

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号  
特許第6072677号  
(P6072677)

(45) 発行日 平成29年2月1日 (2017.2.1)

(24) 登録日 平成29年1月13日 (2017.1.13)

(51) Int. Cl.	F I
A 6 1 K 31/327 (2006.01)	A 6 1 K 31/327
A 6 1 K 45/00 (2006.01)	A 6 1 K 45/00
A 6 1 K 39/00 (2006.01)	A 6 1 K 39/00 A
A 6 1 P 31/00 (2006.01)	A 6 1 P 31/00
A 6 1 K 31/7088 (2006.01)	A 6 1 K 31/7088

請求項の数 28 (全 66 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2013-508577 (P2013-508577)	(73) 特許権者	504389991
(86) (22) 出願日	平成23年5月6日 (2011.5.6)		ノバルティス アーゲー
(65) 公表番号	特表2013-528586 (P2013-528586A)		スイス国 バーゼル リヒトシュトラーセ
(43) 公表日	平成25年7月11日 (2013.7.11)		35
(86) 国際出願番号	PCT/IB2011/001394	(74) 代理人	100078282
(87) 国際公開番号	W02011/138682		弁理士 山本 秀策
(87) 国際公開日	平成23年11月10日 (2011.11.10)	(74) 代理人	100113413
審査請求日	平成26年4月15日 (2014.4.15)		弁理士 森下 夏樹
(31) 優先権主張番号	61/395,117	(72) 発明者	グレゲルセン, イエンス パーター
(32) 優先日	平成22年5月6日 (2010.5.6)		ドイツ国 35041 マールブルグ,
(33) 優先権主張国	米国 (US)		エミルーフォン・ペーリング・シュトラー
			セ 76, ノバルティス ヴァクシンズ
			アンド ダイアグノスティクス ゲーエ
			ムペーハー

最終頁に続く

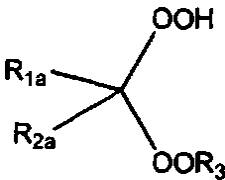
(54) 【発明の名称】 微生物の不活化のための有機ペルオキシド化合物

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

薬学的組成物を調製するための方法であって、該方法は、(i) 微生物含有試料と、 - C (= O) - OOH 基を含まない多官能性有機ペルオキシドとを接触させて、該試料中の微生物を不活化する工程； (ii) 工程 (i) の生成物から薬学的組成物を調製する工程を包含し、該多官能性有機ペルオキシドが、式 I：

【化 1 A】



10

を有し、式中、

R<sub>1a</sub> は、Hであり；  
R<sub>2a</sub> は、H、C<sub>1-6</sub> アルキル、C<sub>2-6</sub> アルケニル、C<sub>1-6</sub> アルキニル、C<sub>1-6</sub> - アルコキシ、C<sub>2-6</sub> - アルケニルオキシ、C(O)H、C(O)C<sub>1-6</sub> アルキル、C(O)OC<sub>1-6</sub> アルキル、場合によりN - モノもしくはN - ジC<sub>1-6</sub> アルキル化アミノ、場合によりN - モノもしくはN - ジC<sub>1-6</sub> アルキル化アミノカルボニル、S (

20

O)  $0 - 2$  C<sub>1 - 6</sub> アルキル、ヘテロシクロアルキル、アリールまたはヘテロアリール、  
- (C R<sub>4</sub> R<sub>5</sub>)<sub>n</sub> C R<sub>6</sub> (O O H)<sub>2</sub> であるか、あるいは R<sub>2 a</sub> は、L によって R<sub>2 b</sub>  
に連結されており；

R<sub>3</sub> は、H または C (O O H) R<sub>1 b</sub> R<sub>2 b</sub> であり、

R<sub>1 b</sub> は、H、C<sub>1 - 6</sub> アルキル、C<sub>2 - 6</sub> アルケニル、C<sub>1 - 6</sub> アルキニル、C<sub>1 - 6</sub>  
- アルコキシ、C<sub>2 - 6</sub> - アルケニルオキシ、C (O) H、C (O) C<sub>1 - 6</sub> アルキル  
、C (O) O C<sub>1 - 6</sub> アルキル、場合により N - モノもしくは N - ジ C<sub>1 - 6</sub> アルキル化  
アミノ、場合により N - モノもしくは N - ジ C<sub>1 - 6</sub> アルキル化アミノカルボニル、S (O)  
(O)  $0 - 2$  C<sub>1 - 6</sub> アルキル、ヘテロシクロアルキル、アリールまたはヘテロアリールで  
あり；

10

R<sub>2 b</sub> は、H、C<sub>1 - 6</sub> アルキル、C<sub>2 - 6</sub> アルケニル、C<sub>1 - 6</sub> アルキニル、C<sub>1 - 6</sub>  
- アルコキシ、C<sub>2 - 6</sub> - アルケニルオキシ、C (O) H、C (O) C<sub>1 - 6</sub> アルキル  
、C (O) O C<sub>1 - 6</sub> アルキル、場合により N - モノもしくは N - ジ C<sub>1 - 6</sub> アルキル化  
アミノ、場合により N - モノもしくは N - ジ C<sub>1 - 6</sub> アルキル化アミノカルボニル、S (O)  
(O)  $0 - 2$  C<sub>1 - 6</sub> アルキル、ヘテロシクロアルキル、アリールまたはヘテロアリールで  
あるか、あるいは R<sub>2 b</sub> は、L によって R<sub>2 a</sub> に連結されており；

R<sub>4</sub> は、各出現時、H または C<sub>1 - 3</sub> アルキル、ヒドロキシル、シアノ、ニトロ、C<sub>2</sub>  
- <sub>4</sub> - アルケニル、C<sub>1 - 3</sub> - アルコキシ、C<sub>2 - 4</sub> - アルケニルオキシ、C<sub>1 - 3</sub> - ア  
ルキルカルボニル、カルボキシ、C<sub>1 - 6</sub> - アルコキシカルボニル、場合により N - モ  
ノもしくは N - ジ C<sub>1 - 3</sub> アルキル化アミノカルボニル、C<sub>1 - 3</sub> - チオアルキル、C<sub>1 - 3</sub>  
- アルキルスルフィニル、C<sub>1 - 3</sub> - アルキルスルホニル、C<sub>1 - 3</sub> - アルキルアミノ  
スルホニルおよびジ - C<sub>1 - 3</sub> - アルキルアミノスルホニルから選択され；

20

R<sub>5</sub> は、各出現時、H または C<sub>1 - 3</sub> アルキル、ヒドロキシル、シアノ、ニトロ、C<sub>2</sub>  
- <sub>4</sub> - アルケニル、C<sub>1 - 3</sub> - アルコキシ、C<sub>2 - 4</sub> - アルケニルオキシ、C<sub>1 - 3</sub> - ア  
ルキルカルボニル、カルボキシ、C<sub>1 - 6</sub> - アルコキシカルボニル、場合により N - モ  
ノもしくは N - ジ C<sub>1 - 3</sub> アルキル化アミノカルボニル、C<sub>1 - 3</sub> - チオアルキル、C<sub>1 - 3</sub>  
- アルキルスルフィニル、C<sub>1 - 3</sub> - アルキルスルホニル、C<sub>1 - 3</sub> - アルキルアミノ  
スルホニルおよびジ - C<sub>1 - 3</sub> - アルキルアミノスルホニルから選択され；

L は、C<sub>1 - 8</sub> アルキレンであり；

R<sub>6</sub> は、H、C<sub>1 - 6</sub> アルキル、C<sub>2 - 6</sub> アルケニル、C<sub>1 - 6</sub> アルキニル、C<sub>1 - 6</sub>  
- アルコキシ、C<sub>2 - 6</sub> - アルケニルオキシ、C (O) H、C (O) C<sub>1 - 6</sub> アルキル、  
C (O) O C<sub>1 - 6</sub> アルキル、場合により N - モノもしくは N - ジ C<sub>1 - 6</sub> アルキル化ア  
ミノ、場合により N - モノもしくは N - ジ C<sub>1 - 6</sub> アルキル化アミノカルボニル、S (O)  
(O)  $0 - 2$  C<sub>1 - 6</sub> アルキル、ヘテロシクロアルキル、アリールまたはヘテロアリールで  
あり；

30

n は、1 ~ 8 である、

方法。

#### 【請求項 2】

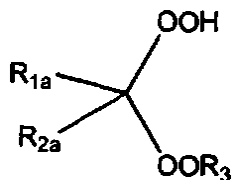
前記薬学的組成物がワクチン、好ましくは獣医学的ワクチンである、請求項 1 に記載の  
方法。

40

#### 【請求項 3】

微生物含有試料を処理するためのまたは微生物を含有する危険のある試料を処理するた  
めのプロセスであって、該プロセスは、該試料を、- C (= O) - O O H 基を含まない多  
官能性有機ペルオキシドと接触させる工程を包含し、ここで、該プロセスは、アルキル化  
剤を使用する工程も包含し、該多官能性有機ペルオキシドが、式 I：

## 【化 1 A】



を有し、式中、

$R_{1a}$  は、H であり；

$R_{2a}$  は、H、 $C_{1-6}$  アルキル、 $C_{2-6}$  アルケニル、 $C_{1-6}$  アルキニル、 $C_{1-6}$  - アルコキシ、 $C_{2-6}$  - アルケニルオキシ、 $C(O)H$ 、 $C(O)C_{1-6}$  アルキル、 $C(O)OC_{1-6}$  アルキル、場合により N - モノもしくは N - ジ  $C_{1-6}$  アルキル化アミノ、場合により N - モノもしくは N - ジ  $C_{1-6}$  アルキル化アミノカルボニル、 $S(O)_{0-2}C_{1-6}$  アルキル、ヘテロシクロアルキル、アリールまたはヘテロアリール、 $-(CR_4R_5)_nCR_6(OOH)_2$  であるか、あるいは  $R_{2a}$  は、L によって  $R_{2b}$  に連結されており；

$R_3$  は、H または  $C(OOH)R_{1b}R_{2b}$  であり、

$R_{1b}$  は、H、 $C_{1-6}$  アルキル、 $C_{2-6}$  アルケニル、 $C_{1-6}$  アルキニル、 $C_{1-6}$  - アルコキシ、 $C_{2-6}$  - アルケニルオキシ、 $C(O)H$ 、 $C(O)C_{1-6}$  アルキル、 $C(O)OC_{1-6}$  アルキル、場合により N - モノもしくは N - ジ  $C_{1-6}$  アルキル化アミノ、場合により N - モノもしくは N - ジ  $C_{1-6}$  アルキル化アミノカルボニル、 $S(O)_{0-2}C_{1-6}$  アルキル、ヘテロシクロアルキル、アリールまたはヘテロアリールであり；

$R_{2b}$  は、H、 $C_{1-6}$  アルキル、 $C_{2-6}$  アルケニル、 $C_{1-6}$  アルキニル、 $C_{1-6}$  - アルコキシ、 $C_{2-6}$  - アルケニルオキシ、 $C(O)H$ 、 $C(O)C_{1-6}$  アルキル、 $C(O)OC_{1-6}$  アルキル、場合により N - モノもしくは N - ジ  $C_{1-6}$  アルキル化アミノ、場合により N - モノもしくは N - ジ  $C_{1-6}$  アルキル化アミノカルボニル、 $S(O)_{0-2}C_{1-6}$  アルキル、ヘテロシクロアルキル、アリールまたはヘテロアリールであるか、あるいは  $R_{2b}$  は、L によって  $R_{2a}$  に連結されており；

$R_4$  は、各出現時、H または  $C_{1-3}$  アルキル、ヒドロキシル、シアノ、ニトロ、 $C_{2-4}$  - アルケニル、 $C_{1-3}$  - アルコキシ、 $C_{2-4}$  - アルケニルオキシ、 $C_{1-3}$  - アルキルカルボニル、カルボキシ、 $C_{1-6}$  - アルコシカルボニル、場合により N - モノもしくは N - ジ  $C_{1-3}$  アルキル化アミノカルボニル、 $C_{1-3}$  - チオアルキル、 $C_{1-3}$  - アルキルスルフィニル、 $C_{1-3}$  - アルキルスルホニル、 $C_{1-3}$  - アルキルアミノスルホニルおよび  $C_{1-3}$  - アルキルアミノスルホニルから選択され；

$R_5$  は、各出現時、H または  $C_{1-3}$  アルキル、ヒドロキシル、シアノ、ニトロ、 $C_{2-4}$  - アルケニル、 $C_{1-3}$  - アルコキシ、 $C_{2-4}$  - アルケニルオキシ、 $C_{1-3}$  - アルキルカルボニル、カルボキシ、 $C_{1-6}$  - アルコシカルボニル、場合により N - モノもしくは N - ジ  $C_{1-3}$  アルキル化アミノカルボニル、 $C_{1-3}$  - チオアルキル、 $C_{1-3}$  - アルキルスルフィニル、 $C_{1-3}$  - アルキルスルホニル、 $C_{1-3}$  - アルキルアミノスルホニルおよび  $C_{1-3}$  - アルキルアミノスルホニルから選択され；

L は、 $C_{1-8}$  アルキレンであり；

$R_6$  は、H、 $C_{1-6}$  アルキル、 $C_{2-6}$  アルケニル、 $C_{1-6}$  アルキニル、 $C_{1-6}$  - アルコキシ、 $C_{2-6}$  - アルケニルオキシ、 $C(O)H$ 、 $C(O)C_{1-6}$  アルキル、 $C(O)OC_{1-6}$  アルキル、場合により N - モノもしくは N - ジ  $C_{1-6}$  アルキル化アミノ、場合により N - モノもしくは N - ジ  $C_{1-6}$  アルキル化アミノカルボニル、 $S(O)_{0-2}C_{1-6}$  アルキル、ヘテロシクロアルキル、アリールまたはヘテロアリールであり；

n は、1 ~ 8 である、

プロセス。

【請求項 4】

前記試料が、容器の表面または作業場の表面である、請求項 1 または 2 に記載の方法。

【請求項 5】

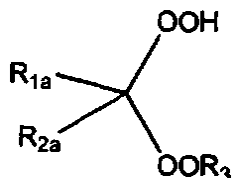
前記試料が、容器の表面または作業場の表面である、請求項 3 に記載のプロセス。

【請求項 6】

微生物含有試料を処理するためのまたは微生物を含有する危険のある試料を処理するためのプロセスであって、該試料を - C ( = O ) - O O H 基を含まない多官能性有機ペルオキシドと接触させる工程を包含し、ここで、該試料は、診断薬生産の際の組換えタンパク質、材料または中間体であり、該多官能性有機ペルオキシドが、式 I :

10

【化 1 A】



を有し、式中、

$R_{1a}$  は、H であり；

20

$R_{2a}$  は、H、 $C_{1-6}$  アルキル、 $C_{2-6}$  アルケニル、 $C_{1-6}$  アルキニル、 $C_{1-6}$  - アルコキシ、 $C_{2-6}$  - アルケニルオキシ、 $C(O)H$ 、 $C(O)C_{1-6}$  アルキル、 $C(O)OC_{1-6}$  アルキル、場合により N - モノもしくは N - ジ  $C_{1-6}$  アルキル化アミノ、場合により N - モノもしくは N - ジ  $C_{1-6}$  アルキル化アミノカルボニル、 $S(O)_{0-2}C_{1-6}$  アルキル、ヘテロシクロアルキル、アリールまたはヘテロアリール、 $-(CR_4R_5)_nCR_6(OOH)_2$  であるか、あるいは  $R_{2a}$  は、L によって  $R_{2b}$  に連結されており；

$R_3$  は、H または  $C(OOH)R_{1b}R_{2b}$  であり、

$R_{1b}$  は、H、 $C_{1-6}$  アルキル、 $C_{2-6}$  アルケニル、 $C_{1-6}$  アルキニル、 $C_{1-6}$  - アルコキシ、 $C_{2-6}$  - アルケニルオキシ、 $C(O)H$ 、 $C(O)C_{1-6}$  アルキル、 $C(O)OC_{1-6}$  アルキル、場合により N - モノもしくは N - ジ  $C_{1-6}$  アルキル化アミノ、場合により N - モノもしくは N - ジ  $C_{1-6}$  アルキル化アミノカルボニル、 $S(O)_{0-2}C_{1-6}$  アルキル、ヘテロシクロアルキル、アリールまたはヘテロアリールであり；

30

$R_{2b}$  は、H、 $C_{1-6}$  アルキル、 $C_{2-6}$  アルケニル、 $C_{1-6}$  アルキニル、 $C_{1-6}$  - アルコキシ、 $C_{2-6}$  - アルケニルオキシ、 $C(O)H$ 、 $C(O)C_{1-6}$  アルキル、 $C(O)OC_{1-6}$  アルキル、場合により N - モノもしくは N - ジ  $C_{1-6}$  アルキル化アミノ、場合により N - モノもしくは N - ジ  $C_{1-6}$  アルキル化アミノカルボニル、 $S(O)_{0-2}C_{1-6}$  アルキル、ヘテロシクロアルキル、アリールまたはヘテロアリールであるか、あるいは  $R_{2b}$  は、L によって  $R_{2a}$  に連結されており；

40

$R_4$  は、各出現時、H または  $C_{1-3}$  アルキル、ヒドロキシル、シアノ、ニトロ、 $C_{2-4}$  - アルケニル、 $C_{1-3}$  - アルコキシ、 $C_{2-4}$  - アルケニルオキシ、 $C_{1-3}$  - アルキルカルボニル、カルボキシ、 $C_{1-6}$  - アルコキシカルボニル、場合により N - モノもしくは N - ジ  $C_{1-3}$  アルキル化アミノカルボニル、 $C_{1-3}$  - チオアルキル、 $C_{1-3}$  - アルキルスルフィニル、 $C_{1-3}$  - アルキルスルホニル、 $C_{1-3}$  - アルキルアミノスルホニルおよびジ -  $C_{1-3}$  - アルキルアミノスルホニルから選択され；

$R_5$  は、各出現時、H または  $C_{1-3}$  アルキル、ヒドロキシル、シアノ、ニトロ、 $C_{2-4}$  - アルケニル、 $C_{1-3}$  - アルコキシ、 $C_{2-4}$  - アルケニルオキシ、 $C_{1-3}$  - アルキルカルボニル、カルボキシ、 $C_{1-6}$  - アルコキシカルボニル、場合により N - モノもしくは N - ジ  $C_{1-3}$  アルキル化アミノカルボニル、 $C_{1-3}$  - チオアルキル、 $C_{1-3}$  -

50

$C_3$  - アルキルスルフィニル、 $C_1 - 3$  - アルキルスルホニル、 $C_1 - 3$  - アルキルアミノ  
スルホニルおよびジ -  $C_1 - 3$  - アルキルアミノスルホニルから選択され；

L は、 $C_1 - 8$  アルキレンであり；

$R_6$  は、H、 $C_1 - 6$  アルキル、 $C_2 - 6$  アルケニル、 $C_1 - 6$  アルキニル、 $C_1 - 6$  - アルコキシ、 $C_2 - 6$  - アルケニルオキシ、 $C(O)H$ 、 $C(O)C_1 - 6$  アルキル、 $C(O)OC_1 - 6$  アルキル、場合により N - モノもしくは N - ジ  $C_1 - 6$  アルキル化アミノ、場合により N - モノもしくは N - ジ  $C_1 - 6$  アルキル化アミノカルボニル、 $S(O)_0 - 2 C_1 - 6$  アルキル、ヘテロシクロアルキル、アリールまたはヘテロアリールであり；

n は、1 ~ 8 である、

10

プロセス。

#### 【請求項 7】

前記微生物が汚染物として存在する、請求項 1、2 または 4 のいずれか一項に記載の方法。

#### 【請求項 8】

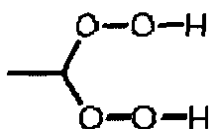
前記微生物が汚染物として存在する、請求項 3、5 または 6 のいずれか一項に記載のプロセス。

#### 【請求項 9】

核酸を含有する試料を処理するためのプロセスであって、該試料を、 $-C(=O)-O$  OH 基を含まない多官能性有機ペルオキシドと接触させて該核酸を分解する工程を包含し、該多官能性有機ペルオキシドが、

20

#### 【化 1 2】



069-1

30

である、プロセス。

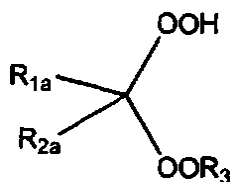
#### 【請求項 10】

前記試料が、溶解状態の核酸を含み、好ましくは、該試料が、細胞培養物から得られ、および該核酸が、該細胞培養物からの細胞 DNA である、請求項 9 に記載のプロセス。

#### 【請求項 11】

(i) 不活化されたウイルスと (ii) 1 重量%未満の、 $-C(=O)-OOH$  基を含まない多官能性有機ペルオキシドとを含む水性組成物の、医薬の製造における使用であって、該多官能性有機ペルオキシドが、式 I：

#### 【化 1 A】



40

を有し、式中、

$R_{1a}$  は、H であり；

$R_{2a}$  は、H、 $C_1 - 6$  アルキル、 $C_2 - 6$  アルケニル、 $C_1 - 6$  アルキニル、 $C_1 - 6$  - アルコキシ、 $C_2 - 6$  - アルケニルオキシ、 $C(O)H$ 、 $C(O)C_1 - 6$  アルキル

50

、 $C(O)OC_{1-6}$  アルキル、場合により  $N$ -モノもしくは  $N$ -ジ  $C_{1-6}$  アルキル化アミノ、場合により  $N$ -モノもしくは  $N$ -ジ  $C_{1-6}$  アルキル化アミノカルボニル、 $S(O)_{0-2}C_{1-6}$  アルキル、ヘテロシクロアルキル、アリールまたはヘテロアリール、 $-(CR_4R_5)_nCR_6(OOH)_2$  であるか、あるいは  $R_{2a}$  は、 $L$  によって  $R_{2b}$  に連結されており；

$R_3$  は、 $H$  または  $C(OOH)R_{1b}R_{2b}$  であり、

$R_{1b}$  は、 $H$ 、 $C_{1-6}$  アルキル、 $C_{2-6}$  アルケニル、 $C_{1-6}$  アルキニル、 $C_{1-6}$  アルコキシ、 $C_{2-6}$  アルケニルオキシ、 $C(O)H$ 、 $C(O)C_{1-6}$  アルキル、 $C(O)OC_{1-6}$  アルキル、場合により  $N$ -モノもしくは  $N$ -ジ  $C_{1-6}$  アルキル化アミノ、場合により  $N$ -モノもしくは  $N$ -ジ  $C_{1-6}$  アルキル化アミノカルボニル、 $S(O)_{0-2}C_{1-6}$  アルキル、ヘテロシクロアルキル、アリールまたはヘテロアリールであり；

10

$R_{2b}$  は、 $H$ 、 $C_{1-6}$  アルキル、 $C_{2-6}$  アルケニル、 $C_{1-6}$  アルキニル、 $C_{1-6}$  アルコキシ、 $C_{2-6}$  アルケニルオキシ、 $C(O)H$ 、 $C(O)C_{1-6}$  アルキル、 $C(O)OC_{1-6}$  アルキル、場合により  $N$ -モノもしくは  $N$ -ジ  $C_{1-6}$  アルキル化アミノ、場合により  $N$ -モノもしくは  $N$ -ジ  $C_{1-6}$  アルキル化アミノカルボニル、 $S(O)_{0-2}C_{1-6}$  アルキル、ヘテロシクロアルキル、アリールまたはヘテロアリールであるか、あるいは  $R_{2b}$  は、 $L$  によって  $R_{2a}$  に連結されており；

$R_4$  は、各出現時、 $H$  または  $C_{1-3}$  アルキル、ヒドロキシル、シアノ、ニトロ、 $C_{2-4}$  アルケニル、 $C_{1-3}$  アルコキシ、 $C_{2-4}$  アルケニルオキシ、 $C_{1-3}$  アルキルカルボニル、カルボキシ、 $C_{1-6}$  アルコキシカルボニル、場合により  $N$ -モノもしくは  $N$ -ジ  $C_{1-3}$  アルキル化アミノカルボニル、 $C_{1-3}$  チオアルキル、 $C_{1-3}$  アルキルスルフィニル、 $C_{1-3}$  アルキルスルホニル、 $C_{1-3}$  アルキルアミノスルホニルおよびジ- $C_{1-3}$  アルキルアミノスルホニルから選択され；

20

$R_5$  は、各出現時、 $H$  または  $C_{1-3}$  アルキル、ヒドロキシル、シアノ、ニトロ、 $C_{2-4}$  アルケニル、 $C_{1-3}$  アルコキシ、 $C_{2-4}$  アルケニルオキシ、 $C_{1-3}$  アルキルカルボニル、カルボキシ、 $C_{1-6}$  アルコキシカルボニル、場合により  $N$ -モノもしくは  $N$ -ジ  $C_{1-3}$  アルキル化アミノカルボニル、 $C_{1-3}$  チオアルキル、 $C_{1-3}$  アルキルスルフィニル、 $C_{1-3}$  アルキルスルホニル、 $C_{1-3}$  アルキルアミノスルホニルおよびジ- $C_{1-3}$  アルキルアミノスルホニルから選択され；

