



등록특허 10-2037555



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2019년10월28일  
(11) 등록번호 10-2037555  
(24) 등록일자 2019년10월22일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
*A61K 38/48* (2006.01) *A61K 38/00* (2006.01)  
*A61K 9/70* (2006.01) *A61L 15/44* (2006.01)
- (21) 출원번호 10-2014-7031717
- (22) 출원일자(국제) 2013년05월13일  
심사청구일자 2018년03월29일
- (85) 번역문제출일자 2014년11월12일
- (65) 공개번호 10-2015-0023253
- (43) 공개일자 2015년03월05일
- (86) 국제출원번호 PCT/JP2013/063868
- (87) 국제공개번호 WO 2013/172468  
국제공개일자 2013년11월21일
- (30) 우선권주장  
JP-P-2012-110390 2012년05월14일 일본(JP)  
(뒷면에 계속)
- (56) 선행기술조사문현  
JP06508777 A\*  
WO2010079047 A2\*  
WO2011146359 A1\*

\*는 심사관에 의하여 인용된 문현

- (73) 특허권자  
데이진 가부시키가이샤  
일본 오사카후 오사카시 기타쿠 나카노시마 3쵸메 2방 4고  
데이진 화-마 가부시키가이샤  
일본국 도쿄도 치요다쿠 가스미가세키 3쵸메 2-1  
케이엠 바이올로직스 가부시키가이샤  
일본 구마모토Ken 구마모토시 기타쿠 오쿠보 1쵸메 6방 1고
- (72) 발명자  
가게야마 유카코  
일본 도쿄도 히노시 아사히가오카 4쵸메 3방 2고  
데이진 화-마 가부시키가이샤 도쿄큐센타 나이  
후지나가 겐타로  
일본 도쿄도 히노시 아사히가오카 4쵸메 3방 2고  
데이진 화-마 가부시키가이샤 도쿄큐센타 나이  
(뒷면에 계속)
- (74) 대리인  
특허법인코리아나

전체 청구항 수 : 총 9 항

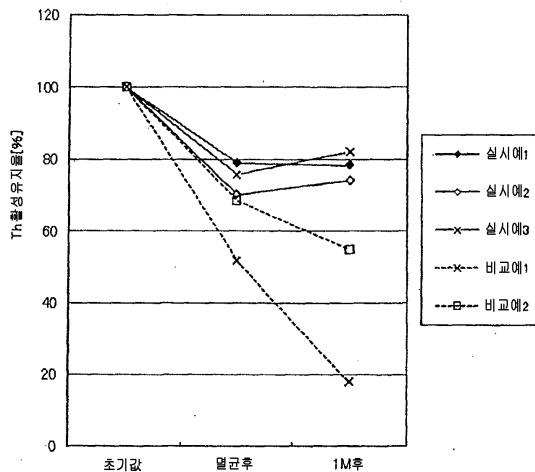
심사관 : 이예리

## (54) 발명의 명칭 멸균 조성물

## (57) 요약

단백질 및 그 단백질을 함유하는 지방족 폴리에스테르를 함유하는, 방사선 멸균된 멸균 조성물. 이 멸균 조성물에서는, 단백질의 구조나 기능(활성)이 유지된다.

대 표 도 - 도1



(72) 발명자

**야마구치 아유코**

일본 도쿄도 히노시 아사히가오카 4쵸메 3방 2고  
데이진 화-마 가부시키가이샤 도쿄큐센타 나이

**혼다 스스무**

일본 도쿄도 히노시 아사히가오카 4쵸메 3방 2고  
데이진 가부시키가이샤 도쿄큐센타 나이

**사타케 마코토**

일본 도쿄도 히노시 아사히가오카 4쵸메 3방 2고  
데이진 가부시키가이샤 도쿄큐센타 나이

**가네코 히로아키**

일본 도쿄도 히노시 아사히가오카 4쵸메 3방 2고  
데이진 가부시키가이샤 도쿄큐센타 나이

**이시와리 아유미**

일본 도쿄도 히노시 아사히가오카 4쵸메 3방 2고  
데이진 가부시키가이샤 도쿄큐센타 나이

---

(30) 우선권주장

JP-P-2012-110765 2012년05월14일 일본(JP)

JP-P-2013-040593 2013년03월01일 일본(JP)

## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

단백질의 적어도 일부분이 지방족 폴리에스테르 내부에 들어가 있는 상태로, 단백질 및 지방족 폴리에스테르를 함유하는 방사선 멸균된 멸균 조성물 (단, 140  $\mu\text{m}$  의 체를 통과하는 미립자의 형태에 있는 것은 제외한다).

#### 청구항 2

제 1 항에 있어서,

단백질이 그대로 또는 약학적으로 허용할 수 있는 첨가물과의 혼합물로서 지방족 폴리에스테르 중에 입자로서 분산되어 있는 멸균 조성물.

#### 청구항 3

제 1 항에 있어서,

단백질이 지혈성 단백질, 효소, 수송 단백질, 근육 단백질, 방어 단백질, 독소 단백질, 단백질 호르몬, 저장 단백질, 구조 단백질, 성장 인자 및 그들의 혼합물로 이루어지는 군에서 선택되는 멸균 조성물.

#### 청구항 4

제 1 항에 있어서,

단백질이 지혈성 단백질인 멸균 조성물.

#### 청구항 5

제 1 항 내지 제 4 항 중 어느 한 항에 있어서,

지방족 폴리에스테르가 폴리글리콜산, 폴리락트산, 폴리카프로락톤, 그들의 공중합체, 그리고 그들의 혼합물로 이루어지는 군에서 선택되는 멸균 조성물.

#### 청구항 6

제 1 항 내지 제 4 항 중 어느 한 항에 있어서,

섬유 형상으로 있는 멸균 조성물.

#### 청구항 7

제 6 항에 있어서,

일렉트로스파닝법으로 제조된 멸균 조성물.

#### 청구항 8

제 1 항 내지 제 4 항 중 어느 한 항에 있어서,

필름 형상으로 있는 멸균 조성물.

#### 청구항 9

제 8 항에 있어서,

유연법에 의해 제조된 멸균 조성물.

## 발명의 설명

## 기술 분야

[0001] 본 발명은 지방족 폴리에스테르에 포함됨으로써 기능이 유지된 단백질의 멸균 조성물에 관한 것이다.

## 배경 기술

[0002] 최근, 천연 및 합성 단백질은 약제로서 그 중요성이 증대되고 있다. 또, 의료 용도로 사용하는 경우, 제품이 멸균되어 있는 것이 필수이다. 멸균 방법으로서, 오토클레이브에서의 가열 멸균, γ 선이나 전자선에 의한 전리 방사선 멸균, 에틸렌옥사이드 가스에서의 가스 멸균, 과산화수소에 의한 플라즈마 멸균, 글루타르알데히드 제제를 사용한 화학 멸균제 및 필터를 사용한 분리 멸균 등이 알려져 있다. 그러나, 생리 활성 단백질 등의 단백질은, 열이나 방사선에 의한 멸균에 의해 활성이 저하된다. 에틸렌옥사이드에 의한 멸균은, 화학 반응에 의해 부생성물이 생성될 가능성이 있을 뿐만 아니라, 독성이 강하고, 잔류 가스가 인체 등에 악영향을 미칠 가능성이 있다. 화학 멸균제에 의한 멸균은, 단백질의 멸균제에 대한 내성, pH의 변화, 이온 강도의 변화 또는 온도의 변화를 고려할 필요가 있다는 등의 문제가 있었다. 그래서, 단백질을 함유·고정시킨 의약품·의료품을 제조하는 경우에는, 제조 프로세스를 모두 무균 상태로 하여 제조하지 않으면 안 되어, 막대한 제조 비용이 필요해지고 있는 것이 현상황이다.

[0003] 또, 단백질을 포함하는 용액은 필터에 의해 분리 멸균되어 있는데, 큰 입자를 포함하는 조성물, 또는 고체 혹은 반고체 조성물에는 적용이 곤란하였다.

[0004] EP0437095호에는 헤파린 또는 헤파린 프래그먼트와 복합하는 중화 산화 셀룰로오스 생성물 (nORC) 을 감마선 조사에 의해 멸균할 수 있는 것이 나타나 있다. 그러나, 이 문헌에는 단백질이 결합되어 있는 ORC 또는 n-ORC 를 멸균하는 것은 나타나 있지 않다.

[0005] EP0562864호에는 콜라겐 스펀지 매트릭스, 제 2 생체 흡수성 폴리머, 예를 들어, 산화 재생 셀룰로오스 (ORC) 의 분산 섬유 및 활성제, 예를 들어 웨პ티드를 함유하는 복합 상처 치료 물질이 나타나 있다. 활성제는 매트릭스, 생체 흡수성 폴리머, 또는 그들의 양방에 포함할 수 있고, 그 복합 스펀지 물질을 패키지하여 멸균할 수 있는 것이 기재되어 있다.

