



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2018-0098420  
(43) 공개일자 2018년09월03일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
C12Q 1/37 (2006.01) C12N 9/68 (2006.01)  
C12Q 1/56 (2006.01) G01N 33/48 (2006.01)  
G01N 33/52 (2006.01)  
(52) CPC특허분류  
C12Q 1/37 (2013.01)  
C12N 9/6435 (2013.01)  
(21) 출원번호 10-2018-7024264(분할)  
(22) 출원일자(국제) 2012년06월22일  
심사청구일자 2018년08월24일  
(62) 원출원 특허 10-2015-7001763  
원출원일자(국제) 2012년06월22일  
심사청구일자 2017년01월26일  
(85) 번역문제출일자 2018년08월23일  
(86) 국제출원번호 PCT/IT2012/000193  
(87) 국제공개번호 WO 2013/190582  
국제공개일자 2013년12월27일

(71) 출원인  
젠티엄 에스알엘  
이태리 코모 가르디아 빌라 22079 피아자 엑스엑스 세템브레 2  
(72) 발명자  
이그노니 테렌시오  
이탈리아 아이-22070 솔비아테 (씨오) 비아 베르디 15  
쿠마르 비제이  
이탈리아 아이-22070 카스네이트 (씨오) 비아 갈릴레이 4  
이슬람 칼리드  
스위스 체하-6900 마사그노 비아 산 고타르도 80  
(74) 대리인  
정홍식, 김태현

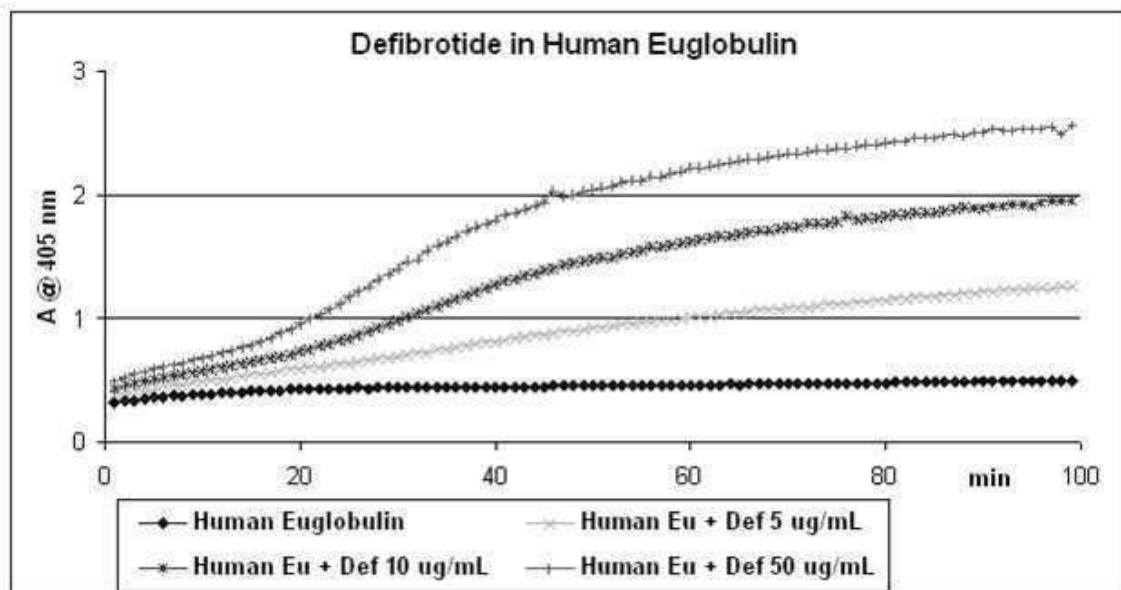
전체 청구항 수 : 총 14 항

(54) 발명의 명칭 디파이브로타이드의 생물학적 활성 측정을 위한 유우글로불린에 기초한 방법

(57) 요약

디파이브로타이드의 생물학적 활성의 측정방법이 개시되고, 상기 방법은 디파이브로타이드와, 포유동물 유우글로불린(mammalian euglobulin)과, 플라스민의 반응을 통해 측정가능한 생산물을 제공하는 플라스민에 특이적인 기질을 접촉시키는 단계; 및 b) 연속해서 형성된 생성물의 양을 측정하여 상기 디파이브로타이드의 생물학적 활성을 측정하는 단계;를 포함한다. 정의된 생물학적 활성을 가지는, 특히 25 내지 35 IU/mg, 바람직하게 27.5 내지 32.5 IU/mg, 더욱 바람직하게 28 내지 32 IU/mg 디파이브로타이드의 생물학적 활성을 가지는, 액체 디파이브로타이드 제형(바람직하게는 수용액)이 또한 개시된다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

*C12Q 1/56* (2013.01)

*C12Y 304/21007* (2013.01)

*G01N 33/48* (2013.01)

*G01N 33/52* (2013.01)

---

## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

디파이브로타이드(defibrotide)의 생물학적 활성의 측정방법에 있어서,

- a) 디파이브로타이드와, 포유동물 유우글로불린(mammalian euglobulin)과, 플라스민의 반응을 통해 측정가능한 생성물을 제공하는 플라스민에 특이적인 기질을 접촉시키는 단계; 및
- b) 연속해서 형성된 생성물의 양을 측정하여 상기 디파이브로타이드의 생물학적 활성을 측정하는 단계;를 포함하는, 디파이브로타이드의 생물학적 활성 측정 방법.

#### 청구항 2

제1항에 있어서,

상기 유우글로불린은 포유동물 유우글로불린인 것인, 디파이브로타이드의 생물학적 활성 측정 방법.

#### 청구항 3

제2항에 있어서,

상기 유우글로불린은 인간, 토끼 또는 소 유우글로불린인 것인, 디파이브로타이드의 생물학적 활성 측정 방법.

#### 청구항 4

제1항에 있어서,

상기 플라스민에 특이적 기질과 반응하는 플라스민은,

유우글로불린에 함유된 플라스미노겐(plasminogen)에 의하여 유리되는 것인, 디파이브로타이드의 생물학적 활성 측정 방법.

#### 청구항 5

제1항에 있어서,

상기 플라스민에 특이적 기질은,

색소생산 기질(chromogenic substrate)인 것인, 디파이브로타이드의 생물학적 활성 측정 방법.

#### 청구항 6

제1항에 있어서,

상기 플라스민에 특이적 기질은,

화학식  $A_1-A_2-A_3-X$ 인 화합물로서,

여기서  $A_1$  및  $A_2$ 는 비-극성 아미노산,  $A_3$ 는 리신(lysine) 또는 아르기닌(arginine)이고, X는 측정가능한 생성물인 것인, 디파이브로타이드의 생물학적 활성 측정 방법.

#### 청구항 7

제6항에 있어서,

상기 측정가능한 생성물 X는 파라니트로아닐린(para-nitroaniline) 및 2-나프틸라민(2-naphthylamine)으로 구성된 군으로부터 선택되는 것인, 디파이브로타이드의 생물학적 활성 측정 방법.

#### 청구항 8

제4항에 있어서,

상기 플라스민에 특이적 기질은,

H-D-발릴-L-류실-L-리신-p-니트로아닐린(H-D-Valyl-L-Leucyl-L-Lysine-p-nitroaniline)인 것인, 디파이브로타이드의 생물학적 활성 측정 방법.

