

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2016-539314

(P2016-539314A)

(43) 公表日 平成28年12月15日(2016.12.15)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
<b>GO 1 N 33/53</b> (2006.01)	GO 1 N 33/53 V	4 C 0 8 5
<b>GO 1 N 33/543</b> (2006.01)	GO 1 N 33/53 S	4 H 0 4 5
<b>A 6 1 K 39/155</b> (2006.01)	GO 1 N 33/543 5 4 5 A	
<b>CO 7 K 14/42</b> (2006.01)	A 6 1 K 39/155	
<b>CO 7 K 14/11</b> (2006.01)	CO 7 K 14/42 Z N A	

審査請求 有 予備審査請求 有 (全 40 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2014-546715 (P2014-546715)	(71) 出願人	504389991 ノバルティス アーゲー
(86) (22) 出願日	平成24年12月12日 (2012.12.12)		スイス国 バーゼル リヒトシュトラーセ 35
(85) 翻訳文提出日	平成26年6月11日 (2014.6.11)	(74) 代理人	100078282 弁理士 山本 秀策
(86) 国際出願番号	PCT/IB2012/057235	(74) 代理人	100113413 弁理士 森下 夏樹
(87) 国際公開番号	W02013/088367	(72) 発明者	ドルミツチャー, フィリップ アメリカ合衆国 マサチューセッツ 02 139, ケンブリッジ, シドニー ス トリート 45, ノバルティス ヴァク シンス アンド ダイアグノスティクス
(87) 国際公開日	平成25年6月20日 (2013.6.20)		
(31) 優先権主張番号	61/569,597		
(32) 優先日	平成23年12月12日 (2011.12.12)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 インフルエンザウイルス血球凝集素のためのアッセイ法

## (57) 【要約】

本発明は、2つの重要な工程を含むプロセスを使用してHAを定量化する：HAは、スノードロップレクチンなどのレクチンを使用して捕獲する；そして捕獲したHAは、免疫アッセイを使用して定量化する。このアッセイは、ELISA形式において簡便に行うことができる。本プロセスは、特異的であり、混入物に対しても頑健であり、および標準的なSRIDアッセイよりも迅速かつ感受性である。一局面において、試料におけるインフルエンザウイルス血球凝集素（HA）を検出するための方法が提供され、この方法は：(i) 固体担体上に固定されたレクチンに上記試料を接触させ、捕獲された血球凝集素を提供する工程；および(ii) 免疫アッセイによって上記捕獲された血球凝集素を検出する工程を含む。

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

試料におけるインフルエンザウイルス血球凝集素（HA）を検出するための方法であって：  
（i）固体担体上に固定されたレクチンに前記試料を接触させ、捕獲された血球凝集素を提供する工程；および（ii）免疫アッセイによって前記捕獲された血球凝集素を検出する工程を含む方法。

## 【請求項 2】

前記レクチンがGNAレクチンである、請求項1の方法。

## 【請求項 3】

工程（ii）が前記試料における血球凝集素の量および／または濃度の決定を可能にする定量的工程である、請求項1または2の方法。

10

## 【請求項 4】

前記試料が（a）1つのインフルエンザウイルス株のみからの血球凝集素または（b）複数のインフルエンザウイルス株からの血球凝集素を含む、請求項1～3のいずれか1項の方法。

## 【請求項 5】

前記HAがインフルエンザAウイルスHAを含む、請求項1～4のいずれか1項の方法。

## 【請求項 6】

前記HAがH1、H3またはH5 HAである、請求項5の方法。

## 【請求項 7】

前記HAがインフルエンザBウイルスHAを含む、請求項1～6のいずれか1項の方法。

20

## 【請求項 8】

前記試料におけるHAがインフルエンザビリオン由来である、請求項1～7のいずれか1項の方法。

## 【請求項 9】

前記試料が（i）インフルエンザウイルス血球凝集素、および（ii）インフルエンザウイルス抗原PB1、PB2、PA、NP、NA、M1、M2、NS1および／またはNS2を含む、請求項1～8のいずれか1項の方法。

## 【請求項 10】

前記試料が完全なインフルエンザビリオンを含む、請求項1～9のいずれか1項の方法。

30

## 【請求項 11】

前記試料が分割したインフルエンザビリオンを含む、請求項1～10のいずれか1項の方法

。

## 【請求項 12】

前記試料がインフルエンザビリオンから精製された表面抗原を含む、請求項1～11のいずれか1項の方法。

## 【請求項 13】

前記HAがHA1である、請求項1～12のいずれか1項の方法。

## 【請求項 14】

前記試料が（i）血清成分、（ii）卵タンパク質および／または（iii）ニワトリDNAを含まない、請求項1～13のいずれか1項の方法。

40

## 【請求項 15】

前記試料がインフルエンザウイルスタンパク質以外のウイルスタンパク質を含まない、請求項1～14のいずれか1項の方法。

## 【請求項 16】

前記試料が界面活性剤を含む、請求項1～15のいずれか1項の方法。

## 【請求項 17】

前記試料がバルクワクチンである、請求項1～16のいずれか1項の方法。

## 【請求項 18】

ワクチンを解析するための方法であって：（a）請求項1～17のいずれか1項の方法によ

50

り、前記ワクチンにおける、またはその試料における血球凝集素を検出する工程；および（b）工程（a）の結果を使用して前記ワクチンにおける前記血球凝集素の濃度を算出する工程を含む方法。

【請求項19】

所望の血球凝集素濃度のバルクワクチンを提供するための方法であって：（a）請求項18の方法によって、前記ワクチンにおける、またはその試料における血球凝集素を解析する工程；（b）工程（a）の結果を使用して前記バルクワクチンにおける前記血球凝集素の濃度を算出する工程；および（c）工程（b）の結果を使用して、前記所望の血球凝集素濃度を与えるために前記バルクワクチンを希釈する工程を含む方法。

【請求項20】

前記所望の血球凝集素濃度が1～150 μg/ml、たとえば90 μg/ml、45 μg/ml、30 μg/ml、15 μg/ml、10 μg/ml、7.5 μg/ml、5 μg/ml、3.8 μg/ml、3.75 μg/ml、1.9 μg/mlまたは1.5 μg/mlである、請求項19の方法。

【請求項21】

患者の使用のためにワクチンを提供するための方法であって：請求項19または請求項20の方法によって所望の血球凝集素濃度のバルクワクチンを調製する工程；および次いで、希釈した前記バルクからワクチンの1つまたは複数の単位用量を抽出する工程を含む方法。

【請求項22】

抽出した単位用量が第2のキット成分と組み合わせたキット成分としてパッケージされ、前記第2のキット成分がワクチンのアジュバントである、請求項21の方法。

【請求項23】

増強されたバルクワクチンを提供するための方法であって：請求項19または請求項20の方法によって所望の血球凝集素含量のバルクワクチンを調製する工程；および次いで、希釈した前記バルクワクチンをアジュバントと混合する工程を含む方法。

【請求項24】

患者の使用のために増強されたワクチンを提供するための方法であって：請求項23の方法によって増強されたバルクワクチンを提供する工程；および次いで、前記バルクからワクチンの1つまたは複数の単位用量を抽出する工程を含む方法。

【請求項25】

（i）マルチウェル固体担体（ii）レクチンおよび（iii）酵素学的なインフルエンザウイルス血球凝集素検出試薬を含むELISAキット。

【請求項26】

試料におけるインフルエンザウイルス血球凝集素を定量化するためのELISA法であって：（i）固体担体上に固定されたレクチンに前記試料を接触させ、捕獲された血球凝集素を提供する工程；（ii）前記捕獲された血球凝集素に抗血球凝集素抗体を介して酵素を付着させる工程；および（iii）付着された前記酵素を使用して基質を生成物に変換する工程を含み、前記生成物の定量的検出が前記試料におけるインフルエンザウイルス血球凝集素の量を示す、ELISA法。

【請求項27】

試料におけるインフルエンザウイルス血球凝集素を精製するための方法であって、固体担体上に固定されたレクチンに前記試料を接触させる工程を含み、前記レクチンはマンノース結合レクチンであり、ただし前記レクチンがConAレクチンではない、方法。

【請求項28】

前記レクチンがGNAレクチンである、請求項27の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

この特許出願は、2011年12月12日に出願された米国仮出願61/569,597の利益を主張し、その内容はこれによって本明細書に完全に援用される。

10

20

30

40

50

## 【0002】

本発明は、たとえばワクチンを解析するための、インフルエンザウイルス血球凝集素のためのアッセイ法の分野のものである。

## 【背景技術】

## 【0003】

不活性化されたインフルエンザワクチンにおける血球凝集素(HA)含量のための標準的なアッセイは、一元放射免疫拡散法(「SRID」)[1、2]に基づいており、それは赤血球の凝集に基づいた試験に取って代わるように1978年にWHOによって推奨された。

## 【0004】

SRIDアッセイは十分に確立されているが、行うのが遅く、乏しいダイナミックレンジ、かなりのばらつきを有し、および必要とされる特異的抗HA血清を調製しかつ較正するために長時間かかることがある。その上、工程内モニタリングのために使用することができない。したがって、人々は、インフルエンザHAを定量化するために、非SRIDアッセイ法を探し求めてきた。

10

## 【0005】

例として、参照文献3は、RP-HPLCによって追従される限外濾過を使用するアッセイを開示する。参照文献4は、界面活性剤の存在下でHAを還元させ、アルキル化してそのスルフヒドрил基を保護し、RP-HPLCカラムに適用して、次いでイオンペアリング薬剤で有機移動相に溶出させる方法を開示する。参照文献5は、脱グリコシル化された試料の電気泳動的分離をデンシトメトリーとともに使用する。ELISAアッセイ法もまた、たとえば参照文献6に報告されている。

20

## 【0006】

SRIDのいくつかの代替手段は、試料の修飾(たとえば、脱グリコシル、変性、またはスルフヒドрил誘導体化)を包含する。いくつかはまた、株識別を欠いており、そのため複数の異なる血球凝集素を含有する製品(たとえば、通常3つのウイルスの株からのHAを含有する季節的なワクチン)の解析のためには有用でない。さらにまた、いくつかの物理化学的技術に基づいたアプローチは、高度に訓練されたスタッフを必要とすることがある。

## 【0007】

インフルエンザウイルスHAを定量化するためのSRIDアッセイ法のさらなる、および改善された代替手段の需要が残されている。

30

## 【先行技術文献】

## 【特許文献】

## 【0008】

【特許文献1】国際公開第2010/136896号

【特許文献2】国際公開第2005/090390号

## 【非特許文献】

## 【0009】

【非特許文献1】Williams、Vet Microbiol(1993)37:253~262

【非特許文献2】FitzgeraldおよびNeedy、Dev Biol Stand d(1986)64:73~79

40

## 【発明の概要】

## 【課題を解決するための手段】

## 【0010】

本発明は、2つの重要な工程を含む方法を使用してHAを定量化する: HAは、スノードロップレクチンなどのレクチンを使用して捕獲する;そして捕獲したHAは、免疫アッセイを使用して定量化する。このアッセイは、ELISA形式において簡便に行うことができる。本方法は、特異的であり、試料におけるその他の成分に対しても頑健であり、および現在のSRIDアッセイよりも迅速かつ感受性である。しかし、都合よく、それは、SRIDアッセイでの使用のために公衆衛生当局によって現在調製される試薬(たとえば、抗HA抗体)を利用

50

することができ、また、免疫アッセイのための異なる抗HA抗体を使用することによって単一の捕獲された試料において異なるHAタンパク質を定量化するために使用することができる。

【0011】

したがって、本発明は、試料における（たとえば、ワクチンにおける）インフルエンザウイルス血球凝集素を検出するための方法であって：（i）固体担体上に固定されたレクチンに試料を接触させ、捕獲された血球凝集素を提供する工程；および（ii）免疫アッセイによって捕獲された血球凝集素を検出する工程を含む方法を提供する。検出工程は、理想的には定量的工程であり、それによって、本来の試料におけるHAの量を定量化することを可能にする。したがって、本発明はまた、試料における（たとえば、ワクチンにおける）インフルエンザウイルス血球凝集素の量および/または濃度を定量化するための方法であって：（i）固体担体上に固定されたレクチンに試料を接触させ、捕獲された血球凝集素を提供する工程；および（ii）定量的免疫アッセイによって捕獲された血球凝集素を検出する工程を含む方法を提供する。工程（ii）において検出されるHAの量は、試料におけるHAの量および/または濃度を算出するために使用することができる。

10

【0012】

本発明はまた、インフルエンザHAを含有するバルク抗原を提供し、バルク材料の試料は、本発明の方法によって解析されたものである。

【0013】

本発明はまた、インフルエンザHAを含むワクチンであって、ワクチンは、（i）本発明の方法によって解析されたバルク抗原から調製されるワクチンおよび/または（ii）バッチからの少なくとも1つのワクチンが本発明の方法によって解析された、ワクチンのバッチの一部であるワクチンを提供する。

20

【0014】

本発明はまた、ELISAによって試料のインフルエンザウイルスHA含量を解析するための方法において、HAを捕獲するためにレクチンを使用することからなる改善を提供する。

【0015】

本発明はまた、以下を含むELISAキットを提供する：（i）マルチウェル固体担体（ii）レクチンおよび（iii）酵素学的なHA検出試薬。本キットはまた、酵素学的なHA検出試薬のための基質を含有することができる。検出試薬は、酵素抱合型の抗HA抗体または酵素が付着することができる標識化された抗HA抗体であることができる。キットにおけるレクチンは、遊離型であることができるが、しかし理想的には固体担体に固定され、すなわち本キットは、以下を含む：（i）その中の少なくとも1つのウェルにおいてレクチンがインフルエンザウイルスHAの捕獲のために固定される、マルチウェル固体担体、および（ii）酵素学的なHA検出試薬。

30

【0016】

本発明はまた、インフルエンザウイルスHAのELISA解析における使用のために、特にHAを含むインフルエンザワクチンの解析のために、レクチン（たとえば、GNAレクチン）が固定された固体担体を提供する。このような固体担体は、GNAレクチンの技術において公知である[7]が、従来はインフルエンザHAまたはワクチンの解析のために使用されてこなかった。担体は、マルチウェルプレートであることができる。担体は、その結合特性が、それが広範囲の異なるインフルエンザウイルス株に由来するHAを解析するために使用することができることを意味するので都合がよく、すなわちそれは普遍的なインフルエンザウイルスHA捕獲試薬として使用することができる。

40

【0017】

本発明はまた、インフルエンザウイルス血球凝集素に特異的な抗体であって、抗体は、ELISAを行うための酵素の付着のためのビオチンまたはストレプトアビジン基を有する抗体を提供する。抗体は、理想的にはヒツジ抗体、たとえば現在SRIDアッセイ法のために使用されるようなポリクローナルヒツジ血清である。

【0018】

50

レクチンに基づいた捕獲工程は、任意の検出または定量化がないとしてもHAの精製のために有用である。したがって、本発明はまた、試料におけるインフルエンザウイルス血球凝集素を精製するための方法であって：固体担体上に固定されたレクチンに試料を接触させる工程を含む方法を提供する。次いで、レクチンによって捕獲されるHAを溶出して、精製されたHA材料を提供することができる。したがって、たとえば、レクチンに基づいた捕獲工程は、インフルエンザHAのための調製技術として、たとえば、高純度なHA標準を調製するために、使用することができる。このような標準は、インフルエンザワクチンの調製において有用であり得る。

#### 【0019】

本発明はまた、インフルエンザウイルスHAのアフィニティー精製における使用のための、レクチン（たとえば、GNAレクチン）が固定されるアフィニティークロマトグラフィー担体またはカラムを提供する。このような材料は、すでに利用可能であるが（たとえば、Vector Laboratoriesからのアガロース結合GNAレクチン）、インフルエンザウイルスHAの精製におけるこれらの使用は新しい。

10

#### 【0020】

本発明はまた、レクチンによるHAの捕獲を含む方法によって調製された、精製されたインフルエンザウイルスHAを提供する。精製されたHAは、好ましくは標準試薬として、たとえばワクチン製造の一部として、使用することができるように、公知のHA濃度を有する。この精製されたHAは、細胞培養において、たとえばMDCK細胞において増殖したインフルエンザウイルスから調製されるときに、特に有用である。本発明はまた、インフルエンザワクチンを調製するための方法であって：この方法によって調製されるHA標準を使用することによってワクチン（またはその試料）を解析する工程を含む方法を提供する。例として、精製されたHAは、対照として、またはその他のアッセイ法のための、たとえばSRIDのための、校正試薬として使用することができる。有用には、HAが実質的に材料における唯一のタンパク質成分であるように、精製されたHAには、その他のタンパク質（たとえばインフルエンザウイルスノイラミニダーゼ）が実質的にない。

20

#### 【0021】

##### HAのレクチン捕獲

本発明の方法は、インフルエンザウイルスHAを捕獲するために、固定されたレクチンを使用する。レクチンは、理想的には -1,3結合マンノース残基などのマンノース残基に結合する。種々のマンノース結合レクチンは当該技術分野において公知であり、およびこれらは典型的には、スノードロップ (*Galanthus nivalis*、「GNA」レクチン)からの、スイセン (*Narcissus pseudonarcissus*、「NPA」レクチン)からの、ニンニク (*Allium sativum*、「ASA」レクチン)からの、およびレンズマメ (*Lens culinaris*、「LCH」レクチン)からのものなどの、植物レクチン（および、特に単子葉植物レクチン）である。コンカナバリンA (*Canavalia ensiformis*からの、「ConA」レクチン)は、一般的に用いられるマンノース結合レクチンである。本発明で使用するためのレクチンは、好ましくはConAレクチンではないマンノース結合レクチンである。レクチンは、好ましくはガラクトース結合レクチンでない。ガラクトース結合レクチンの例は、 $\alpha$ -ガラクトース特異的 *Erythrina christagalli*レクチン (ECL) および  $\beta$ -ガラクトース特異的 *Euonymuseuropaeus*レクチン (EEL) を包含する。

30

40

#### 【0022】

マンノースは、糖タンパク質（たとえば、HAおよびNA）における共通の炭水化物残基である。マンノース結合レクチンが特異的にかつ効率的にその他のウイルスの成分からHAを捕獲できるかどうかは、不明であった。驚くべきことに、本発明者らは、マンノース結合レクチン（たとえば、GNAレクチン）が高特異性でHAを捕獲することができることを見いだした。特に、マンノース結合レクチンは、これらのHAグリコシル化レベルとは独立して、異なるインフルエンザウイルス株のHAを捕獲することができる。本発明者らはまた、マンノース結合レクチンが、種々の宿主、たとえば卵およびMDCK細胞において増殖したインフルエンザウイルスのHAをも捕獲することができることを見いだした。故に、ウイルスエ

50

ンペロブ糖タンパク質の宿主細胞依存的なグリコシル化の変化は、HAに対するマンノース結合レクチンの捕獲特異性に影響を及ぼすように見えない。

#### 【0023】

本発明で使用するためのレクチンは、理想的には、HAに対して、その他のウイルスのエンペロブタンパク質（すなわち、HAでない）、中空カプシド、宿主（すなわち、インフルエンザウイルスが成長するための）由来の核酸および/またはタンパク質に対してより高い結合親和性を有する。本発明で使用するための好ましいレクチンは、GNAであり、元来はスノードロップの球根から調製される。このレクチンは、天然ではホモテトラマーであり、および少なくとも6個の異なるアミノ酸配列変異体またはアイソフォームがGNAレクチンについて報告されている（本明細書において配列番号：1~6）。その3D構造が決定している。テトラマーにおける各モノマーは3つのサブドメインを有し、そのそれぞれはマンノースに結合して12価レクチンを与えることができる。多くのマンノース結合レクチンと異なり、(a)それは金属タンパク質でなく、およびその結合活性は二価カチオンを必要としない(b)それはまた、結合グルコース残基に結合しない。以下に示すように、GNAレクチンは、インフルエンザウイルスHAを効率的に捕獲して、たとえば検出のための、定量化のための、または標準抗原としての使用などのための、精製された材料を提供する。

10

#### 【0024】

本発明は、野生型GNAレクチンを使用することができ、または野生型GNAレクチンの有用なHA結合活性をなおも保持する修飾形態を使用することができる。したがって、本発明で使用するレクチンは、配列番号：1~6のアミノ酸配列のいずれかを含むことができ、それらはGNAレクチン前駆体の変異体である。あるいは、レクチンは、以下を含むことができる(i)：配列番号：1~6のいずれかからの少なくともn個連続したアミノ酸の断片；および/または(ii)配列番号：1~6のアミノ酸配列のいずれかに対して少なくともx%の配列同一性のあるアミノ酸配列、ただし、それはインフルエンザウイルスHAに結合することができ、xは70またはそれ以上、たとえば75、80、85、88、90、92、94、95、96、97、98、99またはそれ以上（たとえば、100）であり、およびnは7またはそれ以上である（たとえば、8、10、12、14、16、18、20、25、30、35、40、50、60、70、80、90またはそれ以上）。適した断片は、配列番号：1~6の天然のシグナルペプチドが欠いているもの（たとえば、配列番号：6のアミノ酸1-26が欠いているもの）を含む。種々のGNA関連レクチンは、当該技術分野において公知である[8]。しかし、公知のGNA、その変異体またはアイソフォームおよびGNA関連レクチンのいずれも、インフルエンザワクチン製造の一部として、たとえばHAを精製する、検出する、または定量化するために、使用されてこなかった。

20

30

#### 【0025】

レクチンは、典型的にはオリゴマー、たとえばテトラマーの形態において使用されるだろう。

#### 【0026】

本発明で使用するために、レクチンは、固体担体上に固定される。適切な担体は、任意のアッセイにおいて意図される形式に応じて選択することができ、たとえば担体は固体のプレート、ビーズ、カラム担体などであってもよい。好ましい担体は、ELISAアッセイにおける使用に適するプレートである。例としては、レクチンは、プラスチックマルチウェルプレート、たとえば96ウェルまたは384ウェルのマイクロタイタープレート、の上に固定されることができる。ポリスチレン担体がELISAのために典型的であり、しかしポリラクタート担体もまた使用することができる。

40

#### 【0027】

その他の固体担体、たとえば典型的にはアフィニティークロマトグラフィー法において使用するものは、充填床、膜吸着器およびモノリスを含有する[9]。充填床については、マトリックスは、典型的には樹脂（ビーズ）を含有し、および通常ポリマーまたは無機の樹脂材料で作製される。重合体に基づくビーズは、天然ポリマー（たとえば、アガロース、アガロース-デキストランコンポジット、セルロースおよびデキストラン）または合

50

成ポリマー（たとえば、ポリアクリルアミド、ポリスチレンジビニルベンゼン、ポリアクリルアミドおよびポリメタクリレートの誘導体）で作製することができる。無機の樹脂材料の例は、ハイドロキシアパタイト、シリカおよび調整多孔質ガラスを含む。ビーズは、球形および非球状の形であることができ、並びに多孔性、非多孔性およびソリッドコアの樹脂として利用可能である。従来の多孔性ビーズの孔径は、10～100nmの範囲である。モノリスは、ポリメタクリレートコポリマー、ポリアクリルアミド、ポリスチレン、ポリスチレン-ジビニルベンゼン、修飾されたセルロースおよびシリカでできたものを含有する。モノリスは、種々の孔径を有するディスク形状、チューブ形状およびロッド形状であることができる。適した膜吸着器は、セルロース、ポリアミン、ポリスルホン、ヒドラジドおよび複合膜（たとえばヒドロキシエチルセルロースで被覆されているポリエチレンオキシドおよびポリエーテルサルホン）を含有する。膜吸着器は、フラットシート、ホローファイバーまたは半径流式装置であることができる。

10

**【0028】**

レクチンの固定は、種々の方法において達成することができる。多くのアッセイ形式（たとえばELISA）については、担体に非特異的にタンパク質を吸着させることは十分でありえる；その他の形式については、レクチンは、たとえばアフィニティークロマトグラフィー担体を調製するために一般に使用されるように、標準的な化学的性質を使用して共有結合性リンカーを用いることにより固定することができる。

**【0029】**

捕獲されたHAがアッセイされることになる態様については、アッセイされる前にHAを溶出させる必要がない（しかし、いくつかの非ELISAアッセイ形式については、このような溶出はそれでもなお望まれるかもしれないし、または必要かもしれない）。HAが精製される態様については、HAは捕獲の後溶出させられなければならない、およびこれは、アフィニティークロマトグラフィーにおいて典型的なように、固定されたレクチンに、レクチンに対し高アフィニティリガンド、たとえば遊離型のマンノースまたはマンノース含有オリゴ糖を接触させることによって達成することができる。

20

**【0030】****HAの免疫アッセイ**

本発明の大部分の態様は、免疫アッセイを使用して捕獲されたHAを検出する工程を含む。免疫アッセイは、理想的には定量的免疫アッセイであり、その結果、検出工程により試料におけるHAの量を決定することが可能になる。

30

**【0031】**

免疫アッセイは、抗HA抗体を使用してもよく、それはポリクローナルまたはモノクローナルであることができる。理想的には、抗体は株特異的であり、その結果、特定のHAをその他のHA種の存在下であっても検出することができる。例としては、現在の季節的なワクチン（A/H1N1、A/H3N2およびB株）において、本発明（SRID様）は、各々がHAタンパク質の1つのみに対して特異的である3つの異なる抗HA抗体を使用することによって、互いの存在下でさえ3個のHAタンパク質のそれぞれの測定を可能にすることができる。したがって、本発明は、特異的検出（試料に存在する異なるHAタンパク質の間で区別することができる免疫アッセイを介する）以外の普遍的な捕獲（それぞれのHAに結合するレクチンを介する）を含むことができる。しかし、いくつかの態様において、特に一価のHA材料（たとえば、一価のバルクワクチン）を解析する際に、本発明は、複数のHAタイプからのHAまたは同じHAタイプを持つ複数の株からのHAと広く反応性のある抗HA抗体（たとえば、モノクローナル抗体）を使用して容易に行うことができる。

40

**【0032】**

適した抗HA抗体は、広く利用可能である。たとえば、公衆衛生機関は、各インフルエンザシーズンにおけるワクチンの解析に使用するための抗血清を調製する。これらの抗血清は本発明で使用することができるが、その他の抗HA抗体もまた使用することができる。抗体は、ELISAの目的で酵素の付着を可能にするために、修飾してもよい（下記参照されたい）。

50

## 【 0 0 3 3 】

抗HA抗体は、理想的にはIgG抗体である。ヒツジIgGは、本発明で特に有用である。適したヒツジIgGは、公衆衛生当局によりSRID試薬として提供される参照血清から精製することができる。

## 【 0 0 3 4 】

免疫アッセイは、理想的には、インサイチューで、すなわちレクチンにまだ結合しているHAについて行われる。別の態様において、HAはレクチンから溶出し、および免疫アッセイは溶出後に行う、すなわちHAはレクチンにもはや結合していない。

## 【 0 0 3 5 】

## ELISA形式

本発明の好ましい態様は、ELISA形式であり、およびより好ましくは、サンドイッチELISA形式である。試薬、設備および技術がそれについて非常によく知られているため、この形式は有用であり、および標準プロトコル（たとえば固定、捕獲、洗浄、検出、校正、その他）は信頼できる定量的結果を提供するために容易に使用することができる。

## 【 0 0 3 6 】

ELISA形式では、固定されたレクチンがHAを捕獲し、および次いで捕獲されたHAが抗HA抗体に曝露される。アッセイ形式は、一次抗体（HAに結合する）および二次抗体（一次抗体に結合する）を含むことができ、二次抗体は酵素を含む。この一次/二次の配置は、それぞれの新たなHAのために新たな酵素抱合型の検出用抗体を調製することを必要とせず、同じ酵素結合二次抗体を複数回使用することができることを意味する。しかし、好ましい形式において、ELISAは標識化された抗HA抗体を使用し、次いでこれを標識に結合する酵素と接触させる。たとえば、ビオチン抱合型の抗HA抗体は捕獲されたHAに結合することができ、次いで、ストレプトアビジン抱合型の酵素を添加する。ここで固体担体上に固定された酵素は、標準的なELISA技術におけるように、次いで容易にアッセイすることができる反応を触媒するために使用する。

## 【 0 0 3 7 】

本発明は、ELISAにおける使用に適する任意の酵素、たとえば、着色された、発光性の（たとえば蛍光性の）または電気化学的に活性な生成物などの、検出可能な生成物に基質を変換することができる任意の酵素を使用することができる。このような酵素は、限定されないが、アルカリホスファターゼ（pNPPを着色した可溶性生成物に変換することができる）または西洋ワサビペルオキシダーゼなどのペルオキシダーゼ（テトラメチルベンジジンを変換して着色した可溶性生成物を生成することができる；その他の典型的な基質はABTS、OPDを含む）を含む。

## 【 0 0 3 8 】

本発明は、既存のELISAプロトコルからの標準的および公知の工程、たとえば校正、洗浄、ネガティブコントロール、ポジティブコントロール、複製、その他を利用する。ELISA技術は、理想的には96または384ウェルプレートにおいて行う。

## 【 0 0 3 9 】

いくつかの態様において、本発明は、参照文献10において開示される代わりにELISAプロトコルを利用することができる。このプロトコルにおいて、抗HA抗体およびHAは、HAをレクチンと接触させる前に混合する。しかし、その他の態様において、HAをレクチンによって捕獲し、次いで抗HA抗体を添加する標準的なELISAプロトコルを使用する。代わりにプロトコルを使用する場合、その方法は、HA上のレクチンの結合部位を遮断しない抗HA抗体を使用すべきであり、この要件を満たすモノクローナル抗体を選別することは簡単である。

## 【 0 0 4 0 】

本発明者らは、ELISAがたとえばNIBSCおよびCBER参照血清において見いだすことができる抗宿主（たとえば、卵）抗体に感受性であり得ることを見だし、これは試料の不正確な校正および/または不正確な定量化に至る可能性があった。本発明者らは、抗HA抗体が起こされるウイルスおよびHA（校正標準または試料において）が異なる供与源に由来する

10

20

30

40

50

場合、この不正確さを最小にすることができることを見いだした。たとえば、卵において増殖したインフルエンザウイルス（すなわち、卵由来インフルエンザウイルス）に対して起こした抗HAは、細胞培養において増殖したインフルエンザウイルスからのHA（すなわち、細胞培養由来HA）を検出するために使用することができる。逆に、細胞培養において増殖したインフルエンザウイルス（すなわち、細胞培養由来インフルエンザウイルス）に対して生じた抗HA抗体は、卵において増殖したインフルエンザウイルスからのHA（すなわち、卵由来HA）を検出するために使用することができる。

【0041】

したがって、本発明は、本発明のELISA形式を使用して細胞培養由来HAを含む試料におけるHAを定量化するための方法であって、ELISAは、細胞培養由来HAおよび卵由来インフルエンザウイルスに対して生じた抗HA抗体を使用して較正される方法を提供する。有用な抗HA抗血清は、NIBSCまたはCBERによって提供されたものを含む。

10

【0042】

逆に、本発明は、本発明のELISA形式を使用して卵由来HAを含む試料におけるHAを定量化するための方法であって、ELISAは、卵由来HAおよび細胞培養由来インフルエンザウイルスに対して生じた抗HA抗体を使用して較正される方法を提供する。

【0043】

ELISAのための抗原較正標準は、典型的には公知のHA濃度を有し、たとえばELISA、SRIDまたは280nmでの吸収およびBCAアッセイなどのその他の従来のアッセイ法によって定まる。

20

【0044】

HAの精製

本発明の方法は、捕獲工程においてレクチンを使用して試料からHAを精製する。したがって、本発明は、試料におけるインフルエンザウイルスHAを精製するための方法であって、固体担体上に固定されたレクチンに試料を接触させる工程を含む方法を提供する。たとえば、本発明は、アフィニティークロマトグラフィー法におけるアフィニティリガンドとして、レクチンを使用する。1つの態様において、本発明は、試料からのHAの回収および精製のためにアフィニティークロマトグラフィー担体またはカラム上に固定されたレクチンを使用する。

