

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第3735137号

(P3735137)

(45) 発行日 平成18年1月18日(2006.1.18)

(24) 登録日 平成17年10月28日(2005.10.28)

(51) Int. Cl.

F I

A 6 1 K 38/36 (2006.01)

A 6 1 K 37/46

A 6 1 K 39/395 (2006.01)

A 6 1 K 39/395 K

請求項の数 9 (全 10 頁)

<p>(21) 出願番号 特願平7-107843 (22) 出願日 平成7年4月10日(1995.4.10) (65) 公開番号 特開平8-175908 (43) 公開日 平成8年7月9日(1996.7.9) 審査請求日 平成13年12月28日(2001.12.28) (31) 優先権主張番号 226593 (32) 優先日 平成6年4月11日(1994.4.11) (33) 優先権主張国 米国(US)</p>	<p>(73) 特許権者 591097333 バイエル・コーポレーション MILES INCORPORATED アメリカ合衆国カリフォルニア州9470 1-1986パークレイ・ピーオーボツク ス1986・ドワイトウェイ800 (74) 代理人 100060782 弁理士 小田島 平吉 (72) 発明者 ミルトン・ビー・ドブキン アメリカ合衆国カリフォルニア州9454 9ラフアイエット・レツドパークコート4 (72) 発明者 ポール・ケイ・ヌグ アメリカ合衆国カリフォルニア州9454 9ラフアイエット・リランドドライブ10 08 最終頁に続く</p>
--	--

(54) 【発明の名称】 生物学的活性なタンパク質の溶液における殺ウイルス剤としてのアゾールの使用

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

治療用の生物学的に活性なタンパク質に実質的な悪影響を及ぼすことなしに、実質的なウイルスの不活化を起こすのに十分な条件下で、前記タンパク質のウイルス含有水性溶液を、イミダゾール、ヒスチジン、2-イミダゾリジノン、1H-イミダゾール-4-エタンアミンからなる群より選ばれるアゾールと接触させる段階を含んでなる、治療用の生物学的に活性なタンパク質のウイルス含有タンパク質水性溶液中のウイルスの不活化方法。

【請求項2】

アゾールが、イミダゾールである、請求項1記載の方法。

【請求項3】

治療用の生物学的に活性なタンパク質のウイルス含有タンパク質水性溶液を、界面活性剤の存在下でアゾールと接触させる請求項1記載の方法。

【請求項4】

ウイルスの減少が、少なくとも対数2のウイルス力価およびタンパク質の生物学的活性の50%を超える回収率をもたらす請求項1記載の方法。

【請求項5】

タンパク質が第VIIIIまたはフィブリノーゲンである請求項1記載の方法。

【請求項6】

治療用の生物学的に活性なタンパク質に実質的な悪影響を及ぼすことなしに、実質的なウイルスの不活化を起こすのに十分な条件下で、前記タンパク質のウイルス含有水性溶液

中のウイルスを不活化するための作用剤であって、イミダゾール、ヒスチジン、2-イミダゾリジノン、1H-イミダゾール-4-エタンアミンからなる群より選ばれるアゾールを含有することを特徴とする作用剤。

【請求項7】

アゾールがイミダゾールである請求項6記載の作用剤。

【請求項8】

界面活性剤をさらに含む請求項6記載の作用剤。

【請求項9】

界面活性剤がポリソルベート80またはオクトキシノールである請求項8記載の作用剤

。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】

本発明は、一般に、生物学的に活性なタンパク質の溶液でウイルスを不活化する方法、特に、生物学的に活性な治療用タンパク質の水溶液でウイルスを不活化するためのアゾールの使用に関する。

【0002】

【従来の技術及び発明が解決しようとする課題】

治療用製品によるウイルスの感染性を除くことの重要性は、長い間認識されて来た。このことは、ヒト血液から、または最近では、バイオテクノロジーの生産物（例えば、組み換えDNA生産物およびモノクローナル抗体）を作製するのに使用される細胞培養物から得られる生物学的に活性な製品の場合に、特にあてはまる。

【0003】

生物学的に活性なタンパク質に対する殺ウイルス剤を考える上で、主要な目標は、そのタンパク質の生物学的活性に悪影響を及ぼさず、完全な殺ウイルス作用を確保することである。これらの目標達成には、タンパク質自体、その活性および/または活性部位の性質、殺ウイルス剤、その重要性および/または使用後の除去の容易さのような変化要因、そして時間、温度および濃度のような処理自体の変化要因、の考慮を必要とする。

【0004】

熱処理単独でも、ある種のタンパク質の殺ウイルス処理に使用できる（例えば、60における低温殺菌）。しかしながら、多くの場合、熱のみを使用する時には生物学的活性またはユーティリティの損失を避けることは困難である。

【0005】

熱単独の使用によるある種の不利益もしくは活性損失を避けるために、種々の化学薬剤が、生物学的に活性なタンパク質の殺ウイルス剤として、使用され、また提案されてきた。例えば、特定の条件下でのアルコールの使用について開示しているG. Dove, M. Dobkin and M. Shearerに対する米国特許第5,071,650号を参照のこと。

【0006】

ウイルスワクチンの調製に関して、そしてごく最近では、ヒト血漿から得られる生物学的製剤の調製における内在性ウイルスの不活化に関して、爆発性のない有機溶媒/界面活性剤混合液を利用することは、使用条件（例えば、pH）によって限定されてきた。中性pHにおいて生物学的に活性なタンパク質とともに使用される一つの殺ウイルス性化合物は、リン酸トリ-n-ブチル(TNBP)である。例えば、脂質エンベロープウイルスを不活化するためにTNBPの使用について開示しているA. Neurath and B. Horowitzに対する米国特許第4,540,573号を参照されたい。また、調節されたpH、伝導率およびタンパク質濃度の下で、殺ウイルス剤としてTNBPの使用を開示しているG. Tsayに対する米国特許第5,110,910号を参照されたい。不幸にも、今日の殺ウイルス剤は、主として、脂質エンベロープウイルスを特異的に不活化するが、脂質エンベロープを欠くhardier classのウイルスに対して有効性を、示さなかった。

【0007】

10

20

30

40

50

種々のアゾール化合物は、殺真菌剤として使用されてきたが、生物学的に活性なタンパク質の溶液において、特に脂質を含まないウイルスに対する殺ウイルス剤として、それらを使用するという示唆については、何も知られていない。本発明者らは、アゾール類が、免疫グロブリンのようなタンパク質の生物学的活性を維持しながら、水溶液中でエンベロープおよび非エンベロープウイルスの両方を不活化する独特の能力を備えていることを初めて見出した。本方法の詳細は、以下に記述される。

【0008】

【課題を解決するための手段】

生物学的に活性な、治療用タンパク質の水溶液中のエンベロープおよび非エンベロープウイルスの両方を不活化する本方法は、前記タンパク質の生物学的活性に悪影響を及ぼすことなしに（すなわち、活性の回収率が50%を超える）、両種類のウイルスの実質的な減少（各種類について対数2ないしそれ以上のウイルス力価の減少）を保証するに十分な条件下で、その溶液を、アゾールと接触させることを含んでなる。殺ウイルス活性は、界面活性剤の存在によって向上させることができる。不活化に寄与する主要な官能基は、5員のアゾール環であり、この環は、環についての変化または環に結合される付加的な官能基によって修飾することができる。好適なアゾールは、好ましくは、後述されるように界面活性剤とともに使用されるイミダゾールである。

10

【0009】

【具体的な態様】

アゾール類は、以下に例示するように、エンベロープウイルスおよび非エンベロープウイルスの両者に対して殺ウイルス活性を示すことが発見された。本明細書で使用される場合、用語アゾールまたはアゾール類似体もしくはアゾール誘導体は、5員のアゾール環を有し、治療用タンパク質のような興味あるタンパク質の生物学的活性に悪影響を及ぼさない温度、pHおよび濃度の条件下で、殺ウイルス活性をもつ化合物を意味する。

20

【0010】

材料および方法

化学薬剤

使用されるアゾールは、イミダゾール、 β -アミノ-1H-イミダゾール-4-プロパン酸（ヒスチジン）、2-イミダゾリジノン（エチレン尿素）、1H-イミダゾール-4-エタンアミン（IEEA）であった。アゾール、界面活性剤（例えば、ポリソルベート80、Triton X-100）、およびバッファー塩は、試薬級であり、Sigma Chemicals, St. Louis, Mo. から得た。

30

【0011】

ウイルス

エンベロープウイルス：

Finnish Red Crossから得た水泡性口内炎ウイルス[Vesicular stomatitis virus (VSV)]、Indiana株は、ラブドウイルス(RNA)である。ワクシニアウイルス(Vaccinia virus)、Lederle株、ATCC VR-118は、ポックスウイルス(DNA)である。シンドビス(Sindbis)は、トガウイルス[Togavirus (RNA)]である。単純ヘルペスウイルス1型[Herpes Simplex virus type 1 (HSV-1)]は、ヘルペスウイルス(DNA)である。

40

【0012】

非エンベロープウイルス：

脳心筋炎ウイルス[Encephalomyocarditis virus (EMC)]は、ネズミ・ピコルナウイルス(RNA)である。ポリオウイルス2型は、ヒト・ピコルナウイルス(RNA)である。レオウイルス3型(Reovirus type 3)は、レオウイルス(RNA)である。ウイルスの誘導は、以前に報告された(Lembach, et al., Current Studies in Hematology and Blood Transfusion. Basel, Karger, 1989; 56:97-108, 参照)。

【0013】

ウイルス検定

50

シンドビスを除く全てのウイルスは、24穴プレートにおいて生育されたVERO細胞のモノレアー上で、希釈当たり4穴を用いて標準条件下で力価測定された。力価は、1mL当たり50%エンドポイント(TCID₅₀/mL)として組織培養感染用量で表示される。シンドビスウイルスは、細胞変性効果を評価する標準条件下で、BHK-21細胞のモノレアーに対して同様の方法で力価測定された。

【0014】

タンパク質

血友病患者に投与される凝固因子であるVII因子(FVII)は、懸濁培養で生育される組み換え新生児ハムスター腎細胞から得られた。この組み換えFVII産物(rFVII)は、D.J. Capon, et al.名義の欧州特許第160,457号に記載されている。

10

【0015】

クラスGのモノクローナル抗体(ヒト)(m-IgG、抗腫瘍壊死因子、細胞系ATCC受託番号HB9736は、懸濁培養で生育されるエプスタイン・パールウイルスで形質転換されたヒトBリンパ球から得られた。IgGは、イオン交換およびサイズ排除クロマトグラフィーによって98%を超えるまで精製された。これらの抗体は、H. Kuo名義の欧州特許第351,789号に記載されている。

【0016】

フィブリノーゲンは、Cohn-Oncley法によってヒト血漿から精製された(画分V)。例えば、Cohn, E.J., L.E. Strong, W.L. Hughes, D.J. Mulford, J.N. Ashworth, M. Melin and H.L. Taylor. "Preparation and Properties of Serum and Plasma Proteins. IV. A System for the Separation into Fractions of the Protein and Lipoprotein Components of Biological Tissues and Fluids." J. Am. Chem. Soc. 68, 459 (1946)参照のこと。

20

【0017】

タンパク質回収率は、A280、放射状免疫拡散法およびFPLC-Superose6(Pharmacia fast protein liquid chromatography by size exclusion)によって評価された。FVIIは、活性化された部分トロンボプラスチン凝固時間(APTT)に基づくLangdellの変法(Langdell, R.D., Wagner, R.H., Brinkhouse, A. "Effect of anti-hemophilic Factor on One-Stage clotting Test," J. Lab. Clin. Med. 41: 637-647, 1953)によって検定された。

30

【0018】

処理プロトコール

タンパク質溶液には、ウイルスを含む培地の影響を最小にするために、保存ウイルスの1/100希釈が接種された。アゾール溶液の一定容量を添加して最終要求濃度とした。処理および対照サンプルは、特定の条件(時間、温度)下で断続的なゆっくりした攪拌によりインキュベートされた。サンプルは、適当な間隔で採取され、直ちに、残存感染性ウイルスの力価が測定された。

【0019】

結果

研究は、殺ウイルス活性を示すアゾールの種類を決定するために実施された。表1に見られるように、多種多様なアゾールが、VSV力価を減少させるのに有効である。ウイルスを不活化する主要な官能基は、5員のアゾール環であり、この環は、環についての変化または環に結合された付加的な官能基によって修飾されていてもよい。

40

【0020】

【表1】

表 1

40℃における種々のアゾールを含むFVIIIIにおけるVSVの不活化の動力学

アゾール濃度	イミダゾール	イミダゾール	ヒスチジン	2-イミダゾリジノン	I4EA
	0.02M	0.2M	0.2M	0.2M	0.2M
時間 (hrs)	残存ウイルス力価				
0	(7.5*)	(7.75)	(8.25)	(7.75)	(8.25)
1	--	6.25	7.0	>7.5	7.25
3	--	3.75	4.5	7.0	5.5
4	--	2.5	3.0	5.75	5.0
5	--	<1.5	2.5	5.75	4.25
6	5.75	<1.5	2.75	5.25	3.5

(): 未処理

*: LOG₁₀TCID₅₀/ML

--: 試験せず

【0021】

研究は、アゾールによる不活化に感受性のウイルス型を決定するために実施された。表2には、種々のエンベロップおよび非エンベロップウイルスについて、実質的なウイルスの減少(対数2以上の減少)を起こすのに必要な条件を挙げる。

【0022】

【表2】

表 2

FVIIIIにおける種々のエンベロープおよび非エンベロープウイルスに関する不活化パラメーター

ウイルス	エンベロープウイルス				非エンベロープウイルス		
	VSV	HSV-1	シンドビス	ワクシニア	ポリオ-2	EMC	レオ-3
処理時間(hr)	0.25	0.25	<1	<1	7	4	7
温度 (C)	15	15	15	40	40	40	40
イミダゾール (M)	0.02	0.02	0.02	0.2	0.2	0.2	0.2
Triton X-100 (%)	0.05	0.05	0.05	0.1	0.1	0.1	0.1
力価 (初発)	8.0*	6.75	8.25	6.25	6.5	6.5	7.75
力価 (最終)	<1.5	<1.5	<1.5	<1.5	4.5	1.5	4.25
減少	>6.5	>5.25	>6.75	>4.75	2.0	5.0	3.5

*: LOG₁₀TCID₅₀/ML

【0023】

界面活性剤は、殺ウイルス活性を高めることもある。表3には、活性を増加するか、またはその作用を欠如する特定の条件を現す数例を挙げる。

【0024】

【表3】

【表4】

表 4

種々の条件におけるイミダゾール存在下のタンパク質回収率

タンパク質	FVIII	FVIII	FVIII	IgG	ファイブリノーゲン
イミダゾール濃度 (M)	0.02	0.2	0.2	0.5	0.2
温度 (C)	40	30	40	40	40
時間	タンパク質回収率 (初発に対する%)				
0	100	100	100	100	100
1		91			
2			85		
3		83	92		
4			86		
5		83	79		
6		84	78		
7		86	77		
24	>95	81	75	>95	>95

【0027】

イミダゾールの作用について次のように解することができる：

各ビリオンは、多数のタンパク質サブユニットのクラスターをもつタンパク質コートからなる。サブユニットは、溶液中では金属イオンによって安定化され、その金属濃度が低下する時には解離することもある。タンパク質サブユニットの金属イオンへの結合は、ヒスチジンのような残基の電子供与側鎖によって促進される。複合体は、金属イオンと、タン

10

20

30

40

50

パク質におけるヒスチジン残基のイミダゾール環からの - 窒素との間で形成される。ウイルスを含む溶液においては、遊離のイミダゾールは、タンパク質サブユニットのイミダゾールと競合する。金属イオンが、遊離のイミダゾールと結合するので、そのタンパク質サブユニットは、不安定になり、ウイルスコートが開かれ、その結果ビリオンのもとの構造が破壊する。その現象は、また、溶液中のタンパク質（例えば、F V I I I）の濃度に依存し、さらに、溶液中のイミダゾールが、タンパク質のイミダゾールと競合するということを支持する。

【 0 0 2 8 】

上記開示があれば、種々の改変が、当業者によって生じるであろうと考えられる。したがって、上記実施例は、例示として解釈されるべきである。

10

【 0 0 2 9 】

本発明の特徴および態様は以下のとおりである。

【 0 0 3 0 】

1 . 治療用の生物学的に活性なタンパク質に実質的な逆効果を及ぼすことなしに、実質的なウイルスの不活化を起こすのに十分な条件下で、前記タンパク質の水溶液を、アゾールと接触させる段階を含んでなる、前記タンパク質溶液中のウイルスの不活化方法。

【 0 0 3 1 】

2 . 該アゾールが、イミダゾール、ヒスチジン、2 - イミダゾリジノン、1 H - イミダゾール - 4 - エタンアミンからなる群より選ばれる、第 1 項の方法。

3 . 該アゾールが、イミダゾールである、第 2 項の方法。

20

【 0 0 3 2 】

4 . 該アゾールが、イミダゾールの同族体である、第 3 項の方法。

【 0 0 3 3 】

5 . 界面活性剤を含有する付加的段階を含む、第 1 項の方法。

【 0 0 3 4 】

6 . 該界面活性剤が、トリトン (T r i t o n) X - 1 0 0 である、第 5 項の方法。

【 0 0 3 5 】

7 . 該タンパク質が、凝固因子および抗体からなる群より選ばれる、第 1 項の方法。

【 0 0 3 6 】

8 . ウイルスの減少が、少なくとも対数 2 である、第 1 項の方法。

30

【 0 0 3 7 】

9 . 該タンパク質の生物学的活性の回収率が、5 0 % を超える、第 1 項の方法。

フロントページの続き

(72)発明者 ジョージ・ビー・ダブ

アメリカ合衆国カリフォルニア州94526ダンビル・ヒルメドウブレイス2003

審査官 吉住 和之

(56)参考文献 欧州特許出願公開第00411810(EP, A1)

米国特許第04675385(US, A)

国際公開第93/022337(WO, A1)

特開平01-149733(JP, A)

米国特許第5110910(US, A)

特開昭56-113713(JP, A)

特開昭64-019023(JP, A)

特表平07-501560(JP, A)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

A61K 38/36

A61K 39/395

CA(STN)

REGISTRY(STN)