

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第6284651号
(P6284651)

(45) 発行日 平成30年2月28日(2018.2.28)

(24) 登録日 平成30年2月9日(2018.2.9)

(51) Int.Cl.	F I
C O 8 B 30/04 (2006.01)	C O 8 B 30/04
C 1 2 P 19/00 (2006.01)	C 1 2 P 19/00
C 1 3 B 99/00 (2011.01)	C 1 3 B 99/00
C 1 3 K 1/00 (2006.01)	C 1 3 K 1/00

請求項の数 3 (全 20 頁)

(21) 出願番号	特願2016-554220 (P2016-554220)	(73) 特許権者	591169401
(86) (22) 出願日	平成27年3月20日 (2015.3.20)		ロケット フレール
(65) 公表番号	特表2017-510674 (P2017-510674A)		ROQUETTE FRERES
(43) 公表日	平成29年4月13日 (2017.4.13)		フランス国、エフ-62136 レストロ
(86) 国際出願番号	PCT/FR2015/050706		ン、リュ・デ・ラ・オート・ロジュ 1
(87) 国際公開番号	W02015/140477	(74) 代理人	100090398
(87) 国際公開日	平成27年9月24日 (2015.9.24)		弁理士 大淵 美千栄
審査請求日	平成28年9月23日 (2016.9.23)	(74) 代理人	100090387
(31) 優先権主張番号	1452354		弁理士 布施 行夫
(32) 優先日	平成26年3月21日 (2014.3.21)	(72) 発明者	ピエール ラノ
(33) 優先権主張国	フランス (FR)		フランス国 F-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】 グルコースポリマーおよびグルコースポリマー加水分解物の生成物を汚染除去するための最適化された方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

グルコースポリマーまたはその加水分解物からその炎症促進性分子を除去するための方法において、下記の工程：

a) グルコースポリマーまたはその加水分解物を準備する工程；

b) 工程 a) で準備された前記グルコースポリマーまたはその加水分解物中の前記炎症促進性分子を検出またはアッセイする工程；

c) 下記の精製工程：

i. 洗浄性および清澄化性を有する酵素製剤による処理、

i i. 非常に高い吸着能および「マイクロポラス」多孔性を有する医薬品グレードの活性炭による処理、

i i i. 「メソポラス」多孔性を有する第2の活性炭による処理、

i v. 100 オングストロームより大きな多孔性を有するマクロポラス吸着性ポリマー樹脂上の通過、および

v. 5 k D a での連続限外濾過

を実施する工程

を含むことを特徴とする、方法。

【請求項 2】

洗浄性および清澄化性を有する前記酵素製剤は、マンナナーゼ活性を有する酵素製剤であることを特徴とする、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

前記グルコースポリマーは、イコデキストリンおよび分岐もしくは非分岐マルトデキストリンから選択され、および前記グルコースポリマーの加水分解物は、デキストロースー水和物の完全な加水分解生成物であることを特徴とする、請求項 1 または 2 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、より詳細には食品分野（食物繊維の豊富な健康食品成分）および医療分野（腹膜透析）を対象とするグルコースポリマー、またはグルコースポリマー加水分解物、より詳細には医療分野（非発熱性注射用ブドウ糖）を対象とするグルコースポリマー加水分解物の製造または精製のための回路を汚染除去するための最適化された方法の開発に関する。

10

【背景技術】

【0002】

本出願人企業は、グルコースポリマーまたはグルコースポリマーの加水分解物を製造する回路内において発生する可能性がある微生物起源の汚染物質の危険性が知られている分野において、その発明を開発することを選択してきた。前記汚染物質は：

- 食中毒、
- ヒトの健康に極めて有害な炎症反応

20

の原因と考えられる。

【0003】

このため、健康安全性へのアプローチと同様に食品安全性へのアプローチに関連して、あらゆる適切な技術的手段、特に：

- 汚染物質の効果的な同定およびアッセイ方法の明確化、
- 適切な精製装置および精製技術を確立することによる安全な製造回路の明確化

により、生細胞の形態および細胞断片の形態の両方において、微生物起源の汚染物質が存在しないことを確認することが重要である。

【0004】

腹膜透析の場合、一定数の成分は最も厳密な純度条件下で調製されなければならない。

30

【0005】

腹膜透析は、實際上、その目的が、腎臓が血漿から除去して精製することができないか、またはそれ以上は精製することができない尿素、クレアチニン、過剰なカリウムもしくは余水などの老廃物を除去することである透析の一種である。この治療は、末期慢性腎不全の場合に示される。

【0006】

最も一般的に使用される透析液は、酸性 pH（5.2 ~ 5.5）または生理的 pH（7.4）の（乳酸塩または重炭酸塩の）緩衝液で構成され：

- 電解質（ナトリウム、カルシウム、マグネシウム、塩素）、および特に
- 浸透圧剤、主としてグルコースポリマー、例えば BAXTER 社により販売されている携行式腹膜透析液 EXTRANEAL（登録商標）中に存在する「イコデキストリン」

40

が添加されている。

【0007】

より特定の連続携行式腹膜透析用のグルコースポリマーの使用分野では、これらのデンプン加水分解物（グルコースとグルコースオリゴマーおよびグルコースポリマーとの混合物）は、そのままでは使用できないことが直ちに明白になった。

【0008】

欧州特許出願の欧州特許第 2 0 7 6 7 6 号明細書は、水中で 10 % の無色透明溶液を形成する、5,000 ~ 100,000 ダルトンの重量平均分子量（Mw）および 8,00

50

0 ダルトン未満の数平均分子量 (M_n) を有するグルコースポリマーが好ましいことを教示している。

【0009】

そのようなグルコースポリマーは、さらに好ましくは分子量が5,000~50,000 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、グルコースまたはDPが3(分子量504)以下であるグルコースポリマーをほとんどまたは全く含まず、および分子量が100,000(DPが約600)超であるグルコースポリマーをほとんど、または全く含まない。

【0010】

換言すれば、好ましいグルコースポリマーは、低多分散性指数(M_w/M_n 比を計算することにより得られる値)を有するグルコースポリマーである。

10

【0011】

デンプン加水分解物から低多分散性指数を有するこれらのグルコースポリマーを得るために、上記の特許出願である欧州特許第207676号明細書に提案された方法は：

- 水混和性溶媒を用いてマルトデキストリンの分別沈殿を実施する工程、または
- 適切なカットオフまたは排除閾値を有する様々な膜を通して、これと同じマルトデキストリンの分子濾過を実施する工程

のいずれかからなる。

【0012】

これら2つの場合、これらの方法は、極めて高分子量のポリマーと低分子量のモノマーまたはオリゴマーとを両方とも除去することを目的としている。

20

【0013】

しかし、これらの方法は、それらの実施の観点からも、それらが入手可能にする生成物の収率および品質の観点からも満足できるものではない。

【0014】

優先的に2.5未満の低多分散性指数を有する、好ましくは8,000ダルトン未満の M_n を有する、および12,000~20,000ダルトンの M_w を有する完全に水に溶けるグルコースポリマーを製造する方法であって、先行技術の欠点を有しない前記方法を開発するために、本出願人企業は、マルトデキストリンではなく加水分解デンプンから出発することにより、本出願人企業の欧州特許第667356号明細書においてこの課題を解決すべく努力した。

30

【0015】

その結果、クロマトグラフィー分画により得られるグルコースポリマーは、好ましくはグルコースおよび3以下のDPを有するグルコースポリマーを3%未満、および600超のDPを有するグルコースポリマーを0.5%未満含有している。

