(19)国家知识产权局

(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 115836123 B
(45)授权公告日 2024.12.31

(21)申请号 202180048395.0
(22)申请日 2021.11.16
(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 115836123 A
(43)申请公布日 2023.03.21
(30)优先权数据
2021-006669 2021.01.19 JP
(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2023.01.06
(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/JP2021/042018 2021.11.16
(87)PCT国际申请的公布数据
WO2022/158097 JA 2022.07.28
(73)专利权人 新田明胶株式会社
地址 日本大阪府大阪市
专利权人 学校法人酪农学园
(72)发明人 萩原克郎 井田昌孝 平冈阳介
弗朗索瓦·玛丽·恩加科·卡德吉
小谷知希 冢本启司
(74)专利代理机构 北京品源专利代理有限公司
11332
专利代理师 吕琳 朴秀玉
(51)Int.Cl.
C12N 7/00(2006.01)
C12N 7/01(2006.01)
(56)对比文件
US 2006204511 A1,2006.09.14
审查员 杨清芬

权利要求书2页 说明书18页

(54)发明名称

病毒稳定剂、病毒稳定剂用明胶水解物以及含病毒的组合物

(57)摘要

本发明的病毒稳定剂由明胶水解物和水性介质构成,所述病毒稳定剂包含1质量%以上且20质量%以下的所述明胶水解物,所述明胶水解物的重均分子量为10000以下,所述明胶水解物的等电点的pH为4.0以上且7.0以下。

CN 115836123 B

1.一种病毒稳定剂,其中,

所述病毒稳定剂由明胶水解物和水性介质构成,

所述病毒稳定剂包含1质量%以上且20质量%以下的所述明胶水解物,

所述明胶水解物的重均分子量为10000以下,

所述明胶水解物的等电点的pH为4.0以上且低于7.0。

2.根据权利要求1所述的病毒稳定剂,其中,

所述明胶水解物的重均分子量为6000以下。

3.根据权利要求1或2所述的病毒稳定剂,其中,

所述明胶水解物为碱处理明胶的水解物。

4.根据权利要求1或2所述的病毒稳定剂,其中,

所述病毒稳定剂包含超过2质量%且10质量%以下的所述明胶水解物。

5.根据权利要求1或2所述的病毒稳定剂,其中,

所述水性介质包含具有缓冲作用的盐。

6.根据权利要求1或2所述的病毒稳定剂,其中,

所述水性介质包含选自由蔗糖、乳糖、山梨糖醇、肌醇、海藻糖、甘露醇、麦芽糖醇、木糖醇、赤藓糖醇以及甘油构成的组中的至少一种。

7.根据权利要求1或2所述的病毒稳定剂,其中,

所述水性介质包含选自由甲硫氨酸、精氨酸、色氨酸、谷氨酰胺以及谷氨酸构成的组中的至少一种氨基酸。

8.一种病毒稳定剂用明胶水解物,其中,

所述病毒稳定剂用明胶水解物的重均分子量为6000以下,并且等电点的pH为4.0以上且低于7.0。

9.根据权利要求8所述的病毒稳定剂用明胶水解物,其中,

所述病毒稳定剂用明胶水解物为液体或粉体。

10.一种含病毒的组合物,其中,

所述含病毒的组合物包含如权利要求1至7中任一项所述的病毒稳定剂和病毒。

11.根据权利要求10所述的含病毒的组合物,其中,

所述病毒包含选自由具有囊膜的DNA病毒、不具有囊膜的DNA病毒、具有囊膜的RNA病毒以及不具有囊膜的RNA病毒构成的组中的至少一种。

12.根据权利要求10或11所述的含病毒的组合物,其中,

所述病毒被导入了基因。

13.根据权利要求10或11所述的含病毒的组合物,其中,

所述含病毒的组合物在25℃下保存了21天的情况下的病毒滴度的对数下降值与在-80℃下保存了21天的情况下的病毒滴度的对数下降值之差为1.5log以下。

14.根据权利要求10或11所述的含病毒的组合物,其中,

所述含病毒的组合物在4℃下保存了210天的情况下的病毒滴度的对数下降值与在-80℃下保存了210天的情况下的病毒滴度的对数下降值之差为1.0log以下。

15.根据权利要求10或11所述的含病毒的组合物,其中,

所述含病毒的组合物的反复进行了三次冻结解冻的情况下病毒滴度的对数下降值为

0.3log以下。

病毒稳定剂、病毒稳定剂用明胶水解物以及含病毒的组合物

技术领域

[0001] 本发明涉及一种病毒稳定剂、病毒稳定剂用明胶水解物以及含病毒的组合物。

背景技术

[0002] 就病毒的保存和运输而言,为了维持感染力等病毒的能力,或为了防止这些能力的降低,通常需要－80～－60℃的环境。或者,在室温下保存和运输病毒的情况下,需要将包含病毒的制剂制成冷冻干燥品。如此,已知病毒的保存和运输一直以来就很复杂。相对于此,日本特开2013－035861号公报(专利文献1)公开了在冷藏温度(例如2～8℃)下具有稳定性的冰箱稳定型流感病毒组合物。

[0003] 现有技术文献

[0004] 专利文献

[0005] 专利文献1:日本特开2013－035861号公报

发明内容

[0006] 发明所要解决的问题

[0007] 上述专利文献1公开了如下事实:通过包含0.5～2%明胶水解物等的组合物,实现了流感病毒株在冷藏温度下的稳定保存和运输。然而,上述专利文献1中,对于是否能在25℃左右的室温下实现上述病毒株的稳定保存和运输,没有公开。根据上述专利文献1,推定:由于从等电点为9附近的猪A型明胶得到了上述明胶水解物,该明胶水解物与病毒表面的特定的蛋白质强烈地相互作用,从而在室温下的稳定保存和运输变得困难。而且,已知:为了将在－80～－60℃的环境下保存的包含病毒的制剂等供于使用而通过加热使其进行溶胶化,返回至冷藏温度(2～8℃)或室温的情况下,无法避免感染力等病毒能力的降低。因此,无需复杂的操作、并且在冷藏温度(2～8℃)和25℃左右的室温这两者下能够在不降低感染力等病毒能力的情况下保存和运输包含病毒的制剂等的材料尚未实现,期待其开发。

[0008] 鉴于以上的情况,本发明的目的在于提供一种病毒稳定剂、病毒稳定剂用明胶水解物以及含病毒的组合物,所述病毒稳定剂通过在冷藏温度(2～8℃)和25℃左右的室温这两者下抑制病毒的能力的降低,从而能够在无需冷冻装置等的情况下保存和运输包含病毒的制剂等。

[0009] 用于解决问题的方案

[0010] 本发明人等进行了深入研究,结果是实现了本发明。即,首先注目于通过将等电点的pH为5附近的明胶以成为规定的重均分子量的方式水解而得到的明胶水解物。进一步,发现如下事实,从而完成了本发明:在以规定浓度包含所述明胶水解物的制剂中含有病毒的情况下,能在冷藏温度(2～8℃)和25℃左右的室温这两者下抑制感染力等病毒能力的降低,从而能在无需冷冻装置等的情况下稳定地保存和运输包含病毒的制剂等。

