(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(51) 。Int. Cl. [7]
C12N 9/70

(11) 공개번호 특2002-0007231
(43) 공개일자 2002년01월26일

(21) 출원번호 10-2001-0046671
(22) 출원일자 2001년08월01일

(71) 출원인 이병철
경기도 수원시 장안구 영화동 31 삼원아파트 2-405

(72) 발명자 이병철
경기도수원시장안구영화동31삼원아파트2동405호

심사청구 : 있음

(54) 스트렙토키나제의 정제방법

요약

본 발명은 스트렙토코커스 속 미생물로부터 유래한 스트렙토키나제의 정제방법에 관한 것으로 더 상세하게는 인체 주사제 용도로 사용하기 위해서는 최종적으로 정제된 최종산물에는 스트렙토도르나제 뿐 아니라 여러 불순물들, 특히 인체에 악영향을 미치는 스트렙토리신(용혈독소, streptolysin 0), 내독소(endotoxin), 발열물질(pyrogen) 등이 제거되고 스트렙토키나제 만이 고농도로 존재하여야 하는데 본 발명은 바로 이러한 물질들을 효과적으로 제거하고 스트렙토키나제 만을 고순도로 정제하는 방법을 제공하는 것이다.

이를 위하여 본 발명은, 첫째, 양이온과 음이온 교환수지를 사용한 이온크로마토그라피법을 이용하여 불순물을 제거하는 단계, 둘째, 스트렙토리신을 제거하기 위하여 콜레스테롤을 농축액에 첨가하고 열처리를 가하는 단계, 셋째, 분자량의 차이를 이용한 한외여과막을 이용한 내독소 및 발열물질을 제거하는 단계를 고안, 발명함으로서 주사제 용도의 스트렙토키나제를 함유한 혈전용해제를 제조하는 것에 특징이 있다.

색인어
스트렙토키나제, 스트렙토리신, 콜레스테롤, 내독소(endotoxin), 발열물질(pyrosen)

명세서

발명의 상세한 설명

발명의 목적

발명이 속하는 기술 및 그 분야의 종래기술

본 발명은 스트렙토코커스 속 미생물로부터 유래한 스트렙토키나제의 정제방법에 관한 것으로 더 상세하게는 인체 주사제 용도로 사용하기 위해서는 최종적으로 정제된 최종산물에는 스트렙토도르나제 뿐 아니라 여러 불순물들, 특히 인체에 악영향을 미치는 스트렙토리신(용혈독소,streptolysin 0), 내독소(endotoxin), 발열물질(pyrogen) 등이 제거되고 스트렙토키나제 만이 고농도로 존재하여야 하는데 본 발명은 바로 이러한 물질들을 효과적으로 제거하고 스트렙토키나제 만을 고순도로 정제하는 방법을 제공하는 것이다.

스트렙토키나제는 용혈성 스트렙토코커스(hemolyticStreptococcus) 속 미생물에 의해 생산되는 단백질의 일종으로 분자량이 46,000 - 50,000정도인 폴리펩타이드며 혈액성분인 플라스미노겐을 플라스민으로 활성화시키는 능력을 가지고 있어 트롬빈을 분해하는 혈전용해인자로 작용한다. 이러한 이유로 스트렙토키나제는 87년 정맥주사제용으로 FDA의 승인을 받아 미국, 유럽, 남미 등지에서 급성심근경색, 급성폐색전중 및 급성동맥폐색증 등에 적용되는 혈전용해제로 사용되는 의약품으로 년간 7천만달러 정도의 세계시장 규모를 형성하고 있으며 최근에는 임상효과와 내성이 우수한 스트렙토키나제 복합체 생산 및 개발이 이루어짐으로서 스트렙토키나제 원료 사용량이 중대되고 있다.

기존의 스트렙토키나제를 정제하는 방법들을 살펴보면 용해도, 전기적인 성질, 분자크기 및 모양의 차이, 비특이적인 물리적 상호작용 등을 이용하는 방법들이다 (미국특허 3,098,015/미국특허 3,226,304) 또한, 스트렙토키나제의 아미노산 서열중에 시스틴 잔기가 없다는 사실에 기초하여 개발된 정제방법(EP 365,278 A2, 1989) 또는 페닐세파로즈와 같은 소수성 리간드를 포함하는 매트릭스로 구성되는 겔을 이용하여 스트렙토키나제를 정제하는 방법(EP 362,696 A1, 1990) 등이 알려져 있다.

그러나, 알려진 이러한 방법들은 스트렙토키나제의 과다한 손실은 물론 더 중요하게는 불순물 및 스트렙토리신, 내독소 등의 인체에 유해한 물질을 효과적으로 제거하지 못함으로서 임상적 목적으로 사용하기에는 어려운 단점을 지니고 있다.

