

【公報種別】特許法第17条の2の規定による補正の掲載  
 【部門区分】第1部門第1区分  
 【発行日】令和7年6月17日(2025.6.17)

【国際公開番号】WO2022/261663  
 【公表番号】特表2024-525142(P2024-525142A)  
 【公表日】令和6年7月10日(2024.7.10)  
 【年通号数】公開公報(特許)2024-128  
 【出願番号】特願2023-576326(P2023-576326)  
 【国際特許分類】  
 C12N 7/02(2006.01)  
 【FI】  
 C12N 7/02

10

【手続補正書】  
 【提出日】令和7年6月9日(2025.6.9)  
 【手続補正1】  
 【補正対象書類名】明細書  
 【補正対象項目名】0153  
 【補正方法】変更

20

【補正の内容】  
 【0153】

本明細書に記載の例及び実施形態は例示を目的としているに過ぎず、その幅広い発明概念から逸脱することなく上記に記載の実施形態に変更をなすことができることが理解される。例えば、本発明の概念は、空粒子から部分粒子を分離して、又は図25に示されているように、樹脂に対して完全粒子よりも強力な親和性を有する不純物を分離して、第1のカラムとは対照的に完全粒子を第2のカラムにて富化することを含む。従って、本発明は、開示されている特定の実施形態に限定されず、添付の特許請求の範囲により規定される本発明の趣旨及び範囲内の改変を網羅することが意図されていることが理解される。

30

本発明のまた別の態様は、以下のとおりであってもよい。

〔1〕完全組換えアデノ随伴ウイルス(rAAV)粒子を精製するための方法であって、  
(a)完全rAAV粒子及び不完全rAAV粒子を含むrAAV調製物を準備するステップ、

(b)負荷緩衝液中の前記rAAV調製物を、クロマトグラフィー媒体を含むカラムに負荷するステップであり、前記完全rAAV粒子は、前記クロマトグラフィー媒体に対して前記不完全粒子よりも高い結合親和性を有し、前記カラムにアプライされる前記完全rAAV粒子及び前記不完全粒子の量は、前記クロマトグラフィー媒体の結合容量を超えており、前記クロマトグラフィー媒体に結合した前記不完全粒子は、前記完全rAAV粒子により置換され、前記カラムからフロースルーへ入る、ステップ、並びに

(c)前記クロマトグラフィー媒体に結合した前記完全rAAV粒子を溶出緩衝液で溶出して、精製調製物を得るステップを含む方法。

40

〔2〕前記クロマトグラフィー媒体は、イオン交換カラムクロマトグラフィー媒体、好ましくは、陰イオン交換クロマトグラフィー媒体である、前記〔1〕に記載の方法。

〔3〕前記カラムクロマトグラフィー媒体は、Poros 50HQ、Poros 50D、Poros 50PI、Capto ImpRes Q、CIMmultus<sup>TM</sup>QAモノリシックカラム、及びPoros XQからなる群から選択され、好ましくは、Poros XQである、前記〔2〕に記載の方法。

〔4〕完全組換えアデノ随伴ウイルス(rAAV)粒子を精製するための方法であって、  
(a)前記完全rAAV粒子及び不完全粒子を含むrAAV調製物を準備するステップ、

50

(b) 負荷緩衝液中の前記 r A A V 調製物の第 1 のバッチを、第 1 のクロマトグラフィー媒体を含む第 1 のカラムに負荷するステップであり、前記完全 r A A V 粒子は、前記第 1 のクロマトグラフィー媒体に対して前記不完全粒子よりも高い結合親和性を有し、前記第 1 のカラムにアプライされる前記完全 r A A V 粒子及び前記不完全粒子の量は、前記第 1 のクロマトグラフィー媒体の結合容量を超えており、前記第 1 のクロマトグラフィー媒体に結合した前記不完全粒子は、前記完全 r A A V 粒子により置換され、前記第 1 のカラムから第 1 の負荷フロースルーへ入る、ステップ、

(c) 前記第 1 の負荷フロースルーを、第 2 のクロマトグラフィー媒体を含む第 2 のカラムに負荷して、負荷された又は部分的に負荷された第 2 のカラムを得るステップであり、前記第 2 のクロマトグラフィー媒体は、前記第 1 のクロマトグラフィー媒体と同じタイプである、ステップ、

10

(d) 任意選択で、前記第 1 のカラムを洗浄緩衝液で洗浄して、洗浄された第 1 のカラムを得るステップ、

(e) 前記第 1 のクロマトグラフィー媒体に結合した前記完全 r A A V 粒子を溶出緩衝液で溶出して、前記第 1 のカラムからの第 1 の溶出物及び溶出された第 1 のカラムを得るステップであり、前記第 1 の溶出物は、前記完全 r A A V 粒子対前記不完全 r A A V 粒子の増加した比を含む、ステップ、

(f) 任意選択で、負荷緩衝液中の前記 r A A V 調製物の第 2 のバッチを、前記少なくとも部分的に負荷された第 2 のカラムにアプライするステップであり、前記第 2 のカラムにアプライされる前記完全 r A A V 粒子及び前記不完全粒子の量は、前記第 2 のクロマトグラフィー媒体の結合容量を超えており、前記第 2 のクロマトグラフィー媒体に結合した前記不完全粒子は、前記完全 r A A V 粒子により置換され、前記第 2 のカラムから第 2 の負荷フロースルーへ入る、ステップ、

20

(g) 任意選択で、ステップ (e) の後で、前記第 2 のカラムからの前記負荷フロースルーを前記溶出された第 1 のカラムに負荷して、第 2 の負荷された第 1 のカラムを得、任意選択で、ステップ (e) で溶出を行う前に、第 2 の負荷された第 1 のカラムを洗浄するステップ、

(h) 任意選択で、前記第 2 のカラムを洗浄緩衝液で洗浄して、洗浄された第 2 のカラムを得るステップ、

(i) 前記第 2 のクロマトグラフィー媒体に結合した前記完全 r A A V 粒子を溶出緩衝液で溶出して、第 2 の溶出物及び溶出された第 2 のカラムを得るステップであり、前記第 2 の溶出物は、前記完全 r A A V 粒子対前記不完全 r A A V 粒子の増加した比を含む、ステップ、並びに

30

(j) 前記第 1 の溶出物及び前記第 2 の溶出物を一緒にして、完全 r A A V 粒子の精製調製物を生成するステップを含む方法。

[5] 前記第 1 のクロマトグラフィー媒体及び / 又は前記第 2 のクロマトグラフィー媒体は、イオン交換カラムクロマトグラフィー媒体、好ましくは、陰イオン交換クロマトグラフィー媒体である、前記 [4] に記載の方法。

[6] 前記ステップ (b) ~ (i) は、1 回又は複数回のサイクルで実施される、前記 [4] 又は [5] に記載の方法。

40

[7] 前記第 2 のカラムは、ステップ (c) の後で部分的に負荷される、前記 [4] ~ [6] のいずれか一項に記載の方法。

[8] 前記第 1 のカラムクロマトグラフィー媒体は、Poros 50 HQ、Poros 50 D、Poros 50 PI、Capto ImpRes Q、CIMmultus<sup>TM</sup> Q A モノリシックカラム、及び Poros XQ からなる群から選択され、好ましくは、Poros XQ である、前記 [4] ~ [7] のいずれか一項に記載の方法。