[0011] 本发明具有如下的特征。

[0012] 〔1〕本发明的病毒稳定剂由明胶水解物和水性介质构成,上述病毒稳定剂包含1质

量%以上且20质量%以下的上述明胶水解物,上述明胶水解物的重均分子量为10000以下,上述明胶水解物的等电点的pH为4.0以上且7.0以下。

[0013] 〔2〕优选的是,上述明胶水解物的重均分子量为6000以下。

[0014] 〔3〕优选的是,上述明胶水解物为碱处理明胶的水解物。

[0015] 〔4〕优选的是,上述病毒稳定剂包含超过2质量%且10质量%以下的上述明胶水解物。

[0016] 〔5〕优选的是,上述水性介质包含具有缓冲作用的盐。

[0017] 〔6〕优选的是,上述水性介质包含选自由蔗糖、乳糖、山梨糖醇、肌醇、海藻糖、甘露醇、麦芽糖醇、木糖醇、赤藓糖醇以及甘油构成的组中的至少一种糖类。

[0018] 〔7〕优选的是,上述水性介质包含选自由甲硫氨酸、精氨酸、色氨酸、谷氨酰胺以及谷氨酸构成的组中的至少一种氨基酸。

[0019] 〔8〕本发明的病毒稳定剂用明胶水解物的重均分子量为10000以下,并且等电点的pH为4.0以上且7.0以下。

[0020] 〔9〕优选的是,上述病毒稳定剂用明胶水解物为液体或粉体。

[0021] 〔10〕本发明的含病毒的组合物包含上述病毒稳定剂和病毒。

[0022] 〔11〕优选的是,上述病毒包含选自由具有囊膜的DNA病毒、不具有囊膜的DNA病毒、具有囊膜的RNA病毒以及不具有囊膜的RNA病毒构成的组中的至少一种。

[0023] 〔12〕优选的是,上述病毒被导入了基因。

[0024] 〔13〕优选的是,上述含病毒的组合物在25℃下保存了21天的情况下的病毒滴度的对数下降值与在－80℃下保存了21天的情况下的病毒滴度的对数下降值之差为1.5log以下。

[0025] 〔14〕优选的是,上述含病毒的组合物在4℃下保存了210天的情况下的病毒滴度的对数下降值与在－80℃下保存了210天的情况的病毒滴度的对数下降值之差为1.0log以下。

[0026] 〔15〕优选的是,上述含病毒的组合物的反复进行了三次冻结解冻的情况的病毒滴度的对数下降值为0.3log以下。

[0027] 发明效果

[0028] 根据上述内容,能提供如下病毒稳定剂、病毒稳定剂用明胶水解物以及含病毒的组合物,所述病毒稳定剂通过在冷藏温度(2～8℃)和25℃左右的室温这两者下抑制病毒能力的降低,能够在无需冷冻装置等的情况下保存和运输包含病毒的制剂等。

具体实施方式

[0029] 以下,对本发明的实施方式(以下,也记为“本实施方式”)进一步详细地进行说明。在此,在本说明书中,“A～B”这样形式的表述是指范围的上限下限(即A以上且B以下),在A中没有单位的记载、仅在B中记载有单位的情况下,A的单位与B的单位相同。在本说明书中,“病毒滴度”是指检体(在本说明书中为“含病毒的组合物”)中的病毒能够感染细胞的最低浓度、即最高的稀释倍率。而且,病毒滴度“降低”是指上述稀释倍率降低,是指能够感染的上述最低浓度上升。在本说明书中,关于“明胶”的术语,有时分别用于说明物质名、明胶凝胶以及明胶溶液的情况。此外,关于“明胶水解物”的术语,也与上述明胶同样地,有时用于

说明明胶水解物的溶液的情况。

[0030] 〔病毒稳定剂〕

[0031] 本实施方式的病毒稳定剂是由明胶水解物和水性介质构成的病毒稳定剂。上述病毒稳定剂包含1质量%以上且20质量%以下的上述明胶水解物。而且,上述明胶水解物的重均分子量为10000以下。上述明胶水解物的等电点的pH为4.0以上且7.0以下。通过具备这样的特征,本实施方式的病毒稳定剂能在冷藏温度(2~8℃)和25℃左右的室温这两者下抑制病毒滴度的降低,从而在构成包含病毒稳定剂和病毒的含病毒的组合物的情况下,能在无需冷冻装置等的情况下稳定地保存和运输该含病毒的组合物。

[0032] <明胶水解物>

[0033] 上述病毒稳定剂如上所述包含明胶水解物。在本说明书中,“明胶水解物”是指通过将明胶和胶原蛋白这两者或任一者水解而得到的肽的集合体(水解物)。即“明胶水解物”是指与通常被称为胶原蛋白肽或胶原蛋白水解物的肽的集合体等同的物质。其中,本实施方式的病毒稳定剂中所含的明胶水解物具有如上所述的重均分子量和等电点的pH。而且,明胶水解物是指如上所述的肽的集合体,因此在构成肽链的氨基酸序列中,具有与胶原蛋白和明胶相同的特征,该特征是指具有甘氨酸按每三个残基进行重复的一次结构等。

[0034] 在本说明书中,“明胶”是指胶原蛋白的三螺旋结构通过热改性、酸改性等而解开的多肽、其化学修饰体及其药学上允许的盐。具体而言,可以通过对源自选自由以下的第一组~第六组构成的组中的至少一种的胶原蛋白实施脱脂处理、脱灰处理、酸或碱处理、热水萃取处理等以往公知的处理而得到。明胶可以是通过使用微生物的发酵法得到的多肽、通过化学合成或基因重组操作得到的重组多肽或合成的多肽。此外,“胶原蛋白”是指分类为以下的第一组~第六组的脊椎动物的皮肤等中的源自细胞外基质的蛋白质。胶原蛋白具有由三根肽链构成的右旋的螺旋结构,构成该肽链的氨基酸残基具有甘氨酸残基按每三个残基进行重复的一次结构(所谓胶原蛋白样序列)。

[0035] 第一组:由牛的皮、皮肤、骨、软骨以及腱构成的组。

[0036] 第二组:由猪的皮、皮肤、骨、软骨以及腱构成的组。

[0037] 第三组:由羊的皮、皮肤、骨、软骨以及腱构成的组。

[0038] 第四组:由鸡的皮、皮肤、骨、软骨以及腱构成的组。

[0039] 第五组:由鸵鸟的皮、皮肤、骨、软骨以及腱构成的组。

[0040] 第六组:由鱼的骨、皮以及鳞构成的组。

[0041] 在此,上述多肽(明胶)的“化学修饰体”是指对构成明胶的氨基酸残基中的氨基、羧基、羟基或硫醇基等进行化学修饰而得到的多肽。受到化学修饰的明胶可以改变在水中的溶解性、等电点等。具体而言,可以对明胶中的羟基脯氨酸残基的羟基实施O-乙酰化等化学修饰。可以对明胶中的甘氨酸残基的α-羧基实施酯化、酰胺化等化学修饰。可以对明胶中的脯氨酸残基的α-氨基实施多肽化、琥珀酰化、马来酰化、乙酰化、脱氨基化、苯甲酰化、烷基磺酰化、烯丙基磺酰化、二硝基苯基化、三硝基苯基化、氨基甲酰化、苯基氨基甲酰化、硫醇化等化学修饰。

[0042] 明胶的化学修饰的具体的方法和处理条件可以应用以往公知的化学修饰方法。关于羟基脯氨酸残基的羟基的化学修饰,可以通过在水溶剂中或非水溶剂中使乙酸酐作用等来实施例如O-乙酰化。关于甘氨酸残基的α-羧基的化学修饰,可以通过在甲醇中悬浮后

通入干燥氯化氢气体等来实施例如酯化。关于甘氨酸残基的α－羧基的化学修饰,可以通过使碳二亚胺等作用来实施酰胺化。

[0043] 而且,在上述多肽(明胶)的“衍生物”中,有时包含在明胶中导入官能团而得到的明胶衍生物、以及明胶与乳酸、乙醇酸等的共聚物、明胶与聚乙二醇、丙二醇的共聚物等。作为明胶衍生物,可举例示出:对明胶导入了胍基、硫醇基、氨基、羧基、硫酸基、磷酸基、烷基、酰基、苯基、苄基等官能团的衍生物。

[0044] 上述多肽(明胶)的“药学上允许的盐”是指药学上允许且具有作为原料的多肽(明胶)的所期望的活性(例如凝胶化能力)的盐。作为药学上允许的盐,例如可举例示出盐酸盐、硫酸盐、磷酸盐以及氢溴酸盐等无机酸盐、乙酸盐、甲磺酸盐、苯磺酸盐、对甲苯磺酸盐、琥珀酸盐、草酸盐、富马酸盐以及马来酸盐等有机酸盐、钠盐、钾盐以及钙盐等无机碱盐、三乙基铵盐等有机碱盐等。可以按照常规方法将明胶中的特定的肽制成药学上允许的盐。

