(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2014-0079252
(43) 공개일자 2014년06월26일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 9/08 (2006.01) *A61K 31/19* (2006.01)
A61K 31/185 (2006.01) *A61K 38/38* (2006.01)
(21) 출원번호 10-2013-0012592
(22) 출원일자 2013년02월04일
심사청구일자 2013년06월17일
(30) 우선권주장
1020120148271 2012년12월18일 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 서대문구 이화여대길 52, 종합과학관 A동 414호 (대현동, 이화여자대학교)
김미선
서울 서대문구 이화여대길 52, 종합과학관 C동 408호 (대현동, 이화여자대학교)
(74) 대리인
손민

전체 청구항 수 : 총 14 항

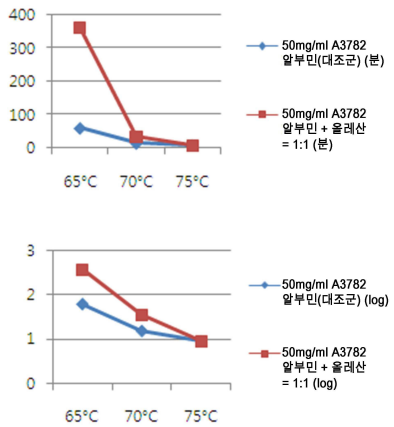
(54) 발명의 명칭 **인간혈청알부민 열안정화용 조성물**

(57) 요 약

본 발명은 탄소수 16 내지 22의 지방산으로 구성된 군으로부터 선택되는 지방산을 포함하는, 인간혈청알부민 제제를 제조하기 위한 열안정화용 조성물, 및 인간혈청알부민 제제를 제조하는 방법에 있어서, 인간혈청알부민에 탄소수 16 내지 22의 지방산으로 구성된 군으로부터 선택되는 지방산을 처리하여 열안정화하는 단계를 포함하는, 인간혈청알부민 제제의 제조 방법에 관한 것이다.

본 발명에 따른 탄소수 16 내지 22의 지방산으로 구성된 군으로부터 선택되는 지방산을 첨가하면, 인간혈청알부민 제제의 제조시 열처리 과정에도 안정한 알부민을 생산하는데 유용하게 이용될 수 있으며, 재조합 인간혈청알부민을 이용하는 경우 인간 유래의 것과 가장 유사한 재조합 인간혈청알부민을 생산할 수 있어 부작용없이 산업적으로 유용하게 사용할 수 있으며, 혈장유래 인간혈청알부민을 이용하는 경우에도 외래의 물질이 아닌 생체 내에 자연적으로 존재하는 다양한 지방산을 포함하는 조성물을 이용하므로 독성이나 부작용의 걱정 없이 제제를 생산할 수 있다.

대 표 도 - 도4



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	2010-1481-3-4
부처명	한국과학재단
연구사업명	원천기술(특정연구)개발 사업
연구과제명	단백질 기반의 산소 전달기전 확립을 통한 저산소증 치료기술 개발
기 여 율	1/1
주관기관	교육과학기술부
연구기간	2012.07.01 ~ 2013.06.30

특허청구의 범위

청구항 1

탄소수 16 내지 22의 지방산으로 구성된 군으로부터 선택되는 지방산 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 포함하는, 인간혈청알부민 제제를 제조하기 위한 열안정화용 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 인간혈청알부민은 인간혈장유래 또는 재조합 인간혈청알부민인 것인 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 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 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 지방산의 염은 알칼리 금속 또는 알칼리 토금속 염인 것인 조성물.

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 지방산은 알부민에 대해 1:0.5 내지 1:2의 몰비가 되도록 첨가되는 것이 특징인 조성물.

청구항 6

제1항에 있어서,

상기 제제는 주사제인 것인 조성물.

청구항 7

인간혈청알부민 제제를 제조하는 방법에 있어서,

인간혈청알부민에 탄소수 16 내지 22의 지방산으로 구성된 군으로부터 선택되는 지방산 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 처리하여 열안정화하는 단계를 포함하는, 인간혈청알부민 제제의 제조 방법.

청구항 8

제7항에 있어서,

상기 인간혈청알부민은 인간혈장유래 또는 재조합 인간혈청알부민인 것인 조성물.

청구항 9

제7항에 있어서,

상기 인간혈청알부민의 제조는 서열번호 1의 아미노산 서열을 갖는 인간혈청알부민을 발현하는 형질전환세포를 배양하는 단계를 포함하는 것인 방법.

청구항 10

제8항에 있어서,

상기 형질전환세포를 배양하는 단계는 탄소수 16 내지 22의 지방산으로 구성된 군으로부터 선택되는 지방산을 포함하는 배지에서 배양하는 것인 방법.

청구항 11

제8항에 있어서,

상기 형질전환세포는 형질전환된 박테리아, 균류 및 효모, 및 유전자 삽입 동물로부터 분리된 세포로 구성된 군으로부터 선택되는 것인 방법.

청구항 12

제7항에 있어서,

분리된 인간혈청알부민에 탄소수 16 내지 22의 지방산으로 구성된 군으로부터 선택되는 지방산을 첨가하는 것이 특징인 방법.

청구항 13

제11항에 있어서,

상기 분리된 인간혈청알부민은 인간혈청알부민을 발현하는 유전자 삽입 동물의 혈액 또는 혈청, 또는 형질전환세포, 상기 세포의 배양물 또는 배양액, 또는 인간의 혈액 또는 혈청으로부터 분리된 것인 방법.

청구항 14

제7항에 있어서,

인간혈청알부민에 탄소수 16 내지 22의 지방산으로 구성된 군으로부터 선택되는 지방산을 처리하는 단계 이후에 열처리하는 단계를 추가로 포함하는 것이 특징인 방법.

명 세 서

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 탄소수 16 내지 22의 지방산으로 구성된 군으로부터 선택되는 지방산을 포함하는, 인간혈청알부민 제제를 제조하기 위한 열안정화용 조성물, 및 인간혈청알부민 제제를 제조하는 방법에 있어서, 인간혈청알부민에

탄소수 16 내지 22의 지방산으로 구성된 군으로부터 선택되는 지방산을 처리하여 열안정화하는 단계를 포함하는, 인간혈청알부민 제제의 제조 방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

[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[Dugiaczyk, A. *et al.*, Proc. Natl Acad. Sci. USA, 1998, 79: 71-75]. 또한 알부민은 혈장부피를 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 불량시 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 수 밖에 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.*, Biotechnique, 1897, 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 과정동안 변성되거나 다량체를 형성할 수 있는 가능성이 높다. 현재로서는 시판 중인 5% 또는 20% 알부민 제제가 별다른 부작용없이 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-아세틸 트립토판(N-acetyl tryptophan)을 첨가하여 제조된다.

