

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第6868572号
(P6868572)

(45) 発行日 令和3年5月19日 (2021.5.19)

(24) 登録日 令和3年4月14日 (2021.4.14)

(51) Int. Cl.

F 1

C 1 2 N 7/02 (2006.01)
 A 6 1 K 48/00 (2006.01)
 A 6 1 K 35/76 (2015.01)
 A 6 1 P 27/02 (2006.01)
 A 6 1 P 9/10 (2006.01)

C 1 2 N 7/02 Z N A
 A 6 1 K 48/00
 A 6 1 K 35/76
 A 6 1 P 27/02
 A 6 1 P 9/10

請求項の数 10 (全 48 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2017-559915 (P2017-559915)
 (86) (22) 出願日 平成28年2月9日 (2016.2.9)
 (65) 公表番号 特表2018-507707 (P2018-507707A)
 (43) 公表日 平成30年3月22日 (2018.3.22)
 (86) 国際出願番号 PCT/EP2016/052740
 (87) 国際公開番号 W02016/128408
 (87) 国際公開日 平成28年8月18日 (2016.8.18)
 審査請求日 平成30年11月2日 (2018.11.2)
 (31) 優先権主張番号 15305188.3
 (32) 優先日 平成27年2月9日 (2015.2.9)
 (33) 優先権主張国・地域又は機関
 欧州特許庁 (EP)

(73) 特許権者 504006489
 インスティテュート ナショナル デ ラ
 サンテ エ デ ラ ルシエルシュ メ
 ディカル (インセルム)
 フランス国 パリ リュー ド トルビア
 1 0 1
 (73) 特許権者 513296752
 ユニバーシティ デ ナント
 フランス国, エフ-44035 ナント
 セデックス 01, ビー. ビー. 1352
 2, 1 ケ ドゥ トゥールヴィユ
 (73) 特許権者 517276837
 シーエイチユー ナント
 フランス国, 44000 ナント, 5 ア
 リー デ イル グロリエット
 最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 アフィニティー精製工程を含む組換えアデノ随伴ウイルス粒子の精製

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

精製された組換えアデノ随伴ウイルス (r A A V) 粒子を得るための方法であって、

(a) r A A V 粒子を産生する細胞から事前に取得された出発材料の深層ろ過を行う工程であって、前記出発材料が細胞溶解物および／または培養上清を含む、それにより r A A V 含有清澄化組成物が提供される工程と、

(b) 前記 r A A V 含有清澄化組成物をイムノアフィニティー精製のステップに供する工程であって、それにより第 1 の r A A V 濃縮組成物が提供される工程と、

(c) 前記第 1 の r A A V 濃縮組成物を少なくとも 1 回、

(c 1) 塩勾配を用いて溶出が行われ r A A V 含有画分が回収される、クロマトグラフィー担体上における陰イオン交換クロマトグラフィーのステップであって、それにより第 2 の r A A V 濃縮組成物が提供されるステップ；または

(c 2) 密度勾配遠心分離のステップであって、r A A V 含有画分が回収される、それにより第 2 の r A A V 濃縮組成物が提供されるステップ；
 に供する工程と、

(d) 前記第 2 の r A A V 濃縮組成物をタンジェンシャルフローろ過のステップに供する工程であって、それにより、精製された組換えアデノ随伴ウイルス (r A A V) 粒子が提供される工程と、
 を含み、

前記細胞溶解物は、r A A V 粒子を産生する細胞の培養物を、少なくとも 1 種の洗浄剤

10

20

または界面活性剤を含む組成物と接触させることによって得られる細胞溶解物であり、

前記 r A A V 粒子が、A A V 4、A A V r h 1 0、A A V 2、A A V 8 および A A V 9 からなる群より選択される A A V 血清型に属し、

工程 (a) が、ホウケイ酸ガラスのマイクロファイバーとセルロースの混合エステルとを含むデブスフィルター膜を用いて実施される、方法。

【請求項 2】

前記 r A A V 粒子に向けられた抗体またはその断片が固定されているクロマトグラフィー担体を用いて工程 (b) が実施される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

前記抗体またはその断片がモノクローナルである、請求項 2 に記載の方法。

【請求項 4】

前記抗体またはその断片がラクダ科動物の抗体またはその断片である、請求項 2 または 3 に記載の方法。

【請求項 5】

A V B S e p h a r o s e (商標) クロマトグラフィー (G E H e a l t h c a r e) 担体を用いて工程 (b) が実施される、請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 6】

ステップ (c 1) において、クロマトグラフィー担体が、モノリス型クロマトグラフィー担体である、請求項 1 ~ 5 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 7】

2 0 k D a ~ 1 5 0 k D a の範囲の分子量カットオフ値を有するフィルター膜を用いて工程 (d) が実施される、請求項 1 ~ 6 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 8】

r A A V 粒子が、A A V 血清型 A A V 4 に属する、請求項 1 ~ 7 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 9】

r A A V 粒子が、ヒト R P E 6 5 をコードする発現カセットを含む D N A を含む r A A V 4 粒子からなる、請求項 1 ~ 8 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 10】

前記精製された r A A V 粒子が、遺伝子治療における使用に適している、請求項 1 ~ 9 のいずれか 1 項に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、アデノ随伴ウイルス粒子 (r A A V) の精製の分野に関する。特に、本発明は、精製された組換えアデノ随伴ウイルス粒子 (r A A V) を得るための方法に関する。本発明はまた、前記方法を用いて得ることができる、精製された r A A V 粒子およびその組成物にも関する。本発明はさらに、A A V プラスミド、および前記プラスミドでトランスフェクトされた宿主細胞、ならびに前記宿主細胞によって産生される r A A V 粒子に関する。

【背景技術】

【0002】

遺伝子送達、後天性疾患および遺伝性疾患の処置のための有望な方法である。アデノ随伴ウイルス (A A V) を利用した系を含め、遺伝子導入を目的とするウイルスを利用した系がいくつか説明されている。A A V は、ディペンドウイルス属に属するヘルパー依存型 D N A パルボウイルスである。増殖性感染が起こるためには、A A V は、無関係のヘルパーウイルス (例えば、アデノウイルス、ヘルペスウイルスまたはワクシニア) との同時感染を必要とする。ヘルパーウイルスの非存在下では、A A V は、そのゲノムを宿主細胞

10

20

30

40

50

の染色体に挿入することにより潜伏状態を確立する。その後のヘルパーウイルスの感染が、組み込まれたウイルスゲノムをレスキューし、その後、このウイルスゲノムは複製して感染性のウイルス子孫を産生できる。

【0003】

AAVは、幅広い宿主域を有し、好適なヘルパーウイルスの存在下で任意の種の細胞において複製することができる。例えば、ヒトAAVは、イヌアデノウイルスと同時感染したイヌ細胞において複製するであろう。AAVは、いかなるヒトまたは動物の疾患とも関連付けられておらず、組み込み時に宿主細胞の生物学的特性を変化させるとは思われない。AAVの総説については、例えば、Berns and Bohezky (1987) *Advances in Virus Research* (Academic Press, Inc.) 32:243-307を参照のこと。

10

【0004】

Le meur et al. (「Restoration of vision in RPE65-deficient Briard dogs using an AAV serotype 4 vector that specifically targets the retinal pigmented epithelium」; *Gene Therapy*; Vol. 14, 292-303; 2007) は、RPE65を欠損したイヌにおいて視力を回復させるためのrAAVの使用を教示する。

【0005】

Petit et al. (「Restoration of vision in the pde6 β -deficient Dog, a Large Animal Model of Rod-cone Dystrophy」; *Molecular Therapy*; Vol. 20, no. 11, 2019-2030; 2012) は、PDE6 β を欠損したイヌにおいて視力を回復させるためのrAAVの使用を教示する。

20

【0006】

これら全ての理由から、遺伝子治療のためのアデノ随伴ウイルスの使用が提唱されている。しかし、臨床用途に十分なだけの純度および／または感染力を有する調製物を必要とするため、未だに適用されていない。

【0007】

従って、アデノ随伴ウイルス粒子 (rAAV) を精製するための新規の方法が依然として必要とされている。特に、明確に定義されており、再現性があり、適正製造規範 (GMP) に従う管理された環境条件内にある、拡張可能な方法が依然として必要とされている。

30

【0008】

特に、限られた数の工程を必要とする、アデノ随伴ウイルス粒子 (rAAV) を精製するための方法が依然として必要とされている。

【0009】

また、医薬としての使用および／または遺伝子治療に適しているアデノ随伴ウイルス粒子 (rAAV) を精製するための方法も依然として必要とされている。

【0010】

従って、純度および感染力が高いrAAV粒子およびその組成物を精製するための拡張可能な方法が依然として必要とされている。

40

【0011】

アデノ随伴ウイルス粒子を精製するための方法は、先行技術において報告されている。しかし、それらの方法は、そのままで医薬としての使用および／または遺伝子治療に適しているrAAV粒子の生産に関して必ずしも十分なものではない。

【0012】

国際公開第2011/094198号は、イオン交換カラムクロマトグラフィーの工程とタンジェンシャルフローろ過の工程とを含む、AAV粒子を精製するための方法を教示する。

50

【0013】

国際公開第03/097797号は、混入DNAのレベルが低下したウイルス粒子を精製するための方法を教示し、この方法は、細胞溶解、深層ろ過および／または遠心分離、超遠心分離、ヌクレアーゼ処理、陰イオン交換クロマトグラフィーならびにタンジェンシャルフローろ過の工程を含んでよい。

【0014】

一方で、利用可能な技術の多くは、細胞抽出物の大規模な事前処理（密度勾配、クロマトグラフィー工程の前のヌクレアーゼと洗浄剤での処理を含む）を必要とするという欠点を有する。このような追加的処理は、プロセス全体を工業規模では不十分なものにす

【0015】

10 イムノアフィニティークロマトグラフィーは、アデノ随伴ウイルス（AAV）の精製のための迅速な一段階の精製方法として報告されている。しかし、その利用は、クロマトグラフィー担体上への固定時の抗体またはその断片の非常に特異的な性質のせいで、依然として限られている。さらに、イムノアフィニティークロマトグラフィー担体は、一段階の精製方法に使用される場合、空の粒子の大部分が混入した精製 rAAV を生成する傾向があり、そのため、それを遺伝子治療における直接投与に使用することを妨げる。

【0016】

イムノアフィニティークロマトグラフィーまたは抗体を利用したアフィニティークロマトグラフィーの代替手段として、ペプチドアフィニティー精製が報告されている。

【0017】

20 Pulicherla et al. (「Peptide affinity reagents for AAV capsid recognition and purification」; Gene Ther. ; 18 (10) : 1020-1024 ; 2011) は、Pep8 に基づくペプチドを用いたペプチドアフィニティー精製の工程の後に陰イオン交換クロマトグラフィーを含む、AAV8 カプシドを精製するための方法を報告する。しかし、この方法は、AAV8 カプシドに限定されるという欠点を有し、臨床グレードの rAAV 粒子調製物を生産するために多大な最適化を必要とする。

【0018】

特に、ペプチドアフィニティー精製は、新規のペプチドリガンドを単離して特徴付けすること、および、これらのリガンドと適合する GMP のクロマトグラフィーカラムを作製すること（時間がかかり、広範囲に及び、そのため、プロセス全体の拡張性のボトルネックとなる可能性があるステップ）を必要とする。

【0019】

30 従って、適正製造規範の事項に関してスケールアップでき、依然として経済的観点から許容でき、医薬としての使用または遺伝子治療に好適である、新規の方法が依然として必要とされている。

【0020】

また、複数の血清型に属する rAAV 粒子を含む出発材料から rAAV 粒子を精製するための方法も依然として必要とされている。

【0021】

40 また、精製された rAAV 粒子に混入する空の粒子が減少する、イムノアフィニティークロマトグラフィーで rAAV 粒子を精製するための方法も依然として必要とされている。

【0022】

また、前記プロセスによってさらに精製でき、所与の宿主細胞における rAAV 粒子の産生に依然として好適である、それ自体としての、および／または医薬としての使用もしくは遺伝子治療のための、新規の精製された rAAV 粒子およびその組成物も依然として必要とされている。

【発明の概要】

【0023】

10

20

30

40

50

本発明は、精製された組換えアデノ随伴ウイルス粒子（r A A V）を得るための方法であって、

（a）r A A V粒子を産生する細胞から事前に取得された出発材料の深層ろ過を行う工程であって、前記出発材料が、細胞溶解物および培養上清を含む群において選択される、それによりr A A V含有清澄化組成物が提供される工程と、

（b）r A A V含有清澄化組成物をアフィニティー精製のステップに供する工程であって、それにより第1のr A A V濃縮組成物が提供される工程と、

（c）第1のr A A V濃縮組成物を少なくとも1回、

（c 1）塩勾配（好ましくは直線的な塩勾配）を用いて溶出が行われr A A V含有画分が回収される、クロマトグラフィー担体上における陰イオン交換クロマトグラフィーのステップであって、それにより第2のr A A V濃縮組成物が提供されるステップ；または

（c 2）密度勾配遠心分離のステップであって、r A A V含有画分が回収される、それにより第2のr A A V濃縮組成物が提供されるステップ；
に供する工程と、

（d）第2のr A A V濃縮組成物をタンジェンシャルフローろ過のステップに供する工程であって、それにより、精製された組換えアデノ随伴ウイルス粒子（r A A V）が提供される工程と、

を含む方法に関する。

【0024】

特に、本発明は、精製された組換えアデノ随伴ウイルス粒子（r A A V）を得るための方法であって、

（a）r A A V粒子を産生する細胞から事前に取得された出発材料の深層ろ過を行う工程であって、前記出発材料が、細胞溶解物および培養上清を含む群において選択される、それによりr A A V含有清澄化組成物が提供される工程と、

（b）r A A V含有清澄化組成物をイムノアフィニティー精製のステップに供する工程であって、それにより第1のr A A V濃縮組成物が提供される工程と、

（c）第1のr A A V濃縮組成物を少なくとも1回、

（c 1）塩勾配（好ましくは直線的な塩勾配）を用いて溶出が行われr A A V含有画分が回収される、クロマトグラフィー担体上における陰イオン交換クロマトグラフィーのステップであって、それにより第2のr A A V濃縮組成物が提供されるステップ；または

（c 2）密度勾配遠心分離のステップであって、r A A V含有画分が回収される、それにより第2のr A A V濃縮組成物が提供されるステップ；
に供する工程と、

（d）第2のr A A V濃縮組成物をタンジェンシャルフローろ過のステップに供する工程であって、それにより、精製された組換えアデノ随伴ウイルス粒子（r A A V）が提供される工程と、

を含む方法に関する。

【0025】

本発明はまた、上述される方法の実施によって得られる精製されたr A A V粒子にも関する。本発明はさらに、上記で定義されるような精製されたr A A V粒子を少なくとも1つ含む、精製されたr A A V粒子の組成物に関する。

【0026】

本発明はさらに、遺伝子治療に使用するための、および／または遺伝子治療に使用するための医薬の調製のための、前記精製されたr A A V粒子およびその組成物に関する。

【0027】

本発明はまた、ヒトPDE6βをコードする発現カセットを含むA A Vプラスミド、ならびに前記A A Vプラスミドでトランスフェクトされた宿主細胞、さらには前記宿主細胞によって産生されるr A A V粒子にも関する。

【図面の簡単な説明】

【0028】

10

20

30

40

50

【図1A】ヒトPDE6 β をコードするAAVプラスミドの発現カセットの地図。ヒトPDE6 β タンパク質をコードする核酸配列は、その5'末端でヒトロドプシンキナーゼ(RK)プロモーターに、その3'末端でウシ成長ホルモンポリアデニル化部位(bGHpA)につながっており、逆方向末端反復(ITR)配列に挟まれている。

【図1B】ヒトRPE65をコードするAAVプラスミドの発現カセットの地図。ヒトRPE65タンパク質をコードする核酸配列は、その5'末端でヒトRPE65プロモーターに、その3'末端でウシ成長ホルモンポリアデニル化部位(bGHpA)につながっており、逆方向末端反復(ITR)配列に挟まれている。

【図2】ヒトPDE6 β をコードする発現カセットを含むAAVプラスミド全体の地図。発現カセットは、図1で定義されるようなITR配列によって区切られている。制限部位は、EcoRV、SpeIおよびHindIIIと定義されている。プラスミドは、追加的なカナマイシン(Kan/neoR)耐性マーカーおよびColI開始点を含む。配列の方向は、標準的な命名法に従って矢印で示されている。

10

【図3A】完了したAVBカラム工程のクロマトグラム。曲線は280nm(Aの線)および260nm(Bの線)における吸光度(左側の軸(mAU))を表す。線Cは伝導率(mS/cm)(右側の軸)を表す。線DはpHを表す。空の四角は、サンプルの注入および溶出の段階を示す。

【図3B】AVBカラム工程からの、溶出されたAAVのピークの拡大表示。曲線は280nm(Aの線)および260nm(Bの線)における吸光度(左側の軸(mAU))を表す。線Cは伝導率(mS/cm)(右側の軸)を表す。線DはpHを表す。空の四角は、AAV含有画分が溶出される箇所を示す。

20

【発明を実施するための形態】

【0029】

本発明は前述の必要性に対処する。

【0030】

本発明は、(1)種々のAAV血清型/カプシドバリエーションの高純度精製に使用でき、そのまま臨床用途に好適である調製物を作製するのに適している、モジュール式プラットフォームプロセス；および(2)アフィニティークロマトグラフィー(イムノアフィニティークロマトグラフィーまたはペプチドアフィニティークロマトグラフィー)の後に少なくとも1回の密度勾配遠心分離工程または好ましくは直線的な塩勾配を用いて実施される少なくとも1回の陰イオン交換クロマトグラフィーを含む、独特な順序のプロセスの工程；という、本発明を現在の「工業規格の」拡張可能なAAV粒子精製プロセスと区別する2つの独特な特徴を含む、組換えアデノ随伴ウイルス(rAAV)粒子の精製方法を提供する。

