



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2012년07월03일
(11) 등록번호 10-1162060
(24) 등록일자 2012년06월27일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61L 2/04 (2006.01) A61L 2/00 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2008-7016839
(22) 출원일자(국제) 2006년12월19일
심사청구일자 2010년03월02일
(85) 번역문제출일자 2008년07월11일
(65) 공개번호 10-2008-0093098
(43) 공개일자 2008년10월20일
(86) 국제출원번호 PCT/FR2006/002817
(87) 국제공개번호 WO 2007/071845
국제공개일자 2007년06월28일
(30) 우선권주장
0512875 2005년12월19일 프랑스(FR)
(56) 선행기술조사문헌

Hatley, R.H.M., et al., Stabilisation and delivery of labile materials by amorphous carbohydrates and their derivatives, J.Mol.Cat.B:Enzymatic 7(1999), pp.11-19

전체 청구항 수 : 총 15 항

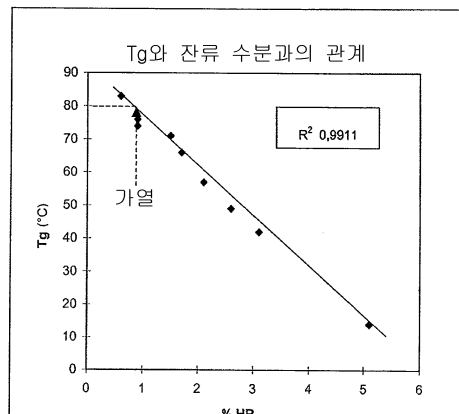
심사관 : 이현송

(54) 발명의 명칭 건식 가열에 의한 바이러스 불활성화 방법

(57) 요약

본 발명은 유리 전이 온도에 따라 건조된 생물학적 샘플 내에 존재하거나, 또는 존재할 수 있는 바이러스의 건식 가열에 의한 바이러스 불활성화 방법에 관한 것이다.

대표도 - 도1



특허청구의 범위

청구항 1

건조된 생물학적 생성물 내에 존재하거나 또는 존재할 수 있는 바이러스의 건식 가열에 의한 바이러스 불활성화 방법으로서,

(a) 상기 처리하려는 건조된 생물학적 생성물의 유리 전이 온도(T_g)를 측정하는 단계; 및

(b) 상기 단계 (a)에서 측정한 바와 같은 유리 전이 온도(T_g)와 동일하거나 그 이상인 건식 가열 온도(T)에서 상기 단계 (a)의 처리하려는 건조된 생물학적 생성물을 가열하는 단계;

를 포함하는 것을 특징으로 하는 바이러스 불활성화 방법.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 건조된 생물학적 생성물의 유리 전이 온도(T_g)는 건식 가열 이전에 조정하는 것을 특징으로 하는 특징으로 하는 바이러스 불활성화 방법.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 건조된 생물학적 생성물이 동결건조물인 것을 특징으로 하는 특징으로 하는 바이러스 불활성화 방법.

청구항 4

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 건조된 생물학적 생성물이 혈장으로부터 추출된 1종 이상의 단백질을 함유하는 조성물인 것을 특징으로 하는 특징으로 하는 바이러스 불활성화 방법.

청구항 5

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 건식 가열 온도(T)는 비-엔벨로프 바이러스(non-enveloped virus)의 불활성화가 가능하도록 선택하는 것을 특징으로 하는 바이러스 불활성화 방법.

청구항 6

제2항에 있어서, 상기 유리 전이 온도는 상기 생물학적 생성물에 고 분자량 부형제를 첨가하거나, 또는 상기 생물학적 생성물의 수분을 감소시킴으로써 증가시키는 것을 특징으로 하는 바이러스 불활성화 방법.

청구항 7

제2항에 있어서, 상기 유리 전이 온도는 상기 생물학적 생성물에 염 또는 저 분자량 부형제를 첨가하거나, 또는 상기 생물학적 생성물의 수분 함량을 증가시킴으로써 감소시키는 것을 특징으로 하는 바이러스 불활성화 방법.

청구항 8

제2항에 있어서, 상기 T_g 는 시차 주사 열분석기(scanning differential thermoanalyser)를 이용하여 측정하는 것을 특징으로 하는 바이러스 불활성화 방법.

청구항 9

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 T 는 T_g 와 $T_g+20^\circ\text{C}$ 사이에 포함되는 것을 특징으로 하는 바이러스 불활성화 방법.

청구항 10

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 건식 가열 온도(T)는 바이러스 감소 인자 $\geq 3 \log_{10}$ 를 얻기 위해 선택하는 것을 특징으로 하는 바이러스 불활성화 방법.

청구항 11

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 건식 가열 온도(T)는 바이러스 감소 인자 $\geq 4 \log_{10}$ 를 얻기 위해 선택하는 것을 특징으로 하는 바이러스 불활성화 방법.

청구항 12

제10항에 있어서, 상기 T는 Tg와 T(Tg + 20℃) 사이의 차이를 증가시킴으로써 바이러스 감소 인자 및 바이러스 불활성화 속도를 증가시키기 위해 선택하는 것인 바이러스 불활성화 방법.

청구항 13

제10항에 있어서, 상기 T는 Tg와 T 사이의 차이를 증가시켜 생물학적 생성물 안정성을 촉진하도록 선택하는 것을 특징으로 하는 불활성화 방법.

