

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2015-224251

(P2015-224251A)

(43) 公開日 平成27年12月14日(2015.12.14)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 0 7 K 14/765 (2006.01)	C 0 7 K 14/765	4 C 0 8 4
A 6 1 K 38/00 (2006.01)	A 6 1 K 37/02	4 H 0 4 5
A 6 1 P 39/06 (2006.01)	A 6 1 P 39/06	

審査請求 未請求 請求項の数 14 O L 外国語出願 (全 16 頁)

(21) 出願番号	特願2015-108569 (P2015-108569)	(71) 出願人	512190491
(22) 出願日	平成27年5月28日 (2015.5.28)		グライフォルス・ス・アー
(31) 優先権主張番号	P 201430824		スペイン・08022・バルセロナ・ヘス
(32) 優先日	平成26年5月29日 (2014.5.29)		ス・イ・マリア・6
(33) 優先権主張国	スペイン (ES)	(74) 代理人	100108453
			弁理士 村山 靖彦
		(74) 代理人	100110364
			弁理士 実広 信哉
		(74) 代理人	100133400
			弁理士 阿部 達彦
		(72) 発明者	フアン・イグナシオ・ホルケーラ・ニエト
			スペイン・08150・(バルセロナ)・
			パレッツ・デル・ヴァレス・ポリゴノ・イ
			ンドゥストリアル・レヴァンテ・カリエ・
			カン・グアスク・2
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 溶存酸素レベルが低減されたヒトアルブミンの調製方法

(57) 【要約】

【課題】ヒトアルブミン溶液の製造方法において、血漿中に存在するアルブミンの還元状態と非常によく似たアルブミンの還元状態を達成することにより、アルブミンの適用用途においてその治療有効性の改善をもたらすこと。

【解決手段】本発明は、ヒトアルブミン溶液の調製方法に関し、より詳細には前記アルブミン溶液中の溶存酸素を0.5ppm以下の濃度になるまで低減させる工程を含む、方法に関する。本発明の方法により、ヒト血漿中に存在するアルブミンの還元状態により近い還元状態を有するヒトアルブミン溶液を取得できる。

【選択図】なし

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

ヒトアルブミン溶液の調製方法であって、前記アルブミン溶液中の溶存酸素を、酸素レベルが0.5ppm以下の濃度になるまで低減させる工程を含むことを特徴とする、調製方法。

【請求項 2】

アルブミン溶液中の溶存酸素を低減させる工程が、アルブミン溶液を不活性ガスで表面処理することによって実施されることを特徴とする、請求項1に記載の方法。

【請求項 3】

溶液中の溶存酸素を低減させる工程が、前記アルブミン溶液内で不活性ガスをバブリングすることによって実施されることを特徴とする、請求項1に記載の方法。

10

【請求項 4】

アルブミンが、組換えまたはトランスジェニックの血漿に由来することを特徴とする、請求項1から3のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 5】

アルブミン溶液が、約4から25%(w/v)の間のアルブミン濃度を有することを特徴とする、請求項1から4のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 6】

使用される不活性ガスが、窒素またはヘリウムであることを特徴とする、請求項2から5のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 7】

アルブミン溶液中の溶存酸素を低減させる工程が、前記アルブミン溶液の低温殺菌工程の前に実施されることを特徴とする、請求項1から6のいずれか一項に記載の方法。

20

【請求項 8】

アルブミン溶液中の溶存酸素を低減させる工程が、前記アルブミン溶液の低温殺菌工程の後に実施されることを特徴とする、請求項1から7のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 9】

アルブミン溶液中の溶存酸素を低減させる工程の後、前記アルブミン溶液が不活性ガス雰囲気中に維持されることを特徴とする、請求項1から8のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 10】

不活性ガス雰囲気が、窒素またはヘリウムガスの雰囲気であることを特徴とする、請求項9に記載の方法。

30

【請求項 11】

アルブミン溶液が、酸素不透過性材料で製造された容器中にバックおよび/または保存されることを特徴とする、請求項1から10のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 12】

酸素不透過性材料が、ガラスであることを特徴とする、請求項11に記載の方法。

【請求項 13】

溶存酸素の濃度が0.5ppm以下であることを特徴とする、請求項1から12のいずれか一項に記載の方法によって調製されたヒトアルブミンを含む組成物。

【請求項 14】

医薬を調製するための、請求項13に記載のアルブミンを含む組成物の使用。

40

【発明の詳細な説明】**【技術分野】****【0001】**

本発明はヒトアルブミン溶液の調製のための方法に関し、より詳細には前記アルブミン溶液中の溶存酸素を0.5ppm以下の濃度になるまで低減させる工程を含む方法に関する。本発明の方法により、ヒト血漿中に存在するアルブミンの還元状態により近い還元状態を有するヒトアルブミン溶液を取得できる。

【背景技術】**【0002】**

50

ヒトアルブミンは66kDaの非グリコシル化タンパク質である。ヒトアルブミンは量的に最も重要な血漿タンパク質であり、標準血漿中におけるその濃度は35から50g/lの間であり、全血漿タンパク質の最大60%を構成する(Peters T.J., All About Albumin, Biochemistry, Genetics and Medical Applications, Academic Press, San Diego, 1996)。

