



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2014-0116358
(43) 공개일자 2014년10월02일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 38/38 (2006.01) A61K 47/12 (2006.01)
A61K 9/20 (2006.01) A61K 38/17 (2006.01)
A61K 35/16 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2014-0033638
(22) 출원일자 2014년03월21일
심사청구일자 2014년03월21일
(30) 우선권주장
1020130030338 2013년03월21일 대한민국(KR)

(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

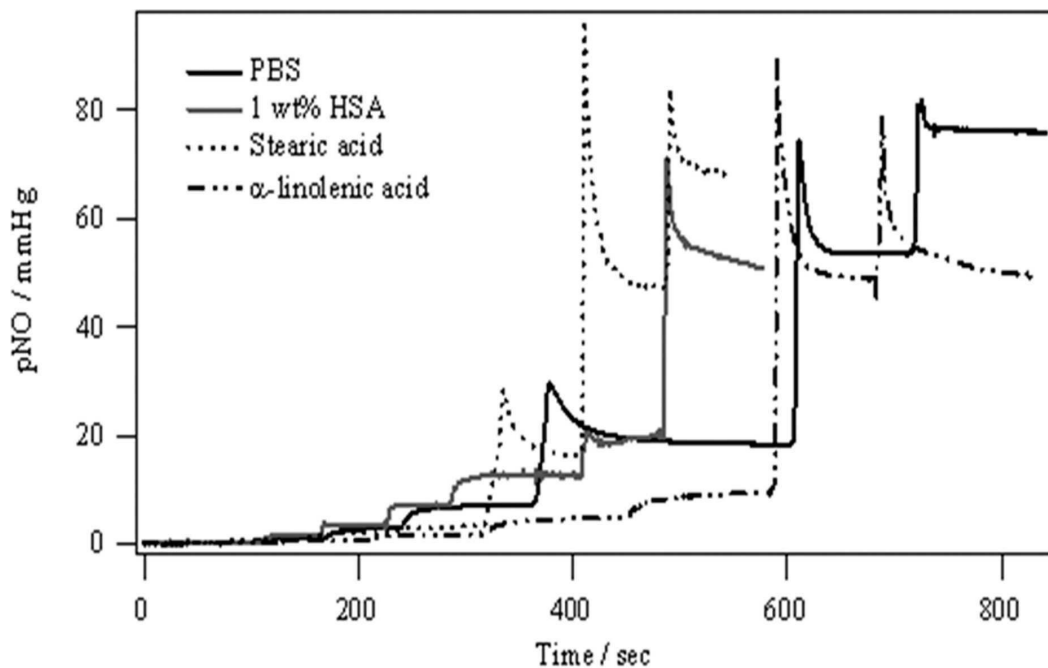
전체 청구항 수 : 총 14 항

(54) 발명의 명칭 신규한 기능성 알부민 제제 및 이의 제조 방법

(57) 요약

본 발명은 신규한 기능성 알부민 제제, 이의 제조 방법 및 상기 제제의 용도에 관한 것이다.

대표도 - 도5



(72) 발명자

이영미

서울 강남구 영동대로 210, 3동 505호 (대치동, 쌍
용아파트)

김미선

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

임진경

서울 양천구 목동서로 130, 410동 207호 (목동, 목
동4단지아파트)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2010-50214

부처명 교육과학기술부

연구관리전문기관 한국과학재단

연구사업명 원천기술(특정연구)개발사업-신기술융합형성장동력사업

연구과제명 단백질 기반의 산소전달기전 확립을 통한 저산소증 치료기술 개발

기 여 율 1/1

주관기관 이화여자대학교 산학협력단

연구기간 2010.09.01 ~ 2014.06.30

특허청구의 범위

청구항 1

- (a) 인간혈청알부민을 포함하는 시료에서, 인간혈청알부민에 결합된 물질을 일부 또는 전부 제거하는 단계;
- (b) 상기 시료에 탄소수 16 내지 22의 지방산 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 첨가하는 단계; 및
- (c) 상기 시료에 열을 가하는 단계를 포함하는, 인간혈청알부민 제제의 제조 방법.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 탄소수 16 내지 22의 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 선택되는 것인 제조방법.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 염은 알칼리 금속 또는 알칼리 토금속 염인 것인 제조방법.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 지방산 또는 이의 염은 알부민에 대하여 1:0.5 내지 1:2의 몰비가 되도록 첨가하는 것인 제조방법.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 인간혈청알부민 제제의 알부민은 탄소수 16 내지 22의 지방산만이 서들러 사이트 I(sudlow's site I)에 결합되어 있고, 나머지 캐버티(cavity)가 비어있는 형태인 것인 제조방법.

청구항 6

알부민에 탄소수 16 내지 22의 지방산이 서들러 사이트 I(sudlow's site I)에 결합되어 있고, 도메인 IA 내지 도메인 IIB 부위에 옥탄산이 결합되어 있지 않은 것을 특징으로 하는 인간혈청알부민 제제.

청구항 7

인간혈청알부민을 포함하는 시료에, N-아세틸트립토판, 및 탄소수 16 내지 22의 불포화지방산 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 첨가하여 서들러 사이트 II(sudlow's site II)에 N-아세틸트립토판을 결합시키고, 서들러 사이트 I(sudlow's site I)에 탄소수 16 내지 22의 불포화지방산을 결합시키는 단계를 포함하는, 인간혈청알부민 제제의 제조방법.

청구항 8

제7항에 있어서, 상기 제조방법은 추가로 일산화질소(Nitric oxide, NO)를 처리하는 단계를 포함하는 것인 제조방법.

청구항 9

제7항에 있어서, 상기 탄소수 16 내지 22의 불포화지방산은 팔미톨레산(palmitoleic acid), 올레산(oleic acid), 리놀레산(linoleic acid), 리놀렌산(linolenic acid), EPA(eicosapentaenoic acid) 및 DHA(docosahexaenoic acid)로 구성된 군으로부터 선택된 것인 제조방법.

청구항 10

제7항에 있어서, 상기 인간혈청알부민 제제의 인간혈청알부민은 트립토판 및 탄소수 16 내지 22의 불포화지방산이 결합된 것이고, 그 외 다른 리간드는 결합되지 않은 것인 제조방법.

청구항 11

제7항에 있어서, 상기 제조방법은 추가로 상기 N-아세틸트립토판; 및 탄소수 16 내지 22의 불포화지방산이 결합된 인간혈청알부민을 포함하는 시료에 열을 가하는 단계를 포함하는, 제조방법.

청구항 12

알부민에 탄소수 16 내지 22의 불포화 지방산이 서들러 사이트 I(sudlow's site I)에 결합되어 있고, 트립토판이 서들러 사이트 II(sudlow's site II)에 결합되어 있는 것을 특징으로 하는, 인간혈청알부민 제제.

청구항 13

인간혈청알부민을 포함하는 시료에, N-아세틸-N-니트로스트립토판; 및 탄소수 16 내지 22의 불포화지방산 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 첨가하여 서들러 사이트 II(sudlow's site II)에 N-아세틸-N-니트로스트립토판을 결합시키고, 서들러 사이트 I(sudlow's site I)에 탄소수 16 내지 22의 불포화지방산을 결합시키는 단계를 포함하는, 인간혈청알부민 제제의 제조방법.

청구항 14

알부민에 탄소수 16 내지 22의 불포화 지방산이 서들러 사이트 I(sudlow's site I)에 결합되어 있고, N-아세틸-N-니트로스트립토판이 서들러 사이트 II에 결합되어 있는 것을 특징으로 하는, 인간혈청알부민 제제.

명세서**기술분야**

[0001]

본 발명은 신규한 기능성 알부민 제제, 이의 제조 방법 및 상기 제제의 용도에 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[Dugiacyk, A. *et al.*, Proc. Natl Acad. Sci. USA, 1998, 79: 71-75]. 또한 알부민은 혈장 부피를 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 불량 시 아미노산 공급원으로서의 역할을 한다[Bar-Or, D. *et al.*, Eur J. Biochem., 2001,

268: 42-47]. 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. 알부민은 또한, 보다 높은 진핵 세포의 성장에 사용되는 매체의 보충 및 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 제조된다. 정제방법으로는, 일반적으로 단백질화학에서 통상 사용되는 정제방법, 예를 들어, 염석법(salting out method), 한외여과법, 등전점침전법, 전기영동법, 이온교환 크로마토그래피법, 겔여과 크로마토그래피법, 친화(affinity) 크로마토그래피법 등을 사용할 수 있다. 실제로는 생체조직, 세포, 혈액 등으로부터 유래하는 많은 종류의 오염물질이 혼재하여 있기 때문에 인간혈청알부민의 정제는 상기 방법을 조합하여 사용한다. 그러나 이와 같이 인간 혈장으로부터 정제되는 알부민의 양은 제한적일 수밖에 없다. 따라서, 최근에는 원료를 인간 혈장에 의존하지 않는 방법으로 유전자 조작기술을 응용하여 효모[Quirk, R. *et al.*, Biotechnol. Appl. Biochem., 1989, 11: 273-287; Ken, O. *et al.*, J. Biochem., 1991, 110: 103-110; Richard, G. *et al.*, Bio/Technology, 1991, 9: 1067-1072], 대장균(*Escherichia coli*)[Lawn, R. M., Eur. Patent Appl., 1983, 73: 646; Latta, L. *et al.*, Biotechnology, 1997, 5: 1309-1314] 및 고초균(*Bacillus subtilis*)[Saunders, C. W. *et al.*, J. Bacteriol., 1987, 169: 2917-2925]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. 따라서, 열 등에 의해 쉽게 변성되고 응집되는 알부민의 특성을 고려할 때, 이러한 일련의 과정 동안 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 과정에 의한 변성을 방지하기 위하여 현재 시판되고 있는 알부민 제제는 안정화제로서 옥탄산 나트륨(sodium octanoate) 및 N-아세틸트립토판(N-acetyltryptophan)을 첨가하여 제조된다. 열처리 과정을 수반하지 않는 요오드 처리를 이용한 바이러스 불활성화 방법(미국특허 제5919907호) 및 SD(용매/세제) 방법으로 대체된 알부민을 이용하는 방법(WO 2004/071524) 등이 제시되었으나, 처리된 혈장 제제로 인한 감염 사례가 알려지지 않은 경우는 열처리 공정밖에 없으므로, 아직까지도 이러한 열처리 공정은 알부민 제제의 제조에 있어서 주요하게 사용되고 있다. 그러나, 기존 알부민의 제조 공정에서 사용되는 상기 옥탄산 나트륨 및 N-아세틸트립토판과 같은 안정화제는 알부민에 지나치게 많이 결합하여 알부민의 결합능을 저해시키며, 이러한 결합능이 감소된 알부민이 주입되는 환자는 약제학적 활성 물질의 투여 시에 알부민에 결합되지 않은 유리된 물질들에 노출되는 문제점을 수반하고 있다. 따라서, 열처리 과정에 안정하면서도 알부민의 캐비티(cavity)가 옥탄산 및 기타 리간드에 의하여 지나치게 많이 결합되어 있지 않아 우수한 결합능을 지니는 알부민 제제의 개발이 요구되어 왔다.

[0005] 이에 본 발명자들은 열처리 과정에 안정하면서도, 우수한 약리학적 효과를 수반하는 알부민 제제를 개발하기 위하여 예의 노력한 결과, 탄소수 16 내지 22의 지방산은, 알부민에 결합하여 옥탄산 나트륨 및 N-아세틸트립토판의 사용 없이도 알부민 제제를 안정하게 제조할 수 있도록 할 뿐만 아니라, 알부민에 결합된 물질을 모두 제거하고 탄소수 16 내지 22의 지방산 또는/및 트립토판만을 결합시킨 인간혈청알부민은 열에 안정할 뿐만 아니라, 우수한 NO 전달능을 지니 저산소증과 같은 질환에 알부민 제제로서 유용하게 사용할 수 있음을 확인하고, 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0006] 본 발명의 하나의 목적은 (a) 인간혈청알부민을 포함하는 시료에서, 인간혈청알부민에 결합된 물질을 일부 또는 전부 제거하는 단계; (b) 상기 시료에 탄소수 16 내지 22의 지방산 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 첨

가하는 단계; 및 (c) 상기 시료에 열을 가하는 단계를 포함하는, 인간혈청알부민 제제의 제조 방법을 제공하는 것이다.

