

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11)公表番号
特表2025-509566
(P2025-509566A)

(43)公表日 令和7年4月11日(2025.4.11)

(51)国際特許分類		F I	テーマコード (参考)	
A 6 1 K	48/00 (2006.01)	A 6 1 K	48/00	4 C 0 7 6
A 6 1 K	35/76 (2015.01)	A 6 1 K	35/76	4 C 0 8 4
A 6 1 K	47/18 (2017.01)	A 6 1 K	47/18	4 C 0 8 7
A 6 1 K	47/02 (2006.01)	A 6 1 K	47/02	
A 6 1 K	47/26 (2006.01)	A 6 1 K	47/26	
		審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全59頁) 最終頁に続く		
(21)出願番号	特願2024-554782(P2024-554782)	(71)出願人	597160510	
(86)(22)出願日	令和5年3月13日(2023.3.13)		リジェネロン・ファーマシューティカルズ・インコーポレイテッド	
(85)翻訳文提出日	令和6年11月1日(2024.11.1)		REGENERON PHARMACEUTICALS, INC.	
(86)国際出願番号	PCT/US2023/015112		アメリカ合衆国10591-6707ニューヨーク州タリータウン、オールド・ソー・ミル・リバー・ロード777番	
(87)国際公開番号	WO2023/177626	(74)代理人	100127926	
(87)国際公開日	令和5年9月21日(2023.9.21)		弁理士 結田 純次	
(31)優先権主張番号	63/319,657	(74)代理人	100216105	
(32)優先日	令和4年3月14日(2022.3.14)		弁理士 守安 智	
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)	(72)発明者	ディンティアン・リウ	
(81)指定国・地域	AP(BW,CV,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV)		アメリカ合衆国ニューヨーク州10591. タリータウン. オールド・ソー・ミ	最終頁に続く
		最終頁に続く		

(54)【発明の名称】 A A V 医薬製品の凍結乾燥製剤

(57)【要約】

本開示は、組換えアデノ随伴ウイルス（r A A V）粒子を含む安定な凍結乾燥医薬組成物を提供する。特定の実施形態では、組成物は、r A A V 粒子に加えて、緩衝液、一つまたは複数の塩、界面活性剤、増量剤、および糖を含有する。本開示の医薬組成物は、ストレスおよび保管時にかなりの程度の r A A V 安定性を示す。

【選択図】 図 4

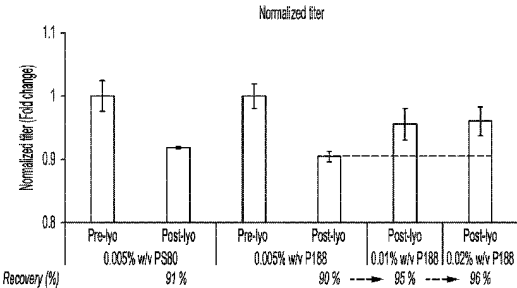


FIG. 4

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

(i) 組換えアデノ随伴ウイルス (rAAV) 粒子、(ii) 約 1 mM ~ 約 20 mM の濃度の緩衝剤、(iii) 約 10 mM ~ 約 50 mM の濃度の第一の塩、(iv) 約 60 mM ~ 100 mM の濃度の第二の塩、(v) 約 1 % w / v ~ 約 10 % w / v の濃度の糖、(vi) 約 1 % w / v ~ 約 6 % w / v の濃度の増量剤、および (vii) 約 0.001 % w / v ~ 約 0.1 % w / v の濃度の界面活性剤を含む医薬製剤であって、前記製剤が約 6.8 ~ 約 7.8 の pH を有する、医薬製剤。

【請求項 2】

前記緩衝剤が、トリス緩衝液またはリン酸ナトリウム緩衝液である、請求項 1 に記載の医薬製剤。 10

【請求項 3】

前記緩衝剤が、トリス緩衝液である、請求項 2 に記載の医薬製剤。

【請求項 4】

前記緩衝剤の前記濃度が、5 mM ~ 15 mM である、請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載の医薬製剤。