청구항 14

제10항에 있어서, 최종 단계에서, 상기 제10항의 방법으로 처리되고 건조된 생물학적 생성물 내에서 바이러스 불활성화의 효능을 측정하고, 상기 효능이 불충분한 것으로 인정되는 경우, 상기 가열 온도(T)와 상기 유리 전이 온도(Tg) 사이의 차이를 증가시킨 후, 제10항에 따라 건조된 생물학적 생성물의 바이러스 불활성화를 계속하는 것을 특징으로 하는 바이러스 불활성화 방법.

청구항 15

제10항에 있어서, 최종 단계에서, 상기 제10항의 방법으로 처리되고 건조된 생물학적 생성물의 안정성을 평가하고, 상기 안정성이 불충분한 것으로 인정되는 경우, 상기 가열 온도(T)와 상기 유리 전이 온도(Tg) 사이의 차이를 증가시킨 후, 상기 제10항에 따라 건조된 생물학적 생성물의 바이러스 불활성화를 계속하는 것을 특징으로 하는 바이러스 불활성화 방법.

명세서

기술 분야

- [0001] 본 발명은 건식 가열에 의한 바이러스 불활성화 방법에 관한 것이다.
- [0002] 바이러스 감염의 위험은 임의의 고형 생물학적 재료에 존재하며, 이러한 고형 생물학적 재료 또는 그로부터 유래한 제품, 또는 그러한 재료를 사용하는 제조 방법에 의해 제조된 제품은 치료적 목적 또는 예방적 목적을 위해 사용될 수 있는 바이러스 불활성화 방법을 이용하여 바이러스를 불활성화시켜야 한다.
- [0003] 치료적 영역 및 예방적 영역에서, 생물학적 소스로부터 유래하거나, 또는 그들의 제조 과정에서 생물학적 소스에 의해 감염되는 것으로 생각되는 활성 물질이 사용된다.
- [0004] 이들 활성 물질은 지질 또는 탄수화물 기에 의해 치환될 수도 있는 단백질, 펩티드, 폴리펩티드, 항체, 핵산, DNA, RNA, 다당류, 박테리아, 바이러스 입자 또는 기타일 수 있다.
- [0005] 이들이 유래하거나 제조 과정에서 이들을 오염시킬 것으로 생각되는 생물학적 소스는 인간 또는 동물 조직, 혈액, 혈장, 뼈, 임의의 식물 조직, 임의의 미생물, 세포 배양 배지, 바이러스 배양 배지, 박테리아 배양 배지, 효모 배양 배지, 곰팡이 배양 배지 또는 진균류 배양 배지일 수 있다.
- [0006] 따라서, 바이러스 감소 또는 불활성화 단계는 이러한 생물학적 소스로부터 생성된 활성 물질의 추출 단계에 일반적으로 포함된다.
- [0007] 본 발명에서 사용한 용어 '생물학적 생성물'이라는 용어는, 생물학적 소스로부터 생성된 활성 물질, 및 상기 활성 물질의 제조 과정으로부터 유래하는 다른 화합물 또는 부형제를 포함하는 생성물을 의미한다.
- [0008] 화학 제품 및/또는 열을 이용하는 처리에 기초한 바이러스 불활성화 방법은 당해 기술 분야에 공지되어 있다. 이들 방법 중 대다수의 방법은 바이러스 불활성화의 효능이 매우 중요한 혈액 수혈 분야에서 유래한 것인데, 그 이유는 어떤 시도가 공여체로부터 얻은 생성물 유래의 가능한 오염을 제거하여야만 하기 때문이다.
- [0009] 가열은 HIV를 불활성화시키기 위해 추천되는 방법인데, 그 이유는 이의 바이러스 기원은 특히 혈액 및 혈장, 및 혈액 유도된 생성물 및 혈장 유도된 생성물인 것으로 알려져 있기 때문이다. 건식 가열, 즉 건조 생성물을

온도 T에서 t 시간 동안 가열하는 방법이 추천되는데, 예를 들어 액체 형태로 가열되지 않은 응집 인자의 동결건조 농축물(lyophilised 또는 freeze-dried concentrates)에 사용할 수 있다. 예를 들어, 인간 혈장으로부터 추출된 혈액 응고 인자 VIII는 상기 방법을 이용하여 동결건조된 상태로 60℃에서 72-96 시간 동안 가열하여 혈우병을 안전하게 치료하기 위해 의도된 생물학적 활성 물질을 제조할 수 있다. 그러나, 건식 가열에 의한 바이러스 불활성화의 일관되지 않은 감소로 인해 이러한 방법은 더 사용할 수 없게 되었는데, 그 이유는 바이러스 불활성화에도 불구하고 HIV 감염에 의한 수혈의 혈우병 감염 케이스가 보고되었기 때문이다.

[0010] 따라서, 이들 생성물을 소위 '혹독한(severe)' 가열 조건, 즉 건조 상태로 80℃에서 72 시간 동안 가열하는 방법이 제안되었다.

[0011] 이어서, 이러한 바이러스 불활성화 방법은 HIV에 대해서는 효과적인 것으로 확인되었는데, 이는 이러한 방식으로 처리한 혈액 응고 인자 VIII에 얻은 임상 결과에 의해 확인할 수 있다(L. Winkelmann et al., Severe Heat Treatment of Lyophilised Coagulation Factors Curr. Stud. Hematol. Blood Transfus. [1989] 56: 55-69).

