



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2012-0081048
(43) 공개일자 2012년07월18일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 9/50 (2006.01) C07K 14/36 (2006.01)
- (21) 출원번호 10-2012-0056692(분할)
(22) 출원일자 2012년05월29일
심사청구일자 2012년05월29일
(62) 원출원 특허 10-2009-0111797
원출원일자 2009년11월19일
심사청구일자 2009년11월19일
- (71) 출원인
조선대학교산학협력단
광주광역시 동구 서석동 375 조선대학교 내
- (72) 발명자
유진철
광주광역시 남구 광복마을길 53, 101동 1202호
(진월동, 새한아파트)
조승식
광주광역시 동구 장동 17-2 307
박성주
전라남도 해남군 마산면 연구리 277-1
- (74) 대리인
최성용

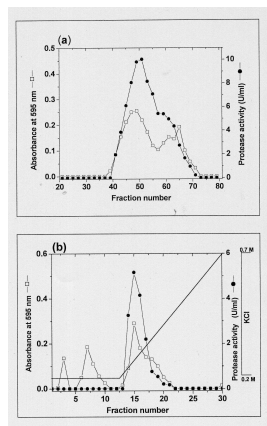
전체 청구항 수 : 총 2 항

(54) 발명의 명칭 스트렙토마이세스속 균주로부터 혈전용해 효소의 제조 방법

(57) 요약

본 발명은 스트렙토마이세스속 균주 유래의 혈전용해 효소 및 그의 제조 방법에 관한 것으로서, 본 발명에 따른 피브리 용해 효소는 스트렙토마이세스속 균주(*Streptomyces* sp. CS684)(수탁번호 KCTC 10631 BP)로부터 분리되고, 정제 효소의 SDS-PAGE 및 피브리린 자이모그래피에 의해 약 35 kDa의 분자량을 가지며, 최대 활성은 45 °C 및 pH 7-8에서 나타나고, pH 6-9 및 40°C 이하의 온도에서 안정하며, 피브리노겐의 B β -사슬을 가수분해하나, A α - 및 γ -체인을 절단하지는 않으며, 아조카세인에 대한 Km, Imax 및 Kcat 값은 각각 4.2 mg ml⁻¹, 305.8 μ g min mg⁻¹ 및 188.7 s⁻¹이고, 활성은 Cu²⁺ 및 Fe²⁺에 의하여 2mM 수준에서 90% 이상 억압되고, 단백질 활성은 아프로티닌 및 PMSF에 의해 억제되지 않고, 페파블록(pefabloc)에 의해서는 4mM에서 50% 이상 억제되며, EDTA 및 EGTA에 의해서는 1mM에서 80% 이상 억제되는 것을 특징으로 하며, 뛰어난 피브리린 분해 능력을 가지므로 혈전용해제로서 사용될 수 있다.

대표도 - 도1



특허청구의 범위

청구항 1

- a) 1 리터 중에 글루코오스 10g, 귀리분 15g, K_2HPO_4 3g 및 NaH_2PO_4 3g을 포함하는 배지에서 28℃ 및 160 rpm 으로 설정한 회전식 진탕기에서 48시간 동안 배양한 스트렙토마이세스 종 균주(*Streptomyces* sp. CS684) 수탁번호 KCTC 10631 BP 함유 배양액을 10,000 x g에서 1 시간 동안 원심분리시키는 단계,
- b) 0-75% 포화도의 고체 $(NH_4)_2SO_4$ 를 상층액에 첨가하여 단백질을 침전시키고, 단백질들은 10,000 x g, 4℃에서 1 시간 동안 원심분리에 의해 회수하는 단계,
- c) 10 mM Tris-HCl 완충액(pH 7.5)에 대하여 투석하고, 한외여과 멤브레인 YM30 (Millipore Corp.)으로 농축시키고, 이어서 효소를 10 mM Tris-HCl 완충액(pH 7.5)으로 예비 평형시킨 Sepharose CL-6B column (120 cm x 2.2 cm) 상에서 15 ml/h의 유속으로 겔 투과시키고 고틍이 활성을 가진 활성 분획들을 모으고, 농축하여 10 mM Tris-HCl 완충액(pH 7.5)으로 예비 평형시킨 Poros-HQ 이온교환 컬럼 (10 cm x 1 cm)을 사용하여 더욱 정제하는 단계; 및
- d) 결합 단백질들은 0-1 M KCl을 함유한 10 mM Tris-HCl 구매 완충액(pH 7.5)에 의해 30ml/h의 유속으로 용출시키는 단계;
- 를 포함하는 것을 특징으로 하는 스트렙토마이세스속 균주(*Streptomyces* sp. CS684) 수탁번호 KCTC 10631 BP로부터 혈전용해 효소의 제조 방법.

청구항 2

제 1항에 있어서, 상기 혈전용해 효소는

정제 효소의 SDS-PAGE 및 피브린 자이모그래피에 의해 35 kDa의 분자량을 가지며, 최대 활성은 45℃ 및 pH 7-8에서 나타나고, pH 6-9 및 40℃ 이하의 온도에서 안정하며, 피브리노겐의 B β -사슬을 가수분해하나, A α - 및 γ -체인을 절단하지는 않으며, 아조카세인에 대한 K_m , I_{max} 및 K_{cat} 값은 각각 4.2 mg ml⁻¹, 305.8 μ g min⁻¹ mg⁻¹ 및 188.7 s⁻¹이고, 활성은 Cu²⁺ 및 Fe²⁺에 의하여 2mM 수준에서 90% 이상 억압되고, 단백질 활성은 아프로티닌 및 PMSF에 의해 억제되지 않고, 페파블록(pefabloc)에 의해서는 4mM에서 50% 이상 억제되며, EDTA 및 EGTA에 의해서는 1mM에서 80% 이상 억제되고, N-말단의 처음 15개의 아미노산이 서열번호 1로 나타난 것을 특징으로 하는 혈전용해 효소의 제조 방법.

명세서

기술분야

[0001]

본 발명은 스트렙토마이세스속 균주로 부터 혈전용해 효소의 제조 방법에 관한 것으로서, 본 발명에 따른 혈전 용해 효소는 뛰어난 피브린 분해 능력을 가지므로 혈전용해제로서 사용될 수 있다.

배경기술

[0002]

고혈압, 급성 심근경색증, 허혈성 심장 질환, 심장 관막증, 말초 혈관 질환, 부정맥, 심장마비 등의 심혈관계 질환은 전세계에 걸쳐서 주된 사망원인이 되는 질환이다. 2000년도의 세계보건기구(WHO)의 통계에 따르면, 전 세계의 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; 조

직플라스미노겐 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 알러지 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 다양한 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. CS684)는 항생물질 생산자로서 한국의 토양으로부터 단리되었고[참조 문헌, Yoo JC, Kim JH, Ha JW, Park NS, Sohng JK, Lee JW, Park SC, Kim MS, Seong CN. Production and biological activity of laidlomycin, anti-MRSA/VRE antibiotic from *Streptomyces* sp. CS684. J Microbiol 2007;45:6-10], 이 균주는 또한 신규의 저분자량 인지질 D를 생산하였다[참조문헌; Simkhada JR, Lee HJ, Jang SY, Kim JH, Lee HC, Sohng JK, Yoo JC. A novel low molecular weight phospholipase D from *Streptomyces* sp. CS684. Bioresour Technol 2009;100:1388-1393]. 상기 두 문헌에 기재된 내용은 본 발명의 명세서의 일부로서 인용한다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 본 발명자들은 스트렙토마이세스 속 균주(CS684)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(FP84), 그의 정제 및 생화학적 특성을 확인하고 본 발명을 완성하기에 이르렀다.