【 0 0 0 3 】

ヒトアルブミンの構造は585個のアミノ酸を有するポリペプチドからなり、約67%がヘリックスであり、シートは存在しない(Otagiri M., Chuang V.T., Pharmaceutically important pre- and posttranslational modifications on human serum albumin, Biol Pharm Bull 2009, 32, 527~534)。ヒトアルブミンは、17個のジスルフィド結合の形成に
10
関与する6個のメチオニン残基と35個のシステイン残基を含有する。Cys-34は分子全体で
唯一の遊離システインである。ヒトアルブミンは、複数のリガンドに結合する能力とそれ
らの急進的捕捉特性の点で特別な抗酸化機能を有しているが、いずれの特性もアルブミン
の構造と密接に関連している。

【 0 0 0 4 】

アルブミンには多くの酸化可能性が存在しているが、Cys-34は特に酸化/還元を受けやすい部位である。したがって、一般的に、アルブミンの還元状態は、Cys-34の観点から述
べることが適切である。アルブミンをクロマトグラフィーで分離すると、Cys-34の還元状
態に応じて3つの画分が得られる(Peters, 1996, 前掲)：

- (i) システインが遊離のチオール基の形態にある還元形態であって、ヒトメルカプトアル
ブミン(HMA)と称されるもの；
20
- (ii) システインが、主としてシステインまたはシステイニルグリシンである低分子のチオ
ール化合物と、加えてホモシステインおよびグルタチオンともジスルフィド結合を形成し
ている酸化形態であって、ヒト非メルカプトアルブミン1(HNA1)と称されるもの；ならびに
- (iii) システインがスルフィン酸またはスルホン酸である最も酸化された形態であって、
ヒト非メルカプトアルブミン2(HNA2)と称されるもの。

【 0 0 0 5 】

健常なヒトでは、全アルブミンの約50~69%がHMAの形態であり、27~42%がHNA1の形態
であり、3~5%がHNA2の形態である(Oettl K.ら、Oxidative damage of albumin in advan
ced liver disease, Biochim. Biophys. Acta 2008, 1782, 469~473; Oettl K.およびMa
rsche G., Redox State of human serum albumin in terms of cysteine-34 in health a
nd disease, Methods Enzymol, 2010, 474, 181~95;ならびにOettl K.ら、Oxidative al
bumin damage in chronic liver failure: Relation to albumin binding capacity; liv
er dysfunction and survival, J Hepatol, 2013, 59, 978~983)。一般的に、HMAのHNA1
への酸化は可逆的である一方、HNA2への酸化は不可逆的過程と考えられている。
30

【 0 0 0 6 】

アルブミンは、インビボで、および治療用アルブミン調製に使用される過程中的の両方
において様々な構造的改変を受ける可能性があり、それによってその構造の改変が起こり
、結果としてその還元状態と共に結合特性の改変も起こる(Oettl, K.ら、2010, 前掲)。

【 0 0 0 7 】

アルブミンが含まれている精製タンパク質を取得するためのヒト血漿の分画において一
般に使用されている方法は、コーン法[Cohn E.J.ら、Preparation and properties of se
rum plasma proteins, IV. A system for the separation into fractions of the prote
in and lipoprotein components of biological tissues and fluids, J. Am. Chem. Soc
., (1946) 68, 459~475]またはそれに軽微な変更を施した方法である。
40

【 0 0 0 8 】

コーン法はヒト血漿で開始され、連続的に沈殿および分離工程が施される。各工程で血
漿タンパク質の1種が濃縮された沈殿物と、デカンテーションによる上清とが得られる。
連続的なコーン画分の沈殿物(画分I、画分II+III、画分IVおよび画分V)を得るために、異
なるタンパク質の溶解度を変更する目的で、溶液のパラメータ、例えば、特にpH、誘電率
、温度、タンパク質濃度およびイオン強度を変化させることが必要となる。さらに注目す
50

べきことに、前記コーン画分は濃度が高められたエタノールを含有する。したがって画分IVの上清に含まれているアルブミンは約40%(v/v)のエタノールと共に沈殿され、画分Vのペーストの一部の形成に移行する。

【0009】

画分Vが得られたら、沈殿物を溶液中に再懸濁し、次いで様々な工程を施して最終製品を得る。これらの工程は、慣習的に、透析、熱処理、滅菌、バイアルへの充填および前記バイアルの最終低温殺菌を含む。その後、最終製品を確実に無菌にする目的で、前記バイアルに検疫を、一般的には30～32℃で14日間以上行う。

【先行技術文献】

【非特許文献】

10

【0010】

【非特許文献1】Peters T.J., All About Albumin, Biochemistry, Genetics and Medical Applications, Academic Press, San Diego, 1996

【非特許文献2】Otagiri M., Chuang V.T., Pharmaceutically important pre- and posttranslational modifications on human serum albumin, Biol Pharm Bull 2009, 32, 527-534

【非特許文献3】Oettl K.ら、Oxidative damage of albumin in advanced liver disease, Biochim. Biophys. Acta 2008, 1782, 469～473

【非特許文献4】Oettl K.およびMarsche G., Redox State of human serum albumin in terms of cysteine-34 in health and disease, Methods Enzymol, 2010, 474, 181～95

20

【非特許文献5】Oettl K.ら、Oxidative albumin damage in chronic liver failure: Relation to albumin binding capacity; liver dysfunction and survival, J Hepatol, 2013, 59, 978～983

【非特許文献6】Cohn E.J.ら、Preparation and properties of serum plasma proteins, IV. A system for the separation into fractions of the protein and lipoprotein components of biological tissues and fluids, J. Am. Chem. Soc., (1946) 68, 459～475

