(19)国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 116323925 A
(43)申请公布日 2023.06.23

(21)申请号 202180067655.9
(22)申请日 2021.08.06
(30)优先权数据
63/063128 2020.08.07 US
63/063108 2020.08.07 US
(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2023.03.31
(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/US2021/044955 2021.08.06
(87)PCT国际申请的公布数据
WO2022/032104 EN 2022.02.10
(71)申请人 詹森生物科技公司
地址 美国宾夕法尼亚州
(72)发明人 B·E·汤姆科维奇
M·P·埃尔科利诺
S·T·斯帕格诺尔
S·S·莫哈帕特拉 J·史密斯
(74)专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司 72001
专利代理师 黄登高 彭昶
(51)Int.Cl.
C12N 7/02(2006.01)

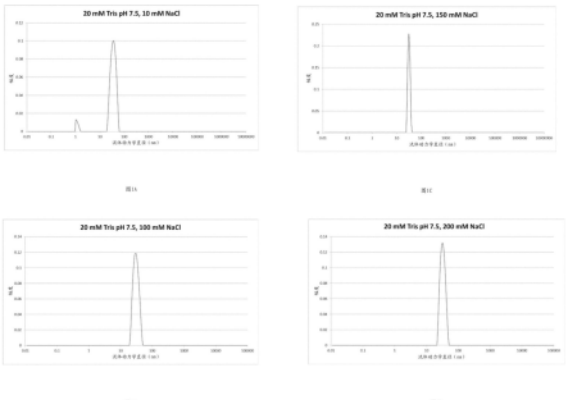
权利要求书7页 说明书57页 附图26页

(54)发明名称

高度纯化的病毒颗粒的制剂

(57)摘要

本文提供了高度纯化的病毒颗粒(例如,腺相关病毒(AAV)颗粒)的制剂。所述制剂包含基本上不含杂质(例如,产物相关杂质和工艺相关杂质)的纯化的AAV颗粒,以及缓冲剂、冷冻保护剂、非离子表面活性剂和任选的药学上可接受的盐中的一种或多种。在某些方面,所述制剂维持或增强所述纯化的AAV颗粒的稳定性并且/或者减少或防止它们的聚集。



CN 116323925 A

1.一种药物组合物,所述药物组合物包含纯化的腺相关病毒(AAV)颗粒、缓冲剂、冷冻保护剂和非离子表面活性剂,其中

(a)所述纯化的AAV颗粒基本上不含杂质,

(b)所述缓冲剂的浓度为约0mM至约50mM,

(c)所述冷冻保护剂为约1%至约10%(w/v),并且

(d)所述非离子表面活性剂为约0.0001%(w/v)至约0.1%(w/v)。

2.根据权利要求1所述的药物组合物,还包含药学上可接受的盐,其中所述药学上可接受的盐的浓度为:

(a)约1mM至约200mM;

(b)约10mM至约150mM;

(c)约10mM;

(d)约100mM;或者

(e)约150mM。

3.一种药物组合物,所述药物组合物包含纯化的AAV颗粒、药学上可接受的盐、缓冲剂、冷冻保护剂和非离子表面活性剂,其中

(a)所述纯化的AAV颗粒基本上不含杂质,

(b)所述药学上可接受的盐的浓度为约1mM至约49mM,

(c)所述缓冲剂的浓度为约0mM至约50mM,

(d)所述冷冻保护剂为约1%至约10%(w/v),并且

(e)所述非离子表面活性剂为约0.0001%(w/v)至约0.1%(w/v)。

4.根据权利要求3所述的药物组合物,其中所述药学上可接受的盐的浓度为:

(a)约5mM至约45mM;

(b)约7.5mM至约40mM;

(c)约10mM至约30mM;或者

(d)约10mM。

5.根据权利要求2至4中任一项所述的药物组合物,其中所述药学上可接受的盐选自由钠盐、镁盐、钙盐、钾盐、磷酸盐和硫酸盐组成的组,其中所述钠盐任选地包括氯化钠。

6.根据权利要求1至5中任一项所述的药物组合物,其中所述缓冲剂包括Tris HCl或L-组氨酸HCl。

7.根据权利要求1至6中任一项所述的药物组合物,其中所述缓冲剂的浓度包括约20mM。

8.根据权利要求1至7中任一项所述的药物组合物,其中所述冷冻保护剂为:

(a)约3%(w/v)至约8%(w/v);

(b)约4%(w/v)至约6%(w/v);或者

(c)约5%(w/v)。

9.根据权利要求1至8中任一项所述的药物组合物,其中所述冷冻保护剂包括糖。

10.根据权利要求9所述的药物组合物,其中所述糖包括:

(a)蔗糖、海藻糖或它们的组合;或者

(b)海藻糖。

11.根据权利要求1至10中任一项所述的药物组合物,其中所述非离子表面活性剂为:

(a)约0.0005%(w/v)至约0.005%(w/v);

(b)约0.00075%(w/v)至约0.0025%(w/v);或者

(c)约0.001%(w/v)。

12.根据权利要求1至11中任一项所述的药物组合物,其中所述非离子表面活性剂选自由共聚物、聚氧乙烯脱水山梨糖醇酯、磷脂、Brij表面活性剂和脱水山梨糖醇酯或它们的组合组成的组,

其中所述聚氧乙烯脱水山梨糖醇酯任选地选自由(PS-20)和聚山梨酯80(PS-80)或它们的组合组成的组;

其中所述共聚物任选地包括泊洛沙姆;并且

其中所述泊洛沙姆任选地

(a)选自由泊洛沙姆188(P188)、泊洛沙姆237(P237)、泊洛沙姆338(P338)和泊洛沙姆407(P407)或它们的组合组成的组;或者

(b)包括泊洛沙姆188(P188)。

13.一种药物组合物,所述药物组合物包含纯化的AAV颗粒、缓冲剂、冷冻保护剂和非离子表面活性剂,其中

(a)所述纯化的AAV颗粒基本上不含杂质,

(b)所述缓冲剂的浓度为约20mM,

(c)所述冷冻保护剂为约5%(w/v)海藻糖,并且

(d)所述非离子表面活性剂为约0.001%(w/v)泊洛沙姆188。

14.一种药物组合物,所述药物组合物包含纯化的AAV颗粒、药学上可接受的盐、缓冲剂、冷冻保护剂和非离子表面活性剂,其中

(a)(i)所述纯化的AAV颗粒基本上不含杂质,

(ii)所述药学上可接受的盐的浓度为约10mM氯化钠,

(iii)所述缓冲剂的浓度为约20mM,

(iv)所述冷冻保护剂为约5%(w/v)海藻糖,并且

(v)所述非离子表面活性剂为约0.001%(w/v)泊洛沙姆188;

(b)(i)所述纯化的AAV颗粒基本上不含杂质,

(ii)所述药学上可接受的盐的浓度为约25mM氯化钠,

(iii)所述缓冲剂的浓度为约20mM,

(iv)所述冷冻保护剂为约5%(w/v)海藻糖,并且

(v)所述非离子表面活性剂为约0.001%(w/v)泊洛沙姆188;

(c)(i)所述纯化的AAV颗粒基本上不含杂质,

(ii)所述药学上可接受的盐的浓度为约50mM氯化钠,

(iii)所述缓冲剂的浓度为约20mM,

(iv)所述冷冻保护剂为约5%(w/v)海藻糖,并且

(v)所述非离子表面活性剂为约0.001%(w/v)泊洛沙姆188;

(d)(i)所述纯化的AAV颗粒基本上不含杂质,

(ii)所述药学上可接受的盐的浓度为约100mM氯化钠,

(iii)所述缓冲剂的浓度为约20mM，

(iv)所述冷冻保护剂为约5％(w/v)海藻糖，并且

(v)所述非离子表面活性剂为约0.001％(w/v)泊洛沙姆188；

(e)(i)所述纯化的AAV颗粒基本上不含杂质，

(ii)所述药学上可接受的盐的浓度为约125mM氯化钠，

(iii)所述缓冲剂的浓度为约20mM，

(iv)所述冷冻保护剂为约5％(w/v)海藻糖，并且

(v)所述非离子表面活性剂为约0.001％(w/v)泊洛沙姆188；

(f)(i)所述纯化的AAV颗粒基本上不含杂质，

(ii)所述药学上可接受的盐的浓度为约150mM氯化钠，

(iii)所述缓冲剂的浓度为约20mM，

(iv)所述冷冻保护剂为约5％(w/v)海藻糖，并且

(v)所述非离子表面活性剂为约0.001％(w/v)泊洛沙姆188；或者

(g)(i)所述纯化的AAV颗粒基本上不含杂质，

(ii)所述药学上可接受的盐的浓度为约200mM氯化钠，

(iii)所述缓冲剂的浓度为约20mM，

(iv)所述冷冻保护剂为约5％(w/v)海藻糖，并且

(v)所述非离子表面活性剂为约0.001％(w/v)泊洛沙姆188。

15.根据权利要求13或14所述的药物组合物，其中所述缓冲剂包括Tris盐酸盐(HCl)或L-组氨酸HCl。

16.根据权利要求1至15中任一项所述的药物组合物，其中所述药物组合物的pH为：

(a)约4.0至约9.0；

(b)约7.0至约8.0；

(c)约7.3至约7.7；或者

(d)约7.5。

17.根据权利要求1至16中任一项所述的药物组合物，其中

(a)所述AAV选自由AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9和AAV10组成的组，并且/或者

(b)所述AAV包括重组AAV(rAAV)。

18.根据权利要求1至17中任一项所述的药物组合物，其中所述纯化的AAV颗粒的滴度为：

(a)约1×10^{10}个病毒基因组/毫升(vg/mL)或更大；

(b)约1×10^{11}个病毒基因组/毫升(vg/mL)或更大；

(c)约1×10^{12}个病毒基因组/毫升(vg/mL)或更大；

(d)约1×10^{13}个病毒基因组/毫升(vg/mL)或更大；

(e)约1×10^{14}个病毒基因组/毫升(vg/mL)或更大；或者

(f)约1×10^{15}个病毒基因组/毫升(vg/mL)或更大。

19.根据权利要求1至18中任一项所述的药物组合物，其中所述杂质包括

(a)工艺相关杂质，

其中所述工艺相关杂质任选地选自由残余宿主细胞组分、残余病毒生产组分、残余细胞培养组分、残余纯化组分或它们的组合组成的组，

其中所述残余宿主细胞组分任选地包括宿主细胞蛋白、宿主细胞DNA、宿主细胞RNA或它们的组合，

其中所述宿主细胞DNA任选地包括病毒外染色质相关DNA，

其中所述残余病毒生产组分任选地包括质粒DNA、辅助病毒或它们的组合，

其中所述残余细胞培养组分任选地包括抗生素、补充剂、诱导剂、生长因子或它们的组合，并且/或者

其中所述残余纯化组分任选地包括缓冲剂、无机盐、酶、洗涤剂、培养基或它们的组合；

(b)产物相关杂质，其中所述产物相关杂质包括空衣壳、聚集的AAV颗粒、降解的AAV颗粒或它们的组合；或者

(c)(a)和(b)的组合。

20.根据权利要求19所述的药物组合物，其中所述纯化的AAV颗粒包括：

(a)完整或部分完整衣壳，并且所述产物相关杂质包括空衣壳；或者

(b)完整衣壳，并且所述产物相关杂质包括空衣壳。

21.根据权利要求19所述的药物组合物，其中所述纯化的AAV颗粒基本上由完整衣壳组成，并且所述产物相关杂质包括空衣壳。

22.根据权利要求19所述的药物组合物，其中所述产物相关杂质包括：

(a)聚集的AAV颗粒、降解的AAV颗粒或它们的组合；或者

(b)聚集的AAV颗粒或它们的组合。

23.根据权利要求22所述的药物组合物，其中所述纯化的AAV颗粒包括空衣壳或基本上由空衣壳组成。

24.根据权利要求1至23中任一项所述的药物组合物，其中所述药物组合物处于：

(a)液体状态；或者

(b)固体或半固体状态。

25.根据权利要求1至24中任一项所述的药物组合物，其中所述药物组合物

(a)维持或增强所述纯化的AAV颗粒的稳定性；并且/或者

(b)减少或防止所述纯化的AAV颗粒的聚集。

26.根据权利要求25所述的药物组合物，其中

(a)在以下情况下，所述纯化的AAV颗粒的稳定性得以维持或增强

(i)在一个或多个冷冻/解冻循环后；或者

(ii)在三个或更多个冷冻/解冻循环后；并且/或者

(b)所述AAV颗粒的聚集为以下情况

(i)在一个或多个冷冻/解冻循环后小于5％；

(ii)在一个或多个冷冻/解冻循环后小于2％；

(iii)在一个或多个冷冻/解冻循环后小于1％；

(iv)在三个或更多个冷冻/解冻循环后小于5％；

(v)在三个或更多个冷冻/解冻循环后小于2％；或者

(vi)在三个或更多个冷冻/解冻循环后小于1％，并且

其中所述AAV颗粒的稳定性和/或聚集任选地通过选自由动态光散射(DLS)、分析超速离心(AUC)、光学显微术、尺寸排阻色谱法(SEC)、透射电子显微术和具有多角度静态光散射的场流分级(FFF-MALS)组成的组的测定来测量。

27.根据权利要求1至26中任一项所述的药物组合物,其中所述纯化的AAV颗粒通过包括以下步骤的方法获得:

(a)使包含AAV颗粒的上清液与包含核酸酶的组合物接触;以及

(b)纯化所述颗粒,

其中所述核酸酶任选地包括Benzonase或Benzonase®和染色质-DNA核酸酶,并且

其中所述染色质-DNA核酸酶任选地包括MNase。

28.一种用于制备包含纯化的AAV颗粒的药物组合物的方法,所述方法包括:

(a)使包含AAV颗粒的上清液与包含核酸酶的组合物接触,

其中所述核酸酶任选地包括Benzonase®或Benzonase®和染色质-DNA核酸酶,并且

其中所述染色质-DNA核酸酶任选地包括MNase;

(b)纯化所述AAV颗粒,使得所述AAV颗粒基本上不含杂质;

(c)将所述纯化的AAV颗粒与缓冲剂、冷冻保护剂和非离子表面活性剂组合,其中

(i)所述缓冲剂的浓度为约0mM至约50mM,

(ii)所述冷冻保护剂为约1%至约10%(w/v),并且

(iii)所述非离子表面活性剂为约0.0001%(w/v)至约0.1%(w/v)。

29.根据权利要求28所述的方法,其中步骤(c)还包括药学上可接受的盐,其中所述药学上可接受的盐的浓度为:

(a)约1mM至约200mM;

(b)约10mM至约150mM;

(c)约1mM至约49mM;

(d)约5mM至约45mM;

(e)约7.5mM至约40mM;

(f)约10mM至约30mM;

(g)约10mM;

(h)约100mM;或者

(i)约150mM。

30.根据权利要求29所述的方法,其中所述药学上可接受的盐选自由钠盐、镁盐、钙盐、钾盐、磷酸盐和硫酸盐组成的组,并且

其中所述钠盐任选地包括氯化钠。

31.根据权利要求28至30中任一项所述的方法,其中所述缓冲剂包括Tris HCl或L-组氨酸HCl。

32.根据权利要求28至31中任一项所述的方法,其中所述缓冲剂的浓度包括约20mM。

33.根据权利要求28至32中任一项所述的方法,其中所述冷冻保护剂为:

(a)约3%(w/v)至约8%(w/v);

(b)约4%(w/v)至约6%(w/v);或者

(c)约5%(w/v)。

34.根据权利要求28至33中任一项所述的方法,其中所述冷冻保护剂包括糖。

35.根据权利要求34所述的方法,其中所述糖包括

(a)蔗糖、海藻糖或它们的组合;或者

(b)海藻糖。

36.根据权利要求28至35中任一项所述的方法,其中所述非离子表面活性剂为

(a)约0.0005%(w/v)至约0.005%(w/v);

(b)约0.00075%(w/v)至约0.0025%(w/v);或者

(c)约0.001%(w/v)。

37.根据权利要求28至36中任一项所述的方法,其中所述非离子表面活性剂选自由共聚物、聚氧乙烯脱水山梨糖醇酯、磷脂、Brij表面活性剂和脱水山梨糖醇酯或它们的组合组成的组,

其中所述聚氧乙烯脱水山梨糖醇酯任选地选自由(PS-20)和聚山梨酯80(PS-80)或它们的组合组成的组,

其中所述共聚物任选地包括泊洛沙姆,并且

其中所述泊洛沙姆任选地

(a)选自由泊洛沙姆188(P188)、泊洛沙姆237(P237)、泊洛沙姆338(P338)和泊洛沙姆407(P407)或它们的组合组成的组;或者

(b)包括泊洛沙姆188(P188)。

38.根据权利要求28至37中任一项所述的方法,其中所述药物组合物的pH为

(a)约4.0至约9.0;

(b)约7.0至约8.0;

(c)约7.3至约7.7;或者

(d)约7.5。

39.根据权利要求28至38中任一项所述的方法,其中所述AAV选自由AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9和AAV10组成的组;并且/或者

其中所述AAV包括rAAV。

40.根据权利要求28至39中任一项所述的方法,其中所述纯化的AAV颗粒的滴度为

(a)约1×10^{10}个病毒基因组/毫升(vg/mL)或更大;

(b)约1×10^{11}个病毒基因组/毫升(vg/mL)或更大;

(c)约1×10^{12}个病毒基因组/毫升(vg/mL)或更大;

(d)约1×10^{13}个病毒基因组/毫升(vg/mL)或更大;

(e)约1×10^{14}个病毒基因组/毫升(vg/mL)或更大;或者

(f)约1×10^{15}个病毒基因组/毫升(vg/mL)或更大。

41.根据权利要求28至40中任一项所述的方法,其中所述杂质包括(a)工艺相关杂质,

其中所述工艺相关杂质任选地选自由残余宿主细胞组分、残余病毒生产组分、残余细胞培养组分、残余纯化组分或它们的组合组成的组,

其中所述残余宿主细胞组分任选地包括宿主细胞蛋白、宿主细胞DNA、宿主细胞RNA或它们的组合,

其中所述宿主细胞DNA任选地包括病毒外染色质相关DNA,

其中所述残余病毒生产组分任选地包括质粒DNA、辅助病毒或它们的组合，

其中所述残余细胞培养组分任选地包括抗生素、补充剂、诱导剂、生长因子或它们的组合，并且/或者

其中所述残余纯化组分任选地包括缓冲剂、无机盐、酶、洗涤剂、培养基或它们的组合；

(b)产物相关杂质，其中所述产物相关杂质包括空衣壳、聚集的AAV颗粒、降解的AAV颗粒或它们的组合；或者

(c)(a)和(b)的组合。

42.根据权利要求41所述的方法，其中所述纯化的AAV颗粒包括：

(a)完整或部分完整衣壳，并且所述产物相关杂质包括空衣壳；或者

(b)完整衣壳，并且所述产物相关杂质包括空衣壳。

43.根据权利要求41所述的方法，其中所述纯化的AAV颗粒基本上由完整衣壳组成，并且所述产物相关杂质包括空衣壳。

44.根据权利要求41所述的方法，其中所述产物相关杂质包括

(a)聚集的AAV颗粒、降解的AAV颗粒或它们的组合；或者

(b)聚集的AAV颗粒。

45.根据权利要求41所述的方法，其中所述纯化的AAV颗粒包括空衣壳或基本上由空衣壳组成。

高度纯化的病毒颗粒的制剂

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求2020年8月7日提交的美国序列号63/063,108和2020年8月7日提交的美国序列号63/063,128的权益,它们中的每一者的公开内容以引用方式全文并入本文。

1.技术领域

[0003] 本文尤其提供了高度纯化的病毒颗粒(例如,腺相关病毒(AAV)颗粒)的制剂。这些制剂可以包含基本上不含杂质(例如,产物相关杂质和工艺相关杂质)的纯化的AAV颗粒,以及缓冲剂、冷冻保护剂、非离子表面活性剂和任选的药学上可接受的盐中的一种或多种。在某些方面,本文提供的制剂维持或增强纯化的AAV颗粒的稳定性并且/或者减少或防止它们的聚集。

2.背景技术

[0004] 腺相关病毒(AAV)是一种无包膜病毒,其可经工程化以将核酸递送到靶细胞,并且已成为基因治疗和基因递送应用中的有用载体。缺少病毒DNA的重组AAV(rAAV)基本上是基于蛋白质的纳米颗粒,其经工程化以穿过细胞膜,最终可在此将其核酸货物运输和递送到细胞核中。该病毒赋予的特性:当与其他病毒系统相比时,持续的基因表达、因具有广泛组织嗜性而天然存在于人类群体中、非整合性、非致病性、低免疫原性、有丝分裂后细胞的感染性和相对易生产,迎来了人类使用方面的迅速扩张。基于AAV(包括rAAV)的基因递送载体已成为众多临床基因疗法应用的安全且有效的载体。

[0005] AAV颗粒的生产和纯化仍然是主要的挑战。此外,在纯化后,开发能够维持病毒感染性和物理稳定性的制剂对于确保向患者提供具有一致生物性能的高质量产品变得至关重要。对病毒载体的一个特别关注点是它们的聚集倾向(参见Wright等人,Molecular Therapy,2005)。因此,本文提供了一种新型AAV制剂,该制剂解决了对含有具有改善的稳定性和最小聚集的高纯度AAV颗粒的制剂的未满足的需求。

3.发明内容

[0006] 在一个方面,本文提供了一种包含纯化的AAV颗粒、缓冲剂、冷冻保护剂和非离子表面活性剂的药物组合物,其中(a)纯化的AAV颗粒基本上不含杂质,(b)缓冲剂的浓度为约0mM至约50mM,(c)冷冻保护剂为约1%至约10%(w/v),并且(d)非离子表面活性剂为约0.0001%(w/v)至约0.1%(w/v)。在一个实施方案中,药物组合物包括药学上可接受的盐,其中药学上可接受的盐的浓度为约1mM至约200mM。在一个实施方案中,药学上可接受的盐为约10mM至约150mM。在一个实施方案中,药学上可接受的盐的浓度为约10mM。在一个实施方案中,药学上可接受的盐的浓度为约100mM。在一个实施方案中,药学上可接受的盐的浓度为约150mM。

[0007] 在一个方面,本文提供了一种包含纯化的AAV颗粒、药学上可接受的盐、缓冲剂、冷冻保护剂和非离子表面活性剂的药物组合物,其中(a)纯化的AAV颗粒基本上不含杂质,(b)

药学上可接受的盐的浓度为约1mM至约49mM，(c)缓冲剂的浓度为约0mM至约50mM，(d)冷冻保护剂为约1％至约10％(w/v)，并且(e)非离子表面活性剂为约0.0001％(w/v)至约0.1％(w/v)。在一个实施方案中，药学上可接受的盐的浓度为约5mM至约45mM。在一个实施方案中，药学上可接受的盐的浓度为约7.5mM至约40mM。在一个实施方案中，药学上可接受的盐的浓度为约10mM至约30mM。在一个实施方案中，药学上可接受的盐的浓度为约10mM。

[0008] 在一个实施方案中，药学上可接受的盐选自由钠盐、镁盐、钙盐、钾盐、磷酸盐和硫酸盐组成的组。在一个实施方案中，钠盐包括氯化钠。

[0009] 在一个实施方案中，缓冲剂包括Tris盐酸盐(HCl)。在一个实施方案中，缓冲剂包括L-组氨酸HCl。在一个实施方案中，缓冲剂的浓度包括约20mM。

[0010] 在一个实施方案中，冷冻保护剂为约3％(w/v)至约8％(w/v)。在一个实施方案中，冷冻保护剂为约4％(w/v)至约6％(w/v)。在一个实施方案中，冷冻保护剂为约5％(w/v)。在一个实施方案中，冷冻保护剂包括糖。在一个实施方案中，糖包括蔗糖、海藻糖或它们的组合。在一个实施方案中，糖包括海藻糖。

[0011] 在一个实施方案中，非离子表面活性剂为约0.0005％(w/v)至约0.005％(w/v)。在一个实施方案中，非离子表面活性剂为约0.00075％(w/v)至约0.0025％(w/v)。在一个实施方案中，非离子表面活性剂为约0.001％(w/v)。在一个实施方案中，非离子表面活性剂选自由共聚物、聚氧乙烯脱水山梨糖醇酯、磷脂、Brij表面活性剂和脱水山梨糖醇酯或它们的组合组成的组。在一个实施方案中，聚氧乙烯脱水山梨糖醇酯选自由(PS-20)和聚山梨酯80(PS-80)或它们的组合组成的组。在一个实施方案中，共聚物包括泊洛沙姆。在一个实施方案中，泊洛沙姆选自由泊洛沙姆188(P188)、泊洛沙姆237(P237)、泊洛沙姆338(P338)和泊洛沙姆407(P407)或它们的组合组成的组。在一个实施方案中，泊洛沙姆包括泊洛沙姆188(P188)。

[0012] 在一个方面，本文提供了一种包含纯化的AAV颗粒、缓冲剂、冷冻保护剂和非离子表面活性剂的药物组合物，其中(a)纯化的AAV颗粒基本上不含杂质，(b)缓冲剂的浓度为约20mM，(c)冷冻保护剂为约5％(w/v)海藻糖，并且(d)非离子表面活性剂为约0.001％(w/v)泊洛沙姆188。

[0013] 在一个方面，本文提供了一种包含纯化的AAV颗粒、药学上可接受的盐、缓冲剂、冷冻保护剂和非离子表面活性剂的药物组合物，其中(a)纯化的AAV颗粒基本上不含杂质，(b)药学上可接受的盐的浓度为约10mM氯化钠，(c)缓冲剂的浓度为约20mM，(d)冷冻保护剂为约5％(w/v)海藻糖，并且(e)非离子表面活性剂为约0.001％(w/v)泊洛沙姆188。

[0014] 在一个方面，本文提供了一种包含纯化的AAV颗粒、药学上可接受的盐、缓冲剂、冷冻保护剂和非离子表面活性剂的药物组合物，其中(a)纯化的AAV颗粒基本上不含杂质，(b)药学上可接受的盐的浓度为约25mM氯化钠，(c)缓冲剂的浓度为约20mM，(d)冷冻保护剂为约5％(w/v)海藻糖，并且(e)非离子表面活性剂为约0.001％(w/v)泊洛沙姆188。

[0015] 在一个方面，本文提供了一种包含纯化的AAV颗粒、药学上可接受的盐、缓冲剂、冷冻保护剂和非离子表面活性剂的药物组合物，其中(a)纯化的AAV颗粒基本上不含杂质，(b)药学上可接受的盐的浓度为约50mM氯化钠，(c)缓冲剂的浓度为约20mM，(d)冷冻保护剂为约5％(w/v)海藻糖，并且(e)非离子表面活性剂为约0.001％(w/v)泊洛沙姆188。

[0016] 在一个方面，本文提供了一种包含纯化的AAV颗粒、药学上可接受的盐、缓冲剂、冷

冻保护剂和非离子表面活性剂的药物组合物，其中(a)纯化的AAV颗粒基本上不含杂质，(b)药学上可接受的盐的浓度为约100mM氯化钠，(c)缓冲剂的浓度为约20mM，(d)冷冻保护剂为约5％(w/v)海藻糖，并且(e)非离子表面活性剂为约0.001％(w/v)泊洛沙姆188。

[0017] 在一个方面，本文提供了一种包含纯化的AAV颗粒、药学上可接受的盐、缓冲剂、冷冻保护剂和非离子表面活性剂的药物组合物，其中(a)纯化的AAV颗粒基本上不含杂质，(b)药学上可接受的盐的浓度为约125mM氯化钠，(c)缓冲剂的浓度为约20mM，(d)冷冻保护剂为约5％(w/v)海藻糖，并且(e)非离子表面活性剂为约0.001％(w/v)泊洛沙姆188。

[0018] 在一个方面，本文提供了一种包含纯化的AAV颗粒、药学上可接受的盐、缓冲剂、冷冻保护剂和非离子表面活性剂的药物组合物，其中(a)纯化的AAV颗粒基本上不含杂质，(b)药学上可接受的盐的浓度为约150mM氯化钠，(c)缓冲剂的浓度为约20mM，(d)冷冻保护剂为约5％(w/v)海藻糖，并且(e)非离子表面活性剂为约0.001％(w/v)泊洛沙姆188。

[0019] 在一个方面，本文提供了一种包含纯化的AAV颗粒、药学上可接受的盐、缓冲剂、冷冻保护剂和非离子表面活性剂的药物组合物，其中(a)纯化的AAV颗粒基本上不含杂质，(b)药学上可接受的盐的浓度为约200mM氯化钠，(c)缓冲剂的浓度为约20mM，(d)冷冻保护剂为约5％(w/v)海藻糖，并且(e)非离子表面活性剂为约0.001％(w/v)泊洛沙姆188。

[0020] 在一个实施方案中，缓冲剂包括Tris HCl。在一个实施方案中，缓冲剂包括L-组氨酸HCl。

[0021] 在一个实施方案中，药物组合物的pH为约4.0至约9.0。在一个实施方案中，药物组合物的pH为约7.0至约8.0。在一个实施方案中，药物组合物的pH为约7.3至约7.7。在一个实施方案中，药物组合物的pH为约7.5。

[0022] 在一个实施方案中，AAV选自由AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9和AAV10组成的组。在一个实施方案中，AAV包括rAAV。

[0023] 在一个实施方案中，纯化的AAV颗粒的滴度为约1×10^{10}个病毒基因组/毫升(vg/mL)或更大。在一个实施方案中，纯化的AAV颗粒的滴度为约1×10^{11}个病毒基因组/毫升(vg/mL)或更大。在一个实施方案中，纯化的AAV颗粒的滴度为约1×10^{12}个病毒基因组/毫升(vg/mL)或更大。在一个实施方案中，纯化的AAV颗粒的滴度为约1×10^{13}个病毒基因组/毫升(vg/mL)或更大。在一个实施方案中，纯化的AAV颗粒的滴度为约1×10^{14}个病毒基因组/毫升(vg/mL)或更大。在一个实施方案中，纯化的AAV颗粒的滴度为约1×10^{15}个病毒基因组/毫升(vg/mL)或更大。

[0024] 在一个实施方案中，杂质包括工艺相关杂质、产物相关杂质或它们的组合。

[0025] 在一个实施方案中，工艺相关杂质选自由残余宿主细胞组分、残余病毒生产组分、残余细胞培养组分、残余纯化组分或它们的组合组成的组。在一个实施方案中，残余宿主细胞组分包括宿主细胞蛋白、宿主细胞DNA、宿主细胞RNA或它们的组合。在一个实施方案中，宿主细胞DNA包括病毒外染色质相关DNA。在一个实施方案中，残余病毒生产组分包括质粒DNA、辅助病毒或它们的组合。在一个实施方案中，残余细胞培养组分包括抗生素、补充剂、诱导剂、生长因子或它们的组合。在一个实施方案中，残余纯化组分包括缓冲剂、无机盐、酶、洗涤剂、培养基或它们的组合。

[0026] 在一个实施方案中，产物相关杂质包括空衣壳、聚集的AAV颗粒、降解的AAV颗粒或它们的组合。

[0027] 在一个实施方案中,纯化的AAV颗粒包括完整或部分完整衣壳,并且产物相关杂质包括空衣壳。在一个实施方案中,纯化的AAV颗粒包括完整衣壳,并且产物相关杂质包括空衣壳。在一个实施方案中,纯化的AAV颗粒基本上由完整衣壳组成,并且产物相关杂质包括空衣壳。

[0028] 在一个实施方案中,产物相关杂质包括聚集的AAV颗粒、降解的AAV颗粒或它们的组合。在一个实施方案中,纯化的AAV颗粒包括空衣壳。在一个实施方案中,纯化的AAV颗粒基本上由空衣壳组成。在一个实施方案中,产物相关杂质包括聚集的AAV颗粒或它们的组合。

[0029] 在一个实施方案中,药物组合物处于液体状态。在一个实施方案中,药物组合物处于固体或半固体状态。

[0030] 在一个实施方案中,药物组合物维持或增强纯化的AAV颗粒的稳定性。

[0031] 在一个实施方案中,药物组合物减少或防止纯化的AAV颗粒的聚集。

[0032] 在一个实施方案中,药物组合物(a)维持或增强纯化的AAV颗粒的稳定性;并且(b)减少或防止纯化的AAV颗粒的聚集。

[0033] 在一个实施方案中,在一个或多个冷冻/解冻循环后,纯化的AAV颗粒的稳定性得以维持或增强。在一个实施方案中,在三个或更多个冷冻/解冻循环后,纯化的AAV颗粒的稳定性得以维持或增强。

[0034] 在一个实施方案中,在一个或多个冷冻/解冻循环后,AAV颗粒的聚集小于5%。在一个实施方案中,在一个或多个冷冻/解冻循环后,AAV颗粒的聚集小于2%。在一个实施方案中,在一个或多个冷冻/解冻循环后,AAV颗粒的聚集小于1%。在一个实施方案中,在三个或更多个冷冻/解冻循环后,AAV颗粒的聚集小于5%。在一个实施方案中,在三个或更多个冷冻/解冻循环后,AAV颗粒的聚集小于2%。在一个实施方案中,在三个或更多个冷冻/解冻循环后,AAV颗粒的聚集小于1%。

[0035] 在一个实施方案中,AAV颗粒的稳定性和/或聚集通过选自由动态光散射(DLS)、分析超速离心(AUC)、光学显微术、尺寸排阻色谱法(SEC)、透射电子显微术和具有多角度静态光散射的场流分级(FFF-MALS)组成的组的测定来测量。

[0036] 在一个实施方案中,纯化的AAV颗粒通过包括以下步骤的方法获得:(a)使包含AAV颗粒的上清液与包含核酸酶的组合物接触;以及(b)纯化颗粒。在一个实施方案中,核酸酶包括Benzonase或Benzonase®和染色质-DNA核酸酶。在一个实施方案中,染色质-DNA核酸酶包括MNase。

[0037] 在一个方面,本文提供了一种用于制备包含纯化的AAV颗粒的药物组合物的方法,该方法包括:(a)使包含AAV颗粒的上清液与包含核酸酶的组合物接触;(b)纯化AAV颗粒,使得AAV颗粒基本上不含杂质;(c)将纯化的AAV颗粒与缓冲剂、冷冻保护剂和非离子表面活性剂组合,其中(i)缓冲剂的浓度为约0mM至约50mM,(ii)冷冻保护剂为约1%至约10%(w/v),并且(iii)非离子表面活性剂为约0.0001%(w/v)至约0.1%(w/v)。在一个实施方案中,步骤(c)还包括药学上可接受的盐,其中药学上可接受的盐的浓度为约1mM至约200mM。

[0038] 在一个实施方案中,药学上可接受的盐为约10mM至约150mM。在一个实施方案中,药学上可接受的盐为约1mM至约49mM。在一个实施方案中,药学上可接受的盐为约5mM至约45mM。在一个实施方案中,药学上可接受的盐为约7.5mM至约40mM。在一个实施方案中,药学

上可接受的盐为约10mM至约30mM。在一个实施方案中，药学上可接受的盐的浓度为约10mM。在一个实施方案中，药学上可接受的盐的浓度为约100mM。在一个实施方案中，药学上可接受的盐的浓度为约150mM。

[0039] 在一个实施方案中，药学上可接受的盐选自由钠盐、镁盐、钙盐、钾盐、磷酸盐和硫酸盐组成的组。在一个实施方案中，钠盐包括氯化钠。

[0040] 在一个实施方案中，缓冲剂包括Tris HCl。在一个实施方案中，缓冲剂包括L-组氨酸HCl。在一个实施方案中，缓冲剂的浓度包括约20mM。

[0041] 在一个实施方案中，冷冻保护剂为约3％(w/v)至约8％(w/v)。在一个实施方案中，冷冻保护剂为约4％(w/v)至约6％(w/v)。在一个实施方案中，冷冻保护剂为约5％(w/v)。在一个实施方案中，冷冻保护剂包括糖。在一个实施方案中，糖包括蔗糖、海藻糖或它们的组合。在一个实施方案中，糖包括海藻糖。

[0042] 在一个实施方案中，非离子表面活性剂为约0.0005％(w/v)至约0.005％(w/v)。在一个实施方案中，非离子表面活性剂为约0.00075％(w/v)至约0.0025％(w/v)。在一个实施方案中，非离子表面活性剂为约0.001％(w/v)。在一个实施方案中，非离子表面活性剂选自由共聚物、聚氧乙烯脱水山梨糖醇酯、磷脂、Brij表面活性剂和脱水山梨糖醇酯或它们的组合组成的组。在一个实施方案中，聚氧乙烯脱水山梨糖醇酯选自由(PS-20)和聚山梨酯80(PS-80)或它们的组合组成的组。在一个实施方案中，共聚物包括泊洛沙姆。在一个实施方案中，泊洛沙姆选自由泊洛沙姆188(P188)、泊洛沙姆237(P237)、泊洛沙姆338(P338)和泊洛沙姆407(P407)或它们的组合组成的组。在一个实施方案中，泊洛沙姆包括泊洛沙姆188(P188)。

[0043] 在一个实施方案中，药物组合物的pH为约4.0至约9.0。在一个实施方案中，药物组合物的pH为约7.0至约8.0。在一个实施方案中，药物组合物的pH为约7.3至约7.7。在一个实施方案中，药物组合物的pH为约7.5。

[0044] 在一个实施方案中，AAV选自由AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9和AAV10组成的组。在一个实施方案中，AAV包括rAAV。

[0045] 在一个实施方案中，核酸酶包括Benzonase或Benzonase®和染色质-DNA核酸酶。在一个实施方案中，染色质-DNA核酸酶包括MNase。

[0046] 在一个实施方案中，纯化的AAV颗粒的滴度为约1×10^{10}个病毒基因组/毫升(vg/mL)或更大。在一个实施方案中，纯化的AAV颗粒的滴度为约1×10^{11}个病毒基因组/毫升(vg/mL)或更大。在一个实施方案中，纯化的AAV颗粒的滴度为约1×10^{12}个病毒基因组/毫升(vg/mL)或更大。在一个实施方案中，纯化的AAV颗粒的滴度为约1×10^{13}个病毒基因组/毫升(vg/mL)或更大。在一个实施方案中，纯化的AAV颗粒的滴度为约1×10^{14}个病毒基因组/毫升(vg/mL)或更大。在一个实施方案中，纯化的AAV颗粒的滴度为约1×10^{15}个病毒基因组/毫升(vg/mL)或更大。

[0047] 在一个实施方案中，杂质包括工艺相关杂质、产物相关杂质或它们的组合。

[0048] 在一个实施方案中，工艺相关杂质选自由残余宿主细胞组分、残余病毒生产组分、残余细胞培养组分、残余纯化组分或它们的组合组成的组。在一个实施方案中，残余宿主细胞组分包括宿主细胞蛋白、宿主细胞DNA、宿主细胞RNA或它们的组合。在一个实施方案中，宿主细胞DNA包括病毒外染色质相关DNA。在一个实施方案中，残余病毒生产组分包括质粒

DNA、辅助病毒或它们的组合。在一个实施方案中，残余细胞培养组分包括抗生素、补充剂、诱导剂、生长因子或它们的组合。在一个实施方案中，残余纯化组分包括缓冲剂、无机盐、酶、洗涤剂、培养基或它们的组合。

[0049] 在一个实施方案中，产物相关杂质包括空衣壳、聚集的AAV颗粒、降解的AAV颗粒或它们的组合。在一个实施方案中，纯化的AAV颗粒包括完整或部分完整衣壳，并且产物相关杂质包括空衣壳。在一个实施方案中，纯化的AAV颗粒包括完整衣壳，并且产物相关杂质包括空衣壳。在一个实施方案中，纯化的AAV颗粒基本上由完整衣壳组成，并且产物相关杂质包括空衣壳。

[0050] 在一个实施方案中，产物相关杂质包括聚集的AAV颗粒、降解的AAV颗粒或它们的组合。在一个实施方案中，纯化的AAV颗粒包括空衣壳。在一个实施方案中，纯化的AAV颗粒基本上由空衣壳组成。在一个实施方案中，产物相关杂质包括聚集的AAV颗粒。

[0051] 在一个方面，本文提供了一种包含用于维持或增强纯化的AAV颗粒的稳定性的手段的药物组合物。在一个实施方案中，在一个或多个冷冻/解冻循环后，纯化的AAV颗粒的稳定性得以维持或增强。在一个实施方案中，在三个或更多个冷冻/解冻循环后，纯化的AAV颗粒的稳定性得以维持或增强。在一个实施方案中，AAV颗粒的稳定性通过选自由动态光散射(DLS)、分析超速离心(AUC)、光学显微术、尺寸排阻色谱法(SEC)、透射电子显微术和具有多角度静态光散射的场流分级(FFF-MALS)组成的组的测定来测量。

