

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第4459353号
(P4459353)

(45) 発行日 平成22年4月28日 (2010. 4. 28)

(24) 登録日 平成22年2月19日 (2010. 2. 19)

(51) Int. Cl. F I
C 1 2 N 7/00 (2006. 01) C 1 2 N 7/00
C 1 2 N 7/06 (2006. 01) C 1 2 N 7/06

請求項の数 20 外国語出願 (全 23 頁)

(21) 出願番号	特願平11-363043	(73) 特許権者	599082883
(22) 出願日	平成11年12月21日 (1999. 12. 21)		トランジェーヌ、ソシエテ、アノニム
(65) 公開番号	特開2000-201673 (P2000-201673A)		TRANSGENE S. A.
(43) 公開日	平成12年7月25日 (2000. 7. 25)		フランス国イルキルシュ、グラフェンスタ
審査請求日	平成18年11月9日 (2006. 11. 9)		デン、セデックス、パルク、ディノバスイ
(31) 優先権主張番号	9816147		オン、ブールパール、ゴンティエ、ダンデ
(32) 優先日	平成10年12月21日 (1998. 12. 21)		ルナシュ
(33) 優先権主張国	フランス (FR)	(74) 代理人	100064285
			弁理士 佐藤 一雄
		(74) 代理人	100067079
			弁理士 小野寺 捷洋
		(74) 代理人	100091487
			弁理士 中村 行孝
		(74) 代理人	100094640
			弁理士 紺野 昭男

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 非エンベロープウイルスのウイルス調製物におけるエンベロープウイルスの不活性化法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

アデノウイルスを含むウイルス調製物中のエンベロープウイルスの不活性化法であって、
- 上記ウイルス調製物中に充分量の溶媒リン酸トリ - n - ブチル (T N B P) 0 . 1 % から 0 . 6 % (容量 / 容量) を添加し、- 1 5 分から 2 4 時間の間に互って、温度 + 4 から + 3 7 、 p H 6 . 5 から 8 . 5 において上記 T N B P を作用させる方法であって、上記不活性化法が上記アデノウイルスの感染性を補助する、方法。

【請求項 2】

上記ウイルス調製物中に T N B P を 0 . 3 % (容量 / 容量) の量添加する、請求項 1 記載のエンベロープウイルスの不活性化方法。

【請求項 3】

可溶化剤の存在下に上記方法を実施する、請求項 1 から 2 のいずれか一項記載のエンベロープウイルスの不活性化方法。

【請求項 4】

可溶化剤が非イオン性界面活性剤である、請求項 3 に記載のエンベロープウイルスの不活性化方法。

【請求項 5】

可溶化剤が「Tween (登録商標)」である、請求項 4 記載のエンベロープウイルスの不

10

20

活性化方法。

【請求項 6】

可溶化剤が「Tween 80（登録商標）」である、請求項 5 記載のエンベロープウイルスの不活性化方法。

【請求項 7】

上記ウイルス調製物中に添加する可溶化剤の量が 0.01% から 5% である、請求項 3 から 6 のいずれか一項記載のエンベロープウイルスの不活性化方法。

【請求項 8】

上記ウイルス調製物中に添加する可溶化剤の量が 0.1% から 2% である、請求項 7 に記載のエンベロープウイルスの不活性化方法。

10

【請求項 9】

温度 + 15 から + 25 において上記 T N B P を作用させる、請求項 1 から 2 のいずれか一項記載のエンベロープウイルスの不活性化方法。

【請求項 10】

上記可溶化剤の存在下に、温度 + 15 から + 25 において上記 T N B P を作用させる、請求項 3 から 8 のいずれか一項記載のエンベロープウイルスの不活性化方法。

【請求項 11】

p H 8.5 において T N B P を作用させる、請求項 1、2、および 9 のいずれか一項記載のエンベロープウイルスの不活性化方法。

【請求項 12】

上記可溶化剤の存在下に、p H 8.5 において上記 T N B P を作用させる、請求項 3 から 8 および 10 のいずれか一項記載のエンベロープウイルスの不活性化方法。

20

【請求項 13】

1 時間から 5 時間の間、上記 T N B P を作用させる、請求項 1、2、9 および 11 のいずれか一項記載のエンベロープウイルスの不活性化方法。

【請求項 14】

上記可溶化剤の存在下に、1 時間から 5 時間の間、上記 T N B P を作用させる、請求項 3 から 8、10 および 12 のいずれか一項記載のエンベロープウイルスの不活性化方法。

【請求項 15】

攪拌下に上記方法を実施する、請求項 1 から 14 のいずれか一項記載のエンベロープウイルスの不活性化方法。

30

【請求項 16】

伝導率が 5 から 500 m S / c m の条件下に上記方法を実施する、請求項 1 から 15 のいずれか一項記載のエンベロープウイルスの不活性化方法。

【請求項 17】

伝導率が 10 から 100 m S / c m の条件下に上記方法を実施する、請求項 16 に記載のエンベロープウイルスの不活性化方法。

【請求項 18】

請求項 1 から 17 のいずれか一項記載の方法に従ってエンベロープウイルスを不活性化する少なくとも一工程を包含する、アデノウイルスを含むウイルス調製物の調製方法。

40

【請求項 19】

a) 適切な細胞系中で上記ウイルス調製物を生成させるための一工程、
b) 工程 a) で生成させたウイルス調製物を生成細胞系および / または培地上清から収集するための一工程、
を包含する、請求項 18 記載の調製方法。

【請求項 20】

さらに：

c) 生成細胞系の細胞を破壊するための一工程、
を包含する、請求項 19 に記載の調製方法。

【発明の詳細な説明】

50

【 0 0 0 1 】

本発明は、非エンベロープウイルスに基づくウイルス調製物を汚染し得るエンベロープウイルスを不活性化する方法に関するものである。また本発明の目的は、エンベロープウイルスを本質的に含まないウイルス調製物、および、この種のウイルス調製物を含む医薬組成物、ならびに、治療もしくは予防目的に対するその使用にある。遺伝子治療特にヒトにおける遺伝子治療の観点で本発明は特に重要である。

【 0 0 0 2 】

遺伝子治療は、細胞もしくは宿主生物への遺伝情報の伝達として定義される。ヒトに適用された最初のプロトコルは、アデニンデアミナーゼ (ADA) をコードする遺伝子に影響を与える突然変異に起因した、遺伝子的免疫不全の患者に対して1990年9月に米国で始め行われた。この治療法には、患者の機能障害が遺伝病に起因している場合の欠陥遺伝子を機能遺伝子で補正または置換することが包含された。この最初の実験が比較的的成功したので、遺伝子治療技術の発展を促し、それ以来、病状を改善する治療用遺伝子を *in situ* で送り出す目的で遺伝的および後天的両方の他の疾病 (がん、AIDS 等の感染性疾患その他) の治療にまで上記技術が拡張された。この戦略の殆どが、標的細胞へ治療用遺伝子を搬送するためのベクターを使用する。ウイルス系および合成系の両方で、多くのベクターが過去数年間に開発され、当業者が入手し得る多くの刊行物の主題になっている。

【 0 0 0 3 】

遺伝子治療用ベクターとしてのアデノウイルスの重要性は既に従来技術において指摘されてきた。アデノウイルスは、分裂状態および静止状態の両細胞を包含する多くの細胞タイプに感染し、非組み込み性であり、かつ、病原性が低い。加えて、アデノウイルスは呼吸道に対する自然屈性を有する。これらの特別な性質が、アデノウイルスをして各種治療用途に対する、およびワクチン用途に対してさえも好ましいベクターとなさしめている。

【 0 0 0 4 】

アデノウイルスの感染サイクルは2段階で生起する。初期段階で複製の開始が進み、これによりウイルスDNAの複製および転写を調節する初期タンパク質の生成を可能にする。ゲノム複製に続いて後期段階があり、この間に、ウイルス粒子を構成する構造タンパク質が合成される。新しいウイルスの集合は核中で生起する。まず、正二十面体構造の中空カプシドが形成されるようにウイルスタンパク質が集まり、この構造中にゲノムが包まれる。放出されたアデノウイルスは他の許容細胞の感染が可能である。

【 0 0 0 5 】

一つの指針として、これらのゲノムは約36kbの直鎖で二重鎖のDNA分子からなり、この分子は約30遺伝子をを含み、これらの遺伝子がウイルスサイクルに関与する。この初期遺伝子 (E1 から E4 ; E は初期の意味) はゲノム中に分散した4つの領域に互って分布している。このE1、E2 および E4 領域はウイルス複製には必須だが、一方、宿主中の抗アデノウイルス免疫応答の変調に関与するE3 領域は必須ではない。後期遺伝子 (L1 から L5 ; L は後期の意味) は構造タンパク質を主にコードし、かつ、初期転写ユニットを一部カバーする。殆どの場合、これらは主たる後期プロモーターMLP (Major Late Promotor の意味) から転写される。加えて、このアデノウイルスゲノムはその末端に cis作用性領域を有し、この領域はウイルス粒子をタンパク質外殻で包むのに必須であり、かつ、この領域は5' および 3' 末端に位置する逆方向末端塩基配列 (ITR) からなり、さらにカプシドに包み込まれる領域が5' ITR に続く。

【 0 0 0 6 】

遺伝子治療プロトコルに最近使用されるアデノウイルスベクターは、環境および宿主生物中へのそれらの播種を回避するようにE1 領域の大半が欠如している。E3 領域をさらに欠失させると、クローン能力の増強ができる。いわゆる第二世代ベクターも入手できる。これらは、カプシド封入 (encapsidation) に必須 なシス領域 (ITR およびカプシド封入配列) を保存するが、形質導入細胞の永続性を妨げ、かつ、導入遺伝子の安定な発現を妨げ得る、ある種のウイルス遺伝子の *in vivo* での発現を低減させる目的の追加的遺伝子修飾を含んでいる (国際特許出願WO第 94/28152 号および同第 97/04119 号公報参照)

10

20

30

40

50

。この観点では、全てのアデノウイルス機能が欠失した最低限ベクターが好ましい代替ベクターといえる。

【 0 0 0 7 】

明らかに安全的理由から、潜在的有害汚染物を含まないウイルス調製物を取得することが重要である。上記組換えアデノウイルスは欠陥機能を相補する細胞系中で生成させる。培養後、感染細胞を収集し、溶菌し、次いでウイルス粒子を細胞溶菌産物から精製する。この分野で作業する大半の研究チームは、塩化セシウム勾配超心分離またはクロマトグラフィー技術を用いた分子状汚染物（タンパク質、DNA、無機汚染物または毒素汚染物その他）の低減に興味をいだいてきた。しかし、他のタイプのウイルスに伴う潜在的汚染物質は今日に至まで未解決のままである。この観点では、エンベロープウイルスに伴う病理学的危険性は、これらが、がん、肝炎、AIDS その他の結果を生じ得るので軽視されるべきではない。したがって、ヒトに使用するための組み換えウイルス調製物は感染性エンベロープウイルスを含まないことが極めて重要である。