【0045】

理想的には、精製されたHAタンパク質は、その免疫原性（すなわち、被験体に投与されるときに、それは抗体産生を誘発することができる）および活性（たとえば、それは赤血球を凝集させることができる）を保持する。精製されたHAは、ワクチン成分として使用することができる。したがって、本発明は、HAを含むインフルエンザウイルスワクチンを調製するための方法であって：固体担体上に固定されたレクチンに試料を接触させること、および試料からHAを精製すること。本発明はまた、本発明の方法によって精製されたHAを含むインフルエンザウイルスワクチンを提供する。

30

【0046】

あるいは、精製されたHAは、インフルエンザワクチンの調製のために、たとえば免疫アッセイ（たとえば、ELISAまたはSRID）において、対照としてまたは較正標準として使用することができる。したがって、本発明は、HA較正標準を調製するための方法であって：固体担体上に固定されたレクチンに試料を接触させること、および試料からHAを精製することを含む方法を提供する。本発明はまた、本発明の方法に従って調製されるHA較正標準を提供する。

40

【0047】

本発明の方法は、マンノース結合レクチンを使用することができ、ただしレクチンはCo nAレクチンではない。好ましくは、上述したように、レクチンは、GNAレクチン、その変異体もしくはアイソフォームまたはGNA関連レクチンである。

【0048】

本発明の方法は、卵または哺乳動物細胞において増殖したインフルエンザウイルスから

50

の抗原を含む試料を使用することができる。好ましくは、哺乳動物は、MDCKまたはVero細胞でない。本発明の方法は、少なくとも1つのインフルエンザウイルス株からの抗原を含む試料を使用することができる。好ましくは、試料は、複数のインフルエンザウイルス株を含む。

**【0049】**

本発明の方法は、HAを精製する前にインフルエンザウイルスを含む試料を処理すること、たとえばインフルエンザウイルスを不活性化すること、および/または分割することを含むことができる。したがって、HAを精製するための方法は、完全なウイルス粒子、分割したビリオン、精製された表面抗原またはピロソームを含有する、不活性化されたウイルスを含む試料を使用することができる。好ましくは、試料は、完全なビリオンを含まない。好ましくは、試料は、株A/Puerto Rico/8/34、A/Wisconsin/67/2005およびB/Malaysia/2506/2004の完全なビリオンを含まない。

10

**【0050】**

あるいは、本発明の方法は、生きているインフルエンザウイルスを含む試料を使用することができる。本発明はまた、HAを含むインフルエンザウイルスワクチンであって、ワクチンは、(i) HAパルクから調製されるワクチンであり、パルクにおけるHAは、本発明の方法に従って調製されるHA較正標準を使用する方法において定量化され、および/または(ii) ワクチンのパッチの一部であり、パッチからの少なくとも1つのワクチンは、本発明の方法に従って調製されるHA較正標準を使用する方法において定量化される、ワクチンを提供する。

20

**【0051】**

精製されたHA試料は、理想的には、その他のウイルスの成分が実質的になく、ノイラミニダーゼ (NA)、遊離型のウイルスのエンベロプタンパク質、中空カプシドおよび核酸がないなどである。精製されたHAはまた、細胞培養からの宿主(たとえば、卵または細胞)タンパク質、核酸および試薬が実質的にない(ウイルスが細胞培養において増殖した場合)。理想的には、精製された試料は、最小の宿主(たとえば、卵またはMDCK細胞などの細胞)タンパク質を有する。

**【0052】**

理想的には、本発明は、タンパク質を精製するために当該技術分野において公知であるアフィニティークロマトグラフィー法、たとえばスピンカラムまたはFPLC[たとえば、参照文献11、12]におけるアフィニティリガンドとして、マンノース結合レクチンを使用する。クロマトグラフィー精製工程は、典型的には試料をアフィニティリガンドをインキュベートして検体を捕獲すること、および捕獲された検体を溶出することを含む。任意の洗浄工程を含むことができる。

30

**【0053】**

たとえば、本発明の精製方法は、レクチンが固定される固体担体(たとえば、アフィニティークロマトグラフィー担体またはカラム)を平衡化すること、担体上にレクチンを吸着させること、試料を固定されたレクチンとインキュベートしてHAを捕獲すること、および捕獲されたHAを精製されたHAタンパク質として溶出させることを含んでもよい。任意に、試料は、固定されたレクチンとインキュベートする前に、オクチルグルコシド(すなわち、n-オクチル-D-グルコピラノシド)と混合することができる。たとえば、オクチルグルコシドは、1.5% (w/v) の終濃度にて存在する。

40

**【0054】**

本発明に有用な固体担体は、上で考察してあり、および参照文献13においても考察してある。適した担体は、ポリマーマトリックス(たとえば約100nmの平均孔径および4.0~5.0mg/mlのリガンド密度を有するもの)を含む。ポリマーマトリックス上に固定されたレクチンは、GALAB Technologies GmbHから購入することができる。アガロース、たとえばCrosslinked Sepharose 4B、を含む担体はまた、本発明に適しており、特に約3mg/mlの沈下したゲルのリガンド密度を持つものである。架橋されたセファロース上に固定されたレクチンは、たとえばVector Laboratories Inc. Actigel ALD (SterogeneBioseparation Inc

50

.) から市販されており、約60-160  $\mu\text{m}$ のビーズサイズをもち、および約4%のアガロースもまた適し得る。

【0055】

また、活性化された多孔性ガラス粒子を含む適した固体担体、たとえばVitraBio GmbHからのTrisopor (登録商標) 4000 Diolも有用であろうし、これは約125~200  $\mu\text{m}$ の粒径および約350~400nmの孔径を有する。その他の有用な固体担体は、セルロースビーズ、たとえば約125~210  $\mu\text{m}$ の粒径を有するCellufine (商標) Formyl (Chisso Corporation) を含むものを含む。また、補強されたセルロース膜、たとえば約0.45  $\mu\text{m}$ の孔径を有する、たとえばSartobind (登録商標) Epoxy膜吸着器 (Sartorius AG) も適している。

【0056】

マンノース結合レクチンの固定は、種々の方法で達成することができる。たとえば、マンノース結合レクチンは、たとえばアフィニティークロマトグラフィー担体を調製するために一般に使用されるように、標準的な化学的性質を使用して共有結合性リンカーを用いて固定することができる。典型的には、固定されたレクチン密度は、約3-8mg/mlの吸着性である。当業者は、当該技術分野における公知の技術に従って適切な固定されたレクチン密度を決定することができるだろう。

【0057】

捕獲されたHAの溶出は、アフィニティークロマトグラフィーにおいて典型的なように、固定されたレクチンに、レクチンに対し高アフィニティリガンド、たとえば遊離型のマンノースまたはマンノース含有オリゴ糖を接触させることによって達成してもよい。捕獲されたHAは、 $\alpha$ -メチル-マンノピラノシドを使用して溶出させることができる。

【0058】

好ましくは、本発明の精製方法を使用して、出発材料における総HA (質量) からHA (質量) の少なくとも75%、80%、90%または95%が回収される。

【0059】

精製された試料におけるHAは、定量化することができ、たとえば本発明のELISAまたはその他のアッセイ法、たとえばHAを捕獲するための抗体を使用するELISA、SRID、280nmの吸収およびBCAアッセイによって決定される。

【0060】

精製されたHAは、1つまたは複数のさらなる工程、たとえばサイズ排除クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、HPLC、ヘパリン処理した、または硫酸化したマトリックスを使用したクロマトグラフィー、その他によって処理してもよい。本発明の方法は、精製されたHAの免疫原性、活性または毒性を評価するために当該技術分野において一般に使用されるさらなる試験を含んでもよい。

【0061】

精製されたHAをワクチンとして使用するとき、ワクチンは理想的にはレクチンを含まない。精製されたHA試料がレクチンを含む態様において、レクチンを除去するためにさらなる工程を含有することができる。血球凝集素15  $\mu\text{g}$ 当たり < 10ng (たとえば < 1ng、< 100pg) の宿主細胞DNAを含有するワクチンが好ましく、同様に0.25ml容積当たり < 10ng (たとえば < 1ng、< 100pg) の宿主細胞DNAを含むワクチンである。血球凝集素50  $\mu\text{g}$ 当たり < 10ng (たとえば < 1ng、< 100pg) の宿主細胞DNAを含有するワクチンがより好ましく、同様に0.5ml容積当たり < 10ng (たとえば < 1ng、< 100pg) の宿主細胞DNAを含むワクチンである。

【0062】

試料

本発明を使用して解析される、または精製される試料は、インフルエンザウイルス血球凝集素 (HA) を含む (または含むことが少なくとも推測される)。SRIDは、いくつかの株からのHAを含む材料 (たとえば三価材料) に対してたいいてい行われる。本発明は、多価試料 (たとえば2価、3価、4価またはそれ以上) に使用することができ、また適切な検出試薬を使用することによって各株から抗原を別々に検出および / または定量化することがで

10

20

30

40

50

き、適切な検出試薬はSRIDでの使用のためにすでに公知である。しかし、その他の態様において、本発明は、一価の試料におけるHAを解析する、または精製するために使用することができる。

#### 【0063】

本発明は、種々のタイプの試料に使用することができる。それは最終的なワクチンを解析するために用いることができるが、解析方法が破壊的であるためこれは通常バッチからの単一のワクチンであるだろうし、解析結果は、バッチの特性を示す。試料は、バルクワクチン材料から採取してもよく、解析結果は、全体としてバルクの特性を示す。その他の態様において、試料がウイルスを含有する流体でもよく、たとえばそれが細胞培養または卵からのウイルス含有収集液でもよい。したがって、試料は、出発材料、最終的なワクチン材料、またはウイルス培養と最終的なワクチンとの間の任意の製造中間体でもよい。好ましくは、試料は、宿主（すなわち、インフルエンザウイルスを生育させるための宿主）からの最小のタンパク質を有する。

10

#### 【0064】

試料は、典型的にはインフルエンザビリオンからのHAを含有するだろうが、あるいは、それは組換え宿主において（たとえば、パキユロウイルスベクターを使用した昆虫細胞株において）発現された、および精製されたHAを含んでもよく [14、15、16]、またはウイルス様粒子（VLPs；たとえば、参照文献17および18を参照されたい）の形態でもよい。しかし、一般的に、抗原はビリオン由来であるだろうし、そのため試料は、HAに加えて、その他のインフルエンザウイルスタンパク質（たとえばPB1、PB2、PA、NP、NA、M1、M2、NS1および/またはNS2タンパク質）を含んでもよく、およびインフルエンザウイルス脂質をも含んでもよい。

20

#### 【0065】

ビリオン由来インフルエンザウイルス抗原は、生きているウイルスまたは不活性化されたウイルスのどちらかに基づく（たとえば、参照文献19の17章および18章を参照されたい）。本発明は、生きているウイルスからのHAレベルを決定するために使用することができるが、生きているワクチンの投与は、HA含量よりもむしろ中間値の組織培養感染性の用量に基づき、そのため本発明は、通常は不活化ワクチンにおけるHAレベルを決定するために使用されるだろう。

#### 【0066】

不活化ワクチンは、完全なビリオン、「分割した」ビリオン、精製された表面抗原（HAを含有し、および通常、ノイラミニダーゼをも含む）またはピロソーム（核酸のないウイルス様リポソーム粒子 [20]）に基づいてもよい。本発明は、全てのこのようなワクチンに使用することができる。BEGRIVAC（商標）、FLUARIX（商標）、PREPANDRIX（商標）、FLUZONE（商標）およびFLUSHIELD（商標）製品は、分割したワクチンである。FLUVIRIN（商標）、AGRIPPAL（商標）、FLUAD（商標）およびINFLUVAC（商標）製品は、表面抗原ワクチンである。INFLEXAL V（商標）およびINAVAC（商標）製品は、ピロソームワクチンである。本発明は、分割した、および表面抗原ワクチンにおけるHA含量を測定するために、最も有用である。したがって、テキストはHAの捕獲をいい、これは遊離型のHAの捕獲であることができ、またはインフルエンザウイルスのその他の成分と組み合わせたHA（たとえば、インフルエンザビリオンの一部としてのHA）の捕獲であることができる。同様に、テキストは、HAの検出をいい、これは遊離型のHAの検出であることができ、またはインフルエンザウイルスのその他の成分と組み合わせたHAの検出（たとえば、インフルエンザビリオンの一部としてのHAの検出）であることができる。しかし、本発明の分取精製方法において、HAは、理想的には精製されたHAタンパク質として調製され、たとえばそれは、ノイラミニダーゼがないなど、その他のウイルスの成分が実質的でない。

30

40

#### 【0067】

本発明は、任意のインフルエンザウイルスタイプからのHAに使用することができ、インフルエンザAウイルスおよびインフルエンザBウイルス（起源にかかわらず、たとえばヒト、ウマ、鳥類、イヌ、ブタインフルエンザ）を含む。したがって、本発明は、多様なイ

50

ンフルエンザ株からのHAを解析する、または精製することに適する。本発明は、好ましくはヒトインフルエンザウイルス、特にヒトワクチンに包含させるための株のために使用する。

【0068】

インフルエンザAウイルスについては、本発明は任意の公知のHAサブタイプ（H1、H2、H3、H4、H5、H6、H7、H8、H9、H10、H11、H12、H13、H14、H15またはH16）からのHAに使用することができ、それは特にH1、H3およびH5株に有用である。株は、NAサブタイプN1、N2、N3、N4、N5、N6、N7、N8またはN9のいずれかを有してもよい。たとえば、本発明は、H1N1株、H1N2株、H3N2株、H5N1株、その他からの材料を解析するために使用することができる。本発明は、三価ワクチン、たとえばA/H1、A/H3およびBウイルスのそれぞれからのHAを含有する三価ワクチンを解析するために非常に有用である。

10

【0069】

インフルエンザBウイルスについては、本発明は、B/Victoria/2/87様株またはB/Yamagata/16/88様株からのHAに使用することができる。これらの2つの株のグループは、通常抗原的に区別されるが、アミノ酸配列における相違もまた2つの系統を区別するために記述されており、たとえばB/Yamagata/16/88様株はたいてい（しかし、常にでなく）、「Lee40」HA配列に対して番号をつけられたアミノ酸残基164が欠失したHAタンパク質を有する[21]。

【0070】

本発明の方法によって解析されるHAは、HA0として公知である全長の前駆体HAでもよい。しかし、いくつかの態様において、HAは、HA0の断片である。HA0は、トリプシンなどのセリンプロテアーゼによって断片化することができ、N末端断片（HA1）およびC末端断片（HA2）を生じ、それらはジスルフィド架橋によって連結されたままであることができる。したがって、本発明の方法は、HA0、HA1またはHA2を精製してもよく、およびこのような断片の1つのみ（たとえば、HA1の断片）の検出および解析を含み得る。精製され、および解析され得るその他のHA断片は、例として、プロメライン処理によって放出される断片またはプロメラインおよびトリプシンの両方での処理によって得られる断片を含む。典型的には、本方法はHA1を精製するだろうし、したがって、少なくともRP-HPLC工程は、HA1およびHA2が分離することを保証するために還元状態下（たとえば、DTTを使用する）で行うべきであり、またHA2からHA1の完全な切断を保証するために精製前消化工程（たとえば、トリプシンを使用する）を任意に含み得る（しかし、この消化はたいてい不必要であり、任意の全長HA0の存在は、消化が有用かどうか決定するために容易に試験することができる）。

20

30

【0071】

試料におけるHAは、HA1/HA2切断部位のまわりの高塩基性の領域を含んでもよいが、その他の態様において、この領域は存在しない。

【0072】

試料におけるHAは、Sia(2,3)Gal末端二糖を持つオリゴ糖と比較してSia(2,6)Gal末端二糖を持つオリゴ糖に対し結合優先性を有してもよく、または逆もまた同様であり、またはこのような優先性を示さなくてもよい。この優先性のためのアッセイ法は、参照文献22において考察してある。ヒトインフルエンザウイルスは、Sia(2,6)Gal末端二糖（シアル酸が-2,6結合したガラクトース）を有する受容体オリゴ糖に結合するが、卵およびVero細胞はSia(2,3)Gal末端二糖を持つ受容体オリゴ糖を有する。