[0052] 在一个方面，本文提供了一种包含用于减少或防止纯化的AAV颗粒的聚集的手段的药物组合物。在一个实施方案中，在一个或多个冷冻/解冻循环后，AAV颗粒的聚集小于5％。在一个实施方案中，在一个或多个冷冻/解冻循环后，AAV颗粒的聚集小于2％。在一个实施方案中，在一个或多个冷冻/解冻循环后，AAV颗粒的聚集小于1％。在一个实施方案中，在三个或更多个冷冻/解冻循环后，AAV颗粒的聚集小于5％。在一个实施方案中，在三个或更多个冷冻/解冻循环后，AAV颗粒的聚集小于2％。在一个实施方案中，在三个或更多个冷冻/解冻循环后，AAV颗粒的聚集小于1％。在一个实施方案中，AAV颗粒通过选自由动态光散射(DLS)、分析超速离心(AUC)、光学显微术、尺寸排阻色谱法(SEC)、透射电子显微术和具有多角度静态光散射的场流分级(FFF-MALS)组成的组的测定来测量。

[0053] 在一个方面，本文提供了一种包含用于(a)维持或增强纯化的AAV颗粒的稳定性并且(b)减少或防止纯化的AAV颗粒聚集的手段的药物组合物。在一个实施方案中，在一个或多个冷冻/解冻循环后，纯化的AAV颗粒的稳定性得以维持或增强。在一个实施方案中，在三个或更多个冷冻/解冻循环后，纯化的AAV颗粒的稳定性得以维持或增强。在一个实施方案中，在一个或多个冷冻/解冻循环后，AAV颗粒的聚集小于5％。在一个实施方案中，在一个或多个冷冻/解冻循环后，AAV颗粒的聚集小于2％。在一个实施方案中，在一个或多个冷冻/解冻循环后，AAV颗粒的聚集小于1％。在一个实施方案中，在三个或更多个冷冻/解冻循环后，AAV颗粒的聚集小于5％。在一个实施方案中，在三个或更多个冷冻/解冻循环后，AAV颗粒的聚集小于2％。在一个实施方案中，在三个或更多个冷冻/解冻循环后，AAV颗粒的聚集小于1％。在一个实施方案中，AAV颗粒的稳定性和聚集通过选自由动态光散射(DLS)、分析超速离心(AUC)、光学显微术、尺寸排阻色谱法(SEC)、透射电子显微术和具有多角度静态光散射的场流分级(FFF-MALS)组成的组的测定来测量。

[0054] 在一个方面，本文提供了一种包含用于制备和获得包含纯化的AAV颗粒、缓冲剂、

冷冻保护剂和非离子表面活性剂的药物组合物的手段的系统，其中(a)纯化的AAV颗粒基本上不含杂质，(b)缓冲剂的浓度为约0mM至约50mM，(c)冷冻保护剂为约1％至约10％(w/v)，并且(d)非离子表面活性剂为约0.0001％(w/v)至约0.1％(w/v)。在一个实施方案中，药物组合物还包含药学上可接受的盐，其中药学上可接受的盐的浓度为约1mM至约200mM。在一个实施方案中，药学上可接受的盐为约10mM至约150mM。在一个实施方案中，药学上可接受的盐的浓度为约10mM。在一个实施方案中，药学上可接受的盐的浓度为约100mM。在一个实施方案中，药学上可接受的盐的浓度为约150mM。

[0055] 在一个方面，本文提供了一种包含用于制备和获得包含纯化的AAV颗粒、药学上可接受的盐、缓冲剂、冷冻保护剂和非离子表面活性剂的药物组合物的手段的系统，其中(a)纯化的AAV颗粒基本上不含杂质，(b)缓冲剂的浓度为约0mM至约50mM，(c)冷冻保护剂为约1％至约10％(w/v)，并且(d)非离子表面活性剂为约0.0001％(w/v)至约0.1％(w/v)。在一个实施方案中，药物组合物还包含药学上可接受的盐，其中药学上可接受的盐的浓度为约1mM至约200mM。在一个实施方案中，药学上可接受的盐为约10mM至约150mM。在一个实施方案中，药学上可接受的盐的浓度为约10mM。在一个实施方案中，药学上可接受的盐的浓度为约100mM。在一个实施方案中，药学上可接受的盐的浓度为约150mM。

[0056] 在一个方面，本文提供了一种包含用于制备和获得包含纯化的AAV颗粒、药学上可接受的盐、缓冲剂、冷冻保护剂和非离子表面活性剂的药物组合物的手段的系统，其中(a)纯化的AAV颗粒基本上不含杂质，(b)药学上可接受的盐的浓度为约1mM至约49mM，(c)缓冲剂的浓度为约0mM至约50mM，(d)冷冻保护剂为约1％至约10％(w/v)，并且(e)非离子表面活性剂为约0.0001％(w/v)至约0.1％(w/v)。在一个实施方案中，药学上可接受的盐的浓度为约5mM至约45mM。在一个实施方案中，药学上可接受的盐的浓度为约7.5mM至约40mM。在一个实施方案中，药学上可接受的盐的浓度为约10mM至约30mM。在一个实施方案中，药学上可接受的盐的浓度为约10mM。

[0057] 在一个实施方案中，药学上可接受的盐选自由钠盐、镁盐、钙盐、钾盐、磷酸盐和硫酸盐组成的组。在一个实施方案中，钠盐包括氯化钠。

[0058] 在一个实施方案中，缓冲剂包括Tris HCl。在一个实施方案中，缓冲剂包括L-组氨酸HCl。在一个实施方案中，缓冲剂的浓度包括约20mM。

[0059] 在一个实施方案中，冷冻保护剂为约3％(w/v)至约8％(w/v)。在一个实施方案中，冷冻保护剂为约4％(w/v)至约6％(w/v)。在一个实施方案中，冷冻保护剂为约5％(w/v)。在一个实施方案中，冷冻保护剂包括糖。在一个实施方案中，糖包括蔗糖、海藻糖或它们的组合。在一个实施方案中，糖包括海藻糖。

[0060] 在一个实施方案中，非离子表面活性剂为约0.0005％(w/v)至约0.005％(w/v)。在一个实施方案中，非离子表面活性剂为约0.00075％(w/v)至约0.0025％(w/v)。在一个实施方案中，非离子表面活性剂为约0.001％(w/v)。在一个实施方案中，非离子表面活性剂选自由共聚物、聚氧乙烯脱水山梨糖醇酯、磷脂、Brij表面活性剂和脱水山梨糖醇酯或它们的组合组成的组。在一个实施方案中，聚氧乙烯脱水山梨糖醇酯选自由(PS-20)和聚山梨酯80(PS-80)或它们的组合组成的组。在一个实施方案中，共聚物包括泊洛沙姆。在一个实施方案中，泊洛沙姆选自由泊洛沙姆188(P188)、泊洛沙姆237(P237)、泊洛沙姆338(P338)和泊洛沙姆407(P407)或它们的组合组成的组。在一个实施方案中，泊洛沙姆包括泊洛沙姆188

(P188)。

[0061] 在一个方面,本文提供了一种包含用于制备和获得包含纯化的AAV颗粒、缓冲剂、冷冻保护剂和非离子表面活性剂的药物组合物的手段的系统,其中(a)纯化的AAV颗粒基本上不含杂质,(b)缓冲剂的浓度为约20mM,(c)冷冻保护剂为约5%(w/v)海藻糖,并且(d)非离子表面活性剂为约0.001%(w/v)泊洛沙姆188。

[0062] 在一个方面,本文提供了一种包含用于制备和获得包含纯化的AAV颗粒、药学上可接受的盐、缓冲剂、冷冻保护剂和非离子表面活性剂的药物组合物的手段的系统,其中(a)纯化的AAV颗粒基本上不含杂质,(b)药学上可接受的盐的浓度为约10mM氯化钠,(c)缓冲剂的浓度为约20mM,(d)冷冻保护剂为约5%(w/v)海藻糖,并且(e)非离子表面活性剂为约0.001%(w/v)泊洛沙姆188。

[0063] 在一个方面,本文提供了一种包含用于制备和获得包含纯化的AAV颗粒、药学上可接受的盐、缓冲剂、冷冻保护剂和非离子表面活性剂的药物组合物的手段的系统,其中(a)纯化的AAV颗粒基本上不含杂质,(b)药学上可接受的盐的浓度为约25mM氯化钠,(c)缓冲剂的浓度为约20mM,(d)冷冻保护剂为约5%(w/v)海藻糖,并且(e)非离子表面活性剂为约0.001%(w/v)泊洛沙姆188。

[0064] 在一个方面,本文提供了一种包含用于制备和获得包含纯化的AAV颗粒、药学上可接受的盐、缓冲剂、冷冻保护剂和非离子表面活性剂的药物组合物的手段的系统,其中(a)纯化的AAV颗粒基本上不含杂质,(b)药学上可接受的盐的浓度为约50mM氯化钠,(c)缓冲剂的浓度为约20mM,(d)冷冻保护剂为约5%(w/v)海藻糖,并且(e)非离子表面活性剂为约0.001%(w/v)泊洛沙姆188。

[0065] 在一个方面,本文提供了一种包含用于制备和获得包含纯化的AAV颗粒、药学上可接受的盐、缓冲剂、冷冻保护剂和非离子表面活性剂的药物组合物的手段的系统,其中(a)纯化的AAV颗粒基本上不含杂质,(b)药学上可接受的盐的浓度为约100mM氯化钠,(c)缓冲剂的浓度为约20mM,(d)冷冻保护剂为约5%(w/v)海藻糖,并且(e)非离子表面活性剂为约0.001%(w/v)泊洛沙姆188。

[0066] 在一个方面,本文提供了一种包含用于制备和获得包含纯化的AAV颗粒、药学上可接受的盐、缓冲剂、冷冻保护剂和非离子表面活性剂的药物组合物的手段的系统,其中(a)纯化的AAV颗粒基本上不含杂质,(b)药学上可接受的盐的浓度为约125mM氯化钠,(c)缓冲剂的浓度为约20mM,(d)冷冻保护剂为约5%(w/v)海藻糖,并且(e)非离子表面活性剂为约0.001%(w/v)泊洛沙姆188。

[0067] 在一个方面,本文提供了一种包含用于制备和获得包含纯化的AAV颗粒、药学上可接受的盐、缓冲剂、冷冻保护剂和非离子表面活性剂的药物组合物的手段的系统,其中(a)纯化的AAV颗粒基本上不含杂质,(b)药学上可接受的盐的浓度为约150mM氯化钠,(c)缓冲剂的浓度为约20mM,(d)冷冻保护剂为约5%(w/v)海藻糖,并且(e)非离子表面活性剂为约0.001%(w/v)泊洛沙姆188。

[0068] 在一个方面,本文提供了一种包含用于制备和获得包含纯化的AAV颗粒、药学上可接受的盐、缓冲剂、冷冻保护剂和非离子表面活性剂的药物组合物的手段的系统,其中(a)纯化的AAV颗粒基本上不含杂质,(b)药学上可接受的盐的浓度为约200mM氯化钠,(c)缓冲剂的浓度为约20mM,(d)冷冻保护剂为约5%(w/v)海藻糖,并且(e)非离子表面活性剂为约

0.001%(w/v)泊洛沙姆188。

[0069] 在一个实施方案中,缓冲剂包括Tris HCl。在一个实施方案中,缓冲剂包括L-组氨酸HCl。

[0070] 在一个实施方案中,药物组合物的pH为约4.0至约9.0。在一个实施方案中,药物组合物的pH为约7.0至约8.0。在一个实施方案中,药物组合物的pH为约7.3至约7.7。在一个实施方案中,药物组合物的pH为约7.5。

[0071] 在一个实施方案中,AAV选自由AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9和AAV10组成的组。在一个实施方案中,AAV包括rAAV。

[0072] 在一个实施方案中,纯化的AAV颗粒的滴度为约1×10^{10}个病毒基因组/毫升(vg/mL)或更大。在一个实施方案中,纯化的AAV颗粒的滴度为约1×10^{11}个病毒基因组/毫升(vg/mL)或更大。在一个实施方案中,纯化的AAV颗粒的滴度为约1×10^{12}个病毒基因组/毫升(vg/mL)或更大。在一个实施方案中,纯化的AAV颗粒的滴度为约1×10^{13}个病毒基因组/毫升(vg/mL)或更大。在一个实施方案中,纯化的AAV颗粒的滴度为约1×10^{14}个病毒基因组/毫升(vg/mL)或更大。在一个实施方案中,纯化的AAV颗粒的滴度为约1×10^{15}个病毒基因组/毫升(vg/mL)或更大。

[0073] 在一个实施方案中,杂质包括工艺相关杂质、产物相关杂质或它们的组合。

[0074] 在一个实施方案中,工艺相关杂质选自由残余宿主细胞组分、残余病毒生产组分、残余细胞培养组分、残余纯化组分或它们的组合组成的组。在一个实施方案中,残余宿主细胞组分包括宿主细胞蛋白、宿主细胞DNA、宿主细胞RNA或它们的组合。在一个实施方案中,宿主细胞DNA包括病毒外染色质相关DNA。在一个实施方案中,残余病毒生产组分包括质粒DNA、辅助病毒或它们的组合。在一个实施方案中,残余细胞培养组分包括抗生素、补充剂、诱导剂、生长因子或它们的组合。在一个实施方案中,残余纯化组分包括缓冲剂、无机盐、酶、洗涤剂、培养基或它们的组合。

[0075] 在一个实施方案中,产物相关杂质包括空衣壳、聚集的AAV颗粒、降解的AAV颗粒或它们的组合。

[0076] 在一个实施方案中,纯化的AAV颗粒包括完整或部分完整衣壳,并且产物相关杂质包括空衣壳。在一个实施方案中,纯化的AAV颗粒包括完整衣壳,并且产物相关杂质包括空衣壳。在一个实施方案中,纯化的AAV颗粒基本上由完整衣壳组成,并且产物相关杂质包括空衣壳。

[0077] 在一个实施方案中,产物相关杂质包括聚集的AAV颗粒、降解的AAV颗粒或它们的组合。在一个实施方案中,纯化的AAV颗粒包括空衣壳。在一个实施方案中,纯化的AAV颗粒基本上由空衣壳组成。在一个实施方案中,产物相关杂质包括聚集的AAV颗粒或它们的组合。

[0078] 在一个实施方案中,药物组合物处于液体状态。在一个实施方案中,药物组合物处于固体或半固体状态。

[0079] 在一个实施方案中,药物组合物维持或增强纯化的AAV颗粒的稳定性。

[0080] 在一个实施方案中,药物组合物减少或防止纯化的AAV颗粒的聚集。

[0081] 在一个实施方案中,药物组合物(a)维持或增强纯化的AAV颗粒的稳定性;并且(b)减少或防止纯化的AAV颗粒的聚集。

[0082] 在一个实施方案中，在一个或多个冷冻/解冻循环后，纯化的AAV颗粒的稳定性得以维持或增强。在一个实施方案中，在三个或更多个冷冻/解冻循环后，纯化的AAV颗粒的稳定性得以维持或增强。

[0083] 在一个实施方案中，在一个或多个冷冻/解冻循环后，AAV颗粒的聚集小于5％。在一个实施方案中，在一个或多个冷冻/解冻循环后，AAV颗粒的聚集小于2％。在一个实施方案中，在一个或多个冷冻/解冻循环后，AAV颗粒的聚集小于1％。在一个实施方案中，在三个或更多个冷冻/解冻循环后，AAV颗粒的聚集小于5％。在一个实施方案中，在三个或更多个冷冻/解冻循环后，AAV颗粒的聚集小于2％。在一个实施方案中，在三个或更多个冷冻/解冻循环后，AAV颗粒的聚集小于1％。

[0084] 在一个实施方案中，AAV颗粒的稳定性和/或聚集通过选自由动态光散射(DLS)、分析超速离心(AUC)、光学显微术、尺寸排阻色谱法(SEC)、透射电子显微术和具有多角度静态光散射的场流分级(FFF-MALS)组成的组的测定来测量。

[0085] 在一个实施方案中，纯化的AAV颗粒通过包括以下步骤的方法获得：(a)使包含AAV颗粒的上清液与包含核酸酶的组合物接触；以及(b)纯化颗粒。在一个实施方案中，核酸酶包括Benzonase或Benzonase®和染色质-DNA核酸酶。在一个实施方案中，染色质-DNA核酸酶包括MNase。

4.附图说明

[0086] 结合附图进行阅读时，能够更好地理解前述发明内容和以下对本专利申请的优选实施方案的详细说明。但是，应当理解，本专利申请不限于附图中示出的精确实施方案。

[0087] 图1A至图1D示出了通过动态光散射(DLS)测量的四种代表性制剂的AAV粒径数据(冷冻前)。图1A描绘了示例性制剂#1(20mM Tris-HCl pH 7.5、10mM NaCl、5％海藻糖和0.001％泊洛沙姆188)中的纯化的AAV颗粒。图1B描绘了示例性制剂#2(20mM Tris-HCl pH 7.5、100mM NaCl、5％海藻糖和0.001％泊洛沙姆188)中的纯化的AAV颗粒。图1C描绘了示例性制剂#3(20mM Tris-HCl pH 7.5、150mM NaCl、5％海藻糖和0.001％泊洛沙姆188)中的纯化的AAV颗粒。图1D描绘了示例性制剂#4(20mM Tris-HCl pH 7.5、200mM NaCl、5％海藻糖和0.001％泊洛沙姆188)中的纯化的AAV颗粒。

[0088] 图2A至图2D示出了通过动态光散射(DLS)测量的四种代表性制剂在单个冷冻/解冻循环后的AAV粒径数据。图2A描绘了示例性制剂#1(20mM Tris-HCl pH 7.5、10mM NaCl、5％海藻糖和0.001％泊洛沙姆188)中的纯化的AAV颗粒。图2B描绘了示例性制剂#2(20mM Tris-HCl pH 7.5、100mM NaCl、5％海藻糖和0.001％泊洛沙姆188)中的纯化的AAV颗粒。图2C描绘了示例性制剂#3(20mM Tris-HCl pH 7.5、150mM NaCl、5％海藻糖和0.001％泊洛沙姆188)中的纯化的AAV颗粒。图2D描绘了示例性制剂#4(20mM Tris-HCl pH 7.5、200mM NaCl、5％海藻糖和0.001％泊洛沙姆188)中的纯化的AAV颗粒。

[0089] 图3A至图3D示出了通过动态光散射(DLS)测量的四种代表性制剂在三个冷冻/解冻循环后的AAV粒径数据。图3A描绘了示例性制剂#1(20mM Tris-HCl pH 7.5、10mM NaCl、5％海藻糖和0.001％泊洛沙姆188)中的纯化的AAV颗粒。图3B描绘了示例性制剂#2(20mM Tris-HCl pH 7.5、100mM NaCl、5％海藻糖和0.001％泊洛沙姆188)中的纯化的AAV颗粒。图3C描绘了示例性制剂#3(20mM Tris-HCl pH 7.5、150mM NaCl、5％海藻糖和0.001％泊洛沙

姆188)中的纯化的AAV颗粒。图3D描绘了示例性制剂#4(20mM Tris-HCl pH 7.5、200mM NaCl、5%海藻糖和0.001%泊洛沙姆188)中的纯化的AAV颗粒。

[0090] 图4A和图4B示出了涉及用60U/mL的MNase处理进行AAV颗粒纯化(图4B)或未进行AAV颗粒纯化(图4A)的示例性AAV纯化方法。在MNase处理之后,对后产物峰的较大260nm(RNA/DNA)吸光度贡献大大降低,280nm(蛋白质)吸收峰也是如此。

[0091] 图5A和图5B示出了来自用或未用MNase处理的含rAAV8颗粒的样品的色谱图的叠加。MNase的添加引起了DNA/RNA(260nm)(图5A)和蛋白质(280nm)(图5B)的后产物峰高度的显著降低,这指示后产物峰是包含病毒外相关染色质的AAV颗粒并且MNase处理增强了AAV颗粒纯化。

[0092] 图6示出了后产物峰的检查证实了使用ExpiFectamine™293转染试剂盒增强剂或未使用该增强剂产生的未经MNase处理的样品中的可见沉淀物。然而,MNase消化防止了病毒颗粒的聚集和沉淀。

[0093] 图7A至图7C示出了与未经MNase处理的样品和使用ExpiFectamine™293转染试剂盒增强剂生成的样品相比,MNase处理增加了病毒滴度(图7A)、基因组拷贝/细胞(图7B)和总基因组拷贝(图7C),并且减少了所产生的后产物的量。

[0094] 图8A和图8B示出了对于三种不同洗脱缓冲液:柠檬酸盐、低pH和低/高pH中的每一种而言,相对于未经MNase处理的样品(正方形),在经MNase处理的样品(圆形)中始终观察到每个细胞的基因组拷贝(GC/细胞)(图8A)和总基因组拷贝(图8B)的增加。

[0095] 图9A和图9B示出了使用表3中所述的不同纯化条件的病毒纯化的汇总。图9A描绘了纯化的AAV颗粒的银染。这三个强条带与VP1、VP2和VP3相对应。图9B描绘了DNA琼脂糖凝胶电泳以及AAV内所含的ITR-转基因的存在。C=柠檬酸盐,pH 2.5;P=磷酸,pH 1.5;"$+^{1}$"=pH10.3;"$+^{2}$"=pH 9.5;"$+^{3}$"=pH 10.2;"$+^{4}$"=pH 10.4;*=(C_2H_5)NCL阴离子交换洗脱。

[0096] 图10A至图10E示出了在以下处理之后来自静态光散射(SLS)的结果以及蛋白聚集(Tagg)和熔解(Tm)曲线:无酶处理(图10A);仅benzonase(图10B);benzonase和MNase(图10C);benzonase、无MNase、高pH洗涤和磷酸洗脱(图10D);以及benzonase、MNase、高pH洗涤和磷酸洗脱(图10E)。

[0097] 图11A和图11B示出了在以下纯化之后使用AlphaLISA检测宿主细胞DNA得到的原始计数(图11A)和浓度结果(图11B):在没有benzonase或MNase的情况下纯化("无酶");(2)在用benzonase和柠檬酸盐洗脱的情况下纯化("B、柠檬酸盐(亲和力)");(3)在用benzonase和柠檬酸盐洗脱的情况下纯化("B、柠檬酸盐");(4)在用benzonase、MNase和磷酸洗脱的情况下纯化("B、M、Phos");(5)在用benzonase、高pH(pH 10.3)洗涤和磷酸洗脱的情况下纯化("B、pH 10.3、Phos");以及(6)在用benzonase、MNase和磷酸洗脱的情况下纯化("B、M、pH10.3、Phos")。

[0098] 图12示出了在按照方案#1收集与产物峰相对应的AAV颗粒样品级分(泳道1)、按照方案#2收集与产物峰相对应的AAV颗粒样品级分(泳道2)以及按照方案#2收集与后产物峰相对应的AAV颗粒样品级分(泳道3)之后的凝胶电泳和银染。

[0099] 图13A至图13B示出了在1个或多个冷冻/解冻循环后AAV颗粒在示例性制剂#2(20mM Tris、100mM NaCl、5%海藻糖、0.001%泊洛沙姆-188,pH 7.5)中是稳定的,如通过DLS所测量的。图13A描绘了Z-平均尺寸的最小变化,并且图13B描绘了多分散指数(PDI)的

最小变化。

[0100] 图14A至图14B示出了在-80℃1至3个月后AAV颗粒在示例性制剂#2(20mM Tris、100mM NaCl、5％海藻糖、0.001％泊洛沙姆-188,pH7.5)中是稳定的,如通过DLS所测量的。图14A描绘了Z-平均尺寸的最小变化,并且图14B描绘了多分散指数(PDI)的最小变化。

[0101] 图15A至图15B示出了在1至5个冷冻/解冻循环后示例性制剂#2(20mM Tris、100mM NaCl、5％海藻糖、0.001％泊洛沙姆-188,pH 7.5)具有最小的AAV聚集,如通过SEC-FLD所测量的。图15A显示出非常少的高分子量物质(HMWS),并且图15B显示出所测量的样品几乎都是单体。

[0102] 图16A至图16B示出了在-80℃1至3个月后示例性制剂#2(20mM Tris、100mM NaCl、5％海藻糖、0.001％泊洛沙姆-188,pH 7.5)具有最小的AAV聚集,如通过SEC-FLD所测量的。图16A显示出非常少的高分子量物质(HMWS),并且图16B显示出所测量的样品几乎都是单体。

5.具体实施方式

[0103] 本公开部分地基于以下发现:可以将基本上不含杂质(例如,产物相关杂质和工艺相关杂质)的纯化病毒颗粒(例如,AAV颗粒)与缓冲剂、冷冻保护剂、非离子表面活性剂和任选的药学上可接受的盐中的一种或多种组合,以产生增强纯化的AAV颗粒的稳定性并且减少或防止它们的聚集的药物组合物。在某些方面,本公开还部分地基于以下发现:本文所述的药物组合物还适用于增强高滴度纯化的病毒颗粒的稳定性并且限制或防止它们的聚集(例如,浓度大于1×10^{13}个vg/mL)。

[0104] 背景以及说明书全篇中引用或描述了各种出版物、文章和专利;这些参考文献中的每一者全文均以引用方式并入本文。本说明书中包括的对文件、行为、材料、装置、文章等的讨论旨在为本发明提供上下文。此类讨论并不是承认这些事项中的任一事项或全部事项均相对于所公开或受权利要求书保护的任何发明形成现有技术的一部分。

[0105] 除非另有定义,否则本文使用的所有技术和科学术语的含义与本发明所属领域的普通技术人员通常所理解的含义相同。否则,本文所用的某些术语具有本说明书中所述的含义。本文引用的所有专利、公布的专利申请和出版物均以引用方式并入本文,如同在本文中进行了充分阐述。

[0106] 应该注意的是,除非上下文清楚地指明,否则如本文和所附权利要求中所用的单数形式“一个/一种”和“所述/该”包括复数引用物。

[0107] 贯穿本说明书和随后的权利要求书,除非上下文另有要求,否则词语“包括”以及诸如“包含”和“含有”的变型将被理解为暗示包括所陈述的整数或步骤或者整数或步骤的组,但不排除任何其他整数或步骤或者整数或步骤的组。当在本文使用时,术语“包含”可用术语“含有”或“包括”替代,或者有时在本文使用时用术语“具有”替代。

[0108] 当在本文使用时,“由……组成”排除权利要求要素中未指定的任何要素、步骤或成分。当在本文使用时,“基本上由……组成”不排除没有实质上影响权利要求的基本和新颖特征的材料或步骤。每当本文在本申请的一个方面或实施方案的上下文中使用时,任何前述术语“包含”、“含有”、“包括”和“具有”均可用术语“由……组成”或“基本上由……组成”替代以改变本公开的范围。

[0109] 如本文所用，多个列举的要素之间的连接术语“和/或”被理解为包含单个选项和组合选项两者。例如，在两个要素由“和/或”连接的情况下，第一种选项是指在没有第二个要素的情况下适用第一个要素。第二种选项是指在没有第一个要素的情况下适用第二个要素。第三种选项是指适合一起使用第一要素和第二要素。这些选项中的任一种均被理解为落在含义内，并且因此满足如本文所用的术语“和/或”的要求。多于一种选项的并行适用性也被理解为落在含义内，并且因此满足术语“和/或”的要求。

[0110] 如本文所用，术语“腺相关病毒(AAV)”旨在表示天然存在的形式(包括所有不同AAV血清型)以及非天然存在的形式的AAV(例如，重组rAAV和假型)及它们的变体。AAV病毒由Rep基因(被翻译为Rep78、Rep68、Rep52、Rep40-AAV生命周期所需)和Cap基因(被翻译为VP1、VP2、VP3-衣壳蛋白)组成。

[0111] 如本文所用，术语“病毒颗粒”或“AAV颗粒”旨在表示含基因组(也称为“完整衣壳”或“部分完整衣壳”以及空衣壳，或完整衣壳、部分完整衣壳和空衣壳的任何组合。

[0112] 如本文所用，术语“杂质”旨在表示存在于纯化的AAV颗粒中或与纯化的AAV颗粒一起存在的不是期望产物或药物组合物的预期组分的任何组分。AAV颗粒杂质包括工艺相关杂质和/或产物相关杂质。示例性工艺相关杂质包括但不限于残余宿主细胞组分(例如，蛋白质、DNA(包括病毒外染色质相关DNA)和/或RNA)、残余病毒生产组分(例如，质粒DNA和/或辅助病毒)、残余细胞培养组分(例如，抗生素、补充剂、诱导剂和/或生长因子)和残余纯化组分(例如，缓冲液、无机盐、酶、培养基和/或洗涤剂)以及其他污染物。示例性产物相关杂质可以包括但不限于空衣壳(在不期望的情况下)、聚集的AAV颗粒和降解的AAV颗粒。应当理解，样品可以“基本上不含”一种或多种杂质，但仍然具有少量(例如，不可检测的水平或低于可接受的范围)的一种或多种杂质，并且“基本上不含”不需要完全去除所有杂质。

[0113] 如本文所用，术语“滴度”旨在表示给定体积中的病毒的数量。病毒滴度可包括“物理滴度”或“功能滴度”。物理滴度是存在多少病毒的量度，并且一般被表示为每mL的病毒颗粒(VP/mL)或每mL的基因组拷贝(GC/mL)的数量。功能滴度或感染滴度是有多少病毒实际感染靶细胞的量度，并且一般以每mL的转导单位(TU/mL)的形式表示，或对于腺病毒而言以每mL的噬菌斑形成单位(pfu/mL)或每mL的感染单位(ifu/mL)的形式表示。应当理解，功能滴度一般将低于物理滴度，通常低约10至约100倍。

[0114] 如本文所用，术语“药学上可接受的盐”是指由药学上可接受的无毒酸或碱(包括无机酸和碱以及有机酸和碱)制备的盐。本文公开的药学上可接受的组合物的合适的药学上可接受的碱加成盐包括但不限于由铝、钙、锂、镁、钾、钠和锌制成的金属盐或者由赖氨酸、N,N'-二苄基乙二胺、氯普鲁卡因、胆碱、二乙醇胺、乙二胺、葡甲胺(N-甲基-葡糖胺)和普鲁卡因制成的有机盐。合适的无毒酸包括但不限于无机酸和有机酸，诸如乙酸、海藻酸、氨茴酸、苯磺酸、苯甲酸、樟脑磺酸、柠檬酸、乙烯磺酸、甲酸、富马酸、糠酸、半乳糖醛酸、葡糖酸、葡糖醛酸、谷氨酸、乙醇酸、氢溴酸、盐酸、羟乙磺酸、乳酸、马来酸、苹果酸、扁桃酸、甲磺酸、粘酸、硝酸、双羟萘酸、泛酸、苯乙酸、磷酸、丙酸、水杨酸、硬脂酸、琥珀酸、磺胺酸、硫酸、酒石酸和对甲苯磺酸。具体的无毒酸包括盐酸、氢溴酸、马来酸、磷酸、硫酸和甲磺酸。因此，具体的盐的示例包括盐酸盐和甲磺酸盐。

[0115] 如本文所用，术语“足够的量”旨在表示能够产生期望效果或实现期望结果(诸如AAV颗粒与固体支持体(诸如亲和支持体)结合，或从含有AAV颗粒的样品中去除杂质(例如，

宿主细胞蛋白、染色质和/或核酸))的数量。

[0116] 如本文所用,术语“基本上不含”在关于AAV颗粒的样品使用时旨在表示AAV颗粒的样品与未纯化的AAV颗粒(例如,粗收获物)相比包含小于约50%、小于约20%、小于约10%或小于约5%的杂质。

[0117] 除非另行指出,否则任何数值,诸如本文所述的浓度或浓度范围被理解为在所有情况下用术语“约”修饰。因此,数值通常包括所述值的±10%。例如,1mg/mL的浓度包括0.9mg/mL至1.1mg/mL。同样,1mg/mL至10mg/mL的浓度范围包括0.9mg/mL至11mg/mL。除非上下文另有明确指示,否则如本文所用,使用的数值范围明确地包括所有可能的子范围、该范围之内的所有单个数值,包括此类范围之内的整数和该范围之内的分数。

[0118] 为了帮助本申请的读者,已将说明书分成各个段落或章节,或者涉及本申请的各个实施方案。这些分割不应被认为是将段落或章节或实施方案的实质与另一段落或章节或实施方案的实质拆开。相反,本领域技术人员将理解,本说明书具有广泛的应用,并且涵盖可设想到的各个章节、段落和句子的所有组合。对任何实施方案的讨论仅意图是示例性的,并且不旨在表明本公开(包括权利要求书)的范围限于这些示例。本申请设想了以任何组合使用任何适用的组分,而不论是否明确描述特定组合。

[0119] 5.1药物组合物

[0120] 本文提供了包含纯化的AAV颗粒以及缓冲剂、冷冻保护剂、非离子表面活性剂和任选的药学上可接受的盐中的一种或多种的药物组合物,其中AAV颗粒基本上不含杂质。本文还提供了用于制备本文所述的药物组合物的方法。

[0121] 5.1.1AAV颗粒

[0122] 本公开部分地基于以下发现:产物纯度可以影响制剂开发。具体地,未包壳的核酸(例如,宿主细胞DNA/RNA、质粒DNA等)和蛋白质杂质[例如,宿主细胞蛋白、空衣壳(在不期望的情况下)等]除了具有明显的安全风险之外,还可能对产品稳定性和聚集具有深远影响。此外,不同的产品纯度可能会使制剂结果混淆。这可能表现为工艺稳健性差以及在引入最终制剂(无论是通过切向流过滤、透析、旋转过滤等)期间导致杂质分布变化的结果。

[0123] 杂质可以包括工艺相关杂质(例如,在AAV颗粒纯化后残留的杂质,诸如宿主细胞DNA或宿主细胞蛋白),以及产物相关杂质(例如,不是完整的非聚集衣壳的AAV颗粒)。因此,本文提供的药物组合物涉及基本上不含杂质的纯化的AAV颗粒。

[0124] 在一些实施方案中,AAV颗粒基本上不含杂质,其中杂质包括工艺相关杂质、产物相关杂质或它们的组合。工艺相关杂质可以包括残余宿主细胞组分、残余病毒生产组分、残余细胞培养组分、残余纯化组分或它们的组合。例如,在纯化AAV颗粒后,如果不采取适当的步骤来去除来自用于生成AAV颗粒的宿主细胞的残余量的核酸和/或蛋白质,这些杂质可能与纯化的AAV颗粒一起残留。因此,在一些实施方案中,AAV颗粒基本上不含宿主细胞蛋白、宿主细胞DNA、宿主细胞RNA或它们的组合。

[0125] 本公开的某些方面还基于以下发现:病毒外染色质相关DNA也是存在于纯化的AAV颗粒中的可能极大地影响AAV颗粒的纯度的杂质,以及本文(例如,在5.4节、5.5节中,和/或在实施例中)所述的示例性纯化方法通过使用染色质-DNA核酸酶显著提高了AAV颗粒的纯度。因此,在一些实施方案中,AAV颗粒基本上不含杂质,其中杂质包括病毒外染色质相关DNA。

[0126] 杂质也可能来自用于支持AAV颗粒生产的残余病毒生产组分。例如,如果不采取适当的步骤来去除用于在宿主细胞系统中生成AAV颗粒的核酸诸如质粒DNA或辅助病毒DNA,这些杂质也可能与纯化的AAV颗粒一起残留。用于去除残余病毒生产组分的纯化方法包括本文(例如,在5.4节、5.5节中,和/或在实施例中)所述的那些。因此,在一些实施方案中,AAV颗粒基本上不含残余病毒生产组分。在某些实施方案中,AAV颗粒基本上不含质粒DNA、辅助病毒或它们的组合。

[0127] 基本上不含杂质的本公开的AAV颗粒还可以包括基本上不含残余细胞培养组分的AAV颗粒。例如,宿主细胞可以在含有抗生素、生长因子、牛血清、诱导剂或其他补充剂的培养基中培养。这些细胞培养组分的去除对于生成纯化的AAV颗粒很重要。因此,在一些实施方案中,纯化的AAV颗粒基本上不含抗生素、补充剂、诱导剂、生长因子或它们的组合。

[0128] 可能影响纯化的AAV颗粒的另一种杂质来源包括用于纯化AAV颗粒的纯化试剂。例如,用于纯化AAV颗粒的示例性方法包括色谱,并且通常涉及用无机盐洗涤。用于纯化AAV颗粒的另一种示例性方法涉及离心,并且该示例性方法通常利用密度梯度介质来分离和离析AAV颗粒。因此,优选的是从包含在本文所述的药物组合物中的纯化的AAV颗粒中去除此类残余纯化组分。因此,在一些实施方案中,纯化的AAV颗粒基本上不含残余纯化组分。在一些实施方案中,残余纯化组分包括缓冲剂、无机盐、酶、洗涤剂、培养基或它们的组合。

[0129] 产物相关杂质代表可能对本文所述的药物组合物具有影响的另一种杂质来源。此类产物相关杂质包括例如聚集的AAV颗粒、降解的AAV颗粒和/或空衣壳(在不期望的情况下)。因此,在一些实施方案中,纯化的AAV颗粒基本上不含产物相关杂质。在一些实施方案中,产物相关杂质包括空衣壳(在不期望的情况下)、聚集的AAV颗粒、降解的AAV颗粒或它们的组合。在一些实施方案中,产物相关杂质包括聚集的AAV颗粒、降解的AAV颗粒或它们的组合。在具体实施方案中,产物相关杂质包括聚集的AAV颗粒。

[0130] 本公开还部分地基于以下发现:本文所述的药物组合物能够减少或防止甚至浓度大于每毫升1×10^{13}个病毒基因组(vg/mL)的AAV颗粒的聚集。迄今为止,AAV颗粒的现有制剂的前提是理解高滴度的病毒(即,滴度大于1×10^{13}个vg/mL)需要高离子强度(>200mM)制剂。通过示例的方式,典型的高离子强度制剂为大约500mM。相比之下,如本文所述,本公开的药物组合物适用于高滴度的AAV颗粒,并且不涉及高离子强度制剂。尽管本公开适用于高滴度的AAV颗粒,但是应当理解,本文所述的药物组合物不一定是高浓度的,并且所述药物组合物也适用于滴度低于1×10^{13}个vg/mL的AAV颗粒。

[0131] 在一些实施方案中,纯化的AAV颗粒的滴度为约1×10^{10}个病毒基因组/毫升(vg/mL)或更大。在一些实施方案中,纯化的AAV颗粒的滴度为约1×10^{11}个病毒基因组/毫升(vg/mL)或更大。在一些实施方案中,纯化的AAV颗粒的滴度为约1×10^{12}个病毒基因组/毫升(vg/mL)或更大。在一些实施方案中,纯化的AAV颗粒的滴度为约1×10^{13}个病毒基因组/毫升(vg/mL)或更大。在一些实施方案中,纯化的AAV颗粒的滴度为约1×10^{14}个病毒基因组/毫升(vg/mL)或更大。在一些实施方案中,纯化的AAV颗粒的滴度为约1×10^{15}个病毒基因组/毫升(vg/mL)或更大。

[0132] 本文所述的AAV颗粒不限于特定的血清型,并且任何AAV血清型以及AAV变体均适用于本文所述的药物组合物。例如,在一些实施方案中,AAV是AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9或AAV10。在一些实施方案中,AAV包括AAV1或基本上由其组成。在一

些实施方案中,AAV包括AAV2或基本上由其组成。在一些实施方案中,AAV包括AAV3或基本上由其组成。在一些实施方案中,AAV包括AAV4或基本上由其组成。在一些实施方案中,AAV包括AAV5或基本上由其组成。在一些实施方案中,AAV包括AAV6或基本上由其组成。在一些实施方案中,AAV包括AAV7或基本上由其组成。在一些实施方案中,AAV包括AAV8或基本上由其组成。在一些实施方案中,AAV包括AAV9或基本上由其组成。在一些实施方案中,AAV包括AAV10或基本上由其组成。在一些实施方案中,AAV包括AAV变体或基本上由其组成。在本公开的某些方面,AAV包括rAAV。

