(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(51) Int. Cl.[7]
A61L 2/00

(45) 공고일자 2003년10월30일
(11) 등록번호 10-0389846
(24) 등록일자 2003년06월19일

(21) 출원번호 10-1996-0700298
(22) 출원일자 1996년01월20일
번역문제출일자 1996년01월20일
(86) 국제출원번호 PCT/CA1994/00401
(86) 국제출원일자 1994년07월22일
(81) 지정국 국내특허 : 오스트레일리아 바베이도스 불가리아 브라질 캐나다 헝가리 일본 북한 대한민국 스리랑카 마다가스카르 몽고 노르웨이 폴란드 루마니아 미국 중국 체코 그루지야 리투아니아 라트비아 뉴질랜드 슬로베니아 슬로바키아 AP ARIPO특허 : 수단 케냐
EA 유라시아특허 : 러시아 아르메니아 벨라루스 키르기즈 카자흐스탄 몰도바 타지키스탄
EP 유럽특허 : 오스트리아 스위스 리히텐슈타인 독일 덴마크 스페인 핀랜드 영국 룩셈부르크 네덜란드 스웨덴 포르투칼
OA OAPI특허 : 부르키나파소 베넹 중앙아프리카 콩고 코트디브와르 카메룬 가봉 기네 말리 모리타니 니제르 세네갈 차드 토고

(65) 공개번호 특1996-0703625
(43) 공개일자 1996년08월31일
(87) 국제공개번호 WO 1995/03071
(87) 국제공개일자 1995년02월02일

(30) 우선권주장 095698 1993년07월22일 미국(US)

(73) 특허권자 클리어런트, 인코포레이티드
미국 캘리포니아 90025 로스 앤젤레스 11111 산타 모니카 블루바드 수트 650
(72) 발명자 랜들 에스. 켄트
미합중국 캘리포니아 91360 싸우전드 오우크스 래드클리프3512
(74) 대리인 박장원

심사관 : 김수미

(54) 조사과민제품의살균방법

명세서

<1> 2. 발명의 상세한 설명

<2> 본 발명은 비루스, 박테리아, 이스트, 곰팡이, 미코플라즈마 및 기생충과 같은 생물학적 오염체를 제거하는 제품의 살균방법에 관한 것이다.

<3> 인체, 수의용 또는 실험용으로 제조되는 여러가지 제품은 비루스, 박테리아, 이스트, 곰팡이, 미코플라즈마 및 기생충과 같은 필요없고 유해할 수 있는 오염체를 함유할 수 있다. 결국, 이러한 제품이 사용되기 전에 오염체가 없는 것이 확실하다는 것은 매우 중요하다. 이것은 제품이 예를들어 수혈, 기관이식 및 다른 형태의 인체 치료에서 환자에게 직접 투여될 때 특히 한정적이다. 이것은 또한 여러가지 형태의 플라즈마를 함유하고 미코플라즈마 또는 다른 비루스 오염체에 걸리기 쉬울 수 있는 배지에서 성장되는 여러가지 생물공학 제품에 대해 한정적이다.

<4> 이전에, 대부분의 방법은 제품으로부터 오염체의 제거라기 보다 특정 오염체에 대해 제품을 스크린하거나 시험하는 방법을 포함하였다(1). 오염체에 대해 양성인 제품은 사용되지만 않는다. 스크리닝 방법의 실예는 혈액 제공자로부터 인체 혈액에서 특정 비루스에 대한 시험을 포함한다. 그러나, 이러한 방법은 항상 신뢰할 수 없으며 매우 낮은 수의 비루스 존재를 검출할 수 없다. 이것은 위음성 결과 (false negative results)에 연관된 결론의 관점에서 시험의 수치 또는 확실성을 감소시킨다. 위음성 결과는 어떠한 경우에, 예를들어 후천성 면역결핍증(AIDS)의 경우에 생명 위협이 있을 수 있다. 또한, 몇가지 일예에서, 제품이 오염되어 있는 지 또는 아닌지를 측정하는 것이 수개월은 아니지만, 수주 걸릴 수 있다.

<5> 보다 최근의 연구는 제품에서 오염체를 제거하거나 불활성화하는 방법에 집중되었다. 이러한 방법은 열처리, 여과, 화학 불활성제의 첨가 및 감마선 조사를 포함한다(2). 감마선 조사가 비루스 및 박테리아를 파괴하는데 효과적이라고 잘알려져 있다(2, 3). 사실상, 한 저자는 감마선 조사가 비루스의 수준을 감소시키거나 제거하는데 가장 효과적인 방법이라고 단정하고 있다(2). 그러나, 조사 과민 제품, 이를테면 혈액에 적용할 때, 감마선 조사는 또한 제품 자체에 대해 손상 작용을 가질 수 있다. 특히, 높은 조사량은 적혈구, 혈소판 및 과립구에 유해하다고 알려진 바 있다(3).

