

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第6198278号
(P6198278)

(45) 発行日 平成29年9月20日 (2017.9.20)

(24) 登録日 平成29年9月1日 (2017.9.1)

(51) Int.Cl.

C 1 2 N 7/02 (2006.01)

F 1

C 1 2 N 7/02

請求項の数 20 (全 20 頁)

(21) 出願番号	特願2014-529633 (P2014-529633)	(73) 特許権者	511185106
(86) (22) 出願日	平成24年9月7日 (2012.9.7)		ユニキュアー アイビー ビー. ブイ.
(65) 公表番号	特表2014-526246 (P2014-526246A)		オランダ国, 1 1 0 5 ビービー アム
(43) 公表日	平成26年10月6日 (2014.10.6)		ステルダム, パースフーフエルヴェーク
(86) 国際出願番号	PCT/NL2012/050619		2 5 エー
(87) 国際公開番号	W02013/036118	(74) 代理人	100107456
(87) 国際公開日	平成25年3月14日 (2013.3.14)		弁理士 池田 成人
審査請求日	平成27年8月12日 (2015.8.12)	(74) 代理人	100162352
(31) 優先権主張番号	11180594.1		弁理士 酒巻 順一郎
(32) 優先日	平成23年9月8日 (2011.9.8)	(74) 代理人	100123995
(33) 優先権主張国	欧州特許庁 (EP)		弁理士 野田 雅一
(31) 優先権主張番号	61/532,176	(74) 代理人	100148596
(32) 優先日	平成23年9月8日 (2011.9.8)		弁理士 山口 和弘
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	100140888
前置審査			弁理士 渡辺 欣乃
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 AAV調製物からの混入ウイルスの除去

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

バキュロウイルスピリオンの集団からパルボウイルスピリオンの集団を分離するための方法であって、パルボウイルスピリオンの集団及びバキュロウイルスピリオンの集団を含む試料をフィルターで濾過するステップを含み、前記フィルターが30～40nmの公称孔径を有し、

パルボウイルスが、アデノ随伴ウイルスである、方法。

【請求項 2】

バキュロウイルスがアウトグラフィ・カリフォルニカマルチカプシド核多角体病ウイルス (AcMNPV) である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

フィルターがウイルスフィルター又は限外濾過膜である、請求項 1 又は 2 に記載の方法。

【請求項 4】

フィルターがサーフェスフィルター及び/又はデプスフィルターである、請求項 1～3 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 5】

フィルターが、銅アンモニア再生セルロース、ポリフッ化ビニリデン、ポリスルホン、ポリテトラフルオロエチレン、ポリプロピレン、修飾若しくは非修飾ポリエーテルスルホン、酢酸セルロース、硝酸セルロース、ポリアミド又は再生セルロースからなる群から選

扱われる材料を含む、請求項 1 ~ 4 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 6】

前記フィルターが 32 ~ 38 nm の公称孔径を有する、請求項 1 ~ 5 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 7】

フィルターが、銅アンモニア再生セルロースを含む、請求項 5 又は 6 に記載の方法。

【請求項 8】

フィルターが、銅アンモニア再生セルロース中空糸を含む、請求項 7 に記載の方法。

【請求項 9】

フィルターが Asahi KASEI プラノバ（登録商標）35 膜（銅アンモニア再生セルロース中空糸）又はウルチポア（登録商標）VF Grade DV50 ウイルス除去フィルター（親水性修飾ポリフッ化ビニリデン）である、請求項 5 に記載の方法。

10

【請求項 10】

前記試料を、2 つ以上のフィルターを使用する濾過に供する、請求項 1 ~ 9 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 11】

濾過するステップの前の前記試料が、密度勾配、予備濾過、クロマトグラフィーステップ、及びこれらの方法の組み合わせからなる群から選択される方法を使用して予備精製される、請求項 1 ~ 10 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 12】

20

濾過するステップの前の前記試料が、アフィニティークロマトグラフィー及びイオン交換クロマトグラフィー、並びにこれらの組み合わせからなる群から選択されるクロマトグラフィーステップを使用して予備精製される、請求項 11 に記載の方法。

【請求項 13】

予備濾過が、孔径が 70 ~ 200 nm のフィルターによって実施される、請求項 11 又は 12 に記載の方法。

【請求項 14】

前記試料の pH が 6 ~ 10 である、請求項 1 ~ 13 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 15】

前記試料の pH が 7 ~ 9 である、請求項 14 に記載の方法。

30

【請求項 16】

前記試料の pH が 7.5 ~ 8.5 である、請求項 15 に記載の方法。

【請求項 17】

前記試料の pH が 8 である、請求項 16 に記載の方法。

【請求項 18】

フィルター表面 1 cm² 当たり試料 1 ~ 200 ml が濾過される、請求項 1 ~ 17 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 19】

フィルター表面 1 cm² 当たり試料 80 ~ 120 ml が濾過される、請求項 18 に記載の方法。

40

【請求項 20】

濾過するステップに供された前記試料中のパルボウイルスの少なくとも 85 % が、濾液中に保持され、濾過するステップが、前記濾液中のパキユロウイルスの力価を少なくとも 5 log 低下させることができる、請求項 1 ~ 19 のいずれか一項に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【発明の詳細な説明】

【0001】

[発明の分野]

本発明は、ウイルス学及び遺伝子療法の分野に関する。特に、本発明は、混入している桿状のウイルス、例えば、パキユロウイルス等を、本質的に球状のウイルス、例えば、ア

50

デノ随伴ウイルス遺伝子療法ベクター等の調製物から除去するための方法に関する。

【0002】

[発明の背景]

遺伝子療法において使用するためのウイルスベクターの生産では、安全上の理由で複製欠損性ウイルスが使用される。複製欠損性ウイルスは、*in vivo*でヒト細胞に感染し、その細胞に導入遺伝子を移入することができるが、細胞において自ら複製することができない。一般には、複製欠損性ウイルスは、例えば、*rep* 遺伝子及び *cap* 遺伝子等の、ウイルスの複製のために重要なウイルス遺伝子を欠失させることによって実現される。これにより、対象の遺伝子産物（複数可）をウイルス遺伝子の代わりに組み込むことも可能になる。宿主細胞においてウイルス粒子を生成するために、複製欠損性ウイルスから欠失しているウイルス遺伝子を別々に、例えば、ヘルパーウイルスを用意することによってもたす必要がある。

10

【0003】

アデノ随伴ウイルス（AAV）は、パルボウイルス科（*Parvoviridae*）に属し、直径およそ18～26nmの外側の正二十面体の構造タンパク質の被膜を有する一本鎖のDNA分子を構成する非自己複製性ウイルスである。野生型AAVウイルスは、宿主細胞のゲノム内に統合すること、又はヘルパーウイルスの存在下で宿主細胞において複製することができる。アデノウイルスは、有望なヘルパーウイルスとして最初に同定された。しかし、ヒト及び動物に対して病原性であるヘルペスウイルス等の他の本質的に球形の哺乳動物ヘルパーウイルスも適切である。近年、昆虫細胞においてバキュロウイルスベースの発現系によってアデノ随伴ウイルス（AAV）ベクターを生産すること（Urabeら[2002] *Hum Gene Ther* . 13（16）：1935-43）が、遺伝子療法の工業的な応用のために容易に規模を変えることができるので、ますます一般的になっている。この生産系では、一般にはAAV *rep* 遺伝子、AAV *cap* 遺伝子及びAAV末端逆位反復（ITR）が隣接する対象の遺伝子産物（導入遺伝子DNA）をコードする3つの組換えバキュロウイルスが使用される。

20

【0004】

ヘルパーウイルス又はウイルスベースの発現系を使用したウイルスベクターの調製に伴う重大な不都合は、生産物のウイルス粒子とヘルパーウイルスとが混在する集団が形成され、それをさらに精製しなければならないことである。遺伝子療法においてウイルスベクターを使用する場合、混入ウイルスには潜在的な病原性及び／又は免疫原性があるので、例えばアデノウイルス又はバキュロウイルス等の混入ウイルスは回避するか最小限にするかなければならない。

