



**(19) 대한민국특허청(KR)**  
**(12) 공개특허공보(A)**

(11) 공개번호 10-2013-0079398  
 (43) 공개일자 2013년07월10일

- |  |   |
|--|---|
| (51) 국제특허분류(Int. Cl.)<br>A01N 35/02 (2006.01) A01N 43/24 (2006.01)<br>A01P 1/00 (2006.01)<br>(21) 출원번호 10-2012-7030049<br>(22) 출원일자(국제) 2011년05월06일<br>심사청구일자 없음<br>(85) 번역문제출일자 2012년11월16일<br>(86) 국제출원번호 PCT/IB2011/001394<br>(87) 국제공개번호 WO 2011/138682<br>국제공개일자 2011년11월10일<br>(30) 우선권주장<br>61/395,117 2010년05월06일 미국(US) | (71) 출원인<br>노파르티스 아게<br>스위스 체하-4056 바젤 리히트스트라제 35<br>(72) 발명자<br>그레거센 옌스 페터<br>독일 35041 마부르크 에밀-본-베링-스트라제 76<br>노파르티스 백신스 & 디아그노스틱스 지엠비에이치<br>그룬드만 토마스<br>독일 12055 베를린 란스트라제 34<br>(74) 대리인<br>송봉식, 정삼영 |
|--|---|

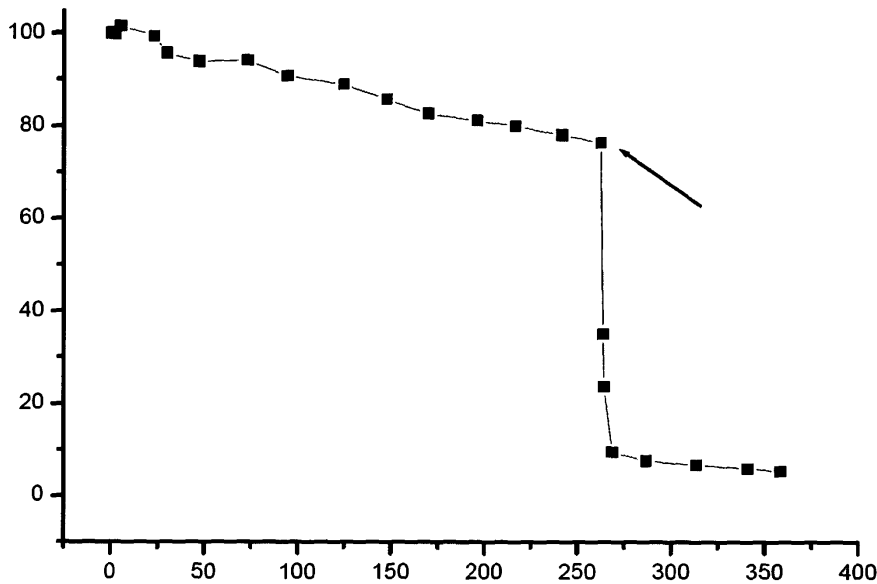
전체 청구항 수 : 총 38 항

(54) 발명의 명칭 **미생물 불활성화를 위한 유기 과산화 화합물**

**(57) 요약**

다기능성 유기 과산화물은 미생물학적 불활성화제로서 및/또는 핵산의 분해를 위해 사용된다. 이것들은 적어도 하나의 탄소 원자 및 적어도 두 개의 유기 과산화물 기를 포함한다. 불활성화제는 이상적으로 히드로과산화물이다. 본 발명은 바이러스성 백신의 제조 중에 특히 유용하다.

**대표도**



## 특허청구의 범위

### 청구항 1

미생물-함유 샘플을 처리하거나, 미생물 함유할 가능성이 있는 샘플을 처리하는 공정으로서, 샘플을 다기능성 유기 과산화물에 접촉시키는 단계를 포함하는 공정.

### 청구항 2

핵산을 함유하는 샘플을 처리하는 공정으로서, 핵산을 분해하기 위해 샘플을 다기능성 유기 과산화물에 접촉시키는 단계를 포함하는 공정.

### 청구항 3

약학적 조성물을 제조하는 방법으로서, (i) 미생물을 불활성화시키기 위해 미생물-함유 샘플을 다기능성 유기 과산화물에 접촉하는 단계, (ii) 단계 (i)의 생성물로부터 약학적 조성물을 제조하는 단계를 포함하는 방법.

### 청구항 4

다기능성 유기 과산화물의 수용액으로서, 다기능성 유기 과산화물은 (a) 1 중량% 미만 또는 (b) 5-70 중량% 사이의 농도로 존재하는 다기능성 유기 과산화물의 수용액.

### 청구항 5

(i) 불활성화된 미생물 및 (ii) 1 중량% 미만의 다기능성 유기 과산화물을 포함하는 수성 조성물.

### 청구항 6

미생물 및 다기능성 유기 과산화물의 반응 생성물을 포함하는 수성 조성물.

### 청구항 7

제 1항에 있어서, 샘플은 용기의 표면 또는 작업실의 표면인 것을 특징으로 하는 처리 공정.

### 청구항 8

제 1항 또는 제 3항에 있어서, 미생물-함유 샘플은 또한 용액에 핵산을 포함하는 것을 특징으로 하는 처리 공정 또는 제조 방법.

### 청구항 9

제 2항 또는 제 8항, 또는 제 8항에 있어서, 샘플은 세포 배양액으로부터 얻고 핵산은 세포 배양액의 세포 DNA 인 것을 특징으로 하는 처리 공정 또는 제조 방법.

### 청구항 10

제 1항 내지 제 9항 중에 어느 한 항에 있어서, 샘플은 바이러스를 함유하는 것을 특징으로 하는 공정, 방법, 용액 또는 조성물.

### 청구항 11

제 10항에 있어서, 샘플은 외피가 없는 DNA 바이러스를 함유하는 것을 특징으로 하는 공정, 방법, 용액 또는 조성물.

### 청구항 12

제 1항 내지 제 11항 중에 어느 한 항에 있어서, 다기능성 유기 과산화물은 -O-O-H 기를 포함하는 것을 특징으로 하는 공정, 방법, 용액 또는 조성물.

### 청구항 13

제 1항 내지 제 12항 중에 어느 한 항에 있어서, 다기능성 유기 과산화물은 같은 자리 과산화물인 것을 특징으로 하는 공정, 방법, 용액 또는 조성물.

**청구항 14**

제 1항 내지 제 13항 중에 어느 한 항에 있어서, 다기능성 유기 과산화물은 두 개, 세 개 또는 네 개의 과산화물 기를 갖는 것을 특징으로 하는 공정, 방법, 용액 또는 조성물.

**청구항 15**

제 1항 내지 제 14항 중에 어느 한 항에 있어서, 다기능성 유기 과산화물은 같은 자리 비스히드로과산화물인 것을 특징으로 하는 공정, 방법, 용액 또는 조성물.

**청구항 16**

제 1항 내지 제 15항 중에 어느 한 항에 있어서, 다기능성 유기 과산화물은 호모이기능성인 것을 특징으로 하는 공정, 방법, 용액 또는 조성물.

**청구항 17**

제 1항 내지 제 16항 중에 어느 한 항에 있어서, 다기능성 유기 과산화물은 수용성인 것을 특징으로 하는 공정, 방법, 용액 또는 조성물.

**청구항 18**

제 1항 내지 제 17항 중에 어느 한 항에 있어서, 다기능성 유기 과산화물은 할로젠이 없는 것을 특징으로 하는 공정, 방법, 용액 또는 조성물.

**청구항 19**

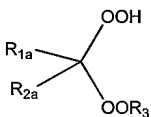
제 1항 내지 제 18항 중에 어느 한 항에 있어서, 다기능성 유기 과산화물은 탄소, 수소 및 산소만으로 구성되는 것을 특징으로 하는 공정, 방법, 용액 또는 조성물.

**청구항 20**

제 1항 내지 제 19항 중에 어느 한 항에 있어서, 다기능성 유기 과산화물은 300 미만의 분자량을 갖는 것을 특징으로 하는 공정, 방법, 용액 또는 조성물.

**청구항 21**

제 1항 내지 제 20항 중에 어느 한 항에 있어서, 다기능성 유기 과산화물은 화학식 I



을 갖고:

R<sub>1a</sub>는 H, C<sub>1-6</sub>알킬, C<sub>2-6</sub>알케닐, C<sub>1-6</sub>알키닐, C<sub>1-6</sub>-알콕시, C<sub>2-6</sub>-알케닐옥시, C(O)H, C(O)C<sub>1-6</sub>알킬, C(O)OC<sub>1-6</sub>알킬, 선택적으로 엔-일 또는 엔-이 C<sub>1-6</sub>알킬화 아미노, 선택적으로 엔-일 또는 엔-이 C<sub>1-6</sub>알킬화 아미노카르보닐, S(O)<sub>0-2</sub>C<sub>1-6</sub>알킬, 헤테로시클로알킬, 아릴 또는 헤테로아릴이고;

R<sub>2a</sub>는 H, C<sub>1-6</sub>알킬, C<sub>2-6</sub>알케닐, C<sub>1-6</sub>알키닐, C<sub>1-6</sub>-알콕시, C<sub>2-6</sub>-알케닐옥시, C(O)H, C(O)C<sub>1-6</sub>알킬, C(O)OC<sub>1-6</sub>알킬, 선택적으로 엔-일 또는 엔-이 C<sub>1-6</sub>알킬화 아미노, 선택적으로 엔-일 또는 엔-이 C<sub>1-6</sub>알킬화 아미노카르보닐, S(O)<sub>0-2</sub>C<sub>1-6</sub>알킬, 헤테로시클로알킬, 아릴 또는 헤테로아릴, -(CR<sub>4</sub>R<sub>5</sub>)<sub>n</sub>CR<sub>6</sub>(OOH)<sub>2</sub>이거나, R<sub>2a</sub>는 R<sub>2b</sub>와 L에 의해 결합되고;

R<sub>3</sub>는 H 또는 C(OOH)R<sub>1b</sub>R<sub>2b</sub>이고,

R<sub>1b</sub>는 H, C<sub>1-6</sub>알킬, C<sub>2-6</sub>알케닐, C<sub>1-6</sub>알키닐, C<sub>1-6</sub>-알콕시, C<sub>2-6</sub>-알케닐옥시, C(O)H, C(O)C<sub>1-6</sub>알킬, C(O)OC<sub>1-6</sub>알킬, 선택적으로 엔-일 또는 엔-이 C<sub>1-6</sub>알킬화 아미노, 선택적으로 엔-일 또는 엔-이 아미노카르보닐, S(O)<sub>0-2</sub>C<sub>1-6</sub>알킬, 헤테로시클로알킬, 아릴 또는 헤테로아릴이고,

R<sub>2b</sub>는 H, C<sub>1-6</sub>알킬, C<sub>2-6</sub>알케닐, C<sub>1-6</sub>알키닐, C<sub>1-6</sub>-알콕시, C<sub>2-6</sub>-알케닐옥시, C(O)H, C(O)C<sub>1-6</sub>알킬, 선택적으로 엔-일 또는 엔-이 C<sub>1-6</sub>알킬화 아미노, 선택적으로 엔-일 또는 엔-이 C<sub>1-6</sub>알킬화 아미노카르보닐, S(O)<sub>0-2</sub>C<sub>1-6</sub>알킬, 헤테로시클로알킬, 아릴 또는 헤테로아릴이거나, R<sub>2b</sub>는 R<sub>2a</sub>와 L에 의해 결합되고;

R<sub>4</sub>는, 각각의 발생에서, H 또는 C<sub>1-3</sub> 알킬, 히드록실, 시아노, 니트로, C<sub>2-4</sub>-알케닐, C<sub>1-3</sub>-알콕시, C<sub>2-4</sub>-알케닐옥시, C<sub>1-3</sub>-알킬카르보닐, 카르복시, C<sub>1-6</sub>-알콕시카르보닐, 선택적으로 엔-일 또는 엔-이 C<sub>1-3</sub>알킬화 아미노카르보닐, C<sub>1-3</sub>-티오알킬, C<sub>1-3</sub>-알킬설피닐, C<sub>1-3</sub>-알킬설포닐, C<sub>1-3</sub>-알킬아미노설포닐 및 디-C<sub>1-3</sub>-알킬아미노설포닐로부터 선택되고;

R<sub>5</sub>는, 각각의 발생에서, H 또는 C<sub>1-3</sub> 알킬, 히드록실, 시아노, 니트로, C<sub>2-4</sub>-알케닐, C<sub>1-3</sub>-알콕시, C<sub>2-4</sub>-알케닐옥시, C<sub>1-3</sub>-알킬카르보닐, 카르복시, C<sub>1-6</sub>-알콕시카르보닐, 선택적으로 엔-일 또는 엔-이 C<sub>1-3</sub>알킬화 아미노카르보닐, C<sub>1-3</sub>-티오알킬, C<sub>1-3</sub>-알킬설피닐, C<sub>1-3</sub>-알킬설포닐, C<sub>1-3</sub>-알킬아미노설포닐 및 디-C<sub>1-3</sub>-알킬아미노설포닐로부터 선택되고;

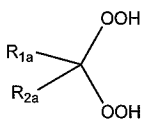
L은 C<sub>1-8</sub>알킬렌이고;

R<sub>6</sub>은 H, C<sub>1-6</sub>알킬, C<sub>2-6</sub>알케닐, C<sub>1-6</sub>알키닐, C<sub>1-6</sub>-알콕시, C<sub>2-6</sub>-알케닐옥시, C(O)H, C(O)C<sub>1-6</sub>알킬, 선택적으로 엔-일 또는 엔-이 C<sub>1-6</sub>알킬화 아미노, 선택적으로 엔-일 또는 엔-이 아미노카르보닐, S(O)<sub>0-2</sub>C<sub>1-6</sub>알킬, 헤테로시클로알킬, 아릴 또는 헤테로아릴;

n은 8인 것을 특징으로 하는 공정, 방법, 용액 또는 조성물.

**청구항 22**

제 21항에 있어서, 다기능성 유기 과산화물은 화학식 II



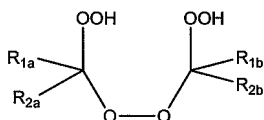
을 갖는 것을 특징으로 하는 공정, 방법, 용액 또는 조성물.

**청구항 23**

제 22항에 있어서, R<sub>1a</sub>는 H 또는 CH<sub>3</sub>이고; 및 R<sub>2a</sub>는 CH<sub>3</sub>, Et, 또는 n-Pr인 것을 특징으로 하는 공정, 방법, 용액 또는 조성물.

**청구항 24**

제 21항에 있어서, 다기능성 유기 과산화물은 화학식 III



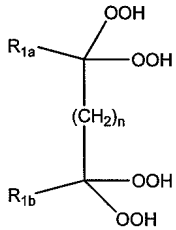
을 갖는 것을 특징으로 하는 공정, 방법, 용액 또는 조성물.

**청구항 25**

제 24항에 있어서, R<sub>1a</sub>는 H 또는 CH<sub>3</sub>이고; R<sub>2a</sub>는 CH<sub>3</sub>, Et, 또는 n-Pr이거나, R<sub>2a</sub>는 L에 의해 R<sub>2b</sub>와 결합되고; R<sub>1b</sub>는 H 또는 CH<sub>3</sub>이고; R<sub>2b</sub>는 CH<sub>3</sub>, Et, n-Pr이거나, R<sub>2b</sub>는 L에 의해 R<sub>2a</sub>와 결합되고; L은 -(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>-인 것을 특징으로 하는 공정, 방법, 용액 또는 조성물.

**청구항 26**

제 21항에 있어서, 다기능성 유기 과산화물은 화학식 IV



을 갖는 것을 특징으로 하는 공정, 방법, 용액 또는 조성물.

**청구항 27**

제 26항에 있어서, R<sub>1a</sub>는 H이고; R<sub>1b</sub>는 H이고; n은 3인 것을 특징으로 하는 공정, 방법, 용액 또는 조성물.

**청구항 28**

제 17항 내지 제 23항 중에 어느 한 항에 있어서,

R<sub>1a</sub> 및 R<sub>2a</sub>는 동일하고; 및/또는

R<sub>1a</sub> 및 R<sub>2b</sub>는 동일하고; 및/또는

R<sub>2a</sub> 및 R<sub>2b</sub>는 동일한 것을 특징으로 하는 공정, 방법, 용액 또는 조성물.

**청구항 29**

제 21항 내지 제 28항 중에 어느 한 항에 있어서,

R<sub>1a</sub>는 H 또는 C<sub>1-6</sub>알킬 또는 C<sub>1-4</sub>알킬이고; 및/또는

R<sub>2a</sub>는 H 또는 C<sub>1-4</sub>알킬 또는 -(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>CH(OOH)<sub>2</sub>이거나 L에 의해 R<sub>2b</sub>와 결합되고; 및/또는

R<sub>1b</sub>는 H 또는 C<sub>1-4</sub>알킬이고; 및/또는

R<sub>2b</sub>는 C<sub>1-4</sub>알킬이거나 L에 의해 R<sub>2a</sub>와 결합한다. 따라서 R<sub>2b</sub>는 CH<sub>3</sub>, Et, 또는 n-Pr일 수 있고; 및/또는

각각의 R<sub>4</sub>는 H 또는 CH<sub>3</sub>이고; 및/또는

각각의 R<sub>5</sub>는 H 또는 CH<sub>3</sub>이고; 및/또는

L은 C<sub>2-5</sub>알킬렌이고; 및/또는

R<sub>6</sub>은 H 또는 C<sub>1-4</sub>알킬이고; 및/또는

n은 2 내지 6인 것을 특징으로 하는 공정, 방법, 용액 또는 조성물.

**청구항 30**

제 21항 내지 제 29항 중에 어느 한 항에 있어서, R<sub>1a</sub>는 H 또는 CH<sub>3</sub>이고; R<sub>2a</sub>는 CH<sub>3</sub>, Et, n-Pr, 또는

$-(CH_2)_nCH(OOH)_2$ 이거나,  $R_{2a}$ 는 L에 의해  $R_{2b}$ 와 결합되고;  $R_3$ 는 H 또는  $C(OOH)R_{1b}R_{2b}$ 이고;  $R_{1b}$ 는 H 또는  $CH_3$ 이고;  $R_{2b}$ 는  $CH_3$ , Et, 또는 n-Pr이거나  $R_{2b}$ 는 L에 의해  $R_{2a}$ 와 결합되고; 및 n은 3인 것을 특징으로 하는 공정, 방법, 용액 또는 조성물.

**청구항 31**

제 1항 내지 제 30항 중에 어느 한 항에 있어서, 다기능성 유기 과산화물은 도 1에 나타난 화학식을 갖는 것을 특징으로 하는 공정, 방법, 용액 또는 조성물.

**청구항 32**

제 1항 내지 제 31항 중에 어느 한 항에 있어서, 다기능성 유기 과산화물은:

2, 2'-디히드로과산화-2, 2'-디부틸과산화물; 2, 2-디히드로과산화부탄; 1, 1-디히드로과산화메탄; 1, 1-디히드로과산화프로판; 1, 1-디히드로과산화부탄; 1, 1'-디히드로과산화-1, 1'-디프로필과산화물; 1, 1'-디히드로과산화-1, 1'-디부틸과산화물; 1, 1'-디히드로과산화-1, 1'-디에틸과산화물; 1, 1, 5, 5-테트라히드로과산화펜탄; 3, 7-비스-히드로과산화-1, 2-디옥세판; 및 1, 1-디히드로과산화에탄을 포함하지만, 이에 제한되지 않는다. 1, 1-디히드로과산화에탄으로 구성되는 기로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 공정, 방법, 용액 또는 조성물.

**청구항 33**

제 1항 내지 제 32항 중에 어느 한 항에 있어서, 다기능성 유기 과산화물은 0.01-0.25% 사이의 농도로 사용되는 것을 특징으로 하는 공정, 방법, 용액 또는 조성물.

**청구항 34**

제 1항 내지 제 33항 중에 어느 한 항에 있어서, 다기능성 유기 과산화물은 0-50℃ 사이의 온도에서 사용되는 것을 특징으로 하는 공정, 방법, 용액 또는 조성물.

**청구항 35**

제 1항 내지 제 34항 중에 어느 한 항에 있어서, 다기능성 유기 과산화물은 불활성화를 위해 0.25-72시간 사이 동안 사용되는 것을 특징으로 하는 공정, 방법, 용액 또는 조성물.

**청구항 36**

제 1항 내지 제 35항 중에 어느 한 항에 있어서, 남은 또는 초과한 과산화물은 샘플의 처리 후에 제거되는 것을 특징으로 하는 공정.

**청구항 37**

제 36항에 있어서, 제거는 환원제를 사용하는 것을 특징으로 하는 공정.

**청구항 38**

제 37항에 있어서, 환원제는 아스코르브산 또는 환원당인 것을 특징으로 하는 공정.

**명세서**

**기술분야**

[0001] 본 출원은 미국 가특허출원 61/395, 117호 (2010년 5월 6일 출원됨)의 이익을 주장하고, 그 전문은 모든 목적으로 본원에 참고로 포함된다.

[0002] **기술분야**

[0003] 본 발명은 미생물의 불활성화 및/또는 핵산의 분해에 (및 특히, DNA를 분해하는데) 유용한 화합물의 분야에 있다.