[9] 完全組換えアデノ随伴ウイルス (r A A V) 粒子を精製するための方法であって、(a) 前記完全 r A A V 粒子及び不完全粒子を含む r A A V 調製物を準備するステップ、

(b) 負荷緩衝液中の前記 r A A V 調製物の第 1 のバッチを、第 1 のクロマトグラフィー

50

—媒体を含む第1のカラムに負荷するステップであり、前記完全 r A A V 粒子は、前記第1のクロマトグラフィー媒体に対して前記不完全粒子よりも高い結合親和性を有し、前記第1のカラムにアプライされる前記完全 r A A V 粒子及び前記不完全粒子の量は、前記第1のクロマトグラフィー媒体の結合容量を超えており、前記第1のクロマトグラフィー媒体に結合した前記不完全粒子は、前記完全 r A A V 粒子により、前記第1のカラムからの第1の負荷フロースルーへと置換される、ステップ、

—(c) 前記第1の負荷フロースルーを、第2のクロマトグラフィー媒体を含む第2のカラムに負荷して、負荷された又は部分的に負荷された第2のカラムを得るステップであり、前記第2のクロマトグラフィー媒体は、前記第1のクロマトグラフィー媒体と同じタイプである、ステップ、

—(d) 任意選択で、前記第1のカラムを洗浄緩衝液で洗浄して、洗浄された第1のカラムを得るステップ、

—(e) 前記第1のクロマトグラフィー媒体に結合した前記完全 r A A V 粒子を溶出緩衝液で溶出して、前記第1のカラムからの第1の溶出物及び溶出された第1のカラムを得るステップであり、前記第1の溶出物は、前記完全 r A A V 粒子対前記不完全 r A A V 粒子の増加した比を含む、ステップ、

—(f) 任意選択で、負荷緩衝液中の前記 r A A V 調製物の第2のバッチを、前記少なくとも部分的に負荷された第2のカラムにアプライするステップであり、前記第2のカラムにアプライされる前記完全 r A A V 粒子及び前記不完全粒子の量は、前記第2のクロマトグラフィー媒体の結合容量を超えており、前記第2のクロマトグラフィー媒体に結合した前記不完全粒子は、前記完全 r A A V 粒子により置換され、前記第2のカラムから第2の負荷フロースルーへ入る、ステップ、

—(g) 前記第2のカラムからの前記第2の負荷フロースルーを、第3のクロマトグラフィー媒体を含む第3のカラムに負荷して、負荷された又は部分的に負荷された第3のカラムを得るステップであり、好ましくは、前記第3のクロマトグラフィー媒体は、前記第1のクロマトグラフィー媒体と同じタイプである、ステップ、

—(h) 任意選択で、前記第2のカラムを洗浄緩衝液で洗浄して、洗浄された第2のカラムを得るステップ、

—(i) ステップ(k)の後で、又は洗浄ステップ(l)が実施される場合には前記洗浄ステップ(l)の後で、前記第1のカラムをバイパスし、前記第2のクロマトグラフィー媒体に結合した前記完全 r A A V 粒子を溶出緩衝液で溶出して、第2の溶出物及び溶出された第2のカラムを得るステップであり、前記第2の溶出物は、前記完全 r A A V 粒子対前記不完全 r A A V 粒子の増加した比を含む、ステップ、

—(j) 任意選択で、前記第2カラムフロースルー後に前記第3のカラムが飽和(つまり、負荷)されていない場合、負荷緩衝液中の前記 r A A V 調製物の第3バッチを、前記部分的に負荷された第3のカラムにアプライしてもよく、前記第3のカラムにアプライされる前記完全 r A A V 粒子及び前記不完全粒子の量は、前記第3のクロマトグラフィー媒体の結合容量を超えており、前記第3のクロマトグラフィー媒体に結合した前記不完全粒子は、前記完全 r A A V 粒子により置換され、前記第3のカラムから第3の負荷フロースルーへ入る、ステップ、

—(k) ステップ(n)が実施される場合、ステップ(d)と(e)との間で、前記第3のカラムからの前記第3の負荷フロースルーを、前記洗浄された第1のカラムに負荷して、第2の負荷された第1のカラムを得、任意選択で、ステップ(e)で溶出を行う前に、第2の負荷された第1のカラムを洗浄する、ステップ、

—(l) 任意選択で、前記第3のカラムを洗浄緩衝液で洗浄して、洗浄された第3のカラムを得るステップ、

—(m) 前記第1のカラム及び前記第2のカラムをバイパスし、前記第3のクロマトグラフィー媒体に結合した前記完全 r A A V 粒子を溶出緩衝液で溶出して、第3の溶出物及び溶出された第3のカラムを得るステップであり、前記第3の溶出物は、前記完全 r A A V 粒子対前記不完全 r A A V 粒子の増加した比を含む、ステップ、並びに

10

20

30

40

50

(n) 前記第1の溶出物、前記第2の溶出物、及び前記第3の溶出物を一緒にして、完全 r A A V 粒子の精製調製物を生成するステップを含む方法。

〔10〕前記第1のクロマトグラフィー媒体及び/又は前記第2のクロマトグラフィー媒体及び/又は前記第3のクロマトグラフィー媒体は、イオン交換カラムクロマトグラフィー媒体、好ましくは、陰イオン交換クロマトグラフィー媒体である、前記〔9〕に記載の方法。

〔11〕前記ステップ(b)~(m)は、1回又は複数回のサイクルで実施される、前記〔9〕又は〔10〕に記載の方法。

〔12〕前記第2のカラムは、ステップ(c)の後で部分的に負荷される、前記〔9〕~〔11〕のいずれか一項に記載の方法。 10

〔13〕前記第3のカラムは、ステップ(g)の後で部分的に負荷される、前記〔9〕~〔12〕のいずれか一項に記載の方法。

〔14〕前記第1のカラムクロマトグラフィー媒体は、Poros 50HQ、Poros 50D、Poros 50PI、Capto ImpRes Q、CIMmultus<sup>TM</sup> Q Aモノリシックカラム、及びPoros XQからなる群から選択され、好ましくは、Poros XQである、前記〔9〕~〔13〕のいずれか一項に記載の方法。

〔15〕前記不完全粒子は、空粒子及び/又は部分粒子を含み、好ましくは空粒子及び部分粒子を両方とも含む、前記〔1〕~〔14〕のいずれか一項に記載の方法。

〔16〕前記負荷緩衝液は、Tris、Bis-tris、Bis-trisプロパン、Tris酢酸、エタノールアミン、及びホスフェートからなる群から選択される少なくとも1つの緩衝剤を含む、前記〔1〕~〔15〕のいずれか一項に記載の方法。 20

