

公告本

申請日期	90 11 13
案 號	90128128
類 別	C12N ¹⁵ / _{E2} , C12N ¹⁵ / _{E6} , C12N ¹⁵ / _{E7}

A4
C4

(以上各欄由本局填註)

發 明 專 利 說 明 書
~~新 型~~

一、發明名稱	中 文	重組DNA-衍生tPA或K2S分子之大量製備方法
	英 文	METHODS FOR LARGE SCALE PRODUCTION OF RECOMBINANT DNA-DERIVED tPA OR K2S MOLECULES
二、發明人	姓 名	1.阿蘭亞 馬諾斯洛伊 ARANYA MANOSROI 2.仁拉迪 馬諾斯洛伊 JIRADEJ MANOSROI 3.查才 塔亞皮瓦塔那 CHATCHAI TAYAPIWATANA 4.費德里克 構斯 FRIEDRICH GOETZ 5.洛夫-古恩瑟 渥尼爾 ROLF-GUENTHER WERNER
	國 籍	1.-3.均泰國 4.-5.均德國
三、申請人	住、居所	1.2.均泰國清邁市慕安鎮濃后區馬海道路瑟里瓦塔那尼福斯234/171號 3. 泰國曼谷市幾內瓦路莎普拉度369/73號 4.德國圖賓根市赫普斯坦霍夫路31號 5.德國畢伯拉克市赫勾-海林街72號
	姓 名 (名稱)	德商百靈佳殷格翰國際股份有限公司 BOEHRINGER INGELHEIM INTERNATIONAL GMBH
代 表 人 姓 名	國 籍	德國
	住、居所 (事務所)	德國萊茵區英格翰市
		1.戴特. 勞頓 博士 DR. DIETER LAUDIEN 2.漢斯-彼得 穆勒 HANS-PETER MULLER

(由本局填寫)

承辦人代碼：
大類：
I P C 分類：

A6
B6

本案已向：

國(地區) 申請專利，申請日期： 案號： ， 有 無主張優先權

英國 2000年11月14日 0027779.8 有 無主張優先權

有關微生物已寄存於： 寄存日期： ，寄存號碼：

裝
訂
線

五、發明說明 (1)

本發明係屬於血栓溶解及於原核細胞中製備組織胞漿素原活化子(tPA)衍生物之領域。

本發明係關於用以於原核細胞中製備重組 DNA-衍生 tPA、其變體或(Kringle 2 絲胺酸)K2S 分子或其變體之方法，其中該 tPA 或 K2S 或變體係呈活化及正確摺疊之形式分泌至細胞外，且該原核細胞含有並可表現一種載體，其包含編碼該 tPA 或 K2S 或變體之 DNA 實際連接於編碼訊號胜肽 OmpA 之 DNA 上。本發明進一步關於可藉由該方法取得之特定 K2S 衍生物。本發明進一步係關於該 DNA 分子及使用該 DNA 分子於該方法中。

背景技藝

組織胞漿素原活化子(tPA)係為一種含有 527 個胺基酸殘基之多太(27)，其分子量為 72 kDa。該分子分成五個構造性功能區域。緊鄰 N-端區域者為環狀之手指功能區域，其後接著生長因子功能區域。其後接著兩個相似之功能區域，kringle 1 與 kringle 2。手指及 kringle 2 功能區域均專一性結合於纖維蛋白團，因而加速結合之胞漿素原之 tPA 蛋白質活化。Kringle 2 之下游為絲胺酸蛋白酶，其催化位置位於 C-端。絲胺酸蛋白酶係負責將胞漿素原轉化成胞漿素，此為纖維蛋白生成與團塊溶解之體內平衡中之重要反應。tPA 之正確摺疊需要分子內 17 個雙硫價橋之正確配對(1)。

臨床上，tPA 係被選用來治療急性心肌梗塞、肺栓塞、中風、周圍動脈閉塞、及其他血栓疾病之溶血栓劑。其優點

五、發明說明 (2)

為不引起系統性出血及纖維蛋白原枯竭之副作用(7)。
Bowes 黑色素瘤細胞是最先用於治療用途之 tPA 生產中作為來源者(12)。因為臨床使用上需要具有良好產率之高度純化蛋白質之有效率生產之固定製程，故於哺乳類細胞中進行全長重組-tPA (r-tPA)之構築。以 tPA 基因轉染中國倉鼠卵巢細胞以合成 r-tPA (8, 22)。由培養基中回收並純化藉由哺乳動物細胞發酵系統生產之重組產物。由於具簡單及經濟生產之吸引力，許多人致力於研究從微生物，特別是從細胞，且更特別是從 *Escherichia coli* 生產 tPA(10, 13, 30)。關於其低產率及包覆體之生成，其可導致錯誤摺疊及不活化酵素，有許多策略已被提出以克服此等問題。

主數種之刪除突變變種，包括 kringle 2 加絲胺酸蛋白酶 (K2S)係在考慮之列。然而，重組-K2S (r-K2S)之酵素活性之獲得僅可於得自細胞質成份之經純化包覆體之再摺疊程序達成時(16, 29)。為要避免繁複的再摺疊過程，錯誤摺疊之蛋白質雜質及環原生質之蛋白質傳遞，可使用特殊之細菌表現系統(6,31)。儘管 tPA 之環原生質表現，過度表現會導致不活化聚集，縱使於環原生質之相對較高氧化狀態下。

於先前技藝中，對於在 *E. coli* 中製備重組 K2S 之方法有一些說明。然而，並未揭示可大量製備生物活化 K2S 之具成本效益之方法。

Obukowicz 等人(25)從環原生質空間表現並純化 r-K2S。此方法之明顯缺點為需額外之環原生質萃取步驟，其並不適於大量製備。

五、發明說明 (3)

Saito 等人(29)揭示 r-K2S 之細胞質表現。該作者使用生體內復性程序來表現 r-K2S，其係以包覆體之形式從 E. coli 之細胞質空間中純化出來。Boehringer Mannheim 使用類似之繁複變性/再摺疊方法，其涉及細胞分解，於變性及還原狀態下溶解並於 GSH/GSSG 存在之下於氧化狀態下再活化之步驟，其並不具成本效益(24)且需要以可能之抗原潛力將胺基酸序列之突變。

於 1991 年，Waldenstrom 等人(34)構築一種載體(pEZZK2P)，用以將 kringle 2 加絲胺酸蛋白酶功能區域分泌至 E. coli 培養液中。使用羧胺由 IgG-Sepharose 純化區分中移除 ZZ 融合胜肽。切割劑羧胺需要將 kringle 2 加絲胺酸蛋白酶之切割位置之修飾(Asn¹⁷⁷→Ser 及 Asn¹⁸⁴→Gln)，以保護其不受羧胺之水解。然而，所得之非原態，非適當摺疊之 K2S 分子並不適於治療用途。其並未揭示關於纖維蛋白結合之非酵素活性/蛋白酶活性。該不尋常序列甚至可能活化人類免疫系統。

因此本發明之所面臨之問題係提供可商業化應用於 tPA 分子及其衍生物，例如：K2S 之大量製備方法，其中該 K2S 係以生物活化之形式分泌至培養液中。

發明之說明

問題於本發明之申請專利訴求及說明書之範圍內獲得解決。

申請專利訴求及說明書之單一或多重使用並不受任何限制且亦包括其它型式。

五、發明說明 (4)

本發明係關於在原核細胞內製備重組 DNA 衍生性組織胞漿素原活化子(tPA)、tPA 變體、Kringle 2 絲胺酸蛋白酶分子(K2S)或 K2S 變體之方法，其中該 tPA、tPA 變體、K2S 或 K2S 變體係可胞外分泌成活化且正確摺疊之蛋白質，其特徵為該原核細胞包含並可表現一載體，其包含編碼該 tPA 之 DNA，其實際連接於編碼訊號胜肽 OmpA 之 DNA 或其功能性衍生物。

出乎意料地，單獨使用訊號胜肽 OmpA 及/或併用 N-端胺基酸 SEGN (SEQ ID NO : 9) / SEGNSD (SEQ ID NO : 10)可較先前技藝中之任何其他方法有較大程度之重組 DNA-衍生性 tPA、tPA 變體、K2S 或 K2S 變體轉移至外表面及促進功能性及活性分子釋放至培養基中。穿越外膜之前，重組 DNA-衍生性蛋白質係先根據本發明之方法正確摺疊。切下訊號胜肽以製備成熟分子。出乎意料地，訊號胜肽移除之效率極高且可導致重組 DNA-衍生性蛋白質之正確摺疊。

該訊號胜肽 OmpA 可與 SecE 交互作用並藉由 SecA 產生之能量而穿過內膜，其結合於 Sec 成份(SecE-SecY)。SecY 生成分泌孔洞以遞送根據本發明之重組 DNA-衍生性蛋白質。革蘭氏陰性細菌之外膜及內膜間之空間，環原生質，有較細胞質空間為高之氧化狀態。此可支持重組蛋白質(例如：K2S)於環原生質中之雙硫鍵之生成及適當摺疊以產生活性分子。根據本發明，訊號胜肽需切下以生產成熟分子。GspD 分泌素與 GspS 脂蛋白於外膜上之複合物提供將根據本發明之重組 DNA 衍生性蛋白質分泌至胞外介質之門

五、發明說明 (5)

徑。此等分泌程序需要能量，其藉由 GspE 核苷酸結合蛋白質於細胞質中產生再轉移至內膜蛋白質(Gsp G-J, F 及 K-N)。GspC 藉由於一系列膜蛋白質(Gsp G-J, F 及 K-N)及 GspD 間生交叉連接子而將能量轉移之 GspD。於成功穿越外膜之前，重組 DNA 衍生性蛋白質已先正確摺疊。

根據本發明之實際連接係指將編碼 tPA、tPA 變體、K2S 分子或 K2S 變體之 DNA(較佳為於其 N 端部分包含編碼 SEGN 或 SEGNSD 之核酸)轉殖至載體內最靠近 OmpA DNA 處以便達成 OmpA-tPA、tPA 變體、K2S 分子或 K2S 變體-融合蛋白質融合蛋白質之表現並使之直接分泌至原核宿主細胞外。典型地，主要之 tPA、tPA 變體、K2S 分子或 K2S 變體係可分泌且可再藉由適當之方法純化，例如：以硫酸銨沉澱及/或親和性層析及進一步之純化步驟。本發明亦包括使用誘導劑，例如：IPTG 或 IPTG 合併甘油，改良培養條件及收穫期以使活化蛋白質量達最高。

於較佳之具體實施例中，該編碼 OmpA 訊號胜肽之 DNA 可融合至胺基酸序列為 SEGN 或 SEGNSD 或編碼核酸序列 TCTGAGGGAAAC (SEQ ID NO: 20)或 TCTGAGGGAAACAGTGAC (SEQ ID NO: 1)上並位於 tPA、tPA 變體、K2S 分子或 K2S 變體之 N 端部分內或 N 端部分處。因此，較佳者，該融合蛋白質包含 OmpA-SEGNSD-tPA、-tPA 變體、-K2S 分子或 -K2S 變體。再更佳者，該特徵為 SEGN(SEQ ID NO: 2)之胺基酸可攜有點突變或可由非天然性胺基酸取代。再更佳者，OmpA 與 SEGN 或 SEGNSD 與 tPA、tPA 變體、K2S 分子或

五、發明說明 (6)

K2S 變體間有一個胺基酸或非胺基酸間隔子。

因此，於根據本發明之較佳方法中，該原核細胞包含並可表現載體，其包含編碼該 tPA、tPA 變體、K2S 分子或 K2S 變體之 DNA 實際連接於編碼訊號胜肽 OmpA 之 DNA，其係實施連接於序列為 TCTGAGGGAAACAGTGAC 之核酸分子或其功能性衍生物。

根據本發明之方法包含原核宿主細胞，例如，但不限於：Escherichia coli(E. coli)，Bacillus subtilis，Streptomyces，Pseudomonas，例如：Pseudomonas putida，Proteus mirabilis，Saccharomyces，Pichia 或 Staphylococcus，例如：Staphylococcus carnosus。較佳者，根據本發明之該原核細胞係為革蘭氏陰性細胞。較佳者，根據本發明之方法之特徵亦為該原核細胞係為 E. coli。適當之菌株包括，但不限於 E. coli XL-1 blue，BL21(DE3)，JM109，DH 系列，TOP10 及 HB101。

較佳者，根據本發明之方法之特徵亦為進行下列步驟：

- a) 藉由 PCR 增幅編碼 tPA、tPA 變體、K2S 分子或 K2S 變體之 DNA；
- b) 純化 PCR 產物；
- c) 將該 PCR 產物嵌入包含編碼 OmpA 信號胜肽之 DNA 及編碼 gp III 之 DNA 之載體內，其使用之方法可使該 PCR 產物實際連接於該載體之編碼 OmpA 信號胜肽之 DNA 之上游並連接於編碼 gp III 之 DNA 之下游；
- d) 於該 tPA、tPA 變體、K2S 分子或 K2S 變體與 gpIII 之間嵌入終止密碼組；

五、發明說明 (7)

e) 藉由原核細胞表現該載體

f) 純化 tPA、tPA 變體、K2S 分子或 K2S 變體。

於根據本發明之步驟 a) 中，引子之選擇/設計很重要，使其可選殖出位於表現載體之正確位置及方向上之 DNA (參見實例 1)。因此，實例 1 及圖 4 中示例之引子包含本發明之重要面向。步驟 c) 之 gp III 係指基因蛋白質 III，其主要存在於噬菌體質體載體中。嵌入終止密碼組可避免 gp III 之轉錄，因而最後導致所欲 tPA、tPA 變體、K2S 分子或 K2S 變體之分泌。任何用以嵌入終止密碼組之適當方法均可使用，例如：定位突變 (例如：Weiner MP, Costa GL (1994) PCR Methods Appl 4(3): S131-136; Weiner MP, Costa GL, Schoettlin W, Cline J, Mathur E, Bauer JC (1994) Gene 151(1-2):119-123; 亦參見實例 1)。

任何載體均可用於本發明之方法，該載體較佳者為噬菌體質體載體 (請見以下)。

較佳者，根據本發明之方法之特徵亦為該 tPA、tPA 變體、K2S 分子或 K2S 變體係選自人類組織胞漿素原活化子 (tPA, 圖 16) 或其片段、功能性變體、對偶變體、次單元、化學衍生物、融合蛋白質或糖苷化變體。此等片段、對偶變體、功能性變體、基於退化性核酸密碼之變體，具有根據本發明之 tPA 蛋白質之融合蛋白質、根據本發明之 tPA 之糖苷化變體可包括一個、數個或所有之下列功能區域或次單元或其變體：

1. 手指功能區域 (4-50)

五、發明說明 (8)

2. 生長因子功能區域(50-87)
3. Kringle 1 功能區域(87-176)
4. Kringle 2 功能區域(176-262)
5. 蛋白酶功能區域(276-527)

功能區域之編號/命名係根據 Genbank 登錄號碼 GI 137119 或 Nature 301 (5897), 214-221 (1983)。

較佳者，根據本發明之方法之特徵亦為該 tPA、tPA 變體、K2S 分子或 K2S 變體係選自人類組織胞漿素原活化子(tPA)或其片段、功能性變體、對偶變體、次單元、化學衍生物、融合蛋白質或糖苷化變體之 Kringle 2(4.)加絲胺酸蛋白酶(5.)K2S 變體。更佳者，根據本發明之方法之特徵亦為該載體係為噬菌體質體載體，其包含編碼 OmpA 訊號胜肽之 DNA 及編碼 gpIII 之 DNA。

更佳者，根據本發明之方法之特徵亦為該載體係為 pComb3HSS 噬菌體質體(亦參見實例 1)。

更佳者，根據本發明之方法之特徵亦為該 DNA 序列包含或由下列編碼 OpmA 及 K2S 或其功能性變體或由於退化性核苷酸密碼之變體之 DNA 序列所組成：

```

ATGAAAAAGACAGCTATCGCGATTGCAGTGGCACTGGCTGGTTTTCGCTACCGTGGCC
CAGGCGGCCTCTGAGGGAAACAGTGACTGCTACTTTGGGAATGGGTCAGCCTACCG
TGGCACGCACAGCCTCACCGAGTCGGGTGCCTCCTGCCTCCCGTGGAATTCCATGAT
CCTGATAGGCAAGGTTTACACAGCACAGAACCCAGTGCCCAGGCACTGGGCCTGG
GCAAACATAATTACTGCCGGAATCCTGATGGGGATGCCAAGCCCTGGTGCCACGTG
CTGAAGAACCGCAGGCTGACGTGGGAGTACTGTGATGTGCCCTCCTGCTCCAGETGC
GGCCTGAGACAGTACAGCCAGCCTCAGTTTCGCATCAAAGGAGGGCTCTTCGCCGA
CATCGCCTCCCACCCCTGGCAGGCTGCCATCTTTGCCAAGCACAGGAGGTCGCCCGG
AGAGCGGTTCTGTGCGGGGGCATACTCATCAGCTCCTGCTGGATTCTCTCTGCCGC
CCACTGCTTCCAGGAGAGGTTTCCGCCCCACCACCTGACGGTGATCTTGGGCAGAAC
ATACCGGGTGGTCCCTGGCGAGGAGGAGCAGAAATTTGAAGTCGAAAAATACATTG

```

五、發明說明 (9)

TCCATAAGGAATTCGATGATGACACTTACGACAATGACATTGCGCTGCTGCAGCTGA
 AATCGGATTCGTCCCGCTGTGCCAGGAGAGCAGCGTGGTCCGCACTGTGTGCCTTC
 CCCC GGCGGACCTGCAGCTGCCGGACTGGACGGAGTGTGAGCTCTCCGGCTACGGC
 AAGCATGAGGCCTTGTCTCCTTTCTATTTCGGAGCGGCTGAAGGAGGCTCATGTGAGA
 CTGTACCCATCCAGCCGCTGCACATCACAACTTTACTTAACAGAACAGTCAACCGAC
 AACATGCTGTGTGCTGGAGACACTCGGAGCGGCGGGCCCCAGGCAAACCTTGCACGA
 CGCCTGCCAGGGCGATTTCGGGAGGCCCTGGTGTGTCTGAACGATGGCCGCATGA
 CTTTGGTGGGCATCATCAGCTGGGGCCTGGGCTGTGGACAGAAGGATGTCCCGGGT
 GTGTACACAAAGGTTACCAACTACCTAGACTGGATTTCGTGACAACATGCGACCG
 (SEQ ID NO:2)

更佳者，根據本發明之方法之特徵亦為 OmpA 之 DNA 序列包含或由下列序列或其功能性變體或由於退化性核苷酸密碼之變體之 DNA 序列所組成：

ATGAAAAAGACAGCTATCGCGATTGCAGTGGCACTGGCTG
 GTTTCGCTACCGTGGCCCAGGCGGCC(SEQ ID NO : 3)。

該 DNA 編碼下列 OmpA 之胺基酸序列。OmpA 因而包含或由具有下列胺基酸序列或其片段、功能性變體、對偶變體、次單元、化學衍生物、融合蛋白質或糖苷化變體之蛋白質所組成，作為本發明之一部分：

MKKTAIAlAVALAGFATVAQAA(SEQ ID NO : 21)。

未轉譯區域可包含調節性元件，例如：轉錄起始單元(起動子)或增強子。該起動子可，例如：為構成性，可誘導性或發展調控性起動子。較佳者，不排除其他已知之起動子，人類細胞巨大型病毒(CMV)及勞司肉瘤病毒(RSV)之構成性起動子，及類人猿病毒 40 (SV40)和單純皰疹起動子。根據本發明之可誘導性起動子包含抗生素抗性起動子，熱休克起動子，荷爾蒙誘導性“乳房腫瘤病毒起動子”及 metallothioneine 起動子。較佳之起動子包括 T3 起動子，T7

五、發明說明 (10)

起動子，Lac/aral 及 Ltet0-1。

更佳者，根據本發明之方法之特徵亦為編碼 tPA、tPA 變體、K2S 分子或 K2S 變體之 DNA 位於 lac 起動子及/或核糖體結合位置，例如：Shine-Dalgarno 序列之前(亦參見實例)。

較佳者，根據本發明之方法之特徵亦為該編碼 tPA、tPA 變體、K2S 分子或 K2S 變體之 DNA 係選自編碼至少 90% 之人類組織胞漿素原活化子蛋白質之胺基酸 87-527，174-527，180-527 或 220-527 之 DNA 群。

更佳者，根據本發明之方法之特徵亦為 K2S 之 DNA 序列包含或由下列序列所組成：

TCTGAGGGAAACAGTGACTGCTACTTTGGGAATGGGTCAGCCTACCGTGGCACGCA
CAGCCTCACCGAGTCGGGTGCCTCCTGCCTCCCGTGGAATTCCATGATCCTGATAGG
CAAGGTTTACACAGCACAGAACCCAGTGCCCAGGCACTGGGCCTGGGCAAACATA
ATTACTGCCGGAATCCTGATGGGGATGCCAAGCCCTGGTGCCACGTGCTGAAGAAC
CGCAGGCTGACGTGGGAGTACTGTGATGTGCCCTCCTGCTCCACCTGCGGCCTGAGA
CAGTACAGCCAGCCTCAGTTTCGCATCAAAGGAGGGCTCTTCGCCGACATCGCCTCC
CACCCCTGGCAGGCTGCCATCTTTGCCAAGCACAGGAGGTCGCCCCGAGAGCGGTT
CCTGTGCGGGGGCATACTCATCAGCTCCTGCTGGATTCTCTCTGCCGCCACTGCTTC
CAGGAGAGGTTTCCGCCCCACCACCTGACGGTGATCTTGGGCAGAACATAACCGGGT
GGTCCCTGGCGAGGAGGAGCAGAAATTTGAAGTCGAAAAATACATTGTCCATAAGG
AATTCGATGATGACACTTACGACAATGACATTGCGCTGCTGCAGCTGAAATCGGATT
CGTCCCGCTGTGCCAGGAGAGCAGCGTGGTCCGCACTGTGTGCCTTCCCCCGGCGG
ACCTGCAGCTGCCGACTGGACGGAGTGTGAGCTCTCCGGCTACGGCAAGCATGAG.
GCCTTGTCTCCTTTCTATTCGGAGCGGCTGAAGGAGGCTCATGTCAGACTGTACCCA
TCCAGCCGCTGCACATCACAACATTTACTTAACAGAACAGTCCCGACAACATGCTG
TGTGCTGGAGACACTCGGAGCGGCGGGCCCCAGGCAAACCTTGCACGACGCCTGCCA

五、發明說明 (11)

GGGCGATTCGGGAGGCCCCCTGGTGTGTCTGAACGATGGCCGCATGACTTTGGTGGG
CATCATCAGCTGGGGCCTGGGCTGTGGACAGAAGGATGTCCCGGGTGTGTACACAA
AGGTTACCAACTACCTAGACTGGATTCGTGACAACATGCGACCGTGA (SEQ ID NO:4).