[0133] 本文所述的AAV颗粒旨在用于与AAV颗粒相容的任何下游应用。例如,在一些实施方案中,AAV颗粒适合用于基因疗法,并且纯化的AAV颗粒具有带治疗基因的AAV载体。然而,还应当理解,AAV颗粒也可以用作疫苗。此外,下游申请人扩展到治疗用途之外。例如,本文所述的AAV颗粒还可以用作激动剂,用于成像应用或其他非治疗用途。在一些实施方案中,可能期望的是具有包括空衣壳的AAV颗粒;包括完整衣壳和空衣壳的混合物的AAV颗粒;包括完整衣壳、部分完整衣壳和空衣壳的混合物的AAV颗粒;包括部分完整衣壳和空衣壳的混合物的AAV颗粒。在一些实施方案中,AAV颗粒包括空衣壳。在一些实施方案中,AAV颗粒包括完整衣壳。在一些实施方案中,AAV颗粒包括部分完整衣壳。在一些实施方案中,AAV颗粒包括完整衣壳和空衣壳的混合物。在一些实施方案中,AAV颗粒包括完整衣壳、部分完整衣壳和空衣壳的混合物。在一些实施方案中,AAV颗粒包括部分完整衣壳和空衣壳的混合物。因此,下游应用不受本文所述的药物组合物的限制。

[0134] 5.1.2缓冲剂

[0135] 在一些实施方案中,本文公开的药物组合物包含缓冲剂。在一些实施方案中,缓冲剂是本领域熟知的药学上可接受的缓冲剂。在一些实施方案中,缓冲剂是HEPES、Tris、Bicine、乙酸盐、谷氨酸盐、乳酸盐、马来酸盐、酒石酸盐、磷酸盐、柠檬酸盐、碳酸盐、甘氨酸盐、组氨酸、甘氨酸、赖氨酸、精氨酸、琥珀酸盐、HEPES(4-(2-羟乙基)-1-哌嗪乙磺酸)、MOPS(3-(N-吗啉代)丙磺酸)、MES(2-(N-吗啉代)乙磺酸)和三乙醇胺缓冲液以及它们的混合物。在一些实施方案中,缓冲剂是HEPES。在一些实施方案中,缓冲剂是Tris。在一些实施例中,缓冲剂是Bicine。在一些实施例中,缓冲剂是乙酸盐。在一些实施例中,缓冲剂是谷氨酸盐。在一些实施例中,缓冲剂是乳酸盐。在一些实施例中,缓冲剂是马来酸盐。在一些实施例中,缓冲剂是酒石酸盐。在一些实施例中,缓冲剂是磷酸盐。在一些实施例中,缓冲剂是柠檬酸盐。在一些实施例中,缓冲剂是碳酸盐。在一些实施例中,缓冲剂是甘氨酸盐。在一些实施例中,缓冲剂是组氨酸。在一些实施例中,缓冲剂是甘氨酸。在一些实施例中,缓冲剂是赖氨酸。在一些实施例中,缓冲剂是精氨酸。在一些实施例中,缓冲剂是琥珀酸盐。在一些实施方案中,缓冲剂是HEPES(4-(2-羟乙基)-1-哌嗪乙磺酸)。在一些实施方案中,缓冲剂是MOPS(3-(N-吗啉代)丙磺酸)。在一些实施方案中,缓冲剂是MES(2-(N-吗啉代)乙磺酸)。在一些实施方案中,缓冲剂是三乙醇胺缓冲液。

[0136] 在一些实施方案中,缓冲剂是Tris或组氨酸以及它们的混合物。在一些实施方案中,缓冲剂是Tris。在一些实施例中,缓冲剂是组氨酸。在一些实施方案中,缓冲剂是Tris和组氨酸的混合物。

[0137] 在一些实施方案中,缓冲剂包括Tris HCl或L-组氨酸HCl或它们的混合物。在一些实施方案中,缓冲剂包括L-组氨酸HCl。在一些实施方案中,缓冲剂包括Tris HCl。在一些实

施方案中,缓冲剂是Tris HCl。在一些实施方案中,缓冲剂是L-组氨酸HCl。

[0138] 在一些实施方案中,缓冲剂具有在约4.0至约9.0、约6.0至约8.0或约7.3至约7.7范围内的pH。在一些实施方案中,缓冲剂具有在约4.0至约9.0范围内的pH。在一些实施方案中,缓冲剂具有在约6.0至约8.0范围内的pH。在一些实施方案中,缓冲剂具有在约7.3至约7.7范围内的pH。在一个实施方案中,缓冲剂具有约7.5的pH。

[0139] 在一些实施方案中,本文公开的药物组合物包含约0mM至约50mM、约0mM至约45mM、约0mM至约40mM、约0mM至约35mM、约0mM至约30mM、约0mM至约25mM、约0mM至约20mM、约5至约30mM、约10至约25mM或约15mM至约20mM的缓冲剂。在一些实施方案中,本文公开的药物组合物包含约0.5mM、约1mM、约2mM、约3mM、约4mM、约5mM、约6mM、约7mM、约8mM、约9mM、约10mM、约11mM、约12mM、约13mM、约14mM、约15mM、约16mM、约17mM、约18mM、约19mM或约20mM的缓冲剂。在一些实施方案中,本文公开的药物组合物包含约0mM至约50mM的缓冲剂。在一些实施方案中,药物组合物包含约0mM至约45mM的缓冲剂。在一些实施方案中,药物组合物包含约0mM至约40mM的缓冲剂。在一些实施方案中,药物组合物包含约0mM至约35mM的缓冲剂。在一些实施方案中,药物组合物包含约0mM至约30mM的缓冲剂。在一些实施方案中,药物组合物包含约0mM至约25mM的缓冲剂。在一些实施方案中,药物组合物包含约0mM至约20mM的缓冲剂。在一些实施方案中,药物组合物包含约5mM至约30mM的缓冲剂。在一些实施方案中,药物组合物包含约10mM至约25mM的缓冲剂。在一些实施方案中,药物组合物包含约15mM至约20mM的缓冲剂。在一些实施方案中,本文公开的药物组合物包含约0.5mM的缓冲剂。在一些实施方案中,药物组合物包含约1mM的缓冲剂。在一些实施方案中,药物组合物包含约2mM的缓冲剂。在一些实施方案中,药物组合物包含约3mM的缓冲剂。在一些实施方案中,药物组合物包含约4mM的缓冲剂。在一些实施方案中,药物组合物包含约5mM的缓冲剂。在一些实施方案中,药物组合物包含约6mM的缓冲剂。在一些实施方案中,药物组合物包含约7mM的缓冲剂。在一些实施方案中,药物组合物包含约8mM的缓冲剂。在一些实施方案中,药物组合物包含约9mM的缓冲剂。在一些实施方案中,药物组合物包含约10mM的缓冲剂。在一些实施方案中,药物组合物包含约11mM的缓冲剂。在一些实施方案中,药物组合物包含约12mM的缓冲剂。在一些实施方案中,药物组合物包含约13mM的缓冲剂。在一些实施方案中,药物组合物包含约14mM的缓冲剂。在一些实施方案中,药物组合物包含约15mM的缓冲剂。在一些实施方案中,药物组合物包含约16mM的缓冲剂。在一些实施方案中,药物组合物包含约17mM的缓冲剂。在一些实施方案中,药物组合物包含约18mM的缓冲剂。在一些实施方案中,药物组合物包含约19mM的缓冲剂。在一个实施方案中,本文公开的药物组合物包含约20mM的缓冲剂。

[0140] 5.1.3冷冻保护剂

[0141] 在一些实施方案中,本文公开的药物组合物还包含冷冻保护剂。在一些实施方案中,冷冻保护剂是有机溶剂、多元醇、聚合物、糖或它们的组合。在一些实施方案中,冷冻保护剂是DMSO(二甲基亚砜)、乙二醇、甘油、丙二醇、(MPD)2-甲基-2,4-戊二醇、甘油-3-磷酸酯、二乙二醇、三甘醇、聚乙烯醇、PEG、羟乙基淀粉、山梨醇、甘露糖醇、乳糖、蔗糖、海藻糖或它们的组合。在一些实施方案中,冷冻保护剂是有机溶剂。在一些实施方案中,冷冻保护剂是多元醇。在一些实施方案中,冷冻保护剂是聚合物。在一些实施方案中,冷冻保护剂是糖。在一些实施方案中,冷冻保护剂是DMSO(二甲基亚砜)。在一些实施方案中,冷冻保护剂是乙二醇。在一些实施方案中,冷冻保护剂是甘油。在一些实施方案中,冷冻保护剂是丙二醇。在

一些实施方案中,冷冻保护剂是(MPD)2-甲基-2,4-戊二醇。在一些实施方案中,冷冻保护剂是甘油-3-磷酸酯。在一些实施方案中,冷冻保护剂是二乙二醇。在一些实施方案中,冷冻保护剂是三甘醇。在一些实施方案中,冷冻保护剂是聚乙烯醇。在一些实施方案中,冷冻保护剂是PEG。在一些实施方案中,冷冻保护剂是羟乙基淀粉。在一些实施方案中,冷冻保护剂是山梨醇。在一些实施方案中,冷冻保护剂是甘露醇。在一些实施方案中,冷冻保护剂是乳糖。在一些实施方案中,冷冻保护剂是蔗糖。在一些实施方案中,冷冻保护剂是海藻糖。在一个实施方案中,冷冻保护剂包括糖。在一些实施方案中,糖是单糖。在一些实施方案中,糖是二糖。在一些实施方案中,糖是多糖。在一个这样的实施方案中,糖是蔗糖、海藻糖或它们的组合。在一个实施方案中,冷冻保护剂是海藻糖。

[0142] 在一些实施方案中,本文公开的药物组合物包含约1%(w/v)至约10%(w/v)、约3%(w/v)至约8%(w/v)或约4%(w/v)至约6%(w/v)冷冻保护剂。在一些实施方案中,本文公开的药物组合物包含约1%(w/v)至约10%(w/v)冷冻保护剂。在一些实施方案中,本文公开的药物组合物包含约3%(w/v)至约8%(w/v)冷冻保护剂。在一些实施方案中,本文公开的药物组合物包含约4%(w/v)至约6%(w/v)冷冻保护剂。在一些实施方案中,本文公开的药物组合物包含约1%(w/v)、约2%(w/v)、约3%(w/v)、约4%(w/v)、约5%(w/v)、约6%(w/v)、约7%(w/v)、约8%(w/v)、约9%(w/v)或约10%(w/v)冷冻保护剂。在一个实施方案中,本文公开的药物组合物包含约1%(w/v)冷冻保护剂。在一个实施方案中,本文公开的药物组合物包含约2%(w/v)冷冻保护剂。在一个实施方案中,本文公开的药物组合物包含约3%(w/v)冷冻保护剂。在一个实施方案中,本文公开的药物组合物包含约4%(w/v)冷冻保护剂。在一个实施方案中,本文公开的药物组合物包含约5%(w/v)冷冻保护剂。在一个实施方案中,本文公开的药物组合物包含约6%(w/v)冷冻保护剂。在一个实施方案中,本文公开的药物组合物包含约7%(w/v)冷冻保护剂。在一个实施方案中,本文公开的药物组合物包含约8%(w/v)冷冻保护剂。在一个实施方案中,本文公开的药物组合物包含约9%(w/v)冷冻保护剂。在一个实施方案中,本文公开的药物组合物包含约10%(w/v)冷冻保护剂。

[0143] 5.1.4非离子表面活性剂

[0144] 在一些实施方案中,本文公开的药物组合物还包含非离子表面活性剂。在一些实施方案中,非离子表面活性剂是共聚物。在一些实施方案中,非离子表面活性剂是泊洛沙姆。泊洛沙姆是一种非离子三嵌段共聚物,由聚氧丙烯(聚(环氧丙烷))的中心疏水链和两侧的聚氧乙烯(聚(环氧乙烷))的两条亲水链构成。泊洛沙姆还以商品名Pluronic®已知。因为聚合物嵌段的长度可以定制,所以存在性质略有不同的许多不同泊洛沙姆。对于通用术语“泊洛沙姆”,这些共聚物通常以字母“P”(代表泊洛沙姆)后跟三位数字命名,前两位数字×100给出聚氧丙烯核心的近似分子质量,并且最后一位数字×10给出聚氧乙烯含量百分比(例如,P407=聚氧丙烯分子量为4,000g/mol且聚氧乙烯含量为70%的泊洛沙姆)。在一些实施方案中,泊洛沙姆是P188、P237、P338或P407。在一个实施方案中,泊洛沙姆是P188。在一个实施方案中,泊洛沙姆是P237。在一个实施方案中,泊洛沙姆是P338。在一个实施方案中,泊洛沙姆是P407。在一些实施方案中,非离子表面活性剂是聚氧乙烯脱水山梨糖醇酯表面活性剂(通常称为Tween),诸如PS-20和PS-80;环氧乙烷(EO)、磷脂诸如磷脂酰胆碱(卵磷脂)的共聚物;衍生自月桂醇、鲸蜡醇、硬脂醇和油醇的聚氧乙烯脂肪醚(称为Brij表面活性剂),诸如三甘醇单月桂醚(Brij 30)或聚氧乙烯(23)月桂醚(Brij 35);以及脱水山梨糖

醇酯(通常称为SPAN),诸如脱水山梨糖醇三油酸酯(Span 85)和脱水山梨糖醇单月桂酸酯。在一个实施方案中,非离子表面活性剂是聚山梨酯20(PS-20)、聚山梨酯80(PS-80)或Brij表面活性剂或它们的组合。在一个实施方案中,非离子表面活性剂是聚山梨酯。在一个实施方案中,聚山梨酯是PS-20。在一个实施方案中,聚山梨酯是PS-40。在一个实施方案中,聚山梨酯是PS-60。在一个实施方案中,聚山梨酯是PS-80。在一个实施方案中,非离子表面活性剂是Brii表面活性剂。在一个实施方案中,非离子表面活性剂是EO的共聚物。在一个实施方案中,非离子表面活性剂是磷脂。在一个实施方案中,非离子表面活性剂是磷脂酰胆碱(卵磷脂)。在一个实施方案中,非离子表面活性剂是衍生自月桂醇的聚氧乙烯脂肪醚。在一个实施方案中,非离子表面活性剂是衍生自鲸蜡醇的聚氧乙烯脂肪醚。在一个实施方案中,非离子表面活性剂是衍生自硬脂醇的聚氧乙烯脂肪醚。在一个实施方案中,非离子表面活性剂是衍生自油醇的聚氧乙烯脂肪醚。在一个实施方案中,非离子表面活性剂是三甘醇单月桂醚(Brij 30)。在一个实施方案中,非离子表面活性剂是聚氧乙烯(23)月桂醚(Brij 35)。在一个实施方案中,非离子表面活性剂是脱水山梨糖醇酯。在一个实施方案中,非离子表面活性剂是脱水山梨糖醇三油酸酯(Span 85)。在一个实施方案中,非离子表面活性剂是脱水山梨糖醇单月桂酸酯。

[0145] 在一些实施方案中,本文公开的药物组合物包含约0.0001%(w/v)至约0.1%(w/v)、约0.0005%(w/v)至约0.005%(w/v)、约0.00075%(w/v)至约0.0025%(w/v)非离子表面活性剂。在一些实施方案中,本文公开的药物组合物包含约0.0001%(w/v)至约0.1%(w/v)非离子表面活性剂。在一些实施方案中,本文公开的药物组合物包含约0.0005%(w/v)至约0.005%(w/v)非离子表面活性剂。在一些实施方案中,本文公开的药物组合物包含约0.00075%(w/v)至约0.0025%(w/v)非离子表面活性剂。

[0146] 在一些实施方案中,药物组合物包含约0.001%(w/v)、约0.0015%(w/v)、约0.002%(w/v)、约0.0025%(w/v)、约0.003%(w/v)、约0.0035%(w/v)、约0.004%(w/v)、约0.0045%(w/v)、约0.005%(w/v)、约0.0055%(w/v)、约0.006%(w/v)、约0.0065%(w/v)、约0.007%(w/v)、约0.0075%(w/v)、约0.008%(w/v)、约0.0085%(w/v)、约0.009%(w/v)、约0.0095%(w/v)非离子表面活性剂。在一些实施方案中,药物组合物包含约0.001%(w/v)非离子表面活性剂。在一些实施方案中,药物组合物包含约0.0015%(w/v)非离子表面活性剂。在一些实施方案中,药物组合物包含约0.002%(w/v)非离子表面活性剂。在一些实施方案中,药物组合物包含约0.0025%(w/v)非离子表面活性剂。在一些实施方案中,药物组合物包含约0.003%(w/v)非离子表面活性剂。在一些实施方案中,药物组合物包含约0.0035%(w/v)非离子表面活性剂。在一些实施方案中,药物组合物包含约0.004%(w/v)非离子表面活性剂。在一些实施方案中,药物组合物包含约0.0045%(w/v)非离子表面活性剂。在一些实施方案中,药物组合物包含约0.005%(w/v)非离子表面活性剂。在一些实施方案中,药物组合物包含约0.0055%(w/v)非离子表面活性剂。在一些实施方案中,药物组合物包含约0.006%(w/v)非离子表面活性剂。在一些实施方案中,药物组合物包含约0.0065%(w/v)非离子表面活性剂。在一些实施方案中,药物组合物包含约0.007%(w/v)非离子表面活性剂。在一些实施方案中,药物组合物包含约0.0075%(w/v)非离子表面活性剂。在一些实施方案中,药物组合物包含约0.008%(w/v)非离子表面活性剂。在一些实施方案中,药物组合物包含约0.0085%(w/v)非离子表面活性剂。在一些实施方案中,药物组合

物包含约0.009％(w/v)非离子表面活性剂。在一些实施方案中，药物组合物包含约0.0095％(w/v)非离子表面活性剂。

[0147] 5.1.5药学上可接受的盐

[0148] 如本文所提供，本公开的药物组合物还可以包括药学上可接受的盐。因此，在本公开的一些方面，药物组合物包括纯化的AAV颗粒、药学上可接受的盐、缓冲剂、冷冻保护剂和非离子表面活性剂。

[0149] 在一些实施方案中，药学上可接受的盐是金属盐以及氨或有机胺的盐，它们在药物制剂中对于施用于受试者(例如，人)是安全的。合适的药学上可接受的盐包括但不限于钠、钾、镁、钙、铯、铵、三乙胺、胍和N-取代的胍盐、乙脒和N-取代的乙脒、吡啶、甲基吡啶、乙醇胺、三乙醇胺、二环己基胺和N,N'-二苄基乙二胺盐。(碱性氮中心的)药学上可接受的盐包括但不限于无机酸盐，诸如盐酸盐、氢溴酸盐、硫酸盐、磷酸盐；有机酸盐，诸如三氟乙酸盐和马来酸盐；磺酸盐，诸如甲磺酸盐、乙磺酸盐、苯磺酸盐、对甲苯磺酸盐、樟脑磺酸盐和萘磺酸盐；氨基酸盐，诸如精氨酸盐、丙氨酸盐、天冬氨酸盐和谷氨酸盐；以及碳水化合物盐，诸如葡糖酸盐和半乳糖醛酸盐。可用于本文的其他盐是本领域熟知的，参见例如Remington's Pharmaceutical Sciences，第18版，Mack Publishing，Easton PA(1990)或Remington:The Science and Practice of Pharmacy，第19版，Mack Publishing，Easton PA(1995)，它们以引用方式全文并入本文用于所有意图和目的。在一个实施方案中，药学上可接受的盐是钠盐、镁盐、钙盐、钾盐、磷酸盐或硫酸盐。在一个实施方案中，药学上可接受的盐是金属盐。在一个实施方案中，药学上可接受的盐是钠盐。在一些实施方案中，药学上可接受的盐是镁盐。在一些实施方案中，药学上可接受的盐是钙盐。在一些实施方案中，药学上可接受的盐是钾盐。在一些实施方案中，药学上可接受的盐是磷酸盐。在一些实施方案中，药学上可接受的盐是硫酸盐。在一个实施方案中，药学上可接受的盐是氯化钠。

[0150] 在一些实施方案中，药学上可接受的盐的浓度为约1mM至约200mM。在一些实施方案中，药学上可接受的盐的浓度为约10mM至约150mM。在一些实施方案中，药学上可接受的盐的浓度为约1mM至约49mM。在一些实施方案中，药学上可接受的盐的浓度为约5mM至约45mM。在一些实施方案中，药学上可接受的盐的浓度为约7.5mM至约40mM。在一些实施方案中，药学上可接受的盐的浓度为约10mM至约30mM。在一些实施方案中，药学上可接受的盐的浓度小于约200mM、小于约150mM、小于约100mM、小于约90mM、小于约80mM、小于约70mM、小于约60mM、小于约50mM、小于约40mM、小于约30mM、小于约20mM或小于约10mM。在一些实施方案中，药学上可接受的盐的浓度小于约200mM。在一些实施方案中，药学上可接受的盐的浓度小于约150mM。在一些实施方案中，药学上可接受的盐的浓度小于约100mM。在一些实施方案中，药学上可接受的盐的浓度小于约90mM。在一些实施方案中，药学上可接受的盐的浓度小于约80mM。在一些实施方案中，药学上可接受的盐的浓度小于约70mM。在一些实施方案中，药学上可接受的盐的浓度小于约60mM。在一些实施方案中，药学上可接受的盐的浓度小于约50mM。在一些实施方案中，药学上可接受的盐的浓度小于约40mM。在一些实施方案中，药学上可接受的盐的浓度小于约30mM。在一些实施方案中，药学上可接受的盐的浓度小于约20mM。在一些实施方案中，药学上可接受的盐的浓度小于约10mM。在一些实施方案中，药学上可接受的盐的浓度为约200mM、约150mM、约100mM或约50mM。在一些实施方案中，药学上可接受的盐的浓度为约150mM。在一些实施方案中，药学上可接受的盐的浓度为约100mM。在一

些实施方案中，药学上可接受的盐的浓度为约10mM。

[0151] 5.1.6 pH条件

[0152] 如本文所提供，本公开的药物组合物可以具有约4.0至约9.0的pH。在一些实施方案中，药物组合物的pH为约7.0至约8.0。在一些实施方案中，药物组合物的pH为约7.3至约7.7。在某些实施方案中，药物组合物的pH为约4.0、约4.1、约4.2、约4.3、约4.4、约4.5、约4.6、约4.7、约4.8、约4.9、约5.0、约5.1、约5.2、约5.3、约5.4、约5.5、约5.6、约5.7、约5.8、约5.9、约6.0、约6.1、约6.2、约6.3、约6.4、约6.5、约6.6、约6.7、约6.8、约6.9、约7.0、约7.1、约7.2、约7.3、约7.4、约7.5、约7.6、约7.7、约7.8、约7.9、约8.0、约8.1、约8.2、约8.3、约8.4、约8.5、约8.6、约8.7、约8.8、约8.9、约9.0。在一些实施方案中，药物组合物的pH为约7.3至约7.7。在某些实施方案中，药物组合物的pH为约4.0。在某些实施方案中，药物组合物的pH为约4.1。在某些实施方案中，药物组合物的pH为约4.2。在某些实施方案中，药物组合物的pH为约4.3。在某些实施方案中，药物组合物的pH为约4.4。在某些实施方案中，药物组合物的pH为约4.5。在某些实施方案中，药物组合物的pH为约4.6。在某些实施方案中，药物组合物的pH为约4.7。在某些实施方案中，药物组合物的pH为约4.8。在某些实施方案中，药物组合物的pH为约4.9。在某些实施方案中，药物组合物的pH为约5.0。在某些实施方案中，药物组合物的pH为约5.1。在某些实施方案中，药物组合物的pH为约5.2。在某些实施方案中，药物组合物的pH为约5.3。在某些实施方案中，药物组合物的pH为约5.4。在某些实施方案中，药物组合物的pH为约5.5。在某些实施方案中，药物组合物的pH为约5.6。在某些实施方案中，药物组合物的pH为约5.7。在某些实施方案中，药物组合物的pH为约5.8。在某些实施方案中，药物组合物的pH为约5.9。在某些实施方案中，药物组合物的pH为约6.0。在某些实施方案中，药物组合物的pH为约6.1。在某些实施方案中，药物组合物的pH为约6.2。在某些实施方案中，药物组合物的pH为约6.3。在某些实施方案中，药物组合物的pH为约6.4。在某些实施方案中，药物组合物的pH为约6.5。在某些实施方案中，药物组合物的pH为约6.6。在某些实施方案中，药物组合物的pH为约6.7。在某些实施方案中，药物组合物的pH为约6.8。在某些实施方案中，药物组合物的pH为约6.9。在某些实施方案中，药物组合物的pH为约7.0。在某些实施方案中，药物组合物的pH为约7.1。在某些实施方案中，药物组合物的pH为约7.2。在某些实施方案中，药物组合物的pH为约7.3。在某些实施方案中，药物组合物的pH为约7.4。在某些实施方案中，药物组合物的pH为约7.5。在某些实施方案中，药物组合物的pH为约7.6。在某些实施方案中，药物组合物的pH为约7.7。在某些实施方案中，药物组合物的pH为约7.8。在某些实施方案中，药物组合物的pH为约7.9。在某些实施方案中，药物组合物的pH为约8.0。在某些实施方案中，药物组合物的pH为约8.1。在某些实施方案中，药物组合物的pH为约8.2。在某些实施方案中，药物组合物的pH为约8.3。在某些实施方案中，药物组合物的pH为约8.4。在某些实施方案中，药物组合物的pH为约8.5。在某些实施方案中，药物组合物的pH为约8.6。在某些实施方案中，药物组合物的pH为约8.7。在某些实施方案中，药物组合物的pH为约8.8。在某些实施方案中，药物组合物的pH为约8.9。在某些实施方案中，药物组合物的pH为约9.0。还可以想到上述pH值的居间范围。

[0153] 5.1.7药物组合物的状态

[0154] 本文提供的药物组合物可以是液体组合物或冷冻组合物。因此，在一些实施方案中，药物组合物处于液体状态。在其他实施方案中，药物组合物处于固体或半固体状态。

[0155] 5.2药物组合物和施用途径

[0156] 在某些实施方案中，本文公开的组合物通过本领域技术人员已知的一种或多种方法施用于受试者，诸如胃肠外、经粘膜、经皮、肌内、静脉内、皮内、鼻内、皮下、腹膜内，并且相应地配制。在一个实施方案中，本文所述的组合物经由液体制备物的表皮注射、肌内注射、静脉内、动脉内、皮下注射或呼吸道粘膜内注射来施用。用于注射的液体制剂包括溶液等。

[0157] 5.3储存条件

[0158] 在某些实施方案中，本文公开的组合物储存在环境温度诸如约25℃。在一些实施方案中，本文公开的组合物储存在低于25℃。在一些实施方案中，本文公开的组合物储存在约0℃至约25℃之间。在一些实施方案中，组合物储存在0℃至10℃之间。在一些实施方案中，组合物储存在约2℃至约8℃之间。在一些实施方案中，组合物储存在约4℃。在一些实施方案中，组合物储存在0℃以下。在一些实施方案中，组合物储存在约-20℃至约-80℃之间。在一些实施方案中，组合物储存在约-20℃。在一些实施方案中，组合物储存在约-70℃。在一些实施方案中，组合物储存在约-80℃。

[0159] 如本文所提供，在一个或多个冷冻/解冻循环后，本文公开的组合物可以维持或增强纯化的AAV颗粒的稳定性并且/或者减少或防止的聚集。在一些实施方案中，本文公开的组合物维持纯化的AAV颗粒的稳定性。在一些实施方案中，在一个冷冻/解冻循环后，本文公开的组合物减少聚集。在一些实施方案中，在超过一个冷冻/解冻循环后，本文公开的组合物减少聚集。在一些实施方案中，在一个冷冻/解冻循环后，本文公开的组合物防止聚集。在一些实施方案中，在超过一个冷冻/解冻循环后，本文公开的组合物防止聚集。

[0160] 在某些实施方案中，组合物储存在0℃以下，并且在一个或多个冷冻/解冻循环后，稳定性得以维持或增强。在某些实施方案中，组合物储存在-20℃，并且在一个或多个冷冻/解冻循环后，稳定性得以维持或增强。在某些实施方案中，组合物储存在-20℃，并且在一个或多个冷冻/解冻循环后，稳定性得以维持或增强。在某些实施方案中，组合物储存在-70℃，并且在一个或多个冷冻/解冻循环后，稳定性得以维持或增强。在某些实施方案中，组合物储存在-80℃，并且在一个或多个冷冻/解冻循环后，稳定性得以维持或增强。在一些实施方案中，稳定性得以维持。在一些实施方案中，在一个冷冻/解冻循环后，稳定性得以维持。在一些实施方案中，在超过一个冷冻/解冻循环后，稳定性得以维持。在一些实施方案中，稳定性得以增强。在一些实施方案中，在一个冷冻/解冻循环后，稳定性得以增强。在一些实施方案中，在超过一个冷冻/解冻循环后，稳定性得以增强。

[0161] 在某些实施方案中，组合物储存在0℃以下，并且在三个或更多个冷冻/解冻循环后，稳定性得以维持或增强。在某些实施方案中，组合物储存在-20℃，并且在三个或更多个冷冻/解冻循环后，稳定性得以维持或增强。在某些实施方案中，组合物储存在-20℃，并且在三个或更多个冷冻/解冻循环后，稳定性得以维持或增强。在某些实施方案中，组合物储存在-70℃，并且在三个或更多个冷冻/解冻循环后，稳定性得以维持或增强。在某些实施方案中，组合物储存在-80℃，并且在三个或更多个冷冻/解冻循环后，稳定性得以维持或增强。在一些实施方案中，稳定性得以维持。在一些实施方案中，在三个冷冻/解冻循环后，稳定性得以维持。在一些实施方案中，在超过三个冷冻/解冻循环后，稳定性得以维持。在一些实施方案中，稳定性得以增强。在一些实施方案中，在三个冷冻/解冻循环后，稳定性得以增

强。在一些实施方案中，在超过三个冷冻/解冻循环后，稳定性得以增强。

[0162] 在一些实施方案中，组合物储存在0℃以下，并且在一个或多个冷冻/解冻循环后，聚集得以减少或防止。在一些实施方案中，组合物储存在约-20℃，并且在一个或多个冷冻/解冻循环后，聚集得以减少或防止。在一些实施方案中，组合物储存在约-70℃，并且在一个或多个冷冻/解冻循环后，聚集得以减少或防止。在一些实施方案中，组合物储存在约-80℃，并且在一个或多个冷冻/解冻循环后，聚集得以减少或防止。在一些实施方案中，在一个或多个冷冻/解冻循环后，AAV颗粒的聚集小于5％。在一些实施方案中，在一个或多个冷冻/解冻循环后，AAV颗粒的聚集小于2％。在一些实施方案中，在一个或多个冷冻/解冻循环后，AAV颗粒的聚集小于1％。在一些实施方案中，聚集得以减少。在一些实施方案中，在一个冷冻/解冻循环后，聚集得以减少。在一些实施方案中，在超过一个冷冻/解冻循环后，聚集得以减少。在一些实施方案中，聚集得以防止。在一些实施方案中，在一个冷冻/解冻循环后，聚集得以防止。在一些实施方案中，在超过一个冷冻/解冻循环后，聚集得以防止。

[0163] 在一些实施方案中，组合物储存在0℃以下，并且在三个或更多个冷冻/解冻循环后，聚集得以减少或防止。在一些实施方案中，组合物储存在约-20℃，并且在三个或更多个冷冻/解冻循环后，聚集得以减少或防止。在一些实施方案中，组合物储存在约-70℃，并且在三个或更多个冷冻/解冻循环后，聚集得以减少或防止。在一些实施方案中，组合物储存在约-80℃，并且在三个或更多个冷冻/解冻循环后，聚集得以减少或防止。在一些实施方案中，在三个或更多个冷冻/解冻循环后，AAV颗粒的聚集小于5％。在一些实施方案中，在三个或更多个冷冻/解冻循环后，AAV颗粒的聚集小于2％。在一些实施方案中，在三个或更多个冷冻/解冻循环后，AAV颗粒的聚集小于1％。在一些实施方案中，聚集得以减少。在一些实施方案中，在三个冷冻/解冻循环后，聚集得以减少。在一些实施方案中，在超过三个冷冻/解冻循环后，聚集得以减少。在一些实施方案中，聚集得以防止。在一些实施方案中，在三个冷冻/解冻循环后，聚集得以防止。在一些实施方案中，在超过三个冷冻/解冻循环后，聚集得以防止。

[0164] 5.4示例性制剂

[0165] 本文公开的示例性制剂包括但不限于以下或实施例中描述的制剂中的任一种。然而，应当理解，本申请不限于以下描述的并且通过示例的方式提供的精确实施方案。

[0166] 在一个实施方案中，药物组合物包括包含纯化的AAV颗粒、缓冲剂、冷冻保护剂和非离子表面活性剂的药物组合物，其中(a)纯化的AAV颗粒基本上不含杂质，(b)缓冲剂的浓度为约20mM，(c)冷冻保护剂为约5％(w/v)海藻糖，并且(d)非离子表面活性剂为约0.001％(w/v)泊洛沙姆188。在一些实施方案中，缓冲剂包括Tris HCl。在一些实施方案中，缓冲剂包括L-组氨酸HCl。

[0167] 在一个实施方案中，药物组合物包括包含纯化的AAV颗粒、药学上可接受的盐、缓冲剂、冷冻保护剂和非离子表面活性剂的药物组合物，其中(a)纯化的AAV颗粒基本上不含杂质，(b)药学上可接受的盐的浓度为约10mM氯化钠，(c)缓冲剂的浓度为约20mM，(d)冷冻保护剂为约5％(w/v)海藻糖，并且(e)非离子表面活性剂为约0.001％(w/v)泊洛沙姆188。在一些实施方案中，缓冲剂包括Tris HCl。在一些实施方案中，缓冲剂包括L-组氨酸HCl。

[0168] 在一个实施方案中，药物组合物包括包含纯化的AAV颗粒、药学上可接受的盐、缓冲剂、冷冻保护剂和非离子表面活性剂的药物组合物，其中(a)纯化的AAV颗粒基本上不含

杂质,(b)药学上可接受的盐的浓度为约25mM氯化钠,(c)缓冲剂的浓度为约20mM,(d)冷冻保护剂为约5%(w/v)海藻糖,并且(e)非离子表面活性剂为约0.001%(w/v)泊洛沙姆188。在一些实施方案中,缓冲剂包括Tris HCl。在一些实施方案中,缓冲剂包括L-组氨酸HCl。

[0169] 在一个实施方案中,药物组合物包括包含纯化的AAV颗粒、药学上可接受的盐、缓冲剂、冷冻保护剂和非离子表面活性剂的药物组合物,其中(a)纯化的AAV颗粒基本上不含杂质,(b)药学上可接受的盐的浓度为约50mM氯化钠,(c)缓冲剂的浓度为约20mM,(d)冷冻保护剂为约5%(w/v)海藻糖,并且(e)非离子表面活性剂为约0.001%(w/v)泊洛沙姆188。在一些实施方案中,缓冲剂包括Tris HCl。在一些实施方案中,缓冲剂包括L-组氨酸HCl。

[0170] 在另一个方面,药物组合物包括包含纯化的AAV颗粒、药学上可接受的盐、缓冲剂、冷冻保护剂和非离子表面活性剂的药物组合物,其中(a)纯化的AAV颗粒基本上不含杂质,(b)药学上可接受的盐的浓度为约100mM氯化钠,(c)缓冲剂的浓度为约20mM,(d)冷冻保护剂为约5%(w/v)海藻糖,并且(e)非离子表面活性剂为约0.001%(w/v)泊洛沙姆188。在一些实施方案中,缓冲剂包括Tris HCl。在一些实施方案中,缓冲剂包括L-组氨酸HCl。

[0171] 在另一个方面,药物组合物包括包含纯化的AAV颗粒、药学上可接受的盐、缓冲剂、冷冻保护剂和非离子表面活性剂的药物组合物,其中(a)纯化的AAV颗粒基本上不含杂质,(b)药学上可接受的盐的浓度为约125mM氯化钠,(c)缓冲剂的浓度为约20mM,(d)冷冻保护剂为约5%(w/v)海藻糖,并且(e)非离子表面活性剂为约0.001%(w/v)泊洛沙姆188。在一些实施方案中,缓冲剂包括Tris HCl。在一些实施方案中,缓冲剂包括L-组氨酸HCl。

[0172] 在另一个方面,药物组合物包括包含纯化的AAV颗粒、药学上可接受的盐、缓冲剂、冷冻保护剂和非离子表面活性剂的药物组合物,其中(a)纯化的AAV颗粒基本上不含杂质,(b)药学上可接受的盐的浓度为约150mM氯化钠,(c)缓冲剂的浓度为约20mM,(d)冷冻保护剂为约5%(w/v)海藻糖,并且(e)非离子表面活性剂为约0.001%(w/v)泊洛沙姆188。在一些实施方案中,缓冲剂包括Tris HCl。在一些实施方案中,缓冲剂包括L-组氨酸HCl。

[0173] 在另一个方面,药物组合物包括包含纯化的AAV颗粒、药学上可接受的盐、缓冲剂、冷冻保护剂和非离子表面活性剂的药物组合物,其中(a)纯化的AAV颗粒基本上不含杂质,(b)药学上可接受的盐的浓度为约200mM氯化钠,(c)缓冲剂的浓度为约20mM,(d)冷冻保护剂为约5%(w/v)海藻糖,并且(e)非离子表面活性剂为约0.001%(w/v)泊洛沙姆188。在一些实施方案中,缓冲剂包括Tris HCl。在一些实施方案中,缓冲剂包括L-组氨酸HCl。

[0174] 5.5AAV颗粒的纯化

[0175] 可以使用本领域已知的各种方法来纯化AAV颗粒。一般来讲,纯化涉及离心、色谱或过滤或可能它们的组合。在一些实施方案中,纯化可包括两步纯化方案,包括例如两个色谱步骤或色谱与超速离心/过滤的组合。作为示例,两步纯化方案可包括通过亲和色谱(例如,使用肝素亲和树脂)的纯化,之后在离子交换柱上精制。另一个例示性两步纯化方案可涉及超速离心(例如,碘克沙醇密度超速离心)和随后的色谱(例如,亲和色谱,诸如肝素亲和纯化)。

[0176] 纯化过程中使用的原料的过滤和/或离心可有助于去除一些大块杂质,诸如细胞碎片和/或细胞片段。因此,在一些实施方案中,该上清液是澄清的上清液。在某些实施方案中,在一个或多个附加纯化步骤(诸如色谱纯化)之前执行过滤和/或离心。用于澄清上清液的各种方法是本领域中已知的。例如,可使用0.2μm过滤器来澄清上清液。在具体实施方案

中,可在一个或多个附加纯化步骤之前用Benzonase®处理澄清的上清液。

[0177] 用于纯化AAV颗粒的离心技术可包括例如密度梯度离心、超速离心或它们的组合。示例性类型的密度梯度离心可涉及CsCl,其在经受强离心场时形成密度梯度。例如,当将病毒在CsCl盐中离心至平衡时,这些病毒与污染物分离并且基于其浮力密度而收集在各条带中。在一些实施方案中,AAV颗粒的纯化包括多个CsCl梯度离心步骤。用于纯化AAV颗粒的另一种示例性密度介质可包括碘克沙醇。在一些实施方案中,AAV颗粒的纯化可包括密度梯度离心(例如,不连续碘克沙醇梯度离心)作为预纯化步骤,之后是亲和色谱病毒纯化步骤(诸如通过肝素化支持基质色谱或离子交换色谱)。

[0178] 在一些实施方案中,AAV颗粒的纯化涉及色谱。例如,大规模数量的AAV颗粒的纯化一般涉及某种形式的色谱,由此基于与固定材料(固相或固体支持体)的化学或物理相互作用的差异来分离溶液(流动相)中的分子。示例性类型的色谱包括例如凝胶过滤(也称为尺寸排阻色谱或SEC),其使用多孔树脂材料以基于大小来分离分子(即,物理排阻)。另一种例示性类型的色谱是亲和色谱(也称为亲和纯化)。

[0179] 在某些实施方案中,色谱涉及色谱柱。如本文所公开,可使用各种类型的色谱柱来纯化AAV颗粒。在某些实施方案中,该色谱柱是整体。整体是包括具有许多互连通道的单块均匀固定相的色谱柱。整体的固定相可具有各种化学物质,从而允许纯化具有不同特性的不同种类的生物分子。然而,应当理解,该柱不必是整体,并且还可使用小珠、基于多孔颗粒的柱和膜吸附剂。

[0180] 亲和色谱利用分子之间的特异性结合相互作用,诸如配体结合于靶分子或与靶分子的特异性离子相互作用。示例性类型的亲和色谱涉及基于病毒衣壳与偶联至色谱基质的特异性生物配体或受体之间的可逆相互作用来将病毒颗粒从蛋白质和核酸污染物分离。在一些实施方案中,通过亲和色谱的纯化可包括带负电的纤维素亲和介质cellulofine硫酸酯。另选的亲和纯化方法基于单克隆抗体(例如,A20)识别AAV颗粒(例如,AAV2颗粒),从而允许分离未组装的衣壳蛋白。亲和色谱的附加例示性示例包括肝素亲和。

