

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号

特許第6995045号
(P6995045)

(45)発行日 令和4年2月4日(2022.2.4)

(24)登録日 令和3年12月16日(2021.12.16)

(51)国際特許分類

F I

C 0 8 B 37/00 (2006.01)

C 0 8 B 37/00

P

A 6 1 P 31/04 (2006.01)

A 6 1 P 31/04

A 6 1 K 39/02 (2006.01)

A 6 1 K 39/02

A 6 1 K 39/112 (2006.01)

A 6 1 K 39/112

請求項の数 6 (全16頁)

(21)出願番号 特願2018-532443(P2018-532443)

(86)(22)出願日 平成28年12月21日(2016.12.21)

(65)公表番号 特表2018-538415(P2018-538415
A)

(43)公表日 平成30年12月27日(2018.12.27)

(86)国際出願番号 PCT/IB2016/057896

(87)国際公開番号 WO2017/109733

(87)国際公開日 平成29年6月29日(2017.6.29)

審査請求日 令和1年11月26日(2019.11.26)

(31)優先権主張番号 62/270,766

(32)優先日 平成27年12月22日(2015.12.22)

(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)

(73)特許権者 305060279

グラクソスミスクライン バイオロジカ
ルズ ソシエテ アノニム
ベルギー ベー ー 1 3 3 0 リクセンサー
ル リュ ドランスティテュ 8 9

(74)代理人 110002572

特許業務法人平木国際特許事務所

(72)発明者 カーン, ジェフリー エー.

アメリカ合衆国 5 9 8 4 0 モンタナ州
、ハミルトン, オールド コーバリス ロ
ード 5 5 3

(72)発明者 ファレンブルグ, チャド

アメリカ合衆国 5 9 8 4 0 モンタナ州
、ハミルトン, オールド コーバリス ロ
ード 5 5 3

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 L P S抽出プロセス

(57)【特許請求の範囲】

【請求項1】

グラム陰性菌細胞からのリポ多糖(LPS)の抽出で使用するための、

(i) NaOAc、NaCl、KOAc及びKClから成る群より選択される塩、

(ii) 水、

(iii) メタノール、及び(iv) クロロホルム

を含むLPS抽出溶液であって、

前記LPS抽出溶液の体積が、0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1、2、
3、4、5、10、15及び20Lから成る群より選択される体積以上であり、

前記塩濃度が2mM以上30mM以下であり、且つ、

前記LPS抽出溶液中の前記水の量が0.1%(v/v)以上3%(v/v)以下である、

前記LPS抽出溶液。

【請求項2】

前記塩がNaOAcである、請求項1記載のLPS抽出溶液。

【請求項3】

グラム陰性菌細胞からLPSを抽出するための請求項1又は2記載のLPS抽出溶液の使用で
あって、前記LPS抽出溶液の体積が0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1
、2、3、4、5、10、15及び20Lから成る群より選択される体積以上である、前記使用。

【請求項4】

グラム陰性菌細胞からLPSを抽出する方法であって、請求項1又は2記載のLPS抽出溶液を使用してグラム陰性菌細胞からLPSを抽出するステップを含み、前記LPS抽出溶液の体積が0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1、2、3、4、5、10、15及び20Lから成る群より選択される体積以上である、前記方法。

【請求項5】

グラム陰性菌細胞からLPSを抽出する方法であって、

- (i)85%(v/v)エタノール溶液でグラム陰性菌細胞を洗浄するステップ、
- (ii)90%(v/v)エタノール溶液でグラム陰性菌細胞を洗浄する2回目のステップ、
- (iii)メタノール溶液でグラム陰性菌細胞を洗浄するステップ、
- (iv)請求項1又は2記載のLPS抽出溶液中でグラム陰性菌細胞からLPSを抽出するステップ、及び
- (v)LPS抽出溶液からアルコール及びクロロホルムを蒸発させるステップを含む、前記方法。

10

【請求項6】

抽出LPS組成物を酸加水分解に供してMPLを産生するステップ、及びMPLを塩基加水分解に供して3-O-脱アシル化モノホスホリルリピドA(3D-MPL)組成物を形成するステップを更に含む、請求項4又は5記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

20

本発明は、モノホスホリルリピドA(MPL)を産生するためのリポ多糖(LPS)の抽出の分野に関する。

【背景技術】

【0002】

LPSはグラム陰性菌外膜の外部小葉の主要表面分子であり、そこにのみ存在する。LPSは血清中補体及び食細胞による菌の破壊を妨げ、コロニー化のための接着に参与する。LPSは大きさ約10,000ダルトンの一群の構造上関連した複合体分子であり、(図1中に示したように)以下の3つの共有結合領域からなる。

- (i)外部領域のO-特異的多糖鎖(O-抗原)
- (ii)コアオリゴ糖中心領域
- (iii)リピドA-疎水性アンカーとして働く最も内側の領域、長鎖脂肪酸を有するグルコサミン二糖単位を含む。

30

【0003】

LPS抽出の技法には、フェノール、クロロホルム、及び石油エーテル(PCP)の混合物を用いたLPS抽出、次にクロロホルム及び石油エーテルの蒸発、LPSを沈殿させるためのアセトンと水の添加、及び遠心分離又は濾過によるLPSの回収を含むGalanos法がある(Galanos et al., Eur.J.Biochem. 9:245(1969))。Chen法は、クロロホルムとメタノールの混合物(CM)を用いたLPS抽出、次にリン脂質を除去するための一連のメタノール沈殿ステップを含む(Chen et al., J. of Infectious Diseases, 128(Supplement1):S43-S51(1973))。Galanos法はLPSの工業生産には適していない。それは大規模生産に適用できず、健康上及び安全上の問題を提起する溶媒混合物(例えば、フェノール:クロロホルム:石油エーテル)を使用するからである。Chen法はLPS及びリン脂質富化CM相をもたらし、例えばワクチンアジュバントとしての使用などの、免疫刺激用途における使用に十分な純度のLPSを得るために複数の沈殿ステップを典型的に必要とする。

40

【0004】

W002/078637は、エタノールなどの脂肪族アルコールを含む溶液で細胞を抽出し、それによってリン脂質含有量が低い細胞を産生するステップ、及びクロロホルムとメタノールを含む溶液でリン脂質含有量が低い細胞を抽出し、それによってクロロホルムとメタノール(CM)中に溶けたLPSの溶液を得るステップを含む、グラム陰性菌(特にサルモネラ・ミネソタ(Salmonella minnesota)R595)のディープラフ(deep rough)突然変異菌株を

50

使用したLPS及び3D-MPLの産生法を開示する。細菌産生用に使用する増殖培地及び発酵プロセス(供給バッチ、バッチ発酵など)に応じて、WO02/078637の方法は乾燥細胞質量単位あたり2%~12%の収率をもたらした。より高効率(利用可能な全回収LPSのパーセントによって測定された)を得る大規模LPS抽出の改良法が必要とされる。

