

(11) 공개번호 특1996-0014346
(43) 공개일자 1996년05월22일

(21) 출원번호 특1994-0016792
(22) 출원일자 1994년07월13일
(30) 우선권주장 P 43 23 754.1 1993년07월15일 독일(DE)
(71) 출원인 그뤼넨탈 게엠베하 프란쯔 비르츠, 파우쓰-베르크후스
독일연방공화국 데-52078 아켄 지글러슈트라쎄 6
(72) 발명자 게르트 요트. 슈테펜즈
독일연방공화국 데-52072 아켄 무페터 베크 50
슈테판 브렌츠
독일연방공화국 데-52066 아켄-포르스트 알트슈트라쎄 19
요하네스 슈나이더
독일연방공화국 데-52223 스톨베르크 롤란트슈트라쎄 40
레기나 하인젤-비란트
독일연방공화국 데-52078 아켄 후베르투스베크 19
드렉 죤 손더스
독일연방공화국 데-52072 아켄 포르슈터슈트라쎄 19
(74) 대리인 이병호, 최달용

심사청구 : 없음

(54) 개선된 피브린용해 특성 및 트롬빈-억제 활성을 갖는 이작용성 유로키나제 변이체

요약

본 발명은 개선된 피브린 용액 특성 및 트롬빈 억제 활성을 갖는 이작용성 유리키나제 변이체, 이들 폴리펩타이드를 제조하는데 사용되는 플라스미드 및 활성성분으로서 하나의 이작용성 유로키나제 변이체를 함유하는 혈전 용해제에 관한 것이다.

대표도

도1

명세서

[발명의 명칭]

개선된 피브린용해 특성 및 트롬빈-억제 활성을 갖는 이작용성 유로키나제 변이체

[도면의 간단한 설명]

제1도는 본 발명에 따른 대표적인 이작용성 유로키나제의 아미노산 서열을 나타낸다.

제2도는 본 발명의 이작용성 유로키나제 변이체를 암호화하는 유전자를 발현시키기 위한 발현 플라스미드의 작제 단계들을 개괄적으로나타낸 것이고,

제2a도 내지 제2p도는 이들 단계를보다 상세히 설명하는 도면들이다.

제3도는 트롬빈 시간의 농도 의존성 증가를 나타낸다.

본 내용은 요부공개 건이므로 전문 내용을 수록하지 않았음

(57) 청구의 범위

청구항 1

일반식(I)의 이작용성 유로키나제 변이체.

$$M4-X_1-Y_1 \qquad (I)$$

상기식에서, M4는 제1도에 따른 비글리코실화 프로유로키나제의 47Ser 내지 411Leu의 아미노산 서열을 나타내고, X1은 M4와 Y1간의 결합을 나타내거나 또는 펩타이드 서열 Ser-Pro-Pro-Ser-Pro-Pro-Gly-Gly-Phe 또는 Ser-Pro-Pro-Ser-Pro-Ser-Pro-Pro-Gly-Gly-Phe 또는 Ser-Pro-Pro-Ser-Pro-Pro-Ser-Pro-Pro-Gly-Gly-Phe-Gly 또는 일반식(II)의 펩타이드 서열

$$Ser-X_2-X_3-X_4-X_5-X_6-X_7 \qquad (II)$$

(여기에서, X_2은 Pro 또는 Leu이고, X_3은 Val 또는 Pro이며, X_4은 Lys, Val, Arg, Gly 또는 Glu이고, X_5은 Ala, Val, Gly, Leu 또는 Ile이며, X_6은 Phe, Trp, Tyr 또는 Val이며, X_7은 Gly 또는 X_6과 Y_1사이의 직접 결합을 나타낸다)을 나타내며, Y_1는 펩타이드 서열 Y_2-Arg-Pro-Y_3-Gly-Gly-Gly-Gly-Asn-Gly-Asp-Phe-Glu-Glu-Ile-Pro-Glu-Glu-Tyr-Leu-T_4 또는 Y_2-Arg-Pro-Phe-Leu-Leu-Leu-Arg-Asn-Pro-Asn-Asp-Lys-Tyr-Glu-Pro-Phe-Trp-Glu-Asp-Glu-Glu-Glu-Lys-Asn-Glu 또는 Y_2-Arg-Pro-Ser-Ser-Glu-Phe-Glu-Glu-Phe-Glu-Ilu-Ile-Asp-Glu-Glu-Glu-Lys (여기서, Y_2는 Pro 또는 Val이고, Y_3는 Leu 또는 Pro와 Gly간의 직접 결합을 나타내고, Y_4은 Gln 또는 하이드록실 그룹이다)을 나타낸다.

청구항 2

제1항에 있어서, Y_1이 하기 서열의 펩타이드인 유로키나제 변이체.

$$Y_2-Arg-Pro-Y_3-Gly-Gly-Gly-Gly-Asn-Gly-Asp-Phe-Glu-Glu-Ile-Pro-Glu-Glu-Tyr-Leu-Y_4$$

청구항 3

제1항에 있어서, Y_1이 하기 서열의 펩타이드인 유로키나제 변이체.

$$Y_2-Arg-Pro-Phe-Leu-Leu-Arg-Asn-Pro-Asn-Asp-Lys-Tyr-Glu-Pro-Phe-Trp-Glu-Asp-Glu-Glu-Glu-Lys-Asn-Glu.$$

청구항 4

제1항 또는 제2항에 있어서, X_1이 일반식(II)의 펩타이드 서열을 나타내고, X_2가 Pro 또는 Leu이며,, X_3가 Val이고, X_4가 Lys, Val 또는 Arg이며, X_5가 Ala, Gly이고, X_6가 Phe, Trp, Tyr 또는 Val이며, X_7이 Gly 또는 X_6과 Y_1간의 직접 결합인 유로키나제 변이체.

