

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第6189751号
(P6189751)

(45) 発行日 平成29年8月30日(2017.8.30)

(24) 登録日 平成29年8月10日(2017.8.10)

(51) Int. Cl.		F I	
A 6 1 L	2/18	(2006.01)	A 6 1 L 2/18
A 6 1 K	35/14	(2015.01)	A 6 1 K 35/14
A 6 1 K	35/20	(2006.01)	A 6 1 K 35/20
A 6 1 K	35/22	(2015.01)	A 6 1 K 35/22
A 6 1 K	35/28	(2015.01)	A 6 1 K 35/28

請求項の数 8 (全 18 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2013-546778 (P2013-546778)
(86) (22) 出願日	平成23年12月23日(2011.12.23)
(65) 公表番号	特表2014-503305 (P2014-503305A)
(43) 公表日	平成26年2月13日(2014.2.13)
(86) 国際出願番号	PCT/IB2011/003271
(87) 国際公開番号	W02012/090067
(87) 国際公開日	平成24年7月5日(2012.7.5)
審査請求日	平成26年12月17日(2014.12.17)
(31) 優先権主張番号	61/428, 416
(32) 優先日	平成22年12月30日(2010.12.30)
(33) 優先権主張国	米国 (US)

前置審査

(73) 特許権者	513164679 ラボラトワール フランセ デュ フラク ショヌマン エ デ ビオテクノロジー Laboratoire Francais du Fractionnement et des Biotechnolo gies フランス国 F-91940 レ ジュリ ス ゼッドアー ドゥ クルタブフ アヴ ニュ デ トロピック 3
(74) 代理人	100073184 弁理士 柳田 征史
(72) 発明者	シュトゥルー, サミ フランス国 F-78990 エランクー ル アヴニュ デュ シャトー 20 最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 病原体不活性化剤としてのグリコール

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

治療剤の製造において使用するまたは臨床サンプルとして使用するための生物学的組成物におけるウイルス病原体不活性化剤としてのグリコールの使用であって、前記生物学的組成物は、血液組成物、乳組成物、尿、汗、唾液、糞、脊髄液、細胞抽出物または組織抽出物であり、前記グリコールがプロピレングリコールであり、前記生物学的組成物中の前記グリコールの濃度が40% (v/v)と50% (v/v)の間である、使用。

【請求項 2】

治療剤の製造において使用するまたは臨床サンプルとして使用するための生物学的組成物中のウイルス病原体を不活性化させる方法であって、前記生物学的組成物をグリコールと接触させる工程を含み、前記生物学的組成物が、血液組成物、乳組成物、尿、汗、唾液、糞、脊髄液、細胞抽出物または組織抽出物であり、前記グリコールがプロピレングリコールであり、前記接触工程後のグリコールの濃度が、前記生物学的組成物の40% (v/v)と50% (v/v)の間である、方法。

【請求項 3】

前記ウイルス病原体がエンベロープウイルスである、請求項 2 記載の方法。

【請求項 4】

前記エンベロープウイルスが、X - MuLV、PRV、BVDVおよびTGEVウイルスからなる群より選択される、請求項 3 記載の方法。

【請求項 5】

10

20

前記方法により、 $4 \text{ Log}_{10} \text{TCID}$ （組織培養感染量）以上の病原体除去がもたらされ、該 TCID がケルバーの方法および/またはスピアマン・ケルバーの方法にしたがう、請求項2から4いずれか1項記載の方法。

【請求項6】

15 と25 の間の温度で行われる、請求項2から5いずれか1項記載の方法。

【請求項7】

7.0と8.0の間のpHで行われる、請求項2から6いずれか1項記載の方法。

【請求項8】

病原体不活性化剤としてグリコールを含む、治療剤の製造において使用するまたは臨床サンプルとして使用するための生物学的組成物であって、該生物学的組成物が、血液組成物、乳組成物、尿、汗、唾液、糞、脊髄液、細胞抽出物または組織抽出物であり、前記グリコールがプロピレングリコールであり、前記生物学的組成物中の前記グリコールの濃度が40% (v/v)と50% (v/v)の間である、生物学的組成物。

10

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本開示は、生物学的組成物中の病原体の不活性化のための使用、方法および組成物に関する。

【背景技術】

【0002】

生物学的組成物の使用は、治療剤の開発と製造（例えば、組換えタンパク質の製造）にとって重要である。血液組成物などの生物学的組成物は、例えば、血液病を患った患者、出血した患者、または外科手術を受けた患者に関して、輸血によって多くの生命を救う。しかしながら、生物学的組成物中の病原体の存在は、重大な健康上のリスクを呈する。

20

【0003】

生物学的組成物中の病原体を不活性化する方法が開発されてきた。典型的な病原体不活性化方法としては、熱処理、溶媒処理および/または洗浄剤処理、ガンマ線照射、UV処理、および白血球除去に基づく手法が挙げられる。しかしながら、それらの方法の効率および有効性は、病原体の様々な感受性およびいくつかの方法の特定の生物学的組成物との不適合性のために、ばらつきがある。

30

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0004】

新規の病原体不活性化方法および病原体不活性化剤が必要とされている。

【課題を解決するための手段】

【0005】

本開示は、生物学的組成物中の病原体を不活性化するための使用、方法、薬剤および組成物に関する。

【0006】

1つの態様において、本開示は、病原体不活性化剤としてのグリコールの使用に関する。いくつかの実施の形態において、グリコールはプロピレングリコールである。

40

【0007】

1つの態様において、本開示は、生物学的組成物中の病原体を不活性化する方法であって、その生物学的組成物をグリコールと接触させる工程を含む方法に関する。生物学的組成物中の病原体を不活性化するためのいくつかの実施の形態において、グリコールはプロピレングリコールである。生物学的組成物中の病原体を不活性化するためのいくつかの実施の形態において、生物学的組成物は血液組成物または乳組成物である。生物学的組成物中の病原体を不活性化するためのいくつかの実施の形態において、病原体は、ウイルス、細菌、菌類、原生動物、寄生虫、およびプリオンからなる群より選択される。いくつかの実施の形態において、ウイルスは、X-MuLV、PRV、BVDVおよびTGEVウイ