30

$L$  は、 $C_{1-8}$  アルキレンであり；

$R_6$  は、 $H$ 、 $C_{1-6}$  アルキル、 $C_{2-6}$  アルケニル、 $C_{1-6}$  アルキニル、 $C_{1-6}$  アルコキシ、 $C_{2-6}$  アルケニルオキシ、 $C(O)H$ 、 $C(O)C_{1-6}$  アルキル、 $C(O)OC_{1-6}$  アルキル、場合により  $N$ -モノもしくは  $N$ -ジ  $C_{1-6}$  アルキル化アミノ、場合により  $N$ -モノもしくは  $N$ -ジ  $C_{1-6}$  アルキル化アミノカルボニル、 $S(O)_{0-2}C_{1-6}$  アルキル、ヘテロシクロアルキル、アリールまたはヘテロアリールであり；

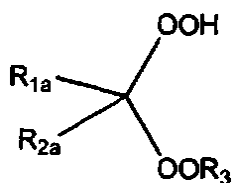
$n$  は、1 ~ 8 である、使用。

#### 【請求項 12】

ウイルスと、 $-C(=O)-OOH$  基を含まない多官能性有機ペルオキシドとの反応生成物を含む水性組成物の、医薬の製造における使用であって、該多官能性有機ペルオキシドが、式 I：

40

#### 【化 1 A】



50

を有し、式中、

$R_{1a}$  は、Hであり；

$R_{2a}$  は、H、 $C_{1-6}$  アルキル、 $C_{2-6}$  アルケニル、 $C_{1-6}$  アルキニル、 $C_{1-6}$  - アルコキシ、 $C_{2-6}$  - アルケニルオキシ、 $C(O)H$ 、 $C(O)C_{1-6}$  アルキル、 $C(O)OC_{1-6}$  アルキル、場合によりN - モノもしくはN - ジ $C_{1-6}$  アルキル化アミノ、場合によりN - モノもしくはN - ジ $C_{1-6}$  アルキル化アミノカルボニル、 $S(O)_{0-2}C_{1-6}$  アルキル、ヘテロシクロアルキル、アリールまたはヘテロアリール、 $-(CR_4R_5)_nCR_6(OOH)_2$  であるか、あるいは $R_{2a}$  は、Lによって $R_{2b}$  に連結されており；

$R_3$  は、Hまたは $C(OOH)R_{1b}R_{2b}$  であり、

$R_{1b}$  は、H、 $C_{1-6}$  アルキル、 $C_{2-6}$  アルケニル、 $C_{1-6}$  アルキニル、 $C_{1-6}$  - アルコキシ、 $C_{2-6}$  - アルケニルオキシ、 $C(O)H$ 、 $C(O)C_{1-6}$  アルキル、 $C(O)OC_{1-6}$  アルキル、場合によりN - モノもしくはN - ジ $C_{1-6}$  アルキル化アミノ、場合によりN - モノもしくはN - ジ $C_{1-6}$  アルキル化アミノカルボニル、 $S(O)_{0-2}C_{1-6}$  アルキル、ヘテロシクロアルキル、アリールまたはヘテロアリールであり；

$R_{2b}$  は、H、 $C_{1-6}$  アルキル、 $C_{2-6}$  アルケニル、 $C_{1-6}$  アルキニル、 $C_{1-6}$  - アルコキシ、 $C_{2-6}$  - アルケニルオキシ、 $C(O)H$ 、 $C(O)C_{1-6}$  アルキル、 $C(O)OC_{1-6}$  アルキル、場合によりN - モノもしくはN - ジ $C_{1-6}$  アルキル化アミノ、場合によりN - モノもしくはN - ジ $C_{1-6}$  アルキル化アミノカルボニル、 $S(O)_{0-2}C_{1-6}$  アルキル、ヘテロシクロアルキル、アリールまたはヘテロアリールであるか、あるいは $R_{2b}$  は、Lによって $R_{2a}$  に連結されており；

$R_4$  は、各出現時、Hまたは $C_{1-3}$  アルキル、ヒドロキシル、シアノ、ニトロ、 $C_{2-4}$  - アルケニル、 $C_{1-3}$  - アルコキシ、 $C_{2-4}$  - アルケニルオキシ、 $C_{1-3}$  - アルキルカルボニル、カルボキシ、 $C_{1-6}$  - アルコシカルボニル、場合によりN - モノもしくはN - ジ $C_{1-3}$  アルキル化アミノカルボニル、 $C_{1-3}$  - チオアルキル、 $C_{1-3}$  - アルキルスルフィニル、 $C_{1-3}$  - アルキルスルホニル、 $C_{1-3}$  - アルキルアミノスルホニルおよびジ -  $C_{1-3}$  - アルキルアミノスルホニルから選択され；

$R_5$  は、各出現時、Hまたは $C_{1-3}$  アルキル、ヒドロキシル、シアノ、ニトロ、 $C_{2-4}$  - アルケニル、 $C_{1-3}$  - アルコキシ、 $C_{2-4}$  - アルケニルオキシ、 $C_{1-3}$  - アルキルカルボニル、カルボキシ、 $C_{1-6}$  - アルコシカルボニル、場合によりN - モノもしくはN - ジ $C_{1-3}$  アルキル化アミノカルボニル、 $C_{1-3}$  - チオアルキル、 $C_{1-3}$  - アルキルスルフィニル、 $C_{1-3}$  - アルキルスルホニル、 $C_{1-3}$  - アルキルアミノスルホニルおよびジ -  $C_{1-3}$  - アルキルアミノスルホニルから選択され；

L は、 $C_{1-8}$  アルキレンであり；

$R_6$  は、H、 $C_{1-6}$  アルキル、 $C_{2-6}$  アルケニル、 $C_{1-6}$  アルキニル、 $C_{1-6}$  - アルコキシ、 $C_{2-6}$  - アルケニルオキシ、 $C(O)H$ 、 $C(O)C_{1-6}$  アルキル、 $C(O)OC_{1-6}$  アルキル、場合によりN - モノもしくはN - ジ $C_{1-6}$  アルキル化アミノ、場合によりN - モノもしくはN - ジ $C_{1-6}$  アルキル化アミノカルボニル、 $S(O)_{0-2}C_{1-6}$  アルキル、ヘテロシクロアルキル、アリールまたはヘテロアリールであり；

n は、1 ~ 8 である、使用。

#### 【請求項 13】

(i) 前記多官能性有機ペルオキシドが、ジェミナルビスヒドロペルオキシドである；および/または

(ii) 前記多官能性有機ペルオキシドが、ホモ二官能性である；および/または

(iii) 前記多官能性有機ペルオキシドが、水溶性である；および/または

(iv) 前記多官能性有機ペルオキシドが、炭素、水素および酸素のみから成る；および/または

(v) 前記多官能性有機ペルオキシドが、300未満の分子量を有する、請求項 1、2

10

20

30

40

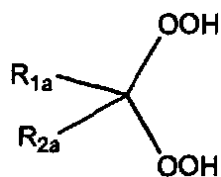
50

、4、7、11または12のいずれか一項に記載の方法または使用。

【請求項14】

(i) 前記多官能性有機ペルオキシドが、式II：

【化2A】

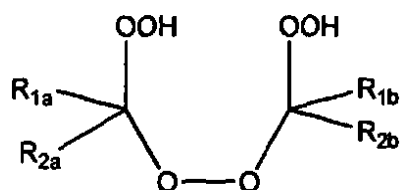


10

を有し、好ましくは $R_{1a}$ が、Hであり；および $R_{2a}$ が、 $CH_3$ 、Etまたはn-Prであるか；あるいは

(ii) 前記多官能性有機ペルオキシドが、式III：

【化3A】

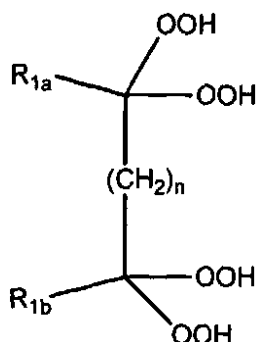


20

を有し、好ましくは $R_{1a}$ が、Hであり； $R_{2a}$ が、 $CH_3$ 、Et、もしくはn-Prであるか、または $R_{2a}$ が、Lによって $R_{2b}$ に連結されており； $R_{1b}$ が、Hまたは $CH_3$ であり； $R_{2b}$ が、 $CH_3$ 、Et、n-Prであるか、または $R_{2b}$ が、Lによって $R_{2a}$ に連結されており；およびLが、 $-(CH_2)_3-$ であるか；あるいは

(iii) 前記多官能性有機ペルオキシドが、式IV：

【化4A】



30

を有し、好ましくは $R_{1a}$ が、Hであり； $R_{1b}$ が、Hであり；およびnが、3である、  
請求項1、2、4、7または11～13のいずれか一項に記載の方法または使用。

40

【請求項15】

$R_{1a}$  および  $R_{2a}$  が、同一である；および/または

$R_{1a}$  および  $R_{2b}$  が、同一である；および/または

$R_{2a}$  および  $R_{2b}$  が、同一である；および/または

$R_{2a}$  が、Hもしくは $C_{1-4}$ アルキルもしくは $-(CH_2)_nCH(OOH)_2$ である、またはLによって $R_{2b}$ に連結されている；および/または

$R_{1b}$  が、Hもしくは $C_{1-4}$ アルキルである；および/または

$R_{2b}$  が、 $C_{1-4}$ アルキルである、もしくはLによって $R_{2a}$ に連結されている。

従って $R_{2b}$ が、 $CH_3$ 、Etもしくはn-Prであり得る；および/または

50





。

## 【請求項 17】

前記多官能性有機ペルオキシドが、1, 1 - ジヒドロペルオキシメタン；1, 1 - ジヒドロペルオキシプロパン；1, 1 - ジヒドロ - ペルオキシブタン；1, 1' - ジヒドロペルオキシ - 1, 1' - ジブロピルペルオキシド；1, 1' - ジヒドロペルオキシ - 1, 1' - ジブチルペルオキシド；1, 1' - ジヒドロペルオキシ - 1, 1' - ジエチルペルオキシド；1, 1, 5, 5 - テトラヒドロペルオキシペンタン；3, 7 - ビス - ヒドロペルオキシ - 1, 2 - ジオキセパン；および 1, 1 - ジヒドロペルオキシエタンから成る群より選択される、請求項 1、2、4、7 または 11 ~ 15 のいずれか一項に記載の方法または使用。

10

## 【請求項 18】

(i) 前記多官能性有機ペルオキシドが、ジェミナルビスヒドロペルオキシドである；  
および / または

(ii) 前記多官能性有機ペルオキシドが、ホモ二官能性である；および / または

(iii) 前記多官能性有機ペルオキシドが、水溶性である；および / または

(iv) 前記多官能性有機ペルオキシドが、炭素、水素および酸素のみから成る；および / または

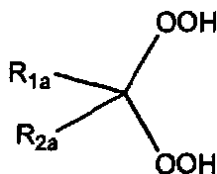
(v) 前記多官能性有機ペルオキシドが、300 未満の分子量を有する、請求項 3、5、6 または 8 のいずれか一項に記載のプロセス。

20

## 【請求項 19】

(i) 前記多官能性有機ペルオキシドが、式 I I :

## 【化 2 A】

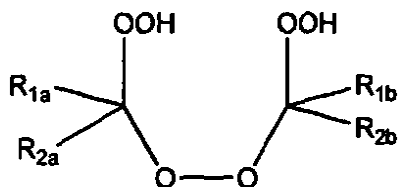


30

を有し、好ましくは  $\text{R}_{1a}$  が、H であり；および  $\text{R}_{2a}$  が、 $\text{CH}_3$ 、Et または n - Pr であるか；あるいは

(ii) 前記多官能性有機ペルオキシドが、式 I I I :

## 【化 3 A】

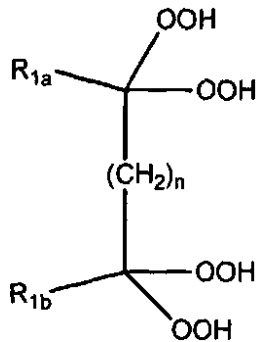


40

を有し、好ましくは  $\text{R}_{1a}$  が、H であり； $\text{R}_{2a}$  が、 $\text{CH}_3$ 、Et、もしくは n - Pr であるか、または  $\text{R}_{2a}$  が、L によって  $\text{R}_{2b}$  に連結されており； $\text{R}_{1b}$  が、H または  $\text{CH}_3$  であり； $\text{R}_{2b}$  が、 $\text{CH}_3$ 、Et、n - Pr であるか、または  $\text{R}_{2b}$  が、L によって  $\text{R}_{2a}$  に連結されており；および L が、 $-(\text{CH}_2)_3-$  であるか；あるいは

(iii) 前記多官能性有機ペルオキシドが、式 I V :

## 【化 4 A】



10

を有し、好ましくは  $R_{1a}$  が、H であり； $R_{1b}$  が、H であり；および  $n$  が、3 である、請求項 3、5、6、8 または 18 のいずれか一項に記載のプロセス。

## 【請求項 20】

$R_{1a}$  および  $R_{2a}$  が、同一である；および / または  
 $R_{1a}$  および  $R_{2b}$  が、同一である；および / または  
 $R_{2a}$  および  $R_{2b}$  が、同一である；および / または  
 $R_{2a}$  が、H もしくは  $C_{1-4}$  アルキルもしくは  $-(CH_2)_n CH(OOH)_2$  である、または L によって  $R_{2b}$  に連結されている；および / または  
 $R_{1b}$  が、H もしくは  $C_{1-4}$  アルキルである；および / または  
 $R_{2b}$  が、 $C_{1-4}$  アルキルである、もしくは L によって  $R_{2a}$  に連結されている。  
 従って  $R_{2b}$  が、 $CH_3$ 、Et もしくは  $n-Pr$  であり得る；および / または  
 各  $R_4$  が、H もしくは  $CH_3$  である；および / または  
 各  $R_5$  が、H もしくは  $CH_3$  である；および / または  
 L が、 $C_{2-5}$  アルキレンである；および / または  
 $R_6$  が、H もしくは  $C_{1-4}$  アルキルである；および / または  
 $n$  が、2 ~ 6 である；および / または、  
 $R_{1a}$  が、H であり； $R_{2a}$  が  $CH_3$ 、Et、 $n-Pr$  もしくは  $-(CH_2)_n CH(OOH)_2$  であるか、または  $R_{2a}$  が、L によって  $R_{2b}$  に連結されており； $R_3$  が、H または  $C(OOH)R_{1b}R_{2b}$  であり； $R_{1b}$  が、H または  $CH_3$  であり； $R_{2b}$  が、 $CH_3$ 、Et もしくは  $n-Pr$  であるか、または  $R_{2b}$  が、L によって  $R_{2a}$  に連結されており；L が、 $-(CH_2)_3-$  であり；および  $n$  が、3 である、請求項 3、5、6、8、18 または 19 のいずれか一項に記載のプロセス。

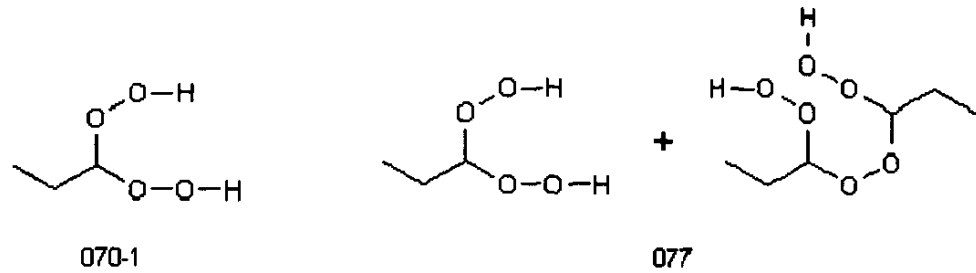
20

30

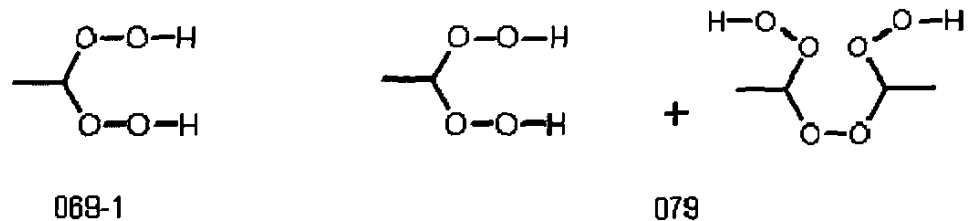
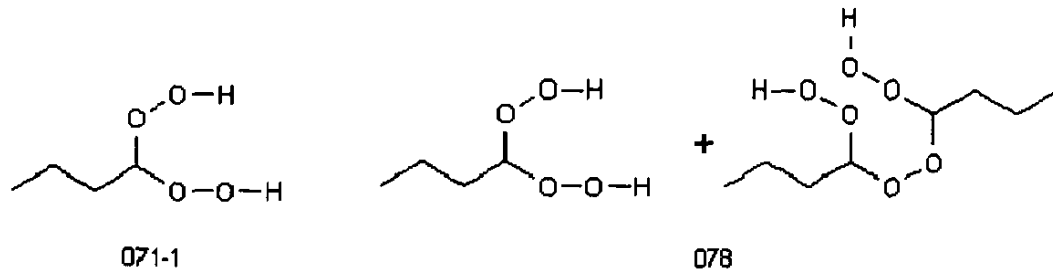
## 【請求項 21】

前記多官能性有機ペルオキシドが、式 070 - 1、077、071 - 1、069 - 1 を有するか、または式 077、078、079 もしくは 080 を有する化合物の混合物である、請求項 3、5、6、8 または 18 ~ 20 のいずれか一項に記載のプロセス：

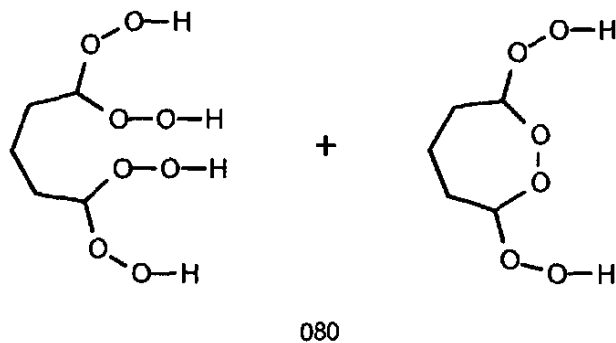
## 【化 5 A】



10



20



30

°  
【請求項 2 2】

前記多官能性有機ペルオキシドが、1, 1 - ジヒドロペルオキシメタン；1, 1 - ジヒドロペルオキシプロパン；1, 1 - ジヒドロ - ペルオキシブタン；1, 1' - ジヒドロペルオキシ - 1, 1' - ジプロピルペルオキシド；1, 1' - ジヒドロペルオキシ - 1, 1' - ジブチルペルオキシド；1, 1' - ジヒドロペルオキシ - 1, 1' - ジエチルペルオキシド；1, 1, 5, 5 - テトラヒドロペルオキシペンタン；3, 7 - ビス - ヒドロペルオキシ - 1, 2 - ジオキセパン；および 1, 1 - ジヒドロペルオキシエタンから成る群より選択される、請求項 3、5、6、8 または 18 ~ 20 のいずれか一項に記載のプロセス

40

°  
【請求項 2 3】

( i ) 前記多官能性有機ペルオキシドが、0.01 ~ 0.25 % の間の濃度で使用される；および / または

( i i ) 前記多官能性有機ペルオキシドが、0 ~ 50 の間の温度で使用される；およ

50

び / または

( i i i ) 前記多官能性有機ペルオキシドが、0 . 2 5 ~ 7 2 時間の間の時間、不活化のために使用される ; および / または

( i v ) 残存するまたは過剰なペルオキシドが、前記試料の処理後に除去される ;

好ましくは除去が、還元剤を用いるものであり、そして

より好ましくは該還元剤が、アスコルビン酸または還元糖である、請求項 1、2、4、7 または 1 3 ~ 1 7 のいずれか一項に記載の方法。

#### 【請求項 2 4】

前記試料がウイルスを含み、好ましくは該試料が ( i ) 無エンベロープ DNA ウイルス ; および / または ( i i ) インフルエンザ A 型ウイルス、インフルエンザ B 型ウイルス、インフルエンザ C 型ウイルスもしくは狂犬病ウイルスを含む、請求項 1、2、4、7、1 3 ~ 1 7 または 2 3 のいずれか一項に記載の方法。

#### 【請求項 2 5】

前記試料が、初代細胞培養物中で増殖させたウイルスを含む、請求項 2 4 に記載の方法。

#### 【請求項 2 6】

( i ) 前記多官能性有機ペルオキシドが、0 . 0 1 ~ 0 . 2 5 % の間の濃度で使用される ; および / または

( i i ) 前記多官能性有機ペルオキシドが、0 ~ 5 0 の間の温度で使用される ; および / または

( i i i ) 前記多官能性有機ペルオキシドが、0 . 2 5 ~ 7 2 時間の間の時間、不活化のために使用される ; および / または

( i v ) 残存するまたは過剰なペルオキシドが、前記試料の処理後に除去される ;

好ましくは除去が、還元剤を用いるものであり、そして

より好ましくは該還元剤が、アスコルビン酸または還元糖である、請求項 3、5、6、8 ~ 1 0 または 1 8 ~ 2 2 のいずれか一項に記載のプロセス。

#### 【請求項 2 7】

前記試料がウイルスを含み、好ましくは該試料が ( i ) 無エンベロープ DNA ウイルス ; および / または ( i i ) インフルエンザ A 型ウイルス、インフルエンザ B 型ウイルス、インフルエンザ C 型ウイルスもしくは狂犬病ウイルスを含む、請求項 3、5、6、8 ~ 1 0、1 8 ~ 2 2 または 2 6 のいずれか一項に記載のプロセス。

#### 【請求項 2 8】

前記試料が、初代細胞培養物中で増殖させたウイルスを含む、請求項 2 7 に記載のプロセス。

#### 【発明の詳細な説明】

#### 【技術分野】

#### 【0 0 0 1】

この出願は、米国仮出願第 6 1 / 3 9 5 , 1 1 7 号 ( 2 0 1 0 年 5 月 6 日出願 ) ( この完全な内容は、全ての目的のために参考として本明細書に援用される ) の利益を主張する。

#### 【0 0 0 2】

##### 技術分野

本発明は、微生物の不活化におよび / または核酸の分解に ( および特に、DNA の分解に ) 有用である化合物の分野にある。

#### 【背景技術】

#### 【0 0 0 3】

ウイルスおよび細菌を不活性にするためのそれらの処理は、廃水または下水の衛生化を含む様々な領域において、およびワクチンなどの非経口薬の分野においても重要である。例えば、多くのワクチンは微生物に基づいており、これらの微生物は、生感染性物質が最終ワクチンに存在しないことを確実にするように不活化される。ポリオウイルスの不活化

10

20

30

40

50

が失敗した1950年代の「カッター（C u t t e r）事件」から公知であるように、不活化の失敗は、深刻な安全性リスクをもたらし得る。

【0004】

不活化処理は、代表的に化学的手段に基づく。化学的処理としては、洗剤、ホルムアルデヒド（通常はホルマリンとして）、β-プロピオラクトン（B P L）、グルタルアルデヒド、エチレンイミン、フェノールなどの使用が挙げられる。これらの不活化剤は、長年にわたって使用されている。例えば参考文献1（非特許文献1）を参照のこと。

【0005】

これらの不活化剤の一部は、核酸の分解にも有用である。この分解は、ウイルスまたは細菌自体の不活化において役割を果たすことができるが、成長中に使用されてきた任意の細胞基質から残存核酸を無くすことにも有用であり得る。例えば、ウイルスを細胞培養で成長させて、ワクチンを調製するための材料を得ることができ、および製造中に、細胞培養基質からの一切の残存核酸を分解する工程を含むことは通例であり、それによって潜在的に発癌性の材料を除去する。参考文献2（特許文献1）には、ウイルスの不活化と宿主細胞DNAの分解の両方のためのB P Lの使用が記載されている。

【0006】

特定の微生物に応じてその最良の不活化剤は様々である。例えば、ウイルスの形態（サイズ、カプシド化（c a p s i d a t i o n）、エンベロープなど）の相違は、不活化感度の相違につながる。例えば、参考文献3（非特許文献2）の付録2を参照のこと。一部の処理（例えば、非常に苛酷な加熱、消毒剤、強いUV線または放射線）は、普遍的に微生物を不活化することができるが、これらは免疫原性も破壊し、そのため有効なワクチンの調製には不適切である。その代りとして、ワクチン免疫原性を保ちながら問題の微生物に対して有効であるような不活化処理が選択される。それ故、残念なことに、この処理は活性形態の汚染因子を残すことがあり、ことによると、頑丈な感染性因子によるワクチン汚染につながる。従って、ターゲット微生物と潜在的汚染物質の両方を不活化する広域スペクトルの不活化剤が必要とされている。そのような不活化剤は、ウイルス不活化が推奨されるウシ血清またはトリブシンなどの製品[4（非特許文献3）]の処理にも有用であるだろう。

