

# (19)대한민국특허청(KR) (12) 공개특허공보(A)

(51) 。 Int. Cl. <sup>7</sup> A61K 35/16	(11) 공개번호 (43) 공개일자	10-2005-0071582 2005년07월07일
--	------------------------	--------------------------------

(21) 출원번호	10-2005-7006501		
(22) 출원일자	2005년04월15일		
번역문 제출일자	2005년04월15일		
(86) 국제출원번호	PCT/JP2003/013238	(87) 국제공개번호	WO 2004/035066
국제출원일자	2003년10월16일	국제공개일자	2004년04월29일

(30) 우선권주장      JP-P-2002-00301433      2002년10월16일      일본(JP)

(71) 출원인      아사히 가세이 파마 가부시키가이샤  
일본 도쿄도 지요다구 간다 미토시로쵸 9반쵸 1

(72) 발명자      사토, 사카에  
일본 419-0112 시즈오카현 타가타군 칸나미쵸 카시아 1012-17  
사토, 테즈오  
일본 182-0006 도쿄도 쇼푸시 니시쓰쓰지가오카 1쵸메 4-8 주노우쓰  
쓰지가오카 401  
버나우, 티에리  
프랑스 에프-59249 오버르 뒤 드르발 86  
라도세비치, 미리아나  
프랑스 에프-59249 오버르 뒤 드르발 86  
구브란, 하디 알폰스  
이집트 11111 카이로 마리에트 스트리트 아파트 9 카스르 이엘닐 13

(74) 대리인      주성민  
                  위혜숙

심사청구 : 없음

## (54) 혈장 제제 또는 혈청 제제, 및 그의 제조 방법

### 명세서

#### 기술분야

본 발명은 안전성이 높은 인간 및 동물의 혈장 또는 혈청 및 그의 제조 방법에 관한 것이다.

#### 배경기술

인간의 혈장 또는 혈청 및 동물의 혈장 또는 혈청은 잠재적으로 바이러스 혼재의 가능성이 있다. 따라서, 혈장, 혈청 및 그것을 원료로서 제조되는 혈액 제제의 사용에 의해, 인간의 경우 에이즈 바이러스 및 각종 간염 바이러스 등의 위험성이 높은 바이러스에 감염되는 가능성은 부정할 수 없다.

종래, 이들 혈액 제제 사용에 관한 바이러스 감염을 방지하는 방법이 제안되어 왔다. 예를 들면 혈액 제제 중에 존재하는 바이러스를 불활화하는 방법으로서, 계면활성제나 메틸렌 블루를 사용하는 화학적인 불활화 방법 등이 알려져 있다. 그러나 어느 쪽의 방법도 단백질 활성의 저하, 사용한 화학 물질의 제거 등을 위한 번잡한 조작이 필요하고, 또한 화학 물질의 잔존이라는 결점을 갖고 있다.

한편, 막을 이용하여 바이러스를 제거하는 방법은, 단백질을 변성시키지 않고, 활성의 저하도 실질적으로 없으며 바이러스에 대한 안전성을 높이는 방법으로서 다른 방법에 비하여 우수하다. 예를 들면, 일본 특허 공개 소 61-16837호 공보 및 일본 특허 공개 소 63-68176호 공보에는, 혈장을 특별한 성능을 갖는 다공질 중공사로 처리함으로써 C형 간염 바이러스 또는 에이즈 바이러스에 대하여 높은 안전성을 확보하는 방법이 기재되어 있다.

마찬가지로, 일본 특허 공개 평 1-192368호 공보 및 일본 특허 공개 평 1-254205호 공보에는 재생 셀룰로오스의 여과막을 사용하는 여과 방법 및 그 시스템이 개시되어 있다. 이들은 모두 바이러스를 그 크기에 의해 분리하는 방법을 제안하고 있다. 한편, 일본 특허 공개 평 10-28581호 공보에는 용액의 특수한 조건하에서, 바이러스의 입경보다 큰 구멍을 갖는 막에 의해 바이러스를 제거하는 방법이 개시되어 있다.