[0005] 알부민의 다양한 순기능에 대한 연구가 지속되고 있고 이에 따라, 새로운 알부민 제제 개발 가능성이 높음을 고려할 때, 그 수요는 지속적으로 증가할 것으로 예상된다. 그러나, 현재 유일한 인간혈청알부민의 공급원은 인간의 혈액으로, 다소 제한적이어서, 알부민의 특성 연구 뿐만 아니라 새로운 공급원의 개발이 시급하다. 현재 생명과학기술분야의 높은 기술력을 고려할 때, 형질전환체를 이용한 재조합 인간혈청알부민은 알부민 제제 생산을 위한 또 다른 공급원이 될 수 있을 것이다.

[0006] 한편, 상기한 바와 같이 알부민은 물, 이온, 지방산, 호르몬 등의 다양한 물질과 결합하여 생리활성을 나타낸다. 따라서, 재조합 인간혈청알부민을 알부민 제제 생산에 활용하기 위해서는 이들 물질 중 알부민이 생리활성을 나타내기 위해 필수적인 요소를 동정하고 이들이 어떻게 결합하는지를 확인하고, 이를 재조합 인간혈청알부민에 적용하여 생리활성을 갖도록 하는 것이 필요하다.

[0007] 이에 본 발명자들은 생체 내에서 자연적으로 생리활성의 인간혈청알부민과 결합하고 있는 리간드를 동정하고, 이들 중 알부민 제제 제조과정의 필수적인 과정인 열처리에 대해 알부민을 안정화할 수 있는 물질을 발굴하고자 예의 연구 노력한 결과, 올레산, 리놀레산 등의 탄소수 16 내지 22의 포화 또는 불포화 지방산이 결합되어 있으며, 상기 지방산이 알부민에 열적 안정성을 향상시키므로, 알부민 제제 생산에 필요한 과정인 열처리 과정에서 변성을 방지하는 효과를 나타낼 수 있음을 확인하고 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 본 발명의 하나의 목적은 탄소수 16 내지 22의 지방산으로 구성된 군으로부터 선택되는 지방산 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 포함하는, 인간혈청알부민 제제를 제조하기 위한 열안정화용 조성물을 제공하는 것이다.

[0009] 본 발명의 다른 목적은 인간혈청알부민 제제를 제조하는 방법에 있어서, 인간혈청알부민에 탄소수 16 내지 22의 지방산으로 구성된 군으로부터 선택되는 지방산 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 처리하여 열안정화하는 단계를 포함하는, 인간혈청알부민 제제의 제조 방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0010] 상기 목적을 달성하기 위한 하나의 양태로서, 본 발명은 탄소수 16 내지 22의 지방산으로 구성된 군으로부터 선택되는 지방산 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 포함하는, 인간혈청알부민 제제를 제조하기 위한 열안정화용 조성물을 제공한다.

[0011] 본 발명의 용어 "알부민"은 세포의 기본 물질을 구성하는 단백질의 하나로,혈액 중에 매우 많이 존재하며, 간에서 생성된다. 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. 본 발명의 목적상, 본 발명의 조성물은 상기 알부민을 제제화하는 과정에서 열처리에 대한 안정성을 부여하기 위한 것으로서, 그 대상이 되는 알부민은 제제화가 가능한 모든 알부민을 포함할 수 있으며, 바람직하게는 인간혈장으로부터 유래한 것이거나, 유전자 조작에 의해 제조된 재조합 인간혈청알부민일 수 있다.

[0012] 상기 재조합 인간혈청알부민은 인간의 혈장에서 유래한 자연적인 인간혈청알부민과 대비되기 위한 개념으로 사용되는 용어로서, 인위적으로 생산되는 인간혈청알부민을 통칭하는 의미이다. 예컨대, 서열번호 1의 아미노산 서열을 갖는 폴리펩티드를 발현하도록 제조된 형질전환체로부터 획득한 인간혈청알부민으로서 혈장으로부터 분리된 인간혈청알부민과 동일한 아미노산 서열을 갖는다.

[0013] 본 발명의 용어 "형질전환체(transformant)"는 유전자 조작(genetic engineering)을 통해 특정 유전자를 발현하도록 유전적으로 변형된 유기체(genetically modified organism)로서, 본 발명의 목적상, 바람직하게 상기 특정 유전자는 서열번호 1의 아미노산 서열을 갖는 폴리펩티드, 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.

[0014] 본 발명의 "인간혈청알부민 제제"는 인간을 포함한 개체에 투여될 수 있는 형태로 제제화될 수 있는 인간혈청알부민으로 제조한 모든 제제를 포함하는 개념으로서, 현재 시판되고 있는 알부민 제제를 포함할 수 있으며, 이를 대체할 수 있도록 제조된, 시판용 알부민 제제와 유사한 성분, 기능 및 약효를 갖는 제제 역시 포함할 수 있다. 시판되고 있는 알부민 제제의 경우 제한적인 공급원인 혈액에 의존해야 하는 문제점을 안고 있으며, 이를 해결하기 위한 대안으로 재조합 인간혈청알부민을 이용한 재조합 인간혈청알부민 제제가 제조될 수 있다. 바람직하게, 상기 본 발명의 재조합 인간혈청알부민 제제는 서열번호 1의 인간혈청알부민을 발현하도록 제조된 형질전환체로부터 획득한 재조합 인간혈청알부민을 유효성분으로 포함할 수 있다.

[0015] 상기 인간혈청알부민을 인체에 투여 가능한 제제로 제조하기 위해서는 바이러스의 오염 및/또는 기타 감염을 방지하기 위하여 열처리 과정을 필요로 한다. 그러나 보통의 단백질과 유사하게 인간혈청알부민은 고온으로 처리시 구조가 변하거나 응집되는 등 변성을 일으킬 수 있다. 따라서, 이를 안정화시키기 위한 첨가제를 필요로 하며, 현재 혈장유래 알부민 제제의 제조 공정에서는 옥탄산염, 예를 들어 옥탄산 나트륨(sodium octanoate)과 N-아세틸 트립토판(N-acetyl tryptophan) 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.

