

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第6029651号

(P6029651)

(45) 発行日 平成28年11月24日(2016.11.24)

(24) 登録日 平成28年10月28日(2016.10.28)

(51) Int.Cl.	F I
<b>C 1 2 N</b> 7/02 (2006.01)	C 1 2 N 7/02
<b>B O 1 D</b> 15/34 (2006.01)	B O 1 D 15/34
<b>G O 1 N</b> 30/88 (2006.01)	G O 1 N 30/88 E
<b>G O 1 N</b> 30/84 (2006.01)	G O 1 N 30/84 Z
<b>G O 1 N</b> 30/26 (2006.01)	G O 1 N 30/26 A

請求項の数 26 (全 18 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2014-506699 (P2014-506699)	(73) 特許権者	501332264
(86) (22) 出願日	平成24年4月27日(2012.4.27)		オンコリティクス バイオテック、インコーポレーテッド
(65) 公表番号	特表2014-516515 (P2014-516515A)		カナダ・アルバータ・T 2 N・1 X 7・カルガリー・ケンジントン・クレセント・ノースウエスト・1 1 6 7・2 1 0
(43) 公表日	平成26年7月17日(2014.7.17)	(74) 代理人	100078282
(86) 国際出願番号	PCT/CA2012/000406		弁理士 山本 秀策
(87) 国際公開番号	W02012/145837	(74) 代理人	100113413
(87) 国際公開日	平成24年11月1日(2012.11.1)		弁理士 森下 夏樹
審査請求日	平成27年4月24日(2015.4.24)	(72) 発明者	コフィー, マシュー シー,
(31) 優先権主張番号	61/480,561		カナダ国 ティー2エヌ 3エル4 アルバータ, カルガリー, エヌダブリュー, ボウネス ロード 2 2 3 1
(32) 優先日	平成23年4月29日(2011.4.29)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】ゲル浸透クロマトグラフィーを使用してウイルスを精製する方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

ウイルスを精製する方法であって、前記方法は、

ウイルスおよび液体担体を含むウイルス標品とゲル浸透クロマトグラフィーカラムを接触させることであって、前記ウイルスが前記ゲル浸透クロマトグラフィーカラム上で保持される、ことと、

少なくとも1つの賦形剤、二価陽イオン、および、リン酸緩衝食塩水を含む溶出緩衝液により前記ゲル浸透クロマトグラフィーカラムから前記ウイルスを回収することとであって、前記少なくとも1つの賦形剤が、ヒスチジンまたはスクロースを含み、前記少なくとも1つの賦形剤がスクロースを含む場合、前記溶出緩衝液が界面活性剤をさらに含む、ことと

を含む、方法。

【請求項 2】

前記液体担体が溶出緩衝液である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

前記少なくとも1つの賦形剤が、マンニトールまたはソルビトールの1以上を含む、請求項 1 または 2 に記載の方法。

【請求項 4】

前記二価陽イオンが  $Mg^{2+}$  である、請求項 1 ~ 3 のいずれかに記載の方法。

【請求項 5】

Mg<sup>2+</sup> が塩化マグネシウムとして存在する、請求項 4 に記載の方法。

【請求項 6】

前記リン酸緩衝食塩水が、1 以上のリン酸塩および 1 以上の塩化物塩の組み合わせを含む、請求項 1 ~ 5 のいずれかに記載の方法。

【請求項 7】

前記 1 以上のリン酸塩が、リン酸二ナトリウム、リン酸二水素カリウム、または、それらの組み合わせを含み、前記 1 以上の塩化物塩が、塩化ナトリウム、塩化カリウム、または、それらの組み合わせを含む、請求項 6 に記載の方法。

【請求項 8】

前記少なくとも 1 つの賦形剤がヒスチジンを含む場合、前記溶出緩衝液が界面活性剤をさらに含む、請求項 1 に記載の方法。

10

【請求項 9】

前記界面活性剤が非イオン性界面活性剤を含む、請求項 1 ~ 8 のいずれかに記載の方法。

【請求項 10】

前記非イオン性界面活性剤がポリソルベート 80 である、請求項 9 に記載の方法。

【請求項 11】

前記溶出緩衝液が、マンニトール、ヒスチジン、ソルビトール、ポリソルベート 80、および、MgCl<sub>2</sub> を含むか、または、スクロース、ポリソルベート 80、および、MgCl<sub>2</sub> を含み、前記リン酸緩衝食塩水が、リン酸二ナトリウム、リン酸二水素カリウム、塩化ナトリウムおよび塩化カリウムを含む、請求項 1 に記載の方法。

20

【請求項 12】

前記溶出緩衝液中で前記ウイルスを保存することをさらに含む、請求項 1 ~ 11 のいずれかに記載の方法。

【請求項 13】

前記ウイルスが腫瘍退縮ウイルスであるか、または、前記ウイルスが非エンベロープウイルスである、請求項 1 ~ 12 のいずれかに記載の方法。

【請求項 14】

前記非エンベロープウイルスがレオウイルスである、請求項 13 に記載の方法。

【請求項 15】

前記レオウイルスが哺乳動物レオウイルスである、請求項 14 に記載の方法。

30

【請求項 16】

前記哺乳動物レオウイルスがヒトレオウイルスである、請求項 15 に記載の方法。

【請求項 17】

前記ヒトレオウイルスが血清型 3 ウイルスである、請求項 16 に記載の方法。

【請求項 18】

前記血清型 3 ウイルスが血清型 3 ウイルスの Dearing 株である、請求項 17 に記載の方法。

【請求項 19】

前記ウイルスが組み換えまたは再集合レオウイルスである、請求項 13 ~ 18 のいずれか一項に記載の方法。

40

【請求項 20】

前記レオウイルスが IDAC # 190907 - 01 である、請求項 14 に記載の方法。

【請求項 21】

装置であって、前記装置は、

ゲル浸透クロマトグラフィーカラムと、

溶出緩衝液と

を含み、

前記溶出緩衝液が、少なくとも 1 つの賦形剤、二価陽イオン、および、リン酸緩衝食塩水を含み、

前記少なくとも 1 つの賦形剤が、ヒスチジンまたはスクロースを含み、

50

前記少なくとも1つの賦形剤がスクロースを含む場合、前記溶出緩衝液が界面活性剤をさらに含む、  
装置。

【請求項22】

前記ゲル浸透クロマトグラフィーカラムが前記緩衝液で平衡化される、請求項21に記載の装置。

【請求項23】

ウイルスおよび液体担体を含むウイルス標品をさらに含む、請求項21または22に記載の装置。

【請求項24】

(a) 溶出緩衝液が、少なくとも1つの賦形剤と、二価陽イオンと、非イオン性界面活性剤と、リン酸緩衝食塩水とを含み、前記少なくとも1つの賦形剤が、ヒスチジンまたはスクロースを含むか、

(b) 溶出緩衝液が、スクロースと、 $MgCl_2$ と、ポリソルベート80と、リン酸緩衝食塩水とを含むか、または、

(c) 溶出緩衝液が、マンニトールと、ヒスチジンと、ソルビトールと、 $MgCl_2$ と、ポリソルベート80と、リン酸緩衝食塩水とを含むかであり、

前記溶出緩衝液がゲル浸透クロマトグラフィー溶出緩衝液である、  
溶出緩衝液。

【請求項25】

ゲル浸透クロマトグラフィーカラムからのウイルス回収率を向上させる方法であって、前記方法は、

ウイルスおよび液体担体を含むウイルス標品とゲル浸透クロマトグラフィーカラムを接触させることであって、前記ウイルスが前記ゲル浸透クロマトグラフィーカラム上で保持される、ことと、

少なくとも1つの賦形剤、二価陽イオン、および、リン酸緩衝食塩水を含む溶出緩衝液により前記ゲル浸透クロマトグラフィーカラムから前記ウイルスを回収することであって、前記少なくとも1つの賦形剤が、ヒスチジンまたはスクロースを含み、前記少なくとも1つの賦形剤がスクロースを含む場合、前記溶出緩衝液が界面活性剤をさらに含む、ことと

を含む、方法。

【請求項26】

前記ウイルス回収率が、リン酸緩衝食塩水で溶出されるウイルスの回収率よりも少なくとも20%高いか、または、

前記ウイルス回収率が、リン酸緩衝食塩水で溶出されるウイルスの回収率よりも少なくとも25%高いか、または、

前記ウイルス回収率が、リン酸緩衝食塩水で溶出されるウイルスの回収率よりも少なくとも30%高いか、または、

前記ウイルス回収率が、リン酸緩衝食塩水で溶出されるウイルスの回収率よりも少なくとも35%高いかである、

請求項25に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

優先出願に対する相互参照

本願は、その全体において参照により本明細書中に組み込まれる、2011年4月29日出願の、米国特許仮出願第61/480,561号に対する優先権を主張する。

【背景技術】

【0002】

ウイルス製造には、例えばゲル浸透クロマトグラフィーなどのクロマトグラフィー法を

10

20

30

40

50

用いてウイルスを精製する段階が含まれる。クロマトグラフィー法はウイルス精製の有効な方法であるが、これらの方法のにより、クロマトグラフィーカラム上で著しいウイルス損失が起こり得る。結果として、このような方法を用いた場合のウイルス製造費は相当なものとなり得る。

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0003】

ゲル浸透クロマトグラフィーを用いてウイルスを精製するための溶出緩衝液および方法が本明細書中で提供される。本方法は、例えばウイルス製造中のゲル浸透クロマトグラフィーカラムからのウイルス回収率を向上させることにおいて有用である。

10

実施形態において、本発明は、例えば、下記の項目を提供する。

(項目1)

ウイルスおよび液体担体を含むウイルス標品とゲル浸透クロマトグラフィーカラムを接触させることと(ここで、前記ウイルスはゲル浸透クロマトグラフィーカラム上で保持される。);

少なくとも1つの賦形剤、二価陽イオンおよびリン酸緩衝食塩水を含む溶出緩衝液により前記ゲル浸透クロマトグラフィーカラムから前記ウイルスを回収することと(前記少なくとも1つの賦形剤は、ヒスチジンまたはスクロースを含む。);

を含む、ウイルスを精製する方法。

(項目2)

前記液体担体が溶出緩衝液である、項目1に記載の方法。

20

(項目3)

前記少なくとも1つの賦形剤が、マンニトールまたはソルビトールの1以上を含む、項目1または2に記載の方法。

(項目4)

前記二価陽イオンが $Mg^{2+}$ である、項目1から3の何れかに記載の方法。

(項目5)

$Mg^{2+}$ が塩化マグネシウムとして存在する、項目4に記載の方法。

(項目6)

前記リン酸緩衝食塩水が、1以上のリン酸塩および1以上の塩化物塩の組み合わせを含む、項目1から5の何れかに記載の方法。

30

(項目7)

前記1以上のリン酸塩がリン酸二ナトリウムを含む、項目6に記載の方法。

(項目8)

前記1以上のリン酸塩がリン酸二水素カリウムを含む、項目6または7に記載の方法。

(項目9)

前記1以上の塩化物塩が塩化ナトリウムを含む、項目6に記載の方法。

(項目10)

前記1以上の塩化物塩が塩化カリウムを含む、項目6または9に記載の方法。

(項目11)

前記溶出緩衝液が、非イオン性界面活性剤をさらに含む、項目1から10の何れかに記載の方法。

40

(項目12)

前記非イオン性界面活性剤がポリソルベート80である、項目11に記載の方法。

(項目13)

前記溶出緩衝液が、マンニトール、ヒスチジン、ソルビトール、ポリソルベート80および $MgCl_2$ を含み、前記リン酸緩衝食塩水が、リン酸二ナトリウム、リン酸二水素カリウム、塩化ナトリウムおよび塩化カリウムを含む、項目1に記載の方法。

(項目14)

前記溶出緩衝液が、スクロース、ポリソルベート80および $MgCl_2$ を含み、前記リ

50

ン酸緩衝食塩水がリン酸二ナトリウム、リン酸二水素カリウム、塩化ナトリウムおよび塩化カリウムを含む、項目 1 に記載の方法。

( 項目 1 5 )

前記溶出緩衝液中で前記ウイルスを保存することをさらに含む、項目 1 から 1 4 の何れかに記載の方法。

( 項目 1 6 )

前記ウイルスが腫瘍退縮ウイルスである、項目 1 から 1 5 の何れかに記載の方法。

( 項目 1 7 )

前記ウイルスが非エンベロープウイルスである、項目 1 から 1 5 の何れかに記載の方法。

( 項目 1 8 )

前記ウイルスがレオウイルスである、項目 1 から 1 7 の何れかに記載の方法。

( 項目 1 9 )

前記レオウイルスが哺乳動物レオウイルスである、項目 1 8 に記載の方法。

( 項目 2 0 )

前記哺乳動物レオウイルスがヒトレオウイルスである、項目 1 9 に記載の方法。

( 項目 2 1 )

前記ヒトレオウイルスが血清型 3 ウイルスである、項目 2 0 に記載の方法。

( 項目 2 2 )

前記血清型 3 ウイルスが Dearing 株である、項目 2 1 に記載の方法。

( 項目 2 3 )

前記レオウイルスが組み換えまたは再集合レオウイルスである、項目 1 8 に記載の方法。

( 項目 2 4 )

前記レオウイルスが I D A C # 1 9 0 9 0 7 - 0 1 である、項目 1 8 に記載の方法。

( 項目 2 5 )

ゲル浸透クロマトグラフィーカラムと、

溶出緩衝液と、を含み、

前記溶出緩衝液が、少なくとも 1 つの賦形剤、二価陽イオンおよびリン酸緩衝食塩水を含み、

前記少なくとも 1 つの賦形剤がヒスチジンまたはスクロースを含む、装置。

( 項目 2 6 )

前記ゲル浸透クロマトグラフィーカラムが前記緩衝液で平衡化される、項目 2 5 に記載の装置。

( 項目 2 7 )

ウイルスおよび液体担体を含むウイルス標品をさらに含む、項目 2 5 または 2 6 に記載の装置。

( 項目 2 8 )

少なくとも 1 つの賦形剤と；

二価陽イオンと；

非イオン性界面活性剤と；

リン酸緩衝食塩水と、

を含む溶出緩衝液であって、

前記少なくとも 1 つの賦形剤がヒスチジンまたはスクロースを含み、

ゲル浸透クロマトグラフィー溶出緩衝液である、溶出緩衝液。

( 項目 2 9 )

スクロースと；

M g C l <sub>2</sub> と；

ポリソルベート 8 0 と；

リン酸緩衝食塩水と、

10

20

30

40

50

を含む溶出緩衝液であって、  
 ゲル浸透クロマトグラフィー溶出緩衝液である、  
 溶出緩衝液。

(項目 3 0 )

マンニトールと；

ヒスチジンと；

ソルビトールと；

$MgCl_2$  と；

ポリソルベート 80 と；

リン酸緩衝食塩水と、

を含む溶出緩衝液であって、

ゲル浸透クロマトグラフィー溶出緩衝液である、溶出緩衝液。

(項目 3 1 )

ウイルスおよび液体担体を含むウイルス標品とゲル浸透クロマトグラフィーカラムを接触させることと（ここで、前記ウイルスはゲル浸透クロマトグラフィーカラム上で保持される。）；

少なくとも 1 つの賦形剤、二価陽イオンおよびリン酸緩衝食塩水を含む溶出緩衝液により前記ゲル浸透クロマトグラフィーカラムから前記ウイルスを回収することと（前記少なくとも 1 つの賦形剤はヒスチジンまたはスクロースを含む。）、

を含み、

ウイルス回収率が、リン酸緩衝食塩水で溶出されるウイルスの回収率よりも少なくとも約 20 % 高い、ゲル浸透クロマトグラフィーカラムからのウイルス回収率を向上させる方法。

(項目 3 2 )

前記ウイルス回収率が、リン酸緩衝食塩水で溶出されるウイルスの回収率よりも少なくとも約 25 % 高い、項目 3 1 に記載の方法。

(項目 3 3 )