30

【0031】

驚くべきことに、これらの特徴は、細胞溶解物または培養上清などの出発材料の精製に関して、予想外の拡張性をもたらす。特に、このプロセスは、最適な感染性を有し遺伝子治療に適している精製された組換えアデノ随伴ウイルス粒子を調製するための最適化に適しているという利点を有する。

【0032】

40

1つ以上の追加的工程(陰イオンクロマトグラフィー工程および/または密度勾配遠心分離を含む)の使用は、前記担体上の空の粒子と完全な粒子の最適な分離をもたらす、従って、改善された様式でrAAV粒子を単離するのに適している。

【0033】

有利なことに、この多段階の精製方法は、工業規模で、臨床グレードのrAAV調製物を精製することを可能にする。

【0034】

有利なことに、組成物は、直線的な塩勾配を用いて陰イオン交換クロマトグラフィー担体に通すことができる。いかなる特定の理論にも束縛されることを望むものではないが、直線的な塩勾配は、段階的な塩勾配と比較して、より効率的な溶出種の分離をもたらすと

50

も発明者等は考えている。その差は、より小さな勾配の傾きにあり、これが、塩濃度の穏やかな増加の形成を可能にし、従って、クロマトグラフィー担体内での r A A V 粒子の最適な分離を可能にする。

【0035】

発明者等の知る限り、これは、アフィニティークロマトグラフィー工程（特にイムノアフィニティークロマトグラフィー工程）を含む多段階の精製法を伴う、臨床グレードの r A A V 粒子（特に A A V 4 血清型に属する r A A V 粒子）を精製するための、初めて説明される「工業規格の」方法である。

【0036】

実際、以前に報告された r A A V 粒子を精製するための方法は、一段階のアフィニティークロマトグラフィーまたはイムノアフィニティークロマトグラフィーの工程を伴い、および／または「工業規格の」方法ではなかった。

【0037】

また、本発明の方法は、最終産物において完全な粒子の割合がより高いため、r A A V の特定の血清型を精製するのに特に適している。

【0038】

また、プロセス終了時の残留 DNA は、洗浄剤とヌクレアーゼ（DNAseを含む）での処理を行わなくても、臨床基準に合致する。

【0039】

従って、本発明は、精製された組換えアデノ随伴ウイルス粒子（r A A V）を得るための方法に関し、A A V 1、A A V 2、A A V 3、A A V 4、A A V 5、A A V 8、A A V 9、A A V 10 およびアカゲザル由来血清型（A A V r h 10 を含む）ならびにそれらの混合物を含む群またはそれらからなる群において選択される A A V 血清型（特に A A V 4）に属する r A A V 粒子を精製するのに特に適している。

【0040】

本発明は、精製された組換えアデノ随伴ウイルス粒子（r A A V）を得るための方法であって、

（a）r A A V 粒子を産生する細胞から事前に取得された出発材料の深層ろ過を行う工程であって、前記出発材料が、細胞溶解物および培養上清を含む群において選択される、それにより r A A V 含有清澄化組成物が提供される工程と、

（b）r A A V 含有清澄化組成物をアフィニティー精製のステップに供する工程であって、それにより第1の r A A V 濃縮組成物が提供される工程と、

（c）第1の r A A V 濃縮組成物を少なくとも1回、

（c1）塩勾配（好ましくは直線的な塩勾配）を用いて溶出が行われ r A A V 含有画分が回収される、クロマトグラフィー担体上における陰イオン交換クロマトグラフィーのステップであって、それにより第2の r A A V 濃縮組成物が提供されるステップ；または

（c2）密度勾配遠心分離のステップであって、r A A V 含有画分が回収される、それにより第2の r A A V 濃縮組成物が提供されるステップ；
に供する工程と、

（d）第2の r A A V 濃縮組成物をタンジェンシャルフローろ過のステップに供する工程であって、それにより、精製された組換えアデノ随伴ウイルス粒子（r A A V）が提供される工程と、
を含む方法に関する。

【0041】

アフィニティー精製のステップは、ペプチドアフィニティー精製のステップまたはイムノアフィニティー精製のステップからなってもよい。

【0042】

第1の実施形態によれば、本発明は、精製された組換えアデノ随伴ウイルス粒子（r A A V）を得るための方法であって、

（a）r A A V 粒子を産生する細胞から事前に取得された出発材料の深層ろ過を行う工

10

20

30

40

50

程であって、前記出発材料が、細胞溶解物および培養上清を含む群において選択される、それにより r A A V 含有清澄化組成物が提供される工程と、

(b) r A A V 含有清澄化組成物をイムノアフィニティー精製のステップに供する工程であって、それにより第 1 の r A A V 濃縮組成物が提供される工程と、

(c) 第 1 の r A A V 濃縮組成物を少なくとも 1 回、

(c 1) 塩勾配 (好ましくは直線的な塩勾配) を用いて溶出が行われ r A A V 含有画分が回収される、クロマトグラフィー担体上における陰イオン交換クロマトグラフィーのステップであって、それにより第 2 の r A A V 濃縮組成物が提供されるステップ; または

(c 2) 密度勾配遠心分離のステップであって、r A A V 含有画分が回収される、それにより第 2 の r A A V 濃縮組成物が提供されるステップ;

に供する工程と、

(d) 第 2 の r A A V 濃縮組成物をタンジェンシャルフローろ過のステップに供する工程であって、それにより、精製された組換えアデノ随伴ウイルス粒子 (r A A V) が提供される工程と、

を含む方法に関する。

【0043】

出発材料は、A A V 4、A A V 2、A A V 10 および / または A A V 5 の血清型に属する r A A V 粒子を含め、1 つの血清型に属する r A A V 粒子または複数の血清型に属する r A A V 粒子のいずれかを含んでよい。

【0044】

特に、出発材料は、A A V 4 および / または A A V 5 の血清型に属する r A A V 粒子を含め、1 つの血清型に属する r A A V 粒子または複数の血清型に属する r A A V 粒子のいずれかを含んでよい。

【0045】

好ましくは、本発明は、精製された A A V 4 血清型に属する組換えアデノ随伴ウイルス粒子 (r A A V) を得るための方法であって、

(a) A A V 4 血清型に属する前記 r A A V 4 粒子を産生する細胞から事前に取得された出発材料の深層ろ過を行う工程であって、前記出発材料が、細胞溶解物および培養上清を含む群において選択される、それにより r A A V 含有清澄化組成物が提供される工程と

、

(b) r A A V 4 含有清澄化組成物をイムノアフィニティー精製のステップに供する工程であって、それにより第 1 の r A A V 4 濃縮組成物が提供される工程と、

(c) 第 1 の r A A V 4 濃縮組成物を少なくとも 1 回、

(c 1) 塩勾配 (好ましくは直線的な塩勾配) を用いて溶出が行われ r A A V 含有画分が回収される、クロマトグラフィー担体上における陰イオン交換クロマトグラフィーのステップであって、それにより第 2 の r A A V 濃縮組成物が提供されるステップ; または

(c 2) 密度勾配遠心分離のステップであって、r A A V 含有画分が回収される、それにより第 2 の r A A V 4 濃縮組成物が提供されるステップ;

に供する工程と、

(d) 第 2 の r A A V 4 濃縮組成物をタンジェンシャルフローろ過のステップに供する工程であって、それにより、精製された A A V 4 血清型に属する組換えアデノ随伴ウイルス粒子 (r A A V) が提供される工程と、

を含む方法に関する。

【0046】

本発明の精製された r A A V 粒子は、所望の遺伝子産物をコードする異種核酸を含む。このような産物には、限定されるものではないが、s i R N A、アンチセンス分子、m i R N A、リボザイム等が包含される。他の産物には、ホルモン、増殖受容体、リガンド、および遺伝子治療に有用なタンパク質、をコードする核酸が包含される。

【0047】

第 2 の実施形態によれば、本発明は、上記で説明されるような方法の実施によって得ら

10

20

30

40

50

れる精製された r A A V 粒子、およびその組成物に関する。

【0048】

第3の実施形態によれば、本発明は、遺伝子治療に使用するための、前記精製された r A A V 粒子およびその組成物に関する。

【0049】

第4の実施形態によれば、本発明は、ヒト P D E 6 β をコードする発現カセットを含む A A V プラスミド、前記 A A V プラスミドでトランスフェクトされた宿主細胞、および前記宿主細胞によって産生される r A A V 粒子（それ自体、ならびに遺伝子治療に使用するためのもの）に関する。

【0050】

本発明によれば、「工程を含む」などにおける「含む」なる表現は、「工程からなる」などにおける「からなる」とも理解される。

【0051】

精製された組換えアデノ随伴ウイルス粒子を得るための方法

本発明は、精製された組換えアデノ随伴ウイルス粒子（r A A V）を得るための方法であって、

（a）r A A V 粒子を産生する細胞から事前に取得された出発材料の深層ろ過を行う工程であって、前記出発材料が、細胞溶解物および培養上清を含む群において選択される、それにより r A A V 含有清澄化組成物が提供される工程と、

（b）r A A V 含有清澄化組成物をアフィニティー精製のステップ（イムノアフィニティー精製のステップまたはペプチドアフィニティー精製のステップなど）に供する工程であって、それにより第1の r A A V 濃縮組成物が提供される工程と、

（c）第1の r A A V 濃縮組成物を少なくとも1回、

（c1）塩勾配（好ましくは直線的な塩勾配）を用いて溶出が行われ r A A V 含有画分が回収される、クロマトグラフィー担体上における陰イオン交換クロマトグラフィーのステップであって、それにより第2の r A A V 濃縮組成物が提供されるステップ；または

（c2）密度勾配遠心分離のステップであって、r A A V 含有画分が回収される、それにより第2の r A A V 濃縮組成物が提供されるステップ；

に供する工程と、

（d）第2の r A A V 濃縮組成物をタンジェンシャルフローろ過のステップに供する工程であって、それにより、精製された組換えアデノ随伴ウイルス粒子（r A A V）が提供される工程と、

を含む方法に関する。

【0052】

特に、アフィニティー精製のステップは、イムノアフィニティー精製のステップである。

【0053】

より具体的には、本発明は、精製された組換えアデノ随伴ウイルス粒子（r A A V）を得るための方法であって、

（a）r A A V 粒子を産生する細胞から事前に取得された出発材料の深層ろ過を行う工程であって、前記出発材料が、細胞溶解物および培養上清を含む群において選択される、それにより r A A V 含有清澄化組成物が提供される工程と、

（b）r A A V 含有清澄化組成物をイムノアフィニティー精製のステップに供する工程であって、それにより第1の r A A V 濃縮組成物が提供される工程と、

（c）第1の r A A V 濃縮組成物を少なくとも1回、

（c1）塩勾配（好ましくは直線的な塩勾配）を用いて溶出が行われ r A A V 含有画分が回収される、クロマトグラフィー担体上における陰イオン交換クロマトグラフィーのステップであって、それにより第2の r A A V 濃縮組成物が提供されるステップ；または

（c2）密度勾配遠心分離のステップであって、r A A V 含有画分が回収される、それにより第2の r A A V 濃縮組成物が提供されるステップ；

10

20

30

40

50

に供する工程と、

(d) 第2のrAAV濃縮組成物をタンジェンシャルフローろ過のステップに供する工程であって、それにより、精製された組換えアデノ随伴ウイルス粒子(rAAV)が提供される工程と、
を含む方法に関する。

【0054】

一部の実施形態によれば、方法は、洗浄剤および／またはヌクレアーゼ(DNAseを含む)での処理の工程を含む。

【0055】

一部の実施形態によれば、方法は、洗浄剤および／またはヌクレアーゼ(DNAseを含む)での処理の工程を含まない。

10

【0056】

別の実施形態によれば、rAAV粒子は、AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV8、AAV9、AAV10およびアカゲザル由来血清型(AAVrh10を含む)ならびにそれらの混合物を含む群において選択されるAAV血清型(特にAAV4)に属する。

【0057】

代替的な一実施形態によれば、rAAV粒子は、ヒトPDE6βをコードする発現カセットを含むDNAを含むrAAV5粒子からなる。

【0058】

20

前記実施形態によれば、前記発現カセットは配列番号1のものである。

【0059】

一実施形態によれば、rAAV5粒子は、配列番号2を含むDNAを含む。

【0060】

別の代替的な実施形態によれば、rAAV粒子は、ヒトRPE65をコードする発現カセットを含むDNAを含むrAAV4粒子からなる。

【0061】

「組換えAAVビリオン」、「rAAVビリオン」、「AAV粒子」、「完全なカプシド」および「完全な粒子」なる用語は、本明細書では、両側にAAVのITRが隣接している目的の異種ヌクレオチド配列をカプシドで包んでいる、AAVのタンパク質の殻を含む感染性の複製欠損ウイルスと定義される。rAAVビリオンは、その中にAAVヘルパー機能およびアクセサリー機能が導入された、AAVプラスミドを指定する配列を有している好適な宿主細胞において産生される。このように、宿主細胞は、AAVプラスミド(目的の組換えヌクレオチド配列を含む)を後の遺伝子送達のための感染性組換えビリオン粒子にパッケージングするのに必要とされるAAVのポリペプチドをコードすることができるようにしている。

30

【0062】

「組換えウイルス」は、例えば粒子内への異種核酸コンストラクトの添加または挿入によって、遺伝学的に改変されているウイルスを意味する。

【0063】

40

「AAVビリオン」は、野生型(wt)AAVウイルス粒子(AAVカプシドタンパク質外被と結合した直線状の一本鎖AAV核酸ゲノムを含む)など、完全なウイルス粒子を意味する。この点に関して、相補的センス(例えば、「センス」鎖または「アンチセンス」鎖)のいずれかの一本鎖AAV核酸分子が、任意の1つのAAVビリオンにパッケージングされてよく、両方の鎖は、同等に感染性である。

【0064】

「宿主細胞」なる用語は、例えば、AAVヘルパーコンストラクト、AAVプラスミド、アクセサリー機能プラスミドまたは他の導入DNAの一時的または永久的な安定産生細胞株レシピエントとして使用できるか使用されている微生物、酵母細胞、昆虫細胞および哺乳動物細胞を意味する。この用語には、トランスフェクトされた最初の細胞の子孫が包

50

含まれる。従って、本明細書で使用される場合、「宿主細胞」は一般に、外因性のDNA配列でトランスフェクトされた細胞を指す。1つの親細胞の子孫は、天然の、偶然の、または意図的な変異に起因して、形態またはゲノムもしくは全DNAの相補物が必ずしも元の親と完全に同一であるわけではない可能性があるということが理解される。

【0065】

「rAAV含有清澄化組成物」なる用語は、細胞溶解物または培養上清などの出発材料の深層ろ過の工程の後に得られる、rAAV粒子を含む任意の組成物を包含する。「rAAV含有清澄化組成物」は、「rAAV濃縮組成物」および／または精製されたrAAV粒子とは異なる。

【0066】

10

従って、「rAAV含有清澄化組成物」は、深層ろ過された出発材料（細胞溶解物または培養上清など）から直接得られる、濃縮および／または精製の工程にさらに供されていない、rAAV粒子を含む任意の組成物（イオン（例えば陽イオン）交換クロマトグラフィーの工程に供されていないものを含む）を包含してよい。

【0067】

前記実施形態によれば、本発明は、精製された組換えアデノ随伴ウイルス粒子（rAAV）を得るための方法であって、

（a）細胞溶解物および／または培養上清の深層ろ過を行う工程であって、それによりrAAV含有清澄化組成物が提供される工程と、

（b）rAAV含有清澄化組成物をアフィニティー精製のステップ（イムノアフィニティー精製のステップまたはペプチドアフィニティー精製のステップなど）に供する工程であって、それにより第1のrAAV濃縮組成物が提供される工程と、

20

（c）第1のrAAV濃縮組成物を少なくとも1回、

（c1）塩勾配（好ましくは直線的な塩勾配）を用いて溶出が行われrAAV含有画分が回収される、クロマトグラフィー担体上における陰イオン交換クロマトグラフィーのステップであって、それにより第2のrAAV濃縮組成物が提供されるステップ；または

（c2）密度勾配遠心分離のステップであって、rAAV含有画分が回収される、それにより第2のrAAV濃縮組成物が提供されるステップ；

に供する工程と、

（d）第2のrAAV濃縮組成物をタンジェンシャルフローろ過のステップに供する工程であって、それにより、精製された組換えアデノ随伴ウイルス粒子（rAAV）が提供される工程と、

30

を含む方法に関する。

【0068】

別の実施形態によれば、本発明は、本発明の精製された組換えアデノ随伴ウイルス粒子（rAAV）を得るための方法であって、アフィニティーのステップ（イムノアフィニティー精製のステップまたはペプチドアフィニティー精製のステップ）の第1段階に供されるrAAV含有清澄化組成物が、工程（a）の終了時に直接得られる組成物である、方法に関する。従って、前記実施形態によれば、工程（a）と工程（b）は、連続した工程である。

40

【0069】

「連続した工程」は、クロマトグラフィー（特にイオン（陽イオン）交換クロマトグラフィー）のステップという中間工程は除外される、第1の工程の後に来る任意の工程を意味する。一方、別段の記載がない限り、「連続した工程」は、前記組成物の緩衝液の条件（すなわち、塩濃度、pH）を改変することを目的とした、緩衝液の交換および／または希釈の工程を除外しない。

【0070】

一実施形態によれば、本発明の方法は、陽イオン交換クロマトグラフィーの工程を含まない。

【0071】

50

一実施形態によれば、本発明の方法は、アパタイトクロマトグラフィーの工程を含まない。

【0072】

好ましい一実施形態によれば、本発明は、本発明の精製された組換えアデノ随伴ウイルス粒子（rAAV）を得るための方法であって、アフィニティー精製（イムノアフィニティー精製またはペプチドアフィニティー精製）工程と陰イオン交換クロマトグラフィー工程が、あるいはアフィニティー精製（イムノアフィニティー精製またはペプチドアフィニティー精製）と密度勾配遠心分離が、連続した工程である、方法に関する。従って、前記実施形態によれば、工程（b）と工程（c）は、連続した工程である。

