

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第4426720号
(P4426720)

(45) 発行日 平成22年3月3日 (2010.3.3)

(24) 登録日 平成21年12月18日 (2009.12.18)

(51) Int. Cl.	F I
A 6 1 K 39/00 (2006.01)	A 6 1 K 39/00 D
A 6 1 K 39/145 (2006.01)	A 6 1 K 39/145
A 6 1 P 31/16 (2006.01)	A 6 1 P 31/16
A 6 1 L 2/18 (2006.01)	A 6 1 L 2/18

請求項の数 7 (全 14 頁)

(21) 出願番号	特願2000-504878 (P2000-504878)	(73) 特許権者	500093443
(86) (22) 出願日	平成10年7月31日 (1998.7.31)		メデヴァ ヨーロッパ リミテッド
(65) 公表番号	特表2001-511458 (P2001-511458A)		イギリス国, エスタブリュ 1 1 イーエフ
(43) 公表日	平成13年8月14日 (2001.8.14)		ロンドン, エスティー. ジェイムズ
(86) 国際出願番号	PCT/GB1998/002314		ストリート 10
(87) 国際公開番号	W01999/006067	(74) 代理人	100083839
(87) 国際公開日	平成11年2月11日 (1999.2.11)		弁理士 石川 泰男
審査請求日	平成17年7月22日 (2005.7.22)	(72) 発明者	メイプルソン, ブリジット, キャサリン
(31) 優先権主張番号	9716242.4		イギリス国, エル24 9 ジーアール リ
(32) 優先日	平成9年7月31日 (1997.7.31)		ヴァプー, スピーク, ガスキル ロード
(33) 優先権主張国	英国 (GB)		, メデヴァ パルマ
前置審査		(72) 発明者	サイザー, フィリップ
			イギリス国, ダブリュエイ6 0 キューエ
			ス ヘルスピー, チェスター ロード 1
			20

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ワクチンの菌体内毒素除去方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

医薬製造溶液中のインフルエンザ抗原である血球凝集素から菌体内毒素を解離させる効果を有するデオキシコール酸ナトリウムで前記溶液を処理し、そして前記血球凝集素を保持するが、解離された細菌菌体内毒素は通過させることができるのに有効な孔サイズを有する分子量分離フィルタにより前記溶液を濾過することを含む、インフルエンザ抗原である血球凝集素を含む医薬品製造溶液からの細菌菌体内毒素除去方法。

【請求項 2】

前記デオキシコール酸ナトリウムが、その臨界ミセル濃度と少なくとも同じ濃度で存在する請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

前記デオキシコール酸ナトリウムが、その臨界ミセル濃度の 1.5 から 5 倍の濃度で存在する請求項 2 に記載の方法。

【請求項 4】

前記デオキシコール酸ナトリウムが、その臨界ミセル濃度の 2 倍と 4 倍との間の濃度で存在する請求項 3 に記載の方法。

【請求項 5】

前記分子量分離フィルタが、再生酢酸セルロース膜もしくはポリスルホン膜を含む請求項 1 から 4 のいずれか 1 つに記載の方法。

【請求項 6】

前記細菌菌体内毒素の除去の後、前記医薬製造溶液は前記デオキシコール酸ナトリウムが除去されるさらなる工程に供される請求項1から5のいずれか1つに記載の方法。

【請求項7】

前記さらなる工程が、前記医薬製造溶液を透析に供することを含むものである請求項6に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

本発明は、例えばワクチン組成物といった医薬組成物から細菌菌体内毒素の除去方法に関するものである。

【0001】

菌体内毒素は、細菌、特にグラム陰性菌の細胞壁から典型的に誘導されるリポ多糖類である。菌体内毒素を伴う不純物は、医薬工業、特に、非無菌製造工程における一般的な問題である。

10

【0002】

例えばウィルスワクチンといったワクチンは、適当なウィルス基質にウィルスを接種し、ウィルスが複製するように基質を培養し、そして基質からウィルスを得ることにより製造することができる。そして、ウィルスは好適な不活性剤を用いて不活性化され、さらにウィルス液が調製され、そしてワクチンを得るために精製される。

【0003】

ワクチン、特にインフルエンザワクチンのようなウィルスワクチンを製造する方法の一つにおいては、卵がウィルスの基質として用いられる。例えば、卵は種ウィルスにより接種され、ウィルスが複製されるように培養され、そしてウィルスを含む尿膜腔液が卵から採取される。そして、ウィルスを粉碎しそして要求されるウィルス抗原を放出するために、尿膜腔液はトリトン（T r i t o n）のような洗浄剤で溶解され得る精製されたウィルス画分を得るための一連の精製工程に供される。ウィルス抗原は、さらに精製され、そして必要であれば、多効果のワクチン組成物を得るため他の抗原と混合されてもよい。ワクチンの調製は、一般的には無菌室で行われ、チオマーサル（t h i o m e r s a l）のような防腐剤は、細菌の増殖を最小限にするか、もしくは防止する工程の間における種々の工程で添加される。