前記ウイルス回収率が、リン酸緩衝食塩水で溶出されるウイルスの回収率よりも少なくとも約 30 % 高い、項目 3 1 に記載の方法。

(項目 3 4 )

前記ウイルス回収率が、リン酸緩衝食塩水で溶出されるウイルスの回収率よりも少なくとも約 35 % 高い、項目 3 1 に記載の方法。

【 0 0 0 4 】

本明細書中に記載のウイルス精製方法は、ウイルスおよび液体担体を含むウイルス標品とゲル浸透クロマトグラフィーカラムを接触させることと（ここで、ウイルスはゲル浸透クロマトグラフィーカラム上で保持される。）、少なくとも 1 つの賦形剤、二価陽イオンおよびリン酸緩衝食塩水を含む溶出緩衝液によりゲル浸透クロマトグラフィーカラムからウイルスを回収することと、を含む。これらの方法において、この少なくとも 1 つの賦形剤は、ヒスチジンまたはスクロースを含む。液体担体は、任意に溶出緩衝液である。任意に、この少なくとも 1 つの賦形剤は、マンニトールまたはソルビトールの 1 以上を含む。二価陽イオンは、任意に  $Mg^{2+}$  である。任意に、 $Mg^{2+}$  は塩化マグネシウムとして存在する。

【 0 0 0 5 】

リン酸緩衝食塩水は、1 以上のリン酸塩および 1 以上の塩化物塩の組み合わせを含み得る。任意に、この 1 以上のリン酸塩は、リン酸二ナトリウムおよび / またはリン酸二水素カリウムを含む。任意に、この 1 以上の塩化物塩は、塩化ナトリウムおよび / または塩化カリウムを含む。

【 0 0 0 6 】

溶出緩衝液は、例えば、ポリソルベート 80 など、非イオン性界面活性剤をさらに含み得る。任意に、溶出緩衝液は、マンニトール、ヒスチジン、ソルビトール、ポリソルベ

10

20

30

40

50

ト 8 0 および  $MgCl_2$  を含み、リン酸緩衝食塩水は、リン酸二ナトリウム、リン酸二水素カリウム、塩化ナトリウムおよび塩化カリウムを含む。任意に、溶出緩衝液は、スクロース、ポリソルベート 8 0 および  $MgCl_2$  を含み、リン酸緩衝食塩水は任意にリン酸二ナトリウム、リン酸二水素カリウム、塩化ナトリウムおよび塩化カリウムを含む。

【 0 0 0 7 】

本明細書中に記載のウイルス標品中に含まれるウイルスは、例えば腫瘍退縮ウイルスおよび/または非エンベロープウイルスであり得る。ウイルスがレオウイルス、例えば哺乳動物レオウイルスなどであるウイルス標品が本明細書中で提供される。哺乳動物レオウイルスの例はヒトレオウイルス、例えば血清型 3 ウイルスなど（例えば Dearing 株レオウイルス）である。レオウイルスは、任意に組み換えレオウイルス、再集合レオウイルスまたは IDAC # 1 9 0 9 0 7 - 0 1 である。これらの方法に従い調製された精製ウイルス製剤も本明細書中に記載される。本明細書中に記載の方法は、溶出緩衝液中でこのウイルスを保存することをさらに含み得る。

10

【 0 0 0 8 】

ゲル浸透クロマトグラフィーカラムおよび溶出緩衝液を含む装置も本明細書中で提供される。溶出緩衝液は、少なくとも 1 つの賦形剤、二価陽イオンおよびリン酸緩衝食塩水を含み、この少なくとも 1 つの賦形剤は、ヒスチジンまたはスクロースを含む。ゲル浸透クロマトグラフィーカラムは、任意に緩衝液で平衡化される。任意に、本装置は、ウイルスおよび液体担体を含むウイルス標品をさらに含む。

【 0 0 0 9 】

20

ゲル浸透クロマトグラフィーカラムから溶出されたウイルスと、ゲル浸透クロマトグラフィー媒体と接触させた溶出緩衝液と、を含む精製ウイルス製剤が本明細書中でさらに提供される。いくつかの例において、溶出緩衝液は、少なくとも 1 つの賦形剤、二価陽イオンおよびリン酸緩衝食塩水を含み、この少なくとも 1 つの賦形剤はヒスチジンまたはスクロースを含む。

【 0 0 1 0 】

ゲル浸透クロマトグラフィー溶出緩衝液も本明細書中で提供される。いくつかの例において、溶出緩衝液は、少なくとも 1 つの賦形剤、二価陽イオン、非イオン性界面活性剤およびリン酸緩衝食塩水を含み得る。これらの例において、少なくとも 1 つの賦形剤はヒスチジンまたはスクロースを含み、溶出緩衝液はゲル浸透クロマトグラフィー溶出緩衝液である。任意に、溶出緩衝液は、スクロース、 $MgCl_2$ 、ポリソルベート 8 0 およびリン酸緩衝食塩水を含む。任意に、溶出緩衝液は、マンニトール、ヒスチジン、ソルビトール、 $MgCl_2$ 、ポリソルベート 8 0 およびリン酸緩衝食塩水を含む。

30

【 0 0 1 1 】

ゲル浸透クロマトグラフィーカラムからのウイルスの回収率を向上させる方法が本明細書中でさらに提供される。本方法は、ウイルスおよび液体担体を含むウイルス標品とゲル浸透クロマトグラフィーカラムを接触させることと（ここで、このウイルスはゲル浸透クロマトグラフィーカラム上に保持される。）、少なくとも 1 つの賦形剤、二価陽イオンおよびリン酸緩衝食塩水を含む溶出緩衝液を用いてゲル浸透クロマトグラフィーカラムからウイルスを回収することと（この少なくとも 1 つの賦形剤はヒスチジンまたはスクロースを含む。）、を含む。これらの方法において、ウイルス回収率は、リン酸緩衝食塩水で溶出されるウイルスの回収率よりも少なくとも約 2 0 % 高い。任意に、ウイルス回収率は、リン酸緩衝食塩水で溶出されるウイルスの回収率よりも少なくとも約 2 5 % 高い（例えばリン酸緩衝食塩水で溶出されるウイルスの回収率よりも少なくとも約 3 0 % 高いか、またはリン酸緩衝食塩水で溶出されるウイルスの回収率よりも少なくとも約 3 5 % 高い。）。

40

【 0 0 1 2 】

1 以上の態様の詳細を下記の添付の説明で示す。他の特性、目的および長所は、説明および特許請求の範囲から明らかとなる。

【 発明を実施するための形態 】

【 0 0 1 3 】

50

本明細書中で、ゲル浸透クロマトグラフィーを用いてウイルスを精製するための溶出緩衝液および方法が記載される。ゲル浸透クロマトグラフィー（すなわちゲルろ過またはサイズ排除クロマトグラフィー）は、その大きさによって混合物の構成成分を分離するために使用される拡散律速プロセスである。本明細書中に記載のゲル浸透クロマトグラフィー溶出緩衝液は、例えばウイルス製造中のゲル浸透クロマトグラフィーカラムからのウイルスの回収率を上昇させるために使用され得る。本明細書中に記載の溶出緩衝液には、1以上の賦形剤、二価陽イオン、非イオン性界面活性剤およびリン酸緩衝食塩水が含まれる。

【0014】

本明細書中で提供される溶出緩衝液には、少なくとも1つの賦形剤（例えば1、2、3、4以上の賦形剤）が含まれる。溶出緩衝液中での使用のための賦形剤としては糖およびアミノ酸が挙げられるがこれらに限定されない。本明細書中に記載の溶出緩衝液中での使用に適切な糖の例としてはスクロースが挙げられる。本明細書中に記載の溶出緩衝液での使用に適切なアミノ酸の例としてはヒスチジンが挙げられる。任意に、本明細書中に記載の溶出緩衝液には、ヒスチジンまたはスクロースの少なくとも1つが含まれる。

【0015】

本明細書中に記載の溶出緩衝液での使用に適切な糖としては、例えば、単糖類および二糖類が挙げられる。いくつかの例において、溶出緩衝液には、スクロース、マンニトール、ソルビトールまたはこれらの組み合わせが含まれる。適切な糖のさらなる例としては、ラクトース、デキストロース、フルクトース、グルコースおよびマルトースが挙げられる。任意に、溶出緩衝液は、実質的にトレハロース不含である。実質的に不含とは、溶出緩衝液に含まれ得るトレハロースが溶出緩衝液の重量に基づいて0.1%未満、0.01%未満、0.001%未満、0.0001%未満または0%であることを意味する。いくつかの例において、溶出緩衝液は、実質的にスクロース以外の糖不含である（すなわち溶出緩衝液は実質的に非スクロースのポリオールを含まない。）。

【0016】

溶出緩衝液中での使用のための糖は、1種類の糖または2種類以上の糖の組み合わせを含み得る。例えば、溶出緩衝液は、緩衝液中に存在する糖としてスクロースを含み得る。任意に、溶出緩衝液は、緩衝液中に存在する糖としてマンニトールまたはソルビトールの1以上（例えばマンニトールおよびソルビトールの組み合わせ）を含み得る。溶出緩衝液中に存在する糖の総濃度は、溶出緩衝液の重量に基づいて10重量%以下であり得る。例えば、糖の総濃度は、溶出緩衝液の重量に基づいて7.5重量%未満（例えば溶出緩衝液の重量に基づいて、7.4重量%未満、7.3重量%未満、7.2重量%未満、7.1重量%未満、7重量%未満、6重量%未満、5重量%未満、4重量%未満、3重量%未満、2重量%または1重量%未満）であり得る。例えば、スクロースは、0.1重量%から5重量%、1重量%から4.5重量%、2重量%から4重量%（例えば3重量%）の範囲の濃度で、または溶出緩衝液の重量にに対して列挙される範囲内の何れかの量で、溶出緩衝液中に存在し得る。任意に、マンニトールおよびソルビトールは、溶出緩衝液の重量に基づいて7.5%未満（例えば7%）の合計濃度で溶出緩衝液中に含まれ得る。例えば、これらの糖の合計濃度が溶出緩衝液の重量に基づいて7.5%未満となるよう、例えば、マンニトールは、0.01%から7.4%（例えば0.1%から7%、1%から6%、2%から5%または3%から4%）の範囲の濃度で含まれ得、ソルビトールは、0.01%から7.4%（例えば0.1%から7%、1%から6%、2%から5%または3%から4%）の範囲の濃度で含まれ得る。

【0017】

本明細書中に記載の溶出緩衝液中にはアミノ酸も含まれ得る。適切なアミノ酸としては、例えば、ヒスチジン、アルギニン、リジン、メチオニン、グルタミン酸またはこれらの混合物が含まれる。1以上のアミノ酸が、溶出緩衝液の重量に基づいて5%以下の濃度で溶出緩衝液中に存在し得る。例えば、アミノ酸濃度は、溶出緩衝液の重量に基づいて4.5%以下、4.0%以下、3.5%以下、3.0%以下、2.5%以下、2.0%以下、1.5%以下、1.0%以下または0.5%以下であり得る。



## 【0018】

上述のように、二価陽イオンも本明細書中に記載の溶出緩衝液中に含まれる。溶出緩衝液中での使用のための適切な二価陽イオンとしては、マグネシウム陽イオン（すなわち  $Mg^{2+}$ ）が挙げられる。 $Mg^{2+}$  は、 $MgCl_2$  など、塩として陰イオンと組み合わせて溶出緩衝液に導入され得る。いくつかの例において、二価陽イオン導入塩は、水和物であり得る（すなわち緩衝液に二価陽イオンを導入する塩は、金属中心に結合されているかまたは錯体と結晶化されている水分子を含有し得る。）。水和物は、例えば、一水和物、二水和物、三水和物、四水和物、五水和物、六水和物または七水和物であり得る。例えば、 $Mg^{2+}$  は、 $MgCl_2 \cdot 6H_2O$  として溶出緩衝液に導入され得る。任意に、溶出緩衝液は、実質的に  $Zn^{2+}$  不含である。二価陽イオンは、0.01 mM から 5 mM の範囲の濃度で溶出緩衝液中に存在し得る。例えば、 $Mg^{2+}$  は、0.1 mM から 4.5 mM、0.5 mM から 4 mM、1 mM から 3 mM の範囲の濃度（例えば 2 mM）で、または列举される範囲内の何らかの濃度で、 $MgCl_2$  または  $MgCl_2 \cdot 6H_2O$  としてウイルス製剤中に存在し得る。任意に、リン酸緩衝食塩水構成成分を除く溶出緩衝液中の賦形剤は、実質的に一価陽イオン塩、例えばナトリウム（ $Na^+$ ）、リチウム（ $Li^+$ ）、カリウム（ $K^+$ ）およびアンモニウム（ $NH_4^+$ ）含有塩など、不含であり得る。

10

## 【0019】

界面活性剤もまた本明細書中に記載の溶出緩衝液中に含まれ得る。界面活性剤とは、親水性部分および疎水性部分を一緒に有する物質を指す。本明細書中に記載の溶出緩衝液中での使用に適切な界面活性剤としては、イオン性および非イオン性界面活性剤が挙げられる。いくつかの例において、ポリソルベート 80 は、任意に溶出緩衝液中で非イオン性界面活性剤として含まれる。1 以上の界面活性剤は、溶出緩衝液中に、任意に溶出緩衝液の重量に基づいて 1 重量%未満の量で存在し得る。例えば、界面活性剤は、0.5 重量%未満、0.1 重量%未満または 0.05 重量%未満（例えば 0.01 重量%）の量で溶出緩衝液中に存在し得る。

20

## 【0020】

任意に、本溶出緩衝液は、実質的にカルボン酸塩不含である。カルボン酸塩の例としては、コハク酸塩およびクエン酸塩が挙げられる。

## 【0021】

上述のように、本明細書中で提供される溶出緩衝液は、リン酸緩衝食塩水（PBS）をさらに含む。リン酸緩衝食塩水は、例えば、1 以上のリン酸塩、1 以上の塩化物塩またはこれらの組み合わせを含み得る。任意に、この 1 以上のリン酸塩は、リン酸二ナトリウムおよび/またはリン酸二水素カリウムを含む。溶出緩衝液中での使用に適切な塩化物塩の例としては、塩化ナトリウムおよび/または塩化カリウムが挙げられる。リン酸緩衝食塩水を調製するために使用される塩は、任意に水和物である。上述のように、水和物は、例えば、一水和物、二水和物、三水和物、四水和物、五水和物、六水和物または七水和物であり得る。例えば、リン酸緩衝食塩水を調製するために使用されるリン酸二ナトリウムは、リン酸二ナトリウム七水和物（すなわち  $Na_2HPO_4 \cdot 7H_2O$ ）であり得る。

30

## 【0022】

溶出緩衝液中での使用のためのリン酸緩衝食塩水を調製するために使用される塩の代表的な組み合わせとしては、リン酸二ナトリウム七水和物（すなわち  $Na_2HPO_4 \cdot 7H_2O$ ）、リン酸二水素カリウム（すなわち  $KH_2PO_4$ ）、塩化ナトリウム（すなわち  $NaCl$ ）および塩化カリウム（すなわち  $KCl$ ）が挙げられる。任意に、 $Na_2HPO_4 \cdot 7H_2O$  は、リン酸緩衝食塩水中で、5 mM から 15 mM の  $Na_2HPO_4 \cdot 7H_2O$  濃度とするのに十分な量で、またはこの間の何れかの量で使用され得る。例えば  $Na_2HPO_4 \cdot 7H_2O$  は、7.5 mM から 12.5 mM または 9 mM から 11 mM（例えば 10.14 mM）の濃度とするのに十分な量で、またはこれらの間の何れかの量で使用され得る。任意に、 $KH_2PO_4$  は、リン酸緩衝食塩水中で、0.5 mM から 5 mM の濃度とするのに十分な量で、またはこれらの間の何れかの量で使用され得る。例えば、 $KH_2PO_4$  は、1.0 mM から 3.0 mM または 1.5 mM から 2.0 mM（例えば 1.76 mM）