【0073】

別の実施形態によれば、工程（c）と工程（d）は連続している。

【0074】

別の実施形態によれば、工程（b）と工程（c）と工程（d）は連続している。

【0075】

別の実施形態によれば、工程（a）と工程（b）と工程（c）は連続している。

【0076】

別の実施形態によれば、工程（a）と工程（b）と工程（c）と工程（d）は連続している。

【0077】

従って、本発明はまた、精製された組換えアデノ随伴ウイルス粒子（rAAV）を得るための方法であって、

（a）rAAV粒子を産生する細胞から事前に取得された出発材料の深層ろ過を行う工程であって、前記出発材料が、細胞溶解物および培養上清を含む群において選択される、それによりrAAV含有清澄化組成物が提供される工程と、

（b）工程（a）で得られたrAAV含有清澄化組成物をアフィニティー精製のステップ（イムノアフィニティー精製のステップまたはペプチドアフィニティー精製のステップ）に供する工程であって、それにより第1のrAAV濃縮組成物が提供される工程と、

（c）工程（b）で得られた第1のrAAV濃縮組成物を少なくとも1回、

（c1）塩勾配（好ましくは直線的な塩勾配）を用いて溶出が行われrAAV含有画分が回収される、クロマトグラフィー担体上における陰イオン交換クロマトグラフィーのステップであって、それにより第2のrAAV濃縮組成物が提供されるステップ；または

（c2）密度勾配遠心分離のステップであって、rAAV含有画分が回収される、それにより第2のrAAV濃縮組成物が提供されるステップ；
に供する工程と、

（d）工程（c）で得られた第2のrAAV濃縮組成物をタンジェンシャルフローろ過のステップに供する工程であって、それにより、精製された組換えアデノ随伴ウイルス粒子（rAAV）が提供される工程と、
を含む方法にも関する。

【0078】

別の実施形態によれば、工程（a）と工程（b）と工程（c）と工程（d）は連続しており、工程（a）における出発材料は、細胞溶解物または培養上清から直接得られる。

【0079】

前記実施形態によれば、本発明は、精製された組換えアデノ随伴ウイルス粒子（rAAV）を得るための方法であって、

（a）細胞溶解物および／または培養上清の深層ろ過を行う工程であって、それによりrAAV含有清澄化組成物が提供される工程と、

（b）工程（a）で得られたrAAV含有清澄化組成物をアフィニティー精製のステップ（イムノアフィニティー精製のステップまたはペプチドアフィニティー精製のステップ）に供する工程であって、それにより第1のrAAV濃縮組成物が提供される工程と、

（c）工程（b）で得られた第1のrAAV濃縮組成物を少なくとも1回、

10

20

30

40

50

(c1) 塩勾配（好ましくは直線的な塩勾配）を用いて溶出が行われ r A A V 含有画分が回収される、クロマトグラフィー担体上における陰イオン交換クロマトグラフィーのステップであって、それにより第2の r A A V 濃縮組成物が提供されるステップ；または

(c2) 密度勾配遠心分離のステップであって、r A A V 含有画分が回収される、それにより第2の r A A V 濃縮組成物が提供されるステップ；

に供する工程と、

(d) 工程(c)で得られた第2の r A A V 濃縮組成物をタンジェンシャルフローろ過のステップに供する工程であって、それにより、精製された組換えアデノ随伴ウイルス粒子(r A A V)が提供される工程と、

を含む方法に関する。

10

【0080】

上述の方法は全て、少なくとも、(1)1回の出発材料の深層ろ過の工程、(2)第1のアフィニティー（イムノアフィニティーまたはペプチドアフィニティー）クロマトグラフィーの工程、(3)第2の陰イオン交換クロマトグラフィーまたは密度勾配遠心分離の工程、および(4)タンジェンシャルフローろ過の工程を含む。個々の工程はそれぞれ、以下でさらに定義される。

【0081】

追加的工程はそれぞれ、精製された組換えアデノ随伴ウイルス粒子の拡張性および高純度に寄与するとも発明者等は考えている。

【0082】

深層ろ過

深層ろ過の工程は、混入したDNAおよびタンパク質の大部分を排除することを可能にする。この工程は、r A A V 含有清澄化組成物から直接、イムノアフィニティークロマトグラフィーによって r A A V 粒子を精製することを可能にする。

20

【0083】

一実施形態によれば、工程(a)で使用される出発材料は、r A A V 粒子を産生する細胞の培養物を、少なくとも洗浄剤または界面活性剤（好ましくは洗浄剤）を含む組成物と接触させることによって得られる細胞溶解物である。

【0084】

一実施形態によれば、工程(a)で使用される出発材料は、r A A V 粒子を産生する細胞の培養物を、洗浄剤または界面活性剤を含んでも含まなくてもよい組成物と接触させることによって得られる細胞溶解物であるが、この細胞溶解物は、DNAseなどのヌクレアーゼで処理されない。

30

【0085】

細胞溶解のための好適な洗浄剤の例としては、T r i t o n X-100、T r i t o n X-114、NP-40、B r i j -35、B r i j -58、T w e e n 20、T w e e n 80、オクチルグルコシド、オクチルチオグルコシド、SDS、CHAPSおよびCHAPS Oが挙げられる。

【0086】

好ましい一実施形態によれば、工程(a)は、ホウケイ酸ガラスのマイクロファイバーの層とセルロースの混合エステルの層とを含むデプスフィルター膜を用いて行われる。

40

【0087】

例示的な一実施形態によれば、工程(a)は、P o l y s e p（商標）I I（M i l l i p o r e（登録商標））フィルターを用いて行われる。

【0088】

アフィニティークロマトグラフィー

本明細書で使用される場合、「アフィニティークロマトグラフィー」または「アフィニティー精製」なる用語は、分子間の特異的な結合相互作用を利用する任意の方法を指し示す。特定のリガンドが固体担体に化学的に固定または「カップリング」され、その結果、複合混合物がカラムを通過する際に、このリガンドに対する特異的な結合親和性を有する

50

分子が結合する。サンプルの他の構成成分が洗い流された後、結合した分子が担体からはがされ、その結果、元のサンプルから精製されたことになる。

【0089】

本明細書で使用される場合、「イムノアフィニティークロマトグラフィー」なる用語は、固定された抗体またはその断片をアフィニティークロマトグラフィーにおいて利用する任意の方法を指し示す。

【0090】

「抗体またはその断片」なる用語は、モノクローナル抗体およびポリクローナル抗体、天然に存在する抗体および天然には存在しない抗体、抗体全体およびその断片（Fv領域、Fab領域およびF(ab')₂領域などの抗原結合断片を含む）、相補性決定領域（CDR）、単ドメイン抗体、ナノボディならびにそれらの混合物を包含してよい。

10

【0091】

「その断片」なる用語は、元の抗体の一部を除去することによって得ることができる抗体の任意の断片を包含してよく、これには、非限定的ではあるが、そのFc領域、または可変領域の一部（CDRを含む）、が除去されている任意の抗体が包含される。

【0092】

本明細書で使用される場合、「ペプチドアフィニティークロマトグラフィー」なる用語は、固定されたペプチドをアフィニティークロマトグラフィーにおいて利用する任意の方法を指し示す。ペプチドアフィニティークロマトグラフィーは、当技術分野で周知である（例えばPulicherla et al., 2011, Gen Ther 18 (10): 1020-1024を参照のこと）。

20

【0093】

クロマトグラフィー担体上に固定される場合、この用語は、精製されるrAAV粒子の表面に存在する少なくとも1つのエピトープに結合する能力をそれが保持する限りにおいて、上述のバリエーションのうちのいずれかを包含する。

【0094】

特に、そのような抗体またはその断片には、IgA、IgD、IgE、IgGおよびIgMのサブクラスというアイソタイプが包含されてよい。

【0095】

特定の一実施形態によれば、抗体またはその断片は、モノクローナルである。

30

【0096】

本発明で考慮される抗体は、天然に存在するもの、または天然には存在しないものであってよい。それらは、ヒト起源または非ヒト起源のものであってよい。

【0097】

例示的な一実施形態によれば、抗体は、ラクダ科動物（ヒトコブラクダ、ラクダ、リャマおよびアルパカを含む）またはサメの免疫化によって得られるものなどの単鎖抗体である。

【0098】

抗体およびその断片は、例えばMoser & Hage（「Immunoaffinity chromatography: an introduction to applications and recent developments」; Bioanalysis; 2 (4): 769-790; 2010）において説明されるように、取得され、共有結合から吸着に基づく方法にわたる様々な技術を用いて担体上に固定されてよい。

40

【0099】

モノクローナル抗体は、培養中の連続細胞株による抗体分子の産生をもたらす任意の技術を用いて調製されてよい。これらには、限定されるものではないが、ハイブリドーマ技術、ヒトB細胞ハイブリドーマ技術、およびEBVハイブリドーマ技術が包含される（Kohler, et al., 1975, Nature 256: 495-497; Kozbor, et al., 1985, J. Immunol. Methods 81: 3

50

1-42; Cote, et al., 1983, Proc. Natl. Acad. Sci. 80:2026-2030; Cole, et al, 1984, Mol Cell Biol. 62:109-120)。

【0100】

本発明で使用するための好適なイムノアフィニティークロマトグラフィー担体がいくつか知られており、これらには、限定されるものではないが、Affi-Gel (Biorad); Affinica Agarose/Polymeric Supports (Schleicher and Schuell); AvidGel (BioProbe); Bio-Gel (BioRad); Fractogel (EM Separations); HEMA-AFC (Alltech); Reacti-Gel (Pierce) ; Sephacryl (Pharmacia); Sepharose (Pharmacia); Superose (Pharmacia); Trisacryl (IBF); TSK Gel Toyopearl (TosoHaas); Ultragel (IBF); AvidGel CPG (BioProbe); HiPAC (ChromatoChem); Protein-Pak Affinity Packing (Waters); Ultrafinity-EP (Bodman) および Emphaze (3M Corp. / Pierce) が包含される。

10

【0101】

他のクロマトグラフィー担体には、アフィニティーモノリス型クロマトグラフィー担体およびPOROS (登録商標) アフィニティークロマトグラフィー担体が包含される。

20

【0102】

好ましくは、抗体およびその断片は、アガロースマトリックス上に固定されてよい。

【0103】

従って、一実施形態によれば、方法は、前記rAAV粒子に向けられた抗体またはその断片が固定されているクロマトグラフィー担体を用いて実施される工程(b)を含む。

【0104】

特に、抗体またはその断片は、親水性のスペーサーアームによってアガロースマトリックスに固定される。

【0105】

一実施形態によれば、工程(b)は、AAV粒子上に存在する少なくとも1つのエピトープに特異的に結合する抗体を使用して実施される。一実施形態において、前記エピトープは少なくとも、AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9およびAAVrh10を含む群において選択される血清型に属する。

30

【0106】

一実施形態において、前記エピトープは少なくとも、AAV1、AAV2、AAV3およびAAV5を含む群またはそれらからなる群において選択される血清型に属する。

【0107】

特定の一実施形態によれば、工程(b)は、AAV粒子上に存在する少なくとも1つのエピトープに特異的に結合するラクダ科動物の単鎖抗体またはVHH抗体を使用して実施される。一実施形態において、前記エピトープは少なくとも、AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9およびAAVrh10を含む群において選択される血清型に属し、これには、AAV1、AAV2、AAV3およびAAV5を含む群またはそれらからなる群より選択されるエピトープが包含される。

40

【0108】

さらに、例示的な一実施形態によれば、工程(b)は、AVB Sepharose (商標) クロマトグラフィー (GE Healthcare) 担体を使用して実施される。

【0109】

好ましい一実施形態によれば、イムノアフィニティークラムにロードする前において、

50

r A A V含有清澄化組成物（特に r A A V 4、r A A V r h 1 0またはr A A V 2を含有する清澄化組成物）のpHは、中性～塩基性のpHであり、これには、6. 0～8. 0の範囲のpHが包含される。

【0110】

最も好ましい一実施形態によれば、r A A V含有清澄化組成物は、r A A V 4含有清澄化組成物である。

【0111】

さらに、例示的な一実施形態によれば、r A A V含有清澄化組成物は、カルシウムおよびマグネシウムを追加したD u l b e c c oのリン酸緩衝食塩水（D P B S）、またはリン酸緩衝食塩水（P B S）、で平衡化したA V Bカラムにロードされる。

10

【0112】

さらに、例示的な一実施形態によれば、第1のr A A V濃縮組成物は、酸性pHでイムノアフィニティークラムから溶出される。酸性pHは、7. 0未満（5. 0未満または3. 0未満を含む）の任意のpHを指してよい。

【0113】

前記例示的な実施形態によれば、第1のr A A V濃縮組成物は、酸性pHでイムノアフィニティークラムから溶出され、ここで前記pHは3. 0未満であり、これには約2. 0というpHが包含される。

【0114】

上述のイムノアフィニティーの担体および方法は、A A V 4、A A V 1 0（すなわちA A V r h 1 0）またはA A V 2の血清型に属するr A A V粒子（特にA A V 4血清型に属するr A A V粒子）を精製するための本発明の方法において特に便利である。

20

【0115】

溶出されると、第1のr A A V濃縮組成物のpHは、好ましくは、中性または塩基性のpH（これには、8. 5を含め、8. 0以上のpHが包含される）を有する第1のr A A V濃縮組成物を得るのに好適な様式で中和される。r A A V 4粒子を含め、r A A V粒子は、酸性pHを有する組成物中で維持されると、その完全性および／または感染性を失う傾向があるというのがその理由である。

【0116】

例示的な一実施形態によれば、第1のr A A V濃縮組成物は、約8. 5のpHを有するT r i s緩衝液で中和される。

30

【0117】

別の例示的な実施形態によれば、第1のr A A V濃縮組成物は、約8. 0のpHを有するT r i s緩衝液で中和される。

【0118】

有利なことに、中和の前、間または後に、第1のr A A V濃縮組成物は、非イオン性界面活性剤（例えばP l u r o n i c（登録商標） F - 6 8（G i b c o））を追加されてよい。

【0119】

非イオン性界面活性剤は、組成物の総体積の0. 0001%～0. 1%（v/v）の範囲の量で存在してよく、これには、組成物の総体積の0. 0005%～0. 005%（v/v）の範囲の量が包含され、これには、組成物の総体積の約0. 001%（v/v）が包含される。

40

【0120】

有利なことに、アデノ随伴ウイルス粒子（r A A V）濃縮組成物は、上記で定義されるような量の非イオン性界面活性剤（例えばP l u r o n i c（登録商標） F - 6 8（G i b c o））の存在下で濃縮される。

【0121】

また、有利なことに、アデノ随伴ウイルス粒子（r A A V）含有組成物は、上記で定義されるような非イオン性界面活性剤を、やはり上記で定義されるような量で、さらに含ん

50

でよい眼用塩類溶液 (Saline Ocular Solution) に対してダイアフィルトレーションおよび濃縮される。

【0122】

上記で定義されるような、および他の工程における、非イオン性界面活性剤の使用はさらに、方法の効率および拡張性に寄与する。特に、上記で定義されるような、非イオン性界面活性剤の使用は、精製の前、間および後に、rAAV粒子の凝集または接着を防止する。

【0123】

陰イオン交換クロマトグラフィー

本発明で使用するための好適な陰イオン交換体がいくつか知られており、これらには、限定されるものではないが、MACRO PREP Q (BioRad (Hercules, Calif.)) から入手可能な強力な陰イオン交換体)、UNOSPHERE Q (BioRad (Hercules, Calif.)) から入手可能な強力な陰イオン交換体)、POROS 50HQ (Applied Biosystems (Foster City, Calif.)) から入手可能な強力な陰イオン交換体)、POROS 50D (Applied Biosystems (Foster City, Calif.)) から入手可能な弱い陰イオン交換体)、POROS 50PI (Applied Biosystems (Foster City, Calif.)) から入手可能な弱い陰イオン交換体)、SOURCE 30Q (GE Healthcare (N. J.)) から入手可能な強力な陰イオン交換体)、DEAE SEPHAROSE (GE Healthcare (Piscataway, N. J.)) から入手可能な弱い陰イオン交換体)、Q SEPHAROSE (GE Healthcare Biosciences (Piscataway, N. J.)) から入手可能な強力な陰イオン交換体)、Canto QおよびCanto Adhere (GE Healthcare, N. J.) が包含される。

【0124】

好適なモノリス型クロマトグラフィー担体の例は、当技術分野で公知であり、これらには、非限定的ではあるが、モノリス型カラムCIMmultus (登録商標) QA、CIM (登録商標) QA、CIM DEAEおよびCIMmultus (登録商標) DEAE (Bia Separations) が包含される。

【0125】

クロマトグラフィーモノリスは、融合したマイクロメートルサイズのシリカの小球、またはクロマトグラフィーチューブ内で直接合成できる有機ポリマー、でできた一体型の多孔質固体である。このおかげで、この担体は、非常に耐久性があり、すぐに使用でき、パッケージパラメータ (package parameters) のばらつきがない。

【0126】

モノリスは、相互につながっている流路 (perfusion channel) からなる、連続した多孔質ベッドのマトリックスを有する均一なカラムである。これらの流路は、充填ベッド粒子を利用したクロマトグラフィーの典型的な孔径 (5~100 nm) と比較すると、比較的大きい (1~5 μm)。これの1つの利点は、接触可能な表面が大きいために、それが、ウイルスなどの巨大分子の潜在的結合容量を増加させるということである。これらの担体は、高流速および低い速度においてさえ、低い逆圧を生じさせる。

