



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2023-0049670
(43) 공개일자 2023년04월13일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 9/19 (2006.01) A61K 47/02 (2006.01)
A61K 47/18 (2017.01) A61K 47/26 (2017.01)
A61K 47/34 (2017.01) A61K 48/00 (2006.01)
C12N 15/86 (2006.01) C12N 7/00 (2006.01)

(52) CPC특허분류

A61K 9/19 (2013.01)
A61K 47/02 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2023-7007796

(22) 출원일자(국제) 2021년08월06일

심사청구일자 없음

(85) 번역문제출일자 2023년03월06일

(86) 국제출원번호 PCT/US2021/044955

(87) 국제공개번호 WO 2022/032104

국제공개일자 2022년02월10일

(30) 우선권주장

63/063,128 2020년08월07일 미국(US)

63/063,108 2020년08월07일 미국(US)

(71) 출원인

얀센 바이오테크 인코포레이티드

미국 펜실베이니아주 19044 호삼 릿지뷰 드라이브
800/850

(72) 발명자

탐코위츠, 브라이언, 이.

미국 펜실베이니아 19477 스프링 하우스 맥킨 로드
1400

에르콜리노, 매튜, 피.

미국 펜실베이니아 19477 스프링 하우스 맥킨 로드
1400

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

특허법인한성

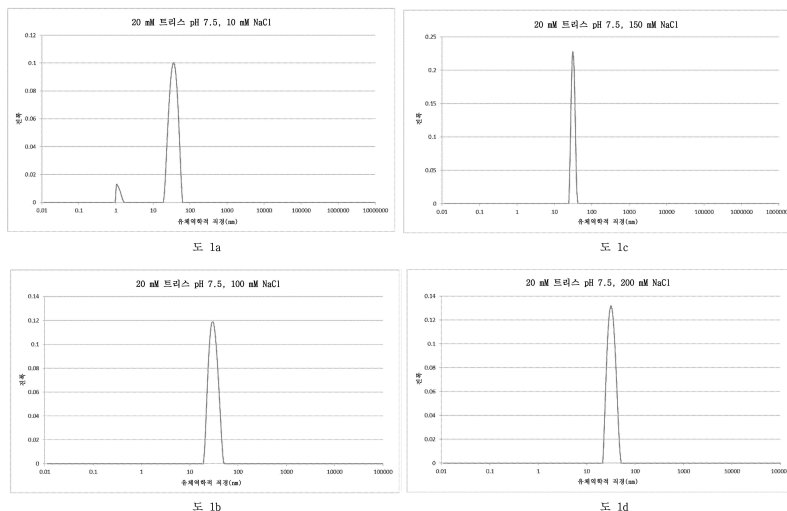
전체 청구항 수 : 총 45 항

(54) 발명의 명칭 고도로 정제된 바이러스 입자를 위한 제형

(57) 요약

본 명세서에는 고도로 정제된 바이러스 입자(예를 들어, 아데노-관련 바이러스(AAV) 입자)를 위한 제형이 제공된다. 제형은 불순물(예를 들어, 생성물-관련 불순물 및 공정-관련 불순물)이 실질적으로 없는 정제된 AAV 입자, 및 완충제, 동결보호제, 비-이온성 계면활성제, 및 임의로 약제학적으로 허용가능한 염 중 하나 이상을 포함한다. 소정의 태양에서, 제형은 정제된 AAV 입자의 안정성을 유지하거나 향상시키고/시키거나 응집을 감소시키거나 방지한다.

대표도



(52) CPC특허분류

A61K 47/18 (2013.01)

A61K 47/26 (2013.01)

A61K 47/34 (2013.01)

A61K 48/0091 (2013.01)

C12N 15/86 (2013.01)

C12N 7/00 (2013.01)

C12N 2750/14143 (2013.01)

C12N 2750/14151 (2013.01)

(72) 발명자

스파그놀, 스테판, 티.

미국 펜실베이니아 19477 스프링 하우스 맥킨 로드
1400

모하파트라, 사카, 싱

미국 펜실베이니아 19477 스프링 하우스 맥킨 로드
1400

스미스, 제프리

미국 펜실베이니아 19477 스프링 하우스 맥킨 로드
1400

명세서

청구범위

청구항 1

정제된 아데노-관련 바이러스(AAV) 입자, 완충제, 동결보호제(cryoprotectant), 및 비-이온성 계면활성제를 포함하며, 여기서

- (a) 정제된 AAV 입자에는 불순물이 실질적으로 없고,
- (b) 완충제 농도는 약 0 mM 내지 약 50 mM이고,
- (c) 동결보호제는 약 1% 내지 약 10%(w/v)이고,
- (d) 비-이온성 계면활성제는 약 0.0001%(w/v) 내지 약 0.1%(w/v)인, 약제학적 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 약제학적으로 허용가능한 염을 추가로 포함하며, 여기서 약제학적으로 허용가능한 염 농도는

- (a) 약 1 mM 내지 약 200 mM.
- (b) 약 10 mM 내지 약 150 mM;
- (c) 약 10 mM;
- (d) 약 100 mM; 또는
- (e) 약 150 mM인, 약제학적 조성물.

청구항 3

정제된 AAV 입자, 약제학적으로 허용가능한 염, 완충제, 동결보호제, 및 비-이온성 계면활성제를 포함하며, 여기서

- (a) 정제된 AAV 입자에는 불순물이 실질적으로 없고,
- (b) 약제학적으로 허용가능한 염 농도는 약 1 mM 내지 약 49 mM이고,
- (c) 완충제 농도는 약 0 mM 내지 약 50 mM이고,
- (d) 동결보호제는 약 1% 내지 약 10%(w/v)이고,
- (e) 비-이온성 계면활성제는 약 0.0001%(w/v) 내지 약 0.1%(w/v)인, 약제학적 조성물.

청구항 4

제3항에 있어서, 약제학적으로 허용가능한 염 농도는

- (a) 약 5 mM 내지 약 45 mM;
- (b) 약 7.5 mM 내지 약 40 mM;
- (c) 약 10 mM 내지 약 30 mM; 또는
- (d) 약 10 mM인, 약제학적 조성물.

청구항 5

제2항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 약제학적으로 허용가능한 염은 소듐 염, 마그네슘 염, 칼슘 염, 포타슘 염, 포스페이트 염, 및 설페이트 염으로 이루어진 군으로부터 선택되며, 여기서 소듐 염은 임의로 소듐 클로라이드를 포함하는, 약제학적 조성물.

청구항 6

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, 완충제는 트리스 HCl 또는 L-히스티딘 HCl을 포함하는, 약제학적 조성물.

청구항 7

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서, 완충제 농도는 약 20 mM을 포함하는, 약제학적 조성물.

청구항 8

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서, 동결보호제는

- (a) 약 3%(w/v) 내지 약 8%(w/v);
- (b) 약 4%(w/v) 내지 약 6%(w/v); 또는
- (c) 약 5%(w/v)인, 약제학적 조성물.

청구항 9

제1항 내지 제8항 중 어느 한 항에 있어서, 동결보호제는 당을 포함하는, 약제학적 조성물.

청구항 10

제9항에 있어서, 당은

- (a) 수크로스, 트레할로스, 또는 이들의 조합; 또는
- (b) 트레할로스를 포함하는, 약제학적 조성물.

청구항 11

제1항 내지 제10항 중 어느 한 항에 있어서, 비-이온성 계면활성제는

- (a) 약 0.0005%(w/v) 내지 약 0.005%(w/v);
- (b) 약 0.00075%(w/v) 내지 약 0.0025%(w/v); 또는
- (c) 약 0.001%(w/v)인, 약제학적 조성물.

청구항 12

제1항 내지 제11항 중 어느 한 항에 있어서, 비-이온성 계면활성제는 공중합체, 폴리옥시에틸렌 소르비탄 에스테르, 인지질, Brij 계면활성제, 및 소르비탄 에스테르, 또는 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되며, 여기서 폴리옥시에틸렌 소르비탄 에스테르는 (PS-20), 및 폴리소르베이트 80(PS-80), 또는 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 임의로 선택되고;

여기서 공중합체는 폴록사머를 임의로 포함하고;

여기서 폴록사머는 임의로

- (a) 폴록사머 188(P188), 폴록사머 237(P237), 폴록사머 338(P338), 및 폴록사머 407(P407), 또는 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되거나;
- (b) 폴록사머 188(P188)을 포함하는, 약제학적 조성물.

청구항 13

정제된 AAV 입자, 완충제, 동결보호제, 및 비-이온성 계면활성제를 포함하며, 여기서

- (a) 정제된 AAV 입자에는 불순물이 실질적으로 없고,
- (b) 완충제 농도는 약 20 mM이고,

- (c) 동결보호제는 약 5%(w/v) 트레할로스이고,
- (d) 비-이온성 계면활성제는 약 0.001%(w/v) 폴록사머 188인, 약제학적 조성물.

청구항 14

정제된 AAV 입자, 약제학적으로 허용가능한 염, 완충제, 동결보호제, 및 비-이온성 계면활성제를 포함하며, 여기서

- (a) (i) 정제된 AAV 입자에는 불순물이 실질적으로 없고,
- (ii) 약제학적으로 허용가능한 염 농도는 약 10 mM 소듐 클로라이드이고,
- (iii) 완충제 농도는 약 20 mM이고,
- (iv) 동결보호제는 약 5%(w/v) 트레할로스이고,
- (v) 비-이온성 계면활성제는 약 0.001%(w/v) 폴록사머 188이거나;
- (b) (i) 정제된 AAV 입자에는 불순물이 실질적으로 없고,
- (ii) 약제학적으로 허용가능한 염 농도는 약 25 mM 소듐 클로라이드이고,
- (iii) 완충제 농도는 약 20 mM이고,
- (iv) 동결보호제는 약 5%(w/v) 트레할로스이고,
- (v) 비-이온성 계면활성제는 약 0.001%(w/v) 폴록사머 188이거나;
- (c) (i) 정제된 AAV 입자에는 불순물이 실질적으로 없고,
- (ii) 약제학적으로 허용가능한 염 농도는 약 50 mM 소듐 클로라이드이고,
- (iii) 완충제 농도는 약 20 mM이고,
- (iv) 동결보호제는 약 5%(w/v) 트레할로스이고,
- (v) 비-이온성 계면활성제는 약 0.001%(w/v) 폴록사머 188이거나;
- (d) (i) 정제된 AAV 입자에는 불순물이 실질적으로 없고,
- (ii) 약제학적으로 허용가능한 염 농도는 약 100 mM 소듐 클로라이드이고,
- (iii) 완충제 농도는 약 20 mM이고,
- (iv) 동결보호제는 약 5%(w/v) 트레할로스이고,
- (v) 비-이온성 계면활성제는 약 0.001%(w/v) 폴록사머 188이거나;
- (e) (i) 정제된 AAV 입자에는 불순물이 실질적으로 없고,
- (ii) 약제학적으로 허용가능한 염 농도는 약 125 mM 소듐 클로라이드이고,
- (iii) 완충제 농도는 약 20 mM이고,
- (iv) 동결보호제는 약 5%(w/v) 트레할로스이고,
- (v) 비-이온성 계면활성제는 약 0.001%(w/v) 폴록사머 188이거나;
- (f) (i) 정제된 AAV 입자에는 불순물이 실질적으로 없고,
- (ii) 약제학적으로 허용가능한 염 농도는 약 150 mM 소듐 클로라이드이고,
- (iii) 완충제 농도는 약 20 mM이고,
- (iv) 동결보호제는 약 5%(w/v) 트레할로스이고,
- (v) 비-이온성 계면활성제는 약 0.001%(w/v) 폴록사머 188이거나;
- (g) (i) 정제된 AAV 입자에는 불순물이 실질적으로 없고,

- (ii) 약제학적으로 허용가능한 염 농도는 약 200 mM 소듐 클로라이드이고,
- (iii) 완충제 농도는 약 20 mM이고,
- (iv) 동결보호제는 약 5%(w/v) 트레할로스이고,
- (v) 비-이온성 계면활성제는 약 0.001%(w/v) 폴록사머 188인, 약제학적 조성물.

청구항 15

제13항 또는 제14항에 있어서, 완충제는 트리스 하이드로클로라이드(HCl) 또는 L-히스티딘 HCl을 포함하는, 약제학적 조성물.

청구항 16

제1항 내지 제15항 중 어느 한 항에 있어서, 약제학적 조성물 pH는

- (a) 약 4.0 내지 약 9.0;
- (b) 약 7.0 내지 약 8.0;
- (c) 약 7.3 내지 약 7.7; 또는
- (d) 약 7.5인, 약제학적 조성물.

청구항 17

제1항 내지 제16항 중 어느 한 항에 있어서,

- (a) AAV는 AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, 및 AAV10으로 이루어진 군으로부터 선택되고/되거나,
- (b) AAV는 재조합 AAV(rAAV)를 포함하는, 약제학적 조성물.

청구항 18

제1항 내지 제17항 중 어느 한 항에 있어서, 정제된 AAV 입자 역가는

- (a) 약 1×10^{10} 바이러스 게놈/밀리리터(vg/mL) 이상;
- (b) 약 1×10^{11} 바이러스 게놈/밀리리터(vg/mL) 이상;
- (c) 약 1×10^{12} 바이러스 게놈/밀리리터(vg/mL) 이상;
- (d) 약 1×10^{13} 바이러스 게놈/밀리리터(vg/mL) 이상;
- (e) 약 1×10^{14} 바이러스 게놈/밀리리터(vg/mL) 이상; 또는
- (f) 약 1×10^{15} 바이러스 게놈/밀리리터(vg/mL) 이상인, 약제학적 조성물.

청구항 19

제1항 내지 제18항 중 어느 한 항에 있어서, 불순물은

- (a) 공정-관련 불순물

(여기서 공정-관련 불순물은 잔류 숙주-세포 성분, 잔류 바이러스 생성 성분, 잔류 세포 배양 성분, 잔류 정제 성분, 또는 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 임의로 선택되고/되거나,

여기서 잔류 숙주-세포 성분은 숙주-세포 단백질, 숙주-세포 DNA, 숙주-세포 RNA, 또는 이들의 조합을 임의로 포함하고/하거나,

여기서 숙주-세포 DNA는 바이러스 외(extra-viral), 염색질-관련 DNA를 임의로 포함하고/하거나,

여기서 잔류 바이러스 생성 성분은 플라스미드 DNA, 헬퍼 바이러스, 또는 이들의 조합을 임의로 포함하고/하거나,

여기서 잔류 세포 배양 성분은 항생제, 보충제, 유도 인자, 성장 인자, 또는 이들의 조합을 임의로 포함하고/하거나,

여기서 잔류 정제 성분은 완충제, 무기 염, 효소, 세제, 배지, 또는 이들의 조합을 임의로 포함함);

(b) 생성물-관련 불순물(여기서 생성물-관련 불순물은 빈 캡시드(empty capsid), 응집된 AAV 입자, 분해된 AAV 입자, 또는 이들의 조합을 포함함); 또는

(c) (a) 및 (b)의 조합을 포함하는, 약제학적 조성물.

청구항 20

제19항에 있어서, 정제된 AAV 입자는

(a) 적재되거나 부분적으로 적재된 캡시드(a full or a partially-full capsid)를 포함하고, 생성물-관련 불순물은 빈 캡시드를 포함하거나;

(b) 적재된 캡시드를 포함하고, 생성물-관련 불순물은 빈 캡시드를 포함하는, 약제학적 조성물.

청구항 21

제19항에 있어서, 정제된 AAV 입자는 적재된 캡시드로 본질적으로 이루어지고, 생성물-관련 불순물은 빈 캡시드를 포함하는, 약제학적 조성물.

청구항 22

제19항에 있어서, 생성물-관련 불순물은

(a) 응집된 AAV 입자, 분해된 AAV 입자, 또는 이들의 조합; 또는

(b) 응집된 AAV 입자 또는 이들의 조합을 포함하는, 약제학적 조성물.

청구항 23

제22항에 있어서, 정제된 AAV 입자는 빈 캡시드를 포함하거나 이로 본질적으로 이루어지는, 약제학적 조성물.

청구항 24

제1항 내지 제23항 중 어느 한 항에 있어서,

(a) 액체 상태; 또는

(b) 고체 또는 반-고체 상태인, 약제학적 조성물.

청구항 25

제1항 내지 제24항 중 어느 한 항에 있어서,

(a) 정제된 AAV 입자의 안정성을 유지하거나 향상시키고/시키거나;

(b) 정제된 AAV 입자의 응집을 감소시키거나 방지하는, 약제학적 조성물.

청구항 26

제25항에 있어서,

(a) 정제된 AAV 입자의 안정성은

(i) 1회 이상의 동결/해동 주기; 또는

(ii) 3회 이상의 동결/해동 주기 후에 유지되거나 향상되고/되거나;

(b) AAV 입자의 응집은

- (i) 1회 이상의 동결/해동 주기 후에 5% 미만이거나;
- (ii) 1회 이상의 동결/해동 주기 후에 2% 미만이거나;
- (iii) 1회 이상의 동결/해동 주기 후에 1% 미만이거나;
- (iv) 3회 이상의 동결/해동 주기 후에 5% 미만이거나;
- (v) 3회 이상의 동결/해동 주기 후에 2% 미만이거나;
- (vi) 3회 이상의 동결/해동 주기 후에 1% 미만이며,

여기서 AAV 입자의 안정성 및/또는 응집은 동적 광 산란(DLS), 분석용 초원심분리(AUC), 광학 현미경, 크기 배제 크로마토그래피(SEC), 투과 전자 현미경, 및 다중-각 정적 광 산란을 이용한 장 흐름 분획법(FFF-MALS: field flow fractionation with multi-angle static light scattering)으로 이루어진 군으로부터 선택된 검정에 의해 임의로 측정되는, 약제학적 조성물.

청구항 27

제1항 내지 제26항 중 어느 한 항에 있어서, 정제된 AAV 입자는

- (a) AAV 입자를 포함하는 상청액을 뉴클레아제를 포함하는 조성물과 접촉시키는 단계; 및
- (b) 입자를 정제하는 단계를 포함하는 방법에 의해 얻어지며,

여기서 뉴클레아제는 Benzonase, 또는 Benzonase® 및 염색질-DNA 뉴클레아제를 임의로 포함하고,

여기서 염색질-DNA 뉴클레아제는 MNase를 임의로 포함하는, 약제학적 조성물.

청구항 28

정제된 AAV 입자를 포함하는 약제학적 조성물을 제조하기 위한 방법으로서,

- (a) AAV 입자를 포함하는 상청액을 뉴클레아제를 포함하는 조성물과 접촉시키며,
- 여기서 뉴클레아제는 Benzonase®, 또는 Benzonase® 및 염색질-DNA 뉴클레아제를 임의로 포함하고,
- 여기서 염색질-DNA 뉴클레아제는 MNase를 임의로 포함하는 단계;
- (b) AAV 입자에 불순물이 실질적으로 없도록, AAV 입자를 정제하는 단계;
 - (c) 정제된 AAV 입자를 완충제, 동결보호제, 및 비-이온성 계면활성제와 조합하며, 여기서
 - (i) 완충제 농도는 약 0 mM 내지 약 50 mM이고,
 - (ii) 동결보호제는 약 1% 내지 약 10%(w/v)이고,
 - (iii) 비-이온성 계면활성제는 약 0.0001%(w/v) 내지 약 0.1%(w/v)인 단계를 포함하는, 방법.

청구항 29

제28항에 있어서, 단계 (c)는 약제학적으로 허용가능한 염을 추가로 포함하며, 여기서 약제학적으로 허용가능한 염 농도는

- (a) 약 1 mM 내지 약 200 mM;
- (b) 약 10 mM 내지 약 150 mM;
- (c) 약 1 mM 내지 약 49 mM;
- (d) 약 5 mM 내지 약 45 mM;
- (e) 약 7.5 mM 내지 약 40 mM;
- (f) 약 10 mM 내지 약 30 mM;
- (g) 약 10 mM;

(h) 약 100 mM; 또는

(i) 약 150 mM인, 방법.

청구항 30

제29항에 있어서, 약제학적으로 허용가능한 염은 소듐 염, 마그네슘 염, 칼슘 염, 포타슘 염, 포스페이트 염, 및 셀레이트 염으로 이루어진 군으로부터 선택되며,

여기서 소듐 염은 소듐 클로라이드를 임의로 포함하는, 방법.

청구항 31

제28항 내지 제30항 중 어느 한 항에 있어서, 완충제는 트리스 HCl 또는 L-히스티딘 HCl을 포함하는, 방법.

청구항 32

제28항 내지 제31항 중 어느 한 항에 있어서, 완충제 농도는 약 20 mM을 포함하는, 방법.

청구항 33

제28항 내지 제32항 중 어느 한 항에 있어서, 동결보호제는

(a) 약 3%(w/v) 내지 약 8%(w/v);

(b) 약 4%(w/v) 내지 약 6%(w/v); 또는

(c) 약 5%(w/v)인, 방법.

청구항 34

제28항 내지 제33항 중 어느 한 항에 있어서, 동결보호제는 당을 포함하는, 방법.

청구항 35

제34항에 있어서, 당은

(a) 수크로스, 트레할로스, 또는 이들의 조합; 또는

(b) 트레할로스를 포함하는, 방법.

청구항 36

제28항 내지 제35항 중 어느 한 항에 있어서, 비-이온성 계면활성제는

(a) 약 0.0005%(w/v) 내지 약 0.005%(w/v);

(b) 약 0.00075%(w/v) 내지 약 0.0025%(w/v); 또는

(c) 약 0.001%(w/v)인, 방법.

청구항 37

제28항 내지 제36항 중 어느 한 항에 있어서, 비-이온성 계면활성제는 공중합체, 폴리옥시에틸렌 소르비탄 에스테르, 인지질, Brij 계면활성제, 및 소르비탄 에스테르, 또는 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되며,

여기서 폴리옥시에틸렌 소르비탄 에스테르는 (PS-20), 및 폴리소르베이트 80(PS-80), 또는 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 임의로 선택되고,

여기서 공중합체는 폴록사머를 임의로 포함하고,

여기서 폴록사머는 임의로

(a) 폴록사머 188(P188), 폴록사머 237(P237), 폴록사머 338(P338), 및 폴록사머 407(P407), 또는 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되거나;

(b) 폴록사머 188(P188)을 포함하는, 방법.

청구항 38

제28항 내지 제37항 중 어느 한 항에 있어서, 약제학적 조성물 pH는

- (a) 약 4.0 내지 약 9.0;
- (b) 약 7.0 내지 약 8.0;
- (c) 약 7.3 내지 약 7.7; 또는
- (d) 약 7.5인, 방법.

청구항 39

제28항 내지 제38항 중 어느 한 항에 있어서, AAV는 AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, 및 AAV10으로 이루어진 군으로부터 선택되고/되거나;

AAV는 rAAV를 포함하는, 방법.

청구항 40

제28항 내지 제39항 중 어느 한 항에 있어서, 정제된 AAV 입자 역가는

- (a) 약 1×10^{10} 바이러스 게놈/밀리리터(vg/mL) 이상;
- (b) 약 1×10^{11} 바이러스 게놈/밀리리터(vg/mL) 이상;
- (c) 약 1×10^{12} 바이러스 게놈/밀리리터(vg/mL) 이상;
- (d) 약 1×10^{13} 바이러스 게놈/밀리리터(vg/mL) 이상;
- (e) 약 1×10^{14} 바이러스 게놈/밀리리터(vg/mL) 이상; 또는
- (f) 약 1×10^{15} 바이러스 게놈/밀리리터(vg/mL) 이상인, 방법.

청구항 41

제28항 내지 제40항 중 어느 한 항에 있어서, 불순물은

- (a) 공정-관련 불순물

(여기서 공정-관련 불순물은 잔류 숙주-세포 성분, 잔류 바이러스 생성 성분, 잔류 세포 배양 성분, 잔류 정제 성분, 또는 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 임의로 선택되고/되거나,

여기서 잔류 숙주-세포 성분은 숙주-세포 단백질, 숙주-세포 DNA, 숙주-세포 RNA, 또는 이들의 조합을 임의로 포함하고/하거나,

여기서 숙주-세포 DNA는 바이러스 외, 염색질-관련 DNA를 임의로 포함하고/하거나,

여기서 잔류 바이러스 생성 성분은 플라스미드 DNA, 헬퍼 바이러스, 또는 이들의 조합을 임의로 포함하고/하거나,

여기서 잔류 세포 배양 성분은 항생제, 보충제, 유도 인자, 성장 인자, 또는 이들의 조합을 임의로 포함하고/하거나,

여기서 잔류 정제 성분은 완충제, 무기 염, 효소, 세제, 배지, 또는 이들의 조합을 임의로 포함함);

- (b) 생성물-관련 불순물(여기서 생성물-관련 불순물은 빈 캡시드, 응집된 AAV 입자, 분해된 AAV 입자, 또는 이들의 조합을 포함함); 또는

- (c) (a) 및 (b)의 조합을 포함하는, 방법.

청구항 42

제41항에 있어서, 정제된 AAV 입자는

- (a) 적재되거나 부분적으로 적재된 캡시드를 포함하고, 생성물-관련 불순물은 빈 캡시드를 포함하거나;
- (b) 적재된 캡시드를 포함하고, 생성물-관련 불순물은 빈 캡시드를 포함하는, 방법.

청구항 43

제41항에 있어서, 정제된 AAV 입자는 적재된 캡시드로 본질적으로 이루어지고, 생성물-관련 불순물은 빈 캡시드를 포함하는, 방법.

청구항 44

제41항에 있어서, 생성물-관련 불순물은

- (a) 응집된 AAV 입자, 분해된 AAV 입자, 또는 이들의 조합; 또는
- (b) 응집된 AAV 입자를 포함하는, 방법.

청구항 45

제41항에 있어서, 정제된 AAV 입자는 빈 캡시드를 포함하거나 이로 본질적으로 이루어지는, 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 관련 출원의 상호 참조

[0002] 본 출원은 2020년 8월 7일자로 출원된 미국 특허 출원 제63/063,108호 및 2020년 8월 7일자로 출원된 미국 특허 출원 제63/063,128호의 이익을 주장하며, 이들 각각의 개시내용은 전체적으로 본 명세서에 참고로 포함된다.

[0003] 기술분야

[0004] 본 명세서에는, 특히, 고도로 정제된 바이러스 입자(예를 들어, 아데노-관련 바이러스(AAV) 입자)를 위한 제형이 제공된다. 제형은 불순물(예를 들어, 생성물-관련 불순물 및 공정-관련 불순물)이 실질적으로 없는 정제된 AAV 입자, 및 완충제, 동결보호제(cryoprotectant), 비-이온성 계면활성제, 및 임의로 약제학적으로 허용가능한 염 중 하나 이상을 포함할 수 있다. 소정의 태양에서, 본 명세서에 제공된 제형은 정제된 AAV 입자의 안정성을 유지하거나 향상시키고/시킴, 응집을 감소시키거나 방지한다.

배경 기술

[0005] 아데노-관련 바이러스(AAV)는 핵산을 표적 세포로 전달하도록 유전자 조작될 수 있는 비외피성 바이러스이며, 유전자 치료 및 유전자 전달 응용에서 유용한 비히클로서 부각되어 왔다. 바이러스 DNA가 결합된 재조합 AAV(rAAV)는 본질적으로 세포막을 통과하도록 유전자 조작된 단백질 기반 나노입자로, 궁극적으로 이의 핵산 수송물(cargo)을 세포의 핵으로 이송 및 전달할 수 있다. 다른 바이러스 시스템과 비교해 광범위한 조직 친화성(tissue tropism)을 갖는 인간 집단에서 천연적으로 발생하는 지속적인 유전자 발현, 비-융합되고 비-병원성인 낮은 면역원성, 유사분열 후 세포의 감염성 및 상대적인 생물의 용이성과 같은 이러한 바이러스에 의해 부여되는 특성은 인간이 사용할 수 있는 급속한 확장으로 이어졌다. rAAV를 포함하는, AAV에 기초하는 유전자 전달 벡터는 다수의 임상 유전자 요법 응용에 대해 안전하고 효과적인 것으로 부각되었다.

[0006] AAV 입자의 생성 및 정제는 주요 난제로 남아 있다. 추가로, 일단 정제되면, 일관적인 생체성능을 갖는 고품질 생성물이 환자에게 방출되는 것을 보장하기 위해서는 바이러스 감염성 및 물리적 안정성을 유지할 수 있는 제형의 개발이 가장 중요해진다. 바이러스 벡터에 대한 하나의 특정 관심사는 이들의 응집 성향이다(문헌[Wright et al., Molecular Therapy, 2005] 참조). 따라서, 개선된 안정성 및 최소의 응집을 갖는 고도로 순수한 AAV 입자를 함유하는 제형의 충족되지 않은 요구를 해결하는 신규한 AAV 제형이 본 명세서에 제공된다.

발명의 내용

- [0007] 일 태양에서 본 명세서에는, 정제된 AAV 입자, 완충제, 동결보호제, 및 비-이온성 계면활성제를 포함하며, 여기서 (a) 정제된 AAV 입자에는 불순물이 실질적으로 없고, (b) 완충제 농도는 약 0 mM 내지 약 50 mM이고, (c) 동결보호제는 약 1% 내지 약 10%(w/v)이고, (d) 비-이온성 계면활성제는 약 0.0001%(w/v) 내지 약 0.1%(w/v)인 약제학적 조성물이 제공된다. 일 실시 형태에서, 약제학적 조성물은 약제학적으로 허용가능한 염을 포함하며, 여기서 약제학적으로 허용가능한 염 농도는 약 1 mM 내지 약 200 mM이다. 일 실시 형태에서, 약제학적으로 허용가능한 염은 약 10 mM 내지 약 150 mM이다. 일 실시 형태에서, 약제학적으로 허용가능한 염 농도는 약 10 mM이다. 일 실시 형태에서, 약제학적으로 허용가능한 염 농도는 약 100 mM이다. 일 실시 형태에서, 약제학적으로 허용가능한 염 농도는 약 150 mM이다.
- [0008] 일 태양에서 본 명세서에는, 정제된 AAV 입자, 약제학적으로 허용가능한 염, 완충제, 동결보호제, 및 비-이온성 계면활성제를 포함하며, 여기서 (a) 정제된 AAV 입자에는 불순물이 실질적으로 없고, (b) 약제학적으로 허용가능한 염 농도는 약 1 mM 내지 약 49 mM이고, (c) 완충제 농도는 약 0 mM 내지 약 50 mM이고, (d) 동결보호제는 약 1% 내지 약 10%(w/v)이고, (e) 비-이온성 계면활성제는 약 0.0001%(w/v) 내지 약 0.1%(w/v)인 약제학적 조성물이 제공된다. 일 실시 형태에서, 약제학적으로 허용가능한 염 농도는 약 5 mM 내지 약 45 mM이다. 일 실시 형태에서, 약제학적으로 허용가능한 염 농도는 약 7.5 mM 내지 약 40 mM이다. 일 실시 형태에서, 약제학적으로 허용가능한 염 농도는 약 10 mM 내지 약 30 mM이다. 일 실시 형태에서, 약제학적으로 허용가능한 염 농도는 약 10 mM이다.
- [0009] 일 실시 형태에서, 약제학적으로 허용가능한 염은 소듐 염, 마그네슘 염, 칼슘 염, 포타슘 염, 포스페이트 염, 및 설페이트 염으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 일 실시 형태에서, 소듐 염은 소듐 클로라이드를 포함한다.
- [0010] 일 실시 형태에서, 완충제는 트리스 하이드로클로라이드(HCl)를 포함한다. 일 실시 형태에서, 완충제는 L-히스티딘 HCl을 포함한다. 일 실시 형태에서, 완충제 농도는 약 20 mM을 포함한다.
- [0011] 일 실시 형태에서, 동결보호제는 약 3%(w/v) 내지 약 8%(w/v)이다. 일 실시 형태에서, 동결보호제는 약 4%(w/v) 내지 약 6%(w/v)이다. 일 실시 형태에서, 동결보호제는 약 5%(w/v)이다. 일 실시 형태에서, 동결보호제는 당을 포함한다. 일 실시 형태에서, 당은 수크로스, 트레할로스, 또는 이들의 조합을 포함한다. 일 실시 형태에서, 당은 트레할로스를 포함한다.
- [0012] 일 실시 형태에서, 비-이온성 계면활성제는 약 0.0005%(w/v) 내지 약 0.005%(w/v)이다. 일 실시 형태에서, 비-이온성 계면활성제는 약 0.00075%(w/v) 내지 약 0.0025%(w/v)이다. 일 실시 형태에서, 비-이온성 계면활성제는 약 0.001%(w/v)이다. 일 실시 형태에서, 비-이온성 계면활성제는 공중합체, 폴리옥시에틸렌 소르비탄 에스테르, 인지질, Brij 계면활성제, 및 소르비탄 에스테르, 또는 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 일 실시 형태에서, 폴리옥시에틸렌 소르비탄 에스테르는 (PS-20), 및 폴리소르베이트 80(PS-80), 또는 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 일 실시 형태에서, 공중합체는 폴록사머를 포함한다. 일 실시 형태에서, 폴록사머는 폴록사머 188(P188), 폴록사머 237(P237), 폴록사머 338(P338), 및 폴록사머 407(P407), 또는 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 일 실시 형태에서, 폴록사머는 폴록사머 188(P188)을 포함한다.
- [0013] 일 태양에서 본 명세서에는, 정제된 AAV 입자, 완충제, 동결보호제, 및 비-이온성 계면활성제를 포함하며, 여기서 (a) 정제된 AAV 입자에는 불순물이 실질적으로 없고, (b) 완충제 농도는 약 20 mM이고, (c) 동결보호제는 약 5%(w/v) 트레할로스이고, (d) 비-이온성 계면활성제는 약 0.001%(w/v) 폴록사머 188인 약제학적 조성물이 제공된다.
- [0014] 일 태양에서 본 명세서에는, 정제된 AAV 입자, 약제학적으로 허용가능한 염, 완충제, 동결보호제, 및 비-이온성 계면활성제를 포함하며, 여기서 (a) 정제된 AAV 입자에는 불순물이 실질적으로 없고, (b) 약제학적으로 허용가능한 염 농도는 약 10 mM 소듐 클로라이드이고, (c) 완충제 농도는 약 20 mM이고, (d) 동결보호제는 약 5%(w/v) 트레할로스이고, (e) 비-이온성 계면활성제는 약 0.001%(w/v) 폴록사머 188인 약제학적 조성물이 제공된다.
- [0015] 일 태양에서 본 명세서에는, 정제된 AAV 입자, 약제학적으로 허용가능한 염, 완충제, 동결보호제, 및 비-이온성 계면활성제를 포함하며, 여기서 (a) 정제된 AAV 입자에는 불순물이 실질적으로 없고, (b) 약제학적으로 허용가능한 염 농도는 약 25 mM 소듐 클로라이드이고, (c) 완충제 농도는 약 20 mM이고, (d) 동결보호제는 약 5%(w/v) 트레할로스이고, (e) 비-이온성 계면활성제는 약 0.001%(w/v) 폴록사머 188인 약제학적 조성물이 제공된다.
- [0016] 일 태양에서 본 명세서에는, 정제된 AAV 입자, 약제학적으로 허용가능한 염, 완충제, 동결보호제, 및 비-이온성

계면활성제를 포함하며, 여기서 (a) 정제된 AAV 입자에는 불순물이 실질적으로 없고, (b) 약제학적으로 허용가능한 염 농도는 약 50 mM 소듐 클로라이드이고, (c) 완충제 농도는 약 20 mM이고, (d) 동결보호제는 약 5%(w/v) 트레할로스이고, (e) 비-이온성 계면활성제는 약 0.001%(w/v) 폴록사머 188인 약제학적 조성물이 제공된다.

[0017] 일 태양에서 본 명세서에는, 정제된 AAV 입자, 약제학적으로 허용가능한 염, 완충제, 동결보호제, 및 비-이온성 계면활성제를 포함하며, 여기서 (a) 정제된 AAV 입자에는 불순물이 실질적으로 없고, (b) 약제학적으로 허용가능한 염 농도는 약 100 mM 소듐 클로라이드이고, (c) 완충제 농도는 약 20 mM이고, (d) 동결보호제는 약 5%(w/v) 트레할로스이고, (e) 비-이온성 계면활성제는 약 0.001%(w/v) 폴록사머 188인 약제학적 조성물이 제공된다.

[0018] 일 태양에서 본 명세서에는, 정제된 AAV 입자, 약제학적으로 허용가능한 염, 완충제, 동결보호제, 및 비-이온성 계면활성제를 포함하며, 여기서 (a) 정제된 AAV 입자에는 불순물이 실질적으로 없고, (b) 약제학적으로 허용가능한 염 농도는 약 125 mM 소듐 클로라이드이고, (c) 완충제 농도는 약 20 mM이고, (d) 동결보호제는 약 5%(w/v) 트레할로스이고, (e) 비-이온성 계면활성제는 약 0.001%(w/v) 폴록사머 188인 약제학적 조성물이 제공된다.

[0019] 일 태양에서 본 명세서에는, 정제된 AAV 입자, 약제학적으로 허용가능한 염, 완충제, 동결보호제, 및 비-이온성 계면활성제를 포함하며, 여기서 (a) 정제된 AAV 입자에는 불순물이 실질적으로 없고, (b) 약제학적으로 허용가능한 염 농도는 약 150 mM 소듐 클로라이드이고, (c) 완충제 농도는 약 20 mM이고, (d) 동결보호제는 약 5%(w/v) 트레할로스이고, (e) 비-이온성 계면활성제는 약 0.001%(w/v) 폴록사머 188인 약제학적 조성물이 제공된다.

[0020] 일 태양에서 본 명세서에는, 정제된 AAV 입자, 약제학적으로 허용가능한 염, 완충제, 동결보호제, 및 비-이온성 계면활성제를 포함하며, 여기서 (a) 정제된 AAV 입자에는 불순물이 실질적으로 없고, (b) 약제학적으로 허용가능한 염 농도는 약 200 mM 소듐 클로라이드이고, (c) 완충제 농도는 약 20 mM이고, (d) 동결보호제는 약 5%(w/v) 트레할로스이고, (e) 비-이온성 계면활성제는 약 0.001%(w/v) 폴록사머 188인 약제학적 조성물이 제공된다.

[0021] 일 실시 형태에서, 완충제는 트리스 HCl을 포함한다. 일 실시 형태에서, 완충제는 L-히스티딘 HCl을 포함한다.

[0022] 일 실시 형태에서, 약제학적 조성물 pH는 약 4.0 내지 약 9.0이다. 일 실시 형태에서, 약제학적 조성물 pH는 약 7.0 내지 약 8.0이다. 일 실시 형태에서, 약제학적 조성물 pH는 약 7.3 내지 약 7.7이다. 일 실시 형태에서, 약제학적 조성물 pH는 약 7.5이다.

[0023] 일 실시 형태에서, AAV는 AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, 및 AAV10으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 일 실시 형태에서, AAV는 rAAV를 포함한다.

[0024] 일 실시 형태에서, 정제된 AAV 입자 역가는 약 1×10^{10} 바이러스 게놈/밀리리터(vg/mL) 이상이다. 일 실시 형태에서, 정제된 AAV 입자 역가는 약 1×10^{11} 바이러스 게놈/밀리리터(vg/mL) 이상이다. 일 실시 형태에서, 정제된 AAV 입자 역가는 약 1×10^{12} 바이러스 게놈/밀리리터(vg/mL) 이상이다. 일 실시 형태에서, 정제된 AAV 입자 역가는 약 1×10^{13} 바이러스 게놈/밀리리터(vg/mL) 이상이다. 일 실시 형태에서, 정제된 AAV 입자 역가는 약 1×10^{14} 바이러스 게놈/밀리리터(vg/mL) 이상이다. 일 실시 형태에서, 정제된 AAV 입자 역가는 약 1×10^{15} 바이러스 게놈/밀리리터(vg/mL) 이상이다.

[0025] 일 실시 형태에서, 불순물은 공정-관련 불순물, 생성물-관련 불순물, 또는 이들의 조합을 포함한다.

[0026] 일 실시 형태에서, 공정-관련 불순물은 잔류 숙주-세포 성분, 잔류 바이러스 생성 성분, 잔류 세포 배양 성분, 잔류 정제 성분, 또는 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 일 실시 형태에서, 잔류 숙주-세포 성분은 숙주-세포 단백질, 숙주-세포 DNA, 숙주-세포 RNA, 또는 이들의 조합을 포함한다. 일 실시 형태에서, 숙주-세포 DNA는 바이러스 외(extra-viral), 염색질-관련 DNA를 포함한다. 일 실시 형태에서, 잔류 바이러스 생성 성분은 플라스미드 DNA, 헬퍼 바이러스, 또는 이들의 조합을 포함한다. 일 실시 형태에서, 잔류 세포 배양 성분은 항생제, 보충제, 유도 인자, 성장 인자, 또는 이들의 조합을 포함한다. 일 실시 형태에서, 잔류 정제 성분은 완충제, 무기 염, 효소, 세제, 배지, 또는 이들의 조합을 포함한다.

[0027] 일 실시 형태에서, 생성물-관련 불순물은 빈 캡시드(empty capsid), 응집된 AAV 입자, 분해된 AAV 입자, 또는

이들의 조합을 포함한다.

- [0028] 일 실시 형태에서, 정제된 AAV 입자는 적재되거나 부분적으로 적재된 캡시드(a full or a partially-full capsid)를 포함하고, 생성물-관련 불순물은 빈 캡시드를 포함한다. 일 실시 형태에서, 정제된 AAV 입자는 적재된 캡시드를 포함하고, 생성물-관련 불순물은 빈 캡시드를 포함한다. 일 실시 형태에서, 정제된 AAV 입자는 적재된 캡시드로 본질적으로 이루어지고, 생성물-관련 불순물은 빈 캡시드를 포함한다.
- [0029] 일 실시 형태에서, 생성물-관련 불순물은 응집된 AAV 입자, 분해된 AAV 입자, 또는 이들의 조합을 포함한다. 일 실시 형태에서, 정제된 AAV 입자는 빈 캡시드를 포함한다. 일 실시 형태에서, 정제된 AAV 입자는 빈 캡시드로 본질적으로 이루어진다. 일 실시 형태에서, 생성물-관련 불순물은 응집된 AAV 입자 또는 이들의 조합을 포함한다.
- [0030] 일 실시 형태에서, 약제학적 조성물은 액체 상태이다. 일 실시 형태에서, 약제학적 조성물은 고체 또는 반-고체 상태이다.
- [0031] 일 실시 형태에서, 약제학적 조성물은 정제된 AAV 입자의 안정성을 유지하거나 향상시킨다.
- [0032] 일 실시 형태에서, 약제학적 조성물은 정제된 AAV 입자의 응집을 감소시키거나 방지한다.
- [0033] 일 실시 형태에서, 약제학적 조성물은 (a) 정제된 AAV 입자의 안정성을 유지하거나 향상시키고; (b) 정제된 AAV 입자의 응집을 감소시키거나 방지한다.
- [0034] 일 실시 형태에서, 정제된 AAV 입자의 안정성은 1회 이상의 동결/해동 주기 후에 유지되거나 향상된다. 일 실시 형태에서, 정제된 AAV 입자의 안정성은 3회 이상의 동결/해동 주기 후에 유지되거나 향상된다.
- [0035] 일 실시 형태에서, AAV 입자의 응집은 1회 이상의 동결/해동 주기 후에 5% 미만이다. 일 실시 형태에서, AAV 입자의 응집은 1회 이상의 동결/해동 주기 후에 2% 미만이다. 일 실시 형태에서, AAV 입자의 응집은 1회 이상의 동결/해동 주기 후에 1% 미만이다. 일 실시 형태에서, AAV 입자의 응집은 3회 이상의 동결/해동 주기 후에 5% 미만이다. 일 실시 형태에서, AAV 입자의 응집은 3회 이상의 동결/해동 주기 후에 2% 미만이다. 일 실시 형태에서, AAV 입자의 응집은 3회 이상의 동결/해동 주기 후에 1% 미만이다.
- [0036] 일 실시 형태에서, AAV 입자의 안정성 및/또는 응집은 동적 광 산란(DLS), 분석용 초원심분리(AUC), 광학 현미경, 크기 배제 크로마토그래피(SEC), 투과 전자 현미경, 및 다중-각 정적 광 산란을 이용한 장 흐름 분획법(FFF-MALS: field flow fractionation with multi-angle static light scattering)으로 이루어진 군으로부터 선택된 검정에 의해 측정된다.
- [0037] 일 실시 형태에서, 정제된 AAV 입자는, (a) AAV 입자를 포함하는 상청액을 뉴클레아제를 포함하는 조성물과 접촉시키는 단계; 및 (b) 입자를 정제하는 단계를 포함하는 방법에 의해 얻어진다. 일 실시 형태에서, 뉴클레아제는 Benzonase, 또는 Benzonase® 및 염색질-DNA 뉴클레아제를 포함한다. 일 실시 형태에서, 염색질-DNA 뉴클레아제는 MNase를 포함한다.
- [0038] 일 태양에서 본 명세서에는, 정제된 AAV 입자를 포함하는 약제학적 조성물을 제조하기 위한 방법으로서, (a) AAV 입자를 포함하는 상청액을 뉴클레아제를 포함하는 조성물과 접촉시키는 단계; (b) AAV 입자에 불순물이 실질적으로 없도록, AAV 입자를 정제하는 단계; (c) 정제된 AAV 입자를 완충제, 동결보호제, 및 비-이온성 계면활성제와 조합하며, 여기서 (i) 완충제 농도는 약 0 mM 내지 약 50 mM이고, (ii) 동결보호제는 약 1% 내지 약 10%(w/v)이고, (iii) 비-이온성 계면활성제는 약 0.0001%(w/v) 내지 약 0.1%(w/v)인 단계를 포함하는, 방법이 제공된다. 일 실시 형태에서, 단계 (c)는 약제학적으로 허용가능한 염을 추가로 포함하며, 여기서 약제학적으로 허용가능한 염 농도는 약 1 mM 내지 약 200 mM이다.
- [0039] 일 실시 형태에서, 약제학적으로 허용가능한 염은 약 10 mM 내지 약 150 mM이다. 일 실시 형태에서, 약제학적으로 허용가능한 염은 약 1 mM 내지 약 49 mM이다. 일 실시 형태에서, 약제학적으로 허용가능한 염은 약 5 mM 내지 약 45 mM이다. 일 실시 형태에서, 약제학적으로 허용가능한 염은 약 7.5 mM 내지 약 40 mM이다. 일 실시 형태에서, 약제학적으로 허용가능한 염은 약 10 mM 내지 약 30 mM이다. 일 실시 형태에서, 약제학적으로 허용가능한 염 농도는 약 10 mM이다. 일 실시 형태에서, 약제학적으로 허용가능한 염 농도는 약 100 mM이다. 일 실시 형태에서, 약제학적으로 허용가능한 염 농도는 약 150 mM이다.
- [0040] 일 실시 형태에서, 약제학적으로 허용가능한 염은 소듐 염, 마그네슘 염, 칼슘 염, 포타슘 염, 포스페이트 염, 및 설페이트 염으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 일 실시 형태에서, 소듐 염은 소듐 클로라이드를

포함한다.

- [0041] 일 실시 형태에서, 완충제는 트리스 HCl을 포함한다. 일 실시 형태에서, 완충제는 L-히스티딘 HCl을 포함한다. 일 실시 형태에서, 완충제 농도는 약 20 mM을 포함한다.
- [0042] 일 실시 형태에서, 동결보호제는 약 3%(w/v) 내지 약 8%(w/v)이다. 일 실시 형태에서, 동결보호제는 약 4%(w/v) 내지 약 6%(w/v)이다. 일 실시 형태에서, 동결보호제는 약 5%(w/v)이다. 일 실시 형태에서, 동결보호제는 당을 포함한다. 일 실시 형태에서, 당은 수크로스, 트레할로스, 또는 이들의 조합을 포함한다. 일 실시 형태에서, 당은 트레할로스를 포함한다.
- [0043] 일 실시 형태에서, 비-이온성 계면활성제는 약 0.0005%(w/v) 내지 약 0.005%(w/v)이다. 일 실시 형태에서, 비-이온성 계면활성제는 약 0.00075%(w/v) 내지 약 0.0025%(w/v)이다. 일 실시 형태에서, 비-이온성 계면활성제는 약 0.001%(w/v)이다. 일 실시 형태에서, 비-이온성 계면활성제는 공중합체, 폴리옥시에틸렌 소르비탄 에스테르, 인지질, Brij 계면활성제, 및 소르비탄 에스테르, 또는 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 일 실시 형태에서, 폴리옥시에틸렌 소르비탄 에스테르는 (PS-20), 및 폴리소르베이트 80(PS-80), 또는 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 일 실시 형태에서, 공중합체는 폴록사머를 포함한다. 일 실시 형태에서, 폴록사머는 폴록사머 188(P188), 폴록사머 237(P237), 폴록사머 338(P338), 및 폴록사머 407(P407), 또는 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 일 실시 형태에서, 폴록사머는 폴록사머 188(P188)을 포함한다.
- [0044] 일 실시 형태에서, 약제학적 조성물 pH는 약 4.0 내지 약 9.0이다. 일 실시 형태에서, 약제학적 조성물 pH는 약 7.0 내지 약 8.0이다. 일 실시 형태에서, 약제학적 조성물 pH는 약 7.3 내지 약 7.7이다. 일 실시 형태에서, 약제학적 조성물 pH는 약 7.5이다.
- [0045] 일 실시 형태에서, AAV는 AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, 및 AAV10으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 일 실시 형태에서, AAV는 rAAV를 포함한다.
- [0046] 일 실시 형태에서, 뉴클레아제는 Benzonase, 또는 Benzonase® 및 염색질-DNA 뉴클레아제를 포함한다. 일 실시 형태에서, 염색질-DNA 뉴클레아제는 MNase를 포함한다.
- [0047] 일 실시 형태에서, 정제된 AAV 입자 역가는 약 1×10^{10} 바이러스 게놈/밀리리터(vg/mL) 이상이다. 일 실시 형태에서, 정제된 AAV 입자 역가는 약 1×10^{11} 바이러스 게놈/밀리리터(vg/mL) 이상이다. 일 실시 형태에서, 정제된 AAV 입자 역가는 약 1×10^{12} 바이러스 게놈/밀리리터(vg/mL) 이상이다. 일 실시 형태에서, 정제된 AAV 입자 역가는 약 1×10^{13} 바이러스 게놈/밀리리터(vg/mL) 이상이다. 일 실시 형태에서, 정제된 AAV 입자 역가는 약 1×10^{14} 바이러스 게놈/밀리리터(vg/mL) 이상이다. 일 실시 형태에서, 정제된 AAV 입자 역가는 약 1×10^{15} 바이러스 게놈/밀리리터(vg/mL) 이상이다.
- [0048] 일 실시 형태에서, 불순물은 공정-관련 불순물, 생성물-관련 불순물, 또는 이들의 조합을 포함한다.
- [0049] 일 실시 형태에서, 공정-관련 불순물은 잔류 숙주-세포 성분, 잔류 바이러스 생성 성분, 잔류 세포 배양 성분, 잔류 정제 성분, 또는 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 일 실시 형태에서, 잔류 숙주-세포 성분은 숙주-세포 단백질, 숙주-세포 DNA, 숙주-세포 RNA, 또는 이들의 조합을 포함한다. 일 실시 형태에서, 숙주-세포 DNA는 바이러스 외, 염색질-관련 DNA를 포함한다. 일 실시 형태에서, 잔류 바이러스 생성 성분은 플라스미드 DNA, 헬퍼 바이러스, 또는 이들의 조합을 포함한다. 일 실시 형태에서, 잔류 세포 배양 성분은 항생제, 보충제, 유도 인자, 성장 인자, 또는 이들의 조합을 포함한다. 일 실시 형태에서, 잔류 정제 성분은 완충제, 무기 염, 효소, 세제, 배지, 또는 이들의 조합을 포함한다.
- [0050] 일 실시 형태에서, 생성물-관련 불순물은 빈 캡시드, 응집된 AAV 입자, 분해된 AAV 입자, 또는 이들의 조합을 포함한다. 일 실시 형태에서, 정제된 AAV 입자는 적재되거나 부분적으로 적재된 캡시드를 포함하고, 생성물-관련 불순물은 빈 캡시드를 포함한다. 일 실시 형태에서, 정제된 AAV 입자는 적재된 캡시드를 포함하고, 생성물-관련 불순물은 빈 캡시드를 포함한다. 일 실시 형태에서, 정제된 AAV 입자는 적재된 캡시드로 본질적으로 이루어지고, 생성물-관련 불순물은 빈 캡시드를 포함한다.
- [0051] 일 실시 형태에서, 생성물-관련 불순물은 응집된 AAV 입자, 분해된 AAV 입자, 또는 이들의 조합을 포함한다. 일 실시 형태에서, 정제된 AAV 입자는 빈 캡시드를 포함한다. 일 실시 형태에서, 정제된 AAV 입자는 빈 캡시드

로 본질적으로 이루어진다. 일 실시 형태에서, 생성물-관련 불순물은 응집된 AAV 입자를 포함한다.

[0052] 일 태양에서 본 명세서에는, 정제된 AAV 입자의 안정성을 유지하거나 향상시키기 위한 수단을 포함하는 억제학적 조성물이 제공된다. 일 실시 형태에서, 정제된 AAV 입자의 안정성은 1회 이상의 동결/해동 주기 후에 유지되거나 향상된다. 일 실시 형태에서, 정제된 AAV 입자의 안정성은 3회 이상의 동결/해동 주기 후에 유지되거나 향상된다. 일 실시 형태에서, AAV 입자의 안정성은 동적 광 산란(DLS), 분석용 초원심분리(AUC), 광학 현미경, 크기 배제 크로마토그래피(SEC), 투과 전자 현미경, 및 다중-각 정적 광 산란을 이용한 장 흐름 분획법(FFF-MALS)으로 이루어진 군으로부터 선택된 검정에 의해 측정된다.

[0053] 일 태양에서 본 명세서에는, 정제된 AAV 입자의 응집을 감소시키거나 방지하기 위한 수단을 포함하는 억제학적 조성물이 제공된다. 일 실시 형태에서, AAV 입자의 응집은 1회 이상의 동결/해동 주기 후에 5% 미만이다. 일 실시 형태에서, AAV 입자의 응집은 1회 이상의 동결/해동 주기 후에 2% 미만이다. 일 실시 형태에서, AAV 입자의 응집은 1회 이상의 동결/해동 주기 후에 1% 미만이다. 일 실시 형태에서, AAV 입자의 응집은 3회 이상의 동결/해동 주기 후에 5% 미만이다. 일 실시 형태에서, AAV 입자의 응집은 3회 이상의 동결/해동 주기 후에 2% 미만이다. 일 실시 형태에서, AAV 입자의 응집은 3회 이상의 동결/해동 주기 후에 1% 미만이다. 일 실시 형태에서, AAV 입자는 동적 광 산란(DLS), 분석용 초원심분리(AUC), 광학 현미경, 크기 배제 크로마토그래피(SEC), 투과 전자 현미경, 및 다중-각 정적 광 산란을 이용한 장 흐름 분획법(FFF-MALS)으로 이루어진 군으로부터 선택된 검정에 의해 측정된다.

[0054] 일 태양에서 본 명세서에는, (a) 정제된 AAV 입자의 안정성을 유지하거나 향상시키고, (b) 정제된 AAV 입자의 응집을 감소시키거나 방지하기 위한 수단을 포함하는 억제학적 조성물이 제공된다. 일 실시 형태에서, 정제된 AAV 입자의 안정성은 1회 이상의 동결/해동 주기 후에 유지되거나 향상된다. 일 실시 형태에서, 정제된 AAV 입자의 안정성은 3회 이상의 동결/해동 주기 후에 유지되거나 향상된다. 일 실시 형태에서, AAV 입자의 응집은 1회 이상의 동결/해동 주기 후에 5% 미만이다. 일 실시 형태에서, AAV 입자의 응집은 1회 이상의 동결/해동 주기 후에 2% 미만이다. 일 실시 형태에서, AAV 입자의 응집은 1회 이상의 동결/해동 주기 후에 1% 미만이다. 일 실시 형태에서, AAV 입자의 응집은 3회 이상의 동결/해동 주기 후에 5% 미만이다. 일 실시 형태에서, AAV 입자의 응집은 3회 이상의 동결/해동 주기 후에 2% 미만이다. 일 실시 형태에서, AAV 입자의 응집은 3회 이상의 동결/해동 주기 후에 1% 미만이다. 일 실시 형태에서, AAV 입자의 안정성 및 응집은 동적 광 산란(DLS), 분석용 초원심분리(AUC), 광학 현미경, 크기 배제 크로마토그래피(SEC), 투과 전자 현미경, 및 다중-각 정적 광 산란을 이용한 장 흐름 분획법(FFF-MALS)으로 이루어진 군으로부터 선택된 검정에 의해 측정된다.

[0055] 일 태양에서 본 명세서에는, 정제된 AAV 입자, 완충제, 동결보호제, 및 비-이온성 계면활성제를 포함하며, 여기서 (a) 정제된 AAV 입자에는 불순물이 실질적으로 없고, (b) 완충제 농도는 약 0 mM 내지 약 50 mM이고, (c) 동결보호제는 약 1% 내지 약 10%(w/v)이고, (d) 비-이온성 계면활성제는 약 0.0001%(w/v) 내지 약 0.1%(w/v)인 억제학적 조성물을 제조하고 얻기 위한 수단을 포함하는 시스템이 제공된다. 일 실시 형태에서, 억제학적 조성물은 억제학적으로 허용가능한 염을 추가로 포함하며, 여기서 억제학적으로 허용가능한 염 농도는 약 1 mM 내지 약 200 mM이다. 일 실시 형태에서, 억제학적으로 허용가능한 염은 약 10 mM 내지 약 150 mM이다. 일 실시 형태에서, 억제학적으로 허용가능한 염 농도는 약 10 mM이다. 일 실시 형태에서, 억제학적으로 허용가능한 염 농도는 약 100 mM이다. 일 실시 형태에서, 억제학적으로 허용가능한 염 농도는 약 150 mM이다.

[0056] 일 태양에서 본 명세서에는, 정제된 AAV 입자, 억제학적으로 허용가능한 염, 완충제, 동결보호제, 및 비-이온성 계면활성제를 포함하며, 여기서 (a) 정제된 AAV 입자에는 불순물이 실질적으로 없고, (b) 완충제 농도는 약 0 mM 내지 약 50 mM이고, (c) 동결보호제는 약 1% 내지 약 10%(w/v)이고, (d) 비-이온성 계면활성제는 약 0.0001%(w/v) 내지 약 0.1%(w/v)인 억제학적 조성물을 제조하고 얻기 위한 수단을 포함하는 시스템이 제공된다. 일 실시 형태에서, 억제학적 조성물은 억제학적으로 허용가능한 염을 추가로 포함하며, 여기서 억제학적으로 허용가능한 염 농도는 약 1 mM 내지 약 200 mM이다. 일 실시 형태에서, 억제학적으로 허용가능한 염은 약 10 mM 내지 약 150 mM이다. 일 실시 형태에서, 억제학적으로 허용가능한 염 농도는 약 10 mM이다. 일 실시 형태에서, 억제학적으로 허용가능한 염 농도는 약 100 mM이다. 일 실시 형태에서, 억제학적으로 허용가능한 염 농도는 약 150 mM이다.

[0057] 일 태양에서 본 명세서에는, 정제된 AAV 입자, 억제학적으로 허용가능한 염, 완충제, 동결보호제, 및 비-이온성 계면활성제를 포함하며, 여기서 (a) 정제된 AAV 입자에는 불순물이 실질적으로 없고, (b) 억제학적으로 허용가능한 염 농도는 약 1 mM 내지 약 49 mM이고, (c) 완충제 농도는 약 0 mM 내지 약 50 mM이고, (d) 동결보호제는 약 1% 내지 약 10%(w/v)이고, (e) 비-이온성 계면활성제는 약 0.0001%(w/v) 내지 약 0.1%(w/v)인 억제학적 조

성물을 제조하고 얻기 위한 수단을 포함하는 시스템이 제공된다. 일 실시 형태에서, 약제학적으로 허용가능한 염 농도는 약 5 mM 내지 약 45 mM이다. 일 실시 형태에서, 약제학적으로 허용가능한 염 농도는 약 7.5 mM 내지 약 40 mM이다. 일 실시 형태에서, 약제학적으로 허용가능한 염 농도는 약 10 mM 내지 약 30 mM이다. 일 실시 형태에서, 약제학적으로 허용가능한 염 농도는 약 10 mM이다.

[0058] 일 실시 형태에서, 약제학적으로 허용가능한 염은 소듐 염, 마그네슘 염, 칼슘 염, 포타슘 염, 포스페이트 염, 및 설페이트 염으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 일 실시 형태에서, 소듐 염은 소듐 클로라이드를 포함한다.

[0059] 일 실시 형태에서, 완충제는 트리스 HCl을 포함한다. 일 실시 형태에서, 완충제는 L-히스티딘 HCl을 포함한다. 일 실시 형태에서, 완충제 농도는 약 20 mM을 포함한다.

[0060] 일 실시 형태에서, 동결보호제는 약 3%(w/v) 내지 약 8%(w/v)이다. 일 실시 형태에서, 동결보호제는 약 4%(w/v) 내지 약 6%(w/v)이다. 일 실시 형태에서, 동결보호제는 약 5%(w/v)이다. 일 실시 형태에서, 동결보호제는 당을 포함한다. 일 실시 형태에서, 당은 수크로스, 트레할로스, 또는 이들의 조합을 포함한다. 일 실시 형태에서, 당은 트레할로스를 포함한다.

[0061] 일 실시 형태에서, 비-이온성 계면활성제는 약 0.0005%(w/v) 내지 약 0.005%(w/v)이다. 일 실시 형태에서, 비-이온성 계면활성제는 약 0.00075%(w/v) 내지 약 0.0025%(w/v)이다. 일 실시 형태에서, 비-이온성 계면활성제는 약 0.001%(w/v)이다. 일 실시 형태에서, 비-이온성 계면활성제는 공중합체, 폴리옥시에틸렌 소르비탄 에스테르, 인지질, Brij 계면활성제, 및 소르비탄 에스테르, 또는 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 일 실시 형태에서, 폴리옥시에틸렌 소르비탄 에스테르는 (PS-20), 및 폴리소르베이트 80(PS-80), 또는 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 일 실시 형태에서, 공중합체는 폴록사머를 포함한다. 일 실시 형태에서, 폴록사머는 폴록사머 188(P188), 폴록사머 237(P237), 폴록사머 338(P338), 및 폴록사머 407(P407), 또는 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 일 실시 형태에서, 폴록사머는 폴록사머 188(P188)을 포함한다.

[0062] 일 태양에서 본 명세서에는, 정제된 AAV 입자, 완충제, 동결보호제, 및 비-이온성 계면활성제를 포함하며, 여기서 (a) 정제된 AAV 입자에는 불순물이 실질적으로 없고, (b) 완충제 농도는 약 20 mM이고, (c) 동결보호제는 약 5%(w/v) 트레할로스이고, (d) 비-이온성 계면활성제는 약 0.001%(w/v) 폴록사머 188인 약제학적 조성물을 제조하고 얻기 위한 수단을 포함하는 시스템이 제공된다.

[0063] 일 태양에서 본 명세서에는, 정제된 AAV 입자, 약제학적으로 허용가능한 염, 완충제, 동결보호제, 및 비-이온성 계면활성제를 포함하며, 여기서 (a) 정제된 AAV 입자에는 불순물이 실질적으로 없고, (b) 약제학적으로 허용가능한 염 농도는 약 10 mM 소듐 클로라이드이고, (c) 완충제 농도는 약 20 mM이고, (d) 동결보호제는 약 5%(w/v) 트레할로스이고, (e) 비-이온성 계면활성제는 약 0.001%(w/v) 폴록사머 188인 약제학적 조성물을 제조하고 얻기 위한 수단을 포함하는 시스템이 제공된다.

[0064] 일 태양에서 본 명세서에는, 정제된 AAV 입자, 약제학적으로 허용가능한 염, 완충제, 동결보호제, 및 비-이온성 계면활성제를 포함하며, 여기서 (a) 정제된 AAV 입자에는 불순물이 실질적으로 없고, (b) 약제학적으로 허용가능한 염 농도는 약 25 mM 소듐 클로라이드이고, (c) 완충제 농도는 약 20 mM이고, (d) 동결보호제는 약 5%(w/v) 트레할로스이고, (e) 비-이온성 계면활성제는 약 0.001%(w/v) 폴록사머 188인 약제학적 조성물을 제조하고 얻기 위한 수단을 포함하는 시스템이 제공된다.

[0065] 일 태양에서 본 명세서에는, 정제된 AAV 입자, 약제학적으로 허용가능한 염, 완충제, 동결보호제, 및 비-이온성 계면활성제를 포함하며, 여기서 (a) 정제된 AAV 입자에는 불순물이 실질적으로 없고, (b) 약제학적으로 허용가능한 염 농도는 약 50 mM 소듐 클로라이드이고, (c) 완충제 농도는 약 20 mM이고, (d) 동결보호제는 약 5%(w/v) 트레할로스이고, (e) 비-이온성 계면활성제는 약 0.001%(w/v) 폴록사머 188인 약제학적 조성물을 제조하고 얻기 위한 수단을 포함하는 시스템이 제공된다.

[0066] 일 태양에서 본 명세서에는, 정제된 AAV 입자, 약제학적으로 허용가능한 염, 완충제, 동결보호제, 및 비-이온성 계면활성제를 포함하며, 여기서 (a) 정제된 AAV 입자에는 불순물이 실질적으로 없고, (b) 약제학적으로 허용가능한 염 농도는 약 100 mM 소듐 클로라이드이고, (c) 완충제 농도는 약 20 mM이고, (d) 동결보호제는 약 5%(w/v) 트레할로스이고, (e) 비-이온성 계면활성제는 약 0.001%(w/v) 폴록사머 188인 약제학적 조성물을 제조하고 얻기 위한 수단을 포함하는 시스템이 제공된다.

[0067] 일 태양에서 본 명세서에는, 정제된 AAV 입자, 약제학적으로 허용가능한 염, 완충제, 동결보호제, 및 비-이온성

계면활성제를 포함하며, 여기서 (a) 정제된 AAV 입자에는 불순물이 실질적으로 없고, (b) 약제학적으로 허용가능한 염 농도는 약 125 mM 소듐 클로라이드이고, (c) 완충제 농도는 약 20 mM이고, (d) 동결보호제는 약 5%(w/v) 트레할로스이고, (e) 비-이온성 계면활성제는 약 0.001%(w/v) 폴록사머 188인 약제학적 조성물을 제조하고 얻기 위한 수단을 포함하는 시스템이 제공된다.

[0068] 일 태양에서 본 명세서에는, 정제된 AAV 입자, 약제학적으로 허용가능한 염, 완충제, 동결보호제, 및 비-이온성 계면활성제를 포함하며, 여기서 (a) 정제된 AAV 입자에는 불순물이 실질적으로 없고, (b) 약제학적으로 허용가능한 염 농도는 약 150 mM 소듐 클로라이드이고, (c) 완충제 농도는 약 20 mM이고, (d) 동결보호제는 약 5%(w/v) 트레할로스이고, (e) 비-이온성 계면활성제는 약 0.001%(w/v) 폴록사머 188인 약제학적 조성물을 제조하고 얻기 위한 수단을 포함하는 시스템이 제공된다.

[0069] 일 태양에서 본 명세서에는, 정제된 AAV 입자, 약제학적으로 허용가능한 염, 완충제, 동결보호제, 및 비-이온성 계면활성제를 포함하며, 여기서 (a) 정제된 AAV 입자에는 불순물이 실질적으로 없고, (b) 약제학적으로 허용가능한 염 농도는 약 200 mM 소듐 클로라이드이고, (c) 완충제 농도는 약 20 mM이고, (d) 동결보호제는 약 5%(w/v) 트레할로스이고, (e) 비-이온성 계면활성제는 약 0.001%(w/v) 폴록사머 188인 약제학적 조성물을 제조하고 얻기 위한 수단을 포함하는 시스템이 제공된다.

[0070] 일 실시 형태에서, 완충제는 트리스 HCl을 포함한다. 일 실시 형태에서, 완충제는 L-히스티딘 HCl을 포함한다.

[0071] 일 실시 형태에서, 약제학적 조성물 pH는 약 4.0 내지 약 9.0이다. 일 실시 형태에서, 약제학적 조성물 pH는 약 7.0 내지 약 8.0이다. 일 실시 형태에서, 약제학적 조성물 pH는 약 7.3 내지 약 7.7이다. 일 실시 형태에서, 약제학적 조성물 pH는 약 7.5이다.

[0072] 일 실시 형태에서, AAV는 AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, 및 AAV10으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 일 실시 형태에서, AAV는 rAAV를 포함한다.

[0073] 일 실시 형태에서, 정제된 AAV 입자 역가는 약 1×10^{10} 바이러스 게놈/밀리리터(vg/mL) 이상이다. 일 실시 형태에서, 정제된 AAV 입자 역가는 약 1×10^{11} 바이러스 게놈/밀리리터(vg/mL) 이상이다. 일 실시 형태에서, 정제된 AAV 입자 역가는 약 1×10^{12} 바이러스 게놈/밀리리터(vg/mL) 이상이다. 일 실시 형태에서, 정제된 AAV 입자 역가는 약 1×10^{13} 바이러스 게놈/밀리리터(vg/mL) 이상이다. 일 실시 형태에서, 정제된 AAV 입자 역가는 약 1×10^{14} 바이러스 게놈/밀리리터(vg/mL) 이상이다. 일 실시 형태에서, 정제된 AAV 입자 역가는 약 1×10^{15} 바이러스 게놈/밀리리터(vg/mL) 이상이다.

[0074] 일 실시 형태에서, 불순물은 공정-관련 불순물, 생성물-관련 불순물, 또는 이들의 조합을 포함한다.

[0075] 일 실시 형태에서, 공정-관련 불순물은 잔류 숙주-세포 성분, 잔류 바이러스 생성 성분, 잔류 세포 배양 성분, 잔류 정제 성분, 또는 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 일 실시 형태에서, 잔류 숙주-세포 성분은 숙주-세포 단백질, 숙주-세포 DNA, 숙주-세포 RNA, 또는 이들의 조합을 포함한다. 일 실시 형태에서, 숙주-세포 DNA는 바이러스 외, 염색질-관련 DNA를 포함한다. 일 실시 형태에서, 잔류 바이러스 생성 성분은 플라스미드 DNA, 헬퍼 바이러스, 또는 이들의 조합을 포함한다. 일 실시 형태에서, 잔류 세포 배양 성분은 항생제, 보충제, 유도 인자, 성장 인자, 또는 이들의 조합을 포함한다. 일 실시 형태에서, 잔류 정제 성분은 완충제, 무기 염, 효소, 세제, 배지, 또는 이들의 조합을 포함한다.

[0076] 일 실시 형태에서, 생성물-관련 불순물은 빈 캡시드, 응집된 AAV 입자, 분해된 AAV 입자, 또는 이들의 조합을 포함한다.

[0077] 일 실시 형태에서, 정제된 AAV 입자는 적재되거나 부분적으로 적재된 캡시드를 포함하고, 생성물-관련 불순물은 빈 캡시드를 포함한다. 일 실시 형태에서, 정제된 AAV 입자는 적재된 캡시드를 포함하고, 생성물-관련 불순물은 빈 캡시드를 포함한다. 일 실시 형태에서, 정제된 AAV 입자는 적재된 캡시드로 본질적으로 이루어지고, 생성물-관련 불순물은 빈 캡시드를 포함한다.

[0078] 일 실시 형태에서, 생성물-관련 불순물은 응집된 AAV 입자, 분해된 AAV 입자, 또는 이들의 조합을 포함한다. 일 실시 형태에서, 정제된 AAV 입자는 빈 캡시드를 포함한다. 일 실시 형태에서, 정제된 AAV 입자는 빈 캡시드로 본질적으로 이루어진다. 일 실시 형태에서, 생성물-관련 불순물은 응집된 AAV 입자 또는 이들의 조합을 포함한다.

- [0079] 일 실시 형태에서, 약제학적 조성물은 액체 상태이다. 일 실시 형태에서, 약제학적 조성물은 고체 또는 반-고체 상태이다.
- [0080] 일 실시 형태에서, 약제학적 조성물은 정제된 AAV 입자의 안정성을 유지하거나 향상시킨다.
- [0081] 일 실시 형태에서, 약제학적 조성물은 정제된 AAV 입자의 응집을 감소시키거나 방지한다.
- [0082] 일 실시 형태에서, 약제학적 조성물은 (a) 정제된 AAV 입자의 안정성을 유지하거나 향상시키고; (b) 정제된 AAV 입자의 응집을 감소시키거나 방지한다.
- [0083] 일 실시 형태에서, 정제된 AAV 입자의 안정성은 1회 이상의 동결/해동 주기 후에 유지되거나 향상된다. 일 실시 형태에서, 정제된 AAV 입자의 안정성은 3회 이상의 동결/해동 주기 후에 유지되거나 향상된다.
- [0084] 일 실시 형태에서, AAV 입자의 응집은 1회 이상의 동결/해동 주기 후에 5% 미만이다. 일 실시 형태에서, AAV 입자의 응집은 1회 이상의 동결/해동 주기 후에 2% 미만이다. 일 실시 형태에서, AAV 입자의 응집은 1회 이상의 동결/해동 주기 후에 1% 미만이다. 일 실시 형태에서, AAV 입자의 응집은 3회 이상의 동결/해동 주기 후에 5% 미만이다. 일 실시 형태에서, AAV 입자의 응집은 3회 이상의 동결/해동 주기 후에 2% 미만이다. 일 실시 형태에서, AAV 입자의 응집은 3회 이상의 동결/해동 주기 후에 1% 미만이다.
- [0085] 일 실시 형태에서, AAV 입자의 안정성 및/또는 응집은 동적 광 산란(DLS), 분석용 초원심분리(AUC), 광학 현미경, 크기 배제 크로마토그래피(SEC), 투과 전자 현미경, 및 다중-각 정적 광 산란을 이용한 장 흐름 분획법(FFF-MALS)으로 이루어진 군으로부터 선택된 검정에 의해 측정된다.
- [0086] 일 실시 형태에서, 정제된 AAV 입자는, (a) AAV 입자를 포함하는 상청액을 뉴클레아제를 포함하는 조성물과 접촉시키는 단계; 및 (b) 입자를 정제하는 단계를 포함하는 방법에 의해 얻어진다. 일 실시 형태에서, 뉴클레아제는 Benzonase, 또는 Benzonase® 및 염색질-DNA 뉴클레아제를 포함한다. 일 실시 형태에서, 염색질-DNA 뉴클레아제는 MNase를 포함한다.

도면의 간단한 설명

- [0087] 전술한 개요뿐만 아니라, 본 출원의 바람직한 실시 형태의 하기의 상세한 설명도 첨부 도면과 함께 읽을 때 더 잘 이해될 것이다. 그러나, 본 출원은 도면에 나타난 정확한 실시 형태로 제한되지 않음이 이해되어야 한다.
- 도 1a** 내지 **도 1d**는 4개의 대표적인 제형에 대해 동적 광 산란(DLS)에 의해 측정된 AAV 입자 크기 데이터(동결 전(pre-freeze))를 예시한다. **도 1a**는 예시적인 제형 #1(20 mM 트리스-HCl pH 7.5, 10 mM NaCl, 5% 트레할로스, 및 0.001% 폴록사머 188) 내의 정제된 AAV 입자를 도시한다. **도 1b**는 예시적인 제형 #2(20 mM 트리스-HCl pH 7.5, 100 mM NaCl, 5% 트레할로스, 및 0.001% 폴록사머 188) 내의 정제된 AAV 입자를 도시한다. **도 1c**는 예시적인 제형 #3(20 mM 트리스-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 5% 트레할로스, 및 0.001% 폴록사머 188) 내의 정제된 AAV 입자를 도시한다. **도 1d**는 예시적인 제형 #4(20 mM 트리스-HCl pH 7.5, 200 mM NaCl, 5% 트레할로스, 및 0.001% 폴록사머 188) 내의 정제된 AAV 입자를 도시한다.
- 도 2a** 내지 **도 2d**는 4개의 대표적인 제형에 대해 동적 광 산란(DLS)에 의해 측정된 1회의 동결/해동 주기 후의 AAV 입자 크기 데이터를 예시한다. **도 2a**는 예시적인 제형 #1(20 mM 트리스-HCl pH 7.5, 10 mM NaCl, 5% 트레할로스, 및 0.001% 폴록사머 188) 내의 정제된 AAV 입자를 도시한다. **도 2b**는 예시적인 제형 #2(20 mM 트리스-HCl pH 7.5, 100 mM NaCl, 5% 트레할로스, 및 0.001% 폴록사머 188) 내의 정제된 AAV 입자를 도시한다. **도 2c**는 예시적인 제형 #3(20 mM 트리스-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 5% 트레할로스, 및 0.001% 폴록사머 188) 내의 정제된 AAV 입자를 도시한다. **도 2d**는 예시적인 제형 #4(20 mM 트리스-HCl pH 7.5, 200 mM NaCl, 5% 트레할로스, 및 0.001% 폴록사머 188) 내의 정제된 AAV 입자를 도시한다.
- 도 3a** 내지 **도 3d**는 4개의 대표적인 제형에 대해 동적 광 산란(DLS)에 의해 측정된 3회의 동결/해동 주기 후의 AAV 입자 크기 데이터를 예시한다. **도 3a**는 예시적인 제형 #1(20 mM 트리스-HCl pH 7.5, 10 mM NaCl, 5% 트레할로스, 및 0.001% 폴록사머 188) 내의 정제된 AAV 입자를 도시한다. **도 3b**는 예시적인 제형 #2(20 mM 트리스-HCl pH 7.5, 100 mM NaCl, 5% 트레할로스, 및 0.001% 폴록사머 188) 내의 정제된 AAV 입자를 도시한다. **도 3c**는 예시적인 제형 #3(20 mM 트리스-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 5% 트레할로스, 및 0.001% 폴록사머 188) 내의 정제된 AAV 입자를 도시한다. **도 3d**는 예시적인 제형 #4(20 mM 트리스-HCl pH 7.5, 200 mM NaCl, 5% 트레할로스, 및 0.001% 폴록사머 188) 내의 정제된 AAV 입자를 도시한다.
- 도 4a** 및 **도 4b**는 60 U/mL의 MNase 처리를 이용한 AAV 입자 정제를 포함하거나(도 4b) AAV 입자 정제가 없는(도

4a) 예시적인 AAV 정제 방법을 예시한다. MNase 처리 후, 큰 260 nm(RNA/DNA) 흡광도 기여는 후-생성물 피크에 대하여 크게 감소시켰고, 280 nm(단백질) 흡광도 피크와 같이 크게 감소된다.

도 5a 및 도 5b는 Mnase로 처리된 또는 Mnase가 없는 샘플을 함유한 rAAV8 입자로부터의 크로마토그램의 중첩을 도시한다. MNase의 첨가는 DNA/RNA(260 nm)(도 5a) 및 단백질(280 nm)(도 5b)에 대한 후-생성물 피크 높이의 유의미한 감소를 야기하였으며, 이는 후-생성물 피크가 바이러스 외 염색질 관련된 AAV이고, MNase 처리가 AAV 입자 정제를 증강시켰음을 나타내었다.

도 6은 후-생성물 피크의 검사가 ExpiFectamine™ 293 형질감염 키트 인헨서를 사용하거나 인헨서 없이 생성된 MNase 처리되지 않은 샘플에서 가시적 침전을 나타냈다는 것을 예시한다. 그러나, MNase 분해는 바이러스 입자의 응집 및 침전을 방지하였다.

도 7a 내지 도 7c는 MNase 처리되지 않은 샘플 및 ExpiFectamine™ 293 형질감염 키트 인헨서를 사용하여 생성된 샘플에 비교하여, MNase 처리가 바이러스 역가(도 7a), 계능 카피/세포(도 7b), 및 총 계능 카피(도 7c)를 증가시켰고, 생성된 후-생성물의 양을 감소시켰음을 예시한다.

도 8a 및 도 8b는 3가지의 상이한 용리 완충제, 시트레이트, 저 pH, 및 저/고 pH 각각에 대해 MNase 처리되지 않은 샘플(정사각형)에 비해 MNase 처리된 샘플(원)에서 계능 카피/세포(GC/세포)(도 8a) 및 총 계능 카피(도 8b)의 증가가 일관되게 관찰되었음을 예시한다.

도 9a 및 도 9b는 표 3에 기재된 상이한 정제 조건을 사용하는 바이러스 정제의 요약을 예시한다. 도 9a는 정제된 AAV 입자의 음 염색을 도시한다. 3개의 진한 밴드는 VP1, VP2 및 VP3에 해당된다. 도 9b는 DNA 아가로스 겔 전기영동 및 AAV 내에 함유된 ITR-전이유전자(transgene)의 존재를 도시한다. C = 시트레이트, pH 2.5; P = 인산, pH 1.5; "+¹" = pH 10.3; "+²" = pH 9.5; "+³" = pH 10.2; "+⁴" = pH 10.4; * = (C₂H₅)₃NCL 음이온 교환 용리.

도 10a 내지 도 10e는, 효소 처리 없음(도 10a); Benzonase 단독(도 10b); Benzonase 및 MNase(도 10c); Benzonase, MNase 없음, 고 pH 세척, 및 인산 용리(도 10d); 및 Benzonase, MNase, 고 pH 세척, 및 인산 용리(도 10e) 후의, 정적 광 산란(SLS) 및 단백질 응집(Tag) 및 용융(Tm) 곡선으로부터의 결과를 예시한다.

도 11a 및 도 11b는, benzonase 또는 MNase를 이용하지 않은 정제("효소 없음"); (2) benzonase 및 시트레이트 용리를 이용한 정제("B, 시트레이트(친화성)"); (3) benzonase 및 시트레이트 용리를 이용한 정제("B, 시트레이트"); (4) benzonase, MNase, 및 인산 용리를 이용한 정제("B, M, Phos"); (5) benzonase, 고 pH(pH 10.3) 세척, 및 인산 용리를 이용한 정제("B, pH 10.3, Phos"); 및 (6) benzonase, MNase, 및 인산 용리를 이용한 정제("B, M, pH 10.3, phos") 후의, 숙주-세포 DNA를 검출하기 위해 AlphaLISA를 사용하는 미가공(raw) 카운트(도 11a) 및 농도 결과(도 11b)를 예시한다.

도 12는 프로토콜 #1에 따른 생성물 피크와 상응하는 AAV 입자 샘플 분획(레인 1), 프로토콜 #2에 따른 생성물 피크와 상응하는 AAV 입자 샘플 분획(레인 2), 및 프로토콜 #2에 따른 후-생성물 피크와 상응하는 AAV 입자 샘플 분획(레인 3)의 수집 후 겔 전기영동 및 음-염색을 예시한다.

도 13a 및 도 13b는, DLS에 의해 측정되는 바와 같이, 예시적인 제형 #2(20 mM 트리스, 100 mM NaCl, 5% 트레할로스, 0.001% 폴록사머-188, pH 7.5)에서 AAV 입자가 1회 이상의 동결/해동 주기 후에 안정하다는 것을 예시한다. 도 13a는 Z-평균 크기의 최소 변동을 도시하고, 도 13b는 다분산 지수(PDI)의 최소 변동을 도시한다.

도 14a 및 도 14b는, DLS에 의해 측정되는 바와 같이, 예시적인 제형 #2(20 mM 트리스, 100 mM NaCl, 5% 트레할로스, 0.001% 폴록사머-188, pH 7.5)에서 AAV 입자가 -80℃에서 1 내지 3개월 후에 안정하다는 것을 예시한다. 도 14a는 Z-평균 크기의 최소 변동을 도시하고, 도 14b는 다분산 지수(PDI)의 최소 변동을 도시한다.

도 15a 및 도 15b는, SEC-FLD에 의해 측정되는 바와 같이, 예시적인 제형 #2(20 mM 트리스, 100 mM NaCl, 5% 트레할로스, 0.001% 폴록사머-188, pH 7.5)가 1 내지 5회의 동결/해동 주기 후에 최소의 AAV 응집을 갖는다는 것을 예시한다. 도 15a는 매우 적은 고분자량 종(HMWS)을 나타내고, 도 15b는 측정된 샘플이 거의 모두 단량체였음을 나타낸다.

도 16a 및 도 16b는, SEC-FLD에 의해 측정되는 바와 같이, 예시적인 제형 #2(20 mM 트리스, 100 mM NaCl, 5% 트레할로스, 0.001% 폴록사머-188, pH 7.5)가 -80℃에서 1 내지 3개월 후에 최소의 AAV 응집을 갖는다는 것을

예시한다. 도 16a는 매우 적은 고분자량 중(HMWS)을 나타내고, 도 16b는 측정된 샘플이 거의 모두 단량체였음을 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0088] 본 개시내용은, 불순물(예를 들어, 생성물-관련 불순물 및 공정-관련 불순물)이 실질적으로 없는 정제된 바이러스 입자(예를 들어, AAV 입자)를 완충제, 동결보호제, 비-이온성 계면활성제, 및 임의로 약제학적으로 허용가능한 염 중 하나 이상과 조합하여 정제된 AAV 입자의 안정성을 향상시키고 응집을 감소시키거나 방지하는 약제학적 조성물을 생성할 수 있다는 발견에 부분적으로 기초한다. 소정의 태양에서 본 개시내용은 또한, 본 명세서에 기재된 약제학적 조성물이 고역가 정제된 바이러스 입자(예를 들어, 1×10^{13} vg/mL 초과 농도)의 안정성을 향상시키고 응집을 제한하거나 방지하기에 또한 적합하다는 발견에 부분적으로 기초한다.
- [0089] 다양한 간행물, 논문, 및 특허가 배경기술에 그리고 본 명세서 전체에 걸쳐 인용되어 있거나 기재되어 있으며; 이들 참고문헌 각각은 전체적으로 본 명세서에 참고로 포함된다. 본 명세서에 포함된 문헌, 행동, 재료, 장치, 물품 등에 대한 논의는 본 발명에 대한 상황을 제공하는 것을 목적으로 한다. 그러한 논의는 이들 대상 중 임의의 것 또는 모든 것이 개시되거나 청구된 임의의 발명에 대하여 종래 기술의 일부를 형성하는 것을 인정하는 것은 아니다.
- [0090] 달리 정의되지 않는 한, 본 명세서에 사용된 모든 기술 및 과학 용어는 본 발명이 속하는 기술 분야의 당업자에 의해 통상적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 갖는다. 그렇지 않으면, 본 명세서에 사용되는 소정의 용어는 본 명세서에 제시된 바와 같은 의미를 갖는다. 본원에 인용된 모든 특허, 공개된 특허 출원 및 간행물은 마치 본원에 완전히 기재되어 있는 것처럼 참고로 포함된다.
- [0091] 본 명세서 및 첨부된 청구범위에서 사용되는 바와 같이, 단수 형태(부정 관사 및 정관사)는, 문맥이 명확하게 달리 지시하지 않으면, 복수의 지시 대상을 포함한다는 것에 유의해야 한다.
- [0092] 본 명세서 및 이어지는 청구범위 전체에 걸쳐, 문맥상 달리 필요로 하지 않는 한, 단어 "포함하다" 및 변형 형태, 예컨대 "포함한다" 및 "포함하는"은 언급된 정수 또는 단계 또는 정수들 또는 단계들의 군을 포함하지만, 임의의 다른 정수 또는 단계 또는 정수들 또는 단계들의 군을 배제하지 않음을 내포하는 것으로 이해될 것이다. 본 명세서에서 사용될 때, 용어 "포함하는"은 용어 "함유하는" 또는 "구비하는"으로 치환될 수 있거나, 경우에 따라서는 본 명세서에 사용될 때 용어 "갖는"으로 치환될 수 있다.
- [0093] 본 명세서에서 사용될 때, "~로 이루어진"은 청구범위 요소에 명시되지 않은 임의의 요소, 단계, 또는 구성성분을 배제한다. 본원에서 사용될 때, "~로 본질적으로 이루어진"은 청구항의 기본적인 신규한 특징에 실질적으로 영향을 주지 않는 재료 또는 단계를 배제하지 않는다. 본 출원의 태양 또는 실시 형태와 관련하여 본 명세서에 사용되는 모든 경우에, 임의의 전술한 용어 "포함하는", "함유하는", "구비하는" 및 "갖는"은 본 개시내용의 범주를 변동시키기 위해 용어 "~로 이루어진" 또는 "~로 본질적으로 이루어진"으로 대체될 수 있다.
- [0094] 본 명세서에 사용되는 바와 같이, 다수의 언급된 요소들 사이의 접속 용어 "및/또는"은 개별 선택지 및 조합된 선택지 둘 모두를 포함하는 것으로 이해된다. 예를 들어, 2개의 요소들이 "및/또는"에 의해 결합되는 경우, 제1 선택지는 제2 요소 없이 제1 요소의 적용가능성을 지칭한다. 제2 선택지는 제1 요소 없이 제2 요소의 적용가능성을 지칭한다. 제3 선택지는 제1 요소와 제2 요소가 함께 적용가능함을 지칭한다. 이들 선택지 중 어느 것이든 하나는 이 의미 내에 속하는 것으로 이해되며, 이에 따라 본 명세서에 사용되는 바와 같이 용어 "및/또는"의 요건을 충족시킨다. 이들 선택지 중 하나 초과 동시 적용가능성 또한 이 의미 내에 속하는 것으로 이해되며, 이에 따라 용어 "및/또는"의 요건을 충족시킨다.
- [0095] 본 명세서에 사용된 바와 같이, 용어 "아데노-관련 바이러스(AAV)"는 모든 상이한 AAV 혈청형(serotype)을 포함하는 AAV의 천연 발생 형태뿐만 아니라 비-천연 발생 형태(예를 들어, 재조합 rAAV 및 위형(pseudotype)), 및 이들의 변이체 모두를 의미하는 것으로 의도된다. AAV 바이러스는 Rep 유전자(Rep78, Rep68, Rep52, Rep40으로 번역됨 - AAV 생활 주기에 필요), 및 Cap 유전자(VP1, VP2, VP3로서 번역됨 - 캡시드 단백질)로 구성된다.
- [0096] 본 명세서에 사용되는 바와 같이, 달리 명시되지 않는 한, 용어 "바이러스 입자" 또는 "AAV 입자"는 게놈-함유("적재된 캡시드" 또는 "부분적으로 적재된 캡시드"로도 알려짐) 캡시드뿐만 아니라, 빈 캡시드, 또는 적재된 캡시드, 부분적으로 적재된 캡시드, 및 빈 캡시드의 임의의 조합을 의미하도록 의도된다.
- [0097] 본 명세서에 사용되는 바와 같이, 용어 "불순물" 또는 "불순물들"은 원하는 생성물, 또는 약제학적 조성물의 의

도된 성분이 아닌, 정제된 AAV 입자 내에 또는 이와 함께 존재하는 임의의 성분을 의미하도록 의도된다. AAV 입자 불순물은 공정-관련 불순물 및/또는 생성물-관련 불순물 둘 모두를 포함한다. 예시적인 공정-관련 불순물은 잔류 숙주-세포 성분(예를 들어, 단백질, DNA - 바이러스 외, 염색질-관련 DNA를 포함함 - 및/또는 RNA), 잔류 바이러스 생성 성분(예를 들어, 플라스미드 DNA, 및/또는 헬퍼 바이러스), 잔류 세포 배양 성분(예를 들어, 항생제, 보충제, 유도 인자, 및/또는 성장 인자), 및 잔류 정제 성분(예를 들어, 완충제, 무기 염, 효소, 배지, 및/또는 세제)뿐만 아니라 다른 오염물을 포함하지만 이로 제한되지 않는다. 예시적인 생성물-관련 불순물은 빈 캡시드(바람직하지 않은 경우), 응집된 AAV 입자, 및 분해된 AAV 입자를 포함할 수 있지만 이로 제한되지 않는다. 샘플에는 하나 이상의 불순물이 "실질적으로 없음" 수 있지만, 계속해서 소량(예를 들어, 검출 불가능한 수준, 또는 허용가능한 범위 미만)의 하나 이상의 불순물을 가지며, "실질적으로 없음"은 모든 불순물의 완전한 제거를 필요로 하지는 않는다는 것이 이해된다.