[0007] 본 발명의 다른 목적은 알부민에 탄소수 16 내지 22의 지방산이 서들러 사이트 I(sudlow's site I)에 결합되어 있고, 도메인 IA 내지 도메인 IIB 부위에 옥탄산이 결합되어 있지 않은 것을 특징으로 하는 인간혈청알부민 제제, 구체적으로 알부민에 탄소수 16 내지 22의 지방산이 서들러 사이트 I(sudlow's site I)에 결합되어 있고, 나머지 캐버티(cavity)가 비어있는 것을 특징으로 하는, 인간혈청알부민 제제를 제공하는 것이다.

[0008] 본 발명의 또 다른 목적은 인간혈청알부민을 포함하는 시료에, N-아세틸트립토판, 및 탄소수 16 내지 22의 불포화지방산 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 첨가하여 서들러 사이트 II에 N-아세틸트립토판을 결합시키고, 서들러 사이트 I에 탄소수 16 내지 22의 불포화지방산을 결합시키는 단계를 포함하는, 인간혈청알부민 제제의 제조방법을 제공하는 것이다.

[0009] 본 발명의 또 다른 목적은 알부민에 탄소수 16 내지 22의 불포화 지방산이 서들러 사이트 I(sudlow's site I)에 결합되어 있고, 트립토판이 서들러 사이트 II(sudlow's site II)에 결합되어 있는 것을 특징으로 하는, 인간혈청알부민 제제를 제공하는 것이다.

[0010] 본 발명의 또 다른 목적은 인간혈청알부민을 포함하는 시료에, N-아세틸-N-니트로소트립토판; 및 탄소수 16 내지 22의 불포화지방산을 첨가하여 서들러 사이트 II에 N-아세틸-N-니트로소트립토판을 결합시키고, 서들러 사이트 I에 탄소수 16 내지 22의 불포화지방산을 결합시키는 단계를 포함하는, 인간혈청알부민 제제의 제조방법을 제공하는 것이다.

[0011] 본 발명의 또 다른 목적은 알부민에 탄소수 16 내지 22의 불포화 지방산이 서들러 사이트 I(sudlow's site I)에 결합되어 있고, N-아세틸-N-니트로소트립토판이 서들러 사이트 II에 결합되어 있는 것을 특징으로 하는, 인간혈청알부민 제제를 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0012] 상기의 목적을 달성하기 위한 하나의 양태로서, 본 발명은 (a) 인간혈청알부민을 포함하는 시료에서, 인간혈청알부민에 결합된 물질을 일부 또는 전부 제거하는 단계; (b) 상기 시료에 탄소수 16 내지 22의 지방산 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 첨가하는 단계; 및 (c) 상기 시료에 열을 가하는 단계를 포함하는, 인간혈청알부민 제제의 제조 방법을 제공한다.

[0013] 본 발명에서는, 탄소수 16 내지 22의 지방산이 알부민 열처리 공정에서 옥탄산 나트륨을 사용하지 않고도 안정한 알부민 제제의 제조를 가져오고, 또한 옥탄산 나트륨 등을 사용하지 않아 리간드 결합 캐버티(cavity)인 서들러 사이트 I(sudlow's site I) 또는/및 서들러 사이트 II(sudlow's site II)를 제외한 나머지 캐버티들에 충분한 결합공간을 지니는 인간혈청알부민 제제의 제조 방법을 개발하였다.

[0014] 본 발명의 용어 "인간혈청알부민"은 세포의 기본 물질을 구성하는 단백질의 하나로, 혈액 중에 매우 많이 존재하며, 간에서 생성되는 단백질을 의미한다. 상기 알부민은 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. 상기 알부민은 제재화가 가능한 모든 알부민을 포함할 수 있으나, 바람직하게는 인간 혈장으로부터 유래한 것이거나, 유전자 조작에 의해 제조된 재조합 인간혈청알부민일 수 있으며, 더욱 바람직하게는 인간 혈장 유래일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 상기 인간혈청알부민에 대한 유전적 정보는 NCBI GenBank와 같은 공지의 데이터베이스로부터 얻을 수 있으며, 그 예로 서열번호 1의 인간혈청알부민일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0015] 상기 재조합 인간혈청알부민은 인간의 혈장에서 유래한 자연적인 인간혈청알부민과 대비되기 위한 개념으로 사용되는 용어로서, 인위적으로 생산되는 인간혈청알부민을 통칭하는 의미이다. 예컨대, 서열번호 1의 아미노산 서열을 갖는 폴리펩타이드를 발현하도록 제조된 형질전환체로부터 획득한 인간혈청알부민으로서 혈장으로부터 분리된 인간혈청알부민과 동일한 아미노산 서열을 갖는다.

[0016] 본 발명에서 용어, "형질전환체(transformant)"는 유전자 조작(genetic engineering)을 통해 특정 유전자를 발

현하도록 유전적으로 변형된 유기체(genetically modified organism)로서, 본 발명의 목적상, 바람직하게 상기 특정 유전자는 서열번호 1의 아미노산 서열을 갖는 폴리펩타이드, 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 있다. 바람직하게 상기 유전자 삽입 동물로는 마우스, 랫트, 기니피그 등의 포유동물이 사용될 수 있다.

[0017] 본 발명에서 용어, "인간혈청알부민 제제"는 인간을 포함한 개체에 투여될 수 있는 형태로 제제화될 수 있는 인간혈청알부민으로 제조한 모든 제제를 포함하는 개념이다. 상기 방법으로 제조된 인간혈청알부민 제제는 서들러 사이트 I(sudlow's site I)에 탄소수 16 내지 22의 지방산이 결합되어 있고, 나머지 캐버티(cavity)에 다른 리간드가 적게 결합되어 있거나, 바람직하게는 전혀 결합되어 있지 않은 형태의 알부민을 포함하는 제제를 의미하나, 이에 제한되지 않는다. 특히, 상기 방법으로 제조된 인간 혈청 알부민 제제는 옥탄산 나트륨 및 N-아세틸트립토판이 결합되지 않은 혹은 최소량으로 결합한 형태이다. 여기서, 상기 캐버티(cavity)는 리간드 등이 결합할 수 있는 알부민 단백질 내의 부분 또는 공간 등을 의미하며, 현재 서들러 사이트 I(sudlow's site I) 및 II를 포함하여 12개가 알려져 있다. 상기 캐버티에 다른 리간드나 물질이 적게 결합되어 있는 형태의 알부민의 경우, 혈청 내에서 독소 물질과 같은 여러 물질들과 결합할 수 있는 능력이 있다.

[0018] 상기 인간혈청알부민 제제는, 인간 혈장, 또는 형질전환체의 배양액 또는 파쇄액으로부터 제조될 수 있다. 구체적으로, 인간 혈장 유래의 인간혈청알부민을 포함하는 용액을 제조하기 위해서는, 수득한 혈장에서 정제 과정을 거쳐야 하며, 정제 후 멸균 과정을 수행하여야 한다[Matejtschuk P *et al.*, Br J Anaesth., 2000 Dec; 85(6): 887-95]. 또한, 재조합 인간혈청알부민 제제를 제조하기 위해서는 인간혈청알부민을 생산하는 형질전환체의 배양액 또는 파쇄액을 정제하는 과정을 거쳐야 한다. 알부민은 지방산, 호르몬, 약물, 양이온, 빌리루빈(bilirubin), 티록신(thyroxine, T4) 등 다양한 물질에 결합할 수 있기 때문에, 특히 혈장으로부터 결합능이 향상된 인간혈청알부민 제제를 제조하기 위해서는 탄소수 16 내지 22의 지방산을 첨가하기 전에 알부민에 결합된 물질을 제거하는 단계가 필요하다.

[0019] 따라서, 상기 방법에서 (a) 단계는 인간혈청알부민을 포함하는 시료에서, 인간혈청알부민에 결합된 물질을 제거하는 단계이다.

[0020] 본 발명에서 용어, "인간혈청알부민을 포함하는 시료"는 혈청, 또는 형질전환체의 배양액 또는 파쇄액으로부터 부분 정제된 시료 등을 의미한다. 상기 혈청, 형질전환체의 배양액 또는 파쇄액에는 인간혈청알부민 외에도 다른 단백질, 지방산 등이 존재하고 있으므로 이러한 물질들을 제거할 필요가 있다.

[0021] 다만, 이러한 부분 정제 과정을 수행하여도 인간혈청알부민에는 여전히 혈청, 배양액 등에 존재하는 지방산, 비타민, 양이온 또는/및 호르몬 등이 결합되어 있기 때문에, 결합능이 우수한 알부민 제제를 제조하기 위해서는 이를 제거하는 과정이 필요하다.

[0022] 이러한 인간혈청알부민에 결합된 물질을 제거하는 방법은, 단백질의 캐버티(cavity)에 결합된 물질을 제거할 수 있는 방법이라면 제한 없이 포함하며, 그 예로 산 조건하에 활성탄을 처리하는 방법일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0023] 본 발명의 방법에서 상기 (b)는 상기 시료에 탄소수 16 내지 22의 지방산 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 첨가하는 단계이다.

[0024] 상기 (b) 단계는 알부민 제제를 감염의 위험 없이 제조하기 위해서는 열 처리에 의한 불활성화 과정이 요구되므로, 열 처리시 알부민을 안정화시키기 위하여 탄소수 16 내지 22의 지방산 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 추가하는 단계이다.

[0025] 본 발명에서 용어, "탄소수 16 내지 22의 지방산"은 지방산 중에서 16 내지 22개의 탄소를 갖는 지방산을 총칭하는 의미로서, 일 말단에는 친수성 카르복실기를 포함하며, 다른 말단은 소수성 탄소사슬로 구성된다. 이때, 탄소사슬에서 이중결합의 수와 위치에 따라 종류가 달라질 수 있으며, 바람직하게는 탄소수 16의 지방산인 팔미트산(palmitic acid) 및 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;

docosaehaenoic acid), 또는 이들의 조합으로부터 선택되는 것일 수 있다. 본 발명의 목적상 상기 탄소수 16 내지 22의 지방산은 알부민 제제의 제조 공정에서 열 안정화를 부여하는 역할을 수행하거나, 알부민의 저산소증, 저산소혈증, 폐성고혈압 또는 겸상적혈구빈혈증의 치료적 효과를 가져올 수 있는 물질이나, 이에 제한되지 않는다. 또한, 상기 탄소수 16 내지 22의 지방산은 알부민의 서둘러 사이트 I에 우선적으로 결합하는 물질을 의미한다. 본 발명에서는 상기 탄소수 16 내지 22의 지방산이 알부민의 서둘러 사이트 I에 우선적으로 결합함을 확인하였다.

[0026] 상기 본 발명에서 용어, "팔미트산"은 16개 탄소 사슬을 갖는 포화 지방산으로 IUPAC 명으로는 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 첫 번째 지방산으로 장쇄 지방산의 전구물질이다. 생물학적으로 일부 단백질은 팔미토일기와 결합하여 수식될 수 있으며 이를 팔미토일화(palmitoylation)라 하고 이는 단백질의 막 국부화(membrane localisation)에 중요하다.

[0027] 상기 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 생합성된다. 유익한 지방산으로 인슐린-분비 이자베타세포의 파괴를 저해할 뿐만 아니라 염증을 억제하여 인슐린 민감성을 증가시킨다. 동식물 및 해양생물의 기름으로부터 식용 팔미톨레산을 추출할 수 있다.

[0028] 상기 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 머리 부분과 유기 용매에 대한 용해도를 제공하는 비극성 사슬을 가지므로 이중 기능성을 갖는다. 이러한 특성으로 인해 계면활성제 또는 유연제로 사용될 수 있다.

[0029] 상기 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)으로 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.

[0030] 상기 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 생합성에 사용되는 다중불포화 지방산이다. 세포막 지질에서 발견되며 식물성 오일에 풍부하다. 화학적으로 18개 탄소로 구성된 사슬과 두 개의 시스(cis) 이중결합을 갖는 카르복시산으로 첫 번째 이중결합은 소수성 말단인 메틸 말단으로부터 6번째 탄소에 위치한다.

[0031] 상기 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 메틸 말단 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.

[0032] 상기 본 발명에서 용어, "EPA(에이코사펜타엔산; eicosapentaenoic acid)"는 오메가-3 지방산으로 틱노돈산(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.

