



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2012-0055245
(43) 공개일자 2012년05월31일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 38/16 (2006.01) *A61K 38/02* (2006.01)

A61K 35/66 (2006.01) *A61P 7/02* (2006.01)

(21) 출원번호 10-2010-0116868

(22) 출원일자 2010년11월23일

심사청구일자 2010년11월23일

(71) 출원인

조선대학교산학협력단

광주광역시 동구 서석동 375 조선대학교 내

(72) 발명자

유진철

광주광역시 남구 광복마을길 53, 101동 1202호
(진월동, 새한아파트)

조승식

광주광역시 남구 봉선로9번길 22, 102동 1103호
(주월동, 현대)

(74) 대리인

최성용

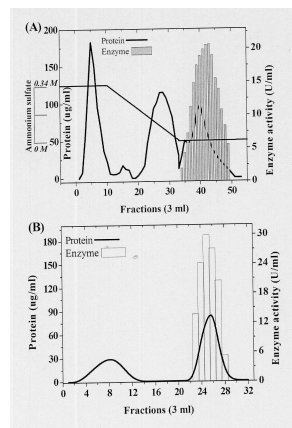
전체 청구항 수 : 총 2 항

(54) 발명의 명칭 스트렙토마이세스속 균주 유래의 혈전용해 효소

(57) 요약

본 발명은 스트렙토마이세스속 균주 유래의 혈전용해 효소에 관한 것으로서, 본 발명에 따른 피브리 용해 효소는 독성이 없고, 뛰어난 피브린 분해 능력을 가지므로 혈전용해제로서 사용될 수 있다.

대표도 - 도1



특허청구의 범위

청구항 1

스트렙토마이세스 속 균주(*Streptomyces* sp. CS628; 기탁번호: KCTC18202p, 2011.11.15)로부터 정제되고, SDS-PAGE에 의해 17,600 Da에 해당하는 단일 폴리펩타이드로서 이동하고, 최대 활성 온도는 50-55℃이고, 최적 pH는 pH 8.0이며, pH 8.0-12.0 및 40 ℃이하에서 안정하고, 활성이 페닐메틸설포닐 플루오리드 및 페파블록에 의해 완전히 억제되고 키모트립신에 대한 크로모젠성 기질에 대해 고도의 특이성을 보이고, 키모트립신-유사 세린계 프로테아제임을 특징으로 하는 피브린 분해 효소.

청구항 2

제1항에 있어서, N-말단의 처음 15개의 아미노산이 서열번호 1의 것인 피브린 분해 효소.

명세서

기술 분야

[0001] 본 발명은 스트렙토마이세스속 균주 유래의 혈전용해 효소에 관한 것으로서, 본 발명에 따른 피브린 용해 효소는 독성이 없고, 뛰어난 피브린 분해 능력을 가지므로 혈전용해제로서 사용될 수 있다.

배경 기술

[0002] 고혈압, 급성 심근경색증, 허혈성 심장 질환, 심장 판막증, 말초 혈관 질환, 부정맥, 심장마비 등의 심혈관계 질환(CVDs)은 전세계에 걸쳐서 주된 사망원인이 되는 질환이다. 2000년도의 세계보건기구(WHO)의 통계에 따르면, 전세계의 총 사망률의 29%가 심혈관계 질환에 의한 것이다[참조 문헌 Mine Y, Wong A, Jiang B. Fibrinolytic enzymes in Asian traditional fermented foods. Food Res Int 2005;38:243-250]. 마찬가지로 2006년의 WHO의 다른 보고에 의하면, 매년 1800만명의 인구가 심혈관계의 질환으로 사망한다고 한다[참조 문헌: Kim JS, Kim JE, Choi BS, Park SE, Sapkota K, Kim S, Lee HH, Kim CS, Park Y, Kim MK, Kim YS, Kim SJ. Purification and characterization of fibrinolytic metalloprotease from *Perenniporia fraxinea* mycelia. Mycol Res 2008;112:990-998].

[0003] 이 치명적인 문제에 관계되는 근본적인 병리생리학적 과정은 혈관의 손상되지 않은 벽에 부착하는 피브린(혈괴)의 형성이다. 피브린은 정상적으로 트롬빈(EC 3.4.21.5)의 작용에 의해 피브리노겐으로부터 형성되고; 조직플라스미노겐 활성화제에 의해 플라스미노겐으로부터 활성화되는 플라스민(EC 3.4.21.7)에 의해 용해된다. 균형 잡힌 조건에서는 피브린 응괴는 플라스민에 의해 가수분해되어 혈관에서 혈전증이 방지된다. 그러나, 병리생리학적인 무질서의 결과로 인한 균형을 잃은 조건에서는 응괴들은 가수분해되지 않아서, 혈전증이 발생한다. 유로키나아제 타입 플라스미노겐 활성화제(EC 3.4.21.31), 조직 플라스미노겐 활성화제(t-PA), 세균성 플라스미노겐 활성화제 스트렙토키나아제(EC 3.2.1.35)는 치료 목적으로 사용되는 대표적인 혈전용해제이다[상기 Kim JS, et al. 문헌 참조]. 작용기전에 기초하면, 혈전용해제는 두가지 타입이 있는데, 하나는 플라스미노겐 활성화제 및 유로키나아제로서 이들은 플라스미노겐을 활성 플라스민으로 활성화시켜 피브린을 분해하고 다른 것은 피브린에 직접 작용하는 플라스민-유사 단백질들이다[참조문헌: Peng Y, Yang X, Zhang Y. Microbial fibrinolytic enzymes: an overview of source, production, properties, and thrombolytic activity in vivo. Appl Microbiol Biotechnol 2005;69:126-132]. 또한, 촉매적 기전에 기초하면, 미생물 피브린용해 효소는 3개의 타입으로 분류되는데, 세린 프로테아제(예, Nattokinase), 메탈로프로테아제(예, *Armillaria mellea* 메탈로프로테아제) 및 세린과 메탈로프로테아제의 혼합형(예, *Streptomyces* sp. Y405 유래의 프로테아제)이 있다.

[0004] 널리 보급되어 사용됨에도 불구하고, t-PA 및 유로키나제 등의 혈전용해제들은 고가이며, 낮은 피브린 특이성을 나타내고, 위장관 출혈, 재관류에 대한 내성 및 앨러지 반응 등의 원치 않는 부작용이 있다. 따라서, 다양한 소스로부터 안전하고 저가의 혈전용해제의 연구에 중점을 두고 지속적인 노력이 이루어지고 있다.

[0005] 최근까지, 혈전용해제로 적용가능한 피브린 분해효소들은 발효 음식, 지렁이, 버섯, 뱀독 및 미생물 등 다양

한 소스로부터 분리되었다[참조문헌: Chang AK, Kim HY, Park JE, Acharya P, Park IS, Yoon SM, You HJ, Hahm KS, Park JK, Lee JS. *Vibrio vulnificus* secretes a broad-specificity metalloprotease capable of interfering with blood homeostasis through prothrombin activation and fibrinolysis. J Bacteriol 2005;187:6909-6916]. 미생물 소스로는, 세균, 방선균, 곰팡이 및 조류가 피브린 용해 효소를 생산하는 것으로 보고되었다. 이들 중, 스트렙토마이세스(*Streptomyces*)에서는 소수만이 보고되었다[참조 문헌; Chitte RR, Dey S. Cloning and expression of an actinokinase gene from a thermophilic *Streptomyces* in *Escherichia coli*. Indian J Exp Biol 2001;39:410-415].

[0006] 스트렙토마이세스 균주(*Streptomyces* sp. CS628)는 한국의 토양으로부터 단리되었고, 이 균주는 또한 신규의 저분자량 인지질 D를 생산하였다[참조문헌; Simkhada, J. R., Cho S. S., Choi, H. S., Kim, S. W., Lee, H. C., Sohng, J. K., and Yoo, J. C. (2010) *Biotechnol. Bioprocess Eng.* 15, 595-602]. 상기 문헌에 기재된 내용은 본 발명의 명세서의 일부로서 인용한다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 본 발명자들은 스트렙토마이세스 속 균주(CS628)로부터 혈전용해기능을 갖는 효소의 생산에 관하여 예의 연구한 결과, 상기 균주의 배양 배지에서 피브린 용해 활성을 갖는 단백질분해 효소를 발견하기에 이르렀으며, 그의 잠재적 생물촉매적 적용에 관심을 갖게 되었고, 이로부터 스트렙토마이세스속 균주에 의해 생산된 신규의 피브린 용해 효소(FP28), 그의 정제 및 생화학적 특성을 확인하고 본 발명을 완성하기에 이르렀다.

과제의 해결 수단

[0008] 따라서, 본 발명은 스트렙토마이세스속 균주(CS628)에 의해 생산된 신규의 피브린 용해 효소를 제공하는 것을 목적으로 한다.

[0009] 본 발명은, 추가의 일면에 있어서, 상기 피브린 용해 효소를 포함하는 혈전용해제를 제공하는 것을 목적으로 한다.