40

50

M)の濃度とするのに十分な量で、またはこれらの間の何れかの量で使用され得る。任意に、NaClは、リン酸緩衝食塩水中で、75 mMから200 mMの濃度とするのに十分な量で、またはこれらの間の何れかの量で使用され得る。例えば、NaClは、100 mMから175 mMまたは125 mMから150 mM(例えば137 mM)の濃度とするのに十分な量で、またはこれらの間の何れかの量で使用され得る。任意に、KClは、リン酸緩衝食塩水中で、0.5 mMから5 mMの濃度とするのに十分な量で、またはこれらの間の何れかの量で使用され得る。例えば、KClは、1.0 mMから4.0 mMまたは1.5 mMから3.0 mM(例えば2.68 mM)の濃度とするのに十分な量で、またはこれらの間の何れかの量で使用され得る。

#### 【0023】

本明細書中に記載のような溶出緩衝液を生成させるための賦形剤、二価陽イオン、界面活性剤およびリン酸緩衝食塩水の代表的な組み合わせには、マンニトール、ヒスチジン、ソルビトール、MgCl<sub>2</sub>、ポリソルベート80およびリン酸緩衝食塩水が含まれる。ソルビトールは、溶出緩衝液の重量に基づいて3%未満の濃度で存在し得る。例えば、ソルビトールは、2.9%未満、2.8%未満、2.7%未満、2.6%未満、2.5%未満、2.4%未満、2.3%未満、2.2%未満、2.1%未満、2%未満、1.9%未満、1.8%未満、1.7%未満、1.6%未満、1.5%未満、1.4%未満、1.3%未満、1.2%未満、1.1%未満または1%未満の濃度で存在し得る。いくつかの例において、マンニトールおよびソルビトールの合計濃度は、溶出緩衝液の重量に基づいて10%未満である。例えば、合計濃度を5%とするために、マンニトールの濃度は3%であり得、ヒスチジンの濃度は2%であり得る。ポリソルベート80は、0.1溶出緩衝液重量%未満の量(例えば0.01%)で存在し得る。これらの例において、リン酸緩衝食塩水は、リン酸二ナトリウム、リン酸二水素カリウム、塩化ナトリウムおよび塩化カリウムを含み得る。さらに、溶出緩衝液は、実質的に一価陽イオン塩、Zn<sup>2+</sup>および/またはトレハロース不含であり得る。

#### 【0024】

別の適切な溶出緩衝液は、スクロース、MgCl<sub>2</sub>、ポリソルベート80およびリン酸緩衝食塩水を含む。任意に、スクロースは、溶出緩衝液の重量に基づいて5%未満の濃度で存在する。例えば、スクロースは、溶出緩衝液の重量に基づいて4.5%以下、4%以下、3.5%以下、3%以下、2.5%以下または2%以下の濃度で存在し得る。これらの例において、リン酸緩衝食塩水は、リン酸二ナトリウム、リン酸二水素カリウム、塩化ナトリウムおよび塩化カリウムを含み得る。さらに、溶出緩衝液は、実質的に一価陽イオン塩、非スクロースのポリオールおよびカルボン酸塩(例えばコハク酸塩およびクエン酸塩)不含であり得る。

#### 【0025】

本明細書中に記載の溶出緩衝液は、例えばウイルス製造中にウイルスを精製するために、ゲル浸透クロマトグラフィー溶出緩衝液として使用され得る。本明細書中に記載のようなウイルス精製方法には、ウイルスおよび液体担体を含むウイルス標品とゲル浸透クロマトグラフィーカラムを接触させることが含まれる。

#### 【0026】

本明細書中に記載のウイルス標品中での使用のためのウイルスとしては、エンベロープおよび非エンベロープウイルスが挙げられる。エンベロープおよび非エンベロープウイルスは、DNAウイルス、RNAウイルスまたはレトロウイルスであり得る。任意に、本明細書中に記載のウイルス標品での使用のためのウイルスは、非エンベロープウイルスである。非エンベロープウイルスとしては、例えば、アデノウイルス科(例えばアデノウイルス)、ピコルナウイルス科(例えばポリオウイルス)、レオウイルス科(例えばレオウイルス)、パピローマウイルス科(例えばパピローマウイルス)、ポリオーマウイルス科(例えばポリオーマウイルス)、パルボウイルス科(例えばキルハムラットウイルス)およびイリドウイルス科(例えばガガンボ-イリデッセントウイルス)に属するウイルスが挙げられる。

## 【 0 0 2 7 】

任意に、ウイルスは、腫瘍退縮ウイルスである。本明細書中に記載のウイルス標品および方法での使用に適切なウイルスとしては、マイオウイルス科、サイフォウイルス科、ポドウイルス科、テクティウイルス科、コルチコウイルス科、プラズマウイルス科、リボスリクスウイルス科、フセロウイルス科、ボックスウイルス科、イリドウイルス科、フィコドナウイルス科、バキュロウイルス科、ヘルペスウイルス科、アデノウイルス科、パポバウイルス科、ポリドナウイルス科、イノウイルス科、ミクロウイルス科、ジェミニウイルス科、サーコウイルス科、パルボウイルス科、ヘパドナウイルス科、レトロウイルス科、シストウイルス科、レオウイルス科、ビルナウイルス科、パラミクソウイルス科、ラプトウイルス科、フィロウイルス科、オルトミクソウイルス科、ブニヤウイルス科、アレナウイルス科、レピウイルス科、ピコルナウイルス科、セキウイルス科、コモウイルス科、ポティウイルス科、カリシウイルス科、アストロウイルス科、ノダウイルス科、テトラウイルス科、トンプスウイルス科、コロナウイルス科、フラビウイルス科、トガウイルス科、バルナウイルス科およびボルナウイルス科ウイルスが挙げられるが、これらに限定されない。

10

## 【 0 0 2 8 】

ウイルス標品は、任意にレオウイルスを含む。本明細書中で使用される場合、レオウイルスとは、天然および組み換えレオウイルスを含め、レオウイルス属に分類される何らかのウイルスを指す。レオウイルスは、2本鎖、分節RNAゲノムを有するウイルスである。ビリオンは、直径60から80nmであり、2個の正二十面体、同心円状カプシド殻を有する。ゲノムは、総ゲノムサイズが16から27キロ塩基対(kbp)である、10から12個の個々のセグメント中の2本鎖RNAからなる。個々のRNAセグメントの大きさは変動する。3種類の個別ではあるが関連するタイプのレオウイルスが多く種の回収されてきた。3種類は全て、共通する補体結合抗原を有する。ヒトレオウイルスは3種類の血清型：1型(Lang株、T1L)、2型(Jones株、T2J)および3型(Dearing株、T3DまたはAbney株、T3A)からなる。

20

## 【 0 0 2 9 】

上述のように、レオウイルスは、天然または非天然であり得る、組み換えレオウイルスであり得る。レオウイルスは、それが、天然起源から単離され得、実験室でヒトにより意図的に修飾されていない場合、天然と言われる。例えば、レオウイルスは、フィールド起源由来(すなわちレオウイルスに感染したヒト由来)であり得る。レオウイルスはまた、活性(例えば腫瘍退縮活性)向上のために選択されるかまたは変異誘発され得る。特異的なレオウイルスの例は、例えば米国特許第7,803,385号または米国特許出願公開第2008/0292594号で見出すことができる。

30

## 【 0 0 3 0 】

レオウイルスは、修飾されているが、活性ras経路を有する哺乳動物細胞にに対して依然として溶解性感染可能であり得る。レオウイルスは、増殖細胞への投与前に、化学的にまたは生化学的に(例えばキモトリプシンまたはトリプシンなどのプロテアーゼでの処置により)前処理され得る。プロテアーゼでの前処理により、ウイルスの外被またはカプシドが除去され、ウイルスの感染性が向上し得る。レオウイルスは、リボソームまたはミセル中で被覆され得る(ChandranおよびNibert, Journal of Virology, 72(1):467-75(1998))。例えば、新しい感染性サブウイルス粒子(ISVP)を生成させるために、ミセル形成濃度のアルキル硫酸塩界面活性剤の存在下でビリオンをキモトリプシンで処置し得る。