30

【0005】

ヘルパーウイルスを排除するためいくつかの方法が現在当技術分野で公知であるが、これらの方法全てに不都合がある。これらの方法の例は密度勾配遠心分離若しくは熱不活化又はそれらの組み合わせである。しかし、密度勾配遠心分離は、経済的に、比較的小さな体積でのみ実行可能であり、したがって、この方法は工業的な規模では実行不可能である。熱不活化は、AAVとヘルパーウイルスとの熱安定性が異なることに基づく。例えば、アデノウイルスとAAVとが混在する集団を56～65℃まで加熱することにより、ヘルパーウイルスがほぼ選択的に熱不活化され、AAVの活性の損失はほんのわずかである。残念ながら、変性したヘルパーウイルスタンパク質はなお試料中に存在し、遺伝子療法において使用する際に患者の細胞性免疫応答を惹起できる（Smith, C. A. ら（1996）*J. Virol.*、70、6733-6740）。

40

【0006】

さらに、イオン交換（アニオン及び／又はカチオンベース）クロマトグラフィー及びアフィニティークロマトグラフィーを含めたカラムクロマトグラフィー法が、AAVベクターを精製するために開発されてきた。これらの方法により、AAVベクターの高度に濃縮された調製物がもたらされるが、これらの方法単独では、販売される医薬製品の規制要件を満たすヘルパーウイルスの十分な枯渇が示されることを確認することができない。

50

【0007】

最後に、米国特許第6,479,273号には、組換えAAVとアデノウイルス、すなわち、直径が実質的に異なる2つの本質的に球状のウイルスの分離は、両方のウイルスを含有する溶液を、孔径がおよそ50nmのフィルター膜又は孔径がおよそ35nmのフィルター膜を通して1回又は複数回濾過することによって実現されることが開示されている。rAAVは直径がおよそ25nmであることが開示されており、また、アデノウイルスは直径がおよそ65~90nmといわれているが、それよりも大きな直径、例えば100nm近くが文献において報告されている[Kennedy及びParks(2009)Molecular Therapy 17(10):1664-1666; Berkowitz(2003)2003年1月7日~10日、WCBP第7回年次総会、San Francisco, CA]。しかし、昆虫細胞においてバキュロウイルスの発現系によってAAVベクターを生産したことに起因する混入ウイルスは、バキュロウイルス科(baculoviridae)に由来し、したがって、桿状であり、長さおよそ260nm、直径およそ20nmである。(組換え)AAVは実質的に球状であり、直径がおよそ18~26nmであるので、バキュロウイルスは部分的に(2次元で)標的ウイルスと同様のサイズを有する。

10

【0008】

規制要件、例えば、欧州医薬品庁(European Medicines Agency)(EMA)によるヒト又は動物起源の細胞株に由来するバイオテクノロジー製品のウイルス安全性評価(ICH Q5A(R1))では、生物医薬品を精製するためのプロセスには、いかなる生産物以外のウイルスも除去できることが必要とされる。ウイルス混入物の除去は、「ウイルスクリアランス」又は「ウイルス除去」プロセスのステップによって実施され、通常、クロマトグラフィー及び/又はウイルス濾過によって得られる。「ウイルス不活化」プロセスのステップも、生産物以外のウイルスによって引き起こされる潜在的な病原性の影響を弱めるために使用される。このプロセスのステップは、通常、極端な物理的条件(例えば、pH、温度)及び/又は化学的条件(例えば、界面活性剤、溶媒)を含む。医薬製品は、通常およそ200kDa未満のタンパク質であり、「ウイルス除去」プロセスはよく確立されている。しかし、数千kDaのウイルスを含む遺伝子療法製品に関する比較的新しい種類の製品に対する「ウイルス除去」プロセスは、文書による十分な裏付けがない。特に、医薬製品が球状のウイルスであり、ウイルス混入物が桿状のウイルスである「ウイルス除去」のプロセスは未だ実証されていない。

20

30

【0009】

したがって、当技術分野では、工業的な規模での使用が技術的且つ経済的に実行可能であり、ウイルスの発現系の生産物以外のウイルスを、AAVを含有する試料、好ましくはバキュロウイルスの発現系から得られた組換えAAV試料から部分的に又は完全に除去できる追加的な分離/精製方法が必要とされている。それにより、生産物以外のウイルスの潜在的な病原性及び/又は免疫原性が低下する。特に、当技術分野では、生産物以外のウイルスが、長さがAAVの直径の数倍であるが直径がAAVと同様の桿状である場合の追加的な分離/精製方法が必要とされている。

40

【0010】

[本発明の説明]

本発明の簡単な説明

第1の態様では、本発明は、バキュロウイルスピリオンの集団からパルボウイルスピリオンの集団を分離するための方法であって、パルボウイルスピリオンの集団及びバキュロウイルスピリオンの集団を含む試料を、パルボウイルスピリオンのみが通過できるフィルターで濾過するステップを含む方法に関する。フィルターは30~70nm、より好ましくは30~40nm、さらにより好ましくは32~38nm、最も好ましくは(約)35nmの公称孔径を有することが好ましい。好ましい実施形態では、パルボウイルスはアデノ随伴ウイルスであり、バキュロウイルスはアウトグラフ・カリフォルニカ(Autographa californica)マルチカプシド(multicapsid)核

50

多角体病ウイルス (AcMNPV) であることがより好ましい。

【0011】

好ましい実施形態では、試料の濾過に使用するフィルターは、ウイルスフィルター又は限外濾過膜である。フィルターはサーフェスフィルター及び/又はデプスフィルターであることが好ましい。本発明の方法において使用するためのフィルターは、銅アンモニア再生セルロース、ポリフッ化ビニリデン、ポリスルホン、例えば、ポリエーテルスルホン、例えば、修飾若しくは非修飾ポリエーテルスルホン等、ポリテトラフルオロエチレン、ポリプロピレン、修飾若しくは非修飾ポリエーテルスルホン、酢酸セルロース、硝酸セルロース、ポリアミド又は再生セルロースからなる群から選択される材料を含むことが好ましい。特に好ましい実施形態では、本発明の方法において使用するためのフィルターは、銅アンモニア再生セルロース、好ましくは銅アンモニア再生セルロース中空糸を含み、フィルターはプラノバ (Planova) (商標) 35 膜 (Asahi Kasei; www.planovafilters.com) であることがより好ましい。別の好ましい実施形態では、本発明の方法において使用するためのフィルターは、ウルチポア (Ultipor) (商標) VF Grade DV50 ウイルス除去フィルター (Pall Corp.; www.pall.com) である。

10

【0012】

本発明による方法のある実施形態では、試料を、2つ以上のフィルターを使用する濾過に供する。

【0013】

20

本発明による方法では、試料を、濾過するステップの前に、密度勾配、予備濾過、クロマトグラフィーステップ、好ましくはアフィニティークロマトグラフィー及び/又はイオン交換クロマトグラフィー、並びにこれらの方法の組み合わせからなる群から選択される方法を使用して予備精製することができる。予備濾過は、孔径が70~200nmのフィルターによって実施することが好ましい。本発明の方法に供される試料のpHは6~10、好ましくは7~9、より好ましくは7.5~8.5、最も好ましくは約8であることが好ましい。本発明のある実施形態では、ウイルスフィルター表面1cm²当たり試料1~200ml、好ましくは1cm²当たり80~120mlが濾過される。

【0014】

本発明の方法により、パルボウイルスの少なくとも85%が溶出し、バキュロウイルスが少なくとも5log、すなわち、10×10⁵低下することが好ましい。

30

【0015】

定義

「ウイルス (virus)」又は「複数のウイルス (viruses)」という用語は、本明細書で使用される場合、天然に存在するウイルス又は遺伝子操作によって改変されたウイルス (すなわち、いわゆる組換えウイルス) だけでなく、ウイルス粒子、すなわち、感染性ウイルスと非感染性ウイルスの両方、国際公開第96/11272号によるパピローマウイルス (papillomavirus) 様粒子等のウイルス様粒子 (「VLP」)、並びに核酸を含有するが空であってもよいカプシド、及びその一部、特に、1つ又は複数の、好ましくは数個のサブユニット又はカプソメア、特にいくつかのカプソメアが会合して又は組み合わさってカプシドの少なくともおよそ50%、好ましくは少なくとも80%、特におよそ90%を構成するようなカプシドも包含する。混合物から除去されるウイルスは、特に、本質的に球状ではない桿状構造を有するが、医薬製品であるウイルスは、本質的に球状、好ましくは正二十面体の形状である。さらに、「ウイルス」という用語は、そのウイルスのビリオンの集団、好ましくはウイルスの均一な集団を指し得ることが理解される。したがって、「パルボウイルス」という用語は、パルボウイルスビリオンの集団、好ましくはパルボウイルスビリオンの均一な集団を指し得る。