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0011】

30

本発明者らは、ヒト血漿から開始されるアルブミン溶液の取得方法の間にアルブミンのCys-34の還元状態が改変を受けることを見出した。これらの改変は、基本的に酸素の存在下で保存する間に生じることから、本質的に検疫工程の後で検出される。いくつかの生産バッチ(n=7)では、HMA、HNA1およびHNA2のレベルがそれぞれ40～53%、39～44%および7～16%(w/v)であり、したがって健常人で説明されたレベルと主にHMAおよびHNA2のレベルで異なっていることが見出された(Oettl K. 2008、2010および2013、前掲)。このことは、例えばHNA2の場合、HNA2への酸化が前述のように不可逆的過程であることから重要な意義を有する可能性がある。

【0012】

40

驚いたことに、本発明者らは、ヒトアルブミン溶液の製造方法に、溶液中の溶存酸素を0.5ppm以下の濃度の酸素レベルに低減させることを含む工程を加えることによって、Cys-34の酸化の低減が達成され、血漿中に存在するアルブミンの還元状態と非常によく似たアルブミンの還元状態が得られることを発見した。このことは取得されるアルブミンの特性、例えばその抗酸化特性が、血液中に存在するアルブミンの特性にさらに近くなるという事実に着するものであり、これにより多くのアルブミンの適用用途においてその治療有効性の改善がもたらされうる。

【課題を解決するための手段】

【0013】

したがって本発明は、ヒトアルブミン溶液の調製方法であって、前記アルブミン溶液中の溶存酸素を、酸素レベルが0.5ppm以下の濃度になるまで低減させる工程を含むことを特

50

徴とする、調製方法を明らかにするものである。アルブミン溶液中の溶存酸素を低減させる工程の後、前記アルブミン溶液が不活性ガス雰囲気中に維持されることが好ましい。

【0014】

前記アルブミン溶液中の溶存酸素の低減工程は、当技術水準において公知の様々な方法により実施できる。好ましくは、アルブミン溶液の表面処理は、不活性ガスを用いて実施してもよく、または前記アルブミン溶液内で不活性ガスをバブリングしてもよい。本発明の方法で使用される前記不活性ガスは、窒素、ヘリウムまたは同様のガスであってもよい。

【0015】

本発明の方法は、約4から25%(w/v)の間の濃度のアルブミンを有するアルブミン溶液を取得するために利用してもよい。好ましくは、取得されるアルブミンは治療用アルブミンである。

10

【0016】

さらに、本発明のアルブミンは、組換え形態またはトランスジェニック形態で得られたアルブミンであってもよい。組換えまたはトランスジェニックアルブミン分子は、そのアミノ酸配列に関してヒトアルブミンと同一であり、グリコシル化されておらず、機能的であるという目的から、ヒト血漿由来のアルブミンと同じ折り重み構造を示すものでなければならない。そのようでない場合には、前記差異によって生じる可能性のある有害作用の中でも特に免疫原性のリスクの観点から、ヒトに投与することはできない。

20

【0017】

本発明におけるアルブミン溶液中の溶存酸素の低減工程は、前記アルブミン溶液の低温殺菌工程の前または後に行うことができ、さらには、前記アルブミン溶液の低温殺菌工程は実施せずに、最初のアルブミン溶液の調製方法と独立して実施されてもよい。

【0018】

本発明の方法によって得られるアルブミン溶液におけるCys-34の還元状態でより良い結果を得るためには、アルブミン溶液の溶存酸素を低減させる工程の後、前記アルブミン溶液を不活性ガス雰囲気中に維持することが好ましい。前記不活性ガス雰囲気は、窒素、ヘリウムまたは同様のガスの雰囲気であってもよい。

【0019】

本発明の方法によって得られたアルブミンをパックおよび/または保存する容器に関してあらゆる容器が利用可能であるが、前記容器は、酸素不透過性材料、より好ましくはガラスから製造されていることが好ましい。

30

【0020】

本発明のさらなる目的は、本発明の方法によって調製されるヒトアルブミンを含む組成物と、その医薬としての使用を明らかにすることである。

【0021】

最後に本発明は、医薬を調製するための、上記方法に従って調製したアルブミンを含む組成物の使用を明らかにするものである。

【0022】

本発明を、実施例および比較例に関連させて下記でより詳細に説明するが、これらの例は本発明を限定するものではない。さらに、以下で図面について述べる。

40

【図面の簡単な説明】

【0023】

【図1】図1は、当分野の先行技術で利用される血漿由来の治療用ヒトアルブミンの取得方法を模式図で示すものである。

【図2】図2は、本発明に先行する技術で利用される方法の様々な工程におけるアルブミンのCys-34のHMA、HNA1およびHNA2形態の濃度を、クロマトグラフィーによって得られたピーク高さで表したグラフである。

【化 1】

(□)

は、健常ドナーからの血漿 (n=59) であり、

【化 2】

(★)

は、寒冷沈降反応からの上清 (n=3) であり、

10

【化 3】

(⊗)

は、安定剤添加前および熱処理前のアルブミン溶液 (n=3) であり、

【化 4】

(●)

は、安定剤を含む熱処理前のアルブミン溶液 (n=1) であり、

20

【化 5】

(■)

は、安定剤を含む熱処理後のアルブミン溶液 (n=1) であり、

【化 6】

(◆)

は、滅菌濾過前の20%アルブミン溶液 (n=3) であり、

30

【化 7】

(▲)

は、最終容器中の滅菌20%アルブミン溶液 (n=4) であり、

【化 8】

(▼)

は、低温殺菌済みで最終溶液中の未検疫20%アルブミン溶液 (n=4) であり、

40

【化 9】

(○)

は、最終20%アルブミン製品 (n=7) であり、ここでnは分析バッチの数を表す。

【図 3】図3は、本発明に先行する技術の方法を利用した、様々な工程におけるアルブミンのCys-34のHMA、HNA1およびHNA2形態の濃度を、クロマトグラフィーによって得られたピーク高さで表したグラフである。

【化 1 0】

(▲)

は、最終容器中の滅菌25%アルブミン溶液(n=1)であり、

【化 1 1】

(▼)

は、低温殺菌済みで未検疫の25%アルブミン溶液(n=1)であり、

10

【化 1 2】

(●)

は、最終25%アルブミン製品(n=1)であり、

【化 1 3】

(▲)

は、最終容器中の滅菌5%アルブミン溶液(n=1)であり、

20

【化 1 4】

(▼)

は、低温殺菌済みで最終容器中の未検疫5%アルブミン溶液(n=1)であり、

【化 1 5】

(●)

は、最終5%アルブミン製品(n=1)であり、ここでnは分析バッチの数を表す。

30

【図 4】図4は、低温殺菌前にガス状窒素で表面処理する工程を用いた本発明の方法を利用した、様々な工程におけるアルブミンのCys-34のHMA、HNA1およびHNA2形態の濃度を、クロマトグラフィーによって得られたピーク高さで表したグラフである。

【化 1 6】

(▲)

は、最終容器中の滅菌20%アルブミン溶液(n=3)であり、

【化 1 7】

(▼)

40

は、低温殺菌済みで最終容器中の未検疫20%アルブミン溶液(n=3)であり、

【化 1 8】

(○)

は、最終20%アルブミン製品(n=3)であり、ここでnは分析バッチの数を表す。

【図 5】図5は、低温殺菌前にガス状窒素でアルブミン溶液をバブリングする処理工程を用いた本発明の方法を利用した、様々な工程におけるアルブミンのCys-34のHMA、HNA1お

50

よびHNA2形態の濃度を、クロマトグラフィーによって得られたピーク高さで表したグラフである。

【化 1 9】

(▲)

は、最終容器中の滅菌20%アルブミン溶液(n=3)であり、

【化 2 0】

(▼)

10

は、低温殺菌済みで最終容器中の未検疫20%アルブミン溶液(n=3)であり、

【化 2 1】

(○)

は、最終20%アルブミン製品(n=3)であり、ここでnは分析バッチの数を表す。

【図 6】図6は、低温殺菌前にガス状窒素で表面処理する工程を用いた本発明の方法を利用した、様々な工程におけるアルブミンのCys-34のHMA、HNA1およびHNA2形態の濃度を、クロマトグラフィーによって得られたピーク高さで表したグラフである。

【化 2 2】

20

(▲)

は、パックされていない滅菌25%アルブミン溶液(n=1)であり、

【化 2 3】

(▲)

は、低温殺菌済みで未検疫の25%アルブミン溶液(n=1)であり、

【化 2 4】

30

(●)

は、最終25%アルブミン製品(n=1)であり、

【化 2 5】

(▲)

は、最終容器中の滅菌5%アルブミン溶液(n=1)であり、

【化 2 6】

40

(▼)

は、低温殺菌済みで最終容器中の未検疫5%アルブミン溶液(n=1)であり、

【化 2 7】

(●)

は、最終5%アルブミン製品(n=1)であり、ここでnは分析バッチの数を表す。

【図 7】図7は、低温殺菌前にガス状ヘリウムでアルブミン溶液を表面処理する工程を用

50

いた本発明の方法を利用した、様々な工程におけるアルブミンのCys-34のHMA、HNA1およびHNA2形態の濃度を、クロマトグラフィーによって得られたピーク高さで表したグラフである。

【化 2 8】

(▲)

は、最終容器中の滅菌25%アルブミン溶液(n=1) であり、

【化 2 9】

(▼)

は、低温殺菌済みで最終容器中の未検疫25%アルブミン溶液(n=1) であり、

【化 3 0】

(●)

は、最終25%アルブミン製品であり、ここでnは分析バッチの数を表す。

【発明を実施するための形態】

【0024】

(実施例1)

先行技術によるアルブミンの取得方法

健常ドナーから取得したヒト血漿を、コーン法(Cohn E.J.ら、1946、前掲)に従って、連続的な沈殿および分離工程で処理し、最初の寒冷沈降反応上清物の取得から画分Vの沈殿物の獲得まで行った(図1参照)。コーン画分Vを、冷やした注射用水(WFI)に懸濁し、pH7.0に調整し、インデプス(in-depth)フィルタによって清澄化した。1価イオンの塩(塩化ナトリウム)で形成された透析溶液を適用して温度を5℃に維持することにより、清澄化溶液を一定体積で透析した(図1、清澄化/透析工程)。安定化剤としてカプリル酸ナトリウムおよびN-アセチルトリプトファンを透析溶液に添加した。前記溶液に60℃で熱処理を施した(図1、熱処理工程)。その後、熱処理溶液を、所望の最終タンパク質濃度[例えば、5%、20%または25%(w/v)]に応じてWFIで希釈するかまたは濃縮した(図1、バックされていない溶液)。次いで、最終溶液を滅菌方式(0.22 μmフィルタ)で濾過し、最終滅菌容器への充填を無菌ゾーンで行った(図1、滅菌濾過および充填工程)。最終容器中の溶液を60℃で10時間以上、加熱した(図1、バイアル中での低温殺菌工程)。最後に、バイアルを30~32℃で14日間以上、インキュベートした(図1、検疫工程)。前記期間の後、バイアルを目視で検査し、何らかの微生物汚染が示されているものは廃棄した(図1、最終アルブミン製品)。