발명의 효과

[0010] 본 발명에 따른 피브린 용해 효소는 피브린을 특이적으로 분해하는 신규의 혈전용해효소임을 확인할 수 있다. 따라서, 본 발명에 따른 혈전용해 효소는 혈전증의 치료 및 예방에 효과적으로 이용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0011] 도 1은 본 발명에 따른 혈전용해 효소의 용출 프로필을 나타내는 그래프도.

도 2는 본 발명에 따른 혈전용해 효소 단백질의 전기영동 결과를 나타내는 도면.

도 3은 효소 활성 및 안정성에 관한 pH 및 온도의 영향을 나타내는 그래프도.

도 4는 FP28의 아미드 분해 결과를 나타내는 그래프도.

도 5는 FP28의 피브린분해 활성을 나타내는 도면.

도 6은 카라기난 유발 마우스 꼬리 혈전 모델에 있어서 FP28의 생체내 혈전용해 활성을 나타내는 도면.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0012] 본 발명은, 일면에 있어서, 스트렙토마이세스 속 균주(*Streptomyces* sp. CS628)로부터 정제되고, SDS-PAGE에 의해 17,600 Da에 해당하는 단일 폴리펩타이드로서 이동하고, 최대 활성 온도는 50-55℃이고, 최적 pH는 pH 8.0이며, pH 8.0-12.0 및 40℃ 이하에서 안정하고, 활성이 페닐메틸설포닐 플루오리드 및 페파블록에 의해 완전히 억제되고 키모트립신에 대한 크로모젠성 기질에 대해 고도의 특이성을 보이고, 키모트립신-유사 세린계 프로테아제임을 특징으로 하는 피브린 분해 효소를 제공한다.

[0013] 본 발명자들은 미생물원으로부터 경제적으로 유용한 효소를 단리할 목적으로 스트렙토마이세스속 균주(*Streptomyces* sp.) CS628)로부터 혈전용해 효소(FP28)를 정제하고 생화학적 특성을 분석하였다.

[0014] 방선균은 기타 유용한 화합물과 함께 항생제의 생산자로서 잘 알려져 있다. 그러나 이 그룹으로부터 피브린

분해 효소는 거의 보고되지 않았다. 본 발명에 있어서, 효소를 소수성 상호작용 및 겔 투과 크로마토그래피의 조합에 의해 전기영동적으로 균일하게 정제하였다. 정제 효소의 분자량은 SDS-PAGE에 의해 ~17,600 Da으로 측정되었다. 이는 대부분의 피브린 분해 프로테아제 보다 훨씬 적은 것이다(표 3 참조). 이는 지금까지 보고된 바의 가장 낮은 분자량의 *Streptomyces* 피브린 분해 프로테아제이다. 그의 분자량은 버섯 *Pleurotus eryngii* 으로부터 최근에 정제된 14 kDa 피브린 분해 프로테아제에 필적할 만한 크기이다[참고문헌: Cha, W. S., Park, S. S., Kim, S. J., and Choi, D. *Bioresour Technol* 101, 6475-6481].

[0015] 피브린 자이모그래피에 의해 효소의 분자 크기를 풀 수 없었고 겔의 상부에 거의 남아 있었다. 소위 "a binding mode"라고 하는 이 현상은 효소의 높은 등전점(pI)에 기인하거나 또는 다른 피브린분해 효소에서 관찰되는 바와 같은 피브린 겔에 대한 효소의 결합에 기인할 수 있다[참조문헌: Choi, N. S., Chang, K., Maeng, P., and Kim, S. (2004) *FEMS Microbiology Letters* 236, 325-331 및 Choi, N. S., Chung, D., Ryu C., Yoon, K., Maeng, P., and Kim, S. (2006) *J. Microbiol. Biotechnol.* 16, 457-464].

[0016] 세린계 프로테아제 억제제인 PMSF 및 Pefabloc은 활성을 상당히 억제하였는데 이는 이것이 세린계 프로테아제임을 나타낸다. 키모스타틴 역시 활성을 억제하였는데 이는 이것이 키모트립신 유사 세린계 프로테아제일 수 있음을 나타내는데 이를 더욱 아미드 분해에 의해 확인한 결과 활성은 키모트립신에 대한 기질에 대하여 가장 높은 특이성을 나타냈다. 스트렙토마이세스로부터 지금까지 보고된 대부분의 피브린 분해 프로테아제는 세린계 프로테아제이고; 따라서 이는 이전의 결과와 일치된다(표 3 참조).

[0017] 세린계 프로테아제 슈퍼패밀리는 6개의 부류(clan, superfamily)로 이루어진다. Subtilase 및 키모(트립신)-유사 프로테아제들은 슈퍼패밀리의 두 개의 가장 큰 부류이다. 이들 두 부류는 키모트립신에 대한 라디컬 상 다른 β/β 및 섭틸리신 단백질 스카폴드에 대한 α/β 로 촉매적 His, Asp 및 Ser의 고도로 유사한 배열에 의해 구분된다[참고문헌: Siezen, R. J., and Leunissen, J. A. (1997) *Protein Sci* 6, 501-523].

[0018] 또한, 효소는 시험된 어떠한 금속 이온도 그의 활성에 있어서 영향을 미치지 않았으므로 금속 이온 영향에 관련하여 대부분의 피브린 분해 효소와는 다른 특성을 나타내었다. 처음 15개의 N말단 아미노산 잔기는 IAGGQAIYAGGRRS(서열번호 1)이었다. NCBI Blast 조사에 있어서, 로 부터의 세린계 프로테아제와 73%의 동일성을 나타내었다. 프로테아제 억제 연구로 부터의 통계에 의하면 FP28은 세린계 프로테아제임을 나타낸다. 이는 *Fusarium oxysporum*로 부터의 피브린 분해 효소와 33%만의 동일성을 나타내었다[참고문헌: Wu, B., Wu, L., Chen, D., Yang, Z., and Luo, M. (2009) *J Ind Microbiol Biotechnol* 36, 451-459]. 그 외에, 이는 지금까지 알려진 피브린분해 효소와의 동일성을 나타내지 않았다. 이전에, *Bacillus* sp. nov. SK006로 부터의 피브린 분해 효소가 피브리노젠-풍부 및 피브리노젠-프리 플레이트에서 피브린 클롯을 분해하였으며; 활성은 이전의 경우보다 약간 증대된 것으로 보고되었다[참고문헌: Hua, Y., Jiang, B., Mine, Y., and Mu, W. (2008) *J Agric Food Chem* 56, 1451-1457]. 마찬가지로 최근에 보고된 *S. omiyaensis*로 부터의 강력한 세린계 프로테아제 역시 플라스미노겐의 존재하에서 약간 증가된 피브린 분해 활성을 나타내었다[참고문헌: Uesugi, Y., Usuki, H., Iwabuchi, M., and Hatanaka, T. (August 2010) *Enzyme Microb. Technol.* doi:10.1016/j.enzmictec.2010.08.003]. 이들과는 달리, FP28의 활성은 플라스미노젠-풍부 및 플라스미노젠-프리 피브린 플레이트 모두에 있어서 동일하였는데 이는 직접적 피브린 분해에 의하여 피브린 클롯을 분해하며 플라스미노겐을 활성화에 의하지 않음을 의미한다. μg 단백질 당 용해 면적의 의미로 표현된 FP28의 피브린 분해 활성은 각각 플라스민의 것보다 14.3 ± 2.6 -배 높았고, 유로키나아제의 것보다 2 ± 0.15 -배 낮았다.

[0019] 유로키나아제 및 이러한 타입의 효소는 플라스미노겐의 존재하에서만 피브린을 효율적으로 가수분해 시키기 때문에 플라스민 및 FP28은 플라스미노젠 활성화제를 요하지 않는 우수한 것일 수 있다. FP28의 피브린 분해 활성은 플라스민에 비하여 고도로 우월하였는데, 이는 혈전용해 치료에 사용될 가능성을 더욱 높인다. 그의 혈전 용해 활성은 플라스민의 것보다 거의 18-배 높은 활성을 나타내는 것으로 보고된 *Streptomyces omiyaensis*의 피브린분해 세린계 프로테아제에 필적할만하다. 그러나 그의 혈전용해 활성은 더 시험해볼 필요가 있다.

[0020] 헥사메릭 글리코단백질인 피브리노젠은 340 kDa (가용성 이량체)의 분자량을 가진 피브린 전구체이다. 이는 두 세트의 이황화-교량결합된 각각 63.5, 56 및 47 kDa의 $A\alpha$ -, $B\beta$ - 및 γ -체인을 포함한다.

