

【公報種別】特許法第 17 条の 2 の規定による補正の掲載

【部門区分】第 1 部門第 1 区分

【発行日】令和 2 年 3 月 26 日 (2020.3.26)

【公表番号】特表 2019-509745 (P2019-509745A)

【公表日】平成 31 年 4 月 11 日 (2019.4.11)

【年通号数】公開・登録公報 2019-014

【出願番号】特願 2018-550782 (P2018-550782)

【国際特許分類】

C 1 2 N 15/864 (2006.01)

C 1 2 N 7/01 (2006.01)

A 6 1 K 38/46 (2006.01)

A 6 1 K 48/00 (2006.01)

A 6 1 K 35/76 (2015.01)

A 6 1 K 38/30 (2006.01)

A 6 1 K 38/28 (2006.01)

A 6 1 K 38/26 (2006.01)

A 6 1 K 38/27 (2006.01)

A 6 1 K 38/29 (2006.01)

A 6 1 K 38/24 (2006.01)

A 6 1 K 38/20 (2006.01)

A 6 1 K 38/36 (2006.01)

A 6 1 K 38/37 (2006.01)

【F I】

C 1 2 N 15/864 1 0 0 Z

C 1 2 N 7/01

A 6 1 K 38/46

A 6 1 K 48/00

A 6 1 K 35/76

A 6 1 K 38/30

A 6 1 K 38/28

A 6 1 K 38/26

A 6 1 K 38/27

A 6 1 K 38/29

A 6 1 K 38/24

A 6 1 K 38/20

A 6 1 K 38/36

A 6 1 K 38/37

【手続補正書】

【提出日】令和 2 年 2 月 13 日 (2020.2.13)

【手続補正 1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

組換えアデノ随伴ウイルス (r A A V) ベクター粒子を精製するための方法であって、
(a) r A A V ベクター粒子を含む細胞及び細胞培養上清を回収して、回収物を製造す

るステップと、

(b) 任意選択でステップ(a)で製造された前記回収物を濃縮して、濃縮された回収物を製造するステップと、

(c) ステップ(a)で製造された前記回収物又はステップ(b)で製造された前記濃縮された回収物を溶解して、溶解物を製造するステップと、

(d) ステップ(c)で製造された前記溶解物を処理して、前記溶解物中の混入核酸を減少させ、それにより核酸が減少した溶解物を製造するステップと、

(e) ステップ(d)で製造された前記核酸が減少した溶解物を濾過して、清澄化された溶解物を製造し、任意選択で前記清澄化された溶解物を希釈して、希釈され清澄化された溶解物を製造するステップと、

(f) ステップ(e)で製造された前記清澄化された溶解物又は希釈され清澄化された溶解物を、アニオン交換カラムクロマトグラフィーに供して、rAAVベクター粒子で構成されるカラム溶出物を製造し、任意選択で前記カラム溶出物を濃縮して、濃縮されたカラム溶出物を製造するステップと、

(g) ステップ(f)で製造された前記カラム溶出物又は前記濃縮されたカラム溶出物を、サイズ排除カラムクロマトグラフィーに供して、rAAVベクター粒子で構成される第2のカラム溶出物を製造し、それによりrAAVベクター粒子をタンパク質不純物から分離して、任意選択で前記第2のカラム溶出物を希釈して、希釈された第2のカラム溶出物を製造するステップと、

(h) ステップ(g)で製造された前記第2のカラム溶出物又は前記希釈された第2のカラム溶出物を、カチオン交換カラムクロマトグラフィーに供して、rAAVベクター粒子で構成される第3のカラム溶出物を製造し、それによりrAAVベクター粒子をタンパク質又は他の産生不純物から分離して、任意選択で前記第3のカラム溶出物を濃縮して、濃縮された第3のカラム溶出物を製造するステップと、

(i) ステップ(h)で製造された前記第3のカラム溶出物又は前記濃縮された第3のカラム溶出物を濾過して、それにより精製されたrAAVベクター粒子を製造するステップと

を含む方法。

【請求項2】

ステップ(b)及び/又はステップ(f)及び/又はステップ(h)の前記濃縮が、限外濾過/透析濾過によってなされ、任意選択でタンジェンシャルフロー濾過によってなされる、請求項1に記載の方法。