【0016】

最終的には、それらの浸透圧能のために使用されるこれらのグルコースポリマーが完全に満足できるものであることは、腹膜透析分野の専門家により今後受け入れられる。

【0017】

汚染のリスク

40

しかし、腹膜透析を対象とする製剤に微生物汚染のリスクがあることは残念なことである。

【0018】

実際に、グルコースポリマーの製造回路は、微生物により、または前記微生物中に含有される炎症促進性物質により汚染される可能性があることは知られている。

【0019】

例えば、酵母、カビおよび細菌類の微生物による、およびより詳細にはアリシクロバシルス・アシドカルダリウス(*Alicyclobacillus acidocaldarius*)類の好酸好熱性細菌(回路の高温および酸性ゾーン内で増殖する好極限性細菌)によるトウモロコシデンプンまたはコムギデンプンの汚染がデンプン産業において報告

50

されている。

【 0 0 2 0 】

その場合、これらの汚染した製品を受容する患者にとっての深刻なリスクは、腹膜炎である。

【 0 0 2 1 】

これらの腹膜炎の発症は、腹腔内細菌感染により引き起こされ、診断は、通常、陽性透析液培養を介して容易に確立される。

【 0 0 2 2 】

無菌性腹膜炎、化学性腹膜炎または培養陰性腹膜炎として記載される「無菌性腹膜炎」自体は、通常、化学刺激または異物により引き起こされる。

10

【 0 0 2 3 】

腹膜透析液を調製するためにイコデキストリンが導入されて以来、様々な原因、特に潜在的に存在する炎症促進性物質による誘導に結び付けることのできる無菌性腹膜炎の孤立した症例が報告されている。

【 0 0 2 4 】

このため、無菌性炎症の発症は、透析液の注入後に観察される主要な合併症である。

【 0 0 2 5 】

これらの炎症性の発症の一部は化学的性質の問題（化学的汚染物質または特定の化合物の誤った用量の偶発的な注入）に関連しているが、症例の大多数は、透析液を調製するために使用される溶液中に存在する微生物起源の汚染物質の存在と直接的に関連している。

20

【 0 0 2 6 】

リポ多糖（LPS）およびペプチドグリカン（PGN）は、それらが微量で存在する場合でさえ炎症を引き起こすリスクが高い、微生物起源の主要な汚染物質である。

【 0 0 2 7 】

さらに、これらの汚染物質により誘導される炎症反応を増悪させる可能性がある分子、例えば、依然として生物活性のあるその最小構造がムラミルジペプチド（MDP）であるPGNの解重合成生成物の存在も考慮に入れたことは、本出願人企業の功績である。

【 0 0 2 8 】

PGNの解重合成生成物に加えて、そのプロトタイプが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また、実質的な相乗活性を有する。元々、これらのペプチドは白血球に及ぼす化学誘因活性について同定されたが、それら自体ではサイトカイン反応を誘導することができない。

30

【 0 0 2 9 】

このため、それらが微量のPGNおよび/またはLPSの作用を増悪させることにより無菌性炎症の発症の間接的原因となる可能性があるため、これらの「小分子」を見逃さないことが重要である。

【 0 0 3 0 】

前記汚染物質を効果的に同定およびアッセイするための方法の明確化

このため本出願人企業は、先行技術において利用可能な方法よりも有効な検出およびアッセイ方法を開発することに専心してきた。

40

【 0 0 3 1 】

ここ数年間にわたり、炎症反応試験において動物モデルを置き換えるために、初代細胞を使用する多数の試験が開発されてきた。

【 0 0 3 2 】

しかし、これらの*in vitro*モデルは、実験的なバイアスの原因となる可能性がある、かなり大きな個体間変動の対象になる。

【 0 0 3 3 】

これとは反対に、単球細胞系は一貫した反応を生じるため、これにより現在開発中の試験が培養においてこの種の細胞をますます使用する理由が説明される。しかし、これらの試験には、溶液中に混合物として存在する全ての汚染物質に対する全ての炎症反応を生じ

50

させ、結果として汚染物質の性質を特徴付けることができないという欠点がある。

【 0 0 3 4 】

さらに増悪した炎症反応が、例えば炎症の急性期のサイトカイン、例えば：

- T N F - α (腫瘍壊死因子 α)、
 - I L - 1 β (インターロイキン 1 β)、および
 - 例えば C C L 5 (ケモカイン (C - C 単位) リガンド 5) / R A N T E S (R e g u l a t e d u p o n A c t i v a t i o n , N o r m a l T - c e l l E x p r e s s e d , a n d S e c r e t e d) などのケモカイン
- に対しては視認できるが、I L - 6 (インターロイキン 6) に対しては全く、またはごくわずかにしか視認できないことに留意することも重要である。

10

【 0 0 3 5 】

このように、I L - 6 の産生に基づく方法 (米国特許出願公開第 2 0 0 9 / 0 2 3 9 8 1 9 号明細書および同第 2 0 0 7 / 0 1 8 4 4 9 6 号明細書) は、溶液中の混合物などの汚染物質を検出するために好適ではない。

【 0 0 3 6 】

このため、本出願人企業の国際特許出願である国際公開第 2 0 1 2 / 1 4 3 6 4 7 号パンフレットの中で、文献において現在使用および / または記載されている手順の感度の閾値より低い炎症促進性作用を有する微生物汚染物質を検出するための高感度で効果的な方法を開発し、および引き続いて製造回路から発生するバッチ内に微量に存在する炎症促進性分子の群またはさらにその性質を同定したのは、本出願人企業の功績であった。

20

【 0 0 3 7 】

個々の精製工程の有効性の決定

本出願人企業は、次に製造ラインに、特にグルコースポリマーの製造ラインに最適な安全性を確保するために実施すべき、重要な精製工程をより明確に規定することを目指した。

【 0 0 3 8 】

このため、本出願人企業は、本出願人企業の国際特許出願である国際公開第 2 0 1 2 / 1 4 3 6 4 7 号パンフレットの中に提示した単球細胞系に基づく検出およびアッセイ法を使用することにより、前記回路を精製するために重要な個々の工程の妥当性を確認することに専心した。

30

【 0 0 3 9 】

そこで、本出願人企業の国際特許出願である国際公開第 2 0 1 3 / 1 7 8 9 3 1 号パンフレットでは、本出願人企業は、下記の個々の工程：

- 熱処理、
- 酸化、
- 活性炭上の通過、
- 吸着樹脂、限外濾過樹脂または濾過樹脂上の通過、
- 化学的もしくは酵素的加水分解

の有効性を分析した。

【 0 0 4 0 】

40

これらの様々な個々の工程の有効性を分析するために、次に様々な除去工程を様々な基質；

- イコデキストリンの原料であるグルコースポリマー (欧州特許第 6 6 7 3 5 6 号明細書の教示によるクロマトグラフィー分画の前に)、
- イコデキストリンのバッチ、
- 商標名 N U T R I O S E (登録商標) F B 0 6 で本出願人企業により販売されている、分岐マルトデキストリンのバッチ、
- 商標名 L Y C A D E X (登録商標) P F で本出願人企業により販売されている、注射剤中で調製できるように調製されたデキストロース水和物のバッチ、
- 本出願人企業が特許所有者である国際特許出願の国際公開第 2 0 0 7 / 0 9 9 2 1

50

2号パンフレットの教示により調製された高分岐可溶性グルコースポリマーのバッチ、
- 市販のマルトデキストリン
で実施した。

【0041】

これらの様々な研究は、これらの工程各々が基質各々に対して所定の汚染物質の除去に及ぼした可能性のある影響の証明を可能にしてきたが、それでも依然として全ての潜在的汚染物質から全ての基質を確保できる最良の組み合わせを定義することが不可欠であった。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

10

【0042】

このため、特許出願の国際公開第2013/178931号パンフレットに提示した全ての結果から、依然として、グルコースポリマー、より詳細には食品分野（食物繊維の豊富な健康食品成分）および医療分野（腹膜透析）を対象とするグルコースポリマー、またはグルコースポリマー加水分解物、より詳細には医療分野（非発熱性注射用ブドウ糖）を対象とするグルコースポリマー加水分解物の製造または精製回路を汚染除去するための最適化された方法を開発するという、満たされていない要件が存在する。

