



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2015-0017254

(43) 공개일자 2015년02월16일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C07K 14/76 (2006.01) C07K 1/06 (2006.01)

A61K 38/38 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2013-0093289

(22) 출원일자 2013년08월06일

심사청구일자 2013년08월06일

(71) 출원인

이화여자대학교 산학협력단

서울특별시 서대문구 이화여대길 52 (대현동, 이화여자대학교)

(72) 발명자

신동해

서울 서대문구 이화여대길 52, 종합과학관 C동 408호 (대현동, 이화여자대학교)

전길자

서울 영등포구 여의나루로 7, 9동 1002호 (여의도동, 광장아파트)

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

손민

전체 청구항 수 : 총 11 항

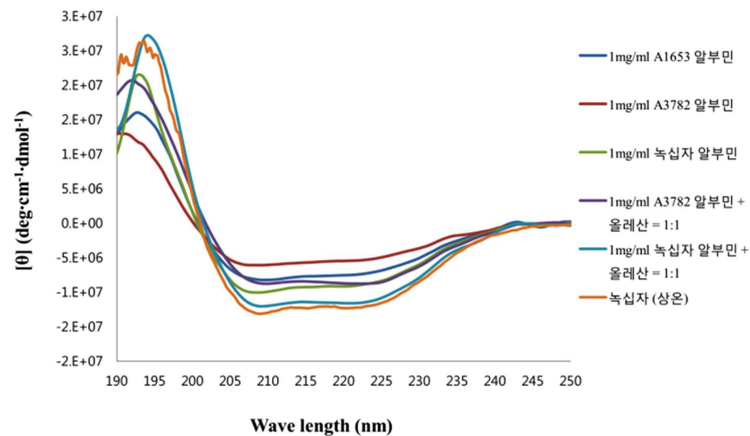
(54) 발명의 명칭 열안정화된 인간혈청알부민의 제조방법

(57) 요약

본 발명은 탄소수 16 내지 24의 지방산으로 구성된 군으로부터 선택되는 지방산 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 1 내지 40 mg/ml 농도의 인간혈청알부민에 처리하는 단계를 포함하는, 열안정화된 인간혈청알부민의 제조방법에 관한 것이다.

대표도 - 도1

인간혈청알부민 60℃ 10시간 가열



(72) 발명자

김미선

서울 서대문구 이화여대길 52, 종합과학관 C동 40
8호 (대현동, 이화여자대학교)

박지민

부산 수영구 연수로315번길 16, 105동 1304호 (망
미동, 포스코더샵파크리치)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1345170132

부처명 교육과학기술부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 원천기술(특정연구)개발사업-신기술융합형성장동력사업

연구과제명 단백질 기반의 산소전달기전 확립을 통한 저산소증 치료기술 개발

기 여 율 1/1

주관기관 이화여자대학교

연구기간 2010.09.01 ~ 2014.06.30

특허청구의 범위

청구항 1

탄소수 16 내지 24의 지방산 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을, 1 내지 40 mg/ml 농도의 인간혈청알부민에 첨가하는 단계를 포함하는, 열안정화된 인간혈청알부민의 제조방법.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 지방산은 팔미트산(palmitic acid), 팔미톨레산(palmitoleic acid), 스테아르산(stearic acid; octadecanoic acid), 올레산(oleic acid), 리놀레산(linoleic acid), 리놀렌산(linolenic acid), EPA(eicosapentaenoic acid) 및 DHA(docosahexaenoic acid)로 구성된 군으로부터 선택된 하나 이상의 지방산인 제조방법.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 열안정화된 인간혈청알부민을 60 내지 80℃ 온도에서 6시간 내지 15시간 동안 열처리하였을 때, α -나선구조(α -Helix)가 80% 이상 유지되는 것을 특징으로 하는, 제조방법.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 지방산의 약학적으로 허용가능한 염은 알칼리 금속 또는 알칼리토금속 염인 것인 제조방법.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 지방산 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염은 인간혈청알부민에 대하여 1:0.5 내지 1:2의 몰비가 되도록 첨가하는 것을 특징으로 하는 제조방법.

청구항 6

제1항에 있어서, 상기 인간혈청알부민은 인간혈장유래 또는 재조합 인간혈청알부민인 것인 제조방법.

청구항 7

제1항에 있어서, 상기 제조방법은 상기 인간혈청알부민을 60 내지 80℃로 가열하는 단계를 추가로 포함하는 것인 제조방법.

청구항 8

제1항에 있어서, 상기 제조방법은 인간혈청알부민을 50 내지 200 mg/ml 농도로 농축하는 단계를 추가로 포함하는 것인 제조방법.

청구항 9

- (a) 인간혈청알부민에 탄소수 16 내지 24의 지방산 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 처리하는 단계;
- (b) 상기 인간혈청알부민의 농도를 1 내지 40 mg/ml 농도로 조절하는 단계를 포함하는, 열안정화된 인간혈청알부민의 제조방법.

청구항 10

제9항에 있어서, (c) 상기 인간혈청알부민을 60 내지 80℃로 가열하는 단계를 추가로 포함하는, 열안정화된 인간혈청알부민의 제조방법.

청구항 11

제10항에 있어서, (d) 상기 인간혈청알부민을 50 내지 200 mg/ml 농도로 농축하는 단계를 추가로 포함하는, 제조방법.

명세서

기술분야

[0001]

본 발명은 탄소수 16 내지 24의 지방산으로 구성된 군으로부터 선택되는 지방산 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 1 내지 40 mg/ml 농도의 인간혈청알부민에 처리하는 단계를 포함하는, 열안정화된 인간혈청알부민의 제조방법에 관한 것이다.

배경기술

[0002]

알부민은 혈액에 매우 많이 존재하는 단백질로, 간에서 생성된다. 구조적으로 인간혈청알부민(human serum albumin; HSA)은 585개의 아미노산(66,438 Da)으로 이루어져 있으며, 17개의 이황 가교(disulfide bridge)와 하나의 자유 시스테인(Cys34)으로 구성되어 있다. 또한 알부민은 혈장부피를 유지 및 회복시키는 역할, 물, 칼슘, 나트륨, 칼륨 등의 양이온, 지방산, 호르몬, 빌리루빈(bilirubin), 약물 등 다양한 리간드와 결합하여 혈액의 콜로이드 삼투압을 조절, 전달하는 역할 및 영양 불량시 아미노산 공급원으로서의 역할을 한다. 특히 약물과 알부민의 결합은 약물의 약효 발현에 크게 관여한다. 한편, 순화한 HSA는 예를 들어 외과수술, 출혈성 쇼크 또는 화상 및 신증후군(nephrotic syndromes) 등 알부민 상실 및 알부민 합성 기능 장애에 의한 저알부민혈증의 치료에 사용된다. 또한, 알부민은 보다 높은 진핵 세포의 성장을 가져오도록 보충제로서 사용되거나, 치료용 단백질 배합에 있어서 의약품 첨가제로 사용된다. 혈청알부민의 또 다른 알려진 기능은 헤모글로빈과 유사하게 산소 분압에 따라 산소와 흡착하고 탈착하는 산소 캐리어로서의 작용이다. 따라서 비상시에 헤모글로빈을 대신하여 투여될 수 있다. 현재, 알부민 제품에 대한 수요는 인간 혈액으로부터 추출된 알부민에 의하여 충당되고 있다.

[0003]

종래 HSA는 인간 혈장으로부터 콘(Cone)의 저온 에탄올 분획법 또는 그에 준하는 방법으로, HSA 함유 분획물(분획물 V)을 얻은 후, 각종 정제방법을 통해 제조되었다. 정제방법으로는, 일반적으로 단백질 화학에서 통상 사용되는 정제방법, 예를 들어, 염석법(salting out method), 환외여과법, 등전점침전법, 전기영동법, 이온교환 크로마토그래피법, 겔여과 크로마토그래피법, 친화(affinity) 크로마토그래피법 등을 사용할 수 있다. 인간혈청알부민의 정제과정에 있어, 혈장으로부터 얻은 시료 내에는, 생체조직, 세포, 혈액 등으로부터 유래하는 많은 종류의 오염물질이 혼재하여 있기 때문에 인간혈청알부민의 정제는 상기 방법을 조합하여 사용할 필요가 있다. 그러나 이와 같은 과정으로 인간 혈장으로부터 정제되는 알부민의 양은 제한적일 수 밖에 없다. 따라서, 최근에는 원료를 인간 혈장에 의존하지 않는 방법으로 유전자 조작기술을 응용하여 효모 및 고초균(*Bacillus subtilis*)을 이용하여 인간혈청알부민을 제조하는 방법이 개발되었다.