本發明亦關於前述由於退化密碼或其片段之核酸分子之變體，可於嚴苛條件下雜交於該核酸之核酸，對偶或功能性變體。本發明亦關於核酸，其包含 K2S 分子融合至編碼另一蛋白質分子之核酸。

熟習此技藝之者明瞭之嚴苛條件係為用以篩選 85% 以上，較佳為 90% 以上同源性之條件 (Sambrook 等人，1989；Molecular Cloning：A Laboratory Manual，2nd ed.，Cold Spring Harbor Laboratory Press，Cold Spring Harbor，New York)。雜交反應可於例如：6×SSC/5×Denhard's 溶液/0.1%SDS (SDS：十二基硫酸鈉) 中於 65°C 下進行。嚴苛程度決定於洗滌步驟。因此，例如用以篩選具有大約 85% 或更高之同源性之 DNA 序列時之適當條件為 0,2×SSC/0,01%SDS/65°C 且用以篩選具有大約 90% 或更高之同源性之 DNA 序列時之適當條件為 0,1×SSC/0,01%SDS/65°C。該試劑之組成係說明於 Sambrook 等人 (1989，同前述)。

本發明之另一重要部分係為人類組織胞漿素原活化子之變體，其包含或由 Kringle 2(4.) 加絲胺酸蛋白酶 (5.) (縮寫成 K2S) 蛋白質或其變體或片段、功能性變體、對偶變體、次單元、化學衍生物、融合蛋白質或糖苷化變體。

功能區域之編號/命名係根據 Genbank 登錄號碼 GI 137119 或 Nature 301 (5897)，214-221 (1983)，其中該 Kringle

五、發明說明 (12)

2 功能區域之範圍為胺基酸 176-262 且蛋白酶之範圍為 276-527。因此，根據本發明，較佳之 K2S 分子可包括胺基酸 176-527，包括 Kringle 2 及蛋白酶間之胺基酸(胺基酸 263 至 275；示例於圖中(結構 A))。根據本發明之 K2S 分子包含最小部分之 Kringle 2 及仍保留蛋白酶活性及纖維蛋白結合活性之蛋白酶功能區域(其測定如說明/實例中之示例)。該根據本發明之 K2S 分子包含 N 端部分之胺基酸 SEGN 或 SEGNSD(見下文)。較佳之 K2S 分子並不包括 tPA 分子之胺基酸 1 至 3 或 1 至 5。較佳者，根據本發明之 K2S 分子於位置 177 及 184 處具有胺基酸 Asn，即：以根據本發明之方法，其不需如 Waldenström 之揭示進行修飾以改良產率。因此，根據本發明之較佳 K2S 分子具有相反於先前技藝中已知之分子之原態胺基酸序列(無突變)。最佳者，該根據本發明之 K2S 分子係為一種分子，其特徵為原態胺基酸序列或其部分不具有 tPA 之胺基酸 1 至 3 及 1 至 5 且包含 N 端之胺基酸 SEGN 或 SEGNSD 改良產率及/或分子之正確摺疊。

根據本發明之 K2S 分子必需於 N 端部分包含一胜肽，其特徵為其胺基酸序列為 SEGN，其有助於使用前述說明之方法商業化生產可正確摺疊、分泌之 K2S 蛋白質。該特徵為 SEGN 之 4 個胺基酸可具有多於一或數個胺基酸之 N 端，然而該胺基酸必需位於相反於 C 端部分之 N 端部分。最佳者，該特徵為 SEGN 之胺基酸可攜有點突變或可由非天然胺基酸取代。

五、發明說明 (13)

因此，於另一具體實施例中，本明係關於 K2S 蛋白質，其特徵為其包含序列確定為 SEGN 之胺基酸或其變體或片段、功能性變體、對偶變體、次單元、化學衍生物、融合蛋白質或糖苷化變體。

此等片段示例於，例如：範圍自胺基酸 193-527 之圖 10(結構 B-1)及圖 11(結構 B-2)。結構 B-1 於位置 261 處具有原態胺基酸 Cys，而 B-2 之該處胺基酸係為 Ser 取代。根據本發明之進一步片段包含胺基酸 220-527(圖 14，構造 C)或包含胺基酸 260-527(圖 15，構造 D)，其可根據本發明藉由加入胺基酸 SEGN 及/或以 Ser 取代 Cys-261 而修飾之。熟習此技藝者可測定出根據本發明之 K2S 之最小長度以便保留其生物功能並藉由於 N 端部分加入胺基酸 SEGN 以產生具有改善之產率及/或正確摺疊之 K2S 分子。因此，另一較佳之具體實施例係為該最小 K2S 分子於 N 端部分具有 SEGN。

於另一重要之具體實施例中，本發明係關於 K2S 蛋白質其特徵為其包含序列確定為 SEGNSD 之胺基酸或其變體或片段、功能性變體、對偶變體、次單元、化學衍生物、融合蛋白質或糖苷化變體。此等片段示例於，例如：範圍自胺基酸 191-527 之圖 12(結構 B-3)及圖 13(結構 B-4)。結構 B-3 於位置 261 處具有原態胺基酸 Cys，而 B-4 之該處胺基酸係為 Ser 取代。根據本發明之進一步片段包含胺基酸 220-527(圖 14，構造 C)或包含胺基酸 260-527(圖 15，構造 D)，其可根據本發明藉由加入胺基酸 SEGNSD 及/或以 Ser 取代 Cys-261 而修飾之。熟習此技藝者可測定出根據本發

五、發明說明 (14)

明之 K2S 之最小長度以便保留其生物功能並藉由於 N 端部分加入胺基酸 SEGNSD 以產生具有改善之產率及/或正確摺疊之 K2S 分子。因此，另一較佳之具體實施例係為該最小 K2S 分子於 N 端部分具有 SEGNSD。

本發明之另一較佳具體實施例係關於一種 K2S 蛋白質，其包含特徵為下列胺基酸序列或其變體或片段、功能性變體、對偶變體、次單元、化學衍生物、融合蛋白質或糖苷化變體之蛋白質：

SEGNSDCYFGNGSAYRGTHSLTESGASCLPWNSMILIGKVYTAQNPSAQALGLGKHNY
CRNPDGDAKPWCHVLKNRRLTWEYCDVPCSTCGLRQYSQPQFRIKGGLFADIASHPW
QAAIFAKHRRSPGERFLCGGILISSCWILSAAHCFQERFPPHLLTVILGRITYRVVPGEEEQ
KFEVEKYIVHKEFDDDTYDNDIALQLKSDSSRCAQESSVVRTVCLPPADLQLPDWTEC
ELSGYGKHEALSPFYSERLKEAHVRLYPSSRCTSQHLLNRTVTDNMLCAGDTRSGGPQA
NLHDACQGDSSGGLVCLNDGRMTLVGIISWGLGCGQKDVPGVYTKVTNYLDWIRDNM
RP* (SEQ ID NO:11).

根據本發明，*係指終止(即：由終止密碼組編碼)。此 K2S 分子係示例於圖 8。

根據本發明之一種 K2S 分子變體係關於將 K2S 融合於另一蛋白質分子之融合蛋白質。

本發明之另一較佳具體實施例係關於 K2S 蛋白質，其係由特徵為下列胺基酸序列之蛋白質所組成：

SEGNSDCYFGNGSAYRGTHSLTESGASCLPWNSMILIGKVYTAQNPSAQALGLGKHNY
CRNPDGDAKPWCHVLKNRRLTWEYCDVPCSTCGLRQYSQPQFRIKGGLFADIASHPW
QAAIFAKHRRSPGERFLCGGILISSCWILSAAHCFQERFPPHLLTVILGRITYRVVPGEEEQ

五、發明說明 (15)

KFEVEKYIVHKEFDDDDTYDNDIALLLQLKSDSSRCAQESSVVRTVCLPPADLQLPDWTEC
ELSGYKGHEALSPFYSERLKEAHVRLYPSSRCTSQHLLNRTVTDNMLCAGDTRSGGPQA
NLHDACQGDSDGGPLVCLNDGRMTLVGIISWGLGCGQKDVPGVYTKVTNYLDWIRDNM
RP* (SEQ ID NO:11).

該 K2S 分子可由前述說明之 DNA 分子編碼。

本發明之另一重要方面係關於 DNA 分子，其特徵為其係編碼：

a) OmpA 蛋白質或其功能性衍生物實際連接於

b) 編碼含有組織胞漿素原活化子蛋白質之 kringle 2 功能區域及絲胺酸蛋白酶功能區域之多太之 DNA 分子。

較佳者，根據本發明之 DNA 分子之特徵亦為其 DNA 序列包含或由下列編碼 OmpA 及 K2S 或其功能性變體或由於退化性核苷酸密碼而得之變體之 DNA 序列所組成：

ATGAAAAAGACAGCTATCGCGATTGCAGTGGCACTGGCTGGTTTCGCTACCGTGGCC
CAGGCGCCTCTGAGGGAAACAGTGA CTACTTTGGGAATGGGTCAGCCTACCG
TGGCACGCACAGCCTCACCGAGTCGGGTGCCTCCTGCCTCCCGTGGAATTCCATGAT
CCTGATAGGCAAGGTTTACACAGCACAGAACCCAGTGCCCAGGCACTGGGCCTGG
GCAAACATAATTACTGCCGGAATCCTGATGGGGATGCCAAGCCCTGGTGCCACGTG
CTGAAGAACCGCAGGCTGACGTGGGAGTACTGTGATGTGCCCTCCTGCTCCACCTGC
GGCCTGAGACAGTACAGCCAGCCTCAGTTTCGCATCAAAGGAGGGCTCTTCGCCGA
CATCGCCTCCCACCCCTGGCAGGCTGCCATCTTTGCCAAGCACAGGAGGTGCGCCGG
AGAGCGGTTCTGTGCGGGGGCATACTCATCAGCTCCTGCTGGATTCTCTGCCGC
CCACTGCTTCCAGGAGAGGTTTCCGCCCCACCACCTGACGGTGATCTTGGGCAGAAC
ATACCGGGTGGTCCCTGGCGAGGAGGAGCAGAAATTTGAAGTCGAAAAATACATTG
TCCATAAGGAATTCGATGATGACACTTACGACAATGACATTGCGCTGCTGCAGCTGA
AATCGGATTGTCCTCGCTGTGCCAGGAGAGCAGCGTGGTCCGCACTGTGTGCCTTC
CCCCGGCGGACCTGCAGCTGCCGACTGGACGGAGTGTGAGCTCTCCGGCTACGGC
AAGCATGAGGCCTTGTCTCCTTTCTATTCCGAGCGGCTGAAGGAGGCTCATGTCAGA
CTGTACCCATCCAGCCGCTGCACATCACAACATTTACTTAACAGAACAGTCACCGAC
AACATGCTGTGTGCTGGAGACACTCGGAGCGGGCGGGCCCCAGGCAAACCTTGCACGA
CGCCTGCCAGGGCGATTCCGGAGGCCCTGGTGTGTCTGAACGATGGCCGCATGA
CTTTGGTGGGCATCATCAGCTGGGGCCTGGGCTGTGGACAGAAGGATGTCCCGGGT
GTGTACACAAAGGTTACCAACTACCTAGACTGGATTCTGTGACAACATGCGACCG
(SEQ ID No:2)

五、發明說明 (16)

該 DNA 分子編碼下列 OmpA 及 K2S 之融合蛋白質。該 OmpA 及 K2S 之融合蛋白質特徵為具下列胺基酸序列或其片段、功能性變體、對偶變體、次單元、化學衍生物、融合蛋白質或糖苷化變體，其形成本發明之重要部分：

MKKTALALAVLAGFATVAQAASEGNSDCYFGNGSAYRGTHSLTESGASCLPWNSMLI
GKVYTAQNPSAQUALGLGKHNYCRNPDGDAKPWCHVLKNRRLTWEYCDVPCSTCGLR
QYSQPQFRIKGGFLFADIASHPWQAAIFAKHRRSPGERFLCGGILISSCWILSAAHCFQERF
PPHHLTIVLGRTYRVVPGEEEQKFEVEKYIVHKEFDDDDTYDNDIALLLQKSDSSRCAQES
SVVRTVCLPPADLQLPDWTECELSGYGKHEALSPFYSERLKEAHVRLYPSSRCTSQHLL
NRTVTDNMLCAGDTRSGGPQANLHDACQGDSGGPLVCLNDGRMTLVGIISWGLGCGQ
KDVPGVYTKVTNYLDWIRDNMRPG (SEQ ID NO:8)

本發明之另一較佳方面係關於根據本發明之 DNA 分子，其特徵為該 DNA 序列 b) 係編碼至少 90% 之人類組織胞漿素原活化子蛋白質之胺基酸 87-527 (本文中使用了之編號係如 GI 137119 或 Nature 301 (5879), 214-221(1983)。

本發明之另一較佳方面係關於根據本發明之 DNA 分子，其特徵為該 DNA 序列 b) 係編碼至少 90% 之人類組織胞漿素原活化子蛋白質之胺基酸 174-527。

本發明之另一較佳方面係關於根據本發明之 DNA 分子，其特徵為該 DNA 序列 b) 係編碼至少 90% 之人類組織胞漿素原活化子蛋白質之胺基酸 180-527。

本發明之另一較佳方面係關於根據本發明之 DNA 分子，其特徵為該 DNA 序列 b) 係編碼至少 90% 之人類組織胞漿素原活化子蛋白質之胺基酸 220-527。

五、發明說明 (17)

本發明之另一較佳方面係關於根據本發明之 DNA 分子，其特徵為該 DNA 序列 a) 係於嚴苛條件下雜交至下列序列：

ATGAAAAGACAGCTATCGCGATTGCAGTGGCACTGGCTG
GTTTCGTCTACCGTGGCCCAGGCGGCC(SEQ ID NO : 3)。

本發明之另一較佳方面係關於根據本發明之 DNA 分子，其特徵為該 DNA 序列 a) 係由下列序列所組成：

ATGAAAAGACAGCTATCGCGATTGCAGTGGCACTGGCTG
GTTTCGCTTACCGTGGCCCAGGCGGCC(SEQ ID NO : 3)。

本發明之另一較佳方面係關於根據本發明之 DNA 分子，其特徵為該 DNA 序列 b) 係於嚴苛條件下雜交至下列序列：

TCTGAGGGAAACAGTGACTGCTACTTTGGGAATGGGTCAGCCTACCGTGGCAGCA
CAGCCTCACCGAGTCGGGTGCCTCCTGCCTCCCGTGGAAATCCATGATCCTGATAGG
CAAGGTTTACACAGCACAGAACCCAGTGCCCAGGCACTGGGCCTGGGCAAACATA
ATTACTGCCGAATCCTGATGGGGATGCCAAGCCCTGGTGCCACGTGCTGAAGAAC
CGCAGGCTGACGTGGGAGTACTGTGATGTGCCCTCCTGCTCCACCTGCGGCCTGAGA
CAGTACAGCCAGCCTCAGTTTCGCATCAAAGGAGGGCTCTTCGCCGACATCGCCTCC
CACCCCTGGCAGGCTGCCATCTTTGCCAAGCACAGGAGGTGCCCCGAGAGCGGTT
CCTGTGCGGGGGCATACTCATCAGCTCCTGCTGGATTCTCTCTGCCGCCCACTGCTTC
CAGGAGAGGTTTCCGCCCCACCACCTGACGGTGATCTTGGGCAGAACATAACGGGT
GGTCCCTGGCGAGGAGGAGCAGAAATTTGAAGTCGAAAATAACATTGTCCATAAGG
AATTCGATGATGACACTTACGACAATGACATTGCGCTGCTGCAGCTGAAATCGGATT
CGTCCCGCTGTGCCAGGAGAGCAGCGTGGTCCGCACTGTGTGCCTTCCCCGGCGG
ACCTGCAGCTGCCGACTGGACGGAGTGTGAGCTCTCCGGCTACGGCAAGCATGAG

五、發明說明 (18)

GCCTTGTCTCCTTTCTATTTCGGAGCGGCTGAAGGAGGCTCATGTCAGACTGTACCCA
TCCAGCCGCTGCACATCACAACATTTACTTAAACAGAACAGTCACCGACAACATGCTG
TGTGCTGGAGACTCGGAGCGGCGGGCCCCAGGCAAACCTTGCACGACGCCTGCCA
GGGCGATTTCGGGAGGCCCCCTGGTGTGTCTGAACGATGGCCGCATGACTTTGGTGGG
CATCATCAGCTGGGGCCTGGGCTGTGGACAGAAGGATGTCCCGGGTGTGTACACAA
AGGTTACCAACTACCTAGACTGGATTTCGTGACAACATGCGACCGTGA (SEQ ID NO:4).

本發明之另一較佳方面係關於根據本發明之 DNA 分
子，其特徵為該 DNA 序列 b)係由下列序列所組成：

TCTGAGGGAAACAGTGACTGCTACTTTGGGAATGGGTCAGCCTACCGTGGCAGCA
CAGCCTCACCGAGTCGGGTGCCTCCTGCCTCCCGTGAATTCCATGATCCTGATAGG
CAAGTTTACACAGCACAGAACCCAGTGCCCAGGCACTGGGCCTGGGCAAACATA
ATTACTGCCGGAATCCTGATGGGGATGCCAAGCCCTGGTGCCACGTGCTGAAGAAC
CGCAGGCTGACGTGGGAGTACTGTGATGTGCCCTCCTGCTCCACCTGCGGCCTGAGA
CAGTACAGCCAGCCTCAGTTTCGCATCAAAGGAGGGCTCTTCGCCGACATCGCCTCC
CACCCCTGGCAGGCTGCCATCTTTGCCAAGCACAGGAGGTCGCCCGGAGAGCGGTT
CCTGTGCGGGGGCATACTCATCAGCTCCTGCTGGATTCTCTCTGCCGCCACTGCTTC
CAGGAGAGGTTTCCGCCCCACCACCTGACGGTGATCTTGGGCAGAACATAACCGGT
GGTCCCTGGCGAGGAGGAGCAGAAATTTGAAGTCGAAAAATACATTGTCCATAAGG
AATTCGATGATGACACTTACGACAATGACATTGCGCTGCTGCAGCTGAAATCGGATT
CGTCCCGCTGTGCCAGGAGAGCAGCGTGGTCCGCACTGTGTGCCTTCCCCGGCGG
ACCTGCAGCTGCCGACTGGACGGAGTGTGAGCTCTCCGGCTACGGCAAGCATGAG
GCCTTGTCTCCTTTCTATTTCGGAGCGGCTGAAGGAGGCTCATGTCAGACTGTACCCA
TCCAGCCGCTGCACATCACAACATTTACTTAAACAGAACAGTCACCGACAACATGCTG
TGTGCTGGAGACTCGGAGCGGCGGGCCCCAGGCAAACCTTGCACGACGCCTGCCA
GGGCGATTTCGGGAGGCCCCCTGGTGTGTCTGAACGATGGCCGCATGACTTTGGTGGG
CATCATCAGCTGGGGCCTGGGCTGTGGACAGAAGGATGTCCCGGGTGTGTACACAA
AGGTTACCAACTACCTAGACTGGATTTCGTGACAACATGCGACCGTGA (SEQ ID NO:4).