40

【0016】

パルボウイルス科のウイルスは小さなDNAの動物ウイルスである。パルボウイルス科は、2つの亜科：脊椎動物に感染するパルボウイルス亜科 (Parvovirinae)

50

、及び昆虫に感染するデンソウイルス亜科 (Densovirinae) に分けることができる。パルボウイルス亜科のメンバーは、本明細書ではパルボウイルスと称され、ディペンドウイルス属を含む。それらの属の名称から推定することができる通り、ディペンドウイルスのメンバーは、通常、細胞培養物において増殖性感染するためにはアデノウイルス又はヘルペスウイルス等のヘルパーウイルスとの同時感染を必要とするという点で独特である。

【0017】

ディペンドウイルス属としては、通常ヒトに感染するアデノ随伴ウイルス (AAV) (例えば、血清型 1、2、3A、3B、4、5、及び 6) 又は霊長類に感染するアデノ随伴ウイルス (AAV) (例えば、血清型 1 及び 4)、及び他の温血動物に感染する関連ウイルス (例えば、ウシアデノ随伴ウイルス、イヌアデノ随伴ウイルス、ウマアデノ随伴ウイルス、及びヒツジアデノ随伴ウイルス) が挙げられる。現在では、少なくとも AAV-1、AAV-2、AAV-3、AAV-4、AAV-5、AAV-6、AAV-7、AAV-8 及び AAV-9 の血清学的に区別可能な種類を弁別することが可能である。AAV ベクターは、直径が 18 ~ 26 nm、一般には約 25 nm である外側の正二十面体の構造タンパク質の被膜を有する一本鎖の DNA を構成する。パルボウイルス及びパルボウイルス科の他のメンバーに関するさらなる情報は、Kenneth I. Berns、*Parvoviridae: The Viruses and Their Replication*、第 69 章、Fields Virology (第 3 版、1996) に記載されている。便宜上、本発明は、本明細書において AAV について言及することによってさらに例示及び説明されている。しかし、本発明は、AAV に限定されず、他のパルボウイルスに同等に適用できることが理解される。本発明は、野生型パルボウイルスに見いだされるサイズ (直径 18 ~ 26 nm) と同様のサイズも有するキメラカプシドタンパク質及び/又は AAV ハイブリッドウイルス (又はシュードタイピングされたウイルス) を含む AAV キメラウイルスにまで及ぶことも理解される。説明及びいくつかの例が WO 00 28 004 において示されている。AAV キメラウイルス及び/又はハイブリッドウイルスの例は、例えば、AAV2/1、AAV2/3、AAV2/4、AAV2/5、AAV2/5.2、AAV2/6、AAV2/7、AAV2/8 及び AAV2/9 である。

【0018】

AAV ゲノムは、ウイルスの複製のために必要なタンパク質をコードする rep 遺伝子及びウイルスの構造タンパク質をコードする cap 遺伝子からなる。複製のために必要である rep 遺伝子 (例えば、rep40、rep52、rep68 及び/又は rep78) 又はカプシド構造に必要である cap 遺伝子 (例えば、VP-1、VP-2 及び/又は VP-3) のうちの 1 つ又は複数を、例えば、アデノ随伴ベクターを調製する際にウイルス内で導入遺伝子と置き換えることができる。5' 末端及び 3' 末端になお存在する ITR 領域が、導入遺伝子を感染性組換え AAV 粒子にパッケージングするため及び組換え AAV ゲノムの DNA を複製するために、シス活性エレメントとして必要である (Kotelnik, R. M. (1994) Hum Gene Ther. 5 (7): 793-801)。「組換えパルボウイルスベクター又は組換え AAV ベクター」 (又は「rAAV ベクター」) とは、本明細書では、パルボウイルス又は AAV の末端逆位反復配列 (ITR) が隣接する対象のポリヌクレオチド配列、対象の遺伝子又は「導入遺伝子」を 1 つ又は複数含むベクターを指す。そのような rAAV ベクターは、AAV の rep 遺伝子産物及び cap 遺伝子産物 (すなわち、AAV の Rep タンパク質及び Cap タンパク質) を発現している昆虫宿主細胞に存在する場合、複製され、感染性ウイルス粒子にパッケージングされ得る。rAAV ベクターをより大きな核酸構築物 (例えば、染色体、又は、クローニング若しくはトランスフェクションのために使用されるプラスミド若しくはバキュロウイルス等の別のベクター) に組み込む場合には、rAAV ベクターは、一般には、「プロベクター (pro-vector)」と称され、AAV パッケージング機能及び必要なヘルパー機能の存在下での複製及びカプシド形成によって「レスキュー」することができる。

【0019】

「昆虫細胞」とは、本明細書で使用される場合、組換えパルボウイルス(rAAV)ベクターの複製を可能にし、また、培養物中で維持できる昆虫細胞を指す。例えば、使用する細胞株は、スポドプテラ・フルギペルダ(Spodoptera frugiperda)、ショウジョウバエ細胞株、又は蚊細胞株、例えば、セスジヤブカ(Aedes albopictus)由来細胞株に由来し得る。好ましい昆虫細胞又は細胞株は、例えば、Se301、SeIZD2109、SeUCR1、Sf9、Sf900+、Sf21、BTI-TN-5B1-4、MG-1、Tn368、HzAm1、Ha2302、Hz2E5、ハイファイブ(High Five)(Invitrogen、CA、USA)及びエクスプレスSF+(expresSF+)(登録商標)(米国特許第6,103,526号; Protein Sciences Corp.、CT、USA)を含めた、バキュロウイルスに感染しやすい昆虫種由来の細胞である。培養物中での昆虫細胞の成長条件、及び培養物中の昆虫細胞における異種性産物の産生は、当技術分野で周知であり、例えば、昆虫細胞の分子工学に関する以下の参考文献に記載されている。分子工学及び昆虫細胞におけるポリペプチドの発現の方法体系は、例えば、Summers and Smith, 1986, A Manual of Methods for Baculovirus Vectors and Insect Culture Procedures, Texas Agricultural Experimental Station Bull. No. 7555, College Station, Tex.; Luckow, 1991, In Prokop, Cloning and Expression of Heterologous Genes in Insect Cells with Baculovirus Vectors' Recombinant DNA Technology and Applications, 97-152; King, L. A. and R. D. Possee, 1992, The baculovirus expression system, Chapman and Hall, United Kingdom; O'Reilly, D. R., L. K. Miller, V. A. Luckow, 1992, Baculovirus Expression Vectors: A Laboratory Manual, New York; W. H. Freeman and Richardson, C. D., 1995, Baculovirus Expression Protocols, Methods in Molecular Biology, 39巻; 米国特許第4,745,051号; 米国特許出願公開第2003148506号; 及び国際公開第03/074714号に記載されている。

【0020】

[発明の詳細な説明]

組換えrAAVは、昆虫細胞において、昆虫細胞にAAVベクター及びrep機能及びcap機能を有する3つの組換えバキュロウイルスを感染させる、バキュロウイルススペースの発現系を用いて生産することができる。感染させた昆虫細胞を培養すると、AAV非構造タンパク質遺伝子及びAAV構造タンパク質遺伝子が発現され、導入遺伝子DNAが複製され、組換えAAV粒子(rAAV粒子)がパッケージングされ、アセンブリされる。rAAV粒子は、両末端がITR領域と隣接する対象の遺伝子産物(複数可)(導入遺伝子(複数可))を、一本鎖DNAの形態で含有する。同時に、組換えバキュロウイルスはこれらの細胞において複製され、このうちのいくらかは、一般に、数日後に感染細胞の溶解及び死をもたらす。生じたウイルス(バキュロウイルス及びrAAV粒子)は細胞培養上清に部分的に放出される、又は、溶解した細胞内に残る。この理由で、一般に、細胞を、当業者に公知の細胞破壊方法、例えば、交互に凍結融解することを用いて、又は、ウイルスの本質的に完全な放出を実現するために例えばトリプシンを用いた酵素による加水分解によって、又は界面活性剤溶解によって破壊する。

【0021】

バキュロウイルススペースの発現系等のウイルススペースの発現系を用いた、又はヘルパーウイルス系を用いたウイルスベクターの調製に伴う重大な不都合は、生産物のウイルス粒