[0006] US5730933호에는 생물학적으로 활성인 웨პ티드를 그 생물학적 활성을 소실시키지 않고 감마선 또는 전자빔 조사에 의해 멸균하는 방법이 나타나 있다. 이 방법은, 생물학적으로 활성 웨პ티드와 젤라틴 등의 외래 단백질을 포함하는 혼합물을 형성하고, 이 혼합물을 동결 또는 동결 건조시키고, 다음으로 이 혼합물을 조사하는 공정을 포함하는 기술로, 외래 단백질의 존재가 웨პ티드를 안정화하여 웨პ티드의 활성 저하를 방지한다고 기재되어 있다.

[0007] 국제 공개 WO2000/033893호에는 치료 웨პ티드와 산화 재생 셀룰로오스, 중화 산화 재생 셀룰로오스 및 이들의 혼합물로 이루어지는 군에서 선택되는 폴리사카라이드와의 복합체가 기재되어 있다. 그리고 전리 방사선에 의해 멸균하기 전에 웨პ티드를 유효량의 폴리사카라이드와 함께 제제함으로써, 전리 방사선에 의해 멸균하더라도 웨პ티드 치료제의 생물학적 활성은 소실되지 않고 안정화된다고 기재되어 있다.

[0008] 그러나, 이를 문헌은, 전리 방사선에 의해 멸균할 때에 발생하는, 단백질의 응집 등의 구조 변화나 실활을 지방족 폴리에스테르를 억제할 수 있는 것은 시사하고 있지 않다.

[0009] 한편, 일본 공개특허공보 2011-47089호에는 효소 활성이 우수한 효소 함유 나노 파이버의 제조 방법이 기재되어 있다. 이 방법은, 효소와 비수 용매에 용해한 폴리머를 함유하는 방사액을, 정전 방사법에 의해 방사하여 효소 전구 나노 파이버를 형성한 후, 물을 부여하여 건조시키는 것이다. 그러나, 이 문헌에는 효소 함유 나노 파이버를 멸균하는 것에 관한 기술은 없다.

## 발명의 내용

### 해결하려는 과제

[0010] 본 발명의 목적은 단백질의 구조나 기능이 유지된 멸균 조성물을 제공하는 것이다.

[0011] 본 발명의 발명자들은 상기 과제를 해결하기 위해서 예의 연구한 결과, 놀랍게도 단백질을 지방족 폴리에스테르에 함유시킴으로써, 방사선 멸균에 의한 단백질의 구조 변화나 기능 저하 및 방사선 멸균 후의 보존에 수반하는 이들 변화나 저하 중, 어느 것 또는 양방을 억제할 수 있는 것을 알아내어 본 발명에 도달하였다.

[0012] 즉, 본 발명은 단백질 및 그 단백질을 함유하는 지방족 폴리에스테르를 함유하는, 방사선 멸균된 멸균 조성물이

다.

## 과제의 해결 수단

### 발명의 효과

#### 도면의 간단한 설명

[0013] 도 1 은 실시예 1 및 2에서 얻어진 본 발명의 트롬빈 함유 시트상 섬유 성형체, 실시예 3에서 얻어진 본 발명의 트롬빈 함유 필름, 비교예 1의 트롬빈 함유 입자 그리고 비교예 2에서 얻어진 비교 트롬빈 함유 시트상 섬유 성형체의 각각에 대해 측정한 트롬빈 활성을, 멸균 전의 초기값에 대한 멸균 후의 값 및 멸균 후 1개월 보존 후의 값의 유지 비율 (유지율, %)로서 나타낸 것이다.

도 2는 실시예 4에서 얻어진 본 발명의 피브리노겐 함유 시트상 섬유 성형체 및 비교예 3의 피브리노겐 함유 입자의 각각에 대해 측정한 피브리노겐 응집체량 (%)을, 미조사, 멸균 후 (OM) 및 멸균 후 1개월 보존 후 (1M)에 대하여 나타낸 것이다.

#### 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0014] 본 발명은 단백질 및 그 단백질을 함유하는 지방족 폴리에스테르를 함유하는, 방사선 멸균된 멸균 조성물이다.

[0015] 본 발명에 사용되는 단백질은 특별히 한정되지 않는다. 바람직한 것으로는, 예를 들어, 피브리노겐이나 트롬빈으로 대표되는 지혈성 단백질, 아스파라기나아제, 카탈라아제, 수퍼옥사이드 디스뮤타아제, 리파아제로 대표되는 효소, 혜모글로빈, 혈청 알부민, 저밀도 리포 단백질로 대표되는 수송 단백질, 액틴, 미오신으로 대표되는 근육 단백질, 항체, 보체로 대표되는 방어 단백질, 디프테리아 독소, 보툴리누스 독소, 뱀독으로 대표되는 독소 단백질, 인슐린, 중식 인자, 사이토카인으로 대표되는 단백질 호르몬, 난 알부민, 폐리틴으로 대표되는 저장 단백질, 콜라겐, 캐라틴으로 대표되는 구조 단백질, 상피 성장 인자 (Epidermal growth factor : EGF), 인슐린양 성장 인자 (Insulin-like growth factor : IGF), 트랜스포밍 성장 인자 (Transforming growth factor : TGF), 신경 성장 인자 (Nerve growth factor : NGF), 뇌유래 신경 영양 인자 (Brain-derived neurotrophic factor : BDNF), 혈관 내피 세포 증식 인자 (Vesicular endothelial growth factor : VEGF), 과립구 콜로니 자극 인자 (Granulocyte-colony stimulating factor : G-CSF), 과립구 매크로파지 콜로니 자극 인자 (Granulocyte-macrophage-colony stimulating factor : GM-CSF), 혈소판 유래 성장 인자 (Platelet-derived growth factor : PDGF), 에리트로포에틴 (Erythropoietin : EPO), 트롬보포이에틴 (Thrombopoietin : TPO), 염기성 선유아세포 증식 인자 (basic fibroblast growth factor : bFGF 또는 FGF2), 간세포 증식 인자 (Hepatocyte growth factor : HGF)로 대표되는 성장 인자를 들 수 있다. 그 중에서도 바람직한 것은, 효소, 수송 단백질, 근육 단백질, 방어 단백질, 독소 단백질, 단백질 호르몬, 저장 단백질, 구조 단백질 및 성장 인자이다.

[0016] 본 발명에 있어서 사용되는 단백질은, 동물 유래인 것이어도 되고, 유전자 재조합 기술에 의해 제조한 것이어도 된다. 동물 유래이면 인간 유래가 바람직하다. 또, 유전자 재조합 기술에 의해 제작된 단백질은, 본질적인 생물 활성이 동일하면, 아미노산 배열을 다른 아미노산 배열로 치환한 개변체이어도 된다. 또, 이들의 단백질을 수식한 것 및 이들의 혼합물을 사용할 수도 있다.

[0017] 또, 본 발명에서 사용되는 단백질에는, 약학적으로 허용할 수 있는 첨가제를 첨가하여도 된다. 그러한 첨가제의 바람직한 예로는, 혈액 응고 제 XIII 인자, 알부민, 이소류신, 글리신, 아르기닌, 글루타민산, 페닐알라닌, 히스티딘, 계면 활성제, 염화나트륨, 당 알코올 (글리세롤, 만니톨 등), 트레할로오스, 시트르산나트륨, 아프로티닌 및 염화칼슘으로 이루어지는 군에서 선택되는 1종 이상을 들 수 있다.

[0018] 본 발명에서 사용되는 단백질 또는 단백질과 첨가제의 혼합물은, 지방족 폴리에스테르 중에, 각각 분자로서 분산되어 존재하여 되는데, 각각 분자가 모인 입자 (이하 첨가제와의 혼합 입자를 포함하여 「단백질 입자」라고 기재하는 경우가 있다)로서 분산되어 존재하는 것이 바람직하다.

[0019] 본 발명에 있어서 사용되는 지방족 폴리에스테르는, 생체 흡수성 또는 생분해성 폴리머인 것이 바람직하다. 생체 흡수성 폴리머의 구체예로는, 폴리락트산, 폴리글리콜산, 폴리락트산-폴리글리콜산 공중합체, 폴리카프로

락톤, 폴리락트산-폴리카프로락톤 공중합체, 폴리글리세롤세바스산, 폴리하이드록시알칸산, 폴리부틸렌숙시네이트 및 이들의 유도체를 예시할 수 있다.