五、發明說明 (19)

本發明之另一較佳具體實施例係關於含有根據本發明之 DNA 序列之載體。

本發明之另一較佳具體實施例係關於根據本發明之載體，其中該 DNA 序列係位於 lac 起動子及核糖體結合位置之前。根據本發明之適當載體包括，但不限於病毒性載體，例如：牛痘，Semliki-Forest 病毒及腺病毒，噬菌體質體載體及其類似者。較佳之載體為有益用於 E. coli，但亦可用於任何其他原核性宿主，例如：pPROTet.E，pPROLar.A，pBAD 族成員，pSE 族，pQE 族及 pCAL 中。

本發明之另一較佳具體實施例係關於載體 pComb3HSS，其含有根據本發明之 DNA，其中該 gp III 蛋白質之表現藉由刪除編碼該 gp III 蛋白質之 DNA 或藉由編碼含人類組織包漿素原活化子蛋白質之 kringle 2 功能區域及絲胺酸蛋白酶之多太與蛋白質 III 基因間之終止密碼組而受壓制或抑制。

本發明之另一重要方面係關於包含根據本發明之 DNA 分子之原核宿主細胞。

本發明之另一重要方面係關於包含根據本發明之載體之原核宿主細胞。

本發明之另一重要方面係關於包含根據本發明之 DNA 分子之 E.coli 宿主細胞。

本發明之另一重要方面係關於包含根據本發明之載體之一 E.coli 宿主細胞。

本發明之再另一重要方面係為使用根據本發明之 DNA

五、發明說明 (20)

分子或根據本發明之載體或根據本發明之宿主細胞於用以製備具組織包漿素原活化子活性之多太之方法中。本發明之再另一重要方面係為如上述說明之根據本發明之使用，其中該方法係為根據本發明之方法。

另一非常重要之方面係為醫藥組合物，其包含藉由根據本發明之方法獲得之物質及醫藥上可接受之賦形劑及載體。該物質之一實例係為前述說明之 K2S 分子。本文所使用之“醫藥上可接受之載體”一辭係指傳統使用於製藥技藝中之賦形劑或添加物。此等生理可接受性化合物包括，例如：碳水化合物，例如：葡萄糖、蔗糖或葡聚糖，抗氧化劑，例如：抗壞血酸或麩光甘太，嵌合劑，低分子量蛋白質或其他安定劑或賦形劑（亦可參見 Remington's Pharmaceutical Sciences(1990, 18th ed. Mack Publ., Easton)）。該根據本發明之醫藥組合物可有助於以團劑靜脈施用，例如：以單一團劑形式每 5 至 10 秒經靜脈施用。

本發明進一步關於將藉由根據本發明之方法獲得之物質使用於治療中風、心肌梗塞、急性冠狀動脈梗塞、肺栓塞、任何動脈閉塞，例如：冠狀動脈閉塞、顱內動脈閉塞（例如：供給腦部之動脈），周圍動脈閉塞、深度靜脈血栓或與不正常血液凝塊有關之疾病之藥物製造中。

下列實例係用以幫助了解本發明且其不以任何方式限制本發明之範圍。

實例 1

材料及方法

五、發明說明 (21)

引子設計。為要增幅 tPA 基因之特定部分，故合成引子對 sK2/174[5' GAGGAGGAGGTGGCCCAGGCGGCCTCTGAGGG AAACAGTGAC 3'](SEQ ID NO : 22)和 ASSP [5' GAGGAGGAGCTGGCCGGCCTGGCCCGGTTCGCATGTTG TCACG 3'](SEQ ID NO : 23)(Life Technologies, Grand Island, NY)。此等引子之設計係根據擷取自 NCBI 資料庫之人類 tPA 基因(g137119)。其係以具有 Sfi I 端選殖位置(畫線處)並使噬菌體質體載體，pComb3HSS，內之 gpIII 基因之自 ATG 之讀取框架可遍佈於嵌入序列之方式合成。

另一組用於定位突變之引子係設計以與介於 pComb3H-K2S 之基因 III 和 K2S 基因間之序列鏈合。具有突變鹼基(畫線處)，其用以產生新穎之終止密碼組之引子序列係為 $_{MS}TPA$

[5'ACATGCGACCGTGACAGGCCGGCCAG 3'] (SEQ ID NO : 24) 和 $_{MA}STPA$

[5'CTGGCCGGCCTGTCACGGTCGCATGT 3'](SEQ ID NO : 25)。

藉由 PCR 增幅 K2S 基因。將一微克 sK2/174 及 $_{AS}SP$ 引子連同 50 奈克之 p51-3 模板(得自 Hiroshi Sasaki 博士, Fujisawa Pharmaceutical, Japan)懸浮於 100 微升之 PCR 混合物中。最後於溶液中加入 2.5 U 用量之 Taq 聚合酶(Roche Molecular Biochemicals, Indianapolis, IN)定量增幅條件係起始於突然開始於 85°C，4 分鐘，再於 95°C 變性 50 秒，於 42°C 鏈合 50 秒，於 72°C 延續 1.5 分鐘。重覆進行 35 回合。將該混合物置於 72°C 下 10 分鐘。將 1110 bp 之增幅產物接著以 QIAquick PCR 純化套組(QIAGEN, Hilden, Germany)純化。

五、發明說明 (22)

以限制酶確認經純化產物之正確性。

構築可表現 K2S 之噬菌體質體。將經純化之 K2S PCR 產物及 pComb3HSS 噬菌體質體(由美國 Scripps Institute, Carlos F. Barbas 博士贊助提供)以 Sfi I (Roche Molecular Biochemicals, Indianapolis, IN) 水解以製備特定之黏接性選殖位置。將四微克之經純化 PCR 產物以 60 U 之 Sfi I 於 50°C 下水解 18 小時。至於 pComb3HSS, 將 20 微克之噬菌體載體以 100 U Sfi I 處理之。將經純化之 K2S PCR 產物及 pComb3HSS (~3300bp) 之水解產物隨後藉由 QIAquick 膠體萃取套組 (QIAGEN, Hilden, Germany) 進行膠體純化。將 5 U 之 T4 接合酶加至 0.7 微克之經純化 Sfi I 水解性 pComb3HSS 及 0.9 微克之經純化 Sfi I 水解性 PCR 產物之混合物中。置於 30°C 下進行接合反應 18 小時。該新構築之噬菌體質體命名為 pComb3H-K2S。

E. coli XL-1 Blue 之轉形。將一百微升之 CaCl₂ competent E. coli XL-1 Blue (Stratagene, La Jolla, CA) 以 70 奈克之經接合或經突變產物進行轉形。將經轉形之細胞塗佈於含 100 微克/毫升安比西林 (ampicillin) 及 10 微克/毫升四環黴素 (Sigma, Saint Louis, MO) 之 LB 洋菜上使之增殖。將洋菜於 37°C 下培養 18 小時, 挑出數個抗生素抗性菌落以藉由鹼溶解法用於噬菌體質體之微量製備中。將各個經純化之質體進行 Sfi I 限制位置分析。將具有 Sfi I 限制位置之內含轉殖物之質體隨後於 37°C 下, 於含安比西林 100 微克/毫升及四環黴素 10 微克/毫升之 100 毫升 LB 洋菜上增殖 18 小時。質體之大

五、發明說明 (23)

量製備係藉由使用 QIAGEN 質體大量套組 (QIAGEN, Hilden, Gemany)。將經純化質體藉由 Sfi I 再度檢測特定限制位置並藉由 AmpliTaq DNA 聚合酶終結子循環定序套組 (Perkin-Elmer 公司, Forster City, CA) 定序。

PComb3H-K2S 之定位突變。將 10 奈克之 pComb3H-K2S 模板與 125 奈克之 m_s TPA 及 m_{AS} TPA 引子混合將 2.5 U 之 PfuTurbo DNA 聚合酶 (Stratagene, LA Jolla, CA) 加至混合物中以進行循環增幅。反應開始為一回合之 95°C, 30 秒。再接著 16 回合之 95°C, 30 秒; 55°C, 1 分鐘及 68°C, 9 分鐘。再隨後將該反應置於冰上 2 分鐘。為要破壞模板股, 故於增幅反應中加入 10 U 之 Dpn I 限制酶 (Stratagene, LA Jolla, CA) 並於 37°C 下培養 1 小時。將此合成產物 (MpComb3H-K2S) 進一步用以轉形 E. coli XL-1 Blue。

噬菌體-展示重組-K2S 之製備。將 pComb3H-K2S 轉形至 E. coli XL-1 Blue 後, 實行噬菌體展示技術。將經 pComb3H-K2S 轉形之 E. coli XL-1 Blue 選殖株於 10 毫升之含安比西林 100 微克/毫升及四環黴素 10 微克/毫升之超培養液中, 於 37°C 下增殖至 O.D.[600 nm] 達 1.5 為止。隨後將該細菌培養液於 100 毫升之相同培養基內增殖並培養 2 小時。使用 10^{12} pfu 之 VCSM13 助手噬菌體 (Stratagene, La Jolla, CA) 感染經轉形之 E. coli XL-1 Blue。培養 3 小時後, 將最終濃度為 70 微克/毫升之卡納黴素 (kanamycin) 加至培養液中。使培養液於 37°C 下振盪 (200 RPM) 18 小時。再藉由添加 4% w/v PEG MW 8000 (Sigma, Saint Louis, MO) 及 3%

五、發明說明 (24)

w/v NaCl 收穫於 gp3 上具有 K2S 之噬菌體(K2S-Φ)。最後，將收穫之噬菌體再懸浮於 2 毫升 pH 7.4 之 PBS 中。噬菌體數之測定係藉由感染 E.coli XL-1 Blue。如先前之說明(21)計算每毫升之菌落生成單位(cfu/ml)。

於振盪三角瓶中表現重組-K2S。將經 MpComb3H-K2S 轉形之 XL-1 Blue 於 37°C 下，於 pH 7.0 及安比西林(100 微克/毫升)存在下培養於 100 毫升之超培養液(3% w/v tryptone, 2% w/v 酵母萃取物及 1% w/v MOPS)中，直至 O.D.[600 nm] 達 0.8 為止。隨後，以 1 mM 之 IPTG (Promega, Madison, WI)誘發蛋白質合成。將細菌進一步於 30°C 下振盪培養(200 RPM)6 小時。收集培養上清液並以 55%飽和硫酸銨沉澱(32)。將沉澱於 pH 7.2 之 PBS 中回溶並於 4°C 下，於相同之緩衝溶液中透析 18 小時。如先前由 Ames 等人說明者(2)，藉由利用氯仿衝擊由細菌細胞萃取環原生質蛋白質。

重組 K2S 之免疫分析定量。為要偵測 r-K2S，故於固相上塗佈單株抗-kringle 2 功能區域(16/B)(由 Ute Zacharias 博士慷慨提供，Central Institute of Molecular Biology, Berlin-Buch, Germany)。進行標準之 ELISA 洗滌及阻斷程序。將五十微升之 10^{11} cfu/ml 之 K2S-Φ 或分泌性 r-K2S 加至各個抗-kringle 2 塗佈槽中。抗原-抗體偵測之進行如下。於洗滌步驟後，在各個反應槽加入綿羊抗-M13 結合性 HRP (Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden)或綿羊抗-tPA 結合性 HRP (Cedarlane, Ontario, Canada)。將基質 TMB 加至各槽中，反應 30 分鐘後，最後以 H₂SO₄ 溶液終止反應。使用標

五、發明說明 (25)

準黑色素瘤 tPA 86/670 (National Institute for Biological Standards and Control, Hertfordshire, UK)作為正控制組。

胺基分解活性分析。用以偵測 tPA 胺基分解活性之試驗套組係購自 Chromogenix (Molndal, Sweden)。使用含有胞漿素原及 S-2251 之基質混合物以測定絲胺酸蛋白酶酵素活性。將各個銨沉澱樣品之 10^{-2} 稀釋液於具有或不具刺激劑-人類纖維素原片段下分析。分析步驟係根據 COASET t-PA 手冊。

SDS-PAGE 及免疫轉印。將得自培養上清液之經透析沉澱產物進一步以 centricon 10 (AMICON, Beverly, MA)濃縮 10 倍。藉由 SDS-PAGE, 15%分離膠體, 於還原緩衝液中將該濃縮樣品進行蛋白質分離, 接著將之電轉印至硝化纖維上。再將該硝化纖維以 4%脫脂乳阻斷 2 小時。為要偵測 r-K2S, 故將經適當稀釋之綿羊抗-tPA 結合性 HRP 塗佈於硝化纖維上。以靈敏之偵測系統, Amplified Opti-4CN 套組 (BIORAD, Hercules, CA)顯現免疫反應帶。

共聚合之胞漿素原聚丙烯醯胺膠體電泳。將 11%分離性丙烯醯胺膠體與胞漿素原及明膠共同聚合, 如 Heussen 等人先前之說明(14)。聚集膠體為 4%濃度且不含胞漿素原及明膠。於 4°C 及 8 mA 之固定電流下進行電泳。殘留於膠體片中之 SDS 可於室溫下, 於 2.5% Triton-X-100 中緩慢搖動 1 小時後移除。然後將該膠體片於 37°C 下, 置於 0.1M, pH 8.3 之甘胺酸-NaOH 中 5 小時。最後, 藉由標準考馬斯藍 (R-250) 染色系統將該膠體片染色並脫色。具有酵素活性之胜肽位

五、發明說明 (26)

置不會被染劑染色，故與藍色背景形成對比。

結果

K2S 基因攜帶性載體之構築。吾人利用引子 SK2/174 和 ASSP 從載體 p51-3 增幅 tPA 之 kringle 2 加絲胺酸蛋白酶部分 (kringle 2 功能區域內之 Ser¹⁷⁴ 至絲胺酸蛋白酶之 Pro⁵²⁷)。將經增幅之 1110 bp 產物藉由洋菜瓊脂膠體電泳證實 (圖 1, 第 2 道) 並藉由位於 5' 及 3' 上之雙 Sfi I 切割位置將之嵌入 pComb3HSS 噬菌體質體內之正確讀取框架中。因而產生新穎載體, pComb3H-K2S, 其含有 K2S。於此載體中, K2S 係側接於 OmpA 訊號序列上游及 gp3 下游。K2S 之正確嵌入之確認係藉由以 Sfi I 進行限制分析 (圖 2, 第 3 道), PCR-分析 (於 1110 bp 處顯示單一帶), 及 DNA 定序。pComb3H-K2S 圖譜圖示於圖 3 中。

噬菌體展示性 r-K2S。使用 VCSM13 絲狀噬菌體感染經 pComb3H-K2S 轉形之 E. coli XL-1 Blue, X[K2S]。於病毒包裝過程中, VCSM13 會增殖並併入 K2S-gp3 融合蛋白質中。收穫之重組噬菌體 (K2S-Φ) 以由 PEG-沉澱之噬菌體再感染之 E. coli XL-1 Blue 測得之濃度為 5.4×10^{11} 。藉由三明治 ELISA 確認此等重組噬菌體顆粒之 r-K2S 表現。將噬菌體結合性異源 K2S 蛋白質藉由單株抗-kringle 2 抗體 (16/B), 利用綿羊抗-tPA 結合性 HRP 抗體偵測系統辨識之。此分析之吸光值為 1.12 ± 0.03 (表 1)。於 10^{12} 個噬菌體顆粒上可測得之 K2S 量係相等於標準黑色素瘤 tPA 之蛋白質 336 奈克。為要證實 K2S-gp3 融合蛋白質係連接於噬菌體顆

五、發明說明 (27)

粒，故以綿羊抗-M13 抗體結合性 HRP 取代綿羊抗-tPA 結合性 HRP 抗體。此免疫反應顯示之吸光值為 1.89 ± 0.07 (表 1)。反之，倘若捕捉抗體為綿羊抗-M13 抗體，則觀察到極低之 K2S 具有綿羊抗-tPA 抗體結合性 HRP；其吸光值僅為 0.17 ± 0.01 (表 1)。此暗示僅有少量之經純化噬菌體顆粒攜有 K2S-gp3 融合蛋白質。使用自非轉形性 *E. coli* XL-1 Blue 所製備之 VCSM13 作為負控制組。

MpComb3H-K2S 之構築。吾人以突變引子 (M_S TPA 和 M_{AS} TPA) 輔助，於 pComb3H-K2S 內之 K2S 與 gp3 間產生終止密碼組 (圖 4)。為要增加新合成及突變之 pComb3H-K2S，故將循環增幅混合物以 Dpn I 完全水解以分解舊 dam 甲基化 pComb3H-K2S 模板 (Dpn I 較喜好 dam 甲基化 DNA)。以 pComb3H-K2S 轉形 *E. coli* XL-1 Blue 後，篩選出 XM[K2S] 轉形株進行進一步研究。Bp 取代之結果，有一接近 K2S 基因之 3' 端之 Sfi I 切割位置於定位突變後喪失。以 Sfi I 切割之線形 MpComb3H-K2S 經觀察其於 4319 bp 處並無嵌入之 K2S 基因片段出現 (圖 5, 第 3 道)。因此，由 MpComb3H-K2S 編碼之 K2S 基因於 *E. Coli* XM[K2S] 內表現成非-gp3 融合形式。

K2S 之表現及純化。K2S 於 *E. Coli* XM[K2S] 內之表現係由 IPTG 誘發。利用 ELISA 可於環原生質空間及培養液內偵測 r-K2S。藉由三明治 ELISA 測定各個製品中之異源性蛋白質質量及與標準 tPA 之關係。由 O.D.[600 nm] 為 50 之 100 毫升之振盪三角瓶培養菌液中，其環原生質區分產出 1.38

五、發明說明 (28)

微克之 r-K2S(約為 32%)，然而 2.96 微克之 r-K2S(約為 68%) 可得於經銨沉澱之培養上清液中使用三明治 ELISA 確認得自經 VCSM13 感染之 E. Coli XM[K2S]之經 PEG 沉澱噬菌體。以抗-M13 結合性 HRP 並未測得由單株-kringle 2 抗體捕捉之 r-K2S，此表示倘若 gp3 遺失，則 K2S 不會存在於噬菌體顆粒上。

胺基分解活性分析。倘若絲胺酸蛋白酶功能區域存在於樣品中，則胞漿素原可轉換成胞漿素。所產之之胞漿素可進一步水解 S-2251 基質而產生有色產物，對-硝基苯胺，其於 405 nm 處有最大之吸光值。重組產物之比活性與吸光值有一致性。評估並比較各個樣品，即：K2S- Φ ，環原生質 r-K2S 或上清液 r-K2S 之纖維素原依賴性酵素活性。K2S- ϕ 及環原生質 r-K2S 二者均顯示特別低之酵素活性，其低於測試之敏感度(0.25 IU/毫升)。培養上清液之 r-K2S 具有 7 IU/毫升之纖維素原依賴性酵素活性。是以，自 100 毫升培養液中可獲致總共 700 IU 之酵素活性。若無纖維素原，則無法由培養上清液純化出 r-K2S—然而，標準黑色素瘤 tPA 可顯示出一些活性。

藉由免疫轉印證實重組蛋白質。得自 E. Coli XM[K2S]之培養上清液之部分純化 K2S 以綿羊抗-tPA 抗體測得之分子量為 39 kDa(圖 6)。負控制組，未經轉形之 E. coli XL-1 Blue 之部分純化培養上清液於相似大小處並無反應帶。

藉由 PAGE 之活性酵素定位。於電泳前，先將胞漿素原與明膠共同聚合並固定於聚丙烯醯胺膠體中。分析 E.coli

五、發明說明 (29)

XL-1 Blue, 經 pComb3HSS 轉形之 E. coli XL-1 Blue 及 E. coli XM[K2S] 之經硫酸胺沉澱之之培養上清液(圖 7)。將所有樣品於非還原條件下處理以保留其正確之構形及絲胺酸蛋白酶活性。僅可於 E. coli XM[K2S] 之經硫酸胺沉澱之之培養上清液之 34 及 37 kDa 處看到經絲胺酸蛋白酶水解之胞漿素原透明區域。其它樣品均無透明環。標準黑色素瘤 tPA 之正控制道亦於 66 及 72 kDa 位置處顯示出酵素活性。

參考文獻

1. Allen, S., H. Y. Naim, and N. J. Bulleid. 1995. Intracellular folding of tissue-type plasminogen activator. Effects of disulfide bond formation on N-linked glycosylation and secretion. *J. Biol. Chem.* 270:4797-4804.
2. Ames, G. F., C. Prody, and S. Kustu. 1984. Simple, rapid, and quantitative release of periplasmic proteins by chloroform. *J. Bacteriol.* 160: 1181-1183.
3. Barbas, C. F. III, A. S. Kang, R. A. Lerner, and S. J. Benkovic. 1991. Assembly of combinatorial antibody libraries on phage surfaces: the gene III site. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 88:7978-7982.
4. Barbas, C. F. III, and J. Wagner. 1995. Synthetic human antibodies: selecting and evolving functional proteins. *A Companion to Methods in Enzymology* 8: 94-103.
5. Bennett, W. F., N. F. Paoni, B. A. Keyt, D. Botstein, A. J. Jones, L. Presta, F. M. Wurm, and M. J. Zoller. 1991. High resolution

五、發明說明 (30)

analysis of functional determinants on human tissue-type plasminogen activator. *J Biol Chem.* 266:5191-5201.

6. Betton, J. M., N. Sassoon, M. Hofnung, and M. Laurent. 1998. Degradation versus aggregation of misfolded maltose-binding protein in the periplasm of *Escherichia coli*. *J. Biol.Chem.*273:8897-8902.

7. Camiolo, S. M., S. Thorsen, and T. Astrup. 1971. Fibrinogenolysis and fibrinolysis with tissue plasminogen activator, urokinase, streptokinase-activated human globulin and plasmin. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 38:277-280.

8. Cartwright, T. 1992. Production of t-PA from animal cell culture, p. 217-245. In R. E. Spier, and J. B. Griffiths (ed.), *Animal Cell Biotechnology, Vol 5.* Academic Press, N. Y .

9. Curry, K. A., A. W. Yem, M. R. Deibel, Jr., N. T. Hatzenbuhler, J. G. Hoogerheide, and C. S. Tomich. 1990. *Escherichia coli* expression and processing of human interleukin-1 beta fused to signal peptides. *DNA Cell Biol.* 9:167-175.

10. Datar, R. V., T. Cartwright, an C.-G. Rosen. 1993. Process economics of animal cell and bacterial fermentations: a case study analysis of tissue plasminogen activator. *Biotechnology* 11: 349-357.

11. Deneffe, P., S. Kovarik, T. Ciora, N. Gosselet, J. C. Benichou, M. Latta, F. Guinet, A. Ryter, and J. F. Mayaux. 1989. Heterologous protein export in *Escherichia coli*: influence of

五、發明說明 (31)

bacterial signal peptides on the export of human interleukin 1 beta. *Gene* 85 :499-510.

12. Griffiths, J. B., A. Electricwala. 1987. Production of tissue plasminogen activators from animal cells. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* 34: 147-166.

