

①9 RÉPUBLIQUE FRANÇAISE
INSTITUT NATIONAL
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE
PARIS

①1 N° de publication :
(à n'utiliser que pour les
commandes de reproduction)

2 950 901

②1 N° d'enregistrement national : **10 58133**

⑤1 Int Cl⁸ : **C 12 N 7/02** (2006.01), A 61 K 39/12

⑫

DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

A1

②2 Date de dépôt : 07.10.10.

③0 Priorité : 07.10.09 JP 2009233759; 05.07.10 JP 2010153160.

④3 Date de mise à la disposition du public de la demande : 08.04.11 Bulletin 11/14.

⑤6 Liste des documents cités dans le rapport de recherche préliminaire : *Ce dernier n'a pas été établi à la date de publication de la demande.*

⑥0 Références à d'autres documents nationaux apparentés :

⑦1 Demandeur(s) : HOYA CORPORATION — JP.

⑦2 Inventeur(s) : KUROSAWA YAE et KOBAYASHI SHINTARO.

⑦3 Titulaire(s) : HOYA CORPORATION.

⑦4 Mandataire(s) : SANTARELLI.

⑤4 PROCÉDE DE PURIFICATION ET PROCÉDE DE PRODUCTION D'UN VACCIN.

⑤7 L'invention concerne un procédé de purification d'un virus ou antigène viral à partir d'une solution d'échantillon.

Il comprend la préparation d'un poudre frittée d'hydroxyapatite, la mise en contact de la solution d'échantillon avec la poudre frittée pour l'adsorption du virus ou de l'antigène viral aux particules de la poudre frittée, et l'apport d'un éluant pour éluer le virus ou l'antigène viral adsorbé hors des particules de la poudre frittée.

APPLICATION:

Procédé de production d'un vaccin à base du virus ou de l'antigène viral purifié par ledit procédé.

FR 2 950 901 - A1



La présente invention concerne un procédé de purification d'un virus ou antigène viral à partir d'une solution d'un échantillon, ainsi qu'un procédé pour la production d'un vaccin en utilisant un tel procédé de purification.

Un virus ou antigène viral (désigné ci-après sous le nom de "virus") est séparé et purifié en partant d'une solution d'un échantillon contenant une solution de culture renfermant les virus et des cellules hôtes. Ces procédés de séparation et de purification sont des procédés importants dans les domaines de la biogénétique, du diagnostic clinique et de la production de vaccins.

En général, les virus n'existent pas seuls dans la solution d'échantillon décrite ci-dessus, mais les virus existent avec des cellules en culture, des protéines contaminantes et des substances similaires dans la solution d'échantillon. En conséquence, il est nécessaire de séparer et purifier les virus de la solution d'échantillon.

Jusqu'à présent, les procédés de séparation et de purification pour ces virus ont été mis en œuvre par un procédé d'ultracentrifugation, un procédé de centrifugation en gradient de densité ou un procédé similaire. Cependant, ces procédés nécessitent des appareils coûteux et volumineux, en plus d'opérations complexes. En conséquence, les travaux pour les procédés de séparation et de purification étaient très complexes.

Afin de résoudre ces problèmes, il a été proposé d'utiliser une poudre frittée d'hydroxyapatite comme adsorbant fourni dans un appareil de séparation, en tant que procédé pour séparer et purifier aisément des virus à partir d'une solution d'échantillon contenant les virus en une brève période de temps, sans réduire l'activité des virus (le document JP-A 2000-262 280 est un exemple de l'art antérieur).

Cependant, dans un tel procédé, il est impossible de parvenir à un taux de production (récupération) uniforme

des virus à purifier et, en outre, l'adsorbant ne présente pas une grande longévité. En conséquence, un problème consiste en le fait que les virus ne sont pas purifiés avec une bonne reproductibilité.

5 Un objectif de la présente invention consiste à proposer un procédé pour la purification de virus à partir d'une solution d'échantillon contenant les virus avec un taux de production uniforme et une bonne reproductibilité (ce procédé étant désigné simplement ci-après sous le nom
10 de "procédé de séparation"). En outre, un autre objectif de la présente invention consiste à proposer un procédé pour la production d'un vaccin en utilisant un tel procédé de séparation.

15 Ces objectifs sont atteints par les présentes inventions (1) à (7) décrites ci-dessous.

20 (1) Un procédé de purification d'un virus ou antigène viral à partir d'une solution d'échantillon contenant le virus ou l'antigène viral, le procédé comprenant : la préparation d'une poudre frittée d'hydroxyapatite, ladite
25 poudre frittée comprenant des particules, la surface spécifique des particules de la poudre frittée étant comprise dans l'intervalle de 2,0 à 11,0 m²/g ; la mise de la solution d'échantillon en contact avec la poudre frittée pour adsorber ainsi le virus ou l'antigène viral aux
particules de la poudre frittée ; et l'apport d'un éluant à la poudre frittée pour éluer ainsi le virus adsorbé ou l'antigène viral adsorbé des particules de la poudre frittée.

30 Cela permet de séparer et de purifier des virus à partir d'une solution d'échantillon contenant les virus avec un taux de production uniforme et une bonne reproductibilité.

35 Dans le procédé décrit dans le paragraphe (1) précité, la porosité dans les surfaces des particules de la poudre frittée est comprise dans l'intervalle de 0,1 à 0,14 μ m.

Suivant le procédé, il est possible d'adsorber sélectivement les virus qui sont en contact avec la poudre frittée sans adsorber des substances étrangères autres que les virus. En conséquence, il est possible de séparer et de purifier les virus à partir de la solution d'échantillon avec une excellente précision.

Dans le procédé décrit dans le paragraphe (1) précité, le vide dans les surfaces des particules de la poudre frittée est compris dans l'intervalle de 10 à 35 %.

(2) Dans le procédé décrit dans le paragraphe (1) précité, le diamètre moyen des particules de la poudre frittée est compris dans l'intervalle de 10 à 100 μm .

Suivant le procédé, il est possible d'améliorer le rapport de remplissage avec la poudre frittée d'un espace de remplissage d'adsorbant qui est présent dans un appareil de séparation pour séparer les virus. En conséquence, il existe de nombreuses possibilités de mise en contact des virus avec la poudre frittée, ce qui fait qu'il est possible de séparer et purifier de manière fiable les virus de la solution d'échantillon.

(3) Dans le procédé décrit dans le paragraphe (1) précité, la préparation de la poudre frittée comprend : le mélange de matières premières pour obtenir une suspension contenant des particules primaires de l'hydroxyapatite et des agrégats des particules primaires ; le séchage de la suspension pour obtenir les particules secondaires de l'hydroxyapatite ; et le frittage des particules secondaires de l'hydroxyapatite pour obtenir la poudre frittée.

L'utilisation d'une telle poudre frittée permet de parvenir aisément à une surface spécifique de cette poudre frittée comprise dans l'intervalle précité.

(4) Dans le procédé décrit dans le paragraphe (3) précité, les particules secondaires sont obtenues par granulation des particules primaires de l'hydroxyapatite et des agrégats des particules primaires.

L'utilisation d'une telle poudre frittée permet de parvenir aisément à une surface spécifique de cette poudre frittée comprise dans l'intervalle précité.

5 (5) Dans le procédé décrit dans le paragraphe (1) précité, l'éluant est une solution tampon à base de phosphate.

Cela permet d'éviter la modification des virus à séparer.

10 (6) Dans le procédé décrit dans le paragraphe (1) précité, les virus comprennent un virus appartenant aux Flaviviridae.

Lorsque le virus qui appartient à une telle famille est séparé et purifié, le procédé de séparation conforme à la présente invention est utilisé de préférence.

15 (7) Un procédé pour la production d'un vaccin à base du virus ou de l'antigène viral en utilisant le procédé de purification du virus ou de l'antigène viral décrit en (1).

20 Cela permet de purifier les virus sans réduction de leur titre d'infectivité.

Suivant le procédé de séparation conforme à la présente invention, il est possible de séparer et de purifier des virus à partir d'une solution d'échantillon contenant les virus avec un taux de production uniforme et
25 une bonne reproductibilité. En outre, puisque les virus, qui ont été séparés et purifiés par le procédé de séparation conforme à la présente invention, conservent une bonne bioactivité, il est possible d'appliquer le procédé à un procédé de production d'un vaccin présentant
30 une excellente innocuité et une excellente disponibilité.

La figure 1 est une vue en coupe verticale qui illustre un exemple d'un appareil de séparation destiné à être utilisé pour un procédé de séparation conforme à la présente invention.

35 La figure 2 représente un motif d'élution du virus de la dengue qui est obtenu dans l'exemple 1.

La figure 3 représente le taux de production de virus de la dengue recueilli lorsque les procédés de séparation dans l'exemple 1 et l'exemple comparatif 1 sont mis en œuvre de manière répétée.

5 Un procédé de séparation et un procédé de production d'un vaccin conformément à la présente invention sont décrits ci-dessous en détail sur la base d'une forme de réalisation préférée.

10 Tout d'abord, avant la description du procédé de séparation et du procédé de production de vaccin conformément à la présente invention, un exemple d'un appareil de séparation (appareil d'adsorption destiné à être utilisé pour le procédé de séparation conforme à la présente invention) est décrit.

15 La figure 1 est une vue en coupe verticale qui représente un exemple d'un appareil de séparation destiné à être utilisé pour un procédé de séparation conforme à la présente invention. Il faut noter que, dans la description suivante, la face supérieure et la face inférieure sur la
20 figure 1 seront désignées respectivement sous le nom de "face d'entrée" et "face de sortie".

Plus spécifiquement, la face d'entrée consiste en une face par laquelle des liquides tels qu'une solution d'échantillon (c'est-à-dire un liquide contenant un virus ou antigène viral) et un liquide d'élution sont introduits
25 dans l'appareil de séparation pour séparer (purifier) un virus cible ou antigène viral cible (désignés simplement ci-après sous le nom de "virus"), et la face de sortie consiste en une face située du côté opposé par rapport à
30 la face d'entrée, c'est-à-dire une face à travers laquelle les liquides décrits ci-dessus sont évacués de l'appareil de séparation comme liquide déchargé.

L'appareil de séparation 1 représenté sur la figure 1, qui sépare (isole) un virus cible (matériau isolé) de
35 la solution d'échantillon, comprend une colonne 2, un

adsorbant granulaire (une charge) 3 et deux éléments filtrants 4 et 5.

La colonne 2 est constituée d'un corps principal de colonne 21 et de capuchons 22 et 23 destinés à être fixés à l'extrémité de la face d'entrée et à l'extrémité de la face de sortie du corps principal de colonne 21, respectivement.

Le corps principal de colonne 21 est formé, par exemple, d'un élément cylindrique. Des exemples de matériaux constitutifs de chacune des parties (chacun des membres) constituant la colonne 2, incluant le corps principal de colonne 21, comprennent divers verres, diverses résines, diverses matières métalliques, diverses matières céramiques et des matières similaires.

Une ouverture du corps principal de colonne 21 présente sur sa face d'entrée est couverte de l'élément filtrant 4 et, dans cet état, le capuchon 22 est monté par un filetage sur l'extrémité de la face d'entrée du corps principal de colonne 21. De manière similaire, une ouverture du corps principal de colonne 21 présente sur sa face de sortie est couverte de l'élément filtrant 5 et, dans cet état, le capuchon 23 est monté par un filetage sur l'extrémité de la face de sortie du corps principal de colonne 21.

La colonne 2 ayant une structure telle que celle décrite ci-dessus comporte un espace de remplissage d'adsorbant 20 défini par le corps principal de colonne 21 et les éléments filtrants 4 et 5, et au moins une partie de l'espace de remplissage d'adsorbant 20 est remplie de l'adsorbant 3 (dans cette forme de réalisation, pratiquement la totalité de l'espace de remplissage d'adsorbant 20 est remplie de l'adsorbant 3).

La capacité volumétrique de l'espace de remplissage d'adsorbant 20 est choisie de manière appropriée en fonction du volume d'une solution d'échantillon à utiliser et n'est pas particulièrement limitée, mais est comprise

avantageusement dans l'intervalle d'environ 0,1 à 100 ml et plus avantageusement dans l'intervalle d'environ 1 à 50 ml par ml de la solution d'échantillon.

5 En choisissant le volume de l'espace de remplissage d'adsorbant 20 de telle sorte qu'il soit égal à une valeur comprise dans l'intervalle précité en choisissant les dimensions de l'adsorbant 3 (qui seront décrites plus loin) de telle sorte qu'elles soient égales à une valeur comprise dans un intervalle décrit plus loin, il est possible d'isoler (purifier) sélectivement un virus cible à partir de la solution d'échantillon, c'est-à-dire de séparer de manière fiable le virus des substances étrangères autres que les virus présents dans la solution d'échantillon.

15 En outre, dans la colonne 2, l'étanchéité aux liquides entre le corps principal de colonne 21 et les capuchons 22 et 23 est garantie en fixant les capuchons 22 et 23 au corps principal de colonne 21.

20 Un conduit d'admission 24 est fixé de manière étanche aux liquides au capuchon 22 substantiellement au centre de celui-ci, et un conduit de sortie 25 est également fixé d'une manière étanche aux liquides au capuchon 23 substantiellement au centre de celui-ci. La solution d'échantillon (le liquide) décrite ci-dessus est amenée à l'adsorbant 3 à travers le conduit d'admission 24 et l'élément filtrant 4. La solution d'échantillon amenée à l'adsorbant 3 passe à travers les espaces entre les particules de l'adsorbant 3 et ensuite est déchargée de la colonne 2 à travers l'élément filtrant 5 et le conduit de sortie 25. A ce moment, le virus et les substances étrangères autres que les virus existant dans la solution d'échantillon (échantillon) sont séparés sur la base d'une différence de degré d'adsorption entre le virus et les substances étrangères par rapport à l'adsorbant 3 et d'une différence de degré d'affinité entre le virus et les substances étrangères par rapport au liquide d'élution.

Chacun des éléments filtrants 4 et 5 a pour fonction d'empêcher l'adsorbant 3 d'être déchargé de l'espace de remplissage d'adsorbant 20. En outre, chacun des éléments filtrants 4 et 5 est formé d'une étoffe non tissée constituée d'une résine synthétique telle que le polyuréthane, l'alcool polyvinylique, le polypropylène, un polyétherpolyamide, le poly-(téréphtalate d'éthylène) et le poly-(téréphtalate de butylène) ; d'une mousse (un corps poreux analogue à une éponge), ayant des pores communicants ; d'une étoffe tissée ; d'une toile ; d'un filtre en verre fritté ; ou d'un matériau similaire.

Dans le procédé de séparation conforme à la présente invention, les caractéristiques résident dans les configurations de l'adsorbant 3 décrit ci-dessus. Ci-après, une description de cet adsorbant 3 est présentée de manière détaillée.

L'adsorbant 3 est une poudre frittée d'hydroxyapatite. La surface spécifique de l'adsorbant 3 est comprise dans l'intervalle de 2,0 à 11,0 m²/g.

Afin de séparer et purifier sélectivement le virus cible des protéines et des substances étrangères provenant des cellules hôtes, qui sont présentes dans la solution d'échantillon contenant la solution de culture et les cellules hôtes, il est nécessaire d'adsorber sélectivement les virus à l'adsorbant (la poudre frittée) 3. A cet égard, d'après l'étude effectuée par les présents Inventeurs, il a été trouvé que la surface spécifique de l'adsorbant (la poudre frittée) 3 est fortement impliquée dans l'adsorption des virus. En d'autres termes, il a été trouvé que les virus peuvent être adsorbés sélectivement à l'adsorbant 3 en choisissant la surface spécifique de cet adsorbant de telle sorte qu'elle soit égale à une valeur comprise dans un intervalle prédéterminé. Cela est dû au fait que la surface spécifique correspond à une surface où l'adsorbant 3 vient en contact avec les virus, c'est-à-

dire la possibilité de contacter l'adsorbant 3 avec les virus.

Les présents inventeurs ont étudié plus en détail ces points, ce qui fait qu'il a été trouvé que les virus sont
5 adsorbés sélectivement à l'adsorbant 3 en choisissant la surface spécifique de l'adsorbant 3 de telle sorte qu'elle soit égale à une valeur comprise dans l'intervalle de 2,0 à 11,0 m²/g. En outre, il a été trouvé que le virus est
10 séparé et purifié de la solution d'échantillon contenant les virus avec un taux de production (récupération) uniforme et une bonne reproductibilité. En conséquence, les présents inventeurs ont mené à bonne fin la présente invention.

Dans la présente invention, la poudre frittée
15 d'hydroxyapatite ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$) est une poudre obtenue par frittage de particules secondaires d'hydroxyapatite. Les particules secondaires d'hydroxyapatite consistent en une poudre séchée obtenue par séchage d'une suspension contenant des particules primaires d'hydroxyapatite et des
20 agrégats de ces particules primaires et par leur granulation. Le rapport Ca/P de l'hydroxyapatite est destiné à être compris dans l'intervalle d'environ 1,64 à 1,70. Puisqu'une telle poudre frittée et de telles particules secondaires d'hydroxyapatite ont chimiquement
25 une structure d'apatite stable, la poudre frittée obtenue par frittage des particules secondaires peut être utilisée de manière fiable comme adsorbant 3 qui est fourni avec l'appareil de séparation.

Lorsque la solution d'échantillon contenant la
30 solution de culture et les cellules hôtes est amenée à l'adsorbant 3 ayant une telle configuration, le virus présent dans la solution d'échantillon est adsorbé spécifiquement à l'adsorbant 3 ayant une surface spécifique comprise dans l'intervalle de 2,0 à 11,0 m²/g,
35 présentant une capacité d'adsorption inhérente (un pouvoir de fixation inhérent). Le virus est séparé des substances

étrangères autres que les virus présents dans la solution d'échantillon et est purifié d'après la différence entre les capacités d'adsorption du virus et des substances étrangères.

5 La surface spécifique de l'adsorbant (la poudre frittée d'hydroxyapatite) 3 peut être comprise dans l'intervalle de 2,0 à 11,0 m²/g mais est de préférence comprise dans l'intervalle d'environ 6,0 à 11,0 m²/g. Si la surface spécifique est comprise dans l'intervalle
10 précité, les virus peuvent être adsorbés sélectivement à l'adsorbant 3. En conséquence, il est possible de séparer et purifier les virus de la solution d'échantillon avec une excellente précision. En général, lorsque la surface spécifique de l'adsorbant 3 devient grande, les quantités
15 adsorbées non seulement des virus mais également des substances étrangères sont améliorées. En résultat, il est difficile de séparer et de purifier seulement les virus avec une excellente précision. Cependant, la présente invention fixe la surface spécifique de l'adsorbant 3, à
20 laquelle les substances étrangères s'adsorbent à peine dans la mesure du possible, tout en présentant suffisamment une capacité d'adsorption de l'hydroxyapatite vis-à-vis du virus.

 En outre, la porosité (le diamètre moyen des pores)
25 dans une surface de l'adsorbant (la poudre frittée) 3 est comprise avantageusement dans l'intervalle d'environ 0,1 à 0,14 µm, plus avantageusement dans l'intervalle d'environ 0,11 à 0,14 µm et encore plus avantageusement dans l'intervalle d'environ 0,12 à 0,13 µm. A cet égard, il
30 faut noter que la porosité (le diamètre des pores) de l'adsorbant 3 indique une forme de surface de l'adsorbant 3, c'est-à-dire une irrégularité de la surface de l'adsorbant 3. En fixant la porosité de l'adsorbant 3 à une valeur dans l'intervalle précité, le virus tombe dans
35 les pores, ce qui fait que l'élution du virus est retardée. Cela permet de séparer le virus des protéines

contaminantes autre que le virus, avec une bonne précision. En conséquence, il est possible de séparer et de purifier le virus de la solution d'échantillon avec une précision encore meilleure.

5 En outre, les vides dans la surface de l'adsorbant (la poudre frittée) 3 sont compris avantageusement dans l'intervalle d'environ 10 à 35 % et plus avantageusement dans l'intervalle d'environ 25 à 35 %. Les vides
10 représentent un autre indice qui est différent de la porosité, indiquant la forme de surface de l'adsorbant 3. En choisissant les vides de l'adsorbant 3 de telle sorte qu'ils soient égaux à une valeur comprise dans l'intervalle précité, la fréquence de chute du virus dans les pores est améliorée, ce qui retarde l'élution du
15 virus. Cela permet de séparer et purifier le virus dans la solution d'échantillon avec une excellente précision. A cet égard, dans le cas où les vides excèdent la valeur limite supérieure précitée, il existe un risque que la résistance mécanique de l'adsorbant devienne insuffisante.

20 En outre, le diamètre moyen de particules de l'adsorbant 3 est compris avantageusement dans l'intervalle d'environ 10 à 100 μm et plus avantageusement dans l'intervalle d'environ 40 à 80 μm . En utilisant la poudre frittée ayant un tel diamètre moyen de particules
25 comme adsorbant 3, il est possible d'améliorer le rapport de remplissage de l'espace de remplissage de l'adsorbant 20 avec l'adsorbant 3. En conséquence, puisque les opportunités de mise en contact du virus avec l'adsorbant 3 augmentent, il est possible de séparer et purifier de
30 manière fiable le virus de la solution d'échantillon.

 A cet égard, l'appareil de séparation 1 est décrit dans le cas où pratiquement la totalité de l'espace de remplissage d'adsorbant 20 est rempli avec l'adsorbant 3, comme dans le cas de cette forme de réalisation. En
35 variante, l'appareil de séparation 1 peut être décrit dans le cas où l'espace de remplissage de l'adsorbant 20 peut

être rempli partiellement avec l'adsorbant 3 (par exemple, une partie de l'espace de remplissage d'adsorbant 20 située du côté où le conduit d'admission 24 est présent et peut être remplie avec l'adsorbant 3). Dans ce cas, la
5 partie restante de l'espace de remplissage d'adsorbant 20 peut être remplie d'un autre adsorbant.

L'adsorbant 3 (la poudre frittée) répondant à la description précitée peut être produit, par exemple, par le procédé suivant.

10 Un procédé pour la production de la poudre frittée conformément à la présente invention comprend trois étapes. Une première étape (S1) est une étape de réaction d'un composé de calcium et d'un composé du type phosphate en agitant un mélange d'un premier liquide contenant le
15 composé de calcium (la source de calcium) tel que l'hydroxyde de calcium et d'un second liquide contenant le composé du type phosphate (la source de phosphate) tel que l'acide phosphorique pour obtenir une suspension contenant des particules primaires d'hydroxyapatite et des agrégats
20 de ces particules primaires. La deuxième étape (S2) est une étape de séchage de la suspension contenant les particules primaires et des agrégats des particules primaires et de granulation de celles-ci pour obtenir une poudre séchée qui est constituée de particules secondaires
25 d'hydroxyapatite comme constituant principal. Une troisième étape est une étape de frittage de la poudre séchée pour obtenir une poudre frittée qui est constituée d'hydroxyapatite.

Ci-après, ces étapes sont décrites l'une après
30 l'autre.

[S1 : Etape d'obtention d'une suspension contenant des agrégats d'hydroxyapatite (première étape)].

Tout d'abord, un premier liquide contenant un composé à base de calcium, contenant du calcium, comme source de
35 calcium, est préparé.

Le composé à base de calcium (la source de calcium) n'est pas particulièrement limité à un composé spécifique. Des exemples de composés à base de calcium comprennent l'hydroxyde de calcium, l'oxyde de calcium, le nitrate de calcium et des composés similaires. Ces composés peuvent être utilisés isolément ou sous forme d'une association de deux ou plus de deux d'entre eux. Parmi ceux-ci, l'hydroxyde de calcium est particulièrement apprécié comme source de calcium. Cela permet d'obtenir de manière fiable de l'hydroxyapatite comprenant des impuretés en une faible quantité, qui est synthétisée dans cette étape. A cet égard, ci-après, il faut noter une description du cas où de l'hydroxyde de calcium est utilisé comme source de calcium et est présenté à titre d'exemple.

Une solution-suspension contenant de l'hydroxyde de calcium comme source de calcium peut être utilisée comme premier liquide. En particulier, une suspension d'hydroxyde de calcium, dans laquelle l'hydroxyde de calcium est mis en suspension dans de l'eau, est utilisée de préférence. Si de l'hydroxyapatite est synthétisé en utilisant une telle suspension, de fines particules primaires d'hydroxyapatite peuvent être obtenues.

Puis un second liquide (solution contenant de l'acide phosphorique) qui contient de l'acide phosphorique comme source de phosphate est préparé.

Le solvant pour la dissolution de l'acide phosphorique n'est pas particulièrement limité, et n'importe quel solvant peut être utilisé du moment qu'il n'inhibe pas la réaction entre l'hydroxyde de calcium et l'acide phosphorique dans cette étape S1. Des exemples d'un tel solvant comprennent l'eau, un alcool tel que le méthanol et l'éthanol, et des solvants similaires. Ces solvants peuvent être utilisés sous forme d'une association de deux d'entre eux ou plus. Cependant, parmi ceux-ci, l'eau est particulièrement appréciée. Si de l'eau est utilisée comme solvant, il est possible d'éviter de

manière fiable l'interférence avec la réaction entre l'hydroxyde de calcium et l'acide phosphorique.

Puis les premier et second liquides préparés sont mélangés l'un à l'autre pour obtenir un mélange.
5 L'hydroxyde de calcium et l'acide phosphorique sont soumis alors à une réaction sous agitation du mélange pour obtenir une suspension contenant les particules primaires d'hydroxyapatite et les agrégats de ces particules primaires.

10 Concrètement, le second liquide est ajouté goutte à goutte à un liquide de dispersion (premier liquide) contenant de l'hydroxyde de calcium obtenu par agitation du premier liquide dans un récipient (non représenté). De cette manière, le premier liquide (liquide de dispersion)
15 et le second liquide sont mélangés l'un à l'autre pour obtenir un mélange. Puis l'hydroxyde de calcium est amené à réagir avec l'acide phosphorique dans le mélange pour obtenir la suspension contenant les particules primaires d'hydroxyapatite et les agrégats de ces particules
20 primaires.

Dans ce procédé, on utilise un procédé de synthèse par voie humide dans lequel de l'acide phosphorique est utilisé sous forme d'une solution aqueuse répondant à la description précitée. Cela permet de synthétiser
25 efficacement et aisément de l'hydroxyapatite (matière synthétique) sans utiliser une installation de production coûteuse. Dans la réaction entre l'hydroxyde de calcium et l'acide phosphorique, seule de l'eau est produite en plus de l'hydroxyapatite. En conséquence, des sous-produits ne
30 persistent pas dans les particules secondaires produites (la poudre séchée) et la poudre frittée produite. En outre, puisque cette réaction est une réaction acide-base, il existe l'avantage d'une possibilité de contrôle aisé de cette réaction en ajustant le pH du liquide de dispersion
35 d'hydroxyde de calcium et de la solution aqueuse d'acide phosphorique.

En outre, en conduisant cette réaction sous agitation, il est possible de conduire efficacement la réaction entre l'hydroxyde de calcium et l'acide phosphorique. En d'autres termes, il est possible
5 d'améliorer l'efficacité de la réaction entre ces deux composés.

En outre, la puissance d'agitation du mélange contenant les premier et second liquides n'est pas particulièrement limitée à une puissance spécifique mais
10 comprise avantageusement dans l'intervalle d'environ 0,75 à 2,0 W et plus avantageusement dans l'intervalle d'environ 0,925 à 1,85 W par litre du mélange (de la suspension). En choisissant la puissance d'agitation de telle sorte qu'elle soit égale à une valeur comprise dans l'intervalle précité,
15 il est possible d'améliorer davantage l'efficacité de la réaction entre l'hydroxyde de calcium et l'acide phosphorique.

La quantité d'hydroxyde de calcium dans le premier liquide est comprise avantageusement dans l'intervalle
20 d'environ 5 à 15 % en poids et plus avantageusement dans l'intervalle d'environ 10 à 12 % en poids. La quantité d'acide phosphorique dans le second liquide est comprise avantageusement dans l'intervalle d'environ 10 à 25 % en poids et plus avantageusement dans l'intervalle d'environ
25 15 à 20 % en poids. En choisissant la quantité de chacun des composés consistant en hydroxyde de calcium et acide phosphorique de telle sorte qu'elle soit égale à une valeur comprise dans l'intervalle précité, il est possible de faire réagir efficacement l'hydroxyde de calcium et l'acide
30 phosphorique. En conséquence, il est possible de synthétiser de manière fiable l'hydroxyapatite. Cela est dû au fait que la possibilité de contact entre l'hydroxyde de calcium et l'acide phosphorique augmente lorsque le second liquide est ajouté goutte à goutte au premier liquide, sous
35 agitation.

La vitesse d'addition au goutte à goutte du second liquide au premier liquide est comprise avantageusement dans l'intervalle d'environ 1 à 40 litres/heure et plus avantageusement dans l'intervalle d'environ 3 à 30 litres/heure. En mélangeant (ajoutant) le second liquide au premier liquide à une telle vitesse d'addition au goutte à goutte, il est possible de faire réagir l'hydroxyde de calcium avec l'acide phosphorique dans des conditions plus douces.

Dans ce cas, le second liquide est de préférence ajouté au goutte à goutte (ajouté) au premier liquide pendant une période de temps d'environ 5 à 32 heures et plus avantageusement pendant une période de temps d'environ 6 à 30 heures. En ajoutant goutte à goutte le second liquide au premier liquide en une telle une période de temps pour la réaction de l'hydroxyde de calcium avec l'acide phosphorique, il est possible de synthétiser suffisamment l'hydroxyapatite. Il faut noter que, même si le temps d'addition au goutte à goutte du second liquide au premier liquide est prolongé de manière à dépasser la valeur limite supérieure précitée, il ne peut être escompté que la réaction entre l'hydroxyde de calcium et l'acide phosphorique s'effectue davantage.

Lorsque la réaction entre l'hydroxyde de calcium et l'acide phosphorique s'effectue progressivement, les particules primaires d'hydroxyapatite (matières synthétiques) sont produites dans la suspension (ces particules étant désignées simplement ci-après sous le nom de "particules primaires"). La structure chimique de ces particules primaires comprend des parties chargées positivement et des parties chargées négativement. En conséquence, des forces de Van der Waals (force intermoléculaire) sont engendrées entre les parties chargées positivement dans la structure chimique d'une particule primaire dans l'ensemble de particules primaires et les particules chargées négativement dans la structure

chimique de l'autre particule primaire de l'ensemble de particules primaires. Par ces forces de Van der Waals, la première particule primaire et la seconde particule primaire adhèrent l'une à l'autre pour obtenir un pré-agrégat. Puis, dans la suspension, les pré-agrégats s'agglutinent pour obtenir des agrégats d'hydroxyapatite (matière synthétique) (ceux-ci étant désignés simplement ci-après sous le nom de "agrégats"). Les agrégats provoquent une augmentation progressive de la viscosité de la suspension.

[S2 : Etape d'obtention de particules secondaires d'hydroxyapatite par séchage de la suspension (deuxième étape)].

Dans cette deuxième étape, par séchage de la suspension contenant les particules primaires d'hydroxyapatite et les agrégats de ces particules primaires obtenues dans l'étape [S1] et par granulation de ceux-ci, une poudre séchée constituée des particules secondaires d'hydroxyapatite est obtenue comme constituant principal.

Le procédé de séchage de la suspension n'est pas particulièrement limité à un procédé spécifique, mais un procédé de séchage par atomisation est de préférence utilisé. En conséquence d'un tel procédé, les particules primaires d'hydroxyapatite et les agrégats de ces particules primaires sont granulés, ce qui fait qu'il est possible d'obtenir de manière fiable une poudre ayant un diamètre de particule prédéterminé pendant une brève période de temps.

En outre, la température de séchage de la suspension est comprise avantageusement dans l'intervalle d'environ 75 à 250°C, plus avantageusement dans l'intervalle d'environ 95 à 220°C. En choisissant la température de séchage de telle sorte qu'elle soit égale à une valeur comprise dans l'intervalle précité, il est possible d'obtenir de manière fiable les particules secondaires (la poudre séchée) ayant un diamètre de particule uniforme.

[S3 : Etape de frotage des particules secondaires pour obtenir une poudre frittée d'hydroxyapatite (troisième étape)].

5 Dans la troisième étape, par frittage de la poudre séchée d'hydroxyapatite obtenue dans l'étape [S2], une poudre frittée constituée d'hydroxyapatite est obtenue comme constituant principal. La résistance à la compression des particules (résistance à la rupture) de cette poudre frittée est améliorée, comparativement à celle de la poudre
10 séchée.

Dans ce cas, la température de frittage de la poudre est comprise avantageusement dans l'intervalle d'environ 800 à 1100°C, plus avantageusement dans l'intervalle d'environ 900 à 1000°C.

15 A cet égard, le procédé de production de la poudre frittée conforme à la présente invention, en particulier, convient à la production d'une poudre frittée ayant un diamètre de particule envisagé compris dans l'intervalle d'environ 10 à 100 µm.

20 En menant à bonne fin les étapes décrites ci-dessus, il est possible de produire la poudre frittée d'hydroxyapatite. A cet égard, la surface spécifique de l'adsorbant (la poudre frittée) 3 utilisé pour le procédé de purification conforme à la présente invention est
25 comprise dans l'intervalle de 2,0 à 11,0 m²/g, de la manière décrite ci-dessus. Dans le procédé de production de la poudre frittée décrit ci-dessus, la surface spécifique de l'adsorbant 3 peut être aisément fixée à une valeur comprise dans l'intervalle précité en ajustant de manière
30 appropriée la température de frittage dans l'étape [S3], les capacités de dispersion des particules primaires et des agrégats de ces particules primaires dans l'étape [S1] (leur distribution de particules) et des facteurs similaires.

35 En outre, la porosité de l'adsorbant (la poudre frittée) 3 est comprise de préférence dans l'intervalle de

0,1 à 0,14 μm et les vides de cet adsorbant sont compris de préférence dans l'intervalle de 10 à 35 %. Dans le procédé de production de la poudre frittée décrit ci-dessus, chacun de ces facteurs consistant en la porosité et les vides de
5 l'adsorbant 3 peut être fixé aisément à une valeur comprise dans l'intervalle précité en ajustant de manière appropriée la température de frittage dans l'étape [S3], les capacités de dispersion des particules primaires et des agrégats de ces particules primaires dans l'étape [S1] (leur
10 distribution de particules), la température de séchage dans l'étape [S2] et des facteurs similaires.

A cet égard, l'ajustement des capacités de dispersion (de la distribution de particules) des particules primaires et des agrégats de ces particules primaires dans l'étape
15 [S1] peut être effectué en ajustant de manière appropriée, par exemple, la puissance d'agitation du mélange des premier et second liquides et la température du mélange. En variante, l'ajustement peut également être effectué en pulvérisant physiologiquement les agrégats produits des
20 particules primaires en dispersant ensuite les agrégats pulvérisés dans la suspension.

En outre, le procédé de pulvérisation physique des agrégats des particules primaires d'hydroxyapatite n'est pas particulièrement limité à un procédé spécifique. Des
25 exemples du procédé comprennent : un procédé de broyage par jet par voie humide pendant l'écrasement sous forte pression de gouttelettes de la suspension pulvérisée ; un procédé utilisant un broyeur à billes consistant à placer la suspension et des billes formées de matières céramiques
30 telles que la zircone dans un récipient clos hermétiquement et à mettre le récipient clos hermétiquement en rotation ; et des procédés similaires.

Un procédé de purification d'un virus ou d'un antigène viral en utilisant l'appareil de séparation 1 décrit ci-dessus (c'est-à-dire le procédé de purification conforme à
35 la présente invention) est ensuite décrit.

(1) Etape de préparation

Tout d'abord, une solution d'échantillon contenant une solution de culture et des cellules hôtes est préparée.

5 Dans ce cas, des virus sont obtenus en les laissant croître dans une cellule en culture, en plus d'une cellule cérébrale et d'une cellule nerveuse d'un mammifère provenant d'animaux ou d'œufs d'oiseaux. En conséquence, on les laisse croître dans une solution dépendant de la cellule hôte, comme solution d'échantillon contenant les
10 virus.

Les virus ne sont pas particulièrement limités à un virus spécifique, mais comprennent des virus comportant des enveloppes, des virus sans enveloppe et des virus similaires. Des exemples de familles de virus comportant
15 des enveloppes comprennent : les Flaviviridae auxquels appartiennent le virus de la dengue et le virus de l'encéphalite japonaise ; les Orthomyxoviridae auxquels appartient le virus de la grippe ; les Togaviridae auxquels appartient le virus de rubéole ; les
20 Paramyxoviridae auxquels appartiennent le virus de la rougeole et le virus des oreillons. Des exemples de famille de virus ne comportant aucune enveloppe comprennent : les Papillomaviridae auxquels appartient le virus du papillome ; les Reoviridae auxquels appartiennent les
25 réovirus et le rotavirus. Parmi ces virus, un virus qui appartient aux Flaviviridae est préférable. Le diamètre (les dimensions) du virus de la dengue et du virus de l'encéphalite japonaise appartenant au Flaviviridae, est compris dans l'intervalle d'environ 40 à 50 nm. Lorsque le
30 virus ayant de telles dimensions est séparé et purifié, il est possible de séparer de manière fiable le virus et d'autres substances étrangères présentes dans la solution d'échantillon avec une plus grande précision en utilisant l'adsorbant 3 répondant à la description précitée.

35 Des exemples d'antigène viral comprennent : un antigène viral dépourvu de toxicité ou ayant une faible

toxicité, tel qu'un virus ; un antigène viral dans lequel les parties présentant une antigénicité ont été éliminées des virus sélectivement ; et des antigènes viraux similaires.

5 (2) Etape de distribution (première étape)

La solution d'échantillon préparée est ensuite amenée à l'adsorbant 3 par le conduit d'admission 24 et l'élément filtrant 4 pour être mis en contact avec l'adsorbant 3 et passer à travers la colonne 2 (l'appareil de séparation 1).

10 En conséquence, les virus ayant une grande capacité d'adsorption vis-à-vis de l'adsorbant 3 et les substances étrangères ayant une capacité d'adsorption relativement grande vis-à-vis de l'adsorbant 3 parmi les substances étrangères autres que les virus sont portés par l'adsorbant
15 3 dans la colonne 2. Les substances étrangères ayant une faible capacité d'adsorption par rapport à l'adsorbant 3 sont déchargées de la colonne 2 à travers l'élément filtrant 5 et le conduit de sortie 25.

 (3) Etape de fractionnement (deuxième étape)

20 Puis un tampon d'élution au phosphate, comme éluat, est introduit dans la colonne 2 par le conduit d'admission 24 et l'élément filtrant 4 pour éluer les virus adsorbés.

L'éluant déchargé de la colonne 2 à travers le conduit de sortie 25 et l'élément filtrant 5 est ensuite fractionné
25 (recueilli) pour obtenir des fractions comprenant une quantité prédéterminée de l'éluant. De cette manière, les virus, qui sont adsorbés à l'adsorbant 3, et les autres substances étrangères sont recueillis (séparés les uns des autres) dans les fractions dans leur ordre d'élution, en
30 fonction de la différence entre la capacité d'absorption des virus par rapport à l'adsorbant 3 et la capacité d'absorption des substances étrangères par rapport à l'adsorbant 3.

Des exemples de tampon d'élution au phosphate
35 comprennent le phosphate de sodium, le phosphate de

potassium, le phosphate de lithium et des phosphates similaires.

Le pH du tampon d'élution au phosphate n'est pas particulièrement limité mais est de préférence compris dans la plage de la neutralité, concrètement avantageusement dans la plage d'environ 6 à 8 et plus avantageusement dans la plage d'environ 6,5 à 7,5. Cela permet d'éviter une altération du virus à séparer, en évitant ainsi une perte d'activité biologique du virus. En outre, il est également possible d'éviter de manière fiable une altération de l'adsorbant 3, ce qui fait qu'il est également possible d'éviter une modification de la capacité de séparation de l'appareil de séparation 1.

En conséquence, en utilisant le tampon d'élution au phosphate dont le pH est compris dans les intervalles précités, il est possible d'améliorer le taux de production d'un virus cible.

En outre, la concentration en sel du tampon d'élution au phosphate était de préférence égale à environ 600 mM. La séparation du virus au moyen du tampon d'élution au phosphate ayant une telle concentration en sel permet d'éviter l'apparition d'effets néfastes sur le virus en raison de l'existence d'ions métalliques dans le tampon d'élution au phosphate.

Plus précisément, la concentration en sel du tampon d'élution au phosphate est comprise de préférence dans l'intervalle d'environ 1 à 600 mM. En outre, il est préféré que la concentration en sel du tampon d'élution au phosphate soit modifiée de manière continue ou par étapes lorsqu'une opération de séparation du virus est effectuée. Cela permet d'améliorer efficacement l'opération de séparation du virus.

La vitesse d'écoulement du tampon d'élution au phosphate dans l'espace de remplissage de l'adsorbant 20 est comprise avantageusement dans l'intervalle d'environ 0,1 à 10 ml/minute et plus avantageusement dans

l'intervalle d'environ 1 à 5 ml/minute. En séparant le virus à une telle vitesse d'écoulement, il est possible de séparer de manière fiable un virus cible de la solution d'échantillon sans qu'une longue période de temps soit
5 nécessaire pour l'opération de séparation. Cela signifie qu'il est possible d'obtenir un virus ayant une grande pureté. Par les opérations décrites ci-dessus, le virus est recueilli dans un nombre prédéterminé de fractions.

En outre, le virus cible est purifié en utilisant le
10 procédé de purification conforme à la présente invention (l'étape de purification), puis un vaccin peut être produit en inactivant le virus purifié (étape d'inactivation). Suivant un tel procédé de production du vaccin, puisque le virus est purifié avec une grande pureté, il est possible
15 de réduire fortement le risque de contamination dû à d'autres microorganismes. En résultat, il est possible de produire un vaccin présentant une grande innocuité.

Dans cette étape d'inactivation, divers types de procédés peuvent être choisis comme procédés d'inactivation
20 du virus, bien que ces procédés dépendent du type de vaccin à produire.

Bien que le procédé de purification et le procédé de production du vaccin conformément à la présente invention aient été décrits ci-dessus, la présente invention n'est
25 pas limitée à ceux-ci.

Par exemple, le procédé de purification conforme à la présente invention peut comprendre en outre une pré-étape avant l'étape [S1], une étape intermédiaire entre l'étape [S1] et l'étape [S2] ou entre l'étape [S2] et l'étape [S3],
30 et une post-étape après l'étape [S3], librement.

Exemples

La présente invention est décrite ensuite par référence à des exemples spécifiques.

1. Purification du virus de la dengue

(Exemple 1)

-1- Tout d'abord, une solution d'échantillon a été préparée de la manière suivante : on a laissé le virus de la dengue croître avec une cellule C6/36 provenant d'un moustique pour obtenir un surnageant de culture, puis le surnageant de culture a été extrait. Le surnageant de culture extrait a été filtré au moyen d'un filtre ayant des dimensions de pores de 0,22 μ m pour obtenir la solution d'échantillon.

-2- Puis 10 ml de la solution d'échantillon (de l'échantillon) ont été introduits (amenés) dans un appareil de séparation pour l'adsorption du virus et des substances étrangères à un adsorbant. Un éluat A et un éluat B ont été ensuite amenés dans l'appareil de séparation à une vitesse d'écoulement de 1 ml/minute pendant 15 minutes de telle sorte que la proportion de l'éluat B soit modifiée de manière continue dans l'intervalle de 0 à 100 %. Puis l'éluat B a été introduit dans l'appareil de séparation à une vitesse d'écoulement de 1 ml/minute. Un éluant contenant le virus et les substances étrangères a été ensuite déchargé de la colonne. L'éluant déchargé a été fractionné en fractions ayant des numéros de fractions de 1 à 10 en volumes de 2 ml et en fractions ayant des numéros de fractions de 11 à 30 en un volume de 1 ml.

En résultat, le virus de la dengue présent dans la solution d'échantillon a pu être séparé des substances étrangères de la manière représentée sur la figure 2. Plus précisément, le virus de la dengue a pu être séparé des substances étrangères, qui ont été déchargées dans les fractions avant la période de 20 minutes du temps de rétention sur la figure 2, les substances étrangères ayant une faible capacité d'adsorption ont été déchargées dans les fractions à partir de 20 minutes du temps de rétention de la figure 2. Cela signifie que le virus de la dengue a pu être recueilli (purifié) dans les fractions contenant

l'éluant qui ont été déchargées au bout d'environ 30 minutes du temps de rétention.

Il faut noter qu'un tampon d'élution au phosphate à 10 mM (pH 7,2) a été utilisé comme éluat A et un tampon
5 d'élution au phosphate à 600 mM (pH 7,2) a été utilisé comme éluat B.

A cet égard, il faut noter qu'une colonne (dimensions 4,6 mm x 35 mm) dans laquelle une quantité d'environ 0,6 g de billes d'hydroxyapatite (poudre frittée dont le diamètre
10 moyen de particule est égal à 40 μ m) produites de la manière décrite ci-dessous comme adsorbant, remplissant l'espace de remplissage d'adsorbant, a été utilisée dans l'appareil de séparation.

-2A- Tout d'abord, de l'hydroxyde de calcium a été mis
15 en suspension dans de l'eau pure pour obtenir une suspension d'hydroxyde de calcium, puis une solution aqueuse d'acide phosphorique a été ajoutée goutte à goutte à la suspension d'hydroxyde de calcium pour obtenir un mélange. Le mélange a été agité à une puissance d'agitation
20 de 1 kW à une température de 30°C pendant 24 heures. De cette manière, 500 litres d'une suspension contenant 10 % en poids de particules primaires d'hydroxyapatite ont été obtenus.

Il faut noter que la matière synthétique ainsi obtenue
25 s'est révélée consister en hydroxyapatite par diffractométrie des rayons X sur poudre.

-2B- Puis la suspension contenant les particules primaires d'hydroxyapatite a été séchée par atomisation à 150°C en utilisant un appareil de séchage par atomisation
30 (produit par OHKAWARA KAKOHKI Co., Ltd. sous le nom commercial "OC-20"), pour obtenir ainsi une poudre séchée en particules.

-2C- En outre, des parties de la poudre séchée ont été calibrées pour obtenir des particules ayant un diamètre
35 médian de particules d'environ 40 μ m. Puis les particules

ont été frittées dans un four électrique à une température de 950°C pendant 4 heures pour obtenir une poudre frittée.

5 A cet égard, le diamètre moyen de particule, la surface spécifique, la porosité et les vides des particules de la poudre frittée hydroxyapatite ainsi obtenue étaient respectivement égaux à environ 40 μm , 6,6 m^2/g , 0,13 μm et 32 %.

(Exemples 2 à 5 et exemples comparatifs 1 et 2)

10 Le virus de la dengue présent dans une solution d'échantillon a été recueilli (séparé et/ou purifié) de la même manière que dans l'exemple 1, sauf qu'une poudre frittée produite dans les conditions indiquées sur le tableau 1 a été utilisée comme poudre frittée d'hydroxyapatite qui a été utilisée comme adsorbant.

15 A cet égard, les purifications du virus de la dengue dans l'exemple 1 et l'exemple comparatif 1 ont été effectuées de manière répétée cinq fois et huit fois en utilisant dans tous les cas le même appareil de séparation.