【請求項3】

ステップ(a)で製造された前記回収物、又はステップ(b)で製造された前記濃縮された回収物の前記溶解が微小流動化による、請求項1に記載の方法。

【請求項4】

ステップ(d)が、ヌクレアーゼで処理して、それにより混入核酸を減少させることを含む、請求項1に記載の方法。

【請求項5】

ステップ(e)の前記清澄化された溶解物又は前記希釈され清澄化された溶解物の前記濾過が、両端を含めて約0.1~0.8ミクロンの間の細孔直径を有するフィルターによる、請求項1に記載の方法。

【請求項6】

ステップ(e)の前記清澄化された溶解物又は前記希釈され清澄化された溶解物の前記希釈が、酢酸塩緩衝水溶液を用いる、請求項1に記載の方法。

【請求項7】

ステップ(g)の前記第2のカラム溶出物の前記希釈が、酢酸塩緩衝水溶液を用いる、請求項1に記載の方法。

【請求項8】

ステップ(i)及び/又はステップ(i)から生じた前記rAAVベクター粒子が、界

面活性剤を用いて製剤化されて、A A Vベクター製剤が製造される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 9】

ステップ (f) の前記アニオン交換カラムクロマトグラフィーが、ポリエチレングリコール (P E G) 調整カラムクロマトグラフィーを含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 10】

ステップ (f) の前記アニオン交換カラムが、前記 r A A Vベクター粒子の前記カラムからの溶出の前に、前記カラムを界面活性剤水溶液で洗浄することを含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 11】

ステップ (h) の前記カチオン交換カラムが、前記 r A A Vベクター粒子の前記カラムからの溶出の前に、前記カラムを界面活性剤溶液で洗浄することを含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 12】

前記 r A A Vベクター粒子が、ステップ (f) の前記アニオン交換カラムから、トリス C l / N a C l 緩衝水溶液に溶出される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 13】

前記 r A A Vベクター粒子が、ステップ (h) の前記カチオン交換カラムから、リン酸 / N a C l 緩衝水溶液に溶出される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 14】

塩化セシウム勾配超遠心分離のステップが除外される、請求項 1 ~ 13 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 15】

前記 r A A Vベクター粒子が、s i R N A、アンチセンス分子、m i R N A、リボザイム及びs h R N A からなる群から選択される核酸をコードする導入遺伝子を含む、請求項 1 ~ 14 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 16】

前記 r A A Vベクター粒子が、インスリン、グルカゴン、成長ホルモン (G H)、副甲状腺ホルモン (P T H)、成長ホルモン放出因子 (G R F)、卵胞刺激ホルモン (F S H)、黄体形成ホルモン (L H)、ヒト絨毛膜性腺刺激ホルモン (h C G)、血管内皮増殖因子 (V E G F)、アンジオポエチン、アンジオスタチン、顆粒球コロニー刺激因子 (G C S F)、エリスロポエチン (E P O)、結合組織成長因子 (C T G F)、塩基性線維芽細胞増殖因子 (b F G F)、酸性線維芽細胞増殖因子 (a F G F)、上皮成長因子 (E G F)、トランスフォーミング成長因子 α (T G F α)、血小板由来成長因子 (P D G F)、インスリン様成長因子 I 及び I I (I G F - I 及び I G F - I I)、T G F β 、アクチビン、インヒビン、骨形成タンパク質 (B M P)、神経成長因子 (N G F)、脳由来神経栄養因子 (B D N F)、ニューロトロフィン N T - 3 及び N T 4 / 5、毛様体神経栄養因子 (C N T F)、グリア細胞株由来神経栄養因子 (G D N F)、ニュールツリン、アグリン、ネトリン - 1 及びネトリン - 2、肝細胞成長因子 (H G F)、エフリン、ノギン、ソニックヘッジホッグ並びにチロシンヒドロキシラーゼからなる群から選択される遺伝子生成物をコードする導入遺伝子を含む、請求項 1 ~ 15 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 17】

前記 r A A Vベクター粒子が、トロンボポエチン (T P O)、インターロイキン (I L 1 ~ I L - 17)、単球走化性タンパク質、白血病阻止因子、顆粒球 - マクロファージコロニー刺激因子、F a s リガンド、腫瘍壊死因子 α 及び β 、インターフェロン α 、 β 、及び γ 、幹細胞因子、f l k - 2 / f l t 3 リガンド、I g G、I g M、I g A、I g D 及び I g E、キメラ免疫グロブリン、ヒト化抗体、単鎖抗体、T 細胞受容体、キメラ T 細胞受容体、単鎖 T 細胞受容体、クラス I 及びクラス I I の M H C 分子からなる群から選択される遺伝子生成物をコードする導入遺伝子を含む、請求項 1 ~ 15 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 18】