13. Harris, T. J., T. Patel, F. A. Marston, S. Little, J. S. Emtage, G. Opdenakker, G. Volckaert, W. Rombauts, A. Billiau, and P. De Somer. 1986. Cloning of cDNA coding for human tissue-type plasminogen activator and its expression in *Escherichia coli*. *Mol. Biol. Med.* 3 :279-292.

14. Heussen, C., and E. B. Dowdle. 1980. Electrophoretic analysis of plasminogen activators in polyacrylamide gels containing sodium dodecyl sulfate and copolymerized substrates. *Anal. Biochem.* 102: 196-202.

15. Heussen, C., F. Joubert, and E. B. Dowdle. 1984. Purification of human tissue plasminogen activator with *Erythrina* trypsin inhibitor. *J. Biol. Chem.* 259: 11635-11638.

16. Hu, C. K., U. Kohnert, O. Wilhelm, S. Fischer, and M. Llinas. 1994. Tissue-type plasminogen activator domain-deletion mutant BM 06.022: modular stability, inhibitor binding, and activation cleavage. *Biochemistry* 33: 11760-11766.

17. Kipriyanov, S. M., G. Moldenhauer, and M. Little. 1997. — High level production of soluble single chain antibodies in small-scale *Escherichia coli* cultures. *J. Immunol. Methods*

五、發明說明 (32)

200:69- 77. 18. Ko, J. H., D. K. Park, I. C. Kim, S. H. Lee, and S. M. Byun. 1995. High-level expression and secretion of streptokinase in *Echerichia coli*. *Biotechnol. Lett.* 17: 1019-1024.

19. Kouzuma, Y., N. Yamasaki, and M. Kimura. 1997. The tissue-type plasminogen activator inhibitor ETIa from *Erythrina variegata*: structural basis for the inhibitory activity by cloning, expression, and mutagenesis of the cDNA encoding ETIa. *J. Biochem. (Tokyo)* 121:456-463.

20. Lasters, I., N. Van Herzeele, H. R. Lijnen, D. Collen, and L. Jespers. 1997. Enzymatic properties of phage-displayed fragments of human plasminogen. *Eur. J. Biochem.* 244:946-952.

21. Lobel, L. I., P. Rausch, I. Trakht, S. Pollak, and J. W. Lustbader. 1997. Filamentous phage displaying the extracellular domain of the hLH/CG receptor bind hCG specifically. *Endocrinology.* 138: 1232-1239.

22. Lubiniecki, A., R. Arathoon, G. Polastri, J. Thomas, M. Wiebe, R. Garnick, A. Jones, R. van Reis, and S. Builder. Selected strategies for manufacture and control of recombinant tissue plasminogen activator prepared from cell culture, p. 442-451. In R. E. Spier, J. B. Griffiths, J. Stephenne, and P. J. Crooy (ed.), *Advances in animal cell biology and technology for bioprocesses*. Butterworths, London.

23. Lucic, M. R., B. E. Forbes, S. E. Grosvenor, J. M. Carr, J. C. Wallace, and G. Forsberg. 1998. Secretion in *Escherichia coli*

五、發明說明 (33)

and phage-display of recombinant insulin-like growth factor binding protein-2. *J. Biotechnol.* 61 :95-108.

24. Martin, U., S. Fischer, U. Kohnert, H. Lill, R. Rudolph, G. Sponer, A. Stern, and K. Strein. 1990. Properties of a novel plasminogen activator (EM 06.022) produced in *Escherichia coli*. *Z. Kardiol.* 79: 167-170.

25. Obukowicz, M. G., M. E. Gustafson, K. D. Junger, R. M. Leimgruber, A. J. Wittwer, T. C. Wun, T. G. Warren, B. F. Bishop, K. J. Mathis, D. T. McPherson, N. R. Siegel, M. G. Jennings, B. B. Brightwell, J. A. Diaz-Cllier, L. D. Bell, C. S. Craik, and W. C. Tacon. 1990. Secretion of active kringle-2-serine protease in *Escherichia coli*. *Biochemistry* 29:9737-9745.

26. Parmley, S. F., and G. P. Smith. 1988. Antibody-selectable filamentous fd phage vectors: affinity purification of target genes. *Gene* 73:305-318.

27. Pennica, D., W. E. Holmes, w. J. Kohr, R. N. Harkins, G. A. Vehar, C. A. Ward, W. F. Bennett, E. Yelverton, P. H. Seeburg, H. I. Heyneker, D. V. Goeddel, and D. Collen. 1983. Cloning and expression of human tissue-type plasminogen activator cDNA in *E. coli*. *Nature* 301:214-221.

28. Rippmann, J. F., M. Klein, C. Hoischen, B. Brocks, W. J. Rettig, J. Gumpert, K. Pfizenmaier, R. Mattes, and D. Moosmayer. 1998. Procaryotic expression of single-chain variable- fragment (scFv) antibodies: secretion in L-form cells of *Proteus mirabilis*

五、發明說明 (34)

leads to active product and overcomes the limitations of periplasmic expression in *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* 64:4862-4869.

29. Saito, Y., Y. Ishii, H. Sasaki, M. Hayashi, T. Fujimura, Y. Imai, S. Nakamura, S. Suzuki, J. Notani, T. Asada, H. Horiai, K. Masakazu, and N. Mineo. 1994. Production and characterization of a novel tissue-type plasminogen activator derivative in *Escherichia coli*. *Biotechnol. Prog.* 10:472-479.

30. Sarmientos, P., M. Duchesne, P. Deneffe, J. Boiziau, N. Fromage, N. Delporte, F. Parker, Y. Lelievre, J.-F. Mayaux, and T. Cartwright. 1989. Synthesis and purification of active human tissue plasminogen activator from *Escherichia coli*. *Biotechnology* 7:495-501.

31. Scherrer, S., N. Robas, H. Zouheiry, G. Branlant, and C. Branlant. 1994. Periplasmic aggregation limits the proteolytic maturation of the *Escherichia coli* penicillin G amidase precursor polypeptide. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 42:85-89.

32. Soeda, S., M. Kakiki, H. Shimeno, and A. Nagamatsu. 1986. Rapid and high-yield purification of porcine heart tissue-type plasminogen activator by heparin-sepharose chromatography. *Life Sci.* 39: 1317-1324.

33. Szarka, S. J., E. G. Sihota, H. R. Habibi., and S.-L. Wong. — 1999. Staphylokinase as a plasminogen activator component in recombinant fusion proteins. *Appl. Environ. Microbiol.* 65:

五、發明說明 (35)

506-513.

34. Waldenstrom, M., E. Holmgren, A. Attersand, C. Kalderen, B. Lowenadler, B. Raden, L. Hansson, and G. Pohl. 1991. Synthesis and secretion of a fibrinolytically active tissue-type plasminogen activator variant in *Escherichia coli*. *Gene* 99: 243-248.

35. Wan, E. W.-M., and F. Baneyx. 1998. TolAIII Co-overexpression Facilitates the Recovery of Periplasmic Recombinant Proteins into the Growth Medium of *Escherichia coli*. *Protein Expr. Purif.* 14: 13-22.

36. Zacharias, U., B. Fischer, F. Noll, and H. Will. 1992. Characterization of human tissue-type plasminogen activator with monoclonal antibodies: mapping of epitopes and binding sites for fibrin and lysine. *Thromb. Haemost.* 67:88-94.

圖示說明

圖 1. 藉由利用 SK2/174 及 ASSP 引子確認來自 p51-3 載體之 K2S 基因之 PCR 增幅產物。第 1 道顯示 1kb 標示物 (Roche Molecular Biochemicals, Indianapolis, IN)。第 2 道係載入 1 微升之增幅產物。其顯示 1110 bp 處之單一橫帶。電泳係於 1% 洋菜瓊脂膠體上進行。

圖 2. pComb3H-K2S 經 Sfi I 水解後，於 1110 bp(*) 處之所欲 K2S 基因之鑑定係顯示於第 3 道。第 1 道顯示 1kb 標示物。第 2 道係載入未切割之 pComb3H-K2S。電泳係於 1% 洋菜瓊脂膠體上進行。

五、發明說明 (36)

圖 3. pComb3H-K2S 之圖示，其顯示兩個 Sfi I 選殖位置，其中嵌入 K2S 基因。亦顯示訊號序列(OmpA)，核糖體結合位置(RIBS)，lac 起動子，及 gpIII 基因。

圖 4. 位於 pComb3H-K2S 上之 K2S 及 gpIII 交接處之突變位置圖示。pComb3H-K2S 之鏈合位置係與一組含有經修飾寡核甘(畫線者)之突變引子(M_S TPA 及 M_{AS} TPA)結合。進行循環增幅後，Sfi I 位置 1(粗體字)被修飾並於新合成股中丢失。

圖 5. 以 Sfi 限制酶分析新合成之 MpComb3H-K2S 之特徵。相關於 MpComb3H-K2S 之單一切割位置之位於 4319 bp 處之單一橫帶可見於第 3 道。並不見位於 1110 bp 處之 K2S 嵌入帶。第 1 道顯示 1kb 標示物。第 2 道係載入未切割之 MpComb3H-K2S。電泳係於 1% 洋菜瓊脂膠體上進行。

圖 6. 以自具有綿羊抗-tPA 結合性 HRP 之 E. coli XM[K2S] 培養上清液純化之重組蛋白質鑑定具免疫反應帶。第 1 道載入 40 奈克之標準黑色素瘤 tPA (86/670)，其於 70kDa 處顯示反應帶。將得自未轉形 E. coli XL-1 Blue 及 E. coli XM[K2S] 之部分純化及濃縮之培養上清液分別注入第 2 及 3 道。清晰之反應帶特別顯示於第 3 道之 39 kDa 處。

圖 7. 藉由共聚合之胞漿素原聚丙烯醯胺膠體電泳測定內含活性絲胺酸蛋白酶功能區域之胞外 r-K2S 之分子量。第 1 道含有指示性分子量標準品($\times 10^{-3}$)，SDS-6H(Sigma, Saint Louis, MO)。將五十微克之經 55% 飽和硫酸銨沉澱之 E. coli XL-1 Blue，經 pComb3HSS 轉形之 E. coli XL-1 Blue，及 E. coli

五、發明說明 (37)

XM[K2S]之培養上清液分別載入第 2、3 及 4 道中。第 5 道含有 50 mIU 之標準黑色素瘤 tPA (86/670)。於聚丙烯醯胺膠體內之水解胞漿素原透明環僅可見於第 4 道之分子量為 34 及 37 kDa 處(B)及第 5 道之分子量為 66 及 72kDa 處(A)。

圖 8.結構 A

來自無修飾之胺基酸 174-527 之原態 K2S 分子(SEQ ID NO : 11)

圖 9.結構 B-0

來自無修飾之胺基酸 197-527 之原態 K2S 分子(SEQ ID NO : 12)

圖 10.結構 B-1

來自胺基酸 193-527 之 K2S 分子，其中於圖 9 之結構 B-0 之 N 端部分加入胺基酸 SEGN (SEQ ID NO : 13)

圖 11.結構 B-2

來自胺基酸 193-527 之 K2S 分子，如圖 10，其中之 Cys-261 改變為 Ser (SEQ ID NO : 14)

圖 12.結構 B-3

來自胺基酸 191-527 之 K2S 分子，其中於圖 9 之結構 B-0 之 N 端部分加入胺基酸 SEGNSD (SEQ ID NO : 15)

圖 13.結構 B-4

來自胺基酸 191-527 之 K2S 分子，如圖 12，其中之 Cys-261 改變為 Ser (SEQ ID NO : 16)

圖 14.結構 C

來自無修飾之胺基酸 220-527 之原態 K2S 分子。此分子

五、發明說明 (38)

可進一步以類似被揭示用於圖 10-13 之結構 B 之方式修飾 (SEQ ID NO : 17)。

圖 15. 結構 D

來自無修飾之胺基酸 260-527 之原態 K2S 分子。此分子可進一步以類似被揭示用於圖 10-13 之結構 B 之方式修飾 (SEQ ID NO : 18)。

圖 16. tPA 分子 (SEQ ID NO : 19)

表 1. 藉由三明治 ELISA 測定噬菌體製劑中之 r-K2S。

捕捉抗體	追蹤抗體 (結合性 HRP)			
	抗 -tPA		抗 -M13	
	K2S-Φ	VCSM13 ^a	K2S-Φ	VCSM13
抗 -kringle 2 ^b	1.12±0.04 ^c	0.12±0.03	1.89±0.02	0.16±0.02
抗 -M13	0.17±0.01	0.14±0.05	1.91±0.02	1.88±0.03

^a VCSM13 係由經 pComb3HSS 轉形之 XL-1 Blue 獲得。

^b 使用老鼠單株抗 -kringle2(16/B)。其他抗體係由綿羊免疫球蛋白製備而得。

^c 數值係為各樣品之三重覆分析平均值。

五、發明說明 (39)

序列表

<110> Boehringer Ingelheim International GmbH

<120> 用以大規模製備重組DNA-衍生tPA或K2S
分子之方法

<130> case 1-1170

<140>

<141>

<150> GB 0027779.8

<151> 2000-11-14

<160> 25

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 18

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列之說明：K2S蛋白質之N端
部分之編碼序列

<400> 1

tctgagggaa acagtgac

18

<210> 2

<211> 1128

<212> DNA

<213> 人工序列

五、發明說明 (40)

<220>

<223> 人工序列之說明：OmpA-K2S融合
蛋白質之編碼序列

<400> 2

```

atgaaaaaga cagctatcgc gattgcagtg gcaactggctg gtttcgctac cgtggcccag 60
gcggcctctg agggaaacag tgactgctac tttgggaatg ggtcagccta ccgtggcacg 120
cacagcctca ccgagtcggg tgccctcctgc ctcccgtgga attccatgat cctgataggc 180
aaggtttaca cagcacagaa ccccagtgcc caggcactgg gcctgggcaa acataattac 240
tgccggaatc ctgatgggga tgccaagccc tggtgccacg tgctgaagaa ccgcaggctg 300
acgtgggagt actgtgatgt gccctcctgc tccacctgcg gcctgagaca gtacagccag 360
cctcagtttc gcatcaaagg agggctcttc gccgacatcg cctcccaccc ctggcaggct 420
gccatctttg ccaagcacag gaggtcgccc ggagagcggg tccctgtgcg gggcatactc 480
atcagctcct gctggattct ctctgccgcc cactgcttcc aggagaggtt tccgccccac 540
cacctgacgg tgatcttggg cagaacatac cgggtggtcc ctggcgagga ggagcagaaa 600
tttgaagtgc aaaaatacat tgtccataag gaattcgatg atgacactta cgacaatgac 660
attgcgctgc tgcagctgaa atcggattcg tcccgtgtg cccaggagag cagcgtggtc 720
cgcactgtgt gccttcccc ggccggacctg cagctgccgg actggacgga gtgtgagctc 780
tccggctacg gcaagcatga ggccctgtct cctttctatt cggagcggct gaaggaggct 840
catgtcagac tgtaccatc cagccgctgc acatcacaac atttacttaa cagaacagtc 900
accgacaaca tgctgtgtgc tggagacact cggagcggcg ggccccaggc aaacttgac 960
gacgcctgcc agggcgattc gggaggcccc ctggtgtgtc tgaacgatgg ccgcatgact 1020
ttggtgggca tcatcagctg gggcctgggc tgtggacaga aggatgtccc ggggtgtgtac 1080
acaaaggtta ccaactacct agactggatt cgtgacaaca tgcgaccg 1128

```

<210> 3

<211> 66

<212> DNA

<213> Escherichia coli

<400> 3

```

atgaaaaaga cagctatcgc gattgcagtg gcaactggctg gtttcgctac cgtggcccag 60
gcggcc 66

```

<210> 4

<211> 1065

<212> DNA

五、發明說明 (41)

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列之說明：K2S蛋白質之
編碼序列

<400> 4

```

tctgagggaa acagtgactg ctactttggg aatgggtcag cctaccgtgg cacgcacagc 60
ctcaccgagt cgggtgcctc ctgcctcccg tggaaattcca tgatcctgat aggcaagggt 120
tacacagcac agaaccccag tgcccaggca ctgggcctgg gcaaacataa ttactgccgg 180
aatcctgatg gggatgcaa gccctgggtgc cacgtgctga agaaccgcag gctgacgtgg 240
gagtactgtg atgtgccctc ctgctccacc tgcggcctga gacagtacag ccagcctcag 300
tttcgcatca aaggagggct cttgcgcgac atcgcctccc acccctggca ggctgccatc 360
tttgccaagc acaggaggtc gcccgagag cggttcctgt gcgggggcat actcatcagc 420
tcctgctgga ttctctctgc cgccactgc ttccaggaga ggtttcgccc ccaccacctg 480
acggtgatct tgggcagaac ataccgggtg gtccctggcg aggaggagca gaaatttgaa 540
gtcgaaaaat acattgtcca taaggaattc gatgatgaca cttacgaaa tgacattgcg 600
ctgctgcagc tgaaatcgga ttcgtcccgc tgtgcccagg agagcagcgt ggtccgcaact 660
gtgtgccttc ccccggcgga cctgcagctg ccggactgga cggagtgtga gctctccggc 720
tacggcaagc atgaggcctt gtctcctttc tattcggagc ggctgaagga ggctcatgtc 780
agactgtacc catccagccg ctgcacatca caacatttac ttaacagaac agtcaccgac 840
aacatgctgt gtgctggaga cactcggagc ggcgggcccc aggcaaactt gcacgacgcc 900
tgccagggcg attcgggagg ccccctggtg tgtctgaacg atggccgcat gactttggtg 960
ggcatcatca gctggggcct gggctgtgga cagaaggatg tcccgggtgt gtacacaaag 1020
gttaccaact acctagactg gattcgtgac aacatgcgac cgtga 1065

```

<210> 5

<211> 1128

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列之說明：OmpA-K2S融合
蛋白質之編碼序列

<400> 5

```

atgaaaaaga cagctatcgc gattgcagtg gcactggctg gtttcgctac cgtggcccag 60
gcggcctctg agggaaacag tgactgctac tttgggaatg ggtcagccta ccgtggcacg 120

```

五、發明說明 (42)

cacagcctca ccgagtcggg tgcctcctgc ctcccgtgga attccatgat cctgataggc 180
aaggttttaca cagcacagaa ccccagtgcc caggcactgg gcctgggcaa acataattac 240
tgccggaatc ctgatgggga tgccaagccc tggtgccacg tgctgaagaa ccgcaggctg 300
acgtgggagt actgtgatgt gccctcctgc tccacctgcy gcctgagaca gtacagccag 360
cctcagtttc gcatcaaagg agggctcttc gccgacatcy cctcccaccc ctggcaggct 420
gccatctttg ccaagcacag gaggtcgccc ggagagcggg tcctgtgcyg gggcatactc 480
atcagctcct gctggattct ctctgcccgc cactgcttcc aggagagggt tccgccccac 540
cacctgacgg tgatcttggg cagaacatac cgggtggtcc ctggcgagga ggagcagaaa 600
tttgaagtcg aaaaatacat tgtocataag gaattcgatg atgacactta cgacaatgac 660
attgcgctgc tgcagctgaa atcggattcg tcccgtgtg cccaggagag cagcgtggtc 720
cgcactgtgt gccttcccc ggcgacactg cagctgccgg actggacgga gtgtgagctc 780
tccggctacg gcaagcatga ggccttgtct cctttctatt cggagcggct gaaggaggct 840
catgtcagac tgtaccatc cagccgctgc acatcacaac atttacttaa cagaacagtc 900
accgacaaca tgctgtgtgc tggagacact cggagcggcg ggccccaggc aaacttgac 960
gacgcctgcc agggcgattc gggaggcccc ctggtgtgtc tgaacgatgg ccgcatgact 1020
ttggtgggca tcatcagctg gggcctgggc tgtggacaga aggatgtccc ggggtgtgtac 1080
acaaaggtta ccaactacct agactggatt cgtgacaaca tgcgaccg 1128

<210> 6

<211> 66

<212> DNA

<213> Escherichia coli

<400> 6

atgaaaaaga cagctatcgc gattgcagtg gcactggctg gtttcgctac cgtggcccag 60
gcggcc 66

<210> 7

<211> 1065

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列之說明：K2S蛋白質之
編碼序列

<400> 7

五、發明說明 (43)

tctgagggaa acagtgactg ctactttggg aatgggtcag cctaccgtgg cacgcacagc 60
 ctcaccgagt cgggtgcctc ctgcctcccg tggaaattcca tgatcctgat aggcaaggtt 120
 tacacagcac agaaccccag tgcccaggca ctgggcctgg gcaaacataa ttactgccgg 180
 aatcctgatg gggatgccaa gccctggtgc cacgtgctga agaaccgcag gctgacgtgg 240
 gagtactgtg atgtgcctc ctgctccacc tgcggcctga gacagtacag ccagcctcag 300
 tttcgcacatca aaggagggct cttcgcggac atcgcctccc acccctggca ggctgccatc 360
 tttgccaaagc acaggaggtc gcccgagag cggttcctgt gcgggggcat actcatcagc 420
 tcctgctgga ttctctctgc cgcccactgc ttccaggaga ggtttccgcc ccaccacctg 480
 acggtgatct tgggcagAAC ataccgggtg gtccttggcg aggaggagca gaaatttgaa 540
 gtcgaaaaat acattgtcca taaggaattc gatgatgaca cttacgacaa tgacattgcy 600
 ctgctgcagc tgaaatcgga ttcgtcccgc tgtgcccagg agagcagcgt ggtccgcact 660
 gtgtgccttc ccccggcgga cctgcagctg cgggactgga cggagtgtga gctctccggc 720
 tacggcaagc atgaggcctt gtctcctttc tattcggagc ggctgaagga ggctcatgtc 780
 agactgtacc catccagccg ctgcacatca caacatttac ttaacagAAC agtcaccgac 840
 aacatgctgt gtgctggaga cactcggagc ggccggcccc aggcaactt gcacgacgcc 900
 tgccagggcg attcgggagg cccctggtg tgtctgaacg atggccgcat gactttggtg 960
 ggcacatca gctggggcct gggctgtgga cagaaggatg tcccgggtgt gtacacaaag 1020
 gttaccaact acctagactg gattcgtgac aacatgcgac cgtga 1065