이런 상황 하에서 본 발명자들은 이러한 인체에 유해한 물질들(스트렙토리신, 내독소, 발열물질 등)을 제거하기 위한 방법들을 연구하던 중, 다음과 같은 방법들을 고안해 냄으로서 주사제 용도로의 사용을 가능하게 하였다. 첫째, 양이온과 음이온 교환수지를 사용한 이온크로마토그라피법을 이용하여 스트렙토도르나제, 불순물 및 스트렙토리신을 제거하기 위하여 처리했던 콜레스테롤 등을 제거하는 공정단계, 둘째, 스트렙토리신을 제거하기 위하여 콜레스테롤을 농축액에 첨가하고 열처리를 가하는 공정단계, 셋째, 막 분자량 한계의 차이를 지닌 한외여과막을 이용한 내독소 및 발열물질을 제거하는 공정단계를 고안, 발명함으로서 주사제용도의 스트렙토키나제를 함유한 혈전용해제를 제조할 수 있게 된 것이다.

특히 스트렙토리신의 제거를 위한 콜레스테롤 첨가 공정단계를 거치게 되면 스트렙토키나제의 손실은 거의 없으면서 스트렙토리신은 유럽약전에서 요구하는 수준(스트렙토리신 1 IU 이하 / 스트렙토키나제 1,000,000 IU)보다도 현저히 낮은 0.05 IU - 0.15 IU 수준을 보여준다.

본 발명의 목적은 스트렙토키나제를 고순도로 정제하며 스트렙토리신, 내독소, 발열물질을 효과적으로 제거하는 방법을 제공하는 것이다.

본 발명의 다른 목적 및 적용은 하기 발명의 상세한 설명으로부터 당업자에게 명백해질 것이다.

이에 본 발명을 보다 상세하게 설명하고자 한다. 아래에 설명하는 공정 단계는 실제 생산수준으로 적용 가능한 단계로서 실질적인 실시 예가 될 것이다.

스트렙토코커스(Streptococcus) 속 미생물을 배양하면 스트렙토키나제는 세포 내에 존재하지 않고 배양액으로 분비된다. 따라서, 이를 회수, 정제하기 위해서는 8,000 rpm의 속도로 약 8-10시간 정도 원심분리를 수행하여 균제를 제거한다. 이때 원심분리 속도와 시간에 따른 온도 상승으로 효소의 활성도가 낮아지는 위험요소를 없애주기 위해 온도는 4℃로 유지시켜 준다. 원심분리 과정에서 효과적으로 제거하지 못한 균체 및 균체 파쇄물은 막공의 크기(pore size)가 0.22㎛되는 막 여과장치를 이용함으로서 효과적으로 제거할 수 있다.

균체를 제거한 후 상등액의 농축 및 정제과정을 거치게 된다. 먼저 막의 분자량 한계가 20,000 정도 되는 한외여과(ultrafiltration)막을 사용하여 농축과정을 거침으로서 그 이하의 분자량이 되는 물질들은 버린다. 농축된 액은 음이온교환수지(DEAE ,Diethylaminoethyl)에 통과시켜 스트렙토도르나제를 스트렙토키나제와 분리시킨다. 스트렙토키나제를 생산하는 스트렙토코커스 속 미생물들의 특징은 배양액 내에 스트렙토키나제 뿐 아니라 스트렙토도르나제도 함께 분비한다는 것이다. 따라서 혈전용해제의 고순도 스트렙토키나제를 얻기 위해서는 스트렙토도르나제를 제거해야 하며 바로 본 공정단계에서 이루어진다. 농축액을 음이온교환수지에 통과시키면 수지 표면에 스트렙토키나제와 스트렙토도르나제가 흡착되어 있으며 이들 두 물질은 다음의 방법을 통해서 효과적으로 분리된다. 먼저 pH = 7.2로 조정된 0.12 몰(mole)의 인산완충용액을 통과시키면 스트렙토도르나제 만이 용출된다. 이는 폐기하거나 또는 따로 보관한 후 소염제 제조 시 사용할 수 있다. 그런 다음 pH = 7.2로 조정된 0.03 - 0.05몰(mole)의 인산완충용액을 통과시켜 컬럼을 닦아준 후 pH = 7.2로 조정된 0.15 몰(mole)의 인산완충용액을 통과시키면 스트렙토키나제가 용리되어 나온다. 이 용리된 액은 막의 분자량 한계가 10,000 정도 되는 한외여과(ultrafiltration)막을 사용하여 재농축과정을 거친다. 이 농축액은 양이온교환수지(CM, carboxy methyl)에 통과시켜 농축액에 포함되어있는 불순물을 흡착, 제거시킨다. 이때 pH = 5.5인 0.03 몰 (mole) 인산용액으로 완충액을 교체해주어야 한다. 왜냐하면 CM(carboxy methyl)재질의 수지는 pH가 5.5 되는 범위에서 기능을 발휘하기 때문이다. 그런 다음 막의 분자량 한계가 10,000 정도 되는 한외여과(ultrafiltration)막을 사용하여 농축과정을 다시 거친다. 그런 후에 이 농축액을 용혈독소인 스트렙토리신의 제거를 위해 콜레스테롤 처리를 해준다. 콜레스테롤의 처리 농도는 20리 터의 농축액 용량에 약 2-5 그램 농도 수준으로 처리해 준다. 이때 콜레스테롤은 물에는 잘 용해되지 않으므로 에탄올에 녹인 후 처리해 준다. 이렇게 처리한 후 농축액의 온도를 42℃에서 15분 간 유지시킴으로서 스트렙토리신을 제거하게 된다. 이렇게 하면 스트렙토키나제의 수율은 처리 전과 비교할 때 약 99% 이상을 보여주고 스트렙토리신은 0.1 IU 정도(스트렙토키나제 1,000,000 IU 당)의 수준을 보임으로서 매우 효과적인 공정 단계가 확립된 것이다. 15분이 경과되면 온도는 다시 냉각시킨다. 다음에 스트렙토리신 제거를 위해 사용했던 콜레스테롤의 제거를 위해 음이온교환수지(DEAE ,Diethylaminoethyl)에 통과시킨다.