【0007】

一部の不活化剤に伴うもう1つの難点は、それらの安定性である。ホルムアルデヒドは、特に高温で有効な不活化剤であるが、それは非常に安定であり、そのため不活化後に残留物が残存する。これらの残留物は、残留活性微生物についての下流の試験に干渉することがある。従って、これらの試験では高希釈物が使用されるが、これはそれらの感度を低減する。さらに、それらの残留物は、最終ワクチンにおける免疫応答に干渉することがあり、例えば、参考文献5（非特許文献4）は、ホルマリン不活化ワクチンは過敏症を引き起こす危険がより高いだろうことを示唆している。

【0008】

最後に、ホルムアルデヒドでの不活化は、いくつかの状況では可逆的であり得る[6、7]。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0009】

【特許文献1】国際公開第2007/052163号

【非特許文献】

【0010】

【非特許文献1】Mayrら編、Handbuch der Schutzimpfungen in der Tiermedizin Verlag Paul Parey（1984年）

【非特許文献2】European guidelines on Viral Safety Evaluations of Biotechnology Product

10

20

30

40

50

s ; ICH Q5A (CPMP/ICH/295/95)

【非特許文献3】Note for Guidance on the use of bovine serum in the manufacture of human biological medicinal products, CPMP/BWP/1793/02

【非特許文献4】Moghaddam, Nature Medicine (2006) 12:905~7

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0011】

10

従って、新規の改善された微生物不活化剤が必要とされている。これらは、頑丈なものを含めて様々な微生物に対して、所望の免疫原性を除去することなく、有用であらねばならない。それらはまた、干渉するまたは有害な残留物を殆どまたは全く残してはならず、その不活化は、可逆的であってはならない。理想的には、それらは、核酸の分解にも適したものであらねばならず、水性媒体の存在下であってもそれらの活性を示さねばならない。

【課題を解決するための手段】

【0012】

本発明は、微生物不活化剤として、および/または核酸を分解するために、多官能性有機ペルオキシドを使用する。これらの不活化剤は、(i)少なくとも1つの炭素原子またはバックボーンと(ii)少なくとも2つのペルオキシド基、すなわち、2つの酸素原子間に単結合-O-O-を含有する少なくとも2つの基とを含む。前記不活化剤は、理想的にはヒドロペルオキシドであり、すなわち、基-O-O-Hを含有する。そのような化合物は、当該技術分野において既知であるが、今般、それらが、免疫原性に負の影響を及ぼすことなく不活化を達成することができる微生物(レオウイルスなどの安定していることで知られているウイルスを含む)の強力な不活化剤であることを示す。さらに、それらは、高水溶性であり得、毒性分解生成物を生成せず(例えば、酢酸、プロピオン酸または酪酸などの単純なカルボン酸しか生成せず)、ならびに広範なpHおよび温度にわたって活性である。さらに、それらは、水性条件で驚くべき安定性を示すことができ、および細胞DNAの分解に有効である。

20

30

【0013】

従って、本発明は、微生物含有試料(例えば、液体試料)を処理するためのプロセスを提供し、このプロセスは、前記試料と多官能性有機ペルオキシドを接触させる工程を包含する。このプロセスは、結果として、試料中の微生物の不活化を生じさせることができる。

【0014】

本発明は、核酸(例えば、DNA、例えば細胞DNA)を含有する試料(例えば、液体試料)を処理するためのプロセスも提供し、このプロセスは、前記試料と多官能性有機ペルオキシドを接触させる工程を包含する。このプロセスは、結果として、試料中の核酸の分解を生じさせることができる。

40

【0015】

本発明は、薬学的組成物を調製するための方法も提供し、この方法は、(i)微生物含有試料と多官能性有機ペルオキシドを接触させて、試料中の微生物を不活化する工程；(ii)工程(i)の生成物から薬学的組成物を調製する工程を包含する。この薬学的組成物は、有用にはワクチン(例えば、ウイルスワクチン)である。

本発明は、(i)活性因子、例えばウイルス免疫原、および(ii)多官能性有機ペルオキシドと還元剤との反応生成物を含む薬学的組成物も提供する。前記還元剤および反応生成物は、非毒性であらねばならず、例えば、両方とも糖であり得る。

【0016】

本発明は、多官能性有機ペルオキシドの水溶液も提供し、ここで、前記多官能性有機ペ

50

ルオキシドが ( a ) 1 重量 % 未満または ( b ) 5 重量 % ~ 7 0 重量 % の間のいずれかの濃度で存在する。この溶液は、特に選択肢 ( a ) の場合、微生物も含有することがある。選択肢 ( a ) の場合、その濃度は、通常、0 . 0 0 1 % ~ 0 . 5 %、例えば 0 . 0 1 % ~ 0 . 2 5 % の間、0 . 0 1 % ~ 0 . 1 % の間、または約 0 . 0 5 % である。選択肢 ( b ) の場合、その濃度は、6 % ~ 6 0 %、7 % ~ 5 0 %、8 % ~ 4 0 %、9 % ~ 3 5 % または 1 0 % ~ 3 0 % の範囲であり得る。

【 0 0 1 7 】

本発明は、( i ) 不活化された微生物および ( i i ) 1 重量 % 未満 (例えば、0 . 0 0 1 % ~ 0 . 5 % の範囲内、例えば、0 . 0 1 % ~ 0 . 2 5 % の間、0 . 0 1 % ~ 0 . 1 % の間、または約 0 . 0 5 % ) の多官能性有機ペルオキシドを含む液体組成物も提供する。

10

【 0 0 1 8 】

本発明は、微生物と多官能性有機ペルオキシドとの反応生成物を含む液体組成物も提供する。

【 0 0 1 9 】

本発明は、多官能性有機ペルオキシドを含む殺菌性組成物も提供する。そのような溶液は、微生物が無いことを除いて上で論じた水溶液を含む。

【 0 0 2 0 】

本発明は、薬物の製造に使用するための、例えばワクチンの製造の際に使用するための、任意の上述の組成物も提供する。同様に、本発明は、薬物を製造するためのプロセスを提供し、このプロセスは、任意の上述の組成物を使用する。

20

【 0 0 2 1 】

本発明は、微生物不活化剤としての多官能性有機ペルオキシドの使用も提供する。本発明は、微生物不活化剤として使用するための多官能性有機ペルオキシドも提供する。本発明は、微生物不活化剤としての本発明の水溶液の使用も提供する。本発明は、微生物不活化剤として使用するための本発明の水溶液も提供する。

【 0 0 2 2 】

試料

本発明は、微生物含有試料の処理に有用である。これらの試料は、好ましくは液体試料であるが、固体、例えば容器または作業場の表面、であってもよい。そのような試料としては、微生物培養液；血液製剤、血清、血漿、または血液由来製剤 (例えば、抗血液凝固薬)；動物由来原料および製品；微生物によって汚染され得る他の原料；ワクチンおよび診断薬生産 (例えば、E L I S A) の際の組換えタンパク質、材料および中間体；微生物剤を利用するプロセスからの廃棄物；廃水、下水；食品 (例えばミルク)；などが挙げられるが、これらに限定されない。

30

【 0 0 2 3 】

本発明は、試料の消毒または滅菌において、および特に、表面上で生きている微生物を破壊するための該表面の消毒のために、さらなる用途を有する。例えば、本発明は、使用前に作業面を消毒するために、使用前に外科用器具もしくはインプラントを滅菌するために、または消毒もしくは滅菌が望ましい任意の他の目的のために、使用することができる。

40

【 0 0 2 4 】

本発明は、ウイルスと細菌の両方を含む様々なタイプの微生物の不活化に有用である。エンベロープウイルスおよび無エンベロープウイルスに関してそれを使用することができる。RNA ゲノム (一本もしくは二本鎖) または DNA ゲノム (一本もしくは二本鎖) を有するウイルスに関してそれを使用することができ、一本鎖ゲノムは + センスであってもよいし、- センスであってもよい。分節ゲノムまたは非分節ゲノムを有するウイルスに関してそれを使用することができる。カプシド (単数もしくは複数) を有するウイルス、またはカプシドを有さないウイルスに関してそれを使用することができる。グラム陰性菌またはグラム陽性菌に関してそれを使用することができる。

【 0 0 2 5 】

50



従って、前記試料は、以下のものの1つ以上を含有し得る：

オルトミクソウイルス：インフルエンザA型、B型またはC型ウイルスなどの、オルトミクロウイルスを不活化するために本発明を使用することができる。インフルエンザA型またはB型ウイルスは、汎流行間期（*inter pandemic*）（周年性／流行期性）株である場合もあり、または汎流行アウトブレイクを引き起こす可能性のある株（すなわち、現在循環している株中の赤血球凝集素に比べて新しい赤血球凝集素を有するインフルエンザ株、または鳥類被験体において病原性であり、且つ、ヒト集団において水平伝播する可能性を有するインフルエンザ株、またはヒトに対して病原性であるインフルエンザ株）からのものである場合もある。特定の流行期におよび株の性質に依存して、インフルエンザA型ウイルスは、次の赤血球凝集素サブタイプの1つ以上に由来し得る：H1、H2、H3、H4、H5、H6、H7、H8、H9、H10、H11、H12、H13、H14、H15またはH16。

10

パラミクソウイルス科ウイルス：ニューモウイルス（RSV）、パラミクソウイルス（PIV）およびモルビリウイルス（麻疹）などの、パラミクソウイルス科ウイルスを不活化するために本発明を使用することができる。

ニューモウイルス：ニューモウイルスまたはメタニューモウイルス、例えば呼吸器合胞体ウイルス（RSV）、ウシ呼吸器合胞体ウイルス、マウス肺炎ウイルスおよびシチメンチョウ鼻気管炎ウイルス、を不活化するために本発明を使用することができる。好ましくは、前記ニューモウイルスは、RSVまたはヒトメタニューモウイルス（HMPV）である。

20

パラミクソウイルス：1、2、3または4型パラインフルエンザウイルス（PIV）、流行性耳下腺炎、センダイウイルス、シミアンウイルス5、ウシパラインフルエンザウイルスおよびニューカッスル病ウイルスなどの、パラミクソウイルスを不活化するために本発明を使用することができる。好ましくは、前記パラミクソウイルスは、PIVまたは流行性耳下腺炎である。

モルビリウイルス：麻疹などのモルビリウイルスを不活化するために本発明を使用することができる。

ピコルナウイルス：エンテロウイルス、ライノウイルス、ヘパルナウイルス（Heparnavirus）、カルジオウイルスおよびアフトウイルスなどの、ピコルナウイルスを不活化するために本発明を使用することができる。

30

エンテロウイルス：1、2または3型ポリオウイルス、1～22および24型コクサッキーAウイルス、1～6型コクサッキーBウイルス、1～9、11～27および29～34型エコーウイルス（ECHOVirus）ならびにエンテロウイルス68～71などの、エンテロウイルスを不活化するために本発明を使用することができる。好ましくは、前記エンテロウイルスは、ポリオウイルス、例えば、MahoneyもしくはBrunenderなどの1型株、MEF-Iなどの2型株、またはSaukettなどの3型株である。

ヘパルナウイルス：A型肝炎ウイルスなどのヘパルナウイルス（ヘパトウイルスとも呼ばれる）を不活化するために本発明を使用することができる。

トガウイルス：ルビウイルス、アルファウイルスまたはアルテリウイルスなどの、トガウイルスを不活化するために本発明を使用することができる。風疹ウイルスなどのルビウイルスが好ましい。不活化に有用なアルファウイルスとしては、サケ膵臓病ウイルス（salmon pancreas disease virus）および睡眠病ウイルス（sleeping disease virus）などの、水生アルファウイルスが挙げられる。

40

フラビウイルス：ダニ媒介脳炎（TBE）、デング熱（1、2、3または4型）、黄熱病、日本脳炎、西ナイル脳炎、セントルイス脳炎、ロシア春夏脳炎、ポワッサン脳炎などの、フラビウイルスを不活化するために本発明を使用することができる。

C型肝炎ウイルス：C型肝炎ウイルス（HCV）を不活化するために本発明を使用することができる。

50

ペスチウイルス：ウシウイルス性下痢（BVDV）、ブタコレラ（CSFV）またはボーダー病（Border disease）（BDV）などの、ペスチウイルスを不活化するために本発明を使用することができる。

ヘパドナウイルス：B型肝炎ウイルスなどのヘパドナウイルスを不活化するために本発明を使用することができる。

ラブドウイルス：リッサウイルス（例えば、狂犬病ウイルス）およびベシクロウイルス（VSV）などの、ラブドウイルスを不活化するために本発明を使用することができる。

カリシウイルス科：ノーウォークウイルス、ならびにノーウォーク様ウイルス、例えばハワイウイルス（Hawaii Virus）および雪山ウイルス（Snow Mountain Virus）、ならびにベシウイルス（Vesivirus）、例えばブタ小水疱性発疹ウイルス、などの、カリシウイルス科を不活化するために本発明を使用することができる。

10

コロナウイルス：SARS、ヒト呼吸器系コロナウイルス、トリ伝染性気管支炎（Avian infectious bronchitis）（IBV）、マウス肝炎ウイルス（MHV）およびブタ伝染性胃腸炎ウイルス（TGEV）などの、コロナウイルスを不活化するために本発明を使用することができる。

レトロウイルス：オンコウイルス、レンチウイルスまたはスプーマウイルスなどの、レトロウイルスを不活化するために本発明を使用することができる。オンコウイルスは、HTLV-1、HTLV-2またはHTLV-3であり得る。レンチウイルスは、SIV、HIV-1またはHIV-2であり得る。

20

レオウイルス：オルトレオウイルス、ロタウイルス、オルビウイルスまたはコルティウイルスなどの、レオウイルスを不活化するために本発明を使用することができる。

パルボウイルス：パルボウイルスB19またはボカウイルス（Bocavirus）などの、パルボウイルスを不活化するために本発明を使用することができる。

他の肝炎ウイルス：デルタ肝炎ウイルス、E型肝炎ウイルスまたはG型肝炎ウイルスを不活化するために本発明を使用することができる。

ヒトヘルペスウイルス：単純ヘルペスウイルス（HSV）、水痘 - 帯状疱疹ウイルス（VZV）、エプスタイン・バーウイルス（EBV）、サイトメガロウイルス（CMV）、ヒトヘルペスウイルス6（HHV6）、ヒトヘルペスウイルス7（HHV7）およびヒトヘルペスウイルス8（HHV8）などの、ヒトヘルペスウイルスを不活化するために本発明を使用することができる。

30

パポバウイルス：パピローマウイルスおよびポリオーマウイルスなどの、パポバウイルスを不活化するために本発明を使用することができる。パピローマウイルスとしては、HPV血清型1、2、4、5、6、8、11、13、16、18、31、33、35、39、41、42、47、51、57、58、63および65が挙げられる。

アデノウイルス科：ヒトアデノウイルスA、B、C、D、E、FまたはGのいずれかを含む、アデノウイルスを不活化するために本発明を使用することができる。

ボルデテラ属：百日咳菌などのボルデテラ属の細菌を不活化するために本発明を使用することができる。

40

クロストリジウム属（Clostridiaceae）：破傷風菌およびボツリヌス菌などの、クロストリジウム属を不活化するために本発明を使用することができる。

コリネバクテリウム科：ジフテリア菌などのコリネバクテリウム属を不活化するために本発明を使用することができる。

パスツレラ科：インフルエンザ菌などのパスツレラ属の種を不活化するために本発明を使用することができる。

ミコバクテリウム科（Mycobacteriaceae）：ヒト結核菌（M. tuberculosis）、ウシ結核菌および弱毒化カルメットゲラン桿菌などの、ミコバクテリアを不活化するために本発明を使用することができる。

ナイセリア科：髄膜炎菌および淋菌などの、ナイセリア属の種を不活化するために本

50

発明を使用することができる。

サルモネラ属 (*Salmonellaceae*) : チフス菌、*S. paratyphi*、*S. typhimurium*、*S. enteritidis* などの、サルモネラ属の種を不活化するために本発明を使用することができる。

連鎖球菌属 (*Streptococcaceae*) : 肺炎連鎖球菌 (肺炎球菌)、*S. agalactiae* および化膿連鎖球菌などの、連鎖球菌を不活化するために本発明を使用することができる。

マイコプラズマ科 : 汚染された細胞培養物または細胞培養由来材料において見つけることができる任意の *M.* 種を含めて、*M. pneumonia*、*M. hyorhinitis*、*M. bovis*、*M. agalactiae*、*M. gallisepticum* などの、マイコプラズマを不活化するために本発明を使用することができる。

10

#### 【0026】

微生物に加えて、試料は、溶解状態の核酸、例えば残留細胞 DNA、も含むことがある。これらの状態は、例えば溶菌ウイルスを細胞培養中に成長させ、細胞を含まない産物を調製したとき、起こり得る。そのような試料の場合、前記多官能性有機ペルオキシドは、微生物を不活化することもでき、溶解状態の核酸を分解することもできるので、ワクチン製造中に、特にウイルスワクチンの製造中に、二重の恩恵をもたらすことができる。従って、本発明による処理のための試料は、微生物および細胞 DNA (例えば、MDCK などの細胞株からのゲノム DNA) を含み得る。

#### 【0027】

20

試料が、(微生物も含んで、または含まずに) 核酸を含む場合、該核酸は、典型的には、DNA (例えば細胞 DNA) を含む。微生物内の (例えば、細菌内の、またはビリオン内の) 核酸ではなく、前記核酸は、溶解状態で遊離しているであろう (例えば、細胞内の細胞 DNA ではなく溶解状態である細胞 DNA (すなわち、元々は細胞のものであるが、もはや細胞内に存在しない DNA))。

#### 【0028】

前記微生物は、意図的に (例えば、ワクチンを調製するためのウイルス成長後に) 存在することもあり、(例えば、下水中の、または汚染された細胞培養培地成分、細胞もしくは培養物からの組換えタンパク質発現後の) 汚染物として存在することもある。また、幾つかの実施形態において、試料は、微生物を計画的に含有することがあるが、汚染微生物 (単数または複数) も含有することがある。

30

#### 【0029】

本発明は、ウイルスの不活化に特に有用であるので、微生物含有試料を処理するためのプロセスは、好ましくは、ウイルス含有試料中のウイルスを不活化するためのプロセスである。

#### 【0030】

幾つかの実施形態では、必ずしも微生物を含有するとは限らないが微生物を含有する疑いのあるかまたはその危険のある試料を処理するために、本発明を使用することができる。これらの実施形態において、前記処理は必須ではないが、危険回避のために微生物不活化を確実にするために (例えば、消毒に) 用いられる。一般に、前記試料は、微生物の成長または存続を支持することができるだろう。

40

#### 【0031】

微生物を含むことに加えて、試料は、他の材料、例えば細胞基質またはそれらの残留物、細胞核酸 (例えば、DNA)、卵タンパク質など、を含有することがある。微生物を不活化することに加えて、有機ペルオキシドは、これらの他の材料と反応することができる。しかし、理想的には、前記試料は、不活化剤との反応について感染性材料と競合する有意な量の非感染性材料を含まない。そのような反応は、不活化剤を浪費する。これらの無駄な反応を被ることがある材料としては、例えば、還元剤 (下記参照) が挙げられる。従って、例えば、高レベルの残留グルコースを保持する培養を回避し得る。

#### 【0032】

50

本発明による試料の処理後、残存するまたは過剰なペルオキシドを除去および／または破壊することができる。これは、様々な方法で、例えば還元剤の添加によって、達成することができる。適する還元剤としては、チオ硫酸ナトリウム、アスコルビン酸、糖（例えば、グルコースまたはスクロース；好ましくは還元糖）、多糖類、ポリフェノールなどが挙げられるが、これらに限定されない。還元剤（単数または複数）は、代表的に、ペルオキシドに対して（還元基あたりで計算して）モル過剰で、例えば、2：1と4：1の間の化学的不活化剤に対してモル過剰の還元基で添加される。ペルオキシドの初期濃度を遮断するために十分な量で還元剤を添加することができる。しかし、既知の終濃度範囲を用いる十分に標準化されたプロセスについては、使用者は、より低い濃度、例えば不活化後に残存するであろう量のペルオキシドを遮断するために十分な濃度、を添加することを好むだろう。

10

#### 【0033】

化学的不活化剤に依存して、および使用される還元剤に依存して、不活化された不活化剤が反応溶液中に残存してもよく（例えば、それが無害な場合、例えば、単純な糖の場合）、またはそれを希釈してもよく、またはそれを除去してもよい。除去工程は、関心のある試薬の下流プロセッシングの一部として（例えば、不活化された材料からのタンパク質またはウイルス成分の精製中に）行うことができる。従って、除去は、限外濾過／ダイアフィльтраーション、透析、クロマトグラフ精製などを伴うことがある。

#### 【0034】

多官能性有機ペルオキシド

20

本発明は、多官能性有機ペルオキシドを使用する。そのような化合物は、少なくとも1つの炭素原子またはバックボーンを含む、すなわち、それらは $H_2O_2$ とは異なる有機物である。それらは、少なくとも2つの基も含む、すなわち、それらは、過酢酸とは異なる複数の官能性ペルオキシド基を含有する。

#### 【0035】

前記ペルオキシド化合物は、理想的にはヒドロペルオキシドであり、すなわち、基-O-O-Hを含有する。それは複数のヒドロペルオキシド基を含有することもある。他の多官能性有機ペルオキシドは、ペルオキシケタール、例えば $CR^1R^2(OOR^3)(OOR^4)$ またはテトラオキサンであり得るが、炭素原子に結合している少なくとも1つの-O-O-H基を含む化合物が好ましい。

30

#### 【0036】

少なくとも1つのペルオキシド基が、有機ペルオキシドを生じさせるように炭素原子に結合しており、および幾つかの実施形態では、各ペルオキシド基中の酸素原子の少なくとも1つが、炭素原子に結合している。

#### 【0037】

前記ペルオキシド化合物は、理想的には、2つのペルオキシド（またはヒドロペルオキシド）基が同じ炭素原子に結合しているジェミナルペルオキシド（またはヒドロペルオキシド）である。

#### 【0038】

前記化合物は、理想的には、2つ、3つまたは4つのペルオキシド基を有するが、より多数のペルオキシド基を有する化合物を除外しない。

40

#### 【0039】

前記化合物は、ホモ二官能性である場合があり、すなわち、それは、2つの同一のペルオキシド（またはヒドロペルオキシド）官能基を含む；従って、不活化剤は、ジェミナルビスヒドロペルオキシドであることがある。あるいは、不活化剤は、ヘテロ二官能性であることがあり、すなわち、それは、2つの異なるペルオキシド官能基を含み、例えば、それは、ヒドロペルオキシド(-OOH)および別のペルオキシド(-OOR(式中、R H))を含むことがある。

#### 【0040】

好ましい化合物は、水溶性である。これは、ワクチン製造中のそれらの使用を容易にす

50

る。

【 0 0 4 1 】

好ましい化合物は、ハロゲンを含まない。なぜなら、そのような化合物は、代表的により有害ではないようであるからである。従って、不活化剤は、炭素、水素、酸素および窒素原子のみから成り得る。特に好ましい化合物は、炭素、水素および酸素原子のみから成る。

【 0 0 4 2 】

好ましい化合物は、500未満、例えば、<300、<250、<200、<150、<100の分子量を有する。

【 0 0 4 3 】

好ましい化合物は、 $-C(=O)-OOH$ 基を含まず、そのため（例えば過酢酸とは異なり）不活化中に非常に酸性のpHを生じさせない。そのような条件sは、pH感受性免疫原を破壊する場合があります、不活化プロセスに使用されるデバイスおよび機械類の腐食につながる場合もある。

【 0 0 4 4 】

好ましい化合物は非爆発性であり、例えば、トリアセントリペルオキシドは好ましくない。

【 0 0 4 5 】

不活化中、前記化合物は、理想的には、元の生成物より動物（ヒトを含む）に対して毒性である反応または分解生成物を形成しない。

【 0 0 4 6 】

好ましい化合物は、(i)感染性力価の5、好ましくは7 log10低減でヒトインフルエンザA型ウイルス、および/または(ii)感染性力価の3、好ましくは5、および特に好ましい7 log10低減で3型レオウイルスを不活化することができる。

【 0 0 4 7 】

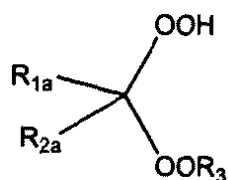
好ましい化合物は、微生物を、その免疫原性を低減することなく、不活化することができる。特に好ましい化合物は、インフルエンザA型ウイルスを、その赤血球凝集素の免疫原性を低減することなく、不活化することができる。

【 0 0 4 8 】

有用な化合物は、式I：

【 0 0 4 9 】

【 化 1 】



を有し、ここで式中、

$R_{1a}$ は、H、 $C_{1-6}$ アルキル、 $C_{2-6}$ アルケニル、 $C_{1-6}$ アルキニル、 $C_{1-6}$ -アルコキシ、 $C_{2-6}$ -アルケニルオキシ、 $C(O)H$ 、 $C(O)C_{1-6}$ アルキル、 $C(O)OC_{1-6}$ アルキル、場合によりN-モノもしくはN-ジ $C_{1-6}$ アルキル化アミノ、場合によりN-モノもしくはN-ジ $C_{1-6}$ アルキル化アミノカルボニル、 $S(O)_{0-2}C_{1-6}$ アルキル、ヘテロシクロアルキル、アリールまたはヘテロアリールであり；