<210> 8

<211> 377

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列之說明：OmpA-K2S融合
蛋白質

<400> 8

Met Lys Lys Thr Ala Ile Ala Ile Ala Val Ala Leu Ala Gly Phe Ala
 1 5 10 15

Thr Val Ala Gln Ala Ala Ser Glu Gly Asn Ser Asp Cys Tyr Phe Gly
 20 25 30

Asn Gly Ser Ala Tyr Arg Gly Thr His Ser Leu Thr Glu Ser Gly Ala
 35 40 45

五、發明說明 (44)

Ser Cys Leu Pro Trp Asn Ser Met Ile Leu Ile Gly Lys Val Tyr Thr
50 55 60

Ala Gln Asn Pro Ser Ala Gln Ala Leu Gly Leu Gly Lys His Asn Tyr
65 70 75 80

Cys Arg Asn Pro Asp Gly Asp Ala Lys Pro Trp Cys His Val Leu Lys
85 90 95

Asn Arg Arg Leu Thr Trp Glu Tyr Cys Asp Val Pro Ser Cys Ser Thr
100 105 110

Cys Gly Leu Arg Gln Tyr Ser Gln Pro Gln Phe Arg Ile Lys Gly Gly
115 120 125

Leu Phe Ala Asp Ile Ala Ser His Pro Trp Gln Ala Ala Ile Phe Ala
130 135 140

Lys His Arg Arg Ser Pro Gly Glu Arg Phe Leu Cys Gly Gly Ile Leu
145 150 155 160

Ile Ser Ser Cys Trp Ile Leu Ser Ala Ala His Cys Phe Gln Glu Arg
165 170 175

Phe Pro Pro His His Leu Thr Val Ile Leu Gly Arg Thr Tyr Arg Val
180 185 190

Val Pro Gly Glu Glu Glu Gln Lys Phe Glu Val Glu Lys Tyr Ile Val
195 200 205

His Lys Glu Phe Asp Asp Asp Thr Tyr Asp Asn Asp Ile Ala Leu Leu
210 215 220

Gln Leu Lys Ser Asp Ser Ser Arg Cys Ala Gln Glu Ser Ser Val Val
225 230 235 240

Arg Thr Val Cys Leu Pro Pro Ala Asp Leu Gln Leu Pro Asp Trp Thr
245 250 255

五、發明說明 (45)

Glu Cys Glu Leu Ser Gly Tyr Gly Lys His Glu Ala Leu Ser Pro Phe
260 265 270

Tyr Ser Glu Arg Leu Lys Glu Ala His Val Arg Leu Tyr Pro Ser Ser
275 280 285

Arg Cys Thr Ser Gln His Leu Leu Asn Arg Thr Val Thr Asp Asn Met
290 295 300

Leu Cys Ala Gly Asp Thr Arg Ser Gly Gly Pro Gln Ala Asn Leu His
305 310 315 320

Asp Ala Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro Leu Val Cys Leu Asn Asp
325 330 335

Gly Arg Met Thr Leu Val Gly Ile Ile Ser Trp Gly Leu Gly Cys Gly
340 345 350

Gln Lys Asp Val Pro Gly Val Tyr Thr Lys Val Thr Asn Tyr Leu Asp
355 360 365

Trp Ile Arg Asp Asn Met Arg Pro Gly
370 375

<210> 9

<211> 4

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列之說明：胜肽序列

<400> 9

Ser Glu Gly Asn

1

五、發明說明 (46)

<210> 10

<211> 6

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列之說明：胜肽序列

<400> 10

Ser Glu Gly Asn Ser Asp

1 5

<210> 11

<211> 354

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列之說明：K2S 174-527

<400> 11

Ser Glu Gly Asn Ser Asp Cys Tyr Phe Gly Asn Gly Ser Ala Tyr Arg

1 5 10 15

Gly Thr His Ser Leu Thr Glu Ser Gly Ala Ser Cys Leu Pro Trp Asn

20 25 30

Ser Met Ile Leu Ile Gly Lys Val Tyr Thr Ala Gln Asn Pro Ser Ala

35 40 45

Gln Ala Leu Gly Leu Gly Lys His Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Gly

50 55 60

Asp Ala Lys Pro Trp Cys His Val Leu Lys Asn Arg Arg Leu Thr Trp

65 70 75 80

Glu Tyr Cys Asp Val Pro Ser Cys Ser Thr Cys Gly Leu Arg Gln Tyr

五、發明說明 (47)

	85		90		95
Ser Gln Pro Gln Phe Arg Ile Lys Gly Gly Leu Phe Ala Asp Ile Ala	100		105		110
Ser His Pro Trp Gln Ala Ala Ile Phe Ala Lys His Arg Arg Ser Pro	115		120		125
Gly Glu Arg Phe Leu Cys Gly Gly Ile Leu Ile Ser Ser Cys Trp Ile	130		135		140
Leu Ser Ala Ala His Cys Phe Gln Glu Arg Phe Pro Pro His His Leu	145		150		155
Thr Val Ile Leu Gly Arg Thr Tyr Arg Val Val Pro Gly Glu Glu Glu	165		170		175
Gln Lys Phe Glu Val Glu Lys Tyr Ile Val His Lys Glu Phe Asp Asp	180		185		190
Asp Thr Tyr Asp Asn Asp Ile Ala Leu Leu Gln Leu Lys Ser Asp Ser	195		200		205
Ser Arg Cys Ala Gln Glu Ser Ser Val Val Arg Thr Val Cys Leu Pro	210		215		220
Pro Ala Asp Leu Gln Leu Pro Asp Trp Thr Glu Cys Glu Leu Ser Gly	225		230		235
Tyr Gly Lys His Glu Ala Leu Ser Pro Phe Tyr Ser Glu Arg Leu Lys	245		250		255
Glu Ala His Val Arg Leu Tyr Pro Ser Ser Arg Cys Thr Ser Gln His	260		265		270
Leu Leu Asn Arg Thr Val Thr Asp Asn Met Leu Cys Ala Gly Asp Thr	275		280		285
Arg Ser Gly Gly Pro Gln Ala Asn Leu His Asp Ala Cys Gln Gly Asp					

五、發明說明 (48)

290	295	300
Ser Gly Gly Pro Leu Val Cys Leu Asn Asp Gly Arg Met Thr Leu Val		
305	310	315 320
Gly Ile Ile Ser Trp Gly Leu Gly Cys Gly Gln Lys Asp Val Pro Gly		
	325	330 335
Val Tyr Thr Lys Val Thr Asn Tyr Leu Asp Trp Ile Arg Asp Asn Met		
	340	345 350
Arg Pro		
<210> 12		
<211> 331		
<212> PRT		
<213> 人工序列		
<220>		
<223> 人工序列之說明：K2S 197-527		
<400> 12		
Ser Gly Ala Ser Cys Leu Pro Trp Asn Ser Met Ile Leu Ile Gly Lys		
1	5	10 15
Val Tyr Thr Ala Gln Asn Pro Ser Ala Gln Ala Leu Gly Leu Gly Lys		
	20	25 30
His Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Gly Asp Ala Lys Pro Trp Cys His		
	35	40 45
Val Leu Lys Asn Arg Arg Leu Thr Trp Glu Tyr Cys Asp Val Pro Ser		
	50	55 60
Cys Ser Thr Cys Gly Leu Arg Gln Tyr Ser Gln Pro Gln Phe Arg Ile		
	65	70 75 80

五、發明說明 (49)

Lys Gly Gly Leu Phe Ala Asp Ile Ala Ser His Pro Trp Gln Ala Ala
85 90 95

Ile Phe Ala Lys His Arg Arg Ser Pro Gly Glu Arg Phe Leu Cys Gly
100 105 110

Gly Ile Leu Ile Ser Ser Cys Trp Ile Leu Ser Ala Ala His Cys Phe
115 120 125

Gln Glu Arg Phe Pro Pro His His Leu Thr Val Ile Leu Gly Arg Thr
130 135 140

Tyr Arg Val Val Pro Gly Glu Glu Glu Gln Lys Phe Glu Val Glu Lys
145 150 155 160

Tyr Ile Val His Lys Glu Phe Asp Asp Asp Thr Tyr Asp Asn Asp Ile
165 170 175

Ala Leu Leu Gln Leu Lys Ser Asp Ser Ser Arg Cys Ala Gln Glu Ser
180 185 190

Ser Val Val Arg Thr Val Cys Leu Pro Pro Ala Asp Leu Gln Leu Pro
195 200 205

Asp Trp Thr Glu Cys Glu Leu Ser Gly Tyr Gly Lys His Glu Ala Leu
210 215 220

Ser Pro Phe Tyr Ser Glu Arg Leu Lys Glu Ala His Val Arg Leu Tyr
225 230 235 240

Pro Ser Ser Arg Cys Thr Ser Gln His Leu Leu Asn Arg Thr Val Thr
245 250 255

Asp Asn Met Leu Cys Ala Gly Asp Thr Arg Ser Gly Gly Pro Gln Ala
260 265 270

Asn Leu His Asp Ala Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro Leu Val Cys
275 280 285

五、發明說明 (50)

Leu Asn Asp Gly Arg Met Thr Leu Val Gly Ile Ile Ser Trp Gly Leu
290 295 300

Gly Cys Gly Gln Lys Asp Val Pro Gly Val Tyr Thr Lys Val Thr Asn
305 310 315 320

Tyr Leu Asp Trp Ile Arg Asp Asn Met Arg Pro
325 330

<210> 13

<211> 339

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列之說明：K2S 193-527，經修飾

<400> 13

Ser Glu Gly Asn Ser Leu Thr Glu Ser Gly Ala Ser Cys Leu Pro Trp
1 5 10 15

Asn Ser Met Ile Leu Ile Gly Lys Val Tyr Thr Ala Gln Asn Pro Ser
20 25 30

Ala Gln Ala Leu Gly Leu Gly Lys His Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Asp
35 40 45

Gly Asp Ala Lys Pro Trp Cys His Val Leu Lys Asn Arg Arg Leu Thr
50 55 60

Trp Glu Tyr Cys Asp Val Pro Ser Cys Ser Thr Cys Gly Leu Arg Gln
65 70 75 80

Tyr Ser Gln Pro Gln Phe Arg Ile Lys Gly Gly Leu Phe Ala Asp Ile
85 90 95

Ala Ser His Pro Trp Gln Ala Ala Ile Phe Ala Lys His Arg Arg Ser

五、發明說明 (51)

100	105	110
Pro Gly Glu Arg Phe Leu Cys Gly Gly Ile Leu Ile Ser Ser Cys Trp		
115	120	125
Ile Leu Ser Ala Ala His Cys Phe Gln Glu Arg Phe Pro Pro His His		
130	135	140
Leu Thr Val Ile Leu Gly Arg Thr Tyr Arg Val Val Pro Gly Glu Glu		
145	150	155
Glu Gln Lys Phe Glu Val Glu Lys Tyr Ile Val His Lys Glu Phe Asp		
165	170	175
Asp Asp Thr Tyr Asp Asn Asp Ile Ala Leu Leu Gln Leu Lys Ser Asp		
180	185	190
Ser Ser Arg Cys Ala Gln Glu Ser Ser Val Val Arg Thr Val Cys Leu		
195	200	205
Pro Pro Ala Asp Leu Gln Leu Pro Asp Trp Thr Glu Cys Glu Leu Ser		
210	215	220
Gly Tyr Gly Lys His Glu Ala Leu Ser Pro Phe Tyr Ser Glu Arg Leu		
225	230	235
Lys Glu Ala His Val Arg Leu Tyr Pro Ser Ser Arg Cys Thr Ser Gln		
245	250	255
His Leu Leu Asn Arg Thr Val Thr Asp Asn Met Leu Cys Ala Gly Asp		
260	265	270
Thr Arg Ser Gly Gly Pro Gln Ala Asn Leu His Asp Ala Cys Gln Gly		
275	280	285
Asp Ser Gly Gly Pro Leu Val Cys Leu Asn Asp Gly Arg Met Thr Leu		
290	295	300
Val Gly Ile Ile Ser Trp Gly Leu Gly Cys Gly Gln Lys Asp Val Pro		

五、發明說明 (53)

Phe Leu Cys Gly Gly Ile Leu Ile Ser Ser Cys Trp Ile Leu Ser Ala
115 120 125

Ala His Cys Phe Gln Glu Arg Phe Pro Pro His His Leu Thr Val Ile
130 135 140

Leu Gly Arg Thr Tyr Arg Val Val Pro Gly Glu Glu Glu Gln Lys Phe
145 150 155 160

Glu Val Glu Lys Tyr Ile Val His Lys Glu Phe Asp Asp Asp Thr Tyr
165 170 175

Asp Asn Asp Ile Ala Leu Leu Gln Leu Lys Ser Asp Ser Ser Arg Cys
180 185 190

Ala Gln Glu Ser Ser Val Val Arg Thr Val Cys Leu Pro Pro Ala Asp
195 200 205

Leu Gln Leu Pro Asp Trp Thr Glu Cys Glu Leu Ser Gly Tyr Gly Lys
210 215 220

His Glu Ala Leu Ser Pro Phe Tyr Ser Glu Arg Leu Lys Glu Ala His
225 230 235 240

Val Arg Leu Tyr Pro Ser Ser Arg Cys Thr Ser Gln His Leu Leu Asn
245 250 255

Arg Thr Val Thr Asp Asn Met Leu Cys Ala Gly Asp Thr Arg Ser Gly
260 265 270

Gly Pro Gln Ala Asn Leu His Asp Ala Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly
275 280 285

Pro Leu Val Cys Leu Asn Asp Gly Arg Met Thr Leu Val Gly Ile Ile
290 295 300

Ser Trp Gly Leu Gly Cys Gly Gln Lys Asp Val Pro Gly Val Tyr Thr
305 310 315 320

五、發明說明 (54)

Lys Val Thr Asn Tyr Leu Asp Trp Ile Arg Asp Asn Met Arg Pro
 325 330 335

<210> 15

<211> 343

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列之說明：K2S 191-527

<400> 15

Ser Glu Gly Asn Ser Asp Thr His Ser Leu Thr Glu Ser Gly Ala Ser
 1 5 10 15

Cys Leu Pro Trp Asn Ser Met Ile Leu Ile Gly Lys Val Tyr Thr Ala
 20 25 30

Gln Asn Pro Ser Ala Gln Ala Leu Gly Leu Gly Lys His Asn Tyr Cys
 35 40 45

Arg Asn Pro Asp Gly Asp Ala Lys Pro Trp Cys His Val Leu Lys Asn
 50 55 60

Arg Arg Leu Thr Trp Glu Tyr Cys Asp Val Pro Ser Cys Ser Thr Cys
 65 70 75 80

Gly Leu Arg Gln Tyr Ser Gln Pro Gln Phe Arg Ile Lys Gly Gly Leu
 85 90 95

Phe Ala Asp Ile Ala Ser His Pro Trp Gln Ala Ala Ile Phe Ala Lys
 100 105 110

His Arg Arg Ser Pro Gly Glu Arg Phe Leu Cys Gly Gly Ile Leu Ile
 115 120 125

五、發明說明 (55)

Ser Ser Cys Trp Ile Leu Ser Ala Ala His Cys Phe Gln Glu Arg Phe
130 135 140

Pro Pro His His Leu Thr Val Ile Leu Gly Arg Thr Tyr Arg Val Val
145 150 155 160

Pro Gly Glu Glu Glu Gln Lys Phe Glu Val Glu Lys Tyr Ile Val His
165 170 175

Lys Glu Phe Asp Asp Asp Thr Tyr Asp Asn Asp Ile Ala Leu Leu Gln
180 185 190

Leu Lys Ser Asp Ser Ser Arg Cys Ala Gln Glu Ser Ser Val Val Arg
195 200 205

Thr Val Cys Leu Pro Pro Ala Asp Leu Gln Leu Pro Asp Trp Thr Glu
210 215 220

Cys Glu Leu Ser Gly Tyr Gly Lys His Glu Ala Leu Ser Pro Phe Tyr
225 230 235 240

Ser Glu Arg Leu Lys Glu Ala His Val Arg Leu Tyr Pro Ser Ser Arg
245 250 255

Cys Thr Ser Gln His Leu Leu Asn Arg Thr Val Thr Asp Asn Met Leu
260 265 270

Cys Ala Gly Asp Thr Arg Ser Gly Gly Pro Gln Ala Asn Leu His Asp
275 280 285

Ala Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro Leu Val Cys Leu Asn Asp Gly
290 295 300

Arg Met Thr Leu Val Gly Ile Ile Ser Trp Gly Leu Gly Cys Gly Gln
305 310 315 320

Lys Asp Val Pro Gly Val Tyr Thr Lys Val Thr Asn Tyr Leu Asp Trp
325 330 335

五、發明說明 (56)

Ile Arg Asp Asn Met Arg Pro
340

<210> 16

<211> 343

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列之說明：K2S 191-527，經修飾

<400> 16

Ser Glu Gly Asn Ser Asp Thr His Ser Leu Thr Glu Ser Gly Ala Ser
1 5 10 15

Cys Leu Pro Trp Asn Ser Met Ile Leu Ile Gly Lys Val Tyr Thr Ala
20 25 30

Gln Asn Pro Ser Ala Gln Ala Leu Gly Leu Gly Lys His Asn Tyr Cys
35 40 45

Arg Asn Pro Asp Gly Asp Ala Lys Pro Trp Cys His Val Leu Lys Asn
50 55 60

Arg Arg Leu Thr Trp Glu Tyr Cys Asp Val Pro Ser Ser Ser Thr Cys
65 70 75 80

Gly Leu Arg Gln Tyr Ser Gln Pro Gln Phe Arg Ile Lys Gly Gly Leu
85 90 95

Phe Ala Asp Ile Ala Ser His Pro Trp Gln Ala Ala Ile Phe Ala Lys
100 105 110

His Arg Arg Ser Pro Gly Glu Arg Phe Leu Cys Gly Gly Ile Leu Ile
115 120 125

Ser Ser Cys Trp Ile Leu Ser Ala Ala His Cys Phe Gln Glu Arg Phe

五、發明說明 (57)

130		135		140
Pro Pro His His Leu Thr Val Ile Leu Gly Arg Thr Tyr Arg Val Val				
145		150		155 160
Pro Gly Glu Glu Glu Gln Lys Phe Glu Val Glu Lys Tyr Ile Val His				
		165		170 175
Lys Glu Phe Asp Asp Asp Thr Tyr Asp Asn Asp Ile Ala Leu Leu Gln				
		180		185 190
Leu Lys Ser Asp Ser Ser Arg Cys Ala Gln Glu Ser Ser Val Val Arg				
		195		200 205
Thr Val Cys Leu Pro Pro Ala Asp Leu Gln Leu Pro Asp Trp Thr Glu				
		210		215 220
Cys Glu Leu Ser Gly Tyr Gly Lys His Glu Ala Leu Ser Pro Phe Tyr				
		225		230 235 240
Ser Glu Arg Leu Lys Glu Ala His Val Arg Leu Tyr Pro Ser Ser Arg				
		245		250 255
Cys Thr Ser Gln His Leu Leu Asn Arg Thr Val Thr Asp Asn Met Leu				
		260		265 270
Cys Ala Gly Asp Thr Arg Ser Gly Gly Pro Gln Ala Asn Leu His Asp				
		275		280 285
Ala Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro Leu Val Cys Leu Asn Asp Gly				
		290		295 300
Arg Met Thr Leu Val Gly Ile Ile Ser Trp Gly Leu Gly Cys Gly Gln				
		305		310 315 320
Lys Asp Val Pro Gly Val Tyr Thr Lys Val Thr Asn Tyr Leu Asp Trp				
		325		330 335
Ile Arg Asp Asn Met Arg Pro				

五、發明說明 (59)

Asp Asp Asp Thr Tyr Asp Asn Asp Ile Ala Leu Leu Gln Leu Lys Ser
145 150 155 160

Asp Ser Ser Arg Cys Ala Gln Glu Ser Ser Val Val Arg Thr Val Cys
165 170 175

Leu Pro Pro Ala Asp Leu Gln Leu Pro Asp Trp Thr Glu Cys Glu Leu
180 185 190

Ser Gly Tyr Gly Lys His Glu Ala Leu Ser Pro Phe Tyr Ser Glu Arg
195 200 205

Leu Lys Glu Ala His Val Arg Leu Tyr Pro Ser Ser Arg Cys Thr Ser
210 215 220

Gln His Leu Leu Asn Arg Thr Val Thr Asp Asn Met Leu Cys Ala Gly
225 230 235 240

Asp Thr Arg Ser Gly Gly Pro Gln Ala Asn Leu His Asp Ala Cys Gln
245 250 255

Gly Asp Ser Gly Gly Pro Leu Val Cys Leu Asn Asp Gly Arg Met Thr
260 265 270

Leu Val Gly Ile Ile Ser Trp Gly Leu Gly Cys Gly Gln Lys Asp Val
275 280 285

Pro Gly Val Tyr Thr Lys Val Thr Asn Tyr Leu Asp Trp Ile Arg Asp
290 295 300

Asn Met Arg Pro
305

<210> 18

<211> 268

<212> PRT

<213> 人工序列

五、發明說明 (61)