前記 r A A V ベクター粒子が、カルバモイルシンテターゼ I、オルニチントランスカルバミラーゼ、アルギノスクシネートシンテターゼ、アルギノスクシネートリアーゼ、アルギナーゼ、フマリルアセトアセテートヒドロラーゼ、フェニルアラニンヒドロキシラーゼ、アルファ - 1 アンチトリプシン、グルコース - 6 - ホスファターゼ、ボルホビリノーゲンデアミナーゼ、第 V 因子、第 V I I I 因子、第 I X 因子、シスタチオンベータ - シンテターゼ、分岐鎖ケト酸デカルボキシラーゼ、アルブミン、イソバレリル - c o A デヒドロゲナーゼ、プロピオニル C o A カルボキシラーゼ、メチルマロニル C o A ムターゼ、グルタリル C o A デヒドロゲナーゼ、インスリン、ベータ - グルコシダーゼ、ピルベートカルボキシレート、肝ホスホリラーゼ、ホスホリラーゼキナーゼ、グリシンデカルボキシラーゼ、R P E 6 5、H - タンパク質、T - タンパク質、嚢胞性線維症膜貫通制御因子 (C F T R) 配列、及びジストロフィン c D N A 配列からなる群から選択される先天性代謝異常の修正に有用なタンパク質をコードする導入遺伝子を含む、請求項 1 ~ 1 5 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 19】

前記 r A A V ベクター粒子が、第 V I I I 因子又は第 I X 因子をコードする導入遺伝子を含む、請求項 1 ~ 1 5 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 20】

ステップ (a) で製造された前記回収物又はステップ (b) で製造された前記濃縮された回収物から全 r A A V ベクター粒子の約 4 0 ~ 7 0 % を回収する、請求項 1 ~ 1 9 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 21】

A A V 親和性カラム精製により製造又は精製された r A A V ベクター粒子よりも高い純度を有する r A A V ベクター粒子を製造する、請求項 1 ~ 2 0 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 22】

アニオン交換カラム精製と組み合わせられた A A V 親和性カラムにより製造又は精製された r A A V ベクター粒子よりも高い純度を有する r A A V ベクター粒子を製造する、請求項 1 ~ 2 1 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 23】

アニオン交換カラム及びカチオン交換精製と組み合わせられた A A V 親和性カラムにより製造又は精製された r A A V ベクター粒子よりも高い純度を有する r A A V ベクター粒子を製造する、請求項 1 ~ 2 1 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 24】

前記 r A A V ベクター粒子が、A A V 1、A A V 2、A A V 3、A A V 4、A A V 5、A A V 6、A A V 7、A A V 8、A A V 9 及び A A V 1 0 からなる群から選択される A A V から誘導される、請求項 1 ~ 2 3 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 25】

組換えアデノ随伴ウイルス (r A A V) ベクター粒子を精製するための方法であって、
(a) r A A V ベクター粒子を含む細胞及び細胞培養上清を回収して、回収物を製造するステップと、
(b) 任意選択でステップ (a) で製造された前記回収物を濃縮して、濃縮された回収物を製造するステップと、
(c) ステップ (a) で製造された前記回収物、又はステップ (b) で製造された前記濃縮された回収物を溶解して、溶解物を製造するステップと、
(d) ステップ (c) で製造された前記溶解物を処理して、前記溶解物中の混入核酸を減少させ、それにより核酸が減少した溶解物を製造するステップと、
(e) ステップ (d) で製造された前記核酸が減少した溶解物を濾過して、清澄化された溶解物を製造し、任意選択で前記清澄化された溶解物を希釈して、希釈され清澄化された溶解物を製造するステップと、

(f) ステップ(e)で製造された前記清澄化された溶解物又は希釈され清澄化された溶解物を、カチオン交換カラムクロマトグラフィーに供して、r A A Vベクター粒子で構成されるカラム溶出物を製造し、それによりr A A Vベクター粒子をタンパク質又は他の産生不純物から分離して、任意選択で前記カラム溶出物を濃縮して、濃縮されたカラム溶出物を製造するステップと、

(g) ステップ(f)で製造された前記カラム溶出物又は前記濃縮されたカラム溶出物を、サイズ排除カラムクロマトグラフィーに供して、r A A Vベクター粒子で構成される第2のカラム溶出物を製造し、それによりr A A Vベクター粒子をタンパク質不純物から分離して、任意選択で前記第2のカラム溶出物を希釈して、希釈された第2のカラム溶出物を製造するステップと、