#### 청구항 9

제6항에 있어서,

상기 측정가능한 생성물 X는,

분광측정법(spectrophotometry) 또는 형광측정법(fluorimetry)에 의하여 측정되는 것인, 디파이브로타이드의 생물학적 활성 측정 방법.

#### 청구항 10

제2항에 있어서,

상기 포유동물 유우글로불린은, 원래 혈장과 동일 부피로 재구성되거나 적절한 버퍼로 1:10으로 희석되고, 색소 생산/형광생성 기질(chromogenic/fluorogenic substrate)은 2.5 내지 3.5mM의 농도를 가지는 것인, 디파이브로타이드의 생물학적 활성 측정 방법.

#### 청구항 11

제1항에 있어서,

상기 디파이브로타이드의 생물학적 활성 측정 방법은,

pH 7 내지 8로 완충된 수용액인 반응 배지(reaction medium)에서 수행되는 것인, 디파이브로타이드의 생물학적 활성 측정 방법.

#### 청구항 12

제1항에 있어서,

35 내지 39℃로 온도가 유지되는 것인, 디파이브로타이드의 생물학적 활성 측정 방법.

#### 청구항 13

제1항에 있어서,

상기 플라스민 특이적 기질의 농도는,

0.3 내지 4 mM인 것인, 디파이브로타이드의 생물학적 활성 측정 방법.

#### 청구항 14

제1항에 있어서,

c) 표준 샘플과 테스트 샘플 모두의 효소 반응의 과정 동안, 상기 측정가능한 생성물의 유리 속도(rate of release)를 측정하는 단계; 및

d) 해당하는 디파이브로타이드 농도와 상기 유리 속도를 수학적으로 및/또는 그래프를 이용해서 상호 관련시켜, 디파이브로타이드의 테스트 샘플의 생물학적 활성을 구하는 단계;를 더 포함하는 것인, 디파이브로타이드의 생물학적 활성 측정 방법.

### 발명의 설명

### 기술 분야

본 발명은 디파이브로타이드의 생물학적 활성을 결정하는 방법에 관한 것이며, 더 구체적으로는 디파이브로타이드의 생물학적 활성을 결정하기 위한 간접적인 효소 방법에 관한 것이다.

[0001]

## 배경 기술

- [0002] 디파이브로타이드(Defibrotide, Merck Index, 1996, no. 2915)는 동물 기관(animal organs)으로부터 추출에 의하여 획득되는 천연기원의 물질로서 저분자량을 가지는 폴리데옥시리보뉴클레오티드(polydeoxyribonucleotides)의 sodium 염(sodium salt)으로 구성된다. 디파이브로타이드는 수많은 약학 조사의 주제가 되어 왔고, 약학 조사들은 디파이브로타이드가 항혈전제(anti-thrombotic agent)로서 치료에 적용될 수 있다고 제안해 왔다(U.S. Pat. No. 3,829,567).
- [0003] 추가로, 디파이브로타이드는 또한 말초 동맥질환(peripheral arteriopathies), 급성 신기능부전(acute renal insufficiency)(U.S. Pat. No. 4,694,134), 또는 급성 심근허혈증(acute myocardial ischaemia) (U.S. Pat. No. 4,693,995)의 치료에서 성공적으로 사용되어 왔다.
- [0004] 디파이브로타이드는 현재 정맥폐색증(venous occlusive disease, VOD)의 치료 및 예방을 위하여 사용되기 위하여 임상 시험 진행에 있다.
- [0005] 추출에 의하여 획득되는 다른 생물학적 물질과 같이, 디파이브로타이드 또한 전형적인 천연 바이오폴리머인 조성물의 제한된 변형성을 가진다.
- [0006] 이 상황의 전형적인 예시로서, 사슬 길이, 분자량, 조성물, 황화(sulphatation)의 정도 등과 관련된 batch-to-batch 변형을 가지는 헤파린의 경우가 잘 알려져 있다. 이러한 상황의 결과는, 디파이브로타이드의 동일 무게가 사실상 특이적 생물학적 활성의 측면에선 균등하지 않을 수 있다는 것이다.
- [0007] 추출, 분리 및 정제의 과정 그 자체는, 생산물의 완벽한 재생산을 보장할 수 없고, 이는 바로 고유한 바이오폴리머 본성 때문이다.
- [0008] 그러나, 잘 제어만 된다면, 이 변형성의 감소가 가능하고; 이를 위하여, 예를 들어 미국특허번호 제4,985,552호에 기재된 것과 같이, 기관(organs)으로부터의 추출을 통한 디파이브로타이드의 분리에 대한 표준화된 산업 프로세스를 만드는 연구가 있어 왔다.
- [0009] 상술한 프로세스에 따라 획득된 생산물은, 몇몇의 특정 이화학적 변수(physico-chemical parameter)들, 예를 들어 전기영동이동도(electrophoretic mobility), 흡광계수(coefficient of extinction), 선풍도(optical rotatory power), 및 평균-질량에 상대적인 분자량의 결정에 의하여 특징지어진다. 하지만, 이러한 파라미터들은 기본적으로 디파이브로타이드의 구조에 의존할 뿐, 그것의 생물학적 활성에 대한 정보를 제공하진 못한다.
- [0010] 지금까지 알려진 것처럼, 디파이브로타이드의 생물학적 활성을 평가하기 위하여 지금까지 사용되어 온 것으로 보고된 방법들은, 피브린 플레이트 테스트(fibrin plate test) 및 유우글로불린 라이시스 시간의 혈액응고검사 기록[Prino G., Mantovani M, Niada R., Coccheri S., Butti A., Indagini preliminari sull'attivita fibrinolitica, nell'animale e nell'uomo, di una nuova sostanza presente in diversi organi animali, Simposio Internazionale: La ricerca scientifica nell'industria farmaceutica in Italia, Rome, 2-4 Oct. 1975? II Farmaco, Ed. Prat.) (1969), 24,552-561]과 여기에 참조로서 포함된 미국특허번호 제7,338,777호에서 개시된 플라스민(plasmin)에 기초한 방법뿐이다.
- [0011] 그러나, 상기 언급된 유우글로불린 라이시스 시간의 혈액응고검사의 기록(thromboelastographic recording of the euglobulin lysis time)은 상당한 실험의 복잡성, 불만족스런 재생산성 및 불만족스런 정확성에 의하여 특징지어지고, 혈액응고검사의 특이적 케이스에선, 매우 제한적인 농도 범위에 제한된 반응 선형성에 의하여 특징지어진다.
- [0012] 상기 플라스민-기초 방법에 대해선, 플라스민의 효소 활성은 다양한 표준 인비트로(in vitro) 테스트에 의하여 정상적으로 결정된다. 가장 일반적으로 사용되는 방법들 중 하나는 적절한 기질(substrate) 상에서 플라스민의 활동에 의하여 자유로워진 색원체(chromogenic) 또는 형광원(fluorogenic) 물질의 분광측정법(spectrophotometry) 또는 형광측정법(fluorimetry)에 의하여 결정되는 것이다 [Haemostasis, (1978), 7, 138-145]. 화학식  $A_1-A_2-A_3-X$ 인 펩타이드 기질이 일반적으로 사용되며, 여기서  $A_1$ 과  $A_2$ 는 지배적으로 무극성이며,  $A_3$ 는 라이신(lysine) 또는 아르기닌(arginine)이고, X는 파라-니트로아닐린(para-nitroaniline, pNa) 또는 2-나프틸아민(2-naphthylamine, NA)과 같은 측정가능한 자유로운 복합체(measurable freed compound)를 대표한다.[Haemostasis, (1978), 7, 146-149]. 상기 언급된 펩타이드 기질에 추가하여, 다른 간단한 화합물, 예를 들어 p-니트로벤질-p-톨루엔설폰닐-L-아르기닌(p-nitrobenzyl-p-toluenesulphonyl-L-arginine)을 이용하여 성과

가 있었다[Haemostasis, (1978), 7, 105-108].