Thr Asp Asn Met Leu Cys Ala Gly Asp Thr Arg Ser Gly Gly Pro Gln
195 200 205

Ala Asn Leu His Asp Ala Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro Leu Val
210 215 220

Cys Leu Asn Asp Gly Arg Met Thr Leu Val Gly Ile Ile Ser Trp Gly
225 230 235 240

Leu Gly Cys Gly Gln Lys Asp Val Pro Gly Val Tyr Thr Lys Val Thr
245 250 255

Asn Tyr Leu Asp Trp Ile Arg Asp Asn Met Arg Pro
260 265

<210> 19

<211> 527

<212> PRT

<213> 人類

<400> 19

Ser Tyr Gln Val Ile Cys Arg Asp Glu Lys Thr Gln Met Ile Tyr Gln
1 5 10 15

Gln His Gln Ser Trp Leu Arg Pro Val Leu Arg Ser Asn Arg Val Glu
20 25 30

Tyr Cys Trp Cys Asn Ser Gly Arg Ala Gln Cys His Ser Val Pro Val
35 40 45

Lys Ser Cys Ser Glu Pro Arg Cys Phe Asn Gly Gly Thr Cys Gln Gln
50 55 60

Ala Leu Tyr Phe Ser Asp Phe Val Cys Gln Cys Pro Glu Gly Phe Ala
65 70 75 80

Gly Lys Cys Cys Glu Ile Asp Thr Arg Ala Thr Cys Tyr Glu Asp Gln

五、發明說明 (62)

	85		90		95
Gly Ile Ser Tyr Arg Gly Thr Trp Ser Thr Ala Glu Ser Gly Ala Glu					
	100		105		110
Cys Thr Asn Trp Asn Ser Ser Ala Leu Ala Gln Lys Pro Tyr Ser Gly					
	115		120		125
Arg Arg Pro Asp Ala Ile Arg Leu Gly Leu Gly Asn His Asn Tyr Cys					
	130		135		140
Arg Asn Pro Asp Arg Asp Ser Lys Pro Trp Cys Tyr Val Phe Lys Ala					
	145		150		155
Gly Lys Tyr Ser Ser Glu Phe Cys Ser Thr Pro Ala Cys Ser Glu Gly					
		165		170	
					175
Asn Ser Asp Cys Tyr Phe Gly Asn Gly Ser Ala Tyr Arg Gly Thr His					
		180		185	190
Ser Leu Thr Glu Ser Gly Ala Ser Cys Leu Pro Trp Asn Ser Met Ile					
	195		200		205
Leu Ile Gly Lys Val Tyr Thr Ala Gln Asn Pro Ser Ala Gln Ala Leu					
	210		215		220
Gly Leu Gly Lys His Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Gly Asp Ala Lys					
	225		230		235
					240
Pro Trp Cys His Val Leu Lys Asn Arg Arg Leu Thr Trp Glu Tyr Cys					
		245		250	255
Asp Val Pro Ser Cys Ser Thr Cys Gly Leu Arg Gln Tyr Ser Gln Pro					
	260		265		270
Gln Phe Arg Ile Lys Gly Gly Leu Phe Ala Asp Ile Ala Ser His Pro					
	275		280		285
Trp Gln Ala Ala Ile Phe Ala Lys His Arg Arg Ser Pro Gly Glu Arg					

五、發明說明 (63)

290		295		300
Phe Leu Cys Gly Gly Ile Leu Ile Ser Ser Cys Trp Ile Leu Ser Ala				
305		310		315 320
Ala His Cys Phe Gln Glu Arg Phe Pro Pro His His Leu Thr Val Ile				
		325		330 335
Leu Gly Arg Thr Tyr Arg Val Val Pro Gly Glu Glu Glu Gln Lys Phe				
		340		345 350
Glu Val Glu Lys Tyr Ile Val His Lys Glu Phe Asp Asp Asp Thr Tyr				
		355		360 365
Asp Asn Asp Ile Ala Leu Leu Gln Leu Lys Ser Asp Ser Ser Arg Cys				
		370		375 380
Ala Gln Glu Ser Ser Val Val Arg Thr Val Cys Leu Pro Pro Ala Asp				
		385		390 395 400
Leu Gln Leu Pro Asp Trp Thr Glu Cys Glu Leu Ser Gly Tyr Gly Lys				
		405		410 415
His Glu Ala Leu Ser Pro Phe Tyr Ser Glu Arg Leu Lys Glu Ala His				
		420		425 430
Val Arg Leu Tyr Pro Ser Ser Arg Cys Thr Ser Gln His Leu Leu Asn				
		435		440 445
Arg Thr Val Thr Asp Asn Met Leu Cys Ala Gly Asp Thr Arg Ser Gly				
		450		455 460
Gly Pro Gln Ala Asn Leu His Asp Ala Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly				
		465		470 475 480
Pro Leu Val Cys Leu Asn Asp Gly Arg Met Thr Leu Val Gly Ile Ile				
		485		490 495
Ser Trp Gly Leu Gly Cys Gly Gln Lys Asp Val Pro Gly Val Tyr Thr				

五、發明說明 (64)

	500		505		510									
Lys	Val	Thr	Asn	Tyr	Leu	Asp	Trp	Ile	Arg	Asp	Asn	Met	Arg	Pro
			515					520				525		

<210> 20

<211> 12

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列之說明：引子
sequence for SEGN

<400> 20

tctgagggaa ac

12

<210> 21

<211> 22

<212> PRT

<213> Escherichia coli

<400> 21

Met	Lys	Lys	Thr	Ala	Ile	Ala	Ile	Ala	Val	Ala	Leu	Ala	Gly	Phe	Ala
1			5					10					15		

Thr	Val	Ala	Gln	Ala	Ala
			20		

<210> 22

<211> 42

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列之說明：引子

五、發明說明 (65)

<400> 22
gaggaggagg tggcccaggc ggcctctgag ggaacagtg ac 42

<210> 23
<211> 42
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之說明：引子

<400> 23
gaggaggagc tggccggcct ggcccggtcg catgttgca cg 42

<210> 24
<211> 26
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之說明：引子

<400> 24
acatgagacc gtgacaggcc ggccag 26

<210> 25
<211> 26
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之說明：引子

<400> 25
ctggccggcc tgtcacggtc gcatgt 26

四、中文發明摘要 (發明之名稱: 重組DNA-衍生tPA或K2S分子之大量製備方法)

本發明係屬於血栓溶解及於原核細胞中製備組織胞漿素原活化子(tPA)衍生物之領域。本發明係關於用以於原核細胞中製備重組 DNA-衍生 tPA、其變體或(Kringle 2 絲胺酸)K2S 分子或其變體之方法，其中該 tPA 或 K2S 或變體係呈活化及正確摺疊之形式分泌至細胞外，且該原核細胞含有並可表現一種載體，其包含編碼該 tPA 或 K2S 或變體之 DNA 實際連接於編碼訊號胜肽 OmpA 之 DNA 上。本發明進一步關於可藉由該方法取得之特定 K2S 衍生物。本發明進一步係關於該 DNA 分子及使用該 DNA 分子於該方法中。

英文發明摘要 (發明之名稱: METHODS FOR LARGE SCALE PRODUCTION OF RECOMBINANT DNA-DERIVED tPA OR K2S MOLECULES)

The invention belongs to the field of thrombolysis and of tissue plasminogen activator (tPA) derivative production in prokaryotic cells. The invention relates to methods for the production of a recombinant DNA-derived tPA, a variant thereof or a (Kringle 2 Serine) K2S molecule or a variant thereof in prokaryotic cells, wherein said tPA or K2S or variant is secreted extracellularly as an active and correctly folded protein, and the prokaryotic cell contains and expresses a vector comprising the DNA coding for said tPA or K2S or variant operably linked to the DNA coding for the signal peptide OmpA. The invention further relates to specific K2S derivatives obtainable by said method. The invention further relates to said DNA molecules and the use of said DNA molecules in said methods.

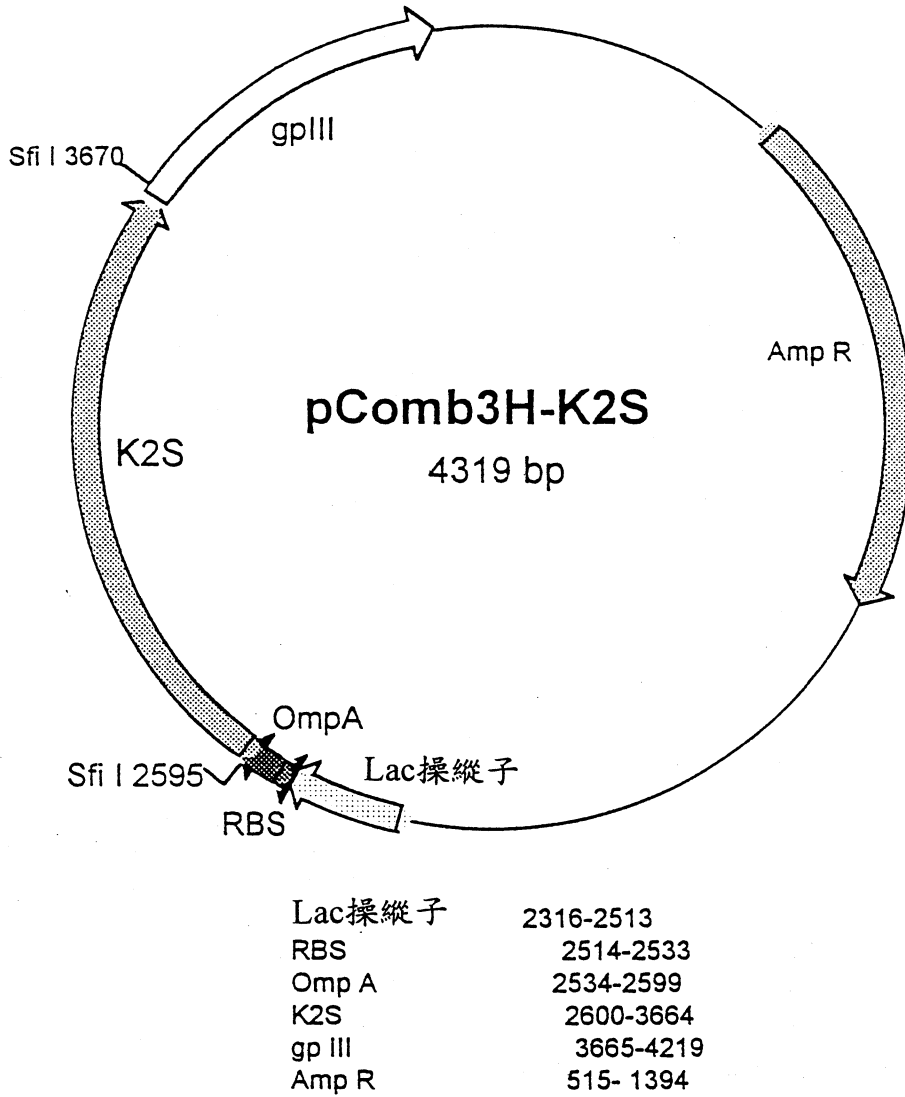


圖 3

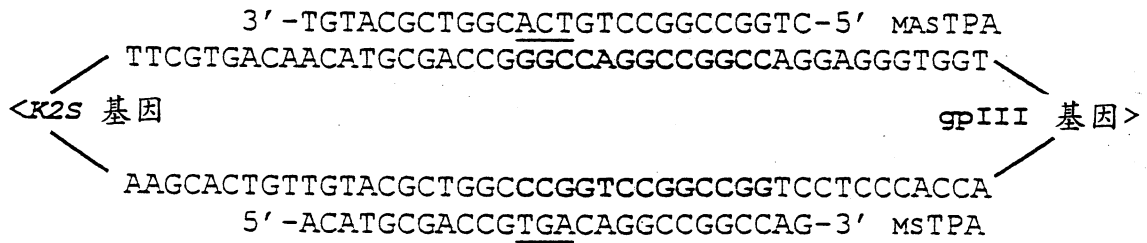
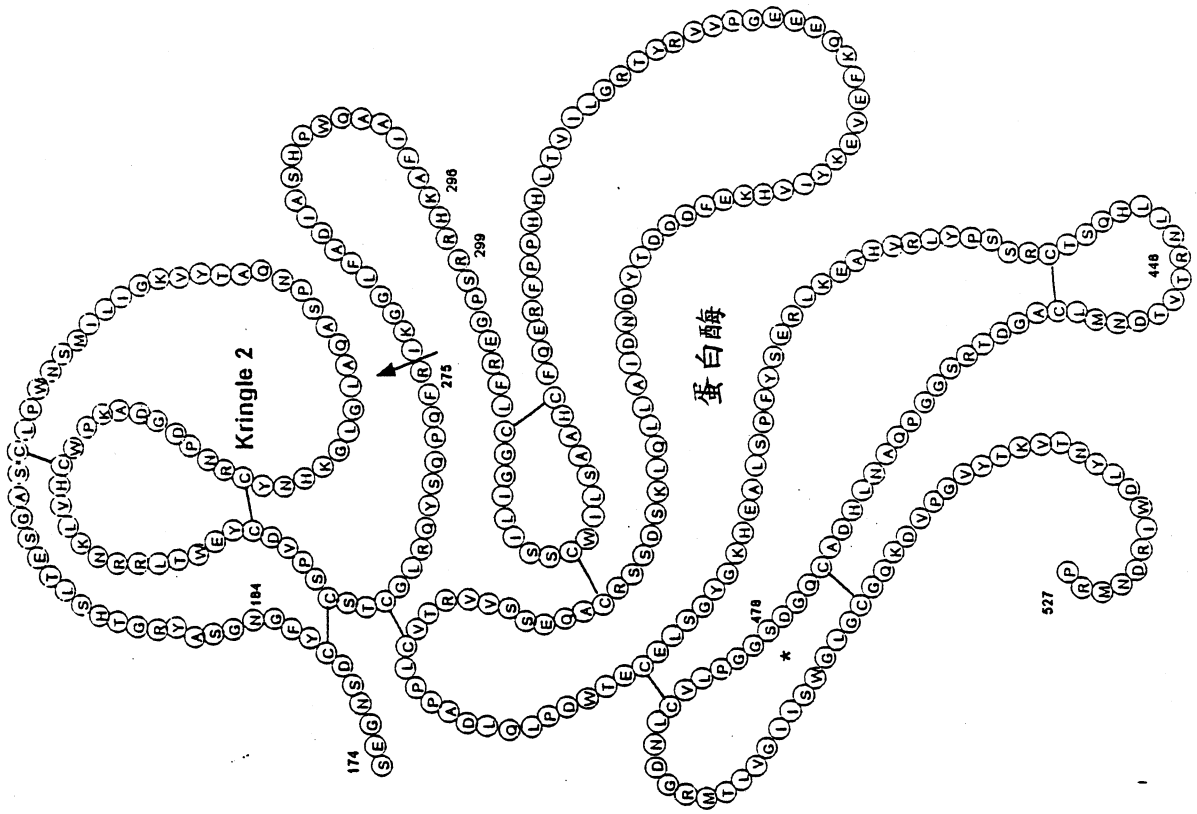


