

(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 특허공보(B1)(51) Int. Cl.⁵
A61K 37/02(45) 공고일자 1992년04월 10일
(11) 공고번호 특허1992-0002934

(21) 출원번호	특1984-0004074	(65) 공개번호	특1985-0000971
(22) 출원일자	1984년07월 12일	(43) 공개일자	1985년03월 14일
(30) 우선권주장	P33 25 223.8 1983년07월 13일	독일(DE)	
(71) 출원인	핵스트 아크티엔게젤샤프트	하인리히 벡커	
	독일연방공화국 데-6230 프랑크푸르트 암 마인 80 브뤼닝스트라세 45	핵스트 아크티엔게젤샤프트	베른하르트 벡크
	독일연방공화국 데-6230 프랑크푸르트 암 마인 80 브뤼닝스트라세 45		
(72) 발명자	호르스트 투로브		
	독일연방공화국 데-6233 켈크하임(타우누스)파크 스트라세 20		
(74) 대리인	이병호		

심사관 : 정진수 (책자공보 제2732호)

(54) 내변성 단백질 수용액의 제조방법

요약

내용 없음.

명세서

[발명의 명칭]

내변성 단백질 수용액의 제조방법

[발명의 상세한 설명]

본 발명은 다음 일반식 (I)의 화합물을 함유하는 분자량 8,500달톤 이상의 내변성 단백질 수용액의 제조 방법에 관한 것이다.



상기식에서, X_n은 일반식 (II) 또는 (III)의 그룹 n개가 원하는 서열로 이루어진 쇠이고,



n은 2내지 200, 바람직하게는 4내지 100, 특히 8내지 50이며, R¹은 수소, 메틸 또는 에틸이고, 라디칼 R²은 서로 동일하거나 상이할 수 있으나, 쇠성분중의 반 이상이 수소이며, R² 및 R³은 동일하거나 상이하고, 수소 또는 유기 라디칼이다.

용해된 단백질이 소수성 접촉면(수용액/공기 접촉면 포함)에서 흡착된다는 것은 공지되어 있다[참조: C.W.N.Cumper 및 A.E.Alexander, Trans. Faraday Soc.46, 235(1950)]. 단백질은 양성 물질이며, 즉 이는 친수성 및 소수성 부위를 모두 갖는다. 소수성 부위는 소수성 접촉면을 형성한다.

접촉면에서의 단백질의 흡착결과로 여러 가지의 2차 반응이 나타난다. 예를 들면, "변성(denaturing)", 즉 흡착된 단백질 분자모양의 변화(3차 및/또는 2차 구조의 변화)가 발생할 수 있다. 또한, 흡착된 단백질 분자들을 응집시키면 가용성 또는 불용성 중합체 형태가 수득될 수 있다. 따라서, 많은 단백질은 표면응집되는 것으로 알려져 있으며, 표면응집이 되었는가는, 예를들면, 수용액을 교반시키거나 진탕시킬 경우 용액의 혼탁도 또는 단백질의 생물학적 비활성으로서 알 수 있다[참조: A.F.Henson, I.R. Mitchell, P.R.Mussellwhite, J.Colloid Interface Sci, 32, 162(1970)]. 이 표면흡착 및 응집은 단백질용액의 운반장치, 예를 들면, 자동 약물 측정장치에 있어서는 특히 해롭다. 어떤 경우에는, 흡착된 단백질과 용해된 물질과의 화학반응도 또한 일어난다[참조: F.MacRitchie, J.Macromol.Sci., Chem., 4, 1169(1970)].

전술한 접촉면 처리법은 또한 단백질에 면역성(즉, 유기체에 있어 면역학적 방법 반응 유도력)을 제공할

수 있거나 기존의 면역성을 보장시킬 수 있다. 또한, 효소적 활성, 혈청학적 활성 또는 호르몬성 활성과 같은 생물학적 특성이 변화되거나 파괴될 수 있다.

특이한 형태의 소수성 접촉면은 수용액이 동결될 경우, 예를 들면 단백질의 동결건조시에 형성된다. 전술한 단백질의 변성작용은 이러한 접촉면에서 유사하게 발생할 수 있다[참조: U.B.Hansson, Acta Chem. Scand., 22, 483(1968)].

유럽 특허 제A1-18,609호에는 단백질 수용액중의 단백질의 접촉면에서의 변성을 피하기 위하여쇄 형태의 기본구조를 갖는 계면활성제(이의쇄성분의 반 이상이 메틸-치환되거나 에틸-치환된 옥시에틸렌 단위이다)를 함유하는 단백질 수용액을 기술하고 있다. 이러한 계면활성제에 의한 표면의 처리 및 단백질을 취급하고 정제하는 경우 이의 용도에 대하여도 기술되어 있다.