〔17〕前記負荷緩衝液は、K(I)、Li(I)、Ca(II)、Mg(II)、Cu(II)、Ba(II)、Co(II)、Ni(II)、Mn(II)、Zn(II)、Cd(II)、Pb(II)、Fe(III)、Fe(II)、Na(I)、及びNH<sub>4</sub><sup>+</sup>からなる群から選択される陽イオンの少なくとも1つの塩を含む、前記〔1〕~〔16〕のいずれか一項に記載の方法。

〔18〕前記負荷緩衝液は、約10~100mMのナトリウム塩、好ましくは20~60mM NaClを含む、前記〔1〕~〔17〕のいずれか一項に記載の方法。

〔19〕前記負荷緩衝液は、約0~20mMのマグネシウム塩、好ましくは1~10mM MgCl<sub>2</sub>を含む、前記〔1〕~〔17〕のいずれか一項に記載の方法。 30

〔20〕前記負荷緩衝液は、約0~10mMのカルシウム塩、好ましくは0.1~2.5mM CaCl<sub>2</sub>を含む、前記〔1〕~〔17〕のいずれか一項に記載の方法。

〔21〕前記負荷緩衝液は、約0~100mMのリチウム塩、好ましくは0~75mM LiClを含む、前記〔1〕~〔17〕のいずれか一項に記載の方法。

〔22〕前記負荷緩衝液は、約0~5mMの銅塩、好ましくは0.1~2.5mM CuCl<sub>2</sub>を含む、前記〔1〕~〔17〕のいずれか一項に記載の方法。

〔23〕前記負荷緩衝液は、約5~100mMのアンモニウム塩、好ましくは10~50mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>を含む、前記〔1〕~〔17〕のいずれか一項に記載の方法。

〔24〕前記負荷緩衝液は、約20~60mM NaCl、20~50mM Tris、1~5mM MgCl<sub>2</sub>、0~75mM LiCl、0~10mM CuCl<sub>2</sub>、及び/又は0.1~2.5mM CaCl<sub>2</sub>を含む、前記〔1〕~〔23〕のいずれか一項に記載の方法。 40

〔25〕前記負荷緩衝液は、約20~60mM NaCl、10~30mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>、1~5mM MgCl<sub>2</sub>、0.1~2.5mM CuCl<sub>2</sub>を、好ましくはTris中に、より好ましくは20~100mM Tris中に、含む、前記〔1〕~〔23〕のいずれか一項に記載の方法。

〔26〕前記負荷緩衝液は、約6~10のpHを有する、前記〔1〕~〔25〕のいずれか一項に記載の方法。

〔27〕前記負荷緩衝液は、ポロクサマー188、ポリソルベート80、ポリソルベート 50

20、NP-40、Triton X-100、及びTriton CG-110からなる群から選択される少なくとも1つの界面活性剤を含む、前記〔1〕～〔26〕のいずれか一項に記載の方法。

〔28〕前記負荷緩衝液中の前記界面活性剤の濃度は、0.0001%～0.1%である、前記〔27〕に記載の方法。

〔29〕前記溶出緩衝液は、K(I)、Li(I)、Ca(II)、Mg(II)、Cu(II)、Ba(II)、Co(II)、Ni(II)、Mn(II)、Zn(II)、Cd(II)、Pb(II)、Fe(III)、Fe(II)、Na(I)、及びNH<sub>4</sub><sup>+</sup>からなる群から選択される陽イオンの少なくとも1つの塩を含む、前記〔1〕～〔28〕のいずれか一項に記載の方法。

10

〔30〕前記溶出緩衝液は、約0～1000mM NaCl、好ましくは、20～300mM NaClを含む、前記〔1〕～〔29〕のいずれか一項に記載の方法。

〔31〕前記溶出緩衝液は、約0～30mM MgCl<sub>2</sub>、好ましくは、2～15mM MgCl<sub>2</sub>を含む、前記〔1〕～〔29〕のいずれか一項に記載の方法。

〔32〕前記溶出緩衝液は、約0～200mM LiCl、好ましくは、0～150mM LiClを含む、前記〔1〕～〔29〕のいずれか一項に記載の方法。

〔33〕前記溶出緩衝液は、約0.1～20mM CaCl<sub>2</sub>、好ましくは、5～10mM CaCl<sub>2</sub>を含む、前記〔1〕～〔29〕のいずれか一項に記載の方法。

〔34〕前記溶出緩衝液は、約0～10mM CuCl<sub>2</sub>、好ましくは、0～3mM CuCl<sub>2</sub>を含む、前記〔1〕～〔29〕のいずれか一項に記載の方法。

20

〔35〕前記溶出緩衝液は、約5～100mMのアンモニウム塩、好ましくは10～50mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>を含む、前記〔1〕～〔29〕のいずれか一項に記載の方法。

〔36〕前記溶出緩衝液は、Tris、Bis-tris、Bis-trisプロパン、Tris酢酸、エタノールアミン、及びホスフェートからなる群から選択される少なくとも1つの緩衝剤を含む、前記〔1〕～〔35〕のいずれか一項に記載の方法。

〔37〕前記溶出緩衝液は、約20～200mM NaClを、好ましくはTris緩衝液中に、含む、前記〔1〕～〔36〕のいずれか一項に記載の方法。

〔38〕前記溶出緩衝液は、ポロクサマー188、ポリソルベート80、ポリソルベート20、NP-40、Triton X-100、及びTriton CG-110からなる群から選択される少なくとも1つの界面活性剤を含む、前記〔1〕～〔37〕のいずれか一項に記載の方法。

30

〔39〕前記溶出緩衝液中の前記界面活性剤の濃度は、0.0001%～0.1%である、前記〔38〕に記載の方法。

〔40〕前記溶出緩衝液は、約6～10、好ましくは8～9のpHを有する、前記〔1〕～〔39〕のいずれか一項に記載の方法。

〔41〕前記rAAV調製物中の不純物は、前記完全rAAV粒子よりも高い親和性で前記第1のカラムに結合する、前記〔9〕又は〔10〕に記載の方法。

〔42〕完全組換えアデノ随伴ウイルス(rAAV)粒子を精製するための方法であって

— (a) 前記完全rAAV粒子及び不完全粒子を含むrAAV調製物を準備するステップ、

40

(b) 負荷緩衝液中の前記rAAV調製物を、クロマトグラフィー媒体を含むカラムに負荷するステップであり、前記負荷緩衝液はCaCl<sub>2</sub>を含み、前記完全rAAV粒子は前記クロマトグラフィー媒体に結合する、ステップ、及び

(c) 前記クロマトグラフィー媒体に結合した前記完全rAAV粒子を溶出緩衝液で溶出して、精製調製物を得るステップであり、前記溶出緩衝液はCaCl<sub>2</sub>を含む、ステップを含む方法。

〔43〕前記クロマトグラフィー媒体は、イオン交換カラムクロマトグラフィー媒体、好ましくは、陰イオン交換クロマトグラフィー媒体である、前記〔42〕に記載の方法。

〔44〕前記カラムクロマトグラフィー媒体は、Poros 50HQ、Poros 50D

50

Poros 50 PI、Capto ImpRes Q、CIMmultus<sup>TM</sup>QAモノリシックカラム、及びPoros XQからなる群から選択され、好ましくは、Poros XQである、前記〔43〕に記載の方法。

〔45〕前記負荷緩衝液は、K(I)、Li(I)、Ca(II)、Mg(II)、Cu(II)、Ba(II)、Co(II)、Ni(II)、Mn(II)、Zn(II)、Cd(II)、Pb(II)、Fe(III)、Fe(II)、Na(I)、及びNH<sub>4</sub><sup>±</sup>からなる群から選択される陽イオンの少なくとも1つの塩を含む、前記〔42〕～〔44〕のいずれか一項に記載の方法。

〔46〕前記負荷緩衝液は、約0～10mM CaCl<sub>2</sub>、好ましくは、0.1～2.5mM CaCl<sub>2</sub>を含む、前記〔42〕～〔45〕のいずれか一項に記載の方法。

10

〔47〕前記負荷緩衝液は、約10～100mM NaCl、好ましくは20～60mM NaClを含む、前記〔42〕～〔45〕のいずれか一項に記載の方法。

〔48〕前記負荷緩衝液は、約0～20mM MgCl<sub>2</sub>、好ましくは、1～10mM MgCl<sub>2</sub>を含む、前記〔42〕～〔45〕のいずれか一項に記載の方法。

〔49〕前記負荷緩衝液は、約0～100mM LiCl、好ましくは、0～75mM LiClを含む、前記〔42〕～〔45〕のいずれか一項に記載の方法。

〔50〕前記負荷緩衝液は、約0～5mMの銅塩、好ましくは0.1～2.5mM CuCl<sub>2</sub>を含む、前記〔42〕～〔45〕のいずれか一項に記載の方法。

〔51〕前記負荷緩衝液は、約5～100mMのアンモニウム塩、好ましくは10～50mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>を含む、前記〔42〕～〔45〕のいずれか一項に記載の方法。

20

〔52〕前記負荷緩衝液は、Tris、Bis-tris、Bis-trisプロパン、Tris酢酸、エタノールアミン、及びホスフェートからなる群から選択される少なくとも1つの緩衝剤を含む、前記〔42〕～〔51〕のいずれか一項に記載の方法。

〔53〕前記負荷緩衝液は、約20～60mM NaCl、1～5mM MgCl<sub>2</sub>、0～75mM LiCl、0.1～2.5mM CaCl<sub>2</sub>を、好ましくは20～50mM Tris中に、含む、前記〔42〕～〔52〕のいずれか一項に記載の方法。

〔54〕前記負荷緩衝液は、約20～60mM NaCl、10～30mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>、1～5mM MgCl<sub>2</sub>、0.1～2.5mM CuCl<sub>2</sub>を、好ましくはTris中に、より好ましくは20～100mM Tris中に、含む、前記〔42〕～〔52〕のいずれか一項に記載の方法。

30

〔55〕前記負荷緩衝液は、ポロクサマー188、ポリソルベート80、ポリソルベート20、NP-40、Triton X-100、及びTriton CG-110からなる群から選択される少なくとも1つの界面活性剤を含む、前記〔42〕～〔54〕のいずれか一項に記載の方法。

〔56〕前記負荷緩衝液中の前記界面活性剤の濃度は、0.0001%～0.1%である、前記〔55〕に記載の方法。

〔57〕前記負荷緩衝液は、約6～10、好ましくは8～9のpHを有する、前記〔42〕～〔56〕のいずれか一項に記載の方法。

〔58〕前記溶出緩衝液は、K(I)、Li(I)、Ca(II)、Mg(II)、Cu(II)、Ba(II)、Co(II)、Ni(II)、Mn(II)、Zn(II)、Cd(II)、Pb(II)、Fe(III)、Fe(II)、Na(I)、及びNH<sub>4</sub><sup>±</sup>からなる群から選択される陽イオンの少なくとも1つの塩を含む、前記〔42〕～〔57〕のいずれか一項に記載の方法。

40

〔59〕前記溶出緩衝液は、約0.1～20mM CaCl<sub>2</sub>、好ましくは、5～10mM CaCl<sub>2</sub>を含む、前記〔42〕～〔58〕のいずれか一項に記載の方法。

〔60〕前記溶出緩衝液は、約0～1000mM NaCl、好ましくは、20～300mM NaClを含む、前記〔42〕～〔58〕のいずれか一項に記載の方法。

〔61〕前記溶出緩衝液は、約0～30mM MgCl<sub>2</sub>、好ましくは、2～15mM MgCl<sub>2</sub>を含む、前記〔42〕～〔58〕のいずれか一項に記載の方法。

〔62〕前記溶出緩衝液は、約0～200mM LiCl、好ましくは、0～150mM

50

LiClを含む、前記〔42〕～〔58〕のいずれか一項に記載の方法。

〔63〕前記溶出緩衝液は、Tris、Bis-tris、Bis-trisプロパン、Tris酢酸、エタノールアミン、及びホスフェートからなる群から選択される少なくとも1つの緩衝剤を含む、前記〔42〕～〔62〕のいずれか一項に記載の方法。

〔64〕前記溶出緩衝液は、約20～200mM NaClを、好ましくは40～60mM Tris緩衝液中に、含む、前記〔42〕～〔63〕のいずれか一項に記載の方法。

〔65〕前記溶出緩衝液は、ポロクサマー188、ポリソルベート80、ポリソルベート20、NP-40、Triton X-100、及びTriton CG-110からなる群から選択される少なくとも1つの界面活性剤を含む、前記〔42〕～〔64〕のいずれか一項に記載の方法。

10

〔66〕前記溶出緩衝液中の前記界面活性剤の濃度は、0.0001%～0.1%である、前記〔65〕に記載の方法。

〔67〕前記溶出緩衝液は、約6～10、好ましくは8～9のpHを有する、前記〔42〕～〔66〕のいずれか一項に記載の方法。

〔68〕精製された完全rAAV粒子の収率は、70%以上、好ましくは80%以上、より好ましくは90%以上、最も好ましくは95%以上である、前記〔1〕～〔67〕のいずれか一項に記載の方法。

〔69〕前記精製調製物中の前記完全rAAV粒子対前期不完全粒子の比は、9：1以上、好ましくは49：1以上である、前記〔1〕～〔68〕のいずれか一項に記載の方法。

〔70〕前記不完全粒子は、空粒子及び/又は部分粒子を含み、好ましくは空粒子及び部分粒子を両方とも含む、前記〔1〕～〔69〕のいずれか一項に記載の方法。

20

〔71〕部分rAAV粒子を精製するための方法であって、

（d）空粒子及び部分粒子を含む不完全rAAV調製物を準備するステップ、

（e）負荷緩衝液中の前記不完全rAAV調製物を、クロマトグラフィー媒体を含むカラムに負荷するステップであり、前記部分rAAV粒子は、前記クロマトグラフィー媒体に対して前記空粒子よりも高い結合親和性を有する、ステップ、並びに

（f）前記クロマトグラフィー媒体に結合した前記部分rAAV粒子を溶出緩衝液で溶出して、精製調製物を得るステップ

を含む方法。

〔72〕前記完全rAAV粒子は、ポリペプチドをコードする導入遺伝子、又はsiRNA、アンチセンス分子、miRNA、リボザイム、及びshRNAからなる群から選択される核酸を含む、前記〔1〕～〔71〕のいずれか一項に記載の方法。

30

〔73〕空組換えアデノ随伴ウイルス（rAAV）粒子を精製するための方法であって、

（a）前記空rAAV粒子、並びに完全rAAV粒子及び部分rAAV粒子の少なくとも1つを含むrAAV調製物を準備するステップ、

（b）負荷緩衝液中の前記rAAV調製物を、クロマトグラフィー媒体を含むカラムに負荷するステップであり、前記空rAAV粒子は、前記クロマトグラフィー媒体に対して前記完全粒子又は前記部分粒子よりも高い結合親和性を有し、前記カラムにアプライされる前記空rAAV粒子、並びに完全粒子及び部分粒子の前記少なくとも1つの量は、前記クロマトグラフィー媒体の結合容量を超えており、前記クロマトグラフィー媒体に結合した完全粒子及び部分粒子の前記少なくとも1つは、前記空rAAV粒子により置換され、前記カラムからフロースルーへ入る、ステップ、並びに

40

（c）前記クロマトグラフィー媒体に結合した前記空rAAV粒子を溶出緩衝液で溶出して、精製調製物を得るステップ

を含む方法。

〔74〕前記rAAV粒子は、AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV9.47、AAV9(hu14)、AAV10、AAV11、AAV12、Rh8、Rh10、Rh74、AAV3B、AAV-2i8、LK03、RHM4-1、DJ、DJ8、NP59、Anc-80、及びそれらのバリエーションからなる群から選択される1つ又は複数のAAVに由来するカプシドを含む

50

前記〔1〕～〔73〕のいずれか一項に記載の方法。

【**手続補正2**】

【**補正対象書類名**】特許請求の範囲

【**補正対象項目名**】全文

【**補正方法**】変更

【**補正の内容**】

【**特許請求の範囲**】

【**請求項1**】

完全組換えアデノ随伴ウイルス（rAAV）粒子を精製するための方法であって、

（a）完全rAAV粒子及び不完全rAAV粒子を含むrAAV調製物を準備するステップ、 10

（b）負荷緩衝液中の前記rAAV調製物を、クロマトグラフィー媒体を含むカラムに負荷するステップであり、前記完全rAAV粒子は、前記クロマトグラフィー媒体に対して前記不完全粒子よりも高い結合親和性を有し、前記カラムにアプライされる前記完全rAAV粒子及び前記不完全粒子の量は、前記クロマトグラフィー媒体の結合容量を超えており、前記クロマトグラフィー媒体に結合した前記不完全粒子は、前記完全rAAV粒子により置換され、前記カラムからフロースルーへ入る、ステップ、並びに

（c）前記クロマトグラフィー媒体に結合した前記完全rAAV粒子を溶出緩衝液で溶出して、精製調製物を得るステップ

を含む方法。 20

【**請求項2**】

前記クロマトグラフィー媒体は、イオン交換カラムクロマトグラフィー媒体、好ましくは、陰イオン交換クロマトグラフィー媒体である、請求項1に記載の方法。

【**請求項3**】

前記カラムクロマトグラフィー媒体は、Poros 50HQ、Poros 50D、Poros 50PI、Capto ImpRes Q、CIMmultus<sup>TM</sup>QAモノリシックカラム、及びPoros XQからなる群から選択され、好ましくは、Poros XQである、請求項2に記載の方法。

【**請求項4**】

完全組換えアデノ随伴ウイルス（rAAV）粒子を精製するための方法であって、 30

（a）前記完全rAAV粒子及び不完全粒子を含むrAAV調製物を準備するステップ

、  
（b）負荷緩衝液中の前記rAAV調製物の第1のバッチを、第1のクロマトグラフィー媒体を含む第1のカラムに負荷するステップであり、前記完全rAAV粒子は、前記第1のクロマトグラフィー媒体に対して前記不完全粒子よりも高い結合親和性を有し、前記第1のカラムにアプライされる前記完全rAAV粒子及び前記不完全粒子の量は、前記第1のクロマトグラフィー媒体の結合容量を超えており、前記第1のクロマトグラフィー媒体に結合した前記不完全粒子は、前記完全rAAV粒子により置換され、前記第1のカラムから第1の負荷フロースルーへ入る、ステップ、

（c）前記第1の負荷フロースルーを、第2のクロマトグラフィー媒体を含む第2のカラムに負荷して、負荷された又は部分的に負荷された第2のカラムを得るステップであり、前記第2のクロマトグラフィー媒体は、前記第1のクロマトグラフィー媒体と同じタイプである、ステップ、 40

（d）任意選択で、前記第1のカラムを洗浄緩衝液で洗浄して、洗浄された第1のカラムを得るステップ、

（e）前記第1のクロマトグラフィー媒体に結合した前記完全rAAV粒子を溶出緩衝液で溶出して、前記第1のカラムからの第1の溶出物及び溶出された第1のカラムを得るステップであり、前記第1の溶出物は、前記完全rAAV粒子対前記不完全rAAV粒子の増加した比を含む、ステップ、

（f）任意選択で、負荷緩衝液中の前記rAAV調製物の第2のバッチを、前記少なく 50

とも部分的に負荷された第2のカラムにアプライするステップであり、前記第2のカラムにアプライされる前記完全 r A A V 粒子及び前記不完全粒子の量は、前記第2のクロマトグラフィー媒体の結合容量を超えており、前記第2のクロマトグラフィー媒体に結合した前記不完全粒子は、前記完全 r A A V 粒子により置換され、前記第2のカラムから第2の負荷フロースルーへ入る、ステップ、

(g) 任意選択で、ステップ(e)の後で、前記第2のカラムからの前記負荷フロースルーを前記溶出された第1のカラムに負荷して、第2の負荷された第1のカラムを得、任意選択で、ステップ(e)で溶出を行う前に、第2の負荷された第1のカラムを洗浄するステップ、

(h) 任意選択で、前記第2のカラムを洗浄緩衝液で洗浄して、洗浄された第2のカラムを得るステップ、 10

(i) 前記第2のクロマトグラフィー媒体に結合した前記完全 r A A V 粒子を溶出緩衝液で溶出して、第2の溶出物及び溶出された第2のカラムを得るステップであり、前記第2の溶出物は、前記完全 r A A V 粒子対前記不完全 r A A V 粒子の増加した比を含む、ステップ、並びに

(j) 前記第1の溶出物及び前記第2の溶出物を一緒にして、完全 r A A V 粒子の精製調製物を生成するステップを含む方法。

【請求項5】

前記第1のクロマトグラフィー媒体及び/又は前記第2のクロマトグラフィー媒体は、イオン交換カラムクロマトグラフィー媒体、好ましくは、陰イオン交換クロマトグラフィー媒体である、請求項4に記載の方法。 20

【請求項6】

前記ステップ(b)~(i)は、1回又は複数回のサイクルで実施される、請求項4に記載の方法。

【請求項7】

前記第2のカラムは、ステップ(c)の後で部分的に負荷される、請求項4に記載の方法。

【請求項8】

前記第1のカラムクロマトグラフィー媒体は、Poros 50 HQ、Poros 50 D、Poros 50 PI、Capto ImpRes Q、CIMmultus™QAモノリシックカラム、及びPoros XQからなる群から選択され、好ましくは、Poros XQである、請求項5に記載の方法。 30

【請求項9】

完全組換えアデノ随伴ウイルス(r A A V)粒子を精製するための方法であって、

(a) 前記完全 r A A V 粒子及び不完全粒子を含む r A A V 調製物を準備するステップ、

(b) 負荷緩衝液中の前記 r A A V 調製物の第1のバッチを、第1のクロマトグラフィー媒体を含む第1のカラムに負荷するステップであり、前記完全 r A A V 粒子は、前記第1のクロマトグラフィー媒体に対して前記不完全粒子よりも高い結合親和性を有し、前記第1のカラムにアプライされる前記完全 r A A V 粒子及び前記不完全粒子の量は、前記第1のクロマトグラフィー媒体の結合容量を超えており、前記第1のクロマトグラフィー媒体に結合した前記不完全粒子は、前記完全 r A A V 粒子により置換され、前記第1のカラムから第1の負荷フロースルーへ入る、ステップ、 40

(c) 前記第1の負荷フロースルーを、第2のクロマトグラフィー媒体を含む第2のカラムに負荷して、負荷された又は部分的に負荷された第2のカラムを得るステップであり、前記第2のクロマトグラフィー媒体は、前記第1のクロマトグラフィー媒体と同じタイプである、ステップ、

(d) 任意選択で、前記第1のカラムを洗浄緩衝液で洗浄して、洗浄された第1のカラムを得るステップ、 50

(e) 前記第1のクロマトグラフィー媒体に結合した前記完全 r A A V 粒子を溶出緩衝液で溶出して、前記第1のカラムからの第1の溶出物及び溶出された第1のカラムを得るステップであり、前記第1の溶出物は、前記完全 r A A V 粒子対前記不完全 r A A V 粒子の増加した比を含む、ステップ、

(f) 任意選択で、負荷緩衝液中の前記 r A A V 調製物の第2のバッチを、前記少なくとも部分的に負荷された第2のカラムにアプライするステップであり、前記第2のカラムにアプライされる前記完全 r A A V 粒子及び前記不完全粒子の量は、前記第2のクロマトグラフィー媒体の結合容量を超えており、前記第2のクロマトグラフィー媒体に結合した前記不完全粒子は、前記完全 r A A V 粒子により置換され、前記第2のカラムから第2の負荷フロースルーへ入る、ステップ、

10

(g) 前記第2のカラムからの前記第2の負荷フロースルーを、第3のクロマトグラフィー媒体を含む第3のカラムに負荷して、負荷された又は部分的に負荷された第3のカラムを得るステップであり、好ましくは、前記第3のクロマトグラフィー媒体は、前記第1のクロマトグラフィー媒体と同じタイプである、ステップ、

(h) 任意選択で、前記第2のカラムを洗浄緩衝液で洗浄して、洗浄された第2のカラムを得るステップ、

(i) ステップ(k)の後で、又は洗浄ステップ(l)が実施される場合には前記洗浄ステップ(l)の後で、前記第1のカラムをバイパスし、前記第2のクロマトグラフィー媒体に結合した前記完全 r A A V 粒子を溶出緩衝液で溶出して、第2の溶出物及び溶出された第2のカラムを得るステップであり、前記第2の溶出物は、前記完全 r A A V 粒子対前記不完全 r A A V 粒子の増加した比を含む、ステップ、

20

(j) 任意選択で、前記第2カラムフロースルー後に前記第3のカラムが飽和(つまり、負荷)されていない場合、負荷緩衝液中の前記 r A A V 調製物の第3バッチを、前記部分的に負荷された第3のカラムにアプライしてもよく、前記第3のカラムにアプライされる前記完全 r A A V 粒子及び前記不完全粒子の量は、前記第3のクロマトグラフィー媒体の結合容量を超えており、前記第3のクロマトグラフィー媒体に結合した前記不完全粒子は、前記完全 r A A V 粒子により置換され、前記第3のカラムから第3の負荷フロースルーへ入る、ステップ、

(k) ステップ(n)が実施される場合、ステップ(d)と(e)との間で、前記第3のカラムからの前記第3の負荷フロースルーを、前記洗浄された第1のカラムに負荷して、第2の負荷された第1のカラムを得、任意選択で、ステップ(e)で溶出を行う前に、第2の負荷された第1のカラムを洗浄する、ステップ、

30

(l) 任意選択で、前記第3のカラムを洗浄緩衝液で洗浄して、洗浄された第3のカラムを得るステップ、

(m) 前記第1のカラム及び前記第2のカラムをバイパスし、前記第3のクロマトグラフィー媒体に結合した前記完全 r A A V 粒子を溶出緩衝液で溶出して、第3の溶出物及び溶出された第3のカラムを得るステップであり、前記第3の溶出物は、前記完全 r A A V 粒子対前記不完全 r A A V 粒子の増加した比を含む、ステップ、並びに

(n) 前記第1の溶出物、前記第2の溶出物、及び前記第3の溶出物を一緒にして、完全 r A A V 粒子の精製調製物を生成するステップを含む方法。

40

#### 【請求項10】

前記第1のクロマトグラフィー媒体及び/又は前記第2のクロマトグラフィー媒体及び/又は前記第3のクロマトグラフィー媒体は、イオン交換カラムクロマトグラフィー媒体、好ましくは、陰イオン交換クロマトグラフィー媒体である、請求項9に記載の方法。

#### 【請求項11】

前記ステップ(b)~(m)は、1回又は複数回のサイクルで実施される、請求項9に記載の方法。

#### 【請求項12】

前記第2のカラムは、ステップ(c)の後で部分的に負荷される、請求項9に記載の方

50

法。

【請求項 13】

前記第3のカラムは、ステップ(g)の後で部分的に負荷される、請求項9に記載の方法。

【請求項 14】

前記第1のカラムクロマトグラフィー媒体は、Poros 50HQ、Poros 50D、Poros 50PI、Capto ImpRes Q、CIMmultus<sup>TM</sup>QAモノリシックカラム、及びPoros XQからなる群から選択され、好ましくは、Poros XQである、請求項9に記載の方法。

【請求項 15】

前記不完全粒子は、空粒子及び/又は部分粒子を含み、好ましくは空粒子及び部分粒子を両方とも含む、請求項1~14のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 16】

前記負荷緩衝液は、Tris、Bis-tris、Bis-trisプロパン、Tris酢酸、エタノールアミン、及びホスフェートからなる群から選択される少なくとも1つの緩衝剤を含む、請求項1~14のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 17】

前記負荷緩衝液は、K(I)、Li(I)、Ca(II)、Mg(II)、Cu(II)、Ba(II)、Co(II)、Ni(II)、Mn(II)、Zn(II)、Cd(II)、Pb(II)、Fe(III)、Fe(II)、Na(I)、及びNH<sub>4</sub><sup>+</sup>からなる群から選択される陽イオンの少なくとも1つの塩を含む、請求項1~14のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 18】

前記負荷緩衝液は、

a) 約10~100mMのナトリウム塩、好ましくは20~60mM NaCl;

b) 約0~20mMのマグネシウム塩、好ましくは1~10mM MgCl<sub>2</sub>;

c) 約0~10mMのカルシウム塩、好ましくは0.1~2.5mM CaCl<sub>2</sub>;

d) 約0~100mMのリチウム塩、好ましくは0~75mM LiCl;

e) 約0~5mMの銅塩、好ましくは0.1~2.5mM CuCl<sub>2</sub>;又は

f) 約5~100mMのアンモニウム塩、好ましくは10~50mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>

を含む、請求項1~14のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 19】

前記負荷緩衝液は、約20~60mM NaCl、20~50mM Tris、1~5mM MgCl<sub>2</sub>、0~75mM LiCl、0~10mM CuCl<sub>2</sub>、及び/又は0.1~2.5mM CaCl<sub>2</sub>を含む、又は約20~60mM NaCl、10~30mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>、1~5mM MgCl<sub>2</sub>、0.1~2.5mM CuCl<sub>2</sub>を、好ましくはTris中に、より好ましくは20~100mM Tris中に、含む、請求項1~14のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 20】

前記負荷緩衝液は、約6~10のpHを有する、請求項1~14のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 21】

前記負荷緩衝液は、ポロクサマー188、ポリソルベート80、ポリソルベート20、NP-40、Triton X-100、及びTriton CG-110からなる群から選択される少なくとも1つの界面活性剤を含む、請求項1~14のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 22】

前記負荷緩衝液中の前記界面活性剤の濃度は、0.0001%~0.1%である、請求項21に記載の方法。

【請求項 23】

10

20

30

40

50

前記溶出緩衝液は、 $K(I)$ 、 $Li(I)$ 、 $Ca(II)$ 、 $Mg(II)$ 、 $Cu(II)$ 、 $Ba(II)$ 、 $Co(II)$ 、 $Ni(II)$ 、 $Mn(II)$ 、 $Zn(II)$ 、 $Cd(II)$ 、 $Pb(II)$ 、 $Fe(III)$ 、 $Fe(II)$ 、 $Na(I)$ 、及び $NH_4^+$ からなる群から選択される陽イオンの少なくとも1つの塩を含む、請求項1～14のいずれか一項に記載の方法。

【請求項24】

前記溶出緩衝液は、

- a) 約0～1000mM  $NaCl$ 、好ましくは、20～300mM  $NaCl$ ；
- b) 約0～30mM  $MgCl_2$ 、好ましくは、2～15mM  $MgCl_2$ ；
- c) 約0～200mM  $LiCl$ 、好ましくは、0～150mM  $LiCl$ ；
- d) 約0.1～20mM  $CaCl_2$ 、好ましくは、5～10mM  $CaCl_2$ ；
- e) 約0～10mM  $CuCl_2$ 、好ましくは、0～3mM  $CuCl_2$ ；又は
- f) 約5～100mMのアンモニウム塩、好ましくは10～50mM  $(NH_4)_2SO_4$ を含む、請求項1～14のいずれか一項に記載の方法。

10

【請求項25】

前記溶出緩衝液は、Tris、Bis-tris、Bis-trisプロパン、Tris酢酸、エタノールアミン、及びホスフェートからなる群から選択される少なくとも1つの緩衝剤を含む、請求項1～14のいずれか一項に記載の方法。

【請求項26】

前記溶出緩衝液は、約20～200mM  $NaCl$ を、好ましくはTris緩衝液中に

20

【請求項27】

前記rAAV調製物中の不純物は、前記完全rAAV粒子よりも高い親和性で前記第1のカラムに結合する、請求項9に記載の方法。

【請求項28】

完全組換えアデノ随伴ウイルス(rAAV)粒子を精製するための方法であって、

- (a) 前記完全rAAV粒子及び不完全粒子を含むrAAV調製物を準備するステップ、
- (b) 負荷緩衝液中の前記rAAV調製物を、クロマトグラフィー媒体を含むカラムに負荷するステップであり、前記負荷緩衝液は $CaCl_2$ を含み、前記完全rAAV粒子は前記クロマトグラフィー媒体に結合する、ステップ、及び
- (c) 前記クロマトグラフィー媒体に結合した前記完全rAAV粒子を溶出緩衝液で溶出して、精製調製物を得るステップであり、前記溶出緩衝液は $CaCl_2$ を含む、ステップを含む方法。

30

【請求項29】

前記クロマトグラフィー媒体は、イオン交換カラムクロマトグラフィー媒体、好ましくは、陰イオン交換クロマトグラフィー媒体である、請求項28に記載の方法。

【請求項30】

前記カラムクロマトグラフィー媒体は、Poros 50HQ、Poros 50D、Poros 50PI、Capto ImpRes Q、CIMmultus<sup>TM</sup>QAモノリシックカラム、及びPoros XQからなる群から選択され、好ましくは、Poros XQである、請求項29に記載の方法。

40

【請求項31】

前記負荷緩衝液は、 $K(I)$ 、 $Li(I)$ 、 $Ca(II)$ 、 $Mg(II)$ 、 $Cu(II)$ 、 $Ba(II)$ 、 $Co(II)$ 、 $Ni(II)$ 、 $Mn(II)$ 、 $Zn(II)$ 、 $Cd(II)$ 、 $Pb(II)$ 、 $Fe(III)$ 、 $Fe(II)$ 、 $Na(I)$ 、及び $NH_4^+$ からなる群から選択される陽イオンの少なくとも1つの塩を含む、請求項28に記載の方法。

【請求項32】

前記負荷緩衝液は、

50

a) 約 0 ~ 10 mM  $\text{CaCl}_2$ 、好ましくは、0.1 ~ 2.5 mM  $\text{CaCl}_2$ ;

b) 約 10 ~ 100 mM  $\text{NaCl}$ 、好ましくは 20 ~ 60 mM  $\text{NaCl}$ ;

c) 約 0 ~ 20 mM  $\text{MgCl}_2$ 、好ましくは、1 ~ 10 mM  $\text{MgCl}_2$ ;

d) 約 0 ~ 100 mM  $\text{LiCl}$ 、好ましくは、0 ~ 75 mM  $\text{LiCl}$ ;

e) 約 0 ~ 5 mM の銅塩、好ましくは 0.1 ~ 2.5 mM  $\text{CuCl}_2$ ; 又は

f) 約 5 ~ 100 mM のアンモニウム塩、好ましくは 10 ~ 50 mM  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  を含む、請求項 28 に記載の方法。

【請求項 33】

前記負荷緩衝液は、Tris、Bis-tris、Bis-trisプロパン、Tris 酢酸、エタノールアミン、及びホスフェートからなる群から選択される少なくとも 1 つの緩衝剤を含む、請求項 28 ~ 32 のいずれか一項に記載の方法。 10

【請求項 34】

前記負荷緩衝液は、約 20 ~ 60 mM  $\text{NaCl}$ 、1 ~ 5 mM  $\text{MgCl}_2$ 、0 ~ 75 mM  $\text{LiCl}$ 、0.1 ~ 2.5 mM  $\text{CaCl}_2$  を、好ましくは 20 ~ 50 mM Tris 中に、含む、又は約 20 ~ 60 mM  $\text{NaCl}$ 、10 ~ 30 mM  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、1 ~ 5 mM  $\text{MgCl}_2$ 、0.1 ~ 2.5 mM  $\text{CuCl}_2$  を、好ましくは Tris 中に、より好ましくは 20 ~ 100 mM Tris 中に、含む、請求項 28 ~ 32 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 35】

前記負荷緩衝液は、約 6 ~ 10、好ましくは 8 ~ 9 の pH を有する、請求項 28 ~ 32 のいずれか一項に記載の方法。 20

【請求項 36】

前記溶出緩衝液は、K(I)、Li(I)、Ca(II)、Mg(II)、Cu(II)、Ba(II)、Co(II)、Ni(II)、Mn(II)、Zn(II)、Cd(II)、Pb(II)、Fe(III)、Fe(II)、Na(I)、及び  $\text{NH}_4^+$  からなる群から選択される陽イオンの少なくとも 1 つの塩を含む、請求項 28 ~ 32 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 37】

前記溶出緩衝液は、

a) 約 0.1 ~ 20 mM  $\text{CaCl}_2$ 、好ましくは、5 ~ 10 mM  $\text{CaCl}_2$ ;

b) 約 0 ~ 1000 mM  $\text{NaCl}$ 、好ましくは、20 ~ 300 mM  $\text{NaCl}$ ;

c) 約 0 ~ 30 mM  $\text{MgCl}_2$ 、好ましくは、2 ~ 15 mM  $\text{MgCl}_2$ ; 又は

d) 約 0 ~ 200 mM  $\text{LiCl}$ 、好ましくは、0 ~ 150 mM  $\text{LiCl}$  を含む、請求項 28 ~ 32 のいずれか一項に記載の方法。 30

【請求項 38】

前記溶出緩衝液は、Tris、Bis-tris、Bis-trisプロパン、Tris 酢酸、エタノールアミン、及びホスフェートからなる群から選択される少なくとも 1 つの緩衝剤を含む、請求項 28 ~ 32 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 39】

前記溶出緩衝液は、約 20 ~ 200 mM  $\text{NaCl}$  を、好ましくは 40 ~ 60 mM Tris 緩衝液中に、含む、請求項 28 ~ 32 のいずれか一項に記載の方法。 40

【請求項 40】

前記負荷緩衝液及び / 又は溶出緩衝液は、ポロクサマー 188、ポリソルベート 80、ポリソルベート 20、NP-40、Triton X-100、及び Triton CG-110 からなる群から選択される少なくとも 1 つの界面活性剤を含む、請求項 28 ~ 32 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 41】

前記負荷緩衝液及び / 又は溶出緩衝液中の前記界面活性剤の濃度は、0.0001% ~ 0.1% である、請求項 40 に記載の方法。

【請求項 42】

前記溶出緩衝液は、約 6 ~ 10、好ましくは 8 ~ 9 の pH を有する、請求項 1、5、10 又は 28 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 43】

精製された完全 rAAV 粒子の収率は、70% 以上、好ましくは 80% 以上、より好ましくは 90% 以上、最も好ましくは 95% 以上である、請求項 1、5、10 又は 28 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 44】

前記精製調製物中の前記完全 rAAV 粒子対前期不完全粒子の比は、9 : 1 以上、好ましくは 49 : 1 以上である、請求項 1、5、10 又は 28 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 45】

前記不完全粒子は、空粒子及び / 又は部分粒子を含み、好ましくは空粒子及び部分粒子を両方とも含む、請求項 1、5、10 又は 28 のいずれか一項に記載の方法。

10

【請求項 46】

部分 rAAV 粒子を精製するための方法であって、

(a) 空粒子及び部分粒子を含む不完全 rAAV 調製物を準備するステップ、

(b) 負荷緩衝液中の前記不完全 rAAV 調製物を、クロマトグラフィー媒体を含むカラムに負荷するステップであり、前記部分 rAAV 粒子は、前記クロマトグラフィー媒体に対して前記空粒子よりも高い結合親和性を有する、ステップ、並びに

(c) 前記クロマトグラフィー媒体に結合した前記部分 rAAV 粒子を溶出緩衝液で溶出して、精製調製物を得るステップ

20

を含む方法。

【請求項 47】

前記完全 rAAV 粒子は、ポリペプチドをコードする導入遺伝子、又は siRNA、アンチセンス分子、miRNA、リボザイム、及び shRNA からなる群から選択される核酸を含む、請求項 1、5、10、28 又は 46 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 48】

空組換えアデノ随伴ウイルス (rAAV) 粒子を精製するための方法であって、

(a) 前記空 rAAV 粒子、並びに完全 rAAV 粒子及び部分 rAAV 粒子の少なくとも 1 つを含む rAAV 調製物を準備するステップ、

(b) 負荷緩衝液中の前記 rAAV 調製物を、クロマトグラフィー媒体を含むカラムに負荷するステップであり、前記空 rAAV 粒子は、前記クロマトグラフィー媒体に対して前記完全粒子又は前記部分粒子よりも高い結合親和性を有し、前記カラムにアプライされる前記空 rAAV 粒子、並びに完全粒子及び部分粒子の前記少なくとも 1 つの量は、前記クロマトグラフィー媒体の結合容量を超えており、前記クロマトグラフィー媒体に結合した完全粒子及び部分粒子の前記少なくとも 1 つは、前記空 rAAV 粒子により置換され、前記カラムからフロースルーへ入る、ステップ、並びに

30

(c) 前記クロマトグラフィー媒体に結合した前記空 rAAV 粒子を溶出緩衝液で溶出して、精製調製物を得るステップ

を含む方法。

【請求項 49】

前記 rAAV 粒子は、AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV9.47、AAV9(hu14)、AAV10、AAV11、AAV12、Rh8、Rh10、Rh74、AAV3B、AAV-2i8、LK03、RHM4-1、DJ、DJ8、NP59、Anc-80、及びそれらのバリエーションからなる群から選択される 1 つ又は複数の AAV に由来するカプシドを含む、請求項 1、5、10、28、46 又は 48 のいずれか一項に記載の方法。

40

50