圖 4



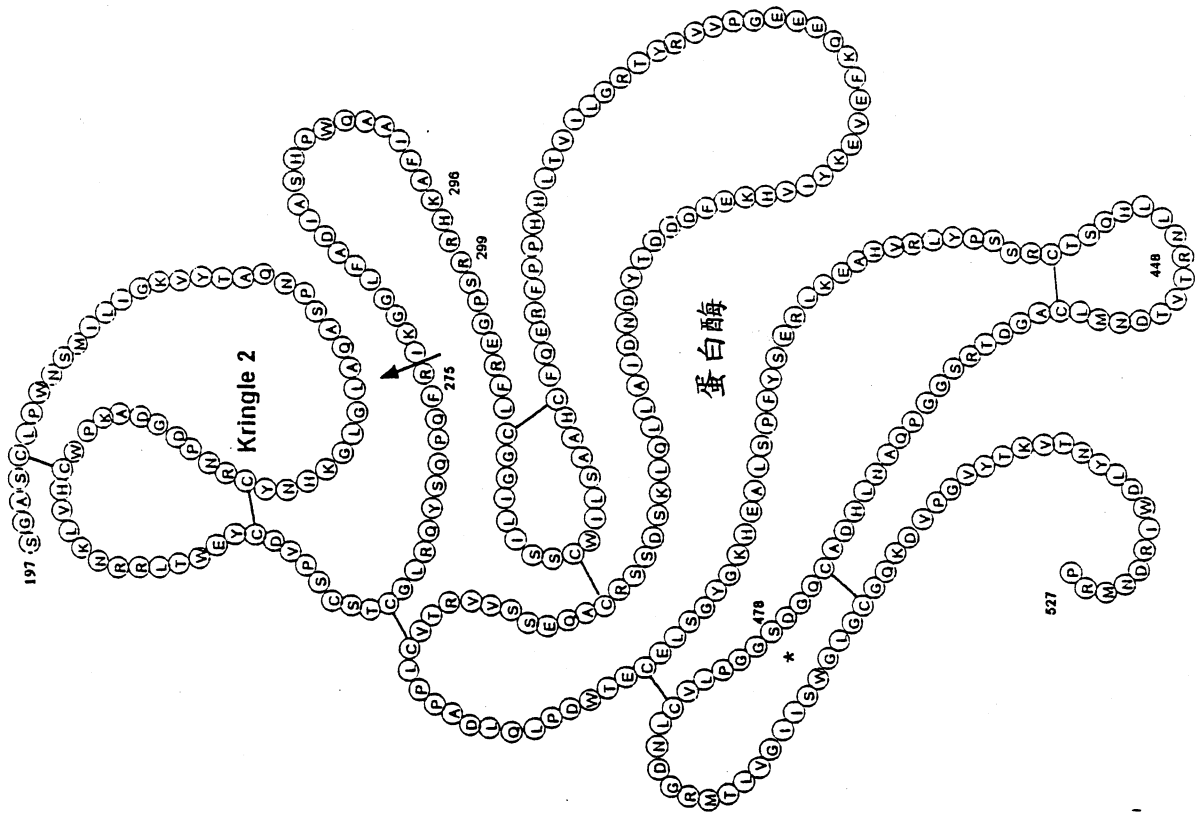


圖 9

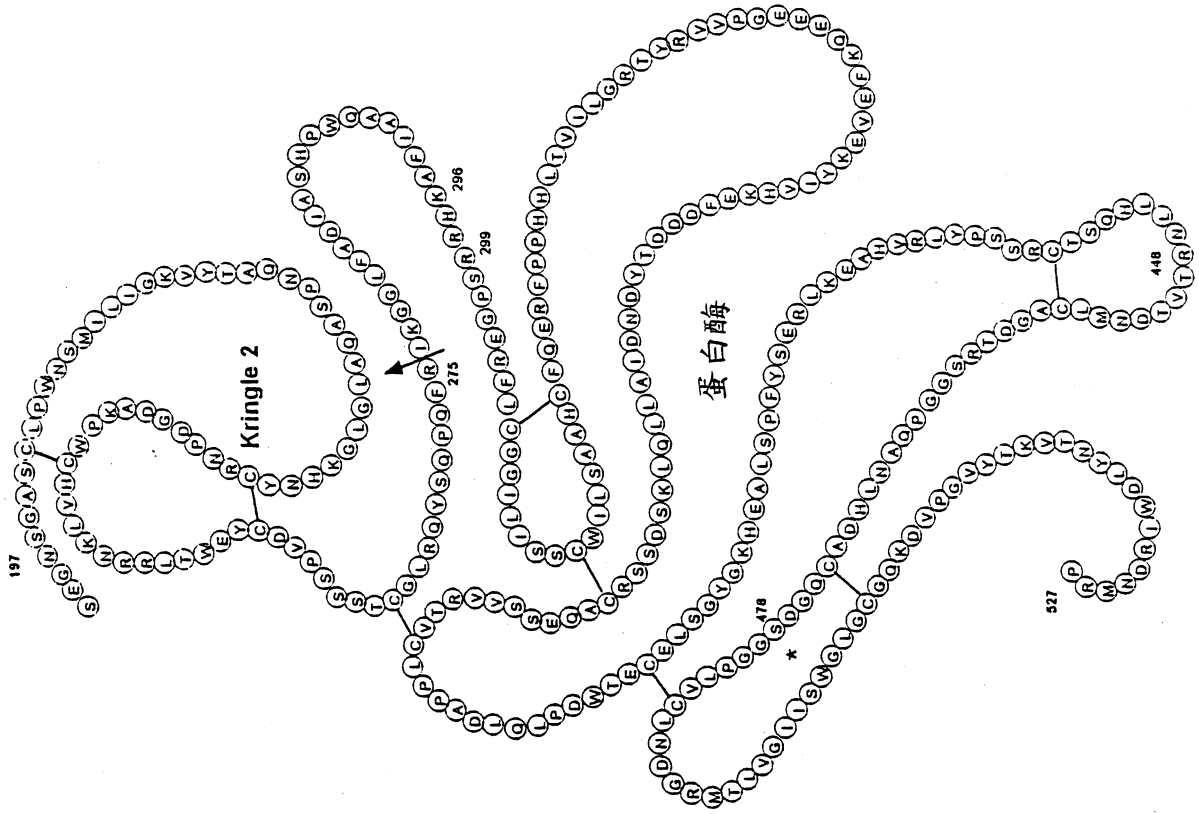


圖 11

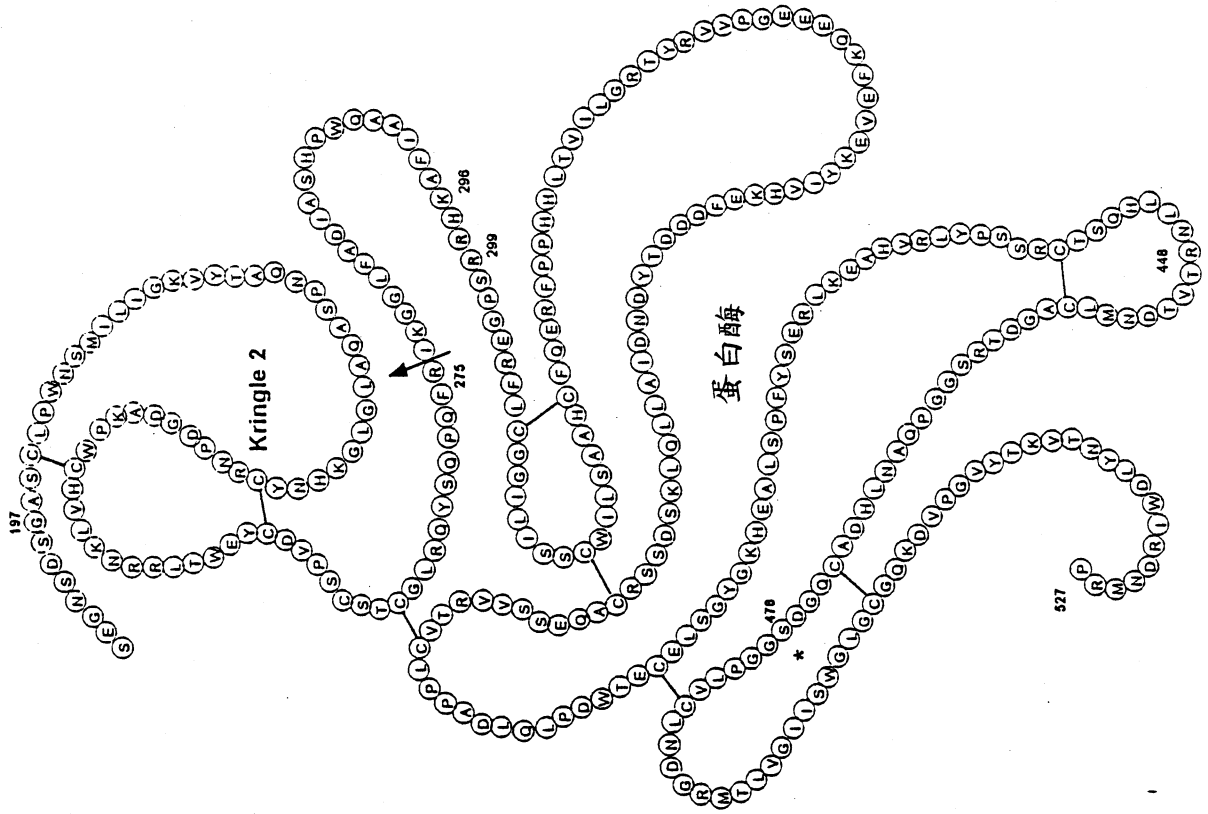


圖 12

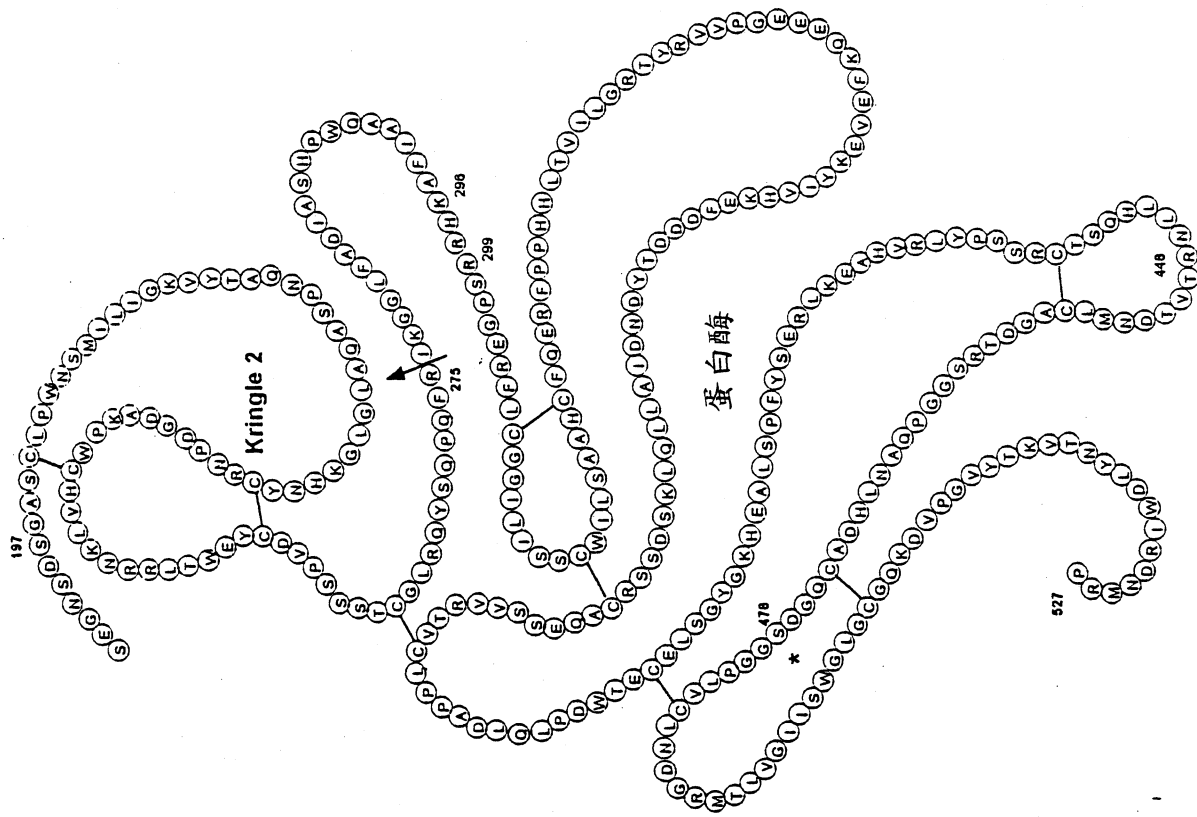
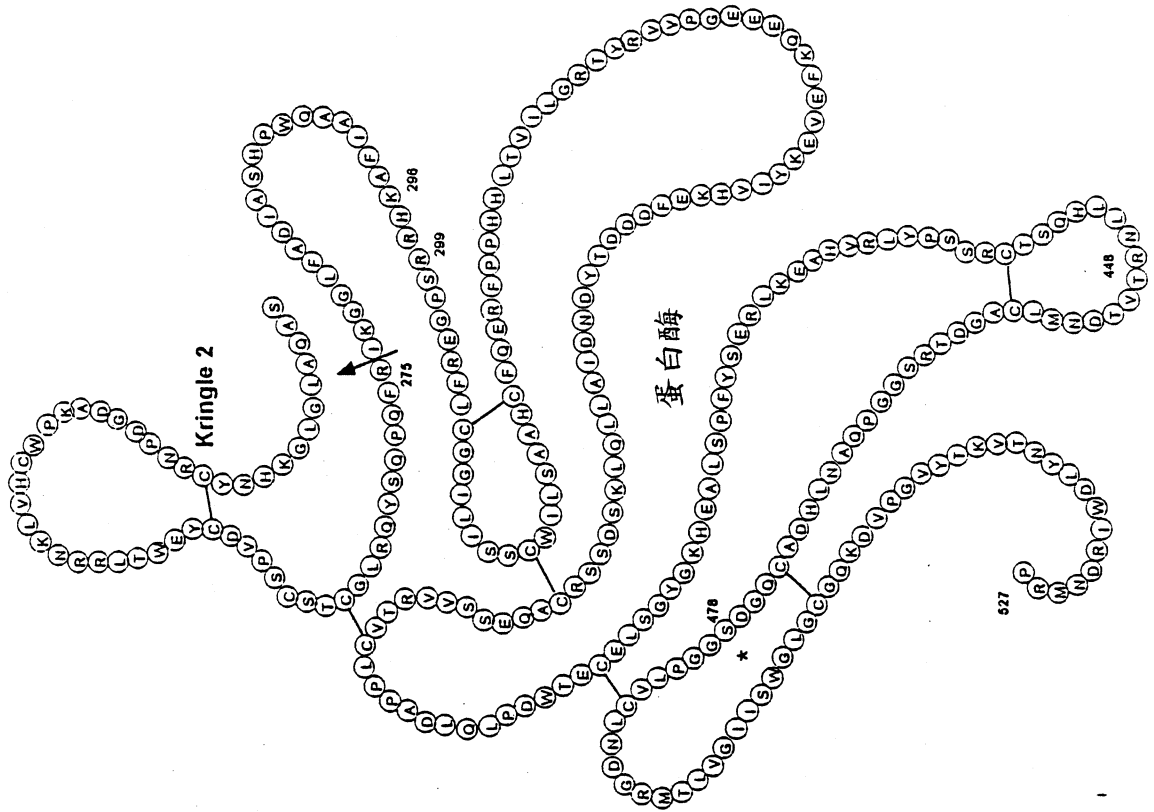
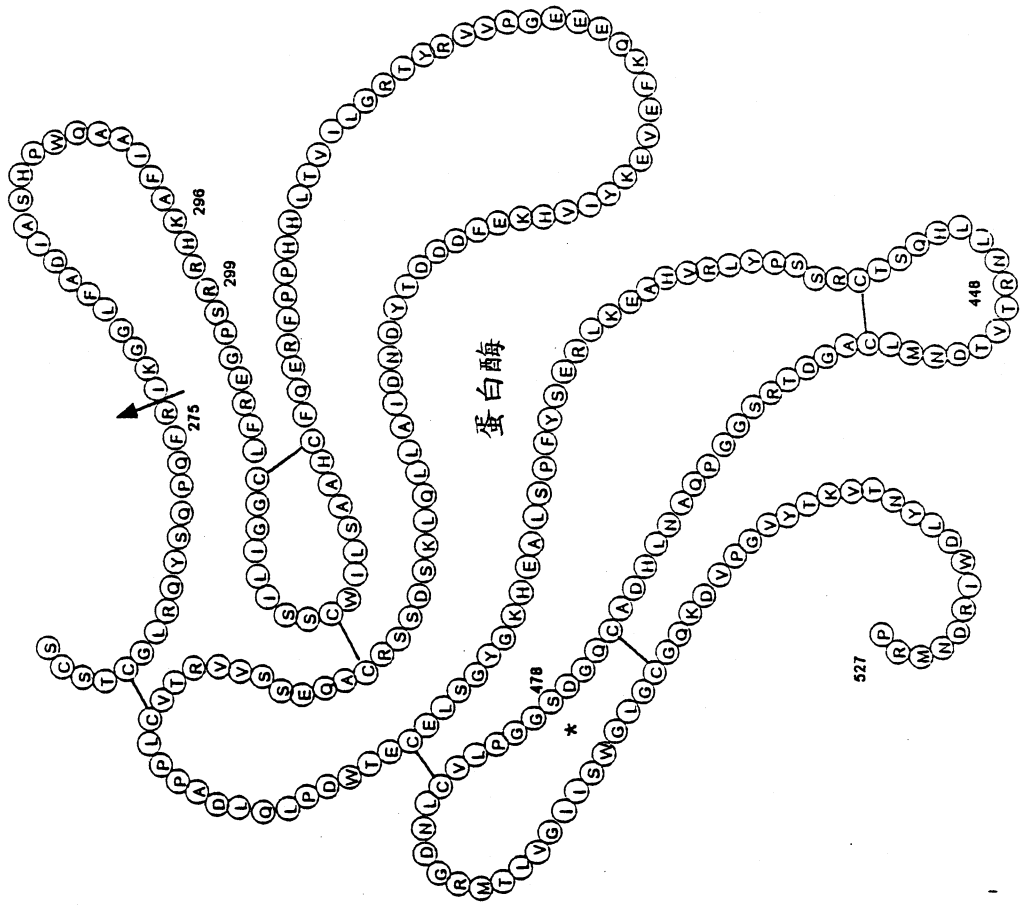


圖 13



蛋白酶



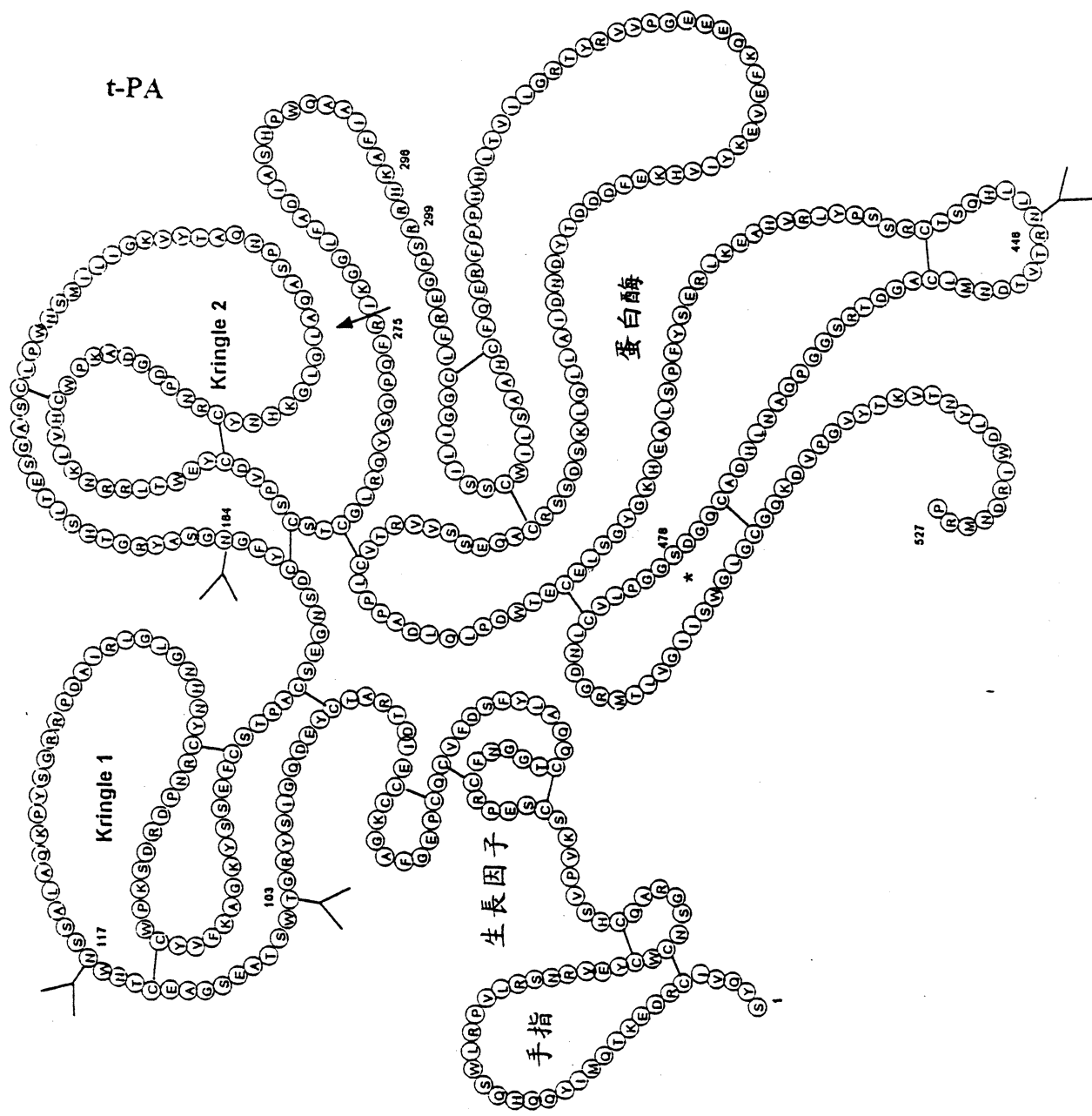


圖 16

六、申請專利範圍

1. 一種在原核細胞中製備重組DNA-衍生組織胞漿素原活化子(tPA)或Kringle 2 絲胺酸蛋白酶分子(K2S)之方法，其中該tPA或K2S分子係呈活化及正確摺疊之形式分泌至細胞外，其特徵為該原核細胞含有並表現編碼該tPA或K2S分子之DNA，該tPA或K2S分子係經操作連接至編碼訊號胜肽OmpA之DNA。
2. 根據申請專利範圍第1項之方法，其特徵為該原核細胞表現編碼該tPA或K2S分子之DNA，該tPA或K2S分子係經操作連接至編碼訊號胜肽OmpA之DNA，該編碼訊號胜肽OmpA之DNA係經操作連接至序列TCTGAGGAAACAGTGAC(SEQ ID NO: 1)之核酸分子。
3. 根據申請專利範圍第1或2項之方法，其特徵為該原核細胞係為大腸桿菌E. coli。
4. 根據申請專利範圍第1或2項之方法，其特徵為實施下列步驟：
 - a) 藉由PCR增幅編碼該tPA或K2S分子之DNA；
 - b) 純化PCR產物；
 - c) 將該PCR產物嵌入包含編碼OmpA信號胜肽之DNA及編碼gpIII之DNA之pComb3HSS載體內，其使用之方法可使該PCR產物經操作連接至該載體之編碼OmpA信號胜肽之DNA之上游並連接至編碼gpIII之DNA之下游；
 - d) 於該tPA或K2S分子與gpIII之間嵌入終止密碼組；
 - e) 藉由原核細胞表現該載體；
 - f) 純化該tPA或K2S分子。

六、申請專利範圍

5. 根據申請專利範圍第1或2項之方法，其特徵為該DNA係插入pComb3HSS噬菌體質體載體。
6. 根據申請專利範圍第1或2項之方法，其特徵為連接於K2S上游之OmpA之DNA序列包含下列序列：

ATGAAAAGACAGCTATCGCGATTGCAGTGGCACTGGCTGGTTTCGCTACCGTGGCC
CAGGCGGCCTCTGAGGGAAACAGTGACTGCTACTTTGGGAATGGGTCAGCCTACCG
TGGCACGCACAGCCTCACCGAGTCGGGTGCCCTCCTGCCCTCCCGTGAATTCCATGAT
CCTGATAGGCAAGGTTTACACAGCACAGAACCCAGTGCCCAGGCACTGGGCCTGG
GCAAACATAATTACTGCCGGAATCCTGATGGGGATGCCAAGCCCTGGTGCCACGTG
CTGAAGAACCGCAGGCTGACGTGGGAGTACTGTGATGTGCCCTCCTGCTCCACCTGC
GGCCTGAGACAGTACAGCCAGCCTCAGTTTCGCATCAAAGGAGGGCTCTTCGCCGA
CATCGCCTCCCACCCCTGGCAGGCTGCCATCTTTGCCAAGCACAGGAGGTGCCCCGG
AGAGCGGTTCTGTGCGGGGCATACTCATCAGCTCCTGCTGGATTCTCTCTGCCGC
CCACTGCTTCCAGGAGAGGTTTCCGCCCCACCACCTGACGGTGATCTTGGGCAGAAC
ATACCGGGTGGTCCCTGGCGAGGAGGAGCAGAAATTTGAAGTCGAAAAATACATTG
TCCATAAGGAATTCGATGATGACACTTACGACAATGACATTGCGCTGCTGCAGCTGA
AATCGGATTCGTCCCGCTGTGCCAGGAGAGCAGCGTGGTCCGCACTGTGTGCCCTC
CCCCGGCGGACCTGCAGCTGCCGGACTGGACGGAGTGTGAGCTCTCCGGCTACGGC
AAGCATGAGGCCTTGTCTCCTTTCTATTTCGGAGCGGCTGAAGGAGGCTCATGTCAGA
CTGTACCCATCCAGCCGCTGCACATCACAACATTTACTTAACAGAACAGTCACCGAC
AACATGCTGTGTGCTGGAGACACTCGGAGCGGGCGGGCCCCAGGCCAACTTGACGGA
CGCCTGCCAGGGCGATTCCGGAGGCCCCCTGGTGTGTCTGAACGATGGCCGCATGA
CTTTGGTGGGCATCATCAGCTGGGGCCTGGGCTGTGGACAGAAGGATGTCCCGGGT
GTGTACACAAAGGTTACCAACTACCTAGACTGGATTCTGTGACAACATGCGACCG
(SEQ ID NO:2)

7. 根據申請專利範圍第1或2項之方法，其特徵為該OmpA之DNA序列包含下列序列：

ATGAAAAGACAGCTATCGCGATTGCAGTGGCACTGGCTG
GTTTCGCTACCGTGGCCCAGGCGGCC(SEQ ID NO: 3)。

六、申請專利範圍

8. 根據申請專利範圍第1或2項之方法，其特徵為該 OmpA 之 DNA 序列係由下列序列所組成：

ATGAAAAAGACAGCTATCGCGATTGCAGTGGCACTGGCTG
GTTTCGCTACCGTGGCCCAGGCGGCC(SEQ ID NO : 3)。

9. 根據申請專利範圍第1或2項之方法，其特徵為該 tPA 或 K2S 分子之 DNA 係位於 lac 起動子及 / 或核糖體結合位置之後。

10. 根據申請專利範圍第1或2項之方法，其特徵為編碼該 tPA 或 K2S 分子之 DNA 係選自編碼至少 90% 之人類組織胞漿素原活化子蛋白質之胺基酸 87-527，174-527，180-527 或 220-527 之 DNA 分子群。

11. 根據申請專利範圍第5項之方法，其特徵為 K2S 之 DNA 序列包含下列序列：

TCTGAGGGAAACAGTGACTGCTACTTTGGGAATGGGTCAGCCTACCGTGGCACGCA
CAGCCTCACCGAGTCGGGTGCCTCCTGCCTCCCGTGGAAATCCATGATCCTGATAGG
CAAGGTTTACACAGCACAGAACCCAGTGCCCAGGCACTGGGCCTGGGCAAACATA
ATTACTGCCGGAATCCTGATGGGGATGCCAAGCCCTGGTGCCACGTGCTGAAGAAC
CGCAGGCTGACGTGGGAGTACTGTGATGTGCCCTCCTGCTCCACCTGCGGCCTGAGA
CAGTACAGCCAGCCTCAGTTTCGCATCAAAGGAGGGCTCTTCGCCGACATCGCCTCC
CACCCCTGGCAGGCTGCCATCTTTGCCAAGCACAGGAGGTGCGCCGGAGAGCGGTT
CCTGTGCGGGGGCATACTCATCAGCTCCTGCTGGATTCTCTCTGCCGCCACTGCTTC
CAGGAGAGGTTTCCGCCCCACCACCTGACGGTGATCTTGGGCAGAACATAACGGGT
GGTCCCTGGCGAGGAGGAGCAGAAATTTGAAGTCGAAAAATACATTGTCCATAAGG
AATTCGATGATGACACTTACGACAATGACATTGCGCTGCTGCAGCTGAAATCGGATT
CGTCCCGCTGTGCCAGGAGAGCAGCGTGGTCCGCACTGTGTGCCTTCCCCGGCGG
ACCTGCAGCTGCCGGACTGGACGGAGTGTGAGCTCTCCGGCTACGGCAAGCATGAG

六、申請專利範圍

GCCTTGTCTCCTTTCTATTTCGGAGCGGCTGAAGGAGGCTCATGTCAGACTGTACCCA
TCCAGCCGCTGCACATCACAACATTTACTTAAACAGAACAGTCACCGACAACATGCTG
TGTGCTGGAGACTCGGAGCGGCGGGCCCCAGGCAAACCTGCACGACGCCTGCCA
GGGCGATTCTGGGAGGCCCCCTGGTGTGTCTGAACGATGGCCGCATGACTTTGGTGGG
CATCATCAGCTGGGGCCTGGGCTGTGGACAGAAGGATGTCCCAGGTTGTGTACACAA
AGGTTACCAACTACCTAGACTGGATTCTGTGACAACATGCGACCGTGA (SEQ ID NO:4).

