



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2019년03월21일

(11) 등록번호 10-1960729

(24) 등록일자 2019년03월15일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C07K 14/76 (2006.01) A61K 38/38 (2006.01)

(52) CPC특허분류

C07K 14/76 (2013.01)

A61K 38/38 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2015-0074568

(22) 출원일자 2015년05월28일

심사청구일자 2016년11월09일

(65) 공개번호 10-2016-0024348

(43) 공개일자 2016년03월04일

(30) 우선권주장

P201430824 2014년05월29일 스페인(ES)

(56) 선행기술조사문헌

JP2009526080 A*

JP2003010287 A*

*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자

그리풀스, 에스.에이.

스페인 바르셀로나 헤수스 이 마리아 6 08022

(72) 발명자

호르케라 니에토 후안 이그나시오

스페인 08150 - 파레트스 델 바예스 (바르셀로나)

) 폴리고노 인두스트리알 레반테 씨/칸 과스크 2

오르티스 페르난데스 아나 마리아

스페인 08150 - 파레트스 델 바예스 (바르셀로나)

) 폴리고노 인두스트리알 레반테 씨/칸 과스크 2

코스타 리에롤라 몬트세라트

스페인 08302 - 마타로 (바르셀로나) 씨/로헤르

데 플로르 5-7

(74) 대리인

리엔목특허법인

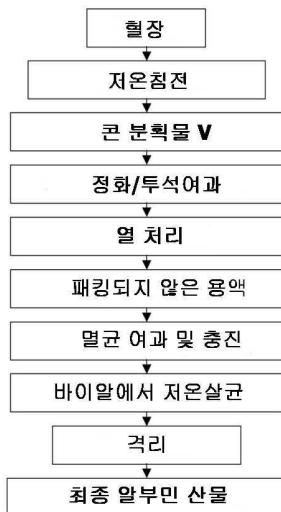
전체 청구항 수 : 총 10 항

심사관 : 손영희

(54) 발명의 명칭 감소된 수준의 용존 산소를 갖는 인간 알부민을 제조하는 방법

(57) 요 약

본 발명은 인간 알부민의 용액을 제조하는 방법에 관한 것이고, 더 구체적으로 알부민의 용액 중 용존 산소를 0.5 ppm 이하의 농도까지 감소시키는 단계를 포함하는 방법에 관한 것이다. 본 발명의 방법으로, 인간 혈장에 존재하는 알부민의 레독스 상태와 근접한 레독스 상태를 갖는 인간 알부민의 용액을 수득하는 것이 가능하다.

대 표 도 - 도1

명세서

청구범위

청구항 1

인간 알부민의 용액을 제조하는 방법으로서, 상기 알부민의 용액을 비활성 기체로 표면 처리(surface treatment)하거나 비활성 기체를 상기 알부민의 용액의 내부로 베블링하여 상기 알부민의 용액 중 용존 산소를 감소시키는 단계를 포함하고, 산소의 수준을 0.5 ppm 이하의 농도까지 감소시키는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 2

삭제

청구항 3

삭제

청구항 4

청구항 1에 있어서, 상기 알부민은 혈장 재조합 또는 형질전환 기원인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 5

청구항 1에 있어서, 상기 알부민의 용액은 4 내지 25% (w/v)의 알부민의 농도를 갖는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 6

청구항 1에 있어서, 사용되는 비활성 기체는 질소 또는 헬륨인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 7

청구항 1에 있어서, 상기 알부민의 용액 중 용존 산소를 감소시키는 단계는 알부민의 용액의 저온살균(pasteurisation)의 단계 이전에 수행되는 것인 방법.

청구항 8

청구항 1에 있어서, 상기 알부민의 용액 중 용존 산소를 감소시키는 단계는 알부민의 용액의 저온살균의 단계 이후에 수행되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 9

청구항 1에 있어서, 상기 알부민의 용액 중 용존 산소를 감소시키는 단계 이후에, 상기 알부민의 용액을 비활성 기체 대기(atmosphere) 중에서 유지하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 10

청구항 9에 있어서, 상기 비활성 기체 대기는 질소 또는 헬륨 기체인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 11

청구항 1에 있어서, 상기 알부민의 용액은 산소를 통과시키지 않는 재료로 제조된 용기에 패킹(pack) 또는 저장되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 12

청구항 11에 있어서, 상기 산소를 통과시키지 않는 재료는 유리인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 13

삭제

청구항 14

삭제

발명의 설명**기술 분야**

[0001]

본 발명은 인간 알부민의 용액을 제조하는 방법에 관한 것이고, 더 구체적으로 상기 용액 중 용존 산소를 0.5 ppm 이하의 농도까지 감소시키는 단계를 포함하는 방법에 관한 것이다. 본 발명의 방법으로 인간 혈장에 존재하는 알부민의 레독스 상태에 더 가까운 레독스 상태를 갖는 인간 알부민의 용액을 수득하는 것이 가능하다.

배경 기술

[0002]

인간 알부민은 66 kDa의 비-글리코질화 단백질이다. 정량적으로, 이는 가장 significant 혈장 단백질이고 정상 혈장 중 이의 농도는 35 내지 50 g/l에 있고, 총 혈장 단백질의 60%까지 구성한다 (Peters T.J.: All About Albumin; Biochemistry, Genetics and Medical Applications. Academic Press, San Diego, 1996).

[0003]

인간 알부민의 구조는 약 67%의 알파-헬릭스가 있고, 베타-시트가 없이 존재하는, 585개의 아미노산을 갖는 폴리펩티드로 구성된다 (Otagiri M., Chuang V.T.: Pharmaceutically important pre - and posttranslational modifications on human serum albumin. Biol Pharm Bull 2009; 32:527-534). 인간 알부민은 17개의 디술피드 결합의 형성에 관여하는 6개의 메티오닌 및 35개의 시스테인 잔기를 포함한다. Cys-34는 전체 분자 중 유일한 유리 시스테인이다. 인간 알부민은 다양한 리간드로의 결합의 능력 및 이의 라디칼 포집(radical entrapment) 특성에 의하여 특정 항산화 기능을 갖고, 둘다 이의 구조에 밀접하게 관련된다.