$R_{2a}$ は、H、 $C_{1-6}$ アルキル、 $C_{2-6}$ アルケニル、 $C_{1-6}$ アルキニル、 $C_{1-6}$ -アルコキシ、 $C_{2-6}$ -アルケニルオキシ、 $C(O)H$ 、 $C(O)C_{1-6}$ アルキル、 $C(O)OC_{1-6}$ アルキル、場合によりN-モノもしくはN-ジ $C_{1-6}$ アルキル化アミノ、場合によりN-モノもしくはN-ジ $C_{1-6}$ アルキル化アミノカルボニル、 $S(O)_{0-2}C_{1-6}$ アルキル、ヘテロシクロアルキル、アリールまたはヘテロアリール、

10

20

30

40

50

- (CR<sub>4</sub>R<sub>5</sub>)<sub>n</sub>CR<sub>6</sub>(OOH)<sub>2</sub>であるか、あるいはR<sub>2a</sub>は、LによってR<sub>2b</sub>に連結されており；

R<sub>3</sub>は、HまたはC(OOH)R<sub>1b</sub>R<sub>2b</sub>であり、

R<sub>1b</sub>は、H、C<sub>1-6</sub>アルキル、C<sub>2-6</sub>アルケニル、C<sub>1-6</sub>アルキニル、C<sub>1-6</sub>-アルコキシ、C<sub>2-6</sub>-アルケニルオキシ、C(O)H、C(O)C<sub>1-6</sub>アルキル、C(O)OC<sub>1-6</sub>アルキル、場合によりN-モノもしくはN-ジC<sub>1-6</sub>アルキル化アミノ、場合によりN-モノもしくはN-ジC<sub>1-6</sub>アルキル化アミノカルボニル、S(O)<sub>0-2</sub>C<sub>1-6</sub>アルキル、ヘテロシクロアルキル、アリーールまたはヘテロアリーールであり；

R<sub>2b</sub>は、H、C<sub>1-6</sub>アルキル、C<sub>2-6</sub>アルケニル、C<sub>1-6</sub>アルキニル、C<sub>1-6</sub>-アルコキシ、C<sub>2-6</sub>-アルケニルオキシ、C(O)H、C(O)C<sub>1-6</sub>アルキル、C(O)OC<sub>1-6</sub>アルキル、場合によりN-モノもしくはN-ジC<sub>1-6</sub>アルキル化アミノ、場合によりN-モノもしくはN-ジC<sub>1-6</sub>アルキル化アミノカルボニル、S(O)<sub>0-2</sub>C<sub>1-6</sub>アルキル、ヘテロシクロアルキル、アリーールまたはヘテロアリーールであるか、あるいはR<sub>2b</sub>は、LによってR<sub>2a</sub>に連結されており；

R<sub>4</sub>は、各出現時、HまたはC<sub>1-3</sub>アルキル、ヒドロキシル、シアノ、ニトロ、C<sub>2-4</sub>-アルケニル、C<sub>1-3</sub>-アルコキシ、C<sub>2-4</sub>-アルケニルオキシ、C<sub>1-3</sub>-アルキルカルボニル、カルボキシ、C<sub>1-6</sub>-アルコキシカルボニル、場合によりN-モノもしくはN-ジC<sub>1-3</sub>アルキル化アミノカルボニル、C<sub>1-3</sub>-チオアルキル、C<sub>1-3</sub>-アルキルスルフィニル、C<sub>1-3</sub>-アルキルスルホニル、C<sub>1-3</sub>-アルキルアミノスルホニルおよびジ-C<sub>1-3</sub>-アルキルアミノスルホニルから選択され；

R<sub>5</sub>は、各出現時、HまたはC<sub>1-3</sub>アルキル、ヒドロキシル、シアノ、ニトロ、C<sub>2-4</sub>アルケニル、C<sub>1-3</sub>-アルコキシ、C<sub>2-4</sub>-アルケニルオキシ、C<sub>1-3</sub>-アルキルカルボニル、カルボキシ、C<sub>1-6</sub>-アルコキシカルボニル、場合によりN-モノもしくはN-ジC<sub>1-3</sub>アルキル化アミノカルボニル、C<sub>1-3</sub>-チオアルキル、C<sub>1-3</sub>-アルキルスルフィニル、C<sub>1-3</sub>-アルキルスルホニル、C<sub>1-3</sub>-アルキルアミノスルホニルおよびジ-C<sub>1-3</sub>-アルキルアミノスルホニルから選択され；

Lは、C<sub>1-8</sub>アルキレンであり；

R<sub>6</sub>は、H、C<sub>1-6</sub>アルキル、C<sub>2-6</sub>アルケニル、C<sub>1-6</sub>アルキニル、C<sub>1-6</sub>-アルコキシ、C<sub>2-6</sub>-アルケニルオキシ、C(O)H、C(O)C<sub>1-6</sub>アルキル、C(O)OC<sub>1-6</sub>アルキル、場合によりN-モノもしくはN-ジC<sub>1-6</sub>アルキル化アミノ、場合によりN-モノもしくはN-ジC<sub>1-6</sub>アルキル化アミノカルボニル、S(O)<sub>0-2</sub>C<sub>1-6</sub>アルキル、ヘテロシクロアルキル、アリーールまたはヘテロアリーールであり；そして

nは、1～8である。

#### 【0050】

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>およびR<sub>6</sub>のこれらの選択肢に加えて、これらの基のそれぞれは、列挙した選択肢の誘導体である場合もある。

#### 【0051】

アルキル、アルコキシラジカルのアルキル部分、アルケニル、アルケニルラジカルのアルケニル部分、アルキニルまたはアルキレンは、分岐していてもよく、もしくは非分岐であってもよく、および/または置換されていてもよく、もしくは非置換であってもよい。置換されている場合、各置換基を、ヒドロキシル、シアノ、ニトロ、C<sub>1-6</sub>-アルキル、C<sub>6-10</sub>-アリーール、ベンジル、C<sub>2-6</sub>-アルケニル、C<sub>1-6</sub>-アルコキシ、C<sub>2-6</sub>-アルケニルオキシ、C<sub>1-6</sub>-アルキルカルボニル、カルボキシ、C<sub>1-6</sub>-アルコキシカルボニル、場合によりN-モノまたはN-ジC<sub>1-6</sub>アルキル化アミノ、場合によりN-モノまたはN-ジC<sub>1-6</sub>アルキル化アミノカルボニル、場合によりN-モノまたはN-ジC<sub>1-6</sub>アルキル化アミノスルフィニル、C<sub>1-6</sub>-チオアルキル、C<sub>1-6</sub>-アルキルスルフィニル、C<sub>1-6</sub>-アルキルスルホニル、アミノスルホニル、C<sub>1-6</sub>-アルキルアミノスルホニルおよびジ-C<sub>1-6</sub>-アルキルアミノスルホニルから選択

10

20

30

40

50

することができる。

【0052】

$R_3$  が - H でなく、 $R_{1a}$  が  $R_{2a}$  とは異なる場合、これらの化合物は、異なるエナンチオマー形態で存在する場合がある。本発明は、特定のエナンチオマーまたはラセミ混合物を使用することができる。

【0053】

幾つかの実施形態において、 $R_{1a}$  および  $R_{2a}$  は、同一である。他の実施形態において、 $R_{1a}$  および  $R_{2a}$  は、異なる。

【0054】

幾つかの実施形態において、 $R_{1a}$  および  $R_{1b}$  は、同一である。他の実施形態において、 $R_{1a}$  および  $R_{1b}$  は、異なる。

10

【0055】

幾つかの実施形態において、 $R_{2a}$  および  $R_{2b}$  は、同一である。他の実施形態において、 $R_{2a}$  および  $R_{2b}$  は、異なる。

【0056】

$R_{1a}$  は、好ましくは H または  $C_{1-6}$  アルキルまたは  $C_{1-4}$  アルキルである。従って、 $R_{1a}$  は、H または  $CH_3$  であり得る。

【0057】

$R_{2a}$  は、好ましくは H もしくは  $C_{1-6}$  アルキルもしくは  $C_{1-4}$  アルキルもしくは  $-(CH_2)_nCH(OOH)_2$  であり、または L によって  $R_{2b}$  に連結されている。従って、 $R_{2b}$  は、 $CH_3$ 、Et、n-Pr または  $-(CH_2)_{2-4}CH(OOH)_2$  であり得る。

20

【0058】

$R_{1b}$  は、好ましくは H または  $C_{1-6}$  アルキルまたは  $C_{1-4}$  アルキルである。従って、 $R_{1b}$  は、H または  $CH_3$  であり得る。

【0059】

$R_{2b}$  は、好ましくは  $C_{1-4}$  アルキルであり、または L によって  $R_{2a}$  に連結されている。従って、 $R_{2b}$  は、 $CH_3$ 、Et または n-Pr であり得る。

【0060】

各  $R_4$  (これらは同じであることもあり、または異なることもある) は、好ましくは H または  $CH_3$  またはヒドロキシルである。

30

【0061】

各  $R_5$  (これらは同じであることもあり、または異なることもある) は、好ましくは H または  $CH_3$  またはヒドロキシルである。

【0062】

L は、好ましくは  $C_{2-5}$  アルキレン、例えば  $-(CH_2)_3-$ 、である。

【0063】

$R_6$  は、好ましくは H または  $C_{1-6}$  アルキルまたは  $C_{1-4}$  アルキルである。

【0064】

n は、好ましくは 2 ~ 6 であり、または 2 ~ 4 であり、または 3 である。

40

【0065】

1つの実施形態において、 $R_{1a}$  は、H または  $CH_3$  であり； $R_{2a}$  は、 $CH_3$ 、Et、n-Pr もしくは  $-(CH_2)_nCH(OOH)_2$  であるか、または  $R_{2a}$  は、L によって  $R_{2b}$  に連結されており； $R_3$  は、H または  $C(OOH)R_{1b}R_{2b}$  であり； $R_{1b}$  は、H または  $CH_3$  であり； $R_{2b}$  は、 $CH_3$ 、Et もしくは n-Pr であるか、または  $R_{2b}$  は、L によって  $R_{2a}$  に連結されており；L は、 $-(CH_2)_3-$  であり；および n は、3 である。

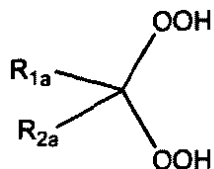
【0066】

前記化合物は、式 II :

【0067】

50

## 【化 2】



を有することがあり、この式中、好ましい実施形態では、 $R_{1a}$  は、H または  $CH_3$  であり；および  $R_{2a}$  は、 $CH_3$ 、Et または  $n-Pr$  である。

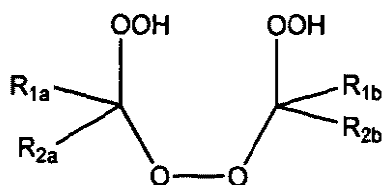
## 【0068】

前記化合物は、式 III :

10

## 【0069】

## 【化 3】



を有することがあり、この式中、好ましい実施形態では、 $R_{1a}$  は H または  $CH_3$  であり； $R_{2a}$  は、 $CH_3$ 、Et もしくは  $n-Pr$  であるか、または  $R_{2a}$  は、L によって  $R_{2b}$  に連結されており； $R_{1b}$  は、H または  $CH_3$  であり； $R_{2b}$  は、 $CH_3$ 、Et、 $n-Pr$  であるか、または  $R_{2b}$  は、L によって  $R_{2a}$  に連結されており；および L は、 $-(CH_2)_3-$  である。

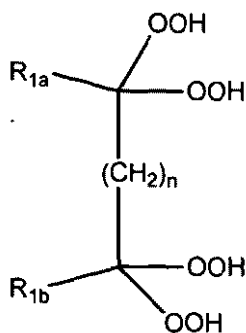
20

## 【0070】

前記化合物は、式 IV :

## 【0071】

## 【化 4】



30

を有することがあり、この式中、好ましい実施形態では、 $R_{1a}$  は、H であり； $R_{1b}$  は、H であり；および  $n$  は、3 である。

## 【0072】

適する化合物としては、2, 2'-ジヒドロペルオキシ-2, 2'-ジブチルペルオキシド；2, 2'-ジヒドロペルオキシブタン；1, 1'-ジヒドロペルオキシエタン；1, 1'-ジヒドロペルオキシプロパン；1, 1'-ジヒドロ-ペルオキシブタン；1, 1'-ジヒドロペルオキシ-1, 1'-ジプロピルペルオキシド；1, 1'-ジヒドロペルオキシ-1, 1'-ジブチルペルオキシド；1, 1'-ジヒドロペルオキシ-1, 1'-ジエチルペルオキシド；1, 1, 5, 5-テトラヒドロペルオキシペンタン；3, 7-ビス-ヒドロペルオキシ-1, 2-ジオキセパン；および 1, 1'-ジヒドロペルオキシメタンが挙げられるが、これらに限定されない。1, 1'-ジヒドロペルオキシエタンが好ましい。これらの化合物のうちの少なくとも幾つかは、当該技術分野において既知であり（例えば、参考文献 8 ~ 10 を参照のこと）および/または商業的供給業者から、例えば Ferak AG（ドイツ、ベルリン）からまたは Arkema Inc.（米国、フィラデルフィア

40

50



）から、入手できる。参考文献 8 ～ 10 からのまたはこれらの供給業者から入手できる化合物、および特にそれらの水溶性化合物を、本発明で使用する事ができる。

【0073】

本発明は、単一の不活化剤化合物を使用することができ、または例えば式 I の 1 つより多くの異なる化合物を含む、化合物の混合物を使用することができる。混合物が 2 つの異なる有機ペルオキシドを含む場合、これらは、様々なモル比で、例えば 10 : 1 と 1 : 10 の間、5 : 1 と 1 : 5 の間、2 : 1 と 1 : 2 の間、または実質的に等モル比で存在し得る。混合物中の化合物は、例えば 056 - 1 と 058 - 1 の分子間で、環構造を形成するような水素結合を示すことがある。幾つかの化合物は、ダイマーとして存在することがあり、ならびにモノマーとオリゴマーの混合物として存在することもある。

10

【0074】

従って、本発明は、式 I I の化合物と式 I I I の化合物とを含む混合物を使用することができる。そのような混合物において、 $R_{1a}$  および  $R_{1b}$  は、式 I I と式 I I I の両方において同じであってもよく；および / または  $R_{2a}$  および  $R_{2b}$  は、式 I I と式 I I I の両方において同じであってもよい。

【0075】

不活化剤は、関心のある試料中の微生物を不活化するために十分な濃度で、理想的には所望の微生物（またはその成分）の免疫原性を低減することなく、使用される。それらは、一般に、1 重量 % 未満、および通常は 0.001 % ～ 0.5 % の範囲内、例えば 0.01 % ～ 0.25 % の間、0.01 % ～ 0.1 % の間、の最終濃度をもたらしように液体試料と混合されるであろう。例えば、添加される多官能性有機ペルオキシド（単数または複数）の全量は、全液体試料の（重量で）約 0.75 %、0.5 %、0.25 %、0.2 %、0.1 %、0.075 %、0.05 %、0.025 %、0.01 % または 0.005 % であり得る。典型的な量は、約 0.05 % である。

20

【0076】

不活化剤は、広範な PH 範囲にわたって、例えば、pH 5 と 10 の間、pH 6 と 9 の間、または pH 7 ± 0.5 で使用することができる。不活化を緩衝液の存在下で行ってもよい（緩衝液が不活化剤と一緒に組成物中に存在してもよい）が、これは、通常、必要ではない。

【0077】

不活化剤は、任意の特定の状況で望まれる結果のために組み合わせた温度 / 時間スキームで使用され、実質的に同じ結果を達成しながらこれら 2 つの因子を変動させることができる。不活化は高温でより速く、そのため不活化期間を短縮することができる。状況に依存して、不活化温度は、例えば、長い不活化時間（例えば数時間もしくは数日）で 0 ほどの低さに保たれることがあり、または短時間（例えば、ほんの数分間）、60 ほどの高さに保たれることがある。しかし、より高温では、多くの機能性タンパク質または抗原が損なわれるまたは破壊されることとなり、そのため好ましい処理は、通常、より低い温度（例えば、< 30 °C）を長時間用いることとなる。任意の特定の状況でのこれらのパラメータの影響を容易に試験することができる。

30

【0078】

不活化剤は、化合物が関心のある試料中の所望の微生物を所望の処理期間にわたって不活化できるようにする温度で使用されるだろう。従って、任意の適する温度で、例えば、0 °C ～ 60 °C の間、10 °C ～ 50 °C の間、15 °C ～ 40 °C の間、15 °C ～ 25 °C の間、19 °C ～ 23 °C の間などで不活化を行うことができる。不活化は、典型的には実質的に一定の温度、例えば ± 2 °C、± 1 °C、で行われるだろう。しかし、幾つかの実施形態において、不活化は、異なる温度の相、例えば、低温での第一相（例えば、2 °C ～ 8 °C の間、例えば約 4 °C）およびより高温での、典型的には第一相より少なくとも 10 °C 高い、第二相（例えば、25 °C ～ 50 °C の間、例えば約 37 °C）、またはより高温の第一相（例えば、25 °C ～ 50 °C の間、例えば約 37 °C）、その後、より低温の第二相（例えば、2 °C ～ 8 °C の間、例えば約 4 °C）を用いる。

40

50

## 【 0 0 7 9 】

二相プロセスは、多官能性ペルオキシドを不活化と核酸分解の両方に使用する場合、特に有用である。典型的なスキームでは、より低温の相はウイルス不活化に好適であり得、これに対してより高温の相は、核酸分解に好適であり得る。

## 【 0 0 8 0 】

不活化剤は、関心のある試料中の微生物を所望の温度で、理想的には所望の微生物の免疫原性を低減することなく、不活化するために十分な時間、使用される。不活化処理は、典型的には15分と72時間の間、例えば、6時間～48時間、12時間～36時間、18時間～26時間、または約16時間もしくは約24時間、続く。

## 【 0 0 8 1 】

不活化される微生物の性質および工業上の設定に依存して、当業者は、(i)不活化時間、(ii)不活化剤の濃度、および(iii)不活化温度の適切な組み合わせを選択することができる。実施において、ワクチン抗原のための不活化処理は、典型的に72時間まで続くが、実施上の理由のため24時間までまたはより短いプロセス時間が好ましい。しかし、数週間までのはるかに長い不活化時間が、例えば細菌抗原を無毒化のために、用いられてもいる。頑強な抗原のために、または廃棄物中の微生物の不活化のために、より高い不活化剤濃度およびほんの数分または数時間の短い不活化時間が選択されることもある。

## 【 0 0 8 2 】

処理の単一ラウンドによって達成されるより高いレベルの分解を達成するまたは確保するために反復を用いて、不活化のまたは核酸分解のプロセスを1回以上行ってもよい(すなわち、多官能性有機ペルオキシドを試料に添加し、試料に作用させ、その後、さらなる多官能性有機ペルオキシドを添加する、など)。例えば、前記プロセスを2回行ってもよい。各ラウンドの時間、温度および濃度を含む条件は、同じであってもよいし、または異なってもよい。異なるラウンドが異なる目的(focus)(例えば、1つのラウンドは不活化に好適であり、別のラウンドは核酸分解に好適であるなど)を有することができるように、条件を変えることができる。任意の2つのラウンドは、好ましくは、同じ多官能性有機ペルオキシドを使用するが、代替法としてそれらは異なる多官能性有機ペルオキシドを使用することができる。あるプロセスは、多官能性有機ペルオキシドを使用する2つのラウンドの間に、残留多官能性有機ペルオキシドを除去するおよび/または分解する工程を含む場合があるが、幾つかの実施形態では、この除去を伴わずに第二のラウンドが進行する場合がある。

## 【 0 0 8 3 】

## 組み合わせ処理

本発明の不活化剤をアルキル化剤、すなわち化合物にアルキルラジカルを導入する物質、と組み合わせ使用することができる。適するアルキル化剤としては、-プロピオラクトン(BPL)などのモノアルキル化剤が挙げられる。BPLは、多くのワクチンの調製の際にウイルスの不活化のために使用されるモノアルキル化剤である[2]。BPLは、核酸を含む様々な生体分子と反応し、アルキル化およびデプリネーションによって構造上の修飾を生じさせる。

## 【 0 0 8 4 】

従って、本発明のプロセスが、多官能性有機ペルオキシドを使用する工程を伴う場合、そのプロセスは、アルキル化剤を使用する工程も伴うことができる。多官能性有機ペルオキシドとアルキル化剤を同時に使用するのではなく、これら2つの工程を好ましくは別々に行う。すなわち、多官能性有機ペルオキシドを使用して、後ほどアルキル化剤を使用するか、アルキル化剤を既に使用した後に多官能性有機ペルオキシドを使用する。

## 【 0 0 8 5 】

従って、例えば、本発明は、微生物含有試料を処理するためのプロセスを提供し、このプロセスは、前記試料を、いずれかの順序で、(i)多官能性有機ペルオキシドおよび(ii)BPLなどのアルキル化剤と接触させる工程を包含する。

## 【0086】

同様に、本発明は、薬学的組成物を調製するための方法を提供し、この方法は、(i) 微生物含有試料を、いずれかの順序で、多官能性有機ペルオキシドおよびアルキル化剤と接触させる工程；(ii) 工程(i)の生成物から薬学的組成物を調製する工程を包含する。両方の処理を伴う工程(i)が、微生物の非常に良好な不活化を達成する。

## 【0087】

本発明は、(i) 微生物と多官能性有機ペルオキシドの反応生成物、(ii) 微生物とアルキル化剤の反応生成物、および/または(iii) 微生物と多官能性有機ペルオキシドとアルキル化剤との反応生成物のうちの2つ以上を含む液体組成物も提供する。前記組成物は、  
- ヒドロキシプロピオン酸を含むことがある。

10

## 【0088】

本発明は、試料を処理するためのプロセスを提供し、このプロセスは、微生物含有試料とBPLなどのアルキル化剤との反応生成物である前記試料を多官能性有機ペルオキシドと接触させる工程を包含する。逆に、本発明は、試料を処理するためのプロセスも提供し、このプロセスは、微生物含有試料と多官能性有機ペルオキシドの反応生成物である前記試料をBPLなどのアルキル化剤と接触させる工程を包含する。本発明は、これら2つのプロセスのいずれかの結果として得られる処理された試料を使用する工程を含む、薬学的組成物の調製方法も提供する。

## 【0089】

上で述べたように、アルキル化剤と組み合わせて使用する場合、処理の少なくとも1つのラウンドは、アルキル化剤によるものであり、処理の少なくとも1つのラウンドは、多官能性有機ペルオキシドによるものである。前記試料を不活化の第一のラウンドにおいてアルキル化剤で、そして不活化の第二のラウンドにおいて多官能性有機ペルオキシドで処理してもよいし、または代替的に、不活化の第一のラウンドにおいて多官能性有機ペルオキシドで、そして不活化の第二のラウンドにおいてアルキル化剤で処理してもよい。不活化のさらなるラウンドをアルキル化剤または多官能性有機ペルオキシドのいずれかで(または任意の他の不活化剤で)行ってもよい。

20

## 【0090】

処理の各ラウンドの時間、温度および濃度を含む条件は、同じであってもよいし、または異なってもよい。BPLによる処理のための有用な条件を下で説明する：

30

BPLを典型的には1体積%未満(例えば、1%、0.75%、0.5%、0.25%、0.2%、0.1%、0.075%、0.05%、0.025%、0.01%、または0.005%未満)の最終濃度まで添加する。好ましくは、BPLを0.1%と0.01%の間で使用する。

## 【0091】

アルキル化剤を好ましくは緩衝化水性試料に添加し、その溶液のpHを好ましくは5と10の間に維持する。さらに好ましくは、前記溶液のpHを6と9の間に維持する。さらにいっそう好ましくは、前記溶液のpHを7と8の間に維持する。

## 【0092】

アルキル化剤による逐次的処理の間に、アルキル化剤除去工程があってもよいが、第一の処理からの残存アルキル化剤を一切除去せずに第二の処理のためにアルキル化剤を添加してもよい。同様に、多官能性有機ペルオキシドを使用した場合には、それをアルキル化剤による処理の前に除去してもよい。

40

## 【0093】

アルキル化剤での、特にBPLでの処理は、異なる温度での相を伴うことがある。例えば、低温での(例えば、2 ~ 8 の間、例えば約4 での)第一の相、およびより高温での、典型的には第一の相より少なくとも10 高い(例えば、25 ~ 50 の間、例えば37 での)第二の相があってもよい。この二相プロセスは、アルキル化剤を不活化とDNA分解の両方に使用する場合、特に有用である。典型的なスキームでは、ウイルス不活化をより低温の相の間で行い、DNA分解をより高温の相の間に行う。下でより詳細

50

に説明するように、上昇された温度が熱感受性アルキル化剤の除去も助長し得る。

【0094】

アルキル化剤および任意の残留副生成物を、好ましくは、医薬の最終調合前に除去する。従って、最終組成物は、併せて0.1%未満の遊離プロピオン酸とBPL（例えば、0.1%、0.05%、0.025%、0.01%、0.005%、0.001%、または0.01%未満）を含有し得る。好ましくは、最終薬学的組成物は、0.01%未満のBPLを含有し得る。