[0020] 이들 중에서도, 바람직하게는 폴리글리콜산, 폴리락트산, 폴리카프로락톤 및 그들의 공중합체, 그리고 그들의 혼합물로 이루어지는 군에서 선택되고, 가장 바람직한 것은 폴리락트산, 폴리락트산-글리콜산 공중합체이다. 예를 들어, 폴리L락트산과 폴리D락트산의 스테레오 캠플렉스를 사용하여도 된다.

[0021] 또, 본 발명에서 사용하는 지방족 폴리에스테르의 분자량은  $1 \times 10^3 \sim 5 \times 10^6$  이고, 바람직하게는  $1 \times 10^4 \sim 1 \times 10^6$ , 보다 바람직하게는  $5 \times 10^4 \sim 5 \times 10^5$  이다. 또, 폴리머의 말단 구조나 폴리머를 종합하는 촉매는 임의로 선택할 수 있다.

[0022] 본 발명의 멸균 조성물에 있어서는, 그 목적을 저해하지 않는 범위에서, 다른 폴리머나 다른 화합물을 병용하여도 된다. 예를 들어, 폴리머 공중합, 폴리머 블렌드, 화합물 혼합이다.

[0023] 본 발명에서 사용하는 지방족 폴리에스테르는 고순도인 것이 바람직하고, 특히 지방족 폴리에스테르 중에 포함되는 첨가제나 가소제, 잔존 촉매, 잔존 모노머, 성형 가공이나 후가공에 사용한 잔류 용매 등의 잔류물을 적은 것이 바람직하다. 특히, 의료에 사용하는 경우에는 안전성의 기준치 미만으로 억제할 필요가 있다.

[0024] 본 발명에 있어서 「단백질을 함유한다」란, 단백질의 적어도 일부분이 지방족 폴리에스테르 내부에 들어가 있는 상태를 말한다. 단백질이 조성물 표면이나 조성물의 공극에 존재하는 동결 건조에 의한 복합체와 구별되는 상태이다.

[0025] 본 발명의 멸균 조성물의 형상은 특별히 한정되는 것이 아니고, 예를 들어 섬유, 필름, 시트, 판상체, 관상체, 선상체, 봉상체, 쿠션재, 발포체, 다공질체 등을 들 수 있다. 성형품을 제조할 때의 성형 방법은, 단백질의 구조 변화나 활성 저하가 억제되는 방법이면 특별히 제한되지 않고, 예를 들어 압출 성형, 사출 성형, 캘린더 성형, 압축 성형, 블로우 성형, 진공 성형, 분말 성형, 유연 성형, 주형 등의 적당한 성형 방법을 채용할 수 있다. 그 중에서도, 본 발명의 멸균 조성물은 섬유 및 필름 형상이 적합하고, 그들의 제조에 있어서는 플라스틱 섬유 또는 필름의 제조에 종래부터 채용되고 있는 어느 방법도 채용할 수 있으며, 예를 들어 인플레이션 압출 성형법, T 다이 압출 성형법 등의 압출 성형법, 캘린더법, 유연법 (캐스트법) 등을 들 수 있다. 상기 성형은, 용융 성형에 의해 실시하여도 되고, 또는 용액 성형에 의해 실시하여도 되는데, 단백질의 기능 저하를 방지할 목적으로 단백질을 용이하게 분산시키기 위해서는 용액 성형이 바람직하다.

[0026] 여기서 섬유 형상이란, 얹어진 1 개 또는 복수 개의 섬유가 적층되어, 짜기, 엮기 혹은 그 밖의 수법에 의해 형성된 3 차원의 성형체를 말한다. 구체적인 섬유의 형태로는, 예를 들어 부직포를 들 수 있다. 또한, 그 것을 기초로 가공한 튜브, 메시 등도 섬유 형상에 포함된다.

[0027] 본 발명의 섬유 형상을 갖는 멸균 조성물의 평균 섬유 직경은, 예를 들어  $0.01 \sim 50 \mu\text{m}$  이지만, 당업자이면 사용 목적으로 따라 적절히 정할 수 있다.

[0028] 또, 본 발명의 섬유 형상을 갖는 멸균 조성물은 장섬유로 이루어지는 것이어야 된다. 장섬유란, 구체적으로는 방사로부터 섬유 성형체로의 가공에 이르는 공정 중에서, 섬유를 절단하는 공정을 가하지 않고 형성되는 섬유를 말하고, 일렉트로스피닝법, 스펀본드법, 멜트 블로우법 등에 의해 형성할 수 있다. 이들 중, 일렉트로스피닝법이 바람직하게 사용된다.

[0029] 일렉트로스피닝법은, 폴리머가 용해되어 있는 액에 고전압을 인가함으로써, 전극 상에 섬유 성형체를 얻는 방법이다. 공정으로는, 폴리머가 용해되어 있는 방사액을 제조하는 공정과, 그 용액에 고전압을 인가하는 공정과, 그 용액을 분출시키는 공정과, 분출시킨 용액으로부터 용매를 증발시켜 섬유 성형체를 형성시키는 공정과, 임의로 실시할 수 있는 공정으로서 형성된 섬유 성형체의 전하를 소실시키는 공정과, 전하 소실에 의해 섬유 성형체를 누적시키는 공정을 포함한다.

[0030] 이하, 일렉트로스피닝법을 예로 들어, 본 발명 중, 섬유 형상 또는 부직포 형상을 갖는 멸균 조성물의 제조법을 설명한다.

[0031] 일렉트로스피닝법에 있어서의, 방사액을 제조하는 단계에 대해 설명한다. 본 발명에 있어서의 방사액은 특별히 한정되는 것은 아니고, 예를 들어 지방족 폴리에스테르의 유기 용매 용액과 단백질의 수용액으로 이루어지는 에멀션, 지방족 폴리에스테르의 유기 용매 용액과 단백질 입자로 이루어지는 혼탁액, 지방족 폴리에스테르와 단백질이 용해된 유기 용매 용액을 사용할 수 있는데, 지방족 폴리에스테르의 유기 용매 용액과 단백질 입자로

이루어지는 혼탁액을 사용하는 것이 바람직하다.

[0032] 지방족 폴리에스테르 용액에 있어서의 지방족 폴리에스테르의 농도는 1 ~ 30 중량% 인 것이 바람직하다. 지방족 폴리에스테르의 농도가 1 중량% 보다 낮으면 섬유 성형체를 형성하는 것이 곤란해져 바람직하지 않다. 또, 30 중량% 보다 높으면 얻어지는 섬유 성형체의 섬유 직경이 커져 바람직하지 않다. 보다 바람직한 유기 용매 용액 중의 지방족 폴리에스테르의 농도는 2 ~ 20 중량% 이다.

[0033] 지방족 폴리에스테르의 용매는, 지방족 폴리에스테르를 용해할 수 있고, 방사하는 단계에서 증발되고, 섬유를 형성할 수 있는 것이면 특별히 한정되지 않고, 1 종을 단독으로 사용하여도 되고, 복수의 용매를 조합하여도 된다. 예를 들어 클로로포름, 2-프로판올, 톨루엔, 벤젠, 벤질알코올, 디클로로메탄, 4염화탄소, 시클로헥산, 시클로헥사논, 트리클로로에탄, 메틸에틸케톤, 아세트산에틸 및 이들의 혼합 용매를 들 수 있다. 또, 에멀션을 형성하는 범위 내에 있어서, 아세톤, 에탄올, 테트라하이드로푸란, 1,4-디옥산, 1-프로판올, 페놀, 피리딘, 아세트산, 포름산, 헥사플루오로-2-프로판올, 헥사플루오로아세톤, N,N-디메틸포름아미드, N,N-디메틸아세트아미드, 아세토니트릴, N-메틸-2-피롤리디논, N-메틸모르폴린-N-옥사이드, 1,3-디옥솔란 등의 용매를 함유하고 있어도 된다. 이들 중에서도, 취급성이나 물성으로부터 디클로로메탄, 에탄올을 사용하는 것이 바람직하다.

[0034] 본 발명에 있어서의 단백질은, 지방족 폴리에스테르의 유기 용매 용액에 고체, 액체, 또는 용액 중 어느 상태로 첨가, 혼합하여도 된다.

[0035] 본 발명에 있어서, 지방족 폴리에스테르의 유기 용매 용액과 단백질의 수용액으로 이루어지는 에멀션을 방사액으로서 사용하는 경우, 단백질의 수성 용매는, 단백질을 용해할 수 있고, 또한 지방족 폴리에스테르의 유기 용매 용액과 에멀션을 형성하고, 방사하는 단계에서 증발되고, 섬유를 형성할 수 있는 것이면 특별히 한정되지 않는다. 예를 들어, 생리 식염수나 각종 완충액을 사용할 수 있다. 나아가서는, 단백질의 안정제나 첨가제를 첨가하여도 된다. 그 중에서도 인산 완충액, 생리 식염수를 사용하는 것이 바람직하다.