<6> 상기의 관점에서, 제품에 대한 부작용이 없으면서 생물학적 오염체를 제거하는데 효과적인 제품의 살균방법을 동시에 제공할 필요성이 있다. 오염체의 일예는 비루스, 박테리아, 이스트, 곰팡이, 미코플라즈마 및 기생충을 포함한다.

<7> 따라서, 본 발명은 약 0.1 kGy/hr - 약 3.2 kGy/hr의 비율에서 감마선 조사로서 주위 온도에서 제품을 조사하는 것으로 이루어진 제품의 살균방법을 제공한다.

<8> 바람직한 일예에서, 제품을 10 시간 보다 적지 않은 시간 동안 조사한다.

<9> 본 발명의 방법에 의하여, 실제로 제품에 손상을 감소시키는 연장된 기간에 걸쳐 감마선을 송출한다. 전형적으로, 10 시간 보다 적지 않은 시간, 바람직하게는 약 20-약 40시간, 보다 바람직하게는 약 20-약 30 시간 동안 조사를 수행한다. 조사율은 살균될 제품 그외에 조사 시간의 길이에 따라, 약 0.5 kGy/hr-약 3.0 kGy/hr이다. 제공된 조사 총량은 전형적으로 약 20-약 32 kGy이며 그 이유는 이들 수준이 비루스와 같은 오염체를 파괴하는데 효과적이라고 보이기 때문이었다.

<10> 바람직하게는 20% 이하의 고체를 함유한 형태로 제품을 조사한다. 결국, 어떤 제품은 조사전에 희석되어야 한다. 희석된 형태로 제품을 처리하는 것은 또한 조사 중에 제품의 분해를 감소시키는 작용을 한다. 희석제의 선택은 조사될 제품의 특성에 따른다. 예를들어, 혈구를 조사할 때 시트레이트 포스페이트 덱스트로스와 같은 생리적으로 허용되는 희석제를 선택할 것이다.

<11> 본 발명에 따른 방법은 주위 온도에서 수행될 수 있으며 방법을 수행하기 전에 제품의 냉각, 냉동 또는 화학적 처리를 필요로 하지 않는다. 이것은 선행 기술 방법에 존재하는 보조 처리 단계 몇가지를 피한다.

<12> 본 발명의 방법은 조사에 과민한 유기 제품을 처리하는데 유용하다. 이러한 제품은 표준 방법에 의하여 조사될 때 분해되기 쉬울 수 있다. 그러나, 본 방법에 의해 조사 과민 제품은 제품에 해롭다고 예상되지 않을 것이다. 본 방법은 전형적으로 여기에 한정되지 않지만 혈액 및 혈액 성분과 같은 생물학적 제품에 적용된다.

<13> 생존 세포(이를테면 혈구)가 조사될 경우에, 스케빈저(scavenger)가 첨가되어 유리 라디칼 및 세포에 독성인 다른 물질을 결합할 수 있다. 적합한 스케빈저는 에탄올이다.

<14> 본 발명의 방법의 효능은 이 분야의 숙련가들이 예상한 것과 다르다. 특히, 미국 특허 제 4,620,908(1)에서 감마선 조사가 주위 온도에서 단백질 물질에 수행되었다면, 물질이 거의 완전히 파괴되거나 물질에 실제로 무력화하게 하는 범위로 파괴될 것이라고 언급되어 있다. 비교하여, 혈액에 시험할 때, 본 발명의 방법은 여기에 함유된 세포의 생육성을 파괴하지 않는다.

<15> 다음 실시예는 본 발명의 방법을 예시하기 위하여 제공되며 본 발명의 범위를 한정하는 것을 의미하지 않는다.

<16> 실시예 1.

<17> 혈액의 살균

<18> 1일령 포장 적혈구 200 ml 백을 사용하였다. 최종 에탄올 농도 0.01%를 얻기 위하여 세포에 에탄올을 첨가하였다. pH 약 6.4-6.7이고 총부피 500 ml에서 다음 조성을 가진 개질된 시트레이트 포스페이트 덱스트로스(CPD) 용액을 사용하여 적혈구를 10분의 1 배수로 희석하였다:

시트르산 모노히드레이트	0.1 g
나트륨 시트레이트 디히드레이트	26.3 g
나트륨 일염기성 포스페이트	2.2 g
나트륨 이염기성 포스페이트	1.0 g
덱스트로스	3.2 g

<21> 코발트 60 소스 랙(source rack)을 함유한 상업적 크기의 감마선 조사기로 세포를 조사하였다. 비보호 박스에서 캐리어(carrier) 없이 조사를 수행하였다. 세포를 약 1 kGy/hr의 비율에서 24 시간 동안 조사하였다. 조사 기간 후에 적혈구를 외관 시험하였고 빛나는 적색을 가지면서, 생육성이 있음을 발견하였다. 상기에 기재된 CPD 용액으로서 희석되지 않은 포장 적혈구로 구성된, 대조 샘플은 조사 후에 생육성이 없었다.

<22> 조사 과정 4일 후에, 희석된 세포를 여러가지 혈액 성분의 수준에 대해 시험하였고 그 결과를 표 1에 제시한다. 대조 샘플은 시험 샘플과 동일한 백으로부터의 혈액으로 구성되었으나 그것은 조사를 수행하지 않았다. 표 1은 인체의 혈구의 희석 및 조사가 백혈구 카운트(count)를 상당히 변경하지 않았다는 것을 예시한다. 혈소판 카운트 및 헤마토크리트(hematocrit) 수치들은 대조예 보다 약간 낮았으나, 이들 수치는 정상적인 성인 혈액에서 보이는 범위내이다. 헤모글로빈의 수준은 그 과정 중에 약간의 적혈구가 용해되었다는 것을 보여주는 대조예에서 보다 높았다. 이것은 또한 보다 낮은 적혈구 카운트에 의해 입증되었다. 그럼에도 불구하고, 이전에 공개되었던 것과 다르게, 25 kGy 이하의 조사는 본 방법에 의해 혈액의 성분을 파괴하지 않았다. 세포를 또한 카운트하였고 감마 조사 25 kGy 후에 생육성이 있음을 발견하였다.

<23> 표 1

성분	조사된 혈액	대조 혈액
백혈구	4 K/mm^3	4.8 K/mm^3
적혈구	3 Mi/mm^3	7.2 Mi/mm^3
헤모글로빈	42 g/dl	21 g/dl
헤마토크리트	46%	64%
혈소판	100 k/mm^3	120 k/mm^3

<25> 실시예 2

<26> 덱스트로스의 살균

<27> 텍스트로스(또는 글루코스) 함유 용액을 탄수화물 및 유체 부족의 치료에서, 혈장 증보액으로서, 저혈당증의 치료에서, 신장 투석에서 그리고 간독소를 중화하기 위해 사용된다(4, 5). 덱스트로스는 또한 비경구 영양 식이법에서 탄수화물의 바람직한 원이다(4, 5). 상기의 모든 적용에서, 덱스트로스는 사용전에 살균되어야 한다. 덱스트로스 함유 제품의 살균은 일반적으로 열 살균 또는 오토클레이빙(autoclaving)에 의해 수행된다. 불행히도, 이들 방법은 용액에서 색 변화를 초래하는 덱스트로스 함유 용액을 분해하거나 카라멜화한다고 보고된 바 있다(5). 글루코스의 감마선 조사는 또한 글루코스 함유 용액을 분해한다고 보고된 바 있다(6). 따라서, 제품 자체를 분해하지 않는 덱스트로스 함유 제품을 살균할 수 있는 방법에 대한 필요성이 있다. 선행 기술의 문제점에 비추어, 덱스트로스 용액을 다음과 같이 본 발명의 방법에 따라 처리하였다.

<28> 5% 덱스트로스 용액을 약 1 kGy/hr의 비율에서, 24 시간 동안 조사하였다. 조사 후에 제품을 시험하였고 조사되지 않은 대조예에 비교하여 과시광 스펙트럼 변화가 없었다는 것을 발견하였다. 따라서, 본 방법은 덱스트로스를 함유하는 제품을 살균하는데 유용할 수 있다.

<29> 상기 실험 후에 5 및 50% 덱스트로스의 새 용액을 주위 온도에서 36 시간에 걸쳐 25 kGy로 조사하였다. 그 결과는 상기에 기재된 것들과 유사하였다. 이에 더하여, UV/VIS 스캔을 얻었고 U.S.P.에 의하여 '푸르푸랄'(furfurals)에 대해 283.4 nm에서 피크의 완전 부존재를 나타냈다. 비교하여, 오토클레이브를 이용하여 살균된 덱스트로스 샘플은 283.4 푸르푸랄 피크를 포함한다.

<30> 실시예 3

<31> 인체의 혈청 알부민의 살균

<32> 정상적인 사람의 혈청 알부민을 25% 염 용액으로서 감마 셀 220을 이용하여 36 시간에 걸쳐 25 kGy의 전체 조사량으로 조사하였다. 조사 중에 온도를 조절하지 않았으나 그것은 알부민 용액을 넣은 콘테이너가 약 23 ℃이었다고 평가된다. HPLC 분석 결과를 표 2에 제공한다.

<33> 표 2

파리미터	대조(%)	조사(%)
폴리머	2	3
다이머	7	8
모노머	90	86
저분자량	1	3
pH	7.05	6.97
NTU(>20 이어야함)	11.4	11.4

<35> 그 결과가 나타내듯이, 정상의 사람 혈청 알부민은 단백질의 필수 특성에 부작용이 없이 상온에서 25 kGy로 안전하게 조사될 수 있다. 이것은 전에 알려진 바 없다. 혈청 알부민을 조사할 때 다른 모든 시도는 혈청 알부민이 동결 단계에서 조사될 것을 필요로 한다. 이것은 조사를 수행하는 것에 대한 비용 및 곤란함을 추가한다.

<36> 실시예 4

<37> 건강한 공여자(donor)로부터 정상의 사람 혈액을 헤파린을 가한 튜브에 취하고; 표준 CPD 용액으로서 3회 세척한다음, CPD 함유 0.01% v/v 에탄올로서 1:20으로 희석하였다. 후자의 0.01% v/v 에탄올을 가진 CPD 용액을 SCPD로 지칭한다. 그후 2 ml 부분표본을 10 ml 플라스틱 시험관에 넣고 상온에서 36 시간에 걸쳐 26 kGy로 서로다른 조사량으로 조사하였다. 거기서 용혈은 없었고 세포는 형태에서 약간 크고 약간 불규칙적이지만 손상되지 않은 듯하였다. 세가지 별도 실험의 결과를 표 3에 기록한다.

<38> 표 3

파라미터	RBC[1]	HGB[2]	HCT[3]	MCV[4]	MCH[5]	MCHC[6]	RDW[7]	FLAGS
1* 대조	1.08 0.99	41 33	0.097 0.089	89.5 90.2	38.3 33.0	427 366	17.7 15.3	거의 정상
2*				95.0	32.3	339	12.0	
12 kGy 1	1.22 1.38	45 45	0.166 0.199	135.8 144.7	36.5 33.0	269 228	27.3 24.9	1+부동세포증 3+대적혈구증다증
1 16 kGy	1.04 0.54	32 29	0.169 0.088	163.0 162.5	31.3 54.5	192 335	18.8 18.8	1+부동세포증 3+대적혈구증다증
2	0.82 0.81	27 26	0.128 0.124	156.5 152.6	32.8 32.4	209 212	19.8 20.2	2+부동세포증 3+대적혈구증다증
1 20 kGy	0.79 1.26	244 28	0.125 0.203	158.4 161.5	30.8 22.1	194 137	19.4 19.0	1+부동세포증 3+대적혈구증다증
2	0.93 0.92	30 30	0.141 0.143	151.5 155.5	32.3 32.1	213 207	20.1 20.5	2+부동세포증 3+대적혈구증다증
26 kGy 1	1.15 1.15	34 34	0.180 0.176	155.9 153.0	29.4 29.9	189 195	19.3 23.4	1+부동세포증 3+대적혈구증다증

* 실험 1 및 실험 2

1. 적혈구 카운트: 세포수 x 10^{12}/liter

2. 헤모글로빈: grams/liter

3. 헤마토크리트

4. 평균 혈구 부피: Femtoliters

5. 평균 혈구 헤모글로빈: picograms

6. 평균 혈구 헤모글로빈 농도: grams/liter

<40> 용혈이 없었으며 형태에서 약간 크고 약간 불규칙적이지만 세포는 손상되지 않은 듯하였다. 세포는 쉽게 분산되었고 새 완충액에서 재구성되었다 (reconstituted).

<41> HIV-함유 혈액을 처리할 때 본 방법의 효능을 측정하기 위하여 다음의 세가지 실험(실시예 5, 6 및 7)을 수행하였다. 각 실시예에서 세포를 유사하게 처리하였다. 제이의 별도 실험에 의해 분석을 수행하였다. 제이 실험은 또한 그것이 AIDS 비루스를 다룰 수 있었기 때문에 선택되었다. 이들 실험에서, 세포를 12, 16 및 24 시간후에 천천히 교반하였다. 또한, 제 3의 실험(실시예 7)에서, 원심분리관의 밑에 고착으로 인해 세포를 T25 플라스크에 넣어 보다 큰 표면적을 제공하고 농도를 감소시켰다.

<42> 실시예 5

<43> HIV-함유 혈액의 살균

<44> 다음 특수 목적으로서 다음 실험을 수행하였다:

<45> 1. 적혈구(RBCs)에 대한 본 방법의 독성 평가.

<46> 2. 본 방법의 항-리트로비루스(anti-retroviral) 활성 평가.

<47> 과정

<48> 최초에, 항응고 혈액 2 ml를 HIV-혈청 음성 공여자로부터 얻었다. 혈액을 원심분리하였고, 혈장을 제거하였다. 잔류 세포 혈소판을 CDP 완충액 10 ml에 재분산시키고 원심분리하였다. 이 세척 공정을 총 3회 반복하였다. 최종 펠릿(pellet)을 SCDP 완충액 40 ml에 재분산시키고, 2 ml 부분 표본으로 플라스틱 관으로 분배하고, 16개의 별도 부분 표본을 추가 조작을 위해 남겼다. 이들 튜브 8개에 대해, HTLV-IIIB의 부분 표본을 첨가하였다. 이것은 HIV 비루스의 실험실 균주이며, 100 조직 배양 감염 투여량

(TCID)을 감염될 튜브 각각에 첨가하였다. 남아 있는 8개 튜브에 대해, 소량의 비감염성 실험실 완충액, 포스페이트 완충 살린(PBS)을 첨가함으로서 "모방"(mock) 감염을 수행하였다. 네개의 감염 튜브와 네개의 비감염 튜브를 본 방법으로 처리하였다. 비교를 위해, 그들이 본 방법으로 처리하지 않는 것을 제외하고, 남아 있는 8개 튜브(네개의 감염 및 네개의 비감염)를 동일한 방식으로 취급하였다.

<49> 연구 초기에, 별도 부분 표본의 혈액을 공여자로부터 얻었다고 언급되어야 한다. 이것을 임상 혈액학 실험으로 처리하였고 완전한 헤모그램(hemogram)을 수행하였다. 이들 기준선 결과를 비교하여 연구 부분 표본에 대해 시험을 반복하였고, 여기서 이 시험은 네개의 처리 및 네개의 미처리 샘플의 평가를 포함하며, 이들 모두는 HIV로서 감염되지 않았다.

<50> 감염 연구 샘플의 각각 0.5 ml 부분 표본을 3일 이전에 얻었던 단핵 세포(MCs)에 대해 접종하였다. 이들 세포를 1 ug/ml PHA-P와 다같이 10% 소태아 혈청 및 다른 첨가제(페니실린, 스트렙토마이신, 글루타민, HEPES 완충액)와 함께, RPMI 배양 배지에 분산시켰다. 이러한 접종과 동시에, 세포를 rIL-2(20 U/ml)와 함께 새 배지에 재분산시켰다. 배양을 7일간 유지하였다. 매주 2회, 비루스 성장의 측정을 위한 HIV p24 항원 수준(상용 ELISA 키트, Coulter Electronics, Hialeah, FL)의 측정을 위해 배양 배지의 일부를 수집하였다.

<51> 비루스 적정 실험을 위해 8개 감염 연구 샘플의 별도 부분 표본을 사용하였다. 간략히 말하자면, 비루스-함유 유체의 연속 4배 희석액(1:16에서 1:65,536)을 96-웰 평판-밑면 조직 배양 플레이트에서 3겹으로 접종하였다. PHA-자극 MCs를 각 웰에 첨가하였다(IL-2와 함께, 2 ml 배양 배지에서 4백만 세포). 각 배양 웰로부터 상징액의 부분 표본을 HIV p24 항원 수준의 측정을 위해 매주 2회 수집하였다. HIV p24 항원 수준이 > 36 pg/ml이었다면 웰을 "양성"으로서 표하였다. 비루스 적정량 (titer)은 다음식을 이용하여 Spearman-Karber 법(참조 ACTG 비루스학 프로토콜 매뉴얼)에 따라 계산되었다:

<52> $M = xk + d[0.5 - (1/n)r]$

<53> M: 적정량(log 4에서)

<54> xk: 가장 높은 희석액의 사용량

<55> d: 희석액 사이의 간격

<56> n: 희석액당 웰의 수

<57> r: 웰의 전체 수의 합계

<58> 결과

<59> 기저선 샘플에 대해 그외에 처리되지 않은 연구 샘플 및 처리된 연구 샘플에 대한 적혈구 파라미터를 표 4에 제시한다.