과제의 해결 수단

[0008] 따라서, 본 발명은 스트렙토마이세스속 균주(CS684)에 의해 생산된 신규의 피브린 용해 효소 및 그의 제조 방법을 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 (a) Sepharose CL-6B 컬럼을 사용한 겔 투과 및 (b) Poros-HQ 컬럼을 사용한 이온 수지로 부터의 FP84의 용출 프로필을 나타내는 도면,
- 도 2는 Laemmli의 방법에 따라 10% (w/v) 폴리아크릴아마이드 슬랩 겔에서 수행한 FP84의 전기영동 분석사진.
- 도 3은 효소 활성 및 안정성에 관한 pH 및 온도의 영향을 나타내는 그래프도.
- 도 4는 (a) FP84의 피브린 분해 활성 및 FP84에 의해 촉매화된 피브리노젠 가수분해의 SDS-PAGE 분석 결과를 나타내는 사진.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0012] 본 발명은, 일면에 있어서,
- [0013] a) 1 리터 중에 글루코오스 10g, 귀리분 15g, K_2HPO_4 3g 및 NaH_2PO_4 3g을 포함하는 배지에서 28℃ 및 160 rpm으로 설정한 회전식 진탕기에서 48시간 동안 배양한 스트렙토마이세스 종 균주(*Streptomyces* sp. CS684) 수탁번호 KCTC 10631 BP 함유 배양액을 10,000 x g에서 1 시간 동안 원심분리시키는 단계;
- [0014] b) 0-75% 포화도의 고체 $(NH_4)_2SO_4$ 를 상층액에 첨가하여 단백질을 침전시키고, 단백질들은 10,000 x g, 4℃에서 1 시간 동안 원심분리에 의해 회수하는 단계;
- [0015] c) 10 mM Tris-HCl 완충액(pH 7.5)에 대하여 투석하고, 한외여과 멤브레인 YM30 (Millipore Corp.)으로 농축시키고, 이어서 효소를 10 mM Tris-HCl 완충액(pH 7.5)으로 예비 평형시킨 Sepharose CL-6B column (120 cm x 2.2 cm) 상에서 15 ml/h의 유속으로 겔 투과시키고 고특이 활성을 가진 활성 분획들을 모으고, 농축하여 10 mM Tris-HCl 완충액(pH 7.5)으로 예비 평형시킨 Poros-HQ 이온교환 컬럼 (10 cm x 1 cm)을 사용하여 더욱 정제하는 단계; 및
- [0016] d) 결합 단백질들은 0-1 M KCl을 함유한 10 mM Tris-HCl 구배 완충액(pH 7.5)에 의해 30ml/h의 유속으로 용출시키는 단계;
- [0017] 를 포함하는 것을 특징으로 하는 스트렙토마이세스속 균주(*Streptomyces* sp. CS684) 수탁번호 KCTC 10631 BP로부터 혈전용해 효소의 제조 방법을 제공한다.
- [0018] 본 발명은, 다른 일면에 있어서, 스트렙토마이세스속 균주 (*Streptomyces* sp. CS684) 수탁번호 KCTC 10631 BP로부터 단리되고, 정제 효소의 SDS-PAGE 및 피브린 자이모그래피에 의해 약 35 kDa의 분자량을 가지며, 최대 활성은 45℃ 및 pH 7-8에서 나타나고, pH 6-9 및 40℃ 이하의 온도에서 안정하며, 피브리노겐의 B β -사슬을 가수분해하나, A α - 및 γ -체인을 절단하지는 않으며, 아조카세인에 대한 K_m , I_{max} 및 K_{cat} 값은 각각 4.2 mg ml⁻¹, 305.8 μ g min⁻¹ mg⁻¹ 및 188.7 s⁻¹이고, 활성은 Cu²⁺ 및 Fe²⁺에 의하여 2mM 수준에서 90% 이상 억압되고, 단백질 활성은 아프로티닌 및 PMSF에 의해 억제되지 않고, 페파블록(pefabloc)에 의해서는 4mM에서 50% 이상 억제되며, EDTA 및 EGTA에 의해서는 1mM에서 80% 이상 억제되는 것을 특징으로 하는 혈전용해 효소(FP84)을 제공한다.
- [0019] 본 발명자들은 미생물원으로부터 경제적으로 유용한 효소를 단리할 목적으로 스트렙토마이세스속 균주 (*Streptomyces* sp.) CS684)로부터 혈전용해 효소(FP84)를 정제하였다.
- [0020] 정제 효소의 SDS-PAGE 및 피브린 자이모그래피에 의해 약 35 kDa의 단일 밴드를 확인하였다. 최대 활성은 45℃ 및 pH 7-8에서 나타났으며, 이 효소는 pH 6-9 및 40℃ 이하의 온도에서 안정하였다. 이 효소는 플라스민보다 더 강력한 피브린 분해 활성을 나타냈다. FP84는 피브리노겐의 B β -사슬을 가수분해하였으나, A α - 및 γ -체인을 절단하지는 않았다. 아조카세인에 대한 K_m , I_{max} 및 K_{cat} 값은 각각 4.2 mg ml⁻¹, 305.8 μ g min⁻¹ mg⁻¹ 및 188.7 s⁻¹이었다. 활성은 Co²⁺, Zn²⁺, Cu²⁺ 및 Fe²⁺에 의하여 억압되었으나, Ca²⁺ and Mg⁺²에 의해서는 약간 영향을 받았다. 또한 단백질 활성은 아프로티닌 및 PMSF에 의해 약간 억제되었으나, 페파블록(pefabloc), EDTA 및 EGTA에 의해서는 상당히 억제되었다.
- [0021] N-말단 서열의 처음 15개 아미노산은 GTQENPPSSGLDDID(서열번호 1)이었다. 이 효소는 다양한 스트렙토마이세

스(*Streptomyces*) 균주로부터의 세린 프로테아제의 것들과 고도로 유사하였으나, 공지의 피브린분해 효소와는 달랐다. 이러한 결과는 혈전증 치료에 적용가능성이 있는 신규의 세린계 메탈로프로테아제임을 의미한다.