[0004]

통상적으로 수용액 형태의 알부민 제제는 제제를 오염시킬 수 있는 바이러스를 불활성화시키기 위하여 60℃에서 10시간 동안 열처리 과정을 거친다. 또한 알부민의 공업적 생산은 인체 내 환경과 다른 조건에서 수행된다. 따

라서, 열 등에 의해 쉽게 변성되고 응집되는 알부민의 특성을 고려할 때 상기 과정은, 과정의 수행동안 변성되거나 다량체를 형성할 수 있는 가능성이 높다. 현재로서는 시판 중인 5% 또는 20% 알부민 제제가 별다른 부작용 없이 널리 사용되고 있어 제제 중 포함되어 있는 다량체가 인체에 무해한 것으로 여겨지고 있으나, 변성된 알부민 주사제에 의한 혈압 상승, 발열, 빈맥, 떨림, 홍조, 두드러기, 오한 등의 부작용이 보고되고 있다. 따라서, 열처리 과정에서 알부민을 변성시키지 않는 공정의 개발이 필요하다.

[0005]

이에 본 발명자들은 장시간의 열처리 과정에서도 인간혈청알부민의 안정성을 높게 유지시킬 수 있는 최적의 공정을 개발하기 위하여 예의노력한 결과, 염을 1 내지 40 mg/ml 농도의 인간혈청알부민에 탄소수 16 내지 24의 지방산을 포함하도록 하여 염을 가할 경우, 10시간 가량의 장시간 열처리에도 안정성을 높게 유지시킬 수 있음을 확인하고, 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0006]

본 발명의 하나의 목적은, 탄소수 16 내지 24의 지방산으로 구성된 군으로부터 선택되는 지방산 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 1 내지 40 mg/ml 농도의 인간혈청알부민에 처리하는 단계를 포함하는, 열안정화된 인간혈청알부민의 제조방법을 제공하는 것이다.

[0007]

본 발명의 다른 목적은, (a) 인간혈청알부민에 탄소수 16 내지 24의 지방산으로 구성된 군으로부터 선택되는 지방산 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 처리하는 단계; (b) 상기 인간혈청알부민의 농도를 1 내지 40 mg/ml 농도로 조절하는 단계를 포함하는, 열안정화된 인간혈청알부민의 제조방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0008]

상기 목적을 달성하기 위한 하나의 양태로서, 탄소수 16 내지 24의 지방산으로 구성된 군으로부터 선택되는 지방산 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 1 내지 40 mg/ml 농도의 인간혈청알부민에 처리하는 단계를 포함하는, 열안정화된 인간혈청알부민의 제조방법을 제공한다.

[0009]

본 발명의 제조방법에 따라, 1 내지 40 mg/ml 농도의 인간혈청알부민에 탄소수 16 내지 24의 지방산으로 구성된 군으로부터 선택되는 지방산 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 처리함으로써, 열안정화된 인간혈청알부민을 제조할 수 있다.

[0010]

이전에는 알부민의 감염성 질환 부작용이 보고되면서, 이를 극복하기 위한 방법으로 냉에탄올에 의한 바이러스 사멸효과와 함께 60℃에서 10시간 열처리 공정을 도입하였다. 그러나 알부민은 구조적으로 매우 안정한 단백질임에도 불구하고 상기 열처리 과정에서 이합체, 소중합체와 중합체의 형성이 유발될 수 있으며, 심한 경우 겔화(gelation)되는 현상이 보고되었다. 따라서, 인간혈청알부민 제제의 제조에 있어, 필요한 열처리 공정에서 인간혈청알부민의 안정성을 장시간 유지시킬 수 있는 방법의 개발이 중요하다. 이에 본 발명에서는 1 내지 40 mg/ml의 저농도 인간혈청알부민에 대하여 탄소수 16 내지 24의 지방산 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 처리하였을 때, 60 내지 80℃의 온도에서 10시간 이상을 열처리하여도 알부민의 이차구조가 유지됨을 규명하였다. 이와 같은 본 발명의 방법은 수시간의 열처리 공정에도 알부민 구조의 안정성을 부여함으로써, 안정성이 증대된 알부민 제제의 개발에 대한 유용성을 가질 수 있다.

[0011]

본 발명에서 용어, "알부민"은 세포의 기본 물질을 구성하는 단백질의 하나로, 혈액 중에 많이 존재하며, 간에서 생성된다. 자연상태에 존재하는 단순 단백질 중 가장 분자량이 적다. 혈액 중의 혈청알부민은 혈장부피를 유지하고 회복시키는 기능이 있어서 과다 출혈에 따른 쇼크를 방지하고 수술 및 화상치료 등에 사용된다. 또한 헤모글로빈과 유사한 산소전달 능력을 갖는 것으로 알려져 있다. 본 발명의 목적상, 상기 알부민은 이를 제제화하

는 과정에서 열처리에 대한 안정성이 부여되어야 할 대상으로서, 그 대상이 되는 알부민은 제제화가 가능한 모든 알부민을 포함할 수 있으며, 바람직하게는 인간혈장으로부터 유래한 것이거나, 유전자 조작에 의해 제조된 재조합 인간혈청알부민일 수 있으며, 더욱 바람직하게는 인간혈장으로부터 유래한 인간혈청알부민이나, 이에 제한되지 않는다.

[0012] 본 발명에서 용어, “재조합 인간혈청알부민”은 인간의 혈장에서 유래한 자연적인 인간혈청알부민과 대비되기 위한 개념으로서, 인위적으로 생산되는 인간혈청알부민을 통칭한다. 예컨대, 서열번호 1(HSA의 서열)의 아미노산 서열을 갖는 폴리펩티드를 발현하도록 제조된 형질전환체로부터 획득한 인간혈청알부민으로서, 혈장으로부터 분리된 인간혈청알부민과 동일한 아미노산 서열을 가질 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0013] 본 발명에서 용어, “형질전환체(transformant)”는 유전자 조작(genetic engineering)을 통해 특정 유전자를 발현하도록 유전적으로 변형된 유기체(genetically modified organism)로서, 본 발명의 목적상, 바람직하게 상기 특정유전자는 서열번호 1의 아미노산 서열을 갖는 폴리펩티드, 예컨대 인간혈청알부민을 코딩하는 유전자일 수 있다. 바람직하게 상기 유전적으로 변형된 유기체는 형질전환시킨 박테리아, 균류 및 효모 등의 세포 또는 유전자 삽입 동물(transgenic animal)일 수 있으며, 이에 제한되지 않는다. 바람직하게 상기 유전자 삽입 동물로는 마우스, 랫트, 기니피그 등의 포유동물이 사용될 수 있으며, 이에 제한되지 않는다.

[0014] 본 발명의 제조방법에 따라 열안정화된 인간혈청알부민은 이를 제제화하여 인간을 포함한 개체에 투여될 수 있다. 이 때, 상기 인간혈청알부민 제제는 현재 시판되고 있는 알부민 제제를 포함할 수 있으며, 이를 대체할 수 있도록 제조된, 시판용 알부민 제제와 유사한 성분, 기능 및 약효를 갖는 제제 역시 포함할 수 있다. 시판되고 있는 알부민 제제의 경우 제한적인 공급원인 혈액에 의존해야 하는 문제점을 안고 있으며, 이를 해결하기 위한 대안으로 재조합 인간혈청알부민을 이용한 재조합 인간혈청알부민 제제가 제조될 수 있다.

[0015] 상기 열안정화된 인간혈청알부민을 인체에 투여 가능한 제제로 제조하기 위해서는 바이러스의 오염 및/또는 기타 감염을 방지하기 위하여 열처리 과정을 필요로 한다. 그러나 보통의 단백질과 유사하게 인간혈청알부민은 고온으로 처리시 구조가 변하거나 응집되는 등 변성을 일으킬 수 있다. 따라서, 이를 안정화시키기 위한 첨가제를 필요로 하며, 현재 혈장유래 알부민 제제의 제조 공정에서는 옥탄산염, 예를 들어 옥탄산 나트륨(sodium octanoate)과 N-아세틸 트립토판(N-acetyl tryptophan) 등이 사용되고 있다. 그러나 이들 물질은, 본래 혈장 내에 존재하는 물질이 아닌 열처리 과정에 대한 안정성을 향상시키기 위하여 임의로 첨가한 물질로서, 자연적인 인간혈청알부민과는 달리, 인체 내로 투여되었을 때, 그에 따른 부작용 등이 발생할 가능성이 있다.