[0181] 在一些实施方案中,亲和色谱可对于待纯化的AAV颗粒的AAV衣壳血清型或假型具有特异性。例如,一些AAV血清型(诸如AAV1、4和5)不太有效地结合肝素柱。因此,在一些实施方案中,用于捕获例如AAV5颗粒的亲和基质可包括共价偶联至CNBr活化的琼脂糖的富含唾液酸的蛋白质(称为粘蛋白)。另选地,PDGFR-α和PDGFR-β可用作用于捕获例如AAV5颗粒的特异性分子。

[0182] 在一些实施方案中,该色谱是离子交换色谱。离子交换色谱涉及根据分子与固相材料的总体离子相互作用的强度来分离这些分子。通过离子交换色谱的纯化基于病毒衣壳的外部上的蛋白质的净电荷。表面蛋白质的净电荷取决于暴露的氨基酸基团的pH。

[0183] 一种示例性类型的离子交换色谱是阴离子交换色谱,其用于基于分子的净表面电荷来分离这些分子。阴离子交换色谱使用对带净负表面电荷的分子具有亲和力的带正电荷的离子交换树脂。应当理解,以上提供的示例旨在是示例性的,并且不旨在穷举可与本公开一起使用的色谱的类型。

[0184] 如本文所提供,可在纯化AAV颗粒的过程中采用的一种示例性类型的纯化是亲和色谱。在一些实施方案中,该亲和色谱可涉及特定配体,该配体以化学方式固定或“偶联”至固体支持体(例如,亲和支持体),使得当复杂混合物穿过该柱时,对该配体具有特异性结合

亲和力的那些分子被结合。在其他实施方案中，该亲和色谱可涉及基于特定净表面电荷的离子相互作用，使得对固体支持体具有基于其净表面电荷的特异性结合亲和力的分子被结合。

[0185] 在一些实施方案中，该亲和色谱是离子交换色谱。如先前所述，离子交换色谱根据分子与固相材料(诸如亲和支持体)的总体离子相互作用的强度来分离这些分子。在一些实施方案中，该离子交换色谱是阴离子交换色谱。可使用阴离子交换色谱基于分子的净表面电荷来分离这些分子。例如，阴离子交换色谱使用对带净负表面电荷的分子具有亲和力的带正电荷的离子交换树脂。

[0186] 如上所述，色谱一般涉及基于与固定材料(固相或固体支持体)的化学或物理相互作用的差异来分离的溶液(流动相)中的分子。各种形式的色谱还可任选地涉及洗涤以从固体支持体去除非期望的组分。因此，在一些实施方案中，本文所提供的方法涉及洗涤固体支持体。在洗掉其他样品组分之后，将结合的分子从支持体反萃取(即，洗脱)，从而使其从初始样品纯化。

[0187] AAV颗粒的洗脱可通过线性梯度洗脱或通过使用分步等度洗脱来洗脱。通常，可使用梯度洗脱来优化洗脱条件。一旦已确定感兴趣的蛋白质的洗脱概况并且已知蛋白质在什么离子强度或pH下洗脱，就可使用分步洗脱来加速该纯化过程。根据用于纯化AAV颗粒的色谱类型，洗脱条件涉及竞争性配体或涉及变化的pH、离子强度或极性。靶蛋白可以以纯化且浓缩的形式洗脱。例如，对于离子交换色谱而言，最终产物可根据其净表面电荷依次洗脱。pI值更接近7.5的样品将在更低离子强度下洗脱，并且具有极低pI值的样品将在高盐浓度下洗脱。

[0188] 在一些实施方案中，AAV颗粒可使用低pH缓冲液来洗脱。在某些实施方案中，高pH缓冲液紧接在低pH缓冲液的使用之前使用，称为“高/低pH缓冲液”。在具体实施方案中，低pH为约pH 2.5。在一些实施方案中，低pH缓冲液为柠檬酸盐缓冲液、甘氨酸缓冲液或磷酸缓冲液。在某些实施方案中，低pH缓冲液包括弱酸。

[0189] 如本文所提供，将乙醇添加到洗脱步骤可改善病毒从离子交换柱的回收。因此，在一些实施方案中，洗脱缓冲液可以包括乙醇。在一些实施方案中，乙醇可以为约5％至约40％的乙醇。在一些实施方案中，乙醇可以为约10％至约30％的乙醇。在一些实施方案中，乙醇可以为约15％至约25％的乙醇。在具体实施方案中，乙醇可以为约20％的乙醇。

[0190] 使用低pH缓冲液执行的洗脱通常需要立即中和洗脱缓冲液。因此，在一些实施方案中，洗脱还包括中和缓冲液的pH。在具体实施方案中，中和包括添加Bis-Tris丙烷(BTP)。在某些实施方案中，中和包括添加Tris。由于用于Ad或AAV纯化程序的许多色谱洗脱缓冲液不适用于体内操纵，因此附加纯化步骤(诸如透析或浓缩)可能有必要。因此，在一些实施方案中，纯化还包括AAV病毒颗粒的透析和/或浓缩。

[0191] 因此，在一些实施方案中，本文提供了一种用于纯化AAV颗粒的方法，该方法包括(a)将包含AAV颗粒的上清液与固体支持体一起温育足够的时间量以结合AAV颗粒；(b)使包含AAV颗粒的上清液与包含染色质-DNA核酸酶的组合物接触；以及(c)使纯化的AAV颗粒洗脱。应当理解，还可在AAV颗粒的结合之前执行与染色质-DNA核酸酶的接触。因此，在一些实施方案中，本文提供了一种用于纯化腺相关病毒(AAV)颗粒的方法，该方法包括(a)使包含AAV颗粒的上清液与包含染色质-DNA核酸酶的组合物接触；(b)将包含AAV颗粒的上清液与

固体支持体一起温育足够的时间量以结合AAV颗粒;以及(c)使纯化的AAV颗粒洗脱。类似地,还应当理解,与染色质-DNA核酸酶的接触不必组合在固体支持体的环境中,而是可与本领域中已知的任何AAV颗粒纯化技术组合。在某些实施方案中,使纯化的AAV颗粒经受一次或多次附加纯化以精制AAV颗粒。例如,可以通过亲和色谱来纯化颗粒,然后通过不同类型的色谱(诸如阴离子交换色谱)来精制颗粒。

[0192] 在一些实施方案中,该方法还包括在洗脱样品之前洗涤固体支持体。如本文所述,可使用保持靶标与配体之间的结合相互作用的适当缓冲液来执行从支持体洗掉未结合的样品组分。洗涤可以去除一些未结合的污染物。在一些实施方案中,可通过添加低水平的洗涤剂或通过对结合和/或洗涤缓冲液中的盐浓度进行适度调节来使非特异性结合相互作用最小化。

[0193] 如本文所提供,在一些实施方案中,可通过用高pH洗涤来增加AAV颗粒的纯度。例如,可通过亲和色谱来纯化批量收获液(bulk harvest),然后用高pH缓冲液洗涤以去除杂质。在一些实施方案中,高pH洗涤之后是用Benzonase®和/或染色质-DNA核酸酶进行柱上酶处理。在某些实施方案中,高pH洗涤缓冲液大于pH 9。在一些实施方案中,高pH洗涤缓冲液在pH 9.5与pH 10.9之间。在其他实施方案中,高pH洗涤缓冲液为pH9.5。在一些实施方案中,高pH洗涤缓冲液为pH 10.2。在一些实施方案中,高pH洗涤缓冲液为pH 10.3。在一些实施方案中,高pH洗涤缓冲液为pH 10.4。

[0194] 在一些实施方案中,染色质-DNA核酸酶是微球菌核酸酶(MNase)(EC 3.1.31.1)。从金黄色葡萄球菌(Staphylococcus aureus)分离的MNase是具有非特异性核酸内外切酶活性并能够消化核酸(DNA和/或RNA)的磷酸二酯酶。MNase消化连接两个核小体的接头区内的暴露的核酸,直到其遇到障碍物(核小体或其他核酸结合蛋白)。MNase可适用于从细胞裂解物去除核酸,从而释放染色质结合的蛋白质,而DNase优先裂解核小体缺失或“游离”的DNA。MNase消化双链、单链、环状和线性核酸。在一些实施方案中,上清液中的MNase的浓度大于2.5单位/mL(U/mL)。在某些实施方案中,上清液中的MNase的浓度大于10单位/mL。在具体实施方案中,上清液中的MNase的浓度为约30单位/mL至约100单位/mL。在更具体的实施方案中,上清液中的MNase的浓度为约60单位/mL。在一些实施方案中,MNase是具有MNase活性的多肽。在一个实施方案中,MNase以足够的量存在以消化与AAV颗粒相关的染色质。

[0195] 在一个实施方案中,MNase以足够的量存在以减少AAV颗粒杂质。在一个实施方案中,AAV颗粒杂质包括宿主细胞DNA、宿主细胞蛋白、染色质相关DNA和DNA结合蛋白中的一种或多种。在一个实施方案中,AAV颗粒杂质包括宏观和微观杂质。在一个实施方案中,DNA结合蛋白包括组蛋白。

[0196] 在一个实施方案中,MNase以足以减少AAV颗粒后产物级分的量存在,如通过260nm处的吸光度所测量的。在一个实施方案中,MNase以足以减少AAV颗粒后产物级分的量存在,如通过280nm处的吸光度所测量的。

[0197] 在一个实施方案中,MNase以足以产生纯化的AAV颗粒的量存在,所述纯化的AAV颗粒具有与聚集温度(Tagg)的偏差在小于约10℃以内的熔解温度(Tm),如动态光散射(DLS)所测量。在一个实施方案中,MNase以足以产生纯化的AAV颗粒的量存在,所述纯化的AAV颗粒具有与聚集温度(Tagg)的偏差在小于约5℃以内的熔解温度(Tm),如动态光散射(DLS)所测量。在一个实施方案中,MNase以足以产生纯化的AAV颗粒的量存在,所述纯化的AAV颗粒

具有与聚集温度(Tagg)的偏差在小于约2℃以内的熔解温度(Tm),如动态光散射(DLS)所测量。

[0198] 染色质-DNA核酸酶释放在病毒外与AAV颗粒复合的DNA结合蛋白和游离核酸所需的时长的确定在本领域技术人员的技能范围内。在某些实施方案中,温育持续约10分钟至约1小时。在一些实施方案中,温育持续约20分钟至约40分钟。在具体实施方案中,温育持续约30分钟。

[0199] 在本文所提供的方法的一些实施方案中,包含染色质-DNA核酸酶的组合物还可包含Benzonase®核酸酶(来自粘质沙雷氏菌(Serratia marcescens)的核酸内切酶;酶学委员会(EC)编号3.1.30.2)。Benzonase®是可降解可接近的DNA和RNA(例如,非染色质DNA)的混杂核酸内切酶。其攻击并降解所有形式的DNA和RNA(例如,单链、双链、线性和环状)并且在广泛操作条件范围内有效。例如,其可消化天然或热变性的DNA和RNA。

[0200] Benzonase®的添加可有助于去除存在于粗样品中的核酸酶敏感核酸,诸如来自宿主生产细胞的残余核酸。尽管可包括Benzonase®的添加以消化游离核酸,诸如降低蛋白样品的粘度,但其自身不足以释放在病毒外与AAV颗粒复合的DNA结合蛋白。在一些实施方案中,将Benzonase®和染色质-DNA核酸酶一起温育。在具体实施方案中,在亲和交换色谱之后将Benzonase®和染色质-DNA核酸酶一起温育。然而,应当理解,Benzonase®处理不必与染色质-DNA核酸酶同时执行。例如,在一些实施方案中,在纯化之前将Benzonase®添加到批量收获液。还应当理解,任何Benzonase®产品都适用于本公开。

[0201] 尽管本公开描述了Benzonase®在某些实施方案中用作示例性核酸内切酶,但是应当理解,可使用能够减少残余宿主细胞DNA的任何核酸酶或具有能够减少残余宿主细胞DNA的核酸酶的活性的多肽。此类另选的核酸酶可以包括例如cryonase(源自嗜冷菌希瓦氏菌属物种(Shewanella sp.)的重组核酸内切酶)、盐活性核酸酶(SAN)或DNase I™。

[0202] 如本文所提供,使包含AAV颗粒的样品与MNase接触可以去除染色质相关DNA、宿主细胞蛋白,并且相对于未经MNase处理的样品,提高AAV颗粒的总收率。因此,在一些实施方案中,当与未接触MNase的纯化的AAV颗粒相比时,使用本文提供的方法制备的纯化的AAV颗粒基本上不含染色质相关DNA。在某些实施方案中,当与未接触MNase的纯化的AAV颗粒相比时,纯化的AAV颗粒基本上不含宿主细胞蛋白。在一些实施方案中,当与未接触MNase的纯化的AAV颗粒相比时,AAV颗粒具有增加的收率。

[0203] 5.6 AAV的产生

[0204] 各种生产平台当前用于产生AAV颗粒并且是本领域中已知的,它们中的每一种均适合用于本文所述的纯化方法和组合物。用于大规模生成AAV颗粒的示例性方法可以涉及例如在哺乳动物细胞中进行质粒DNA转染、稳定哺乳动物细胞系的Ad感染、用重组单纯疱疹病毒(rHSV)感染哺乳动物细胞以及用重组杆状病毒感染昆虫细胞(参见例如Penaud-Budloo M.等人,Mol Ther Methods Clin Dev.2018年1月8日;8:166-180)。

[0205] 用于产生AAV颗粒的示例性方法是例如人胚胎HEK293细胞的质粒转染。例如,可使用无机化合物(例如,磷酸钙)或有机化合物(例如,聚乙烯亚胺(PEI))或非化学方式(例如,电穿孔),同时用包含感兴趣的基因的质粒和一个或两个辅助质粒转染HEK293细胞。辅助质

粒允许表达四种Rep蛋白质(Rep78、Rep68、Rep52、Rep40)、三种AAV结构蛋白质(VP1、VP2和VP3)、AAP以及腺病毒辅助功能E2A、E4和VA RNA。AAV复制所需的附加腺病毒E1A/E1B辅因子可在HEK293生产者细胞中表达。质粒可使用细菌来源和抗生素抗性基因通过大肠杆菌(E.coli)中的常规技术或通过微环(MC)技术来产生。生产者细胞(诸如HEK293生产者细胞)可为贴壁培养物或悬浮培养物。

[0206] 另一种例示性产生方法涉及用rHSV载体感染哺乳动物细胞。细胞(诸如仓鼠BHK21细胞系或HEK293和衍生物)可被感染上两种rHSV,其中一种携带由AAV ITR连接的感兴趣的基因(rHSV-AAV)并且第二种具有用于产生AAV颗粒的期望血清型的AAV rep和cap ORF(rHSV-repcap)。

[0207] 用于产生AAV颗粒的稳定生产者细胞系提供了用于产生AAV颗粒的另外一种例示性方法。例如,稳定生产者细胞系可来源于细胞系(例如,HEK293细胞、HeLa细胞或衍生物)并且通过引入AAV rep和cap基因(包装细胞系)和/或待产生的AAV基因组(例如,rAAV基因组)(生产者细胞)来工程化。用于产生AAV颗粒的另一种例示性稳定细胞系包括掺入了通常有毒的AAV复制(rep)基因以及AAV衣壳(cap)基因和转基因的稳定细胞系(参见例如,美国申请号62/877,508,该申请在本文中完全公开)。

[0208] 还应当理解,生产者细胞系不必是哺乳动物细胞系,并且非哺乳动物细胞(诸如昆虫细胞和酵母)可用于生产。适用于产生AAV颗粒的非哺乳动物平台的例示性示例包括杆状病毒-Sf9昆虫细胞平台。适用于产生AAV颗粒的非哺乳动物细胞系可以使用转染方法来生成或生成为稳定细胞系(参见例如Mietzsch M.等人,Hum.Gene Ther.,2014;25:212-222;Mietzsch M.等人,Hum.Gene Ther.,Methods.2017;28:15-22)。上述AAV颗粒生产平台的示例应被理解为例示性的,并非旨在进行限制,并且各种生产平台中的任何生产平台可与本文所述的纯化方法和组合物组合。

[0209] 如本文所用,“载体”是用于将遗传物质携带到细胞中并可使之在此进行复制和/或表达的核酸分子。可使用本领域技术人员根据本公开已知的任何载体。载体的示例包括但不限于质粒、病毒载体(噬菌体、动物病毒和植物病毒)、粘粒和人工染色体(例如,YAC)。优选地,载体是DNA质粒。本领域的普通技术人员可根据本公开通过标准重组技术来构建本申请的载体。

[0210] 本申请的载体可为表达载体。如本文所用,术语“表达载体”是指包含编码能够被转录的RNA的核酸的任何类型的基因构建体。表达载体包括但不限于用于重组蛋白表达的载体(诸如DNA质粒或病毒载体)和用于将核酸递送到受试者中以在受试者的组织中表达的载体(诸如DNA质粒或病毒载体)。本领域技术人员应当理解,表达载体的设计可以取决于诸如待转化的宿主细胞的选择、期望的蛋白质的表达水平等之类的因素。

[0211] 在本申请的一些实施方案中,载体是非病毒载体。非病毒载体的示例包括但不限于DNA质粒、细菌人工染色体、酵母人工染色体、噬菌体等。优选地,非病毒载体是DNA质粒。“DNA质粒”(其可与“DNA质粒载体”、“质粒DNA”或“质粒DNA载体”互换使用)是指能够在合适的宿主细胞中自主复制的双链且大致环状的DNA序列。用于表达所编码的多核苷酸的DNA质粒通常包含复制起点、多克隆位点和选择性标记,该选择性标记例如可为抗生素抗性基因。可使用的合适DNA质粒的示例包括但不限于用于熟知表达系统(包括原核系统和真核系统)的可商购获得的表达载体,诸如可用于在大肠杆菌(Escherichia coli)中生产和/或表达

蛋白质的pSE420(Invitrogen,San Diego,Calif.);可用于在酵母的酿酒酵母(Saccharomyces cerevisiae)菌株中生产和表达的pYES2(Invitrogen,Thermo Fisher Scientific);可用于在昆虫细胞中生产和/或表达的MAXBAC®完整杆状病毒表达系统(Thermo Fisher Scientific);可用于哺乳动物细胞中的高水平组成型蛋白表达的pcDNA™或pcDNA3™(Life Technologies,Thermo Fisher Scientific);以及可用于大部分哺乳动物细胞中感兴趣的蛋白质的高水平瞬时表达的pVAX或pVAX-1(Life Technologies,Thermo Fisher Scientific)。可以通过使用常规技术和易得原料来修饰任何可商购获得的DNA质粒的骨架以优化宿主细胞中的蛋白表达,诸如使某些元件(例如,复制起点和/或抗生素抗性盒)的取向反向、替换质粒内源的启动子(例如,抗生素抗性盒中的启动子)和/或替换编码所转录的蛋白质的多核苷酸序列(例如,抗生素抗性基因的编码序列)。(参见例如Sambrook等人,Molecular Cloning a Laboratory Manual,第二版,Cold Spring Harbor Press(1989))。

[0212] 优选地,DNA质粒是适用于哺乳动物宿主细胞中的蛋白表达的表达载体。适用于哺乳动物宿主细胞中的蛋白表达的表达载体包括但不限于pUC、pcDNATM、pcDNA3TM、pVAX、pVAX-1、ADVAX、NTC8454等。例如,载体可以基于含有pUC复制起点和氨苄青霉素抗性基因的pUC57。其还可包含哺乳动物嘌呤霉素抗性基因盒,该哺乳动物嘌呤霉素抗性基因盒由疱疹病毒胸苷激酶基因启动子、嘌呤霉素N-乙酰转移酶编码区和来自牛生长激素基因的聚腺苷酸化信号构建。该载体还可包含爱泼斯坦-巴尔病毒(EBV)OriP复制起点片段,该片段表示EBV的“二重对称”区和“重复序列家族”区的复合物。

[0213] 本申请的载体也可为病毒载体。一般来讲,病毒载体是携带经修饰的病毒DNA或RNA的基因工程化病毒,该经修饰的病毒DNA或RNA已呈现非感染性,但仍包含病毒启动子和转基因,因此允许通过病毒启动子来翻译该转基因。由于病毒载体常常缺少感染序列,因此它们需要辅助病毒或包装系来大规模转染。可使用的病毒载体的示例包括但不限于腺病毒载体、腺相关病毒载体、痘病毒载体、肠道病毒载体、委内瑞拉马脑炎病毒载体、赛姆利基森林病毒载体、烟草花叶病毒载体、慢病毒载体等。该载体也可为非病毒载体。

[0214] 例示性病毒载体是腺病毒载体,例如重组腺病毒载体。如本文所用,术语“重组腺病毒载体(recombinant adenovirus vector)”和“重组腺病毒载体(recombinant adenoviral vector)”和“重组腺病毒颗粒”可互换使用并且是指基因工程化腺病毒,该基因工程化腺病毒被设计为将感兴趣的多核苷酸插入到真核细胞中,使得随后表达该多核苷酸。可用作本发明的病毒载体的腺病毒的示例包括具有或来源于以下血清型的那些腺病毒:Ad2、Ad5、Ad11、Ad12、Ad24、Ad26、Ad34、Ad35、Ad40、Ad48、Ad49、Ad50、Ad52(例如,RhAd52)和Pan9(也称为AdC68);这些载体可来源于例如人、黑猩猩(例如,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或SA7P)或恒河猴腺病毒(例如,rhAd51、rhAd52或rhAd53)。重组腺病毒载体可例如来源于人腺病毒(HAdV或AdHu)或猿猴腺病毒诸如黑猩猩或大猩猩腺病毒(ChAd、AdCh或SAdV)或恒河猴腺病毒(rhAd)。

[0215] 优选地,腺病毒载体是重组人腺病毒载体,例如重组人腺病毒血清型5、或重组人

腺病毒血清型26、4、35、7、48等中的任何一种。可根据本公开使用本领域已知的方法制备可用于本申请的重组病毒载体。例如，考虑到遗传密码的简并性，可设计编码相同多肽的若干核酸序列。可以任选地对编码感兴趣的蛋白质的多核苷酸进行密码子优化以确保在宿主细胞(例如，细菌或哺乳动物细胞)中正确表达。密码子优化是本领域中广泛应用的技术，并且根据本公开，用于获得密码子优化的多核苷酸的方法将为本领域技术人员所熟知。

[0216] 非天然存在的核酸分子或载体可包含一个或多个表达盒。“表达盒”是核酸分子或载体中的指导细胞机制产生RNA和蛋白质的一部分。表达盒可以包含启动子序列、开放阅读框、任选地包含聚腺苷酸化信号的3'-非翻译区(UTR)。开放阅读框(ORF)是包含感兴趣的蛋白质(例如，Rep、Cap、重组酶或感兴趣的重组蛋白质)的从起始密码子到终止密码子的编码序列的阅读框。表达盒的调控元件能够可操作地连接至编码感兴趣的蛋白质的多核苷酸序列。

[0217] 本申请的非天然存在的核酸分子或载体可包含多种调控序列。如本文所用，术语“调控序列”是指允许、促成或调节核酸分子的功能调控的任何序列，该功能调控包括核酸或其衍生物中的一种(即，mRNA)的复制、倍增、转录、剪接、翻译、稳定和/或向宿主细胞或生物体的运输。调控元件包括但不限于启动子、增强子、聚腺苷酸化信号、翻译终止密码子、核糖体结合元件、转录终止子、选择标记、复制起点等。

[0218] 非天然存在的核酸分子或载体可包含启动子序列(优选地在表达盒内)，以控制感兴趣的蛋白质的表达。术语“启动子”以其常规含义使用，是指启动可操作地连接的核苷酸序列的转录的核苷酸序列。启动子位于其转录的核苷酸序列附近的相同链上。启动子可以是组成型、诱导型或阻抑型。启动子可以是天然存在的或合成的。启动子可以来源于各种源头，包括病毒、细菌、真菌、植物、昆虫和动物。启动子可以是同源启动子(即，来源于与载体相同的遗传源头)或异源启动子(即，来源于不同的载体或遗传源头)。例如，如果待采用的载体是DNA质粒，则启动子可以是质粒内源的(同源)或来源于其他源(异源)。优选地，启动子位于表达盒内的编码感兴趣的蛋白质的多核苷酸的上游。

[0219] 可使用的启动子的示例包括但不限于来自猿猴病毒40(SV40)的启动子、小鼠乳腺瘤病毒(MMTV)启动子、人类免疫缺陷病毒(HIV)启动子(诸如牛免疫缺陷病毒(BIV)长末端重复序列(LTR)启动子)、莫洛尼病毒启动子、禽白血病病毒(ALV)启动子、巨细胞病毒(CMV)启动子(诸如CMV立即早期启动子(CMV-IE))、爱泼斯坦-巴尔病毒(EBV)启动子或劳氏肉瘤病毒(RSV)启动子。启动子还可以是来自人类基因(诸如人肌动蛋白、人肌球蛋白、人血红蛋白、人肌肉肌酸或人金属硫蛋白)的启动子。启动子还可以是组织特异性启动子，诸如肌肉或皮肤特异性启动子(天然或合成)。优选地，启动子是强真核启动子，诸如巨细胞病毒(CMV)启动子(nt-672至+15)、EF1-α启动子、疱疹病毒胸苷激酶基因启动子等。

[0220] 非天然存在的核酸分子或载体可以包含附加的多核苷酸序列，这些多核苷酸序列稳定表达的转录物、增强RNA转录物的核输出，并且/或者改善转录-翻译偶联。此类序列的示例包括聚腺苷酸化信号和增强子序列。聚腺苷酸化信号通常位于载体的表达盒内的感兴趣的蛋白质(例如，Rep、Cap、重组酶)的编码序列的下游。增强子序列是当被转录因子结合时增强相关联基因的转录的调控DNA序列。增强子序列优选地位于启动子序列的下游并且可位于载体的表达盒内的编码序列的下游或上游。

[0221] 可以使用本领域技术人员根据本公开已知的任何聚腺苷酸化信号。例如，聚腺苷

酸化信号可以是SV40聚腺苷酸化信号、AAV2聚腺苷酸化信号(bp 4411-4466,NC_001401)、来自单纯疱疹病毒胸腺激酶基因的聚腺苷酸化信号、LTR聚腺苷酸化信号、牛生长激素(bGH)聚腺苷酸化信号、人生长激素(hGH)聚腺苷酸化信号或人β-珠蛋白聚腺苷酸化信号。优选地,聚腺苷酸化信号是牛生长激素(bGH)聚腺苷酸化信号、AAV2的聚腺苷酸化信号(其具有GenBank登录号NC_001401的核苷酸序列的核苷酸编号4411至4466)或SV40聚腺苷酸化信号。

[0222] 可以使用本领域技术人员根据本公开已知的任何增强子序列。例如,增强子序列可以是人肌动蛋白、人肌球蛋白、人血红蛋白、人肌肉肌酸或病毒增强子,诸如来自CMV、HA、RSV或EBV的病毒增强子。特定增强子的示例包括但不限于土拨鼠HBV转录后调控元件(WPRE)、来源于人载脂蛋白A1前体(ApoAI)的内含子/外显子序列、人T细胞白血病病毒1型(HTLV-1)长末端重复序列(LTR)的非翻译R-U5结构域、剪接增强子、合成兔β-珠蛋白内含子或它们的任何组合。

[0223] 优选地,增强子序列包含AAV的P5启动子。P5启动子是rep基因的编码序列内的顺式作用Rep依赖型元件(CARE)的一部分。CARE显示出在以顺式的方式存在时增强复制和衣壳化。CARE对于如一些AAV颗粒生产者细胞系中的染色体整合的rep基因(如果不存在AAV ITR)的扩增也很重要。虽然不希望受理论的约束,但据信置于cap编码序列下游的P5启动子潜在地充当增强子以增加Cap表达,因此增加AAV颗粒收率,并且其还提供用于扩增整合到染色体中的基因的增强子活性。

[0224] 非天然存在的核酸分子或载体(诸如DNA质粒)还可包括细菌复制起点以及用于细菌细胞(例如,大肠杆菌)中质粒的选择和维持的抗生素抗性表达盒。复制起点(ORI)是在此发起复制的序列,从而使质粒能够在细胞内繁殖和生存。适用于本申请的ORI的示例包括但不限于ColE1、pMB1、pUC、pSC101、R6K和15A,优选pUC。

[0225] 用于在细菌细胞中选择和维持的载体通常包含可操作地连接至抗生素抗性基因的启动子序列。优选地,可操作地连接至抗生素抗性基因的启动子序列不同于可操作地连接至编码感兴趣的蛋白质的多核苷酸序列的启动子序列。可对抗生素抗性基因进行密码子优化,并且通常调节抗生素抗性基因的序列组成以适应细菌(例如,大肠杆菌)密码子使用。可使用本领域技术人员根据本公开已知的任何抗生素抗性基因,包括但不限于卡那霉素抗性基因(Kan^r)、氨苄青霉素抗性基因(Amp^r)和四环素抗性基因(Tet^r)以及赋予对氯霉素、博来霉素、壮观霉素、羧苄青霉素等的抗性的基因。

[0226] 5.7用于测试药物组合物性质的测定

[0227] 如本文所提供,本公开的药物组合物能够防止AAV颗粒的聚集和/或增强其稳定性。用于测量AAV颗粒的物理性质(例如,AAV粒径)、病毒滴度和/或纯度的各种技术是本领域已知的。下文提供了示例性测定,并且在一些情况下,该测定可以测量多种性质。然而,应当理解,本申请不限于以下描述的测定。

[0228] 5.7.1测量特性的示例性测定

[0229] 用于评估AAV颗粒制备物的特性的测定是本领域已知的。例如,分析病毒蛋白表达的测定可以用于评估AAV颗粒的特性。此类测定包括但不限于SDS-PAGE、质谱、免疫印迹和ELISA。病毒蛋白的适当数量、分子量和化学计量可以用于明确地鉴定载体以及杂质的存在。另外,可以使用PCR或高通量NGS(下一代基因组测序)来评估载体基因组以确保明确特

性。

[0230] 5.7.2测量病毒滴度的示例性测定

[0231] 本公开的AAV颗粒还可以通过它们的病毒滴度来表征。病毒滴度可以包括物理滴度以及功能滴度。物理滴度计算存在的活病毒颗粒和死病毒颗粒的总数，并且表示为每mL的病毒颗粒数(VP/mL)，或对于AAV表示为每mL的基因组拷贝数(GC/mL)。基于对病毒基因组或病毒蛋白的浓度进行定量，可以使用多种方法来确定病毒的物理滴度。合适的技术包括但不限于DNA杂交、实时PCR(包括但不限于定量PCR(qPCR)和数字滴式PCR(dPCR))、光密度(A260/280)、NanoSight和高效液相色谱(HPLC)。

[0232] 例如，光密度(A260/280)测定测量病毒DNA和蛋白质的浓度。它是一种测量病毒颗粒(VP)的浓度的物理测定。HPLC也是一种通过将完整病毒颗粒与其他细胞污染物或病毒颗粒片段分离来定量总病毒颗粒的快速方法。

[0233] 功能滴度测量有多少病毒进入靶细胞，并且可包括在抗生素选择(如果载体包含抗生素抗性基因)或靶细胞的流式细胞术或免疫荧光分析(如果载体包含荧光蛋白)后集落形成单位的数量的评估。另选地，如果载体不表达荧光蛋白，则通过qPCR来确定每个细胞的整合的前病毒DNA拷贝的数量提供了用于评估功能滴度的快速且简单的方法。

[0234] 5.7.3测量纯度的示例性测定

[0235] 测量AAV颗粒的纯度的测定是本领域已知的。确定残余DNA水平的传统方法包括PicoGreen和DNA阈值测定。最近，已经使用实时或定量PCR(qPCR)对宿主细胞核酸进行定量。如本文所提供，测量残余宿主细胞DNA的另一种示例性测定是AlphaLISA测定。

[0236] 宿主细胞相关蛋白的检测可以通过其中抗体与宿主蛋白反应的ELISA进行。还可以使用透射电子显微术(TEM)来成功地检测蛋白质杂质。

[0237] 用于测量纯度的另外的示例性方法包括质谱(MS)和色谱方法。除了能够检测和鉴定蛋白质污染物之外，MS和色谱也可以用于鉴定AAV颗粒制剂中的洗涤剂和有机溶剂。还可以通过用TEM或分析超速离心(AUC)直接可视化来分析AAV颗粒制备物的质量。

[0238] 分析超速离心(AUC)是一种通过质量(沉降速度)或密度(沉降平衡)区分和定量不同AAV物质的强大工具。AUC是一种监测在离心力场下颗粒随时间沉降的技术，提供关于颗粒分子量、均匀性以及与其他颗粒和自身的相互作用的关键信息。空衣壳具有与完整颗粒和部分填充的颗粒不同的密度和/或质量，允许在离心力作用下基于流体动力学进行基线分离。在一些仪器中，多波长吸收可以用于在单个实验中定量基因组DNA和病毒衣壳含量。

[0239] 5.7.4测量稳定性的示例性测定

[0240] 用于测量AAV颗粒的稳定性的示例性技术包括但不限于动态光散射(DLS)、分析超速离心(AUC)、光学显微术、尺寸排阻色谱法(SEC)(包括具有多角度静态光散射(MALS)的SEC)、透射电子显微术(TEM)和具有多角度静态光散射的场流分级(FFF-MALS)。

[0241] DLS是AAV开发领域中确立已久的分析技术。其主要用途是测试聚集体形成。由于其对大物质的高敏感性，即使聚集引起的小杂质也可以被检测到。还可以将DLS与SLS组合。在DLS中，可获得溶液中的颗粒的流体力学尺寸和尺寸分布。检查随时间和温度而变化的该测量值可能是有意义的。例如，尽管在低温下蛋白质可能是稳定的并显示出可重复的大小(和散射强度)测量值，但是通常在某升高的温度(Tagg)下，蛋白质分子将显示出低聚或聚集的趋势。该现象发生的温度将取决于蛋白质自身加上缓冲液组成。因此DLS或DLS和SLS的

组合允许仪器用户筛选熔解温度(Tm)、聚集温度(Tagg)和起始温度(Tonset)(分子有聚集在一起的趋势的温度)。该信息可以帮助理解胶体和构象稳定性的温度依赖性。

[0242] 如本文所提供,在一些实施方案中,药物组合物维持或增强纯化的AAV颗粒的稳定性。在一些实施方案中,药物组合物减少或防止纯化的AAV颗粒的聚集。在一些实施方案中,药物组合物(a)维持或增强纯化的AAV颗粒的稳定性;并且(b)减少或防止纯化的AAV颗粒的聚集。

[0243] 在某些实施方案中,在一个或多个冷冻/解冻循环后,稳定性得以维持或增强并且/或者聚集得以减少或防止。在一些实施方案中,在一个或多个冷冻/解冻循环后,稳定性得以维持或增强。在一些实施方案中,在三个或更多个冷冻/解冻循环后,稳定性得以维持或增强。

[0244] 在一些实施方案中,在一个或多个冷冻/解冻循环后,AAV颗粒的聚集小于5%。在一些实施方案中,在一个或多个冷冻/解冻循环后,AAV颗粒的聚集小于2%。在一些实施方案中,在一个或多个冷冻/解冻循环后,AAV颗粒的聚集小于1%。

[0245] 在一些实施方案中,在三个或更多个冷冻/解冻循环后,AAV颗粒的聚集小于5%。在一些实施方案中,在三个或更多个冷冻/解冻循环后,AAV颗粒的聚集小于2%。在一些实施方案中,在三个或更多个冷冻/解冻循环后,AAV颗粒的聚集小于1%。

[0246] 上述任何测定都可以用于测量聚集和/或稳定性。例如,在一些实施方案中,聚集和/或稳定性通过DLS来确定。在一些实施方案中,聚集和/或稳定性通过AUC来确定。

[0247] 6.实施方案

[0248] 本发明提供了以下非限制性实施方案。

[0249] 在一组实施方案中,提供了:

[0250] A1.一种药物组合物,所述药物组合物包含纯化的腺相关病毒(AAV)颗粒、缓冲剂、冷冻保护剂和非离子表面活性剂,其中

[0251] (a)所述纯化的AAV颗粒基本上不含杂质,

[0252] (b)所述缓冲剂的浓度为约0mM至约50mM,

[0253] (c)所述冷冻保护剂为约1%至约10%(w/v),并且

[0254] (d)所述非离子表面活性剂为约0.0001%(w/v)至约0.1%(w/v)。

[0255] A2.根据实施方案A1所述的药物组合物,还包含药学上可接受的盐,其中所述药学上可接受的盐的浓度为约1mM至约200mM。

[0256] A3.根据实施方案A2所述的药物组合物,其中所述药学上可接受的盐为约10mM至约150mM。

[0257] A4.根据实施方案A2或A3所述的药物组合物,其中所述药学上可接受的盐的浓度为约10mM。

[0258] A5.根据实施方案A2或A3所述的药物组合物,其中所述药学上可接受的盐的浓度为约100mM。

[0259] A6.根据实施方案A2或A3所述的药物组合物,其中所述药学上可接受的盐的浓度为约150mM。

[0260] A7.一种药物组合物,所述药物组合物包含纯化的腺相关病毒(AAV)颗粒、药学上可接受的盐、缓冲剂、冷冻保护剂和非离子表面活性剂,其中

[0261] (a)所述纯化的AAV颗粒基本上不含杂质，

[0262] (b)所述药学上可接受的盐的浓度为约1mM至约49mM，

[0263] (c)所述缓冲剂的浓度为约0mM至约50mM，

[0264] (d)所述冷冻保护剂为约1％至约10％(w/v)，并且

[0265] (e)所述非离子表面活性剂为约0.0001％(w/v)至约0.1％

[0266] (w/v)。

[0267] A8.根据实施方案A7所述的药物组合物，其中所述药学上可接受的盐的浓度为约5mM至约45mM。

[0268] A9.根据实施方案A7或A8所述的药物组合物，其中所述药学上可接受的盐的浓度为约7.5mM至约40mM。

[0269] A10.根据实施方案A7至A9中任一项所述的药物组合物，其中所述药学上可接受的盐的浓度为约10mM至约30mM。

[0270] A11.根据实施方案A7至A10中任一项所述的药物组合物，其中所述药学上可接受的盐的浓度为约10mM。

[0271] A12.根据实施方案A2至A11中任一项所述的药物组合物，其中所述药学上可接受的盐选自由钠盐、镁盐、钙盐、钾盐、磷酸盐和硫酸盐组成的组。

[0272] A13.根据实施方案A12所述的药物组合物，其中所述钠盐包括氯化钠。

[0273] A14.根据实施方案A1至A13中任一项所述的药物组合物，其中所述缓冲剂包括Tris HCl。

[0274] A15.根据实施方案A1至A13中任一项所述的药物组合物，其中所述缓冲剂包括L-组氨酸HCl。

[0275] A16.根据实施方案A1至A15中任一项所述的药物组合物，其中所述缓冲剂的浓度包括约20mM。

[0276] A17.根据实施方案A1至A16中任一项所述的药物组合物，其中所述冷冻保护剂为约3％(w/v)至约8％(w/v)。

[0277] A18.根据实施方案A1至A17中任一项所述的药物组合物，其中所述冷冻保护剂为约4％(w/v)至约6％(w/v)。

[0278] A19.根据实施方案A1至A18中任一项所述的药物组合物，其中所述冷冻保护剂为约5％(w/v)。

[0279] A20.根据实施方案A1至A19中任一项所述的药物组合物，其中所述冷冻保护剂包括糖。

[0280] A21.根据实施方案A20所述的药物组合物，其中所述糖包括蔗糖、海藻糖或它们的组合。

[0281] A22.根据实施方案A20所述的药物组合物，其中所述糖包括海藻糖。

[0282] A23.根据实施方案A1至A22中任一项所述的药物组合物，其中所述非离子表面活性剂为约0.0005％(w/v)至约0.005％(w/v)。

[0283] A24.根据实施方案A1至A23中任一项所述的药物组合物，其中所述非离子表面活性剂为约0.00075％(w/v)至约0.0025％(w/v)。

[0284] A25.根据实施方案A1至A24中任一项所述的药物组合物，其中所述非离子表面活

性剂为约0.001％(w/v)。

[0285] A26.根据实施方案A1至A25中任一项所述的药物组合物,其中所述非离子表面活性剂选自由共聚物、聚氧乙烯脱水山梨糖醇酯、磷脂、Brij表面活性剂和脱水山梨糖醇酯或它们的组合组成的组。

[0286] A27.根据实施方案A26所述的药物组合物,其中所述聚氧乙烯脱水山梨糖醇酯选自由(PS-20)和聚山梨酯80(PS-80)或它们的组合组成的组。

[0287] A28.根据实施方案A26所述的药物组合物,其中所述共聚物包括泊洛沙姆。

[0288] A29.根据实施方案A28所述的药物组合物,其中所述泊洛沙姆选自由泊洛沙姆188(P188)、泊洛沙姆237(P237)、泊洛沙姆338(P338)和泊洛沙姆407(P407)或它们的组合组成的组。