- [0022] 다양한 심혈관계 질환 및 통상적인 혈전용해제의 결점들에 대한 보고가 증가 추세에 있으므로 새로운 혈전용해제의 개발은 필수적이다[참조 문헌; Toombs CF. New directions in thrombolytic therapy. Curr Opin Pharmacol 2001;1:164-168].
- [0023] 이하, *Streptomyces* sp. CS684로부터 FP84로 명명한 피브린 용해 효소의 정제 및 특성화에 대하여 기술한다.
- [0024] 최근까지, 극소수의 피브린 용해 효소가 방선균에서 보고된 바 있으며, 이 생물체의 대다수는 항생제를 포함한 몇가지 유익한 산물을 생성할 수 있다. 효소는 Sepharose CL-6B 및 Poros-HQ 상의 크로마토그래피 단계의 조합에 의하여 전기영동의 측면에서 균질하게 정제되었다.
- [0025] 정제 효소의 분자량은 SDS-PAGE 및 피브린 자이모그래피에 의하여 대략 35 kDa 인 것으로 측정되었으며, 이는 *Streptomyces megasporus* SD5로부터의 피브린 용해 효소의 것과 유사하였고[참조문헌: Chitte RR, Dey S. Potent fibrinolytic enzyme from a thermophilic *Streptomyces megasporus* strain SD5. Lett Appl Microbiol 2000;31:405-410.], 마찬가지로 후술하는 표 3에 열거한 피브린 용해 효소의 범주 안에 포함된다. pH 및 온도의 영향의 관점에서, FP84의 패턴은 표 3에 나타난 Fu-P 및 일부 다른 피브린 용해 효소들의 것과 유사하였다. 금속 이온들의 억제 영향은 *Cordyceps sinensis*[참조문헌; Li HP, Hu Z, Yuan JL, Fan HD, Chen W, Wang SJ, Zheng SS, Zheng ZL, Zou GL. A novel extracellular protease with fibrinolytic activity from the culture supernatant of *Cordyceps sinensis*: purification and characterization. Phytother Res 2007;21:1234-1241] 및 *Bacillus* sp. nov. SK006 [참조 문헌; Hua Y, Jiang B, Mine Y, Mu W. Purification and characterization of a novel fibrinolytic enzyme from *Bacillus* sp. nov. SK006 isolated from an Asian traditional fermented shrimp paste. J Agric Food Chem 2008;56:1451-1457.]로 부터의 피브린용해 효소에서 관찰된 것과 유사하였다.
- [0026] 처음 15개의 N-말단 아미노산 잔기는 Gly-Thr-Gln-Glu-Asn-Pro- Pro-Ser-Ser-Gly-Leu-Asp-Asp-Ile-Asp이었다(서열번호 1). NCBI Blast 조사에 있어서, 이는 다양한 *Streptomyces*의 균주로부터 단리된 세린 프로테아제와 약 80%의 유사성을 보였는데(표 4 참조), 이것이 세린 프로테아제일 수 있음을 의미한다. FP84의 단지 3개의 잔기(숫자 8-10), Ser-Ser-Gly가 *Fusarium* sp. CPCC480097로부터 최근에 보고된 피브린 용해 효소의 3 내지 5 번째 잔기와 동일하였다[후술하는 Wu et al 문헌 및 표 4 참조]. 그러나, 이러한 점을 제외하고는 지금까지 보고된 다른 피브린 용해 효소와는 어떠한 상동성을 나타내지 않았다. 세린 프로테아제와 N-말단 상동성 뿐만 아니라, 활성은 페파블록에 의해 현저히 억제되었으며, 이는 이 효소가 세린 프로테아제일 수 있음을 의미한다. 흥미롭게도, FP84는 *Streptomyces* 세린-프로테아제에서 관찰되는 바와 같이 PMSF에 대하여 덜 민감하였다[참조 문헌; 후술하는 Bono et al. 및 Lopes A, Coelho RR, Meirelles MN, Branquinho MH, Vermelho AB. Extracellular serine-proteinases isolated from *Streptomyces alboniger*: partial characterization and effect of aprotinin on cellular structure. Mem Inst Oswaldo Cruz 1999;94:763-770]. FP84는 또한 *Cordyceps sinensis*로부터의 세린 프로테아제에서 관찰되는 바와 같이 아프로티닌에 대해 덜 민감하였다. 더욱이, 활성은 EDTA 및 EGTA에 의하여 현저히 억제되었는데, 이는 또한 메탈로프로테아제일 수 있음을 의미한다. 이를 고려하면, 본 발명자들은 후술하는 Wang et al. 및 Wu et al.에 의해 보고된 바와 같이 FP84는 세린계 및 메탈로프로테아제 활성을 모두 갖는 피브린 용해 효소인 것으로 보인다.
- [0027] Hua et al.[상기함]은 *Bacillus* sp. nov. SK006로 부터의 피브린 용해 효소가 플라스미노겐-풍부 플레이트에서 플라스미노겐으로부터 활성 플라스민을 형성함으로써 그리고 플라스민-부재 플레이트에서 직접적 피브린 용해에 의해 피브린 응괴를 분해하였는데, 활성은 전자의 경우에서 약간 증대되었다고 보고하였다. FP84의 강력한 피브린 용해 활성은 플라스미노겐-부재 피브린 플레이트에서 관찰되었는데, 이는 직접적인 피브린 용해에 의해 피브린 응괴를 분해시킬 수 있음을 나타낸다. 단백질 μ g 당 용해 면적으로 표현된 FP84의 피브린 용해 활성은 플라스민의 것보다 아주 고무적으로 1.38-배가 높았다(도 4a 참조). FP84의 피브리노겐 용해 패턴은 *Bacillus* sp. nov. SK006로 부터의 피브린용해 효소와 동일하였다. 모두 $B\beta$ -체인을 분해하였고, 기타 저 분자량 산물(거의 40 kDa, 도 4b 참조)과 마찬가지로 γ -체인을 서서히 방출하였다. 피브리노겐의 $A\alpha$ -서브유닛은 효소 분해에 내성으로 남아 있었는데, 이는 적어도 체인 내에 존재하는 물리적 및(또는) 화학적 조성에 기인하는 것일 수 있다. 반대로, FP84의 피브리노겐 용해 패턴은 모두가 $B\beta$ - 및 γ -체인에 이어 $A\alpha$ -체인을 우선적으로 분해하였으므로, 플라스민(Sigma, 상기 Kim JS의 문헌 참조) 및 *Bacillus subtilis* DC33으로 부터의 피브린 용해 세린 프로테아제[참조문헌; 후술하는 Wang et al. 참조]의 것들과는 현저하게 달랐다.