50

ルスからなる群より選択される。生物学的組成物中の病原体を不活性化するためのいくつかの実施の形態において、前記方法により、ケルバー (Kaerber) の方法および/またはスピアマン・ケルバー (Spearman-Kaerber) の方法にしたがって $4 \text{ Log}_{10} \text{TCID}$ (組織培養感染量) 以上の病原体除去がもたらされる。生物学的組成物中の病原体を不活性化するためのいくつかの実施の形態において、接触工程後のグリコールの濃度は、生物学的組成物の 40% (w/w) と 50% (w/w) の間である。生物学的組成物中の病原体を不活性化するためのいくつかの実施の形態において、接触工程後のグリコールの濃度は、生物学的組成物の 40% (v/v) と 50% (v/v) の間である。生物学的組成物中の病原体を不活性化するためのいくつかの実施の形態において、前記方法は 15 と 25 の間の温度で行われる。生物学的組成物中の病原体を不活性化するためのいくつかの実施の形態において、前記方法は、7.0 と 8.0 の間の pH で行われる。

10

【0008】

1つの態様において、本開示は、グリコールを含む生物学的組成物であって、ここに記載された方法のいずれかにより得られる生物学的組成物に関する。いくつかの実施の形態において、このグリコールは、40% と 50% の間の濃度である。いくつかの実施の形態において、グリコールはプロピレングリコールである。いくつかの実施の形態において、生物学的組成物は乳組成物または血液組成物である。

【図面の簡単な説明】

【0009】

図面は、本明細書の一部を構成し、本開示のいくつかの態様をさらに説明するために含まれる。本開示は、ここに提示された特定の実施の形態の詳細な説明と一緒にこれらの図面の1つ以上を参照することによって、よりよく理解されるであろう。図面は、説明目的のためだけであり、本開示の実施可能性について要求されない。

20

【図1】45%のプロピレングリコールを含有するアフィニティー・クロマトグラフィー溶出液中のTEGVの不活性化を示すグラフ

【図2】45%のプロピレングリコールを含有するアフィニティー・クロマトグラフィー溶出液中のBVDVの不活性化を示すグラフ

【発明を実施するための形態】

【0010】

1つの態様において、本開示は、病原体不活性化剤としてのグリコールの使用に関する。1つの態様において、本開示は、生物学的組成物中の病原体を不活性化する方法であって、その生物学的組成物をグリコールと接触させる工程を含む方法に関する。1つの態様において、本開示は、グリコールを含む生物学的組成物に関する。いくつかの実施の形態において、そのグリコールを含む生物学的組成物は、ここに記載された方法のいずれかにより得られる。

30

【0011】

ここに記載された使用、方法および組成物のいくつかの実施の形態において、グリコールはビシナルグリコールである。いくつかの実施の形態において、ビシナルグリコールはプロピレングリコールまたはエチレングリコールである。

【0012】

「グリコール」(または「ジオール」)という用語は、2つのヒドロキシル基(-OH)を含有する化合物を称する。「ビシナルグリコール」という用語は、2つのヒドロキシル基が隣接した原子に結合している(例えば、近接位置に)グリコールを称する。

40

【0013】

いくつかの実施の形態において、ここに記載された方法および組成物に使用されるグリコールは、2つから6つの炭素を含み、化学式 $R_1R_2-(C-OH)_2-R_3R_4$ を有するビシナルグリコールであり、式中、 R_1 、 R_2 、 R_3 および R_4 は、同一でも異なってよく、各々が水素原子またはアルキル基のいずれかであり、 R_1 、 R_2 、 R_3 および R_4 の組合せが多くとも2つの炭素原子しか含有しない。ビシナルグリコールの例には、プロピレングリコール、エチレングリコール、1,2-ブタンジオールおよび1,2-ペンタンジオー

50

ルがある。

【 0 0 1 4 】

ここに記載された使用、方法および組成物のいくつかの実施の形態において、グリコールはプロピレングリコールまたはエチレングリコールである。

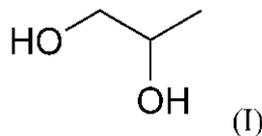
【 0 0 1 5 】

「 1 , 2 - ジヒドロキシプロパン 」または「メチルグリコール」とも称される「プロピレングリコール」という用語は、プロパン - 1 , 2 - ジオールを称し、以下に示す構造式 (I) を有する。

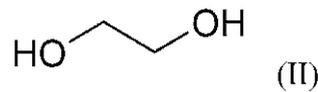
【 0 0 1 6 】

「 1 , 2 - ジヒドロキシエタン 」とも称される「エチレングリコール」という用語は、エタン - 1 , 2 - ジオールを称し、以下に示す構造式 (II) を有する。

【 化 1 】



プロピレングリコール



エチレングリコール

【 0 0 1 7 】

ここに記載された使用、方法および組成物のいくつかの実施の形態において、グリコールはジェミナルグリコールである。ジェミナルグリコールは、同じ炭素原子に結合した 2 つのヒドロキシル基を有し、 1 , 2 - メタンジオール、 1 , 2 - エタンジオールおよび 1 , 2 - プロパンジオールを含む。ここに記載された使用、方法および組成物のいくつかの実施の形態において、グリコールは、ヒドロキシル基が同じ炭素原子または隣接する炭素原子に結合していないジオールである。そのようなグリコールの例には、 1 , 3 - ブタンジオール、 1 , 4 - ペンタンジオール、および 1 , 3 - ベンゼンジオールがある。

【 0 0 1 8 】

1 つの態様において、本開示は、病原体不活性化剤、そのような薬剤を含む組成物およびその使用に関する。

【 0 0 1 9 】

「病原体」という用語は、ヒトなどの哺乳類において疾病を生じさせることのできる任意の生物学的作用物質（例えば、任意の核酸含有作用物質またはプリオンなどのタンパク質様感染性粒子）を称する。病原体という用語は、一本鎖または二本鎖の形態にある、遺伝物質として DNA または RNA を有する単細胞または多細胞の微生物を含む。この用語は、特に、ウイルス、細菌、菌類、原生動物およびプリオンを含む。細菌の例としては、以下に限られないが、ストレプトコッカス種、エシェリキア種およびバチルス種が挙げられる；ウイルスの例としては、以下に限られないが、ヒト免疫不全ウイルス (HIV) および他のレトロウイルス、ヘルペスウイルス、パラミクソウイルス、ポックスウイルス、トガウイルス、サイトメガロウイルスおよび肝炎ウイルス (HAV 、 HBV 、 HCV) が挙げられる；寄生虫の例としては、以下に限られないが、マラリア原虫 (プラスモジウム種) およびトリパノソーマ原虫が挙げられる。