20

【0004】

卵がウィルスの基質として用いられた場合は、接種の前に、生物学的負担を減少させるための洗浄工程が行われても、洗浄工程は完全に微生物を取り除くことを保障するものではない。さらには、卵が病原菌に汚染されている可能性があり、また細菌を含む可能性もある。結果として、卵におけるウィルスの成長期間中に、不純物である多くの細菌は増殖するであろう。細菌は防腐剤により殺菌されたとしても、菌体内毒素を有する細菌の細胞壁が残る。洗浄剤によるウィルス粒子の破壊の間、細菌の細胞壁も最終的なワクチン組成物内で共に精製される菌体内毒素を放出することになる破壊がなされる。高いレベルの細菌性の菌体内毒素がワクチン内で検出された場合、現在の慣行では、菌体内毒素を取り除くことを試みるよりむしろ汚染されたワクチンとして処理される。結果的に、菌体内毒素による汚染により、ワクチンの製造の間、重大で高価な廃棄物となる。

30

【0005】

菌体内毒素の不純物は、インフルエンザワクチンの製造において、特有の問題が示される。インフルエンザワクチンの主たる構成要素は、より少ない量のノイラミニターゼ表面抗原（N A）と共にある、血球凝集素（ヘムアグルチニン（h a e m a g g l u t i n i n）（H A））表面抗原である。H AおよびN Aの両者は、抗原の両タイプを含む、単独のもしくは混合されたロゼットとしてのいずれかの特徴的なロゼット構造を形成することができる。この挙動は、膜を移動する疎水性の柄が、安定な疎水性の微細環境を得るために自己結合される場合の膜タンパクにおける典型である。

40

【0006】

ノイラミニダーゼ抗原は四量体の形状で存在する傾向にあるが、血球凝集素は、一般的に三量体を形成して存在する。一度形成されると、ロゼットはとても安定であり、そして例

50

えば洗浄剤で容易に破壊されない (S i a n R e n f r e y P h D T h e s i s ,
U n i v e r s i t y o f O x f o r d 1 9 9 4) 。

【0007】

細胞菌体内毒素は、親水性の多糖類の長鎖と、疎水性の脂肪酸含有尾部を有するリポ多糖類である。したがって、これらは両親媒性の構造を有する。水性の環境においては、凝集体を形成する傾向にある。

【0008】

インフルエンザの表面抗原および菌体内毒素は、それぞれを分離することは困難であり、例えばHAといったインフルエンザ表面抗原および菌体内毒素の両者は両親媒性構造を有し、水性の条件下では強力に結合されるようになるためであると考えられている。菌体内毒素はHA/NAロゼット内に含まれていることも明らかである。

10

【0009】

ワクチン組成物から菌体内毒素を除去するいかなる方法も、多くの基準を満たさなければならない。第1に、その方法は製造される抗原の過剰な損失を招いてはならない。第2に、比較的高い濃度の菌体内毒素を除去することが必要である (例えば、200 EU/ml より少なく、例えば100 EU/ml より少なくなるように菌体内毒素のレベルを減少させることができる必要がある。) 。その方法は、製造物内に潜在的に毒性を有する化学物質を導入してはならず、さらに用いられるいかなる化合物も抗原に悪影響を与えてはならない。このようないかなる方法も、製造条件下で行う際に好適にスケールアップができることも必要である。小さいスケールでのみ行われ、効率よくスケールアップができない方法は、工業上の面においては有用でない。最後に、菌体内毒素の除去の方法は、現存する方法や製造装置を用いて実行できるものである必要がある。

20

【0010】

ワクチンから菌体内毒素を除去するための数多くの試みがなされたが、これまで概して失敗に終わっている。

【0011】

ショ糖密度勾配遠心分離は、それら特定の分子密度を基礎とした物質間の分離による技術であり、物質間に相互作用がないものと仮定している。この技術は、インフルエンザ抗原溶液から菌体内毒素を除去する問題に対するこの用途に適用された。菌体内毒素の30%がショ糖密度勾配上の血球凝集素から分離して溶出したにもかかわらず、残りの70%は表面抗原に結合して残存した。ショ糖密度勾配への洗浄剤の添加は、比較的小さい範囲における血球凝集素からの菌体内毒素の分解能を改良しただけであった。

30

【0012】

トリエチルアミンは、菌体内毒素の疎水性を増加させることにより菌体内毒素と相互作用し、そしてこれによりトリメチルアミンは、形成されていると予想されているHA/NA/菌体内毒素錯体の分離を導くと仮定されたことが報告されている。したがって、トリメチルアミンはショ糖密度勾配に添加された。しかしながら、これは血球凝集素からの菌体内毒素の分解能を改良することには成功しなかった。

【0013】

活性化木炭、ガラス、陰イオン交換媒体 (D E A E) およびポリエステル上への菌体内毒素の非特異的な吸着も試みられたが、このような試みも失敗であった。

40

【0014】

多くのアフィニティー・クロマトグラフィー媒体は、医薬品からの菌体内毒素の除去を目的として商品化されている。独占的な解毒媒体 "A c t i c l e a n E t o x" , " P r o s e p - R e m t o x " および " C U N O Z e t a P l u s Z A " が、試みられ、一様でない程度での成功を得た。例えば、" A c t i c l e a n E t o x " は、小さなスケールの実験においては、血球凝集素から菌体内毒素の99%の分離に成功した。しかしながら、小さなスケールでの分離は、十分に再現することができず、そしてその方法は、大きなスケールにおいて十分に働かないものであった。" P r o s e p - R e m t o x " は、菌体内毒素もしくは血球凝集素のいずれをも吸着せず、また " C U N O Z e

50

t a P l u s Z A ”は100%の菌体内毒素と。100%の血球凝集素を吸着した。

【0015】

したがって、医薬組成物、そして特にワクチン組成物から菌体内毒素を除去する方法に対して緊急の必要性が存在する。

【0016】

本発明の目的は、工業的なスケールにおいて効果的であり、毒性のもしくは問題の有りそうな化学的な副産物を医薬製造物の中に残さず、従来の製造設備を利用でき、そして特にワクチンの場合に、過度の損失や抗原の変性とならない菌体内毒素の除去方法を提供することである。

【0017】

HAおよびNAといったインフルエンザ表面抗原および菌体内毒素は、洗浄剤を添加し、そして、濾過により濾液と共に菌体内毒素が通過すると同時に、抗原がフィルター残渣に残るような孔の大きさを有する分子量分離 (m o l e c u l a r w e i g h t c u t - o f f (M W C O)) フィルターを用い、得られる混合物を濾過することにより分離することができることを見出された。この技術は、他の医薬製造物、特にポリペプチド鎖を含むかもしくは両親媒性構造を有する医薬およびワクチンにも適用され得ることが予想される。

【0018】

したがって、本発明は、医薬製造用溶液から細菌菌体内毒素を除去する方法であって、上記溶液中のワクチン物質もしくは医薬品から上記菌体内毒素を解離させることに有効な界面活性剤で溶液を処理し、そして医薬品もしくはワクチン物質を保持するが、解離された菌体内毒素は通過することができることに有効な孔の大きさを有する分子量分離フィルターにより上記溶液を濾別する方法を提供する。

【0019】

ここで用いられる「医薬製造溶液」の語は、いかなる医薬品物質を含む、もしくはワクチンの抗原を含む溶液であって、最終産物までの、および最終産物を含む医薬製造工程の一部として製造される溶液を示すものである。医薬製造溶液は、例えば、微生物粒子（例えば、ウィルス粒子）もしくは細胞から細胞廃棄物もしくは望まれない物質が除去された部分的に精製されたワクチン抗原の溶液であってもよい。

【0020】

医薬品物質としては、その製造工程中で菌体内毒素汚染に対して感受性のある、もしくは潜在的に感受性のあるいかなる医薬品もしくはワクチン物質であってもよい。例えば、物質は、ペプチドホルモン、もしくは血液製剤のような治療的なポリペプチド産物もしくはワクチン物質であってもよい。特に、治療的ペプチド産物は、組換えペプチド産物であってもよい。ここで用いられる用語「ペプチド」および「ポリペプチド」は、例えば糖タンパクのように単糖類のような他の成分と連結もしくは結合したペプチドを含む物質と共に、ペプチド単独からなる物質も含むものである。

【0021】

その物質は、例えば錯体を形成して菌体内毒素と結合するものが典型例であろう。両親媒性構造を有し、結果的に菌体内毒素と錯体を形成する非ペプチド医薬品は、本発明の方法に対して有効に用いることができる。

【0022】

界面活性剤は、陽イオン性、非イオン性、両性イオン性、両性、もしくは陰イオン性界面活性剤であり、抗原の特性、特にM W C O フィルター上に保持される能力に悪影響を与えずに、抗原から菌体内毒素を解離させる効果を提供する。しかしながら、イオン性の界面活性剤、特に陰イオン性の界面活性剤が好ましい。

【0023】

特に界面活性剤が、ステロイド様の構造を有する陰イオン性の界面活性剤、特に胆汁酸塩類に相当する、もしくは類似の界面活性剤である。したがって、例えば、界面活性剤がデオキシコール酸塩、コール酸塩 (c h o l a t e)、グリココール酸塩 (g l y c o c h

10

20

30

40

50

olate)、タウロデオキシコール酸塩、もしくはタウロコール酸塩の好適な塩を例として挙げることができる。デオキシコール酸塩の塩類(DOC)が現在より好ましい。

【0024】

陰イオン界面活性剤の他の例としては、アルキルベンゼンスルホン酸塩およびドデシルスルホン酸塩のような長鎖のアルキルおよびアルキルアールスルホン酸塩を含む。

【0025】

界面活性剤の濃度は、抗原もしくはそのMWCO膜上に保持される能力に悪影響を有さずに、抗原から菌体内毒素を解離するのに有効なものであろう。界面活性剤の濃度は、好ましくは、少なくともその臨界ミセル濃度(CMC)と同等であり、より好ましくは、その臨界ミセル濃度より濃度が高いことである。現在最も好ましい界面活性剤の用いられる濃度としては、臨界ミセル濃度の1.5~5倍、より好ましくは2~4倍である。

10

【0026】

界面活性剤は、例えば透析技術により産物から容易に取り除くことができるものが最も好ましい。

【0027】

分子量分離(MWCO)濾過膜は、要求される産物抗原の膜上において保持されることができ、菌体内毒素および界面活性剤が膜を通過することができる分子量分離性を有する点で選択される。

【0028】

例えば、インフルエンザ抗原に対しては、100kD MWCO膜を採用することができる。これは、分子量約230kDを有する3量体を形成して典型的に存在する血球凝集素抗原の多くを保持するであろう。

20

【0029】

菌体内毒素が、界面活性剤と共にミセルもしくは凝集体を形成することができ、そのような状況下で界面活性剤は、菌体内毒素と形成されたいかなるミセルの全分子量が濾過膜の分子量分離性より低くなるようにする必要がある。

【0030】

その膜は、例えば再生酢酸セルロース膜、もしくはポリスルホン膜であってもよい。本発明の方法において好ましく、もしくは用いられる膜の特定の例としては、100kD MWCO酢酸セルロースミリポア膜である。

30

【0031】

本発明の方法は、インフルエンザウィルス表面抗原から細菌菌体内毒素を分離するために有用であることが見出されたが、この方法は、菌体内毒素汚染が問題となる他のポリペプチド物質および他の医薬物質と同様に、他のウィルス、細菌、原生動物、および寄生性のワクチン抗原、特に他の血球凝集素抗原の用途も見出されることが予想される。

【0032】

本発明の方法は、限定されるものではないが、以下の実施例を参照することにより説明される。

【0033】

図1は、インフルエンザワクチンの製造に含まれる工程の代表的な順序を概略示す。例えば、まず鶏卵は外側の不純物を除去するために洗浄され、活性のある種ウィルスが接種され、そして卵内でウィルスの成長と増殖が行えるように培養される。ウィルスの培養工程の終わりに、卵は冷却され、ウィルスを含む尿膜腔液が卵から採取される。

40

【0034】

採取の後、防腐剤(チオマーサル(thiomersal))であってもよい。)が添加される。得られた防腐処理がされた溶液は、その後、溶液の清澄化のため遠心分離され、ウィルス成分を濃縮させるため限外濾過に供される。

【0035】

濃縮の後、溶液はゾーン遠心分離による全ウィルスの精製の前に、例えばβ-プロピオラクトンといったウィルス不活性化剤で処理される。

50

【0036】

そして、精製されたウィルス画分は、ウィルス粒子を破壊するためにトリトン (T r i t o n) N101といった洗浄剤で処理され、そして得られる混合物は、インフルエンザ表面抗原からより密度の高いウィルス核物質を分離するためにゾーン遠心分離に供される。

【0037】

リン酸緩衝液を添加した後、表面抗原が、単一株の抗原溶液を得るためにゾーン遠心分離により洗浄剤から分離される。分離産物工程からの溶液のバッチは、多効果ワクチンを得るために他のウィルス株からモノブレンドプール (m o n o b l e n d p o o l s) で混合する前に、限外濾過によりさらに濃縮および精製されることができ「モノブレンドプール (M o n o b l e n d P o o l) (M B P)」を得るために集められる。

10

【0038】

上述した工程の間、菌体内毒素のレベルは通常いくつかのポイントで測定され、得られるポイントにおけるレベルが既定の限界を超える場合、本発明前の状況における手順では、バッチは廃棄される。

【0039】

しかしながら、菌体内毒素と精製された表面抗原との間のいかなる結合をも破壊する適当な洗浄剤での処理に単一価ブレンドプール (M o n o v a l e n t B l e n d P o o l (M B P)) を供し、そして菌体内毒素は通過させるが、精製された表面抗原は保持されるのに十分なグレードの分子量分離フィルターにより得られる混合物を濾過することにより、菌体内毒素が除去されることが見出された。そして、実質的に菌体内毒素の無い精製された表面抗原は、フィルターの残渣から回収される。以下の実験は、陰イオン性洗浄剤デオキシコール酸ナトリウムでの処理、およびその後の100kD分離フィルターを用いたMWC O濾過での菌体内毒素のレベルについての効果を説明するものである。

20

【0040】

実施例 1小スケールでの研究

100kD MWC Oフィルタによる菌体内毒素の除去における、2%w/v (50mM) および0.2%w/v (5mM) 濃度のデオキシコール酸ナトリウムの効果について、小スケールでの研究が、約10,000EU/mlの抗原を含む試料A/テキサス/36/91バッチ531 MBPで行われた。上述した方法にしたがって調製された抗原試料は、0.15M塩化ナトリウムおよび0.01%のチオマーサル (t h i o m e r s a l) を含むpH7.2の食塩加リン酸緩衝液10mM内で表面抗原を精製した血球凝集素およびノイラミニダーゼから実質的になるものである。

30

【0041】

デオキシコール酸 (D O C) は、そのpKa値より低いpH値のゲルを形成する傾向を有する。ゲルの形成を防止するために、抗原試料のpHは、最初、洗浄剤の添加前にはpH8もしくはそれより大きいpH値に調整された。例えば、2%w/v (0.14M) のリン酸二ナトリウム (d i s o d i u m p h o s p h a t e) が、リン酸二ナトリウムが完全に溶解することを確認することに注意が払われながら、37℃に暖められたMBPに添加された。MBPのpHは、これにより、約pH7.4からpH8.1に上昇した。得られた溶液中のナトリウムイオンの濃度は、約0.3Mであった。

40

【0042】

デオキシコール酸ナトリウムは、最終的なD O C濃度が0.2%w/v (5mM) および2%w/v (50mM) であるテスト溶液を得るために、MBP溶液に添加された。そして、テスト溶液は37℃で約1時間培養された。培養の後、各混合物は図2に示すようなミリポアミニタントランスバースフロウ (M i l l i p o r e M i n i t a n t r a n s v e r s e f l o w) 濾過装置を用いて、100kD MWC O膜により濾過された。

【0043】

D O C処理MBP試料の濾過および濃縮の後、残渣および濾液はそれらの最初の容量とな

50

ったので、HAおよび菌体内毒素の濃度は、直接比較することができた。

【0044】

濾液および残渣中の血球凝集素の濃度は、酵素結合免疫吸着検定法（ELISA）によりおよび放射状免疫拡散法により決定された。菌体内毒素のレベルは、自動LALアッセイ（Bio Whittaker Colorimetric Kinetic K-QCL LAL Assay）を用いて決定された。DOCでの処理前後のテスト試料の電子顕微鏡写真は、インフルエンザ表面抗原のロゼットクラスタにおけるDOCの影響を決定するため、Phillips 300 Transmission Electron Microscopeを用いて撮影された。HA ELISAおよびSRDアッセイの結果は、下記の表1および2にまとめられている。

10

【0045】

小スケールにおける結果

表1

残渣と濾液中の%HAにおけるDOC処理（5mMおよび50mM）の効果を示す結果のまとめ（0mM DOCをコントロールとして使用）

【0046】

【表1】

実験番号	テスト容量(L)	DOC 濃度 (mM)	濃度 因子 ^b	HA：オリジナルの α -センチジ			
				ELISA		SRD	
				残渣	濾液	残渣	濾液
A/テキサス/チ 531							
1	1.0	0 (コントロール)	10	49.2	1.5	ND ^c	ND ^c
	1.0	50 ^a	10	57.6	5.3	ND ^c	ND ^c
2	1.0	0 (コントロール)	10	80.9	0.7	ND ^c	ND ^c
	1.0	50	10	84.7	1.6	ND ^c	ND ^c
3	0.26	0 (コントロール)	5	41.9	0.8	ND ^c	ND ^c
	0.26	5	5	137.2	3.1	ND ^c	ND ^c
A/テキサス/チ 570							
4	0.5	0 (コントロール)	7.1	50.4	13.2	64.5	18.2
	0.5	5	10	95.7	4.0	107.5	11.4
B/ハナマ/チ 387							
5	0.4	0 (コントロール)	8.3	75.6	0.0	ND ^c	ND ^c
	1.0	5	2.7	74.9	0.3	ND ^c	ND ^c

20

30

40

a：DOC 50mMのスタート試料が得られていないので、50mM DOCの残渣および濾液試料における%HAおよび%LP Sを計算するための除数として0mM DOCのスタート試料が用いられた。

b：濃度因子は、希釈後の抗原の濃度と関連する濾過および濃縮工程の後の溶液中の抗原の濃度を示すものである。

c：ND：行っていない。

【0047】

HAおよびLP Sレベル（%）は以下のようにして測定された。

【0048】

50

【数 1】

$$\frac{\text{残渣もしくは濾液中のレベル} \times \text{mM DOC} \times 100}{\text{スタートのMPB中のレベル} \times \text{mM DOC}}$$

表 2

S R Dによる測定された0.2% (5 mM) DOCの有無におけるダイアフィルトレーション (d i a f i l t r a t i o n) 前後の実際のMBA、HAレベルの比較

【0049】

【表 2】

10

A/テキサスバッチ570	モ/フ レント 中のHA濃度 (μg/ml)	
	濾過前	濾過後
0 mM DOC	190	123
5 mM DOC	68	69

HAアッセイの結果は、一般的にHAは、DOCの存在下ではほとんど大きな程度では膜を通過することはないことを示す。一つの実験例 (実験例4) において、テスト溶液 (5 mM DOC) の濾液におけるHAのレベルは、他の実験例におけるものと比較してむしろより高かった。これは、100 kDのMWCO膜を通過することが可能な分子量 (77 kD) である、モノマー形状のHAが大きな比率で含有されたHAの特別なバッチのためであろう。

20

【0050】

菌体内毒素レベルの決定

菌体内毒素のレベルは、上述したように、DOCを用いた処理およびダイアフィルトレーション (d i a f i l t r a t i o n) および透析の前後でアッセイされた。結果は、図3および図4に示す。

【0051】

図3に示すように、結果は、ダイアフィルトレーション単独では、MBPから菌体内毒素を除去されないであろうことを示した。DOCが添加され (図4)、溶液が濾過された場合、残渣 (混合産品) における菌体内毒素のレベルは、処理前のレベルと比較して実質的に減少している。濾液 (廃棄物) 中の菌体内毒素のレベルは、それに応じて増加した。DOC (5 mMおよび50 mM) の両濃度は、MBPからの菌体内毒素の除去において効果的であった。

30

【0052】

実施例 2

パイロットスケールでの実験

実施例1に記載された小スケールの実験は、pH 8.15を得るために2% w/vのリン酸二ナトリウムで4.32 Lインフルエンザ A/テキサスバッチ#531 MBPのバッチを処理し、0.2% w/vのDOCを添加し、そして100 kD MWCO低結合 (Low Binding) 再生酢酸セルロース膜 (ミリポア) により濾過することにより、スケールアップされた。コントロールとして、インフルエンザ A/テキサスバッチ#531 MBPは、DOCによる処理はなされないが、同じ膜により濾過された。ダイアフィルトレーションの後、そして菌体内毒素のレベルの測定の前に、溶液の各々は、スタート溶液の容量 (4.3 L) に調整された。

40

【0053】

図5は、スタートの溶液、残渣、および濾液における菌体内毒素の結果の分布を示すものである。図5に示す結果は、小さいスケールでの実験と同様に、90%を超える菌体内毒素が、デオキシコール酸塩の存在下におけるダイアフィルトレーションにより除去できることを示した。

50

【0054】

血液凝集素の濃度は、上記実施例1に記載されるようにELISAおよびSDRにより決定された。

【0055】

4. 32 Lの菌体内毒素で汚染されたMBPのDOC処理前および処理後のHAレベルは、実験誤差の限界の範囲内であり、実質的に同一であることが見出された。例えば、DOCによる処理前のHAレベルは、 $68.25 \mu\text{g}/\text{ml}$ であり、DOC処理後のに検出されたHAのレベルは、 $68.75 \mu\text{g}/\text{ml}$ であった。これらの結果、DOC処理は、HAエпитープに影響しないことを示す。

【0056】

10

実施例3HPLCを用いたゲル濾過クロマトグラフィー (SEC)

菌体内毒素で汚染されたモノブレンドプール (MBP) は、(a) DOCがHAロゼットの大きさに影響を与えるか否か、(b) HAおよび菌体内毒素が同じ画分に溶出し、それによりそれらが連結している可能性があることを示されるか否か、を決定するために50 mM DOCの有り無しで、pH 8、10 mMのPBSで溶出するSECカラム (G43000 SWXL) に通された。

【0057】

例えば、10回保持 (ten-hold) で濃縮されたA/テキサス#531 MBPは、DOCの存在が、HAの分子径に影響するか否かを決定し、HAはより凝集された形状において、分離した分子として存在するか否かを確認するために、0%および0.2% (50 mM) のDOCと共に、SECにより調査された。得られた画分は、HAおよび菌体内毒素について分析され、そして280 nmのタンパク吸光度溶出プロファイルと比較された (図6および7参照)。DOCは、800 nmと200 nmとの間の光の吸収が見られなかったので、0および50 mMのDOCと共に、A/テキサスMBPの吸光パターンは直接比較された。HA-ELISAの結果は、DOCが0%および0.2%存在下の両方において、約3000 kDでの280 nmプロテインピークと一致するHAピークが見られる。HAロゼッタがDOCの有無でも同じ位置で溶出することを示すこれらの結果は、HA分子が50 mMのDOC処理によって破壊されない凝集されたロゼッタを採用していることが示された。

20

30

【0058】

DOCが存在しない場合に菌体内毒素がHAと共に溶出したことは、菌体内毒素がおそらくHAロゼッタと結合していることを示す (図6)。

【0059】

LALテストにおける菌体内毒素の測定は、DOCの存在により阻害されるので、50 mMのDOCを含む試料でのSEC画分の菌体内毒素プロファイルからはいかなる結論も導くことはできない (図7)。

【0060】

図7において、90分に出現する第2のピークは、洗浄剤ミセルによる光の回折によるものとして説明することができる。このようなミセルは、低いレベルのタンパク (例えば、280 nmプロファイル) を含むことができ、また菌体内毒素を含むことができる。

40

【0061】

EM写真は、DOC処理の前および後で約34 nmの平均径のロゼッタを示し、これはHAロゼッタは2% DOCにより破壊されないことも示すものである (図8aおよび8b)。

【0062】

上記実施例に示される結果は、MBPがDOCの不存在下でダイアフィルタされた場合は、菌体内毒素は100 kDのMWCO膜を通過せず、そしてHAロゼッタと共に残渣に残ることを示した (図5)。HAと同時に菌体内毒素が溶出したことを示した、0%のDOCと共にを行ったゲル濾過クロマトグラフィー分画の分析 (図6) の分析は、それらが物理

50

的に連結されていることを示した。5から50mMのDOCを添加することは、菌体内毒素が100kDのMWCO膜を自由に通過し濾液内に入ることを可能とし、これによりHAから分離される(図3、4および5、および表1)。またHAは、MWCO膜をそれほど多くの程度通過することはない。いかなる論理にも束縛されることを望むことがなければ、菌体内毒素とDOCとの親和性は、菌体内毒素がHAよりむしろDOCと結合するように、HAロゼッタの菌体内毒素との親和性より大きいとすることができた。菌体内毒素の分子は、混合された菌体内毒素/DOCミセルの形状で、100kDのMWCO膜を通過することができる。このようなミセルは、フィルター膜を通過するためには、100kDより小さい分子量を有する必要があるであろう。

【0063】

得られた結果は、HA-ELISAによれば事実上HAが濾液中で測定されなかったことから、A/テキサス#531、A/テキサス#570およびB/パナマ#87から誘導されたMBP-HAは、5mMもしくは50mM DOCと共に、100kD MWCO膜を重大な程度には通過しないことを説明している(表1)。これは、HAロゼットもしくはタンパク三量体が100kDより小さい分子までには解離されないことを示している。個々のHA三量体の分子量は230kDであると予想され、理論的にはそれらは100kDのMWCO膜を通過しない。HA三量体が、DOCの存在下において、モノマー成分である77kDまで減少することは生じない。

【0064】

(a) 最終産物中において好ましくない点、(b) DOCが試料中に存在すると汚染されたMBPから菌体内毒素の分離を測定することができない点で、DOCの分離は重要な工程である。一つの実験例において、DOCは30kD MWCOを透過するダイアフィルトレーションにより、当初約0.5%のDOCを含む残渣試料から0.002%より少なくなるまで除去することに成功した。

【0065】

したがって、上述した結果は、抗原溶液のデオキシコール酸ナトリウムでの処理の後、分子量分離フィルター膜により濾過することにより、大きなスケールとすることができなかった前の概念にもかかわらず、ワクチンの調製から菌体内毒素を分離する効果的な手段を提供することができることを論証したものである。

【0066】

上述した実施例は本発明を説明するものであるが、本発明の範囲に関していかなる場合も制限する意図はない。例えば、DOCと同様な特性を有する他の洗浄剤が本発明の方法に有用であることは予想され、またその方法が、インフルエンザ抗原より他の抗原から、また菌体内毒素の汚染が潜在的に問題である他の医薬品産物(例えば、他のポリペプチド)から、菌体内毒素の除去を行う際に有用であることが見出せることも予想される。

【図面の簡単な説明】

【図1】 図1は、ワクチンの製造に含まれる主たる工程の概略を示すものである。

【図2】 図2は、本発明の方法に用いられるMWCOダイアフィルトレーション装置を概略示すものである。

【図3】 図3は、界面活性剤の処理が無い場合の抗原溶液において保持された菌体内毒素の量(パーセントによる)を示す棒グラフである。

【図4】 図4は、MWCO膜による濾過後の抗原溶液において保持された菌体内毒素の量(パーセントによる)におけるデオキシコール酸ナトリウムの効果を示す棒グラフである。

【図5】 図5は、100kD MWCO膜による濾過前後の0.2%(w/v)デオキシコール酸ナトリウム(DOC)で前処理されたもしくは前処理されないインフルエンザA/テキサス#531のパイロットスケールバッチにおける菌体内毒素のレベルを示すものである。

【図6】

【図7】 図6および図7は、それぞれ、0%および2%w/v(50mM)DOCで処

10

20

30

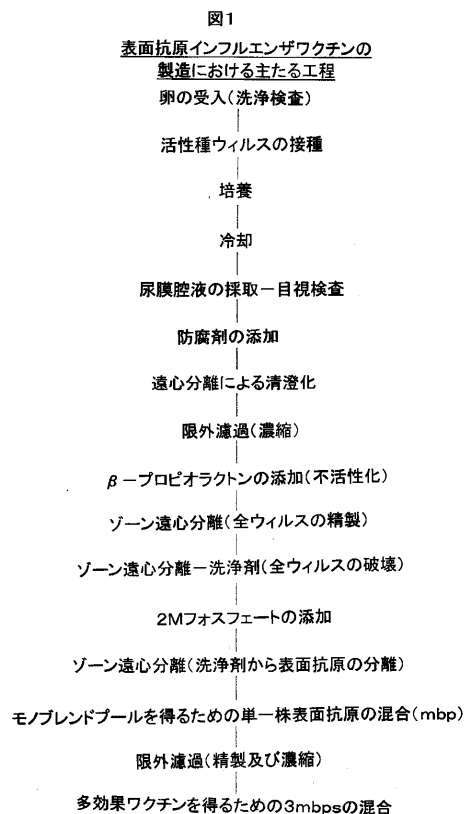
40

50

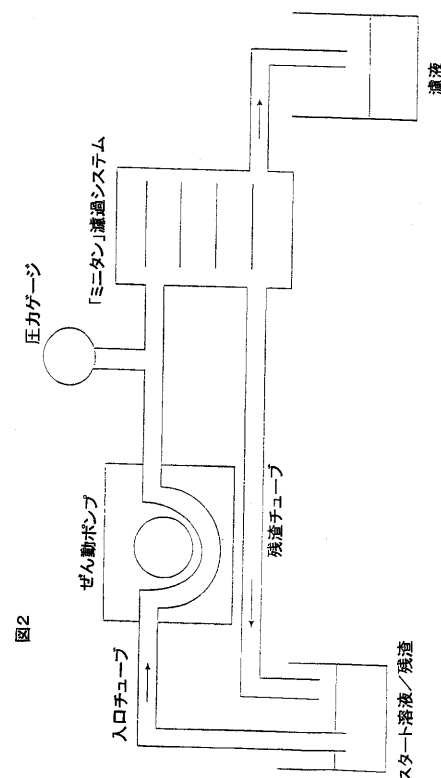
理された抗原調合品のゲル濾過クロマトグラフィー（SEC）分析から収集された画分のHA、および菌体内毒素およびA₂₈₀測定を示すものである。

【図8】 図8aおよび8bは、2%w/v（mM）デオキシコール酸ナトリウム（DOC）による処理前後のインフルエンザA/テキサス#531モノブレンドプール（monobrend pool）（MBP）の電子顕微鏡写真を示し、その後100kD MWCO膜によりダイアフィルトレーションされ、そしてDOCを除去するため10kDのMWCO膜を用いたPBSに対する透析がなされる。

【図1】



【図2】



【図 3】

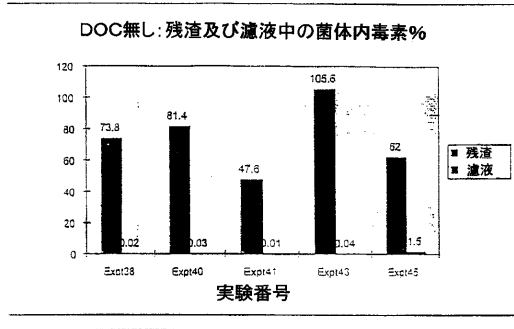


図3

【図 4】

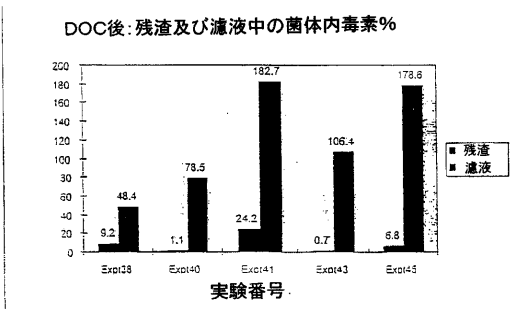


図4

【図 5】

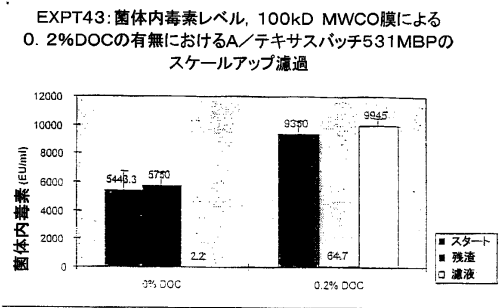


図5

【図 6】

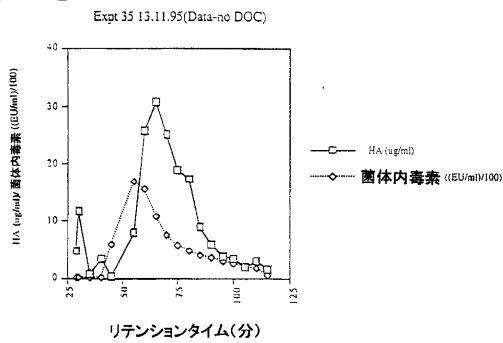
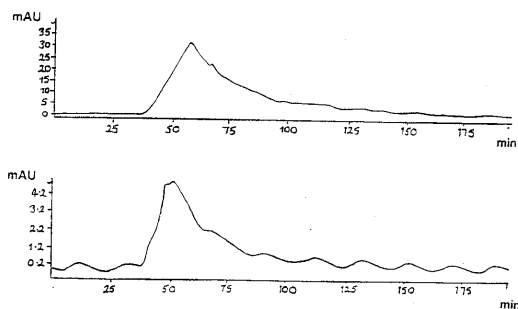


図6

FIGURE 6 CONTINUED:-

SEC Profile (above: A = 280nm), below: A = 320nm



【図 7】

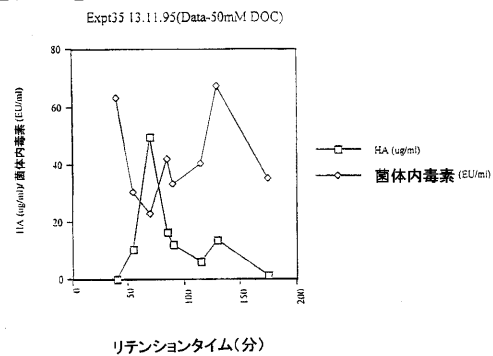
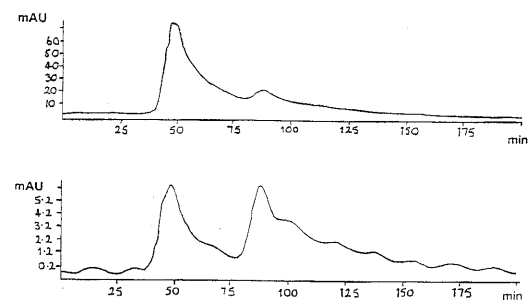


図7

FIGURE 7 CONTINUED:-

SEC Profile (above: A = 280nm), below: A = 320nm



【図 8】

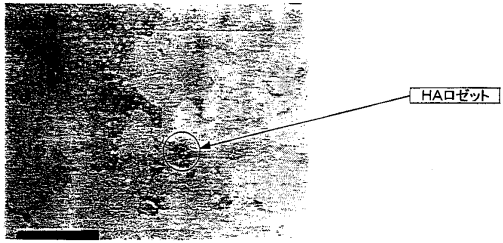


図8a

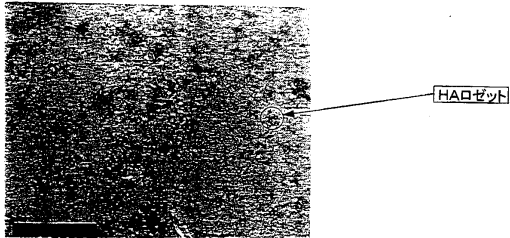


図8b

フロントページの続き

審査官 菊池 美香

- (56)参考文献 特開平08-034798 (JP, A)
特開昭58-118518 (JP, A)
特開昭63-264532 (JP, A)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

A61K 39/145

A61L 2/18

A61P 31/16

CA/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN)

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII)