(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(51) Int. Cl.[6]
C12N 15/17

(11) 공개번호 특1996-0031602
(43) 공개일자 1996년09월17일

(21) 출원번호 특1995-0002751
(22) 출원일자 1995년02월15일

(71) 출원인 주식회사 한일합섬 김정재
경상남도 마산시 회원구 양덕동 222번지(우 : 630-490)
(72) 발명자 신항철
경기도 광명시 철산동 224번지 쌍마한신아파트 102동 1206호
장승구
서울특별시 강남구 압구정동 현대아파트 79동 604호
김대영
경기도 시흥시 신천동 141-18
(74) 대리인 김동완

심사청구 : 있음

(54) 유전자 조환에 의한 사람 인슐린 전구체의 제조 및 이를 이용한 인슐린의 제조 방법

요약

본 발명은 종양괴사인자 알파의 DNA단편을 융합파트너로 벡터에 삽입하고, 하기 일반식을 지닌 일슐린 전구체를 코우딩하는 DNA를 벡터에 삽입하여 형질전환시킨 벡터를, 미생물 숙주에 도입하여 배양후, 배양물을 분리, 정제함을 특징으로 하는 하기 일반식을 지닌 인슐린 전구체의 제조방법에 관한 것이다.

B사슬-X-A사슬 상기식에서 X는 다음의 식을 갖는다. A-A-B-C-D-En-A-A A : 아르지닌 또는 라이신, B : 불특정 아미노산, C : 프롤린, D : 글라이신, 아르지닌 또는 라이신, E : 불특정 아미노산 서열, n은 0부터 50이다.

대표도

도1

명세서

[발명의 명칭]

유전자 조환에 의한 사람 인슐린 전구체의 제조 및 이를 이용한 인슐린의 제조 방법

[도면의 간단한 설명]

제1도는 플라스미드 pT7-T1 및 pT7-T2의 조립에 관한 개요를 나타낸 것이다,

제2도는 플라스미드 pT1-hPI 및 pT2-hPI의 조립에 관한 개요를 나타낸 것이다,

제3도는 플라스미드 pT1-M1PI, pT1-M2PI, pT1-M3PI 및 pT1-M4PI의 조립에 관한 개요를 나타낸 것이다.

본 내용은 요부공개 건이므로 전문 내용을 수록하지 않았음.

(57) 청구의 범위

청구항 1

아래의 일반식의 펩타이드 서열을 갖는 일슐린 전구체 B사슬-X-A사슬 상기식에서 X는 다음의 식을 갖는다. A-A-B-C-D-En-A-A A : 아르지닌 또는 라이신, B : 불특정 아미노산, C : 프롤린, D : 글라이신, 아르지닌 또는 라이신, E : 불특정 아미노산 서열, n은 0부터 50이다.

청구항 2

제1항에 있어서, B가 알라닌, 타이로신, 히스티딘, 글라이신 중의 하나의 아미노산이고, n이 20이고 E가 아스파라진산, 발린 또는 아르지닌, 글라이신임을 특징으로 하는 일슐린 전구체.

청구항 3

제2항에 있어서, B,C,D가 각각 알라닌, 프롤린, 글라이신이고, E가 아스파라진산, 발린임을 특징으로 하는 일슐린 전구체.

청구항 4

제2항에 있어서, B,C,D가 각각 타이로신, 프롤린, 글라이신이고, E가 아스파라진산, 발린임을 특징으로 하는 일슐린 전구체.

청구항 5

제2항에 있어서, B,C,D가 각각 히스티딘, 프롤린, 글라이신이고, E가 아스파라진산, 발린임을 특징으로 하는 일슐린 전구체.

청구항 6

제1항에 있어서, B,C,D가 각각 글라이신, 프롤린, 글라이신이고, n이 0임을 특징으로 하는 인슐린 전구체.

청구항 7

제2항에 있어서, B,C,D가 각각 글라이신, 프롤린, 아르지닌이고, E가 아르지닌, 글라이신임을 특징으로 하는 인슐린 전구체.

청구항 8

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항의 인슐린 전구체를 코우딩하는 DNA 염기서열.

청구항 9

제8항의 염기서열 삽입시킨 벡터.

청구항 10

제9항의 벡터에 의해 형질 전환된 미생물.

청구항 11

제10항에 있어서, pT1-M1PI로 형질 전환된 대잘균 BL21(DE 3)(기탁번호 : KCCM-10059)

청구항 12

제10항에 있어서, pT1-M2PI로 형질 전환된 대잘균 BL21(DE 3)(기탁번호 : KCCM-10060)

청구항 13

종양괴사인자 알파의 DNA단편을 융합파트너로 벡터에 삽입하고, 제1항의 일반식을 지닌 인슐린 전구체를 코우딩하는 DNA를 벡터에 삽입하여 형질전환시킨 벡터를, 미생물 숙주에 도입하여 배양후, 배양물을 분리, 정제함을 특징으로 하는 제1항의 일반식을 지닌 인슐린 전구체의 제조방법.

청구항 14

제13항에서 만들어진 일슐린 전구체로부터 리폴딩, 단백질효소 가수분해등의 공정을 거쳐 인체 인슐린을 제조하는 방법.