(h) ステップ(g)で製造された前記第2のカラム溶出物又は前記希釈された第2のカラム溶出物を、アニオン交換カラムクロマトグラフィーに供して、r A A Vベクター粒子で構成される第3のカラム溶出物を製造し、任意選択で前記第3のカラム溶出物を濃縮して、濃縮された第3のカラム溶出物を製造するステップと、

(i) ステップ(h)で製造された前記第3のカラム溶出物又は前記濃縮された第3のカラム溶出物を濾過して、それにより精製されたr A A Vベクター粒子を製造するステップと

を含む方法。

【請求項26】

ステップ(b)及び/又はステップ(f)及び/又はステップ(h)の前記濃縮が、限外濾過/透析濾過によってなされ、任意選択でタンジェンシャルフロー濾過によってなされる、請求項25に記載の方法。

【請求項27】

ステップ(a)で製造された前記回収物又はステップ(b)で製造された前記濃縮された回収物の前記溶解が微小流動化による、請求項25に記載の方法。

【請求項28】

ステップ(d)が、ヌクレアーゼで処理して、それにより混入核酸を減少させることを含む、請求項25に記載の方法。

【請求項29】

ステップ(e)の前記清澄化された溶解物又は前記希釈され清澄化された溶解物の前記濾過が、両端を含めて約0.1~0.8ミクロンの間の細孔直径を有するフィルターによる、請求項25に記載の方法。

【請求項30】

ステップ(e)の前記清澄化された溶解物又は前記希釈され清澄化された溶解物の前記希釈が、酢酸塩緩衝水溶液を用いる、請求項25に記載の方法。

【請求項31】

ステップ(g)の前記第2のカラム溶出物の前記希釈が、酢酸塩緩衝水溶液を用いる、請求項25に記載の方法。

【請求項32】

ステップ(i)から生じた前記r A A Vベクター粒子が界面活性剤で製剤化されて、A A Vベクター製剤が製造される、請求項25に記載の方法。

【請求項33】

ステップ(h)の前記アニオン交換カラムクロマトグラフィーが、ポリエチレングリコール(P E G)調整カラムクロマトグラフィーを含む、請求項25に記載の方法。

【請求項34】

ステップ(h)の前記アニオン交換カラムクロマトグラフィーが、前記r A A Vベクター粒子の前記カラムからの溶出の前に、前記カラムをP E G溶液で洗浄することを含む、請求項25に記載の方法。

【請求項35】

ステップ(h)の前記アニオン交換カラムが、前記r A A Vベクター粒子の前記カラム

からの溶出の前に、前記カラムを界面活性剤水溶液で洗浄することを含む、請求項 2 5 に記載の方法。

【請求項 3 6】

ステップ (f) の前記カチオン交換カラムが、前記 r A A V ベクター粒子の前記カラムからの溶出の前に、前記カラムを界面活性剤溶液で洗浄することを含む、請求項 2 5 に記載の方法。

【請求項 3 7】

前記 r A A V ベクター粒子が、ステップ (h) の前記アニオン交換カラムから、トリス C l / N a C l 緩衝水溶液に溶出される、請求項 2 5 に記載の方法。

【請求項 3 8】

前記 r A A V ベクター粒子が、ステップ (f) の前記カチオン交換カラムから、リン酸 / N a C l 緩衝水溶液に溶出される、請求項 2 5 に記載の方法。

【請求項 3 9】

塩化セシウム勾配超遠心分離のステップが除外される、請求項 2 5 ~ 3 8 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 4 0】

前記 r A A V ベクター粒子が、s i R N A、アンチセンス分子、m i R N A、リボザイム及び s h R N A からなる群から選択される核酸をコードする導入遺伝子を含む、請求項 2 5 ~ 3 9 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 4 1】