40

## 【 0 0 3 1 】

レオウイルスは、2以上の遺伝的に異なっているレオウイルス由来のゲノムセグメントの組み換え/再集合の結果得られる組み換えまたはリアソータントレオウイルスであり得る。レオウイルスゲノムセグメントの組み換え/再集合は、少なくとも2種類の遺伝的に異なっているレオウイルスの宿主生物への感染後に自然に起こり得る。組み換えビリオンはまた、細胞培養においても、例えば遺伝的に異なっているレオウイルスの許容宿主細胞

50

への同時感染によって作製され得る。したがって、本明細書中に記載の製剤での使用のための組み換えレオウイルスは、ヒトレオウイルス、例えば1型（例えばL a n g 株）、2型（例えばJ o n e s 株）および3型（例えばD e a r i n g 株またはA b n e y 株）、非ヒト哺乳動物レオウイルスまたは鳥類レオウイルスなどを含むが限定されない、2以上の遺伝的に異なっているレオウイルス由来のゲノムセグメントの再集合の結果であり得る。いくつかの例において、組み換えレオウイルスは、少なくとも1つの親ウイルスが遺伝子改変されているか、1以上の化学合成ゲノムセグメントを含むか、化学的または物理的変異原で処置されているか、またはそれ自身が組み換え事象の結果である、2以上の遺伝的に異なっているレオウイルス由来のゲノムセグメントの再集合の結果であり得る。組み換えレオウイルスでは、例えば硫酸ジメチルおよび臭化エチジウムを含むが限定されない化学的変異原または紫外線および他の形式の放射を含むが限定されない物理的変異原の存在下で組み換えが起こり得る。

10

#### 【0032】

適切な組み換えレオウイルスの他の例としては、1以上のゲノムセグメントに欠失または複製を含むもの、宿主細胞ゲノムでの組み換えの結果としてさらなる遺伝情報を含むものまたは合成遺伝子を含むものが挙げられる。レオウイルスは、ビリオン外殻カプシドへの例えば3など、変異導入コートタンパク質の組み込みによっても改変され得る。このタンパク質は、置換、挿入または欠失により変異導入され得る。置換には、ネイティブアミノ酸の代わりに異なるアミノ酸を挿入することが含まれる。挿入には、1以上の位置でのタンパク質へのさらなるアミノ酸残基の挿入が含まれる。欠失には、タンパク質における1以上のアミノ酸残基の欠失が含まれる。このような突然変異は、当技術分野で公知の方法により生成され得る。例えば、コートタンパク質の1つをコードする遺伝子の、オリゴヌクレオチド部位特異的突然変異誘発により、所望の突然変異コートタンパク質を生成させ得る。ある実施形態において、レオウイルスはI D A C # 1 9 0 9 0 7 - 0 1である。

20

#### 【0033】

本明細書中に記載のウイルス標品における使用のためのウイルスは、1以上の前精製段階が行われたものであり得る。ウイルスは、例えば、それらの全体において参照により本明細書中に組み込まれる米国特許第6,808,916号；同第7,186,542号；同第7,223,585号；および同第7,901,921号および米国特許出願公開第2007/0269856号に記載の方法に従い、本明細書中に記載のゲル浸透クロマトグラフィー法の前に精製され得る。例えば、密度勾配遠心、限外濾過、ダイアフィルトレーション、イオン交換クロマトグラフィー、高速液体クロマトグラフィーまたはこれらの組み合わせの技術を用いて、ウイルスを他の粒子から分離し得る。

30

#### 【0034】

本明細書中に記載のウイルス標品は液体担体をさらに含む。適切な液体担体は、水性または非水性担体であり得る。適切な非水性担体の例としては、プロピレングリコール、ポリエチレングリコールおよび、石油、動物、植物または合成由来のものを含む油、例えばピーナツ油、大豆油、鉱物油、ゴマ油、オリーブ油などが挙げられる。オレイン酸エチルなどの有機エステルもまた適切な非水性担体である。水性担体としては、食塩水および緩衝化液を含む、水、エタノール、グリセロール、アルコール性/水性溶液、乳濁液または懸濁液が挙げられる。食塩水溶液および水性デキストロースおよびグリセロール溶液もまた液体担体として使用され得る。本標品はまた、必要に応じて、湿潤剤または乳化剤、潤滑剤、流動促進剤、皮膚軟化剤、保湿剤、増粘剤、香味剤、保存料またはpH緩衝液も含む。ウイルス標品のpHを調節するために、溶出緩衝液中に含まれるリン酸緩衝食塩水に加えて、pH緩衝液が含まれ得る。いくつかの例において、ウイルス標品のpHを5から8.5の間に維持するために緩衝液が含まれる。例えば、ウイルス製剤のpHを6.8から8.0または7.0から7.8の間（例えば7.4）に維持するために緩衝液が含まれ得る。適切な緩衝液の例としては、リン酸緩衝液、例えば0.05Mリン酸緩衝液、酢酸緩衝液、安息香酸緩衝液、クエン酸緩衝液、乳酸緩衝液、マレイン酸緩衝液および酒石酸緩衝液が挙げられる。ハンクス溶液、リンゲル液、デキストロース溶液、5%ヒト

40

50

血清アルブミン、リンゲルデキストロース、デキストロースおよび塩化ナトリウム、乳酸リンゲルおよび固定油、ポリエチレングリコール、ポリビニルピロリドンまたはレシチンのような緩衝担体を使用することができる。適切な緩衝液としてモノエタノールアミン、ジエタノールアミン、トロメタミンおよびグリシン溶液も使用され得る。リポソームおよび非水性ビヒクル、例えば固定油なども担体として使用され得る。適切な担体のさらなる例は、Remington: The Science and Practice of Pharmacy (21th ed.) ed. David B. Troy, Lippincott Williams & Wilkins, 2005に記載されている。いくつかの例において、この緩衝液は、本明細書中に記載のウイルス標品または溶出緩衝液中で使用されない。

10

#### 【0035】

本ウイルス標品は、ウイルスを液体担体と組み合わせることによって調製される。いくつかの例において、 $1 \times 10^5$  から  $1 \times 10^{14}$  ウイルス粒子/mL (VP/mL) の範囲のタイターでウイルス標品を調製するために、適切な量のウイルスが提供される。あるいは、ウイルス感染した細胞培養物に液体担体を添加し得る。本明細書中で使用される場合、細胞の培養物とは、それらの培養条件で見出されるような培養細胞集団を指す（例えばウイルス感染した細胞および培地）。さらに、ウイルス標品を作製するために、ウイルス感染細胞の溶液または懸濁液を液体担体で希釈し得る。

#### 【0036】

任意に、ウイルス標品の液体担体は、本明細書中に記載のような溶出緩衝液である。液体担体が溶出緩衝液以外である実施形態において、ウイルス標品は、ゲル浸透クロマトグラフィー法で直接使用され得る。あるいは、液体担体としての溶出緩衝液とともにウイルス標品を提供するために、緩衝液交換が行われ得る。当業者にとって公知の方法に従い、緩衝液交換を行い得る。例えば、ろ過方法を用いて緩衝液交換を行い得る。

20

#### 【0037】

上記で論じられるように、ウイルスを精製する方法は、ゲル浸透クロマトグラフィーカラムを本明細書中に記載のウイルス標品と接触させることを含む。本明細書中に記載のようなゲル浸透クロマトグラフィーカラムおよび溶出緩衝液を含む装置を用いて、ウイルスを精製する方法を行い得る。本方法での使用のためのおよび本明細書中に記載の装置中に含まれるゲル浸透クロマトグラフィーカラムは市販品であり得る。例えばゲル浸透クロマトグラフィーカラムは、GE Healthcare (Chalfont St. Giles, UK) から市販されているBPGカラム、Amersham Biosciences (Piscataway, NJ) から市販されているXK16/70カラムまたは他の同等物であり得る。ゲル浸透クロマトグラフィーカラムでの使用のための適切なレジンの例としては、SEPHAROSE 4 Fast FlowレジンおよびSEPHAROSE CL-4Bレジン（両者ともGE Healthcareから市販）または他の同等物が挙げられる。適切なゲル浸透クロマトグラフィーカラムのさらなる例としては、SUPERDEXカラム（例えばSUPERDEX-200カラム）およびSEPHAROSEカラム（例えばSEPHAROSE 4FFレジンカラム（両者ともGE Healthcareから市販）または他の同等物が挙げられる。任意に、ゲル浸透クロマトグラフィーカラムをウイルス標品と接触させる前に、このゲル浸透クロマトグラフィーカラムを緩衝液で平衡化する。ゲル浸透クロマトグラフィーカラムを接触させることには、例えば標品をカラムに手動で載せることまたは自動化システムを使用して標品をカラムに載せることが含まれる。載せた後、ウイルスはゲル浸透クロマトグラフィーカラム上で保持され、その後、本明細書中に記載のような溶出緩衝液をカラムに通すことによってカラムから回収される。ウイルス溶出は、例えば紫外線検出器を使用して、または溶出剤の伝導度もしくは屈折率を測定することによって、検出することができる。