[0016] 따라서, 가능하다면 인간혈장유래 또는 재조합 인간혈청알부민 제제의 제조시에 자연적인 인간혈청알부민과 가장 유사한 형태와 구조를 유지할 필요가 있다. 또한, 재조합 인간혈청알부민은 인간 혈장에서 추출한 인간혈청알부민과 몇몇 속성이 다르므로, 재조합 인간혈청알부민 제제를 제조하기 위한 열안정화용 조성물로서 임의의 첨가물이 아닌 생체 내에 존재하는 물질 을 처리하는 것이 보다 안전할 수 있다. 이에 본 발명에서는 혈장으로부터 분리한 인간혈청알부민에 결합되어 있는 것으로 확인하여 동정된 탄소수 16 내지 22의 지방산을 이용하였다. 상기 본 발명의 "탄소수 16 내지 22의 지방산"은 지방산 중에서 16 내지 22개의 탄소를 갖는 지방산을 총칭하는 의미로서, 일 말단에는 친수성 카르복실기 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; docosahexaenoic acid), 또는 이들의 조합으로부터 선택되는 것일 수 있다. 또한 상기 지방산은 약학적으로 허용가능한 염의 형태로 이용될 수 있다.

[0017] 상기 본 발명의 "팔미트산"은 16개 탄소 사슬을 갖는 포화 지방산으로 IUPAC 명으로는 헥사데칸산(hexadecanoic acid)이라고 한다. $CH_3(CH_2)_{14}CO_2H$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 첫번째 지방산으로 장쇄 지방산의 전구물질이다. 생물학적으로 일부 단백질은 팔미토일기와 결합하여 수식될 수 있으며 이를 팔미토일화(palmitoylation)라 하고 이는 단백질의 막국부화(membrane localisation)에 중요하다.

[0018] 상기 본 발명의 "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 $CH_3(CH_2)_5CH=CH(CH_2)_7CO_2H$의 화학식을 갖지며, 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.

[0019] 상기 본 발명의 "스테아르산"은 18개 탄소 사슬을 갖는 포화 지방산으로 IUPAC 명으로는 옥타데칸산(octadecanoic acid)이라고 한다. $CH_3(CH_2)_{16}CO_2H$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 머리부분과 유기 용매에 대한 용해도를 제공하는 비극성 사슬을 가지므로 이중 기능성을 갖는다. 이러한 특성으로 인해 계면활성제 또는 유연제로 사용될 수 있다.

[0020] 상기 본 발명의 "올레산"은 다양한 동식물의 유지로부터 생산되는 무색무취의 오일이다. 시판되는 제품은 노란색을 띠기도 한다. 화학적으로 일불포화 오메가-9 지방산(monounsaturated omega-9 fatty acid)로 분류되며 $CH_3(CH_2)_7CH=CH(CH_2)_7CO_2H$의 화학식을 갖는다. 한편 올레산은 인간 지방조직에서 가장 풍부한 지방산이다.

[0021] 상기 본 발명의 "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 첫번째 이중결합은 소수성 말단

인 메틸말단으로부터 6번째 탄소에 위치한다.

[0022] 상기 본 발명의 "리놀렌산"은 α와 ɣ의 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 메틸말단 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 ɣ-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. ɣ-리놀렌산은 가몰렌산(gamolenic acid)라고도 불리며, 염증성 및 자가면역성 질환에 대한 효과를 나타내는 것으로 알려져 있다.

[0023] 상기 본 발명의 "EPA(에이코사펜타엔산; eicosapentaenoic acid)"는 오메가-3 지방산으로 팀노돈산(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.

[0024] 마지막으로, 상기 본 발명의 "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, 뇌인지질 및 망막의 주된 지방산으로, DHA를 섭취하면 혈중 트리글리세라이드 수준을 감소시킴으로써 심장병의 위험을 감소시킬 수 있다. 또한, 정상치 미만의 DHA 수준은 알츠하이머와도 관련된다.

[0025] 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 메틸말단으로부터 이중결합이 시작되는 탄소의 위치를 나타낸다. 상기 n 대시에 ω를 쓰기도 한다. 예컨대, 본 발명의 팔미트산은 탄소수 16의 포화지방산이므로 16:0, 팔미톨레산은 메틸말단으로부터 7번째 탄소에 하나의 이중결합을 가지므로 16:1(n-7) 또는 16:1(ω-7), 스테아르산은 탄소수 18의 포화지방산이므로 18:0, 올레산은 메틸말단으로부터 9번째 탄소에 하나의 이중결합을 가지므로 18:1(n-9) 또는 18:1(ω-9), 리놀레산은 18:2(n-6) 또는 18:2(ω-6), 리놀렌산-α는 18:3(n-3) 또는 18:3(ω-3), 리놀렌산-ɣ는 18:3(n-6) 또는 18:3(ω-6), EPA는 20:5(n-3), 마지막으로 DHA는 22:6(n-3)으로 표기한다.

[0026] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 혈장유래 인간혈청알부민을 원료로 하는 주사제의 구조를 확인하고 질량분석을 수행한 결과, 올레산을 비롯한 탄소수 18의 지방산이 결합하고 있음을 확인하였다(도 2 및 3). 또한 알부민에 대한 상기 지방산의 결합위치를 확인하였다(도 1). 이에 올레산 또는 이외의 탄소수 18의 지방산, 탄소수 16의 지방산, EPA 또는 DHA를 지방산 유리(fatty acid free) 인간혈청알부민 용액에 첨가하여 고온 처리하여, 탄소수 18의 올레산을 첨가한 인간혈청알부민은 올레산을 첨가하지 않은 지방산 유리 인간혈청알부민 용액에 비해 70℃의 고온에서도 훨씬 더 오랫동안(2배 이상) 변성되지 않고 안정한 형태를 유지할 수 있음을 확인하였으며(표 3 내지 6), 이외의 다른 탄소수 18의 지방산을 첨가한 알부민 용액도 지방산 유리 알부민 용액에 비해 오랜 시간 변형 없이 지속될 수 있음을 확인하였다(표 7). 또한 이외에 탄소수 16의 지방산, EPA 및 DHA에 대해서도 동일한 효과가 나타남을 확인하였다(표 8 및 9).