[0021] FP28의 피브리노젠분해 패턴은 모두 $A\alpha$ - 에 이어, $B\beta$ - 및 γ -체인을 우월하게 분해하므로 버섯 및 플라스민 [참고문헌: Park, S. E., Li, M. H., Kim, J. S., Sapkota, K., Kim, J. E., Choi, B. S., Yoon, Y. H., Lee, J. C., Lee, H. H., Kim, C. S., and Kim, S. J. (2007) *Biosci Biotechnol Biochem* 71, 2214-2222 및 Cha, W. S., Park, S. S., Kim, S. J., and Choi, D. *Bioresour Technol* 101, 6475-6481]으로부터의 피브린분해

효소와 유사하다. FP28은 $A\alpha$ -, $B\beta$ - 및 γ -체인을 각각 1, 5 및 30분 내에 절단하였다. 따라서, 이는 상기 플라스민 또는 버섯의 프로테아제보다 더욱 효율적이다.

- [0022] 카라기난 유도-꼬리 혈전모델은 동물에 있어서 꼬리 혈전을 유도하는데 점점 일반적으로 사용되고 있으며 몇 가지의 잠재적인 물질들이 이들의 혈전용해 효과를 평가하는데 사용되고 있다. 카라기난을 마우스의 등쪽의 피하에 주사하였을 때, 와인-색의 영역이 꼬리의 끝에서 나타나고 이는 일정 시간 간격후에 건조 피사로 변한다. 정확한 기전은 불분명하나 카라기난은 혈관의 염증을 유발하고 이것이 인터류킨-1 및 종양 괴사 인자 등의 염증성 인자의 생성을 초래하는 것으로 추정된다. 이들 인자의 과도한 생성이 항상성을 교란하고 궁극적으로 혈전을 유발한다[참고문헌: Yan, F., Yan, J., Sun, W., Yao, L., Wang, J., Qi, Y., and Xu, H. (2009) *J Thromb Thrombolysis* 28, 444-448]. 많은 타입의 혈전용해 모델이 항혈전제 및 혈전용해제를 평가하는데 사용되고 있으나 이 동물 모델은 복잡한 외과적 과정이 없이 혈전의 진행을 직접적으로, 가시적으로 그리고 시간 의존적 방식으로 관찰할 수 있는 유일한 방법이다. 몇가지 장점에도 불구하고, 이 모델은 또한 꼬리 혈전의 길이에 있어서 불일치성 및 결과의 낮은 빈도의 혈전 방해 재현성 등의 단점도 아울러 가지고 있다. 최근 이 모델은 혈행을 개선함으로써 혈전의 빈도를 증대시키도록 수정되었다[참고문헌: Hagimori, M., Kamiya, S., Yamaguchi, Y., and Arakawa, M. (2009) *Pharmacol Res* 60, 320-323]. 본 발명에 있어서, 본 발명자들은 hypercoagulability 및 정상 혈행을 변화시킴으로써 이 수정된 방법을 혈전 형성을 개선시키는데 적용하였다. 본 발명자들은 카라기난을 10 mg/kg으로 정맥내 주사하고 얼음물에 2 분 동안 담군 후 20분 동안 꼬리 연결을 하는 것이 일정하고 뛰어난 꼬리 혈전을 유도하는 최상의 조합임을 발견하였다. 결과는 거의 일정하긴 하지만, 본 발명에 있어서 효율적인 카라기난의 투여량은 수정된 방법(1 mg/kg) 보다 더 높았다(10 mg/kg). 그러나 본 발명자들의 보고와 밀접하였다(15 mg/kg) (참고문헌: Yan, F., Yan, J., Sun, W., Yao, L., Wang, J., Qi, Y., and Xu, H. (2009) *J Thromb Thrombolysis* 28, 444-448]. 카라기난 유발-꼬리 혈전의 억제에 관한 FP28의 효과는 혈전에 임상적으로 사용되는 유로키나아제의 것과 거의 유사하였다. 따라서, 스트렙토마이세스 속으로부터 정제한 본 발명의 신규 피브린 용해 효소는 혈전증의 치료에 사용될 가능성이 매우 높은 것이다.
- [0023] 본 발명에 따른 피브린 분해 효소는 플라스민에 대비하여 더욱 뛰어난 피브린 분해능을 가지므로 혈전용해제의 주성분 또는 보조성분으로 이용될 수 있다.
- [0024] 따라서, 본 발명은 추가의 일면에 있어서, 스트렙토마이세스속 균주(CS628)에 의해 생산된 신규의 피브린 용해 효소를 포함하는 혈전용해제를 제공한다.
- [0025] 본 발명에 따른 피브린 용해 효소는 조 추출물을 그대로 사용할 수도 있고, 이를 정제하여 순도 높게 사용해도 좋다.
- [0026] 본 발명의 제약 조성물은 혈전에 직접 작용하여 피브린을 용해시키는 혈전 용해제로서 사용될 수 있으며, 당업자는 그러한 질병, 상태 및 이상으로부터 고통을 받는 것으로 추정되는 개인들을 표준 진단 기술을 사용하여 용이하게 파악할 수 있다. 본 발명의 혈전용해제를 적용할 수 있는 질환으로는, 이들에 한정되지 않고, 뇌혈전, 뇌색전증 등의 뇌질환, 폐색전, 폐경색증 등의 폐질환, 하지심부정맥 혈전증, 보행장애, 혈류장애성빈혈, 동맥경화성괴저증, 신경통, 고지혈증 등의 말초신경계질환, 신성고혈압, 신장병, 신부전 등의 신장질환, 협심증, 허혈성심장질환, 심근경색 등의 심장계 질환 등을 포함한다.
- [0027] 본 발명의 제약 조성물은 공지의 의약품 담체와 조합하여 제제화할 수 있다. 일반적으로는, 유효 성분을 약학적으로 허용할 수 있는 액상 또는 고체상의 담체와 배합하고, 또한 필요에 따라 용제, 분산제, 유화제, 완충제, 안정제, 부형제, 결합제, 붕괴제, 활택제 등을 가하고, 정제, 과립제, 산제, 분말제, 캡슐제 등의 고형제, 통상액제, 현탁제, 유제 등의 액제로 할 수 있다. 또한 이것을 사용 전에 적당한 담체의 첨가에 의해 액상으로 만들 수 있는 건조품으로 할 수도 있다.
- [0028] 본 발명의 제약 조성물은 경구제나, 주사제, 점적용제 등의 비경구제 중의 어떠한 것에 의해서도 투여할 수 있다.
- [0029] 의약품 담체는, 상기 투여형태 및 제형에 따라서 선택할 수 있고, 경구제의 경우는, 예를 들어 전분, 유당, 백당, 만니톨, 카복시메틸셀룰로스, 콘 스타치, 무기염 등이 이용된다. 또한 경구제의 조제에 있어서는 추가로 결합제, 붕괴제, 계면활성제, 윤택제, 유동성 촉진제, 교미제, 착색제, 향료 등을 배합할 수도 있다.
- [0030] 한편, 비경구제의 경우는 통상의 방법에 따라서 본 발명의 유효성분인 단백분해효소를 포함하는 조성물을 희석제로서의 주사용 증류수, 생리식염수, 포도당 수용액, 주사용 식물유, 참기름, 낙화생유, 대두유,

옥수수유, 프로필렌글리콜, 폴리에틸렌글리콜 등에 용해 내지 현탁시켜서 필요에 따라 살균제, 안정제, 등장화제, 무통화제 등을 가함으로써 조제된다.

[0031] 본 발명의 의약 조성물은 제제 형태에 따른 적당한 투여경로로 투여된다. 투여방법은 특히 한정할 필요는 없고, 내용, 외용 및 주사에 의해 투여할 수 있다. 주사제는, 예를 들어 정맥내, 근육내, 피하, 피내 등에 투여할 수 있다.

[0032] 본 발명의 의약 조성물의 투여량은, 그 제제형태, 투여방법, 사용 목적 및 이것에 적용되는 환자의 연령, 체중, 증상에 따라서 적절히 설정되고, 일정하지 않지만 일반적으로는 제제중에 함유되는 유효성분의 양은 성인 1일당 예컨대 2500 ~ 1,500,000 IU이다. 그러나, 당업자는 특정 시약의 약물동력학적인 특성 및 그의 투여 모드 및 경로; 수여자의 나이, 건강, 체중; 증상의 성질 및 정도, 동시 치료의 종류, 치료의 빈도 및 목적하는 효과 등의 공지의 요인에 따라서 투여량이 변화함은 이해할 것이다.

[0033] <실시예>

[0034] 이하, 본 발명은 다음의 대표적인 실시예에 의하여 더욱 구체적으로 설명되나, 본 발명이 이들 실시예에 의해 어떤 식으로든 제한되는 것은 아니다.

[0035] 본 실시예에서 사용된 바의 트롬빈, 피브리노겐 및 플라스민(모두 인간 혈장으로부터 유래한 것), 유로키나아제, 카라기난(Type 1), 아조카세인, 폴린-시칼투스 페놀 시약(Folin-Ciocalteu's phenol reagent) 및 티로신은 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)로부터 구매하였다. Sepharose CL-6B는 Pharmacia(Uppasala, Sweden)로부터 입수하였고, 프로테아제 억제제 페파블록 sc(pefabloc), 아프로티닌, 류펩틴, 키모스타틴, EDTA는 Roche Applied Science(Mannheim, Germany)로부터 입수하였다. 파라니트로아닐리드(pNA) 크로모제닉 기질은 Chromogenix(이탈리아 밀라노소재)로부터 입수하였다. 모든 기타 약품 및 시약은 분석급을 사용하였다.