또한, 일본 특허 공개 2000-334037호 공보에는 외피 바이러스가 LDL (Low density lipoprotein: 저비중 리포 단백질)와 결합하는 것에 착안하여, LDL 제거용의 막을 이용하여 바이러스를 제거하는 방법이 제안되어 있다.

그러나, 이러한 어떠한 방법도 결점을 갖고 있다. 상기 특허 문헌 5 및 6은 바이러스를 특수한 조건하에서 응집시키고, 또는 다른 혼합물과 결합시킴으로써 배제 또는 흡착에 의해 제거하는 방법이다. 해당 방법은, 제거되는 바이러스의 종류가 한정되는 것 및 조건의 변동에 의해 제거의 효과가 일정하지 않다는 등의 결점을 갖는다.

한편, 일본 특허 공개 소 61-16837호 공보 및 일본 특허 공개 소 63-68176호 공보는, 바이러스의 입경과 그보다 작은 입경의 단백질을 크기에 따라 분리하는 방법이지만, 해당 막으로서는 바이러스의 제거율, 단백질의 투과 성능 모두 만족할 수 있는 것이 아니다. 한편, 일본 특허 공개 평 1-192368호 공보 및 일본 특허 공개 평 1-254205호 공보는 바이러스 제거율에 관해서는 우수한 방법이지만 단백질 처리량에 문제가 있어, 실용에 제공할 수 없다.

### 발명의 상세한 설명

본 발명의 과제는, 바이러스 오염의 가능성이 있는 혈장, 혈청으로부터 효과적으로 바이러스를 제거하고, 또한 공업적으로 유효한 안전한 혈장 제제, 혈청 제제를 제조하는 방법, 및 상기 방법에 의해 제조된 혈장 제제, 혈청 제제를 제공하는 것이다.

이상에서 진술한 바와 같이, 막을 사용하여 단백질에 변성을 제공하지 않고 바이러스에 대한 안전성을 높이는 방법은, 종래부터 검토되어 왔지만 혈장, 혈청은, 혼재하는 단백질도 많고, 또한 분자량이 높은 유용 단백질이 많이 포함되어 있기 때문에, 유용 단백질의 투과성을 확보하고, 또한 위험한 바이러스를 확실하게 제거하는 방법의 제공은 곤란하였다.

본 발명자들은, 상기한 과제를 해결하기 위하여 여러가지 연구를 중복한 결과, 원료가 되는 인간 또는 동물의 혈장을, 바이러스 제거막으로 여과하기 전에, 백혈구를 제거하는 공정을 도입함으로써 효율적인 바이러스 제거가 가능하다는 것을 발견하고, 또한 검토를 중복하여 본 발명을 완성하였다.

즉, 본 발명은,

(1) 인간 또는 동물의 혈장 제제 또는 혈청 제제의 제조 방법으로서,

(a) 인간 또는 동물 유래의 전혈로부터 혈장을 분리하고, 혈장으로부터 백혈구를 감소시키는 공정, 및

(b) (a) 공정보다 후에 행하는 바이러스 제거막을 이용한 여과 공정

을 포함하는 제조 방법.

(2) 인간 또는 동물의 혈장 제제 또는 혈청 제제의 제조 방법으로서,

(a) 인간 또는 동물 유래의 전혈로부터 혈장을 즉시 분리하고, 분리 직후 혈장으로부터 백혈구를 감소시키는 공정, 및

(b) (a) 공정보다 후에 행하는 바이러스 제거막을 이용한 여과 공정

을 포함하는 제조 방법.

(3) (b) 공정의 바이러스 제거막의 평균 공경이 100 nm 이하인 것을 특징으로 하는 상기 (1) 또는 (2)에 기재된 제조 방법.

(4) (a) 공정이 백혈구 제거막에 의한 백혈구 감소 공정인 상기 (1) 내지 (3) 중 어느 한 항에 기재된 제조 방법.

(5) (a) 및 (b) 공정이 25 내지 40 °C의 온도 환경 하에서 행하여지는 것을 특징으로 하는 상기 (1) 내지 (4) 중 어느 한 항에 기재된 제조 방법.

(6) (a) 및 (b) 공정이 98 kPa 이하의 압력 환경하에서 행하여지는 것을 특징으로 하는 상기 (1) 내지 (5) 중 어느 한 항에 기재된 제조 방법.

(7) (a) 및 (b) 공정에서 통과시키는 혈액의 양이 100 ml 내지 500 ml인 것을 특징으로 하는 상기 (1) 내지 (6) 중 어느 한 항에 기재된 제조 방법.

(8) (b) 공정의 처리 시간이 10 내지 40 분인 것을 특징으로 하는 상기 (1) 내지 (7) 중 어느 한 항에 기재된 제조 방법.

(9) (b) 공정에 이용하는 바이러스 제거막의 평균 공경이 75 nm 이하인 것을 특징으로 하는 상기 (1) 내지 (8) 중 어느 한 항에 기재된 제조 방법.

(10) (b) 공정에 이용하는 바이러스 제거막이 평균 공경 75 nm와 그에 계속되는 평균 공경 35 nm의 바이러스 제거막의 조합인 것을 특징으로 하는 상기 (1) 내지 (9) 중 어느 하나에 기재된 제조 방법.

(11) (a) 인간 또는 동물 유래의 전혈로부터 혈장을 분리하고, 혈장으로부터 백혈구를 감소시키는 공정, 및

(b) (a) 공정보다 후에 행하는 바이러스 제거막을 이용한 여과 공정

을 포함하는 공정에 의해 제조되는 인간 또는 동물의 혈장 제제 또는 혈청 제제.

<발명을 실시하기 위한 최선의 형태>

본 발명은 신선 동결 혈장의 동결 전의 혈장을, 바이러스 제거막으로 여과할 때, 미리 백혈구를 감소시킴으로써 유용 물질의 투과성을 확보하면서 바이러스를 효율적으로 확실하게 제거할 수가 있다는 것을 발견한 것에 기초하는 것이다.

또한, 본 발명은 전혈로부터 백혈구 제거를 행하는 것이 아니고, 전혈로부터 우선 혈장을 분리한 후에 백혈구를 감소시킴으로써 바이러스를 효율적으로 확실하게 제거할 수가 있다는 것을 발견한 것이다.

본 발명의 인간 또는 동물의 혈장 제제 또는 혈청 제제의 제조의 원료가 되는 혈장 또는 혈청은, 신선 동결 혈장의 동결 전의 원료 혈장인 것이 바람직하다. 또한, 동결 전의 보존 기간이 긴 혈장은 포함되는 단백질, 지질 등이 결합하고, 여과 조작 시에, 투과율의 저하 및 투과량의 저하를 야기하기 때문에 동결 전의 보존 기간이 짧은 혈장이 바람직하다.

본 발명에 있어서, 백혈구를 감소하는 공정은 백혈구를 감소시킬 수 있는 것이면 어떠한 방법일 수도 있다. 예를 들면, 초원심 분리에 의한 방법 등이 있지만 백혈구 제거막을 이용하는 방법이 간단하고 바람직하다. 백혈구 제거막은 백혈구를 감소시키는 막이면 재질 등을 불문하지만 예를 들면 폴리에스테르 부직포를 사용하는 것이 바람직하다.

본 발명에 있어서의 바이러스 제거막이란 적어도 바이러스와 단백질을 그 크기의 차이에 의해 분리하는 기능을 갖는 막을 의미하고, 재생 셀룰로오스, 폴리에틸렌, 폴리불화비닐리덴 등 재질은 불문하지만 재생 셀룰로오스는 단백질의 흡착이 적고 바람직하다.

또한, 종래 사용되고 있는 각종 바이러스 제거막으로서, 그 평균 공경을 나타내는 방법·척도가 통일되어 있지 않지만, 본 발명에 있어서 바이러스 제거막의 평균 공경이란 바이러스 제거막에 있어서의 평균 공경을 바이러스 제거 성능에 의해 이하와 같이 정의한다.

즉, 평균 공경 A nm의 바이러스 제거막이란, 입경 A nm 이상의 입경을 갖는 바이러스를 효과적으로 제거할 수 있다는 것을 의미한다. 효과적으로 제거한다는 것은 대수 제거율 ( $LRV = -\log_{10}(\text{여과 후 바이러스 농도} / \text{여과 전 바이러스 농도})$ )가 3 이상, 바람직하게는 4 이상, 보다 바람직하게는 6 이상을 의미한다. 예를 들면, 평균 공경 100 nm의 바이러스 제거막이란 입경 100 nm 이상의 바이러스를 효과적으로 제거할 수 있는 것을 의미한다.