[0013] 상기 화합물 X가 배양 배지로 유리되는 속도는 샘플에 존재하는 플라스민의 활성 (Units/mg)에 비례한다. 미국 특허번호 제7,338,777호에 개시된 방법은 그러므로 상기 기재된 플라스민-평가 테스트에서 디파이브로타이드는 화합물 X의 유리 속도를 그 농도에 비례적으로 증가시키는 발견에 기초한다.

[0014] 그러나, 그러한 방법은 TRIS 버퍼에서 다른 어떤 혈장/혈청 활성화제(activator)/억제제(inhibitor) 없이 수행되었다. 그러므로, 상기 절차는 생리학적 상태를 반영하지 않고 인비보(in vivo)에서 디파이브로타이드의 활동 메카니즘을 정확히 시뮬레이션하지 않는다.

[0015] 그러므로, 지금까지, 진짜로 유효하고, 정확하고, 재생산적인 방법들이 정확한 방식으로 복잡한 생물학적 시스템(인 비보)에서 상기 생산물의 활동 메카니즘을 반영하는 디파이브로타이드의 생물학적 활성을 결정하기 위하여 설명되고 입증되지 않았다.

### 도면의 간단한 설명

[0016] 도 1은 디파이브로타이드으로 활성화 및 비-활성화되는 포유동물의 유우글로불린 분획(농도 0-50 g/ml, 0-100 min)에 의하여, 기질 S-2251로부터 pNA의 유리(release)의 키네틱(kinetics)을 보여주는 플롯이다.

도 2는 디파이브로타이드의 표준물질 및 테스트 샘플에 상대적으로 일어나는 S자형 곡선(sigmoid)을 도시하는 플롯이다.

도 3은 적절한 선형 범위(예: 30 내지 35분)를 나타내는 표준 제제(standard preparation)(예를 들어, SI\_Ca, SI\_Cb, SI\_Cc)의 "흡광 대비 시간(absorbance versus time)"을 도시하는 플롯이다.

### 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0017] 우리는 디파이브로타이드의 생물학적 활성의 단순하고 신뢰성있는 방법을 개발하였고, 이에 따라, 추출에 의하여 획득된 샘플을 제어할 수 있으며, 디파이브로타이드에 기초한 의료용 제제(medicinal preparations)를 표준화할 수 있다.

[0018] 본 발명의 방법은 높은 정도의 정밀성 및 정확성으로 참조 표준물질과의 비교로 디파이브로타이드의 특정 생물학적 활성이 측정될 수 있도록 하는 것에 대한 것이다.

[0019] 그러므로 본 발명은 디파이브로타이드의 샘플의 특정 생물학적 활성의 측정방법에 대한 것으로서, 상기 방법은 다음 단계들을 포함한다:

[0020] a) 디파이브로타이드와, 유우글로불린과, 플라스민의 반응을 통해 측정가능한 생산물을 제공하는 플라스민에 특이적인 기질을 접촉시키는 단계, 및

[0021] b) 연속해서 형성된 생성물의 양을 측정하는 단계.

[0022] 본 발명의 상기 방법은 디파이브로타이드의 활성 측정을 위한 간접적인 인비트로(in vitro) 방법으로, 디파이브로타이드 및 유우글로불린 사이의 기능적 상호작용에 기초한 것이다.

[0023] 유우글로불린은 증류수에는 불용성이고 식염수(saline solutions)에는 가용성인 혈청 글로불린 분획이다.

[0024] 유우글로불린은 피브리노겐, PAI-1, 조직 플라스미노겐 활성화제(tissue plasminogen activator, tPA), 플라스미노겐(plasminogen)을 포함하고, 더 작은 범위에서는, 알파 2-안티플라스민, 및 또한 팩터 VIII(factor VIII)을 포함한다.

[0025] 본 발명자들은 디파이브로타이드가 플라스미노겐을 플라스민으로 가수분해하는 것을 촉매한다는 놀라운 사실을 발견하였다. 결과적으로, 여기에서 참조로서 포함된 헤모스타시스(Haemostasis, (1978), 7, 138-149)에 개시된 것처럼 디파이브로타이드가 유우글로불린 및 화학식 A<sub>1</sub>-A<sub>2</sub>-A<sub>3</sub>-X인 펩타이드와 같은 플라스민에 특이적인 기질과 배양되었을 때, 상기 화합물 X의 배양 배지로의 유리 속도는 디파이브로타이드 그 자체의 농도에 비례적으로 증가한다.

[0026] 다시 말해, 디파이브로타이드는 유우글로불린에 포함된 플라스미노겐이 플라스민으로 가수분해되는 것을 촉매한다; 플라스민은 효소적으로 플라스민에 특이적 기질, 바람직하게 크로모게닉 기질(cromogenic substrate)과 반응하여 측정가능한 생산물을 제공한다.