[0036] 통계적 분석:

[0037] 대조군과 약 시험군 사이의 통계적 차이는 스튜덴츠 *t*-test.를 사용하여 분석하였다. $P < 0.05$ 는 통계적으로 유의성 있는 것으로 판단되었다. 모든 데이터는 평균의 표준오차로서 표현하였다.

[0038] 본 발명에 사용된 균주는 스트렙토마이세스속 균주의 타입 CS628로 일부특성과 인지질분해효소 생산에 관하여 논문으로 발표한 바 있다.(참조문헌; Simkhada, J. R., Cho S. S., Choi, H. S., Kim, S. W., Lee, H. C., Sohng, J. K., and Yoo, J. C. (2010) *Biotechnol. Bioprocess Eng.* 15, 595-602. 상기 균주는 한국생명공학 연구원에 2010.11.15일자로 기탁되어 기탁번호 KCTC 18202p를 부여받았다.

[0039] 실시예 1: 균주 및 배양

[0040] 스트렙토마이세스 종(*Streptomyces* sp.) CS628를 배지 1 리터 중에 말토오스 10g, 대두 g, 및 K_2HPO_4 1g을 포함하는 10 리터 발효기에서 배양하였다. 배양은 28℃ 및 150 rpm 및 0.5 vvm(용존 산소 용적/분 당 배지 용적) 통기로 설정한 회전식 진탕기에서 85 시간 동안 수행하여 이후의 분석에 사용하였다.

[0041] 실시예 2: 단백질 분석

[0042] 2-1) 단백질 농도 분석

[0043] 단백질 농도는 표준 단백질로서 소혈청 알부민을 사용하여 Bradford의 염료 결합법에 의해 결정하였다[참조문헌: Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976;72:248-254].

[0044] 2-2) 효소 활성 에세이

[0045] 프로테아제 활성은 Oda와 Murao의 Folin-Ciocalteu 방법을 일부 변형하여 결정하였다[참조 문헌: Oda K, Murao S. Purification and some properties of acid proteinase A and B of *Scytalidium lignicolum* ATCC 24568. *Agric Biol Chem* 1974;38:2435-2444]. 아조카세인 용액(10 mM Tris-HCl buffer pH 8.0 중의 아조카세인 (5 mg/ml) 25 μ l 및 적절하게 희석한 효소 시료를 함유한 반응 혼합물 75 μ l를 50 ℃에서 20분 동안 인큐

배이션시켰다. 반응은 10% (w/v) 트리클로로아세트산 30 μ l을 첨가하여 종료시키고, 이어서 얼음물에서 10분 동안 정치시킨 후 10,000 x g로 20분 동안 원심분리시켰다. 상층액 75 μ l를 Folin-Ciocalteu's 페놀 시약 (0.33 M) 150 μ l 및 Na₂CO₃ (10 %, w/v) 용액 200 μ l와 혼합하였다. 30℃에서 30분 동안 혼합물을 인큐베이션시킨 후, 생성된 칼라의 광학 밀도를 Lab System Multiscan RC 96-웰 플레이트 판독기(미국 매사추세츠주 프랭클린 소재, Lab System Multiscan RC, Thermo Lab System)를 사용하여 660 nm에서 측정하였다. 표준 곡선은 1-15 mg/l에 걸친 티로신 용액을 사용하여 작성하였다. 효소 활성의 1 유닛(U)는 상기 에세이 조건에서 1분당 아조카제인으로부터 티로신 1 μ l을 방출하는데 필요한 효소의 양으로 정의하였다.

[0046] 2-3) 효소 정제: 스트렙토마이세스 종 균주(*Streptomyces* sp. CS628)를 85 시간 동안 배양하여 10,000 x g에서 1 시간 동안 원심분리시켰다. 75% 포화도의 고체 (NH₄)₂SO₄를 상층액에 첨가하여 단백질을 침전시켰다. 단백질들은 10,000 x g, 4℃에서 1 시간 동안 원심분리에 의해 회수하여, 10 mM Tris-HCl 완충액(pH 8.0)에 대하여 투석하고, 한외여과 멤브레인 YM30 (Millipore Corp.)로 농축시켰다. 이어서 효소를 Sepharose CL-4B column (1.2 cm x 150 cm)가 장착된 소수성 상호작용 크로마토그래피에 의해 정제하였다. 컬럼은 0.34M 암모늄 설페이트로 예비 평형시켰고, 효소는 0.34M 내지 0 M의 암모늄 설페이트로 30 ml/h의 네가티브 선형 구배로 용출시켰다. 활성 분획들을 모으고, 농축하여 10 mM Tris-HCl 완충액(pH 8.0)으로 예비 평형시킨 Sepharose CL-6B 컬럼 (70 cm x 1.2 cm) 상의 크기 배제 크로마토그래피를 사용하여 30 ml/h의 유속으로 더욱 정제하였다.

[0047] 2-4) 전기영동 분석: 5% 스택킹 겔 및 15% 폴리아크릴아마이드 해상 겔을 사용하여 Laemmli의 방법에 따라 SDS-PAGE를 수행하였다. 효소의 분자량은 참고 단백질의 상대 이동성을 비교함으로써 결정하였다. 피브린 자이모그래피를 상기한 바와 같이 수행하였다[참고문헌: Simkhada, J. R., Mander, P., Cho, S. S., and Yoo, J.C. (2010) *Process Biochem.* 45, 88-93].

[0048] 스트렙토마이세스 종 CS628로부터의 피브린 분해효소 생산은 탄소, 질소 및 무기염 원료로서 각각 말토오스, 대두 및 포타슘 염 중에서 최상이었다(데이터로 나타내지는 않음). 배양 상층액으로부터 FP28의 정제 결과는 표 1에 요약하였다.

표 1

정제 단계	용적 (ml)	총단백질(mg)	전체 활성(U)	특이 활성(U/mg)	수율(%)	정제 (-배수)
조 상층액	100	62	930	15	100	1
암모늄 설페이트	5	34.95	801	22.9	86.2	1.5
페닐 세파로오스 CL-4B	1	2.25	631	280.7	67.9	18.7
세파로오스 CL-6B	1	0.9	362	402.6	38.9	26.8

[0050] 효소는 암모늄 설페이트 침전, 소수성 상호작용 크로마토그래피(도 1a) 및 겔투과 크로마토그래피(도 1b)를 수반하는 3-단계 절차에 의해 균질하게 정제하여 26.8-배 정제 및 38.9% 활성 회수를 초래하였다. 도 1은 (a) 페닐 세파로오스 CL-4B와의 소수성 상호작용 및 (b) gel filtration with Sepharose CL-6B 컬럼을 사용한 겔투과 크로마토그래피에 의한 본 발명에 따른 혈전용해 효소(FP28)의 용출 프로필을 나타내는 그래프도이다. 각 분획의 단백질 농도 및 효소 활성은 각각 595 및 660 nm에서 측정하였다. 단백질 농도 및 효소 활성은 각각 μ g/ml 및 U/ml로 표시하였다. 100 ml의 배양 브로쓰로부터, 정제 단백질 0.9 mg을 얻었다. 수율을 상당히 높은 것이어서 본 연구에 사용된 정제 프로토콜은 효율적이다. 전기영동 분석에 있어서, FP28은 단일 단백질 밴드로서 이동하였다(도 1a 참조). 상대적 이동성(Rf) vs 참고 단백질[참고문헌: Cha, W. S., Park, S. S., Kim, S. J., and Choi, D. *Bioresour Technol* 101, 6475-6481]의 분자량의 log에 의해 계산한 분자량은 ~17,600 Da이었다(도 2b 참조). 도 2는 본 발명에 따른 혈전용해 효소 단백질의 전기영동 결과를 나타내는 도면이다. (a) SDS-PAGE, 단백질 크기 마커(kDa의 크기는 각 레인의 왼쪽에 나타냄), 라인 1-3: 조 상층액 중의 FP28(10 μ g), 페닐 세파로오스 CL-4B (3 μ g) 및 세파로오스 CL-6B (2 μ g). (b) 참고 단백질의 상대적 이동성을 비교하여 결정된 분자량, 화살표가 정제 효소를 나타냄, (c) 피브린 자이모그래피, 라인 1, 분자량 및 2, FP28 (0.5 μ g). 밴드의 위치 및 패턴은 환원 및 비환원 조건에서 동일하였다(데이터 나타내지 않음). 그러나, 피브린 자이모그래피에 있어서, FP28은 130 kDa 근처의 명확한 단일 밴드로 나타났는데(도 2c 참조), 이는 SDS-PAGE에서 나타났던 단백질 크기와 동일하지 않았다.