【0005】

WO2011/144645は、アルコール及び更なる有機溶媒に加えて、LPS抽出ステップにおける水の使用を開示した。利用可能な全LPSの約60%を回収した。水を使用したこの方法は、LPS抽出ステップにおいて水を欠く同等のプロセスと比較して、より効率的なLPS回収をもたらした。水を含む抽出溶液の使用によりグラム陰性菌からLPSを抽出することによって、このプロセスは、水を欠く同等の溶液を使用したプロセスと比較して、より短時間で確実により多くのLPSをもたらした。それでもなお、より高効率を得る大規模LPS抽出の改良法が求められている。

10

【先行技術文献】

【特許文献】

【0006】

【文献】WO02/078637

WO2011/144645

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0007】

より高い効率と低い変動性でLPSを抽出する組成物及び方法が、本明細書において提供される。一態様では、塩、水、アルコール、及び更なる有機溶媒を含むLPS抽出溶液を提供する。一態様では、塩、水、アルコール、及び更なる有機溶媒を含むリポ多糖(LPS)抽出溶液を提供する。

20

【0008】

一態様では、グラム陰性菌細胞からのLPSの抽出において使用するための、塩、水、アルコール、及び更なる有機溶媒を含むLPS抽出溶液を提供する。

【0009】

一態様では、グラム陰性菌細胞からLPSを抽出する方法における、塩、水、アルコール、及び更なる有機溶媒を含むLPS抽出溶液の使用を提供する。

30

【0010】

一態様では、グラム陰性菌細胞からLPSを抽出する方法であって、塩、水、アルコール、及び更なる有機溶媒を含むLPS抽出溶液中でグラム陰性菌細胞からLPSを抽出するステップを含む方法を提供する。

【0011】

一態様では、NaOAcを含むLPS抽出溶液を提供し、ここでNaOAcの濃度は2mM~30mMであり、水は0.1%(v/v)~3%(v/v)であり、メタノールは20%(v/v)~45%(v/v)であり、且つクロロホルムは50%(v/v)~X%(v/v)であり、ここで $X=100-[\%(v/v)\text{アルコール}+\%(v/v)\text{水}]$ である。一態様では、10mMのNaOAc、66%(v/v)のクロロホルム、33%(v/v)のメタノール及び1%(v/v)の水を含むLPS抽出溶液を提供する。

40

【0012】

一態様では、グラム陰性菌細胞からLPSを抽出する方法であって、85%(v/v)エタノール溶液でグラム陰性菌細胞を洗浄するステップ、90%(v/v)エタノール溶液でグラム陰性菌細胞を洗浄する2回目のステップ、メタノール溶液でグラム陰性菌細胞を洗浄するステップ、請求項1から16に記載のLPS抽出溶液中でグラム陰性菌細胞からLPSを抽出するステップ、及びLPS抽出溶液からアルコール及びクロロホルムを蒸発させるステップを含む方法を提供する。

【図面の簡単な説明】

【0013】

【図1】LPS分子の3つの共有結合領域：(i)外部領域のO-特異的多糖鎖(O-抗原)、(ii)コア

50

オリゴ糖中心領域、及び(iii)リピドAを示す図である。

【図2】突然変異菌株サルモネラ・ミネソタR595により産生したトランケートされたLPSを示し、完全長LPSに対するトランケートの位置を示す図である。

【図3A】抽出スキームの第1の部分を示すフローチャートを示す図である。細胞ブロスを抽出容器内でEtOHと組み合わせ、次いでセラミック膜を用いてタンジェンシャルフロー濾過(TFF)により濾過する。保持液(retentate)は、～70%エタノール中の細胞懸濁液を含む。EtOHを保持液に加え、次いでそれを熱に供し、攪拌し、TFFによって濃縮する。保持液は85～88%のEtOH中の細胞懸濁液を含む。EtOHとH₂Oを保持液に加え、熱に供し、TFFによって濃縮する。保持液は88～90%のEtOH中の細胞懸濁液を含む。次いで保持液中のEtOHを、透析濾過方式のTFF下でMeOHに置換する。得られる保持液はMeOH中の細胞懸濁液を含む。

10

【図3B】抽出スキームの第2の部分を示すフローチャートを与える図である。酢酸ナトリウム水溶液を保持液に加え、次いでクロロホルムを加え、10mMのNaOAc、1%(v/v)の水、66%(v/v)のCHCl₃、33%(v/v)のMeOHの濃度を得る。これを51℃で1時間加熱し(還流)、次いでTFFによる濃縮に供する。クロロホルム-メタノール抽出物を含む透過液を容器内に回収する。これを溶媒蒸発による濃縮に供して非水溶媒を除去する。溶媒蒸発中に水を加え、水中に分散した粗LPS抽出物を産生する。

【図4】クロロホルム:メタノール抽出収率に対する、クロロホルム:メタノール抽出物へのナトリウム添加の影響の図である。結果はベンチスケール試験からのものである。抽出はNaCl又はNaOAcを加えて実施し、0.5%～1.4%の水を含有していた。

20

【図5】クロロホルム:メタノール抽出収率に対する、クロロホルム:メタノール抽出物への1%の水及び10mMのNaOAc添加の影響を例証する図である。結果は、2つの異なる時期(2012年及び2015年)中に実施された生産スケール試験からのものである。

【発明を実施するための形態】

【0014】

抽出組成物

LPS抽出効率を改善するためのLPS抽出用の組成物及び方法が、本明細書において提供される。用語「抽出効率」は、利用可能な全回収LPSのパーセントを意味する。抽出効率は利用可能な全回収LPSのパーセントによって、又はLPS収率によって測定することができる。本明細書で使用する用語「LPS収率」は、乾燥細菌細胞重量(DCW)のパーセンテージとして得られるLPSの量を意味する。例えば、同一条件下で増殖した細菌細胞に本発明の方法及び他の方法を適用すると、本発明の方法は、他の方法によって生じるLPS収率と比較して、より高いLPS収率をもたらす。

30

【0015】

一態様では、LPS抽出溶液は大規模である。大規模によって、7、8、9、10、11、12、13、14、15、20、25、30、35、40、45、50、60、65、70、75、80、85、90、100、150、200、300、400、500、600、700、800、900、又は1000mL以上の抽出体積を意味する。特定の態様では、大規模は、0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1、2、3、4、5、10、15、20L以上の抽出体積を意味する。「LPS抽出溶液」は、細菌の膜からLPSを直接抽出するLPS抽出ステップ中で使用する、組成物/混合物を意味する。一態様では、塩、水、アルコール、及び更なる有機溶媒を含み、本明細書の他の箇所を開示する方法中で有用なLPS抽出溶液を提供する。本発明のLPS抽出溶液は単相抽出組成物である。「単相」は、液体が不混和性の混合物ではなく、液体が単一の均質な液体を形成していることを意味し、単相は、懸濁液を含む。

40

【0016】

用語「塩」は当業者に周知である。適切な塩は、ナトリウム、リチウム、及びカリウムを含めた一価陽イオンを有する塩である。理論によって縛られることを望むものではないが、本出願人は、LPS抽出溶液中の一価陽イオンが二価陽イオン(即ち、主にCa⁺⁺及びMg⁺⁺)を置換し、それによって外膜中のLPSを不安定化すると仮定する。本発明において使用するのに適した塩には、NaOAc、NaCl、酢酸カリウム(KCH₃COO)(本明細書では以後「

50

KOAc」)、KCl、酢酸リチウム、及び塩化リチウムが挙げられる。

【0017】

一態様では、本発明のLPS抽出溶液中の塩濃度は2、3、4、5、6、7、8、9、10、20、又は30mM以上である。一態様では、本発明のLPS抽出溶液中の塩濃度は2mM以上、30、20、15、14、13、12、11、10、9、8、7、6、5、4、又は3mM以下である。一態様では、本発明のLPS抽出溶液中の塩濃度は、両端の値を含めて、2、3、4、5、6、7、8、9、10mMから10、20、30、40、50、60、70、80、90、100、200、300、400、500mMまでである。例えば、本発明のLPS抽出溶液中の塩濃度は、両端の値を含めて、2mMから30mMまでであってよい。本発明の特定の実施形態では、LPS抽出溶液中の塩濃度は5mM～15mMの塩である。一態様では、本発明のLPS抽出溶液は詳細には約2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、又は30mMの塩を含む。一態様では、塩の濃度は10mMである。

10

【0018】

用語「水(H₂O)」は当業者に周知である。この用語は、(蒸留、脱イオン化、イオン交換処理又は逆浸透によって得られる水を含めた)純粋及び実質的に純粋な水(H₂O)、及びわずかな不純物を含む水を包含する。当業者には明らかなように、典型的には、水はわずかな不純物を含む。水中の不純物は当業者に周知であり、無機イオン、有機分子、粒子、コロイド、溶存気体、微生物及びそれらの副産物を含む。特定の態様では、いかなる生存微生物も実質的に存在しない点で、水は、滅菌状態である。更なる態様では、水は、濾過されている。

20

【0019】

用語「水」は脱イオン水も包含する。脱イオン水は当業者に周知の用語であるが、簡単に言うと脱イオン水は、実質的に全ての金属イオンが除去された水である。脱イオン化のレベルは伝導性によって測定することができ、特定の実施形態では、脱イオン水は1μジーメンズ/cmの最大伝導性を有する。本発明の水は、LPS抽出溶液の他の成分から別々に加えられる必要はない。例えば、LPS抽出溶液中の水は、アルコールと水の両方を含むアルコール溶液、又は塩と水を含む塩溶液、又はアルコール溶液と塩溶液の両方に由来してよい。したがって当業者は、塩、アルコール、水、及び更なる有機溶媒を含むLPS溶液を得るために、アルコール、塩溶液、及び更なる有機溶媒の混合のみを必要とする。

30

【0020】

LPS抽出溶液中の水の適量は、両端の値を含めて、0.1から3.5%(v/v)までの範囲内、例えば0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1.0、1.1、1.2、1.3、1.4、1.5、1.6、1.7、1.8、1.9、2.0、2.1、2.2、2.3、2.4、2.5、2.6、2.7、2.8、2.9、3.0、3.1、3.2、3.3、3.4%(v/v)である。一態様では、本発明のLPS抽出溶液は0.4%～3.5%の水(v/v)を含み得る。詳細には、本発明のLPS抽出溶液中の水の量は1%(v/v)、即ち0.8～1.2%(v/v)である。

【0021】

本発明のLPS抽出溶液はアルコールを含む。本明細書で使用する用語「アルコール」は、ヒドロキシ基(-OH)がアルキル又は置換アルキル基の炭素原子と結合した任意の非環式有機化合物、特にメタノール、エタノール、及びプロパノールを含めた短鎖(1～4炭素)一価官能基アルコールとして定義する。明確に言うと、フェノール(環式アルコール)などの芳香族不飽和アルコールは本発明によって包含されず、したがって、水、アルコール及び更なる有機溶媒を含み、アルコールが芳香族不飽和アルコール、例えばフェノールではないLPS抽出溶液を提供する。

40

【0022】

本発明のLPS抽出溶液中のアルコールのパーセンテージは、約20%～約45%であってよく、本発明の特定の実施形態では、LPS抽出溶液は25%(v/v)～40%(v/v)のアルコールを含む。本発明のLPS抽出溶液は詳細には約26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39%(v/v)のアルコールを含む。LPS抽出溶液に適したアルコールには、

50

メタノール、エタノール、イソプロパノール、及びブタノールが挙げられる。アルコールの選択は、特定のLPS抽出溶液中の特定の有機溶媒を含めた幾つかの要因に依存する場合があり、これは、特定のアルコールは特定の有機溶媒に溶けないこと、又は蒸発による除去しやすさという観点によるものである。例えば、メタノールはその低い沸点のため蒸発により除去しやすく、大部分のメタノールは水相に分かれるのでBligh-Dyerの液相-液相分離を使用して除去することができる。

【0023】

本発明のLPS抽出溶液は、アルコールに加えて有機溶媒を含む。用語「有機溶媒」は当技術分野で周知である。有機溶媒は、固体、液体、又は気体状溶質を溶液中に溶かすことができる炭素含有化学物質である。適切な有機溶媒は、クロロホルム、アルカン、トルエン及び石油エーテルの群から選択することができる。クロロホルムは当業者に周知であり、化学式 CHCl_3 によって表される。

【0024】

一態様では、塩、及びアルコール、水、及びクロロホルムを含むLPS抽出溶液を提供する。クロロホルムの適切なパーセンテージは、クロロホルムの $\%(\text{v/v}) = 100 - (\text{アルコールの}\% + \text{水の}\%)$ に従い計算することができる。一実施形態では、LPS抽出溶液は50%~80%(v/v)を含む。本発明の特定の実施形態では、LPS抽出溶液は55%(v/v)~75%(v/v)のクロロホルムを含む。本発明の特定の実施形態では、LPS抽出溶液は60%(v/v)~70%(v/v)のクロロホルムを含む。詳細には本発明のLPS抽出溶液は、アルコールに加えて、約52、53、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80%(v/v)のクロロホルムを含む。

【0025】

一態様では、塩、0.1%(v/v)~3%(v/v)の水、20%(v/v)~45%(v/v)のアルコール、及び50%(v/v)~X%(v/v)の更なる有機溶媒を含むLPS抽出溶液を提供し、ここで $X = 100 - [\%(\text{v/v}) \text{ アルコール} + \%(\text{v/v}) \text{ 水}]$ であり、塩の濃度は2mM~500mMである。前述の一態様では、塩濃度は3mM~50mM、4mM~30mMなど、詳細には5mM~20mMである。前述の一態様では、塩は一価の塩である。前述の一態様では、塩はNaOAc、NaCl、KOAc、及びKClからなる群から選択される。前述の一態様では、塩はNaOAcである。前述の一態様では、アルコールはメタノールである。前述の一態様では、更なる有機溶媒はクロロホルムである。

【0026】

一態様では、NaOAc、0.1%(v/v)~3%(v/v)の水、20%(v/v)~45%(v/v)のメタノール、及び50%(v/v)~X%(v/v)のクロロホルムを含むLPS抽出溶液を提供し、ここでは $X = 100 - [\%(\text{v/v}) \text{ アルコール} + \%(\text{v/v}) \text{ 水}]$ であり、NaOAcの濃度は2mM~30mMである。前述の一態様では、NaOAc濃度は3mM~50mM、4mM~30mMなど、詳細には5mM~20mMである。

【0027】

一態様では、NaOAc、1%(v/v)の水、33%(v/v)のメタノール、及び66%(v/v)のクロロホルムを含み、NaOAcの濃度が10mMであるLPS抽出溶液を提供する。

【0028】

一態様では、NaOAc、1%(v/v)の水、33%(v/v)のメタノール、及び66%(v/v)のクロロホルムから本質的になり、NaOAcの濃度が10mMであるLPS抽出溶液を提供する。

【0029】

LPS抽出溶液の使用

一態様では、本明細書に記載するLPS抽出溶液は、グラム陰性菌細胞からのLPSの抽出において有用である。このような細菌細胞は、細菌細胞培養によって得ることができる。

【0030】

サルモネラ(Salmonella)又はエシェリキア(Escherichia)、例えばサルモネラ又はエシェリキアのディープラフ突然変異菌株を非制限的に含むグラム陰性菌細胞からLPSを得ることができる。サルモネラ・ミネソタ突然変異菌株R595は、親(滑面)菌株の培養物から196

10

20

30

40

50

6年に単離された(Luderitz et al. 1966 Ann.N.Y.Acad.Sci. 133:349-374)。選択したコロニー是一群のファージによる溶解に対するそれらの感受性をスクリーニングし、狭い範囲の感受性を示した(1又は2ファージのみに感受性があった)コロニーのみを更なる試験用を選択した。この努力は、LPS生合成を欠くS.ミネソタR595と呼ばれるディープラフ突然変異菌株の単離をもたらした。

【0031】

他のLPSと比較して、サルモネラ・ミネソタR595により産生されたLPSは、

(i)O-特異的領域-野生型滑面表現型から突然変異型粗面表現型への移行を担い毒性の消失をもたらす特徴を含有せず、

(ii)コア領域が非常に短く-この特徴によって様々な化学物質に対する菌株の感受性が増大する、且つ

(iii)リピドA部分が最大7脂肪酸で高度にアシル化状態されているため、トランケートされており、比較的単純な構造を有する(図2参照)。

【0032】

本発明の方法中で使用する細菌細胞は、サルモネラ又はエシェリキアのディープラフ突然変異菌株の細胞であってよい。「ディープラフ突然変異菌株」は、ディープラフの表現型を有するグラム陰性菌の菌株を意味する。ディープラフの表現型は、リピドAと結合した多糖部分が2-ケト-3-デオキシ-D-マンノオクトロン酸(KDO)のわずか2〜3残基のみからなる表現型である。詳細には、ディープラフ突然変異菌株はサルモネラ属から選択される。ディープラフ突然変異菌株をサルモネラ属から選択する場合、それはサルモネラ・ミネソタ種、詳細には菌株サルモネラ・ミネソタR595であってよい。他のディープラフ突然変異菌株、例えばカンピロバクター・ジェジュニ(*Compylobacter jejuni*)(Kanipes et al. 2004 Infection and Immunity72:2452-2455)、大腸菌(*E.coli*)K12菌株CS2429(Kl ena et al.2005 J.Bact.187:1710-1715)、大腸菌D31m4(Qureshi et al.1988 J.Biol.Chem.263:11971-11976)、大腸菌株F515(Wiese et al.1997 Biochemistry36:10311-10319)及びプロテウス・ミラビリス(*Proteus mirabilis*)菌株R45(Wiese et al.1997 Biochemistry36:10311-10319)を使用することができる。

【0033】

抽出の方法及び抽出LPS組成物

一態様では、グラム陰性菌細胞からLPSを抽出する方法における、本明細書の他の箇所に記載するLPS抽出溶液の使用を提供する。この方法の一態様では、グラム陰性菌細胞は、サルモネラ又はエシェリキアのディープラフ突然変異菌株の細胞である。この方法の一態様では、グラム陰性菌細胞は大腸菌の細胞である。この方法の一態様では、グラム陰性菌細胞はサルモネラ・ミネソタの細胞である。

【0034】

一態様では、塩、水、アルコール、及び更なる有機溶媒を含むLPS抽出溶液においてグラム陰性菌細胞からLPSを抽出するステップを含む、グラム陰性菌細胞からLPSを抽出する方法を提供する。「LPS抽出」又は「細菌細胞からのLPS抽出」は、LPSが細菌外膜から直接除去されることを意味する。

【0035】

一態様では、LPS抽出溶液におけるLPSの抽出は35℃〜65℃の温度で実施する。一態様では、LPS抽出溶液におけるLPSの抽出は45℃〜55℃の温度で実施する。一態様では、LPS抽出溶液におけるLPSの抽出は45℃〜57℃、46℃〜56℃、47℃〜55℃、48℃〜54℃、49℃〜53℃、又は50℃〜52℃の温度で実施する。一態様では、LPS抽出溶液におけるLPSの抽出は51℃の還流温度で実施する。「還流温度」は、熱に供される溶媒混合物の沸点又はその付近の温度を意味する。

【0036】

方法の一態様では、LPS抽出溶液におけるLPS抽出のステップは0.1〜4時間実施する。一態様では、LPS抽出溶液におけるLPS抽出のステップは0.5〜2時間実施する。一態様では、LPS抽出溶液におけるLPS抽出のステップは1時間実施する。

【0037】

方法の一態様では、エタノール溶液でグラム陰性菌細胞を洗浄するステップが、LPS抽出溶液におけるLPS抽出のステップに先行する。方法の一態様では、LPS抽出溶液中でグラム陰性菌細胞からLPSを抽出するステップの前、エタノール溶液でグラム陰性菌細胞を洗浄するステップの後に、エタノールでグラム陰性菌細胞を洗浄する第2のステップが続く。「洗浄」は、望ましくない成分のエタノール抽出のプロセスを意味する。

【0038】

抽出ステップの前にエタノールで洗浄することによって、LPS抽出ステップ中にLPSと共に抽出されるリン脂質の量を減らすことができ、したがって、洗浄によってLPS抽出における不純物の量を減らすことができる。したがって、

- (i)エタノール溶液でグラム陰性菌細胞を洗浄するステップ、
- (ii)エタノールでグラム陰性菌細胞を洗浄する2回目のステップ、及び
- (iii)塩、水、アルコール、及び更なる有機溶媒を含むLPS抽出溶液中でグラム陰性菌細胞からLPSを抽出するステップを含む、細菌細胞からLPSを抽出する方法を提供する。