[0033] 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, 뇌 인지질 및 망막의 주된 지방산으로, DHA를 섭취하면 혈중 트리글리세라이드 수준을 감소시킴으로써 심장병의 위험을 감소시킬 수 있다. 또한, 정상치 미만의 DHA 수준은 알츠하이머와도 관련된다.

[0034] 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 메틸 말단으로부터 이중결합이 시작되는 탄소의 위치를 나타낸다. 상기 n 대신에 ω 를 쓰기도 한다. 예컨대, 본 발명의 팔미트산은 탄소수 16의 포화지방산이므로 16:0, 팔미톨레산은 메틸 말단으로부터 7번째 탄소에 하나의 이중결합을 가지므로 16:1(n-7) 또는 16:1(ω -7), 스테아르산은 탄소수 18의 포화지방산이므로 18:0, 올레산은 메틸 말단으로부터 9번째 탄소에 하나의 이중결합을 가지므로 18:1(n-9) 또는 18:1(ω -9), 리놀레산은 18:2(n-6) 또는 18:2(ω -6), α -리놀렌산은 18:3(n-3) 또는 18:3(ω -3), γ -리놀렌산은 18:3(n-6) 또는 18:3(ω -6), EPA는 20:5(n-3), 마지막으로 DHA는 22:6(n-3)으로 표기한다.

[0035] 또한, 상기 탄소수 16 내지 22의 지방산은 약학적으로 허용 가능한 염의 형태로 사용될 수 있다.

[0036] 본 발명에서 용어, "약학적으로 허용 가능한 염"은 상기 조성물의 원하는 생물학적 및/또는 생리학적인 활성을 보유하고 있고, 상기 인간혈청알부민 제제에 노출되는 세포나 인간에게 독성이 없는, 원하지 않는 독물학적 효과는 최소한으로 나타내는 모든 염을 의미한다. 염으로는 약학적으로 허용 가능한 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 알코올(예, 글리콜 모노메틸 에테르)을 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, 트리프루오로아세트산, 말레인산(maleic acid), 숙신산, 옥살산, 벤조산, 타르타르산, 푸마르산(fumaric acid), 만데르산, 프로피온산(propionic acid), 구연산(citric acid), 젖산(lactic acid), 글리콜산(glycolic acid), 글루콘산(gluconic acid), 갈락투론산, 글루탐산, 글루타르산(glutaric acid), 글루쿠론산(glucuronic acid), 아스파르트산, 아스코르브산, 카본산, 바닐릭산, 히드로아이오딕산 등을 사용할 수 있으며, 이들에 제한되지 않는다.

[0037] 또한, 염기를 사용하여 약학적으로 허용 가능한 금속염을 만들 수 있다. 알칼리 금속 또는 알칼리 토금속 염은, 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 칼슘 염을 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.

[0038] 상기 탄소수 16 내지 22의 지방산 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염은, 달리 지시되지 않는 한, 탄소수 16 내지 22의 지방산에 존재할 수 있는 산성 또는 염기성 기의 염을 포함한다. 예를 들어 약학적으로 허용 가능한 염으로는 히드록시기의 나트륨, 칼슘 및 칼륨 염 등이 포함될 수 있고, 아미노기의 기타 약학적으로 허용 가능한 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.

- [0039] 상기 탄소수 16 내지 22의 지방산 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염은 알부민에 대해 지방산이 1:0.5 내지 1:2의 물비가 되도록 첨가될 수 있으며, 바람직하게는 1:0.7 내지 1:1.5, 보다 바람직하게는 1:0.8 내지 1:1.2, 보다 더 바람직하게는 1:1의 물비가 되도록 첨가될 수 있다.
- [0040] 본 발명의 방법에서 상기 (c) 단계는 상기 인간혈청알부민을 포함하는 시료에 열을 가하는 단계이다.
- [0041] 인간혈청알부민을 인체에 투여 가능한 제제로 제조하기 위해서는 바이러스의 오염 및/또는 기타 감염을 방지하여야 하므로, 열 처리 과정이 알부민 제제의 제조에 있어 필요하다. 그러나 보통의 단백질과 유사하게 인간혈청알부민은 고온으로 처리시 구조가 변하거나 응집되는 등 변성을 일으킬 수 있다. 따라서, 이를 안정화시키기 위한 첨가제를 필요로 하며, 현재 혈장 유래 알부민 제제의 제조 공정에서는 옥탄산염, 예를 들어 옥탄산 나트륨(sodium octanoate)과 N-아세틸트립토판(N-acetyltryptophan) 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.
- [0042] 또한, 본 발명에서는 상기 옥탄산 나트륨은 인간 혈청 알부민 내에 3개의 결합 위치를 지니는 것을 규명하였다. 여기서, 두 개의 옥탄산은 알부민의 지질 결합부위로 알려진 도메인 IA 및 IIB에 결합되어 있으며, 나머지 하나는 알부민 표면에 존재한다. 또한, 본 발명에서는 상기 옥탄산은 알부민의 캐버티를 과도하게 차지하며, 옥탄산을 이용하여 제조한 알부민 제제는 알부민의 결합능이 현저하게 감소시켜 알부민 제제의 약리학적 효능을 감소시킬 수 있음을 확인하였다. 따라서, 옥탄산을 이용하지 않고 탄소수 16 내지 22의 지방산을 첨가하여 인간혈청알부민 제제를 제조하는 본 발명의 방법은, 알부민의 약리학적 효능을 크게 감소시키지 않으면서도 이의 제조 역시 간편한 방법이다.
- [0043] 상기 (c) 단계에서, 열 처리는 알부민 제조 공정에 사용되는 열 처리 온도라면 특별히 그 온도 범위는 제한되지 않으나, 바람직하게는 60℃ 내지 65℃일 수 있다. 또한, 공업적으로는 약 60℃에서 10시간 동안 처리하나, 이에 제한되지 않는다.
- [0044] 본 발명의 방법은 옥탄산 염 또는/및 N-아세틸트립토판을 사용하지 않고도, 변성되지 않은 인간혈청알부민을 포함하는 제제를 제조할 수 있는 방법이므로, 상기 방법으로 제조된 인간혈청알부민 제제는 소량의 옥탄산 염 또는/및 N-아세틸트립토판 포함하거나, 옥탄산 염 또는/및 N-아세틸트립토판을 포함하지 않을 수 있다.
- [0045] 따라서, 본 발명의 방법으로 제조된 인간혈청알부민 제제의 알부민은 탄소수 16 내지 22의 지방산만이 서들러 사이트 I(sudlow's site I)에 결합되어 있고, 나머지 캐버티는 비어있는 형태로 제조될 수 있다. 이와 같은 형태의 본 발명의 인간혈청알부민 제제는 독성물질들이 결합할 수 있는 충분한 공간을 지닌다.
- [0046] 본 발명의 일 실시예에서는 시판되는 인간혈청알부민 제제를 분석하여, 상기 인간혈청알부민에 3개의 옥탄산 결합 위치; 하나의 L-트립토판 결합위치(서들러 사이트 II) 및 하나의 올레산 결합 위치(서들러 사이트 I)가 있는 것을 규명하였다(도 1). 또한, 결합된 물질을 제거한 인간혈청알부민에 탄소수 16 내지 22의 지방산만을 결합시켜도, 열 처리 공정에 열 안정성을 나타낼 수 있는 것을 확인하였다(도 2 내지 4). 또한, 인간혈청알부민의 캐버티 안에 들어있는 지방산이 제거한 다음, 여기에 탄소수 16 내지 22인 불포화지방산의 대표적인 예인 올레산을 첨가하여 이를 서들러 사이트 I에 결합시키고, NO 가스를 주입하여 지방산으로 올레산만이 결합된 알부민의 NO 전달능을 확인하였고, 그 결과 캐버티에 탄소수 16 내지 22인 불포화지방산이 결합된 인간혈청알부민의 경우, NO 전달능이 우수한 결과를 나타내었다(실시예 2).
- [0047] 또 하나의 양태로서, 본 발명은 상기 방법으로 제조된 인간혈청알부민 제제, 구체적으로 알부민에 탄소수 16 내지 22의 지방산이 서들러 사이트 I(sudlow's site I)에 결합되어 있고, 도메인 IA 내지 도메인 IIB 부위에 옥탄산이 결합되어 있지 않은 것을 특징으로 하는 인간혈청알부민 제제를 제공한다.
- [0048] 상기 방법 및 인간혈청알부민 제제에 대해서는 상기에서 설명한 바와 같다.
- [0049] 상기 인간혈청알부민 제제는 약학적 조성물의 형태일 수 있고, 또한 약학적 조성물의 제조에 통상적으로 사용하는 적절한 담체, 부형제 또는 희석제를 추가로 포함할 수 있으며, 또한, 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제, 현

탁제, 내용액제, 유제, 시럽제, 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조제 및 좌제으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나의 제형을 가질 수 있으며, 경구 또는 비경구의 여러 가지 제형일 수 있다. 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충전제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제된다. 경구투여를 위한 고형제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제에는 하나 이상의 화합물에 적어도 하나 이상의 부형제 예를 들면, 전분, 탄산칼슘, 수크로오스(Sucrose) 또는 락토오스(Lactose), 젤라틴 등을 섞어 조제된다. 또한 단순한 부형제 이외에 스테아린산 마그네슘, 탈크 등과 같은 윤활제들도 사용된다. 경구투여를 위한 액상제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 해당되는데 흔히 사용되는 단순 희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다. 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조제, 좌제가 포함된다. 비수성용제, 현탁용제로는 프로필렌글리콜(Propylene glycol), 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텟솔(Witepsol), 마크로골, 트윈(Tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로젤라틴 등이 사용될 수 있다.

[0050] 상기 본 발명의 제제는 약학적으로 유효한 양으로 투여할 수 있다.

[0051] 본 발명에서 용어, "투여"란 어떠한 적절한 방법으로 개체에게 본 발명의 약학적 조성물을 도입하는 것을 의미하며, 조성물의 투여 경로는 목적 조직에 도달할 수 있는 다양한 경로를 통하여 투여될 수 있으며, 바람직하게는 MARS(분자 흡착 재순환 시스템) 간 투석 또는 소위 단일-패스 투석법 등으로 이용될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0052] 본 발명에서 용어, "약학적으로 유효한 양"은 의학적 치료에 적용 가능한 합리적인 수혜/위험 비율로 질환을 치료하기에 충분한 양을 의미하며, 유효 용량 수준은 개체 종류 및 중증도, 연령, 성별, 기억 장애 질환의 종류, 약물의 활성, 약물에 대한 민감도, 투여 시간, 투여 경로 및 배출 비율, 치료기간, 동시 사용되는 약물을 포함한 요소 및 기타 의학 분야에 잘 알려진 요소에 따라 결정될 수 있다.

[0053] 또 하나의 양태로서, 본 발명은 인간혈청알부민을 포함하는 시료에, N-아세틸트립토판, 및 탄소수 16 내지 22의 불포화지방산 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 첨가하여 서둘러 사이트 II(sudlow's site II)에 N-아세틸트립토판을 결합시키고, 서둘러 사이트 I(sudlow's site I)에 탄소수 16 내지 22의 불포화지방산을 결합시키는 단계를 포함하는, 인간혈청알부민 제제의 제조방법을 제공한다.

[0054] 본 발명에서는, 탄소수 16 내지 22의 불포화지방산 및 N-아세틸트립토판을 모두 포함하는 인간혈청알부민이 우수한 NO(일산화질소) 결합능 및 전달능을 가지는 것을 확인하였다.

[0055] 또한, 상기 방법은 (a) 인간혈청알부민을 포함하는 시료에, N-아세틸트립토판, 및 탄소수 16 내지 22의 불포화지방산 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 첨가하여 서둘러 사이트 II(sudlow's site II)에 N-아세틸트립토판을 결합시키고, 서둘러 사이트 I(sudlow's site I)에 탄소수 16 내지 22의 불포화지방산을 결합시키는 단계; 및 (b) 상기 인간혈청알부민을 포함하는 시료에 열처리하는 단계를 포함할 수 있다.

[0056] 본 발명에서 상기 (a) 단계는 인간혈청알부민을 포함하는 시료에, N-아세틸트립토판, 및 탄소수 16 내지 22의 불포화지방산 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 첨가하여 서둘러 사이트 II(sudlow's site II)에 트립토판을 결합시키고, 서둘러 사이트 I(sudlow's site I)에 탄소수 16 내지 22의 불포화지방산을 결합시키는 단계이다.