10

20

30

40

50

子と生産物以外のウイルスとが混在する集団が形成され、その集団をさらに精製しなければならないことである。便宜上、「ヘルパーウイルス」という単語は、本明細書では、例えば、アデノウイルス若しくはヘルペスウイルス等の、AAVの生産に使用される「真の」ヘルパーウイルス、又はパキキュロウイルスのいずれかを示すために使用されるが、パキキュロウイルスが実際にヘルパー機能をもたらすのか、単にAAV遺伝子を昆虫細胞に送達するだけなのかは未だ不明である。遺伝子療法においてウイルスベクターを使用する場合、パキキュロウイルスには潜在的な病原性又は免疫原性があるので、混入パキキュロウイルスは回避されるべきである。

【0022】

したがって、本発明は、例えば、規制当局による認可を受けたパルボウイルス製品を得るために適した、工業的な規模での使用が技術的且つ経済的に実行可能であり、桿状のウイルス粒子及び本質的に球状のウイルス粒子を含むウイルス試料において、特に、桿状のウイルス粒子の直径がパルボウイルス粒子と同様である（すなわち、桿状のウイルス粒子が2次元では同様であるが、3次元では同様でなく、それよりも大きくなければならない）場合に、桿状のウイルスの減少、好ましくは枯渇を実証することができ、したがって、ヘルパーウイルスの潜在的な病原性及び/又は免疫原性が低下する分離/精製方法を提供する。2次元のサイズが同様である生産物以外のウイルスと生産物のウイルスとの混合物を濾過技法によって、好ましくは高レベルで分離することができることは困難であり可能性が低いことが当業者には理解される。

【0023】

したがって、第1の態様では、本発明は、一方のビリオンの集団が本質的に球状のビリオンを含み、他方のビリオンの集団が桿状のビリオンを含むことが好ましい試料中の2つのビリオンの集団を分離するための方法であって、両方のビリオンの集団を含む試料を、本質的に球状のビリオンのみが通過できるフィルターで濾過するステップを含む方法に関する。桿状のウイルスの縦横比は少なくとも4:1であることが好ましい。桿状のウイルスの直径と本質的に球状の直径の違いが12nmを超えないことも好ましい。本質的に球状のウイルスがパルボウイルスであること、及び桿状のウイルスがパキキュロウイルスであることが好ましい。特に、本発明は、パキキュロウイルスビリオンの集団からパルボウイルスビリオンの集団を分離するための方法であって、パルボウイルスビリオンの集団及びパキキュロウイルスビリオンの集団を含む試料を、パルボウイルスビリオンのみが通過できる

【0024】

「分離」という用語は、本明細書で使用される場合、分離される粒子の両方を試料から回収することを意味するものではない。「分離」という用語は、本明細書で使用される場合、桿状のウイルス粒子を試料から部分的又は完全に除去すること、したがって、本質的に球状のウイルス粒子の試料への桿状のウイルスの混入を減少させることを示す。したがって、分離とは、試料中の本質的に球状のウイルス粒子の精製を意味するものと理解される。パキキュロウイルスとパルボウイルスの場合では、「分離」という用語は、本明細書で使用される場合、パキキュロウイルスを試料から部分的又は完全に除去すること、したがって、パルボウイルスを含む試料中へのパキキュロウイルスの混入を減少させることを示す

【0025】

濾過とは、例えば、固体を、サイズが異なる固体から、又は流体から、媒体を間にはさんで、所与のサイズ限界を下回るサイズの固体のみ、又は流体のみが通過できるようにすることによって分離するために使用される物理的操作である。試料中のサイズが大きすぎる固体は供給液に保持される。フィルターを通過した固体を含む流体は、濾液又は透過液と称することができる。

【0026】

本発明に適用される「ウイルス除去」のプロセスは、「ウイルス濾過」としても公知の「濾過」によって行う。「ウイルス濾過」は、ウイルス混入物から医薬製品を、ウイルス

フィルター又は限外濾過膜等のフィルターによって分離することであると理解される。医薬製品自体もウイルス（遺伝子療法）ベクター等のウイルスであってもよいことが理解される。

【0027】

ウイルス濾過とは、公称孔径がナノメートル規模の膜を使用する濾過技術である。ウイルスフィルター及び限外濾過膜は、一般には、公称孔径が30ナノメートル～1マイクロメートルの範囲内である、又は分画分子量（MWCO）が10000～750000ダルトンの範囲内、好ましくは10000～500000ダルトンの範囲内、より好ましくは10000～100000ダルトンの範囲内である膜を含む。フィルターの種類の分類は、膜の構造、材料、及びベンダーに左右される。使用の種類によっても分類が決定される。限外濾過膜を接線流濾過（TFF）方式（クロスフロー濾過としても公知であり、再循環中、試料を含む供給流体がフィルターに対して平行であり、試料を含む供給流体の一部のみが透過産生物（permeate production）に使用され、供給流体の最大部分はフィルターを横切ることなくモジュールから出る）で使用することもでき、デッドエンドフィルターとして使用することもできる（試料の全てがフィルターを通過する）。用語は当業者には非常によく理解される。

【0028】

ウイルス濾過では、一般には、膜にかかる圧力差：0.02MPa～0.8MPa、好ましくは0.02MPa～0.1MPaの膜間圧（膜間の圧力損失）を用いる。圧力差は、試料に適用する（すなわち、ポンプによって）流速の影響を受ける可能性がある。フィルターをTFF方式で操作する場合、膜の前に保持液のラインを圧縮することにより、又は膜の後に（すなわち、透過液において）ポンプを使用することにより、試料に圧力をかけることによって膜間圧を調節することもできる。これらの操作は、当業者が容易に決定することができる。

【0029】

本発明の好ましい実施形態では、本質的に球状のビリオンの集団は、二十面体対称性を有し、直径がおよそ18～25nmのビリオンである。したがって、本発明の好ましい実施形態では、本質的に球状のビリオンの集団は、パルポウイルスビリオン、好ましくはアデノ随伴ウイルスの集団である。

【0030】

形状の「縦横比」とは、その形状の長い方の寸法と短い方との寸法の比率である。したがって、対称の物体については、ちょうど2つの測定値、例えば棒の長さ及び直径等によって説明される。本発明の他の実施形態のいずれかの代わりに、又はそれと組み合わせて、本発明の好ましい実施形態では、桿状のウイルスの縦横比は、少なくとも4：1、好ましくは少なくとも5：1、より好ましくは少なくとも6：1、少なくとも7：1、少なくとも8：1、少なくとも9：1、少なくとも10：1、少なくとも11：1、少なくとも12：1、又はおよそ13：1である。本発明の方法を用いて分離されるバキュロウイルス等の桿状のビリオンの集団では、ビリオンの直径が18～30nm、より好ましくは20～27nm、より好ましくは20～25nm、より好ましくは20～23nmであり、長さが70nm～300nm、好ましくは80nm～280nm、90nm～260nm、100nm～260nm、120nm～260nm、140nm～260nm、160nm～260nm、180nm～260nm、200nm～260nm、220nm～260nm、240nm～260nmであることが好ましい。ビリオンの直径が20～23nmであり、長さが180～280nmであること、特に、直径が約20nmであり、長さが約120～260nmであることがより好ましい。

【0031】

本発明の桿状のビリオンの集団は、バキュロウイルス科に属するビリオンの集団であることが好ましい。バキュロウイルス科という名称は、それらのビリオンが桿状であることが理由で提唱され、ラテン語の杖（baculum）＝杖（cane、walking stick、staff）に由来する。最もよく研究されたバキュロウイルスは、非対称

形状であり、直径がおよそ20 - 120 ~ 260 nm (すなわち、2次元ではおよそ20 nmであり、3次元ではおよそ120 ~ 260 nmである、或いは、より好ましくは、直径がおよそ20 nmであり、長さがおよそ120 ~ 260 nmであると表される)であるアウトグラフィ・カリフォルニカ単核多角体病ウイルス (AcMNPV) である。バキュロウイルス科の属に分類されるウイルスは、アルファバキュロウイルス (Alphabaculovirus)、ベータバキュロウイルス (Betabaculovirus)、デルタバキュロウイルス (Deltabaculovirus) 及びガンマバキュロウイルス (Gammabaculovirus) であり、それらのそれぞれのメンバーは、鱗翅目 (Lepidopteran) NPV、鱗翅目 (Lepidopteran) GV、膜翅目 (Hymenopteran) NPV 及び双翅目 (Dipteran) NPV である。いくつかのバキュロウイルスはゲノム長が異なることが決定されているので、カプシド長は、80 kb ~ 160 kb で変動するゲノム長に応答して柔軟性がある可能性があることが示唆される。本明細書の他の箇所では定義されているパルボウイルスビリオンの集団から本発明の方法を用いて分離できるバキュロウイルスの例が表1に提供される (Baculovirus Molecular Biology by G. F. Rohrmann; 第2版; 2011年1月26日; 第1章: 「Introduction to the baculoviruses and their taxonomy」に基づく)。