【0095】

BPLは、加熱して非毒性 - ヒドロキシプロピオン酸への加水分解を生じさせることによって、便利に除去することができる。加水分解に必要な時間の長さは、BPLの全量および温度に依存する。温度が高いほど、迅速な加水分解が生ずるが、活性なタンパク質成分を損なわせるほど高く温度を上昇させるべきではない。2時間～2.5時間、約37℃への加熱がBPLの除去に適している。DNA断片化は、2～8℃でのウイルス不活化工程中ではなく、37℃でのBPL加水分解工程中に主として発生する。

10

【0096】

薬学的組成物および製品

本発明は、薬学的組成物を調製するための方法を提供し、この方法は、微生物含有試料（通常は液体試料）を多官能性有機ペルオキシドと接触させてその中の微生物を不活化する第一の工程、続いてその不活化された材料から薬学的組成物を調製する工程を包含する。不活化された材料を医薬の調製に直接使用することができ、またはそれをさらなる処理、例えば希釈、精製、他の活性成分との組み合わせ、不活性医薬成分との組み合わせなどに供することができる。

20

【0097】

例えば、本発明は、ワクチンを調製するための方法を提供し、この方法は、ウイルス含有試料（例えば、液体試料、例えば培養液）を多官能性有機ペルオキシドと接触させてウイルスを不活化する第一の工程、続いてその不活化されたウイルスから薬学的組成物を調製する工程を包含する。不活化されてウイルスをワクチンの調製に直接使用することができ、またはそれをさらなる処理、例えば希釈、ウイルス成分のさらなる精製、他のワクチン抗原（ウイルス性および/もしくは細菌性）との組み合わせ、緩衝液（単数もしくは複数）との組み合わせ、アジュバントとの組み合わせなど、に供することがある。

30

【0098】

このプロセスは、微生物含有試料を調製する最初の工程、例えばウイルスまたは細菌培養工程、を含むことができる。

【0099】

ウイルスを成長させた後、精製ビリオンに対して、例えば、清澄化細胞培養物中に存在するビリオンに対して、またはそのような清澄化細胞培養物から精製されたビリオンに対して、不活化剤を使用することができる。1つの方法は、清澄化による細胞材料の除去、およびその後、その清澄化された細胞培養物からの、例えばクロマトグラフィーによる、ビリオンの精製を伴うだろう。不活化剤を、この様式で生成されたビリオンに対して使用することができ、またはさらなる必要に応じた限外濾過/ダイアフィルトレーション工程後に使用してもよい。上で述べたように、多官能性有機ペルオキシドは、ウイルスを不活化することに加えて、ウイルスを成長させた細胞基質からの一切の残留DNAを分解することができる。

40

【0100】

不活化剤をエンドトキシン除去工程前に使用することができ、またはエンドトキシン除去工程を行った後に使用することができる。

【0101】

ワクチン組成物は、例えば不活化インフルエンザウイルスからのスプリットまたは表面抗原ワクチンの調製の場合のように、不活化ウイルスからの免疫原性タンパク質（単数または複数）の精製によって調製することができる。

50

## 【0102】

不活化のためのウイルスは、任意の適する基質を用いて、例えば、細胞株培養物中、初代細胞培養物中、卵の中、などで、増殖させることができる。細胞培養は、多くの場合、哺乳動物細胞、例えば、ハムスター、ウシ、霊長類（ヒトおよびサルを含む）およびイヌの細胞を使用するだろう。様々な細胞タイプ、例えば腎臓細胞、線維芽細胞、網膜細胞、肺細胞など、を使用することができる。適するハムスター細胞の例は、BHK 21またはHKCCという名を有する細胞株である。適するサル細胞は、例えば、アフリカミドリザル細胞、例えばVero細胞株におけるような腎臓細胞である[11-13]。適するイヌ細胞は、例えば、CLDKおよびMDCK細胞株におけるような腎臓細胞である。従って、適する細胞株としては、MDCK; CHO; 293T; BHK; Vero; MRC-5; PER.C6; WI-38; などが挙げられるが、これらに限定されない。インフルエンザウイルスを成長させるために好ましい哺乳動物細胞としては、メイディン・ダービー・イヌ腎臓に由来するMDCK細胞[14-17]; アフリカミドリザル(*Cercopithecus aethiops*)腎臓に由来するVero細胞[18-20]; またはヒト胚性網膜芽細胞に由来するPER.C6細胞[21]が挙げられる。これらの細胞株は、例えばAmerican Type Cell Culture(ATCC)コレクション[22]から、Coriell Cell Repositories[23]から、またはEuropean Collection of Cell Cultures(ECACC)から、幅広く入手できる。例えば、ATCCは、カタログ番号CCL-81、CCL-81.2、CRL-1586およびCRL-1587で様々な異なるVero細胞を供給しており、ならびにカタログ番号CCL-34でMDCK細胞を供給している。PER.C6は、ECACCから寄託番号96022940で入手できる。哺乳動物細胞を使用することと同様に、アヒル（例えば、アヒル網膜）または雌鶏に由来する細胞株、例えばニワトリ胚線維芽細胞(CEF)など、を含む鳥類細胞または細胞株（例えば、参考文献24-26を参照のこと）上でウイルスを成長させることができる。例としては、ニワトリ胚性幹細胞に由来するEBx細胞株、EB45、EB14およびEB14-074[28]を含む、鳥類胚性幹細胞[24、27]が挙げられる。

## 【0103】

1つの有用な細胞株は、メイディン・ダービー・イヌ腎臓に由来するMDCK[29-31]である。元のMDCK細胞株は、ATCCからCCL-34として入手できる。MDCK細胞の派生物も使用することができる。例えば、参考文献14は、懸濁培養での成長に適合させたMDCK細胞株(DSM ACC 2219として寄託された「MDCK 33016」)を開示している。同様に、参考文献32は、無血清培養で懸濁状態で成長するMDCK由来細胞株(FERM BP-7449として寄託された「B-702」)を開示している。参考文献33は、「MDCK-S」(ATCC PTA-6500)、「MDCK-SF101」(ATCC PTA-6501)、「MDCK-SF102」(ATCC PTA-6502)および「MDCK-SF103」(PTA-6503)を含む、非腫瘍形成性MDCK細胞を開示している。参考文献34は、「MDCK.5F1」細胞(ATCC CRL-12042)を含む、感染に対する高い易罹患性を有するMDCK細胞株を開示している。これらのMDCK細胞株のいずれを使用してもよい。

## 【0104】

ウイルスを懸濁培養（例えば、参考文献14、35および36を参照のこと）で成長させることができ、または付着培養で成長させることができる。懸濁培養のための1つの適するMDCK細胞株は、(DSM ACC 2219として寄託された)MDCK 33016である。代替法として、マイクロキャリア培養を使用することができる。

## 【0105】

ウイルスを無血清培養培地および/または無タンパク質培地で成長させることができる。培地は、ヒトまたは動物起源の血清からの添加物を含有しない場合、本発明の文脈の中で無血清培地と呼ばれる。無タンパク質は、タンパク質、成長因子、他のタンパク質添加物および非血清タンパク質を排除して細胞の増殖(multiplication)が生

10

20

30

40

50

じる培養であるが、ウイルス成長に必要であり得るトリプシンまたは他のプロテアーゼなどの外因性タンパク質を場合により含むことがある培養を意味すると解される。

【0106】

材料であって、それら自体は薬学的組成物ではないが、薬学的組成物の調製中に使用されるものである材料を調製するためにも、本発明を使用することができる。例えば、本発明は、多官能性有機ペルオキシドを使用して既存のまたは可能性のある汚染ウイルスを不活化することによる、発酵培養プロセスからの組換えタンパク質分子などの、安全な医薬製品を製造するための方法を提供する。そのようなプロセスに存在し得るまたは導入される得るウイルスは、例えば、多くの不朽細胞株 (permanent cell line) に、特に、齧歯動物細胞、例えばCHO (チャイニースハムスター卵巣) 細胞、またはマウス骨髄腫細胞、に存在するレトロウイルスである。他の汚染物は、動物由来原料、例えばブタトリプシン、ウシ起源の培地補充物または動物起源のタンパク質水解物に由来する動物ウイルスであり得る。不活化剤を製造プロセスのほぼいずれの工程にでも導入することができる：原料、緩衝液、培地および他の出発物質の前処理にそれを使用してもよいし、バルク原料 (例えば、発酵槽回収物) の回収中もしくは後に、または後の濃縮および精製工程中もしくは後にそれを適用してもよい。しかし、実施上の理由から、プロセスを通して活性微生物が持ち越されるのを避けるためにプロセスの早期に不活化を行うことが好まれる。

10

【0107】

薬学的組成物は、通常はそれらの抗原に加えて成分を含み、例えば、典型的には1つ以上の薬学的キャリア (単数もしくは複数) および / または賦形剤 (単数もしくは複数) を含む。そのような成分の詳細な論述は、参考文献37において入手できる。ワクチン組成物は、例えば参考文献38および39に開示されているようなアジュバント (例えば、1つ以上のアルミニウム塩を含む、またはサブミクロン水中油型エマルジョンを含むアジュバント) も含むことがある。

20

【0108】

薬学的組成物は、特に投与の時点で、好ましくは水性形態であるが、非水性液体形態または乾燥形態で、例えばゼラチンカプセルまたは凍結乾燥物 (lyophilisate) などとして、提供することもできる。

【0109】

薬学的組成物は、1つ以上の保存薬、例えばチオメルサールまたは2-フェノキシエタノール、を含むことがある。水銀を含まない組成物が好ましく、保存薬を含まないワクチンを調製することができる。

30

【0110】

薬学的組成物は、例えば、張度を制御するために、ナトリウム塩などの生理的塩を含むことがある。塩化ナトリウム (NaCl) が典型的であり、これは1mg/mLと20mg/mLの間で存在し得る。存在し得る他の塩としては、塩化カリウム、リン酸二水素カリウム、無水リン酸二ナトリウム (disodium phosphate dehydrate)、塩化マグネシウム、塩化カルシウムなどが挙げられる。

【0111】

薬学的組成物は、200mOsm/kgと400mOsm/kgの間、例えば、240mOsm/kg ~ 360mOsm/kgの間、または290mOsm/kg ~ 310mOsm/kgの間の重量オスモル濃度を有し得る。

40

【0112】

薬学的組成物は、1つ以上の緩衝液を含むことがある。典型的な緩衝液としては、リン酸緩衝液; Tris緩衝液; ホウ酸塩緩衝液; コハク酸塩緩衝液; ヒスチジン緩衝液 (特に、水酸化アルミニウムアジュバントとともに); またはクエン酸塩緩衝液が挙げられる。緩衝液は、典型的には5mM ~ 20mMの範囲で含まれるであろう。

【0113】

薬学的組成物は、典型的に、5.0と9.5の間、例えば、6.0と8.0の間のpH

50

を有する。

【0114】

薬学的組成物は、好ましくは無菌である。

【0115】

薬学的組成物は、好ましくは、非発熱性であり、例えば、1用量あたり<1EU（エンドトキシン単位、標準尺度）、および好ましくは1用量あたり<0.1EUを含有する。

【0116】

薬学的組成物は、好ましくはグルテンを含まない。

【0117】

薬学的組成物は、洗剤、例えばポリオキシエチレンソルビタンエステル界面活性剤（「Tween」として公知）、オクトキシノール（例えば、オクトキシノール-9（Triton X-100）もしくはt-オクチルフェノキシポリエトキシエタノール）、セチルトリメチルアンモニウムブロミド（「CTAB」）、またはデオキシコール酸ナトリウム、を含むことができる。洗剤は、痕跡量でのみ存在し得る。

10

【0118】

組成物は、単回投与用の材料を含むことがあるか、または多回免疫化用の材料を含むことがある（すなわち、「多回用量（multidose）」キット）。保存薬を含めることは、多回用量の構成（arrangement）において有用である。多回用量組成物に保存薬を含めることの代替法として（またはそれに加えて）、材料の取り出し用の無菌アダプタを有する容器に組成物を収容することができる。

20

【0119】

薬学的組成物および特にワクチンは、典型的には約0.5mLの投薬体積で投与されるが、小児には半分の用量（すなわち、約0.25mL）が投与されるだろう。

【0120】

薬学的組成物を様々な方法で投与することができる。最も好ましい経路は、筋肉内注射による（例えば、腕または下肢への）経路であるが、他の利用可能な経路としては、皮下注射、鼻内、経口、皮内、経皮（transcutaneous）、経皮（transdermal）などが挙げられる。

【0121】

薬学的組成物は、動物（および特にヒト）患者への投与に適しており、従って、人的用途と獣医学的用途の両方を含む。患者における免疫応答を上昇させる方法においてそれらを使用することができ、この方法は、患者に前記組成物を投与する工程を含む。

30

【0122】

これらの方法によって上昇される免疫応答としては、一般に、抗体応答、好ましくは防御的抗体応答が挙げられる。ウイルスワクチン接種後の抗体応答、中和能力および防御を評価するための方法は、当該技術分野において周知である。インフルエンザウイルスについては、例えば、ヒトでの研究により、HAに対する抗体力価は防御と相関することが証明されている。

【0123】

上で述べたように、ワクチン組成物は、該組成物を受ける患者において惹起される免疫応答（体液性および/または細胞性）を強化するように機能することができる1つ以上のアジュバント（単数または複数）を含むことができる。有用なアジュバントは、1つ以上のアルミニウム塩を含み得る。もう1つの有用なアジュバントは、水中油型エマルジョンを含み得る。他の有用なアジュバントは、当該技術分野において公知である。

40

【0124】

水酸化アルミニウムおよびリン酸アルミニウムとして公知のアジュバントを単独でまたは組み合わせて使用することができる。これらの名前は従来のであるが、いずれも存在する実際の化合物の正確な記述ではないので、単に便宜上用いられている（例えば、参考文献40の第9章を参照のこと）。本発明は、アジュバントとして一般に使用される任意の「水酸化物」または「リン酸塩」を使用することができる。患者に投与するための組成

50

物中の  $Al^{+++}$  濃度は、好ましくは  $5\text{ mg/mL}$  未満、例えば、 $4\text{ mg/mL}$ 、 $3\text{ mg/mL}$ 、 $2\text{ mg/mL}$ 、 $1\text{ mg/mL}$  などである。好ましい範囲は、 $0.3\text{ mg/mL}$  と  $1\text{ mg/mL}$  の間である。最大  $0.85\text{ mg/用量}$  が好ましい。

#### 【0125】

様々な有用な水中油型エマルジョンアジュバントが公知であり、それらは典型的には少なくとも1つの油と少なくとも1つの界面活性剤を含み、油（単数または複数）および界面活性剤（単数または複数）は、生体分解性（代謝性）および生体適合性である。エマルジョン中の油滴は、一般に、直径が  $1\text{ }\mu\text{m}$  未満であり、これらの小さいサイズは、マイクロフルイダイザーを用いて達成され、安定したエマルジョンを提供する。 $<220\text{ nm}$  である平均直径を有する液滴は、濾過滅菌に供することができるので好ましい。有用なアジュバントとしては、スクアレノおよび/またはポリソルベート80を挙げることができる。使用することができる適するアジュバントとしては、MF59およびAS03として公知のものが挙げられる。

10

#### 【0126】

免疫原性薬学的組成物を単回用量スケジュールまたは多回用量スケジュールによって投与することができる。複数の用量を一次免疫化スケジュールでおよび/または追加免疫化スケジュールで用いることができる。多回用量スケジュールでは、様々な用量を同じ経路または異なる経路、例えば、非経口での初回刺激（prime）および粘膜での追加刺激（boost）、粘膜での初回刺激および非経口での追加刺激などによって与えることができる。1用量より多く（典型的には2用量）の投与が免疫原的にナイーブな患者では特に有用である。複数の用量を典型的には少なくとも1週間（例えば、約2週間、約3週間、約4週間、約6週間、約8週間、約10週間、約12週間、約16週間など）隔てて投与する。

20

#### 【0127】

##### 宿主細胞DNA

上で述べたように、多官能性有機ペルオキシドを本発明に従って使用して核酸を分解することができる。これは、例えば細胞培養物中でのウイルスの成長後に依然として存在する、宿主細胞DNAなどのDNAの分解に特に有用である。

#### 【0128】

核酸を分解するための多官能性有機ペルオキシドでの処理は、理想的には、核酸が  $10^8$  塩基対あたり  $10$  より多くの脱塩基ヌクレオチド残基を含むまで、例えば、それが  $10^7$  塩基対あたり  $10$  より多くの脱塩基ヌクレオチド残基、 $10^6$  塩基対あたり  $10$  より多くの脱塩基ヌクレオチド残基、または  $10^5$  塩基対あたり  $10$  より多くの脱塩基ヌクレオチド残基を含むまで、継続する。脱塩基残基の（および特に、デブリネーション後の）存在は、核酸バックボーンの切断および従って断片化をもたらす得る。

30

#### 【0129】

核酸を分解するための多官能性有機ペルオキシドでの処理は、理想的には、残存DNA鎖の平均長が  $1000$  塩基対未満（例えば、 $900$ 、 $800$ 、 $700$ 、 $600$ 、 $500$ 、 $400$ 、 $300$ 、 $200$ 、 $150$ 、 $100$ 、 $75$  または  $50$  塩基対未満）になるまで継続する。好ましくは、残存DNAの長さは、 $500$  塩基対未満であり、さらに好ましくは  $200$  塩基対未満である。いずれの残存DNAのサイズも、キャピラリーゲル電気泳動または核酸増幅技術を含む、標準的な技術によって測定することができる。これらの残存する短い断片は、それらが機能性タンパク質をコードする可能性が低いもしくはコードすることができない、ヒトレシピエントの染色体に転位される可能性が低いもしくは転位され得ない、または別様にレシピエントDNA複製機構によって認識される可能性が低いもしくは認識され得ないほど小さい。一般に、機能性タンパク質に翻訳され得るヌクレオチド配列は、プロモーター領域、開始コドン、停止コドン、および機能性タンパク質についての内部コーディング配列を必要とする。DNA損傷が、例えば多官能性有機ペルオキシドでの処理によって発生する場合、これらの領域の多くが改変または破壊されるので、転写および/または翻訳はもはや生じ得ない。

40

50



## 【0130】

薬学的組成物は、好ましくは、1用量あたり10ng未満（好ましくは1ng未満、およびさらに好ましくは100pg未満）の残留DNAを含有するが、痕跡量の宿主細胞DNAがなお存在することもある。一般に、本発明の組成物から排除されることが最も望ましい宿主細胞DNAは、200塩基対より長いDNAである。

## 【0131】

残留宿主細胞DNAの測定は、今では生物学的薬剤の慣例的規制要件であり、当業者の通常の能力の範囲内である。DNAを測定するために用いられるアッセイは、典型的には検証されたアッセイであるだろう[41、42]。検証されたアッセイの性能特性を数学的な用語および定量可能な用語で説明することができ、その誤差の可能性のある源は同定されているだろう。前記アッセイは、一般に、正確度、精度、特異性などの特性について試験されているだろう。一旦、アッセイを（例えば、宿主細胞DNAの公知標準量に対して）校正し、試験したら、定量的DNA測定を慣例的に行うことができる。DNA定量についての3つの原則技術を用いることができる：ハイブリダイゼーション法、例えばサザンブロットまたはスロットブロット[43]；イムノアッセイ法、例えばThreshold（商標）システム[44]；および定量的PCR[45]。これらの方法は、すべて当業者によく知られているが、各方法の特性そのものは、問題の宿主細胞、例えば、ハイブリダイゼーションのためのプローブの選択、増幅のためのプライマーおよび/またはプローブの選択などによって左右され得る。Molecular DevicesからのThreshold（商標）システムは、ピコグラムレベルの全DNAについての定量的アッセイであり、生物製剤中の汚染DNAのレベルのモニタリングに使用されている[44]。典型的なアッセイは、ビオチン化ssDNA結合タンパク質とウレアーゼ結合体化抗ssDNA抗体とDNAとの反応複合体の非配列特異的形成を伴う。すべてのアッセイ成分が、その製造業者から入手できる完全Total DNA Assay Kitに含まれている。様々な商業的製造業者、例えば、AppTec（商標）Laboratory Services、BioReliance（商標）、Althea Technologiesなどが、残留宿主細胞DNAを検出するための定量的PCRアッセイを提供している。ヒトウイルスワクチンの宿主細胞DNA汚染を測定するための化学発光ハイブリダイゼーションアッセイと全DNA Threshold（商標）システムの比較は、参考文献46において見つけることができる。

## 【0132】

特にMDCK細胞などのイヌの細胞に関して、ゲノムの分析は、長さが<500bpの13のコーディング配列、<200bpの3つの配列および<100bpの1つの配列を示す。従って、<200bpへのDNAの断片化は、実質的にすべてのコーディング配列を除去し、いずれの断片もその長さ付近の3つの遺伝子（すなわち：81bpのセクレチン；108bpのPYY；および135bpのオステオカルシン）のうちの1つに実際に対応する可能性は非常に低い。

## 【0133】

短い分解DNAは、長いDNAより容易に組成物から除去することができるので、本発明は、薬学的組成物中の残留DNAの量の低減に有用である。遊離DNAを分解するように微生物含有組成物を処理した後、DNA分解生成物を場合により除去することができる。従って、ウイルス含有試料については、DNA分解生成物をウイルスから分離することができる。小さい可溶性分解DNA断片を、例えばアニオン交換クロマトグラフィー、サイズベースの方法、などによって、ウイルスから容易に分離することができる。

## 【0134】

## インフルエンザワクチン

本発明は、ワクチン製造中のインフルエンザウイルスの不活化に有用である。インフルエンザウイルス用のワクチンは、ビリオン全体に基づくことがあり、「スプリット」ビリオンに基づくことがあり、または精製表面抗原（赤血球凝集素を含み、通常はノイラミニダーゼも含む）に基づくことがある。本発明をこれらのいずれのタイプのワクチンの製造

中にも使用することができる。

#### 【0135】

インフルエンザビリオンをウイルス含有流体、例えば尿膜腔液または細胞培養上清、から様々な方法によって回収することができる。例えば、精製プロセスは、ビリオンを破壊するために洗剤を含む線形スクロース勾配溶液を使用するゾーン遠心分離を伴うことがある。その後、抗原を必要に応じた希釈後にダイアフィルトレーションによって精製してもよい。

#### 【0136】

スプリットビリオンは、「Tween-エーテル」分割プロセスを含む、サブビリオン調製物を生成させるための洗剤（例えば、エチルエーテル、ポリソルベート80、デオキシコール酸塩、トリ-N-ブチルホスフェート、Triton X-100、Triton N101、セチルトリメチルアンモニウムブロミド、Tergitol NP9など）での精製ビリオンの処理によって得られる。例えばインフルエンザウイルスを分割する方法は、当該技術分野において周知である（例えば、参考文献47～52などを参照のこと）。ウイルスの分割は、典型的には、感染性であろうと非感染性であろうとウイルス全体を破壊濃度の分割剤（splitting agent）で破壊するかまたは断片化することによって行われる。この破壊は、ウイルスの完全性を改変する、ウイルスタンパク質の完全なまたは部分的な可溶化を生じさせる結果となる。好ましい分割剤は、非イオン性およびイオン性（例えば、カチオン性）界面活性剤、例えばアルキルグリコシド、アルキルチオグリコシド、アシル糖、スルホベタイン、ベタイン、ポリオキシエチレンアルキルエーテル、N,N-ジアルキル-グルカミド、Hecameg、アルキルフェノキシ-ポリエトキシエタノール、NP9、第四級アンモニウム化合物、サルコシル、CTAB（セチルトリメチルアンモニウムブロミド）、トリ-N-ブチルホスフェート、Cetavlon、ミリスチルトリメチルアンモニウム塩、リポフェクチン、リポフェクタミン、およびDOT-MA、オクチル-またはノニルフェノキシポリオキシエタノール（例えば、Triton界面活性剤、例えばTriton X-100またはTriton N101）、ポリオキシエチレンソルビタンエステル（Tween界面活性剤）、ポリオキシエチレンエーテル、ポリオキシエチレン（polyoxyethylene）エステルなどである。1つの有用な分割手順は、デオキシコール酸ナトリウムおよびホルムアルデヒドの逐次的作用を用い、最初のビリオン精製中に（例えば、スクロース密度勾配溶液中で）分割を行うことができる。従って、分割プロセスは、ビリオン含有材料の（非ビリオン材料を除去するための）清澄化、回収したビリオンの（例えば、CaHPO<sub>4</sub>吸着などの吸着法を使用する）濃縮、非ビリオン材料からのビリオン全体の分離、密度勾配遠心分離工程において分割剤を使用する（例えば、デオキシコール酸ナトリウムなどの分割剤を含有するスクロース勾配を使用する）ビリオンの分割、およびその後、所望していない材料を除去するための濾過（例えば、限外濾過）を伴う場合がある。スプリットビリオンをリン酸ナトリウム緩衝化等張性塩化ナトリウム溶液に有用に再懸濁させることができる。スプリット・インフルエンザ・ワクチンの例は、BEGRIVAC（商標）、FLUARIX（商標）、FLUZONE（商標）およびFLUSHIELD（商標）製品である。

#### 【0137】

精製インフルエンザウイルス表面抗原ワクチンは、表面抗原赤血球凝集素および、典型的には、ノイラミニダーゼも含む。精製形態のこれらのタンパク質を調製するためのプロセスは、当該技術分野において周知である。FLUVIRIN（商標）、AGRIPRAL（商標）およびINFLUVAC（商標）製品は、インフルエンザ・サブユニット・ワクチンである。

#### 【0138】

HAは、現行の不活化インフルエンザワクチンにおける主免疫原であり、ワクチン用量は、典型的にSRIDによって測定されるHAレベルに照らして標準化される。既存のワクチンは、典型的には1株あたり約15 μgのHAを含有するが、例えば小児には、または汎流行状況では、またはアジュバントを使用するときには、より低い用量を使用するこ

10

20

30

40

50

とができる。1/2 (すなわち、1株あたり7.5 µg HA)、1/4および1/8などの分割量が使用されるのと同様に、より高い用量 (例えば、3×用量または9×用量 [53, 54]) も使用される。従って、ワクチンは、1インフルエンザ株あたり0.1 µgと150 µgの間、好ましくは、0.1 µgと50 µgの間、例えば、0.1 µg ~ 20 µg、0.1 µg ~ 15 µg、0.1 µg ~ 10 µg、0.1 µg ~ 7.5 µg、0.5 µg ~ 5 µgなどのHAを含むことがある。具体的な用量としては、例えば、1株あたり約45、約30、約15、約10、約7.5、約5、約3.8、約3.75、約1.9、約1.5などが挙げられる。

#### 【0139】

本発明で使用されるインフルエンザ株は、野生型ウイルスにおいて見いだされるような天然HAを有することもあり、または修飾HAを有することもある。例えば、ウイルスを鳥種において高病原性にさせる決定因子 (例えば、HA1/HA2切断部位周辺の高塩基性領域) を除去するようにHAを修飾することは公知である。逆遺伝学の使用は、そのような修飾を助長する。

#### 【0140】

ワクチンに使用するためのインフルエンザウイルス株は、流行期ごとに変わる。汎流行期間では、ワクチンは、代表的に2つのインフルエンザA型株 (H1N1およびH3N2) と1つのインフルエンザB型株とを含み、三価ワクチンが典型的である。本発明は、汎流行ウイルス株 (すなわち、ワクチンレシピエントおよび一般ヒト集団が免疫学的にナীবである株、特にインフルエンザA型ウイルス)、例えばH2、H5、H7またはH9サブタイプ株、も使用することができ、汎流行株のためのインフルエンザワクチンは、一価であることもあり、または汎流行株が補足された通常の三価ワクチンに基づくこともある。しかし、流行期に、およびワクチンに含まれる抗原の性質に依存して、本発明は、HAサブタイプ、H1、H2、H3、H4、H5、H6、H7、H8、H9、H10、H11、H12、H13、H14、H15またはH16のうちの1つ以上から防護することができる。本発明は、インフルエンザA型ウイルスのNAサブタイプN1、N2、N3、N4、N5、N6、N7、N8またはN9のうちの1つ以上から防護することができる。

#### 【0141】

本発明の組成物は、インフルエンザA型ウイルスおよび/またはインフルエンザB型ウイルスを含めて、1つ以上 (例えば、1、2、3、4以上) のインフルエンザウイルス株からの抗原 (単数または複数) を含むことができる。ワクチンが1つより多くのインフルエンザ株を含む場合、代表的に、異なる株を別々に成長させ、それらを、ウイルスを回収して抗原を調製した後、混合する。従って、本発明のプロセスは、1つより多くのインフルエンザ株からの抗原を混合する工程を含むことがある。2つのインフルエンザA型ウイルス株および1つのインフルエンザB型ウイルス株からの抗原を含む、三価ワクチンが典型的である。2つのインフルエンザA型ウイルス株および2つのインフルエンザB型ウイルス株、または3つのインフルエンザA型ウイルス株および1つのインフルエンザB型ウイルス株からの抗原を含む、四価ワクチンも有用である [55]。

#### 【0142】

一旦、インフルエンザウイルスを特定の株について精製したら、それを他の株からのウイルスと組み合わせ、例えば、上で説明したような三価ワクチンを作製することができる。ウイルスを混合し、多価混合物からのDNAを分解するのではなく、各株を別々に処理し、そして一価バルクを混合して最終多価混合物を得ることが好ましい。

#### 【0143】

一般

用語「含むこと (comprising)」は、「含むこと (including)」および「からなる」を包含する。例えば、Xを「含む」組成物は、Xから排他的に成ることがあり、または追加の何かを含むことがある (例えば、X + Y)。

#### 【0144】

語「実質的に」は、「完全に」を除外しない。例えば、Yを「実質的に含まない」組成

10

20

30

40

50

物は、Yを完全に含まないもある。必要とされる場合、語「実質的に」は本発明の定義から省略されることがある。

【0145】

数値xに関連して、用語「約」は、必要に応じたものであり、例えば $x \pm 10\%$ を意味する。

【0146】

明確に言及されない限り、2つ以上の成分を混合する工程を含むプロセスは、いずれの特定の混合順序も求めない。従って、任意の順序で混合することができる。3成分がある場合には、2成分を互いに併せることができ、その後、その併せたものを第三の成分と併せてもよい、等々。

10

【0147】

動物（および特にウシ）材料を細胞の培養で使用する場合、伝染性海綿状脳症（TSE）が無いおよび特にウシ海綿状脳症（BSE）の無い源からそれらを得るべきである。一般的に、動物由来材料がまったく無い細胞を培養することが好ましい。

【0148】

化合物を組成物の一部として身体に投与する場合には、代替的にその化合物を適するプロドラッグで置換してもよい。

【0149】

細胞基質を（例えば、再集合または逆遺伝学のために）使用する場合、好ましくは、それは、例えば欧州薬局方総則（Ph Eur general chapter）5.2.3におけるような、ヒトワクチン生産における使用が認可されているものである。

20

したがって、本発明は、以下の項目を提供する：

（項目1）

微生物含有試料を処理するためのまたは微生物を含有する危険のある試料を処理するためのプロセスであって、該試料を多官能性有機ペルオキシドと接触させる工程を包含する、プロセス。

（項目2）

核酸を含有する試料を処理するためのプロセスであって、該試料を多官能性有機ペルオキシドと接触させて該核酸を分解する工程を包含する、プロセス。

（項目3）

薬学的組成物を調製するための方法であって、該方法は、（i）微生物含有試料と多官能性有機ペルオキシドとを接触させて、該試料中の微生物を不活化する工程；（ii）工程（i）の生成物から薬学的組成物を調製する工程を包含する、方法。

30

（項目4）

多官能性有機ペルオキシドの水溶液であって、該多官能性有機ペルオキシドが（a）1重量%未満または（b）5重量%～70重量%の間のいずれかの濃度で存在するものである水溶液。

（項目5）

（i）不活化された微生物と（ii）1重量%未満の多官能性有機ペルオキシドとを含む水性組成物。

40

（項目6）

微生物と多官能性有機ペルオキシドとの反応生成物を含む水性組成物。

（項目7）

上記試料が、容器の表面または作業場の表面である、項目1に記載のプロセス。

（項目8）

上記微生物含有試料が、溶解状態の核酸も含む、項目1に記載のプロセスまたは項目3に記載の方法。

（項目9）

上記試料が、細胞培養物から得られ、および上記核酸が、該細胞培養物からの細胞DNAである、項目2もしくは項目8に記載のプロセスまたは項目8に記載の方法。

50

(項目 10)

上記試料がウイルスを含有する、上記いずれかの項目に記載のプロセス、方法、溶液または組成物。

(項目 11)

上記試料が、無エンベロープDNAウイルスを含有する、項目10に記載のプロセス、方法、溶液または組成物。

(項目 12)

上記多官能性有機ペルオキシドが、 $-O-O-H$ 基を含む、上記いずれかの項目に記載のプロセス、方法、溶液または組成物。

(項目 13)

上記多官能性有機ペルオキシドが、ジェミナルペルオキシドである、上記いずれかの項目に記載のプロセス、方法、溶液または組成物。

(項目 14)

上記多官能性有機ペルオキシドが、2つ、3つまたは4つのペルオキシド基を有する、上記いずれかの項目に記載のプロセス、方法、溶液または組成物。

(項目 15)

上記多官能性有機ペルオキシドが、ジェミナルビスヒドロペルオキシドである、上記いずれかの項目に記載のプロセス、方法、溶液または組成物。

(項目 16)

上記多官能性有機ペルオキシドが、ホモ二官能性である、上記いずれかの項目に記載のプロセス、方法、溶液または組成物。

(項目 17)

上記多官能性有機ペルオキシドが、水溶性である、上記いずれかの項目に記載のプロセス、方法、溶液または組成物。

(項目 18)

上記多官能性有機ペルオキシドが、ハロゲンを含まない、上記いずれかの項目に記載のプロセス、方法、溶液または組成物。

(項目 19)

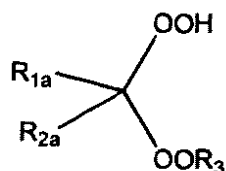
上記多官能性有機ペルオキシドが、炭素、水素および酸素のみから成る、上記いずれかの項目に記載のプロセス、方法、溶液または組成物。

(項目 20)

上記多官能性有機ペルオキシドが、300未満の分子量を有する、上記いずれかの項目に記載のプロセス、方法、溶液または組成物。

(項目 21)

上記多官能性有機ペルオキシドが、式I：  
【化8】



を有し、式中、

$R_{1a}$  は、 $H$ 、 $C_{1-6}$  アルキル、 $C_{2-6}$  アルケニル、 $C_{1-6}$  アルキニル、 $C_{1-6}$  - アルコキシ、 $C_{2-6}$  - アルケニルオキシ、 $C(O)H$ 、 $C(O)C_{1-6}$  アルキル、 $C(O)OC_{1-6}$  アルキル、場合により  $N$  - モノもしくは  $N$  - ジ  $C_{1-6}$  アルキル化アミノ、場合により  $N$  - モノもしくは  $N$  - ジ  $C_{1-6}$  アルキル化アミノカルボニル、 $S(O)_0-2 C_{1-6}$  アルキル、ヘテロシクロアルキル、アリールまたはヘテロアリールであり；

10

20

30

40

50

$R_{2a}$  は、 $H$ 、 $C_{1-6}$  アルキル、 $C_{2-6}$  アルケニル、 $C_{1-6}$  アルキニル、 $C_{1-6}$  - アルコキシ、 $C_{2-6}$  - アルケニルオキシ、 $C(O)H$ 、 $C(O)C_{1-6}$  アルキル、 $C(O)OC_{1-6}$  アルキル、場合により  $N$  - モノもしくは  $N$  - ジ  $C_{1-6}$  アルキル化アミノ、場合により  $N$  - モノもしくは  $N$  - ジ  $C_{1-6}$  アルキル化アミノカルボニル、 $S(O)_{0-2}C_{1-6}$  アルキル、ヘテロシクロアルキル、アリーールまたはヘテロアリーール、 $-(CR_4R_5)_nCR_6(OOH)_2$  であるか、あるいは  $R_{2a}$  は、 $L$  によって  $R_{2b}$  に連結されており；

$R_3$  は、 $H$  または  $C(OOH)R_{1b}R_{2b}$  であり、

$R_{1b}$  は、 $H$ 、 $C_{1-6}$  アルキル、 $C_{2-6}$  アルケニル、 $C_{1-6}$  アルキニル、 $C_{1-6}$  - アルコキシ、 $C_{2-6}$  - アルケニルオキシ、 $C(O)H$ 、 $C(O)C_{1-6}$  アルキル、 $C(O)OC_{1-6}$  アルキル、場合により  $N$  - モノもしくは  $N$  - ジ  $C_{1-6}$  アルキル化アミノ、場合により  $N$  - モノもしくは  $N$  - ジ  $C_{1-6}$  アルキル化アミノカルボニル、 $S(O)_{0-2}C_{1-6}$  アルキル、ヘテロシクロアルキル、アリーールまたはヘテロアリーールであり；

$R_{2b}$  は、 $H$ 、 $C_{1-6}$  アルキル、 $C_{2-6}$  アルケニル、 $C_{1-6}$  アルキニル、 $C_{1-6}$  - アルコキシ、 $C_{2-6}$  - アルケニルオキシ、 $C(O)H$ 、 $C(O)C_{1-6}$  アルキル、 $C(O)OC_{1-6}$  アルキル、場合により  $N$  - モノもしくは  $N$  - ジ  $C_{1-6}$  アルキル化アミノ、場合により  $N$  - モノもしくは  $N$  - ジ  $C_{1-6}$  アルキル化アミノカルボニル、 $S(O)_{0-2}C_{1-6}$  アルキル、ヘテロシクロアルキル、アリーールまたはヘテロアリーールであるか、あるいは  $R_{2b}$  は、 $L$  によって  $R_{2a}$  に連結されており；

$R_4$  は、各出現時、 $H$  または  $C_{1-3}$  アルキル、ヒドロキシル、シアノ、ニトロ、 $C_{2-4}$  - アルケニル、 $C_{1-3}$  - アルコキシ、 $C_{2-4}$  - アルケニルオキシ、 $C_{1-3}$  - アルキルカルボニル、カルボキシ、 $C_{1-6}$  - アルコシカルボニル、場合により  $N$  - モノもしくは  $N$  - ジ  $C_{1-3}$  アルキル化アミノカルボニル、 $C_{1-3}$  - チオアルキル、 $C_{1-3}$  - アルキルスルフィニル、 $C_{1-3}$  - アルキルスルホニル、 $C_{1-3}$  - アルキルアミノスルホニルおよび  $C_{1-3}$  - アルキルアミノスルホニルから選択され；

$R_5$  は、各出現時、 $H$  または  $C_{1-3}$  アルキル、ヒドロキシル、シアノ、ニトロ、 $C_{2-4}$  - アルケニル、 $C_{1-3}$  - アルコキシ、 $C_{2-4}$  - アルケニルオキシ、 $C_{1-3}$  - アルキルカルボニル、カルボキシ、 $C_{1-6}$  - アルコシカルボニル、場合により  $N$  - モノもしくは  $N$  - ジ  $C_{1-3}$  アルキル化アミノカルボニル、 $C_{1-3}$  - チオアルキル、 $C_{1-3}$  - アルキルスルフィニル、 $C_{1-3}$  - アルキルスルホニル、 $C_{1-3}$  - アルキルアミノスルホニルおよび  $C_{1-3}$  - アルキルアミノスルホニルから選択され；

$L$  は、 $C_{1-8}$  アルキレンであり；

$R_6$  は、 $H$ 、 $C_{1-6}$  アルキル、 $C_{2-6}$  アルケニル、 $C_{1-6}$  アルキニル、 $C_{1-6}$  - アルコキシ、 $C_{2-6}$  - アルケニルオキシ、 $C(O)H$ 、 $C(O)C_{1-6}$  アルキル、 $C(O)OC_{1-6}$  アルキル、場合により  $N$  - モノもしくは  $N$  - ジ  $C_{1-6}$  アルキル化アミノ、場合により  $N$  - モノもしくは  $N$  - ジ  $C_{1-6}$  アルキル化アミノカルボニル、 $S(O)_{0-2}C_{1-6}$  アルキル、ヘテロシクロアルキル、アリーールまたはヘテロアリーールであり；

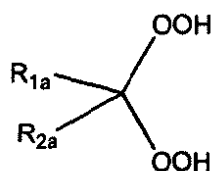
$n$  は、 $1 \sim 8$  である、

上記いずれかの項目に記載のプロセス、方法、溶液または組成物。

(項目 22)

上記多官能性有機ペルオキシドが、式 II：

【化 9】



10

20

30

40

50

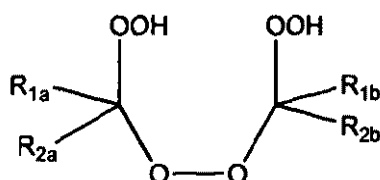
を有する、項目 2 1 に記載のプロセス、方法、溶液または組成物。

(項目 2 3)

$R_{1a}$  が、H または  $CH_3$  であり；および  $R_{2a}$  が、 $CH_3$ 、Et または  $n-Pr$  である、項目 2 2 に記載のプロセス、方法、溶液または組成物。

(項目 2 4)

上記多官能性有機ペルオキシドが、式 I I I :



10

を有する、項目 2 1 に記載のプロセス、方法、溶液または組成物。

(項目 2 5)

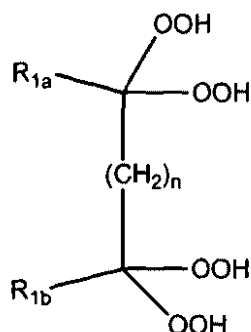
$R_{1a}$  が、H または  $CH_3$  であり； $R_{2a}$  が、 $CH_3$ 、Et、もしくは  $n-Pr$  であるか、または  $R_{2a}$  が、L によって  $R_{2b}$  に連結されており； $R_{1b}$  が、H または  $CH_3$  であり； $R_{2b}$  が、 $CH_3$ 、Et、 $n-Pr$  であるか、または  $R_{2b}$  が、L によって  $R_{2a}$  に連結されており；および L が、 $-(CH_2)_3-$  である、項目 2 4 に記載のプロセス、方法、溶液または組成物。

20

(項目 2 6)

上記多官能性有機ペルオキシドが、式 I V :

【化 1 1】



30

を有する、項目 2 1 に記載のプロセス、方法、溶液または組成物。

(項目 2 7)

$R_{1a}$  が、H であり； $R_{1b}$  が、H であり；および n が、3 である、項目 2 6 に記載のプロセス、方法、溶液または組成物。

40

(項目 2 8)

$R_{1a}$  および  $R_{2a}$  が、同一である；および / または

$R_{1a}$  および  $R_{2b}$  が、同一である；および / または

$R_{2a}$  および  $R_{2b}$  が、同一である、

項目 1 7 ~ 2 3 のいずれか一項に記載のプロセス、方法、溶液または組成物。

(項目 2 9)

$R_{1a}$  が、H もしくは  $C_{1-4}$  アルキルである；および / または

$R_{2a}$  が、H もしくは  $C_{1-4}$  アルキルもしくは  $-(CH_2)_nCH(OOH)_2$  であるか、または L によって  $R_{2b}$  に連結されている；および / または

$R_{1b}$  が、H もしくは  $C_{1-4}$  アルキルである；および / または

50

$R_{2b}$  が、 $C_{1-4}$  アルキルであるか、もしくは  $L$  によって  $R_{2a}$  に連結されている。従って  $R_{2b}$  が、 $CH_3$ 、 $Et$  もしくは  $n-Pr$  であり得る；および / または  
各  $R_4$  が、 $H$  もしくは  $CH_3$  である；および / または  
各  $R_5$  が、 $H$  もしくは  $CH_3$  である；および / または  
 $L$  が、 $C_{2-5}$  アルキレンである；および / または  
 $R_6$  が、 $H$  もしくは  $C_{1-4}$  アルキルである；および / または  
 $n$  が、 $2 \sim 6$  である、

項目 2 1 ~ 2 8 のいずれか一項に記載のプロセス、方法、溶液または組成物。

(項目 3 0)

$R_{1a}$  が、 $H$  または  $CH_3$  であり； $R_{2a}$  が  $CH_3$ 、 $Et$ 、 $n-Pr$  もしくは  $-(CH_2)_nCH(OOH)_2$  であるか、または  $R_{2a}$  が、 $L$  によって  $R_{2b}$  に連結されており； $R_3$  が、 $H$  または  $C(OOH)R_{1b}R_{2b}$  であり； $R_{1b}$  が、 $H$  または  $CH_3$  であり； $R_{2b}$  が、 $CH_3$ 、 $Et$  もしくは  $n-Pr$  であるか、または  $R_{2b}$  が、 $L$  によって  $R_{2a}$  に連結されており； $L$  が、 $-(CH_2)_3-$  であり；および  $n$  が、 $3$  である、項目 2 1 ~ 2 9 のいずれか一項に記載のプロセス、方法、溶液または組成物。

10

(項目 3 1)

上記多官能性有機ペルオキシドが、図 1 に示す式を有する、上記いずれかの項目に記載のプロセス、方法、溶液または組成物。

(項目 3 2)

上記多官能性有機ペルオキシドが、 $2, 2'$ -ジヒドロペルオキシ- $2, 2'$ -ジブチルペルオキシド； $2, 2$ -ジヒドロペルオキシブタン； $1, 1$ -ジヒドロペルオキシメタン； $1, 1$ -ジヒドロペルオキシプロパン； $1, 1$ -ジヒドロ-ペルオキシブタン； $1, 1'$ -ジヒドロペルオキシ- $1, 1'$ -ジプロピルペルオキシド； $1, 1'$ -ジヒドロペルオキシ- $1, 1'$ -ジブチルペルオキシド； $1, 1'$ -ジヒドロペルオキシ- $1, 1'$ -ジエチルペルオキシド； $1, 1, 5, 5$ -テトラヒドロペルオキシペンタン； $3, 7$ -ビス-ヒドロペルオキシ- $1, 2$ -ジオキセパン；および  $1, 1$ -ジヒドロペルオキシエタンから成る群より選択される、上記いずれかの項目に記載のプロセス、方法、溶液または組成物。

20

(項目 3 3)

上記多官能性有機ペルオキシドが、 $0.01\% \sim 0.25\%$  の間の濃度で使用される、上記いずれかの項目に記載のプロセス、方法、溶液または組成物。

30

(項目 3 4)

上記多官能性有機ペルオキシドが、 $0 \sim 50$  の間の温度で使用される、上記いずれかの項目に記載のプロセス、方法、溶液または組成物。

(項目 3 5)

上記多官能性有機ペルオキシドが、 $0.25$  時間 ~  $72$  時間にわたり、不活化のために使用される、上記いずれかの項目に記載のプロセス、方法、溶液または組成物。

(項目 3 6)

残存するまたは過剰なペルオキシドが、上記試料の処理後に除去される、上記いずれかの項目に記載のプロセス。

40

(項目 3 7)

除去が、還元剤を用いるものである、項目 3 6 に記載のプロセス。

(項目 3 8)

上記還元剤が、アスコルビン酸または還元糖である、項目 3 7 に記載のプロセス。

【図面の簡単な説明】

【0150】

【図 1】図 1 は、本発明の様々な不活化剤の構造を示す。

【図 2】図 2 ~ 4 は、時（図 2 および 3 では時間；図 4 では日）の経過につれての DME 中の薬剤 069-1 の含有率（％）を示す。矢印は、不活化剤（アスコルビン酸または

50



グルコース)の添加を示す。

【図3】図2～4は、時(図2および3では時間;図4では日)の経過につれてのDME M中の薬剤069-1の含有率(%)を示す。矢印は、不活化剤(アスコルビン酸またはグルコース)の添加を示す。

【図4】図2～4は、時(図2および3では時間;図4では日)の経過につれてのDME M中の薬剤069-1の含有率(%)を示す。矢印は、不活化剤(アスコルビン酸またはグルコース)の添加を示す。

【発明を実施するための形態】

【0151】

公知の不活化剤

10

公知不活化剤( - プロピオラクトン、エチレンイミン、N - アセチルエチレンイミン、ホルマリン)を4つのウイルス:(i)エンベロープが無く、dsRNAゲノムを有する、3型レオウイルス;(ii)エンベロープを有し、dsDNAゲノムを有する、HSV-1ヘルペスウイルス;(iii)エンベロープが無く、dsDNAゲノムを有する、アデノウイルス5;および(iv)エンベロープを有し、ssRNAゲノムを有する、鳥類C型レトロウイルスについて試験した。レオウイルスは、二重カプシド層を有する小さな無エンベロープウイルスであり、そのようなウイルスは、不活化(それらに勝るのは結核菌および細菌孢子だけである[56])に対して非常に耐性である。

【0152】

結果を処理後のウイルス力価の $\log_{10}$ 低減率( $\log_{10}$  reduction factor)として表1に表示する:

20

【0153】

【表 1】

ウイルス	不活化	低減	
(i)	BPL、0.05%、16時間、2-8℃(その後、BPLを除去するために37℃で3時間)	2.3-3.8	
	エチレンイミン、0.05%、16時間、2-8℃(その後、37℃で3時間)	0.65	
	NAc-エチレンイミン、0.05%、16時間、2-8℃(その後、37℃で3時間)	1.15	
	37%ホルムアルデヒド 0.05%、16時間、2-8℃	~0	10
	37%ホルムアルデヒド 0.05%、3日、2-8℃	0.9	
	37%ホルムアルデヒド 0.05%、6日、2-8℃	1.55	
	37%ホルムアルデヒド 0.05%、17時間、19-23℃	1.7	
	37%ホルムアルデヒド 0.05%、24時間、19-23℃	2.1	
(ii)	BPL、0.05%、16時間、2-8℃(その後、BPLを除去するために37℃で3時間)	4.5	
	37%ホルムアルデヒド 0.05%、3日、2-8℃	2.8	
	37%ホルムアルデヒド 0.05%、6日、2-8℃	2.95	
	37%ホルムアルデヒド 0.05%、17時間、19-23℃	2.95	20
	37%ホルムアルデヒド 0.05%、24時間、19-23℃	3.25	
(iii)	BPL、0.05%、16時間、2-8℃(その後、BPLを除去するために37℃で3時間)	2.7	
	37%ホルムアルデヒド 0.05%、3日、2-8℃	≥3.4, ≤6.65	
	37%ホルムアルデヒド 0.05%、6日、2-8℃	≥3.4, ≤6.65	
	37%ホルムアルデヒド 0.05%、17時間、19-23℃	≥6.65	
	37%ホルムアルデヒド 0.05%、24時間、19-23℃	≥6.65	
(iv)	BPL、0.05%、16時間、2-8℃(その後、BPLを除去するために37℃で3時間)	≥5.15, ≤7.15	30
	37%ホルムアルデヒド 0.05%、16-24時間、16℃	0.6-1.0	
	37%ホルムアルデヒド 0.05%、16-24時間、20℃	1.3-1.8	
	37%ホルムアルデヒド 0.05%、16-24時間、24℃	1.5-2.2	

これらのデータは、ヒトワクチンに使用した2つの主要な不活化剤(BPLおよびホルムアルデヒド)はすべての必要性を満たすことができないことを示す。安定したウイルスの低レベルの感染性でさえ、材料が下流での使用に(例えば、診断試薬として、またはワクチンもしくは他の医薬製品として)安全でない場合があることを意味する。

## 【0154】

## 新規な不活化剤

その安定性のため、レオウイルスモデルを樹立して、新規不活化剤の活性を評価した。哺乳動物オルトレオウイルス、3型(Dearing株、ATCC VR-824)をL929マウス結合組織細胞(ATCC Cl-1)において成長させた。感染培養物の細胞を含まない培養上清からウイルスストックを作製し、アリコートに分け、その後、-60℃未満で保管した。不活化研究のためにウイルスを解凍し、その後、0.05%不活化剤を添加し(体積で1:2000)、その混合物を、ある一定の期間、低温(2-8℃)、室温(19-23℃と測定された)または37℃でインキュベートした。BPLとの比較を可能にするために、(i)不活化反応を一時的に37℃に上昇させ、(ii)チオ硫酸ナトリウムを不活化終了時に添加した(1mLの不活化溶液につき20μLの1.