[0016] 따라서, 가능하다면 인간혈장유래 또는 재조합 인간혈청알부민 제제의 제조시에 자연적인 인간혈청알부민과 가장 유사한 형태와 구조를 유지할 필요가 있다. 또한, 재조합 인간혈청알부민은 인간 혈장에서 유래한 인간혈청알부민과 일부 속성이 다르므로, 재조합 인간혈청알부민 제제를 제조하기 위한 열안정화용 조성물로서 임의의 첨가물이 아닌 생체 내에 존재하는 물질을 처리하는 것이 보다 안전할 수 있다. 이에 본 발명에서는 혈장으로부터 분리한 인간혈청알부민에 결합되어 있는 것으로 확인하여 동정된 탄소수 16 내지 24의 지방산을 이용하였다.

[0017] 본 발명에서 용어, “탄소수 16 내지 24의 지방산”은 지방산 중에서 16 내지 24개의 탄소를 갖는 지방산을 총칭하는 의미로서, 일 말단에는 친수성 카르복실기 포함하며, 다른 말단은 소수성 탄소사슬로 구성된다. 이때, 탄소사슬에서 이중결합의 수와 위치에 따라 종류가 달라질 수 있으며, 바람직하게는 탄소수 16의 지방산인 팔미트산(palmitic acid), 팔미톨레산(palmitoleic acid), 탄소수 18의 지방산인 스테아르산(stearic acid; octadecanoic acid), 올레산(oleic acid), 리놀레산(linoleic acid) 및 리놀렌산(linolenic acid), 탄소수 20의 지방산인 에이코사펜타엔산(EPA; eicosapentaenoic acid) 및 탄소수 22의 지방산인 도코사헥사엔산(DHA; docosahexaenoic acid), 또는 이들의 조합으로부터 선택되는 것일 수 있으며, 이에 제한되지 않는다. 또한 상기 지방산은 약학적으로 허용가능한 염의 형태로 이용될 수 있다.

[0018] 본 발명에서 용어, “팔미트산”은 16개 탄소 사슬을 갖는 포화 지방산으로 IUPAC명으로는 헥사데칸산(hexadecanoic acid)이라고 한다. $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{14}\text{CO}_2\text{H}$ 의 화학식을 가지며, 동식물 및 미생물에서 발견되는 가장 보편적인 지방산이다. 야자나무 기름의 주성분이나 육류, 치즈, 버터 및 유제품에도 존재한다. 팔미트산의 염 및 에스테르 형태를 팔미테이트라고 한다. 염기성 pH에서는 팔미테이트 음이온의 형태로 존재한다. 체내에서 과량의 탄수화물은 팔미트산으로 전환된다. 팔미트산은 지방산 합성과정에서 생산되는 첫번째 지방산으로 장쇄 지방산의 전구물질이다. 생물학적으로 일부 단백질은 팔미토일기와 결합하여 수식될 수 있으며 이를 팔미토일화(palmitoylation)라 하고 이는 단백질의 막국부화(membrane localisation)에 중요하다.

- [0019] 본 발명에서 용어, "팔미톨레산"은 오메가-7 일불포화 지방산(omega-7 monounsaturated fatty acid), 시스-팔미톨레산, 9-시스-헥사데케노익산(9-cis-hexadecenoic acid)라고도 하며, IUPAC 명은 헥사데크-9-에노익산(hexadec-9-enoic acid)이다. 하나의 이중결합을 포함하는 탄소 16의 지방산으로 $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_5\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{CO}_2\text{H}$ 의 화학식을 가지며, 인간 지방조직의 글리세라이드(glyceride)의 성분이다. 모든 조직에 존재하여 주로 간에서 높은 농도로 발견된다. 델타-9 탈포화효소(delta-9 desaturase)의 작용에 의해 팔미트산으로부터 합성된다. 유익한 지방산으로 인슐린-분비 이자베타세포의 파괴를 저해할 뿐만 아니라 염증을 억제하여 인슐린 민감성을 증가시킨다. 동식물 및 해양생물의 기름으로부터 식물 팔미톨레산을 추출할 수 있다.
- [0020] 본 발명에서 용어, "스테아르산"은 18개 탄소 사슬을 갖는 포화 지방산으로 IUPAC 명으로는 옥타데칸산(octadecanoic acid)이라고 한다. $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{16}\text{CO}_2\text{H}$ 의 화학식을 갖는 납질의 고체(waxy solid)이다. 이의 염 및 에스테르는 스테아레이트(stearate)라고 한다. 상기 스테아르산은 팔미트산과 더불어 자연계에 가장 널리 존재하는 포화 지방산 중 하나이다. 금속 이온과 결합할 수 있는 극성 머리부분과 유기 용매에 대한 용해도를 제공하는 비극성 사슬을 가지므로 이중 기능성을 갖는다. 이러한 특성으로 인해 계면활성제 또는 유연제로 사용될 수 있다.
- [0021] 본 발명에서 용어, "올레산"은 다양한 동식물의 유지로부터 생산되는 무색무취의 오일이다. 시판되는 제품은 노란색을 띠기도 한다. 화학적으로 일불포화 오메가-9 지방산(monounsaturated omega-9 fatty acid)로 분류되며 $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_7\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{CO}_2\text{H}$ 의 화학식을 갖는다. 한편 올레산은 인간 지방조직에서 가장 풍부한 지방산이다.
- [0022] 본 발명에서 용어, "리놀레산"은 불포화 n-6 지방산이며 실온에서는 무색의 액체이다. 상기 리놀레산은 체내에서 다른 음식성분으로부터 합성될 수 없는 필수 지방산 중 하나이다. 특히 아라키돈산 나아가 일부 프로스타글란딘의 합성에 사용되는 다중불포화 지방산이다. 세포막 지질에서 발견되며 식물성 오일에 풍부하다. 화학적으로 18개 탄소를 구성된 사슬과 두 개의 시스(cis) 이중결합을 갖는 카르복시산으로 첫번째 이중결합은 소수성 말단인 메틸말단으로부터 6번째 탄소에 위치한다.
- [0023] 본 발명에서 용어, "리놀렌산"은 α 와 γ 의 두 가지 형태의 리놀렌산을 총칭하거나 이의 혼합물을 일컫는 말이다. 상기 리놀렌산은 보통 에스테르 형태(linolenate)로 식물성 오일에 존재한다. 이중 α -리놀렌산은 18개 탄소 사슬 및 3개의 시스 이중결합을 갖는 카르복시산으로, 첫 번째 이중결합은 메틸말단 즉, n-말단으로부터 3번째 탄소에 위치하는 다중불포화 n-3 지방산이며, 올-시스-9,12,15-옥타데카트리에노산(all-cis-9,12,15-octadecatrienoic acid)의 화학식명을 갖는다. 이의 이성질체(isomer)인 γ -리놀렌산은 상기 α -리놀렌산과 동일한 수의 이중결합을 포함하는 동일한 탄소수의 사슬을 갖지만 첫 번째 이중결합이 n-말단으로부터 6번째 탄소에 위치하는 다중불포화 n-6 지방산으로, 사슬 내에서 이중결합의 위치가 서로 상이하다. γ -리놀렌산은 가몰렌산(gamolenic acid)라고도 불리며, 염증성 및 자가면역성 질환에 대한 효과를 나타내는 것으로 알려져 있다.
- [0024] 본 발명에서 용어, "EPA(에이코사펜타엔산; eicosapentaenoic acid)"는 오메가-3 지방산으로 팀노돈산(timnodonic acid)라고도 하며, 화학구조는 20개 탄소 사슬에 5개 시스 이중결합을 갖는 카르복시산이다. 첫 번째 이중결합은 오메가 말단 즉, 탄화수소 말단으로부터 세 번째 탄소에 위치한다. EPA는 다중불포화 지방산(polyunsaturated fatty acid; PUFA)으로 아이코사노이드(eicosanoid)인 프로스타글란딘-3(prostaglandin-3; 혈소판응고 억제), 트롬복산-3(thromboxane-3) 및 류코트리엔-5(leukotriene-5)의 전구체로 작용한다. 해초류 및 생선류 특히 생선 오일에 다량 존재하며 인간의 모유에도 존재한다. 생선은 자연적으로 EPA를 생산하지 못하나 이들이 소비하는 조류(algae)로부터 획득한다. 인간 체내에서 알파-리놀렌산을 EPA로 전환할 수 있으나, 효율이 매우 낮다. 한편, EPA는 DHA의 전구체로 작용한다.
- [0025] 본 발명에서 용어, "DHA(도코사헥사엔산; docosahexaenoic acid)"는 역시 인간 뇌, 대뇌피질, 피부, 정자, 고환 및 망막의 일차적 구성요소인 오메가-3 지방산이다. 알파-리놀렌산으로부터 합성되거나, 모유 또는 생선 오일로부터 직접 얻을 수 있다. 화학적 구조는 22개 탄소 사슬에 6개 시스 이중결합을 갖는 카르복시산이다. 첫 번째 이중결합은 오메가 말단 즉, 탄화수소 말단으로부터 세 번째 탄소에 위치한다. 관용명으로는 세르본산(cervonic acid), IUPAC 명으로는 (4Z,7Z,10Z,13Z,16Z,19Z)-도코사-4,7,10,13,16,19-헥사엔산((4Z,7Z,10Z,13Z,16Z,19Z)-docosa-4,7,10,13,16,19-hexaenoic acid)이라고도 한다. 심해어류 오일에 풍부하게 존재하는 것으로 알려져 있다. 광합성 및 타가영양생물 미세조류로부터 유래하여 먹이사슬의 상부에 위치한 생물에 농축된다. 체내에서 알파-리놀렌산의 전환으로 생성될 수 있으며, 상기 전환율은 여성에서 15% 정도 높고, 테스토스테론을 투여하거나 테스토스테론의 에스트라다이올로의 전환을 억제하였을 경우 DHA로의 전환이 감소한다. 정자, 뇌인지질 및 망막의 주된 지방산으로, DHA를 섭취하면 혈중 트리글리세라이드 수준을 감소시킴으로써 심장병의 위험을 감소시킬