【 0 0 2 0 】

本開示のいくつかの実施の形態において、不活性化すべき病原体は、ウイルス、細菌、菌類、原生動物、寄生虫およびプリオンからなる群より選択される。

【 0 0 2 1 】

いくつかの実施の形態において、前記病原体はウイルスである。

【 0 0 2 2 】

いくつかの実施の形態において、そのウイルスは、エンベロープウイルスまたは非エンベロープウイルスである。

10

20

30

40

50

【0023】

エンベロープウイルスは、宿主細胞様「エンベロープ」を有するウイルスであり、その例としては、以下に限られないが、哺乳類または鳥類白血病ウイルス、ヘルペスウイルス、ポックスウイルス、ヘパドナウイルス、フラビウイルス、トガウイルス、コロナウイルス、肝炎ウイルス、レトロウイルス、オルトミクソウイルス、パラミクソウイルス、ラウドウイルス、プニヤウイルス、フィラウイルスおよびレオウイルスが挙げられる。裸のウイルスとも称される非エンベロープウイルスは、当該技術分野で周知されており、その例としては、以下に限られないが、アデノウイルス、ノロウイルス、ロタウイルスおよびヒト乳頭腫ウイルスが挙げられる。

【0024】

いくつかの実施の形態において、ウイルスは、X - M u L V、P R V、T G E VまたはB V D Vである。「ゼノトロピックマウス白血病ウイルス関連ウイルス」を表す「X - M u L V」という用語は、ガンマレトロウイルスを称する。「P R V」という用語は、仮性狂犬病ウイルスを称する。「伝染性胃腸炎コロナウイルス」を表す「T G E V」という用語は、コロナウイルス科に属する動物ウイルスの種を称する。「牛ウイルス性下痢ウイルス」を表す「B V D V」という用語は、フラビウイルス科のペスチウイルスである。

【0025】

1つの態様において、本開示は、生物学的組成物中の病原体を不活性化する方法であって、その生物学的組成物をグリコールと接触させる工程を含む方法に関する。

【0026】

ここに用いたように、「接触させる工程」という用語は、少なくとも2種類の別個の組成物または成分を、それらが相互作用できるように接触させるプロセスを称する。

【0027】

「生物学的組成物」という用語は、哺乳類を含む生体を起源とする組成物（または物質）を称する。生物学的組成物の例としては、以下に限られないが、血液組成物、乳（トランスジェニック哺乳類からの乳など）、尿、汗、唾液、糞および脊髄液などの臨床サンプル、細胞抽出物、組織抽出物、細胞培養媒質などが挙げられる。ここに用いたように、生物学的組成物は、代用血液などの、生物学的組成物として機能できる合成組成物、および1つ以上の精製工程または分離工程を経た組成物も含む。

【0028】

本開示によれば、血液組成物としては、以下に限られないが、全血および血液製剤が挙げられる。「血液製剤」という用語は、全血から分離されるであろう1種類以上の成分を称し、細胞血液成分（赤血球、血小板、白血球およびその濃縮物など）、血液タンパク質（血液凝固因子、酵素、アルブミン、プラスミノゲン、イムノグロブリンなど）および血液流体成分（血漿、血漿分画および血清分画など）が挙げられる。いくつかの実施の形態において、血液組成物は、白血球除去されている（例えば、白血球が減少している）。

【0029】

いくつかの実施の形態において、処理すべき血液組成物は、全血、赤血球濃縮物、血小板濃縮物、血漿および血漿分画からなる群より選択される。

【0030】

いくつかの実施の形態において、生物学的組成物は乳組成物である。いくつかの実施の形態において、処理すべき乳組成物は、乳内に分泌されるタンパク質を生成するトランスジェニック動物の乳由来である。

【0031】

いくつかの実施の形態において、前記方法は、乳組成物などの生物学的組成物の、アフィニティー・クロマトグラフィーなどによる精製のプロセスにおける溶出液に行われる。ここに用いた「病原体不活性化」または「病原体を不活性化する」などの用語は、前記病原体の複製(replication)（または繁殖(reproduction)）の抑制または阻害、および/またはそれらの破壊または除去を称する。概して、病原体不活性化剤は、病原体が適切な条件下で複製または繁殖する能力を厳しくまたは少なくとも実質的に妨げる。

10

20

30

40

50

【 0 0 3 2 】

特定の方法により、病原体の複製が抑制または阻害されるか否かを判定する方法が、当該技術分野で周知されている。概して、そのような方法は、病原体不活性化剤による処理の前に、(活性)病原体の数を決定し、処理後に(活性)病原体の数を決定する各工程を含む。活性病原体の数を決定する特定の方法は、病原体の性質に依存し、その例としては、コロニー形成アッセイ(活性細菌の数を決定する)および感染アッセイ(「活性」ウイルスの数を決定する)が挙げられる。活性ウイルスの数の尺度の1つは組織培養感染量(TCID)であり、これは、例えば、ケルバーの方法および/またはスピアマン・ケルバーの方法により決定できる(例えば、Karber, G. (1931). Arch. J. Exper. Path. u. pharmakol., 162, 480; Spearman (1908). Brit. J. Psychol., 2:227-242を参照のこと)

10

【 0 0 3 3 】

いくつかの実施の形態において、本開示の方法により、 $4 \text{Log}_{10} \text{TCID}$ 以上の病原体除去がもたらされる。病原体除去は、実施例に説明されるように、ケルバーの方法および/またはスピアマン・ケルバーの方法により計算してよい。

【 0 0 3 4 】

いくつかの実施の形態において、生物学的組成物は、接触工程後には、病原体の量を、例えば、所望のレベル未満まで、不活性化させる、除去する、または低下させるのに十分な量のグリコールを含有する。いくつかの実施の形態において、接触工程後の生物学的組成物中のグリコール濃度は、組成物の10%と75%(w/w)の間、15%と70%(w/w)の間、20%と65%(w/w)の間、25%と60%(w/w)の間、30%と60%(w/w)の間、35%と55%(w/w)の間、または40%と50%(w/w)の間である。いくつかの実施の形態において、接触工程後の生物学的組成物中のグリコール濃度は、組成物の10%と75%(v/v)の間、15%と70%(v/v)の間、20%と65%(v/v)の間、25%と60%(v/v)の間、30%と60%(v/v)の間、35%と55%(v/v)の間、または40%と50%(v/v)の間である。