30

40

#### 【0038】

本明細書中に記載の方法により、他の溶出緩衝液を使用して得られたウイルスの回収率と比較した場合、本明細書中に記載の溶出緩衝液を用いたゲル浸透クロマトグラフィーカ

50

ラムからのウイルスの回収率が向上する。いくつかの例において、本明細書中に記載の溶出緩衝液を用いた場合のウイルス回収率は、リン酸緩衝食塩水のみ（すなわち賦形剤、二価陽イオンおよび任意に界面活性剤を含まないリン酸緩衝食塩水）で溶出されるウイルスの回収率よりも少なくとも約20%高い。例えば、ウイルス回収率は、リン酸緩衝食塩水のみで溶出されるウイルスの回収率よりも少なくとも約25%高いか、少なくとも約30%高いか、または少なくとも約35%高い。

#### 【0039】

本明細書中に記載の方法は、精製ウイルス製剤を提供する。精製ウイルス製剤は、ゲル浸透クロマトグラフィーカラムから溶出されたウイルスと、ゲル浸透クロマトグラフィー媒体と接触させられた溶出緩衝液と、を含む。溶出されたウイルスは精製ウイルスであり得る。本明細書中で使用される場合、精製ウイルスとは、天然でそれらに付随する細胞構成成分から分離されているウイルスを指す。通常、ウイルスが、天然でそれらに付随するタンパク質および他の細胞構成成分を、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%または少なくとも99乾燥重量%、含まないようにしている場合、そのウイルスは精製されているとみなされる。

10

#### 【0040】

任意に、本明細書中に記載の精製ウイルス製剤は、ゲル浸透クロマトグラフィー媒体と接触させられた溶出緩衝液中で、ある時間にわたり保存され得る。例えば、精製ウイルスおよび溶出緩衝液を含有する精製ウイルス製剤をゲル浸透クロマトグラフィーカラムから溶出した後、最長12ヶ月までその精製ウイルス製剤を保存することができる（例えば1日、1週間、1ヶ月、3ヶ月、6ヶ月、9ヶ月または12ヶ月を含む。）。いくつかの例において、精製ウイルス製剤は、保存期間中、ウイルス感染性を保持する。精製ウイルス製剤は、周囲温度前後または周囲温度よりも低い温度で保存され得る。本明細書中で使用される場合、周囲温度は、約10 から約30 の間の温度を指す。

20

#### 【0041】

本願を通じて、様々な刊行物が参照される。それらの全体におけるこれらの刊行物の開示は、本願に参照により本明細書により組み込まれる。

#### 【0042】

多くの態様が記載されているものの、様々な変更が為され得ることを理解されたい。さらに、ある特徴または段階が記載される場合、その組み合わせに明確に言及されなくても、本明細書中で何らかの他の特徴または段階と組み合わせられ得る。したがって、他の態様は請求項の範囲内である。

30

#### 【実施例】

#### 【0043】

（実施例1）：材料

溶出緩衝液を調製するために使用した材料は、別段の指示がない限り、Sigma-Aldrich (St. Louis, MO) から入手した。50.06グラムのMilli-Qグレード水および1.03グラムのTween 80保存液を組み合わせることによって、Milli-Qグレード水中1% Tween 80の希釈標準溶液を調製した。構成成分を混合した後、さらなるMilli-Qグレード水を添加して100gの溶液を得た。80.61グラムのMilli-Qグレード水および2.04グラムのMgCl<sub>2</sub>・6H<sub>2</sub>Oを組み合わせることによって、100mM MgCl<sub>2</sub>・6H<sub>2</sub>Oの希釈標準溶液を調製した。構成成分を混合した後、さらなるMilli-Qグレード水を添加して100gの溶液を得た。

40

#### 【0044】

（実施例2）：溶出緩衝液1

次の手順に従い、溶出緩衝液1を調製した。Milli-Qグレード水（1.0kg）およびL-ヒスチジン（32.0g）を合わせ、室温で10分間攪拌した。次に混合物を40±5 に加熱して、水中でL-ヒスチジンを完全に溶解させた。次いで加熱を止め、

50

混合物に次の構成成分を添加した：D - マンニトール ( 4 8 . 0 2 g )、1 % T w e e n 8 0 希釈標準溶液 ( 1 6 . 0 2 g )、D - ソルビトール ( 3 2 . 0 3 g )、1 0 0 m M  $MgCl_2 \cdot 6H_2O$  希釈標準溶液 ( 3 2 . 0 g )、 $KH_2PO_4$  ( 0 . 3 8 g )、 $Na_2HPO_4 \cdot 7H_2O$  ( 4 . 3 6 g )、K C l ( 0 . 3 2 g ) および N a C l ( 1 2 . 8 0 g )。構成成分をよく混合し、さらなる M i l l i - Q グレード水を添加して 1 . 6 k g の緩衝液を得た。

【 0 0 4 5 】

緩衝液の調製日と同日に較正した pH メーターを用いたところ、緩衝液の pH は 7 . 5 2 であった。次に、0 . 4 5  $\mu$  m H A 膜付きの M i l l i p o r e る過システム ( M i l l i p o r e ; B i l l e r i c a , M A ) を通じて溶出緩衝液をろ過し、3 0 分間にわたり室温で脱気して、溶出緩衝液 1 を生成させた。

10

【 0 0 4 6 】

( 実施例 3 ) : 溶出緩衝液 2

次の手順に従い、溶出緩衝液 2 を調製した。M i l l i - Q グレード水 ( 1 . 0 k g )、スクロース ( 6 4 . 0 g )、T w e e n 8 0 ( 0 . 8 1 g )、1 0 0 m M  $MgCl_2 \cdot 6H_2O$  希釈標準溶液 ( 3 2 . 0 g )、 $KH_2PO_4$  ( 0 . 3 8 g )、 $Na_2HPO_4 \cdot 7H_2O$  ( 4 . 3 5 g )、K C l ( 0 . 3 2 g ) および N a C l ( 1 2 . 8 0 g ) を合わせた。構成成分をよく混合し、さらなる M i l l i - Q グレード水を添加して、1 . 6 k g の緩衝液を得た。

【 0 0 4 7 】

20

緩衝液の調製日と同日に較正した pH メーターを用いたところ、緩衝液の pH は 7 . 4 0 であった。次に、0 . 4 5  $\mu$  m H A 膜付きの M i l l i p o r e る過システム ( M i l l i p o r e ; B i l l e r i c a , M A ) を通じて溶出緩衝液をろ過し、3 0 分にわたり室温で脱気して、溶出緩衝液 2 を生成させた。

【 0 0 4 8 】

( 実施例 4 ) : 溶出緩衝液 1 - 2 x

次の手順に従い、実施例 2 で示される緩衝液の 2 倍の濃縮処方の溶出緩衝液 1 を調製した。M i l l i - Q グレード水 ( 6 1 . 7 8 g ) および L - ヒスチジン ( 4 . 0 0 g ) を合わせ、室温で 1 0 分間攪拌した。次に、混合物を 4 0 に 2 7 分間加熱し、水中で L - ヒスチジンを完全に溶解させた。次いで加熱を止め、混合物に次の構成成分を添加した：D - マンニトール ( 6 . 0 0 g )、1 % T w e e n 8 0 希釈標準溶液 ( 2 . 0 2 g )、D - ソルビトール ( 4 . 0 0 g )、1 0 0 m M  $MgCl_2 \cdot 6H_2O$  希釈標準溶液 ( 4 . 0 1 g )、 $KH_2PO_4$  ( 0 . 0 2 4 g )、 $Na_2HPO_4 \cdot 7H_2O$  ( 0 . 2 7 g )、K C l ( 0 . 0 2 1 g ) および N a C l ( 0 . 8 1 g )。構成成分をよく混合し、さらなる M i l l i - Q グレード水を添加して、1 0 0 g の緩衝液を得た。