수 있다. 또한, 정상치 미만의 DHA 수준은 알츠하이머와도 관련된다.

[0026] 상기 지방산들은 지질 수에 따른 표기법에 의해 N:X(n-Y)로 표기할 수 있다. 상기 N은 전체 사슬의 탄소수 즉, 16, 18, 20 또는 22, X는 사슬 중에 포함된 이중결합의 수를 나타내며, Y는 각 지방산의 메틸말단으로부터 이중결합이 시작되는 탄소의 위치를 나타낸다. 상기 n 대신에 ω 를 쓰기도 한다. 예컨대, 본 발명의 팔미트산은 탄소수 16의 포화지방산이므로 16:0, 팔미톨레산은 메틸말단으로부터 7번째 탄소에 하나의 이중결합을 가지므로 16:1(n-7) 또는 16:1(ω -7), 스테아르산은 탄소수 18의 포화지방산이므로 18:0, 올레산은 메틸말단으로부터 9번째 탄소에 하나의 이중결합을 가지므로 18:1(n-9) 또는 18:1(ω -9), 리놀레산은 18:2(n-6) 또는 18:2(ω -6), 리놀렌산- α 는 18:3(n-3) 또는 18:3(ω -3), 리놀렌산- γ 는 18:3(n-6) 또는 18:3(ω -6), EPA는 20:5(n-3), 마지막으로 DHA는 22:6(n-3)으로 표기한다.

[0027] 본 발명에서 용어, "약학적으로 허용가능한 염"은 상기 열안정화된 인간혈청알부민의 원하는 생물학적 및/또는 생리학적 활성을 보유하고 있고, 상기 인간혈청알부민에 노출되는 세포나 인간에게 독성이 없는, 원하지 않는 독물학적 효과는 최소한으로 나타내는 모든 염을 의미한다. 염으로는 약학적으로 허용가능한 유리산(free acid)에 의해 형성된 산부가염이 유용하다. 산부가염은 통상의 방법, 예를 들어 화합물을 과량의 산 수용액에 용해시키고, 이 염을 수산화성 유기 용매, 예를 들어 메탄올, 에탄올, 아세톤 또는 아세토니트릴을 사용하여 침전시켜서 제조한다. 동 물량의 화합물 및 물 중의 산 또는 알칼리(예, 글리콜 모노메틸 에테르)를 가열하고, 이어서 상기 혼합물을 증발시켜 건조시키거나, 또는 석출된 염을 흡인 여과시킬 수 있다. 이때, 유리산으로는 무기산과 유기산을 사용할 수 있으며, 무기산으로는 염산, 히드로브롬산, 인산, 질산, 황산, 주석산 등을 사용할 수 있고, 유기산으로는 메탄 술폰산, p-톨루엔 술폰산, 아세트산, 트리프로오로아세트산, 말레인산(maleic acid), 숙신산, 옥살산, 벤조산, 타르타르산, 푸마르산(fumaric acid), 만데르산, 프로피온산(propionic acid), 구연산(citric acid), 젖산(lactic acid), 글리콜산(glycollic acid), 글루콘산(gluconic acid), 갈락투론산, 글루탐산, 글루타르산(glutaric acid), 글루쿠론산(glucuronic acid), 아스파르트산, 아스코르브산, 카본산, 바닐릭산, 히드로아이오딕산 등을 사용할 수 있으며, 이들에 제한되지 않는다.

[0028] 또한, 바람직하게는 염기를 사용하여 약학적으로 허용가능한 금속염을 만들 수 있다. 알칼리 금속 또는 알칼리 토금속염은, 예를 들어 화합물을 과량의 알칼리 금속 수산화물 또는 알칼리 토금속 수산화물 용액 중에 용해시키고, 비용해 화합물 염을 여과한 후 여액을 증발, 건조시켜 얻는다. 이때, 금속염으로서는 특히 나트륨, 칼륨 또는 칼슘염을 제조하는 것이 제약상 적합하나 이들에 제한되는 것은 아니다. 또한, 이에 대응하는 은염은 알칼리 금속 또는 알칼리 토금속 염을 적당한 은염(예, 질산은)과 반응시켜 얻을 수 있다.

[0029] 상기 탄소수 16 내지 24의 지방산 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염은 달리 지시되지 않는 한, 탄소수 16 내지 24의 지방산에 존재할 수 있는 산성 또는 염기성기의 염을 포함한다. 예를 들어 약학적으로 허용가능한 염으로는 히드록시기의 나트륨, 칼슘 및 칼륨염 등이 포함될 수 있고, 아미노기의 기타 약학적으로 허용가능한 염으로는 히드로브로마이드, 황산염, 수소 황산염, 인산염, 수소 인산염, 이수소 인산염, 아세테이트, 숙시네이트, 시트레이트, 타르트레이트, 락테이트, 만델레이트, 메탄술포네이트(메실레이트) 및 p-톨루엔술포네이트(토실레이트)염 등이 있으며 당업계에서 알려진 염의 제조 방법을 통하여 제조될 수 있다. 바람직하게는 알칼리 금속 또는 알칼리 토금속 염일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0030] 본 발명에서 사용되는 용어, "처리"는 열안정화를 위하여 탄소수 16 내지 24의 지방산 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 화학적, 생물학적 작용 등 어떠한 형태로든 포함시키는 모든 과정을 총칭하는 의미이다. 예컨대, 열안정화된 인간혈청알부민을 제조하기 위한 배양과정에서 이를 배지 조성물에 포함시키거나, 인간혈청알부민의 가공과정에서 조성물의 형태로 포함시키는 등 열처리 이전의 어떠한 단계에서든지 적용시킬 수 있다.

[0031] 바람직하게 본 발명의 열안정화된 인간혈청알부민은, 알부민에 대해 상기 지방산 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염이 1:0.5 내지 1:2의 물비가 되도록 처리될 수 있으며, 바람직하게는 1:0.7 내지 1:1.5, 보다 바람직하게는 1:0.8 내지 1:1.2, 가장 바람직하게는 1:1의 물비가 되도록 처리될 수 있으나 이에 제한되지 않는다.

[0032] 본 발명의 제조방법에서 상기 탄소수 16 내지 24의 지방산 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염은 1 내지 40 mg/mL의 인간혈청알부민에 처리하는 것을 특징으로 한다. 상기 탄소수 16 내지 24의 지방산을 1 내지 40 mg/mL의 저농도 인간혈청알부민에 처리하여, 이에 열을 가할 경우 5 내지 16 시간까지 가열 전 인간혈청알부민의 α -나선구조(α -Helix)의 80 내지 100%까지 유지할 수 있다.

[0033] 이 때, 상기 인간혈청알부민의 농도를 1 내지 40 mg/mL로 조절하기 위하여, 알부민 제제의 제조에 일반적으로 사용되는 다양한 희석 완충액이 사용될 수 있다. 이러한 희석 완충액의 예로는, 히스티딘-완충액, 시트레이트-

완충액, 숙신에이트-완충액, 아세테이트-완충액 또는 포스페이트-완충액 등을 포함할 수 있으며, 바람직하게는 50 mM 포타슘 포스페이트 및 150 mM NaCl(pH 7.5)의 혼합용액일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0034] 본 발명의 방법에 따라 제공된 열안정화된 인간혈청알부민은 전술한 바와 같이 제제화하여 인간에 투여하는 것을 목적으로 하므로, 이의 제조방법은 오염 및/또는 감염 가능성을 차단하기 위한 열처리 과정을 추가로 포함할 수 있다.

[0035] 바람직하게는 상기 인간혈청알부민을 60 내지 80℃로 가열하는 단계를 포함할 수 있고, 더욱 바람직하게는 65 내지 75℃, 가장 바람직하게는 70℃로 가열할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 이때, 상기 온도에서 6시간 내지 15시간 동안, 바람직하게는 8시간 내지 12시간 동안, 더욱 바람직하게는 10시간 동안 가열하였을 때에도, 상기 인간혈청알부민의 α -나선구조(α -Helix)가 유지될 수 있다.

[0036] 또한, 본 발명의 방법은 상기 열처리 과정을 거친 인간혈청알부민을 50 내지 200 mg/ml 농도로 농축하는 단계를 추가로 포함할 수 있다. 구체적으로, 상기 단계는 1 내지 40 mg/ml의 저농도의 열안정화된 인간혈청알부민을 제제화하여 인간을 포함한 개체에 투여하기 위한 적정 농도로 농축하는 단계에 해당한다.

[0037] 상기 농축단계는 일반적으로 통용되는 농축방법에 의해 이루어질 수 있으며, 그 예로 10 내지 30kD의 MWCO(Molecular Weight Cut Off)를 가지는 한외여과막을 사용하여 원심분리 방법으로 적정 농도가 될 때까지 농축할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0038] 상기 열안정화된 인간혈청알부민 제제의 적정 농도는 인간혈청알부민 제제로서 사용될 수 있는 농도라면 특별히 이에 제한되지 않으나, 50 내지 200 mg/ml 농도일 수 있다.

[0039] 본 발명의 일 실시예에서는, 1 mg/ml 농도의 인간혈청알부민에 올레산을 1:1의 물비로 처리하고 60 내지 80℃에서 10시간 동안 가열한 후, 원편광이색성 측정값으로부터 α -나선구조의 구성비를 통하여 알부민의 구조안정성을 관찰한 결과, 60℃ 및 70℃에서는 안정성이 유지되었으나 80℃ 이상에서는 안정성이 감소하였음을 확인하였다(실험예 1 내지 3, 도 1 내지 3).

[0040] 또한, 1 내지 40 mg/ml 농도의 인간혈청알부민에 올레산을 1:1의 물비로 처리하고 70℃에서 10시간동안 가열한 후에도, 안정성이 유지됨을 확인하였으며(실험예 4, 도 4), 올레산 이외에도 대표적으로 리놀레산, α -리놀레산, γ -리놀레산 및 팔미톨레산의 지방산을 처리하고, 70℃에서 10시간 동안 가열한 후에도, 안정성이 유지됨을 확인하였다(실험예 5, 도 5).

[0041] 이는 1 내지 40 mg/ml의 저농도 인간혈청알부민이 60 내지 80℃의 온도에서 올레산과 같은 탄소수 16 내지 24의 지방산의 첨가에 의해 열안정성이 현저히 높아짐을 시사한다.

[0042] 또 다른 양태로서, 본 발명은 (a) 인간혈청알부민에 탄소수 16 내지 24의 지방산 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 처리하는 단계; (b) 상기 인간혈청알부민의 농도를 1 내지 40 mg/ml 농도로 조절하는 단계를 포함하는, 열안정화된 인간혈청알부민의 제조방법을 제공한다.

[0043] 상기 탄소수 16 내지 24의 지방산, 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염 및 인간혈청알부민에 대해서는 상기에서 설명한 바와 같다.

[0044] 본 발명의 제조방법에서 상기 (a) 단계는 탄소수 16 내지 24의 지방산으로 구성된 군으로부터 선택되는 지방산 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 인간혈청알부민에 처리함으로써, 인간혈청알부민을 안정화시키는 제1단계이다.

[0045] 본 발명의 제조방법에서 상기 (b) 단계는 제1단계의 인간혈청알부민의 농도를 1 내지 40 mg/ml 농도로 조절함으로써, 장시간 열처리과정을 거쳐도 열안정화될 수 있는, 저농도의 인간혈청알부민을 제조하는 제2단계이다. 상

기 (a) 단계를 통해 탄소수 16 내지 24의 지방산, 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 처리한 인간혈청알부민을, 본 단계에서 1 내지 40 mg/ml 농도로 조절함으로써, 70℃ 이상의 고온에서도 10시간 이상 안정하게 인간혈청알부민을 열처리할 수 있다.

[0046] 본 발명의 방법은 상기 열안정화된 인간혈청알부민을 60 내지 80℃로 가열하는 단계를 추가로 포함할 수 있다. 이는 상기에서 설명한 바와 같이, 본 발명에 따른 열안정화된 인간혈청알부민을 제제화하여 인간에 투여하기 위하여 오염 및/또는 감염 가능성을 차단하기 위한 열처리 과정에 해당한다. 바람직하게는, 오염 및/또는 감염 방지를 위해 수행되는 열처리 단계는 인간혈청알부민에 탄소수 16 내지 24의 지방산을 처리하는 단계 이후에 수행될 수 있다.

[0047] 또한, 본 발명의 방법은 상기 열처리 과정을 거친 인간혈청알부민을 50 내지 200 mg/ml 농도로 농축하는 단계를 추가로 포함할 수 있으며, 이에 대하여는 상기에서 설명한 바와 같다.

[0048] 상기와 같은 과정으로 제조된 열안정화된 인간혈청알부민은 인간에 투여될 수 있으며, 이 때 바람직한 투여방식 및 제제는 정맥 주사제, 피하 주사제, 피내 주사제, 근육 주사제, 점적 주사제 등의 주사제일 수 있으며, 이에 제한되지 않는다. 주사제는 생리식염액, 링겔액 등의 수성용제, 식물유, 고급 지방산 에스테르(예, 올레인산에칠 등), 알코올 류(예, 에탄올, 벤질알코올, 프로필렌글리콜, 글리세린 등) 등의 비수성용제 등을 이용하여 제조할 수 있고, 변질 방지를 위한 안정화제(예, 아스코르빈산, 아황산수소나트륨, 피로아황산나트륨, BHA, 토코페롤, EDTA 등), 유화제, pH 조절을 위한 완충제, 미생물 발육을 저지하기 위한 보존제(예, 질산페닐수은, 치메로살, 염화벤잘코늄, 페놀, 크레솔, 벤질알코올 등) 등의 약학적 담체를 포함할 수 있으며, 이에 제한되는 것은 아니다.

발명의 효과

[0049] 본 발명의 제조방법을 이용하면, 60℃ 이상의 고온에서 10시간 이상 열처리를 하여도, 안정성이 유지된 인간혈청알부민을 제조할 수 있다. 따라서, 부작용이 없으면서도 생리활성이 유지된 인간혈청알부민 제제(예컨대, 주사제 등)의 제조에 유용하게 이용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0050] 도 1은 5가지 인간혈청알부민 검체(녹십자 알부민, A3782 알부민, A1653 알부민, 녹십자 알부민+올레산(1:1 몰비), A3782 알부민+올레산(1:1 몰비))를 60℃에서 10시간 가열하였을 때 원편광이색성을 측정된 결과를 나타낸 그래프이다.

도 2는 5가지 인간혈청알부민 검체(녹십자 알부민, A3782 알부민, A1653 알부민, 녹십자 알부민+올레산(1:1 몰비), A3782 알부민+올레산(1:1 몰비))를 70℃에서 10시간 가열하였을 때 원편광이색성을 측정된 결과를 나타낸 그래프이다.

도 3은 5가지 인간혈청알부민 검체(녹십자 알부민, A3782 알부민, A1653 알부민, 녹십자 알부민+올레산(1:1 몰비), A3782 알부민+올레산(1:1 몰비))를 80℃에서 10시간 가열하였을 때 원편광이색성을 측정된 결과를 나타낸 그래프이다.