[0057] 첨가된 N-아세틸트립토판 및 탄소수 16 내지 22의 불포화지방산은 알부민에 결합하는 특징을 지니며, 특히 N-아세틸트립토판은 트립토판의 형태로 알부민의 서둘러 사이트 I(sudlow's site I)에 결합하며, 탄소수 16 내지 22의 불포화지방산은 알부민의 서둘러 사이트 II(sudlow's site II)에 결합한다. 따라서, N-아세틸트립토판 및 탄소수 16 내지 22의 불포화지방산을 첨가하는 경우, 각각은 알부민의 서둘러 사이트 II 및 I에 결합한다.

- [0058] 본 발명에서 용어, "탄소수 16 내지 22의 불포화 지방산"은 인간혈청알부민에 결합하여, 인간혈청알부민 제제의 제조에 있어 열 안정화를 부여하며, 우수한 NO 전달능을 가지는 물질을 포함한다. 상기 탄소수 16 내지 22의 불포화지방산의 예로서, 팔미톨레산(palmitoleic acid), 올레산(oleic acid), 리놀레산(linoleic acid), 리놀렌산(linolenic acid), EPA(eicosapentaenoic acid) 또는 DHA(docosahexaenoic acid)가 있으나, 이에 제한되지 않는다. 본 발명의 일 실시예에서는 상기 탄소수 16 내지 22의 불포화 지방산이 결합된 알부민은 우수한 NO 결합력을 가짐을 확인하여, NO 전달체로서 기능하므로, 이를 NO 전달에 유용하게 적용할 수 있음을 확인하였다(실시예 2).
- [0059] 본 발명에서 용어, "N-아세틸트립토판"은 본 발명의 목적상 인간혈청알부민에 결합하여 NO 전달능을 가지는 물질을 의미하며, 상기 N-아세틸트립토판은 트립토판의 형태로 인간혈청알부민에 결합한다.
- [0060] 본 발명에서 상기 (b) 단계는 상기 인간혈청알부민을 포함하는 시료에 열을 가하는 단계이다.
- [0061] 이는 상기에서 설명한 바와 같이 인간혈청알부민 제제를 실제로 임상에 적용하기 위해서는 바이러스 또는/및 기타 감염원을 제거하여야 하므로 수행되는 과정이다.
- [0062] 상기 (a) 단계에서 알부민에 결합한 탄소수 16 내지 22의 불포화지방산은 이러한 열 처리 과정에서 인간혈청알부민에 열 안정화를 부여한다.
- [0063] 또한 상기 제조방법은 추가로 (c) 상기 시료에 일산화질소를 처리하는 단계를 포함한다.
- [0064] 본 발명에서, 트립토판 및 탄소수 16 내지 22의 지방산이 결합된 인간혈청알부민은 일산화질소를 포집하는 우수한 능력을 지니므로, 일산화질소가 처리된 인간혈청알부민 제제는 일산화질소를 요구하는 부위에 일산화질소를 가져다 줄 수 있는 활성, 예컨대 저산소증의 예방 또는 치료 효과를 가질 수 있다.
- [0065] 본 발명에서 용어, "저산소증(Hypoxia) 또는 저산소혈증(Hypoxemia)"은 호흡기능의 장애로 숨쉬기가 곤란하여 산소 분압이 떨어진 상태로, 산소 분압이 60mmHg 미만이거나 산소 포화도가 90% 미만인 경우를 의미한다. NO를 전달하는 경우, 호흡 곤란을 해소하여 저산소증을 치료하거나[Sokol J *et al.*, *Anesth Analg.*, 2003; 97: 989-98], 저산소증에 의해 유발된 세포 손상을 예방 또는 치료할 수 있다.
- [0066] 이와 같이 본 발명의 방법으로 제조된 인간혈청알부민 제제는 일산화질소를 포집하는 활성을 지녀 일산화질소로 치료할 수 있는 질병에 사용될 수 있으며, 또한 정상 세포의 형태를 회복 또는 유지시키는 효과를 가지고 올 수 있다. 본 발명의 방법에서는 옥탄산 염을 안정화제로 사용하지 않는 것이 바람직하므로, 이와 같이 제조된 인간혈청알부민 제제의 인간혈청알부민은 i) 트립토판 및 ii) 탄소수 16 내지 22의 불포화지방산이 결합된 것이고, 옥탄산 염이 결합되지 않은 형태인 것이 바람직하며, 구체적으로 알부민에 탄소수 16 내지 22의 불포화 지방산이 서들러 사이트 I(sudlow's site I)에 결합되어 있고, 트립토판이 서들러 사이트 II에 결합되어 있으며, 나머지 지 캐버티(cavity)가 비어있는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0067] 본 발명의 일 실시예에서는 탄소수 16 내지 22의 불포화지방산이 인간혈청알부민의 제조 시에 열 안정성을 가져다 줄 수 있을 뿐만 아니라(도 2 내지 4), 포화지방산에 비하여 우수한 NO 결합능을 지님을 확인하였다(도 5). 또한, NO의 불포화 지방산과의 결합은 질량 분석기(Mass spectroscopy) 실험으로 확인하였다(도 6). 또한, 캐버티에 결합된 물질이 제거된 인간혈청알부민에서 탄소수 18인 불포화지방산인 올레산과 니트로소기가 결합된 N-아세틸트립토판이 결합된 알부민을 제조하여 이의 세포 형태에 미치는 영향을 확인하였고, 이러한 알부민 제제가 세포 형태 유지에 효과를 가짐을 확인하였고, 특히 저산소증이 유발된 정상세포에서 세포 형태 유지 효과를 가지고 있음을 확인하여, 저산소증에 의한 세포 손상의 예방 또는 치료에 유용할 수 있음을 시사하였다(실시예 2; 도 7 및 8).
- [0068] 또 하나의 양태로서, 본 발명은 상기 방법으로 제조된, i) 트립토판 및 ii) 탄소수 16 내지 22의 불포화지방산이 결합된 인간혈청알부민 제제를 제공한다.
- [0069] 상기 방법 및 인간혈청알부민 제제에 대해서는 상기에서 설명한 바와 같다.

- [0070] 또한, 상기 인간혈청알부민 제제는 알부민에 탄소수 16 내지 22의 불포화 지방산이 서들러 사이트 I(sudlow's site I)에 결합되어 있고, 트립토판이 서들러 사이트 II(sudlow's site II)에 결합되어 있으며, 도메인 IA 내지 도메인 IIB 부위에 옥탄산이 결합되어 있지 않는, 바람직하게는 나머지 캐버티는 비어있는 알부민 제제일 수 있다.
- [0071] 또 하나의 양태로서, 본 발명은 인간혈청알부민을 포함하는 시료에, N-아세틸-N-니트로스트립토판; 및 탄소수 16 내지 22의 불포화지방산 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 첨가하여 서들러 사이트 II(sudlow's site II)에 N-아세틸-N-니트로스트립토판을 결합시키고, 서들러 사이트 I(sudlow's site I)에 탄소수 16 내지 22의 불포화지방산을 결합시키는 단계를 포함하는, 인간혈청알부민 제제의 제조방법을 제공한다.
- [0072] 상기 인간혈청알부민, 탄소수 16 내지 22의 불포화지방산 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염 및 인간혈청알부민 제제에 대해서는 앞서 설명한 바와 같다.
- [0073] 본 발명에서 용어, "N-아세틸-N-니트로스트립토판"은, NO 공여자로서, 2-[Acetyl(nitroso)amino]-3-(1H-indol-3-yl)propanoic acid로도 명명된다.
- [0074] 상기 제조방법에서 인간혈청알부민을 포함하는 시료에 포함된 인간혈청알부민은 이의 캐버티에 결합된 물질, 특히 지방산이 제거된 형태일 수 있으며, 여기에 N-아세틸-N-니트로스트립토판 및 탄소수 16 내지 22의 불포화지방산을 결합시킨 형태일 수 있다. 이러한 인간혈청알부민을 포함하는 제제는 NO 전달능; 세포 형태 회복능; 및 열 안정성이 우수한 효과를 지닌다.
- [0075] 또 하나의 양태로서, 본 발명은 알부민에 탄소수 16 내지 22의 불포화 지방산이 서들러 사이트 I(sudlow's site I)에 결합되어 있고, N-아세틸-N-니트로스트립토판이 서들러 사이트 II에 결합되어 있는 것을 특징으로 하는, 인간혈청알부민 제제를 제공한다.
- [0076] 특히, 상기 알부민 제제는 탄소수 16 내지 22의 불포화 지방산과 N-아세틸-N-니트로스트립토판이 결합되어 있고, 도메인 IA 내지 도메인 IIB 부위에 옥탄산이 결합되어 있지 않는, 바람직하게는 나머지 캐버티는 비어있는 알부민 제제일 수 있다.
- [0077] 상기 알부민, 탄소수 16 내지 22의 불포화 지방산, N-아세틸-N-니트로스트립토판 및 인간혈청알부민 제제에 대해서는 앞서 설명한 바와 같다.

발명의 효과

- [0078] 본 발명의 알부민 제제는 열에 안정하면서도 우수한 약학적 효능을 지니므로, 알부민 제제가 필요한 여러 분야에 유용하게 이용될 수 있다.

[0079]

도면의 간단한 설명

- [0080] 도 1은, X-선 결정법에 의해 획득한 제제화되어 상용화되고 있는 혈장 유래 인간혈청알부민을 원료로 하는 녹십자사의 20% 인간혈청알부민 주사제로부터 수득한 인간혈청알부민 결정의 3차원 입체구조를 나타낸 도이다. 종래 혈장 유래 인간혈청알부민의 제조공정에서 열 안정화제로 사용되는 옥탄산염(octanoic acid)과 N-아세틸 트립토판(N-acetyl tryptophan)의 분해 산물인 L-트립토판의 결합위치를 구모델(sphere model)로 표시하였다. 탄소수 18의 지방산 중 하나인 올레산의 결합위치는 구형모델(sphere model)로 표시하였다. 일반적인 알부민의 도메인(domain)의 표현방법에 따라서 푸른색(domain IA), 하늘색(domain IB), 녹색(domain IIA), 연두색(domain IIB), 노란색(domain IIIA), 붉은색(domain IIIB)의 변화로 도메인을 구별하여 표시하였다. 두 개의 옥탄산은 도메인 IA 및 IB에 결합되어 있고 올레산은 서들러 사이트 I(domain IIA)에 트립토판은 서들러 사이트 II(domain IIIA)에 결합되어 있다. 나머지 하나의 옥탄산은 알부민-알부민 사이에 결합되어 있어 캐버티에는 영향을 주지 않는다.

도 2는, 제제화되어 상용화되고 있는 혈장 유래 인간혈청알부민을 원료로 하는 녹십자사의 20% 인간혈청알부민

주사제의 질량분석 결과를 나타낸 도이다.

도 3은, 제제화되어 상용화되고 있는 혈장 유래 인간혈청알부민을 원료로 하는 SK사의 20% 인간혈청알부민 주사제의 질량분석 결과를 나타낸 도이다.

도 4는, 지방산 유리(fatty acid free) 인간혈청알부민 용액과 올레산을 첨가한 인간혈청알부민 용액의 온도에 따른 지속처리 가능시간을 분 단위 및 이의 로그단위로 나타낸 도이다.

도 5는, 알부민에 결합된 탄소수 18인 불포화지방산의 NO 전달능을 확인한 도이다.

도 6은, 알부민에 결합된 탄소수 18인 불포화지방산의 NO₂ 결합을 질량분석기를 이용하여 확인한 도이다. NO₂는 체내에서 NO로 변환된다.

도 7은, (i) 지방산을 제거한 인간혈청알부민(defatted HSA); (ii) 지방산을 제거한 HSA에 올레산을 첨가한 인간혈청알부민(D+O HSA); (iii) 지방산을 제거한 HSA에 올레산 및 N-아세틸-N-니트로소트립토판을 첨가한 인간혈청알부민(D+O+T HSA); (iv) 녹십자 사 인간혈청알부민; (v) SK 케미칼 사의 인간혈청알부민 (SK HSA); (vi) Sigma 사의 지방 제거 인간혈청알부민; 또는 (vii) Sigma 사의 인간혈청알부민을 암 세포에 처리한 다음, 세포 형상에 미치는 영향을 광학 현미경을 사용하여 확인한 결과를 나타낸 도이다.