<60> 표 4

샘플/수	MCV	MCH	MCHC
기준선	94.5	32.0	339
처리안됨-1	91.4	34.4	376
처리안됨-2	90.2	37.9	420
처리안됨-3	92.1	40.0	433
처리안됨-4	91.0	40.2	442
처리됨-1	133.4	37.8	284
처리됨-2	131.5	45.0	342
처리됨-3	128.5	38.9	303
처리됨-4	131.1	39.4	301

<62> 표 4에서 사용된 약호가 표 3 밑에 설명되어 있다.

<63> 상기에 기재된 바와 같이, HIV 배양체를 처리안된 및 처리된 연구 샘플의 0.5 ml 부분 표본을 사용하여 성취하였다. 배양 4일 및 7일에 연구 샘플로부터 p24 항원 수준(pg/ml)을 표 5에 제시한다.

<64> 표 5

샘플/수	p24-4일	p24-7일
처리안됨-1	1360	464
처리안됨-2	1180	418
처리안됨-3	1230	516
처리안됨-4	1080	563
처리됨-1	579	241
처리됨-2	760	303
처리됨-3	590	276
처리됨-4	622	203

<66> 끝으로, 한가지 처리안된 샘플 및 한가지 처리된 샘플을 배양없이 직접 비루스 적정의 성능을 위해 선택하였다. 그 결과를 표 6에 제시한다.

<67> 표 6

샘플/수	적정량(log 10ml)
처리안됨-1	1.5
처리됨-1	0.0

<69> 적혈구는 약간의 재현성 대적혈구증다증이 관찰되었지만 본 방법에 의해 최소로 영향을 받았다. 처리된 샘플의 동시 배양시, 약간의 잔류 생존 비루스가 있는 듯하지만, 이것은 직접 적정 실험에 의해 확인되지 않았다.

<70> 실시예 6

<71> 이 실험의 목적은 포괄적인 방식으로 적혈구에 대한 본 방법의 독성을 평가하는 것이었다.

<72> 방법

<73> 본 실험을 위해, 항응고된 혈액 1 ml를 처음 실험에서와 동일한 HIV-혈청 음성 공여자로부터 얻었다. 혈액을 원심분리하고, 혈장을 제거하였다. 잔류 세포 펠릿을 CPD 완충액 10 ml에 재분산하고, 원심분리하였다. 이러한 세척 과정을 총 3회 반복하였다. 최종 펠릿을 SCPD 완충액 20 ml에 재분산하고, 추가 조작을 위해 모두 10개의 부분 표본을 보유하면서, 2 ml 부분 표본으로 플라스틱 튜브로 분배하였다. 8개 튜브를 본 방법으로 처리하고, 반면에 최종 2개의 튜브를 대조예, 처리안된 튜브로서 보유하였다. 처리 후에, 모두 10개 튜브를 원심분리하고, 얻어진 펠릿을 100 ul 완충액에 재분산하였다. 이들 재농축된 연구 샘플에 대해 완전한 혜모그램을 수행하였다.

<74> 처음 실험에서처럼, 혈액의 별도 부분 표본을 연구 샘플을 취할 때의 공여자로부터 얻었다. 이 기준선 샘플에 대해 완전한 혜모그램을 수행하였다. 연구 샘플을 그들의 최초 상태의 33-50%로 재농축할 때, 이전의 실험에서 가능한 것 보다 기준선 샘플과 더 많은 비교를 보증할 수 있었다.

<75> 결과

<76> 기준선 샘플에 대해 그외에 처리안된 및 처리된 연구 샘플에 대해 적혈구 파라미터를 표 7에 제시한다. 표 7에서 사용된 약호를 표 3에서 정의한다.

<77> 표 7

샘플/수	RBC	HGB	MCV	MCH	MCHC
기준선	4.76	152	94.9	31.9	336
처리안됨-1	0.99	33	90.2	33.0	366
처리안됨-2	1.08	41	89.5	38.3	427
처리됨-1	1.15	34	153.0	29.9	195
처리됨-2	1.15	34	155.9	29.4	189
처리됨-3	1.26	28	161.5	22.1	137
처리됨-4	0.79	24	158.4	30.8	194
처리됨-5	0.54	29	162.5	54.5	335
처리됨-6	1.04	32	163.0	31.3	192
처리됨-7	1.35	45	144.7	33.0	228
처리됨-8	1.22	45	135.8	36.5	269

<79> 모든 처리된 샘플에서 존재하는 세포의 대적혈구증다증이 있었다. 처리안된 및 처리된 샘플에서 비교할만한 헤모글로빈 수준을 측정하였다. 절대치는 나머지 희석을 위해 적합하였다. 적혈구는 보존되어 있다.

<80> 실시예 7

<81> 본 실시예의 목적은 실시예 6에서 얻어진 결과에 대해 증명하고 확대하는 것이었다.

<82> 방법

<83> 본 실험을 위해 항응고된 혈액 5 ml를 처음 두가지 실험에서와 같은 HIV-혈청 음성 공여자로부터 얻었다. 혈액을 원심분리하고, 혈장을 제거하였다. 잔류 세포 펠릿을 CPD 완충액 100 ml에 재분산시키고, 원심분리하였다. 이러한 세척 과정을 총 3회 반복하였다. 최종 펠릿을 SCPD 완충액 100 ml에 재분산시키고, T25 조직 배양 플라스크에서, 25 ml 부분 표본으로 분배하였고, 추가 조작을 위해 모두 4개의 부분 표본을 보유하였다. 두개의 플라스크를 본 방법으로 처리하고, 반면에 나머지 두개는 대조예, 처리안된 플라스크로서 보유하였다. 처리 후에, 각 플라스크의 내용물을 관찰하였고, 산소를 흡수하는 세포 용량의 외관 측정을 수행하였다(주위 공기에 노출시 밝은 적색으로 변함). 이 후, 플라스크의 내용물을 아스피레이트하고 원심분리하였고, 잔류 펠릿을 적은 부피의 완충액에 재분산시켰다. 이들 재농축된 연구 샘플에 대해 완전한 헤모그램을 수행하였다.

<84> 실시예 5 및 6에서처럼, 혈액의 별도 부분 표본을 연구 샘플을 취할 때의 공여자로부터 얻었다. 이 기준선 샘플에 대해 완전한 헤모그램을 수행하였다. 연구 샘플을 그들의 최초 상태의 33-50%로 재농축하였을 때, 많은 특정 파라미터의 직접 비교는 기준선 샘플로서 가능할 것이다.

<85> 결과

<86> 외관 검사시, 처리된 및 처리안된 연구 샘플 사이에 확인될 수 있는 차이가 없었다. 특히, 잘 분산된 세포의 균일한 분포가 있는 듯하였다. 주위 공기에 노출시, 모든 플라스크의 내용물이 약간 밝은 적색으로 되었다. 산화반응의 특이한 정량적 측정은 수행되지 않았다.

<87> 기준선 샘플에 대해 그외에 처리안된 및 처리된 연구 샘플에 대한 적혈구 파라미터를 표 8에 제시한다. 표 8에서 사용된 약호는 표 3 밑에 정의되어 있다.

<88> 표 8

샘플/수	RBC	HGB	MCV	MCH	MCHC
기준선	4.75	153	95.0	32.3	339
처리안됨-1	0.93	30	151.5	32.3	213
처리안됨-2	0.92	30	155.5	32.1	207
처리됨-1	0.82	27	156.5	32.8	209
처리됨-2	0.81	26	152.6	32.4	212

<90> 본 실험은 환자에게 수혈될 적혈구의 보다 밀접한 근사 조건을 목적으로 하며, 결론적으로 보다 큰 부피에서 수행되었다. 예비적인 근거로, 본 방법이 보다 공식적으로 측정되어야 하지만, 산소를 운반하는 적혈구의 능력을 부족하게 하는 것처럼 보이지 않는다. 흥미롭게도, 본 실험에서, 처리된 및 처리안된 샘플 사이에 세포 크기에 차이가 없었으며, 두가지 다 기준선에 비교하여 컸다. 이것은 당연히 거듭된다. 비교할만한 헤모글로빈 수준은 모든 연구 샘플에서 측정되었다.

<91> 실시예가 본 발명의 방법의 구체적인 일예에 관한 것이지만, 본 방법이 살균을 필요로 하는 매우 광범위한 제품을 처리하는데 사용될 수 있다는 사실이 예상될 것이다. 본 방법이 파괴되기 쉬운 생물학적 물질인 혈액에서 효과적이라고 입증된 사실은 본 방법이 많은 유사하게 과민한 제품에 대해 사용될 수 있다고 예상하는것이 이해된다. 처리될 수 있는 다른 제품의 일예는 의약품, 단백질, 핵산, 혈액 성분, 체액(이를테면 뇌척수액, 타액), 리포좀, 글루코스 함유 제품, 세포 배양체, 소태아 혈청, 골수, 기관, 식품 및 삼푸, 로션과 크림과 같은 화장품을 포함한다.