제W0-A1-83/00,288호에서는 또한 인슐린-측정장치용 폴리옥시에틸렌(C₈-C₁₅)-알킬 에테르를 함유하는 안정한 수성 인슐린 제제를 기술하고 있다.

본 발명은 접촉면에서의 흡착으로부터 보호되고 단백질의 변성 및 침전에 대하여 보호되는 분자량이 8,500톤이상인 단백질 수용액 및 이의 제조방법에 관한 것이며, 또한 치료용, 바람직하게는 약물투입용 측정장치에서의 이러한 안정화된 용액의 용도에 관한 것이다.

놀랍게도 분자량이 8,500톤이상인 단백질의 수용액은 다음 일반식(I)로 특징되는 물질과 혼합시킴으로써 특히 안정화될 수 있음이 밝혀졌다.



상기 일반식(I) 화합물 중에서 바람직한 화합물은 라디칼 R² 또는 R³중의 하나가 수소를 나타내는 화합물이다.

R² 또는 R³이 유기 라디칼인 경우, 이는 바람직하게는 탄소수 1내지 20의 지방족 라디칼, 탄소수 3내지 10의 지환족 라디칼, 탄소수 4내지 20의 지환족-지방족 라디칼, 탄소수 2내지 20의 지방족 에스테르 그룹, 탄소수 7내지 20의 아릴-지방족 라디칼 또는 탄소수 6내지 20의 아릴 라디칼이며, 특히 탄소수 1내지 20의 알킬, 탄소수 2내지 20의 알카노일 또는 알킬의 탄소수가 1내지 10인 알킬페닐이다.

라디칼 R² 및 R³의 예에는 메틸, 에틸, 프로필 및 부틸, 및 라우릴 알코올 또는 미리스탈 알코올로부터 유도된 라디칼; 아세트산, 프로피온산, 부티르산, 팔미트산 또는 스테아르산으로부터 유도된 카복시알킬 그룹 및 노닐 페녹시가 있다.

유럽 특허 제A1-18,609호에 공지된 첨가제와 비교하여, 이러한 형태의 안정화 첨가제는 폴리옥시에틸렌쇄(R¹-H)가 더 길기 때문에 수성 매질내에서 용해도를 증가시킨다는 장점이 있다. 또한, 전술한 형태의 안정화제가 첨가될 경우 특히 더 큰 단백질, 즉 분자량이 8,500달톤이상인 단백질은 접촉면 처리로부터 보호될 수 있다.

본 발명의 단백질용액은 또한 일반식(I)의 여러 상이한 화합물의 혼합물을 함유할 수 있다. 글리세롤, 염화나트륨, 글루코스 또는 유사한 카보하이드레이트 같은 통상의 등장성 조절제; 페놀, 크레졸 또는 메틸p-하이드록시벤조에이트 같은 통상의 방부제; 나트륨 포스페이트, 아세테이트, 시트레이트, 바비탈 또는 트리스(하이드록시메틸)-아미노메탄 같은 통상의 pH값 완충제 및 통상의 지속성(depot)작용제도 용액에 첨가할 수 있다.

본 발명은 또한 일반식(I)의 계면활성제를 단백질수용액에 첨가하는 것을 포함하는 안정한 단백질용액의 제조방법에 관한 것이다.

접촉면에서 본 발명의 계면활성제는 불력 중합체의 소수성 부위가 접촉면과 접촉부를 형성하고 친수성 폴리옥시에틸렌 부위를 수성상에 투입한 형태이므로, 이들은 용해된 단백질과 접촉면 사이의 직접적인 상호작용을 차단할 수 있다.

수성상에 투입될 수 있는 안정화제의 비교적 친수성인 큰 폴리옥시에틸렌 부위는 거친 크기의 투입량만의 접촉을 초래할 수 있으므로 보다 작은 단백질 분자는 접촉면에서 흡착될 수 있다.

따라서, 본 발명의 물질은 고분자량의 단백질 수용액을 안정화시키는 데에 특히 적절하다. 이 단백질은 하나이상의 폴리펩타이드쇄로 이루어지며 아미노산 외에도 기타의 유닛(당, 지방 등)을 함유할 수 있다.