[0051] 실시예 3: pH 및 온도의 영향

[0052] pH 및 온도의 영향은 상기한 바의 표준 에세이 조건하에서 아조카제인으로 45℃에서 20분 동안 결정하였다. pH 영향은 표준 완충액: 시트르산-소듐 포스페이트 (pH 3-7), Tris-HCl (pH 7.5-9), NaHCO₃ (pH 9.6-11) 및 KCl/NaOH(12-14)을 사용하여 다양한 pH값(3.0-13.0)에서 결정하였다. 효소의 pH 안정성을 결정하기 위하여, 효소 시료의 분취량을 상기한 이들의 각각의 완충액으로 2 시간 동안 냉장고(0-4℃)에서 인큐베이션시키고, 잔류 활성은 pH 8.0에서 측정하였다. FP28의 최적 온도는 다양한 온도 (4-80℃) 및 pH 8.0에서 효소 에세이를 수행함으로써 평가하였다. 효소의 열 안정성은 효소 시료를 다양한 온도(65℃ 이하)에서 pH 8.0 및 1시간 동안 인큐베이션시킴으로써 평가하고, 이어서 잔류 활성을 측정하였다.

[0053] FP28 활성 및 안정성에 미치는 pH 및 온도의 영향은 도 3에 나타났다. 도 3은 효소 활성 및 안정성에 관한 pH 및 온도의 영향을 나타내는 그래프도이다. (a) pH 최적은 효소 활성을 다양한 pH 완충액과 평가함으로써 결정하였다: 100 mM 시트르산/소듐 포스페이트(pH 3.0-7.0), Tris/HCl (pH 7.5-9.0), NaHCO₃ (pH 9.6-11.0) 및 KCl/NaOH (12.0-14.0). (b) pH 안정성은 효소 시료의 분취량을 0-4 ℃에서 2 시간 동안 각각의 완충액으로 인큐베이션시킨 후 잔류 활성을 측정함으로써 결정하였다. (c) 효소의 최적 온도는 다양한 온도에서 활성을 20 분동안 평가함으로써 결정하였다. (d) 효소의 열안정성은 효소를 다양한 온도에서 1 시간 동안 인큐베이션시킨 후 잔류 활성을 측정함으로써 평가하였다. 각 점은 평균($n = 3$)의 표준편차를 나타낸다. FP28은 pH 7.0-11.0에서 활성을 나타냈고 최적은 pH 8.0이었다(도 3a 참조). 거의 온전한 활성(~90%)이 넓은 pH 범위(7.0-12.0)에서 안정하였다(도 3b 참조). 또한, 활성은 50-60℃에서 최적이었고(도 3c 참조), 40 ℃ 이하에서도 안정하였다(도 3d 참조). FP28의 pH 및 온도의 영향 및 기타 특성들을 다른 혈전용해 효소와 비교하여 표 2에 나타났다.

표 2

[0054]

효소	분자량	최적		안정성		비고	참고문헌
		pH	T(℃)	pH	T(℃)		
FP28	17.6	8	50-55	8-12	<40	키모트립신-유사 SP	본 발명
<i>B. sp. nov.</i> SK006	43-46	7.2	30	5-11	<40	SP	(5)
<i>S. megasporus</i> SD5	35	8	55	6-9	37-60	키모트립신-유사 SP	(7)
SW-1	30	ND	ND	4-9	4-37	SMP	(9)
FP84	35	7.5	45	6-9	<40	SMP	(10)
Fu-P	28	8.5	45	6-9	<37	키모트립신-유사 SMP	(17)
<i>Pleurotus eryngii</i>	14	5.0	40	4-6	<40	플라스민-유사 SP	(22)
<i>S. sp.</i>	33	7.8	35-50	ND	ND	키모트립신-유사 SP	(23)
Subtilisin FS33	30	8	55	ND	ND	셉틸리신-유사 SP	(24)
Subtilisin DJ-4	29	ND	40	4-11	RT	플라스민-유사 SP	(25)
Subtilisin DFE	28	9	48	6-10	<50	셉틸리신-페밀리 SP	(26)
<i>Fusarium sp.</i> BLB	27	9.5	50	2.5-11.5	<50	SP	(27)
Subtilisin QK-2	28	8.5	55	3-12	40	셉틸리신-페밀리 SP	(28)

[0055] 상기 표에 있어서, ND는 데이터가 유용하지 않거나 측정되지 않은 것이고, T는 온도; RT는 실온; B는 *Bacillus*; S는 *Streptomyces*; P는 *Pseudomonas*. SP는 serine protease를, SMP는 serine metalloprotease를 나타내며, 참고 문헌은 다음과 같다. (5): Hua, Y., Jiang, B., Mine, Y., and Mu, W. (2008) *J Agric Food Chem* 56, 1451-1457; (7): Chitte, R. R., and Dey, S. (2000) *Lett Appl Microbiol* 31, 405-410; (9): Wang, J., Wang, M., and Wang, Y. (1999) *Chin J Biotechnol* 15, 83-89; (10): Simkhada, J. R., Mander, P., Cho, S. S., and Yoo, J.C. (2010) *Process Biochem*. 45, 88-93; (17): Wu, B., Wu, L., Chen, D., Yang, Z., and Luo, M. (2009) *J Ind Microbiol Biotechnol* 36, 451-459; (22): Cha, W. S., Park, S. S., Kim, S. J., and Choi, D. *Bioresour Technol* 101, 6475-6481; (23): Bono, F., Savi, P., Tuong, A., Maftouh, M., Pereillo, J. M., Capdevielle, J., Guillemot, J. C., Maffrand, J. P., and Herbert, J. M. (1996) *FEMS Microbiol Lett* 141, 213-220; (24): Wang, C. T., Ji, B. P., Li, B., Nout, R., Li, P. L., Ji, H., and Chen, L. F. (2006) *J Ind Microbiol Biotechnol* 33, 750-758; (25): Kim, S. H., and Choi, N. S. (2000) *Biosci Biotechnol Biochem* 64, 1722-1725; (26): Peng, Y., Huang, Q., Zhang, R. H., and Zhang, Y. Z. (2003) *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* 134, 45-52; (27): Ueda, M., Kubo, T., Miyatake, K., and

Nakamura, T. (2007) *Appl Microbiol Biotechnol* 74, 331-338; (28): Ko, J. H., Yan, J. P., Zhu, L., and Qi, Y. P. (2004) *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* 137, 65-74.

실시예 4: 금속 이온 및 억제제의 영향

프로테아제 시료들을 다양한 금속 이온 및 억제제로 실온에서 30분 동안 인큐베이션시키고, 잔류 활성을 측정하였다. CaCl_2 , MgCl_2 , CuCl_2 , ZnCl_2 , FeSO_4 및 CoCl_2 등의 2가 이온 및 에틸렌디아민 테트라아세트산(EDTA), 에틸렌글리콜-비스-(β -아미노에틸에테르)-N,N',N'-테트라아세트산 (EGTA) 및 페닐메틸술폰닐 플루오리드(PMSF), 아프로티닌, 및 페파블록 SC 등의 억제제의 영향을 결정하였다.

FP28의 활성은 이들을 에세이 혼합물에 첨가하였을 때 금속 이온에 의해 영향을 받지 않았다(데이터 나타내지 않음). 마찬가지로 메탈로프로테아제 억제제인 EDTA 및 EGTA에 의해 영향을 받지 않았는데 이 효소는 메탈로 프로테아제 효소가 아님을 나타낸다(표 3 참조).

표 3

금속 이온	농도 (mM)	상대 활성 (%)
EDTA	2.0	98±2.8
EGTA	2.0	6.8±4.5
PMSF	0.1	13.2±1.1
	1.0	5±1.3
키모트립신	0.05	48.3±1.9
	0.1	39.3±5.8
Pefabloc sc	1.0	35.4±6.7
	2.0	5.1±3.6
아프로티닌	1.0	100±4.6
	2.0	99.5±3.6
류펩틴	0.01	101±2.9
무첨가		100.0±2.7

상기 표에서 결과는 평균±표준 편차($n=3$)로 나타냈다.

대조적으로, 활성은 PMSF 및 pefabloc sc에 의해 고도로 억압을 받았는데 이는세린계 프로테아제임을 나타낸다. 키모스타틴은 활성을 50% 이상 억제한 반면 기타 세린계 프로테아제 억제제인 아프로티닌 및 류펩틴은 어떠한 억제 효과를 나타내지 못하였다.