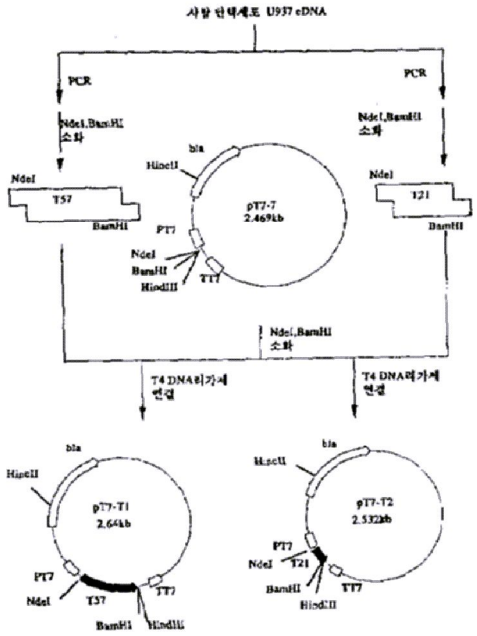
청구항 15

제14항에서 만들어진 인체 일슐린 및 약학적으로 허용되는 담체를 함유하는 약학적 조성물.

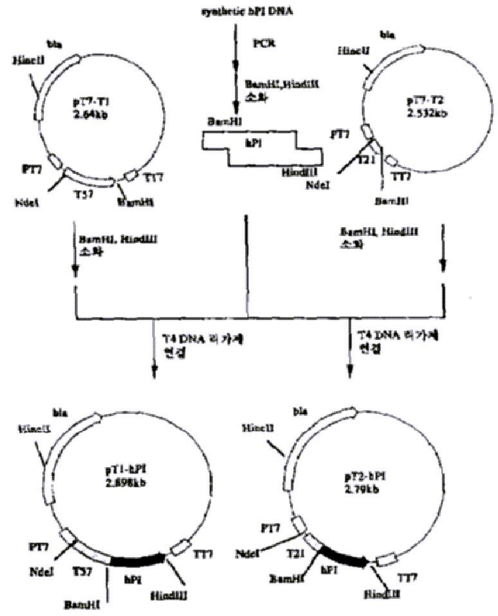
※ 참고사항 : 최초출원 내용에 의하여 공개하는 것임.

도면

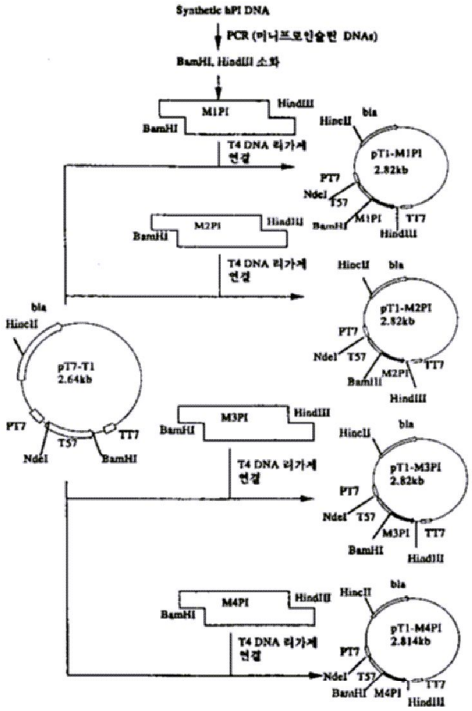
도면1


사람 단핵세포 U937 cDNA
PCR
PCR
NdeI,BamHI 소화
NdeI,BamHI 소화
NdeI
T57
BamHI
bla
HincII
pT7-7
2.469kb
PT7
NdeI
BamHI
HindIII
T17
NdeI
T21
BamHI
NdeI,BamHI 소화
T4 DNA리가제 연결
T4 DNA리가제 연결
bla
HincII
pT7-T1
2.64kb
PT7
NdeI
T57
BamHI
HindIII
T17
bla
HincII
pT7-T2
2.532kb
PT7
NdeI
T21
BamHI
HindIII
T17

도면2


synthetic hPI DNA
PCR
BamHI,HindIII 소화
BamHI
hPI
HindIII
NdeI
bla
HincII
pT7-T1
2.64kb
PT7
NdeI
T57
BamHI
T17
bla
HincII
pT7-T2
2.532kb
PT7
T21
NdeI
BamHI
T17
BamHI, HindIII 소화
BamHI, HindIII 소화
T4 DNA 리가제 연결
T4 DNA 리가제 연결
bla
HincII
pT1-hPI
2.898kb
PT7
NdeI
T57
hPI
BamHI
HindIII
T17
bla
HincII
pT2-hPI
2.79kb
PT7
NdeI
T21
BamHI
hPI
HindIII
T17

도면3


Synthetic hPI DNA
PCR (미니프로민솔된 DNAs)
BamHI, HindIII 소화
M1PI
HindIII
BamHI
T4 DNA 리가제 연결
HincII
bla
pT1-M1PI 2.82kb
PT7
NdeI
T57
M1PI
T77
HindIII
M2PI
pT1-M2PI 2.82kb
M2PI
pT7-T1 2.64kb
M3PI
pT1-M3PI 2.82kb
M3PI
M4PI
pT1-M4PI 2.814kb
M4PI