**배경기술**

- [0004] 바이러스 및 박테리아의 처리는 그것들을 불활성화시키는데, 폐수 또는 하수의 살균을 포함하는, 다양한 영역 및, 또한 백신과 같은 비경구 약물의 분야에서 중요하다. 예를 들어, 많은 백신은 최종 백신에서 살아있는 감염성 물질이 없도록 불활성화된 미생물에 기초한다. 폴리오바이러스 (poliovirus)의 불활성화가 실패했던 1950년대의 "커터 사건"으로부터 알려진 바와 같이, 불활성화의 실패는 심각한 안전성 위험을 나타낸다.
- [0005] 불활성화 처리는 전형적으로 화학적 수단에 기초한다. 화학적 처리는 세제, 포름알데히드 (보통 포르말린으로),  $\beta$ -프로피오락톤 (BPL), 글루타르알데히드, 에틸렌이민, 페놀 등의 사용을 포함한다. 이 불활성화제는 수년 동안 사용되었다. 예를 들어, 참고문헌 1을 참조한다.
- [0006] 이 불활성화제 중 일부는 또한 핵산의 분해에 유용하다. 이 분해는 바이러스 또는 박테리아 자체를 불활성화시키는 역할을 할 수 있지만, 그것은 또한 성장 중에 사용된 어느 세포 기질로부터 남은 핵산의 제거에 유용할 수 있다. 예를 들어, 바이러스는 백신의 제조를 위한 물질을 제공하는 세포 배양액에서 성장할 수 있고 제조 중에 세포 배양액 기질로부터 남은 핵산을 분해해서, 잠재적으로 종양 발생 물질을 제거하는 것이 일반적이다. 참고문헌 2는 바이러스의 불활성화 및, 숙주 세포 DNA의 분해 둘 다에 대한 BPL의 사용법을 설명한다.
- [0007] 특정 미생물에 따라 최고의 불활성화제는 다르다. 예를 들어, 바이러스 형태의 차이 (크기, 캡시드화, 외피, 등)는 불활성화 민감도의 차이로 이어진다. 예를 들어, 참고문헌 3의 부록 2를 참조한다. 일부 처리는 일반적으로 미생물을 불활성화시키는 것이 가능하지만 (예를 들어, 초고온, 살균제, 강한 자외선 또는 방사선), 이것들은 또한 면역원성을 파괴해서 효과적인 백신의 제조에 부적절하다. 불활성화 처리는 대신 백신 면역원성을 유지하지만 문제의 미생물에 대해 효과적인 것으로 대신 선택된다. 따라서, 불행하게도, 처리는 활성 형태의 오염원을 남길 수도 있는데, 아마 강한 감염원에 의한 백신 오염으로 이어질 수도 있다. 따라서 표적 미생물 및 잠재적 오염물질 모두를 불활성화시킬 광범위한 불활성화제 (broad-spectrum inactivator)에 대한 필요가 있다. 바이러스성 불활성화가 추천된 경우, 이러한 불활성화제는 또한 소 혈청 또는 트립신과 같은 생성물의 처리에 유용할 것이다.
- [0008] 일부 불활성화제가 갖는 또 다른 어려움은 그것들의 안정성이다. 포름알데히드는, 특히 고온에서, 효과적인 불활성화제이지만, 매우 안정해서 불활성화 후에 잔기가 남는다. 이 잔기들은 남은 활성 미생물에 대한 다운스트림 테스트를 방해할 수도 있다. 따라서 높은 희석이 이 테스트에 사용되지만, 이것은 그것들의 민감도를 감소시킨다. 게다가, 잔기는 최종 백신의 면역 반응을 방해할 수 있다. 예를 들어, 참고문헌 5는 포르말린-불활성화된 백신이 과민증을 일으킬할 더 큰 위험을 가질 수도 있다는 것을 제안한다.
- [0009] 최종적으로, 포름알데히드를 가지고 불활성화는 일부 환경에서 가역적일 수 있다.
- [0010] 따라서 새로운 및 향상된 미생물 불활성화제에 대한 필요가 있다. 이것들은 원하는 면역원성을 제거하지 않고, 강한 것을 포함하는, 다양한 미생물에 대해 유용해야 한다. 그것들은 또한 방해 또는 해로운 잔기를 거의 또는 전혀 남기지 않고, 불활성화는 가역적이지 않아야 한다. 이상적으로, 그것들은 또한 핵산의 분해에 적합해야 하고 수성 배지의 존재시 그것들의 활성을 나타내야 한다.

## 발명의 내용

### 해결하려는 과제

- [0011] 본 발명은 미생물학적 불활성화제로서 및/또는 핵산을 분해하기 위해 다기능성 유기 과산화물을 사용한다. 이 불활성화제는 (i) 적어도 하나의 탄소 원자 또는 백본 (backbone) 및 (ii) 적어도 두 개의 과산화물 기, 즉, 두 개의 산소 원자 사이에 단일 결합을 함유하는 적어도 두 개의 기를 포함한다 -O-O-. 불활성화제는 이상적으로 히드로과산화물이다, 즉, 기 -O-O-H를 함유한다. 이러한 화합물은 이미 업계에 알려져 있지만, 그것들은 현재 면역원성에 부정적인 영향을 미치지 않고 불활성화를 이룰 수 있는, 레오바이러스 (reovirus)와 같이 유명하게 안정한 바이러스를 포함하는, 미생물의 잠재적인 불활성화제인 것으로 나타난다. 게다가, 그것들은 고도로 수용성이고, 독성 분해 생성물을 생산하지 않고 (예를 들어, 아세트산, 프로피온산, 부티르산, 등과 같은 단순 카르복실산만을 생산), 넓은 범위의 pH 및 온도에 걸쳐 활성일 수 있다. 게다가, 그것들은 수성 조건에서 놀라운 안정성을 나타낼 수 있고, 그것들은 세포의 DNA를 분해하는데 효과적이다.
- [0012] 따라서 본 발명은 미생물 함유 샘플 (액체 샘플과 같이)을 처리하는 공정을 제공하는데, 샘플을 다기능성 유기 과산화물에 접촉시키는 단계를 포함한다. 이 공정은 샘플 내 미생물의 불활성화를 일으킬 수 있다.
- [0013] 본 발명은 또한 핵산 (DNA, 예를 들어, 세포 DNA와 같이)을 함유하는 샘플 (액체 샘플과 같은)을 처리하는 방법

을 제공하는데, 샘플을 다기능성 유기 과산화물에 접촉시키는 단계를 포함한다. 이 공정은 샘플 내 핵산의 분해를 일으킬 수 있다.

[0014] 본 발명은 또한 (i) 그 안에 미생물을 불활성화시키기 위해 미생물-함유 샘플을 다기능성 유기 과산화물에 접촉시키는 단계; (ii) 단계 (i)의 생성물로부터 약학적 조성물을 제조하는 단계를 포함하는, 약학적 조성물을 제조하는 방법을 제공한다. 이 약학적 조성물은 바이러스성 백신과 같은, 유용한 백신이다.

[0015] 본 발명은 또한 (i) 바이러스성 면역원과 같은, 활성화제, 및 (ii) 다기능성 유기 과산화물과 환원제의 반응 생성물을 포함하는, 약학적 조성물을 제공한다. 환원제 및 반응 생성물은 비-독성이어야 한다. 예를 들어, 모두 동일 수도 있다.

[0016] 본 발명은 또한 다기능성 유기 과산화물의 수용액을 제공하는데, 다기능성 유기 과산화물은 (a) 1 중량% 미만 또는 (b) 5-70 중량% 사이의 농도로 존재한다. 이 용액은, 특히 옵션 (a)에서, 또한 미생물을 함유할 수도 있다. 옵션 (a)에서 농도는 일반적으로 0.001-0.5%, 예를 들어, 0.01-0.25% 사이, 0.01-0.1% 사이, 또는 약 0.05% 범위에 있다. 옵션 (b)에서 농도는 6-60%, 7-50%, 8-40%, 9-35% 또는 10-30%의 범위에 있을 수 있다.

[0017] 본 발명은 또한 (i) 불활성화된 미생물 및 (ii) 1 중량% 미만의 (예를 들어, 0.001-0.5%, 예를 들어, 0.01-0.25% 사이, 0.01-0.1% 사이, 또는 약 0.05%의 범위에서) 다기능성 유기 과산화물을 포함하는 액체 조성물을 제공한다.

[0018] 본 발명은 또한 미생물 및 다기능성 유기 과산화물의 반응 생성물을 포함하는 액체 조성물을 제공한다.

[0019] 본 발명은 또한 다기능성 유기 과산화물을 포함하는 살균용 조성물을 제공한다. 이러한 용액은 상기 논의된 수용액을 포함하지만, 미생물은 없다.

[0020] 본 발명은 또한 약물의 제조에 사용되는, 예를 들어, 백신의 제조에 사용되는 상기 조성물 중에 하나를 제공한다. 유사하게, 본 발명은 상기 조성물 중에 하나를 사용하는, 약물을 제조하는 공정을 제공한다.

[0021] 본 발명은 또한 미생물 불활성화제로서 다기능성 유기 과산화물의 사용을 제공한다. 본 발명은 또한 미생물 불활성화제로서 사용되는 다기능성 유기 과산화물을 제공한다. 본 발명은 또한 미생물 불활성화제로서 본 발명의 수용액의 사용법을 제공한다. 본 발명은 또한 미생물 불활성화제로서 사용되는 본 발명의 수용액을 제공한다.

[0022] **샘플**

[0023] 본 발명은 미생물 함유 샘플의 처리에 유용하다. 이 샘플들은 바람직하게 액체 샘플이지만, 또한 고체, 예를 들어, 예를 들어, 용기 또는 작업실의 표면일 수도 있다. 이러한 샘플은 미생물 배양 유도체; 혈액 생성물, 혈청, 혈장, 또는 혈액-유래 조제물 (예를 들어, 항-응고제); 동물-유래 원재료 및 산물; 미생물에 의해 오염될 수도 있는 다른 원재료; 재조합 단백질, 백신 및 진단 생성물의 재료 및 중간생성물 (예를 들어, ELISAs); 미생물원을 활용하는 공정으로부터 나온 폐기물; 폐수, 하수; 식품 (예를 들어, 우유); 등을 포함하지만, 이에 제한되지 않는다.

[0024] 본 발명은 샘플의 살균 또는 멸균, 및 특히, 표면에 살고 있는 미생물을 파괴하기 위해 표면을 살균하는 추가의 사용법을 갖는다. 예를 들어, 본 발명은 사용 전에 작업실 표면을 살균에, 사용 전에 수술 기구 및 임플란트 (implant)를 멸균에, 또는 살균 또는 멸균이 필요한 다른 어느 목적에도 사용될 수 있다.

[0025] 본 발명은 바이러스 및 박테리아 모두를 포함하는, 다양한 타입의 미생물의 불활성화에 유용하다. 외피가 있는 바이러스 및 외피가 없는 바이러스에 사용될 수 있다. RNA 게놈 (단일- 또는 이중-가닥) 또는 DNA 게놈 (단일- 또는 이중-가닥)을 갖는 바이러스에 사용될 수 있고, 단일-가닥 게놈은 + 또는 - 센스일 수도 있다. 세그먼트 게놈 또는 비-세그먼트 게놈을 갖는 바이러스에 사용될 수도 있다. 캡시드 (단일 또는 여러)를 가진 바이러스 또는 캡시드를 갖지 않는 바이러스에 사용될 수도 있다. 그람-음성 박테리아 또는 그람-양성 박테리아에 사용될 수도 있다.

[0026] 따라서 샘플은 다음 중에 하나 이상을 함유할 수도 있다.

[0027] ● 오르토믹소바이러스 (orthomyxovirus): 본 발명은 인플루엔자 A, B 또는 C 바이러스와 같은, 오르토믹소바이러스를 불활성화시키는데 사용될 수도 있다. 인플루엔자 A 또는 B 바이러스는 유행기 사이의 (매년/매계절) 중, 또는 유행성 발병을 일으키는 가능성을 가진 종일 수도 있다 (즉, 현재 순환하는 종의 헤마글루티닌과 비교하여 새로운 헤마글루티닌을 갖는 인플루엔자 중, 또는 조류 대상체에서 병원성이고 사람 집단에 수평으로 전염될 가능성이 있는 인플루엔자 중, 또는 사람에게 대해 병원성인 인플루엔자 중). 특정 계절 및 종의 성질에



의존적으로, 인플루엔자 A 바이러스는 다음 헤마글루티닌 서브타입 H1, H2, H3, H4, H5, H6, H7, H8, H9, H10, H11, H12, H13, H14, H15 또는 H16 중에 하나 이상으로부터 유래할 수도 있다.

- [0028] ● 파라믹소비리대 바이러스 (paramyxoviridae virus): 본 발명은 뉴모바이러스 (Pneumovirus; RSV), 파라믹소 바이러스 (Paramyxovirus; PIV) 및 모빌리바이러스 (Morbillivirus; 홍역 (measles))와 같은, 파라믹소비리대 바이러스를 불활성화시키는데 사용될 수도 있다.
- [0029] ● 뉴모바이러스: 본 발명은 뉴모바이러스 또는 메타뉴모바이러스 (metapneumovirus), 예를 들어, 호흡기 세포 융합 바이러스 (respiratory syncytial virus), 소 호흡기 세포 융합 바이러스 (bovine respiratory syncytial virus), 쥐의 뉴모니아바이러스 (pneumoniavirus), 및 칠면조 비기관염 바이러스 (turkey rhinotracheitis virus)를 불활성화시키는데 사용될 수도 있다. 바람직하게 뉴모바이러스는 RSV 또는 사람 메타뉴모바이러스 (HMPV)이다.
- [0030] ● 파라믹소바이러스: 본 발명은 파라인플루엔자 바이러스 (PIV) 타입 1, 2, 3 또는 4, 볼거리 (Mumps), 센다이 바이러스 (Sendai virus), 유인원 바이러스 5 (Simian virus 5), 소 파라인플루엔자 바이러스 및 뉴캐슬병 바이러스 (Newcastle disease virus)와 같은 파라믹소바이러스를 불활성화시키는데 사용될 수도 있다. 바람직하게, 파라믹소바이러스는 PIV 또는 볼거리이다.
- [0031] ● 모빌리바이러스: 본 발명은 홍역과 같은, 모빌리바이러스를 불활성화시키는데 사용될 수도 있다.
- [0032] ● 피코르나바이러스 (Picornavirus): 본 발명은 엔테로바이러스 (Enterovirus), 리노바이러스 (Rhinovirus), 헤파르나바이러스 (Heparnavirus), 뇌심근염 바이러스 (Cardiovirus) 및 아프토바이러스 (Aphthovirus)와 같은 피코르나바이러스를 불활성화시키는데 사용될 수도 있다.
- [0033] ● 엔테로바이러스: 본 발명은 폴리오바이러스 타입 1, 2 또는 3, 콕사키 A 바이러스 (Coxsackie A virus) 타입 1, 내지 22 및 24, 콕사키 B 바이러스 (Coxsackie B virus) 타입 1 내지 6, 에코바이러스 (Echovirus) 타입 1 내지 9, 11 내지 27 및 29 내지 34 및 엔테로바이러스 68 내지 71을 불활성화시키는데 사용될 수도 있다. 바람직하게 엔테로바이러스는 폴리오바이러스, 예를 들어, Mahoney 또는 Brunender와 같은 타입 1 중, MEF-I와 같은 타입 2 중, 또는 Saukett와 같은 타입 3 중이다.
- [0034] ● 헤파르나바이러스: 본 발명은 본 발명은 간염 A 바이러스 (Hepatitis A virus)와 같은, 헤파르나바이러스 (또한 헤파토바이러스 (Hepatovirus)로 명명됨)를 불활성화시키는데 사용될 수도 있다.
- [0035] ● 토가바이러스 (Togavirus): 본 발명은 풍진바이러스 (Rubivirus), 알파바이러스 (Alphavirus), 또는 아테리 바이러스 (Arterivirus)와 같은, 토가바이러스를 불활성화시키는데 사용될 수도 있다. 루벨라 바이러스 (Rubella virus)와 같은, 풍진바이러스가 바람직하다. 불활성화에 대해 유용한 알파바이러스는 연어 채장 질환 바이러스 및 수면병 바이러스 (sleeping disease)와 같은, 수성 알파바이러스를 포함한다.
- [0036] ● 플라비바이러스 (Flavivirus): 본 발명은 진드기 매개 뇌염 (Tick-borne encephalitis; TBE), 뎅구 (Dengue; 타입 1, 2, 3 또는 4), 황열 (Yellow fever), 일본 뇌염 (Japanese encephalitis), 웨스트 나일 뇌염 (West Nile encephalitis), 세인트 루이스 뇌염 (St. Louis encephalitis), 러시아 봄-여름 뇌염 (Russian spring-summer encephalitis), 포와산 뇌염 (Powassan encephalitis)과 같은 플라비바이러스를 불활성화시키는데 사용될 수도 있다.
- [0037] ● 간염 C 바이러스: 본 발명은 간염 C 바이러스 (HCV)를 불활성화시키는데 사용될 수도 있다.
- [0038] ● 페스티바이러스 (Pestivirus): 본 발명은 소 바이러스성 설사 (Bovine viral diarrhea; BVDV), 돼지 콜레라 (Classical swine fever; CSFV) 또는 보더병 (Border disease; BDV)과 같은, 페스티바이러스를 불활성화시키는데 사용될 수도 있다.
- [0039] ● 헤파드나바이러스 (Hepadnavirus): 본 발명은 간염 B 바이러스와 같은, 러스 (Bocavirus)와 같은, 파르보바이러스를 불활성화시키는데 사용될 수도 있다.
- [0040] ● 다른 간염 바이러스: 간염 델타 바이러스, 간염 E 바이러스, 또는 간염 G 바이러스를 불활성화시키는데 사용될 수도 있다.
- [0041] ● 사람 헤르페스바이러스: 단순 헤르페스 바이러스 (HSV), 바리셀라 조스터 바이러스 (varicella zoster virus; VZV), 엡스타인-막대 바이러스 (EBV), 거대 세포 바이러스 (CMV), 사람 헤르페스 바이러스 6 (HHV6), 사람 헤르페스 바이러스 7 (HHV7), 및 사람 헤르페스 바이러스 8 (HHV8)과 같은, 사람 헤르페스 바이러스를 불

활성화시키는데 사용될 수도 있다.

- [0042] ● 파포바바이러스 (Papovavirus): 본 발명은 유두종 바이러스 (Papillomavirus) 및 폴리오마바이러스 (Polyomavirus)와 같은, 파포바바이러스를 불활성화시키는데 사용될 수도 있다. 유두종 바이러스는 HPV 혈청형 1, 2, 4, 5, 6, 8, 11, 13, 16, 18, 31, 33, 35, 39, 41, 42, 47, 51, 57, 58, 63 및 65를 포함한다.
- [0043] ● 아데노비리대 (Adenoviridae): 본 발명은 사람 아데노바이러스 (Adenovirus) A, B, C, D, E, F 또는 G 중에 하나를 포함하는, 아데노바이러스를 불활성화시키는데 사용될 수도 있다.
- [0044] ● 보르데텔라 속 (bordetella): 본 발명은 백일해균 (B. Pertussis)와 같은, 보르데텔라 박테리아를 불활성화시키는데 사용될 수도 있다.
- [0045] ● 클로스트리디아 속 (Clostridiaceae): 본 발명은 과상풍균 (C.tetani) 및 보툴리누스균 (C.botulinum)과 같은, 클로스트리디아를 불활성화시키는데 사용될 수도 있다.
- [0046] ● 코리네박테리아 속 (Corynebacteriaceae): 본 발명은 씨. 디프테리아균 (C.diphtheriae)과 같은, 코리네박테리아를 불활성화시키는데 사용될 수도 있다.
- [0047] ● 파스퇴렐라 속 (Pasteurellaceae): 본 발명은 인플루엔자 간균 (Haemophilus influenzae)과 같은, 파스퇴렐라 종을 불활성화시키는데 사용될 수도 있다.
- [0048] ● 마이코박테리아 속 (Mycobactericeaea): 본 발명은 결핵균 (M.tuberculossi), 결핵균 (M.bovis) 및 감소된 칼메트-게린 간균 (Bacillus Calmette Guerin)과 같은, 마이코박테리아를 불활성화시키는데 사용될 수도 있다.
- [0049] ● 나이세리아 속 (Neisseriaceae): 본 발명은 수막염균 (N. meningitidis) 및 임질균 (N. gonorrhoeae)과 같은 나이세리아 종을 불활성화시키는데 사용될 수도 있다.
- [0050] ● 살모넬라 속 (Salmonellaceae): 본 발명은 티푸스균 (S. typhi), 파라티푸스균 (S.paratyphi), 쥐티프스균 (S.typhimurium), 장염균 (S.enteritidis)과 같은 살모넬라 종을 불활성화시키는데 사용될 수도 있다.
- [0051] ● 마이코플라스마 속 (Mycoplasmataceae): 본 발명은 오염된 세포 배양액 또는 세포 배양액-유래 물질에서 발견될 수도 있는 어느 마이코플라스마 종을 포함하는, 폐렴균 (M.pneumonia), 히오리니스 균 (M.hyorhinis), 소 결핵균 (M.bovis), 연쇄상구균 (M.agalactiae), 마이코플라스마 병원균 (M.gallisepticum)과 같은, 마이코플라스마를 불활성화시키는데 사용될 수도 있다.
- [0052] 미생물 이외에, 샘플은 또한 용액에서 핵산, 예를 들어 남은 바이러스 세포의 DNA를 포함할 수 있다. 이 조건은, 예를 들어, 분해성 바이러스가 세포 배양액에서 성장하고 세포가 없는 수확물이 준비될 때, 일어날 수 있다. 이러한 샘플에서, 다기능성 유기 과산화물은 용액에서 미생물을 불활성화시키고 핵산을 분해할 수 있어서, 백신 제조 중에, 및 특히 바이러스성 백신에 대해 이중의 이익을 제공한다. 따라서 본 발명에 의해 처리되는 샘플은 미생물 및 세포의 DNA (예를 들면, MDCK와 같은, 세포주의 게놈 DNA)를 포함할 수도 있다.
- [0053] 샘플이 핵산을 포함하는 경우 (또한 미생물을 포함하는 것과 상관 없이), 핵산은 전형적으로 DNA, 예를 들어, 세포 DNA를 포함한다. 미생물 내에 (예를 들어, 박테리아 내, 또는 비리온 내) 핵산이 있는 것보다, 핵산은 일반적으로, 용액에서 세포 내에 세포 DNA보다, 예를 들어, 용액에 있는 세포 DNA가 더 자유로울 것이다 (즉, 기원이 세포이지만, 더 이상 세포 내에 존재하지 않는 DNA).
- [0054] 미생물은 의도적으로 (예를 들어, 백신을 제조하기 위해 바이러스를 성장시킨 후에) 또는 오염물질로서 (예를 들어, 하수에서, 또는 재조합 단백질 발현 후에, 오염된 세포 배양 배지 성분, 세포 또는 배지로부터) 존재할 수도 있다. 또한, 일부 구체예에서 샘플은 계획적으로 미생물을 함유하지만 오염 물질 미생물 또한 함유할 수도 있다.
- [0055] 본 발명은 특히 바이러스의 불활성화에 유용하고, 미생물-함유 샘플의 처리 공정은 바람직하게 바이러스-함유 샘플에서 바이러스를 불활성화시키는 공정이다.
- [0056] 일부 구체예에서, 본 발명은 반드시 미생물을 함유하지 않지만 미생물을 함유한 것으로 의심되거나, 함유할 위험이 있는 샘플을 처리하는데 사용될 수 있다. 이 구체예에서 처리가 필수적이지 않지만 위험의 방지를 위해 미생물의 불활성화 (예를 들어, 소독)를 확실히 하기 위해 사용된다. 일반적으로, 샘플은 미생물의 성장 또는 지속을 지원할 수 있을 것이다.
- [0057] 미생물을 포함하는 것 이외에 샘플은 다른 물질, 예를 들어, 세포 기질 또는 그것들의 잔기, 세포의 핵산 (예를

들어, DNA), 알 단백질 (egg protein), 등을 함유할 수도 있다. 미생물을 불활성화시키는 것 이외에, 유기 과산화물은 이 다른 물질들과 반응할 수도 있다. 하지만, 이상적으로, 샘플은 불활성화제와 반응하는 감염성 물질과 경쟁하는 많은 양의 비-감염성 물질을 포함하지 않는다. 이러한 반응은 불활성화제를 낭비한다. 이 헛된 반응을 경험할 수 있는 물질은, 예를 들어, 환원제 (하기 참조)를 포함한다. 따라서, 예를 들어, 높은 레벨의 남은 글루코스를 유지하는 배지를 피할 수 있다.

[0058] 본 발명에 따라 샘플의 처리 후, 남은 또는 초과한 과산화물은 제거 및/또는 파괴될 수 있다. 이것은 다양한 방법, 예를 들어, 환원제를 추가함으로써 이루어질 수 있다. 적합한 환원제는 티오황산나트륨, 아스코르브산, 당 (예를 들어, 글루코스 또는 수크로스; 바람직하게 환원당), 다당류, 폴리페놀, 등을 포함하지만, 이에 제한되지 않는다. 환원제는 전형적으로 과산화물에 몰 초과량 (환원기 당 계산됨), 예를 들어, 2:1 및 4:1 사이에서 화학적 불활성화제에 환원기의 몰 초과량이 추가될 것이다. 환원제는 과산화물의 시작 농도를 차단하기 위해 충분한 양이 추가될 수도 있다. 하지만, 알려진 끝-농도 범위를 가지고 잘 규격화된 공정에 대해, 사용자는 더 낮은 농도, 예를 들어, 불활성화 후에 남은 과산화물의 양의 차단에 충분한 농도를 추가하는 것이 바람직할 수도 있다.

[0059] 화학적 불활성화제의 의존적으로 및 사용된 환원제에 의존적으로, 불활성화된 불활성화제는 반응 용액에 남을 수 있거나 (예를 들어, 단당과 같이, 그것이 무해하면), 그것은 회석되거나, 제거될 수도 있다. 제거 단계는 원하는 시약의 다운스트림 공정의 일부로서 일어날 수도 있다 (예를 들어, 불활성화된 물질의 단백질 또는 바이러스 성분의 정제 중에). 따라서 제거는 초미세/투석여과, 투석, 크로마토그래피 정제 등을 수반할 수도 있다.

[0060] **다기능성 유기 과산화물**

[0061] 본 발명은 다기능성 유기 과산화물을 사용한다. 이러한 화합물은 적어도 하나의 탄소 원자 또는 백본을 포함한다, 즉, 그것들은, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>와 달리, 유기적이다. 그것들은 또한 적어도 두 개의 기를 포함한다, 즉, 그것들은, 과아세트산과 달리, 다수의 다기능성 과산화물 기를 함유한다.

[0062] 과산화 화합물은 이상적으로 히드로과산화물이다, 즉, -O-O-H 기를 함유한다. 그것은 다수의 히드로과산화물 기를 함유할 수도 있다. 다른 다기능성 유기 과산화물은 과산화케탈, 예를 들어, CR<sub>1</sub>R<sub>2</sub>(OOR<sub>3</sub>)(OOR<sub>4</sub>) 또는 테트라옥산일 수 있지만, 탄소 원자에 부착된 적어도 하나의 -O-O-H 기를 포함하는 화합물이 바람직하다.

[0063] 적어도 하나의 과산화물 기는 유기 과산화물을 제공하기 위해 탄소 원자에 부착되고, 일부 구체예에서 각각의 과산화물 기의 산소 원자 중에 적어도 하나는 탄소 원자에 부착된다.

[0064] 과산화 화합물은 이상적으로 같은 자리 (geminal) 과산화물 (또는 히드로과산화물)인데, 두 개의 과산화물 (또는 히드로과산화물) 기가 같은 탄소 원자에 부착된다.

[0065] 더 많은 수의 과산화물 기를 갖는 화합물이 제외되지 않지만, 화합물은 이상적으로 두 개, 세 개 또는 네 개 이상의 과산화물 기를 갖는다.

[0066] 화합물은 호모이기능성 (homobifunctional)일 수 있다, 즉, 그것은 두 개의 동일한 과산화물 (또는 히드로과산화물) 작용기를 포함하고; 따라서 불활성화제는 제미널 비스히드로과산화물일 수도 있다. 대안으로, 불활성화제는 헤테로이기능성 (heterobifunctional)일 수도 있다, 즉, 그것은 두 개의 다른 과산화물 작용기를 포함한다. 예를 들어, 그것은 히드로과산화물 (-OOH) 및 다른 과산화물 (R≠H인 경우, -OOR)을 포함할 수도 있다.

[0067] 바람직한 화합물은 수용성이다. 이것은 백신 제조 중에 사용을 가능하게 한다.

[0068] 바람직한 화합물은 이러한 화합물이 전형적으로 덜 해로운 것으로 보이는 바와 같이 할로젠이 없다. 따라서 불활성화제는 단지 탄소, 수소, 산소 및 질소 원자로 구성될 수도 있다. 특히 바람직한 화합물은 단지 탄소, 수소 및 산소 원자로 구성된다.

[0069] 바람직한 화합물은 500 미만, 예를 들어, 300 미만, 250 미만, 200 미만, 150 미만, 100 미만의 분자량을 갖는다.

[0070] 바람직한 화합물은 -C(=O)-OOH 기를 포함하지 않아서 불활성화 중에 매우 산성인 pH를 제공하지 않는다 (예를 들어, 과아세트산과 달리). 이러한 환경은 pH-민감한 면역원을 파괴할 수도 있고, 또한 불활성화 공정에 사용된 장치 및 기계의 부식으로 이어질 수도 있다.

[0071] 바람직한 화합물은 비-폭발성이다. 예를 들어, 트리아세톤 삼과산화물은 바람직하지 않다.

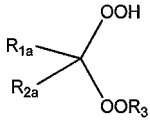
[0072] 불활성화 중에 화합물은 이상적으로 원래의 생성물보다 동물 (사람을 포함)에게 더 독성인 반응 또는 분해 생성

물을 형성하지 않는다.

[0073] 바람직한 화합물은 (i) 감염성 적정 농도의 5 이상, 바람직하게 7 이상 로그 10 감소를 갖는 사람 인플루엔자 A 바이러스, 및/또는 (ii) 감염성 적정 농도의 3이상, 바람직하게 5이상, 및 특히 바람직하게 7 이상 로그 10 감소를 갖는 레오바이러스 타입 3을 불활성화시킬 수 있다.

[0074] 바람직한 화합물은 면역원성을 감소시키지 않고 미생물을 불활성화시킬 수 있다. 특히 바람직한 화합물은 헤마글루티닌의 면역원성을 감소시키지 않고 인플루엔자 A 바이러스를 불활성화시킬 수 있다.

[0075] 유용한 화합물은 화학식 I을 갖는다:



[0076]

[0077] 여기에서:

[0078] R<sub>1a</sub>는 H, C<sub>1-6</sub>알킬, C<sub>2-6</sub>알케닐, C<sub>1-6</sub>알키닐, C<sub>1-6</sub>-알콕시, C<sub>2-6</sub>-알케닐옥시, C(O)H, C(O)C<sub>1-6</sub>알킬, C(O)OC<sub>1-6</sub>알킬, 선택적으로 엔-일 또는 엔-이 C<sub>1-6</sub>알킬화 아미노, 선택적으로 엔-일 또는 엔-이 C<sub>1-6</sub>알킬화 아미노카르보닐, S(O)<sub>0-2</sub>C<sub>1-6</sub>알킬, 헤테로시클로알킬, 아릴 또는 헤테로아릴이고;

[0079] R<sub>2a</sub>는 H, C<sub>1-6</sub>알킬, C<sub>2-6</sub>알케닐, C<sub>1-6</sub>알키닐, C<sub>1-6</sub>-알콕시, C<sub>2-6</sub>-알케닐옥시, C(O)H, C(O)C<sub>1-6</sub>알킬, C(O)OC<sub>1-6</sub>알킬, 선택적으로 엔-일 또는 엔-이 C<sub>1-6</sub>알킬화 아미노, 선택적으로 엔-일 또는 엔-이 C<sub>1-6</sub>알킬화 아미노카르보닐, S(O)<sub>0-2</sub>C<sub>1-6</sub>알킬, 헤테로시클로알킬, 아릴 또는 헤테로아릴, -(CR<sub>4</sub>R<sub>5</sub>)<sub>n</sub>CR<sub>6</sub>(OOH)<sub>2</sub>이거나, R<sub>2a</sub>는 R<sub>2b</sub>와 L에 의해 결합되고;

[0080] R<sub>3</sub>는 H 또는 C(OOH)R<sub>1b</sub>R<sub>2b</sub>이고,

[0081] R<sub>1b</sub>는 H, C<sub>1-6</sub>알킬, C<sub>2-6</sub>알케닐, C<sub>1-6</sub>알키닐, C<sub>1-6</sub>-알콕시, C<sub>2-6</sub>-알케닐옥시, C(O)H, C(O)C<sub>1-6</sub>알킬, C(O)OC<sub>1-6</sub>알킬, 선택적으로 엔-일 또는 엔-이 C<sub>1-6</sub>알킬화 아미노, 선택적으로 엔-일 또는 엔-이 아미노카르보닐, S(O)<sub>0-2</sub>C<sub>1-6</sub>알킬, 헤테로시클로알킬, 아릴 또는 헤테로아릴이고,

[0082] R<sub>2b</sub>는 H, C<sub>1-6</sub>알킬, C<sub>2-6</sub>알케닐, C<sub>1-6</sub>알키닐, C<sub>1-6</sub>-알콕시, C<sub>2-6</sub>-알케닐옥시, C(O)H, C(O)C<sub>1-6</sub>알킬, 선택적으로 엔-일 또는 엔-이 C<sub>1-6</sub>알킬화 아미노, 선택적으로 엔-일 또는 엔-이 C<sub>1-6</sub>알킬화 아미노카르보닐, S(O)<sub>0-2</sub>C<sub>1-6</sub>알킬, 헤테로시클로알킬, 아릴 또는 헤테로아릴이거나, R<sub>2b</sub>는 R<sub>2a</sub>와 L에 의해 결합되고;

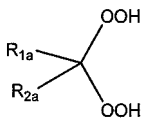
[0083] R<sub>4</sub>는, 각각의 발생에서, H 또는 C<sub>1-3</sub> 알킬, 히드록실, 시아노, 니트로, C<sub>2-4</sub>-알케닐, C<sub>1-3</sub>-알콕시, C<sub>2-4</sub>-알케닐옥시, C<sub>1-3</sub>-알킬카르보닐, 카르복시, C<sub>1-6</sub>-알콕시카르보닐, 선택적으로 엔-일 또는 엔-이 C<sub>1-3</sub>알킬화 아미노카르보닐, C<sub>1-3</sub>-티오알킬, C<sub>1-3</sub>-알킬설피닐, C<sub>1-3</sub>-알킬설포닐, C<sub>1-3</sub>-알킬아미노설포닐 및 디-C<sub>1-3</sub>-알킬아미노설포닐로부터 선택되고;

[0084] R<sub>5</sub>는, 각각의 발생에서, H 또는 C<sub>1-3</sub> 알킬, 히드록실, 시아노, 니트로, C<sub>2-4</sub>-알케닐, C<sub>1-3</sub>-알콕시, C<sub>2-4</sub>-알케닐옥시, C<sub>1-3</sub>-알킬카르보닐, 카르복시, C<sub>1-6</sub>-알콕시카르보닐, 선택적으로 엔-일 또는 엔-이 C<sub>1-3</sub>알킬화 아미노카르보닐, C<sub>1-3</sub>-티오알킬, C<sub>1-3</sub>-알킬설피닐, C<sub>1-3</sub>-알킬설포닐, C<sub>1-3</sub>-알킬아미노설포닐 및 디-C<sub>1-3</sub>-알킬아미노설포닐로부터 선택되고;

[0085] L은 C<sub>1-8</sub>알킬렌이고;

[0086] R<sub>6</sub>은 H, C<sub>1-6</sub>알킬, C<sub>2-6</sub>알케닐, C<sub>1-6</sub>알키닐, C<sub>1-6</sub>-알콕시, C<sub>2-6</sub>-알케닐옥시, C(O)H, C(O)C<sub>1-6</sub>알킬, 선택적으로 엔-일 또는 엔-이 C<sub>1-6</sub>알킬화 아미노, 선택적으로 엔-일 또는 엔-이 아미노카르보닐, S(O)<sub>0-2</sub>C<sub>1-6</sub>알킬, 헤테로시클로알킬, 아릴 또는 헤테로아릴; 및

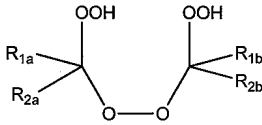
- [0087] n은 1 내지 8이다.
- [0088] R<sub>1a</sub>, R<sub>2a</sub>, R<sub>3</sub>, R<sub>1b</sub>, R<sub>2b</sub>, R<sub>4</sub>, R<sub>5</sub>, 및 R<sub>6</sub>에 대한 이 선택 이외에, 이 각각의 기들은 또한 나열된 선택의 유도체일 수도 있다. 알킬, 알콕시 기의 알킬 모이어티, 알케닐, 알케닐 기의 알케닐 모이어티, 알킬렌 또는 알킬렌은 분지형 또는 비분지형일 수도 있고 및/또는 치환되거나 치환되지 않을 수도 있다. 치환되는 경우, 각각의 치환기는 히드록실, 시아노, 니트로, C<sub>1-6</sub>-알킬, C<sub>6-10</sub>-아릴, 벤질, C<sub>2-6</sub>-알케닐, C<sub>1-6</sub>-알콕시, C<sub>2-6</sub>-알케닐옥시, C<sub>1-6</sub>-알킬카르보닐, 카르복시, C<sub>1-6</sub>-알콕시카르보닐, 선택적으로 엔-일 또는 엔-이 C<sub>1-6</sub>-알킬화 아미노알킬화 아미노, 선택적으로 엔-일 또는 엔-이 C<sub>1-6</sub>-알킬화 아미노카르보닐, 선택적으로 엔-일 또는 엔-이 C<sub>1-6</sub>-알킬화 아미노술폰, C<sub>1-6</sub>-알킬술폰, C<sub>1-6</sub>-알킬술폰, 아미노술폰, C<sub>1-6</sub>-알킬아미노술폰 및 디-6-알킬아미노술폰으로부터 선택될 수도 있다.
- [0089] R<sub>3</sub>이 -H가 아니고, R<sub>1a</sub>가 R<sub>2a</sub>와 다른 경우, 이 화합물은 다른 거울상 형태로 존재할 수 있다. 본 발명은 특정 거울상 또는 라세미 혼합물을 사용할 수 있다.
- [0090] 일부 구체예에서 R<sub>1a</sub> 및 R<sub>2a</sub>는 동일하다. 다른 구체예에서 R<sub>1a</sub> 및 R<sub>2a</sub>는 다르다.
- [0091] 일부 구체예에서 R<sub>1a</sub> 및 R<sub>1b</sub>는 동일하다. 다른 구체예에서 R<sub>1a</sub> 및 R<sub>1b</sub>는 다르다.
- [0092] 일부 구체예에서 R<sub>2a</sub> 및 R<sub>2b</sub>는 동일하다. 다른 구체예에서 R<sub>2a</sub> 및 R<sub>2b</sub>는 다르다.
- [0093] R<sub>1a</sub>는 바람직하게 H 또는 C<sub>1-6</sub>-알킬 또는 C<sub>1-4</sub>-알킬이다. 따라서 R<sub>1a</sub>는 H 또는 CH<sub>3</sub>일 수 있다.
- [0094] R<sub>2a</sub>는 바람직하게 H 또는 C<sub>1-6</sub>-알킬 또는 C<sub>1-4</sub>-알킬 또는 -(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>CH(OOH)<sub>2</sub>이거나 L에 의해 R<sub>2b</sub>와 결합하다. 따라서 R<sub>2a</sub>는 CH<sub>3</sub>, Et, n-Pr 또는 -(CH<sub>2</sub>)<sub>2-4</sub>CH(OOH)<sub>2</sub>일 수 있다.
- [0095] R<sub>1b</sub>는 바람직하게 H 또는 C<sub>1-6</sub>-알킬 또는 C<sub>1-4</sub>-알킬이다. 따라서 R<sub>1b</sub>는 H 또는 CH<sub>3</sub>일 수 있다.
- [0096] R<sub>2b</sub>는 바람직하게 C<sub>1-4</sub>-알킬이거나 L에 의해 R<sub>2a</sub>와 결합하다. 따라서 R<sub>2b</sub>는 CH<sub>3</sub>, Et, 또는 n-Pr일 수 있다.
- [0097] 각각의 R<sub>4</sub> (이것은 같거나 다를 수도 있다)는 바람직하게 H 또는 -CH<sub>3</sub> 또는 히드록실이다.
- [0098] 각각의 R<sub>5</sub> (이것은 같거나 다를 수도 있다)는 바람직하게 H 또는 -CH<sub>3</sub> 또는 히드록실이다.
- [0099] L은 바람직하게 -(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>-와 같은 C<sub>2-5</sub>-알킬렌이다.
- [0100] R<sub>6</sub>은 바람직하게 H 또는 C<sub>1-6</sub>-알킬 또는 C<sub>1-4</sub>-알킬이다.
- [0101] n은 바람직하게 2 내지 6, 또는 2 내지 4, 또는 3이다.
- [0102] 한 구체예에서, R<sub>1a</sub>는 H 또는 CH<sub>3</sub>이고; R<sub>2a</sub>는 CH<sub>3</sub>, Et, n-Pr, 또는 -(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>CH(OOH)<sub>2</sub>이거나, R<sub>2a</sub>는 L에 의해 R<sub>2b</sub>와 결합되고; R<sub>3</sub>는 H 또는 C(OOH)R<sub>1b</sub>R<sub>2b</sub>이고; R<sub>1b</sub>는 H 또는 CH<sub>3</sub>이고; R<sub>2b</sub>는 CH<sub>3</sub>, Et, 또는 n-Pr이거나 R<sub>2b</sub>는 L에 의해 R<sub>2a</sub>와 결합되고; 및 n은 3이다.
- [0103] 화합물은 화학식 II를 가질 수도 있다:



- [0104]
- [0105] 바람직한 구체예에서: R<sub>1a</sub>는 H 또는 CH<sub>3</sub>이고; R<sub>2a</sub>는 CH<sub>3</sub>, Et, 또는 n-Pr이다.



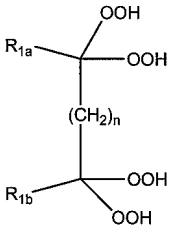
[0106] 화합물은 화학식 III을 가질 수도 있다:



[0107]

[0108] 바람직한 구체예에서: R<sub>1a</sub>는 H 또는 CH<sub>3</sub>이고; R<sub>2a</sub>는 CH<sub>3</sub>, Et, 또는 n-Pr이거나, R<sub>2a</sub>는 L에 의해 R<sub>2b</sub>와 결합되고; R<sub>1b</sub>는 H 또는 CH<sub>3</sub>이고; R<sub>2b</sub>는 CH<sub>3</sub>, Et, n-Pr이거나, R<sub>2b</sub>는 L에 의해 R<sub>2a</sub>와 결합되고; L은 -(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>-이다.

[0109] 화합물은 화학식 IV를 가질 수도 있다:



[0110]

[0111] 바람직한 구체예에서: R<sub>1a</sub>는 H이고; R<sub>1b</sub>는 H이고; n은 3이다.

[0112] 적합한 화합물은 2, 2'-디히드로과산화-2, 2'-디부틸과산화물; 2, 2-디히드로과산화부탄; 1, 1-디히드로과산화에탄; 1, 1-디히드로과산화프로판; 1, 1-디히드로과산화부탄; 1, 1'-디히드로과산화-1, 1'-디프로필과산화물; 1, 1'-디히드로과산화-1, 1'-디부틸과산화물; 1, 1'-디히드로과산화-1, 1'-디에틸과산화물; 1, 1, 5, 5-테트라히드로과산화펜탄; 3, 7-비스-히드로과산화-1, 2-디옥세판; 및 1, 1-디히드로과산화메탄을 포함하지만, 이에 제한되지 않는다. 1, 1-디히드로과산화에탄이 바람직하다. 적어도 이 화합물 중에 일부는 업계에 이미 알려져 있고 (예를 들어, 참고문헌 8-10 참조) 및/또는 상업적인 공급자로부터, 예를 들어, Ferak AG (Berlin, DE)로부터 또는 Arkema Inc. (Philadelphia, US)로부터 상업적으로 사용 가능하다. 참고문헌 8-10의 또는 이 공급자로부터 사용 가능한 화합물, 및 특히 그것들의 수용성 화합물은 본 발명에 사용될 수 있다.

[0113] 본 발명은 단일 불활성화제 화합물 또는, 예를 들어, 화학식 I의 하나 이상의 다른 화합물을 포함하는 화합물의 혼합물을 사용할 수도 있다. 혼합물이 두 개의 다른 유기 과산화물을 포함하는 경우, 이것들은 다양한 분자비, 예를 들어, 10:1 및 1:10 사이, 5:1 및 1:5 사이, 2:1 및 1:2 사이, 또는 실질적으로 등몰의 비율로 존재할 수도 있다. 혼합물에서 화합물은 고리 구조를 형성하는 수소 결합, 예를 들어, 056-1 및 058-1의 분자들 사이를 나타낼 수도 있다. 일부 화합물은 다이머로 존재할 수도 있고, 또한 모노머 및 올리고머의 혼합물로 존재할 수도 있다.

[0114] 따라서 본 발명은 화학식 II의 화합물 및 화학식 III의 화합물을 포함하는 혼합물을 사용할 수 있다. 이러한 혼합물에서 R<sub>1a</sub> 및 R<sub>1b</sub>는 화학식 II 및 화학식 III 모두에서 같을 수 있고; 및/또는 R<sub>2a</sub> 및 R<sub>2b</sub>는 화학식 II 및 화학식 III 모두에서 같을 수 있다.

[0115] 불활성화제는, 이상적으로, 원하는 미생물 (또는 그것의 성분)의 면역원성을 감소시키지 않고, 원하는 샘플에서 미생물을 불활성화시키는데 충분한 농도로 사용된다. 그것들은 일반적으로 1 중량% 미만, 보통 0.001-0.5 중량%의 범위, 예를 들어, 0.01-0.25 중량% 사이, 0.01-0.1 중량% 사이의 최종 농도를 제공하기 위해 액체 샘플과 혼합될 것이다. 예를 들어, 추가된 다기능성 유기 과산화물의 총량은 전체 액체 샘플의 약 0.75 중량%, 0.5 중량%, 0.25 중량%, 0.2 중량%, 0.1 중량%, 0.075 중량%, 0.05 중량%, 0.025 중량%, 0.01 중량%, 또는 0.005 중량%이다. 전형적인 양은 약 0.05%이다. 불활성화제는 넓은 pH 범위에 걸쳐, 예를 들어, pH 5 및 10 사이, pH 6 및 9 사이, 또는 pH 7±0.5에서 사용될 수 있다. 불활성화는 완충액의 존재시 (조성물 내에 불활성화제와 함께 존재할 수도 있다) 발생할 수도 있지만, 이것은 보통 필수적이지 않다.

[0116] 불활성화제는 어느 특정 상황에서도 원하는 결과를 위한 결합된 온도/시간 계획으로 사용될 것이고, 실질적으로 같은 결과를 이루어지지만 이 두 인자는 다를 수 있다. 불활성화는 증가된 온도에서 더 빠를 것이고, 그래서 불활성화 기간은 짧아지나. 상황에 의존적으로, 불활성화 온도는, 예를 들어, 긴 불활성화 시간 (예를 들어, 몇

시간 또는 몇 일)에 0℃로 낮게 유지되거나, 짧은 시간 동안 (예를 들어, 단지 몇 분 동안) 60℃로 높게 유지될 수 있다. 하지만, 더 높은 온도에서, 많은 기능성 단백질 또는 항원은 피해를 입거나 파괴될 것이고, 그래서 바람직한 처리는 보통 더 긴 시간 동안 더 낮은 온도 (예를 들어, 30℃ 미만)를 활용할 것이다. 어느 특정 상황에서 이 파라미터의 효과는 쉽게 테스트될 수 있다.

[0117] 불활성화제는 원하는 처리 시간 동안 원하는 샘플에서 화합물이 원하는 미생물을 불활성화시키는 것을 가능하게 하는 온도에서 사용될 것이다. 따라서 불활성화는 어느 적합한 온도, 예를 들어, 0-60℃ 사이, 10-50℃ 사이, 15-40℃ 사이, 15℃-25℃ 사이, 19-23℃ 사이, 등에서도 일어날 수도 있다. 불활성화는 전형적으로 실질적으로 일정한 온도, 예를 들어, ±2℃, +1℃에서 일어날 것이다. 하지만, 일부 구체예에서, 불활성화는 다른 온도의 위상, 예를 들어, 저온에서 1 위상 (예를 들어, 약 4℃와 같은, 2-8℃ 사이) 및, 전형적으로 적어도 1 위상보다 적어도 10℃ 더 높은 고온 (예를 들어, 약 37℃와 같은, 25-50℃)에서 2 위상, 또는 고온 (예를 들어, 약 37℃와 같은, 25-50℃)에서 1 위상 후에 저온 (예를 들어, 약 4℃와 같은, 2-8℃ 사이)에서 2 위상을 사용한다.

[0118] 2-위상 공정은 다기능성 과산화물이 불활성화 및 핵산 분해 모두에 사용되는 경우 특히 유용하다. 전형적인 계획에서, 더 낮은 온도 상은 바이러스 불활성화를 선호할 수 있는 반면 더 높은 온도 상은 핵산 분해를 선호할 수 있다.

[0119] 불활성화는 원하는 온도로 원하는 샘플에서 미생물을 이상적으로 원하는 미생물의 면역원성을 감소시키지 않고 불활성화시키는데 충분한 시간 동안 사용될 것이다. 불활성화 처리는 전형적으로 15분 및 72시간 사이, 예를 들어, 6-48시간, 12-36시간, 18-26시간, 또는 약 16 또는 약 24시간 동안 유지한다.

[0120] 불활성화되는 미생물의 성질 및 산업적 설정에 의존적으로, 숙련자는 (i) 불활성화 시간, (ii) 불활성화제의 농도, 및 (iii) 불활성화 온도의 적합한 조합을 선택할 수 있다. 실제로, 백신 항원에 대한 불활성화 처리는 최대 72시간까지 유지되지만, 실제적인 이유로 진행 시간은 최대 24시간 이하가 바람직하다. 하지만, 예를 들어, 박테리아 항원을 해독하기 위해, 최대 몇 주의 훨씬 더 긴 불활성화 시간이 또한 사용될 수 있다. 강력한 항원에 대해, 또는 폐기물의 미생물 불활성화에 대해, 더 높은 불활성화제 농도 및 단지 분 또는 몇 시간의 더 짧은 불활성화 시간이 선택될 수도 있다.

[0121] 불활성화 공정 또는 핵산 분해 공정은 단일 라운드 처리에 의해 이루어지는 것보다 더 높은 레벨의 분해를 이루거나 확실히 하기 위해 반복을 사용하여, 한 번 이상 수행될 수도 있다 (즉, 다기능성 유기 과산화물이 샘플에 추가되고, 샘플에서 작용하는 것이 허용되고, 그때 추가의 다기능성 유기 과산화물이 추가된다, 등). 예를 들어, 공정은 두 번 수행될 수도 있다. 각각의 라운드의 시간, 온도 및 농도를 포함하는 조건은 같거나 다를 수도 있다. 조건은 달라질 수도 있어서 다른 라운드는 다른 초점, 예를 들어, 불활성화를 선호하는 한 라운드, 핵산 분해를 선호하는 또 다른 라운드, 등을 가질 수도 있다. 어느 두 라운드가 바람직하게 같은 다기능성 유기 과산화물을 사용하지만, 대안으로 그것들은 다른 다기능성 유기 과산화물을 사용할 수 있다. 다기능성 유기 과산화물이 사용된 두 라운드 사이에서, 공정은 남은 바이러스 다기능성 유기 과산화물이 제거되고 및/또는 분해되는 단계를 수반할 수 있지만, 일부 구체예에서 두 번째 라운드는 이 제거 없이 진행될 수 있다.

[0122] **조합 처리**

[0123] 본 발명의 불활성화제는 알킬화제, 즉, 화합물에 알킬기를 도입하는 물질과 조합으로 사용될 수도 있다.

[0124] 적합한 알킬화제는 β-프로피오락톤 (BPL)과 같은, 모노알킬화제를 포함한다. BPL은 많은 백신의 제조시 바이러스의 불활성화를 위해 사용되는 모노알킬화제이다. BPL은 그것이 알킬화 및 탈퓨린화에 의해 구조적 변형을 일으키는 경우 핵산을 포함하는 다양한 생물학적 분자와 반응한다.

[0125] 따라서, 본 발명의 공정이 다기능성 유기 과산화물이 사용되는 단계를 수반하는 경우, 공정은 또한 알킬화제가 사용되는 단계를 수반할 수 있다. 다기능성 유기 과산화물 및 알킬화제를 동시에 사용하는 대신에, 이 두 단계는 바람직하게 별도로 수행된다, 즉, 다기능성 유기 과산화물이 사용되고 알킬화제가 나중에 사용되거나, 알킬화제가 이미 사용된 후에 다기능성 유기 과산화물이 사용된다.

[0126] 따라서, 예를 들어, 본 발명은 (i) 다기능성 유기 과산화물 및 (ii) BPL과 같은, 알킬화제와, 어느 순서로든, 접촉하는 단계를 포함하는, 미생물 함유 샘플을 처리하는 공정을 제공한다.

[0127] 유사하게, 본 발명은 (i) 다기능성 유기 과산화물 및 알킬화제와, 어느 순서로든, 접촉하는 단계; (ii) 단계 (i)의 생성물로부터 약학적 조성물을 제조하는 단계를 포함하는, 약학적 조성물을 제조하는 방법을 제공한다. 모든 처리가 된 단계 (i)는 미생물의 매우 좋은 불활성화를 이룬다.

- [0128] 본 발명은 또한 (i) 미생물 및 다기능성 유기 과산화물의 반응 생성물, (ii) 미생물 및 알킬화제의 반응 생성물, 및/또는 (iii) 미생물, 다기능성 유기 과산화물 및 알킬화제의 반응 생성물 중에 둘 이상을 포함하는 액체 조성물을 제공한다. 조성물은  $\beta$ -히드록시프로피온산을 포함할 수도 있다.
- [0129] 본 발명은 샘플을 다기능성 유기 과산화물에 접촉시키는 단계를 포함하는, 샘플을 처리하는 방법을 제공하는데, 샘플은 미생물 함유 샘플 및 BPL과 같은 알킬화제의 반응 생성물이다. 반대로, 본 발명은 또한 샘플과 BPL과 같은 알킬화제가 접촉하는 단계를 포함하는, 샘플을 처리하는 방법을 제공하는데, 샘플은 미생물 함유 샘플 및 다기능성 유기 과산화물의 반응 생성물이다. 본 발명은 또한 이 두 공정 중에 하나로부터 일어난 처리된 샘플을 사용하는 단계를 포함하는, 약학적 조성물을 제조하는 방법을 제공한다.
- [0130] 상기 언급된 바와 같이, 알킬화제와 조합으로 사용될 때, 적어도 한 라운드의 처리는 알킬화제에 의한 것이고 적어도 한 라운드의 처리는 다기능성 유기 과산화물에 의한 것이다. 샘플의 불활성화의 첫 번째 라운드에서 알킬화제를 처리할 수도 있고 불활성화의 두 번째 라운드에서 다기능성 유기 과산화물, 또는 대안으로 불활성화의 첫 번째 라운드에서 다기능성 유기 과산화물을 처리할 수도 있고 불활성화의 두 번째 라운드에서 알킬화제를 처리할 수도 있다. 불활성화의 추가의 라운드는 알킬화제 또는 다기능성 유기 과산화물과 함께 (또는 어느 다른 불활성화제와 함께) 일 수도 있다.
- [0131] 처리의 각 라운드의 시간, 온도 및 농도를 포함하는 조건은 같거나 다를 수도 있다. BPL에 의한 처리에 대한 유용한 조건은 하기 설명된다:
- [0132] BPL은 전형적으로 1 부피% 미만 (예를 들어, 1 부피%, 0.75 부피%, 0.5 부피%, 0.25 부피%, 0.2 부피%, 0.1 부피%, 0.075 부피%, 0.05 부피%, 0.025 부피%, 0.01 부피%, 또는 0.005 부피%)의 최종 농도로 추가된다. 바람직하게, BPL은 0.1 부피% 및 0.01 부피% 사이에서 사용된다.
- [0133] 알킬화제를 바람직하게 완충된 수성 샘플에 추가하였고 용액의 pH는 바람직하게 5 및 10 사이에서 유지된다. 더 바람직하게 용액의 pH는 6 및 9 사이에서 유지된다. 더 바람직하게 용액의 pH는 7 및 8 사이에서 유지된다.
- [0134] 알킬화제에 의한 연이은 처리 사이에, 알킬화제 제거 단계가 있을 수도 있지만, 1차 처리에서 남은 바이러스 알킬화제를 제거하지 않고 2차 처리를 위해 알킬화제가 추가될 수도 있다. 유사하게, 다기능성 유기 과산화물이 사용되면, 그것은 처리하기 전에 알킬화제에 의해 제거될 수도 있다.
- [0135] 알킬화제, 특히 BPL의 처리는 다른 온도를 가진 상을 수반할 수도 있다. 예를 들어, 저온에서 1 위상 (예를 들어, 약 4°C와 같은, 2-8°C 사이) 및, 전형적으로 적어도 1 위상보다 적어도 10°C 더 높은 고온 (예를 들어, 약 37°C와 같은, 25-50°C)에서 2 위상이 있을 수도 있다. 이 2-위상 공정은 알킬화제가 불활성화 및 DNA 분해 모두에 사용되는 경우 특히 유용하다. 전형적인 계획에서, 바이러스 불활성화는 저온 위상 중에 일어나고, DNA 분해는 고온 위상 중에 일어난다. 하기 더 상세히 설명된 바와 같이, 증가된 온도는 또한 열-민감 알킬화제의 제거를 가능하게 할 수 있다.
- [0136] 알킬화제 및 어느 남은 바이러스 부산물도 바람직하게 약의 최종 제형 전에 제거된다. 따라서 최종 조성물은 0.1% 미만 (예를 들어, 0.1%, 0.05%, 0.025%, 0.01%, 0.005%, 0.001%, 또는 0.01% 미만)의 유리 프로피온산 및 결합된 BPL을 함유할 수 있다. 바람직하게, 최종 약 조성물은 0.01% 미만의 BPL을 함유한다.
- [0137] BPL은 비-독성  $\beta$ -히드록시프로피온산으로 가수분해를 일으키기 위해, 가열함으로써 편리하게 제거될 수 있다. 가수분해에 필요한 시간의 길이는 BPL의 총량 및 온도에 의존한다. 더 높은 온도는 더 빠른 가수분해를 제공하지만, 온도를 활성 단백질 성분을 손상시킬 정도로 높게 올리면 안된다. 약 37°C로 2-2.5시간 가열이 BPL 제거에 적합하다. DNA 단편화는 2-8°C에서 바이러스 불활성화 단계 중에 보다 주로 37°C에서 BPL 가수분해 단계 중에 일어난다.
- [0138] **약학적 조성물 및 생성물**
- [0139] 본 발명은 미생물을 불활성화시키기 위해 미생물 함유 샘플 (보통 액체 샘플)을 다기능성 유기 과산화물에 접촉시키는 첫 번째 단계 후, 불활성화된 물질로부터 약학적 조성물을 제조하는 단계를 포함하는, 약학적 조성물을 제조하는 방법을 제공한다. 활성화된 물질은 약을 제조하는데 직접적으로 사용될 수도 있거나, 그것은 추가의 공정, 예를 들어, 희석, 정제, 다른 활성 성분들과 조합, 불활성 약 성분과 조합, 등을 받게 될 수도 있다.
- [0140] 예를 들어, 본 발명은 바이러스를 불활성화시키기 위해 바이러스 함유 샘플 (예를 들어, 배양액과 같은, 액체 샘플)과 다기능성 유기 과산화물이 접촉하는 첫 번째 단계 후, 불활성화된 바이러스로부터 약학적 조성물을 제조하는 단계를 포함하는, 백신을 제조하는 방법을 제공한다. 불활성화된 바이러스는 백신을 제조하는데 직접적



으로 사용될 수도 있거나, 그것은 추가의 공정, 예를 들어, 희석, 바이러스 성분의 추가의 정제, 다른 백신 항원 (바이러스성 및 박테리아성)과 조합, 완충액과 조합, 보조제와 조합, 등을 받게 될 수도 있다.

- [0141] 이 공정은 미생물 함유 샘플을 제조하는 초기 단계, 예를 들어, 바이러스 또는 박테리아 배양의 단계를 포함할 수도 있다.
- [0142] 바이러스를 성장시킨 후, 불활성화제는 정제된 비리온, 예를 들어, 정화된 세포 배양액에 존재하는 비리온, 또는 이러한 정화된 세포 배양액으로부터 정제된 비리온에 사용될 수도 있다. 방법은 정화에 의한 세포 물질의 제거, 및, 예를 들어, 크로마토그래피에 의한, 정화된 세포 배양액으로부터 비리온의 정제를 수반할 수도 있다. 불활성화제는 이 방식으로, 또는, 초미세/투석여과의 추가의 선택적인 단계 후에 정제된 비리온에 사용될 수도 있다. 상기 언급된 바와 같이, 다기능성 유기 과산화물은, 바이러스를 불활성화시키는 것 이외에, 바이러스가 성장한 세포 물질에 남은 어느 바이러스 DNA도 분해할 수 있다.
- [0143] 불활성화제는 엔도톡신 제거가 일어나는 단계 전에 및 후에 사용될 수도 있다.
- [0144] 백신 조성물은, 예를 들어, 불활성화된 인플루엔자 바이러스의 분할 또는 표면 항원 백신의 제조에서와 같이, 불활성화된 바이러스의 면역원성 단백질의 정제에 의해 제조될 수도 있다.
- [0145] 불활성화된 바이러스는 어느 적합한 물질에, 예를 들어, 세포주 배양액에, 1차 세포 배양액에, 난세포 (egg)에 번식될 수도 있다. 세포 배양은 종종, 햄스터, 소, 영장류 (사람 및 원숭이를 포함) 및 개 세포와 같은, 포유동물 세포를 사용할 것이다. 신장 세포, 섬유모세포, 망막 세포, 폐 세포, 등과 같은, 다양한 세포 타입이 사용될 수도 있다. 적합한 햄스터 세포의 예는 이름 BHK21 또는 HKCC를 갖는 세포주이다. 적합한 원숭이 세포는, 예를 들어, Vero 세포주와 같은 신장 세포와 같은, 아프리카 녹색원숭이 (African green monkey cells) 세포이다. 적합한 개 세포는, 예를 들어, CLDK 및 MDCK 세포주와 같은, 신장세포이다. 따라서 적합한 세포주는 MDCK; CHO; 293T; BHK; Vero; MRC-5; PER.C6; WI-38; 등을 포함하지만, 이에 제한되지 않는다. 인플루엔자 바이러스를 키우기 위해 바람직한 포유동물은 Madin Darby 개 신장으로부터 유래한, MDCK 세포; 아프리카 녹색원숭이 (*Cercopithecus aethiops*)신장으로부터 유래한, Vero 세포; 또는 사람 배아 망막아세포로부터 유래한, PER.C6 세포를 포함한다. 이 세포주는, 예를 들어, American Type Cell Culture (ATCC) 콜렉션에서, Coriell Cell Repositories에서, European Collection of Cell Cultures (ECACC)에서, 널리 사용 가능하다. 예를 들어, ATCC는 카탈로그 번호 CCL-81, CCL-81.2, CRL-1586 및 CRL-1587하에 다양한 다른 Vero 세포를 공급하고, 그것은 카탈로그 번호 CCL-34하에 MDCK 세포를 공급한다. PER.C6는 보증 번호 96022940하에 ECACC로부터 사용 가능하다. 포유동물 세포를 사용하는 것뿐만 아니라, 바이러스는 오리 (예를 들어, 오리 망막) 또는 암탉, 예를 들어, 닭 배아 섬유모세포 (CEF), 등으로부터 유래한 세포주를 포함하는, 조류 세포 또는 세포주에서 자랄 수 있다 (예를 들어, 참고문헌 24-26 참조). 예는 닭 배아 줄기 세포 EB45, EB14, 및 EB 14-074로부터 유래한 EBx 세포주를 포함하는, 조류 배아 줄기 세포를 포함한다.
- [0146] 한 유용한 세포주는 Madin Darby 개 신장으로부터 유래한, MDCK이다. 원래의 MDCK 세포주는 CCL-34로서 ATCC로부터 사용 가능하다. MDCK 세포의 유도체는 또한 사용될 수도 있다. 예를 들어, 참고문헌 14는 현탁 배양액에서 성장에 적당한 MDCK 세포주 ('MDCK 33016', DSM ACC 2219로 보증)를 개시한다. 유사하게, 참고문헌 32는 혈청 없는 배지의 현탁액에서 성장하는 MDCK 유래 세포주 ('B-702', FERM BP-7449로 보증)를 개시한다. 참고문헌 33은 'MDCK-S' (ATCC PTA-6500), 'MDCK-SF101' (ATCC PTA-6501), 'MDCK-SF102' (ATCC PTA-6502) 및 'MDCK-SF103' (PTA-6503)를 포함하는, 비-종양 형성 MDCK 세포를 개시한다.
- [0147] 참고문헌 34는 'MDCK.5F1' 세포 (ATCC CRL-12042)를 포함하는, 감염에 높은 민감도를 갖는 MDCK 세포주를 개시한다. 이 MDCK 세포주 중에 어느 것도 사용될 수 있다.
- [0148] 바이러스는 현탁 배양액에서 (예를 들어, 참고문헌 14, 35 & 36 참조) 또는 부착 배양에서 자랄 수도 있다. 현탁 배양에 적합한 한 MDCK 세포주는 MDCK 33016 (DSM ACC 2219로 보증)이다. 대안으로서, 마이크로담체 배양이 사용될 수 있다.
- [0149] 바이러스는 혈청 없는 배양 배지 및/또는 단백질 없는 배지에서 자랄 수도 있다. 배지는 사람 또는 동물 기원의 혈청으로부터 첨가물을 함유하지 않으면 본 발명의 맥락에서 혈청 없는 배지로서 나타난다. 단백질이 없다는 것은 단백질, 성장 인자, 다른 단백질 첨가물 및 비-혈청 단백질을 제외하고 세포의 증식이 일어나는 배양을 의미한다는 것으로 생각되지만, 선택적으로 트립신 또는 바이러스 성장에 필수적일 수도 있는 다른 프로테아제와 같은 외인성 단백질을 포함할 수 있다.
- [0150] 본 발명은 또한 자체가 약학적 조성물이 아니지만, 약학적 조성물의 제조 중에 사용되는 물질을 제조하기 위해

사용될 수 있다. 예를 들어, 본 발명은 기존의 또는 잠재적인 오염 바이러스를 불활성화시키기 위해 다기능성 유기 과산화물을 사용함으로써, 발효 배양 공정으로부터 재조합 단백질 분자와 같은, 안전한 약학적 생성물을 제조하는 방법을 제공한다. 이러한 공정에 존재하거나 도입될 수도 있는 바이러스는, 예를 들어, 많은 영구 세포주, 특히, CHO (중국 햄스터 난소) 세포 또는 마우스 골수종 세포와 같은, 설치류 세포에 존재하는 레트로바이러스이다. 다른 오염 물질은 돼지 트립신, 소 기원의 배지 보충제, 또는 동물 기원의 단백질 가수분해물과 같은, 동물 유래한 원재료로부터 기원한 동물 바이러스일 수도 있다. 불활성화제는 대부분의 어느 단계에서도 제조 공정으로 도입될 수 있다: 그것은 원재료, 완충액, 배지 및 다른 시작 물질의 사전 처리를 위해 사용될 수 있고, 대량의 원재료를 수확 (발효기 수확과 같은)하는 중에 또는 후에, 또는 다음의 농축 및 정제 단계 중에 또는 후에 적용될 수도 있다. 하지만, 현실적인 이유로 공정을 통해 활성 미생물의 운반을 방지하기 위해 공정 중에 초기에 불활성화를 수행하는 것이 바람직하다.