[0036] 본 발명에서 사용되는 단백질의 수용액에 있어서의 단백질의 농도는 특별히 한정되지 않고, 단백질의 특성에 따라 적절히 정해지지만, 예를 들어 0.5 ~ 50 중량% 이다.

[0037] 지방족 폴리에스테르의 유기 용매 용액과 단백질의 수용액으로부터 에멀션을 조제하는 경우, 양자의 혼합 비율로는, 안정적인 에멀션을 형성하기만 하면 특별히 한정되는 것은 아니지만, 예를 들어 (단백질의 수용액)/(지방족 폴리에스테르의 유기 용매 용액) (체적비) 가 1/100 ~ 1/2 이다. 이 값이 1/2 보다 크면 에멀션이 불안정해져 바람직하지 않다.

[0038] 지방족 폴리에스테르의 유기 용매 용액과 단백질의 수용액을 혼합하여, 에멀션을 조제하는 방법으로는 특별히 한정되지 않지만, 초음파나 각종 교반 방법을 사용할 수 있다. 교반 방법으로는, 호모게나이저와 같은 고속 교반이나 애트라이터, 볼 밀 등의 교반 방법도 사용할 수 있다. 그 중에서도 초음파 처리에 의한 분산 방법이 바람직하다.

[0039] 또, 유기 용매와 단백질의 수용액으로 에멀션을 형성한 후, 지방족 폴리에스테르를 첨가하여 방사액을 조제할 수도 있다.

[0040] 본 발명에 있어서, 지방족 폴리에스테르의 유기 용매 용액과 단백질로 이루어지는 혼탁액을 방사액으로서 사용하는 경우, 단백질 입자의 사이즈는 특별히 한정되는 것은 아니지만, 0.01 ~ 100  $\mu\text{m}$  의 범위에 있는 것이 바람직하다. 0.01  $\mu\text{m}$  보다 작은 단백질 입자를 제작하는 것은 기술적으로 곤란하고, 100  $\mu\text{m}$  보다 크면 분산성이 나쁘고, 멸균 조성물이 취약해져 바람직하지 않다.

[0041] 지방족 폴리에스테르의 유기 용매 용액과 단백질 입자를 혼합하여, 혼탁액을 조제하는 방법으로는 특별히 한정되지 않지만, 초음파나 각종 교반 방법을 사용할 수 있다. 교반 방법으로는, 호모게나이저와 같은 고속 교반이나 애트라이터, 볼 밀 등의 교반 방법도 사용할 수 있다. 그 중에서도 초음파 처리에 의한 분산 방법이 바람직하다.

[0042] 또, 유기 용매와 단백질 입자로 혼탁액을 형성한 후, 지방족 폴리에스테르를 첨가하여 방사액을 조제할 수도 있다.

[0043] 또, 혼탁액을 조제하기 전에 단백질 입자를 미세 처리할 수 있다. 미세 처리로는, 건식 분쇄와 습식 분쇄가 있으며, 본 발명에 있어서는 어느 방식도 채용할 수 있고, 양자를 조합할 수 있다.

- [0044] 건식 분쇄 처리로는, 예를 들어 볼 밀을 사용한 처리, 유성 밀이나 진동 밀을 사용한 처리, 유발을 사용하여 유봉에 의해 갈아 부수는 처리, 매체 교반형 분쇄기, 제트 밀, 석구를 사용하여 갈아 부수는 처리 등을 들 수 있다.
- [0045] 한편, 습식 분쇄 처리로는, 적당한 분산매에 단백질 입자를 분산시킨 상태에서, 높은 전단력의 교반 장치, 혼련 장치 등에 의해 교반하는 처리나, 매체 중에 분산시킨 상태에서의 볼 밀, 비즈 밀 처리 등을 들 수 있다. 나아가서는, 스프레이 드라이어에 의해 제작한 단백질 입자를 사용할 수도 있다.
- [0046] 본 발명에서 사용하는 멸균 방법은 방사선 멸균이다. 사용되는 방사선으로는, 예를 들어 알파선, 베타선, 감마선, 중성자선, 전자선 및 엑스선을 들 수 있다. 그 중에서도 감마선 혹은 전자선이 바람직하고, 가장 바람직한 것은 전자선이다. 이들의 멸균 방법은 특별히 한정되는 것은 아니지만, 방사선의 조사량으로는 10 ~ 80 kGy, 바람직하게는 20 ~ 30 kGy 이다. 온도 조건으로는 특별히 한정되는 것은 아니지만 -80 ~ 40 °C, 바람직하게는 -80 ~ 30 °C 이다.
- [0047] 알파선, 양전자선, 감마선, 중성자선, 전자선, 엑스선 등의 방사선은, 물질에 닿으면 물질을 구성하는 분자·원자로부터 전자를 떼어낸다. 이 때에 분자 결합이 절단되어 반응성이 높은 라디칼 등이 발생하여, 주변 물질과 2 차적으로 화학 반응한다.
- [0048] 단백질은 방사선 조사에 의해 기능(활성)을 잃기 쉬운 것이 잘 알려져 있다. 이것은 조사에 의해 분자 결합이 끊어져 기능 발현의 근원인 「고차 구조」가 파괴되는 것에 의한 것이라고 생각된다. 또한, 본원 명세서의 비교예에 나타나 있는 바와 같이, 단백질은 방사선 조사 후의 보존에 의해서도 구조 파괴나 실활이 일어난다. 그러나, 본 발명에 있어서의 지방족 폴리에스테르에 함유된 단백질은 방사선 조사하여도 구조 파괴나 기능 저하가 억제되고, 조사 후의 보존에 의한 추가적인 구조 파괴나 기능 저하도 억제되고 있다. 이것은 본 조성물 중에서는, 성 단백질의 고차 구조가 유지되고 있는 것을 의미하고, 이것은 단백질의 종류에 관계없이 공통적인 효과이다. 이 효과는 투과하는 지방족 폴리에스테르의 두께로부터 생각하여 차폐에 의한 것이라고는 생각되지 않고, 억제 기구는 확실하지 않다.
- [0049] 본 발명에 있어서의 방사선 멸균 전의 단백질을 함유하는 지방족 폴리에스테르는, 추가로 전자·이온 포착제, 에너지 이동제, 라디칼 포착제, 산화 방지제, 가소제를 포함하여도 된다. 전자·이온 포착제로는, 예를 들어 N,N'-테트라메틸페닐렌디아민, 디페닐렌디아민, 피렌, 퀴논 등을 들 수 있다. 에너지 이동제로는, 예를 들어 아세나프텐 등을 들 수 있다. 라디칼 포착제로는, 예를 들어 메르캅탄, 옥타하이드로페난트렌, 모노알킬디페닐에테르, 토코페롤, 시트로산, 부틸화하이드록시아니솔, 부틸화하이드록시톨루엔, t-부틸하이드로퀴논, 갈산프로필, 아스코르브산 유도체 등을 들 수 있다. 산화 방지제로는, BHT, 아인산트리에스테르, 폐놀계 노화 방지제, 유기 티오산염류 등을 들 수 있다. 그 중에서도 식품이나 의약품에 사용하는 데에 안전하다고 일반적으로 인정되고 있는 첨가제가 바람직하다. 첨가제의 양은 특별히 한정되는 것은 아니지만, 예를 들어 멸균 조성물에 있어서의 지방족 폴리에스테르에 대해 0.01 ~ 10 중량%의 첨가제를 포함할 수 있다.
- [0050] 멸균 공정에 있어서의 단백질을 함유하는 지방족 폴리에스테르는, 수분을 포함하지 않은 것이 바람직하다. 수분율은 10 중량% 이하가 바람직하고, 보다 바람직하게는 4 중량% 이하, 더욱 바람직하게는 실질적으로 무수인 것이다.
- [0051] 또, 단백질을 함유하는 지방족 폴리에스테르는, 포장재로 포장하여 방사선 멸균하여도 된다. 이러한 포장재료로는, 알루미늄과 같은 가스 배리어성이 높은 재료를 사용하는 것이 바람직하다. 또, 탈산소제나 건조제와 함께 밀봉 포장하여도 되고, 탈기 후에 불활성 가스를 충전한 상태로 포장하여도 되고, 이를 양방을 실시하여도 된다. 이러한 탈산소제 및 건조제는 인체에 해가 없고, 방사선 조사시에 실활하지 않는 것이 바람직하다.
- [0052] 본 발명의 멸균 조성물은, 예를 들어 단백질의 기능 및 멸균성이 요구되는 의료용 재료로서 사용할 수 있다.
- [0053] 실시예
- [0054] 이하, 실시예에 의해 본 발명의 실시형태를 설명하지만, 이들은 본 발명의 범위를 제한하는 것은 아니다.
- [0055] 1. 트롬빈 활성 측정
- [0056] 팔콘사 제조 2008 튜브에 시료 20  $\mu$ l 와 50 mM Tris-HCl (pH 8.5) + 50 mM NaCl 버퍼 60  $\mu$ l, 0.1 % PLURONIC F-68 을 20  $\mu$ l 첨가하고 37 °C에서 3 분 인큐베이션하였다. 표준품으로서 인간 플라즈마 유래 정제  $\alpha$ -트롬빈 (헤마토로직 테크놀로지사로부터 구입: HCT-0020) 을 동일 버퍼로 5, 2.5, 1.25, 0.625, 0.3125 U/ml로

희석한 것을 사용하였다. 그 반응액에 테스트팀 발색 기질 S-2238 (1 mM : 다이이치 화학 약품 공업) 을 100  $\mu\text{l}$  첨가하여 교반 혼합하고, 37 °C 에서 5 분간의 반응 후, 0.1 M 시트르산 용액을 800  $\mu\text{l}$  첨가하고 반응을 정지시켰다. 반응액 200  $\mu\text{l}$  를 96 웰 플레이트로 옮겨, OD 405/650 을 측정하였다.

[0057] 또한, 실시예 5 ~ 7 및 비교예 4 이외에 있어서는 이하의 방법에 의해 측정하였다. BD 사 제조 폴리스티렌튜브에 시료 20  $\mu\text{l}$  와 활성 측정용 희석 용액 (0.01 % F-68, 50 mmol/l NaCl, 50 mmol/l Tris-HCl, pH 8.4) 80  $\mu\text{l}$  첨가하고 37 °C 에서 3 분 인큐베이션하였다. 표준품으로서 재조합 트롬빈 (JPU Thrombin Standard 400 U/ml 또는 WHO/US Thrombin Standard, 110 IU/ml) 을 동일 베퍼로 JPU 의 경우, 4, 2, 1, 0.5, 0.25 U/ml, IU 의 경우, 6, 3, 1.5, 0.75, 0.375 IU/ml 로 희석한 것을 사용하였다. 그 반응액에 테스트팀 발색 기질 S-2238 (1 mM : 다이이치 화학 약품 공업) 을 100  $\mu\text{l}$  첨가하여 교반 혼합하고, 37 °C 에서 7 분간의 반응 후, 0.1 M 시트르산 용액을 800  $\mu\text{l}$  첨가하고 반응을 정지시켰다. 반응액 200  $\mu\text{l}$  를 96 웰 플레이트로 옮겨, OD 405/650 을 측정하였다.

[0058] 2. 피브리노겐 응집체량 측정

[0059] 시트를  $\Phi$ 1 cm 로 자른 후, 희석액에 의해 피브리노겐을 추출하고, 고속 액체 크로마토그래피로 그 응집체량을 측정하였다.

[0060] <시험 조건>

[0061] 검출기 : 자외 흡광 광도계 (측정 파장 : 280 nm)

[0062] 칼럼 : Bio Sep-SEC-s4000 (7.8  $\times$  300 mm, Phenomenex)

[0063] 칼럼 온도 : 25 °C

[0064] 샘플러 온도 : 6 °C

[0065] 이동상 : 0.5 mol/l Arg-HCl/50 mmol/l 인산 베퍼

[0066] 유량 : 1 ml/min

[0067] 분석 시간 : 20 min

[0068] 3. 두께

[0069] 성형체를 고정밀도 디지털 측장기 (주식회사 미쓰토요 : 상품명 「라이트매티 VL-50」) 를 이용하여 측정력 0.01 N 에 의해 n = 15 에서 성형체의 막두께를 측정한 평균값을 산출하여 성형체의 두께로 하였다. 또한, 본 측정에 있어서는 측정 기기가 사용 가능한 최소의 측정력으로 측정을 실시하였다.

[0070] 4. 겉보기 중량

[0071] 성형체를 50 mm  $\times$  100 mm 로 커트하고, 그 중량을 측정하여 환산함으로써 성형체의 겉보기 중량을 산출하였다.

[0072] 5. 부피 밀도

[0073] 상기 측정한 두께와 겉보기 중량의 값으로부터 성형체의 부피 밀도를 산출하였다.

[0074] 6. 트롬빈 ELISA 측정

[0075] ELISA 플레이트 (NUNC 468667) 에 항인간 트롬빈 항체 (Affinity Biological사, No. SAHT-AP) 를 5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  로 고정화시켰다. 0.05 % Tween20 을 포함하는 PBS 로 세정 후, 블록에이스 (DS 파마바이오 메디칼 UK-B80) 를 각 웰에 첨가하고, 마스킹을 실시하였다. 0.05 % Tween20 을 포함하는 PBS 로 세정 후, 검체를 첨가하였다. 표준품으로서 인간 트롬빈 (헤마토로직 테크놀로지사 : HCT-0020) 을 이용하여 검량선을 작성하였다.

0.05 % Tween20 을 포함하는 PBS 로 세정 후, HRP 표식 항인간 트롬빈 항체 ((Affinity Biological 사, No. SAHT-HRP) 를 0.1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  로 첨가하였다. 반응 후, 0.05 % Tween20 을 포함하는 PBS 로 세정하고, TMB 시약 (DaKo S1599) 을 첨가하고, 10 분간 가만히 정지 시켜서 발색시켰다. 1 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 를 첨가하고, 발색을 정지시키고, 마이크로플레이트 리더로 OD450 - 650 nm 를 측정하였다.

[0076] 7. 리파아제 및  $\beta$ -글루코시다아제의 효소 활성 측정

[0077] (1) 추출률 측정

- [0078] 성형체를  $2\text{ cm} \times 2\text{ cm}$  로 잘라,  $1\text{ mL}$  의 생리 식염수에 3 분간 혹은 3 시간 침지시켜, 고정화한 효소를 용출시켰다.  $n = 3$  에서 전후의 중량 변화를 측정하고, 이하의 식에 의해 산출한 추출률의 평균값을 구하였다. 고정화 효소 이론 중량은, 조성물의 중량, 주입 효소 분말 중량%로부터 산출하였다.
- [0079] 추출 비율 = 중량 감소 (mg)/고정화 효소 이론 중량 (mg)
- [0080] (2) 효소 활성 측정
- [0081] 리파아제의 활성 측정에는 Continuous Fluorometric Lipase Test 키트 (PROGEN BIOTECHNIK GMBH 제조)를 사용하였다. 이하의 식에 의해 활성 회수율을 산출하였다. 활성 효소량은, 활성값으로부터 농도 환산하여 산출하였다. 단위 면적당 고정화 효소 이론 중량은, 주입 효소 분말 중량% 와 조성물의 겉보기 중량으로부터 산출하였다.
- [0082] 활성 회수율 (%) =  $\{\text{활성 효소량} (\text{mg}/\text{cm}^2) / (\text{단위 면적당 고정화 효소 이론 중량} (\text{mg}/\text{cm}^2) \times \text{추출 비율})\} \times 100$
- [0083]  $\beta$ -글루코시다아제의 활성 측정에는 Tokyogreen (등록 상표, 이하 동일)- $\beta$ Glu (세키사이 메디컬 주식회사)를 사용한 형광 측정에 의해 실시하였다. 이하의 식에 의해 활성 회수율을 산출하였다. 고정화 효소 이론 중량은, 주입 효소 분말 중량% 와 조성물의 중량으로부터 산출하였다.
- [0084] 활성 회수율 (%) =  $\{\text{활성 효소량} (\text{mg}) / (\text{고정화 효소 이론 중량} (\text{mg}) \times \text{추출 비율})\} \times 100$
- [0085] 이하의 식에 의해 활성 유지율을 산출하였다.
- [0086] 활성 유지율 (%) =  $\{\text{멸균 후의 활성 회수율} (\%) / \text{멸균 전의 활성 회수율} (\%)\} \times 100$
- [0087] 실시예 1
- [0088] 에탄올에 트롬빈 함유 입자 (리콤비넌트 트롬빈  $1\text{ mg/mL}$ , 염화나트륨, 시트르산나트륨, 염화칼슘 및 만니톨 함유 pH 7 의 수용액을 동결 건조시킨 것)를 분산시킨 후, 디클로로메탄을 첨가하여 10 중량% 가 되도록 폴리글리콜산-폴리락트산 공중합체 (Purasorb PDLG5010, Purac 사 제조)를 용해하여, 트롬빈 함유 입자/폴리글리콜산-폴리락트산 공중합체 = 100 (트롬빈으로서 1.69)/100 (w/w) 의 방사액을 조제하였다. 일렉트로스피닝법에 의해 방사를 실시하여, 시트상의 섬유 성형체를 얻었다. 얻어진 섬유 성형체의 두께는  $131\text{ }\mu\text{m}$ , 겉보기 중량은  $1.44\text{ mg/cm}^2$ , 부피 밀도  $111\text{ mg/cm}^3$  였다. 얻어진 시트를 직경  $1\text{ cm}$  로 잘라,  $200\text{ }\mu\text{l}$  의 생리 식염수로 단백질을 추출하여 활성 측정을 실시하였다. 그 결과, 활성 측정값은  $26.7\text{ U/cm}^2$  였다. 얻어진 시트는  $20\text{ kGy}$  의 전자선을 조사하여 멸균 후,  $40\text{ }^\circ\text{C}/75\text{ %RH}$  로 보존하고, 1 개월 후의 트롬빈 활성을 측정하였다. 전자선 조사 직후의 트롬빈 활성은, 멸균 전을 100 % 로 했을 때, 79 % 의 유지율이었다. 1 개월 후의 활성 유지율은 78 % 로, 보존 중의 트롬빈 활성의 저하는 보이지 않았다.
- [0089] 실시예 2
- [0090] 에탄올에 트롬빈 함유 입자 (리콤비넌트 트롬빈  $1\text{ mg/mL}$ , 염화나트륨, 시트르산나트륨, 염화칼슘 및 만니톨 함유 pH 7 의 수용액을 동결 건조시킨 것) 와 퀴니자린 그린 SS (토쿄 화성사 제조)를 분산시킨 후, 디클로로메탄을 첨가하여 10 중량% 가 되도록 폴리글리콜산-폴리락트산 공중합체 (Purasorb PDLG5010, Purac 사 제조)를 용해하여, 트롬빈 함유 입자/폴리글리콜산-폴리락트산 공중합체 = 100 (트롬빈으로서 1.69)/100 (w/w) 의 방사액을 조제하였다. 일렉트로스피닝법에 의해 방사를 실시하여, 시트상의 섬유 성형체를 얻었다. 얻어진 섬유 성형체 (평균 두께 :  $129\text{ }\mu\text{m}$ , 겉보기 중량 :  $1.49\text{ mg/cm}^2$ , 부피 밀도 :  $124\text{ mg/cm}^3$ ) 를 포함하는 시트를 직경  $1\text{ cm}$  로 잘라,  $200\text{ }\mu\text{l}$  의 생리 식염수로 단백질을 추출하여 트롬빈 활성 측정을 실시하였다. 그 결과, 활성 측정값은  $40.2\text{ IU/cm}^2$  였다. 얻어진 시트는  $30\text{ kGy}$  의 전자선을 조사하여 멸균 후,  $40\text{ }^\circ\text{C}/75\text{ %RH}$  로 보존하고, 1 개월 후의 트롬빈 활성을 측정하였다. 전자선 조사 직후의 트롬빈 활성은, 멸균 전을 100 % 로 했을 때, 70 % 의 유지율이었다. 1 개월 후의 활성 유지율은 74 % 로, 보존 중의 트롬빈 활성의 저하는 보이지 않았다.
- [0091] 실시예 3
- [0092] 에탄올에 트롬빈 함유 입자 (리콤비넌트 트롬빈  $1\text{ mg/mL}$ , 염화나트륨, 시트르산나트륨, 염화칼슘 및 만니톨을 함유하는 pH 7 의 수용액을 동결 건조시킨 것) 를 분산시킨 후, 디클로로메탄을 첨가하여 10 중량% 가 되도록 폴리글리콜산-폴리락트산 공중합체 (Purasorb PDLG5010, Purac 사 제조) 를 용해하여, 트롬빈 함유 입자/폴리글리콜산-폴리락트산 공중합체 = 100 (트롬빈으로서 1.69)/100 (w/w) 의 도프액을 조제하였다. 얻어진 도프액을 이용하여 유연법에 의해 필름을 제작하였다. 도포 간격은  $127\text{ }\mu\text{m}$  이고, 도포 속도는  $30.1\text{ mm/sec}$  였다.

얻어진 시트의 두께는 58  $\mu\text{m}$ , 겉보기 중량 2.9  $\text{mg}/\text{cm}^2$ , 부피 밀도 504  $\text{mg}/\text{cm}^3$  였다. 얻어진 시트를 직경 1  $\text{cm}$  로 잘라, 200  $\mu\text{l}$  의 생리 식염수로 단백질을 추출하여 트롬빈 활성 측정을 실시하였다. 그 결과, 활성 측정값은 71.1  $\text{IU}/\text{cm}^2$  였다. 얻어진 시트는 30  $\text{kGy}$  의 전자선을 조사하여 멸균 후, 40  $^{\circ}\text{C}/75\% \text{RH}$  로 보존하고, 1 개월 후의 트롬빈 활성을 측정하였다. 전자선 조사 직후의 트롬빈 활성은, 멸균 전을 100 % 로 했을 때, 75.7 % 의 유지율이었다. 1 개월 후의 활성 유지율은 82 % 로, 보존 중의 트롬빈 활성의 저하는 보이지 않았다.

#### [0093] 실시예 4

에탄올에 피브리노겐 함유 입자 (리콤비넌트 피브리노겐 10  $\text{mg}/\text{mL}$ , 아르기닌, 염화나트륨 및 만니톨을 함유하는 pH 8.5 의 수용액을 동결 건조시킨 것) 를 분산시킨 후, 디클로로메탄을 첨가하여 10 중량% 가 되도록 폴리글리콜산-폴리락트산 공중합체 (Purasorb PDLG5010, Purac 사 제조) 를 용해하여, 피브리노겐 함유 입자/폴리글리콜산-폴리락트산 공중합체 = 100 (피브리노겐으로서 50.85)/100 (w/w) 의 방사액을 조제하였다. 일렉트로스피닝법에 의해 방사를 실시하여, 시트상의 섬유 성형체를 얻었다. 얻어진 섬유 성형체의 두께는 131  $\mu\text{m}$ , 겉보기 중량은 1.44  $\text{mg}/\text{cm}^2$ , 부피 밀도 110  $\text{mg}/\text{cm}^3$  였다. 얻어진 시트를 직경 1  $\text{cm}$  로 잘라, 화석액으로 피브리노겐을 추출하여 고속 크로마토그래피에 의해 응집체량을 측정하였다. 그 결과, 응집체량은 9.79 % 였다.

얻어진 시트는 30  $\text{kGy}$  의 전자선을 조사하여 멸균 후, 40  $^{\circ}\text{C}/75\% \text{RH}$  로 보존하고, 1 개월 후의 응집체량을 측정하였다. 전자선 조사 직후의 응집체량은, 18.81 % 였다. 1 개월 후는 24.14 % 였다.

#### [0095] 비교예 1

트롬빈 함유 입자 (리콤비넌트 트롬빈 1  $\text{mg}/\text{mL}$ , 염화나트륨, 시트르산나트륨, 염화칼슘 및 만니톨을 함유하는 pH 7 의 수용액을 동결 건조시킨 것) 에 30  $\text{kGy}$  의 전자선을 조사하여 멸균 후, 40  $^{\circ}\text{C}/75\% \text{RH}$  로 보존하고, 1 개월 후의 트롬빈 활성을 측정하였다. 조사 전의 트롬빈 활성은, 404.73  $\text{U}/\text{바이알}$  이었다. 전자선 조사 직후의 트롬빈 활성은, 멸균 전을 100 % 로 했을 때, 51.8 % 의 유지율이었다. 1 개월 후의 활성 유지율은 17.9 % 이고, 보존 중의 트롬빈 활성의 저하를 볼 수 있었다.

