

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11)公表番号
特表2025-510977
(P2025-510977A)

(43)公表日 令和7年4月15日(2025.4.15)

(51)国際特許分類

F I

テーマコード (参考)

C 1 2 N 7/02 (2006.01) C 1 2 N 7/02 4 B 0 6 5

C 1 2 N 7/00 (2006.01) C 1 2 N 7/00

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全45頁)			
(21)出願番号	特願2024-557531(P2024-557531)	(71)出願人	500501443
(86)(22)出願日	令和5年3月30日(2023.3.30)		シーエスエル・ペーリング・エルエルシ
(85)翻訳文提出日	令和6年10月21日(2024.10.21)		ー
(86)国際出願番号	PCT/IB2023/053159		アメリカ合衆国・ペンシルベニア・1 9
(87)国際公開番号	WO2023/187691		4 0 6 ・キング・オブ・ブラシア・ファ
(87)国際公開日	令和5年10月5日(2023.10.5)		ースト・アヴェニュー・1 0 2 0
(31)優先権主張番号	63/362,163	(74)代理人	100127926
(32)優先日	令和4年3月30日(2022.3.30)		弁理士 結田 純次
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)	(74)代理人	100216105
(81)指定国・地域	AP(BW,CV,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ ,NA,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW), EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES, FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV 最終頁に続く	(72)発明者	トビアス・ブランド ドイツ連邦共和国 3 5 0 4 1 マルブルク ・エミルーフォン・ペーリング・シュト ラーセ 7 6 . ツェー・エス・エル・イノ バツィオン・ゲー・エム・ペー・ハー 最終頁に続く

(54)【発明の名称】 エンベロープ型ウイルスを精製する方法

(57)【要約】

本開示は、一般に遺伝子治療製品の製造、具体的には、エンドヌクレアーゼおよび／または陰イオン交換クロマトグラフィーを含む、エンベロープ型ウイルスを細胞培養液から精製する方法に関する。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

細胞培養液またはろ過した細胞培養液からエンベロープ型ウイルスを精製する方法であって、ウイルスを精製する前に細胞培養液またはろ過した細胞培養液をエンドヌクレアーゼと接触させることを含む方法。

【請求項 2】

細胞培養液は、安定な産生細胞から採取される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

エンドヌクレアーゼは、非特異的エンドヌクレアーゼであり、配列特異性を有さず DNA と RNA の両方を分解する、請求項 1 に記載の方法。

10

【請求項 4】

エンドヌクレアーゼは、セラチアマルセッセンス、アナベナ属種、サッカロミセスセレビシエ、ボースタウルス、シンセファラストラムラセモサムおよび／またはボレリアブルグドルフェリ由来である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 5】

エンドヌクレアーゼは、セラチア属ヌクレアーゼ、NucA、Nuc1、エンドヌクレアーゼ G、DNase I またはミクロコッカスヌクレアーゼである、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 6】

エンドヌクレアーゼは、細胞培養液またはろ過した細胞培養液 0.001～100 単位／mL の濃度で細胞培養液またはろ過した細胞培養液と接触される、請求項 1 に記載の方法。

20

【請求項 7】

エンドヌクレアーゼは、細胞培養液またはろ過した細胞培養液 0.01～10 単位／mL の濃度で細胞培養液またはろ過した細胞培養液と接触される、請求項 6 に記載の方法。

【請求項 8】

エンドヌクレアーゼは、細胞培養液またはろ過した細胞培養液 0.1～1 単位／mL の濃度で細胞培養液またはろ過した細胞培養液と接触される、請求項 7 に記載の方法。

【請求項 9】

エンドヌクレアーゼは、細胞培養液またはろ過した細胞培養液約 0.3 単位／mL の濃度で細胞培養液またはろ過した細胞培養液と接触される、請求項 8 に記載の方法。

30

【請求項 10】

精製は、細胞培養液もしくはろ過した細胞培養液をエンドヌクレアーゼと接触させた後約 30 時間未満、細胞培養液もしくはろ過した細胞培養液をエンドヌクレアーゼと接触させた後約 22 時間未満、細胞培養液もしくはろ過した細胞培養液をエンドヌクレアーゼと接触させた後約 6 時間未満、細胞培養液もしくはろ過した細胞培養液をエンドヌクレアーゼと接触させた後約 4 時間未満、細胞培養液もしくはろ過した細胞培養液をエンドヌクレアーゼと接触させた後約 2 時間未満、細胞培養液もしくはろ過した細胞培養液をエンドヌクレアーゼと接触させた後約 1 時間未満、または細胞培養液もしくはろ過した細胞培養液をエンドヌクレアーゼと接触させた後約 30 分未満に実行される、請求項 1 に記載の方法。

40

【請求項 11】

エンドヌクレアーゼは、細胞培養液またはろ過した細胞培養液約 0.3 単位／mL の濃度で細胞培養液またはろ過した細胞培養液と接触され、精製は、接触の約 1～約 2 時間後に実行される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 12】

エンドヌクレアーゼは、細胞培養液またはろ過した細胞培養液約 0.01～0.3 単位／mL の濃度で細胞培養液またはろ過した細胞培養液と接触され、精製は、接触後約 2 時間を超えて実行される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 13】

50

エンドヌクレアーゼは、細胞培養液またはろ過した細胞培養液約 0.3～10 単位／mL の濃度で細胞培養液またはろ過した細胞培養液と接触され、精製は、接触後約 1 時間未満に実行される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 14】

エンドヌクレアーゼは、精製直前に細胞培養液またはろ過した細胞培養液と接触される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 15】

ろ過した細胞培養液をエンドヌクレアーゼと接触させる前に、細胞培養液に対して採取ろ過を実行して、ろ過した細胞培養液を作製することを含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 16】

細胞培養液をエンドヌクレアーゼと接触させた後に採取ろ過を実行して、ろ過した細胞培養液を作製することを含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 17】

採取ろ過は、細胞培養液をエンドヌクレアーゼと接触させた直後に実行される、請求項 16 に記載の方法。

【請求項 18】

精製は、ろ過した細胞培養液を陰イオン交換クロマトグラフィーに供することを含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 19】

ろ過した細胞培養液は、採取ろ過の直後に陰イオン交換クロマトグラフィーに供される、請求項 18 に記載の方法。

【請求項 20】

陰イオン交換クロマトグラフィーカラムにロードする前またはその間に、ろ過した細胞培養液を高濃度の塩溶液と接触させて、塩でスパイクした細胞培養液を形成する、請求項 19 に記載の方法。

【請求項 21】

陰イオン交換クロマトグラフィーを使用してろ過した細胞培養液からエンベロープ型ウイルスを精製する方法であって、陰イオン交換クロマトグラフィーカラムにロードする前またはその間に、ろ過した細胞培養液を高濃度の塩溶液と接触させて、塩でスパイクした細胞培養液を形成する、方法。

【請求項 22】

陰イオン交換クロマトグラフィーカラムにロードする直前に、ろ過した細胞培養液を高濃度の塩溶液と接触させて、塩でスパイクした細胞培養液を形成する、請求項 21 に記載の方法。

【請求項 23】

高濃度の塩溶液およびろ過した細胞培養液は、インラインで混合される、請求項 22 に記載の方法。

【請求項 24】

高濃度の塩溶液は、一価および／または二価の塩を含む、請求項 21 に記載の方法。

【請求項 25】

一価の塩は、塩化ナトリウムである、請求項 24 に記載の方法。

【請求項 26】

高濃度の塩溶液は、少なくとも約 1 M の濃度である、請求項 21 に記載の方法。

【請求項 27】

ろ過した細胞培養液および高濃度の塩溶液は、ろ過した細胞培養液約 70～99 %（容量／容量）および高濃度の塩溶液約 1～30 %（容量／容量）の比で混合される、請求項 21 に記載の方法。

【請求項 28】

高濃度の塩溶液は、約 1 M の濃度である、請求項 21 に記載の方法。

【請求項 29】

ろ過した細胞培養液および高濃度の塩溶液は、ろ過した細胞培養液約 70 %（容量／容量）および高濃度の塩溶液約 30 %（容量／容量）の比で混合される、請求項 28 に記載の方法。

【請求項 30】

高濃度の塩溶液は、2 M の濃度である、請求項 21 に記載の方法。

【請求項 31】

ろ過した細胞培養液および高濃度の塩溶液は、ろ過した細胞培養液約 85 %（容量／容量）および高濃度の塩溶液約 15 %（容量／容量）の比で混合される、請求項 30 に記載の方法。

【請求項 32】

高濃度の塩溶液は、5 M の濃度である、請求項 21 に記載の方法。

【請求項 33】

ろ過した細胞培養液および高濃度の塩溶液は、ろ過した細胞培養液約 94 %（容量／容量）および高濃度の塩溶液約 6 %（容量／容量）の比で混合される、請求項 32 に記載の方法。

【請求項 34】

高濃度の塩溶液は、10 M の濃度である、請求項 21 に記載の方法。

【請求項 35】

ろ過した細胞培養液および高濃度の塩溶液は、ろ過した細胞培養液約 97 %（容量／容量）および高濃度の塩溶液約 3 %（容量／容量）の比で混合される、請求項 34 に記載の方法。

【請求項 36】

塩でスパイクした細胞培養液は、300～500 mM の塩濃度を有する、請求項 21 の方法。

【請求項 37】

塩でスパイクした細胞培養液は、約 400 mM の塩濃度を有する、請求項 36 に記載の方法。

【請求項 38】

塩でスパイクした細胞培養液は、25℃で 35～45 mS / cm の標的伝導率を有する、請求項 21 に記載の方法。

【請求項 39】

塩でスパイクした細胞培養液は、25℃で 36～44 mS / cm の標的伝導率を有する、請求項 21 に記載の方法。

【請求項 40】

塩でスパイクした細胞培養液は、25℃で 40 mS / cm の標的伝導率を有する、請求項 38 に記載の方法。

【請求項 41】

1 つまたはそれ以上の洗浄工程により陰イオン交換クロマトグラフィーカラムを洗浄することをさらに含む、請求項 18 に記載の方法。

【請求項 42】

10～100 mM トリス、150 mM NaCl、pH 7.0～9.0；5～50 mM ヒスチジン、150 mM NaCl、pH 5.5～7.4；または 5～50 mM HEPES、150 mM NaCl、pH 6.8～8.2 を含む第 1 の洗浄溶液による第 1 の洗浄工程を含む、請求項 41 に記載の方法。

【請求項 43】

第 1 の洗浄溶液は：50 mM トリス、150 mM NaCl、pH 8；10 mM ヒスチジン、150 mM NaCl、pH 7；または 10 mM HEPES、150 mM NaCl、pH 7.5 を含む、請求項 42 に記載の方法。

【請求項 44】

10～100 mM トリス、750 mM NaCl、pH 7.0～9.0；5～50 mM

10

20

30

40

50

ヒスチジン、750mM NaCl、pH5.5～7.4；または5～50mM HEPES、750mM NaCl、pH6.8～8.2を含む第2の洗浄溶液による第2の洗浄工程を含む、請求項41に記載の方法。

【請求項45】

第2の洗浄溶液は：50mMトリス、750mM NaCl、pH8；10mMトリス、750mM NaCl、pH7；または10mM HEPES、750mM NaCl、pH7.5を含む、請求項44に記載の方法。

【請求項46】

溶出溶液により陰イオン交換クロマトグラフィーカラムから結合しているウイルスを溶出することをさらに含む、請求項18に記載の方法。

10

【請求項47】

溶出溶液は：10～100mMトリス、1M～2M NaCl、pH7.0～9.0；5～50mMヒスチジン、1M～2M NaCl、pH5.5～7.4；または5～50mM HEPES、1M～2M NaCl、pH6.8～8.2を含む、請求項46に記載の方法。

【請求項48】

溶出溶液は：50mMトリス、1.2Mもしくは1.5M NaCl、pH8；10mMヒスチジン、1.2Mもしくは1.5M NaCl、pH7；または10mM HEPES、1.2Mもしくは1.5M NaCl、pH7.5を含む、請求項47に記載の方法。

20

【請求項49】

ヒスチジン、トリスまたはHEPESにより溶出されたウイルスを希釈することをさらに含む、請求項46に記載の方法。

【請求項50】

溶出されたウイルスもしくは希釈された溶出されたウイルスを室温で15分間までまたは2～8℃で60分間までインキュベートすることをさらに含む、請求項46に記載の方法。

【請求項51】

溶出されたウイルスもしくは希釈された溶出されたウイルスを濃縮するおよび／または透析ろ過することをさらに含む、請求項46に記載の方法。

30

【請求項52】

陰イオン交換クロマトグラフィーカラムは、陰イオン交換膜吸着体である、請求項18に記載の方法。

【請求項53】

ウイルス感染力価収率を少なくとも10%増大させる、請求項1に記載の方法。

【請求項54】

エンベロープ型ウイルスはレトロウイルスである、請求項1に記載の方法。

【請求項55】

レトロウイルスは、レンチウイルスである、請求項54に記載の方法。

【請求項56】

細胞培養液からエンベロープ型ウイルスを精製する方法であって：

40

(i) 安定な産生細胞系から産生されるウイルス性ベクターを含む細胞培養液を準備することと；

(ii) 細胞培養液を組換えにより発現されるセラチア属エンドヌクレアーゼと接触させることと；

(iii) エンドヌクレアーゼで処理された細胞培養液をフィルターと接触させて、ろ過した細胞培養液を作製することと；

(iv) 陰イオン交換クロマトグラフィー膜上にろ過した細胞培養液および5M塩化ナトリウムを含む高濃度の塩溶液をロードし、液体および塩溶液が、ろ過した細胞培養液94%（容量／容量）および高濃度の塩溶液6%（容量／容量）の比でロードされることと；

50

(v) 1つまたはそれ以上の洗浄緩衝液により膜を洗浄することと；

(v i) 1. 2 Mまたは1. 5 M塩化ナトリウムを含む溶出緩衝液により膜から結合しているウイルスを溶出することと；

(v i i) 緩衝液により溶出されたウイルスを希釈することと；

(v i i i) 溶出されたウイルスを濃縮および透析ろ過することと

を含む方法。

【請求項 5 7】

細胞培養液および／またはろ過した細胞培養液は、約 1 L、約 5 L、約 10 L、約 50 L、約 100 L、約 500 L、または約 1000 L より大きい容量を有する、請求項 1 に記載の方法。

10

【請求項 5 8】

細胞培養液および／またはろ過した細胞培養液は、約 5 L の容量を有する、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 5 9】

細胞培養液および／またはろ過した細胞培養液は、約 20 L の容量を有する、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 6 0】

細胞培養液および／またはろ過した細胞培養液は、約 44 L の容量を有する、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 6 1】

細胞培養液および／またはろ過した細胞培養液は、約 60 L の容量を有する、請求項 1 に記載の方法。

20

【請求項 6 2】

細胞培養液および／またはろ過した細胞培養液は、約 200 L の容量を有する、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 6 3】

陰イオン交換クロマトグラフィー膜は、細胞培養液および／またはろ過した細胞培養液 1 L 当たり少なくとも約 1 mL の容量を有する、請求項 18 に記載の方法

【請求項 6 4】

エンベロープ型ウイルスを製剤化して、医薬製剤または細胞を感染させるのに適した溶液にすることをさらに含む、請求項 1 に記載の方法。

30

【請求項 6 5】

細胞培養液またはろ過した細胞培養液中の Mg^{2+} の濃度を約 1 ~ 2 mM に調整することをさらに含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 6 6】

細胞培養液またはろ過した細胞培養液中の Mg^{2+} の濃度を約 2 mM に調整することをさらに含む、請求項 6 5 に記載の方法。

【請求項 6 7】

細胞培養液またはろ過した細胞培養液の pH を 6. 0 ~ 10. 0 に調整することをさらに含む、請求項 1 に記載の方法。

40

【請求項 6 8】

細胞培養液またはろ過した細胞培養液の pH を 8. 0 ~ 9. 2 に調整することをさらに含む、請求項 6 7 に記載の方法。

【請求項 6 9】

細胞培養液またはろ過した細胞培養液は、エンドヌクレアーゼと接触している間 0 °C ~ 42 °C の温度である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 7 0】

細胞培養液またはろ過した細胞培養液は、エンドヌクレアーゼと接触している間 2 °C ~ 8 °C の温度である、請求項 6 9 に記載の方法。

【請求項 7 1】

50

細胞培養液またはろ過した細胞培養液は、エンドヌクレアーゼと接触している間 4℃の温度である、請求項 70 に記載の方法。

【請求項 72】

細胞培養液は、付着環境で培養された細胞から採取される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 73】

細胞培養液は、懸濁環境で培養された細胞から採取される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 74】

請求項 1 に記載の方法によって産生される精製されたエンベロープ型ウイルス。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願データ

本出願は、2022年3月30日に出願された「Methods of purifying an enveloped virus」と命名された米国仮出願第63／362，163号の優先権を主張する。その全ての内容を参照によって本明細書に組み入れる。

【0002】

本開示は、一般に遺伝子治療製品の製造、具体的には、エンドヌクレアーゼおよび／または陰イオン交換クロマトグラフィーを含む、エンベロープ型ウイルスを細胞培養液から精製する方法に関する。

【背景技術】

【0003】

レトロウイルス、例えば、レンチウイルスは、遺伝子治療用として最も研究されているウイルス性ベクターの1つである。一般に、レトロウイルスは、標的細胞の染色体内にその遺伝情報を永久に組み込むRNA型ウイルスである。レトロウイルスの優位性には、標的細胞内での長期にわたる導入遺伝子の発現、低い免疫原潜在性、ならびに分裂および非分裂細胞への形質導入能力がある。

【0004】

レンチウイルスは遺伝子操作され、ヒト免疫不全ウイルス1（HIV-1）に通常基づく。安全性を増大させるために、最新のベクターは、感染および遺伝子送達に必要なHIV遺伝子のみを含有するが、複製および毒性因子に必要な遺伝子は除去されている。しばしば、HIV-1のエンベロープタンパク質は、別のウイルス、例えば、水疱性口内炎インディアナウイルス（VSV）のVSV-Gタンパク質と交換されて、広範囲な標的細胞の感染が可能になる。

【0005】

レンチウイルスを作製するために、ヒト胚腎臓細胞HEK 293Tなどの細胞は、3～4つのプラスミドでトランスフェクトされる。これらは、対象の遺伝子を持つ転移プラスミドならびに水疱性口内炎Gタンパク質（VSV-G）および遺伝子組み込みまたは自己集合に関与する必須ウイルスタンパク質をコードしているいくつかのパッケージングプラスミドを含む。これらプラスミドは、細胞に一過性にトランスフェクトされる、または産生細胞系は、レンチウイルスの産生を誘導できる誘導可能なプロモーターを持つプラスミドを安定に組み込むことにより創出される。

【0006】

ウイルス産生が誘導されると、細胞内でアセンブリに成功した後、出芽によるウイルスの放出が起こる。

【0007】

レンチウイルスは産生細胞から採取され、下流のプロセスにおいてその後精製され、濃縮される。しかしながら、商業規模でのレンチウイルスの精製は困難である。この型のウイルスの精製に対する限定的な障壁は、大規模細胞培養で生じる不純物、および一部の精製条件に曝露した際の特定の膜糖タンパク質の不安定性である。したがって、例えば遺伝

10

20

30

40

50

子治療用のレンチウイルスを精製するための効率的なプロセスが当業者に必要とされる。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0008】

本発明に至るまでの研究において、本発明者らは、例えば、遺伝子治療用のエンベロープ型ウイルスを商業規模で規制要件に適切に産生する方法を作製しようと試みた。本発明者らは、インラインまたは連続もしくは半連続の様式で実行可能な方法も開発しようと試みた。

【課題を解決するための手段】

【0009】

一部の例において、本発明者らによって作製されるウイルス性ベクターを精製し、濃縮するための下流のプロセスは、細胞残屑および成分を除去するための採取ろ過工程ならびに全体の容量を減少させ、ウイルス性ベクターを宿主細胞DNA、タンパク質および培地成分と分離する精製工程を含む。本発明者らによって作製されるウイルス性ベクターを精製し、濃縮するための下流のプロセスは、最終製剤緩衝液中にウイルス性ベクターを濃縮するための限外ろ過／透析ろ過工程をさらに含むことができる。一部の例において、下流の工程は、最終産物から微生物を除去するためのろ過滅菌工程をさらに含む。

【0010】

本方法の開発において、本発明者らは、ウイルスが産生された細胞培養液（例えば、安定な細胞系の上清）中の核酸が、下流のプロセス（例えば、陰イオン交換クロマトグラフィーによる精製およびろ過滅菌工程）に使用される膜、樹脂およびフィルターのファウリングを引き起こすことを決定した。この問題を解決するために、本発明者らは、細胞培養液にエンドヌクレアーゼを添加した。本発明者らは、精製前にエンドヌクレアーゼを添加することができ、それにより精製およびろ過滅菌のような他の下流の工程が改善されることを確認した。一例において、本発明者らは、採取ろ過直前にエンドヌクレアーゼを添加し、エンドヌクレアーゼと別途インキュベートすることを必要とせずに精製へとその後進むことができることを見出した。エンドヌクレアーゼを添加することで、クロマトグラフィーカラムおよび／またはろ過滅菌フィルターを目詰まりさせることなく、付着細胞と懸濁細胞の両方によって産生されるウイルスのより長い採取ならびにより高いベクター収率が容易になった。

【0011】

本発明者らは、陰イオン交換クロマトグラフィー前に細胞培養液中の塩濃度を増大させて不純物の結合を減少させ、それにより陰イオン交換体へのウイルス結合および汚染物質の通過を容易にすることが望ましいことをさらに確認した。しかしながら、塩濃度を増大させることは、いくつかの要因により複雑になる。1つには、陰イオン交換前に細胞培養液へ大容量を添加することは望ましくなく、そのため高濃度の塩溶液が好ましい。しかしながら、高張条件は、ウイルス粒子を不安定化する。さらに、商業規模での手作業の混合は、扱いにくく、時間がかかり、インライン処理に適していない。混合が容器内で実行される場合、塩が適切に混合されていないと、一層濃い高塩溶液が、容器の底に集まり、より高い局所塩濃度は、クロマトグラフィー装置にロードする間にウイルスを溶出させる可能性がある。これら問題を解決するために、本発明者らは、クロマトグラフィー直前に2つの流体流と一緒に流すことによって細胞培養液に高濃度の塩溶液を添加する。高濃度の塩溶液および細胞培養液は、陰イオン交換体へロードされるとき、もしくは陰イオン交換体にロードされる直前、または陰イオン交換体内で一緒に流されて、混合される。これにより、大容量を添加することなく、かつウイルスを不安定化することなく溶液を混合することが容易になる。研究室規模か商業規模かにかかわらず、これは、時間のかかる混合工程を必要としない効率的な混合も可能にする。

【0012】

本発明者らによる発見は、エンベロープ型ウイルスを精製する方法を提供した。

【0013】

10

20

30

40

50

一例において、本開示は、細胞培養液からエンベロープ型ウイルスを精製する方法であって、採取る過前に細胞培養液をエンドヌクレアーゼと接触させることを含む方法を提供する。

【0014】

本開示は、細胞培養液またはろ過した細胞培養液からエンベロープ型ウイルスを精製する方法であって、ウイルスを精製する前に細胞培養液またはろ過した細胞培養液をエンドヌクレアーゼと接触させることを含む方法をさらに提供する。

【0015】

本開示の例示的な形態において、細胞培養液または採取した細胞培養液は、安定な産生細胞、すなわち、レンチウイルスを産生するのに必要とされる遺伝物質を安定して組み込んだ細胞由来である。そのような細胞は、その中に一過性に組み込まれた遺伝的エレメントを有する細胞と区別される。

10

【0016】

例示的なエンベロープ型ウイルスは、レトロウイルスである。例えば、レトロウイルスはレンチウイルスである。例えば、レンチウイルスはHIVまたはその誘導体である。

【0017】

例示的なヌクレアーゼは、非特異的エンドヌクレアーゼであり、配列特異性を有さずDNAとRNAの両方を分解する。一例において、エンドヌクレアーゼは、非特異的エンドヌクレアーゼであり、配列特異性を有さずDNAを分解する。

【0018】

適切なエンドヌクレアーゼは、当業者に公知であり、セラチアマルセッセンス (*Serratia marcescens*)、アナベナ属種、サッカロミセスセレビシエ (*Saccharomyces cerevisiae*)、ボースタウルス (*Bos Taurus*)、シンセファラストラムラセモサム (*Syncephalostrium racemosum*) および／またはボレリアブルグドルフェリ (*Borrelia burgdorferi*) 由来のものがある。例えば、エンドヌクレアーゼは、セラチア属ヌクレアーゼ、NucA、Nuc1、エンドヌクレアーゼG、DNase Iまたはミクロコッカスヌクレアーゼである。

20

【0019】

エンドヌクレアーゼは、エンドヌクレアーゼ処理後の膜または陰イオン交換体のファウリングを防ぐのに適切な任意の濃度で添加される。適切な濃度は、本明細書に記載される。一例において、エンドヌクレアーゼは、細胞培養液0.001~100単位/mLの濃度で細胞培養液に添加される。一例において、エンドヌクレアーゼは、細胞培養液0.01~10単位/mLの濃度で細胞培養液に添加される。一例において、エンドヌクレアーゼは、細胞培養液0.1~1単位/mLの濃度で細胞培養液に添加される。例えば、エンドヌクレアーゼは、細胞培養液0.3単位/mLの濃度で細胞培養液に添加される。

30

【0020】

エンドヌクレアーゼは、精製、例えば、陰イオン交換の前に添加される。本開示は、陰イオン交換の前にエンドヌクレアーゼおよび細胞培養液をインキュベートすることを包含する。一部の例において、エンドヌクレアーゼおよび細胞培養液は、陰イオン交換の前に約2時間未満または約1時間未満インキュベートされる。

40

【0021】

本発明者らは、特定の例において、エンドヌクレアーゼと細胞培養液を別途インキュベートすることを含む必要性がないことを示した。例えば、精製、例えば、陰イオン交換前の採取る過プロセス自体の処理時間は、陰イオン交換体のファウリングを防ぐのに十分なので、エンドヌクレアーゼは、採取る過の前に細胞培養液に添加され、次いで細胞培養液は、採取る過へ直ちに進行される。しかしながら、本開示は、採取る過前にエンドヌクレアーゼおよび細胞培養液をインキュベートすることも包含する。一部の例において、エンドヌクレアーゼおよび細胞培養液は、採取る過の前に約2時間未満または約1時間未満インキュベートされる。

50

【0022】

一部の例において、精製は、細胞培養液もしくはろ過した細胞培養液をエンドヌクレアーゼと接触させた後約30時間未満、例えば、細胞培養液もしくはろ過した細胞培養液をエンドヌクレアーゼと接触させた後約6時間未満、例えば、細胞培養液もしくはろ過した細胞培養液をエンドヌクレアーゼと接触させた後約4時間未満、例えば、細胞培養液もしくはろ過した細胞培養液をエンドヌクレアーゼと接触させた後約2時間未満、例えば、細胞培養液もしくはろ過した細胞培養液をエンドヌクレアーゼと接触させた後約1時間未満、または細胞培養液もしくはろ過した細胞培養液をエンドヌクレアーゼと接触させた後例えば約30分未満など細胞培養液もしくはろ過した細胞培養液をエンドヌクレアーゼと接触させた後約22時間未満に実行される。

10

【0023】

一例において、方法は、細胞培養液をエンドヌクレアーゼと接触させた直後に採取ろ過を実行して、ろ過した細胞培養液を作製する工程をさらに含む。

【0024】

一部の例において、エンドヌクレアーゼは、細胞培養液またはろ過した細胞培養液約0.3単位/mLの濃度で細胞培養液またはろ過した細胞培養液と接触され、精製は、接触の約1～約2時間後に実行される。

【0025】

本開示の例において、エンドヌクレアーゼは、細胞培養液またはろ過した細胞培養液約0.01～0.3単位/mLの濃度で細胞培養液またはろ過した細胞培養液と接触され、精製は、接触後約2時間を超えて実行される。

20

【0026】

本開示の追加の例において、エンドヌクレアーゼは、細胞培養液またはろ過した細胞培養液約0.3～10単位/mLの濃度で細胞培養液またはろ過した細胞培養液と接触され、精製は、接触後約1時間未満に実行される。

【0027】

本開示のさらなる例において、エンドヌクレアーゼは、細胞培養液またはろ過した細胞培養液約0.3単位/mLの濃度で細胞培養液またはろ過した細胞培養液と接触され、精製は、接触後約1時間未満に実行される。

【0028】

一例において、本方法は、ウイルスを精製する前に細胞培養液またはろ過した細胞培養液をマグネシウム塩と接触させることをさらに含む。一例において、マグネシウム塩は、標的マグネシウム濃度10mM未満 Mg^{2+} を達成する量で添加される。例えば、0.001mM～10mM、または0.1mM～10mM、または1mM～10mMである。一例において、マグネシウム塩は、9mM、または8mM、または7mM、または6mMなど、標的マグネシウム濃度10mM未満を達成する量で添加される。一例において、マグネシウム塩は、標的マグネシウム濃度5mM未満を達成する量で添加される。例えば、5mM、または4mM、または3mM、または2mM、または1mMである。一例において、マグネシウム塩は、約2mMの標的マグネシウム濃度を達成する量で添加される。

30

【0029】

したがって標的マグネシウム濃度を達成するには、ろ過した細胞培養液または細胞培養液とマグネシウム塩溶液の比は、マグネシウム塩溶液の濃度によって決まる。一例において、マグネシウム塩溶液は、濃度500mM未満、例えば、50mM～500mMもしくは100mM～400mM、または150mM～300mMである。例えば、マグネシウム塩溶液は、濃度200mMである。

40

【0030】

一例において、マグネシウム塩は塩化マグネシウムである。本開示に使用するのに適切なマグネシウム塩の他の適切な形態は、当業者に明らかであり、および／または本明細書に記載されることになる。

【0031】

50

一例において、方法は、ろ過した細胞培養液を陰イオン交換クロマトグラフィーに供することをさらに含む。例えば、ろ過した細胞培養液は、採取ろ過の直後に陰イオン交換クロマトグラフィーに供される。

【0032】

前述のとおり、本発明者らは、陰イオン交換クロマトグラフィーカラムにロードする前またはその間に、細胞培養液もしくはろ過した細胞培養液を高濃度の塩溶液と接触させて、塩でスパイクした細胞培養液を形成することが、例えば、不純物が陰イオン交換体へ結合することを防ぎ、それによりウイルスの結合を増強させ、汚染物質を通過させることにより陰イオン交換による精製を改善することを示した。

【0033】

したがって一部の例において、陰イオン交換クロマトグラフィーカラムにロードする前またはその間に、ろ過した細胞培養液を高濃度の塩溶液と接触させて、塩でスパイクした細胞培養液を形成する。そのような混合形態は、インライン処理を容易にする。例えば、細胞培養液は、エンドヌクレアーゼと接触され、次いでろ過され、次いでそのまま陰イオン交換カラム上へ直接ロードされ、高塩濃度溶液と混合される。

【0034】

本開示は、陰イオン交換クロマトグラフィーを使用して細胞培養液からエンベロープ型ウイルスを精製する方法をさらに提供し、陰イオン交換クロマトグラフィーカラムにロードする前またはその間に、細胞培養液を高濃度の塩溶液と接触させて、塩でスパイクした細胞培養液を形成する。

【0035】

陰イオン交換体は、樹脂製の陰イオン交換体、陰イオン交換膜吸着体、または負に荷電した粒子を捕捉するために正に荷電した基材を含む他の任意の形式の陰イオン交換体である。本開示の例示される形態において、陰イオン交換体は、陰イオン交換膜吸着体である。

【0036】

一例において、高濃度の塩溶液およびろ過した細胞培養液または細胞培養液は、例えば、陰イオン交換クロマトグラフィーカラムにロードする間にインラインで混合される。例えば、陰イオン交換カラムにロードする間に液体は、カラムへ別々に同時に添加される。一部の例において、液体は、陰イオン交換カラムに入る前、陰イオン交換カラムに入った後、または陰イオン交換カラムに入ると同時に互いに接触することができる。

【0037】

一例において、混合したろ過した細胞培養液または細胞培養液および高濃度の塩溶液は、陰イオン交換クロマトグラフィーカラムへロードするために約300 mM～500 mM塩の標的塩濃度を有する。例えば、標的塩濃度は、400 mM塩である。

【0038】

したがって標的塩濃度を達成するには、ろ過した細胞培養液または細胞培養液と高濃度の塩溶液の比は、塩溶液の濃度によって決まる。一例において、高濃度の塩溶液は、少なくとも1 M、例えば、1 M～10 Mまたは2 M～9 Mまたは3 M～8 Mまたは4 M～6 Mの濃度である。例えば、高濃度の塩溶液は、5 Mの濃度である。

【0039】

一例において、ろ過した細胞培養液または細胞培養液および高濃度の塩溶液は、ろ過した細胞培養液または細胞培養液約70～99%（容量／容量）および高濃度の塩溶液約1～30%（容量／容量）の比で混合される。

【0040】

一例において、高濃度の塩溶液は、5 Mの濃度で提供され、ろ過した細胞培養液または細胞培養液および高濃度の塩溶液は、ろ過した細胞培養液または細胞培養液90～95%（容量／容量）および高濃度の塩溶液5～10%（容量／容量）の比で混合される。例えば、ろ過した細胞培養液または細胞培養液および高濃度の塩溶液は、ろ過した細胞培養液または細胞培養液95%（容量／容量）および高濃度の塩溶液5%（容量／容量）の比で

10

20

30

40

50

混合される。例えば、ろ過した細胞培養液または細胞培養液および高濃度の塩溶液は、ろ過した細胞培養液または細胞培養液 94 % (容量 / 容量) および高濃度の塩溶液 6 % (容量 / 容量) の比で混合される。例えば、ろ過した細胞培養液または細胞培養液および高濃度の塩溶液は、ろ過した細胞培養液または細胞培養液 93 % (容量 / 容量) および高濃度の塩溶液 7 % (容量 / 容量) の比で混合される。

【0041】

別の例において、高濃度の塩溶液は、1 M の濃度で提供され、ろ過した細胞培養液または細胞培養液および高濃度の塩溶液は、ろ過した細胞培養液または細胞培養液約 70 % (容量 / 容量) および高濃度の塩溶液約 30 % (容量 / 容量) の比で混合される。

【0042】

別の例において、高濃度の塩溶液は、2 M の濃度で提供され、ろ過した細胞培養液または細胞培養液および高濃度の塩溶液は、ろ過した細胞培養液または細胞培養液約 85 % (容量 / 容量) および高濃度の塩溶液約 15 % (容量 / 容量) の比で混合される。

【0043】

別の例において、高濃度の塩溶液は、10 M の濃度で提供され、ろ過した細胞培養液または細胞培養液および高濃度の塩溶液は、ろ過した細胞培養液または細胞培養液約 97 % (容量 / 容量) および高濃度の塩溶液約 3 % (容量 / 容量) の比で混合される。

【0044】

一例において、ろ過した細胞培養液または細胞培養液を含有する流体流の流速は、高濃度の塩溶液を含有する流体流の流速より高い。別の例において、ろ過した細胞培養液または細胞培養液を含有する流体流の流速は、高濃度の塩溶液を含有する流体流の流速より低い。別の例において、ろ過した細胞培養液または細胞培養液を含有する流体流の流速は、高濃度の塩溶液を含有する流体流の流速と同じである。

【0045】

一例において、混合したろ過した細胞培養液または細胞培養液および高濃度の塩溶液は、25 °C で 35 ~ 45 mS / cm の標的伝導率を有する。一例において、混合したろ過した細胞培養液または細胞培養液および高濃度の塩溶液は、25 °C で 36 ~ 44 mS / cm の標的伝導率を有する。例えば、25 °C で約 40 ± 4 mS / cm の標的伝導率である。

【0046】

一例において、高濃度の塩溶液は、一価および / または二価の塩を含む。例えば、高濃度の塩溶液は、一価の塩を、すなわち唯一の塩として含む。一例において、一価の塩は、塩化ナトリウムである。

【0047】

一例において、高濃度の塩溶液は、少なくとも約 1 M の濃度、例えば、約 5 M の濃度の塩化ナトリウムである。

【0048】

一例において、塩でスパイクした細胞培養液は、300 mM ~ 500 mM、例えば、約 400 mM の塩濃度を有する。

【0049】

一例において、本方法は、1 つまたはそれ以上の洗浄工程により陰イオン交換クロマトグラフィーカラムを洗浄することをさらに含む。例えば、方法は、90 ~ 95 % (容量 / 容量) 緩衝液および 5 ~ 10 % (容量 / 容量) 高濃度の塩溶液を含む溶液による第 1 の洗浄工程を含む。例えば、溶液は、10 ~ 100 mM トリス、150 mM NaCl、pH 7.0 ~ 9.0 を含む。一例において、溶液は、50 mM トリス、150 mM NaCl、pH 8 を含む。別の例において、溶液は、5 ~ 50 mM ヒスチジン、150 mM NaCl、pH 5.5 ~ 7.4 を含む。別の例において、溶液は、10 mM ヒスチジン、150 mM NaCl、pH 7 を含む。別の例において、溶液は、5 ~ 50 mM HEPES、150 mM NaCl、pH 6.8 ~ 8.2 を含む。別の例において、溶液は、10 mM HEPES、150 mM NaCl、pH 7.5 を含む。

【0050】

一例において、方法は、第2の溶液による第2の洗浄工程を含む。例えば、第2の溶液は、10～100mMトリス、750mM NaCl、pH7.0～9.0を含む。一例において、第2の溶液は、50mMトリス、750mM NaCl、pH8を含む。別の例において、第2の溶液は、5～50mMヒスチジン、750mM NaCl、pH5.5～7.4を含む。別の例において、第2の溶液は、10mMヒスチジン、750mM NaCl、pH7を含む。別の例において、第2の溶液は、5～50mM HEPES、750mM NaCl、pH6.8～8.2を含む。別の例において、第2の溶液は、10mM HEPES、750mM NaCl、pH7.5を含む。

【0051】

一例において、方法は、溶出溶液により陰イオン交換クロマトグラフィーカラムから結合しているウイルスを溶出することをさらに含む。例えば、溶出溶液は、10～100mMトリス、1M～2M NaCl、pH7.0～9.0を含む。一例において、溶出溶液は、50mMトリス、1.2M NaCl、pH8を含む。別の例において、溶出溶液は、50mMトリス、1.5M NaCl、pH8を含む。別の例において、溶出溶液は、5～50mMヒスチジン、1M～2M NaCl、pH5.5～7.4を含む。別の例において、溶出溶液は、10mMヒスチジン、1.2M NaCl、pH7を含む。別の例において、溶出溶液は、10mMヒスチジン、1.5M NaCl、pH7を含む。別の例において、溶出溶液は、5～50mM HEPES、1M～2M NaCl、pH6.8～8.2を含む。別の例において、溶出溶液は、10mM HEPES、1.2M NaCl、pH7.5を含む。別の例において、溶出溶液は、10mM HEPES、1.5M NaCl、pH7.5を含む。

【0052】

一例において、方法は、溶出されたウイルスを1：5～1：20希釈に希釈することを含む。例えば、方法は、溶出されたウイルスを1：10希釈に希釈することを含む。

【0053】

一例において、方法はヒスチジン、トリスまたはHEPESにより、溶出されたウイルスを希釈することを含む。例えば、方法は、HEPESにより溶出されたウイルスを希釈することを含む。一例において、方法は、10mM HEPES、pH7.5により溶出されたウイルスを希釈することを含む。例えば、ウイルスは、溶出直後に希釈される。

【0054】

一例において、方法は、溶出されたウイルスを室温で最大15分間または2～8℃で最大60分間インキュベートすることをさらに含む。

【0055】

一例において、方法は、溶出されたウイルスを濃縮および／または透析ろ過することを含む。

【0056】

一例において、方法は、ウイルス感染力価収率を少なくとも2%または3%または4%または5%または10%または15%または20%増大させる。一例において、方法は、ウイルス感染力価収率を少なくとも10%増大させる。

【0057】

本開示は、細胞培養液からエンベロープ型ウイルスを精製する方法をさらに提供し：

(i) (場合により) 安定な産生細胞系から産生されるウイルス性ベクターを含む細胞培養液を準備することと；

(ii) 細胞培養液を組換えにより発現されるセラチア属エンドヌクレアーゼと接触させることと；

(iii) エンドヌクレアーゼで処理された細胞培養液をフィルターと接触させて、ろ過した細胞培養液を作製することと；

(iv) 陰イオン交換クロマトグラフィー膜上にろ過した細胞培養液および5M塩化ナトリウムを含む高濃度の塩溶液をロードし、液体および塩溶液が、ろ過した細胞培養液94% (容量／容量) および高濃度の塩溶液6% (容量／容量) の比でロードされることと

;

(v) 1つまたはそれ以上の洗浄緩衝液により膜を洗浄することと;

(v i) 1. 2 Mまたは1. 5 M塩化ナトリウムを含む溶出緩衝液により膜から結合しているウイルスを溶出することと;

(v i i) (場合により) 緩衝液により溶出されたウイルスを希釈することと;

(v i i i) 溶出されたウイルスまたは希釈された溶出されたウイルスを濃縮および透析ろ過することとを含む。

【0058】

一例において、方法は、インライン、または連続もしくは半連続的に実行される。

【0059】

一例において、本開示の方法は、ろ過滅菌を実行することをさらに含む。例えば、ろ過滅菌は、溶出されたウイルスを濃縮および透析ろ過する前に実行される。代替例において、ろ過滅菌は、溶出されたウイルスを濃縮および透析ろ過した後に行われる。

【0060】

一例において、本開示の方法は、エンベロープ型ウイルスを製剤化して、医薬製剤または細胞を感染させるのに適した溶液にすることをさらに提供する。

【0061】

本開示は、本明細書に記載される方法により産生される精製したエンベロープ型ウイルスをさらに提供する。

【0062】

本開示は、陰イオン交換体のファウリングを防ぐための方法をさらに提供する。そのような方法は、本明細書に述べられる同じ工程を含む。

【0063】

一例において、本開示のクロマトグラフィー方法は、正に荷電したリガンドを固定した基材で実行される。当業者に明らかになるように、そのような基材は、陰イオン交換クロマトグラフィーカラムである。そのような基材は、正に荷電したリガンドを含む多様なクロマトグラフィーカラムでもよい。したがって、本開示は、本明細書に記載される方法を実行することをさらに包含し、正に荷電したリガンドを含む多様なクロマトグラフィーカラムがイオン交換クロマトグラフィーカラムの代わりに使用される。

【図面の簡単な説明】

【0064】

【図1】採取安定性が、高塩条件により損なわれることを示すグラフ図である。

【図2】ベンゾナーゼ処理有りまたは無しにおけるTFF溶出液のRNA収率、感染収率および無菌フィルターのろ過能力を示すグラフ図である(示した通り)。

【図3】ベンゾナーゼ処理無し(A)または有り(B)で、採取した細胞培養液を処理した場合のMustang Q陰イオンクロマトグラフィーカラムにおける圧力を示すグラフ図である(示した通り)。

【図4】平型および付着型バイオリアクターから採集した採取物について、感染力価およびRNA含有量の収率を要約するグラフ図である。

【図5】インラインでの5M NaCl塩のスパイクの有りまたは無しにおいて実行したMustang Q陰イオン交換からのウイルスの回収を示すグラフ図である(示した通り)。

【図6】付着型バイオリアクターの大規模採取物を精製する間の感染力価収率を示すグラフ図である。

【発明を実施するための形態】

【0065】

一般

本明細書の全体を通じて、特に記載されていない限りまたは文脈上要求されない限り、単一の工程、組成物、工程の群または組成物の群への言及は、その工程、組成物、工程の

10

20

30

40

50

群または組成物の群の1つおよび複数（すなわち1つまたはそれ以上）を包含するものとする。したがって、本明細書では、単数形「a」、「an」および「the」は、文脈に別段の明確な指図がない限り複数の態様を含む。例えば、「a」への言及は、1つおよび2つ以上を含み；「an」への言及は、1つおよび2つ以上を含み；「the」への言及は、1つおよび2つ以上などを含む。

【0066】

当業者は、本開示が、特に記載されるもの以外の変形および修正の影響を受けやすいことを認識することになる。本開示が、そのような変形および修正の全てを含むことを理解すべきである。本開示は、本明細書において言及または示される工程、構成、組成物および化合物の全てを個別にもしくは全体的に含み、前記工程もしくは構成のあらゆる組合せもしくは任意の2つ以上の組合せも含む。

10

【0067】

本開示は、本明細書に記載される特定の例によって範囲を限定されるべきではなく、その例は、例示だけを目的とするものである。機能的に同等の産物、組成物および方法は、明確に本開示の範囲内である。

【0068】

特に記載されていない限り、本明細書における本開示のどの例も、本開示の他のどの例にも準用されるものとする。言い換えると、本開示のどの特定の例も、本開示の他のどの特定の例とも組み合わせられる（排他的な場合を除く）。

【0069】

特定の構成もしくは構成の群または方法もしくは方法の工程を開示している本開示のどの例も、特定の構成もしくは構成の群または方法もしくは方法の工程を否定するための明確な支持を提供するものになる。

20

【0070】

特に定義されない限り、本明細書に使用される技術および科学的用語の全ては、当業者（例えば、分子生物学、細菌学、ウイルス学）によって一般に理解される用語と同じ意味を有するものとする。

【0071】

指示されない限り、本開示に利用される分子生物学、細菌学、ウイルス学、組換えDNA技術、溶液中のペプチド合成、固相ペプチド合成および免疫学の従来通りの技術は、標準的な手順であり、当業者に周知である。そのような技術については、J. Perbal、A Practical Guide to Molecular Cloning、John Wiley and Sons（1984年）、J. Sambrookら、Molecular Cloning: A Laboratory Manual、Cold Spring Harbour Laboratory Press（1989年）、T. A. Brown（編）、Essential Molecular Biology: A Practical Approach、第1巻および第2巻、IRL Press（1991年）、D. M. GloverおよびB. D. Hames（編）、DNA Cloning: A Practical Approach、第1巻～第4巻、IRL Press（1995年および1996年）、ならびにF. M. Ausubelら（編）、Current Protocols in Molecular Biology、Greene Pub. Associates and Wiley-Interscience（1988年、現在までの全ての改訂を含める）、Ed HarlowおよびDavid Lane（編）Antibodies: A Laboratory Manual、Cold Spring Harbour Laboratory、（1988年）、ならびにJ. E. Coliganら（編）Current Protocols in Immunology、John Wiley & Sons（現在までの全ての改訂を含める）などの出典中の文献の全体を通じて記載および説明されている。

30

40

【0072】

用語「および／または」、例えば、「Xおよび／またはY」は、「XおよびY」または

50

「X または Y」のいずれかを意味すると理解されるものとし、両方の意味またはいずれかの意味への明確な支持を提供するものとする。

【0073】

用語「約」は、別段の記載がない限り、指定された値の $\pm 20\%$ 、より例えば $\pm 10\%$ のことを指す。誤解を避けるために、用語「約」に続く指定した値は、正確に指定された値自体も包含すると解釈されるべきである（例えば、「約10」は、正確に10も包含する）。

【0074】

本明細書では、用語「から (from)」は、指定された整数が、特定のソースから得られるが、そのソースから必ずしも直接得られるわけではないことを示すものとする（すなわち、組換えにより得られるものを含む）。

【0075】

本明細書の全体を通じて、単語「含む (comprise)」または「含む (comprises)」もしくは「含む (comprising)」などの変形は、記載されるエレメント、整数もしくは工程、またはエレメント、整数もしくは工程の群の内包を意味するが、他の任意のエレメント、整数もしくは工程、またはエレメント、整数もしくは工程の群の除外を意味しないことを理解されよう。

【0076】

選択された定義

用語「精製する (purify)」もしくは「精製する (purifying)」または「精製 (purification)」は、細胞培養液中に存在する少なくとも1つの不純物を完全か部分的かにかかわらず除去することを意味するものとし、それによって溶液中のエンベロープ型ウイルスの純度レベルを改善する。

【0077】

用語「不純物 (impurity)」または「不純物 (impurities)」は、エンベロープ型ウイルス以外の細胞培養液中の1つまたはそれ以上の成分を含むものとする。例えば、不純物には、宿主細胞DNA、宿主細胞タンパク質および培地成分（例えば、ウシ胎仔血清）などのプロセス関連不純物がある。

【0078】

本明細書では、用語「エンベロープ型ウイルス」とは、ウイルスエンベロープを有するDNAおよびRNAウイルスのことを指す。エンベロープは、宿主細胞膜（例えば、リン脂質およびタンパク質）から一般に得られるが、エンベロープ表面にウイルス糖タンパク質を含む場合もある。エンベロープ型ウイルスは、エンベロープとウイルスゲノムの間のタンパク質層である「カプシド」も含む。一例において、エンベロープ型ウイルスは、レトロウイルスである。例えば、エンベロープ型ウイルスは、レンチウイルス、例えば、ヒト免疫不全ウイルスである。

【0079】

本明細書では、用語「細胞培養液」は、エンベロープ型ウイルスを産生するために細胞が増殖される液体を包含すると理解されることになる。液体は、細胞を含んでもよく、または細胞は、例えば、遠心分離および／もしくは上清の除去により除去されていてもよい。

【0080】

本明細書では、「採取 (harvesting)」とは、下流の処理のために産生細胞からウイルス粒子を含有する細胞培養培地を取り出すことを指し、「採取物 (harvest)」とは、下流の処理のために取り出されたウイルス粒子を含有する細胞培養培地のことを指す。採取プロセスは、1つまたはそれ以上の採取物を採集することを含む。「採取ろ過」とは、ろ過された採取物または下流の処理のためにろ過されて産生細胞が除去されたウイルス粒子を含有する細胞培養培地のいずれかのことを指す。

【0081】

本明細書では、用語「ろ過した細胞培養液」は、採取ろ過に供した後の細胞培養液を包

10

20

30

40

50

含すると理解されることになる。

【0082】

本明細書では、用語「塩でスパイクした細胞培養液」は、高濃度の塩溶液と混合された細胞培養液またはろ過した細胞培養液を包含すると理解されることになる。

【0083】

当業者は、「エンドヌクレアーゼ」が、ポリヌクレオチド鎖内のホスホジエステル結合を切断する酵素であると理解することになる。エンドヌクレアーゼは、DNAもしくはRNAまたはDNAとRNAの両方を切断することができる。エンドヌクレアーゼは、配列非特異的様式で切断することができる（「非特異的エンドヌクレアーゼ」とも称される）、または特定のヌクレオチド配列で切断することができる（制限酵素とも称される）。 10

【0084】

本明細書において供給源「由来」、例えば、セラチアマルセッセンス由来エンドヌクレアーゼへの言及は、その供給源から精製されたまたは他の手段、例えば、組換え技術で作製されたエンドヌクレアーゼを包含する。

【0085】

用語「陰イオン交換クロマトグラフィー」は、陰イオン交換樹脂、基材、吸収体、フィルター、等において実行されるクロマトグラフィーを具体的に含むが、これに限定されない。例えば、陰イオン交換クロマトグラフィーは、正に荷電した膜を使用して実行される。当業者は、用語「陰イオン交換クロマトグラフィー」および「陰イオン交換精製」が、本明細書において互換的に使用され、各用語が、他方の用語に対する明確な支持を提供すると理解することになる。 20

【0086】

「陰イオン交換クロマトグラフィーカラム」は、陰イオン交換クロマトグラフィーにより化合物を分離するためのデバイスである。「カラム」は、荷電分子を結合させた樹脂、基材、吸着体、フィルター、等を含む陰イオン交換クロマトグラフィーに使用される容器または管である。当業者は、用語「陰イオン交換クロマトグラフィーカラム」、「陰イオン交換カラム」および「陰イオン交換体」が、本明細書において互換的に使用され、各用語は、他の各用語について明確な支持を提供すると理解することになる。

【0087】

本明細書では、採取ろ過後に陰イオン交換クロマトグラフィーを実行する文脈において、用語「直後」は、採取ろ過と陰イオン交換の間に精製工程がないことを意味する。しかしながら、この用語は、採取ろ過と陰イオン交換クロマトグラフィーの間に細胞培養液もしくはろ過した細胞培養液のpHを調整する、または塩を添加することのような追加の工程を除外するものではない。 30

【0088】

本明細書では、用語「高濃度の塩溶液」は、1M以上、例えば、1M～10Mなど500mMを上回る塩の濃度を意味すると理解されることになる。

【0089】

本明細書では、プロセス工程の文脈において用語「インライン」とは、1つもしくはそれ以上の他のプロセス工程に組み込まれるもしくはそれと組み合わせられる、または手作業の介入もしくは取扱いを必要とせずに別のプロセス工程からもしくは別のプロセス工程へ直接流れるプロセス工程のことを指す。 40

【0090】

本明細書では、特に混合工程の文脈で使用される場合、「インライン混合」または「インライン」とは、第1の液体と第2の液体が互いに接触し、一緒に混合されるように、第1の液体を含む第1の流体流を第2の液体を含む第2の流体流と接触させて流すことを指す。陰イオン交換クロマトグラフィーカラムにロードする文脈においてインライン混合は、陰イオン交換クロマトグラフィーカラムに入る前、陰イオン交換クロマトグラフィーカラムに入った後、または陰イオン交換クロマトグラフィーカラムに入ると同時に2つの流体流が互いに接触することを含む。 50

【0091】

エンベロープ型ウイルスの産生

エンベロープ型ウイルスを産生する方法は、当業者に明らかになり、ならびに／または例えば、Ansorgeら、(2010年) Biochem. Eng. J. 48:362～377頁; SchweizerおよびMerten (2010年) Curr. Gene Ther. 10:474～486頁; およびRodriguesら、(2011年) Viral Gene Therapy. Xu、Intech. 第2章:15～40頁に記載されている。

【0092】

一例において、ウイルスはレトロウイルス、例えば、レンチウイルスである。例示的なレトロウイルスは、アルファレトロウイルス(トリ白血病ウイルス(ALV)など)、ベータレトロウイルス(マウス乳がんウイルス(MMTV)など)、ガンマレトロウイルス(マウス白血病ウイルス(MLV)など)、デルタレトロウイルス(ヒトTリンパ親和性ウイルス(HTLV)など)、イプシロンレトロウイルス(ウォールアイ皮膚肉腫ウイルス(WDSV)など)、スプマウイルス(ヒトフォーミーウイルス(HFV)またはサルフォーミーウイルス(SFV)など)、異なる型のヒト免疫不全ウイルス(HIV)、異なる型のサル免疫不全ウイルス(SIV)などの霊長類レンチウイルス、またはウマ伝染性貧血ウイルス(EIAV)などの非霊長類哺乳動物レンチウイルス、ネコ免疫不全ウイルス(FIV)、ヤギ関節炎脳炎ウイルス(CAEV)、もしくは羊ビスナマエディウイルス(VMV)由来である。

【0093】

一部の例において、エンベロープ型ウイルス、例えば、レトロウイルスは偽型であり、すなわち、偽型は、それが得られるウイルスと異なるウイルスに由来するエンベロープ糖タンパク質、修飾されたエンベロープ糖タンパク質またはキメラエンベロープ糖タンパク質を含む。

【0094】

一部の例において、エンベロープ型ウイルスは、ゲノムに導入された導入遺伝子を含む。導入遺伝子は、エンベロープ型ウイルス性ベクターが意図される特定の使用によって決まることになる。例示的な導入遺伝子は、治療的RNAをコードしている(例えば、標的RNAまたはDNA配列のアンチセンス相補的RNAをコードしている)導入遺伝子、病変のある対象において欠損もしくは欠失しているタンパク質をコードしている導入遺伝子、またはDNAによるワクチン接種に使用される導入遺伝子、すなわち、タンパク質をコードしており、その発現が、前記タンパク質に対するレシピエント身体のワクチン接種を誘導することになる導入遺伝子を含む。一部の例において、導入遺伝子は、異常ヘモグロビン症、例えば、鎌状血球症またはサラセミアを処置するのに有用なタンパク質もしくは核酸をコードする。一部の例において、導入遺伝子は、原発性免疫不全を処置するのに有用なタンパク質もしくは核酸をコードする。一部の例において、導入遺伝子は、ヴィスコットアルドリッチ症候群を処置するのに有用なタンパク質もしくは核酸をコードする。一部の例において、導入遺伝子は、Xに連鎖した無ガンマグロブリン血症を処置するのに有用なタンパク質もしくは核酸をコードする。

【0095】

一部の例において、エンベロープ型ウイルスは、宿主細胞に以下の4つのエレメント: レンチウイルス遺伝子gagpolを含む発現カセット、レンチウイルス遺伝子revを含む発現カセット、レンチウイルスのLTR-5'とレンチウイルスのLTR-3'の間に位置する全ての導入遺伝子およびエンベロープ糖タンパク質をコードしている発現カセットを導入することによって作製される。

【0096】

一部の例において、エンベロープ型ウイルスは、エンベロープ型ウイルスを産生するのに必要な1つまたはいくつかのエレメントを発現している安定な系から産生される(Miller (2001年) Curr. Protoc. Hum. Genet. 第12章:ユニ

10

20

30

40

50

ット12.5.; Rodriguesら2011年、上記)。一例において、エンベロープ型ウイルスは、ウイルスを産生するのに必要なエレメントをコードしている1つまたはいくつかのプラスミドで一過性にトランスフェクトされた哺乳動物宿主細胞から産生される。他の例によると、エレメントは、複数のプラスミド：レンチウイルスgagpol遺伝子を含む発現カセットを有する1つのプラスミド、レンチウイルスrev遺伝子を含む発現カセットを有する1つのプラスミド、エンベロープ糖タンパク質をコードしている発現カセットを有する1つのプラスミド、テトラサイクリン抗生物質耐性遺伝子(tTA)遺伝子を含む発現カセットを有する1つのプラスミド、および／またはレンチウイルスtat遺伝子を含む発現カセットを有する1つのプラスミドを用いて細胞に導入される。レンチウイルスのLTR-5'とLTR-3'の間に含まれる導入遺伝子を持つ発現カセット 10を含む転移プラスミドは、抵抗性を付与する抗生物質耐性カセットを持つヘルパープラスミドと一緒にコンカテマーとして産生細胞に導入することができる。

【0097】

宿主細胞は、エンベロープ型ウイルスの産生を可能にする任意の細胞から選択される。一例によると、細胞は、ヒト細胞(HEK293、HEK293T、HEK293FT、HEK293OX、Te671、HT1080、CEM)、マウス細胞(NIH-3T3)、イタチ科細胞(Mpf)、イヌ科細胞(D17)から選択される。一例によると、細胞は、CHO細胞、BHK細胞、MDCK細胞、C3H 10T1/2細胞、FLY I、Psi-2細胞、BOSC 23細胞、PA317細胞、WEHI細胞、COS細胞、BSC 1細胞、BSC 40細胞、BMT 10細胞、VERO細胞、W138細胞、 20MRC5細胞、A549細胞、HT1080細胞、B-50細胞、3T3細胞、NIH3T3細胞、HepG2細胞、Saos-2細胞、Huh7細胞、HeLa細胞、W163細胞、211細胞、および211A細胞から選択される。

【0098】

一例によると、細胞は、GPR、GPRG、GPRT、GPRGTおよびGPRTG細胞系から選択される。別の例において、細胞は、上記細胞系のいずれかから得られる細胞系から選択される。

【0099】

一例において、エンベロープ型ウイルスは安定な産生細胞から産生される。安定な産生細胞は、本明細書に開示される細胞系のいずれかを含むパッケージング細胞系から得ることができる。一部の実施形態において、パッケージング細胞系は、GPRGまたはGPRTG細胞系である(Thromら、(2009年)Blood 113(21):5104~5110頁;およびBonnerら、(2015年)Molecular Therapy、第23巻、補遺1、S35頁)。一例において、安定な産生細胞系細胞は、組換えプラスミドに1つまたはそれ以上の遺伝子をクローニングすることによってベクターを合成し;合成したベクターから切り出した発現カセットと抗生物質耐性カセットプラスミドから得られる発現カセットからコンカテマーアレイを形成し;パッケージング細胞系細胞を、形成したコンカテマーアレイでトランスフェクトし;安定な産生細胞系細胞を単離することによって生成される。ウイルスは、安定な産生細胞系細胞の誘導可能なプロモーターを誘導することによって産生される。 30 40

【0100】

細胞は、哺乳動物細胞の培養およびエンベロープ型ウイルスの産生に適した培地中で培養される。細胞は、付着環境、例えば表面に結合させながら、または懸濁液環境、例えば、培地中に懸濁して培養することができる。培地は、適切な濃度で添加される抗生物質、血清(特にウシ胎仔血清等)など本分野において公知の添加物でさらに補充される。培地は、GlutaMax(商標)、プルロニック(商標)F-68(ThermoFisher)、LONG(登録商標)R3 IGF-I(Sigma-Aldrich)、Cell Boost(商標)5、および／または抗凝集剤で補充される。使用される培地は、血清を特に含むまたは無血清でもよい。哺乳動物細胞用の培養培地は公知であり、例えば、DMEM(ダルベッコ変法イーグル培地)培地、RPMI1640、もしくは例えば 50

DMEM／F12を含めた様々な培養培地の混合物、またはoptiMEM（登録商標）、optiPRO（登録商標）、optiPRO-SFM（登録商標）、CD293（登録商標）（ThermoFisher）、TransFex（商標）（Cytiva）、BalanCD（登録商標）（Irvine）、Freestyle F17（登録商標）（Life Technologies）もしくはEx-Cell（登録商標）293（Sigma-Aldrich）の様な無血清培地がある。

【0101】

一過性にトランスフェクトした細胞を使用するプロセスにおいて、プラスミドのトランスフェクションを可能にする任意の薬剤が、使用される。例示的な薬剤には、リン酸カルシウムまたはポリエチレンジミンがある。条件（例えば、プラスミドの量、プラスミド同士の比、プラスミドとトランスフェクション薬剤の比、培地の型、等）およびトランスフェクション時間は、産生されるウイルスおよび／または転移プラスミドに導入される導入遺伝子の特徴によって当業者により適合される。

10

【0102】

一部の例によると、使用される培養培地は、細胞を培養するおよびウイルスを産生するために最先端で従来通り使用されている中性pH（例えば、7～7.4に含まれる、特に7、7.1、7.2、7.3または7.4）を有する。他の例において、使用される産生プロセスは、中等度の酸性培地における産生細胞の培養を含む。表現「中等度の酸性条件」は、5～6.8、例えば5.8～6.2など、5.5～6.5に含まれる水性溶液のpHを表す。選択されるpHは、使用される培養培地の緩衝力によって決まることになり、当業者は、一般的な知見を考慮に入れて容易に決定することができる。当業者は、溶液のpHを修飾することが可能である。

20

【0103】

一例において、エンベロープ型ウイルスの産生は：前記エンベロープ型ベクターの産生に必要とされるエレメントをコードしている1つもしくはいくつかのプラスミドによる、または構成的もしくは誘導後にベクターを産生する安定な産生細胞、例えば、GPRGもしくはGPRTGの使用によるHEK293T細胞もしくはその誘導体の一過性トランスフェクション；pHが、約6または約7のものである適切な培地中での細胞の培養；エンベロープ型ウイルスを含有する細胞培養培地の採取を含む。

【0104】

エンベロープ型ウイルスの精製

本開示は、細胞培養液もしくはろ過した細胞培養液からのエンベロープ型ウイルスの純度および／または回収率を改善するための方法を提供する。

30

【0105】

本開示の方法は、小規模および大規模産生からエンベロープ型ウイルスを精製することに適用できる。本方法は、商業規模で医薬品を製造するために規模を拡大する能力に特に有用である。

【0106】

一例において、細胞は、付着または固定床環境で増殖される。一例において、細胞は、CellSTACK（登録商標）（Corning）などの細胞培養チャンバ内で増殖される。一例において、細胞は、iCELLis（登録商標）（Pall）、scale-X（商標）またはNevoLine（商標）（Univercells Technologies）などの付着バイオリアクター内で増殖される。付着細胞培養チャンバまたはバイオリアクターは、約0.1m²より大きい、約1m²より大きい、約10m²より大きい、約30m²より大きい、約100m²より大きい、約200m²より大きい、約500m²より大きい、または約600m²より大きい利用可能な増殖表面を有することができる。

40

【0107】

一例において、細胞は、懸濁環境で増殖される。一例において、細胞は、攪拌槽型バイオリアクターで増殖される。例において、細胞はBiostat（登録商標）またはUn

50

i vessel (登録商標) バイオリアクター (Sartorius) で増殖される。

【0108】

実施形態において、細胞培養液の採取物の容量は、例えば約0.01L～約0.1L、または約0.1L～約1L、または約1L～約5Lである。例えば、細胞培養液の採取物の容量は、約5Lである。他の実施形態において、細胞培養液の採取物の容量は、約5L～約10L、約10L～約50L、約50L～約100L、約100L～約200L、約200L～約500L、約500L～約1000L、約1000L～約2000L、または約2000L～約5000Lである。一例において、採取物の容量は、約35～150Lである。一例において、採取物の容量は、約35～150Lである。例えば、採取物の容量は、約20Lである。一例において、採取物の容量は、約50～70Lである。例えば、採取物の容量は、約50Lである。

10

【0109】

細胞培養液からウイルス性ベクターを精製および濃縮するための下流のプロセスは、採取物から細胞残屑および成分を除去するための採取ろ過工程（別名「清澄化ろ過」もしくは「採取物清澄化ろ過」または「汚染微生物数削減」）、全体の容量を減少させ、宿主細胞DNA、タンパク質および培地成分からウイルス性ベクターを分離するための精製工程、例えば、陰イオン交換クロマトグラフィー、ならびに最終製剤緩衝液にウイルス性ベクターを濃縮するための限外濾過／透析ろ過工程を含む。一部の例において、下流の工程は、最終産物から微生物を除去するためのろ過滅菌工程をさらに含む。

20

【0110】

エンドヌクレアーゼ処理

細胞培養液またはろ過した細胞培養液のエンドヌクレアーゼ処理が、下流のプロセスに追加された。エンドヌクレアーゼ処理は、細胞培養液を採取する間または後だが、陰イオン交換クロマトグラフィーの前に存在することができる。例えば、エンドヌクレアーゼは、採取した細胞培養液が採集されるバッグまたは他の管に直接添加される。別の例において、エンドヌクレアーゼは、採集後であるが採取ろ過の前に細胞培養液に添加される。別の例において、エンドヌクレアーゼは、採取ろ過後であるが陰イオン交換クロマトグラフィーの前に細胞培養液に添加される。別の例において、エンドヌクレアーゼは、陰イオン交換クロマトグラフィーカラムにロードする場合、エンドヌクレアーゼが、カラムに入る直前またはカラムに入った後に細胞培養液に接触するように、細胞培養液とインラインで混合される。

30

【0111】

エンドヌクレアーゼを陰イオン交換クロマトグラフィーカラムへロードする前に細胞培養液と接触させる実施形態において、エンドヌクレアーゼは、細胞培養液と最長約30時間インキュベートすることができる。例えば、エンドヌクレアーゼを含む細胞培養液は、約22時間、約6時間、約4時間、約2時間、または約1時間貯蔵することができる。

【0112】

エンドヌクレアーゼが、採取中または採取ろ過工程の前に細胞培養液に接触される実施形態において、インキュベーションは、陰イオン交換クロマトグラフィーカラムへ細胞培養液をロードする前の介在プロセス工程の間に効果的に存在するので、場合によっては、追加のインキュベーション工程は不要である。

40

【0113】

一例において、採取した細胞培養液は、エンベロープ型ウイルスの産生後にろ過される。採取ろ過の前に、細胞培養液は、エンドヌクレアーゼと接触される。本発明者らは、採取ろ過の前に細胞培養液をエンドヌクレアーゼと接触させることにより、フィルターおよびその後の精製プロセス、例えば、陰イオン交換クロマトグラフィーの目詰まりが減少することを確認した。本発明者らは、細胞培養液をエンドヌクレアーゼと接触させることにより、フィルターを目詰まりさせることなく精製したエンベロープ型ウイルスをろ過滅菌できることをさらに見出した。本発明者らは、細胞培養液をエンドヌクレアーゼで処理することにより、精製したエンベロープ型ウイルスの感染性またはトータルRNA収率が有

50

意に減少しないことをさらに見出した。

【0114】

一例において、細胞培養液は、採取ろ過、すなわち、細胞および細胞残屑を除去するろ過の前に、エンドヌクレアーゼと接触される。一例において、採取ろ過は、膜ろ過を使用して実行される。例えば、採取ろ過は、0.8 μmフィルターおよび0.45 μmフィルターを使用して実行され、それは単一の装置内に含まれる。

【0115】

一例において、細胞培養液は、エンドヌクレアーゼと約1～4時間接触される。例えば、細胞培養液は、エンドヌクレアーゼと約1～3時間接触される。一例において、細胞培養液は、エンドヌクレアーゼと約1時間接触される。一部の例において、エンドヌクレアーゼは、細胞培養培地に添加され、採取ろ過は、いかなる追加のインキュベーション時間もなく開始される。

10

【0116】

適切なエンドヌクレアーゼは、本明細書における開示に基づいて当業者に明らかになる。一例において、エンドヌクレアーゼは、配列非特異的様式で切断する。例えば、エンドヌクレアーゼは、短いオリゴヌクレオチド、例えば、長さ3～7 bp、例えば長さ3～5 bpなど、長さ2～10 bpにDNA（場合によりRNA）を切断する。

【0117】

一例において、エンドヌクレアーゼは、セラチアマルセッセンス、アナベナ属種、サッカロミセスセレビシエ、ボースタウルス、シンセファラストラムラセモサムおよび／またはボレリアブルグドルフェリ由来である。

20

【0118】

一例において、エンドヌクレアーゼはセラチア属ヌクレアーゼ、NucA、Nuc1および／またはエンドヌクレアーゼGである。

【0119】

エンドヌクレアーゼは、列挙した供給源から単離または精製される。別法として、エンドヌクレアーゼは、組換えにより作製することができる。

【0120】

エンドヌクレアーゼは、当業者にとって明らかになるようにおよび／または本明細書に記載される通り適切な市販品から入手することもできる。例えば、エンドヌクレアーゼは、NEW England Biolabs社またはclecta GmbHから市販されている。

30

【0121】

一例において、エンドヌクレアーゼは、セラチアマルセッセンス由来である。そのようなエンドヌクレアーゼは、Goldenヌクレアーゼとも称される。このヌクレアーゼは、商品名ベンゾナーゼ（登録商標）またはDenarase（登録商標）で販売されている。

【0122】

一例において、本方法は、細胞培養液中の Mg^{2+} の濃度を調整して、最高10 mM Mg^{2+} の濃度を達成することを含む。一例において、 Mg^{2+} の濃度は、約1～2 mMに調整される。一例において、 Mg^{2+} の濃度は、2 mMに調整される。一例において、細胞培養液中の Mg^{2+} の濃度は、約0.8 mMであり、さらに調整されない。

40

【0123】

一例において、本方法は、細胞培養液のpHを6.0～10.0に調整することを含む。一例において、本方法は、細胞培養液のpHを8.0～9.2に調整することを含む。

【0124】

一例において、細胞培養液は、エンドヌクレアーゼと接触している間0℃～42℃の温度である。一例において、細胞培養液は、エンドヌクレアーゼと接触している間2℃～8℃の温度である。一例において、細胞培養液は、エンドヌクレアーゼと接触している間4℃の温度である。一例において、細胞培養液は、エンドヌクレアーゼと接触している間3

50

5℃～40℃の温度である。一例において、細胞培養液は、エンドヌクレアーゼと接触している間約37℃の温度である。一例において、細胞培養液は、エンドヌクレアーゼと接触している間18℃～22℃の温度である。一例において、細胞培養液は、エンドヌクレアーゼと接触している間20℃の温度である。

【0125】

一例において、細胞培養液中のジチオスレイトール（DTT）の濃度は、0～100mMである。一例において、細胞培養液中の2-メルカプトエタノールの濃度は、0～100mMである。一例において、細胞培養液中の一価陽イオン、例えば、 Na^+ または K^+ の濃度は、0～150mMである。一例において、細胞培養液中の一価陽イオン、例えば、 Na^+ または K^+ の濃度は、0～20mMである。一例において、細胞培養液中の PO_4^{3-} の濃度は、0～100mMである。一例において、細胞培養液中の PO_4^{3-} の濃度は、0～10mMである。

10

【0126】

一例において、エンドヌクレアーゼは、0.001U/mL細胞培養培地～100U/mL細胞培養培地の濃度で培養培地に添加される。例えば、エンドヌクレアーゼは、0.01U/mL細胞培養培地～10U/mL細胞培養培地の濃度で細胞培養培地に添加される。例えば、エンドヌクレアーゼは、0.1U/mL細胞培養培地～1U/mL細胞培養培地の濃度で細胞培養培地に添加される。例えば、エンドヌクレアーゼは、0.5U/mL未満細胞培養培地の濃度で細胞培養培地に添加される。一例において、エンドヌクレアーゼは、0.3U/mL細胞培養培地の濃度で細胞培養培地に添加される。

20

【0127】

一部の例において、細胞培養液のpHは、エンドヌクレアーゼによる処理の前に調整されない。

【0128】

一部の例において、エンドヌクレアーゼは、細胞培養培地に添加する前に希釈される。例えば、エンドヌクレアーゼは、細胞が増殖される培地に希釈される。例えば、エンドヌクレアーゼは、DMEMに希釈される。一例において、エンドヌクレアーゼは、緩衝液またはウシ胎仔血清（FBS）を含まない培地に希釈される。例えば、エンドヌクレアーゼは、HEPESを含む緩衝液に希釈される。

【0129】

エンドヌクレアーゼによる処理後、細胞培養液はろ過される。

30

【0130】

陰イオン交換精製

採取る過後、エンベロープ型ウイルスは、陰イオン交換を使用して精製される。

【0131】

一例において、陰イオン交換は、結合-溶出モードで実行される。その際、エンベロープ型ウイルスは、陰イオン交換体に結合し、汚染物質は通過する。ウイルスは、陰イオン交換体からその後溶出される。この様式で陰イオン交換を実行することにより、ウイルスが懸濁される液体の容量が減少し、宿主細胞DNA、宿主細胞タンパク質およびウシ胎仔血清のような培地成分などの汚染物質が除去される。

40

【0132】

適切な陰イオン交換体は、当業者に明らかになる。例示的な陰イオン交換体は、樹脂もしくは膜または別の適切な基材を含むカラムである。

【0133】

一例において、陰イオン交換体は、膜陰イオン交換体である。

【0134】

一例において、陰イオン交換体は、弱い陰イオン交換体であり、例えば、ジエチルアミノエチル（DEAE）またはアミノエチル基から選択されるイオン交換基を含む。

【0135】

別の例において、陰イオン交換体は、強力な陰イオン交換体であり、例えば、第4級ア

50

ンモニウム（Ｑ）、ジエチル－２－ヒドロキシプロピルアミノエチル（ＱＡＥ）、トリエチルアミノエチル（ＴＥＡＥ）またはトリメチルアミノエチル基から選択されるイオン交換基を含む。本開示の方法に有用な例示的な陰イオン交換体には、ＭＵＳＴＡＮＧ（登録商標）Ｅ、ＭＵＳＴＡＮＧ（登録商標）Ｑ、ＳＡＲＴＯＢＩＮＤ（登録商標）Ｑ、ＣＨＲＯＭＡＳＯＲＢ（登録商標）、ＰＯＳＳＩＤＹＮＥ（登録商標）、ＣＡＰＴＯ（登録商標）Ｑ、ＱＳＦＦ、ＰＯＲＯＳ（登録商標）Ｑ、ＦＲＡＣＴＯＧＥＬ（登録商標）Ｑ、ＮＡＴＲＩＸ（登録商標）Ｑがある。

【０１３６】

本明細書に例示されるように、陰イオン交換体は、Ｑイオン交換基を含む。

【０１３７】

本明細書に例示されるように、陰イオン交換体は、Ｑイオン交換基を含む膜陰イオン交換体である。例えば、陰イオン交換体は、ＭＵＳＴＡＮＧ（登録商標）Ｑである。

【０１３８】

本明細書に述べられるように、本発明者らは、細胞培養培地またはろ過された細胞培養培地中の塩濃度は、有効な陰イオン交換クロマトグラフィーには低過ぎることを決定した。例えば、本発明者らによって確認された採取した細胞培養培地の塩濃度は、約１５０ｍＭであった。本発明者らは、細胞培養培地またはろ過された細胞培養培地中の最終的な塩濃度３００～５００ｍＭ、例えば、約４００ｍＭが、陰イオン交換クロマトグラフィーカラムへロードするのに望ましいと決定した。約４００ｍＭの塩濃度は、陰イオン交換体に結合する不純物を減少させた。塩濃度を増大させるには、細胞培養培地またはろ過された細胞培養培地に塩溶液を添加（または「スパイク」）して、塩でスパイクした細胞培養培地を生成することが必要であった。本発明者らは、細胞培養培地またはろ過された細胞培養培地に過大な容量を添加することを回避したかった、そのため高濃度の塩溶液を使用することが望ましかった。しかしながら、細胞培養培地またはろ過された細胞培養培地への塩の添加が、ウイルスの不安定化の原因になることも認識していた。図１は、採取安定性が、低塩条件と比較して高塩条件下で減少することを示している。塩を添加した直後には、力価は、約２０～３０％減少する。理論に束縛されるものではないが、本発明者らは、力価のこの初期の損失が、高濃度の塩溶液と混合する際の塩の高い局所領域の形成によって引き起こされる可能性があることを示唆する。

【０１３９】

この問題は、高いせん断力へ曝露することによってウイルスを不安定化することになるより激しい混合技術を使用せずに、ウイルスと高い塩濃度との長時間にわたる接触を回避するのに十分速やかに細胞培養培地またはろ過された細胞培養培地を高濃度の塩溶液と混合することの困難さによって悪化する。不均一または不十分な混合は、ウイルスを損なうだけでなく、ロードの間にウイルスを溶出させることによって陰イオン交換プロセス自体も妨げる。

【０１４０】

混合の典型的な方法は、手作業による取扱い工程を含み、商業規模では時間がかかる。商業規模で従来の方法を使用して十分な混合を実現するために、プロセス時間を数時間追加する場合もある。

【０１４１】

これら問題に対する本発明者らの解決策は、陰イオン交換クロマトグラフィーカラムへロードする間に細胞培養培地またはろ過された細胞培養培地を高濃度の塩溶液とインラインプロセスで接触させることである。この方法は、手作業による取扱い工程なしにまたはプロセス時間を少しも追加することなく混合の改善を実現し、連続または半連続的様式で、インラインで実行することができ、それにより下流のプロセスが簡素化される。

【０１４２】

例えば、高濃度の塩溶液とろ過した細胞培養液または細胞培養液は、陰イオン交換クロマトグラフィーカラムにロードする間に混合されて、塩でスパイクした細胞培養培地が生成される。

【0143】

例えば、高濃度の塩溶液は、陰イオン交換クロマトグラフィーカラムに添加され、細胞培養培地またはろ過された細胞培養培地は、カラムにロードされる。

【0144】

一例において、ロードの間に細胞培養培地またはろ過された細胞培養培地を高濃度の塩溶液と接触させることは、2つの流体流（一方は細胞培養培地またはろ過された細胞培養培地を含有し、他方は高濃度の塩溶液を含有する）を1つの流体流と一緒に流すことを含む。流体流と一緒に流すことにより、陰イオン交換体へロードされるとき、陰イオン交換体にロードされる直前、または陰イオン交換体内のいずれかで、それらを混合して、塩でスパイクした細胞培養培地を生成する。研究室規模または商業規模で実行されるかにかかわらず、本方法は、陰イオン交換体のロードの間にインラインで実行されるのでプロセス時間の大幅な追加はない。

10

【0145】

一例において、高濃度の塩溶液中の塩は、一価または二価である。例えば、高濃度の塩溶液中の塩は、一価である。

【0146】

一例において、高濃度の塩溶液中の塩は、NaClまたはKClである。本開示の例示された形態において、高濃度の塩溶液中の塩は、NaClである。

【0147】

一例において、高濃度の塩溶液中の塩の濃度は、1M～10Mである。例えば、高濃度の塩溶液中の塩の濃度は、2M～8Mである。例えば、高濃度の塩溶液中の濃度は、3M～7Mである。例えば、高濃度の塩溶液中の塩の濃度は、5Mである。

20

【0148】

一例において、高濃度の塩溶液は、5M NaClである。

【0149】

一例において、高濃度の塩溶液は、陰イオン交換クロマトグラフィーカラムへロードするために塩でスパイクした細胞培養培地中で塩の終濃度300mM～500mMを達成するために添加される。例えば、高濃度の塩溶液は、塩の終濃度400mMの塩でスパイクした細胞培養培地を達成するために添加される。

【0150】

一例において、ロード後、陰イオン交換クロマトグラフィーカラムは、緩衝液および塩を含む洗浄溶液で洗浄される。例えば、緩衝液は、ヒスチジン、HEPESまたはトリスである。例えば、塩は、一価の塩、例えば、NaClである。

30

【0151】

一例において、洗浄溶液は、5～50mMヒスチジン、150mM NaCl、pH5.5～7.4、例えば10mMヒスチジン緩衝液、150mM NaCl、pH7を含む。別の例において、洗浄溶液は10～100mMトリス、150mM NaCl、pH7.0～9.0、例えば50mMトリス、150mM NaCl、pH8を含む。別の例において、洗浄溶液は、5～50mM HEPES、150mM NaCl、pH6.8～8.2、例えば10mM HEPES、150mM NaCl、pH7.5を含む。

40

【0152】

一例において、洗浄溶液は、5～50mMヒスチジン、750mM NaCl、pH5.5～7.4、例えば10mMヒスチジン緩衝液、750mM NaCl、pH7を含む。別の例において、洗浄溶液は、10～100mMトリス、750mM NaCl、pH7.0～9.0、例えば50mMトリス、750mM NaCl、pH8を含む。別の例において、洗浄溶液は、5～50mM HEPES、750mM NaCl、pH6.8～8.2、例えば10mM HEPES、750mM NaCl、pH7.5を含む。

【0153】

一例において、洗浄溶液の伝導率は、10mS/cm～20mS/cmである。

【0154】

50

一例において、ロード後に、陰イオン交換クロマトグラフィーカラムは、緩衝液および塩を含む第1の洗浄溶液ならびに緩衝液および塩を含む第2の洗浄溶液で洗浄される。例えば、緩衝液は、ヒスチジン、HEPESまたはトリスである。例えば、塩は、一価の塩、例えば、NaClである。

【0155】

一例において、第1および第2の洗浄溶液は、同じ緩衝液および同じ塩を含むが、第2の洗浄溶液は、第1の洗浄溶液より高濃度の塩を含む。

【0156】

一例において、第2の洗浄溶液の伝導率は、 $60\text{ mS/cm} \sim 75\text{ mS/cm}$ である。

【0157】

一例において、第1の洗浄溶液は、 $5 \sim 50\text{ mM}$ ヒスチジン、 150 mM NaCl、 $\text{pH } 5.5 \sim 7.4$ 、例えば 10 mM ヒスチジン緩衝液および 150 mM NaCl、 $\text{pH } 7$ を含み；第2の洗浄溶液は、 $5 \sim 50\text{ mM}$ ヒスチジン、 750 mM NaCl、 $\text{pH } 6.0 \sim 8.0$ 、例えば 10 mM ヒスチジン緩衝液および 750 mM NaCl、 $\text{pH } 7$ を含む。

【0158】

一例において、第1の洗浄溶液は、 $10 \sim 100\text{ mM}$ トリス、 150 mM NaCl、 $\text{pH } 7.0 \sim 9.0$ 、例えば 50 mM トリスおよび 150 mM NaCl、 $\text{pH } 8$ を含み；第2の洗浄溶液は、 $10 \sim 100\text{ mM}$ トリス、 750 mM NaCl、 $\text{pH } 7.0 \sim 9.0$ 、例えば 50 mM トリスおよび 750 mM NaCl、 $\text{pH } 8$ を含む。

【0159】

一例において、第1の洗浄溶液は、 $5 \sim 50\text{ mM}$ HEPES、 150 mM NaCl、 $\text{pH } 6.8 \sim 8.2$ 、例えば 10 mM HEPES、 150 mM NaCl、 $\text{pH } 7.5$ を含み；第2の洗浄溶液は、 $5 \sim 50\text{ mM}$ HEPES、 750 mM NaCl、 $\text{pH } 6.8 \sim 8.2$ 、例えば 10 mM HEPES、 750 mM NaCl、 $\text{pH } 7.5$ を含む。

【0160】

洗浄後、本方法は、エンベロープ型ウイルスを溶出することを含むことができる。一例において、ウイルスは、緩衝液および塩を含む溶液で溶出される。例えば、緩衝液は、ヒスチジン、HEPESまたはトリスである。例えば、塩は、一価の塩、例えば、NaClである。

【0161】

一例において、第1および第2の洗浄ならびに溶出溶液は、同じ緩衝液および同じ塩を含むが、溶出溶液は、第1および第2の（使用される場合）洗浄溶液より高濃度の塩を含む。

【0162】

一例において、溶出溶液は、 $5 \sim 50\text{ mM}$ ヒスチジン、 $1\text{ M} \sim 2\text{ M}$ NaCl、 $\text{pH } 5.5 \sim 7.4$ 、例えば 10 mM ヒスチジン緩衝液および 1200 または 1500 mM NaClを含む。別の例において、溶出溶液は、 $10 \sim 100\text{ mM}$ トリス、 $1\text{ M} \sim 2\text{ M}$ NaCl、 $\text{pH } 7.0 \sim 9.0$ 、例えば 50 mM トリスおよび 1200 または 1500 mM NaCl、 $\text{pH } 8$ を含む。別の例において、溶出溶液は、 $5 \sim 50\text{ mM}$ HEPES、 $1\text{ M} \sim 2\text{ M}$ NaCl、 $\text{pH } 6.8 \sim 8.2$ 、例えば 10 mM HEPES、 1200 または 1500 mM NaCl、 $\text{pH } 7.5$ を含む。

【0163】

一例において、溶出溶液の伝導率は、 $110 \sim 130\text{ ms/cm}$ である。

【0164】

一例において、ヒスチジン含有溶液の pH は7である。

【0165】

一例において、トリス含有溶液の pH は8である。

【0166】

10

20

30

40

50

一例において、H E P E S 含有溶液の p H は 7 . 5 である。

【 0 1 6 7 】

一例において、陰イオン交換クロマトグラフィーは：

- (i) 細胞培養液またはろ過した細胞培養液および 5 M N a C l をロードすることと；
- (i i) 1 0 m M ヒスチジンおよび 1 5 0 m M N a C l で洗浄することと；
- (i i i) 1 0 m M ヒスチジンおよび 7 5 0 m M N a C l で洗浄することと；
- (i v) 1 0 m M ヒスチジンおよび 1 5 0 0 m M N a C l で溶出することと

を含む。

【 0 1 6 8 】

別の例において、陰イオン交換クロマトグラフィーは：

- (i) 細胞培養液またはろ過した細胞培養液および 5 M N a C l をロードすることと；
- (i i) 5 0 m M トリスおよび 1 5 0 m M N a C l で洗浄することと；
- (i i i) 5 0 m M トリスおよび 7 5 0 m M N a C l で洗浄することと；
- (i v) 5 0 m M トリスおよび 1 5 0 0 m M N a C l で溶出することと

を含む。

【 0 1 6 9 】

別の例において、陰イオン交換クロマトグラフィーは：

- (i) 細胞培養液またはろ過した細胞培養液および 5 M N a C l をロードすることと；
- (i i) 1 0 m M H E P E S および 1 5 0 m M N a C l で洗浄することと；
- (i i i) 1 0 m M H E P E S および 7 5 0 m M N a C l で洗浄することと；
- (i v) 1 0 m M H E P E S および 1 5 0 0 m M N a C l で溶出することと

を含む。

【 0 1 7 0 】

一例において、溶出後、得られた溶出液は、溶出液を希釈緩衝液とインラインで混合する、もしくは希釈緩衝液中に直接溶出する、または別々の工程において溶出および希釈するいずれかによって希釈して塩濃度を減少させる。例えば、溶出液は、ヒスチジン緩衝液（例えば、1 0 m M L - ヒスチジンを含む）またはトリス（例えば、5 0 m M トリスを含む）もしくは H E P E S （例えば、1 0 m M H E P E S を含む）を含むまたはそれからなる溶液で希釈される。例えば、溶出液は、ウイルスを溶出するために使用した同じ緩衝液を含む溶液で希釈される。例えば、溶出が、1 5 0 0 m M N a C l で行われた場合、溶出液は、その溶液で 1 : 1 0 希釈されるまたは溶出が、1 2 0 0 m M N a C l で行われた場合、溶出液は、その溶液で 1 : 8 希釈される。一例において、溶出液は、1 0 m M H E P E S 、 p H 7 . 5 を含む溶液で 1 : 1 0 希釈される。

【 0 1 7 1 】

明細書の全体を通じて、陰イオン交換クロマトグラフィーを参照する。本明細書に記述される方法が、他のイオン交換クロマトグラフィーにも適用できることは理解されるべきである。例えば、陽イオン交換クロマトグラフィーを使用して、不純物を結合し、ウイルス性ベクターを通過させることができる。当業者は、必要に応じて他のイオン交換体に適するように本開示の方法を容易に修飾することができる。

【 0 1 7 2 】

追加の工程

一例において、陰イオン交換カラムから溶出されるエンベロープ型ウイルスは、そのサイズに基づいてさらに精製される。一例において、陰イオン交換カラムからウイルスが溶出された緩衝液は、おおよそ同時に交換される。本開示のプロセスにおいて、タンジェンシャルフローフィルトレーションが好ましい。この方法は、不純物除去と緩衝液交換をほとんど同時に可能にする。

【 0 1 7 3 】

タンジェンシャルフロー限外濾過／透析ろ過は、残余タンパク質および核酸を除去し、作業緩衝液を最終製剤緩衝液へと交換するために使用される方法である。タンジェンシャルフローを使用する限外濾過が好ましく、異なるデバイスも使用できる〔例えば、P r o

10

20

30

40

50

fluxおよびLABSCALE（限外濾過システム）TFFシステム、両方ともMillipore、またはRepligen製KR2iシステム]。選択される特定の限外濾過膜は、エンベロープ型ウイルスを保持するのに十分小さいが、不純物が通過できるのに十分に大きいフィルター細孔サイズのものになる。製造業者および膜の型に応じて、100~1000kDaの名目分画分子量が、適切である（例えばUF750-E-5A、GE Healthcare；BIOMAX（限外濾過デバイス）NMWC 1000、Millipore）。一例において、分画分子量は、500kDaである。膜組成物は、再生セルロース、（修飾）ポリエーテルスルホン、ポリスルホンであってもよいが、それに限定されない。膜は、平板または中空糸型であることができる。最適化されなければならない主なパラメータは、流動速度および膜貫通圧力である。名目分画分子量と組み合わせて、これら2つのパラメータにより、効率的な精製および緩衝液交換および高いウイルス収率が可能になる。

10

【0174】

追加の工程として、ろ過滅菌を実行して、汚染微生物数を排除することができる。したがって限外濾過工程からの希釈された溶出液または最終的な残留物は、フィルター（例えば0.22μmフィルター）によってろ過される。フィルターは、様々な材料から構築され、それだけには限らないが、ポリプロピレン、親水性PVDF、セルロース、親水性再生セルロース、セルロースエステル、湿潤剤不含酢酸セルロース、酢酸セルロース、ナイロン、親水性ナイロン膜、ポリエーテルスルホン、親水性ポリエーテルスルホン、親水性非対称PEESまたは低い非特異的インフルエンザウイルス結合と一致する他の任意の材料がある。フィルターは、単一の膜の層もしくは1つ以上の層を有することができ、または同じもしくは異なる材料の前置フィルター、例えば0.45μm前置フィルターを組み込むこともできる。無菌濾過したウイルスは、その後の操作のために凍結して保持することができる。

20

【0175】

一例において、無菌フィルターは、少なくとも15cm²のろ過領域を有する。例えば、無菌フィルターは、約17.8cm²または約20cm²のろ過領域を有する。一例において、無菌フィルターは、少なくとも200cm²のろ過領域を有する。例えば、無菌フィルターは、約210cm²または約220cm²のろ過領域を有する。

30

【0176】

一例において、無菌フィルターは、少なくとも2.5mL/cm²のろ過能力を有する。例えば、無菌フィルターは、少なくとも4.0mL/cm²のろ過能力を有する。

【0177】

本発明は、以下の付番されたパラグラフにおいてさらに開示される：

1. 細胞培養液またはろ過した細胞培養液からエンベロープ型ウイルスを精製する方法であって、ウイルスを精製する前に細胞培養液またはろ過した細胞培養液をエンドヌクレアーゼと接触させることを含む方法。
2. 細胞培養液は、安定な産生細胞から採取される、パラグラフ1の方法。
3. エンドヌクレアーゼは、非特異的エンドヌクレアーゼであり、配列特異性を有さずDNAとRNAの両方を分解する、パラグラフ1または2の方法。
4. エンドヌクレアーゼは、セラチアマルセッセンス、アナベナ属種、サッカロミセスレビシエ、ボースタウルス、シンセファラストラムラセモサムおよび／またはボレリアブルグドルフェリ由来である、パラグラフ1~3のいずれかの方法。
5. エンドヌクレアーゼは、セラチア属ヌクレアーゼ、NucA、Nuc1、エンドヌクレアーゼG、DNase Iまたはマイクロコッカスヌクレアーゼである、パラグラフ1~4のいずれか1つの方法。
6. エンドヌクレアーゼは、細胞培養液またはろ過した細胞培養液0.001~100単位/mLの濃度で細胞培養液またはろ過した細胞培養液と接触される、パラグラフ1~5のいずれか1つの方法。
7. エンドヌクレアーゼは、細胞培養液またはろ過した細胞培養液0.01~10単位

40

50

／m L の濃度で細胞培養液またはろ過した細胞培養液と接触される、パラグラフ 6 の方法。

8. エンドヌクレアーゼは、細胞培養液またはろ過した細胞培養液 0.1～1 単位／m L の濃度で細胞培養液またはろ過した細胞培養液と接触される、パラグラフ 7 の方法。

9. エンドヌクレアーゼは、細胞培養液またはろ過した細胞培養液約 0.3 単位／m L の濃度で細胞培養液またはろ過した細胞培養液と接触される、パラグラフ 8 の方法。

10. 精製は、細胞培養液もしくはろ過した細胞培養液をエンドヌクレアーゼと接触させた後約 30 時間未満、細胞培養液もしくはろ過した細胞培養液をエンドヌクレアーゼと接触させた後約 22 時間未満、細胞培養液もしくはろ過した細胞培養液をエンドヌクレアーゼと接触させた後約 6 時間未満、細胞培養液もしくはろ過した細胞培養液をエンドヌクレアーゼと接触させた後約 4 時間未満、細胞培養液もしくはろ過した細胞培養液をエンドヌクレアーゼと接触させた後約 2 時間未満、細胞培養液もしくはろ過した細胞培養液をエンドヌクレアーゼと接触させた後約 1 時間未満、または細胞培養液もしくはろ過した細胞培養液をエンドヌクレアーゼと接触させた後約 30 分未満に実行される、パラグラフ 1～9 のいずれかの方法。

10

11. エンドヌクレアーゼは、細胞培養液またはろ過した細胞培養液約 0.3 単位／m L の濃度で細胞培養液またはろ過した細胞培養液と接触され、精製は、接触の約 1～約 2 時間後に実行される、パラグラフ 1～10 のいずれかの方法。

12. エンドヌクレアーゼは、細胞培養液またはろ過した細胞培養液約 0.01～0.3 単位／m L の濃度で細胞培養液またはろ過した細胞培養液と接触され、精製は、接触後約 2 時間を超えて実行される、パラグラフ 1～10 のいずれかの方法。

20

13. エンドヌクレアーゼは、細胞培養液またはろ過した細胞培養液約 0.3～10 単位／m L の濃度で細胞培養液またはろ過した細胞培養液と接触され、精製は、接触後約 1 時間未満に実行される、パラグラフ 1～10 のいずれかの方法。

14. エンドヌクレアーゼは、精製直前に細胞培養液またはろ過した細胞培養液と接触される、パラグラフ 1～10 または 13 のいずれかの方法。

15. ろ過した細胞培養液をエンドヌクレアーゼと接触させる前に、細胞培養液に対して採取ろ過を実行して、ろ過した細胞培養液を作製することを含む、パラグラフ 1～14 のいずれか 1 つの方法。

16. 細胞培養液をエンドヌクレアーゼと接触させた後に採取ろ過を実行して、ろ過した細胞培養液を作製することを含む、パラグラフ 1～14 のいずれか 1 つの方法。

30

17. 採取ろ過は、細胞培養液をエンドヌクレアーゼと接触させた直後に実行される、パラグラフ 16 の方法。

18. 精製は、ろ過した細胞培養液を陰イオン交換クロマトグラフィーに供することを含む、パラグラフ 1～17 のいずれか 1 つの方法。

19. ろ過した細胞培養液は、採取ろ過の直後に陰イオン交換クロマトグラフィーに供される、パラグラフ 18 の方法。

20. 陰イオン交換クロマトグラフィーカラムにロードする前またはその間に、ろ過した細胞培養液を高濃度の塩溶液と接触させて、塩でスパイクした細胞培養液を形成する、パラグラフ 19 の方法。

40

21. 陰イオン交換クロマトグラフィーを使用し、ろ過した細胞培養液からエンベロープ型ウイルスを精製する方法であって、陰イオン交換クロマトグラフィーカラムにロードする前またはその間に、ろ過した細胞培養液を高濃度の塩溶液と接触させて、塩でスパイクした細胞培養液を形成する、方法。

22. 陰イオン交換クロマトグラフィーカラムにロードする直前に、ろ過した細胞培養液を高濃度の塩溶液と接触させて、塩でスパイクした細胞培養液を形成する、パラグラフ 20 または 21 の方法。

23. 高濃度の塩溶液およびろ過した細胞培養液は、インラインで混合される、パラグラフ 20 または 22 のいずれか 1 つの方法。

24. 高濃度の塩溶液は、一価および／または二価の塩を含む、パラグラフ 20～23

50

のいずれか 1 つの方法。

25. 一価の塩は、塩化ナトリウムである、パラグラフ 24 の方法。

26. 高濃度の塩溶液は、少なくとも約 1 M の濃度である、パラグラフ 20 ~ 25 のいずれか 1 つの方法。

27. ろ過した細胞培養液および高濃度の塩溶液は、ろ過した細胞培養液約 70 ~ 99 % (容量 / 容量) および高濃度の塩溶液約 1 ~ 30 % (容量 / 容量) の比で混合される、パラグラフ 20 ~ 26 のいずれか 1 つの方法。

28. 高濃度の塩溶液は、約 1 M の濃度である、パラグラフ 20 ~ 27 のいずれか 1 つの方法。

29. ろ過した細胞培養液および高濃度の塩溶液は、ろ過した細胞培養液約 70 % (容量 / 容量) および高濃度の塩溶液約 30 % (容量 / 容量) の比で混合される、パラグラフ 28 の方法。

30. 高濃度の塩溶液は、2 M の濃度である、パラグラフ 20 ~ 27 のいずれか 1 つの方法。

31. ろ過した細胞培養液および高濃度の塩溶液は、ろ過した細胞培養液約 85 % (容量 / 容量) および高濃度の塩溶液約 15 % (容量 / 容量) の比で混合される、パラグラフ 30 の方法。

32. 高濃度の塩溶液は、5 M の濃度である、パラグラフ 20 ~ 27 のいずれか 1 つの方法。

33. ろ過した細胞培養液および高濃度の塩溶液は、ろ過した細胞培養液約 94 % (容量 / 容量) および高濃度の塩溶液約 6 % (容量 / 容量) の比で混合される、パラグラフ 32 の方法。

34. 高濃度の塩溶液は、濃度 10 M である、パラグラフ 20 ~ 27 のいずれか 1 つの方法。

35. ろ過した細胞培養液および高濃度の塩溶液は、ろ過した細胞培養液約 97 % (容量 / 容量) および高濃度の塩溶液約 3 % (容量 / 容量) の比で混合される、パラグラフ 34 の方法。

36. 塩でスパイクした細胞培養液は、300 ~ 500 mM の塩濃度を有する、パラグラフ 20 ~ 35 のいずれか 1 つの方法。

37. 塩でスパイクした細胞培養液は、約 400 mM の塩濃度を有する、パラグラフ 36 の方法。

38. 塩でスパイクした細胞培養液は、25 °C で 35 ~ 45 mS / cm の標的伝導率を有する、パラグラフ 20 ~ 37 のいずれか 1 つの方法。

39. 塩でスパイクした細胞培養液は、25 °C で 36 ~ 44 mS / cm の標的伝導率を有する、パラグラフ 20 ~ 38 のいずれか 1 つの方法。

40. 塩でスパイクした細胞培養液は、25 °C で 40 mS / cm の標的伝導率を有する、パラグラフ 38 または 39 の方法。

41. 1 つまたはそれ以上の洗浄工程により陰イオン交換クロマトグラフィーカラムを洗浄することをさらに含む、パラグラフ 18 ~ 40 のいずれか 1 つの方法。

42. 10 ~ 100 mM トリス、150 mM NaCl、pH 7.0 ~ 9.0 ; 5 ~ 50 mM ヒスチジン、150 mM NaCl、pH 5.5 ~ 7.4 ; または 5 ~ 50 mM HEPES、150 mM NaCl、pH 6.8 ~ 8.2 を含む第 1 の洗浄溶液による第 1 の洗浄工程を含む、パラグラフ 41 の方法。

43. 第 1 の洗浄溶液は : 50 mM トリス、150 mM NaCl、pH 8 ; 10 mM ヒスチジン、150 mM NaCl、pH 7 ; または 10 mM HEPES、150 mM NaCl、pH 7.5 を含む、パラグラフ 42 の方法。

44. 方法は : 10 ~ 100 mM トリス、750 mM NaCl、pH 7.0 ~ 9.0 ; 5 ~ 50 mM ヒスチジン、750 mM NaCl、pH 5.5 ~ 7.4 ; または 5 ~ 50 mM HEPES、750 mM NaCl、pH 6.8 ~ 8.2 を含む第 2 の洗浄溶液による第 2 の洗浄工程を含む、パラグラフ 41 ~ 43 のいずれか 1 つの方法。

10

20

30

40

50

45. 第2の洗浄溶液は：50mMトリス、750mM NaCl、pH8；10mMトリス、750mM NaCl、pH7；または10mM HEPES、750mM NaCl、pH7.5を含む、パラグラフ44の方法。
46. 溶出溶液により陰イオン交換クロマトグラフィーカラムから結合しているウイルスを溶出することをさらに含む、パラグラフ18～45のいずれか1つの方法。
47. 溶出溶液は：10～100mMトリス、1M～2M NaCl、pH7.0～9.0；5～50mMヒスチジン、1M～2M NaCl、pH5.5～7.4；または5～50mM HEPES、1M～2M NaCl、pH6.8～8.2を含む、パラグラフ46の方法。
48. 溶出溶液は：50mMトリス、1.2Mもしくは1.5M NaCl、pH8；10mMヒスチジン、1.2Mもしくは1.5M NaCl、pH7；または10mM HEPES、1.2Mもしくは1.5M NaCl、pH7.5を含む、パラグラフ47の方法。 10
49. ヒスチジン、トリスまたはHEPESにより溶出されたウイルスを希釈することをさらに含む、パラグラフ46～48のいずれか1つの方法。
50. 溶出されたウイルスもしくは希釈された溶出されたウイルスを室温で15分間または2～8℃で60分間までインキュベートすることをさらに含む、パラグラフ46～49のいずれか1つの方法。
51. 溶出されたウイルスもしくは希釈された溶出されたウイルスを濃縮および／または透析ろ過することをさらに含む、パラグラフ46～50のいずれか1つの方法。 20
52. 陰イオン交換クロマトグラフィーカラムは、陰イオン交換膜吸着体である、パラグラフ18～51のいずれか1つの方法。
53. ウイルス感染力価収率を少なくとも10%増大させる、パラグラフ1～52のいずれか1つの方法。
54. エンベロープ型ウイルスはレトロウイルスである、パラグラフ1～53のいずれか1つの方法。
55. レトロウイルスは、レンチウイルスである、パラグラフ54の方法。
56. 細胞培養液からエンベロープ型ウイルスを精製する方法であって：
- (i) 安定な産生細胞系から産生されるウイルス性ベクターを含む細胞培養液を準備することと； 30
 - (ii) 細胞培養液を組換えにより発現されるセラチア属エンドヌクレアーゼと接触させることと；
 - (iii) エンドヌクレアーゼで処理された細胞培養液をフィルターと接触させて、ろ過した細胞培養液を作製することと；
 - (iv) 陰イオン交換クロマトグラフィー膜上にろ過した細胞培養液および5M塩化ナトリウムを含む高濃度の塩溶液をロードし、液体および塩溶液が、ろ過した細胞培養液94%（容量／容量）および高濃度の塩溶液6%（容量／容量）の比でロードされることと；
 - (v) 1つまたはそれ以上の洗浄緩衝液により膜を洗浄することと；
 - (vi) 1.2Mまたは1.5M塩化ナトリウムを含む溶出緩衝液により膜から結合しているウイルスを溶出することと； 40
 - (vii) 緩衝液により溶出されたウイルスを希釈することと；
 - (viii) 溶出されたウイルスを濃縮および透析ろ過することとを含む方法。
57. 細胞培養液および／またはろ過した細胞培養液は、約1L、約5L、約10L、約50L、約100L、約500L、または約1000Lより大きい容量を有する、パラグラフ1～56のいずれか1つの方法。
58. 細胞培養液および／またはろ過した細胞培養液は、約5Lの容量を有する、パラグラフ1～57のいずれか1つの方法。
59. 細胞培養液および／またはろ過した細胞培養液は、約20Lの容量を有する、パ 50

ラグラフ 1～57 のいずれか 1 つの方法。

60. 細胞培養液および／またはろ過した細胞培養液は、約 44 L の容量を有する、パラグラフ 1～57 のいずれか 1 つの方法。

61. 細胞培養液および／またはろ過した細胞培養液は、約 60 L の容量を有する、パラグラフ 1～57 のいずれか 1 つの方法。

62. 細胞培養液および／またはろ過した細胞培養液は、約 200 L の容量を有する、パラグラフ 1～57 のいずれか 1 つの方法。

63. 陰イオン交換クロマトグラフィー膜は、細胞培養液および／またはろ過した細胞培養液 1 L 当たり少なくとも約 1 mL の容量を有する、パラグラフ 18～62 のいずれか 1 つの方法

64. エンベロープ型ウイルスを製剤化して、医薬製剤または細胞を感染させるのに適した溶液にすることをさらに含む、パラグラフ 1～63 のいずれか 1 つの方法。

65. 細胞培養液またはろ過した細胞培養液中の Mg^{2+} の濃度を約 1～2 mM に調整することをさらに含む、パラグラフ 1～64 のいずれか 1 つの方法。

66. 細胞培養液またはろ過した細胞培養液中の Mg^{2+} の濃度を約 2 mM に調整することをさらに含む、パラグラフ 65 の方法。

67. 細胞培養液またはろ過した細胞培養液の pH を 6.0～10.0 に調整することをさらに含む、パラグラフ 1～64 のいずれか 1 つの方法。

68. 細胞培養液またはろ過した細胞培養液の pH を 8.0～9.2 に調整することをさらに含む、パラグラフ 67 の方法。

69. 細胞培養液またはろ過した細胞培養液は、エンドヌクレアーゼと接触している間 0℃～42℃の温度である、パラグラフ 1～64 のいずれか 1 つの方法。

70. 細胞培養液またはろ過した細胞培養液は、エンドヌクレアーゼと接触している間 2℃～8℃の温度である、パラグラフ 69 の方法。

71. 細胞培養液またはろ過した細胞培養液は、エンドヌクレアーゼと接触している間 4℃の温度である、パラグラフ 70 の方法。

72. 細胞培養液は、付着環境で培養された細胞から採取される、パラグラフ 1～71 のいずれか 1 つの方法。

73. 細胞培養液は、懸濁環境で培養された細胞から採取される、パラグラフ 1～71 のいずれか 1 つの方法。

74. パラグラフ 1～73 のいずれか 1 つによる方法によって産生される精製されたエンベロープ型ウイルス。

【0178】

本開示は、以下の非限定的な例においてさらに記載される。

【実施例 1】

【0179】

方法

細胞培養およびレンチウイルスの産生

細胞を、「iCELLis Nano」バイオリアクター中で増殖させた。成功した細胞増殖の 4 日後、ウイルス産生の誘導を、培地を変えることにより開始した。最初の採取容量を廃棄した後、最高 10 日間で毎日の採取を開始した。採取物は、4℃で採集された。

【0180】

採取清澄化ろ過

下流の部門に採取物を移した後、清澄化ろ過を、それぞれ 0.8 および 0.45 μm の 2 枚の膜を含有する Sartorius Sartopore 2 フィルターを使用して実行した。この工程の主な目的は、レンチウイルスの機能に影響を及ぼすまたはその感染性を損なうことなく細胞および細胞成分／残屑を除去することである。

【0181】

下流の処理の効率に対するエンドヌクレアーゼ処理の効果を研究するために、ベンゾナ

10

20

30

40

50

ーゼ（登録商標）を採取物に添加した。ベンゾナーゼは、DNAを3～5塩基対の小さい断片に切断する。ベンゾナーゼを、清澄化ろ過前に採取物1リットル当たり1mLで添加した。この段階におけるエンドヌクレアーゼの添加は、清澄化ろ過工程のプロセス時間をインキュベーションに使用し、追加のプロセス時間を加える必要がないことを意味した。

【0182】

ベンゾナーゼ作業溶液を、10%ウシ胎仔血清（FBS）を含有するダルベッコ変法イーグル培地（DMEM）に保存溶液を1：1000希釈することによって調製した。清澄化ろ過工程前に、採取物1リットルにつきベンゾナーゼ作業溶液1mLを添加した。

【0183】

採取バッグとフィルターユニットを、内径8～10mmの管を使用して接続した。実際のろ過プロセスを開始する前に、膜を、容量0.5～0.7mL/cm²フィルター領域で平衡化緩衝液を使用する洗浄工程によって平衡化し、その後排液した。平衡化およびその後実行されるろ過を、流速約150mL/分で実行した。ろ過した採取物を、次いで+4℃で最長30時間貯蔵したまたは直接処理し、室温で1時間未満貯蔵した。

【0184】

Mustang Q陰イオン交換膜を使用する精製工程

ろ過後、ウイルスを、陰イオン交換クロマトグラフィーを使用して捕捉した。この捕捉工程の役割は、容量を減少させること、ならびに宿主細胞DNA、宿主細胞タンパク質およびFBSの様な培地成分などのプロセス関連の汚染物質を除去することである。クロマトグラフィー工程を、Mustang Q陰イオン交換膜を使用してAktapur 150システムを使用して実施した。表1は、陰イオン交換精製の間に使用した緩衝液を示す。

【0185】

10

20

30

40

50

【表 1】

表 1:陰イオン交換精製パラメータ

工程	緩衝液	流速 MV/分	MV
前平衡化	10 mM L-ヒスチジンまたは 50 mM トリス, 150 mM NaCl, pH 7.0 または pH 8.0	漸増 (2/4/6/8/10)	100
殺菌	1 M 水酸化ナトリウム	2	10
プレコンディ ショニング	1 M NaCl, 25 mM HCl	2	10
平衡化	10 mM L-ヒスチジン, 150 mM NaCl, pH 7.0 または 50 mM トリス, 150 mM NaCl, pH 8.0 または 10 mM HEPES, 150 mM NaCl, pH 7.5	10	5
ロード	7% 5 M NaCl スパイク溶液でスパイクした 採取物	10	
ロード後洗浄	10 mM L-ヒスチジン 150 mM NaCl, pH 7.0 または 50 mM トリス, 150 mM NaCl, または pH 8.0 または 10 mM HEPES, 150 mM NaCl, pH 7.5	10	10
洗浄	10 mM L-ヒスチジンまたは 10 mM HPES または 50 mM トリス, 750 mM NaCl, pH 7.0 または pH 8.0	10	20
溶出	10 mM L-ヒスチジン 1200 または 1500 mM NaCl, pH 7.0 または 50 mM トリス, 1200 または 1500 mM NaCl pH 8.0 または 10 mM HEPES, 1200 または 1500 mM NaCl, pH 7.5	2	11

10

20

30

【0186】

産物をアブライする前に、膜を、平衡化緩衝液 5 MV を用いて流速 10 MV / 分で平衡化した。ろ過した採取物に、Akt a クロマトグラフィーシステムの内蔵ミキサーを用いて 5 M NaCl 溶液を（インラインで）スパイクして、細胞培養培地成分の非特異的結合を減少させる 40 mS / cm の標的伝導率を達成した。別に、陰イオン交換クロマトグラフィーを、NaCl スパイクなしで実行した。次いで採取物を、流速 10 MV / 分で膜にアブライした。膜洗浄を、洗浄緩衝液 20 MV を用いて流速 10 MV / 分で実施して、宿主細胞 DNA のような不純物を除去した。レンチウイルス溶出を、高濃縮塩緩衝液 11 MV を用いて流速 2 MV / 分で実行した。溶出液採集を、1 MV 後に開始し、6 MV 後に終了した。残った溶出容量を廃棄した。レンチウイルスは、高度に濃縮された塩緩衝液中で不安定なので、溶出液を、10 mM L-ヒスチジンまたは 50 mM トリスいずれかの冷却（+4℃）希釈緩衝液で 1 : 10 に直接希釈した。希釈緩衝液に直接溶出することにより、ウイルスが高塩濃度にある時間が短縮される。

40

【0187】

採集し、希釈した Mustang Q 溶出液は、容量 500 mL であり、直後の次の工程として TFF 工程を実行した場合、最長保持時間 30 分間で氷上に貯蔵した。

50

【0188】

濃縮および透析ろ過工程

タンジェンシャルフローフィルトレーション（TFF）により、希釈したMustang Q溶出液を最終製剤緩衝液X-VIVO 10中に濃縮し、透析ろ過することが可能になる。この工程を、Repligen KR2iシステムで実行した。

【0189】

TFFにより、ウイルスをX-VIVO 10細胞培養培地へと溶液交換して、増殖培地を希釈することなくウイルスを標的細胞に確実に直接添加することも可能になった。

【0190】

フィルター領域390cm²および500kDaカットオフのRepligen Hollow Fibre PS膜を使用した。 10

【0191】

膜の平衡化を、TFF平衡化緩衝液を使用して2mL/cm²で実行した。産物を濃縮するために、供給物貯蔵槽中の希釈されたMustang Q溶出液500mLを補助ポンプに接続した。補助ポンプを、流速20mL/分で開始して、貯蔵槽に供給物を移動させた。貯蔵槽内の容量が、濃縮工程の間一定に保たれるように流速を調整した。このために、KR2iポンプの流速を50mL/分、TMP 0.5バール（上限0.7バール）に設定し、背圧弁を開放した。

【0192】

濃縮標的は、25～30倍であり、限外濾過工程は、ホールドアップボリュームを含めた残留物の容量16～20mLに達したら、停止した。 20

【0193】

膜の残留物側から産物を回収するために、背圧弁およびろ液ラインを開放した。主ポンプの流速を、逆流の4mL/分に設定してホールドアップ再循環容量を採集した。約1分後、背圧弁を接続する残留物ライン、および貯蔵槽を遮断して空気を供給した。この工程により、膜に逆の低いTMPを適用することによって膜に貼り付いているウイルスを取り除くことが可能になる。

【0194】

TFF工程の目的は、出発材料（採取物）に対してTFF残留物の300～1000倍の濃縮を達成することであった。TFF残留物を使用して、ろ過滅菌工程を開発した。 30

【0195】

ろ過滅菌研究

ろ過滅菌工程を、Repligen KR2iシステムを使用して実施した。

【0196】

分析学

感染力価アッセイ

このアッセイにおいて、D1Bおよび／またはHEK293T細胞を、ベクターを含む試料で形質導入した。数日間の増殖期間後、細胞をヒトガンマグロビンに対する抗体で染色して、形質導入単位（TU）/mLで測定される試料の感染力価を決定した。

【0197】

ddPCR RNA含有量

このアッセイは、デジタルドロップレットPCRを使用して試料中のRNAコピー数を定量化する。このアッセイは、RNAコピーの総数を測定する。プライマーおよびプローブを、主に全長RNAコピーを確実に計数するように選択した。

【0198】

p24 ELISA

このELISAアッセイは、ウイルスカプシドタンパク質p24の濃度を測定する。追加のプルダウン工程が確立されているので、ウイルスに結合しているp24だけが検出され、遊離p24は検出されない。ng/mLの読み出しから、ウイルス粒子の推定値を算出することができる。このアッセイは、空のカプシドまたは不完全なカーゴRNAを持つ 50

カブシドも検出する。

【0199】

全DNA

この蛍光に基づくアッセイは、試料内の全てのDNAを検出する。

【実施例2】

【0200】

結果

ベンゾナーゼの添加は、レンチウイルスの精製を改善する

初期の事前調査を実施して、TFF残留物のろ過が原理的に可能かどうか決定した。無処理およびベンゾナーゼで処理したTFF残留物の溶液2つを、Mini Kleenpak EKVフィルターによってろ過した。結果を、図2に示す。示した通り、ベンゾナーゼ処理は、感染収率に影響を及ぼすことなく（101.6%対95.0%）ろ過能力を約2.5倍増大させた。加えて、ベンゾナーゼで処理した残留物に対するRNA収率は、無処理の残留物に対する69.1%と比較した場合、89.5%と明確により高かった。

【0201】

ベンゾナーゼ処理は、ろ過の成功に明確に有益であり、さらに研究した。

【0202】

TFF残留物をベンゾナーゼで処理した有望な結果の後、採取物をベンゾナーゼで処理した試験を遂行した。ベンゾナーゼで採取物を処理することにより、その後の精製工程、例えば、陰イオン交換によってエンドヌクレアーゼを除去することが可能になる。ベンゾナーゼによる採取物処理の成功を決定し、ろ過滅菌工程に対する効果を調査するために、この処理の結果を、事前調査の結果と比較し、表2に示した。

【0203】

【表2】

表2:ベンゾナーゼ処理採取物およびベンゾナーゼ処理TFF残留物のろ過滅菌結果の比較

パラメータ	ベンゾナーゼ処理採取物の結果	ベンゾナーゼ処理TFF残留物の結果
感染力価収率 [%]	99.6	101.6
RNA 収率[%]	90.1	89.5
ろ過能力 [mL/cm ²]	2.8	3.7

【0204】

ベンゾナーゼ処理採取物のろ過滅菌の感染性およびRNA収率は、ベンゾナーゼ処理TFF残留物の結果と同程度であった。しかしながら、ろ過能力は、採取物のベンゾナーゼ処理を使用すると24%低下した。これにもかかわらず、その後の実験の全ては、採取物のベンゾナーゼ処理後に生じるTFF残留物を使用した。

【0205】

図3に示すように、採取物へのベンゾナーゼの添加は、陰イオン交換クロマトグラフィーに対してプラスの影響ももたらした。特に、ベンゾナーゼの添加がないと、Mustang Qフィルターは、ファウリングまたは目詰まりし、圧力の増大を引き起こした。次に、この圧力の増大は、流速をより遅くし、プロセス時間を増大させた（50%～150%より長い）。より高い圧力は、フィルターもしくは接続器の故障の危険性も増大させ、バッチを再プロセスまたは廃棄する必要性をもたらす場合がある。

【0206】

したがって、採取物へのベンゾナーゼの添加は、Mustang Qフィルターとろ過滅菌の両方の成績を改善する。

【0207】

10

20

30

40

50

陰イオン交換クロマトグラフィーからの回収の改善

図4は、平型（図の左側）および付着型（図の右側）バイオリアクターから採集した採取物について、感染力価（濃い灰色のバー）およびRNA含有量（淡い灰色のバー）の収率を要約するグラフ図である。第1の列は、貯蔵およびろ過からの収率を示し、第2の列は、陰イオン交換精製工程からの収率を示し、第3の列はTFF工程からの収率を示す。一番下の列は、全体の収率を示す。図4に示す通りに、下流の精製の間で最も大きなウイルス損失は、陰イオン交換精製の間に起こり、回収率43%～63%を観察した。したがって、この工程からの回収率のどんな改善も、ウイルスの回収率を実質的に増大させることになる。

【0208】

陰イオン交換クロマトグラフィー工程からの回収率を改善する方法を決定するためにいくつかの戦略を、試験した。これら戦略のうちの1つは、採取物中の塩濃度を増大させることであった。塩濃度を約400mMまで増大させることにより、陰イオン交換体へのウイルスの結合が増大する一方、宿主細胞DNA、宿主細胞タンパク質およびウシ胎仔血清のような培地成分などの汚染物質の結合は減少した。しかしながら、採取物に多くの容量を添加することは、混合、ならびに処理時間およびコストを追加することが困難なので、望ましくない。他方、（採取物に直接塩を添加する場合に起こるように）ウイルスを高濃度の塩に曝露することで、ウイルスは不安定化し、結果として回収率は減少する。この問題を解決するために、本発明者らは、5M NaCl溶液をウイルスと予混合するのではなく陰イオン交換カラム自体に直接スパイクした。これにより、ウイルスと高塩濃度溶液の接触時間を数分間ではなく数秒まで短縮した。

【0209】

図5に示すように、本発明者らによって開発されたプロセスは、NaClスパイクがないプロセスと比較して、およそ10%の改善をもたらした。

【実施例3】

【0210】

大規模ろ過滅菌

ろ過滅菌工程のスケールアップを評価するために、Supor EKV（Pall、ポリプロピレン；20cm²）、Sartopore Pt（Sartorius；220cm²、220cm²）、OptiScale Durapore（Merck、Hydrophilic PVDF；17.8cm²）およびSartopore Pt（Sartorius、mPES；210cm²）を含めたいくつかの異なるフィルターを評価した。

【0211】

表3に示すように、Supor EKV 20cm²ろ過滅菌は、感染力価収率>80%およびRNA収率およそ80%を示した。比較において、OptiScale DuraporeおよびSartopore PTは、感染力価収率およそ60%を示した。さらなる研究は、20cm²フィルターが、あまりに小さく、ろ過圧力が急激に増大することを実証した。

【0212】

10

20

30

40

50

【表 3】

表 3:異なるスケールアップフィルターを使用したろ過滅菌の結果

パラメータ	Optiscale Durapore	Sartopore Pt	Supor EKV	
サイズ	17.8cm ²	210cm ²	20cm ²	
感染力価収率 [%]	60.6	60.5	90.9	81.3
RNA 収率[%]	54.8	74.3	59	79.3
ろ過能力 [mL/cm ²]	2.6	(達せず)	4.5	4.5

10

【0213】

Supor EKV 20cm² フィルターのろ過圧力問題を解決するために、より大きな Sartopore Pt 220cm² フィルターを使用した。ロード容量は、0.46mL/cm² であり、220cm² フィルターのろ過能力に達しなかった。220cm² フィルターを使用したろ過滅菌は、試験した4つの下位ロットの全体で平均感染力価収率75.4%およびRNA収率70.0%をもたらした。

【0214】

220cm² フィルターへのろ過滅菌工程のスケールアップは、複数の行程においておよそ80%の強力な感染収率で実現され、全ての下位ロットは、検出可能な微生物学的増殖が検出されず、安全性試験を通過した。

20

【実施例 4】

【0215】

5 L 懸濁液採取物の精製

細胞培養およびレンチウイルス産生を、実施例 1 に記載の通り実行したが、培養は、5 L 懸濁バイオリアクターにおいて実行した。細胞を、ウシ胎仔血清 (FBS) を含まない既知組成培地中で増殖させた。

【0216】

採取物の清澄化ろ過を、実施例 1 に記載の通り実行したが、ベンゾナーゼ作業溶液は、実施例 1 に記載の FBS 含有培地ではなく平衡化緩衝液（すなわち、1mL 平衡化緩衝液当たり 1μL のベンゾナーゼ）に保存溶液を 1:1000 希釈することによって調製された。採取物 1 リットルに対して、清澄化ろ過工程前に希釈したベンゾナーゼ溶液 1mL を採取物各 1 L に添加して、標的濃度 0.3 U/mL を達成した。加えて、200mM MgCl₂ 10mL を添加して、標的濃度 2mM Mg²⁺ を達成した。5 L 懸濁液行程に使用したプロセスパラメータを、表 4 に詳述した。

30

【0217】

【表 4】

表 4: 5L 懸濁液行程の採取物の清澄化ろ過に対するプロセスパラメータ

パラメータ	条件
ベンゾナーゼ	平衡化緩衝液 1mL/L 採取物中のベンゾナーゼ 1μL
200 mM MgCl ₂	10 mL / 1 L 採取物
フィルター	Sartorius Sartopore 2 G8 サイズ - 1000 cm ²
ろ過中の流速(ml/分)	167 mL/分 (= 113 L/m ² /h)

40

【0218】

4 台のバイオリアクターを並行して行い、5 日目および 12 日目に採取物を採集し、分

50

析した。採取物のベンゾナーゼ処理は、感染力価収率に影響を及ぼさず、7つの採取物全体でベンゾナーゼで処理したる過した採取物において感染収率86.1%を達成した。

【0219】

ろ過後、ウイルスを、上記の実施例1に記載される方法と同様にHEPES緩衝液を用いる陰イオン交換クロマトグラフィーを使用して捕捉した。ベンゾナーゼ添加後、採取物を、陰イオン交換クロマトグラフィー膜へロードする前に50～55分間インキュベートした。5L懸濁液行程のクロマトグラフィー精製に使用されるプロセスパラメータを表5に詳述する。使用する膜サイズは、膜容量1mL当たり最大1000mLの採取物に基づいて決定した。したがって、約860mLまでの採取物に対して、0.86mL Mustang Q膜を使用し；採取物約860mL～約1.72Lに対して、1.72mL Mustang Q膜（または2×0.86mL Mustang Q膜）を使用し；採取物約1.72L～約5Lに対して、5mL Mustang Q膜を使用し；採取物約5L～約10Lに対して、10mL Mustang Q膜（または、2×5mL Mustang Q膜）を使用し；採取物約10L～約20Lに対して、2×10mL Mustang Q膜を使用し；採取物約20L～約60Lに対して、60mL Mustang Q膜を使用し；採取物約60L～約120Lに対して、140mL Mustang Q膜（または2×60mL Mustang Q膜）を使用し；採取物約120L～約140Lに対して、140mL Mustang Q膜を使用した。

10

【0220】

【表5】

20

表5:陰イオン交換クロマトグラフィーのプロセスパラメータ

パラメータ	条件
膜	並行の2×5 mL Mustang Q 陰イオン交換膜
緩衝液	10 mM HEPES, pH7.5 (採取物を、6% 5M NaCl で、インラインでスパイクした)
システム	Äkta Pure 150 システム
希釈	溶出: 50 mL 希釈: 450 mL 緩衝液

30

【0221】

採集し、希釈したMustang Q溶出液を、実施例1に記載の通りTFF工程に適用して、希釈したMustang Q溶出液を最終製剤緩衝液X-VIVO 10中に濃縮し、透析ろ過した。TFF工程に使用されるプロセスパラメータを、表6に記載した。

【0222】

【表6】

40

表6: TFF のプロセスパラメータ

パラメータ	条件
TFF 中空糸	500 kDa, 390 cm ² PS Repligen 膜
TFF 貯蔵槽	50 mL
流速	50 mL/分 (=158 L/m ² /h)
透析ろ過培地	X-Vivo 10
濃縮工程	20/25 倍 (標的 20 mL)

50

【0223】

7つの採取物全体でベンゾナーゼで処理したTFF残留物の感染力価収率は46.4%であった。5L懸濁液行程において本発明者らによって得られた結果は、上に記載の実施例1および2において達成した結果ならびに図5における感染力価収率と同程度であった。

【実施例5】

【0224】

付着型バイオリアクターからの大規模採取物の精製

細胞培養およびレンチウイルス産生を、実施例1に記載の通り実行したが、培養を、scale-X（商標）carboバイオリアクター（Univercells Technologies）において実行した。採取物22Lを8日間毎日採集した。採取物の清澄化ろ過を、表7に詳述したプロセスパラメータを使用して実施例1に記載のプロセスを用いて44Lの下位ロットに対して（2日間毎に）実行した。

【0225】

【表7】

表 7:大規模バイオリアクターの採取物の清澄化ろ過のプロセスパラメータ

パラメータ	条件
ベンゾナーゼ	平衡化緩衝液 1mL/L 採取物中にベンゾナーゼ 1μL
200 mM MgCl ₂	10 mL / 1 L 採取物
膜	Sartorius Sartopore 2 G0 - 4500 cm ²
ろ過中の流速(ml/分)	750 mL/分

【0226】

また、陰イオン交換クロマトグラフィー精製を、実施例1に記載の通りHEPES緩衝液を使用して6% 5M NaClをインラインでスパイクして実行して、40mS/cmの標的伝導率を達成した。クロマトグラフィー精製工程のプロセスパラメータを、表8に提供した。実施例4に記載の通り、使用する膜サイズは、膜容量1mL当たり最大1000mLの採取物に基づいて決定し、したがって、44Lの下位ロットに対して60mL Mustang Q膜を使用した。

【0227】

【表 8】

表 8:陰イオン交換クロマトグラフィーのプロセスパラメータ

パラメータ	条件
膜	60 mL Mustang Q 陰イオン交換膜
結合能力	最高 1000mL 採取物/mL 膜容量
注入口最大圧力	3.5 バール
殺菌	1 M 水酸化ナトリウム 流速: 2MV/分
プレコンディショニング	1 M NaCl, 25 mM HCl 流速: 2MV/分
平衡化	10 mM HEPES, 150 mM NaCl, pH 7.5 容量: 20 MV 流速: 5MV/分
ロード	6 % 5 M NaCl スパイク溶液でスパイクした採取物 流速 7.5 MV/分 標的伝導率: 36-44 mS/cm (25°C)
ロード後洗浄	94% ポンプ A: 10 mM HEPES, 150 mM NaCl, pH7.5 6% ポンプ B: 5 M NaCl 容量 10 MV 流速: 7.5 MV/分
洗浄	10 mM HEPES, 750 mM NaCl, pH7.5 容量: 25 MV 流速: 7.5 MV/分
溶出	10 mM HEPES, 1.5 M NaCl, pH7.5 容量: 20 MV 流速: 2 MV/分 溶出液採集: 待機 4 MV, 採集 5 MV
希釈	溶出: 300 mL 希釈: 2700 mL 10 mM Hepes, pH 7.5
システム	Äkta pilot 600 mL, 2-8°C

10

20

30

40

【0228】

採集し、希釈した Mustang Q 溶出液を、実施例 1 に記載の通り TFF 工程に適用して、希釈した Mustang Q 溶出液を最終製剤緩衝液 X-VIVO 10 中に濃縮し、透析ろ過した。TFF 工程に使用されるプロセスパラメータを、表 9 に記載した。

【0229】

50

【表 9】

表 9: TFF のプロセスパラメータ

パラメータ	条件
TFF 中空糸	500 kDa, 1000 cm ²
TFF 貯蔵槽	250 mL
流速	250 mL/分
透析ろ過培地	X-vivo
濃縮工程	30/37.5 倍 (標的 20 mL)

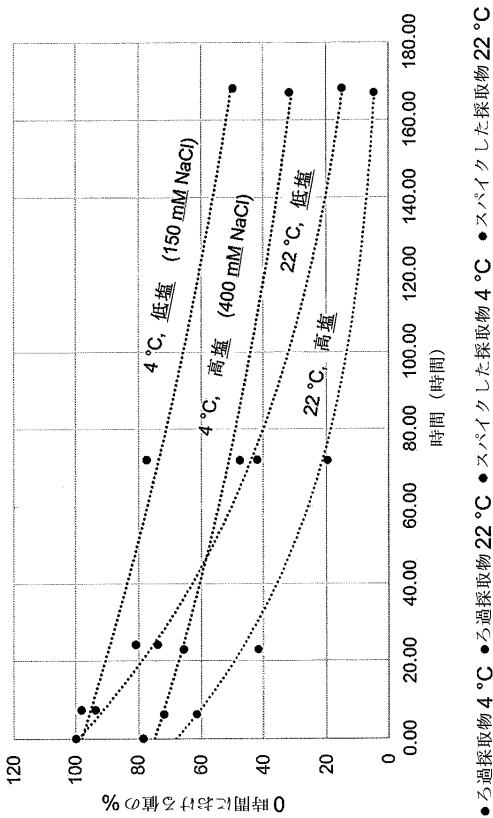
10

【 0 2 3 0 】

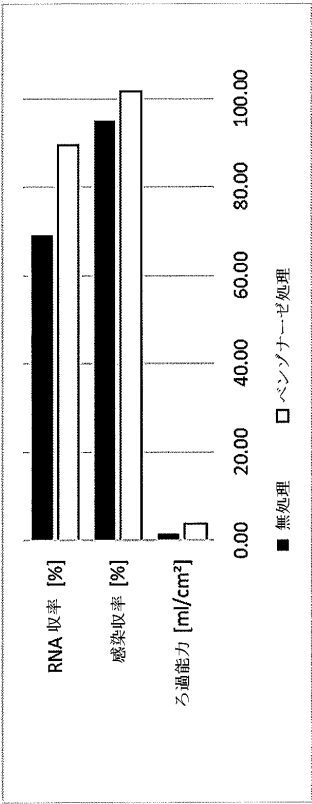
図 6 は、プロセスした 4 4 L の下位ロットの各プロセス工程における感染力価収率を示し、ろ過した採取物において感染力価収率 9 6 %、Mustang Q 溶出液において感染力価収率 5 0 %、TFF 残留物において感染力価収率 9 4 % および無菌ろ過した下位ロットにおいて 1 0 3 % であった（各プロセス工程について N = 4 下位ロット）。

【図面】

【図 1】



【図 2】



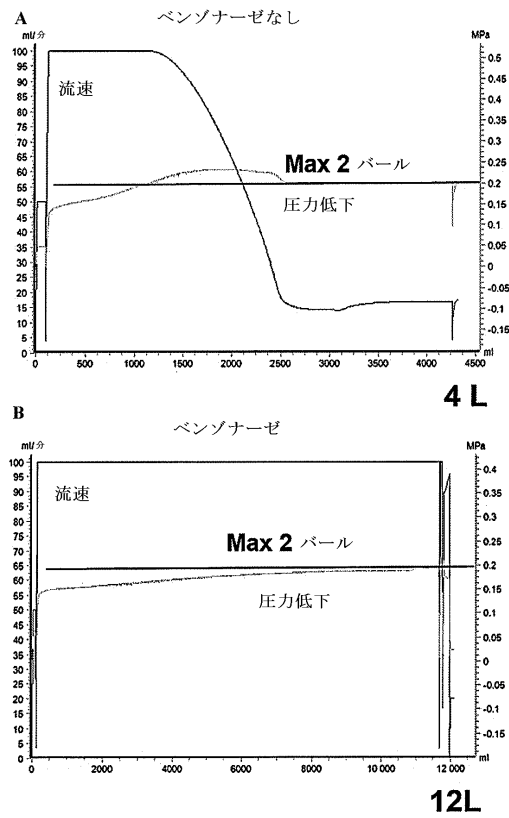
20

30

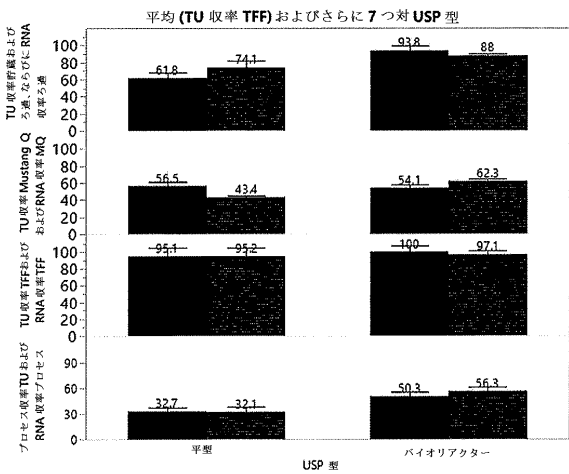
40

50

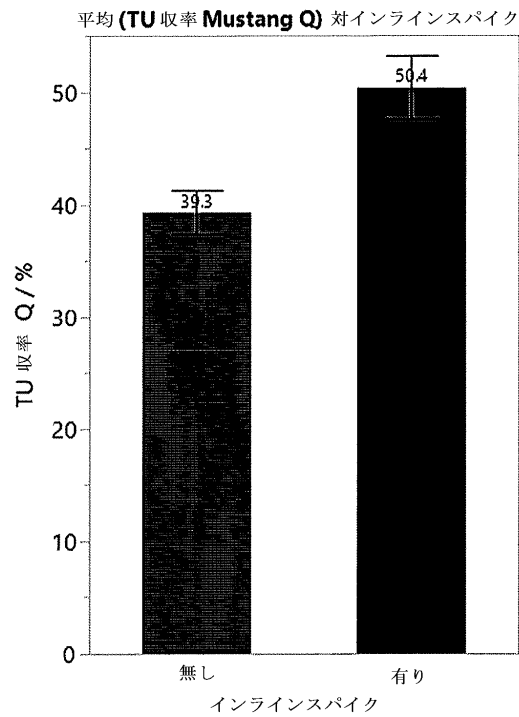
【図 3】



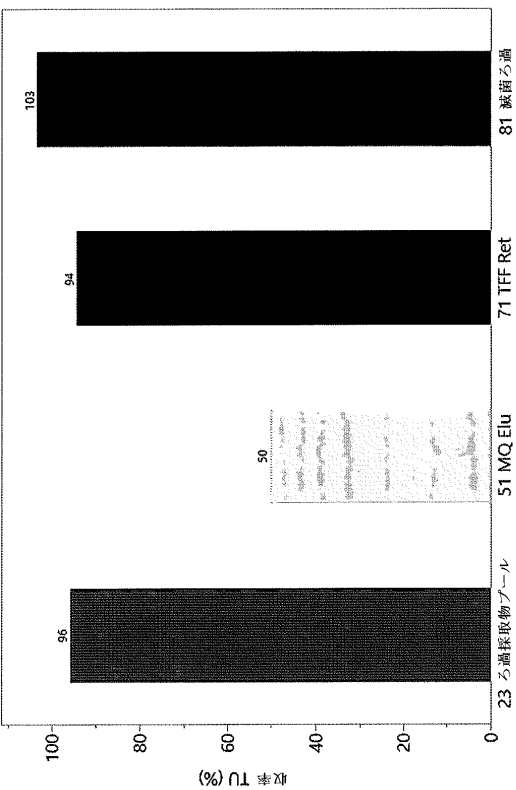
【図 4】



【図 5】



【図 6】



10

20

30

40

50

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/IB 23/53159
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC - INV. C12N 7/00, B01D 15/34, B01D 61/14 (2023.01) ADD. C12N 7/02, C12N 7/01 (2023.01) CPC - INV. C12N 7/00, C12N 5/06, B01D 15/34, B01D 61/145 ADD. C12N 2760/00051, C12N 2710/10051, C12N 2740/16043, C12N 2740/16051 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) See Search History document		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched See Search History document		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) See Search History document		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X — Y	US 2007/0207461 A1 (WEGGEMAN et al.) 06 September 2007 (06.09.2007) abstract, para [0012], [0027], [0030], [0041], [0043], [0046], [0066], [0075], [0086], [0084], [0088], [0136],	1-19, 46-55, 57-74 20, 56
X — Y	US 2008/0050770 A1 (ZHANG et al.) 28 February 2008 (28.02.2008) para [0070], [0181], [0405], [0414], [0438], [0442]	21-45 20, 56
☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "D" document cited by the applicant in the international application "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 11 June 2023 (11.06.2023)		Date of mailing of the international search report JUL 07 2023
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-8300		Authorized officer Kari Rodriguez Telephone No. PCT Helpdesk: 571-272-4300

フロントページの続き

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

(72)発明者 ホルガー・ラオクス

ドイツ連邦共和国 3 5 0 4 1 マルブルク・エミル・フォン・ベーリング・シュトラッセ 7 6・ツェー・エス・エル・イノバツィオン・ゲー・エム・ベー・ハー

(72)発明者 ジェシカ・エリザベトゥ・フォーゲル

ドイツ連邦共和国 3 5 0 4 1 マルブルク・エミル・フォン・ベーリング・シュトラッセ 7 6・ツェー・エス・エル・イノバツィオン・ゲー・エム・ベー・ハー

F ターム (参考) 4B065 AA95X BD44 CA44