따라서, 제거하고 싶은 바이러스의 평균 입경에 따라서 사용하는 바이러스 제거막을 선택한다. 예를 들면 100 nm의 평균 공경을 갖는 바이러스 제거막이 제거 대상으로 하는 바이러스는, 구체적으로는 에이즈 바이러스 (HIV, 평균 입경 100-120 nm), 가성 광견병 바이러스 (PSR, 평균 입경 120-200 nm), 마우스 백혈병 바이러스 (MuLV, 평균 입경 120-150 nm) 등이다.

혈장 또는 혈청으로부터 에이즈 바이러스 (HIV)를 제거하기 위해서는, 바이러스 제거막의 평균 공경은 100 nm 이하인 것이 유용하다. 또한, 평균 공경이 75 nm 이하이면 에이즈 바이러스의 혼입의 가능성은 더욱 저하되어 바람직하고, 또한 100 nm 이하 75 nm 이상의 입자계를 갖는 바이러스도 제거되어 얻어지는 제제의 안전성이 증가한다.

단백질의 투과성은 높을수록 바람직하다. 총 단백질의 투과율은 70 % 이상이 바람직하고, 보다 바람직하게는 80 % 이상이다.

또한, 바이러스 제거막은 적당한 공경을 선택함으로써 병원성 인자나 불필요한 혈장 혼입물도 제거가 가능하다.

본 발명은 신선 혈장으로부터 (a) 백혈구 제거막 등을 사용하여 백혈구를 감소시키는 공정과, (b) (a) 공정을 행한 후 바이러스 제거막을 사용하여 바이러스를 여과 제거하는 공정을 포함하는 안전성이 높은 혈장을 제조하는 방법이고, 이러한 공정은, 어떠한 장치·조작을 행할 수도 있지만, (i) 온도 제어 수단 및 (ii) 가압 수단을 갖는 제조 분위기의 제어 가능한 조건하에서 행하면 조작 결과의 재현성이 기대되고, 여과 후의 혈장의 품질이 안정하기 때문에 바람직하다.

온도 제어 수단 (ii)에 의해 제어된 온도는, 단백질이 변성하지 않는 온도이면 어떠한 온도일 수도 있지만 25 내지 45 °C가 바람직하다. 여과하는 온도가 25 °C 미만이면, 혈장의 점도가 높아지기 때문에 여과에 긴 처리 시간을 요하고, 실용적인 시간 범위 내에 처리하는 것이 곤란해진다. 이러한 것으로부터, 온도는 25 °C 이상이 바람직하다. 한편, 처리 온도가 45 °C 보다 높으면 단백질의 품질이 열에 의해 저하되는 가능성이 있어 바람직하지 않다. 보다 바람직하게는 30 내지 37 °C이다.

처리 시의 압력은, 막의 내압 이하이면 어떠한 값일 수도 있지만, 98 KPa 이하의 압력이면 단백질의 변성이 적기 때문에 바람직하고, 보다 바람직하게는 80 KPa 이하이다.

또한, 본 발명은 인간 또는 동물 유래의 전혈로부터 혈장을 분리할 때는, 즉 시 혈장을 분리하는 것이 바람직하다. 「즉시」란, 혈장 중의 단백질이 응집 등에 의해 막의 투과성이 저하되지 않는 시간을 말하고, 통상 4 시간 이내, 바람직하게는 2 시간 이내, 더욱 바람직하게는 1 시간 이내, 가장 바람직하게는 10 분 이내를 말한다.

1 회에 처리하는 혈장의 용량은 특별히 제한은 없지만 1 개체로부터 채취할 수 있는 혈장은 통상 100 내지 500 ml이기 때문에, 100 ml 내지 500 ml가 통상 1 회에 처리하는 용량이다. 100 ml 이하이면 1 회 처리량으로서는 경제상 바람직하지 않고, 500 ml 이상이면 1 개체로부터 채취하기에는 개체에의 부담이 크다. 보다 바람직하게는 200 내지 400 ml이다.