[0012] 또한, 용매와 세정제의 혼합물을 이용하는 정제된 단백질의 처리는 생물학적 소스로부터 유래한 단백질 외피로 덮여있는 바이러스(엔벨로프 바이러스)의 전염을 예방하는데 종종 사용된다(Piet et al., Transfusion [1990] 30: 592-98). 이러한 처리는 지질 외피를 보유하고 있는 바이러스에 대해서는 효과적이지만, 그러한 구조를 갖지 않은 바이러스에 대해서는 효과가 현저히 떨어진다. 최근에는, 용매/세정제를 이용하여 처리한 생물학적 생성물의 이용을 통한 비-엔벨로프 바이러스의 전염을 이용하는 것이 보고되었다. 비-엔벨로프 RNA 바이러스인 A형 간염 바이러스는 용매/세정제로 처리된 인자 VII를 이용하여 환자에게 전염된다(Purcell et al., Vox Sang [1994] 67: 2-7). 인자 VIII은 또한 비-엔벨로프 파르보바이러스 B19의 전염에 관련되어 있다(Lefrere et al. Lancet [1994] 343: 211-12).

[0013] 정제된 단백질의 가열 처리는 비-엔벨로프 바이러스에 대한 바이러스 불활성화의 연장 스펙트럼을 위해 추천되는 방법이다. 그러나, 비-엔벨로프 바이러스의 열 불활성화는 일반적으로 엔벨로프 바이러스의 불활성화보다 더 어렵고, 만족스러운 불활성화를 보장하기 위해 종종 더 긴 처리 및/또는 더 높은 온도를 필요로 한다. B19는 100℃에서 30분 동안 건식 가열한 인자 VIII을 통해 환자에게 전염된다(Santagostino et al., Lancet [1994] 343:798).

[0014] 따라서, 생물학적 생성물의 안정성을 보전하거나 증강시키기 위해 어떻게 바이러스 불활성화 방법을 개선할 것인가는 매우 중요한 문제이다.

배경 기술

[0015] 많은 저자들은 건식 가열 바이러스 불활성화에 영향을 미치는 중요한 매개변수들을 관찰하려고 시도하였다. 그 목적은 어떤 처리가 처리하려는 고체 재료에 적합한지 여부, 즉 상기 방법이 상기 생성물의 만족스러운 안정성을 보존하면서 충분한 정도로 바이러스를 불활성화시키는지 여부를 예상하는 것이 가능한 물리화학적 매개변수를 결정하는 것이다. 더욱이, 이 매개변수가 바이러스 불활성화 또는 생성물 안정성을 촉진시키도록 조정될 수 있는지 여부는 매우 흥미로운 일이다.

[0016] 바이러스 불활성화 방법에서 바이러스 감소 인자는 건식 가열에 의한 바이러스 불활성화가 감소되는 인자로서 정의되는데, 환언하면 불활성화 단계 이전에 건식 가열에 의한 바이러스 불활성화와 불활성화 단계 이후에 건식 가열에 의한 바이러스 불활성화의 비의 10을 밑으로 하는 로그로서 정의된다.

[0017] 수분 함량은 생성물 100 g 당 물질의 중량으로서 정의된다. 그 이유는 전체 중량의 백분율로 표현되기 때문이다. 전통적인 측정 방법은 그의 중량이 일정하게 유지될 때까지 100℃ 이상의 온도에서 가열한 후 생성물의 중량 감소를 결정하는 것이다.

[0018] Wilkommen et al. (Paul Ehrlich Institute)는, 수분 함량이 낮은(<0.8%) 동결건조물의 경우, 80℃에서 72 시간 동안 가열에 의해 얻은 A형 간염 바이러스(HAV) 감소 인자는 0 내지 0.4 log10인 반면, 상대적으로 수분 함량이 높은(>0.8%) 동결건조물의 경우, 동일한 조건에서 얻은 A형 간염 바이러스 감소 인자는 4.3 log10 또는 그 이상임을 확인하였다.

[0019] Bunch et al. (Alpha Therapeutic Corporation)는 80℃에서 72 시간 동안 가열한 경우, 제조한 인자 VIII A형 간염 바이러스 감소 인자는 $\geq 6.9 \log_{10}$ 임을 확인하였다.

[0020] 문헌[Roberts PL et al., Biologicals [2000] Sept; 28(3): 185-8 Comparison of the Inactivation of Canine

and Bovine Parvovirus by Freeze-Drying and Dry-Heat Treatment in Two High-Purity Factor VIII Concentrates]에서 확인할 수 있는 바와 같이, 인자 VIII 농축물의 2개의 동결건조된 배합물을 80℃에서 72 시간 동안 가열하는 경우, 2개의 파르보바이러스(소 및 개)의 불활성화를 통해 생물학적 생성물의 제제화의 영향 및 바이러스의 내성의 영향을 확인하였다.

[0021] Hart HF et al. (Vox Sang [1994] 67(4): 345-50 Effect of Terminal (Dry) Heat Treatment on Non-Enveloped Viruses in Coagulation Factor Concentrates)는 80℃에서 24 시간 동안 또는 90℃에서 2 시간 동안 가열한 인자 VIII 동결건조물에서 동일한 A형 간염 바이러스 감소 인자를 얻었다.

[0022] Tomokiyo et al. (Vox Sang [2003] Jan; 84(1): 54-64 Large-Scale Production and Properties of Human Plasma-Derived Activated Factor VII Concentrate)는 인자 VIIa의 동결건조물 내에서 다른 바이러스, 즉 CMV(사이토메갈로바이러스), HIV(인간 면역결핍 바이러스), BVDV(소 바이러스성 설사 바이러스 폴리오바이러스), PPV(돼지 파르보바이러스)의 불활성화를 통해 동결건조물 내의 바이러스 불활성화가 65℃에서 가능함을 확인하였다. 수분 함량이 <1.7%인 생성물을 65℃에서 96 시간 동안 가열하면 PPV를 제외한 모든 바이러스의 경우 >4 log10의 바이러스 감소 인자를 확인하였다.