도 8은, (i) 지방산을 제거한 인간혈청알부민(defatted HSA); (ii) 지방산을 제거한 HSA에 올레산을 첨가한 인간혈청알부민(D+O HSA); (iii) 지방산을 제거한 HSA에 올레산 및 N-아세틸-N-니트로소트립토판을 첨가한 인간혈청알부민(D+O+T HSA); (iv) 녹십자사 인간혈청알부민; (v) SK 케미칼 사의 인간혈청알부민 (SK HSA); (vi) Sigma 사의 지방 제거 인간혈청알부민; 또는 (vii) Sigma 사의 인간혈청알부민을, 저산소 상태에서 성장 세포에 처리한 다음, 세포 형상에 미치는 영향을 광학 현미경을 사용하여 확인한 결과를 나타낸 도이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0081] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 보다 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 한정되는 것은 아니다.

[0082] 실시예 1: 알부민의 열 안정성에 대한 탄소수 16 내지 22개인 지방산의 효과 확인

[0083] 실시예 1-1: 혈장 유래 인간혈청알부민의 결정화 조건 탐색

[0084] 생리활성을 갖는 혈장 유래 인간혈청알부민의 구조분석을 위하여 녹십자사의 인간혈청알부민을 결정화하였다. 이하, 침전제 실험을 통하여 결정된 결정화를 위한 최적의 농도는 80 mg/ml로 결정하였다. 초기 결정화는 희소 행렬(sparse matrix) 이론에 의거한 Hampton research 사(Naguna Niguel, Ca, USA)의 스크리닝 키트인 스크린 I&II, 인덱스 스크린 시약을 이용하였으며 행잉 드롭(hanging drop) 또는 시팅 드롭(sitting drop) 증기 확산법(vapor diffusion method)을 이용하여 수동 또는 자동화 방법으로 수행하였다. 자동화 방법은 본 실험실에서 제작한 고효율 결정화 시스템(high-throughput crystallization system)에서 사용하는 Hydra e-Drop(Thermo Scientific, Waltham, MA, USA)을 이용하여 수행하였다.

[0085] 이후 데이터 수집에 적합한 결정화를 위하여 수동 정제 스크린(manual refine screen)을 통하여 녹십자사의 인간혈청알부민의 결정화를 위한 최적의 농도를 결정하기 위하여 150 mg/ml로 진행하였다.

[0086] 상기 과정을 통하여 결정된 인간혈청알부민의 최종 결정화 조건은 하기와 같다: 35% PEG 600, 0.1 M MES(2-(N-Morpholino) ethanesulfonic Acid) pH 6.5 및 0.2 M 황산암모늄(ammonium sulfate)을 포함하는 모액(mother liquor) 즉, 결정화용액 200 μ l가 들어있는 웰에 상기 결정화 용액과 150 mg/ml 단백질 용액을 1:1로 섞어서 만든 행잉 드롭(hanging drop) 2 μ l를 커버 글래스(cover glass)에 올려놓고 행잉 드롭 확산법(diffusion method)으로 결정을 만들었다.

[0087] 실시예 1-2: 혈장 유래 인간혈청알부민의 동결(cryo) 조건 탐색

[0088] 안정화된 동결조건을 찾는 과정은 싱크로트론(Synchrotron)을 이용한 데이터 수집과정에서 있어서 필수적인 단계이다. 이는 싱크로트론으로부터의 방사선(radiation)의 세기가 강해, 결정들이 데이터 수집과정에서 쉽게 분

해(decay)되어 완전한 데이터 수집이 불가능하기 때문이다. 따라서 결정을 순간 냉동(flash frozen)시킬 수 있는 결정화 용액의 조건을 찾아내야 한다.

[0089] 이에 본 발명에서는 녹십자사의 인간혈청알부민에 대하여 LV CryoOil(MiTeGen, Ithaca, NY)을 사용하였다. 녹십자사의 인간혈청알부민 결정이 있는 드롭 옆에 2 μ l의 LV CryoOil을 넣고 결정을 마운팅 루프(mounting loop)로 건져서 LV CryoOil에 담갔다가 다시 결정을 마운팅 루프로 건져서 순간 냉동시켰다.

[0090] 실시예 1-3: 혈장 유래 인간혈청알부민의 X-선 자료수집

[0091] 녹십자사의 인간혈청알부민에 대한 데이터를 X-선 오스트레일리아 싱크로트론(Australian Synchrotron)에서 2.17 Å까지 수집하였다. 검출기는 ADSC Q315r였다. 각 수치는 하기 표 1에 나타내었다. 또한 이로부터 혈장 유래 인간혈청알부민 결정의 3차원 구조를 계산하여 도 1에 나타내었다.

표 1

녹십자사의 인간혈청알부민에 대한 X-선 자료 통계수치
(The values in parentheses are for the highest resolution shell.)

X-ray source	Australian Synchrotron
X-ray wavelength (Å)	0.9536
Temperature (K)	100
Space group	C2
Unit cell parameter	
a (Å)	203.6
b (Å)	113.5
c (Å)	86.8
β (°)	104.9
Volume fraction of solvent (%)	49.99
V_m (Å ³ /Dalton)	2.46
Resolution range (Å)	19.78-2.17 (2.29-2.17)
Unique reflections	96299 (11416)
R_{sym} †(%)	5.3 (28.5)
Data completeness (%)	96.2 (78.3)
Average I/ σ	10.8 (2.7)

[0092]

[0093] 실시예 1-4: 분자 치환법을 이용한 혈장 유래 인간혈청알부민의 위상문제 해결

[0094] 녹십자사의 인간혈청알부민의 결정구조는 분자 치환법(molecular replacement)으로 규명하였다. 즉, 단백질 사이의 구조적인 유사성이 예상되는 경우 기존에 알려진 구조를 이용하여 분자치환(molecular replacement)에 의한 위상문제의 해결방법을 사용하였다. 상기 방법은 빠른 회전 기능(fast rotation function)을 이용하여 분자의 방향성(orientation)을 찾고, 번역 기능(translation function), R-인자 검색(R-factor search), 상관관계 검색(correlation search) 등의 계산을 통하여 분자의 위치를 찾는다. 이렇게 얻어낸 근사적인 방향성과 위치를 강체 정밀화 계산(rigid body refinement) 또는 R-인자 최소화 검색(R-factor minimization search) 방법으로 더 정밀하게 한 다음, 원자위치의 정밀화 계산(refinement)과 모델수정(model rebuilding)을 진행하였다. 본 연구에서는 아포-인간혈청알부민(apo-human serum albumin; apo-HSA, PDB ID:1A06)의 구조를 검색 모델(search model)로 이용하여 EPMR을 사용, 녹십자사의 인간혈청알부민에 대한 해법(solution)을 찾아내었다.

[0095] 실시예 1-5: 혈장유래 인간혈청알부민의 삼차원 결정구조 규명

[0096] 녹십자사의 인간혈청알부민의 위상은 인간알부민 모델을 이용한 분자 치환법으로 얻었다. 초기 모델은 그래픽 소프트웨어인 COOT와 O를 이용하여 만들었으며 에너지 최소화(energy minimization)는 CNS를 이용하여 진행하였

다. 최종적인 모델은 PHENIX를 통하여 얻었다. 최종 모델의 정밀화 값은 표 2에 기록하였다.

표 2

녹십자사의 인간혈청알부민에 대한 데이터 통계 및 정밀화 계산 변수

Data collection statistics	
Wavelength (Å)	0.95369
Resolution (Å)	19.78-2.17
Redundancy	7.1 (6.2)
Unique reflections	96299 (11416)
Completeness (%)	96.2 (78.3)
I/σ	10.8 (2.7)
Rsym ^b (%)	5.3 (28.5)
parameters and refinement statistics	
Space group	C2
Cell dimensions	203.6 Å x 113.5 Å x 86.8 Å
Volume fraction of solvent	49.99%
V _m (Å ³ /Dalton)	2.46
Total number of residues	1743
Total non-H atoms	14109
Number of Oleic acid	3
Number of Octanoic acid	9
Number of SO ₄	9
Number of L-Tryptophan	3
Number of water molecules	402
Average temperature factors	
Protein	46.070 Å ²
Solvent	36.518 Å ²
All substrate	41.910 Å ²
Resolution range of reflections used	19.78-2.17 Å
Amplitude cutoff	0.0 σ
R-factor	19.25 %
Free R-factor	24.28 %
Stereochemical ideality:	
Bond	0.008 Å
Angle	1.080 °
Chirality	0.073 °
Planarity	0.005 °
Dihedral	15.483 °
Ramachandran plot	
Residues in most favored regions	91.8 %
Residues in additional allowed regions	7.7 %
Residues in generously allowed regions	0.6 %
Residues in disallowed regions	0.0 %

[0097]

[0098]

이와 같은 방법으로 규명된 삼차원 구조는 기본적으로 기존의 apo-HSA 구조와 유사하다. 제제 수준의 혈장 유래 인간혈청알부민(pharmaceutical grade plasma-derived HSA)의 제조공정에서 사용되는 옥탄산염(octanoic acid)과 N-아세틸트립토판(N-acetyl tryptophan)의 결합위치도 확인하였다. 두 개의 옥탄산염은 지방산 결합부위로 알려진 자리에 결합되었고 N-아세틸 트립토판은 서들러 사이트 II에 결합되었다. 이와 더불어, 서들러 사이트 I에 예상치 못한 지방산의 결합이 확인되었고, 이후 X-ray 구조와 질량 분광법 분석 결과 상기 지방산은 올레산 등의 탄소수 18의 지방산인 것을 확인하였다. 현재 상용화되고 있는 녹십자사와 SK사의 20% 인간혈청알부민 주사제의 질량분석결과를 각각 도 2와 3에 나타내었다.

[0099]

상기와 같은 결과는 탄소수 16 내지 22인 포화지방산의 대표적인 예인 탄소수 18인 지방산 및 N-아세틸트립토판을 첨가하는 경우, 알부민에 결합할 수 있음을 나타내는 결과로서, 구체적으로 탄소수 16 내지 22인 포화지방산이 알부민의 서들러 사이트 I에 결합하며, 트립토판이 알부민의 서들러 사이트 II에 결합함을 시사하는 결과이다.

[0100] 실시예 1-6: 인간혈청알부민의 열 안정성에 대한 올레산의 효과

[0101] 녹십자사의 인간혈청알부민의 구조규명 결과, 혈장 유래 인간혈청알부민에 결합되어 있는 것으로 확인된 올레산에 의한 영향을 규명하고자 하였다. 이에 본 발명자들은 온도에 따른 안정성에 영향을 줄 수 있을 것으로 예측하였다. 따라서 지방산 유리(fatty acid free) 인간혈청알부민(A3782, Sigma-Aldrich) 용액에 올레산을 첨가하고 고온에서의 열처리 실험을 수행한 후, 발생하는 변화를 관찰하고 그 결과를 하기 표 3 내지 6; 및 도 4에 나타냈다. 대조군으로는 올레산을 처리하지 않은 지방산 유리(fatty acid free) 인간혈청알부민 용액을 사용하였다. 상기 인간혈청알부민 용액의 농도는 50 mg/ml이었으며, 상기 용액을 25 μ l 취하고 실험군에는 이와 동일한 물비가 되도록 올레산을 첨가하였다. 구체적으로 온도를 65℃, 70℃ 및 75℃로 유지하면서 각각 30분, 5분 및 3분 간격으로 단백질의 변성으로 인한 침전 형성 여부를 확인하였다.

[0102] 그 결과, 가장 높은 온도인 75℃에서는 대조군과 실험군에서의 차이를 관찰할 수 없었다. 그러나, 대조군은 70℃에서는 10분 후부터, 65℃에서는 30분 후부터 침전이 생기기 시작하는 반면, 올레산을 첨가한 군에서는 70℃에서는 30분 후부터, 65℃에서는 330분 후부터 침전이 형성되기 시작하였다. 따라서, 올레산이 고온에서 사람혈청알부민의 안정화에 크게 기여할 수 있음을 확인하였다. 즉, 올레산의 첨가로 제제화에 필수적인 과정인 열처리 과정에 대한 안정성을 부여할 수 있으므로, 기존의 열 안정화제로 첨가되었던 옥탄산나트륨 및 N-아세틸트립토판을 대신하여 사용될 수 있음을 확인하였다.