【請求項 5】

緩衝剤の前記濃度が、10 mM $\pm$ 2 mM である、請求項 4 に記載の医薬製剤。

【請求項 6】

前記第一の塩が、塩化ナトリウム、塩化カリウム、または塩化マグネシウムである、請求項 1 ~ 5 のいずれか一項に記載の医薬製剤。 20

【請求項 7】

前記第一の塩が、塩化ナトリウムである、請求項 6 に記載の医薬製剤。

【請求項 8】

前記第一の塩の前記濃度が、20 mM ~ 40 mM である、請求項 1 ~ 7 のいずれか一項に記載の医薬製剤。

【請求項 9】

前記第一の塩の前記濃度が、30 mM $\pm$ 5 mM である、請求項 8 に記載の医薬製剤。

【請求項 10】

前記第二の塩が、アルギニン塩酸塩である、請求項 1 ~ 9 のいずれか一項に記載の医薬製剤。 30

【請求項 11】

前記第二の塩の前記濃度が、30 mM ~ 90 mM である、請求項 1 ~ 10 のいずれか一項に記載の医薬製剤。

【請求項 12】

前記第二の塩の前記濃度が、40 mM $\pm$ 5 mM または 80 mM $\pm$ 5 mM である、請求項 11 に記載の医薬製剤。

【請求項 13】

前記糖が、スクロースまたはトレハロースである、請求項 1 ~ 12 のいずれか一項に記載の医薬製剤。 40

【請求項 14】

前記糖が、スクロースである、請求項 13 に記載の医薬製剤。

【請求項 15】

糖の前記濃度が、3 % w / v ~ 7 % w / v である、請求項 1 ~ 14 のいずれか一項に記載の医薬製剤。

【請求項 16】

糖の前記濃度が、5 % w / v $\pm$ 1 % w / v である、請求項 15 に記載の医薬製剤。

【請求項 17】

前記増量剤が、マンニトールまたはグリシンである、請求項 1 ~ 16 のいずれか一項に記載の医薬製剤。 50

【請求項 18】

前記増量剤がマンニトールである、請求項 17 に記載の医薬製剤。

【請求項 19】

前記増量剤の前記濃度が、 $2\% \text{ w/v} \sim 5\% \text{ w/v}$ である、請求項 1 ～ 18 のいずれか一項に記載の医薬製剤。

【請求項 20】

前記増量剤の前記濃度が、 $3.3\% \text{ w/v} \pm 0.5\% \text{ w/v}$ である、請求項 19 に記載の医薬製剤。

【請求項 21】

前記界面活性剤が、ポリソルベートまたはポロキサマーである、請求項 1 ～ 20 のいずれか一項に記載の医薬製剤。 10

【請求項 22】

前記ポリソルベートが、ポリソルベート 80 である、請求項 21 に記載の医薬製剤。

【請求項 23】

前記ポロキサマーが、ポロキサマー 188 である、請求項 21 に記載の医薬製剤。

【請求項 24】

界面活性剤の前記濃度が、 $0.001\% \text{ w/v} \sim 0.1\% \text{ w/v}$ である、請求項 1 ～ 23 のいずれか一項に記載の医薬製剤。

【請求項 25】

前記界面活性剤濃度が、 $0.01\% \text{ w/v} \pm 0.005\% \text{ w/v}$ である、請求項 24 に記載の医薬製剤。 20

【請求項 26】

前記製剤の前記 pH が、 $7.0 \sim 7.6$ である、請求項 1 ～ 25 のいずれか一項に記載の医薬製剤。

【請求項 27】

前記製剤の前記 pH が、 7.3 ± 0.1 である、請求項 26 に記載の医薬製剤。

【請求項 28】

増量剤と糖との比が、 $1:1 \sim 1:7$ または $1:1 \sim 1:3$ である、請求項 1 ～ 76 のいずれか一項に記載の医薬製剤。

【請求項 29】

マンニトールとスクロースとの比が、 $1:1 \sim 1:7$ または $1:1 \sim 1:3$ である、請求項 28 に記載の医薬製剤。 30

【請求項 30】

第一の塩と第二の塩との比が、 $1:1 \sim 1:4$ である、請求項 1 ～ 29 のいずれか一項に記載の医薬製剤。

【請求項 31】

塩化ナトリウムとアルギニン塩酸塩との比が、 $1:1 \sim 1:4$ である、請求項 30 に記載の医薬製剤。

【請求項 32】

前記製剤が、 $70 \text{ mM} \sim 120 \text{ mM}$ の総イオン強度を有する、請求項 1 ～ 31 のいずれか一項に記載の医薬製剤。 40

【請求項 33】

前記総イオン強度が、 $80 \text{ mM} \pm 5 \text{ mM}$ または $110 \text{ mM} \pm 10 \text{ mM}$ である、請求項 32 に記載の医薬製剤。

【請求項 34】

$1 \times 10^{-10} \text{ g/mL} \sim 1 \times 10^{-15} \text{ g/mL}$ を含む、請求項 1 ～ 33 のいずれか一項に記載の医薬製剤。

【請求項 35】

$1 \times 10^{-12} \text{ g/mL} \sim 1 \times 10^{-14} \text{ g/mL}$ を含む、請求項 34 に記載の医薬製剤。 50