[0023] 유럽 특허 출원 EP 0 844 005호에는 80℃에서 72-77 시간 동안의 건식 가열 방법을 통해 바이러스 불활성화의 효능에서 결정적인 요소는 처리하려는 건조된 생물학적 생성물의 잔류 수분 함량이라는 것이 기재되어 있다. 테스트한 바이러스는 HAV, 돼지 파르보바이러스 및 슈도라비에스 바이러스였다.

[0024] 상기 발명자들은 이 방법을 이용하여 $\geq 4 \log_{10}$ 의 바이러스 감소 인자에 다다르기 위해서는 잔류 수분이 0.8% 또는 그 이상이어야 함을 확인하였다. $\leq 0.8\%$ 의 잔류 수분에서는, 평균 바이러스 감소 인자는 $0.12 \log_{10}$ 이었다.

[0025] 기술적 과제

[0026] 상기한 매우 단편적인 결과에 비추어 보면, 처리하려는 생물학적 생성물에 따라 사용할 수 있는 건식 가열에 기초한 바이러스 불활성화 방법을 위한 특징적인 작동 변수를 신뢰할 수 있게 결정하는 것을 가능하게 하는 매개변수는 없는 것으로 생각된다.

[0027] 그럼에도 불구하고, 처리하려는 생성물의 수분 함량이 매우 중요한 역할을 한다고 하는 점에서는 여러 저자들 간에 어느 정도 공통적인 견해가 있는 것으로 보인다. 물론 어떤 저자들은 만족스러운 바이러스 불활성화를 얻기 위한 한계 값으로서 잔류 수분 함량을 고려하는 것에 대해 동의하고 있지 않다. 실제로, 불완전한 불활성화를 초래하기 위해 이러한 값의 단지 10분의 몇 만큼을 감소시키는 것으로 종종 충분하다.

[0028] 그러나, 어떤 저자들이 주장하는 것과는 대조적으로, 본 출원인은 바이러스 불활성화는 잔류 수분이 거의 없는 동결건조물 내에서 수행될 수 있음을 확인하였다. 수분 함량이 0.1%인 인간 피브리노겐의 동결 건조된 제제를 77℃에서 72 시간 동안 건식 가열하였다. A형 간염 바이러스(HAV), 인간 면역결핍 바이러스(HIV), 소 바이러스 설사 바이러스(BVDV) 및 돼지 파르보바이러스(PPV)에 대해 얻어진 감소 인자를 하기 표 1에 나타냈다.

[0029] [표 1]

[0030]

바이러스	감소 인자
HAV	4.10 ± 0.30
	3.75 ± 0.26
HIV	4.53 ± 0.36
	4.62 ± 0.30
	4.88 ± 0.28
BVDV	5.96 ± 0.40
	5.21 ± 0.38
PPV	2.97 ± 0.43
	2.88 ± 0.37

[0031] 이들 여러 가지 관찰들이 산발적인 것은 다음과 같은 한가지 결론을 도출해 낼 수 있다는 의미이다: 처리하려는 생성물의 잔류 수분은 건식 가열에 의한 바이러스 불활성화의 결과를 위해 결정적인 인자는 아니지만, 결정적인 인자가 의존하는 중요한 인자라는 것이다.

[0032] 따라서, 문제는 만족스러운 바이러스 불활성화와 만족스럽지 못한 바이러스 불활성화를 구분하는 한계 값을 제공할 수 있는, 측정가능하면서 다원적인 물리화학적 매개변수를 확인하는 것이다.

발명의 상세한 설명

[0033] 발명의 개요

[0034] 본 발명자들은 측정 가능한 물리화학적 매개변수가 처리하려는 생물학적 생성물의 유리 전이 온도라는 놀라운 사실을 발견하였다.

[0035] 유리 전이는 이차 전이, 즉 잠열이 아니라 열 용량의 변화와 관련된 열적 전이이다. 이는 결정화가 예방될 정도로 충분히 빠르게 충분히 낮은 온도로 냉각되고, 따라서 유리 또는 비정질 중합체, 또는 경질의 부서지기 쉬운 상태로부터 연질의 가요성 상태로 전이되는 결정질 중합체의 비정질 부분을 형성하는 과냉각된 액체의 특성이다.

[0036] 유리 전이 온도 또는 T_g 는 유리 전이가 일어나는 온도이다.

[0037] 중합체가 유리 전이 온도 이하의 온도로 냉각되는 경우, 유리와 같이 경질이며 부서지기 쉬운 상태가 되는데, 이를 유리질 상태라 칭한다.

[0038] 탄성 고무, 예를 들어 폴리이소프렌 및 폴리이소부틸렌은 그들의 유리 전이 온도 이상에서 사용된다. 즉, 이들은 고무질이고, 연질이며, 가요성인 상태에서 사용된다.

[0039] 상기 유리 전이 온도가 특정 매개변수 세트에 의존한다는 것은 당해 기술 분야의 통상의 기술자에게 공지된 사실이다. 중합체의 경우, 유리 전이 온도는 그들의 분자량, 사슬의 화학 구조, 및 포함되는 가소화제의 양에 따라 달라진다.

[0040] 가소화제는 염과 같은 소분자인데, 이들은 중합체 분자 사이에 삽입되어 중합체 분자들이 서로 미끄러지는데 조력함으로써 그들의 이동을 용이하게 한다. 따라서, 가소제의 첨가로 유리 전이 온도를 낮출 수 있다.