본 발명의 계면활성제는 통상적으로 분자량이 8,500달톤이상이며 소수성 접촉면에서 흡착할 수 있는 용해된 단백질, 예를 들면, 폴리펩타이드, 구형 단백질 및 복합 단백질, 특히 글리코프로테인을 안정화시키는 데에 적절하다.

이러한 단백질의 예로는 프로테오호르몬(예: 프로인슐린 및 프리프로인슐린), 효소(예: 뉴라미니다제, 갈락토시다제, 글리코실전이효소, 아스파라기나제, 카탈라제 및 스트렙토키나제), 미오글로빈 및 기타작용을 하는 단백질(예: 여러종류의 면역 글로불린, 알부민, 혈액응고인자, 인터페론, 인터루신 및 성장 및 변이인자)이 있다. 분자량이 약 30,000이상인 단백질이 바람직하다.

또한, 본 발명은 결정화, 크로마토그래피 또는 한외여과에 의해 단백질을 정제할 경우, 상기 정의한 안정한 단백질용액의 용도에 관한 것이며, 특히 이식 또는 외부의 자동펌프와 같은 측정용장치의 치료적 목적을 위한 이의 용도에 관한 것이다.

단백질용액과 접촉된 소수성 표면은 단백질의 흡착 또는 변성을 피하기 위해 일반식(I)의 계면활성제로

전처리하는 것이 유리할 수 있다.

본 발명에 따라 사용되는 계면활성제는 알킬렌옥사이드를 알킬렌디글리콜(또는 상응하는 하이드록시화합물)에 조절하면서 첨가시키는 공지의 방법으로 제조한다. 필요한 경우 말단 하이드록시 그룹을 에스테르화 또는 에테르화시킬 수 있다. 적절한 블록 중합체의 제조방법은 실시예 1a에 제시한다.

[실시예 1]

a) 프로필렌 글리콜 152.1g 및 49% 농도 수산화칼륨 용액 125g을 질소하에 교반기, 가열조 및 환류 컨덴서 및 알킬렌 옥사이드 측정용장치를 갖춘 30 l의 유리 플라스크에 도입한다. 혼합물을 진공 증류시켜 탈수시킨다. 프로필렌 옥사이드 4,141g 및 에틸렌 옥사이드 17,170g을 120°C에서 계속 교반시키면서 서서히 가한다. 반응이 완결될 때 락트산을 첨가하여 수산화칼륨을 중화시킨다. 고휘발성 성분을 제거시키고 진공증류시켜 생성물을 건조시킨다. 분자중에 80중량%의 폴리옥시에틸렌을 함유하는 생성물의 평균 분자량은 8,750달톤이다.

b) 0.01몰 농도의 인산염 완충제(pH 7)중의 0.1% 농도 계란 알부민 용액 7ml 시료 5개 및 각 경우에 40%의 폴리에틸렌 글리콜로 양쪽에서 예비중합된, 평균 분자량이 1,750달톤이고 직쇄 폴리에틸렌 글리콜로 이루어진 0.1%의 블록 중합체(용액의 중량을 기준으로 하여)의 안정화제를 첨가한 5개의 동일 시료를 10ml의 유리 앰플중에서 융합시킨다. 회전축으로부터 20cm 떨어진 시험관 회전기상에 시험용액을 놓고 37°C의 배양기중에서 60rpm으로 회전시킨다. 안정화제가 없는 시료는 5일후, 변성 단백질에 의해 초래된 높은 혼탁도를 나타낸다. 대조적으로, 안정화제를 함유한 시료는 수개월후에 여전히 투명하다.

[실시예 2]

5%의 인체의 면역 글로불린 용액 7ml, 0.5%의 미오글로빈(말)용액 및 0.1%의 β-갈락토시다제 용액의 각각 7ml의 시료, 및 각각 50%의 폴리에틸렌 글리콜로 양쪽에서 예비중합된, 평균 분자량이 1,750달톤이고 폴리프로필렌 글리콜의 직쇄로 이루어진 0.1%의 블록 중합체(용액의 중량을 기준으로 하여)가 첨가된 동일시료를 10ml의 유리 앰플중에서 융합시킨다.

실시예 1b에 기술된 바와 같이 시료를 37°C에서 진탕시킨다. 안정화제가 없는 시료는 수일후 혼탁해지며 β-갈락토시다제의 경우는 효소적 활성이 처음 값의 3% 이하로 떨어진다. 대조적으로, 안정화제를 함유하는 시료는 수주일후까지도 투명하다. 실질적으로 충분한 효소적 활성이 유지되었다.