또한, 처리 시간은 처리하는 혈장량과 막의 면적 등에 따라 결정되지만 40 분 이하로 하도록 설정하는 것이 바람직하다. 개체로부터의 채혈과 동시에 여과하는 경우, 40 분 이하이면 개체에의 부담이 적기 때문이고, 여과 시간이 지나치게 길면 제제의 변성의 가능성도 경우에 따라서는 생각할 수 있기 때문이다.

또한, 상기한 바와 같은 조작에 있어서, 백혈구를 감소시킨 후의 혈장을 공경이 75 nm인 바이러스 제거막으로 여과하고, 그에 계속해서 공경이 35 nm인 바이러스 제거막으로 여과한 경우는, C형 간염 바이러스(HCV, 평균 입경 30-60 nm)등의 위험한 바이러스가 제거되고, 또한 안전성이 높은 혈장 제제가 제공된다.

또한, 미리 혈장으로부터 피브리노겐을 제거한 혈청을 원료로서 사용할 수도 있다. 또는 혈장 제제 제조 공정 중 어느 하나에 있어서 피브리노겐을 제거하는 등에 의해 마찬가지로 안전성이 높은 혈청 제제를 제조할 수가 있다.

## 실시예

이하, 실시예를 들어 본 발명을 설명한다.

### <실시예 1>

프레세니우스(Fresenius)사 제조의 혈장 분리 채취 장치 AF 104를 이용하여 헌혈자의 혈액으로부터 혈장을 분리한 직후, 아사히 카세이사 제조 백혈구 제거막 「세파셀」로 여과하고, 또한 아사히 카세이사 제조 바이러스 제거막 「플라노바」로 여과하였다. 사용한 「플라노바」는 막 면적 0.06 m<sup>2</sup>이고, 먼저 평균 공경 75 nm의 바이러스 제거막으로 여과하고, 계속해서 평균 공경 35 nm의 바이러스 제거막으로 여과하였다. 여과를 JMS사 제조 펌프 OT-601을 사용하여 일정한 유속으로 행하였다. 여과 온도를 35 °C±2 °C로 제어하였다.

혈장량 250 ml를 30 분 처리하고, 압력은 0.3 내지 0.6 kg/cm<sup>2</sup>였다. 단백질의 투과량을 표 1에 기재한다. 평균 공경 75 nm의 바이러스 제거막으로 여과한 경우의 단백질의 투과량은 75 % 이상이고, 평균 공경 35 nm의 바이러스 제거막으로 여과한 경우도, 글로불린 및 알부민의 투과량은 90 % 이상이고, F-VIII도 50 % 이상이며, 실용상 문제가 없다는 것을 표 1로부터 알 수 있었다.

### <비교예 1>

실시예 1에서의 백혈구 제거막에 의한 「세파셀」 여과 및 평균 공경 75 nm의 바이러스 제거막에 의한 「플라노바」 여과를 행하지 않는 것 이외에는 실시예 1과 동일하게 행하였다. 평균 공경 35 nm, 막 면적 0.06 m<sup>2</sup>의 플라노바로 여과 개시 후, 50 ml 여과한 시점에서 압력이 1.0 kg/cm<sup>2</sup>를 초과하였기 때문에 여과를 중지하였다.

표 1.

단백질	백혈구 제거막	바이러스 제거막	
		75nm	35nm
F-VIII	88%	75%	55%
글로불린	93%	90%	82%
알부민	100%	100%	100%

### <비교예 2>

전 혈액을 채혈한 후, 항응고액을 가하고, 즉시 4 °C에서 2 시간 보존하였다. 그 후 아사히 카세이사 제조 백혈구 제거막 「세파셀」로 백혈구를 제거한 후, 원심 분리에 의해 혈장을 분리하였다.

분리한 혈장은 실시예 1과 동일한 조건으로, 막 면적 0.06 m<sup>2</sup>, 평균 공경 75 nm의 바이러스 제거막 「플라노바」를 통해 초기 압력 0.3 kg/cm<sup>2</sup>으로 여과를 개시하였지만 70 ml 여과한 시점에서 압력이 1.0 kg/cm<sup>2</sup>를 초과하여 여과를 중지하였다.