[0041] 대조적으로, 고분자량 분자는 그들 중에서 중합체 분자의 이동을 차단하고, 따라서 유리 전이 온도를 상승시킨다.

[0042] 또한, 본 발명자들은, 유리 전이 온도는 폰 빌레브란트 인자(von Willebrand Factor; vWF)의 주어진 동결 건조물의 수분 함량과 직접적으로 관련되어 있다.

[0043] 동결 건조물의 유리 전이 온도와 그의 잔류 수분과의 관계는 도 1에 그래프로 나타났다.

[0044] 따라서, 생물학적 생성물의 유리 전이 온도는 활성 물질의 특성 및 부형제의 특성, 예를 들어 가소제의 존재, 결정질 또는 비정질 형태, 부형제의 분자량, 및 생물학적 생성물의 잔류 수분에 따라 달라진다.

[0045] 발명의 상세한 설명

[0046] 본 발명은 건조된 생물학적 생성물 내에 존재하거나 또는 존재할 수 있는 바이러스의 건식 가열에 의한 바이러스 불활성화 방법에 관한 것인데, 본 발명의 바이러스 불활성화 방법은 하기 단계를 포함하는 것을 특징으로 한다.

[0047] (a) 상기 처리하려는 건조된 생물학적 생성물의 유리 전이 온도(T_g)를 측정하는 단계; 및

[0048] (b) 상기 단계 (a)에서 측정한 바와 같은 유리 전이 온도(T_g)와 동일하거나 그 이상인 건식 가열 온도(T)에서 상기 단계 (a) 유래의 처리하려는 건조된 생물학적 생성물을 가열하는 단계.

[0049] 건조된 생성물은 당해 기술 분야의 통상의 기술자에게 친숙한 방법, 예를 들어 동결건조법, 진공 건조법, 예비증발법 또는 분무법을 이용하여 건조한 생성물이다.

[0050] 구체적으로, 건조된 생성물은 동결 건조된 생성물, 즉 일차 냉동되고, 그의 수분 함량 중 적어도 일부는 진공 하에서 후속 승화된 생성물이다.

[0051] 실제로, 본 발명자들은 바이러스 감소 인자 및 바이러스 불활성화의 동역학 둘 다는 가열 온도가 T_g 와 동일하거나 그 이상인 경우 증가되는 것을 관찰하였다.

[0052] 따라서, 유리 전이 온도 값을 아는 것은, 불활성화 공정이 만족스러울 것인지, 그리고 필요에 따라 상기 과정을 적절히 조절하여야 하는지에 대한 예상을 가능하게 한다.

- [0053] 건조된 생물학적 생성물의 유리 전이 온도의 측정은 이러한 생성물의 샘플을 -50℃와 +100℃ 사이의 온도에서 점진적으로 그리고 설정된 프로그램에 따라 상승시키고, 유리 전이를 포함하는 그의 상태 변화를 관찰함으로써 이루어진다.
- [0054] 따라서, 건조된 생물학적 생성물의 온도기록도 및 놀랍게도 그의 유리 전이 온도가 얻어진다.
- [0055] 유리 전이 온도의 측정은 가열에 기초한 바이러스 불활성화 방법 분야의 일반적인 지식을 이용하여 수행하였으며, 당해 기술 분야의 통상의 기술자는 $T \geq T_g$ 라는 요구 조건을 충족시키기 위해
- [0056] - T_g 가 온도 $T \geq T_g$ 를 선택하기 위해 관련된 바이러스에 대해 만족스러운지 여부; 또는
- [0057] - T_g 가 요구되는 바이러스 불활성화 및 생성물의 안정성 둘 다를 만족시키는 것을 담보하기 위해 T 를 선택할 수 있도록 조정되어야 하는지 여부
- [0058] 를 판단할 수 있을 것이다.
- [0059] 예를 들어, 당해 기술 분야의 통상의 기술자가, T_g 는 T , 예를 들어 $T_g \leq T$ 에서 소정의 바이러스의 불활성화를 위해, 그리고 예를 들어 생성물의 안정하게 유지하기 위해 너무 낮은 것을 알고 있는 경우, 당해 기술 분야의 통상의 기술자는 T_g 를 증가시켜 T 를 바이러스를 불활성화시키고, 그리고 T 와 T_g 사이의 차이를 생성물의 분해를 야기시키도록 그렇게 크지 않도록 하는 것으로 공지된 온도 범위 내로 설정할 것이다.
- [0060] 한편, 당해 기술 분야의 통상의 기술자가, T_g 는 $T \geq T_g$ 를 위해, 그리고 생성물을 안정하게 유지하기 위해 너무 크다는 것을 알고 있는 경우, T 를 선택하기 이전에 T_g 를 낮출 것이다.
- [0061] 본 발명에 따른, 생물학적 생성물을 위한 건식 가열 바이러스 불활성화 방법은 비-엔벨로프 바이러스의 경우에 특히 적합하다.
- [0062] 이 방법은 건조된 생물학적 생성물로서 1종 이상의 혈액-혈장 추출된 단백질을 함유하는 조성물을 처리하는데 사용할 수 있다.
- [0063] 구체적인 실시 태양에서, 건식 가열 온도 T 는 비-엔벨로프 바이러스의 불활성화가 가능하도록 선택된다.
- [0064] 바람직한 방식에서, 유리 전이 온도는 생물학적 생성물에 고분자량 부형제를 첨가하거나, 또는 생물학적 생성물의 수분을 감소시킴으로써 증가되며; 별법으로, 유리 전이 온도는 염 또는 저분자량 부형제를 생물학적 생성물에 첨가하거나, 또는 생물학적 생성물의 수분을 증가시킴으로써 낮출 수 있다.
- [0065] 구체적으로, 유리 전이 온도는 시차 주사 열분석기를 이용하여 측정한다. 상 변화는 고려한 온도 범위 내에서 변화가 일어나지않는 불활성 생성물에 대해 측정되는 바와 같이, 칼로리 용량의 변화로서 정의된다.
- [0066] 본 발명에 따른 방법의 가열 온도 T 는 만족스러운 생성물 안정성을 보전하기 위해 T_g 내지 $T_g + 20^\circ\text{C}$ 사이에 포함되어야 하는 것이 바람직할 것이다. 이 범위 내에서, T 는 T_g 와 $T(\text{최대 } T_g + 20^\circ\text{C})$ 사이의 차이를 증가시킴으로써 바이러스 감소 인자 및 바이러스 불활성화 동력학을 촉진시키거나, 또는 T 는 T_g 와 T 사이의 차이를 감소시킴으로써 생성물의 안정성을 촉진시키도록 선택될 수 있다.
- [0067] 특히 바람직한 방식에서, 건식 가열 온도 T 는 바이러스 감소 인자 $\geq 3 \log_{10}$, 바람직하게는 $4 \log_{10}$ 을 얻도록 선택된다.
- [0068] 특정 실시 태양에서, 최종 단계에서는, 건조되고 처리된 생물학적 생성물에서 바이러스 불활성화 효능을 측정하고, 상기 효능이 불충분한 것으로 간주되는 경우, 가열 온도 T 와 유리 전이 온도 T_g 사이의 차이를 증가시킨 후 건조된 생물학적 생성물의 바이러스 불활성화를 계속 수행한다.
- [0069] 다른 특정 실시 태양에서, 최종 단계에서는, 건조되고 처리된 생물학적 생성물의 안정성을 평가하고, 상기 안정성이 불충분한 것으로 간주되는 경우, 가열 온도 T 와 유리 전이 온도 T_g 사이의 차이를 감소시킨 후 건조된 생물학적 생성물의 바이러스 불활성화를 계속 수행한다.