표 3

65℃ 열처리 조건

단백질 \ 분	30	60	90	120	150	180	210	240	270	300	330	360
알부민(대조군)	△	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
알부민 + 올레산	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	△	X

알부민=지방산 유리 인간혈청알부민(50 mg/ml)이며, 알부민과 올레산의 혼합비는 1:1 몰비임
 매 30분 마다 콕스핀 후 침전을 확인
 알부민과 올레산의 혼합물에서 침전이 생성될 때까지 계속 가열
 열처리 60분 후 대조군은 뿌옇게 흐려지기 시작, 어두운 바탕에서 보면 육안으로 구분 가능
 180분 후 대조군은 거의 겔화
 330분 후 올레산과 혼합한 알부민이 미세하게 흐려지기 시작
 △ : 미세하게 뿌옇게 흐려진 상태, 살짝 흔들어주면 뿌연정도가 약해짐
 X: 침전 형성

[0103]

표 4

70℃ 열처리 조건

단백질 \ 분	5	10	15	20	25	30	35	40
알부민(대조군)	O	△	X	X	X	X	X	X
알부민 + 올레산	O	O	O	O	O	△	X	X

알부민=지방산 유리 인간혈청알부민(50 mg/ml)이며,
 알부민과 올레산의 혼합비는 1:1 몰비임
 매 5분 마다 콕스핀 후 침전을 확인
 알부민과 올레산의 혼합물에서 침전이 생성될 때까지 계속 가열
 열처리 10분 후 대조군은 뿌옇게 흐려지기 시작
 15분 후 대조군은 확연히 뿌옇게 흐려짐
 25분 후 대조군은 완전히 겔화
 30분 후 올레산과 혼합한 알부민이 뿌옇게 흐려지기 시작
 40분 후 올레산과 혼합한 알부민이 확연히 뿌옇게 흐려짐
 △ : 미세하게 뿌옇게 흐려진 상태, 살짝 흔들어주면 뿌연정도가 약해짐
 X: 침전 형성

[0104]

표 5

75°C 열처리 조건

단백질 \ 분	3	6	9
알부민(대조군)	O	△	X
알부민 + 올레산	O	△	X

알부민=지방산 유리 인간혈청알부민(50 mg/ml)이며,
 알부민과 올레산의 혼합비는 1:1 몰비임
 매 3분 마다 퀵스핀 후 침전을 확인
 알부민과 올레산의 혼합물에서 침전이 생성될 때까지 계속 가열
 온도가 높아 대조군과 실험군이 거의 비슷한 침전 양상을 보임
 열처리 6분 후 대조군 및 올레산과 혼합한 알부민이 뿌옇게 흐려지기 시작
 9분 후 대조군 및 올레산과 혼합한 알부민이 확연히 뿌옇게 흐려짐
 △: 미세하게 뿌옇게 흐려진 상태, 살짝 흔들어주면 뿌연정도가 약해짐
 X: 침전 형성

[0105]

표 6

온도	65°C	log65°C	70°C	log70°C	75°C	log75°C
알부민(대조군)	60 분	1.78	15 분	1.18	9 분	0.95
알부민 + 올레산	360 분	2.56	35 분	1.54	9 분	0.95

[0106]

[0107]

이러한 실시예 1-6의 결과는, 열처리 공정이 필수적으로 요구되는 혈청 유래의 알부민의 제조에 있어, 기존에 사용되어 알부민의 결합능을 감소시킬 수 있는 옥탄산염 또는/및 N-아세틸트립토판의 사용없이 올레산과 같은 탄소수 18인 포화지방산을 첨가하여도 우수한 열 안정성을 가져올 수 있음을 시사하는 결과이다.

[0108]

실시예 1-7: 인간혈청알부민의 열 안정성에 대한 다양한 탄소수 18의 지방산의 효과

[0109]

상기 실시예 1-6에서 올레산을 이용하여 열처리에 대한 안정성을 확인한 실험과 동일한 방법으로 올레산 뿐만 아니라 다른 탄소수 18의 지방산인 스테아르산, 리놀레산, α-리놀렌산 및 γ-리놀렌산을 이용하여 70°C에서 열 안정화 효과를 확인하였다. 30분까지는 3분 간격으로 이후로는 5분 간격으로 관찰하였다. 대조군으로는 실시예 1-6과 동일하게 지방산을 처리하지 않은 지방산 유리(fatty acid free) 인간혈청알부민 용액을 사용하였다.

[0110]

그 결과, 하기 표 7에 나타난 결과와 같이, 상기 탄소수 18의 지방산을 처리한 실험군 모두가 대조군 인간혈청 알부민에 비해 뛰어난 열처리에 대한 안정성을 갖는 것을 확인하였다. 상기 실시예 1-6에 기재한 바와 같이 각각의 지방산은 알부민과 동일한 몰비를 갖도록 첨가하였다.

표 7

70°C 열처리 조건

단백질 \ 분	3	6	9	12	15	18	21	24	27	30	35	40	45	50	55	60	65
알부민(대조군)	O	△	X	X	X	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
알부민 + 올레산	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	△	△	△	X
알부민 + α-리놀렌산	O	O	O	O	△	△	△	△	X	X	X	-	-	-	-	-	-
알부민 + γ-리놀렌산	O	O	O	O	△	△	△	△	X	X	X	-	-	-	-	-	-
알부민 + 리놀레산	O	O	O	O	O	O	△	△	△	△	X	X	X	-	-	-	-
알부민 + 스테아르산	O	O	△	X	X	X	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

알부민=지방산 유리 인간혈청알부민(50 mg/ml)이며, 알부민과 각각의 지방산의 혼합비는 1:1 몰비임

모든 시료에서 침전이 생성될 때까지 계속 가열

대조군: 열처리 6분 후 미세하게 뿌옇게 흐려지기 시작하여

9분 후 육안으로 구분 가능할 정도로 뿌옇게 흐려짐

20분 후에는 겔화되어 탭핑해도 섞이지 않음

알부민과 스테아르산의 혼합물: 열처리 9분 후 미세하게 뿌옇게 흐려지기 시작하여 점점 더 흐려지다가

12분 후 육안으로 구분 가능할 정도로 뿌옇게 흐려짐

20분 후에는 겔화되어 탭핑해도 섞이지 않음

α와 γ형의 리놀렌산과의 혼합물: 모두 12분 후부터 뿌옇게 흐려지고, 점점 더 흐려지다가

27분 후 육안으로 구분 가능할 정도로 뿌옇게 흐려짐. 그러나

리놀렌산과의 혼합물: 12분 후 미세하게 흐려지기 시작하여 한동안 유지되다가 21분 후 뿌옇게 흐려지고

35분 후에는 육안으로 구분 가능할 정도로 뿌옇게 흐려짐

△: 미세하게 뿌옇게 흐려진 상태, 살짝 흔들어주면 뿌연정도가 약해짐

X: 침전 형성

[0111]

[0112] 실시예 1-8: 인간혈청알부민의 열 안정성에 대한 다양한 탄소수 16의 지방산의 효과

[0113] 상기 실시예 1-6 및 1-7에서 올레산을 비롯한 다양한 탄소수 18의 지방산을 이용하여 열처리에 대한 안정성을 확인한 실험과 동일한 방법으로 탄소수 18의 올레산뿐만 아니라, 탄소수 16의 지방산인 팔미트산(palmitic acid) 및 팔미톨레산(palmitoleic acid)을 이용하여 65°C에서 열 안정화 효과를 확인하였다. 시료를 65°C로 가온하고 5분 간격으로 관찰하였다. 대조군으로는 상기 실시예 1-6 및 1-7과 동일하게 지방산을 처리하지 않은 지방산 유리 인간혈청알부민 용액을 사용하였다.

[0114] 그 결과, 하기 표 8에 나타난 결과와 같이, 상기 탄소수 16의 지방산을 처리한 실험군 모두가 대조군 인간혈청알부민에 비해 현저히 뛰어난 열처리에 대한 안정성을 갖는 것을 확인하였다. 상기 실시예 1-6 및 1-7에 기재한 바와 같이 각각의 지방산은 알부민과 동일한 몰비를 갖도록 첨가하였다.

표 8

단백질 \ 분	5	10	15	20	25	30	35	40	45	50	55	60
알부민(대조군)	O	O	△	△	X	X	X	X	X	X	X	X
알부민 + 팔미트산	O	O	O	O	O	O	O	△	△	X	X	X
알부민 + 팔미톨레산	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O
알부민 + 올레산	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O

단백질 \ 분	65	70	75	80	85	90	95	100	105	110	115	120
알부민(대조군)	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
알부민 + 팔미트산	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
알부민 + 팔미톨레산	O	O	O	△	△	△	△	△	△	△	△	△
알부민 + 올레산	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O

단백질 \ 분	125	130	135	140	145	150	155	160	165	170	175	180
알부민(대조군)	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
알부민 + 팔미트산	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
알부민 + 팔미톨레산	△	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
알부민 + 올레산	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O

알부민=지방산 유리 인간혈청알부민(50 mg/ml)이며, 알부민과 지방산의 혼합비는 1:1 물비임
 매 5분 마다 쿼스핀 후 침전을 확인
 △ : 미세하게 뿌옇게 흐려진 상태, 살짝 흔들어주면 뿌연정도가 약해짐
 X : 침전 형성

[0115]

[0116] 실시예 1-9: 인간혈청알부민의 열 안정성에 대한 EPA 및 DHA의 효과

[0117] 상기 실시예 1-6 내지 1-8에서 다양한 탄소수 16 및 18의 지방산을 이용하여 열처리에 대한 안정성을 확인한 실험과 동일한 방법으로 탄소수 18의 올레산뿐만 아니라 탄소수 20 및 22의 지방산인 EPA(eicosapentaenoic acid) 및 DHA(docosahexanoic acid)를 이용하여 65℃에서 열 안정화 효과를 확인하였다. 시료를 65℃로 가온하고 처음 60분간은 5분 간격으로, 이후 130분까지는 10분 간격으로, 그 이후로는 30분 간격으로 관찰하였다. 대조군으로는 상기 실시예 1-6 내지 1-8과 동일하게 지방산을 처리하지 않은 지방산 유리 인간혈청알부민 용액을 사용하였다. 하기 표 9에 나타난 결과와 같이, 상기 EPA 및 DHA를 처리한 실험군 모두가 대조군 인간혈청알부민에 비해 현저히 뛰어난 올레산과 유사한 수준의 열처리에 대한 안정성을 갖는 것을 확인하였다. 상기 실시예 1-6 내지 1-8에 기재한 바와 같이 각각의 지방산은 알부민과 동일한 물비를 갖도록 첨가하였다.

표 9

단백질 \ 분	5	10	15	20	25	30	35	40	45	50	55	60
알부민(대조군)	O	O	△	△	△	▯	X	X	X	X	X	X
알부민 + EPA	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O
알부민 + DHA	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O
알부민 + 올레산	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O

단백질 \ 분	70	80	90	100	110	120	130	160	190	220	250	280
알부민(대조군)	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
알부민 + EPA	O	O	O	O	O	O	O	O	O	△	△	△
알부민 + DHA	O	O	O	O	O	O	O	O	O	△	△	△
알부민 + 올레산	O	O	O	O	O	O	O	O	O	△	△	△

알부민=지방산 유리 인간혈청알부민(50 mg/ml)이며, 알부민과 지방산의 혼합비는 1:1 물비임
 기재된 시간(5분, 10분 또는 30분 간격)에 콕스핀 후 침전을 확인
 △ : 미세하게 뿌옇게 흐려진 상태, 살짝 흔들어주면 뿌연정도가 약해짐
 X : 침전 형성

[0118]

[0119] 상기와 같은 결과는, 탄소수 16 내지 22인 포화지방산을 알부민 제제의 제조에 사용하는 경우, N-아세틸트립토판 또는/및 옥탄산의 사용 없이도 우수한 열 안정성을 부여해줄 수 있음을 시사하는 결과이다.

[0120] 실시예 1-10: 올레산 지방산의 인간혈청알부민 우선적 결합부위

[0121] 상기 실시예 1-1 부터 1-5까지의 방법으로 인간혈청알부민과 올레산의 1:1 혼합물의 X-ray 구조 규명을 통하여 올레산이 서들러 사이트 I(Sudlow's site I)에 결합되어 있음을 확인하였다.

[0122] 따라서, 상기와 같은 결과는 본 발명에서 사용되는 상기 탄소수 16에서 22의 지방산 및 NO₂ 결합 불포화 지방산은 모두 서들러 사이트 I에 붙어 기능을 나타내는 형태임을 시사한다.

[0123] 실시예 2: 기능성 알부민의 제조 및 검증

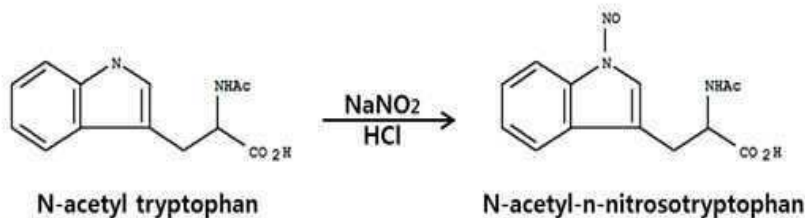
[0124] (1) 기능성 알부민의 제조

[0125] 1) 인간혈청알부민에 결합된 물질의 제거

[0126] 200 mg/ml의 녹십자사의 인간혈청알부민 주사제를 100 mg/ml 알부민용액 100 mL이 되도록 50mM Potassium phosphate pH 7.5 용액으로 희석한 후, 5g의 활성탄(24226, Sigma-Aldrich)을 가했다. 활성탄을 가한 알부민용액을 교반하면서 pH 3.0이 되도록 0.1 N 염산을 서서히 가한 후, 1 시간 동안 얼음 중에서 교반하였다. 교반이 끝난 후 14000 rpm에서 30분 동안 원심분리하여 활성탄을 제거한 알부민 용액을 얻었고, 이에 0.1 N 수산화나트륨을 서서히 가하여 pH 7.5가 되도록 하여 결합된 물질이 제거된 인간혈청알부민을 제조하였다(참고문헌 J Biol Chem. 1967 Jan 25;242(2):173-81. Chen et al.).

[0127] 2) N-아세틸-N-니트로스트립토판 (N-Acetyl-N-nitrosotryptophan)의 합성

[0128] 정제수 20 mL에 N-아세틸트립토판(A6251, Sigma-Aldrich) 526 mg과 아질산나트륨(S2252, Sigma-Aldrich) 162 mg을 넣고, 차광한 다음 2시간 가량 실온에서 교반하였다. 노란색의 반응 혼합물을 1℃로 냉각시킨 후, 1℃에서 보관한 1몰 농도의 염산 10 mL을 반응 혼합물에 천천히 가했다. 노란색의 침전물이 형성되면 곧바로 1℃에서 보관한 에틸아세테이트 60 mL과 소량의 물을 이용하여 이를 추출하고, 유기층을 무수 황산 마그네슘으로 건조하고, 여과한 다음 감압 농축시켜 노란색 고체의 목적 화합물(488 mg, 82.7 %)을 얻었다(참고문헌 J. Pineal Res. 2005; 38:247-253, Kirsch et al.).



[0129]

[0130] 위의 방법으로 얻은 N-아세틸-N-니트로스트립토판은 1H-NMR으로 확인해본 결과 (400MHz, CD3OD) Peyrot et al.(Chem Res Toxicol, 2006, Jan;19(1):58-67, Peyrot. F.)에 의해 규명된 N-아세틸-N-니트로스트립토판의 1H-NMR 피크와 같음을 확인하였다. 또한 질량분석법으로 시료를 분석한 결과 m/z값이 274.08 (M-H)⁻, 549.18 (2M-H)⁻ 로 N-아세틸-N-니트로스트립토판임을 확인하였다.

[0131] 3) 기능성 알부민 제조

[0132] 결합된 물질을 제거한 인간혈청알부민을 150 mg/ml이 되도록 농축하였다. 한 분자의 올레산을 가지는 기능성 알부민은 알부민과 1 대 1의 몰 수를 가지도록 올레산을 첨가하여 밤새 4 ℃에서 결합시켜 제조하였다. 또한, 한 분자의 올레산과 한 분자의 N-아세틸-N-니트로스트립토판을 가지는 기능성 알부민은 알부민과 올레산과 N-아세틸-N-니트로스트립토판의 몰 수비가 1:1:1이 되도록 올레산과 N-아세틸-N-니트로스트립토판을 첨가하여 밤새 4 ℃에서 결합시켜 제조하였다.

[0133] (2) 알부민에 결합된 탄소수 16 내지 22인 불포화지방산의 일산화질소(Nitric oxide, NO) 전달능 확인

[0134] 일산화질소는 생체 내의 다양한 조직에서 생리적 기능을 조절하는 세포 내 신호전달 물질로서, 호흡을 통한 방법으로 임상적 용도로 사용되고 있다. 이에, 본 발명에서는 알부민에 결합된 탄소수 16 내지 22인 지방산의 일산화질소 전달능을 확인하였다.

[0135] 구체적으로, 불포화지방산의 NO 결합 효과를 보기 위하여 인간혈청알부민의 캐버티(cavity) 안에 들어가 있는 지방산을 제거한 인간혈청알부민을 이용하였으며, 탄소수 16 내지 22인 불포화지방산의 효과를 보기 위하여 대표적으로 탄소수 18의 α-리놀렌산을 이용하였다. 보다 구체적으로, 1 wt%로 PBS(phosphate buffered saline, pH 7.4) 용액에 제조하여 스테아르산(stearic acid (18:0)), α-리놀렌산(α-linolenic acid (18:1))을 1:1 몰

비율로 반응시켰다. 이에 따라 제조된 3가지 샘플 용액(1 wt% HSA, 1 wt% HSA w/stearic acid, 1 wt% HSA w/ α -linolenic acid)과 대조군으로 PBS 용액을 사용하여 다음과 같은 실험을 각각 진행하였다.

[0136] 우선, 일정량의 일산화질소가 포화된 PBS 용액을 산소가 없는 기밀(gas-tight) 조건에서, 각 샘플용액에 NO를 순차적으로 주입하면서 NO 센서를 이용하여 각 용액에서의 NO 농도의 변화를 측정하였다. 사용한 NO 센서는 전류측정식 센서(amperometric sensor)로서 전극표면에서 NO를 산화시켜 산화전류를 측정하며, 측정된 산화전류가 NO의 농도에 비례하여 증가하기 때문에, 이를 이용하여 아는 농도의 NO로 보정한 보정곡선을 얻어 측정된 산화전류를 NO 농도로 환산할 수 있으며, 그 결과를 도 5에 나타내었다.

[0137] 또한, NO 포화용액을 1.8, 5, 10, 25, 45, 100 μ l를 취하여 순차적으로 주입하였을 때, NO를 넣기 전의 측정값과 총 286.8 μ l의 NO 포화용액을 주입하였을 때의 측정값의 차이(Δ pNO)를 하기 표 10에 나타내었다.

표 10

	PBS	1 wt% HSA	1 wt% HSA w/stearic acid	1 wt% HSA w/ α -linolenic acid
Δ pNO/mmHg	76.03	52.1	69.55	49.82
Δ pNO _{Norm} /mmHg	1	0.69	0.91	0.66

[0139] 그 결과, 도 5 및 표 10에서 볼 수 있듯이 Δ pNO 값은 PBS 용액 > 1 wt% HSA w/stearic acid > 1 wt% HSA > 1 wt% HSA w/ α -linolenic acid 순으로 관찰되었다.

[0140] 즉, HSA 자체도 NO의 포집 능력이 있으며, 특히 α -리놀렌산과 결합된 HSA가 더 큰 NO 포집 능력을 나타내었다. 또한, 스테아르산은 HSA의 NO 포집 능력에 별 영향을 주지 못하거나 오히려 HSA의 NO 포집 능력을 다소 감소시키는 결과를 나타내었다. 따라서 탄소수 18의 불포화지방산인 α -리놀렌산과 결합된 HSA가 효과적인 NO 캐리어로 역할을 시사하였다.

[0141] 또한, 알부민에 결합된 탄소수 18인 불포화지방산에 NO₂가 결합되었는지 여부를 질량 분석기로 확인하였고, 그 결과를 도 6에 나타내었다.

[0142] 그 결과, 도 6에 나타난 바와 같이, 올레산을 나타내는 291.248 m/z와 더불어, 올레산에 NO₂가 결합된 형태를 나타내는 326.759 m/z에 대한 피크가 나타났다. 즉, 알부민에 결합된 탄소수 18인 불포화지방산에 NO₂가 결합된 형태를 보임을 확인할 수 있었다. 이와 같은 NO₂는 체내에서 NO로 변환되므로, 이는 알부민에 결합된 탄소수 18의 불포화 지방산이 NO 결합에 중요함을 시사하는 결과이다.

[0143] (3) 기능성 알부민의 세포 실험

[0144] 기능성 알부민을 암세포에 각각 처리하여 세포 형상에 미치는 영향을 확인하였고, 광학 현미경으로 관찰한 결과를 도 7에 나타내었다. 구체적으로, 지방산이 제거된 알부민의 경우, 지방을 포함한 알부민에 비하여 세포 형상을 정상적으로 유지하는데 효과적임을 나타내었다.

[0145] 또한, 저산소 상태에서 정상 세포에 기능성 알부민을 처리하여 세포 형상에 미치는 영향을 확인하였고, 그 결과를 도 8에 나타내었다.

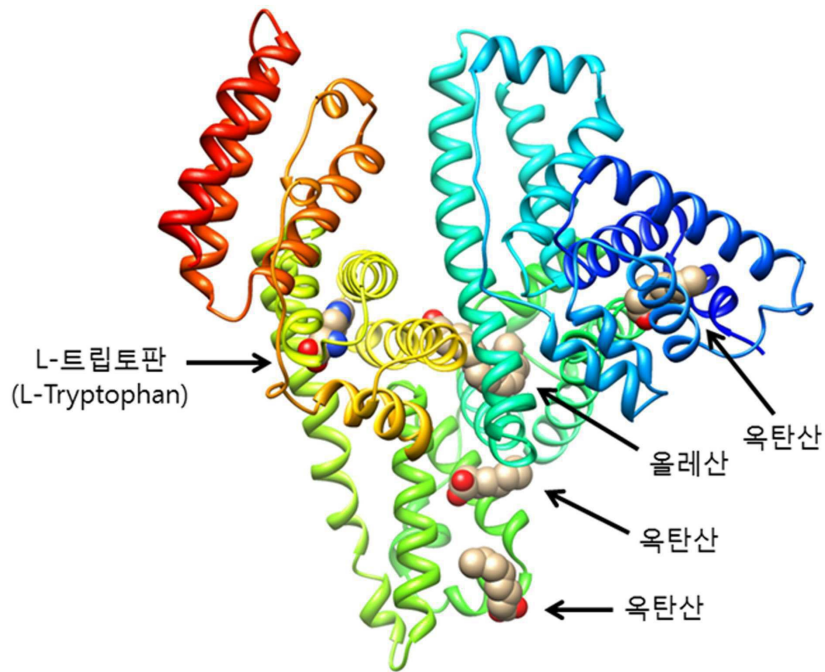
[0146] 그 결과, 도 8에 나타난 바와 같이, 지방산이 제거된 알부민의 경우, 지방을 포함한 알부민에 비하여 세포 형상을 정상적으로 유지하는데 효과적임을 나타내었다.