[실시예 3]

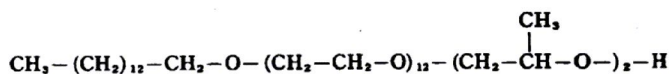
0.01M 인산염 완충제(pH 7)중의 1%인 인체 면역 글로불린을 함유하는 용액 및 안정화제로 40%의 폴리에틸렌 글리콜로 양쪽에서 예비중합된, 평균 분자량이 1,750달톤이고 직쇄 폴리프로필렌 글리콜로 이루어진 0.2%의 블록 중합체(용액의 중량을 기준으로 하여)를 제조한다.

이 용액을 자동적으로 조절되는 측정장치중에 도입한다. 37°C의 배양기중의 모의 교반장치에서 수주일간 측정장치는 투명한 용액을 운반한다. 면역 글로불린 함량은 운반된 투명 용액내에 측정한다. 면역 글로불린 함량은 처음 값과 일치한다.

안정화제가 없는 1% 농도의 면역 글로불린 용액으로 이 실험을 반복한다. 이 경우, 수일후 측정장치의 운반관 중에서 침전이 형성된다. 투명한 상층액은 실질적으로 이미 면역 글로불린을 함유하지 않는다.

[실시예 4]

각각 인산염 완충제(pH 7)중에 350,000단위의 인체의 섬유아세포 인터페론 용액 7ml 시료 5개 및 다음 구조식(IV)의 화합물 0.01%(용액의 중량을 기준으로 하여)을 추가로 함유하는 5개의 유사한 시료를 10ml의 유리 앰플중에서 융합시킨다.

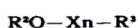


실시예 1b에 기술된 바와 같이 시험용액을 37°C에서 회전시킨다. 5개의 비-안정화된 시료에서, 2일후 95%이상의 생물학적 활성의 손실이 측정되었다. 안정화제를 함유하는 5개의 시료에서는 인터페론의 생물학적 활성이 수주일까지도 불변했다.

(57) 청구의 범위

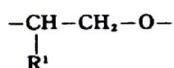
청구항 1

단백질 수용액의 일반식(I)의 계면활성제 화합물을 첨가함을 특징으로 하여, 일반식(I)의 화합물을 함유하는 분자량이 8,500달톤이상인 단백질의 안정한 수용액을 제조하는 방법.

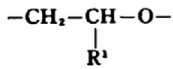


(I)

상기식에서, X_n은 일반식(II) 또는 (III)의 그룹 n개가 원하는 서열로 이루어진 쇠이고,



(II)



(III)

n은 2내지 200이며, R^1 은 수소, 메틸 또는 에틸이고, 라디칼 R^1 은 서로 동일하거나 상이할 수 있으나, 성분중의 반 이상이 수소이며, R^2 및 R^3 는 동일하거나 상이하고, 수소 또는 탄소수 1내지 20의 지방족 라디칼, 탄소수 3내지 10의 지환족 라디칼, 탄소수 4내지 20의 지환족-지방족 라디칼, 탄소수 2내지 20의 지방족 에스테르 그룹, 탄소수 7내지 20의 아릴-지방족 라디칼 또는 탄소수 6 내지 20의 아릴 라디칼이다.

청구항 2

제1항에 있어서, R^2 및 R^3 가 서로 독립적으로 수소, 탄소수 1내지 20의 알킬, 탄소수 2내지 20의 알카노일, 또는 알킬의 탄소수가 1내지 10인 알킬페닐인 방법.

청구항 3

제1항에 있어서, 수용액이 2개이상의 상이한 일반식 (I) 화합물의 혼합물을 함유하는 방법.

청구항 4

제1항에 있어서, 수용액이 등장성 조절제로서 글리세롤, 염화나트륨, 글루코스 또는 유사한 카보하이드레이트; 방부제로서 페놀, 크레졸 또는 메틸 p-하이드록시벤조에이트; 완충제로서 나트륨 포스페이트, 아세테이트, 시트레이트, 바비탈 또는 트리스-(하이드록시메틸)아미노메탄; 또는 이들의 혼합물을 함유하는 방법.

청구항 5

제1항에 있어서, 수용액이 2개이상의 상이한 단백질을 함유하는 방법.

청구항 6

제1항에 있어서, n이 4내지 100인 방법.

청구항 7

제6항에 있어서, R^2 및 R^3 가 서로 독립적으로 수소, 탄소수 1내지 20의 알킬, 탄소수 2내지 20의 알카노일, 또는 알킬의 탄소수가 1내지 10인 알킬페닐인 방법.