(19)日本国特許庁(JP)　(12)特　許　公　報(B2)　(11)特許番号
特許第6967972号
(P6967972)
(45)発行日　令和3年11月17日(2021.11.17)　(24)登録日　令和3年10月28日(2021.10.28)

(51)Int.Cl.　F I
C12P 19/14 (2006.01)　C12P 19/14 Z

請求項の数 2　(全 24 頁)

(21)出願番号　特願2017-562690(P2017-562690)
(86)(22)出願日　平成28年6月3日(2016.6.3)
(65)公表番号　特表2018-516086(P2018-516086A)
(43)公表日　平成30年6月21日(2018.6.21)
(86)国際出願番号　PCT/FR2016/051325
(87)国際公開番号　WO2016/193634
(87)国際公開日　平成28年12月8日(2016.12.8)
審査請求日　令和1年5月28日(2019.5.28)
(31)優先権主張番号　1555077
(32)優先日　平成27年6月4日(2015.6.4)
(33)優先権主張国・地域又は機関
フランス(FR)

(73)特許権者　591169401
ロケット　フレール
ＲＯＱＵＥＴＴＥ　ＦＲＥＲＥＳ
フランス国、エフ－６２１３６　レストロン、リュ・デ・ラ・オート・ロジュ　１
(74)代理人　100090398
弁理士　大渕　美千栄
(74)代理人　100090387
弁理士　布施　行夫
(72)発明者　ピエール　ラノ
フランス国　５９４８０　ラ　バセ　リュ　デ　ランパール　３

最終頁に続く

(54)【発明の名称】腹膜透析用のグルコースポリマーを得るための原料として使用されるデンプンを浄化する最適化された方法

(57)【特許請求の範囲】
【請求項１】
腹膜透析用のグルコースポリマーの製造に原料として使用されるデンプンを浄化する方法であって、以下の工程：
－蝋質トウモロコシデンプンを準備する工程：
－ｐＨ５～６のプロセス水に乾燥物２０～４０％の濃度にて前記蝋質デンプンを懸濁する工程：
－濃度１００～５００ｐｐｍの過酢酸の溶液で、デンプンの懸濁液を処理する工程：
－前記デンプンから余分な水を除去し、ｐＨ５～６に調整された脱イオン水に、乾燥物２０～４０％の濃度で溶解する工程：
－その温度を１００℃～１１０℃に上げ、次いでα－アミラーゼを１０～２０分間、添加する工程：
－マンナナーゼ型の酵素活性を有し、洗浄性及び浄化性を有する酵素製剤で処理する工程：
－珪藻床を通して前記懸濁液を濾過する工程：
－超高吸着能力及びマイクロ孔質多孔度を有する活性炭で処理する工程：
－メソ孔質多孔度を有する第２活性炭で処理する工程：
－ＤＯＷＥＸ　ＯＰＴＩＰＯＲＥ（登録商標）　ＳＤ２の樹脂に通過させる工程：
－多孔度０．２２μｍの滅菌フィルターを通して安全に濾過する工程：
を含み、

前記各工程が上記に示される順序で行われる、方法。
【請求項２】
前記デンプンがＰＧＮタイプの汚染物質を高レベルで有することを特徴とする、請求項１に記載の方法。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
本発明は、グルコースポリマー、さらに詳しくは医療分野用のグルコースポリマー、さらに詳しくは腹膜透析のグルコースポリマーを生成するサーキットにおいて使用されるデンプンを浄化するための最適化された方法の開発に関する。
【背景技術】
【０００２】
本出願会社は、グルコースポリマー生成サーキットにおいて発生する恐れがあり、かつヒトの健康に非常に有害な、可能性のある炎症性反応の原因である、微生物由来の汚染の危険性に関して知られる分野においてその発明を開発することを選択した。
【０００３】
健康安全性のアプローチの文脈において、すべての適切な技術的手段によって、特に：
－　有効に同定し、かつ汚染物質をアッセイする方法の定義、
－　適切な精製デバイス及び技術をセットアップすることによる、安全な製造サーキットの定義、
によって、生細胞の形態と壊死組織片の形態の両方で生物由来の汚染がないことを保証することは重要である。
【０００４】
腹膜透析の場合には、純度の最も厳しい条件下で一定数の成分を調製しなければならない。
【０００５】
これは、腹膜透析が、その目的が、腎臓がうまく血漿から浄化除去を行うことができない、又はもはやできない、尿素、クレアチニン、過剰なカリウム又は余分な水などの老廃物を除去することを目的とするタイプの透析であるためである。この医療処置は、末期慢性腎不全の場合に指示される。
【０００６】
最も一般的に使用される透析液は、
－　電解質（ナトリウム、カルシウム、マグネシウム、塩素）、かつ最も重要なことには、
－　浸透圧剤、主にグルコースポリマー、例えばＢＡＸＴＥＲから販売されている携帯式腹膜透析溶液ＥＸＴＲＡＮＥＡＬ（登録商標）中に存在する「イコデキストリン」など、
が添加された、酸性ｐＨ（５．２～５．５）又は生理学的ｐＨ（７．４）の緩衝液（乳酸又は重炭酸）で構成される。
【０００７】
連続携帯式腹膜透析用のグルコースポリマーを使用する、より詳細なこの分野において、これらのデンプン水解物（グルコースと、グルコースオリゴマーと、ポリマーとの混合物）をそのまま使用することができないことはかなり早期に明らかとなった。
【０００８】
欧州特許第２０７６７６号明細書には、重量平均分子量（Ｍｗ）５０００～１００００ダルトン及び数平均分子量（Ｍｎ）８０００ダルトン未満を有する、水中で１０％の透明かつ無色のグルコースポリマー形成溶液が好ましいことが教示されている。
【０００９】
かかるグルコースポリマーは好ましくは、その分子量が５０００～５００００ダルトンであるグルコースポリマーを少なくとも８０％含み、かつＤＰ３以下（分子量５０４以下

）のグルコース又はグルコースポリマーをほとんど、又は全く含まず、かつ１０００００（ＤＰ約６００）を超える分子量のグルコースポリマーをほとんど、又は全く含まない。

【００１０】

すなわち、好ましいグルコースポリマーは、低い多分散性指数（Ｍｗ／Ｍｎ比の計算によって得られる値）を有するグルコースポリマーである。

【００１１】

デンプン水解物から低多分散性指数のこれらのグルコースポリマーを得るための、欧州特許第２０７６７６号明細書に提示されている方法は：

－　水混和性溶媒によって、マルトデキストリンの分別沈殿を行うこと、又は

－　適切なカットオフ又は排除閾値を有する様々な膜を通して、この同じマルトデキストリンの分子濾過を行うこと、

のいずれかにある。

【００１２】

２つの場合において、これらの方法は、超高分子量ポリマーと低分子量モノマー又はオリゴマーの両方の除去を目的とする。

【００１３】

しかしながら、これらの方法は、その実現の観点から、かつ得ることが可能となる生成物の収量及び品質の観点の両方から、満足の行くものではない。

【００１４】

好ましくはＭｎ８０００ダルトン未満及びＭｗ１２０００～２００００ダルトンを有する、優先的には２．５未満の低多分散性指数の完全に水溶性のグルコースポリマーを製造する方法であって、先行技術の欠点がない方法を開発するために、本出願会社は、マルトデキストリンからではなく、加水分解デンプンから出発することによって、欧州特許第６６７３５６号明細書におけるこの問題を解決しようと努めた。

【００１５】

クロマトグラフ分別によって得られるグルコースポリマーは好ましくは、グルコース及びＤＰ３以下のグルコースポリマーを３％未満、６００を超えるＤＰを有するグルコースポリマーを０．５％未満含有する。

【００１６】

汚染のリスク

しかしながら、腹膜透析用の調製物の微生物汚染のリスクがあることは留意すべきである。

【００１７】

実際に、グルコースポリマー製造サーキットは、微生物で、又は前記微生物に含有される炎症誘発性物質で、汚染され得ることが知られている。

【００１８】

グルコースポリマーを製造する方法がデンプンから出発する場合には、デンプン製造において、トウモロコシ（又はコムギ）デンプンの汚染は、酵母、カビ、及び細菌タイプの微生物、さらに詳しくはアリシクロバチルス・アシドテレストリス（Ａｌｉｃｙｃｌｏｂａｃｉｌｌｕｓ　ａｃｉｄｏｃａｌｄａｒｉｕｓ）タイプの好酸好熱性細菌（サーキットの熱い、かつ酸性の領域で発生する好極限性細菌）が原因であると従来から記述されている。

【００１９】

これらの汚染されたグルコースポリマーを受け入れる患者の主なリスクは腹膜炎である。

【００２０】

腹膜炎のこれらの発症は、腹腔内細菌感染によって引き起こされ、その診断は通常、陽性の透析液培養物によって容易に証明される。

【００２１】

無菌的、化学的又は培養陰性腹膜炎として記載される「無菌性髄膜炎」は、その一部が

、化学的刺激物又は異物によって一般に生じる。

【００２２】

腹膜透析溶液の調製のためのイコデキストリンの導入以来、無菌性腹膜炎の孤立した症例が報告されており、様々な原因、特に潜在的に存在する炎症誘発性物質による誘発と関連している可能性がある。

【００２３】

したがって、無菌性炎症性エピソードは、透析溶液の注入後に確認される主要な合併症である。

【００２４】

これらの炎症性エピソードの一部は化学的性質の問題（化学汚染物質の偶発的注入又は特定の化合物の間違った投与）に関連しているが、症例の大部分は、透析溶液の調製に使用される溶液中に存在する、微生物由来の汚染物質の存在と直接関連している。

【００２５】

リポ多糖（ＬＰＳ）及びペプチドグリカン（ＰＧＮ）は、それが微量で存在する場合でさえ、炎症の引き金となる高いリスクを有する、微生物由来の主な汚染物質である。

【００２６】

さらに、本出願会社の功績となるように、まだ生理活性である、その最小構造がムラミールジペプチド（ＭＤＰ）である、ＰＧＮ解重合生成物などのこれらの汚染物質によって誘発される炎症反応を悪化させ得る分子の存在も考慮に入れられる。

【００２７】

ＰＧＮ解重合生成物に加えて、その原型がｆ－ＭＬＰ（ホルミル－Ｍｅｔ－Ｌｅｕ－Ｐｈｅトリペプチド）であるホルミル化微生物ペプチドも、実質的な相乗効果的活性を有する。本来、これらのペプチドは、白血球に対するその化学誘引活性に関して同定されるが、それ自体でサイトカイン応答を誘発する能力はない。

【００２８】

したがって、それらが微量のＰＧＮ及び／又はＬＰＳの作用を悪化させることによって、間接的に無菌炎症性エピソードの原因となり得ることから、これらの「小分子」を見落とさないようにすることは重要である。

【００２９】

前記汚染物質を有効に同定し、かつアッセイする方法の定義

したがって、本出願会社は、先行技術において利用可能な方法よりも有効な検出及びアッセイ方法の開発にそれ自体を適用する。

【００３０】

過去数年にわたって、炎症反応試験において動物モデルの代わりに、一次細胞を用いた多くの試験が開発されている。

【００３１】

しかしながら、これらの生体内（ｉｎ　ｖｉｔｒｏ）モデルは、かなりの個体間の変動を受けやすく、実験の偏りの原因となり得る。

【００３２】

逆に、単球細胞系は一貫した応答を与えるため、現在開発されている試験において、どうして培養にこのタイプの細胞がますます使用されるようになっているのかの説明がつく。しかしながら、これらの試験は、溶液中の混合物として存在するすべての汚染物質に対して全体的な炎症反応を与えるという欠点を有し、結果的に、汚染物質の性質を特徴付けることは不可能となる。

【００３３】

その増悪した炎症反応は：

－　ＴＮＦ－α（腫瘍壊死因子α）、

－　ＩＬ－１β（インターロイキン１β）及び

－　ケモカイン、例えばＣＣＬ５（ケモカイン（Ｃ－Ｃモチーフ）リガンド５）／ランテス（ＲＡＮＴＥＳ）（Ｒｅｇｕｌａｔｅｄ　ｕｐｏｎ　Ａｃｔｉｖａｔｉｏｎ，Ｎｏｒ

ｍａｌ　Ｔ－ｃｅｌｌ　Ｅｘｐｒｅｓｓｅｄ　ａｎｄ　Ｓｅｃｒｅｔｅｄ）、
などの炎症の急性期サイトカインに関しては目に見えるが、ＩＬ－６（インターロイキン６）に関しては目に見えない、又はほとんど目に見えないことに留意することも重要である。

【００３４】

したがって、ＩＬ－６（米国特許出願公開第２００９／０２３９８１９号明細書及び米国特許出願公開第２００７／０１８４４９６号明細書）の産生に基づく方法は、溶液中の混合物として汚染物質を検出するのに適していない。

【００３５】

したがって、国際公開第２０１２／１４３６４７号パンフレットにおいて、文献で現在使用された、かつ／又は記載の手順の感度の閾値未満の炎症誘発性作用を有する微生物汚染物質を検出するための感度の良い、かつ有効な方法を開発し、続いて、製造サーキットから生じるバッチにおいて微量に存在する炎症誘発性分子ファミリー、又はさらにはその性質を同定することが、本出願会社の功績であった。

【００３６】

個々の精製工程の有効性の決定

次いで、本出願会社は、腹膜透析用のグルコースポリマーに対して行われる主要な精製工程をより良く定義するよう努めた。

【００３７】

この目的のために、国際公開第２０１２／１４３６４７号パンフレットに示されるように、単球細胞系に基づく検出及びアッセイ方法を使用することによって、主要な個々の精製工程の確認にそれ自体を適用した。

【００３８】

したがって、国際公開第２０１３／１７８９３１号パンフレットにおいて、本出願会社は、腹膜透析用のグルコースポリマーで行われる以下の個々の工程：

－　熱処理、
－　酸性化、
－　活性炭の通過、
－　吸着、限外濾過又は濾過樹脂の通過、
－　化学的又は酵素的加水分解

の有効性を分析した。

【００３９】

次いで、まだ審査されていない最近の特許出願において、本出願会社は、注意深く選択され、かつ順序付けられた、いくつかの浄化工程の組み合わせを定義しようと努め、かつ汚染の性質に関係なく、製造法から生じるグルコースポリマー中に存在する可能性のある、すべての炎症性分子の除去におけるその有効性について定義しようと努めた。したがって、本発明の方法は、腹膜透析用のグルコースポリマーで行われる、以下の工程：

－　洗浄性及び浄化性を有する酵素製剤で処理する工程と、
－　超高吸着能力及び「マイクロ孔質」多孔度を有する製薬グレードの活性炭で処理する工程と、
－　任意選択的に、「メソ孔質」多孔度を有する第２活性炭で処理する工程と、
－　１００オングストロームを超える多孔度を有するマクロ孔質吸着剤ポリマー樹脂に通す工程と、
－　５ｋＤａ連続的限外濾過を行う工程と、

の組み合わせに関する。

【００４０】

この作業によって、潜在的なすべての汚染物質から安全に、腹膜透析用のグルコースポリマーを製造することができる最良の組み合わせを定義することが可能となるが、腹膜透析用のグルコースポリマーを製造するサーキットの潜在的汚染物質の実際の原因を浄化するための、つまり、前記グルコースポリマーを製造するサーキット内に入る、蛸質トウモ

ロコシデンプン及び粗製デンプン水解物を浄化するための最適化された方法の上流の開発の必要性は未だ対処されていない。

【００４１】

実際に、酵母、カビ、又は細菌タイプの微生物からの壊死組織片によって自然に汚染されている蝋質トウモロコシデンプンを有効に処理することができる方法を提供することによって、そこから生じるグルコースポリマーのその後の任意の処理を簡略化することが可能となるだろう。

【００４２】

粗生成物に対する発生元でのかかる浄化処理によって、グルコースポリマー製造サーキットを汚染する可能性がある汚染物質の負担が有効に低減され、その結果、安全性に寄与し、腹膜透析用生成物の精製の程度に関して製薬産業の必要条件を満たすことが可能となる。

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【００４３】

したがって、本発明は、汚染物質の性質に関係なく、腹膜透析用グルコースポリマーの製造に原料として使用されるデンプン及びデンプン水解物中に存在する可能性のあるすべての炎症性分子の除去に有効であると判明している、注意深く選択され、かつ順序付けられた、いくつかの浄化工程の組み合わせを提供する。

【００４４】

腹膜透析用のグルコースポリマーの製造に原料として使用されるデンプンを浄化するための、本発明による方法であって、以下の工程：

－　蝋質トウモロコシデンプンを準備する工程と、

－　約５～約６、特に約５．５のｐＨのプロセス水中に乾燥物２０～４０％の濃度で蝋質デンプンを懸濁する工程と、

－　濃度１００～５００ｐｐｍ、好ましくは３００ｐｐｍの過酢酸の溶液でデンプンの懸濁液を処理する工程と、

－　デンプンから余分な水を除去し、次いで約５～約６、特に約５．５のｐＨに調整された脱イオン水中に、乾燥物２０～４０％の濃度で溶解する工程と、

－　その温度を約１００℃～１１０℃、好ましくは約１０７℃に上昇させ、次いでα－アミラーゼを約１０～２０分間、好ましくは約１５分間添加する工程と、

－　任意選択的に、洗浄性及び浄化性を有する酵素製剤で処理する工程と、

－　珪藻床を通して懸濁液を濾過する工程と、

－　超高吸着能力及び「マイクロ孔質」多孔度を有する製薬グレードの活性炭で処理する工程と、

－　「メソ孔質」多孔度を有する第２活性炭で処理する工程と、

－　任意選択的に、１００オングストロームを超える多孔度を有するマクロ孔質吸着剤ポリマー樹脂に通す工程と、

－　任意選択的に、５ｋＤａ連続的限外濾過にかける工程と、

－　多孔度０．２２μｍの滅菌フィルターに通して安全な濾過を行う工程と、

を含む、方法。

【発明を実施するための形態】

【００４５】

この方法の工程は、それらが示される順序で行われる。

【００４６】

好ましい実施形態において、任意の工程を含む、この方法のすべての工程が行われる。

【００４７】

本発明の文脈において：

－　「プロセス水」とは、そこで再循環される湿潤デンプン製造サーキットにおいて使用される水のすべて又は一部を意味し（特に、ファイルアドレス／／／Ｊ：／ＣＤＮＡ１

０９９４ＦＲＣ＿００１．ｐｄｆにてインターネットで入手可能な、Ｂｉｌａｎ ｅｎｅｒｇｅｔｉｑｕｅ ｄｅｓ ｉｎｄｕｓｔｒｉｅｓ ｄｅ ｔｒａｎｓｆｏｒｍａｔｉｏｎ ｄｅｓ ｃｅｒｅａｌｅｓ ｄａｎｓ ｌａ ＣＥＥの文書［Ｅｎｅｒｇｙ ｂａｌａｎｃｅ ｏｆ ｔｈｅ ｃｅｒｅａｌ ｐｒｏｃｅｓｓｉｎｇ ｉｎｄｕｓｔｒｉｅｓ ｉｎ ｔｈｅ ＥＥＣ］のダイアグラム５参照）；

－ 「洗浄性及び浄化性を有する酵素製剤」とは、Ｎｏｖｏｚｙｍｅｓ社によって販売されているＭａｎｎａｗａｙ（登録商標）などのマンナナーゼ型の酵素活性を意味し；

－ 「超高吸着能力及び「マイクロ孔質」多孔度を有する製薬グレードの活性炭」とは、Ｎｏｒｉｔ Ｃ Ｅｘｔｒａ ＵＳＰ活性炭に等しい多孔度を有する活性炭を意味し；

－ 「「メソ孔質」多孔度を有する活性炭」とは、ＥＮＯ－ＰＣ活性炭に等しい多孔度を有する活性炭を意味し；

－ 「１００オングストロームを超える多孔度を有するマクロ孔質吸着剤ポリマー樹脂」とは、ＤＯＷＥＸ ＯＰＴＩＤＯＲＥ ＳＤ２タイプの樹脂を意味する。

－ 「約」とは、その値の±１０％、好ましくは±５％を意味する。例えば、約１００は、９０～１１０、好ましくは９５～１０５を意味する。これは、正確な値も意味する。

【００４８】

炎症誘発性汚染物質は、細菌由来の上記のすべての分子である。

【００４９】

それらは、特に：

－ ＰＧＮ、

－ ＬＰＳ、

－ リポペプチド、

－ ＰＧＮ解重合生成物、特にＭＤＰ、

－ ホルミル化微生物ペプチド、例えばｆ－ＭＬＰ、

－ β－グルカン、

等であり得る。

【００５０】

ヒトにおいて治療上使用するためのグルコースポリマー（例えば、腹膜透析溶液）を調製する方法の浄化工程の有効性をモニターするために、本発明の文脈において使用される生体内炎症反応を測定する方法は、単球／マクロファージ型の系統（ＴＨＰ－１、及び／又はＲａｗ－Ｂｌｕｅ（商標））及び特異的天然免疫受容体を発現するトランスフェクト細胞系（ＨＥＫ－Ｂｌｕｅ（商標））を使用した細胞試験（「バイオアッセイ」）に基づき、その細胞試験は、本出願会社によって市販の細胞系から開発され、その先行特許出願に詳述されている。

【００５１】

したがって、好ましくは５つの細胞系が使用される：

－ Ｒａｗ－Ｂｌｕｅ（商標）細胞系：マウスマクロファージに由来するこの細胞系は、グルコースポリマーマトリックス及び誘導体（ＰＧＮ、リポペプチド、ＬＰＳ、ザイモサン、ＬＴＡ）中に存在し得る炎症誘発性汚染物質の大部分に応答する。したがって、それを使用することによって、試料中に存在する炎症誘発性分子の全体的なロードを推定することが可能となる。

－ ＨＥＫ－Ｂｌｕｅ（商標）ｈＴＬＲ２細胞系：ｈＴＬＲ２受容体を発現するこの細胞系は、ＴＬＲ２アゴニスト（特にＰＧＮ及びリポペプチド）に特異的に応答する。したがって、それを使用することによって、炎症反応のトリガーにおけるこれらの汚染物質のレベルを決定することが可能となる。

－ ＨＥＫ－Ｂｌｕｅ（商標）ｈＴＬＲ４細胞系：ｈＴＬＲ４受容体を発現するこの細胞系は、ＬＰＳに特異的に応答する。したがって、それを使用することによって、炎症反応のトリガーにおけるこれらの汚染物質のレベルを決定することが可能となる。

－ ＨＥＫ－Ｂｌｕｅ（商標）ｈＮＯＤ２細胞系：ｈＮＯＤ２受容体を発現するこの細胞系は、ＮＯＤ２アゴニストに特異的に応答する。したがって、それを使用することによ

って、炎症反応のトリガーにおけるＭＤＰ及び関連する分子のレベルを決定することが可能となる。

－　ＨＥＫ－Ｂｌｕｅ（商標）Ｎｕｌｌ２細胞系：これは、免疫受容体がトランスフェクトされていないコントロール細胞系である。この使用は、グルコースポリマー又はその水解物の溶液が毒性メカニズムを介してＳＥＡＰ産生を誘発しないことを立証するために必要である。

【００５２】

しかしながら、当業者は、他の市販の細胞系（ＩＭＧＥＮＥＸ）を使用してもよいし、又はそれらを製造してもよいことは留意されたい。

【００５３】

好ましい一実施形態において、細胞系は、０．５及び1×10^{6}細胞／ｍｌ（培地）の密度で使用され、グルコースポリマー又はその水解物の調製物と細胞との接触は約１６～２４時間続けられる。

【００５４】

用量反応曲線を用いて、汚染物質を定量化することができる。この用量反応曲線は特に、同じ細胞を用いて同じ条件下にて、汚染物質の用量を増加しながら作製され得る。用量反応曲線は詳細には、ＬＰＳ、ＰＧＮ、リポペプチド及びＭＤＰ標準を用いて作製される。

【００５５】

好ましくは、かかる用量反応曲線は、ＴＬＲ４を発現する細胞（例えば、ＴＨＰ－１、ＨＥＫ－Ｂｌｕｅ（商標）ｈＴＬＲ４及びＲａｗ－Ｂｌｕｅ（商標））ではＬＰＳの用量を増加して、ＴＬＲ２を発現する細胞（例えば、ＴＨＰ－１、ＨＥＫ－Ｂｌｕｅ（商標）ｈＴＬＲ２及びＲａｗ－Ｂｌｕｅ（商標））ではＰＧＮの用量を増加して、ＮＯＤ２を介して反応性である細胞（例えば、ＨＥＫ－Ｂｌｕｅ（商標）ｈＮＯＤ２）ではＭＤＰの用量を増加して、作製することができる。

【００５６】

この細胞試験は、出願人の特許出願：国際公開第２０１２／１４３６４７号パンフレット及び国際公開第２０１３／１７８９３１号パンフレットに記載のように行うことができる。

【００５７】

約５～約６、特に約５．５のｐＨのプロセス水中に乾燥物２０～４０％の濃度で蝋質デンプンの懸濁液を調製する工程の後に、本発明による方法の実際の第１浄化工程は、過酢酸で処理することにある。過酢酸は、濃度１００～５００ｐｐｍで使用することができる。優先的には、過酢酸３００ｐｐｍで処理された水が利用される。接触時間は、温度約５～約１５℃、好ましくは約１０℃で約２時間である。過酢酸でのデンプンのこの処理によって、特にＰＧＮタイプの汚染物質に関して、この方法の次の工程で汚染物質を低減する有効性が実証されている。この効果は、デンプンの懸濁液を調製するためにプロセス水が使用された場合に、すべて、より顕著である。

【００５８】

デンプンから余分な水を除去し、次いで約５～約６、特に約５．５のｐＨに調整された脱イオン水中にデンプンを乾燥物２０～４０％の濃度で溶解した後の以下の工程は、デンプンの液化である。そのデンプンは、温度約１００℃～１１０℃、好ましくは約１０７℃の懸濁液に入れ、α－アミラーゼを添加することによって液化される。酵素加水分解は、約１０～２０分間、好ましくは約１５分間続く。

【００５９】

以下の工程は任意選択的に、洗浄性及び浄化性を有する酵素製剤で処理することにあり得る。

【００６０】

Ｎｏｖｏｚｙｍｅｓ社によって市販されているＭａｎｎａｗａｙ（登録商標）酵素製剤など、この酵素活性のマンナナーゼ型は、細菌壊死組織片及び高分子量ＰＧＮなどのマク

ロ複合物を解離させるのに有効であると証明されている。
【００６１】
したがって、液化及び加水分解デンプンの分析によって高レベルのＰＧＮ型汚染物質が明らかになれば、それが実現される。
【００６２】
この酵素製剤の活性は、５０℃にて２４時間の処理時間、ＮａＯＨでｐＨ１０に調整された３２％（重量／体積）グルコースポリマー溶液中で最終濃度０．４％（体積／体積）にて使用される場合に最適である。
【００６３】
処理後、以下に例示されるように、その溶液は珪藻床に通して濾過される。
【００６４】
次いで、以下の工程は、逐次的に２種類の活性炭で処理することにある：
１）超高吸着能力及び「マイクロ孔質」多孔度を有する第１製薬グレード活性炭。
本出願会社は、Ｎｏｒｉｔ　Ｃ　Ｅｘｔｒａ　ＵＳＰタイプの活性炭の使用を勧める。Ｃ　Ｅｘｔｒａ　ＵＳＰカーボンは、ＰＧＮ及びその分解生成物の除去に有効であると証明されているからである。その作用は、ＨＣｌでｐＨ４．５に調整された３２％（重量／体積）グルコースポリマー溶液中で最終濃度０．５％（重量／体積）にて添加された場合に最適である。この処理は、攪拌しながら８０℃で１時間行われる。
２）「メソ孔質」多孔度を有する第２活性炭。
本明細書では、ＥＮＯ－ＰＣタイプの活性炭が好ましい。この品質の活性炭は、広い作用範囲を有し、分子量＜１００ｋＤａを有する分子（例えば、ＬＰＳ及びＰＧＮの分解生成物）を優先的に除去することが可能となる。本明細書において、この活性炭も、含有量０．５％、ｐＨ４．５にて温度８０℃で１時間使用される。これら２種類の活性炭を通した後に得られる溶液は最終的に、多孔度閾値３μｍの膜を通して濾過される。
【００６５】
任意選択の以下の工程は、１００オングストロームを超える多孔度を有するマクロ孔質吸着剤ポリマー樹脂を通して処理することにある。
【００６６】
同じファミリーの他の樹脂よりも、汚染分子（ＰＧＮ以外）の除去範囲が広い、Ｄｏｗｅｘ　ＳＤ２樹脂が選択される。
【００６７】
以下に例示されるように、３２％グルコースポリマー溶液（２５０ｍｌ）は、この樹脂２０ｍｌを含有するカラムを通して溶出される。
【００６８】
この工程は、ＬＰＳが多量にロードされ、かつ／又は洗浄性及び浄化性を有する酵素製剤で処理された、原料を使用することが推奨される。
【００６９】
また任意選択的に、以下の工程は、５ｋＤａのカットオフ閾値を有する膜での連続的限外濾過からなる。
【００７０】
この工程は、ＰＧＮ解重合生成物が多量にロードされた原料を使用することが推奨される。
【００７１】
この最終工程は、カットオフ閾値０．２２μｍを有する膜での安全な濾過からなる。
【００７２】
本発明は、説明的かつ非制限的であることが意図される以下の実施例から、より明確に理解されよう。
【図面の簡単な説明】
【００７３】
【図１】脱イオン水中又はプロセス水中のいずれかで調製された原料によって誘発される

細胞応答。この結果は、６２０ｎｍで測定される吸光度値として表される（ＳＥＡＰ試験）。
【図２】未濾過原料によって、及び３０ｋＤａの限外濾過後に得られる濾液によって誘発される細胞応答。この結果は、６２０ｎｍで測定される吸光度値として表される（ＳＥＡＰ試験）。
【図３】脱イオン水中で調製され、かつ過酢酸で処理された、又は処理されていない原料によって誘発される細胞応答。この結果は、６２０ｎｍで測定される吸光度値として表される（ＳＥＡＰ試験）。
【図４】プロセス水中で調製され、かつ過酢酸で処理された、又は処理されていない原料によって誘発される細胞応答。この結果は、６２０ｎｍで測定される吸光度値として表される（ＳＥＡＰ試験）。
【図５】プロセス水中で調製され、かつＭａｎｎａｗａｙ（登録商標）で処理された原料によって誘発される細胞応答。この結果は、６２０ｎｍで測定される吸光度値として表される（ＳＥＡＰ試験）。
【図６】（Ａ）浄化の手順１のために調製された原料によって誘発される細胞応答。この結果は、６２０ｎｍで測定される吸光度値として表される（ＳＥＡＰ試験）。（Ｂ）手順１の間の汚染物質ロードの減少。各細胞タイプに関して、ロード値は用量反応曲線から得られ、１００％に低減された、ＤＥＷＲＡＤ試料で得られた値に対するパーセンテージとして表される。
【図７】（Ａ）手順２のために調製された原料によって誘発される細胞応答。この結果は、６２０ｎｍで測定される吸光度値として表される（ＳＥＡＰ試験）。（Ｂ）「簡略化された」浄化手順の間の汚染物質ロードの減少。ロード値は用量反応曲線から得られ、１００％に低減された、ＤＥＷＲＡＤ試料で得られた値に対するパーセンテージとして表される。
【図８】（Ａ）手順３のために調製された原料によって誘発される細胞応答。この結果は、６２０ｎｍで測定される吸光度値として表される（ＳＥＡＰ試験）。（Ｂ）手順３の間の汚染物質ロードの減少。ロード値は用量反応曲線から得られ、１００％に低減された、ＤＥＷＲＡＤＭ試料で得られた値に対するパーセンテージとして表される。
【図９】手順４の間の汚染物質ロードの減少。ロード値は用量反応曲線から得られ、１００％に低減された、ＤＥＷＲＡＤＭ試料で得られた値に対するパーセンテージとして表される。
【実施例】
【００７４】
実施例１：炎症反応試験に使用される細胞系の特徴付け
本出願会社からの国際公開第２０１３／１７８９３１号パンフレットの教示に従って、非発熱性水（注入用）中の未汚染マルトデキストリン（ＰＧＮ＜１ｎｇ／ｇ、ＬＰＳ＜０．５ｎｇ／ｇ、ＭＤＰ＜０．２ｎｇ／ｇ）の溶液に３２％（重量／体積）で溶解された、標準アゴニスト分子：ＬＰＳ、ＰＧＮ及びＭＤＰを用いて、用量反応曲線が作製される。
【００７５】
Ｒａｗ－Ｂｌｕｅ（商標）及びＨＥＫ－Ｂｌｕｅ（商標）ｈＴＬＲ２、ｈＴＬＲ４、ｈＮＯＤ２及びＮｕｌｌ２細胞が、増加濃度のアゴニストと共にインキュベートされ、その細胞応答は、ＳＥＡＰ活性を定量化することによって測定される：
－　Ｒａｗ－Ｂｌｕｅ（商標）細胞系：この細胞は、グルコースポリマーマトリックス及び誘導体中に存在しやすい主要な炎症性分子（ＰＧＮ及びＬＰＳ）に応答し；特に、ＰＧＮに対して高い反応性を有するが、その解重合生成物（ＭＤＰ）には応答しない。
－　ＨＥＫ－Ｂｌｕｅ（商標）ｈＴＬＲ２細胞系：ＰＧＮに対して高い反応性；この細胞は、ＬＰＳ及びＭＤＰに対して反応性を示さず、
－　ＨＥＫ－Ｂｌｕｅ（商標）ｈＴＬＲ４細胞系：ＬＰＳに対して高い反応性；この細胞は、ＰＧＮ及びＭＤＰに対して反応性を示さず、
－　ＨＥＫ－Ｂｌｕｅ（商標）ｈＮＯＤ２細胞系：ＭＤＰに対して高い反応性；この細

胞は、ＰＧＮ及びＬＰＳに対して反応性を示さず、
－　ＨＥＫ－Ｂｌｕｅ（商標）Ｎｕｌｌ２細胞系：細胞毒性なしのコントロール；この細胞は、ＰＧＮ、ＬＰＳ及びＭＤＰに対して反応性を示さない。
【００７６】
実施例２：グルコースポリマー原料の製造
原料製造工程はすべて、パイロット規模で行われた。
【００７７】
原料は、乾燥物２０～４０％（重量／体積）の濃度で懸濁された蝋質デンプンから製造される。
【００７８】
懸濁状態のデンプンを４℃で一晩放置し、そこから余分な水を除去し、次いでｐＨ５．５に調整された水に濃度２０～４０％で再懸濁する。次いで、懸濁液を１０７℃に加熱し、次いでα－アミラーゼの存在下にて１５分間処理する。液化した後、１Ｎ　ＨＣｌ（ｐＨ４）の添加によって、酵素反応を止め、珪藻床（４０μｍ）を通して液化生成物を濾過する。
【００７９】
試験に応じて、一般的に使用されるこの水によって、原料が原因の汚染の比率を推定するために、デンプンを脱イオン水又はプロセス水に溶解する。
【００８０】
方法の最初に汚染物質のロードを減らすため、デンプン懸濁液を０．０３％過酢酸溶液で処理することができる。この場合には、蝋質デンプンを濃度２０～４０％（重量／体積）で懸濁し、４℃で一晩放置し、余分な水をそこから除去し、それを再懸濁して、次いで過酢酸（３００ｐｐｍ）の存在下にて処理する。余分な水をさらに除去した後、ｐＨ５．５に調整された脱イオン水に濃度２０～４０％（重量／体積）でデンプンを再懸濁する。前と同様に、溶液を加熱し、α－アミラーゼを１５分間添加する。１Ｎ　ＨＣｌ（ｐＨ４）を添加して、反応を止め、次いで濾過する。
【００８１】
本出願会社からの国際公開第２０１３／１７８９３１号パンフレットの教示から、Ｍａｎｎａｗａｙ（登録商標）酵素製剤は、最終グルコースポリマー製造において、細菌壊死組織片及び高分子量ＰＧＮなどのマクロ複合物を解離させるのに有効であると示されている。その活性は、５０℃にて２４時間の処理時間、ＮａＯＨでｐＨ８に調整された３２％（重量／体積）グルコースポリマー溶液中で最終濃度０．４％（体積／体積）にて使用した場合に最適である。処理後、溶液をＨＣｌで中和し、８５℃で１０分間加熱することによって、酵素を不活化する。しかしながら、Ｍａｎｎａｗａｙ（登録商標）酵素製剤は、微量のＬＰＳで汚染されている。さらに、微量の酵素が処理後に残り得る。これらの外因性汚染を考慮に入れるために、酵素処理工程は、濾過前、したがって浄化手順の開始前に、原料製造の最後に置かれる。
【００８２】
それぞれの工程後、試料を採取して、全体的な炎症性ロード（Ｒａｗ－Ｂｌｕｅ（商標）細胞での試験）を分析し、ＰＧＮ、ＬＰＳ及びＭＤＰ汚染物質の量（ＨＥＫ－Ｂｌｕｅ（商標）細胞応答）を分析する。
【００８３】
実施例３：浄化前の原料によって誘発される炎症反応の比較
これらの試験の目的は、原料の炎症誘発反応性を決定すること、バイオ汚染物質の性質を同定すること、かつ浄化手順を行う前にその汚染物質を低減することを可能にする手段を試験することである。種々の原料中のバイオ汚染物質の存在は、特定の汚染物質に特異的な炎症反応の概要を把握するために、５つの細胞タイプを使用することによって分析される：
－　Ｒａｗ－Ｂｌｕｅ（商標）細胞系：ＰＧＮに対して高い反応性を有する汚染物質、
－　ＨＥＫ－Ｂｌｕｅ（商標）ｈＴＬＲ２細胞系：ＰＧＮ及びリポペプチドに対して高

い反応性、
－　ＨＥＫ－Ｂｌｕｅ（商標）ｈＴＬＲ４細胞系：ＬＰＳ対して高い反応性、
－　ＨＥＫ－Ｂｌｕｅ（商標）ｈＮＯＤ２細胞系：ＭＤＰ及びＰＧＮ解重合生成物、
－　ＨＥＫ－Ｂｌｕｅ（商標）Ｎｕｌｌ２細胞系：細胞毒性なしのコントロール。
【００８４】
これらの細胞試験については、３．２％（重量／体積）に等しい最終濃度が得られるように、細胞培地中に原料が希釈される。最大の細胞応答に対する活性（ＳＥＡＰ応答）として結果が示される。
【００８５】
試験１：ｐＨ５．５の水に２０％で蝋質デンプンを溶解し、次いでα－アミラーゼの存在下で処理した。２つの調製物を試験する：
－　調製物１：蝋質デンプン＋脱イオン水（ＷＤ）
－　調製物２：蝋質デンプン＋プロセス水（ＷＲ）
【００８６】
方法の各段階：水中でのデンプンの懸濁、α－アミラーゼの添加（Ｅ）、液化段階（ＤＥ）の後に試料を採取した。細胞試験の結果を図１に示す。
【００８７】
脱イオン水（ＷＤ）中のデンプンの懸濁液は、少量のＰＧＮ及びＬＰＳを上清中に放出した（ＨＥＫ－ＴＬＲ２、ＨＥＫ－ＴＬＲ４及びＲａｗ細胞における中程度の応答）。酵素の添加（ＷＤ＋Ｅ）によって、汚染は生じなかった。一方、液化によって、ＨＥＫ－ＴＬＲ２及びＨＥＫ－ＴＬＲ４で測定された、ＤＥＷＤ試料の強い応答によって証明されるように、多量の汚染物質が放出された。これらの結果から、ＰＧＮ及びＬＰＳはデンプン粒と関連しており、かつ液化はその放出を引き起こしたことが示されている。
【００８８】
脱イオン水と比較すると、ＴＬＲ２応答が飽和されていることから、プロセス水は多量のＰＧＮを含有する。ＨＥＫ－ＴＲＬ４細胞の応答について小さな増加が確認され、ＰＧＮより低いレベルであるが、このプロセス水中のＬＰＳの存在が示されている。
【００８９】
ＨＥＫ－ＮＯＤ２細胞の応答は、プロセス水に溶解されたデンプンの液化後に確認された応答に関して、どちらの調製物に関しても有意ではない、又は比較的低い。この確認から、ＰＧＮは特に分解されておらず、したがって本質的に大きな複合物の形で存在することが示唆されている。
【００９０】
この仮説を検証するために、採取した試料をＣｅｎｔｒｉｃｏｎ　３０　ｔｙｐｅの精密濾過ユニット（カットオフ閾値３０ｋＤａ）で濾過した。ＨＥＫ－ＴＬＲ２及びＨＥＫ－ＴＬＲ４での細胞試験をその濾液で行い、未濾過生成物で得られた応答と、その応答を比較した。その結果を図２に示す。
【００９１】
プロセス水（ＷＲ）中のデンプン懸濁液から得られる試料は、相当する濾液中で発見されない、多量のＰＧＮ及びＬＰＳを含有する。プロセス水（水Ｒ）のみがＨＥＫ－ＴＬＲ２及びＨＥＫ－ＴＬＲ４細胞における強い応答を誘導し、採取されたＷＲ試料中に存在するＬＰＳ及びＰＧＮタイプの汚染物質は、懸濁液工程から主に生じるという証拠が導かれる。さらに、脱イオン水（ＷＤ）中の懸濁液で確認された中程度の応答から、非液化デンプンはほとんど汚染物質を放出しないことが確認される。
【００９２】
逆に、デンプンの液化から生じる２つの試料（ＤＥＷＤ及びＤＥＷＲ）は高度に汚染されている。有意な微量のＰＧＮ又はＬＰＳは濾液中で見られず、そのことは分子量＞３０ｋＤａの分子又は凝集体としてのその存在を裏付ける。したがって、これらのデータから、プロセス水が原因となる、かつ／又は液化工程によるデンプン粒から放出された、大分子、凝集体及び／又は壊死組織片の存在が支持される。

【００９３】
試験２：この試験において、過酢酸の効果は、脱イオン水に溶解されたデンプンの同一バッチでの実験を実施することによって評価された。
【００９４】
ｐＨ５．５の水に２０％で蝋質デンプンを溶解し、次いでα－アミラーゼの存在下で処理した。２つの調製物を試験した：
－　調製物１：蝋質デンプン＋脱イオン水（ＷＤ）
－　調製物２：過酢酸（ＷＡＤ）で処理した後の蝋質デンプン＋脱イオン水
【００９５】
方法の各段階：水中でのデンプンの懸濁、α－アミラーゼ（Ｅ）の添加、液化（ＤＥ）段階後に試料を採取した。細胞試験の結果を図３に示す。
【００９６】
脱イオン水中のデンプンの懸濁液（調製物１）は、少量のＰＧＮ及びＬＰＳを上清中に放出した（ＨＥＫ－ＴＬＲ２、ＨＥＫ－ＴＬＲ４及びＲａｗ細胞を有する脱イオン水試料からの応答）。酵素の添加によって、汚染は生じなかった。一方、液化によって、ＨＥＫ－ＴＬＲ２及びＨＥＫ－ＴＬＲ４試験においてＤＥＷＤ試料で確認された強い応答によって証明されるように、多量のバイオ汚染物質が放出された。これらの結果から、ＰＧＮ及びＬＰＳはデンプン粒と強く関連しており、かつ液化はそれらの溶解を生じさせることが確認される。
【００９７】
調製物２で得られた結果から、デンプン粒と関連するＰＧＮに対する中和作用を過酢酸が有したことが分かる。実際に、ＷＡＤ及びＷＡＤ＋Ｅ試料で得られた値がアッセイの検出閾値であることから、液化前に試料におけるＴＬＲ２応答はない。さらに、ＴＬＲ２応答は、液化後に有意に低減される（ＤＥＷＤに対してＤＥＷＡＤ）。
【００９８】
一方、調製物２で得られたＴＬＲ４応答は、すべての試料に関して過酢酸の非存在下で確認される応答と同様であるため、処理はＬＰＳに対してほとんど効果がない。このデータから、ＬＰＳは過酢酸での処理に対してあまり感受性がないことが示されている。さらに、これらの汚染物質の存在によって、なぜＰＧＮの除去によって、Ｒａｗ細胞で確認された炎症反応の中程度の減少のみ引き起こされるのか説明がつく。
【００９９】
ＨＥＫ－ＮＯＤ２応答は有意ではない。この確認から、過酢酸の作用は、ＰＧＮの小断片及び／又はＭＤＰタイプの解重合生成物など、潜在的に炎症性の分解生成物の形成によって達成されないが、実際はＰＧＮの炎症性活性の中和によって達成されないことが示されている。
【０１００】
試験３：この試験において、過酢酸の効果は、プロセス水に溶解されたデンプンの同一バッチでの実験を実施することによって評価された。
【０１０１】
ｐＨ５．５の水に乾燥物約３０％にて蝋質デンプンを溶解し、次いでジェットクッカーでα－アミラーゼの存在下で処理した。２つの調製物を試験した：
－　調製物１：プロセス水に溶解された蝋質デンプン、４℃で一晩放置され、そこから余分な水が除去され、次いでｐＨ５．５に調整されたプロセス水に溶解される（ＷＲ）。
－　調製物２：プロセス水に溶解された蝋質デンプン、４℃で一晩放置され、次いで過酢酸で３００ｐｐｍにて処理される。余分な水を再び除去し、ｐＨ５．５に調整された脱イオン水に溶解される（ＷＲＡＤ）。
【０１０２】
したがって、調製物１は標準プロトコルに相当する。調製物２において、新たな汚染物質を導入しないように過酢酸で処理した後に、脱イオン水にデンプンを溶解する。
【０１０３】

プロセス水中でデンプンを懸濁し、液化する工程の後に、試料を採取した。細胞試験の結果を図４に示す。

【０１０４】

予想されるように、プロセス水は、調製物１において有意な量の可溶性ＰＧＮの原因となった（ＷＲ試料に対するＴＬＲ２応答）。液化後、ＴＬＲ２応答は飽和し（ＤＥＷＲ）、このことから、デンプン粒と関連するＰＧＮタイプの汚染物質の放出が裏付けられる。比較すると、水（ＷＲＡＤ）が原因であろうが、又は液化（ＤＥＷＲＡＤ）によって放出されようと、調製物２におけるＰＧＮのロードを低減するのに、過酢酸処理は非常に有効であった。

【０１０５】

プロセス水は多量の可溶性ＬＰＳ（ＷＲ試料におけるＴＬＲ４応答）にも寄与したが、ＰＧＮで確認されたことと異なり、液化では、このタイプの汚染物質の放出が少なかった（ＷＲ及びＤＥＷＲ試料に対するＴＬＲ４応答）。比較すると、プロセス水が原因の汚染物質ロードのわずかな減少が調製物２（ＷＲＡＤ）において確認されることから、過酢酸は、ＬＰＳのロードに対して中程度の効果を有した。

【０１０６】

どちらの調製物においても、水にはＭＤＰ又はＰＧＮ断片がロードされておらず、液化によってその少量が放出された（ＤＥＷＲ及びＤＥＷＲＡＤに対して同様なＮＯＤ２応答）。

【０１０７】

最後に、全体的な炎症性ロードを反映するＲａｗ細胞の応答は、過酢酸の作用後に試料において低減され、それは、調製物２におけるＰＧＮの有意な減少と一致する（ＷＲに対してＷＲＡＤ、及びＤＥＷＲに対してＤＥＷＲＡＤ）。したがって、過酢酸の作用後のＲａｗ細胞の残存する反応性は主に、プロセス水が原因のＬＰＳによるものである。

【０１０８】

全体的に見てこのデータから、浄化手順前の、原料中のＰＧＮのロードの有意な減少における過酢酸による処理の有効性が実証されている。浄化の利点は、この方法の次の工程において継続する。

【０１０９】

試験４：最初の試験から、プロセス水が原因となり、かつ／又は液化工程によってデンプン粒から放出される炎症性分子の大部分は、凝集体及び／又は壊死組織片などの高分子量複合体の形で存在することが示唆されている。

【０１１０】

この新しい試験において、高分子量凝集体及びＰＧＮの解離にこの酵素製剤が有効であるため、Ｍａｎｎａｗａｙ（登録商標）酵素での処理が、液化工程と濾過工程の間に加えられた。

【０１１１】

蝋質デンプンをｐＨ５．５のプロセス水中に約３０％で溶解し、一晩放置し、次いで過酢酸で３００ｐｐｍにて処理した。余分な水を除去した後、ｐＨ５．５に調整された脱イオン水に溶解し、α－アミラーゼを液化工程のために添加した（ＤＥＷＲＡＤ）。次いで、その溶液をｐＨ８に調整し、次いでＭａｎｎａｗａｙ（登録商標）酵素製剤（０．４％）の存在下にて５０℃で２４時間処理した。最後に、溶液を珪藻床で濾過した（ＤＥＷＲＡＤＭ）。

【０１１２】

過酢酸での処理（ＷＲＡＤ）工程、液化（ＤＥＷＲＡＤ）工程、及び酵素製剤Ｍａｎｎａｗａｙ（登録商標）（ＤＥＷＲＡＤＭ）の作用工程後に、試料を採取した。細胞試験の結果を図５に示す。

【０１１３】

予想されるように、プロセス水は、調製物における有意な量の可溶性ＰＧＮに寄与した（ＷＲＡＤ）。この試験において、ＴＬＲ２及びＲａｗ細胞の応答が、過酢酸（ＷＲＡＤ

）作用後にまだ非常に高く、かつ液化（ＤＥＷＲＡＤ）後に大きく飽和されていたことから、水は特にＰＧＮに汚染されていたに違いない。しかしながら、Ｍａｎｎａｗａｙ（登録商標）の作用後のＲａｗ細胞の応答の減少に留意することが可能であり、酵素製剤が、炎症性汚染物質の一部を実際に除去したことの証拠である（ＤＥＷＲＡＤに対してＤＥＷＲＡＤＭ）。

【０１１４】

ＰＧＮと異なり、ＬＰＳのロードは、液化後にほとんど変わらず、大部分はプロセス水が原因となる証拠である。一方、Ｍａｎｎａｗａｙ（登録商標）の添加後、ＴＬＲ４応答の強い増加があり、溶液自体がＬＰＳで汚染されていると仮定すると、それは予想可能であった。

【０１１５】

この最後の結果から、ＬＰＳのこの外因性の原因は確実に、浄化手順中に考慮に入れなければならいことが示されている。

【０１１６】

実施例４：原料により誘発される炎症反応に対する浄化手順の効果

グルコースポリマー（完成品の形での）の様々な浄化処理は既に、個々に、かつ組み合わせて試験されており、本出願会社からの国際公開第２０１３／１７８９３１号パンフレットに報告されている。この作業によって、試料中に存在する各タイプの汚染物質に最も適した処理を同定し、かつグルコースポリマーマトリックスへのその適用条件を決定することが可能となる。

【０１１７】

本発明者らは、最終精製工程における完成品に対して、デンプン水解物などの複合混合物に対して、開発されたこれらの処理の有効性を試験することを望んだ。

【０１１８】

選択される処理は：

－　活性炭を通しての処理：本発明の研究のために選択された活性炭は：ＰＧＮの除去におけるその有効性のためのＣ　ｅｘｔｒａ　ＵＳＰ；分子量＜１００ｋＤａの汚染物質（例えば、ＬＰＳ及びＰＧＮ分解生成物）に対するその広い範囲用のＥＮＯ－ＰＣである。

【０１１９】

カーボンの作用は、それらが１Ｎ　ＨＣｌでｐＨ４．５に調整された３２％（重量／体積）グルコースポリマー中に、最終濃度０．５％（重量／体積）で添加された場合に、その最大となる。その処理は８０℃で攪拌しながら、１時間行われる。処理後、溶液（５００ｍｌ）をＮａＯＨで中和し、次いで焼結ガラスフィルター（多孔度３μｍ）で濾過した。炭素処理がバッチ式で行われ、かつ加熱、中和及び濾過工程が必要であると仮定すると、他の処理前にそれらが行われる。

－　吸着樹脂の通過：本発明の研究のために選択される樹脂は：広範囲の汚染物質の除去のための、Ｄｏｗｅｘ　ＳＤ２；ＬＰＳ型分子の保持におけるその効率のための、ＭＮ－１００である。

【０１２０】

実験では、各樹脂２０ｍｌを含有するカラムで、３２％グルコースポリマー溶液（２５０ｍｌ）を溶出する。先の研究の教示によって、この手順は、グルコースポリマー溶液によって樹脂のいかなる飽和現象も引き起こさないことが示されている。

－　５ｋＤａでの限外濾過：限外濾過処理の目的は、グルコースポリマー溶液中にまだ存在する小分子（ＰＧＮ及びＭＤＰの分解生成物）を除去することである。したがって、この工程は任意であり、ＮＯＤ２応答がポジティブである場合には、手順の最後に用いられる。

【０１２１】

そのテストは、５ｋＤａフィルターで速度２５ｍｌ／分で室温にて、グルコースポリマー溶液を連続的に３時間注入することによって行われる。濾液の減少を補うために、濃縮

水を出発溶液中に注入し、滅菌脱イオン水を添加することによって初期体積（１００ｍｌ）に連続的に調節する。

【０１２２】

様々な浄化工程が実験室で行われた。各工程後、全体的な炎症性ロード（Ｒａｗ細胞の応答）及びバイオ汚染物質の量（ＴＬＲ２、ＴＬＲ４及びＮＯＤ２応答）をアッセイするために、無菌条件下にて試料を採取し、細胞試験において使用した。飽和細胞の応答に関しては、試料を前もって希釈しておいた（１０倍希釈（１／１０th）及び１００倍希釈（１／１００th））。

【０１２３】

汚染物質の濃度は、本出願会社からの国際公開第２０１３／１７８９３１号パンフレットの教示に従って、実施例１に記載の標準アゴニスト分子：ＬＰＳ、ＰＧＮ及びＭＤＰで作製された用量反応曲線を参照することによって計算され、確立された。

【０１２４】

次いで、汚染物質濃度を試料中に存在するグルコースポリマーの量まで低減した。次いで、各浄化工程後に得られた値を出発原料の値と比較し、その結果、浄化手順の有効性が推定された。この結果は、汚染物質の初期ロードに対する減少％として、かつ各バイオアッセイの検出の限界値（ＬＯＤ）に対する残留汚染（ｎｇ／ｇ（グルコースポリマー））として表される：ＨＥＫ－ＴＬＲ２、＜１ｎｇ　ＰＧＮ；ＨＥＫ－ＴＬＲ４、＜０．５ｎｇ　ＬＰＳ；ＨＥＫ－ＮＯＤ２、＜０．２ｎｇ　ＭＤＰ；Ｒａｗ細胞、＜２ｎｇ　ＰＧＮ。

【０１２５】

以下の手順を分析した：

－　手順１：この最初の浄化試験において、実施例３、試験３に記載のプロトコルに従って原料を調製した：蛸質デンプン（約２０％）をプロセス水に溶解し、４℃で一晩放置し（ＷＲ）、次いで３００ｐｐｍにて過酢酸で処理する。余分な水を除去し、次いでｐＨ５．５の脱イオン水に溶解する（ＷＲＡＤ）。液化し、次いで珪藻床で濾過する（ＤＥＷＲＡＤ）。

【０１２６】

次いで、以下の組み合わせ：

１．Ｃ　ｅｘｔｒａ　ＵＳＰカーボン（０．５％）での処理に続いて、焼結ガラスフィルター（３μｍ）での濾過、

２．ＥＮＯ－ＰＣカーボン（０．５％）での処理に続いて、焼結ガラスフィルター（３μｍ）での濾過、

３．ＳＤ２樹脂カラムの通過、

４．滅菌フィルター濾過（０．２２μｍ）

を用いて、ＤＥＷＲＡＤ試料に相当する原料を浄化した。

【０１２７】

次の浄化手順の原料を調製する様々な工程の後に、試料を採取した。

【０１２８】

細胞試験の結果を図６に示す。

【０１２９】

最初に、過酢酸で処理することによって（ＷＲに対してＷＲＡＤ）、液化前にＰＧＮ含有量が減少したが（ＴＬＲ２及びＲａｗ細胞応答）、ＬＰＳに対して有意な効果はなかった（ＴＬＲ４応答）。ＴＬＲ２及びＲａｗ細胞応答はＤＥＷＲＡＤ試料に関して飽和していることから、液化によって、デンプン粒と関連する多量のＰＧＮが放出されるが、ＴＬＲ４応答は、ごくわずかのみ増加する。この試験において、過酢酸を作用させた後でさえ、ＴＬＲ２及びＲａｗ細胞応答が飽和していることから、デンプンにはＰＧＮがかなりロードされていたことが、結論付けられる（図６Ａ）。

【０１３０】

浄化工程の有効性を計算するために、各細胞タイプに対して、初期の汚染物質濃度をＤ

ＥＷＲＡＤ試料から決定し；飽和細胞応答（ＴＬＲ２及びＲａｗ細胞）に関しては、試料を前もって１００倍に希釈し、次いで濃度の値を希釈率によって補正した。各浄化工程後に、汚染物質の残留濃度を計算し、次いで、その値を初期濃度と関連付けて、減少％として結果を表した（図６Ｂ及び表Ｉ）。

【０１３１】

最も意外なことには、浄化手順は、ＰＧＮロードの減少＞９９．９％（検出閾値）と共に、ＴＬＲ２応答の非常に顕著な減少を可能にする。さらに、Ｃ　ｅｘｔｒａ　ＵＳＰ及びＥＮＯ－ＰＣカーボンは直列で、樹脂を通過させる前にＰＧＮの除去に対して相加効果を有し、その相補的作用のために、これら２種類のカーボンの選択が強化される。

【０１３２】

方法の最後に、この細胞系に関して検出限界値に達すると仮定すると、この手順は、ＮＯＤ２応答の低減にも有効である。ＰＧＮと比較すると、減少は９０％のみであるが、この値は、ＮＯＤ２アゴニスト（ＰＧＮ及びＭＤＰ解重合生成物）が出発原料中に微量で存在したという事実に関連する。

【０１３３】

ＬＰＳの除去は手順の最後で９９．９％を超え、ＴＬＲ４応答も検出限界値に達する。ＳＤ２樹脂の通過は、この浄化閾値に達することに留意されたい。実際に、２種類のカーボンでの処理後に、有意な微量のＬＰＳがまだ存在する。しかしながら、材料はＬＰＳで高度に汚染されており、なぜ２種類のカーボンの併用作用がすべてを除去するのに十分ではなかったのかの説明がつく。

【０１３４】

最後に、Ｒａｗ細胞の応答から、原料中に存在するすべてのタイプの汚染物質の除去における、この最初の手順の有効性が裏付けられる。実際に、有意な炎症反応（検出限界値未満）はもはや確認されず、それは全体的な炎症性ロードの９９．９％を超える減少を反映している。

【０１３５】

【表１】

表 I: 減少値(初期ロードに対する%として)および浄化方法の最後での残留ロード

	HEK-TLR2	HEK-TLR4	HEK-NOD2	Raw
減少 (%)	> 99.9	> 99.9	> 90	> 99.9
残留ロード	<1 ng / g	<0.5 ng / g	<0.2 ng / g	<LOD

LOD, 検出限界値

【０１３６】

－　手順２：最初の試験から、ＬＰＳ含有量が原料中で高すぎないという条件で、ＳＤ２樹脂を任意選択的に使用することができることが示唆されている。この仮説を検証するために、上述のプロトコルに従って、原料を調製した：蛸質デンプン（約２０％）をプロセス水に溶解し、４℃で一晩放置し（ＷＲ）、次いで３００ｐｐｍにて過酢酸で処理する。余分な水を除去し、次いでｐＨ５．５の脱イオン水に溶解する（ＷＲＡＤ）。液化し、次いで珪藻床で濾過する（ＤＥＷＲＡＤ）。

【０１３７】

次いで、ＳＤ２樹脂に通すことなく、「簡略化された」組み合わせを用いて、ＤＥＷＲＡＤ試料に相当する原料を浄化した。

１．Ｃ　ｅｘｔｒａ　ＵＳＰカーボン（０．５％）での処理に続いて、焼結ガラスフィルター（３μｍ）での濾過、

２．ＥＮＯ－ＰＣカーボン（０．５％）での処理に続いて、焼結ガラスフィルター（３μｍ）での濾過、

３．滅菌フィルター濾過（０．２２μｍ）。

【０１３８】
原料を調製する様々な工程、次に浄化手順の工程の後に、試料を採取した。
【０１３９】
細胞試験の結果を図７に示す。
【０１４０】
液化前に、試料ＷＲで得られたＴＬＲ２応答が飽和し、それによってプロセス水がＰＧＮで高度に汚染されていることが示されている。過酢酸での処理によって、汚染は一部低減されるが（ＷＲＡＤ）、ＴＬＲ２応答がＤＥＷＲＡＤ試料でもう一度飽和することから、液化によって新たなＰＧＮが放出される。逆に、プロセス水から生じようと、液化から生じようと、ＬＰＳ汚染（ＴＬＲ４応答）は中程度のままである。したがって、この新たな手順に使用される原料は、前の原料よりもＰＧＮで高度に汚染されているが、ＬＰＳは少ない（図７Ａ）。
【０１４１】
次いで、２種類のカーボン：Ｃ－Ｅｘｔｒａ及びＥＮＯ－ＰＣと０．２２μｍフィルター濾過を組わせた浄化手順に従って、ＤＥＷＲＡＤ試料を処理した。ＤＥＷＲＡＤ試料中に含有される汚染物質の初期ロードは１００％まで低減され、減少の相対％は、各工程後の残留汚染物質ロードから計算された（図７Ｂ）。
【０１４２】
原料中のＰＧＮ汚染は高く、ＳＤ２樹脂に通していないにもかかわらず、この浄化手順によって、ＴＬＲ２応答の非常に顕著な減少（＞９９．９％）が可能となった。この結果から、このタイプの汚染物質の除去におけるカーボンの有効性が裏付けられる。方法の最後でＮＯＤ２応答の検出限界値に達するため、この組み合わせは、ＰＧＮ解重合生成物のロードを低減するのにも十分である。
【０１４３】
最初の浄化試験と異なり、ＳＤ２樹脂はここで、ＬＰＳ汚染の低減に必要であると思われない。実際に、ＴＬＲ４応答も検出限界値に達し、ＬＰＳの除去は手順の最後で９９．９％を超える。
【０１４４】
最後に、Ｒａｗ細胞の応答から、少ないＬＰＳロードを有する原料中に存在する汚染物質を除去する、この「簡略化」手順の有効性が裏付けられる。実際に、手順の最後には、もはやいかなる有意な炎症反応もない（検出限界値未満）。
【０１４５】
－　手順３：この第３の浄化試験では、実施例３の試験４に記載のプロトコルに従って、原料を調製し、Ｍａｎｎａｗａｙ（登録商標）酵素での処理を、液化工程と珪藻床での濾過工程と間に加えた。実際に、この酵素製剤が、高分子量ＰＧＮ及び凝集体の解離に有効であると証明された。
【０１４６】
しかしながら、Ｍａｎｎａｗａｙ（登録商標）はＬＰＳで汚染されている。外因性の原因を排除するため、個々の試験においてＬＰＳタイプの分子を保持するその効率のために、ＳＤ２樹脂に代わりにＭＮ－１００樹脂を使用した。
【０１４７】
調製：蝋質デンプン（乾燥物約３０％を含有する）をプロセス水に溶解し、４℃で一晩放置し、次いで０．０３％過酢酸で処理する。余分な水を除去し、次いでｐＨ５．５に調整された脱イオン水に溶解する（ＷＲＡＤ）。α－アミラーゼを添加し、液化する（ＤＥＷＲＡＤ）。ｐＨ８に調整し、Ｍａｎｎａｗａｙ（登録商標）（０．４％）で５０℃にて２４時間処理する（ＤＥＷＲＡＤＭ）。
【０１４８】
次いで、以下の組み合わせ：
１．Ｃ　ｅｘｔｒａ　ＵＳＰカーボン（０．５％）での処理に続いて、焼結ガラスフィルター（３μｍ）での濾過、