40

【0073】

いくつかの態様において、HAは、卵由来ウイルスにおいて見られるパターンと異なるグリコシル化パターンを有する。したがって、HAは、ニワトリ卵において見られない糖型を含んでもよい。有用なHAは、イヌ糖型を含有し、たとえばウイルスがMDCK細胞において増殖したものであってもよい。その他の有用なHAは、ヒト糖型を含有し、たとえばウイルスがPER.C6細胞において増殖したものであってもよい。その他の有用なHAは、サル糖型を含有し、たとえばウイルスがVero細胞において増殖したものであってもよい。これらの細

50

胞株は、たとえばAmericanType Cell Culture (ATCC) コレクションから、Coriell Cell Repositoriesから、またはEuropeanCollection of Cell Cultures (ECACC) から、広く入手可能である。たとえば、ATCCは、カタログ番号CCL-81、CCL-81.2、CRL-1586およびCRL-1587のもとで種々の異なるVero細胞を供給し、およびそれはカタログ番号CCL-34のもとでMDCK細胞を供給する。PER.C6は、保管番号96022940のもとでECACCから利用可能である。1つの適したMDCK細胞株は「MDCK33016」であり、DSM ACC 2219として保管される [23]。

【0074】

インフルエンザウイルスを増殖するための最も好ましい細胞株は、MDCK細胞株 [23、24、25、26] であり、MadinDarbyイヌ腎臓に由来する。本来のMDCK細胞株は、CCL-34としてATCCから利用可能であるが、この細胞株の誘導体もまた使用してもよい。例として、参考文献23は、懸濁培養における生育に適応したMDCK細胞株を開示する（「MDCK 33016」、DSM ACC 2219として保管される）。同様に、参考文献27は、無血清培養の懸濁液において増殖するMDCK由来細胞株を開示する（「B-702」、FERM BP-7449として保管される）。参考文献28は、非腫瘍形成性MDCK細胞を開示し、「MDCK-S」（ATCCPTA-6500）、「MDCK-SF101」（ATCCPTA-6501）、「MDCK-SF102」（ATCCPTA-6502）および「MDCK-SF103」（PTA-6503）を含む。参考文献29は、感染に高感受性のMDCK細胞株を開示し、「MDCK.5F1」細胞（ATCC CRL-12042）を含む。これらのMDCK細胞株のどれでも使用することができる。

10

【0075】

本発明者らは、マンノース結合レクチンが、種々の宿主、たとえば卵およびMDCK細胞、において増殖したインフルエンザウイルスのHAを特異的に捕獲することができることを見いだした。したがって、本発明の方法は、これらのHAグリコシル化プロファイルと独立してHAを捕獲することができる。試料におけるHAは、特にインフルエンザAウイルスについて、野生株ウイルスからまたはリアソータントウイルスからであってもよい。リアソータントウイルスは、リバーシジェネティクス技術によって得られたものでもよい。したがって、試料は、異なる株からの、たとえばA/PR/8/34からの、A/AA/6/60からの、またはA/WSN/33からのその他のインフルエンザ抗原（たとえばPB1、PB2、PA、NP、M1、M2、NS1および/またはNS2タンパク質）以外の1つのウイルス株からのHAを含んでもよい。

20

【0076】

試料におけるHA濃度は、通常、0.1  $\mu\text{g/ml}$  ~ 10mg/ml、たとえば1  $\mu\text{g/ml}$  ~ 1mg/ml、または10  $\mu\text{g/ml}$  ~ 100  $\mu\text{g/ml}$  であるだろう。いくつかの態様において、濃度は約30  $\mu\text{g/ml}$ 、約15  $\mu\text{g/ml}$  または約7.5  $\mu\text{g/ml}$  である。本発明は、この範囲におけるHAを定量化するために使用することができる。

30

【0077】

試料は、血清成分を含んでもよいが、このような成分がないことが好ましい。

【0078】

試料は、卵タンパク質（たとえば、オボアルブミンおよびオボムコイド）および/またはニワトリDNAを含んでもよいが、いくつかの態様において、たとえばウイルスが細胞培養において増殖したときに、これらの成分がない。

【0079】

試料は、DNA、たとえばニワトリDNAまたは哺乳動物のDNA（たとえばMDCK細胞、Vero細胞、PER.C6細胞、その他に由来する）を含んでもよい。しかし、理想的には、試料は、HAのmg当たりの600ng未満のDNA（好ましくは60ng未満、およびより好ましくは6ng未満）を含有する。

40

【0080】

試料は、好ましくはインフルエンザウイルスタンパク質を除いてウイルスのタンパク質を含まない。

【0081】

試料は、特に分割または表面抗原ワクチン試料について、界面活性剤、たとえばポリオキシエチレンソルビタンエステル表面活性物質（「Tween」として公知、たとえばポリソルベート80）、オクトキシノール（オクトキシノール-9 (Triton X-100) または-10、ま

50

たはt-オクチルフェノキシポリエトキシエタノールなど)、セチルトリメチルアンモニウムブロミド(「CTAB」)またはデオキシコール酸ナトリウムを含んでもよい。界面活性剤は、微量、たとえば抗原製造からの残留物のみ存在してもよい。微量におけるその他の試料成分は、抗生物質(たとえば、ネオマイシン、カナマイシン、ポリミキシンB)であることができる。

#### 【0082】

本発明は、インフルエンザウイルスHAとの関係において本明細書に記述してあが、本発明の原理がさらなるウイルスおよび抗原に同等に適用することができることは明らかだろう。

#### 【0083】

##### 下流の工程

本発明の方法は、所定の材料におけるHA濃度の測定を可能にする。この材料、特にバルクワクチンは、次いで希釈して所望の最終的なHA濃度を与えることができる。したがって、本発明の方法は、HA定量化の結果に基づいてワクチンを希釈するさらなる工程を含んでもよく、および本発明は、ワクチンを解析するための方法であって：(a)本明細書に開示される方法によって、ワクチンにおける、またはその試料におけるHAを定量化する工程；および(b)工程(a)の結果を使用してワクチンにおけるHA濃度を算出する工程を含む方法を提供する。本発明はまた、所望のHA濃度のバルクワクチンを提供するための方法であって：上記工程(a)および(b)、並びにさらなる工程(c)工程(b)の結果を使用してバルクワクチンを希釈して所望のHA濃度を与える工程を含む方法を提供する。次いで、希釈したバルクワクチンの単位用量を抽出することができ、そして本発明はワクチンを患者の使用のために提供するための方法であって：上記工程(a)~(c)およびさらなる工程(d)希釈したバルクからワクチンの1つまたは複数の単位用量を抽出する工程であって、各単位用量は所望のHA含量を有する工程を含む方法を提供する。抽出した材料は、容器、たとえばバイアルまたは注射器の中に置くことができる。

#### 【0084】

希釈したバルクは、単位用量抽出の前に、アジュバントなどのその他の成分と混合することができる。したがって、本発明は、増強されたバルクワクチンを提供するための方法であって：上記工程(a)~(c)およびさらなる工程(d)希釈したバルクワクチンをアジュバントと混合する工程を含む方法を提供する。本発明はまた、患者の使用のために増強されたワクチンを提供するための方法であって：上記工程(a)~(d)およびさらなる工程(e)希釈したバルクからワクチンの1つまたは複数の単位用量を抽出する工程であって、各単位用量は所望のHA含量を有する工程を含む方法を提供する。抽出した材料は、容器、たとえばバイアルまたは注射器の中に置くことができる。

#### 【0085】

抽出した用量をアジュバントと混合することに代わるものとして、抽出した用量は、第2のキット成分と組み合わせた第1のキット成分として代わりにパッケージしてもよく、第2のキット成分は、ワクチンのアジュバントである。2つのキット成分は、使用時に組み合わせて増強されたワクチンを与えることができる。キットは、アジュバントおよび抗原を使用時まで別々に保持することができる(たとえば、PREPANDRIX(商標)製品のように)。成分は、キット内で互いに物理的に分離しており、およびこの分離は種々の方法で達成することができる。例として、2つの成分は、バイアルなどの2つの別々の容器の中にあってもよい。次いで、2つのバイアルの内容物は、たとえば、1つのバイアルの内容物を取り除き、もう一方のバイアルにこれらを添加することによって、または両方のバイアルの内容物を別々に取り除き、第3の容器においてこれらを混合することによって混合することができる。1つの配置において、キット成分の1つは注射器の中にあり、およびもう一方はバイアルなどの容器の中にある。注射器は、(たとえば、針とともに)使用して、その内容物を混合するために第2の容器の中に挿入することができ、および次いで、混合物を注射器の中に回収することができる。次いで、注射器の混合した内容物は、典型的には新たな無菌の針を通して、患者に投与することができる。注射器の中に1つの成分をパッケー

10

20

30

40

50

ジングすることは、患者への投与のために別の注射器を使用する必要を無くす。別の配置において、2つのキット成分は、同じ注射器、たとえば二重チャンパー注射器 [ 30 ] の中に、共に、しかし別々に保たれる。注射器が作動するとき（たとえば、患者に対する投与の間）、2つのチャンパーの内容物は混合される。この配置は、使用時に別の混合工程の必要を回避する。

#### 【 0 0 8 6 】

抗原およびアジュバントが製造の間に混合されようと、または患者に送達時に混合されようと、抗原は一般に水性だろう、およびそれで、混合工程は2つの液体を混合することを包含する。混合するための2つの液体の体積比は、変化することができる（たとえば5 : 1~1 : 5）が、一般に約1 : 1である。したがって、2つのキット成分は、実質的に、互いと同じ液量を含んでもよい。

10

#### 【 0 0 8 7 】

アジュバントは、組成物を受ける患者において誘発される免疫応答（体液性および/または細胞性）を増強することができる。この目的のための典型的なアジュバントは、水中油型乳濁液である。種々の適したエマルジョンは公知であり、これらは典型的には少なくとも1つの油および少なくとも1つの表面活性物質を含有し、油（s）および表面活性物質（s）が生分解性（代謝可能）であり、かつ生物適合性である。エマルジョンにおける油滴は一般に直径5  $\mu$ m未満であり、および都合よくは、エマルジョンはサブミクロンの直径の油滴を含み、これらの小さなサイズはマイクロ流動化装置で達成されて安定なエマルジョンを提供する。液滴は、滅菌濾過に供することができるため、220nm未満のサイズが好ましい。

20

#### 【 0 0 8 8 】

エマルジョンは、動物（魚など）または植物源からの油を含有することができる。植物性油のための供与源は、堅果、種子および穀物を含む。落花生油、ダイズ油、ヤシ油およびオリーブ油、最も一般に利用可能な、堅果油の例である。ホホバ油を使用することができる、たとえばホホバマメから得られる。種子油は、サフラワー油、綿実油、ヒマワリ種子油、ゴマの種子油および同様のものを含む。穀物群において、トウモロコシ油が最も容易に利用可能であるが、コムギ、カラスムギ、ライ麦、米、テフ、ライ小麦および同様のものなどのその他の穀物油もまた使用してもよい。種子油に天然に存在しないが、グリセロールおよび1,2-プロパンジオールの6-10炭素脂肪酸エステルは、堅果および種子油から開始して適切な材料の加水分解、分離およびエステル化によって調製してもよい。哺乳動物の乳由来の脂肪および油は代謝性であり、したがって、本発明の実施の際に使用してもよい。動物供与源から純粋な油を得るために必要な分離、精製、鹸化およびその他の手段のための手順は、当該技術分野において周知である。大部分の魚は、容易に回収し得る代謝可能な油を含む。たとえば、タラ肝油、サメ肝油および鯨ろうなどの鯨油は、本明細書において使用し得る魚油のいくつかの例である。いくつかの分枝鎖油は、5-炭素イソブレン単位で生化学的に合成され、およびテルペノイドと一般に呼ばれる。サメ肝油は、スクアレン、2,6,10,15,19,23-ヘキサメチル-2,6,10,14,18,22-テトラコサヘキサエンとして公知の分枝した不飽和のテルペノイドを含む。その他の好ましい油はトコフェロールであり、DL- -トコフェロールを含む。スクアレンを含むエマルジョンは、特に好ましい。油の混合物を使用することができる。

30

40

#### 【 0 0 8 9 】

表面活性物質は、これらの「HLB」（親水性/親油性バランス）によって分類することができる。本発明の好ましい表面活性物質は、少なくとも10、好ましくは少なくとも15、およびより好ましくは少なくとも16のHLBを有する。適した表面活性物質の例は、限定されないが、以下を含む：ポリオキシエチレンソルビタンエステル表面活性物質（一般にTweenと呼ばれる）、特にポリソルベート20およびポリソルベート80；エチレンオキシド（EO）、プロピレンオキシド（PO）および/またはブチレンオキシド（BO）のコポリマー、DO WFA X（商標）商品名のもとで販売される、直鎖状EO/POブロックコポリマーなど；オクトキシノール、それは反復するエトキシ（オキシ-1,2-エタンジイル）基の数が増加するこ

50

とができる、オクトキシノール-9 (Triton X-100またはt-オクチルフェノキシポリエトキシエタノール) が特に利益がある; (オクチルフェノキシ) ポリエトキシエタノール (IG EPAL CA-630/NP-40); ホスファチジルコリン (レシチン) などのリン脂質; ラウリル、セチル、ステアリルおよびオレイルアルコールに由来したポリオキシエチレン脂肪エーテル (Brij 表面活性物質として公知)、トリエチレングリコールモノラウリルエーテル (Brij30) など; 並びにソルビタンエステル (一般にSPANsとして公知)、ソルビタントリオレート (Span85) およびソルビタンモノラウレートなど。エマルジョンに含むための好ましい表面活性物質は、Tween 80 (ポリオキシエチレンソルビタンモノオレート; ポリソルベート80)、Span 85 (ソルビタントリオレート)、レシチンおよびTriton X-100である。ポリソルベート80を含むことが好ましい。

10

## 【0090】

表面活性物質の混合物、たとえばTween 80/Span 85混合物を使用することができる。ポリオキシエチレンソルビタンモノオレート (Tween 80) などのポリオキシエチレンソルビタンエステルおよびt-オクチルフェノキシポリエトキシエタノール (Triton X-100) などのオクトキシノールの組み合わせもまた適する。別の有用な組み合わせは、ポリオキシエチレンソルビタンエステルおよび/またはオクトキシノールを加えたラウレス9を含む。

## 【0091】

表面活性物質の好ましい量 (重量%) は、以下の通りである: ポリオキシエチレンソルビタンエステル (Tween 80など) 0.01~1%、特に約0.1%; オクチルまたはノニルフェノキシポリオキシエタノール (Triton X-100またはTriton系におけるその他の界面活性剤など) 0.001~0.1%、特に0.005~0.02%; ポリオキシエチレンエーテル (ラウレス9など) 0.1~20%、好ましくは0.1~10%および特に0.1~1%または約0.5%。

20

## 【0092】

本発明に有用な特異的な水中油型乳濁液アジュバントは、限定されないが、以下を含む:

- ・スクアレン、Tween 80およびSpan 85のサブミクロンのエマルジョン。容積によるエマルジョンの組成は、約5%のスクアレン、約0.5%のポリソルベート80および約0.5%のSpan 85であることができる。重量に関して、これらの比率は、4.3%のスクアレン、0.5%のポリソルベート80および0.48%のSpan 85になる。このアジュバントは、「MF59」[31-32、33]として公知であり、参照文献34の第10章および参照文献35の第12章により詳細に記載される。MF59エマルジョンは、クエン酸イオン、たとえば10mMクエン酸ナトリウム緩衝液を都合よく含む。