【0025】

アルブミンの取得方法の様々な工程からのアルブミン試料の酸化状態(図2)を、前掲のOettl K.、2010に記載された方法および下記に記載の方法に基づき高速液体クロマトグラフィー(HPLC)によって分析した。

【0026】

試験下のアルブミン試料を、0.3M塩化ナトリウム、0.1Mリン酸ナトリウム、pH6.87のバッファーで6.5mg/mlの濃度に希釈し、5 μlをShodex Asahipak ES-502N DEAE陰イオン交換カラム(7.5 × 100mm, Shodex、日本)に、流速1.0ml/分で注入した。酢酸ナトリウム50mMおよび硫酸ナトリウム400mMの勾配を利用して、pH4.85で6%のエタノールに達するまで1.0ml/分の一定流速、35℃で溶出を実施することによって、アルブミン試料の酸化状態に応じた3つの画分(HMA、HNA1およびHNA2)を分離した。

【0027】

溶出の最初の5分間は、エタノールの無い状態で行われた。さらに5~35分後、エタノールの濃度は直線的に6%に増加し、その後さらに5分間は、濃度が一定に維持された。最終

10

20

30

40

50

的には、40～45分でエタノールの濃度は0%まで再び低下した。エタノール無しでさらに5分経過した後で、次の試料を分析可能とした。

【0028】

酸化状態の機能に応じたアルブミンの3つの画分の検出を、蛍光法を利用して、それぞれ280nmおよび340nmの励起波長および発光波長を利用して実施した。アルブミンのCys-34のHMA、HNA1およびHNA2形態の濃度の定量は、対応するクロマトグラムで得られたそれぞれの対象ピークの高さを考慮に入れて実施した。

【0029】

図2は、当分野の先行技術のアルブミン取得方法の様々な工程におけるヒト血清アルブミン試料の酸化状態の変化を示す。データは、特に低温殺菌とその後の検疫工程の後(最終20%アルブミン製品)において、HNA1およびHNA2形態が増加し、HMA形態が損失していることを示す。当分野の先行技術の方法を用いたヒト血漿由来の5%および25%濃度の精製アルブミンの低温殺菌および検疫工程後のアルブミンの酸化状態の挙動(図3)は、同じ方法に従った最終20%アルブミン製品で観察される挙動(図2)と同等である。両方の図において、取得したデータは、特に低温殺菌と続く検疫工程の後で、HNA1およびHNA2形態が増加し、HMA形態が損失を受けていることを示している。

10

【0030】

(実施例2)

低温殺菌の前に窒素による表面処理工程を用いた本発明によるアルブミンの取得方法

本発明のアルブミンの取得方法は、実施例1に記載の方法に対応し、下記のようなアルブミン溶液中の溶存酸素を低減させる工程をさらに含む方法である。

20

【0031】

最終容器中で滅菌溶液を取得した後(図1、滅菌濾過および充填工程)、容器内部に存在する酸素を排出する目的で、窒素による表面処理を、バイアルのクロロブチルストッパー内に、2つの0.22 μ m PVDFフィルタ(市販品、Millex GV、Millipore社、0.22 μ m、PVDF、13mmフィルタ、米国、または同種品)に接続した2本の皮下注射針(市販品、Braun社、Sterican 21G \times 1 $^{1/2}$ インチ、0.80 \times 40mm、ドイツ、または同種品)を挿入し、針とアルブミン溶液が接触しないようにして実施した。容器内の圧力が過剰になることを防ぐ目的で、針の一方は窒素ガスの入口として、他方は出口として設定した。窒素による表面処理は、容器内に液体が飛び散らずに移動することが観察されることを目的として、窒素の一定の流れを維持しながら室温で2時間実施した。

30

【0032】

窒素による表面処理が完了後、ヒト血漿由来のアルブミンの取得方法を、実施例1に記載のように(図1、バイアル中での低温殺菌工程)、最終アルブミン製品が取得されるまで継続した。実施例1と同様の方式で、陰イオン交換クロマトグラフィーによって、本発明の技術を用いて取得した20%濃度の試料の酸化状態を分析した。詳細には、窒素による表面処理工程後で低温殺菌前のアルブミン試料、低温殺菌後で検疫前のアルブミン試料および検疫期間後のアルブミン試料について分析を行った。図4に得られた結果を示しているが、先行技術のアルブミン取得方法の場合の図2および図3で観察されたHMA形態の減少は無いことならびにHNA1およびHNA2形態の増加は無いことが観察された。

40

【0033】

酸化状態の分析に加えて、窒素による表面処理後の試料中に存在する溶存酸素の測定を実施したが、その結果、全ての場合において溶存酸素の濃度は0.5ppm以下であった。

【0034】

測定は、室温で溶存酸素測定用のプローブ(市販品、HI9828 Multiparameter Meter、Hanna Instruments社、米国)を使用して実施した。詳細には、前もって窒素による表面処理を施したアルブミン溶液を含む容器を、窒素雰囲気有するキュービクル内で開き、試料中酸素測定用プローブを直ぐに浸した。使用したプローブは、ガルバーニ電池の原理に基づいて機能するもので、銀(Ag)陽極とそれを包む陰極として機能するプラチナ(Pt)ワイヤで構成されている。前述のアセンブリを、塩化カリウムの電解質溶液で満たされ、溶液中

50

に存在する酸素は透過可能であるが溶液自体は通さないガス透過性材料のTeflon(登録商標)膜を末端に有する保護カバー内に挿入する。790mVの電位をかけることによって、セル中に存在する酸素は陰極で水酸化物イオン(OH⁻)に還元され、陽極では塩化銀が析出する。この反応により、試料中に存在する酸素の量に比例する強度の電流が得られる。次いで計量器を、対応する溶存酸素の濃度への電流の測定に切り替える。

【0035】

(実施例3)

低温殺菌の前に溶液中に窒素をバブリングする工程を用いた本発明によるアルブミンの取得方法

本発明のアルブミンの取得方法は、実施例1に記載の方法に対応し、下記の工程を含む方法である。最終容器中で滅菌溶液を取得した後(図1、滅菌濾過および充填工程)、容器内部に存在する酸素を排出する目的で、窒素バブリング処理を、バイアルのクロロブチルストッパー内に、2つの0.22 μm PVDFフィルタ(市販品、Millex GV、Millipore社、0.22 μm、PVDF、13mmフィルタ、米国、または同種品)に接続した2本の皮下注射針(市販品、Braun社、Sterican 21G×1^{1/2}インチ、0.80×40mm、ドイツ、または同種品)を挿入して実施した。容器内の圧力が過剰になることを防ぐ目的で、窒素ガスの入口として設定したスパイナル針(市販品、Terumo社、Spinal Needle、18G×3^{1/2}インチ、1.20×90mm、日本、または同種品)をアルブミン溶液に浸漬し、皮下注射針(市販品、Braun社、Sterican 21G×1^{1/2}インチ、0.80×40mm、ドイツ、または同種品)を液体との接触を避けるように配置させて出口として設定した。窒素によるバブリング処理を、液体内に小さな泡が観察されることを目的に、窒素の一定の流れを維持しながら室温で2時間実施した。

【0036】

窒素のバブリングによる表面処理が完了した後、ヒト血漿由来のアルブミンの取得方法を実施例1に記載のように(図1、バイアル中の低温殺菌工程)、最終アルブミン製品が取得されるまで継続した。

【0037】

実施例1および実施例2と同様にして、本発明の方法による技術を用いて取得した20%濃度のアルブミン試料について、その酸化状態を陰イオン交換クロマトグラフィーによって分析した。詳細には窒素によるバブリング工程後で低温殺菌前のアルブミン試料、低温殺菌後で検疫前のアルブミン試料および検疫期間後のアルブミン試料について分析を行った。図5に得られた結果を示しているが、これらの結果は、低温殺菌前に窒素による表面処理工程を用いた場合の図4で得られた結果と同様である。先行技術のアルブミン取得方法を用いた場合の、図2および図3で観察されるHMA形態の減少は無いこと、ならびにHNA1およびHNA2形態の増加は無いことが観察された。

【0038】

この例において、窒素のバブリング処理後に試料中に存在する溶存酸素の測定を実施例2と同様に実施したが、その結果、全ての場合において溶存酸素の濃度は0.5ppm以下であった。

【0039】

(実施例4)

低温殺菌の前に窒素による表面処理工程を用いた本発明のアルブミンの取得方法の、様々な最終濃度のアルブミンへの適用

本発明のアルブミンの取得方法は、実施例2に記載の方法に対応し、他の濃度、例えば5%および25%のアルブミンに適用される。実施例2と同様に本発明の技術を用いて取得した5%および25%濃度のアルブミンの試料の酸化状態を、陰イオン交換クロマトグラフィーによって分析した。特に、窒素による表面処理工程後で低温殺菌前の5%および25%アルブミン試料、低温殺菌後で検疫前の5%および25%アルブミン試料ならびに検疫期間後の5%および25%アルブミン試料について、分析を行った。図6は得られた結果を示すものであるが、これらの結果は、20%濃度のアルブミンの場合の図4で得られた結果と同様である。先行技術のアルブミン取得方法を用いた場合の、図2および図3で観察されるHMA形態の減少は無い

こと、ならびにHNA1およびHNA2形態における増加は無いことが観察された。

【0040】

酸化状態の分析に加えて、窒素による表面処理後の試料中に存在する溶存酸素の測定を実施したが、その結果、全ての場合において溶存酸素の濃度は0.5ppm以下であった。

【0041】

(実施例5)

低温殺菌の前にヘリウムによる表面処理工程を用いた本発明のアルブミンの取得方法

本発明のアルブミンの取得方法は、実施例1に記載の方法に対応し、下記の工程を含む。最終容器中で滅菌溶液を取得した後(図1、滅菌濾過および充填工程)、バイアル中に残る空気チャンパー中に存在する酸素を排出する目的で、ヘリウムによる表面処理を、クロロブチルストッパー内に、アルブミン溶液との接触をさせながら、2つの0.22 μ m PVDFフィルタ(市販品、Millex GV、Millipore社、0.22 μ m、PVDF、13mmフィルタ、米国、または同種品)に接続した2本の皮下注射針(市販品、Braun社、Sterican 21G \times 1^{1/2}インチ、0.80 \times 40mm、ドイツ、または同種品)を挿入し、針とアルブミン溶液との接触を避けながら実施した。容器内の圧力が過剰になることを防ぐ目的で、針の一方はヘリウムガスの入口として設定し、他方は出口として設定した。ヘリウムによる表面処理を、容器内に液体が飛び散らずに移動することが観察されることを目的に、ヘリウムの一定の流れを維持しながら室温で2時間実施した。