통과돼서 나온 용리액은 막의 분자량 한계가 10,000과 100,000 정도 되는 두 종류의 한외여과(ultrafiltration)막에 번갈아 통과시켜줌으로서 불순물(내독소, 발열물질 등)의 제거와 스트렙토키나제의 농축과정을 거치게 되는 것이다. 즉, 내독소 및 발열물질의 분자량은 보통 100,000 이상이고 스트렙토키나제의 분자량은 보통 46,000 - 50,000 정도이기 때문에 막 분자량 한계가 100,000인 한외여과막을 통과시키면 불순물 등은 막을 통과하지 못하고 제거되며 스트렙토키나제는 용리되어 나온다. 이들 용리액을 막 분자량 한계가 10,000인 한외여과 막에 통과시키면 스트렙토키나제는 막을 통과하지 못하고 농축되는 것이다. 이 과정에서 사용되는 완충액은 pH = 7.2로 조정된 0.06 몰(mole)의 인산완충용액이다. 이러한 불순물 제거와 스트렙토키나제 농축과정은 농축액의 규격이 다음과 같은 조건에 부합될 때까지 반복한다. 즉, 스트렙토도르나제 1 IU 이하 / 스트렙토키나제 10,000 IU, 스트렙토리신 1 IU 이하/ 스트렙토키나제 1,000,000 IU, 세균 내독소(bacterial endotoxin) 8 IL 이하 / 스트렙토키나제 1,000,000 IU, 발열물질 불검출의 조건에 맞아야하는 것이다. 이렇게 농축된 액은 보통 스트렙토키나제 4,000,000 IU 이상 / 농축액 1 ㎖을 포함하게 되며 활성 특이도는 120,000 IU 이상 / 1 mg 단백질을 나타낸다.

이상의 스트렙토키나제 생산공정 단계를 간단한 순서도로 나타내면 다음과 같으며 이로서 본 공정 단계는 당 업자에게 권리가 있음이 명백해질 것이다.

발효

↓

원심분리기 [균체제거 과정]

↓

MF(membrane filtration) [균체 및 균체 파쇄물 제거과정]

↓

UF(ultrafiltration) [막 분자량 한계 20,000 /농축과정]

↓

DEAE(음이온 교환수지) [스트렙토도르나제 제거과정]

↓

UF [막 분자량 한계 10,000 /농축과정]

↓

완충용액 교환(pH 7.2를 5.5로 조정한 인산완충 용액)

↓

CM(양이온 교환수지)[불순물 제거과정]

↓

UF [막 분자량 한계 10,000 / 농축과정]

↓

콜레스테롤 처리 [스트렙토리신 제거과정]

↓

DEAE [콜레스테롤 제거과정]

↓

UF [막 분자량 한계 100,000 / 내독소 및 발열물질 제거과정]

↓

UF [막 분자량 한계 10,000 /농축과정]

↓

UF [막 분자량 한계 100,000 / 내독소 및 발열물질 제거과정]

↓

UF [막 분자량 한계 100,000 / 내독소 및 발열물질 제거과정]

↓

UF [막 분자량 한계 10,000 /농축과정]

발명이 이루고자 하는 기술적 과제

.

발명의 구성 및 작용

.

발명의 효과

.

(57) 청구의 범위

청구항 1.

스트렙토코커스 균주를 배양하고 균체를 제거한 후 농축하고 양이온 및 음이온교환수지에 통과시켜 불순물과 스트렙토도르나제를 제거하고 농축액에 콜레스테롤을 처리함으로서 스트렙토리신을 제거하여 정제함을 특징으로 하는 스트렙토키나제의 정제 방법.

청구항 2.

제1항에 있어서, 스트렙토리신의 제거를 위해 처리하는 콜레스테롤의 농도는 0.005 - 0.05 % 범위임을 특징으로 하는 방법.

청구항 3.

제1항에 있어서, 스트렙토리신의 제거를 위해 농축액에 콜레스테롤 처리를 한후 농축액의 온도를 35 - 47℃의 범위로 10 - 20분간 유지시켜줌을 특징으로 하는 방법.

청구항 4.

스트렙토도르나제의 제거과정에서 이의 제거를 위해 0.05 - 0.15 몰(mole)의 농도범위로 조정되고 pH가 6.0 - 8.0의 범위로 조정된 인산완충용액을 사용함을 특징으로 하는 방법.