<92> 참고문헌

1. Van Duzer, John P.; Method for Destroying Microbial Contamination in Protein Materials; United States Patent No. 4,620,908; November 4, 1986.

2. Keathly, J.D. Et al.; Is There Life after Irradiation? Part 2; BioPharm July-August 1993.

3. Leitman, Susan F; Use of Blood Cell Irradiation in the Prevention of Post Transfusion Graft-vs-Host Disease; Transfusion Science 10: 219-239, 1989.

4. The Merck Index, Eleventh Edition; Merck & Co. Inc. 1989.

5. Martindale's Extra Pharmacopecia p. 1,265.

6. Kawakishi et al; Radiation-Induced Degradation of D-glucose in Anaerobic Condition. Agric.Biol.Chem. June 1977.

(57) 청구의 범위

청구항 1

살균시키기에 충분한 시간 동안 0.5 kGy/hr - 3.0 kGy/hr의 비율로 조사 과민(radiation-sensitive) 제품에 감마선을 조사하는 것을 포함하는 조사 과민 제품의 살균방법.

청구항 2

제 1항에 있어서, 조사 과민 제품을 10 시간 이상 조사하는 살균방법.

청구항 3

제 1항에 있어서, 살균될 조사 과민 제품을 고형분의 함량이 20 중량% 미만인 형태로 조사하는 살균방법.

청구항 4

제 1항에 있어서, 0.5 kGy/hr - 1.5 kGy/hr의 비율로 조사 과민 제품을 조사하는 살균방법.

청구항 5

제 1항에 있어서, 조사 과민 제품을 20 - 40 시간 동안 조사하는 살균방법.

청구항 6

제 1항에 있어서, 조사 과민 제품을 주변 온도에서 조사하는 살균방법.

청구항 7

제 1항에 있어서, 조사 과민 제품이 유기 제품인 살균방법.

청구항 8

제 1항에 있어서, 조사 과민 제품이 생물학적 제품인 살균방법.

청구항 9

제 1항에 있어서, 조사 과민 제품이 혈액 또는 그의 성분인 살균방법.

청구항 10

제 9항에 있어서, 혈액 또는 혈액 성분을 처음에 에탄올로서 처리하는 살균방법.

청구항 11

제 10항에 있어서, 에탄올이 최종 농도 0.01%로 존재하여 혈액 또는 혈액 제품을 조사 전에 생리적으로 허용되는 희석제에서 희석하여 적어도 1 : 10의 최종 희석액을 얻는 살균방법.

청구항 12

제 11항에 있어서, 생리적으로 허용되는 희석제가 pH 6.4 - 6.7인 개질된 시트레이트 포스페이트 덱스트로스 용액인 살균방법.

청구항 13

제 12항에 있어서, 시트레이트 포스페이트 덱스트로스 용액이 0.01% v/v 에탄올을 함유하는 살균방법.

청구항 14

제 3항에 있어서, 조사 과민 제품을 시트레이트 포스페이트 덱스트로스 용액으로서 희석하는 살균방법.

청구항 15

제 1항에 있어서, 조사 과민 제품이 덱스트로스를 함유하는 살균방법.

청구항 16

제 1항에 있어서, 조사 과민 제품이 단백질인 살균방법.

청구항 17

제 16항에 있어서, 조사 과민 제품이 항체인 살균방법.

청구항 18

제 1항의 방법에 따라 처리된 조사에 과민한 유기 제품.

청구항 19

제 1항의 방법에 따라 처리된 조사에 과민한 생물학적 제품.

청구항 20

제 1항의 방법에 따라 처리된 조사에 과민한 혈액 제품 또는 그의 성분.

청구항 21

제 1항의 방법에 따라 처리된 조사에 과민한 덱스트로스 함유 제품.

요약

비루스, 박테리아, 이스트, 곰팡이, 미코플라즈마 및 기생충과 같은 생물학적 오염체를 제거하는 제품의 살균방법이 개시된다. 본 방법은 고체 20% 이하를 함유하는 형태로 제품을 제공하고 이어서 제품을 확장된 시간에 걸쳐 감마선 조사로서 조사하는 것을 포함한다. 일반적으로 제품을 10 시간 보다 적지 않은 기간 동안 조사한다. 제품에서 낮은 수준의 고체에 관련하여 연장된 조사 시간은 실제로, 제품에 대한 손상을 감소시킨다. 본 방법은 혈액 및 혈액 성분과 같은 과민 물질을 살균하는데 유용하다.