【0039】

方法の一態様では、ステップ(i)及び/又はステップ(ii)中、75%~95%(v/v)のエタノール溶液でグラム陰性菌細胞を洗浄する。方法の一態様では、ステップ(i)中、85%(v/v)のエタノール溶液でグラム陰性菌細胞を洗浄する。方法の一態様では、ステップ(ii)中、90%(v/v)のエタノール溶液でグラム陰性菌細胞を洗浄する。

【0040】

方法の一態様では、LPS抽出溶液中でグラム陰性菌細胞からLPSを抽出するステップの前、エタノール溶液でグラム陰性菌細胞を洗浄するステップの後に、メタノール溶液でグラム陰性菌細胞を洗浄するステップが続く。

【0041】

したがって、

- (i)エタノール溶液でグラム陰性菌細胞を洗浄するステップ、
- (ii)エタノールでグラム陰性菌細胞を洗浄する2回目のステップ、
- (iii)メタノールでグラム陰性菌細胞を洗浄するステップ、及び
- (iv)塩、水、アルコール、及び更なる有機溶媒を含むLPS抽出溶液中でグラム陰性菌細胞からLPSを抽出するステップを含む、グラム陰性菌細胞からLPSを抽出する方法を提供する。したがって一態様では、本明細書の方法によって抽出LPS組成物を産生する。別の態様では、本明細書の方法を使用し乾燥細胞単位質量あたりで生じるLPSの収率は、従来技術の方法からの収率と比較して実質的に改善される。例えば、バッチ発酵からのLPSの収率は~45%増大する。(塩を含まない)わずか1%の水を使用する場合、収率は若干増大する(約5~10%)。図4及び5を参照されたい。

【0042】

方法の一態様では、LPS抽出溶液中でグラム陰性菌細胞からLPSを抽出するステップに、LPS抽出溶液から水、アルコール及びクロロホルムを蒸発させるステップが続く。一態様では、蒸発ステップ中に連続的な水添加を行い、水中に分散した固体としてLPSを産生する(「水中分散LPS」)。別の態様では、水の蒸発を完了して乾燥LPS残渣を得る。いずれの場合においても、これらのステップにより産生したLPSを含む組成物は「抽出LPS組成物」と考えられる。したがって、グラム陰性菌細胞からLPSを抽出する方法であって、

- (i)エタノール溶液でグラム陰性菌細胞を洗浄するステップ、
- (ii)エタノール溶液でグラム陰性菌細胞を洗浄する2回目のステップ、
- (iii)メタノール溶液でグラム陰性菌細胞を洗浄するステップ、
- (iv)塩、水、アルコール、及び更なる有機溶媒を含むLPS抽出溶液中でグラム陰性菌細胞からLPSを抽出するステップ、及び
- (v)LPS抽出溶液からアルコール及びクロロホルムを蒸発させるステップを含む方法を提供する。

【0043】

一態様では、エタノール溶液で洗浄するステップは透過液を廃棄するTFFによって行い、メタノール溶液で洗浄するステップは透析濾過方式のTFFを使用して行い、LPSを抽出するステップは保持液を廃棄するTFFを使用して行う。洗浄ステップの後に遠心分離及びペレットの回収のステップが続く、LPS抽出のステップの後に遠心分離のステップが続く、その後に上清回収のステップが続く、代替態様を使用することができる。更なる代替態様では、エタノール及びメタノールの溶液で洗浄するステップは、透過液を廃棄するデッドエンド濾過によって行い、LPSを抽出するステップは、保持液を廃棄するデッドエンド濾過を使用して行う。当業者は、別のステップ中での遠心分離又はデッドエンド濾過の使用と共に1ステップでTFFを利用できることを理解しているであろう。

【0044】

したがって、グラム陰性菌細胞からLPSを抽出する方法であって、

(i)エタノール溶液でグラム陰性菌細胞を洗浄し、TFFを実施して、保持液を産生するステップ、

(ii)(i)の保持液を、エタノール溶液でグラム陰性菌細胞を洗浄する第2のステップに供し、TFFを実施して、保持液を産生するステップ、

(iii)(ii)の保持液を、透析濾過方式のTFFによるメタノール溶液中のグラム陰性菌細胞洗浄ステップに供し、グラム陰性菌細胞を含有する液状メタノール体積を産生するステップ、

(iv)ステップ(iii)のグラム陰性菌細胞含有液状メタノール体積に、塩水溶液と更なる有機溶媒を加え、塩、水、アルコール、及び更なる有機溶媒を含むLPS抽出溶液を産生するステップ、及び

(v)TFFを実施して、グラム陰性菌細胞から抽出したLPSを含有する透過液を産生するステップ、及び

(vi)ステップ(iv)の透過液を、LPS抽出溶液からアルコール及びクロロホルムを蒸発させるステップに供するステップを含む方法を提供する。

【0045】

一態様では、本明細書の方法は微生物を不活性化する。したがって一態様では、本明細書の方法によって産生される抽出LPS組成物は生存微生物を含まない。別の態様では、本明細書の方法は、天然細胞LPS中に通常存在するリン脂質の大部分を除去する。したがって更なる態様では、天然細胞LPSは、大部分のリン脂質の不在によって、本明細書の方法により産生される抽出LPS組成物と異なる。

【0046】

方法の一態様では、抽出LPS組成物を一連の酸加水分解及び塩基加水分解のステップに供して3D-MPL組成物を形成する。一態様では、本明細書の他の箇所で開示する方法によって産生される3D-MPL組成物を提供する。

【0047】

本明細書で開示するLPS抽出法中で利用する塩は、細菌細胞からのLPS抽出が実質的に完了した後の任意の地点で、後に除去することができる。したがって一態様では、塩及び抽出LPSを含む組成物を提供する。更なる態様では、塩及び3D-MPLを含む組成物を提供する。

【0048】

本明細書で開示する産生物は免疫原性である。したがって一態様では、本明細書の方法により産生する抽出LPS組成物を含む免疫原性組成物を提供する。一態様では、本明細書の方法により産生する3D-MPL組成物を含む免疫原性組成物を提供する。一態様では、3D-MPLを含む免疫原性組成物は、(a)免疫刺激物質及び(b)抗原からなる群から選択される1つ以上の成分を更に含む。

【0049】

したがって、免疫原性組成物を製造する方法における、本明細書の他の箇所に記載する3D-MPL組成物の使用を提供する。一態様では、この製造法は、(a)免疫刺激物質及び(b)抗原からなる群から選択される1つ以上の成分と本明細書で開示する3D-MPLを組み合わせるステップを含む。したがって一態様では、本明細書で開示する方法は、