【0042】

ヘリウムによる表面処理が完了した後、ヒト血漿で開始するアルブミン取得方法を、実施例1に記載されるように(図1、バイアル中での低温殺菌工程)、最終アルブミン製品が取得されるまで継続した。

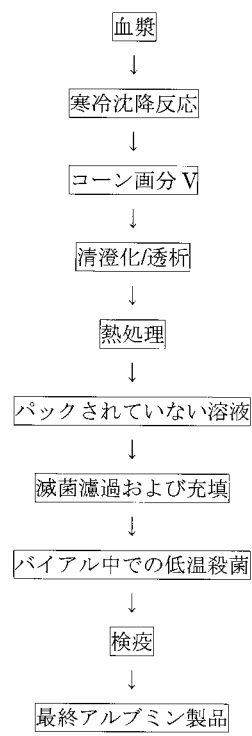
【0043】

実施例1~4と同様にして、本発明の技術を用いて得られたアルブミンの試料について、酸化状態を陰イオン交換クロマトグラフィーによって分析した。詳細にはヘリウムによる表面処理後で低温殺菌前のアルブミン試料、低温殺菌後で検疫前のアルブミン試料および検疫期間後のアルブミン試料について分析を行った。図7に得られた結果を示すが、これらの結果は低温殺菌前に窒素による表面処理を用いた場合の図4および図6で得られた結果と類似しており、また低温殺菌前に容器中に窒素をバブリングする工程を用いた場合の図5で得られた結果とも類似している。先行技術のアルブミン取得方法を用いた場合の、図2および図3で観察されるHMA形態の減少は無いこと、ならびにHNA1およびHNA2形態における増加は無いことが観察された。

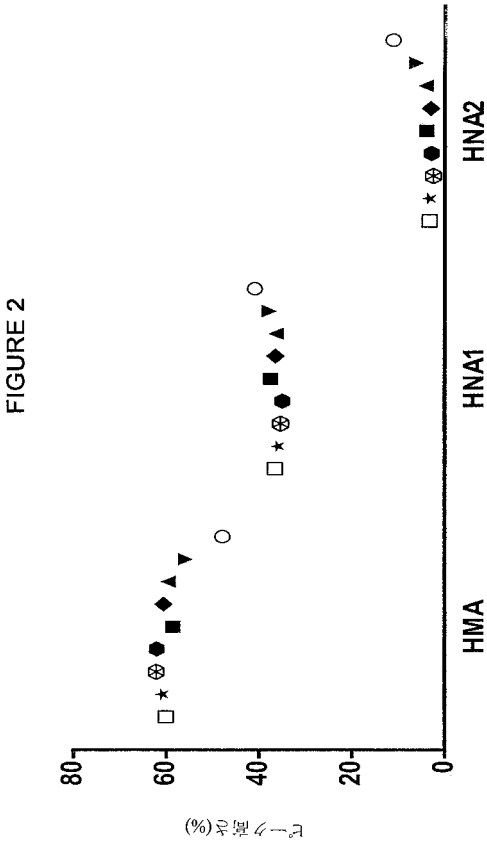
【0044】

この例において、ヘリウムによるバブリング処理後に試料中に存在する溶存酸素の測定を実施例2と同様にして実施したが、その結果、全ての場合において溶存酸素の濃度は0.5 ppm以下であった。