[0045] 明胶是源自许多生物所保有的胶原蛋白的多肽,因此生物相容性优异。因此,通过将上述胶原蛋白和明胶水解而得到的明胶水解物也生物相容性优异,适合作为医药用途的病毒稳定剂的一种成分。

[0046] 明胶水解物在溶解于溶剂(例如水)的情况下,在25℃左右的室温下自不必说,在2～8℃的环境下也不会凝胶化,维持溶胶的状态。因此,上述病毒稳定剂在25℃左右的室温下使用时无需用于溶胶化的加热操作。在本实施方式中,“溶胶”是指在由分散质和分散介质构成的分散系中,分散介质为液体状的分散系。“凝胶”是指在由分散质和分散介质构成的分散系中,分散质形成交联结构,作为分散系整体失去流动性的状态。

[0047] 明胶水解物如上所述通过将明胶和胶原蛋白这两者或任一者水解而得到。该情况的“水解”中,使用酸的水解、使用碱的水解、使用酶的水解以及使用热的水解均包括在内。从防止杂质的污染的观点考虑,明胶水解物优选通过使用热的水解得到。而且,在使用酶将明胶和胶原蛋白这两者或任一者水解的情况下,作为上述酶,例如可列举出:胶原酶、硫醇蛋白酶、丝氨酸蛋白酶、酸性蛋白酶、碱性蛋白酶、金属蛋白酶等。就上述酶而言,可以单独使用或组合使用多种这些酶。作为上述硫醇蛋白酶,可列举出源自植物的木瓜凝乳蛋白酶、木瓜蛋白酶、菠萝蛋白酶、无花果蛋白酶、源自动物的组织蛋白酶、钙依赖性蛋白酶等。作为上述丝氨酸蛋白酶,可列举出胰蛋白酶、组织蛋白酶D等。作为上述酸性蛋白酶,可列举出胃蛋白酶、胰凝乳蛋白酶等。

[0048] 作为使用的酶,若考虑将明胶水解物用于医药,则优选使用除了源自病原性微生物的酶以外的酶(例如源自非病原性微生物的酶)。作为上述酶所源自的非病原性微生物,可列举出地衣芽孢杆菌(Bacillus Iicheniforms)、枯草芽孢杆菌(Bacillus subtillis)、米曲霉(Aspergillus oryzae)、链霉菌(Streptomyces)、解淀粉芽胞杆菌(Bacillus amyloliquefaciens)等。上述酶可以使用一种源自上述非病原性微生物的酶,也可以组合使用多种源自上述非病原性微生物的酶。酶处理的具体方法使用以往已知的方法即可。

[0049] 需要说明的是,在通过单独使用一种酶的水解从上述明胶得到“明胶水解物”的情况下,该酶优选不是胶原酶。这是因为在单独利用胶原酶对上述明胶进行水解的情况下,氨基酸序列的N末端为甘氨酸的特定肽可能会成为主成分(超过50质量%)。上述明胶水解物是由两种以上的肽构成的集合体,但在其组成中,上述的特定肽小于50质量%。

[0050] 明胶水解物可以通过利用上述方法将明胶和胶原蛋白这两者或任一者水解后进

行纯化而以液体的形式得到。而且,也可以通过利用公知的方法对上述液体进行加热干燥或冷冻干燥而以粉体的形成得到。

[0051] (浓度)

[0052] 病毒稳定剂包含1质量%以上且20质量%以下的上述明胶水解物。在病毒稳定剂中所含的上述明胶水解物的浓度小于1质量%的情况下,在构成了包含该病毒稳定剂和病毒的含病毒的组合物时,抑制病毒滴度的降低的作用极少,因此难以发挥所期望的效果。在病毒稳定剂中所含的上述明胶水解物的浓度超过20质量%的情况下,该病毒稳定剂的操作性可能会变差。从更加抑制病毒滴度的降低的观点考虑,病毒稳定剂优选包含超过2质量%且10质量%以下的上述明胶水解物。病毒稳定剂中的上述明胶水解物的浓度可以通过羟基脯氨酸定量等公知的方法进行测定。

[0053] (重均分子量)

[0054] 上述明胶水解物的重均分子量为10000以下。上述明胶水解物的重均分子量优选为6000以下。上述明胶水解物的重均分子量进一步优选为5000以下。由此,病毒稳定剂能在2~30℃左右的环境下维持溶胶状态。而且,在构成了包含病毒稳定剂和病毒的含病毒的组合物的情况下,在上述组合物中,明胶水解物能抑制病毒凝聚,从而能抑制病毒滴度的降低。这是因为虽然详细的机理不明,但推定为:明胶水解物在重均分子量为上述的范围的情况下,分子中的亲水性区域和疏水性区域这两者在分子表面侧(外侧)露出,能够与有无囊膜无关地与病毒的表面进行适度的强度的相互作用,因此能够通过被覆病毒的表面来保护明胶水解物。

[0055] 在上述明胶水解物的重均分子量超过10000的情况下,可能会在2~8℃下进行凝胶化。明胶水解物的重均分子量的下限没有特别限制,例如为甘氨酸的分子量即75。

[0056] 上述明胶水解物的重均分子量可以通过在以下的测定条件下实施凝胶过滤色谱来求出。

[0057] 设备:高效液相色谱(HPLC)(东曹株式会社制)。

[0058] 色谱柱:TSKGel(注册商标)G2000SW_{XL}。

[0059] 色谱柱温度:30℃。

[0060] 洗脱液:40质量%乙腈(包含0.05质量%TFA)。

[0061] 流速:0.5mL/min。

[0062] 注入量:10μL。

[0063] 检测:UV220nm。

[0064] 分子量标记:使用以下的三种。

[0065] 细胞色素C(Cytochrom C)Mw:12384。

[0066] 抑肽酶(Aprotinin)Mw:6512。

[0067] 杆菌肽(Bacitracin)Mw:1423。

[0068] 具体而言,将包含上述明胶水解物的相当于0.5g的病毒稳定剂添加到约100ml的蒸馏水中,进行搅拌后,使用0.2μm过滤器进行过滤,由此制备测定重均分子量的试样(被测定物)。通过基于上述凝胶过滤色谱的条件测定该被测定物,能求出上述明胶水解物的重均分子量。

[0069] (等电点)

[0070] 上述明胶水解物的等电点的pH为4.0以上且7.0以下。上述明胶水解物的等电点的pH优选为4.0～5.5,更优选为pH4.0以上且4.8以下。具有这样的范围的等电点的pH的明胶水解物可以通过将实施了碱处理的胶原蛋白水解、或者将由实施了碱处理的胶原蛋白得到的明胶(所谓碱处理明胶)水解来高效地得到。即,上述明胶水解物优选为碱处理明胶的水解物。尤其优选的是,上述明胶水解物为等电点为pH4.8～5.5左右的碱处理明胶的水解物。通常,将通过使用无机酸对胶原蛋白进行处理而得到的明胶称为酸处理明胶,将通过使用无机碱对胶原蛋白进行处理而得到的明胶称为碱处理明胶。碱处理明胶具体而言可以通过使用氢氧化钠、氢氧化钙或氢氧化钾等无机碱对胶原蛋白进行处理来得到。酸处理明胶的等电点的pH为8～9。相对于此,碱处理明胶的等电点的pH为4.0～7.0。作为这样的碱处理明胶,例如可举例示出源自猪皮的碱处理明胶(商品名:“beMatrix(注册商标)明胶LS—H”,新田明胶株式会社制)。