【課題を解決するための手段】

【0043】

このため、本発明は、製造回路、特にグルコースポリマー中に存在する可能性がある全ての炎症性分子を汚染の性質に係らず除去することに効果的であることが判明している、厳選されて順番に配置された、いくつかの除去工程の組み合わせを提案する。

20

【0044】

そこで本発明の方法は、下記の工程：

- 洗浄性および清澄化性を有する酵素製剤による処理、
 - 非常に高い吸着能および「マイクロポラス」多孔性を有する医薬品グレードの活性炭による処理、
 - 任意選択的に、「メソポラス」多孔性を有する第2の活性炭による処理、
 - 100オングストロームより大きな多孔性を有するマクロポラス吸着性ポリマー樹脂上の通過、および
 - 5 k D aでの連続的限外濾過
- の組み合わせに関する。

30

【0045】

本発明の文脈の中で：

- 「洗浄性および清澄化性を有する酵素製剤」は、ノボザイムズ社（Novozymes）により販売されているMannaway（登録商標）などのマンナナーゼタイプの酵素活性を意味することが意図されており；
- 「非常に高い吸着能および「マイクロポラス」多孔性を有する医薬品グレードの活性炭」は、Norit C Extra USP活性炭と同等の多孔性を有する活性炭を意味することが意図されており；
- 「「メソポラス」多孔性を有する活性炭」は、ENO-PC活性炭と同等の多孔性を有する活性炭を意味することが意図されており；
- 「100オングストロームより大きな多孔性を有するマクロポラス吸着性ポリマー樹脂」は、DOWEX OPTIDORE SD2タイプの樹脂を意味することが意図されている。

40

【0046】

好ましくは、本方法は、5つの工程を含む。

【0047】

特に、グルコースポリマーは、イコデキストリンおよびマルトデキストリン、特に分岐もしくは非分岐マルトデキストリンから選択され、およびグルコースポリマー加水分解物

50

は、デキストロースー水和物などの完全な加水分解生成物である。

【0048】

選択された工程は、様々な群の汚染物質を標的とすること、およびしたがって炎症反応性を有していない生成物を得ることを可能にする。

【図面の簡単な説明】

【0049】

【図1】標準的アゴニストに対するRaw-Blue（商標）細胞の反応である。

【図2】標準的アゴニストに対するHEK-Blue（商標）TLR2細胞の反応である。

【図3】標準的アゴニストに対するHEK-Blue（商標）TLR4細胞の反応である 10

【図4】標準的アゴニストに対するHEK-Blue（商標）NOD2細胞の反応である。

【図5】標準的アゴニストに対するHEK-Blue（商標）Null細胞の反応である。

【図6】グルコースポリマー基質により誘導された細胞反応である。

【図7】手順1による除去後にE1242基質により誘導された細胞反応である。

【図8】手順2による除去後にE209J基質により誘導された細胞反応である。

【図9】手順5による除去後にE5248基質により誘導された細胞反応である。

【図10】手順3による除去後にE3063基質により誘導された細胞反応である。 20

【図11】手順4による除去後にE1565基質により誘導された細胞反応である。

【発明を実施するための形態】

【0050】

本発明の方法は、グルコースポリマーまたはその加水分解物を精製するために慣習的に使用されている経路を置き換えることが意図されている。

【0051】

本発明によるグルコースポリマーまたはその加水分解物を除去するための方法は、下記の工程：

a) グルコースポリマーまたはその加水分解物を準備する工程；

b) 任意選択的に、工程a)で準備されたグルコースポリマーまたはその加水分解物中の炎症促進性分子を検出またはアッセイする工程； 30

c) 下記の精製工程：

i. 洗浄性および清澄化性を有する酵素製剤による処理、

ii. 非常に高い吸着能および「マイクロポラス」多孔性を有する医薬品グレードの活性炭による処理、

iii. 任意選択的に、「メソポラス」多孔性を有する第2の活性炭による処理、

iv. 100オングストロームより大きな多孔性を有するマクロポラス吸着性ポリマー樹脂上の通過、および

v. 5kDaでの連続的限外濾過

を実施する工程 40

を含む。

【0052】

グルコースポリマーまたはその加水分解物は、腹膜透析、経腸および非経口栄養補給ならびに新生児の栄養補給を対象とすることができる。

【0053】

好ましい一実施形態では、本発明の文脈内で調製されるグルコースポリマーは、イコデキストリンまたは（後述するように、分岐もしくは非分岐）マルトデキストリンである。

【0054】

本明細書において関連するグルコースポリマー加水分解物は、詳細には、完全な加水分解生成物、例えば、本出願人企業により商標名LYCADEX（登録商標）PFで販売さ 50

れている非発熱性デキストロース水和物であると理解されている。

【0055】

グルコースポリマー加水分解物は、グルコースポリマー加水分解物の調製の1つもしくは複数の段階で、および詳細にはグルコースポリマー加水分解物の調製法の後期の工程で汚染除去することができる。

【0056】

したがって、本発明による方法で提供されるグルコースポリマーまたはその加水分解物は、最終生成物に先行する製品に相当する。

【0057】

炎症促進性成分は、上記の細菌起源の全ての分子である。

10

【0058】

それらは、特に：

- PGN、
- LPS、
- リポペプチド、
- PGNの解重合生成物、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、
- その他

であってよい。

20

【0059】

ヒトにおける治療使用（例えば腹膜透析液）のためのグルコースポリマーを調製するための方法の汚染除去工程の有効性を測定するために、本発明の文脈で使用される *in vitro* 炎症反応を測定するための方法は、単球/マクロファージタイプの系（THP-1および/またはRaw-Blue（商標））および特定の自然免疫受容体を発現するトランスフェクト系（HEK-Blue（商標））を使用する細胞試験（「バイオアッセイ」）に基づき、これらの細胞試験は本出願人企業により開発され、先行する特許出願に記載されている。

【0060】

好ましくは、下記の5種の系が使用される：

30

- Raw-Blue（商標）系：マウスマクロファージに由来するこの系は、グルコースポリマー基質および誘導体（PGN、リポペプチド、LPS、ザイモサン、LTA）中に存在する可能性がある炎症促進性汚染物質の大多数に反応する。このため、その使用は、サンプル中に存在する炎症促進性分子の全負荷を推定することを可能にする。

- HEK-Blue（商標）hTLR2系：hTLR2受容体を発現するこの系は、TLR2アゴニスト（特にPGNおよびリポペプチド）に特異的に反応する。このため、その使用は、炎症反応を誘発する際のこれらの汚染物質のレベルを決定することを可能にする。

- HEK-Blue（商標）hTLR4系：hTLR4受容体を発現するこの系は、LPSに特異的に反応する。このため、その使用は、炎症反応を誘発する際のこれらの汚染物質のレベルを決定することを可能にする。

40

- HEK-Blue（商標）hNOD2系：hNOD2受容体を発現するこの系は、NOD2アゴニストに特異的に反応する。このため、その使用は、炎症反応を誘発する際のMDPおよび関連分子のレベルを決定することを可能にする。

- HEK-Blue（商標）Null2系：これは、免疫受容体でトランスフェクトされていないコントロール系である。その使用は、グルコースポリマー溶液またはその加水分解物の溶液が毒性機構を介してSEAP産生を誘導しないことを確認する必要がある。

【0061】

しかし、当業者であればさらに他の市販の系（IMGENEX）を使用することも可能

50

であるか、またはそれらを調製できることも留意すべきである。

【0062】

好ましい一実施形態では、細胞系は $0.5 \sim 1 \times 10^6$ 細胞/ml（培養培地）の密度で使用され、グルコースポリマーまたはその加水分解物の製剤と細胞との接触はおよそ16～24時間持続される。