20

25

30

35

Tableau 1

	Conditions de production					Poudre frittée			
	-2A-		Puissance d'agitation [kW]	Température de séchage [°C]	-2B- Température de frittage [°C]	Diamètre moyen de particule 40 [µm]	Surface spécifique [m²/g]	Porosité [µm]	Vides [%]
	Température (°C)	Temps [h]							
Ex. 1	30	24	1	150	950	40	6,6	0,13	32
Ex. 2	30	24	1	150	1000	40	3,3	0,14	19
Ex. 3	30	24	1	150	900	40	10,5	0,12	35
Ex. 4	30	24	3	150	950	40	7,5	0,09	30
Ex. 5	30	24	0,3	150	650	40	6,1	0,16	35
Ex. comp. 1	30	24	1	150	700	40	21,0	0,1	50
Ex. comp. 2	30	24	1	150	1050	40	1,2	0,14	8

2. Evaluation

2-1. Rapport de production (rapport de purification)
du virus de la dengue

Dans chacun des exemples 1 à 5 et des exemples comparatifs 1 et 2, le virus de la dengue présent dans les fractions, pendant l'éluant déchargé de la colonne au bout d'environ 30 minutes du temps de rétention a été soumis à un test d'hémagglutination (test HA) pour obtenir le rapport de production de virus de la dengue.

Le rapport de production ainsi obtenu du virus de la dengue dans chacun des exemples 1 à 5 et des exemples comparatifs 1 et 2 est présenté sur le tableau 2

Tableau 2

	Poudre frittée				Rapport de production [%]
	Diamètre moyen de particule [µm]	Surface spécifique [m ² /g]	Porosité [µm]	Vides [%]	
Ex.1	40	6,6	0,13	32	94
Ex.2	40	3,3	0,14	19	78
Ex.3	40	10,5	0,12	35	90
Ex.4	40	7,5	0,09	30	60
Ex.5	40	6,1	0,16	35	60
Ex. comp. 1	40	21,0	0,1	50	50
Ex. comp. 2	40	1,2	0,14	8	59

Dans le cas où le virus de la dengue a été purifié par le procédé de purification dans chacun des exemples, ce qui signifie que le virus de la dengue a été purifié en utilisant la poudre frittée d'hydroxyapatite ayant une surface spécifique comprise dans l'intervalle de 2,0 à 11,0 m²/g comme adsorbant fourni avec l'appareil de

séparation, le taux de production du virus de la dengue a été égal ou supérieur à 60 %, de la manière indiquée sur le tableau 2. Cela démontre que le virus de la dengue a pu être purifié avec un excellent rapport de production. En outre, dans chacun des exemples 1 à 3, la porosité de la poudre frittée était comprise dans l'intervalle de 0,12 à 0,14 μm , ce qui démontre un taux de production du virus de la dengue encore meilleur.

A l'opposé, le taux de production du virus de la dengue était inférieur à 60 % dans chacun des exemples comparatifs 1 et 2. Cela est dû au fait que la surface spécifique de la poudre frittée d'hydroxyapatite était comprise au-delà de l'intervalle de 2,0 à 11,0 m^2/g .

2-2 Reproductibilité du taux de production du virus de la dengue

Les purifications du virus de la dengue dans l'exemple 1 et l'exemple comparatif 1 ont été effectuées de manière répétée cinq fois et huit fois, respectivement. Dans le cas du virus de la dengue ainsi obtenu, présent dans les fractions correspondant à l'éluant déchargé de la colonne au bout d'environ 30 minutes du temps de rétention, le rapport de production du virus de la dengue a été obtenu au moyen d'un procédé identique à celui décrit dans le paragraphe 2-1.

Les taux de production du virus de la dengue ainsi obtenu dans l'exemple 1 et l'exemple comparatif 1 sont représentés sur la figure 3.

Comme le montre la figure 3, dans le procédé de purification de l'exemple 1, le virus de la dengue a été purifié de manière répétée en utilisant dans chaque cas le même appareil de séparation. En résultat, il n'existait pas de grande différence entre les taux de production du virus de la dengue à chaque fois. Cela montre que le virus de la dengue a pu être recueilli avec un taux de production uniforme et une bonne reproductibilité.

A l'opposé, dans le procédé de purification de l'exemple comparatif 1, le virus de la dengue a été purifié de manière répétée en utilisant dans tous les cas le même appareil de séparation. En résultat, le taux de production
5 du virus de la dengue tendait à diminuer à chaque fois. Cela montre qu'il a été impossible de recueillir le virus de la dengue avec une bonne reproductibilité.

Sauf indication contraire, une référence à un composé ou constituant comprend le composé ou constituant
10 proprement dit, ainsi que celui-ci en association avec d'autres composés ou constituants, tels que des mélanges de composés.

De la manière utilisée dans le présent mémoire, les formes "un", "une", "le" et "la" comprennent la référence
15 au pluriel, sauf spécification contraire nette d'après le contexte.

Sauf indication contraire, toutes les valeurs numériques exprimant des quantités d'ingrédients, les conditions réactionnelles et des conditions similaires,
20 utilisées dans le présent mémoire doivent être considérées comme étant modifiées dans tous les cas par le terme "environ". En conséquence, sauf indication contraire, les paramètres numériques indiqués dans la description des revendications annexées sont des approximations qui peuvent
25 varier en fonction des propriétés désirées que l'on cherche à obtenir au moyen de la présente invention. Dans tous les cas, à titre non limitatif, chaque paramètre numérique doit être envisagé à la lumière du nombre de chiffres significatifs et des conventions usuelles d'arrondissement.

En outre, l'indication d'intervalles numériques dans
30 le présent mémoire est considérée comme étant une description de toutes les valeurs numériques et de tous les intervalles numériques existant dans cet intervalle. Par exemple, si un intervalle va d'environ 1 à environ 50, il
35 est considéré qu'il comprend, par exemple, 1, 7, 34, 46,1,

23,7 ou n'importe quelle autre valeur ou n'importe quelle autre intervalle dans cet intervalle.

Il va de soi que la présente invention n'a été décrite qu'à titre explicatif, mais nullement limitative, et que de nombreuses modifications peuvent y être apportées sans sortir de son cadre.

10

15

20

25

30

35

REVENDICATIONS

1. Procédé pour purifier un virus ou antigène viral à partir d'une solution d'échantillon contenant le virus ou l'antigène viral, caractérisé en ce qu'il comprend :

5 la préparation d'une poudre frittée d'hydroxyapatite, la poudre frittée comprenant des particules, la surface spécifique des particules dans la poudre frittée étant comprise dans l'intervalle de 2,0 à 11,0 m²/g ;

la mise de la solution d'échantillon en contact avec
10 la poudre frittée pour parvenir ainsi à l'adsorption du virus ou de l'antigène viral aux particules de la poudre frittée ; et

l'apport d'un éluant à la poudre frittée pour éluer ainsi le virus ou l'antigène viral adsorbé hors des
15 particules de la poudre frittée.

2. Procédé suivant la revendication 1, caractérisé en ce que le diamètre moyen des particules de la poudre frittée est compris dans l'intervalle de 10 à 100 µm.

3. Procédé suivant la revendication 1, caractérisé en
20 ce que la préparation de la poudre frittée comprend :

le mélange de matières premières pour obtenir une suspension contenant des particules primaires d'hydroxyapatite et des agrégats des particules primaires ;

le séchage de la suspension pour obtenir des
25 particules secondaires d'hydroxyapatite ; et

le frittage des particules secondaires de l'hydroxyapatite pour obtenir la poudre frittée.

4. Procédé suivant la revendication 3, caractérisé en ce que les particules secondaires sont obtenues par
30 granulation des particules primaires d'hydroxyapatite et des agrégats des particules primaires.

5. Procédé suivant la revendication 1, caractérisé en ce que l'éluant est une solution tampon à base de phosphate.

6. Procédé suivant la revendication 1, caractérisé en ce que les virus comprennent un virus appartenant aux Flaviviridae.

5 7. Procédé de production d'un vaccin à base du virus ou de l'antigène viral, caractérisé en ce qu'il utilise le procédé de purification du virus ou de l'antigène viral tel que défini dans la revendication 1.

10

15

20

25

30

35

1/3

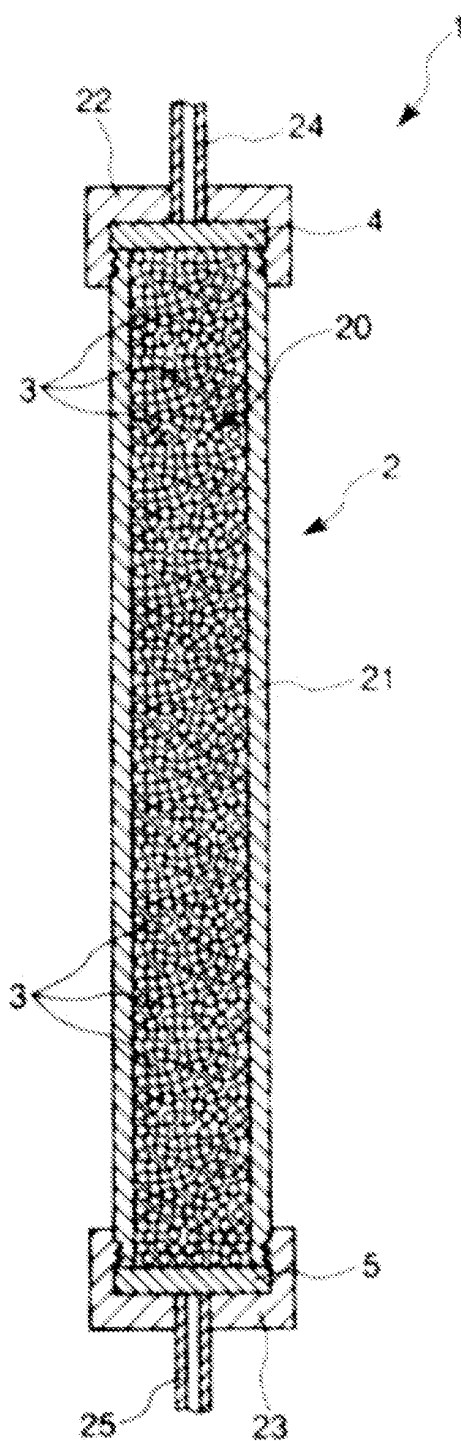


FIG. 1

2/3

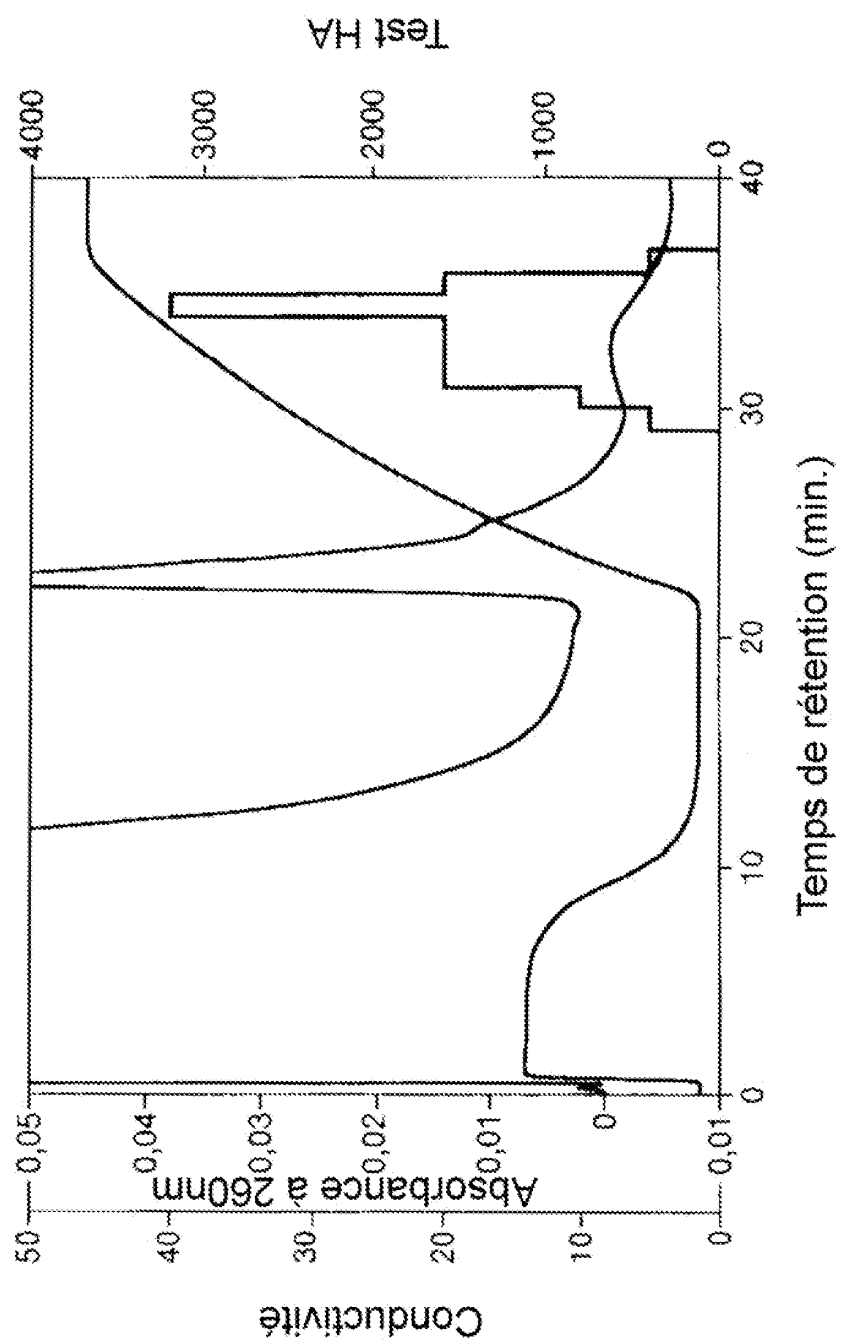


FIG. 2

3/3

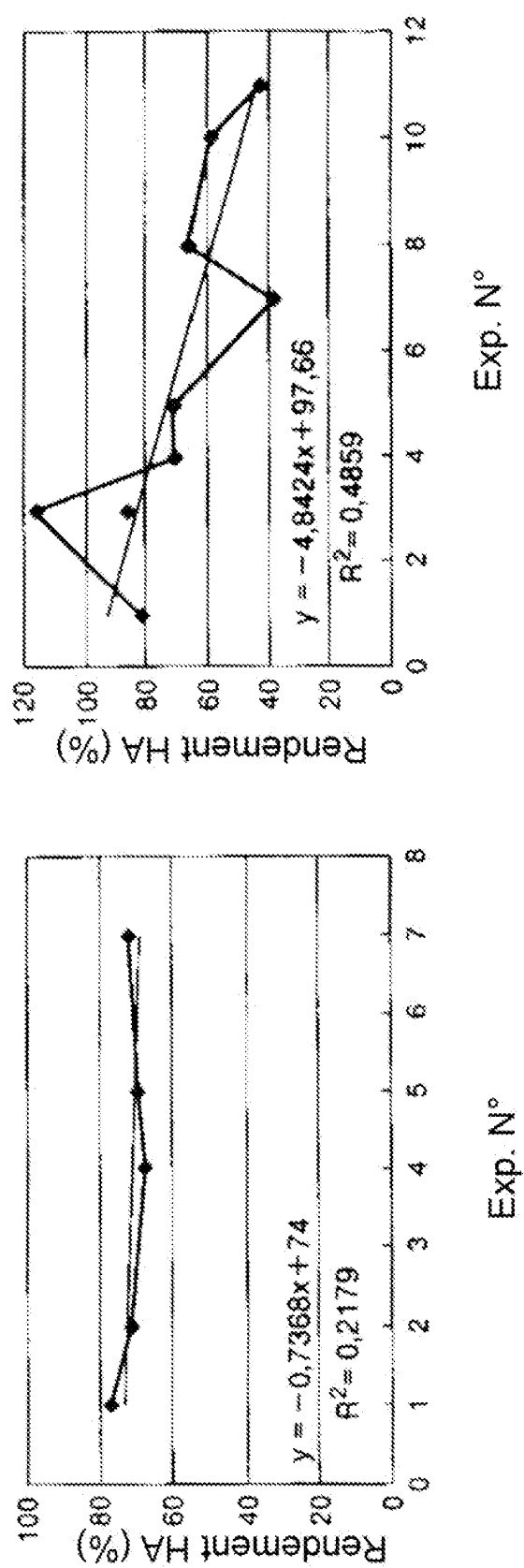


FIG. 3