30

## 【0093】

- ・スクアレン、トコフェロールおよびポリソルベート80を含むエマルジョン。エマルジョンは、リン酸緩衝食塩水を含んでもよい。これらのエマルジョンは、2~10%のスクアレン、2~10%のトコフェロールおよび0.3~3%のポリソルベート80を有してもよく、並びにスクアレン:トコフェロールの重量比は、これがより安定なエマルジョンを提供することができるように、好ましくは1 (たとえば0.90) である。スクアレンおよびポリソルベート80は、約5:2の体積比または約11:5の重量比にて存在してもよい。したがって、3つの成分 (スクアレン、トコフェロール、ポリソルベート80) は、1068:1186:485または約55:61:25の重量比にて存在してもよい。1つのこのようなエマルジョン (「AS03」) は、PBSにTween 80を溶解することによって2%溶液を与え、次いでこの溶液の90mlを混合物 (5gのDL-トコフェロールおよび5mlのスクアレン) と混合し、次いで混合物をマイクロ流動化することによって作製することができる。生じるエマルジョンは、サブミクロンの油滴、たとえば100~250nm、好ましくは約180nmの平均直径を持つ油滴、を有してもよい。エマルジョンはまた、3-de-O-アシル化されたモノホスホリルリピドA (3d-MPL) を含んでもよい。このタイプの他の有用なエマルジョンは、ヒト用量当たり、0.5~10mgスクアレン、0.5~11mgトコフェロールおよび0.1~4mgポリソルベート80 [36] を、たとえば上で考察した比率で含んでもよい。

40

50

## 【0094】

・スクアレン、トコフェロールおよびTriton界面活性剤（たとえば、Triton X-100）のエマルジョン。エマルジョンはまた、3d-MPL（下記参照されたい）を含んでもよい。エマルジョンは、ホスフェート緩衝液を含んでもよい。

## 【0095】

・ポリソルベート（たとえば、ポリソルベート80）、Triton界面活性剤（たとえば、Triton X-100）およびトコフェロール（たとえば、 $\alpha$ -トコフェロールスクシナート）を含むエマルジョン。エマルジョンは、約75:11:10の質量比にてこれらの3つの成分を含んでもよく（たとえば、750  $\mu$ g/mlポリソルベート80、110  $\mu$ g/ml Triton X-100および100  $\mu$ g/ml  $\alpha$ -トコフェロールスクシナート）、およびこれらの濃度は、抗原からのこれらの成分の任意の貢献を含むべきである。エマルジョンはまた、スクアレンを含んでもよい。エマルジョンはまた、3d-MPL（下記参照されたい）を含んでもよい。水相は、ホスフェート緩衝液を含んでもよい。

10

## 【0096】

・スクアラン、ポリソルベート80およびポロキサマー401（「Pluronic（商標）L121」）のエマルジョン。エマルジョンは、リン酸緩衝食塩水（pH 7.4）において製剤化することができる。このエマルジョンは、ムラミルジペプチドのための有用な送達媒体であり、および「SAF-1」アジュバントにおけるスレオニル-MDP[37]（0.05-1%のThr-MDP、5%のスクアラン、2.5%のPluronic L121および0.2%のポリソルベート80）とともに使用されている。それはまた、「AF」アジュバントにおけるように[38]（5%のスクアラン、1.25%のPluronic L121および0.2%のポリソルベート80）、Thr-MDPなしで使うことができる。マイクロ流動化が好ましい。

20

## 【0097】

・スクアレン、水性溶媒、ポリオキシエチレンアルキルエーテルの親水性非イオン性界面活性剤（たとえば、ポリオキシエチレン（12）セトステアリールエーテル）および疎水性非イオン性界面活性剤（たとえば、ソルビタンエステルまたはマンニドエステル、ソルビタンモノオレートまたは「Span 80」など）を含むエマルジョン。エマルジョンは、好ましくは熱可逆的であり、および/または200nm未満のサイズを持つ少なくとも90%の油滴（容積で）を有する[39]。エマルジョンはまた、以下の1つまたは複数を含んでもよい：アルジトール；低温保護剤（たとえば糖、ドデシルマルトシドおよび/またはスクロースなど）；および/またはアルキルポリグリコシド。このようなエマルジョンは、凍結乾燥してもよい。

30

## 【0098】

・0.5-50%の油、0.1-10%のリン脂質および0.05-5%の非イオン性界面活性物質を有するエマルジョン。参照文献40に記載されるように、好ましいリン脂質成分は、ホスファチジルコリン、ホスファチジルエタノールアミン、ホスファチジルセリン、ホスファチジルイノシトール、ホスファチジルグリセロール、ホスファチジン酸、スフィンゴミエリンおよびカルジオリピンである。サブミクロンの液滴サイズが有利である。

## 【0099】

・代謝可能でない油（軽い鉱油など）および少なくとも1つの表面活性物質（レシチン、Tween 80またはSpan 80などの）のサブミクロンの水中油型乳濁液。QuilAサポニン、コレステロール、サポニン親油性接合体（GPI-0100など、参照文献41において記述され、グルクロン酸のカルボキシル基を介して非アシルサポニンに脂肪族アミンを添加することによって生成する）、ジメチルジオクタデシルアンモニウムブロミドおよび/またはN,N-ジオクタデシル-N,N-ビス（2-ヒドロキシエチル）プロパンジアミンなどの添加剤が含まれてもよい。

40

## 【0100】

・鉱油、非イオン性親油性エトキシ化脂肪族アルコールおよび非イオン性親水性表面活性物質（たとえば、エトキシ化脂肪族アルコールおよび/またはポリオキシエチレン-ポリオキシプロピレンブロックコポリマー）を含むエマルジョン[42]。

50

## 【0101】

・鉱油、非イオン性親水性エトキシ化脂肪族アルコールおよび非イオン性親油性表面活性物質（たとえば、エトキシ化脂肪族アルコールおよび/またはポリオキシエチレン-ポリオキシプロピレンブロックコポリマー）を含むエマルジョン [42]。

## 【0102】

・サポニン（たとえば、QuilAまたはQS21）およびステロール（たとえば、コレステロール）がらせん形のみセルとして会合するエマルジョン [43]。

## 【0103】

不活性化されたインフルエンザワクチンがこれらのHAレベルによって標準化されるため、ワクチンにおけるHA含量を測定し、および所望のHA含量にバルクワクチンを希釈する重要性が生じる。現在のワクチンは、典型的には株当たり約30 µg/mlのHAを含有し、より低い用量もまた、たとえば子供のため、または緊急事態において使用される。1/2（すなわち15 µg/mlのHA、FOCETRIA（商標）におけるような）、1/4（すなわち7.5 µg/ml、投与時にPREPANDRIX（商標）におけるような）、および1/8などの分割用量が使用されており [44、45]、同様により高い用量（たとえば3×または9×用量 [46、47]）を有する。したがって、インフルエンザウイルス株当たり0.1~200 µg/ml、好ましくは1~150 µg/ml、たとえば1-90 µg/ml、1-20 µg/ml、0.1-15 µg/ml、0.1-10 µg/ml、0.1-7.5 µg/ml、0.5-5 µg/ml、3.75-15 µg/mlその他のHA濃度を与えるために、希釈が行われてもよい。特に希釈後の濃度は、たとえば約90 µg/ml、約45 µg/ml、約30 µg/ml、約15 µg/ml、約10 µg/ml、約7.5 µg/ml、約5 µg/ml、約3.8 µg/ml、約3.75 µg/ml、約1.9 µg/ml、約1.5 µg/mlその他を含む。アジュバントがワクチン中に存在するときに、より低い濃度（たとえば、< 30 µg/ml）は最も有用である。180 µg/mlと同じ程度の濃度はいくつかの研究（たとえば、参照文献48）において使用されているが、本発明の組成物は通常 30 µg/mlのHA濃度を有するだろう。

10

20

## 【0104】

## 医薬組成物

患者に対する投与のためのHA含有組成物は、薬学的に許容される。これらは、通常HAに加えて成分および任意のアジュバントを含み、たとえばこれらは典型的には1つまたは複数の薬学的担体および/または賦形剤を含む。このような成分の完全な考察は、参照文献49において入手可能である。

30

## 【0105】

医薬組成物は、一般に水性形態（たとえば、注射のための）であるだろうが、固体の投薬形態もまた使用することができ、インフルエンザワクチン接種のために公知である。

## 【0106】

医薬組成物は、チオメルサル（たとえば、10 µg/ml）または2-フェノキシエタノールなどの保存剤を含んでもよい。しかし、ワクチンは、水銀材料が実質的にない（すなわち、5 µg/ml未満）、たとえばチオメルサルフリーであるべきであることが好ましい [50]。水銀を含んでいないワクチンは、より好ましい。保存剤がないワクチンは、特に好ましい。

## 【0107】

張度を制御するために、水性の医薬組成物は、生理的塩、ナトリウム塩などを含んでもよい。塩化ナトリウム（NaCl）は好ましく、それは1~20mg/mlにて存在してもよい。存在してもよいその他の塩は、塩化カリウム、リン酸カリウム、リン酸二ナトリウム二水和物（disodium phosphate dehydrate）、塩化マグネシウム、塩化カルシウム、その他を含む。

40

## 【0108】

水性の医薬組成物は、一般に、200mOsm/kg~400mOsm/kg、好ましくは240~360mOsm/kgの質量オスモル濃度を有するだろう、およびより好ましくは290~310mOsm/kgの範囲に入るだろう。質量オスモル濃度は、ワクチン接種によって生じる疼痛上の影響を有しないことが以前に報告されていた [51] が、この範囲において質量オスモル濃度を保持すること

50

は、それにもかかわらず好ましい。

【0109】

医薬組成物は、1つまたは複数の緩衝液を含んでもよい。典型的な緩衝液は、以下を含む：ホスフェート緩衝液；Tris緩衝液；ホウ酸塩緩衝液；スクシナート緩衝液；ヒスチジン緩衝液；またはシトラート緩衝液。緩衝液は、典型的には5~20mMの範囲において含まれるだろう。緩衝液は、エマルジョンの水相にあってもよい。

【0110】

医薬組成物のpHは、一般に5.0~8.1、より典型的には6.0~8.0、たとえば6.5~7.5、または7.0~7.8であるだろう。したがって、本発明の方法は、用量抽出またはパッケージングの前にバルクのpHを調整する工程を含んでもよい。

10

【0111】

医薬組成物は、好ましくは無菌である。医薬組成物は、好ましくはグルテンフリーである。

【0112】

好ましい医薬組成物は、低いエンドトキシン含量、たとえば1IU/ml未満および好ましくは0.5IU/ml未満を有する。エンドトキシン測定のための国際単位は周知であり、および試料のために、例として、NIBSCから利用可能な第2の国際基準（Code94/580 - IS）などの国際基準との比較によって[52、53]、算出することができる。卵において増殖したウイルスから調製される現在のワクチンは、0.5~5 IU/mlの領域におけるエンドトキシンレベルを有する。

20

【0113】

医薬組成物は、抗生物質（たとえば、ネオマイシン、カナマイシン、ポリミキシンB）がなくてもよい。

【0114】

医薬組成物は、単一の免疫化のための材料を含んでもよく、または複数の免疫化のための材料を含んでもよい（すなわち、「マルチ用量」組成物、この場合、抽出された単位用量が複数の患者の用量のために十分な材料を含む）。マルチ用量の配置は、通常ワクチンにおいて保存剤を含む。この必要を回避するために、ワクチンは、材料の取り出しのための無菌アダプタを有する容器に含まれていてもよい。

30

【0115】

インフルエンザワクチンは、典型的には約0.5mlの投薬容積で筋肉内注射によって投与されるが、半分用量（すなわち、約0.25ml）を子供に投与してもよく、および単位用量は、たとえば単一の患者への投与のための0.5mlの用量を与える単位用量に従って選択されるだろう。より低い投薬容積が使用されてもよく、たとえば0.1mlの容積が皮内注射に有用である。

【0116】

組成物のパッケージングまたはキット成分

本発明の方法は、ワクチンを容器の中に、および特に医師による使用のための配布のために容器の中に置く工程を含むことができる。この工程は、通常、バルクからの材料の抽出および容器の中への挿入を含むだろう。

40

【0117】

水性ワクチンのための適した容器は、バイアル、鼻内噴霧および使い捨て注射器を含み、それらは無菌であるべきである。

【0118】

組成物/成分をバイアルに位置する場合、バイアルは好ましくはガラスまたはプラスチック材料で作製される。バイアルは、好ましくは組成物をそれに添加する前に殺菌される。ラテックス感受性の患者での問題を回避するために、バイアルはラテックスのないストッパーで封止してもよく、および全てのパッケージング材料にラテックスが存在しないことが好ましい。バイアルは、ワクチンの単一用量を含んでもよく、またはそれが複数の用量（「マルチ用量」バイアル）、たとえば10用量を含んでもよい。好ましいバイアルは、

50

無色のガラスで作製される。

【0119】

バイアルは、注射器をその中に挿入することができるように適応されたキャップ（たとえば、ルアーロック）を有することができる。特にマルチ用量バイアルについては、バイアルは、その内容物の無菌的取り出しを可能にするキャップを有してもよい。

【0120】

組成物/成分が注射器の中にパッケージされる場合、注射器はそれに付着される針を有してもよい。針を付着しない場合、別々の針をアSEMBリーおよび使用のために注射器とともに供給してもよい。このような針は鞘に入れられ得る。安全針が好まれる。1インチ23ゲージ、1インチ25-ゲージおよび5/8インチ25ゲージ針が典型的である。注射器は、記録保持を容易にするために、内容物のロット番号、インフルエンザシーズンおよび有効期限が印刷されてもよいピールオフラベルとともに提供してもよい。注射器におけるブランジャーは、好ましくは、吸引中、偶然に除去されることからブランジャーを予防するためのストッパーを有する。注射器は、ラテックスゴムキャップおよび/またはブランジャーを有してもよい。使い捨て注射器は、ワクチンの単一用量を含む。注射器は、一般に、針の付着の前に先端を封止するための先端キャップを有するだろう、および先端キャップは好ましくはブチルゴムで作製される。注射器および針が別々にパッケージされる場合、針には好ましくはブチルゴムシールドが取り付けられる。有用な注射器は、商品名「Tip-Lok（商標）」のもとで市販されるものである。その他の有用な注射器は、皮内投与に適したものの、たとえば長さ約1.5mmの針を持つマイクロインジェクション装置を含む。

10

20

【0121】

容器は、半分-用量容積を示すために、たとえば子供への送達を容易にするために、マークしてもよい。例として、0.5ml用量を含む注射器は、0.25mlの容積を示すマークを有してもよい。

【0122】

ガラス容器（たとえば、注射器またはバイアル）を使用する場合、ソーダ石灰ガラスよりもむしろホウ珪酸ガラスで作製した容器を使用することが好ましい。

【0123】

組成物は、ワクチンの詳細、たとえば投与の説明、ワクチン内の抗原の詳細、その他を含む小冊子と（たとえば、同じ箱において）組み合わせられてもよい。説明はまた、たとえばワクチン接種後のアナフィラキシー反応の場合において容易に利用可能なアドレナリンの溶液を保持するためなどの警告を含んでもよい。

30

【0124】

治療の方法およびワクチンの投与

本発明の組成物は、ヒトなどの動物への投与に適しており、および本発明は動物における免疫応答を高める方法であって、患者に本発明の組成物を投与する工程を含む方法を提供する。

【0125】

本発明はまた、医薬、たとえば動物における免疫応答を高めるための医薬として使用するための、本発明のキットまたは組成物を提供する。本発明はまた、動物における免疫応答を高めるための医薬の製造における本発明の組成物の使用を提供する。

40

【0126】

本発明の方法および使用によって高められる免疫応答は、抗体反応、好ましくは感染防御抗体反応を一般に含むだろう。インフルエンザウイルスワクチン接種後の抗体反応、中和する能力および保護を評価するための方法は、当該技術分野において周知である。ヒト研究は、ヒトインフルエンザウイルスのHAに対する抗体価が保護と相関することを示した（約30~40の血清試料の血球凝集-阻害力価は、相同的ウイルスによる感染から約50%の保護を与える）[54]。抗体反応は、典型的には、血球凝集阻害によって、マイクロ中和によって、一元放射免疫拡散法（SRID）によって、および/または一元放射溶血（SRH）によって測定される。これらのアッセイ技術は、当該技術分野において周知である。

50

## 【0127】

インフルエンザワクチンは、種々の方法において投与することができる。最も好ましい免疫化経路は、筋肉内注射（たとえば、腕または脚の中に）によるものであるが、その他の利用可能な経路は、皮下注射、鼻腔[55、56～57]、皮内[58、59]、経口[60]、経皮（transcutaneous）、経皮（transdermal）[61]、その他を含む。皮内および鼻腔の経路は、魅力的である。皮内投与は、マイクロインジェクション装置、たとえば長さ約1.5mmの針を持つマイクロインジェクション装置を包含してもよい。

## 【0128】

本発明に従って調製されるワクチンは、子供および成人の両方を治療するために使用してもよい。インフルエンザワクチンは、現在は、6カ月の年齢から、小児科および成人の免疫化における使用が推奨される。したがって、患者は、1歳未満、1～5歳、5～15歳、15～55歳または少なくとも55歳でもよい。ワクチンを受けるための好ましい患者は、高齢者（たとえば、50歳、60歳、および好ましくは65歳）、若者（たとえば、5歳）、入院患者、医療従事者、軍部および軍人、妊婦、慢性疾患の人、免疫不全患者、ワクチンを受ける前の7日間に抗ウイルス化合物を摂取した患者（たとえば、オセルタミビルまたはザナミビル組成物；下記参照）、卵アレルギーを持つ人々、並びに海外旅行する人々である。しかし、ワクチンは、これらのグループに対してのみ適するのではなく、集団においてより一般的に使用してもよい。

## 【0129】

本発明の好ましい組成物は、有効性のためのCPMP基準の1、2または3を満たす。成人（18～60歳）において、これらの基準は、以下である：（1）70%の血清保護；（2）40%の血清変換；および/または（3）2.5倍のGMT増大。高齢者（60歳）において、これらの基準は、以下である：（1）60%の血清保護；（2）30%の血清変換；および/または（3）2倍のGMT増大。これらの基準は、少なくとも50人の患者でのオープンラベル研究に基づいている。基準は、ワクチンにおける各株に適用される。

## 【0130】

治療は、単一用量計画または複数用量計画によることができる。複数の用量は、一次免疫化計画において、および/またはブースター免疫化計画において使用してもよい。複数用量計画において、種々の用量は、同じまたは異なる経路、たとえば非経口の初回刺激および粘膜の追加免疫、粘膜の初回刺激および非経口の追加免疫、その他によって与えてもよい。複数の用量（典型的には2回の用量）の投与は、免疫学的にナイーブな患者において、たとえばこれまでインフルエンザワクチンを受けたことがない人々にとって、または新たなHAサブタイプに対するワクチン接種にとって、特に有用である。複数の用量は、典型的には少なくとも1週間（たとえば約2週間、約3週間、約4週間、約6週間、約8週間、約12週間、約16週間、その他）離して投与するだろう。

## 【0131】

本発明によって生成されるワクチンは、その他のワクチンと実質的に同時に（たとえば、同じ医療診断またはヘルスケア専門家またはワクチン接種センターへの来診の間に）、たとえば、麻疹ワクチン、おたふくかぜワクチン、風疹ワクチン、MMRワクチン、水痘ワクチン、MMRVワクチン、ジフテリアワクチン、破傷風ワクチン、百日咳ワクチン、DTPワクチン、抱合インフルエンザ菌（*H. influenzae*）タイプbワクチン、不活性化されたポリオウイルスワクチン、B型肝炎ウイルスワクチン、髄膜炎菌抱合ワクチン（四価のA-C-W135-Yワクチンなど）、呼吸器合胞体ウイルスワクチン、肺炎球菌抱合ワクチン、その他と実質的に同時に、患者に投与してもよい。肺炎球菌ワクチンおよび/または髄膜炎菌ワクチンと実質的に同時の投与は、高齢者患者において特に有用である。

## 【0132】

同様に、本発明のワクチンは、抗ウイルス化合物、および特に、インフルエンザウイルスに対して活性な抗ウイルス化合物（たとえば、オセルタミビルおよび/またはザナミビル）と実質的に同時に（たとえば、同じ医療診断またはヘルスケア専門家への来診の間に）患者に投与してもよい。

10

20

30

40

50

## 【0133】

一般

用語「を含む」は、「を含むこと」、並びに「からなること」を包含し、たとえば、X「を含む」組成物は、Xだけからなってもよく、または何かさらなる、たとえばX + Yを含んでいてもよい。

## 【0134】

用語「実質的に」は、「完全に」を除外せず、たとえば「実質的にYがない」組成物は、Yが完全になくてもよい。必要な場合、用語「実質的に」は、本発明の定義から削除してもよい。

## 【0135】

数値xに関して用語「約」は、任意であり、おおよびたとえば、 $x \pm 10\%$ を意味する。

## 【0136】

「GI」番号付けを上で使用してある。GI番号または「GenInfo Identifier」は、NCBIによって配列がそのデータベースに加えられるときに処理される、各配列記録に対して連続的に割り当てられる一連の数字である。GI番号は、配列記録のアクセッション番号とは類似しない。配列が更新されるとき（たとえば、修正のために、またはさらに注釈もしくは情報を加えるために）、それは、新たなGI番号を受ける。したがって、与えられたGI番号と関連する配列は、決して変更されない。

## 【0137】

具体的に明示される場合を除いて、2つ以上の成分を混合する工程を含む方法は、任意の具体的な混合する順序を必要としない。したがって、成分は、任意の順序において混合することができる。3つの成分がある場合、2つの成分を互いに組み合わせることができ、そしてその組み合わせを第三の成分、その他と組み合わせてもよい。

## 【0138】

動物（おおよび特にウシ）材料を細胞の培養において使用する場合、これらは感染性海綿状脳症（TSE）でない供与源から得るべきであり、おおよび特にウシ海綿状脳症（BSE）でないべきである。全体として、動物由来材料の完全な非存在において細胞を培養することが好ましい。

## 【0139】

細胞培養基をリアソータントまたはリバースジェネティクス手順のために使用する場合、好ましくは、ヒトワクチン製造における使用のために、たとえばPh Eur一般章5.2.3におけるように、承認された1つである。

## 【0140】

ポリペプチド配列間の同一性は、好ましくは、ギャップオープンペナルティ=12およびギャップエクステンションペナルティ=1のパラメーターでアフィンギャップ検索を使用して、MPSRCHプログラム（Oxford Molecular）において実行したSmith-Waterman相同性検索アルゴリズムによって決定される。

## 【図面の簡単な説明】

## 【0141】

【図1】図1は、GNA（三角形）が担体の表面上に固定され、HA（星）に結合し、それにピオチン化された抗HA IgGが次いで添加される、本発明のELISAを図示する。

【図2】図2は、固定されたGNAをA/Brisbane/59/07ワクチンに使用してアフィニティークロマトグラフィーによって精製される材料のクロマトグラムを示す。図3におけるマークされたレーンに示すように、ピークにおける囲まれた画分はプールして、SDS-PAGEによって解析した。

【図3】図3は、（図2に示すように）固定されたGNAをA/Brisbane/59/07ワクチンに使用してアフィニティークロマトグラフィーから得られる画分のSDS-PAGE解析を示す。左側の3つの矢印：還元され、沸騰された材料；右側の3つの矢印：還元されない、沸騰されない材料。

【図4】図4は、抗B/Florida IgG（実線）または抗ソロモンIgG（点線）を使用した $OD_{405}$

10

20

30

40

50

nmを示す。x軸は、抗原希釈を示す。

【図5】図5は、図4と同様であるが、卵生成の(5A) A/Brisbane/59/07 H1N1または(5B) A/Uruguay/716/2007 H3N2のHAによる免疫化によって生成されるヒツジ抗血清からのIgGを使用した解析を示す。試料は、H1N1 NIBSC抗原標準(四角)、H3N2 NIBSC抗原標準(丸)または細胞培養において増殖したウイルスからのH1N1一価のバルク(三角)であった。

【図6】図6は、異なる試料の解析が示される以外は、図5と同様である。卵生成の(6A) A/Brisbane/59/07 H1N1または(6B) A/Uruguay/716/2007 H3N2のHAによる免疫化によって産生されるヒツジ抗血清からのIgGを使用した解析が示される。試料は、H1N1 CBER抗原標準(四角)、H3N2 CBER抗原標準(丸)または細胞培養において増殖したウイルスからのH3N2一価のバルク(三角)であった。

【図7】図7は、図4および5と同様であるが、低いHAグリコシル化を有するウイルスの株:(7A) H5N1 株;(7B) H1N1株から調製される一価のバルクワクチンのための解析を示す。

【図8】図8は、卵生成のA/Brisbane/59/07(H1N1)に対してヒツジ抗血清を使用したELISAおよびSRIDによって得られた試料のHA濃度を示す。抗原試料はMDCKが生成したA/Brisbane/59/07一価バルク、およびそのバルクからGNA-カラムで精製されたHAであった。黒いバーは、卵生成のA/Brisbane/59/07 NIBSC標準対照を較正標準として使用したときに得られた濃度を表す; ストライプのバーは、精製されたMDCK生成のA/Brisbane/59/07 H1を較正標準として使用したときに得られた濃度を表す; および白いバーは、A/Brisbane/59/07(H1N1)一価バルクを較正標準として使用したときに得られた濃度を表す。

【発明を実施するための形態】

【0142】

ELISA形式

本発明のELISAは、容易に調製することができる。ELISAアッセイを調製するための標準的なプロトコルを使用することができるが、ELISAプレート上の捕獲試薬は、GNAレクチンなどのレクチンである。100 $\mu$ lのインフルエンザウイルスワクチンを各ウェルに(重複して)適用して、30分間37 $^{\circ}$ Cにてインキュベートする。次いで、各ウェルは100 $\mu$ lのビオチン化された抗HA IgGを受け、続いてさらに30分間インキュベーションする。次いで、プレートを4時間洗浄し、および200 $\mu$ lのストレプトアビジン抱合アルカリホスファターゼを添加する。プレートを暗所で室温にて30分間インキュベートして、再び4回洗浄する。次いで、200 $\mu$ lのpNPPを添加して、酵素反応を30分間進行させる。次いで、各ウェルを解析して定量的結果を提供する。全ての処理に3時間未満かかる一方、SRIDアッセイは少なくとも24時間かかる。その上、それは、研究室スタッフによって容易に行うことができ、試料の任意の処理を必要としない(たとえば、濃縮、脱グリコシル、変性、その他の必要がない)。

【0143】

アッセイにおいて使用するIgGは、製造業者の説明書にしたがって、Gタンパク質カラム(HiTrap(商標) Protein G HP、GE Healthcare)を使用してNIBSCまたはCBERによって提供されるヒツジ抗血清から精製した。溶出した画分におけるIgG含量は、1.4ODの吸光度が1mg/mlのIgG濃度を表すことを考慮して、280nmでの吸光度によって決定した。OD>0.3の精製された画分をプールして、Slide-A-Lyzer Dialysis Cassettes、10K MWCO(Pierce)において4リットルのPBS 1 $\times$ で、一晚+4 $^{\circ}$ Cにて透析した。透析の間、緩衝液は、3回交換した。IgGはAMICON ULTRA-15 Ultracel-10kのカラムを使用して3000rpmにて遠心することによって1mg/mlに濃縮し、次いで3mg/mlの濃度にてPBSに溶解したNHS-PEG4-Biotinの10 $\times$ モル過剰量と振盪しながら室温にて1時間インキュベートした。インキュベーションの後、IgGは、PBS-2 mM EDTA (pH=7.3)において平衡化したPD-10カラムに流した。1mlの8画分を収集し、およびIgGビオチン濃度は280nmでの吸光度によって決定した。

【0144】

ELISAプレートは、Ca<sup>2+</sup>/Mg<sup>2+</sup>フリーPBSにおける50 $\mu$ g/mlの濃度にて200 $\mu$ l/ウェルのGNAレクチンを添加することによって、EIA/RIA 1 $\times$ 8 Stripwellプレート上に調製した。プ

レートは、プラスチック箔に包み、および+20 にて一晚インキュベートした。次いで、ウェルを吸引し、350  $\mu$ l/ウェルの洗浄緩衝液 (PBS  $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$  1x - Tween 20 0.05%、pH 7.4) で4回洗浄した。次いでプレートを350  $\mu$ l/ウェルのブロッキング緩衝液 (Tris-HCl 10mM - NaCl 150mM - Sucrose 3% - BSA 1%、pH7.68) と共に室温にて1時間インキュベートした。ブロッキング緩衝液を吸引して、プレートを即時にアッセイに使用することができ、または凍結乾燥器において室温にて一晚乾燥させ、次いで乾燥剤パックとともにヒートシールしたホイルパウチの中に+4 にて保存することができる。

#### 【0145】

サンドイッチELISAを行うために、 $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ フリーのPBSにおいて試料の7回の2倍段階希釈を作製した。各希釈は、GNA被覆ウェル (100  $\mu$ l/ウェル) 上に二連で充填して、振盪しながら37 にて30分インキュベートした。インキュベーションの後、ビオチン化されたIgG (ビオチン希釈剤 (50mM Tris - 150mM NaCl - 0.05% Tween20 - 20%ラム血清、pH 7.5) に8  $\mu$ g/mlにて希釈した) を洗浄せずに抗原に添加し (100  $\mu$ l/ウェル)、および振盪しながら37 にてもう30分間インキュベートした。次いで、ウェルを吸引して、350  $\mu$ l/ウェルの洗浄緩衝液 (50mM Tris - 150mM NaC - 0.05%Tween 20) で自動プレート洗浄機で4回洗浄した。IgG結合は、次いで、洗浄緩衝液で1  $\mu$ g/mlにて希釈したストレプトアビジン抱合アルカリホスファターゼ200  $\mu$ l/ウェルを添加し、37 にて30分間振盪することによって検出した。この工程の最後に、プレートを吸引して、以前のように洗浄し、次いで200  $\mu$ l/ウェルのpNPPをウェルに添加して、室温にて30分インキュベートした。プレートをマイクロプレートリーダーにおいて405nmにて読んだ。

#### 【0146】

##### ELISA特異性

株特異性を確認するために、ELISAは、その株に対する、または無関係なA/Solomon/3/2006株に対するIgGのいずれかを用いて調製した、捕獲されたB/Florida/4/2006抗原を使用して試験した。図4は、抗原希釈に対するMDCK細胞 (Optafluバルク) から調製した一価のワクチンバルクについての $\text{OD}_{405\text{nm}}$ を示す。抗B/Florida IgGは、B/Florida HA (実線) を確実に検出したが、抗ソロモンIgGはしなかった (点線)。

#### 【0147】

同様に、A/Brisbane/59/07 (H1N1) またはUruguay/716/2007 (H3N2) に対するIgGは、NIBSCからの関連した参照抗原に対して、およびこれらの株に対する一価のOptafluバルクに対して試験した。図5および6は、ELISAの特異性を確認する。H1N1またはH3N2のMDCK産生一価バルクは、各株に特異的なIgGによってのみ検出された；卵生成CBERまたはNIBSC抗原標準は、H1N1またはH3N2特異的な抗血清のいずれかでポジティブなELISAシグナルを生じた。

#### 【0148】

卵生成HAに対して生じたヒツジ抗血清を、卵生成抗原試料を検出するために使用したときに観察された (しかし、MDCK細胞生成抗原試料を検出するために使用したときにはされなかった) 交差反応性のための最も可能性が高い説明は、卵生成抗原試料における卵由来タンパク質およびヒツジ抗血清における抗卵タンパク質抗体の存在である。この結論は、交差反応性の抗体がHAと共に移動しないタンパク質を認識することを示すウエスタンブロット (図示せず) によって実証される。