【請求項 36】

約 1×10^{13} v g / mL を含む、請求項 35 に記載の医薬製剤。

【請求項 37】

(i) 1×10^{10} v g / mL $\sim 1 \times 10^{15}$ v g / mL の濃度の組換えアデノ随伴ウイルス (rAAV) 粒子、(ii) 10 mM ± 1 mM の濃度のリン酸緩衝液、(iii) 30 mM ± 3 mM の濃度の塩化ナトリウム、(iv) 80 mM ± 8 mM の濃度の L-アルギニン塩酸塩、(v) 5% w / v $\pm 0.5\%$ w / v の濃度のスクロース、(vi) 3.3% w / v $\pm 0.3\%$ w / v の濃度のマンニトール、および (vii) 0.005% w / v $\pm 0.001\%$ w / v の濃度のポロキサマー 188 を含む医薬製剤であって、前記製剤が 7.3 ± 0.2 の pH を有する、医薬製剤。

10

【請求項 38】

(i) 1×10^{10} v g / mL $\sim 1 \times 10^{15}$ v g / mL の濃度の組換えアデノ随伴ウイルス (rAAV) 粒子、(ii) 10 mM ± 1 mM の濃度のトリス緩衝液、(iii) 30 mM ± 3 mM の濃度の塩化ナトリウム、(iv) 80 mM ± 8 mM の濃度の L-アルギニン塩酸塩、(v) 5% w / v $\pm 0.5\%$ w / v の濃度のスクロース、(vi) 3.3% w / v $\pm 0.3\%$ w / v の濃度のマンニトール、および (vii) 0.01% w / v $\pm 0.002\%$ w / v の濃度のポロキサマー 188 を含む医薬製剤であって、前記製剤が 7.3 ± 0.2 の pH を有する、医薬製剤。

【請求項 39】

前記 rAAV 粒子が、 1×10^{12} v g / mL $\sim 1 \times 10^{14}$ v g / mL の濃度である、請求項 37 または 38 に記載の医薬製剤。

20

【請求項 40】

前記 rAAV 粒子が、約 1×10^{13} v g / mL の濃度である、請求項 37 または 38 に記載の医薬製剤。

【請求項 41】

前記 rAAV 粒子が、血清型 AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV-DJ、AAV-DJ / 8、AAV-Rh10、AAV-retro、AAV-PHP.B、AAV8-PHP.eB、または AAV-PHP.S のものである、請求項 1 $\sim$ 40 のいずれか一項に記載の医薬製剤。

【請求項 42】

前記 rAAV 粒子が、血清型 AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、または AAV10 のものである、請求項 41 に記載の医薬製剤。

30

【請求項 43】

前記 rAAV 粒子が、血清型 AAV1 のものである、請求項 42 に記載の医薬製剤。

【請求項 44】

前記 rAAV 粒子が、血清型 AAV5 のものである、請求項 42 に記載の医薬製剤。

【請求項 45】

前記 rAAV 粒子が、血清型 AAV8 のものである、請求項 42 に記載の医薬製剤。

【請求項 46】

前記 rAAV 粒子が、血清型 AAV9 のものである、請求項 42 に記載の医薬製剤。

40

【請求項 47】

前記製剤が、動的光散乱によって決定される、約 20 nm $\sim$ 約 40 nm の平均粒子サイズを有する、請求項 1 $\sim$ 46 のいずれか一項に記載の医薬製剤。

【請求項 48】

前記製剤が、陰イオン交換クロマトグラフィーによって決定される、少なくとも 95% の完全カプシドを含む rAAV 粒子の集合体を含有する、請求項 1 $\sim$ 47 のいずれか一項に記載の医薬製剤。

【請求項 49】

請求項 1 $\sim$ 48 のいずれか一項に記載の医薬製剤を凍結乾燥することによって形成され

50

る、安定な凍結乾燥医薬組成物。

【請求項 5 0】

1. 5 % 以下の水分含量を有する、請求項 4 9 に記載の凍結乾燥医薬組成物。

【請求項 5 1】

1. 0 % 以下の水分含量を有する、請求項 5 0 に記載の凍結乾燥医薬組成物。

【請求項 5 2】

0. 5 % ~ 0. 8 %、または 0. 5 %、0. 5 5 %、0. 6 %、0. 6 5 %、0. 7 %、0. 7 5 %、もしくは 0. 8 % の水分含量を有する、請求項 5 1 に記載の凍結乾燥医薬組成物。