- [0028] 결론적으로, 본 발명자들은 FP84로 명명한 피브리노겐(피브리노겐)용해 효소를 *Streptomyces* sp. CS684의 균주로부터 정제하였다. 이 효소는 플라스민 보다 더 효율적으로 직접적인 피브린 용해에 의해 피브린 응괴를 분해하였다. 이는 피브리노겐의 B β -체인을 가수분해하였으나, A α - 및 γ -체인을 절단하지 못하였다.
- [0029] FP84의 N-말단 아미노산 잔기는 다양한 방선균 균주로부터 단리한 세린계 프로테아제와 거의 80%의 상동성을 보였으나, 공지의 피브린 용해 효소와는 낮은 상동성을 나타내거나 또는 상동성을 나타내지 않았다.
- [0030] 본 발명에 따른 피브린 분해 효소는 플라스민에 대비하여 더욱 뛰어난 피브린 분해능을 가지므로 혈전용해제의 주성분 또는 보조성분으로 이용될 수 있다.
- [0031] 따라서, 본 발명은 추가의 일면에 있어서, 스트렙토마이세스속 균주(CS684)에 의해 생산된 신규의 피브린 용해 효소를 포함하는 혈전용해제를 제공한다.
- [0032] 본 발명에 따른 피브린 용해 효소는 조 추출물을 그대로 사용할 수도 있고, 이를 정제하여 순도 높게 사용해도 좋다.
- [0033] 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.
- [0034] 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.
- [0035] 본 발명의 제약 조성물은 경구제나, 주사제, 점적용제 등의 비경구제 중의 어떠한 것에 의해서도 투여할 수 있다.
- [0036] 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.
- [0037] 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.
- [0038] 본 발명의 의약품 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.
- [0039] 본 발명의 의약품 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.

[0040] <실시예>

[0041] 이하, 본 발명은 다음의 대표적인 실시예에 의하여 더욱 구체적으로 설명되나, 본 발명이 이들 실시예에 의하여 어떤 식으로든 제한되는 것은 아니다.

[0042] 본 실시예에서 사용된 바의 트롬빈, 피브리노겐 및 플라스민(모두 인간 혈장으로부터 유래한 것), 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, Poros-HQ는 Applied biosystems(Foster city, CA, USA)로부터 입수하였다. 프로테아제 억제제 페파블록(pefabloc), 아프로티닌, EDTA는 Roche Applied Science(Mannheim, Germany)로부터 입수하였다. 모든 기타 약품 및 시약은 분석급을 사용하였다. 본 발명의 균주는 스트렙토마이세스 레이드로진스(*Streptomyces laidlogenes*)의 타입 CS684로 명명하였으며, 상기 균주는 2004년 5월 10일자로 한국생명공학연구소 유전자는 행에 기탁된 바 있다(수탁번호 KCTC 10631 BP).

[0043] 실시예 1: 방선균의 배양

[0044] 스트렙토마이세스 종(*Streptomyces* sp.) CS684(수탁번호 KCTC 10631 BP)를 배지 1 리터 중에 글루코오스 10g, 귀리분 15g, K_2HPO_4 3g 및 NaH_2PO_4 3g을 포함하는 배지에서 배양하였다. 배양은 28℃ 및 160 rpm으로 설정한 회전식 진탕기에서 48시간 동안 수행하여 이후의 분석에 사용하였다.

[0045] 실시예 2: 효소 정제

[0046] 스트렙토마이세스 종 균주(*Streptomyces* sp. CS684)를 48 시간 동안 배양하여 10,000 x g에서 1 시간 동안 원심분리시켰다. 0-75% 포화도의 고체 $(NH_4)_2SO_4$ 를 상층액에 첨가하여 단백질을 침전시켰다. 단백질들은 10,000 x g, 4℃에서 1 시간 동안 원심분리에 의해 회수하여, 10 mM Tris-HCl 완충액(pH 7.5)에 대하여 투석하고, 한 외여과 멤브레인 YM30 (Millipore Corp.)로 농축시켰다. 이어서 효소를 10 mM Tris-HCl 완충액(pH 7.5)으로 예비 평형시킨 Sepharose CL-6B column (120 cm x 2.2 cm) 상에서 15 ml/h의 유속으로 겔 투과시켰다. 고틱이 활성을 가진 활성 분획들을 모으고, 농축하여 10 mM Tris-HCl 완충액(pH 7.5)으로 예비 평형시킨 Poros-HQ 이온교환 컬럼 (10 cm x 1 cm)을 사용하여 더욱 정제하였다. 결합 단백질들은 0-1 M KCl을 함유한 10 mM Tris-HCl 구배 완충액(pH 7.5)에 의해 30ml/h의 유속으로 용출시켰다. 겔 전기영동에 의해 효소 순도를 모니터링한 다음 효소의 다양한 생화학적 특성들을 결정하였다.

[0047] 실시예 3: 단백질 분석

[0048] 3-1) 단백질 농도 분석: 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].

[0049] 3-2) 효소 활성 에세이: 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]. 아조카제인 용액(10 mM Tris-HCl buffer pH 7.5 중의 아조카제인 2 mg/ml) 0.05 ml 및 효소 시료의 분취량(aliquot)을 함유한 반응 혼합물 0.15 ml을 45℃에서 20분 동안 인큐베이션시켰다. 반응은 10% (w/v) 트리클로로아세트산 0.06 ml을 첨가하여 종료시키고, 이어서 얼음물에서 10분 동안 정치시킨 후 10,000 x g로 20분 동안 원심분리시켰다. 상층액 (0.15 ml)을 Folin-Ciocalteu's 페놀 시약 (0.33 M) 0.3 ml 및 Na_2CO_3 (10 %, w/v) 용액 0.45 ml와 혼합하였다. 30℃에서 30분 동안 혼합물을 인큐베이션시킨 후, 생성된 칼라의 최적 밀도를 UV-1601 분광광도계(Shimadzu Corporation, Japan)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 1분 당 아조카제인으로 부터 티로신 1g을 방출하는데 필요한 효소의 양으로 정의하였다.

[0050] 3-3) 전기영동 분석: 5% 스택킹 겔 및 10% 폴리아크릴아마이드 해상 겔을 사용하여 Laemmli의 방법에 따라 SDS-PAGE를 수행하였다. 저 분자량 마커(Fermentas)를 참고 단백질로 사용하였다. 겔을 Coomassie Brilliant Blue R-250로 염색하고, 메탄올:빙초산:증류수= 1:1:8 (부피비)를 함유하는 용액으로 탈염색시켰다.

[0051] 3-4) 피브리린 자이모그래피는 Kim et al의 방법을 약간 변형하여 수행하였다[참조 문헌: Kim SH, Choi NS, Lee WY. Fibrin zymography: a direct analysis of fibrinolytic enzymes on gels. Anal Biochem 1998;263:115-116]. 피브리노젠 (1.2 mg/ml) 및 트롬빈 (0.1 μ U/ml)을 10 % 폴리아크릴아마이드 겔 용액과 혼합하고 정제 효소 2 μ g을 피브리린 겔 상에서 전기영동시켰다. 전기영동 후, 겔을 2.5% (v/v) Triton X-100 으로 1시간

동안 세척하고, 증류수로 3회 행구고, 반응 완충액 (10 mM Tris-HCl pH 7.5) 중에서 16 시간 동안 실온에서 인큐베이션시켰다. 염색 및 탈염색은 SDS-PAGE에서와 유사하게 행하였다.