30

【 0 0 4 9 】

緩衝液の調製日と同日に較正した pH メーターを用いたところ、緩衝液の pH は 7 . 5 9 であった。次に、0 . 4 5  $\mu$  m 酢酸セルロース膜 ( C o r n i n g I n c o r p o r a t e d ; C o r n i n g , N Y ) 付きの 1 5 0 m L C o r n i n g る過システムを通じて溶出緩衝液をろ過し、溶出緩衝液 1 - 2 x を生成させた。

40

【 0 0 5 0 】

( 実施例 5 ) : 溶出緩衝液 2 - 2 x

次の手順に従い、実施例 3 で示される緩衝液の 2 倍の濃縮処方の溶出緩衝液 2 を調製した。M i l l i - Q グレード水 ( 6 0 . 0 g )、スクロース ( 8 . 0 0 g )、1 % T w e e n 8 0 希釈標準溶液 ( 1 0 . 0 g )、1 0 0 m M  $MgCl_2 \cdot 6H_2O$  希釈標準溶液 ( 4 . 0 1 g )、 $KH_2PO_4$  ( 0 . 0 2 4 g )、 $Na_2HPO_4 \cdot 7H_2O$  ( 0 . 2 7 g )、K C l ( 0 . 0 2 1 g ) および N a C l ( 0 . 8 0 g ) を合わせた。構成成分をよく混合し、さらなる M i l l i - Q グレード水を添加して 1 0 0 g の緩衝液を生成させた。

【 0 0 5 1 】

50

緩衝液の調製日と同日に校正した pH メーターを用いたところ、緩衝液の pH は 7.28 であった。次に、0.45  $\mu$ m 酢酸セルロース膜 (Corning Incorporated; Corning, NY) 付きの 150 mL Corning ろ過システムを通じて溶出緩衝液をろ過し、溶出緩衝液 2 - 2x を生成させた。

#### 【0052】

(実施例 6) : ウイルス標品

リン酸緩衝食塩水 (PBS) 中  $2.76 \times 10^{14}$  個のレオウイルス粒子を与えることにより、対照ウイルス標品 (対照標品) を調製した。溶出緩衝液 1 中で  $2.76 \times 10^{14}$  個のレオウイルス粒子を与えることにより、ウイルス標品 1 を調製した。溶出緩衝液 2 中で  $2.76 \times 10^{14}$  個のレオウイルス粒子を与えることにより、ウイルス標品 2 を調製した。

#### 【0053】

実施例 7 : ゲル浸透クロマトグラフィー後のウイルス回収

実施例 6 で調製したウイルス標品 (対照標品、ウイルス標品 1 およびウイルス標品 2) をそれぞれ個々にゲル浸透クロマトグラフィーカラム上に載せた。対照標品、ウイルス標品 1 およびウイルス標品 2 を PBS、緩衝液処方 1 および緩衝液処方 2 でそれぞれ溶出した。個々の実験からの平均データを表 1 および 2 で示す。

#### 【0054】

##### 【表 1】

表 1

ウイルス標品	溶出緩衝液	総ウイルス粒子 GPC 前	総ウイルス粒子 GPC 後	段階回収率%
対照処方物	PBS	$2.76 \times 10^{14}$	$2.07 \times 10^{14}$	75%
ウイルス標品 1	溶出緩衝液 1	$2.76 \times 10^{14}$	$2.96 \times 10^{14}$	107%
ウイルス標品 2	溶出緩衝液 2	$2.76 \times 10^{14}$	$3.05 \times 10^{14}$	111%

#### 【0055】

##### 【表 2】

表 2

ウイルス標品	溶出緩衝液	総ウイルス粒子 GPC 前	総ウイルス粒子 GPC 後	段階回収率%
対照処方物	PBS	$2.51 \times 10^{16}$	$1.70 \times 10^{16}$	68%
対照処方物	PBS	$1.31 \times 10^{16}$	$9.58 \times 10^{15}$	73%
ウイルス標品 1	溶出緩衝液 1	$1.57 \times 10^{16}$	$1.42 \times 10^{16}$	90%
ウイルス標品 1	溶出緩衝液 1	$4.29 \times 10^{16}$	$4.13 \times 10^{16}$	96%
ウイルス標品 1	溶出緩衝液 1	$3.28 \times 10^{16}$	$3.48 \times 10^{16}$	106%

#### 【0056】

表 1 で示されるように、ゲル浸透カラムでのレオウイルスと溶出緩衝液 1 の使用によって、PBS 単独使用と比較した場合、ウイルス回収率が 75% から 107% に上昇した。表 2 は、溶出緩衝液 1 を用いると、PBS 単独使用と比較して、ウイルス回収率が一貫して上昇することを示す。さらに、ゲル浸透カラムでのレオウイルスと溶出緩衝液 2 の使用により、PBS 単独使用と比較した場合、ウイルス回収率が 75% から 111% に上昇した (表 1 参照)。したがって、レオウイルスに溶出緩衝液 1 および 2 を添加すると、レオウイルスと PBS の使用と比較して、それぞれおよそ 32% および 36%、タイターが上昇した。

#### 【0057】

添付の特許請求の範囲の組成物および方法は、特許請求の範囲のいくつかの態様の例示であるものとする本明細書中に記載の具体的な組成物および方法により範囲を限定されず、機能的に同等であるいかなる組成物および方法も本開示の範囲内に入る。本明細書中で示され、記載される組成物および方法に加えて、これらの組成物および方法の様々な変形



物が添付の特許請求の範囲内に含まれるものとする。さらに、具体的に記載されるのは、これらの組成物および方法のある一定の代表的な組成物、方法および態様のみであるが、具体的に列挙されなくても、他の組成物および方法ならびにこれらの組成物および方法の様々な特性の組み合わせが、添付の特許請求の範囲内に包含されるものとする。したがって、段階、要素、構成成分または構成物質の組み合わせが明確に本明細書中で言及され得るが、明確に述べられていなくても、段階、要素、構成成分または構成物質の他の組み合わせ全てが含まれる。

## フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I  
**G 0 1 N 30/50 (2006.01)** G 0 1 N 30/50  
**C 1 2 M 1/00 (2006.01)** C 1 2 M 1/00 Z

(72)発明者 ヘイゲルマン, アリソン  
 カナダ国 ティー４シー １エー２ アルバータ, コクラン, アールアールナンバー２, サ  
 イト １１, ボックス ７

(72)発明者 カバディア, ロクソナ  
 イギリス国 エルイー３ ８エフエス レスターシャー, レスター, グレンフィールド, ト  
 ライアンフ ロード ３６

(72)発明者 セル, サラ  
 カナダ国 ティー２ダブリュー ２ティー７ アルバータ, カルガリー, エスダブリュー,  
 ブルックミア ロード ５ - ３ １ ０

審査官 福澤 洋光

(56)参考文献 特表２０１１ - ５０７４８９ (ＪＰ, Ａ)  
 特開平０３ - ０５８９９８ (ＪＰ, Ａ)  
 特表平０３ - ５０３７６４ (ＪＰ, Ａ)  
 特表平１０ - ５００８４７ (ＪＰ, Ａ)  
 国際公開第２００８ / ０１８４１１ (ＷＯ, Ａ１)  
 国際公開第２００８ / ００６７８０ (ＷＯ, Ａ１)  
 HUYGHE B. G., HUMAN GENE THERAPY, １９９５年, V6 N11, P1403-1416

(58)調査した分野(Int.Cl., ＤＢ名)  
 C 1 2 N 7 / 0 2  
 C A p l u s / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S ( S T N )  
 J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 ( J D r e a m I I I )  
 P u b M e d