[0098] 본 명세서에 사용된 바와 같이, 용어 "역가"는 주어진 부피에서 바이러스의 양을 의미하도록 의도된다. 바이러스 역가는 "물리적 역가"또는 "기능적 역가"를 포함할 수 있다. 물리적 역가는 얼마나 많은 바이러스가 존재하는지에 대한 측정치이며, 일반적으로 mL 당 바이러스 입자의 수(VP/mL) 또는 mL 당 게놈 카피의 수(genome copy)(GC/mL)로서 표현된다. 기능적 역가 또는 감염성 역가는 얼마나 많은 바이러스가 실제로 표적 세포를 감염시키는지의 측정치이며, 일반적으로 mL 당 형질도입 단위(TU/mL)의 형태로 표현되거나, 아데노바이러스의 경우 mL 당 플라크 형성 단위(pfu/mL) 또는 mL 당 감염성 단위(ifu/mL)로서 표현된다. 기능적 역가는 일반적으로 물리적 역가보다 낮고, 보통 약 10배 내지 약 100배 정도 낮을 것으로 이해된다.

[0099] 본 명세서에 사용되는 바와 같이, 용어 "약제학적으로 허용가능한 염(들)"은 무기 산 및 염기 및 유기 산 및 염기를 포함하는 약제학적으로 허용가능한 비-독성 산 또는 염기로부터 제조된 염을 지칭한다. 본 명세서에 개시된 약제학적으로 허용가능한 조성물의 적합한 약제학적으로 허용가능한 염기 부가 염은 알루미늄, 칼슘, 리튬, 마그네슘, 포타슘, 소듐, 및 아연으로부터 제조된 금속성 염 또는 리신, N,N'-다이벤질에틸렌다이아민, 클로로프로카인, 콜린, 다이에탄올아민, 에틸렌다이아민, 메글루민(N-메틸-글루카민), 및 프로카인으로부터 제조된 유기 염을 포함하지만 이로 제한되지 않는다. 적합한 비-독성 산은 아세트산, 알긴산, 안트라닐산, 벤젠설폰산, 벤조산, 캄포설폰산, 시트르산, 에텐설폰산, 포름산, 푸마르산, 푸로산, 갈락투론산, 글루콘산, 글루쿠론산, 글루탐산, 글리콜산, 브롬화수소산, 염산, 이세티온산, 락트산, 말레산, 말산, 만델산, 메탄설폰산, 점액산, 질산, 파모산, 판토텐산, 페닐아세트산, 인산, 프로피온산, 살리실산, 스테아르산, 석신산, 설파닐산, 황산, 타르타르산, 및 p-톨루엔설폰산과 같은 무기 및 유기 산을 포함하지만 이로 제한되지 않는다. 특이적 비-독성 산은 염산, 브롬화수소산, 말레산, 인산, 황산, 및 메탄설폰산을 포함한다. 따라서 특이적 염의 예는 하이드로클로라이드 및 메실레이트 염을 포함한다.

[0100] 본 명세서에 사용되는 바와 같이, 용어 "충분한 양"은, 예를 들어, 친화성 지지체와 같은 고체 지지체에 대한 AAV 입자의 결합, 또는 AAV 입자를 함유하는 샘플로부터의 불순물(예를 들어, 숙주-세포 단백질, 염색질, 및/또는 핵산)의 제거와 같이, 원하는 효과를 생성하거나 원하는 결과를 달성할 수 있는 양을 의미하도록 의도된다.

[0101] 본 명세서에 사용되는 바와 같이, AAV 입자의 샘플과 관련하여 사용될 경우에, 용어 "실질적으로 없음"은, 정제되지 않은 AAV 입자(예를 들어, 조 수확물)에 비교하여, AAV 입자의 샘플이 불순물의 약 50% 미만, 약 20% 미만, 약 10% 미만, 또는 약 5% 미만을 포함함을 의미하도록 의도된다.

[0102] 달리 언급되지 않는 한, 본 명세서에 기재된 농도 또는 농도 범위와 같은 임의의 수치 값은 모든 경우에 용어 "약"에 의해 수식되는 것으로 이해되어야 한다. 따라서, 수치 값은 전형적으로 인용된 값의 $\pm 10\%$ 를 포함한다. 예를 들어, 1 mg/mL의 농도는 0.9 mg/mL 내지 1.1 mg/mL를 포함한다. 마찬가지로, 1 mg/mL 내지 10 mg/mL의 농도 범위는 0.9 mg/mL 내지 11 mg/mL를 포함한다. 본 명세서에 사용되는 바와 같이, 문맥이 명백히 달리 지시하지 않는 한, 수치 범위의 사용은 모든 가능한 하위범위, 그 범위 내의 모든 개별 수치 값, 예를 들어 그러한 범위 내의 정수 및 값의 분율을 명시적으로 포함한다.

[0103] 본 출원의 독자를 돕기 위한 시도로, 다양한 단락 또는 섹션에서 설명이 분리되어 있거나 본 출원의 다양한 실시 형태로 설명되고 있다. 이들 분리는 단락 또는 섹션 또는 실시 형태의 요지를 다른 단락 또는 섹션 또는 실시 형태의 요지로부터 분리하는 것으로 간주되어서는 안 된다. 반대로, 당업자는 발명의 상세한 설명이 넓은 응용을 가지며, 고려될 수 있는 다양한 섹션, 단락, 및 문장의 모든 조합을 포함한다는 것을 이해할 것이다. 임의의 실시예의 논의는 단지 예시적인 것으로 의도되며, 청구범위를 포함하는 본 개시 내용의 범주가 이들 실시예로 제한됨을 시사하고자 의도되지 않는다. 본 출원은 특정 조합이 명시적으로 설명되었는지 여부에 관계없이 임의의 조합으로 적용 가능한 구성요소들 중 임의의 것의 사용을 고려한다.

[0104] **1. 약제학적 조성물**

[0105] 본 명세서에는 정제된 AAV 입자, 및 완충제, 동결보호제, 비-이온성 계면활성제, 및 임의로 약제학적으로 허용 가능한 염 중 하나 이상을 포함하며, 여기서 AAV 입자에는 불순물이 실질적으로 없는 약제학적 조성물이 제공된다. 본 명세서에는 또한 본 명세서에 기재된 약제학적 조성물을 제조하기 위한 방법이 제공된다.

[0106] **1.1 AAV 입자**

[0107] 본 개시내용은 생성물 순도가 제형 개발에 영향을 미칠 수 있다는 발견에 부분적으로 기초한다. 구체적으로, 캡시드화되지 않은 핵산(예를 들어, 숙주-세포 DNA/RNA, 플라스미드 DNA 등) 및 단백질 불순물[예를 들어, 숙주-세포 단백질, 빈 캡시드(바람직하지 않은 경우) 등]은 이들의 명백한 안전성 위험에 더하여 생성물 안정성 및 응집에 대한 심각한 영향을 가질 수 있다. 추가로, 상이한 생성물 순도는 제형 결과를 혼동하게 할 수 있다. 이는 불량한 공정 견고성의 결과로서 뿐만 아니라 최종 제형의 도입(접선 유동 여과, 투석, 회전 여과 등에 의한 것이지 아니든) 중에 나타날 수 있으며, 가변적인 불순물 프로파일을 유발한다.

[0108] 불순물은 공정-관련 불순물(예를 들어, AAV 입자 정제 후에 잔류하는 불순물, 예컨대 숙주-세포 DNA 또는 숙주-세포 단백질)뿐만 아니라, 생성물-관련 불순물(예를 들어, 적재된, 비-응집된 캡시드가 아닌 AAV 입자)을 포함할 수 있다. 따라서, 본 명세서에 제공된 약제학적 조성물은 불순물이 실질적으로 없는 정제된 AAV 입자에 관한 것이다.

[0109] 일부 실시 형태에서, AAV 입자에는 불순물이 실질적으로 없으며, 여기서 불순물은 공정-관련 불순물, 생성물-관련 불순물, 또는 이들의 조합을 포함한다. 공정 관련 불순물은 잔류 숙주-세포 성분, 잔류 바이러스 생성 성분, 잔류 세포 배양 성분, 잔류 정제 성분, 또는 이들의 조합을 포함할 수 있다. 예를 들어, AAV 입자의 정제 후에, AAV 입자를 생성하기 위해 사용된 숙주-세포로부터의 핵산 및/또는 단백질의 잔류량은 이러한 불순물을 제거하기 위해 적절한 단계가 취해지지 않는 경우에 정제된 AAV 입자와 함께 잔류할 수 있다. 따라서, 일부 실시 형태에서, AAV 입자에는 숙주-세포 단백질, 숙주-세포 DNA, 숙주-세포 RNA, 또는 이들의 조합이 실질적으로 없다.

[0110] 본 개시내용의 소정의 태양은 또한, 바이러스 외, 염색질-관련 DNA가 또한 AAV 입자의 순도에 크게 영향을 미칠 수 있는 정제된 AAV 입자 내에 존재하는 불순물이며, 본 명세서에 기재된(예를 들어, 섹션 5.4, 섹션 5.5. 및/또는 실시예에) 예시적인 정제 방법은 염색질-DNA 뉴클레아제를 사용함으로써 AAV 입자의 순도를 유의하게 개선한다는 발견에 기초한다. 따라서, 일부 실시 형태에서, AAV 입자에는 불순물이 실질적으로 없으며, 여기서 불순물은 바이러스 외, 염색질-관련 DNA를 포함한다.

[0111] 불순물은 또한 AAV 입자 생성을 지지하기 위해 사용되는 잔류 바이러스 생성 성분으로부터 발생할 수 있다. 예를 들어, 숙주-세포 시스템에서 AAV 입자를 생성하기 위해 사용되는 플라스미드 DNA 또는 헬퍼 바이러스 DNA와 같은 핵산이 또한, 이러한 불순물을 제거하기 위해 적절한 단계가 취해지지 않는 경우에 정제된 AAV 입자와 함께 잔류할 수 있다. 잔류 바이러스 생성을 제거하기 위한 정제 방법은 본 명세서에 기재된(예를 들어, 섹션 5.4, 섹션 5.5. 및/또는 실시예에) 것들을 포함한다. 따라서, 일부 실시 형태에서, AAV 입자에는 잔류 바이러스 생성 성분이 실질적으로 없다. 소정의 실시 형태에서, AAV 입자에는 플라스미드 DNA, 헬퍼 바이러스, 또는 이들의 조합이 실질적으로 없다.

[0112] 불순물이 실질적으로 없는 본 개시내용의 AAV 입자는 또한 잔류 세포 배양 성분이 실질적으로 없는 AAV 입자를 포함할 수 있다. 예를 들어, 항생제, 성장 인자, 소 혈청, 유도 인자, 또는 다른 보충제를 함유하는 배지 중에 숙주-세포를 배양할 수 있다. 정제된 AAV 입자를 생성하기 위해서는 이러한 세포 배양 성분의 제거가 중요하다. 따라서, 일부 실시 형태에서, 정제된 AAV 입자에는 항생제, 보충제, 유도 인자, 성장 인자, 또는 이들의 조합이 실질적으로 없다.

[0113] 정제된 AAV 입자에 영향을 미칠 수 있는 불순물의 다른 공급원은 AAV 입자를 정제하기 위해 사용된 정제 시약을 포함한다. 예를 들어, AAV 입자를 정제하기 위한 예시적인 방법은 크로마토그래피를 포함하며, 종종 무기 염을 이용한 세척을 포함한다. AAV 입자를 정제하기 위한 다른 예시적인 방법은 원심분리를 포함하며, 이러한 예시적인 방법은 AAV 입자의 분리 및 단리를 위해 종종 밀도 구배 매질(density gradient medium)을 이용한다. 따라서, 본 명세서에 기재된 약제학적 조성물 내에 포함된 정제된 AAV 입자로부터 그러한 잔류 정제 성분을 제거하는 것이 바람직하다. 따라서, 일부 실시 형태에서, 정제된 AAV 입자에는 잔류 정제 성분이 실질적으로 없다. 일부 실시 형태에서, 잔류 정제 성분은 완충제, 무기 염, 효소, 세제, 배지, 또는 이들의 조합을 포함한다.

- [0114] 생성물-관련 불순물은 본 명세서에 기재된 약제학적 조성물에 대한 영향을 가질 수 있는 불순물의 다른 공급원을 나타낸다. 그러한 생성물-관련 불순물은, 예를 들어, 응집된 AAV 입자, 분해된 AAV 입자, 및/또는 빈 캡시드(바람직하지 않은 경우)를 포함한다. 따라서, 일부 실시 형태에서, 정제된 AAV 입자에는 생성물-관련 불순물이 실질적으로 없다. 일부 실시 형태에서, 생성물-관련 불순물은 빈 캡시드(바람직하지 않은 경우), 응집된 AAV 입자, 분해된 AAV 입자, 또는 이들의 조합을 포함한다. 일부 실시 형태에서, 생성물-관련 불순물은 응집된 AAV 입자, 분해된 AAV 입자, 또는 이들의 조합을 포함한다. 구체적인 실시 형태에서, 생성물-관련 불순물은 응집된 AAV 입자를 포함한다.
- [0115] 본 개시내용은 또한, 본 명세서에 기재된 약제학적 조성물이 심지어 1×10^{13} 바이러스 게놈/밀리리터(vg/mL) 초과 농도를 갖는 AAV 입자의 응집을 감소시키거나 방지할 수 있다는 발견에 부분적으로 기초한다. 지금까지, AAV 입자를 위한 기존의 제형은 고역가의 바이러스(즉, 1×10^{13} vg/mL 초과 역가)를 위해서는 고이온 강도(200 mM 초과) 제형이 필요하다는 이해를 전제로 하였다. 예로서, 전형적인 고이온 강도 제형은 대략 500 mM이다. 반면에, 본 명세서에 기재된 바와 같이, 본 개시내용의 약제학적 조성물은 고역가의 AAV 입자에 적합하며, 고이온 강도 제형을 포함하지 않는다. 본 개시내용은 고역가의 AAV 입자에 적합하지만, 본 명세서에 기재된 약제학적 조성물은 고농도일 필요가 없으며, 약제학적 조성물은 1×10^{13} vg/mL 미만의 역가를 갖는 AAV 입자에 또한 적합하다는 것이 이해된다.
- [0116] 일부 실시 형태에서, 정제된 AAV 입자 역가는 약 1×10^{10} 바이러스 게놈/밀리리터(vg/mL) 이상이다. 일부 실시 형태에서, 정제된 AAV 입자 역가는 약 1×10^{11} 바이러스 게놈/밀리리터(vg/mL) 이상이다. 일부 실시 형태에서, 정제된 AAV 입자 역가는 약 1×10^{12} 바이러스 게놈/밀리리터(vg/mL) 이상이다. 일부 실시 형태에서, 정제된 AAV 입자 역가는 약 1×10^{13} 바이러스 게놈/밀리리터(vg/mL) 이상이다. 일부 실시 형태에서, 정제된 AAV 입자 역가는 약 1×10^{14} 바이러스 게놈/밀리리터(vg/mL) 이상이다. 일부 실시 형태에서, 정제된 AAV 입자 역가는 약 1×10^{15} 바이러스 게놈/밀리리터(vg/mL) 이상이다.
- [0117] 본 명세서에 기재된 AAV 입자는 특이적 혈청형으로 제한되지 않으며, 임의의 AAV 혈청형뿐만 아니라 AAV 변이체가 본 명세서에 기재된 약제학적 조성물과 적합하다. 예를 들어, 일부 실시 형태에서, AAV는 AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, 또는 AAV10이다. 일부 실시 형태에서, AAV는 AAV1을 포함하거나 이로 본질적으로 이루어진다. 일부 실시 형태에서, AAV는 AAV2를 포함하거나 이로 본질적으로 이루어진다. 일부 실시 형태에서, AAV는 AAV3을 포함하거나 이로 본질적으로 이루어진다. 일부 실시 형태에서, AAV는 AAV4를 포함하거나 이로 본질적으로 이루어진다. 일부 실시 형태에서, AAV는 AAV5를 포함하거나 이로 본질적으로 이루어진다. 일부 실시 형태에서, AAV는 AAV6를 포함하거나 이로 본질적으로 이루어진다. 일부 실시 형태에서, AAV는 AAV7을 포함하거나 이로 본질적으로 이루어진다. 일부 실시 형태에서, AAV는 AAV8을 포함하거나 이로 본질적으로 이루어진다. 일부 실시 형태에서, AAV는 AAV9를 포함하거나 이로 본질적으로 이루어진다. 일부 실시 형태에서, AAV는 AAV10을 포함하거나 이로 본질적으로 이루어진다. 일부 실시 형태에서, AAV는 AAV 변이체를 포함하거나 이로 본질적으로 이루어진다. 본 개시내용의 소정의 태양에서 AAV는 rAAV를 포함한다.
- [0118] 본 명세서에 기재된 AAV 입자는 AAV 입자와 상용성인 임의의 하류 응용에 사용하기 위해 의도된다. 예를 들어, 일부 실시 형태에서, AAV 입자는 유전자 요법에 사용하기에 적합하며, 정제된 AAV 입자는 치료 유전자를 갖는 AAV 벡터를 갖는다. 그러나, AAV 입자는 또한 백신으로서 유용할 수 있다는 것이 또한 이해된다. 추가로, 하류 응용은 치료적 용도 너머로 연장된다. 예를 들어, 본 명세서에 기재된 AAV 입자는 또한 영상화 응용 또는 다른 비-치료적 용도를 위해, 작용제로서 유용할 수 있다. 일부 실시 형태에서, 빈 캡시드를 포함하는 AAV 입자; 적재된 캡시드 및 빈 캡시드의 혼합물을 포함하는 AAV 입자; 적재된 캡시드, 부분적으로 적재된 캡시드, 및 빈 캡시드의 혼합물을 포함하는 AAV 입자; 또는 부분적으로 적재된 캡시드 및 빈 캡시드의 혼합물을 포함하는 AAV 입자를 갖는 것이 바람직할 수 있다. 일부 실시 형태에서, AAV 입자는 빈 캡시드를 포함한다. 일부 실시 형태에서, AAV 입자는 적재된 캡시드를 포함한다. 일부 실시 형태에서, AAV 입자는 부분적으로 적재된 캡시드를 포함한다. 일부 실시 형태에서, AAV 입자는 적재된 캡시드, 부분적으로 적재된 캡시드, 및 빈 캡시드의 혼합물을 포함한다. 일부 실시 형태에서, AAV 입자는 부분적으로 적재된 캡시드 및 빈 캡시드의 혼합물을 포함한다. 따라서, 하류 응용은 본 명세서에 기재된 약제학적 조성물에 의해 제한되지 않는다.

[0119] 1.2 완충제

[0120] 일부 실시 형태에서, 본 명세서에 개시된 약제학적 조성물은 완충제를 포함한다. 일부 실시 형태에서, 완충제는 당업계에 잘 알려진 약제학적으로 허용가능한 완충제이다. 일부 실시 형태에서, 완충제는 HEPES, 트리스, 비신, 아세테이트, 글루타메이트, 락테이트, 말레에이트, 타르트레이트, 포스페이트, 시트레이트, 카르보네이트, 글리시네이트, 히스티딘, 글리신, 리신, 아르기닌, 석시네이트, HEPES(4-(2 - 하이드록시에틸)-1-피페라진에탄설향산), MOPS(3-(N-모르폴리노) 프로판설향산), MES(2-(N-모르폴리노)에탄설향산) 및 트라이에탄올아민 완충제, 및 이들의 혼합물이다. 일부 실시 형태에서, 완충제는 HEPES이다. 일부 실시 형태에서, 완충제는 트리스이다. 일부 실시 형태에서, 완충제는 비신이다. 일부 실시 형태에서, 완충제는 아세테이트이다. 일부 실시 형태에서, 완충제는 글루타메이트이다. 일부 실시 형태에서, 완충제는 락테이트이다. 일부 실시 형태에서, 완충제는 말레에이트이다. 일부 실시 형태에서, 완충제는 타르트레이트이다. 일부 실시 형태에서, 완충제는 포스페이트이다. 일부 실시 형태에서, 완충제는 시트레이트이다. 일부 실시 형태에서, 완충제는 카르보네이트이다. 일부 실시 형태에서, 완충제는 글리시네이트이다. 일부 실시 형태에서, 완충제는 히스티딘이다. 일부 실시 형태에서, 완충제는 글리신이다. 일부 실시 형태에서, 완충제는 리신이다. 일부 실시 형태에서, 완충제는 아르기닌이다. 일부 실시 형태에서, 완충제는 석시네이트이다. 일부 실시 형태에서, 완충제는 HEPES(4-(2 - 하이드록시에틸)-1-피페라진에탄설향산)이다. 일부 실시 형태에서, 완충제는 MOPS(3-(N-모르폴리노) 프로판설향산)이다. 일부 실시 형태에서, 완충제는 MES(2-(N-모르폴리노)에탄설향산)이다. 일부 실시 형태에서, 완충제는 트라이에탄올아민 완충제이다.

[0121] 일부 실시 형태에서, 완충제는 트리스 또는 히스티딘, 및 이들의 혼합물이다. 일부 실시 형태에서, 완충제는 트리스이다. 일부 실시 형태에서, 완충제는 히스티딘이다. 일부 실시 형태에서, 완충제는 트리스 및 히스티딘의 혼합물이다.

[0122] 일부 실시 형태에서, 완충제는 트리스 HCl 또는 L-히스티딘 HCl, 또는 이들의 혼합물을 포함한다. 일부 실시 형태에서, 완충제는 L-히스티딘 HCl을 포함한다. 일부 실시 형태에서, 완충제는 트리스 HCl을 포함한다. 일부 실시 형태에서, 완충제는 트리스 HCl이다. 일부 실시 형태에서, 완충제는 L-히스티딘 HCl이다.

[0123] 일부 실시 형태에서, 완충제는 약 4.0 내지 약 9.0, 약 6.0 내지 약 8.0, 또는 약 7.3 내지 약 7.7의 범위의 pH를 갖는다. 일부 실시 형태에서, 완충제는 약 4.0 내지 약 9.0의 범위의 pH를 갖는다. 일부 실시 형태에서, 완충제는 약 6.0 내지 약 8.0의 범위의 pH를 갖는다. 일부 실시 형태에서, 완충제는 약 7.3 내지 약 7.7의 범위의 pH를 갖는다. 일부 실시 형태에서, 완충제는 약 7.5의 pH를 갖는다.

[0124] 일부 실시 형태에서, 본 명세서에 개시된 약제학적 조성물은 약 0 mM 내지 약 50 mM, 약 0 mM 내지 약 45 mM, 약 0 mM 내지 약 40 mM, 약 0 mM 내지 약 35 mM, 약 0 mM 내지 약 30 mM, 약 0 mM 내지 약 25 mM, 약 0 mM 내지 약 20 mM, 약 5 내지 약 30 mM, 약 10 내지 약 25 mM, 또는 약 15 mM 내지 약 20 mM의 완충제를 포함한다. 일부 실시 형태에서, 본 명세서에 개시된 약제학적 조성물은 약 0.5 mM, 약 1 mM, 약 2 mM, 약 3 mM, 약 4 mM, 약 5 mM, 약 6 mM, 약 7 mM, 약 8 mM, 약 9 mM, 약 10 mM, 약 11 mM, 약 12 mM, 약 13 mM, 약 14 mM, 약 15 mM, 약 16 mM, 약 17 mM, 약 18 mM, 약 19 mM, 또는 약 20 mM의 완충제를 포함한다. 일부 실시 형태에서, 본 명세서에 개시된 약제학적 조성물은 약 0 mM 내지 약 50 mM의 완충제를 포함한다. 일부 실시 형태에서, 약제학적 조성물은 약 0 mM 내지 약 45 mM의 완충제를 포함한다. 일부 실시 형태에서, 약제학적 조성물은 약 0 mM 내지 약 40 mM의 완충제를 포함한다. 일부 실시 형태에서, 약제학적 조성물은 약 0 mM 내지 약 35 mM의 완충제를 포함한다. 일부 실시 형태에서, 약제학적 조성물은 약 0 mM 내지 약 30 mM의 완충제를 포함한다. 일부 실시 형태에서, 약제학적 조성물은 약 0 mM 내지 약 25 mM의 완충제를 포함한다. 일부 실시 형태에서, 약제학적 조성물은 약 0 mM 내지 약 20 mM의 완충제를 포함한다. 일부 실시 형태에서, 약제학적 조성물은 약 5 내지 약 30 mM의 완충제를 포함한다. 일부 실시 형태에서, 약제학적 조성물은 약 10 내지 약 25 mM의 완충제를 포함한다. 일부 실시 형태에서, 약제학적 조성물은 약 15 mM 내지 약 20 mM의 완충제를 포함한다. 일부 실시 형태에서, 본 명세서에 개시된 약제학적 조성물은 약 0.5 mM의 완충제를 포함한다. 일부 실시 형태에서, 약제학적 조성물은 약 1 mM의 완충제를 포함한다. 일부 실시 형태에서, 약제학적 조성물은 약 2 mM의 완충제를 포함한다. 일부 실시 형태에서, 약제학적 조성물은 약 3 mM의 완충제를 포함한다. 일부 실시 형태에서, 약제학적 조성물은 약 4 mM의 완충제를 포함한다. 일부 실시 형태에서, 약제학적 조성물은 약 5 mM의 완충제를 포함한다. 일부 실시 형태에서, 약제학적 조성물은 약 6 mM의 완충제를 포함한다. 일부 실시 형태에서, 약제학적 조성물은 약 7 mM의 완충제를 포함한다. 일부 실시 형태에서, 약제학적 조성물은 약 8 mM의 완충제를 포함한다. 일부 실시 형태에서, 약제학적 조성물은 약 9 mM의 완충제를 포함한다. 일부 실시 형태에서, 약제학적 조성물은 약 10 mM의 완충제를 포함한다. 일부 실시 형태에서, 약제학적 조성물은 약 11 mM의 완충제를 포함한다. 일부 실시 형태

태에서, 약제학적 조성물은 약 12 mM의 완충제를 포함한다. 일부 실시 형태에서, 약제학적 조성물은 약 13 mM의 완충제를 포함한다. 일부 실시 형태에서, 약제학적 조성물은 약 14 mM의 완충제를 포함한다. 일부 실시 형태에서, 약제학적 조성물은 약 15 mM의 완충제를 포함한다. 일부 실시 형태에서, 약제학적 조성물은 약 16 mM의 완충제를 포함한다. 일부 실시 형태에서, 약제학적 조성물은 약 17 mM의 완충제를 포함한다. 일부 실시 형태에서, 약제학적 조성물은 약 18 mM의 완충제를 포함한다. 일부 실시 형태에서, 본 명세서에 개시된 약제학적 조성물은 약 20 mM의 완충제를 포함한다.

[0125] 1.3 동결보호제

[0126] 일부 실시 형태에서, 본 명세서에 개시된 약제학적 조성물은 동결보호제를 추가로 포함한다. 일부 실시 형태에서, 동결보호제는 유기 용매, 폴리올, 중합체, 당, 또는 이들의 조합이다. 일부 실시 형태에서, 동결보호제는 DMSO(다이메틸 설펍사이드), 에틸렌 글리콜, 글리세롤, 프로필렌 글리콜, (MPD)2-메틸-2,4-펜탄다이올, 글리세롤-3-포스페이트, 다이에틸 글리콜, 트라이에틸렌 글리콜, 폴리비닐 알코올, PEG, 하이드록시에틸 전분, 소르비톨, 만니톨, 락토스, 수크로스, 트레할로스, 또는 이들의 조합이다. 일부 실시 형태에서, 동결보호제는 유기 용매이다. 일부 실시 형태에서, 동결보호제는 폴리올이다. 일부 실시 형태에서, 동결보호제는 중합체이다. 일부 실시 형태에서, 동결보호제는 당이다. 일부 실시 형태에서, 동결보호제는 DMSO(다이메틸 설펍사이드)이다. 일부 실시 형태에서, 동결보호제는 에틸렌 글리콜이다. 일부 실시 형태에서, 동결보호제는 글리세롤이다. 일부 실시 형태에서, 동결보호제는 프로필렌 글리콜이다. 일부 실시 형태에서, 동결보호제는 (MPD)2-메틸-2,4-펜탄다이올이다. 일부 실시 형태에서, 동결보호제는 글리세롤-3-포스페이트이다. 일부 실시 형태에서, 동결보호제는 다이에틸 글리콜이다. 일부 실시 형태에서, 동결보호제는 트라이에틸렌 글리콜이다. 일부 실시 형태에서, 동결보호제는 폴리비닐 알코올이다. 일부 실시 형태에서, 동결보호제는 PEG이다. 일부 실시 형태에서, 동결보호제는 하이드록시에틸 전분이다. 일부 실시 형태에서, 동결보호제는 소르비톨이다. 일부 실시 형태에서, 동결보호제는 만니톨이다. 일부 실시 형태에서, 동결보호제는 락토스이다. 일부 실시 형태에서, 동결보호제는 수크로스이다. 일부 실시 형태에서, 동결보호제는 트레할로스이다. 일부 실시 형태에서, 동결보호제는 당을 포함한다. 일부 실시 형태에서, 당은 단당류이다. 일부 실시 형태에서, 당은 이당류이다. 일부 실시 형태에서, 당은 다당류이다. 그러한 일 실시 형태에서, 당은 수크로스, 트레할로스, 또는 이들의 조합이다. 일 실시 형태에서, 동결보호제는 트레할로스이다.

[0127] 일부 실시 형태에서, 본 명세서에 개시된 약제학적 조성물은 약 1%(w/v) 내지 약 10%(w/v), 약 3%(w/v) 내지 약 8%(w/v), 또는 약 4%(w/v) 내지 약 6%(w/v)의 동결보호제를 포함한다. 일부 실시 형태에서, 본 명세서에 개시된 약제학적 조성물은 약 1%(w/v) 내지 약 10%(w/v)의 동결보호제를 포함한다. 일부 실시 형태에서, 본 명세서에 개시된 약제학적 조성물은 약 3%(w/v) 내지 약 8%(w/v)의 동결보호제를 포함한다. 일부 실시 형태에서, 본 명세서에 개시된 약제학적 조성물은 약 4%(w/v) 내지 약 6%(w/v)의 동결보호제를 포함한다. 일부 실시 형태에서, 본 명세서에 개시된 약제학적 조성물은 약 1%(w/v), 약 2%(w/v), 약 3%(w/v), 약 4%(w/v), 약 5%(w/v), 약 6%(w/v), 약 7%(w/v), 약 8%(w/v), 약 9%(w/v), 또는 약 10%(w/v)의 동결보호제를 포함한다. 일 실시 형태에서, 본 명세서에 개시된 약제학적 조성물은 약 1%(w/v)의 동결보호제를 포함한다. 일 실시 형태에서, 본 명세서에 개시된 약제학적 조성물은 약 2%(w/v)의 동결보호제를 포함한다. 일 실시 형태에서, 본 명세서에 개시된 약제학적 조성물은 약 3%(w/v)의 동결보호제를 포함한다. 일 실시 형태에서, 본 명세서에 개시된 약제학적 조성물은 약 4%(w/v)의 동결보호제를 포함한다. 일 실시 형태에서, 본 명세서에 개시된 약제학적 조성물은 약 5%(w/v)의 동결보호제를 포함한다. 일 실시 형태에서, 본 명세서에 개시된 약제학적 조성물은 약 6%(w/v)의 동결보호제를 포함한다. 일 실시 형태에서, 본 명세서에 개시된 약제학적 조성물은 약 7%(w/v)의 동결보호제를 포함한다. 일 실시 형태에서, 본 명세서에 개시된 약제학적 조성물은 약 8%(w/v)의 동결보호제를 포함한다. 일 실시 형태에서, 본 명세서에 개시된 약제학적 조성물은 약 9%(w/v)의 동결보호제를 포함한다. 일 실시 형태에서, 본 명세서에 개시된 약제학적 조성물은 약 10%(w/v)의 동결보호제를 포함한다.

[0128] 1.4 비-이온성 계면활성제

[0129] 일부 실시 형태에서, 본 명세서에 개시된 약제학적 조성물은 비-이온성 계면활성제를 추가로 포함한다. 일부 실시 형태에서, 비-이온성 계면활성제는 공중합체이다. 일부 실시 형태에서, 비-이온성 계면활성제는 폴록사머이다. 폴록사머는 폴리옥시에틸렌(폴리(에틸렌 옥사이드))의 2개의 친수성 사슬이 양 옆에 있는 폴리옥시프로필렌(폴리(프로필렌 옥사이드))의 중심 소수성 사슬로 구성된 비이온성 트라이블록 공중합체이다. 폴록사머는 또한 상표명 Pluronic®에 의해 알려져 있다. 중합체 블록의 길이는 원하는대로 변경할 수 있으므로, 경미하게 상이한 특성을 갖는 다수의 상이한 폴록사머가 존재한다. 일반 용어 "폴록사머"에 대해, 이러한 공중합체는 통

상적으로 문자 "P"(폴록사머에 대해)에 이어서 3개의 숫자로 명명되며, 최초 2개의 숫자 x 100은 폴리옥시프로필렌 코어의 대략적인 분자 질량을 제공하고, 마지막 숫자 x10은 백분율 폴리옥시에틸렌 함량을 제공한다(예를 들어, P407 = 4,000 g/mol의 폴리옥시프로필렌 분자 질량 및 70% 폴리옥시에틸렌 함량을 갖는 폴록사머). 일부 실시 형태에서, 폴록사머는 P188, P237, P338, 또는 P407이다. 일 실시 형태에서, 폴록사머는 P188이다. 일 실시 형태에서, 폴록사머는 P237이다. 일 실시 형태에서, 폴록사머는 P338이다. 일 실시 형태에서, 폴록사머는 P407이다. 일부 실시 형태에서 비-이온성 계면활성제는 폴리옥시에틸렌 소르비탄 에스테르 계면활성제(통상적으로 Tween으로 지칭됨), 예컨대 PS-20 및 PS-80; 에틸렌 옥사이드(EO)의 공중합체, 인지질, 예컨대 포스파티딜 콜린(레시틴); 라우릴, 세틸, 스테아릴, 및 올레일 알코올(Brij 계면활성제로 알려짐)로부터 유래된 폴리옥시에틸렌 지방 에테르, 예컨대 트라이에틸렌글리콜 모노라우릴 에테르(Brij 30) 또는 폴리옥시에틸렌(23) 라우릴 에테르(Brij 35); 및 소르비탄 에스테르(통상적으로 SPAN으로 알려짐), 예컨대 소르비탄 트라이올레이트(Span 85) 및 소르비탄 모노라우레이트이다. 일 실시 형태에서, 비-이온성 계면활성제는 폴리소르베이트 20(PS-20), 폴리소르베이트 80(PS-80), 또는 Brij 계면활성제, 또는 이들의 조합이다. 일 실시 형태에서, 비-이온성 계면활성제는 폴리소르베이트이다. 일 실시 형태에서, 폴리소르베이트는 PS-20이다. 일 실시 형태에서, 폴리소르베이트는 PS-40이다. 일 실시 형태에서, 폴리소르베이트는 PS-60이다. 일 실시 형태에서, 폴리소르베이트는 PS-80이다. 일 실시 형태에서, 비-이온성 계면활성제는 Brij 계면활성제이다. 일 실시 형태에서, 비-이온성 계면활성제는 EO의 공중합체이다. 일 실시 형태에서, 비-이온성 계면활성제는 인지질이다. 일 실시 형태에서, 비-이온성 계면활성제는 포스파티딜 콜린(레시틴)이다. 일 실시 형태에서, 비-이온성 계면활성제는 라우릴 알코올로부터 유래된 폴리옥시에틸렌 지방 에테르이다. 일 실시 형태에서, 비-이온성 계면활성제는 세틸 알코올로부터 유래된 폴리옥시에틸렌 지방 에테르이다. 일 실시 형태에서, 비-이온성 계면활성제는 스테아릴 알코올로부터 유래된 폴리옥시에틸렌 지방 에테르이다. 일 실시 형태에서, 비-이온성 계면활성제는 올레일 알코올로부터 유래된 폴리옥시에틸렌 지방 에테르이다. 일 실시 형태에서, 비-이온성 계면활성제는 트라이에틸렌글리콜 모노라우릴 에테르(Brij 30)이다. 일 실시 형태에서, 비-이온성 계면활성제는 폴리옥시에틸렌(23) 라우릴 에테르(Brij 35)이다. 일 실시 형태에서, 비-이온성 계면활성제는 소르비탄 에스테르이다. 일 실시 형태에서, 비-이온성 계면활성제는 소르비탄 트라이올레이트(Span 85)이다. 일 실시 형태에서, 비-이온성 계면활성제는 소르비탄 모노라우레이트이다.

[0130] 일부 실시 형태에서, 본 명세서에 개시된 약제학적 조성물은 약 0.0001%(w/v) 내지 약 0.1%(w/v), 약 0.0005%(w/v) 내지 약 0.005%(w/v), 약 0.00075%(w/v) 내지 약 0.0025%(w/v)의 비-이온성 계면활성제를 포함한다. 일부 실시 형태에서, 본 명세서에 개시된 약제학적 조성물은 약 0.0001%(w/v) 내지 약 0.1%(w/v)의 비-이온성 계면활성제를 포함한다. 일부 실시 형태에서, 본 명세서에 개시된 약제학적 조성물은 약 0.0005%(w/v) 내지 약 0.005%(w/v)의 비-이온성 계면활성제를 포함한다. 일부 실시 형태에서, 본 명세서에 개시된 약제학적 조성물은 약 0.00075%(w/v) 내지 약 0.0025%(w/v)의 비-이온성 계면활성제를 포함한다.

[0131] 일부 실시 형태에서, 약제학적 조성물은 약 0.001%(w/v), 약 0.0015%(w/v), 약 0.002%(w/v), 약 0.0025%(w/v), 약 0.003%(w/v), 약 0.0035%(w/v), 약 0.004%(w/v), 약 0.0045%(w/v), 약 0.005%(w/v), 약 0.0055%(w/v), 약 0.006%(w/v), 약 0.0065%(w/v), 약 0.007%(w/v), 약 0.0075%(w/v), 약 0.008%(w/v), 약 0.0085%(w/v), 약 0.009%(w/v), 약 0.0095%(w/v)의 비-이온성 계면활성제를 포함한다. 일부 실시 형태에서, 약제학적 조성물은 약 0.001%(w/v)의 비-이온성 계면활성제를 포함한다. 일부 실시 형태에서, 약제학적 조성물은 약 0.0015%(w/v)의 비-이온성 계면활성제를 포함한다. 일부 실시 형태에서, 약제학적 조성물은 약 0.002%(w/v)의 비-이온성 계면활성제를 포함한다. 일부 실시 형태에서, 약제학적 조성물은 약 0.0025%(w/v)의 비-이온성 계면활성제를 포함한다. 일부 실시 형태에서, 약제학적 조성물은 약 0.003%(w/v)의 비-이온성 계면활성제를 포함한다. 일부 실시 형태에서, 약제학적 조성물은 약 0.0035%(w/v)의 비-이온성 계면활성제를 포함한다. 일부 실시 형태에서, 약제학적 조성물은 약 0.004%(w/v)의 비-이온성 계면활성제를 포함한다. 일부 실시 형태에서, 약제학적 조성물은 약 0.0045%(w/v)의 비-이온성 계면활성제를 포함한다. 일부 실시 형태에서, 약제학적 조성물은 약 0.005%(w/v)의 비-이온성 계면활성제를 포함한다. 일부 실시 형태에서, 약제학적 조성물은 약 0.0055%(w/v)의 비-이온성 계면활성제를 포함한다. 일부 실시 형태에서, 약제학적 조성물은 약 0.006%(w/v)의 비-이온성 계면활성제를 포함한다. 일부 실시 형태에서, 약제학적 조성물은 약 0.0065%(w/v)의 비-이온성 계면활성제를 포함한다. 일부 실시 형태에서, 약제학적 조성물은 약 0.007%(w/v)의 비-이온성 계면활성제를 포함한다. 일부 실시 형태에서, 약제학적 조성물은 약 0.0075%(w/v)의 비-이온성 계면활성제를 포함한다. 일부 실시 형태에서, 약제학적 조성물은 약 0.008%(w/v)의 비-이온성 계면활성제를 포함한다. 일부 실시 형태에서, 약제학적 조성물은 약 0.0085%(w/v)의 비-이온성 계면활성제를 포함한다. 일부 실시 형태에서, 약제학적 조성물은 약 0.009%(w/v)의 비-이온성 계면활성제를 포함한다. 일부 실시 형태에서, 약제학적 조성물은 약 0.0095%(w/v)의 비-이온성 계면활성제를 포함한다.

비-이온성 계면활성제를 포함한다.

1.5 약제학적으로 허용가능한 염

본 명세서에 제공되는 바와 같이, 본 개시내용의 약제학적 조성물은 또한 약제학적으로 허용가능한 염을 포함할 수 있다. 따라서, 본 개시내용의 일부 태양에서, 약제학적 조성물은 정제된 AAV 입자, 약제학적으로 허용가능한 염, 완충제, 동결보호제, 및 비-이온성 계면활성제를 포함한다.

일부 실시 형태에서, 약제학적으로 허용가능한 염은 약물 제형으로 대상체(예를 들어, 인간)에게 투여하기에 안전한 금속 염 및 암모니아 또는 유기 아민의 염이다. 적합한 약제학적으로 허용가능한 염은 소듐, 포타슘, 마그네슘, 칼슘, 세슘, 암모늄, 트라이에틸아민, 구아니딘 및 N-치환된 구아니딘 염, 아세트아미딘 및 N-치환된 아세트아미딘, 피리딘, 피롤린, 에탄올아민, 트라이에탄올아민, 다이사이클로헥실아민, 및 N,N'-다이벤질에틸렌다이아민 염을 포함하지만 이로 제한되지 않는다. 약제학적으로 허용가능한 염(염기성 질소 중심의)은 무기 산 염, 예컨대 하이드로클로라이드, 하이드로브로마이드, 설페이트, 포스페이트; 유기 산 염, 예컨대 트라이플루오로아세트레이트 및 말레이트 염; 설타네이트, 예컨대 메탄설포네이트, 에탄설포네이트, 벤젠설포네이트, p-톨루엔설포네이트, 캄포 설타네이트, 및 나프탈렌설포네이트; 아미노산 염, 예컨대 아르기네이트, 알라니네이트, 아스파르기네이트, 및 글루타메이트; 및 탄수화물 염, 예컨대 글루코네이트 및 갈락투로네이트를 포함하지만 이로 제한되지 않는다. 본 명세서에 사용될 수 있는 다른 염은 당업계에서 잘 알려져 있으며, 예를 들어, 모든 의도 및 목적을 위해 전체적으로 본 명세서에 참고로 포함되는 문헌[*Remington's Pharmaceutical Sciences*, 18th eds., Mack Publishing, Easton PA (1990)] 또는 문헌[*Remington: The Science and Practice of Pharmacy*, 19th eds., Mack Publishing, Easton PA (1995)]을 참조한다. 일 실시 형태에서, 약제학적으로 허용가능한 염은 소듐 염, 마그네슘 염, 칼슘 염, 포타슘 염, 포스페이트 염, 또는 설페이트 염이다. 일 실시 형태에서, 약제학적으로 허용가능한 염은 금속 염이다. 일 실시 형태에서, 약제학적으로 허용가능한 염은 소듐 염이다. 일부 실시 형태에서, 약제학적으로 허용가능한 염은 마그네슘 염이다. 일부 실시 형태에서, 약제학적으로 허용가능한 염은 칼슘 염이다. 일부 실시 형태에서, 약제학적으로 허용가능한 염은 포타슘 염이다. 일부 실시 형태에서, 약제학적으로 허용가능한 염은 포스페이트 염이다. 일부 실시 형태에서, 약제학적으로 허용가능한 염은 설페이트 염이다. 일 실시 형태에서, 약제학적으로 허용가능한 염은 소듐 클로라이드이다.

일부 실시 형태에서, 약제학적으로 허용가능한 염 농도는 약 1 mM 내지 약 200 mM이다. 일부 실시 형태에서, 약제학적으로 허용가능한 염 농도는 약 10 mM 내지 약 150 mM이다. 일부 실시 형태에서, 약제학적으로 허용가능한 염 농도는 약 1 mM 내지 약 49 mM이다. 일부 실시 형태에서, 약제학적으로 허용가능한 염 농도는 약 5 mM 내지 약 45 mM이다. 일부 실시 형태에서, 약제학적으로 허용가능한 염 농도는 약 7.5 mM 내지 약 40 mM이다. 일부 실시 형태에서, 약제학적으로 허용가능한 염 농도는 약 10 mM 내지 약 30 mM이다. 일부 실시 형태에서, 약제학적으로 허용가능한 염 농도는 약 200 mM 미만, 약 150 mM 미만, 약 100 mM 미만, 약 90 mM 미만, 약 80 mM 미만, 약 70 mM 미만, 약 60 mM 미만, 약 50 mM 미만, 약 40 mM 미만, 약 30 mM 미만, 약 20 mM 미만, 또는 약 10 mM 미만이다. 일부 실시 형태에서, 약제학적으로 허용가능한 염 농도는 약 200 mM 미만이다. 일부 실시 형태에서, 약제학적으로 허용가능한 염 농도는 약 150 mM 미만이다. 일부 실시 형태에서, 약제학적으로 허용가능한 염 농도는 약 100 mM 미만이다. 일부 실시 형태에서, 약제학적으로 허용가능한 염 농도는 약 90 mM 미만이다. 일부 실시 형태에서, 약제학적으로 허용가능한 염 농도는 약 80 mM 미만이다. 일부 실시 형태에서, 약제학적으로 허용가능한 염 농도는 약 70 mM 미만이다. 일부 실시 형태에서, 약제학적으로 허용가능한 염 농도는 약 60 mM 미만이다. 일부 실시 형태에서, 약제학적으로 허용가능한 염 농도는 약 50 mM 미만이다. 일부 실시 형태에서, 약제학적으로 허용가능한 염 농도는 약 40 mM 미만이다. 일부 실시 형태에서, 약제학적으로 허용가능한 염 농도는 약 30 mM 미만이다. 일부 실시 형태에서, 약제학적으로 허용가능한 염 농도는 약 20 mM 미만이다. 일부 실시 형태에서, 약제학적으로 허용가능한 염 농도는 약 10 mM 미만이다. 일부 실시 형태에서, 약제학적으로 허용가능한 염 농도는 약 200 mM, 약 150 mM, 약 100 mM, 또는 약 50 mM이다. 일부 실시 형태에서, 약제학적으로 허용가능한 염 농도는 약 150 mM이다. 일부 실시 형태에서, 약제학적으로 허용가능한 염 농도는 약 100 mM이다. 일부 실시 형태에서, 약제학적으로 허용가능한 염 농도는 약 10 mM이다.