실시예

- [0076] 실시예 1: 건식 가열에 의한, 동결건조물내 박테리오파지 PR772의 불활성화
- [0077] 동결건조물의 물리적 특성을 개질하여 유리 전이 온도(T_g)를 조정하였다.
- [0078] 유리 전이 온도는 시차 주사 열분석기를 이용하여 측정하였다. 시차 주사 열분석기의 온도는 인덱스(T_m

156.6℃) 및 n-옥타데칸(T_m 28.2℃)을 이용하여 보정하였다. 샘플은 20℃/분의 변화율로 -50℃로부터 130℃까지 처리하였다. 액체 질소를 사용하여 실온 이하의 온도에서 실험을 수행하였다. 유리 전이 온도는 명백한 특정 가열에서 흡열 변화의 중점으로서 취하였다. 측정은 2회 수행하였으며, 평균값을 T_g 로 하였다.

- [0079] 가열은 T_g 보다 더 낮은 온도(즉, 고체의 유리질 상태에서) 또는 T_g 보다 20℃ 이상의 온도(즉, 점탄성[고무질] 상태)에서 수행하였다.
- [0080] 모든 동결건조물은 함수량이 1% 미만이었다.
- [0081] 함수량은 물과 요오드의 반응에 기초하는, 당해 기술 분야의 통상의 기술자에게 공지된 칼-피셔법을 이용하여 측정하였다.
- [0082] 생성물 A의 제제화(pH 7.0±0.5)
- [0083] - 글리신 7.5 g/l
- [0084] - 라이신 HCl 5.5 g/l
- [0085] - $CaCl_2$ 0.15 g/l
- [0086] - 만니톨 40 g/l
- [0087] - 수크로즈 50 g/l
- [0088] - FVIII 100 IU/ml
- [0089] 생성물 A의 T_g 는 62℃였다.
- [0090] 생성물 B는 생성물 A와 동일한 조성이었으나, NaCl이 첨가되었다. 이는 T_g 를 약 40℃로 감소시켰다(RM은 동일하였다).
- [0091] C는 동결 건조된 vWF 농축물이었고, D는 동결 건조된 인간 피브리노겐이었다.
- [0092] 생성물 C의 제제화(pH 7.0±0.5)
- [0093] - 시트르산 삼나트륨 10 mM
- [0094] - $CaCl_2$ 1 mM
- [0095] - 글리신 5 g/l
- [0096] - 아르기닌 HCl 40 g/l
- [0097] - 알부민 10 g/l
- [0098] - vWF 100 IU/ml
- [0099] 생성물 D의 제제화 ($6.8 < pH < 7.2$)
- [0100] - 피브리노겐 11 내지 20 g/l
- [0101] - 아르기닌 히드로클로라이드 40 g/l
- [0102] - 이소류신 10 g/l
- [0103] - 글리신 2 g/l
- [0104] - 라이신 모노히드로클로라이드 2 g/l
- [0105] - 시트르산 삼나트륨·2H₂O 2.5 g/l
- [0106] 생성물 C와 D 각각의 T_g 는 80℃ 및 90℃였다.
- [0107] 박테리오파지 PR772에 대한 감소 인자는 62℃ 및 80℃에서 가열하는 동안 12 시간, 24 시간 및 72 시간에서 측정하였다.
- [0108] 건식 가열에 의한 바이러스 불활성화는 문헌[the Federal Gazette No. 84, May 4 1994, and in Schmidt, N.J.