【0032】

【表 1】

表1.選択されたバキュロウイルスのゲノムサイズ及び予測されるORF含有量*

ウイルス型	ウイルスの名称	参考文献	サイズ (kb)	Orf(>50アミノ酸)
群I(メンバー数12)**	EppoMNPV	Hyink O. et al.; J Gen Virol. 2002;83(Pt 4):957-71. [PubMed]	119	136
	AnpeNPV	Fan Q. et al.; Virology. 2007;366(2):304-15. [PubMed]	126	145
	AcMNPV	Ayres M.D. et al.; Virology. 1994;202:586-605. [PubMed]	134	~150
群II(メンバー数16)	AdhoNPV	Nakai M. et al.; Virology. 2003;316(1):171-83. [PubMed]	113	125
	SeMNPV	Ijkel W.F.J. et al.; J. Gen. Virol. 1999;80:3289-3304. [PubMed]	136	139
	AgseNPV	Jakubowska A.K. et al.; J Gen Virol. 2006;87(Pt 3):537-51. [PubMed]	148	153
	LdMNPV	Kuzio J. et al.; Virology. 1999;253:17-34. [PubMed]	161	163
	LeseNPV	Xiao H., Qi Y.; Virus Genes. 2007;35(3):845-56. [PubMed]	168	169
GV(メンバー数10)	AdorGV	Wormleaton S., Kuzio J., Winstanley D.; Virology. 2003;311(2):350-65. [PubMed]	100	119
	CrleGV	Lange M., Jehle J.A.; Virology. 2003;317(2):220-36. [PubMed]	111	124
	CpGV	Luque T. et al.; J Gen Virol. 2001;82(Pt 10):2531-47. [PubMed]	124	143
	XecnGV	Hayakawa T. et al.; Virology. 1999;262:277-297. [PubMed]	179	181
膜翅目NPV(メンバー数3)	NeleNPV	Lauzon H.A. et al.; J Gen Virol. 2005;86:945-61. [PubMed]	82	89
	NeabNPV	Duffy S.P. et al.; J Virol. 2006;80(14):6952-63. [PubMed]	84	93
	NeseNPV	Garcia-Maruniak A. et al.; J Virol. 2004;78(13):7036-51. [PubMed]	86	90
双翅目NPV(メンバー数1)	CuniNPV	Afonso C.L. et al.; J Virol. 2001;75:11157-65. [PubMed]	108	109

*40超のゲノム配列(2008)から選択される;**括弧内の数はカテゴリー内のゲノムの総数を示す;群Iは、鱗翅目NPVの2つの主要な系列のうちの1つであり、異なるエンベロープ融合タンパク質、gp64を使用することで他のバキュロウイルスと区別される。いくつかの他の遺伝子もこの系列に独特である;群2は鱗翅目NPVの2つの主要な系列のうちの1つであり、メンバーは、融合タンパク質(F)を使用して感染を開始すると考えられている;GVは顆粒病ウイルスであり、これは鱗翅目に対して病原性のバキュロウイルスの系列であり、通常、卵形の包埋体ごとに単一のビリオンを有する;NPVは核多角体病ウイルスであり、これは最も広く分布している種類のバキュロウイルスである。NPVは、核内で複製され、通常、2つ以上のビリオンを含有するポリヘドロン状の包埋体を生成する。

【0033】

本発明の好ましい実施形態では、バキュロウイルスビリオンの集団は、アウトグラフィ・カリフォルニカマルチカプシド核多角体病ウイルス(AcMNPV)の集団である。アウトグラフィ・カリフォルニカの多数の核多角体病ウイルス(AcMNPV)はAAV生産系において選択されるバキュロウイルス種である。AcMNPVは最も研究されたバキュロウイルスである。このウイルスは、最初にアルファルファシャクトリムシ(鱗翅目)から単離されたものであり、154個のオープンリーディングフレームを伴う134kbpのゲノムを含有する。主要なカプシドタンパク質VP39はいくつかの副次的なタンパク質と一緒に、p6.9タンパク質を伴うDNAを封入する桿状ヌクレオカプシド(21nm×260nm)を形成する。バキュロウイルス媒介性AAV生産プロセスでは、AA

10

20

30

40

50

V複製について現在スクリーニングされている遺伝子のうち7種がバキュロウイルス複製に関連すると思われる(lef-1、lef-2、lef-11、dna-pol、lef-3、lef-7、及びdbp)、3種がトランス活性化因子(p35、ie-1、ie-2)をコードすると説明されている。

【0034】

本発明の好ましい実施形態では、桿状のビリオンの直径と本質的に球状のビリオンの直径の違いは、サイズで12nm未満、好ましくは11nm未満、10nm未満、9nm未満、8nm未満、7nm未満、6nm未満、5nm未満であり、それによって球状ビリオンの直径が2つのうちの大きい方であることが好ましい。したがって、例えば、パルボウイルスビリオンの集団を、バキュロウイルスビリオンの集団、好ましくはアデノ随伴ウイルスから分離する本発明の好ましい実施形態では、パルボウイルス(例えば、AAV)の直径とバキュロウイルスの直径(2次元で)の違いは5nm未満であるので、2種類のビリオンは部分的に同様のサイズである。

【0035】

本発明において使用するためのフィルターは、公称孔径が、桿状のウイルスの直径(すなわち、桿状のウイルスの長さではなく短い方の寸法の直径)の1.2~3.3倍であることが好ましい膜である。異なるフィルター製造者に使用される「孔径」、「除去率」、「有効サイズ」、「公称孔径」又は「特定の最小サイズを有する粒子の除去を可能にする孔径」という用語は、本発明の目的では等価の用語であり、本明細書では互換的に使用することができる。

【0036】

膜は、桿状のウイルスの直径の少なくとも1.3倍、1.4倍、1.5倍であるが、桿状のウイルスの直径の3.2倍未満、3.1倍未満、3.0倍未満、2.9倍未満、2.7倍未満、2.5倍未満、2.3倍未満、2.1倍未満、1.9倍未満、1.8倍未満である孔径を有することが好ましい。膜は桿状のウイルスの直径の1.6~1.7倍である孔径を有することがより好ましい。好ましい実施形態では、本発明の方法において使用するためのフィルターは30~70nmの孔径、より好ましくは30~60nmの孔径、より好ましくは30~50nmの孔径、より好ましくは30~40nmの孔径、より好ましくは32~38nmの孔径、より好ましくは34~36nmの孔径、最も好ましくは35nmの孔径を有する。35nmの孔径を有するウイルスフィルターの例は、例えば、Asahi-Kasaiプラノバ35N膜(www.planovafilters.com)である。別の好ましい実施形態では、本発明の方法において使用するためのフィルターは、ウルチポア(商標)VF Grade DV50ウイルス除去フィルター(Pall Corp.; www.pall.com)である。

【0037】

好ましい実施形態では、本発明において使用するためのフィルターは、ウイルスフィルター又は限外濾過膜である。ウイルスフィルターは、一般には、細孔のサイズがナノメートル規模のフィルターである。ウイルスフィルターは、細孔のサイズがナノメートル規模であり、繊維内の細孔が非対称であり、それにより特定のサイズの粒子が捕捉され、それよりも小さな粒子はフィルターを通過するようなフィルターであることが好ましい。本発明において使用することができるウイルスフィルターの例は、35Nプラノバ膜である。限外濾過膜の例は、ペリコン2(Pellicon2)又はペリコン3(Pellicon3)(Millipore)、ザルトコン(Sartocoon)(Sartorius)及びセントラセット(Centracette)(Pall)である。