[0289] A30.根据实施方案A28所述的药物组合物,其中所述泊洛沙姆包括泊洛沙姆188(P188)。

[0290] A31.一种药物组合物,所述药物组合物包含纯化的腺相关病毒(AAV)颗粒、缓冲剂、冷冻保护剂和非离子表面活性剂,其中

[0291] (a)所述纯化的AAV颗粒基本上不含杂质,

[0292] (b)所述缓冲剂的浓度为约20mM,

[0293] (c)所述冷冻保护剂为约5％(w/v)海藻糖,并且

[0294] (d)所述非离子表面活性剂为约0.001％(w/v)泊洛沙姆188。

[0295] A32.一种药物组合物,所述药物组合物包含纯化的腺相关病毒(AAV)颗粒、药学上可接受的盐、缓冲剂、冷冻保护剂和非离子表面活性剂,其中

[0296] (a)所述纯化的AAV颗粒基本上不含杂质,

[0297] (b)所述药学上可接受的盐的浓度为约10mM氯化钠,

[0298] (c)所述缓冲剂的浓度为约20mM,

[0299] (d)所述冷冻保护剂为约5％(w/v)海藻糖,并且

[0300] (e)所述非离子表面活性剂为约0.001％(w/v)泊洛沙姆188。

[0301] A33.一种药物组合物,所述药物组合物包含纯化的腺相关病毒(AAV)颗粒、药学上可接受的盐、缓冲剂、冷冻保护剂和非离子表面活性剂,其中

[0302] (a)所述纯化的AAV颗粒基本上不含杂质,

[0303] (b)所述药学上可接受的盐的浓度为约25mM氯化钠,

[0304] (c)所述缓冲剂的浓度为约20mM,

[0305] (d)所述冷冻保护剂为约5％(w/v)海藻糖,并且

[0306] (e)所述非离子表面活性剂为约0.001％(w/v)泊洛沙姆188。A34.一种药物组合物,所述药物组合物包含纯化的腺相关病毒(AAV)颗粒、药学上可接受的盐、缓冲剂、冷冻保护剂和非离子表面活性剂,其中

[0307] (a)所述纯化的AAV颗粒基本上不含杂质,

[0308] (b)所述药学上可接受的盐的浓度为约50mM氯化钠,

[0309] (c)所述缓冲剂的浓度为约20mM,

[0310] (d)所述冷冻保护剂为约5％(w/v)海藻糖,并且

[0311] (e)所述非离子表面活性剂为约0.001％(w/v)泊洛沙姆188。A35.一种药物组合

物,所述药物组合物包含纯化的腺相关病毒(AAV)颗粒、药学上可接受的盐、缓冲剂、冷冻保护剂和非离子表面活性剂,其中

[0312] (a)所述纯化的AAV颗粒基本上不含杂质,

[0313] (b)所述药学上可接受的盐的浓度为约100mM氯化钠,

[0314] (c)所述缓冲剂的浓度为约20mM,

[0315] (d)所述冷冻保护剂为约5%(w/v)海藻糖,并且

[0316] (e)所述非离子表面活性剂为约0.001%(w/v)泊洛沙姆188。A36.一种药物组合物,所述药物组合物包含纯化的腺相关病毒(AAV)颗粒、药学上可接受的盐、缓冲剂、冷冻保护剂和非离子表面活性剂,其中

[0317] (a)所述纯化的AAV颗粒基本上不含杂质,

[0318] (b)所述药学上可接受的盐的浓度为约125mM氯化钠,

[0319] (c)所述缓冲剂的浓度为约20mM,

[0320] (d)所述冷冻保护剂为约5%(w/v)海藻糖,并且

[0321] (e)所述非离子表面活性剂为约0.001%(w/v)泊洛沙姆188。A37.一种药物组合物,所述药物组合物包含纯化的腺相关病毒(AAV)颗粒、药学上可接受的盐、缓冲剂、冷冻保护剂和非离子表面活性剂,其中

[0322] (a)所述纯化的AAV颗粒基本上不含杂质,

[0323] (b)所述药学上可接受的盐的浓度为约150mM氯化钠,

[0324] (c)所述缓冲剂的浓度为约20mM,

[0325] (d)所述冷冻保护剂为约5%(w/v)海藻糖,并且

[0326] (e)所述非离子表面活性剂为约0.001%(w/v)泊洛沙姆188。

[0327] A38.一种药物组合物,所述药物组合物包含纯化的腺相关病毒(AAV)颗粒、药学上可接受的盐、缓冲剂、冷冻保护剂和非离子表面活性剂,其中

[0328] (a)所述纯化的AAV颗粒基本上不含杂质,

[0329] (b)所述药学上可接受的盐的浓度为约200mM氯化钠,

[0330] (c)所述缓冲剂的浓度为约20mM,

[0331] (d)所述冷冻保护剂为约5%(w/v)海藻糖,并且

[0332] (e)所述非离子表面活性剂为约0.001%(w/v)泊洛沙姆188。

[0333] A39.根据实施方案A31至A38中任一项所述的药物组合物,其中所述缓冲剂包括Tris HCl。

[0334] A40.根据实施方案A31至A38中任一项所述的药物组合物,其中所述缓冲剂包括L-组氨酸HCl。

[0335] A41.根据实施方案A1至A40中任一项所述的药物组合物,其中所述药物组合物的pH为约4.0至约9.0。

[0336] A42.根据实施方案A1至A41中任一项所述的药物组合物,其中所述药物组合物的pH为约7.0至约8.0。

[0337] A43.根据实施方案A1至A42中任一项所述的药物组合物,其中所述药物组合物的pH为约7.3至约7.7。

[0338] A44.根据实施方案A1至A43中任一项所述的药物组合物,其中所述药物组合物的

pH为约7.5。

[0339] A45.根据实施方案A1至A44中任一项所述的药物组合物,其中所述AAV选自由AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9和AAV10组成的组。

[0340] A46.根据实施方案A1至A45中任一项所述的药物组合物,其中所述AAV包括重组AAV(rAAV)。

[0341] A47.根据实施方案A1至A46中任一项所述的药物组合物,其中所述纯化的AAV颗粒的滴度为约1×10^{10}个病毒基因组/毫升(vg/mL)或更大。

[0342] A48.根据实施方案A1至A46中任一项所述的药物组合物,其中所述纯化的AAV颗粒的滴度为约1×10^{11}个病毒基因组/毫升(vg/mL)或更大。

[0343] A49.根据实施方案A1至A46中任一项所述的药物组合物,其中所述纯化的AAV颗粒的滴度为约1×10^{12}个病毒基因组/毫升(vg/mL)或更大。

[0344] A50.根据实施方案A1至A46中任一项所述的药物组合物,其中所述纯化的AAV颗粒的滴度为约1×10^{13}个病毒基因组/毫升(vg/mL)或更大。

[0345] A51.根据实施方案A1至A46中任一项所述的药物组合物,其中所述纯化的AAV颗粒的滴度为约1×10^{14}个病毒基因组/毫升(vg/mL)或更大。

[0346] A52.根据实施方案A1至A46中任一项所述的药物组合物,其中所述纯化的AAV颗粒的滴度为约1×10^{15}个病毒基因组/毫升(vg/mL)或更大。

[0347] A53.根据实施方案A1至A52中任一项所述的药物组合物,其中所述杂质包括工艺相关杂质、产物相关杂质或它们的组合。

[0348] A54.根据实施方案A53所述的药物组合物,其中所述工艺相关杂质选自由残余宿主细胞组分、残余病毒生产组分、残余细胞培养组分、残余纯化组分或它们的组合组成的组。

[0349] A55.根据实施方案A54所述的药物组合物,其中所述残余宿主细胞组分包括宿主细胞蛋白、宿主细胞DNA、宿主细胞RNA或它们的组合。

[0350] A56.根据实施方案A55所述的药物组合物,其中所述宿主细胞DNA包括病毒外染色质相关DNA。

[0351] A57.根据实施方案A56所述的药物组合物,其中所述残余病毒生产组分包括质粒DNA、辅助病毒或它们的组合。

[0352] A58.根据实施方案A54所述的药物组合物,其中所述残余细胞培养组分包括抗生素、补充剂、诱导剂、生长因子或它们的组合。

[0353] A59.根据实施方案A54所述的药物组合物,其中所述残余纯化组分包括缓冲剂、无机盐、酶、洗涤剂、培养基或它们的组合。

[0354] A60.根据实施方案A53所述的药物组合物,其中所述产物相关杂质包括空衣壳、聚集的AAV颗粒、降解的AAV颗粒或它们的组合。

[0355] A61.根据实施方案A60所述的药物组合物,其中所述纯化的AAV颗粒包括完整或部分完整衣壳,并且所述产物相关杂质包括空衣壳。

[0356] A62.根据实施方案A60所述的药物组合物,其中所述纯化的AAV颗粒包括完整衣壳,并且所述产物相关杂质包括空衣壳。

[0357] A63.根据实施方案A60所述的药物组合物,其中所述纯化的AAV颗粒基本上由完整

衣壳组成,并且所述产物相关杂质包括空衣壳。

[0358] A64.根据实施方案A53所述的药物组合物,其中所述产物相关杂质包括聚集的AAV颗粒、降解的AAV颗粒或它们的组合。

[0359] A65.根据实施方案A64所述的药物组合物,其中所述纯化的AAV颗粒包括空衣壳。

[0360] A66.根据实施方案A64所述的药物组合物,其中所述纯化的AAV颗粒基本上由空衣壳组成。

[0361] A67.根据实施方案A53所述的药物组合物,其中所述产物相关杂质包括聚集的AAV颗粒或它们的组合。

[0362] A68.根据实施方案A1至A67中任一项所述的药物组合物,其中所述药物组合物处于液体状态。

[0363] A69.根据实施方案A1至A67中任一项所述的药物组合物,其中所述药物组合物处于固体或半固体状态。

[0364] A70.根据实施方案A1至A69中任一项所述的药物组合物,其中所述药物组合物维持或增强所述纯化的AAV颗粒的稳定性。

[0365] A71.根据实施方案A1至A69中任一项所述的药物组合物,其中所述药物组合物减少或防止所述纯化的AAV颗粒的聚集。

[0366] A72.根据实施方案A1至A69中任一项所述的药物组合物,其中所述药物组合物

[0367] (a)维持或增强所述纯化的AAV颗粒的稳定性;并且

[0368] (b)减少或防止所述纯化的AAV颗粒的聚集。

[0369] A73.根据实施方案A70或A72所述的药物组合物,其中在一个或多个冷冻/解冻循环后,所述纯化的AAV颗粒的稳定性得以维持或增强。

[0370] A74.根据实施方案A70或A72所述的药物组合物,其中在三个或更多个冷冻/解冻循环后,所述纯化的AAV颗粒的稳定性得以维持或增强。

[0371] A75.根据实施方案A71或A72所述的药物组合物,其中在一个或多个冷冻/解冻循环后,所述AAV颗粒的聚集小于5%。

[0372] A76.根据实施方案A71或A72所述的药物组合物,其中在一个或多个冷冻/解冻循环后,所述AAV颗粒的聚集小于2%。

[0373] A77.根据实施方案A71或A72所述的药物组合物,其中在一个或多个冷冻/解冻循环后,所述AAV颗粒的聚集小于1%。

[0374] A78.根据实施方案A71或A72所述的药物组合物,其中在三个或更多个冷冻/解冻循环后,所述AAV颗粒的聚集小于5%。

[0375] A79.根据实施方案A71或A72所述的药物组合物,其中在三个或更多个冷冻/解冻循环后,所述AAV颗粒的聚集小于2%。

[0376] A80.根据实施方案A71或A72所述的药物组合物,其中在三个或更多个冷冻/解冻循环后,所述AAV颗粒的聚集小于1%。

[0377] A81.根据实施方案A73至A80中任一项所述的药物组合物,其中所述AAV颗粒的稳定性和/或聚集通过选自由动态光散射(DLS)、分析超速离心(AUC)、光学显微术、尺寸排阻色谱法(SEC)、透射电子显微术和具有多角度静态光散射的场流分级(FFF-MALS)组成的组的测定来测量。

[0378] A82.根据实施方案A1至A81中任一项所述的药物组合物,其中所述纯化的AAV颗粒通过包括以下步骤的方法获得:

[0379] (a)使包含AAV颗粒的上清液与包含核酸酶的组合物接触;以及

[0380] (b)纯化所述颗粒。

[0381] A83.根据实施方案A82所述的药物组合物,其中所述核酸酶包括

[0382] Benzonase或Benzonase®和染色质-DNA核酸酶。

[0383] A84.根据实施方案A83所述的药物组合物,其中所述染色质-DNA核酸酶包括MNase。

[0384] A85.一种用于制备包含纯化的AAV颗粒的药物组合物的方法,所述方法包括:

[0385] (a)使包含AAV颗粒的上清液与包含核酸酶的组合物接触;

[0386] (b)纯化所述AAV颗粒,使得所述AAV颗粒基本上不含杂质;

[0387] (c)将所述纯化的AAV颗粒与缓冲剂、冷冻保护剂和非离子表面活性剂组合,其中

[0388] i.所述缓冲剂的浓度为约0mM至约50mM,

[0389] ii.所述冷冻保护剂为约1%至约10%(w/v),并且

[0390] iii.所述非离子表面活性剂为约0.0001%(w/v)至约0.1%(w/v)。

[0391] A86.根据实施方案A85所述的方法,其中步骤(c)还包括药学上可接受的盐,其中所述药学上可接受的盐的浓度为约1mM至约200mM。

[0392] A87.根据实施方案A86所述的方法,其中所述药学上可接受的盐为约10mM至约150mM。

[0393] A88.根据实施方案A86所述的方法,其中所述药学上可接受的盐为约1mM至约49mM。

[0394] A89.根据实施方案A86所述的方法,其中所述药学上可接受的盐为约5mM至约45mM。

[0395] A90.根据实施方案A86所述的方法,其中所述药学上可接受的盐为约7.5mM至约40mM。

[0396] A91.根据实施方案A86所述的方法,其中所述药学上可接受的盐为约10mM至约30mM。

[0397] A92.根据实施方案A86所述的方法,其中所述药学上可接受的盐的浓度为约10mM。

[0398] A93.根据实施方案A86所述的方法,其中所述药学上可接受的盐的浓度为约100mM。

[0399] A94.根据实施方案A86所述的方法,其中所述药学上可接受的盐的浓度为约150mM。

[0400] A95.根据实施方案A86至A94中任一项所述的方法,其中所述药学上可接受的盐选自由钠盐、镁盐、钙盐、钾盐、磷酸盐和硫酸盐组成的组。

[0401] A96.根据实施方案A95所述的方法,其中所述钠盐包括氯化钠。

[0402] A97.根据实施方案A85至A96中任一项所述的方法,其中所述缓冲剂包括Tris HCl。

[0403] A98.根据实施方案A85至A96中任一项所述的方法,其中所述缓冲剂包括L-组氨酸HCl。

[0404] A99.根据实施方案A85至A98中任一项所述的方法,其中所述缓冲剂的浓度包括约20mM。

[0405] A100.根据实施方案A85至A99中任一项所述的方法,其中所述冷冻保护剂为约3%(w/v)至约8%(w/v)。

[0406] A101.根据实施方案A85至A100中任一项所述的方法,其中所述冷冻保护剂为约4%(w/v)至约6%(w/v)。

[0407] A102.根据实施方案A85至A101中任一项所述的方法,其中所述冷冻保护剂为约5%(w/v)。

[0408] A103.根据实施方案A85至A102中任一项所述的方法,其中所述冷冻保护剂包括糖。

[0409] A104.根据实施方案A103所述的方法,其中所述糖包括蔗糖、海藻糖或它们的组合。

[0410] A105.根据实施方案A103所述的方法,其中所述糖包括海藻糖。

[0411] A106.根据实施方案A85至A105中任一项所述的方法,其中所述非离子表面活性剂为约0.0005%(w/v)至约0.005%(w/v)。

[0412] A107.根据实施方案A85至A106中任一项所述的方法,其中所述非离子表面活性剂为约0.00075%(w/v)至约0.0025%(w/v)。

[0413] A108.根据实施方案A85至A107中任一项所述的方法,其中所述非离子型表面活性剂为约0.001%(w/v)。

[0414] A109.根据实施方案A85至A108中任一项所述的方法,其中所述非离子表面活性剂选自由共聚物、聚氧乙烯脱水山梨糖醇酯、磷脂、Brij表面活性剂和脱水山梨糖醇酯或它们的组合组成的组。

[0415] A110.根据实施方案A109所述的方法,其中所述聚氧乙烯脱水山梨糖醇酯选自由(PS-20)和聚山梨酯80(PS-80)或它们的组合组成的组。

[0416] A111.根据实施方案A109所述的方法,其中所述共聚物包括泊洛沙姆。

[0417] A112.根据实施方案A111所述的方法,其中所述泊洛沙姆选自由泊洛沙姆188(P188)、泊洛沙姆237(P237)、泊洛沙姆338(P338)和泊洛沙姆407(P407)或它们的组合组成的组。

[0418] A113.根据实施方案A111所述的方法,其中所述泊洛沙姆包括泊洛沙姆188(P188)。

[0419] A114.根据实施方案A85至A113中任一项所述的方法,其中所述药物组合物的pH为约4.0至约9.0。

[0420] A115.根据实施方案A85至A114中任一项所述的方法,其中所述药物组合物的pH为约7.0至约8.0。

[0421] A116.根据实施方案A85至A115中任一项所述的方法,其中所述药物组合物的pH为约7.3至约7.7。

[0422] A117.根据实施方案A85至A116中任一项所述的方法,其中所述药物组合物的pH为约7.5。

[0423] A118.根据实施方案A85至A117中任一项所述的方法,其中所述AAV选自由AAV1、

AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9和AAV10组成的组。

[0424] A119.根据实施方案A85至A118中任一项所述的方法，其中所述AAV包括重组AAV(rAAV)。

[0425] A120.根据实施方案A85至A119中任一项所述的方法，其中所述核酸酶包括Benzonase或Benzonase®和染色质-DNA核酸酶。

[0426] A121.根据实施方案A120所述的方法，其中所述染色质-DNA核酸酶包括MNase。

[0427] A122.根据实施方案A85至A121中任一项所述的方法，其中所述纯化的AAV颗粒的滴度为约1×10^{10}个病毒基因组/毫升(vg/mL)或更大。

[0428] A123.根据实施方案A85至A121中任一项所述的方法，其中所述纯化的AAV颗粒的滴度为约1×10^{11}个病毒基因组/毫升(vg/mL)或更大。

[0429] A124.根据实施方案A85至A121中任一项所述的方法，其中所述纯化的AAV颗粒的滴度为约1×10^{12}个病毒基因组/毫升(vg/mL)或更大。

[0430] A125.根据实施方案A85至A121中任一项所述的方法，其中所述纯化的AAV颗粒的滴度为约1×10^{13}个病毒基因组/毫升(vg/mL)或更大。

[0431] A126.根据实施方案A85至A121中任一项所述的方法，其中所述纯化的AAV颗粒的滴度为约1×10^{14}个病毒基因组/毫升(vg/mL)或更大。

[0432] A127.根据实施方案A85至A121中任一项所述的方法，其中所述纯化的AAV颗粒的滴度为约1×10^{15}个病毒基因组/毫升(vg/mL)或更大。

[0433] A128.根据实施方案A85至A127中任一项所述的方法，其中所述杂质包括工艺相关杂质、产物相关杂质或它们的组合。

[0434] A129.根据实施方案A128所述的方法，其中所述工艺相关杂质选自由残余宿主细胞组分、残余病毒生产组分、残余细胞培养组分、残余纯化组分或它们的组合组成的组。

[0435] A130.根据实施方案A129所述的方法，其中所述残余宿主细胞组分包括宿主细胞蛋白、宿主细胞DNA、宿主细胞RNA或它们的组合。

[0436] A131.根据实施方案A130所述的方法，其中所述宿主细胞DNA包括病毒外染色质相关DNA。

[0437] A132.根据实施方案A129所述的方法，其中所述残余病毒生产组分包括质粒DNA、辅助病毒或它们的组合。

[0438] A133.根据实施方案A129所述的方法，其中所述残余细胞培养组分包括抗生素、补充剂、诱导剂、生长因子或它们的组合。

[0439] A134.根据实施方案A129所述的方法，其中所述残余纯化组分包括缓冲剂、无机盐、酶、洗涤剂、培养基或它们的组合。

[0440] A135.根据实施方案A128所述的方法，其中所述产物相关杂质包括空衣壳、聚集的AAV颗粒、降解的AAV颗粒或它们的组合。

[0441] A136.根据实施方案A135所述的方法，其中所述纯化的AAV颗粒包括完整或部分完整衣壳，并且所述产物相关杂质包括空衣壳。

[0442] A137.根据实施方案A135所述的方法，其中所述纯化的AAV颗粒包括完整衣壳，并且所述产物相关杂质包括空衣壳。

[0443] A138.根据实施方案A135所述的方法，其中所述纯化的AAV颗粒基本上由完整衣壳

组成,并且所述产物相关杂质包括空衣壳。

[0444] A139.根据实施方案A128所述的方法,其中所述产物相关杂质包括聚集的AAV颗粒、降解的AAV颗粒或它们的组合。

[0445] A140.根据实施方案A139所述的方法,其中所述纯化的AAV颗粒包括空衣壳。

[0446] A141.根据实施方案A139所述的方法,其中所述纯化的AAV颗粒基本上由空衣壳组成。

[0447] A142.根据实施方案A128所述的方法,其中所述产物相关杂质包括聚集的AAV颗粒。

[0448] 在第二组实施方案中,提供了:

[0449] B1.一种药物组合物,所述药物组合物包含用于维持或增强纯化的AAV颗粒的稳定性的手段。

[0450] B2.根据实施方案B1所述的药物组合物,其中在一个或多个冷冻/解冻循环后,所述纯化的AAV颗粒的稳定性得以维持或增强。

[0451] B3.根据实施方案B1所述的药物组合物,其中在三个或更多个冷冻/解冻循环后,所述纯化的AAV颗粒的稳定性得以维持或增强。

[0452] B4.根据实施方案B1至B3中任一项所述的药物组合物,其中所述AAV颗粒的稳定性通过选自由动态光散射(DLS)、分析超速离心(AUC)、光学显微术、尺寸排阻色谱法(SEC)、透射电子显微术和具有多角度静态光散射的场流分级(FFF-MALS)组成的组的测定来测量。

[0453] B5.一种药物组合物,所述药物组合物包含用于减少或防止纯化的AAV颗粒的聚集的手段。

[0454] B6.根据实施方案B5所述的药物组合物,其中在一个或多个冷冻/解冻循环后,所述AAV颗粒的聚集小于5%。

[0455] B7.根据实施方案B5所述的药物组合物,其中在一个或多个冷冻/解冻循环后,所述AAV颗粒的聚集小于2%。

[0456] B8.根据实施方案B5所述的药物组合物,其中在一个或多个冷冻/解冻循环后,所述AAV颗粒的聚集小于1%。

[0457] B9.根据实施方案B5所述的药物组合物,其中在三个或更多个冷冻/解冻循环后,所述AAV颗粒的聚集小于5%。

[0458] B10.根据实施方案B5所述的药物组合物,其中在三个或更多个冷冻/解冻循环后,所述AAV颗粒的聚集小于2%。

[0459] B11.根据实施方案B5所述的药物组合物,其中在三个或更多个冷冻/解冻循环后,所述AAV颗粒的聚集小于1%。

[0460] B12.根据实施方案B5至B11中任一项所述的药物组合物,其中所述AAV颗粒通过选自由动态光散射(DLS)、分析超速离心(AUC)、光学显微术、尺寸排阻色谱法(SEC)、透射电子显微术和具有多角度静态光散射的场流分级(FFF-MALS)组成的组的测定来测量。

[0461] B13.一种药物组合物,所述药物组合物包含用于(a)维持或增强纯化的AAV颗粒的稳定性并且(b)降低或防止纯化的AAV颗粒的聚集的手段。

[0462] B14.根据实施方案B13所述的药物组合物,其中在一个或多个冷冻/解冻循环后,所述纯化的AAV颗粒的稳定性得以维持或增强。

[0463] B15.根据实施方案B13所述的药物组合物,其中在三个或更多个冷冻/解冻循环后,所述纯化的AAV颗粒的稳定性得以维持或增强。

[0464] B16.根据实施方案B13所述的药物组合物,其中在一个或多个冷冻/解冻循环后,所述AAV颗粒的聚集小于5%。

[0465] B17.根据实施方案B13所述的药物组合物,其中在一个或多个冷冻/解冻循环后,所述AAV颗粒的聚集小于2%。

[0466] B18.根据实施方案B13所述的药物组合物,其中在一个或多个冷冻/解冻循环后,所述AAV颗粒的聚集小于1%。

[0467] B19.根据实施方案B13所述的药物组合物,其中在三个或更多个冷冻/解冻循环后,所述AAV颗粒的聚集小于5%。

[0468] B20.根据实施方案B13所述的药物组合物,其中在三个或更多个冷冻/解冻循环后,所述AAV颗粒的聚集小于2%。

[0469] B21.根据实施方案B13所述的药物组合物,其中在三个或更多个冷冻/解冻循环后,所述AAV颗粒的聚集小于1%。

[0470] B22.根据实施方案B13至B21中任一项所述的药物组合物,其中所述AAV颗粒的稳定性和聚集通过选自由动态光散射(DLS)、分析超速离心(AUC)、光学显微术、尺寸排阻色谱法(SEC)、透射电子显微术和具有多角度静态光散射的场流分级(FFF-MALS)组成的组的测定来测量。

[0471] B23.一种系统,所述系统包含用于制备和获得包含纯化的腺相关病毒(AAV)颗粒、缓冲剂、冷冻保护剂和非离子表面活性剂的药物组合物的手段,其中

[0472] (a)所述纯化的AAV颗粒基本上不含杂质,

[0473] (b)所述缓冲剂的浓度为约0mM至约50mM,

[0474] (c)所述冷冻保护剂为约1%至约10%(w/v),并且

[0475] (d)所述非离子表面活性剂为约0.0001%(w/v)至约0.1%(w/v)。

[0476] B24.根据实施方案B23所述的系统,其中所述药物组合物还包含药学上可接受的盐,其中所述药学上可接受的盐的浓度为约1mM至约200mM。

[0477] B25.根据实施方案B24所述的系统,其中所述药学上可接受的盐为约10mM至约150mM。

[0478] B26.根据实施方案B24或25所述的系统,其中所述药学上可接受的盐的浓度为约10mM。

[0479] B27.根据实施方案B24或25所述的系统,其中所述药学上可接受的盐的浓度为约100mM。

[0480] B28.根据实施方案B24或25所述的系统,其中所述药学上可接受的盐的浓度为约150mM。

[0481] B29.一种系统,所述系统包含用于制备和获得包含纯化的腺相关病毒(AAV)颗粒、药学上可接受的盐、缓冲剂、冷冻保护剂和非离子表面活性剂的药物组合物的手段,其中

[0482] a.所述纯化的AAV颗粒基本上不含杂质,

[0483] b.所述药学上可接受的盐的浓度为约1mM至约49mM,

[0484] c.所述缓冲剂的浓度为约0mM至约50mM,

[0485] d.所述冷冻保护剂为约1％至约10％(w/v)，并且

[0486] e.所述非离子表面活性剂为约0.0001％(w/v)至约0.1％(w/v)。

[0487] B30.根据实施方案B29所述的系统，其中所述药学上可接受的盐的浓度为约5mM至约45mM。

[0488] B31.根据实施方案B29或B30所述的系统，其中所述药学上可接受的盐的浓度为约7.5mM至约40mM。

[0489] B32.根据实施方案B29至B31中任一项所述的系统，其中所述药学上可接受的盐的浓度为约10mM至约30mM。

[0490] B33.根据实施方案B29至B32中任一项所述的系统，其中所述药学上可接受的盐的浓度为约10mM。

[0491] B34.根据实施方案B24至B33中任一项所述的系统，其中所述药学上可接受的盐选自由钠盐、镁盐、钙盐、钾盐、磷酸盐和硫酸盐组成的组。

[0492] B35.根据实施方案B34所述的系统，其中所述钠盐包括氯化钠。

[0493] B36.根据实施方案B23至B35中任一项所述的系统，其中所述缓冲剂包括Tris HCl。

[0494] B37.根据实施方案B23至B35中任一项所述的系统，其中所述缓冲剂包括L-组氨酸HCl。

[0495] B38.根据实施方案B23至B37中任一项所述的系统，其中所述缓冲剂的浓度包括约20mM。

[0496] B39.根据实施方案B23至B38中任一项所述的系统，其中所述冷冻保护剂为约3％(w/v)至约8％(w/v)。

[0497] B40.根据实施方案B23至B39中任一项所述的系统，其中所述冷冻保护剂为约4％(w/v)至约6％(w/v)。

[0498] B41.根据实施方案B23至B40中任一项所述的系统，其中所述冷冻保护剂为约5％(w/v)。

[0499] B42.根据实施方案B23至B41中任一项所述的系统，其中所述冷冻保护剂包括糖。

[0500] B43.根据实施方案B42所述的系统，其中所述糖包括蔗糖、海藻糖或它们的组合。

[0501] B44.根据实施方案B42所述的系统，其中所述糖包括海藻糖。

[0502] B45.根据实施方案B23至B44中任一项所述的系统，其中所述非离子表面活性剂为约0.0005％(w/v)至约0.005％(w/v)。

[0503] B46.根据实施方案B23至B45中任一项所述的系统，其中所述非离子表面活性剂为约0.00075％(w/v)至约0.0025％(w/v)。

[0504] B47.根据实施方案B23至B46中任一项所述的系统，其中所述非离子型表面活性剂为约0.001％(w/v)。

[0505] B48.根据实施方案B23至B47中任一项所述的系统，其中所述非离子表面活性剂选自由共聚物、聚氧乙烯脱水山梨糖醇酯、磷脂、Brij表面活性剂和脱水山梨糖醇酯或它们的组合组成的组。

[0506] B49.根据实施方案B48所述的系统，其中所述聚氧乙烯脱水山梨糖醇酯选自由(PS-20)和聚山梨酯80(PS-80)或它们的组合组成的组。

[0507] B50.根据实施方案B48所述的系统,其中所述共聚物包括泊洛沙姆。

[0508] B51.根据实施方案B50所述的系统,其中所述泊洛沙姆选自由泊洛沙姆188(P188)、泊洛沙姆237(P237)、泊洛沙姆338(P338)和泊洛沙姆407(P407)或它们的组合组成的组。

[0509] B52.根据实施方案B50所述的系统,其中所述泊洛沙姆包括泊洛沙姆188(P188)。

[0510] B53.一种系统,所述系统包含用于制备和获得包含纯化的腺相关病毒(AAV)颗粒、缓冲剂、冷冻保护剂和非离子表面活性剂的药物组合物的手段,其中

[0511] (a)所述纯化的AAV颗粒基本上不含杂质,

[0512] (b)所述缓冲剂的浓度为约20mM,

[0513] (c)所述冷冻保护剂为约5%(w/v)海藻糖,并且

[0514] (d)所述非离子表面活性剂为约0.001%(w/v)泊洛沙姆188。

[0515] B54.一种系统,所述系统包含用于制备和获得包含纯化的腺相关病毒(AAV)颗粒、药学上可接受的盐、缓冲剂、冷冻保护剂和非离子表面活性剂的药物组合物的手段,其中

[0516] (a)所述纯化的AAV颗粒基本上不含杂质,

[0517] (b)所述药学上可接受的盐的浓度为约10mM氯化钠,

[0518] (c)所述缓冲剂的浓度为约20mM,

[0519] (d)所述冷冻保护剂为约5%(w/v)海藻糖,并且

[0520] (e)所述非离子表面活性剂为约0.001%(w/v)泊洛沙姆188。

[0521] B55.一种系统,所述系统包含用于制备和获得包含纯化的腺相关病毒(AAV)颗粒、药学上可接受的盐、缓冲剂、冷冻保护剂和非离子表面活性剂的药物组合物的手段,其中

[0522] (a)所述纯化的AAV颗粒基本上不含杂质,

[0523] (b)所述药学上可接受的盐的浓度为约25mM氯化钠,

[0524] (c)所述缓冲剂的浓度为约20mM,

[0525] (d)所述冷冻保护剂为约5%(w/v)海藻糖,并且

[0526] (e)所述非离子表面活性剂为约0.001%(w/v)泊洛沙姆188。

[0527] B56.一种系统,所述系统包含用于制备和获得包含纯化的腺相关病毒(AAV)颗粒、药学上可接受的盐、缓冲剂、冷冻保护剂和非离子表面活性剂的药物组合物的手段,其中

[0528] (a)所述纯化的AAV颗粒基本上不含杂质,

[0529] (b)所述药学上可接受的盐的浓度为约50mM氯化钠,

[0530] (c)所述缓冲剂的浓度为约20mM,

[0531] (d)所述冷冻保护剂为约5%(w/v)海藻糖,并且

[0532] (e)所述非离子表面活性剂为约0.001%(w/v)泊洛沙姆188。B57.一种系统,所述系统包含用于制备和获得包含纯化的腺相关病毒(AAV)颗粒、药学上可接受的盐、缓冲剂、冷冻保护剂和非离子表面活性剂的药物组合物的手段,其中

[0533] (a)所述纯化的AAV颗粒基本上不含杂质,

[0534] (b)所述药学上可接受的盐的浓度为约100mM氯化钠,

[0535] (c)所述缓冲剂的浓度为约20mM,

[0536] (d)所述冷冻保护剂为约5%(w/v)海藻糖,并且

[0537] (e)所述非离子表面活性剂为约0.001%(w/v)泊洛沙姆188。B58.一种系统,所述

系统包含用于制备和获得包含纯化的腺相关病毒(AAV)颗粒、药学上可接受的盐、缓冲剂、冷冻保护剂和非离子表面活性剂的药物组合物的手段,其中

[0538] (a)所述纯化的AAV颗粒基本上不含杂质,

[0539] (b)所述药学上可接受的盐的浓度为约125mM氯化钠,

[0540] (c)所述缓冲剂的浓度为约20mM,

[0541] (d)所述冷冻保护剂为约5%(w/v)海藻糖,并且

[0542] (e)所述非离子表面活性剂为约0.001%(w/v)泊洛沙姆188。B59.一种系统,所述系统包含用于制备和获得包含纯化的腺相关病毒(AAV)颗粒、药学上可接受的盐、缓冲剂、冷冻保护剂和非离子表面活性剂的药物组合物的手段,其中

[0543] (a)所述纯化的AAV颗粒基本上不含杂质,

[0544] (b)所述药学上可接受的盐的浓度为约150mM氯化钠,

[0545] (c)所述缓冲剂的浓度为约20mM,

[0546] (d)所述冷冻保护剂为约5%(w/v)海藻糖,并且

[0547] (e)所述非离子表面活性剂为约0.001%(w/v)泊洛沙姆188。B60.一种系统,所述系统包含用于制备和获得包含纯化的腺相关病毒(AAV)颗粒、药学上可接受的盐、缓冲剂、冷冻保护剂和非离子表面活性剂的药物组合物的手段,其中

[0548] (a)所述纯化的AAV颗粒基本上不含杂质,

[0549] (b)所述药学上可接受的盐的浓度为约200mM氯化钠,

[0550] (c)所述缓冲剂的浓度为约20mM,

[0551] (d)所述冷冻保护剂为约5%(w/v)海藻糖,并且

[0552] (e)所述非离子表面活性剂为约0.001%(w/v)泊洛沙姆188。

[0553] B61.根据实施方案B53至B60中任一项所述的系统,其中所述缓冲剂包括Tris HCl。

[0554] B62.根据实施方案B53至B60中任一项所述的系统,其中所述缓冲剂包括L-组氨酸HCl。

[0555] B63.根据实施方案B23至B62中任一项所述的系统,其中所述药物组合物的pH为约4.0至约9.0。

[0556] B64.根据实施方案B23至B63中任一项所述的系统,其中所述药物组合物的pH为约7.0至约8.0。

[0557] B65.根据实施方案B23至B64中任一项所述的系统,其中所述药物组合物的pH为约7.3至约7.7。

[0558] B66.根据实施方案B23至B65中任一项所述的系统,其中所述药物组合物的pH为约7.5。

[0559] B67.根据实施方案B23至B66中任一项所述的系统,其中所述AAV选自由AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9和AAV10组成的组。

[0560] B68.根据实施方案B23至B67中任一项所述的系统,其中所述AAV包括重组AAV(rAAV)。

[0561] B69.根据实施方案B23至B68中任一项所述的系统,其中所述纯化的AAV颗粒的滴度为约1×10^{10}个病毒基因组/毫升(vg/mL)或更大。

[0562] B70.根据实施方案B23至B68中任一项所述的系统,其中所述纯化的AAV颗粒的滴度为约1×10^{11}个病毒基因组/毫升(vg/mL)或更大。

[0563] B71.根据实施方案B23至B68中任一项所述的系统,其中所述纯化的AAV颗粒的滴度为约1×10^{12}个病毒基因组/毫升(vg/mL)或更大。

[0564] B72.根据实施方案B23至B68中任一项所述的系统,其中所述纯化的AAV颗粒的滴度为约1×10^{13}个病毒基因组/毫升(vg/mL)或更大。

[0565] B73.根据实施方案B23至B68中任一项所述的系统,其中所述纯化的AAV颗粒的滴度为约1×10^{14}个病毒基因组/毫升(vg/mL)或更大。

[0566] B74.根据实施方案B23至B68中任一项所述的系统,其中所述纯化的AAV颗粒的滴度为约1×10^{15}个病毒基因组/毫升(vg/mL)或更大。

[0567] B75.根据实施方案B23至B74中任一项所述的系统,其中所述杂质包括工艺相关杂质、产物相关杂质或它们的组合。

[0568] B76.根据实施方案B75所述的系统,其中所述工艺相关杂质选自由残余宿主细胞组分、残余病毒生产组分、残余细胞培养组分、残余纯化组分或它们的组合组成的组。

[0569] B77.根据实施方案B76所述的系统,其中所述残余宿主细胞组分包括宿主细胞蛋白、宿主细胞DNA、宿主细胞RNA或它们的组合。

[0570] B78.根据实施方案B77所述的系统,其中所述宿主细胞DNA包括病毒外染色质相关DNA。

[0571] B79.根据实施方案B78所述的系统,其中所述残余病毒生产组分包括质粒DNA、辅助病毒或它们的组合。

[0572] B80.根据实施方案B76所述的系统,其中所述残余细胞培养组分包括抗生素、补充剂、诱导剂、生长因子或它们的组合。

[0573] B81.根据实施方案B76所述的系统,其中所述残余纯化组分包括缓冲剂、无机盐、酶、洗涤剂、培养基或它们的组合。

[0574] B82.根据实施方案B75所述的系统,其中所述产物相关杂质包括空衣壳、聚集的AAV颗粒、降解的AAV颗粒或它们的组合。

[0575] B83.根据实施方案B82所述的系统,其中所述纯化的AAV颗粒包括完整或部分完整衣壳,并且所述产物相关杂质包括空衣壳。

[0576] B84.根据实施方案B82所述的系统,其中所述纯化的AAV颗粒包括完整衣壳,并且所述产物相关杂质包括空衣壳。

[0577] B85.根据实施方案B82所述的系统,其中所述纯化的AAV颗粒基本上由完整衣壳组成,并且所述产物相关杂质包括空衣壳。

[0578] B86.根据实施方案B75所述的系统,其中所述产物相关杂质包括聚集的AAV颗粒、降解的AAV颗粒或它们的组合。

[0579] B87.根据实施方案B86所述的系统,其中所述纯化的AAV颗粒包括空衣壳。

[0580] B88.根据实施方案B86所述的系统,其中所述纯化的AAV颗粒基本上由空衣壳组成。

[0581] B89.根据实施方案B75所述的系统,其中所述产物相关杂质包括聚集的AAV颗粒或它们的组合。

[0582] B90.根据实施方案B23至B89中任一项所述的系统,其中所述药物组合物处于液体状态。

[0583] B91.根据实施方案B23至B89中任一项所述的系统,其中所述药物组合物处于固体或半固体状态。

[0584] B92.根据实施方案B23至B91中任一项所述的系统,其中所述药物组合物维持或增强所述纯化的AAV颗粒的稳定性。

[0585] B93.根据实施方案B23至B91中任一项所述的系统,其中所述药物组合物减少或防止所述纯化的AAV颗粒的聚集。

[0586] B94.根据实施方案B23至B91中任一项所述的系统,其中所述药物组合物

[0587] (a)维持或增强所述纯化的AAV颗粒的稳定性;并且

[0588] (b)减少或防止所述纯化的AAV颗粒的聚集。

[0589] B95.根据实施方案B92或B94所述的系统,其中在一个或多个冷冻/解冻循环后,所述纯化的AAV颗粒的稳定性得以维持或增强。

[0590] B96.根据实施方案B92或B94所述的系统,其中在三个或更多个冷冻/解冻循环后,所述纯化的AAV颗粒的稳定性得以维持或增强。

[0591] B97.根据实施方案B93或B94所述的系统,其中在一个或多个冷冻/解冻循环后,所述AAV颗粒的聚集小于5%。

[0592] B98.根据实施方案B93或B94所述的系统,其中在一个或多个冷冻/解冻循环后,所述AAV颗粒的聚集小于2%。

[0593] B99.根据实施方案B93或B94所述的系统,其中在一个或多个冷冻/解冻循环后,所述AAV颗粒的聚集小于1%。

[0594] B100.根据实施方案B93或B94所述的系统,其中在三个或更多个冷冻/解冻循环后,所述AAV颗粒的聚集小于5%。

[0595] B101.根据实施方案B93或B94所述的系统,其中在三个或更多个冷冻/解冻循环后,所述AAV颗粒的聚集小于2%。

[0596] B102.根据实施方案B93或B94所述的系统,其中在三个或更多个冷冻/解冻循环后,所述AAV颗粒的聚集小于1%。

[0597] B103.根据实施方案B93至B102中任一项所述的系统,其中所述AAV颗粒的稳定性和/或聚集通过选自由动态光散射(DLS)、分析超速离心(AUC)、光学显微术、尺寸排阻色谱法(SEC)、透射电子显微术和具有多角度静态光散射的场流分级(FFF-MALS)组成的组的测定来测量。

[0598] B104.根据实施方案B23至B103中任一项所述的系统,其中所述纯化的AAV颗粒通过包括以下步骤的方法获得:

[0599] (a)使包含AAV颗粒的上清液与包含核酸酶的组合物接触;以及

[0600] (b)纯化所述颗粒。

[0601] B105.根据实施方案B104所述的系统,其中所述核酸酶包括Benzonase或Benzonase®和染色质-DNA核酸酶。

[0602] B106.根据实施方案B105所述的系统,其中所述染色质-DNA核酸酶包括MNase。

[0603] 本文描述了本发明的特定实施方案。在阅读前述描述后,所公开的实施方案的变

型对于本领域的技术人员来说可能变得显而易见，并且预期那些技术人员可适当地采用此类变型。因此，本发明旨在以不同于本文具体描述的方式实践，并且本发明包括在适用法律允许的情况下在所附权利要求中记载的主题的所有修改和等同物。此外，除非本文另有说明或以其他方式与上下文明显矛盾，否则在其所有可能变型中的上述元素的任何组合均涵盖于本发明中。已描述了本发明的多个实施方案。然而，应当理解，在不脱离本发明的精神和范围的情况下，可进行各种修改。因此，实施例部分中的描述旨在说明而非限制权利要求书中描述的本发明的范围。

[0604] 7.实施例

[0605] 本申请的以下实施例将进一步说明本专利申请的性质。本领域的技术人员应当理解，在不脱离本发明的广义的发明构思的情况下，可对上述实施方案作出修改。因此，应当理解，本发明不限于所公开的特定实施方案，而是旨在涵盖如本说明书所定义的本发明实质和范围内的修改。在以下实施例中使用AAV2/8颗粒作为代表性AAV物质，然而，应当理解，所述制剂适用于任何AAV颗粒。

[0606] 实施例I：低离子强度制剂中的纯化的AAV颗粒在冷冻/解冻后表现出物理稳定性。

[0607] 本实施例确定了盐浓度为200mM或更低的制剂中的纯化的AAV颗粒在冷冻/解冻后表现出物理稳定性。

[0608] 为了确定具有低盐浓度的制剂是否可以在一个或多个冷冻/解冻后维持纯化的AAV颗粒的物理稳定性，将纯化的AAV2/8颗粒用作代表性AAV颗粒物质并且配制在表1中描述的制剂中的一种中。

[0609] 表1：制剂组成

[0610]

	制剂#1	制剂#2	制剂#3	制剂#4
浓度(ng/mL)	>1E13	>1E13	>1E13	>1E13
缓冲液(mM),pH	20mM Tris-HCl pH 7.5	20mM Tris-HCl pH 7.5	20mM Tris-HCl pH 7.5	20mM Tris-HCl pH 7.5
盐(mM)	10mM NaCl	100mM NaCl	150mM NaCl	200mM NaCl
冷冻保护剂(% w/v)	5%海藻糖	5%海藻糖	5%海藻糖	5%海藻糖
表面活性剂(% w/v)	0.001% P188	0.001% P188	0.001% P188	0.001% P188

[0611] 简而言之，在制备和纯化后，将AAV颗粒配制在制剂#1、制剂#2、制剂#3或制剂#4中。然后在配制后使用动态光散射(DLS)表征AAV颗粒的物理性质。四种制剂的代表性DLS数据在图1A至图1D中示出。四种制剂中的每一种的AAV颗粒的流体动力学直径的测量结果表明，所有四种制剂在初始配制后都产生均匀的粒径，几乎没有聚集。

[0612] 接着，将制剂冷冻并使其经受单个冷冻/解冻循环以评价物理稳定性(图2A至图2D)。在单个冷冻/解冻循环后通过DLS测量四种代表性制剂的粒径数据，并且相对于冷冻前DLS，在所有制剂中都观察到稳健的物理稳定性。具体地，在制剂#1、制剂#2、制剂#3或制剂#4中配制的AAV颗粒具有单分散峰，表明几乎没有聚集。1nm处的峰是常见的赋形剂峰，但与AAV的聚集无关。

[0613] 在三个冷冻/解冻循环后观察到类似结果(图3A至图3D)。具体地，三个冷冻/解冻循环后的DLS结果描绘了制剂#2和制剂#3中具有非常小拖尾的单分散峰。

[0614] 总之,本实施例证实了即使在多个冷冻/解冻循环后,具有低离子强度(例如,盐<200mM)的制剂中的AAV颗粒也表现出稳健的物理稳定性。

[0615] 实施例II:AAV颗粒中的杂质和空衣壳的检测

[0616] 本实施例确定了产物和后产物级分中280nm(蛋白质)和260nm(DNA/RNA)处的色谱和UV吸收光谱可以用于检测纯化的AAV颗粒中的杂质,以及区分完整衣壳和空衣壳。另外,本实施例说明了使用涉及MNase处理的示例性方法,可以从纯化的AAV颗粒中显著减少杂质和空衣壳(在不期望的情况下)的量。

[0617] AAV颗粒中的杂质(诸如病毒外染色质相关的AAV颗粒)是不期望的产物。这些杂质可能引起纯化产物出现可见的沉淀,这对任何制剂研究都可能有问题。此外,增加的染色质/DNA结合蛋白是不期望的污染物,两者均可以增加宿主细胞蛋白/DNA污染。此外,在某些情况下,空衣壳也可能是不期望的。本研究证实了可以在纯化期间添加染色质-DNA核酸酶MNase,从而改善AAV颗粒的纯化。

[0618] 产生重组AAV2/8颗粒作为示例性AAV颗粒物质。使用示例性方法产生AAV颗粒,该示例性方法涉及在有或没有MNase处理的情况下使用阴离子交换色谱在Bia Separations CIM盘(0.34mL柱体积,1.3um孔径)上进行悬浮培养和纯化。在产物和后产物级分中测量DNA(260nm处的吸光度)和蛋白质(280nm处的吸光度)。结果表明,在没有MNase处理的情况下纯化的样品中,在后产物级分中存在大量的DNA和蛋白质(图4A),通过MNase处理后显著减少(图4B)。具体地,60U/mL的MNase处理既降低了后产物峰的大260nm(DNA/RNA)吸收峰,又降低了280nm(蛋白质)吸收峰(图4B)。

[0619] 通过叠加在有(虚线)或没有(实线)MNase处理的情况下从悬浮培养物产生的rAAV8颗粒的亲和交换色谱图来直接比较DNA/RNA(260nm)(图5A)和蛋白质(280nm)(图5B)的后产物峰高度提供了进一步证据,表明涉及MNase处理以进行染色质消化的用于AAV颗粒纯化的示例性方法增强了AAV颗粒的纯化,并且将残余宿主细胞蛋白污染显著减少到不可检测的水平(分别为图5A和图5B)。具体地,观察到核酸谱(260nm)后产物峰高度的降低非常显著,估计峰高度和面积降低超过90%(图5A)。此外,还观察到蛋白质谱(280nm)后产物峰的降低(图5B)。

[0620] 因此,上述结果证明了可以通过使用色谱并且测量产物和后产物级分中280nm(蛋白质)和260nm(DNA/RNA)处的UV吸收光谱来检测纯化的AAV颗粒中的杂质。此外,可以使用纯化技术(诸如用MNase处理AAV颗粒)来显著减少纯化的AAV颗粒中杂质的量。

[0621] 实施例III:AAV颗粒中产物相关杂质的减少

[0622] 本实施例确定了可以通过显微术在AAV颗粒中测量产物相关杂质(例如,聚集的AAV颗粒),并且涉及MNase处理的示例性方法可以减少产物相关杂质。

[0623] 为了证实纯化的AAV颗粒可以基本上不含产物相关杂质,诸如聚集的AAV颗粒和沉淀的AAV颗粒,使用不同的纯化技术从样品中获得宏观和微观图像。示例性技术涉及在有或没有MNase处理的情况下纯化AAV颗粒。结果证明了AAV颗粒可以被生成为基本上不含可见沉淀物。

[0624] 例如,后产物峰级分的宏观检查表明,使用ExpiFectamine™293转染试剂盒增强剂(Thermo Fisher Scientific)时在悬浮Expi293F™细胞(Thermo Fisher Scientific)中产生的未经MNase处理的rAAV8颗粒或未使用增强剂时在悬浮Expi293F™细胞中产生的未经

MNase处理的rAAV8颗粒在宏观检查下具有可见沉淀物(图6)。相比之下,未使用增强剂时在悬浮Expi293F™细胞中产生的且用60U/mL MNase在25℃消化30分钟的rAAV8颗粒没有可见沉淀物(图6)。

[0625] 该数据证实了AAV颗粒被纯化使得它们基本上不含产物相关杂质、聚集的AAV颗粒和沉淀的AAV颗粒。此外,结果例证了AAV颗粒杂质可以通过显微术可视化。

[0626] 实施例IV:高滴度的纯化的AAV颗粒的生成

[0627] 本实施例确定了可以生成和测量高滴度的纯化的AAV颗粒。

[0628] 使用三种示例性纯化技术纯化AAV颗粒,并且测量病毒滴度。简而言之,将AAV2/8颗粒制备为示例性AAV颗粒,并且使用包括以下项的示例性纯化技术进行纯化:(1)无MNase;(2)MNase;或者(3)增强剂。每mL的基因组拷贝(GC/mL)滴度(图7A)、每个细胞的基因组拷贝(GC/细胞)(图7B)和总基因组拷贝(图7C)的定量表明,可以生成高滴度的纯化的AAV颗粒。

[0629] 另外,还从用或不用MNase处理的样品中产生高滴度的纯化的AAV载体,并且使用以下项进行洗脱:(1)高/低pH洗脱;(2)柠檬酸盐洗脱,或者(3)低pH洗脱。如图8B所示,对于三种不同的洗脱缓冲液(即,柠檬酸盐、低pH和低/高pH)中的每一种,在MNase处理的样品中一致地观察到1×10^{11}-1×10^{14}范围内的总基因组拷贝(图8B,表2)。

[0630] 表2:总基因组拷贝

[0631]

	无MNase	MNase
柠檬酸盐	$1.09e^{12}$	$3.27e^{12}$
低pH	$8.48e^{11}$	$6.22e^{12}$
低/高pH	$3.45e^{11}$	$2.84e^{13}$

[0632] 总之,这些数据证实了AAV颗粒可以被纯化以生成高病毒滴度,并且可以测量病毒滴度。

[0633] 实施例V:高pH洗涤提高了AAV颗粒的纯度

[0634] 本实施例确定了高pH洗涤在AAV颗粒的亲和交换色谱期间能够减少杂质的存在。

[0635] 为了确定用于纯化AAV颗粒的可以去除杂质的示例性条件,使用AKTA系统并且使样品在纯化期间经受各种洗涤和/或酶处理条件。不同的纯化条件在表3中汇总。

[0636] 表3:纯化条件

[0637]

	亲和力				阴离子交换
条件	洗涤 pH	Benzonase	MNase	洗脱	洗脱
1	n/a	否	否	柠檬酸盐，pH 2.5	20mM BTP，pH 10.2；10mM – 200mM NaCl 线性梯度
2	n/a	是	否	柠檬酸盐，pH 2.5	
3	n/a	是	是	H_3PO_4，pH 1.5	
4	pH 9.5	是	是	柠檬酸盐，pH 2.5	
5	pH 10.2	是	是	H_3PO_4，pH 1.5	
6	pH 10.3	是	是	H_3PO_4，pH 1.5	
7	pH 10.3	是	否	H_3PO_4，pH 1.5	
8	pH 10.9	是	是	H_3PO_4，pH 1.5	
9	pH 10.4	是	是	H_3PO_4，pH 1.5	
10	pH 10.4	是	是	H_3PO_4，pH 1.5	20mM Tris pH 9.0；0-300mM $(C_2H_5)NCl$ 线性梯度

[0638] BTP:Bis-Tris丙烷;NaCl:氯化钠;H_3PO_4:磷酸

[0639] 简而言之，在批量收获和benzonase处理之后，使粗样品经受亲和色谱。如表3中所指示，在特定条件(即，条件4至10)下，用pH 9.5至pH10.9范围内的高pH缓冲液洗涤亲和柱。另外，如表3中所指示，样品未用benzonase或MNase处理(条件1)、在柱上仅用benzonase处理(条件2和7)或者在柱上用benzonase和MNase处理(条件3至5和8至10)。使用柠檬酸盐pH 2.5(条件1、2和4)或磷酸(H_3PO_4)pH 1.5(条件3和5至10)执行从亲和柱洗脱。

[0640] 在亲和色谱纯化之后，随后通过使用CIM QA(季胺)整体柱的阴离子交换色谱来精制样品。然后，使用10mM至200mM NaCl线性梯度洗脱样品并在20mM BTP pH 10.2(条件1至9)中中和，或使用0至300mM(C_2H_5)NCl线性梯度洗脱样品并在20mM Tris pH 9.0(条件10)中中和。

[0641] 收集纯化的样品，并且使其经受十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)，之后进行银染，以检测纯化的AAV颗粒中是否存在杂质。不同示例性纯化条件的比较表明，涉及高pH洗涤条件<pH 10.9的示例性纯化过程在与benzonase和MNase处理组合时产生高纯度AAV样品(图9A)。另外，纯化的AAV样品的DNA琼脂糖凝胶电泳指示AAV内所含的ITR-转基因的存在(图9B)。

[0642] 这些结果表明，涉及高pH洗涤(约pH 9.5至pH 10.4)的示例性纯化过程在亲和色谱纯化期间可以提高纯化的AAV的纯度。此外，结果证实了可以通过涉及凝胶电泳和银染色的示例性测定来测量杂质。

[0643] 实施例VI:几乎没有杂质的AAV颗粒的测量

[0644] 本实施例确定了可以使用动态光散射(DLS)来测量AAV颗粒杂质，并且差示扫描荧光法(DSF)可以用于确定蛋白质聚集Tagg与病毒的熔解相符的温度。

[0645] 作为AAV血清型身份的决定因素的热稳定性是本领域中已知的，并且也可用于检测AAV颗粒样品中的杂质。例如，当消除杂质时，蛋白聚集的起始(Tagg)与病毒的熔解温度(Tm)相符。

[0646] 为了确定纯化后AAV颗粒中是否存在杂质，执行各种纯化方法，并且通过DLS在一定温度范围内测量样品以确定Tm和Tagg。与上述先前结果一致，涉及MNase的示例性方法能够改善从AAV颗粒中去除杂质。具体地，在未用benzonase或MNase处理的样品中，发现Tagg

和Tm相差超过10℃(图10A)。虽然benzonase的添加改善了杂质的去除,但benzonase和MNase一起显示出Tagg和Tm相符性方面的改善(图10B和图10C)。

[0647] 类似地,涉及MNase和高pH洗脱条件的另外的示例性纯化技术表明,可以生成具有Tagg和Tm相符性的纯化的AAV颗粒。具体地,与仅用benzonase处理且用磷酸(pH 10.3)洗脱的样品(图10D)相比,Tagg和Tm在用benzonase和MNase处理且用磷酸(pH 10.3)洗脱的样品(图10E)中相符。

[0648] 总之,这些结果证实了可以基本上去除纯化的AAV颗粒中的杂质,并且DLS和DSF是用于测量AAV颗粒杂质的示例性测定。

[0649] 实施例VII:纯化的AAV颗粒中工艺相关杂质的检测

[0650] 本实施例确定了AAV颗粒可以被纯化为基本上不含工艺相关杂质,诸如宿主细胞DNA和宿主细胞蛋白。

[0651] 为了确定在阴离子交换(AEX)纯化之后纯化的AAV颗粒样品中是否存在任何残余宿主细胞DNA,执行AlphaLISA测定以检测作为分析物的宿主细胞DNA。AlphaLISA基于小珠的技术依赖于PerkinElmer的放大发光邻近均相测定法(amplified luminescent proximity homogeneous assay)并且使用发光氧通道化学物质(luminescent oxygen-channeling chemistry)检测宿主细胞DNA(参见Beaudet等人,Nat Methods 5,an8-an9(2008))。

[0652] 在以下六种不同条件下制备的样品中通过AlphaLISA来测量AEX纯化后残余宿主细胞DNA的分析:(1)在没有benzonase或MNase的情况下纯化(“无酶”);(2)在用benzonase和柠檬酸盐洗脱的情况下纯化(“B、柠檬酸盐(亲和力)”);(3)在用benzonase和柠檬酸盐洗脱的情况下纯化(“B、柠檬酸盐”);(4)在用benzonase、MNase和磷酸洗脱的情况下纯化(“B、M、Phos”);(5)在用benzonase、高pH(pH 10.3)洗涤和磷酸洗脱的情况下纯化(“B、pH 10.3、Phos”);以及(6)在用benzonase、MNase和磷酸洗脱的情况下纯化(“B、M、pH 10.3、Phos”)。生成标准曲线以外推所存在的宿主细胞DNA的浓度水平。

[0653] 结果表明,在包括MNase的示例性纯化技术中,AAV颗粒可以被纯化为基本上不含宿主细胞DNA(图11A和图11B)。例如,在用benzonase、MNase和磷酸洗脱的情况下纯化(“B、M、pH 10.3、Phos”)产生了几乎不可检测水平的宿主细胞DNA(图11A和图11B)。

[0654] 这些结果表明,可以从纯化的AAV颗粒中基本上去除工艺相关杂质,诸如宿主细胞DNA。

[0655] 实施例VIII:MNase处理改进了纯化过程

[0656] 本实施例说明了本文所述的涉及MNase的示例性AAV纯化方法代表对现有技术的改进,并且可以生成具有大幅减少的杂质的纯化的AAV颗粒。

[0657] 已描述了使用阴离子交换和benzonase来纯化AAV颗粒的当前方法(参见Wang C等人,Mol Ther Methods Clin Dev.2019;15:257-263)。然而,此类方法中未采用MNase。

[0658] 为了确定包括MNase处理的本文所述纯化方法的表现是否可优于当前纯化方法,将MNase处理方案(方案#1)与使用Wang等人方法(方案#2)获得的级分进行比较。

[0659] 简而言之,通过亲和树脂来执行根据Wang等人的纯化。在上样到柱之前,将批量AAV池用50U/mL benzonase在37℃处理1小时,并且通过在10,000×g下离心15分钟来使其澄清,之后通过1.2mm和0.45mm过滤器进行连续过滤。使用低pH缓冲液将AAV从柱洗脱下来。

同时，根据本文所述的方法(包括MNase处理)来纯化不同组样品。

[0660] 方案#1与方案#2之间的比较表明，MNase处理能够大大减少存在于AAV颗粒样品中的杂质量，如通过银染所测量(图12)。

[0661] 因此，本实施例证实了本文提供的使用MNase的纯化方法代表对用于AAV纯化的方法的改进。

[0662] 实施例IX:在另选的配制条件下纯化的AAV的改善的稳定性

[0663] 本实施例确定了本文提供的制剂通过冷冻/解冻胁迫和-80℃长期储存具有改善的稳定性。

[0664] 简而言之，使用AAV8(GFP)作为示例性AAV颗粒，并且根据本文所述的方法进行纯化，所述方法包括MNase处理、亲和色谱和阴离子交换色谱。在产生和纯化后，将4.6×10^{13}个VG/mL AAV颗粒配制在制剂#2(20mM Tris、100mM NaCl、5%海藻糖、0.001%泊洛沙姆-188，pH 7.5)的示例性缓冲液中。随后，将AAV8(GFP)颗粒制剂在制剂#2缓冲液中稀释至最终浓度为2.0×10^{13}个VG/mL AAV颗粒。将样品等分到(a)1.2mL标记的冷冻小瓶中；(b)以0.1mL等分到DLS小瓶中；以及(c)以0.15mL等分到SEC-FLD小瓶中，并置于-80℃冰箱中。

[0665] 然后使用动态光散射(DLS)和与荧光检测相关的尺寸排阻色谱(SEC-FLD)在冷冻/解冻和-80℃长期储存之前和之后表征制剂中的AAV颗粒的物理性质。通过从-80℃冰箱中取出样品并在室温下放置超过30分钟以解冻来进行解冻。解冻后再次冷冻拿出的SEC样品。

[0666] 测量DLS和SEC-FLD的时间点的汇总分别在表4和表5中提供。

[0667] 表4:DLS样品汇总

[0668]

样品	温度(℃)	时间点(月)
AAV8(GFP)	初始	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

[0669] 表5:SEC-FLD样品汇总

[0670]

样品	温度(℃)	时间点(月)
AAV8(GFP)	初始	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

[0671] 结果证实了示例性制剂#2通过五个冷冻/解冻循环和通过在-80℃至少三个月后

具有稳健的稳定性。例如，观察到强物理稳定性，如由通过冷冻/解冻和-80℃储存相对于冷冻前DLS(t0)的DLS粒径所测量，如图13A至图13B和图14A至图14B以及表6和7中所示。具体地，粒径或多分散性自始至终几乎没有变化。

[0672] 此外，如图15A至图15B和图16A至图16B以及表8和表9所示，通过SEC-FLD证实了非常强的％单体，并且通过冷冻/解冻和-80℃储存鉴定到非常少的高分子量物质(HMWS)，这表明聚集非常少。

[0673] 表6:冷冻/解冻的DLS结果

[0674]

冷冻/解冻	Z-平均值(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

[0675] PDI＝多分散指数;STDEV＝标准偏差

[0676] 表7.-80℃稳定性的DLS结果

[0677]

时间(月)	Z-平均值(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

[0678] PDI＝多分散指数;STDEV＝标准偏差

[0679] 表8.冷冻/解冻的SEC-FLD结果

[0680]

周期	HMWS	单体
0	0.29％	99.71％
1	0.63％	99.37％
3	0.45％	99.55％
5	2.47％	97.53％

[0681] HMWS＝高分子量物质。

[0682] 表9.-80℃稳定性的SEC-FLD结果

[0683]

时间(月)	HMWS	单体
0	0.29％	99.71％
2	0.47％	99.53％
3	0.76％	99.24％

[0684] HMWS＝高分子量物质。

[0685] 总之，这些结果证实了示例性制剂#2对于纯化的AAV制剂具有强稳定性。

[0686] *****

[0687] 本领域的技术人员应当理解，在不脱离本发明的广义的发明构思的情况下，可对上述实施方案作出修改。因此，应当理解，本发明不限于所公开的特定实施方案，而是旨在

涵盖如本说明书所定义的本发明实质和范围内的修改。

[0688] 背景以及说明书全篇中引用或描述了各种出版物、文章和专利;这些参考文献中的每一者全文均以引用方式并入本文。本说明书中包括的对文件、行为、材料、装置、文章等的讨论旨在为本发明提供上下文。此类讨论并不是承认这些事项中的任一事项或全部事项均相对于所公开或受权利要求书保护的任何发明形成现有技术的一部分。

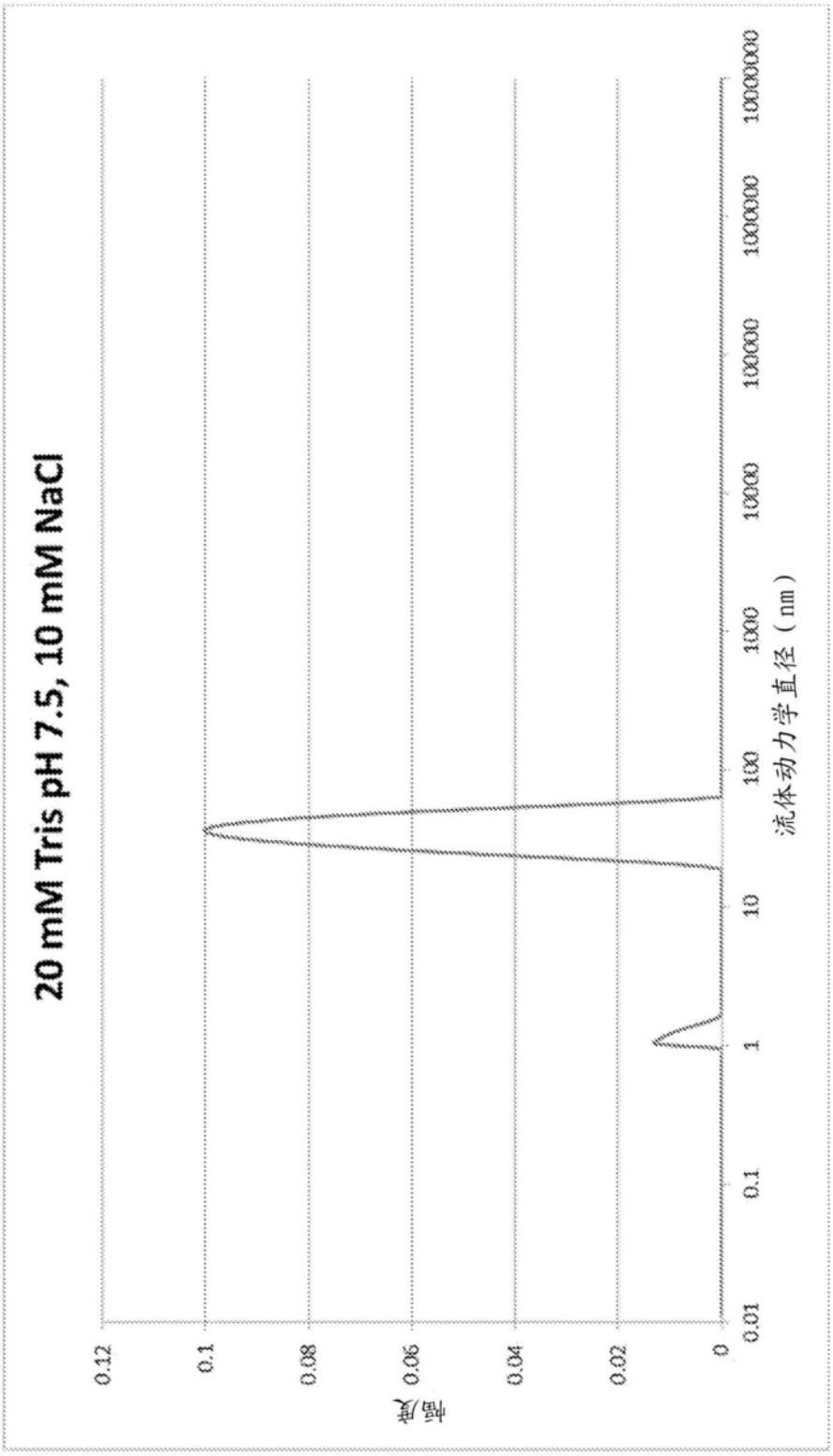

20 mM Tris pH 7.5, 10 mM NaCl
强度
0.12
0.1
0.08
0.06
0.04
0.02
0
0.01
0.1
1
10
100
1000
10000
100000
1000000
10000000
流体动力学直径（nm）

图1A

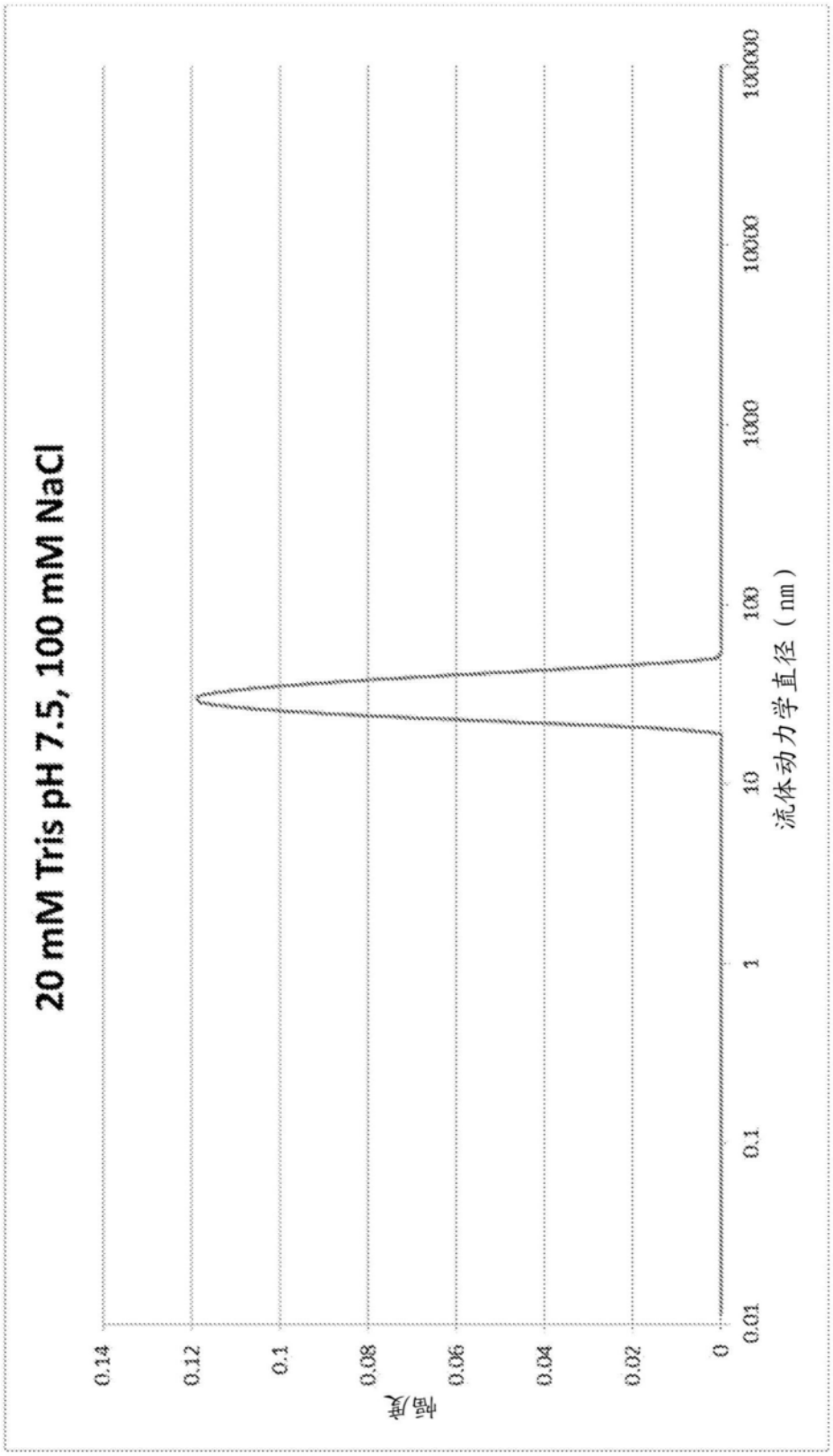

20 mM Tris pH 7.5, 100 mM NaCl
强度
0.14
0.12
0.1
0.08
0.06
0.04
0.02
0
0.01
0.1
1
10
100
1000
10000
100000
流体动力学直径（nm）

图1B

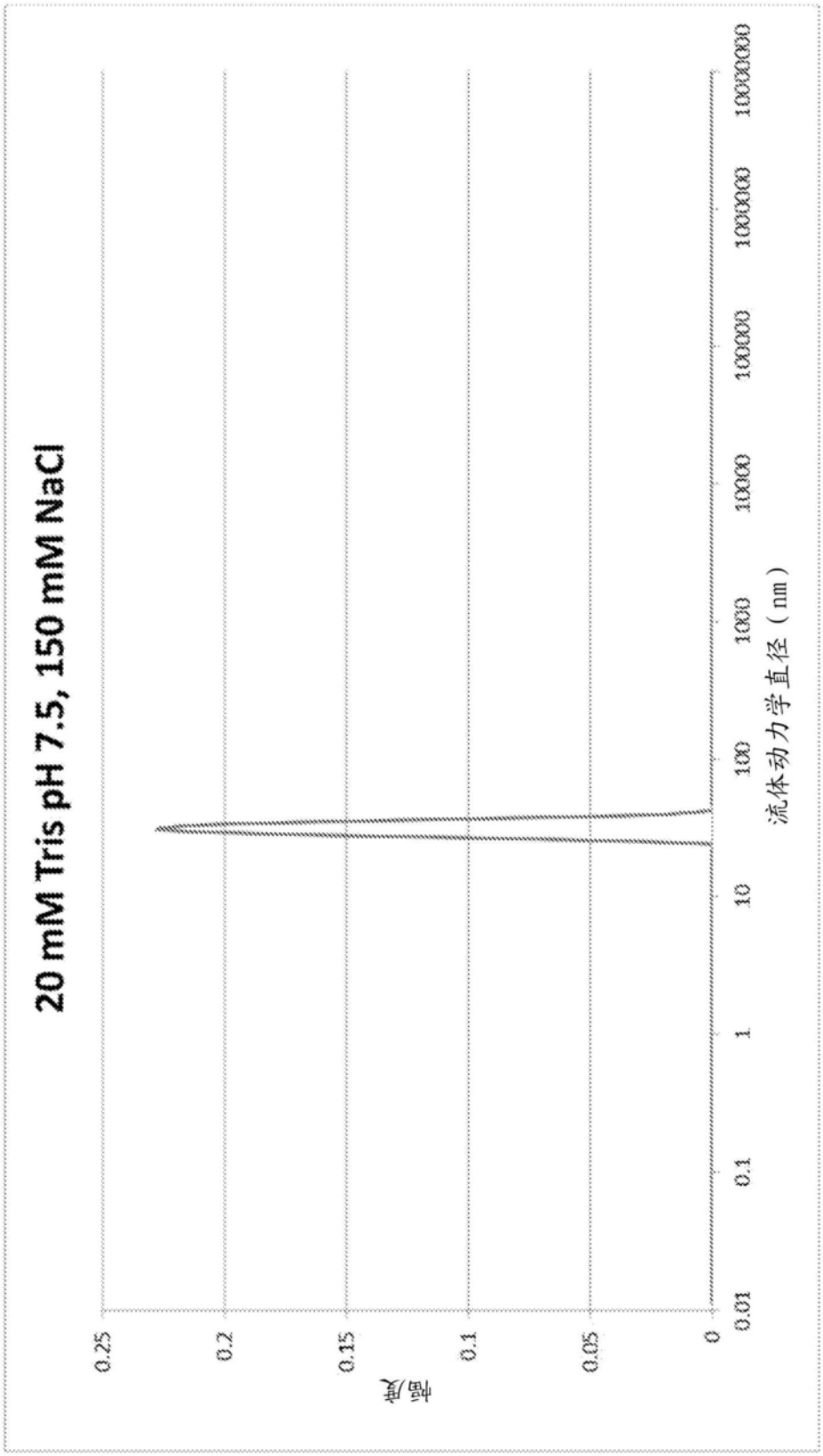

20 mM Tris pH 7.5, 150 mM NaCl
强度
0.25
0.2
0.15
0.1
0.05
0
0.01
0.1
1
10
100
1000
10000
100000
1000000
10000000
流体动力学直径（nm）

图1C

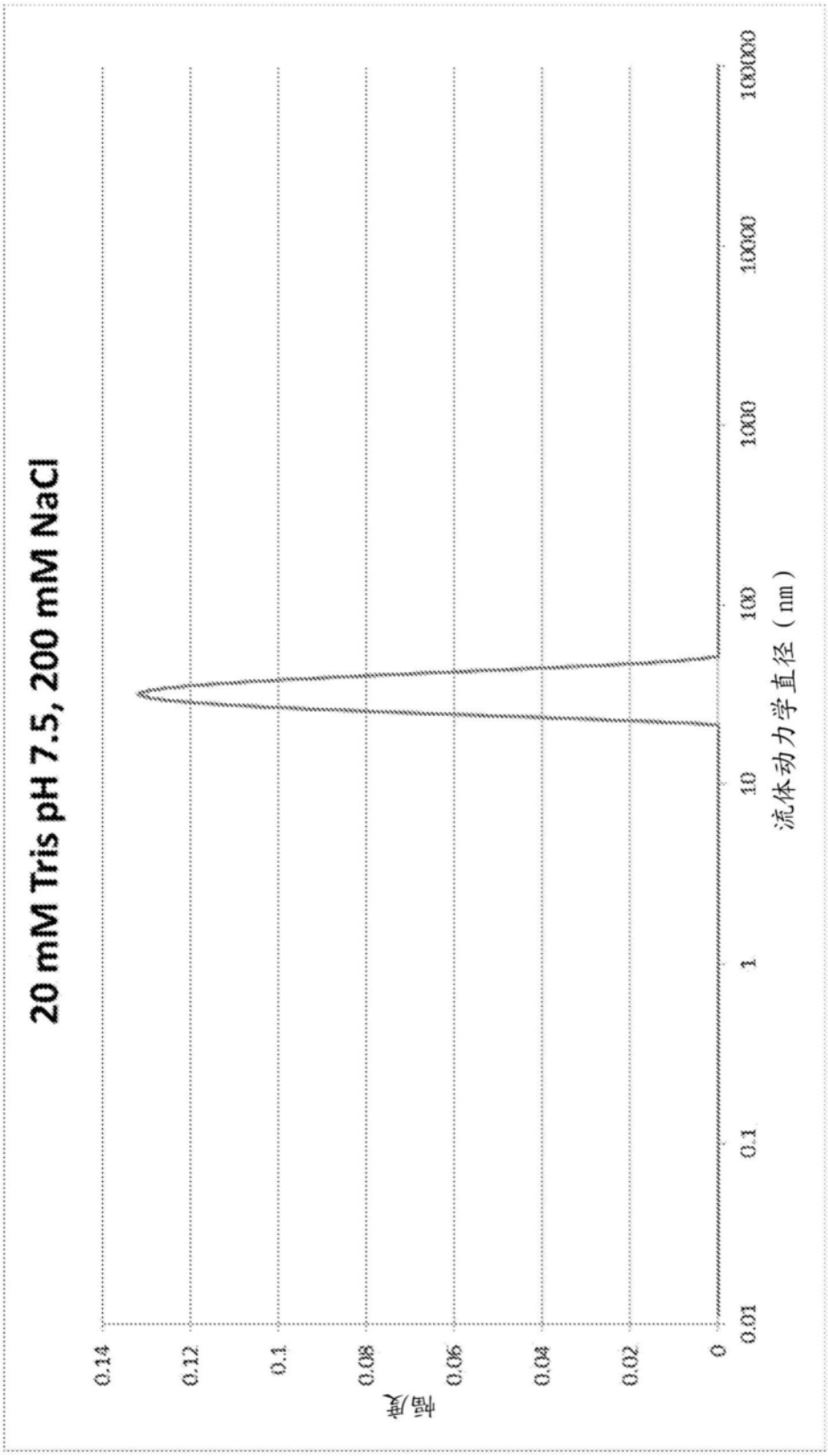

20 mM Tris pH 7.5, 200 mM NaCl
强度
0.14
0.12
0.1
0.08
0.06
0.04
0.02
0
0.01
0.1
1
10
100
1000
10000
100000
流体动力学直径（nm）