10

【 0 0 0 8 】

しかし、汚染原因は、問題ウイルス調製物に導く上記方法を通じて多数にある。事故による汚染以外にも、問題ウイルス増殖に用いる細胞系は、それらのクロモソム中に取り入れられた多数のレトロウイルスゲノム（プロウイルス）を含み得る。これらは、ある種の培養条件に応じて活性化されて感染性エンベロープウイルスを生じる。その上、エンベロープウイルスの主たる源である動物由来の血清をこの培地はしばしば含む。さらに、作業中、環境および多目的用装置（醗酵槽、ホモジナイザー、クロマトグラフィー用カラム、その他）もまた汚染に関与し得る。これらの汚染物質は外来物質と呼称され、エンベロープウイルスを含むと同時に細菌および細胞も含む。

20

【 0 0 0 9 】

リン酸トリ（*n*-ブチル）（TNBP）の混合物を用いたエンベロープウイルス不活性化方法は血液タンパク質および誘導体（血小板濃縮体、クリオプレシピテート、分画生成物その他）の調製用に既に使用されてきたが、この場合は肝炎Bウイルスによる汚染が主たる公衆的健康問題を構成する。エンベロープウイルスによる汚染が臨床用バッチの安全性に不利に働く場合は、この種の方法は非エンベロープウイルス調製用には決して適用されていない。

【 0 0 1 0 】

タンパク質組成物に適用される従来型方法とは異なって、一方では保持されることが望ましい非エンベロープウイルスと、不活性化が追及されるエンベロープウイルスという、2種の型のウイルスが同一調製物中に共存するという特殊問題が存在する。本発明に従った方法は、これらの二種の前提条件を調和させなければならない。一般的にウイルスは複雑な構造的構成を有し、ウイルス粒子の完全性は感染性および宿主細胞中への浸透には必須のものである。この観点でアデノウイルスはタンパク質を伴い、かつ、正二十面体カプシドにより包まれたDNA分子を含む。このカプシドは、720ヘキソンを含み、構造を安定化するポリペプチドIIIIa、IVおよびIXのモノマーを伴った60ペントンを含むカプソマーからなる。このペントンの結合し、かつ、カプシド外方に伸長する3量体繊維があり、この繊維が標的細胞へのウイルスの初期付着を可能ならしめる。アデノウイルスカプシドが僅かでも損傷を受けると、ウイルス感染に重大な影響を与える。アデノウイルスのこの種の脆弱さは、37以上の温度に長期暴露されると感染能力が対数関数的に低減するのに充分であるという事実をモニターすることにより説明できる。

30

40

【 0 0 1 1 】

この度、活性成分としての組み換えアデノウイルスを含む調製物中のエンベロープウイルスを不活性化する方法が開発され、この方法ではリン酸トリ-*n*ブチル（TNBP）を溶媒として用いる。その上、組み換えアデノウイルスの感染性を補助させるのに最も適切で、かつ、総体的精製方法中に取り込むのに最も適切な実験条件を範囲を決める目的で、種々の変数の影響が研究された。実施例の記載では、室温で0.1から0.6%のTNBPおよび1%から2%の「Tween 80」を4時間作用させるとエンベロープウイルス量の著しい低減

50

が可能（少なくとも対数単位で 1 / 4 へと減少）で、一方、アデノウイルス粒子の無欠性は維持される（収率は少なくとも 80 %、または 100 % を超する場合もある）ことが判る。また、時にはウイルス間に形成されてウイルス感染性を妨げる凝集体が低減するので、本発明に従った方法の有益な効果も実証された。

【 0 0 1 2 】

したがって本発明の目的は、主として非エンベロープウイルスを含有するウイルス調製物中のエンベロープウイルスを不活性化する方法であって、上記ウイルス調製物中に充分量の溶媒を添加し、かつ、温度 - 5 から + 50 および pH 約 5 から約 9 において、上記ウイルス調製物中に存在するエンベロープウイルスの量を有意に低減するのに十分に長い時間に亘って上記溶媒を作用させる方法である。

10

【 0 0 1 3 】

“エンベロープウイルス” および “非エンベロープウイルス” なる用語は基本的なウイルス学便覧中に広く定義されている。簡単にいえば、エンベロープウイルスは、ウイルス表面に脂質層もしくは脂質 2 重層を含み、かつタンパク質を伴ったエンベロープを有する。この組成の由来は、ウイルスが細胞膜を貫通して出芽する間に形成されるという事実にある。細胞膜なる用語中には、原形質膜；および、小胞体、ゴルジ装置、核等の他の細胞オルガネラの膜が包含される。これとは対照的に非エンベロープウイルスはその表面に脂質を有さず、かつタンパク質カプシドにより包囲されている。

【 0 0 1 4 】

“ウイルス調製物” は水性媒体（培地、緩衝用媒体、配合用溶液その他）中に一種または二種以上の非エンベロープウイルスを主として含有する。“ウイルス” なる用語中には、野生型ウイルス、突然変異および組み換えウイルス（少なくとも一種の問題遺伝子を含む）が包含される。ウイルス調製物は、一種もしくは二種以上のフラグメントにより運ばれる非エンベロープウイルスの DNA を適切な細胞系中に導入することにより、または、この細胞系をウイルス原液を用いて感染させることにより生成させるのが普通である。感染し移入された細胞系を次いで培養し、生じたウイルス粒子を、生成細胞および/または培地上澄み液から収集する。

20

【 0 0 1 5 】

ウイルス生成物に要求される医薬としての品質に適合した純度水準を達成する目的で、上記ウイルス調製物を一段もしくは二段以上の精製工程（タンパク質、毒素もしくは核酸、その他の汚染物質の少なくとも部分的除去）に処してもよいことを、本発明との関連で指摘しなければならない。

30

【 0 0 1 6 】

本発明における有利な実施態様中には、複製に欠陥のある非エンベロープウイルスの使用が包含され、この場合、突然変異（一種または二種以上の連続もしくは非連続ヌクレオチドの添加、欠失および/または置換）により一種もしくは二種以上のウイルス機能が非機能化される。

【 0 0 1 7 】

本発明に従った不活性化方法は、一種もしくは二種以上の非エンベロープ問題ウイルスを含むウイルス調製物を汚染し得るエンベロープウイルスの低減または除去を意図するものである。

40

【 0 0 1 8 】

“不活性化” なる用語は、問題ウイルス調製物を汚染しているエンベロープウイルスの感染性の有意な、または完全な低減として定義できる。本発明の目的の場合、好ましい感染性は少なくとも対数単位で 1 / 2、有利には少なくとも 1 / 3、および好ましくは少なくとも 1 / 7 になる。エンベロープウイルスの不活性化の評価は、例えば電子顕微鏡、HPLC、分子生物学的方法（PCR）、ウイルス力価滴定、蛍光、免疫学的方法（ELISA、RIA およびその他）、一種または二種以上のウイルスポリペプチドの検出ができる酵素標識抗体法（ウエスタン法および他）、特にレトロウイルスの場合の逆転写酵素活性の測定、およびその他による従来技法に従って実施できる。

50

【 0 0 1 9 】

本発明の目的の場合の溶媒は、非エンベロープウイルス（未精製ウイルス調製物）の収集直後、または、いずれの精製段階でもウイルス調製物中に導入できる。

【 0 0 2 0 】

本発明との関連において「溶媒」なる用語は、脂質の溶解または一種または二種以上の脂質を含む構成物質の解離を可能ならしめる任意の物質、溶液または組成物を指す。一層具体的には本発明の場合、本発明に従った方法に用いる溶媒はウイルスエンベロープを解離することを意図したものである。任意の溶媒が想定できるが、リン酸アルキル単独または組み合わせのいずれかの「Hecameg」（Interchim 引例米国特許第 785480 号）の使用が好ましい。この組み合わせは、同一化学族（例えば二種のリン酸アルキル）または異種化学族（エーテルおよびリン酸アルキル）の組み合わせ溶媒であってもよい。本発明との関連において一層具体的には、この溶媒はリン酸ジアルキルおよびリン酸トリアルキルからなる群から選択される。リン酸ジアルキルまたはリン酸トリアルキルのアルキル基は炭素原子 1 から 10 を独立に含むのが好ましい。このアルキル基は直鎖型または分岐型（イソアルキル）であってもよく、また置換されていてもよい。三つのアルキル基のそれぞれが独立に炭素原子 2 から 8、最も好ましくは 3 から 5 を含む場合のリン酸トリアルキルが好ましい。単に説明の目的ではあるが、リン酸トリ（*n*-ブチル）（TNBP）、リン酸トリ（*t*-ブチル）、リン酸トリ（*n*-ヘキシル）、リン酸トリ（2-エチルヘキシル）、リン酸トリ（*n*-デシル）が挙げられる。特に好ましい溶媒はリン酸トリ（*n*-ブチル）である。

10

20

【 0 0 2 1 】

本発明に従った方法に採用する溶媒量は、問題ウイルス調製物を汚染するエンベロープウイルスの感染性を有意に低減させるのに十分な量でなければならない。当然ながら上記量は本発明の方法のある種パラメーター（ウイルス調製物量、汚染程度、エンベロープウイルス型、ウイルス調製物の精製程度、その他）の関数として変わってもよい。正確な実験条件に必要な溶媒量を調整することは当業者に可能である。溶媒は最終濃度が 0.001% から 10%（1% は純度 99% を超す溶媒の原液 1 ml に、または全容量 100 ml の場合の純溶媒 1 g に該当）の範囲で使用するのが好ましい。好ましい実施態様によれば、上記ウイルス調製物中に導入される溶媒はリン酸トリ（*n*-ブチル）であり、量は 0.05% から 1%、好ましくは 0.1% から 0.6%、および最も最適には 0.3% の範囲である。

30

【 0 0 2 2 】

任意であるが有利な実施態様によれば、本発明におけるエンベロープウイルスの不活性化方法は、洗剤、界面活性剤または両親媒性分子好ましくは非イオン性物質の存在下に実施される。以下に可溶化剤として一括してグループ化されるこれらの呼称は、不溶性または僅かに溶解性の媒体中への他の物質、溶液または組成物の溶解性を容易にし、またはエンベロープウイルスへの接近可能性を促進する、任意の物質、溶液または物質を指す。本発明において追及される目的によれば、上記の可溶化剤の目的は、本発明の方法の効率を増進する目的で問題ウイルス調製物中に存在するエンベロープウイルスに関して、溶剤の溶解性または接近可能性を増進させることにある。当然ながら、この溶媒および可溶化剤はウイルス調製物中に個々に導入でき（溶媒の前もしくは後における可溶化剤）、または同時に導入できる。特に、本発明に従った不活性化方法を精製工程中でのウイルス調製物に使用する場合には、精製第一段階で可溶化剤を導入し、次いで本発明に従った方法の期間中に溶媒を導入するのが好ましい。任意ではあるが次段の精製工程により、特に最終精製生成物からの溶媒除去、および可能であれば、使用した可溶化剤の除去によりウイルス調製物の純度向上が可能になる。

40

【 0 0 2 3 】

可溶化剤の種類は問わないが、特に脂肪酸またはそれらのエステルのポリオキシエチレン誘導体が挙げられる。好ましい可溶化剤の例中には、「Tween」（特に「Tween 20 または 80」）、「Triton」（特に「X-1000」）、PEG（特に「PEG400」）、コール酸ナ

50

トリウム、デオキシコール酸ナトリウム、オクチル β -D-グルコピラノシドおよびN-ドデシル-N,N-ジメチル-2-アンモニオ-1-エタンスルホン酸塩が包含される。「Tween 80」が最も好ましい。TNBP および「Tween 80」の組み合わせは本発明との関連において好ましい。

【0024】

この実施態様が選択される場合、採用する可溶化剤の最終濃度は広範に変わる。一つに指針として、0.001%から10%、特に0.01%から5%、および好ましくは0.1%から2%の範囲である。「Tween 80」に関しては、最適濃度は0.5%から2%である。「Tween 80」に関しては最適濃度は0.5%から2%である。TNBP 0.6%および「Tween 80」2%の組み合わせ、および、TNBP 0.3%および「Tween 80」1%の組み合わせが特に好ましい。

10

【0025】

その上、本発明に従った方法は、エンベロープウイルスについての上記溶媒の効能、その安定性もしくはその溶解性を増進するための、またはエンベロープウイルスの不活性化を妨げ得る干渉活性の低減のための、および/または非エンベロープウイルスの感染性を増進するための一種もしくは二種以上の他の物質の存在下に実施することもできる。この点に関しては、特に抗プロテアーゼを挙げることができる。この実施態様は「Hecameg」を溶媒として使用する方法の実施には特に適している。

【0026】

本発明の実施における温度範囲は-5 から+50 である。しかしウイルス調製物中の非エンベロープウイルスの感染性を確実にする目的では、約+4 から+37 、一層好ましくは約+15 から+25 が好ましく、室温であれば申し分ない。

20

【0027】

本発明の実施におけるpH範囲は約5から約9である。しかし6.5から8.5の範囲で実施するのが好ましく、約8.5での実施が好ましい。必要に応じてpHの増減のために塩基もしくは酸それぞれの添加により、または緩衝用溶液を使用して上記pHの調整をすることは当業者において可能である。

【0028】

本発明における方法との関連で、可溶化剤の任意の存在下における溶媒とウイルス調製物との間の反応時間は各種パラメーター(ウイルス調製物容量、エンベロープウイルス型、反応温度、その他)の関数として変わり得る。上記実験条件に適する反応時間は、簡単な比較試験を行えば当業者自体が容易に決定できる。目安としての反応時間は15分から24時間、好ましくは30分から12時間、一層好ましくは1時間から5時間である。ウイルス調製物容量が殊の外大きい場合または低反応温度の場合には時間延長を考慮してもよい。さらに、反応時間短縮が望ましい場合には、当業者において反応温度の適切な上昇を決めることもできる。

30

【0029】

好ましくは、本発明に従った方法は攪拌しながら実施する。事実、非エンベロープウイルスの収率はこれらの条件下で増加するのが観察される。攪拌速度は広範囲から選択できるが、約50から約5000回転/分、有利には約100から約2000回転/分、および好ましくは約150から約500回転/分の範囲で操作するのが好ましい。磁気攪拌機または他の適切な装置(例えば、プロペラを具備したタンクまたは櫛形攪拌機)も使用できる。

40

【0030】

最後に、本発明に従った方法は、約5から約500 mS/cm、有利には約10から約200 mS/cm、および好ましくは約10から約100 mS/cmの導電率条件下に実施するのが好ましい。これらの条件は、問題非エンベロープウイルスの感染性の保持のためには有利である。

【0031】

その上、本発明に従った方法は、例えば生材料、生物学的材料、環境、ならびに問題非工

50

ンベローブウイルスの調製または精製に関与した環境もしくは作業者等の、多様な源から由来した一種または二種以上の型のエンベローブウイルスに適用可能である。本発明に従った方法はヒトに対して病原性であるエンベローブウイルスを不活性化するためには特に有用である。なかでも、肝炎ウイルス、レトロウイルス、エプスタイン・バールウイルス、サイトメガロウイルス、ヘルペスウイルス、ラブドウイルス、ミクソウイルス、パラミクソウイルス、オルソミクソウイルス、アレナウイルス、コロナウイルス、および外来作因が挙げられる。本発明との関連で、本発明に従った方法は一層具体的にはレトロウイルスおよび肝炎ウイルスに適用される。本発明に従った方法の有効性は、例えば BVD（ウシウイルス性下痢）、PRD（仮性狂犬病ウイルス）、VsV（水泡性口内炎ウイルス）、レトロウイルス、または HSV（単純ヘルペスウイルス）等の、不活性化に対して特に安定なエンベローブウイルスの既知量を問題ウイルス調製物中に導入することにより実施できる。本発明に従った不活性化方法は、“試験”エンベローブウイルスの濃度および/または感染性の有意な低減、すなわち少なくとも対数単位で 1 / 4 の低減があった場合に立証される。加えて、本発明に従った方法はウイルス調製物調製の全体的方法中に組み込まれるので、調製方法の全ての段階に由来する不活性化の定量化を可能ならしめる全体的有効性の想定もできる。不活性化段階有効性の一例を次に記載する。

【0032】

本発明に従った方法は問題非エンベローブウイルスを含むウイルス調製物に応用される。好ましくは、アデノウイルス、イリドウイルス、パポバウイルス、ロタウイルスおよびパルボウイルスを挙げることができる。なかでも、AAV（パルボウイルス族のアデノウイルス会合ウイルス）およびアデノウイルスが好ましい。本発明に従った方法は、複製欠陥組み換えアデノウイルスの調製には特に好適である。“組み換え”なる用語は、宿主細胞中での発現に適する諸要素の制御下に置かれた一種または二種以上の問題遺伝子の存在を指す。“複製欠陥”なる用語は、宿主細胞（相補の不在下）中での自己複製ができないことを意味する。

【0033】

有利なことには、この問題遺伝子はアンチセンス RNA、リボソーム、または問題ポリペプチドをコードする。このものは真核生物、原核生物、寄生生物、またはアデノウイルス以外のウイルスからのものでもよい。このものは、公知の任意従来型技法（クローン法、PCR、化学合成、およびその他）により単離できる。このものは遺伝子型（イントロンの全てまたは一部を含む）、相補 DNA 型（cDNA、イントロン無し）、または混合型（ミニ遺伝子）であってもよい。その上、それがコードするポリペプチドは i）細胞間、ii）宿主細胞の膜中に取り込まれたものの、または iii）分泌されたものであってもよい。このものは、天然（自然）に見いだされるもの、それらの一部（端を切り取ったもの）、特に増強もしくは修飾された生物学的性質を示す突然変異体、または多様な源からの配列の融合から得られたキメラポリペプチドであってもよい。

【0034】

使用可能な問題ポリペプチドの中でも、一層具体的にはケモカイン [MIP-1 α 、MIP-1 β 、RANTES、DC-CK1、MDC、MCP1（Monocyte chemoattraction protein; 単核細胞ケモアトラクションタンパク質）、IP10 およびその他]、サイトカイン [α 、 β 、または γ - インターフェロン、インターロイキン（IL）、特に IL-2、IL-6、IL-10 または IL-12、コロニー刺激因子（GM-CSF、C-CSF、M-CSF）およびその他]、細胞受容体（特に HIV ウイルスにより認識されるもの）、受容体リガンド、凝固因子（因子 VIII、因子 IX、トロンピン、タンパク質 C）、成長因子、プロアングジオニン因子（繊維芽細胞成長因子の略 FGF、導管内皮細胞成長因子の略 VEGF、散点因子 / 肝細胞成長因子の略 SH/HGF、トランスフォーミング成長因子の略 TGF、腫瘍壊死因子の略 TNF、アングリオポイエチン）、酵素（ウレアーゼ、レニン、メタロプロテイナーゼ、窒素酸化物シンセターゼ NOS、SOD、カタラーゼ、レシチンコレステロール、アシルトランスフェラーゼ LCAT、およびその他）、酵素阻害物質（ $\alpha 1$ 抗トリプシン、抗トロンピン III、ウイルスプロテアーゼ阻害物質、プラスミノゲンアクチベータの略 PAI-1）、主要な組織適合性複合体クラス I もし

10

20

30

40

50

くはⅠⅠ、または対応遺伝子の発現に作用するポリペプチド、免疫応答を生じ得る抗原（または抗原性ペプチド）；ウイルス、細菌もしくは寄生生物の感染または発達をを阻害し得るポリペプチド、抗腫瘍効果を有するポリペプチド（がん抑制遺伝子発現の生成物、腫瘍会合抗原、その他）、細胞自滅に陽性または陰性に作用するポリペプチド（Bax、Bc12、Bc1X、およびその他）、静細胞因子（p21、p16、Rb）、完全もしくは部分免疫グロブリン（Fab、ScFv、およびその他）、毒素、免疫毒素、アポリボタンパク質（ApoA1、ApoA1V、ApoE、およびその他）、細胞毒性産物、抗脈管形成性因子、（アンギオスタチン、エンドスタチン、PF-4、およびその他）、マーカー（ β -ガラクトシダーゼ、ルシフェラーゼ、緑色蛍光タンパク質）または標的病状に対して治療的有効性を示す任意の他のポリペプチドが挙げられる。

10

【0035】

一層正確には、遺伝子機能障害を治療する目的で、欠陥遺伝子の機能性コピー、例えば血友病AまたはBの場合の因子VIIまたはIXをコードする遺伝子、Duchenne および Becker ミオパシーの場合のジストロフィン（またはミニジストロフィン）、糖尿病の場合のインスリン、嚢胞性繊維症の場合の CFTR (Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulators; 嚢胞性繊維症膜内外コンダクタンス調節物質) タンパク質が使用される。腫瘍もしくはがんの発生または進行の抑制に関しては、アンチセンスRNA、リボザイム、細胞毒産物 [単純ヘルペスウイルス1チミジンキナーゼ (TK-HSV-1)、リシン、コレラもしくはジフテリア毒素、ウラシルホスホリボシルトランスフェラーゼおよびシトシンデアミナーゼをコードする酵母遺伝子 FCY1 および FUR1 の生成物、およびその他]、免疫グロブリン、細胞分裂もしくは形質導入シグナル阻害剤、腫瘍サプレッサー遺伝子の発現生成物（p53、Rb、p73、DCC、およびその他）、免疫系刺激性ポリペプチド、サイトカイン遺伝子との任意に組み合わせにおける腫瘍会合抗原（MUC-1 BRCA-1 パピローマウイルス初期または後期抗原）をコードする問題遺伝子が好ましく使用される。最後に抗HIV治療の場合には、免疫保護性ポリペプチド、抗原エピトープ、抗体 [2F5; Buchacher らの Vaccines 92, 191-195 (1992)]、CD4 受容体の細胞外ドメイン [sCD4; Trautnecker らの Nature 331, 84-86 (1989)]、免疫着生 [例えば CD4-免疫グロブリン IgG ハイブリッド; Capon らの Nature 337, 525-531 (1989); Byrn らの Nature 344, 667-670 (1990)]、免疫毒素 [例えば抗体 2F5 または免疫着生 CD4-2F5 とアンジオゲニンとの融合; Kurachi らの Biochemistry 24, 5494-5499 (1985)]、トランス優勢変異株（EP第0614980号公報、WO第95/16780号公報）、上記の一種またはIFN α または β 等の細胞毒生成物をコードする遺伝子の使用が可能である。

20

30

【0036】

問題遺伝子の一つは、移入もしくは形質導入された細胞が選択または識別されることを可能にする選択可能遺伝子であってもよい。この場合、抗生物質 G418 に対する抵抗性を付与するネオ遺伝子（ネオマイシンホスホトランスフェラーゼをコードする）、dhfr（ジヒドロ葉酸還元酵素）遺伝子、CAT（クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ）遺伝子、pac（ピブローマイシンアセチル-トランスフェラーゼ）遺伝子または gpt（キサンチンゲアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ）遺伝子が挙げられる。一般には、上記選択可能遺伝子は当業者には既知である。

40

【0037】

一般的に問題遺伝子（1つまたは複数）は宿主細胞もしくは生物中でのそれらの発現を可能ならしめる調節要素の制御下に置かれる。これらは問題遺伝子のRNAへの転写およびmRNAのポリペプチドへの翻訳を可能ならしめる遺伝子要素の組み合わせである。なかでも、プロモーターは特に重要である。真核生物の任意遺伝子またはウイルス源の任意遺伝子からでさえも単離でき、かつ、構築性もしくは調節性のいずれでもよい。これとは別に、問題遺伝子の天然プロモーターであってもよい。その上、プロモーター活性を増進し、転写阻害領域を抑制し、構成プロモーターを調節可能もしくはその逆にし、および制限部位を導入する等の目的で、このものを修飾することもできる。例示として、PGK（ホス

50

ホグリセリン酸キナーゼ)、MT[メタロチオネイン; Mc Ivor らの Mol. Cell. Biol. 8, 838-848 (1987)、または SR α [Takebe らの Mol. Cell. Biol. 8, 466-472 (1988)] 遺伝子、SV40 ウイルス(シミアンウイルス)初期プロモーター、RSV (ラウス肉腫ウイルス) LTR、TK-HSV-1 プロモーター、CMV ウイルス(シトメガロウイルス)初期プロモーターならびにアデノウイルスプロモーター E1Aおよび MLPが挙げられる。

【0038】

本発明に使用するプロモーターは腫瘍またはがん細胞内での発現を刺激してもよい。特に、乳がんおよび前立腺がん中で過剰発現される MUC-1 遺伝子のプロモーター [Chen らの J. Clin. Invest. 96, 2775-2782 (1995)]、結腸がん中で過剰発現される CEA (carc inoma embryonic antigen ; がん腫胚抗原) 遺伝子 [Schrewe らの Mol. Cell. Biol. 10, 2738-2748 (1990)] のプロモーター、メラノーマ中で過剰発現されるチロシノーゼ遺伝子 [Vile らの Cancer Res. 53, 3860-3864 (1993)] のプロモーター、乳がんおよび膵臓がん中に過剰発現される ERB-2 遺伝子 [Harris らの Gene Therapy 1, 170-175 (1994)] のプロモーター、および肝臓がん中で過剰発現される α -フエトプロテイン [Kana i らの Cancer Res. 57, 461-465 (1997)] 遺伝子のプロモーターが挙げられる。ホルモン性もしくは外性物質(ステロイドホルモン、テトラサイクリン、およびその他)により調節され得るプロモーターも想定できる [Saez らの Current Opinion in Biotechnolog y 8, 608-616 (1997)]。

【0039】

組織特異的プロモーターの使用も可能である。単なる例示に過ぎないが、肝特異的プロモーター(α -1- アンチトリプシン、アルブミン、FIX または ApoAI 遺伝子他の)、肺特異的プロモーター(界面活性剤または CFTR 遺伝子の)、リンパ細胞特異的プロモーター(免疫グロブリン)、および筋特異的プロモーター [β -アクチン; Tabin らの Mol. Cell Biol. 2, 426-436 (1982); SM22; Moessler らの Development 122, 2415-2455 (1996) および Desmin; Li らの Gene 78, 243-254 (1989)] が挙げられる。

【0040】

さらに、上記調節要素は宿主細胞中での問題遺伝子の発現または維持を増進させる要素も追加的に含んでいてもよい(複製起点、細胞ゲノム中への組み込みのための要素、イントロン配列、転写終結のためのポリA配列、三裂のリーダー、その他)。加えて、この問題遺伝子は、宿主細胞からの分泌を可能にするシグナルペプチドをコードする配列を、コード領域上流に含んでいてもよい。このシグナルペプチドは、問題遺伝子のもの、または異性のもの(分泌または合成される任意の遺伝子由来の)であってもよい。

【0041】

問題遺伝子は非エンベロープウイルスゲノムの任意部位中に挿入できるが、アデノウイルスを採用する場合は E1 または E2 領域に対する置換体として挿入するのが有利である。組み換えアデノウイルスベクターが種々の問題遺伝子を含む場合は、同一遺伝要素(第2シストロンの翻訳を再開するための I R E S 型翻訳開始のための、内側部位を用いた多シストロン性カセット)の制御下に、または独立要素の制御下に置くことができる。この場合、これらは同一ウイルス領域(例えば E1 に対する置換体として)中に、または異なった領域(例えば E1 または他の関連領域に対する置換体として)中へ挿入してもよい。

【0042】

欠陥ウイルスは、非機能性突然変異により、またはウイルス複製には必須の領域の全部もしくは一部の欠失により得ることができる。宿主生物または環境中での繁殖を回避するために、E1、E2、E4、および L1 から L5 領域から選択した、複製に必須の少なくとも一つの領域の全部もしくは一部を欠いたアデノウイルスベクターの使用が好ましい。E1領域の大半の欠失が好ましい。このものはヌクレオチド(nt)454 から 3328 に伸長するのが好ましいが、カプシドに包み込まれる機能と干渉しないことを条件に、5' および/または 3' における追加配列もカバーできる。p I X 遺伝子は E1 の欠失には包含されないのが好ましい。nt 3510 以下に伸長する欠失がこれらの基準に適合する。

【0043】

さらに、欠陥のある必須機能が相補系および／またはヘルパーウイルスの手段によりトランス型で相補される限りにおいては、特に E2、E4、L1、L2、L3、L4および／または L5 に影響を与えるような他の修飾とE1の欠失とを組み合わせることもできる。この観点で、E1とE4、またはE1とE2機能に欠陥をもつ第二世代ベクター（例えばWO第94/28152号および同第97/04119号公報参照）を採用することができる。この実施態様を説明するために、E2A領域[EnsingerらのJ. Virol., 10, 328-339 (1972)]のDBP(DNA Binding Protein; DNA結合性タンパク質)遺伝子に影響を与える熱感応性突然変異または後者の欠失とE1領域の欠失とを組み合わせたベクターを挙げることができる。読み取り枠(ORF)3および／または6/7をコードする配列以外は、E4領域の部分欠失が好ましく、その理由はE4機能の相補を必要としないからである[KetnerらのNucleic Acids Res. 17, 3037-3048 (1989)]。別の例は、問題遺伝子の発現に好ましい影響を与えるORF3および4またはORF3、6および7をコードするE4の配列をアデノウイルス骨格中に維持することからなる。

10

【0044】

クローン能力増強の目的で、上記組み換えアデノウイルスベクターは非必須E3領域の全てまたは一部を追加的に欠失してもよい。この実施態様によれば、それにも係わらず、特に糖タンパクgp19k[GoodingらのCritical Review of Immunology 10, 53-71 (1990)]を宿主細胞から逃避させ得るポリペプチドをコードするE3配列を保持しているのが好ましい。これとは別の例によれば、5'および3' ITR(Inverted Terminal Repeat; 逆方向末端繰り返し)およびカプシドに包まれる領域を本質的に保有し、かつ全てのウイルス機能に欠陥がある最少限のアデノウイルスベクターの使用が可能である。

20

【0045】

その上、アデノウイルスの上記領域は種の見地およびセロタイプの両見地から多様化できる。このものは、ヒトまたは動物(イヌ、トリ、ウシ、ネズミ、ヒツジ、ブタ、サルその他)アデノウイルス、または、少なくとも二つの異なった起源のアデノウイルスゲノムのフラグメントを含むハイブリッドのゲノム由来である得る。一層具体的には、イヌアデノウイルス CAV-1およびCAV-2、トリアデノウイルス DAVまたはウシアデノウイルス Bad(特にタイプ3)(ZakharchukらのArch. Virol., 1993, 128; 171-176; SpibeyおよびCavanaghのJ. Gen. Virol., 1989, 70; 165-172; JouvenneらのGene, 1987, 60; 21-28; MittalらのJ. Gen. Virol., 1995, 76: 93-102)を挙げることができる。しかし、セロタイプC特にタイプ2もしくは5由来のヒト起源のアデノウイルスベクターが好ましい。

30

【0046】

本発明の他の目的は、非エンベロープウイルスを主として含むウイルス調製物の調製方法にあり、上記方法は本発明における方法に従ったエンベロープウイルスの不活性化を目的とする少なくとも一工程を含む。

【0047】

有利には、本発明に従った調製方法は少なくとも：

- a) 適切な細胞系中で上記ウイルス調製物を生成させるための一工程、
- b) 工程a)で生成させたウイルス調製物を生成細胞系および／または培地上清から収集するための一工程、
- c) 任意に生成細胞系の細胞を破壊するための一工程、
- d) 任意に一つの清澄化工程、
- e) 上記のようなエンベロープウイルスを不活性化するための一工程、および
- f) 任意に一つの精製工程