【0038】

本発明の好ましい実施形態では、フィルター、例えば、35Nプラノバフィルターでは、形態が異なるウイルスを識別するために表面機構若しくは深層機構又はその2つの組み合わせを使用する。表面濾過は孔径に基づき、濾過の間、直径が細孔の直径よりも大きい粒子がフィルターの「流入」側面の表面に保持され、「ケーキ」が形成されることを伴う。対照的に、深層濾過では、個々の繊維層の組成に起因して粒子はフィルター媒体の内側

10

20

30

40

50

にトラップされる。一般には、流入側面の層は粗い繊維からなり、流出側面の層は細かい繊維からなる。デプスフィルターは、粒子を、単に媒体の表面だけでなく媒体全体を通して保持するために多孔質濾過媒体を使用するフィルターの種類である。これらのフィルターは、一般に、他の種類のフィルターと比較して、目詰まりする前に大きな質量の粒子を保持することができるので、濾過される流体が高負荷量の粒子を含有する場合に使用される。

【0039】

「フィルター膜」とは、全てのフィルターにおいて、ふるいを行う実際のフィルター材料を意味すると理解されることに留意する。使用するフィルター膜は、優先的に、再生セルロース、例えば、銅アンモニア再生セルロース、例えば、好ましくは銅アンモニア再生セルロース中空系等で構成されることが有利であるが、他の適切な材料は、ポリフッ化ビニリデン、ポリテトラフルオロエチレン、ポリプロピレン、修飾若しくは非修飾ポリエーテルスルホン、酢酸セルロース、硝酸セルロース又はポリアミドである。サイズがおおよそ40～400nmの粒子の除去を可能にする孔径を有するそのような膜の例は、公称孔径がおおよそ50nm又は20nmであるPall GmbH、63303 DreieichからのウルチポアVF膜、公称孔径がおおよそ15nm、19nm、35nm又は72nmであるAsahi Chemical Industry Ltd.、Tokyo、JapanからのAsahi Chemicalベンベルグ(Bemberg)微細孔性膜、又は他の製造者、すなわち、Sartorius AG、37075 Göttingen又はSchleicher及びSchuell GmbH、37582 Dasselからの対応する膜である。本発明の好ましい実施形態では、フィルターは、銅アンモニア再生セルロース、ポリフッ化ビニリデン、ポリスルホン、ポリテトラフルオロエチレン、ポリプロピレン、修飾若しくは非修飾ポリエーテルスルホン、酢酸セルロース、硝酸セルロース、ポリアミド又は再生セルロースを含み、フィルターは、銅アンモニア再生セルロース中空系又はポリフッ化ビニリデンを含有することが好ましい。

【0040】

本発明の方法は、バキュロウイルスビリオンの集団からパルボウイルスビリオンの集団を精製するために特に適している。実際、rAAV粒子とバキュロウイルスを分離するための本発明の方法では、孔径が35nmであるウイルスフィルター、例えば、Asahi-Kasai プラノバ35N膜が特に有利である。これらのフィルターにより、特に、少なくとも5log10の感染性バキュロウイルスを混合集団から本質的に定量的除去することの実現だけでなく、おおよそ90%超のrAAV粒子の高収量の実現も可能になる。

【0041】

桿状のウイルスの力価の低下、すなわち、除去されるウイルスの力価が低下する因子は、少なくとも5log、例えば、rAAVビリオンと 10×10^5 個のバキュロウイルスビリオンが混在する集団を本発明の方法に従って分離した後に、バキュロウイルスビリオンが濾液中に検出されないことが好ましい。本発明の方法によって実現される桿状のウイルスの力価の低下は、少なくとも5.5log、少なくとも6log、少なくとも6.5log、少なくとも7log、少なくとも8log、少なくとも9log、最も好ましくは少なくとも10logであることが好ましい。力価は、例えば、50%組織培養感染量(TCID₅₀)アッセイ等の、当技術分野で公知の一般的な方法によって決定することができる。例えば、試料中のバキュロウイルスビリオンの集団の感染性バキュロウイルスの力価は、TCID₅₀アッセイを使用して決定することができる。この方法は、陽性対照試料において、単層のSf9昆虫細胞を感染性バキュロウイルスに感染させることに基づく。陽性対照試料の培養培地中の段階希釈を用いて細胞を感染させる。細胞を+28で7日間インキュベートする。その後、上清を、単層のSf9昆虫細胞を伴う新しく調製したプレートに移し、+28で7日間インキュベートする。感染が進行するにしたがい、感染細胞は互いに、及びプレート表面に付着したままになっていることができなくなり、付着していない細胞が形成される、すなわち、細胞変性効果(CPE)が示され、これは、顕微鏡レベルで観察することができる。log10 TCID₅₀/mLにおける力価を、

Spearman - Karber 方法を用いて算出する。

【0042】

本発明の方法を用いて本質的に球状のビリオンの集団の少なくとも60%、65%、70%、75%、80%、85%、87%、90%、93%、95%、97%、99%が回収されることが好ましい。したがって、本質的に球状のビリオンの集団の少なくとも60%、65%、70%、75%、80%、85%、87%、90%、93%、95%、97%、99%が溶出液（又は透過液）中に回収されることが好ましい。

【0043】

本発明の好ましい実施形態では、2つ以上のフィルターを通して試料を濾過する。

【0044】

分離しようとするビリオンの集団を含む試料は、一般には、ウイルススペースの発現系由来、例えば、AAVビリオンを生産するための昆虫細胞培養物由来の培養上清（例えば、培養培地）、AAVビリオンを生産するためのウイルススペースの発現系由来の昆虫細胞、又は培養上清と昆虫細胞との組み合わせである。試料を本発明の方法において使用する前に凍結融解サイクルに供することが好ましい。試料を本発明の方法において使用する前に予備精製することがより好ましい。これにより、本質的に球状のビリオン（例えば、パルボウイルスビリオン、好ましくはAAV）の集団の濾過にわたる収量が増加し、これは、フィルターの寿命に関しても有利であると考えられる。したがって、好ましい実施形態では、試料は細胞性混入物を含まない。

【0045】

したがって、好ましい実施形態では、上記方法は、ビリオンの集団を含む試料を、例えば、遠心分離、1つ又は複数の密度勾配、予備濾過及び/又はクロマトグラフィーによって予備精製することを含む。試料が、例えばrAAV培養物の上清である場合には、試料を、例えば、より大きな粒子が除去され、濾液中にバキュロウイルス及びrAAV粒子が保持されるように予備濾過することによって予備精製することが好ましい。予備濾過は、以下により詳細に記載されている通り、上記のビリオンの集団の実際の分離の前に行うことが有利である。好ましい実施形態では、試料を、密度勾配、予備濾過、クロマトグラフィーステップ、好ましくはアフィニティークロマトグラフィー及び/又はイオン交換クロマトグラフィー、並びにこれらの方法の組み合わせからなる群から選択される方法を用いて予備精製する。そのような精製方法の例としては、Brumentら、2002 Molecular Therapy、Kaluduvら、2002 Human Gene Therapy、Potterら、2002 Methods in Enzymology及びCecchiniら、2010 Human gene therapyが挙げられる。予備精製は、密度勾配並びに1つ又は複数の予備濾過及び/又は遠心分離ステップを含むことが好ましい。予備精製は、1回又は複数回の予備濾過を1つ又は複数のクロマトグラフィーステップと組み合わせて含むことが好ましい。

【0046】

分離しようとするビリオンの集団を通過させるが、それよりも大きな不純物は保持することが可能になる1つ又は複数の膜フィルターを使用して試料を予備精製することは特に好適である。一般に、予備精製により、その後の桿状のビリオンの集団と本質的に球状のビリオンの集団との分離をもたらす、本発明の方法において使用されるフィルターが目詰まりすることが防止される、又はより難しくなる。ビリオンの集団を分離している間のフィルターの目詰まりは、試料を本発明の方法に供する前に除去されていない、又は適切に除去されていない試料中のウイルス培養物の構成物によって起こり得る。そのような構成物を適切に除去するためには低スピードでの遠心分離では不十分であり、したがって、フィルターの目詰まりを最小限にするためには試料をさらに予備精製することが好ましい。

【0047】

予備精製は予備濾過によって行うことが好ましい。AAV及びバキュロウイルスを含み、本発明の方法に供される試料を予備精製するための膜フィルターは70~200nm、より好ましくは80~180nm、90~150nm、100~130nmの孔径を有す