【0063】

汚染物質の定量は、用量反応曲線を使用して実施することができる。この用量反応曲線は、詳細には同一条件下で同一細胞を使用して、汚染物質の用量を増やしながら作成することができる。この用量反応曲線は、特にLPS、PGN、リポペプチドおよびMDP標準物質を用いて作成される。

10

【0064】

好ましくは、そのような用量反応曲線は、TLR4を発現する細胞（例えば、THP-1、HEK-Blue（商標）hTLR4およびRaw-Blue（商標））についてはLPSの用量を増やしながら、TLR2を発現する細胞（例えば、THP-1、HEK-Blue（商標）hTLR2およびRaw-Blue（商標））についてはPGNの用量を増やしながら、ならびにNOD2を介して反応する細胞（例えば、HEK-Blue（商標）hNOD2）についてはMDPの用量を増やしながら作成することができる。

【0065】

細胞試験は、本出願人企業の特許出願：国際公開第2012/143647号パンフレットおよび同第2013/178931号パンフレットに記載されたように実施されてよい。

20

【0066】

本発明による方法の第1の除染除去工程は、洗浄性および清澄化性を有する酵素製剤による処理からなる。

【0067】

マンナナーゼタイプ、例えばノボザイムズ社により販売されている酵素製剤Mannaway（登録商標）の酵素活性は、例えば細菌断片などのマクロ複合体および高分子量PGNを解離させるために有効であることが証明されている。

【0068】

その活性は、50 での処理時間24時間のために、NaOHを用いてpH10へ調整された32%（重量/容量）のグルコースポリマー溶液中で0.4%（容量/容量）の最終濃度で使用された場合に最適である。

30

【0069】

処理後、溶液はHClにより中和され、酵素は85 での10分間にわたり加熱することにより不活性化される。

【0070】

第2の工程は、非常に高い吸着能および「マイクロポラス」多孔性を有する医薬品グレードの活性炭による処理からなる。

【0071】

本出願人企業は、Norit C Extra USPタイプの活性炭を使用することを推奨する。これは、C Extra USP炭素がPGNおよびその分解生成物を除去する際に有効であることが証明されているためである。

40

【0072】

その活性は、HClを用いてpH4.5へ調整された、32%（重量/容量）のグルコースポリマー溶液中で0.5%（重量/容量）の最終濃度で添加された場合に最適である。この処理は、80 での1時間にわたる攪拌下で実施される。処理後、この溶液はNaOHにより中和され、その後0.22 μmで濾過される。

【0073】

第3の工程は、「メソポラス」多孔性を有する第2の活性炭による処理からなる。この工程は任意選択的である。

50

【0074】

この場合、ENO-PCタイプの活性炭が好ましい。活性炭のこの品質は幅広い作用スペクトルを有し、100kDaを超える分子量を有する分子（例えば、LPSおよびPGNの分解生成物）を優先的に排除することを可能にする。

【0075】

活性炭は、さらに本明細書では80の温度で1時間にわたりpH4.5で0.5%の含量で使用される。

【0076】

第4の工程は、100オングストロームより大きな多孔性を有するマクロポーラス吸着性ポリマー樹脂上での処理からなる。

10

【0077】

同一ファミリーの他の樹脂以外の（PGN以外の）汚染分子を排除する、より広範囲のスペクトルを有するDowexSD2樹脂が選択される。

【0078】

32%（250ml）のグルコースポリマー溶液は、この樹脂20mlを含有するカラム上で溶出される。

【0079】

最後の工程は、5kDaのカットオフ閾値を有する限外濾過膜上での濾過からなる。

【0080】

限外濾過による処理の目的は、グルコースポリマー溶液中に依然として存在する小さな分子を排除することである。本出願人企業は、この処理が先行処理の経過にわたって蓄積されてきた微量の塩を排除することを可能にする透析作用を有するために、本方法の最後にこの処理を使用することを推奨している。

20

【0081】

室温で3時間にわたり25ml/分の速度で5kDaフィルター上にグルコースポリマー溶液を持続的に注入することが選択される。濾液の損失を補償するために、出発溶液中に濃縮水が注入され、無菌PBS緩衝液を添加することにより持続的に初期容量（100ml）に調整される。3時間後、濾液の容量は150～200mlであり、これはグルコースポリマー溶液の初期容量より多い。

【0082】

30

以下の実施例において示されるように、単独の工程のこの組み合わせは、ポリマーおよびグルコースならびにその誘導体を製造するための回路を細菌起源の汚染物質からの最大限の保護を提供することができる。

【0083】

本発明は、例示的かつ非限定的であることが意図される下記の実施例からより明確に理解されるであろう。

【実施例】

【0084】

実施例1：用量反応曲線の確立

用量反応曲線は、標準アゴニスト分子：LPS、PGN、PAM3(cys)（合成リポペプチドであるPAM₃Cys-Ser-(Lys)₄三塩酸塩）、LTA、ザイモサンおよびMDPを用いて作成する。Raw-Blue（商標）およびHEK-Blue（商標）hTLR2、hTLR4、hNOD2およびNu11系はアゴニストの濃度を増加させながらインキュベートし、細胞反応はSEAP活性を定量することにより測定する。TNF-αは、細胞活性化の陽性対照として使用する。

40

- Raw-Blue（商標）系（図1）：細胞は、基質中およびグルコースポリマー誘導体（PGN、リポペプチド、LPS、ザイモサン、LTA）中に存在する可能性がある主要な炎症性分子に反応する；これらの細胞は、詳細にはPGNに対しては強度の反応性を有するが、その解重合生成物には反応しない、

- HEK-Blue（商標）hTLR2系（図2）：PGNおよびPAM3(cys)

50

）リポペプチドに対する強度の反応性；細胞は他のTLR2リガンド（LTA、ザイモサン）に対してはより弱度に反応し、LPSおよびMDPに対しては反応性を示さない、

- HEK-Blue（商標）hTLR4系（図3）：LPSに対する強度の反応性；細胞はザイモサンに対しては極めて弱度にのみ反応し、PGN、リポペプチド、LTAおよびMDPに対しては反応性を示さない、

- HEK-Blue（商標）hNOD2系（図4）：MDPに対する強度の反応性、
- HEK-Blue（商標）Null2系（図5）：細胞毒性の非存在についての対照。

【0085】

実施例2：様々なグルコースポリマー基質の調製

10

上述のように、基質は下記の通りである：

- 本明細書ではE1565、E3063、E1242およびE5248を参照として記載する、イコデキストリンの原料である4種のグルコースポリマー（欧州特許第667356号明細書の教示によるクロマトグラフィー分画の前に）。

【0086】

これらのポリマーの調製は、特許出願の国際公開第2012/059685号パンフレットの教示によって実施する；

- イコデキストリンの汚染バッチ（本明細書ではE209Jを参照として記載する）およびイコデキストリンの「陰性対照」バッチ、すなわち細胞試験における非汚染の対照（本明細書ではP11-11を参照として記載する）。これらのバッチは、国際出願の国際公開第2010/125315号パンフレットの実施例1に詳述されている、特許出願である欧州特許第667356号明細書の教示によって調製する。

20

【0087】

実施例3：未処理サンプルにより誘導された細胞反応の分析

これらの試験の目的は、様々な基質中に存在する汚染物質の炎症促進反応性および性質を決定することである。

【0088】

実施例2によるサンプルを非発熱性（注射用）水中の32%（重量/容量）で調製する。

【0089】

LPSレベルおよびPGNレベルのアッセイは、細胞試験に先行してSLP-HSアッセイおよびLALアッセイを使用して実施した（データは下記に提示した）。

30

【0090】

【表1】

	P11-11	E1242	E1565	E3063	E5248	E209J
SLP-HS PGN (ng/g)	<3	21	2320	16185	116	393
LAL LPS (EU/g)	<0.3	2.4	38.4	2.4	9.6	0.6
修飾 LAL LPS (EU/g)	<0.3	1.2	4.8	1.2	0.3	<0.3