- [0151] 약학적 조성물은 보통 그것들의 항원 이외의 성분을 포함한다. 예를 들어, 그것들은 전형적으로 하나 이상의 약학적 담체 및/또는 첨가제를 포함한다. 이러한 성분의 철저한 논의는 참고문헌 37에서 사용 가능하다. 백신 조성물은 또한, 예를 들어, 참고문헌 38 및 39에 개시된 바와 같이, 보조제를 포함할 수도 있다 보조제를 포함할 수도 있다 (예를 들어, 하나 이상의 알루미늄 염을 포함하거나, 서브미크론 수중유 에멀전을 포함하는 보조제).
- [0152] 약학적 조성물은 바람직하게, 특히 투여의 시점에, 수성 형태로 있지만, 그것들은 또한 비-수성 액체 형태로 또는 건조 형태, 예를 들어 젤라틴 캡슐로서, 또는 동결건조물로서 나타날 수 있다.
- [0153] 약학적 조성물은 티메osal 또는 2-페녹시에탄올과 같은, 하나 이상의 방부제를 포함할 수도 있다. 수는 없는 조성물이 바람직하고, 방부제 없는 백신이 바람직하다.
- [0154] 약학적 조성물은, 예를 들어, 탄성을 조절하기 위해, 나트륨 염과 같은, 생리학적 염을 포함할 수 있다. 염화 나트륨 (NaCl)이 전형적인데, 이것은 1 및 20 mg/ml 사이에서 존재할 수도 있다. 존재할 수도 있는 다른 염은 염화 칼륨, 인산 이수소 칼륨, 인산 이나트륨 탈수물, 염화 마그네슘, 염화 칼슘, 등을 포함한다.
- [0155] 약학적 조성물은 20 mOsm/kg 및 400 mOsm/kg 사이, 예를 들어, 240-360 mOsm/kg 사이, 또는 290-310 mOsm/kg 사이의 삼투압을 가질 수 있다.
- [0156] 약학적 조성물은 하나 이상의 완충액을 포함할 수도 있다. 전형적인 완충액은 인산 완충액, 트리스 완충액, 붕산 완충액, 숙신산 완충액, 히스티딘 완충액 (특히 알루미늄 산화물 보조제와 함께); 또는 시트르산염 완충액을 포함한다. 완충액은 전형적으로 5-20 mM 범위에 포함될 것이다.
- [0157] 약학적 조성물은 전형적으로 5.0 및 9.5 사이, 예를 들어, 6.0 및 8.0 사이의 pH를 갖는다.
- [0158] 약학적 조성물은 바람직하게 멸균된다.
- [0159] 약학적 조성물은, 예를 들어, 투여 당 1 EU (엔도톡신 유닛, 표준 측정) 미만, 및 바람직하게 투여 당 0.1 EU 미만을 함유하는, 바람직하게 비-발열성이다.
- [0160] 약학적 조성물은 바람직하게 글루텐이 없다.
- [0161] 약학적 조성물은 세정제, 예를 들어, 폴리옥시에틸렌 소르비탄 에스테르 계면활성제 ('Tweens'로 알려짐), 옥톡시놀 (옥톡시놀-9 (Triton X-100) 또는 티-옥틸페녹시폴리에톡시에탄올과 같은), 세틸 트리메틸 암모늄 브롬화물 ('CTAB'), 또는 데옥시콜산 나트륨을 포함할 수도 있다. 세정제는 소량으로만 존재할 수도 있다.
- [0162] 조성물은 일회 투여를 위한 물질을 포함할 수도 있거나, 다회수 면역화를 위한 물질 (즉, '다회수 투여' 키트)을 포함할 수도 있다. 방부제의 포함은 다회수 투여 방식에 유용하다. 다회수 투여 조성물의 방부제의 포함에 대한 대안으로서 (또는 이외에), 조성물은 물질의 제거를 위한 무균 어댑터를 갖는 용기에 함유될 수도 있다.
- [0163] 약학적 조성물, 및 특히 백신은 전형적으로 약 0.5 ml의 투여량으로 투여되지만, 절반 투여량 (즉, 약 0.25 ml)이 아이들에게 투여될 수도 있다.
- [0164] 약학적 조성물은 다양한 방법으로 투여될 수 있다. 가장 바람직한 경로는 근육 내 주사에 의한 것이지만 (예를 들어, 팔 또는 다리에), 다른 사용 가능한 경로는 피하 주사, 비강내, 구강, 피내, 경피 (subcutaneous), 경피 (transdermal), 등을 포함한다.
- [0165] 약학적 조성물은 동물 (및, 특히, 사람) 환자에 투여에 적합하고, 따라서 사람 및 수의과의 사용 모두를 포함한다. 그것들은 환자에 조성물을 투여하는 단계를 포함하는, 환자의 면역 반응을 일으키는 방법으로 사용될 수도

있다.

- [0166] 이 방법에 의해 일어난 면역 반응은 일반적으로 항체 반응, 바람직하게 보호적 항체 반응을 포함할 것이다. 수용력 및 바이러스성 백신 접종 후에 보호 능력을 증화하는, 항체 반응을 평가하는 방법은 업계에 잘 알려져 있다. 인플루엔자 바이러스에 대해, 예를 들어, 사람 연구는 HA에 대한 항체 적정 농도가 보호와 연관성이 있다는 것을 나타낸다.
- [0167] 상기 언급된 바와 같이, 백신 조성물은 하나 이상의 보조제를 포함할 수 있는데, 이것은 조성물을 받은 환자에서 유도된 면역 반응 (체액의 및/또는 세포의)을 향상시키도록 작용할 수 있다. 유용한 보조제는 하나 이상의 알루미늄 염을 포함할 수 있다. 또 다른 유용한 보조제는 수중유 에멀전을 포함할 수 있다. 다른 유용한 보조제는 업계에 알려져 있다.
- [0168] 수산화 알루미늄 및 인산 알루미늄으로 알려진 보조제는 단독으로 또는 조합으로, 사용될 수도 있다. 이 이름은 고전적이지만, 아무것도 기존의 실제 화합물의 정확한 설명이 아니기 때문에, 편의상 사용된다 (예를 들어, 참고문헌 40의 챕터 9 참조). 본 발명은 일반적으로 보조제로 사용되는 "수산화물" 또는 "인산염" 보조제 중에 어느 것도 사용할 수 있다. 환자에 투여를 위한 조성물에서 Al<sup>+++</sup>의 농도는 바람직하게 5 mg/ml 미만, 예를 들어, 4 mg/ml 이하, 3 mg/ml 이하, 2 mg/ml 이하, 1 mg/ml 이하, 등이다. 바람직한 범위는 0.3 및 1 mg/ml 사이이다. 0.85 mg/투여의 최대가 바람직하다.
- [0169] 다양한 유용한 수중유 에멀전 보조제가 알려져 있고, 그것들은 전형적으로 오일 및 계면활성제가 생분해 가능하고 (대사 가능한) 생체에 적합한, 적어도 하나의 오일 및 적어도 하나의 계면활성제를 포함한다. 안정한 에멀전을 제공하기 위해 미세유동화기로 이루어진 이 작은 크기의, 에멀전의 오일 방울은 일반적으로 직경 1 μm 미만이다. 그것들이 여과 멸균될 수 있기 때문에 220 nm 미만의 평균 직경을 가진 방울이 바람직하다. 유용한 보조제는 스쿠알렌 및/또는 폴리소르베이트 80을 포함할 수 있다. 사용될 수 있는 적합한 보조제는 MF59 및 AS03으로 알려진 것들을 포함한다.
- [0170] 면역원성 약학적 조성물은 일회 투여 계획 또는 다회수 투여 계획에 의해 투여될 수 있다. 다회수 투여는 1차 면역화 계획 및 촉진 면역화 계획에 사용될 수도 있다. 다회수 투여 계획에서 다양한 투여량이 제공될 수도 있다.
- [0171] 같거나 다른 경로, 예를 들어, 비경구 프라임 및 점막의 촉진, 점막의 프라임 및 비경구 촉진, 등에 의해 제공될 수도 있다. 하나 이상의 투여량 (전형적으로 두 번의 투여량)의 투여는 면역학적으로 나이브 (naive) 환자에 특히 유용하다. 다회수 투여는 전형적으로 적어도 1주 간격 (예를 들어, 약 2주, 약 3주, 약 4주, 약 6주, 약 8주, 약 10주, 약 12주, 약 16주, 등)으로 투여될 것이다.
- [0172] **숙주 세포 DNA**
- [0173] 상기 언급된 바와 같이, 다기능성 유기 과산화물은 핵산을 분해하기 위해 본 발명에 따라 사용될 수 있다. 이것은 특히 예를 들어, 이것은 세포 배양액에서 바이러스의 성장 후에 존재하는, 숙주 세포 DNA와 같은, DNA를 분해하는데 유용하다. 한다.
- [0174] 핵산의 분해를 위해, 다기능성 유기 과산화물의 처리는 이상적으로 핵산이 10<sup>8</sup> 염기쌍 당 10 abasic 뉴클레오티드 잔기를 포함할 때까지, 예를 들어, 그것이 10<sup>7</sup> 염기쌍 당 10 abasic 뉴클레오티드 잔기, 10<sup>6</sup> 염기쌍 당 10 abasic 뉴클레오티드 잔기, 또는 10<sup>5</sup> 염기쌍 당 10 abasic 뉴클레오티드 잔기를 포함할 때까지 계속된다. abasic 잔기 (및 특히 다음 탈퓨린화)의 존재는 핵산 백본의 분할로 이어질 수 있다.
- [0175] 핵산의 분해를 위해, 다기능성 유기 과산화물의 처리는 이상적으로 남은 바이러스 DNA 가닥의 평균 길이가 1000 염기쌍 미만 (예를 들어, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 200, 150, 100, 75, 또는 50 염기쌍 미만)일 때까지 계속된다. 바람직하게, 남은 바이러스 DNA의 길이는 500 염기쌍 미만이고, 더 바람직하게 200 염기쌍 미만이다. 어느 남은 바이러스 DNA의 크기는 모세혈관 겔 전기영동 또는 핵산 증폭 기술을 포함하는, 표준 기술에 의해 측정될 수도 있다. 이 남은 바이러스 짧은 단편은 그것들이 기능성 단백질을 암호화하지 않고 사람 수신자의 염색체로 바뀌거나, 그렇지 않으면 수신자 DNA 복제 기관에 의해 인식되지 않거나 할 수 없을 정도로 작다. 일반적으로, 기능성 단백질로 번역될 수 있는 뉴클레오티드 서열은 기능성 단백질에 대한 프로모터 영역, 시작 코돈, 종결 코돈, 및 내부 암호화 서열을 필요로 한다. 다기능성 유기 과산화물의 처리에 의한 바와 같이, DNA 손상이 발생한 경우, 전사 및/또는 번역이 더 길게 일어날 수 있는, 이 많은 영역들은 바뀌거나 파괴된다.

- [0176] 약학적 조성물은 바람직하게 투여 당 10 ng 미만 (바람직하게 1 ng 미만, 및 더 바람직하게 100 pg 미만)의 남은 바이러스 DNA를 함유하지만, 소량의 숙주 세포 DNA는 여전히 존재할 수도 있다. 일반적으로, 본 발명의 조성물로부터 제외하는 것이 가장 바람직한 숙주 세포 DNA는 200 염기쌍보다 더 긴 DNA이다.
- [0177] 남은 바이러스 숙주 세포 DNA의 측정은 지금 생물학적으로 일상적인 규제 요건이고 당업자의 정상 수용력 내에 있다. DNA 측정에 사용된 검정은 전형적으로 입증된 검정일 것이다. 입증된 검정의 성능 특성은 수학적으로 및 정량화 가능한 용어로 설명될 수 있고, 그것의 오차의 가능한 공급원이 확인될 것이다. 검정은 일반적으로 정확도, 정밀도, 특이성과 같은 특성에 대해 테스트될 것이다. 검정이 측정되고 (예를 들어, 알려진 숙주 세포 DNA의 표준량에 대해) 테스트되면 그때 정량인 DNA 측정을 일상적으로 수행할 수 있다. DNA 정량화에 대하여 3개의 원칙적인 기술이 사용되었다: 서던 블롯 또는 슬롯 블롯과 같은 하이브리드화 방법; Threshold™ 시스템과 같은, 면역 검정 시스템; 및 정량인 PCR. 이 방법들은 모두 당업자에게 익숙하지만, 각각의 방법의 정확한 특성, 예를 들어, 하이브리드화를 위한 프로브의 선택, 증폭을 위한 프라이머 및/또는 프로브의 선택, 등은 문제의 숙주 세포에 의존적일 수도 있다. *Molecular Devices*의 Threshold™ 시스템은 전체 DNA의 피코그램 레벨에 대한 정량인 검정이고, 생물 약제에서 오염 DNA의 레벨을 관찰하는데 사용되었다. 전형적인 검정은 비오틴화 ssDNA 결합 단백질, 우레아제-접합된 항-ssDNA 항체, 및 DNA 사이에 비-서열-특이적 반응 복합체 형성을 수반한다. 모든 검정 구성 요소는 제조자로부터 사용 가능한 완벽한 Total DNA Assay Kit에 포함된다. 다양한 상업적인 제조자들은 남은 바이러스 숙주 세포 DNA를 검출하기 위한 정량 PCR 검정, 예를 들어, AppTec™ Laboratory Services, BioReliance™, Althea Technologies, 등을 제공한다. 사람 바이러스성 백신의 숙주 세포 DNA 오염을 측정하기 위한 화학발광 하이브리드화 검정 및 전체 DNA Threshold™ 시스템의 비교는 참고문헌 46에서 발견할 수 있다.
- [0178] 특히 MDCK 세포와 같은, 개 세포에 관하여, 게놈의 분석은 13개의 암호화 서열이 길이에서 500 bp 미만, 3개의 서열은 200 bp 미만 및 1개의 서열은 100 bp 미만인 것으로 나타난다. 따라서 200 bp 미만으로의 DNA 단편화는 실질적으로 모두 암호화 서열을 제거하고, 그것은 어느 단편도 실제로 그 대략의 길이가 3개의 유전자 중에 하나와 일치할 가능성은 크지 않다 (즉: 81 bp에서 세크레틴; 108 bp에서 PYY; 및 135 bp에서 오스테오칼신).
- [0179] 짧은 분해된 DNA는 긴 DNA 보다 조성물로부터 더 쉽게 제거될 수 있고 그래서 본 발명은 약학적 조성물에서 남은 바이러스 DNA의 양을 감소시키는데 유용하다. 자유 DNA를 분해하기 위해 미생물 함유 조성물의 처리 후, DNA 분해 생성물은 선택적으로 제거될 수 있다. 그러므로, 바이러스 함유 샘플에 대하여, DNA 단편은 바이러스로부터 쉽게 분리될 수 있다. 작은 가용성 분리된 DNA 단편은, 예를 들어, 음이온 교환 크로마토그래피, 크기-기반 방법, 등에 의해 바이러스로부터 쉽게 분리될 수 있다.
- [0180] **인플루엔자 백신**
- [0181] 본 발명은 백신 제조 중에 인플루엔자 바이러스를 불활성화시키는데 유용하다. 인플루엔자 바이러스에 대한 백신은 전체 비리온, '분할' 비리온, 또는 정제된 표면 항원 (헤마글루티닌을 포함하고, 보통, 뉴라미니다제를 또한 포함한다)에 기초할 수도 있다. 본 발명은 이 타입의 백신 중에 어느 것의 제조 중에서도 사용될 수 있다.
- [0182] 인플루엔자 비리온은 다양한 방법에 의해 바이러스 함유 유동체, 예를 들어, 요막액 또는 세포 배양 상층액으로부터 수확될 수 있다. 예를 들어, 정제 공정은 비리온을 방해하기 위해 세정제를 포함하는 선행 수크로스 구배 용액을 사용하는 락토솜분리를 수반한다. 항원은 선택적으로 회석 후, 투석여과에 의해 정제될 수도 있다.
- [0183] 'Tween-ether' 분할 공정을 포함하여, 서브비리온 조제물을 생산하기 위해 정제된 비리온에 세정제 (예를 들어, 에틸 에테르, 폴리소르베이트 80, 테옥시콜산, 트리-엔-부틸 인산염, Triton X-100, Triton N101, 브롬화 세틸 트리메틸암모늄, Tergitol NP9, 등)를 처리함으로써 분할 비리온을 얻었다. 예를 들어, 인플루엔자 바이러스의 분할 방법은 업계에 잘 알려져 있다. 예를 들어, 참고문헌 47-52, 등 참조한다. 바이러스의 분할은 전형적으로 전체 바이러스를 방해하거나 단편화함으로써 수행된다.
- [0184] 바이러스의 분할은 전형적으로 전체 바이러스를 방해하거나 단편화함으로써, 분할제 (splitting agent)의 방해 농도로 감염성 또는 비-감염성 여부에 의해 수행된다. 방해는 바이러스의 온전함을 바꾸는, 바이러스 단백질의 전체 또는 부분적인 가용화를 일으킨다. 바람직한 분할제는 비-이온성 및 이온성 (예를 들어, 양이온성) 계면활성제, 예를 들어, 알킬글리코시드, 알킬티오글리코시드, 아실당, 술포베타인, 베타인, 폴리옥시에틸렌알킬에테르, 엔, 엔-디아킬-Glucamid, Hecameg, 알킬페녹시-폴리에톡시에탄올, NP9, 사차 암모늄 화합물, 사르코실, CTAB (세틸 트리메틸 브롬화 암모늄), 트리-엔-부틸 인산염, 세타블론, 미리스틸트리메틸암모늄 염, 리포펙틴, 리포펙타민, 및 DOT-MA, 옥틸- 또는 노닐페녹시 폴리옥시에탄올 (예를 들어, Triton X-100 또는 Triton N101과 같은, Triton 계면활성제), 폴리옥시에틸렌 소르비탄 에스테르 (Tween 계면활성제), 폴리옥시에틸렌 에테르, 폴



리옥시에틸렌 에스테르, 등이다. 한 유용한 분할 공정은 데옥시콜산 나트륨 및 포름알데히드의 연이은 노력을 사용하고, 분할은 초기 비리온 정제 중에 (예를 들어, 수크로스 밀도 구배 용액에서) 일어날 수 있다. 따라서 분할 공정은 비리온 함유 물질의 정화 (비-비리온 물질을 제거하기 위해), 수확된 비리온의 농축 (예를 들어,  $\text{CaHPO}_4$  흡착과 같은, 흡착 방법을 사용하여), 비-비리온 물질로부터 전체 비리온을 분리, 밀도 구배 원심분리 단계에서 분할제를 사용하여 (예를 들어, 데옥시콜산 나트륨과 같은 분할제를 함유하는 수크로스 구배를 사용하여) 비리온의 분할, 및 원하지 않는 물질을 제거하기 위한 여과 (예를 들어, 초미세여과)를 수반할 수 있다. 분할 비리온은 유용하게 인산 나트륨 완충된 등장성 염화 나트륨 용액에 재현탁될 수 있다. 분할 인플루엔자 백신의 예는 BEGRIVAC™, FLUARIX™, FLUZONE™ 및 FLUSHIELD™ 제품이다.

[0185] 정제된 인플루엔자 바이러스 표면 항원 백신은 표면 항원 헤마글루티닌 및, 전형적으로 또한 뉴라미니다제를 포함한다. 정제된 형태의 이 단백질을 제조하는 공정은 업계에 잘 알려져 있다. FLUVIRIN™, AGRIPPAL™ 및 INFLUVAC™ 제품은 인플루엔자 서브유닛 백신이다.

[0186] HA는 현재 불활성화된 인플루엔자 백신의 주요 면역원이고, 백신 투여량은, 전형적으로 SRID에 의해 측정된, HA 레벨을 참고하여 표준화된다. 기존의 백신은 전형적으로 종 당 약 15  $\mu\text{g}$ 의 HA를 함유하지만, 예를 들어 아이들에 대해, 또는 유행성 상황에서, 또는 보조제를 사용할 때 더 낮은 투여량이 사용될 수 있다. 더 높은 투여량 (예를 들어, 3x 또는 9x 투여량)을 갖는 만큼,  $\frac{1}{2}$  (즉, 종 당 7.5  $\mu\text{g}$ ),  $\frac{1}{4}$  및  $\frac{1}{8}$ 과 같은 소량의 투여량이 사용되었다. 따라서 백신은 인플루엔자 종 당 0.1 및 150  $\mu\text{g}$  사이의 HA, 바람직하게 0.1 및 50  $\mu\text{g}$  사이, 예를 들어, 0.1-20  $\mu\text{g}$ , 0.1-15  $\mu\text{g}$ , 0.1-10  $\mu\text{g}$ , 0.1-7.5  $\mu\text{g}$ , 0.5-5  $\mu\text{g}$ , 등을 포함할 수도 있다. 특정 투여량은 예를 들어, 종 당 약 45, 약 30, 약 15, 약 10, 약 7.5, 약 5, 약 3.8, 약 3.75, 약 1.9, 약 1.5, 등을 포함한다.

[0187] 본 발명에 사용된 인플루엔자 종은 야생형 바이러스에서 발견된 바와 같이 자연적 HA, 또는 변형된 HA를 가질 수도 있다. 예를 들어, 조류 중에서 바이러스를 높은 병원성이 되도록 유발하는 결정 요인을 제거하기 위해 HA를 변형하는 것이 알려져 있다. 역유전학의 사용은 이러한 변형을 가능하게 한다.

[0188] 백신에 사용되는 인플루엔자 바이러스 종은 철마다 바뀐다. 유행성 기간 사이에, 백신은 전형적으로 두 개의 인플루엔자 A 종 (H1N1 및 H3N2) 및 하나의 인플루엔자 B 종을 포함하고, 삼가 백신이 전형적이다. 본 발명은 또한 H2, H5, H7 또는 H9 서브타입 종과 같은, 유행성 바이러스 종을 사용할 수도 있고, 유행성 종에 대한 인플루엔자 백신은 일가일 수도 있거나 유행성 종에 의해 보충된 정상 삼가 백신에 기초할 수도 있다. 계절 및 백신에 포함된 항원의 성질에 의존적이지만, 본 발명은 HA 서브타입 H1, H2, H3, H4, H5, H6, H7, H8, H9, H10, H11, H12, H13, H14, H15, 또는 H16 중에 하나 이상에 대해 보호할 수도 있다. 본 발명은 인플루엔자 A 바이러스 NA 서브타입 N1, N2, N3, N4, N5, N6, N7, N8 또는 N9 중에 하나 이상에 대해 보호할 수도 있다.

[0189] 본 발명의 조성물은 인플루엔자 A 바이러스 및/또는 인플루엔자 B 바이러스를 포함하는, 하나 이상 (예를 들어, 1, 2, 3, 4 이상)의 인플루엔자 바이러스 종의 항원을 포함할 수도 있다. 백신이 인플루엔자의 하나 이상의 종을 포함하는 경우, 다른 종은 전형적으로 독립적으로 자라고 바이러스를 수확하고 항원이 제조된 후에 혼합된다. 두 개의 인플루엔자 A 바이러스 종 및 하나의 인플루엔자 B 바이러스 종의 항원을 포함하는, 삼가 백신이 전형적이다. 두 개의 인플루엔자 A 바이러스 종 및 두 개의 인플루엔자 B 바이러스 종, 또는 세 개의 인플루엔자 A 바이러스 종 및 하나의 인플루엔자 B 바이러스 종을 포함하는, 사가 백신은 또한 유용하다.

[0190] 인플루엔자 바이러스가 특정 종에 대해 정제되면, 그것은, 예를 들어, 상기 설명된 바와 같이 사가 백신을 만들기 위해, 다른 종의 바이러스와 혼합될 수도 있다. 바이러스를 혼합하고 다가 혼합물의 DNA를 분해하는 것보다, 최종 다가 혼합물을 제공하기 위해 각각의 종을 독립적으로 처리하고 일가 벌크 (bulk)를 혼합하는 것이 바람직하다.