40

50

4 Mストック溶液)。その後、標準的な力価測定 ( t i t r a t i o n ) により試料を残留感染性ウイルスについて試験した。ウイルス調製物の10倍系列希釈物をマイクロタイタープレート(L929培養物)に接種した。成長ウイルスは、5~6日後、顕微鏡により見ることができる細胞変性効果を生じさせる。力価をスピアマン・カーバー法 ( S p e a r m a n - K a e r b e r m e t h o d ) によって計算した[57]。それを1 mLあたりの  $\log_{10} \text{TCID}_{50}$  として表現する。残留力価が検出限界 ( 1 mLあたり  $1.5 \log_{10} \text{TCID}_{50}$  ) より下である場合、それらを、対照試料力価と  $1.5$  と間の差として表現する。そのような低減を「」記号によって示す。

【0155】

第二の試験ではインフルエンザウイルスを使用した。それはレオウイルスより安定性が低い。本質的にはレオウイルスについて説明したようにウイルス力価測定を行ったが、L929ではなくMDCK細胞を用いた。加えて、そのエンベロープ赤血球凝集素糖タンパク質 ( 重要なワクチン免疫原 ) の安定性を評価した。赤血球凝集試験によってそれを機能的にアッセイすることができる。定量的HAアッセイのために、ウイルス調製物をPBSで系列希釈 (  $\log_2$  希釈 ) し、PBS中の0.5%ニワトリ赤血球と共にインキュベートした。周囲温度でのインキュベーション後、HA反応を評価した。明確な赤血球凝集を依然として生じさせる最高ウイルス希釈度の逆数として活性を表現し、不活化前および後の力価として結果を示す。

【0156】

図1および/または表18からの番号付けで、様々な不活化剤を試験した。すべてが0.05%の濃度であった。混合物を使用したときはこれが総不活化剤濃度である。レオウイルスでの結果は次のとおりであった ( 表2 ) :

【0157】

10

20

【表 2】

不活化剤	条件	低減	
BPL	16時間、2－8℃；その後、37℃で3時間	2.5	
054	16時間、2－8℃；その後、37℃で3時間	≥3.8 *	
069-1	16時間、2－8℃；その後、37℃で3時間	≥6.9	
069-1	24時間、19－23℃	≥7.0	
079	16時間、2－8℃；その後、37℃で3時間	3.5	
079	24時間、19－23℃	4.5	
070-1	16時間、2－8℃；その後、37℃で3時間	5.0	10
070-1	24時間、19－23℃	5.8	
070-1	48時間、19－23℃	5.5	
070-1	16時間、37℃	7.65	
070-1	24時間、37℃	≥7.9	
077	24時間、19－23℃	≥7.7	
071-1	16時間、2－8℃；その後、37℃で3時間	4.0	
078	24時間、19－23℃	3.3－5.4	
078	16時間、37℃	≥7.75	20
058-1	16時間、2－8℃；その後、37℃で3時間	3.5	
056-1	16時間、2－8℃；その後、37℃で3時間	3.3	
080	16時間、2－8℃；その後、37℃で3時間	≥6.9	
比較のため(単一のペルオキシド化合物)			
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	16時間、2－8℃；その後、37℃で3時間	0.45	
072	16時間、2－8℃；その後、37℃で3時間	0.9	

\* 残留細胞毒性がウイルス力価測定に干渉し、完全な不活化能力の評価ができなかった。

前の結果でわかるように、B P L 数値は、レオウイルス不活化が困難であることを裏付ける。複数のペルオキシドを有するすべての不活化剤は、B P L より（および前の実験でのホルムアルデヒドより）良好な不活化をもたらした。単一のペルオキシドを有する化合物（072）は、不良に機能した。より短い鎖長を有する（C4より低い）化合物は、最良の結果をもたらした。温度が高いほど良好な結果をもたらしたが、37℃での長いインキュベーションは、良好な熱安定性を有することができない抗原には理想的でない。より高温でより短時間が最適だろう。

【0158】

インフルエンザウイルスでの結果は次のとおりであった（表3）：

【0159】

【表 3 - 1】

不活化剤	条件	低減	HA 前／後
BPL	16時間、2－8℃；その後、37℃で3時間	$\geq 7.15$	1024 / 1024
069-1	16時間、2－8℃；その後、37℃で3時間	$\geq 7.1$	1024 / 1024
079	16時間、2－8℃；その後、37℃で3時間	$\geq 7.1$	1024 / 1024
079	24時間、19－23℃	$\geq 6.9$	1024 / 1024
070-1	16時間、2－8℃；その後、37℃で3時間	$\geq 7.0$	1024 / 1024
077	24時間、19－23℃	$\geq 7.1$	1024 / 1024
071-1	16時間、2－8℃；その後、37℃で3時間	5.0	1024 / 1024
078	24時間、19－23℃	5.75	1024 / 1024
058-1	16時間、2－8℃；その後、37℃で3時間	$\geq 7.15$	1024 / 1024
056-1	16時間、2－8℃；その後、37℃で3時間	$\geq 7.15$	1024 / 1024
080	16時間、2－8℃；その後、37℃で3時間	7.0	1024 / 1024

10

このように、検出限界より下へのインフルエンザウイルスの不活化が慣例的に達成された。さらにまた、より短い鎖長を有する化合物は最良の結果をもたらし、長い鎖長を有する分子、例えば 0 7 1 - 1、0 7 8 および 0 8 0、ほど低い不活化能力を有した。さらに、すべての場合、および不活化温度にかかわらず、赤血球凝集力価は不活化による影響を受けなかった。これは、表面糖タンパク質の抗原性が無損傷のままであることを示す。

20

## 【0 1 6 0】

安定した無エンベロープウイルス・細菌での結果は、成功裏の細菌の不活化も期待できることを意味する。1968年、Spauldingは、化学的不活化および消毒に対する耐性のレベルを定義した[56]。この格付けによると、細菌（一部のマイコバクテリアおよび胞子を除く）は、裸の（非脂質性）ウイルスより化学的不活化に対する耐性が低い。この格付けは、何十年も前に確立されたが、未だに有効かつ適用可能である[58]。従って、安定した無エンベロープウイルスに対する効力は、細菌もこれらの化合物によって不活化できることを意味する。

## 【0 1 6 1】

30

不活化剤 0 6 9 - 1 の不活化能力をさらなるウイルスに対して試験した。これらの研究では、濃度、時間および温度を変化させて、不活化に適する条件をさらに評価した。力価測定法の検出限界（ $10^{-1.5}$  TCID<sub>50</sub> / mL）より下への完全な不活化が観察された場合、より低い検出限界を有する残留ウイルスについての試験を部分的に行った。ウイルスに関して陰性の場合、そのような「残留ウイルス試験」の結果は、1 mL の不活化試料あたりのそれぞれの検出限界を示すことによって得られる。これらの検出限界は、試験培養物に接種される試料体積に依存する。10 mL の試料体積について、 $10^{-1.5}$  TCID<sub>50</sub> / mL という検出限界を得、1 mL の試料体積について、それぞれの検出限界は、 $10^{-0.5}$  TCID<sub>50</sub> / mL であり、0.1 mL の試料体積については、 $10^{0.5}$  TCID<sub>50</sub> / mL であった。

40

## 【0 1 6 2】

試験培養物中の残留細胞毒性（試験培養物中の細胞剥離または細胞死の初期徴候によって示される）が、信頼できる力価読み取りを損なわせた場合、それらの力価測定希釈度（titration dilution）を評価しなかった。したがって、陰性力価測定の場合、適用可能な検出限界は、より高く、例えば、 $10^{2.5}$  TCID<sub>50</sub> / mL であった。不活化剤およびアスコルビン酸の残留物を有する接種材料が、試験培養物上に残っている場合、最低力価測定希釈度で細胞毒性反応がある程度観察された。より大きな試料体積での残留ウイルス試験では、より大きな培養物を使用したので細胞毒性効果は観察されず、37℃で1時間のウイルスを吸着させた後に接種材料を除去し、中性緩衝液または培地で培養物を洗い流して（flush）残留化学物質を除去した。

50

## 【 0 1 6 3 】

その後、 $\log_{10}$  低減値を、出発力価（同じ条件に曝露したが、不活化剤なしで緩衝液を添加した「保留試料（hold sample）」を用いて測定した）と不活化後の残留力価との差として計算した。「」符号を有する不活化率は、適用した方法の検出限界より下への完全な不活化を示す。その記号のない不活化率は、残留ウイルスの存在を示す。

## 【 0 1 6 4 】

次の表は、ウイルス力価測定のためにおよびより大きい試料体積を用いる必要に応じた残留ウイルス試験のために使用したウイルスおよび利用した細胞培養物を示す。この表は、細胞およびウイルスの起源についての情報も提供し、細胞培養物接種とウイルス力価決定との間のインキュベーション期間（日）にも言及する。3%～5%ウシ胎仔血清を補足したDMEM（ダルベッコ変性イーグル培地）で細胞培養物を成長させた。5%CO<sub>2</sub> および90%湿度を含有する雰囲気下、37℃で、試験培養物をインキュベートした。

## 【 0 1 6 5 】

## 【表 3 - 2】

細胞タイプ	ウイルス	インキュベーション(日)
MDCK 33016 (DSM ACC2219)	インフルエンザウイルス。異なるインフルエンザ株の部分的に精製したウイルス調製物: A/Brisbane/59/2007[H1N1] A/California//7/2009[H1N1]、リアソータントX-179A A/Uruguay/716/2007[H3N2]、リアソータントNYMC X-175 C B/Brisbane/3/2007	4 - 5
L929 (ATCC CCL-1)	レオウイルス3:Dearing株、ATCC VR-824 MVM(マウス微小ウイルス、パルボウイルス):Crawford株、ATCC VR-663	5 - 7 9 - 10
MRC-5 (ATCC CCL-171)	BK-ウイルス(ポリオーマウイルス);ATCC VR-837	10 - 12
RD-A (WHOのEuropean Reference Center for Enteroviruses)	ECHO-ウイルス6(ピコルナウイルス):ドイツ、ベルリン、Robert-Koch-Institute、the Reference-Center for Poliomyelitis and Enterovirusesから入手した、D'Amori株 コクサッキーA16(ピコルナウイルス):ドイツ、ベルリン、Robert-Koch-Institute、the Reference-Center for Poliomyelitis and Enterovirusesから入手した、G-10株	3 - 5 3 - 5
Vero WHO (ECACCによって頒布されている、VeroのWHO株)	アデノウイルス6:分離株524/90:ドイツ、ベルリン、Robert-Koch-Institute、Clinical Virologyから入手した臨床分離株。血清学的におよびPCRによって正体を確認。 狂犬病ウイルスFlury LEP:Novartis Vaccine株。(蛍光標識された特異的抗体での免疫染色によるウイルス検出) HSV-1(単純ヘルペスウイルス1):ET株、所有分離株。独立したPCRによって正体を確認。 パラインフルエンザ3型ウイルス:ATCC VR-93	8 - 10 4 - 5 7 - 8 5 - 6

不活化剤0.69 - 1を0.025、0.05または0.1%（体積/体積）最終濃度の濃度で添加し、示した期間にわたってインキュベートした。所定の時点で不活化を停止させるために、0.2%の最終濃度を得るようにL + アスコルビン酸を添加した。この停止剤は、100 mLの蒸留滅菌水中の20 g L + アスコルビン酸を含有する20%ストッ

ク溶液として調製した。その後、その溶液を  $0.2 \mu\text{m}$  フィルターに通すことによって濾過滅菌した。

#### 【0166】

表4～13は、様々な濃度の薬剤069-1による、および種々の条件下での、種々のウイルスモデルの不活化を示す。これらのウイルスの大部分は、無エンベロープであり、ならびに化学的不活化剤によって、およびウイルス抗原性を保存するために適用される条件下で、容易に不活化されない安定したウイルスの代表である。二本鎖ウイルス（ヘルペスウイルス、レオウイルス、ポリオーマウイルス、アデノウイルス、およびポリオーマウイルス）を選択した。なぜなら、それらは、化学的不活化および他の処理条件に対する耐性がより高いからである。これらのウイルスの大部分は、生物製剤プロセス用のプロセスの不活化を検証するためのモデルウイルスとして使用されている [59]。

10

#### 【0167】

BPLによる種々のウイルスの不活化についてのデータを表14に提供する。表4～13のデータは、069-1が、殆どの場合、優れた不活化をもたらすことを示す。

#### 【0168】

不活化によって誘導される細胞DNA損傷の分析

細胞DNAに対する薬剤069-1の効果を、細胞培養産物またはインフルエンザ感染細胞不含MDCK培養産物（残留細胞DNAを含有）を該不活化剤に曝露すること、およびその後、市販の「DNA Damage Quantification Kit」（Biovision）を使用して脱塩基部位（APS）について抽出DNAを分析することによって測定した。このキットは、核酸の脱塩基部位のアルデヒド基と特異的に反応するアルデヒド反応性プローブ（ARP）を含有する。未結合ARPの除去後、DNAをマイクロタイター・プレート・ウエルに結合させ、ペルオキシダーゼ反応と呈色反応を発現する基質とによって標識部位を染色する。前記試験キットは、検量線の生成に使用するための標準物質も含有する。

20

#### 【0169】

DNA抽出は、Complex 800\_\_V4プロトコル（Qiagen）を用いてQIASymphony SP自動抽出でQIASymphony（登録商標）Virus Bacteria Mini Kitを使用して行った。260nmおよび280nmでの吸光度（adsorption value）に基づきNanoPhotometer（商標）で溶出試料のDNA濃度を決定した。その後、DNA Damage Quantification Kitのために、すべての試験試料をTris/EDTA（TE）緩衝液で $0.1 \mu\text{g/mL}$  DNAの最終濃度に希釈/調整した。TE緩衝液は、陰性対照としての役割を果たした。

30

#### 【0170】

DNA損傷およびAPSの測定は、前記試験キットの指示に従って行った。標準曲線の定量的試験範囲をはるかに超える強い反応のため、1つの試験試行のすべての標識および洗浄試料を同じ比で希釈することによってこれを補償するよう試みた。それにもかかわらず、信頼できる定量的試験範囲より上の極度の呈色反応は避け難かった。従って、 $10^5$ 塩基対あたり40APSの上部標準曲線範囲より上のAP部位の値は、それより下のものより信頼性が低いだろう。さらに、操作者による誤差または固有の試験不一致に起因すると考えることができない高い試験変動性も観察された。

40

#### 【0171】

しかし、インフルエンザウイルス感染細胞からのDNAは、種々のウイルス株を感染のために使用したとき特に高い変動性を示した。これは、アポトーシスの損傷DNAが、正常細胞DNAとは異なって反応し得ることを示している。それ故、試験を半定量的な比較方法で、ならびに参照およびコンパレーターとしてBPL不活化試料を含めることによって、試験を適用した。従って、定量的試験結果および絶対値（ $10^5$ 塩基対あたりのAPS）は、異なる試験間で比較すべきでなく、1つのおよび同じ試験試行の中で試験した異なる条件を比較するためにのみ使用すべきである。

50

## 【0172】

下に示すデータセットは、別々の表における1つの比較試験試行によって得られた結果を提供するものであり、同じ表中の異なる試験試行からの混合された結果を提供するものではない。直接比較に必要とされる場合を除き、試験キット・マイクロタイター・プレートへの吸着前の試料希釈を考慮しなかった。従って、異なる試験試行において試験した類似の条件について異なるAPS値を示すことがある。1より上のAPS値は、小数点のない丸めた数値として与えた。

## 【0173】

BPLの一般に適用される0.05%最終濃度を用いて不活化された試料により、BPL不活化からの比較結果を得た。不活化は、常に、BPLを低温ウイルス調製物に添加することおよび2～8で16時間インキュベートすることによって適用した。その後、温度を37に上昇させることおよびさらに2時間インキュベートすることによって、不活化を停止させた。37で、最初のうちは不活化が漸増速度で続き、同時にBPLが急速に分解される。従って、その上昇した温度はDNA損傷にも影響を及ぼすと予想され、および/または部分的に損傷したDNAに対する二次反応に寄与する。

10

## 【0174】

下の表に示す濃度および温度で16時間の標準不活化時間を用いて069-1での不活化を行った。アスコルビン酸の添加により不活化を停止させた。特定の研究のためおよび直接比較のためだけに、069-1での不活化を、BPLについて用いたようなインキュベーション条件、すなわち2～8で16時間、加えて37で2時間、にも供した。

20

## 【0175】

表15は、相対APS値を示す(1は未処理試料である)。3つの異なるインフルエンザ株(A/Christchurch/16/10 NIB-74、A/Brisbane/10/2010およびA/California/7/09 X-179A)で感染させた細胞上清からのDNAを使用した。A/Californiaを除き、DNA損傷は、BPLでより069-1でのほうが高く、濃度依存的であった。

## 【0176】

表16は、インフルエンザ感染細胞DNA(B/wisconsin/1/2010株)を、単回の不活化の場合の異なる濃度の069-1で処理したときの、または2回の逐次的不活化ラウンドで処理したときの、相対APS値を示す。観察されたDNA損傷は、より低濃度の069-1を使用したときでさえ、BPLよりも069-1でより強く、それらの効果は濃度依存的であった。この2回の不活化は、単回の不活化より強いDNA損傷を明確に生じさせた。

30

## 【0177】

表17は、インフルエンザ感染細胞DNA(B/Wisconsin/1/2010株)を先ずBPL(16時間、2～8、その後2時間、37)で処理し、続けて異なる濃度の069-1で不活化したときの相対APS値を示す。このシリーズでは、069-1も標準BPL不活化についてのものと同じ条件下で使用した。この不活化もアスコルビン酸によって停止させた。多少の注意を払うと(二重不活化試料は、すべて、試験の測定可能範囲より高く、従って、試験プレートへの吸着前に10倍希釈しなければならなかった)、DNA損傷は、BPLおよび069-1での二重処理によって明確に増加された。最初の低温相後の069-1についての不活化温度を、2時間、37へ上昇させることも、DNA損傷を大きく増進させた。明らかに、BPLによって引き起こされるDNA損傷を二回のBPL処理によってのみ増進させることができるわけではなく、BPLに加えて069-1などのヒドロペルオキシド不活化剤を使用することによってもさらにいっそう増進させることができる。

40

## 【0178】

合成および安定性

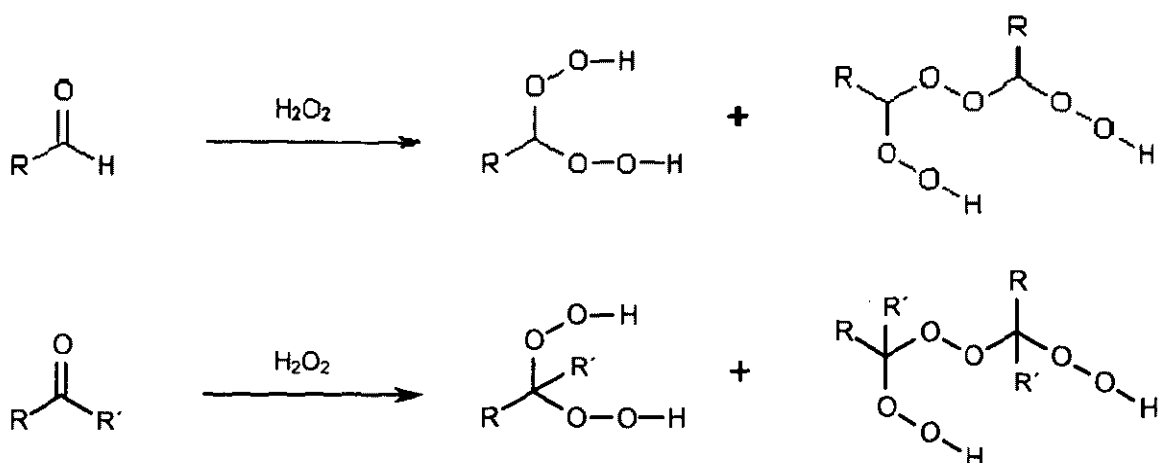
ジェミナルジヒドロペルオキシドの一般合成を、理想的には適する触媒の存在下で、次のように行うことができる：

50



【 0 1 7 9 】

【 化 5 】



10

この合成は、安定性によって制限され、構造に依存する。非常に高い酸素含有率（例えば、化合物 0 6 9 - 1 は 6 8 % 酸素を有する）にもかかわらず、一部の化合物は著しく安定しているが、それらは、取り扱いを間違えると自然爆発または分解する傾向があり得る。この効果は、アルキル側鎖を短くすることによって増加される。安全性考慮のため、それらの化合物を凍結水溶液または凍結固形物として供給するのが最良だろう。

20

【 0 1 8 0 】

0 5 7 の不活化能力は、- 2 0 での 6 ヶ月の保管後、喪失することが分かったので、新鮮なものを使用するのが最良である。同じことが他の化合物および / または混合物に言えることがある。

【 0 1 8 1 】

化合物の安定性を N M R によって評価した。結果は次のとおりである：

【 0 1 8 2 】

【 表 3 - 3 】

不活化剤	条件	分解
057	PBS: 16時間、2-8℃; その後、37℃で3時間	なし
057	PBS: 16時間、2-8℃; その後、37℃で10時間	なし
057	PBS: 6時間、25℃; その後、37℃で3時間	なし
057	PBS: チオ硫酸ナトリウムの添加	即時
070	PBS: 16時間、2-8℃; その後、37℃で3時間	40%
070	MEM: 24時間、5℃	<5%
070	MEM: 24時間、25℃	15%
070	MEM: 24時間、37℃	43%
071	PBS: 16時間、2-8℃; その後、37℃で3時間	なし
071	MEM: 24時間、5℃	11%
071	MEM: 24時間、25℃	15%
071	MEM: 24時間、37℃	30%

30

40

PBS=リン酸緩衝食塩水

MEM=イーグル最小必須培地

水性条件でのおよび特に培養培地中での 0 6 9 - 1 の安定性を研究するために N M R も用いた。これらの研究は、最高分解能 5 0 0 M H z N M R と D M E M 中の 0 . 1 % 0 6 9 - 1 を用いた。

【 0 1 8 3 】

50

図 2 は、非常に遅い分解を伴う、25 での安定性を示す。240 時間（10 日）後、25 % しか分解されなかった。240 時間後のアスコルビン酸の添加は、即時分解をもたらした、これは、アスコルビン酸を完全に使い切って分解プロセスにもはや利用できなくなったときに停止した（線が横ばいになる）。2 モルより多くのアスコルビン酸を 1 モルの 069-1 に添加すると、069-1 の完全分解が観察できるだろう。

【0184】

図 3 は、37 での安定性を示す。分解は 25 よりも速く、55 時間後、50 % が分解された。145 時間後のアスコルビン酸の添加は、明瞭に観察することができる即時分解を生じさせる結果となる。

【0185】

図 4 は、異なる温度でのおよびグルコースの添加後の安定性を示す。30 日より長い間、DMEM 中、5 においては分解が無い。グルコースの添加（8 倍モル過剰）および 5 で 5 日間のさらなる保管の後、依然として分解を観察することはできなかった。温度を 25 に上昇させると、分解プロセスがゆっくりと開始したが、約 10 % の濃度に下がるためには 40 日超をなお必要とする。