图1D

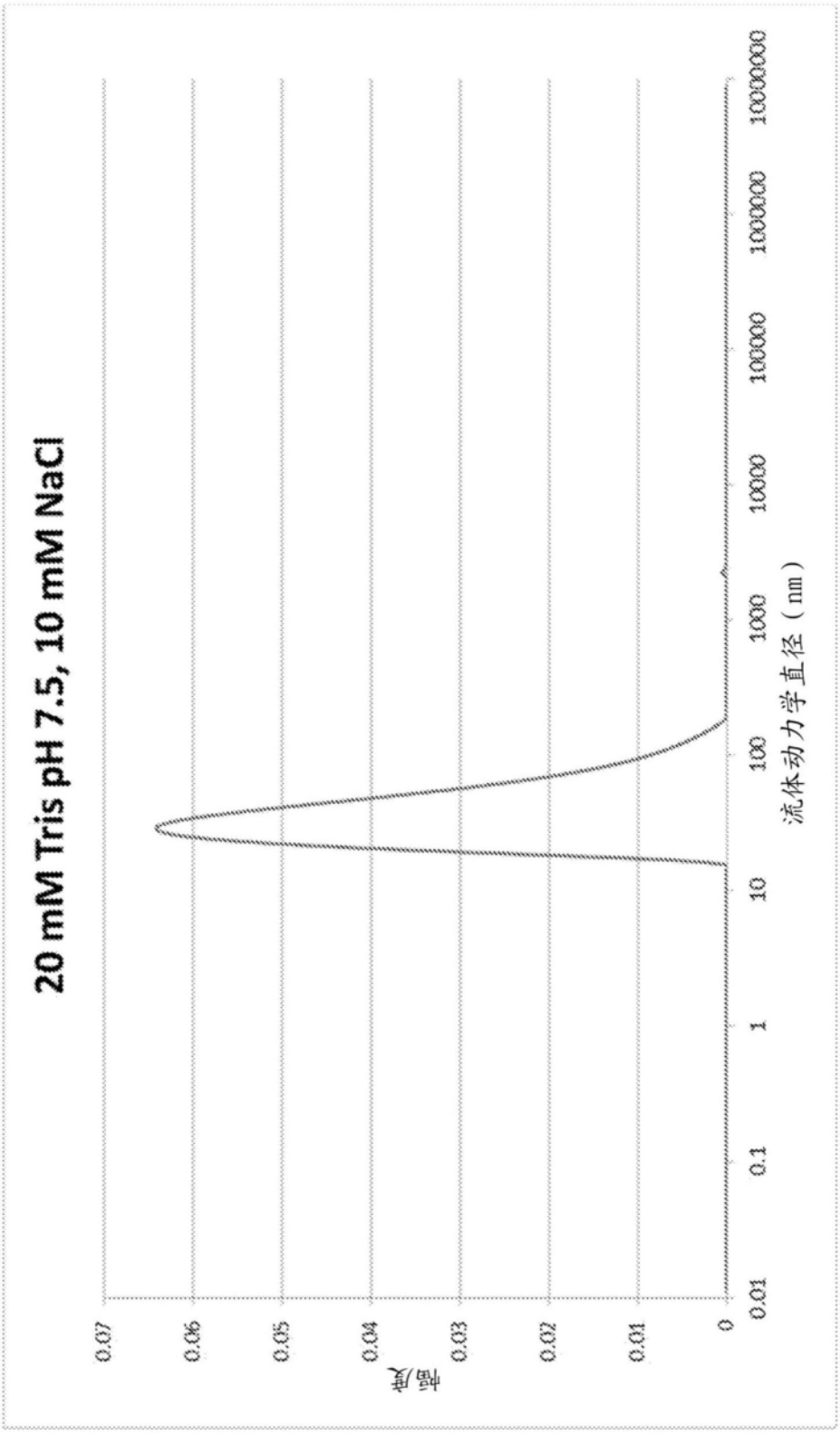

20 mM Tris pH 7.5, 10 mM NaCl
强度
0.07
0.06
0.05
0.04
0.03
0.02
0.01
0
0.01
0.1
1
10
100
1000
10000
100000
1000000
10000000
流体动力学直径（nm）

图2A

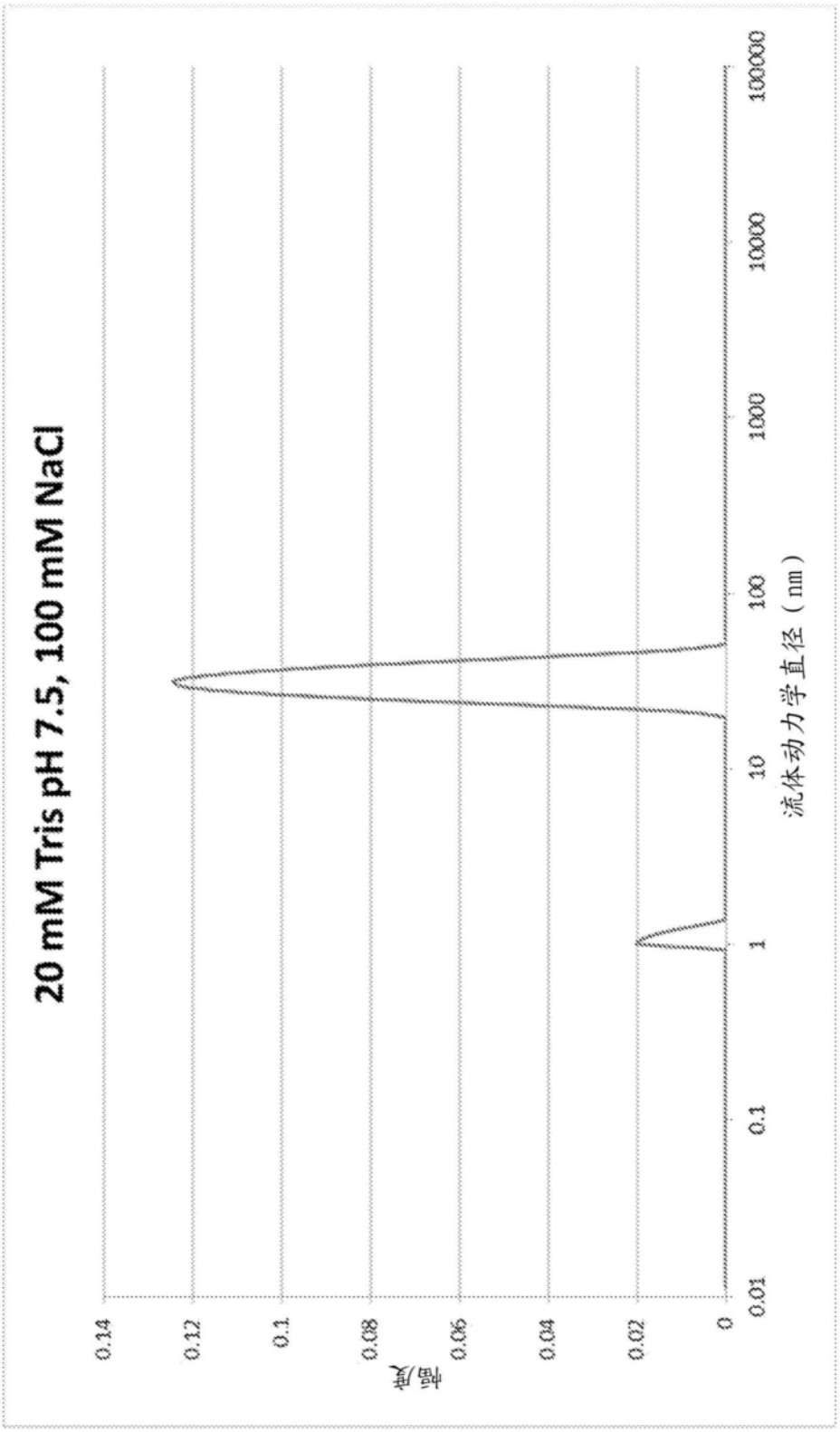

20 mM Tris pH 7.5, 100 mM NaCl
强度
0.14
0.12
0.1
0.08
0.06
0.04
0.02
0
0.01
0.1
1
10
100
1000
10000
100000
流体动力学直径（nm）

图2B

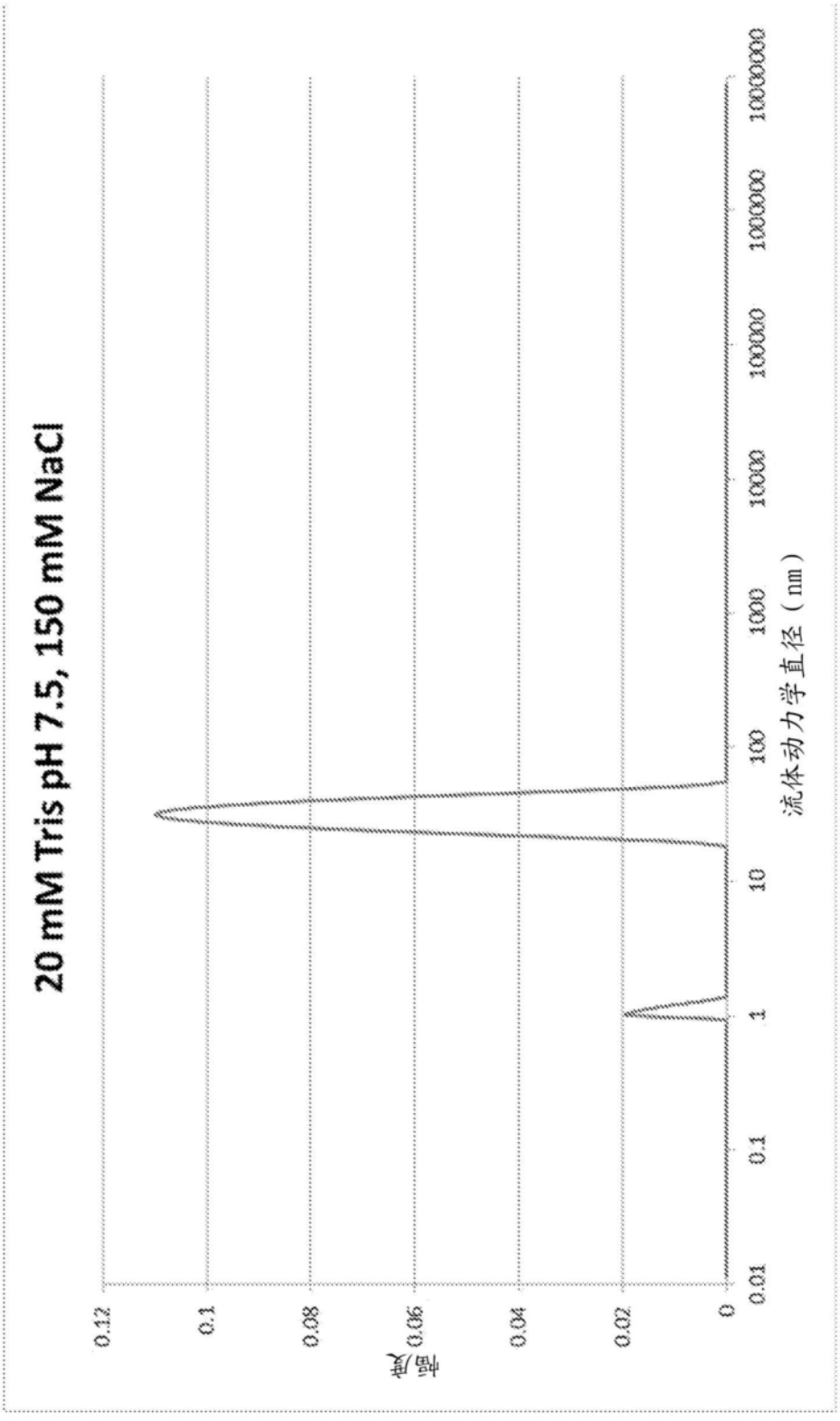

20 mM Tris pH 7.5, 150 mM NaCl
强度
0.12
0.1
0.08
0.06
0.04
0.02
0
0.01
0.1
1
10
100
1000
10000
100000
1000000
10000000
流体动力学直径（nm）

图2C

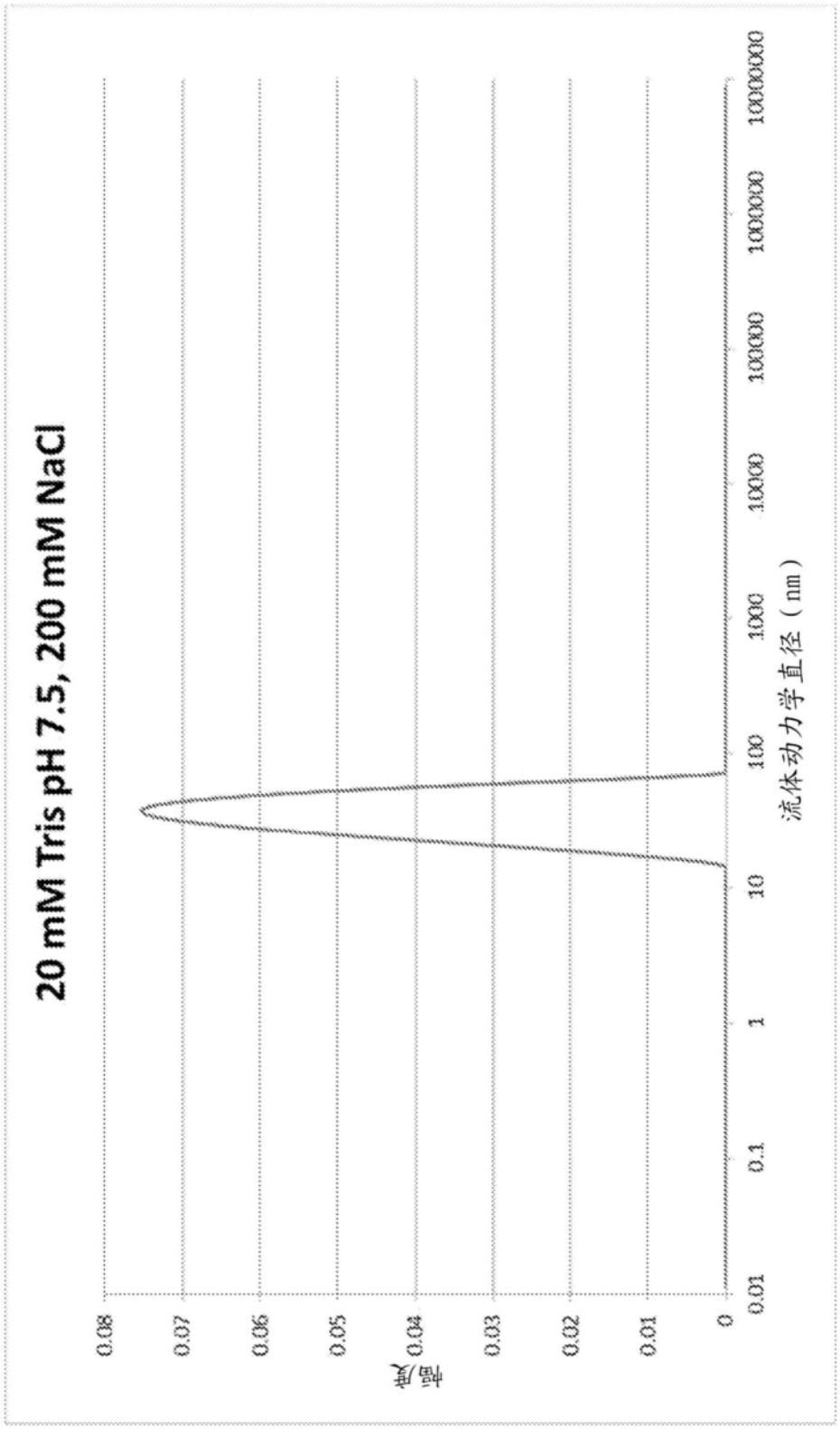

20 mM Tris pH 7.5, 200 mM NaCl
幅度
0.08
0.07
0.06
0.05
0.04
0.03
0.02
0.01
0
0.01
0.1
1
10
100
1000
10000
100000
1000000
10000000
流体动力学直径（nm）

图2D

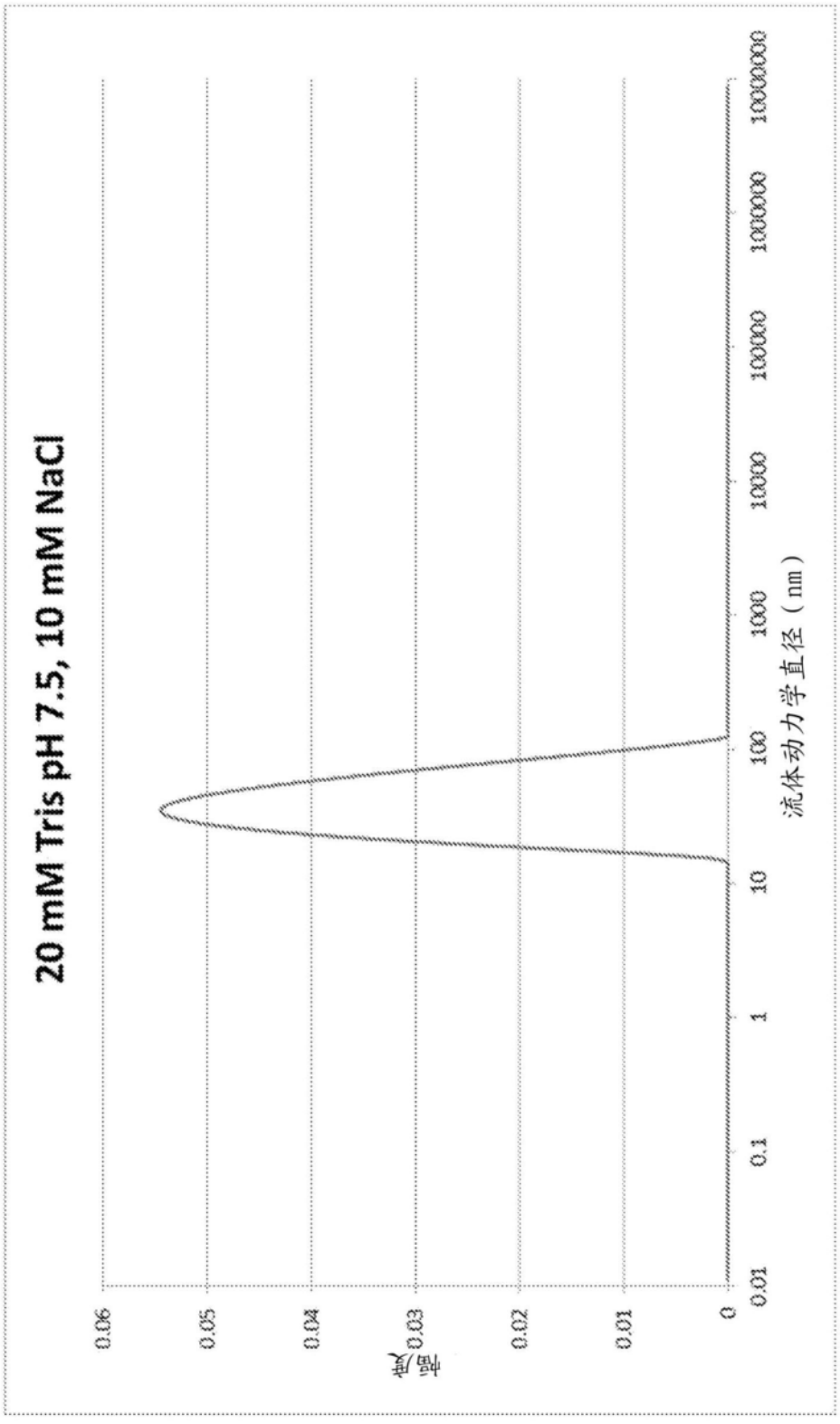

20 mM Tris pH 7.5, 10 mM NaCl
强度
0.06
0.05
0.04
0.03
0.02
0.01
0
0.01
0.1
1
10
100
1000
10000
100000
1000000
10000000
流体动力学直径（nm）

图3A

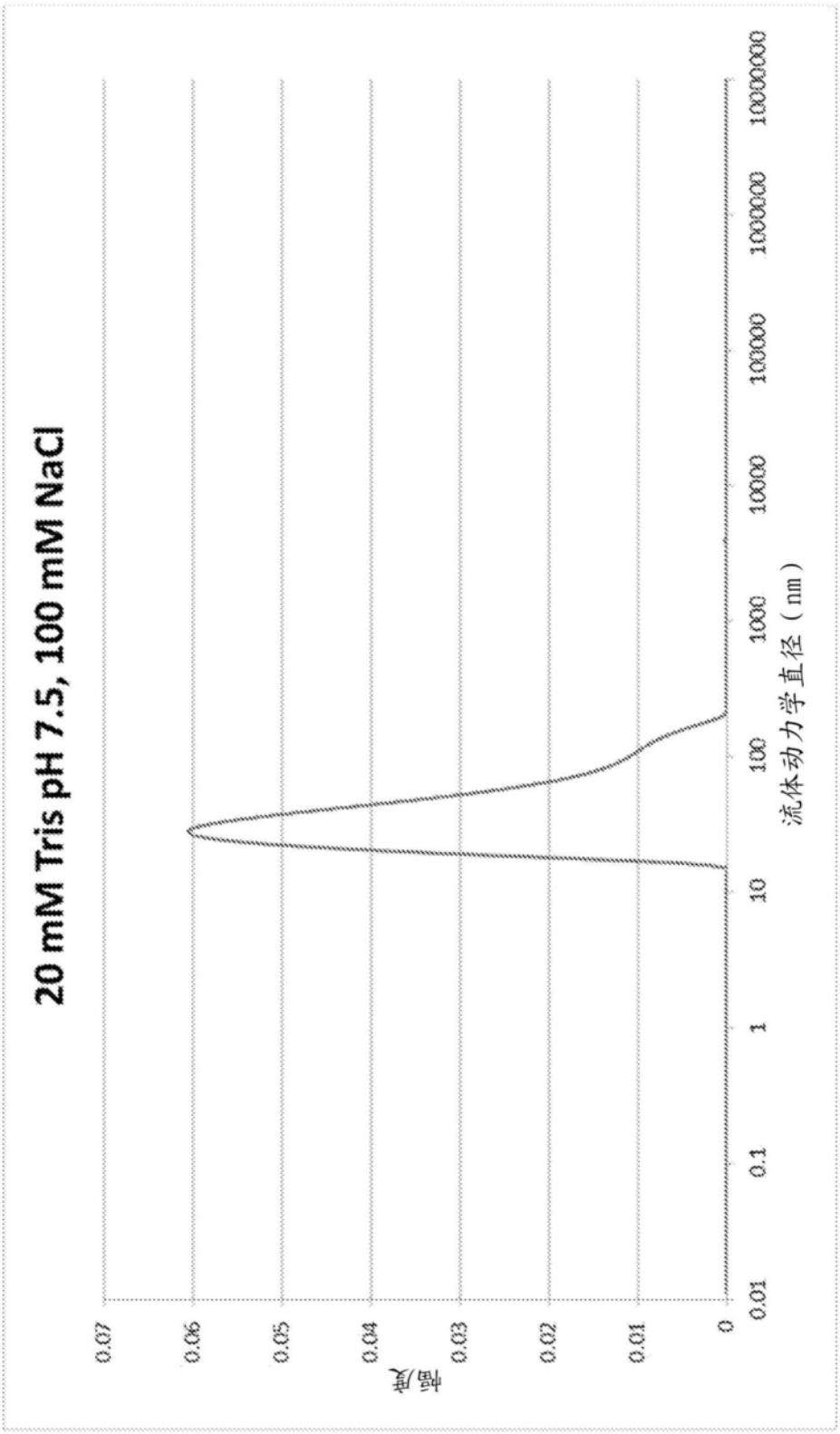

20 mM Tris pH 7.5, 100 mM NaCl
强度
0.07
0.06
0.05
0.04
0.03
0.02
0.01
0
0.01
0.1
1
10
100
1000
10000
100000
1000000
10000000
流体动力学直径（nm）

图3B

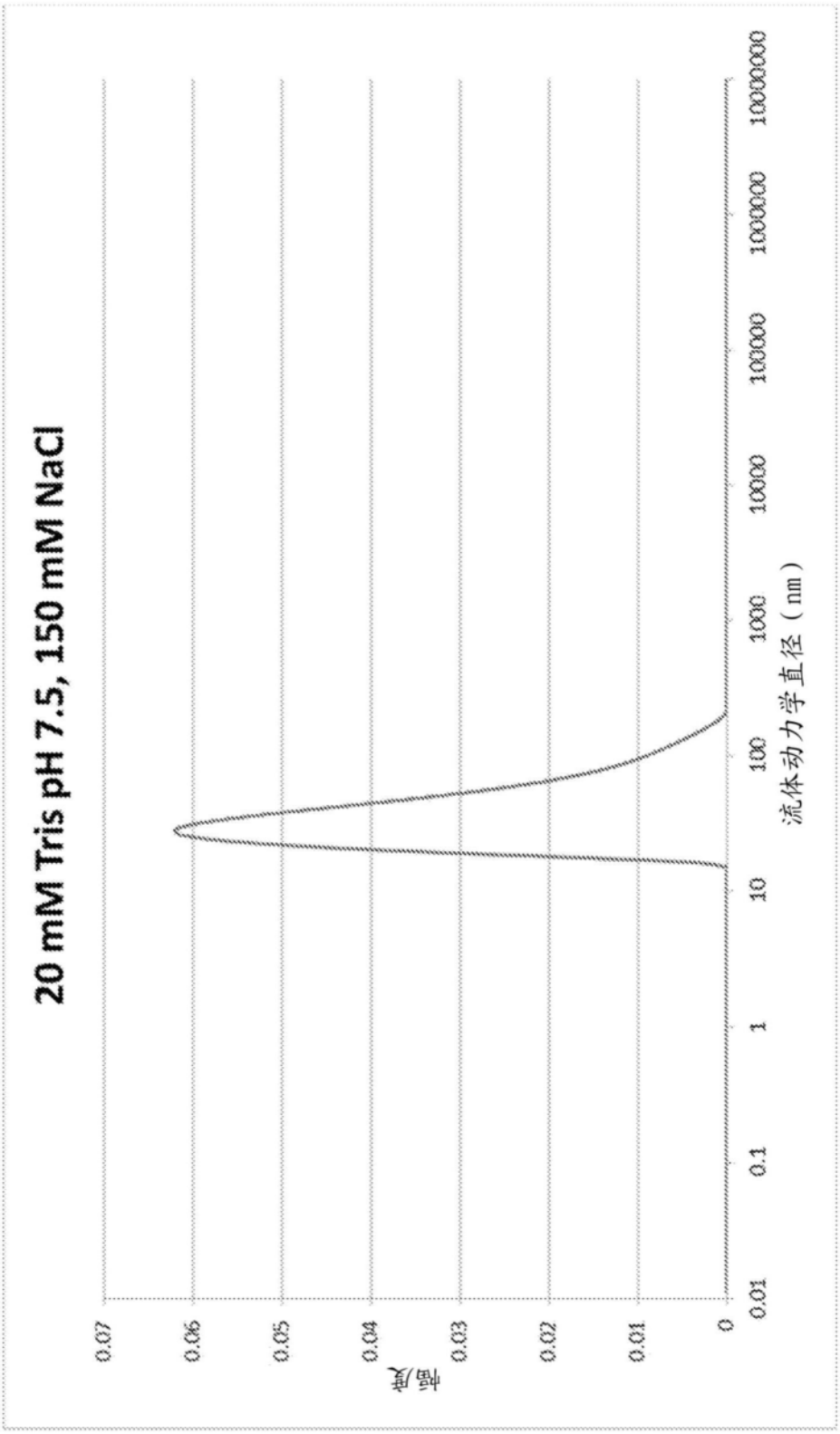

20 mM Tris pH 7.5, 150 mM NaCl
强度
0.07
0.06
0.05
0.04
0.03
0.02
0.01
0
0.01
0.1
1
10
100
1000
10000
100000
1000000
10000000
流体动力学直径（nm）

图3C

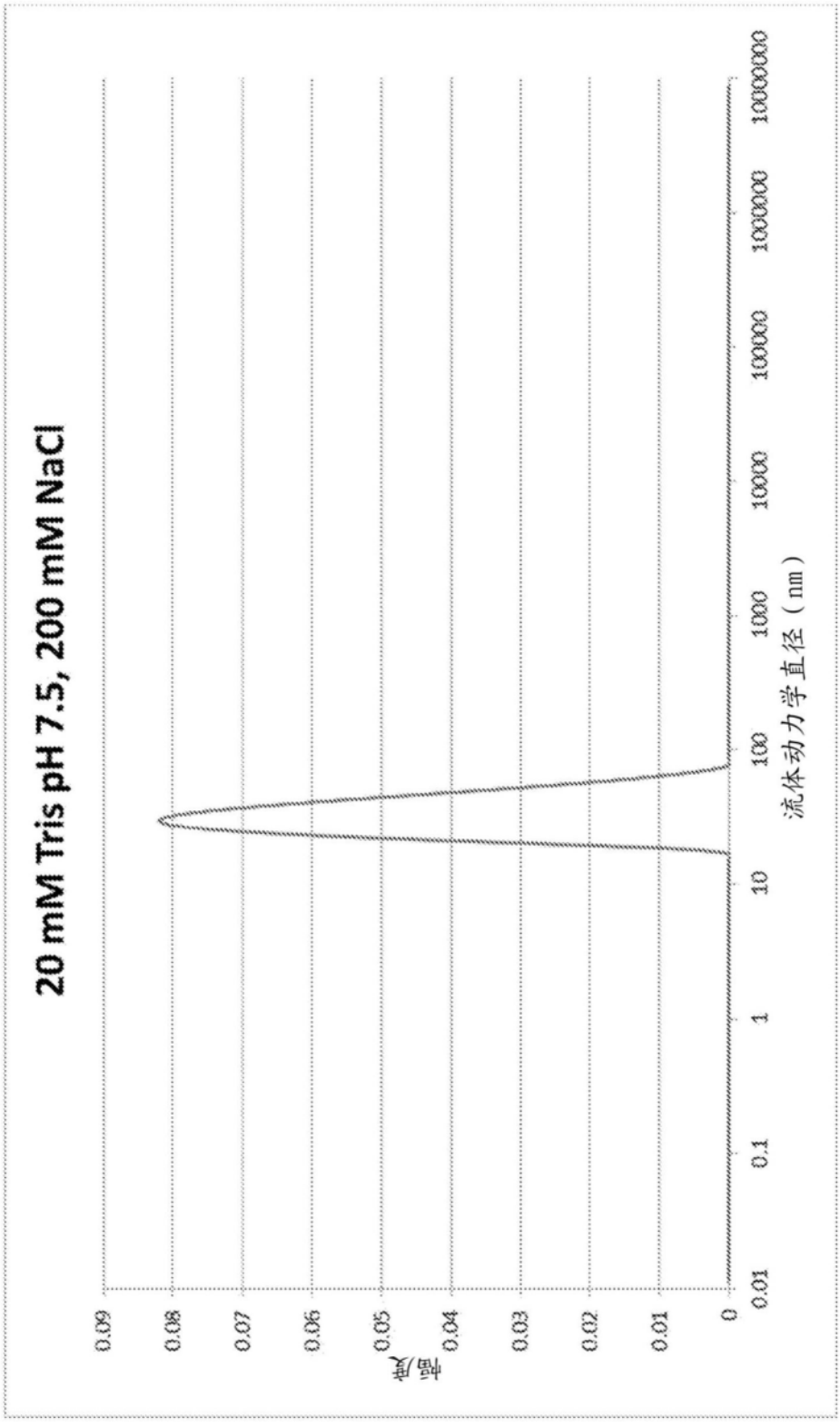

20 mM Tris pH 7.5, 200 mM NaCl
强度
0.09
0.08
0.07
0.06
0.05
0.04
0.03
0.02
0.01
0
0.01
0.1
1
10
100
1000
10000
100000
1000000
10000000
流体动力学直径（nm）

图3D

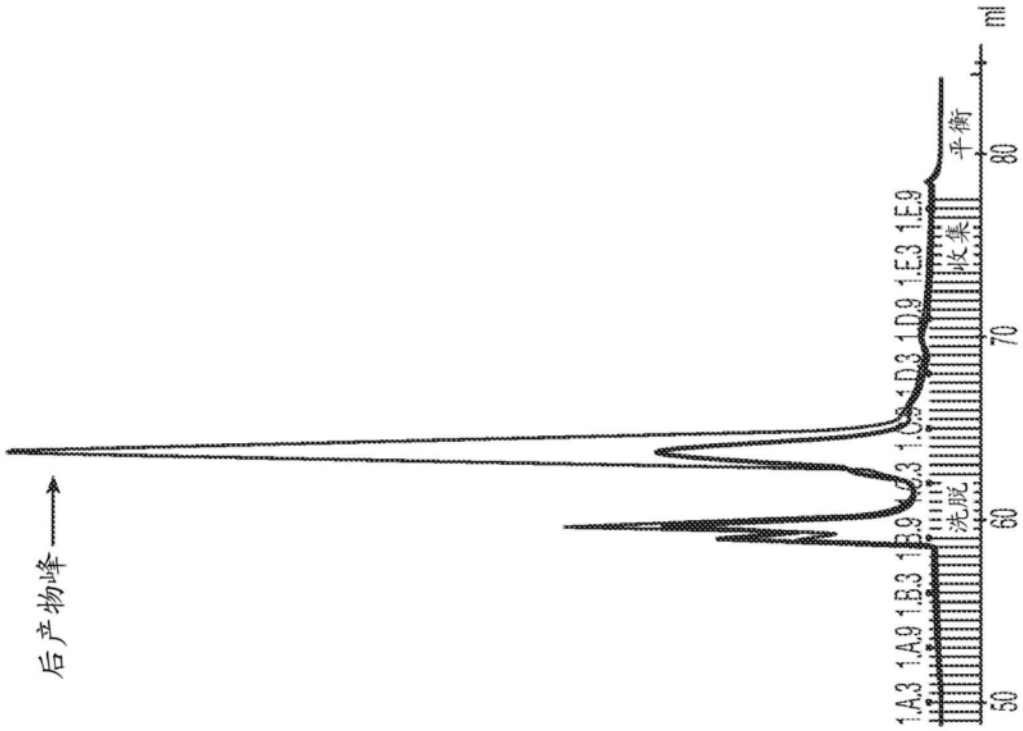

后产物峰
1A.3 1A.9 1B.3 1B.9 洗脱 1D.9 1E.3 1E.9 收集 平衡
50 60 70 80 ml

图4A


1A.1 1A.7 1B.1 1B.7 洗脱 1C.1 1C.7 1D.1 1D.7 收集 平衡
50 60 70 80 ml

图4B

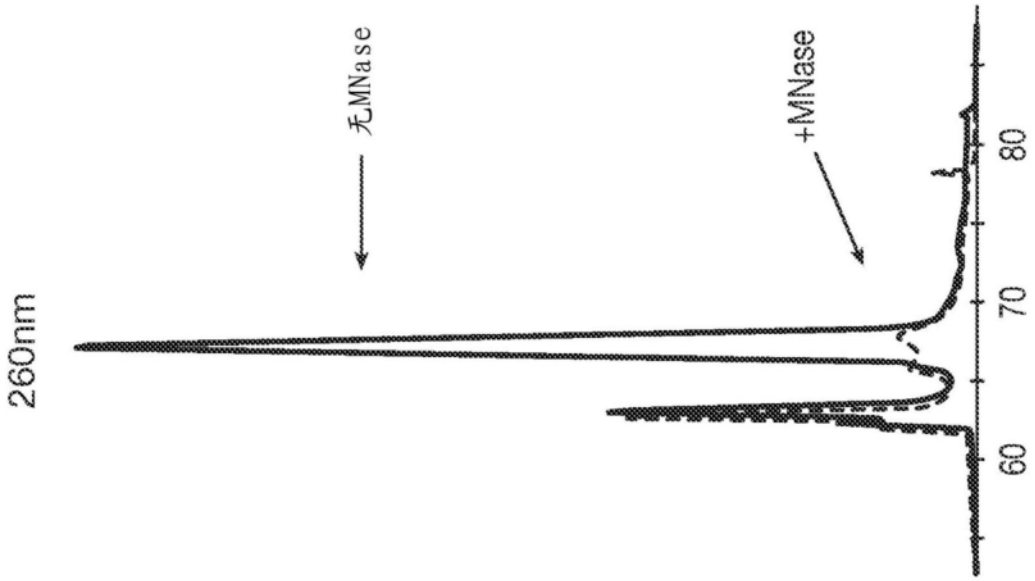


图5A

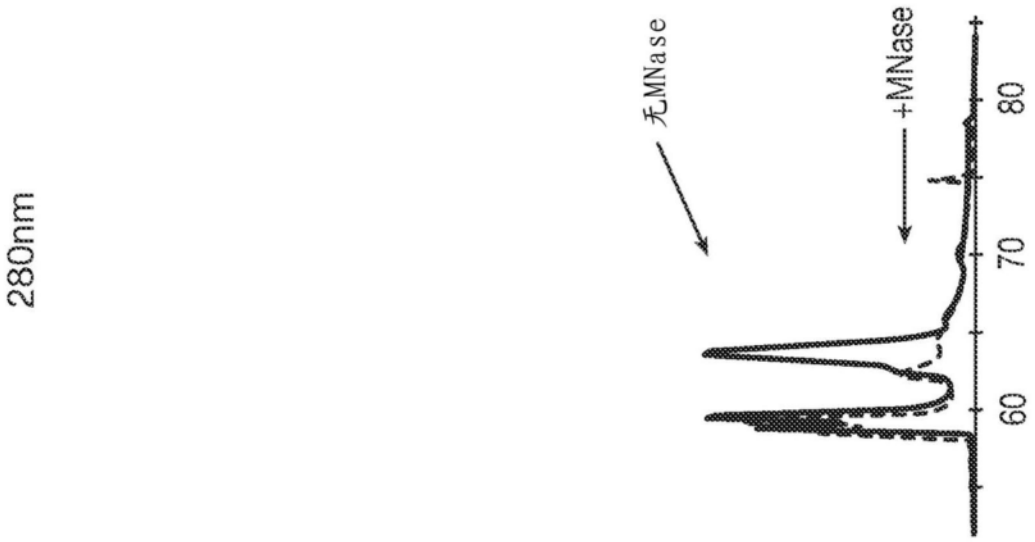


图5B

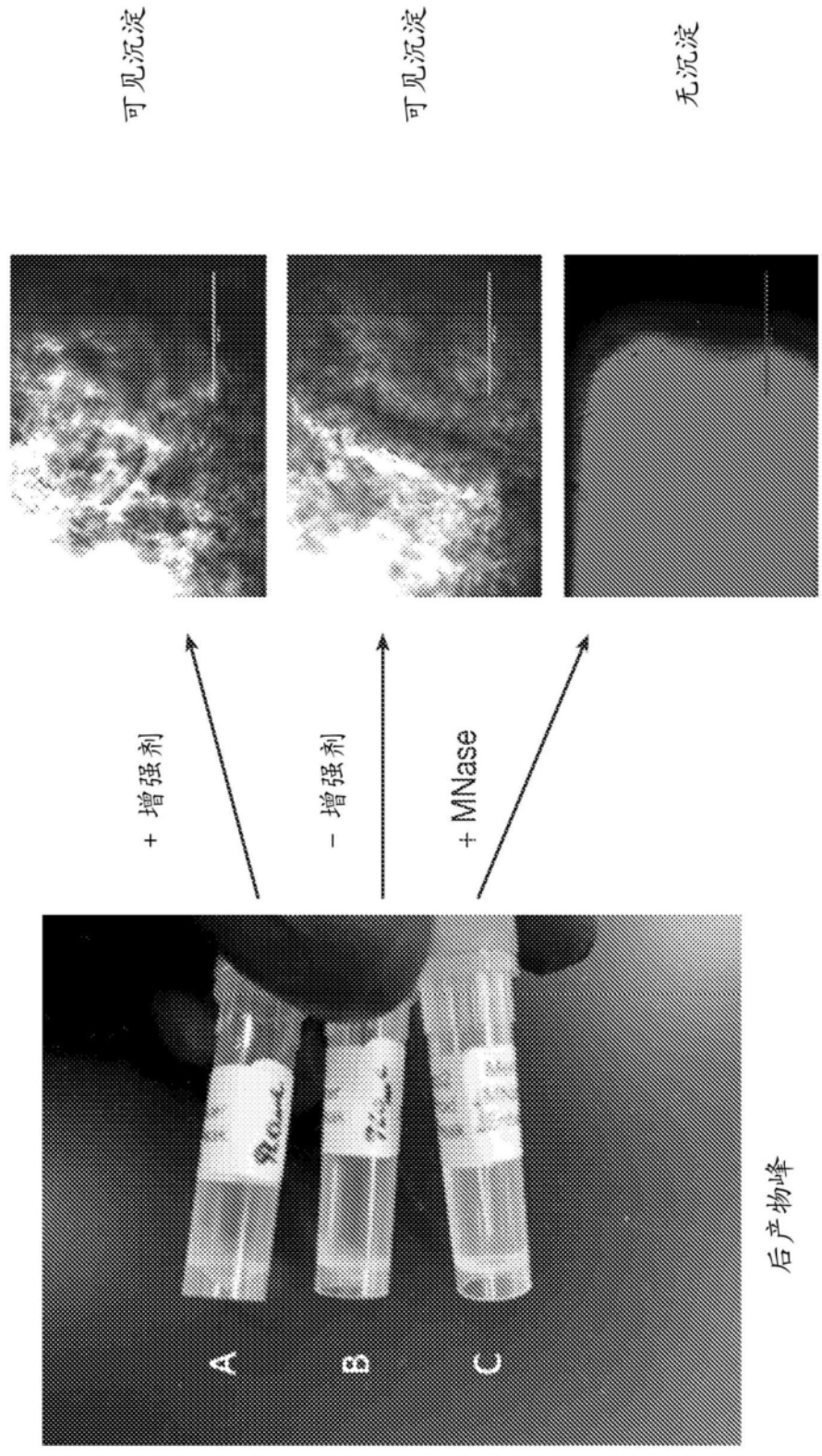


图6

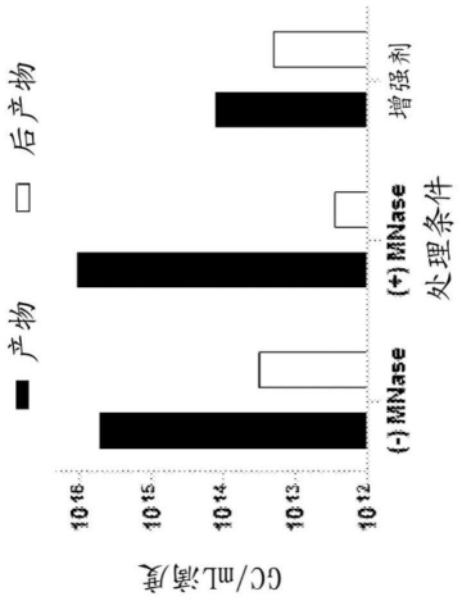

产物
后产物
GC/mL滴度
10^{16}
10^{15}
10^{14}
10^{13}
10^{12}
(-) MNase
(+) MNase
增强剂
处理条件