【0127】

充填ベッドカラムと比較すると、モノリス型担体の向上した物質輸送は、巨大分子の効率的な分離をもたらす。

【0128】

実用的観点からすると、これらのカラムの使用は、流速とは関係なく高い結合容量および良好な分解能を伴いつつ、充填ベッドカラムと比較して高流速でウイルス産物 (それが細胞溶解物である場合でも) を扱うことを可能にする。これらの担体の高分解能は、精製工程の削減およびプロセス全体の拡張性に寄与する。

【0129】

一部の実施形態によれば、精製された組換えアデノ随伴ウイルス粒子（rAAV）を得るための方法は、陰イオン交換クロマトグラフィー工程を1つしか含まない。

【0130】

一部の実施形態によれば、精製された組換えアデノ随伴ウイルス粒子（rAAV）を得るための方法は、2つ以上の陰イオンクロマトグラフィー工程を含み、これには、特に2つ、3つまたは4つの陰イオンクロマトグラフィー工程が包含される。方法が2つ以上の陰イオン交換クロマトグラフィー工程を含む場合、上述の工程は、同種の担体上または異なる担体上で達成されてよい。

【0131】

例示的な実施形態によれば、ステップ（c1）における少なくとも1つのクロマトグラフィー担体は、モノリス型クロマトグラフィー担体である。

10

【0132】

陰イオン交換カラムはまず、標準的な緩衝液を用いて、製造業者の仕様書に従って平衡化される。例えば、カラムは、例えば5～50mMの、好ましくは7～20mM（20mMなど）の、Tris緩衝液で平衡化されてよい。次に、サンプルがロードされ、2種類の溶出緩衝液（1種類の低塩濃度緩衝液および1種類の高塩濃度緩衝液）が使用される。

【0133】

塩勾配を生じさせる低塩濃度緩衝液と高塩濃度緩衝液の漸進的混合（progressive mix）に沿って画分が回収され、それらの画分において、溶出された物質が標準的な技術（260nmおよび280nmにおけるUV吸収のモニタリングなど）を用いて検出される。陰イオン交換体を用いる場合、低塩濃度の溶出液に由来するタンパク質のピークはAAVの空のカプシドを含み、高塩濃度の画分はAAV粒子を含む。

20

【0134】

特に、陰イオン交換カラム上において、AAV粒子は、約pH5～pH12の、好ましくはpH6～pH10の、さらに好ましくはpH7～pH9.5（pH7.1、7.2、7.3、7.4～8.0、8.1、8.2、8.3、8.4、8.5～9.0、9.1、9.2、9.3、9.4、9.5など）のpHの、または上記の範囲内の任意のpHの、適切な緩衝液を用いてさらに精製されてよい。

【0135】

陰イオン交換カラムで使用するための適切な緩衝液は、当技術分野で周知であり、一般的には陽イオン性または双性イオン性である。このような緩衝液には、限定されるものではないが、以下の緩衝イオンを有する緩衝液が包含される：N-メチルピペラジン、ピペラジン、Bis-Tris、Bis-Trisプロパン、トリエタノールアミン、Tris、N-メチルジエタノールアミン、1,3-ジアミノプロパン、エタノールアミン、酢酸等。サンプルを溶出するために、適切なpHで塩（NaCl、KCl、硫酸塩、ギ酸塩または酢酸塩など）を用いて開始緩衝液のイオン強度が高められる。

30

【0136】

有利なことに、陰イオン交換クロマトグラフィーの間、前または後に使用される緩衝液は全て、緩衝液組成物の総体積の0.0001%～0.1%（v/v）の範囲の量で非イオン性界面活性剤（例えばPluronic（登録商標）F-68（ThermoFisher Scientific））を含み、当該量には、緩衝液組成物の総体積の0.0005%～0.005%（v/v）の範囲の量が包含され、当該量には、緩衝液組成物の総体積の約0.001%（v/v）が包含される。

40

【0137】

使用される樹脂（すなわち、強力な、または弱い、イオン交換体）の性質ならびに、塩濃度、使用される緩衝液およびpHについての条件は、AAVカプシドバリエーション（すなわち、AAVカプシドの血清型または偽型）によって異なるであろう。公知のAAVカプシドバリエーションは全て、サイズおよび形状などの特徴が共通しているが、分子トポロジーおよび表面電荷分布という細部において異なる。従って、全てのカプシドバリエーションが、陰イオン交換クロマトグラフィーによる精製に適していると予想され、妥当な方法は、ク

50

ロマトグラフィーの樹脂および緩衝液のスクリーニング実験を用いて体系的に決定できるが、効率的なA A V粒子の精製を達成するには、A A Vカプシドバリエーションごとに異なる条件が必要となるであろう。このような条件の決定は、当業者には明白である。

【0138】

有利なことに、工程（b）の終了時に、r A A V含有清澄化組成物のp Hは、工程（c）で使用される少なくとも1つの陰イオンクロマトグラフィー担体上におけるr A A V粒子の最適な保持を確実にするために、塩基性のp Hに調整される。

【0139】

8.5のp Hまたは8.5超（9を含む）のp Hは、陰イオン交換カラムへのr A A V 4粒子またはr A A V 4含有清澄化組成物の結合に特に便利である。

10

【0140】

従って、例示的な一実施形態によれば、工程（b）の終了時に、陰イオン交換カラムへの結合のためのr A A V 4含有清澄化組成物の最適p Hは、p H 8.5または8.5超（9を含む）に調整される。

【0141】

8.5のp Hまたは8.5超（9を含む）のp Hは、陰イオン交換カラムへのr A A V r h 10粒子またはr A A V r h 10含有清澄化組成物の結合に特に便利である。

【0142】

従って、例示的な一実施形態によれば、工程（b）の終了時に、陰イオン交換カラムへの結合のためのr A A V r h 10含有清澄化組成物の最適p Hは、p H 8.5または8.5超（9を含む）に調整される。

20

【0143】

8.5のp Hまたは8.5超（9を含む）のp Hは、陰イオン交換カラムへのr A A V 2粒子またはr A A V 2含有清澄化組成物の結合に特に便利である。

【0144】

従って、例示的な一実施形態によれば、工程（b）の終了時に、陰イオン交換カラムへの結合のためのr A A V 2含有清澄化組成物の最適p Hは、p H 8.5または8.5超（9を含む）に調整される。

【0145】

陰イオン交換カラムで使用するための適切な緩衝液は、当技術分野で周知であり、一般的には陽イオン性または双性イオン性である。このような緩衝液には、限定されるものではないが、以下の緩衝イオンを有する緩衝液が包含される：N-メチルピペラジン、ピペラジン、B i s -T r i s、B i s -T r i sプロパン、トリエタノールアミン、T r i s、N-メチルジエタノールアミン、1,3-ジアミノプロパン、エタノールアミン、酢酸等。サンプルを溶出するために、適切なp Hで塩（N a C l、K C l、硫酸塩、ギ酸塩または酢酸塩など）を用いて開始緩衝液のイオン強度が高められる。

30

【0146】

また、溶出の前に、陰イオン交換クロマトグラフィーは、溶出工程に一般的に使用される塩濃度よりも低い塩濃度で担体または陰イオン交換カラムを処理する任意選択の工程を含んでもよい。このような処理は、本明細書では「プレ溶出」工程と呼称されることもある。

40

【0147】

従って、本発明の一実施形態では、陰イオン交換カラムはまず、低塩濃度（例えば、5～100mMの塩；特に5～100mMのN a C l；5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65～100mM、またはこれらの範囲内の任意の濃度など）で処理される。例えば、「第1のプレ溶出工程」における塩濃度は、最初は、ロード後にr A A V粒子をカラムに結合させるために使用される緩衝液の塩濃度と一致してよい。

【0148】

一部の実施形態では、最初の処理の後、次に、不純物を溶出させるために、より高いN

50

a C l 濃度など、より高い塩濃度で、またはより大きなイオン強度を有する別の緩衝液で、カラムが処理される。第2の緩衝液としての使用の一例は、酢酸ナトリウム緩衝液または T r i s 系緩衝液である。この追加的工程はまた、本明細書では「第2のプレ溶出」工程と呼称されることもある。この場合、塩濃度は、カラムから A A V 粒子を溶出させない程度に十分に低いままであるように注意される可能性がある。

【0149】

さらなる不純物をカラムから溶出させた後、次に、溶出工程において、より高い塩濃度を用いて A A V 粒子を回収できる。

【0150】

一部の実施形態において、クロマトグラフィー担体上における溶出の p H は、精製される r A A V 粒子に応じて調整される。最適 p H での溶出は、所与の粒子の最適な感染力を維持するという利点を有する。

10

【0151】

また、工程 (c) におけるクロマトグラフィー担体からの r A A V 粒子の溶出 (特に r A A V 4 粒子の溶出) は、p H 8 に調整されてもよい。

【0152】

好ましくは、クロマトグラフィー担体からの r A A V 粒子の溶出は、直線的な塩勾配を用いて行われる。塩は、N a C l、K C l、硫酸塩、ギ酸塩および酢酸塩からなる群より選択されてよく、好ましくは N a C l であってよい。

【0153】

20

「直線的な塩勾配の傾き」なる用語は、直線的勾配の2つの点 (A, B) の間の傾きを指し、以下の式に従って、クロマトグラフィー担体中の塩濃度および経時的に溶出されるカラム体積 (C V) の両方に依存する。

傾き (A, B) = (B における塩濃度 - A における塩濃度) / (B におけるカラム体積 - A におけるカラム体積)

【0154】

従って、直線的な塩勾配の傾きは、M / C V または mM / C V で表すことができ、好ましくは、標準的なプロトコルに従った緩やかな塩勾配である。

【0155】

一実施形態によれば、工程 (c) における直線的な塩勾配の傾きは、0.1 M / C V 以下であり、特に 0.015 ~ 0.09 M / C V の範囲である。

30

【0156】

一実施形態によれば、工程 (c) における直線的な塩勾配の傾きは、0.07 M / C V 以下であり、特に 0.01 ~ 0.06 M / C V の範囲である。

【0157】

有利なことに、該方法は、陰イオン交換クロマトグラフィー工程の前または後に r A A V 濃縮組成物の希釈という追加的工程を含んでよい。希釈の工程は、例えば、緩衝液の交換の工程の形態であってよい。

【0158】

好ましい一実施形態によれば、工程 (c) の終了時に、第2の r A A V 濃縮組成物は、工程 (d) の実施のために使用するまで凍結された形態で保存される。

40

【0159】

密度勾配遠心分離

密度勾配遠心分離において、懸濁液媒体の密度は、密度勾配用容器 (例えば遠心管) の一方の端部から他方の端部にかけて既知の様式で変動する。遠心力の影響下にある粒子が、その等密度点に達すると、すなわち、周囲の液体の密度が r A A V 粒子の密度と等しい場合に、r A A V 粒子は、力ベクトルに従った移動を止めることになる。

【0160】

本発明で考慮される遠心分離のための密度勾配を確立するために使用される溶質系には、非限定的ではあるが、無機塩 (塩化セシウム、臭化カリウム、塩化ナトリウム)、スク

50

ローズおよびいくつかの市販の溶質（スクロースの架橋によって作製される合成多糖である F i c o l l（登録商標）；ポリビニルピロリドンで被覆されたシリカ粒子の懸濁液である P e r c o l l（商標）；および合成分子メトリゾ酸の誘導体（メトリザミド）である N y c o d e n z（登録商標）など）が包含される。N y c o d e n z（登録商標）の二量体であるイオジキシノール（Iodixinol）またはイオジキサノールも広く使用されている。

【0161】

従って、工程（c）は、工程（b）で得られた第1の r A A V濃縮組成物を少なくとも1回、密度勾配遠心分離のステップに供する工程であって、r A A V含有画分が回収される、それにより第2の r A A V濃縮組成物が提供される工程を含んでよい。

10

【0162】

一実施形態によれば、密度勾配遠心分離のステップは、塩化セシウム（C s C l）勾配遠心分離、イオジキサノール勾配遠心分離、スクロース勾配遠心分離、P e r c o l l（商標）勾配遠心分離、F i c o l l（登録商標）遠心分離から選択され、最も好ましくは、塩化セシウム（C s C l）勾配遠心分離である。

【0163】

有利なことに、密度勾配を利用した遠心分離の前に、第1の r A A V濃縮組成物を、特にポリエチレングリコール（P E G 8 0 0 0 など）の存在下で、密度勾配遠心分離工程を行うために好適な体積の材料を得るために沈殿させてよい。

【0164】

20

また、それは、タンジェンシャルフローろ過（T F F）によってダイアフィルトレーションおよび濃縮されてもよい。

【0165】

従って、一実施形態によれば、第1の r A A V濃縮組成物を、P E G 8 0 0 0（例えば、約5～10%（w/v）という終濃度のP E G 8 0 0 0）の存在下で、沈殿させる。さらに、その後、サンプルは、密度勾配を利用した遠心分離の前に、さらなる処理のための沈殿した r A A V粒子の回収を促進するために遠心分離されてよい。

【0166】

最も一般的実施形態によれば、密度勾配を利用した遠心分離の方法は、少なくとも、

（i）目的のサンプルを含む、密度勾配形成溶液を提供する工程と、

30

（i i）第2の r A A V濃縮組成物を含む層を少なくとも1つ有する密度勾配をもたらしのに好適な様式で、工程（i）で提供された溶液を遠心分離する工程と、

（i i i）任意選択で、第2の r A A V濃縮組成物を含む層を回収する工程と、を含む。

【0167】

従って、目的のサンプルは、第1の r A A V濃縮組成物を含むか、第1の r A A V濃縮組成物からなっている。

【0168】

本発明によれば、「密度勾配形成溶液」は、遠心分離の前に連続的勾配または非連続的勾配のいずれかの形態である溶液、あるいは遠心分離中に勾配が自己形成される溶液である。

40

【0169】

「密度勾配形成溶液」は、塩化セシウム（C s C l）、イオジキサノール、スクロース、P e r c o l l（商標）およびF i c o l l（登録商標）の溶液からなる群より選択されてよく、最も好ましくは、塩化セシウム（C s C l）溶液またはイオジキサノールである。

【0170】

調整に関する理由（reglementary reasons）を含め、イオジキサノールが好ましい。

【0171】

工程（i）の一部の実施形態において、目的のサンプルは、単に、密度勾配形成溶液と

50

混合された状態であってよい。

【0172】

工程(i)の他の一部の実施形態において、目的のサンプルは、密度勾配形成溶液の上に、すなわち前記勾配形成溶液と大気との間の境界面に、積層されてよい。

【0173】

従って、第2のrAAV濃縮組成物を含む層を少なくとも1つ有する密度勾配をもたらしのに好適な様式で溶液を遠心分離する工程(ii)は、遠心分離の前に連続的勾配または非連続的勾配のいずれかの形態である密度勾配形成溶液、あるいは遠心分離中に勾配が自己形成される密度勾配形成溶液、を遠心分離することによって達成できる。

【0174】

前記実施形態によれば、工程(i)で提供される溶液は、既に、連続的密度勾配または非連続的密度勾配の形態であってよい。例えば、工程(i)で提供される溶液は、上から底にかけて、密度の増加する複数の層を有する、層の組の形態であってよい。

【0175】

連続的密度勾配および非連続的密度勾配の調製は、当技術分野で周知である。

【0176】

別の実施形態によれば、工程(i)で提供される密度勾配形成溶液は、遠心分離中に密度勾配が自己形成される溶液(例えば、等密度溶液)であってよい。

【0177】

前記実施形態によれば、密度勾配は、遠心分離する工程(ii)の間に形成されてよい。例えば、遠心分離中の密度勾配の形成は、等密度の塩化セシウム(CsCl)溶液から開始することによって生じる可能性がある。

【0178】

一実施形態によれば、工程(i)で提供されるAAV含有溶液は、 $1 \sim 1.6 \text{ g/cm}^3$ の範囲の密度を有するCsCl溶液であり、この密度には、1、1.1、1.2、1.3、1.4、および $1.5 \sim 1.6 \text{ g/cm}^3$ が包含され、この密度には、 $1.3 \sim 1.5 \text{ g/cm}^3$ が包含され、この密度には 1.376 g/cm^3 が包含される。

【0179】

一実施形態によれば、工程(i)における目的のサンプルは、遠心分離前に前記溶液の最上層に存在する。

【0180】

溶液を遠心分離する工程(ii)は、当技術分野で公知であり、少なくとも上から底にかけて勾配が形成されるまで前記溶液に遠心力場を適用することからなる。

【0181】

遠心力は一般に、工程(i)の溶液を含む遠心管を所与の時間(すなわち数時間)、所与の強度(1分あたりの回転すなわちrpmで、あるいはgで、見積もられる)および所与の遠心ローター内温度で回転させることによって適用される。

【0182】

好ましいプロトコルの一例が実施例1で説明される。

【0183】

好ましいプロトコルの別の例が実施例2で説明される。

【0184】

一実施形態によれば、工程(ii)で使用するローターはSV41ローターである。

【0185】

一実施形態によれば、工程(ii)は、完全な粒子を「空の」粒子から分離するために、工程(i)で提供された溶液をSW41ローターにおいて約30,000~50,000rpm(38,000rpmを含む)で約24~72時間(48時間を含む)、約4℃~20℃の温度の範囲の温度(15℃を含む)にて遠心分離することからなる。第2のrAAV濃縮組成物を含む層が、精製されたrAAVのバンド形成密度(banding density)に基づいて工程(iii)で回収されてよい。

【0186】

精製された rAAV のバンド形成密度の決定も当技術分野で公知であり、基準値との比較によって、あるいは経験的に、決定できる。

【0187】

rAAV の密度は、 g/cm^3 で表すことができる。

【0188】

参考までに、公知の rAAV 粒子（完全または空のいずれか）の密度は、Qu et al（「Separation of adeno-associated virus type 2 empty particles from genome containing vectors by anion-exchange column chromatography」；Journal of Virological Methods；2006）において説明されている：空のカプシドについては約 1.32 g/mL 、ゲノムを含むカプシドについては約 1.40 g/mL 。