1.6 pH 조건

본 명세서에 제공되는 바와 같이, 본 개시내용의 약제학적 조성물은 약 4.0 내지 약 9.0인 pH를 가질 수 있다. 일부 실시 형태에서, 약제학적 조성물의 pH는 약 7.0 내지 약 8.0이다. 일부 실시 형태에서, 약제학적 조성물의 pH는 약 7.3 내지 약 7.7이다. 소정의 실시 형태에서, 약제학적 조성물의 pH는 약 4.0, 약 4.1, 약 4.2, 약 4.3, 약 4.4, 약 4.5, 약 4.6, 약 4.7, 약 4.8, 약 4.9, 약 5.0, 약 5.1, 약 5.2, 약 5.3, 약 5.4, 약 5.5, 약

5.6, 약 5.7, 약 5.8, 약 5.9, 약 6.0, 약 6.1, 약 6.2, 약 6.3, 약 6.4, 약 6.5, 약 6.6, 약 6.7, 약 6.8, 약 6.9, 약 7.0, 약 7.1, 약 7.2, 약 7.3, 약 7.4, 약 7.5, 약 7.6, 약 7.7, 약 7.8, 약 7.9, 약 8.0, 약 8.1, 약 8.2, 약 8.3, 약 8.4, 약 8.5, 약 8.6, 약 8.7, 약 8.8, 약 8.9, 약 9.0이다. 일부 실시 형태에서, 약제학적 조성물의 pH는 약 7.3 내지 약 7.7이다. 소정의 실시 형태에서, 약제학적 조성물의 pH는 약 4.0이다. 소정의 실시 형태에서, 약제학적 조성물의 pH는 약 4.1이다. 소정의 실시 형태에서, 약제학적 조성물의 pH는 약 4.2이다. 소정의 실시 형태에서, 약제학적 조성물의 pH는 약 4.3이다. 소정의 실시 형태에서, 약제학적 조성물의 pH는 약 4.4이다. 소정의 실시 형태에서, 약제학적 조성물의 pH는 약 4.5이다. 소정의 실시 형태에서, 약제학적 조성물의 pH는 약 4.6이다. 소정의 실시 형태에서, 약제학적 조성물의 pH는 약 4.7이다. 소정의 실시 형태에서, 약제학적 조성물의 pH는 약 4.8이다. 소정의 실시 형태에서, 약제학적 조성물의 pH는 약 4.9이다. 소정의 실시 형태에서, 약제학적 조성물의 pH는 약 5.0이다. 소정의 실시 형태에서, 약제학적 조성물의 pH는 약 5.1이다. 소정의 실시 형태에서, 약제학적 조성물의 pH는 약 5.2이다. 소정의 실시 형태에서, 약제학적 조성물의 pH는 약 5.3이다. 소정의 실시 형태에서, 약제학적 조성물의 pH는 약 5.4이다. 소정의 실시 형태에서, 약제학적 조성물의 pH는 약 5.5이다. 소정의 실시 형태에서, 약제학적 조성물의 pH는 약 5.6이다. 소정의 실시 형태에서, 약제학적 조성물의 pH는 약 5.7이다. 소정의 실시 형태에서, 약제학적 조성물의 pH는 약 5.8이다. 소정의 실시 형태에서, 약제학적 조성물의 pH는 약 5.9이다. 소정의 실시 형태에서, 약제학적 조성물의 pH는 약 6.0이다. 소정의 실시 형태에서, 약제학적 조성물의 pH는 약 6.1이다. 소정의 실시 형태에서, 약제학적 조성물의 pH는 약 6.2이다. 소정의 실시 형태에서, 약제학적 조성물의 pH는 약 6.3이다. 소정의 실시 형태에서, 약제학적 조성물의 pH는 약 6.4이다. 소정의 실시 형태에서, 약제학적 조성물의 pH는 약 6.5이다. 소정의 실시 형태에서, 약제학적 조성물의 pH는 약 6.6이다. 소정의 실시 형태에서, 약제학적 조성물의 pH는 약 6.7이다. 소정의 실시 형태에서, 약제학적 조성물의 pH는 약 6.8이다. 소정의 실시 형태에서, 약제학적 조성물의 pH는 약 6.9이다. 소정의 실시 형태에서, 약제학적 조성물의 pH는 약 7.0이다. 소정의 실시 형태에서, 약제학적 조성물의 pH는 약 7.1이다. 소정의 실시 형태에서, 약제학적 조성물의 pH는 약 7.2이다. 소정의 실시 형태에서, 약제학적 조성물의 pH는 약 7.3이다. 소정의 실시 형태에서, 약제학적 조성물의 pH는 약 7.4이다. 소정의 실시 형태에서, 약제학적 조성물의 pH는 약 7.5이다. 소정의 실시 형태에서, 약제학적 조성물의 pH는 약 7.6이다. 소정의 실시 형태에서, 약제학적 조성물의 pH는 약 7.7이다. 소정의 실시 형태에서, 약제학적 조성물의 pH는 약 7.8이다. 소정의 실시 형태에서, 약제학적 조성물의 pH는 약 7.9이다. 소정의 실시 형태에서, 약제학적 조성물의 pH는 약 8.0이다. 소정의 실시 형태에서, 약제학적 조성물의 pH는 약 8.1이다. 소정의 실시 형태에서, 약제학적 조성물의 pH는 약 8.2이다. 소정의 실시 형태에서, 약제학적 조성물의 pH는 약 8.3이다. 소정의 실시 형태에서, 약제학적 조성물의 pH는 약 8.4이다. 소정의 실시 형태에서, 약제학적 조성물의 pH는 약 8.5이다. 소정의 실시 형태에서, 약제학적 조성물의 pH는 약 8.6이다. 소정의 실시 형태에서, 약제학적 조성물의 pH는 약 8.7이다. 소정의 실시 형태에서, 약제학적 조성물의 pH는 약 8.8이다. 소정의 실시 형태에서, 약제학적 조성물의 pH는 약 8.9이다. 소정의 실시 형태에서, 약제학적 조성물의 pH는 약 9.0이다. 상기 언급된 pH 값들의 사이에 있는 범위가 또한 고려된다.

[0138] **1.7 약제학적 조성물의 상태**

[0139] 본 명세서에 제공된 약제학적 조성물은 액체 조성물 또는 동결 조성물일 수 있다. 따라서, 일부 실시 형태에서, 약제학적 조성물은 액체 상태이다. 다른 실시 형태에서, 약제학적 조성물은 고체 또는 고체 또는 반-고체 상태이다.

[0140] **2. 약제학적 조성물 및 투여 경로**

[0141] 소정의 실시 형태에서, 본 명세서에 개시된 조성물은 당업자에게 알려진 하나 이상의 방법에 의해, 예컨대 비경구, 경점막, 경피, 근육내, 정맥내, 피내, 비강내, 피하, 복강내로 대상체에게 투여되며, 이에 따라 제형화된다. 일 실시 형태에서, 본 명세서에 기재된 조성물은 액체 제제의 표피 주사, 근육내 주사, 정맥내, 동맥내, 피하 주사, 또는 호흡기 점막내 주사를 통해 투여된다. 주사용 액체 제형은 용액 등을 포함한다.

[0142] **3. 저장 조건**

[0143] 소정의 실시 형태에서, 본 명세서에 개시된 조성물은 주위 온도, 예컨대 약 25℃에서 저장된다. 일부 실시 형태에서, 본 명세서에 개시된 조성물은 25℃ 미만에서 저장된다. 일부 실시 형태에서, 본 명세서에 개시된 조성물은 약 0℃ 내지 약 25℃에서 저장된다. 일부 실시 형태에서, 조성물은 0℃ 내지 10℃에서 저장된다. 일부 실시 형태에서, 조성물은 약 2℃ 내지 약 8℃에서 저장된다. 일부 실시 형태에서, 조성물은 약 4℃에서 저장된다. 일부 실시 형태에서, 조성물은 0℃ 미만에서 저장된다. 일부 실시 형태에서, 조성물은 약 -20℃ 내지 약

-80℃에서 저장된다. 일부 실시 형태에서, 조성물은 약 -20℃에서 저장된다. 일부 실시 형태에서, 조성물은 약 -70℃에서 저장된다. 일부 실시 형태에서, 조성물은 약 -80℃에서 저장된다.

[0144] 본 명세서에 제공되는 바와 같이, 본 명세서에 개시된 조성물은 1회 이상의 동결/해동 주기 후에 정제된 AAV 입자의 안정성을 유지하거나 향상시키고/시키거나 응집을 감소시키거나 방지할 수 있다. 일부 실시 형태에서, 본 명세서에 개시된 조성물은 정제된 AAV 입자의 안정성을 유지한다. 일부 실시 형태에서, 본 명세서에 개시된 조성물은 1회의 동결/해동 주기 후에 응집을 감소시킨다. 일부 실시 형태에서, 본 명세서에 개시된 조성물은 1회 초과 동결/해동 주기 후에 응집을 감소시킨다. 일부 실시 형태에서, 본 명세서에 개시된 조성물은 1회의 동결/해동 주기 후에 응집을 방지한다. 일부 실시 형태에서, 본 명세서에 개시된 조성물은 1회 초과 동결/해동 주기 후에 응집을 방지한다.

[0145] 소정의 실시 형태에서, 조성물은 0℃ 미만에서 저장되며, 안정성은 1회 이상의 동결/해동 주기 후에 유지되거나 향상된다. 소정의 실시 형태에서, 조성물은 약 -20℃에서 저장되며, 안정성은 1회 이상의 동결/해동 주기 후에 유지되거나 향상된다. 소정의 실시 형태에서, 조성물은 약 -20℃에서 저장되며, 안정성은 1회 이상의 동결/해동 주기 후에 유지되거나 향상된다. 소정의 실시 형태에서, 조성물은 약 -70℃에서 저장되며, 안정성은 1회 이상의 동결/해동 주기 후에 유지되거나 향상된다. 소정의 실시 형태에서, 조성물은 약 -80℃에서 저장되며, 안정성은 1회 이상의 동결/해동 주기 후에 유지되거나 향상된다. 일부 실시 형태에서는, 안정성이 유지된다. 일부 실시 형태에서는, 1회의 동결/해동 주기 후에 안정성이 유지된다. 일부 실시 형태에서는, 1회 초과 동결/해동 주기 후에 안정성이 유지된다. 일부 실시 형태에서는, 안정성이 향상된다. 일부 실시 형태에서는, 1회의 동결/해동 주기 후에 안정성이 향상된다. 일부 실시 형태에서는, 1회 초과 동결/해동 주기 후에 안정성이 향상된다.

[0146] 소정의 실시 형태에서, 조성물은 0℃ 미만에서 저장되며, 안정성은 3회 이상의 동결/해동 주기 후에 유지되거나 향상된다. 소정의 실시 형태에서, 조성물은 약 -20℃에서 저장되며, 안정성은 3회 이상의 동결/해동 주기 후에 유지되거나 향상된다. 소정의 실시 형태에서, 조성물은 약 -70℃에서 저장되며, 안정성은 3회 이상의 동결/해동 주기 후에 유지되거나 향상된다. 소정의 실시 형태에서, 조성물은 약 -80℃에서 저장되며, 안정성은 3회 이상의 동결/해동 주기 후에 유지되거나 향상된다. 일부 실시 형태에서는, 안정성이 유지된다. 일부 실시 형태에서는, 3회의 동결/해동 주기 후에 안정성이 유지된다. 일부 실시 형태에서는, 3회 초과 동결/해동 주기 후에 안정성이 유지된다. 일부 실시 형태에서는, 안정성이 향상된다. 일부 실시 형태에서는, 3회 초과 동결/해동 주기 후에 안정성이 향상된다.

[0147] 일부 실시 형태에서, 조성물은 0℃ 미만에서 저장되며, 응집은 1회 이상의 동결/해동 주기 후에 감소되거나 방지된다. 일부 실시 형태에서, 조성물은 약 -20℃에서 저장되며, 응집은 1회 이상의 동결/해동 주기 후에 감소되거나 방지된다. 일부 실시 형태에서, 조성물은 약 -70℃에서 저장되며, 응집은 1회 이상의 동결/해동 주기 후에 감소되거나 방지된다. 일부 실시 형태에서, 조성물은 약 -80℃에서 저장되며, 응집은 1회 이상의 동결/해동 주기 후에 감소되거나 방지된다. 일부 실시 형태에서, AAV 입자의 응집은 1회 이상의 동결/해동 주기 후에 5% 미만이다. 일부 실시 형태에서, AAV 입자의 응집은 1회 이상의 동결/해동 주기 후에 2% 미만이다. 일부 실시 형태에서, AAV 입자의 응집은 1회 이상의 동결/해동 주기 후에 1% 미만이다. 일부 실시 형태에서는, 응집이 감소된다. 일부 실시 형태에서는, 1회의 동결/해동 주기 후에 응집이 감소된다. 일부 실시 형태에서는, 1회 초과 동결/해동 주기 후에 응집이 감소된다. 일부 실시 형태에서는, 응집이 방지된다. 일부 실시 형태에서는, 1회의 동결/해동 주기 후에 응집이 방지된다. 일부 실시 형태에서는, 1회 초과 동결/해동 주기 후에 응집이 방지된다.

[0148] 일부 실시 형태에서, 조성물은 0℃ 미만에서 저장되며, 응집은 3회 이상의 동결/해동 주기 후에 감소되거나 방지된다. 일부 실시 형태에서, 조성물은 약 -20℃에서 저장되며, 응집은 3회 이상의 동결/해동 주기 후에 감소되거나 방지된다. 일부 실시 형태에서, 조성물은 약 -70℃에서 저장되며, 응집은 3회 이상의 동결/해동 주기 후에 감소되거나 방지된다. 일부 실시 형태에서, 조성물은 약 -80℃에서 저장되며, 응집은 3회 이상의 동결/해동 주기 후에 감소되거나 방지된다. 일부 실시 형태에서, AAV 입자의 응집은 3회 이상의 동결/해동 주기 후에 5% 미만이다. 일부 실시 형태에서, AAV 입자의 응집은 3회 이상의 동결/해동 주기 후에 2% 미만이다. 일부 실시 형태에서, AAV 입자의 응집은 3회 이상의 동결/해동 주기 후에 1% 미만이다. 일부 실시 형태에서는, 응집이 감소된다. 일부 실시 형태에서는, 3회의 동결/해동 주기 후에 응집이 감소된다. 일부 실시 형태에서는, 3회 초과 동결/해동 주기 후에 응집이 감소된다. 일부 실시 형태에서는, 응집이 방지된다. 일부 실시 형태에서

는, 3회의 동결/해동 주기 후에 응집이 방지된다. 일부 실시 형태에서는, 3회 초과와 동결/해동 주기 후에 응집이 방지된다.

[0149] 4. 예시적인 제형

[0150] 본 명세서에 개시된 예시적인 제형은 하기 또는 실시예에 기재된 제형 중 어느 하나를 포함하지만 이로 제한되지 않는다. 그러나, 본 출원은 하기 기재되고 예로서 제공되는 정확한 실시 형태로 제한되지 않는다는 것이 이해되어야 한다.

[0151] 일 실시 형태에서, 약제학적 조성물은 정제된 AAV 입자, 완충제, 동결보호제, 및 비-이온성 계면활성제를 포함하며, 여기서 (a) 정제된 AAV 입자에는 불순물이 실질적으로 없고, (b) 완충제 농도는 약 20 mM이고, (c) 동결보호제는 약 5%(w/v) 트레할로스이고, (d) 비-이온성 계면활성제는 약 0.001%(w/v) 폴록사머 188인 약제학적 조성물을 포함한다. 일부 실시 형태에서, 완충제는 트리스 HCl을 포함한다. 일부 실시 형태에서, 완충제는 L-히스티딘 HCl을 포함한다.

[0152] 일 실시 형태에서, 약제학적 조성물은 정제된 AAV 입자, 약제학적으로 허용가능한 염, 완충제, 동결보호제, 및 비-이온성 계면활성제를 포함하며, 여기서 (a) 정제된 AAV 입자에는 불순물이 실질적으로 없고, (b) 약제학적으로 허용가능한 염 농도는 약 10 mM 소듐 클로라이드이고, (c) 완충제 농도는 약 20 mM이고, (d) 동결보호제는 약 5%(w/v) 트레할로스이고, (e) 비-이온성 계면활성제는 약 0.001%(w/v) 폴록사머 188인 약제학적 조성물을 포함한다. 일부 실시 형태에서, 완충제는 트리스 HCl을 포함한다. 일부 실시 형태에서, 완충제는 L-히스티딘 HCl을 포함한다.

[0153] 일 실시 형태에서, 약제학적 조성물은 정제된 AAV 입자, 약제학적으로 허용가능한 염, 완충제, 동결보호제, 및 비-이온성 계면활성제를 포함하며, 여기서 (a) 정제된 AAV 입자에는 불순물이 실질적으로 없고, (b) 약제학적으로 허용가능한 염 농도는 약 25 mM 소듐 클로라이드이고, (c) 완충제 농도는 약 20 mM이고, (d) 동결보호제는 약 5%(w/v) 트레할로스이고, (e) 비-이온성 계면활성제는 약 0.001%(w/v) 폴록사머 188인 약제학적 조성물을 포함한다. 일부 실시 형태에서, 완충제는 트리스 HCl을 포함한다. 일부 실시 형태에서, 완충제는 L-히스티딘 HCl을 포함한다.

[0154] 일 실시 형태에서, 약제학적 조성물은 정제된 AAV 입자, 약제학적으로 허용가능한 염, 완충제, 동결보호제, 및 비-이온성 계면활성제를 포함하며, 여기서 (a) 정제된 AAV 입자에는 불순물이 실질적으로 없고, (b) 약제학적으로 허용가능한 염 농도는 약 50 mM 소듐 클로라이드이고, (c) 완충제 농도는 약 20 mM이고, (d) 동결보호제는 약 5%(w/v) 트레할로스이고, (e) 비-이온성 계면활성제는 약 0.001%(w/v) 폴록사머 188인 약제학적 조성물을 포함한다. 일부 실시 형태에서, 완충제는 트리스 HCl을 포함한다. 일부 실시 형태에서, 완충제는 L-히스티딘 HCl을 포함한다.

[0155] 다른 태양에서, 약제학적 조성물은 정제된 AAV 입자, 약제학적으로 허용가능한 염, 완충제, 동결보호제, 및 비-이온성 계면활성제를 포함하며, 여기서 (a) 정제된 AAV 입자에는 불순물이 실질적으로 없고, (b) 약제학적으로 허용가능한 염 농도는 약 100 mM 소듐 클로라이드이고, (c) 완충제 농도는 약 20 mM이고, (d) 동결보호제는 약 5%(w/v) 트레할로스이고, (e) 비-이온성 계면활성제는 약 0.001%(w/v) 폴록사머 188인 약제학적 조성물을 포함한다. 일부 실시 형태에서, 완충제는 트리스 HCl을 포함한다. 일부 실시 형태에서, 완충제는 L-히스티딘 HCl을 포함한다.

[0156] 다른 태양에서, 약제학적 조성물은 정제된 AAV 입자, 약제학적으로 허용가능한 염, 완충제, 동결보호제, 및 비-이온성 계면활성제를 포함하며, 여기서 (a) 정제된 AAV 입자에는 불순물이 실질적으로 없고, (b) 약제학적으로 허용가능한 염 농도는 약 125 mM 소듐 클로라이드이고, (c) 완충제 농도는 약 20 mM이고, (d) 동결보호제는 약 5%(w/v) 트레할로스이고, (e) 비-이온성 계면활성제는 약 0.001%(w/v) 폴록사머 188인 약제학적 조성물을 포함한다. 일부 실시 형태에서, 완충제는 트리스 HCl을 포함한다. 일부 실시 형태에서, 완충제는 L-히스티딘 HCl을 포함한다.

[0157] 다른 태양에서, 약제학적 조성물은 정제된 AAV 입자, 약제학적으로 허용가능한 염, 완충제, 동결보호제, 및 비-이온성 계면활성제를 포함하며, 여기서 (a) 정제된 AAV 입자에는 불순물이 실질적으로 없고, (b) 약제학적으로 허용가능한 염 농도는 약 150 mM 소듐 클로라이드이고, (c) 완충제 농도는 약 20 mM이고, (d) 동결보호제는 약 5%(w/v) 트레할로스이고, (e) 비-이온성 계면활성제는 약 0.001%(w/v) 폴록사머 188인 약제학적 조성물을 포함한다. 일부 실시 형태에서, 완충제는 트리스 HCl을 포함한다. 일부 실시 형태에서, 완충제는 L-히스티딘 HCl을 포함한다.

- [0158] 다른 태양에서, 약제학적 조성물은 정제된 AAV 입자, 약제학적으로 허용가능한 염, 완충제, 동결보호제, 및 비-이온성 계면활성제를 포함하며, 여기서 (a) 정제된 AAV 입자에는 불순물이 실질적으로 없고, (b) 약제학적으로 허용가능한 염 농도는 약 200 mM 소듐 클로라이드이고, (c) 완충제 농도는 약 20 mM이고, (d) 동결보호제는 약 5%(w/v) 트레할로스이고, (e) 비-이온성 계면활성제는 약 0.001%(w/v) 폴록사머 188인 약제학적 조성물을 포함한다. 일부 실시 형태에서, 완충제는 트리스 HCl을 포함한다. 일부 실시 형태에서, 완충제는 L-히스티딘 HCl을 포함한다.
- [0159] **5. AAV 입자의 정제**
- [0160] AAV 입자는 당업계에 알려진 다양한 방법을 사용하여 정제될 수 있다. 일반적으로, 정제는 원심분리, 크로마토그래피 또는 여과, 또는 가능하게는 이들의 조합을 포함한다. 일부 실시 형태에서, 정제는, 예를 들어, 두 번의 크로마토그래피 단계 또는 초원심분리/여과와 크로마토그래피의 조합을 포함하는 2단계 정제 프로토콜을 포함할 수 있다. 예로서, 2단계 정제 프로토콜은 친화성 크로마토그래피(예를 들어, 헤파린 친화성 수지를 사용함)에 의한 이어서 이온 교환 컬럼상에서 폴리싱에 의한 정제를 포함할 수 있다. 다른 예시적인 2단계 정제 프로토콜은 초원심분리(예를 들어, 이오덕사놀 밀도 초원심분리)와 후속 크로마토그래피(예를 들어, 헤파린 친화성 정제와 같은 친화성 크로마토그래피)를 포함할 수 있다.
- [0161] 정제 공정에 사용되는 출발 물질의 여과 및/또는 원심분리는, 예를 들어, 세포 잔해물 및/또는 세포 단편과 같은 벌크 불순물 중 일부를 제거하는 데 도움이 될 수 있다. 따라서, 일부 실시 형태에서, 상청액은 정화된 상청액이다. 소정 실시 형태에서, 여과 및/또는 원심분리는 예를 들어, 크로마토그래피 정제와 같은 하나 이상의 추가 정제 단계 전에 수행된다. 상청액을 정화하기 위한 다양한 방법이 당업계에 알려져 있다. 예를 들어, 0.2 μ m 필터를 사용하여 상청액을 정화할 수 있다. 구체적인 실시 형태에서, 정화된 상청액은 하나 이상의 추가 정제 단계 전에 Benzonase®로 처리될 수 있다.
- [0162] AAV 입자의 정제를 위한 원심분리 기술은, 예를 들어, 밀도 구배 원심분리, 초원심분리 또는 이들의 조합을 포함할 수 있다. 밀도 구배 원심분리의 예시적인 유형은 CsCl을 포함할 수 있으며, 이는 강한 원심력장(centrifugal field)에 적용될 때 밀도 구배를 형성한다. 예를 들어, 바이러스가 CsCl 염에서 평형 상태로 원심분리되면, 이들은 오염물로부터 분리되고 부유 밀도에 기초하여 밴드로 수집된다. 일부 실시 형태에서, AAV 입자의 정제는 다수 회의 CsCl 구배 원심분리 단계를 포함한다. AAV 입자의 정제를 위한 다른 예시적인 밀도 매질은 이오덕사놀을 포함할 수 있다. 일부 실시 형태에서, AAV 입자의 정제는 예비 정제 단계로서 밀도 구배 원심분리(예를 들어, 불연속 이오덕사놀 구배 원심분리), 이어서 헤파린처리된(heparinized) 지지체 매트릭스 크로마토그래피 또는 이온 교환 크로마토그래피에 의한 것과 같은 친화성 크로마토그래피 바이러스 정제 단계를 포함할 수 있다.
- [0163] 일부 실시 형태에서, AAV 입자의 정제는 크로마토그래피를 포함한다. 예를 들어, 대규모 양의 AAV 입자의 정제는 일반적으로 용액(이동상) 중의 분자가 고정 물질(고체상 또는 고체 지지체)과의 화학적 또는 물리적 상호작용의 차이에 기초하여 분리되는 일부 형태의 크로마토그래피를 포함한다. 예시적인 유형의 크로마토그래피는, 예를 들어, 크기(즉, 물리적 배제)에 기초하여 분자를 분리하기 위해 다공성 수지 재료를 사용하는 겔 여과(크기 배제 크로마토그래피 또는 SEC라고도 칭함)를 포함한다. 다른 예시적인 유형의 크로마토그래피는 친화성 크로마토그래피(친화성 정제라고도 칭함)이다.
- [0164] 소정의 실시 형태에서, 크로마토그래피는 크로마토그래피 컬럼을 포함한다. 본 명세서에 개시된 바와 같이, 다양한 유형의 크로마토그래피 컬럼을 사용하여 AAV 입자를 정제할 수 있다. 소정 실시 형태에서, 크로마토그래피 컬럼은 모노리스(monolith)이다. 모노리스는 다수의 상호연결된 채널을 갖는 균질한 고정상의 단일 블록을 갖는 크로마토그래피 컬럼이다. 모노리스의 고정상은 다양한 화학 물질일 수 있어서, 상이한 특성을 갖는 상이한 종류의 생체분자의 정제를 가능하게 한다. 그러나, 컬럼이 모노리스일 필요는 없으며, 비드, 다공성 입자-기반 컬럼 및 막 흡착기(membrane adsorber)가 또한 사용될 수 있는 것으로 이해된다.
- [0165] 친화성 크로마토그래피는 표적 분자에 결합하는 리간드와 같은 분자들 사이의 특이적 결합 상호작용 또는 표적 분자와의 특이적 이온 상호작용을 이용한다. 예시적인 유형의 친화성 크로마토그래피는 바이러스 캡시드와, 특정 생물학적 리간드 또는 크로마토그래피 매트릭스에 결합된 수용체 사이의 가역적 상호작용에 기초하여 단백질 및 핵산 오염물로부터 바이러스 입자를 분리하는 것을 포함한다. 일부 실시 형태에서, 친화성 크로마토그래피에 의한 정제는 음으로 하전된 셀룰로오스 친화성 매질 셀룰로판 설페이트를 포함할 수 있다. 대안적인 친화성 정제 접근법은 조립되지 않은 캡시드 단백질의 분리를 가능하게 하는 단일클론 항체(예를 들어, A20)에 의한 AAV 입자(예를 들어, AAV2 입자)의 인식에 기초한다. 친화성 크로마토그래피에 대한 추가의 예시적인 예는 해

파린 친화성을 포함한다.

- [0166] 일부 실시 형태에서, 친화성 크로마토그래피는 정제되는 AAV 입자의 위형 또는 AAV 캡시드 혈청형에 특이적일 수 있다. 예를 들어, 일부 AAV 혈청형, 예컨대 AAV1, AAV4 및 AAV5는 헤파린 컬럼에 덜 효율적으로 결합한다. 따라서, 일부 실시 형태에서, 예를 들어, AAV5 입자의 포획을 위한 친화성 매트릭스는 CNBr-활성화 Sepharose에 공유 결합되는 뮤신으로 불리는 시알산-풍부 단백질을 포함할 수 있다. 대안적으로, PDGFR-알파 및 PDGFR-베타는 예를 들어 AAV5 입자의 포획을 위한 특이적 분자로서 사용될 수 있다.
- [0167] 일부 실시 형태에서, 크로마토그래피는 이온 교환 크로마토그래피이다. 이온 교환 크로마토그래피는 고체상 물질과의 전체적인 이온 상호작용의 강도에 따른 분자의 분리를 포함한다. 이온 교환 크로마토그래피에 의한 정제는 바이러스 캡시드의 외부 상의 단백질의 순전하(net charge)에 기초한다. 표면 단백질의 순전하는 노출된 아미노산 기의 pH에 따라 달라진다.
- [0168] 하나의 예시적인 유형의 이온 교환 크로마토그래피는 이들의 순 표면 전하에 기초하여 분자를 분리하는 데 사용되는 음이온 교환 크로마토그래피이다. 음이온 교환 크로마토그래피는 순 음성 표면 전하를 갖는 분자에 대해 친화성을 갖는 양으로 하전된 이온 교환 수지를 사용한다. 상기 제공된 예는 예시적인 것으로 의도되며, 본 개시내용과 함께 사용될 수 있는 크로마토그래피의 유형을 망라하는 것으로 의도되지 않는다는 것이 이해된다.
- [0169] 본 명세서에 제공된 바와 같이, AAV 입자를 정제하는 방법에 사용될 수 있는 하나의 예시적인 유형의 정제는 친화성 크로마토그래피이다. 일부 실시 형태에서, 친화성 크로마토그래피는 착물 혼합물(complex mixture)이 컬럼을 통과할 때, 리간드에 대하여 특이적 결합 친화성을 갖는 그의 분자가 결합하게 되도록 고체 지지체(예를 들어, 친화성 지지체)에 화학적으로 고정되거나 "결합"되는 특정 리간드를 포함할 수 있다. 다른 실시 형태에서, 친화성 크로마토그래피는, 분자의 순 표면 전하에 기초하여 고체 지지체에 특이적 결합 친화성을 갖는 분자가 결합하게 되도록 특이적 순 표면 전하에 기초한 이온 상호작용을 포함할 수 있다.
- [0170] 일부 실시 형태에서, 친화성 크로마토그래피는 이온 교환 크로마토그래피이다. 전술한 바와 같이, 이온 교환 크로마토그래피는 친화성 지지체와 같은 고체상 물질과의 전체적인 이온 상호작용의 강도에 따라 분자를 분리한다. 일부 실시 형태에서, 이온 교환 크로마토그래피는 음이온 교환 크로마토그래피이다. 음이온 교환 크로마토그래피는 분자의 순 표면 전하에 기초하여 분자를 분리하는데 사용될 수 있다. 예를 들어, 음이온 교환 크로마토그래피는 순 음성 표면 전하를 갖는 분자에 대해 친화성을 갖는 양으로 하전된 이온 교환 수지를 사용한다.
- [0171] 상기에 기재된 바와 같이, 크로마토그래피는 일반적으로 고정 물질(고체상 또는 고체 지지체)과의 화학적 또는 물리적 상호작용의 차이에 기초하여 분리되는 분자를 용액(이동상) 중에 포함한다. 다양한 형태의 크로마토그래피는 선택적으로 고체 지지체로부터 원치 않는 성분을 제거하기 위해 세정을 또한 포함할 수 있다. 따라서, 일부 실시 형태에서, 본 명세서에 제공된 방법은 고체 지지체를 세정하는 단계를 포함한다. 다른 샘플 성분을 세정하여 없앤 후, 결합된 분자는 지지체로부터 스트립핑되어(즉, 용리되어), 원래 샘플로부터 분자가 정제된다.
- [0172] AAV 입자의 용리는 선형 구배 용리에 의해 또는 단계 등용매 용리(step isocratic elution)를 사용하여 용리될 수 있다. 보통, 구배 용리를 사용하여 용리 조건을 최적화할 수 있다. 일단 관심 단백질의 용리 프로파일이 확립되어 있고 어떤 이온 강도 또는 pH에서 단백질이 용리되는지 알려져 있으면, 단계 용리는 정제 공정을 가속화하는 데 사용될 수 있다. AAV 입자를 정제하는 데 사용되는 크로마토그래피의 유형에 따라, 용리 조건은 경쟁적 리간드를 포함하거나, 또는 pH, 이온 강도 또는 극성을 변화시키는 것을 포함한다. 표적 단백질은 정제되고 농축된 형태로 용리될 수 있다. 예를 들어, 이온 교환 크로마토그래피의 경우, 최종 생성물은 그들의 순 표면 전하에 따라 순서대로 용리될 수 있다. 7.5에 더 가까운 pI 값을 갖는 샘플은 더 낮은 이온 강도에서 용리될 것이고, 매우 낮은 pI 값을 갖는 샘플은 높은 염 농도에서 용리될 것이다.
- [0173] 일부 실시 형태에서, AAV 입자는 저 pH 완충액을 사용하여 용리될 수 있다. 소정 실시 형태에서, 고 pH 완충액은 저 pH 완충액을 사용하기 직전에 사용되며, "고/저 pH 완충액"이라고 불린다. 구체적인 실시 형태에서, 저 pH는 약 pH 2.5이다. 일부 실시 형태에서, 저 pH 완충액은 시트레이트 완충액, 글리신 완충액 또는 인산 완충액이다. 소정 실시 형태에서, 저 pH 완충액은 약산을 포함한다.
- [0174] 본 명세서에 제공된 바와 같이, 용리 단계에 에탄올의 첨가는 이온 교환 컬럼으로부터 바이러스의 회수를 향상시킬 수 있다. 따라서, 일부 실시 형태에서, 용리 완충액은 에탄올을 포함할 수 있다. 일부 실시 형태에서, 에탄올은 약 5% 내지 약 40%의 에탄올일 수 있다. 일부 실시 형태에서, 에탄올은 약 10% 내지 약 30%의 에탄올일 수 있다. 일부 실시 형태에서, 에탄올은 약 15% 내지 약 25%의 에탄올일 수 있다. 구체적인 실시

형태에서, 에탄올은 약 20%의 에탄올일 수 있다.

- [0175] 저 pH 완충액을 사용하여 수행된 용리는 종종 용리 완충액이 즉시 중화되는 것을 요구한다. 따라서, 일부 실시 형태에서, 용리는 완충액의 pH를 중화시키는 것을 추가로 포함한다. 구체적인 실시 형태에서, 중화는 비스-트리스-프로판(BTP) 또는 트리스 완충액을 첨가하는 것을 포함한다. 소정 실시 형태에서, 중화는 트리스를 첨가하는 것을 포함한다. Ad 또는 AAV 정제 절차에 사용되는 많은 크로마토그래피 용리 완충액은 생체내 조작에 적합하지 않기 때문에, 투석 또는 농축(concentration)과 같은 추가적인 정제 단계가 필요할 수 있다. 따라서, 일부 실시 형태에서, 정제는 또한 AAV 바이러스 입자의 투석 및/또는 농축을 포함한다.
- [0176] 따라서, 일부 실시 형태에서, (a) AAV 입자에 결합하기에 충분한 시간 동안 AAV 입자를 포함하는 상청액을 고체 지지체와 함께 인큐베이션하는 단계; (b) AAV 입자를 포함하는 상청액을 염색질-DNA 뉴클레아제를 포함하는 조성물과 접촉시키는 단계; 및 (c) 정제된 AAV 입자를 용리시키는 단계를 포함하는, AAV 입자를 정제하는 방법이 본 명세서에 제공된다. 염색질-DNA 뉴클레아제와의 접촉은 또한 AAV 입자의 결합 전에 수행될 수 있는 것으로 이해된다. 따라서, 일부 실시 형태에서, (a) AAV 입자를 포함하는 상청액을 염색질-DNA 뉴클레아제를 포함하는 조성물과 접촉시키는 단계; (b) AAV 입자에 결합하기에 충분한 시간 동안 AAV 입자를 포함하는 상청액을 고체 지지체와 함께 인큐베이션하는 단계; 및 (c) 정제된 AAV 입자를 용리시키는 단계를 포함하는, 아데노-관련 바이러스(AAV) 입자를 정제하는 방법이 본 명세서에 제공된다. 유사하게, 염색질-DNA 뉴클레아제와의 접촉이 고체 지지체 설정에서 조합될 필요가 없고 당업계에 공지된 임의의 AAV 입자 정제 기술과 조합될 수 있음이 또한 이해된다. 소정 실시 형태에서, 정제된 AAV 입자를 AAV 입자를 폴리싱하기 위해 하나 이상의 추가의 정제에 적용한다. 예를 들어, 입자는 친화성 크로마토그래피에 의해 정제된 후, 음이온 교환 크로마토그래피와 같은 상이한 유형의 크로마토그래피에 의해 폴리싱될 수 있다.
- [0177] 일부 실시 형태에서, 본 방법은 샘플을 용리하기 전에 고체 지지체를 세정하는 단계를 추가로 포함한다. 본 명세서에 기재된 바와 같이, 지지체로부터 비결합된 샘플 성분을 세정하여 없애는 것은 표적과 리간드 사이의 결합 상호작용을 유지하는 적절한 완충액을 사용하여 수행될 수 있다. 세정은 일부 비결합된 오염물을 제거할 수 있다. 일부 실시 형태에서, 비특이적 결합 상호작용은 낮은 수준의 세제를 첨가하거나, 결합 및/또는 세정 완충액의 염 농도를 중간 정도로 조정하여 최소화될 수 있다.
- [0178] 본 명세서에 제공된 바와 같이, 일부 실시 형태에서, AAV 입자의 순도는 고 pH로 세정함으로써 증가될 수 있다. 예를 들어, 대량의 수확물을 친화성 크로마토그래피로 정제한 후, 고 pH 완충액으로 세정하여 불순물을 제거할 수 있다. 일부 실시 형태에서, 고 pH 세척 후에 Benzonase® 및/또는 염색질-DNA 뉴클레아제를 이용한 컬럼 상호작용 처리가 이어진다. 소정 실시 형태에서, 고 pH 세척 완충액은 pH 9 초과이다. 일부 실시 형태에서, 고 pH 세척 완충액은 pH 9.5 내지 pH 10.9이다. 다른 실시 형태에서, 고 pH 세척 완충액은 pH 9.5이다. 일부 실시 형태에서, 고 pH 세척 완충액은 pH 10.2이다. 일부 실시 형태에서, 고 pH 세척 완충액은 pH 10.3이다. 일부 실시 형태에서, 고 pH 세척 완충액은 pH 10.4이다.
- [0179] 일부 실시 형태에서, 염색질-DNA 뉴클레아제는 미세구균 뉴클레아제(MNase)(EC 3.1.31.1)이다. *스타필로코커스 아우레우스*로부터 단리된 MNase는 핵산(DNA 및/또는 RNA)을 분해할 수 있는 비특이적 엔도-엑소뉴클레아제 활성을 갖는 포스포다이에스테라제이다. MNase는 장애물(뉴클레오솜 또는 다른 핵산 결합 단백질)에 도달할 때까지 2개의 뉴클레오솜을 연결하는 링커 영역 내의 노출된 핵산을 분해한다. MNase는 세포 용해물로부터 핵산을 제거하여 염색질-결합 단백질을 방출하는 데 적합할 수 있는 반면, DNase는 뉴클레오솜-결여된 또는 "유리" DNA를 우선적으로 절단한다. MNase는 이중 가닥, 단일 가닥, 원형 및 선형 핵산을 분해한다. 일부 실시 형태에서, 상청액 중의 MNase의 농도는 2.5 단위/mL(U/mL) 초과이다. 소정 실시 형태에서, 상청액 중의 MNase의 농도는 10 단위/mL 초과이다. 구체적인 실시 형태에서, 상청액 중의 MNase의 농도는 약 30 단위/mL 내지 약 100 단위/mL이다. 보다 구체적인 실시 형태에서, 상청액 중의 MNase의 농도는 약 60 단위/mL이다. 일부 실시 형태에서, MNase는 MNase의 활성을 갖는 폴리펩티드이다. 일 실시 형태에서, MNase는 AAV 입자와 관련된 염색질을 분해시키기에 충분한 양으로 존재한다.
- [0180] 일 실시 형태에서, MNase는 AAV 입자 불순물을 감소시키기에 충분한 양으로 존재한다. 일 실시 형태에서, AAV 입자 불순물은 숙주 세포 DNA, 숙주 세포 단백질, 염색질-관련 DNA 및 DNA 결합 단백질 중 하나 이상을 포함한다. 일 실시 형태에서, AAV 입자 불순물은 육안으로 보이는 불순물 및 미세한 불순물을 포함한다. 일 실시 형태에서, DNA 결합 단백질은 히스톤을 포함한다.
- [0181] 일 실시 형태에서, MNase는 260 nm에서 흡광도에 의해 측정되는 바와 같이 AAV 입자 후-생성물 분획을 감소시키는 데 충분한 양으로 존재한다. 일 실시 형태에서, MNase는 280 nm에서 흡광도에 의해 측정되는 바와 같이 AAV

입자 후-생성물 분획을 감소시키기에 충분한 양으로 존재한다.

- [0182] 일 실시 형태에서, MNase는 동적 광 산란(DLS)에 의해 측정되는 바와 같이 응집 온도(Tagg)의 약 10℃ 미만 이내에 용융 온도(Tm)를 포함하는 정제된 AAV 입자를 생성하기에 충분한 양으로 존재한다. 일 실시 형태에서, MNase는 동적 광 산란(DLS)에 의해 측정되는 바와 같이 응집 온도(Tagg)의 약 5℃ 미만 이내에 용융 온도(Tm)를 포함하는 정제된 AAV 입자를 생성하기에 충분한 양으로 존재한다. 일 실시 형태에서, MNase는 동적 광 산란(DLS)에 의해 측정되는 바와 같이 응집 온도(Tagg)의 약 2℃ 미만 이내에 용융 온도(Tm)를 포함하는 정제된 AAV 입자를 생성하기에 충분한 양으로 존재한다.
- [0183] 염색질-DNA 뉴클레아제가 AAV 입자에 바이러스 외 복합체화된 DNA 결합 단백질 및 유리 핵산을 방출하기 위해 필요한 시간을 결정하는 것은 당업자의 기술 내에 있다. 소정 실시 형태에서, 인큐베이션은 약 10분 내지 약 1시간 동안 수행된다. 일부 실시 형태에서, 인큐베이션은 약 20분 내지 약 40분 동안 수행된다. 구체적인 실시 형태에서, 인큐베이션은 약 30분 동안 수행된다.
- [0184] 본 명세서에 제공된 방법의 일부 실시 형태에서, 염색질-DNA 뉴클레아제를 포함하는 조성물은 또한 Benzonase® 뉴클레아제(*세라티아 마르세센스* 유래 엔도뉴클레아제; 효소 위원회(EC) 번호 3.1.30.2)를 포함할 수 있다. Benzonase®는 접근 가능한 DNA 및 RNA(예를 들어, 비-염색질 DNA)를 분해할 수 있는 무차별적 엔도뉴클레아제이다. 이것은 모든 형태의 DNA 및 RNA(예를 들어, 단일 가닥, 이중 가닥, 선형 및 원형)를 공격하고 분해하며, 광범위한 작동 조건에 걸쳐 효과적이다. 예를 들어, 이는 천연 또는 열 변성 DNA 및 RNA를 분해할 수 있다.
- [0185] Benzonase®의 첨가는 숙주 생성 세포 유래의 잔여 핵산과 같은 조(crude) 샘플에 존재하는 뉴클레아제-민감성 핵산을 제거하는 것을 도울 수 있다. 예컨대, 단백질 샘플에서 점도를 감소시키기 위해서와 같이 유리 핵산을 분해하기 위해 Benzonase®가 첨가될 수 있지만, 그 자체로는 AAV 입자에 바이러스 외 복합체화된 DNA 결합 단백질을 방출하기에 충분하지 않다. 일부 실시 형태에서, Benzonase® 및 염색질-DNA 뉴클레아제가 함께 인큐베이션된다. 구체적인 실시 형태에서, Benzonase® 및 염색질-DNA 뉴클레아제는 친화성 교환 크로마토그래피 후 함께 인큐베이션된다. 그러나, Benzonase® 처리는 염색질-DNA 뉴클레아제와 동시에 수행될 필요가 없다는 것이 이해된다. 예를 들어, 일부 실시 형태에서, Benzonase®는 정제 전에 대량의 수확물에 첨가된다. 추가로, 임의의 Benzonase® 생성물이 본 개시내용에 적합하다는 것이 이해된다.
- [0186] 본 개시내용은 소정 실시 형태에서 예시적인 엔도뉴클레아제로서 Benzonase®의 사용을 기재하지만, 잔여 숙주 세포 DNA를 감소시킬 수 있는 임의의 뉴클레아제 또는 잔여 숙주 세포 DNA를 감소시킬 수 있는 뉴클레아제의 활성을 갖는 폴리펩티드가 사용될 수 있는 것으로 이해된다. 그러한 대안적인 뉴클레아제는, 예를 들어, Cryonase(저온균(psychrophile)인 시와넬라 종(*Shewanella* sp.) 유래의 재조합 엔도뉴클레아제), 염 활성화 뉴클레아제(SAN) 또는 DNase I™을 포함할 수 있다.
- [0187] 본 명세서에 제공된 바와 같이, AAV 입자를 함유하는 샘플을 MNase와 접촉시키는 것은 염색질-관련 DNA, 숙주 세포 단백질을 제거하고, MNase 처리되지 않은 샘플에 비해 AAV 입자의 전체 수율을 향상시킬 수 있다. 따라서, 일부 실시 형태에서, MNase와 접촉하지 않고 정제된 AAV 입자와 비교시, 본 명세서에 제공된 방법을 사용하여 제조된 정제된 AAV 입자에는 염색질-관련 DNA가 실질적으로 없다. 소정 실시 형태에서, MNase와 접촉하지 않고 정제된 AAV 입자와 비교시, 정제된 AAV 입자에는 숙주 세포 단백질이 실질적으로 없다. 일부 실시 형태에서, MNase와 접촉하지 않고 정제된 AAV 입자와 비교시, AAV 입자는 증가된 수율을 갖는다.
- [0188] **6. AAV의 생성**
- [0189] 다양한 생성 플랫폼이 현재 AAV 입자의 생성을 위해 사용되고 있으며 당업계에 알려져 있고, 이들 각각은 본 명세서에 기재된 정제 방법 및 조성물에 사용하기에 적합하다. 대규모의 AAV 입자의 생성을 위한 예시적인 방법은, 예를 들어, 포유류 세포에서의 플라스미드 DNA 형질감염, 안정한 포유류 세포주의 Ad 감염, 재조합 단순 포진 바이러스(rHSV)에 의한 포유류 세포의 감염, 및 재조합 바칼로바이러스에 의한 곤충 세포의 감염을 포함할 수 있다(예를 들어, 문헌[Penaud-Budloo M. et al., Mol Ther Methods Clin Dev. 2018 Jan 8;8:166-180] 참조).
- [0190] AAV 입자의 생성을 위한 예시적인 방법은, 예를 들어, 인간 배아 HEK293 세포의 플라스미드 형질감염이다. 예를 들어, HEK293 세포는 무기 화합물(예를 들어, 인산 칼슘) 또는 유기 화합물(예를 들어, 폴리에틸렌아민(PEI)) 또는 비화학적 방법(예를 들어, 전기천공)을 사용하는 1개 또는 2개의 헬퍼 플라스미드(helper plasmid) 및 관심 유전자를 함유하는 플라스미드로 동시에 형질감염될 수 있다. 헬퍼 플라스미드(들)는 4개의 Rep 단백질(Rep78, Rep68, Rep52, Rep40), 3개의 AAV 구조 단백질(VP1, VP2, 및 VP3), AAP 및 아테노바이러스 보조 기

능 E2A, E4, 및 VA RNA의 발현을 허용한다. AAV 복제에 필요한 추가의 아데노바이러스 E1A/E1B 보조인자는 HEK293 생성자 세포에서 발현될 수 있다. 플라스미드는 박테리아 기원 및 항생제 내성 유전자를 사용한 대장균에서의 통상적인 기술에 의해 또는 소형 고리형(minicircle, MC) 기술에 의해 생성될 수 있다. HEK293 생성자 세포와 같은 생성자 세포는 부착 또는 현탁 배양될 수 있다.