[0052] *Streptomyces* sp. CS684의 배양 상층액으로부터 효소(FP84)의 정제에 관하여 표 1에 나타났다. 효소를 3 단계 절차에 의해 균일하게 정제하여(표 1 및 도 1 참조), 표 1에 혈전용해효소(FP84)의 정제 결과를 요약하였다.

표 1

정제 단계	전체 단백질 (mg)	전체활성 (U)	특이활성(U/mg)	활성회수(%)	정제인자(배수)
조 상층액	489	884	1.8	100	1
황산암모늄	300	772	2.6	87	1.4
Sepharose CL-6B	173	695	4	79	2.2
Poros-HQ	2.5	48	19	5.4	10.5

[0054] 프로테아제 활성은 기질로서 아조카제인을 사용하여 Follin-Ciocalteu 방법에 의해 평가하였다. 도 1은 (a) Sepharose CL-6B 컬럼을 사용한 겔 투과 및 (b) Poros-HQ 컬럼을 사용한 이온 수지로 부터의 FP84의 용출 프로필을 나타내는 도면으로서, 각 분획의 단백질 농도(□) 및 효소 활성 (●)은 각각 595 및 660 nm에서 측정하였다. 효소 활성은 U/ml로 나타내었다. 표 1의 결과로부터 알 수 있는 바와 같이, 10.5-배 정제 및 5.4% 활성 회수를 초래하였다.

[0055] SDS-PAGE 분석 결과, 35 kDa의 분자량에 해당하는 FP84의 단일 밴드가 나타났다(도 2 참조). 도 2는 Laemmli의 방법에 따라 10% (w/v) 폴리아크릴아마이드 슬랩 겔에서 수행한 FP84의 전기영동 분석사진이다. 겔들은 Coomassie Brilliant Blue R-250로 염색하고, 메탄올/빙초산/증류수(1:1:8, 부피비)로 탈염색하였다. Mr, 단백질 크기 마커 (각 레인의 왼쪽에 kDa의 크기를 나타냄). 레인 1, 정제 FP84 (2 µg); 레인 2, 정제 FP84의 피브린 자이모그래피.

[0056] 또한, 활성 염색(피브린 자이모그래피) 단계에 있어서, FP84는 SDS-PAGE에서 나타난 동일한 단백질 밴드에 해당하는 단일 밴드로 나타났다.

[0057] 실시예 4: pH 및 온도의 영향

[0058] 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) 및 NaHCO₃ (pH 9.6-11)을 사용하여 다양한 pH값(3-11)에서 결정하였다. 효소의 pH 안정성을 결정하기 위하여, 효소 시료의 분취량을 상기한 이들의 각각의 완충액으로 3시간 동안 1℃에서 인큐베이션시키고, 잔류 활성은 pH 7.5에서 처음 활성(완충액으로 인큐베이션시키기 전)을 100%로 고려하여 측정하였다. FP84의 최적 온도는 다양한 온도 (4-70℃) 및 pH 7.5에서 효소 에세이를 수행함으로써 평가하였다. 효소의 열 안정성은 효소 시료를 다양한 온도에서 pH 7.5, 15-90분 동안 인큐베이션시킴으로써 평가하고, 이어서 잔류 활성을 측정하였다. 잔류 활성의 백분율은 초기 효소 활성(다양한 온도에 노출시키기 전)을 100%로 하여 계산하였다.

[0059] 도 3은 효소 활성 및 안정성에 관한 pH 및 온도의 영향을 나타내는 그래프도이다. (a) 최적 pH는 다양한 pH 완충액들[100 mM 시트르산/소듐 포스페이트(pH 3-7), Tris-HCl (pH 7.5-9) 및 NaHCO₃ (pH 9.6-11)].로 효소 활성을 평가함으로써 결정하였다. (b) pH 안정성은 효소 시료의 분취량을 1℃에서 3 시간 동안 각각의 완충액들을 인큐베이션시킨 후에 잔류 활성을 측정함으로써 결정하였다. (c) 효소의 최적 온도는 다양한 온도에서 20 분 동안 활성을 평가함으로써 결정하였다. (d) 효소의 열 안정성은 효소를 각각 37℃(■), 40℃ (□) 또는 45℃ (●)에서 15-90 분 동안 인큐베이션시킨 후 잔류 활성을 측정함으로써 평가하였다. 각 점은 평균(n = 3) ± 표준 편차를 나타낸다.

[0060] FP84의 활성 및 안정성은 pH에 의하여 고도로 영향을 받았다. FP84 활성은 pH 7- 7.5에서 최고에 달했다(도 3a 참조). 비록 활성은 고도로 산성 및 염기성인 환경에서는 완전히 상실되었으나, 3시간 후에 측정하였을 때 80% 이상의 활성이 1℃에서 6-9의 범위의 pH에서 안정한 것으로 밝혀졌다(도 3b). 더욱이, FP84 활성은 45℃에서 가장 높았고(도 3c), 40℃ 이하에서 안정하였다(도 3d).

[0061] 실시예 5: 금속 이온 및 억제제의 영향

[0062] 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',N'-테트라아세트산 (EGTA) 및 페닐메틸술폰닐 플루오리드(PMSF), 아프로티닌, 및 페파블록 SC 등의 억제제의 영향을 결정하였다. CaCl_2 and MgCl_2 는 활성을 약간 증대시켰다. 반대로, 활성은 CoCl_2 및 ZnCl_2 에 의하여 상당히 억압되었고, CuCl_2 및 FeSO_4 에 의해 완전히 억압되었다. 활성은 아프로티닌 및 PMSF에 의하여 약간 억제되었으나, 페파블록, EDTA 및 EGTA에 의하여 상당히 억제되었다(표 2). 표 2는 금속이온 및 프로테아제 억제제의 영향을 나타낸다. 결과는 평균 $\pm$ 표준 편차($n=3$)로 나타났다.

표 2

[0063]

금속이온 또는 억제제	농도	잔류 활성(%)
무처리		100
CaCl_2	2mM	110 ± 2.5
MgCl_2	2mM	103 ± 2.9
CoCl_2	2mM	41.8 ± 3.1
CuCl_2	2mM	1.6 ± 3.2
H_2SO_4	2mM	0
ZnCl_2	2mM	35 ± 2.4
EDTA	1mM	8.1 ± 3.7
EGTA	1mM	18.4 ± 2.6
PMSF	5mM	89.3 ± 3.1
Aprotinin	30 μM	96 ± 2.4
Pefabloc	2.5mM	67 ± 2.7
Pefabloc	4mM	53 ± 2.2

[0064] 이상의 실험에서 밝혀진 피브린 용해 효소(FP84)의 특성을 공지의 유사한 피비린 용해 프로테아제와 비교하여 그 결과를 표 3에 나타내었다.