[0191] **일반**

[0192] 용어 "포함하다"는 "포함하다" 뿐만 아니라 "구성되다"를 포함한다. 예를 들어, X를 "포함하는" 조성물은 X의 단독으로 구성되거나 추가적인 것, 예를 들어, X + Y를 포함할 수도 있다.

[0193] 단어 "실질적으로"는 "완벽히"를 제외하지 않는다. 예를 들어, Y로부터 "실질적으로 자유로운" 조성물은 Y로부터 완벽히 자유일 수도 있다. 필요한 경우, 단어 "실질적으로"는 본 발명의 정의로부터 제외될 수도 있다.

[0194] 수치 x에 관하여 용어 "약"은 선택적이고, 예를 들어,  $x \pm 10\%$ 를 의미한다.

[0195] 특이적으로 진술되지 않으면, 둘 이상의 성분을 혼합하는 단계를 포함하는 공정은 어느 특이적 순서의 혼합을

필요로 하지 않는다. 따라서 성분은 어느 순서로도 조합될 수 있다. 세 개의 성분이 있는 경우, 두 개의 성분은 서로 결합될 수 있고, 그 조합은 세 번째 성분, 등과 조합될 수도 있다.

[0196] 동물 (및 특히 소) 물질이 세포의 배양에 사용되는 경우, 그것들을 전염 가능한 해면양뇌증 (spongiform encephalopathy; TSE)으로부터 자유로운, 및 특히 광우병 (bovine spongiform encephalopathy; BSE)으로부터 자유로운 공급원으로부터 얻어야 한다. 전체적으로, 동물 유래한 물질이 전혀 없는 곳에서 세포를 배양하는 것이 바람직하다.

[0197] 화합물이 조성물의 일부로서 신체에 투여되는 경우, 그 조성물은 대안으로 적합한 프로드러그 (prodrug)에 의해 대체될 수도 있다.

[0198] 세포 기질이 사용되는 경우 (예를 들어, 재배열 또는 역유전학), 예를 들어, Ph Eur general chapter 5.2.3.에 서와 같이, 사람 백신 생산에 사용에 대해 승인된 것이 바람직하다.

### 도면의 간단한 설명

[0199] 도 1은 본 발명의 다양한 불활성화제의 구조를 나타낸다.

도 2 내지 4는 DMEM에서 시간이 흐름에 따른 (도 2 & 3에서 시간; 도 4에서 일) 시약 069-1 (%)의 함량을 나타낸다. 화살표는 불활성화제의 추가를 나타낸다 (아스코르브산 또는 글루코스)

### 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0200] 알려진 불활성화제

[0201] 알려진 불활성화제 ( $\beta$ -프로피오락톤, 에틸렌이민, 엔-아세틸 에틸렌이민, 포르말린)를 네 개의 바이러스에 대해 테스트하였다: (i) dsRNA 계놈을 가진 외피가 없는, 타입 3 레오바이러스; (ii) dsDNA 계놈을 가진 외피, HSV-1 헤르페스 바이러스; (iii) dsDNA 계놈을 가진 외피가 없는, 아데노바이러스5; 및 (iv) ssRNA 계놈을 가진 외피, 조류 C-타입 레트로바이러스. 레오바이러스는 이중 캡시드 층을 가진 작은 외피가 없는 바이러스이고, 이러한 바이러스는 불활성화에 대해 높은 저항성이다 (결절 바실루스 및 박테리아성 포자에 의해서만 초과됨).

[0202] 결과는 처리 후에 바이러스성 적정 농도의 로그 10 감소 인자로서 표 1에 나타난다.

바이러스 불활성화제	감소
(i) BPL, 0.05%, 16 시간, 2-8°C (BPL을 제거하기 위해 37°C에서 3 시간)	2.3-3.8
에틸렌이민, 0.05%, 16 시간, 2-8°C (37°C에서 3 시간)	0.65
NAc-에틸렌이민, 0.05%, 16 시간, 2-8°C (37°C에서 3 시간)	1.15
37% 포름알데히드 0.05%, 16 시간, 2-8°C	~0
37% 포름알데히드 0.05%, 3 일, 2-8°C	0.9
37% 포름알데히드 0.05%, 6 일, 2-8°C	1.55
37% 포름알데히드 0.05%, 17 시간, 19-23°C	1.7
37% 포름알데히드 0.05%, 24 시간, 19-23°C	2.1
(ii) BPL, 0.05%, 16 시간, 2-8°C (BPL을 제거하기 위해 37°C에서 3 시간)	4.5
37% 포름알데히드 0.05%, 3 일, 2-8°C	2.8
37% 포름알데히드 0.05%, 6 일, 2-8°C	2.95
37% 포름알데히드 0.05%, 17 시간, 19-23°C	2.95
37% 포름알데히드 0.05%, 24 시간, 19-23°C	3.25
(iii) BPL, 0.05%, 16 시간, 2-8°C (BPL을 제거하기 위해 37°C에서 3 시간)	2.7
37% 포름알데히드 0.05%, 3 일, 2-8°C	≥3.4, ≤6.65
37% 포름알데히드 0.05%, 6 일, 2-8°C	≥3.4, ≤6.65
37% 포름알데히드 0.05%, 17 시간, 19-23°C	≥6.65
37% 포름알데히드 0.05%, 24 시간, 19-23°C	≥6.65
(iv) BPL, 0.05%, 16 시간, 2-8°C (BPL을 제거하기 위해 37°C에서 3 시간)	≥5.15, ≤7.15
37% 포름알데히드 0.05%, 16-24 시간, 15°C	0.6-1.0
37% 포름알데히드 0.05%, 16-24 시간, 20°C	1.3-1.8
37% 포름알데히드 0.05%, 16-24 시간, 24°C	1.5-2.2

[0203]

[0204] 이 데이터는 사람 백신에 사용된 두 개의 주요 불활성화제 (BPL 및 포름알데히드)가 모든 필요를 충족할 수는 없다는 것을 나타낸다. 안정한 바이러스의 낮은 레벨의 감염성은 물질이 다운스트림 사용 (예를 들어, 진단 시약, 또는 백신 또는 다른 의학적 생성물과 같은)에 대해 안정하지 않을 수도 있다는 것을 의미한다.

[0205] 새로운 불활성화제

[0206] 안정성 때문에 새로운 불활성화제의 활성을 평가하기 위해 레오바이러스 모델이 설립되었다. 포유동물 오르토티오바이러스, 타입 3 (종 Dearing, ATCC VR-824)을 L929 마우스 연결 조직 세포 (ATCC CI-1)에서 키웠다. 바이러스성 스톱을 감염된 배지의 세포 없는 배양 상층액으로부터 만들었고 얼리퀴트한 다음 -60°C 미만에 보관하였다. 불활성화 연구를 위해, 바이러스를 녹였고, 0.05% 불활성화제를 추가하였다 (1:2000 부피비)고, 혼합물을 차가운 곳 (2-8°C), 상온 (19-23°C로 측정됨) 또는 37°C서 고정된 기간 동안 배양하였다. BPL과 비교를 허용하기 위해 (i) 불활성화 반응은 간단하게 37°C로 올라가고 (ii) 티오 황산 나트륨을 불활성화 끝에 추가하였다 (불활성화 용액 ml 당 1.4 M 스톱 용액 20 μl). 표준 적정 농도에 의해 남은 바이러스 감염성 바이러스에 대해 샘플을 테스트하였다. 바이러스 조제물의 10 배 단계 희석액을 미세 적정 농도 플레이트의 L929 배양액에 접종하였다. 성장하는 바이러스는 5-6일 후, 현미경으로 볼 수 있는, 세포 변성 효과를 생산한다. 적정 농도를 Spearman-Kaerber 방법에 의해 계산하였고 ml 당 로그10 TCID<sub>50</sub>으로 나타난다. 남은 바이러스 적정 농도가 검출의 한계 (ml 당 1.5 로그10 TCID<sub>50</sub>) 미만인 경우, 그것들은 대조군 샘플 적정 농도 및 1.5 이하 사이의 차이로 나타난다. 이러한 감소는 "≥" 부호에 의해 나타난다.

[0207] 인플루엔자 바이러스를 2차 테스트에 사용하였다. 그것은 레오바이러스보다 덜 안정하다. 바이러스 적정 농도를 본질적으로 레오바이러스에 대해 설명된 바와 같이 수행하였지만, L929가 아닌 MDCK세포를 사용하였다. 게다가, 그것의 외피가 있는 헤마글루티닌 당단백질 (중요한 백신 면역원)의 안정성을 평가하였다. 헤마글루티닌화 테스트에 의해 그것을 기능적으로 검정하였다. 정량인 HA 검정에 대해 바이러스 조제물을 PBS에 단계 희석 (로그2 희석)하였고 0.5% 닭 적혈구와 함께 PBS에서 배양하였다. 주위 온도에서 배양 후에 HA 반응을 평가하였다. 활성은 뚜렷한 헤마글루티닌화를 일으키는 가장 높은 바이러스 희석의 역수로 나타나고, 결과는 불활성화 전에 및 후에 적정 농도로서 나타난다.

[0208] 도 1 및/또는 표 18에 번호가 매겨진, 다양한 불활성화제를 테스트하였다. 모두 0.05%의 농도였고, 이것은 혼합물이 사용되었을 때의 전체 불활성화제 농도이다.

[0209] 레오바이러스의 결과는 다음과 같았다 (표 2):

불활성화제	조건	감소
BPL	16 시간, 2-8°C; 37°C 에서 3 시간	2.5
054	16 시간, 2-8°C; 37°C 에서 3 시간	≥3.8 *
069-1	16 시간, 2-8°C; 37°C 에서 3 시간	≥6.9
069-1	24 시간, 19-23°C	≥7.0
079	16 시간, 2-8°C; 37°C 에서 3 시간	3.5
079	24 시간, 19-23°C	4.5
070-1	16 시간, 2-8°C; 37°C 에서 3 시간	5.0
070-1	24 시간, 19-23°C	5.8
070-1	48 시간, 19-23°C	5.5
070-1	16 시간, 37°C	7.65
070-1	24 시간, 37°C	≥7.9
077	24 시간, 19-23°C	≥7.7
071-1	16 시간, 2-8°C; 37°C 에서 3 시간	4.0
078	24 시간, 19-23°C	3.3 - 5.4
078	16 시간, 37°C	≥7.75
058-1	16 시간, 2-8°C; 37°C 에서 3 시간	3.5
056-1	16 시간, 2-8°C; 37°C 에서 3 시간	3.3
080	16 시간, 2-8°C; 37°C 에서 3 시간	≥6.9
<i>비교 (단일 과산화물 화합물)</i>		
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	16 시간, 2-8°C; 37°C 에서 3 시간	0.45
072	16 시간, 2-8°C; 37°C 에서 3 시간	0.9

[0210]

[0211] \*남은 바이러스 세포 독성은 바이러스 적정 농도를 방해하였고 전체 불활성화 수용력의 평가를 허용하지 않았다.

[0212] BPL 숫자는, 이전 결과에 나타난 바와 같이, 레오바이러스 불활성화가 어렵다는 것을 확인한다. 여러 과산화물을 가진 모든 불활성화제는 BPL보다 (이전 실험에서 포름알데히드보다) 더 좋은 불활성화를 제공하였다. 단일 과산화물을 가진 화합물 (072)은 저조하게 수행되었다. 더 짧은 사슬 길이를 가진 화합물 (C4보다 더 낮은)은 최고의 결과를 제공하였다. 더 낮은 온도는 더 좋은 결과를 제공하였지만, 37°C에서 장기간 배양은 좋은 온도 안정성을 갖지 않을 수도 있는 항원에 대해 이상적이지 않다. 더 높은 온도에서 더 짧은 기간이 최선일 수도 있다.



[0213] 인플루엔자 바이러스의 결과는 다음과 같았다 (표 3):

불활성화제	조건	감소	HA 전/후
BPL	16 시간, 2-8°C; 37°C 에서 3 시간	≥7.15	1024 / 1024
069-1	16 시간, 2-8°C; 37°C 에서 3 시간	≥7.1	1024 / 1024
079	16 시간, 2-8°C; 37°C 에서 3 시간	≥7.1	1024 / 1024
079	24 시간, 19-23°C	≥6.9	1024 / 1024
070-1	16 시간, 2-8°C; 37°C 에서 3 시간	≥7.0	1024 / 1024
077	24 시간, 19-23°C	≥7.1	1024 / 1024
071-1	16 시간, 2-8°C; 37°C 에서 3 시간	5.0	1024 / 1024
078	24 시간, 19-23°C	5.75	1024 / 1024
058-1	16 시간, 2-8°C; 37°C 에서 3 시간	≥7.15	1024 / 1024
056-1	16 시간, 2-8°C; 37°C 에서 3 시간	≥7.15	1024 / 1024
080	16 시간, 2-8°C; 37°C 에서 3 시간	7.0	1024 / 1024

[0214]

[0215] 따라서 검출 한계 미만으로 인플루엔자 바이러스의 불활성화를 일상적으로 성취하였다. 다시, 더 짧은 사슬 길이를 갖는 화합물은 더 긴 사슬 길이, 예를 들어, 071-1, 078 및 080를 가진 분자에 의한 더 낮은 불활성화 수용력으로, 최고의 결과를 제공한다. 게다가, 모든 경우에서, 및 불활성화 온도에 상관없이, 헤마글루티닌 적정 농도는 불활성화에 의해 영향을 받지 않았는데, 표면 당단백질의 항원성이 온전하게 남아있다는 것을 나타낸다.

[0216]

안정한, 외피가 없는 바이러스 박테리아의 결과는 박테리아의 성공적인 불활성화가 또한 예상될 수 있다는 것을 의미한다. 1968년에 Spaulding은 화학적 불활성화 및 살균에 대한 저항성의 레벨을 정의하였다. 이 순위에 따라, 박테리아 (일부 미코박테리아 및 포자 제외)는 노출 (비-지질) 바이러스보다 화학적 불활성화에 대해 덜 저항성이다. 이 순위는 수십 년 전에 확립되었지만, 그것은 여전히 유효하고 적용 가능하다. 따라서 안정한, 외피가 없는 바이러스에 대한 효능은 박테리아가 또한 이 화합물들에 의해 불활성화될 수 있다는 것을 의미한다. 불활성화제 069-1의 불활성화 수용력을 추가의 바이러스에 대해 테스트하였다. 이 연구들에서, 불활성화에 대한 적합한 조건을 더 평가하기 위해 농도, 시간 및 온도를 다르게 했다. 적정 방법의 검출 한계 이하 ( $\leq 10^{1.5}$  TCID<sub>50</sub>/ml)로 완벽한 불활성화가 관찰되는 경우, 더 낮은 검출 한계를 갖는 남은 바이러스 바이러스에 대한 테스트를 부분적으로 수행하였다. 바이러스에 대해 음성이면, 이러한 "남은 바이러스 바이러스 테스트"의 결과는 불활성화된 샘플 mL 당 각각의 검출 한계를 나타냄으로써 제공된다. 이 검출 한계는 테스트 배양액에 접종된 샘플 부피에 의존적이다. 10 mL의 샘플 부피에 대해, 검출 한계는  $10^{-1.5}$  TCID<sub>50</sub>/ml로 제공되고, 1 mL의 샘플 부피에 대해 각각의 검출 한계는  $10^{-0.5}$  TCID<sub>50</sub>/ml였고, 0.1 mL의 샘플 부피에 대해 그것은  $10^{0.5}$  TCID<sub>50</sub>/ml였다.

[0217]

테스트 배양액에서 남은 바이러스 세포 독성 (테스트 배양액에서 세포 부착 또는 사멸의 초기 징후에 의해 나타남)이 신뢰 적정 농도 해독 (reading)을 손상시키는 경우, 이 적정 농도 희석액은 평가되지 않았다. 음성 적정 농도에서 적용 가능한 검출 한계는 더 높은, 예를 들어,  $10^{2.5}$  TCID<sub>50</sub>/ml 이하이다. 불활성화제 및 아스코르브산의 잔기의 접종물이 테스트 배양액에 남아있는 경우, 세포 독성 반응은 가장 낮은 적정 농도 희석액에서 부분적으로 관찰된다. 더 많은 샘플 부피를 갖는 남은 바이러스 바이러스 테스트에서 더 큰 배양액이 사용되었고, 37°C에서 1시간 동안 바이러스의 흡착 후에 접종물이 제거되었고, 배양액은 남은 바이러스 화학 물질을 제거하기 위해 중성 완충액 또는 배지로 붉어졌기 때문에, 세포 독성 효과를 갖지 않는 것으로 나타났다.

[0218]

로그10 감소값은 시작 적정농도 (불활성화제 없이 추가된 완충액으로는 아니지만 같은 조건에 노출된 "홀드 샘플 (hold sample)"로 측정됨) 및 불활성화 후에 남은 바이러스 적정 농도 사이의 차이로 계산되었다. "≥" 부호를 가진 불활성화율은 적용된 방법의 검출 한계 이하로 완벽한 불활성화를 나타낸다. 그 부호가 없는 불활성화율은 남은 바이러스 바이러스의 존재를 나타낸다.

[0219]

다음 표는 사용된 바이러스 및 바이러스 적정에 및 더 큰 샘플 부피를 사용하는 선택적인 남은 바이러스 바이러스 테스트에 적용된 세포 배양액을 나타낸다. 그것은 또한 세포 및 바이러스의 기원에 대한 정보를 제공하고 세포 배양액 접종 및 바이러스 적정 농도의 결정 사이의 배양 기간 (일)을 언급한다. 세포 배양은 3-5% 태아 소

혈청이 보충된 DMEM (Dulbeco modified Eagle's medium)에서 성장하였다. 테스트 배양은 37°C에서 5% CO<sub>2</sub> 및 90% 습도를 함유하는 대기하에 배양되었다.

세포 타입	바이러스	배양 (일)
MDCK 33016 (DSM ACC2219)	인플루엔자 바이러스. 부분적으로 정제된 바이러스 다른 인플루엔자 종의 제조: A/Brisbane/59/2007 [H1N1] A/California/7/2009 [H1N1], 재배열 X-179A A/Uruguay/716/2007 [H3N2], 재배열 NYMC X-175 C B/Brisbane/3/2007	4 - 5
L929 (ATCC CCL-1)	레오바이러스 3: 종 Dearing, ATCC VR-824	5 - 7
	MVM (미세 생쥐 바이러스, 파르보바이러스): 종 Crawford, ATCC VR-663	9 - 10
MRC-5 (ATCC CCL-171)	BK-바이러스 (폴리오마바이러스); ATCC VR-837	10 - 12
RD-A (WHO의 엔테로바이러스에 대한 European Reference Center)	에코-바이러스 6 (Picorna 바이러스): 종 D'Amori, 폴리오미엘리티스 및 엔테로바이러스에 대해 Reference-Center로부터 얻음, Robert-Koch-Institute, Berlin, Germany	3 - 5
	콕사키 A16 (피코르나바이러스): 종 G-10, 폴리오미엘리티스 및 엔테로바이러스에 대해 Reference-Center로부터 얻음, Robert-Koch-Institute, Berlin, Germany	3 - 5
Vero WHO (ECACC에 의해 분산된 Vero의 WHO 종)	아데노바이러스 6: Isolate 524/90: Clinical Virology, Robert-Koch-Institute, Berlin, Germany로부터 얻은 임상적 분리체. 혈청학적으로 및 PCR에 의해 확인된 독자성.	8 - 10
	광견병 바이러스 Flury LEP: Novartis Vaccine 종. (형광발광-표지된 특이적 항체로 면역 염색을 통한 바이러스 검출)	4 - 5
	HSV-1 (단순 헤르페스 바이러스 1): 종 ET, 자체 분리체. 독립 PCR에 의해 확인된 독자성.	7 - 8
	파라인플루엔자 바이러스 타입 3: ATCC VR-93	5 - 6

[0220]

[0221] 불활성화제 069-1을 0.025, 0.05, 또는 0.1 부피% (부피/부피) 최종 농도의 농도로 추가하였고 지정된 기간 동안 배양하였다. 결정된 시점에서 불활성화를 멈추기 위해, L+ 아스코르브산을 0.2%의 최종 농도를 제공하기 위해 추가하였다. 이 정지 시약을 100 mL 증류된, 멸균한 물에 20 g L+ 아스코르브산을 함유하는 20% 스톱 용액으로 제조하였다. 용액을 0.2 µm 필터를 통과시킴으로써 여과 살균하였다.

[0222] 표 4 내지 13은 시약 069-1의 다양한 농도에 의한 및 다른 조건 하에 다른 모델 바이러스의 불활성화를 나타낸다. 이 바이러스들의 대부분은 외피로 둘러싸여 있지 않고 화학적 불활성화제 및 바이러스성 항원성을 보존하기 위해 적용된 조건 하에 쉽게 불활성화되지 않는 안정한 바이러스를 나타낸다. 화학적 불활성화 및 다른 진행 조건에 대해 더 저항성이기 때문에 이중-가닥 바이러스 (헤르페스바이러스, 레오바이러스, 폴리오마바이러스, 아데노바이러스, 및 폴리오마바이러스)를 선택하였다. 대부분의 바이러스는 생약학적 공정에 대한 공정의 공정 불활성화를 확인하는 모델 바이러스로서 사용되었다.

[0223] BPL에 의한 다른 바이러스의 불활성화에 대한 데이터를 표 14에 제공한다. 표 4 내지 13의 데이터는 069-1이 대부분의 경우에서 우수혼 불활성화를 일으킨다는 것을 나타낸다.

[0224] **불활성화에 의해 유발된 세포의 DNA 손상의 분석**

[0225] 세포의 DNA에 대한 시약 069-1의 효과를 세포 배양 수확물 또는 인플루엔자-감염된 세포 없는 MDCK 배양 수확물 (남은 바이러스 세포의 DNA를 함유)을 불활성화제의 노출함으로써 및 상업적인 "DNA Damage Quantification

Kit" (Biovision)를 사용하여 abasic 부위 (APS)에 대한 추출된 DNA를 분석함으로써 측정하였다. 이 키트는 핵산의 abasic 부위의 알데히드기와 특이적으로 반응하는 알데히드 반응성 프로브 (ARP)를 함유한다. 결합되지 않은 ARP의 제거 후에, DNA는 미세적정 플레이트 웰에 결합되고 표지된 부위는 퍼옥시다제 반응 및 색 반응을 발달시키는 기질을 통해 염색된다. 테스트 키트는 또한 보정 곡선을 발생시키는데 사용되는 기준을 함유한다.

[0226] DNA 추출을 Complex800\_V4 프로토콜 (Qiagen)을 사용하는 QIASymphony SP 추출 자동화의 QIASymphony® Virus/Bacteria Mini Kit를 사용하여 수행하였다. 용출된 샘플의 DNA 농도를 260 nm 및 280 nm에서 흡착 값에 기초한 NanoPhotometer™로 결정하였다. DNA Damage Quantification Kit에 대해, 모든 테스트 샘플을 Tris/EDTA (TE) 완충액에서 0.1 µg/mL DNA의 최종 농도로 희석/조정하였다. TE 완충액은 음성 대조군으로서 제공된다.