２．ＥＮＯ－ＰＣカーボン（０．５％）での処理に続いて、焼結ガラスフィルター（３μｍ）での濾過、
３．ＭＮ－１００樹脂カラムの通過、
４．滅菌フィルター濾過（０．２２μｍ）、
を用いて、ＤＥＷＲＡＤＭ試料に相当する原料を浄化した。

【０１４９】

原料を調製する様々な工程、次に浄化手順の工程の後に、試料を採取した。

【０１５０】

細胞試験の結果を図８に示す。

【０１５１】

液化前に、ＷＲＡＤ試料で得られたＴＬＲ２応答は飽和せず、それによってプロセス水が原因のＰＧＮ汚染の低減に過酢酸での処理が有効であったことが示されている。一方、ＴＬＲ２応答はＤＥＷＲＡＤ試料で飽和されていることから、液化によって新たなＰＧＮが放出される。ＬＰＳ汚染はプロセス水中で高く（ＷＲＡＤ）、予想されるように、液化によって、ＴＬＲ４応答は著しく変化しない。一方、ＤＥＷＲＡＤＭ試料によって誘発されるＴＬＲ４応答は飽和していることから、Ｍａｎｎａｗａｙ（登録商標）の添加は、外因性ＬＰＳの有意な汚染の一因となる。したがって、この新たな試験に使用される原料は、ＰＧＮ及びＬＰＳでかなり高度に汚染されている（図８Ａ）。

【０１５２】

次いで、２種類のカーボン：Ｃ－Ｅｘｔｒａ及びＥＮＯ－ＰＣと、ＭＮ－１００樹脂及び０．２２μｍフィルター濾過を組み合わせた手順に従って、ＤＥＷＲＡＤＭ試料を処理した。ＤＥＷＲＡＤＭ試料に含有される汚染物質の初期ロードは１００％まで低減され、低減の相対％は、各工程後の残留ロードから計算された（図８Ｂ及び表ＩＩ）。

【０１５３】

アッセイの検出限界値に達する、ＴＬＲ４応答の顕著な減少（＞９９．８％）が確認されたように、浄化手順はＬＰＳの除去に非常に有効であった。したがって、プロセス水によってもたらされようと、又はＭａｎｎａｗａｙ（登録商標）酵素製剤によってもたらされようと、ＭＮ－１００樹脂はこれらの汚染物質を保持した。

【０１５４】

手順の最後で、ＮＯＤ２応答の検出限界値に達すると仮定すると、この組み合わせもまた、ＰＧＮ解重合生成物の除去に有効である。

【０１５５】

一方、方法の最後で炎症性ロードが約９９％減少するにもかかわらず、ＴＬＲ２応答は残っている（乾燥物１ｇ当たりＰＧＮ　５．２ｎｇに等しい）。このデータから、ＰＧＮの除去における２種類のカーボンを組み合わせた有効性にもかかわらず、ＴＬＲ２アゴニストはまだ、原料中に微量で存在することが示されている。

【０１５６】

Ｒａｗ細胞の応答から、手順の最後に原料中の炎症性汚染物質の存在が裏付けられる。実際に、全体的な炎症性ロードの減少は９８．５％のみであり、応答は、検出限界値を有意に超える（乾燥物１ｇ当たりＰＧＮ　８ｎｇに等しい）。

【０１５７】

【表２】

表 II: 減少値(初期ロードに対する%として)および浄化方法の最後での残留ロード

	HEK-TLR2	HEK-TLR4	HEK-NOD2	Raw
減少 (%)	98.9	> 99.8	> 90	98.4
残留ロード	5.2 ng / g (PGN)	<0.5 ng / g	<0.2 ng / g	8 ng / g (PGN)

【０１５８】
前の試験によって、ひどく汚染された原料でさえ、ＰＧＮ除去における両方のカーボンの有効性が示されたことから、これらの結果から、Ｍａｎｎａｗａｙ（登録商標）酵素製剤は、ＰＧＮに対して異なる化学的性質のＴＬＲ２アゴニストに寄与したことが示唆されている。これらの汚染物質は、例えば、ＴＬＲ２応答の強い誘発物質であることが知られるリポペプチドであり得る。したがって、ＰＧＮ及びＬＰＳの保持には有効であるが、カーボン＋ＭＮ－１００樹脂の組み合わせは、このタイプの汚染物質を通過させると考えられ、残留ＴＬＲ２及びＲａｗ細胞応答に関して説明がつく。
【０１５９】
この問題を克服するために、作用範囲が広いことから、以下の試験において、ＭＮ－１００樹脂の代わりにＳＤ２樹脂を使用した。
【０１６０】
－　手順４：この試験において、原料は、手順３で使用されるＤＥＷＲＡＤＭ試料に相当する。浄化手順では前の工程を用いるが、ＭＮ－１００樹脂の代わりに広範囲のＳＤ２樹脂を使用する：
１．Ｃ　ｅｘｔｒａ　ＵＳＰカーボン（０．５％）での処理に続いて、焼結ガラスフィルター（３μｍ）での濾過、
２．ＥＮＯ－ＰＣカーボン（０．５％）での処理に続いて、焼結ガラスフィルター（３μｍ）での濾過、
３．ＳＤ２樹脂カラムの通過、
４．滅菌フィルター濾過（０．２２μｍ）。
【０１６１】
原料を調製する様々な工程、次に浄化手順の工程の後に、試料を採取した。
【０１６２】
細胞試験の結果を図９に示す。
【０１６３】
各汚染物質の相対的な減少は、組み合わせの各工程後に測定された残留ロードから計算され、ＤＥＷＲＡＤＭ試料中に含有される初期ロードに対するパーセンテージとして表される（図９及び表ＩＩＩ）。
【０１６４】
手順３で試験される組み合わせと異なり、ＳＤ２樹脂を使用したこの組み合わせは、９９．９％を超える炎症性ロードの減少と共に、検出限界値でのＨＥＫ－ＴＬＲ２細胞応答を消すことを可能にする。したがって、直列のＣ　ｅｘｔｒａ－ＵＳＰ及びＥＮＯ－ＰＣカーボンと、ＳＤ２樹脂との組み合わせは明らかに、ＰＧＮであろうと、他のタイプであろうと、ＴＬＲ２アゴニストの除去に対して相補的な効果を有する。この手順は、ＮＯＤアゴニスト汚染物質の除去においても有効なままである。
【０１６５】
ＭＮ－１００樹脂の選択は、Ｍａｎｎａｗａｙ（登録商標）酵素製剤がＬＰＳで汚染されているという事実に基づく。ＳＤ２樹脂に交換することによって、手順の最後に９９．９％（検出限界値）を超える減少と共に、ＬＰＳの有効な除去が可能になる。したがって、これらの結果から、ＳＤ２樹脂は最終的には、原料中のＬＰＳ、及びＭａｎｎａｗａｙ（登録商標）が原因の他の汚染物質の除去において、ＭＮ－１００樹脂よりも良い選択であると結論付けられる。
【０１６６】
最後に、Ｒａｗ細胞の応答から、原料中に存在するすべてのタイプの汚染物質の除去における、この手順の有効性が裏付けられる。実際に、有意な炎症反応（検出限界値未満）はもはや確認されず、９９．９％を超える全体的な炎症性ロードの減少が反映されている。
【０１６７】

【表３】

表 III: 減少値(初期ロードに対する%として)および浄化方法の最後での残留ロード				
	HEK-TLR2	HEK-TLR4	HEK-NOD2	Raw
減少 (%)	> 99.9	> 99.9	> 90	> 99.9
残留ロード	<1 ng / g	<0.5 ng / g	<0.2 ng / g	<LOD

LOD, 検出限界値

【０１６８】

評価：

まとめると、この研究で得られた結果から、注意深く選択され、かつ順序付けられた、いくつかの生成及び浄化工程の組み合わせが、グルコースポリマーの製造に使用される原料中に存在し得る炎症性分子の除去に有効であることが判明したことが分かる。

【０１６９】

この組み合わせは、以下の工程：

－　ｐＨ＝５．５のプロセス水に乾燥物２０～４０％の濃度にて蝋質デンプンを懸濁する工程、

－　最終濃度１００～５００ｐｐｍ、好ましくは３００ｐｐｍの過酢酸の溶液で、デンプンの懸濁液を処理する工程、

－　デンプンから余分な水を除去し、ｐＨ５．５に調整された脱イオン水に、乾燥物２０～４０％の濃度で溶解する工程、

－　温度を１０７℃に上げ、次いでα－アミラーゼを１５分間添加する工程、

－　ＰＧＮが高度にロードされた原料を、洗浄性及び浄化性を有する酵素製剤、例えばＭａｎｎａｗａｙ（登録商標）で任意選択的に処理する工程、

－　珪藻床を通して懸濁液を濾過する工程、

－　Ｃ　Ｅｘｔｒａ　ＵＳＰに等しい多孔度の活性炭で処理する工程、

－　ＥＮＯ－ＰＣに等しい多孔度の第２活性炭で処理する工程、

－　ＬＰＳが高度にロードされた、かつ／又は洗浄性及び浄化性を有する酵素製剤、例えばＭａｎｎａｗａｙ（登録商標）で処理された原料を、Ｄｏｗｅｘ－ＳＤ２タイプ吸着樹脂に、任意選択的に通す工程、

－　ＰＧＮ解重合生成物が高度にロードされた原料に対して、任意選択的に、５ｋＤａ連続的限外濾過を行う工程、

－　多孔度０．２２μｍの滅菌フィルターを通して安全に濾過する工程、

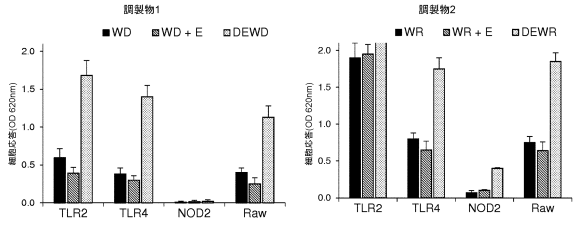
を含む。

【０１７０】

これらの工程の組み合わせは、汚染物質の様々なファミリーを標的化し、かつ炎症反応性のないグルコースポリマー用原料を提唱することを可能にする。

【図１】

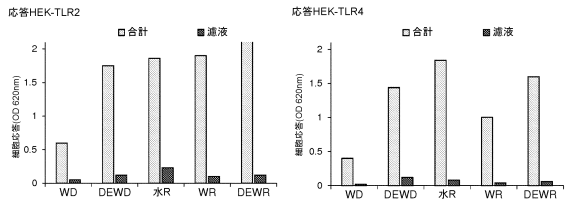
図1



WD:脱イオン水中の螺質デンプン
WD+E:脱イオン水中の螺質デンプン+酵素
DEWD:液化後の脱イオン水中の螺質デンプン
WR:プロセス水中の螺質デンプン
WR+E:プロセス水中の螺質デンプン+酵素
DEWR:液化後のプロセス水中の螺質デンプン

【図２】

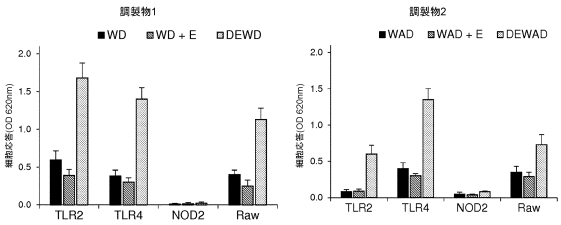
図2



WD:脱イオン水中の螺質デンプン
DEWD:液化後の脱イオン水中の螺質デンプン
水R:プロセス水
WR:プロセス水中の螺質デンプン
DEWR:液化後のプロセス水中の螺質デンプン

【図３】

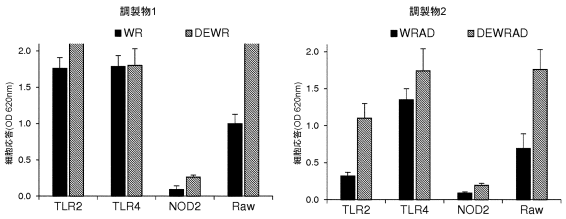
図3



WD:脱イオン水中の螺質デンプン
WD+E:脱イオン水中の螺質デンプン+酵素
DEWD:液化後の脱イオン水中の螺質デンプン
WAD:過酢酸で処理された脱イオン水中の螺質デンプン
WAD+E:過酢酸で処理された脱イオン水中の螺質デンプン+酵素
DEWAD:液化後の過酢酸で処理された脱イオン水中の螺質デンプン

【図４】

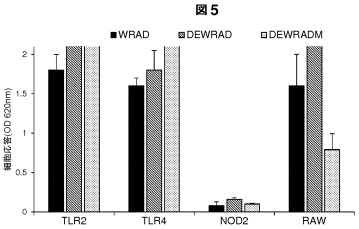
図4



WR:プロセス水中の螺質デンプン
DEWR:液化後のプロセス水中の螺質デンプン
WRAD:過酢酸で処理されたプロセス水中の螺質デンプン
DEWRAD:液化後の過酢酸で処理されたプロセス水中の螺質デンプン

【図５】

図5

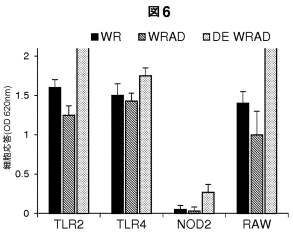


WRAD:過酢酸で処理されたプロセス水中の螺質デンプン
DEWRAD:過酢酸で処理され、次いで液化された、プロセス水中の螺質デンプン
DEWRADM:過酢酸で処理し、液化され、次いでMannaway®で処理された、プロセス水中の螺質デンプン

【図６】

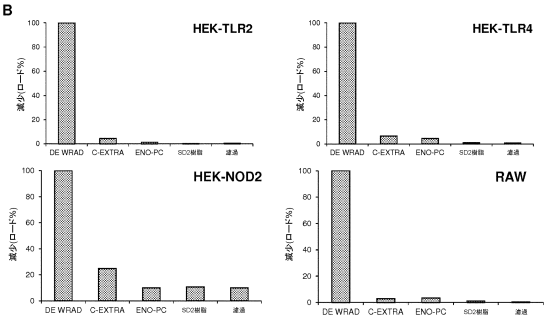
図6

A



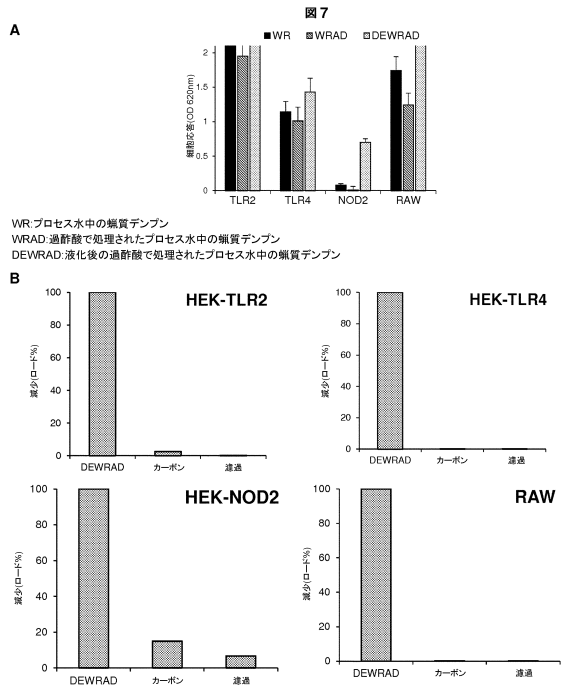
WR:プロセス水中の螺質デンプン
WRAD:過酢酸で処理されたプロセス水中の螺質デンプン
DEWRAD:液体後の過酢酸で処理されたプロセス水中の螺質デンプン

B



浄化手順:
1.C extra USPカーボン(0.5%)で処理、
2.ENO-PCカーボン(0.5%)で処理、
3.SD2樹脂の通過
4.滅菌0.22μmフィルターでの濾過

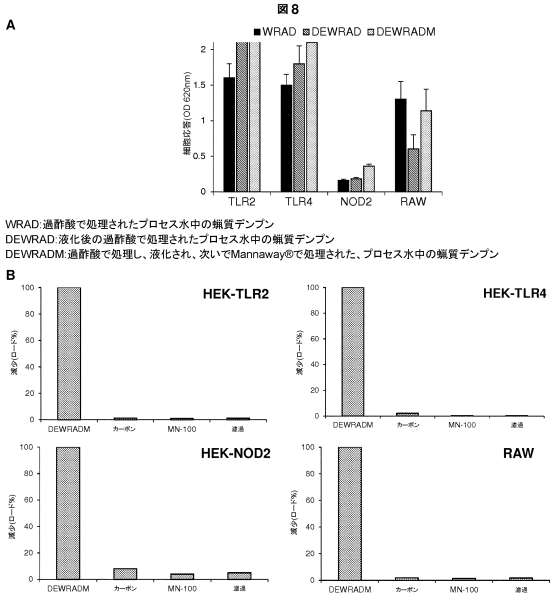
【図７】



WR:プロセス水中の蝙質デンプン
WRAD:過酢酸で処理されたプロセス水中の蝙質デンプン
DEWRAD:液化後の過酢酸で処理されたプロセス水中の蝙質デンプン

浄化手順:
1.(extra USP(0.5%)およびENO-PC(0.5%)カーボンでの処理
2.滅菌0.22μmフィルターでの濾過

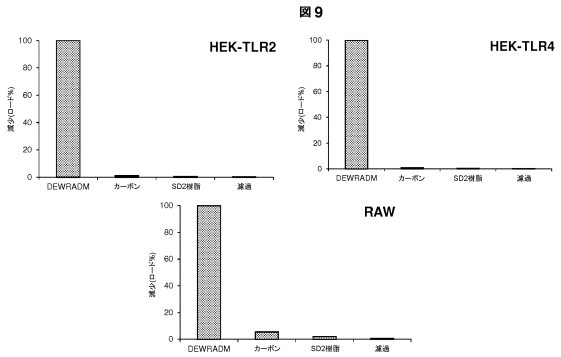
【図８】



WRAD:過酢酸で処理されたプロセス水中の蝙質デンプン
DEWRAD:液化後の過酢酸で処理されたプロセス水中の蝙質デンプン
DEWRADM:過酢酸で処理し、液化され、次いでMannaway®で処理された、プロセス水中の蝙質デンプン

浄化手順:
1.C extra USPカーボン(0.5%)で処理、
2.ENO-PCカーボン(0.5%)で処理、
3.SD2樹脂の通過
4.滅菌0.22μmフィルターでの濾過

【図９】



浄化手順:
1.C extra USPカーボン(0.5%)で処理、
2.ENO-PCカーボン(0.5%)で処理、
3.SD2樹脂の通過
4.滅菌0.22μmフィルターでの濾過

フロントページの続き

(72)発明者 ティエリー デュポン
フランス国 ６２２３２ ヴォンダン レ ベテューヌ リュ レジェール マイユー １０５
(72)発明者 ファブリス アラン
フランス国 ５９８００ リール レジダンス アルボノワーズ アパルトマン４３８ リュ デ スタシオン ８８
(72)発明者 マチュー カルパンティエ
フランス国 ５９３５０ サン タンドレ レ リール リュ デ イロンデル ３４
(72)発明者 エラ アシン－ジェルビ
フランス国 ５９６５０ ヴィルヌーヴ ダスク アントレ１１ シュマン デ クリウール ５３
(72)発明者 アニエス デニ
フランス国 ５９８００ リール アヴニュ モルマル パルク サン－モール レジダンス シトー １／１０３

審査官 西垣 歩美

(56)参考文献 米国特許出願公開第２０１２／００４６４６０（ＵＳ，Ａ１）
特表２０１３－５４１３４５（ＪＰ，Ａ）
米国特許第０３０５８８５３（ＵＳ，Ａ）
特開昭４９－１００２４０（ＪＰ，Ａ）
米国特許出願公開第２０１５／０１２５８７１（ＵＳ，Ａ１）

(58)調査した分野(Int.Cl.，ＤＢ名)
Ｃ１２Ｐ １／００－４１／００