10

20

30

40

50

- (i)塩、水、アルコール、及び更なる有機溶媒を含むLPS抽出溶液中でグラム陰性菌細胞からLPSを抽出して抽出LPS組成物を産生するステップ、
- (ii)抽出LPS組成物を一連の酸加水分解及び塩基加水分解に供して3D-MPL組成物を形成するステップ、
- (iii)(a)免疫刺激物質及び(b)抗原からなる群から選択される1つ以上の成分と本明細書で開示する3D-MPLを組み合わせ、それによって免疫原性組成物を産生するステップを含む。

【0050】

用語

本開示の様々な態様の検討を容易にするため、以下の用語の説明を示す。他の用語及び説明は、本開示の文脈中に示す場合がある。

【0051】

他に説明しない限り、本明細書で使用する全ての技術及び科学用語は、本開示が属する技術分野の当業者により一般的に理解されているものと同じ意味を有する。分子生物学における一般用語の定義は、Oxford University Pressにより公開されたBenjamin Lewin, Genes V, 1994(ISBN0-19-854287-9)、Blackwell Science Ltdにより公開されたKendrew et al.(eds.),The Encyclopedia of Molecular Biology, 1994(ISBN0-632-02182-9)、及びVCH Publishers, Incにより公開されたRobert A. Meyers(ed.),Molecular Biology and Biotechnology: a Comprehensive Desk Reference, 1995(ISBN 1-56081-569-8)中に見出され得る。

【0052】

単数形の用語「1つの(a)」、「1つの(an)」、及び「その(the)」は、文脈が明らかに他の事を示さない限り、複数形の指示対象を含む。同様に語句「又は」は、文脈が明らかに他の事を示さない限り、「及び」を含むことを意味する。用語「複数」は2つ以上を指す。核酸又はポリペプチドに関して与える、全ての塩基サイズ又はアミノ酸サイズ、及び全ての分子量又は分子質量値はおおよそであり、記載のために提供されることが更に理解されるものとする。他に、温度、組成物などの物質のパーセンテージ、濃度、又はレベルに関して与える数値制限値は、おおよそであることを意味する。したがって、温度が15℃～25℃であることを示す場合、温度は約(又は「又は」、「～(約)」)15℃から約(又は「又は」、「～」)25℃であることを意味すると理解される。同様に、濃度が少なくとも(例えば)200pgであることを示す場合、濃度は少なくとも約(又は「又は」、「～」)200pgであることを意味すると理解される。

【0053】

以下、本発明の実施形態を示す。

(1) グラム陰性菌細胞からのLPSの抽出で使用するための、

(i)NaOAc、NaCl、KOAc、及びKClからなる群から選択される塩、

(ii)水、

(iii)アルコール、及び

(iv)更なる有機溶媒

を含むリポ多糖(LPS)抽出溶液であって、前記LPSの抽出溶液の体積が、0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1、2、3、4、5、10、15、及び20Lからなる群から選択される体積以上である、リポ多糖(LPS)抽出溶液。

(2) グラム陰性菌細胞からLPSを抽出するための(1)に記載のLPS抽出溶液の使用であって、前記LPS抽出溶液の体積が0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1、2、3、4、5、10、15、及び20Lからなる群から選択される体積以上である、使用。

(3) グラム陰性菌細胞からLPSを抽出する方法であって、(1)に記載の抽出溶液を使用してグラム陰性菌細胞からLPSを抽出するステップを含み、前記LPS抽出溶液の体積が0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1、2、3、4、5、10、15、及び20Lからなる群から選択される体積以上である方法。

(4) (1) から (3) に記載のLPS抽出溶液であって、塩がNaOAcである、LPS抽出溶液

(5) (1) から (4) に記載のLPS抽出溶液であって、塩濃度が2mM以上30mM以下である、LPS抽出溶液。

(6) (1) から (5) に記載のLPS抽出溶液であって、更なる有機溶媒がクロロホルムである、LPS抽出溶液。

(7) (1) から (6) に記載のLPS抽出溶液であって、LPS抽出溶液中の水の量が0.1%(v/v)以上3%(v/v)以下である、LPS抽出溶液。

(8) (1) から (7) に記載のLPS抽出溶液であって、アルコールがメタノールである、LPS抽出溶液。

(9) グラム陰性菌細胞からLPSを抽出する方法であって、

(i) 85%(v/v)エタノール溶液でグラム陰性菌細胞を洗浄するステップ、

(ii) 90%(v/v)エタノール溶液でグラム陰性菌細胞を洗浄する2回目のステップ、

(iii) メタノール溶液でグラム陰性菌細胞を洗浄するステップ、

(iv) (1) から (8) に記載のLPS抽出溶液中でグラム陰性菌細胞からLPSを抽出するステップ、及び

(v) LPS抽出溶液からアルコール及びクロロホルムを蒸発させるステップ

を含む方法。

(10) 塩を更に含む、(2) に記載の使用又は(3) 若しくは(9) に記載の方法によって產生される抽出LPS組成物。

(11) (10) に記載の方法であって、抽出LPS組成物を酸加水分解に供してMPLを產生するステップ、及びMPLを塩基加水分解に供して3D-MPL組成物を形成するステップを更に含む、方法。

(12) (11) に記載の方法によって產生される3D-MPL組成物であって、塩を更に含む、組成物。

本明細書に記載したものと類似又は同等の方法及び材料を、本開示の実施又は試験において使用することができるが、適切な方法及び材料を以下に記載する。用語「含む(comprises)」は「含む(includes)」を意味する。したがって文脈により別段の要求がない限り、語句「含む(comprises)」、並びに「含む(comprise)」及び「含むこと(comprising)」などの変形は、言及された化合物又は組成物(例えば核酸、ポリペプチド、又は抗原)若しくはステップ、又は化合物若しくはステップの群を包含することを意味するが、任意の他の化合物、組成物、ステップ、又はそれらの群を除外しないことを意味することが理解されたと予想される。略語「例えば(e.g.)」はラテン語exempli gratiaから派生したものであり、本明細書では非制限的な例を示すため使用される。したがって、略語「例えば(e.g.)」は用語「例えば(for example)」と同義である。

【0054】

[実施例]

[実施例1]

ベンチスケールでの、塩添加によるLPSの抽出増大の実証

サルモネラ・ミネソタR595のバッチ発酵由来の1リットルの発酵ブ罗斯を、4つの250mL遠心分離ボトルにおいて遠心分離する。次いで精製水を用いた2回のすすぎを以下のように実施する。ペレットを200mLの精製水中に再懸濁し、1つの遠心分離ボトル中にプールし、遠心分離し、上清を廃棄し、200mL精製水中に再懸濁し、遠心分離し、そして上清を廃棄する。

【0055】

2回のエタノール抽出を実施してリン脂質不純物を除去する。細胞は60mLの95%試薬用アルコール(+5%水)中に再懸濁し、次いで45分間50℃においてインキュベーター内で攪拌する。次いで細胞を遠心分離し、上清を廃棄する。細胞は60mLの90%試薬用アルコール(+10%水)中に再懸濁し、次いで45分間50℃においてインキュベーター内で攪拌する。次いで細胞を遠心分離し、上清を廃棄する。次いで(再懸濁及び遠心分離により)100mLのメタノールを用いて細胞を2回すすぐ。