도 4는 농도를 달리한 10가지 인간혈청알부민 검체(1 내지 45 mg/ml A3782 알부민+올레산(1:1몰비))를 70℃에서 10시간 가열하였을 때 원편광이색성을 측정된 결과를 나타낸 그래프이다.

도 5는 지방산을 달리한 5가지 인간혈청알부민 검체(A3782 알부민+올레산(1:1몰비), A3782 알부민+리놀레산(1:1 몰비), A3782 알부민+ α -리놀렌산(1:1몰비), A3782 알부민+ γ -리놀렌산(1:1 몰비), A3782 알부민+팔미톨레산(1:1 몰비))를 70℃에서 10시간 가열하였을 때 원편광이색성을 측정된 결과를 나타낸 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0051] 이하, 본 발명을 하기 예에서 보다 구체적으로 설명한다. 그러나 이들 예는 본 발명의 이해를 돕기 위한 것일 뿐, 이들에 의해 본 발명이 한정되는 것은 아니다.

[0052] 실시예 : 인간혈청알부민 검체 준비

[0053] 녹십자 알부민, A3782 알부민(Sigma), A1653 알부민(Sigma)을 각각 1mg/ml가 되도록 20mM 인산칼륨 완충액(Potassium phosphate buffer, pH 7.5)로 희석하였다. 그리고 올레산을 알부민과 몰비가 1:1이 되도록 녹십자 알부민과 A3782 알부민에 각각 가한 후 4℃에서 밤새 반응시켜, 총 5가지 인간혈청알부민 검체로 준비하였다; i) 녹십자(상온), ii) A1653 알부민, iii) A3782 알부민, iv) A3782 알부민+올레산(1:1 몰비), v) 녹십자 알부민+올레산(1:1 몰비).

[0054] 실험예 1: 인간혈청알부민의 열안정성 시험

[0055] (1) 알부민의 원편광이색성(circular dichroism) 측정 방법

[0056] 원편광이색성(Circular dichroism)은 단백질의 이차구조의 구성비를 예측할 수 있어 열 변성된 단백질의 구조 변화를 측정할 수 있다. 열 변성되지 않은 원래의 녹십자 알부민과 열 변성된 다섯 종류의 알부민 검체를 모두 0.25 mg/ml이 되도록 20mM 인산칼륨 완충액(Potassium phosphate buffer, pH 7.5)로 희석하였다.

[0057] 원편광이색성의 측정은 Jasco J-715 spectropolarimeter로 path length가 0.1cm인 quartz cuvette을 사용하였고, data pitch 0.2nm, band width 1.0nm, response time 4초, scanning speed 50 nm/min로 각 3회씩 측정하였다. 측정된 원편광이색성 측정값으로부터 이차구조의 구성비를 Dicroprot 프로그램에 포함되어 있는 SELCON3 프로그램을 이용하여 예측하였다.

[0058] (2) 60℃에서의 인간혈청 알부민의 열안정성 시험

[0059] 상기 실시예에서 준비된 5가지 인간혈청 알부민 검체(녹십자 알부민, A3782 알부민, A1653 알부민, 녹십자 알부민+올레산(1:1 몰비), A3782 알부민+올레산(1:1 몰비))를 60℃에서 10시간 가열하였다.

[0060] 이후, 상기 (1)의 방법으로 원편광이색성 측정을 한 결과, 상기 알부민 검체의 2차 구조의 구성비는 하기 표 1과 같았다.

표 1

[0061]

	α -Helix	β -sheet	Turn	poly(Pro) II	Unordered
녹십자(상온)	0.706	0.038	0.070	0.022	0.193
A1653 알부민	0.481	0.072	0.105	0.042	0.311
A3782 알부민	0.308	0.130	0.133	0.052	0.379
녹십자 알부민	0.514	0.071	0.109	0.029	0.302
A3782 알부민+올레산(1:1)	0.514	0.079	0.104	0.030	0.283
녹십자 알부민+올레산(1:1)	0.740	0.011	0.096	0.013	0.151

[0062] 그 결과, 표 1에 나타난 바와 같이 열 변성을 하지 않은 녹십자(상온) 검체에 비해 열 변성된 검체들의 α -나선 구조(α -Helix)의 비율이 대체적으로 줄어 들고, 무질서한(unordered) 구조가 증가하는 결과를 보였다.

[0063] 그러나, 녹십자 알부민+올레산(1:1) 검체는 그 비율이 녹십자(상온) 검체와 비슷하여 60℃에서 10시간 동안 가열하여도 매우 안정한 것을 알 수 있었다. 또한 A3782 알부민+올레산(1:1) 검체 역시 A3782 알부민에 비해 열 변성 후에도 α -나선구조(α -Helix)의 비율이 더 높아 열 안정성이 더 높음을 알 수 있었다. 이는 알부민에 올레산을 반응시켰을 경우 열안정성이 증가함을 시사한다.

실험예 2: 70℃에서의 인간혈청 알부민의 열안정성 시험

상기 실시예에서 준비된 5가지 인간혈청 알부민 검체(녹십자 알부민, A3782 알부민, A1653 알부민, 녹십자 알부민+올레산(1:1 물비), A3782 알부민+올레산(1:1 물비))를 70℃에서 10시간 가열하였다.

이후, 상기 (1)의 방법으로 원편광이색성 측정을 한 결과, 상기 알부민 검체의 2차 구조의 구성비는 하기 표 2과 같았다.

표 2

	α -Helix	β -sheet	Turn	poly(Pro) II	Unordered
녹십자(상온)	0.706	0.038	0.070	0.022	0.193
A1653 알부민	0.330	0.124	0.144	0.055	0.369
A3782 알부민	0.309	0.107	0.141	0.053	0.378
녹십자 알부민	0.441	0.022	0.207	0.022	0.314
A3782 알부민+올레산(1:1)	0.724	0.017	0.079	0.030	0.163
녹십자 알부민+올레산(1:1)	0.627	0.036	0.081	0.030	0.234

상기와 같이 열처리를 한 결과, 열 변성을 하지 않은 녹십자(상온) 검체에 비해 열 변성된 검체들의 α -나선구조(α -Helix)의 비율이 대체적으로 줄어 들고, 무질서한(unordered) 구조가 증가하였다.

그러나 올레산을 반응시킨 후 열처리를 한 녹십자 알부민+올레산(1:1 물비) 검체와 A3782 알부민+올레산(1:1 물비) 검체는 α -나선구조(α -Helix)의 비율이 녹십자(상온) 검체와 비슷하여 올레산을 반응시키지 않은 알부민들에 비해서 70℃에서 10시간 동안 가열하여도 매우 안정한 것을 확인하였다.

실험예 3: 80℃에서의 인간혈청 알부민의 열안정성 시험

상기 실시예에서 준비된 5가지 인간혈청 알부민 검체(녹십자 알부민, A3782 알부민, A1653 알부민, 녹십자 알부민+올레산(1:1 물비), A3782 알부민+올레산(1:1 물비))를 80℃에서 10시간 가열하였다.

이후, 상기 (1)의 방법으로 원편광이색성 측정을 한 결과, 상기 알부민 검체의 2차 구조의 구성비는 하기 표 3과 같았다.

표 3

	α -Helix	β -sheet	Turn	poly(Pro) II	Unordered
녹십자(상온)	0.706	0.038	0.070	0.022	0.193
A1653 알부민	0.270	0.127	0.149	0.054	0.390
A3782 알부민	0.217	0.143	0.178	0.043	0.432
녹십자 알부민	0.298	0.135	0.131	0.064	0.380
A3782 알부민+올레산(1:1)	0.212	0.169	0.162	0.066	0.404
녹십자 알부민+올레산(1:1)	0.132	0.223	0.188	0.061	0.404

상기 열 처리 결과, 열 변성을 하지 않은 녹십자(상온) 검체에 비해 열 변성된 모든 검체들의 α -나선구조(α -Helix)의 비율이 줄어들었고, 무질서한(unordered) 구조가 증가하였다.

다만, 60℃, 70℃에서와는 달리 녹십자 알부민+올레산(1:1 물비) 검체와 A3782 알부민+올레산(1:1 물비) 모두 α -나선구조(α -Helix)의 비율이 감소하였고, 무질서한(unordered) 구조가 증가하였다.