표 3

[0065]

효소	분자량 (kDa)	최적 pH	최적 T (°C)	안정성 pH	안정성 T (°C)	비 고
FP84	35	7.5	45	6-9	<40	세린 메탈로프로테아제
<i>B. sp. nov.</i> SK006	43-46	7.2	30	5-11	<40	세린 프로테아제(1)
<i>B. megasporus</i>	35	8	55	6-9	37-60	키모트립신-유사 세린 펩티다아제(2)
<i>Sf</i> -1	30	ND	ND	4-9	4-37	세린 메탈로프로테아제(3)
Fu-P	28	8.5	45	6-9	<37	키모트립신-유사 세린 메탈로프로테아제(4)
<i>S. sp.</i>	33	7.8	35-50	ND	ND	키모트립신-유사 세린 프로테아제(5)
Subtilisin FS33	30	8	55	ND	ND	섭틸리신-유사 세린 프로테아제(6)
Subtilisin DJ-4	29	ND	40	4-11	RT	플라스민-유사 세린 프로테아제(7)
Subtilisin DFE	28	9	48	6-10	<50	섭틸리신-패밀리 세린 프로테아제(8)
<i>Fusarium sp.</i> BLB	27	9.5	50	2.5-11.5	<50	세린 프로테아제(9)
Subtilisin QK-2	28	8.5	5.5	3-12	40	섭틸리신-패밀리 세린 프로테아제(10)
<i>P. sp.</i> TK015	21-24	7	50	4-11	<50	세린 프로테아제(낮토키나아제)(11)

[0066] 상기 표에서, ND, 데이터가 유용하지 않음; T, 온도; RT, 실온; B, *Bacillus*; S, *Streptomyces*; P, *Pseudomonas*를 나타낸다. 상기 표 3의 비고에 인용된 물질의 참조문헌은 다음과 같다. (1) Hua Y, et al 상기 함 (2) Chitte RR Dey S. Potent fibrinolytic enzyme from a thermophilic *Streptomyces megasporus* strain SD5. Lett Appl Microbiol 2000;31:405-410. (3) Wang J, Wang M, Wang Y. Purification and characterization of a novel fibrinolytic enzyme from *Streptomyces* spp. Chin J Biotechnol 1999;15:83-89. (4) Wu B, Wu L, Chen D, Yang Z, Luo M. Purification and characterization of a novel fibrinolytic protease from *Fusarium* sp. CPCC 480097. J Ind Microbiol Biotechnol 2009;36:451-459. (5) Bono F, Savi P, Tuong A, Maftouh M, Pereillo JM, Capdevielle J, Guillemot JC, Maffrand JP, Herbert JM. Purification and characterization of a novel protease from culture filtrates of a *Streptomyces* sp. FEMS Microbiol Lett 1996;141:213-220. (6) Wang CT, Ji BP, Li B, Nout R, Li PL, Ji H, Chen LF. Purification and characterization of a fibrinolytic enzyme of *Bacillus subtilis* DC33, isolated from Chinese traditional Douchi. J Ind Microbiol Biotechnol 2006;33:750-758. (7) Kim SH, Choi NS. Purification and characterization of subtilisin DJ-4 secreted by *Bacillus* sp. strain DJ-4 screened from Doen-Jang. Biosci Biotechnol Biochem 2000;64:1722-1725. (8) Peng Y, Huang Q, Zhang RH, Zhang YZ. Purification and characterization of a fibrinolytic enzyme produced by *Bacillus amyloliquefaciens* DC-4 screened from douchi, a traditional Chinese soybean food. Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol 2003;134:45-52. (9) Ueda M, Kubo T, Miyatake K, Nakamura T. Purification and characterization of fibrinolytic alkaline protease from *Fusarium* sp. BLB. Appl Microbiol Biotechnol 2007;74:331-338. (10) Ko JH, Yan JP, Zhu L, Qi YP. Identification of two novel fibrinolytic enzymes from *Bacillus subtilis* QK02. Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol 2004;137:65-74. (11) Wang SL, Chen HJ, Liang TW, Lin YD. A novel nattokinase produced by *Pseudomonas* sp. TKU015 using shrimp shells as substrate. Process Biochem;2009;44:70-76.

[0067] **실시예 6: 피브린 분해 및 피브리노겐 분해 에세이**

[0068] 피브린 분해 활성은 Astrup 및 Mullertz의 피브린 플레이트법을 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. 균일한 겔 두께를 위하여 페트리접시 대신에 Bio-Rad 미니겔 샌드위치에서 준비하였다. 클롯을 실온에서 30분 동안 정치시킨 후 다양한 농도(최종 0.5 내지 4 $\mu\text{g}/\text{well}$)의 효소 시료 10 μl 를 겔에서 제조된 웰(3.5 mm 직경)에 조심스럽게 위치시켰다. 플레이트를 37°C에서 인큐베이션시키고, 웰 주위의 용해된 원의 치수를 16 시간 후에 측정하였다. 피브린용해 활성은 단백질 μg 당 용해된 영역으로 표현하였다[참조 문헌: Giron ME, Salazar AM, Aguilar I, Perez JC, Sanchez EE, Arocha-Pinango CL, Rodriguez-Acosta A, Guerrero B. Hemorrhagic, coagulant and fibrinolytic activities of crude venom and fractions from mapanare (*Bothrops colombiensis*) snakes. Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol 2008;147:113-121].

[0069] 피브리노겐 용해 활성은 상기 KIM JS 등의 방법을 다음과 같이 변형하여 평가하였다. 0.15 M NaCl를 함유한 10 mM Tris-HCl (pH 7.5)에서 제조된 피브리노겐 (1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) 150 μl 를 정제 효소(0.1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) 45 μl 로 37°C에서 인큐베이션시켰다. 시료 (20 μl)의 분취량을 다양한 시간 간격으로 철회하고, 5 분 동안 끓여서 반응을 종료시켰다. 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]. 두 에세이에서, 인간 혈장 유래의 플라스민은 양성 대조군으로 사용되었다.

[0070] FP84의 피브린의 가수분해는 피브린 플레이트법에 의해 분석하고 그 결과를 도 4에 나타내었다.

[0071] 도 4는 (a) FP84의 피브린 분해 활성 및 FP84에 의해 촉매화된 피브리노겐 가수분해의 SDS-PAGE 분석 결과를 나타내는 사진이다. (a) FP84의 피브린 분해 활성. 음성 대조군(완충액), 양성 대조군(플라스민) 및 정제 효소를 피브린 플레이트에서 제조된 각 웰(직경 3.5 mm)에 조심스럽게 위치시키고, 37°C에서 16 시간 동안 인큐베이션시켰다. 도면에서 레인 1-6은 각각 완충액; 플라스민 3 및 0.5 μg ; 정제 효소 4, 3 및 0.5 μg 을 나타낸다. (b) FP84에 의해 촉매화된 피브리노겐 가수분해의 SDS-PAGE 분석 결과. 레인 1, 단백질 크기 마커 (Fermentas); 2-7, 각각 37°C에서 0, 5, 15, 30, 60 및 90 분 동안 인큐베이션시킨 후 가수분해된 FP84 분취량.