[0147] 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

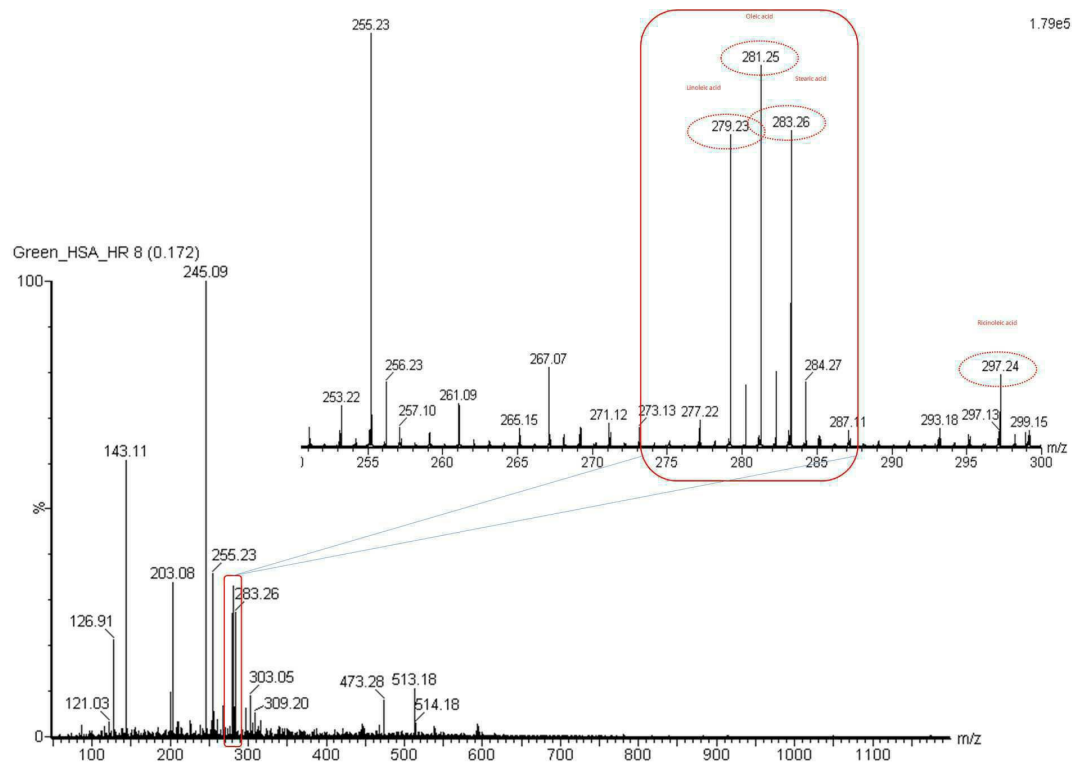
기술한 실시 예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적인 것이 아닌 것으로서 이해해야만 한다. 본 발명의 범위는 상기 상세한 설명보다는 후술하는 특허 청구범위의 의미 및 범위 그리고 그 등가 개념으로부터 도출되는 모든 변경 또는 변형된 형태가 본 발명의 범위에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.

도면

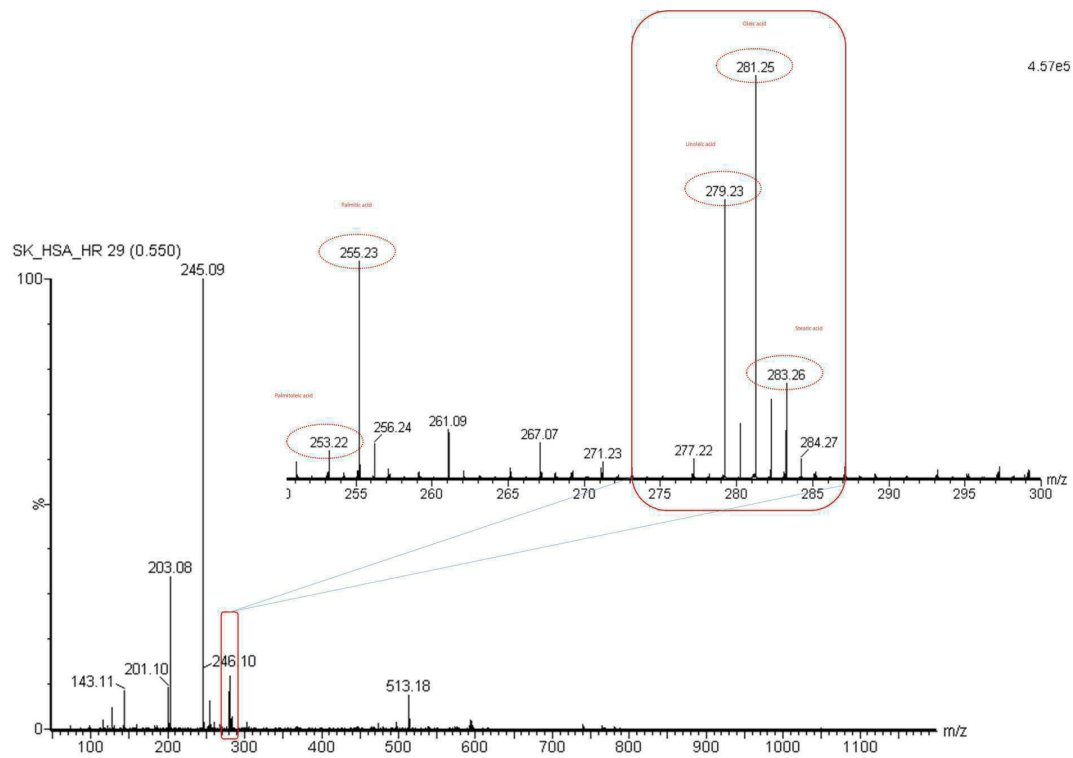
도면1



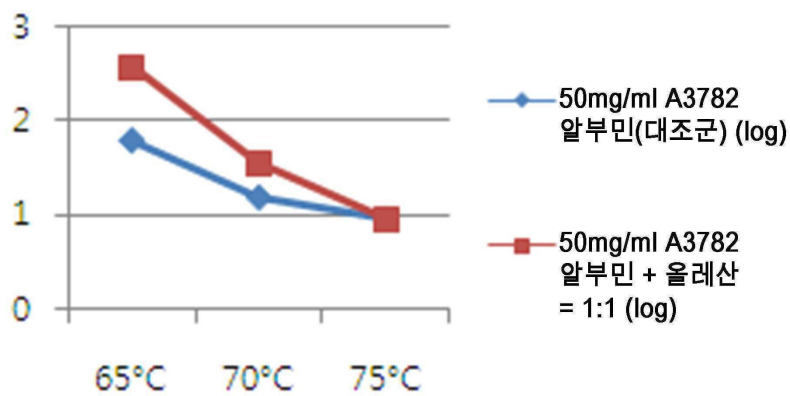
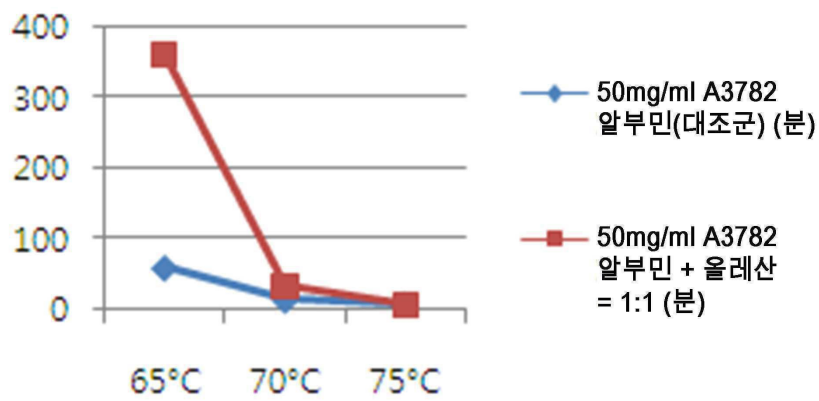
도면2



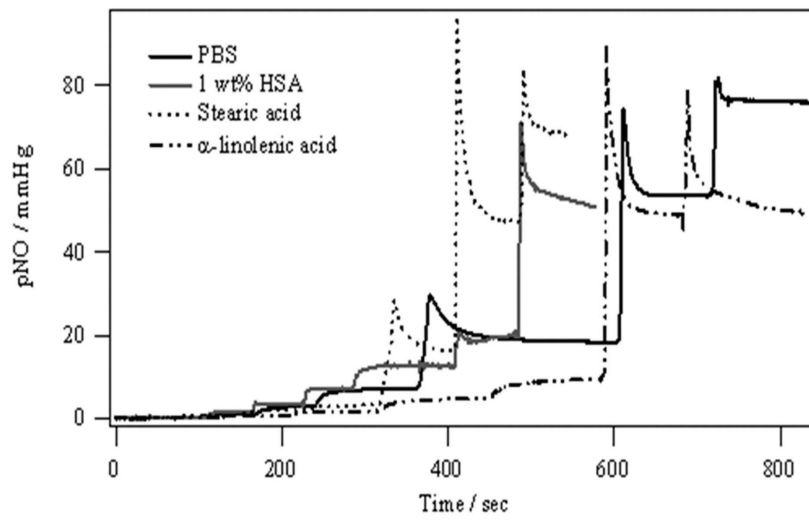
도면3



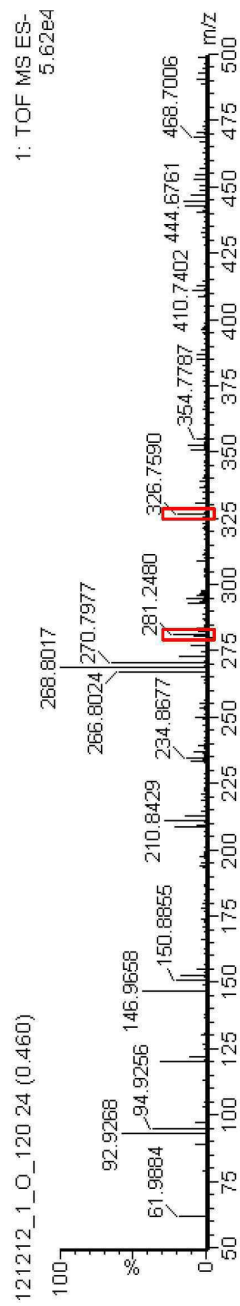
도면4



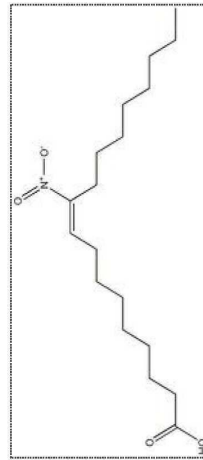
도면5



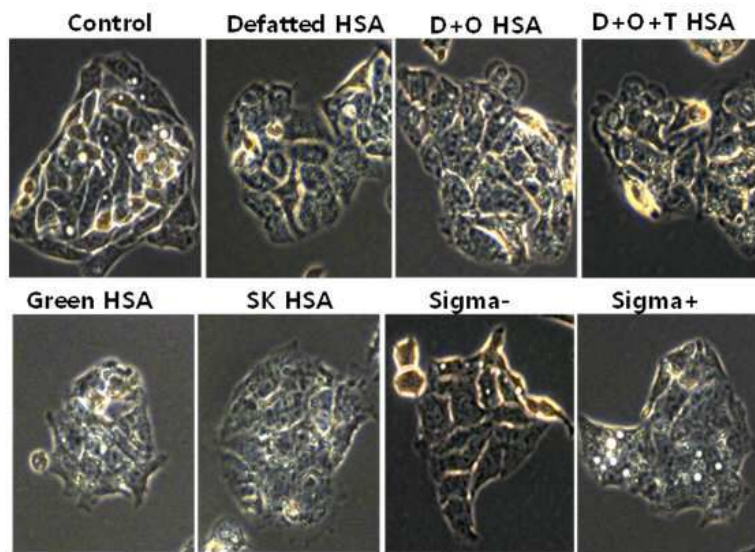
도면6



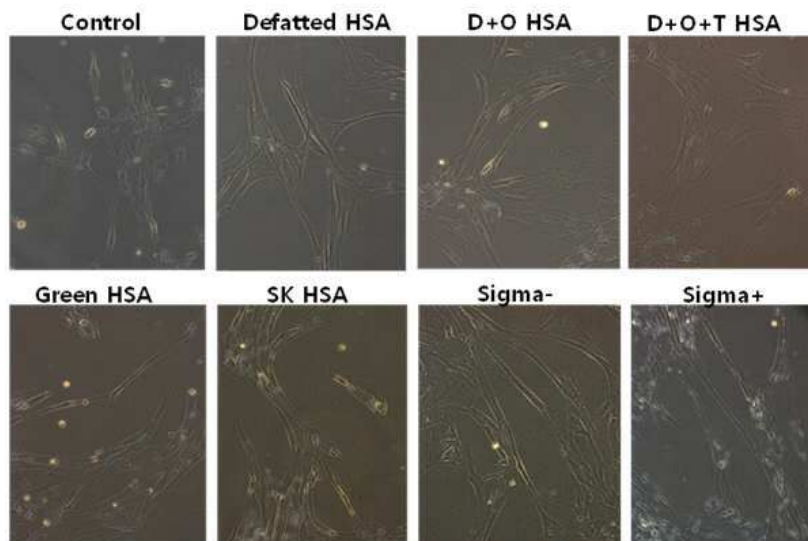
281.248: Oleic acid
326.759: Oleic acid + NO₂



도면7



도면8



서열 목록

- <110> Ewha University - Industry Collaboration Foundation
- <120> A novel functional serum albumin and the preparation method thereof
- <130> PA130161-KR-P1
- <150> KR 10-2013-0030338
- <151> 2013-03-21
- <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