[0071] 在由包含具有上述范围的等电点的pH的明胶水解物的病毒稳定剂和病毒构成了含病毒的组合物的情况下,在上述组合物中,明胶水解物能抑制病毒凝聚,从而能抑制病毒滴度的降低。虽然详细的机理不明,但就具有这样的范围的等电点的pH的明胶水解物而言,在分子内负电荷相对于正电荷存在得多,因此作为整体显示负电荷,但具有显示正电荷的部位和显示负电荷的部位这两者。因此,明胶水解物通过在显示正电荷的部位与病毒中显示负电荷的衣壳蛋白(capsid protein)、刺突蛋白(spike protein)以及病毒表面的囊膜蛋白(envelope protein)等之间呈现弱的静电相互作用,能与病毒结合。另一方面,明胶水解物在显示负电荷的部位与构成病毒和明胶水解物的其他肽链相互排斥。据以上,推定为:就明胶水解物而言,能通过抑制病毒的凝聚并且被覆病毒的表面来保护该明胶水解物。另一方面,由等电点的pH为9附近的酸处理明胶得到的明胶水解物(例如上述专利文献1中公开的明胶水解物)具有正电荷,因此与显示负电荷的衣壳蛋白等强烈地显示静电相互作用,从而可能会使病毒凝聚。推定为:由酸处理明胶得到的明胶水解物特别是在25℃左右的温度环境下,使病毒凝聚的作用显著地显现。

[0072] 明胶水解物的等电点的pH可以通过使用以往公知的方法测定作为明胶水解物的原料的明胶和胶原蛋白这两者或任一者的等电点的pH来求出,但使用以下的以Zeta电位为指标的等电点的测定方法可以更准确地求出等电点的值,因此优选。即,首先将作为测定对象的明胶水解物溶解于乙酸缓冲液(pH4.0～5.5),得到0.4w/v%的被测定溶液。接着,利用0.22μm的过滤器(Merck公司制)过滤该被测定溶液,之后,以气泡不进入的方式将被测定溶液0.8mL填充至毛细管样品池(capillary cell)中。接着,将填充有上述被测定溶液的该毛细管样品池置于Zeta电位测定装置(Malvern Panalytical公司制),测定25℃的各pH下的Zeta电位。此时,可以求出Zeta电位为0的pH值作为被测定溶液(作为测定对象的明胶水解物)的等电点。

[0073] ＜水性介质＞

[0074] 病毒稳定剂如上所述包含水性介质。在本说明书中,“水性介质”是指使明胶水解物溶解或分散的介质,是指能够包含后述的氨基酸、糖类以及具有缓冲作用的盐等水以外的成分的介质。例如,水性介质有时为包含具有缓冲作用的盐的缓冲液。具体而言,水性介质有时为GTS缓冲液。即,上述水性介质优选包含具有缓冲作用的盐。由此,病毒稳定剂在通过包含病毒而构成了含病毒的组合物的情况下,通过上述缓冲作用能有助于病毒的稳定

化。

[0075] (具有缓冲作用的盐)

[0076] 作为具有缓冲作用的盐,可举例示出:磷酸钠、磷酸钾、磷酸钙、磷酸镁、磷酸氢钠、磷酸氢钾、磷酸氢钙、磷酸氢镁、氯化钠、氯化钾等。水性介质可以单独包含一种上述具有缓冲作用的盐,可以组合包含两种以上。作为包含上述具有缓冲作用的盐的水性介质,可举例示出上述GTS缓冲液、PBS缓冲液、Tris缓冲液、HEPES缓冲液、柠檬酸缓冲液等。作为GTS缓冲液的组成,例如可以采用2.5质量%甘油、20mM Tris pH8、25mM NaCl。

[0077] (氨基酸)

[0078] 水性介质优选包含选自由甲硫氨酸、精氨酸、色氨酸、谷氨酰胺以及谷氨酸构成的组中的至少一种氨基酸。水性介质可以单独包含选自这些氨基酸的组中的一种氨基酸,也可以组合包含两种以上。水性介质更优选包含甲硫氨酸、精氨酸中的两者或任一氨基酸。由此,病毒稳定剂在通过包含病毒而构成含病毒的组合物的情况下,能有助于病毒的稳定化。

[0079] (糖类)

[0080] 上述水性介质优选包含选自由蔗糖、乳糖、山梨糖醇、肌醇、海藻糖、甘露醇、麦芽糖醇、木糖醇、赤藓糖醇以及甘油构成的组中的至少一种糖类。水性介质可以单独包含选自这些组中的一种糖类,也可以组合包含两种以上。水性介质更优选至少包含蔗糖、乳糖或山梨糖醇中的任意。由此,病毒稳定剂在通过包含病毒而构成了含病毒的组合物的情况下,能有助于病毒的稳定化。在本说明书中,作为“糖类”中所含的化合物,不仅包含通常被分类为糖类的有机化合物,还包含被分类为糖醇的有机化合物。上述的组的糖类中被分类为糖醇的有机化合物为上述山梨糖醇、甘露醇、麦芽糖醇、木糖醇、赤藓糖醇以及甘油。

[0081] (其他成分)

[0082] 只要能发挥本发明的效果,水性介质也可以包含其他成分。作为其他成分,例如可列举出:生长因子、分化因子、激素、趋化因子(chemokine)、细胞因子、细胞粘接分子、趋化因子(chemotactic factor)、酶、酶抑制剂、辅酶(维生素类)、矿物、脂肪、脂质、稳定剂以及保存剂等。

[0083] <作用效果>

[0084] 本实施方式的病毒稳定剂,如上所述,由水性介质和以1质量%以上且20质量%以下的浓度包含的明胶水解物构成。明胶水解物的重均分子量为10000以下,并且等电点的pH为4.0以上且7.0以下。在本实施方式的病毒稳定剂通过包含病毒而构成了后述的含病毒的组合物的情况下,能抑制病毒在该含病毒的组合物中凝聚,能防止对病毒的感染力等造成不良影响。从而能抑制病毒滴度的降低,因此能在冷藏温度(2~8℃)和25℃左右的室温这两者下稳定地保存和运输该含病毒的组合物。

[0085] 〔病毒稳定剂用明胶水解物〕

[0086] 本实施方式的病毒稳定剂用明胶水解物的重均分子量为10000以下,并且等电点的pH为4.0以上且7.0以下。上述病毒稳定剂用明胶水解物的重均分子量为6000以下,或者等电点的pH优选为4.0~5.5。具体而言,关于病毒稳定剂用明胶水解物,作为明胶水解物,具有<明胶水解物>这一部分中所说明的特征,因此不反复进行重复的说明。作为明胶水解物的以往并未公知的属性、即未知的属性,在通过包含病毒而构成了后述的含病毒的组合物的情况下,病毒稳定剂用明胶水解物具备抑制病毒在该含病毒的组合物中凝聚的作

用。从而病毒稳定剂用明胶水解物能供于病毒稳定剂的用途,能在冷藏温度(2～8℃)和25℃左右的室温这两者下在无需冷冻装置等的情况下稳定地保存和运输上述含病毒的组合物。

[0087] 上述病毒稳定剂用明胶水解物优选为液体或粉体。由此,在病毒稳定剂用明胶水解物为液体的情况下,通过与水性介质一并添加病毒,能容易地制备含病毒的组合物。在病毒稳定剂用明胶水解物为粉体的情况下,通过使病毒溶解或分散在水性介质中来制备病毒稳定剂,并能向其中添加病毒而容易地制备含病毒的组合物。病毒稳定剂用明胶水解物可以通过将明胶和胶原蛋白这两者或任一者水解后进行纯化而制备成液体。病毒稳定剂用明胶水解物可以通过利用公知的方法对如上所述制备的病毒稳定剂用明胶水解物的液体进行加热干燥或冷冻干燥而制备成粉体。

[0088] 〔含病毒的组合物〕

[0089] 本实施方式的含病毒的组合物包含上述病毒稳定剂和病毒。含病毒的组合物通过包含病毒稳定剂,能抑制病毒在上述组合物中凝聚,因此能抑制病毒滴度的降低。从而能在冷藏温度(2～8℃)和25℃左右的室温这两者下在无需冷冻装置等的情况下稳定地保存和运输该含病毒的组合物。在此,含病毒的组合物中所含的病毒稳定剂具体而言具有〔病毒稳定剂〕这一部分中所说明的特征,因此不反复进行重复的说明。