[0072] 도 4a에서, FP84는 동일한 양의 플라스민(μg)에 의해 생성된 것보다 더 뚜렷하고 더 큰 명확한 대역을 나타냈는데, 이는 FP84의 피브리노겐 용해 효능이 플라스민의 것보다 상대적으로 더 크다는 것을 의미한다. FP84에 의한 명확함의 영역은 $121.5 \pm 3.5 \text{ mm}^2/\mu\text{g}$ 인 것으로 관찰되었으며, 이는 37°C 에서 16 시간 동안 인큐베이션시킨 후, 플라스민에 의해 생성된 것인 $88 \pm 2.8 \text{ mm}^2/\mu\text{g}$ 보다 1.38배 더 높다.

[0073] 또한, FP84에 의해 촉매화되는 피브리노겐 용해 반응의 모드를 밝히기 위하여, 분해 산물을 SDS-PAGE로 분석하고, 그 결과를 도 4b에 나타내었다. 가수분해 동안 $B\beta$ -체인은 15분 이내에 거의 완전히 절단된 반면, 효소는 인큐베이션 150 분 후에조차도 $A\alpha$ 및 γ -체인을 가수분해시키지 못하였다(데이터는 나타내지 않음).

[0074] **실시예 7: 운동 파라메타(Kinetic parameter)**

[0075] 효소의 운동 상수는 상이한 아조카제인 농도($0.1\text{--}13.3 \text{ mg/ml}$)에서 활성의 데이터를 Lineweaver-Burk 이중 상호 플롯 상의 선형 회귀로 피팅시켜 계산하였다[참조 문헌; Lineweaver M, Burk D. The determination of enzyme dissociation constants. J Am Chem Soc 1934;56: 658-666]. 효소 농도를 일정하게 ($1.3 \mu\text{g}$) 유지시키고, 활성을 40°C 및 pH 7.5에서 평가하였다. 겉보기 Michaelis 상수(K_m), 최대 속도(V_{max}), 및 턴오버 수(K_{cat})는 각각 4.2 mg/ml , $305.8 \mu\text{g/min} \cdot \text{mg}$ 및 $188.7/\text{s}$ 이었다.

[0076] **실시예 8: N-말단 아미노산 서열의 결정**

[0077] 정제된 FP84의 N-말단 아미노산 서열은 Procise Model 492 protein sequencer(Applied Biosystems, CA, USA)를 사용하여 Edman 분해법에 의해 결정하였다.

[0078] N-말단의 처음 15개의 아미노산 잔기는 GTQENPPSSGLDDID(서열번호 1)이었다. 효소의 아미노산 서열을 GenBank에 대한 BLAST 조사를 이용하여 분석하였다. 다른 밀접하게 관련된 효소 서열에 비교한 서열들을 표 4에 나타내었으며, FP84의 관찰된 서열이 상이한 것임을 보여준다.

표 4

[0079] 밀접하게 연관된 스트렙토마이세스 세린 프로테아제 및 가장 높은 상동성을 가진 섬유소용해 프로테아제와의 N-말단 아미노산 서열의 배열

효소	N-말단 아미노산	동일성%
<i>S. pristinaespiralis</i> ATCC 25486로 부터의 알칼린 세린 프로테아제(서열 2)	TQDNPPSWGLD	81
<i>S. griseus</i> subsp. <i>griseus</i> NBRC 13350로부터 추정 분비성 셉틸리신유사 세린 프로테아제(서열 3)	TQDNPPSWGLDRID	78
<i>S. sp. SPB74</i> 로 부터의 알칼린 세린 프로테아제(서열 4)	TQANPPSWGLDRID	78
<i>S. clavuligerus</i> ATCC 27064로 부터의 알칼린 세린 프로테아제(서열 5)	TQSNPPSWGLDRID	78
FP84 (본 발명, 서열 1)	GTQENPPSSGLDDID	100
<i>Fusarium sp. CPCC480097</i> 로 부터의 <i>Fu-P</i> (서열6)	QASSGTPATIRVLVV	20

[0080] FP84 및 *Fusarium* sp. CPCC480097 [Wu et al. 참조]으로부터 피브리노 용해 효소 사이에 동일한 잔기들은 굵게 표시하고 밑줄 그은 것이다.

[0081] **실시예 9: 제약학적 제제**

[0082] 제형의 형태(정제)

[0083] 실시예 3의 혈전용해효소 50 mg

[0084] 락토오스 80 mg

[0085] 전분 17 mg

[0086] 스테아르산 마그네슘 3 mg

[0087] 결정성 셀룰로오스 10 mg

[0088] 본 발명의 한 실시 형태는 그 예를 상기에 나타난 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

[0089] 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 세린 메탈로프로테아제일 수 있다. 적절한 pH 및 온도에서 고도로 활성이고 안정된 이 피브린 용해 효소는 혈전증의 치료제로서 사용될 수 있다.

수탁번호

[0090]