& Emmons, R.W. (1989) in Diagnostic Procedures for Viral, Rickettsial and Chlamydial Infection, 6th Edition.]에 기재되어 있는 Spearman Kaerber 방정식을 이용하여 계산하였다.

- [0109] 감소 인자는 건식 가열 처리 이전에 ml 당 건식 가열에 의한 바이러스 불활성화와 건식 가열 처리 이후에 ml 당 건식 가열에 의한 바이러스 불활성화의 비율의 결과이다.
- [0110] 측정 결과는 도 2 및 도 3의 그래프에 나타났다.
- [0111] 하기 사항을 확인할 수 있다:
- [0112] - $T = 80^{\circ}\text{C}$ 에서 가열하는 동안
- [0113] 1. $T_g = 62^{\circ}\text{C}$ ($T - T_g \approx 20^{\circ}\text{C}$)의 생성물 A, 불활성화는 매우 신속했으며, 감소 인자는 24 시간 미만에서 4 log10에 이르렀다.
- [0114] 2. $T_g = T$ 의 생성물 C, 감소 인자는 72 시간 후에 4 log10에 이르렀다.
- [0115] 3. $T_g = 90^{\circ}\text{C}$ 의 생성물 D, 감소 인자는 72 시간 후에 4 log10에 이르렀다.
- [0116] - $T = 62^{\circ}\text{C}$ 에서 가열하는 동안
- [0117] 1. $T_g = T$ 의 생성물 A, 감소 인자는 72 시간 후에 4 log10에 이르렀다.
- [0118] 2. $T_g = 40^{\circ}\text{C}$ ($T - T_g \approx 20^{\circ}\text{C}$)의 생성물 B, 불활성화 역학은 매우 신속하였으며, 감소 인자는 24 시간 미만 내에 4 log10에 이르렀다.
- [0119] 실시예 2: 건식 가열에 의한, 동결건조물내 PPV의 불활성화
- [0120] PPV 감소 인자는 $T_g = 80^{\circ}\text{C}$ 또는 90°C 의 동결 건조물을 80°C 에서 가열하는 동안 12 시간, 24 시간 및 72 시간에서 측정하였다.
- [0121] 측정 결과는 도 4에서 그래프로 나타났다.
- [0122] 상기 결과로부터 확인할 수 있는 바와 같이, $T=80^{\circ}\text{C}$ 에서 가열하는 동안,
- [0123] - $T_g = T$ 인 경우, 감소 인자는 4 log10에 근접하였고,
- [0124] - $T < T_g$ 인 경우, 감소 인자는 2 log10으로 상대적으로 낮았다.
- [0125] 실시예 3: $T = T_g$ 에서 건식 가열에 의한, 동결건조물내 PPV, HAV, BVDV, PR772 및 Phi174의 불활성화
- [0126] PPV, HAV, BVDV, PR772 및 박테리오파지 Phi174에 대한 감소 인자는 $T = T_g = 80^{\circ}\text{C}$ ($T_g = 80^{\circ}\text{C}$ 인 동결건조물) 또는 $T = T_g = 62^{\circ}\text{C}$ ($T_g = 62^{\circ}\text{C}$ 인 동결건조물)에서 가열하는 동안 12 시간, 24 시간 및 72 시간에서 측정하였다.
- [0127] 측정 결과는 도 5 및 도 6에서 그래프로 나타났다.
- [0128] 상기 결과로부터 확인할 수 있는 바와 같이, 약 내성 바이러스, 즉 HAV, BVDV, Phi174의 경우, $T = T_g$ 로 가열하는 것은 24 시간이 경과하고 나서 바로 4 log10의 감소 인자에 이르기에 충분하였다.
- [0129] 대조적으로, 더 내성인 바이러스, 즉 PPV 및 PR772에서, 감소 인자가 4 log10으로 근접하기 위해서 가열 시간을 72 시간으로 연장하여야만 했다.
- [0130] 결과적으로, 이들 더 내성이 바이러스의 경우, 목적은 그들의 불활성화였기 때문에, 바이러스 감소 인자 및 바이러스 불활성화 속도는 가열 온도 T 를 증가시키거나, 또는 생성물의 T_g 를 감소시켜 T 와 T_g 사이의 차이를 증가시킴으로써 증강시킬 수 있었다.
- [0131] 또한, 범위 $T - T_g \geq 20^{\circ}\text{C}$ 는 바이러스 불활성화 속도를 증가시키는 데 바람직할 것이거나, 또는 범위 $T - T_g \leq 20^{\circ}\text{C}$ 는 생성물 안정성을 증강시키는 데 바람직할 것이다.
- [0132] 실시예 4: vWF 동결건조물의 유리 전이 온도의 함수로서 vWF 동결건조물의 물리화학적 특징에 대한 80°C 에서 72 시간 동안 가열의 효과
- [0133] 상이한 유리 전이 온도를 가진 3개의 vWF 동결건조물을 80°C 에서 72 시간 동안 가열하였다. 여러 가지 매개변수, 즉 동결건조물의 외관, 그의 용해 시간 및 생성된 용액의 외관을 관찰하였다.

[0134] 관찰 결과는 하기 표 2에 나타냈다.

[0135] [표 2]

% RM	0.9	1.7	3.1
Tg (°C)	74	66	42
vWF: Rco (IU/ml)	140	120	105
동결건조물의 외관	정상	약간 오그라들	매우 오그라들
용해 시간 (s)	15	35	75
용액의 외관	투명함	투명함	투명함

[0137] 상기 결과로부터 확인할 수 있는 바와 같이, 가열 온도 $T \geq T_g$ 및 $T - T_g \leq 20^\circ\text{C}$ 는, 선택된 온도가 유리질 상태에서 고무질 상태로의 상태 변화를 유도함에도 불구하고, 만족스러운 생성물 안정성을 보존하는 것이 가능하였다.