## 산업상 이용 가능성

본 발명에 의해서 얻어진 혈장 제제 또는 혈청 제제는, 여과하는 바이러스 제거막의 평균 공경에 따라서 바이러스의 안전성이 높아지기 때문에, 그 사용 목적에 따라서, 그대로 수혈용으로 사용되거나 또는 동결 신선 혈장으로서는 보관되고, 또한 수혈, 또는 분획 제제의 원료 혈장으로서는 사용할 수가 있다.

#### (57) 청구의 범위

##### 청구항 1.

- (a) 인간 또는 동물 유래의 전혈로부터 혈장을 분리하고, 혈장으로부터 백혈구를 감소시키는 공정, 및
  - (b) (a) 공정보다 후에 행하는 바이러스 제거막을 이용한 여과 공정
- 을 포함하는 인간 또는 동물의 혈장 제제 또는 혈청 제제의 제조 방법.

##### 청구항 2.

- (a) 인간 또는 동물 유래의 전혈로부터 혈장을 즉시 분리하고, 분리 직후 혈장으로부터 백혈구를 감소시키는 공정, 및
  - (b) (a) 공정보다 후에 행하는 바이러스 제거막을 이용한 여과 공정
- 을 포함하는 인간 또는 동물의 혈장 제제 또는 혈청 제제의 제조 방법.

##### 청구항 3.

제1항 또는 제2항에 있어서, (b) 공정의 바이러스 제거막의 평균 공경이 100 nm 이하인 것을 특징으로 하는 제조 방법.

##### 청구항 4.

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, (a) 공정이 백혈구 제거막에 의한 백혈구 감소 공정인 제조 방법.

##### 청구항 5.

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, (a) 공정 및 (b) 공정이 25 내지 40 °C의 온도 환경하에서 행하여지는 것을 특징으로 하는 제조 방법.

##### 청구항 6.

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, (a) 공정 및 (b) 공정이 98 kPa 이하의 압력 환경하에서 행하여지는 것을 특징으로 하는 제조 방법.

##### 청구항 7.

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서, (a) 공정 및 (b) 공정에서 통과시키는 혈액의 양이 100 ml 내지 500 ml인 것을 특징으로 하는 제조 방법.

##### 청구항 8.

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서, (b) 공정의 처리 시간이 40 분 이하인 것을 특징으로 하는 제조 방법.

##### 청구항 9.

제1항 내지 제8항 중 어느 한 항에 있어서, (b) 공정에 사용하는 바이러스 제거막의 평균 공경이 75 nm 이하인 것을 특징으로 하는 제조 방법.

## 청구항 10.

제1항 내지 제9항 중 어느 한 항에 있어서, (b) 공정에 이용하는 바이러스 제거막이 평균 공경 75 nm과 그에 계속되는 평균 공경 35 nm의 바이러스 제거막의 조합인 것을 특징으로 하는 제조 방법.

## 청구항 11.

(a) 인간 또는 동물 유래의 전혈로부터 혈장을 분리하고, 혈장으로부터 백혈구를 감소시키는 공정, 및

(b) (a) 공정보다 후에 행하는 바이러스 제거막을 이용한 여과 공정

을 포함하는 공정에 의해 제조되는 인간 또는 동물의 혈장 제제 또는 혈청 제제.

## 요약

본 발명은, 바이러스 혼입의 가능성의 매우 낮은, 혈장 제제, 혈청 제제 및 그의 제조법에 관한 것이다. 혈장 제제, 혈청 제제의 원료의 혈장 또는 혈청을 바이러스 제거막에 적용하기 전에, 혈액 중의 협잡물인 백혈구를 제거하여 덩으로써 응집을 방지하고 효율적으로 바이러스 혼입의 가능성이 매우 낮은 혈장 제제, 혈청 제제를 제조한다. 응집이 발생하기 어렵기 때문에 여과가 진행됨에 따라 고압력을 가할 필요도 없이 효율적인 여과가 가능하다.

## 색인어

바이러스 혼입, 혈장 제제, 혈청 제제, 백혈구