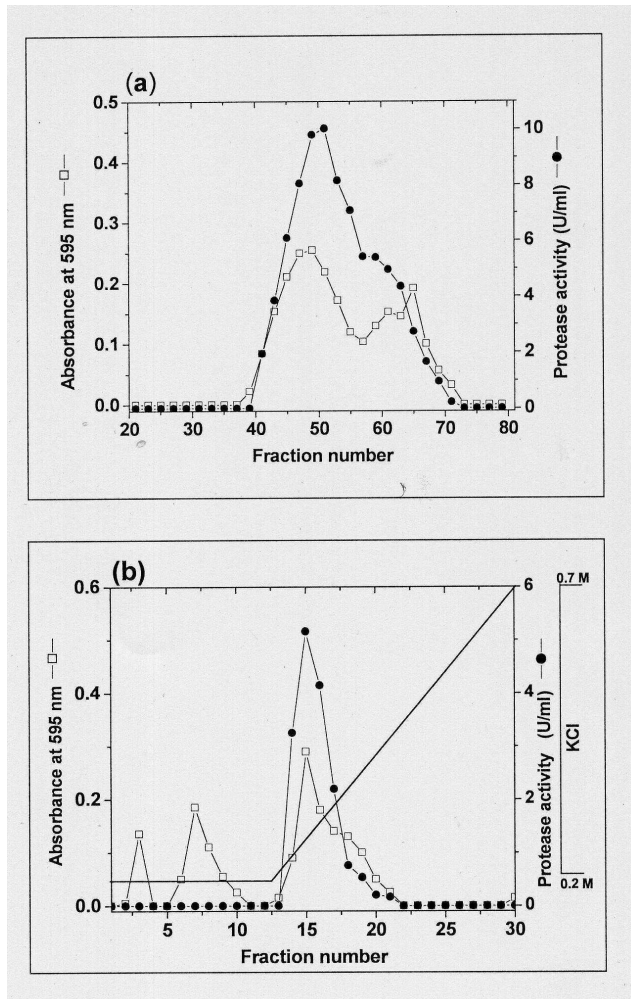
기탁기관명 : 한국생명공학연구원

수탁번호 : KCTC10631BP

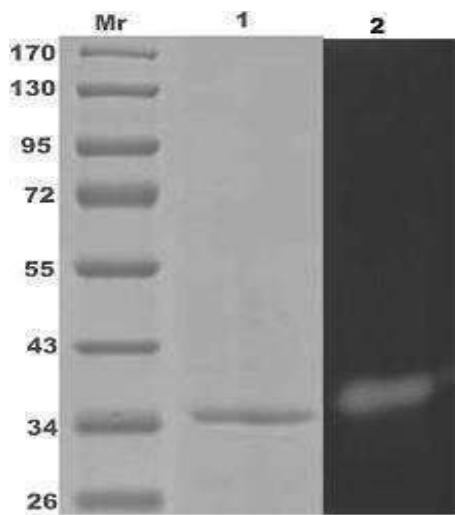
수탁일자 : 20040510

도면

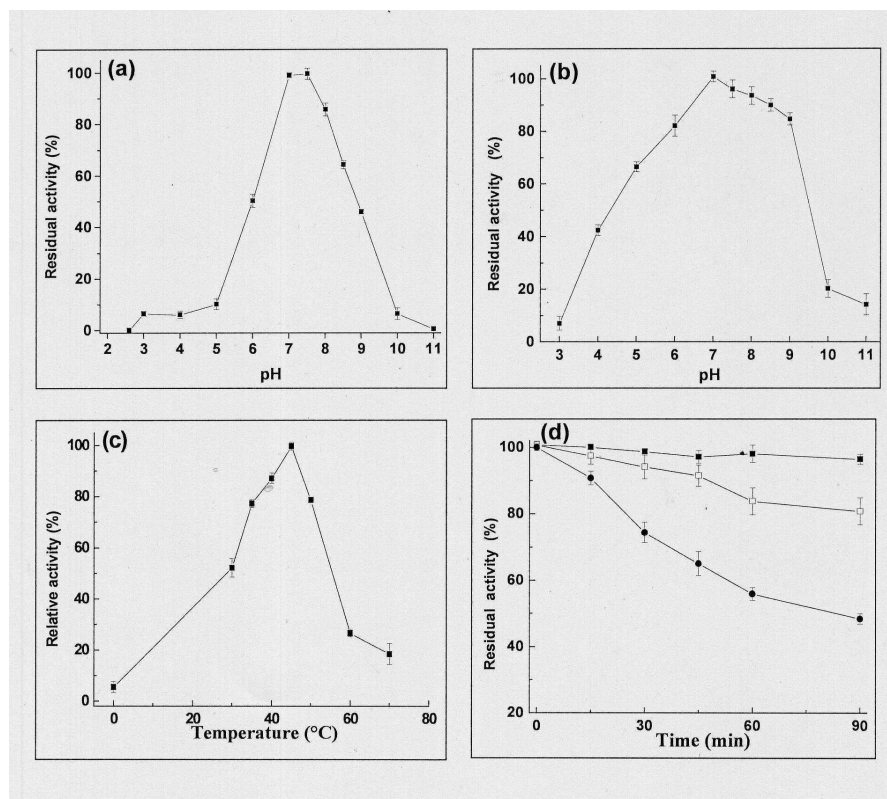
도면1



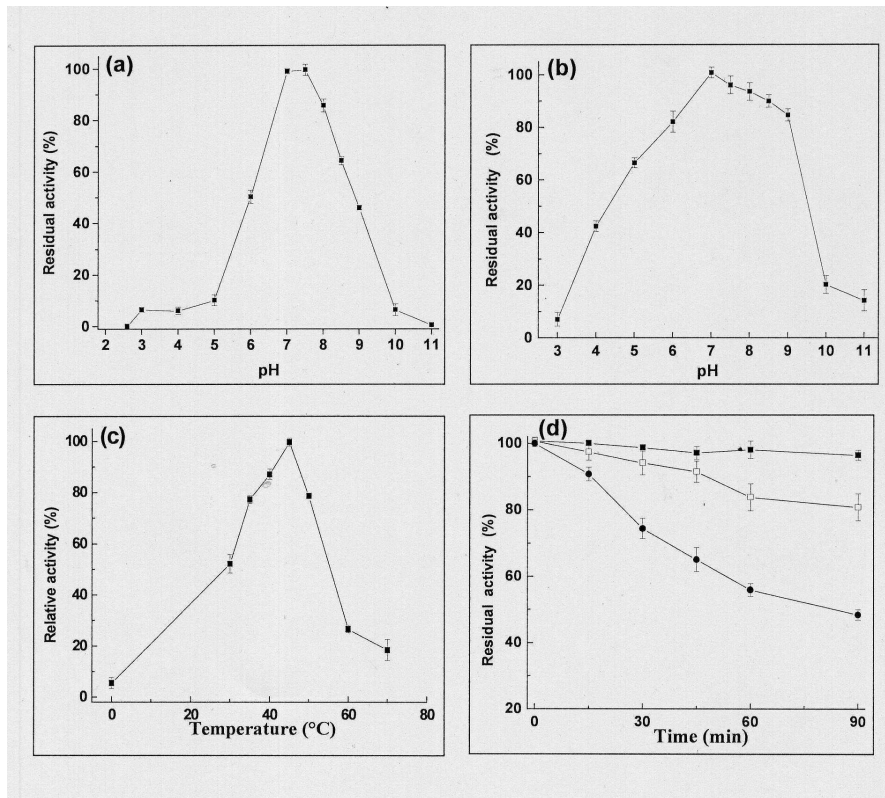
도면2



도면3



도면4



서열목록

- <110> Chosun University Industry-Academic Cooperation Foundation
- <120> Process for Parparing Fibrinolytic protease from Streptomyces sp.
CS684
- <130> pkr-223
- <160> 6
- <170> Kopatent In 1.71
- <210> 1
- <211> 15
- <212> PRT
- <213> Streptomyces sp.
- <400> 1
- Gly Thr Gln Glu Asn Pro Pro Ser Ser Gly Leu Asp Asp Ile Asp
- 1 5 10 15
- <210> 2
- <211> 11
- <212> PRT
- <213> Streptomyces pristinaespiralis

<400> 2

Thr Gln Asp Asn Pro Pro Ser Trp Gly Leu Asp

1 5 10

<210> 3

<211> 14

<212> PRT

<213> Streptomyces griseus

<400> 3

Thr Gln Asp Asn Pro Pro Ser Trp Gly Leu Asp Arg Ile Asp

1 5 10

<210> 4

<211> 14

<212> PRT

<213> Streptomyces sp.

<400> 4

Thr Gln Ala Asn Pro Pro Ser Trp Gly Leu Asp Arg Ile Asp

1 5 10

<210> 5

<211> 14

<212> PRT

<213> Streptomyces clavuligerus

<400> 5

Thr Gln Ser Asn Pro Pro Ser Trp Gly Leu Asp Arg Ile Asp

1 5 10

<210> 6

<211> 15

<212> PRT

<213> Fusarium sp.

<400> 6

Gln Ala Ser Ser Gly Thr Pro Ala Thr Ile Arg Val Leu Val Val

1 5 10 15