20

【 0 0 3 5 】

要求はされないが、一般に、病原体を含む生物学的組成物のグリコールへの曝露の長さにより、病原体の不活性化が増加することが予測される。いくつかの実施の形態において、生物学的組成物は、病原体除去を $4 \text{Log}_{10} \text{TCID}$ (細胞培養感染量)以上にできる期間に亘りグリコールに接触させられる。

30

【 0 0 3 6 】

いくつかの実施の形態において、生物学的組成物は、少なくとも10分間、少なくとも20分間、少なくとも30分間、少なくとも40分間、少なくとも50分間、少なくとも60分間、少なくとも70分間、少なくとも80分間、少なくとも90分間、少なくとも1200分間、少なくとも150分間、少なくとも180分間、少なくとも210分間、少なくとも240分間、少なくとも300分間、少なくとも360分間、少なくとも2500分間、少なくとも1000分間、またはそれより長い期間に亘り、グリコールと接触させられる。いくつかの実施の形態において、生物学的組成物は、15分間と360分間の間、60分間と240分間の間、または90分間と180分間の間の期間に亘り、グリコールと接触させられる。いくつかの実施の形態において、グリコールは、特定の量の病原体不活性化が達成された後に、生物学的組成物から除去される。いくつかの実施の形態において、グリコールは、病原体の不活性化後に、生物学的組成物中に存在したままである。

40

【 0 0 3 7 】

いくつかの実施の形態において、ここに記載された方法は、10 と30 の間、12 と28 の間、または15 と25 の間の温度で行われる。

【 0 0 3 8 】

いくつかの実施の形態において、ここに記載された方法は、4と11の間、5と10の

50

間、6と9の間、6.5と8.5の間、または7と8の間のpHで行われる。いくつかの実施の形態において、ここに記載された方法は、およそ7.5のpHで行われる。いくつかの実施の形態において、ここに記載された方法は、7.5のpHで行われる。当業者は、特定の生物学的組成物にとってどのpH範囲が許容されるかを決定するために、文献に頼ることができる。

【0039】

いくつかの実施の形態において、前記方法は、ナノ濾過法などのウイルス除去のさらに別の工程を含む。

【0040】

いくつかの実施の形態において、前記方法は、生物学的組成物の、アフィニティー・クロマトグラフィーなどの精製プロセスにおいて、溶出段階で行われる。いくつかの実施の形態において、グリコールは親和溶出緩衝液に加えられる。いくつかの実施の形態において、親和溶出緩衝液は、50mMのトリス、45%(w/w)のプロピレングリコール、および1.5MのNaClを含み、7.5のpHを有する。いくつかの実施の形態において、親和溶出緩衝液は、50mMのトリス、45%(v/v)のプロピレングリコール、および1.5MのNaClを含み、7.5のpHを有する。

10

【0041】

いくつかの実施の形態において、ここに記載された方法は、生物学的組成物を多量のアブラナ油(cruciferous oil)またはアルギニンと接触させる工程を含まない。

【0042】

ここに用いた多量のアルギニンは、接触工程後の、少なくとも0.2Mの、少なくとも0.01Mの、または少なくとも0.001Mのアルギニン濃度に相当する。

20

【0043】

ここに用いた多量のアブラナ油は、接触工程後の、少なくとも0.1%の、少なくとも0.01%の、または少なくとも0.001%のアブラナ油の濃度に相当する。

【0044】

1つの態様において、本開示は、病原体を不活性化するためのグリコールを含む生物学的組成物であって、ここに記載された方法のいずれかなどによって、生物学的組成物をグリコールと接触させることによって得られる生物学的組成物に関する。

【0045】

いくつかの実施の形態において、グリコールはプロピレングリコールまたはエチレングリコールである。

30

【0046】

いくつかの実施の形態において、生物学的組成物中のグリコール濃度は、組成物の10%と75%(w/w)の間、15%と70%(w/w)の間、20%と65%(w/w)の間、25%と60%(w/w)の間、30%と60%(w/w)の間、35%と55%(w/w)の間、または40%と50%(w/w)の間である。いくつかの実施の形態において、生物学的組成物中のグリコール濃度は、組成物の10%と75%(v/v)の間、15%と70%(v/v)の間、20%と65%(v/v)の間、25%と60%(v/v)の間、30%と60%(v/v)の間、35%と55%(v/v)の間、または40%と50%(v/v)の間である。

40

【0047】

いくつかの実施の形態において、生物学的組成物は、TWEEN 20またはTWEEN 80などの洗浄剤も含む。いくつかの実施の形態において、生物学的組成物は、TNBP(リン酸トリ-N-ブチル)などの溶媒も含む。いくつかの実施の形態において、生物学的組成物は、グリコールとの接触前に洗浄剤を含んだ。いくつかの実施の形態において、生物学的組成物は、グリコールとの接触前に、洗浄剤と接触させられる。いくつかの実施の形態において、生物学的組成物は、グリコールとの接触と同時に、洗浄剤と接触させられる。いくつかの実施の形態において、生物学的組成物は、グリコールとの接触後に、洗浄剤と接触させられる。

50

【 0 0 4 8 】

いくつかの実施の形態において、生物学的組成物は、多量のアルギニンを含まない。

【 0 0 4 9 】

いくつかの実施の形態において、生物学的組成物は、多量のアブラナ油を含まない。

【 0 0 5 0 】

いくつかの実施の形態において、生物学的組成物は、多量のアルギンもアブラナ油もいずれも含まない。

【実施例】

【 0 0 5 1 】

以下の実施例は、本開示の方法を実施する実施の形態および組成物を製造する実施の形態のいくつかを記載している。しかしながら、これらの実施例は、説明目的のためだけであり、本開示の範囲を制限することを意図していないことが理解されよう。本出願の至る所に挙げられた文献（学術文献、発行された特許、公開された特許出願、および同時係属の特許出願を含む）の全ての中身全体は、引用により明白にここに含まれる。

【 0 0 5 2 】

材料および方法

アフィニティー・クロマトグラフィー溶出液中に45%（v/v）で存在するプロピレングリコール（PG）による2つのエンベロープウイルス（TGEVおよびBVDV）の不活性化を評価した。関心のあるトランスジェニックタンパク質（乳中に分泌される、そのタンパク質を産生するトランスジェニック動物由来の乳組成物中の）の産生中に、溶出液が生成された。