10

20

30

40

50

ることが好ましい。例えば、孔径がおよそ100nmの膜フィルター、例えば、ウルチポアN66(Ultipor N66)フィルター(Pall GmbH、63303 Dreieich)等が、rAAV粒子とバキュロウイルスとが混在する集団を予備精製するために特によく適している。したがって、好ましい実施形態では、予備濾過は、孔径が70~200nmのフィルターによって実施する。

【0048】

予備精製のための適切な方法及び手段は、本発明の方法において、上記の通り、また当業者が試験することができる通りパルボウイルスビリオンの集団とバキュロウイルスビリオンの集団とを分離するために使用されるフィルターに左右される。予備精製後の状態は以下のようにならなければならない。1) フィルターは完全なままであり、2) パルボウイルスは安定であり、3) 塩濃度は生理的なものに近く、且つ4) フィルターにかかる圧力損失は、それによってパルボウイルス(例えば、AAV)が「溶解」し、したがって、機能的でなくなるほどは大きくない。

【0049】

別の好ましい実施形態では、試料のpHは6~10、好ましくは7~9、より好ましくは7.5~8.5、特におよそ8.0である。必要であれば、試料のpHを、適切な緩衝液、例えば、トリス/HCl緩衝液(トリス(ヒドロキシメチル)アミノ-メタン)を用いて調整して、上に明記されているpHにする。試料のpHは、濾過後のAAVの好収量をもたらされるので、約8.0であることが好ましい。

【0050】

本発明の好ましい実施形態では、試料のpHは、AAVが安定であることを確実にするために、6~8.5(本質的に生理的)である。pHがこの範囲内である緩衝液は、好ましくは、特定のパルボウイルスに適した伝導率(conductivity)も有すべきである。一般には、必要な伝導率は、AAVの血清型及び導入遺伝子に左右される。当業者は、場合ごとに適切な緩衝液を決定することができる。一般には、バックグラウンド伝導率は、生理的伝導率、すなわち137mMのNaClと同等であるべきである。適切な緩衝溶液の例はMES、Trizma、ビス-トリス、HEPES、PBS及びビス-トリスプロパンである。

【0051】

好ましい実施形態では、フィルター表面1cm²当たり試料少なくとも0.5ml、好ましくは1cm²当たり1~100mlが濾過される。しかし、これは、分離しようとする試料中のウイルスの純度及び濃度に大きく左右され、また、大部分の事象において濾過は下流のプロセスの最後に適用されるので、1cm²当たり1L超を濾過することができる。任意の他の好ましい実施形態の代わりに、又は任意の他の好ましい実施形態と組み合わせ、本発明の好ましい実施形態では、フィルター表面1cm²当たり少なくとも1~10ml、好ましくは1~5ml、特に約1.5mlの試料が濾過される。一般に、これにより、例えば、バキュロウイルスの除去を同時に実現しながら、rAAV粒子の高収量が実現される。

【0052】

したがって、本発明は、本質的に球状のビリオンの集団と桿状のビリオンの集団との分離/精製を単純かつ安価な様式でもたらす方法を提供し、該方法は工業的な規模で適用できる。本発明の方法は、特に穏やかな条件下で用いることができ、本質的に球状のビリオンを高収量でもたらし、同時に桿状のビリオンを減少させる、さらには濾液から排除する。本発明のさらなる利点は、本発明に従って精製されたビリオンは、他のウイルス、例えば、バキュロウイルスを適切に含まないのので、例えば、遺伝子療法用のウイルスベクターとして直接使用できることである。バキュロウイルスDNAのわずかな残留画分が濾液中に残っている可能性があるが、このDNAは、複製コンピテントバキュロウイルスには関連せず、一緒にパッケージングされたrAAV内のDNAに関連し、したがって、これは感染性バキュロウイルスを表さない。

【0053】

好ましい実施形態では、例えば遊離のバキュロウイルスタンパク質及びウイルス成分粒子等のバキュロウイルス構成物は、本発明の方法によって減少する。これは、これらの構成物は、ウイルスベクターが遺伝子療法において使用された際に患者において非特異的な免疫応答を誘導しうるので、特に有利である。

【0054】

上記の実施形態の代わりに、又はそれと組み合わせて、本発明の方法を、例えば、2種以上の異なるバキュロウイルスのベクターを使用してバキュロウイルス発現系を使用し、したがって、多数の種類のパキュロウイルスビリオンをもたらす場合等の、3種以上の異なるビリオンの集団を分離するために適用できることは本発明の実施形態である。上記の本発明の方法を用いて、パルボウイルスビリオン集団からバキュロウイルス集団を分離することができる。したがって、本発明は、ビリオンの集団を含む試料を、本質的に球状のビリオンのみが通過できるフィルターで濾過するステップを含む、試料中の少なくとも2つのビリオンの集団を分離するための方法であって、1つ又は複数のビリオンの集団が本質的に球状のビリオンを含み、1つ又は複数の他のビリオンの集団が桿状のビリオンを含むことが好ましい方法にも関する。

【0055】

本文書及びその特許請求の範囲では、「含む (to comprise)」という動詞及びその活用は、その単語の次に続く項目が含まれるが、具体的に言及されていない項目が排除されるものではないということを意味する、非限定的な意味で使用されている。さらに、不定冠詞「a (1つの)」又は「an (1つの)」によって要素に言及することにより、文脈がたった1つのその要素があるということを明らかに必要としている場合を除き、その要素が2つ以上存在する可能性は排除されない。したがって、不定冠詞「a (1つの)」又は「an (1つの)」とは、通常、「少なくとも1つの (at least one)」を意味する。

【0056】

本明細書において引用されている全ての特許及び文献参照は、その全体が参照により本明細書に組み込まれる。

【0057】

以下の実施例は、単に例示的な目的で提供されており、いかなる形でも本発明の範囲を限定するものではない。

【図面の簡単な説明】

【0058】

【図1】ウイルス濾過中のGC及びTPの回収率を示すグラフである。この図には、試料の体積、膜の使用後洗浄液及び上述の一定分量のプールに対して行った補正を含めた回収率がゲノムコピーの%インプット及び濾液の全粒子として示されている。

【図2】ウイルス濾過中のバキュロウイルスの減少を示すグラフである。この図には、バキュロウイルススパイク材料、ウイルスフィルター供給液（スパイクAIEX溶出液）、濾過体積（xmL）に応じたナノ濾液、並びにウイルスフィルター濾液及びウイルスフィルター洗浄液の最終的なプールのTCID₅₀によって測定されたバキュロウイルスの力価が示されている。濾液及び最終的なプールは、アッセイではバキュロウイルスに関して十分な陽性が生じなかったので最大の可能性のある力価である。

【実施例】

【0059】

実施例1

Urabeら、2002 (Hum. Gene Ther 13 (16): 1935 - 1943) によって以前に記載されている通り、昆虫細胞に3つの組換えバキュロウイルスを感染させた後に、アデノ随伴ウイルスベクター (AAV) を生産した。

感染させた3日後に細胞培養物を界面活性剤により溶解させ、その後、9U/mLのベンゾナーゼ (Benzonase) (Merck) を添加することによってヌクレアーゼ処理し、製造者の推奨でインキュベートした。

【 0 0 6 0 】

その後、粗製の溶解したバルクをポールプロファイル（Pall Profile）（登録商標）スター（Star）及びポールスボール（Pall Supor）（登録商標）フィルター（Pall Corporation）を順番に用いて濾過することによって清澄化した。界面活性剤の存在下、少なくとも28 でウイルス減少インキュベーションを実施した。この材料をAVBセファローズHP（AVB Sepharose HP）、GE Healthcareを使用してアフィニティークロマトグラフィーによって精製した。簡単に述べると、濾過した細胞溶解物を直径20cmのカラム（BPG200/500、GE Healthcare、ベッドの高さおよそ6cm）に、1時間当たり150cmの線速度で適用した。UV吸収曲線がベースラインに戻り、安定化するまで、カラムをリン酸緩衝生理食塩水で洗浄した。吸着したrAAV粒子を酸性培地（HClを用いてpH3.0に調整した50mMのクエン酸ナトリウム）に溶出させ、カラム溶出液をすぐに1/10体積の1Mトリス・Cl（pH8.0）を用いて調整した。

10

【 0 0 6 1 】

この中和された溶出液に、Uraべら（2002；上記）によって以前に記載されている通り製造された10%v/vのバキュロウイルススパイクを清澄化した後に加えて、1900gで15分遠心分離し、0.2μmのボトルトップフィルター（Corning）で濾過することによって、ウイルスフィルターに供給するための、バキュロウイルスとAAVとが混在する集団を用意した。