[0138] 또한, 가열 온도와 T_g 사이의 너무 중요한 차이, 본 실시예에서 38°C 는 생성물 안정성을 위해 바람직하지 않음을 확인할 수 있었다.

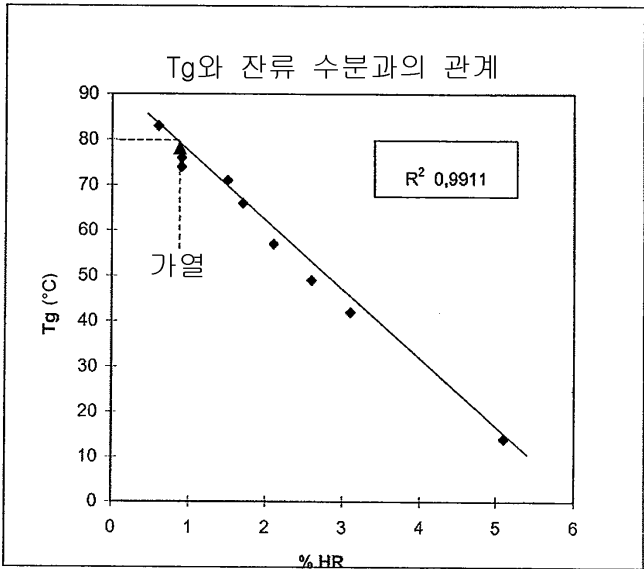
[0139] 결론적으로, T_g 에 더 가깝게 T 를 선택하는 경우, 더 큰 생성물 안정성을 기대할 수 있었다.

도면의 간단한 설명

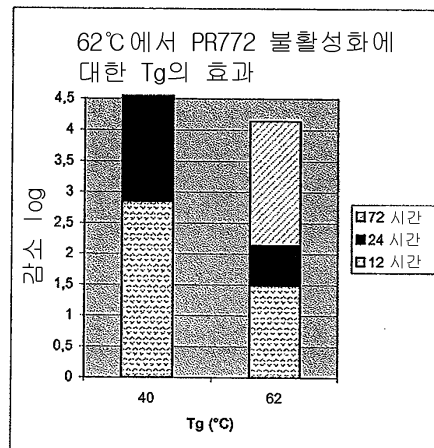
- [0070] 도 1은 T_g (유리 전이 온도)와 RM (잔류 수분)의 관계를 나타낸다.
- [0071] 도 2는 T_g 에 따른, 62°C 에서 건식 가열 후 PR772 잔류 인자를 나타낸다.
- [0072] 도 3은 T_g 에 따른, 80°C 에서 건식 가열 후 PR772 잔류 인자를 나타낸다.
- [0073] 도 4는 T_g 에 따른, 80°C 에서 건식 가열 후 PPV 잔류 인자를 나타낸다.
- [0074] 도 5는 $T = T_g = 80^\circ\text{C}$ 에서 PPV, HAV, BVDV, PR772, Phi174 감소 인자를 나타낸다.
- [0075] 도 6은 $T = T_g = 62^\circ\text{C}$ 에서 PPV, HAV, BVDV, PR772, Phi174 감소 인자를 나타낸다.

도면

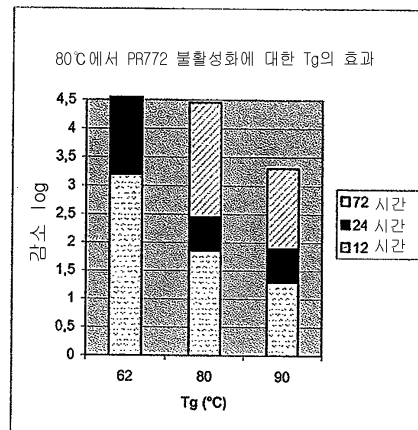
도면1



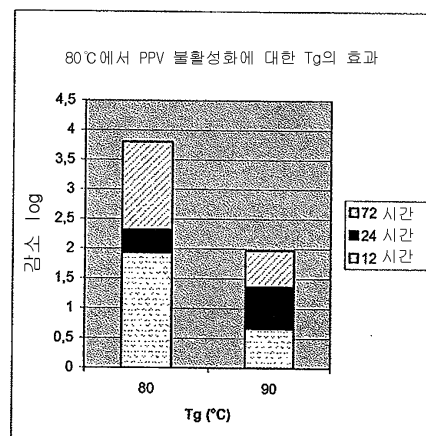
도면2



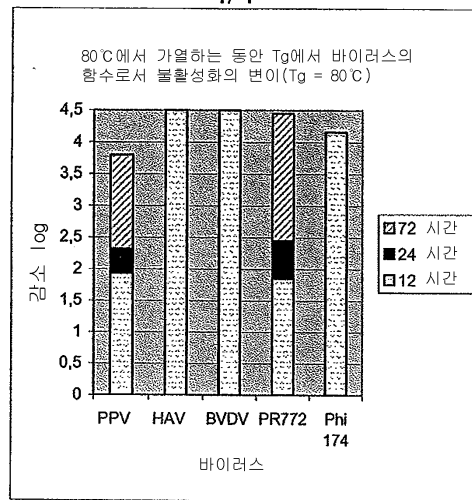
도면3



도면4



도면5



도면6