【請求項 5 3】

3 0 秒以下で再構成され得る、請求項 4 9 ~ 5 2 のいずれか一項に記載の凍結乾燥医薬組成物。

【請求項 5 4】

2 0 秒以下で再構成され得る、請求項 5 3 に記載の凍結乾燥医薬組成物。

【請求項 5 5】

1 5 秒以下で再構成され得る、請求項 5 4 に記載の凍結乾燥医薬組成物。

【請求項 5 6】

請求項 4 9 ~ 5 5 のいずれか一項に記載の凍結乾燥医薬組成物を再構成することによって形成される、再構成医薬製品。

【請求項 5 7】

動的光散乱によって決定される、約 2 0 n m ~ 約 4 0 n m の平均粒子サイズを含む、請求項 5 6 に記載の再構成医薬製品。

【請求項 5 8】

陰イオン交換クロマトグラフィーによって決定される、少なくとも 9 5 % の完全カプシドを含む r A A V 粒子の集合体を含む、請求項 5 6 または 5 7 に記載の再構成医薬製品。

【請求項 5 9】

陰イオン交換クロマトグラフィーによって決定される、完全カプシドの割合を含む r A A V 粒子の集合体を含み、前記再構成医薬製品中の完全カプシドの前記割合が、凍結乾燥前の前記医薬製剤中の完全カプシドの割合の 2 % 以内である、請求項 5 6 ~ 5 8 のいずれか一項に記載の再構成医薬製品。

【請求項 6 0】

前記再構成医薬製品中の完全カプシドの前記割合が、凍結乾燥前の前記医薬製剤中の完全カプシドの割合の 1 % 以内である、請求項 5 9 に記載の再構成医薬製品。

【請求項 6 1】

前記再構成医薬製品中の完全カプシドの前記割合が、凍結乾燥前の前記医薬製剤中の完全カプシドの割合の 0. 5 % 以内である、請求項 6 0 に記載の再構成医薬製品。

【請求項 6 2】

液滴デジタルポリメラーゼ連鎖反応によって決定される、ベクターゲノム力価を含み、前記再構成医薬製品中の前記ベクターゲノム力価が、凍結乾燥前に前記医薬製剤中に存在する前記ベクターゲノム力価の 1 0 % 以内である、請求項 5 6 ~ 6 1 のいずれか一項に記載の再構成医薬製品。

【請求項 6 3】

前記再構成医薬製品中の前記ベクターゲノム力価が、凍結乾燥前に前記医薬製剤中に存在する前記ベクターゲノム力価の 7 % 以内である、請求項 6 2 に記載の再構成医薬製品。

【請求項 6 4】

2 ~ 8 °C の温度で 1 か月間の保存後に前記凍結乾燥医薬組成物を再構成することによって形成される、請求項 5 7 ~ 6 3 のいずれか一項に記載の再構成医薬製品。

【請求項 6 5】

2 ~ 8 °C の温度で 3 か月間の保存後に前記凍結乾燥医薬組成物を再構成することによって形成される、請求項 5 7 ~ 6 3 のいずれか一項に記載の再構成医薬製品。

10

20

30

40

50

【請求項 66】

2～8℃の温度で6か月間の保存後に前記凍結乾燥医薬組成物を再構成することによって形成される、請求項57～63のいずれか一項に記載の再構成医薬製品。

【請求項 67】

請求項1～48のいずれか一項に記載の医薬製剤を収容する容器。

【請求項 68】

請求項49～55のいずれか一項に記載の凍結乾燥医薬組成物を収容する容器。

【請求項 69】

請求項56～66のいずれか一項に記載の再構成医薬製品を収容する容器。

【請求項 70】

ガラスバイアルである、請求項67～69のいずれか一項に記載の容器。

【請求項 71】

請求項67～70のいずれか一項に記載の容器、および使用説明書を含む、キット。

【請求項 72】

請求項49～55のいずれか一項に記載の安定な凍結乾燥医薬組成物を生成する方法であって、請求項1～48のいずれか一項に記載の医薬製剤上で凍結乾燥プロセスを実施することを含む、方法。

【請求項 73】

前記凍結乾燥プロセスが、(i)凍結、(ii)アニーリング、(iii)一次乾燥、および(iv)二次乾燥を含む、請求項72に記載の方法。

【請求項 74】

前記凍結が、 $-45^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$ の温度で60分 $\pm$ 10分間実施される、請求項73に記載の方法。

【請求項 75】

前記凍結が、前記アニーリングの前および後の両方で実施される、請求項73または74に記載の方法。

【請求項 76】

前記アニーリングが、 $-20^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$ の温度で6時間 $\pm$ 30分間実施される、請求項73～75のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 77】

前記一次乾燥が、 $-26^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$ の温度で50時間 $\pm$ 10時間実施される、請求項73～76のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 78】

前記二次乾燥が、 $35^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$ の温度で5～20時間、または15時間 $\pm$ 5時間実施される、請求項73～77のいずれか一項に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、組換えアデノ随伴ウイルス(rAAV)製品の安定な凍結乾燥組成物、およびかかる組成物を生成するための方法に関する。

【背景技術】

【0002】

近年、遺伝子治療は、バイオ医薬品企業間で大きな関心を引き寄せ、多数の遺伝子疾患に新しい治療選択肢を提供できる変革戦略として浮上してきた。これは、ウイルス学、免疫学、ベクター工学技術、ベクター製造科学、および他の関連分野の進歩が、レトロウイルスなどの初期の遺伝子送達ベクターに関連する安全性問題を克服した改善されたベクターを提供し続けたことに起因する。現在、世界中で700件以上の遺伝子治療臨床試験が進行中または完了している。非エンベロープ一本鎖DNAウイルスであるアデノ随伴ウイルス(AAV)は、インビボで広範囲の種および組織を形質導入するその能力、免疫毒性の低いリスク、ならびに軽度の自然および適応免疫応答に起因して、遺伝子療法のために

10

20

30

40

50

遺伝物質を宿主細胞に送達するための治療剤の魅力的なクラスとして出現している。

【0003】

A A V 遺伝子治療製品は、典型的には注射によって投与され、液体溶液として製剤化され、低温（例えば、 -65°C 未満）で凍結保存される。任意の注射可能な液体製剤については、製造が容易であり、エンドユーザーにとって便利であるため、通常は好ましい剤形である。しかしながら、水性環境で A A V 製品の安定性を維持することは、構造安定性が乏しいため困難であり得る。したがって、A A V の長期保存安定性を向上させるために、物理的および化学的不安定性による劣化速度を最小限に抑える凍結が一般的に使用されるが、凍結はサプライチェーンおよび在庫管理に現実的な課題をもたらす。典型的な医薬製品（D P）製造プロセスでは、原薬（D S）が凍結保存され、D P 充填仕上げの準備の前に解凍されるとき、A A V は凍結融解にさらされ得る。臨床で A A V D P を投与する前に、最低一回の凍結融解も必要である。D P 製造工程、その後の包装およびラベル付け、ならびに臨床応用においては、A A V を周囲条件下で液体状態で短期保存することが必要とされる。A A V の凝集または力価の低下などの製品の劣化は、凍結融解中や高温での長期保存中にも生じる可能性がある。凝集は、ウイルス力価を低下させ、製品の有効性を低下させ、免疫原性の可能性のあるウイルスタンパク質の負荷を増加させ、生体内分布に影響を及ぼし、A A V 製品のインビボ活性が一定にならない可能性がある。したがって、製造および保存中に A A V 製品の安定性および活性を維持することは、治療剤としての A A V の開発を成功させるために重要である。

10

【発明の概要】

20

【0004】

一態様では、本開示は、（i）組換えアデノ随伴ウイルス（r A A V）粒子、（i i）約 1 mM ～ 約 20 mM の濃度の緩衝剤、（i i i）約 10 mM ～ 約 50 mM の濃度の第一の塩、（i v）約 20 mM ～ 100 mM の濃度の第二の塩、（v）約 $1\% \text{ w/v}$ ～ 約 $10\% \text{ w/v}$ の濃度の糖、（v i）約 $1\% \text{ w/v}$ ～ 約 $6\% \text{ w/v}$ の濃度の増量剤、および（v i i）約 $0.001\% \text{ w/v}$ ～ 約 $0.1\% \text{ w/v}$ の濃度の界面活性剤を含み、約 6.8 ～ 約 7.8 の pH を有する、医薬製剤を提供する。

【0005】

いくつかの実施形態では、緩衝剤は、トリス緩衝液またはリン酸ナトリウム緩衝液である。いくつかの事例では、緩衝剤はトリス緩衝液である。いくつかの実施形態では、緩衝剤の濃度は、 5 mM ～ 15 mM である。いくつかの事例では、緩衝剤の濃度は、 $10\text{ mM} \pm 2\text{ mM}$ である。

30

【0006】

いくつかの実施形態では、第一の塩は、塩化ナトリウム、塩化カリウム、または塩化マグネシウムである。いくつかの事例では、第一の塩は塩化ナトリウムである。いくつかの実施形態では、第一の塩の濃度は、 20 mM ～ 40 mM である。いくつかの事例では、第一の塩の濃度は、 $30\text{ mM} \pm 5\text{ mM}$ である。