【0056】

10

20

30

40

50

細胞ペレットをある体積(例えば18mL)のメタノール中に再懸濁し、メタノールスラリーは100mLの丸底フラスコ中に分配し(例えば、4フラスコのそれぞれに5.5mL分配)、次いでこれらを使用して様々なLPS抽出溶液を用いた抽出を評価する。更に、測定された体積のメタノールスラリー(例えば3.1mL)を風袋ガラス遠心分離用チューブに移し、次いでチューブを遠心分離し、上清を廃棄し、ペレットは少量体積の精製水中に再懸濁し、次いでチューブを凍らせ凍結乾燥状態にする。次いで乾燥細胞の質量を重量測定する。この質量が、様々なLPS抽出溶液を用いて得られるLPS収量を計算する基盤となる。

【0057】

5.5mLメタノールスラリーを含有するそれぞれの100mLフラスコに、多量の塩化ナトリウム又は酢酸ナトリウムストック水溶液及び/又は多量の精製水、次に16mLの体積のクロロホルムを加える。加えるナトリウム溶液と水の体積が、0~30mMの範囲のナトリウム濃度と0.0%~1.4%の水濃度をもたらす。約16時間攪拌しながらフラスコを還流温度で加熱する。次いで細胞スラリーを、焼結ガラス製Buchner漏斗を使用して濾過し、それぞれのフラスコとフィルターは30mLのクロロホルム:メタノール4:1(v/v)ですすぐ。回転式蒸発を実施して(CM4:1でのすすぎを含む)濾液から溶媒を蒸発させる。次に、Bligh and Dyerの液相-液相抽出を実施して塩を除去し、粗LPS抽出物の収量の重量測定を可能にする。

【0058】

この実施例中に記載したように実施したベンチスケール抽出からの結果は、図4中に要約する。

【0059】

[実施例2]

生産スケールでの、リン脂質不純物を除去するためのエタノールを用いた抽出
細胞ブロス+EtOH、抽出容器中→セラミック膜で濾過(TFF)→保持液(=約70%のエタノール中の細胞懸濁液)

【0060】

保持液+EtOH→加熱→攪拌→TFFにより濃縮→保持液(=85~88%のEtOH中の細胞懸濁液)

【0061】

保持液+EtOH+H₂O+加熱→TFFにより濃縮→保持液(=88~90%のEtOH中の細胞懸濁液)

【0062】

保持液→透析濾過方式のTFFの下MeOHに置換されるEtOH→保持液(=MeOH中の細胞懸濁液)

【0063】

(バッチ発酵から採取し、タンジェンシャルフロー濾過を使用し精製水で細胞を濃縮及び透析濾過処理した)約1600グラムの乾燥細胞塊を含有する約34Lの濃縮サルモネラ・ミネソタR595細胞、及び77Lの試薬用アルコールを、攪拌器及び温度制御装置を備える200Lのジャケット付きステンレススチール製容器中に投入する。次いでこの混合物を、0.2µm孔径、3.5mmチャネル径、及び全濾過面積0.25m²の19チャネル円筒形Keracel(商標)セラミック膜を備えるタンジェンシャルフロー濾過(TFF)ユニットを用いて36Lに濃縮する。透過液は廃棄する。

【0064】

保持液は、約86%v/vエタノールの濃度まで試薬用アルコール(45L)で希釈する。この混合物を50℃まで加熱し、この温度で60分間攪拌する。次いでこの混合物をTFFにより19Lに濃縮する。透過液は廃棄する。

【0065】

試薬用アルコール(76L)及び精製水(8.5L)を保持液に加え、89%v/vエタノール中約102Lに細胞を希釈する。この混合物を50℃まで加熱し、この温度で60分間攪拌する。次いでこの混合物をTFFにより19Lに濃縮する。透過液は廃棄する。

【0066】

それぞれ19Lメタノールの添加、次にTFFによる約17Lまでの濃縮からなる、一連の7回のメタノールでのすすぎを実施する。透過液は廃棄する。

10

20

30

40

50

【0067】

エタノール洗浄及びメタノールでのすすぎ後の透過液の分析によって、約15%の乾燥細胞塊が除去されたことを決定した。薄層クロマトグラフィーによる分析は、排除された塊は、(残存細胞中に残る)リポ多糖を含まない疎水性不純物(リン脂質)からなることを示す(データ示さず)。

【0068】

[実施例3]

生産スケールでの、塩添加なしでのLPSの抽出

保持液+CHCl₃+加熱→TFFにより濃縮→透過液(=クロロホルム-メタノール抽出物(CME))、回収容器中。

【0069】

実施例2中に記載したようなエタノール洗浄及びメタノールでのすすぎ後、50LのCHCl₃を保持液に加える。LPSを抽出するため、次に混合物を50℃で16時間加熱する。次いで混合物をTFFにより約13Lに濃縮し、透過液はステンレススチール製回収容器に注入する。クロロホルム(20L)及びメタノール(8L)を保持液に加え、混合物を再度約13Lに濃縮し、透過液は回収容器に注入する。

【0070】

回収した透過液は、50LのBuchi R-250EXロータリーエバポレーター中で約1リットルに濃縮する。この体積を2つの2L丸底フラスコに移す(追加のクロロホルムを使用してすすぎ、移動を完了する)。次いで溶媒蒸発を、Buchi R-215ロータリーエバポレーターを使用して完了する。フラスコは少なくとも10時間1000ミリトル未満の圧力で真空チャンバー内に置き、残存溶媒の除去を引き起こす。2Lフラスコにおいて回収する塊は、クロロホルム:メタノール抽出物(CME)とも呼ばれる粗LPS抽出物である。

【0071】

この実施例の方法によって得たCME収量は図5中に表し、「Naなし/H₂Oなし」としてラベルしたバーによって示す。

【0072】

[実施例4]

生産スケールでの、塩添加ありでのLPSの抽出

保持液+H₂O+NaOAc+CHCl₃+加熱→TFFにより濃縮→透過液(=クロロホルム-メタノール抽出物(CME))、回収容器中→非H₂O溶媒を排除するための溶媒蒸発による濃縮→溶媒蒸発中にH₂Oの添加→水中分散CME(粗LPS抽出物)

【0073】

実施例2中に記載したようなエタノール洗浄及びメタノールでのすすぎ後、1.0MのNaOAc及びCHCl₃を保持液に加え、10mMのNaOAc、1%(v/v)の水、66%(v/v)のCHCl₃、33%(v/v)のMeOHの濃度を得る。LPSを抽出するため、次に混合物を50℃で1時間加熱する。次いで混合物をTFFにより約13Lに濃縮し、透過液はステンレススチール製回収容器に注入する。クロロホルム(20L)及びメタノール(8L)を保持液に加え、混合物を再度約13Lに濃縮し、透過液は回収容器に注入する。クロロホルム及びメタノールを用いたこのすすぎを反復し、LPSのより完全な回収に至る。