[0004]

알부민의 산화의 많은 가능성성이 존재하나, Cys-34는 산화/환원에 특히 민감한 위치이다. 그 결과, 일반적으로, 알부민의 레독스 상태를 Cys-34와 관련하여 기술하는 것이 타당하다. 알부민의 크로마토그래피 분리를 통해, Cys-34의 레독스 상태에 따라 3개의 분획물이 수득된다 (Peters, 1996, op. cit.):

[0005]

(i) 시스테인이 유리 티올기의 형태로 존재하는 환원된 형태로, 인간 메르캅토알부민(human mercaptoalbumin: HMA)으로 지칭되고;

[0006]

(ii) 시스테인이 작은 티올 화합물, 주로 시스테인 또는 시스테인일글리신이고, 그러나 또한 호모시스테인 및 글루타티온과 디술피드 결합을 형성하는 산화된 형태로 인간 비-메르캅토 알부민 1 (human non-mercaptoalbumin 1: HNA1)로 지칭되고; 및

[0007]

(iii) 시스테인이 술핀산 또는 술폰산인 가장 산화된 형태이고, 인간 비-메르캅토알부민 2 (human non-mercaptoalbumin 2: HNA2)로 지칭된다.

[0008]

건강한 사람 중에서, 총 알부민의 약 50 - 69%는 HMA의 형태, 27 - 42%는 HNA1의 형태, 및 3 - 5%는 HNA2의 형태로 존재한다 (Oettl K., et al. Oxidative damage of albumin in advanced liver disease. Biochim. Biophys. Acta 2008; 1782: 469-473; Oettl K. and Marsche G. Redox State of human serum albumin in terms of cysteine-34 in health and disease. Methods Enzymol. 2010; 474:181-95; and Oettl K. et al. Oxidative albumin damage in chronic liver failure: Relation to albumin binding capacity; liver dysfunction and survival. J Hepatol, 2013, 59:978-983). 일반적으로 HMA의 HNA1로의 산화가 가역적이고, 반면에 HNA2로의 산화는 비가역적 과정으로 생각된다.

[0009]

알부민은 인 비보 및 치료상 알부민을 생성하는데 이용되는 방법 둘 다에서 다양한 구조 변형을 받아서, 이의 구조(conformation), 그 결과, 이의 레독스 상태와 함께 결합 특성의 변형을 초래한다(Oettl, K. et al, 2010, op. cit.).

[0010]

알부민으로 확인될 것 중 정제된 단백질의 수득을 위한 인간 혈장의 분류의 통상적으로 사용된 방법은 콘(Cohn) 방법(Cohn E.J. et al. 'Preparation and properties of serum plasma proteins, IV. A system for the separation into fractions of the protein and lipoprotein components of biological tissues and fluids. J. Am. Chem. Soc. (1946) 68, 459-475) 또는 이의 작은 변형이다.

[0011]

콘 방법(Cohn method)은 침전과 분리의 연속적 단계를 받은 인간 혈장으로 시작한다. 각각에서 혈장 단백질 중

하나에 중진된 침전물 및 디캔테이션 상청액(decantation supernatant)이 수득된다. 연속적 콘 분획물(분획물 I, 분획물 II+III, 분획물 IV 및 분획물 V)의 침전을 달성하기 위해, 상이한 단백질의 용해도를 달리하기 위한 용액의 변수, 예를 들면, 그 중에서도, pH, 유전 상수(dielectric constant), 온도, 단백질 농도, 및 이온 강도를 변형하는 것이 필요하다. 이는 추가적으로, 상기 콘 분획물이 에탄올의 증가하는 농도를 포함하는 것을 보여주어야 한다. 그 결과, 분획물 IV의 상청액에 함유된 알부민을 약 40% (v/v) 에탄올로 침전시키고 넘어가 분획물 V의 반죽(paste)의 부분을 형성한다.

[0012] 분획물 V가 수득되면, 후자는 용액에 재현탁되고 최종 산물이 수득될 때까지 상이한 단계를 받는다. 늘 (habitually), 이 단계는 포함한다: 일반적으로 30 - 32 °C에서 14일 미만의 기간 동안, 최종 산물의 멸균을 보장하는 목적을 갖는, 격리(quarantine)까지 상기 바이알의 제출(submission) 이전에, 투석여과, 열 처리, 멸균, 바이알에 충진, 및 상기 바이알의 최종 저온살균.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0013] 본 발명자는 인간 혈장으로부터 시작되는 알부민의 용액의 수득의 과정 동안 알부민이 Cys-34의 레독스 상태(redox state)로의 변형을 겪는다는 것을 발견하였다. 이를 변형은 하기 격리(quarantine) 단계에서 필수적으로 검출되기 때문에, 이들은 산소의 존재에서의 저장 동안 기본적으로 일어난다. 여러 제조 회분(production batch) (n = 7)에서, HMA, HNA1 및 HNA2의 수준이 각각, 40 - 53%, 39 - 44% 및 7 - 16% (w/v)이고, 그 결과, 주로 HMA 및 HNA2의 수준이 건강한 사람으로부터 기재된 것과 다르다는 것을 확인하였다 (Oettl K. 2008, 2010 and 2013, ops. cit.). 예를 들면 HNA2의 경우, 이전에 기재된 바와 같이, HNA2로의 산화는 비가역적 과정(irreversible process)이라는 사실 때문에, 이는 상당히 중요할 수 있다.