#### 【0149】

##### 広い株適用性

ELISA法がインフルエンザウイルス株に広く適することを確認するために、低グリコシル化を有する株、すなわち、A/Vietnam/1194/2004 (H5N1) およびA/California/04/2009 (H1N1) から調製される一価のバルクワクチンでGNAレクチン捕獲を試験した。図7は、捕獲がこれらの株でさえ十分に働くことを示す。したがって、捕獲レクチンは、これらのHAグリコシル化レベルに独立に、異なる株に容易に適応可能である。

#### 【0150】

##### SRIDとの比較

試料は、一価のA/Brisbane/59/07 (H1N1) バルクワクチンの生成の間の13段階にて採取した。これらは、SRIDによって、RP-HPLCによって、または本発明のELISAによってHA含量について解析した。SRIDおよびRP-HPLCアッセイ法は、関連したNIBSC標準を使用して校正した；ELISAは、精製したA/Brisbane/59/07血球凝集素またはSRID校正されたA/Brisbane/59/07の一価のバルクのいずれかで校正した。ELISAにおけるHA濃度は、少なくとも3つの異なる希釈の平均として（変動係数 20%）算出した。

【 0 1 5 1 】

各段階の結果は、以下の通りだった（ $\mu\text{g/ml}$ ；「 - 」検出不可能）：

【 0 1 5 2 】

【表 1】

段階	SRID	RP-HPLC	ELISA <sup>1</sup>	ELISA <sup>2</sup>
1	-	34	19	19
2	-	33	16	16
3	-	32	16	16
4	-	31	18	19
5	-	3	2	2
6	-	2	-	-
7	-	2	4	4
8	-	2	-	-
9	342	313	280	328
10	124	138	97	125
11	180	175	142	176
12	129	127	106	130
13	29	19	36	36

1：ELISA 参照は、精製したタンパク質であった；2：ELISA 参照は、SRID 校正した一価のバルクであった。

【 0 1 5 3 】

したがって、ELISAは、SRIDによる検出ではとても低いレベルでさえ、HAを定量化することができ、および定量的結果は、その他の技術によって測定した結果と一致する。

【 0 1 5 4 】

分取HA精製

固定されたGNAレクチンを持つアフィニティー担体は、Burlingame California (カタログ#AL-1243) におけるVector Laboratories社から得て、およびGE Healthcare HR 16/10 (20ml) カラムで使用した。一価のバルクインフルエンザワクチンをn-オクチル-D-グルコピラノシド (オクチルグルコシド、OG；終濃度1.5%) と混合して、氷上でインキュベートした。この材料を洗浄したカラムに適用して、次いで -メチル-マンノピラノシドを使用して溶出した。

【 0 1 5 5 】

図2は、固定されたGNAレクチンをA/Brisbane/59/07ワクチンに使用するアフィニティークロマトグラフィーによって精製した材料のクロマトグラムを示す。囲まれた画分をプールして、PBSに対して透析した。透析した材料をSDS-PAGEによって解析した (図3)。HAは非常に純粋であり、そのため、GNAレクチンのアフィニティークロマトグラフィーは、HAの分取精製のために使用することができる。

【 0 1 5 6 】

HA ELISAのための抗原基準

図8は、MDCK生成ワクチンの一価のバルクにおけるHAの検出のため本発明のELISA形式を校正するために、NIBSC抗原標準および抗血清 (両方とも卵-プラットフォームに基づく) を使用するとき、一価のバルクのHA含量は、SRIDにおいて同じ試薬を使用して決定され

10

20

30

40

50

る含量 (365  $\mu\text{g/ml}$ 、左から4番目のカラム) に対して著しく過小評価される (27  $\mu\text{g/ml}$ 、左から1番目のカラム) ことを示す。したがって、ELISAおよびSRIDにおけるシグナルに対する抗HAおよび抗宿主(卵)抗体抗原相互作用の相対的な寄与は、異なるように見える。本発明者らは、SRIDにおける沈降素環が、試料(HA)において主に最も大量の抗原における抗体相互作用から生じるため、宿主細胞タンパク質および抗宿主細胞タンパク質の抗体効果が、SRIDではELISAより、それほど重要でないかもしれないと考える。

#### 【0157】

本発明者らは、抗原標準として精製したHAを使用することがELISAに対する宿主細胞タンパクの効果を無くすだろうと仮定し、その結果をSRIDによって得られたものとならべた。この仮説を試験するために、本発明者らは、MDCK細胞において生成して、GNA-カラムで精製し、並びにELISAのための標準として卵に基づいた抗原標準および抗血清を使用して従来のSRIDによって109  $\mu\text{g/ml}$  (図8、右から1番目のカラム) にて定量化したHAを使用した。従来のSRIDによって決定された精製されたHAの量は、物理的な方法によって決定されたこの試料におけるHAの量に、よく対応した。280nmでの吸収は、100  $\mu\text{g/ml}$  HAを示し、およびBCAアッセイは、83  $\mu\text{g/ml}$  HAを示した。この精製されたHA標準を使用することにより、MDCK生成の一価のバルクについてのELISA値 (327  $\mu\text{g/ml}$ 、図8における左から2番目のカラム) を、一価のバルクについてのSRID値 (365  $\mu\text{g/ml}$ ) に妥当に対応させた。

#### 【0158】

ELISAにおけるマトリックス効果が、SRIDにはなく、ELISAとSRIDとの間の相違の原因となるという仮説は、卵に基づいた抗原標準および抗血清でSRIDによって定量化したMDCK生成の一価のバルクが、MDCK生成試料に使用するためのELISAを較正するために使用することができると予測したが、ただしELISAにおける検出のために使用したヒツジ抗血清は、卵生成HAによる免疫化によって誘発されることを条件とした。この仮説と一致して、この一価のバルク標準で較正したELISAによるMDCK生成された精製されたHAの量 (100  $\mu\text{g/ml}$ 、図8における左から3番目のカラム) をSRIDによって決定した、同じ精製されたHA試料の量 (109  $\mu\text{g/ml}$ ) に適合した。したがって、本データは、標準のSRIDで割り当てられたHA濃度で定量化した細胞由来の一価のバルクを、MDCK生成抗原を定量化するELISAのための標準として使用することができることを示唆する。

#### 【0159】

結論において、ELISAは、SRIDのために使用する従来の抗血清における抗宿主(たとえば、卵)抗体に感受性である。したがって、本データは、哺乳動物の細胞生成HAを検出するために、卵生成HAに対して生じた血清を使用することが最善であることを示唆する。本発明のELISA形式のための抗原較正標準は、抗宿主細胞タンパク質の効果を回避するように精製されるべきである、または少なくともヒツジを免疫化するために使用した抗原を生成したものと同一プラットフォームから生成するべきでない。本発明が一例としてのみ記載され、本発明の範囲および趣旨の範囲内にとどまるとき改良がなされてもよいことは、理解されるだろう。

#### 【0160】

##### 参考文献

- [1]Williams (1993) Vet Microbiol 37:253-262.
- [2]Fitzgerald & Needy (1986) Dev Biol Stand 64:73-79.
- [3]国際公開第2010/136896号
- [4]国際公開第2005/090390号
- [5]Liら (2010) Biologicals 38:284-9.
- [6]Brady & Griffiths (1982) J Biol Standardization 10:9-15.
- [7]Mahmood & Hay (1992) J Immunol Meth 151:9-13.
- [8]Liら (2009) Curr Chem Viol 3:324-33.
- [9]Wolff and Reichl (2011) Expert Rev. Vaccines 10:1451-1475.
- [10]国際公開第2007/066231号
- [11]Opitzら (2007) Vaccine 939-947

10

20

30

40

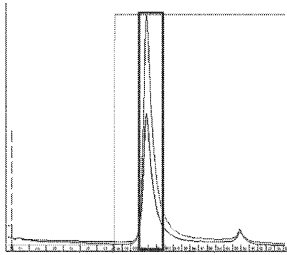
50

- [12]Optiz 5 ( 2008 ) Journal of Virological Methods154:61-68
- [13]Opitz 5 ( 2007 ) Journal of Biotechnology 131:309-317
- [14]国際公開第96/37624号
- [15]国際公開第98/46262号
- [16]国際公開第95/18861号
- [17]Bright 5 ( 2008 ) PLoS ONE 3:e1501.
- [18]Crevar & Ross ( 2008 ) Virology Journal 5:131.
- [19]Vaccines. ( eds. Plotkin & Orenstein ) . 4th edition,2004, ISBN: 0-7216-9688-0
- [20]Huckriede 5 ( 2003 ) Methods Enzymol 373:74-91. 10
- [21]GenBank sequence GI:325176.
- [22]国際公開第2008/032219号
- [23]国際公開第97/37000号
- [24]Brands 5 ( 1999 ) Dev Biol Stand 98:93-100.
- [25]Halperin 5 ( 2002 ) Vaccine 20:1240-7.
- [26]Tree 5 ( 2001 ) Vaccine 19:3444-50.
- [27]欧州特許出願公開第1260581号明細書 ( 国際公開第01/64846号 ) .
- [28]国際公開第2006/071563号
- [29]国際公開第2005/113758号
- [30]国際公開第2008/001221号 20
- [31]国際公開第90/14837号
- [32]Podda & Del Giudice ( 2003 ) Expert Rev Vaccines 2:197-203.
- [33]Podda ( 2001 ) Vaccine 19: 2673-2680.
- [34]Vaccine Design: The Subunit and Adjuvant Approach ( eds. Powell & Newman ) Plenum Press 1995 ( ISBN 0-306-44867-X ) .
- [35]Vaccine Adjuvants: Preparation Methods and Research Protocols ( Volume 42 of Methods in Molecular Medicine series ) . ISBN: 1-59259-083-7. Ed. O ' Hagan.
- [36]国際公開第2008/043774号
- [37]Allison & Byars ( 1992 ) Res Immunol 143:519-25.
- [38]Hariharan 5 ( 1995 ) Cancer Res 55:3486-9. 30
- [39]米国特許出願公開第2007/014805号
- [40]国際公開第95/11700号
- [41]米国特許第6,080,725号明細書
- [42]国際公開第2006/113373号
- [43]国際公開第2005/097181号
- [44]国際公開第01/22992号
- [45]Hehme 5 ( 2004 ) Virus Res. 103 ( 1-2 ) :163-71.
- [46]Treanor 5 ( 1996 ) J Infect Dis 173:1467-70.
- [47]Keitel 5 ( 1996 ) Clin Diagn Lab Immunol 3:507-10.
- [48]Zangwill 5 ( 2008 ) J Infect Dis. 197 ( 4 ) :580-3. 40
- [49]Gennaro ( 2000 ) Remington: The Science and Practice of Pharmacy. 20th edition, ISBN: 0683306472.
- [50]Banzhoff ( 2000 ) Immunology Letters 71:91-96.
- [51]Nony 5 ( 2001 ) Vaccine 27:3645-51.
- [52]Poole & Mussett ( 1989 ) J Biol Stand 17:161-71.
- [53]Poole 5 ( 1997 ) J. Endotoxin Res 4:221-31
- [54]Potter & Oxford ( 1979 ) Br Med Bull 35: 69-75.
- [55]Greenbaum 5 ( 2004 ) Vaccine 22:2566-77.
- [56]Zurbriggen 5 ( 2003 ) Expert Rev Vaccines 2:295-304.
- [57]Piascik ( 2003 ) J Am Pharm Assoc ( Wash DC ) . 43:728-30. 50

- [58]Halperin S (1979) Am J Public Health 69:1247-50.
- [59]Herbert S (1979) J Infect Dis 140:234-8.
- [60]Mann S (2004) Vaccine 22:2425-9.
- [61]Chen S (2003) Vaccine 21:2830-6.

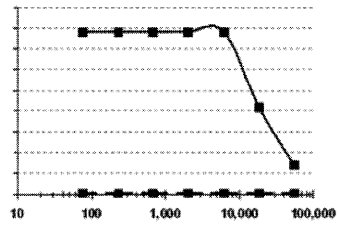
【 図 2 】

Figure 2



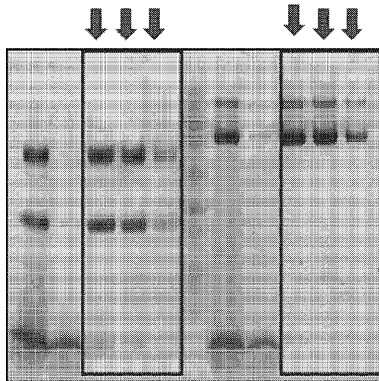
【 図 4 】

Figure 4



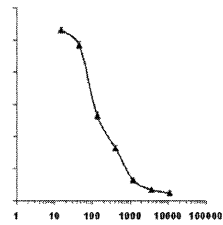
【 図 3 】

Figure 3



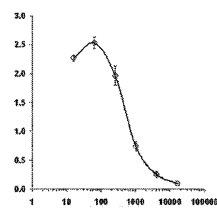
【 図 7 A 】

Figure 7A



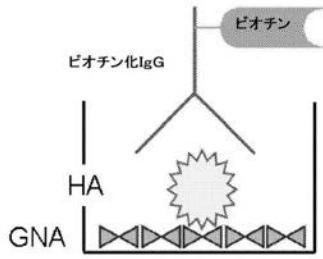
【 図 7 B 】

Figure 7B



【 図 1 】

Figure 1



【 図 5 】

Figure 5A

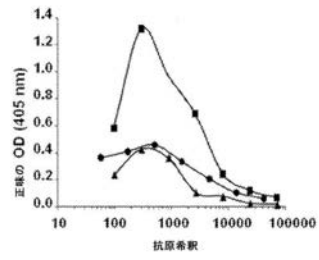
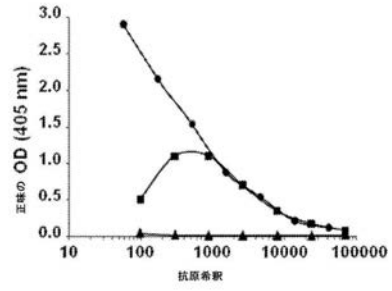


Figure 5B



【 図 6 】

Figure 6A

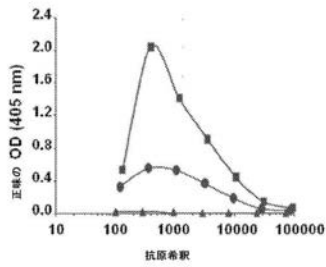
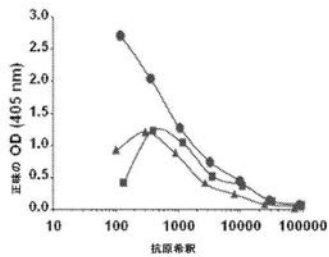
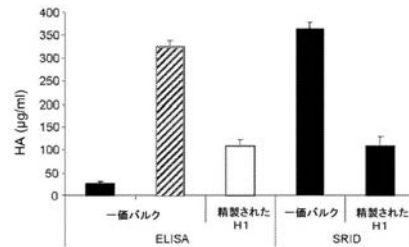


Figure 6B



【 図 8 】

Figure 8



## 【配列表】

2016539314000001.xml

## 【手続補正書】

【提出日】平成26年8月11日(2014.8.11)

## 【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】配列表

【補正方法】追加

【補正の内容】

## 【配列表】

2016539314000001.app

## 【手続補正書】

【提出日】平成27年12月1日(2015.12.1)

## 【手続補正1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】

ワクチンを解析するための方法であって：

(a) 前記ワクチン、またはその試料におけるインフルエンザウイルス血球凝集素を検出する工程であって：(i) 固体担体上に固定されたレクチンに前記試料を接触させ、捕獲された血球凝集素を提供する工程；および(ii) 免疫アッセイによって前記捕獲された血球凝集素を検出する工程を含む、工程；並びに

(b) 工程(a)の結果を使用して前記ワクチンにおける前記血球凝集素の濃度を算出する工程、  
を含む方法。

【請求項2】

前記レクチンがGNAレクチンである、請求項1の方法。

【請求項3】

工程(ii)が前記試料における血球凝集素の量および/または濃度の決定を可能にする定量的工程である、請求項1または2の方法。

【請求項4】

前記試料が(a)1つのインフルエンザウイルス株のみからの血球凝集素、または(b)複数のインフルエンザウイルス株からの血球凝集素を含む、請求項1~3のいずれか1項の方法。