[0090] ＜病毒＞

[0091] 含病毒的组合物如上所述包含病毒。上述病毒优选包含选自由具有囊膜的DNA病毒、不具有囊膜的DNA病毒、具有囊膜的RNA病毒以及不具有囊膜的RNA病毒构成的组中的至少一种。即,构成含病毒的组合物的病毒根据其种类来使用,不受限制。进一步,含病毒的组合物可以单独包含选自上述的组中的一种病毒,也可以组合包含两种以上的病毒。即使在这样的情况下,含病毒的组合物通过包含病毒稳定剂,能在冷藏温度(2～8℃)和25℃左右的室温这两者下稳定地保存和运输该病毒。

[0092] 具体而言,上述病毒可举例示出:流感病毒、轮状病毒等用作活疫苗或灭活疫苗的病毒、具有溶解肿瘤的作用的溶瘤病毒、单纯疱疹病毒、痘苗病毒、腺病毒、柯萨奇病毒、痘病毒、副粘病毒、小核糖核酸病毒、弹状病毒(Rhabdoviruses)、呼肠孤病毒、细小病毒(Parvoviruses)、Brackenviruses、粘病毒、逆转录酶病毒等。进而,上述病毒可以被导入基因。

[0093] ＜其他成分＞

[0094] 只要能发挥本发明的效果,含病毒的组合物也可以包含其他成分。作为其他成分,例如可列举出:生长因子、分化因子、激素、趋化因子(chemokine)、细胞因子、细胞粘接分子、趋化因子(chemotactic factor)、酶、酶抑制剂、辅酶(维生素类)、矿物、脂肪、脂质、稳定剂以及保存剂等。

[0095] ＜病毒滴度的对数下降值(LRV)＞

[0096] 含病毒的组合物在25℃下保存了21天的情况下的病毒滴度的对数下降值(以下也记为“LRV”)与在－80℃下保存了21天的情况下的病毒滴度的LRV之差优选为1.5log以下。上述差更优选为1.0log以下。就含病毒的组合物而言,上述差的下限值优选为0。

[0097] 含病毒的组合物在4℃下保存了210天的情况下的病毒滴度的LRV与在－80℃下保存了210天的情况下的病毒滴度的LRV之差优选为1.0log以下。上述差更优选为0.5log以

下。就含病毒的组合物而言,上述差的下限值优选为0。

[0098] 在具备如上所述的与病毒滴度的LRV相关的特征的情况下,含病毒的组合物会确保能在冷藏温度(2～8℃)和25℃左右的室温这两者下稳定地保存和运输病毒的能力。

[0099] 进而,含病毒的组合物在25℃下保存了21天的情况下的病毒滴度的LRV与在－80℃下保存了21天的情况下的病毒滴度的LRV之差也优选为1.5log以下,并且在4℃下保存了21天的情况下的病毒滴度的LRV与在－80℃下保存了21天的情况下的病毒滴度的LRV之差也优选为1.0log以下。

[0100] 上述含病毒的组合物的重复三次冻结解冻的情况下的病毒滴度的对数下降值优选为0.3log以下。由此,上述含病毒的组合物即使在重复进行三次冻结解冻的情况下,也能维持病毒滴度。从而能灵活地使用含病毒的组合物,因此极为方便。

[0101] (病毒滴度的对数下降值(LRV)的测定方法)

[0102] 在含病毒的组合物中,病毒滴度的LRV可以使用测定病毒滴度的现有方法来求出,例如可以通过求出含病毒的组合物中的病毒的TCID50而得到。“TCID50”是指在预先培养细胞并附着的试验管或96孔平底板等培养皿上接种病毒稀释液(在本说明书中为“含病毒的组合物”的稀释液)的情况下,确认到50％的感染的病毒的稀释度。上述感染例如可以以细胞改性效果(CPE)为指标通过显微镜进行确认。病毒滴度的LRV能基于依照Beherens－Karber法的计算式的TCID50来计算出。

[0103] 病毒滴度的LRV的测定方法可以如下所述。具体而言,首先在保存规定期间后的含病毒的组合物的稀释中,可以使用DMEM培养基作为稀释液。细胞培养可以通过将规定的细胞悬浮液100μL/well(约10^4个/well)散布于96孔平底板(TPP公司制),利用37℃的CO_2恒温箱(CO_2浓度5％)培育一晚来进行。

[0104] 之后,利用DMEM培养基将含病毒的组合物梯度稀释10倍。稀释后的病毒以50μL/孔添加至96孔平底板内的规定细胞(与含病毒的组合物中所含的病毒种类对应的各种细胞(例如LCC－MK2细胞、MDBK细胞、HEK293细胞等))中,在37℃的CO_2恒温箱(CO_2浓度5％)中培养,在第七天以CPE为指标,并且能依照上述计算式求出病毒滴度(TCID50),基于该TCID50的值计算出LRV。

[0105] 此外,在含病毒的组合物中所含的病毒种类为rNDV－GFP的情况下,能如下计算出病毒滴度的LRV。即,将稀释后的上述病毒以50μL/孔添加至24孔平底板内的Vero细胞中,在37℃的CO_2恒温箱(CO_2浓度5％)中培养24～48小时,利用0.25质量％胰蛋白酶EDTA(SIGMA-ALDRICH公司制)回收上述细胞。之后,利用DMEM培养基和PBS清洗。进而,使上述细胞悬浮于含有0.5质量％福尔马林的PBS中,利用FCM分析或者荧光显微镜来计算感染细胞数,并且依照上述计算式求出病毒滴度(FFU/mL)。之后,可以基于该病毒滴度(FFU/mL)计算出LRV。

[0106] ＜病毒稳定剂的制备方法＞

[0107] 本实施方式的病毒稳定剂优选可以通过以下的方法得到。即,可以通过经过制备明胶水解物的工序(第一工序)和制备由上述明胶水解物和水性介质构成的病毒稳定剂的工序(第二工序)来得到病毒稳定剂。

[0108] (第一工序)

[0109] 第一工序是制备明胶水解物的工序。如上所述,明胶水解物可以通过如下方式来制备:将等电点的pH为4.0以上且7.0以下的明胶、或通过碱处理而使等电点的pH为4.0以上

且7.0以下的胶原蛋白这两者或任一者以重均分子量为10000以下的方式进行水解。作为等电点的pH为4.0以上且7.0以下的明胶,优选使用碱处理明胶。进而,也可以利用市售品(例如商品名:“beMatrix(注册商标)明胶LS—H”,新田明胶株式会社制)来准备明胶水解物。

[0110] (第二工序)

[0111] 第二工序是由上述明胶水解物和水性介质制备病毒稳定剂的工序。病毒稳定剂可以通过如下方式来制备:以上述明胶水解物的浓度为1质量%以上且20质量%以下的质量比率混合上述明胶水解物和上述水性介质。具体的混合方法可以使用以往公知的方法。关于水性介质,也可以通过将具有缓冲作用的盐以成为规定的浓度的方式添加至离子交换水中等以往公知的方法来制备。

[0112] <含病毒的组合物的制备方法>

[0113] 含病毒的组合物的制备可以通过将病毒添加至上述病毒稳定剂中来进行。病毒可以利用以往公知的方法添加至上述病毒稳定剂中。病毒通常可以以病毒滴度(TCID50)最终成为10^5/mL以上的方式添加至上述病毒稳定剂中。综上所述,可以得到本实施方式的含病毒的组合物。

[0114] 实施例

[0115] 以下,列举实施例对本发明更详细地进行说明,但本发明并不限定于这些实施例。

[0116] 〔试样的准备〕

[0117] 如下所述地准备后述的各种实验(实验1~实验6)中使用的含病毒的组合物的各试样(试样1~试样17)。试样1~试样4、试样9~试样12以及试样14~试样17为实施例,试样5~试样8和试样13为比较例。