40

を包含する。

【0048】

当然ながら上記工程の順序は変更でき、特に不活性化工程e)はウイルス収集工程b)の直後、任意の工程c)もしくはd)後、または精製工程f)中に包含させてもよい。

【0049】

50

上記のように工程 (a) は、問題非エンベロープウイルスのゲノムを適切な細胞系中に移入することからにより達成できる。導入されたウイルス DNA は細胞 (W O 第 96/17070 号公報) 中、酵母 (W O 第 95/03400 号公報) 中、または細胞中で任意に構築されらウイルスゲノムであってもよい。この構築は従来型分子生物学的手法または分子間相同組み換え手法により実施される。この DNA は、ウイルスゲノムの一部を含むと共に相同領域も有するフラグメント形態で細胞系中に導入してもよく、この相同領域は各フラグメントにより保持される相同配列間の組み換えにより完全ゲノムが再構築されるのを可能ならしめる [Graham および Preveet による Methods in Molecular Biology, Vol 7, 109-128 (1991) ; Ed Murey, The Human Press Inc.]。別法はでは、ウイルス原液を用いて細胞系を感染することからなる。感染条件は当業者自体により決定できる。説明目的ではあるが、範囲を限定した感染の多様性において非エンベロープウイルスを用いて細胞を感染 (MOI) (欠陥アデノウイルスの場合は約 1 から 10) させる。

10

【 0050 】

移入または感染後、好ましくは 37 で充分時間培養を続行してウイルス増幅を可能ならしめる。生成させるべきウイルス量に応じて、工程は培養皿中、醗酵槽中、または他の適当な培養装置中で実施される。一般的には、非エンベロープウイルスの集収は感染後または移入後 24 時間から 1 週間の間に行われる。収集時間は各種尺度で決定できる：最適ウイルス力価、細胞変性の観測 (生成細胞の線形)、および / または酸素消費量の低減。48 時間または 72 時間での収集が好ましい。ウイルスは生成細胞、培地上澄み液または細胞のいずれから捕集し、上澄み液は併合する。

20

【 0051 】

第 1 の選択としては、生成細胞を収集する。細胞破壊工程は、細胞内に生じたウイルスを放出する目的で一般的には細胞性バイオマス再懸濁後に実施する。本発明との関連では従来型手法の全て、特に化学的および / または機械的手法が採用できる。例えば、細胞膜を壊れ易くする凍結 - 解凍サイクル、酵素的溶菌 (細胞膜分解酵素の使用) または化学的溶菌 (洗剤、pH ショック、浸透ショックその他の使用) が実施できる。機械的手法は、超音波法 (超音波処理)、漸減法 (「DynoMill」ガラスビーズ、BeadMill)、加圧およびせん断力法 (French Press 高圧ホモジナイザー)、マイクロ流動体 (「Microfluidics, Newton, MA」) または油圧および機械的せん断力を生じさせる 2 本ローラーによる機械的作用 (「Silverman」ホモジナイザー) により遂行できる。

30

【 0052 】

ウイルス調製物を培地から直接収集す場合は破壊工程の実施は必要なく、細胞性破片除去のためには培地上澄み液を例えばカスケード濾過または低速遠心分離により直接清澄化させることも可能である。この場合、ウイルス収率を最大にすために培養の一層長期間の継続も可能である。

【 0053 】

第 3 の選択としては、上澄み液および細胞を収集してもよい。この場合は、細胞内ウイルス放出の目的で破壊工程および清澄化工程を実施することが推奨される。

【 0054 】

清澄化工程の目的は不溶性物質 (細胞性破片、ミクロ分子浮遊物その他) の除去にある。この工程は任意の従来型濾過技法により遂行できる (デプス濾過法、切線方向マイクロ濾過法その他) および遠心分離法 (連続法その他) により実施できる。ウイルス調製物が高濃度である場合は特にそうであるが、大半の不溶性物質を先ず遠心分離し、次いでデプス濾過法により清澄化を続行するのが賢明である。本発明との関連では各種のフィルターが使用できるが、問題の非エンベロープウイルスを通過し得るような孔密度を有し、かつ、不溶性物質はフィルター上に保持し得るような孔密度を有することが前提になる。アデノウイルスの大きさは約 0.07 から 0.1 μm であるから、これより大きな密度のフィルターの使用が要求される。その上、このフィルターは合成材料 (ナイロン)、有機材料 (セルロース) または非有機材料 (ジルコニウム) から作り得る。有利な実施態様にしたがえば、孔密度を順次低減させた数枚のフィルター上で逐次的濾過を行い、例えば先ず孔密

40

50

度 $8\text{ }\mu\text{m}$ のフィルター (Sartorius 5591301P5--00)、次いで孔密度 $5\text{ }\mu\text{m}$ のフィルター (Sartorius 5591342P5--00)、次いで孔密度 3 から $0.8\text{ }\mu\text{m}$ のフィルター (Sartorius, Sartoclean CA カプセル 5621304E9-00-A) および次いで $0.8\text{ }\mu\text{m}$ から $0.65\text{ }\mu\text{m}$ のフィルター (Sartorius, Sartoclean CA カプセル 5621305G9-00-A) 上で濾過する。これとは別に、アデノウイルスの大きさより一層大きな孔密度を有する平坦膜上または中空繊維上での切線方向マイクロ濾過法によっても濾過が実施できる。この点については、「Durapore」(Millipore) および「Omega」(Pall) 膜が使用できる。

【0055】

精製工程は、例えば超心分離法 (塩化セシウム勾配、およびその他) またはクロマトグラフィーによる従来型技法により遂行できる。

10

【0056】

有利な実施態様に従えば、本発明における調製方法中の精製工程は、特にイオン交換法に準拠するクロマトグラフィー工程を包含する。非エンベロープウイルスの精製を完成させる目的で、特にゲル濾過法による異種型クロマトグラフィーを任意にこれと組み合わせることもできる。この2種のクロマトグラフィーは任意順序で実施できるが、先ずイオン交換クロマトグラフィーを、次いでゲル濾過クロマトグラフィーを実施するのが好ましい。

【0057】

イオン交換クロマトグラフィーの場合、セルロース、アガロース (Sephacrose または Macro-Prep ゲル)、デキストラン (Sephadex ゲル)、アクリルアミド (Sephacryl、Trisacryl ゲル)、シリカ (TSK、SW ゲル)、ポリ (スチレン - ジビニルベンゼン) (Source または Poros ゲル)、エチレングリコール - メタアクリル酸塩共重合体 (Toyopearl HW、TSK、PW、フラクトゲル EMD ゲル) またはこれらの混合物特にアガロースとデキストランとの混合物 (Superdex ゲル) に基づく支持体等の、各種の型の支持体を使用できる。一層詳しくは、米国監督官庁 (FDA; Food And Drug Administration) またはヨーロッパ連合の監督官庁によりヒトまたは脊椎動物用として認可された支持体を選択できる。さらに、選択支持体は精製されるべき非エンベロープウイルスと相互反応し得る一種もしくは二種以上の官能基に、好ましくは共有結合により結合させる必要がある (支持体の機能化と呼ぶ)。特に3級または4級アミンからなるアニオンの交換を可能にする基の使用が好ましい。3級アミンで機能化した支持体のなかでは、「Fractogel-DEAE」(ジエチルアミノエチル)、「Fractogel-DMAE」(ジメチルアミノエチル) および「Toyopearl-DEAE」樹脂を挙げることができる。4級アミンで機能化した支持体のなかでは、「Source Q」、「MonoQ」、「Q Sepharose」、「Poros HQ」および「QE」樹脂、「Streamline QXL」(フランス特許出願第 n° 99 02167号) および「Fractogel-TMAE」および「Toyopearl super Q」型の樹脂が挙げられる。「Poros PL」樹脂はポリエチレンイミンで機能化した支持体の適切な例である。「Fractogel-DEAE」支持体は本発明との関連で好ましい。カラムは先ず塩類溶液条件下に平衡化して問題の非エンベロープウイルスが、正に荷電した機能基に付着できるようにする。最終濃度約 $250\text{ }\mu\text{M}$ の NaCl を含む緩衝液を使用する。しかし、当然ながらクロマトグラフィー条件は各種パラメーター特にカラム容量、選択支持体、選択ウイルス、およびウイルス濃度の関数として調整できる。アミン基上に保持されたウイルスの溶離は順次塩類濃度を高めことにより、好ましくは最終濃度が 300 から 400 mM 、好ましくは最終濃度 300 から 350 mM NaCl の塩類溶液を用いた溶離で実施し、問題非エンベロープウイルスを含むフラクションは従来の任意の技法 (260 から 280 nm における吸収度の分光光度計による測定、ウイルスゲノムまたはペプチドの肉視、その他) により測定し決定できる。ウイルスフラクションのオンライン検出用フィルターを具備した検出器にカラムを接続することもできる。このウイルスフラクション (DNA およびタンパク質を含む) は 260 および 280 nm において特徴ある吸収を示すが、一方、タンパク質汚染物質は 280 nm のみで検出され、また遊離核酸は 260 nm で検出される。

20

30

40

【0058】

ゲル濾過クロマトグラフィーに関しては、ビーズ直径 3 から $160\text{ }\mu\text{m}$ 、有利には 5 から

50

105 μm 、好ましくは10から80 μm を有する支持体上でウイルスを精製する。支持体の孔密度はウイルスの大きさに近いのが好ましく、この場合、ウイルスはビーズ内部には浸透しない。これとは反対に、大きさが一層小さい全ての分子はビーズ内部に浸透し、かつ、妨げられる。アガロース (Sephacrose)、デキストラン (Sephadex ゲル)、アクリルアミド (Sephacryl および Trisacryl ゲル)、シリカ (TSK および SW ゲル)、エチレングリコール - メタアクリル酸塩共重合体 (Toyopearl HW、TSK および PW ゲル)、および混合物特にアガロースとデキストリンとの混合物 (Superdexゲル) に基づくマトリックス等の、各種の型の支持体を使用できる。上記支持体は機能化基なしに好ましく使用できる。本発明の方法を実施するのに特に好ましい支持体は次のようである：

- ビーズ直径25から75 μm のアリルデキストラン - メチレンビスアクリルアミドマトリックス (「Sephacryl S300 HR」)、ビーズ直径25から75 μm の「Sephacryl S400 HR」、ビーズ直径25から75 μm の「Sephacryl S500 H4」、ビーズ直径40から105 μm の「Sephacryl S1000 SF」；Pharmacia)、
- エチレングリコール - メタアクリル酸塩共重合体マトリックス (ビーズ直径20から60 μm の「Toyopearl HW 55」、「Toyopearl HW 65」および「Toyopearl HW 75」；Tosoh aas)、
- N - アクリルアミンヒドロキシプロパンジオールマトリックス (ビーズ直径80から160 μm の「Triacryl」；Biosepra)、および
- アガロースマトリックス (ビーズ直径20から80 μm の「Macro-Prep SE」；Biorad)。

【0059】

指針として、「Toyopearl HW 65F および HW 65S」 (孔密度 1000 オングストローム) または「Sephacryl S400 HR」型が好ましい。このカラムは、支持体とウイルス間の疏水性相互反応を限定する塩類溶液および pH 条件を示す緩衝液中で平衡化させる。pH 8.5 において2 ml の MgCl_2 および2%のスクロースを含む50 mMの「Tris-HCl」緩衝液の使用が有利である。問題非エンベロープウイルスは保持されることなくビーズを通じて通過し、分子量が一層小さな汚染物質に先立って流出する。これらを含むフラクションは通常の技法 (260 および 280 における吸収、電気泳動または PCR 技法、その他) により測定して決める。本発明に従った調製方法の一つの利点は、この工程 f) 間での、本発明に従った不活性化方法に使用する溶媒および可溶化剤の除去にある。任意の実施態様によれば、精製工程後に得られたウイルスフラクションは併合し、かつ、通常技術を採用して任意に濃縮する。この場合、切線方向超遠心分離法および透析濾過法が挙げられる。「BioMax PES」 (Millipore 照合数字 PXC300C50 または PXB300C50) および「PLCMK」 (Millipore 照合数字 PXC300C50 または PXB01MC50) カートリッジが特に好ましい。

【0060】

さらに、本発明に従った調製方法には追加的諸工程、特に細胞破壊後に大量に存在する核酸 (主として細胞性起源の) の分解工程を包含できる。エンドヌクレアーゼまたはエキソヌクレアーゼ型の全ての非特異的制限酵素がこの目的に使用され得る。しかし好ましい方法はベンゾナーゼで処理する。指針として、約5から50 U/ml のベンゾナーゼを使用するが、最適条件はウイルス調製物の粘度および処理容積に応じて当業者自体が調整できる。ベンゾナーゼの作用は文献記載の任意の方法を適用して核酸濃度の減少を測定して評価する。これらの工程は互換可能であるが、上記調製方法の破壊工程 (c) および清澄工程 (d) の間に上記ベンゾナーゼ処理工程を実施するのが好ましい。別法は、破壊および清澄工程後にベンゾナーゼ処理工程と不活性化工程とを同時に行うこととなる。加えて、このベンゾナーゼは β - シクロデキストリンの存在下に任意に使用できる。後者は脂質の沈殿を促進し、最終濃度 0.1 から 10%、および特に 1.5% で添加してよい。

【0061】

本発明に従った調製方法は滅菌濾過工程も包含でき、この滅菌濾過工程は上記調製方法の工程 f) 後に実施するのが好ましい。処理容量に適した表面積の 0.22 μm フィルターの使用が有利である。例えば、「Minisart」 (Sartorius, 参照数字 SM16534)、「Sarto

lab P20」(Sartorius, 参照数字 18053D)、「Mullex GF」(Millipore, 参照数字 SLG025)、 「Millex GV」(Millipore, 参照数字 SLG025BS)、「Mill 1 GP」(Millipore, 参照数字 SLGpR25LS)、「Spirale Cap」(Version Super CQS 92 HS または HP; Gelman Sciences)、「Criticap 50」(12995, Gelman Sciences)、または「Millipak」(Millipore 参照数字 MPGL04SK2または MPGL02SH2)型が挙げられる。次いで濾液は所定濃度に調整された用量に包装できる。

【0062】

品質すなわちウイルス調製物の純度は、汚染物質の残り濃度および問題非エンベロープウイルスの官能価の測定により、本発明に従った調製方法を通じてモニターできる。最初の好ましい実施態様の事例では、工程(f)後の「Tween 80」(または「Polysorbate 80」)の消失は欧州薬局方(1997, 1372-1373)で推奨する方法により、チオシアン酸カリウムおよびクロロホルムを用いて評価する。ウイルス調製物中に存在する TNBP の量は Horowitz ら(1985, Transfusion 25, 516-522)による記載のガスクロマトグラフィー技法により滴定できる。残ったタンパク質濃度はタンパク質検定に対する任意技法で測定できる。適当な技法は BCA(ビシンコニン酸検定)(キット「Micro BCA Protein Assay Reagent Kit; Pierce 参照数字 23235」)である。ウイルス活性成分に関しては、SDS の存在下、波長 260 nm における分光度測定により決める [Shabram ら, Human Gene Therapy 8, 453-465 (1997)]。非エンベロープウイルスの官能価は一般には、例えば感染性単位の数による、感染能力により決める [Lisky らの J. Virol. 72, 2022-2032 (1998)]。組み換えウイルスの場合は、標的細胞を感染後、蛍光、免疫学的方法(ELISA、RIAその他)、免疫酵素法(ウエスタン法その他)、染色法またはルミネセンス法により組み換え遺伝子の発現を評価することもできる。

【0063】

本発明に従った調製方法は上記のような非エンベロープウイルス特にアデノウイルスに応用される。後者は上記定義のような特徴を示すのが好ましい。

【0064】

本発明に従った方法の実施に適する各種細胞系の選択は広範に及び、かつ当業者の能力範囲以内のものである。選択される非エンベロープウイルスに適する細胞系が選択される。好ましい実施態様(複製-欠陥組み換えアデノウイルス)の場合、文献記載のようなアデノウイルスの欠損に適する相補系が使用される。これは、例えばヒト胚腎細胞から得られ、かつそのゲノム中に組み込まれたAD5 ゲノムの5'末端を含む 293 系等の、E1 機能を相補する系が有利である [Graham らの J. Gen. Virol. 36, 59-72 (1977)]。他の E1 相補系も入手できる [Imler らの Gene Therapy 7, 215-222 (1996); Fallaux 等の Human Gene Therapy 7, 215-222; Fallaux らの Human Gene Therapy 9, 1909-1917 (1998)]。このウイルスの欠失がE2 またはE4 にも適用される場合は、Brough ら [Virology 190, 624 (1992)]、Yeh ら [J. Virol 70, 559-565]、Kougliak および Graham [Human Gene Therapy 6, 1575-1586 (1996)]、および Lusky ら [J. Virol, 72, 2022-2032 (1998)] ならびに WO 94/28152 号および同第 97/04119 号公報に記載の相補系の使用が可能である。別法は問題非エンベロープウイルスの欠陥機能を少なくとも一部相補する「ヘルパーウイルス」と呼称する追加的ウイルス要素の使用に基づく。従来型ヘルパーウイルスは、問題ウイルスが相補を必要としない必須領域、または、その系により提供される必須領域を任意に欠いたウイルスゲノムからなる。一般的には、適当な細胞系中での発現に要する諸要素の制御下に置かれた、ウイルスの欠陥機能を修復するウイルス配列の移入により相補系は生じ得る。この観点で、好ましくは医薬としての見地から容認できる(ヒトに対する使用を意図した大量生産用に使用でき、かつ既知の病原特性を有しない)ヒトもしくは動物起源の、確立された細胞系から誘導できる。特にKB、HeLa、Vero (ATCC CCL-81)、BHK (ATCC CCL-10)、A 549 (ATCC CCL-185)、MRC5 (ATCC CCL-171)、WI-38 (ATCC-CCL-75)、CHO、MDCKおよびMDBK細胞が挙げられる。また本発明の関連で適当な系は、一次細胞特にヒト胚から採取した網膜もしくは腎細胞由来のものである。ヒト胚腎細胞からの、網膜細胞からの(特にヒト胚網膜 HER)またはヒトがん腫(A549)から由

来した系から作られたものの使用が好ましい。

【0065】

また本発明は本発明に従った調製方法により得られたウイルス調製物ならびに本発明に従ったウイルス調製物で感染した真核細胞にも関する。細胞は好ましくは哺乳動物特にヒト細胞である。この細胞は一次もしくは腫瘍細胞であってもよく、かつ任意の起源特に造血器官（全能性幹細胞、白血球、リンパ球、単核細胞もしくはマクロファージ、その他）、心臓、肺、気管、肝臓、表皮、繊維芽細胞起源のものであってよい。本発明の調製物は、感染性エンベロープウイルスを本質的に含まない点において従来型調製物とは際立って区別される。

【0066】

本発明はまた、本発明記載のウイルス調製物または宿主細胞を含む組成物にも関する。上記ウイルス調製物は本発明に従った方法により調製された一種もしくは二種以上の非エンベロープウイルスを含む。同一族（異なった組み換え遺伝子を保有するアデノウイルス）または異なった族のものでもよい。上記組成物は、医薬として容認し得るピヒクルの少なくとも一種を含む医薬組成物である。

【0067】

本発明による組成物は、局所、非経口もしくは消化経路による従来型投与形態で製造できる。投与経路は多数が想定できる。例えば、胃内、皮下、心臓内、筋肉内、静脈内、動脈内、脈管内、腹腔内、鼻内、膀胱内経路が想定できる。後者3例の実施態様では、エアゾールもしくは吸入による投与が有利である。投与は単回投与または一定期間を隔てた後の1回もしくは数回で投与が実施されてよい。投与経路および適切なウイルスは例えば個人、病理、移入されるべき問題遺伝子、投与経路等の各種パラメーターに応じて変わる。指針としてアデノウイルス粒子に基づく調製物は 10^4 から 10^{14} p f u (plaque forming units; プラーク形成単位) の用量形態で処方でき、有利には 10^5 から 10^{13} p f u、好ましくは 10^6 から 10^{12} p f u で処方できる。

【0068】

また上記配合中には、医薬として容認し得る希釈物質、アジュバントまたは賦形剤、ならびに可溶化剤、安定剤および保存料が包含される。好ましい組成物は注射用形態のものである。このものは、水性、塩類溶液（リン酸塩、モノナトリウム塩、ジナトリウム塩、マグネシウム塩、カリウム塩その他）、または等張性溶液として処方できる。特許出願第W O 第 98/02522 号に記載の処方用緩衝液は特に好適である。このものは、使用直前に適当な希釈物質を用いて再調製し得る液状もしくは乾燥形態（粉末、凍結乾燥品および他）の単回用量もしくは多回用量の形態で提供できる。

【0069】

一層詳しくは本発明に従った組成物は、遺伝子治療（免疫治療を包含する）による疾病の予防的もしくは治療的処置を意図したものであり、かつ一層具体的には増殖性疾病（がん、腫瘍、異形成、その他）、感染性疾病および特にウイルス性疾病（BおよびC型肝炎ウイルス、HIV、ヘルペス、レトロウイルス、その他）、遺伝性疾病（嚢胞性繊維症、ジストロフィン、血友病、当尿病、その他）および心欠陥疾病（再狭窄、虚血、脂肪血症異常 (dyslipaemia)、その他）を意図したものである。

【0070】

本発明はまた、細胞中もしくは宿主生物中における問題遺伝子の移入および発現を意図した医薬調製のための、本発明に従った宿主細胞のウイルス調製物、組成物または医薬組成物の治療的もしくは予防的使用に関する。一層具体的にはこの医薬は遺伝子治療による疾病の治療を意図する。最初の可能性によれば、このものは *in vivo* で（例えば静脈注射による腫瘍中への、エアゾールによる肺中への、適当なプローブ手段による血管系への）直接投与ができる。Ex vivo での接近法の採用も可能であり、この接近法中には、患者から細胞（骨髄幹細胞、末梢血液リンパ球細胞、筋細胞、およびその他）の取り出し、これを従来技法に従って任意の増幅工程後に *in vitro* で患者に移入または感染、および任意の増幅工程後の患者への再投与が包含される。多くの病理学的症状の予防と治療が想起で

10

20

30

40

50

きる。好ましい用途は、がん、腫瘍、および好ましく細胞増殖に起因する疾病の予防または治療からなる。想定可能な応用例のなかでも、乳房、子宮（特にパピローマウイルスにより誘発されるもの）、前立腺、肺、膀胱、肝臓、結腸、膵臓、胃、食道、喉頭、中枢神経系および血液系（リンパ腫、白血病、およびその他）のがんを挙げることができる。また心血管疾病の場合、例えば導管壁の平滑筋細胞の増殖（再発狭窄症）の抑制または遅延にも有用である。最後に、感染性疾病については、AIDS への適用も想定できる。

【0071】

本発明はまた、本発明に従ったウイルス調製物、宿主細胞または組成物を生物、またはこの種の処置を要する宿主細胞中に投与することを特徴とする、遺伝子治療による疾病の治療方法にも拡張される。

【0072】

【実施例】

次に実施例により本発明を説明するが、その結果として限定はされない。

この組み換えアデノウイルスは Chatier らの (1996, J. Virol. 70, 4805-4810) に記載の相同組み換え技法により構築された。使用し構築体は一般的な遺伝子工学的技法および分子クローン化技法 [詳細は Maniatis らの Laboratory Manual (1989), Cold Spring Harbor, Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY または最新版] に従って生成させ、市販キット使用の場合は製造メーカーの指示に従った。クローン化工程は E. Coli 5k (hsdR, mcrA)、DH5 α [(recA1, endA1, hodR17 (r-m-), supE44 thi-1, gyrA (nalr)] または NM522 (supE, thi, Δ (lac-proAB), Δ hsd5, (r-m-) (F=proAB), lacI^q、Z Δ M15) 株を使用し、また相同組み換え工程は E. Coli BJ 5183 株 (Hanahan, 1983, J. Mol. Biol. 166, 557-580) を使用する。制限部位修復の場合の使用技法は、E. Coli DNA ポリメラーゼ I (Klenow, Boehringer Mannheim) の大きなフラグメントを用いて突出 5' 末端を充填することからなる。この DNA は「Gene Clean II^R」DNA 精製キット (Bio101 Inc.) を用いて精製した。さらに、各種構築体に用いたアデノウイルスゲノムフラグメントは、参照数字 M73260 として Gene データバンクに開示のように Ad5 ゲノムのヌクレオチド配列中のそれらの位置に従って正確に示してある。

【0073】

細胞生物学については、当業者に公知の標準技法に従って細胞を移入または形質導入および培養処理する。使用細胞系は 293 (ATCC CRL-1573)、A549 E1+ (WO 第 94/28152 号) および 293-E40RF6+7 [Lusky らの J. Virol. 72 2022-2032 (198)] である。他の細胞系も使用できることは理解される。この細胞を、1 mM グルタミン、1 % アミノ酸 (Gibco BRL)、40 μ g/l のゲンタマイシンおよび 10 % ウシ胎児血清 (FCS, Gibco, BRL) で補給した DMEM 培地 (Dulbecco's Modified Eagle Medium, Gibco BRL) 中の 5 % CO₂ 強化湿気雰囲気中、37 °C の培地中に維持する。この細胞は細胞培養反応器中で生成させることもできる。細胞は従来型技法 (リン酸カルシウム沈殿法他) に従って移入処理をする。感染単位 (i.u.) または全ウイルス粒子力価は既知技法 [Lusky らの J. Virol. 72, 2022-2032 (198)] に従って測定して決める。

【0074】

次の実施例は、マーカー遺伝子または治療用遺伝子を発現する組み換えアデノウイルスを用いて実施した。これらは Ad5 血清型由来であり、次の構造を有する；

【0075】

- AdTG6297 は、E1 機能 (nt 459 から 3328 の欠失) および E3 機能 (nt 28592 から 30470 に伸長する XbaI フラグメントの欠失) に欠陥のある第 1 世代アデノウイルスベクターであり、このゲノム中へ E1 領域の置換体として、GFP タンパク (green fluorescent protein ; 緑色蛍光タンパク質の略) をコードするマーカー遺伝子の発現用セットを挿入する。後者は、蛍光照射による光励起 (485 nm) と反応し、蛍光強度はフィルター (535 nm) の手段により測定される。一層詳しくは、このカセットは CMV プロモーターを含み、次いでキメライントロンが続く、この配列は GFP タンパク質および SV 40 ウイルス polyA をコードする。このイントロン配列はプラスミド pCI (Promega Corp, p

10

20

30

40

50

CI 哺乳類発現ベクター E1731) から単離され、かつヒト β - グロビン遺伝子のイントロン 1 のスプライス供与体部位ならびに分枝点およびマウス免疫グロブリンに対する遺伝子のスプライス受容体部位を含む。上記ウイルス粒子は、E1 相補系 (293 または A549 E1+) 中へのベクター AdTG6297 の移入により生成され、および許容系 (相補系 E1) 上への連続的通過により修飾される。

【 0 0 7 6 】

- ベクター AdTG5643 は E1 (nt 459 から 3328)、3 (nt 28592 から 30470) および E4 (nt 32994 から 34998) 領域が欠失され、かつヒト治療用 CFTR 遺伝子を発現する第 2 世代ベクターである。この発現カセットは CMV 初期プロモーター、CFTR cDNA およびウサギ β - グロビン遺伝子の poly A からなり、かつ上記欠失 E1 配列の代わりに挿入される。上記ウイルス粒子はベクター AdTG5643 の E1 および E4 (293-E4ORF6+7) 相補系中への移入により生成され、かつウイルス株は許容系 (相補 E1 および E4) 上への連続通過により構築される。

10

【 0 0 7 7 】

- ベクター AdTG13383 は E1 (nt 459 3511) および E3 (nt 28539 30470) 領域が欠失し、かつヒト治療用 IL2 遺伝子を発現するベクターである。E1 配列の代わりに挿入されるこの発現カセットは、CMV 初期プロモーター、pCI プラスミドから単離された合成イントロン、ヒト IL2 をコードする cDNA および poly A SV40 により構築される。ウイルス粒子は、E1 の相補系に pTG13383 ベクター を移入して生成され、かつウイルス株は許容系 (相補 E1) 上への連続通過により構築される。

20

【 0 0 7 8 】

(実施例 1) : 相補細胞からのウイルスの調製

細胞密度 2.5×10^5 cells/cm² が得られるまで、A549-E1+ 細胞を培養皿中で培養し、次いで MOI 速度約 3 で AdTG6297 の原液を感染させる。感染後 72 時間で感染細胞を収集し、低速で遠心分離する。無血清培地約 600 ml 中にペレットを取り上げる。得られたウイルス調製物は容量約 20 l に該当する。

【 0 0 7 9 】

回転速度 4200 回 / 分に設定した「Silverson」型ホモジナイザー (L4R-Silverson) の 7 から 10 分間の機械的作用に処する細胞破壊後、細胞内ウイルスが放出される。

【 0 0 8 0 】

この段階では、細胞破壊後のゲノム DNA 放出が原因でウイルス調製物は著しく粘性がある。ベンゾナーゼの作用を最高にする目的の緩衝液であって、かつ「Tris」100 mM、MgCl₂ 4 mM、4 % スクロース (pH = 8.5) からなる緩衝液に、可溶化剤「Tween 80」(Merck 参照数字 8-22187-1000) を添加した液 1 容量を上記ウイルス調製物中に添加する。ベンゾナーゼ 50 U / ml (Merck 参照数字 101697) の添加に先立ち、混合物を室温で攪拌し、攪拌下に室温で 2 時間反応を継続する。

30

【 0 0 8 1 】

このように処理したウイルス調製物は次いでデプスフィルターにより連続 4 段階で清澄化する。最初の濾過は、8 μ m フィルター (Sartorius 5591301 P5--00) 上で、次いで 5 μ m フィルター (Sartorius 5591342 P5--00) 上で、次に 3 から 0.8 μ m フィルター (Sartoclean CA カプセル 5621304E9-00-A) 上で、さらに 0.8 から 0.65 μ m フィルター (Sartoclean CA カプセル 5621305G9-00-A) を通じて 4 回目の濾過を行う。

40

【 0 0 8 2 】

エンベロープウイルスの不活性化工程は、最終濃度 0.3 % の TNBP の作用により実施する。この目的には、2 mM の MgCl₂、2 % スクロース、350 mM の NaCl および 0.6 % TNBP (Aldrich 24-049-4)、pH 8.5 を含む 50 mM 「Tris」緩衝溶液中、容量 / 容量で上記濾液を希釈する。一層濃厚な緩衝溶液 (50 mM の「Tris」、2 mM の MgCl₂、2 % スクロース、1.82 M の NaCl、および 3 % TNBP、pH = 8.5) の 9 容量を上記ウイルス調製物に対して添加することも可能である。使用塩類溶液条件 (最終 250 mM の NaCl) はイオン交換クロマトグラフィーに対する平衡条件

50

に対応することに注意されたい。TNBP / 「Tween 80」の作用は、攪拌下に (5 0 0 r p m) 室温で3時間、または4 で4時間継続する。

【 0 0 8 3 】

イオン交換ガスクロマトグフイー工程では、2 m M の $M g C l _ 2$ 、2 % スクロース、2 5 0 m M の $N a C l$ 、 $p H = 8 . 5$ を含む「Tris」緩衝溶液 5 0 m M を用いて予め平衡化した、フラクトゲル MED DEAE (Merck, 参照数字 1,16883) を含むカラム上に上記不活性化ウイルス調製物を負荷する。平衡緩衝液で濯ぎ、支持体上に吸収された諸成分を、増加塩濃度 ($N a C l$ 3 0 0 m M 、3 5 0 m M 、4 0 0 m M 、および他) の存在下に上記緩衝液で溶離する。流速 3 0 から 1 0 0 c m / 時間、好ましくは 5 0 c m / 時間が適用される。異なった溶離画分を 2 6 0 および 2 8 0 n m で吸光度測定により肉視する。一般的には、2 8 0 n m のみで検出される上記諸タンパク質は 3 0 0 m M の $N a C l$ を含む緩衝溶液で溶離される。第 2 の溶離ピーク (2 6 0 および 2 8 0 n m で検出される) 中には、塩類濃度 3 5 0 m M で溶離される問題アデノウイルスが含まれる。1 . 5 M の $N a C l$ の存在下にカラムを再生する。0 . 5 N の $N a O H$ を通過させてフラクトゲルを定期的に衛生的にする。

10

【 0 0 8 4 】

次いでウイルス画分を、2 m M の $M g C l _ 2$ 、2 % スクロース、 $p H = 8 . 5$ を含む 2 5 m M の「Tris」緩衝溶液で予め平衡化した、「Toyopearl ゲル HW-65F (Tosohaas, 参照数字 43304 または 07465) または 65S (Tosohaas, 参照数字 43354 または 07467) または「Sephacryl S400HR (Pharmacia, 参照数字 17-0609-10) を含むカラム上に負荷する。注入されるウイルス調製物容量は一般的にはゲル濾過カラム容量の 5 から 2 0 % であり、適用流速は 5 から 1 0 0 c m / 時間の範囲で変わるが、好ましくは 1 0 から 5 0 c m / 時間である。2 8 0 n m における吸光度測定によりモニターされる溶離プロフィールによれば、アデノウイルスピークはカラムを去る際に得られる最初のピークである。

20

【 0 0 8 5 】

次の工程は、配合用緩衝溶液中に包装できるように、ウイルス調製物を透析濾過することからなる。このためには、ウイルス画分を集合し、全ウイルス粒子および感染性単位力価をアリコートについて測定する。ウイルス力価が充分であれば、配合用緩衝溶液でこれを希釈し、0 . 2 2 μm フィルター (Sartolab P20, Sartorius 参照数字 18053D) 上で滅菌濾過し、次いで用量単位に分ける。力価が低すぎる場合は、例えば「BioMax PES (Millipore 参照数字 PXB300C50) および PLCKM (Millipore 参照数字 PXC300C50) カートリッジを用いて切線方向限外濾過および / または透析濾過により予め濃縮する。

30

【 0 0 8 6 】

GFP マーカーを発現する AdTG6297 のウイルス調製物を用いて実施した代表的実験のウイルス力価結果は次のようである :

【 0 0 8 7 】

工程	全 i u × 10 ¹¹	収率 (%)
開始	35	100
ベンゾナーゼ	81.6	233
濾過	48.2	138
不活性化 t 0	110	314
不活性化 t 4時間	154	440
クロマトフラクトゲル -DEAE (Flow through)	14.8	
溶離 NaCl 350mM	30	85

- i u : 感染性単位の数を示す。

- Flow through はカラム上に残らない物質、したがって直接溶離される物質を示す。
不活性化工程期間中のアデノウイルス力価は3から4倍も増加することは、溶媒存在下のウイルス崩壊により説明できる。

【0088】

(実施例2) : 細胞培地からのウイルスの調製

細胞および培地上澄み液(容量約20 l)を感染後72時間で収集し、かつ全部を破壊工程に処する以外は、実施例1を繰り返す。

【0089】

(実施例3) : エンベロープウイルスウイルスの不活性化

3.1 レトロウイルス製剤の有効性

本発明において提案される不活性化方法の効率を、酵素β-ガラクトシダーゼをコードする LacZ マーカーを発現する組み換えレトロウイルスについて評価する。293細胞の20 F500培地を調製する。3000 rpm で8分間の遠心分離後、無血清培地中に細胞を取り上げる。容量25 mlの調製物中には 3×10^7 cells/mlで細胞が含まれる。この細胞を「Silverman」中で破壊させ、次いで3500 rpm で10分間遠心分離に処して破片を除去する。次いで調製物を二つに分けるが、最初の半分はβ-シクロデキストリンの不在下にベンゾナーゼ緩衝溶液(100 mM「Tris」、4 mMのMgCl₂、4%スクロース、pH = 8.5)中に容量/容量で希釈し、一方、次の半分は3%β-シクロデキストリン(最終1.5%)の存在下に同様に処理する。5 μm(参照数字 17594Q)、1.2 μm(参照数字 17593Q)および0.8 μm(参照数字 17592Q)の「Minisart」フィルター(Sartorius)上のカスケード濾過により試料を清澄化する。次いで各試料を、50 mM「Tris」、2 mMのMgCl₂、2%スクロース、450 mMのNaCl、0.6% TNBP および2%「Tween 80」(pH = 8.5)の1容量で処理する。レトロウイルス粒子は、最終濃度 1.5×10^6 感染粒子/mlで導入する。レトロウイルス力価は、4 または室温のいずれかで、保温15秒、20分、1時間、2時間および4時間後に測定し決める。滴定は標準方法論(例えば、米国特許第 5,747,323号公報参照)に従って青色細胞を計数して行う。

【0090】

結果を次に要約する：

処理前： 1.5×10^6 レトロウイルス粒子/ml、

室温、+β-シクロデキストリン、保温15秒： $< 1 \times 10^3$ /ml、

室温、-βシクロデキストリン、保温15秒： 1×10^4 /ml

4、+β-シクロデキストリン、保温15秒： $< 1 \times 10^3$ /ml

【0091】

10

20

30

40

50

保温 15 秒を超えると、レトロウイルス力価は検出可能限度 (10^3 感染性粒子 / ml) 未満である。この結果は、レトロウイルスの感染性が 15 秒で 1 / 2 (対数単位) にまで低減することを示す。 β - シクロデキストリンの存在は、これがレトロウイルス不活性化を追加的に 10 倍も増進するので有利である。

【0092】

3.2 BVD ウイルスにより汚染されたアデノウイルス調製物の有効性

実施例 1 で用いたプロトコルに従って小規模 (18 ml) アデノウイルス調製物を調製する。深フィルターによる 4 回連続工程による清澄化後、BVD の粒子溶液 2 ml を導入する。次いで、0.3% TNBT および 1% 「Tween 80」の最終濃度の存在下に不活性化工程を実施する。BVD 中の力価および感染性アデノウイルス粒子の力価は室温保温の約 0 分、15 分、60 分および 120 分後に測って決める。

10

【0093】

本発明者らは BVD ウイルスの不活性化物を得た：

時間	力価 ($\log_{10} \text{TCID}_{50}$)
T 0	5.88
T 5秒	5.27
T 15分	3.87
T 60分	<2.57
T 120分	1.18

20

すなわち不活性化後 2 時間で $4.7 \log_{10}$ 単位の低減といえる。

【0094】

(実施例 4)：相補細胞からのウイルスの調製

E1 アデノウイルス機能の場合の相補細胞を、濃度 1×10^6 細胞 / ml になるまで「Excell 525」(JRF Biosciences) 培地中のバイオ反応器で培養し、次いで MOI 速度約 3 で AdTG13383 の原液の当量容量を用いて感染させる。感染細胞を感染後 72 時間で収集する。培地上澄み液 (容量約 20 l) および全部を、精製されるべき粗製ウイルス標取得の目的で破壊工程に直接処する。

30

【0095】

上記細胞内ウイルス粒子は、回転速度 50 Hz (速度 8.1) に設定した「Silverson」型ホモジナイザー (275 UHLS) の 7 から 10 分の機械的作用に処する細胞破壊後に放出される。

【0096】

清澄化工程は、まず 8 μ m フィルター (Sartopure 300PP25592501)、次いで 5 μ m フィルター (Sartopure 300 PP35592542)、最終的に 3 から 0.8 μ m フィルター (Sartorius, Saltoclean CA カプセル 5621304E9-00-A) の低減孔密度フィルター上で連続的に濾過することにより実施する。

40

【0097】

この清澄化ウイルス調製時に、100 mM 「Tris」- HCl、4 mM の MgCl_2 、4% サッカロース、 $\text{pH} = 8.5$ からなり、さらに「Tween 80」(Merck 参照数字 8-221 87-1000) を含む緩衝溶液の一定量を濃度 2% で添加する。10 U / ml (Merck 参照数字 101697) 中のベンゾナーゼの添加に先立ち、この混合物を室温で攪拌し、2 時間攪拌下 (500 rpm) に室温で反応を継続する。上記清澄ウイルス調製物も、ベンゾナーゼ (DNA の分解工程) および TNBP / 「Tween 80」(エンベロープウイルスの不活性化) の同時作用に処することもできる。このために、上記調製物中に最終濃度 0.3% の TNBP (AI

50

drich 24-049-40) を添加する。TNBP / 「Tween 80」の作用を攪拌下に継続する (5 0 0 r p m) 。この方法の各必須工程後に測定された感染性単位における力価を次表に要約する。

【 0 0 9 8 】

工程	収率 U I - % (全)	収率 U I - % (工程)
細胞破壊	1 0 0	—
清澄化	9 6	9 6
Dnase / 不活性化	1 3 0	1 3 5

10

不活性化工程間のアデノウイルス力価の 1 . 3 倍増加は、溶媒の存在下におけるウイルスの崩壊により説明できる。

【 0 0 9 9 】

(実施例 5) : V S V ウイルスにより汚染されたアデノウイルス調製物の有効性
 実施例 4 で用いたプロトコルに従ってアデノウイルス調製物を小規模に調製する。デプスフィルターによる破壊および清澄化工程後に、VSV 粒子溶液 (ATCC VR-158; $9 . 9 \log _{10}$ TCTID50) を、このアデノウイルス調製物 ($2 . 5 \times 10^{10}$ u i) 中に導入する。次いで、最終濃度 0 . 3 % TNBP および 1 % 「Tween 80」の存在下に、ベンゾナーゼ (Merck 参照数字 1016797) 1 0 U / m l の存在下、核酸分解工程と同時に不活性化工程を実施する。感染性 VSV 力価は既知 (Virology Methods Manual 1996, 35-40 頁、Ed. Mahy and Kangro, Academic Press Ltd. London) 技法に従って VERO 細胞について、保温時間 0 分、3 0 分、6 0 分および 1 2 0 分後に室温で測定する。

20

【 0 1 0 0 】

時間	力価 ($\log _{10}$ T C I D 5 0 / m l)
T 0	9 . 2
T 1 5 分	6 . 8
T 6 0 分	5 . 3
T 1 2 0 分	1 . 7

30

すなわち、不活性化 2 時間後、 $7 . 5 \log _{10}$ 単位の低減である。

【 0 1 0 1 】

全体として、本発明に従った方法は感染性を阻害することなく、かつ、1 0 0 % を超す収率で組み換えアデノウイルス調製物のエンベロープウイルスの不活性化を可能にするを示す。

40

フロントページの続き

(72)発明者 デイビッド、ガイヤック

フランス国ティエ、アベニュー、ド、ベルサイユ、83、レジダンス、プラン、シュド、11

(72)発明者 ミシェル、コール

フランス国ストラスブール、ケ、サン、トーマス、5

審査官 三原 健治

(56)参考文献 特開昭60-051116(JP,A)

米国特許第03962421(US,A)

特開平03-218322(JP,A)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12N 7/00-7/08

CAPLUS/BIOSIS/MEDLINE/EMBASE(STN)

WPI