[0191] 다른 예시적인 생성 방법은 rHSV 벡터에 의한 포유류 세포의 감염을 포함한다. 햄스터 BHK21 세포주 또는 HEK293 및 유도체와 같은 세포는 2개의 rHSV로 감염될 수 있는데, 하나는 AAV ITR에 의해 결합(rHSV-AAV)된 관심 유전자를 운반하고, 두 번째는 AAV 입자의 생성을 위해 원하는 혈청형의 AAV rep 및 cap ORF(rHSV-rep)를 가지고 있다.

[0192] AAV 입자 생성을 위한 안정한 생성자 세포주는 AAV 입자의 생성을 위한 추가의 예시적인 방법을 제공한다. 예를 들어, 안정한 생성자 세포주는 세포주(예를 들어, HEK293 세포, HeLa 세포 또는 유도체)로부터 유래되고, AAV rep 및 cap 유전자(패키징 세포주(packaging cell line)) 및/또는 AAV 게놈(예를 들어, rAAV 게놈)을 도입하여 유전자 조작되어 생성(생성자 세포)될 수 있다. AAV 입자의 생성을 위한 또 다른 예시적인 안정한 세포주는 통상적으로 독성인 AAV 복제(rep) 유전자 및 AAV 캡시드(cap) 유전자 및 전이유전자를 포함하는 안정한 세포주를 포함한다(예를 들어, 본 명세서에 전체적으로 개시된 미국 특허 출원 제62/877,508호 참조).

[0193] 생성자 세포주는 포유류 세포주일 필요가 없고, 비-포유류 세포, 예컨대 곤충 세포 및 효모가 생성에 사용될 수 있음이 추가로 이해된다. AAV 입자의 생성에 적합한 비-포유류 플랫폼의 예시적인 예는 바콜로바이러스-Sf9 곤충-세포 플랫폼을 포함한다. AAV 입자의 생성에 적합한 비-포유류 세포주는 형질감염 방법을 사용하여, 또는 안정한 세포주로서 생성될 수 있다(예를 들어, 문헌[Mietzsch M. et al. Hum. Gene Ther. 2014; 25: 212-222]; 문헌[Mietzsch M. et al. Hum. Gene Ther. Methods. 2017; 28: 15-22] 참조). 상기 기재된 AAV 입자 생성 플랫폼의 예는 예시적인 것으로 이해되고, 제한적인 것으로 의도되지 않으며, 다양한 생성 플랫폼들 중 임의의 것이 본 명세서에 기재된 정제 방법 및 조성물과 조합될 수 있다.

[0194] 본 명세서에 사용된 바와 같이, "벡터"는 유전 물질을 세포 내로 운반하는 데 사용되는 핵산 분자이며, 이것은 복제 및/또는 발현될 수 있다. 본 개시내용의 관점에서 당업자에게 알려진 임의의 벡터가 사용될 수 있다. 벡터의 예는 플라스미드, 바이러스 벡터(박테리오파지, 동물 바이러스 및 식물 바이러스), 코스미드 및 인공 염색체(예를 들어, YAC)를 포함하지만, 이로 제한되지는 않는다. 바람직하게는, 벡터는 DNA 플라스미드이다. 당업자는 본 개시내용을 고려하여 표준 재조합 기법을 통해 본 출원의 벡터를 구성할 수 있다.

[0195] 본 출원의 벡터는 발현 벡터일 수 있다. 본 명세서에 사용된 바와 같이, 용어 "발현 벡터"는 전사될 수 있는 RNA를 코딩하는 핵산을 포함하는 임의의 유형의 유전자 작제물을 지칭한다. 발현 벡터는 재조합 단백질 발현을 위한 벡터, 예컨대 DNA 플라스미드 또는 바이러스 벡터 및 대상체의 조직 내에서의 발현을 위하여 대상체 내로의 핵산의 전달을 위한 벡터, 예컨대 DNA 플라스미드 또는 바이러스 벡터를 포함하지만 이로 제한되지 않는다. 발현 벡터의 설계가 형질전환될 숙주-세포의 선택, 원하는 단백질의 발현 수준 등과 같은 인자에 의존할 수 있다는 것을, 당업자는 이해할 것이다.

[0196] 본 출원의 일부 실시 형태에서, 벡터는 비-바이러스 벡터이다. 비-바이러스 벡터의 예에는 DNA 플라스미드, 박테리아 인공 염색체, 효모 인공 염색체, 박테리오파지 등이 포함되지만 이로 제한되지 않는다. 바람직하게는, 비-바이러스 벡터는 DNA 플라스미드이다. "DNA 플라스미드 벡터", "플라스미드 DNA", 또는 "플라스미드 DNA 벡터"와 상호교환적으로 사용되는 "DNA 플라스미드"는 적합한 숙주-세포에서 자율 복제할 수 있는 이중 가닥 및 일반적으로 원형 DNA 서열을 지칭한다. 암호화된 폴리뉴클레오타이드의 발현에 사용되는 DNA 플라스미드는 전형적으로 복제 기점, 다중 클로닝 부위, 및 예를 들어, 항생제 내성 유전자일 수 있는 선택 가능한 마커를 포함한다. 사용될 수 있는 적합한 DNA 플라스미드의 예에는 공지된 발현 시스템(원핵 및 진핵 시스템 둘 모두를 포함함)에 사용하기 위해 상업적으로 입수 가능한 발현 벡터, 예컨대, 대장균에서 단백질의 생성 및/또는 발현에 사용될 수 있는 pSE420(Invitrogen, 미국 캘리포니아주 샌디에이고 소재); 효모 균주 *사카로마이세스 세레비지에*에서 단백질의 생성 및/또는 발현에 사용될 수 있는 pYES2(Invitrogen, Thermo Fisher Scientific); 곤충 세포에서의 생성 및/또는 발현에 사용될 수 있는 MAXBAC[®] 완전 바콜로바이러스 발현 시스템(Thermo Fisher Scientific); 포유류 세포에서 높은 수준의 구성 단백질 발현을 위해 사용될 수 있는 pcDNA[™] 또는 pcDNA3[™](Life Technologies, Thermo Fisher Scientific); 및 대부분의 포유류 세포에서 관심 단백질의 고수준 일시적 발현에 사용될 수 있는 pVAX 또는 pVAX-1(Life Technologies, Thermo Fisher Scientific)이 포함되지만, 이로 제한되지 않는다. 임의의 구매가능한 DNA 플라스미드의 골격을 변형시켜, 숙주-세포에서 단

백질 발현을 최적화할 수 있으며, 예컨대, 통상적인 기술 및 용이하게 입수 가능한 출발 물질을 사용하여, 소정의 요소(예를 들어, 복제 기점 및/또는 항생제 내성 카세트)의 배향을 역전시키고/시키거나, 플라스미드에 내인성인 프로모터(예를 들어, 항생제 내성 카세트의 프로모터)를 대체하고/하거나, 전사된 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드 서열(예를 들어, 항생제 내성 유전자의 코딩 서열)을 대체할 수 있다. (예를 들어, 문헌 [Sambrook *et al.*, Molecular Cloning a Laboratory Manual, Second Ed. Cold Spring Harbor Press (1989)] 참조).

[0197] 바람직하게는, DNA 플라스미드는 포유류 숙주-세포에서 단백질 발현에 적합한 발현 벡터이다. 포유류 숙주-세포에서 단백질 발현에 적합한 발현 벡터는 pUC, pcDNATM, pcDNA3TM, pVAX, pVAX-1, ADVAX, NTC8454 등을 포함하지만 이로 제한되지 않는다. 예를 들어, 벡터는 pUC 복제 기점 및 암피실린 내성 유전자를 함유하는 pUC57에 기초할 수 있다. 이는 헤르페스 바이러스 티미딘 키나제 유전자 프로모터, 퓨로마이신 N-아세틸 트랜스퍼라제 코딩 영역, 및 소 성장 호르몬 유전자로부터의 폴리아데닐화 신호로부터 작제된 포유류 퓨로마이신 내성 유전자 카세트를 추가로 포함할 수 있다. 벡터는 또한 엡스타인 바 바이러스(EBV)의 '2회 대칭(Dyad Symmetry)' 영역 및 EBV의 '반복체 군(Family of Repeats)' 영역의 복합체를 나타내는 EBV OriP 복제 기원 단편을 포함할 수 있다.

[0198] 본 출원의 벡터는 또한 바이러스 벡터일 수 있다. 일반적으로, 바이러스 벡터는 비-감염성이 된 변형된 바이러스 DNA 또는 RNA를 갖지만 여전히 바이러스 프로모터 및 전이유전자를 보유하는 유전자 조작된 바이러스이며, 따라서 바이러스 프로모터를 통한 전이유전자의 번역을 허용한다. 바이러스 벡터는 감염성 서열이 빈번하게 결여되기 때문에, 대규모 형질감염을 위한 헬퍼 바이러스 또는 패키징 세포주를 필요로 한다. 사용될 수 있는 바이러스 벡터의 예는 아데노바이러스 벡터, 아데노-관련 바이러스 벡터, pox 바이러스 벡터, 장용 바이러스 벡터, 베네수엘라 말 뇌염 바이러스 벡터, 샘키 삼립 바이러스 벡터, 담배 모자이크 바이러스 벡터, 렌티바이러스 벡터 등을 포함하지만, 이로 제한되지 않는다. 벡터는 비-바이러스 벡터일 수 있다.

[0199] 예시적인 바이러스 벡터는 아데노바이러스 벡터, 예를 들어, 재조합 아데노바이러스 벡터이다. 본 명세서에 사용된 바와 같이, 용어 "재조합 아데노바이러스 벡터" 및 "재조합 아데노바이러스 벡터" 및 "재조합 아데노바이러스 입자"는 상호교환적으로 사용되고, 관심 폴리뉴클레오타이드를 진핵 세포 내로 삽입하도록 설계된 유전자 조작된 아데노바이러스를 지칭하며, 폴리뉴클레오타이드가 후속적으로 발현된다. 본 발명의 바이러스 벡터로서 사용될 수 있는 아데노바이러스의 예는 혈청형 Ad2, Ad5, Ad11, Ad12, Ad24, Ad26, Ad34, Ad35, Ad40, Ad48, Ad49, Ad50, Ad52(예를 들어, RhAd52) 및 Pan9(AdC68로도 공지됨)를 갖거나 이로부터 유래된 것들을 포함하며; 이들 벡터는 예를 들어, 인간, 침팬지(예를 들어, ChAd1, ChAd3, ChAd7, ChAd8, ChAd21, ChAd22, ChAd23, ChAd24, ChAd25, ChAd26, ChAd27.1, ChAd28.1, ChAd29, ChAd30, ChAd31.1, ChAd32, ChAd33, ChAd34, ChAd35.1, ChAd36, ChAd37.2, ChAd39, ChAd40.1, ChAd41.1, ChAd42.1, ChAd43, ChAd44, ChAd45, ChAd46, ChAd48, ChAd49, ChAd49, ChAd50, ChAd67 또는 SA7P), 또는 레서스 아데노바이러스(예를 들어, rhAd51, rhAd52 또는 rhAd53)로부터 유래될 수 있다. 재조합 아데노바이러스 벡터는, 예를 들어, 인간 아데노바이러스(HAdV 또는 AdHu), 또는 침팬지 또는 고릴라 아데노바이러스와 같은 유인원 아데노바이러스(ChAd, AdCh 또는 SAdV), 또는 레서스 아데노바이러스(rhAd)로부터 유래될 수 있다.

[0200] 바람직하게는, 아데노바이러스 벡터는 재조합 인간 아데노바이러스 벡터, 예를 들어 재조합 인간 아데노바이러스 혈청형 5, 또는 재조합 인간 아데노바이러스 혈청형 26, 4, 35, 7, 48 등 중 임의의 하나이다. 본 출원에 유용한 재조합 바이러스 벡터는 본 개시내용을 고려하여 당업계에 공지된 방법을 사용하여 제조될 수 있다. 예를 들어, 유전자 코드의 축퇴성을 고려하여, 동일한 폴리펩타이드를 암호화하는 몇몇 핵산 서열이 설계될 수 있다. 관심 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드는 숙주-세포(예를 들어, 박테리아 또는 포유류 세포)에서 적절한 발현을 보장하기 위해 임의로 코돈-최적화될 수 있다. 코돈 최적화는 당업계에 널리 적용된 기술이며, 코돈 최적화된 폴리뉴클레오타이드를 얻는 방법은 본 개시내용을 고려하여 당업자에게 잘 알려져 있을 것이다.

[0201] 비-천연 발생 핵산 분자 또는 벡터는 하나 이상의 발현 카세트를 포함할 수 있다. "발현 카세트"는 RNA 및 단백질을 제조하도록 세포 조직에 지시하는 핵산 분자 또는 벡터의 일부이다. 발현 카세트는 프로모터 서열, 오픈 리딩 프레임, 및 선택적으로 폴리아데닐화 신호를 포함하는 3'-비번역 영역(UTR)을 포함할 수 있다. 오픈 리딩 프레임(ORF)은 시작 코돈에서 정지 코돈까지 관심 단백질(예를 들어, Rep, Cap, 재조합 효소 또는 관심 재조합 단백질)의 코딩 서열을 함유하는 리딩 프레임이다. 발현 카세트의 조절 요소는 관심 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드 서열에 작동 가능하게 연결될 수 있다.

[0202] 본 출원의 비-천연 발생 핵산 분자 또는 벡터는 다양한 조절 서열을 함유할 수 있다. 본 명세서에 사용되는 바

와 같이, 용어 "조절 서열"은, 숙주-세포 또는 유기체 내로의 핵산 또는 그의 유도체 중 하나(즉, mRNA)의 복제, 중복(duplication), 전사, 스플라이싱, 번역, 안정성, 및/또는 수송을 포함하는, 핵산 분자의 기능적 조절을 허용하거나, 이에 기여하거나, 이를 조절하는 임의의 서열을 지칭한다. 조절 요소에는, 비제한적으로, 프로모터, 인핸서, 폴리아데닐화 신호, 번역 정지 코돈, 리보솜 결합 요소, 전사 종결자, 선별 마커, 복제 기점 등이 포함된다.

[0203] 비-천연 발생 핵산 분자 또는 벡터는 관심 단백질의 발현을 제어하기 위해 바람직하게는 발현 카세트 내에 프로모터 서열을 포함할 수 있다. 용어 "프로모터"는 그의 통상적인 의미로 사용되며 작동가능하게 연결된 뉴클레오타이드 서열의 전사를 개시하는 뉴클레오타이드 서열을 지칭한다. 프로모터는 그것이 전사하는 뉴클레오타이드 서열 부근의 동일한 가닥 상에 위치한다. 프로모터는 구성적, 유도성, 또는 억제성일 수 있다. 프로모터는 천연 발생 또는 합성일 수 있다. 프로모터는 바이러스, 박테리아, 진균, 식물, 곤충, 및 동물을 포함하는 공급원으로부터 유래될 수 있다. 프로모터는 상동성 프로모터(즉, 벡터와 동일한 유전자 공급원으로부터 유래됨) 또는 이종성 프로모터(즉, 상이한 벡터 또는 유전자 공급원으로부터 유래됨)일 수 있다. 예를 들어, 사용되는 벡터가 DNA 플라스미드인 경우, 프로모터는 플라스미드에 내인성(상동성)이거나 다른 공급원(이종성)으로부터 유래될 수 있다. 바람직하게는, 프로모터는 발현 카세트 내부에서 관심 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드의 상류에 위치한다.

[0204] 사용될 수 있는 예시적인 프로모터는 유인원 바이러스 40(SV40) 유래 프로모터, 마우스 유방 종양 바이러스(MMTV) 프로모터, 인간 면역결핍 바이러스(HIV) 프로모터, 예컨대 소 면역결핍 바이러스(BIV) 긴 말단 반복부(LTR) 프로모터, 모로니 바이러스 프로모터, 조류 백혈증 바이러스(ALV) 프로모터, 거대세포바이러스(CMV) 프로모터, 예컨대 CMV 전초기(immediate early) 프로모터(CMV-IE), 엡스타인 바 바이러스(EBV) 프로모터 또는 라우스 육종 바이러스(RSV) 프로모터를 포함하지만, 이로 제한되지는 않는다. 프로모터는 또한 인간 액틴, 인간 미오신, 인간 헤모글로빈, 인간 근육 크레아틴 또는 인간 메탈로티오네인과 같은 인간 유전자 유래의 프로모터일 수 있다. 프로모터는 또한 천연 또는 합성의 근육 또는 피부 특이적 프로모터와 같은 조직 특이적 프로모터일 수 있다. 바람직하게는, 프로모터는 강력한 진핵생물 프로모터, 예컨대 거대세포바이러스(CMV) 프로모터(nt -672 내지 +15), EF1-알파 프로모터, 헤르페스 바이러스 티미딘 키나제 유전자 프로모터 등이다.

[0205] 비-천연 발생 핵산 분자 또는 벡터는 발현된 전사체를 안정화시키고/시키거나, RNA 전사체의 핵 방출을 증강시키고/시키거나, 전사-번역 커플링을 개선시키는 추가의 폴리뉴클레오타이드 서열을 포함할 수 있다. 이러한 서열의 예에는 폴리아데닐화 신호 및 인핸서 서열이 포함된다. 폴리아데닐화 신호는 전형적으로 벡터의 발현 카세트 내 관심 단백질(예를 들어, Rep, Cap, 재조합 효소)에 대한 코딩 서열의 하류에 위치한다. 인핸서 서열은 전사 인자에 의해 결합되는 경우에 연관된 유전자의 전사를 증강시키는 조절 DNA 서열이다. 인핸서 서열은 바람직하게는 프로모터 서열의 하류에 있고, 벡터의 발현 카세트 내의 코딩 서열의 하류 또는 상류에 있을 수 있다.

[0206] 본 개시내용의 관점에서 당업자에게 알려진 임의의 폴리아데닐화 신호가 사용될 수 있다. 예를 들어, 폴리아데닐화 신호는 SV40 폴리아데닐화 신호, AAV2 폴리아데닐화 신호(bp 4411-4466, NC_001401), 단순 포진 바이러스 티미딘 키나제 유전자로부터의 폴리아데닐화 신호, LTR 폴리아데닐화 신호, 소 성장 호르몬(bGH) 폴리아데닐화 신호, 인간 성장 호르몬(hGH) 폴리아데닐화 신호, 또는 인간 β -글로빈 폴리아데닐화 신호일 수 있다. 바람직하게는, 폴리아데닐화 신호는 소 성장 호르몬(bGH) 폴리아데닐화 신호, GenBank 수탁 번호 NC_001401의 뉴클레오타이드 서열의 뉴클레오타이드 번호 4411 내지 4466을 갖는 AAV2의 폴리아데닐화 신호 또는 SV40 폴리아데닐화 신호이다.

[0207] 본 개시내용의 관점에서 당업자에게 알려진 임의의 인핸서 서열이 사용될 수 있다. 예를 들어, 인핸서 서열은 인간 액틴, 인간 미오신, 인간 헤모글로빈, 인간 근육 크레아틴, 또는 CMV, HA, RSV 또는 EBV 중 하나와 같은 바이러스 인핸서일 수 있다. 특정 인핸서의 예는 우드척 HBV 전사 후 조절 요소(Woodchuck HBV Post-transcriptional regulatory element, WPRE), 인간 아포지질단백질 A1 전구체(ApoA1)로부터 유래된 인트론/엑손 서열, 인간 T-세포 백혈병 바이러스 유형 1(HTLV-1) 긴 말단 반복부(LTR)의 비번역 R-U5 도메인, 스플라이싱 인핸서, 합성 토끼 β -글로빈 인트론 또는 이들의 임의의 조합을 포함하지만, 이로 제한되지는 않는다.

[0208] 바람직하게는, 인핸서 서열은 AAV의 P5 프로모터를 포함한다. P5 프로모터는 *rep* 유전자의 코딩 서열 내의 시스-작용성 Rep-의존 요소(cis-acting Rep-dependent element, CARE)의 일부이다. CARE는 시스 내에 존재할 때 복제 및 캡슐화를 증가시키는 것으로 나타났다. CARE는 또한 일부 AAV 입자 생성자 세포주에서와 같이 염색체 융합된 *rep* 유전자(AAV ITR이 존재하지 않는 경우)의 증폭에 중요하다. 이론에 구속되고자 하지 않지만, *cap*

코딩 서열의 하류에 배치된 P5 프로모터는 잠재적으로 Cap 발현, 이에 따른 AAV 입자 수율을 증가시키는 인핸서로서 작용하는 것으로 여겨지며, 이는 또한 염색체 내로 통합되는 유전자를 증폭시키는 인핸서 활성을 제공한다.

[0209] 비-천연 발생 핵산 분자 또는 벡터, 예컨대 DNA 플라스미드는 또한 박테리아 복제 기점 및 박테리아 세포, 예를 들어, 대장균에서 플라스미드의 선택 및 유지를 위한 항생제 내성 발현 카세트를 포함할 수 있다. 복제 기점(ORI)은 복제가 개시되어, 플라스미드가 세포 내에서 재생되고 생존할 수 있게 하는 서열이다. 본 출원에 사용하기에 적합한 ORI의 예에는 비제한적으로, ColE1, pMB1, pUC, pSC101, R6K 및 15A, 바람직하게는 pUC가 포함되지만 이로 제한되지 않는다.

[0210] 박테리아 세포에서 선택 및 유지를 위한 벡터는 전형적으로 항생제 내성 유전자에 작동 가능하게 연결된 프로모터 서열을 포함한다. 바람직하게는, 항생제 내성 유전자에 작동 가능하게 연결된 프로모터 서열은 관심 단백질을 인코딩하는 폴리뉴클레오타이드 서열에 작동 가능하게 연결된 프로모터 서열과 상이하다. 항생제 내성 유전자는 코돈 최적화될 수 있고, 항생제 내성 유전자의 서열 조성은 보통 박테리아, 예를 들어, 대장균의 코돈 사용으로 조정된다. 본 개시내용의 당업자에게 알려진 임의의 항생제 내성 유전자가 사용될 수 있으며, 카나마이신 내성 유전자(Kan^r), 암피실린 내성 유전자(Amp^r) 및 테트라사이클린 내성 유전자(Tet^r) 뿐만 아니라 클로람페니콜, 블레오마이신, 스펙티노마이신, 카르베니실린 등에 대한 내성을 부여하는 유전자를 포함하지만 이로 제한되지 않는다.

[0211] 7. 약제학적 조성물 특성을 시험하기 위한 검정

[0212] 본 명세서에 제공되는 바와 같이, 본 개시내용의 약제학적 조성물은 AAV 입자의 응집을 방지하고/하거나 안정성을 향상시킬 수 있다. 물리적 특성(예를 들어, AAV 입자 크기), 바이러스 역가, 및/또는 AAV 입자의 순도를 측정하기 위한 다양한 기술이 당업계에 알려져 있다. 예시적인 검정은 하기 제공되며, 일부 경우에, 검정은 다중 특성을 측정할 수 있다. 그러나, 본 출원은 하기 기재된 검정으로 제한되지 않음이 이해되어야 한다.

[0213] 7.1 동일성을 측정하는 예시적인 검정

[0214] AAV 입자 제제의 동일성을 평가하기 위한 다양한 검정이 당업계에 알려져 있다. 예를 들어, 바이러스 단백질 발현을 분석하는 검정은 AAV 입자의 동일성을 평가함에 있어서 유용할 수 있다. 그러한 검정은 SDS-PAGE, 질량 분석법, 면역블로팅, 및 ELISA를 포함하지만 이로 제한되지 않는다. 바이러스 단백질의 적절한 수, 분자량, 및 화학양론을 사용하여 벡터뿐만 아니라 불순물의 존재를 양성 식별할 수 있다. 또한, 양성 동일성을 보장하기 위해, PCR 또는 고처리량 NGS(차세대 게놈 서열분석)를 사용하여 벡터 게놈을 평가할 수 있다.

[0215] 7.2 바이러스 역가를 측정하는 예시적인 검정

[0216] 본 개시내용의 AAV 입자는 또한 이들의 바이러스 역가에 의해 특성화될 수 있다. 바이러스 역가는 물리적 역가뿐만 아니라 기능적 역가를 포함할 수 있다. 물리적 역가는 존재하는 생존 또는 사멸 바이러스 입자의 총 수를 계산하며, 바이러스 입자의 수/mL(VP/mL)로서, 또는 AAV의 경우에는 게놈 카피/mL(GC/mL)로서 표현된다. 바이러스 게놈 또는 바이러스 단백질의 농도를 정량화하는 단계에 기초하여 바이러스의 물리적 역가를 결정하기 위해 다양한 방법이 사용될 수 있다. 적합한 기술은 DNA 혼성화, 실시간 PCR - 정량적 PCR(qPCR) 및 디지털 드롭 PCR(dPCR)을 포함하지만 이로 제한되지 않음, 광학 밀도(A260/280), NanoSight, 및 고성능 액체 크로마토그래피(HPLC)를 포함하지만 이로 제한되지 않는다.

[0217] 예를 들어, 광학 밀도(A260/280) 검정은 바이러스 DNA 및 단백질의 농도를 측정한다. 그것은 바이러스 입자(VP)의 농도를 측정하는 물리적 검정이다. HPLC는 또한 온전한 바이러스 입자를 다른 세포 오염물 또는 바이러스 입자 단편으로부터 분리함으로써 총 바이러스 입자를 정량화하는 신속한 방법이다.

[0218] 기능적 역가는 얼마나 많은 바이러스가 표적 세포로 들어가는지를 측정하고, 벡터가 항생제 내성 유전자를 함유하는 경우 또는 벡터가 표적 세포의 형광 단백질, 유세포 분석 또는 면역형광 분석을 포함하는 경우, 항생제 선택 후 콜로니 형성 단위의 수의 평가를 포함할 수 있다. 대안적으로, 벡터가 형광 단백질을 발현하지 않는 경우, qPCR에 의해 세포당 융합된 프로바이러스의 DNA(proviral DNA) 카피 수를 결정하는 것은 기능적 역가를 평가하는 빠르고 용이한 방법을 제공한다.

[0219] 7.3 순도를 측정하는 예시적인 검정

[0220] AAV 입자의 순도를 측정하는 검정은 당업계에 알려져 있다. 잔류 DNA 수준을 결정하는 전통적인 방법은

PicoGreen 및 DNA Threshold Assay를 포함한다. 더 최근에는, 숙주 세포 핵산을 정량화하는 단계는 실시간 또는 정량적 PCR(qPCR)을 사용하여 실행되었다. 본 명세서에 제공되는 바와 같이, 잔류 숙주-세포 DNA를 측정하기 위한 추가의 예시적인 검정은 AlphaLISA Assay이다.

[0221] 숙주 세포-관련 단백질의 검출은 항체가 숙주 단백질과 반응하는 ELISA에 의해 수행될 수 있다. 단백질 불순물은 또한 투과 전자 현미경(TEM)을 사용하여 성공적으로 검출될 수 있다.

[0222] 순도를 측정하기 위한 추가의 예시적인 방법은 질량 분석법(MS) 및 크로마토그래피 방법을 포함한다. 단백질 오염물을 검출하고 식별할 수 있는 것에 더하여, MS 및 크로마토그래프는 또한 AAV 입자 제제 내의 세제 및 유기 용매를 식별하기 위해 사용될 수 있다. AAV 입자 제제의 품질은 또한 TEM을 이용한 직접 가시화 또는 분석용 초원심분리(AUC)를 통해 분석될 수 있다.

[0223] 분석용 초원심분리(AUC)는 질량(침강 속도) 또는 밀도(침강 평형)에 의해 상이한 AAV 종을 구별하고 정량화하는 강력한 도구이다. AUC는 원심력장 하에 시간 경과에 따른 입자의 침강을 모니터링하는 기술이며, 이는 입자 분자량, 균질성, 및 다른 입자 및 그 자체와의 상호작용에 대한 결정적 정보를 제공한다. 빈 캡시드는 적재된 입자 및 부분적으로 충전된 것들과는 상이한 밀도 및/또는 질량을 가지며, 이는 원심력장 하의 유체역학에 기초하여 기저선 분리를 허용한다. 일부 기기에서는, 단일 실험에서 다중-파장 흡광도를 사용하여 게놈 DNA 및 바이러스 캡시드 함량 둘 모두를 정량화할 수 있다.

[0224] 7.4안정성을 측정하는 예시적인 검정

[0225] AAV 입자의 안정성을 측정하기 위한 예시적인 기술은 동적 광 산란(DLS), 분석용 초원심분리(AUC), 광학 현미경, 크기 배제 크로마토그래피(SEC) - 다중-각 정적 광 산란(MALS)을 이용한 SEC를 포함함, 투과 전자 현미경(TEM), 및 다중-각 정적 광 산란을 이용한 장 흐름 분획법(FFF-MALS)을 포함하지만 이로 제한되지 않는다.

[0226] DLS는 AAV 개발 분야에서 잘 확립된 분석 기술이다. 이는 응집체 형성을 시험하기 위해 주로 사용된다. 큰 종에 대한 높은 감도로 인해, 심지어 응집에 의해 야기되는 작은 불순물도 검출될 수 있다. DLS를 SLS와 조합하는 것도 가능하다. DLS에서, 용액 중 입자의 유체역학적 크기 및 크기 분포가 얻어질 수 있다. 시간 및 온도의 함수로서 이러한 측정을 조사하는 것에 관심이 있을 수 있다. 예를 들어, 저온에서 단백질은 안정하고 반복 가능한 크기(및 산란 강도) 측정치를 나타낼 수 있지만, 전형적으로 일부 승도(Tagg)에서는 단백질 분자가 응집되고 고체화되거나 응집되는 경향을 보일 수 있다. 이것이 발생하는 온도는 단백질 자체와 완충액 조성물에 따라 달라질 것이다. 따라서 DLS 또는 DLS 및 SLS의 조합은 기기 사용자가 용융(Tm), 응집(Tagg), 및 개시 온도(Tonse) - 분자가 함께 응집되는 경향을 갖는 온도를 스크리닝하는 것을 허용한다. 이러한 정보는 콜로이드 안정성 및 구조적 안정성(conformational stability)의 온도 의존성 둘 모두를 이해하는 것을 보조할 수 있다.

[0227] 본 명세서에 제공되는 바와 같이, 일부 실시 형태에서 약제학적 조성물은 정제된 AAV 입자의 안정성을 유지하거나 향상시킨다. 일부 실시 형태에서, 약제학적 조성물은 정제된 AAV 입자의 응집을 감소시키거나 방지한다. 일부 실시 형태에서, 약제학적 조성물은 (a) 정제된 AAV 입자의 안정성을 유지하거나 향상시키고; (b) 정제된 AAV 입자의 응집을 감소시키거나 방지한다.

[0228] 소정의 실시 형태에서는, 1회 이상의 동결/해동 주기 후에 안정성이 유지되거나 향상되고/되거나 응집이 감소되거나 방지된다. 일부 실시 형태에서는, 1회 이상의 동결/해동 주기 후에 안정성이 유지되거나 향상된다. 일부 실시 형태에서는, 3회 이상의 동결/해동 주기 후에 안정성이 유지되거나 향상된다.

[0229] 일부 실시 형태에서, AAV 입자의 응집은 1회 이상의 동결/해동 주기 후에 5% 미만이다. 일부 실시 형태에서, AAV 입자의 응집은 1회 이상의 동결/해동 주기 후에 2% 미만이다. 일부 실시 형태에서, AAV 입자의 응집은 1회 이상의 동결/해동 주기 후에 1% 미만이다.

[0230] 일부 실시 형태에서, AAV 입자의 응집은 3회 이상의 동결/해동 주기 후에 5% 미만이다. 일부 실시 형태에서, AAV 입자의 응집은 3회 이상의 동결/해동 주기 후에 2% 미만이다. 일부 실시 형태에서, AAV 입자의 응집은 3회 이상의 동결/해동 주기 후에 1% 미만이다.

[0231] 상기 기재된 검정 중 임의의 것을 사용하여 응집 및/또는 안정성을 측정할 수 있다. 예를 들어, 일부 실시 형태에서, 응집 및/또는 안정성은 DLS에 의해 결정된다. 일부 실시 형태에서, 응집 및/또는 안정성은 AUC에 의해 결정된다.

[0232] 실시 형태

- [0233] 본 발명은 하기의 비제한적인 실시 형태를 제공한다.
- [0234] 일 세트의 실시 형태에서, 다음이 제공된다:
- [0235] A1. 정제된 아데노-관련 바이러스(AAV) 입자, 완충제, 동결보호제, 및 비-이온성 계면활성제를 포함하며, 여기서
- [0236] (a) 정제된 AAV 입자에는 불순물이 실질적으로 없고,
- [0237] (b) 완충제 농도는 약 0 mM 내지 약 50 mM이고,
- [0238] (c) 동결보호제는 약 1% 내지 약 10%(w/v)이고,
- [0239] (d) 비-이온성 계면활성제는 약 0.0001%(w/v) 내지 약 0.1%(w/v)인, 약제학적 조성물.
- [0240] A2. 실시 형태 A1에 있어서, 약제학적으로 허용가능한 염을 추가로 포함하며, 여기서 약제학적으로 허용가능한 염 농도는 약 1 mM 내지 약 200 mM인, 약제학적 조성물.
- [0241] A3. 실시 형태 A2에 있어서, 약제학적으로 허용가능한 염은 약 10 mM 내지 약 150 mM인, 약제학적 조성물.
- [0242] A4. 실시 형태 A2 또는 실시 형태 A3에 있어서, 약제학적으로 허용가능한 염 농도는 약 10 mM인, 약제학적 조성물.
- [0243] A5. 실시 형태 A2 또는 실시 형태 A3에 있어서, 약제학적으로 허용가능한 염 농도는 약 100 mM인, 약제학적 조성물.
- [0244] A6. 실시 형태 A2 또는 실시 형태 A3에 있어서, 약제학적으로 허용가능한 염 농도는 약 150 mM인, 약제학적 조성물.
- [0245] A7. 정제된 아데노-관련 바이러스(AAV) 입자, 약제학적으로 허용가능한 염, 완충제, 동결보호제, 및 비-이온성 계면활성제를 포함하며, 여기서
- [0246] (a) 정제된 AAV 입자에는 불순물이 실질적으로 없고,
- [0247] (b) 약제학적으로 허용가능한 염 농도는 약 1 mM 내지 약 49 mM이고,
- [0248] (c) 완충제 농도는 약 0 mM 내지 약 50 mM이고,
- [0249] (d) 동결보호제는 약 1% 내지 약 10%(w/v)이고,
- [0250] (e) 비-이온성 계면활성제는 약 0.0001%(w/v) 내지 약 0.1%(w/v)인, 약제학적 조성물.
- [0251] A8. 실시 형태 A7에 있어서, 약제학적으로 허용가능한 염 농도는 약 5 mM 내지 약 45 mM인, 약제학적 조성물.
- [0252] A9. 실시 형태 A7 또는 실시 형태 A8에 있어서, 약제학적으로 허용가능한 염 농도는 약 7.5 mM 내지 약 40 mM인, 약제학적 조성물.
- [0253] A10. 실시 형태 A7 내지 실시 형태 A9 중 어느 한 실시 형태에 있어서, 약제학적으로 허용가능한 염 농도는 약 10 mM 내지 약 30 mM인, 약제학적 조성물.
- [0254] A11. 실시 형태 A7 내지 실시 형태 A10 중 어느 한 실시 형태에 있어서, 약제학적으로 허용가능한 염 농도는 약 10 mM인, 약제학적 조성물.
- [0255] A12. 실시 형태 A2 내지 실시 형태 A11 중 어느 한 실시 형태에 있어서, 약제학적으로 허용가능한 염은 소듐 염, 마그네슘 염, 칼슘 염, 포타슘 염, 포스페이트 염, 및 셀레이트 염으로 이루어진 군으로부터 선택되는, 약제학적 조성물.
- [0256] A13. 실시 형태 A12에 있어서, 소듐 염은 소듐 클로라이드를 포함하는, 약제학적 조성물.
- [0257] A14. 실시 형태 A1 내지 실시 형태 A13 중 어느 한 실시 형태에 있어서, 완충제는 트리스 HCl을 포함하는, 약제학적 조성물.
- [0258] A15. 실시 형태 A1 내지 실시 형태 A13 중 어느 한 실시 형태에 있어서, 완충제는 L-히스티딘 HCl을 포함하는, 약제학적 조성물.
- [0259] A16. 실시 형태 A1 내지 실시 형태 A15 중 어느 한 실시 형태에 있어서, 완충제 농도는 약 20 mM을 포함하는,

약제학적 조성물.

- [0260] A17. 실시 형태 A1 내지 실시 형태 A16 중 어느 한 실시 형태에 있어서, 동결보호제는 약 3%(w/v) 내지 약 8%(w/v)인, 약제학적 조성물.
- [0261] A18. 실시 형태 A1 내지 실시 형태 A17 중 어느 한 실시 형태에 있어서, 동결보호제는 약 4%(w/v) 내지 약 6%(w/v)인, 약제학적 조성물.
- [0262] A19. 실시 형태 A1 내지 실시 형태 A18 중 어느 한 실시 형태에 있어서, 동결보호제는 약 5%(w/v)인, 약제학적 조성물.
- [0263] A20. 실시 형태 A1 내지 실시 형태 A19 중 어느 한 실시 형태에 있어서, 동결보호제는 당을 포함하는, 약제학적 조성물.
- [0264] A21. 실시 형태 A20에 있어서, 당은 수크로스, 트레할로스, 또는 이들의 조합을 포함하는, 약제학적 조성물.
- [0265] A22. 실시 형태 A20에 있어서, 당은 트레할로스를 포함하는, 약제학적 조성물.
- [0266] A23. 실시 형태 A1 내지 실시 형태 A22 중 어느 한 실시 형태에 있어서, 비-이온성 계면활성제는 약 0.0005%(w/v) 내지 약 0.005%(w/v)인, 약제학적 조성물.
- [0267] A24. 실시 형태 A1 내지 실시 형태 A23 중 어느 한 실시 형태에 있어서, 비-이온성 계면활성제는 약 0.00075%(w/v) 내지 약 0.0025%(w/v)인, 약제학적 조성물.
- [0268] A25. 실시 형태 A1 내지 실시 형태 A24 중 어느 한 실시 형태에 있어서, 비-이온성 계면활성제는 약 0.001%(w/v)인, 약제학적 조성물.
- [0269] A26. 실시 형태 A1 내지 실시 형태 A25 중 어느 한 실시 형태에 있어서, 비-이온성 계면활성제는 공중합체, 폴리옥시에틸렌 소르비탄 에스테르, 인지질, Brij 계면활성제, 및 소르비탄 에스테르, 또는 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는, 약제학적 조성물.
- [0270] A27. 실시 형태 A26에 있어서, 폴리옥시에틸렌 소르비탄 에스테르는 (PS-20), 및 폴리소르베이트 80(PS-80), 또는 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는, 약제학적 조성물.
- [0271] A28. 실시 형태 A26에 있어서, 공중합체는 폴록사머를 포함하는, 약제학적 조성물.
- [0272] A29. 실시 형태 A28에 있어서, 폴록사머는 폴록사머 188(P188), 폴록사머 237(P237), 폴록사머 338(P338), 및 폴록사머 407(P407), 또는 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는, 약제학적 조성물.
- [0273] A30. 실시 형태 A28에 있어서, 폴록사머는 폴록사머 188(P188)을 포함하는, 약제학적 조성물.
- [0274] A31. 정제된 아데노-관련 바이러스(AAV) 입자, 완충제, 동결보호제, 및 비-이온성 계면활성제를 포함하며, 여기서
- [0275] (a) 정제된 AAV 입자에는 불순물이 실질적으로 없고,
- [0276] (b) 완충제 농도는 약 20 mM이고,
- [0277] (c) 동결보호제는 약 5%(w/v) 트레할로스이고,
- [0278] (d) 비-이온성 계면활성제는 약 0.001%(w/v) 폴록사머 188인, 약제학적 조성물.
- [0279] A32. 정제된 아데노-관련 바이러스(AAV) 입자, 약제학적으로 허용가능한 염, 완충제, 동결보호제, 및 비-이온성 계면활성제를 포함하며, 여기서
- [0280] (a) 정제된 AAV 입자에는 불순물이 실질적으로 없고,
- [0281] (b) 약제학적으로 허용가능한 염 농도는 약 10 mM 소듐 클로라이드이고,
- [0282] (c) 완충제 농도는 약 20 mM이고,
- [0283] (d) 동결보호제는 약 5%(w/v) 트레할로스이고,
- [0284] (e) 비-이온성 계면활성제는 약 0.001%(w/v) 폴록사머 188인, 약제학적 조성물.
- [0285] A33. 정제된 아데노-관련 바이러스(AAV) 입자, 약제학적으로 허용가능한 염, 완충제, 동결보호제, 및 비-이온성

계면활성제를 포함하며, 여기서

- [0286] (a) 정제된 AAV 입자에는 불순물이 실질적으로 없고,
- [0287] (b) 약제학적으로 허용가능한 염 농도는 약 25 mM 소듐 클로라이드이고,
- [0288] (c) 완충제 농도는 약 20 mM이고,
- [0289] (d) 동결보호제는 약 5%(w/v) 트레할로스이고,
- [0290] (e) 비-이온성 계면활성제는 약 0.001%(w/v) 폴록사머 188인, 약제학적 조성물.

A34. 정제된 아데노-관련 바이러스(AAV) 입자, 약제학적으로 허용가능한 염, 완충제, 동결보호제, 및 비-이온성 계면활성제를 포함하며, 여기서

- [0292] (a) 정제된 AAV 입자에는 불순물이 실질적으로 없고,
- [0293] (b) 약제학적으로 허용가능한 염 농도는 약 50 mM 소듐 클로라이드이고,
- [0294] (c) 완충제 농도는 약 20 mM이고,
- [0295] (d) 동결보호제는 약 5%(w/v) 트레할로스이고,
- [0296] (e) 비-이온성 계면활성제는 약 0.001%(w/v) 폴록사머 188인, 약제학적 조성물.

A35. 정제된 아데노-관련 바이러스(AAV) 입자, 약제학적으로 허용가능한 염, 완충제, 동결보호제, 및 비-이온성 계면활성제를 포함하며, 여기서

- [0298] (a) 정제된 AAV 입자에는 불순물이 실질적으로 없고,
- [0299] (b) 약제학적으로 허용가능한 염 농도는 약 100 mM 소듐 클로라이드이고,
- [0300] (c) 완충제 농도는 약 20 mM이고,
- [0301] (d) 동결보호제는 약 5%(w/v) 트레할로스이고,
- [0302] (e) 비-이온성 계면활성제는 약 0.001%(w/v) 폴록사머 188인, 약제학적 조성물.

A36. 정제된 아데노-관련 바이러스(AAV) 입자, 약제학적으로 허용가능한 염, 완충제, 동결보호제, 및 비-이온성 계면활성제를 포함하며, 여기서

- [0304] (a) 정제된 AAV 입자에는 불순물이 실질적으로 없고,
- [0305] (b) 약제학적으로 허용가능한 염 농도는 약 125 mM 소듐 클로라이드이고,
- [0306] (c) 완충제 농도는 약 20 mM이고,
- [0307] (d) 동결보호제는 약 5%(w/v) 트레할로스이고,
- [0308] (e) 비-이온성 계면활성제는 약 0.001%(w/v) 폴록사머 188인, 약제학적 조성물.

