

(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 특허공보(B1)

(51) Int. Cl.⁵
C12N 5/00

(45) 공고일자 1994년01월24일
(11) 공고번호 특1994-0000540

(21) 출원번호	특1986-0000415	(65) 공개번호	특1986-0005884
(22) 출원일자	1986년01월23일	(43) 공개일자	1986년08월13일
(30) 우선권 주장	85-17077 1985년01월30일 일본(JP)		
(71) 출원인	가부시끼가이샤 미도리 주우지 마쓰시다 렌조		
	일본국 오오사카시 히가시구 이마바시 1쥬메 15반쥬 1		

(72) 발명자 모리모토 가즈오
일본국 후쿠지야마시 오이게자카쥬 142
사가네 모토시
일본국 조요시 구세시모오따니 6-180-5
오하라 가즈히로
일본국 후쿠지야마시 히가시 히라노쥬 6 미도리쥬우지 오사다노료
나리따 쥬사꾸
일본국 후쿠지야마시 히가시 히라노쥬 6 미도리쥬우지 오사다노 샤다꾸
402
(74) 대리인 이준구, 백락신

심사관 : 김성완 (책자공보 제3518호)

(54) 플라스미노겐 활성화제 전구체의 안정화 방법

요약

내용 없음.

명세서

[발명의 명칭]

플라스미노겐 활성화제 전구체의 안정화 방법

[발명의 상세한 설명]

본 발명은 플라스미노겐 활성화제 전구체(이하 '전구체'로 약칭한다)의 안정화 방법에 관한 것이다

전구체는 생체에 존재하는 섬유소 용해 유도 효소의 하나이다. 상세한 설명은 예를들면 일본국 특허출원 제170354/83호 및 그에 상응하는 유럽 특허출원 공개 제013447호(1985.5.2 공개)에 기재되어 있다. 전구체는 그 자체로는 비활성이지만 플라스민으로 처리할때 효소활성을 나타내는 쥬모겐이다. 전구체는 예를들면 일본국 특허출원에 기재된 방법에 따라, 인간 공팔으로 부터 얻어진 전구체 생산 세포를 혈청이 없는 조직배양 배지에서 배양하여 전구체를 제조하고, 배양상층액을 단백질 정제후, 전구체를 함유한 단백질 용액을 고정된 항-전구체 항체의 컬럼을 사용하여 친화크로마토그래피 함으로써 제조될 수 있다.

이렇게 수득된 전구체는 411 아미노산을 함유한 단일사슬 구조를 가지며, 분자량이 53,000이고; 피브린에 특이한 친화성을 나타내며 항유로키나아제 항체와 면역반응을 하지 않는다는 점에서 종전의 유로키나아제(이하 UK로 약칭한다)의 특성과는 다른 특성을 갖는다.

전구체는 효소활성을 나타내지는 않지만, 전구체의 플라스민 처리에 의해 나타난 플라스마노겐 활성화제 활성이 항유로키나아제 항체에 의해 완전히 억제되기 때문에 유로키나아제의 전구체이다. 전구체는 피브린에 특이한 친화성을 가지며, 트롬부스를 구성하는 섬유인 피브린을 선택적으로 분해한다는 점에서 종전의 유로키나아제와는 상이한 트롬보리틱 특성을 갖는다. UK와는 상이한 우수한 특성을 갖는 이 전구체는 UK와는 상이한 그의 특성으로 인해 섬유소 용해유도 효소로서 임상적으로 널리 사용되는 것이 기대되고 있다. 그의 활성이 합성기질 방법에 의해 결정될 수는 없지만, 플레이팅 방법에 의해 결정될 수 있다.

일반적으로 단백질은 용액에 불안정한 경향이 있다. 전구체 또한 이와 유사한 경향이 있다. 따라서 전구체는 정제단계 또는 금속동결-용해 단계에서 변성분해 또는 역가감소의 우려가 있다.

상술한 유럽 특허출원 공보에는 전구체를 안정화시키기 위한 알부민이 기재되어 있다. 그러나 알부민은 때때로 중합체를 형성하며, 알부민이 최종 의약제제에 함유될때 항원성의 문제가 나타난다.

따라서, 본 발명의 목적은 항원성의 문제가 없는 전구체의 안정화 방법 및 안정화된 전구체를 제공

하는 것이다.

본 발명자들은 이러한 문제점을 해결하기 위해 광범위한 연구를 수행하였다. 그 결과, 젤라틴, 폴리알킬렌글리콜, 폴리옥시에틸렌-폴리옥시프로필렌 공중합체, 만델산염, 트리에탄올아민, 아세틸글리실리신메틸 에스테르의 산부가염, 구아니딘염, 티오시안산염, 알칼리금속 요오다이드 및 세린이 전구체의 안정화 효과를 갖는다는 것을 발견하였다. 본 발명은 이러한 발견을 기초로 완성되었다.

그러므로, 본 발명은 전구체의 용액에 젤라틴, 폴리알킬렌글리콜, 폴리옥시에틸렌-폴리옥시프로필렌 공중합체, 만델산염, 트리에탄올아민, 아세틸글리실리신 메틸에스테르의 산부가염, 구아니딘염, 티오시안산염, 알칼리금속 요오다이드 및 세린에서 선택된 한가지 이상의 안정화제를 가함을 특징으로 하는 플라즈미노겐 활성화제 전구체의 안정화 방법에 관한 것이다.

본 발명에 사용된 전구체는 그의 원료에 특별히 제한되지 않으며, 예를들면 혈장에서 유도된것, 인간공팔 세포를 혈청이 없는 배지에서 배양함으로써 수득된것, 및 유전공학 방법에 의해 수득된 것이다. 이와 관련하여, 공팔세포의 배양방법 및 전구체의 회수 및 경제방법이 상술한 일본국 특허출원 제170354/83호(유럽특허출원 공개 제0134447호)에 기재되어 있다.

전구체의 순도는 본 발명에서 특별히 제한되지는 않지만, 전구체의 농도(활성)가 낮을때 본 발명의 안정화 효과가 일반적으로 커진다. 예를들어 약 100-2,000IU/ml의 농도가 사용된다('IU'는 'UK'의 국제단위'의 약어이다). 1IU/ml는 1ml의 전구체 용액을 플라스민으로 처리할때 생성된 용액이 1IU의 UK에 해당하는 활성을 갖는 것을 의미한다.

본 발명에 사용된 폴리알킬렌글리콜에서 알킬렌기는 메틸렌 및 에틸렌과 같이 1-5 탄소원자를 갖는 것이 바람직하다. 이런 폴리알킬렌글리콜은 바람직하게는 3,000-10,000의 분자량을 갖는다.

폴리옥시에틸렌-폴리옥시프로필렌 공중합체는 바람직하게는 2,000-20,000의 분자량을 갖는다. 그의 특징으로는 플루로닉(등록된 상품명) F68이 있다.

사용된 만델산염의 예로는 소듐 또는 포타슘염과 같은 알칼리금속염 및 마그네슘 또는 칼슘염과 같은 알칼리토금속염이 있다.

아세틸글리실리신 메틸에스테르(Ac-Gly-Lys-OMe)의 산부가염은 생리적으로 수용가능한 염이며, 예를들면 아세테이트와 같은 유기산염 및 염산염 및 황산염과 같은 무기산염이 있다.

생리적으로 수용가능한 구아니딘염의 바람직한 예로는 산부가염, 특히 염산염 및 황산염과 같은 무기산염이 있다.

티오시안산염은 생리적으로 수용가능한 염이며, 예를들면 소듐 또는 포타슘염과 같은 알칼리금속염 및 마그네슘 또는 칼슘염과 같은 알칼리토금속염이 있다.

알칼리금속 요오다이드는 예를들면 생리적으로 수용가능한 소듐 또는 포타슘 요오다이드이다.

본 발명에 사용된 안정화제는 역가가 100-2,000IU/ml인 전구체 용액에 대해 1.5%(w/v)이상, 바람직하게는 약 1.5-20%(w/v)의 비율로 배합될때 안정화 효과를 나타낸다. 명세서 및 특허청구의 범위에서 '%(w/v)'는 100ml의 용액에 1g의 용질이 함유된 것을 의미한다.

본 발명에서 전구체를 비활성화된 조건의 어떤기간, 예를들면 전구체는 의약제제를 만들때 또는 전구체제제를 저장할때 상술한 안정화제를 가한다.

또한 본 발명에서 다른 안정화제를 가할 수 있다는 것은 말할 필요가 있다. 예를들어, 무기염(예, 염화나트륨, 시트르산나트륨) 및 유기염(예, 아스코르브산 및 글루탐산의 염)을 가할 수 있다.

본 발명에 사용된 안정화제는 전구체에 강한 안정화 작용을 나타낸다. 결과적으로 본 발명의 방법에 따라 전구체는 용액에서 그의 활성을 잃지 않으며, 동결건조 및 용해시킬때 조차도 안정하게 그의 활성을 유지한다.

[실시예 1]

일본국 특허출원 제10345/83호 기재된 방법에 의해 수득된 전구체 210IU/ml에 해당하는 양을 각종 농도의 KSCN과 혼합하고, 생성된 혼합물을 각각 2부분으로 나눈다. 한 부분을 5℃에서 30분간 유지시킨후, 역가시험 한다.

다른 부분은 건조얼음-에탄올 혼합물(약 -30℃) 및 37℃를 유지하는 온도조절장치에서 각기 3분씩 동결 및 건조시키는 것을 5회 반복한 후, 그 역가를 시험한다.

각 역가 측정의 결과는 표 1에 나타난 바와 같다. 표 1에 나타난 역가는 상술한 처리전의 역가에 대한 잔류 활성의 퍼센트로 표시한 것이다.

역가 측정의 방법은 다음과 같다.

0.1ml의 시료에 0.1ml의 플라스민 용액을 가하고 혼합물을 37℃에서 10분간 방치한다. 생성 혼합물을 1ml의 Glu-Gly-Arg-MCA(MCA : p-메틸쿠마릴아미드; p-MCA)와 혼합하고, 37℃에서 20분간 방치한다. 생성된 용액을 1.5ml의 18% 아세트산과 혼합하고, 혼합물을 370nm의 자극파장 및 460nm의 형광파장에서 형광 강도를 시험한다.

역가 결정(p-MCA 방법)을 위한 시약

(1) 젤라틴 완충용액

증류수에 6.09g의 트리스(히드록시메틸)아미노 메탄, 5.84g의 NaCl 및 10.0g의 젤라틴(Difco사제)을 용해시킨다. 용액을 2N-HCl에 의해 pH 8.60으로 조절하고, 1L가 되게 한 다음 121℃의 오토클레이

브에서 20분간 멸균시킨다.

(2) p-MCA 용액

단백질 연구촉진 연합(Protein Research Promotion Association)에서 제조한 Glu-Gly-Arg-MCA 1바이알에 1ml의 디메틸 술폭시드(DMSO) 1ml를 가하여 용액을 형성한다. 용액을 완충액(1)으로 희석하고, 100ml로 채운다. 생성된 MCA 농도는 0.1mM이다. 이 용액을 사용전에 바로 제조한다.

(3) 플라스민 용액

1바이알(250U)의 '라보캠용 플라스민'(일본국 녹십자사 제품)을 5ml을 완충용액(1)에 용해시킨다. 생성된 용액을 0.1ml씩 나누고, 저장을 위해 동결시킨다. 동결된 생성물은 사용전에 0.2CU/ml 농도가 되도록 2.4ml의 완충용액(1)을 가하여 희석한다.

(4) 18% 아세트산

아세트산 18ml를 증류수로 희석하여 100ml가 되게 한다.

[표 1]

KSCN의 농도 (% (w/v))	활성의 잔류율(%)	
	5℃에서 저장	동결-용해
0	90	64
1.0	99	67
2.5	99	88
5	100	87
10	100	90
20	100	89

[실시에 2]

일본국 특허출원 제170354/83호에 기재된 방법에 의해 수득된 740IU/ml에 해당하는 양을 각종 첨가제와 혼합하고, 생성 혼합물을 실시예 1과 같은 방법으로 안정화 효과를 시험한다. 수득된 결과는 표 2에 나타낸다.

[표 2]

첨가제	첨가제 농도 (% (w/v))	활성의 잔류율(%)	
		5℃에서 저장	동결-용해
없음	—	54	22
일부면	4.0	98	72
젤라틴	1.8	97	67
폴리에틸렌글리콜(M.W. 4000)	10	82	50
플루로닉® F681	2.0	98	91
만델산나트륨	5.0	91	76
트리에탈올아민	1.5	92	55
Ac-Gly-Lys-OMe 아세테이트	2.0	71	57
구아니딘염산염	9.5	88	61
포타슘 티오시아네이트	5.0	93	67
포타슘 요오다이드	16.6	95	58
세린	2.0	70	45

주 :

1) 플루로닉® F68은 폴리옥시에틸렌-폴리옥시프로필렌 공중합체이다.

2) 활성의 잔류율은 처리전의 값을 100%로 하여 계산된 값을 나타낸다.

(57) 청구의 범위

청구항 1

전구체의 용액에 젤라틴, 3,000~10,000의 분자량을 갖는 폴리 -C₁~C₅ - 알킬렌 글리콜, 2,000~20,000의 분자량을 갖는 폴리옥시에틸렌-폴리옥시프로필렌 공중합체, 생리적으로 수용가능한 만델산염, 트리에탄올아민, 아세틸글리실리신메틸에스테르의 생리적으로 수용가능한 산부가염, 생리적으로 수용가능한 구아니딘염, 생리적으로 수용가능한 티오시안산염, 생리적으로 수용가능한 알칼리금속 요오다이드 및 세린의 군에서 선택된 안정화제 일종 이상을 전구체를 안정화시키기에 충분한 양으로 가함을 특징으로 하는 플라스미노겐 활성화제 전구체의 안정화방법.

청구항 2

제1항에 있어서, 플라스미노겐 활성화제 전구체가 인간공팔로부터 얻은 전구체-생성세포를 혈청이 없는 조직배양배지에서 배양하여 전구체를 제조하고, 배양상층액을 단백질 정제한 후, 전구체를 함유한 단백질 용액을 고정된 항-전구체 항체의 컬럼을 사용하여 친화크로마토그래피 함으로써 수득됨을 특징으로 하는 방법.

청구항 3

제1항에 있어서, 전구체를 안정화시키기에 충분한 양이 100~2,000IU/ml의 농도의 전구체를 함유한 수용액에 대해 약 1.5%(w/v) 이상인 방법.

청구항 4

제3항에 있어서, 안정화제의 양이 약 1.5~20%(w/v)인 방법.