10

【0189】

1つの所与の調製物の全体密度は、rAAV の血清型および調製物中の完全な粒子または空の粒子の存在の両方に依存する可能性がある。

【0190】

特に、生じる勾配の分解能は、非限定的ではあるが、工程（i）で使用される溶液の性質、溶液の遠心分離のために工程（ii）で使用されるパラメータおよび回収される必要のある rAAV のバンド形成密度を含め、様々なパラメータに依存するであろう。

20

【0191】

例えば、イオジキサノールは、臨床用途に使用される、当技術分野で公知のヨウ素化された密度勾配媒体である。イオジキサノール中での巨大分子の見かけの密度は CsCl 中のものとは異なるため、精製された rAAV のバンド形成密度は、経験的に決定されなければならない。rAAV カプシドの場合、密度は、CsCl 中で約 1.40 g/mL であり、イオジキサノール中で 1.266 g/mL である。

【0192】

工程（iii）において、および勾配の分取の後に、陽性画分が定量的 PCR によって特定されてもよく、任意選択でプールされてもよい。

【0193】

任意選択で、rAAV 粒子含有画分は、例えばタンジェンシャルフローろ過を用いて、さらに濃縮および／または透析されてもよい。

30

【0194】

任意選択で、rAAV 粒子含有画分は、追加的な密度勾配遠心分離に供されてもよい。

【0195】

密度勾配遠心分離を用いて rAAV 粒子調製物を精製するためのプロトコルは、当技術分野で公知であり、例えば Zolotukhin et al.（「Recombinant adeno-associated virus purification using novel methods improves infectious titer and yield」；Gene Therapy（1999）において、さらに説明されている。

40

【0196】

タンジェンシャルフローろ過およびその後の工程

タンジェンシャルフローろ過は、フィルターの細孔を介した濃縮とダイアフィルトレーションのサイクルによって小さな粒子関連の不純物を排除することを可能にする洗練工程である。この洗練工程は、溶出画分の緩衝液の変更および rAAV の濃縮に適しているという別の利点を有する。

【0197】

タンジェンシャルフローろ過は、好ましくは、フィルターとして中空糸フィルターを用いて達成される。

50

【0198】

一実施形態によれば、工程（d）は、150kDa以下（特に20kDa～150kDa、好ましくは25kDa～150kDa、の範囲；約30kDaを含む）の分子量カットオフ値を有するフィルター膜を用いて行われる。

【0199】

当業者であれば、精製されるrAAV粒子のタイプおよび溶出のパラメータ（pH、塩）に応じて分子量カットオフが調整されなければならないということを理解するであろう。

【0200】

一実施形態によれば、塩および／または洗浄剤および／または界面活性剤および／またはヌクレアーゼが、タンジェンシャルフローろ過の間、前または後（特にタンジェンシャルフローろ過の間または前）に添加されてよい。

10

【0201】

一実施形態によれば、方法は、タンジェンシャルフローろ過の間、前または後に、洗浄剤、界面活性剤および／またはヌクレアーゼ（DNaseを含む）での処理の工程をさらに含んでよい。

【0202】

有利なことに、アデノ随伴ウイルス粒子（rAAV）含有組成物は、非イオン性界面活性剤（例えばPluronic（登録商標）F-68（Gibco））の存在下でダイアフィльтраーションおよび濃縮される。

20

【0203】

非イオン性界面活性剤は、組成物の総体積の0.0001%～0.1%（v/v）の範囲の量で存在してよく、これには、組成物の総体積の0.0005%～0.005%（v/v）の範囲の量が包含され、これには、組成物の総体積の約0.001%（v/v）が包含される。

【0204】

また、有利なことに、アデノ随伴ウイルス粒子（rAAV）含有組成物は、上記で定義されるような非イオン性界面活性剤を、やはり上記で説明されるような量で、さらに含んでよい眼用塩類溶液に対してダイアフィльтраーションおよび濃縮される。

【0205】

30

一実施形態によれば、工程（c）または工程（d）で得られる精製された組換えアデノ随伴ウイルス粒子（rAAV）は、追加的な勾配に供され、これは分画遠心法の工程を包含し、これは密度勾配を包含し、特に、塩化セシウム（CsCl）勾配遠心分離、イオジキサノール勾配遠心分離、スクロース勾配遠心分離から選択される。

【0206】

好ましい一実施形態によれば、方法は、前記追加的な勾配の後に、追加的なタンジェンシャルフローろ過の工程をさらに含んでよい。

【0207】

一実施形態によれば、工程（d）で得られる精製された組換えアデノ随伴ウイルス粒子（rAAV）は、滅菌される。

40

【0208】

一実施形態によれば、精製された組換えアデノ随伴ウイルス粒子（rAAV）は、0.2μm以下の孔径を有するフィルター膜による滅菌ろ過の工程に供される。

【0209】

本発明はまた、上記で定義されるような方法の実施によって得られる精製されたrAAV粒子にも関する。

【0210】

精製されたrAAV粒子の特性評価

有利なことに、上述の方法は、遺伝子治療、および／または遺伝子治療のための医薬の調製、に適している精製された組換えアデノ随伴ウイルス粒子（rAAV）を得るために

50

用いることができる。

【0211】

好ましい一実施形態によれば、前記精製された r A A V 粒子は、遺伝子治療に使用するのに適している。

【0212】

アデノ随伴ウイルス (A A V) 粒子調製物の純度はまた、臨床上の遺伝子導入の安全性および有効性の両方に関して重要な意味を有する。

【0213】

r A A V 粒子を精製するために用いられる方法は、宿主細胞のタンパク質の混入の量および完全な粒子／全粒子の比という点で調製物の純度に劇的に影響し得る。

10

【0214】

ベクター粒子の濃度は、実施例 1 に示されるように定量的 P C R (ゲノム含有粒子) または E L I S A (全ベクター粒子) によって評価できる。

【0215】

調製物の純度は、最も一般的には、実施例 1 に示されるように、ドデシル硫酸ナトリウム-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (S D S - P A G E) によって評価される。

【0216】

ウイルスの構造 (カプシド) タンパク質である V P 1、V P 2 および V P 3 に対応するバンドは染色後に可視化されてよく、それらのサイズおよび相対強度が、混入したタンパク質に対して評価される。参考までに、A A V 4 および A A V 5 の血清型に属する V P 1、V P 2 および V P 3 は、配列番号 10～15 の配列の核酸によってコードされる。

20

【0217】

A A V 4 血清型に属する V P 1、V P 2 および V P 3 は、それぞれ、配列番号 10～12 の配列の核酸によってコードされてよい。

【0218】

A A V 5 血清型に属する V P 1、V P 2 および V P 3 は、それぞれ、配列番号 13～15 の配列の核酸によってコードされてよい。

【0219】

上述の配列は、参考として提示されている。

【0220】

30

従って、「純度」なる用語は、一般的不純物が存在しないことを指す。純度は、パーセンテージとして表され、クマシーブルーで染色されたポリアクリルアミドゲルにおいて検出されるタンパク質の総量と比較した V P 1 タンパク質、V P 2 タンパク質および V P 3 タンパク質の総量に関する。

【0221】

「一般的不純物」なる用語は、出発材料中に存在したが粒子関連の不純物とはみなされない不純物を指す。従って、一般的不純物は、宿主細胞に由来するが A A V 粒子ではない不純物を包含する。

【0222】

「粒子関連の不純物」なる用語は、真正の組換え A A V 粒子以外の全てのタイプの A A V 粒子を指す。粒子関連の不純物には、空の A A V カプシド (「空のもの (empties)」または「空の粒子」とも呼称される)、および意図される粒子ゲノム以外のポリヌクレオチド配列を含む A A V 粒子 (「A A V のカプシドで包まれた核酸の不純物」または「A A V のカプシドで包まれた D N A の不純物」とも呼称される) が包含される。

40

【0223】

残留 D N A または宿主細胞の D N A は、r A A V 調製物中に混入物として存在し得る。残留 D N A は悪影響を与え得るため、製造業者は、宿主細胞から得られる最終産物が含む残留 D N A が必ず許容レベルであるようにしなければならない。

【0224】

残留 D N A 試験は、実施例 1 で説明されるプロトコルを用いて、定量的 P C R (リアル

50

タイムPCRを含む)により評価できる。残留DNAは、1mLあたりのngで、あるいは1用量あたりのngで、表される。

【0225】

好ましくは、残留DNAは、qPCRによって、既知量のE1AアンプリコンDNAを用いて確立された検量線と比較して組成物中のE1AアンプリコンDNAの相対量を決定することにより決定される。

【0226】

「用量」は、 1×10^{12} 個のベクターゲノム(vg)に相当する調製物の量と定義される。

【0227】

有利なことに、本発明の組成物はさらに、それらの空のrAAV粒子/完全なrAAV粒子の比を特徴とし得る。

【0228】

「空のカプシド」および「空の粒子」なる用語は、AAVのタンパク質の殻を含むが、両側にAAVのITRが隣接している目的の異種ヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチドコンストラクトの全体または一部を欠いている、AAVビリオンを指す。従って、空のカプシドは、目的の遺伝子を宿主細胞中に導入するようには機能しない。

【0229】

空のrAAV粒子/完全なrAAV粒子の比は、実施例1で説明されるプロトコルを用いて、SDS-PAGEゲルにより評価できる。

【0230】

感染性粒子の濃度はまた、実施例1で説明されるICAのプロトコルを用いて評価できる。

【0231】

従って、本発明の組成物は、上述の方法のうちのいずれか1つを用いた少なくとも1つの精製されたrAAV粒子を含み、好ましくは、以下の特徴のうちの少なくとも1つを有する：

- ・90%以上(好ましくは99%超または100%)の純度；
- ・1用量あたり50ng以下の細胞性残留DNAの量。

【0232】

1用量あたり50ng以下の細胞性残留DNAの量には、1用量あたり50、49、48、47、46、45、44、43、42、41、40、39、38、37、36、35、34、33、32、31、30、29、28、27、26、25、24、23、22、21、20、19、18、17、16、15、14、13、12、11、10、9、8、7、6または5ng以下が包含される。

【0233】

特に、本発明の組成物は、上述の方法のうちのいずれか1つを用いた少なくとも1つの精製されたrAAV粒子を含み、以下の特徴を有する：

- ・99%以上または100%の純度；および
- ・1用量あたり25ng以下の細胞性残留DNAの量(1用量あたり15ngを含む)。

【0234】

最も好ましくは、組成物の純度は99%超であり、これには100%の純度が包含される。

【0235】

好ましい実施形態によれば、本発明の精製されたrAAV粒子の組成物は、任意選択で非イオン性界面活性剤を追加されていてもよい、本発明に従って精製されたrAAV粒子を含む組成物である。

【0236】

好ましい実施形態によれば、本発明の精製されたrAAV粒子の組成物は、任意選択で

10

20

30

40

50

非イオン性界面活性剤を追加されていてもよい、本発明に従って精製された r A A V 粒子を含む眼用塩類溶液である。

【0237】

例示的な実施形態によれば、組成物は、上述の方法のうちの1つから直接得られる。

【0238】

本発明に適している眼用塩類溶液は、B D M e d i c a l から入手されてよい（例えば B D S t a n d a r d S o l u t i o n または B D A q u e o P r e m i u m（商標）など）。

【0239】

前記例示的な実施形態によれば、非イオン性界面活性剤は、好ましくは P l u r o n i c（登録商標） F - 6 8（G i b c o（登録商標））である。 10

【0240】

非イオン性界面活性剤（すなわち、P l u r o n i c（登録商標） F - 6 8）は、組成物の総体積の 0.0001%~0.1%（v/v）の範囲の量で存在してよく、これには、組成物の総体積の 0.0005%~0.005%（v/v）の範囲の量が包含され、これには、組成物の総体積の約 0.001%（v/v）が包含される。

【0241】

投与用組成物および／または遺伝子治療に使用される組成物を含め、以下でさらに説明されるような本発明の組成物は、好ましくは無菌である。

【0242】

20

遺伝子治療に使用するための r A A V 粒子

本発明はさらに、遺伝子治療に使用するための、および／または遺伝子治療に好適な医薬の調製に使用するための、精製された組換えアデノ随伴ウイルス粒子（r A A V）を得るための方法に関する。

【0243】

有利なことに、このような r A A V 粒子およびその組成物はまた、それ自体が、遺伝子治療のための使用および／または遺伝子治療に好適な医薬の調製のための使用に適している。

【0244】

「遺伝子治療」は、疾患の発生の可能性を処置および／または防止および／または低減するために核酸配列を個体に投与することを意味する。当技術分野では、いくつかのアプローチが提唱されている。上記を考慮すると、r A A V 粒子は、処置される個体に前記核酸配列を送達するための媒体として使用される。 30

【0245】

疾患を引き起こす変異した遺伝子を健全な遺伝子のコピーで置き換える可能性がある。

【0246】

不適切に機能している変異した遺伝子を不活化（ノックアウト）する可能性がある。

【0247】

疾患の発生の可能性を処置および／または防止および／または低減するために新しい遺伝子を体内に導入する可能性がある。 40

【0248】

報告される方法およびプラスミドは、眼疾患（失明、より具体的には桿体特異的な欠損に起因する桿体錐体ジストロフィー、を含む）のための医薬の調製のための使用に特に効果的である。

【0249】

特に、前記疾患は、ホスホジエステラーゼ 6（P D E 6）関連疾患（P D E 6 β 関連疾患を含む）および網膜色素上皮特異的 65 k D a タンパク質（Retinal Pigment Epithelium-specific 65 kDa protein）（R P E 6 5）関連疾患から選択されてよい。

【0250】

R P E 6 5 関連疾患には、レーバー先天性黒内障および網膜色素変性症が包含される。 50

P D E 6 関連疾患には、桿体錐体ジストロフィーおよび網膜色素変性症が包含される。

【0251】

処置される個体には、ヒトおよびヒト以外の哺乳動物が包含される。

【0252】

A A V 粒子およびその組成物は、局所投与または非経口投与されてよく、これには、眼窩内投与および眼内投与が包含される。さらに、眼内投与には、硝子体内投与、網膜下投与および角膜内投与が包含される。

【0253】

従って、前記 A A V 粒子を含む組成物は、好ましくは、局所投与または非経口投与に適しており、これには、眼内投与（好ましくは硝子体内投与および網膜下投与）および角膜内投与が包含される。

10

【0254】

本発明の r A A V 粒子は、好ましくは、以下でさらに説明されるような、ヒト P D E 6 β 遺伝子またはヒト R P E 6 5 遺伝子をコードする発現カセット（それぞれ配列番号 1 および配列番号 7 の配列のもの）を含む。

【0255】

好ましい一実施形態によれば、精製された r A A V 粒子は、本明細書で説明される方法のうちのいずれか 1 つを実施することによって得ることができる。精製された r A A V 粒子の組成物は、前記精製された r A A V 粒子のうちの少なくとも 1 つを含む。精製された r A A V 粒子およびその組成物は、遺伝子治療のための使用に適している。

20

【0256】

A A V プラスミド

前記 r A A V 粒子の生産のための A A V プラスミドが、さらに開示される。

【0257】

感染性の組換え A A V (r A A V) ビリオンの構築は説明されている。例えば、米国特許第 5, 173, 414 号および同第 5, 139, 941 号；国際公開第 92/01070 号（1992 年 1 月 23 日公開）および同第 93/03769 号（1993 年 3 月 4 日公開）；Lebkowski et al. (1988) Molec. Cell. Biol. 8:3988-3996；Vincent et al. (1990) Vaccines 90 (Cold Spring Harbor Laboratory Press)；Carter, B. J. (1992) Current Opinion in Biotechnology 3:533-539；Muzyczka, N. (1992) Current Topics in Microbiol, and Immunol. 158:97-129；ならびに Kotin, R. M. (1994) Human Gene Therapy 5:793-801 を参照のこと。

30

【0258】

「A A V プラスミド」は、限定されるものではないが A A V 1、A A V 2、A A V 3、A A V 4、A A V 5、A A V 6、A A V 7、A A V 8、A A V 9、および A A V 10 ならびにアカゲザル由来血清型 (A A V r h 10 を含む) を含む、アデノ随伴ウイルス血清型に由来するプラスミドを意味する。A A V プラスミドは、A A V の野生型遺伝子のうちの 1 つ以上（好ましくは r e p 遺伝子および／または c a p 遺伝子）が全体的または部分的に欠失していてよいが、機能的なフランキング I T R 配列を保持する。機能的な I T R 配列は、A A V ビリオンのレスキュー、複製およびパッケージングに必要である。従って、A A V プラスミドは、本明細書では、少なくとも、ウイルスの複製およびパッケージングに c i s に必要とされるこれらの配列（例えば、機能的な I T R）を含むと定義される。I T R は、野生型のヌクレオチド配列である必要はなく、その配列が機能的なレスキュー、複製およびパッケージングをもたらす限りにおいて、例えばヌクレオチドの挿入、欠失または置換によって変更されてよい。また、「A A V 粒子」は、標的細胞の核への核酸の送達のための効果的な媒体を提供する、タンパク質の殻またはカプシドを意味する。

40

【0259】

50

特に、AAV粒子は、AAV4、AAV5、AAVrh10および／またはAAV2の血清型に属するAAVから選択されるアデノ随伴ウイルスに由来する。

【0260】

好ましくは、AAV粒子は、AAV4またはAAV5の血清型に属するAAVから選択されるアデノ随伴ウイルスに由来する。

【0261】

「AAVヘルパー機能」は、発現してAAVの遺伝子産物をもたらすことができ、次に当該遺伝子産物が増殖性のAAVの複製のためにtransに機能する、AAV由来のコード配列を指す。従って、AAVヘルパー機能には、主要なAAVのオープンリーディングフレーム(ORF)であるrepおよびcapの両方が包含される。Repの発現産物は、多くの機能(特に、AAVのDNA複製開始点の認識、結合およびニッキング; DNAヘリカーゼ活性; ならびにAAV(または他の異種)プロモーターからの転写の調節を含む)を有することが示されている。Capの発現産物は、必要なパッケージング機能を供給する。AAVヘルパー機能は、本明細書では、AAVプラスミドが失っているAAV機能をtransに補完するために用いられる。