前記 r A A V ベクター粒子が、インスリン、グルカゴン、成長ホルモン (G H)、副甲状腺ホルモン (P T H)、成長ホルモン放出因子 (G R F)、卵胞刺激ホルモン (F S H)、黄体形成ホルモン (L H)、ヒト絨毛膜性腺刺激ホルモン (h C G)、血管内皮増殖因子 (V E G F)、アンジオポエチン、アンジオスタチン、顆粒球コロニー刺激因子 (G C S F)、エリスロポエチン (E P O)、結合組織成長因子 (C T G F)、塩基性線維芽細胞増殖因子 (b F G F)、酸性線維芽細胞増殖因子 (a F G F)、上皮成長因子 (E G F)、トランスフォーミング成長因子 α (T G F α)、血小板由来成長因子 (P D G F)、インスリン様成長因子 I 及び I I (I G F - I 及び I G F - I I)、T G F β 、アクチビン、インヒビン、骨形成タンパク質 (B M P)、神経成長因子 (N G F)、脳由来神経栄養因子 (B D N F)、ニューロトロフィン N T - 3 及び N T 4 / 5、毛様体神経栄養因子 (C N T F)、グリア細胞株由来神経栄養因子 (G D N F)、ニューロニン、アグリニン、ネトリン - 1 及びネトリン - 2、肝細胞成長因子 (H G F)、エフリン、ノギン、ソニックヘッジホッグ並びにチロシンヒドロキシラーゼからなる群から選択される遺伝子生成物をコードする導入遺伝子を含む、請求項 2 5 ~ 3 9 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 4 2】

前記 r A A V ベクター粒子が、トロンボポエチン (T P O)、インターロイキン (I L 1 ~ I L - 1 7)、単球走化性タンパク質、白血病阻止因子、顆粒球 - マクロファージコロニー刺激因子、F a s リガンド、腫瘍壊死因子 α 及び β 、インターフェロン α 、 β 、及び γ 、幹細胞因子、f l k - 2 / f l t 3 リガンド、I g G、I g M、I g A、I g D 及び I g E、キメラ免疫グロブリン、ヒト化抗体、単鎖抗体、T 細胞受容体、キメラ T 細胞受容体、単鎖 T 細胞受容体、クラス I 及びクラス I I の M H C 分子からなる群から選択される遺伝子生成物をコードする導入遺伝子を含む、請求項 2 5 ~ 3 9 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 4 3】

前記 r A A V ベクター粒子が、カルバモイルシンテターゼ I、オルニチントランスカルバミラーゼ、アルギノスクシネートシンテターゼ、アルギノスクシネートリアーゼ、アルギナーゼ、フマリルアセトアセテートヒドロラーゼ、フェニルアラニンヒドロキシラーゼ、アルファ - 1 アンチトリプシン、グルコース - 6 - ホスファターゼ、ボルホビリノーゲンデアミナーゼ、第 V 因子、第 V I I I 因子、第 I X 因子、シスタチオンベータ - シンテターゼ、分岐鎖ケト酸デカルボキシラーゼ、アルブミン、イソバレリル - c o A デヒドロゲ

ナーゼ、プロピオニル CoA カルボキシラーゼ、メチルマロニル CoA ムターゼ、グルタリル CoA デヒドロゲナーゼ、インスリン、ベータ - グルコシダーゼ、ピルベートカルボキシレート、肝ホスホリラーゼ、ホスホリラーゼキナーゼ、グリシンデカルボキシラーゼ、RPE65、H - タンパク質、T - タンパク質、嚢胞性線維症膜貫通制御因子 (CFTR) 配列、及びジストロフィン cDNA 配列からなる群から選択される先天性代謝異常の修正に有用なタンパク質をコードする導入遺伝子を含む、請求項 25 ~ 39 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 44】

前記 rAAV ベクター粒子が、第 VII 因子又は第 IX 因子をコードする導入遺伝子を含む、請求項 25 ~ 39 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 45】

ステップ (a) で製造された前記回収物、又はステップ (b) で製造された前記濃縮された回収物から全 rAAV ベクター粒子の約 40 ~ 70 % を回収する、請求項 25 ~ 39 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 46】

AAV 親和性カラム精製により製造又は精製された rAAV ベクター粒子よりも高い純度を有する rAAV ベクター粒子を製造する、請求項 25 ~ 39 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 47】

アニオン交換カラム精製と組み合わせられた AAV 親和性カラムにより製造又は精製される rAAV ベクター粒子よりも高い純度を有する rAAV ベクター粒子を製造する、請求項 25 ~ 39 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 48】

アニオン交換カラム及びカチオン交換精製と組み合わせられた AAV 親和性カラムにより製造又は精製された rAAV ベクター粒子よりも高い純度を有する rAAV ベクター粒子を製造する、請求項 25 ~ 39 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 49】

前記 rAAV ベクター粒子が、AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9 及び AAV10 からなる群から選択される AAV から誘導される、請求項 25 ~ 39 のいずれか一項に記載の方法。