[0027] 본 발명의 용어 "약학적으로 허용가능한 염"은 상기 조성물의 원하는 생물학적 및/또는 생리학적 활성을 보유하고 있고, 상기 조성물에 노출되는 세포나 인간에게 독성이 없는, 원하지 않는 독물학적 효과는 최소한으로 나타

내는 모든 염을 의미한다. 염으로는 약학적으로 허용가능한 유리산(free acid)에 의해 형성된 산부가염이 유용하다. 산부가염은 통상의 방법, 예를 들어 화합물을 과량의 산 수용액에 용해시키고, 이 염을 수혼화성 유기 용매, 예를 들어 메탄올, 에탄올, 아세톤 또는 아세토니트릴을 사용하여 침전시켜서 제조한다. 동 몰량의 화합물 및 물 중의 산 또는 알콜(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(glycollic acid), 글루콘산(gluconic acid), 갈락투론산, 글루탐산, 글루타르산(glutaric acid), 글루쿠론산(glucuronic acid), 아스파르트산, 아스코르브산, 카본산, 바닐릭산, 히드로아이오딕산 등을 사용할 수 있으며, 이들에 제한되지 않는다.

[0028] 또한, 염기를 사용하여 약학적으로 허용가능한 금속염을 만들 수 있다. 알칼리 금속 또는 알칼리 토금속염은, 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 칼슘염을 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.

[0029] 상기 탄소수 16 내지 22의 지방산 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염은, 달리 지시되지 않는 한, 탄소수 16 내지 22의 지방산에 존재할 수 있는 산성 또는 염기성 기의 염을 포함한다. 예를 들어 약학적으로 허용가능한 염으로는 히드록시기의 나트륨, 칼슘 및 칼륨 염 등이 포함될 수 있고, 아미노기의 기타 약학적으로 허용가능한 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.

[0030] 바람직하게 상기 본 발명의 열안정화용 조성물은 알부민에 대해 상기 지방산이 1:0.5 내지 1:2의 몰비가 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 몰비가 되도록 첨가될 수 있다.

[0031] 본 발명의 열안정화용 조성물을 처리하여 제조한 재조합 인간혈청알부민 제제는 활성 물질이 표적 세포로 이동할 수 있는 임의의 장치에 의해 투여될 수 있다. 바람직한 투여방식 및 제제는 정맥 주사제, 피하 주사제, 피내 주사제, 근육 주사제, 점적 주사제 등의 주사제일 수 있다. 주사제는 생리식염액, 링겔액 등의 수성용제, 식물유, 고급 지방산 에스테르(예, 올레인산에칠 등), 알코올 류(예, 에탄올, 벤질알코올, 프로필렌글리콜, 글리세린 등) 등의 비수성용제 등을 이용하여 제조할 수 있고, 변질 방지를 위한 안정화제(예, 아스코르빈산, 아황산수소나트륨, 피로아황산나트륨, BHA, 토코페롤, EDTA 등), 유화제, pH 조절을 위한 완충제, 미생물 발육을 저지하기 위한 보존제(예, 질산페닐수은, 치메로살, 염화벤잘코늄, 페놀, 크레솔, 벤질알코올 등) 등의 약학적 담체를 포함할 수 있다.

[0032] 다른 하나의 양태로서, 본 발명은 인간혈청알부민 제제를 제조하는 방법에 있어서, 인간혈청알부민에 탄소수 16 내지 22의 지방산으로 구성된 군으로부터 선택되는 지방산 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 처리하여 열안정화하는 단계를 포함하는, 인간혈청알부민 제제의 제조 방법을 제공한다.

[0033] 바람직하게 본 발명에 따른 인간혈청알부민 제제는 인간혈장으로부터 분리한 알부민 또는 유전자 조작에 의해 제조된 재조합 인간혈청알부민을 사용하여 제조할 수 있다.

[0034] 본 발명에 따른 인간혈청알부민 제제는 전술한 바와 같이 인간에 투여하는 것을 목적으로 하므로, 이의 제조 방법은 오염 및/또는 감염 가능성을 차단하기 위한 열처리 과정을 포함한다. 이에 따라, 상기 열처리 과정에 의한 단백질의 변성을 방지하기 위하여 인간혈청알부민에 탄소수 16 내지 22의 지방산으로 구성된 군으로부터 선택되는 지방산 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 처리하여 열안정화하는 단계를 포함하는 것이 특징이다.

[0035] 기존의 인간혈청알부민 제제의 제조 과정에서는 옥탄산나트륨 및/또는 N-아세틸트립토판 등을 사용하여 열처리에 대한 안정성을 부여하였으나, 본 발명에서는 탄소수 16 내지 22의 지방산이 상기 화합물들에 비해 동등하거

나 우수한 열안정화 효과를 가짐을 확인하였으며, 추가로 탄소수 18의 지방산의 경우 인간혈청알부민 제제에 포함되어 있는 바 부작용이 전혀 없이 자연적인 인간혈청알부민과 가장 유사한 형태 및 구조를 유지할 수 있다는 장점이 있다.

[0036] 본 발명의 제제를 제조함에 있어서, 재조합 인간혈청알부민을 사용하는 경우, 상기 재조합 인간혈청알부민은 바람직하게는 서열번호 1의 아미노산 서열을 갖는 폴리펩티드인 인간혈청알부민을 발현하는 형질전환체로부터 수득할 수 있다. 상기 형질전환체의 정의는 전술한 바와 동일하다.

[0037] 본 발명에서 사용되는 용어, "처리"는 열안정화를 위하여 탄소수 16 내지 22의 지방산 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 화학적, 생물학적 작용 등 어떠한 형태로든 포함시키는 모든 과정을 총칭하는 의미이다. 예컨대, 인간혈청알부민을 제조하기 위한 배양과정에서 배지 조성물에 포함시키거나, 인간혈청알부민의 가공과정에서 조성물의 형태로 포함시키는 등 열처리 이전의 어떠한 단계에서든지 적용시킬 수 있다.