12. 根據申請專利範圍第5項之方法，其特徵為K2S之DNA序列係由下列序列組成：

TCTGAGGGAAACAGTGACTGCTACTTTGGGAATGGGTCAGCCTACCGTGGCACGCA
CAGCCTACCGAGTCGGGTGCCTCCTGCCTCCCGTGGAAATCCATGATCCTGATAGG
CAAGGTTTACACAGCACAGAACCCAGTGCCCAGGCACTGGGCCTGGGCAAACATA
ATTACTGCCGGAATCCTGATGGGGATGCCAAGCCCTGGTGCCACGTGCTGAAGAAC
CGCAGGCTGACGTGGGAGTACTGTGATGTGCCCTCCTGCTCCACCTGCGGCCTGAGA
CAGTACAGCCAGCCTCAGTTTCGCATCAAAGGAGGGCTCTTCGCCGACATCGCCTCC
CACCCCTGGCAGGCTGCCATCTTTGCCAAGCACAGGAGGTCGCCCGGAGAGCGGTT
CCTGTGCGGGGGCATACTCATCAGCTCCTGCTGGATTCTCTCTGCCGCCACTGCTTC
CAGGAGAGGTTTCCGCCCCACCACCTGACGGTGATCTTGGGCAGAACATAACCGGGT
GGTCCCTGGCGAGGAGGAGCAGAAATTTGAAGTCGAAAATAACATTGTCCATAAGG
AATTCGATGATGACACTTACGACAATGACATTGCGCTGCTGCAGCTGAAATCGGATT
CGTCCCGCTGTGCCAGGAGAGCAGCGTGGTCCGCACTGTGTGCCTTCCCCGGCGG
ACCTGCAGCTGCCGACTGGACGGAGTGTGAGCTCTCCGGCTACGGCAAGCATGAG
GCCTTGTCTCCTTTCTATTTCGGAGCGGCTGAAGGAGGCTCATGTCAGACTGTACCCA
TCCAGCCGCTGCACATCACAACATTTACTTAAACAGAACAGTCACCGACAACATGCTG
TGTGCTGGAGACTCGGAGCGGCGGGCCCCAGGCAAACCTGCACGACGCCTGCCA
GGGCGATTCTGGGAGGCCCCCTGGTGTGTCTGAACGATGGCCGCATGACTTTGGTGGG
CATCATCAGCTGGGGCCTGGGCTGTGGACAGAAGGATGTCCCAGGTTGTGTACACAA
AGGTTACCAACTACCTAGACTGGATTCTGTGACAACATGCGACCGTGA (SEQ ID NO:4).

13. 一種DNA分子，其特徵為其編碼：

a) OmpA蛋白質，其係經操作連接至

六、申請專利範圍

b) 編碼含有組織胞漿素原活化子蛋白質之kringle 2功能區域及絲胺酸蛋白酶功能區域之多肽之DNA分子；

其特徵為該DNA序列a)係由下列序列所組成：

ATGAAAAAGACAGCTATCGCGATTGCAGTGGCACTGGCTG
GTTTCGCTACCGTGGCCCAGGCGGCC(SEQ ID NO: 6)。

14. 根據申請專利範圍第13項之DNA分子，其特徵為該DNA序列包含下列序列：

ATGAAAAAGACAGCTATCGCGATTGCAGTGGCACTGGCTGGTTTCGCTACCGTGGCC
CAGGCGCCTCTGAGGGAAACAGTGACTGCTACTTTGGGAATGGGTGAGCCTACCG
TGGCACGCACAGCCTCACCGAGTCGGGTGCCTCCTGCCTCCCGTGGAAATCCATGAT
CCTGATAGGCAAGGTTTACACAGCACAGAACCCAGTGCCAGGCACTGGGCCTGG
GCAAACATAATTACTGCCGGAATCCTGATGGGGATGCCAAGCCCTGGTGCCACGTG
CTGAAGAACCGCAGGCTGACGTGGGAGTACTGTGATGTGCCCTCCTGCTCCACCTGC
GGCCTGAGACAGTACAGCCAGCCTCAGTTTCGCATCAAAGGAGGGCTCTTCGCCGA
CATCGCTCCACCCCTGGCAGGCTGCCATCTTTGCCAAGCACAGGAGGTGCGCCGG
AGAGCGGTTCTGTGCGGGGGCATACTCATCAGCTCCTGCTGGATTCTCTCTGCCGC
CCACTGCTTCCAGGAGAGGTTTCCGCCACCACCTGACGGTATCTTGGGCAGAAC
ATACCGGGTGGTCCCTGGCGAGGAGGAGCAGAAATTTGAAGTCGAAAAATACATTG
TCCATAAGGAATTCGATGATGACACTTACGACAATGACATTGCGCTGCTGCAGCTGA
AATCGGATTCGTCCCGCTGTGCCAGGAGAGCAGCGTGGTCCGCACTGTGTGCCCTC
CCCCGGCGGACCTGCAGCTGCCGACTGGACGGAGTGTGAGCTCTCCGGCTACGGC
AAGCATGAGGCCTTGTCTCCTTTCTATTTCGGAGCGGCTGAAGGAGGCTCATGTCAGA
CTGTACCCATCCAGCCGCTGCACATCACAAACATTTACTTAACAGAACAGTCACCGAC
AACATGCTGTGTGCTGGAGACTCGGAGCGGCGGGCCCCAGGCAAACCTTGCACGA
CGCCTGCCAGGGCGATTTCGGGAGGCCCTGGTGTGTCTGAACGATGGCCGCATGA
CTTTGGTGGGCATCATCAGCTGGGGCCTGGGCTGTGGACAGAAGGATGTCCCGGGT
GTGTACAAAAGGTTACCAACTACCTAGACTGGATTCGTGACAACATGCGACCG
(SEQ ID NO:5).

15. 根據申請專利範圍第13項之DNA分子，其特徵為該DNA序列係由下列序列所組成：

ATGAAAAAGACAGCTATCGCGATTGCAGTGGCACTGGCTGGTTTCGCTACCGTGGCC
CAGGCGCCTCTGAGGGAAACAGTGACTGCTACTTTGGGAATGGGTGAGCCTACCG
TGGCACGCACAGCCTCACCGAGTCGGGTGCCTCCTGCCTCCCGTGGAAATCCATGAT
CCTGATAGGCAAGGTTTACACAGCACAGAACCCAGTGCCAGGCACTGGGCCTGG
GCAAACATAATTACTGCCGGAATCCTGATGGGGATGCCAAGCCCTGGTGCCACGTG
CTGAAGAACCGCAGGCTGACGTGGGAGTACTGTGATGTGCCCTCCTGCTCCACCTGC

六、申請專利範圍

GGCCTGAGACAGTACAGCCAGCCTCAGTTTCGCATCAAAGGAGGGCTCTTCGCCGA
CATCGCCTCCCACCCCTGGCAGGCTGCCATCTTTGCCAAGCACAGGAGGTCGCCCGG
AGAGCGGTTCTGTGCGGGGCATACTCATCAGCTCCTGCTGGATTCTCTCTGCCGC
CCACTGCTTCCAGGAGAGGTTTCCGCCCCACCACCTGACGGTGATCTTGGGCAGAAC
ATACCGGGTGGTCCCTGGCGAGGAGGAGCAGAAATTTGAAGTCGAAAAATACATTG
TCCATAAGGAATTCGATGATGACACTTACGACAATGACATTGCGCTGCTGCAGCTGA
AATCGGATTCGTCCCGCTGTGCCAGGAGAGCAGCGTGGTCCGCACTGTGTGCCTTC
CCCCGGCGGACCTGCAGCTGCCGACTGGACGGAGTGTGAGCTCTCCGGCTACGGC
AAGCATGAGGCCTTGTCTCCTTTCTATTTCGGAGCGGCTGAAGGAGGCTCATGTCAGA
CTGTACCCATCCAGCCGCTGCACATCACAACATTTACTTAACAGAACAGTCACCGAC
AACATGCTGTGTGCTGGAGACACTCGGAGCGGGCCCGCCAGGCAAACCTGCACGA
CGCCTGCCAGGGCGATTCCGGGAGGCCCCCTGGTGTGTCTGAACGATGGCCGCATGA
CTTTGGTGGGCATCATCAGCTGGGGCCTGGGCTGTGGACAGAAGGATGTCCCGGGT
GTGTACACAAAGTTACCAACTACCTAGACTGGATTCTGTGACAACATGCGACCG
(SEQ ID NO:5).

16. 根據申請專利範圍第13項之DNA分子，其特徵為該DNA序列b)係編碼至少90%之人類組織胞漿素原活化子蛋白質之胺基酸87-527。
17. 根據申請專利範圍第13項之DNA分子，其特徵為該DNA序列b)係編碼至少90%之人類組織胞漿素原活化子蛋白質之胺基酸174-527。
18. 根據申請專利範圍第13項之DNA分子，其特徵為該DNA序列b)係編碼至少90%之人類組織胞漿素原活化子蛋白質之胺基酸180-527。
19. 根據申請專利範圍第13項之DNA分子，其特徵為該DNA序列b)係編碼至少90%之人類組織胞漿素原活化子蛋白質之胺基酸220-527。
20. 根據申請專利範圍第13或14項之DNA分子，其特徵為該DNA序列a)係於嚴苛條件下雜交至下列序列：
ATGAAAAAGACAGCTATCGCGATTGCAGTGGCACTGGCTG
GTTTCGCTACCGTGGCCCAGGCGGCC(SEQ ID NO: 6)。

六、申請專利範圍

21. 根據申請專利範圍第13或14項之DNA分子，其特徵為該DNA序列b)係於嚴苛條件下雜交至下列序列：

TCTGAGGGAAACAGTGACTGCTACTTTGGGAATGGGTCAGCCTACCGTGGCACGCA
CAGCCTCACCGAGTCGGGTGCCTCCTGCCTCCCGTGGAATTCCATGATCCTGATAGG
CAAGGTTTACACAGCACAGAACCCAGTGCCCAGGCACTGGGCCTGGGCAAACATA
ATTACTGCCGGAATCCTGATGGGGATGCCAAGCCCTGGTGCCACGTGCTGAAGAAC
CGCAGGCTGACGTGGGAGTACTGTGATGTGCCCTCCTGCTCCACCTGCGGCCTGAGA
CAGTACAGCCAGCCTCAGTTTCGCATCAAAGGAGGGCTCTTCGCCGACATCGCCTCC
CACCCCTGGCAGGCTGCCATCTTTGCCAAGCACAGGAGGTGCGCCGGAGAGCGGTT
CCTGTGCGGGGGCATACTCATCAGCTCCTGCTGGATTCTCTCTGCCGCCACTGCTTC
CAGGAGAGGTTTCCGCCCCACCACCTGACGGTGATCTTGGGCAGAACATAACGGGT
GGTCCCTGGCGAGGAGGAGCAGAAATTTGAAGTCGAAAATACATTGTCCATAAGG
AATTCGATGATGACTTACGACAATGACATTGCGCTGCTGCAGCTGAAATCGGATT
CGTCCCGCTGTGCCAGGAGAGCAGCGTGGTCCGCACTGTGTGCCTTCCCCGGCGG
ACCTGCAGCTGCCGACTGGACGGAGTGTGAGCTCTCCGGCTACGGCAAGCATGAG
GCCTTGTCTCCTTTCTATTTCGGAGCGGCTGAAGGAGGCTCATGTCAGACTGTACCCA
TCCAGCCGCTGCACATCACAACATTTACTTAACAGAACAGTCACCGACAACATGCTG
TGTGCTGGAGACACTCGGAGCGGGCGGGCCCCAGGCAAACCTTGACGACGCCTGCCA
GGCGATTTCGGGAGGCCCCCTGGTGTGTCTGAACGATGGCCGCATGACTTTGGTGGG
CATCATCAGCTGGGGCCTGGGCTGTGGACAGAAGGATGTCCCGGGTGTGTACACAA
AGGTTACCAACTACCTAGACTGGATTCGTGACAACATGCGACCGTGA (SEQ ID NO:7).

22. 根據申請專利範圍第13或14項之DNA分子，其特徵為該DNA序列b)係由下列序列所組成：

TCTGAGGGAAACAGTGACTGCTACTTTGGGAATGGGTCAGCCTACCGTGGCACGCA
CAGCCTCACCGAGTCGGGTGCCTCCTGCCTCCCGTGGAATTCCATGATCCTGATAGG
CAAGGTTTACACAGCACAGAACCCAGTGCCCAGGCACTGGGCCTGGGCAAACATA
ATTACTGCCGGAATCCTGATGGGGATGCCAAGCCCTGGTGCCACGTGCTGAAGAAC
CGCAGGCTGACGTGGGAGTACTGTGATGTGCCCTCCTGCTCCACCTGCGGCCTGAGA
CAGTACAGCCAGCCTCAGTTTCGCATCAAAGGAGGGCTCTTCGCCGACATCGCCTCC

六、申請專利範圍

CACCCCTGGCAGGCTGCCATCTTTGCCAAGCACAGGAGGTCGCCCGGAGAGCGGTT
 CCTGTGCGGGGGCATACTCATCAGCTCCTGCTGGATTCTCTCTGCCGCCACTGCTTC
 CAGGAGAGGTTTCCGCCCCACCACCTGACGGTGATCTTGGGCAGAACATAACGGGT
 GGTCCCTGGCGAGGAGGAGCAGAAATTGAAGTCGAAAATACATTGTCCATAAGG
 AATTCGATGATGACTTACGACAATGACATTGCGCTGCTGCAGCTGAAATCGGATT
 CGTCCCGCTGTGCCAGGAGAGCAGCGTGGTCCGCACTGTGTGCCTTCCCCCGGCGG
 ACCTGCAGCTGCCGGACTGGACGGAGTGTGAGCTCTCCGGCTACGGCAAGCATGAG
 GCCTTGTCTCCTTTCTATTCCGGAGCGGCTGAAGGAGGCTCATGTGACTGTACCCA
 TCCAGCCGCTGCACATCACAACATTTACTTAACAGAACAGTCACCGACAACATGCTG
 TGTGCTGGAGACTCGGAGCGGGCCCCAGGCCAAACTTGCACGACGCCTGCCA
 GGGCGATTCCGGAGGCCCTGGTGTGTCTGAACGATGGCCGCATGACTTTGGTGGG
 CATCATCAGCTGGGGCCTGGGCTGTGGACAGAAGGATGTCCCGGGTGTGTACACAA
 AGGTTACCAACTACCTAGACTGGATTTCGTGACAACATGCGACCGTGA (SEQ ID NO:7).

23. 根據申請專利範圍第13或14項之DNA分子，其係用於用以製備具有組織胞漿素原活化子之多肽之方法中。
24. 根據申請專利範圍第23項之DNA分子，其中該方法係為根據申請專利範圍第1至12項之任一項之方法。
25. 一種OmpA與K2S之融合蛋白質，其特徵為其包含具下列胺基酸序列之特徵之蛋白質：

MKKTALAI AVALAGFATVAQAASEGNSDCYFGNGSA YRGTHSLTESGASCLPWNSMLI
 GKVYTAQNPSA QALGLGKHNYCRNPDGDAKPWCHVLKNRRLTWEYCDVPSCSTCGLR
 QYSQPQFRIK GGLFADIASHPWQAAIFAKHRRSPGERFLCGGILISSCWILSAAHCFQERF
 PPHHLTVILGR TYRVVPGE EEQKFÉVEKYIVHKEFDDDDTYDNDIAL LQLKSDSSRCAQES
 SVVRTVCLPPADLQLPDWTECELSGYGKHEALSPFYSERLKEAHVRLYPSSRCTSQHLL
 NRTVTDNMLCAGDTRSGGPQANLHDACQGDSSGGLVCLNDGRMTLVGHSWGLGCGQ
 KDVPGVYTKVTNYLDWIRDNMRPG (SEQ ID NO:8).

26. 根據申請專利範圍第25項之OmpA與K2S之融合蛋白質，其特徵為其係由具下列胺基酸序列特徵之蛋白質所組

六、申請專利範圍

成：

MKKTALIAVALAGFATVAQAASEGNSDCYFGNGSAYRGTHSLTESGASCLPWNSMLI
GKVYTAQNPSAQALGLGKHNYCRNPDGDAKPWCHVLKNRRLTWEYCDVPSCSTCGLR
QYSQPQFRIKGGLFADIASHPWQAAIFAKHRRSPGERFLCGGILISSCWILSAAHCFQERF
PPHHLTVILGRITYRVVPGEEEEQKFEVEKYIVHKEFDDDDTYDNDIALQLKSDSSRCAQES
SVVRTVCLPPADLQLPDWTECELSGYGKHEALSPFYSERLKEAHVRLYPSSRCTSQHLL
NRTVTDNMLCAGDTRSGGPQANLHDACQGDSGGPLVCLNDGRMTLVGIISWGLGCGQ
KDVPGVYTKVTNYLDWIRDNM RPG (SEQ ID NO:8).

27. 一種 K2S 蛋白質，其特徵為其包含序列定義為 SEGN (SEQ ID NO: 9) 之蛋白質。

28. 根據申請專利範圍第 27 項之 K2S 蛋白質，其特徵為其包含序列定義為 SEGNSD 之蛋白質 (SEQ ID NO: 10)。

29. 根據申請專利範圍第 27 或 28 項之 K2S 蛋白質，其特徵為其包含具下列胺基酸序列之特徵之蛋白質：

SEGNSDCYFGNGSAYRGTHSLTESGASCLPWNSMLIGKVYTAQNPSAQALGLGKHNY
CRNPDGDAKPWCHVLKNRRLTWEYCDVPSCSTCGLRQYSQPQFRIKGGLFADIASHPW
QAAIFAKHRRSPGERFLCGGILISSCWILSAAHCFQERFPPHHLTVILGRITYRVVPGEEEEQ
KFEVEKYIVHKEFDDDDTYDNDIALQLKSDSSRCAQESSVVRTVCLPPADLQLPDWTEC
ELSGYGKHEALSPFYSERLKEAHVRLYPSSRCTSQHLLNRTVTDNMLCAGDTRSGGPQA
NLHDACQGDSGGPLVCLNDGRMTLVGIISWGLGCGQKDVPGVYTKVTNYLDWIRDNM
RP* (SEQ ID NO:11).

30. 根據申請專利範圍第 27 或 28 項之 K2S 蛋白質，其特徵為其係由具下列胺基酸序列之特徵之蛋白質所組成：

SEGNSDCYFGNGSAYRGTHSLTESGASCLPWNSMLIGKVYTAQNPSAQALGLGKHNY
CRNPDGDAKPWCHVLKNRRLTWEYCDVPSCSTCGLRQYSQPQFRIKGGLFADIASHPW
QAAIFAKHRRSPGERFLCGGILISSCWILSAAHCFQERFPPHHLTVILGRITYRVVPGEEEEQ
KFEVEKYIVHKEFDDDDTYDNDIALQLKSDSSRCAQESSVVRTVCLPPADLQLPDWTEC

六、申請專利範圍

ELSGYGKHEALSPFYSERLKEAHVRLYPSSRCTSQHLLNRTVTDNMLCAGDTRSGGPQA
NLHDACQGDSGGPLVCLNDGRMTLYGIISWGLGCGQKDVPGVYTKVTNYLDWIRDNM
RP* (SEQ ID NO:11).

31. 一種K25蛋白質，其特徵為其係由根據申請專利範圍第16至19項中任一項之DNA分子所編碼。