[0014] 놀랍게도, 본 발명자는 상기 용액 중 용존 산소를 감소시키는 단계를 포함하는 인간 알부민의 용액의 제조의 방법 중 단계 추가로, 상기 산소의 수준은 0.5 ppm 이하의 농도까지 감소되고, Cys-34의 산화의 감소가 달성되고, 혈장에 존재하는 알부민의 레독스 상태와 매우 유사한 알부민의 레독스 상태가 수득되는 것을 발견하였다. 이는 수득된 알부민의 특성, 예를 들면 이의 항산화(antioxidant) 특성이 혈액에 존재하는 알부민의 것과 더 유사하고, 이는 이의 많은 적용에서 치료적 효능의 개선을 부여할 수 있다는 사실을 가져온다.

[0015] 그 결과, 본 발명은 인간 알부민의 용액을 제조하는 방법을 보이고, 이는 상기 알부민의 용액 중 용존 산소를 감소시키는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하고, 상기 산소의 수준은 0.5 ppm 이하 농도까지 감소시킨다. 바람직하게, 상기 알부민의 용액 중 용존 산소를 감소시키는 단계 이후, 상기 알부민의 용액을 비활성 기체 대기(atmosphere) 중에서 유지한다.

[0016] 상기 알부민 용액 중 용존 산소를 감소시키는 단계는 해당 기술분야의 수준에서 알려진 다양한 방식으로 수행될 수 있다. 바람직하게, 상기 알부민의 용액의 표면 처리(surface treatment)는 비활성 기체로 실현될 수 있거나, 비활성 기체가 상기 알부민의 용액의 내부로 베블링될 수 있다. 본 발명의 방법에 사용되는 비활성 기체는 질소, 헬륨 또는 유사 기체일 수 있다.

[0017] 본 발명의 방법은 약 4 내지 25% (w/v)의 알부민의 농도를 갖는 알부민의 용액의 수득을 위해 활용될 수 있다. 바람직하게, 수득된 알부민은 치료상 알부민(therapeutic albumin)일 수 있다.

[0018] 또한, 본 발명의 알부민은 재조합(recombinant) 또는 형질전환(transgenic) 형태로 수득된 알부민일 수 있다. 재조합 또는 형질전환 알부민의 분자는 그 아미노산의 서열과 관련하여 인간 알부민과 동일하나, 이는 당화(glycosylation)를 제공(present)하지 않고, 기능적인 목적을 갖도록, 이는 인간 혈장 기원(human plasmatic origin)의 알부민과 동일한 형태 폴딩(conformational folding)을 제공하여야 한다. 상기 차이점에 의해 유발된 기타 가능한 부작용 중 면역원성(immunogenicity)의 위험에 의하여 이는 인간에게 투여될 수 없어서, 이는 그렇게 되지 않아야 한다.

[0019] 본 발명의 알부민의 용액 중 용존 산소를 감소시키는 단계는 상기 알부민의 용액의 저온살균(pasteurisation)의 단계 이전 또는 이후에 수행될 수 있고, 또한 이는 알부민의 초기 용액(initial solution)을 제조하는 방법에 독립적으로, 상기 알부민의 용액의 저온살균의 단계가 실현되지 않아도 수행될 수 있다.

[0020] 본 발명의 방법에 의해 수득된 알부민의 용액 중 Cys-34의 레독스 상태와 관련하여 더 좋은 결과를 수득하기 위해, 바람직하게 상기 알부민의 용액 중 용존 산소를 감소시키는 단계 이후에, 상기 알부민의 용액을 비활성 기

체 대기 중에서 유지한다. 상기 비활성 기체 대기는 질소, 헬륨 또는 유사 기체일 수 있다.

[0021] 본 발명의 방법으로 수득된 알부민이 패킹되고 및/또는 저장되는 임의의 용기를 활용하는 것이 가능하나, 상기 용기는 산소를 통과시키지 않는 재료로 제조되는 것이 바람직하고, 유리로 제조되는 것이 더 바람직하다.

[0022] 본 발명의 추가 목적은 본 발명의 방법에 의해 제조된 인간 알부민을 포함하는 조성물 및 약제로서 이의 용도를 보이는 것이다.

[0023] 최종적으로, 본 발명은 앞에 기재된 약제를 제조하기 위한 방법에 따라 제조된 알부민을 포함하는 조성물의 용도를 보이는 것이다.

도면의 간단한 설명

[0024] 본 발명은 본 발명의 한정사항을 구성하지 않는 실시예 및 비교예와 관련하여 더 상세히 아래 기재된다. 또한, 참고가 도면에 이루어진다:

- 도 1은 해당 기술분야의 이전 수준에 활용되는 혈장으로부터 치료상 인간 알부민을 수득하는 방법의 모식도를 보여준다.

- 도 2는 본 발명의 이전 해당 기술 분야에서의 수준에서 활용된 방법의 다양한 단계에서 크로마토그래피로 수득된 피크(peak)의 높이(height)로 표현된 알부민의 Cys-34의 HMA, HNA1 및 HNA2 형태의 농도의 그래프를 보여준다: (□) 건강한 기증자로부터의 혈장 ($n = 59$); (★) 저온침전으로부터의 상청액 ($n = 3$); (▨) 안정제의 첨가 이전 및 열 처리 이전에 알부민의 용액 ($n = 3$); (●) 열 처리 이전에 안정제를 갖는 알부민의 용액 ($n = 1$); (■) 열 처리 이후에 안정제를 갖는 알부민의 용액 ($n = 1$); (◆) 멸균 여과 이전에 알부민의 20% 용액 ($n = 3$); (▲) 최종 용기 중 멸균 20% 알부민 용액 ($n = 4$); (▼) 최종 용기 중 저온살균된 20% 알부민 용액 및 격리되지 않음(unquarantined) ($n = 4$); 및 (○) 최종 20% 알부민 산물 ($n = 7$); 여기에서 n 은 분석된 회분(batch)의 수를 나타낸다.