20

【 0 0 6 2 】

使用する前に、プラノバ35Nフィルターを製造推奨に従って調製した。簡単に述べると、保存液を除去し、60mMのトリス/HCl、pH8.0を40ml添加することによって全てを空気パージし、フラッシング手順を製造推奨に従って実施した。

【 0 0 6 3 】

ウイルスフィルターへの供給流速を、蠕動ポンプを使用して製造推奨の通り1分当たり5mlに設定した（表2参照）。ウイルス濾過中、供給圧力及び透過流をモニターした（表2参照）。

【 0 0 6 4 】

【表2】

表2:ウイルス濾過性能

30

処理時間 (分)	ポンプ スピード (rpm)	供給 圧力 (mBar)	処理体積 (mL)	透過流 (1分 当たりmL)
0	3	160	0	5
10	3	160	50	5
20	3	160	100	5
30	3	160	150	5
40	3	160	200	5
50	3	160	250	5
60	3	160	300	5
70	3	160	350	5
80	3	160	400	5

40

【 0 0 6 5 】

濾液50ml、250ml及び400mlを取得した後に、Sf9細胞株を使用した感染性バキュロウイルスに対するTCID₅₀アッセイによってバキュロウイルスを滴定するために試料を収集した。結果は、接種された組織培養Sf9細胞の50%において細胞変性効果を生じさせるために必要なウイルスの量を示すTCID₅₀：50%組織培養感染量で示されている。

【 0 0 6 6 】

濾液のうち約1mlの試料を取得し、これらをAAVにおける対象の遺伝子のゲノムコ

50

ピー（以後GCと称される）、及びAAVの全粒子（以後TPと称される）について分析して、それらの関連する回収率をモニターした。GC及びTPの分析は下記の通り実施した。

【0067】

試料のゲノムコピー濃度を決定するために、試験試料の10倍段階希釈物及び必要条件を満たした標準試薬を調製し、外来性DNAをDNase消化によって除去し、カプシド形成したDNAをプロテイナーゼK消化によって遊離させる。次いで、放出されたウイルスDNAを、マグネシルブルー（MagneSil Blue）（登録商標）を使用して精製した。その後、ベクターのゲノム配列に特異的なプライマーを使用した定量的PCR（Q-PCR）を用いてDNAを増幅する。色素であるサイバーグリーン（SYBR green）に結合する蛍光DNAを含めることによってDNA増幅をリアルタイムでモニターする。試料中に存在するDNAの量は、試験試料について見いだされるCt値と標準試薬について見いだされるCt値を比較することによって算出することができる。平行線検定（parallel-line-assay）設計を使用して、試験試料の段階希釈物を、必要条件を満たした標準試薬と対照して試験し、それにより比率をもたらす。この比率を、標準試薬のゲノム含有量を使用してゲノムコピー濃度（gc/mL）に変換する。

10

【0068】

AAV粒子の総数（正確なゲノムを含有する完全な粒子（ベクター粒子）並びに空の粒子の両方）を、ゲル濾過クロマトグラフィーを用いて決定する。ゲル濾過HPLCを、バイオベーシックSEC-1000（BioBasic SEC-1000）（Thermo Electron Corporation）を1分当たり1mLの流速で使用し、D-PBSの水相を用い、25℃で実施する。214nmにおけるUV吸収を用いて溶出をモニターする。試験試料のピーク面積を、1mL当たりのAAV粒子の量が既知である必要条件を満たした標準試薬の校正曲線を使用して数量化する。

20

【0069】

プラノバ35Nフィルターを、製造品説明書の通り60mMのトリス/HCl、pH8.0を10mL使用して洗浄した。洗浄液を濾液と一緒にプールし、TCID₅₀アッセイによるバキュロウイルスの感染力価のために試料を採取した。洗浄液を、濾液材料と一緒にプールする前に、後でGC及びTPの力価を決定するために試料採取した。濾液及び洗浄のプールを、手動で混合して、均一性を確実にし、後でGC及びTPの力価を決定するために試料採取した。TP及びGCの力価から回収率を算出し、それが図1に示されている。

30

【0070】

試料の感染性バキュロウイルスの力価を、50%組織培養感染量（TCID₅₀）アッセイを用いて決定する。この方法は、単層のSf9昆虫細胞を試験試料中の感染性バキュロウイルスに感染させることに基づく。試験試料の培養培地中の3倍段階希釈物を使用して、細胞を8重に感染させる。プレートを+28℃で7日間インキュベートする。その後、上清を新しく調製したプレートに移し、+28℃で7日間インキュベートする。感染が進行するにしたがい、感染細胞は互いに、及びプレート表面に付着したままになっていることができなくなり、付着していない細胞が形成される、すなわち、細胞変性効果（CPE）が示され、これは、顕微鏡レベルで観察することができる。log₁₀ TCID₅₀/mLにおける力価を、Spearman-Kärber方法を用いて算出する。

40

【0071】

結果

バキュロウイルスの滴定についての結果が図2に示されている。

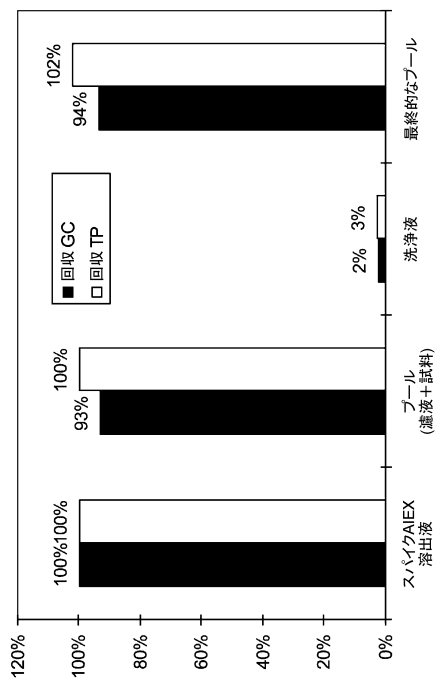
【0072】

スパイク溶液の感染性バキュロウイルスの力価は、8.1 log₁₀ TCID₅₀/mLである。10%のスパイク溶液を加えたスパイクAIEX溶出液は7.62 log₁₀ TCID₅₀/mLである。ナノ濾液のTCID₅₀値は少なくとも6 log減退し、こ

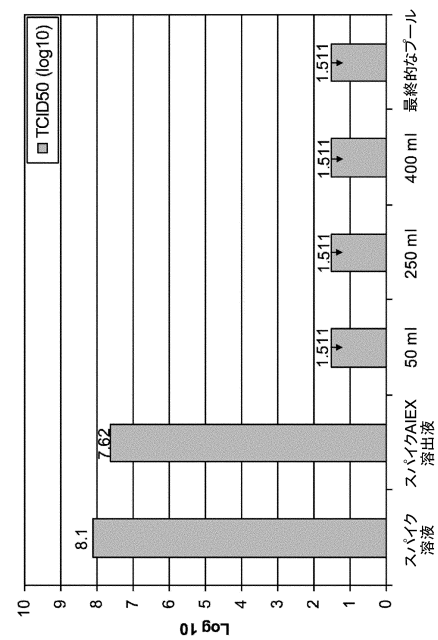
50

の特定のアッセイの数量化のレベルである $1.511 \log_{10} \text{TCID}_{50} / \text{mL}$ を下回る。したがって、ナノ濾過によりバキュロウイルスが少なくとも $6 \log$ の減少し、したがって、ナノ濾過は、2次元のサイズが同等である2種のウイルスを識別するために実行可能な単位操作である。

【図1】



【図2】



フロントページの続き

(74)代理人 100165526

弁理士 阿部 寛

(72)発明者 エルメンス, ヴィルヘルムス テオドルス ヨハネス マリア クリスティアーン
オランダ, エヌエル - 1105 ビーエー アムステルダム, マイベルグドレーフ 61

(72)発明者 スミス, ジェームズ パトリック
オランダ, エヌエル - 1105 ビーエー アムステルダム, マイベルグドレーフ 61

審査官 川合 理恵

(56)参考文献 国際公開第2010/148143(WO, A1)

特表2001-513644(JP, A)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12N 7/00 - 7/08

B01D 61/00 - 71/82

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)

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