【請求項5】

前記HAがインフルエンザAウイルスHAを含む、請求項1~4のいずれか1項の方法。

【請求項6】

前記HAがH1、H3またはH5 HAである、請求項5の方法。

【請求項7】

前記HAがインフルエンザBウイルスHAを含む、請求項1~6のいずれか1項の方法。

【請求項8】

前記試料におけるHAがインフルエンザビリオン由来である、請求項1~7のいずれか1項の方法。

【請求項9】

前記試料が(i)インフルエンザウイルス血球凝集素、および(ii)インフルエンザウイルス抗原PB1、PB2、PA、NP、NA、M1、M2、NS1および/またはNS2を含む、請求項1~8のいずれか1項の方法。

## 【請求項 1 0】

前記試料が完全なインフルエンザビリオンを含む、請求項1～9のいずれか1項の方法。

## 【請求項 1 1】

前記試料が分割したインフルエンザビリオンを含む、請求項1～10のいずれか1項の方法。

## 【請求項 1 2】

前記試料がインフルエンザビリオンから精製された表面抗原を含む、請求項1～11のいずれか1項の方法。

## 【請求項 1 3】

前記HAがHA1である、請求項1～12のいずれか1項の方法。

## 【請求項 1 4】

前記試料が、(i) 血清成分、(ii) 卵タンパク質および/または(iii) ニワトリDNAを含まない、請求項1～13のいずれか1項の方法。

## 【請求項 1 5】

前記試料がインフルエンザウイルスタンパク質以外のウイルスタンパク質を含まない、請求項1～14のいずれか1項の方法。

## 【請求項 1 6】

前記試料が界面活性剤を含む、請求項1～15のいずれか1項の方法。

## 【請求項 1 7】

前記試料がバルクワクチンである、請求項1～16のいずれか1項の方法。

## 【請求項 1 8】

請求項1～17のいずれか1項の方法であって、前記血球凝集素は、ELISA法において定量化され、前記ELISA法は：(i) 固体担体上に固定されたレクチンに前記試料を接触させ、捕獲された血球凝集素を提供する工程；(ii) 前記捕獲された血球凝集素に抗血球凝集素抗体を介して酵素を付着させる工程；および(iii) 付着された前記酵素を使用して基質を生成物に変換する工程を含み、前記生成物の定量的検出が前記試料におけるインフルエンザウイルス血球凝集素の量を示す、方法。

## 【請求項 1 9】

所望の血球凝集素濃度のバルクワクチンを提供するための方法であって：(a) 請求項1～18のいずれか1項の方法によって、前記ワクチンにおける、またはその試料における血球凝集素を解析する工程；(b) 工程(a)の結果を使用して前記バルクワクチンにおける前記血球凝集素の濃度を算出する工程；および(c) 工程(b)の結果を使用して、前記所望の血球凝集素濃度を与えるために前記バルクワクチンを希釈する工程を含む、方法。

## 【請求項 2 0】

前記所望の血球凝集素濃度が1～150 µg/ml、たとえば90 µg/ml、45 µg/ml、30 µg/ml、15 µg/ml、10 µg/ml、7.5 µg/ml、5 µg/ml、3.8 µg/ml、3.75 µg/ml、1.9 µg/mlまたは1.5 µg/mlである、請求項19の方法。

## 【請求項 2 1】

患者の使用のためにワクチンを提供するための方法であって：請求項19または請求項20の方法によって所望の血球凝集素濃度のバルクワクチンを調製する工程；および次いで、希釈した前記バルクからワクチンの1つまたは複数の単位用量を抽出する工程を含む、方法。

## 【請求項 2 2】

抽出した単位用量が第2のキット成分と組み合わせたキット成分としてパッケージされ、前記第2のキット成分がワクチンのアジュバントである、請求項21の方法。

## 【請求項 2 3】

増強されたバルクワクチンを提供するための方法であって：請求項19または請求項20の方法によって所望の血球凝集素含量のバルクワクチンを調製する工程；および次いで希釈した前記バルクワクチンをアジュバントと混合する工程を含む、方法。

## 【請求項 2 4】

患者の使用のために増強されたワクチンを提供するための方法であって：請求項23の方法によって増強されたバルクワクチンを提供する工程；および次いで、前記バルクからワクチンの1つまたは複数の単位用量を抽出する工程を含む、方法。

【請求項25】

試料におけるインフルエンザウイルス血球凝集素を精製するための方法であって、固体担体上に固定されたレクチンに前記試料を接触させる工程を含み、前記レクチンはマンノース結合レクチンであり、ただし前記レクチンがConAレクチンではない、方法。

【請求項26】

前記レクチンがGNAレクチンである、請求項25の方法。

【手続補正2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0140

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0140】

ポリペプチド配列間の同一性は、好ましくは、ギャップオープンペナルティ=12およびギャップエクステンションペナルティ=1のパラメーターでアフィンギャップ検索を使用して、MPSRCHプログラム（OxfordMolecular）において実行したSmith-Waterman相同性検索アルゴリズムによって決定される。

本発明は、例えば、以下の項目も提供する。

（項目1）

試料におけるインフルエンザウイルス血球凝集素（HA）を検出するための方法であって：（i）固体担体上に固定されたレクチンに前記試料を接触させ、捕獲された血球凝集素を提供する工程；および（ii）免疫アッセイによって前記捕獲された血球凝集素を検出する工程を含む方法。

（項目2）

前記レクチンがGNAレクチンである、項目1の方法。

（項目3）

工程（ii）が前記試料における血球凝集素の量および/または濃度の決定を可能にする定量的工程である、項目1または2の方法。

（項目4）

前記試料が（a）1つのインフルエンザウイルス株のみからの血球凝集素または（b）複数のインフルエンザウイルス株からの血球凝集素を含む、項目1～3のいずれか1項の方法。

（項目5）

前記HAがインフルエンザAウイルスHAを含む、項目1～4のいずれか1項の方法。

（項目6）

前記HAがH1、H3またはH5 HAである、項目5の方法。

（項目7）

前記HAがインフルエンザBウイルスHAを含む、項目1～6のいずれか1項の方法。

（項目8）

前記試料におけるHAがインフルエンザビリオン由来である、項目1～7のいずれか1項の方法。

（項目9）

前記試料が（i）インフルエンザウイルス血球凝集素、および（ii）インフルエンザウイルス抗原PB1、PB2、PA、NP、NA、M1、M2、NS1および/またはNS2を含む、項目1～8のいずれか1項の方法。

（項目10）

前記試料が完全なインフルエンザビリオンを含む、項目1～9のいずれか1項の方法。

(項目11)

前記試料が分割したインフルエンザビリオンを含む、項目1~10のいずれか1項の方法。

(項目12)

前記試料がインフルエンザビリオンから精製された表面抗原を含む、項目1~11のいずれか1項の方法。

(項目13)

前記HAがHA1である、項目1~12のいずれか1項の方法。

(項目14)

前記試料が(i)血清成分、(ii)卵タンパク質および/または(iii)ニワトリDNAを含まない、項目1~13のいずれか1項の方法。

(項目15)

前記試料がインフルエンザウイルスタンパク質以外のウイルスタンパク質を含まない、項目1~14のいずれか1項の方法。

(項目16)

前記試料が界面活性剤を含む、項目1~15のいずれか1項の方法。

(項目17)

前記試料がバルクワクチンである、項目1~16のいずれか1項の方法。

(項目18)

ワクチンを解析するための方法であって：(a)項目1~17のいずれか1項の方法により、前記ワクチンにおける、またはその試料における血球凝集素を検出する工程；および(b)工程(a)の結果を使用して前記ワクチンにおける前記血球凝集素の濃度を算出する工程を含む方法。

(項目19)

所望の血球凝集素濃度のバルクワクチンを提供するための方法であって：(a)請求項18の方法によって、前記ワクチンにおける、またはその試料における血球凝集素を解析する工程；(b)工程(a)の結果を使用して前記バルクワクチンにおける前記血球凝集素の濃度を算出する工程；および(c)工程(b)の結果を使用して、前記所望の血球凝集素濃度を与えるために前記バルクワクチンを希釈する工程を含む方法。

(項目20)

前記所望の血球凝集素濃度が1~150 µg/ml、たとえば90 µg/ml、45 µg/ml、30 µg/ml、15 µg/ml、10 µg/ml、7.5 µg/ml、5 µg/ml、3.8 µg/ml、3.75 µg/ml、1.9 µg/mlまたは1.5 µg/mlである、項目19の方法。

(項目21)

患者の使用のためにワクチンを提供するための方法であって：項目19または項目20の方法によって所望の血球凝集素濃度のバルクワクチンを調製する工程；および次いで、希釈した前記バルクからワクチンの1つまたは複数の単位用量を抽出する工程を含む方法。

(項目22)

抽出した単位用量が第2のキット成分と組み合わせたキット成分としてパッケージされ、前記第2のキット成分がワクチンのアジュバントである、項目21の方法。

(項目23)

増強されたバルクワクチンを提供するための方法であって：項目19または項目20の方法によって所望の血球凝集素含量のバルクワクチンを調製する工程；および次いで、希釈した前記バルクワクチンをアジュバントと混合する工程を含む方法。

(項目24)

患者の使用のために増強されたワクチンを提供するための方法であって：項目23の方法によって増強されたバルクワクチンを提供する工程；および次いで、前記バルクからワクチンの1つまたは複数の単位用量を抽出する工程を含む方法。

(項目25)

(i) マルチウェル固体担体 (ii) レクチンおよび (iii) 酵素学的なインフルエンザウ

イルス血球凝集素検出試薬を含むELISAキット。

(項目26)

試料におけるインフルエンザウイルス血球凝集素を定量化するためのELISA法であって、(i) 固体担体上に固定されたレクチンに前記試料を接触させ、捕獲された血球凝集素を提供する工程；(ii) 前記捕獲された血球凝集素に抗血球凝集素抗体を介して酵素を付着させる工程；および(iii) 付着された前記酵素を使用して基質を生成物に変換する工程を含み、前記生成物の定量的検出が前記試料におけるインフルエンザウイルス血球凝集素の量を示す、ELISA法。

(項目27)

試料におけるインフルエンザウイルス血球凝集素を精製するための方法であって、固体担体上に固定されたレクチンに前記試料を接触させる工程を含み、前記レクチンはマンノース結合レクチンであり、ただし前記レクチンがConAレクチンではない、方法。

(項目28)

前記レクチンがGNAレクチンである、項目27の方法。

## 【 国際調査報告 】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/IB2012/057235

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. G01N33/569 ADD.		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) G01N		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) EPO-Internal, WPI Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	YUICHIRO SATO ET AL: "High mannose-specific lectin (KAA-2) from the red alga <i>Porphyra</i> inhibits influenza virus infection in a strain-independent manner", BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS, vol. 405, no. 2, 8 January 2011 (2011-01-08), pages 291-296, XP028361653, ISSN: 0006-291X, DOI: 10.1016/J.BBRC.2011.01.031 [retrieved on 2011-01-08]	1-17,25, 26
Y	(p 292, col 2, para 3), title; abstract ----- -/--	18-24, 27,28
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C.		<input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.
* Special categories of cited documents :		
*A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *E* earlier application or patent but published on or after the international filing date *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		*T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art *&* document member of the same patent family
Date of the actual completion of the international search 13 March 2013	Date of mailing of the international search report 27/03/2013	
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016	Authorized officer Bigot-Maucher, Cora	

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/IB2012/057235

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 2010/136896 A1 (NOVARTIS AG [CH]; DORMITZER PHILIP [US]; WEN YINGXIA [US]; PALMER GENE) 2 December 2010 (2010-12-02) (p 1, 1 32-33)(p 2, para 2; claims 18-19); abstract	18-24, 27,28
A	----- KIM Y K ET AL: "Evaluation of new hemagglutinin-based rapid antigen test for influenza A pandemic (H1N1) 2009", JOURNAL OF CLINICAL VIROLOGY, ELSEVIER, AMSTERDAM, NL, vol. 49, no. 1, 1 September 2010 (2010-09-01), pages 69-72, XP027212183, ISSN: 1386-6532 [retrieved on 2010-08-12] page 70, column 1, paragraph 3	1-28
A	----- HUI-LONG XU ET AL: "Molecular modeling, docking and dynamics simulations of GNA-related lectins for potential prevention of influenza virus (H1N1)", JOURNAL OF MOLECULAR MODELING, SPRINGER VERLAG, DE, vol. 18, no. 1, 29 March 2011 (2011-03-29) , pages 27-37, XP019994702, ISSN: 0948-5023, DOI: 10.1007/S00894-011-1022-7 abstract	1-28
	-----	

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

Information on patent family members

International application No

PCT/IB2012/057235

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2010136896	A1	02-12-2010	
		AU 2010252661 A1	22-12-2011
		CA 2763440 A1	02-12-2010
		EA 201171491 A1	30-07-2012
		EP 2435066 A1	04-04-2012
		JP 2012528139 A	12-11-2012
		KR 20120030442 A	28-03-2012
		US 2012237545 A1	20-09-2012
		WO 2010136896 A1	02-12-2010
-----			

## フロントページの続き

(51) Int. Cl.

F I

テーマコード (参考)

C 0 7 K 14/11

(81) 指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), EP(AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC

(72) 発明者 アンドリュース, ウィリアム

アメリカ合衆国 マサチューセッツ 02139, ケンブリッジ, シドニー ストリート 4  
5, ノバルティス ヴァクシNZ アンド ダイアグノスティクス

(72) 発明者 リネラ, パオラ

イタリア国 イ - 53100 シエナ, ピア フィオレンティーナ 1, ノバルティス ヴァ  
クシNZ アンド ダイアグノスティクス

(72) 発明者 ローザ, ドメニーコ

イタリア国 イ - 53100 シエナ, ピア フィオレンティーナ 1, ノバルティス ヴァ  
クシNZ アンド ダイアグノスティクス

(72) 発明者 パラディーノ, ジセッピ

アメリカ合衆国 マサチューセッツ 02139, ケンブリッジ, シドニー ストリート 4  
5, ノバルティス ヴァクシNZ アンド ダイアグノスティクス

F ターム(参考) 4C085 AA03 BA57 CC08 DD01 DD33 EE06 GG01

4H045 AA10 AA11 AA20 AA30 BA10 CA01 CA30 DA80 DA86 EA31

EA50 EA53 FA71 GA26

专利名称(译)	<无法获取翻译>		
公开(公告)号	<a href="#">JP2016539314A5</a>	公开(公告)日	2017-01-26
申请号	JP2014546715	申请日	2012-12-12
[标]申请(专利权)人(译)	瑞士商诺华公司		
申请(专利权)人(译)	诺华公司		
[标]发明人	ドルミッターフィリップ アンドリュースウィリアム リネラパオラ ローザドメニーコ パラディーノジセッピ		
发明人	ドルミッター, フィリップ アンドリュース, ウィリアム リネラ, パオラ ローザ, ドメニーコ パラディーノ, ジセッピ		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/543 A61K39/155 C07K14/42 C07K14/11		
CPC分类号	G01N33/56983 C07K14/005 G01N2333/11		
FI分类号	G01N33/53.V G01N33/53.S G01N33/543.545.A A61K39/155 C07K14/42.ZNA C07K14/11		
F-TERM分类号	4C085/AA03 4C085/BA57 4C085/CC08 4C085/DD01 4C085/DD33 4C085/EE06 4C085/GG01 4H045/AA10 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/CA01 4H045/CA30 4H045/DA80 4H045/DA86 4H045/EA31 4H045/EA50 4H045/EA53 4H045/FA71 4H045/GA26		
代理人(译)	夏木森下		
优先权	61/569597 2011-12-12 US		
其他公开文献	JP2016539314A		

#### 摘要(译)

本发明使用包括两个关键步骤的方法对HA进行定量：使用凝集素如雪花莲凝集素捕获HA。并使用免疫测定法定量捕获的HA。该测定可以方便地以ELISA形式进行。该过程是特定的，面对污染物时具有鲁棒性，并且比标准SRID分析更快，更灵敏。