실시예 5: 아미드분해 활성

활성은 0.3 mM의 다양한 프로테아제들에 대해 특이적인 다양한 크로모젠 기질들을 사용하여 결정하였다. 기질들은 S-2222 (Bz-Ile-Glu-(OR)-Gly-Arg-pNA for factor Xa, S-2288 (H-D-Ile-Pro-Arg-pNA for t-PA), S-2238 (H-D-Phe-Pip-Arg-pNA for thrombin), S-2251 (H-D-Val-Leu-Lys-pNA for plasmin and streptokinase activated plasminogen), S-2444 (pyroGlu-Gly-Arg-pNA for urokinase), S-2586 (MeO-Suc-Arg-Pro-Tyr-pNA.HCl for chymotrypsin) 및 S-2765 (Z-D-Arg-Gly-Arg-pNA.2HCl for factor Xa)이었다. 활성은 정제 FP28 (50 mM Tris/HCl pH 8.0 중의 $1\mu\text{l}$ /200 μl)을 0.5mM 기질(300 μl)로 37 °C에서 5 분 동안 인큐베이션시킴으로써 평가하였다. 방출된 *p*-니트로아닐린을 405 nm에서 측정하고 활성을 *p*-니트로아닐린(Sigma) 표준 곡선에 의해 평가하였다.

FP28 활성을 다양한 크로모젠성 기질로 평가하고 그 결과를 도 4에 나타냈다. 도 4는 FP28의 아미드 분해 결과를 나타내는 그래프도이다. 활성은 다양한 크로모젠 기질들을 0.3 mM에서 결정하였다. S-2586은 키모트립신에 특이적이다. 이는 키모트립신에 대한 기질 S-2586 (MeO-Suc-Arg-Pro-Tyr-pNA.HCl)에 대하여 가장 높은 활성(278.6 mM/min mg)을 나타냈다. 따라서, FP28은 키모트립신 유사 프로테아제이다.

실시예 6: 피브리노 분해 및 피브리노 분해 에세이

- [0066] 피브린 분해 활성은 Astrup 및 Mullertz의 플라스미노겐-부재 및 플라스미노겐-풍부 피브린 플레이트 법을 약간 변형하여 결정하였다[참조 문헌: Astrup T, Mullertz S. The fibrin plate method for estimating fibrinolytic activity. Arch Biochem Biophys 1952;40:346-351]. 피브린 아가로스 겔(1 mm 두께)은 1.2% 아가로오스, 피브리노겐 4.5 mg/ml 및 트롬빈 0.45 U/ml를 함유하였다. 피브린 용괴를 실온에서 30분 동안 정치시킨 후 피브린 플레이트를 80℃에서 30분 동안 가열하여 다른 피브린 용해 인자들을 불활성화시켰다. 플라스미노겐(5U)을 함유하는 플라스미노겐-풍부 피브린 플레이트는 가열하지 않았다. 다양한 농도의 효소 시료 10 μ l를 플레이트에서 제조된 웰(3.5 mm 직경)에 위치시켰다. 플레이트를 37℃에서 인큐베이션시키고, 웰 주위의 용해된 원의 치수를 다양한 시간 간격으로 측정하였다. 피브린용해 활성은 단백질 μ g 당 용해된 영역(mm²/ μ g)으로 표현하였다[참조 문헌: Simkhada, J. R., Mander, P., Cho, S. S., and Yoo, J.C. (2010) *Process Biochem.* 45, 88-93]. 피브린용해 활성은 또한 겔 전기영동법에 의해 평가하였다[참조문헌: Park, S. E., Li, M. H., Kim, J. S., Sapkota, K., Kim, J. E., Choi, B. S., Yoon, Y. H., Lee, J. C., Lee, H. H., Kim, C. S., and Kim, S. J. (2007) *Biosci Biotechnol Biochem* 71, 2214-2222].
- [0067] 피브리노겐 용해 활성은 상기 Simkhada 등의 방법을 다음과 같이 변형하여 평가하였다. 0.15 M NaCl를 함유한 10 mM Tris-HCl (pH 8.0)에서 제조된 피브리노겐 (1 μ g/ μ l) 150 μ l를 정제 효소(0.1 μ g/ μ l) 45 μ l로 37℃에서 인큐베이션시켰다. 시료 (20 μ l)의 분취량을 다양한 시간 간격으로 철회하고, 10M 우레아, 4% SDS 및 4% β -머캅토에탄올로 이루어진 변성 용액 20 μ l을 첨가하여 반응을 종료시켰다[참고문헌: Li, H. P., Hu, Z., Yuan, J. L., Fan, H. D., Chen, W., Wang, S. J., Zheng, S. S., Zheng, Z. L., and Zou, G. L. (2007) *Phytother Res* 21, 1234-1241]. 얼음물에서 냉각시킨 후, 시료들을 Laemmli의 방법에 따라 SDS-PAGE에 의해 분석하였다[참조 문헌: Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 1970;227:680-685].
- [0068] 피브린 플레이트법에 의한 FP28에 의한 피브린(피브리노겐)의 가수분해에 대한 분석 결과는 도 5에 나타났다. 도 5는 FP28의 피브린분해 활성을 나타내는 도면이다. (a) 1-5는 각각 플라스민 0.75 μ g, 1.5 μ g, 3.0 μ g, 6.0 μ g 및 9.0 μ g이고, 6-9는 FP28 1.26 μ g, 0.28 μ g, 0.7 μ g 및 0.14 μ g이며, 10은 완충액이다. (b) 피브린 플레이트에서 유로키나아제(0.9 μ g), FP28 (0.9 μ g) 및 플라스민 (3.75 μ g)의 시간 경과 피브린 분해 활성, (c) FP28에 의해 촉매되는 피브리노겐 가수분해의 SDS-PAGE 분석 결과이다.
- [0069] 도 5a에서, FP28는 동일 농도의 플라스민에 의해 생긴 것 보다 더 큰 맑은 대역을 나타냈다. 도 5b는 정상적인 피브린 플레이트에서 0 내지 31 시간 동안 유로키나아제 (0.9 μ g), FP28 (0.9 μ g) 및 플라스민(3.75 μ g)에 의해 생성된 시간의존성 맑음 대역을 나타낸다(플레이트는 피브린을 포함할 수도 있는 플라스미노겐을 가열하지도 않았고 추가의 플라스미노겐을 첨가하지도 않았다). 이는 FP28의 활성이 플라스민의 것보다는 크고 유로키나아제의 것보다는 낮음을 의미한다. μ g FP28 당 생성된 평균 용해 서클이 플라스민의 것보다 14.3 ± 2.6 배 높았고, 유로키나아제(1 μ g)에 의해 생성된 것 보다 2 ± 0.15 배 낮았다. 또한, 플라스민 및 FP28의 경우에 플라스미노겐-풍부 및 플라스미노겐-프리 피브린 플레이트 상이에 차이점은 없었다(데이터 나타내지 않음). 반대로, 플라스미노겐을 활성화시키는 것으로 널리 알려진 유로키나아제는 플라스미노겐-풍부 플레이트 및 정상 피브린 플레이트(가열하지 않음)에서 보다 높은 피브린 분해 활성을 보였으나, 그 활성은 플라스미노겐-프리 플레이트에서 미약하였다. 이들 결과는 FP28이 피브린 유사 플라스민을 직접 분해하며 유로키나아제와 같이 플라스미노겐을 플라스민으로 활성화시키지 않음을 의미한다. 보다 중요한 것은 FP28의 활성이 플라스미노겐의 부재하에서 유로키나아제 및 플라스민에 비하여 고도로 우월하다는 것이다. 또한, FP28에 의해 가수분해되는 피브리노겐 분해 활성의 모델을 밝히기 위하여, 분해 산물을 SDS-PAGE에 의해 분석하였다. FP28은 A α -chains (1분내)에 이어 B β -chains (5분내) 및 γ -chains(60분내)에 가수분해하였다(도 5c 참조). 또한, FP28은 모든 교차-결합된 피브린 사슬을 2 시간 내에 완전히 분해하였다(데이터 나타내지 않음).
- [0070]
- [0071] **실시예 7: N-말단 아미노산 서열의 결정**
- [0072] 정제된 FP28의 N-말단 아미노산 서열은 Procise Model 492 protein sequencer(Applied Biosystems, CA, USA)를 사용하여 Edman 분해법에 의해 결정하였다.
- [0073] N-말단의 처음 15개의 아미노산 잔기는 IAGGQAIYAGGGRRS(서열번호 1)이었다. 효소의 아미노산 서열을 BLAST 검색(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>)를 이용하여 분석하였다. 다른 밀접하게 관련된 효소 서열에 비교한 서열들을 표 4에 나타내었으며, FP28의 관찰된 서열이 일부 세린계 프로테아제와 동일하였으나 보고된 피브린 분해 효소와는 상당히 상이한 것임을 보여준다.

표 4

프로테아제 종류	N-말단 아미노산	동일성 %
<i>Streptomyces</i> sp. ACTE 펩티다아제 알파-용해 프로 도메인 단백질	IAGGQAIYAGGGRCs (서열번호 2)	93
<i>Streptomyces fradiae</i> 로 부터의 세린 프로테아제	IAGGEAIYAAGGGRC (서열번호 3)	73
FP28 (본 발명)	IAGGQAIYAGGGRRS (서열번호 1)	100
<i>Fusarium oxysporum</i> 로 부터의 피브린 분해 프로테아제	IVGGTSASAGDFPFI (서열번호 4)	33

상기 표에서 *Fusarium oxysporum*로 부터의 피브린 용해 효소와 동일한 FP28의 잔기들은 밑줄 그었다.

실시예 8: 카라기난-유발 꼬리 혈전 모델 시험

동물-5주령의 수컷 ICR 마우스 (25 ± 2 g)를 대한바이오링크사(충북소재)로부터 구입하였다. 마우스들은 사용하기 적어도 1주일 이전에 순화시켰다. 동물들은 퓨리나 설치류 사료와 생수, 아드리비툼(ad libitum)을 제공하였고, 12-h 암/명 사이클과 25°C 및 $50 \pm 5\%$ 의 상대 습도의 제어된 환경에 유지시켰다. 모든 동물들은 조선대학교의 동물윤리위원회의 규칙과 규정에 따라 수행하였다.

카라기난-유발 꼬리 혈전 모델 시험의 전반적인 절차는 이전의 보고서에 따라 수행하였다[참고문헌: Bekemeier, H., Hirschelmann, R., and Giessler, A. J. (1985) *Agents Actions* 16, 446-451 및 Yan, F., Yan, J., Sun, W., Yao, L., Wang, J., Qi, Y., and Xu, H. (2009) *J Thromb Thrombolysis* 28, 444-448]. 마우스들에 생리 식염수 중에 녹인 1-20 mg/kg의 멸균 카라기난으로 정맥내 주사하여 최상의 결과를 나타내는 적절한 투여량을 결정하였다. 효율적인 혈전 생성을 위하여 보고된 방법을 약간 변형하여 수행하였다[참조문헌: Hagimori, M., Kamiya, S., Yamaguchi, Y., and Arakawa, M. (2009) *Pharmacol Res* 60, 320-323].

혈전 형성에 미치는 낮은 온도를 평가하기 위하여, 카라기난 주사 직후 꼬리를 빙수조에 2분간 담구었다. 이 후, 꼬리들을 다양한 시간 간격(1 내지 30 분)에서 연결하여 꼬리의 최대 혈전을 검사하였다. 와인-채색 꼬리 혈전의 길이, 병리학적인 정도 및 외양 비율을 24 시간 동안 관찰하였다.

카라기난-유발 마우스 꼬리 혈전 모델에서 혈전용해 활성의 시험은 60마리의 마우스를 4개의 그룹으로 나누었다($n = 15$). 그룹 1은 생리식염수를 투여한 음성 대조군; 그룹 2 및 3은 생리식염수에 녹은 정제 FP28을 150 U 및 300 U를 주사하였고, 그룹 4는 양성 대조군으로서 유로키나아제 300 U를 주사하였다. FP28 및 유로키나아제는 카라기난 주사 30분 전에 복강내 투여하였다. FP28 단위는 유로키나아제 표준 곡선에 의해 계산한 유로키나아제 단위와 같다.

카라기난 유도 마우스 꼬리 혈전에 있어서 FP28의 피브린 용해 효과는 표 5 및 도 6에 나타내었다. 도 6은 카라기난 유발 마우스 꼬리 혈전 모델에 있어서 FP28의 생체내 혈전용해 활성을 나타내는 도면이다. (A) 음성 대조군(카라기난 주사후 생리식염수만을 주입), (B) 효소 (300 U) 처리그룹, (C) 양성 대조군(유로키나아제 300 U).

표 5

시험군	카라기난 투여량 (mg/kg)	동물수	빈도(%)	혈전의 길이(cm)
식염수	10	15	13/15 (87)	4.15 ± 1.7
FP28 (150 U)	10	15	5/15(33)	1.17 ± 1.7
FP28 (300 U)	10	15	3/15(20)	0.63 ± 1.3
유로키나아제 (300 U)	10	15	1/15(6.7)	0.03 ± 1.3

혈전의 길이는 평균 $\pm$ SEM으로 나타냈다. 음성 대조군(카라기난 단독)에서 평균 혈전의 길이는 4.15 ± 1.7 cm 이었다. 이 군에 있어서, 심각한 괴사성 꼬리가 카라기난 주사 24시간 후부터 관찰되었고, 다음 24시간 후에는 거의 50%의 마우스가 치사하였다. 모든 경우에 있어서 꼬리 괴사를 가진 조각은 동물들이 살아 있을 때에

서 처졌다. FP28의 경우에 평균 혈전 길이는 150 U를 처리한 군에서는 1.1 ± 1.7 이었고, 300 U를 처리한 군에서는 0.63 ± 1.3 이었다. 따라서, 카라기난-유발 꼬리 혈전은 투여량 의존적 방식으로 FP28에 의해 억제되었다. 300 U의 유로키나아제를 양성 대조군으로서 고려하였으며 혈전의 길이는 0.03 ± 1.3 이었다. 따라서, 이 군에서는 카라기난-유발 꼬리 혈전은 거의 억제되었다.

[0084] 실시예 9: 제약학적 제제

[0085] 제형의 형태(정제)

[0086] 실시예 2-3의 혈전용해효소 50 mg

[0087] 락토오스 80 mg

[0088] 전분 17 mg

[0089] 스테아르산 마그네슘 3 mg

[0090] 결정성 셀룰로오스 10 mg

[0091] 본 발명의 한 실시 형태는 그 예를 상기에 나타낸 정제의 유효 성분으로써 상기 피브린용해효소의 용도이다. 정제는 통상의 방법에 의해 제조될 수 있으며, 한 바람직한 실시형태는 통상의 장용성 피복(예를 들면, 히드록시프로필메틸 셀룰로오스 프탈레이트), 당코팅 또는 피막 코팅을 갖는 정제 또는 연질캡셀 형태이다.

산업상 이용가능성

[0092] 이상 설명한 바와 같이, 본 발명에 따른 피브린 용해 효소는 그의 N-말단 아미노산 서열, 프로테아제 억제제의 영향 및 피브리노겐 용해 모드에 기초하여 신규 타입의 세린계 프로테아제일 수 있다. 적절한 pH 및 온도에서 고도로 활성이고 안정된 이 피브린 용해 효소는 혈전증의 치료제로서 사용될 수 있다.

수탁번호

[0093]