#### [0097] 비교예 2

2-프로판올에 트롬빈 함유 입자 (리콤비넌트 트롬빈 1  $\text{mg}/\text{mL}$ , 염화나트륨, 시트르산나트륨, 염화칼슘 및 만니톨을 함유하는 pH 7 의 수용액을 동결 건조시킨 것) 를 분산시킨 후, 13 중량% 가 되도록 하이드록시프로필셀룰로오스 (2.0 - 2.9  $\text{mPa} \cdot \text{s}$  냍폰 소다 제조) 를 용해하여, 트롬빈 함유 입자/하이드록시프로필셀룰로오스 = 100/100 (w/w) 의 도프액을 조제하였다. 일렉트로스피닝법에 의해 방사를 실시하여, 시트상의 섬유 성형체를 얻었다. 얻어진 섬유 성형체의 두께는 204  $\mu\text{m}$ , 겉보기 중량은 2.08  $\text{mg}/\text{cm}^2$ , 부피 밀도 101  $\text{mg}/\text{cm}^3$  였다. 얻어진 시트를 직경 1  $\text{cm}$  로 잘라, 200  $\mu\text{l}$  의 생리 식염수로 단백질을 추출하여 활성 측정을 실시하였다. 그 결과, 활성 측정값은 110.3  $\text{IU}/\text{cm}^2$  였다. 얻어진 시트는 30  $\text{kGy}$  의 전자선을 조사하여 멸균 후, 40  $^{\circ}\text{C}/75\% \text{RH}$  로 보존하고, 1 개월 후의 트롬빈 활성을 측정하였다. 전자선 조사 직후의 트롬빈 활성은, 멸균 전을 100 % 로 했을 때, 68.4 % 의 유지율이었다. 1 개월 후의 활성 유지율은 54.9 % 로, 보존 중의 트롬빈 활성의 저하를 볼 수 있었다.

#### [0099] 비교예 3

피브리노겐 함유 입자 (리콤비넌트 피브리노겐 10  $\text{mg}/\text{mL}$ , 아르기닌, 염화나트륨 및 만니톨을 함유하는 pH 8.5 의 수용액을 동결 건조시킨 것) 에 30  $\text{kGy}$  의 전자선을 조사하여 멸균 후, 40  $^{\circ}\text{C}/75\% \text{RH}$  로 보존하고, 1 개월 후의 피브리노겐의 응집체량을 측정하였다. 조사 전의 응집체량은 6.97 % 였다. 전자선 조사 직후의 응집체량은 18.51 % 였다. 1 개월 후는 54.72 % 였다.

[0101] 실시예 1 ~ 3, 비교예 1 ~ 2 의 결과 (멸균 후 및 멸균 후 보존 후의, 멸균 전에 대한 트롬빈 (Th) 활성 유지율) 를 도 1 에 나타낸다.

[0102] 단백질을 지방족 폴리에스테르에 함유시킴으로써, 단백 함유 입자만인 경우 (비교예 1) 에 비하여, 방사선 멸균에 의한 단백질의 구조 변화나 기능 저하가 억제되고, 나아가서는 방사선 멸균 후의 보존에 수반하는 이들 변화나 저하가 지방족 폴리에스테르가 아니라 셀룰로오스류 (하이드록시프로필셀룰로오스) 인 경우 (비교예 2) 에 대하여, 각각 억제되어 있는 것을 알 수 있다.

[0103] 실시예 4 및 비교예 3 의 결과 (멸균 후 및 멸균 후 보존 후의, 피브리노겐의 응집체량) 를 도 2 에 나타낸다.

[0104] 단백질을 지방족 폴리에스테르에 함유 (실시예 4) 시킴으로써, 단백 함유 입자만인 경우 (비교예 3) 에 비하여,

방사선 멸균 후의 보존에 수반하는 단백질의 구조 변화가 억제되어 있는 것을 알 수 있다.

[0105] 실시예 5

에탄올에 트롬빈 함유 입자 (볼힐 (등록 상표, 이하 동일) 조직 접착용 : 바이알 3) 를 분산시킨 후, 디클로로메탄을 첨가하여 10 wt % 가 되도록 폴리락트산 (PL18 Purac Biomaterial 제조) 을 용해하여, 트롬빈 함유 입자/ 폴리락트산 = 40 (트롬빈으로서 0.45)/100 (w/w) 의 방사액을 조제하였다. 일렉트로스피닝법에 의해 방사를 실시하여, 시트상의 섬유 성형체를 얻었다. 얻어진 시트를 20 kGy 로 전자선 멸균하였다. 얻어진 시트를 2 cm × 2 cm 로 절단하고, 1 mL 의 생리 식염수로 단백질을 추출하여 활성 및 ELISA 측정을 실시하였다. 그 결과, 활성 측정값은 5.0 U/cm<sup>2</sup>, ELISA 측정값은 3.4 μg/cm<sup>2</sup> 였다. 한편, 멸균 처리하지 않은 시트에 대해서도 동일하게 활성 및 ELISA 측정을 실시한 결과, 활성 측정값은 7.5 U/cm<sup>2</sup>, ELISA 측정값은 4.35 μg/cm<sup>2</sup> 였다. 즉, 미멸균 시트에 대한 멸균 시트의 활성 유지율은 73 % 였다.

[0107] 실시예 6

에탄올에 트롬빈 함유 입자 (볼힐 조직 접착용 : 바이알 3) 를 분산시킨 후, 디클로로메탄을 첨가하여 10 wt % 가 되도록 폴리락트산 (PL18 Purac Biomaterial 제조) 을 용해하여, 트롬빈 함유 입자/ 폴리락트산 = 70 (트롬빈으로서 0.78)/100 (w/w) 의 방사액을 조제하였다. 일렉트로스피닝법에 의해 방사를 실시하여, 시트상의 섬유 성형체를 얻었다. 얻어진 시트를 20 kGy 로 전자선 멸균하였다. 얻어진 시트를 2 cm × 2 cm 로 절단하고, 1 mL 의 생리 식염수로 단백질을 추출하여 활성 및 ELISA 측정을 실시하였다. 그 결과, 활성 측정값은 9.575 U/cm<sup>2</sup>, ELISA 측정값은 7.0 μg/cm<sup>2</sup> 였다. 한편, 멸균 처리하지 않은 시트에 대해서도 동일하게 활성 및 ELISA 측정을 실시한 결과, 활성 측정값은 11.15 U/cm<sup>2</sup>, ELISA 측정값은 7.2 μg/cm<sup>2</sup> 였다. 즉, 미멸균 시트에 대한 멸균 시트의 활성 유지율은 86 % 였다.

[0109] 실시예 7

에탄올에 트롬빈 동결 건조 분말 (볼힐 조직 접착용 : 바이알 3) 을 분산시킨 후, 디클로로메탄을 첨가하여 10 wt % 가 되도록 폴리락트산 (PL18 Purac Biomaterial 제조) 을 용해하여, 트롬빈 동결 건조 분말/ 폴리락트산 = 100 (트롬빈으로서 1.1)/100 (w/w) 의 방사액을 조제하였다. 온도 22 °C, 습도 26 % 이하에서 일렉트로스 피닝법에 의해 방사를 실시하여, 시트상의 섬유 성형체를 얻었다. 분출 노즐의 내경은 0.8 mm, 전압은 15 kV, 방사액 유량은 3.0 mL/h, 분출 노즐로부터 평판까지의 거리는 25 cm 였다. 얻어진 시트를 20 kGy 로 전자선 멸균하였다. 얻어진 시트를 2 cm × 2 cm 로 절단하고, 1 mL 의 생리 식염수로 단백질을 추출하여 활성 및 ELISA 측정을 실시하였다. 그 결과, 활성 측정값은 15 U/cm<sup>2</sup>, ELISA 측정값은 11 μg/cm<sup>2</sup> 였다. 한편, 멸균 처리하지 않은 시트에 대해서도 동일하게 활성 및 ELISA 측정을 실시한 결과, 활성 측정값은 23 U/cm<sup>2</sup>, ELISA 측정값은 16 μg/cm<sup>2</sup> 였다. 즉, 미멸균 시트에 대한 멸균 시트의 활성 유지율은 64 % 였다.

[0111] 비교예 4

트롬빈 함유 입자 (볼힐) 를 20 kGy 로 전자선 멸균하였다. 1 mL 의 생리 식염수로 단백질을 추출하여 활성 및 ELISA 측정을 실시하였다. 그 결과, 활성 측정값은 22.5 U/cm<sup>2</sup>, ELISA 측정값은 11.5 μg/cm<sup>2</sup> 였다. 한편, 멸균 처리하지 않은 트롬빈 함유 입자에 대해서도 동일하게 활성 및 ELISA 측정을 실시한 결과, 활성 측정값은 68.5 U/cm<sup>2</sup>, ELISA 측정값은 41.5 μg/cm<sup>2</sup> 였다. 즉, 미멸균 시트에 대한 멸균 시트의 활성 유지율은 32 % 였다.

[0113] 실시예 8

에탄올에 리파아제 분말 (돼지 췌장 유래, 와코 줌야쿠 제조, 이하 동일) 을 분산시킨 후, 디클로로메탄을 첨가하여 10 wt % 가 되도록 폴리락트산-글리콜산 공중합체 (PDLG5010 Purac Biomaterial 제조) 를 용해하여, 리파아제 분말/ 폴리락트산-글리콜산 공중합체 = 50/100 (w/w) 의 방사액을 조제하였다. 온도 27 °C, 습도 25 % 이하에서 일렉트로스피닝법에 의해 방사를 실시하여, 시트상의 섬유 성형체를 얻었다. 분출 노즐의 내경은 0.9 mm, 전압은 15 kV, 방사액 유량은 4.0 mL/h, 분출 노즐로부터 평판까지의 거리는 25 cm 였다. 얻어진 시트의 리파아제 추출률은 79 % 였다. 얻어진 시트를 20 kGy 로 전자선 멸균하였다. 얻어진 멸균 시트를 1 cm × 1 cm 로 절단하고, 키트에 포함되는 Lipase buffer 1 mL 로 리파아제를 추출하여 활성 측정을 실시하였다. 그 결과, 활성 회수율은 100 % 였다.

[0115] 실시예 9

리파아제 분말에 디클로로메탄을 첨가하여 10 wt % 가 되도록 폴리락트산-글리콜산 공중합체 (PDLG5010 Purac

Biomaterial 제조)를 용해하여, 리파아제 분말/폴리락트산 = 50/100 (w/w)의 방사액을 조제하였다. 온도 26 °C, 습도 25 % 이하에서 일렉트로스피닝법에 의해 방사를 실시하여, 시트상의 섬유 성형체를 얻었다. 분출 노즐의 내경은 0.8 mm, 전압은 15 kV, 방사액 유량은 4.0 mL/h, 분출 노즐로부터 평판까지의 거리는 25 cm 였다. 얻어진 시트의 리파아제 추출률은 63 % 였다. 얻어진 시트를 20 kGy로 전자선 멸균하였다. 얻어진 시트를 1 cm × 1 cm로 절단하고, 키트에 포함되는 Lipase buffer 1 mL로 리파아제를 추출하여 활성 측정을 실시하였다. 그 결과, 활성 회수율은 92 % 였다.

[0117] 실시예 10

[0118] 에탄올에  $\beta$ -글루코시다아제 분말 (아몬드 유래, 오리엔탈 효모 공업 제조, 이하 동일)을 분산시킨 후, 디클로로메탄을 첨가하여 10 wt % 가 되도록 폴리락트산-글리콜산 공중합체 (PDLG5010 Purac Biomaterial 제조)를 용해하여,  $\beta$ -글루코시다아제 분말/폴리락트산-글리콜산 공중합체 = 38/62 (w/w)의 방사액을 조제하였다. 온도 27 °C, 습도 25 % 이하에서 일렉트로스피닝법에 의해 방사를 실시하여, 시트상의 섬유 성형체를 얻었다. 분출 노즐의 내경은 0.9 mm, 전압은 15 kV, 방사액 유량은 4.0 mL/h, 분출 노즐로부터 평판까지의 거리는 25 cm 였다. 얻어진 시트를 2 cm × 2 cm로 절단 후, 20 kGy로 전자선 멸균하였다. 생리 식염수 1 mL로  $\beta$ -글루코시다아제를 추출하여 Tokyogreen- $\beta$ Glu로 활성 측정을 실시하였다. 그 결과, 활성 회수율은 92 % 였다. 한편, 멸균 처리하지 않은 시트에 대해서도 동일하게 활성 측정을 실시한 결과, 활성 회수율은 94 % 였다. 이상으로부터, 미멸균 섬유 성형체에 대한 멸균 섬유 성형체의 활성 유지율은 98 % 이고, 전자선 멸균에 의해 실활하고 있지 않는 것을 알 수 있었다.

[0119] 실시예 11

[0120] 에탄올에  $\beta$ -글루코시다아제 분말을 분산시킨 후, 디클로로메탄을 첨가하여 10 wt % 가 되도록 폴리락트산-카프로락톤 공중합체 (PLCA8812 다카 화학 제조)를 용해하여,  $\beta$ -글루코시다아제 분말/폴리락트산-카프로락톤 공중합체 = 38/62 (w/w)의 방사액을 조제하였다. 온도 27 °C, 습도 25 % 이하에서 일렉트로스피닝법에 의해 방사를 실시하여, 시트상의 섬유 성형체를 얻었다. 분출 노즐의 내경은 0.9 mm, 전압은 15 kV, 방사액 유량은 3.0 mL/h, 분출 노즐로부터 평판까지의 거리는 25 cm 였다. 얻어진 시트를 2 cm × 2 cm로 절단 후, 20 kGy로 전자선 멸균하였다. 생리 식염수 1 mL로  $\beta$ -글루코시다아제를 추출하여 Tokyogreen- $\beta$ Glu로 활성 측정을 실시하였다. 그 결과, 활성 회수율은 81 % 였다. 한편, 멸균 처리하지 않은 시트에 대해서도 동일하게 활성 측정을 실시한 결과, 활성 회수율은 80 % 였다. 이상으로부터, 미멸균 섬유 성형체에 대한 멸균 섬유 성형체의 활성 유지율은 101 %로, 전자선 멸균에 의해 실활하고 있지 않는 것을 알 수 있었다.

[0121] 실시예 12

[0122] 에탄올에  $\beta$ -글루코시다아제 분말을 분산시킨 후, 디클로로메탄을 첨가하여 11 wt % 가 되도록 폴리락트산 (PL18 Purac Biomaterial 제조)을 용해하여,  $\beta$ -글루코시다아제 분말/폴리락트산 = 38/62 (w/w)의 방사액을 조제하였다. 온도 27 °C, 습도 25 % 이하에서 일렉트로스피닝법에 의해 방사를 실시하여, 시트상의 섬유 성형체를 얻었다. 분출 노즐의 내경은 0.9 mm, 전압은 15 kV, 방사액 유량은 3.0 mL/h, 분출 노즐로부터 평판까지의 거리는 25 cm 였다. 얻어진 시트를 2 cm × 2 cm로 절단 후, 20 kGy로 전자선 멸균하였다. 생리 식염수 1 mL로  $\beta$ -글루코시다아제를 추출하여 Tokyogreen- $\beta$ Glu로 활성 측정을 실시하였다. 그 결과, 활성 회수율은 62 % 였다. 한편, 멸균 처리하지 않은 시트에 대해서도 동일하게 활성 측정을 실시한 결과, 활성 회수율은 71 % 였다. 이상으로부터, 미멸균 섬유 성형체에 대한 멸균 섬유 성형체의 활성 유지율은 87 %로, 전자선 멸균에 의해 실활하고 있지 않는 것을 알 수 있었다.

[0123] 비교예 5

[0124] 리파아제 분말을 20 kGy로 전자선 멸균하였다. 분말 1 mg에 1 mL의 Lipase buffer를 첨가하여 활성 측정을 실시하였다. 그 결과, 활성 회수율은 74 % 였다.

[0125] 비교예 6

[0126]  $\beta$ -글루코시다아제 분말을 20 kGy로 전자선 멸균하였다. 분말 2 mg을 1 mL의 생리 식염수에 용해시켜, Tokyogreen- $\beta$ Glu로 활성 측정을 실시하였다. 그 결과, 활성 유지율은 81 % 였다.

[0127] 발명의 효과

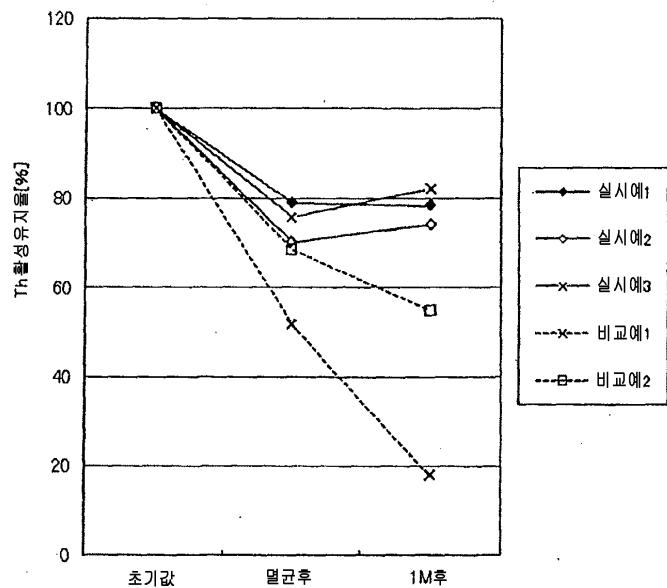
[0128] 본 발명의 멸균 조성물은 멸균되어 있음에도 불구하고 단백질의 구조나 기능이 유지되고 있다.

[0129]

산업상 이용가능성

[0130]

본 발명의 멸균 조성물은, 예를 들어 단백질의 기능 및 멸균성이 요구되는 의료품의 제조업에서 이용된다.

**도면****도면1****도면2**