

	<b>(19) 대한민국특허청(KR)</b> <b>(12) 공개특허공보(A)</b>	<b>(11) 공개번호</b> 10-2014-0024406 <b>(43) 공개일자</b> 2014년02월28일
<b>(51) 국제특허분류(Int. Cl.)</b> <b>C12N 7/02</b> (2006.01) <b>B01D 15/08</b> (2006.01)		<b>(71) 출원인</b> <b>온콜리틱스 바이오테크 인코포레이티드</b> 캐나다 알버타 티2엔 1엑스7 칼개리 켄싱턴 크레 센트 엔.더블유. 1167 스위트 210
<b>(21) 출원번호</b> 10-2013-7031292		<b>(72) 발명자</b> <b>코페이 매튜 씨</b> 캐나다 알버타 티2엔 3엘4 칼개리 노쓰웨스트 보 우니스 로드 2231
<b>(22) 출원일자(국제)</b> 2012년04월27일 심사청구일자 <b>없음</b>		<b>해거만 엘리슨</b> 캐나다 알버타 티4씨 1에이2 코크란 알알2 박스 7 사이트 11 (뒷면에 계속)
<b>(85) 번역문제출일자</b> 2013년11월26일		<b>(74) 대리인</b> <b>제일특허법인</b>
<b>(86) 국제출원번호</b> PCT/CA2012/000406		
<b>(87) 국제공개번호</b> WO 2012/145837 국제공개일자 2012년11월01일		
<b>(30) 우선권주장</b> 61/480,561 2011년04월29일 미국(US)		

전체 청구항 수 : 총 34 항

(54) 발명의 명칭 **겔 침투 크로마토그래피를 이용한 바이러스의 정제방법**

### (57) 요약

본 명세서에서는 겔 침투 크로마토그래피를 이용해서 바이러스를 정제시키기 위한 용리 완충액 및 방법이 제공된다. 상기 방법은, 예를 들어, 겔 침투 크로마토그래피 칼럼으로부터 바이러스의 회수를 증가시키는데 있어서 유용하다. 이 방법에서 이용하기 위한 완충액은 히스티딘 또는 수크로스, 2가 양이온, 비이온성 세제 및 인산염 완충 식염수로부터 선택된 적어도 1종의 부형제를 포함한다.

(72) 발명자

**카파디아 록스나**

영국 레스터셔 엘리3 8에프에스 레스터 글렌필드  
트라이엄프 로드 36

**셀 사라**

캐나다 알버타 티2더블유 2티7 칼개리 사우스웨스트  
트 브룩미어 로드 5-310

---

## 특허청구의 범위

### 청구항 1

바이러스를 정제시키는 방법으로서,

겔 침투 크로마토그래피 칼럼을, 바이러스와 액체 담체를 포함하는 바이러스 제제와 접촉시키는 단계로서, 상기 바이러스는 상기 겔 침투 크로마토그래피 칼럼 상에 보유되는 것인, 상기 접촉시키는 단계; 및

적어도 1종의 부형제, 2가 양이온 및 인산염 완충 식염수를 포함하는 용리 완충액(elution buffer)을 이용해서 상기 겔 침투 크로마토그래피 칼럼으로부터 상기 바이러스를 회수하는 단계를 포함하되,

상기 적어도 1종의 부형제는 히스티딘 또는 수크로스를 포함하는 것인, 바이러스의 정제방법.

### 청구항 2

제1항에 있어서,

상기 액체 담체는 상기 용리 완충액인 것인, 바이러스의 정제방법.

### 청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서,

상기 적어도 1종의 부형제는 만니톨 또는 솔비톨 중 1종 이상을 포함하는 것인, 바이러스의 정제방법.

### 청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 2가 양이온은  $Mg^{2+}$ 인 것인, 바이러스의 정제방법.

### 청구항 5

제4항에 있어서,

$Mg^{2+}$ 는 염화마그네슘으로서 존재하는 것인, 바이러스의 정제방법.

### 청구항 6

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 인산염 완충 식염수는 1종 이상의 인산염과 1종 이상의 염화물염의 조합물을 포함하는 것인, 바이러스의 정제방법.

### 청구항 7

제6항에 있어서,

상기 1종 이상의 인산염은 인산수소이나트륨을 포함하는 것인, 바이러스의 정제방법.

### 청구항 8

제6항 또는 제7항에 있어서,

상기 1종 이상의 인산염은 인산이수소칼륨을 포함하는 것인, 바이러스의 정제방법.

### 청구항 9

제6항에 있어서,

상기 1종 이상의 염화물염은 염화나트륨을 포함하는 것인, 바이러스의 정제방법.

### 청구항 10

제6항 또는 제9항에 있어서,

상기 1종 이상의 염화물염은 염화칼륨을 포함하는 것인, 바이러스의 정제방법.

#### 청구항 11

제1항 내지 제10항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 용리 완충액은 비이온성 세제(non-ionic detergent)를 더 포함하는 것인, 바이러스의 정제방법.

#### 청구항 12

제11항에 있어서,

상기 비이온성 세제는 폴리솔베이트 80인 것인, 바이러스의 정제방법.

#### 청구항 13

제1항에 있어서,

상기 용리 완충액은 만니톨, 히스티딘, 솔비톨, 폴리솔베이트 80 및  $MgCl_2$ 를 포함하고, 상기 인산염 완충 식염수는 인산수소이나트륨, 인산이수소칼륨, 염화나트륨 및 염화칼륨을 포함하는 것인, 바이러스의 정제방법.

#### 청구항 14

제1항에 있어서,

상기 용리 완충액은 수크로스, 폴리솔베이트 80 및  $MgCl_2$ 를 포함하고, 상기 인산염 완충 식염수는 인산수소이나트륨, 인산이수소칼륨, 염화나트륨 및 염화칼륨을 포함하는 것인, 바이러스의 정제방법.

#### 청구항 15

제1항 내지 제14항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 용리 완충액 중에 상기 바이러스를 보존하는 단계를 더 포함하는, 바이러스의 정제방법.

#### 청구항 16

제1항 내지 제15항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 바이러스는 종양분해성 바이러스인 것인, 바이러스의 정제방법.

#### 청구항 17

제1항 내지 제16항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 바이러스는 비외피성 바이러스인 것인, 바이러스의 정제방법.

#### 청구항 18

제1항 내지 제17항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 바이러스는 레오바이러스인 것인, 바이러스의 정제방법.

#### 청구항 19

제18항에 있어서,

상기 레오바이러스는 포유류 레오바이러스인 것인, 바이러스의 정제방법.

#### 청구항 20

제19항에 있어서,

상기 포유류 레오바이러스는 인간 레오바이러스인 것인, 바이러스의 정제방법.

**청구항 21**

제20항에 있어서,

상기 인간 레오바이러스는 혈청형(serotype) 3 바이러스인 것인, 바이러스의 정제방법.

**청구항 22**

제21항에 있어서,

상기 혈청형 3 바이러스는 디어링 균주(Dearing strain)인 것인, 바이러스의 정제방법.

**청구항 23**

제18항에 있어서,

상기 레오바이러스는 재조합 또는 재편성 레오바이러스인 것인, 바이러스의 정제방법.

**청구항 24**

제18항에 있어서,

상기 레오바이러스는 IDAC #190907-01인 것인, 바이러스의 정제방법.

**청구항 25**

장치로서,

겔 침투 크로마토그래피 칼럼; 및

용리 완충액을 포함하되,

상기 용리 완충액은 적어도 1종의 부형제, 2가 양이온 및 인산염 완충 식염수를 포함하고,

상기 적어도 1종의 부형제는 히스티딘 또는 수크로스를 포함하는 것인, 장치.

**청구항 26**

제25항에 있어서,

상기 겔 침투 크로마토그래피 칼럼은 상기 완충액으로 평형화되는 것인, 장치.

**청구항 27**

제25항 또는 제26항에 있어서,

바이러스와 액체 담체를 포함하는 바이러스 제제를 더 포함하는, 장치.

**청구항 28**

용리 완충액으로서,

적어도 1종의 부형제;

2가 양이온;

비이온성 세제; 및

인산염 완충 식염수를 포함하되,

상기 적어도 1종의 부형제는 히스티딘 또는 수크로스를 포함하고,

상기 용리 완충액은 겔 침투 크로마토그래피 용리 완충액인 것인, 용리 완충액.

**청구항 29**

용리 완충액으로서,

수크로스;

MgCl<sub>2</sub>;

폴리솔베이트 80; 및

인산염 완충 식염수를 포함하되

상기 용리 완충액은 겔 침투 크로마토그래피 용리 완충액인 것인, 용리 완충액.

### 청구항 30

용리 완충액으로서,

만니톨;

히스티딘;

솔비톨;

MgCl<sub>2</sub>;

폴리솔베이트 80; 및

인산염 완충 식염수를 포함하되,

상기 용리 완충액은 겔 침투 크로마토그래피 용리 완충액인 것인, 용리 완충액.

### 청구항 31

겔 침투 크로마토그래피 칼럼으로부터 바이러스의 회수를 증가시키는 방법으로서,

겔 침투 크로마토그래피 칼럼을, 바이러스와 액체 담체를 포함하는 바이러스 제제와 접촉시키는 단계로서, 상기 바이러스는 상기 겔 침투 크로마토그래피 칼럼 상에 보유되는 것인, 상기 접촉시키는 단계; 및

적어도 1종의 부형제, 2가 양이온 및 인산염 완충 식염수를 포함하는 용리 완충액을 이용해서 상기 겔 침투 크로마토그래피 칼럼으로부터 상기 바이러스를 회수하는 단계를 포함하되,

상기 바이러스 회수가 인산염 완충 식염수로 용리된 바이러스의 회수보다 적어도 약 20% 더 많은 것인, 겔 침투 크로마토그래피 칼럼으로부터 바이러스의 회수를 증가시키는 방법.

### 청구항 32

제31항에 있어서,

상기 바이러스 회수는 인산염 완충 식염수로 용리된 바이러스의 회수보다 적어도 약 25% 더 많은 것인, 겔 침투 크로마토그래피 칼럼으로부터 바이러스의 회수를 증가시키는 방법.

### 청구항 33

제31항에 있어서,

상기 바이러스 회수는 인산염 완충 식염수로 용리된 바이러스의 회수보다 적어도 약 30% 더 많은 것인, 겔 침투 크로마토그래피 칼럼으로부터 바이러스의 회수를 증가시키는 방법.

### 청구항 34

제31항에 있어서,

상기 바이러스 회수는 인산염 완충 식염수로 용리된 바이러스의 회수보다 적어도 약 35% 더 많은 것인, 겔 침투 크로마토그래피 칼럼으로부터 바이러스의 회수를 증가시키는 방법.

**명세서**

## 기술 분야

### 우선권 출원에 관한 교차 참조

[0002] 본 출원은 미국 특허 가출원 제61/480,561호(출원일: 2011년 4월 29일)에 대한 우선권을 주장하며, 이 기초 출원은 참조로 그의 전문이 본 명세서에 병합된다.

[0003] 본 명세서에는, 겔 침투 크로마토그래피를 이용해서 바이러스를 정제시키기 위한 용리 완충액(elution buffer) 및 방법이 제공된다. 이 방법은, 예를 들어, 바이러스 제조 동안 겔 침투 크로마토그래피 칼럼으로부터 바이러스의 회수를 증가시키는데 유용하다.

## 배경 기술

[0004] 바이러스 제법은, 예를 들어, 겔 침투 크로마토그래피 등과 같은 크로마토그래피 방법을 이용해서 바이러스를 정제하는 단계들을 포함한다. 크로마토그래피 방법들이 바이러스를 정제시키는 효과적인 방법이지만, 이들 방법은 크로마토그래피 칼럼 상에서 바이러스의 상당한 소실을 초래할 수 있다. 그 결과, 이러한 방법을 이용하는 바이러스 제조 비용은 상당할 수 있다.

## 발명의 내용

[0005] 본 명세서에 기재된 바이러스를 정제시키는 방법은 겔 침투 크로마토그래피 칼럼을, 바이러스와 액체 담체를 포함하는 바이러스 제제와 접촉시키는 단계(여기서, 바이러스는 겔 침투 크로마토그래피 칼럼 상에 보유됨), 및 적어도 1종의 부형제, 2가 양이온 및 인산염 완충 식염수를 포함하는 용리 완충액을 이용해서 겔 침투 크로마토그래피 칼럼으로부터의 바이러스를 회수하는 단계를 포함한다. 이들 방법에 있어서, 적어도 1종의 부형제는 히스티딘 또는 수크로스를 포함한다. 액체 담체는 선택적으로 용리 완충액이다. 선택적으로, 적어도 1종의 부형제는 만니톨 또는 솔비톨 중 1종 이상을 포함한다. 2가 양이온은 선택적으로  $Mg^{2+}$ 이다. 선택적으로,  $Mg^{2+}$ 는 염화마그네슘으로서 존재한다.

[0006] 인산염 완충 식염수는 1종 이상의 인산염과 1종 이상의 염화물염의 조합물을 포함할 수 있다. 선택적으로, 1종 이상의 인산염은 인산수소이나트륨(disodium phosphate) 및/또는 인산이수소칼륨(potassium dihydrogen phosphate)을 포함한다. 선택적으로, 1종 이상의 염화물염은 염화나트륨 및/또는 염화칼륨을 포함한다.

[0007] 용리 완충액은, 예를 들어, 폴리솔베이트 80 등과 같은 비이온성 세제(non-ionic detergent)를 더 포함할 수 있다. 선택적으로, 용리 완충액은 만니톨, 히스티딘, 솔비톨, 폴리솔베이트 80 및  $MgCl_2$ 를 포함하고, 인산염 완충 식염수는 인산수소이나트륨, 인산이수소칼륨, 염화나트륨 및 염화칼륨을 포함한다. 선택적으로, 용리 완충액은 수크로스, 폴리솔베이트 80 및  $MgCl_2$ 를 포함하고, 인산염 완충 식염수는 선택적으로 인산수소이나트륨, 인산이수소칼륨, 염화나트륨 및 염화칼륨을 포함한다.

[0008] 본 명세서에 기재된 바이러스 제제 중에 포함된 바이러스는, 예를 들어, 종양분해성 바이러스(oncolytic virus) 및/또는 비외피성 바이러스(non-enveloped virus)일 수 있다. 본 명세서에서는 바이러스가 포유류 레오바이러스 등과 같은 레오바이러스인 바이러스 제제가 제공된다. 포유류 레오바이러스의 일례는 인간 레오바이러스, 예컨대, 혈청형(serotype) 3 바이러스(예컨대, 디어링 군주 레오바이러스(Dearing strain reovirus)) 등이다. 레오바이러스는 선택적으로 재조합 레오바이러스, 재편성(reassorted) 레오바이러스 또는 IDAC #190907-01이다. 이들 방법에 따라 제조된 정제된 바이러스 조제물(purified viral formulation)이 또한 본 명세서에 기재되어 있다. 본 명세서에 기재된 방법은 용리 완충액 중에 바이러스를 보존하는 단계를 더 포함할 수 있다.

[0009] 또한, 본 명세서에서는 겔 침투 크로마토그래피 칼럼 및 용리 완충액을 포함하는 장치가 제공된다. 용리 완충액은 적어도 1종의 부형제, 2가 양이온 및 인산염 완충 식염수를 포함하고, 적어도 1종의 부형제는 히스티딘 또는 수크로스를 포함한다. 겔 침투 크로마토그래피 칼럼은 선택적으로 완충액으로 평형화된다. 선택적으로, 상기 장치는 바이러스와 액체 담체를 포함하는 바이러스 제제를 더 포함한다.

[0010] 또, 본 명세서에는 겔 침투 크로마토그래피 칼럼으로부터 용리된 바이러스 및 겔 침투 크로마토그래피 매질과 접촉하는 용리 완충액을 포함하는 정제된 바이러스 조제물이 제공된다. 몇몇 예에서, 용리 완충액은 적어도 1종의 부형제, 2가 양이온 및 인산염 완충 식염수를 포함하고, 적어도 1종의 부형제는 히스티딘 또는 수크로스를 포함한다.

[0011] 겔 침투 크로마토그래피 용리 완충액이 또한 본 명세서에서 제공된다. 몇몇 예에서, 용리 완충액은 적어도 1종의 부형제, 2가 양이온, 비이온성 세제 및 인산염 완충 식염수를 포함할 수 있다. 이들 예에서, 적어도 1종의 부형제는 히스티딘 또는 수크로스를 포함하고, 용리 완충액은 겔 침투 크로마토그래피 용리 완충액이다. 선택적으로, 용리 완충액은 수크로스,  $MgCl_2$ , 폴리술베이트 80 및 인산염 완충 식염수를 포함한다. 선택적으로, 용리 완충액은 만니톨, 히스티딘, 술비톨,  $MgCl_2$ , 폴리술베이트 80 및 인산염 완충 식염수를 포함한다.

[0012] 겔 침투 크로마토그래피 칼럼으로부터 바이러스의 회수를 증가시키는 방법이 본 명세서에서 제공된다. 이 방법은, 겔 침투 크로마토그래피 칼럼을, 바이러스와 액체 담체를 포함하는 바이러스 제제와 접촉시키는 단계(여기서, 상기 바이러스는 상기 겔 침투 크로마토그래피 칼럼 상에 보유되어 있음), 및 적어도 1종의 부형제, 2가 양이온 및 인산염 완충 식염수를 포함하는 용리 완충액을 이용해서 겔 침투 크로마토그래피 칼럼으로부터 바이러스를 회수하는 단계를 포함하되, 상기 적어도 1종의 부형제는 히스티딘 또는 수크로스를 포함한다. 이들 방법에서, 바이러스 회수(viral recovery)는 인산염 완충 식염수로 용리된 바이러스의 회수보다 적어도 약 20% 더 많다. 선택적으로, 바이러스 회수는 인산염 완충 식염수로 용리된 바이러스의 회수보다 적어도 약 25% 더 많다(예컨대, 인산염 완충 식염수로 용리된 바이러스의 회수보다 적어도 약 30% 더 많거나 또는 인산염 완충 식염수로 용리된 바이러스의 회수보다 적어도 약 35% 더 많다).

[0013] 하나 이상의 양상의 상세는 이하에 수반되는 상세한 설명에 기술되어 있다. 기타 특징, 목적 및 이점은 상세한 설명 및 특허청구범위로부터 명백할 것이다.

### 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0014] 본 명세서에는 겔 침투 크로마토그래피를 이용해서 바이러스를 정제시키기 위한 용리 완충액 및 방법이 기재되어 있다. 겔 침투 크로마토그래피(즉, 겔 여과 또는 크기 배제 크로마토그래피)는 혼합물의 성분들을 그들의 크기에 따라서 분리하는데 이용되는 확산 제어 방법이다. 본 명세서에 기재된 겔 침투 크로마토그래피 용리 완충액은, 예를 들어, 바이러스 제조 동안 겔 침투 크로마토그래피 칼럼으로부터 바이러스의 회수를 증가시키는데 이용될 수 있다. 본 명세서에 기재된 용리 완충액은 1종 이상의 부형제, 2가 양이온, 비이온성 세제 및 인산염 완충 식염수를 포함한다.

[0015] 본 명세서에서 제공되는 용리 완충액은 적어도 1종의 부형제(예컨대, 1, 2, 3, 4종 또는 그 이상의 부형제)를 포함한다. 용리 완충액 중에 이용하기 위한 부형제로는, 당 및 아미노산을 포함하지만 이들로 제한되는 것은 아니다. 본 명세서에 기재된 용리 완충액에 이용하기 위한 적절한 당의 예로는 수크로스를 포함한다. 본 명세서에 기재된 용리 완충액에 이용하기 위한 적절한 당의 예로는 히스티딘을 포함한다. 선택적으로, 본 명세서에 기재된 용리 완충액은 히스티딘 또는 수크로스 중 적어도 1종을 포함한다.

[0016] 본 명세서에 기재된 용리 완충액에 이용하기 위한 적절한 당으로는, 예를 들어, 단당류 및 이당류를 포함한다. 몇몇 예에서, 용리 완충액은 수크로스, 만니톨, 술비톨, 또는 이들의 조합물을 포함한다. 적절한 당의 추가의 예로는, 락토스, 텍스트로스, 프럭토스, 글루코스 및 말토스를 포함한다. 선택적으로, 용리 완충액에는 트레할로스가 실질적으로 없다. 실질적으로 없다면, 용리 완충액이 해당 용리 완충액의 중량에 의거해서 트레할로스를 0.1% 미만, 0.01% 미만, 0.001% 미만, 0.0001% 미만 또는 0% 포함할 수 있다는 것을 의미한다. 몇몇 예에서, 용리 완충액에는 수크로스 이외의 당이 실질적으로 없다(즉, 용리 완충액에는 비-수크로스 폴리올류가 실질적으로 없다).

[0017] 용리 완충액에 이용하기 위한 당은 1종의 당 또는 2종 이상의 당의 조합물을 포함할 수 있다. 예를 들어, 용리 완충액은 해당 완충액 중에 존재하는 당으로서 수크로스를 포함할 수 있다. 선택적으로, 용리 완충액은 해당 완충액 중에 존재하는 당(들)으로서 만니톨 또는 술비톨 중 1종 이상(예컨대, 만니톨과 술비톨의 조합물)을 포함할 수 있다. 용리 완충액 중에 존재하는 당(들)의 총 농도는 용리 완충액의 중량에 의거해서 10중량% 이하일 수 있다. 예를 들어, 당의 총 농도는 용리 완충액의 중량에 의거해서 7.5중량% 미만(예컨대, 용리 완충액의 중량에 의거해서 7.4중량% 미만, 7.3중량% 미만, 7.2중량% 미만, 7.1중량% 미만, 7중량% 미만, 6중량% 미만, 5중량% 미만, 4중량% 미만, 3중량% 미만, 2중량% 미만 또는 1중량% 미만)일 수 있다. 예를 들어, 수크로스는, 용리 완충액의 중량에 의거해서, 0.1중량% 내지 5중량%, 1중량% 내지 4.5중량%, 2중량% 내지 4중량%(예컨대, 3중량%)의 범위의 농도 또는 이 인용된 범위 내의 어떠한 양으로 용리 완충액 중에 존재할 수 있다. 선택적으로, 만니톨과 술비톨은, 용리 완충액의 중량에 의거해서, 7.5%(예컨대, 7%) 미만의 조합된 농도로 용리 완충액 중에 포함될 수 있다. 예를 들어, 당의 배합된 농도가 용리 완충액의 중량에 의거해서 7.5% 미만이 되도록, 만니톨은 0.01% 내지 7.4%(예컨대, 0.1% 내지 7%, 1% 내지 6%, 2% 내지 5% 또는 3% 내지 4%) 범위의 농도로 포함될



수 있고, 솔비톨은 0.01% 내지 7.4%(예컨대, 0.1% 내지 7%, 1 % 내지 6%, 2% 내지 5% 또는 3% 내지 4%) 범위의 농도로 포함될 수 있다.

[0018] 아미노산은 또한 본 명세서에 기재된 용리 완충액 중에 포함될 수 있다. 적절한 아미노산으로는, 예를 들어, 히스티딘, 아르기닌, 라이신, 메티오닌, 글루탐산 또는 이들의 혼합물을 포함한다. 1종 이상의 아미노산은 용리 완충액의 중량에 의거해서 5% 이하의 농도로 용리 완충액 중에 존재할 수 있다. 예를 들어, 아미노산의 농도는 용리 완충액의 중량에 의거해서 4.5% 이하, 4.0% 이하, 3.5% 이하, 3.0% 이하, 2.5% 이하, 2.0% 이하, 1.5% 이하, 1.0% 이하 또는 0.5% 이하일 수 있다.

[0019] 위에서 기재된 바와 같이, 2가 양이온이 또한 본 명세서에 기재된 용리 완충액에 포함된다. 용리 완충액에 이 용하기 위한 적절한 2가 양이온은 마그네슘 양이온(즉,  $Mg^{2+}$ )을 포함한다.  $Mg^{2+}$ 는  $MgCl_2$  등과 같은 염으로서 음이온과 조합하여 용리 완충액에 도입될 수 있다. 몇몇 예에서, 2가 양이온 도입 염은 수화물일 수 있다(즉, 2가 양이온을 완충액에 도입하는 염은 금속 중심에 결합된 물 분자를 포함할 수 있거나 또는 복합체로 결정화될 수 있다. 수화물은, 예를 들어, 1수화물, 2수화물, 3수화물, 4수화물, 5수화물, 6수화물 또는 7수화물일 수 있다. 예를 들어,  $Mg^{2+}$ 는  $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ 로서 용리 완충액에 도입될 수 있다. 선택적으로, 용리 완충액에는  $Zn^{2+}$ 가 실질적으로 없다. 2가 양이온은 0.01mM 내지 5mM 범위의 농도로 용리 완충액에 존재할 수 있다. 예를 들어,  $Mg^{2+}$ 는 0.1mM 내지 4.5mM, 0.5mM 내지 4mM, 1mM 내지 3mM(예컨대, 2mM) 범위의 농도로, 또는 상기 인용된 범위 내의 임의의 농도로  $MgCl_2$  또는  $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ 로서 바이러스 조제물에 존재할 수 있다. 선택적으로, 인산염 완충 식염수 성분을 배제한, 용리 완충액 중의 부형제에는, 1가 양이온염, 예컨대, 나트륨( $Na^+$ ), 리튬( $Li^+$ ), 칼륨( $K^+$ ) 및 암모늄( $NH_4^+$ ) 함유 염이 실질적으로 없을 수 있다.

[0020] 세제가 또한 본 명세서에 기재된 용리 완충액에 포함될 수 있다. 세제란 친수성 모이어티와 소수성 모이어티를 함께 가진 물질을 지칭한다. 본 명세서에 기재된 용리 완충액에 이용하기 위한 적절한 세제는 이온성 및 비이온성 세제를 포함한다. 몇몇 예에서, 폴리솔베이트 80은 용리 완충액 중에 비이온성 세제로서 선택적으로 포함된다. 1종 이상의 세제가, 용리 완충액의 중량에 의거해서 선택적으로 1중량% 미만의 양으로 용리 완충액 중에 존재할 수 있다. 예를 들어, 세제(들)가 0.5중량% 미만, 0.1중량% 미만 또는 0.05중량% 미만(예컨대, 0.01중량%)의 양으로 용리 완충액 중에 존재할 수 있다.

[0021] 선택적으로, 용리 완충액에는 카복실레이트가 실질적으로 없다. 카복실레이트의 예로는 숙시네이트 및 사이트레이트를 포함한다.

[0022] 위에서 기재된 바와 같이, 본 명세서에서 제공되는 용리 완충액은 인산염 완충 식염수(phosphate buffered saline: PBS)를 더 포함한다. 인산염 완충 식염수는, 예를 들어, 1종 이상의 인산염, 1종 이상의 염화물염, 또는 이들의 조합물을 포함할 수 있다. 선택적으로, 1종 이상의 인산염으로는 인산수소이나트륨 및/또는 인산이수소칼륨을 포함한다. 용리 완충액에 이용하기 위한 적절한 염화물염의 예로는 염화나트륨 및/또는 염화칼륨을 포함한다. 인산염 완충 식염수를 제조하는데 이용되는 염은 선택적으로 수화물이다. 위에서 기재된 바와 같이, 수화물은, 예를 들어, 1수화물, 2수화물, 3수화물, 4수화물, 5수화물, 6수화물 또는 7수화물일 수 있다. 예를 들어, 인산염 완충 식염수를 제조하는데 이용되는 인산수소이나트륨은 인산수소이나트륨 7수화물(즉,  $Na_2HPO_4 \cdot 7H_2O$ )이다.

[0023] 용리 완충액에 이용하기 위한 인산염 완충 식염수를 제조하는데 이용되는 염들의 예시적인 조합으로는 인산수소이나트륨 7수화물(즉,  $Na_2HPO_4 \cdot 7H_2O$ ), 인산이수소칼륨(즉,  $KH_2PO_4$ ), 염화나트륨(즉,  $NaCl$ ) 및 염화칼륨(즉,  $KCl$ )을 포함한다. 선택적으로,  $Na_2HPO_4 \cdot 7H_2O$ 는 인산염 완충 식염수 중에 5mM 내지 15mM의 농도 또는 이 사이의 임의의 양을 제공하는데 충분한 양으로 이용될 수 있다. 예를 들어,  $Na_2HPO_4 \cdot 7H_2O$ 는 7.5mM 내지 12.5mM 또는 9mM 내지 11mM(예컨대, 10.14mM)의 농도 또는 이들 사이의 임의의 양을 제공하는데 충분한 양으로 이용될 수 있다. 선택적으로,  $KH_2PO_4$ 는 인산염 완충 식염수 중에 0.5mM 내지 5mM의 농도 또는 이들 사이의 임의의 양을 제공하는데 충분한 양으로 이용될 수 있다. 예를 들어,  $KH_2PO_4$ 는 1.0mM 내지 3.0mM 또는 1.5mM 내지 2.0mM(예컨대, 1.76mM)의 농도 또는 이들 사이의 임의의 양을 제공하는데 충분한 양으로 이용될 수 있다. 선택적으로,  $NaCl$ 은, 인산염 완충 식염수 중에 75mM 내지 200mM의 농도, 또는 이들 사이의 임의의 양을 제공하는데 충분한 양으로 이용될 수 있다. 예를 들어,  $NaCl$ 은 100mM 내지 175mM 또는 125mM 내지 150mM(예컨대, 137mM)의 농도,

또는 이들 사이의 임의의 양을 제공하는데 충분한 양으로 이용될 수 있다. 선택적으로, KCl은 인산염 완충 식염수 중에 0.5mM 내지 5mM의 농도, 또는 이들 사이의 임의의 양을 제공하는데 충분한 양으로 이용될 수 있다. 예를 들어, KCl은 1.0mM 내지 4.0mM 또는 1.5mM 내지 3.0mM(예컨대, 2.68mM)의 농도, 또는 이들 사이의 임의의 양을 제공하는데 충분한 양으로 이용될 수 있다.

[0024] 본 명세서에 기재된 용리 완충액을 형성하기 위하여 부형제, 2가 양이온, 세제 및 인산염 완충 식염수의 예시적인 조합으로는, 만니톨, 히스티딘, 솔비톨,  $MgCl_2$ , 폴리솔베이트 80 및 인산염 완충 식염수를 포함한다. 솔비톨은 용리 완충액의 중량에 의거해서 3% 미만의 농도로 존재할 수 있다. 예를 들어, 솔비톨은, 2.9% 미만, 2.8% 미만, 2.7% 미만, 2.6% 미만, 2.5% 미만, 2.4% 미만, 2.3% 미만, 2.2% 미만, 2.1% 미만, 2% 미만, 1.9% 미만, 1.8% 미만, 1.7% 미만, 1.6% 미만, 1.5% 미만, 1.4% 미만, 1.3% 미만, 1.2% 미만, 1.1% 미만, 1% 미만의 농도로 존재할 수 있다. 몇몇 예에서, 만니톨과 솔비톨의 조합된 농도는 용리 완충액의 중량에 의거해서 10% 미만이다. 예를 들어, 만니톨의 농도는 3%일 수 있고, 히스티딘의 농도는 5%의 조합된 농도를 제공하기 위하여 2%일 수 있다. 폴리솔베이트 80은, 용리 완충액의 중량으로 0.1% 미만(예컨대, 0.01%)의 양으로 존재할 수 있다. 이들 예에서, 인산염 완충 식염수는 인산수소이나트륨, 인산이수소칼륨, 염화나트륨 및 염화칼륨을 포함할 수 있다. 또한, 용리 완충액에는 1가 양이온 염,  $Zn^{2+}$  및/또는 트레할로스가 실질적으로 존재하지 않는다.

[0025] 다른 적절한 용리 완충액으로는 수크로스,  $MgCl_2$ , 폴리솔베이트 80 및 인산염 완충 식염수를 포함한다. 선택적으로, 수크로스는 용리 완충액의 중량에 의거해서 5% 미만의 농도로 존재한다. 예를 들어, 수크로스는 용리 완충액의 중량에 의거해서 4.5% 이하, 4% 이하, 3.5% 이하, 3% 이하, 2.5% 이하 또는 2% 이하의 농도로 존재할 수 있다. 이들 예에서, 인산염 완충 식염수는, 인산수소이나트륨, 인산이수소칼륨, 염화나트륨 및 염화칼륨을 포함할 수 있다. 또한, 용리 완충액에는, 1가 양이온 염, 비-수크로스 폴리올 및 카복실레이트(예컨대, 숙시네이트 및 사이트레이트)가 실질적으로 없다.

[0026] 본 명세서에 기재된 용리 완충액은, 예를 들어, 바이러스 제조 동안 바이러스를 정제시키기 위하여 겔 침투 크로마토그래피 용리 완충액으로서 이용될 수 있다. 본 명세서에 기재된 바와 같은 바이러스를 정제시키는 방법은, 겔 침투 크로마토그래피 칼럼을, 바이러스와 액체 담체를 포함하는 바이러스 제제와 접촉시키는 단계를 포함한다.

[0027] 본 명세서에 기재된 바이러스 제제에 이용하기 위한 바이러스로는 외피성 및 비외피성 바이러스를 포함한다. 외피성 및 비외피성 바이러스는 DNA 바이러스, RNA 바이러스 또는 레트로바이러스일 수 있다. 선택적으로, 본 명세서에 기재된 바이러스 제제에 이용하기 위한 바이러스는 비외피성 바이러스이다. 비외피성 바이러스로는, 예를 들어, 아데노비리대(Adenoviridae)(예컨대, 아데노바이러스), 피코나비리대(Picornaviridae)(예컨대, 폴리오 바이러스), 레오비리대(Reoviridae)(예컨대, 레오바이러스), 파필로마비리대(Papillomaviridae)(예컨대, 파필로마 바이러스), 폴리오마비리대(Polyomaviridae)(예컨대, 폴리오마바이러스), 파보비리대(Parvoviridae)(예컨대, 킬함 래트 바이러스(Kilham rat virus)) 및 이리도비리대(Iridoviridae)(예컨대, 티폴라 진주광 바이러스(tipula iridescent virus))의 군에 속하는 바이러스를 포함한다.

[0028] 선택적으로, 바이러스는 종양분해성 바이러스이다. 본 명세서에 기재된 바이러스 제제 및 방법에 이용하기 위한 적절한 바이러스로는, 마이오비리대(myoviridae), 시포비리대(siphoviridae), 포도비리대(podoviridae), 텍티비리대(tectiviridae), 코티코비리대(corticoviridae), 플라스마비리대(plasmaviridae), 리포트릭스비리대(lipothrixviridae), 푸셀로비리대(fuselloviridae), 폭스비리대(poxviridae), 이리도비리대(iridoviridae), 피코드나비리대(phycodnaviridae), 바쿨로비리대(baculoviridae), 헤르페스비리대(herpesviridae), 아데노비리대(adenoviridae), 파포바비리대(papovaviridae), 폴리드나비리대(polydnviridae), 이노비리대(inoviridae), 마이크로비리대(microviridae), 제미니비리대(geminiviridae), 서코비리대(circoviridae), 파보비리대(parvoviridae), 헤파드나비리대(hepadnaviridae), 레트로비리대(retroviridae), 시스토비리대(cystoviridae), 레오비리대(reoviridae), 버나비리대(birnaviridae), 파라믹소비리대(paramyxoviridae), 라브도비리대(rhabdoviridae), 필로비리대(filoviridae), 오조믹소비리대(orthomyxoviridae), 부니아비리대(bunyaviridae), 아레나비리대(arenaviridae), 레비비리대(eviviridae), 피코나비리대(picornaviridae), 세퀴비리대(sequiviridae), 코모비리대(comoviridae), 포티비리대(potyviridae), 칼리시비리대(caliciviridae), 아스트로비리대(astroviridae), 노다비리대(nodaviridae), 테트라비리대(tetraviridae), 톰부스비리대(tombusviridae), 코로나비리대(coronaviridae), 플라비비리대(flaviviridae), 토가비리대(togaviridae), 바나비리대(barnaviridae) 및 보나비리대(bornaviridae) 바이러스를 포함하지만 이들로 제한되는 것은 아니다.

- [0029] 바이러스 제제는 선택적으로 레오바이러스를 포함한다. 본 명세서에서 이용되는 바와 같이, 레오바이러스는 천연 유래 및 재조합 레오바이러스를 비롯하여, 레오바이러스 속으로 분류된 임의의 바이러스를 지칭한다. 레오바이러스는 이중 가닥, 분절 RNA 게놈(segmented RNA genome)을 지니는 바이러스이다. 비리온은 60 내지 80nm 직경으로 측정되고, 2개의 2면체의 동심 캡시드 껍질(icosahedral, concentric capsid shell)을 지닌다. 게놈은 16 내지 27킬로염기쌍(kbp)의 총 게놈 크기를 지니면서 10 내지 12개의 별개의 분절의 이중 가닥 RNA로 구성된다. 개별의 RNA 분절은 크기가 다양하다. 3개의 개별적이지만 관련된 유형의 레오바이러스가 많은 종으로부터 회수되었다. 세 유형 모두는 공통의 상보체-고정 항원을 공유한다. 인간 레오바이러스는 제1형(균주 랑(strain Lang), T1L), 제2형(균주 존스(strain Jones), T2J) 및 제3형(균주 디어링(strain Dearing), T3D 또는 균주 아브니(strain Abney), T3A)의 3개의 혈청형으로 구성된다.
- [0030] 위에서 기재된 바와 같이, 레오바이러스는 재조합 레오바이러스일 수 있고, 이것은 천연 유래 또는 비천연 유래일 수 있다. 레오바이러스는 사실상 공급원으로부터 단리될 수 있을 경우 천연 유래로서 기재되고, 실험실에서 인간에 의해 의도적으로 변형되지 않는다. 예를 들어, 레오바이러스는 필드 공급원(field source)으로부터(즉, 레오바이러스에 감염된 인간으로부터) 기인될 수 있다. 레오바이러스는 또한 증가된 활성(예컨대, 종양분해성 활성)을 위하여 선택되거나 돌연변이를 일으킬 수 있다. 특정 레오바이러스의 예는, 예를 들어, 미국 특허 제 7,803,385호 또는 미국 특허 출원 공개 제2008/0292594호에서 찾을 수 있다.
- [0031] 레오바이러스는 변성될 수 있지만 여전히 활성 라스 경로를 지니는 포유류 세포를 용해방식으로 감염시킬 수 있다. 레오바이러스는 증식 중인 세포에 투여되기 전에(예컨대, 프로테아제, 예컨대, 키모트립신 또는 트립신에 의한 처리에 의해) 화학적으로 또는 생화학적으로 전처리될 수 있다. 프로테아제에 의한 전처리는 바이러스의 외피 또는 캡시드를 제거하여, 바이러스의 감염력을 증가시킬 수 있다. 레오바이러스는 리포솜 또는 마이셀(micelle) 내에 코팅될 수 있다(문헌[Chandran and Nibert, *Journal of Virology*, 72(1):467-75 (1998)]). 예를 들어, 비리온은 새로운 감염성 서브바이러스 입자(infectious subviral particle: ISVP)를 생성하기 위하여 알킬 설페이트 세제의 마이셀-형성 농도의 존재 하에 키모트립신으로 처리될 수 있다.
- [0032] 레오바이러스는 2종 이상의 유전적으로 별개인 레오바이러스로부터 게놈 분절의 재조합/재편성에 기인하는 재조합 또는 재편성 레오바이러스일 수 있다. 레오바이러스 게놈 분절의 재조합/재편성은 사실상 적어도 2종의 유전적으로 별개인 레오바이러스에 의해 숙주 유기체의 후속의 감염을 일으킬 수 있다. 재조합 비리온은 또한, 예를 들어, 유전적으로 별개인 레오바이러스로 허용되는 숙주 세포의 공감염(co-infection)에 의해 세포 배양물에서 생성될 수도 있다. 따라서, 본 명세서에 기재된 조제물에 이용하기 위한 재조합 레오바이러스는, 인간 레오바이러스, 예컨대, 제1형(균주 랑), 제2형(균주 존스) 및 제3형(균주 디어링 또는 균주 아브니), 비인간 포유류 레오바이러스, 또는 조류 레오바이러스를 포함하지만, 이들로 제한되는 것은 아닌 2개 이상의 유전적으로 별개인 레오바이러스로부터의 게놈 분절의 재편성에 기인할 수 있다. 몇몇 예에서, 재조합 레오바이러스는, 2종 이상의 유전적으로 별개인 레오바이러스로부터의 게놈 분절의 재편성에 기인할 수 있고, 여기서 적어도 하나의 부모 바이러스는 유전적으로 조작되어 있고, 하나 이상의 화학적으로 합성된 게놈 분절을 포함하며, 화학적 또는 물리적 돌연변이원으로 처리되거나, 또는 그 자체가 재조합 이벤트의 결과이다. 재조합 레오바이러스는, 예를 들어, 다이메틸 설페이트 및 에티듐 브로마이드를 포함하지만, 이들로 제한되는 것은 아닌 화학적 돌연변이원, 또는 자외광 또는 다른 형태의 방사선을 포함하지만, 이들로 제한되는 것은 아닌 물리적 돌연변이원의 존재 하에 재조합될 수 있다.
- [0033] 적절한 재조합 레오바이러스의 다른 예로는 1개 이상의 게놈 분절에 결실 또는 복제를 포함하는 것, 숙주 세포 게놈의 재조합의 결과로서 추가의 유전자 정보를 포함하는 것, 또는 합성 유전자를 포함하는 것을 포함한다. 레오바이러스는 또한, 예를 들어,  $\sigma 3$  등과 같은 돌연변이된 피막 단백질을 비리온 외피 캡시드 내로 편입시킴으로써 변성될 수도 있다. 단백질은 치환, 삽입 또는 결실에 의해 돌연변이될 수 있다. 치환은 천연 아미노산 대신에 상이한 아미노산의 삽입을 포함한다. 삽입은 하나 이상의 장소에서 단백질 내로 추가의 아미노산 잔기의 삽입을 포함한다. 결실은 단백질 내의 하나 이상의 아미노산 잔기의 결실을 포함한다. 이러한 돌연변이는 당업계에 공지된 방법에 의해 일어날 수 있다. 예를 들어, 피막 단백질 중 하나에 대해서 유전자 암호화의 올리고뉴클레오타이드 부위 지향된 돌연변이유발은, 소량의 돌연변이체 피막 단백질의 생성을 가져올 수 있다. 일 실시형태에 있어서, 레오바이러스는 IDAC #190907-01이다.
- [0034] 본 명세서에 기재된 바이러스 제제에 이용하기 위한 바이러스에는 하나 이상의 종래의 정제 단계가 실시될 수 있다. 바이러스는, 예를 들어, 미국 특허 제 6,808,916호; 제 7,186,542호; 제 7,223,585호; 및 제 7,901,921호, 및 미국 특허 출원 공개 제 2007/0269856호(이들 문헌은 참조로 그들의 전문이 본 명세서에 병합됨)에 기재된 방법에 따라서, 본 명세서에 기재된 겔 침투 크로마토그래피 방법 전에 정제될 수 있다. 예를 들어, 바이러스는

밀도 구배 원심분리, 한외여과, 정용여과(diafiltration), 이온교환 크로마토그래피, 고성능 액체 크로마토그래피 또는 이들의 조합의 기술을 이용해서 다른 입자로부터 분리될 수 있다.

[0035] 본 명세서에 기재된 바이러스 제제는 액체 담체를 추가로 포함한다. 적절한 액체 담체는 수성 또는 비수성 담체일 수 있다. 적절한 비수성 담체의 예로는, 프로필렌 글라이콜, 폴리에틸렌 글라이콜 및 오일류, 예를 들어, 식유, 동물, 식물 또는 합성 기원의 것, 예컨대 땅콩유, 대두유, 광유, 참기름, 올리브유 등을 포함한다. 에틸올레에이트 등과 같은 유기 에스터는 또한 적절한 비수성 담체이다. 수성 담체로는, 물, 에탄올, 글라이세롤, 알코올성/수성 용액, 에멀전 또는 현탁액, 예를 들어, 식염수 및 완충 매질을 포함한다. 식염수 용액 및 수성 텍스트로스 및 글라이세롤 용액은 또한 액체 담체로서 이용될 수 있다. 제제는, 필요한 경우, 또한 습윤제 또는 유화제, 윤활제, 활주제, 에몰리언트, 보습제, 증점제, 향미제, 보존제 또는 pH 완충액을 함유할 수 있다. 용리 완충액 중에 포함되는 인산염 완충 식염수에 부가해서, pH 완충액은, 바이러스 제제의 pH를 제어하도록 포함될 수 있다. 몇몇 예에서, 완충액은 바이러스 제제의 pH를 5 내지 8.5 사이에 유지하기 위하여 포함된다. 예를 들어, 완충액은 바이러스 제제의 pH를 6.8 내지 8.0 또는 7.0 내지 7.8 사이(예컨대, 7.4)에 유지하도록 포함될 수 있다. 적절한 완충액의 예로는 인산염 완충액, 예컨대, 0.05M 인산염 완충액, 아세트산염 완충액, 벤조산염 완충액, 시트르산염 완충액, 락트산염 완충액, 말레산염 완충액 및 주석산염 완충액을 포함한다. 완충 담체, 예컨대, 헵크(Hanks) 용액, 링거 용액, 텍스트로스 용액, 5% 인간 혈청 알부민, 링거의 텍스트로스, 텍스트로스 및 염화나트륨, 락트산화 링거 및 고정유, 폴리에틸렌 글라이콜, 폴리비닐 피롤리돈 또는 레시틴이 이용될 수 있다. 모노에탄올아민, 다이에탄올아민, 트로메타민 및 글라이신 용액이 또한 적절한 완충액으로서 이용될 수 있다. 리포솜 및 비수성 비히클, 예컨대, 고정유가 또한 담체로서 이용될 수 있다. 적절한 담체의 추가의 예는 문헌[Remington: The Science and Practice of Pharmacy (21th ed.) ed. David B. Troy, Lippincott Williams & Wilkins, 2005]에 기재되어 있다. 몇몇 예에서, 트리스 완충액(Tris buffer)은 본 명세서에 기재된 바이러스 제제 또는 용리 완충액에 이용되지 않는다.

[0036] 바이러스 제제는 바이러스를 액체 담체와 배합함으로써 제조된다. 몇몇 예에서, 적절한 양의 바이러스는  $1 \times 10^5$  내지  $1 \times 10^{14}$  바이러스 입자/밀리리터(VP/mL) 범위의 역가에서 바이러스 제제를 제조하기 위하여 제공된다. 대안적으로, 액체 담체는 바이러스로 감염된 세포의 배양물에 첨가될 수 있다. 본 명세서에서 이용되는 바와 같이, 세포의 배양물이란 그의 배양 조건에서 발견되는 바와 같은 배양 세포의 모집단(예컨대, 바이러스로 감염된 세포 및 배양 매질)을 지칭한다. 또한, 바이러스로 감염된 세포의 용액 또는 현탁액은 바이러스 제제를 생성하기 위하여 액체 담체로 희석될 수 있다.

[0037] 선택적으로, 바이러스 제제의 액체 담체는 본 명세서에 기재된 바와 같은 용리 완충액이다. 액체 담체가 용리 완충액 이외의 것인 실시형태에 있어서, 바이러스 제제는 겔 침투 크로마토그래피 방법에서 직접 이용될 수 있다. 대안적으로, 완충액 교환은 액체 담체로서 용리 완충액을 지니는 바이러스 제제를 제공하기 위하여 수행될 수 있다. 완충액 교환은 당업자에게 공지된 방법에 따라서 수행될 수 있다. 예를 들어, 완충액 교환은 여과 방법을 이용해서 수행될 수 있다.

[0038] 위에서 논의된 바와 같이, 바이러스를 정제시키는 방법은, 겔 침투 크로마토그래피 칼럼을 본 명세서에 기재된 바와 같은 바이러스 제제와 접촉시키는 단계를 포함한다. 바이러스를 정제시키는 방법은 겔 침투 크로마토그래피 칼럼 및 본 명세서에 기재된 바와 같은 용리 완충액을 포함하는 장치를 이용해서 수행될 수 있다. 본 명세서에 기재된 장치에 포함되고 방법에 이용하기 위한 겔 침투 크로마토그래피 칼럼은 상업적으로 입수가능하다. 예를 들어, 겔 침투 크로마토그래피 칼럼은 GE 헬스케어(GE Healthcare)(영국 샬폰트 세인트 자일즈에 소재)로부터 상업적으로 입수가능한 BPG 칼럼, 아머삼 바이오사이언시스(Amersham Biosciences)(뉴저지주의 피스카타웨이에 소재)로부터 상업적으로 입수가능한 XK 16/70 칼럼, 또는 기타 등가물일 수 있다. 겔 침투 크로마토그래피 칼럼에 이용하기 위한 적절한 수지의 예로는 세파로스 4 패스트 플로 수지(SEPHAROSE 4 Fast Flow resin) 및 세파로스 CL-4B 수지(SEPHAROSE CL-4B resin)(이들 둘 모두는 GE 헬스케어로부터 상업적으로 입수가능함) 또는 기타 등가물을 포함한다. 적절한 겔 침투 크로마토그래피 칼럼의 추가의 예로는 슈퍼덱스(SUPERDEX) 칼럼(예컨대, 슈퍼덱스(SUPERDEX)-200 칼럼) 및 세파로스(SEPHAROSE) 칼럼(예컨대, 세파로스(SEPHAROSE) 4 FF 수지 칼럼)(이들 둘 모두는 GE 헬스케어로부터 상업적으로 입수가능함), 또는 기타 등가물을 포함한다. 선택적으로, 겔 침투 크로마토그래피 칼럼은 바이러스 제제와 해당 칼럼을 접촉시키기 전에 완충액으로 평형화된다. 겔 침투 크로마토그래피 칼럼을 접촉시키는 단계는, 예를 들어, 칼럼에 제제를 수동으로 장입하는 단계 또는 자동화 시스템을 이용해서 칼럼에 제제를 장입하는 단계를 포함한다. 바이러스는 장입 후의 겔 침투 크로마토그래피 칼럼 상에 보유되며, 또한 이어서, 본 명세서에 기재된 바와 같은 용리 완충액을 칼럼에 통과시킴으로써 해당



칼럼으로부터 회수된다. 바이러스 용리는, 예를 들어, 자외선 검출기를 이용해서, 또는 용리액의 전도도 또는 굴절률을 측정함으로써 검출될 수 있다.

[0039] 본 명세서에 기재된 방법은, 다른 용리 완충액을 이용해서 얻어진 바이러스의 회수에 비해서, 본 명세서에 기재된 용리 완충액을 이용해서 겔 침투 크로마토그래피 칼럼으로부터의 바이러스의 증가된 회수를 제공한다. 몇몇 예에서, 본 명세서에 기재된 용리 완충액을 이용한 바이러스 회수는 인산염 완충 식염수(즉, 부형제, 2가 양이온, 및 선택적으로 세제가 없는 인산염 완충 식염수) 단독으로 용리된 바이러스의 회수보다도 적어도 약 20% 더 많다. 예를 들어, 바이러스 회수는 인산염 완충 식염수 단독으로 용리된 바이러스의 회수보다 적어도 약 25% 더 많거나, 적어도 약 30% 더 많거나 또는 적어도 약 35% 더 많다.

[0040] 본 명세서에 기재된 방법은 정제된 바이러스 조제물을 제공한다. 정제된 바이러스 조제물은 겔 침투 크로마토그래피 칼럼으로부터 용리된 바이러스 및 겔 침투 크로마토그래피 매질과 접촉되어 있던 용리 완충액을 포함한다. 용리된 바이러스는 정제된 바이러스일 수 있다. 본 명세서에서 이용되는 바와 같이, 정제된 바이러스란 천연적으로 수반되는 세포 성분으로부터 분리된 바이러스를 지칭한다. 전형적으로, 바이러스는, 천연적으로 연관된 기타 세포 성분 및 단백질이 없는, 건조중량으로 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95% 또는 적어도 99%일 경우 정제된 것으로 간주된다.

[0041] 선택적으로, 본 명세서에 기재된 정제된 바이러스 조제물은, 겔 침투 크로마토그래피 매질과 접촉되어 있던 용리 완충액에 소정 시간의 기간 동안 보존될 수 있다. 예를 들어, 정제된 바이러스와 용리 완충액을 포함하는 정제된 바이러스 조제물이 겔 침투 크로마토그래피 칼럼으로부터 용리된 후, 정제된 바이러스 조제물은 12개월(예컨대, 1일, 1주, 1개월, 3개월, 6개월, 9개월 또는 12개월)까지 보존될 수 있다. 몇몇 예에서, 정제된 바이러스 조제물은 보존 기간 동안 바이러스 감염력을 유지한다. 정제된 바이러스 조제물은 대략 주위 온도에서 또는 주위 온도보다 낮은 온도에서 보존될 수 있다. 본 명세서에서 이용되는 바와 같이, 주위 온도란 약 10℃ 내지 약 30℃의 온도를 지칭한다.

[0042] 본 출원을 통하여, 각종 문헌이 언급되어 있다. 이들 문헌의 내용은 전체로서 본 출원에 참조로 병합된다.

[0043] 많은 양상이 기재되어 있다. 그럼에도 불구하고, 각종 변형이 행해질 수 있다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 또, 하나의 특징 또는 단계가 기재된 경우, 임의의 다른 특징 또는 단계의 조합이 명확히 기술되어 있지 않더라도 이들 조합이 행해질 수 있다. 따라서, 기타 양상은 특허청구범위의 범주 내이다.

[0044] **실시예**

[0045] **실시예 1: 물질**

[0046] 용리 완충액을 제조하는데 이용되는 물질들은 달리 표시되지 않는 한 시그마-알드리치(Sigma-Aldrich)(미주리주의 세인트 루이스시에 소재)로부터 입수하였다. 밀리-큐 등급 수(Milli-Q grade water) 중 1% 트윈(Tween) 80의 작업 용액(working solution)은, 밀리-큐 등급 수 50.06g과 트윈(Tween) 80 스톱 1.03g을 배합시킴으로써 준비하였다. 이들 성분을 혼합한 후, 추가의 밀리-큐 등급 수를 첨가하여, 용액 100g을 얻었다. 100mM  $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ 의 작업 용액은 밀리-큐 등급 수 80.61g과  $MgCl_2 \cdot 6H_2O$  2.04g을 배합하여 제조하였다. 이들 성분을 혼합한 후, 추가의 밀리-큐 등급 수를 첨가하여 용액 100g을 얻었다.

[0047] **실시예 2: 용리 완충액 1**

[0048] 용리 완충액 1을 이하의 절차에 따라서 제조하였다. 밀리-큐 등급 수(1.0kg)와 L-히스티딘(32.0g)을 배합하여, 실온에서 10분 동안 교반하였다. 이어서, 이 혼합물을  $40 \pm 5^\circ C$ 까지 가열하여 해당 수중에 L-히스티딘을 완전히 용해시켰다. 그 후, 열을 제거하고, 이 혼합물에 이하의 성분들: D-만니톨(48.02g), 1% 트윈(Tween) 80 작업 용액(16.02g), D-솔비톨(32.03g), 100mM  $MgCl_2 \cdot 6H_2O$  작업 용액(32.0g),  $KH_2PO_4$ (0.38g),  $Na_2HPO_4 \cdot 7H_2O$ (4.36g), KCl(0.32g) 및 NaCl(12.80g)을 첨가하였다. 이 성분들을 잘 혼합하고, 추가의 밀리-큐 등급 수를 첨가하여 완충액 1.6kg을 얻었다.

[0049] 이 완충액의 pH는 해당 완충액이 제조된 당일에 측정된 pH 미터를 이용해서 측정한 바 7.52였다. 이어서, 이 용리 완충액을, 0.45 $\mu m$  HA 막(밀리포어(Millipore); 매사추세츠주의 발레리카시에 소재)을 이용하는 코닝 여과 시스템(Corning filtering system)을 통해 여과시키고, 실온에서 30분 동안 탈기시켜, 용리 완충액 1을 형성하였다.

[0050] **실시예 3: 용리 완충액 2**

- [0051] 용리 완충액 2를 이하의 절차에 따라서 제조하였다. 밀리-큐 등급 수(1.0kg), 수크로스(64.0g), 트윈(Tween) 80(0.81g), 100mM  $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  작업 용액(32.0g),  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ (0.38g),  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (4.35g),  $\text{KCl}$ (0.32g) 및  $\text{NaCl}$ (12.80g)을 배합하였다. 이 성분들을 잘 혼합하고, 추가의 밀리-큐 등급 수를 첨가하여 완충액 1.6kg을 얻었다.
- [0052] 이 완충액의 pH는 해당 완충액이 제조된 당일에 검정된 pH 미터를 이용해서 측정한 바 7.40이었다. 이어서, 이 용리 완충액을, 0.45 $\mu\text{m}$  HA 막(밀리포어; 매사추세츠주의 발레리카시에 소재)을 이용하는 코닝 여과 시스템을 통해 여과시키고, 실온에서 30분 동안 탈기시켜 용리 완충액 2를 형성하였다.
- [0053] **실시예 4: 용리 완충액 1-2x**
- [0054] 용리 완충액 1을 이하의 절차에 따라서 실시예 2에 표시된 바와 같은 농축된 조제물로서 2회 제조하였다. 밀리-큐 등급 수(61.78g)와 L-히스티딘(4.00g)을 배합하고 실온에서 10분 동안 교반하였다. 이 혼합물을 이어서 40 $^{\circ}\text{C}$ 까지 27분 동안 가열하여 해당 수중에 L-히스티딘을 완전히 용해시켰다. 그 후, 열을 제거하고, 이 혼합물에 이하의 성분들: D-만니톨(6.00g), 1% 트윈(Tween) 80 작업 용액(2.02g), D-솔비톨(4.00g), 100mM  $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  작업 용액(4.01g),  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (0.024g),  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0.27g),  $\text{KCl}$ (0.021g) 및  $\text{NaCl}$ (0.81g)을 첨가하였다. 이 성분들을 잘 혼합하고, 추가의 밀리-큐 등급 수를 첨가하여 완충액 100g을 얻었다.
- [0055] 이 완충액의 pH는 해당 완충액이 제조된 당일에 검정된 pH 미터를 이용해서 측정한 바 7.59였다. 이어서, 이 용리 완충액을, 0.45 $\mu\text{m}$  셀룰로스 아세테이트 막(코닝 인코포레이티드(Corning Incorporated); 뉴욕주의 코닝시에 소재)을 이용하는 150ml 코닝 여과 시스템을 통해 여과시켜 용리 완충액 1-2x를 형성하였다.
- [0056] **실시예 5: 용리 완충액 2-2x**
- [0057] 용리 완충액 2를 이하의 절차에 따라서 실시예 3에 표시된 것과 같은 농축된 조제물로서 2번 제조하였다. 밀리-큐 등급 수(60.0g), 수크로스(8.00g), 1% 트윈(Tween) 80 작업 용액(10.0g), 100mM  $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  작업 용액(4.01g),  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (0.024g),  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0.27g),  $\text{KCl}$ (0.021g) 및  $\text{NaCl}$ (0.80g)을 배합하였다. 이들 성분을 잘 혼합하고, 추가의 밀리-큐 등급 수를 첨가하여 완충액 100g을 얻었다.
- [0058] 이 완충액의 pH는 해당 완충액이 제조된 당일에 검정된 pH 미터를 이용해서 측정한 바 7.28이었다. 이어서, 이 용리 완충액을, 0.45 $\mu\text{m}$  셀룰로스 아세테이트 막(코닝 인코포레이티드; 뉴욕주의 코닝시에 소재)을 이용하는 150 ml 코닝 여과 시스템을 통해 여과시켜, 용리 완충액 2-2x를 형성하였다.
- [0059] **실시예 6: 바이러스 제제**
- [0060] 대조군 바이러스 제제(대조군 제제)를 인산염 완충 식염수(PBS) 중에  $2.76 \times 10^{14}$  레오바이러스 입자를 제공함으로써 제조하였다. 바이러스 제제 1은 용리 완충액 1 중에  $2.76 \times 10^{14}$  레오바이러스 입자를 제공함으로써 제조하였다. 바이러스 제제 2는 용리 완충액 2 중에  $2.76 \times 10^{14}$  레오바이러스 입자를 제공함으로써 제조하였다.
- [0061] **실시예 7: 겔 침투 크로마토그래피 후의 바이러스 회수**
- [0062] 실시예 6에서 제조된 바이러스 제제(대조군 제제, 바이러스 제제 1 및 바이러스 제제 2)를 각각 개별적으로 겔 침투 크로마토그래피 칼럼 상에 장입시켰다. 대조군 제제, 바이러스 제제 1 및 바이러스 제제 2를 각각 PBS, 완충액 조제물 1 및 완충액 조제물 2로 용리시켰다. 평균 데이터가 별도의 실험으로부터 표 1 및 표 2에 표시되어 있다.

표 1

바이러스 제제	용리 완충액	GPC 전 총 바이러스 입자	GPC 후 총 바이러스 입자	단계 회수 %
대조군 제제	PBS	$2.76 \times 10^{14}$	$2.07 \times 10^{14}$	75%
바이러스 제제 1	용리 완충액 1	$2.76 \times 10^{14}$	$2.96 \times 10^{14}$	107%
바이러스 제제 2	용리 완충액 2	$2.76 \times 10^{14}$	$3.05 \times 10^{14}$	111%

[0063]

표 2

바이러스 제제	용리 완충액	GPC 전 총 바이러스 입자	GPC 후 총 바이러스 입자	단계 회수 %
대조군 제제	PBS	$2.51 \times 10^{16}$	$1.70 \times 10^{16}$	68%
대조군 제제	PBS	$1.31 \times 10^{16}$	$9.58 \times 10^{15}$	73%
바이러스 제제 1	용리 완충액 1	$1.57 \times 10^{16}$	$1.42 \times 10^{16}$	90%
바이러스 제제 1	용리 완충액 1	$4.29 \times 10^{16}$	$4.13 \times 10^{16}$	96%
바이러스 제제 1	용리 완충액 1	$3.28 \times 10^{16}$	$3.48 \times 10^{16}$	106%

[0064]

[0065]

표 1에 표시된 바와 같이, 겔 침투 칼럼 상의 레오바이러스와 함께 용리 완충액 1의 사용은, PBS 단독 사용에 비해서 바이러스 회수를 75%에서 107%로 증가시켰다. 표 2는 바이러스 회수가 PBS 단독 사용에 비해서 용리 완충액 1을 이용하면 항상 증가하는 것을 입증한다. 또한, 겔 침투 칼럼 상의 레오바이러스와 함께 용리 완충액 2의 사용은, PBS 단독 사용에 비해서 바이러스 회수를 75%에서 111%로 증가시켰다(표 1 참조). 이와 같이 해서, 레오바이러스에의 용리 완충액 1 및 2의 첨가는, 각각, 레오바이러스와 함께 PBS를 이용한 것에 비해서, 대략 32% 및 36%만큼 개선된 역가로 되었다.

[0066]

첨부된 특허청구범위의 조성 및 방법은, 특허청구범위의 수개의 양상의 예시로서 의도된 본 명세서에 기재된 특정 조성 및 방법에 의해 그 범위가 제한되는 것은 아니며, 기능적으로 등가인 어떠한 조성 및 방법이라도 본 개시내용의 범위 내이다. 본 명세서에 도시되고 기재된 것에 부가해서 상기 조성 및 방법의 각종 변형은 첨부된 특허청구범위의 범주 내에 들어가도록 의도되어 있다. 또, 이들 조성 및 방법의 단지 소정의 대표적인 조성, 방법 및 양상이 구체적으로 설명되어 있지만, 다른 조성 및 방법, 및 해당 조성 및 방법의 각종 특징의 조합은, 구체적으로 언급되어 있지 않더라도, 첨부된 특허청구범위의 범주 내에 들어가도록 의도되어 있다. 이와 같이 해서, 단계들, 요소들, 성분들 또는 구성들의 조합이 본 명세서에 명확하게 언급될 수도 있지만; 단계들, 요소들, 성분들 및 구성들의 기타 모든 조합은, 명확하게 기술되어 있지 않더라도, 포함되는 것이다.