【0007】

いくつかの実施形態では、第二の塩は、アルギニン塩酸塩である。いくつかの実施形態では、第二の塩の濃度は、 70 mM ～ 90 mM である。いくつかの事例では、第二の塩の濃度は、 $80\text{ mM} \pm 5\text{ mM}$ である。いくつかの実施形態では、第二の塩の濃度は、約 20 mM ～ 約 60 mM である。いくつかの事例では、第二の塩の濃度は、 $40\text{ mM} \pm 5\text{ mM}$ である。いくつかの実施形態では、第二の塩の濃度は、 30 mM ～ 90 mM である。

40

【0008】

いくつかの実施形態では、糖は、スクロースまたはトレハロースである。いくつかの事例では、糖はスクロースである。いくつかの実施形態では、糖の濃度は、 $3\% \text{ w/v}$ ～ $7\% \text{ w/v}$ である。いくつかの事例では、糖の濃度は、 $5\% \text{ w/v} \pm 1\% \text{ w/v}$ である。

【0009】

いくつかの実施形態では、増量剤は、マンニトールまたはグリシンである。いくつかの事例では、増量剤はマンニトールである。いくつかの実施形態では、増量剤の濃度は、 2

50

%w/v ~ 5 %w/v である。いくつかの事例では、増量剤の濃度は、3.3 %w/v ± 0.5 %w/v である。

【0010】

いくつかの実施形態では、界面活性剤は、ポリソルベートまたはポロキサマーである。いくつかの事例では、ポリソルベートは、ポリソルベート80 (PS80) である。いくつかの事例では、ポロキサマーは、ポロキサマー188 (P188) である。いくつかの実施形態では、界面活性剤の濃度は、0.001 %w/v ~ 0.1 %w/v である。いくつかの事例では、界面活性剤の濃度は、0.01 %w/v ± 0.005 %w/v である。

【0011】

いくつかの実施形態では、製剤のpHは、7.0 ~ 7.6 である。いくつかの事例では、製剤のpHは、7.3 ± 0.1 である。

【0012】

いくつかの実施形態では、増量剤と糖との比は、1:1 ~ 1:3 である。いくつかの実施形態では、増量剤と糖との比は、1:1 ~ 1:7 である。いくつかの事例では、マンニトールとスクロースとの比は、1:1 ~ 1:3 である。いくつかの事例では、マンニトールとスクロースとの比は、1:1 ~ 1:7 である。いくつかの実施形態では、マンニトールとスクロースとの比は、3.3:5 である。いくつかの実施形態では、第一の塩と第二の塩との比は、1:1 ~ 1:4 である。いくつかの事例では、塩化ナトリウムとアルギニン塩酸塩との比は、1:1 ~ 1:4 である。いくつかの実施形態では、塩化ナトリウムとL-アルギニン塩酸塩との比は、3:8 である。

【0013】

いくつかの実施形態では、製剤は、70 mM ~ 120 mM の総イオン強度を有する。いくつかの事例では、総イオン強度は、80 mM ± 5 mM である。いくつかの事例では、総イオン強度は、110 mM ± 10 mM である。

【0014】

いくつかの実施形態では、医薬製剤は、 1×10^{10} vg/mL ~ 1×10^{15} vg/mL を含む。いくつかの事例では、医薬製剤は、 1×10^{12} vg/mL ~ 1×10^{14} vg/mL を含む。いくつかの事例では、医薬製剤は、約 1×10^{13} vg/mL を含む。

【0015】

一態様では、本開示は、(i) 1×10^{10} vg/mL ~ 1×10^{15} vg/mL の濃度の組換えアデノ随伴ウイルス (rAAV) 粒子、(ii) 10 mM ± 1 mM の濃度のリン酸緩衝液、(iii) 30 mM ± 3 mM の濃度の塩化ナトリウム、(iv) 80 mM ± 8 mM の濃度のL-アルギニン塩酸塩、(v) 5 %w/v ± 0.5 %w/v の濃度のスクロース、(vi) 3.3 %w/v ± 0.3 %w/v の濃度のマンニトール、(vii) 0.005 %w/v ± 0.001 %w/v の濃度のポロキサマー188を含み、7.3 ± 0.2 のpHを有する、医薬製剤を提供する。いくつかの事例では、医薬製剤は、 1×10^{12} vg/mL ~ 1×10^{14} vg/mL を含む。いくつかの事例では、医薬製剤は、約 1×10^{13} vg/mL を含む。