청구항 5

제4항에 있어서, X_4가 Lys 또는 Val이고, X_5가 Ala 또는 Val이며, X_6가 Phe, Trp 또는 Tyr이고, X_7이 Gly 또는 X_6과 Y_1간의 직접 결합인 유로키나제 변이체.

청구항 6

제4항 또는 제5항에 있어서, X_7이 X_6과 Y_1간의 직접 결합인 유로키나제 변이체.

청구항 7

제1항 또는 제3항에 있어서, X_1이 일반식(II)의 펩타이드 서열을 나타내고, X_2가 Pro 또는 Leu이며, X_3가 Val이고, X_4가 Lys 또는 Val이고, X_5가 Ala 또는 Val이고, X_6이 Phe 또는 Trp이며, X_7이 X_6과 Y_1간의 직접 결합인 유로키나제 변이체.

청구항 8

오페론이 조절성 프로모터, 리보좀 결합 부위로서 효과적인 샤인-달가노(Shine-Dalgarno)서열, 출발코돈, 제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 따른 일반식(I)의 이작용성 유로키나제 변이치에 대한 합성 구조 유전자 및 구조 유전자 1 또는 2개의 종결자의 하류를 포함하고, 에스케리키아 콜라이 균주내에서 이작용서 유로키나제 변이체 중의 하나를 별현시키기에 적합함을 특징으로 하는, 제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 따른 이작용성 유로키나제 변이체 생산에 사용하기 위한 플라스미드.

청구항 9

제8항에 있어서, 샤인-달가노 서열이 출발 코돈으로부터 6 내지 12, 바람직하게는 8 내지 10개 뉴클레오타이드 만큼 이격된 플라스미드.

청구항 10

제8항 또는 제9항에 있어서, 그룹 pSJ69, pSJ76, pSJ77, pSJ79, pSJ81, pSJ83, pSJ90, pSJ91, pSJ93, pSJ94, pSJ95, pSJ101, pSJ102, pSJ104, pSJ105, pSJ106, pSJ109, pSJ111, pSJ114 및 pSJ113으로부터 선택된 플라스미드.

청구항 11

제10항에 있어서, 그룹 pSJ76, pSJ81, pSJ90, pSJ91, pSJ92, pSJ93, pSJ94, pSJ95, pSJ101, pSJ102, pSJ103, pSJ105, pSJ106, pSJ109, pSJ111 및 pSJ114로부터 선택된 플라스미드.

청구항 12

제10항 또는 제11항에 있어서, 그룹 pSJ76, pSJ81, pSJ83, pSJ91, pSJ94, pSJ95, pSJ101, pSJ102, pSJ103, pSJ106, pSJ109, pSJ111 및 pSJ114로부터 선택된 플라스미드.

청구항 13

제10항 내지 제13항 중 어느 한 항에 있어서, 그룹 pSJ76, pSJ94, pSJ101, pSJ102, pSJ103, pSJ106, pSJ109, pSJ111 및 pSJ114로부터 선택된 플라스미드.

청구항 14

제2도 및 제2a도 내지 제2p도에 따라 플라스미드 p블루 스크립트 KS II+, pUC8 및 PGR 201로부터 플라스미드를 작제함을 특징으로 하여, 제8항 내지 제13항 중 어느 한 항에 따른 플라스미드를 제조하는 방법.

청구항 15

에스카리키아 콜라이 균주를 제8항 내지 제13항 중 어느 한 항에 따른 플라스미드로 형질전환시키고, 구조 유전자의 발현을 유도하며, 이로써 생성되는 일반식(I)의 이작용성 유로키나제 변이체의 중간체 단백질을 매질 및 용해시킨 박테리아 세포로부터 분리하고, 이 중간체 단백질을 가용화시킨 후, 산화환원 시스템으로 재중첩시켜 일반식(I)의 폴리펩타이드를 형성시킴을 특징으로 하는, 제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 따른 일반식(I)의 이작용성 유로키나제 변이체를 생산하는데 사용하기 위한 제8항 내지 제13항 중 어느 한 항에 따른 플라스미드의 용도.

청구항 16

활성 성분으로서 제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 따른 일반식(I)의 이작용성 유로키나제 변이체를 함유하는 혈전용해제.

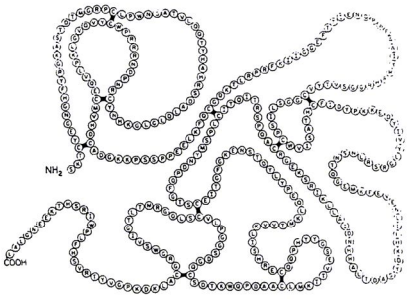
청구항 17

제16항에 있어서, 거환(bolus) 적용용으로 적합한 혈전용해제.

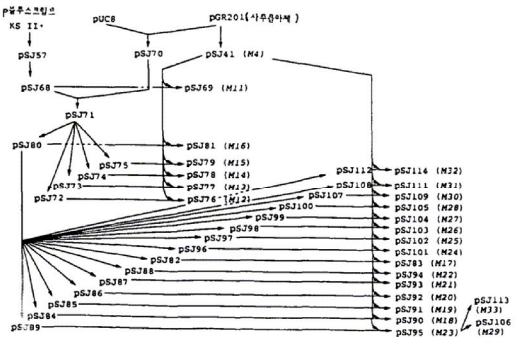
※ 참고사항 : 최초출원 내용에 의하여 공개하는 것임.

도면

도면1



도면2



도면3