【0186】

多くのウイルス成長培地が追加のグルコース（または類似の糖）を含有し、これらが不活化剤を分解するかどうかを知ることは重要であったので、グルコースの添加を試験した。少なくともより低温については、これらの糖の存在は問題であるように思われない。

【0187】

水性条件での 069-1 の高い安定性は驚くべきことである。なぜなら、ペルオキシ基は非常に不安定であるので、ペルオキシドが一般に（および特に、1 - 5 個しか炭素原子を有さない短鎖ペルオキシドが）急速に分解されやすいまたは爆発さえしやすいことは非常によく知られているからである。薬剤 069-1 は、DMEM のような複雑な環境でさえ種々の温度で溶解状態で予想外に高い安定性を示す。この分子は、68 % 酸素を含有するので、2 個しか炭素原子を含有しないジェミナルビスヒドロペルオキシドに対して最も顕著で予想外の安定性レベルを保有する。溶解状態での予想分解時間尺度は、ほぼ数分～数時間程度であったが、図 2 - 4 は、25 で 250 時間より長くにわたって高い安定性を示す。

【0188】

単なる例として本発明を説明したこと、および本発明の範囲および精神の中にとどまりながら変更を行うことができることは、理解されるであろう。

【0189】

L R V の表

【0190】

10

20

30

【表 4】

表4:069-1によるアデノウイルスの不活化

$t_{IA}$	$T_{IA}$	TCID <sub>50</sub> /ml		不活化後のTCID <sub>50</sub> /ml			LRV	
時間	°C	保留試料		力価測定	R e s . ウィ ルス試験			
		log 10	95% CI	log 10	95% CI	log 10	log 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

【 0 1 9 1 】

【表 5】

表5:069-1によるBK-ポリオーマウイルスの不活化

$t_{IA}$	$T_{IA}$	TCID <sub>50</sub> /ml		不活化後のTCID <sub>50</sub> /ml			LRV	
時間	°C	保留試料		力価測定	R e s . ウィ ルス試験			
		log 10	95% CI	log 10	95% CI	log 10	log 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

【 0 1 9 2 】

【表 6】

表6:069-1によるコクサッキーウイルスA16の不活化

$t_{IA}$	$T_{IA}$	TCID <sub>50</sub> /ml		不活化後のTCID <sub>50</sub> /ml		LRV		
時間	°C	保留試料		力価測定	Res. ウィルス試験			
		log 10	95% CI	log 10	95% CI	log 10	log 10	95% CI
0.05%								
16	RT	7.45	± 0.33	7.55	$\pm 0.28$	n.d.	$\bar{0.10}$	± 0.43
24	37	7.40	± 0.28	≤ 2.40	$\pm 0.27$	n.d.	≥ 5.00	± 0.39
48	37	7.10	± 0.29	≤ 1.50	$\pm 0.00$	n.d.	≥ 5.60	± 0.29
0.10%								
16	RT	7.40	± 0.32	2,15	$\pm 0.30$	n.d.	5.25	± 0.44
16	37	7.20	± 0.28	≤ 1.50	$\pm 0.00$	n.d.	≥ 5.70	± 0.28
16	37	7.40	± 0.33	3.75	$\pm 0.24$	n.d.	3.65	± 0.41

10

20

【 0 1 9 3 】

【表 7】

表7:069-1によるエコーウイルス6の不活化

$t_{IA}$	$T_{IA}$	TCID <sub>50</sub> /ml		不活化後のTCID <sub>50</sub> /ml			LRV	
時間	°C	保留試料		力価測定		Res. ウィルス試験		
		log 10	95% CI	log 10	95% CI	log 10	log 10	95% CI
0.05%								
6	37	8.95	± 0.26	8.00	± 0.33	n.d.	0.95	± 0.42
16	6	8.90	± 0.25	9.15	± 0.25	n.d.	- 0.25	± 0.35
16	RT	9.10	± 0.24	8.55	± 0.31	n.d.	0.55	± 0.39
24	RT	8.45	± 0.30	8.30	± 0.27	n.d.	0.15	± 0.40
24	37	8.55	± 0.34	6.55	± 0.28	n.d.	2.00	± 0.44
48	RT	8.60	± 0.28	7.20	± 0.35	n.d.	1.40	± 0.45
48	37	8.30	± 0.27	3.45	± 0.30	n.d.	4.85	± 0.40
0.10%								
6	RT	8.80	± 0.27	8.05	± 0.30	n.d.	0.75	± 0.40
6	37	8.90	± 0.25	5.50	± 0.29	n.d.	3.40	± 0.38
6	37	8.55	± 0.32	5.70	± 0.21	n.d.	2.85	± 0.38
16	RT	8.70	± 0.18	7.05	± 0.23	n.d.	1.65	± 0.29
16	RT	8.30	± 0.25	7.10	± 0.29	n.d.	1.20	± 0.39
16	37	8.50	± 0.18	3.20	± 0.30	n.d.	5.30	± 0.35
16	37	8.40	± 0.28	3.10	± 0.25	n.d.	5.30	± 0.38

【 0 1 9 4 】

【表 8】

表8:069-1による単純ヘルペスウイルス 1の不活化

t <sub>IA</sub>	T <sub>IA</sub>	TCID <sub>50</sub> /ml		不活化後のTCID <sub>50</sub> /ml			LRV	
時間	°C	保留試料		力価測定		R e s . ウイ ルス試験		
		log 10	95% CI	log 10	95% CI	log 10	log 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

\* 2回の独立した試験試行からの結果

【 0 1 9 5 】

【表 9】

表9:069-1による3型パラインフルエンザウイルスの不活化

t <sub>IA</sub>	T <sub>IA</sub>	TCID <sub>50</sub> /ml		不活化後のTCID <sub>50</sub> /ml			LRV	
時間	°C	保留試料		力価測定	R e s . ウイ ルス試験			
		log 10	95% CI	log 10	95% CI	log 10	log 10	95% CI
0.025%								
16	RT	7.55	± 0.28	2.90	± 0.24	n.d.	<b>4.65</b>	± 0.37
16	37	6.90	± 0.28	≤ 1.50	± 0.00	n.d.	≥ <b>5.40</b>	± 0.28
0.05%								
16	RT	7.55	± 0.31	≤ 1.50	± 0.00	n.d.	≥ <b>6.05</b>	± 0.31
16	RT	7.35	± 0.21	≤ 1.50	± 0.00	≤ -0.5	≥ <b>7.85</b>	± 0.21
16	37	7.55	± 0.35	≤ 1.50	± 0.00	n.d.	≥ <b>6.05</b>	± 0.35
16	37	7.00	± 0.29	≤ 1.50	± 0.00	n.d.	≥ <b>5.50</b>	± 0.29
0.10%								
16	RT	7.55	± 0.31	≤ 2.50	± 0.00	n.d.	≥ <b>5.05</b>	± 0.31
16	37	6.60	± 0.35	≤ 2.50	± 0.00	n.d.	≥ <b>4.10</b>	± 0.35

【 0 1 9 6 】

10

20

【表 10】

表10:069-1によるマウス微小ウイルス・パルボウイルスの不活化

$t_{IA}$	$T_{IA}$	TCID <sub>50</sub> /ml		不活化後のTCID <sub>50</sub> /ml			LRV	
時間	°C	保留試料		力価測定	R e s . ウイ ルス試験			
		log 10	95% CI	log 10	95% CI	log 10	log 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

【 0 1 9 7 】



## 【表 1 1】

表11:069-1によるレオウイルス3の不活化

t <sub>IA</sub>	T <sub>IA</sub>	TCID <sub>50</sub> /ml		不活化後のTCID <sub>50</sub> /ml			LRV	
時間	°C	保留試料		力価測定	Res. ウィ ルス試験			
		log 10	95% CI	log 10	95% CI	log 10	log 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

10

## 【 0 1 9 8 】

## 【表 1 2】

表 1 2 : 0 6 9 - 1 による狂犬病ウイルスの不活化

t <sub>IA</sub>	T <sub>IA</sub>	TCID <sub>50</sub> /ml		不活化後のTCID <sub>50</sub> /ml			LRV	
時間	°C	保留試料		力価測定		R e s . ウィ ルス試験		
		log 10	95% CI	log 10	95% CI	log 10	log 10	95% CI
0.0125%								
18	2-8/37 #)	8.3	± 0.31	4.8	± 0.31	n.d.	3.5	± 0.31
		8.4	± 0.41	3.5	± 0.00	n.d.	4.9	± 0.41
0.025%								
18	2-8/37 #)	8.3	± 0.31	≤ 2.8	± 0.00	≤ 0.5	≥ 5.5	± 0.31
		8.4	± 0.41	n.d.		≤ 0.5	≥ 7.9	± 0.41
0.05								
18	2-8/37 #)	8.3	± 0.31	n.d.	± 0.31	≤ 0.5	≥ 7.8	± 0.31
		8.4	± 0.41	n.d.	± 0.31	≤ 0.5	≥ 7.9	± 0.41

20

30

#) : すべての不活化を16時間、2-8℃で行い、その後、不活化温度を2時間、37℃に上昇させた。その後、アスコルビン酸の添加により不活化を停止させた。

40

## 【 0 1 9 9 】

【表 13】

表 13 : 069-1 によるインフルエンザウイルスの不活化

t <sub>IA</sub>	T <sub>IA</sub>	TCID <sub>50</sub> /ml		不活化後のTCID <sub>50</sub> /ml			LRV	
時間	°C	保留試料		力価測定	R e s . ウイ ルス試験			
		log 10	95% CI	log 10	95% CI	log 10	log 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.

株差が観察されなかったため、個々の株（上の3参照）をこの表には示さなかった。

【0200】

【表 14】

表 14 : BPLでの不活化についての比較データ

DNA/RNA タ イプ	ENV	ウイルスタイプ	不活化剤/条件	LRV
二本鎖DNA	-	BKポリオーマウイルス	BPL 0.05%; 16時間 + 2-8℃ (その後、BPL加水分解 のために2時間 37℃ )	2.1
一本鎖RNA	-	エンテロウイルス（コクサッキー ウイルス、エコーウイルス）		4-5
一本鎖RNA	+	パラミクソウイルス、パライン フルエンザウイルス3		≥ 9.5 (完全不 活化)

表中で用いた略語：

t<sub>IA</sub> : 不活化時間 / 持続時間 (単位: 時間)T<sub>IA</sub> : 不活化温度TCID<sub>50</sub>/ml : 1 mLあたりの50%組織培養感染単位

L R V : l o g 1 0 低減値

R e s . ウイルス試験：より大きな試料体積を用いる残留ウイルスについての試験（上の本文参照）

9 5 % C I : 9 5 % 信頼区画

R T : 1 7 ~ 2 6 の範囲であった、周囲温度（室温）

n . d . : 行われなかった、または決定されなかった

% 値は、不活化剤の最終濃度を示す。

【 0 2 0 1 】

D N A 損傷の表

【 0 2 0 2 】

## 【表 15】

表 15：不活化によって誘導された脱塩基部位

不活化剤	濃度 (%)	温度 (°C)	A P S の相 対 数
インフルエンザ A / C h r i s t c h u r c h / / 1 6 / 1 0 感染細胞 DNA			
なし		2-8	1
BPL	0.05	2-8/37	0.6
069-1	0.025	2-8	15
069-1	0.025	37	26
069-1	0.05	2-8	6
069-1	0.05	37	46
069-1	0.1	2-8	50
069-1	0.1	37	66
インフルエンザ A / B r i s b a n e / 1 0 / 2 0 1 0 感染細胞 DNA			
なし		2-8	1
BPL	0.05	2-8/37	29
069-1	0.025	2-8	42
069-1	0.025	37	67
069-1	0.05	2-8	48
069-1	0.05	37	119
069-1	0.1	2-8	109
069-1	0.1	37	146
インフルエンザ A / C a l i f o r n i a / 7 / 0 9 感染細胞 DNA			
なし		2-8	1
BPL	0.05	4/37	63
069-1	0.025	2-8	25
069-1	0.025	37	50
069-1	0.05	2-8	16
069-1	0.05	37	23
069-1	0.1	2-8	63
069-1	0.1	37	89

## 【 0 2 0 3 】

【表 16】

表 16：種々の濃度の 069-1 での単一／二重不活化によって誘導された脱塩基部位

不活化剤	濃度 (%)	温度 (°C)	A P S の相対数
インフルエンザ B/Wisconsin/1/2010 感染細胞 DNA			
単一不活化 処理	なし	2-8	1
	BPL	2-8/37	30
	069-1	2-8	39
	069-1	37	43
	069-1	2-8	39
	069-1	37	58
	069-1	2-8	56
	069-1	37	53
二回不活化 処理	069-1	2-8	69
	069-1	37	88
	069-1	2-8	57
	069-1	37	94
	069-1	2-8	85
	069-1	37	73

10

20

【0204】

【表 17】

表 17：BPL および 069-1 での二重不活化によって誘導された脱塩基部位

不活化剤	濃度 (%)	温度 (°C)	A P S の相対数
インフルエンザ B/Wisconsin/1/2010 感染細胞 DNA			
単一不活化 処理	なし	2-8	1
	BPL	2-8/37	2
	069-1	2-8/37	10
	069-1	2-8	5
	069-1	37	3
	069-1	2-8	8
	069-1	37	8
	069-1	2-8	15
	069-1	37	15
二回不活化 処理：BPL、 加えて 069-1	BPL	2-8/37	20
	069-1	2-8/37	93
	069-1	2-8	79
	069-1	37	141
	069-1	2-8	150
	069-1	37	172
	069-1	2-8	205
	069-1	37	110

30

40

二回不活化試料は、希釈しないとすべての値が試験範囲よりはるかに上であったので希釈した。比較のために、その希釈倍率を用いて、この表に与えた相対 A P S 数を計算した。

本発明で有用な不活化剤（図 1 も参照のこと）

【0205】

## 【表 18】

表 18

コード	詳細
054	1, 1-ジヒドロペルオキシメタン
056-1	(ダイマー) $C_8H_{18}O_6$ 2, 2'-ジヒドロペルオキシ-2, 2'-ジブチルペルオキシド
058-1	$C_4H_{10}O_4$ 2, 2-ジヒドロペルオキシブタン
057-1	056-1と058-1の混合物(1:1比)
069-1	$C_2H_6O_4$ 1, 1-ジヒドロペルオキシエタン ヒドロペルオキシド-1, 1'-エチリデンビス エタン-1, 1-ジヒドロペルオキシド[8]または1, 1-ビスヒドロペルオキシエタンとしても公知
070-1	$C_3H_8O_4$ 1, 1-ジヒドロペルオキシプロパン
071-1	$C_4H_{14}O_4$ 1, 1-ジヒドロペルオキシブタン
077	(ダイマー) $C_6H_{14}O_6$ 1, 1-ジヒドロペルオキシプロパン + 1, 1'-ジヒドロペルオキシ-1, 1'-ジプロピルペルオキシド
078	(ダイマー) $C_8H_{18}O_6$ 1, 1-ジヒドロペルオキシブタン + 1, 1'-ジヒドロペルオキシ-1, 1'-ジブチルペルオキシド
079	$C_4H_8O_4$ 1, 1-ジヒドロペルオキシエタン + 1, 1'-ジヒドロペルオキシ-1, 1'-ジエチルペルオキシド
080	$C_5H_4O_8$ および/または $C_5H_4O_8$ と閉環 $C_5H_2O_6$ 1, 1, 5, 5-テトラヒドロペルオキシペンタン + 3, 7-ビス-ヒドロペルオキシ-1, 2-ジオキセパン

10

20

比較のため、次の一官能性有機ペルオキシドも試験した：

072	メチルヒドロペルオキシド、 $CH_3-OOH$
-----	--------------------------

30

## 参考文献

【0206】

## 【 化 6 】

- [1] *Handbuch der Schutzimpfungen in der Tiermedizin* (eds. Mayr *et al.*). Verlag Paul Beyer, 1984.
- [2] WO2007/052163.
- [3] European guidelines on Viral Safety Evaluations of Biotechnology Products; ICH Q5A (CPMP/ICH/295/95).
- [4] Note for Guidance on the use of bovine serum in the manufacture of human biological medicinal products, CPMP/BWP/1793/02.
- [5] Moghaddam *et al.* (2006) *Nature Medicine* 12:905-7.
- [6] Haas *et al.* (1959) *Arch Gesamte Virusforsch.* 9:470-83.
- [7] Rheinbaben & Wolff; *Handbuch der viruswirksamen Desinfektionen*; Springer 2002; p 163. 10
- [8] Hamann *et al.* (2008) *Chem Eur J* 14:6849-51.
- [9] Bunge *et al.* (2009) *Tetrahedron letters* 50:524-6
- [10] Žmitek *et al.* (2007) *Org Biomol Chem* 5:3895-908.
- [11] Kistner *et al.* (1998) *Vaccine* 16:960-8.
- [12] Kistner *et al.* (1999) *Dev Biol Stand* 98:101-10.
- [13] Bruhl *et al.* (2000) *Vaccine* 19:1149-58.
- [14] WO97/37000.
- [15] Brands *et al.* (1999) *Dev Biol Stand* 98:93-100.
- [16] Halperin *et al.* (2002) *Vaccine* 20:1240-7.
- [17] Tree *et al.* (2001) *Vaccine* 19:3444-50.
- [18] Kistner *et al.* (1998) *Vaccine* 16:960-8. 20
- [19] Kistner *et al.* (1999) *Dev Biol Stand* 98:101-110.

## 【 0 2 0 7 】

## 【化 7】

- [20] Bruhl *et al.* (2000) *Vaccine* 19:1149-58.
- [21] Pau *et al.* (2001) *Vaccine* 19:2716-21.
- [22] <http://www.atcc.org/>
- [23] <http://locus.umdnh.edu/>
- [24] WO03/076601.
- [25] WO2005/042728.
- [26] WO03/043415.
- [27] WO01/85938.
- [28] WO2006/108846.
- [29] WO97/37000.
- [30] Brands *et al.* (1999) *Dev Biol Stand* 98:93-100.
- [31] Halperin *et al.* (2002) *Vaccine* 20:1240-7.
- [32] EP-A-1260581 (WO01/64846).
- [33] WO2006/071563.
- [34] WO2005/113758.
- [35] WO03/023021
- [36] WO03/023025
- [37] Remington: *The Science and Practice of Pharmacy* (Gennaro, 2000; 20th edition, ISBN: 0683306472)
- [38] *Vaccine Design: The Subunit and Adjuvant Approach* (eds. Powell & Newman) Plenum Press 1995 (ISBN 0-306-44867-X).
- [39] *Vaccine Adjuvants: Preparation Methods and Research Protocols* (Volume 42 of *Methods in Molecular Medicine* series). ISBN: 1-59259-083-7. Ed. O'Hagan.
- [40] *Vaccine Design: The Subunit and Adjuvant Approach* (eds. Powell & Newman) Plenum Press 1995 (ISBN 0-306-44867-X).
- [41] Lundblad (2001) *Biotechnology and Applied Biochemistry* 34:195-197.
- [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.
- [43] Ji *et al.* (2002) *Biotechniques*. 32:1162-7.
- [44] Briggs (1991) *J Parenter Sci Technol*. 45:7-12.
- [45] Lahijani *et al.* (1998) *Hum Gene Ther*. 9:1173-80.
- [46] Lokteff *et al.* (2001) *Biologicals*. 29:123-32.
- [47] WO02/28422
- [48] WO02/067983
- [49] WO02/074336
- [50] WO01/21151
- [51] WO02/097072
- [52] WO2005/113756
- [53] Treanor *et al.* (1996) *J Infect Dis* 173:1467-70
- [54] Keitel *et al.* (1996) *Clin Diagn Lab Immunol* 3:507-10
- [55] WO2008/068631
- [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.
- [57] Darling *et al.* (1998) *Biologicals* 26:105-10.
- [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.
- [59] ICH Q5A. Viral safety evaluation of biotechnology products derived from cell lines of human or animal origin. 1999.

10

20

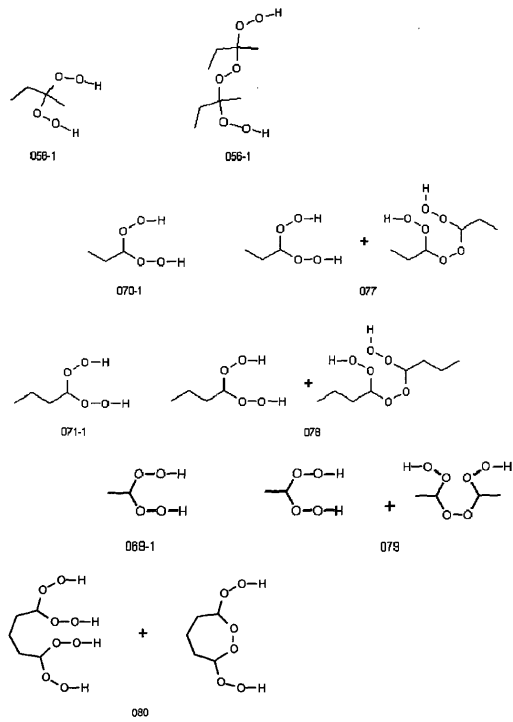
30

40



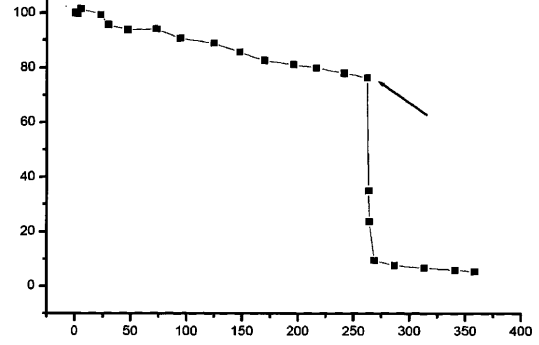
【 図 1 】

FIGURE 1



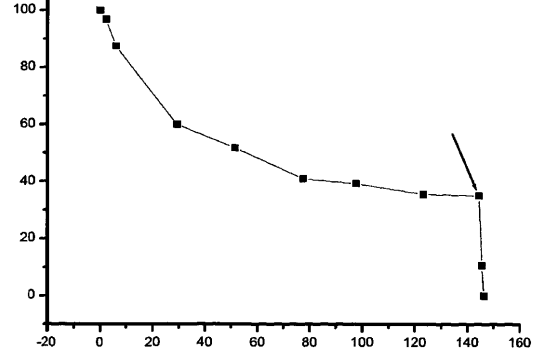
【 図 2 】

FIGURE 2



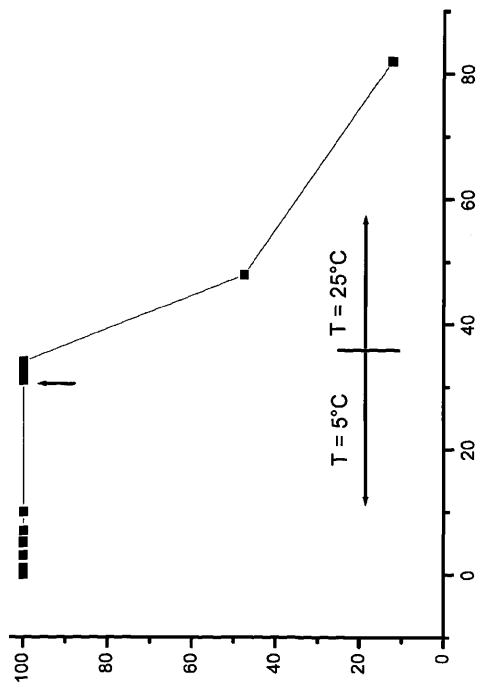
【 図 3 】

FIGURE 3



【 図 4 】

FIGURE 4



## フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I  
 A 6 1 K 35/74 (2015.01) A 6 1 K 35/74 A  
 A 6 1 K 35/76 (2015.01) A 6 1 K 35/76

(72)発明者 グルンデマン, トーマス  
 ドイツ国 1 2 0 5 5 ベルリン, ラーンシュトラッセ 3 4

審査官 安藤 公祐

(56)参考文献 中国特許出願公開第1 4 3 6 7 8 7 ( C N , A )  
 特開2 0 0 4 - 0 9 1 3 3 2 ( J P , A )  
 特表平0 8 - 5 0 2 4 1 5 ( J P , A )  
 JOURNAL OF CHEMOTHERAPY, 1 9 9 0 年, V2 N6, P362-367  
 Steroids, 1 9 9 6 年, 61(12), 688-96  
 Chemistry., 2 0 0 8 年, 14(23), 6849-51  
 Process Biochem, 2 0 0 4 年, 39(11), 1465-8

(58)調査した分野(Int.Cl., D B 名)  
 A 6 1 K 3 1 / 3 2 7  
 A 6 1 K 3 9 / 0 0  
 A 6 1 K 4 5 / 0 0  
 A 6 1 P 3 1 / 0 0  
 A 6 1 K 3 1 / 7 0 8 8  
 A 6 1 K 3 5 / 7 4  
 A 6 1 K 3 5 / 7 6  
 J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 ( J D r e a m I I I )  
 C A p l u s / R E G I S T R Y / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S ( S T N )