

(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 특허공보(B1)

(51) Int. Cl.⁴
C12N 9/00

(45) 공고일자 1989년 10월 20일
(11) 공고번호 특허 1989-0004090

(21) 출원번호	특 1986-0003300	(65) 공개번호	특 1986-0008280
(22) 출원일자	1986년 04월 29일	(43) 공개일자	1986년 11월 14일
(30) 우선권주장	P 35 15 386, 8호 1985년 04월 30일 서독(DE)		
(71) 출원인	뵐링거 만하임 게엠베하 독트르. 다움 독일연방공화국, 디-6800 만하임-발드호프, 산드호페르 스트라세 112-132 링거 만하임 게엠베하 독트르. 포우쿠에르 독일연방공화국, 디-6800 만하임-발드호프, 산드호페르 스트라세 112-132		
(72) 발명자	빌헬름 티처 독일연방공화국, 디-8123 파인센베르그, 핀켄베그 5 만프레드 글로게르 독일연방공화국, 디-8120 바일하임, 카르벤델스트라세 6 조세프 하인리 독일연방공화국, 디-8000 윈헨 90, 바이리쉬젤러 스트라세 29		
(74) 대리인	목영돈		

심사관 : 김성완 (책자공보 제 1667호)

(54) 안정화된 사르코신 산화효소의 제제

요약

내용 없음.

대표도

도 1

명세서

[발명의 명칭]

안정화된 사르코신 산화효소의 제제

[도면의 간단한 설명]

도면은 혼탁도 측정으로, 37℃ 546nm에서 흡광도를 사르코신 산화효소의 반응 시간에 대해 곡선화한 것이다.

[발명의 상세한 설명]

본 발명은 안정화된 사르코신(sarcosine) 산화효소의 제제 및 그것의 사용법에 관한 것이다.

사르코신 산화효소(E.C.1.5.3.1)(sarco-OD)는 산소 및 물과 함께 사르코신과 반응하여 포름알데히드 및 과산화수소를 생성한다. 이 반응에서 과산화수소는 평형상태로부터 쉽게 제거할 수 있으며 사르코신의 정량에 이용할 수 있다. 사르코신은 크레아틴아미디노 가수분해효소(creatineamidinohydrolase)(E.C.3.5.3.3)에 의해 크레아틴이 가수분해되고 그로부터 물과 반응하여 사르코신 및 우레아(urea)가 생성됨으로써 만들어진다. 최종적으로 크레아틴은 크레아티닌으로부터 효소반응에 의해 생성되기 때문에, 위에서 기술한 사르코신의 정량 방법은 크레아틴과 크레아티닌의 정량도 가능케한다. 혈액내의 크레아틴의 정량은 임상학적으로 상당히 중요하다.

그러나, 사르코신 산화효소를 사르코신, 크레아틴 또는 크레아티닌의 정량에 이용하기 위해서는, 실제적으로 냉동건조된 효소가 충분히 안정해야 하고 특히 용해된 상태가 안정해야 한다. 지금까지는 이러한 성질의 결여로 상기한 사르코신 정량에 사르코신 산화효소의 실제적 이용이 방해받았다. 따라서 사르코신 산화효소는 완충된 수용성액내에서 수시간 후면 뚜렷한 혼탁도의 차이를 보이며 따라서 특히 광학적인 방법의 측정에서는 반드시 고려되어야 한다. 상업적 시약으로 이용되기 위한 최소한의 안정화 기간인 수일동안의 안정화가 이루어지지 못했다.

따라서 본 발명의 목적은 상기한 결점을 없애고 상업적으로 사르코신의 정량이 가능한 안정화된 사르코신 산화효소를 제공함에 있다.

본 발명에 따라서, 수용성 다당류에 공유결합된 크레아틴아미디노 가수분해효소를 포함한 안정화된 사르코신 산화효소가 제공된다.

놀랍게도 다당류와 결합된 크레아틴아미디노 가수분해효소는 사르코신 산화효소에 의한 혼탁도의 생성을 방해한다. 이러한 효과의 이유는 공지되어 있지 않았다. 복합물으로써 두효소의 결합이 가능한 것은 한효소에 의해 생성된 사르코신이 다른효소의 기질로 직접 이용되기 때문에, 한효소의 탄수화물 부분을 불안정화 영향으로부터 다른효소를 보호할 수 있다.

따라서 다당류 및 크레아틴아미디노 가수분해효소의 공유결합 없이 본제제의 세가지 조성물을 서로 혼합하면, 혼탁도의 형성이 방해받지 않는다.

본 발명에 있어서 이용한 다당류는 가용성 녹말, 글리코겐, 덱스트란, 이눌린, 펙틴, 만난 및 갈락탄인데, 덱스트란이 바람직하다.