- 도 3은 본 발명의 이전 해당 기술분야에서의 수준의 방법에서 활용한, 다양한 단계에서 크로마토그래피로 수득된 피크의 높이로 표현된 알부민의 Cys-34의 HMA, HNA1 및 HNA2 형태의 농도의 그래프를 보여준다: (▲) 최종 용기 중 알부민의 멸균 25% 용액 ($n = 1$); (▼) 격리되지 않은(unquarantined) 알부민의 저온살균된 25% 용액 ($n = 1$); 및 (●) 25% 최종 알부민 산물 ($n = 1$); (▲) 최종 용기 중 알부민의 멸균 5% 용액 ($n = 1$); (▼) 최종 용기 중 저온살균된 알부민의 5% 용액 및 격리되지 않음 ($n = 1$); 및 (●) 최종 5% 알부민 산물 ($n = 1$); 여기에서 n 은 분석된 회분(batch)의 수를 나타낸다.

- 도 4는 저온살균 이전에 기체성 질소로 표면 처리가 사용된, 본 발명의 방법에서 활용한, 다양한 단계에서 크로마토그래피로 수득된 피크의 높이로 표현된 알부민의 Cys-34의 HMA, HNA1 및 HNA2 형태의 농도의 그래프를 보여준다: (▲) 최종 용기 중 알부민의 멸균 20% 용액 ($n = 3$); (▼) 최종 용기 중 저온살균된 알부민의 20% 용액 및 격리되지 않음 ($n = 3$); 및 (○) 최종 20% 알부민 산물 ($n = 3$); 여기에서 n 은 분석된 회분의 수를 나타낸다.

- 도 5는 저온살균 이전에 상기 알부민의 용액으로 기체성 질소로의 버블리의 처리의 단계가 사용된, 본 발명의 방법에서 활용한, 다양한 단계에서 크로마토그래피로 수득된 피크의 높이로 표현된 알부민의 Cys-34의 HMA, HNA1 및 HNA2 형태의 농도의 그래프를 보여준다: (▲) 최종 용기 중 알부민의 멸균의 20% 용액 ($n = 3$); (▼) 최종 용기 중 저온살균된 알부민의 20% 용액 및 격리되지 않음 ($n = 3$); 및 (○) 최종 20% 알부민 산물 ($n = 3$); 여기에서 n 은 분석된 회분(batch)의 수를 나타낸다.

- 도 6은 저온살균 이전에 기체성 질소로의 표면 처리의 단계가 사용된, 본 발명의 방법에서 활용한, 다양한 단계에서 크로마토그래피로 수득된 피크의 높이로 표현된 알부민의 Cys-34의 HMA, HNA1 및 HNA2 형태의 농도의 그래프를 보여준다: (▲) 패킹되지 않은(not packed) 알부민의 멸균 25% 용액 ($n = 1$); (▼) 저온살균된 알부민의 25% 용액 및 격리되지 않음 ($n = 1$); 및 (●) 최종 25% 알부민 산물 ($n = 1$); (▲) 최종 용기 중 알부민의 멸균 5% 용액 ($n = 1$); (▼) 최종 용기 중 저온살균된 알부민의 5% 용액 및 격리되지 않음 ($n = 1$); 및 (●) 최종 5% 알부민 산물 ($n = 1$); 여기에서 n 은 분석된 회분의 수를 나타낸다,

- 도 7은 저온살균 이전에 상기 일부민의 용액으로 기체성 헬륨으로의 표면 처리의 단계가 사용된, 본 발명의 방법에서 활용한, 다양한 단계에서 크로마토그래피로 수득된 피크의 높이로 표현된 일부민의 Cys-34의 HMA, HNA1 및 HNA2 형태의 농도의 그래프를 보여준다: (▲) 최종 용기 중 일부민의 멸균 25% 용액 ($n = 1$); (▼) 최종 용기 중 일부민의 저온살균된 25% 용액 및 격리되지 않음 ($n = 1$); 및 (●) 최종 25% 일부민 산물; 여기에서 n 은 분석된 회분(batch)의 수를 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0025] 실시예

[0026] 실시예 1: 해당 기술분야의 이전 수준에 따라 일부민을 수득하는 방법

[0027] 건강한 기부자로부터 수득된 인간 혈장을 초기 저온침전 상청액 (cryoprecipitation supernatant)의 수득으로부터 분획물 V (Fraction V)의 침전을 달성할 때까지, 콘 방법 (Cohn's method) (Cohn E.J. et al, 1946, op. cit.)에 따라 침전 (precipitation) 및 분리 (separation)의 연속적 (successive) 단계를 수행하였다 (도 1 참조). 콘 분획물 V를 차가운(cool) 주사용 수 (WFI)에 혼탁시키고(suspend), 이를 pH 7.0으로 조정하고 상세한 (in-depth) 필터로 정화(clarify)하였다. 정화된 용액을 일정한 부피(constant volume)에서 투석여과 (diafiltration)하고, 1가 이온의 염(소듐 클로리드)으로 형성된 투석 용액을 적용(apply)하고 5°C에서 온도를 유지하였다 (도 1, 정화 (clarification)/투석여과 (diafiltration) 단계). 소듐 카프릴레이트 및 N-아세틸트립토판을 상기 투석여과된 용액에 안정제 (stabiliser)로서 첨가하였다. 상기 용액을 60 °C에서 열 처리(heat treatment)를 받았다 (도 1, 열-처리 단계).

[0028] 그 후 상기 열-처리된 용액을 WFI로 희석하거나 원하는 최종 단백질 농도의 함수(function)로 농축하였다 (예, 5%, 20% 또 w/jdh 는 25% (w/v)) (도 1, 패킹되지 않은 (non-packed) 용액). 최종 용액을 그 후 멸균 방식으로 여과하고 (0.22 μm 필터) 최종 멸균 용기의 충진(filling)을 무균 영역(aseptic zone)에서 진행하였다 (도 1, 멸균 여과 및 충진(filling) 단계). 최종 용기 중 상기 용액을 10 시간 이상 동안 60°C에서 가열하였다 (도 1, 바이알에서 저온살균 단계). 최종적으로, 상기 바이알(vial)을 14일 이상 동안 30 - 32°C에서 인큐베이션하였다 (도 1, 격리(quarantine) 단계). 이 기간 후, 미생물 오염물(microbial contamination)의 조짐(indication)을 폐기하기 위해 상기 바이알을 가시적으로 검사하였다 (도 1, 최종 일부민 산물).

[0029] 일부민의 수득의 방법의 상이한 단계로부터 유래된 일부민의 샘플의 산화 상태(oxidative state)를 Oettl K., 2010, op. cit에 기재된 방법에 기초하여, 고성능 액체 크로마토그래피 (HPLC)로 분석하였고, 하기 상세히 기재된 바와 같다.

[0030] 시험 하에 일부민의 샘플을 0.3 M 소듐 클로리드, 0.1 M 소듐 포스페이트의 버퍼, pH 6.87에서 6.5 mg/ml의 농도까지 희석하고, 5 μl 을 Shodex Asahipak ES-502N DEAE 음이온 교환 컬럼 (7.5 x 100 mm, Shodex, Japan)에 1.0 ml/min의 흐름(flow)으로 주입하였다. 일부민의 샘플의 산화 상태에 따른 3개의 분획물(HMA, HNA1 및 HNA 2)로의 분리를, 이하 이의 용출(elution)을, 4.85의 pH에서 소듐 아세테이트 50 mM 및 소듐 술페이트 400 mM 구배(gradient)를 활용하여, 35°C에서 0.1 ml/min의 일정한 흐름에서 6% 에탄올을 획득할 때까지 수행하여 달성하였다.

[0031] 처음 5분의 용출을 에탄올의 부재에서 수행하였다. 이하 5 내지 35분에서 에탄올의 농도는 6%까지 선형식으로 증가하였고, 그 이후 추가 5분 동안 일정하게 유지하였다. 최종적으로, 40 내지 45분까지, 에탄올의 농도는 0%로 다시 감소하였다. 에탄올 없는 추가 5분 후에, 다음 샘플이 분석될 수 있다.

[0032] 일부민의 분획물의 산화적 상태의 함수로서 일부민의 3개의 분획물의 검출을, 여기 및 방출 파장을 각각 280 및 340 nm로 활용하여, 형광으로 수행하였다. 일부민의 Cys-34의 HMA, HNA1 및 HNA2 형태의 농도의 정량을 대응하는 크로마토그램에서 수득된 관심대상의 각각의 피크의 높이를 고려하여 수행하였다.

[0033] 도 2는 해당 기술분야의 선행 수준의 일부민의 수득의 방법 동안 상이한 단계로부터의 인간 혈장 일부민의 산화 상태의 변화를 보여준다. 데이터는 구체적으로 저온살균과 이후 격리(quarantine) 이후 (최종 20% 일부민 산물), HMA 형태를 손상하며(detriment) HNA1 및 HNA2 형태의 증가를 보여준다. 해당 기술분야의 선행 수준의 방법으로 인간 혈장으로부터 정제된 5% 및 25% 일부민 농도에서 저온살균 및 격리의 단계 후에 일부민의 산화적 상태의 행동(도 3)은 동일한 기법 후에 최종 20% 일부민 산물에 대하여 관찰된 것(도 2)과 동등하다. 두 도면에서 수득된 데이터는, 구체적으로 이후에 격리를 갖는 저온살균의 단계 후, HMA 형태를 손상하며 HNA1 및 HNA2

형태의 증가를 보여준다.

[0035] 실시예 2: 저온살균 이전에 질소로 표면 처리하는 단계를 활용한 본 발명의 일부분을 수득하기 위한 방법.

[0036] 본 발명의 일부분을 수득하기 위한 방법은 실시예 1에 기재된 방법에 해당하고, 하기 기재된 바와 같이 일부분의 용액 중 용존 산소를 감소시키는 단계를 더 포함한다.

[0037] 최종 용기에서 멸균 용액의 수득 이후 (도 1, 멸균 여과 및 충진 단계), 상기 용기의 내부에 존재하는 산소를 대신하는(displace) 목적을 갖기 위해, 질소로의 표면 처리를 수행하고, 2개의 0.22 μm PVDF 필터(commercial type Millex GV Millipore, 0.22 μm , PVDF, 13 mm 필터, USA, or similar)에 연결된 2개의 피하주사 바늘(commercial type Braun Sterican 21G x 1 $\frac{1}{2}''$, 0.80 x 40 mm, Germany, or similar)을 바이알의 클로로부틸 스토퍼(chlorobutyl stopper)에 삽입하고, 상기 바늘과 일부분의 용액 간의 접촉을 피하였다. 바늘 중 하나는 질소 가스의 입구에 잡아 두고(destine), 다른 하나는 상기 용기 내 고압(overpressure)을 방지하는 목적을 갖는 출구로 잡아 두었다. 표면 질소의 처리를 2시간 동안 실온에서 수행하고, 액체의 이동의 관찰을 허용하는 목적을 갖는, 상기 용기 중 이의 스플래쉬(splash) 없이 질소의 일정한 흐름을 유지하였다.

[0038] 질소로 표면 처리를 완료하고, 인간 혈장으로부터의 일부분을 수득하기 위한 방법은 실시예 1에 기재된 바와 같이 최종 일부분 산물을 수득할 때까지 계속되었다 (도 1, 바이알에서 저온살균 단계). 실시예 1에서와 동일한 방식으로, 음이온 교환 크로마토그래피에 의해 본 발명의 기법으로 수득된 20% 농도 샘플의 산화적 상태를 분석하였다. 구체적으로, 저온살균 이전에 질소로 표면 처리의 단계를 받은 일부분의 샘플, 저온살균 이후 및 격리 이전의 일부분의 샘플, 및 격리의 기간 이후 일부분의 샘플을 분석하였다. 도 4는 수득된 결과를 보여주고, 선행 기술의 일부분을 수득하는 방법으로 도 2 및 3에서 관찰된 HMA 형태에서의 감소가 없고 HNA1 및 HNA2 형태에서의 증가가 없는 것을 관찰하였다.

[0039] 산화 상태의 분석에 더하여, 질소로의 표면 처리 이후 샘플에 존재하는 용존 산소의 측정을 하고, 결과는 모든 경우에 용존 산소의 농도는 0.5 ppm 이하이었다.

[0040] 측정을 용존 산소의 측정을 위한 프로브(commercial type HI 9828 Multiparameter Meter, Hanna Instruments, USA)를 사용하여 실온에서 수행하였다. 구체적으로, 이전에 질소로 표면 처리를 수행한 일부분의 용액을 포함하는 용기를 질소 대기(nitrogen atmosphere)를 갖는 큐비클(cubicle)의 내부에서 개방하고 샘플 중 산소의 측정을 위한 프로브를 즉시 침지(submerge)시켰다. 갈바니 전지(galvanic cell)의 원칙에 근거하여 기능하는, 사용된 프로브는 음극으로 작동하는 백금(Pt) 와이어로 둘러싸인 은(Ag) 양극을 포함하였다. 이전에 기재된 조립체(assembly)는 맨 끝에 Teflon ®의 맴브레인(용액에 존재하는 산소의 통과를 허용하고 용액 자체의 통과를 허용하지 않는 기체 투과성인 재료)을 갖는 포타슘 클로라이드의 전해질 용액으로 가득한 보호 커버(protective cover)에 삽입된다. 790 mV의 페텐셜(potential)의 인가(application)로, 전지(cell)에 존재하는 산소는 음극에서 히드록시드 이온(OH^-)으로 환원되고 은 클로리드(silve chloride)는 양극에 배치된다. 이 반응은 샘플에 존재하는 산소의 양에 비례하는 세기를 갖는 전류 흐름(current flow)을 가져온다. 계측기(meter)는 그 후 전류 흐름의 측정값을 상응하는 용존 산소의 농도로 전환한다.

[0042] 실시예 3: 저온살균 이전에 용액으로 질소를 버블링하는 단계를 활용한, 본 발명의 일부분을 수득하는 방법.

[0043] 하기 기재된 단계를 포함하는, 실시예 1에 기재된 방법에 해당하는 본 발명의 일부분을 수득하기 위한 방법. 최종 용기 중 멸균 용액의 수득 (도 1, 멸균 여과 및 충진 단계) 이후, 상기 용기의 내부에 존재하는 산소를 대신하는 목적을 갖기 위해, 2개의 0.22 μm PVDF 필터(commercial type Millex GV Millipore, 0.22 μm , PVDF, 13 mm filter, USA, or similar)에 연결된 2개의 피하주사 바늘(hypodermic needle) (commercial type Braun Sterican 21G x 1 $\frac{1}{2}''$, 0.80 x 40 mm, Germany, or similar)을 바이알의 클로로부틸 스토퍼에 삽입하여 질소 버블링(bubbling nitrogen)의 처리를 수행하였다. 질소 기체의 입구로 잡아 둔(destine) 바늘, 척추 바늘(spinal needle) (commercial type Terumo Spinal Needle, 18G x 3 $\frac{1}{2}''$, 1.20 x 90 mm, Japan, or similar)을 일부분의 용액에 침지하고, 액체와 접촉하는 것을 피하게 놓인 상기 피하주사 바늘 (commercial type Braun Sterican 21G x 1 $\frac{1}{2}''$, 0.80 x 40 mm, Germany, or similar)을 용기 내 고압을 방지하는 목적을 갖도록 그의 출구로 잡아 주었다(destin). 질소 버블링의 처리를 2시간 동안 실온에서 수행하고, 액체 중 작은 버블의 관찰을 허용하는 목적을 갖도록 질소의 일정한 흐름을 유지하였다.

[0044] 질소 버블링 처리를 완료하고, 인간 혈장으로부터 일부분을 수득하기 위한 방법은 실시예 1에 기재된 바와 같이

최종 알부민 산물을 수득할 때까지 계속되었다 (도 1, 바이알에서 저온살균 단계).

[0045] 실시예 1 및 2와 동일한 방식으로, 본 발명의 기법에 의해 수득된 20% 알부민 농도의 샘플의 음이온 교환 크로마토그래피로 산화 상태를 측정하였다. 구체적으로, 저온살균의 단계 이전에 질소를 베블링하는 단계를 받은 알부민의 샘플, 저온살균 이후 및 격리 이전의 알부민의 샘플, 및 격리의 기간 이후의 알부민의 샘플을 분석하였다. 도 5는 저온살균 이전에 질소로의 표면 처리의 단계를 활용한 도 4에서 수득된 것과 유사한 수득된 결과를 보여준다. 선행기술의 알부민을 수득하는 방법으로 도 2 및 3에서 관찰된 HMA 형태에서의 감소가 없고 HNA1 및 HNA2 형태에서의 증가가 없는 것을 관찰하였다.

[0046] 질소 베블링의 처리 이후의 샘플에 존재하는 용존 산소의 측정이 또한 수행된 경우, 실시예 2와 동일한 방식으로, 결과는 모든 경우에 용존 산소의 농도가 0.5 ppm 이하이었다.