A37. 정제된 아데노-관련 바이러스(AAV) 입자, 약제학적으로 허용가능한 염, 완충제, 동결보호제, 및 비-이온성 계면활성제를 포함하며, 여기서

- [0310] (a) 정제된 AAV 입자에는 불순물이 실질적으로 없고,
- [0311] (b) 약제학적으로 허용가능한 염 농도는 약 150 mM 소듐 클로라이드이고,
- [0312] (c) 완충제 농도는 약 20 mM이고,
- [0313] (d) 동결보호제는 약 5%(w/v) 트레할로스이고,
- [0314] (e) 비-이온성 계면활성제는 약 0.001%(w/v) 폴록사머 188인, 약제학적 조성물.

A38. 정제된 아데노-관련 바이러스(AAV) 입자, 약제학적으로 허용가능한 염, 완충제, 동결보호제, 및 비-이온성 계면활성제를 포함하며, 여기서

- [0316] (a) 정제된 AAV 입자에는 불순물이 실질적으로 없고,

- [0317] (b) 약제학적으로 허용가능한 염 농도는 약 200 mM 소듐 클로라이드이고,
- [0318] (c) 완충제 농도는 약 20 mM이고,
- [0319] (d) 동결보호제는 약 5%(w/v) 트레할로스이고,
- [0320] (e) 비-이온성 계면활성제는 약 0.001%(w/v) 폴록사머 188인, 약제학적 조성물.
- [0321] A39. 실시 형태 A31 내지 실시 형태 A38 중 어느 한 실시 형태에 있어서, 완충제는 트리스 HCl을 포함하는, 약제학적 조성물.
- [0322] A40. 실시 형태 A31 내지 실시 형태 A38 중 어느 한 실시 형태에 있어서, 완충제는 L-히스티딘 HCl을 포함하는, 약제학적 조성물.
- [0323] A41. 실시 형태 A1 내지 실시 형태 A40 중 어느 한 실시 형태에 있어서, 약제학적 조성물 pH는 약 4.0 내지 약 9.0인, 약제학적 조성물.
- [0324] A42. 실시 형태 A1 내지 실시 형태 A41 중 어느 한 실시 형태에 있어서, 약제학적 조성물 pH는 약 7.0 내지 약 8.0인, 약제학적 조성물.
- [0325] A43. 실시 형태 A1 내지 실시 형태 A42 중 어느 한 실시 형태에 있어서, 약제학적 조성물 pH는 약 7.3 내지 약 7.7인, 약제학적 조성물.
- [0326] A44. 실시 형태 A1 내지 실시 형태 A43 중 어느 한 실시 형태에 있어서, 약제학적 조성물 pH는 약 7.5인, 약제학적 조성물.
- [0327] A45. 실시 형태 A1 내지 실시 형태 A44 중 어느 한 실시 형태에 있어서, AAV는 AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, 및 AAV10으로 이루어진 군으로부터 선택되는, 약제학적 조성물.
- [0328] A46. 실시 형태 A1 내지 실시 형태 A45 중 어느 한 실시 형태에 있어서, AAV는 재조합 AAV(rAAV)를 포함하는, 약제학적 조성물.
- [0329] A47. 실시 형태 A1 내지 실시 형태 A46 중 어느 한 실시 형태에 있어서, 정제된 AAV 입자 역가는 약 1×10^{10} 바이러스 게놈/밀리리터(vg/mL) 이상인, 약제학적 조성물.
- [0330] A48. 실시 형태 A1 내지 실시 형태 A46 중 어느 한 실시 형태에 있어서, 정제된 AAV 입자 역가는 약 1×10^{11} 바이러스 게놈/밀리리터(vg/mL) 이상인, 약제학적 조성물.
- [0331] A49. 실시 형태 A1 내지 실시 형태 A46 중 어느 한 실시 형태에 있어서, 정제된 AAV 입자 역가는 약 1×10^{12} 바이러스 게놈/밀리리터(vg/mL) 이상인, 약제학적 조성물.
- [0332] A50. 실시 형태 A1 내지 실시 형태 A46 중 어느 한 실시 형태에 있어서, 정제된 AAV 입자 역가는 약 1×10^{13} 바이러스 게놈/밀리리터(vg/mL) 이상인, 약제학적 조성물.
- [0333] A51. 실시 형태 A1 내지 실시 형태 A46 중 어느 한 실시 형태에 있어서, 정제된 AAV 입자 역가는 약 1×10^{14} 바이러스 게놈/밀리리터(vg/mL) 이상인, 약제학적 조성물.
- [0334] A52. 실시 형태 A1 내지 실시 형태 A46 중 어느 한 실시 형태에 있어서, 정제된 AAV 입자 역가는 약 1×10^{15} 바이러스 게놈/밀리리터(vg/mL) 이상인, 약제학적 조성물.
- [0335] A53. 실시 형태 A1 내지 실시 형태 A52 중 어느 한 실시 형태에 있어서, 불순물은 공정-관련 불순물, 생성물-관련 불순물, 또는 이들의 조합을 포함하는, 약제학적 조성물.
- [0336] A54. 실시 형태 A53에 있어서, 공정-관련 불순물은 잔류 숙주-세포 성분, 잔류 바이러스 생성 성분, 잔류 세포 배양 성분, 잔류 정제 성분, 또는 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는, 약제학적 조성물.
- [0337] A55. 실시 형태 A54에 있어서, 잔류 숙주-세포 성분은 숙주-세포 단백질, 숙주-세포 DNA, 숙주-세포 RNA, 또는 이들의 조합을 포함하는, 약제학적 조성물.
- [0338] A56. 실시 형태 A55에 있어서, 숙주-세포 DNA는 바이러스 외, 염색질-관련 DNA를 포함하는, 약제학적 조성물.

- [0339] A57. 실시 형태 A56에 있어서, 잔류 바이러스 생성 성분은 플라스미드 DNA, 헬퍼 바이러스, 또는 이들의 조합을 포함하는, 약제학적 조성물.
- [0340] A58. 실시 형태 A54에 있어서, 잔류 세포 배양 성분은 항생제, 보충제, 유도 인자, 성장 인자, 또는 이들의 조합을 포함하는, 약제학적 조성물.
- [0341] A59. 실시 형태 A54에 있어서, 잔류 정제 성분은 완충제, 무기 염, 효소, 세제, 배지, 또는 이들의 조합을 포함하는, 약제학적 조성물.
- [0342] A60. 실시 형태 A53에 있어서, 생성물-관련 불순물은 빈 캡시드, 응집된 AAV 입자, 분해된 AAV 입자, 또는 이들의 조합을 포함하는, 약제학적 조성물.
- [0343] A61. 실시 형태 A60에 있어서, 정제된 AAV 입자는 적재되거나 부분적으로 적재된 캡시드를 포함하고, 생성물-관련 불순물은 빈 캡시드를 포함하는, 약제학적 조성물.
- [0344] A62. 실시 형태 A60에 있어서, 정제된 AAV 입자는 적재된 캡시드를 포함하고, 생성물-관련 불순물은 빈 캡시드를 포함하는, 약제학적 조성물.
- [0345] A63. 실시 형태 A60에 있어서, 정제된 AAV 입자는 적재된 캡시드로 본질적으로 이루어지고, 생성물-관련 불순물은 빈 캡시드를 포함하는, 약제학적 조성물.
- [0346] A64. 실시 형태 A53에 있어서, 생성물-관련 불순물은 응집된 AAV 입자, 분해된 AAV 입자, 또는 이들의 조합을 포함하는, 약제학적 조성물.
- [0347] A65. 실시 형태 A64에 있어서, 정제된 AAV 입자는 빈 캡시드를 포함하는, 약제학적 조성물.
- [0348] A66. 실시 형태 A64에 있어서, 정제된 AAV 입자는 빈 캡시드로 본질적으로 이루어지는, 약제학적 조성물.
- [0349] A67. 실시 형태 A53에 있어서, 생성물-관련 불순물은 응집된 AAV 입자 또는 이들의 조합을 포함하는, 약제학적 조성물.
- [0350] A68. 실시 형태 A1 내지 실시 형태 A67 중 어느 한 실시 형태에 있어서, 액체 상태인, 약제학적 조성물.
- [0351] A69. 실시 형태 A1 내지 실시 형태 A67 중 어느 한 실시 형태에 있어서, 고체 또는 반-고체 상태인, 약제학적 조성물.
- [0352] A70. 실시 형태 A1 내지 실시 형태 A69 중 어느 한 실시 형태에 있어서, 정제된 AAV 입자의 안정성을 유지하거나 향상시키는, 약제학적 조성물.
- [0353] A71. 실시 형태 A1 내지 실시 형태 A69 중 어느 한 실시 형태에 있어서, 정제된 AAV 입자의 응집을 감소시키거나 방지하는, 약제학적 조성물.
- [0354] A72. 실시 형태 A1 내지 실시 형태 A69 중 어느 한 실시 형태에 있어서,
- [0355] (a) 정제된 AAV 입자의 안정성을 유지하거나 향상시키고;
- [0356] (b) 정제된 AAV 입자의 응집을 감소시키거나 방지하는, 약제학적 조성물.
- [0357] A73. 실시 형태 A70 또는 실시 형태 A72에 있어서, 정제된 AAV 입자의 안정성은 1회 이상의 동결/해동 주기 후에 유지되거나 향상되는, 약제학적 조성물.
- [0358] A74. 실시 형태 A70 또는 실시 형태 A72에 있어서, 정제된 AAV 입자의 안정성은 3회 이상의 동결/해동 주기 후에 유지되거나 향상되는, 약제학적 조성물.
- [0359] A75. 실시 형태 A71 또는 실시 형태 A72에 있어서, AAV 입자의 응집은 1회 이상의 동결/해동 주기 후에 5% 미만인, 약제학적 조성물.
- [0360] A76. 실시 형태 A71 또는 실시 형태 A72에 있어서, AAV 입자의 응집은 1회 이상의 동결/해동 주기 후에 2% 미만인, 약제학적 조성물.
- [0361] A77. 실시 형태 A71 또는 실시 형태 A72에 있어서, AAV 입자의 응집은 1회 이상의 동결/해동 주기 후에 1% 미만인, 약제학적 조성물.
- [0362] A78. 실시 형태 A71 또는 실시 형태 A72에 있어서, AAV 입자의 응집은 3회 이상의 동결/해동 주기 후에 5% 미만

인, 약제학적 조성물.

- [0363] A79. 실시 형태 A71 또는 실시 형태 A72에 있어서, AAV 입자의 응집은 3회 이상의 동결/해동 주기 후에 2% 미만인, 약제학적 조성물.
- [0364] A80. 실시 형태 A71 또는 실시 형태 A72에 있어서, AAV 입자의 응집은 3회 이상의 동결/해동 주기 후에 1% 미만인, 약제학적 조성물.
- [0365] A81. 실시 형태 A73 내지 실시 형태 A80 중 어느 한 실시 형태에 있어서, AAV 입자의 안정성 및/또는 응집은 동적 광 산란(DLS), 분석용 초원심분리(AUC), 광학 현미경, 크기 배제 크로마토그래피(SEC), 투과 전자 현미경, 및 다중-각 정적 광 산란을 이용한 장 흐름 분획법(FFF-MALS)으로 이루어진 군으로부터 선택된 검정에 의해 측정되는, 약제학적 조성물.
- [0366] A82. 실시 형태 A1 내지 실시 형태 A81 중 어느 한 실시 형태에 있어서, 정제된 AAV 입자는
- [0367] (a) AAV 입자를 포함하는 상청액을 뉴클레아제를 포함하는 조성물과 접촉시키는 단계; 및
- [0368] (b) 입자를 정제하는 단계를 포함하는 방법에 의해 얻어지는, 약제학적 조성물.
- [0369] A83. 실시 형태 A82에 있어서, 뉴클레아제는 Benzonase, 또는 Benzonase® 및 염색질-DNA 뉴클레아제를 포함하는, 약제학적 조성물.
- [0370] A84. 실시 형태 A83에 있어서, 염색질-DNA 뉴클레아제는 MNase를 포함하는, 약제학적 조성물.
- [0371] A85. 정제된 AAV 입자를 포함하는 약제학적 조성물을 제조하기 위한 방법으로서,
- [0372] (a) AAV 입자를 포함하는 상청액을 뉴클레아제를 포함하는 조성물과 접촉시키는 단계;
- [0373] (b) AAV 입자에 불순물이 실질적으로 없도록, AAV 입자를 정제하는 단계;
- [0374] (c) 정제된 AAV 입자를 완충제, 동결보호제, 및 비-이온성 계면활성제와 조합하며, 여기서
- [0375] i. 완충제 농도는 약 0 mM 내지 약 50 mM이고,
- [0376] ii. 동결보호제는 약 1% 내지 약 10%(w/v)이고,
- [0377] iii. 비-이온성 계면활성제는 약 0.0001%(w/v) 내지 약 0.1%(w/v)인 단계를 포함하는, 방법.
- [0378] A86. 실시 형태 A85에 있어서, 단계 (c)는 약제학적으로 허용가능한 염을 추가로 포함하며, 여기서 약제학적으로 허용가능한 염 농도는 약 1 mM 내지 약 200 mM인, 방법.
- [0379] A87. 실시 형태 A86에 있어서, 약제학적으로 허용가능한 염은 약 10 mM 내지 약 150 mM인, 방법.
- [0380] A88. 실시 형태 A86에 있어서, 약제학적으로 허용가능한 염은 약 1 mM 내지 약 49 mM인, 방법.
- [0381] A89. 실시 형태 A86에 있어서, 약제학적으로 허용가능한 염은 약 5 mM 내지 약 45 mM인, 방법.
- [0382] A90. 실시 형태 A86에 있어서, 약제학적으로 허용가능한 염은 약 7.5 mM 내지 약 40 mM인, 방법.
- [0383] A91. 실시 형태 A86에 있어서, 약제학적으로 허용가능한 염은 약 10 mM 내지 약 30 mM인, 방법.
- [0384] A92. 실시 형태 A86에 있어서, 약제학적으로 허용가능한 염 농도는 약 10 mM인, 방법.
- [0385] A93. 실시 형태 A86에 있어서, 약제학적으로 허용가능한 염 농도는 약 100 mM인, 방법.
- [0386] A94. 실시 형태 A86에 있어서, 약제학적으로 허용가능한 염 농도는 약 150 mM인, 방법.
- [0387] A95. 실시 형태 A86 내지 실시 형태 A94 중 어느 한 실시 형태에 있어서, 약제학적으로 허용가능한 염은 소듐 염, 마그네슘 염, 칼슘 염, 포타슘 염, 포스페이트 염, 및 셀레이트 염으로 이루어진 군으로부터 선택되는, 방법.
- [0388] A96. 실시 형태 A95에 있어서, 소듐 염은 소듐 클로라이드를 포함하는, 방법.
- [0389] A97. 실시 형태 A85 내지 실시 형태 A96 중 어느 한 실시 형태에 있어서, 완충제는 트리스 HCl을 포함하는, 방법.
- [0390] A98. 실시 형태 A85 내지 실시 형태 A96 중 어느 한 실시 형태에 있어서, 완충제는 L-히스티딘 HCl을 포함하는,

방법.

- [0391] A99. 실시 형태 A85 내지 실시 형태 A98 중 어느 한 실시 형태에 있어서, 완충제 농도는 약 20 mM을 포함하는, 방법.
- [0392] A100. 실시 형태 A85 내지 실시 형태 A99 중 어느 한 실시 형태에 있어서, 동결보호제는 약 3%(w/v) 내지 약 8%(w/v)인, 방법.
- [0393] A101. 실시 형태 A85 내지 실시 형태 A100 중 어느 한 실시 형태에 있어서, 동결보호제는 약 4%(w/v) 내지 약 6%(w/v)인, 방법.
- [0394] A102. 실시 형태 A85 내지 실시 형태 A101 중 어느 한 실시 형태에 있어서, 동결보호제는 약 5%(w/v)인, 방법.
- [0395] A103. 실시 형태 A85 내지 실시 형태 A102 중 어느 한 실시 형태에 있어서, 동결보호제는 당을 포함하는, 방법.
- [0396] A104. 실시 형태 A103에 있어서, 당은 수크로스, 트레할로스, 또는 이들의 조합을 포함하는, 방법.
- [0397] A105. 실시 형태 A103에 있어서, 당은 트레할로스를 포함하는, 방법.
- [0398] A106. 실시 형태 A85 내지 실시 형태 A105 중 어느 한 실시 형태에 있어서, 비-이온성 계면활성제는 약 0.0005%(w/v) 내지 약 0.005%(w/v)인, 방법.
- [0399] A107. 실시 형태 A85 내지 실시 형태 A106 중 어느 한 실시 형태에 있어서, 비-이온성 계면활성제는 약 0.00075%(w/v) 내지 약 0.0025%(w/v)인, 방법.
- [0400] A108. 실시 형태 A85 내지 실시 형태 A107 중 어느 한 실시 형태에 있어서, 비-이온성 계면활성제는 약 0.001%(w/v)인, 방법.
- [0401] A109. 실시 형태 A85 내지 실시 형태 A108 중 어느 한 실시 형태에 있어서, 비-이온성 계면활성제는 공중합체, 폴리옥시에틸렌 소르비탄 에스테르, 인지질, Brij 계면활성제, 및 소르비탄 에스테르, 또는 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는, 방법.
- [0402] A110. 실시 형태 A109에 있어서, 폴리옥시에틸렌 소르비탄 에스테르는 (PS-20), 및 폴리소르베이트 80(PS-80), 또는 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는, 방법.
- [0403] A111. 실시 형태 A109에 있어서, 공중합체는 폴록사머를 포함하는, 방법.
- [0404] A112. 실시 형태 A111에 있어서, 폴록사머는 폴록사머 188(P188), 폴록사머 237(P237), 폴록사머 338(P338), 및 폴록사머 407(P407), 또는 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는, 방법.
- [0405] A113. 실시 형태 A111에 있어서, 폴록사머는 폴록사머 188(P188)을 포함하는, 방법.
- [0406] A114. 실시 형태 A85 내지 실시 형태 A113 중 어느 한 실시 형태에 있어서, 약제학적 조성물 pH는 약 4.0 내지 약 9.0인, 방법.
- [0407] A115. 실시 형태 A85 내지 실시 형태 A114 중 어느 한 실시 형태에 있어서, 약제학적 조성물 pH는 약 7.0 내지 약 8.0인, 방법.
- [0408] A116. 실시 형태 A85 내지 실시 형태 A115 중 어느 한 실시 형태에 있어서, 약제학적 조성물 pH는 약 7.3 내지 약 7.7인, 방법.
- [0409] A117. 실시 형태 A85 내지 실시 형태 A116 중 어느 한 실시 형태에 있어서, 약제학적 조성물 pH는 약 7.5인, 방법.
- [0410] A118. 실시 형태 A85 내지 실시 형태 A117 중 어느 한 실시 형태에 있어서, AAV는 AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, 및 AAV10으로 이루어진 군으로부터 선택되는, 방법.
- [0411] A119. 실시 형태 A85 내지 실시 형태 A118 중 어느 한 실시 형태에 있어서, AAV는 재조합 AAV(rAAV)를 포함하는, 방법.
- [0412] A120. 실시 형태 A85 내지 실시 형태 A119 중 어느 한 실시 형태에 있어서, 뉴클레아제는 Benzonase, 또는 Benzonase® 및 염색질-DNA 뉴클레아제를 포함하는, 방법.
- [0413] A121. 실시 형태 A120에 있어서, 염색질-DNA 뉴클레아제는 MNase를 포함하는, 방법.

- [0414] A122. 실시 형태 A85 내지 실시 형태 A121 중 어느 한 실시 형태에 있어서, 정제된 AAV 입자 역가는 약 1×10^{10} 바이러스 게놈/밀리리터(vg/mL) 이상인, 방법.
- [0415] A123. 실시 형태 A85 내지 실시 형태 A121 중 어느 한 실시 형태에 있어서, 정제된 AAV 입자 역가는 약 1×10^{11} 바이러스 게놈/밀리리터(vg/mL) 이상인, 방법.
- [0416] A124. 실시 형태 A85 내지 실시 형태 A121 중 어느 한 실시 형태에 있어서, 정제된 AAV 입자 역가는 약 1×10^{12} 바이러스 게놈/밀리리터(vg/mL) 이상인, 방법.
- [0417] A125. 실시 형태 A85 내지 실시 형태 A121 중 어느 한 실시 형태에 있어서, 정제된 AAV 입자 역가는 약 1×10^{13} 바이러스 게놈/밀리리터(vg/mL) 이상인, 방법.
- [0418] A126. 실시 형태 A85 내지 실시 형태 A121 중 어느 한 실시 형태에 있어서, 정제된 AAV 입자 역가는 약 1×10^{14} 바이러스 게놈/밀리리터(vg/mL) 이상인, 방법.
- [0419] A127. 실시 형태 A85 내지 실시 형태 A121 중 어느 한 실시 형태에 있어서, 정제된 AAV 입자 역가는 약 1×10^{15} 바이러스 게놈/밀리리터(vg/mL) 이상인, 방법.
- [0420] A128. 실시 형태 A85 내지 실시 형태 A127 중 어느 한 실시 형태에 있어서, 불순물은 공정-관련 불순물, 생성물-관련 불순물, 또는 이들의 조합을 포함하는, 방법.
- [0421] A129. 실시 형태 A128에 있어서, 공정-관련 불순물은 잔류 숙주-세포 성분, 잔류 바이러스 생성 성분, 잔류 세포 배양 성분, 잔류 정제 성분, 또는 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는, 방법.
- [0422] A130. 실시 형태 A129에 있어서, 잔류 숙주-세포 성분은 숙주-세포 단백질, 숙주-세포 DNA, 숙주-세포 RNA, 또는 이들의 조합을 포함하는, 방법.
- [0423] A131. 실시 형태 A130에 있어서, 숙주-세포 DNA는 바이러스 외, 염색질-관련 DNA를 포함하는, 방법.
- [0424] A132. 실시 형태 A129에 있어서, 잔류 바이러스 생성 성분은 플라스미드 DNA, 헬퍼 바이러스, 또는 이들의 조합을 포함하는, 방법.
- [0425] A133. 실시 형태 A129에 있어서, 잔류 세포 배양 성분은 항생제, 보충제, 유도 인자, 성장 인자, 또는 이들의 조합을 포함하는, 방법.
- [0426] A134. 실시 형태 A129에 있어서, 잔류 정제 성분은 완충제, 무기 염, 효소, 세제, 배지, 또는 이들의 조합을 포함하는, 방법.
- [0427] A135. 실시 형태 A128에 있어서, 생성물-관련 불순물은 빈 캡시드, 응집된 AAV 입자, 분해된 AAV 입자, 또는 이들의 조합을 포함하는, 방법.
- [0428] A136. 실시 형태 A135에 있어서, 정제된 AAV 입자는 적재되거나 부분적으로 적재된 캡시드를 포함하고, 생성물-관련 불순물은 빈 캡시드를 포함하는, 방법.
- [0429] A137. 실시 형태 A135에 있어서, 정제된 AAV 입자는 적재된 캡시드를 포함하고, 생성물-관련 불순물은 빈 캡시드를 포함하는, 방법.
- [0430] A138. 실시 형태 A135에 있어서, 정제된 AAV 입자는 적재된 캡시드로 본질적으로 이루어지고, 생성물-관련 불순물은 빈 캡시드를 포함하는, 방법.
- [0431] A139. 실시 형태 A128에 있어서, 생성물-관련 불순물은 응집된 AAV 입자, 분해된 AAV 입자, 또는 이들의 조합을 포함하는, 방법.
- [0432] A140. 실시 형태 A139에 있어서, 정제된 AAV 입자는 빈 캡시드를 포함하는, 방법.
- [0433] A141. 실시 형태 A139에 있어서, 정제된 AAV 입자는 빈 캡시드로 본질적으로 이루어지는, 방법.
- [0434] A142. 실시 형태 A128에 있어서, 생성물-관련 불순물은 응집된 AAV 입자를 포함하는, 방법.
- [0435] 제2 세트의 실시 형태에는, 하기가 제공된다:

- [0436] B1. 정제된 AAV 입자의 안정성을 유지하거나 향상시키기 위한 수단을 포함하는, 약제학적 조성물.
- [0437] B2. 실시 형태 B1에 있어서, 정제된 AAV 입자의 안정성은 1회 이상의 동결/해동 주기 후에 유지되거나 향상되는, 약제학적 조성물.
- [0438] B3. 실시 형태 B1에 있어서, 정제된 AAV 입자의 안정성은 3회 이상의 동결/해동 주기 후에 유지되거나 향상되는, 약제학적 조성물.
- [0439] B4. 실시 형태 B1 내지 실시 형태 B3 중 어느 한 실시 형태에 있어서, AAV 입자의 안정성은 동적 광 산란(DLS), 분석용 초원심분리(AUC), 광학 현미경, 크기 배제 크로마토그래피(SEC), 투과 전자 현미경, 및 다중-각 정적 광 산란을 이용한 장 흐름 분획법(FFF-MALS)으로 이루어진 군으로부터 선택된 검정에 의해 측정되는, 약제학적 조성물.
- [0440] B5. 정제된 AAV 입자의 응집을 감소시키거나 방지하기 위한 수단을 포함하는, 약제학적 조성물.
- [0441] B6. 실시 형태 B5에 있어서, AAV 입자의 응집은 1회 이상의 동결/해동 주기 후에 5% 미만인, 약제학적 조성물.
- [0442] B7. 실시 형태 B5에 있어서, AAV 입자의 응집은 1회 이상의 동결/해동 주기 후에 2% 미만인, 약제학적 조성물.
- [0443] B8. 실시 형태 B5에 있어서, AAV 입자의 응집은 1회 이상의 동결/해동 주기 후에 1% 미만인, 약제학적 조성물.
- [0444] B9. 실시 형태 B5에 있어서, AAV 입자의 응집은 3회 이상의 동결/해동 주기 후에 5% 미만인, 약제학적 조성물.
- [0445] B10. 실시 형태 B5에 있어서, AAV 입자의 응집은 3회 이상의 동결/해동 주기 후에 2% 미만인, 약제학적 조성물.
- [0446] B11. 실시 형태 B5에 있어서, AAV 입자의 응집은 3회 이상의 동결/해동 주기 후에 1% 미만인, 약제학적 조성물.
- [0447] B12. 실시 형태 B5 내지 실시 형태 B11 중 어느 한 실시 형태에 있어서, AAV 입자는 동적 광 산란(DLS), 분석용 초원심분리(AUC), 광학 현미경, 크기 배제 크로마토그래피(SEC), 투과 전자 현미경, 및 다중-각 정적 광 산란을 이용한 장 흐름 분획법(FFF-MALS)으로 이루어진 군으로부터 선택된 검정에 의해 측정되는, 약제학적 조성물.
- [0448] B13. (a) 정제된 AAV 입자의 안정성을 유지하거나 향상시키고, (b) 정제된 AAV 입자의 응집을 감소시키거나 방지하기 위한 수단을 포함하는, 약제학적 조성물.
- [0449] B14. 실시 형태 B13에 있어서, 정제된 AAV 입자의 안정성은 1회 이상의 동결/해동 주기 후에 유지되거나 향상되는, 약제학적 조성물.
- [0450] B15. 실시 형태 B13에 있어서, 정제된 AAV 입자의 안정성은 3회 이상의 동결/해동 주기 후에 유지되거나 향상되는, 약제학적 조성물.
- [0451] B16. 실시 형태 B13에 있어서, AAV 입자의 응집은 1회 이상의 동결/해동 주기 후에 5% 미만인, 약제학적 조성물.
- [0452] B17. 실시 형태 B13에 있어서, AAV 입자의 응집은 1회 이상의 동결/해동 주기 후에 2% 미만인, 약제학적 조성물.
- [0453] B18. 실시 형태 B13에 있어서, AAV 입자의 응집은 1회 이상의 동결/해동 주기 후에 1% 미만인, 약제학적 조성물.
- [0454] B19. 실시 형태 B13에 있어서, AAV 입자의 응집은 3회 이상의 동결/해동 주기 후에 5% 미만인, 약제학적 조성물.
- [0455] B20. 실시 형태 B13에 있어서, AAV 입자의 응집은 3회 이상의 동결/해동 주기 후에 2% 미만인, 약제학적 조성물.
- [0456] B21. 실시 형태 B13에 있어서, AAV 입자의 응집은 3회 이상의 동결/해동 주기 후에 1% 미만인, 약제학적 조성물.
- [0457] B22. 실시 형태 B13 내지 실시 형태 B21 중 어느 한 실시 형태에 있어서, AAV 입자의 안정성 및 응집은 동적 광 산란(DLS), 분석용 초원심분리(AUC), 광학 현미경, 크기 배제 크로마토그래피(SEC), 투과 전자 현미경, 및 다중-각 정적 광 산란을 이용한 장 흐름 분획법(FFF-MALS)으로 이루어진 군으로부터 선택된 검정에 의해 측정되는, 약제학적 조성물.

- [0458] B23. 정제된 아데노-관련 바이러스(AAV) 입자, 완충제, 동결보호제, 및 비-이온성 계면활성제를 포함하며, 여기서
- [0459] (a) 정제된 AAV 입자에는 불순물이 실질적으로 없고,
- [0460] (b) 완충제 농도는 약 0 mM 내지 약 50 mM이고,
- [0461] (c) 동결보호제는 약 1% 내지 약 10%(w/v)이고,
- [0462] (d) 비-이온성 계면활성제는 약 0.0001%(w/v) 내지 약 0.1%(w/v)인 약제학적 조성물을 제조하고 얻기 위한 수단을 포함하는, 시스템.
- [0463] B24. 실시 형태 B23에 있어서, 약제학적 조성물은 약제학적으로 허용가능한 염을 추가로 포함하며, 여기서 약제학적으로 허용가능한 염 농도는 약 1 mM 내지 약 200 mM인, 시스템.
- [0464] B25. 실시 형태 B24에 있어서, 약제학적으로 허용가능한 염은 약 10 mM 내지 약 150 mM인, 시스템.
- [0465] B26. 실시 형태 B24 또는 실시 형태 B25에 있어서, 약제학적으로 허용가능한 염 농도는 약 10 mM인, 시스템.
- [0466] B27. 실시 형태 B24 또는 실시 형태 B25에 있어서, 약제학적으로 허용가능한 염 농도는 약 100 mM인, 시스템.
- [0467] B28. 실시 형태 B24 또는 실시 형태 B25에 있어서, 약제학적으로 허용가능한 염 농도는 약 150 mM인, 시스템.
- [0468] B29. 정제된 아데노-관련 바이러스(AAV) 입자, 약제학적으로 허용가능한 염, 완충제, 동결보호제, 및 비-이온성 계면활성제를 포함하며, 여기서
- [0469] a. 정제된 AAV 입자에는 불순물이 실질적으로 없고,
- [0470] b. 약제학적으로 허용가능한 염 농도는 약 1 mM 내지 약 49 mM이고,
- [0471] c. 완충제 농도는 약 0 mM 내지 약 50 mM이고,
- [0472] d. 동결보호제는 약 1% 내지 약 10%(w/v)이고,
- [0473] e. 비-이온성 계면활성제는 약 0.0001%(w/v) 내지 약 0.1%(w/v)인 약제학적 조성물을 제조하고 얻기 위한 수단을 포함하는, 시스템.
- [0474] B30. 실시 형태 B29에 있어서, 약제학적으로 허용가능한 염 농도는 약 5 mM 내지 약 45 mM인, 시스템.
- [0475] B31. 실시 형태 B29 또는 실시 형태 B30에 있어서, 약제학적으로 허용가능한 염 농도는 약 7.5 mM 내지 약 40 mM인, 시스템.
- [0476] B32. 실시 형태 B29 내지 실시 형태 B31 중 어느 한 실시 형태에 있어서, 약제학적으로 허용가능한 염 농도는 약 10 mM 내지 약 30 mM인, 시스템.
- [0477] B33. 실시 형태 B29 내지 실시 형태 B32 중 어느 한 실시 형태에 있어서, 약제학적으로 허용가능한 염 농도는 10 mM인, 시스템.
- [0478] B34. 실시 형태 B24 내지 실시 형태 B33 중 어느 한 실시 형태에 있어서, 약제학적으로 허용가능한 염은 소듐 염, 마그네슘 염, 칼슘 염, 포타슘 염, 포스페이트 염, 및 셀레이트 염으로 이루어진 군으로부터 선택되는, 시스템.
- [0479] B35. 실시 형태 B34에 있어서, 소듐 염은 소듐 클로라이드를 포함하는, 시스템.
- [0480] B36. 실시 형태 B23 내지 실시 형태 B35 중 어느 한 실시 형태에 있어서, 완충제는 트리스 HCl을 포함하는, 시스템.
- [0481] B37. 실시 형태 B23 내지 실시 형태 B35 중 어느 한 실시 형태에 있어서, 완충제는 L-히스티딘 HCl을 포함하는, 시스템.
- [0482] B38. 실시 형태 B23 내지 실시 형태 B37 중 어느 한 실시 형태에 있어서, 완충제 농도는 약 20 mM을 포함하는, 시스템.
- [0483] B39. 실시 형태 B23 내지 실시 형태 B38 중 어느 한 실시 형태에 있어서, 동결보호제는 약 3%(w/v) 내지 약 8%(w/v)인, 시스템.

- [0484] B40. 실시 형태 B23 내지 실시 형태 B39 중 어느 한 실시 형태에 있어서, 동결보호제는 약 4%(w/v) 내지 약 6%(w/v)인, 시스템.
- [0485] B41. 실시 형태 B23 내지 실시 형태 B40 중 어느 한 실시 형태에 있어서, 동결보호제는 약 5%(w/v)인, 시스템.
- [0486] B42. 실시 형태 B23 내지 실시 형태 B41 중 어느 한 실시 형태에 있어서, 동결보호제는 당을 포함하는, 시스템.
- [0487] B43. 실시 형태 B42에 있어서, 당은 수크로스, 트레할로스, 또는 이들의 조합을 포함하는, 시스템.
- [0488] B44. 실시 형태 B42에 있어서, 당은 트레할로스를 포함하는, 시스템.
- [0489] B45. 실시 형태 B23 내지 실시 형태 B44 중 어느 한 실시 형태에 있어서, 비-이온성 계면활성제는 약 0.0005%(w/v) 내지 약 0.005%(w/v)인, 시스템.
- [0490] B46. 실시 형태 B23 내지 실시 형태 B45 중 어느 한 실시 형태에 있어서, 비-이온성 계면활성제는 약 0.00075%(w/v) 내지 약 0.0025%(w/v)인, 시스템.
- [0491] B47. 실시 형태 B23 내지 실시 형태 B46 중 어느 한 실시 형태에 있어서, 비-이온성 계면활성제는 약 0.001%(w/v)인, 시스템.
- [0492] B48. 실시 형태 B23 내지 실시 형태 B47 중 어느 한 실시 형태에 있어서, 비-이온성 계면활성제는 공중합체, 폴리옥시에틸렌 소르비탄 에스테르, 인지질, Brij 계면활성제, 및 소르비탄 에스테르, 또는 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는, 시스템.
- [0493] B49. 실시 형태 B48에 있어서, 폴리옥시에틸렌 소르비탄 에스테르는 (PS-20), 및 폴리소르베이트 80(PS-80), 또는 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는, 시스템.
- [0494] B50. 실시 형태 B48에 있어서, 공중합체는 폴록사머를 포함하는, 시스템.
- [0495] B51. 실시 형태 B50에 있어서, 폴록사머는 폴록사머 188(P188), 폴록사머 237(P237), 폴록사머 338(P338), 및 폴록사머 407(P407), 또는 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는, 시스템.
- [0496] B52. 실시 형태 B50에 있어서, 폴록사머는 폴록사머 188(P188)을 포함하는, 시스템.
- [0497] B53. 정제된 아데노-관련 바이러스(AAV) 입자, 완충제, 동결보호제, 및 비-이온성 계면활성제를 포함하며, 여기서
 - [0498] (a) 정제된 AAV 입자에는 불순물이 실질적으로 없고,
 - [0499] (b) 완충제 농도는 약 20 mM이고,
 - [0500] (c) 동결보호제는 약 5%(w/v) 트레할로스이고,
 - [0501] (d) 비-이온성 계면활성제는 약 0.001%(w/v) 폴록사머 188인 약제학적 조성물을 제조하고 얻기 위한 수단을 포함하는, 시스템.
- [0502] B54. 정제된 아데노-관련 바이러스(AAV) 입자, 약제학적으로 허용가능한 염, 완충제, 동결보호제, 및 비-이온성 계면활성제를 포함하며, 여기서
 - [0503] (a) 정제된 AAV 입자에는 불순물이 실질적으로 없고,
 - [0504] (b) 약제학적으로 허용가능한 염 농도는 약 10 mM 소듐 클로라이드이고,
 - [0505] (c) 완충제 농도는 약 20 mM이고,
 - [0506] (d) 동결보호제는 약 5%(w/v) 트레할로스이고,
 - [0507] (e) 비-이온성 계면활성제는 약 0.001%(w/v) 폴록사머 188인 약제학적 조성물을 제조하고 얻기 위한 수단을 포함하는, 시스템.
- [0508] B55. 정제된 아데노-관련 바이러스(AAV) 입자, 약제학적으로 허용가능한 염, 완충제, 동결보호제, 및 비-이온성 계면활성제를 포함하며, 여기서
 - [0509] (a) 정제된 AAV 입자에는 불순물이 실질적으로 없고,

- [0510] (b) 약제학적으로 허용가능한 염 농도는 약 25 mM 소듐 클로라이드이고,
- [0511] (c) 완충제 농도는 약 20 mM이고,
- [0512] (d) 동결보호제는 약 5%(w/v) 트레할로스이고,
- [0513] (e) 비-이온성 계면활성제는 약 0.001%(w/v) 폴록사머 188인 약제학적 조성물을 제조하고 얻기 위한 수단을 포함하는, 시스템.
- [0514] B56. 정제된 아데노-관련 바이러스(AAV) 입자, 약제학적으로 허용가능한 염, 완충제, 동결보호제, 및 비-이온성 계면활성제를 포함하며, 여기서
- [0515] (a) 정제된 AAV 입자에는 불순물이 실질적으로 없고,
- [0516] (b) 약제학적으로 허용가능한 염 농도는 약 50 mM 소듐 클로라이드이고,
- [0517] (c) 완충제 농도는 약 20 mM이고,
- [0518] (d) 동결보호제는 약 5%(w/v) 트레할로스이고,
- [0519] (e) 비-이온성 계면활성제는 약 0.001%(w/v) 폴록사머 188인 약제학적 조성물을 제조하고 얻기 위한 수단을 포함하는, 시스템.
- [0520] B57. 정제된 아데노-관련 바이러스(AAV) 입자, 약제학적으로 허용가능한 염, 완충제, 동결보호제, 및 비-이온성 계면활성제를 포함하며, 여기서
- [0521] (a) 정제된 AAV 입자에는 불순물이 실질적으로 없고,
- [0522] (b) 약제학적으로 허용가능한 염 농도는 약 100 mM 소듐 클로라이드이고,
- [0523] (c) 완충제 농도는 약 20 mM이고,
- [0524] (d) 동결보호제는 약 5%(w/v) 트레할로스이고,
- [0525] (e) 비-이온성 계면활성제는 약 0.001%(w/v) 폴록사머 188인 약제학적 조성물을 제조하고 얻기 위한 수단을 포함하는, 시스템.
- [0526] B58. 정제된 아데노-관련 바이러스(AAV) 입자, 약제학적으로 허용가능한 염, 완충제, 동결보호제, 및 비-이온성 계면활성제를 포함하며, 여기서
- [0527] (a) 정제된 AAV 입자에는 불순물이 실질적으로 없고,
- [0528] (b) 약제학적으로 허용가능한 염 농도는 약 125 mM 소듐 클로라이드이고,
- [0529] (c) 완충제 농도는 약 20 mM이고,
- [0530] (d) 동결보호제는 약 5%(w/v) 트레할로스이고,
- [0531] (e) 비-이온성 계면활성제는 약 0.001%(w/v) 폴록사머 188인 약제학적 조성물을 제조하고 얻기 위한 수단을 포함하는, 시스템.
- [0532] B59. 정제된 아데노-관련 바이러스(AAV) 입자, 약제학적으로 허용가능한 염, 완충제, 동결보호제, 및 비-이온성 계면활성제를 포함하며, 여기서
- [0533] (a) 정제된 AAV 입자에는 불순물이 실질적으로 없고,
- [0534] (b) 약제학적으로 허용가능한 염 농도는 약 150 mM 소듐 클로라이드이고,
- [0535] (c) 완충제 농도는 약 20 mM이고,
- [0536] (d) 동결보호제는 약 5%(w/v) 트레할로스이고,
- [0537] (e) 비-이온성 계면활성제는 약 0.001%(w/v) 폴록사머 188인 약제학적 조성물을 제조하고 얻기 위한 수단을 포함하는, 시스템.
- [0538] B60. 정제된 아데노-관련 바이러스(AAV) 입자, 약제학적으로 허용가능한 염, 완충제, 동결보호제, 및 비-이온성 계면활성제를 포함하며, 여기서

- [0539] (a) 정제된 AAV 입자에는 불순물이 실질적으로 없고,
- [0540] (b) 약제학적으로 허용가능한 염 농도는 약 200 mM 소듐 클로라이드이고,
- [0541] (c) 완충제 농도는 약 20 mM이고,
- [0542] (d) 동결보호제는 약 5%(w/v) 트레할로스이고,
- [0543] (e) 비-이온성 계면활성제는 약 0.001%(w/v) 폴록사머 188인 약제학적 조성물을 제조하고 얻기 위한 수단을 포함하는, 시스템.
- [0544] B61. 실시 형태 B53 내지 실시 형태 B60 중 어느 한 실시 형태에 있어서, 완충제는 트리스 HCl을 포함하는, 시스템.
- [0545] B62. 실시 형태 B53 내지 실시 형태 B60 중 어느 한 실시 형태에 있어서, 완충제는 L-히스티딘 HCl을 포함하는, 시스템.
- [0546] B63. 실시 형태 B23 내지 실시 형태 B62 중 어느 한 실시 형태에 있어서, 약제학적 조성물 pH는 약 4.0 내지 약 9.0인, 시스템.
- [0547] B64. 실시 형태 B23 내지 실시 형태 B63 중 어느 한 실시 형태에 있어서, 약제학적 조성물 pH는 약 7.0 내지 약 8.0인, 시스템.
- [0548] B65. 실시 형태 B23 내지 실시 형태 B64 중 어느 한 실시 형태에 있어서, 약제학적 조성물 pH는 약 7.3 내지 약 7.7인, 시스템.
- [0549] B66. 실시 형태 B23 내지 실시 형태 B65 중 어느 한 실시 형태에 있어서, 약제학적 조성물 pH는 약 7.5인, 시스템.
- [0550] B67. 실시 형태 B23 내지 실시 형태 B66 중 어느 한 실시 형태에 있어서, AAV는 AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, 및 AAV10으로 이루어진 군으로부터 선택되는, 시스템.
- [0551] B68. 실시 형태 B23 내지 실시 형태 B67 중 어느 한 실시 형태에 있어서, AAV는 재조합 AAV(rAAV)를 포함하는, 시스템.
- [0552] B69. 실시 형태 B23 내지 실시 형태 B68 중 어느 한 실시 형태에 있어서, 정제된 AAV 입자 역가는 약 1×10^{10} 바이러스 게놈/밀리리터(vg/mL) 이상인, 시스템.
- [0553] B70. 실시 형태 B23 내지 실시 형태 B68 중 어느 한 실시 형태에 있어서, 정제된 AAV 입자 역가는 약 1×10^{11} 바이러스 게놈/밀리리터(vg/mL) 이상인, 시스템.
- [0554] B71. 실시 형태 B23 내지 실시 형태 B68 중 어느 한 실시 형태에 있어서, 정제된 AAV 입자 역가는 약 1×10^{12} 바이러스 게놈/밀리리터(vg/mL) 이상인, 시스템.
- [0555] B72. 실시 형태 B23 내지 실시 형태 B68 중 어느 한 실시 형태에 있어서, 정제된 AAV 입자 역가는 약 1×10^{13} 바이러스 게놈/밀리리터(vg/mL) 이상인, 시스템.
- [0556] B73. 실시 형태 B23 내지 실시 형태 B68 중 어느 한 실시 형태에 있어서, 정제된 AAV 입자 역가는 약 1×10^{14} 바이러스 게놈/밀리리터(vg/mL) 이상인, 시스템.
- [0557] B74. 실시 형태 B23 내지 실시 형태 B68 중 어느 한 실시 형태에 있어서, 정제된 AAV 입자 역가는 약 1×10^{15} 바이러스 게놈/밀리리터(vg/mL) 이상인, 시스템.
- [0558] B75. 실시 형태 B23 내지 실시 형태 B74 중 어느 한 실시 형태에 있어서, 불순물은 공정-관련 불순물, 생성물-관련 불순물, 또는 이들의 조합을 포함하는, 시스템.
- [0559] B76. 실시 형태 B75에 있어서, 공정-관련 불순물은 잔류 숙주-세포 성분, 잔류 바이러스 생성 성분, 잔류 세포 배양 성분, 잔류 정제 성분, 또는 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는, 시스템.
- [0560] B77. 실시 형태 B76에 있어서, 잔류 숙주-세포 성분은 숙주-세포 단백질, 숙주-세포 DNA, 숙주-세포 RNA, 또는

이들의 조합을 포함하는, 시스템.