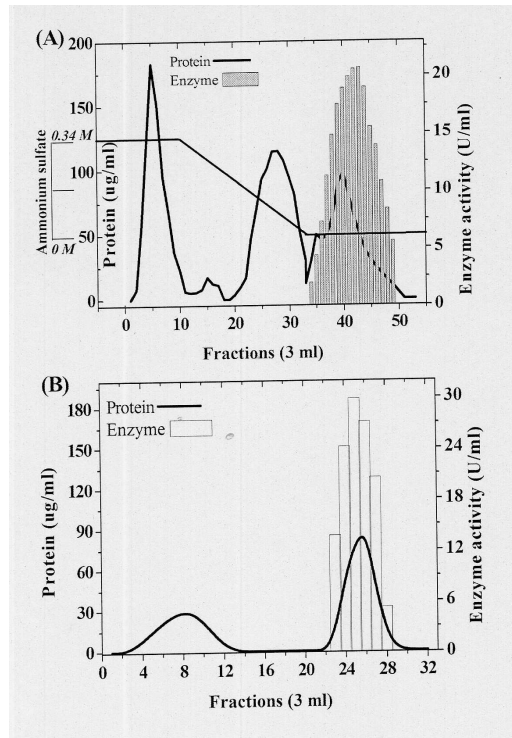
기탁기관명 : 한국생명공학연구원

수탁번호 : KCTC18202P

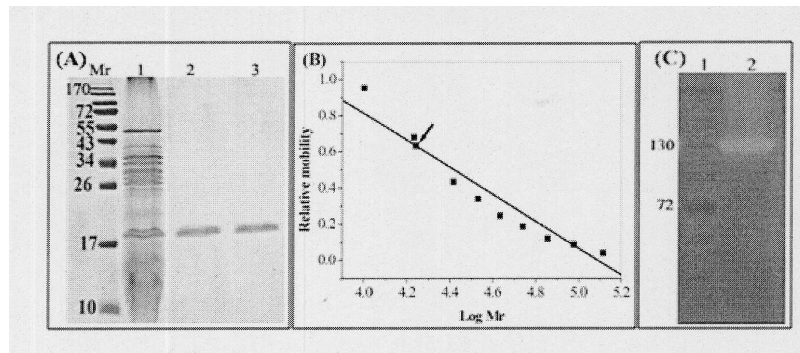
수탁일자 : 20101115

도면

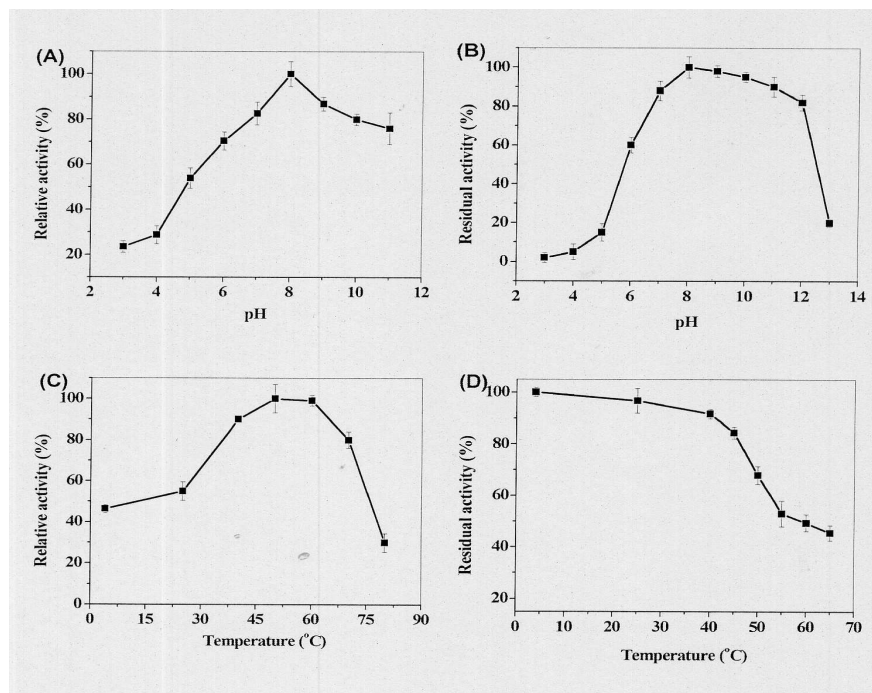
도면1



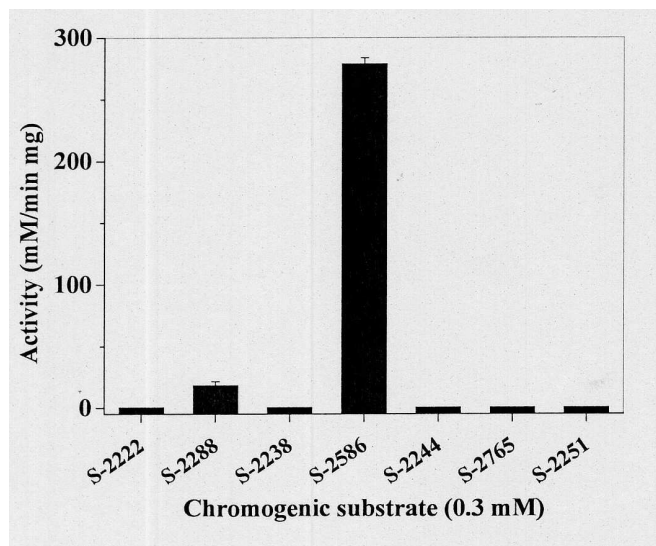
도면2



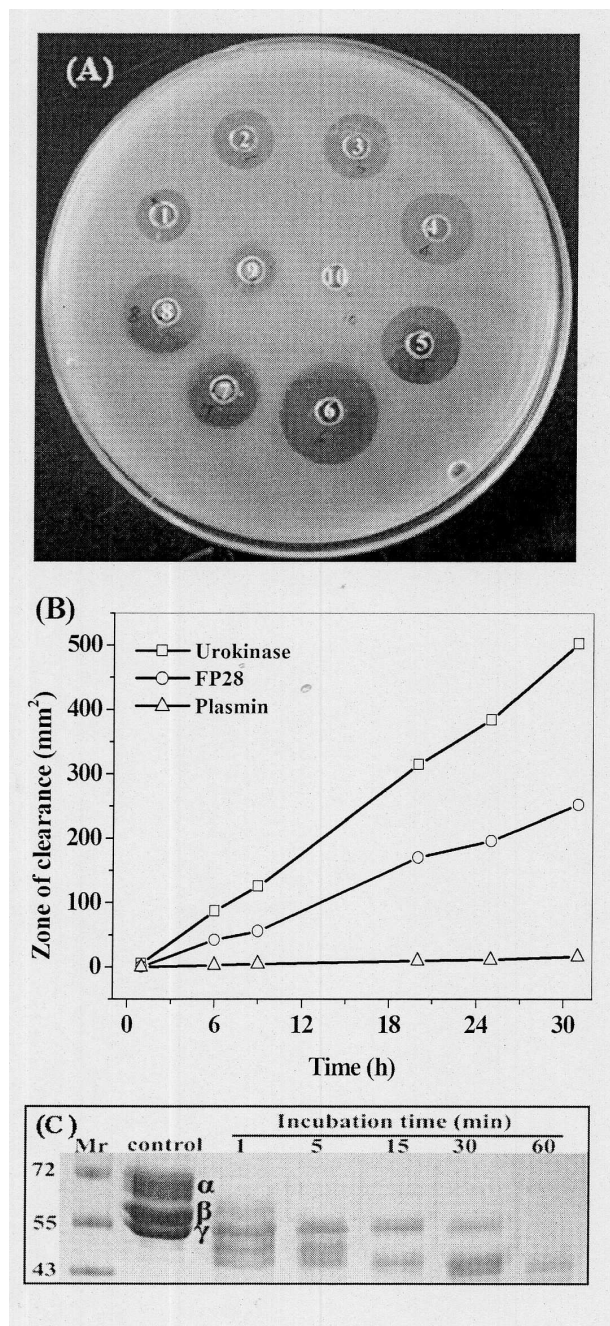
도면3



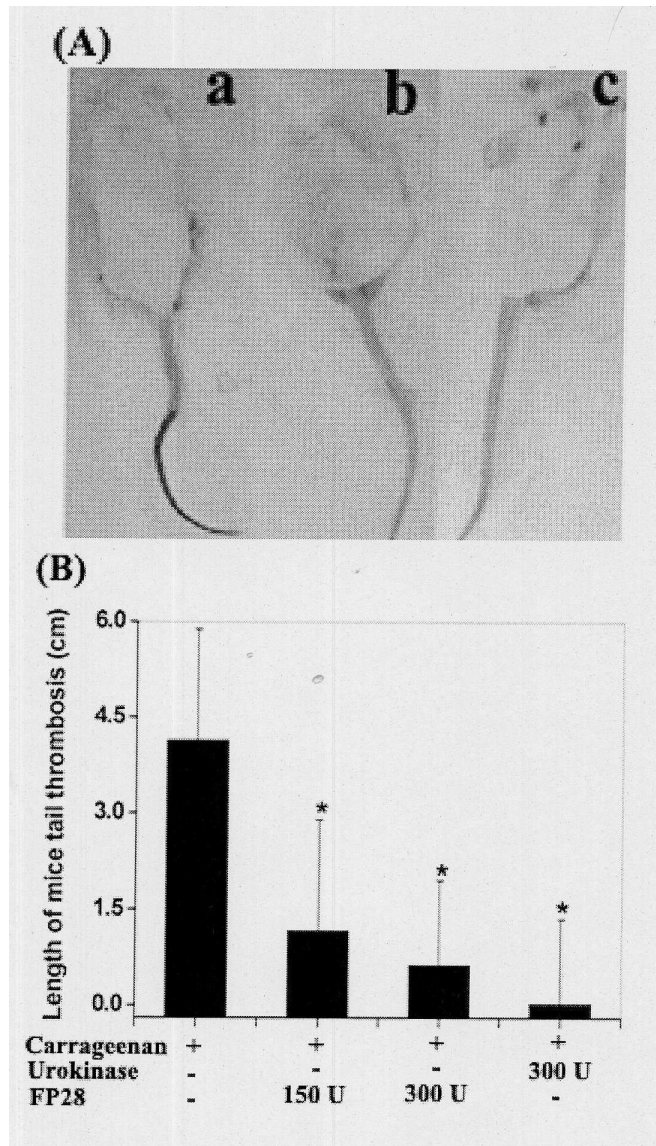
도면4



도면5



도면6



서열 목록

<110> Chosun University Industry-Academic Cooperation Foundation

<120> Fibrinolytic protease from Streptomyces sp. CS628

<130> pkr-0240

<160> 4

<170> Kopatent In 1.71

<210> 1

<211> 15

<212> PRT

<213> Streptomyces sp.

<400> 1

Ile Ala Gly Gly Gln Ala Ile Tyr Ala Gly Gly Gly Arg Arg Ser

1

5

10

15

<210> 2

<211> 15

<212> PRT

<213> Streptomyces sp.

<400> 2

Ile Ala Gly Gly Gln Ala Ile Tyr Ala Gly Gly Gly Arg Cys Ser

1 5 10 15

<210> 3

<211> 15

<212> PRT

<213> Streptomyces fradiae

<400> 3

Ile Ala Gly Gly Glu Ala Ile Tyr Ala Ala Gly Gly Gly Arg Cys

1 5 10 15

<210> 4

<211> 15

<212> PRT

<213> Fusarium oxysporum

<400> 4

Ile Val Gly Gly Thr Ser Ala Ser Ala Gly Asp Phe Pro Phe Ile

1 5 10 15