[0118] <试样1>

[0119] 利用热将等电点的pH为5的源自猪皮的碱处理明胶“beMatrix(注册商标)明胶LS—H(新田明胶株式会社制)”以重均分子量为3800的方式水解,由此得到了明胶水解物。接着,将上述明胶水解物以包含5质量%的方式溶解于作为水性介质的GTS缓冲液中,由此得到了病毒稳定剂。在上述病毒稳定剂中将作为具有囊膜的DNA病毒的牛疱疹病毒(BHV—1)以TCID50成为$2\times10^{8.1}$/mL的方式添加,由此得到了含病毒的组合物。进而,将上述含病毒的组合物分成七个检体,分别在4℃下保存了21天、56天以及210天,在25℃下保存了21天,以及在—80℃下保存了21天、56天以及210天。

[0120] <试样2>

[0121] 利用热将等电点的pH为5的源自猪皮的碱处理明胶“beMatrix(注册商标)明胶LS—H(新田明胶株式会社制)”以重均分子量为650的方式水解,由此得到了明胶水解物。接着,将上述明胶水解物以包含5质量%的方式溶解于上述GTS缓冲液中,由此得到了病毒稳定剂。之后,通过与试样1相同的方法在上述病毒稳定剂中添加病毒,由此得到了含病毒的组合物。将上述含病毒的组合物分成四个检体,分别在4℃下保存了56天,在25℃下保存了21天,以及在—80℃下保存了21天和56天。

[0122] <试样3>

[0123] 利用热将等电点的pH为5的源自猪皮的碱处理明胶“beMatrix(注册商标)明胶LS—H(新田明胶株式会社制)”以重均分子量为1980的方式水解,由此得到了明胶水解物。接着,将上述明胶水解物以包含5质量%的方式溶解于上述GTS缓冲液中,由此得到了病毒

稳定剂。之后,通过与试样1相同的方法在上述病毒稳定剂中添加病毒,由此得到了含病毒的组合物。将上述含病毒的组合物分成四个检体,分别在4℃下保存了56天,在25℃下保存了21天,以及在－80℃下保存了21天和56天。

[0124] ＜试样4＞

[0125] 利用热将等电点的pH为5的源自猪皮的碱处理明胶“beMatrix(注册商标)明胶LS－H(新田明胶株式会社制)”以重均分子量为9890的方式水解,由此得到了明胶水解物。接着,将上述明胶水解物以包含5质量％的方式溶解于上述GTS缓冲液中,由此得到了病毒稳定剂。之后,通过与试样1相同的方法在上述病毒稳定剂中添加病毒,由此得到了含病毒的组合物。将上述含病毒的组合物分成四个检体,分别在4℃下保存了56天,在25℃下保存了21天,以及在－80℃下保存了21天和56天。

[0126] ＜试样5＞

[0127] 利用热将等电点的pH为5的源自猪皮的碱处理明胶“beMatrix(注册商标)明胶LS－H(新田明胶株式会社制)”以重均分子量为59800的方式水解,由此得到了明胶水解物。接着,将上述明胶水解物以包含5质量％的方式溶解于上述GTS缓冲液中,由此得到了病毒稳定剂。之后,通过与试样1相同的方法在上述病毒稳定剂中添加病毒,由此得到了含病毒的组合物。进而,将上述含病毒的组合物分成四个检体,分别在4℃下保存了56天,在25℃下保存了21天,以及在－80℃下保存了21天和56天。

[0128] ＜试样6＞

[0129] 利用热将等电点的pH为9的由源自猪皮的酸处理明胶得到的明胶水解物(新田明胶株式会社制)以重均分子量为2060的方式水解,由此得到了明胶水解物。接着,将上述明胶水解物以包含5质量％的方式溶解于上述GTS缓冲液中,由此得到了病毒稳定剂。之后,通过与试样1相同的方法在上述病毒稳定剂中添加病毒,由此得到了含病毒的组合物。将上述含病毒的组合物分成四个检体,分别在4℃下保存了56天,在25℃下保存了21天,以及在－80℃下保存了21天和56天。

[0130] ＜试样7＞

[0131] 利用热将等电点的pH为5的源自猪皮的碱处理明胶“beMatrix(注册商标)明胶LS－H(新田明胶株式会社制)”以重均分子量为3800的方式水解,由此得到了明胶水解物。接着,将上述明胶水解物以包含0.1质量％的方式溶解于上述GTS缓冲液中,由此得到了病毒稳定剂,除此以外,通过与试样1相同的方法得到了含病毒的组合物。将上述含病毒的组合物分成四个检体,分别在4℃下保存了56天,在25℃下保存了21天,以及在－80℃下保存了21天和56天。

[0132] ＜试样8＞

[0133] 利用热将等电点的pH为5的源自猪皮的碱处理明胶“beMatrix(注册商标)明胶LS－H(新田明胶株式会社制)”以重均分子量为3800的方式水解,由此得到了明胶水解物。接着,将上述明胶水解物以包含0.5质量％的方式溶解于上述GTS缓冲液中,由此得到了病毒稳定剂,除此以外,通过与试样1相同的方法得到了含病毒的组合物。将上述含病毒的组合物分成四个检体,分别在4℃下保存了56天,在25℃下保存了21天,以及在－80℃下保存了21天和56天。

[0134] ＜试样9＞

[0135] 利用热将等电点的pH为5的源自猪皮的碱处理明胶“beMatrix(注册商标)明胶LS－H(新田明胶株式会社制)”以重均分子量为3800的方式水解,由此得到了明胶水解物。接着,将上述明胶水解物以包含1质量%的方式溶解于上述GTS缓冲液中,由此得到了病毒稳定剂,除此以外,通过与试样1相同的方法得到了含病毒的组合物。将上述含病毒的组合物分成四个检体,分别在4℃下保存了56天,在25℃下保存了21天,以及在－80℃下保存了21天和56天。

[0136] ＜试样10＞

[0137] 利用热将等电点的pH为5的源自猪皮的碱处理明胶“beMatrix(注册商标)明胶LS－H(新田明胶株式会社制)”以重均分子量为3800的方式水解,由此得到了明胶水解物。接着,将上述明胶水解物以包含2.5质量%的方式溶解于上述GTS缓冲液中,由此得到了病毒稳定剂,除此以外,通过与试样1相同的方法得到了含病毒的组合物。将上述含病毒的组合物分成四个检体,分别在4℃下保存了56天,在25℃下保存了21天,以及在－80℃下保存了21天和56天。

[0138] ＜试样11＞

[0139] 利用热将等电点的pH为5的源自猪皮的碱处理明胶“beMatrix(注册商标)明胶LS－H(新田明胶株式会社制)”以重均分子量为3800的方式水解,由此得到了明胶水解物。接着,将上述明胶水解物以包含10质量%的方式溶解于上述GTS缓冲液中,由此得到了病毒稳定剂,除此以外,通过与试样1相同的方法得到了含病毒的组合物。将上述含病毒的组合物分成四个检体,分别在4℃下保存了56天,在25℃下保存了21天,以及在－80℃下保存了21天和56天。

[0140] ＜试样12＞

[0141] 利用热将等电点的pH为5的源自猪皮的碱处理明胶“beMatrix(注册商标)明胶LS－H(新田明胶株式会社制)”以重均分子量为3800的方式水解,由此得到了明胶水解物。接着,将上述明胶水解物以包含20质量%的方式溶解于上述GTS缓冲液中,由此得到了病毒稳定剂,除此以外,通过与试样1相同的方法得到了含病毒的组合物。将上述含病毒的组合物分成四个检体,分别在4℃下保存了56天,在25℃下保存了21天,以及在－80℃下保存了21天和56天。