【 0 0 5 3 】

細胞毒性、ウイルス干渉および抑制(quenching)

出発材料（溶出液）の細胞毒性、ウイルス干渉および抑制のパラメータを、PGの存在下でのインキュベーションアッセイの前に判定した。細胞毒性、ウイルス干渉および抑制を判定するためのアッセイを、アフィニティー・クロマトグラフィーの溶出液サンプルについて行った。

【 0 0 5 4 】

細胞毒性

出発材料の細胞毒性パラメータを、表1の条件を使用して評価した：

【表1】

表1. 細胞毒性および試験した希釈の評価のためのサンプル

接種するサンプル	希釈範囲	細胞および 関連ウイルス	接種後の観察
出発マトリクス (溶出液)	未希釈対 1/243 (3の範囲)	ST (豚の精巢) TGEV	日数+3/6
		MDBK (メイ イン ダー ビー 牛 肝臓) BVDV	日数+3/6

【 0 0 5 5 】

サンプルマトリクスの非細胞毒性濃度は、マトリクス中にインキュベーションされた細胞の細胞外層のどのような破壊も含まないサンプルマトリクスの最初の希釈と定義される

【 0 0 5 6 】

このアッセイにおいて + 3 日目に得られた細胞毒性パラメータは、ウイルス干渉条件を決定するために使用され、+ 6 日目に確認された。

【 0 0 5 7 】

ウイルス干渉制御およびサンプル抑制

ウイルス干渉制御およびサンプル抑制のパラメータを同時に決定した。

【 0 0 5 8 】

滴定システムに関するサンプルのウイルス干渉パラメータを評価した。このアッセイは、培地中の滴定と比較した、サンプルマトリクス中のウイルス B V D V および T G E C の希釈滴定（第 1 の希釈点：先に決定した非細胞毒性マトリクス）からなる。ウイルスの適切な希釈を決定する前に、実際のアッセイには、T 0、T 5 および T 1 5 での画分の滴定の前に、1 5 ~ 3 0 分間の待ち時間があるので、アッセイ環境を模倣するために、4 で 3 0 分間のインキュベーション期間をとった。

【 0 0 5 9 】

両方の滴定系（S T 細胞および M D B K 細胞）によるマトリクスの潜在的干渉を、表 I I に示された動作条件にしたがって、評価した。

【表 2】

表 II. 干渉の動作条件

細胞	ウイルス	希釈液	希釈液の希釈範囲	接種後の観察
MDBK	BVDV	非毒性濃度での出発マトリクス (溶出液)	第 1 の時点：非毒性マトリクス+ 3 の範囲の 3 つの他の希釈点 (成長)	D+6
		培地	未希釈	D+6
ST	TGEV	非毒性濃度での出発マトリクス (溶出液)	第 1 の時点：非毒性マトリクス+ 3 の範囲の 3 つの他の希釈点 (成長)	D+6
		培地	未希釈	D+6

【 0 0 6 0 】

$1.0 \log_{10} \text{TCID}_{50} / \text{mL}$ を超える差が、サンプルマトリクス（溶出液）中の滴定と培地中の滴定との間に観察された場合、マトリクスによるウイルス干渉 / 抑制が、有意であると判定した。

【 0 0 6 1 】

プロセス

動作条件

プロピレングリコール（P G）によるエンベロープウイルス（T G E V および B V D V）の不活性化の反応速度 (kinetics) は、これらのウイルスを 2 0 (± 5) で 6 時間に亘り、トランスジェニックタンパク質の精製プロセス中に得られた、4 5 % (v / v) の P G を含有するアフィニティークロマトグラフィーの溶出液と接触させることによって評価した。ウイルスは、5 % (v / v) の濃度でサンプルに加えた。各ウイルスについて、アッセイは二重に行った。

【 0 0 6 2 】

材料

出発材料はアフィニティー・クロマトグラフィー溶出液であった。この出発材料に、5% (v/v) のウイルスを加えた。

【 0 0 6 3 】

このアッセイに使用した T G E V および B V D V のウイルス懸濁液の条件が、表 I I I (T E G V) および表 V (B V D V) に記載されている。

【表 3】

表 III. TGEV 添加

使用したウイルス	TEGV (清澄上清)
培地	細胞培養培地 ST
アリコート	5x5mL, 4x1mL, 81x80μL
力価	8.53log ₁₀ TCID ₅₀ /mL ± 0.5log ₁₀
貯蔵	<-65° C

10

20

【表 4】

表 IV. BVDV 添加

使用したウイルス	BVDV (清澄上清)
培地	細胞培養培地 MDBK
アリコート	10x3mL, 1x11mL, 81x0, 2mL
力価	6.08log ₁₀ TCID ₅₀ /mL ± 0.5log ₁₀
貯蔵	<-65° C

30

【 0 0 6 4 】

それぞれの細胞培養培地 (S T 細胞および M D B K 細胞について) を中和工程中使用した。この中和は、細胞毒性、ウイルス干渉およびマトリクス抑制についてのアッセイにおいて決定した濃度で行った。

【 0 0 6 5 】

アッセイ

ビーカーを、20 ± 5 の加熱装置に入れた。このビーカーを、マグネチックスターラー上に配置し、処理前に 20 ± 5 に維持した。

【 0 0 6 6 】

各アッセイについて、出発材料のアリコート (20 mL) を 20 ± 5 の水浴中で解凍した。解凍後、温度をチェックした。

【 0 0 6 7 】

ウイルス懸濁液の各アリコート (1 mL) を周囲温度で解凍した。約 0.1 mL のアリコートを - 65 未満の温度で貯蔵した。このウイルス懸濁液を使用して、5% のウイルスを含有する出発材料のサンプルを作製した。

40

50

【 0 0 6 8 】

処理は、45%のPGを含有する19mLのマトリクス（アフィニティー・クロマトグラフィーの溶出液から得た）19mL中に1mL（5%）のウイルス懸濁液の添加からなる。

【 0 0 6 9 】

急速な均一化および混合物の温度のチェック後に、サンプルアリコート（1mL）を採取し、培地（使用した細胞株に応じて、ST細胞培養培地またはMDBK細胞培養培地）で抑制した。添加した細胞培養培地の容積は、細胞毒性、干渉およびウイルス抑制研究において得られたデータに依存した。このサンプルは「T0」を構成した。

【 0 0 7 0 】

ウイルス添加材料（45%（v/v）でPGを含有する）を「T0」サンプルに関してと同様に20 ± 5 で6時間に亘りインキュベーションし、T = 5分、T = 15分、T = 60分、T = 180分、T = 360分のインキュベーション期間後に、1mLのサンプルアリコートを採取（し、直ちに希釈）した。

【 0 0 7 1 】

溶出液マトリクスの様々なインキュベーションアッセイ中に採取したサンプル「FV I I セレクト」（45%でPGを含有する）が、表Vに要約されている。

【表5】

表V: アッセイ中に採取したサンプルの表示

分画	TGEV 処理		BVDV 処理	
	アッセイ A	アッセイ B	アッセイ A	アッセイ B
添加	添加 A TEGV	添加 B TEGV	添加 A BVDV	添加 B BVDV
インキュベーション T= 0 分	T0A TGEV	T0B TGEV	T0A BVDV	T0B BVDV
インキュベーション T= 5 分	T5A TGEV	T5B TGEV	T5A BVDV	T5B BVDV
インキュベーション T= 15 分	T15A TGEV	T15B TGEV	T15A BVDV	T15B BVDV
インキュベーション T= 60 分	T60A TGEV	T60B TGEV	T60A BVDV	T60B BVDV
インキュベーション T= 180 分	T180A TGEV	T180B TGEV	T180A BVDV	T180B BVDV
インキュベーション T= 360 分	T360A TGEV	T360B TGEV	T360A BVDV	T360B BVDV

【 0 0 7 2 】

サンプルは、滴定後に、-65 未満の温度で貯蔵した。それに加え、非細胞毒性かつ非干渉の濃度に希釈したマトリクスにTGEVウイルスおよびBVDVウイルスを添加することによって、低ウイルス量、平均ウイルス量および高ウイルス量で対照を作製した。

【 0 0 7 3 】

以下の条件が満たされた場合、45%のPGを含有するマトリクスのインキュベーションアッセイは成功したと考えた：

- ・ 20 ± 5 の温度および6時間のインキュベーション期間、
- ・ 計画通りのサンプルアリコートの採取。

【 0 0 7 4 】

プロセスのサンプルの滴定

上述したアッセイ中に作製したサンプルの滴定は同じ日に行った。

【 0 0 7 5 】

滴定プロトコル

表 I I I に示されたサンプルのウイルスの滴定は、TGEVに関する研究 L - 5 0 および BVDVに関する研究 L - 3 1 9 にしたがって行った。

【 0 0 7 6 】

滴定は3工程で行った：96穴プレートの播種、標準滴定またはLVP（大容量平板培養）におけるそのプレートの感染および力価の決定。

【 0 0 7 7 】

各ウイルスの滴定に関する96穴プレートの播種条件が表 V I に記載されている。

【表 6】

表 VI. BVDV および TGEV の滴定に関する 96 穴プレートの播種条件

播種特徴	BVDV	TGEV
支持体	96 穴プレート	
細胞	MDBK	ST
細胞／穴の数	1000	3000
細胞容積／穴	100μL	
培地	DMEM + 2% HS + P/S + NEAA	OptiMEM +5% SVF + P/S + NEAA + ビタミン酸 Na
プレートのインキュベーション期間	18 時間 ± 6 時間（一晩中）	

【 0 0 7 8 】

各ウイルスについて：

- ・ 第1の実験により得られたサンプル（表 V）を標準プロトコルによって最初に滴定した、
- ・ 標準プロトコルによりウイルスが検出されなかった第1の実験により得られた分画を、第2の実験により得られたサンプルに類似の大容量平板培養（LVP）において分析した、
- ・ 標準プロトコルにおいてウイルスが検出されなかった場合、第1のサンプルと最後のサンプル（6時間のインキュベーション後に採取したサンプル）を、LVPを使用して、最小限に滴定した。

【 0 0 7 9 】

滴定は、サンプルを冷凍せずに、処理アッセイ直後に行った。

【 0 0 8 0 】

標準滴定

培養上清を除去し、滴定すべきサンプルの 20 μ L で置き換えた。

【 0 0 8 1 】

37 での 1 時間のインキュベーション後、130 μ L の培地を各穴に加えた。ウイルスの増殖により、細胞外層の全破壊または部分破壊が生じた。

【 0 0 8 2 】

各希釈について、ケルバーの方法および / またはスピアマン・ケルバーの方法にしたがって統計分析を行えるようにするために、12 の感染複製を行った (例えば、Chapter 5 of "Virology Labfax", Bios Publishers (plus Academic Press (US), or Blackwell non-US, 1993 ; Karber, G. (1931). Arch. J. Exper. Path. u. pharmakol., 162, 480; Spearman (1908). Brit. J. Psychol., 2:227-242を参照のこと)。

10

【 0 0 8 3 】

LVP 滴定

「n」の複製におけるウイルス滴定法「大容量平板培養」により、試験されるサンプル容量を増加させることができ、それゆえ、検出限界を増加させることができる。分析は、サンプル希釈を一回だけ使用して行い、1枚以上の96穴プレートの全ての穴に配置したことを除いて、プロトコルは標準滴定と同一である。統計分析は、スピアマン・ケルバーの方法にしたがって行った。

20

【 0 0 8 4 】

対照

サンプル滴定と並行して、以下の対照を作製した：

- ・ 各一連の滴定に、負の対照を使用した。この対照は、培地 (一連の滴定に使用した) のサンプル滴定に使用した条件による滴定からなる。
- ・ 各一連の滴定に、正の対照も使用した。この研究において、正の対照として、BVDV および TGEV を使用した。これらの正の対照の力価は、 $6.08 \log_{10} TCID_{50} / mL \pm 0.5 \log_{10} TCID_{50} / mL$ および $6.41 \log_{10} TCID_{50} / mL \pm 0.5 \log_{10} TCID_{50} / mL$ であった。

30

【 0 0 8 5 】

滴定アッセイの有効性

滴定アッセイは、以下であれば、有効であると考えた：

- ・ 細胞外層の破壊が負の対照に観察されなかった。
- ・ サンプル滴定が、少なくとも3回の連続希釈について、0%と100%の間の正の穴の率を示す。
- ・ サンプルの少なくとも最後の希釈について、0%と等しい正の穴の率が認識される。

【 0 0 8 6 】

力価、負荷 (charge) および減少係数の計算

40

6 日間のインキュベーション期間後 (各ウイルスについて)、各希釈の各穴について、細胞外層の全破壊または部分破壊を有した細胞の数を数量化した (40 倍および / または 100 倍のサイズの顕微鏡により)。各穴のウイルス力価を $TCID_{50} / mL$ (\log_{10} で) で表されたケルバーの式にしたがって決定した。

【 0 0 8 7 】

ウイルス懸濁液の力価は、ケルバーの方法にしたがって計算した。ウイルスの滴定は、 $\pm 0.5 \log_{10} TCID_{50} / mL$ の不確実性で与えられ、式：

【数 1】

$$IC_{(\alpha=5\%)} = 1.96 \times \sqrt{\frac{\sum (p_i x q_i)}{(n-1)}}$$

【0088】

式中、 p_i は、希釈 i での正の穴の率であり、
 q_i は、希釈 i での負の穴の率である、
 により計算した。

10

【0089】

しかしながら、ウイルスが、サンプルの最初に試験した希釈時のみに観察され、その感染率が100%未満であった場合、 $TCID_{50}/mL$ で表されるウイルスの対数濃度は、スピアマン・ケルバーの方法の式：

【数 2】

$$\text{Log}_{10} C = \log_{10} \left[\frac{\log_e \left(\frac{n}{n-r} \right)}{v \cdot \log_e (2)} \right]$$

20

【0090】

式中、 C は、 $TCID_{50}/mL$ で表されるウイルス濃度であり、
 v は、穴毎の接種材料容積であり、
 n は、各希釈についての接種した穴の数であり、
 r は、感染した穴の数である、

にしたがって計算した。

30

【0091】

デシマル値でここに表されたウイルス量および力価について、サンプル中の総ウイルス量は、以下の式：

$$\text{総ウイルス量} = \text{力価} \times \text{サンプル容積 (mL)}$$

にしたがって、力価およびサンプル容積により計算した。

【0092】

減少係数 (RF) は、 $\langle \langle T_0 \rangle \rangle$ サンプル中のウイルス量と比較して計算した。

【0093】

$RF = (\text{「}T_0\text{」における総ウイルス量}) / (\text{後の時間で採取したサンプル中の総ウイルス量})$ 。

40

【0094】

結果

アフィニティークロマトグラフィー溶出液 (45%のPGの存在下) についてのTGEV研究

結果が、表VIIに記載され、図1に図示されている。

【表 7】

表 VII

時点サンプル	容量 (ml)	力価 (log ₁₀ TCID ₅₀ /ml)	補正 (細胞毒性)	Log ₁₀ TCID ₅₀	減少係数 (log)	隙間容積係数 (log)	力価
TGEV - 実験 1							
添加	1	7.45	N/A	7.45	NA	NA	標準
T=0 カプセル装填	20	5.2	9	7.38	NA	0.07	標準
T=5	20	3.95	9	6.21	1.17	1.24	標準
T=15	20	2.78	9	5.04	2.34	2.41	標準
T=60	20	1.32	9	3.58	3.8	3.87	標準
T=180	20	0.8	9	3.06	4.32	4.39	標準
T=360	20	< 0.8	9	< 3.06	> 4.32	> 4.39	標準
TGEV - 実験 2							
添加	1	7.62	N/A	7.62	NA	NA	標準
T=0 カプセル装填	20	5.28	9	7.54	NA	0.08	標準
T=5	20	4.28	9	6.54	1	1.08	標準
T=15	20	3.2	9	5.46	2.08	2.16	標準
T=60	20	0.8	9	3.06	4.48	4.56	標準
T=180	20	-0.2	9	2.14	5.4	5.48	1LVP (96 穴)
T=360	20	< -0.12	9	< 2.14	> 5.40	> 5.48	1 LVP (96 穴)

10

【 0 0 9 5 】

アフィニティークロマトグラフィー溶出液 (45%のPGの存在下) についての BVDV 研究

結果が、表 V I I I に記載され、図 2 に図示されている。

【表 8】

表 VIII

時点サンプル	容量 (ml)	力価 (log ₁₀ TCID ₅₀ /ml)	補正 (細胞毒性)	Log ₁₀ TCID ₅₀	減少係数 (log)	隙間容積係数 (log)	力価
BVDV - 実験 1							
添加	1	6.28	NA	6.28	NA	NA	標準
T=0 カプセル装填	20	3.2	27	5.85	NA	0.43	標準
T=5	20	1.9	27	4.63	1.22	1.65	標準
T=15	20	2.25	27	4.98	0.87	1.3	標準
T=60	20	2.25	27	4.98	0.87	1.3	標準
T=180	20	2.25	27	4.98	0.87	1.3	標準
T=360	20	0.8	27	3.53	> 4.32	2.75	標準
BVDV - 実験 2							
添加	1	6.2	NA	6.20	NA	NA	標準
T=0 カプセル装填	20	3.03	27	5.76	NA	0.44	標準
T=5	20	1.59	27	4.32	1.44	1.88	標準
T=15	20	1.32	27	4.05	1.71	2.15	標準
T=60	20	1.59	27	4.32	1.44	1.88	標準
T=180	20	< 0.8	27	< 3.53	> 2.23	> 2.67	標準
T=360	20	< -0.12	27	< 2.61	> 3.15	> 3.59	1 LVP

30

40

【 0 0 9 6 】

アフィニティークロマトグラフィー溶出液 (45%のPGの存在下) についての X - M u L V 研究および P R V 研究

類似の研究を、X - M u L V ウイルスおよび P R V ウイルスを使用し、標準偏差の決定を含む、45%のPGで溶出したアフィニティークロマトグラフィーについて行った。

【 0 0 9 7 】

結果が、表 I X および X に記載されている。

【表 9】

表 IX. X-MuLV 研究

サンプル	力価 (TCID50/ml)	容積 (ml)	容積補正	ウイルス量 (log10)
正の対照の添加	8.03 ± 0.36	-	-	-
理論量 (5%添加)	6.71 ± 0.36	20	-	8.01 ± 0.36
対照 T=0h (w/o SD)	4.80 ± 0.42	20	10	7.10 ± 0.42
対照 T=6h (w/o SD)	0.59 ± 0.91	20	10	2.89 ± 0.91
T=0h (+SD)	≤ 0.78*	20	100	≤ 4.08
T=1h (+SD)	≤ 0.78*	20	100	≤ 4.08
T=3h (+SD)	≤ 0.78*	20	100	≤ 4.08
T=6h (+SD) (標準滴定)	≤ 0.78*	20	100	≤ 4.08
T=6h (+SD) (LVP)	≤ -1.13*	20	100	≤ 2.17
T=6h (+SD) (LVP + ST)	≤ -1.13*	20	100	≤ 2.17