【0016】

一態様では、本開示は、(i) 1×10^{10} vg/mL ~ 1×10^{15} vg/mL の濃度の組換えアデノ随伴ウイルス (rAAV) 粒子、(ii) 10 mM ± 1 mM の濃度のトリス緩衝液、(iii) 30 mM ± 3 mM の濃度の塩化ナトリウム、(iv) 80 mM ± 8 mM の濃度のL-アルギニン塩酸塩、(v) 5 %w/v ± 0.5 %w/v の濃度のスクロース、(vi) 3.3 %w/v ± 0.3 %w/v の濃度のマンニトール、(vii) 0.01 %w/v ± 0.002 %w/v の濃度のポロキサマー188を含み、7.3 ± 0.2 のpHを有する、医薬製剤を提供する。いくつかの事例では、医薬製剤は、 1×10^{12} vg/mL ~ 1×10^{14} vg/mL を含む。いくつかの事例では、医薬製剤は、約 1×10^{13} vg/mL を含む。

【0017】

いくつかの実施形態では、r A A V 粒子は、血清型 A A V 1、A A V 2、A A V 3、A A V 4、A A V 5、A A V 6、A A V 7、A A V 8、A A V 9、A A V - D J、A A V - D J / 8、A A V - R h 1 0、A A V - r e t r o、A A V - P H P . B、A A V 8 - P H P . e B、または A A V - P H P . S の粒子である。いくつかの実施形態では、r A A V 粒子は、血清型 A A V 1、A A V 2、A A V 3、A A V 4、A A V 5、A A V 6、A A V 7、A A V 8、A A V 9、または A A V 1 0 の粒子である。いくつかの事例では、r A A V 粒子は、血清型 A A V 1 の粒子である。いくつかの事例では、r A A V 粒子は、血清型 A A V 5 の粒子である。いくつかの事例では、r A A V 粒子は、血清型 A A V 8 の粒子である。いくつかの事例では、r A A V 粒子は、血清型 A A V 9 の粒子である。

【0018】

10

いくつかの実施形態では、製剤は、動的光散乱によって決定される約 2 0 n m ~ 約 4 0 n m の平均粒子サイズを有する。

【0019】

いくつかの実施形態では、製剤は、陰イオン交換クロマトグラフィーによって決定される、少なくとも 9 5 % の完全カプシドを含む r A A V 粒子の集合体を含む。

【0020】

一態様では、本開示は、上記または本明細書で考察される医薬製剤を凍結乾燥することによって形成される安定な凍結乾燥医薬組成物を提供する。

【0021】

いくつかの実施形態では、凍結乾燥医薬組成物は、1 . 5 % 以下の水分含量を有する。いくつかの実施形態では、凍結乾燥医薬組成物は、1 . 0 % 以下の水分含量を有する。いくつかの実施形態では、凍結乾燥医薬組成物は、0 . 5 % ~ 0 . 8 %、または 0 . 5 %、0 . 5 5 %、0 . 6 %、0 . 6 5 %、0 . 7 %、0 . 7 5 %、もしくは 0 . 8 % の水分含量を有する。さまざまな実施形態のいずれかでは、水分含量は、カールフィッシャー (K F) 滴定によって決定されてもよい。

20

【0022】

いくつかの実施形態では、凍結乾燥医薬組成物は、3 0 秒以下で再構成され得る。いくつかの実施形態では、凍結乾燥医薬組成物は、2 0 秒以下で再構成され得る。いくつかの実施形態では、凍結乾燥医薬組成物は、1 5 秒以下で再構成され得る。

【0023】

30

一態様では、本開示は、上記または本明細書で考察される凍結乾燥医薬組成物を再構成することによって形成される再構成医薬製品を提供する。

【0024】

いくつかの実施形態では、再構成医薬製品は、動的光散乱によって決定される約 2 0 n m ~ 約 4 0 n m の平均粒子サイズを含む。

【0025】

いくつかの実施形態では、再構成医薬製品は、陰イオン交換クロマトグラフィーによって決定される、少なくとも 9 5 % の完全カプシドを含む r A A V 粒子の集合体を含む。いくつかの実施形態では、再構成医薬製品は、陰イオン交換クロマトグラフィーによって決定される完全カプシドの割合を含む r A A V 粒子の集合体を含み、再構成医薬製品中の完全カプシドの割合は、凍結乾燥前の医薬製剤中の完全カプシドの割合の 2 % 以内である。いくつかの事例では、再構成医薬製品中の完全カプシドの割合は、凍結乾燥前の医薬製剤中の完全カプシドの割合の 1 % 以内である。いくつかの事例では、再構成医薬製品中の完全カプシドの割合は、凍結乾燥前の医薬製剤中の完全カプシドの割合の 0 . 5 % 以内である。

40

【0026】

いくつかの実施形態では、再構成医薬製品は、液滴デジタルポリメラーゼ連鎖反応によって決定されるベクターゲノム力価を含み、再構成医薬製品中のベクターゲノム力価は、凍結乾燥前に医薬製剤中に存在するベクターゲノム力価の 1 0 % 以内である。いくつかの事例では、再構成医薬製品中のベクターゲノム力価は、凍結乾燥前の医薬製剤中に存在す