[0142] ＜试样13＞

[0143] 将重组人白蛋白“Recombumin(注册商标)Elite(Albumedix公司制)”以包含1质量%的方式溶解于上述GTS缓冲液中,由此得到了病毒稳定剂。之后,通过与试样1相同的方法在上述病毒稳定剂中添加病毒,由此得到了含病毒的组合物。进而,将上述含病毒的组合物分成四个检体,分别在4℃下保存了56天,在25℃下保存了21天,以及在－80℃下保存了21天和56天。试样13为以往公知的病毒稳定剂。

[0144] ＜试样14＞

[0145] 在病毒稳定剂中将作为具有囊膜的RNA病毒的副流感病毒(PI－3)以TCID50成为$2\times10^{5.5}$/mL的方式添加,除此以外,通过与试样1相同的方法得到了含病毒的组合物。将上述含病毒的组合物分成七个检体,分别在4℃下保存了21天、56天以及210天,在25℃下保存了21天,以及在－80℃下保存了21天、56天以及210天。

[0146] ＜试样15＞

[0147] 在病毒稳定剂中将添加作为不具有囊膜的RNA病毒的呼肠孤病毒(Reo－3)以TCID50成为$2\times10^{6.5}$/mL的方式,除此以外,通过与试样1相同的方法得到了含病毒的组合物。将上述含病毒的组合物分成七个检体,分别在4℃下保存了21天、56天以及210天,在25℃下保存了21天,以及在－80℃下保存了21天、56天以及210天。

[0148] ＜试样16＞

[0149] 在病毒稳定剂中将作为不具有囊膜的DNA病毒的腺病毒(Ad5)以TCID50为2×10^{8}/mL的方式添加,除此以外,通过与试样1相同的方法得到了含病毒的组合物。将上述含病毒的组合物分成七个检体,分别在4℃下保存了21天、56天以及210天,在25℃下保存了21天,以及在－80℃下保存了21天、56天以及210天。

[0150] ＜试样17＞

[0151] 在病毒稳定剂中,将副粘病毒(新城疫病毒:rNDV－GFP)以FFU为4×10^{6}/mL包含的方式进行了添加,所述副粘病毒是将GFP进行基因导入了的溶瘤病毒,是具有囊膜的RNA病毒,除此以外,通过与试样1相同的方法得到了含病毒的组合物。将上述含病毒的组合物分成四个检体,分别在4℃下保存了56天,在25℃下保存了21天,以及在－80℃下保存了21天和56天。将试样1～试样17的一览示于表1。在此,试样1～试样4、试样9～试样12以及试样14～试样17的病毒稳定剂中所含的明胶水解物的等电点的pH表示通过上述的以Zeta电位为指标的等电点的测定方法来测定出的值。

[0152] [表1]

[0153] 表1

[0154]

	明胶水解物				缓冲液	病毒种类
	浓度(质量%)	重均分子量(Mw)	等电点	动物种类		
试样1	5	3800	4.7	猪	GTS	BHV-1
试样2	5	650	4.0	猪	GTS	BHV-1
试样3	5	1980	4.3	猪	GTS	BHV-1
试样4	5	9890	4.8	猪	GTS	BHV-1
试样5	5	59800	5.0	猪	GTS	BHV-1
试样6	5	2060	8.0	猪	GTS	BHV-1
试样7	0.1	3800	4.7	猪	GTS	BHV-1
试样8	0.5	3800	4.7	猪	GTS	BHV-1
试样9	1	3800	4.7	猪	GTS	BHV-1
试样10	2.5	3800	4.7	猪	GTS	BHV-1
试样11	10	3800	4.7	猪	GTS	BHV-1
试样12	20	3800	4.7	猪	GTS	BHV-1
试样13	1	-	-	重组人	GTS	BHV-1
试样14	5	3800	4.7	猪	GTS	PI-3
试样15	5	3800	4.7	猪	GTS	Reo-3
试样16	5	3800	4.7	猪	GTS	Ad5
试样17	5	3800	4.7	猪	GTS	rNDV-GFP

[0155] ※试样13中,由白蛋白和水性介质构成了病毒稳定剂。

[0156] 〔实验1:明胶水解物的适当的重均分子量的研究〕

[0157] 关于试样1、试样2、试样3、试样4以及试样5,分别求出在4℃下保存了56天和在25

℃下保存了21天的各检体的TCID50,基于该TCID50的值计算出4℃下的病毒滴度的LRV和25℃下的病毒滴度的LRV。进一步,关于试样1、试样2、试样3、试样4以及试样5,分别求出在－80℃下保存了21天和56天的各检体的TCID50,基于该TCID50的值计算出－80℃下的病毒滴度的LRV。基于这些,关于试样1、试样2、试样3、试样4以及试样5,计算出在25℃下保存了21天的各检体的病毒滴度的LRV与在－80℃下保存了21天的各检体的病毒滴度的LRV之差。将结果示于表2。进一步,在表3中,关于试样1、试样2、试样3以及试样4,示出计算在4℃下保存了56天的各检体的病毒滴度的LRV与在－80℃下保存了56天的各检体的病毒滴度的LRV之差而得的结果。

[0158] [表2]

[0159] 表2

[0160]

	明胶水解物的 重均分子量（Mw）	对数下降值（LRV） 25℃下的LRV与－80℃下的LRV之差（3W）
试样1	3800	0.7
试样2	650	0.7
试样3	1980	1
试样4	9890	0.9
试样5	59800	1.8

[0161] [表3]

[0162] 表3

[0163]

	明胶水解物的 重均分子量（Mw）	对数下降值（LRV） 4℃下的LRV与－80℃下的LRV之差（8W）
试样1	3800	0.3
试样2	650	0.4
试样3	1980	0.5
试样4	9890	0.5
试样5	59800	-

[0164] 根据上述表2和表3,试样1、试样2、试样3以及试样4各自的上述LRV之差为1.0log以下和1.5log以下,因此可以评价为能在4℃(冷藏温度)和25℃(室温)下稳定地保存和运输病毒。试样5中,通过凝胶化,上述LRV之差在25℃下超过1.5log。需要说明的是,对于试样5,出于凝胶化的理由而未进行4℃56天的评价。

[0165] 〔实验2:明胶水解物的适当的等电点的研究〕

[0166] 关于试样1、试样2、试样3、试样4以及试样6,分别求出在4℃下保存了56天和在25℃下保存了21天的各检体的TCID50,基于该TCID50的值计算出4℃下的病毒滴度的LRV、和25℃下的病毒滴度的LRV。进一步,关于试样1、试样2、试样3、试样4以及试样6,分别求出在－80℃下保存了21天和56天的各检体的TCID50,基于该TCID50的值计算出－80℃下的病毒滴度的LRV。基于这些,关于试样1、试样2、试样3、试样4以及试样6的含病毒的组合物,计算出在25℃下保存了21天的各检体的病毒滴度的LRV与在－80℃下保存了21天的各检体的病毒滴度的LRV之差。将结果示于表4。进一步,在表5中,关于试样1、试样2、试样3、试样4以及试样6,示出计算在4℃下保存了56天的各检体的病毒滴度的LRV与在－80℃下保存了56天的各检体的病毒滴度的LRV之差而得的结果。

[0167] [表4]

[0168] 表4

[0169]

	明胶水解物的等电点	对数下降值（LRV）25℃下的LRV与－80℃下的LRV之差（3W）
试样1	4.7	0.7
试样2	4.0	0.7
试样3	4.3	1
试样4	4.8	0.9
试样6	8.0	4.8

[0170] [表5]

[0171] 表5

[0172]

	明胶水解物的等电点	对数下降值（LRV）4℃下的LRV与－80℃下的LRV之差（8W）
试样1	4.7	0.3
试样2	4.0	0.4
试样3	4.3	0.5
试样4	4.8	0.5
试样6	8.0	1.2

[0173] 根据上述表4和表5,试样1、试样2、试样3以及试样4各自的上述LRV之差为1.0log以下和1.5log以下,因此可以评价为能在4℃(冷藏温度)和25℃(室温)下稳定地保存和运输病毒。试样6中,上述LRV之差在25℃下超过1.5log,在4℃下超过1.0log。