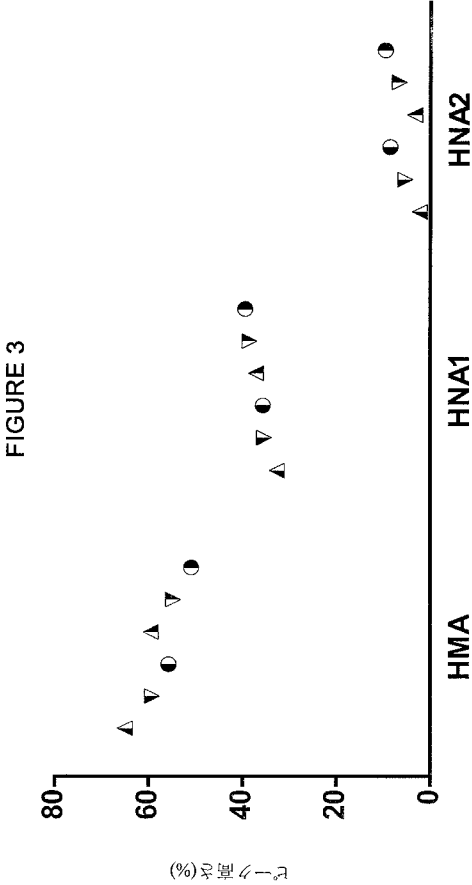
【 図 1 】



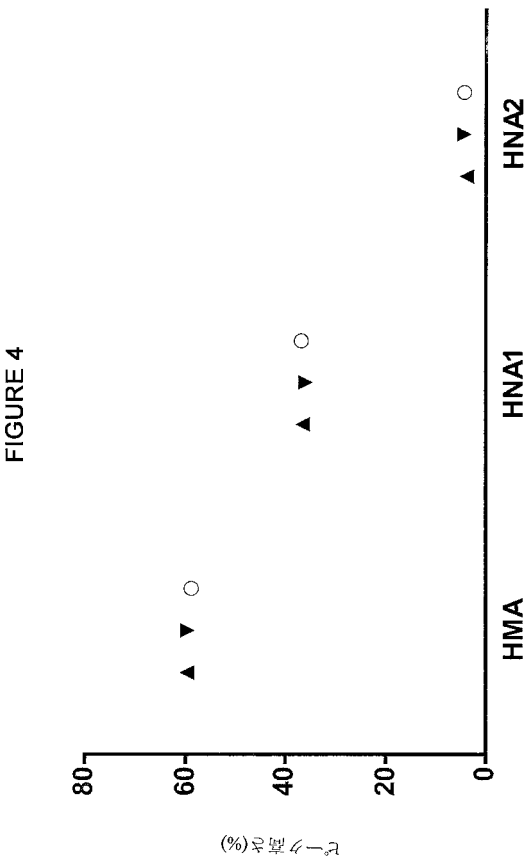
【 図 2 】



【 図 3 】

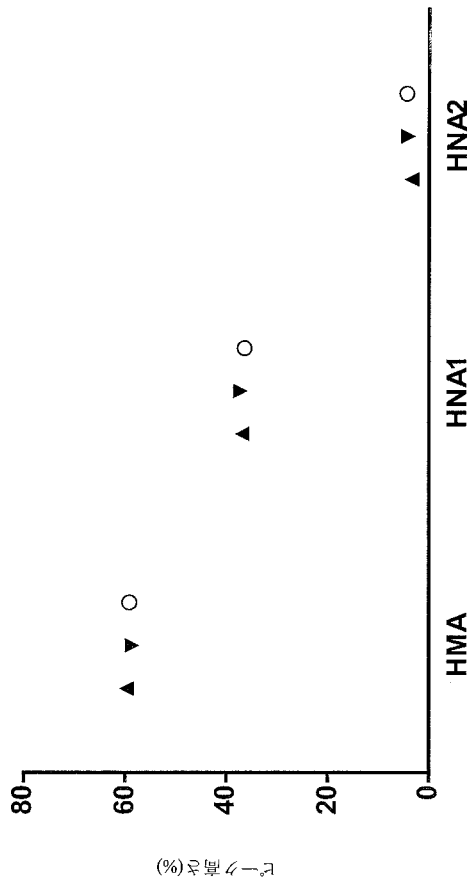


【 図 4 】



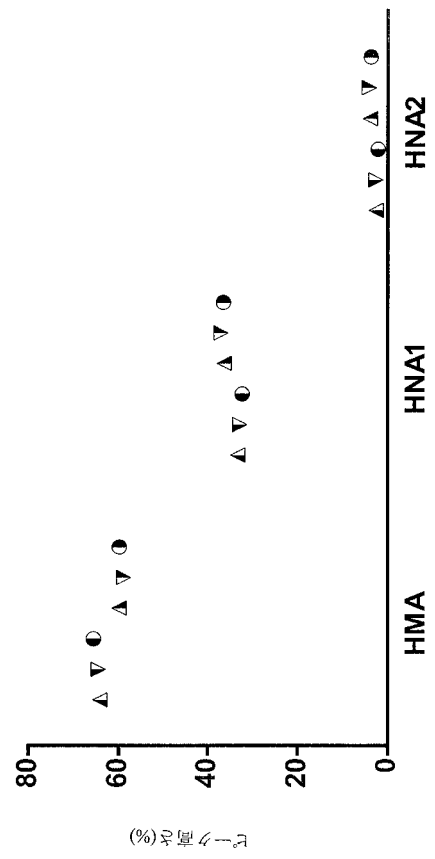
【 図 5 】

FIGURE 5



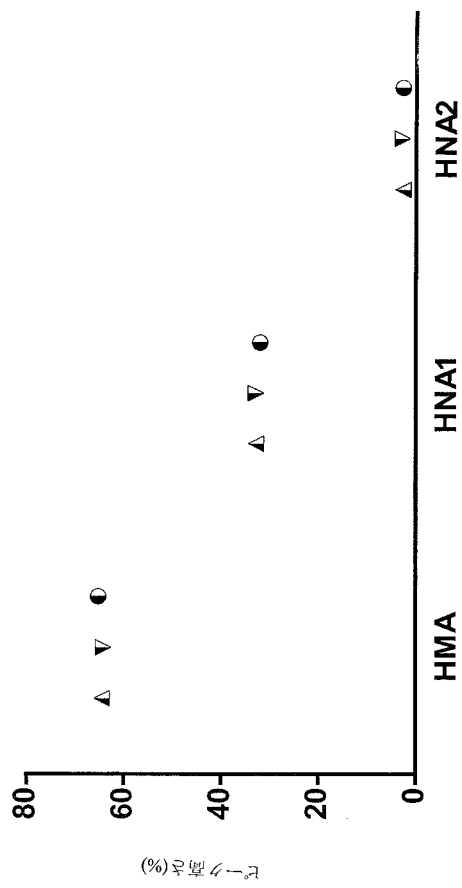
【 図 6 】

FIGURE 6



【 図 7 】

FIGURE 7



フロントページの続き

(72)発明者 アナ・マリア・オルティス・フェルナンデス
スペイン・08150・(バルセロナ)・パレッツ・デル・ヴァレス・ポリゴノ・インドゥストリ
アル・レヴァンテ・カリエ・カン・グアスク・2

(72)発明者 モンセラット・コスタ・リエローラ
スペイン・08302・(バルセロナ)・マタロ・カリエ・ロヘール・デ・フロール・5 - 7

Fターム(参考) 4C084 AA02 DA36 NA03 ZC371
4H045 AA20 AA30 BA10 CA42 DA70 EA34 FA71 FA74 HA06

【外国語明細書】
2015224251000001.pdf