【0262】

「AAVヘルパーコンストラクト」なる用語は、一般的には、目的のヌクレオチド配列の送達のための形質導入粒子を作製するために使用されるべきAAVプラスミドから除去されたAAV機能を提供するヌクレオチド配列を含む核酸分子を指す。AAVヘルパーコンストラクトは一般に、AAVのrep遺伝子および／またはcap遺伝子の一過性または安定な発現を提供してAAVの複製に必要な失われたAAV機能を補完するために用いられる。しかし、ヘルパーコンストラクトは、AAVのITRを欠いており、自身を複製することもパッケージングすることもできない。AAVヘルパーコンストラクトは、プラスミド、ファージ、トランスポゾン、コスミド、ウイルスまたはビリオンの形態であってよい。一般に使用されるプラスミドである、RepおよびCapの発現産物の両方をコードするpAAV/AdおよびpIM29+45など、いくつかのAAVヘルパーコンストラクトが説明されている。例えば、Samulski et al. (1989) J. Virol. 63:3822-3828およびMcCarty et al. (1991) J. Virol. 65:2936-2945を参照のこと。Repおよび／またはCapの発現産物をコードする、いくつかの他のプラスミドが説明されている。例えば、米国特許第5,139,941号および同第6,376,237号を参照のこと。

【0263】

「トランスフェクション」なる用語は、細胞による外来性のDNAの取り込みを指すために使用され、外因性のDNAが細胞膜の内側に導入された場合、細胞は「トランスフェクトされ」ている。当技術分野では、いくつかのトランスフェクション技術が一般的に知られている。例えば、Graham et al. (1973) Virology, 52:456、Sambrook et al. (1989) Molecular Cloning, a laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratories, New York、Davis et al. (1986) Basic Methods in Molecular Biology, Elsevier、およびChu et al. (1981) Gene 13:197を参照のこと。このような技術を用いて、好適な宿主細胞内に1つ以上の外因性DNA部分を導入できる。

【0264】

「核酸」、「ヌクレオチド配列」または「ポリヌクレオチド配列」は、DNAまたはRNAの配列を指す。当該用語は、限定されるものではないが4-アセチルシトシン、8-ヒドロキシ-N6-メチルアデノシン、アジリジニルシトシン、シュードイソシトシン、5-(カルボキシヒドロキシルメチル)ウラシル、5-フルオロウラシル、5-プロモウラシル、5-カルボキシメチルアミノメチル-2-チオウラシル、5-カルボキシメチルアミノメチルウラシル、ジヒドロウラシル、イノシン、N6-イソペンテニルアデニン、

1-メチルアデニン、1-メチルシュードウラシル、1-メチルグアニン、1-メチルイノシン、2, 2-ジメチルグアニン、2-メチルアデニン、2-メチルグアニン、3-メチルシトシン、5-メチルシトシン、N6-メチルアデニン、7-メチルグアニン、5-メチルアミノメチルウラシル、5-メトキシアミノメチル-2-チオウラシル、 β -D-マンノシルキューオシン (beta-D-mannosylqueosine)、5'-メトキシカルボニルメチルウラシル、5-メトキシウラシル、2-メチルチオ-N6-イソペンテニルアデニン、ウラシル-5-オキシ酢酸メチルエステル (uracil-5-oxyacetic acid methylester)、ウラシル-5-オキシ酢酸、オキシブトキシシン (oxybutoxosine)、シュードウラシル、キューオシン、2-チオシトシン、5-メチル-2-チオウラシル、2-チオウラシル、4-チオウラシル、5-メチルウラシル、Bウラシル-5-オキシ酢酸メチルエステル (Buracil-5-oxyacetic acid methylester)、ウラシル-5-オキシ酢酸、シュードウラシル、キューオシン、2-チオシトシンおよび2, 6-ジアミノプリンなど、DNAおよびRNAの公知の塩基類似体のうちのいずれかを含む配列を包含する

10

【0265】

「コード配列」または選択されたポリペプチドを「コードする」配列は、適切な調節配列の制御下に置かれた場合に *in vivo* で、転写され (DNA の場合)、ポリペプチドに翻訳される (mRNA の場合)、核酸分子である。コード配列の境界は、5' (アミノ) 末端の開始コドンおよび3' (カルボキシ) 末端の翻訳終止コドンによって決定される。コード配列に対して3'側に転写終結配列が位置する可能性がある。

【0266】

20

DNA「制御配列」なる用語は、レシピエント細胞におけるコード配列の複製、転写および翻訳を集合的にもたらず、プロモーター配列、ポリアデニル化シグナル、転写終結配列、上流調節ドメイン (upstream regulatory domain)、複製開始点、配列内リボソーム進入部位 (「IRES」)、エンハンサー等を集合的に指す。選択されたコード配列が適切な宿主細胞において複製、転写および翻訳されることが可能である限り、これらの制御配列の全てが常に存在する必要があるわけではない。「プロモーター」なる用語は、本明細書では、その通常の意味で使用され、DNA調節配列を含むヌクレオチドの領域を指し、ここで、この調節配列は、RNAポリメラーゼと結合して下流 (3-方向) のコード配列の転写を開始することが可能である遺伝子に由来する。転写プロモーターには、(そのプロモーターに機能可能に連結されたポリヌクレオチド配列の発現がアナライト、コファクター、調節タンパク質等によって誘導される)「誘導性プロモーター」、(そのプロモーターに機能可能に連結されたポリヌクレオチド配列の発現がアナライト、コファクター、調節タンパク質等によって誘導される)「抑制性プロモーター」および「恒常的プロモーター」が包含され得る。

30

【0267】

「異種」なる用語は、通常はつながっていない、および／または特定の細胞と通常は関連していない、配列を表す。従って、核酸コンストラクトまたはプラスミドの「異種」領域は、天然では他方の分子と結び付いて見出されることのない別の核酸分子内の、またはそれに結合した、核酸のセグメントである。異種核酸を含む導入遺伝子は、いくつかの有用な産物をコードし得る。これらには、例えば siRNA、アンチセンス分子および miRNA が包含され得る。あるいは、導入遺伝子は、ホルモンならびに増殖因子および分化因子をコードし得る。

40

【0268】

AAVプラスミドは、AAVゲノムの内部部分を全体的または部分的に除去して ITR と ITR の間に目的の DNA 配列を挿入することによって目的の異種ヌクレオチド配列 (例えば、治療用タンパク質、アンチセンス核酸分子、リボザイム、miRNA 等をコードする選択された遺伝子) を保持するように改変されてよい。このようなプラスミドにおいて、ITR は機能を有したままであり、目的の異種ヌクレオチド配列を含む rAAV の複製およびパッケージングを可能にする。異種ヌクレオチド配列はまた、典型的には、特定の条件下で患者の標的細胞において遺伝子発現を駆動することが可能なプロモーター配列

50

に連結されている。ポリアデニル化部位などの終結シグナルもプラスミドに含まれ得る。

【0269】

「発現カセット」なる用語は、少なくとも1つの目的の遺伝子、1つのオープンリーディングフレームおよび3'非翻訳領域（通常、真核生物ではポリアデニル化部位を含む）を含むDNA核酸配列を指す。

【0270】

従って、一般的な実施形態によれば、本発明による発現カセットは、一般式：

[5' ITR] - [目的の遺伝子] - [PolyA] - [3' ITR] -
を有するDNA核酸配列を含むか、からなる可能性があり、式中、

[5' ITR] および [3' ITR] は逆方向末端反復（ITR）であり、
[目的の遺伝子] は、目的のタンパク質をコードする任意の遺伝子であり、
[PolyA] はポリアデニル化シグナルであり、zは0または1であり、
[5' ITR]、[目的の遺伝子]、[PolyA] および [3' ITR] はそれぞれ、任意選択で、1つの追加的なリンカー配列で隔てられていてもよい。

10

【0271】

本発明の意味において、「目的のタンパク質をコードする遺伝子」は、目的のタンパク質をコードする少なくとも1つの核酸配列、および好ましくは少なくとも1つのプロモーター、を含む。

【0272】

好ましくは、目的の遺伝子は、ヒトPDE-6βまたはヒトRPE65をコードする核酸である。

20

【0273】

一実施形態によれば、AAVプラスミドは、配列番号1の、ヒトPDE-6βをコードする核酸を含む発現カセットを含む。

【0274】

代替的な一実施形態によれば、AAVプラスミドは、配列番号7の、ヒトRPE65をコードする核酸を含む発現カセットを含む。

【0275】

特定の一実施形態によれば、AAVプラスミドは、配列番号2の、ヒトPDE-6βをコードする核酸を含む。

30

【0276】

一実施形態によれば、[5' ITR] および [3' ITR] は、AAV-2に由来する逆方向末端反復であり、これらは、好ましくは、それぞれ配列番号3および配列番号4の配列のものである。

【0277】

有利なことに、AAVプラスミドは、ポリアデニル化部位とAAV2に由来するITRとヒトPDE6βをコードする発現カセットとを含む。

【0278】

好ましくは、ヒトPDE6β遺伝子の発現は、好ましくは配列番号5の配列の、ロドプシンキナーゼのプロモーターの制御下にある。

40

【0279】

代替的な実施形態によれば、AAVプラスミドは、ポリアデニル化部位とAAV2に由来するITRとヒトRPE65をコードする発現カセットとを含む。

【0280】

好ましくは、ヒトRPE65遺伝子の発現は、好ましくは配列番号8の配列の、RPE65プロモーターの制御下にある。

【0281】

一実施形態によれば、ポリアデニル化シグナルは、ウシ成長ホルモン（bGH）に由来し、好ましくは配列番号6の配列のものである。

【0282】

50

上述の実施形態は、個別に、または組み合わせて、考慮されてよい。

【0283】

最も好ましい一実施形態によれば、AAVプラスミドは、上記で開示されるような、および図1Aに示されるような、PDE6 β をコードする核酸を含む発現カセットを含む。

【0284】

代替的な一実施形態によれば、AAVプラスミドは、上記で開示されるような、および図1Bに示されるような、RPE65をコードする核酸を含む発現カセットを含む。

【0285】

本発明はさらに、上記で定義されるようなAAVプラスミドでトランスフェクトされた宿主細胞、および前記宿主細胞によって産生されるrAAV粒子に関する。

10

【0286】

本発明はさらに、遺伝子治療に使用するための、宿主細胞によって産生されるrAAV粒子に関する。

【0287】

本発明はさらに、上記で説明されるようなAAVプラスミドを含むrAAV粒子に関する。特に、本発明はさらに、AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10およびアカゲザル由来血清型（AAVrh10を含む）を含む群において選択されるrAAV粒子に関する。

【0288】

特に、rAAV粒子は、AAV4、AAV5、AAV10（すなわちAAVrh10）および／またはAAV2の血清型に属するrAAV粒子から選択される。

20

【0289】

好ましくは、rAAV粒子は、AAV4および／またはAAV5の血清型に属するrAAV粒子から選択される。

【0290】

特に、本発明は、上記で定義されるようなヒトPDE6 β をコードする発現カセットを含むDNAを含むrAAV5粒子に関する。

【実施例】

【0291】

実施例1：イムノアフィニティークロマトグラフィーという第1段階を用いる、AAV4粒子を精製するための二段階のクロマトグラフィー

30

【0292】

A. 材料および方法

【0293】

A1. 細胞溶解物の回収

【0294】

トランスフェクトされた細胞を、CellStack 10（CS10）の全ての面を軽くたたくことによってトランスフェクションから96 $\pm$ 5時間後に回収する。全懸濁液をBioProcess Container（BPC）に移す。ウイルス粒子の大部分は上清中に放出される。

40

【0295】

この段階で、ウイルスベクターの大部分は既に上清中に放出されているが、細胞からのAAV4の抽出を最適化するために、不純物から粒子を分離させるのに寄与するために、および最後に上清中のAAV4の回収を最適化するために、および次の深層ろ過の工程を最適化するために、0.5%（v/v）のTriton X-100での処理（1時間、攪拌、室温）が必要である。

【0296】

A2. 細胞溶解物の清澄化

【0297】

Triton X-100の作用の後に得られた懸濁液をMilliporeのデプス

50

フィルターPolysеп I I 1/0.2 μmに通してろ過し、細胞の残骸を排除する。ろ過工程の終了時に、空気で押すことによってろ過ユニットを空にする。これが清澄化溶解物である。

【0298】

この工程の間に、DNAおよび可溶性タンパク質の大部分が同様に排除される。

【0299】

A3. クロマトグラフィーによるイムノアフィニティー精製工程

【0300】

この工程は、Unicornソフトウェアによって制御されるAkta Pilot (GE Healthcare)を用いて実施される。清澄化溶解物を150 cm/hの線流速で注入して、カルシウムおよびマグネシウムを追加したDPBSで平衡化したAVBカラム(185 mLの充填マトリックス)に通す。この工程の間に、AAVがカラムに特異的に結合する。不純物はカラムに結合せず、フロースルー中に排除される。次に、非特異的に結合した物質を洗浄するために、DPBSでカラムをリンスする。

【0301】

pH2.0のPBS緩衝液でAAVを溶出させる。溶出画分を10%の緩衝液(Tris 1M、MgCl₂ 20mM、CaCl 10mM、pH8.5)で同時に中和する。

【0302】

Tris緩衝液で中和した溶出画分を、各画分中のAAVの量を検出するためのQPCRによるAAVの力価測定まで-70℃未満または-80℃未満で凍結する。

【0303】

A4. 第1の選択枝：イムノアフィニティー精製工程の後のCsCl勾配

【0304】

AVBカラムから溶出された、AAVを含む画分をプールする。AAVを沈殿させ、勾配に好適な体積を得るために、PEG8000を終濃度が8%となるように添加する。8% (w/v)のPEGで一晩沈殿させた後、AAVを含む懸濁液を4000 rpmで1時間、4℃にて遠心分離する。

【0305】

AAVを含むペレットを1.376 g/cm³の密度のCsCl 12 mL中に再懸濁し、SW41ローター用のUltraClearチューブに移す。この勾配を38,000 rpmで48時間、15℃にて遠心分離し、完全な粒子を「空の」粒子から分離する。濃縮された完全な粒子のバンドを5または10 mLのシリンジで回収する。次に、このウイルス懸濁液をタンジェンシャルフローろ過(TFF)に供する。

【0306】

A5. 第2の選択枝：イムノアフィニティー精製工程の後のCIMmultus陰イオン交換クロマトグラフィー

【0307】

この工程は、Unicornソフトウェアによって制御されるAkta Pilot (GE Healthcare)を用いて実現される。

【0308】

AVBカラムから溶出された、AAVを含む画分をプールし、ダイアフィルトレーションのためのTFF工程に供する。このTFF工程の目的は、AVBからの中和された溶出画分の緩衝液を変更して、AAVをCIMmultus QAカラムに結合させることを可能にすることである。

【0309】

次に、ダイアフィルトレーションされたAAVを注入して、カラムへのAAVの結合を促進するために緩衝液1(Tris 20mM、NaCl 10mM、MgCl₂ 2mM、CaCl₂ 1mM、pH8.5)で平衡化したMonolith CIMmultus QAカラムに通す。

【0310】

AAVを含む懸濁液の注入の終了時に、カラムを緩衝液1で洗浄して、非特異的に結合している可能性がある全てのものを除去する。

【0311】

溶出工程は、緩衝液1 (Tris 20mM、NaCl 10mM、MgCl₂ 2mM、CaCl₂ 1mM、pH8.5) と緩衝液2 (Tris 20mM、NaCl 1M、MgCl₂ 2mM、CaCl₂ 1mM、pH8.5) との混合の結果である、非常に緩やかな傾きを有するNaClの塩勾配である。塩の緩徐な増加は、AAVを徐々に溶出させること、および亜集団が存在する場合には完全な粒子としての亜集団と空の粒子としての亜集団とを分離すること、を可能にする。

10

【0312】

溶出画分をポリプロピレンのボトルに回収し、TFFまで-70℃未満または-80℃未満で保存する。

【0313】

A6. タンジェンシャルフローろ過 (TFF)

【0314】

選択された画分をプールする (体積で約1L)。30kDaのカットオフを有するmPES中空糸を用いてTFFを行う。AAVを眼用塩類溶液 (SSO) に対してダイアフィルトレーションおよび濃縮する。

【0315】

20

プールされた画分をまず、僅かに濃縮し、10容量の緩衝液に対してダイアフィルトレーションし、最後に、期待される濃度に達するように濃縮する。TFFは、残っている小さな不純物を排除すること、ならびに注射用の正しい緩衝液中にウイルスベクターを配合すること、および正しいレベルまで濃縮すること、を可能にする。ろ過、精製および濃縮されたウイルスベクターは、力価測定まで-70℃未満または-80℃未満で保存する。

【0316】

A7. 滅菌ろ過

【0317】

患者への注射に必要とされる正確な濃度を得るためにAAVをSSO (眼用塩類溶液) で希釈し、期待される量に従って最終的な容器に分注する前に0.2μmのPESフィルターで滅菌ろ過する。用量は、注射まで-80℃未満で保存する。

30

【0318】

A8. qPCRによるベクターゲノムの濃度 (vg/mL)

【0319】

この方法は、導入遺伝子の発現カセット (導入遺伝子、ポリ (A)、ITRまたはプロモーター) を標的とする定量的PCR (qPCR) によるゲノム含有粒子の定量にある。rAAVのサンプルをまず、カプシドで包まれていないDNAを排除するためにDNaseで消化する。その後、プロテイナーゼKでの処理により、AAVカプシドを分解し、その後のqPCRによる定量化のためのウイルスDNAを放出させる。