[0038] 바람직하게 형질전환 세포로부터 재조합 인간혈청알부민을 수득하는 경우, 본 발명의 제조 방법은 형질전환 세포를 배양하는 단계를 포함할 수 있다. 이때, 탄소수 16 내지 22의 지방산 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 처리하는 과정은 상기 형질전환 세포를 배양하는 배지에 본 발명의 조성물을 첨가하여 배양함으로써 달성될 수 있다.

[0039] 상기 형질전환세포는 형질전환된 박테리아, 균류 및 효모 뿐만 아니라 인간혈청알부민을 발현하는 유전자 삽입 동물로부터 분리된 세포를 포함한다.

[0040] 또는, 배양된 형질전환 세포 또는 유전자 삽입 동물로부터 분리된 세포, 상기 세포 배양물 또는 배양액으로부터 또는 유전자 삽입 동물의 혈액 또는 혈장으로부터 재조합 인간혈청알부민을 분리 및/또는 정제한 후, 또는 인간 혈장으로부터 인간혈청알부민을 분리 및/또는 정제한 후, 본 발명의 지방산 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 처리하여 열안정화하는 단계를 수행할 수 있다.

[0041] 상기 분리된 인간혈청알부민은 인간혈청알부민을 발현하는 형질전환동물의 혈액 또는 혈청, 형질전환세포, 상기 세포의 배양물 또는 배양액, 또는 인간의 혈액 또는 혈청으로부터 분리 및/또는 정제된 인간혈청알부민일 수 있다.

[0042] 바람직하게 본 발명의 알부민 제제를 제조하는 방법에 따르면, 오염 및/또는감염 방지를 위해 수행되는 열처리 단계는 인간혈청알부민에 탄소수 16 내지 22의 지방산을 처리하는 단계 이후에 수행될 수 있다.

[0043] 본 발명의 인간혈청알부민 제제의 제조 방법에 재조합 인간혈청알부민을 이용하면, 종래 혈장유래 알부민 제제 제조에 있어서 공급원이 제한적인 문제를 해결할 수 있다. 그러나, 인간혈청알부민은 생체 내에서 다양한 리간드와 결합하여 안정한 구조를 형성하고 생리활성을 나타내므로, 재조합 인간혈청알부민을 제제화하기 위해서는 생리활성 알부민의 구조 및/또는 이에 결합한 리간드에 대한 고찰이 선행되어야 할 것이다. 한편, 종래의 혈장유래 인간혈청알부민을 이용한 제제의 제조방법에 있어서도 열처리에 대해 안정성을 부여하기 위하여 안정성 여부가 검증되지 않은 옥탄산 나트륨 및 N-아세틸 트립토판와 같은 외래물질을 첨가하였으나, 이를 대체할 수 있는 생체 내에 자연적으로 존재하는 물질을 발굴할 필요가 있다. 이에 본 발명자들은 혈장유래 인간혈청알부민에 탄소수 16 내지 22의 지방산으로 구성된 군으로부터 선택되는 지방산이 결합하고 있으며, 이들이 인간혈청알부민의 안정화 특히, 열처리에 대한 안정성을 부여할 수 있음을 확인함으로써, 재조합 인간혈청알부민에 탄소수 16 내지 22의 지방산으로 구성된 군으로부터 선택되는 지방산을 첨가하여 열처리 과정에도 안정한 알부민을 형성할 수 있으므로 이를 이용한 제제의 제조가 가능함을 확인하였다.

발명의 효과

[0044] 본 발명에 따른 탄소수 16 내지 22의 지방산으로 구성된 군으로부터 선택되는 지방산을 첨가하면, 인간혈청알부민 제제의 제조시 열처리 과정에도 안정한 알부민을 생산하는데 유용하게 이용될 수 있으며, 재조합 인간혈청알부민을 이용하는 경우 인간 유래의 것과 가장 유사한 재조합 인간혈청알부민을 생산할 수 있어 부작용없이 산업적으로 유용하게 사용할 수 있으며, 혈장유래 인간혈청알부민을 이용하는 경우에도 외래의 물질이 아닌 생체 내에 자연적으로 존재하는 다양한 지방산을 포함하는 조성물을 이용하므로 독성이나 부작용의 걱정 없이 제제를 생산할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0045] 도 1은 X-선 결정학법에 의해 획득한 제제화되어 상용화되고 있는 혈장유래 인간혈청알부민을 원료로 하는 녹십자사의 20% 인간혈청알부민 주사제로부터 수득한 인간혈청알부민 결정의 3차원 입체구조를 나타낸 도이다. 종래 혈장유래 인간혈청알부민의 제조공정에서 열안정화제로 사용되는 옥탄산염(octanoic acid)과 N-아세틸 트립토판(N-acetyl tryptophan)의 분해산물인 L-트립토판의 결합위치를 막대모델(stick model)로 표시하였다. 탄소수 18의 지방산 중 하나인 올레산의 결합위치는 구형모델(sphere model)로 표시하였다.

도 2는 제제화되어 상용화되고 있는 혈장유래 인간혈청알부민을 원료로 하는 녹십자사의 20% 인간혈청알부민 주사제의 질량분석 결과를 나타낸 도이다.

도 3은 제제화되어 상용화되고 있는 혈장유래 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.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0046] 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.

[0047] **실시예 1: 혈장유래 인간혈청알부민의 결정화 조건 탐색**

[0048] 생리활성을 갖는 혈장유래 인간혈청알부민의 구조분석을 위하여 녹십자사의 인간혈청알부민을 결정화하였다. 이하, 침전제 실험을 통하여 결정된 결정화를 위한 최적의 농도는 80 mg/ml로 결정하였다. 초기 결정화는 희소행렬(sparse matrix) 이론(Jancarik & Kim, 1991)에 의거한 Hampton research 사(Naguna Niguel, Ca, USA)의 스크리닝 키트인 스크린 I & II, 인덱스 스크린 시약을 이용하였으며 행잉드롭(hanging drop) 또는 시팅드롭(sitting drop) 증기확산법(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.

[0049] 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.

[0050] 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 ㎕가 들어있는 웰에 상기 결정화 용액과 150 mg/ml 단백질 용액을 1:1로 섞어서 만든 행잉드롭(hanging drop) 2 ㎕를 커버글래스(cover glass)에 올려놓고 행잉드롭 확산법(diffusion method)으로 결정을 만들었다.