10

【表 10】

表 X. PRV 研究

サンプル	力価 (TCID50/ml)	容積 (ml)	容積補正	ウイルス量 (log10)
正の対照の添加	8.64 ± 0.32	-	-	-
理論量 (5%添加)	7.32 ± 0.32	20	-	8.62 ± 0.32
対照 T=0h (w/o SD)	2.17 ± 0.30	20	10	4.47 ± 0.30
対照 T=6h (w/o SD)	≤ 0.78*	20	10	≤ 3.08
T=0h (+SD)	≤ 1.48*	20	10	≤ 3.78
T=1h (+SD)	≤ 1.48*	20	10	≤ 3.78
T=3h (+SD)	≤ 1.48*	20	10	≤ 3.78
T=6h (+SD) (標準滴定)	≤ 1.48*	20	10	≤ 3.78
T=6h (+SD) (LVP)	**	20	10	NA

20

30

【0098】

先に記載した明細書は、当業者が本発明を実施可能にするのに十分であると考えられる。実施例は、本発明の1つの態様のたった1つの説明であり、他の機能的に同等な実施の形態は、本発明の範囲に含まれるので、本発明は、与えられた実施例による範囲に制限されるものではない。本発明の様々な改変は、ここに示され記載されたものに加え、先の説明から当業者に明らかになり、付随の特許請求の範囲に含まれる。本発明の利点および目的は、必ずしも、本発明の各実施の形態により包含されていない。

他の実施態様

1. 病原体不活性化剤としてのグリコールの使用。
2. 前記グリコールがプロピレングリコールである、実施態様1記載の使用。
3. 生物学的組成物中の病原体を不活性化させる方法であって、前記生物学的組成物をグリコールと接触させる工程を含む方法。
4. 前記グリコールがプロピレングリコールである、実施態様3記載の方法。
5. 前記生物学的組成物が血液組成物または乳組成物である、実施態様3または4記載の方法。
6. 前記病原体が、ウイルス、細菌、菌類、原生動物、寄生虫、およびプリオンからなる群より選択される、実施態様3から5いずれか1項記載の方法。
7. 前記ウイルスが、X-MuLV、PRV、BVDVおよびTGEVウイルスからなる群より選択される、実施態様6記載の方法。

40

50

8. 前記方法により、 $4 \text{ Log}_{10} \text{TCID}_{50}$ （組織培養感染量）以上の病原体除去がもたらされ、該 TCID_{50} がケルバーの方法および/またはスピアマン・ケルバーの方法にしたがう、実施態様3から7いずれか1項記載の方法。

9. 前記接触工程後のグリコールの濃度が、前記生物学的組成物の40%（v/v）と50%（v/v）の間である、実施態様3から8いずれか1項記載の方法。

10. 15 と25 の間の温度で行われる、実施態様3から9いずれか1項記載の方法。

11. 7.0と8.0の間のpHで行われる、実施態様3から10いずれか1項記載の方法。

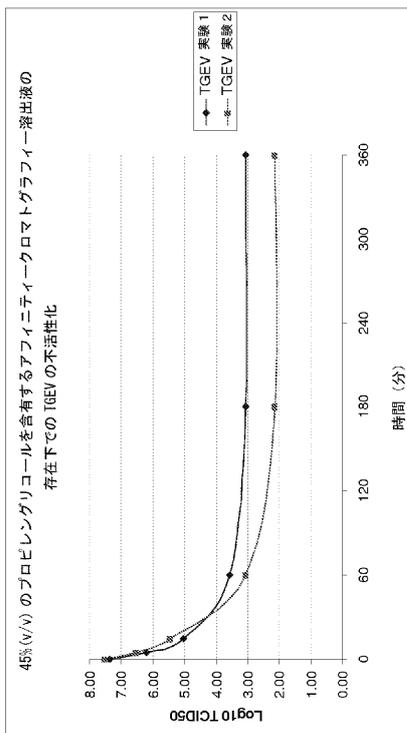
12. 実施態様3から11いずれか1項記載の方法により得られる、グリコールを含む生物学的組成物。

13. 前記グリコールが40%（v/v）と50%（v/v）の間の濃度である、実施態様12記載の生物学的組成物。

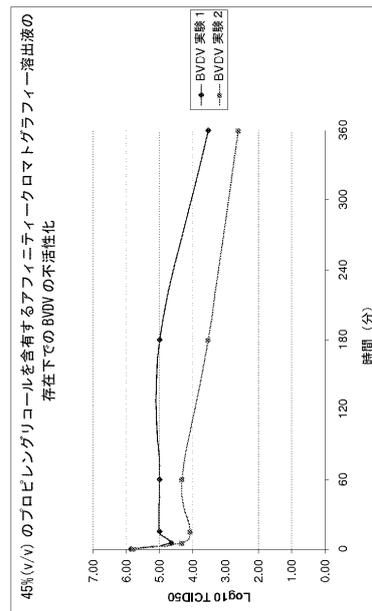
14. 前記グリコールがプロピレングリコールである、実施態様12または13記載の生物学的組成物。

10

【図1】



【図2】



フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I
A 6 1 K 35/12 (2015.01) A 6 1 K 35/12
C 1 2 N 7/06 (2006.01) C 1 2 N 7/06

審査官 森井 隆信

(56)参考文献 特開平07 - 126109 (JP, A)
特開平09 - 206362 (JP, A)
特開昭59 - 175879 (JP, A)
特開昭46 - 006912 (JP, A)
特開昭55 - 164627 (JP, A)
特表平10 - 507367 (JP, A)
特表平04 - 503067 (JP, A)
国際公開第2010/059232 (WO, A1)
特表2012 - 509081 (JP, A)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

A 6 1 L 2 / 0 0 - 1 2 / 1 4
A 6 1 K 3 5 / 1 2 - 3 5 / 7 6 8
A 6 1 K 4 7 / 0 0 - 4 7 / 4 8
A 2 3 C 3 / 0 0 - 7 / 0 4
A 0 1 N 3 1 / 0 0
C 1 2 N 7 / 0 6
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)
CPlus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN)