

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第6549126号
(P6549126)

(45) 発行日 令和1年7月31日(2019.7.31)

(24) 登録日 令和1年7月5日(2019.7.5)

(51) Int.Cl.

F I

C 1 2 Q 1/686 (2018.01)

C 1 2 Q 1/686 Z N A Z

G O 1 N 33/543 (2006.01)

G O 1 N 33/543 5 4 5 A

C 1 2 N 15/33 (2006.01)

C 1 2 N 15/33

請求項の数 16 (全 29 頁)

(21) 出願番号 特願2016-539674 (P2016-539674)
 (86) (22) 出願日 平成26年9月9日(2014.9.9)
 (65) 公表番号 特表2016-529908 (P2016-529908A)
 (43) 公表日 平成28年9月29日(2016.9.29)
 (86) 国際出願番号 PCT/IB2014/064352
 (87) 国際公開番号 WO2015/036917
 (87) 国際公開日 平成27年3月19日(2015.3.19)
 審査請求日 平成29年9月7日(2017.9.7)
 (31) 優先権主張番号 61/875,729
 (32) 優先日 平成25年9月10日(2013.9.10)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(73) 特許権者 516070184
 モックヴィー ソリューションズ, イン
 コーポレイテッド
 アメリカ合衆国 メリーランド 2085
 O, ロックビル, ボルティモア ロー
 ド 22
 (74) 代理人 100078282
 弁理士 山本 秀策
 (74) 代理人 100113413
 弁理士 森下 夏樹
 (74) 代理人 100181674
 弁理士 飯田 貴敏
 (74) 代理人 100181641
 弁理士 石川 大輔

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 生成された溶液からのモックウイルス粒子の除去を定量するための方法およびキット

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

目的の生物物質を含む溶液から除去されるモックウイルス粒子(MVP)の量を定量するための方法であって、ここで該方法は、

a) MVPを溶液に添加する工程であって、該溶液は、抗体、非抗体タンパク質、ワクチン、核酸生成物、および血液もしくは血漿派生物からなる群より選択される目的の生物物質を含み、該MVPは、ウイルスキャプシドタンパク質および/またはエンベロープタンパク質を含む、非感染性で非複製性のアセンブリされたユニットであり、該MVPは、該キャプシドタンパク質および/またはエンベロープタンパク質が由来する特定のウイルスに生化学的に似ている、工程；

b) 精製技術によって該溶液を加工処理して該目的の生物物質を精製する工程；および

c) 該溶液から除去されるMVPの量を定量する工程、
 を包含する、方法。

【請求項 2】

前記目的の生物物質は、プロセスによって生成され、ここで該プロセスは、細胞培養プロセスもしくは発酵プロセスのいずれかであり、該プロセスは、ヒト細胞、動物細胞、植物細胞、昆虫細胞、ハイブリドーマ細胞、酵母細胞、もしくは細菌細胞を利用する、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

前記精製技術は、クロマトグラフィー、濾過、限外濾過、遠心分離、もしくはウイルス

不活性化である、請求項 1 または 2 に記載の方法。

【請求項 4】

工程 (a) において、前記溶液中の M V P の量は、工程 (b) の後の溶液中の M V P の量より多い、請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 5】

前記 M V P は、

(i) インビトロ核酸を含む；かつ／または

(i i) ウイルスキャプシドタンパク質、ウイルスエンベロープタンパク質、またはウイルスキャプシドタンパク質およびウイルスエンベロープタンパク質の両方を含み、該ウイルスキャプシドタンパク質もしくはウイルスエンベロープタンパク質は、細菌、酵母、植物、昆虫細胞、動物もしくはヒト細胞で生成される、

請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 6】

前記ウイルスキャプシドタンパク質もしくはウイルスエンベロープタンパク質は、P a r v o v i r i d a eもしくはR e t r o v i r i d a eの供給源に由来する、請求項 5 の (i i) に記載の方法。

【請求項 7】

前記ウイルスキャプシドタンパク質もしくはウイルスエンベロープタンパク質は、異種エピトープをさらに含む、請求項 5 または 6 に記載の方法。

【請求項 8】

前記 M V P は、インビトロ核酸を含む、請求項 1 ~ 7 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 9】

溶液から除去される M V P の量を定量する工程は、E L I S A 法、P C R 法、ナノ画像化法、蛍光法、酵素法、顕微鏡法、分光光度法、透過型電子顕微鏡 (T E M) 法、もしくはウェスタンブロット分析法を含む、溶液中の M V P の量を決定するための定量技術の使用を包含する、請求項 1 ~ 8 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 10】

前記定量技術は、

(i) キャプシドタンパク質エピトープ、エンベロープタンパク質エピトープもしくは前記 M V P の表面に存在する異種エピトープに結合し得る抗体を使用する、または

(i i) 前記 M V P に結合したリンカー分子に結合し得る抗体を使用する、または

(i i i) 前記 M V P に結合した分子および該分子に結合し得る抗体もしくは該分子に結合される核酸セグメントに結合し得るプライマーを使用する、または、

(i v) 前記 M V P 内に含まれるインビトロ核酸配列に結合し得るプライマーを使用する、

請求項 9 に記載の方法。

【請求項 11】

溶液から除去されるモックウイルス粒子 (M V P) の量を定量するためのキットであって、ここで該キットは、

a) M V P のストック溶液を含む少なくとも 1 個の容器であって、該 M V P は、ウイルスキャプシドタンパク質および／またはエンベロープタンパク質を含む、非感染性で非複製性のアセンブリされたユニットであり、該 M V P は、該キャプシドタンパク質および／またはエンベロープタンパク質が由来する特定のウイルスに生化学的に似ている、容器；

b) 定量溶液を含む少なくとも 1 個の容器であって、該定量溶液は、M V P 、インビトロ核酸、M V P に結合した分子、または該分子に結合した核酸に結合し得る薬剤を含む、容器

を含む、キット。

【請求項 12】

前記定量溶液は、M V P に、または該 M V P に結合され得る分子に結合し得る抗体を含

10

20

30

40

50

み、前記キットは、該MVPに、または該MVPに結合され得る分子に結合し得る前記抗体に結合し得る第2の抗体の溶液をさらに含む、請求項11に記載のキット。

【請求項13】

前記MVPに、または該MVPに結合され得る分子に結合し得る抗体は、酵素と結合体化される、かつ/または前記第2の抗体は、酵素と結合体化される、請求項11または12に記載のキット。

【請求項14】

前記キットは、前記MVPに結合し得る固定化された抗体または分子を含むELISAプレートをさらに含む、請求項11～13のいずれか1項に記載のキット。

【請求項15】

前記定量溶液は、インビトロ核酸配列または前記MVPに結合され得る分子に結合した核酸のセグメントに結合し得るプライマーを含む、請求項11～14のいずれか1項に記載のキット。

【請求項16】

前記キットは、前記MVPに結合し得る分子の溶液をさらに含む、請求項11～15のいずれか1項に記載のキット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

(発明の要旨)

本発明は、精製技術によって溶液を加工処理する結果として、その溶液から除去されるモックウイルス粒子(MVP)の量を定量するための方法に関する。この方法は、MVPを溶液に添加する工程、上記溶液を精製技術によって加工処理する工程、および次いで、上記溶液から除去されるMVPの量を定量する工程を包含する。本発明はまた、上記方法とともに使用され得るキットに関する。このキットは、好ましくは、MVPの少なくとも1種のストック溶液および少なくとも1種の定量溶液を含む。

【背景技術】

【0002】

(背景)

生物薬学的生成物(例えば、モノクローナル抗体、組換えタンパク質、ワクチン、血液派生物および動物生成物)は、感染性ウイルスを伝播するリスクがある(Burnouf, 2005; Aranha, 2011)。これは、生物薬学的製造のために使用される供給源物質に存在している内因性ウイルス、または製造の間に、生物薬剤含有溶液を汚染する外因性の「偶発的な」ウイルスのリスクのいずれかに起因する(Kerr, 2010)。結果として、生物薬学的生成物の製造者は、十分なウイルスクリアランス工程をそれらの製造プロセスの中に組み込むことおよびしっかりとしたウイルスクリアランスデータを提供することによってこれら工程を確認することを、国際監督機関によって要求されている(EMEA, 2008; EMEA, 2008; ICH, 1997; ICH, 998; FDA, 1997)。

【0003】

ウイルスクリアランスを確認するために、ウイルス「添加研究(spiking study)」は、生ウイルスが生物薬学的材料に添加され、スケールダウンされた精製プロセス工程が行われることによって、行われる(Darling, 2002)。次いで、この工程のウイルスを減少させる能力は、感染性アッセイ(TCID₅₀)もしくは定量的ポリメラーゼ連鎖反応法(Q-PCR)によって、溶液中に残っているウイルスを定量することによって分析される。これら結果は通常、生ウイルス粒子を増殖および定量するために必要とされる、専門家およびさらなる安全手段に起因して、第三者の契約研究機関によって行われる。結果として、これら研究は、極めて高価であり、論理主義的にも行うのが困難である。実際に、プロセス工程は、代表的には、ウイルス除去効力について評価される前に、数ヶ月もしくは数年にわたって開発される。この実務は、規制上のリスクを

10

20

30

40

50

増大させる。なぜなら、監督機関が有効性確認研究を可能にする間に、最終的にウイルスを十分に除去できない可能性があるプロセス工程を開発して、時間および金銭が費やされるからである。従って、精製プロセス開発の間に、ウイルス除去効率を決定するための新しい改善された方法が必要である。

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0004】

(発明の要旨)

本発明は、精製技術によって溶液を加工処理する結果として、上記溶液から除去されるモックウイルス粒子(MVP)の量を定量するための方法に関する。上記方法の工程は、以下を包含する；MVPを溶液に添加する工程、上記溶液を精製技術によって加工処理する工程、および上記溶液から除去されるMVPの量を定量する工程。好ましい実施形態において、上記MVPが添加される溶液は、目的の生物物質を含む。さらにより好ましい実施形態において、上記目的の生物物質は、抗体、非抗体タンパク質、ワクチン、核酸生成物、血液もしくは血漿派生物である。別のさらにより好ましい実施形態において、上記目的の生物物質は、ヒト細胞、動物細胞、植物細胞、昆虫細胞、ハイブリドーマ細胞、酵母細胞、または細菌細胞を利用する、細胞培養プロセスまたは発酵プロセスによって生成される。別のさらにより好ましい実施形態において、上記溶液に存在する目的の生物物質は、上記精製技術によるその溶液の加工処理によって精製される。

【0005】

別の好ましい実施形態において、上記MVPを含む溶液を加工処理する精製技術は、クロマトグラフィー、濾過、限外濾過、遠心分離、もしくはウイルス不活性化技術である。別の好ましい実施形態において、精製技術によって溶液を加工処理する前に、その溶液に添加されるMVPの量は、加工処理後に残っている溶液中のMVPの量より多い。

【0006】

好ましい実施形態において、MVPは、ウイルスキャプシドタンパク質、ウイルスエンベロープタンパク質、またはウイルスキャプシドおよびウイルスエンベロープタンパク質の両方を含む。さらにより好ましい実施形態において、上記ウイルスキャプシドタンパク質もしくはエンベロープタンパク質は、細菌、酵母、植物、昆虫、および/もしくは動物の細胞ならびに/またはヒト細胞によって生成される。別のさらにより好ましい実施形態において、上記ウイルスキャプシドタンパク質もしくはエンベロープタンパク質は、ParvoviridaeもしくはRetroviridae供給源に由来する。別のさらにより好ましい実施形態において、上記ウイルスキャプシドタンパク質もしくはエンベロープタンパク質は、異種エピトープを含む。別のさらにより好ましい実施形態において、MVPは、インビトロ核酸を含む。

【0007】

好ましい実施形態において、上記溶液から除去されるMVPの量を定量する工程は、酵素結合イムノソルベントアッセイ(ELISA)法、ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)法、ナノ画像化法、蛍光法、酵素法、顕微鏡法、分光光度法、透過型電子顕微鏡(TEM)法、またはウェスタンブロット法を含む、溶液中のMVPの量を決定するための定量技術の使用を包含する。さらにより好ましい実施形態において、上記定量技術は、キャプシドタンパク質エピトープ、エンベロープタンパク質エピトープ、もしくは上記MVPの表面に存在する異種エピトープに結合し得る抗体を使用する。別のさらにより好ましい実施形態において、上記定量技術は、上記MVPに結合されるリンカー分子に結合し得る抗体を使用する。別のさらにより好ましい実施形態において、上記定量技術は、上記MVPに結合される分子および上記分子に結合し得る抗体もしくは上記分子に結合される核酸セグメントに結合し得るプライマーを使用する。別のさらにより好ましい実施形態において、上記定量技術は、上記MVP内に含まれるインビトロ核酸配列に結合し得るプライマーを使用する。

【0008】

本発明は、M V P が溶液に添加され、上記溶液が精製技術によって加工処理され、上記溶液から除去されるM V P の量が定量されることによる方法に関する。好ましい実施形態において、M V P の第2の種は、上記溶液に添加される。上記溶液は、精製技術によって加工処理され、上記溶液から除去される上記M V P の第2の種の量が定量される。さらに好ましい実施形態において、上記M V P の第1のおよび第2の種は、同時にもしくは逐次的に、溶液に添加される。別のさらに好ましい実施形態において、M V P の2種以上のさらなる種が、上記溶液に添加される。

【0009】

本発明はまた、M V P のストック溶液を含む少なくとも1個の容器、および定量溶液を含む少なくとも1個の容器を含むキットに関する。好ましい実施形態において、上記定量溶液は、M V P に、またはM V P に結合され得る分子に結合し得る抗体を含む。さらに好ましい実施形態において、上記キットは、M V P に、またはM V P に結合され得る分子に結合し得る上記抗体に結合し得る第2の抗体の溶液をさらに含む。別のさらに好ましい実施形態において、上記M V P に結合し得る抗体は、酵素に結合体化される。別のさらに好ましい実施形態において、M V P またはM V P に結合し得る分子に結合し得る上記抗体に結合し得る上記第2の抗体は、酵素に結合体化される。別の好ましい実施形態において、上記キットは、固定化抗体またはM V P に結合し得る分子を含むE L I S A プレートをさらに含む。別の好ましい実施形態において、上記定量溶液は、インビトロ核酸配列もしくはM V P に結合され得る分子に結合される核酸のセグメントに結合し得るプライマーを含む。別の好ましい実施形態において、上記キットは、M V P に結合し得る分子の溶液を含む別の容器を含む。別の好ましい実施形態において、上記キットはまた、E L I S A 法もしくはP C R 法を行うためのさらなる試薬を含む。

本発明は、例えば、以下の項目を提供する。

(項目1)

溶液から除去されるM V P の量を定量するための方法であって、ここで該方法は、

a) M V P を溶液に添加する工程；

b) 精製技術によって該溶液を加工処理する工程；および

c) 該溶液から除去されるM V P の量を定量する工程、
を包含する、方法。

(項目2)

工程(a)において、前記溶液は、目的の生物物質を含む、項目1に記載の方法。

(項目3)

前記目的の生物物質は、抗体、非抗体タンパク質、ワクチン、核酸生成物、および血液もしくは血漿派生物である、項目2に記載の方法。

(項目4)

前記目的の生物物質は、プロセスによって生成され、ここで該プロセスは、細胞培養プロセスもしくは発酵プロセスのいずれかであり、該プロセスは、ヒト細胞、動物細胞、植物細胞、昆虫細胞、ハイブリドーマ細胞、酵母細胞、もしくは細菌細胞を利用する、項目2または3のいずれかに記載の方法。

(項目5)

前記目的の生物物質は、項目1の工程(b)によって精製される、項目2～4のいずれか1項に記載の方法。

(項目6)

前記精製技術は、クロマトグラフィー、濾過、限外濾過、遠心分離、もしくはウイルス不活性化技術である、項目1～5のいずれか1項に記載の方法。

(項目7)

工程(a)において、前記溶液中のM V P の量は、工程(b)の後の溶液中のM V P の量より多い、項目1～6のいずれか1項に記載の方法。

(項目8)

前記M V P は、ウイルスクャプシドタンパク質、ウイルスエンベロープタンパク質、ま

10

20

30

40

50

たはウイルスキャプシドタンパク質およびウイルスエンベロープタンパク質の両方を含む、項目 1 ~ 7 のいずれか 1 項に記載の方法。

(項目 9)

前記ウイルスキャプシドタンパク質もしくはウイルスエンベロープタンパク質は、細菌、酵母、植物、昆虫細胞、動物もしくはヒト細胞で生成される、項目 8 に記載の方法。

(項目 10)

ウイルスキャプシドタンパク質もしくはウイルスエンベロープタンパク質は、ParvoviridaeもしくはRetroviridaeの供給源に由来する、項目 8 または 9 のいずれかに記載の方法。

(項目 11)

前記ウイルスキャプシドタンパク質もしくはウイルスエンベロープタンパク質は、異種エピトープをさらに含む、項目 8 ~ 10 のいずれか 1 項に記載の方法。

(項目 12)

前記MVPは、インビトロ核酸を含む、項目 1 ~ 11 のいずれか 1 項に記載の方法。

(項目 13)

溶液から除去されるMVPの量を定量する工程は、ELISA法、PCR法、ナノ画像化法、蛍光法、酵素法、顕微鏡法、分光光度法、透過型電子顕微鏡(TEM)法、もしくはウェスタンブロット分析法を含む、溶液中のMVPの量を決定するための定量技術の使用を包含する、項目 1 ~ 12 のいずれか 1 項に記載の方法。

(項目 14)

前記定量技術は、キャプシドタンパク質エピトープ、エンベロープタンパク質エピトープもしくは前記MVPの表面に存在する異種エピトープに結合し得る抗体を使用する、項目 13 に記載の方法。

(項目 15)

前記定量技術は、前記MVPに結合したリンカー分子に結合し得る抗体を使用する、項目 13 に記載の方法。

(項目 16)

前記定量技術は、前記MVPに結合した分子および該分子に結合し得る抗体もしくは該分子に結合される核酸セグメントに結合し得るプライマーを使用する、項目 13 に記載の方法。

(項目 17)

前記定量技術は、前記MVP内に含まれるインビトロ核酸配列に結合し得るプライマーを使用する、項目 13 に記載の方法。

(項目 18)

前記方法は、

- a) MVPの第2の種を前記溶液に添加する工程；
 - b) 該溶液を精製技術によって加工処理する工程；および
 - c) 該溶液から除去される該MVPの第2の種の量を定量する工程、
- をさらに包含する、項目 1 ~ 17 のいずれか 1 項に記載の方法。

(項目 19)

前記MVPの第1の種および前記MVPの第2の種は、同時にもしくは逐次的に、前記溶液に添加される、項目 18 に記載の方法。

(項目 20)

MVPの2種以上のさらなる種は、前記溶液に添加される、項目 18 または 19 のいずれかに記載の方法。

(項目 21)

- a) MVPのストック溶液を含む少なくとも1個の容器；
 - b) 定量溶液を含む少なくとも1個の容器、
- を含む、キット。

(項目 22)

前記定量溶液は、MVPに、またはMVPに結合され得る分子に結合し得る抗体を含む、項目21に記載のキット。

(項目23)

前記キットは、MVPに、またはMVPに結合され得る分子に結合し得る前記抗体に結合し得る第2の抗体の溶液をさらに含む、項目21または22のいずれかに記載のキット。

(項目24)

前記抗体は、酵素と結合体化される、項目21または22のいずれかに記載のキット。

(項目25)

前記第2の抗体は、酵素と結合体化される、項目23に記載のキット。

10

(項目26)

前記キットは、MVPに結合し得る固定化された抗体または分子を含むELISAプレートにさらに含む、項目21～25のいずれか1項に記載のキット。

(項目27)

前記定量溶液は、インビトロ核酸配列またはMVPに結合され得る分子に結合した核酸のセグメントに結合し得るプライマーを含む、項目21～26のいずれか1項に記載のキット。

(項目28)

前記キットは、MVPに結合し得る分子の溶液をさらに含む、項目21～27のいずれか1項に記載のキット。

20

(項目29)

ELISA法もしくはPCR法を行うためのさらなる試薬が前記キット中に含まれる、項目21～28のいずれか1項に記載のキット。

【図面の簡単な説明】

【0010】

実施形態は、例示によって示されるのであって、添付の図面の図中の限定によって示されるのではない。ここで類似の参照は、類似の要素を示す。

【0011】

【図1】図1：MMV MVP画分の純度。

【0012】

【図2】図2：MMV MVPストック溶液の透過型電子顕微鏡画像。

30

【0013】

【図3】図3：異種エピトープMMV MVP画分の純度。

【0014】

【図4】図4：異種エピトープMMV MVPストック溶液の透過型電子顕微鏡画像。

【発明を実施するための形態】

【0015】

マウス微小ウイルス(MMV) MVPを、実施例1および実施例2において言及される方法によって精製した。塩化セシウム密度勾配画分の純度を決定するために、各密度画分由来のサンプル(レーン1～13)を還元し、4-12% ポリアクリルアミドゲルで電気泳動した。タンパク質バンドを、クーマシーブルー染色によって可視化した。VP2タンパク質標準(alpha diagnostic cat# MVMVP25-R-10)を、比較のためにレーン「S」の中で泳動し(VP2タンパク質は、64KDaと推測される)、分子量マーカータンパク質をレーン「M」の中で泳動した。図1において、天然のVP2タンパク質形成から生じるMVPを分析した。画分11～13をプールして、MVPストック溶液を形成した。染色結果に基づけば、上記プールしたストック溶液は、純度>95%のMVPを含んだ。図3において、組換えVP2タンパク質形成から生じるMVPを分析した。画分11～13をプールして、MVPストック溶液を形成した。染色結果に基づけば、上記プールしたストック溶液は、純度約90%のMVPを含んだ。

40

【0016】

50

MMV MVPストック溶液を、実施例1および実施例2に記載される方法によって生成した。図2において、TEM画像は、天然の（非改変）VP2タンパク質の60コピーのアセンブリから生じるMMV MVPストック溶液のものを撮影した。図4において、TEM画像は、組換えVP2タンパク質の60コピー（各々は、異種エピトープ（*strept II* タグアミノ酸配列）を含む）のアセンブリから生じるMMV MVPストック溶液のものを撮影した。画像をネガティブ染色した後に取り込んだ。各ストック溶液の2マイクロリットルを、別個のformvar/carbon被覆電子顕微鏡グリッドの上に置き、風乾させた。10分後、残りの材料を、上記グリッドから逃がした。次いで、上記グリッドを固定し、20マイクロリットルの2.0% リンタンゲステン酸（PTA）、pH7.0を各グリッドの上に1分間置くことによって染色した。次いで、過剰のPTAを除去し、倍率165,000xでFEI Tecnai Spirit Twin顕微鏡を使用して、上記グリッドを調べ、定量および撮影した。結果は、ストック溶液1mlあたり 3.06×10^{13} 個のMMV MVP（図2）およびストック溶液1mlあたり 3.56×10^{13} 個の異種エピトープMMV MVP（図4）の濃度を示す。

【0017】

（発明の詳細な説明）

本発明において、用語「モックウイルス粒子（MVP）」とは、合成的に生成され（例えば、組換え発現されたかもしくは化学合成された）ウイルスキャプシドタンパク質、ウイルスエンベロープタンパク質、またはウイルスキャプシドタンパク質およびエンベロープタンパク質から構成される、非感染性で非複製性のアセンブリされたユニットをいう。MVPは、天然において見出されるウイルス粒子（生ウイルス粒子、天然では感染する能力が失われた天然に見出されるウイルス粒子、もしくはインビトロで感染する能力を失ったウイルス粒子（例えば、「紫外線照射された」か、「熱で死滅させた」か、または「熱不活性化」されたウイルス粒子）が挙げられるが、これらに限定されない）には言及しない。従って、MVPの合成的性質は、当該分野で使用されるウイルス粒子の他の形態と比較して、それらが産業的状況において容易に生成および使用される能力を提供する。用語「ウイルスキャプシドタンパク質」とは、そのゲノムの周りに殻を含む任意のウイルスのタンパク質をいう。用語「ウイルスエンベロープタンパク質」とは、キャプシドタンパク質の殻を覆い、ウイルスの外側の層の一部になる任意のウイルスタンパク質をいう。ある種のウイルスキャプシドタンパク質およびエンベロープタンパク質は、具体的なウイルス分類学上の科内のウイルスに一般的にあることが公知である。MVPは、これらウイルスの科内に由来する特定のウイルスに生理化学的に似たユニットを生じるそれらの科のキャプシドタンパク質もしくはエンベロープタンパク質から生成され得る。しかし、アセンブリされたMVPユニットは、これらウイルスに対する遺伝的類似性を欠く（MVPは、いかなる核酸をも含む可能性がない）。主要なウイルスキャプシドタンパク質およびエンベロープタンパク質の例（当該分野でいわれるこれらタンパク質の共通名）およびそれらの関連づけられるウイルスの科は、それらタンパク質のうちの1種以上からアセンブリされ得る例示的なMVPとともに、以下の表1に列挙される（Fauquet et al., 2005）。

【表 1 - 1】

表1

ウイルス科	公知のキャプシドタンパク質例	公知のエンベロープタンパク質例	MVP 例
<i>Parvoviridae</i>	VP1,VP2,VP3,VP4	なし	マウス微小ウイルス -MVP
<i>Retroviridae</i>	MA, CA, NC (gag タンパク質)	SU, TM, LP (env タンパク質), Sag	異種指向性マウス白血病ウイルス-
<i>Reoviridae</i>	μ1, μ2, μA, μB, λ1, λ2, λ3, λA, λB, λC, σ1, σ2, σ3, σA, σB, σC, VP1,VP2, VP3, VP4, VP5, VP6, VP7, CSP, LPP, TP, P1, P2, P3, P5, P7, P8	なし	レオウイルス 3 型-MVP
<i>Caliciviridae</i>	VP60,VP62,VP8.5, VP10, CP	なし	ネコカリシウイルス-MVP
<i>Tymoviridae</i>	CP	なし	ホオズキ斑紋-MVP
<i>Herpesviridae</i>	VP5, VP1-3, VP23, VP26 VP19C, VP21, VP24, VP22, UL16, MCP, CP62, U56, U29, U57	gM, gB, gD, gL, gH, gC, gE, gO, gI, gG, gK, gJ, gN, BMRF2, BDFL2, UL45H, UL34, US9	単純ヘルペス-MVP
<i>Togaviridae</i>	CP	E1, E2, E3	風疹-MVP
<i>Coronaviridae</i>	N	S, M, E, HE	伝染性気管支炎-MVP
<i>Orthomyxoviridae</i>	NP, PA, PB ₁ , PB ₂	HA, NA, M ₁ , M ₂ , HEF, GP, NB, BM ₂ , CM ₂	インフルエンザ A - MVP
<i>Filoviridae</i>	NP, VP30, VP35, L	GP, VP24, VP40	エボラ - MVP
<i>Hepadnaviridae</i>	HBc	L,M,S	B 型肝炎 - MVP
<i>Paramyxoviridae</i>	NP, P	M, F, HN, SH, G, H	ヒトパラインフルエンザ 3-MVP

10

20

30

40

【表 1 - 2】

<i>Flaviviridae</i>	C	M, E, prM, E ^{ms} , E1, E2	ウシウイルス性下痢 -MVP
<i>Picornavirus</i>	VP1, VP2, VP3, VP4, Vpg, VP0	なし	A 型肝炎-MVP
<i>Polyomaviridae</i>	Vp1, Vp2, Vp3	なし	サルウイルス 40 - MVP

【 0 0 1 8 】

本発明において、MVPユニットは、インビトロでのウイルスキャプシドタンパク質もしくはウイルスエンベロープタンパク質の組換え発現もしくは化学合成の結果としてアセンブリされる。好ましくは、アセンブリしてMVPを形成するウイルスキャプシドタンパク質およびエンベロープタンパク質は、天然に存在するウイルスタンパク質核酸配列の発現生成物である。あるいは、それらは、インビトロで変化、もしくは改変されたウイルスタンパク質核酸配列の発現生成物である。本発明において、変化もしくは改変した核酸配列の発現の結果としての変化もしくは改変したアミノ酸配列から構成されるタンパク質生成物は、「組換え」タンパク質といわれる。天然に存在するウイルスタンパク質核酸配列を変化もしくは改変して、組換えウイルスキャプシドタンパク質もしくはエンベロープタンパク質を発現させるという行為は、当該分野で周知である（例えば、Gilllock, 1998を参照のこと）。好ましくは、組換えMVPキャプシドタンパク質もしくはエンベロープタンパク質は、標準的なタンパク質ベースのBLAST相同性検索によれば、それらの天然のウイルスタンパク質源に99.9%以上相同である。あるいは、MVPの組換えキャプシドタンパク質もしくはエンベロープタンパク質は、標準的なBLAST相同性検索によれば、それらの天然のキャプシドタンパク質および/もしくはエンベロープタンパク質源に少なくとも50%、60%、70%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%相同である。

【 0 0 1 9 】

好ましくは、アセンブリしてMVPを形成するウイルスキャプシドタンパク質もしくはエンベロープタンパク質は、細菌細胞、酵母細胞、植物細胞、昆虫細胞、動物細胞、もしくはヒト細胞においてそれらの遺伝子を発現させることによって生成される。MVPをアセンブリする代わりにこれらタンパク質を生成するという行為は、一般に、当該分野で公知である（例えば、Makarova 2011を参照のこと）。例えば、天然のもしくは改変されたウイルス核酸タンパク質配列は、発現ベクターへと最初にクローニングされる。好ましくは、発現ベクターは、酵母ベースの発現ベクター、細菌ベースの発現ベクター、バキュロウイルスベースの発現ベクター、および/もしくは哺乳動物ベースの発現ベクター、および/もしくは植物ベースの発現ベクターである。次いで、上記発現ベクターは、細胞へとトランスフェクトさせられる。好ましくは、トランスフェクトされ得る細胞としては、細菌細胞、酵母細胞、植物細胞、昆虫細胞、動物細胞、哺乳動物細胞および/もしくはヒト細胞が挙げられるが、これらに限定されない。好ましくは、天然もしくは組換えのウイルスキャプシドタンパク質もしくはエンベロープタンパク質の発現後に、上記タンパク質は、MVPへと自発的にアセンブリする。あるいは、MVPのアセンブリは、自発的には起こらない。これらの場合、そのアセンブリされないタンパク質を含有する溶液は、MVPアセンブリの発生を増大させるように、化学物質および/もしくはタンパク質で処理され得る。あるいは、そのアセンブリされないタンパク質を含有する溶液は、溶液中の他の分子に対して溶液中のキャプシドタンパク質および/もしくはエンベロープタンパク質の量を増大させるために精製される。

【 0 0 2 0 】

好ましくは、アセンブリされてMVPを形成するウイルスキャプシドタンパク質もしくは

はエンベロープタンパク質を生成するために発現される核酸配列は、*Parvoviridae*もしくは*Retroviridae*ゲノム源に由来する。*Parvoviridae*由来核酸配列源の例としては、マウスの微小ウイルス(マウス微小ウイルス)、イヌパルボウイルス、ネコパルボウイルス、ブタパルボウイルス、B19ウイルス、アデノ随伴ウイルス1、*Junonia coenia*デングウイルス、カイコ(*Bombyx mori*)ウイルス、およびネッタイシマカ(*Aedes aegypti*)デングウイルスのゲノムが挙げられるが、これらに限定されない。これらゲノムから生成およびアセンブリされて、MVPを形成し得るウイルスキャプシドタンパク質の例としては、VP1、VP2、VP3、もしくはVP4タンパク質が挙げられるが、これらに限定されない。*Retroviridae*由来核酸タンパク質配列源の例としては、以下のゲノムが挙げられるが、これらに限定されない：トリ赤芽球症ウイルス、トリ白血病ウイルス、トリ骨髓芽球症ウイルス、トリ肉腫ウイルス、トリ骨髓球腫症ウイルス、Esh肉腫ウイルス、藤浪肉腫ウイルス、キンケイウイルス、誘発性白血病ウイルス、リンパ性白血病ウイルス、骨髓芽球症随伴ウイルス、骨髓球腫症ウイルス、ラウス随伴ウイルス、コウライキジウイルス、ラウス肉腫ウイルス、NK-24、SKV、ヒヒ内在性ウイルス、BEV、CCC、CERV-CI、CPC4、コーンスネークレトロウイルス、ニワトリ合胞体ウイルス、アヒル伝染性貧血ウイルス、シカ腎臓ウイルス、DPC4、ウマ皮膚線維肉腫ウイルス、ネコ白血病ウイルス、FeLV-AIDS、ネコ肉腫ウイルス、Fr-MLV、Fr-SFFV、FS-1、テナガザル白血病ウイルス、ハムスター白血病ウイルス、リンパ増殖性疾患ウイルス、ミンク細胞フォーカス形成ウイルス、MAIDS、MDEV、ミンク白血病ウイルス、マウス白血病ウイルス、MMCA、マウス肉腫ウイルス、骨髓性白血病ウイルス、OMCA、PK-1S、R-35、RadLV、ラット白血病ウイルス、Ra-MCF、Ra-MLV、Ra-SFFV、ラット肉腫ウイルス、RDL14、細胞内皮症随伴ウイルス、脾臓フォーカス形成ウイルス、サル肉腫ウイルス、サルリンパ腫ウイルス、サル骨髓性白血病ウイルス、脾臓壊死ウイルス、サル肉腫随伴ウイルス、サル肉腫ウイルス、TRV4、Vand C-I、バイパーレトロウイルス(*Viper retrovirus*)、ウーリーサルウイルス、ウーリーサル白血病ウイルス、ウシ白血病ウイルス、BoLV、ヒトT細胞白血病ウイルス、サルT細胞白血病ウイルス、STLVpan-p、ウシ合胞体ウイルス、ネコ合胞体形成ウイルス、ヒトフォーミーウイルス、サルフォーミーウイルス、ウシ免疫不全ウイルス、ヤギ関節脳炎ウイルス、ウマ伝染性貧血ウイルス、ネコ免疫不全ウイルス、ヤギ白質脳炎ウイルス、ヒト免疫不全ウイルス、ジェンブラナ(*Jembrana*)、マエディーノビスナウイルス、進行性肺炎ウイルス、サル免疫不全ウイルス、マウス乳腺腫瘍ウイルス、M432、M832、MNV、マソン・ファイザーサルウイルス、PMFV、P0-1-Lu、リスザルレトロウイルス、サルレトロウイルス、ヤークジークレトロウイルス、ウォールアイ皮膚肉腫ウイルス、ウォールアイ皮膚過形成ウイルス、およびGypsyゲノム。これら*Retroviridae*ゲノムから生成およびアセンブリされて、MVPを形成し得るウイルスキャプシドタンパク質およびエンベロープタンパク質の例としては、gagタンパク質(MA、CA、NC)、envタンパク質(SU、TM、LP)、およびSagタンパク質が挙げられるが、これらに限定されない。さらにより好ましくは、*Retroviridae*由来タンパク質源としては、哺乳動物細胞の内在性レトロウイルスおよびレトロウイルス様粒子に由来するゲノム配列が挙げられる。哺乳動物細胞の内在性レトロウイルスおよびレトロウイルス様粒子の例としては、以下が挙げられるが、これらに限定されない：マウス白血病ウイルス(Ab、AKT8、Cas-Br-E、Du5H MAIDS、FMCF-98、Fr、Graffi、Gross、LP-BM5、Ki、Mo、MPLV、NT40、PVC-211、Ra、RadLV、SL3-3、TRI-3、XMuLV)および囊内A粒子(*Intracisternal A type particle*)。内在性レトロウイルスもしくはレトロウイルス様粒子を含み得る哺乳動物細胞の例としては、CHO細胞、NS0細胞、NS-1細胞、Sp20Ag14細胞、MH細胞、BHK細胞、およびRH細胞が挙げられる。

10

20

30

40

50

【 0 0 2 1 】

好ましくは、ウイルスクャプシドタンパク質もしくはエンベローブタンパク質は、アセンブリされて、エピトープをその表面に示すMVPを形成する。本発明において、「エピトープ」は、MVPの外部表面に示されるアミノ酸の特定の配列である。エピトープは、感染性もしくは非感染性のウイルス粒子除去を定量する分野に一般的な、感染性アッセイ、QPCR、もしくは他の扱いづらくかつ高価な方法の必要性なく、溶液中に存在するMVPの量（従って、溶液からのそれらの除去）を定量するために利用され得る。いくつかの場合には、組換えウイルスクャプシドタンパク質もしくはエンベローブタンパク質は、アセンブリされて、MVPを形成する。これらの場合に、上記MVPは、その表面に異種エピトープを示し得る。本発明において、「異種エピトープ」とは、組換えキャプシドタンパク質もしくはエンベローブタンパク質の発現から生じるエピトープをいう。同様に、MVPは、組換えタンパク質からアセンブリされる場合に、異種エピトープを含み得る。異種エピトープの例としては、strepタグ（例えば、アミノ酸配列 WSH PQFEK（配列番号1））、flagタグ（例えば、アミノ酸配列 DYKDDDDK（配列番号2））およびHisタグ（例えば、アミノ酸配列 HHHHHH（配列番号3））が挙げられるが、これらに限定されない。好ましくは、エピトープもしくは異種エピトープの1コピーが、そのMVPのタンパク質ユニットあたりで存在し得る。あるいは、エピトープもしくは異種エピトープの複数コピーが、そのMVPのタンパク質ユニットあたりで存在し得る。異種エピトープは、定量法の感度を増強し得、感染性アッセイ、QPCRアッセイもしくは当該分野で現在一般的な他のアッセイに関する達成可能であるものを上回るレベルまで溶液中のMVPの量を決定するために使用され得る。

【 0 0 2 2 】

好ましくは、MVPは、いかなる核酸をも含まない。あるいは、MVPは、インビトロ核酸のセグメントを含み得る。本発明において、「インビトロ核酸のセグメント」とは、MVP溶液に意図的に導入される核酸の特定の配列をいう。なぜなら上記粒子が、得られるMVPがその配列のコピーを保持するようにアセンブリされているからである。従って、当該分野で公知の全ての他の粒子とは異なり、MVPは、溶液中でのそれらの量を定量することに関して、ウイルスゲノムの遺伝性の遺伝子材料に拠らない。本発明において、用語「遺伝性の遺伝子材料」とは、複製性もしくは複製欠損のウイルス粒子に存在する全ての天然に被包された核酸をいう。例えば、当該分野において、感染性ウイルス粒子の定量は、感染性（天然に被包されたゲノム核酸発現の結果）もしくはQPCR（それらの天然に被包されたゲノム核酸に対するプライマーを利用する）の測定のいずれかを要する（Shi, 2004）。同様に、当該分野では、非複製性内在性レトロウイルス様粒子の定量は、天然に被包されたゲノム核酸に対するプライマーを利用するQPCR、もしくはウイルス逆転写酵素活性を測定する定量的生成物増強逆転写酵素（quantitative product enhanced reverse transcriptase）（Q-PERT）を要する（Zhang, 2008）。好ましくは、インビトロ核酸のセグメントは、核酸の合成由来配列をいい得る。あるいは、インビトロ核酸のセグメントは、天然に由来する配列であり得る。好ましくは、天然に由来する場合には、上記配列の長さは、上記配列が由来した生物のゲノムの約1%以下、約5%以下、約10%以下、約25%、約30%以下、約40%以下、約50%、約60%以下、約70%以下、約75%以下、約90%以下、約95%以下、もしくは約99%以下である。インビトロ核酸の量は、当該分野で一般的な方法によって測定される場合、MVPの複製もしくは感染を可能にするには十分でない。感染性を測定するために当該分野で一般に使用される方法の一例は、TCID₅₀である。従って、当該分野に一般的な他のウイルス粒子とは異なり、MVPは、感染性であるかもしくは感染性になるリスクは全く有しない。いくつかの場合に、インビトロ核酸セグメントは、ウイルス源由来であり得る。他の場合に、インビトロ核酸は、非ウイルス源由来であり得る。インビトロ核酸源の例としては、ウイルス、細菌、酵母、昆虫、動物、および/もしくはヒトが挙げられるが、これらに限定されない。好ましくは、インビトロ核酸がウイルス源に由来する場合に、上記ウイルス源は、上

10

20

30

40

50

記MVPのキャプシドタンパク質もしくはエンベロープタンパク質が由来したものと同一供給源であり得る。あるいは、インビトロ核酸がウイルス源に由来する場合に、上記ウイルス源は、上記MVPのキャプシドタンパク質もしくはエンベロープタンパク質が由来した供給源とは異なり得る。さらにより好ましくは、いずれの場合にも、上記インビトロ核酸セグメントの5'末端および3'末端は、上記配列が由来した天然のウイルスゲノムに存在しない特有の配列を含み得る。

【0023】

好ましくは、アセンブリ後に、上記MVPは、当該分野で公知の方法を使用して精製され得る(Hernando, 2000)。さらに、精製後のそのアセンブリ溶液中のMVPの純度は、溶液中の全てのタンパク質のうちの65%未満が非MVP関連である、溶液中の全てのタンパク質のうちの55%未満が非MVP関連である、溶液中の全てのタンパク質のうちの45%未満が非MVP関連である、溶液中の全てのタンパク質のうちの35%未満が非MVP関連である、溶液中の全てのタンパク質のうちの25%未満が非MVP関連である、溶液中の全てのタンパク質のうちの15%未満が非MVP関連である、溶液中の全てのタンパク質のうちの5%未満が非MVP関連であるような純度であり得る。本発明において、用語「非MVP関連[タンパク質]」とは、MVPを形成するようにアセンブリしない全ての非キャプシドタンパク質および/もしくは非エンベロープタンパク質をいう。MVPを精製するための方法の一例は、スクロース密度勾配である。別の例は、遠心分離である。別の例は、クロマトグラフィーである。ストック溶液中のMVPの純度は、当該分野で一般的な方法(ポリアクリルアミドゲル電気泳動(PAGE)、高圧液体クロマトグラフィー、質量分析、フローサイトメトリー、ELISA、動的光散乱、ゲル濾過、もしくは超遠心分離が挙げられるが、これらに限定されない)によって決定され得る。いくつかの場合には、アセンブリ後に、MVPは、得られたMVPがリンカー分子をその表面に結合させるように、そのリンカー分子に導入され得、これに対して反応させられ得る。本発明において、用語「リンカー分子」とは、別の分子に共有結合もしくはイオン結合され得る合成ポリマーもしくは天然ポリマー(例えば、タンパク質)をいう。

【0024】

先に記載されるように、MVPは、ウイルスキャプシドタンパク質もしくはエンベロープタンパク質からアセンブリされる。本発明において、MVPは、それらのウイルスタンパク質源に従ってそのように表示される。例えば、上記マウス微小ウイルスのVP2タンパク質(もしくは上記VP2タンパク質の組換えバージョン)からアセンブリされるMVPは、「MMV MVP」といわれる。別の例は、異種指向性マウス白血病ウイルス(XMuLV)のenvタンパク質および/もしくはgagタンパク質(またはenvタンパク質および/もしくはgagタンパク質の組換えバージョン)からアセンブリされるMVPを「XMuLV MVP」という。本発明において、MVPは、ParvoviridaeもしくはRetroviridae核酸源から生成される天然のもしくは組換えのウイルスタンパク質から好ましくは構成される。あるいは、MVPは、他のウイルス科(Caliciviridae、Reoviridae、Tymoviridae、Togaviridae、Herpesviridae、Coronaviridae、Orthomyxoviridae、Filoviridae、Hepadnaviridae、Paramyxoviridae、Flaviviridae、Picornaviridae、および/もしくはPolyomaviridaeが挙げられるが、これらに限定されない)の核酸源から生成されるウイルスタンパク質から構成される。好ましくは、MVPは、1つのウイルス源に由来するタンパク質からアセンブリされる。1つのウイルス源からアセンブリされるMVPの例は、天然もしくは組換えのMMV VP2キャプシドタンパク質からアセンブリされるMMV MVPである。あるいは、MVPは、複数のウイルス源に由来するタンパク質からアセンブリされ得る。1つより多くのウイルスタンパク質源からアセンブリされるMVPの例は、天然もしくは組換えのXMuLV gagタンパク質および天然もしくは組換えのHIV envタンパク質からアセンブリされるXMuLV MVPである。

10

20

30

40

50

【 0 0 2 5 】

本発明において、用語「MVPの種」とは、同じタンパク質から構成され、それらのタンパク質の同じコピー数を有する全てのMVPに言及する。例えば、MVPの種は、上記MMV VP2タンパク質の60コピーを含む全てのMVPである。MVPの種のさらに好ましい定義において、タンパク質の組換え形態は、これが由来した天然のタンパク質と同じと考えられるべきである。例えば、組換えMMV VP2タンパク質の60コピーを含むMVPは、天然に由来するMMV VP2タンパク質の60コピーを含むMVPと同じ種である。

【 0 0 2 6 】

好ましくは、MVPを溶液に添加するという行為は、MVPの1つの種のみを溶液に添加することをいう。あるいは、MVPを溶液に添加するという行為は、MVPの第2の種を溶液に添加することをいう。好ましくは、これらの場合に、MVPの上記第1の種および第2の種は、同時に溶液に添加される。あるいは、これらの場合に、MVPの上記第1の種および第2の種は、逐次的に添加される。MVPの2種を溶液に逐次的に添加する一例は、MMV MVPを溶液に第1に添加し、次いで、XMULV MVPをその同じ溶液に第2に添加することである。MVPの2種を溶液に同時に添加する例は、MMV MVPおよびXMULV MVPの両方を含む溶液を別の溶液に添加することである。他の場合には、MVPを溶液に添加するという行為は、MVPの2以上の種を溶液に添加することをいう。

【 0 0 2 7 】

好ましくは、MVPを溶液に添加することは、MVPの特定の種を含む溶液のある体積を、MVPのその特定の種を含まない別の溶液に添加することをいう。本発明において、MVPの特定の種が溶液に添加されるまでMVPのその種を含まない上記溶液は、「プロセス溶液」といわれる。例えば、MMV MVPの溶液は、MMV MVPを未だ含まないCHO細胞上清プロセス溶液に添加される。別の例では、XMULV MVPの溶液は、MMV MVPを含むが、XMULV MVPを未だ含まないCHO細胞上清プロセス溶液に添加される。本発明において、上記プロセス溶液に添加されるMVPを含む溶液は、「MVPのストック溶液」、もしくは「MVPストック溶液」といわれ得る。好ましくは、当該分野に一般的な非感染性粒子のストック溶液とは異なり、MVPのストック溶液は、MVPの既知の濃度を有する。例えば、本発明のキット実施形態内に含まれるMVPのストック溶液は、MVP濃度情報を含む。さらに、MVPのストック溶液は、当該分野に一般的な他の非感染性粒子より高い濃度のMVPを有する。例えば、ストック溶液中のMVPは、少なくとも 1×10^5 MVP/ml、 1×10^6 MVP/ml、 1×10^7 MVP/ml、 1×10^8 MVP/ml、 1×10^9 MVP/ml、 1×10^{10} MVP/ml、 1×10^{11} MVP/ml、 1×10^{12} MVP/ml、 1×10^{13} MVP/ml、 1×10^{14} MVP/ml、 1×10^{15} MVP/ml、 1×10^{16} MVP/ml以上の濃度で存在し得る。さらに、MVPストック溶液は、当該分野に一般的な他の非感染性粒子より高い純度でMVPを含む。例えば、MVPのストック溶液中の非MVP関連タンパク質は、上記溶液中の全てのタンパク質のうちの65%未満、上記溶液中の全てのタンパク質のうちの55%未満、上記溶液中の全てのタンパク質のうちの45%未満、上記溶液中の全てのタンパク質のうちの35%未満、上記溶液中の全てのタンパク質のうちの25%未満、上記溶液中の全てのタンパク質のうちの15%未満、上記溶液中の全てのタンパク質のうちの5%未満であり得る。ストック溶液中のMVPの純度は、当該分野に共通の方法（ポリアクリルアミドゲル電気泳動（PAGE）、高圧液体クロマトグラフィー、質量分析、フローサイトメトリー、ELISA、動的光散乱、ゲル濾過、もしくは超遠心分離が挙げられるが、これらに限定されない）によって決定され得る。MVPのストック溶液を生成する例は、実施例の節に記載される。好ましくは、MVPのストック溶液は、MVPの1種を含む。MVPの1種を含むMVPストック溶液の一例は、MMV MVPを含むMVPストック溶液である。あるいは、MVPのストック溶液は、MVPの複数の種を含み得る。MVPの複数の種を含むMVPストック溶

液の一例は、MMV MVPおよびXMULV MVPを含むストック溶液である。

【0028】

プロセス溶液に添加されるMVPストック溶液の量は、いくつかの要因（プロセス溶液の体積、添加後の上記プロセス溶液中のMVPストック溶液の所望のパーセント（ v/v ）、および上記MVPストック溶液中のMVPの濃度が挙げられるが、これらに限定されない）に依存して変動する。好ましくは、MVPストック溶液添加の体積は、ほぼミリリットルもしくはマイクロリットル程度であり得る。例えば、上記添加の体積は、約100マイクロリットル以下、約200マイクロリットル以下、約500マイクロリットル以下、約1ミリリットル以下、約2ミリリットル以下、約5ミリリットル以下、約10ミリリットル以下、約100ミリリットル以下、もしくは約1000ミリリットル以下であり得る。あるいは、上記添加の体積は、リットルであり得る。例えば、上記添加の体積は、約1リットル以下、約2リットル以下、約5リットル以下、もしくは約10リットル以下であり得る。好ましくは、添加後に、プロセス溶液内のMVPストック溶液のパーセントは、約1%（ v/v ）以下、約2%（ v/v ）以下、約3%（ v/v ）以下、約4%（ v/v ）以下、約5%（ v/v ）以下、約10%（ v/v ）以下、約25%（ v/v ）以下、もしくは約50%（ v/v ）以下であり得る。

【0029】

好ましくは、上記プロセス溶液は、目的の生物物質を含む。本発明において、用語「目的の生物物質」とは、治療可能性を示し得る、生物学的プロセスによって生成される任意の分子をいう。本発明における生物学的プロセスの一例は、細胞タンパク質発現である。いくつかの場合には、目的の生物物質は、糖、タンパク質、核酸もしくはこれら物質の複雑な組み合わせから構成され得る。他の場合には、目的の生物物質は、細胞および/もしくは組織のような生きている実体であり得る。好ましくは、目的の生物物質は、抗体、非抗体タンパク質、ワクチン、核酸、または血液もしくは血漿派生物である。目的の生物物質としての抗体の例は、トラスツズマブであり、これは、商品名ハーセプチンTMの下で市場に出ている。別の例は、リツキシマブ（商品名リツキサンTMの下で市場に出ている）である。別の例は、ペバシズマブ（商品名アバスチンTMの下で市場に出ている）である。目的の生物物質としての非抗体タンパク質の例としては、顆粒球コロニー刺激因子（GCSF）、幹細胞因子、レプチン、ホルモン、サイトカイン、造血因子、増殖因子、抗肥満因子、栄養因子、抗炎症因子、レセプター、可溶性レセプター、酵素、および/またはこれらタンパク質のうちのいずれかの改変体、誘導体、もしくはアナログが挙げられるが、これらに限定されない。目的の生物物質の他の好ましい例としては、以下が挙げられるが、これらに限定されない：インスリン、ガストリン、プロラクチン、副腎皮質刺激ホルモン（ACTH）、甲状腺刺激ホルモン（TSH）、黄体形成ホルモン（LH）、卵胞刺激ホルモン（FSH）、ヒト絨毛性ゴナドトロピン（HCG）、モチリン、インターフェロン（例えば、 α 、 β 、もしくは γ ）、インターロイキン（例えば、IL-1、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-8、IL-9、IL-10、IL-11および/もしくはIL-12）、腫瘍壊死因子（TNF）、腫瘍壊死因子結合タンパク質（TNF-bp）、脳由来神経栄養因子（BDNF）、グリア細胞由来神経栄養因子（GDNF）、神経栄養因子3（NT3）、線維芽細胞増殖因子（FGF）、神経栄養成長因子（NGF）、骨増殖因子（例えば、オステオプロテゲリン（OPG））、インスリン様増殖因子（IGF）、マクロファージコロニー刺激因子（M-CSF）、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子（GM-CSF）、巨核球由来増殖因子（MGDF）、ケラチノサイト増殖因子（KGF）、トロンボポエチン、血小板由来増殖因子（PGDF）、コロニー刺激増殖因子（CSF）、骨形成タンパク質（BMP）、スーパーオキシドジスムターゼ（SOD）、組織プラスミノゲン活性化因子（TPA）、ウロキナーゼ、ストレプトキナーゼ、もしくはカリクレイン、および/またはこれらタンパク質のうちのいずれかの改変体、誘導体、もしくはアナログ。目的の生物物質としてのワクチンの1つの好ましい例は、Recombivax HBである。ワクチンの別の好ましい例は、Gardasilである。ワクチンの別の好ましい例は、Optafliuである。別

10

20

30

40

50

の好ましい例は、Cervarixである。目的の生物物質としての核酸の1つの好ましい例は、ホミビルセンであり、これは、商品名VitraveneTMの下で市場に出ている。核酸の別の好ましい例は、mipomersenであり、これは、商品名KynamroTMの下で市場に出ている。別の好ましい例は、Pegaptanibであり、これは、商品名MacugenTMの下で市場に出ている。目的の生物物質としての血液もしくは血漿派生物の1つの好ましい例は、アルブミンである。血液もしくは血漿派生物の別の好ましい例は、抗血友病因子である。別の好ましい例は、抗血友病因子/フォン・ウィルブランド因子複合体である。本発明における目的の生物物質の他の好ましい例としては、抗インヒビター凝固複合体(anti-inhibitor coagulant complex)アンチトロンビン(組換え)、c1エステラーゼインヒビター、凝固因子、コリファクト、フィブリン、フィブリノゲン、免疫グロブリン、profilin SD-第IX因子複合体、kcentra(プロトロンビン複合体濃縮物、ヒト)、プロテインC濃縮物(ヒト)、トロンビン、骨髓生成物、および胚性流体生成物(embryonic fluid products)が挙げられるが、これらに限定されない。

10

【0030】

好ましくは、プロセス溶液中の上記目的の生物物質は、細胞培養プロセスもしくは発酵プロセスによって生成されてきた。本発明において、用語「細胞培養発現プロセス」とは、細胞が制御された条件下で増殖させられて、ある種の遺伝子(代表的には、インビトロで導入される)を発現するプロセスをいう。本発明において、用語「発酵発現プロセス」とは、微生物が増殖させられてある種の遺伝子(代表的には、インビトロで導入される)を発現するように条件づけられているプロセスをいう。好ましくは、細胞培養もしくは発酵発現のための細胞株は、ヒト、動物、植物、昆虫、ハイブリドーマ、酵母、もしくは細菌が起源のものである。ヒト細胞株の例としては、HeLa細胞、NCI60細胞、DU145細胞、MCF-7細胞、PC3細胞、ARH-77細胞、および/もしくはHEK-293細胞が挙げられるが、これらに限定されない。動物細胞株の例としては、CHO細胞、BHK細胞、NSO細胞、MDCK細胞、Vero細胞、GH3細胞、PC12細胞、および/もしくはMC3T3細胞が挙げられるが、これらに限定されない。植物細胞株の例としては、タバコBY-2細胞が挙げられるが、これらに限定されない。昆虫細胞株の例としては、sf9細胞、High Five細胞、および/もしくはC6/36細胞が挙げられるが、これらに限定されない。酵母細胞株が由来し得る酵母種の例としては、Saccharomyces cerevisiae細胞および/もしくはPichia pastoris細胞が挙げられるが、これらに限定されない。細菌細胞株が由来し得る細菌種の例としては、Escherichia coliおよび/もしくはLactobacillusが挙げられるが、これらに限定されない。あるいは、細胞培養もしくは発酵発現のための細胞株は、他の起源のものである。他の細胞株の例としては、ZF4細胞、AB9細胞、および/もしくはXenopus A6腎臓上皮細胞が挙げられるが、これらに限定されない。

20

30

【0031】

本発明において、用語「ハイブリドーマ」とは、研究室において抗体生成リンパ球と非抗体生成癌細胞、好ましくは、骨髓腫もしくはリンパ腫との融合から生成される細胞をいう。さらに、本発明のハイブリドーマは、増殖させられ、特異的モノクローナル抗体の連続供給を生じさせることができる。ハイブリドーマ細胞株の例としては、RF5細胞、SP2/o細胞、および/もしくはHB54細胞が挙げられるが、これらに限定されない。

40

【0032】

いくつかの場合には、目的の生物物質を発現する細胞培養もしくは発酵プロセスは、他の生物物質もしくは分子を共発現する。本発明において、目的の生物物質ではない、細胞培養もしくは発酵プロセスの間に共発現される全ての生物物質もしくは分子は、「不純物」といわれる。不純物の例としては、宿主細胞タンパク質(上記目的の生物物質以外に発

50

現されるタンパク質)、核酸(目的の生物物質である核酸以外)、上記目的の生物物質の電荷改変体、凝集複合体、 β -グルカン、および/もしくはウイルスが挙げられるが、これらに限定されない。さらに、不純物とは、目的の生物物質を含む溶液に添加される全ての生物物質、分子、もしくは化学物質をいう。従って、不純物の一例は、それがプロセス溶液に添加された後のMVPである。いくつかの場合には、プロセス溶液は、全ての不純物の起源とともに、元の細胞培養もしくは発酵発現溶液中に存在し得る。他の場合には、この溶液は、MVPの添加の前に、「精製技術」として当該分野で一般に公知の種々の技術によって、その本来の状態から既に精製されている可能性がある。本発明において、用語「精製する」とは、溶液に存在する不純物の量を、同じ溶液に存在する非不純物の量に対して減少させるという行為をいう。好ましくは、非不純物とは、上記溶液に存在する目的の生物物質をいう。MVPの添加の前に上記プロセス溶液を既に精製している可能性のある精製技術の例としては、遠心分離、クロマトグラフィー、濾過、沈殿、濃縮、ダイアフィльтраーション、低温殺菌、もしくはウイルス不活性化が挙げられるが、これらに限定されない。いくつかの場合には、上記溶液は、MVPの添加の前に、凍結、融解、pH調節、および/もしくは希釈が挙げられるが、これらに限定されない他の技術もしくは厳密さに供されている可能性がある。

10

【0033】

本発明の第1の実施形態は、「精製技術によって上記溶液を加工処理すること」を含む。上記方法のこの工程において、用語「溶液」とは、MVPストック溶液のある量が添加された後のプロセス溶液をいう。好ましくは、この溶液は、目的の生物物質を含む。先に言及されるように、目的の生物物質ではない「不純物」もまた、MVPを含め、存在し得る。本発明の第1の実施形態の間に、この溶液は、「精製技術によって、加工処理される」。本発明において、用語「精製技術」とは、上記溶液を「精製する」技術、すなわち、溶液に存在する不純物の量を、その同じ溶液に存在する非不純物の量に対して減少させる技術をいう。好ましくは、非不純物とは、目的の生物物質をいう。従って、本発明のさらに好ましい実施形態は、精製技術によって上記プロセス溶液を加工処理するという行為を通じて、その溶液に存在する目的の生物物質を精製することである。

20

【0034】

好ましくは、上記プロセス溶液を加工処理するために使用される精製技術は、クロマトグラフィー、濾過、限外濾過、遠心分離、もしくはウイルス不活性化技術である。本発明において、クロマトグラフィー、濾過、限外濾過、もしくは遠心分離は、「分離技術」といわれ得る。分離技術は、溶液の構成要素を2種以上の別個の溶液へと分配する物質移動法である。分離技術は、溶液の種々の構成要素間の物理的特性および化学的特性の差異(サイズ、形状、質量、および/もしくは化学的親和性が挙げられるが、これらに限定されない)に基づいて行われる。分離技術の例としては、アフィニティークロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、疎水性相互作用クロマトグラフィー、逆相クロマトグラフィー、ミックスモードクロマトグラフィー、深層濾過、サイズベースの濾過(ナノ濾過、滅菌濾過、もしくは限外濾過が挙げられる)、および遠心分離が挙げられるが、これらに限定されない。ウイルス不活性化技術とは、ウイルスがその適切な構造もしくは複製を保持する能力を低減することを目的とした任意の方法をいう。ウイルス不活性化技術の例としては、溶媒および洗剤もしくは化学的処理、低pH、熱、もしくは紫外線照射への曝露が挙げられる。

30

40

【0035】

本発明の第1の実施形態は、「上記溶液を精製技術によって加工処理すること」を含む。本発明において、用語「加工処理すること」とは、精製技術を物理的に行うという行為をいう。分離技術をして処理する(*processing*)異なる物理的行為としては、ポンプ輸送すること、直接圧力をかけること、遠心分離、重力、もしくは振盪すること、が挙げられるが、これらに限定されない。いくつかの場合には、処理の1つより多くの方法が、上記分離技術の形式に依存して、1つの分離技術に適用され得る。例えば、イオン交換クロマトグラフィー法の形式は、充填済みカラム、フィルタ、もしくは96ウェルプレ

50

ートであり得る。従って、このイオン交換クロマトグラフィー法で処理するという行為は、ポンプ輸送すること、圧力をかけること、遠心分離すること、重力、および/もしくは振盪することからなり得る。ウイルス不活性化技術で処理する異なる物理的行為としては、有機溶媒、洗剤もしくは酸性溶液を添加すること、マイクロ波にかけること、UV光に曝すこと、ホットウォーターバスへの浸漬、低温殺菌、もしくはスチーム処理が挙げられるが、これらに限定されない。

【0036】

いくつかの場合には、溶液を分離技術によって加工処理することは、溶液中の不純物の量を減少させるので、上記溶液を「精製する」といわれる。MVPをプロセス溶液に添加した後に、MVPは、不純物とみなされる。好ましくは、上記プロセス溶液に存在するMVPの量は、加工処理という行為の前に存在するMVPの量と比較して、このような加工処理を通じて減少させられる。あるいは、上記プロセス溶液に存在するMVPの量は、加工処理によって減少しない。精製技術が溶液中の不純物の量を減少させる能力は、当業者が加工処理するために利用するパラメーターのセット、もしくは「変数入力」に依拠する。変数入力の例としては、加工処理される予定の溶液のpH、導電性、および温度が挙げられるが、これらに限定されない。変数入力の他の例としては、かけられる圧力、曝露時間、もしくは溶液の流速が挙げられるが、これらに限定されない。別の例は、上記溶液中の構成要素の濃度である。他の例は、溶液を加工処理するために使用される緩衝液のpH、導電性、もしくは化学的組成である。別の例は、加工処理という行為の間もしくはその後、上記プロセス溶液を集めるために使用される基準である。従って、精製技術によって溶液を加工処理するために利用される上記パラメーターのセットは、非不純物（例えば、目的の生物物質）に対して、不純物（例えば、MVP）を減少させるその技術の能力の有効性に影響を及ぼす。

【0037】

いくつかの場合に、加工処理の間もしくはその後、プロセス溶液を集めるための有効な基準が使用され、これは、より少ない不純物を生じさせる。加工処理という行為がいったん始まれば、プロセス溶液を集める方法論は、当業者に依拠する。本発明において、加工処理という行為が始まって以降に集められたプロセス溶液は、「プロセス収集物」といわれる。精製技術の間にプロセス収集物を集めるために使用される方法論の例としては、吸光検出および体積固定（fixed volume）が挙げられるが、これらに限定されない。好ましくは、当業者は、プロセス収集物が、上記プロセス溶液が加工処理する前に含んでいた不純物のより少量を含むように、加工処理の間もしくはその後、有効な収集基準を利用する。さらにより好ましくは、収集基準は、プロセス収集物が、加工処理前のプロセス溶液より少ないMVPを含むように利用される。

【0038】

いくつかの場合には、別個のプロセス収集物が、加工処理の間に集められる。別個のプロセス収集物を加工処理の間にどのように集めるかの一例は、クロマトグラフィー分離技術のロード段階の間のカラム溶離液収集である。別の例は、クロマトグラフィー分離技術の洗浄段階の間にカラム溶離液を集めることである。別の例は、クロマトグラフィー分離技術の溶出段階の間にカラム溶離液を集めることである。別の例は、フィルタの濾液を集めることである。別の例は、低pH滴定の間に上記溶液を集めることである。別の例は、UV光もしくは化学的処理への曝露の間に上記溶液を集めることである。あるいは、別個のプロセス収集物は、加工処理後に集められ得る。別個の加工処理された溶液を、加工処理後にどのように集めるかの一例は、クロマトグラフィー分離技術の除去段階（stripping phase）の間にカラム溶離液を集めることによるものである。別の例は、低いpH滴定、続いて、pHの上昇および濾過の後に、上記溶液を集めることである。別の例は、UV光もしくは化学的処理への曝露後に、上記溶液を集めることである。

【0039】

本発明の第1の実施形態は、「上記溶液から除去されるMVPの量を定量すること」を含む。この具体的実施形態において、「定量する」という行為は、当業者が上記溶液を加

10

20

30

40

50

工処理することによって除去されるMVPの量を数学的に計算する手段をいう。好ましくは、この値は、対数減少値(LRV)として表され得る。あるいは、この値は、モル濃度(mol/L)として、MVPの総グラムで、および/もしくはMVPの総分子で、表され得る。好ましくは、当業者は、加工処理前の溶液中のMVPの量に対して、加工処理後の溶液中に残っているMVPの量を関連づける等式によって、上記溶液から除去されるMVPの量を数学的に計算し得る。好ましくは、加工処理前の溶液中に存在するMVPの量は、プロセス溶液に添加されるMVPストック溶液の体積にそのMVPストック溶液のMVP濃度を乗算することによって分かる。さらに好ましくは、加工処理前の溶液に存在するMVPの量は、経験的に決定され得る。同様に、好ましくは、プロセス収集物中に残っているMVPの量は、経験的に決定され得る。種々の技術が、溶液に存在するMVPの量を経験的に決定するために利用され得る。本発明において、これら技術は、「定量技術」といわれる。溶液から除去されるMVPの量をどのように定量するかの好ましい例は、実施例の節で示される。

10

【0040】

好ましくは、溶液中のMVPの量を経験的に決定するために使用される「定量技術」としては、ELISA法、PCR法、ナノ画像化法、蛍光法、酵素法、顕微鏡法、分光光度法、透過型電子顕微鏡(TEM)法、およびウェスタンブロット法が挙げられる。本発明のこの実施形態において、MVPの量が決定されている「溶液」は、MVPの添加後のプロセス溶液、プロセス収集物、もしくはいずれかから採取したアリコートを用いる。この実施形態において、上記溶液は、「MVP含有溶液」といわれ得る。好ましくは、定量技術を行う場合、MVPにもしくはMVPに結合された分子に結合し得る薬剤を含む溶液が、MVP含有溶液に添加される。このような薬剤の一例は、抗体である。あるいは、定量技術を行う場合、インビトロ核酸に、もしくはMVPに最初に結合され得る分子に結合した核酸配列に結合し得るPCRプライマーを含む溶液は、MVP含有溶液に添加される。本発明において、薬剤もしくはPCRプライマーを含む上記溶液は、「定量溶液」といわれる。

20

【0041】

好ましくは、溶液中のMVPの量を定量するという行為の間に、プロセス溶液中のMVPの段階希釈が行われ、定量技術によって分析される。好ましくは、このような分析からのデータは、上記定量技術の結果として受容したシグナルに対して、溶液中のMVPの量を関連づける。定量技術の一部として受容されるシグナルの例としては、光学密度(Ocular Density)(OD)、吸光度単位(Absorbance Units)、1mlあたりのpRNAコピー、1mlあたりのpDNAコピー、1mlあたりのRNAコピー、1mlあたりのDNAコピー、もしくは逆転写酵素活性の単位が挙げられるが、これらに限定されない。さらに好ましくは、最良適合の線は、MVPの未知の量によって生成される定量技術シグナルを既知の量によって生成されるシグナルに関連づけるために、データとともに使用される。溶液からのMVP除去を定量する代わりに、溶液中のMVPの量を定量するために段階希釈を作製および使用する例は、実施例の節に示される。

30

【0042】

いくつかの場合には、MVPは、天然もしくは組換えのウイルスクャプシドタンパク質もしくはエンベロープタンパク質から構成され、その表面にエピトープもしくは異種エピトープを呈示する。好ましくは、これらの場合において、これらエピトープもしくは異種エピトープに結合する抗体は、溶液に存在するMVPの量を決定するために、定量技術の間に利用され得る。MVP上に呈示されるエピトープに結合する抗体がMVPの量を決定するためにどのように利用され得るかの一例は、天然もしくは組換えのVP2キャプシドタンパク質に対して指向される抗VP2抗体を、ELISA定量技術の間にMMV MVP含有溶液に添加することによるものである。MVP上に呈示される異種エピトープに結合する抗体が、どのようにMVPの量を決定するために利用され得るかの例は、hisタグ(上記MVPの表面上の異種エピトープとして存在する)に対して指向される抗his

40

50

抗体を、E L I S A 定量技術の間に M V P 含有溶液に添加することによるものである。好ましくは、M V P によって含まれるエピトープもしくは異種エピトープに結合し得ることが当該分野で公知の抗体は、定量溶液中で使用される薬剤であり得る。さらにより好ましくは、生物において免疫原として M V P を使用することによって作製される新規な抗体は、定量溶液中で使用される薬剤であり得る。従って驚くほど感度の高い定量測定および M V P 除去計算が、当該分野に一般的な非遺伝的物質ベースの技術によって達成され得る。

【 0 0 4 3 】

他の場合には、M V P は、リンカー分子に結合される。好ましくは、これらの場合には、リンカー分子に結合する抗体は、溶液に存在する M V P の量を決定するために、定量技術の間に M V P 含有溶液に添加され得る。他の場合には、分子を含む溶液は、定量溶液を添加する前に、M V P 含有溶液に添加され得る。本発明において、用語「分子」とは、M V P に親和性を有する天然もしくは人工の低分子もしくはタンパク質をいう。

10

【 0 0 4 4 】

いくつかの場合には、分子は、M V P - 分子複合体を形成するために M V P 含有溶液に添加される。好ましくは、これらの場合には、分子は、それらの表面上に結合および呈示された核酸配列を有しない。他の場合には、分子は、それらの表面上に結合および呈示された核酸配列を有し得る。好ましくは、分子を含む溶液が M V P 含有溶液に添加される場合、定量溶液は、定量技術によって溶液に存在する M V P の量を決定するために添加される。溶液に存在する M V P の量が、分子を含む溶液を添加することによってどのように決定されるかの一例は、第 1 に、s t r e p t a c t i n を含む溶液を s t r e p タグ - M V P (s t r e p タグ異種エピトープを含む M V P) を含む溶液に添加し、次いで、抗 s t r e p t a c t i n 抗体を使用して、M V P の量を E L I S A 定量技術で決定することによるものである。別の例は、第 1 に、核酸結合体化 s t r e p t a c t i n (結合された核酸のセグメントを含む s t r e p t a c t i n) の溶液を M V P 含有溶液に添加し、次いで、上記核酸のセグメントに対して指向されるプライマーを使用して、M V P の量を P C R 定量技術で決定することによるものである。

20

【 0 0 4 5 】

いくつかの場合には、M V P は、その構造内にインビトロ核酸のセグメントを含む。好ましくは、この場合には、上記 M V P 内に含まれるインビトロ核酸に結合するプライマーを含む定量溶液は、M V P の量を P C R 定量技術で決定するために利用され得る。いくつかの場合には、当該分野に一般的な定量技術によって生成されるシグナルを増強するための方法が使用され得る。定量技術によって生成されるシグナルを増強するための方法の一例は、金属増強発光 (m e t a l e n h a n c e d l u m i n e s c e n c e) を含む。

30

【 0 0 4 6 】

好ましくは、除去される M V P の量を定量することは、M V P の 1 種に言及される。好ましくは、この場合には、M V P の 1 種を、精製技術によって加工処理されるプロセス溶液に添加した。あるいは、M V P の 2 種以上が、精製技術によって加工処理されるプロセス溶液に添加される場合には、除去される M V P の量を定量することは、M V P の複数の種に言及し得る。好ましくは、この場合には、その同じ定量技術が、溶液中の M V P の複数の種の量を決定するにあたって使用され得る。溶液中の M V P の複数の種の量を決定するにあたってその同じ定量技術を使用する一例は、別個の E L I S A 定量技術において、M M V M V P に結合する抗 V P 2 抗体および X M u L V M V P に結合する抗 e n v 抗体を使用することである。あるいは、異なる定量技術が、溶液中の M V P の複数の種の量を決定するにあたって使用され得る。異なる定量技術を使用する一例は、E L I S A ベースの技術を使用して、溶液中の M M V M V P の量を決定すること、および P C R 技術を使用して、同じ溶液中で X M u L V M V P を決定することである。

40

【 0 0 4 7 】

好ましくは、M V P を溶液に添加する工程、上記溶液を精製技術によって加工処理する工程、および溶液から除去される M V P の量を定量する工程は、逐次的におよび連続して

50

、行われるべきである。あるいは、さらなる工程は、合理的な実験デザインに従って含められ得る。合理的な実験デザインに従って含められ得るさらなる工程の例としては、プロセス溶液に添加する前にMVPのストック溶液をさらに精製する工程（濾過する工程、クロマトグラフィー、もしくは他の技術によって）、プロセス溶液に添加する前にMVPのストック溶液に対して透析もしくはダイアフィルトレーションを行う工程、MVPを添加する前もしくは後に、非MVP溶液を上記プロセス溶液に添加する工程が挙げられるが、これらに限定されない。非MVP溶液の一例は、ウイルスを含まない生ウイルス調製物の細胞培養懸濁物である。他のさらなる工程の例としては、MVPの添加後であるが精製技術によって加工処理する前に、上記プロセス溶液のアリコートを採取する工程、定量技術を行う前に、プロセス収集物もしくは加工処理された収集物のアリコートを遠心分離もしくは希釈する工程、および/または定量技術のために採取された上記アリコートを、上記定量技術を行う前に凍結および融解する工程が挙げられ得る。

10

【0048】

従って、本発明の一実施形態は、溶液から除去されるMVPの量を定量するための方法である。本発明の別の実施形態は、上記方法を実施するために使用されるキットである。好ましくは、上記キットは、MVPの単一の種のストック溶液を含む1つの容器、および定量溶液を含む1つの容器を含む。あるいは、上記キットは、MVPの複数の種を含むMVPのストック溶液を含む1つの容器を含む。好ましくは、この場合には、上記キットはまた、ストック溶液ボトルに存在するMVPの各種の量を経験的に決定するために、定量溶液の複数の容器を含む。上記キットがMVPの複数のストック溶液のボトル（MVPの異なる種を含む）を含む場合に、上記キットはまた、MVPのそれら種の量を決定するために、複数の定量溶液の容器を含む。

20

【0049】

本発明において、「MVPのストック溶液を含む容器」とは、既知の濃度（MVPの）にあるMVPのストック溶液を含む、上記キット内に含まれるボトルをいう。さらに、ストック溶液容器中の上記MVPは、当該分野に一般的な他の非感染性粒子の濃度および純度レベルを超える濃度および純度で存在する。例えば、ストック溶液容器中のMVPの濃度は、少なくとも 1×10^5 MVP/ml、 1×10^6 MVP/ml、 1×10^7 MVP/ml、 1×10^8 MVP/ml、 1×10^9 MVP/ml、 1×10^{10} MVP/ml、 1×10^{11} MVP/ml、 1×10^{12} MVP/ml、 1×10^{13} MVP/ml、 1×10^{14} MVP/ml、 1×10^{15} MVP/ml、 1×10^{16} MVP/ml以上であり得、上記非MVP関連タンパク質は、上記溶液中の全てのタンパク質のうちの65%未満、上記溶液中の全てのタンパク質のうちの55%未満、上記溶液中の全てのタンパク質のうちの45%未満、上記溶液中の全てのタンパク質のうちの35%未満、上記溶液中の全てのタンパク質のうちの25%未満、上記溶液中の全てのタンパク質のうちの15%未満、上記溶液中の全てのタンパク質のうちの5%未満、のレベルで存在し得る。好ましくは、ストック溶液ボトル中のMVPは、上記MVPがアセンブリされた元の細胞培養もしくは発酵ベースの発現溶液中にあり得る。さらにより好ましくは、ストック溶液中の上記MVPは、溶液中の細胞性の非MVP関連タンパク質、核酸、もしくは脂質の濃度が、上記MVPがアセンブリされた元の発現溶液と比較して低下するように精製される。さらにより好ましくは、ストック溶液ボトル中の上記MVPは、上記MVPがアセンブリされた元の発現溶液から高度に精製される。いくつかの場合には、MVPのストック溶液は、添加された緩衝液成分を含み得る。好ましくは、MVPの単一のストック溶液ボトルは、MVPのわずか1つの特定の種を含む。あるいは、単一のストック溶液ボトルは、MVPの複数の種を含む。

30

40

【0050】

本発明において、「定量溶液を含む容器」とは、MVPに結合し得る薬剤、インビトロ核酸、MVPに結合した分子、もしくはその分子に結合した核酸配列を含む定量溶液を含む、上記キット内に含まれるボトルをいう。好ましくは、定量ボトルは、MVPにもしくはMVPに結合され得る分子に結合し得る抗体を含む定量溶液を含む。抗体を含む定量溶

50

液を含む定量ボトルの一例は、溶液中のMMV MVPの量を決定するために、ELISA定量技術の間に利用され得る抗VP2抗体を含む定量溶液を含む定量溶液ボトルである。この場合には、上記抗体は、上記MVPに存在するエピトープもしくは異種エピトープ、または上記分子に存在するエピトープに結合し得る。本発明のさらにより好ましい実施形態において、上記キットはまた、二次抗体（これは、MVPもしくはMVPに結合した分子に結合する一次抗体に結合し得る）の溶液を含む。好ましくは、上記二次抗体の溶液は、MVPもしくは分子に結合し得る抗体の添加後に、定量技術の実施の間に添加される。

【0051】

いくつかの場合には、MVPもしくはMVPに結合した分子に結合し得る抗体は、酵素に結合体化されていない。あるいは、本発明のさらに好ましい実施形態において、MVPにもしくはMVPに結合した分子に結合し得る、定量溶液中に含まれる抗体は、酵素に結合体化される。抗体に結合体化され得る酵素の例は、西洋ワサビペルオキシダーゼ（HRP）およびアルカリホスファターゼである。同様に、別のさらに好ましい実施形態において、MVPもしくはMVPに結合した分子に結合し得る抗体に結合する二次抗体は、酵素に結合体化される。

【0052】

本発明のさらに好ましい実施形態において、上記キットは、MVPに結合する固定化された抗体もしくは分子を含むELISAプレートにさらに含む。好ましくは、上記プレートは、96ウェルを含む。あるいは、上記プレートは、96未満のウェルを含み得る。好ましくは、上記ELISAプレートに含まれる上記固定化された抗体もしくは分子は、その同じキットのMVPストック溶液内に含まれるMVPに結合する。

【0053】

あるいは、別のさらに好ましい実施形態において、上記定量ボトルは、インビトロ核酸配列にもしくはMVPに結合され得る分子に結合した核酸のセグメントに結合し得るプライマーを含む定量溶液を含む。好ましくは、この場合には、定量溶液ボトルは、MVP内に含まれるインビトロ核酸のセグメントに特異的なPCRプライマーを含み得る。あるいは、この場合には、定量溶液ボトルは、定量工程の間に、MVPにまず結合され得る分子に結合される核酸のセグメントに対して特異的なPCRプライマーを含み得る。

【0054】

本発明のさらに好ましい実施形態において、上記キットは、MVPに結合し得る分子の溶液をさらに含む。分子の溶液の一例は、ストレプトアビジンを含む溶液である。分子の溶液の別の例は、短い核酸配列を呈示するストレプトアビジンを含む溶液である。好ましくは、この溶液は、定量溶液を添加する前に、定量技術の実行の間に添加される。

【0055】

本発明のさらに好ましい実施形態において、ELISAもしくはPCRを行うためのさらなる試薬が、上記キット中に含まれる。ELISAもしくはPCRを行うためのさらなる試薬の例としては、当該分野に一般的な緩衝液、酵素、もしくは分子が挙げられる。

【0056】

具体的な例示の実施形態を参照しながら実施形態が記載されてきたが、種々の改変および変更が本願のより広い精神および範囲から逸脱することなくこれら例示の実施形態に対して行われ得ることは、明らかである。従って、本明細書および図面は、制限的な意味ではなく例示の意味で考えられるべきである。

【実施例】

【0057】

（実施例1：ストック溶液を生成するためのマウス微小ウイルス（MMV）モックウイルス粒子（MVP）のクローニング、発現および精製）

マウス微小ウイルス（MMV）は、脊椎動物宿主に感染する科Parvoviridaeに属する1本鎖DNA含有ウイルスである。マウス微小ウイルスキャプシドタンパク質遺伝子、VP2は、MVPを生成するためにバキュロウイルス発現系を使用して、クロー

10

20

30

40

50

ニングおよび発現され得る (Hernando, 2000)。MMV MVPをクローニングおよび発現するために、上記キャプシドタンパク質遺伝子VP2を、公開されたMMV VP2配列テンプレート (GenBank J02275.1, ヌクレオチド2794~4557, 配列番号4) から合成した。特定のコドン、この合成の間に最適化して、翻訳効率を高めた (配列番号5)。得られたアミノ酸配列 (配列番号6) は、その公開されたVP2配列 (GenBank AA67114.1, 配列番号7) に100%相同であった。上記遺伝子を、クローニングベクターpUC57へと挿入し、このベクターから、上記遺伝子をpFastBac発現ベクターへとサブクローニングした。次いで、このベクターを使用して、DH10Bac細胞を形質転換した。陽性クローンをスクリーニングした後、バクミドDNAを使用して、Sf9細胞をトランスフェクトした。MMV VP2遺伝子を有する組換えバキュロウイルスを、Sf9細胞培養上清から集めた。次いで、その元の組換えバキュロウイルスストックを増幅させ、感染後4日目で集めた。このストックを、10% FBSを補充したGrace培地中で培養し、次いで、これを使用して、感染多重度4.0でSf9細胞をトランスフェクトした。次いで、細胞を、感染後3日目で採取し、溶解緩衝液中に再懸濁した。次いで、この懸濁物を3回、凍結および融解した。可溶性溶解物を、遠心分離によって回収し、次いで、その得られたMVPの精製を、公開されたプロトコル (Hernando, 2000) に従って行った。塩化セシウム密度勾配分画後のMVPの純度を、SDS-PAGEとクーマシーブルー染色 (図1) およびウェスタンブロット分析 (示さず) によって決定した。その結果に基づいて、画分をプールして、MMV MVPストック溶液を形成した。MMV MVPストック溶液の可視化および濃度決定を、透過型電子顕微鏡とネガティブ染色 (図2) によって行った。

【0058】

(実施例2: ストック溶液を生成するための異種エピトープMMV MVPのクローニング、発現および精製)

MMV MVPを、その構造の表面上に異種エピトープを呈示するように作製し得るので、従って、MVP定量のための標的として使用し得る。異種エピトープを呈示するMMV MVPをクローニングするために、MMV VP2遺伝子の天然のヌクレオチド配列を、まず合成すると同時に (GenBank J02275.1、ヌクレオチド2794~4557、配列番号4をテンプレートとして使用)、特定のコドンを最適化して、翻訳効率を高めた (配列番号5)。次いで、この配列にアミノ酸2位で変異誘発を受けさせた (配列番号8) ところ、strept IIタグ (配列番号9) を含む10アミノ酸配列の挿入を含むアミノ酸配列を生じた。次いで、その同じ方法および手順を、実施例1から利用して、異種エピトープ (strept IIタグ) 含有MVPストック溶液をクローニング、発現、精製および生成した。塩化セシウム密度勾配分画後のMVPの純度を、SDS-PAGEとクーマシーブルー染色 (図3) およびウェスタンブロット分析 (示さず) によって決定した。その結果に基づいて、画分をプールして、異種エピトープMMV MVPストック溶液を形成した。その得られたストック溶液の可視化および濃度決定を、透過型電子顕微鏡とネガティブ染色によって行った (図4)。その得られたMVPがstrept IIタグを呈示したというさらなる確認を、streptactinおよび上記タグに対するmAbを利用するELISAアッセイによって行った (データは示さず)。

【0059】

(実施例3: ストック溶液を生成するための異種指向性マウス白血病ウイルス (XMuLV) MVPのクローニング、発現および精製)

XMRV env遺伝子およびgag遺伝子を共発現するAd5ベクターでの細胞の感染が、非感染性粒子の生成をもたらすことが、以前示された (Makarova, 2011)。第1に、上記XMuLV gag遺伝子およびenv遺伝子は、テンプレートとしてのこれらの遺伝子の公開された配列を使用してカスタム合成し得る (それぞれ、GenBankアクセッション番号JF908817.1、ヌクレオチド546~2156、配列番号10、およびアクセッション番号K02730.1、ヌクレオチド291~222

5、配列番号11)。次いで、上記核酸配列を、pUC57ベクターへとクローニングし得る。次に、上記env配列を、pDP1シャトルベクターのCMV駆動発現カセットへとサブクローニングし得、上記gag配列を、その同じベクターのCMV駆動発現カセットへとクローニングし得、結果、pDP1-XMuLVenvgagが生じる。次いで、293-AD細胞を共トランスフェクトする前に、上記pDP1-XMuLVenvgagプラスミドを直線状にし、pAdEasy-1プラスミドと混合して、組換えAd5-XMuLVを生成し得る。上記組換えアデノウイルスを、塩化セシウム勾配上での二重遠心分離によって精製し得る。MVPストック溶液を生成するために、Mv1Lu細胞を、ウイルス吸収(virus absorption)のためにAd5-XMuLVで感染させ得る。次いで、培養培地を感染の48時間後に集め、0.45mmフィルタに通過させ、スクロース勾配による超遠心分離によって濃縮/精製し得る。

10

【0060】

(実施例4：ストック溶液を生成するための異種エピトープを含むXMuLV MVPのクローニング、発現、および精製)

XMuLV MVPを、その構造の表面上に異種エピトープを含むように、Suomala *et al.*, 1994で考察される方法によって作製し得る。あるいは、上記XMuLV gag遺伝子および/もしくはenv遺伝子(それぞれ、GenBankアクセッション番号JF908817.1、ヌクレオチド546~2156、配列番号10、およびアクセッション番号K02730.1、ヌクレオチド291~2225、配列番号11)のいずれかのヌクレオチド配列を、異種タグ(例えば、astrept-タグ(アミノ酸配列WSHPQFEK(配列番号1))、Flagタグ(アミノ酸配列DYKDDDDK(配列番号2))もしくはHisタグ(アミノ酸配列HHHHHH(配列番号3))が挙げられるが、これらに限定されない)の配列を含むように合成し得る。クローニング、発現、および精製は、上記の実施例3に記載されるとおりに起こり得る。

20

【0061】

(実施例5：核酸を含むXMuLV MVPのアセンブリ)

1片の核酸を含むXMuLV MVPを生成するために、XMuLV gagタンパク質および/もしくはenvタンパク質を、第1に、実施例4に記載されるように哺乳動物細胞から発現させ得る。次いで、核酸(これは、DNAもしくはRNAであり得る)を含めるためのXMuLV gagタンパク質および/もしくはenvタンパク質のインビトロアセンブリを、以下の公開されたプロトコル(Gross *et al.*, 1997; Yue *et al.*, 2001)に従って行い得る。

30

【0062】

(実施例6：アニオン交換カラムによる加工処理後のmAb含有溶液からのMMV MVP除去の定量)

モノクローナル抗体(mAb1)を含むNS0採取細胞培養流体を、貯蔵の-80から融解した。上記材料を、pH7.5へと1M Trisで滴定し、次いで、0.22μmフィルタに通して濾過した。異種strept IIタグエピトープを呈示するVP2キャプシドタンパク質の60コピーを含む、100マイクロリットルのMMV MVPストック溶液(濃度 1×10^9 MVP/ml)を、10mlの上記mAb1プロセス溶液に添加した(1% v/v添加)。よって、上記プロセス溶液は、 9.9×10^6 MVP/ml($(0.1 \text{ ml} \times 1 \times 10^9 \text{ MVP/ml}) / 10.1 \text{ ml}$)の濃度を有した。次に、0.66cm×2cm Qセファロースファストフローカラムを、業者が推奨する仕様(GE Healthcare)に詰めて、AKTA explorerを使用して、流速60cm/時で50mM Tris-HCl、50mM NaCl(pH7.5)を用いて平衡化した。平衡化後に、MVPを含むプロセス溶液の10.1mlを、60cm/時でカラムを通してロードした。プロセス収集物を、タンパク質のフロースルーを示すUV₂₈₀追跡として採取した。上記収集物の200μlサンプルを採取した。

40

【0063】

次いで、ELISA定量技術を行って、精製加工処理からのプロセス収集物の各々にお

50

いて除去されるMVPの量を定量した。マイクロタイターウェルを、第1に、ウサギポリクローナル抗MMV VP2抗体(Alpha Diagnostic, Cat# MMV MVP21-S)でコーティングした。上記プロセス収集物サンプルの各々の50μlを、上記コーティングしたウェルに添加し、1時間インキュベートし、1×リン酸緩衝食塩水(PBS)で3回洗浄した。さらに、MVP濃度 1×10^8 MVP/ml、 1×10^6 MVP/ml、および 1×10^4 MVP/mlを生じる上記MMV MVPストック溶液の段階希釈物を、元のプロセス材料の中で作製した。各希釈物の50μlを、コーティングしたウェルに同様に添加し、インキュベートし、洗浄した。次いで、ウサギポリクローナル抗MMV VP2抗体を、各ウェルに添加し、1時間インキュベートし、1×PBSで3回洗浄した。次いで、HRP結合体化抗ウサギ抗体(1:500)を添加し、1時間インキュベートし、1×PBSで3回洗浄した。TMB基質溶液を添加し、その反応を、停止溶液を添加することによって停止させた。光学密度(OD)を450nmで測定した。そのOD₄₅₀の結果を、以下の表2に示す。

【表2】

表2:MMV MVP除去研究からのOD₄₅₀測定値

サンプル	OD ₄₅₀
MVP 希釈 1 (1×10^8 MVP/ml)	1.1
MVP 希釈 2 (1×10^6 MVP/ml)	0.9
MVP 希釈 3 (1×10^4 MVP/ml)	0.52
MVP 希釈コントロール(プロセス溶液)	0.03
プロセス収集物 1	0.04
プロセス収集物 2	0.01

【0064】

最良適合の線を、既知の濃度の3つの希釈サンプルで確立した(OD₄₅₀およびMVP濃度を関連づける)。この線の式は、以下であった：

$$Y = 0.05251 \ln(x) + 0.1235$$

【0065】

上記2つのプロセス収集物からのOD₄₅₀の結果の中に当てはめることによって、それらサンプル中のMVP濃度を決定した。いずれのプロセス収集物中にも0 MVP/mlが残っていたことが、このようにして経験的に分かった。このELISAアッセイにおける検出限界は未知であるので、その限界は、試験したMVPの最低濃度(1×10^4 MVP/ml)であると想定される。MMV MVPの対数減少値を、上記プロセス溶液中のMVPの既知量および上記プロセス収集物中に残っているMVPの経験的に決定された量から計算した。従って、この値、 9.9×10^2 は、精製技術によって溶液を加工処理する方法によって、その溶液から除去されるMVPの量である。

【0066】

(実施例7：パルボウイルスフィルタによる加工処理後のMab含有溶液からのXMULV MVP除去の定量)

モノクローナル抗体を含むバイオテクノロジープロセスに由来する溶液は、当該分野でよく知られている方法を使用して、タンパク質アフィニティークロマトグラフィーカラムおよびイオン交換クロマトグラフィーカラムによって精製され得る。上記溶液は、-80で数カ月間凍結され、次いで、融解され、0.22μmフィルタに通して濾過され得る。次いで、XMULV MVPストック溶液の12.5mlは、上記濾過されたプロセス溶

液の250mlの中へとピペットで移される(5% スパイク v/v)。このMVPが添加されたプロセス溶液のうちの1mlサンプルを、後の定量のためにとっておく。次いで、上記プロセス溶液(ここではXMuLV MVPを含む)を、30psiでVproパルポウイルスフィルタに通して加圧し、その濾液を集める。この濾液(プロセス収集物)の1mlサンプルを採取する。

【0067】

プロセス溶液中でのXMuLV MVPの段階希釈物を、プロセス溶液の濃度 1×10^9 、 1×10^7 、 1×10^5 、および 1×10^3 MVP/mlのMVPの希釈物により調製し得る。次いで、各希釈物の50μlを、XMuLV envエプिटープに対する抗体でコーティングしたマイクロタイターウェルに添加し得る。次いで、上記ウェルを、1時間インキュベートし、1xPBS緩衝液で3回洗浄する。次に、異なるenvエプिटープに対するHRP結合体化抗体を、各ウェルに添加し、1時間インキュベートし、1xPBSで3回洗浄し得る。次いで、TMB基質溶液を添加し、その反応を、停止溶液の添加によって停止させる。ODを450nmで測定して、ODとMVP濃度との間の関係を示すデータ曲線を作成する。OD₄₅₀の結果は、以下の表3のデータと酷似し得る。

【0068】

【表3】

表3:XMuLV MVP除去研究のOD₄₅₀測定値

希釈濃度(MVP/ml)	OD ₄₅₀
1×10^9	1.47
1×10^7	0.9
1×10^5	0.56
1×10^3	0.33
0(プロセス溶液コントロール)	0.01

【0069】

上記パルポウイルスフィルタによる加工処理から除去されるXMuLV MVPの量は、経験的に定量され得る。プロセス溶液(MVP添加後)およびプロセス収集物の1mlサンプルを、上記の段階希釈サンプルについて記載されたその同じELISA法に供する。そのOD₄₅₀の結果を、表3のデータに最良に適合する式に当てはめて、濾過前および濾過後の溶液中のMVPの量を推定する。このデータから、XMuLV MVP LRVは、実施例6に記載されるようにおよびウイルス除去を定量するために当該分野で一般的な方法に従って計算され得る。

【図 1】

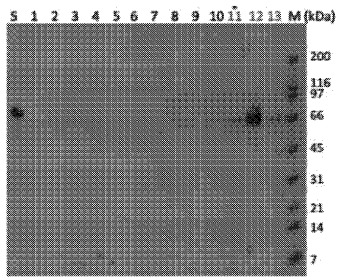


FIGURE 1

【図 2】

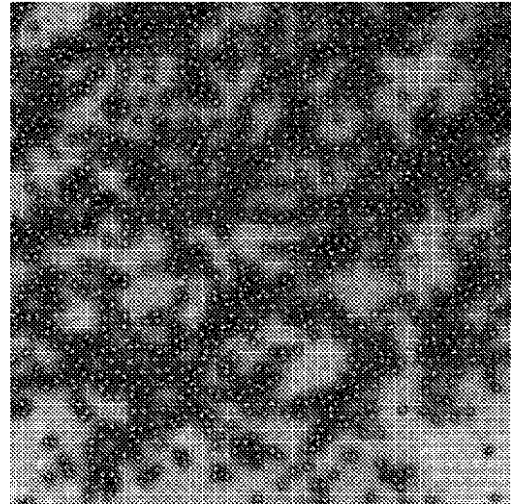


FIGURE 2

【図 3】

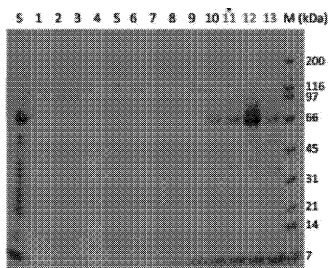


FIGURE 3

【図 4】

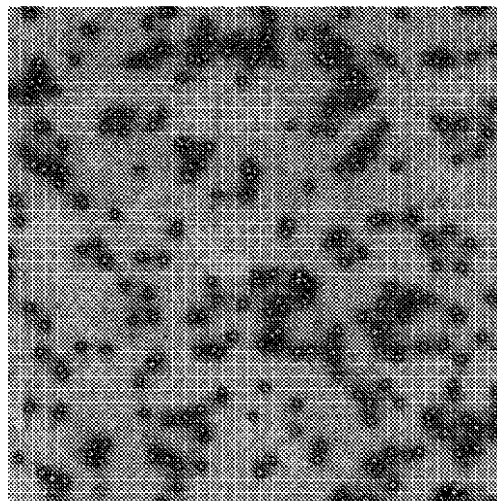


FIGURE 4

【配列表】

0006549126000001.app

フロントページの続き

(74)代理人 230113332

弁護士 山本 健策

(72)発明者 セトリン, デイビッド

アメリカ合衆国 メリーランド 20854, ポトマック, カークウォール テラス 108
17

(72)発明者 ダール, アルン

アメリカ合衆国 メリーランド 21784, サイクスビル, カロラマ ロード 470

審査官 松田 芳子

(56)参考文献 特表2011-512151(JP, A)

Nat Biotechnol., 1996年, 14, 651-652

Appl. Environ. Microbiol., 2001年, 70(7), p.3904-3909

Biotechnol. Bioeng., 2003年, 84(6), 714-722

Gene Ther., 1999年, 6(7), 1322-1330

Water Res., 2013年 7月12日, 47(15), 5819-5827

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12Q 1/686

C12N 15/33

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)

Caplus/MEDLINE/EMBASE/WPIDS/BIOSIS(STN)