【0320】

40

標的とされるアンプリコンを含むベクタープラスミドを用いてqPCR用の検量線を生成する。各アッセイにおいて検量線の安定性および再現性を確実にするために、このプラスミドは、制限エンドヌクレアーゼ消化によって線状化され、分注され、-18℃以下で保存される。

【0321】

1^e10コピーのアンプリコンの算出は、以下の式に基づく：

DNAの量 (g) = (660 × プラスミドのサイズ (bp) × 1^e10コピー) / (6.02 × 10²³)

【0322】

ベクターゲノムDNAの相対量は、既知量のアンプリコンDNAを含む検量線から反応

50

あたりのコピー数を外挿することによって割り当てる。

【0323】

結果は、1 mLあたりのベクターゲノムで表す。

【0324】

A9. ICAによる感染性粒子の濃度 (i p/mL)

【0325】

Infectious Center Assay (ICA) は、rAAVのロット中の感染性粒子の定量化を可能にする。このアッセイは、増加する段階希釈のrAAVベクターで、および野生型のアデノウイルス (5型) で、AAV2のrepおよびcapの配列を安定に保持する許容細胞株 (HeLaRC32、ATCC CRL-2972) を感染させることを伴う。従って、細胞内に侵入する感染性のrAAV粒子は複製可能であることになる。次に、複製イベントを、導入遺伝子に特異的なプローブを用いたハイブリダイゼーションの後に化学発光によって検出し、定量化する (Salvetti et al., Hum Gene Ther, 1998)。

10

【0326】

感染から26時間後に、細胞を回収し、溶解し、ナイロンメンブレン上にブロットする。フルオレセインで標識した特異的な導入遺伝子用プローブを用いてハイブリダイゼーションを行う。次に、アルカリホスファターゼを結合させた抗フルオレセイン抗体でシグナルを増幅し、化学発光によって検出する。

【0327】

20

最後に、X線撮影用フィルムへの露光の後にドットを計数することによって複製イベントを定量化する。

【0328】

A10. SDS-PAGEおよびクマシーブルー染色によるベクターカプシドの純度および識別

【0329】

SDS-PAGE法は、タンパク質およびサンプルの他の構成成分を、それらの分子量およびそれらの電荷に応じて分離する、変性条件下でのポリアクリルアミドゲルにおける電気泳動である。

【0330】

30

電気泳動の後、サンプル中のタンパク質だけを定量化するためにクマシーブルー (Imperial Protein Stain) でゲルを染色する。rAAVのタンパク質の識別は、それらの分子量 (87、72および62 kDa) に関連してVP1、VP2およびVP3と呼称されるAAVの3種のカプシドタンパク質の存在により確認される。rAAVのタンパク質の純度は、サンプル中に存在するタンパク質の総量と比較したカプシドタンパク質の相対量として算出される。

【0331】

クマシーブルー染色の後に、CCDカメラを有する発光画像分析器によって電気泳動ゲルを分析する。タンパク質のバンドはそれぞれ、ピークとして検出され、シグナルは分析器によって積分される。次に、各ピークの面積が算出される。100%の純度の生成物は、VP1、VP2およびVP3の3種のタンパク質のバンドしか含まない。

40

【0332】

A11. SDS-PAGEおよび銀染色によるベクター粒子の定量化

【0333】

Heukeshoven and Dernick (Heukeshoven and Dernick Electrophoresis, 1985) の方法論に基づく銀染色は、ポリアクリルアミドゲル電気泳動によって分離されたタンパク質および核酸の検出を可能にする。

【0334】

検量線に使用されるrAAVと同じゲル上にサンプルをロードする。rAAV8 RSM

50

(Ayuso et al, Hum Gene Ther. 2014)と同じように作製および特徴付けされ、100%の完全な粒子を含む、参照対象のrAAVのロットを用いて検量線を生成する。

【0335】

電気泳動の後、CCDカメラを有する画像分析器を用いてゲルを分析し、VP3に対応するバンドのシグナルをレーンごとに積分する。サンプル中に存在する全カプシドの量を検量線から外挿し、1mLあたりの粒子で表す。

【0336】

完全な粒子／全粒子の比は、以下の計算に基づく：

1mLあたりのベクターゲノムの力価／1mLあたりの粒子の力価

10

【0337】

参考用：Simplified method for silver staining of proteins in polyacrylamide gels and the mechanism of silver staining (Electrophoresis 6 (1985) 103-112, Heukeshoven, J. and Dernick, R.) および Manufacturing and Characterization of a recombinant associated virus type 8 reference standard material, Ayuso et al, (Hum Gene Ther. 2014 Oct 2)。

20

【0338】

A12. qPCRによる残留宿主細胞DNA (HEK293細胞に由来するアルブミンおよびE1A)

【0339】

ヒトアルブミン遺伝子またはアデノウイルス5型E1A遺伝子を標的とするリアルタイム定量的PCR法を用いて、残留ヒト宿主細胞DNAを定量する。

【0340】

特定のアンプリコン (アルブミンおよびE1A) を含むプラスミドを用いてqPCR用の検量線を生成する。各アッセイにおいて検量線の安定性および再現性を確実にするために、このプラスミドは、制限エンドヌクレアーゼ消化によって線状化され、充填され、-18℃以下で保存される。1^e10コピーのアルブミン遺伝子配列の算出は、以下の計算に基づく：

30

DNAの量 (g) = (660 × プラスミドのサイズ (bp) × 1e10コピー) / (6.02 × 10^{e23})

【0341】

アルブミンまたはE1AのアンプリコンDNAの相対量は、既知量のアルブミンまたはE1AのアンプリコンDNAを含む検量線から反応あたりのコピー数を外挿することによって割り当てる。

【0342】

第2の検量線は、1ウェルあたり50pg～5ngのHEK293細胞株由来ゲノムDNAを用いて実施される。この検量線は、アルブミンまたはE1Aのコピーの量と対応するHEK293のDNAの量 (ng) との間の相関を指し示す。

40

【0343】

B. 結果

【0344】

図3Aおよび図3Bは、AVBカラム上でのイムノアフィニティークロマトグラフィーの工程 (図3Aを参照のこと) からの、AAV4粒子を含む清澄化上清の溶出プロファイルを示す。図3Bに溶出プロファイルのピークの拡大図をさらに開示する。

【0345】

精製方法は、1Lスケールで達成される。各工程におけるベクターゲノムの力価測定お

50

よび最終産物の特性評価は、上述のプロトコルに従って確立され、以下の表に要約される。

【0346】

【表1】

回収	$1.1 \cdot 10^{14}$
深層ろ過	$9.2 \cdot 10^{13}$
ABVカラム	$8.7 \cdot 10^{13}$
タンジェンシヤルフローろ過	$7.2 \cdot 10^{13}$
全収率	65%

表1：1 Lスケールの精製からのベクターゲノムの力価測定

10

【0347】

【表2】

力価 (vg/mL)	$3.8 \cdot 10^{12}$
残留DNA (アルブミン) ng/用量*	1.2
残留DNA (E1A) ng/用量*	15
純度 (タンパク質)	100%

*ここで1用量は 1×10^{12} 個のベクターゲノム (vg) である

表2：最終産物の特性評価

20

【0348】

結論：このプロトコルは、1 Lスケールにおいて、非常に良好な収率で清澄化上清から臨床グレードのAAV4調製物を精製するのに効果的である。有利なことに、AVBカラムイムノクロマトグラフィー工程は、ベクターゲノムの量に中程度に影響するに過ぎない。

【0349】

実施例2：イムノアフィニティークロマトグラフィーという第1段階の後に陰イオン交換クロマトグラフィーという第2段階を用いる、AAV4粒子を精製するための二段階のクロマトグラフィー（代替的プロトコル）

30

【0350】

A. 材料および方法

以下を除いて、実施例1の材料および方法のセクションを実施例2にも適用できる。

【0351】

A3. クロマトグラフィーによるイムノアフィニティー精製工程（代替的プロトコル）

【0352】

この工程は、Unicornソフトウェアによって制御されるAktapilot (GE Healthcare) を用いて実施される。清澄化溶解物を 150 cm/h の線流速で注入して、PBSで平衡化したAVBカラム (185 mL の充填マトリックス) に通す。この工程の間に、AAVがカラムに特異的に結合する。不純物はカラムに結合せず、フロースルー中に排除される。次に、非特異的に結合した物質を洗浄するために、PBSでカラムをリンスする。

40

【0353】

pH 2.0のPBS緩衝液でAAVを溶出させる。溶出画分を10%の緩衝液 (Tris 1M、 MgCl_2 20mM、 CaCl_2 10mM、pH 8) で同時に中和する。

【0354】

Tris緩衝液で中和した溶出画分に0.001%のPluronic F68を追加し、各画分中のAAVの量を検出するためのQPCRによるAAVの力価測定まで -70°C 未満または -80°C 未満で凍結する。

50

【0355】

A4. 第1の選択肢：イムノアフィニティー精製工程の後のCsCl勾配（代替的プロトコル）

【0356】

AVBカラムから溶出された、AAVを含む画分をプールする。AAVを濃縮し、勾配に好適な体積を得るために、AAVの画分のプールを、0.001%のPluronic F68を含む眼用塩類溶液に対するタンジェンシャルフローろ過に供する。

【0357】

ダイアフィルトレーションされたAAVを1.376 g/cm³の密度のCsCl 12 mL中に再懸濁し、SW41ローター用のUltraClearチューブに移す。この勾配を38,000 rpmで48時間、15℃にて遠心分離し、完全な粒子を「空の」粒子から分離する。濃縮された完全な粒子のバンドを5または10 mLのシリンジで回収する。次に、このウイルス懸濁液をタンジェンシャルフローろ過（TFF）に供する。

10

【0358】

A5. 第2の選択肢：イムノアフィニティー精製工程の後のCIMmultus陰イオン交換クロマトグラフィー（代替的プロトコル）

【0359】

この工程は、Unicornソフトウェアによって制御されるAktapilot（GE Healthcare）を用いて実現される。

【0360】

20

AVBカラムから溶出された、AAVを含む画分をプールし、ダイアフィルトレーションのためのTFF工程に供する。このTFF工程の目的は、AVBからの中和された溶出画分の緩衝液を変更して、AAVをCIMmultus QAカラムに結合させることを可能にすることである。

【0361】

IEXクロマトグラフィー工程の間に使用される緩衝液は全て、0.001%のPluronic F68を含む

【0362】

ダイアフィルトレーションされたAAVを注入して、カラムへのAAVの結合を促進するために緩衝液1（Tris 20 mM、NaCl 10 mM、MgCl₂ 2 mM、CaCl₂ 1 mM、pH 9）で平衡化したMonolith CIMmultus QAカラムに通す。

30

【0363】

AAVを含む懸濁液の注入の終了時に、カラムを緩衝液1で洗浄して、非特異的に結合している可能性がある全てのものを除去する。

【0364】

溶出工程は、緩衝液1（Tris 20 mM、NaCl 10 mM、MgCl₂ 2 mM、CaCl₂ 1 mM、pH 8）と緩衝液2（Tris 20 mM、NaCl 500 mM、MgCl₂ 2 mM、CaCl₂ 1 mM、pH 8）との混合の結果である、非常に緩やかな傾きを有するNaClの塩勾配である。塩の緩徐な増加は、AAVを徐々に溶出させること、および亜集団が存在する場合には完全な粒子としての亜集団と空の粒子としての亜集団とを分離すること、を可能にする。

40

【0365】

溶出画分をポリプロピレンのボトルに回収し、TFFまで-70℃未満または-80℃未満で保存する。

【0366】

A6. タンジェンシャルフローろ過（TFF）（代替的プロトコル）

【0367】

選択された画分をプールする（体積で約0.5 L）。100 kDaのカットオフを有するmPES中空糸を用いてTFFを行う。AAVを、0.001%のPluronic

50

F 6 8を含む眼用塩類溶液（S S O）に対してダイアフィルトレーションおよび濃縮する。

【0368】

プールされた画分をまず、僅かに濃縮し、10容量の緩衝液に対してダイアフィルトレーションし、最後に、期待される濃度に達するように濃縮する。T F Fは、残っている小さな不純物を排除すること、ならびに注射用の正しい緩衝液中にウイルスベクターを配合すること、および正しいレベルまで濃縮すること、を可能にする。ろ過、精製および濃縮されたウイルスベクターは、力価測定まで -70°C 未満または -80°C 未満で保存する。

【0369】

A 7. 滅菌ろ過（代替的プロトコル）

10

【0370】

注射に必要とされる正確な濃度を得るためにA A Vを、P l u r o n i c F 6 8を含むS O S（眼用塩類溶液）で希釈し、期待される量に従って最終的な容器に分注する前に $0.2\mu\text{m}$ のP E Sフィルターで滅菌ろ過する。用量は、注射まで -70°C 未満または -80°C 未満で保存する。

【0371】

B. 結果

【0372】

B 1. 1 LスケールでのA A V 4の結果

【0373】

20

精製方法は、1 Lスケールで達成される。表3に示されるように、第2段階は、I E Xクロマトグラフィー工程またはC s C l勾配のいずれかである。各工程におけるベクターゲノムの力価測定は、以下の表に要約される。

【0374】

【表3】

	アフィニティー+C s C l勾配	アフィニティー+I E X
回収	$1.1 \cdot 10^{14}$	$7.0 \cdot 10^{13}$
深層ろ過	$9.8 \cdot 10^{13}$	$6.9 \cdot 10^{13}$
A V Bカラム	$1.3 \cdot 10^{14}$	$6.9 \cdot 10^{13}$
タンジェンシャルフローろ過1	$7.8 \cdot 10^{13}$	$4.8 \cdot 10^{13}$
第2段階 (C s C lまたはI E X)	$5.3 \cdot 10^{13}$	$3.4 \cdot 10^{13}$
タンジェンシャルフローろ過2	$4.4 \cdot 10^{13}$	$2.7 \cdot 10^{13}$
最終産物（ $0.2\mu\text{m}$ でろ過）	$3.9 \cdot 10^{13}$	$3.0 \cdot 10^{13}$
全収率	35%	43%
純度	> 90%	> 90%

30

表3：1 Lスケールの精製（代替的プロトコル）からのベクターゲノムの力価測定

【0375】

40

B 2. 3 LスケールでのA A V 4の結果

【0376】

これは3 Lスケールの例であり、ここで、A A V 4は、T r i t o n X-100での抽出、深層ろ過、アフィニティークロマトグラフィー工程、T F F、I E Xクロマトグラフィー工程、T F Fおよび $0.2\mu\text{m}$ での滅菌ろ過を含む上記で説明されるプロセスで精製される。

【0377】

ベクターゲノムの力価測定による、各工程の結果は、表4に要約される。

【0378】

溶出プロファイルをI E Xクロマトグラフィー工程から得る。各画分を、銀染色された

50

S D S ポリアクリルアミドゲル上で分析する。画分は全て、同じベクターゲノム量でロードした。カプシドタンパク質のシグナル（第1画分においてより重要）、ならびに280 nmおよび254 nmにおける吸光度の曲線の比は、溶出された第1画分が、大抵の場合、空のカプシドに汚染されていることを示す。

【0379】

選択された画分は、大抵の場合、完全なカプシドを含む。

【0380】

各画分のカプシドタンパク質の強度を、2回のC s C l 勾配によるプロセスでの精製によって得られた、90%超の完全な粒子を含む参照用のA A V 4 調製物と比較した。

【0381】

【表4】

	アフィニティー+I E X
回収	$2.9 \cdot 10^{14}$
深層ろ過	$4.3 \cdot 10^{14}$
アフィニティーA V B カラム	$5.9 \cdot 10^{14}$
タンジェンシャルフローろ過1	$3.7 \cdot 10^{14}$
I E X C I M Q A カラム	$1.9 \cdot 10^{14}$
タンジェンシャルフローろ過2	$1.6 \cdot 10^{14}$
最終産物 (0.2 μ mでろ過)	$1.3 \cdot 10^{14}$
全収率	45%

表4：3 Lスケールの精製からのベクターゲノムの力価測定

【0382】

【表5】

	アフィニティー+I E X
力価 (vg/mL)	$3.4 \cdot 10^{12}$
感染力価 (pi/mL)	$3.7 \cdot 10^6$
比 vg/pi	$9.3 \cdot 10^5$
純度 (タンパク質)	>99%
残留DNA (アルブミン) ng/用量*	<0.25
残留DNA (E1A) ng/用量*	21.4

*ここで1用量は 1×10^{12} 個のベクターゲノム (vg) である

表5：最終産物の特性評価

【0383】

A A V 4 に対するH e L a細胞の許容度が低いためにvg / piの比が非常に高いということが留意されるべきである。それにもかかわらず、この比は、A A V 4の参照用調製物の比に匹敵する。

【0384】

結論：このプロトコルは、3 Lスケールにおいて、非常に良好な収率で清澄化上清から臨床グレードのA A V 4 調製物を精製するのに効果的である。有利なことに、I E X カラムクロマトグラフィー工程は、完全な粒子の量に影響する。

【0385】

実施例3：イムノアフィニティークロマトグラフィーという第1段階の後にC s C l 勾配または陰イオン交換クロマトグラフィーという第2段階を用いる、A A V r h 1 0 粒子を精製するための二段階のクロマトグラフィー（代替的プロトコル）

【0386】

A. 材料および方法

以下を除いて、実施例1の材料および方法のセクションを実施例3にも適用できる。

【0387】

A1. 細胞溶解物の回収（代替的プロトコル）

【0388】

2 Lのバイオリアクターにおいてバキュロウイルスに感染させた昆虫 Sf9 細胞を、感染から 96 ± 5 時間後に回収する。全懸濁液を Triton X-100 で処理する（終濃度 0.5% (v/v)、27℃、2.5時間）。ウイルス粒子の大部分は上清中に放出される。