[0227] DNA 손상 및 APS를 측정하는 단계를 테스트 키트의 지시에 따라 수행하였다. 표준 곡선의 정량 테스트 범위를 훨씬 초과한 강한 반응 때문에, 같은 속도로 수행되는 한 테스트의 모든 표지된 및 세척된 샘플을 희석함으로써 이것을 해결하려는 시도가 이루어졌다. 하지만 신뢰할 수 있는 정량 테스트 범위를 넘어선 극도의 색 반응은 불가피하다. 따라서 10<sup>5</sup> 염기쌍 당 40 APS의 상부 기준 곡선 범위 상의 AP 부위 값을 하기 것들보다 덜 신뢰할 수도 있다. 게다가, 높은 테스트 가변성을 또한 관찰하였는데, 이것은 오퍼레이터 오차 또는 내재된 테스트 불일치의 결과로 나타낼 수 없다.

[0228] 하지만, 인플루엔자 바이러스 감염된 세포의 DNA는 다른 바이러스 종이 감염에 사용될 때 특히 높은 가변성을 나타내었다. 이것은 아포토시스성으로 분해되는 DNA가 정상 세포 DNA와 다르게 반응할 수도 있다는 것을 나타낸다. 따라서 테스트를 반-정량, 비교 방법에 및 참조 및 비교기로서 BPL에 의해 불활성화된 샘플을 포함시킴으로써 적용되었다. 그래서 정량 테스트 결과 및 절대값 (10<sup>5</sup> 염기쌍 당 APS)은 다른 테스트 사이에서 비교될 수 없지만 하나 및 같은 테스트 수행에서 테스트된 다른 조건을 비교하는데만 사용되어야 한다.

[0229] 하기 나타난 데이터 세트는 별도의 표에 하나의 비교 테스트에 의해 얻은 결과를 제공하지만 같은 표에서 다른 테스트 수행의 혼합된 결과는 아니다. 직접적인 비교가 필요한 경우를 제외하고, 테스트 키트 미세적정 플레이트에 흡착 전에 샘플 희석은 고려되지 않았다. 따라서, 다른 APS 값은 다른 테스트 수행에서 테스트된 유사한 조건에 대해 나타날 수도 있다. 1 이상의 APS 값은 소수점 없이 반올림한 숫자로 제공된다. 일반적으로 적용되는 BPL의 0.05% 최종 농도를 사용하여 불활성화된 샘플에 의해 BPL 불활성화의 비교 결과를 얻었다. 불활성화는 차가운 바이러스 조제물에 BPL을 추가함으로써 및 2-8°C에서 16시간 동안 배양에 의해 항상 적용된다. 그때 불활성화는 온도를 37°C로 증가시키고 2시간 동안 추가의 배양에 의해 중지되었다. 37°C에서 불활성화는 초기에 증가된 속도로 계속되지만, 동시에 BPL은 신속하게 분해된다. 따라서 향상된 온도는 또한 DNA 손상에 영향을 미치는 것으로 예상되고 및/또는 부분적으로 손상된 DNA에 대한 2차 반응에 기여한다.

[0230] 하기 표에 지시된 농도 및 시간에서 16시간의 표준 불활성화 시간을 사용하여 069-1로 불활성화를 수행하였다. 불활성화는 아스코르브산의 추가에 의해 중지되고 있었다. 특이적 연구에 대해 및 직접적인 비교에 대해, 069-1로 불활성화는 또한 BPL에 사용된 바와 같은 배양 조건, 즉, 2-8°C에서 16시간 플러스 37°C에서 2시간에 따랐다.

[0231] 표 15는 상대적인 APS 값을 나타낸다 (1은 처리되지 않은 샘플). 3개의 다른 인플루엔자 종 (A/Christchurch/16/10 NIB-74, A/Brisbane/ 10/2010 및 A/California/7/09 X-179A)으로 감염된 세포 상층액의 DNA를 사용하였다. A/California를 제외하고, DNA 손상은 BPL보다 069-1에서 더 높았고 농도-의존적이었다.

[0232] 표 16은 인플루엔자 감염된 세포 DNA (종 B/Wisconsin/1/2010)에 단일 불활성화로서 다른 농도의 069-1 또는 두 개의 연속적인 불활성화 라운드가 처리되었을 때 상대적인 APS 값을 나타낸다. 관찰된 DNA 손상은 더 낮은 농도의 069-1이 사용될 때, BPL보다 069-1이 더 컸고, 효과는 농도-의존적이었다. 2배 불활성화는 명백하게 단일 불활성화보다 더 강한 DNA 손상을 유발하였다.

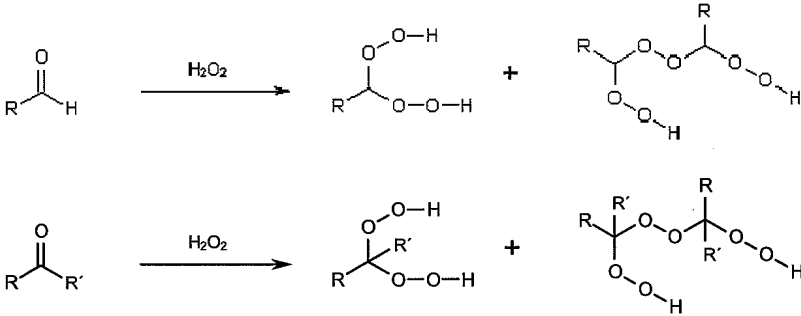
[0233] 표 17은 상대적인 APS 값을 나타낸다.

[0234] 인플루엔자 감염된 세포 DNA (종 B/Wisconsin/1/2010)에 BPL을 먼저 처리하고 (2-8°C에서 16시간, 그 후에 37°C에서 2시간) 연속하여 다른 농도의 069-1로 불활성화될 때, 상대적인 APS 값을 나타낸다. 이 시리즈에서, 069-1은 또한 표준 BPL 불활성화에 대한 것과 같은 조건하에 사용되었다. 이 불활성화는 또한 아스코르브산에 의해 중지되었다. 일부 주의하여 (이중-불활성화된 샘플은 테스트의 측정 가능한 범위보다 모두 높았고 따라서 테스트 플레이트에 흡착 전에 10배 희석되어야 했다), DNA 손상은 BPL 및 069-1의 이중 처리에 의해 명백하게 증가하였다. 증가한 069-1에 대한 불활성화 온도

[0235] 초기 차가운 위상 후에 2시간 동안 37°C로, 069-1에 대한 불활성화 온도의 증가는 또한 크게 DNA 손상을 향상시켰다. 분명히 BPL에 의해 유발된 DNA 손상은 2배 BPL 처리에 의해서뿐만 아니라 BPL의 추가에서, 069-1과 같은, 히드로과산화물 불활성화제를 사용함으로써 더 많이 향상될 수 있다.

[0236] **합성 및 안정성**

[0237] 같은 자리 디히드로과산화물의 일반적인 합성은 다음과 같이, 적합한 촉매의 존재시 이상적으로, 수행될 수 있다:



[0238]

[0239] 합성은 안정성에 의해 제한되고 구조에 의존적이다. 매우 높은 산소 함량 (예를 들어, 화합물 069-1은 69% 산소를 갖는다)에도 불구하고 일부 화합물은 매우 안정적이지만 그것들은 부정확하게 조작하면 자연 폭발 (spontaneous explosion) 또는 분해되는 성향이 있을 수 있다. 이 효과는 짧아진 알킬 측쇄에 의해 증가한다. 안전성 고려 때문에 화합물은 최선으로 냉동 수용액 또는 냉동 고체로 공급될 수도 있다.

[0240] 057의 불활성화 수용력은 -20°C에서 6개월 저장 후에 손실된다는 것이 발견되었고 그래서 그것은 신중하게 사용되는 것이 최선이다. 다른 화합물 및/또는 혼합물에 대한 같은 것들은 사실일 수도 있다.

[0241] 화합물의 안정성은 NMR에 의해 평가되었다. 결과는 다음과 같다:

불활성화제	조건	분해
057	PBS: 16 시간, 2-8°C; 37°C 에서 3 시간	없음
057	PBS: 16 시간, 2-8°C; 10 시간 37°C 에서	없음
057	PBS: 6 시간, 25°C; 37°C 에서 3 시간	없음
057	PBS: 티오황산 나트륨의 추가	즉시
070	PBS: 16 시간, 2-8°C; 37°C 에서 3 시간	40%
070	MEM: 24 시간, 5°C	<5%
070	MEM: 24 시간, 25°C	15%
070	MEM: 24 시간, 37°C	43%
071	PBS: 16 시간, 2-8°C; 37°C 에서 3 시간	없음
071	MEM: 24 시간, 5°C	11%
071	MEM: 24 시간, 25°C	15%
071	MEM: 24 시간, 37°C	30%

PBS = 인산염 완충된 식염수

MEM = 이글의 최소 필수 배지

[0242]

[0243] NMR은 또한 수성 조건에서, 및 특히 배양 배지에서, 069-1의 안정성을 연구하는데 사용되었다. 이 연구는 DMEM에서 0.1% 069-1과 함께 높은 해상도 500 MHz NMR을 사용하였다.

[0244] 도 2는 25°C에서 아주 천천히 분해되는, 안정성을 나타낸다. 240시간 (10일) 후에 25%만 분해되었다. 240시간 후에 아스코르브산의 추가는 즉각적인 분해로 이어졌는데, 이것은 아스코르브산이 완벽히 사용되고 더 이상 분해 공정에서 사용 가능하지 않을 때 정지되었다 (선 레벨에서). 2몰 이상의 아스코르브산이 1몰의 069-1에 추가 되면 069-1의 완벽한 분해가 관찰될 수 있다.

- [0245] 도 3은 37℃에서 안정성을 나타낸다. 분해는 25℃에서보다 더 빠르고 55시간 후에 50%가 분해되었다. 145시간 후에 아스코르브산의 추가는 명백하게 관찰될 수 있는 즉각적인 분해로 이어진다.
- [0246] 도 4는 다른 온도에서 및 글루코스의 추가 후에 안정성을 나타낸다. DMEM에서 5℃에서 30일 이상 동안 분해는 없다. 글루코스의 추가 (8배의 몰 초과량) 및 5℃에서 5일 동안 추가의 저장 후에 여전히 분해를 관찰할 수 없었다. 25℃로 온도 증가에서 천천히 분해 공정이 시작되었지만, ~10%의 농도까지 떨어뜨리기 위해 40일 이상이 필요하다.
- [0247] 많은 바이러스성 성장 배지가 추가적인 글루코스 (또는 유사한 당)를 포함하기 때문에 글루코스의 추가를 테스트하였고 만약 이것이 불활성화제를 분해하는지 관찰하는 것은 중요하지 않았다. 적어도 더 낮은 온도에서, 이 당의 존재가 문제인 것으로 보이지 않았다.
- [0248] 퍼옥시기가 매우 불안정한 것처럼, 일반적인 과산화물 (및 특히 1-5개의 탄소 원자만을 가진 단쇄 과산화물)은 빠른 분해, 또는 폭발에 민감할 것이라고 잘 알려져 있기 때문에 수성 조건에서 069-1의 높은 안정성은 놀랍다. 시약 069-1은 DMEM과 같은 복잡한 환경의 다른 온도에서 용액의 예상외로 높은 안정성을 증명한다. 분자는 68% 산소를 함유하기 때문에 그것은 두 개의 탄소 원자만을 함유하는 같은 자리 비스히드로과산화물에 대한 가장 놀랍고 예상외의 레벨을 소유한다. 용액에서 예상된 분해 기간은 수 분 내지 수 시간의 순서였지만, 도 2-4는 25℃에서 250시간 이상 동안 높은 안정성을 나타낸다.
- [0249] 본 발명이 예시에 의한 방법으로만 설명되었고 본 발명의 범위 및 사상 내에 유지하는 동안 변형이 이루어질 수도 있다는 것이 이해될 것이다.
- [0250] LRV 표
- [0251] 표 4: 069-1에 의한 아데노바이러스의 불활성화

시간	t <sub>IA</sub>	T <sub>IA</sub>	TCID <sub>50</sub> /ml		불활성화제 후 TCID <sub>50</sub> /ml			LRV	
			홀드 샘플	적정	호흡기 바이러스 테스트				
			로그 10	95% CI	로그 10	95% CI	로그 10	로그 10	95% CI
0.025%									
16	RT		6.60	± 0.21	≤ 2.50	± 0.25	n. d.	≥ 4.10	± 0.32
0.05%									
6	RT		6.45	± 0.31	≤ 2.50	± 0.00	n. d.	≥ 3.95	± 0.31
16	RT		6.30	± 0.27	≤ 1.50	± 0.00	n. d.	≥ 4.80	± 0.27
16	RT		6.35	± 0.35	≤ 1.50	± 0.00	≤ 0.5	≥ 5.85	± 0.35
16	37		6.25	± 0.26	≤ 1.50	± 0.00	n. d.	≥ 4.75	± 0.26
0.10%									
16	RT		6.25	± 0.31	≤ 1.50	± 0.00	n. d.	≥ 4.75	± 0.31
16	37		6.30	± 0.25	≤ 1.50	± 0.00	n. d.	≥ 4.80	± 0.25

[0252]

[0253] 표 5: 069-1에 의한 BK-폴리오마바이러스의 불활성화

$t_{IA}$	$T_{IA}$	TCID <sub>50</sub> /ml		불활성화제 후 TCID <sub>50</sub> /ml			LRV	
시간	°C	홀드 샘플		적정		호흡기 바이러스 테스트		
		로그 10	95% CI	로그 10	95% CI	로그 10	로그 10	95% CI
0.025%								
16	RT	6.05	± 0.26	≤ 2.40	± 0.24	n. d.	≥ 3.65	± 0.36
16	37	5.85	± 0.24	≤ 1.50	± 0.00	n. d.	≥ 4.35	± 0.24
0.05%								
16	RT	5.95	± 0.24	≤ 1.50	± 0.00	n. d.	≥ 4.45	± 0.24
16	RT	6.20	± 0.28	≤ 1.50	± 0.00	≤ -1.5	≥ 7.70	± 0.28
16	37	5.70	± 0.21	≤ 1.50	± 0.00	n. d.	≥ 4.20	± 0.21
16	37	6.05	± 0.28	≤ 1.50	± 0.00	n. d.	≥ 4.55	± 0.28
0.10%								
16	RT	6.05	± 0.26	≤ 2.50	± 0.00	n. d.	≥ 3.55	± 0.26
16	37	5.75	± 0.22	≤ 2.50	± 0.00	n. d.	≥ 3.25	± 0.22

[0254]

[0255] 표 6: 069-1에 의한 콕사키 바이러스 A16의 불활성화

$t_{IA}$	$T_{IA}$	TCID <sub>50</sub> /ml		불활성화제 후 TCID <sub>50</sub> /ml			LRV	
시간	°C	홀드 샘플		적정		호흡기 바이러스 테스트		
		로그 10	95% CI	로그 10	95% CI	로그 10	로그 10	95% CI
0.05%								
16	RT	7.45	± 0.33	7.55	± 0.28	n. d.	-0.10	± 0.43
24	37	7.40	± 0.28	≤ 2.40	± 0.27	n. d.	≥ 5.00	± 0.39
48	37	7.10	± 0.29	≤ 1.50	± 0.00	n. d.	≥ 5.60	± 0.29
0.10%								
16	RT	7.40	± 0.32	2.15	± 0.30	n. d.	5.25	± 0.44
16	37	7.20	± 0.28	≤ 1.50	± 0.00	n. d.	≥ 5.70	± 0.28
16	37	7.40	± 0.33	3.75	± 0.24	n. d.	3.65	± 0.41

[0256]



[0257] 표 7: 069-1에 의한 에코바이러스의 불활성화

t <sub>IA</sub>	T <sub>IA</sub>	TCID <sub>50</sub> /ml		불활성화제 후 TCID <sub>50</sub> /ml			LRV	
시간	°C	홀드 샘플		적정		호흡기 바이러스 테스트		
		로그 10	95% CI	로그 10	95% CI	로그 10	로그 10	95% CI
0.05%								
6	37	8.95	± 0.26	8.00	± 0.33	n.d.	<b>0.95</b>	± 0.42
16	6	8.90	± 0.25	9.15	± 0.25	n.d.	<b>-0.25</b>	± 0.35
16	RT	9.10	± 0.24	8.55	± 0.31	n.d.	<b>0.55</b>	± 0.39
24	RT	8.45	± 0.30	8.30	± 0.27	n.d.	<b>0.15</b>	± 0.40
24	37	8.55	± 0.34	6.55	± 0.28	n.d.	<b>2.00</b>	± 0.44
48	RT	8.60	± 0.28	7.20	± 0.35	n.d.	<b>1.40</b>	± 0.45
48	37	8.30	± 0.27	3.45	± 0.30	n.d.	<b>4.85</b>	± 0.40
0.10%								
6	RT	8.80	± 0.27	8.05	± 0.30	n.d.	<b>0.75</b>	± 0.40
6	37	8.90	± 0.25	5.50	± 0.29	n.d.	<b>3.40</b>	± 0.38
6	37	8.55	± 0.32	5.70	± 0.21	n.d.	<b>2.85</b>	± 0.38
16	RT	8.70	± 0.18	7.05	± 0.23	n.d.	<b>1.65</b>	± 0.29
16	RT	8.30	± 0.25	7.10	± 0.29	n.d.	<b>1.20</b>	± 0.39
16	37	8.50	± 0.18	3.20	± 0.30	n.d.	<b>5.30</b>	± 0.35
16	37	8.40	± 0.28	3.10	± 0.25	n.d.	<b>5.30</b>	± 0.38

[0258]

[0259] 표 8: 069-1에 의한 단순 헤르페스 바이러스 1의 불활성화

t <sub>IA</sub>	T <sub>IA</sub>	TCID <sub>50</sub> /ml		불활성화제 후 TCID <sub>50</sub> /ml			LRV	
시간	°C	홀드 샘플		적정		호흡기 바이러스 테스트		
		로그 10	95% CI	로그 10	95% CI	로그 10	로그 10	95% CI
0.05%								
6	37	8.55	± 0.23	5.75	± 0.33	n. d.	<b>2.80</b>	± 0.40
16	RT	8.55	± 0.29	3.70	± 0.28	n. d.	<b>4.85</b>	± 0.41
24	RT	8.60	± 0.18	≤ 1.50	± 0.00	n. d.	≥ <b>7.10</b>	± 0.18
24	RT	8.35	± 0.26	≤ 1.50	± 0.00	≤ -1.5	≥ <b>9.85</b>	± 0.26
48	RT	8.45	± 0.26	3.05*	± 0.30	n. d.	<b>5.40*</b>	± 0.39
48	RT	8.15	± 0.31	3.05*	± 0.27	n. d.	<b>5.10*</b>	± 0.42
0.10%								
6	RT	8.60	± 0.25	≤ 1.50	± 0.00	n. d.	≥ <b>7.10</b>	± 0.25
6	RT	8.50	± 0.00	≤ 1.50	± 0.00	≤ -1.5	≥ <b>10.00</b>	± 0.00
6	37	8.35	± 0.26	≤ 1.50	± 0.00	n. d.	≥ <b>6.85</b>	± 0.26
16	RT	8.50	± 0.25	≤ 1.50	± 0.00	n. d.	≥ <b>7.00</b>	± 0.25
16	37	7.80	± 0.23	≤ 1.50	± 0.00	n. d.	≥ <b>6.30</b>	± 0.23

[0260]

[0261] \* 2개의 독립적인 테스트 수행의 결과

[0262] 표 9: 069-1에 의한 파라인플루엔자 바이러스 타입 3의 불활성화

$t_{IA}$	$T_{IA}$	TCID <sub>50</sub> /ml		불활성화제 후 TCID <sub>50</sub> /ml				LRV	
시간	°C	홀드 샘플		적정		호흡기 바이러스 테스트			
		로그 10	95% CI	로그 10	95% CI	로그 10	로그 10	95% CI	
0.025%									
16	RT	7.55	± 0.28	2.90	± 0.24	n. d.	4.65	± 0.37	
16	37	6.90	± 0.28	≤ 1.50	± 0.00	n. d.	≥ 5.40	± 0.28	
0.05%									
16	RT	7.55	± 0.31	≤ 1.50	± 0.00	n. d.	≥ 6.05	± 0.31	
16	RT	7.35	± 0.21	≤ 1.50	± 0.00	≤ -0.5	≥ 7.85	± 0.21	
16	37	7.55	± 0.35	≤ 1.50	± 0.00	n. d.	≥ 6.05	± 0.35	
16	37	7.00	± 0.29	≤ 1.50	± 0.00	n. d.	≥ 5.50	± 0.29	
0.10%									
16	RT	7.55	± 0.31	≤ 2.50	± 0.00	n. d.	≥ 5.05	± 0.31	
16	37	6.60	± 0.35	≤ 2.50	± 0.00	n. d.	≥ 4.10	± 0.35	

[0263]

[0264] 표 10: 069-1에 의한 미세 생쥐 바이러스 파르보바이러스의 불활성화

$t_{IA}$	$T_{IA}$	TCID <sub>50</sub> /ml		불활성화제 후 TCID <sub>50</sub> /ml				LRV	
시간	°C	홀드 샘플		적정		호흡기 바이러스 테스트			
		로그 10	95% CI	로그 10	95% CI	로그 10	로그 10	95% CI	
0.05%									
6	37	7.70	± 0.21	4.40	± 0.25	n. d.	3.30	± 0.32	
16	6	7.20	± 0.32	4.70	± 0.18	n. d.	2.50	± 0.37	
16	RT	7.45	± 0.31	4.50	± 0.29	n. d.	2.95	± 0.43	
24	RT	7.00	± 0.28	5.15	± 0.31	n. d.	1.85	± 0.42	
24	37	7.00	± 0.29	4.35	± 0.26	n. d.	2.65	± 0.39	
48	RT	6.95	± 0.26	5.10	± 0.34	n. d.	1.85	± 0.43	
	37	7.45	± 0.28	3.65	± 0.31	n. d.	3.80	± 0.41	
0.10%									
6	RT	7.55	± 0.31	4.90	± 0.25	n. d.	2.65	± 0.40	
6	37	7.50	± 0.18	3.95	± 0.26	n. d.	3.55	± 0.32	
16	RT	7.60	± 0.24	3.50	± 0.18	n. d.	4.10	± 0.30	
16	RT	7.05	± 0.28	4.90	± 0.25	n. d.	2.15	± 0.38	
16	37	6.75	± 0.25	3.90	± 0.25	n. d.	2.85	± 0.35	
16	37	7.65	± 0.24	4.95	± 0.26	n. d.	2.70	± 0.36	
24	37	7.60	± 0.30	3.20	± 0.28	n. d.	4.40	± 0.42	
48	37	7.35	± 0.36	≤ 2.50	± 0.00	n. d.	≥ 4.85	± 0.36	

[0265]



[0266] 표 11: 069-1에 의한 레오바이러스 3의 불활성화

t <sub>IA</sub>	T <sub>IA</sub>	TCID <sub>50</sub> /ml		불활성화제 후 TCID <sub>50</sub> /ml			LRV	
시간	°C	출드 샘플		적정		호흡기 바이러스 테스트		
		로그 10	95% CI	로그 10	95% CI	로그 10	로그 10	95% CI
0.025%								
16	RT	9.45	± 0.13	3.50	± 0.00	n. d.	<b>5.95</b>	± 0.13
16	37	9.10	± 0.25	2.65	± 0.16	n. d.	<b>6.45</b>	± 0.30
0.05%								
6	RT	9.30	± 0.23	3.50	± 0.00	n. d.	<b>5.80</b>	± 0.23
6	37	9.40	± 0.16	≤ 1.50	± 0.00	n. d.	≥ <b>7.90</b>	± 0.16
16	RT	9.30	± 0.23	≤ 1.50	± 0.00	≤ 0.5	≥ <b>8.80</b>	± 0.23

[0267]

[0268] 표 12: 069-1에 의한 광견병 바이러스의 불활성화

t <sub>IA</sub>	T <sub>IA</sub>	TCID <sub>50</sub> /ml		불활성화제 후 TCID <sub>50</sub> /ml			LRV	
시간	°C	출드 샘플		적정		호흡기 바이러스 테스트		
		로그 10	95% CI	로그 10	95% CI	로그 10	로그 10	95% CI
0.0125%								
18	2-8/37 <sup>#)</sup>	8.3	± 0.31	4.8	± 0.31	n.d.	<b>3.5</b>	± 0.31
		8.4	± 0.41	3.5	± 0.00	n.d.	<b>4.9</b>	± 0.41
0.025%								
18	2-8/37 <sup>#)</sup>	8.3	± 0.31	≤ 2.8	± 0.00	≤ 0.5	≥ <b>5.5</b>	± 0.31
		8.4	± 0.41	n.d.		≤ 0.5	≥ <b>7.9</b>	± 0.41
0.05								
18	2-8/37 <sup>#)</sup>	8.3	± 0.31	n.d.	± 0.31	≤ 0.5	≥ <b>7.8</b>	± 0.31
		8.4	± 0.41	n.d.	± 0.31	≤ 0.5	≥ <b>7.9</b>	± 0.41

[0269]

[0270] #): 모든 불활성화는 2-8°C에서 16시간 동안 수행되었고, 불활성화 온도는 2시간 동안 37°C로 증가하였다. 그 후, 불활성화는 아스코르브산의 추가에 의해 증지되었다.