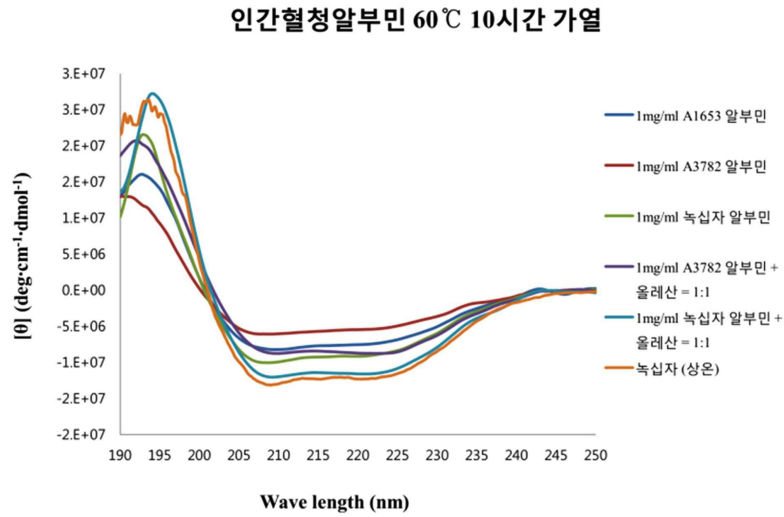
실험예 4: 열안정성이 유지되는 알부민의 농도 범위 시험

A3782 알부민(Sigma)을 1mg/ml, 5mg/ml, 10mg/ml, 15mg/ml, 20mg/ml, 25mg/ml, 30mg/ml, 35mg/ml, 40mg/ml, 45mg/ml이 되도록 20mM 포타슘 포스페이트 pH 7.5 완충액으로 희석하였다. 그리고 올레산을 알부민과 물수 비가 1:1이 되도록 A3782 알부민에 가한 후 4℃에서 밤새 반응시켰다.

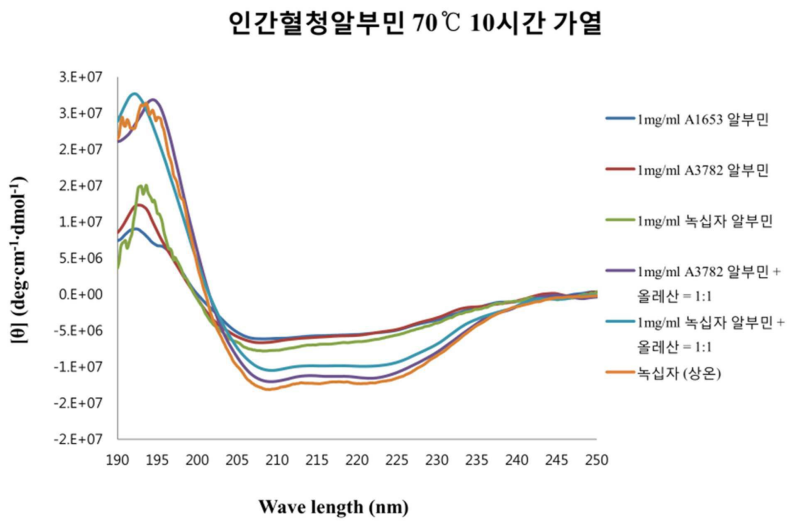
- [0078] 이후, 1mg/ml A3782 알부민+올레산(1:1몰비), 5mg/ml A3782 알부민+올레산(1:1몰비), 10mg/ml A3782 알부민+올레산(1:1몰비), 15mg/ml A3782 알부민+올레산(1:1몰비), 20mg/ml A3782 알부민+올레산(1:1몰비), 25mg/ml A3782 알부민+올레산(1:1몰비), 30mg/ml A3782 알부민+올레산(1:1몰비), 35mg/ml A3782 알부민+올레산(1:1몰비), 40mg/ml A3782 알부민+올레산(1:1몰비), 45mg/ml A3782 알부민+올레산(1:1몰비)와 같이 10종류의 검체를 70℃에서 10시간 가열하였다.
- [0079] 상기 실험예 1-(1)의 방법에 따라 알부민의 원편광이색성(circular dichroism)을 측정하였고, 그 결과, 1mg/ml A3782 알부민+올레산(1:1 몰비)의 검체는 열 변성하지 않은 녹십자 검체와 α -나선구조(α -Helix)의 비율이 비슷하였다(표 2 및 도 2). 열변성된 1 내지 45 mg/ml A3782 알부민+올레산(1:1 몰비) 검체의 원이색성편광 그래프에서 1 내지 40 mg/ml의 A3782 알부민+올레산(1:1몰비)는 1 mg/ml A3782 알부민+올레산(1:1 몰비)과 그 스펙트럼이 유사해 단백질 이차구조의 구성비가 크게 변하지 않았음을 확인하였다(도 4).
- [0080] 반면 45 mg/ml A3782 알부민+올레산(1:1) 검체는 현저히 원이색성편광의 신호가 약해져 α -Helix의 비율이 낮아지고, unordered 구조가 증가하였다. 따라서 A3782 알부민+올레산(1:1 몰비) 검체는 그 농도가 1 내지 40 mg/ml 범위 내에서 높은 열안정성이 유지됨을 확인하였다(도 4).
- [0081] **실험예 5: 탄소수 16 내지 24의 불포화지방산의 첨가에 따른 알부민의 열안정성 평가**
- [0082] A3782 알부민(Sigma)을 1mg/ml가 되도록 20mM 포타슘 포스페이트 pH 7.5 완충액으로 희석하였다. 그리고 올레산, 리놀레산, α -리놀렌산, γ -리놀렌산 및 팔미톨레산을 알부민과 물수 비가 1:1이 되도록 A3782 알부민에 가한 후 4℃에서 밤새 반응시켰다.
- [0083] A3782 알부민+올레산(1:1몰비), A3782 알부민+리놀레산(1:1몰비), A3782 알부민+ α -리놀렌산(1:1몰비), A3782 알부민+ γ -리놀렌산(1:1 몰비), A3782 알부민+팔미톨레산(1:1 몰비)와 같이 5종류의 검체를 70℃에서 10시간 가열하였다.
- [0084] 상기 실험예 1-(1)의 방법에 따라 알부민의 원편광이색성(circular dichroism)을 측정하였고, 그 결과, A3782 알부민+올레산(1:1몰비)의 검체는 열 변성하지 않은 녹십자 검체와 α -나선구조(α -Helix)의 비율이 비슷하였다(표 2 및 도 2). 열변성된 16 내지 24의 불포화 지방산을 첨가한 알부민 검체의 원편광이색성 그래프에서 올레산을 제외한 탄소수 16 내지 24의 불포화 지방산을 첨가한 검체는 대체적으로 올레산을 첨가한 검체와 원편광이색성 스펙트럼이 유사하게 나와 단백질의 이차구조에 큰 변화가 없음을 확인하였다(도 5).
- [0085] 이러한 결과는 올레산 이외에도 탄소수 16 내지 24의 지방산을 본 발명의 방법에 사용하여도 동일 또는 상응하는 효과를 얻을 수 있음을 시사하는 것이다.
- [0086] 이상의 설명으로부터, 본 발명이 속하는 기술분야의 당업자는 본 발명이 그 기술적 사상이나 필수적 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 실시될 수 있다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 이와 관련하여, 이상에서 기술한 예들은 모든 면에서 예시적인 것이며, 한정적인 것이 아닌 것으로서 이해해야만 한다. 본 발명의 범위는 상기 상세한 설명보다는 후술하는 특허청구범위의 의미 및 범위, 그리고 그 등가 개념으로부터 도출되는 모든 변경 또는 변형된 형태가 본 발명의 범위에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.