10

【0389】

A3. クロマトグラフィーによるイムノアフィニティー精製工程（代替的プロトコル）

【0390】

この工程は、Unicornソフトウェアによって制御される Akta Pilot (GE Healthcare) を用いて実施される。清澄化細胞溶解物を $60 \text{ cm}^3/\text{h}$ の線流速で注入して、カルシウムおよびマグネシウムを追加した DPBS で平衡化した AVB カラム (185 mL の充填マトリックス) に通す。この工程の間に、AAV がカラムに特異的に結合する。不純物はカラムに結合せず、フロースルー中に排除される。次に、非特異的に結合した物質を洗浄するために、DPBS でカラムをリンスする。

20

【0391】

300 mM の NaCl を含む 50 mM のクエン酸緩衝液 (pH 3.4) で AAV を溶出させる。溶出画分を 10% の緩衝液 (Tris 1 M 、MgCl₂ 20 mM 、CaCl₂ 10 mM 、pH 8.5) で同時に中和する。

【0392】

A4. 第1の選択枝：イムノアフィニティー精製工程の後の CsCl 勾配（代替的プロトコル）

【0393】

AVB カラムから溶出された、AAV のピーク (280 nm および 254 nm における吸光度の測定によって検出) を含む画分をプールする。AAV を濃縮し、勾配に好適な体積を得るために、AAV の画分のプールを、4℃で一晩、PEG 8000 による沈殿に供した後、 4000 rpm で1時間、4℃にて遠心分離する。ペレットを 1.376 g/cm^3 の密度の CsCl 12 mL 中に再懸濁し、SW41 ローター用の UltraClear チューブに移す。この勾配を $38,000 \text{ rpm}$ で48時間、15℃にて遠心分離し、完全な粒子を「空の」粒子から分離する。濃縮された完全な粒子のバンドを5または 10 mL のシリンジで回収する。次に、このウイルス懸濁液を、カルシウムおよびマグネシウムを含む DPBS に対する透析に供する。透析されたウイルス懸濁液に 0.001% の Pluronic F68 を追加し、 -80°C 未満で凍結する。

30

【0394】

A5. 第2の選択枝：イムノアフィニティー精製工程の後の POROS HQ 陰イオン交換クロマトグラフィー（代替的プロトコル）

40

【0395】

この工程は、Unicornソフトウェアによって制御される Akta Explorer (GE Healthcare) を用いて実現される。

【0396】

AVB カラムから溶出された、AAV を含む画分をプールし、0.001% の Pluronic F68 を追加し、4℃で一晩保存する。翌日、この AAV のプールをダイアフィルトレーションのための TFF 工程に供する。この TFF 工程の目的は、AVB からの中和された溶出画分の緩衝液を変更して、AAV を POROS HQ カラムに結合させることを可能にすることである。

【0397】

50

ダイアフィルトレーションされたAAVを注入して、カラムへのAAVの結合を促進するために緩衝液1 (Tris 20 mM、MgCl₂ 2 mM、CaCl₂ 1 mM、pH 8.5) で平衡化したPOROS HQカラムに通す。

【0398】

AAVを含む懸濁液の注入の終了時に、カラムを緩衝液1で洗浄して、非特異的に結合している可能性がある全てのものを除去する。

【0399】

溶出工程は、緩衝液2 (Tris 10 mM、クエン酸ナトリウム 10 mM、MgCl₂ 2 mM、CaCl₂ 1 mM、pH 8、0.001% Pluronic F68) と緩衝液3 (Tris 10 mM、クエン酸ナトリウム 500 mM、MgCl₂ 2 mM、CaCl₂ 1 mM、pH 8、0.001% Pluronic F68) との混合の結果である、非常に緩やかな傾きを有するクエン酸ナトリウムの塩勾配である。塩の緩徐な増加 (40カラム体積において70%の緩衝液3を得る勾配) は、AAVを徐々に溶出させること、および亜集団が存在する場合には完全な粒子としての亜集団と空の粒子としての亜集団とを分離すること、を可能にする。

【0400】

溶出画分をポリプロピレンのチューブに回収し、TFFまで-80℃未満で保存する。

【0401】

A6. タンジェンシャルフローろ過 (TFF) (代替的プロトコル)

【0402】

選択された画分をプールする。100 kDaのカットオフを有するmPES中空糸を用いてTFFを行う。AAVを、カルシウムおよびマグネシウムと共に0.001%のPluronic F68を含むDPBSに対してダイアフィルトレーションおよび濃縮する。

【0403】

プールされた画分をまず、僅かに濃縮し、10容量の緩衝液に対してダイアフィルトレーションし、最後に、期待される濃度に達するように濃縮する。ろ過、精製および濃縮されたウイルスベクターは、力価測定まで-80℃未満で保存する。

【0404】

B. 結果

【0405】

B1. 1 LスケールでのAAV r h 10の結果

【0406】

精製方法は、1 Lスケールで達成される。表6に示されるように、第2段階は、CsCl勾配またはIEXクロマトグラフィー工程のいずれかである。各工程におけるベクターゲノムの力価測定は、以下の表に要約される。

【0407】

【表6】

	アフィニティー+CsCl勾配	アフィニティー+IEX
清澄化細胞溶解物	$5.1 \cdot 10^{13}$	$6.2 \cdot 10^{13}$
AVBカラム	$2.9 \cdot 10^{13}$	$2.5 \cdot 10^{13}$
タンジェンシャルフローろ過1	該当なし	$1.6 \cdot 10^{13}$
第2段階 (CsClまたはIEX)	$3.1 \cdot 10^{13}$	$1.5 \cdot 10^{13}$
製剤化された精製産物	$2.5 \cdot 10^{13}$	$1.5 \cdot 10^{13}$
全収率	49%	24%

表6：1 Lスケールの精製 (代替的プロトコル) に相当するベクターゲノムの力価測定

10

20

30

40

50

【0408】

実施例4：イムノアフィニティークロマトグラフィーという第1段階の後にCsCl勾配という第2段階を用いる、AAV2粒子を精製するための二段階のクロマトグラフィー（代替的プロトコル）

【0409】

A. 材料および方法

以下を除いて、実施例1の材料および方法のセクションを実施例4にも適用できる。

【0410】

A1. 細胞溶解物の回収（代替的プロトコル）

【0411】

2 Lのバイオリアクターにおいてバキュロウイルスに感染させた昆虫Sf9細胞を、感染から96±5時間後に回収する。全懸濁液をTriton X-100で処理する（終濃度0.5%（v/v）、27℃、2.5時間）。ヌクレアーゼ消化という追加的工程は、37℃でさらに2時間、5 U/mLのベンゾナーゼを添加することにより実現される。

【0412】

A3. クロマトグラフィーによるイムノアフィニティー精製工程（代替的プロトコル）

【0413】

この工程は、Unicornソフトウェアによって制御されるAktapilot（GE Healthcare）を用いて実施される。清澄化溶解物を115 cm/hの線流速で注入して、カルシウムおよびマグネシウムを追加したDPBSで平衡化したAVBカラム（185 mLの充填マトリックス）に通す。この工程の間に、AAVがカラムに特異的に結合する。不純物はカラムに結合せず、フロースルー中に排除される。次に、非特異的に結合した物質を洗浄するために、DPBSでカラムをリンスする。

【0414】

300 mMのNaClを含む50 mMのクエン酸緩衝液（pH 3.4）でAAVを溶出させる。溶出画分を10%の緩衝液（Tris 1 M、MgCl₂ 20 mM、CaCl₂ 10 mM、pH 8.5）で同時に中和する。

【0415】

A4. 第1の選択枝：イムノアフィニティー精製工程の後のCsCl勾配（代替的プロトコル）

【0416】

AVBカラムから溶出された、AAVのピーク（280 nmおよび254 nmにおける吸光度の測定によって検出）を含む画分をプールする。AAVを濃縮し、勾配に好適な体積を得るために、AAVの画分のプールの、4℃で一晩、PEG 8000による沈殿に供した後、4000 rpmで1時間、4℃にて遠心分離する。ペレットを1.376 g/cm³の密度のCsCl 12 mL中に再懸濁し、SW41ローター用のUltraClearチューブに移す。この勾配を38,000 rpmで48時間、15℃にて遠心分離し、完全な粒子を「空の」粒子から分離する。濃縮された完全な粒子のバンドを5または10 mLのシリンジで回収する。次に、このウイルス懸濁液を、カルシウムおよびマグネシウムを含むDPBSに対する透析に供する。透析されたウイルス懸濁液に0.001%のPluronic F68を追加し、-80℃未満で凍結する。

【0417】

A7. 滅菌ろ過

【0418】

期待される量に従って最終的な容器に分注する前に0.2 μmのPESフィルターでAAVをろ過する。用量は、-80℃未満で保存する。

【0419】

B. 結果

【0420】

B1. 1 LスケールでのAAV2の結果

【0421】

精製方法は、1 Lスケールで達成される。表7に示されるように、第2段階はCsCl勾配である。各工程におけるベクターゲノムの力価測定は、以下の表に要約される。

【0422】

【表7】

	アフィニティー+CsCl勾配
清澄化細胞溶解物	$3.2 \cdot 10^{13}$
AVBカラム	$1.7 \cdot 10^{13}$
第2段階 (CsClまたはIEX)	$9.2 \cdot 10^{12}$
製剤化された精製産物	$6.6 \cdot 10^{12}$
全収率	21%

表7：1 Lスケールの精製（代替的プロトコル）に相当するベクターゲノムの力価測定

10

【0423】

実施例5：本発明の方法と陽イオン交換クロマトグラフィーおよび陰イオン交換クロマトグラフィーを含むrAAV粒子を精製するための方法との間での比較

【0424】

A. 材料および方法

【0425】

陽イオン交換クロマトグラフィーおよび陰イオン交換クロマトグラフィーを含む方法の説明

トランスフェクトされた細胞を、Cell Stack 5 (CS5)の全ての面を軽くたたくことによってトランスフェクションから48～72時間後に回収した。高圧ホモジナイザー (Emulsiflex C55、Avestin)において 900 ± 50 barでホモジナイズすることによってAAV4の全懸濁液を溶解させた。この系における圧力低下は細胞の破壊をもたらし、上清中へのAAV粒子の抽出および細胞の残骸のサイズの減少を可能にする。

30

【0426】

ホモジナイズされた細胞溶解物をMillistack COHCユニット (Merck Millipore) およびPES0.5/0.2 μmフィルターにより深層ろ過して細胞の残骸を除去する。

【0427】

Mustang Q (Pall Life Science) 工程により清澄化細胞溶解物をプレ精製および濃縮した。この陰イオン交換膜は、高流速にてAAVを膜に結合させること、ならびに、その後にNaClでAAVを選択的に溶出させ、約80%のDNA不純物および50%のタンパク質不純物を排除すること、を可能にする。溶出体積が少ないため、AAV生成物を100倍濃縮することが可能である。

40

【0428】

プレ精製されたAAVは、 -80°C 未満で保存した。

【0429】

Mustang Qからのプレ精製されたAAVを、陽イオン交換特性および疎水性相互作用特性を伴うマルチモーダルなクロマトグラフィーマトリックスであるCaptor MMCカラム (GE Healthcare) によってさらに精製した。 600 mMの NH_4Cl を含む緩衝液でAAV4を溶出させ、 -80°C 未満で保存した。

【0430】

Captor MMCからの溶出されたAAVを希釈して、最後のクロマトグラフィー担体であるCaptor Qカラム (GE Healthcare) に結合するように導電率

50

および pH のパラメータを調整した。この陰イオン交換工程は、180 mM の NaCl を含む Tris 緩衝液で AAV が溶出された洗練工程である。

【0431】

Capt o Q からの溶出された AAV を、AAV の製剤化および濃縮を可能にする 100 KDa の中空糸 (GE Healthcare) でダイアフィルトレーションした。ダイアフィルトレーションされた AAV を -80°C 未満で保存し、最後に $0.2\text{ }\mu\text{m}$ で滅菌ろ過した。

【0432】

本発明の方法の説明

実施例 1 で説明されるような本発明の方法に従って rAAV 4 粒子を精製した。

10

【0433】

B. 結果

【0434】

陽イオン交換クロマトグラフィーおよび陰イオン交換クロマトグラフィーを含む方法で得られた全収率が約 1 ~ 2 % であるのに対し、本発明の方法で得られた全収率は少なくとも 20 % である。

【0435】

【表 8】

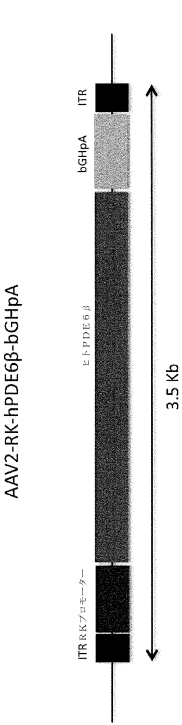
配列表

20

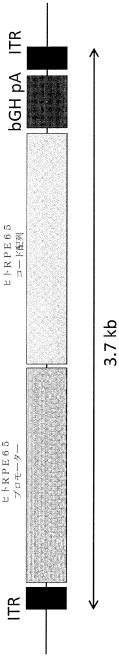
配列番号 1	ヒト PDE6 β をコードする発現カセット
配列番号 2	ヒト PDE6 β をコードする核酸
配列番号 3	AAV-2 由来 [5' ITR] 逆方向末端反復
配列番号 4	AAV-2 由来 [3' ITR] 逆方向末端反復
配列番号 5	ロドプシンキナーゼのプロモーター
配列番号 6	ウシ成長ホルモン (bGH) 由来 [PolyA] シグナル
配列番号 7	ヒト RPE65 の発現カセット
配列番号 8	ヒト RPE65 遺伝子のプロモーター
配列番号 9	ヒト RPE65 をコードする核酸
配列番号 10	AAV-4 VP1 のコード配列 (2205 nt)
配列番号 11	AAV-4 VP2 のコード配列 (VP1 の 409 ~ 2205)
配列番号 12	AAV-4 VP3 のコード配列 (VP1 の 589 ~ 2205)
配列番号 13	AAV-5 VP1 のコード配列 (2175 nt)
配列番号 14	AAV-5 VP2 のコード配列 (VP1 の 409 ~ 2175)
配列番号 15	AAV-5 VP3 のコード配列 (VP1 の 577 ~ 2175)

30

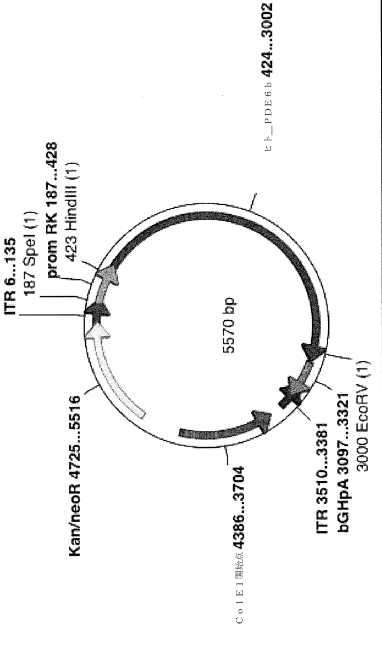
【図 1 A】



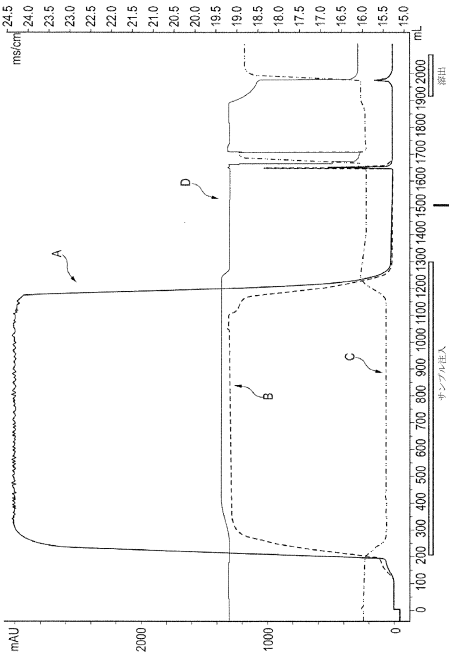
【図 1 B】



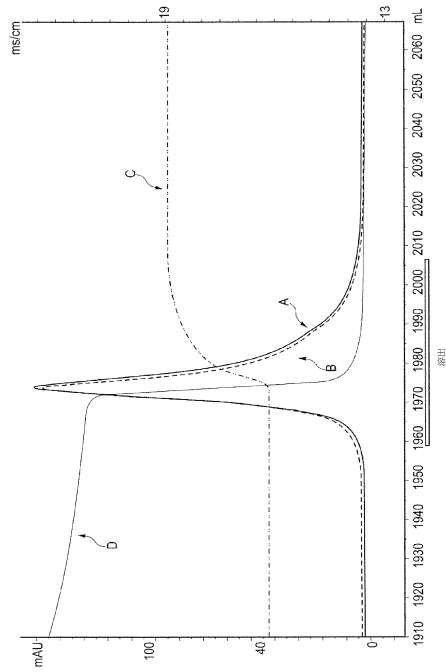
【図 2】



【図 3 A】



【図 3 B】



【配列表】

0006868572000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I
C 1 2 N 15/10 (2006.01) C 1 2 N 15/10 Z

(73)特許権者 517276848

アソシエーション フランセーズ コントル レス ミオパシーズ
フランス国, 7 5 6 5 1 パリ セデックス 1 3, 4 7 - 8 3 ブールバール デ オピタル

(74)代理人 100114775

弁理士 高岡 亮一

(74)代理人 100121511

弁理士 小田 直

(74)代理人 100202751

弁理士 岩堀 明代

(74)代理人 100191086

弁理士 高橋 香元

(72)発明者 ブルメント, ニコル

フランス国, 4 4 3 0 0 ナント, 3 6 リュ アンリ ジュラン

審査官 林 康子

(56)参考文献 特表2014-526246 (JP, A)

国際公開第02/012455 (WO, A1)

特表2012-529917 (JP, A)

特表2013-517798 (JP, A)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C 1 2 N 7/02

C A p l u s / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S / W P I D S (S T N)

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