[0048] 실시예 4: 알부민의 상이한 최종 농도에 적용된, 저온살균 이전에 질소로 표면 처리하는 단계를 활용한 본 발명의 알부민을 수득하는 방법.

[0049] 실시예 2에 기재된 방법에 해당하는 본 발명의 알부민을 수득하기 위한 방법을 5% 및 25%와 같은 알부민의 다른 농도에 적용하였다. 실시예 2에서와 동일한 방식으로, 본 발명의 기법에 의해 수득된 알부민의 5% 및 25%의 샘플의 산화적 상태를 음이온 교환 크로마토그래피로 분석하였다. 구체적으로, 저온 살균 이전에 질소로 표면 처리하는 단계를 받은 5% 및 25% 알부민의 샘플, 저온살균 이후 및 격리 이전에 5 및 25% 알부민의 샘플, 및 격리 단계 이후 5% 및 25% 알부민의 샘플을 분석하였다. 도 6은 20%의 농도의 알부민에 대하여 도 4에 수득된 것과 유사한 수득된 결과를 보여준다. 선행기술의 알부민을 수득하는 방법으로 도 2 및 3에서 관찰된 HMA 형태에서의 감소가 없고 HNA1 및 HNA2 형태에서의 증가가 없는 것을 관찰하였다.

[0050] 산화 상태의 분석에 더하여, 질소로 표면 처리한 이후 샘플에 존재하는 용존 산소의 측정을 수행하고, 그 결과는 모든 경우에 용존 산소의 농도가 0.5 ppm 이하이었다.

[0052] 실시예 5: 저온살균 이전에 헬륨으로 표면 처리하는 단계를 활용한 본 발명의 알부민을 수득하는 방법.

[0053] 하기 기재된 단계를 포함하는, 실시예 1에 기재된 방법에 해당하는 본 발명의 알부민을 수득하는 방법. 최종 용기에 멸균 용액의 수득 (도 1, 멸균 여과 및 충진 단계) 이후, 바이알에 남은 공기 챔버 중에 존재하는 산소를 대신하는 목적을 갖기 위해, 헬륨으로의 표면 처리를 수행하고, 클로로부틸 스토퍼로 삽입하고, 알부민의 용액과 2개의 $0.22 \mu\text{m}$ PVDF 필터(commercial type Millex GV Millipore, $0.22 \mu\text{m}$, PVDF, 13 mm 필터, USA, or similar)에 연결된 2개의 피하주사 바늘(commercial type Braun Sterican 21G x $1\frac{1}{2}''$, $0.80 \times 40 \text{ mm}$, Germany, or similar)의 접촉을 피하고, 알부민의 용액과 상기 바늘의 접촉을 피하였다. 바늘 중 하나는 헬륨 가스의 입구로 잡아두고(destine) 다른 하나는 용기 내 고압을 방지하는 목적을 갖는 출구로 잡아주었다(destine). 표면 헬륨의 처리(treatment with surface helium)를 2시간 동안 실온에서 수행하고, 액체의 이동의 관찰을 허용하는 목적을 갖도록, 상기 용기 중 이의 스플래쉬 없이 헬륨의 일정한 흐름을 유지하였다.

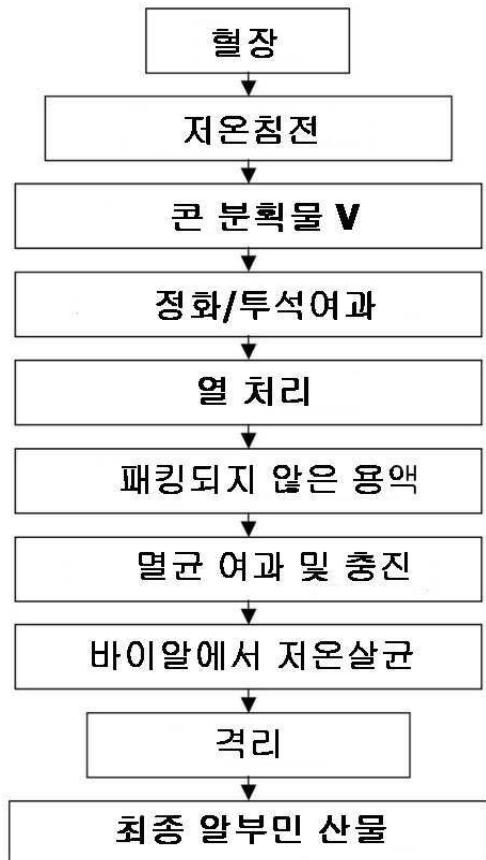
[0054] 헬륨으로 표면 처리를 완료하고, 인간 혈장으로부터 시작된 알부민을 수득하는 방법은 실시예 1에 기재된 바(도 1, 바이알 중 저온살균 단계)와 같이 최종 알부민 산물의 수득까지 계속하였다.

[0055] 실시예 1 내지 4에서와 동일한 방식으로, 본 발명의 기법으로 수득된 알부민의 샘플의 산화 상태를 음이온 교환 크로마토그래피로 분석하였다. 구체적으로, 저온살균 이전에 헬륨으로 표면 처리의 단계를 받은 알부민의 샘플, 저온 살균 이후 및 격리 이전의 알부민의 샘플, 및 격리 기간 이후의 알부민의 샘플을 분석하였다. 도 7은 저온 살균 이전에 질소로 표면 처리의 단계를 활용한 도 4 및 6에서 수득된 것, 및 저온 살균 이전에 용액에 질소를 베블링한 단계를 활용한 도 5에서 수득한 것과 비슷한 수득된 결과를 보여준다. 선행 기술의 알부민을 수득하는 방법으로 도 2 및 3에서 관찰된 HMA 형태에서의 증가가 없고 HNA1 및 HNA2에서의 감소가 없다는 것을 관찰되었다.