图7A

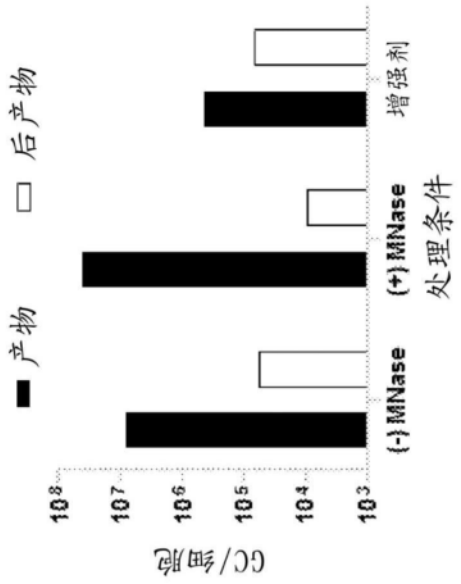

产物
后产物
GC/细胞
10^{8}
10^{7}
10^{6}
10^{5}
10^{4}
10^{3}
(-) MNase
(+) MNase
增强剂
处理条件

图7B

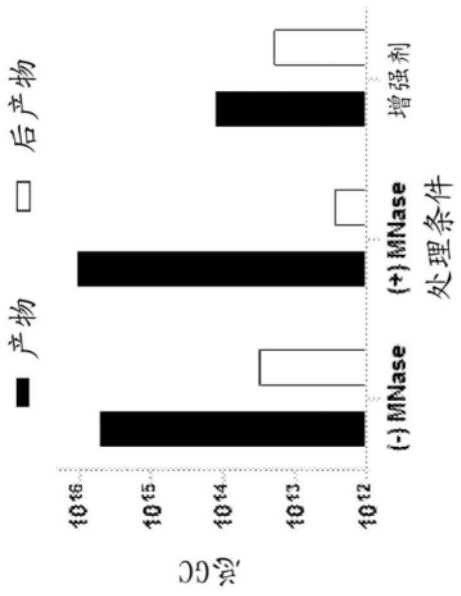

产物
后产物
增强剂
(+) MNase
(-) MNase
处理条件
10^{16}
10^{15}
10^{14}
10^{13}
10^{12}
总GC

图7C

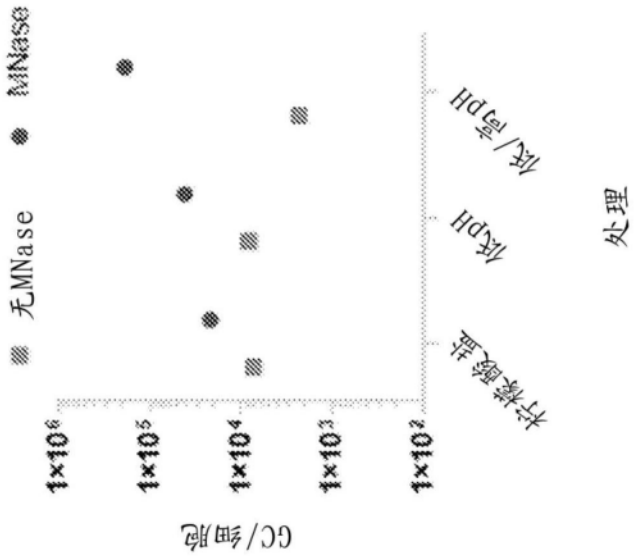

无MNase
MNase
低/高pH
低pH
标核酸量
处理
1×10^{6}
1×10^{5}
1×10^{4}
1×10^{3}
1×10^{2}
GC/细胞

图8A

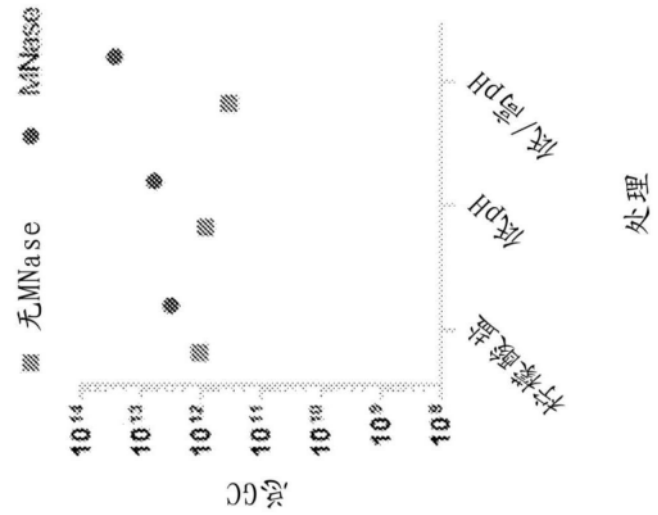

无MNase
MNase
处理
柠檬酸盐
低pH
低/高pH
总GC
10^{14}
10^{13}
10^{12}
10^{11}
10^{10}
10^{9}
10^{8}

图8B

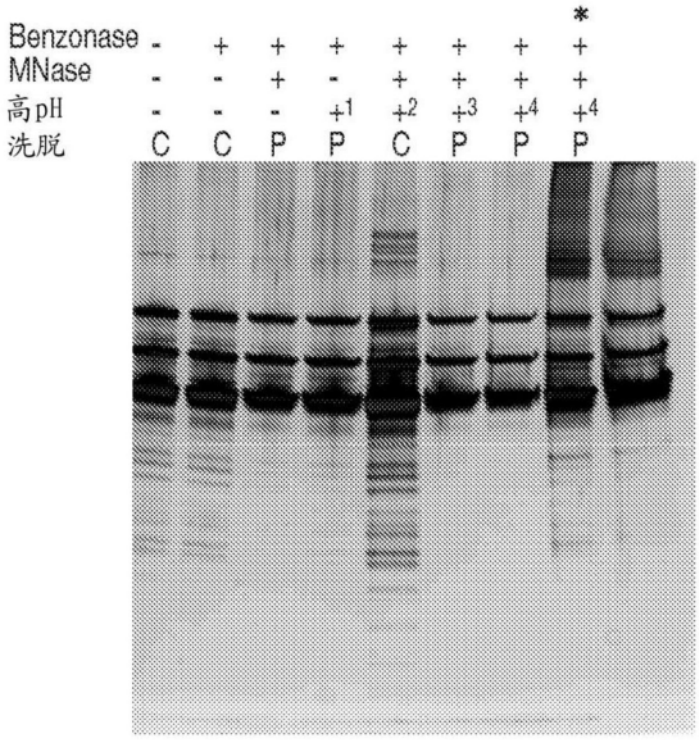

Benzonase - + + + + + + +
MNase - - + - + + + +
高pH - - - +1 +2 +3 +4 +4
洗脱 C C P P C P P P
*

图9A

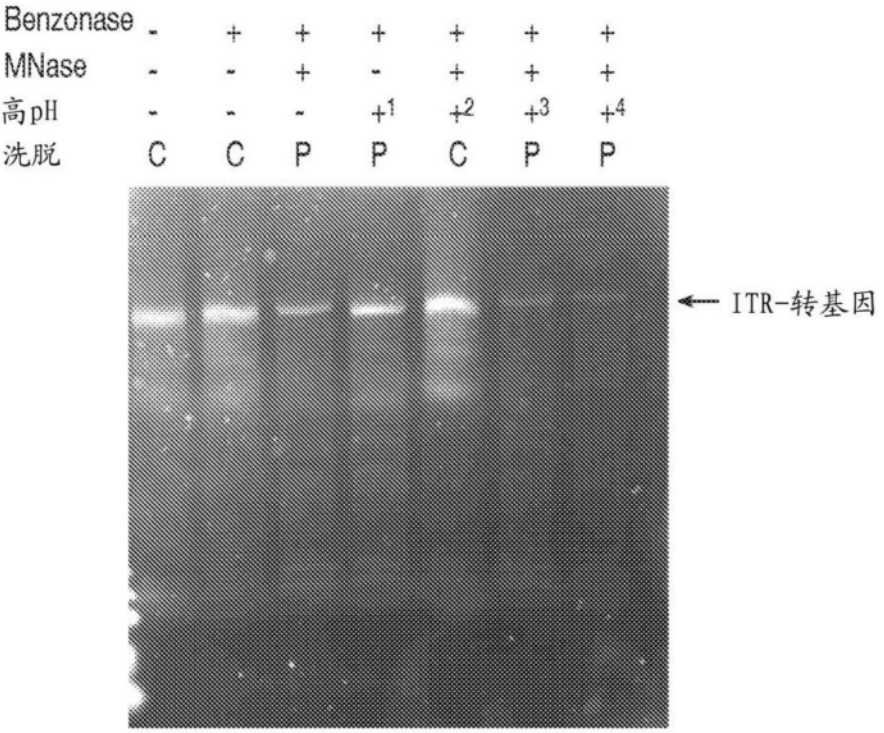

Benzonase - + + + + + +
MNase - - + - + + +
高pH - - - +1 +2 +3 +4
洗脱 C C P P C P P
ITR-转基因

图9B

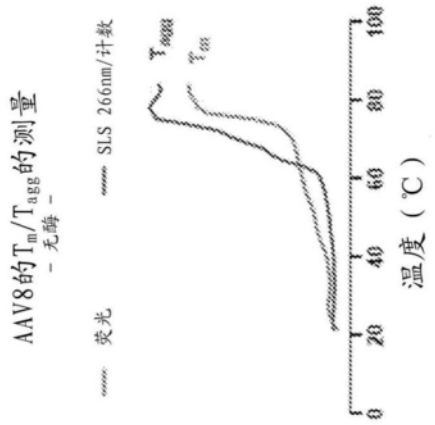

AAV8的Tm/Tagg的测量
- 无醇 -
荧光
SLS 266nm/计数
温度（℃）
0
20
40
60
80
100

图10A

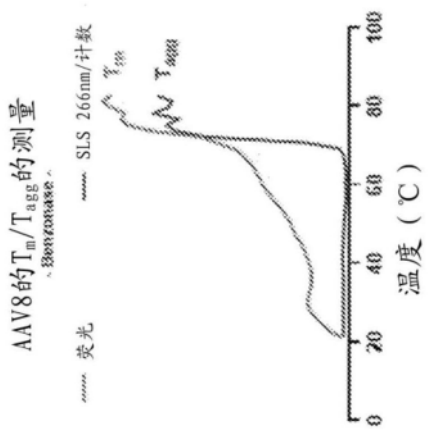


图10B

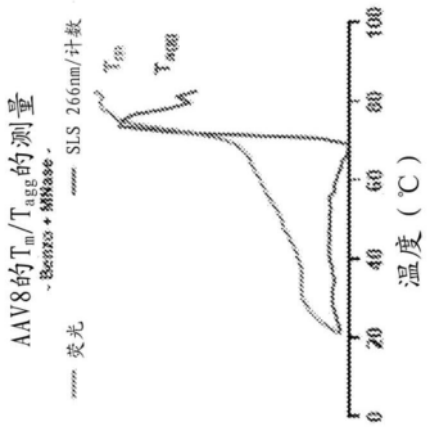


图10C

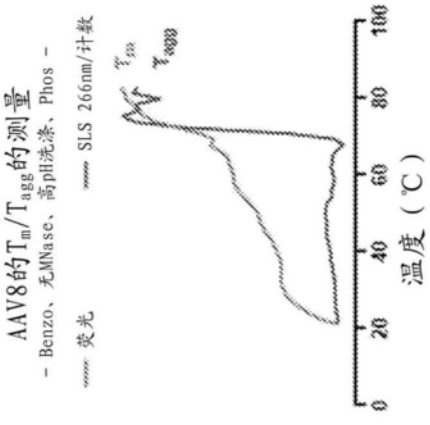


图10D

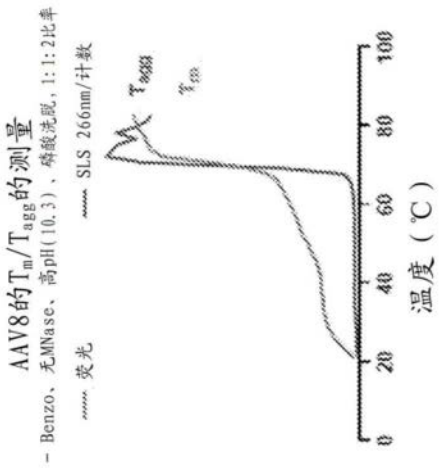

AAV8的Tm/Tagg的测量
- Benzo、无MNase、高pH(10.3)、磷酸洗脱，1:1:2比率
荧光
SLS 266nm/计数
温度（℃）
0
20
40
60
80
100

图10E

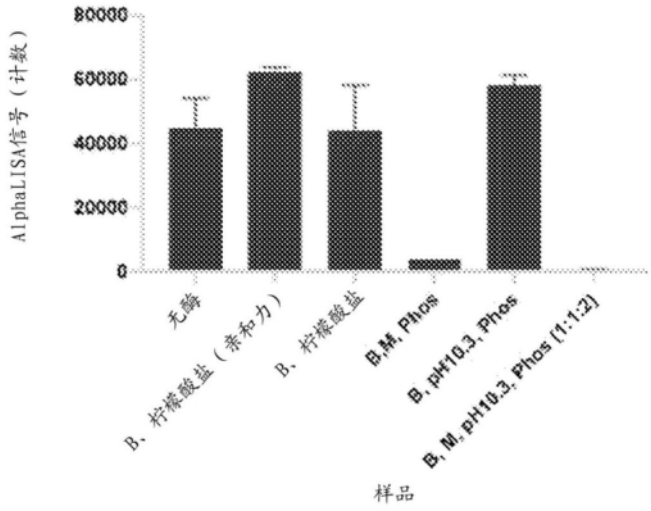

AlphaLISA信号（计数）
80000
60000
40000
20000
0
无酶
B、柠檬酸盐（亲和力）
B、柠檬酸盐
B,M, Phos
B, pH10.3, Phos
B, M, pH10.3, Phos [1:1:2]
样品

图11A

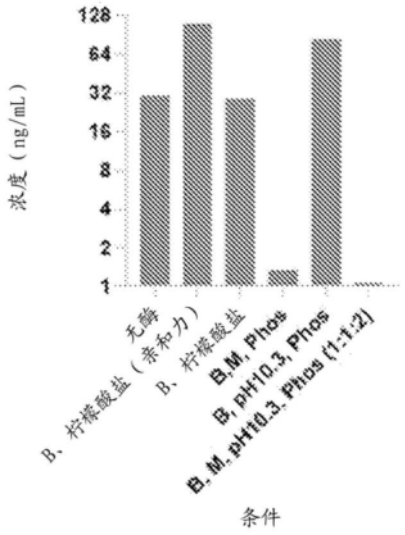

128
64
32
16
8
4
2
1
浓度（ng/mL）
无酶
B、柠檬酸盐（非和力）
B、柠檬酸盐
B,M, Phos
B, pH10.3, Phos
B, M, pH10.3, Phos (1:1:2)
条件

图11B

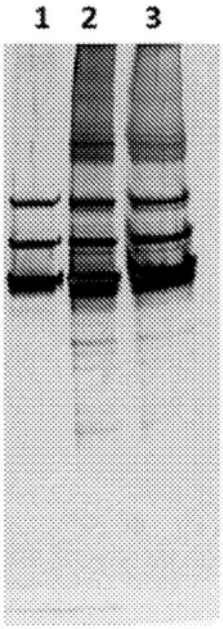

1
2
3

图12

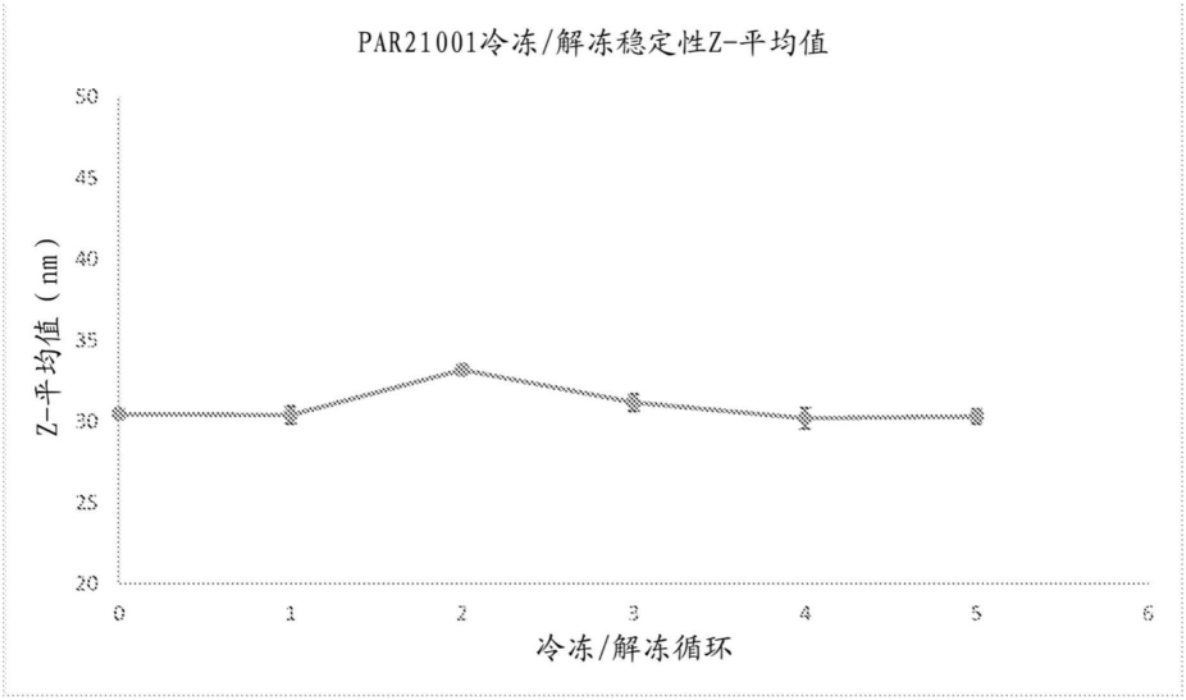

PAR21001冷冻/解冻稳定性Z-平均值
Z-平均值（nm）
50
45
40
35
30
25
20
0
1
2
3
4
5
6
冷冻/解冻循环

图13A

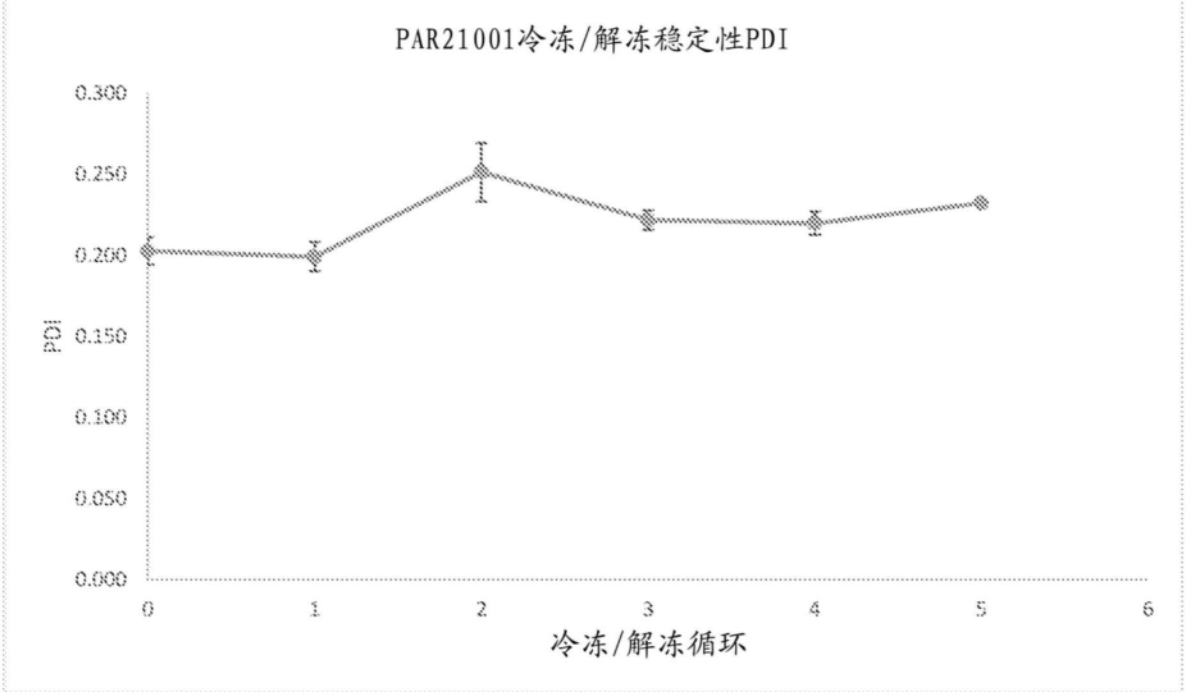

PAR21001冷冻/解冻稳定性PDI
PDI
0.300
0.250
0.200
0.150
0.100
0.050
0.000
0
1
2
3
4
5
6
冷冻/解冻循环

图13B

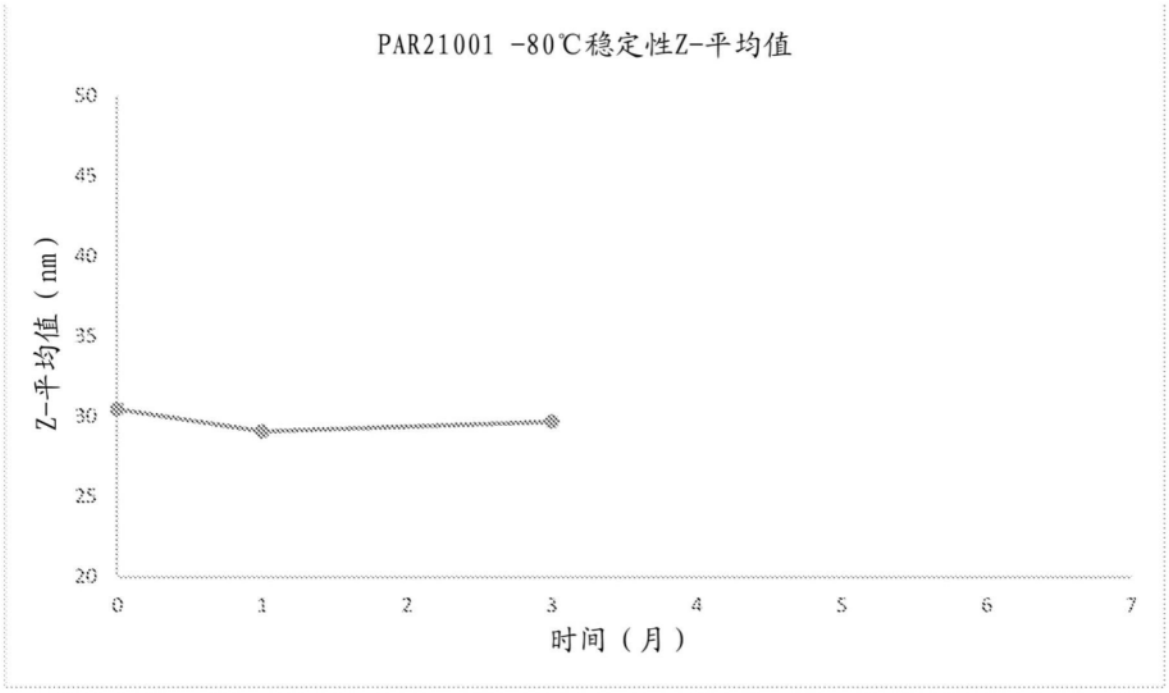

PAR21001 -80℃稳定性Z-平均值
Z-平均值（nm）
50
45
40
35
30
25
20
0
1
2
3
4
5
6
7
时间（月）

图14A

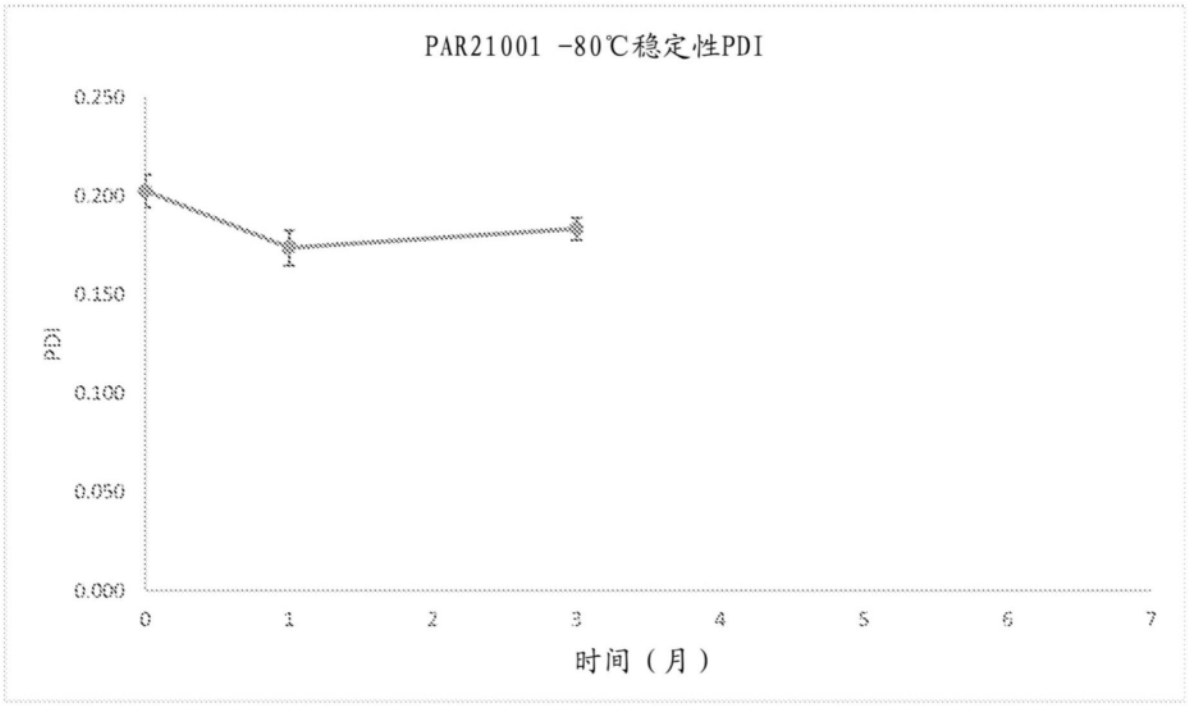

PAR21001 -80℃稳定性PDI
PDI
0.250
0.200
0.150
0.100
0.050
0.000
0
1
2
3
4
5
6
7
时间（月）

图14B

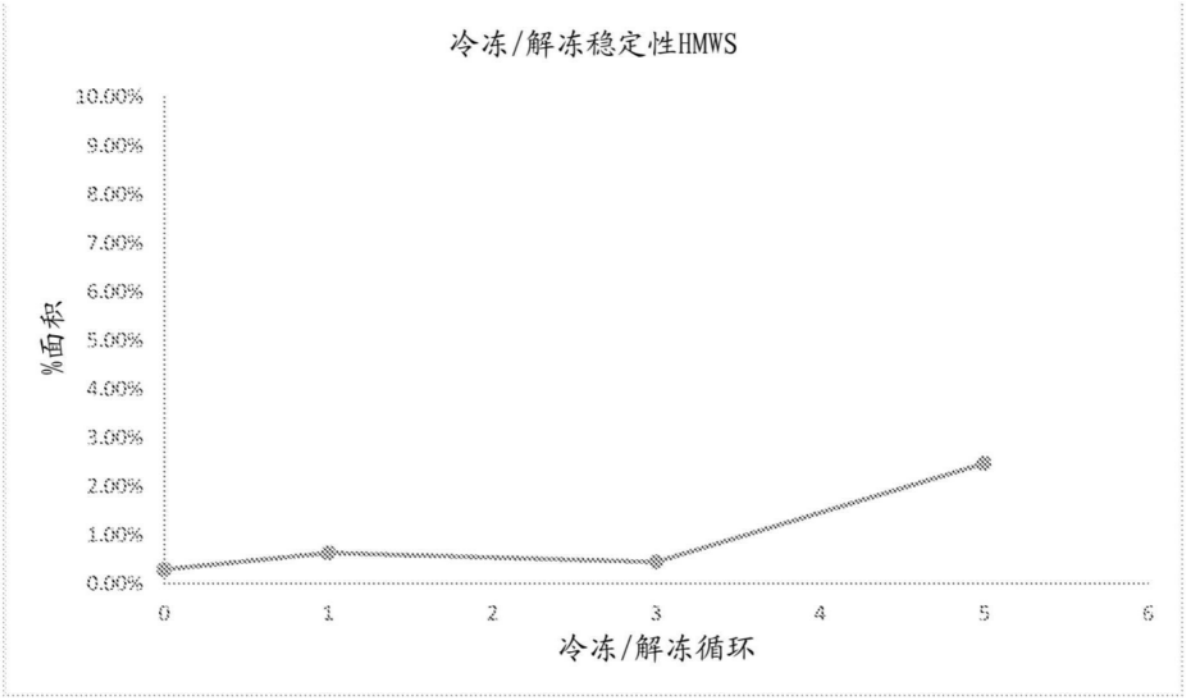

冷冻/解冻稳定性HMWS
10.00%
9.00%
8.00%
7.00%
6.00%
5.00%
4.00%
3.00%
2.00%
1.00%
0.00%
%面积
0
1
2
3
4
5
6
冷冻/解冻循环

图15A

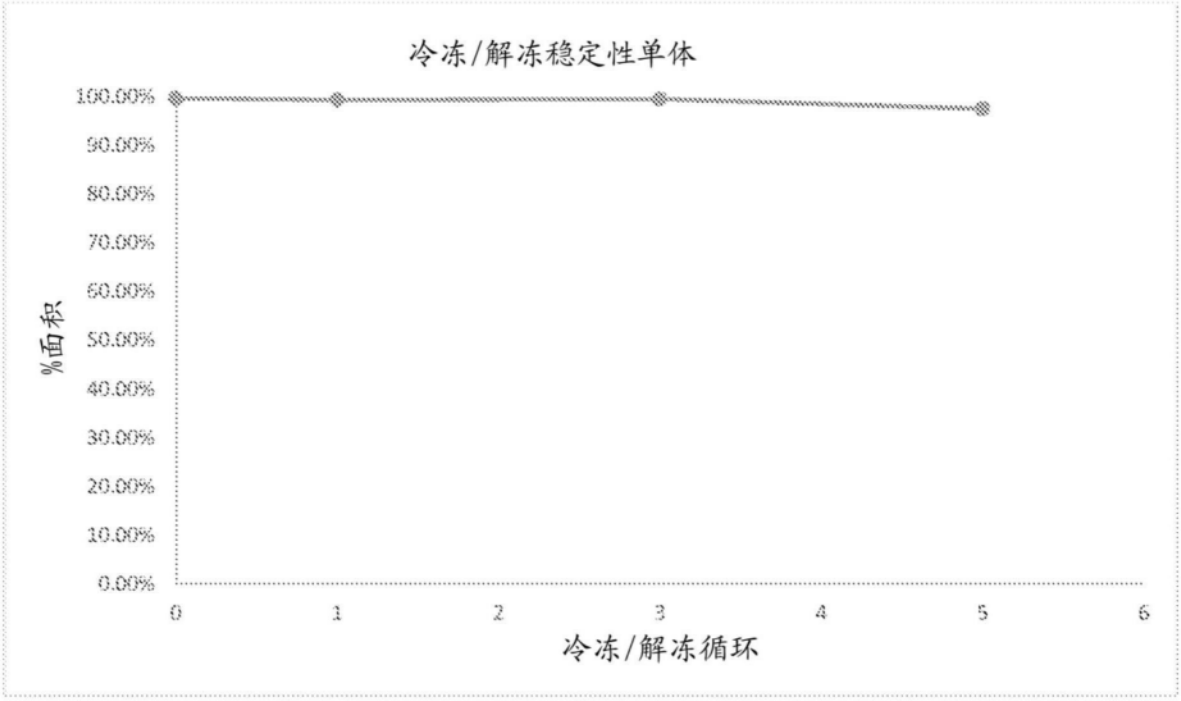

冷冻/解冻稳定性单体
100.00%
90.00%
80.00%
70.00%
60.00%
50.00%
40.00%
30.00%
20.00%
10.00%
0.00%
%面积
0
1
2
3
4
5
6
冷冻/解冻循环

图15B

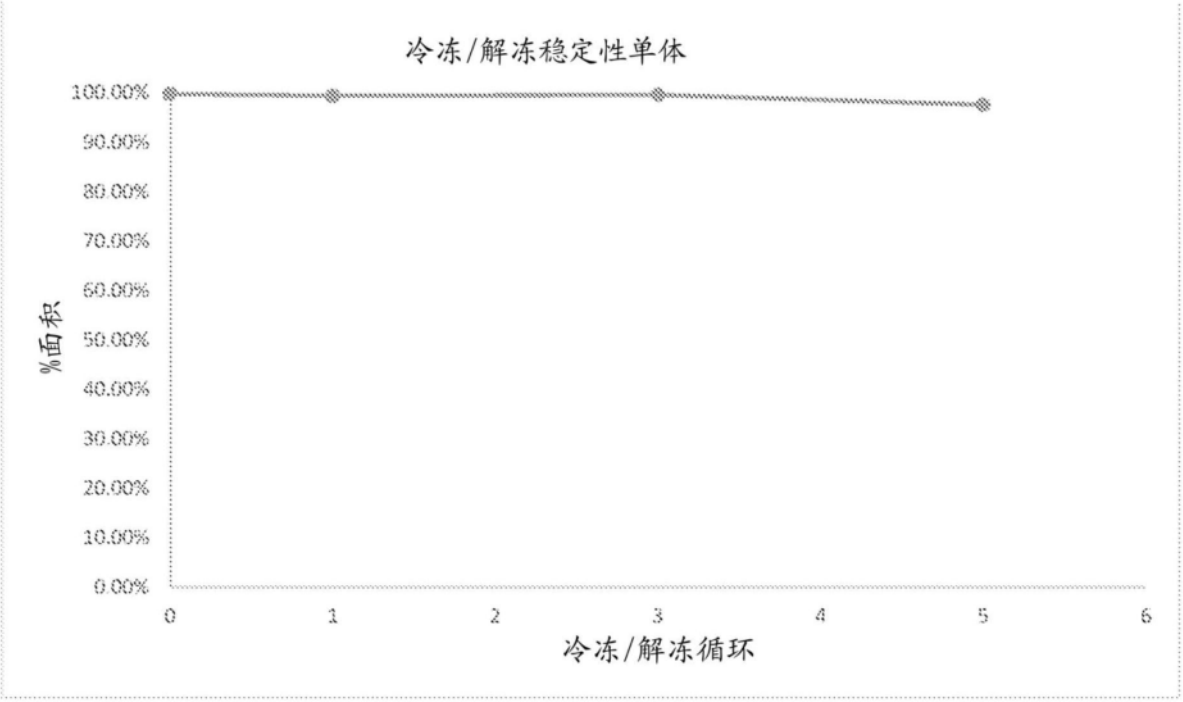

冷冻/解冻稳定性单体
100.00%
90.00%
80.00%
70.00%
60.00%
50.00%
40.00%
30.00%
20.00%
10.00%
0.00%
%面积
0
1
2
3
4
5
6
冷冻/解冻循环

图16A

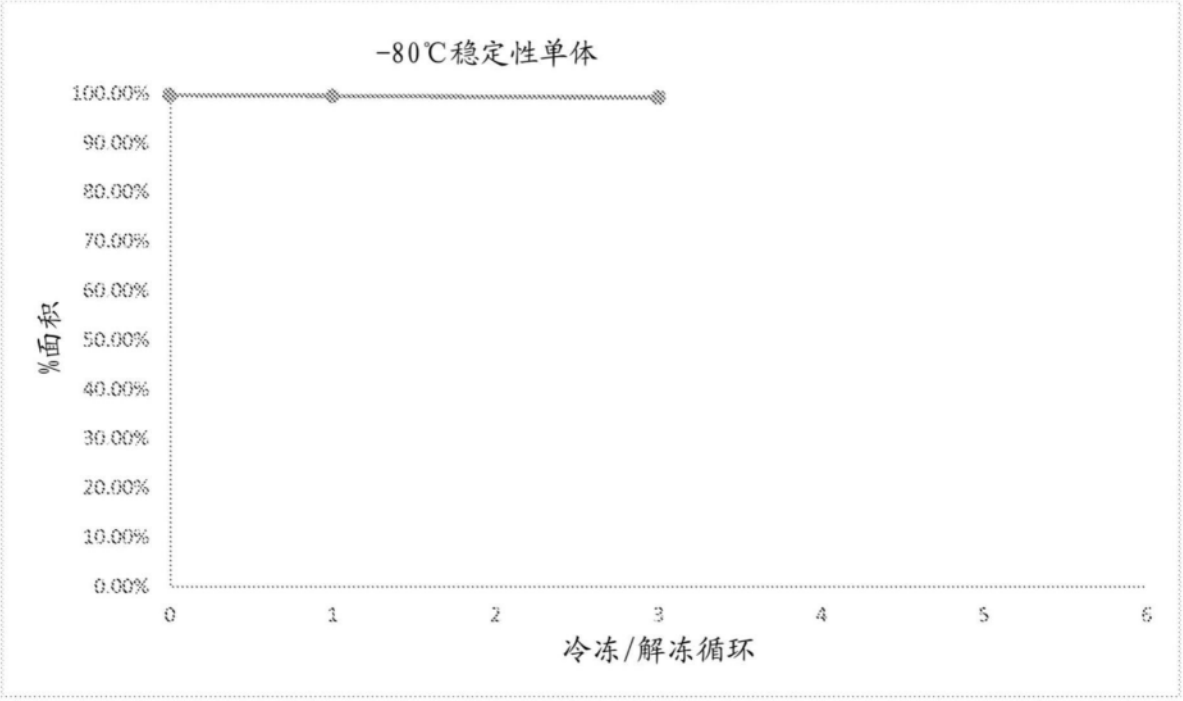

-80℃稳定性单体
100.00%
90.00%
80.00%
70.00%
60.00%
50.00%
40.00%
30.00%
20.00%
10.00%
0.00%
%面积
0
1
2
3
4
5
6
冷冻/解冻循环

图16B