- [0561] B78. 실시 형태 B77에 있어서, 숙주-세포 DNA는 바이러스 외, 염색질-관련 DNA를 포함하는, 시스템.
- [0562] B79. 실시 형태 B78에 있어서, 잔류 바이러스 생성 성분은 플라스미드 DNA, 헬퍼 바이러스, 또는 이들의 조합을 포함하는, 시스템.
- [0563] B80. 실시 형태 B76에 있어서, 잔류 세포 배양 성분은 항생제, 보충제, 유도 인자, 성장 인자, 또는 이들의 조합을 포함하는, 시스템.
- [0564] B81. 실시 형태 B76에 있어서, 잔류 정제 성분은 완충제, 무기 염, 효소, 세제, 배지, 또는 이들의 조합을 포함하는, 시스템.
- [0565] B82. 실시 형태 B75에 있어서, 생성물-관련 불순물은 빈 캡시드, 응집된 AAV 입자, 분해된 AAV 입자, 또는 이들의 조합을 포함하는, 시스템.
- [0566] B83. 실시 형태 B82에 있어서, 정제된 AAV 입자는 적재되거나 부분적으로 적재된 캡시드를 포함하고, 생성물-관련 불순물은 빈 캡시드를 포함하는, 시스템.
- [0567] B84. 실시 형태 B82에 있어서, 정제된 AAV 입자는 적재된 캡시드를 포함하고, 생성물-관련 불순물은 빈 캡시드를 포함하는, 시스템.
- [0568] B85. 실시 형태 B82에 있어서, 정제된 AAV 입자는 적재된 캡시드로 본질적으로 이루어지고, 생성물-관련 불순물은 빈 캡시드를 포함하는, 시스템.
- [0569] B86. 실시 형태 B75에 있어서, 생성물-관련 불순물은 응집된 AAV 입자, 분해된 AAV 입자, 또는 이들의 조합을 포함하는, 시스템.
- [0570] B87. 실시 형태 B86에 있어서, 정제된 AAV 입자는 빈 캡시드를 포함하는, 시스템.
- [0571] B88. 실시 형태 B86에 있어서, 정제된 AAV 입자는 빈 캡시드로 본질적으로 이루어지는, 시스템.
- [0572] B89. 실시 형태 B75에 있어서, 생성물-관련 불순물은 응집된 AAV 입자 또는 이들의 조합을 포함하는, 시스템.
- [0573] B90. 실시 형태 B23 내지 실시 형태 B89 중 어느 한 실시 형태에 있어서, 약제학적 조성물은 액체 상태인, 시스템.
- [0574] B91. 실시 형태 B23 내지 실시 형태 B89 중 어느 한 실시 형태에 있어서, 약제학적 조성물은 고체 또는 반-고체 상태인, 시스템.
- [0575] B92. 실시 형태 B23 내지 실시 형태 B91 중 어느 한 실시 형태에 있어서, 약제학적 조성물은 정제된 AAV 입자의 안정성을 유지하거나 향상시키는, 시스템.
- [0576] B93. 실시 형태 B23 내지 실시 형태 B91 중 어느 한 실시 형태에 있어서, 약제학적 조성물은 정제된 AAV 입자의 응집을 감소시키거나 방지하는, 시스템.
- [0577] B94. 실시 형태 B23 내지 실시 형태 B91 중 어느 한 실시 형태에 있어서, 약제학적 조성물은
- [0578] (a) 정제된 AAV 입자의 안정성을 유지하거나 향상시키고;
- [0579] (b) 정제된 AAV 입자의 응집을 감소시키거나 방지하는, 시스템.
- [0580] B95. 실시 형태 B92 또는 실시 형태 B94에 있어서, 정제된 AAV 입자의 안정성은 1회 이상의 동결/해동 주기 후에 유지되거나 향상되는, 시스템.
- [0581] B96. 실시 형태 B92 또는 실시 형태 B94에 있어서, 정제된 AAV 입자의 안정성은 3회 이상의 동결/해동 주기 후에 유지되거나 향상되는, 시스템.
- [0582] B97. 실시 형태 B93 또는 실시 형태 B94에 있어서, AAV 입자의 응집은 1회 이상의 동결/해동 주기 후에 5% 미만인, 시스템.
- [0583] B98. 실시 형태 B93 또는 실시 형태 B94에 있어서, AAV 입자의 응집은 1회 이상의 동결/해동 주기 후에 2% 미만인, 시스템.
- [0584] B99. 실시 형태 B93 또는 실시 형태 B94에 있어서, AAV 입자의 응집은 1회 이상의 동결/해동 주기 후에 1% 미만

인, 시스템.

- [0585] B100. 실시 형태 B93 또는 실시 형태 B94에 있어서, AAV 입자의 응집은 3회 이상의 동결/해동 주기 후에 5% 미만인, 시스템.
- [0586] B101. 실시 형태 B93 또는 실시 형태 B94에 있어서, AAV 입자의 응집은 3회 이상의 동결/해동 주기 후에 2% 미만인, 시스템.
- [0587] B102. 실시 형태 B93 또는 실시 형태 B94에 있어서, AAV 입자의 응집은 3회 이상의 동결/해동 주기 후에 1% 미만인, 시스템.
- [0588] B103. 실시 형태 B93 내지 실시 형태 B102 중 어느 한 실시 형태에 있어서, AAV 입자의 안정성 및/또는 응집은 동적 광 산란(DLS), 분석용 초원심분리(AUC), 광학 현미경, 크기 배제 크로마토그래피(SEC), 투과 전자 현미경, 및 다중-각 정적 광 산란을 이용한 장 흐름 분획법(FFF-MALS)으로 이루어진 군으로부터 선택된 검정에 의해 측정되는, 시스템.
- [0589] B104. 실시 형태 B23 내지 실시 형태 B103 중 어느 한 실시 형태에 있어서, 정제된 AAV 입자는
- [0590] (a) AAV 입자를 포함하는 상청액을 뉴클레아제를 포함하는 조성물과 접촉시키는 단계; 및
- [0591] (b) 입자를 정제하는 단계를 포함하는 방법에 의해 얻어지는, 시스템.
- [0592] B105. 실시 형태 B104에 있어서, 뉴클레아제는 Benzonase, 또는 Benzonase® 및 염색질-DNA 뉴클레아제를 포함하는, 시스템.
- [0593] B106. 실시 형태 B105에 있어서, 염색질-DNA 뉴클레아제는 MNase를 포함하는, 시스템.
- [0594] 본 발명의 특정 실시 형태가 본 명세서에 기재되어 있다. 전술한 설명을 읽을 때, 개시된 실시 형태들의 변형이 당업자에게 명백해질 수 있으며, 숙련자는 적절한 경우에 그러한 변형을 사용할 수 있을 것으로 예상된다. 따라서, 본 발명은 본 명세서에 구체적으로 기재된 것과 다른 방식으로 실시될 수 있으며, 본 발명은 적용가능한 법에 의해 허용되는 한 본 명세서에 첨부된 청구범위에 언급된 발명 요지의 모든 변형 및 등가물을 포함하는 것으로 의도된다. 더욱이, 본 명세서에서 달리 지시되거나 문맥에 의해 달리 명확하게 모순되지 않는 한, 이의 모든 가능한 변형 내의 전술된 요소들의 임의의 조합이 본 발명에 의해 포함된다. 본 발명의 다수의 실시 형태가 기재되어 있다. 그럼에도 불구하고, 본 발명의 사상 및 범주로부터 벗어남이 없이 다양한 변형들이 이루어질 수 있다는 것은 이해될 것이다. 따라서, 실시예 섹션에서의 설명은 청구범위에 기재된 본 발명의 범주를 예시하지만 이를 제한하고자 하지 않는다.
- [0595] **실시예**
- [0596] 본 출원의 하기 실시예는 본 출원의 성질을 추가로 예시하기 위한 것이다. 당업자는 광범위한 본 발명의 개념으로부터 벗어나지 않고서 전술된 실시 형태에 변경이 이루어질 수 있음을 인식할 것이다. 따라서, 본 발명은 개시된 특정 실시 형태로 제한되는 것이 아니라, 본 명세서에 의해 한정되는 바와 같은 본 발명의 사상 및 범주 내의 변형들을 포함하는 것으로 의도됨이 이해된다. 하기 실시예에서는 대표적인 AAV 종으로서 AAV2/8 입자를 사용하였지만, 제형은 임의의 AAV 입자에 적합하다는 것이 이해된다.
- [0597] **실시예 I: 저이온 강도 제형 내의 정제된 AAV 입자는 동결/해동 후에 물리적 안정성을 나타냈다**
- [0598] 본 실시예는 200 mM 이하의 염 농도를 갖는 제형 내의 정제된 AAV 입자가 동결/해동 후에 물리적 안정성을 나타냈음을 확증한다.
- [0599] 낮은 염 농도를 갖는 제형이 1회 이상의 동결/해동 후에 정제된 AAV 입자의 물리적 안정성을 유지할 수 있었는지 여부를 결정하기 위해, 정제된 AAV2/8 입자를 대표적인 AAV 입자 종으로 사용하고 표 1에 기재된 제형 중 하나로 제형화하였다.

[0600] [표 1]

제형 조성

	제형 #1	제형 #2	제형 #3	제형 #4
농도(vg/mL)	>1E13	>1E13	>1E13	>1E13
완충제(mM), pH	20 mM 트리스-HCl pH 7.5	20 mM 트리스-HCl pH 7.5	20 mM 트리스-HCl pH 7.5	20 mM 트리스-HCl pH 7.5
염(mM)	10 mM NaCl	100 mM NaCl	150 mM NaCl	200 mM NaCl
동결보호제(% w/v)	5% 트레할로스	5% 트레할로스	5% 트레할로스	5% 트레할로스
계면활성제(% w/v)	0.001% P188	0.001% P188	0.001% P188	0.001% P188

[0601]

[0602]

간략하게는, 생성 및 정제 후에, AAV 입자를 제형 #1, 제형 #2, 제형 #3, 또는 제형 #4로 제형화하였다. 이어서 제형화 후에 동적 광 산란(DLS)을 사용하여 AAV 입자의 물리적 특성을 특성화하였다. 4개의 제형에 대한 대표적인 DLS 데이터를 도 1a 내지 도 1d에 나타낸다. 4개의 제형 각각에 대한 AAV 입자의 유체역학적 직경의 측정에 의해 4개의 제형 모두가 초기 제형화 후에 응집이 거의 없이 균질한 입자 크기를 유발했음이 밝혀졌다.

[0603]

그 다음에, 물리적 안정성의 평가를 위해 제형을 동결시키고 1회의 동결/해동 주기를 적용하였다(도 2a 내지 도 2d). 1회의 동결/해동 주기 후에 4개의 대표적인 제형에 대해 DLS에 의해 입자 크기 데이터를 측정하였으며, 동결전 DLS에 비해 모든 제형에 걸쳐 견고한 물리적 안정성이 관찰되었다. 구체적으로, 제형 #1, 제형 #2, 제형 #3, 또는 제형 #4로 제형화된 AAV 입자는 단분산 피크(monodispersed peak)를 가졌으며, 이는 응집이 거의 없음을 나타낸다. 1 nm에서의 피크는 통상의 부형제 피크이지만, AAV의 응집과는 관련되지 않는다.

[0604]

3회의 동결/해동 주기 후에 유사한 결과가 관찰되었다(도 3a 내지 도 3d). 구체적으로, 3회의 동결/해동 주기의 DLS 결과는 제형 #2 및 제형 #3에서 매우 작은 테일링을 갖는 단분산 피크를 도실했다.

[0605]

종합하면, 본 실시예는 저이온 강도(예를 들어, 200 mM 이하의 염)를 갖는 제형 내의 AAV 입자가 심지어 다회의 동결/해동 주기 후에도 견고한 물리적 안정성을 나타냈음을 입증한다.

[0606]

실시예 II: AAV 입자 내의 불순물 및 빈 캡시드의 검출

[0607]

본 실시예는, 생성물 및 후-생성물 분획에서 크로마토그래피 및 280 nm(단백질) 및 260 nm(DNA/RNA)에서의 UV 흡광도 스펙트럼을 사용하여, 정제된 AAV 입자 내의 불순물을 검출할 뿐만 아니라 적재된 캡시드와 빈 캡시드를 구별할 수 있다는 것을 확증한다. 또한, MNase 처리를 포함하는 예시적인 방법을 사용하여 본 실시예는 정제된 AAV 입자로부터 불순물 및 빈 캡시드(바람직하지 않은 경우)의 양이 실질적으로 감소될 수 있음을 예시한다.

[0608]

AAV 입자 내의 불순물, 예컨대 바이러스 외, 염색질-관련 AAV 입자는 바람직하지 않은 생성물이다. 이러한 불순물은 정제된 생성물의 가시적 침전을 야기할 수 있으며, 이는 임의의 제형 연구에 문제가 될 수 있다. 더욱이, 증가된 염색질/DNA 결합 단백질은 바람직하지 않은 오염물이며, 이들 둘 모두는 숙주 세포 단백질/DNA 오염을 증가시킬 수 있다. 추가로, 소정의 설정에서는 빈 캡시드가 또한 바람직하지 않을 수 있다. 본 연구는 염색질-DNA 뉴클레아제, MNase가 정제 중에 첨가될 수 있고, AAV 입자의 개선된 정제를 유발한다는 것을 입증하였다.

[0609]

예시적인 AAV 입자 종으로서 재조합 AAV2/8 입자가 생성되었다. MNase 처리의 존재 또는 부재 하에 현탁 배양 및 Bia Separations CIM Disk 상의 음이온 교환 크로마토그래피(0.34 mL 컬럼 부피, 1.3 μ m 기공 크기)를 사용하는 정제를 포함한 예시적인 방법을 사용하여 AAV 입자를 생성하였다. 생성물 및 후-생성물 분획에서 DNA(260 nm에서의 흡광도) 및 단백질(280 nm에서의 흡광도)을 측정하였다. 결과는, MNase 처리 없이 정제된 샘플에서, 후-생성물 분획 내에 다량의 DNA 및 단백질이 존재하였으며(도 4a), 이는 MNase 처리에 의해 실질적으로 감소되었음(도 4b)을 나타냈다. 구체적으로, 60 U/mL의 MNase 처리는 큰 260 nm(DNA/RNA) 흡광도 피크 및 후-생성물 피크의 280 nm(단백질) 흡광도 피크 둘 모두를 감소시켰다(도 4b).

[0610]

MNase 처리의 존재(점선) 또는 부재(실선) 하에 현탁 배양으로부터 생성된 rAAV8 입자의 친화도 교환 크로마토그램의 중첩에 의한 DNA/RNA(260 nm)(도 5a) 및 단백질(280 nm)(도 5b)에 대한 후-생성물 피크 높이의 직접 비교는, 염색질 분해를 위한 MNase 처리를 포함하는 AAV 입자 정제를 위한 예시적인 방법이 AAV 입자의 정제를 향상시키고, 잔류 숙주-세포 단백질 오염을 검출 불가능한 수준으로 유의하게 감소시켰다는 추가의 증거를 제공하였다(각각 도 5a 및 도 5b). 특히, 핵산 스펙트럼(260 nm)으로 관찰된 후-생성물 피크 높이의 감소는 상당히 유의미하며, 피크 높이 및 면적에서 90% 초과로 감소한 것으로 추정되었다(도 5a). 또한, 단백질 스펙트럼(280 nm)에서 후-생성물 피크 높이의 감소가 또한 관찰되었다(도 5b).

[0611] 따라서, 상기 기재된 결과는, 생성물 및 후-생성물 분획에서 크로마토그래피를 사용하고 280 nm(단백질) 및 260 nm(DNA/RNA)에서 UV 흡광도 스펙트럼을 측정함으로써 정제된 AAV 입자 내의 불순물을 검출할 수 있다는 것을 입증하였다. 또한, AAV 입자를 MNase로 처리하는 단계와 같은 정제 기술을 사용하여 정제된 AAV 입자 내의 불순물의 양을 실질적으로 감소시킬 수 있다.

[0612] **실시예 III: AAV 입자 내의 생성물-관련 불순물의 감소**

[0613] 본 실시예는 생성물-관련 불순물(예를 들어, 응집된 AAV 입자)이 AAV 입자에서 현미경에 의해 측정될 수 있으며, MNase 처리를 포함하는 예시적인 방법이 생성물-관련 불순물을 감소시킬 수 있음을 확증한다.

[0614] 정제된 AAV 입자에 생성물-관련 불순물, 예컨대 응집된 AAV 입자 및 침전된 AAV 입자가 실질적으로 없을 수 있음을 입증하기 위해, 상이한 정제 기술을 사용하여 샘플로부터 거시적 영상 및 현미경 영상을 얻었다. 예시적인 기술은 MNase 처리의 존재 또는 부재 하의 AAV 입자의 정제를 포함하였다. 결과는 가시적 참여가 실질적으로 없도록 AAV 입자가 생성될 수 있었음을 입증하였다.

[0615] 예를 들어, 후-생성물 피크 분획의 거시적 검사는, ExpiFectamine™ 293 형질감염 키트 인헨서(Thermo Fisher Scientific)를 사용하는 Expi293F™ 세포(Thermo Fisher Scientific) 현탁액에서 생성된 MNase 처리되지 않은 rAAV8 입자, 또는 인헨서 없이 Expi293F™ 세포 현탁액에서 생성된 MNase 처리되지 않은 rAAV8 입자가 거시적 검사 하에 가시적 침전을 가졌음을 나타냈다(도 6). 반면에, 인헨서 없이 Expi293F™ 세포 현탁액에서 생성되고 25℃에서 30 분 동안 60 U/mL MNase로 분해된 rAAV8 입자는 가시적 침전이 없었다(도 6).

[0616] 이러한 데이터는 생성물-관련 불순물, 응집된 AAV 입자, 및 침전된 AAV 입자가 실질적으로 없도록 AAV 입자가 정제되었음을 입증하였다. 추가로, 결과는 AAV 입자 불순물이 현미경에 의해 가시화될 수 있음을 예시하였다.

[0617] **실시예 IV: 고역가의 정제된 AAV 입자의 생성**

[0618] 본 실시예는 고역가의 정제된 AAV 입자가 생성되고 측정될 수 있음을 확증한다.

[0619] 3가지의 예시적인 정제 기술을 사용하여 AAV 입자를 정제하고, 바이러스 역가를 측정하였다. 간략하게는, 예시적인 AAV 입자로서 AAV2/8 입자를 제조하고, (1) MNase 없음; (2) MNase; 또는 (3) 인헨서를 포함한 예시적인 정제 기술을 사용하여 정제하였다. 게놈 카피/mL(GC/mL) 역가(도 7a), 게놈 카피/세포(GC/세포)(도 7b), 및 총 게놈 카피(도 7c)의 정량화에 의해 고역가의 정제된 AAV 입자가 생성될 수 있었음이 밝혀졌다.

[0620] 또한, 고역가의 정제된 AAV 벡터는 또한 MNase의 존재 또는 부재 하에 처리된 샘플로부터 생성되고 (1) 고/저 pH 용리; (2) 시트레이트 용리, 또는 (3) 저 pH 용리를 사용하여 용리시켰다. 도 8b에 나타난 바와 같이, 3가지의 상이한 용리 완충제(즉, 시트레이트, 저 pH, 및 저/고 pH) 각각에 대해 MNase 처리된 샘플에서 1×10^{11} 내지 1×10^{14} 범위의 총 게놈 카피(도 8b, 표 2)가 일관되게 관찰되었다.

[0621] [표 2]

총 게놈 카피

	MNase 없음	MNase
시트레이트	$1.09e^{12}$	$3.27e^{12}$
저 pH	$8.48e^{11}$	$6.22e^{12}$
저/고 pH	$3.45e^{11}$	$2.84e^{13}$

[0623] 종합하면, 이러한 데이터는, 높은 바이러스 역가를 생성하기 위해 AAV 입자를 정제할 수 있으며, 바이러스 역가는 측정될 수 있다는 것을 입증한다.

[0624] **실시예 V: 고 pH 세척은 AAV 입자의 순도를 개선하였다**

[0625] 본 실시예는 AAV 입자의 친화성 교환 크로마토그래피 중에 고 pH 세척이 불순물의 존재를 감소시킬 수 있었음을 확증한다.

[0626] 불순물을 제거할 수 있는 AAV 입자를 정제하기 위한 예시적인 조건을 결정하기 위해, AKTA 시스템을 사용하고, 정제 중의 다양한 세척 및/또는 효소 처리 조건을 샘플에 적용하였다. 상이한 정제 조건이 표 3에 요약되어 있다.

[0627] [표 3]

정제 조건

조건	친화도				음이온 교환제
	세정 pH	Benzonase	MNase	용리	용리
1	n/a	아니오	아니오	시트레이트, pH 2.5	20 mM BTP, pH 10.2; 10 mM – 200 mM NaCl 선형 구배
2	n/a	예	아니오	시트레이트, pH 2.5	
3	n/a	예	예	H ₃ PO ₄ , pH 1.5	
4	pH 9.5	예	예	시트레이트, pH 2.5	
5	pH 10.2	예	예	H ₃ PO ₄ , pH 1.5	
6	pH 10.3	예	예	H ₃ PO ₄ , pH 1.5	
7	pH 10.3	예	아니오	H ₃ PO ₄ , pH 1.5	
8	pH 10.9	예	예	H ₃ PO ₄ , pH 1.5	
9	pH 10.4	예	예	H ₃ PO ₄ , pH 1.5	
10	pH 10.4	예	예	H ₃ PO ₄ , pH 1.5	20 mM 트리스 pH 9.0; 0-300 mM (C ₂ H ₅) NCl 선형 구배

BTP: 비스-트리스-프로판; NaCl: 염화나트륨; H₃PO₄: 인산

[0628]

[0629]

간략하게는, 대량 수확 및 benzonase 처리 후에, 조 샘플에 친화성 크로마토그래피를 적용하였다. 표 3에 나타난 바와 같이, 특이적 조건(즉, 조건 4-10) 하에, 친화성 컬럼을 pH 9.5 내지 pH 10.9 범위의 고 pH 완충제로 세척하였다. 또한, 표 3에 나타난 바와 같이, 샘플을 benzonase 또는 MNase로 처리하지 않거나(조건 1), benzonase 단독으로 컬럼 상 처리하거나(조건 2 및 7), benzonase 및 MNase로 컬럼 상 처리하였다(조건 3-5, 및 8-10). 친화성 컬럼으로부터의 용리를 시트레이트, pH 2.5(조건 1, 2, 및 4), 또는 인산(H₃PO₄), pH 1.5(조건 3 및 5-10)를 사용하여 수행하였다.

[0630]

친화성 크로마토그래피 정제 후, 이어서 샘플을 CIM QA(4차 아민) 모노리스 컬럼을 사용하여 음이온-교환 크로마토그래피로 폴리싱하였다. 그 후, 샘플을 10 mM 내지 200 mM NaCl 선형 구배를 사용하여 용리시키고 20 mM BTP, pH 10.2(조건 1-9)에서 중화시키거나, 0 내지 300 mM (C₂H₅)NCl 선형 구배를 사용하여 용리시키고 20 mM 트리스 pH 9.0(조건 10)에서 중화시켰다.

[0631]

정제된 샘플을 수집하고 소듐 도데실 설페이트-폴리아크릴아미드 겔 전기영동(SDS-PAGE)에 이어서 은 염색을 적용하여 정제된 AAV 입자 내에 불순물이 존재하는지 여부를 검출하였다. 상이한 예시적인 정제 조건의 비교는, benzonase 및 MNase 처리와 조합될 경우에, pH 10.9 미만의 고 pH 세척 조건을 포함한 예시적인 정제 공정은 고도로 순수한 AAV 샘플을 유발하였음을 나타냈다(도 9a). 또한, 정제된 AAV 샘플의 DNA 아가로스 겔 전기영동은 AAV 내에 함유된 ITR-전이유전자의 존재를 나타냈다(도 9b).

[0632]

이러한 결과는 친화성 크로마토그래피 정제 중의 고 pH 세척(약 pH 9.5 내지 pH 10.4)을 포함하는 예시적인 정제 공정이 정제된 AAV의 순도를 개선할 수 있었음을 나타냈다. 추가로, 결과는 겔 전기영동 및 은 염색을 포함하는 예시적인 검정에 의해 불순물이 측정될 수 있음을 입증한다.

[0633]

실시예 VI: 불순물이 거의 없는 AAV 입자의 측정

[0634]

본 실시예는, 동적 광 산란(DLS)을 사용하여 AAV 입자 불순물을 측정할 수 있으며, 단백질 응집 Tagg가 바이러스의 용융과 정렬되는 온도의 결정을 위해 시차 주사 형광측정법(DSF)을 사용할 수 있다는 것을 확증한다.

[0635]

AAV 혈청형 식별의 결정 요인으로서 열 안정성은 당업계에 공지되어 있으며, 이는 또한 AAV 입자 샘플에서 불순물을 검출하는 데 사용될 수 있다. 예를 들어, 제거된 불순물로서, 단백질 응집(Tagg)의 개시는 바이러스의 용융 온도(T_m)과 일치한다.

[0636]

정제 후에 AAV 입자 내에 불순물이 존재하였는지 여부를 결정하기 위해 다양한 정제 방법을 수행하였으며, 소정의 범위의 온도에 걸쳐 DLS에 의해 샘플을 측정하여 T_m 및 Tagg를 결정하였다. 상기 기재된 이전의 결과와 일관되게, MNase를 포함하는 예시적인 방법은 AAV 입자로부터의 불순물의 제거를 개선할 수 있었다. 구체적으로, benzonase 또는 MNase로 처리되지 않은 샘플에서, Tagg 및 T_m은 10°C 초과만큼 상이한 것으로 확인되었다(도

10a). benzonase의 첨가는 불순물의 제거를 개선하였지만, benzonase 및 MNase는 함께 Tagg 및 Tm 정렬의 개선을 나타냈다(도 10b 및 도 10c).

[0637] 유사하게, MNase 및 고 pH 용리 조건을 포함하는 추가의 예시적인 정제 기술은 Tagg 및 Tm 정렬을 갖는 정제된 AAV 입자가 생성될 수 있었음을 나타냈다. 구체적으로, benzonase 및 MNase로 처리되고 인산(pH 10.3)으로 용리된 샘플(도 10e)에서 Tagg 및 Tm 정렬은 benzonase 단독으로 처리되고 인산(pH 10.3)으로 용리된 샘플(도 10d)에 비교하여 향상되었다.

[0638] 종합하면, 이러한 결과는 정제된 AAV 입자 내의 불순물이 실질적으로 제거될 수 있었으며, DLS 및 DSF가 AAV 입자 불순물을 측정하기 위한 예시적인 검정임을 입증하였다.

[0639] **실시예 VII: 정제된 AAV 입자 내의 공정-관련 불순물의 검출**

[0640] 본 실시예는, 공정 관련 불순물, 예컨대 숙주-세포 DNA 및 숙주-세포 단백질이 실질적으로 없도록 AAV 입자가 정제될 수 있음을 확증한다.

[0641] 음이온-교환(AEX) 정제 후에 정제된 AAV 입자 샘플에 임의의 잔류 숙주-세포 DNA가 존재하는지 여부를 결정하기 위해, AlphaLISA 검정을 수행하여 숙주-세포 DNA를 분석물로서 검출하였다. AlphaLISA 비드 기반 기술은 PerkinElmer의 증폭된 발광 근접 균질 검정에 의존하고, 숙주 세포 DNA를 검출하기 위해 발광 산소-채널링 화학을 사용한다(문헌[Beaudet *et al.*, *Nat Methods* 5, an8-an9 (2008)] 참조).

[0642] AEX 정제 후에 잔류 숙주-세포 DNA의 분석을 6개의 상이한 조건 하에 제조된 샘플에서 AlphaLISA에 의해 측정하였다: (1) benzonase 또는 MNase를 이용하지 않은 정제("효소 없음"); (2) benzonase 및 시트레이트 용리를 이용한 정제("B, 시트레이트(친화성)"); (3) Benzonase 및 시트레이트 용리를 이용한 정제("B, 시트레이트"); (4) Benzonase, MNase, 및 인산 용리를 이용한 정제("B, M, Phos"); (5) benzonase, 고 pH(pH 10.3) 세척, 및 인산 용리를 이용한 정제("B, pH 10.3, Phos"); 및 (6) benzonase, MNase, 및 인산 용리를 이용한 정제("B, M, pH 10.3, phos"). 존재하는 숙주 세포 DNA의 농도 수준을 외삽하기 위해 표준 곡선을 생성하였다.

[0643] 결과는, MNase를 포함한 예시적인 정제 기술에서, AAV 입자는 숙주-세포 DNA가 실질적으로 없도록 정제될 수 있었음을 나타냈다(도 11a 및 도 11b). 예를 들어, benzonase, MNase, 및 인산 용리를 이용한 정제("B, M, pH 10.3, Phos")는 거의 검출 불가능한 수준의 숙주-세포 DNA를 유발하였다(도 11a 및 도 11b).

[0644] 이러한 결과는 공정-관련 불순물, 예컨대 숙주-세포 DNA가 정제된 AAV 입자로부터 실질적으로 제거될 수 있었음을 입증하였다.

[0645] **실시예 VIII: MNase 처리는 정제 공정을 개선한다**

[0646] 본 실시예는, MNase를 포함하는 본 명세서에 기재된 예시적인 AAV 정제 방법이 선행 기술에 비해 개선을 나타내며, 실질적으로 더 적은 불순물을 갖는 정제된 AAV 입자를 생성할 수 있음을 예시한다.

[0647] 음이온-교환 및 benzonase를 사용하는 AAV 입자의 현재 정제 방법이 기재되어 있다(문헌[Wang C, *et al.* *Mol Ther Methods Clin Dev.* 2019;15:257-263] 참조). 그러나, MNase는 이러한 방법에서 사용되지 않는다.

[0648] MNase 처리를 포함하는 본 명세서에 기재된 정제 방법이 현재의 정제 방법보다 더 양호하게 수행할 수 있는지를 여부를 결정하기 위해, MNase 처리 프로토콜(프로토콜#1)을 Wang 등의 방법(프로토콜#2)을 사용하여 얻은 분획과 비교하였다.

[0649] 간략하게는, Wang 등에 따른 정제는 친화성 수지에 의해 수행되었다. 컬럼에 로딩하기 전에, 대량 AAV 풀을 37 °C에서 1 시간 동안 50 U/mL benzonase로 처리하고 15 분 동안 10,000 × g에서 원심분리에 의해 청정화한 후, 1.2 mm 필터 및 0.45 mm 필터를 통해 순차적으로 여과하였다. AAV를 저 pH 완충액을 갖는 컬럼으로부터 용리시켰다. 동시에, MNase 처리를 포함하는, 본 명세서에 기재된 방법에 따라 상이한 샘플 세트를 정제하였다.

[0650] 프로토콜 #1과 프로토콜 #2 사이의 비교에 의해, 은 염색에 의해 측정되는 바와 같이, MNase 처리가 AAV 입자 샘플 내에 존재하는 불순물의 양을 크게 감소시킬 수 있었음이 밝혀졌다(도 12).

[0651] 따라서, 본 실시예는 MNase를 사용하는 본 명세서에 제공된 정제 방법이 AAV 정제에 사용된 방법에 비해 개선을 나타냄을 입증한다.

[0652] **실시예 IX: 대안적인 제형화 조건 하에 정제된 AAV의 개선된 안정성**

[0653] 본 실시예는, 본 명세서에 제공된 제형이 동결/해동 스트레스 및 -80 °C에서의 연장된 저장에 걸쳐 개선된 안정

성을 갖는다는 것을 확증한다.

[0654] 간략하게는, AAV8(GFP)을 예시적인 AAV 입자로서 사용하였고, 본 명세서에 기재된 방법에 따라 정제하였으며, 이는 MNase 처리, 친화도 크로마토그래피, 및 음이온-교환 크로마토그래피를 포함하였다. 생성 및 정제 후에, 4.6×10^{13} VG/mL AAV 입자를 제형 #2(20 mM 트리스, 100 mM NaCl, 5% 트레할로스, 0.001% 폴록사머-188, pH 7.5)의 예시적인 완충제 중에 제형화하였다. 이어서, AAV8(GFP) 입자 제형을 2.0×10^{13} VG/mL AAV 입자의 최종 농도로 제형 #2 완충제에 희석하였다. 샘플을 (a) 1.2 mL 표지된 동결-바이알; (b) DLS 바이알 내로 0.1 mL; 및 (c) SEC-FLD 바이알 내로 0.15 mL로 분취하고, -80°C 냉동기에 넣었다.

[0655] 이어서 동결/해동 및 -80°C 에서의 연장된 저장 전 및 후에 동적 광 산란(DLS) 및 형광 검출에 연결된 크기-배제 크로마토그래피(SEC-FLD)를 사용하여 제형 내의 AAV 입자의 물리적 특성을 특성화하였다. 샘플을 -80°C 냉동기로부터 수거하고 실온에서 30 분 초과 동안 해동되도록 방치함으로써 해동을 수행하였다. 풀링된 SEC 샘플을 해동 후에 재동결시켰다.

[0656] DLS 및 SEC-FLD가 측정된 시점의 요약은 각각 표 4 및 표 5에 제공되어 있다.

[0657] [표 4]

DLS 샘플 요약

샘플	온도($^{\circ}\text{C}$)	시점(개월)
AAV8(GFP)	초기	0
AAV8(GFP)	-80	1
AAV8(GFP)	-80	3
AAV8(GFP)	-80	6
AAV8(GFP)	-80	F/T 1
AAV8(GFP)	-80	F/T 2
AAV8(GFP)	-80	F/T 3
AAV8(GFP)	-80	F/T 4
AAV8(GFP)	-80	F/T 5

[0658]

[0659] [표 5]

SEC-FLD 샘플 요약

샘플	온도($^{\circ}\text{C}$)	시점(개월)
AAV8(GFP)	초기	0
AAV8(GFP)	-80	1
AAV8 (GFP)	-80	3
AAV8(GFP)	-80	6
AAV8(GFP)	-80	F/T 1
AAV8(GFP)	-80	F/T 3
AAV8(GFP)	-80	F/T 5

[0660]

[0661] 결과는 5회의 동결/해동 주기 및 -80°C 에서 3개월 이상의 저장에 걸쳐 예시적인 제형 #2의 견고한 안정성을 입증하였다. 예를 들어, 도 13a 내지 도 13b 및 도 14a 내지 도 14b뿐만 아니라 표 6 및 표 7에 나타난 바와 같이, 동결전 DLS(t_0)에 비해 동결/해동 및 -80°C 저장에 걸쳐 DLS 입자 크기에 의해 측정된 바와 같이, 강력한 물리적 안정성이 관찰되었다. 구체적으로, 전체에 걸쳐 입자 크기 또는 다분산도의 변화가 거의 없었다.

[0662] 추가로, 도 15a 내지 도 15b 및 도 16a 내지 도 16b뿐만 아니라 표 8 및 표 9에 나타난 바와 같이, 매우 강력한 %단량체가 SEC-FLD에 의해 입증되었고 매우 적은 고분자량 종(HMWS)이 동결/해동 및 -80°C 저장에 걸쳐 식별되었으며, 이는 매우 적은 응집을 나타냈다.

[0663] [표 6]

동결/해동에 대한 DLS 결과

동결/해동	Z-평균(nm)	Z STDEV	PDI	PDI STDEV
0	30	0.30	0.203	0.008
1	30	0.53	0.199	0.009
2	33	0.18	0.251	0.018
3	31	0.52	0.222	0.006
4	30	0.63	0.220	0.007
5	30	0.45	0.232	0.002

PDI = 다분산 지수; STDEV = 표준 편차.

[0664]

[0665] [표 7]

-80 °C 안정성에 대한 DLS 결과

시간(개월)	Z-평균(nm)	Z STDEV	PDI	PDI STDEV
0	30	0.30	0.203	0.008
1	29	0.23	0.174	0.009
3	30	0.28	0.184	0.006

PDI = 다분산 지수; STDEV = 표준 편차.

[0666]

[0667] [표 8]

동결/해동에 대한 SEC-FLD 결과

주기	HMWS	단량체
0	0.29%	99.71%
1	0.63%	99.37%
3	0.45%	99.55%
5	2.47%	97.53%

HMWS = 고분자량 종.

[0668]

[0669] [표 9]

-80 °C 안정성에 대한 SEC-FLD 결과

시간(개월)	HMWS	단량체
0	0.29%	99.71%
2	0.47%	99.53%
3	0.76%	99.24%

HMWS = 고분자량 종.

[0670]

[0671] 종합하면, 이러한 결과는 예시적인 제형 #2가 정제된 AAV 제형에 대해 강력한 안정성을 갖는다는 것을 입증한다.

[0672] * * * * *

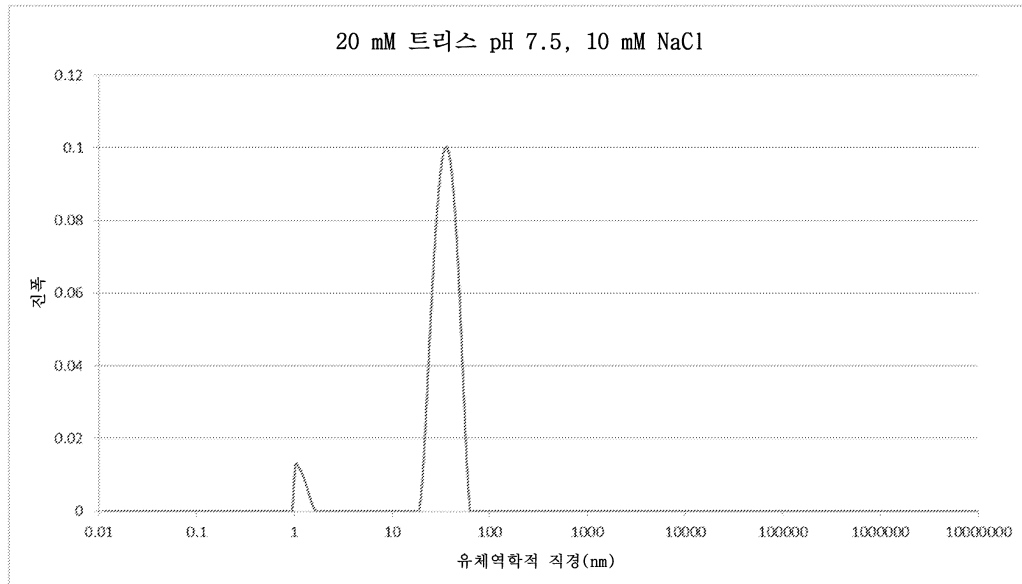
[0673] 당업자는 광범위한 본 발명의 개념으로부터 벗어나지 않고서 전술된 실시 형태에 변경이 이루어질 수 있음을 인식할 것이다. 따라서, 본 발명은 개시된 특정 실시 형태로 제한되는 것이 아니라, 본 명세서에 의해 한정되는 바와 같은 본 발명의 사상 및 범주 내의 변형들을 포함하도록 의도됨이 이해된다.

[0674] 다양한 간행물, 논문, 및 특허가 배경기술에 그리고 본 명세서 전체에 걸쳐 인용되어 있거나 기재되어 있으며; 이들 참고문헌 각각은 전체적으로 본 명세서에 참고로 포함된다. 본 명세서에 포함된 문헌, 행동, 재료, 장치, 물질 등에 대한 논의는 본 발명에 대한 상황을 제공하는 것을 목적으로 한다. 그러한 논의는 이들 대상 중 임의의 것 또는 모든 것이 개시되거나 청구된 임의의 발명에 대하여 종래 기술의 일부를 형성하는 것을 인정하는

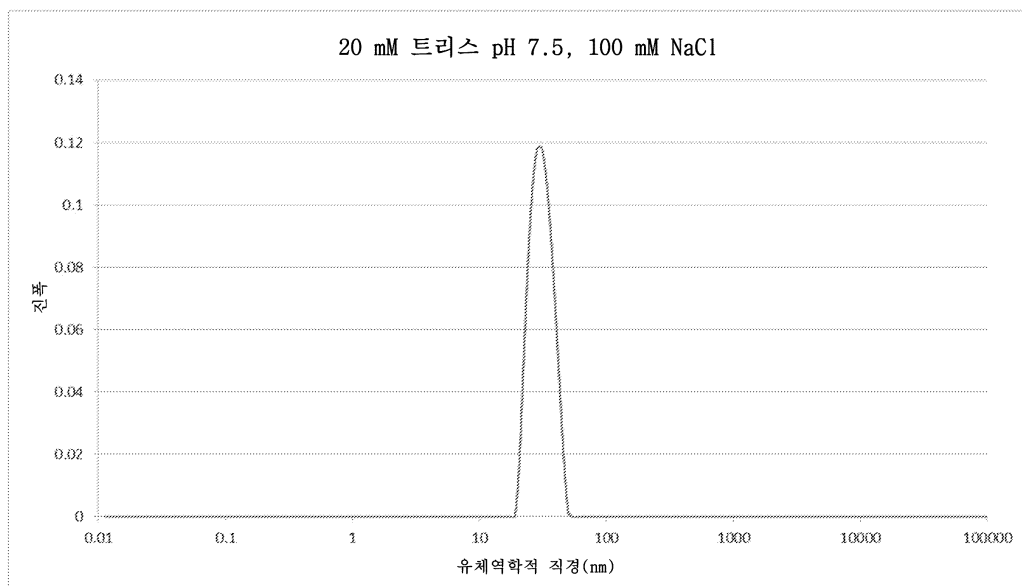
것은 아니다.