[0051] **실시예 2: 혈장유래 인간혈청알부민의 동결(cryo) 조건 탐색**

[0052] 안정화된 동결조건을 찾는 과정은 싱크로트론(Synchrotron)을 이용한 데이터 수집과정에서 있어서 필수적인 단계이다. 이는 싱크로트론으로부터의 방사선(radiation)의 세기가 강해, 결정들이 데이터 수집과정에서 쉽게 분해(decay)되어 완전한 데이터 수집이 불가능하기 때문이다. 따라서 결정을 순간 냉동(flash frozen)시킬 수 있는 결정화 용액의 조건을 찾아내야 한다.

[0053] 이에 본 발명에서는 녹십자사의 인간혈청알부민에 대하여 LV CryoOil(MiTeGen, Ithaca, NY)을 사용하였다. 녹십자사의 인간혈청알부민 결정이 있는 드롭 옆에 2㎕의 LV CryoOil을 놓고 결정을 마운팅 루프(mounting loop)로 건져서 LV CryoOil에 담갔다가 다시 결정을 마운팅 루프로 건져서 순간 냉동시켰다.

[0054] **실시예 3: 혈장유래 인간혈청알부민의 X-선 자료수집**

[0055] 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 혈청유래 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)

[0056]

[0057] **실시예 4: 분자치환법을 이용한 혈장유래 인간혈청알부민의 위상문제 해결**

[0058] 녹십자사의 인간혈청알부민의 결정구조는 분자치환법(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:1AO6)의 구조를 검색 모델(search model)로 이용하여 EPMR을 사용, 녹십자사의 인간혈청알부민에 대한 해법(solution)을 찾아내었다.

[0059] **실시예 5: 혈장유래 인간혈청알부민의 삼차원 결정구조 규명**

[0060] 녹십자사의 인간혈청알부민의 위상은 인간알부민 모델을 이용한 분자치환법으로 얻었다. 초기 모델은 그래픽 소프트웨어인 COOT와 O를 이용하여 만들었으며 에너지 최소화(energy minimization)는 CNS를 이용하여 진행하였다. 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 113.5Å x86.8Å
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	19.78-2.17Å
Amplitude cutoff	0.0 σ
R-factor	19.25 %
Free R-factor	24.28 %
Stereochemical ideality:	
Bond	0.008Å
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 %

[0061]

[0062] 이와 같은 방법으로 규명된 삼차원 구조는 기본적으로 기존의 apo-HSA 구조와 유사하다. 제제 수준의 혈장유래 인간혈청알부민(pharmaceutical grade plasma-derived HSA)의 제조공정에서 사용되는 옥탄산염(octanoic acid)과 N-아세틸 트리립토판(N-acetyl tryptophan)의 결합위치도 확인하였다. 두 개의 옥탄산염은 지방산 결합부위로 알려진 자리에 결합되었고 N-아세틸 트립토판은 Sudlow site II에 결합되었다. 이와 더불어, 예상치 못한 지방산의 결합이 확인되었고, 이후 X-ray 구조와 질량분광법 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.

[0063] **실시예 6: 인간혈청알부민의 열안정성에 대한 올레산의 효과**

[0064] 녹십자사의 인간혈청알부민의 구조규명 결과 혈장유래 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/ml 이었으며, 상기 용액을 25 ㎕ 취하고 실험군에는 이와 동일한 몰비가 되도록 올레산을 첨가하였다. 구체적으로 온도를 65℃, 70℃ 및 75℃로 유지하면서 각각 30분, 5분 및 3분 간격으로 단백질의 변성으로 인한 침전 형성 여부를 확인하였다. 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 열안정화제로 첨가되었던 옥탄산 나트륨 및 N-아세틸 트립토판을 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 퀵스핀 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

[0065]

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 퀵스핀 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

[0066]

표 5

75℃ 열처리 조건

분 / 단백질	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

[0067]

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

[0068]

[0069] **실시예 7: 인간혈청알부민의 열안정성에 대한 다양한 탄소수 18의 지방산의 효과**

[0070] 상기 실시예 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℃에서 열안정화 효과를 확인하였다. 30분까지는 3분 간격으로 이후로는 5분 간격으로 관찰하였다. 대조군으로는 실시예 6과 동일하게 지방산을 처리하지 않은 지방산 유리(fatty acid free) 인간혈청알부민 용액을 사용하였다. 하기 표 7에 나타난 결과와 같이, 상기 탄소수 18의 지방산을 처리한 실험군 모두가 대조군 인간혈청알부민에 비해 뛰어난 열처리에 대한 안정성을 갖는 것을 확인하였다. 상기 실시예 6에 기재한 바와 같이 각각의 지방산은 알부민과 동일한 몰비를 갖도록 첨가하였다.

표 7

70℃ 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
리놀레산과의 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

[0071]

[0072] **실시예 8: 인간혈청알부민의 열안정성에 대한 다양한 탄소수 16의 지방산의 효과**

[0073] 상기 실시예 6 및 7에서 올레산을 비롯한 다양한 탄소수 18의 지방산을 이용하여 열처리에 대한 안정성을 확인한 실험과 동일한 방법으로 탄소수 18의 올레산 뿐만 아니라 탄소수 16의 지방산인 팔미트산(palmitic acid) 및 팔미톨레산(palmitoleic acid)을 이용하여 65℃에서 열안정화 효과를 확인하였다. 시료를 65℃로 가온하고 5분 간격으로 관찰하였다. 대조군으로는 상기 실시예 6 및 7과 동일하게 지방산을 처리하지 않은 지방산 유리 인간혈청알부민 용액을 사용하였다. 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 6 및 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 몰비임
매 5분 마다 퀵스핀 후 침전을 확인
△ : 미세하게 뿌옇게 흐려진 상태, 살짝 흔들어주면 뿌연정도가 약해짐
X : 침전 형성

[0074]

[0075] **실시예 9: 인간혈청알부민의 열안정성에 대한 EPA 및 DHA의 효과**

[0076] 상기 실시예 6 내지 8에서 다양한 탄소수 16 및 18의 지방산을 이용하여 열처리에 대한 안정성을 확인한 실험과 동일한 방법으로 탄소수 18의 올레산 뿐만 아니라 탄소수 20 및 22의 지방산인 EPA(eicosapentaenoic acid) 및 DHA(docosahexanoic acid)를 이용하여 65℃에서 열안정화 효과를 확인하였다. 시료를 65℃로 가온하고 처음 60분간은 5분 간격으로, 이후 130분까지는 10분 간격으로, 그 이후로는 30분 간격으로 관찰하였다. 대조군으로는 상기 실시예 6 내지 8과 동일하게 지방산을 처리하지 않은 지방산 유리 인간혈청알부민 용액을 사용하였다. 하기 표 9에 나타난 결과와 같이, 상기 EPA 및 DHA을 처리한 실험군 모두가 대조군 인간혈청알부민에 비해 현저히 뛰어난 올레산과 유사한 수준의 열처리에 대한 안정성을 갖는 것을 확인하였다. 상기 실시예 6 내지 8에 기재한 바와 같이 각각의 지방산은 알부민과 동일한 몰비를 갖도록 첨가하였다.