도면

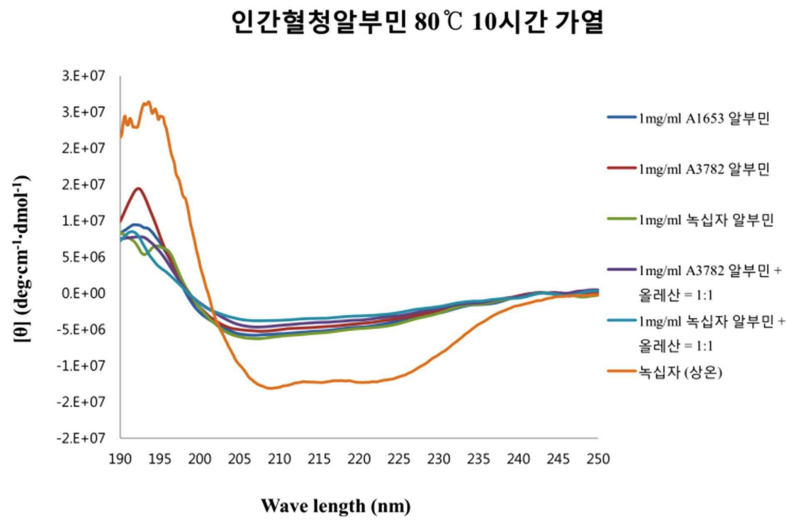
도면1



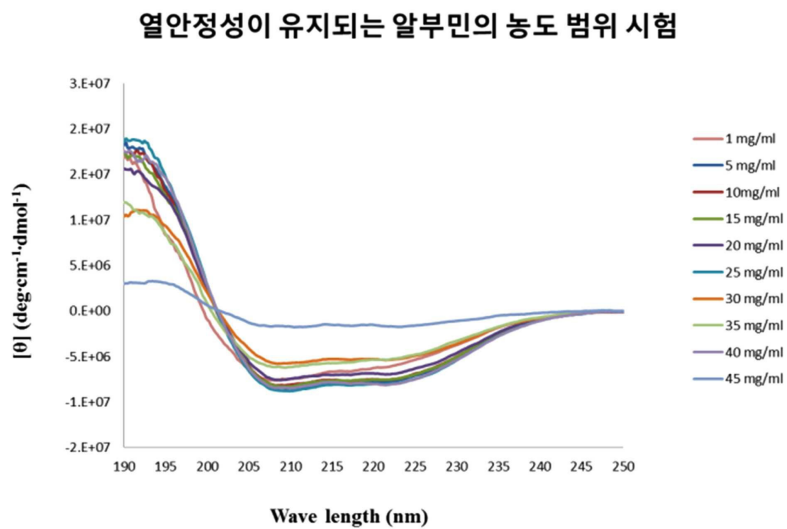
도면2



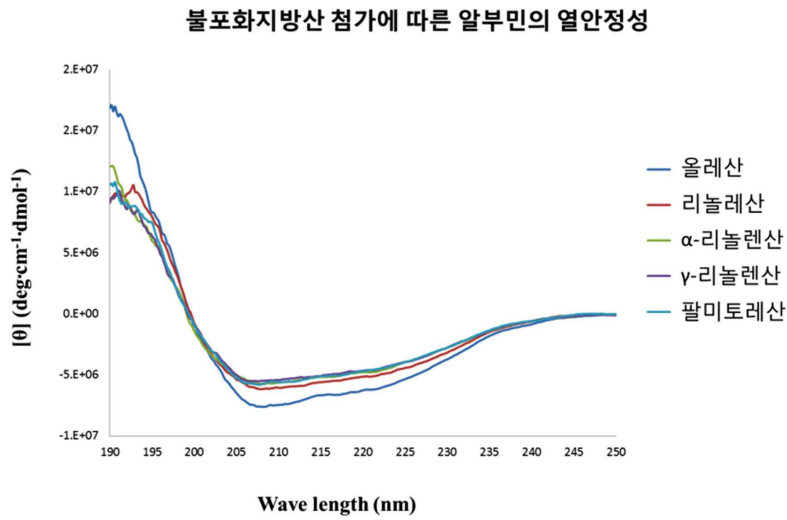
도면3



도면4



도면5



서열목록

<110> Ewha University - Industry Collaboration Foundation

<120> Method for preparing thermal-stabilized human serum albumin

<130> PA130370/KR

<160> 1

<170> Kopatent In 2.0

<210> 1

<211> 585

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Asp Ala His Lys Ser Glu Val Ala His Arg Phe Lys Asp Leu Gly Glu

1 5 10 15

Glu Asn Phe Lys Ala Leu Val Leu Ile Ala Phe Ala Gln Tyr Leu Gln

20 25 30

Gln Cys Pro Phe Glu Asp His Val Lys Leu Val Asn Glu Val Thr Glu

35 40 45

Phe Ala Lys Thr Cys Val Ala Asp Glu Ser Ala Glu Asn Cys Asp Lys

50 55 60

Ser Leu His Thr Leu Phe Gly Asp Lys Leu Cys Thr Val Ala Thr Leu

65 70 75 80

Arg Glu Thr Tyr Gly Glu Met Ala Asp Cys Cys Ala Lys Gln Glu Pro

	85	90	95
Glu Arg Asn Glu Cys Phe Leu Gln His Lys Asp Asp Asn Pro Asn Leu			
	100	105	110
Pro Arg Leu Val Arg Pro Glu Val Asp Val Met Cys Thr Ala Phe His			
115	120	125	
Asp Asn Glu Glu Thr Phe Leu Lys Lys Tyr Leu Tyr Glu Ile Ala Arg			
130	135	140	
Arg His Pro Tyr Phe Tyr Ala Pro Glu Leu Leu Phe Phe Ala Lys Arg			
145	150	155	160
Tyr Lys Ala Ala Phe Thr Glu Cys Cys Gln Ala Ala Asp Lys Ala Ala			
165	170	175	
Cys Leu Leu Pro Lys Leu Asp Glu Leu Arg Asp Glu Gly Lys Ala Ser			
180	185	190	
Ser Ala Lys Gln Arg Leu Lys Cys Ala Ser Leu Gln Lys Phe Gly Glu			
195	200	205	
Arg Ala Phe Lys Ala Trp Ala Val Ala Arg Leu Ser Gln Arg Phe Pro			
210	215	220	
Lys Ala Glu Phe Ala Glu Val Ser Lys Leu Val Thr Asp Leu Thr Lys			
225	230	235	240
Val His Thr Glu Cys Cys His Gly Asp Leu Leu Glu Cys Ala Asp Asp			
245	250	255	
Arg Ala Asp Leu Ala Lys Tyr Ile Cys Glu Asn Gln Asp Ser Ile Ser			
260	265	270	
Ser Lys Leu Lys Glu Cys Cys Glu Lys Pro Leu Leu Glu Lys Ser His			
275	280	285	
Cys Ile Ala Glu Val Glu Asn Asp Glu Met Pro Ala Asp Leu Pro Ser			
290	295	300	
Leu Ala Ala Asp Phe Val Glu Ser Lys Asp Val Cys Lys Asn Tyr Ala			
305	310	315	320
Glu Ala Lys Asp Val Phe Leu Gly Met Phe Leu Tyr Glu Tyr Ala Arg			
325	330	335	

Arg His Pro Asp Tyr Ser Val Val Leu Leu Leu Arg Leu Ala Lys Thr
 340 345 350
 Tyr Glu Thr Thr Leu Glu Lys Cys Cys Ala Ala Ala Asp Pro His Glu
 355 360 365
 Cys Tyr Ala Lys Val Phe Asp Glu Phe Lys Pro Leu Val Glu Glu Pro
 370 375 380
 Gln Asn Leu Ile Lys Gln Asn Cys Glu Leu Phe Lys Gln Leu Gly Glu

 385 390 395 400
 Tyr Lys Phe Gln Asn Ala Leu Leu Val Arg Tyr Thr Lys Lys Val Pro
 405 410 415
 Gln Val Ser Thr Pro Thr Leu Val Glu Val Ser Arg Asn Leu Gly Lys
 420 425 430
 Val Gly Ser Lys Cys Cys Lys His Pro Glu Ala Lys Arg Met Pro Cys
 435 440 445
 Ala Glu Asp Tyr Leu Ser Val Val Leu Asn Gln Leu Cys Val Leu His
 450 455 460

 Glu Lys Thr Pro Val Ser Asp Arg Val Thr Lys Cys Cys Thr Glu Ser
 465 470 475 480
 Leu Val Asn Arg Arg Pro Cys Phe Ser Ala Leu Glu Val Asp Glu Thr
 485 490 495
 Tyr Val Pro Lys Glu Phe Asn Ala Glu Thr Phe Thr Phe His Ala Asp
 500 505 510
 Ile Cys Thr Leu Ser Glu Lys Glu Arg Gln Ile Lys Lys Gln Thr Ala
 515 520 525
 Leu Val Glu Leu Val Lys His Lys Pro Lys Ala Thr Lys Glu Gln Leu

 530 535 540
 Lys Ala Val Met Asp Asp Phe Ala Ala Phe Val Glu Lys Cys Cys Lys
 545 550 555 560
 Ala Asp Asp Lys Glu Thr Cys Phe Ala Glu Glu Gly Lys Lys Leu Val
 565 570 575
 Ala Ala Ser Gln Ala Ala Leu Gly Leu
 580 585