도면

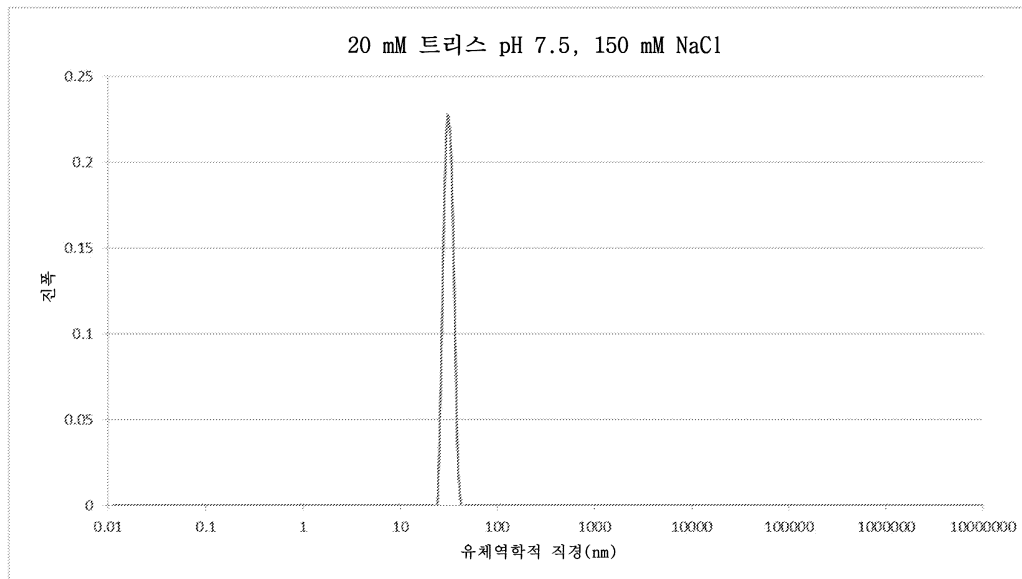
도면1a



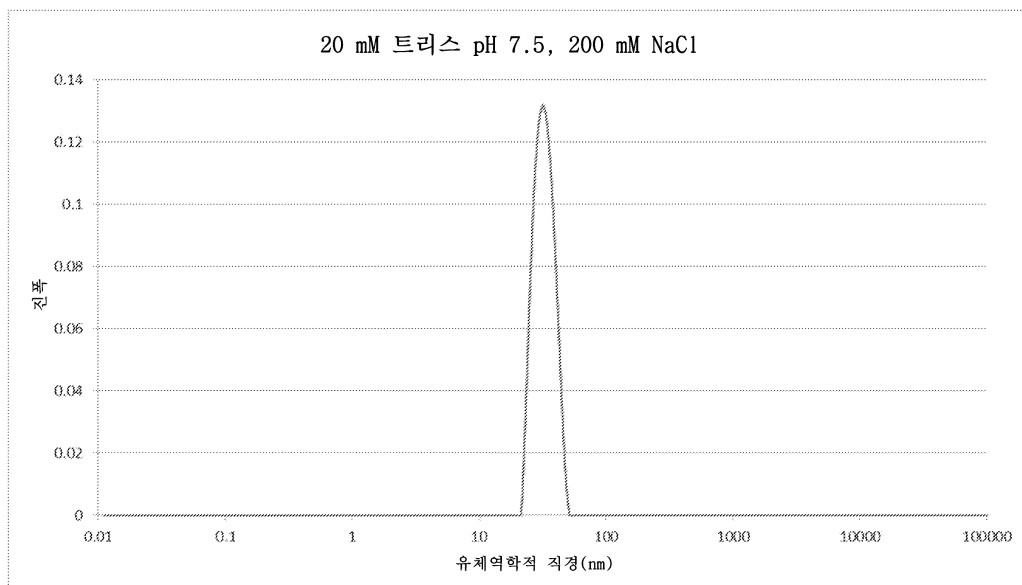
도면1b



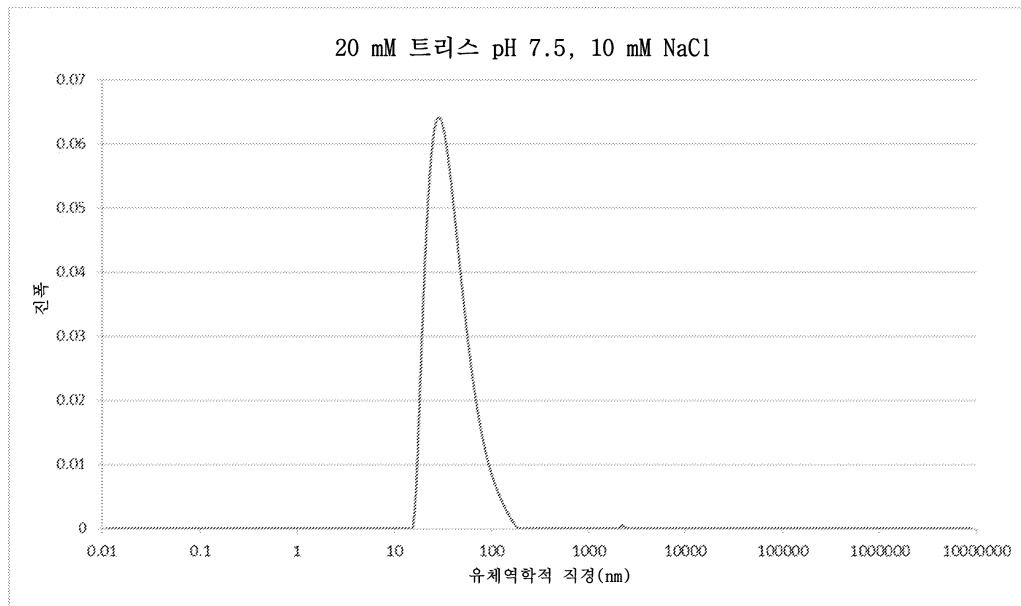
도면1c



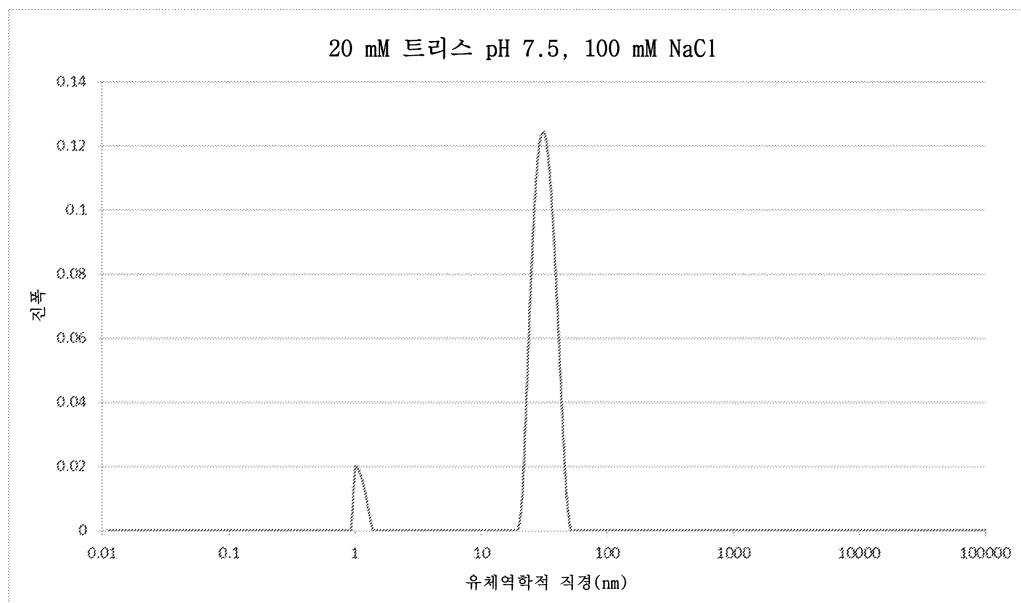
도면1d



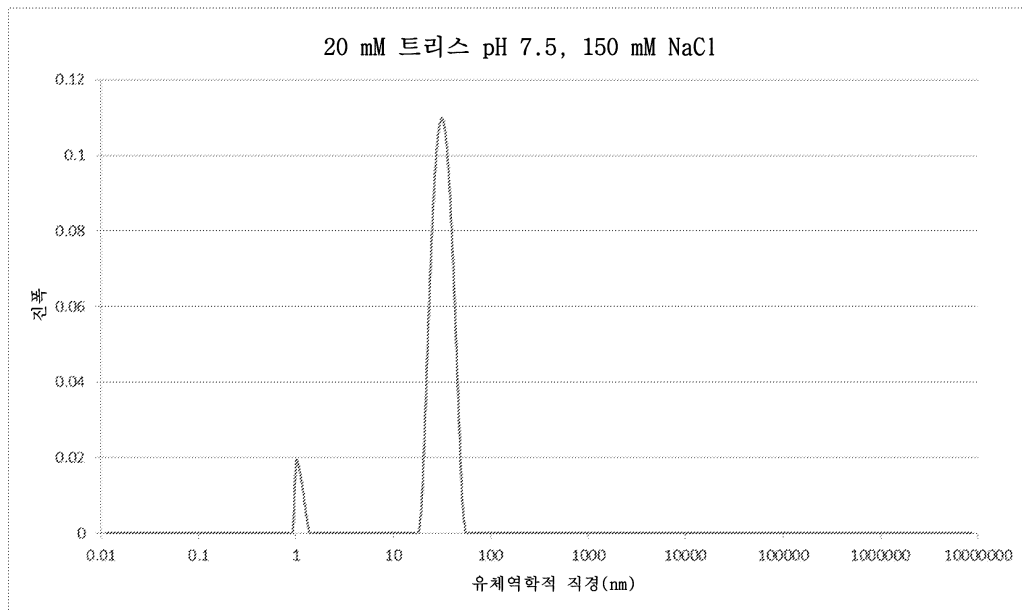
도면2a



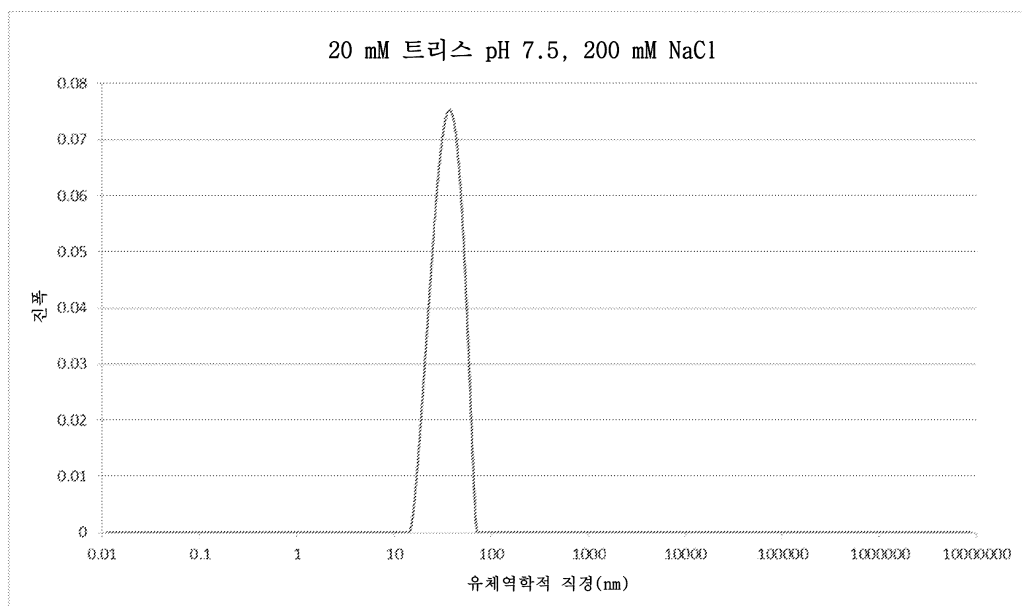
도면2b



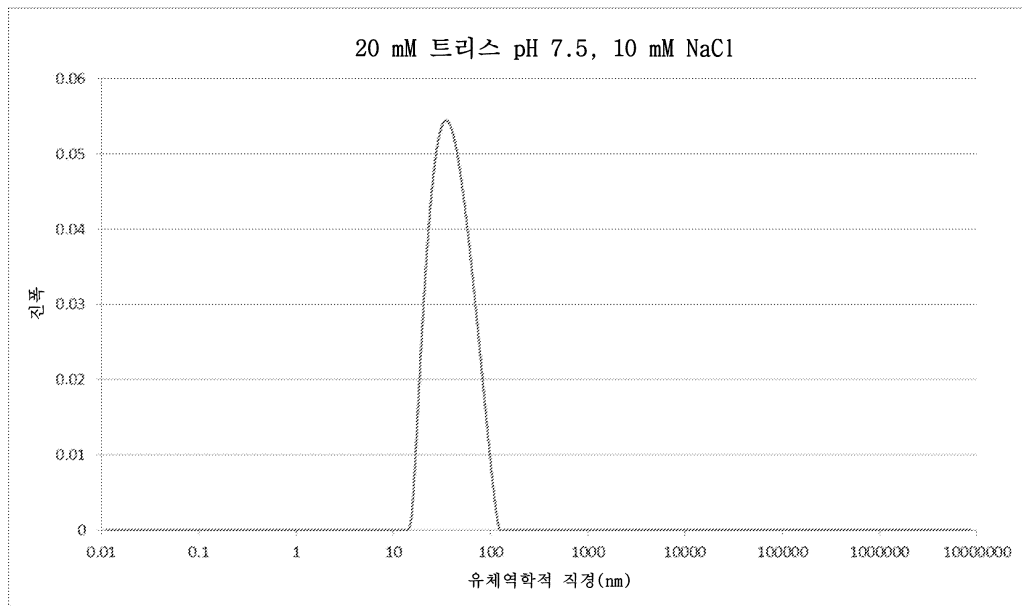
도면2c



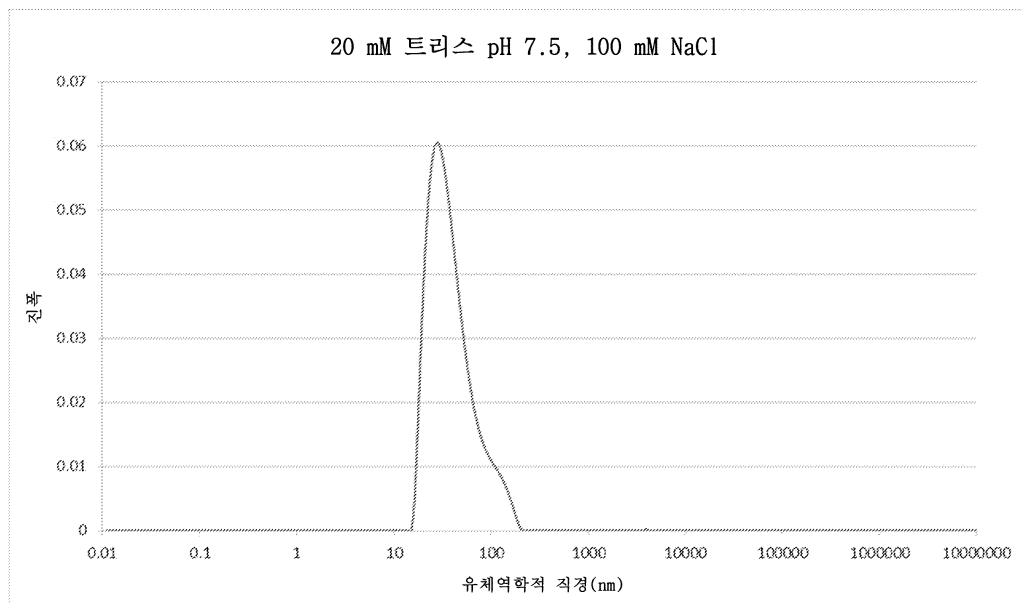
도면2d



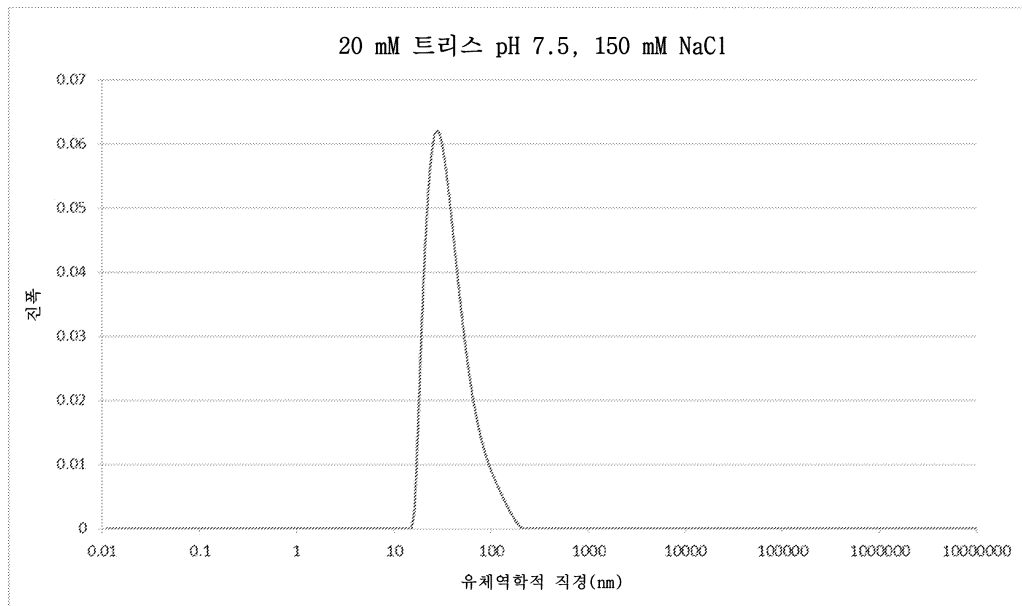
도면3a



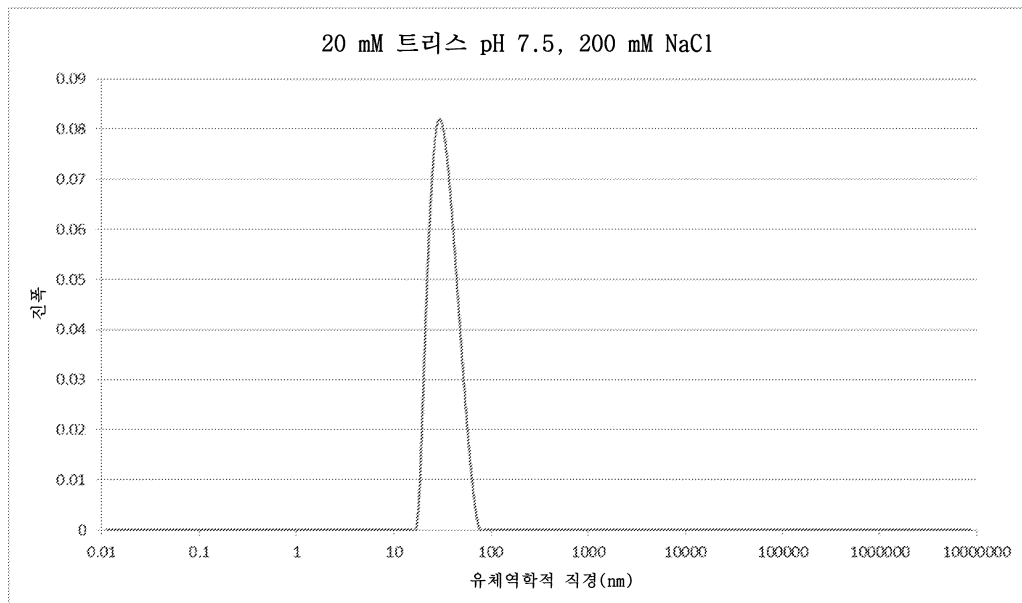
도면3b



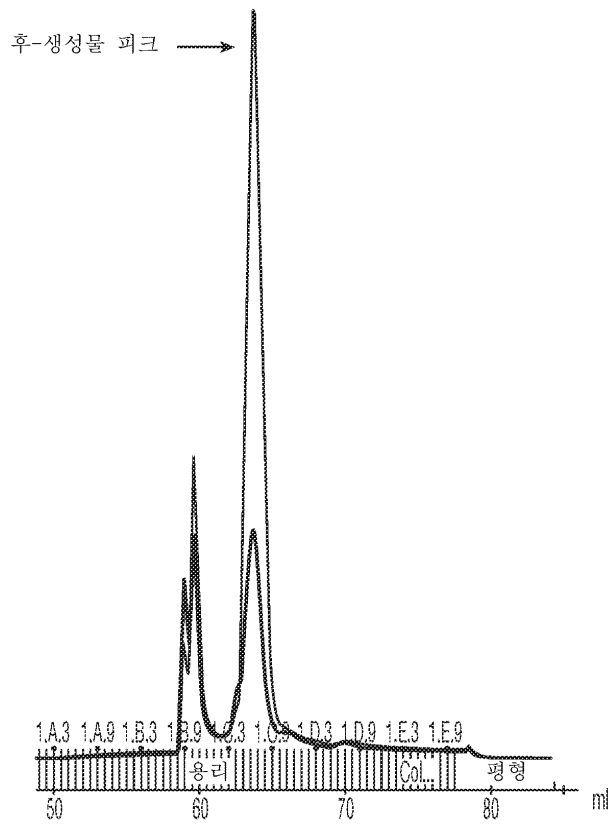
도면3c



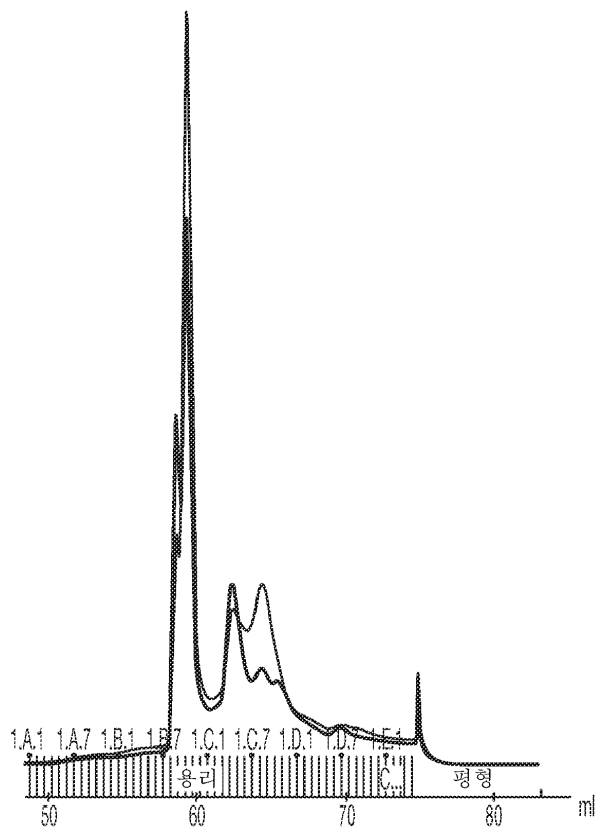
도면3d



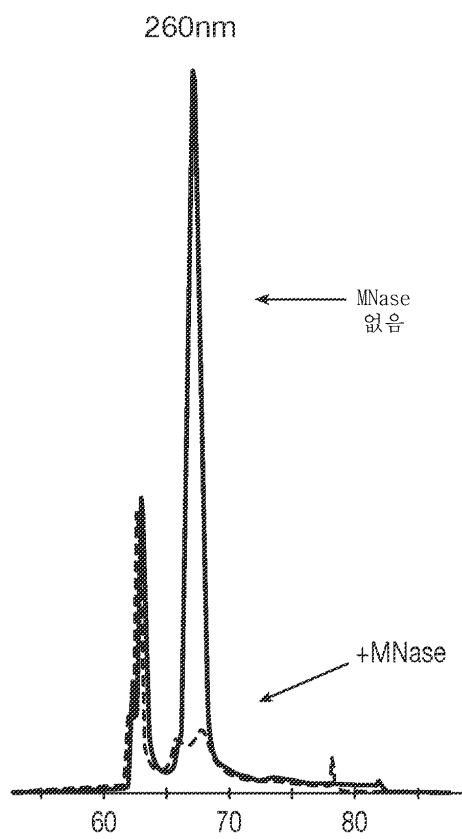
도면4a



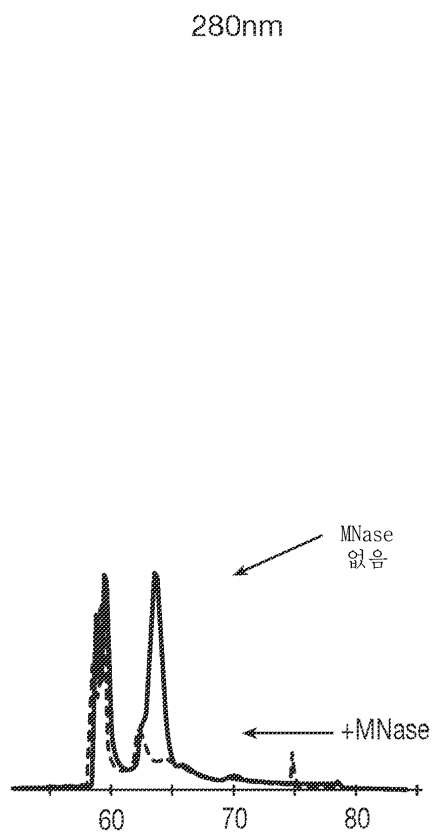
도면4b



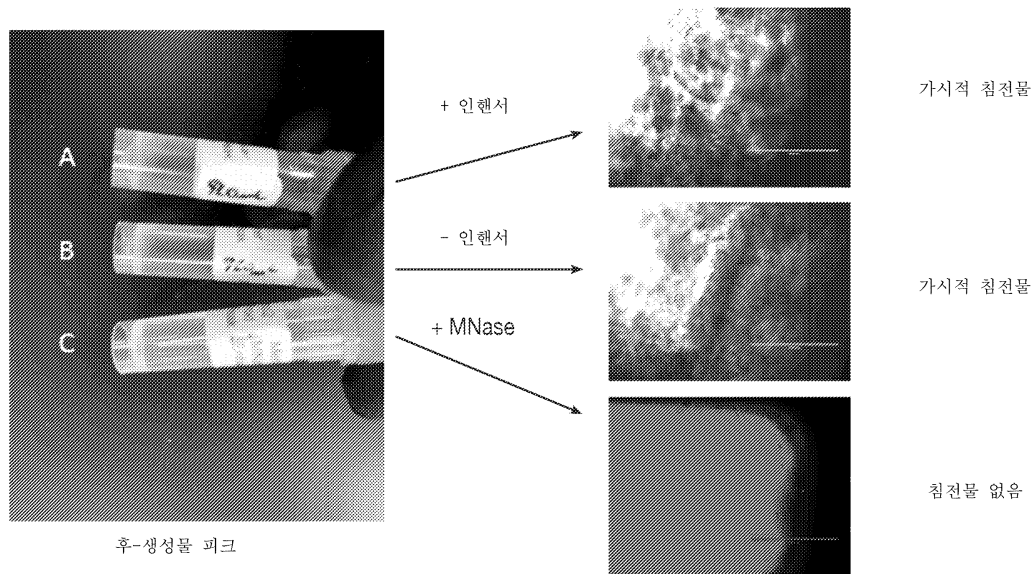
도면5a



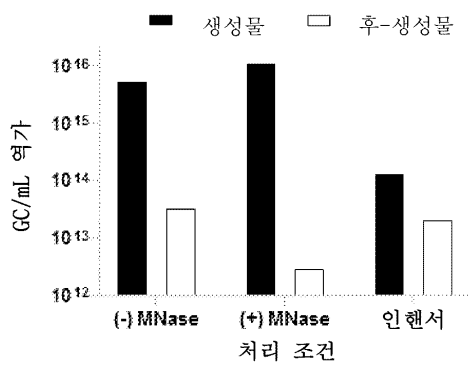
도면5b



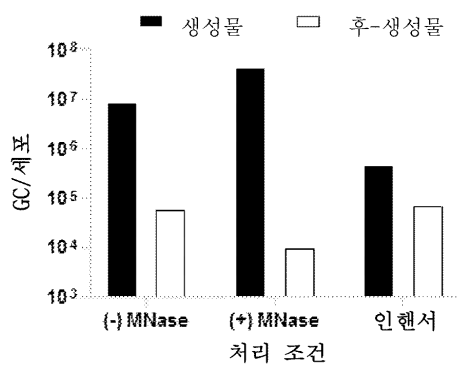
도면6



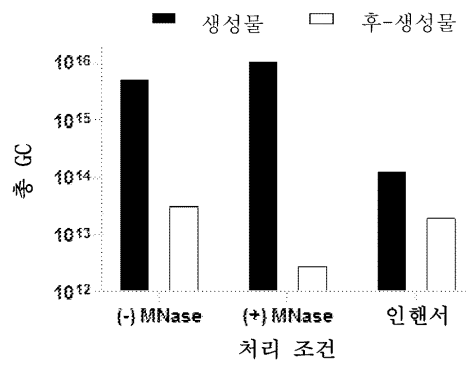
도면7a



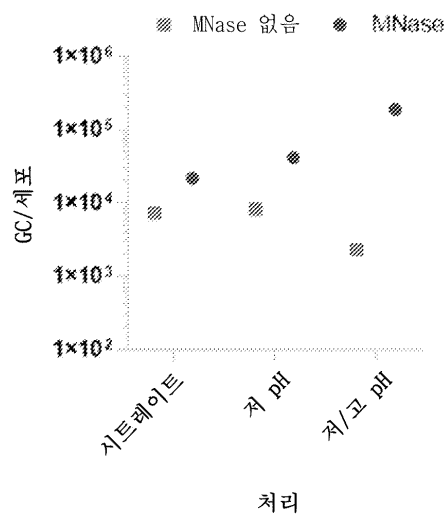
도면7b



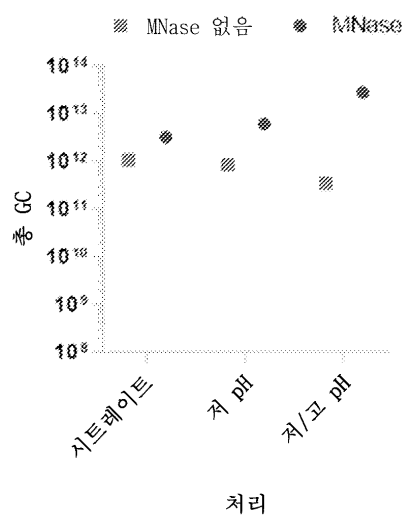
도면7c



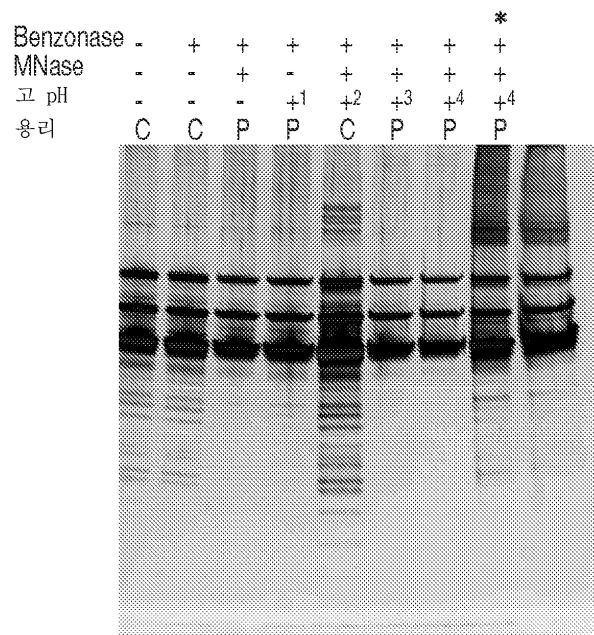
도면8a



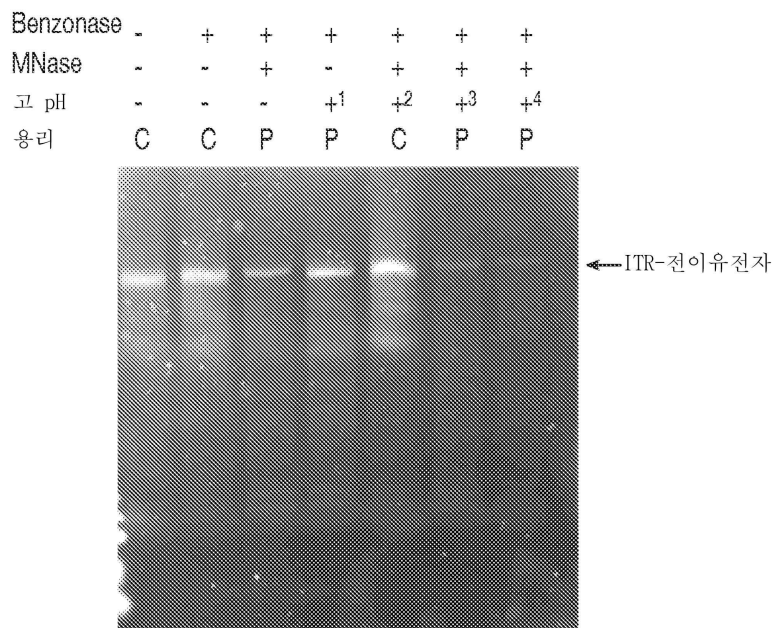
도면8b



도면9a

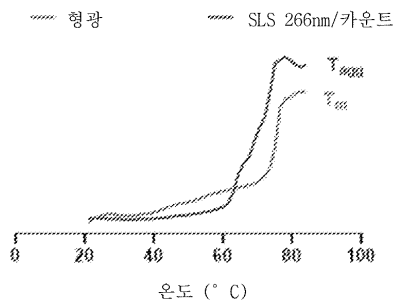


도면9b



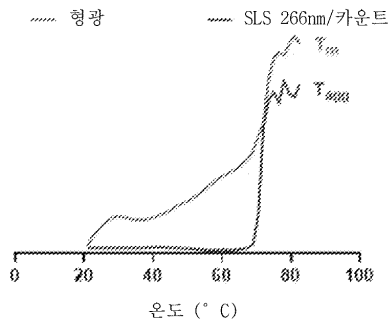
도면10a

AAV8에 대한 T_m/T_{agg} 의 측정
- 효소 없음 -



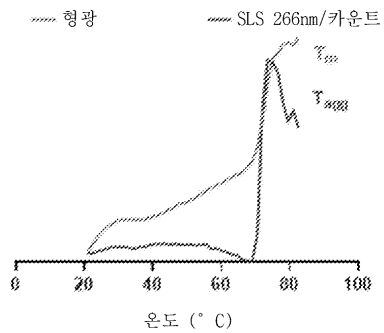
도면10b

AAV8에 대한 T_m/T_{agg} 의 측정
- Benzonase -

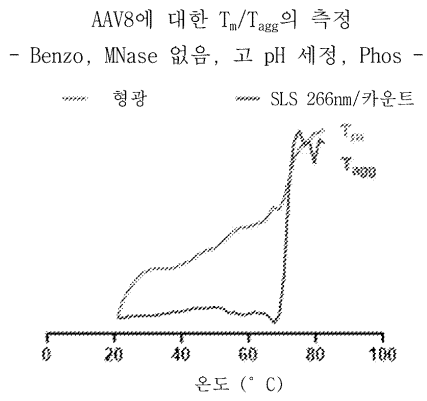


도면10c

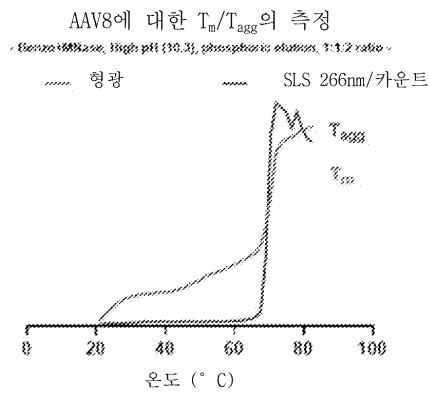
AAV8에 대한 T_m/T_{agg} 의 측정
- Benzo + MNase



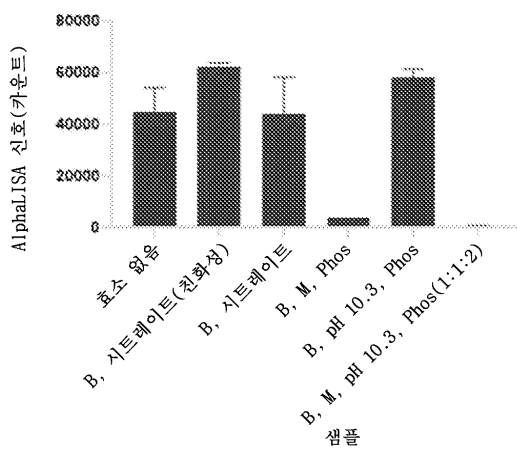
도면10d



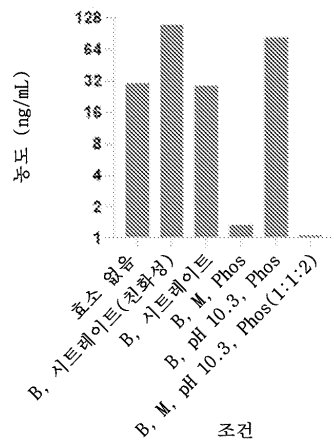
도면10e



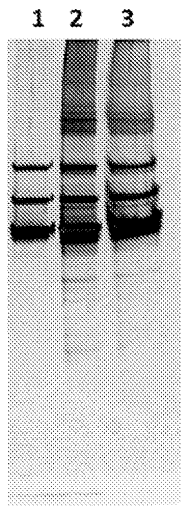
도면11a



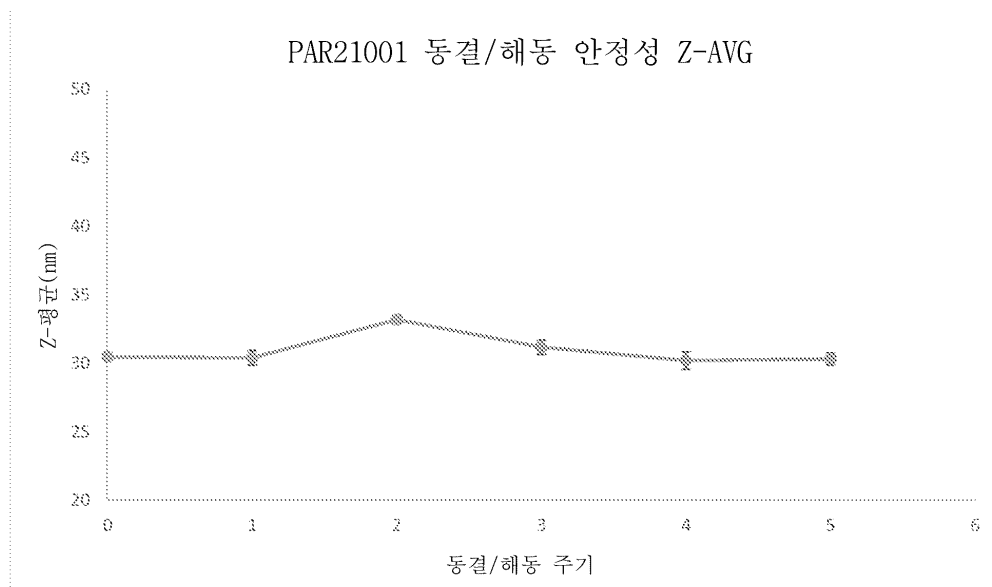
도면11b



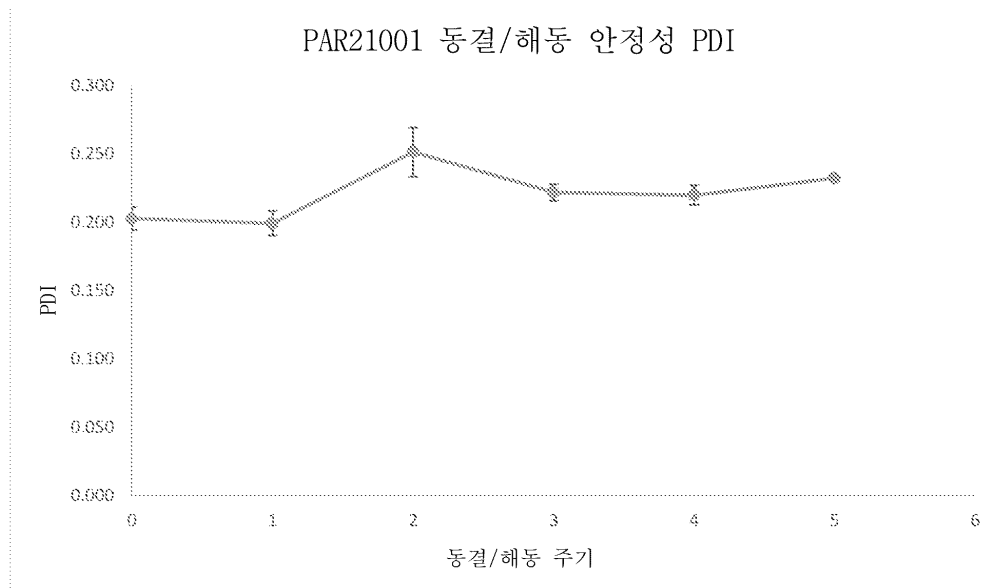
도면12



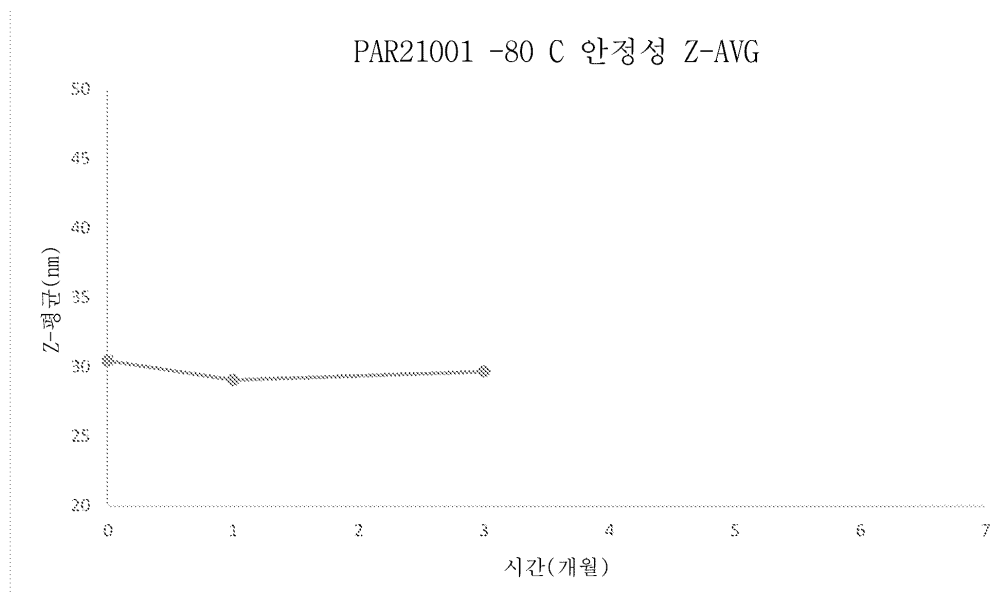
도면13a



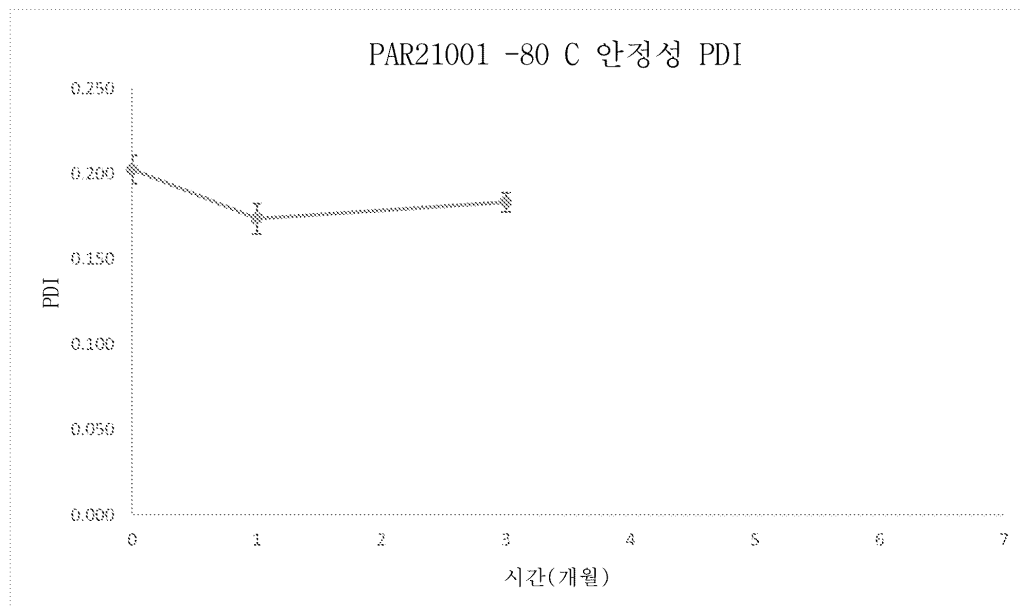
도면13b



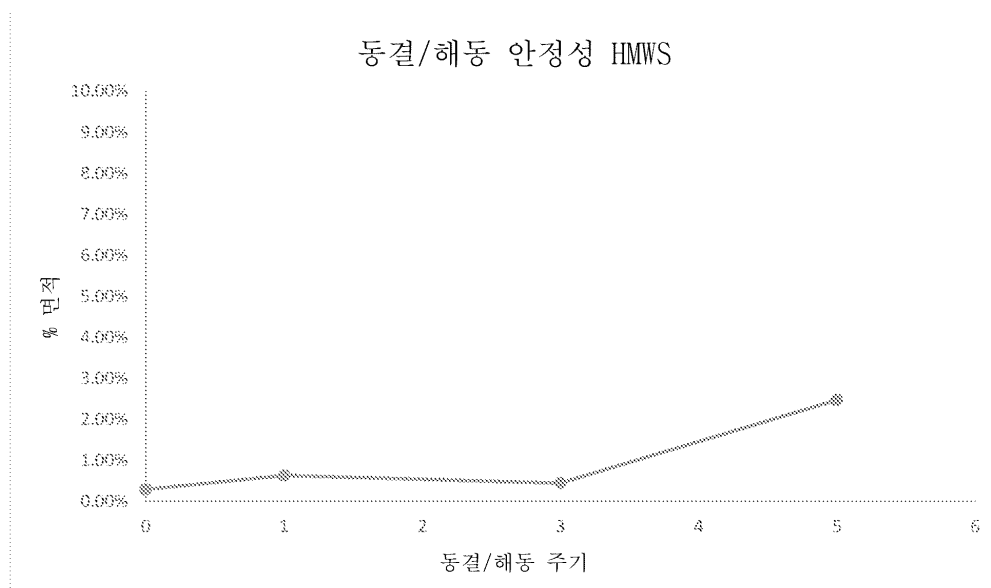
도면14a



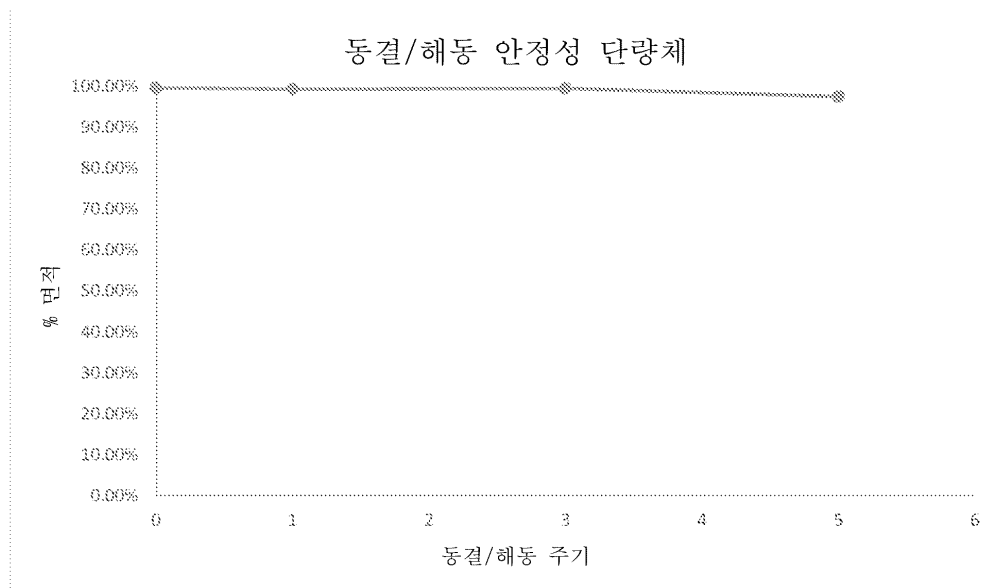
도면14b



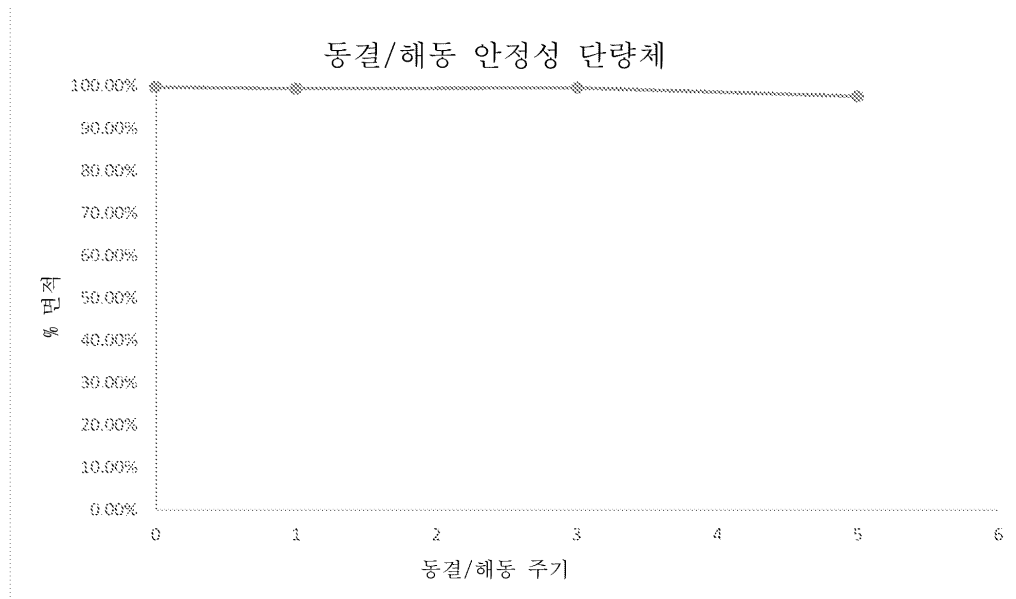
도면15a



도면15b



도면16a



도면16b