40

【0091】

所定の汚染物質に対する炎症反応の概観を得られるように、様々な基質中の生物汚染物質の存在を5種の細胞種によって分析した（図6）。

【0092】

細胞試験のために、サンプルを細胞培養培地中で1/10に希釈する（最終濃度：3.2%（w/v））。

【0093】

分析は：

- Raw-Blue（商標）系：PGNに対する高反応性を有するあらゆる汚染物質、

50

- H E K - B l u e (商 標) h T L R 2 系 : P G N お よ び リ ポ ペ プ チ ド に 対 す る 高 反 応 性、
 - H E K - B l u e (商 標) h T L R 4 系 : L P S に 対 す る 高 反 応 性、
 - H E K - B l u e (商 標) h N O D 2 系 : M D P お よ び P G N 解 重 合 生 成 物、
 - H E K - B l u e (商 標) N u l l 2 系 : 細 胞 毒 性 の 非 存 在 に つ い て の 対 照
- に 対 し て 実 施 す る。

【 0 0 9 4 】

サ ン プ ル に よ る 評 価 :

- E 1 2 4 2 : ご く わ ず か に 分 解 し た P G N に よ る 強 度 の 汚 染 の 証 拠 で あ る、H E K - T L R 2 細 胞 に お け る 高 強 度 炎 症 反 応 お よ び H E K - N O D 2 細 胞 に お け る 低 強 度 炎 症 反 応。
- E 1 5 6 5 : 分 解 し た P G N お よ び L P S に よ る 強 度 の 汚 染 の 証 拠 で あ る、H E K - T L R 2 細 胞 に お け る 高 強 度 炎 症 反 応、H E K - T L R 4 細 胞 に お け る 中 強 度 炎 症 反 応 お よ び H E K - N O D 2 細 胞 に お け る 高 強 度 炎 症 反 応。
- E 3 0 6 3 : ご く わ ず か に 分 解 し た P G N お よ び 微 量 の L P S に よ る 極 め て 強 度 の 汚 染 の 証 拠 で あ る、H E K - T L R 2 細 胞 に お け る 飽 和 炎 症 反 応、H E K - T L R 4 細 胞 に お け る 中 強 度 炎 症 反 応 お よ び H E K - N O D 2 細 胞 に お け る 低 強 度 炎 症 反 応。
- E 5 2 4 8 : P G N お よ び L P S に よ る 低 汚 染 の 証 拠 で あ る、様 々 な 系 に お け る 低 強 度 炎 症 反 応。

- E 2 0 9 J : 弱 く 分 解 し た P G N に よ る 強 度 の 汚 染 の 証 拠 で あ る、H E K - T L R 2 細 胞 に お け る 高 強 度 炎 症 反 応 お よ び H E K - N O D 2 細 胞 に お け る 低 強 度 炎 症 反 応。

【 0 0 9 5 】

グ ル コ ー ス ポ リ マ ー 基 質 は、い ず れ も H E K - N u l l 細 胞 が 存 在 下 で 全 く 反 応 を 与 え な い た め、こ れ は 細 胞 毒 性 が な い こ と を 確 証 す る。

【 0 0 9 6 】

実 施 例 4 : サ ン プ ル に よ り 誘 導 さ れ た 細 胞 反 応 に 除 去 の 手 順 が 及 ぼ す 効 果 の 分 析

本 出 願 人 企 業 は、本 出 願 人 企 業 の 特 許 出 願 で あ る 国 際 公 開 第 2 0 1 3 / 1 7 8 9 3 1 号 パ ン フ レ ッ ト の 中 で、サ ン プ ル 中 に 存 在 す る 各 タ イ プ の 汚 染 物 質 に 最 適 合 な 処 理 の 同 定 を 可 能 に し、グ ル コ ー ス ポ リ マ ー 基 質 へ 適 用 す る た め の 実 験 条 件 を 決 定 す る こ と を 可 能 に し た。

【 0 0 9 7 】

本 出 願 人 企 業 の 以 前 の 研 究 に 基 づ い て、提 案 さ れ た 数 多 く の 個 々 の 処 理 は :

- 活 性 炭 上 の 処 理、
- 5 k D a の 濾 過 閾 値 を 有 す る 膜 を 通 し て の 限 外 濾 過、
- 吸 着 樹 脂 上 の 通 過、
- 酵 素 製 剤 に よ る 処 理

で あ る。

【 0 0 9 8 】

下 記 に 記 載 し た 組 み 合 わ せ を 用 い た 実 験 に お い て、工 程 の 選 択 お よ び 配 列 は :

- 実 験 処 理 条 件、
- サ ン プ ル 中 の 汚 染 の レ ベ ル、お よ び
- 炎 症 促 進 性 分 子 の 性 質

の 関 数 と し て 決 定 し た。

【 0 0 9 9 】

M a n n a w a y (登 録 商 標) の 使 用

国 際 特 許 出 願 の 国 際 公 開 第 2 0 1 3 / 1 7 8 9 3 1 号 パ ン フ レ ッ ト の 教 示 は、酵 素 製 剤 が 微 量 の L P S に よ っ て わ ず か に 汚 染 さ れ る こ と を 証 明 し た。さ ら に、微 量 の 酵 素 は、処 理 後 に グ ル コ ー ス ポ リ マ ー 溶 液 中 に 残 留 す る 可 能 性 が あ る。こ の た め、こ れ ら の 外 因 性 汚 染 を 除 去 で き る よ う に、本 出 願 人 企 業 は、組 み 合 わ せ の 試 験 に お い て 酵 素 処 理 工 程 を 手 順 開 始 時 に 配 置 す る こ と を 推 奨 す る。

10

20

30

40

50

【 0 1 0 0 】

活性炭の使用

本試験で保持された活性炭は：

- C E X T R A U S P、P G Nおよびその分解生成物を除去する際に有効であるため；
- E N O - P C、分子量が100 k D aより大きな汚染物質（例えば、L P SおよびP G Nの分解生成物）に選択的作用を及ぼすため；
- A S U P R A E U R、高分子量の複合体を除去する際に有効性があるためである。

【 0 1 0 1 】

本出願人企業は、活性炭を単独または様々な組み合わせで一対で組み合わせて使用することを選択し、炭素による処理がバッチ式で実施され、加熱工程、中和工程および濾過工程が必要とされることを前提に、それらの工程は酵素処理の直後であるが他の処理の前に実施することを選択してきた。

【 0 1 0 2 】

樹脂の使用

保持された樹脂は：

- M a c r o n e t M N - 1 5 0、低分子量の分子（例えば、M D PおよびP G Nの分解生成物）を保持する際に有効であるため；
- D o w e x S D 2、P G N S以外の汚染物質を除去する広域スペクトルのためである。

【 0 1 0 3 】

膜分離の使用

5 k D aの限外濾過による処理の目的は、グルコースポリマー溶液中に依然として存在する小さな分子を排除することである。さらに、この手順は透析作用を有し、先行処理の経過にわたって蓄積している微量の塩の排除を可能にする。

【 0 1 0 4 】

このため、この工程は手順の最後に体系的に配置する。

【 0 1 0 5 】

各工程後、サンプルを無菌条件下で取り出し、全炎症負荷（R a w - B l u e（商標）細胞反応）および生物汚染物質（H E K - B l u e（商標）反応）の量をアッセイできるように細胞試験に使用する。各工程後に得られた細胞反応は、除去手順の有効性を推定できるように、出発基質により誘導された反応と比較する。結果は、最高細胞反応に対する活性として表示する。全ての試験において、非汚染対照は、P 1 1 - 1 1 イコデキストリンの溶液を用いて実施する。

【 0 1 0 6 】

実施例5：個々の処理工程の様々な組み合わせについての比較分析

可能性な組み合わせの多くは、特許出願の国際公開第2013/178931号パンフレットの教示から推定することができる。

【 0 1 0 7 】

考えられる手順の3について得られた結果は、下記の通りである。

【 0 1 0 8 】

- 手順1：E 1 2 4 2 基質；C E X T R A U S P + E N O - P C 活性炭による処理；M a c r o n e t M N - 1 5 樹脂上の通過；5 k D aでの限外濾過
細胞試験の結果を図7に示した。

【 0 1 0 9 】

E 1 2 4 2 基質は、主として高濃度のP G Nに関連しているR a w - B l u e細胞における中間炎症反応（T L R 2の反応）を誘導する。

【 0 1 1 0 】

E 1 2 4 2 基質は、T L R 4およびN O D 2の反応がバックグラウンドノイズに近いこ

10

20

30

40

50

とを前提に、微量の L P S および P G N の微量の分解生成物も含有する。

【 0 1 1 1 】

除去手順は、炎症反応を効果的に減少させる。

【 0 1 1 2 】

それにもかかわらず、R a w - B l u e 細胞の反応は非汚染対照 (P 1 1 - 1 1) よりごくわずかに高いままであり、これは微量の汚染物質が依然として存在することを示している。

【 0 1 1 3 】

この結果は、除去後の残留 P G N の存在に起因する。実際に、T L R 2 の反応は、炭素による処理後には大きく減少するが、陰性対照よりは高いままである。

10

【 0 1 1 4 】

他の工程は、T L R 2 の反応に影響を及ぼさず、T L R 2 の反応は手順の最後までもはや進化しない。他方、T L R 4 の反応は、第 1 の処理工程と同様に早期にもはや検出することができず、これは L P S が除去されていることを証明する。N O D 2 の反応に関しては、この反応は限外濾過工程後には抑制される。

【 0 1 1 5 】

結論：

炎症性化合物の負荷は効果的に低減されたが、P G N により重度に負荷された基質の完全な除去を保証するためには手順 1 では不十分である。

【 0 1 1 6 】

20

- 手順 2 : E 2 0 9 J 基質 ; C E X T R A U S P + E N O - P C 活性炭による処理 ; D o w e x S D 2 樹脂上の通過 ; 5 k D a での限外濾過

細胞試験の結果を図 8 に示した。

【 0 1 1 7 】

この手順のために、樹脂を保持の広域スペクトルを有する D o w e x S D 2 と置換した。これらの試験は、E 1 2 4 2 と同様の汚染プロファイルを有する E 2 0 9 J 基質を用いて実施した。

【 0 1 1 8 】

この場合、R a w - B l u e 細胞の反応は陰性対照と同一であり、これは汚染除去が有効であったことを証明する。

30

【 0 1 1 9 】

それにもかかわらず、T L R 2 の反応は依然として非汚染対照よりごくわずかに高いため、これは微量の P G N が依然として存在することを示している。

【 0 1 2 0 】

反応の差は、H E K - T L R 2 細胞が P G N に対して R a w - B l u e 細胞よりも低い検出閾値を有するという事実と確実に関連している。

【 0 1 2 1 】

N O D 2 の反応は S D 2 上の通過後には減少して限外濾過後に抑制されるが、これはこの樹脂が P G N の分解生成物を除去するために少なくとも補完作用を有することを示唆している。

40

【 0 1 2 2 】

結論

このデータは、樹脂の変更が全ての P G N を排除する際に手順の有効性を改良しなかったことを示している。

【 0 1 2 3 】

- 手順 3 : E 5 2 4 8 基質 ; M a n n a w a y (登録商標) および次に C E X T R A U S P + A S U P R A E U R 炭素による処理 ; D o w e x S D 2 樹脂上の通過 ; 5 k D a での限外濾過

細胞試験の結果を図 9 に示した。

【 0 1 2 4 】

50

この最後の組み合わせでは、A S U P R A E U R炭素をE N O - P Cの代替物としてのC E X T R A U S Pと組み合わせた。

【0125】

A S U P R A E U R炭素は、後者とは反対に高分子量の分子を優先的に排除する。

【0126】

この組み合わせは、P G Nまたは β -グルカンタイプの凝集したマクロ複合体が負荷されたサンプルの汚染除去するために有効でなければならない。

【0127】

これらの試験は、様々な細胞系において低強度炎症反応を誘導するE 5 2 4 8基質上で実施したが、S L P - H SおよびL A LのアッセイはP G Nおよび/または β -グルカンの強度の汚染の存在を示唆している。

10

【0128】

この差は、それらの溶解度を低下させるそれらの高質量の炎症性分子、および結果として試験細胞における反応を誘導する接近可能性によって説明できる。

【0129】

手順の第1の工程後には、様々な細胞系において細胞反応の強度の増加が観察される。

【0130】

この結果は、M a n n a w a y（登録商標）による酵素処理が細菌複合体もしくは細菌断片をバラバラにさせ、これによりT L R 2、T L R 4およびN O D 2に対するアゴニスト分子を遊離させる際に有効であることを確認している。

20

【0131】

炭素による処理後、R a w細胞およびH E K - T L R 2細胞の反応は有意に減少したが、依然として陰性対照より上回ったままである。

【0132】

同様に、T L R 4およびN O D 2の反応は大きいままであり、様々な細胞種における非汚染対照と同一のシグナルを入手するための樹脂上の通過および限外濾過の最終的な工程を待つことが不可欠である。

【0133】

結論

これらの結果は、A S U P R A E U R炭素が汚染除去手順に顕著な利益を全く提供しなかったことを示している。

30

【0134】

最終的な結論

完全に想定できたが、これらの汚染除去手順は、いずれも完全に満足できる結果を与えない。

【0135】

実施例6：最適化された手順の提示

E 3 0 6 3基質上で一連の下記の工程を実施することを選択する。

- M a n n a w a y（登録商標）による処理、次に
- C E X T R A U S P + E N O - P C活性炭による処理、次に
- D o w e x S D 2樹脂上の通過、および最後に
- 5 k D aでの限外濾過。

40

【0136】

細胞試験の結果を図10に示した。

【0137】

P G Nを排除することを目的とする手順の有効性を高めるために、M a n n a w a y（登録商標）による酵素処理の工程を他の工程の上流に導入する。

【0138】

これらの試験のためには、P G Nが極めて大量に負荷されたE 3 6 0 3基質を使用した。

50

【 0 1 3 9 】

手順の様々な工程後、R a w - B l u e 細胞の反応は、汚染除去が有効であったことを証明する陰性対照と同一である。

【 0 1 4 0 】

さらに、酵素 + 炭素処理の組み合わせは、T L R 2 の反応が処理前の飽和シグナルから非汚染対照と同一のシグナルになるため、P G N を排除するために特に適する。

【 0 1 4 1 】

最後に、他の工程は、L P S (T L R 4 の反応) および N O D 2 アゴニストの痕跡を排除することに有効である。

【 0 1 4 2 】

この組み合わせが実際に有効であることを証明するために、E N O - P C 炭素の使用が現実的に汚染除去手順に利益を提供するかどうかを確認するために、E N O - P C 炭素を除去した。

【 0 1 4 3 】

細胞試験の結果を図 1 1 に示した。

【 0 1 4 4 】

これらの試験は、また別の基質である、T L R 2、T L R 4 および N O D 2 の様々なアゴニストを用いて汚染されている E 1 5 6 5 基質上で実施した。

【 0 1 4 5 】

手順の最後に、R a w - B l u e 細胞の反応は有意に減少したが、非汚染対照よりはわずかに大きいままである。この極めて弱い反応は残留 P G N の存在とは関連していないが、むしろ微量の L P S および N O D 2 アゴニストと、ならびに 2 つの群の分子間の可能性のある相乗効果と関連している。

【 0 1 4 6 】

E N O - P C 炭素は、分子量 < 1 0 0 k D a の分子 (L P S および P G N の分解生成物) に対して広域の保持スペクトルを有する。

【 0 1 4 7 】

結論

その非存在は、特に基質がこれらの 2 つの群の炎症性分子で重度に汚染させられている場合は、汚染手順の有効性を低下させたことが観察されている。

【 0 1 4 8 】

これらをまとめると、この試験で得られた結果は、厳選されて順番に配置された数種の汚染工程の組み合わせがグルコースポリマー溶液中に存在する可能性がある炎症性分子を排除することに有効であることを立証したことを示している。

【 0 1 4 9 】

この組み合わせは、下記の工程：

- 洗浄性および清澄化性を有する酵素製剤、例えば M a n n a w a y (登録商標) による処理、

- C E X T R A U S P と同等の多孔性を有する活性炭による処理、

- 任意選択的に、分解された P G N および / または L P S が負荷された基質に対して E N O - P C と同等の多孔性を有する第 2 の活性炭による処理、

- D o w e x - S D 2 タイプの吸着樹脂上の通過、

- 5 k D a での連続限外濾過

を含む。

【 0 1 5 0 】

選択された工程は、様々な汚染物質の群を標的とすること、および炎症反応性を有していない生成物を提案することを可能にする。

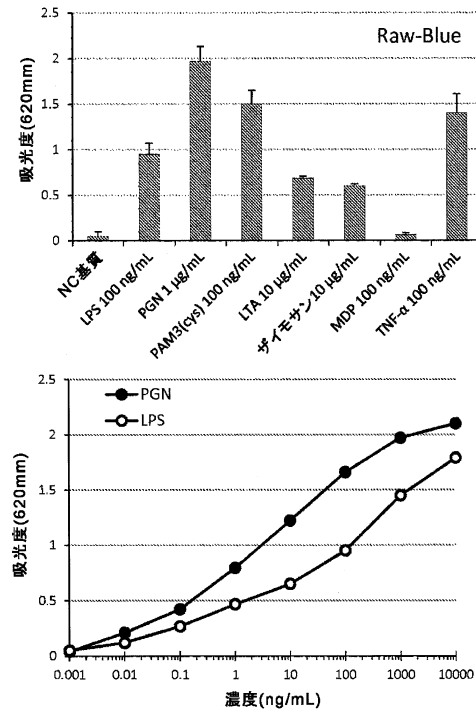
10

20

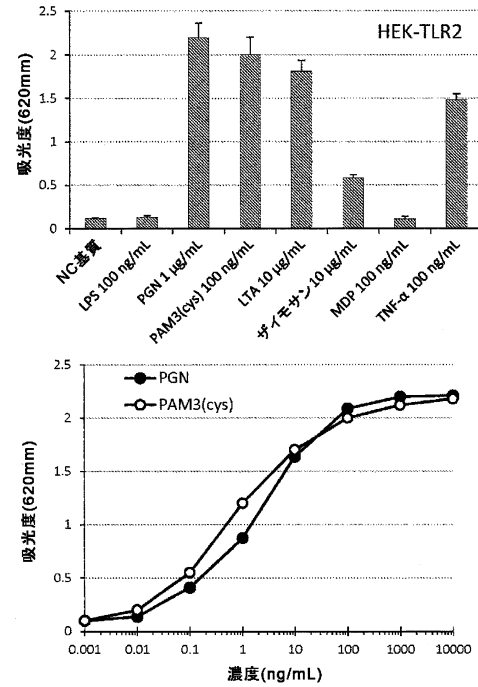
30

40

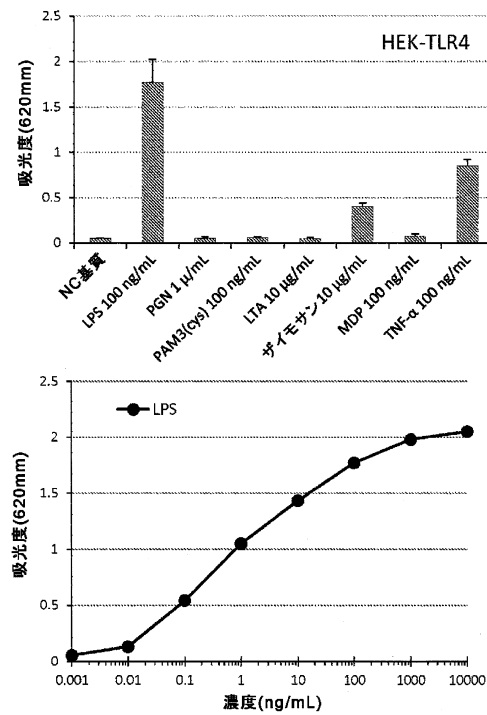
【図 1】



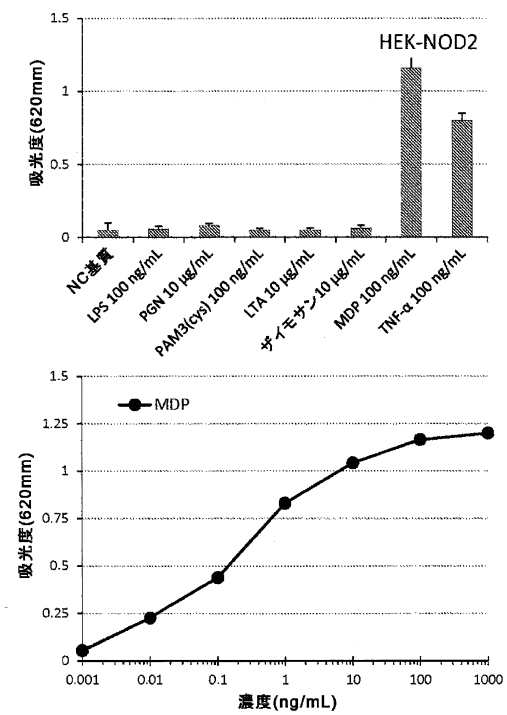
【図 2】



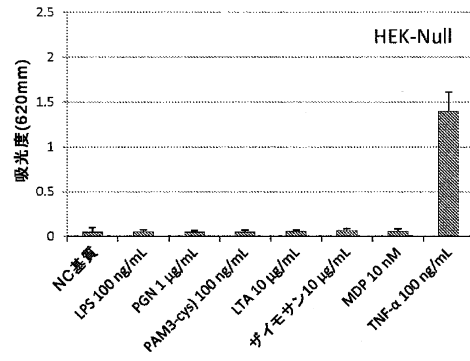
【図 3】



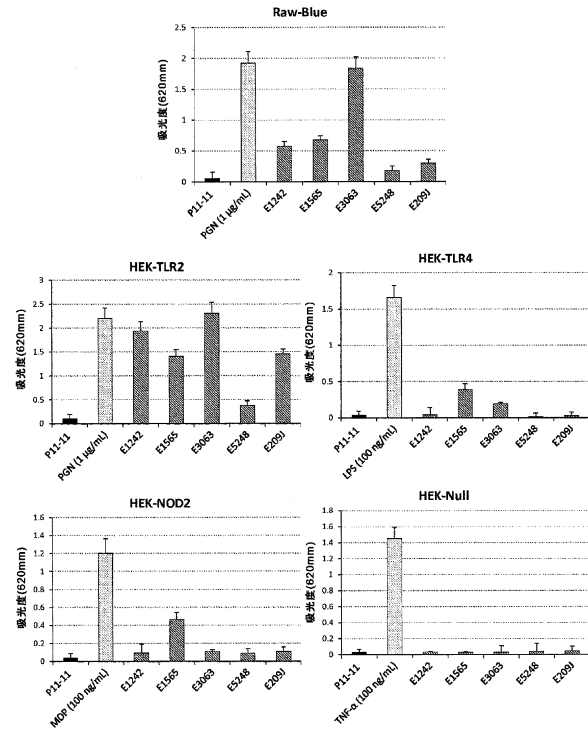
【図 4】



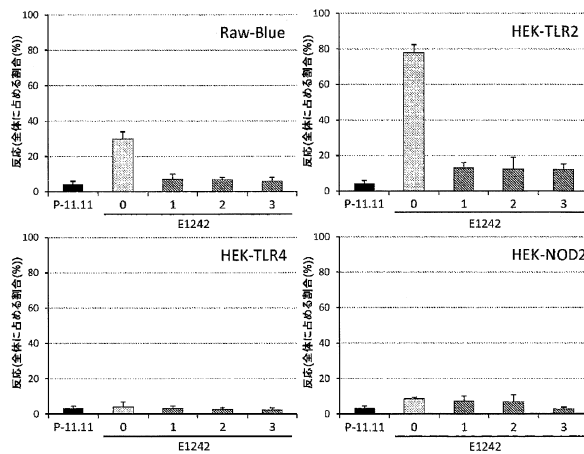
【図5】



【図6】



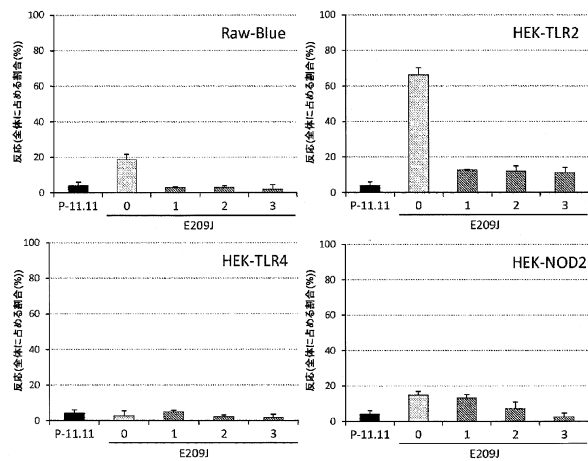
【図7】



処理:

- 0: 未処理
- 1: C-Extra USP+ENO-PC炭素:0.5%(重量/容量)、pH4.5;80℃で1時間。
- 2: 1+Macronet MN-150樹脂。
- 3: 1+2+5kDa限外濾過:3時間にわたり閉回路。

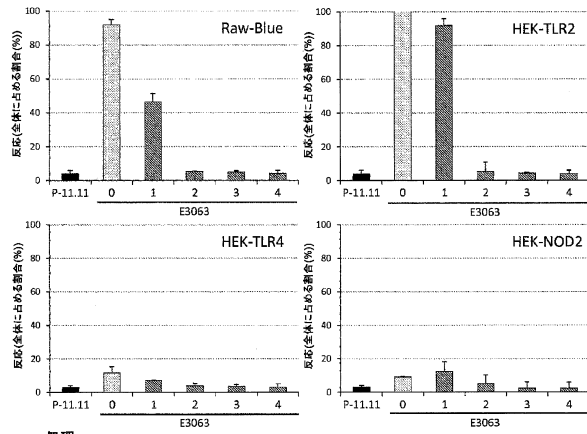
【図8】



処理:

- 0: 未処理
- 1: C-Extra USP+ENO-PC炭素:0.5%(重量/容量)、pH4.5;80℃で1時間。
- 2: 1+Dowex SD2樹脂:11回の通過
- 3: 1+2+5kDa限外濾過:3時間にわたり閉回路。

【図 9】



処理:

-0: 未処理

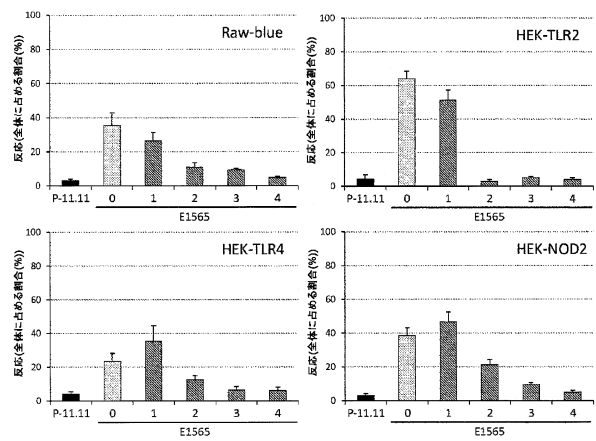
-1: Mannaway (登録商標) 酵素: 0.4% (容量/容量), pH10; 50°C で 24 時間。

-2: 1+Extra USP+ENO-PC 炭素: 0.5% (重量/容量), pH4.5; 80°C で 1 時間。

-3: 1+2+Dowex SD2 樹脂: 11 回の通過

-4: 1+2+3+5kDa 限外濾過: 3 時間にわたり閉回路。

【図 10】



処理:

-0: 未処理

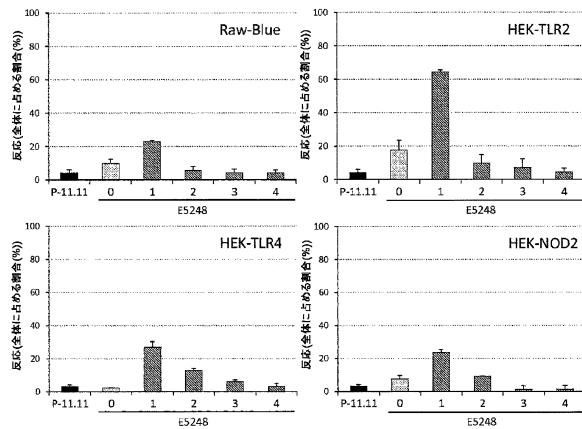
-1: Mannaway (登録商標) 酵素: 0.4% (容量/容量), pH10; 50°C で 24 時間。

-2: 1+Extra USP+ENO-PC 炭素: 0.5% (重量/容量), pH4.5; 80°C で 1 時間。

-3: 1+2+Dowex SD2 樹脂: 11 回の通過

-4: 1+2+3+5kDa 限外濾過: 3 時間にわたり閉回路。

【図 11】



処理:

-0: 未処理

-1: Mannaway (登録商標) 酵素: 0.4% (容量/容量), pH10; 50°C で 24 時間。

-2: 1+Extra USP+A-Supra-Eur 炭素: 0.5% (重量/容量), pH4.5; 80°C で 1 時間。

-3: 1+2+Dowex SD2 樹脂: 11 回の通過

-4: 1+2+3+5kDa 限外濾過: 3 時間にわたり閉回路。

フロントページの続き

- (72)発明者 ソフィー デュベ
フランス国 F - 5 9 8 9 0 ケノウ - シュル - ドユル シュマン ドゥ プラ パレ 1 1 6 5
- (72)発明者 ティエリー デュボン
フランス国 F - 6 2 2 3 2 ヴォンダン - レ - ベテューヌ リュ レジェール マイユー 1 0 5
- (72)発明者 ファブリス アラン
フランス国 F - 5 9 8 0 0 リール レジダンス アルボノワーズ アパルトマン 4 3 8 リュ
デ スタシオン 8 8
- (72)発明者 マチュー カルバンティエ
フランス国 F - 5 9 3 5 0 サン タンドレ レ リール リュ デ イロンドル 3 4
- (72)発明者 アニエス デニ
フランス国 F - 5 9 8 0 0 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 / 1 0 3
- (72)発明者 エラ アシン - ジェルビ
フランス国 F - 5 9 6 5 0 ヴィルヌーヴ ダスク アントレ 1 1 シュマン デ クリウール
5 3

審査官 齋藤 光介

(56)参考文献 国際公開第 2 0 1 3 / 1 7 8 9 3 1 (WO , A 1)

(58)調査した分野(Int.Cl. , DB名)

C 0 8 B

J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 (J D r e a m I I I)