본 발명에 따르는 안정화된효소 제제의 특별한 잇점은 대개 농밀한 불안정화된 살코신 산화효소를 신속히 만드는 표면 활성제의 존재시에도 안정성이 증가된다는 것이다. 대개 표면 활성제는 사르코신과 같은 대사 생성물을 체액 특히 혈청내에서 정량할때 필요하기 때문에, 다른 혈청 성분에 의한 혼탁도의 형성을 막기 위해서, 이것은 본 발명에 있어서 중요한 잇점이다. 따라서 바람직한 제제는 한가지 이상의 표면활성제를 포함한다. 표면활성제로써 특히 혈청에 대해 바람직한 것은 소위 "청징제"라는 성분으로서 공지된 물질이다. 전형적인 예는 비이온성 표면활성제와 특히 코올 산군의 양이온성 표면활성제이다.

본 발명에 있어서 이용된 안정제를 생성하기 위한 크레아틴아미디노 가수분해효소와 다당류의 공유결합(다당류-효소결합)은 운반체효소를 고정화하는 방법으로 할 수 있다. 다당류로써 덱스트란을 이용하는 경우 브롬화 사아노겐 또는 트리클로로트리아진(TCT)을 통한 결합이 특히 적당한 것으로 밝혀졌으며, 결합제로 바람직하게 먼저 덱스트란과 반응시켜 상응되는 활성화된 덱스트란을 형성한 다음 수용액 상태에서 크레아틴아미디노 가수분해효소와 공유 결합시킨다. 다당류와효소의 적당한 중량비는 1 : 1에서 1 : 20정도이며 1 : 4에서 1 : 15가 바람직하다.

이것의 탁월한 안정성 때문에, 사르코신 산화효소 제제는 사르코신 산화효소에 의해 생성된 과산화수소의 정량을 위한 계와 혼합하여 사용할 수 있을 뿐아니라 완충용액과도 가능하며, 크레아티닌 정량시 크레아틴아미디노 가수분해효소와도 안정성의 감소없이 혼합하여 사용할 수 있다.

본 발명의 특징에서의 완충용액은 사르코신 산화효소와 크레아틴아미디노 가수분해효소의 안정화 특징내의 모든것을 사용할 수 있다. 바람직한 완충용액은 인산 완충용액과 트리스(Tris) 완충용액이다. 바람직한 pH범위는 7.0에서 8.5이며 특히 7.6에서 8.2가 바람직하다. 예를들어 적당한 농도는 50에서 500mmole/l이다.

과산화수소를 정량하기 위한 계에는효소 활성을 손상시키는 어떠한 성분도 포함되지 않았다. 계에 대한 전형적인 예는 H.U.Bergmeyer의 "Methoden der enzymatischen Analyse", 제4판에 기술되어 있다. 예로써 청징제는 코올산 나트륨(sodium cholate)와 같은 임의적인 코올산 군의 음이온성 표면 활성제와 함께, n-데카놀 폴리글리콜 에테르(Lutensol No 50)와 같은 비이온성 표면활성제와 2,4,6-트리브로모-3-히드로벤조산과 같은 할로겐화된 페놀로 구성된다. 마지막으로 제제는 아지드화 알칼리 금속과 같은 통상적인 방부제와 혼합될 수 있다.

본 발명의 좀 더 바람직한 구체예에 따라, 사르코신 산화효소는 교차 결합전 상태로 제제내에 존재 가능하다. 이와 같은 교차결합전의 사르코신 산화효소는 예를들어 독일연방공화국 특허 명세서 제 21 28 743 호 및 제 22 60 185호에 기재된 이중기능성의 단백질제와 반응시킴에 의해 얻을 수 있고, 글루타르디알데히드와 반응시켜 얻은 것이 특히 바람직하다. 본 발명의 사르코신 산화효소 제제의 안정성이 좀더 증가되었다.

본 발명에 있어서 표면활성제의 유무에 따른 안정화 효과는 도면으로 보여질 수 있다. 여기에서 혼탁도의 측정은 546nm의 파장에서 흡광도를 37°C에서 사르코신 산화효소의 반응시간에 대해 곡선화한 것이다. 모든 경우에 천연 사르코신 산화효소는 300mM인산 완충용액(pH7.9) 내에서 사용하였다. 곡선1은 사르코신 산화효소에 대한 것이고, 곡선2는 사르코신 산화효소+덱스트란-효소 결합체에 대한 것이고 곡선 3은 곡선1의 경우에 0.1%의 Lutensol(표면활성제)를 첨가한 것이며, 곡선4는 곡선3의 경우에 덱스트란-효소 결합체를 첨가한 것이고, 곡선5는 곡선3의 경우에 0.4%의 Lutensol을 첨가한 것이며, 곡선6은 곡선5의 경우에 덱스트란-효소 결합체를 첨가한 것이다. 이때 덱스트란-효소 결합체의 양은 모든 경우에 12U/ml이며 사르코신 산화효소의 양은 6.5U/ml이고 크레아틴아미디노 가수분해효소의 농도는 12U/ml이다. 결합체내의효소 대 덱스트란의 비는 1 : 40이다.

곡선에서 보는바와 같이 주어진 온도에서 90분동안 천연 사르코신 산화효소의 혼탁도는 덱스트란-효소결합체가 안정제로써 존재할때보다 이미 2배 만큼 크다. 표면 활성제가 존재할 경우, 안정제가 존재하지 않을 때의 혼탁도는 15분경과후, 이미 측정한계를 초과할 정도로 강력하였다. 반면 표면활성제와 안정제가 존재할 경우, 초기에는 혼탁도가 확실히 증가하였으나 약 40분 이후에는 더 이상의 증가가 없었다. 따라서 본 발명은 사르코신, 크레아틴 혹은 크레아티닌의 정량에 충분히 안정한 시약의 획득이 가능하며 사르코신 산화효소에 의해 사르코신의 정량이 가능하며 이로부터 크레아틴 및 크레아티닌의 정량이 실질적으로 유용하게 되었다.

다음의 실시예는 이러한 목적을 위한 본 발명의 상세한 설명이다.

[실시예 1]

안정제의 제조

가용성 덱스트란(Roth, Karlsruhe) 중 평균 분자량이 10,000 : 20,000, 40,000과 50,000의 것을 pH10.6이 되게 하였다. 교반하는 동안 총량 36 내지 60g의 브롬화시아노겐을 40분마다 12g씩 첨가하였다. pH값

을 2N수산화나트륨 용액으로 pH10.6을 유지하였다. 더이상의 수산화나트륨 용액이 소비되지 않을때 활성화 반응은 끝난다.

2mole/l염산용액으로 pH를 8.0으로 맞추면 맑은 용액이 얻어지며 활성화된 덱스트란은 20℃에서 2시간 동안 물에 대해 투석함으로써 얻어진다.

냉동건조된 상태의 44.47g의 상업적으로 판매되고 효소 단백질 24g에 상당하는 크레아틴아미디노 가수분해효소(4.2U/mg ; 0.54mg.단백질/mg.냉동건조물)를 250ml의 20mmole/l 인산완충용액(pH8.0)에 녹이고 20l의 동일한 완충용액에 대해 투석한다. 이렇게 얻어진 효소용액을 활성화된 덱스트란 용액과 혼합하여 상온에서 16시간 동안 천천히 교반한다. 얻어진 덱스트란-효소 결합체는 0.04mole/l 시트르산나트륨 완충용액(pH5.8)에 대해 3시간 동안 투석한다. 여기서 24g의 라피노스(raffinose)를 첨가한 후 용액을 여과에 의하여 정제하고 냉동건조시킨다. 냉동건조체에는 80%의 효소 활성이 남아 있다.

[실시예 2]

시약을 혼합함으로써 생성된 안정화된 사르코신 산화효소제제는 크레아티닌의 정량에 적당하며 수용액상태로서 다음과 같은 조성물을 지닌다.

6.5U/ml	사르코신 산화효소
12U/ml	크레아틴아미디노 가수분해효소-덱스트란 결합체
25U/ml	크레아틴아미디노 가수분해효소
2U/ml	과산화효소

칸디다 실린드라세(candida cylindracea)로부터의 콜레스테롤 에스테라제(cholesterol esterase)

150mmole/l	인산칼륨 완충용액(pH7.9)
0.3%	Lutensol ON 50
8.6mmole/l	2,4,6-트리브로모-3-히드록시벤조산.
5mmole/l	코올산나트륨
0.5mmole/l	Titriplex III
0.2%	아지드화나트륨
10 T1 mole/l	페로시아화칼륨

위의 시약은 냉동건조되어 있다 물을 탄후 얻어진 용액은 크레아티닌의 광학적 정량을 위해 적어도 2일간은 사용가능하다.

(57) 청구의 범위

청구항 1

수용성 다당류에 공유결합된 크레아틴아미디노 가수분해효소를 포함하는 안정화된 사르코신 산화효소제제.

청구항 2

제1항에 있어서, 수용성 다당류는 가용성 녹말, 글리코겐, 덱스트란, 이눌린, 펙틴, 만난 또는 갈락탄인 사르코신 산화효소 제제.

청구항 3

제1항 혹은 제2항에 있어서, 표면 활성제를 포함하는 사르코신 산화효소 제제.

청구항 4

제1항에 있어서, 브롬화 시아노겐 또는 트리클로로트리아진으로 활성화된 덱스트란과 결합된 크레아틴아미디노 가수분해효소를 포함한 사르코신 산화효소 제제.

청구항 5

제1항에 있어서, 크레아틴아미디노 가수분해효소, 완충용액 및 과산화수소 정량을 위한 계를 포함하는 살코신 산화효소 제제.

청구항 6

제1항의 사르코신 산화효소 제제 및 크레아틴아미디노 가수분해효소, 완충액 및 H₂O₂를 정량하는 계(system)를 포함하는 시약을 사용하여 크레아티닌을 정량하는 방법.

도면

도면1