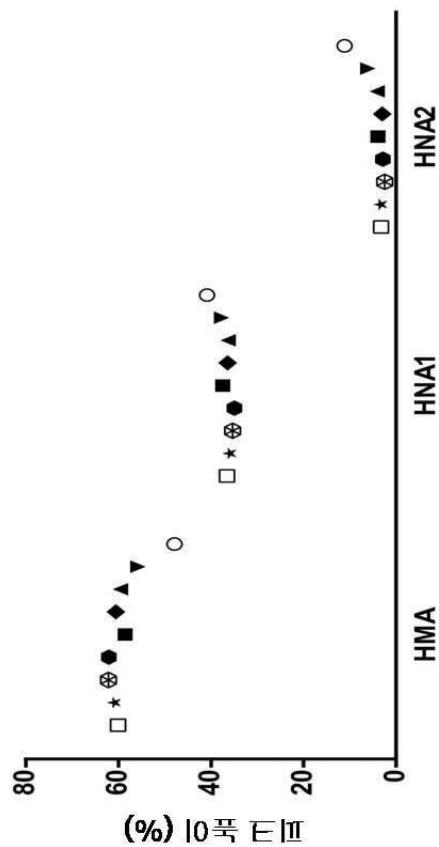
[0056] 헬륨 베블링에 의한 처리 이후 샘플에 존재하는 용존 산소의 측정이 이루어진 경우, 실시예 2와 동일한 방식으로, 결과는 모든 경우 용존 산소의 농도가 0.5 ppm 이하이다.

도면

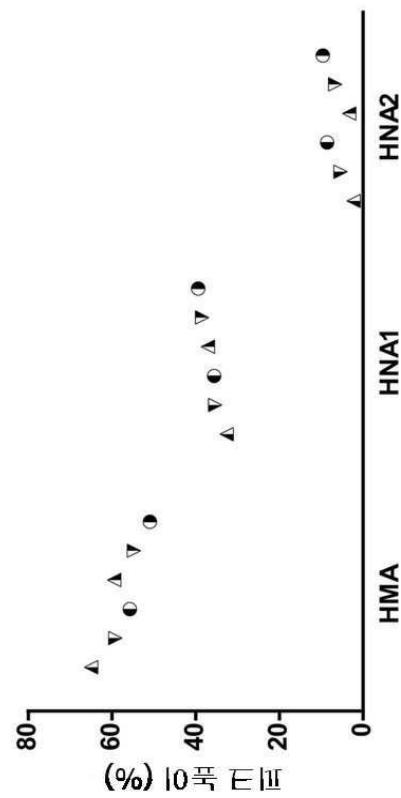
도면1



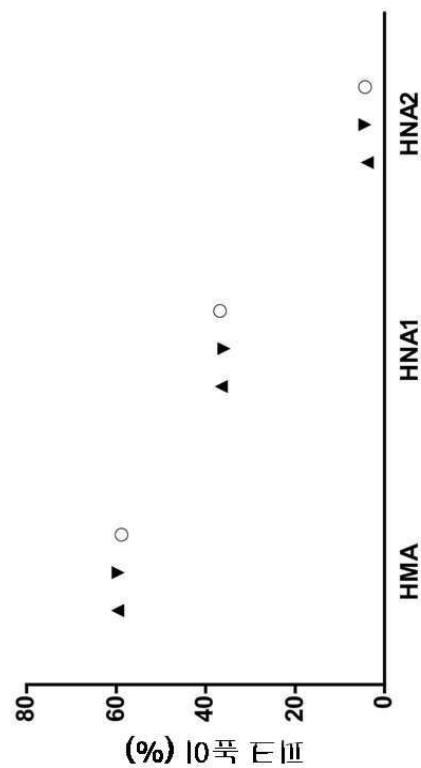
도면2



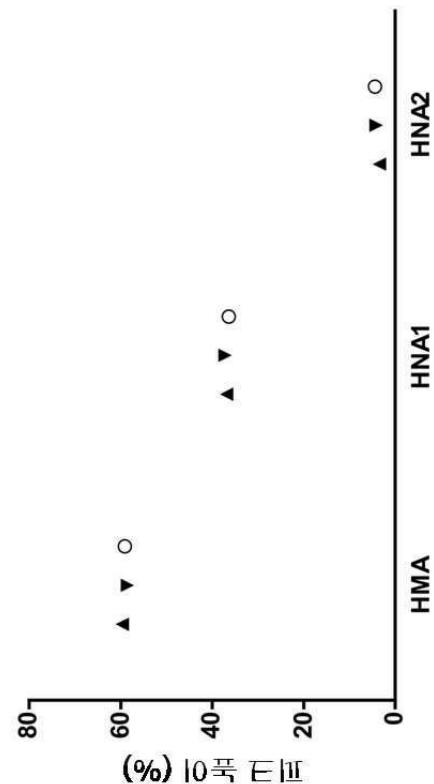
도면3



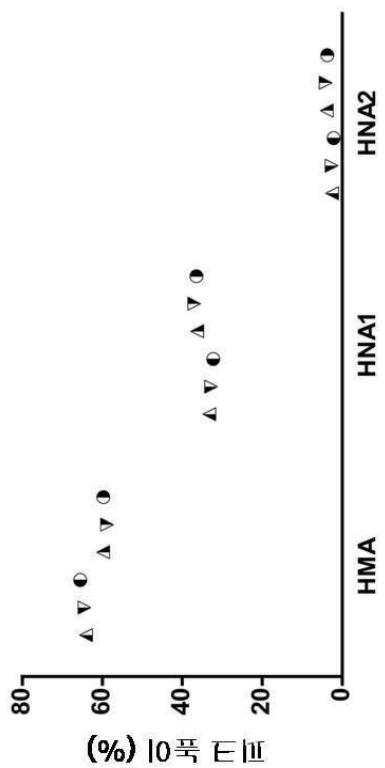
도면4



도면5



도면6



도면7