표 9

단백질 \ 분	5	10	15	20	25	30	35	40	45	50	55	60
알부민(대조군)	O	O	△	△	△	ㅍ	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

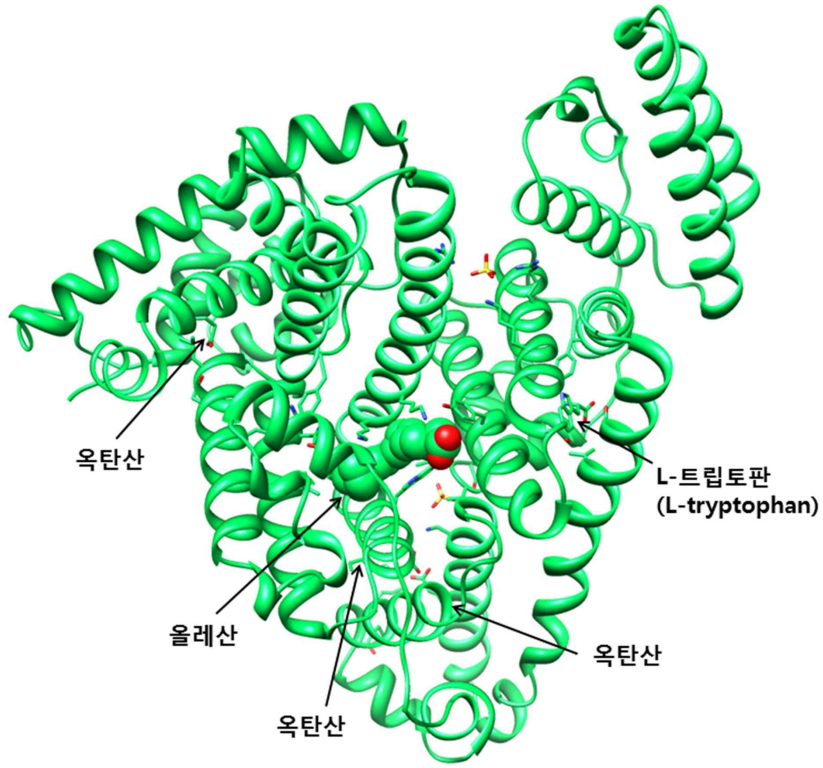
단백질 \ 분	70	80	90	100	110	120	130	160	190	220	250	280
알부민(대조군)	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
알부민 + EPA	O	O	O	O	O	O	O	O	O	△	△	△
알부민 + DHA	O	O	O	O	O	O	O	O	O	△	△	△
알부민 + 올레산	O	O	O	O	O	O	O	O	O	△	△	△

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

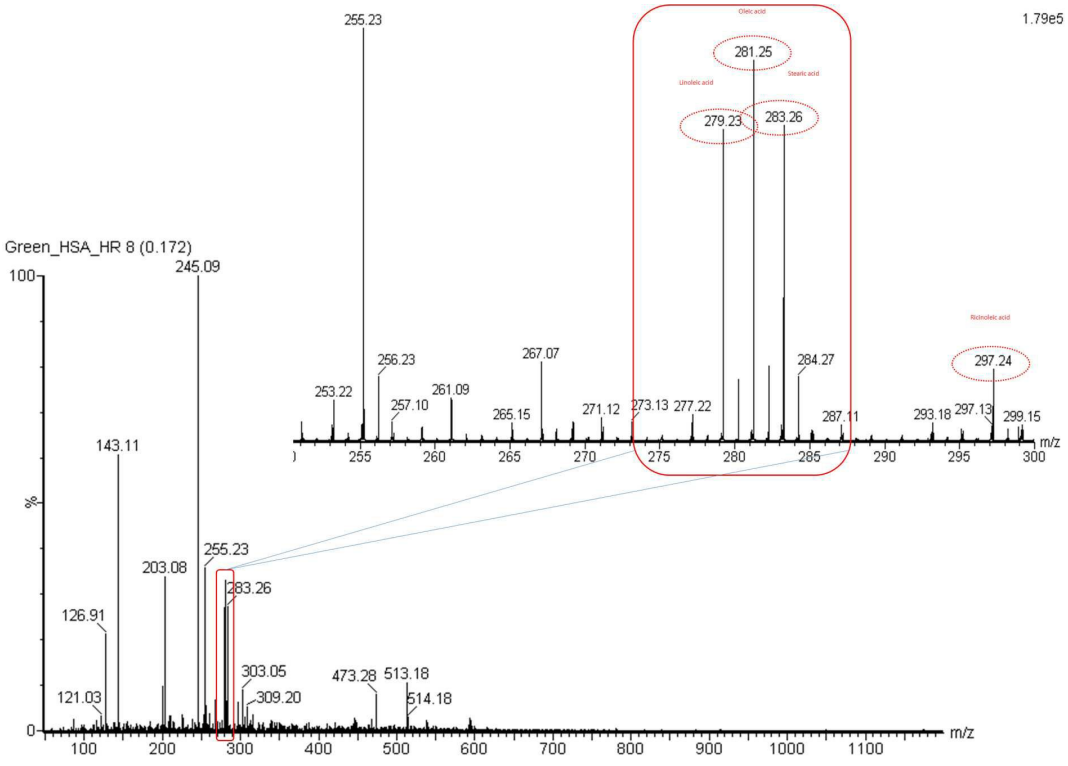
[0077]