【0074】

回収した透過液は、50LのBuchi R-250EXロータリーエバポレーター中で約1リットルに濃縮する。1.5Lの精製水を加え、混合物は再度1リットルに濃縮する。次いで1.5Lの水の2回目の添加及び1リットルへの濃縮を実施する。これが水中に分散した粗LPSの回収をもたらす。このスラリーを追加の水を使用してフラスコに移し、移動を完了する。収量を測定するため、分散した粗LPSの試料を液相-液相抽出により処理して塩を除去し、有機相は乾燥させ質量を重量測定する。

【0075】

この実施例の方法によって得た収率は図5中に表し、「10mMのNaOAc/1%のH₂O」としてラベルしたバーによって示す。2012年に産生した2バッチに関して、その平均収率は、

10

20

30

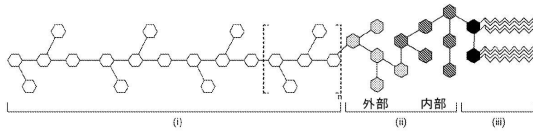
40

50

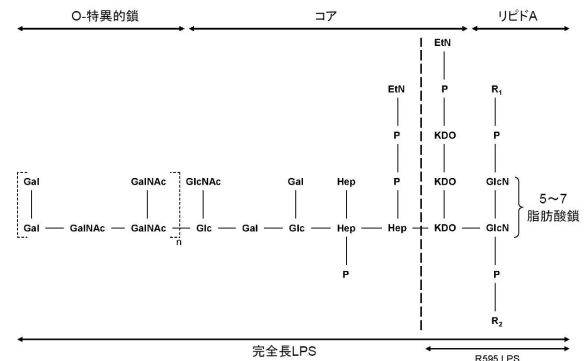
(実施例2の方法に従い)塩添加なしで産生した38バッチに関して得た平均より高い47%であった。2015年に産生した1バッチに関して、その収率は、(実施例2の方法に従い)塩添加なしで産生した21バッチに関して得た平均より高い64%であった。塩を添加せず1%の水を添加し2012年に産生した2バッチに関しては、その平均収率は、水及び塩を添加せず産生したバッチに関する平均より7%高かった。

【図面】

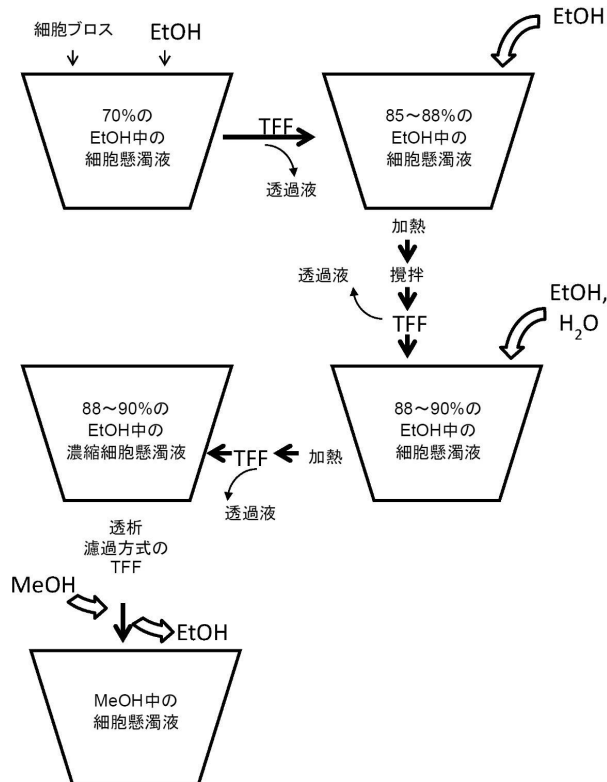
【図 1】



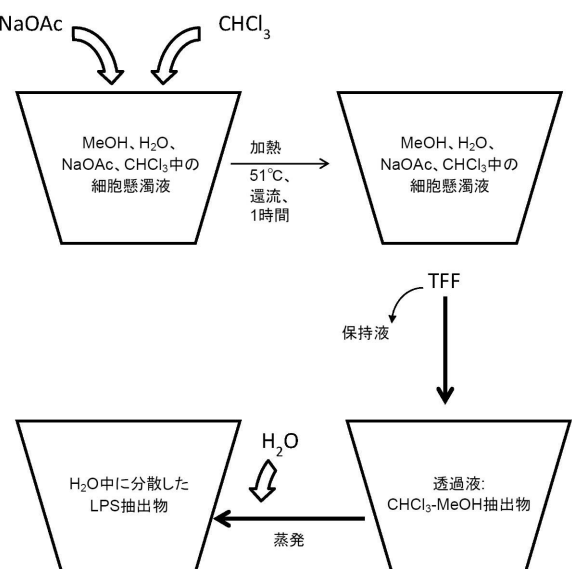
【図 2】



【図 3 A】



【図 3 B】



10

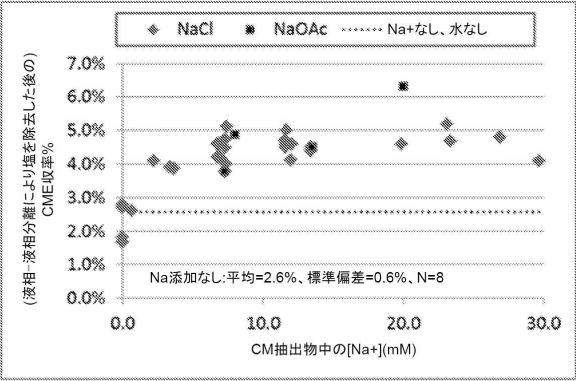
20

30

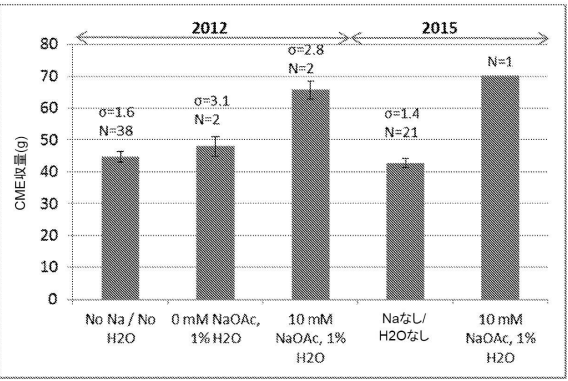
40

50

【図 4】



【図 5】



10

20

30

40

50

フロントページの続き

審査官 前田 憲彦

(56)参考文献 特表2013-527289 (JP, A)

特表2004-535477 (JP, A)

特表2013-520159 (JP, A)

特開平09-296004 (JP, A)

(58)調査した分野 (Int.Cl., DB名)

C08B 37/00

A61P 31/00

A61K 39/00

CAplus/REGISTRY (STN)