- [0027] 본 발명의 방법은 다음 단계를 더 포함한다: c) 디파이브로타이드의 표준 샘플 및 테스트 샘플 모두에서 효소 반응의 과정 동안 상기 측정가능한 생산물의 유리 속도 결정단계; d) 상기 디파이브로타이드의 테스트 샘플의 생물학적 활성을 획득하기 위하여, 수학적 및/또는 그래픽적으로, 상기 유리 속도를 대응되는 디파이브로타이드 농도와 연관시키는 단계.
- [0028] 본 발명에 따라 상기 측정을 위하여 사용된 디파이브로타이드 샘플은 예를 들어 이미 언급되고 여기에 참조로써 통합된 미국특허번호 제4,985,552호에서 기재된 것처럼 일반적으로 알려진 절차에 따라 기관(organs)으로부터 추출에 의하여 준비된다.
- [0029] 보통 산업적으로 제조된 디파이브로타이드 배치(batch)는 참조 샘플(표준물질)로서 선택되고, 본 발명의 방법에 따라 교정 곡선(calibration curves)을 작성하는데 사용되었다.
- [0030] 일반적으로, 본 방법은 예를 들어, RNA, 헤파린, 분해된 디파이브로타이드 (퓨린이나 피리미딘이 제거된 디파이브로타이드), 또는 에탄올과 같은 오염물질의 존재에서 정밀하고 정확한 디파이브로타이드의 측정을 제공하고, 상기 오염물질은 상기 시스템을 손상시키지 않을 정도로 일반적으로 10 중량% 미만의 농도로 존재한다.
- [0031] 디파이브로타이드의 측정을 허용하는 것 뿐만 아니라, 상기 방법은 또한 디파이브로타이드로부터 유래된 생물학적으로 동일한 다른 물질의 측정을 가능하게 한다. 다른 생물학적 균등 물질의 예로서, 예컨대 탈아미노화된 디파이브로타이드(deaminated defibrotide), 또는 더욱 간단하게 이화학적 상태의 조합에 의하여 변질(denatured)/분해(degraded)된 디파이브로타이드가 있다.
- [0032] 본 방법은 2.5  $\mu\text{g/ml}$  (측정 시스템의 최종 농도) 이하의 디파이브로타이드의 농도를 검출할 정도로 감도가 충분하고, 일반적으로 1000  $\mu\text{g/ml}$  이상인 최대 농도 수치까지 우수한 상호관계를 나타낸다.
- [0033] 사용되는 유우글로불린은 일반적으로 어떤 포유동물의 유우글로불린 분획, 예를 들어 소(bovine), 돼지(porcine), 토끼(rabbit) 또는 인간 유우글로불린으로, 바람직하게는 인간 및 소의 유우글로불린이 바람직하다.
- [0034] 그러나, 비록 유우글로불린 분획이 바람직한 효소 시스템일지라도, 동등한 다른 효소 시스템, 예를 들어, 희석된 혈장 및 혈청(버퍼로 최고 1:10), 인공적으로 생성되거나 분리된 플라스미노젠, tPA, uPA, PAI-1&2 알파 2 안티플라스민 및 화학적 및 생물학적으로 관련되고 유사 기능성을 가지는 유사 효소 시스템의 조합이 본 발명의 범위에 포함된다.
- [0035] 본 발명의 방법에 있어서, 플라스민용 기질은 본 방법의 조건 하에서 검출가능한 가수분해 산물 X를 유리시키는, 플라스민에 특이적인 어떠한 기질인 것으로 이해될 수 있다.
- [0036] 검출가능한 작용기 X의 성질에 따라, 당업자에게 일반적으로 알려진 대안적인 검출 시스템이 또한 동일하게 적용될 수 있다. 분광 측정 또는 형광 측정 검출 시스템이 특히 유리하고, 특히 분광 광도 측정 시스템이 유리하다.
- [0037] 일반적으로 상기 기질은 플라스미노게-플라스민 분석(plasminoge-plasmin assay)에 특이적인 것이다. 화학식  $A_1-A_2-A_3-X$ 인 펩타이드를 이용하는 것이 바람직하고, 여기서  $A_1$  및  $A_2$ 는 주로 비극성인 아미노산이고,  $A_3$ 는 리신(lysine) 또는 아르기닌(arginine)이고, X는 검출가능한 기(group)이다. 이 기질의 예시는, Val-Leu-Lys-pNa, Val-Phe-Lys-pNa 또는 pyroGlu-Phe-Lys-pNa로, 여기서 분광 측정법에 의하여 측정가능한 X 기는 파라-니트로아닐린(para-nitroaniline, pNA)이다. 이와 다른 적절한 기질, 예를 들어, Val-Gly-Arg-2NA는, 2-나프틸라민을 함유하고, 이는 형광 측정법에 의하여 측정될 수 있다. 특히 바람직한 기질은 화합물 H-D-Val-Leu-Lys-pNA (H-D-Valyl-L-Leucyl-L-Lysine-p-nitroaniline)이다.
- [0038] 유우글로불린 분획에서 디파이브로타이드 활성 측정을 위하여 사용된 특정 기질은 일반적으로 상업용으로 구매 가능하다.
- [0039] 본 발명의 측정 방법은, 특정 pH와 물농도를 가진 유우글로불린 용액에 디파이브로타이드 샘플을 위치시킴으로써 수행된다.
- [0040] 특히, 포유동물 혈장으로부터 획득된 유우글로불린 분획은 상기 유우글로불린을 생성된 혈장의 원래 부피가 되도록 식염수 버퍼(saline buffer)로 용해 및 희석하여 재구성된다 (예: 10mL 혈장으로부터 획득된 유우글로불린 분획의 양을 pH 7 내지 8 사이에서 식염수 버퍼로 10mL가 되도록 용해 및 재구성한다).
- [0041] 그러나, 기질에 대해선, 일반적으로 0.3 내지 4mM 농도, 바람직하게 2.5 내지 3.5mM 농도, 더욱 바람직하게 3mM

농도가 색소생산 기질(chromogenic substrate)의 경우에 사용되고, 반면 0.05 내지 0.15mM의 농도가 형광발생 기질(fluorogenic substrate)의 경우에 사용된다.

- [0042] 본 발명의 측정방법은, 다른 효소 방법처럼, 배지(medium)의 pH에 민감하다.
- [0043] 사실상, 이 방법은 효소 시스템이 활성화되지 않는 극단적인 pH 값에서는 보통 적용될 수 없다.
- [0044] 또한, 측정을 수행하는 중에는 항상 매질의 pH가 변하지 않는 것이 바람직하고, 이에 따라, 유우글로불린 분획은 생물학적 테스트를 위하여 일반적으로 사용되는 것들로부터 선택된 버퍼 시스템으로 재구성된다. 적절한 버퍼 시스템은 예를 들어, 인산염 버퍼(phosphate buffer), 시트레이트 버퍼(citrate buffer) 또는 트리스(하이드록시메틸)아미노메탄 하이드로클로라이드 및 염화 나트륨 (tris(hydroxymethyl)aminomethane hydrochloride and sodium chloride, TRIS-NaCl) 버퍼이다. 상기 유우글로불린 분획의 재구성은 바람직하게 TRIS-NaCl로 수행된다.
- [0045] 본 발명에서 배지의 pH를 대략 7 내지 8의 범위에서, 바람직하게 7.4 내지 7.6의 범위에서 유지하는 것이 보통 바람직하다.
- [0046] 추가로, 버퍼 시스템의 농도는 10 내지 200mM의 범위에서, 바람직하게 약 50mM로 유지하는 것이 바람직하다. 특히, TRIS-NaCl에 대해선, 상기 농도가 TRIS의 경우 50mM이고 염화 나트륨의 경우 150mM가 되어야 한다.
- [0047] 디파이브로타이드 생물학적 활성의 측정을 위한 본 발명의 방법, 디파이브로타이드 샘플 용액은 직접 유우글로불린 분획으로 희석되고, 상기 색소생산(chromogenic) 또는 형광발생(fluorogenic) 기질이 첨가된다. 특히 상기 측정이 가능하도록 하기 위하여, 디파이브로타이드를 TRIS-NaCl 버퍼에 우선적으로 희석/용해시켜, 샘플 및 표준물질 두 가지의 모 저장 용액(mother stock solution)을 획득하는 것이 바람직하다. 상기 모 저장 용액으로부터, 샘플 및 표준물질이, 약 1 내지 1000  $\mu\text{g/mL}$ 의 디파이브로타이드인 분석 농도 범위가 될때까지 연속 희석(serial dilution)을 통해 유우글로불린 분획의 기질정 부피로 희석된다.
- [0048] 본 측정 방법의 중요한 파라미터는 온도이다. 전체 측정 시간 중 내내 동일한 온도가 유지되고, 모든 시료가 기준물질 곡선의 작성에 관해 측정되고 측정 단계 중 측정되는 것이 바람직하다. 이를 위해, 온도 제어 장치를 사용하는 것이 바람직하고, 또한, 필요한 경우, 시스템이 최대한의 열적 균일성을 갖는다는 사실을 보장하기 위해 시료의 위치를 적절히 바꾸면서 여러 개의 측정 세트로 진행할 수 있다.
- [0049] 일반적으로, 측정 단계는 예를 들어 25 내지 40 $^{\circ}\text{C}$ , 바람직하게 35 내지 39 $^{\circ}\text{C}$ , 더욱 바람직하게 37 $^{\circ}\text{C}$ 의 온도 범위에서 수행된다.
- [0050] 본 발명에 따라, 모든 시약이 추가되었을 때 디파이브로타이드의 활동에 의하여 배지로 유리된 화합물 X의 농도 측정이 시작되고, 미리 결정된 시간 동안 미리 결정된 주기로 X의 화학적 성질과 검출 시스템의 함수로 진행된다.
- [0051] 생물학적 측정의 다른 방법과 유사하게, 본 발명의 방법은 또한 교정 단계와 측정 단계를 제공하며, 이들은 실험적 변형성의 발생 가능성을 최대한 감소시키기 위하여 동일한 마이크로플레이트에서 실행되는 것이 바람직하다.
- [0052] 교정 단계는, 알고 있는 디파이브로타이드 (표준물질)의 증가 농도에서 시료에 관한 흡광도 데이터를 얻는 단계와, 이러한 데이터를 통계적으로 재처리하는 단계와, 본 발명의 효소 반응 속도의 증가와 유우글로불린 분획에 존재하는 디파이브로타이드의 농도 사이의 상호관계를 나타내는 검정 곡선의 외삽 단계를 포함한다. 측정 단계에서, 교정 단계에서 얻은 상호관계 때문에, 동일 조건에서 측정 및 처리된 흡광도 값을 기준으로 디파이브로타이드 시료의 미지의 생물학적 활성을 측정할 수 있다.
- [0053] 더욱 상세하게, 실험적인 프로토콜은 일반적으로 디파이브로타이드의 여러 알려진 농도에서, 표준과 미지(unknown) 모두의 여러 시료를 제공한다. 디파이브로타이드 샘플은 미리 결정된 희석 인자에 따라 모액(母液)의 점진적인 희석을 통해 제조된다.
- [0054] 본 방법에서, 표준 물질의 각 농도에 대해, 이와 유사하게 시험용 시료의 각 농도에 대해 (일반적으로 모액을 연속해서 1:2로 희석하기 위한), 적어도 4개의 복제물(replicate)을 제조해서, 적어도 5가지 농도의 표준물질과 5가지 농도의 시험용 시료를 제조하는 것이 바람직하다.
- [0055] 디파이브로타이드의 표준물질 및 테스트-샘플 농도 둘 다는 일반적으로 0.1 내지 1000  $\mu\text{g/ml}$ 이다.



- [0056] 상기 테스트 샘플의 농도는 표준물질의 농도와 크기 자리수가 같은 것이 바람직하다.
- [0057] 상기 설명에 따라, 각 농도에 대한 측정은 하나의 마이크로플레이트(microplate)에서 수행하는 것이 바람직한데, 각각의 시료인 표준물질과 시험용 시료 각각의 해당 농도에서의 위치는 바뀌는 것이 바람직하다. 시료의 배열에 대한 이번 계획(scheme)에 따라 (실험 파트에서 보다 상세하게 설명됨), 표준물질과 시험용 시료 디파이브로타이드 모두의 각 농도에 대해, 적어도 4개의 흡광도 값이 항상 측정된다.
- [0058] 앞에서 기술된 한 세트의 측정은 미리 결정된 시간, 즉 우선 다른 무엇보다 시간 ( $t_0$ ), 즉 본 발명의 효소 반응이 시작되기 전, 모든 성분이 첨가되었을 때 수행되고, 이어서 정확한 시간 간격으로, 필요한 데이터를 얻는데 충분한 시간 동안 수행된다.
- [0059] 흡광도 측정은 1 - 10분마다 측정값을 재면서 최대 90분까지 진행하는 것이 바람직하다. 더욱 효과적으로, 상기 측정은 매분 이루어진다. 광도 흡광 측정은 효소 가수분해 반응 경로에서 유리된 검출 가능한 작용기 X의 성질에 의존하는 과정에서 수행된다. X가 p-NA인 특정한 경우, 흡광도는 405nm에서 측정된다.
- [0060] 로우 데이터(raw data)로서 알려진 표준물질과 미지의 디파이브로타이드 샘플의 흡광 측정은 일반적으로 상기 측정 작업을 제공하는 동일한 기기로부터 직접적으로 유래된다; 그들은 흡광 수치가 각 시간 및 웰(well)에 대하여 표현되는 방식으로 통계된다.
- [0061] 상기 로우 데이터는 예를 들어 스프레드시트 마이크로소프트 엑셀(등록상표)을 사용해서 처리된다. 이러한 첫 번째 처리 작업은 매번 각각의 측정값 세트에서 평균 흡광도 및 관련 표준 편차를 계산하고, 각각의 측정값 세트는 표준물질과 시험용 시료 디파이브로타이드 모두의 각 농도에 대해 적어도 4개의 복제물을 포함한다.
- [0062] Finney D J(Finney D J, Statistical Method in Biological Assay, 2nd ed. Ch. Griffin, London and relevant Pharmacopoeias)에 기재된 것처럼 상기 데이터의 통계적 처리가 생물학적 분석 측정을 위하여 상업적으로 이용가능한 소프트웨어로 더 수행된다.
- [0063] 더욱 정확히 하기 위하여, 본 발명에 따라, 디파이브로타이드 생물학적 분석 측정은 예를 들어, 관련 유럽 약전 일반 텍스트 5.3, 통계 분석(the relevant European Pharmacopoeia General text 5.3, Statistical Analysis)에 의하여 정의된 것처럼 평행 라인 모델(parallel line model), 슬로프 레이션 모델(slope ration model), 및 네-변수 로지스틱 곡선 모델(four-parameter logistic curve model)을 이용하여 수행될 수 있다.
- [0064] 도 1에 도시된 바와 같이, 시간을 가로좌표(abscissa)에 두고 흡광도를 세로좌표(ordinate)에 둠으로써, "b"가 효소 반응 속도에 비례하는 직선이 얻어질 것이고, 디파이브로타이드의 농도를 증가시킴으로써, 가수분해 속도와, 이와 비례해서 "b"의 값이 증가할 것이다. 마지막으로, 표준물질인 디파이브로타이드와 시험용 시료인 디파이브로타이드 복제물의 각 세트에 대해 앞에서 기술한 바와 같이 계산된 기울기 값은 이 값이 관련된 디파이브로타이드 농도와 서로 관련되어 있다. 가로좌표의 적절한 수학적 변화(즉, 디파이브로타이드 농도의 로그)가 실제 수치 대신에 사용될 수 있다.
- [0065] 그래프에서, 이러한 상호 관계는 표준물질에 대한 S자형 곡선(sigmoid)과 시험용 시료에 대한 S자형 곡선을 나타낸다 (도 2); 이러한 S자형 곡선의 중심부에는 두 개의 직선이 있고, 이 직선은 일반적으로 서로 평행하고 이 사이의 거리는 시험용 시료와 표준물질과의 생물학적 활성 차의 함수이다. 이 간격은 Finney D J(Finney D J, Statistical Method in Biological Assay, 2nd ed. Ch. Griffin, London)에 의하여 기재된 평행 라인 모델을 이용하여 효능 측정(potency determination)을 위하여 사용된다.
- [0066] 좀더 특별한 측정을 위하여, 상기 네-변수 로지스틱스 곡선 모델(four-parameter logistic curve models)이 이용되고 이 경우 샘플 및 표준물질 양자의 전체 S자형 곡선이 상기 샘플의 상대적인 생물학적 효능의 계산을 위하여 사용된다.
- [0067] 본 발명의 바람직한 실시예에서, 상기 측정되는 디파이브로타이드의 표준 용액 및 샘플 용액이 마이크로플레이트의 각 웰로 도입된다. 유우글로불린 분획이 사용할 양만큼 준비되고 이는 디파이브로타이드 저장 용액(stock solution)의 희석 배지이다. 마지막으로 색소생산기질을 함유하는 용액이 첨가된다. 상기 마이크로플레이트는 온도조절된 리더(thermostated reader)에 위치시키고, 빠른 교반(agitation) 후에, 상기 시스템의 흡광도 리딩이 기설정된 간격에서, 기설정된 시간 동안 이루어진다. 상기 획득된 로우 데이터는 처리되어 상기 디파이브로타이드 샘플의 미확인 활성을 측정한다.
- [0068] 다음 예시로부터 평가될 것이지만, 본 발명에 따른 방법은 정의된 생물학적 활성을 가지는, 특히 디파이브로타

이드의 25 내지 35 IU/mg 의 활성을 가지는, 바람직하게 27.5 내지 32.5IU/mg 의 활성, 더욱 바람직하게 28 내지 32IU/mg 의 활성을 가지는, 액체 디파이브로타이드 제형, 바람직하게 수용액을 획득하도록 한다.

[0069] 액체 디파이브로타이드 제형은 사용되기 전 희석되기 위하여 2.5ml의 버퍼 수용액(바람직하게 pH6.5 내지 8.5, 더욱 바람직하게 pH7 내지 8에서)에서 200 mg의 디파이브로타이드를 함유하는 바람직하게 용기의 형태로, 더욱 바람직하게 바이알(vial)의 형태로 판매되고; 결과적으로 상기 생물학적 활성은 본 발명의 방법으로 측정되고, 각 용기는 5000 내지 7000 IU의 디파이브로타이드 활성, 바람직하게 5500 내지 6500 IU, 더욱 바람직하게 5600 내지 6400 IU의 디파이브로타이드 활성을 나타낸다.

[0070] 본 발명의 상기 및 다른 측면이 다음 실시예에서 더욱 잘 기재될 것이나 이는 본 발명을 제한하지 않는다.

## [0072] 실시예

[0073] 아래 제시된 실시 예에서 다음이 사용되었다:

## [0074] 장치

주요 특징:	자동온도 조절 챔버(thermostatic chamber)와 405 nm 에서 흡광 필터(absorbance filter)를 구비한 UV-Vis 흡광 측정용 마이크로플레이트 리더		
검출	405nm 에서 키네틱 흡광 측정		
플레이트 타입	UV-Vis 측정용 96-웰 클리어 (96-well clear)		
챔버온도	37°C	총 흡광 레코딩 시간	45-60 min
흡광 레코딩 주기	About 1 x min		

[0075]

## [0077] 프로그램 & 소프트웨어

[0078] o 마이크로소프트 엑셀® (Microsoft Corporation, Redmond, Wash., USA)

## [0080] 물질

[0081] o 디파이브로타이드 (Gentium)

[0082] o 색소 생성 기질(Chromogenic substrate) S-2251 (Chromogenix Instrumentation Laboratory S.p.A., Milan, Italy)

[0083] o 트리스(하이드록시메틸)아미노메탄 (TRIS)-NaCl, (Sigma-Aldrich, Milan, Italy)

[0084] o 1N HCl (Carlo Erba reagenti, Milan, Italy)

[0085] o 1N NaOH (Carlo Erba reagenti, Milan, Italy)

[0086] o 소 혈장(Bovine Plasma) (Tebu Bio Italia, Magenta (MI), Italy)

[0087] o 빙초산(Glacial Acetic Acid) (Carlo Erba reagenti, Milan, Italy)

## [0089] 용액

[0090] o TRIS-NaCl (1 L 준비): 1 L 비커 안에 정량적으로 6.06 g의 TRIS-HCl 및 2.2 g의 NaCl을 옮기고, 약 40mL의 HCl 1N로 pH 7.4까지 조정한다. 정량적으로 상기 용액을 1L의 메스 플라스크(volumetric flask)로 옮기고 상기

용액을 정제수로 부피까지 희석시킨다. 상기 용액을 냉장고에서 보관한다(2-8℃).

[0091] o 색소발생기질 S2251 (CAS 63589-93-5) 3 mM (15.2 mL 준비): 약 25 mg의 색소발생 기질을 15.2 mL의 정제수로 용해시킨다. 상기 용액을 냉장고에서 보관한다(2-8℃).

[0092] o 소 유우글로불린 (10 mL 준비). 최소 용량 300 mL의 용기에 240 mL의 아이스-냉각된 정제수를 도입하고, 교반 하에서 10 mL 소 혈장을 첨가한다. 아세트산 1%로 pH 5.3 ± 0.1 로 조정한다. 1 내지 16시간 동안 2-8℃에서 정착하도록 한다. 사이포닝(siphoning)으로 상기 맑은 상등액(supernatant solution)을 제거하고 4℃, 5분 동안 2,800 rpm에서 원심분리로 상기 침전물을 수거한다. 상기 침전물을 5mL의 얼음-냉각된 정제수로 기계적으로 분산되도록 하고(예: 실험실 글래스 로드(glass rod)를 이용하여), 약 5분 동안 흔들고 4℃, 5분동안 2,800 rpm에서 원심분리로 상기 침전물을 수거한다. 상기 침전물을 기계적으로 약 10 mL의 TRIS-NaCl로 분산시키고; 상기 침전물의 용해를 용이하게 하기 위하여, 상기 침전물의 입자를 적절한 도구(예: 실험실 글래스 로드)로 크러쉬한다. 상기 획득된 현탁은 사용되기 전에 2-8℃에서 1시간 미만 동안, 6시간 초과하지 않고 보관한다.

#### [0094] 표준 및 샘플 디파이브로타이드 용액

##### [0095] 참조 저장 용액(Reference Stock solution)

[0096] 20 mL 메스 플라스크로 정확히 계량된 약 100 mg 의 디파이브로타이드 참조 표준물질을 정량적으로 옮긴다. 상기 분말을 약 10 mL TRIS- NaCl로 용해시키고 상기 부피를 동일 용매로 가져온다. 상기 획득 용액을 TRIS-NaCl로 1:4로 희석시켜 약 1.25 mg/mL의 디파이브로타이드 RS 용액을 획득한다.