도면

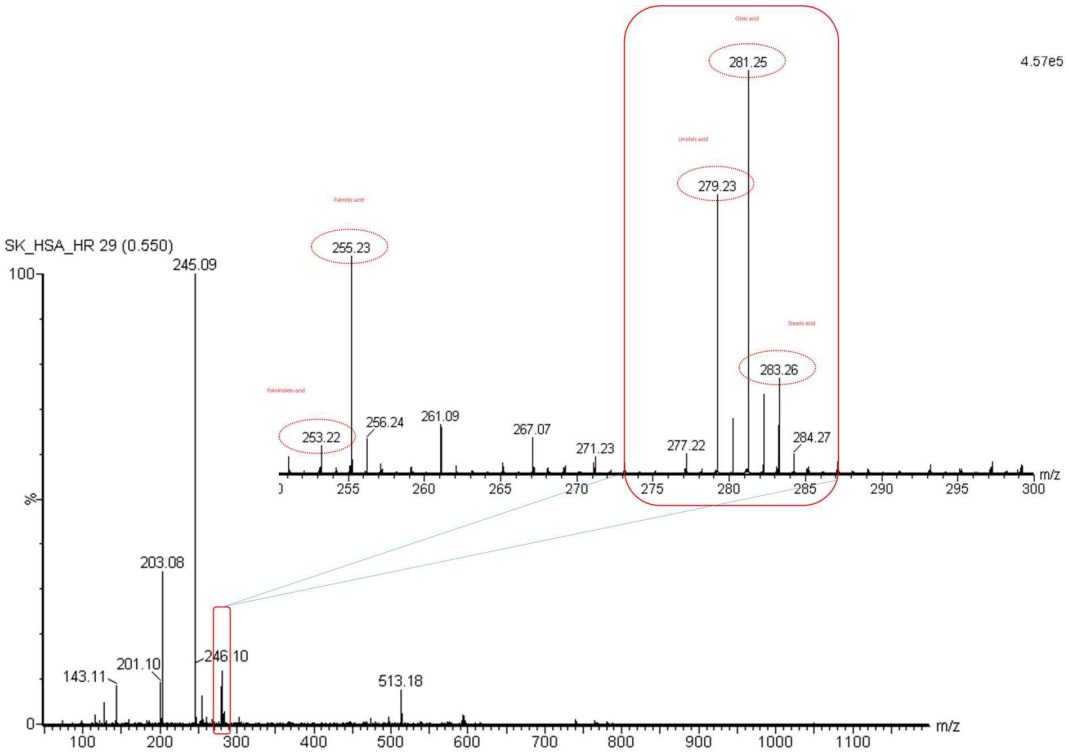
도면1


옥탄산
L-트립토판
(L-tryptophan)
올레산
옥탄산
옥탄산

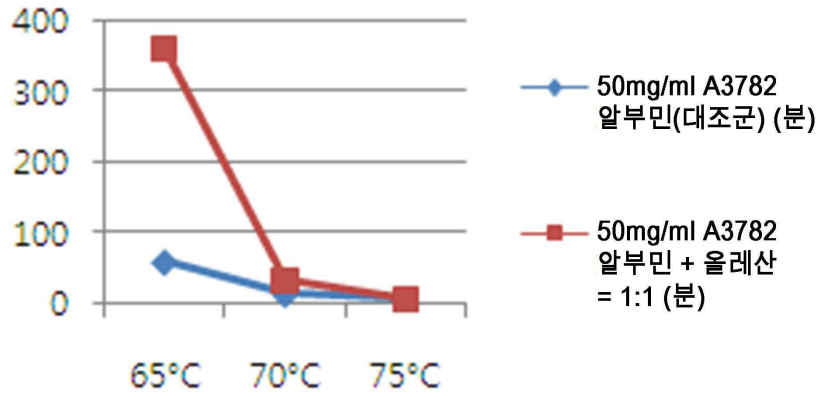
도면2

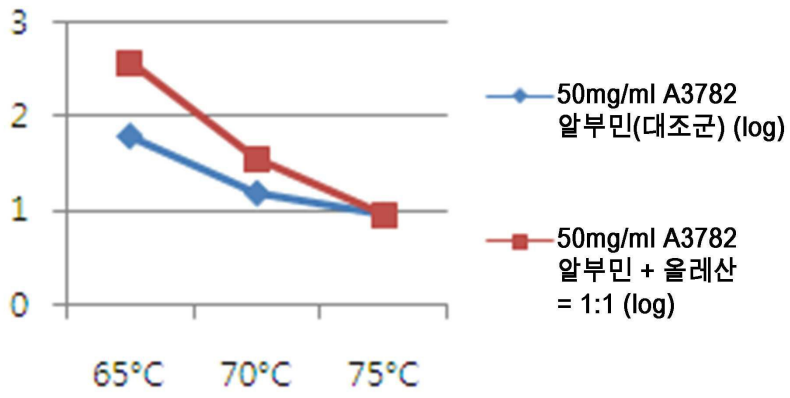

Green_HSA_HR 8 (0.172)
100
%
0
245.09
143.11
255.23
203.08
283.26
126.91
303.05
121.03
309.20
473.28
513.18
514.18
m/z
255.23
1.79e5
281.25
279.23
283.26
253.22
256.23
257.10
261.09
267.07
265.15
271.12
273.13
277.22
284.27
287.11
293.18
297.13
297.24
299.15
m/z

도면3


SK_HSA_HR 29 (0.550)
100
%
0
245.09
203.08
143.11
201.10
246.10
513.18
255.23
253.22
256.24
261.09
267.07
271.23
277.22
281.25
279.23
283.26
284.27
4.57e5
m/z
100
200
300
400
500
600
700
800
900
1000
1100
255
260
265
270
275
280
285
290
295
300

도면4


400
300
200
100
0
65°C
70°C
75°C
50mg/ml A3782
알부민(대조군) (분)
50mg/ml A3782
알부민 + 올레산
= 1:1 (분)


3
2
1
0
65°C
70°C
75°C
50mg/ml A3782
알부민(대조군) (log)
50mg/ml A3782
알부민 + 올레산
= 1:1 (log)

서 열 목 록

<110> Ewha University - Industry Collaboration Foundation

<120> A composition for thermal-stability of human serum albumin

<130> PA130129/KR

<150> KR 10-2012-0148271

<151> 2012-12-18

<160> 1

<170> KopatentIn 2.0

<210> 1

<211> 585

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> human serum albumin

<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