[0174] 〔实验3:病毒稳定剂中的明胶水解物的适当的浓度的研究〕

[0175] 关于试样1、试样7、试样8、试样9、试样10、试样11以及试样12,分别求出在4℃下保存了56天和在25℃下保存了21天的各检体的TCID50,基于该TCID50的值计算出4℃下的病毒滴度的LRV、和25℃下的病毒滴度的LRV。进一步,关于试样1、试样7、试样8、试样9、试样10、试样11以及试样12,分别求出在－80℃下保存了21天和56天的各检体的TCID50,基于该TCID50的值计算出－80℃下的病毒滴度的LRV。基于这些,关于试样1、试样7、试样8、试样9、试样10、试样11以及试样12,计算出在25℃下保存了21天的各检体的病毒滴度的LRV与在－80℃下保存了21天的各检体的病毒滴度的LRV之差。将结果示于表6。进一步,在表7中,关于试样1、试样7、试样8、试样9、试样10、试样11以及试样12,示出计算在4℃下保存了56天的各检体的病毒滴度的LRV与在－80℃下保存了56天的各检体的病毒滴度的LRV之差而得的结果。

[0176] [表6]

[0177] 表6

[0178]

	明胶水解物的浓度（质量%）	对数下降值（LRV）25℃下的LRV与－80℃下的LRV之差（3W）
试样1	5	0.7
试样7	0.1	1.8
试样8	0.5	2
试样9	1	1.0
试样10	2.5	0.9
试样11	10	0.9
试样12	20	1.3

[0179] [表7]

[0180] 表7

[0181]

	明胶水解物的浓度（质量%）	对数下降值（LRV）4℃下的LRV与－80℃下的LRV之差（8W）
试样1	5	0.3
试样7	0.1	1.4
试样8	0.5	1.1
试样9	1	0.7
试样10	2.5	0.4
试样11	10	0.3
试样12	20	0.2

[0182] 根据上述表6和表7,试样1、试样9、试样10、试样11以及试样12各自的上述LRV之差为1.0log以下和1.5log以下,因此可以评价为能在4℃(冷藏温度)和25℃(室温)下稳定地保存和运输病毒。试样7和试样8中,上述LRV之差在25℃下均超过1.5log,在4℃下超过1.0log。

[0183] 〔实验4:与以往的病毒稳定剂的比较〕

[0184] 关于试样1和试样13,分别求出在4℃下保存了56天和在25℃下保存了21天的各检体的TCID50,基于该TCID50的值计算出4℃下的病毒滴度的LRV、和25℃下的病毒滴度的LRV。进一步,关于试样1和试样13,分别求出在－80℃下保存了21天和56天的各检体的TCID50,基于该TCID50的值计算出－80℃下的病毒滴度的LRV。基于这些,关于试样1和试样13,计算出在25℃下保存了21天的各检体的病毒滴度的LRV与在－80℃下保存了21天的各检体的病毒滴度的LRV之差。将结果示于表8。进一步,在表9中,关于试样1和试样13,示出计算在4℃下保存了56天的各检体的病毒滴度的LRV与在－80℃下保存了56天的各检体的病毒滴度的LRV之差而得的结果。

[0185] [表8]

[0186] 表8

[0187]

	病毒稳定剂中的肽成分	对数下降值（LRV）25℃下的LRV与－80℃下的LRV之差（3W）
试样1	明胶水解物	0.7
试样13	白蛋白	2

[0188] [表9]

[0189] 表9

[0190]

	病毒稳定剂中的肽成分	对数下降值（LRV）4℃下的LRV与－80℃下的LRV之差（8W）
试样1	明胶水解物	0.3
试样13	白蛋白	1.2

[0191] 根据上述表8和表9,试样1与试样13相比,可以评价为能在4℃(冷藏温度)和25℃(室温)下抑制病毒滴度的降低。

[0192] 〔实验5:每个病毒的种类的病毒稳定剂的效果的研究〕

[0193] 关于试样1、试样14、试样15、试样16以及试样17,分别求出在25℃下保存了21天的各检体的TCID50,基于该TCID50的值计算出25℃下的病毒滴度的LRV。进一步,关于试样1、试样14、试样15、试样16以及试样17,分别求出在－80℃下保存了21天的各检体的TCID50,基于该TCID50的值计算出－80℃下的病毒滴度的LRV。基于这些,关于试样1、试样14、试样15、试样16以及试样17,计算出在25℃下保存了21天的各检体的病毒滴度的LRV与在－80℃下保存了21天的各检体的病毒滴度的LRV之差。需要说明的是,对于试样17,求出FFU来代替TCID。将结果示于表10。

[0194] 进一步,关于试样1、试样14、试样15以及试样16,分别求出在4℃下保存了21天、56天以及210天的各检体的TCID50,基于该TCID50的值计算出4℃下的病毒滴度的LRV。关于试样1、试样14、试样15以及试样16,也分别求出在－80℃下保存了21天、56天以及210天的各检体的TCID50,基于该TCID50的值计算出－80℃下的病毒滴度的LRV。基于这些,关于试样1、试样14、试样15以及试样16,计算出在4℃下保存了21天、56天以及210天的各检体的病毒滴度的LRV与在－80℃下保存了21天、56天以及210天的各检体的病毒滴度的LRV之差。将结果示于表11。

[0195] [表10]

[0196] 表10

[0197]

	病毒种类	对数下降值（LRV）25℃下的LRV与－80℃下的LRV之差（3W）
试样1	BHV-1	0.7
试样14	PI-3	0.9
试样15	Reo-3	0.5
试样16	Ad5	0.2
试样17	rNDV-GFP	0.1

[0198] [表11]

[0199] 表11

[0200]

	病毒种类	对数下降值（LRV）4℃下的LRV与－80℃下的LRV之差		
		3W	8W	30W
试样1	BHV-1	0.1	0.3	0.8
试样14	PI-3	0.2	0.6	0.9
试样15	Reo-3	0.3	0.2	0.2
试样16	Ad5	0.1	0.1	0.6

[0201] 根据上述表10和表11,试样1、试样14、试样15、试样16以及试样17各自的上述LRV

之差为1.0log以下和1.5log以下,因此可以评价为能在4℃(冷藏温度)和25℃(室温)下稳定地保存和运输病毒。需要说明的是,根据上述表10和表11,在25℃下维持了3周活性的试样1、试样14～试样16均在4℃下能维持活性至30周,因此推定试样17也同样能在4℃(冷藏温度)下维持活性至30周的可能性高。

[0202] 若考虑上述实验1～5的结果,则就试样1～试样4、试样9～试样12以及试样14～试样17各实施例而言,可以评价为能在4℃的环境下21天内稳定地保存和运输病毒。

[0203] 〔实验6:重复进行病毒稳定剂的冻结解冻的情况的影响〕

[0204] 将试样1在－80℃下冻结,之后,将其在冰水中解冻。将这样的操作重复三次。每次解冻时(冻结解冻第一次、第二次以及第三次)分别测定试样1的病毒滴度,计算出用于与试样1的冻结解冻前的病毒滴度进行比较的对数下降值(LRV)。将结果示于表12。

[0205] [表12]

[0206] 表12

[0207]

	病毒种类	与冻结解冻前比较而得到的对数下降值（LRV）		
		冻结解冻第一次	冻结解冻第二次	冻结解冻第三次
试样1	BHV-1	0.1	0.2	0.1

[0208] 根据上述表12,试样1在1～3次的冻结解冻中均将上述LRV维持在0附近,因此可以评价为在进行了冻结解冻的情况下也能维持病毒滴度。

[0209] 如上所述,对本发明的实施方式和实施例进行了说明,但从最初也预期了上述的各实施方式和实施例的构成的适当组合。

[0210] 应该认为本次公开的实施方式和实施例在所有方面都是示例而不是限制性的。本发明的范围并不是上述的说明,而权利要求书所示出的,意图在于包括与权利要求书等同的含义和范围内的所有变更。