[0271] 표 13: 069-1에 의한 인플루엔자 바이러스의 불활성화

$t_{IA}$	$T_{IA}$	TCID <sub>50</sub> /ml		불활성화제 후 TCID <sub>50</sub> /ml			LRV	
시간	°C	출드 샘플		적정		호흡기 바이러스 테스트		
		로그 10	95% CI	로그 10	95% CI	로그 10	로그 10	95% CI
0.05%								
8	RT	3.55	n.d.	≤ 2.5	n.d.	≤ -1.5	≥ 5.05	n.d.
8	RT	6.05	n.d.	≤ 2.5	n.d.	≤ -1.5	≥ 7.55	n.d.
8	RT	5.2	n.d.	≤ 2.5	n.d.	≤ -1.5	≥ 6.7	n.d.
16	2-8	6.6	n.d.	≤ 2.5	n.d.	≤ -1.5	≥ 8.1	n.d.
16	2-8	4.7	n.d.	≤ 2.5	n.d.	≤ -1.5	≥ 6.2	n.d.
16	2-8	6.55	n.d.	≤ 2.5	n.d.	≤ 1.5	≥ 5.05	n.d.
16	2-8	6.5	n.d.	≤ 2.5	n.d.	≤ -1.5	≥ 8.0	n.d.
16	2-8	6.4	n.d.	≤ 2.5	n.d.	≤ -1.5	≥ 7.9	n.d.
16	2-8	3.55	n.d.	≤ 2.5	n.d.	≤ -1.5	≥ 5.05	n.d.
16	2-8	6.05	n.d.	≤ 2.5	n.d.	≤ -1.5	≥ 7.55	n.d.
16	2-8	5.2	n.d.	≤ 2.5	n.d.	≤ -1.5	≥ 6.7	n.d.
0.1%								
3	RT	6.05	n.d.	≤ 2.5	n.d.	≤ -1.5	≥ 7.55	n.d.
3	RT	5.2	n.d.	≤ 2.5	n.d.	≤ -1.5	≥ 6.7	n.d.
3	RT	3.7	n.d.	≤ 2.5	n.d.	≤ -1.5	≥ 5.2	n.d.
6	RT	6.05	n.d.	≤ 2.5	n.d.	≤ -1.5	≥ 7.55	n.d.
6	RT	5.2	n.d.	≤ 2.5	n.d.	≤ -1.5	≥ 6.7	n.d.
6	RT	3.7	n.d.	≤ 2.5	n.d.	≤ -1.5	≥ 5.3	n.d.

[0272]

[0273] 종 차이는 관찰되지 않았다, 따라서 개개의 종 (상기 3 참조)은 이 표에 나타나지 않았다.

[0274] 표 14: BPL을 가지고 불활성화에 대한 비교 데이터

DNA/RNA 타입	ENV	바이러스 타입	불활성화제/조건	LRV
이중-가닥 DNA	-	BK 폴리오마 바이러스	BPL 0.05%; 16 시간 +2-8°C (BPL 가수분해를 위해 2 시간 37°C)	2.1
단일-가닥 RNA	-	엔테로바이러스 (콕사키 바이러스, 에코바이러스)		4-5
단일-가닥 RNA	+	파라믹소바이러스, 파라인플루엔자바이러스 3		≥ 9.5 (완벽한 불활성화제)

[0275]

[0276] 표에 사용된 축약형:

[0277]  $t_{IA}$ : 불활성화 시간/시간으로 기간

[0278]  $T_{IA}$ : 불활성화 온도

[0279] TCID<sub>50</sub>/ml: mL 당 50% 조직 배양액 감염성 유닛

[0280] LRV: 로그 10 감소값

[0281] 남은 바이러스 테스트: 더 큰 샘플 부피를 사용하는 남은 바이러스에 대한 테스트 (또한 상기 본문 참조)

[0282] 95% CI: 95% 신뢰 구간

[0283] RT: 주위 (방) 온도, 이것은 17-26℃의 범위에 있다

[0284] n.d.: 미수행 또는 미결정

[0285] %값은 불활성화제의 최종 농도를 나타낸다.

[0286] DNA 손상 표

[0287] 표 15: 불활성화에 의해 유발된 Abasic 부위

불활성화제	농도 (%)	온도 (°C)	APS의 비례수
<b>인플루엔자 A/Christchurch//16/10 감염된 세포 DNA</b>			
없음		2-8	<b>1</b>
BPL	0.05	2-8/37	<b>0.6</b>
069-1	0.025	2-8	<b>15</b>
069-1	0.025	37	<b>26</b>
069-1	0.05	2-8	<b>6</b>
069-1	0.05	37	<b>46</b>
069-1	0.1	2-8	<b>50</b>
069-1	0.1	37	<b>66</b>
<b>인플루엔자 A/Brisbane/10/2010 감염된 세포 DNA</b>			
없음		2-8	<b>1</b>
BPL	0.05	2-8/37	<b>29</b>
069-1	0.025	2-8	<b>42</b>
069-1	0.025	37	<b>67</b>
069-1	0.05	2-8	<b>48</b>
069-1	0.05	37	<b>119</b>
069-1	0.1	2-8	<b>109</b>
069-1	0.1	37	<b>146</b>
<b>인플루엔자 A/California/7/09 감염된 세포 DNA</b>			
없음		2-8	<b>1</b>
BPL	0.05	4/37	<b>63</b>
069-1	0.025	2-8	<b>25</b>
069-1	0.025	37	<b>50</b>
069-1	0.05	2-8	<b>16</b>
069-1	0.05	37	<b>23</b>
069-1	0.1	2-8	<b>63</b>
069-1	0.1	37	<b>89</b>

[0288]

[0289] 표 16: 다른 농도의 069-1로 단일/이중 불활성화에 의해 유발된 Abasic 부위

불활성화제	농도 (%)	온도 (°C)	APS의 비례수
인플루엔자 B/Wisconsin/1/2010 감염된 세포 DNA			
	없음	2-8	1
	BPL	2-8/37	30
단일	069-1	0.025	39
	069-1	0.025	43
불활성화제	069-1	0.05	39
	069-1	0.05	58
치료	069-1	0.1	56
	069-1	0.1	53
두	069-1	0.025	69
	069-1	0.025	88
불활성화제	069-1	0.05	57
	069-1	0.05	94
치료	069-1	0.1	85
	069-1	0.1	73

[0290]

[0291] 표 17: BPL 및 069-1로 이중 불활성화에 의해 유발된 Abasic 부위

불활성화제	농도 (%)	온도 (°C)	APS의 비례수
인플루엔자 B/Wisconsin/1/2010 감염된 세포 DNA			
	없음	2-8	1
	BPL	2-8/37	2
단일	069-1	0.05	10
	069-1	0.025	5
불활성화제	069-1	0.025	3
	069-1	0.05	8
치료	069-1	0.05	8
	069-1	0.1	15
	069-1	0.1	15
두	BPL	2-8/37	20
	069-1	0.05	93
불활성화제	069-1	0.025	79
	069-1	0.025	141
치료: BPL	069-1	0.05	150
플러스 BPL	069-1	0.5	172
또는 069-1	069-1	0.1	205
	069-1	0.1	110

[0292]

[0293] 회석하지 않은 모든 값이 테스트 범위 훨씬 이상이였기 때문에 두 배 불활성화 샘플을 회석하였다. 비교를 위해 이 표에 제공된 상대적인 APS 수를 계산하기 위해 회석 인자를 사용하였다.

[0294] 본 발명에 유용한 불활성화제 (또한 도 1 참조)

[0295] 표 18

코드	상세설명
054	1,1-디히드로퍼옥시메탄
056-1	(다이머) C <sub>8</sub> H <sub>18</sub> O <sub>6</sub> 2,2'-디히드로퍼옥시-2,2'-디부틸과산화물
058-1	C <sub>4</sub> H <sub>10</sub> O <sub>4</sub> 2,2-디히드로퍼옥시부탄
057-1	056-1 및 058-1 의 혼합물 (1:1 비율)
069-1	C <sub>2</sub> H <sub>6</sub> O <sub>4</sub> 1,1-디히드로퍼옥시메탄 히드로퍼옥시드-1,1'-에틸리덴비스 또한 에탄-1,1-디히드로과산화물 또는 1,1-비스히드로퍼옥시메탄으로 알려짐.
070-1	C <sub>3</sub> H <sub>8</sub> O <sub>4</sub> 1,1-디히드로록시프로판
071-1	C <sub>4</sub> H <sub>14</sub> O <sub>4</sub> 1,1-디히드로퍼옥시부탄
077	(다이머) C <sub>6</sub> H <sub>14</sub> O <sub>6</sub> 1,1-디히드로퍼옥시프로판 + 1,1'-디히드로퍼옥시-1,1'-디프로필과산화물
078	(다이머) C <sub>8</sub> H <sub>18</sub> O <sub>6</sub> 1,1-디히드로퍼옥시부탄 + 1,1'-디히드로퍼옥시-1,1'-디부틸과산화물
079	C <sub>4</sub> H <sub>8</sub> O <sub>4</sub> 1,1-디히드로퍼옥시메탄 + 1,1'-디히드로록시-1,1'-디에틸과산화물
080	C <sub>5</sub> H <sub>4</sub> O <sub>8</sub> 및/또는 달린 고리 C <sub>5</sub> H <sub>2</sub> O <sub>6</sub> 1,1,5,5-테트라히드로퍼옥시펜탄 + 3,7-비스-히드로퍼옥시-1-2-디옥세판

[0296]

[0297] 비교를 위해, 다음 일-기능성 유기 과산화물을 또한 테스트하였다:

072	메틸히드로과산화물, CH <sub>3</sub> -OOH
-----	---------------------------------

[0298]

[0299] 참고문헌

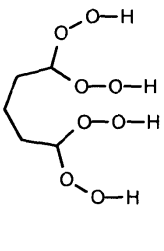
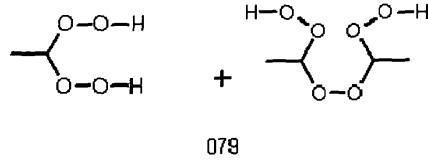
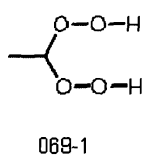
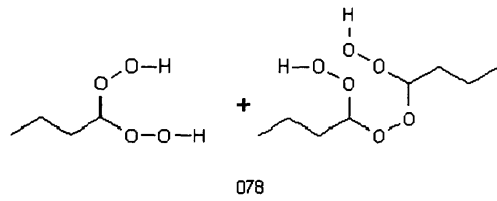
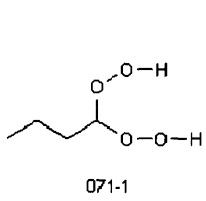
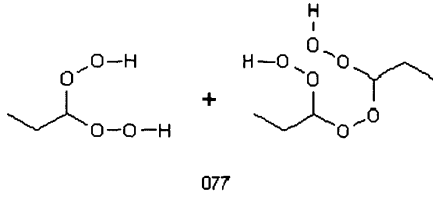
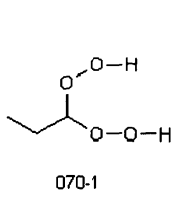
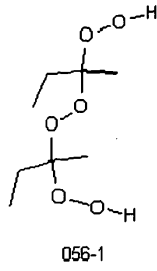
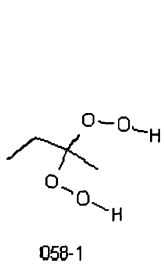
- [0300] [1] *Handbuch der Schutzimpfungen in der Tiermedizin* (eds. Mayr et al). Verlag Paul Beyer, 1984.
- [0301] [2] WO2007/052163.
- [0302] [3] European guidelines on Viral Safety Evaluations of Biotechnology Products; ICH Q5A (CPMP/ICH/295/95).
- [0303] [4] Note for Guidance on the use of bovine serum in the manufacture of human biological medicinal products, CPMP/BWP/1793/02.
- [0304] [5] Moghaddam et al. (2006) *Nature Medicine* 12:905-7.
- [0305] [6] Haas et al. (1959) *Arch Gesamte Virusforsch.* 9:470-83.
- [0306] [7] Rheinbaben & Wolff; *Handbuch der viruswirksamen Desinfektionen*; Springer 2002; p 163.
- [0307] [8] Hamann et al. (2008) *Chem Eur J* 14:6849-51.
- [0308] [9] Bunge et al. (2009) *Tetrahedron letters* 50:524-6
- [0309] [10] Zmitek et al. (2007) *OrgBiomol Chem* 5:3895-908.
- [0310] [11] Kistner et al. (1998) *Vaccine* 16:960-8.
- [0311] [12] Kistner et al. (1999) *Dev Biol Stand* 98:101-10.
- [0312] [13] Bruhl et al. (2000) *Vaccine* 19:1149-58.
- [0313] [14] WO97/37000.
- [0314] [15] Brands et al. (1999) *Dev Biol Stand* 98:93-100.

- [0315] [16] Halperin et al. (2002) *Vaccine* 20:1240-7.
- [0316] [17] Tree et al. (2001) *Vaccine* 19:3444-50.
- [0317] [18] Kistner et al. (1998) *Vaccine* 16:960-8.
- [0318] [19] Kistner et al. (1999) *Dev Biol Stand* 98:101-110.
- [0319] [20] Bruhl et al. (2000) *Vaccine* 19:1149-58.
- [0320] [21] Pau et al. (2001) *Vaccine* 19:2716-21.
- [0321] [22] <http://www.atcc.org/>
- [0322] [23] <http://locus.umdj.edu/>
- [0323] [24] W003/076601.
- [0324] [25] W02005/042728.
- [0325] [26] W003/043415.
- [0326] [27] W001/85938.
- [0327] [28] W02006/108846.
- [0328] [29] W097/37000.
- [0329] [30] Brands et al. (1999) *Dev Biol Stand* 98:93-100.
- [0330] [31] Halperin et al. (2002) *Vaccine* 20:1240-7.
- [0331] [32] EP-A-1260581 (W001/64846).
- [0332] [33] W02006/071563.
- [0333] [34] W02005/113758.
- [0334] [35] W003/023021
- [0335] [36] W003/023025
- [0336] [37] *Remington: The Science and Practice of Pharmacy* (Gennaro, 2000; 20th edition, ISBN: 0683306472)
- [0337] [38] *Vaccine Design: The Subunit and Adjuvant Approach* (eds. Powell & Newman) Plenum Press 1995 (ISBN 0-306-44867-X).
- [0338] [39] *Vaccine Adjuvants: Preparation Methods and Research Protocols (Methods in Molecular Medicine series 중예 42권)*. ISBN: 1-59259-083-7. Ed. O'Hagan.
- [0339] [40] *Vaccine Design: The Subunit and Adjuvant Approach* (eds. Powell & Newman) Plenum Press 1995 (ISBN 0-306-44867-X).
- [0340] [41] Lundblad (2001) *Biotechnology and Applied Biochemistry* 34:195-197.
- [0341] [42] *Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation*. U.S. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration Center for Drug Evaluation and Research (CDER) Center for Veterinary Medicine (CVM). May 2001.
- [0342] [43] Ji et al. (2002) *Biotechniques*. 32:1162-7.
- [0343] [44] Briggs (1991) *J Parenter Sci Technol.* 45:7-12.
- [0344] [45] Lahijani et al. (1998) *Hum Gene Ther.* 9:1173-80.
- [0345] [46] Lokteff et al. (2001) *Biologicals*. 29: 123-32.
- [0346] [47] W002/28422

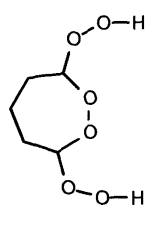
- [0347] [48] W002/067983
- [0348] [49] W002/074336
- [0349] [50] W001/21151
- [0350] [51] W002/097072
- [0351] [52] W02005/113756
- [0352] [53] Treanor et al. (1996) *J Infect Dis* 173:1467-70
- [0353] [54] Keitel et al. (1996) *Clin Diagn Lab Immunol* 3:507-10
- [0354] [55] W02008/068631
- [0355] [56] Spaulding. *Chemical disinfection of medical and surgical materials*. In: Block (Editor): *Disinfection, Sterilization, and Preservation*. Chapter 32, pages 517-31. Lippincott Williams & Wilkins, 1968.
- [0356] [57] Darling et al. (1998) *Biologicals* 26:105-10.
- [0357] [58] Favero & Bond. *Chemical disinfection of medical and surgical materials*. In: Block (Editor): *Disinfection, Sterilization, and Preservation*. Chapter 35, pages 617-41. Lea and Febinger, 1991.
- [0358] [59] ICH Q5A. Viral safety evaluation of biotechnology products derived from cell lines of human or animal origin. 1999.

도면

도면1



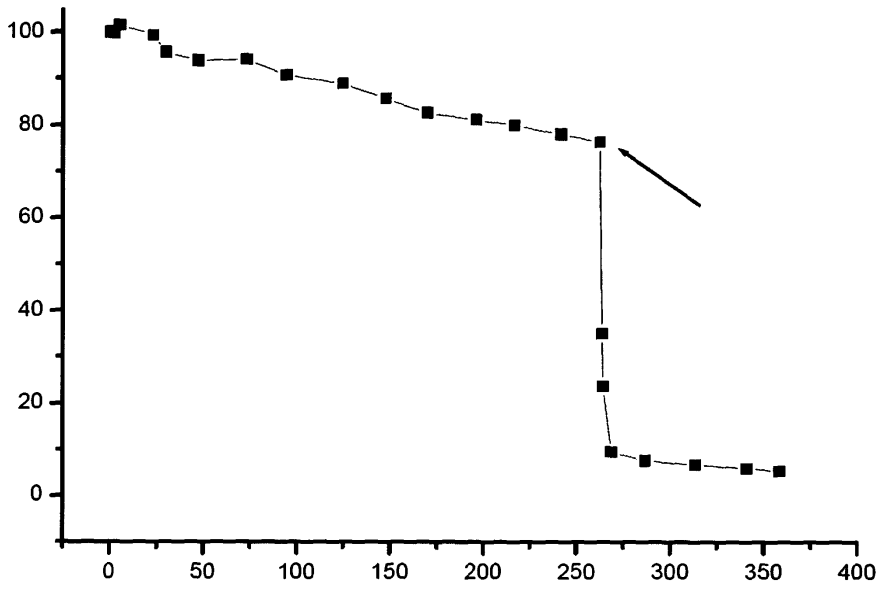
+



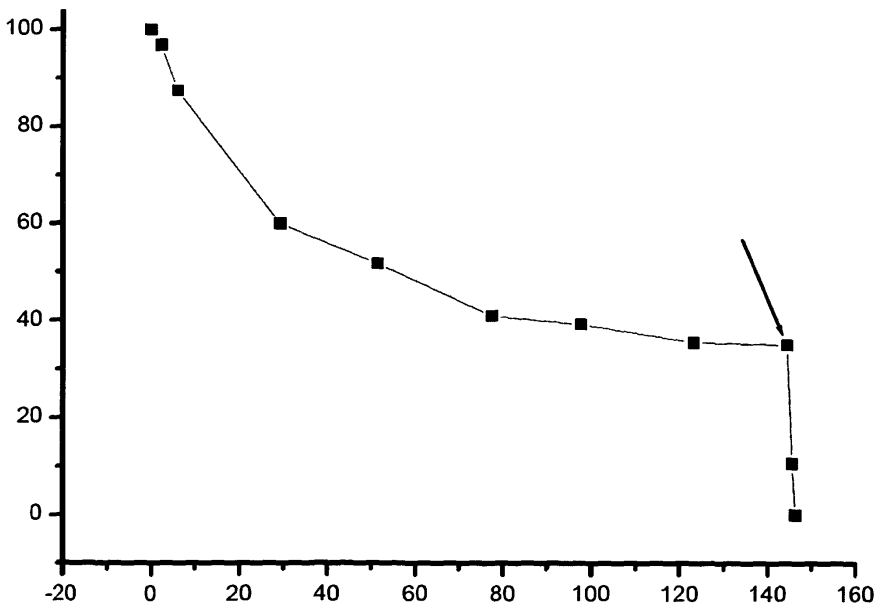
080



도면2



도면3



도면4