##### [0098] 샘플 저장 용액(Sample Stock solution)

[0099] 20 mL 메스 플라스크로 정확히 계량된 약 100 mg 의 디파이브로타이드 샘플을 정량적으로 옮긴다. 상기 분말을 약 10 mL TRIS- NaCl로 용해시키고 상기 부피를 동일 용매로 가져온다. 상기 획득 용액을 TRIS-NaCl로 1:4로 희석시켜 약 1.25 mg/mL의 디파이브로타이드 샘플 용액을 획득한다.

##### [0101] 참조 및 샘플 용액 준비

[0102] a) 디파이브로타이드 125 ug/mL: 디파이브로타이드 저장 용액(참조 및 샘플)을 (상기 플레이트 웰로 50 ug/mL에 대응하는) TRIS NaCl로 1:10으로 희석시킨다. 이펜도르프 튜브(eppendorf tube)로 상기 준비된 용액의 500 μL을 정량적으로 이송시키고 500 μL의 유우글로불린과 혼합시킨다. 상기 튜브를 밀폐하여 얼음-냉각 수에서 저장한다.

[0103] b) 디파이브로타이드 62.5 ug/mL: 용액(a)를 (상기 플레이트 웰로 25 ug/mL에 대응하는) TRIS NaCl로 1:2로 희석시킨다. 이펜도르프 튜브(eppendorf tube)로 상기 준비된 용액의 500 μL을 정량적으로 이송시키고 500 μL의 유우글로불린과 혼합시킨다. 상기 튜브를 밀폐하여 얼음-냉각 수에서 저장한다.

[0104] c) 디파이브로타이드 31.25 ug mL: 용액(b)를 (상기 플레이트 웰로 12.5 ug/mL에 대응하는) TRIS NaCl로 1:2로 희석시킨다. 이펜도르프 튜브(eppendorf tube)로 상기 준비된 용액의 500 μL을 정량적으로 이송시키고 500 μL의 유우글로불린과 혼합시킨다. 상기 튜브를 밀폐하여 얼음-냉각 수에서 저장한다.

[0105] d) 디파이브로타이드 12.5 ug/mL: 용액(d)를 (상기 플레이트 웰로 5 ug/mL에 대응하는) TRIS NaCl로 1:2.5로 희석시킨다. 이펜도르프 튜브(eppendorf tube)로 상기 준비된 용액의 500 μL을 정량적으로 이송시키고 500 μL의 유우글로불린과 혼합시킨다. 상기 튜브를 밀폐하여 얼음-냉각 수에서 저장한다.

##### [0107] 바탕용액(Blank solution)

[0108] 1 부피의 유우글로불린과 1 부피의 TRIS NaCl 용액(예: 500 μL + 500 μL)을 혼합한다.

#### [0110] 플레이트 침적(Plate Deposition)

[0111] 상기 제안 침적 계획 (하기 표 1에서 확인)에 따라 상기 플레이트의 각 웰에 200  $\mu$ L의 표준물질 또는 샘플 또는 바탕 용액을 첨가한다. 상이한 침적 계획이 자동 피펫의 이용 가능성 및 배열에 따라 사용될 수 있음에 주의한다. 그러나 각 참조 및 샘플 용액의 경우 적어도 4 침적이 상기 분석을 위하여 사용되어야만 한다.

[0112] 상기 마이크로플레이트 리더 내의 상기 플레이트의 배양 전에 즉시 각 웰에 50  $\mu$ L의 색소 발생 기질을 첨가한다.

[0114] [표 1]

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	-	BLK	S1_Ca	S1_Cb	S1_Cc	S1_Cd	-	-	-	-	-	-
B	-	BLK	S2_Ca	S2_Cb	S2_Cc	S2_Cd	-	-	-	-	-	-
C	-	BLK	S3_Ca	S3_Cb	S3_Cc	S3_Cd	-	-	-	-	-	-
D	-	BLK	S4_Ca	S4_Cb	S4_Cc	S4_Cd	-	-	-	-	-	-
E	-	BLK	U1_Ca	U1_Cb	U1_Cc	U1_Cd	-	-	-	-	-	-
F	-	BLK	U2_Ca	U2_Cb	U2_Cc	U2_Cd	-	-	-	-	-	-
G	-	BLK	U3_Ca	U3_Cb	U3_Cc	U3_Cd	-	-	-	-	-	-
H	-	BLK	U4_Ca	U4_Cb	U4_Cc	U4_Cd	-	-	-	-	-	-

[0115]

[0116] S1, S2, S3, S4: 참조 용액 침전(Reference Solution deposition) 1, 참조 용액 침전 2, 참조 용액 침전 3, 참조 용액 침전 4

[0117] U1, U2, U2, U5: 샘플 용액 침전(Sample solution deposition) 1, 샘플 용액 침전 2, 샘플 용액 침전 3, 샘플 용액 침전 4,

[0118] Ca, Cb, Cc 등.: 디파이브로타이드 참조 및 샘플 농도 a, b, c 등.

[0119] BLK Blank solution

## [0121] 계산 및 결과

[0122] 키네틱 플롯으로부터 상기 표준 체제(예: S1\_Ca, S1\_Cb, S1\_Cc)의 "흡광 대 시간"은 적절한 선형 범위를 확인한다(예: 30분 내지 35분, 도 3 참조).

[0123] 상기 선형 키네틱 범위의 식별(A@405 nm vs time).

[0124] 다음과 같이 기-정의된 시간에서 상기 분석의 반응(Slope)을 상기 표준물질 및 샘플의 각 준비의 경우에 계산한다.

$$\text{샘플 \& 표준물질 반응} = \frac{A_b - A_a}{T_b - T_a} \times 1000$$

[0126] 여기에서:

[0127] Aa는 시간 Ta(상기 플롯으로부터 30분)에서의 흡광 수치

[0128] Ab는 시간 Tb(상기 플롯으로부터 35분)에서의 흡광 수치

[0130] 표 2에서 기록한 바와 같이 표형식으로 상기 획득 수치를 기록한다.

[0131] [표 2]

	Standard Preparation				Sample Preparation			
Concentration Level [ug/mL]	S1	S2	S3	S4	U1	U2	U3	U4
5	S1_Cd	S2_Cd	S3_Cd	S4_Cd	U1_Cd	U2_Cd	U3_Cd	U4_Cd
12,5	S1_Cc	S2_Cc	S3_Cc	S4_Cc	U1_Cc	U2_Cc	U3_Cc	U4_Cc
25	S1_Cb	S2_Cb	S3_Cb	S4_Cb	U1_Cb	U2_Cb	U3_Cb	U4_Cb
50	S1_Ca	S2_Ca	S3_Ca	S4_Ca	U1_Ca	U2_Ca	U3_Ca	U4_Ca

[0132]

[0133] 시험되는 물질의 경우 및 상기 농도의 로그에 대한 표준물질의 경우의 반응을 플롯하고 Ph. Eur Current edition의 5.3.2 챕터 관련부분에서 정의된 것과 같이 평행 라인 모델을 이용하여 시험되는 물질의 활성을 계산한다.

[0134] 참조 및 샘플의 적어도 3 연이은 시리얼 희석이 사용되어야만 한다(예. 디파이브로타이드 농도 5 µg/mL, 12.5g/mL, 25 µg/mL, 50 µg/mL, 또는 5 µg/mL, 12.5g/mL, 25 µg/mL, 또는 12.5g/mL, 25 µg/mL, 50 µg/mL)

[0136] 변화의 분석

[0137] 변화 분석은 Ph. Eur. current edition의 섹션 5.3.2.3 및 Finney DJ (Finney DJ (1964) Statistical Method in Biological Assay 2<sup>nd</sup> ed)에 따라 수행된다.

[0139] 유효성 테스트

[0140] 1) 상기 선형 회귀 구간(linear regression terms)이 중요하고, 즉 상기 계산된 개연성은 0.05 미만이다. 만약 이 기준이 맞춰지지 않으면, 95% C.I 를 계산하는 것은 불가능하다.

[0141] 2) 비-유사성의 구간은 중요하지 않고, 즉, 상기 계산된 개연성은 0.05미만이다.

[0142] 3) 비선형 구간은 중요하지 않고, 즉, 상기 계산된 개연성은 0.05미만이다.

[0144] 허용기준

[0145] 4) 상기 추정된 효능(estimated potency)은 상기 정해진 효능(stated potency)의 90% 미만이 아니고 111% 이상이 아니다.

[0146] 5) 상기 추정된 효능의 신뢰 한계(P=0.95)는 상기 정해진 효능의 80% 미만이 아니고 125% 이상이 아니다.

[0148] 계산

[0149] 샘플 효능(UI/mg) = 
$$\frac{R \times \text{Std Potency (UI/mg)} \times \text{Conc. Std (mg/mL)}}{\text{Conc. Sample (mg/mL)}}$$

[0150] 여기에서:

[0151] R: 상기 평행 선형 모델 분석에 의하여 획득된 샘플 결과

[0152] Std Potency: 상기 표준물질의 정해진 효능 (건조 물질에 대한 UI/mg)

[0153] Conc. Std: 상기 표준물질의 농도 (건조 물질에 대한 mg/mL)



[0154] Cone. Sample: 상기 샘플의 농도(건조 물질에 대한 mg/mL)

[0156] 디파이프로타이드 제형에 적용된 분석

[0157] 상기-개시된 분석은 2.5 ml에서 200 mg의 디파이프로타이드(ml 당 80 mg)을 포함하는 액체 제형의 생물학적 활성을 측정하는데 사용되고 표 3에서 정성-정량적 조성물(quali-quantitative composition)이 개시되어 있다.

[0158] [표 3]

Component	Reference to Standard Quality	Function	200 mg Injection	Concentration per mL
Defibrotide	In-house standard	Drug Substance	200.00 mg	80.00 mg
Sodium Citrate, Dihydrate	USP - EP	Buffer	25.00 mg	10.00 mg
Water-for-injection	USP - EP	Solvent/vehicle	q.s. to 2.5 mL	1.00 mL
Sodium hydroxide 1M or hydrochloric acid 1M	NF - EP	pH adjustment	q.s. to 6.8-7.8	-
Nitrogen	NF - EP	Inert gas to displace the air	q.s.	-

[0159]

[0160] 결과는 표 4에서 보고된다.

[0161] [표 4]

Batch	Potency IU/mg	Potency IU/container of 200 mg
688	31	6200
738	34	6800
785	32	6400
836	30	6000
0406	31	6200
DS0617	35	7000
DV0502*	*	Not available
DV0601	35	7000
1070010073	32	6400
1080010016	32	6400
1080020018	31	6200
1080030021	31	6200
1080040110	32	6400
1080050114	35	7000
1080060117	34	6800
Mean	33	
Min	30	
Max	35	
RSD (%)	5.4	

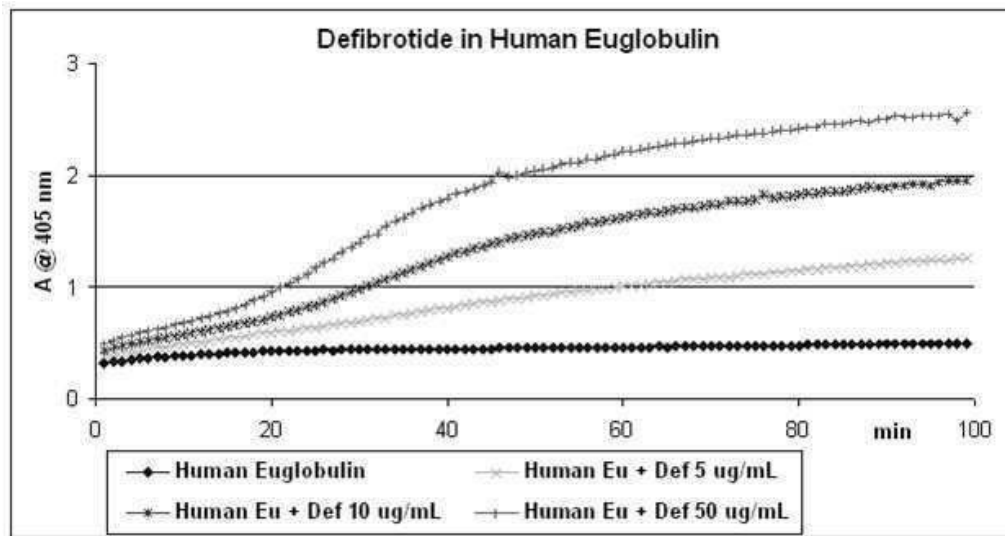
[0162]

[0163] \* 참조 표준으로서 사용됨

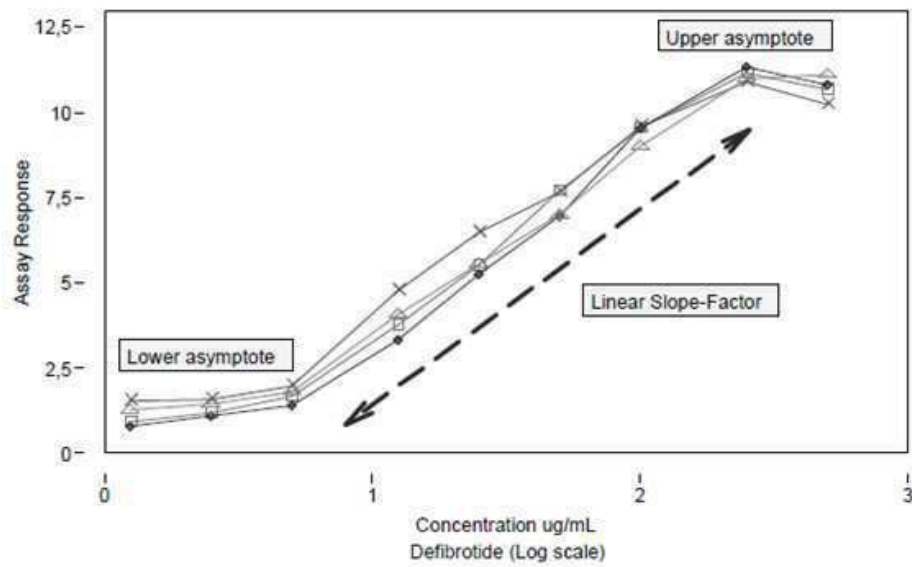


도면

도면1



도면2



도면3