50

るベクターゲノム力価の 7 % 以内である。

【 0 0 2 7 】

上記または本明細書で考察されるさまざまな実施形態のいずれかでは、再構成医薬製品は、2 ~ 8 °C の温度で 1 か月間の保存後に凍結乾燥された医薬組成物を再構成することによって形成され得る。いくつかの実施形態では、再構成医薬製品は、2 ~ 8 °C の温度で 3 か月間の保存後に凍結乾燥医薬組成物を再構成することによって形成され得る。いくつかの実施形態では、再構成医薬製品は、2 ~ 8 °C の温度で 6 か月間の保存後に凍結乾燥医薬組成物を再構成することによって形成され得る。

【 0 0 2 8 】

一態様では、本開示は、上記または本明細書で考察される医薬製剤を収容する容器を提供する。

【 0 0 2 9 】

一態様では、本開示は、上記または本明細書で考察される凍結乾燥医薬組成物を収容する容器を提供する。

【 0 0 3 0 】

一態様では、本開示は、上記または本明細書で考察される再構成医薬製品を収容する容器を提供する。

【 0 0 3 1 】

さまざまな実施形態のいずれかでは、容器はガラスバイアルであってもよい。

【 0 0 3 2 】

一態様では、本開示は、上記または本明細書で考察される容器と、使用説明書とを含むキットを提供する。

【 0 0 3 3 】

一態様では、本開示は、上記または本明細書で考察される安定な凍結乾燥医薬組成物を生成する方法を提供し、方法は、上記または本明細書で考察される医薬製剤上で凍結乾燥プロセスを実施することを含む。

【 0 0 3 4 】

いくつかの実施形態では、凍結乾燥プロセスは、(i) 凍結、(i i) アニール、(i i i) 一次乾燥、および (i v) 二次乾燥を含む。いくつかの事例では、凍結は、- 4 5 °C ± 5 °C の温度で 6 0 分 ± 1 0 分間実施される。いくつかの事例では、凍結は、アニーリングの前および後の両方で実施される。いくつかの事例では、アニーリングは、- 2 0 °C ± 5 °C の温度で 6 時間 ± 3 0 分間実施される。いくつかの事例では、一次乾燥は、- 2 6 °C ± 5 °C の温度で 5 0 時間 ± 1 0 時間実施される。いくつかの事例では、二次乾燥は、3 5 °C ± 5 °C の温度で 5 時間 ~ 2 0 時間の間実施される。いくつかの事例では、二次乾燥は、3 5 °C ± 5 °C の温度で 1 5 時間 ± 5 時間実施される。

【 0 0 3 5 】

さまざまな実施形態では、上記または本明細書で考察される実施形態の特徴または構成要素のうちのいずれかが、組み合わせられてもよく、そのような組み合わせは、本開示の範囲内に包含される。上記または本明細書で考察される任意の具体的な値は、範囲の上限および下限を表す値を有する範囲を列挙するように、上記または本明細書で考察される別の関連する値と組み合わせられてもよく、そのような範囲は、本開示の範囲内に包含される。

【 0 0 3 6 】

他の実施形態は、後に続く発明を実施するための形態の検討から明らかになるであろう。

【図面の簡単な説明】

【 0 0 3 7 】

【図 1 A】図 1 A および 1 B は、異種核酸分子（例えば、治療用遺伝子または目的の遺伝子（GOI））を含む AAV カプシド（図 1 A）、ならびに空カプシド、部分的に完全カプシド、および完全カプシド（図 1 B）を示す。

【図 1 B】同上。

【図 2-1】図 2 は、凍結乾燥実現可能性試験で評価された七つの製剤のサイズ分布プロファイルを示す（実施例 2）。F 7 を除くすべてのパネルで左の実線のピークは凍結乾燥前の粒子サイズを表し、F 7 を除くすべてのパネルで右の破線のピークは凍結乾燥後の粒子サイズを表す。F 7 パネルでは、二つのピークが互いに重なっている。

【図 2-2】同上。

【図 3】図 3 は、A A V 8 とプラセボ製剤（A A V なし）の粒子サイズ比較を示し、再構成組成物中にナノバブルが存在することを実証する。

【図 4】図 4 は、A A V 製剤中の界面活性剤濃度が A A V 力価回収率に及ぼす影響を示す。図示したように、ポリソルベート 8 0 およびポロキサマー 1 8 8 は、試験した製剤中で 0.005 % w / v で同等の回収率を示し、界面活性剤（P 1 8 8）の濃度を 0.01 % w / v に増加させると、回収率が改善した。界面活性剤の濃度を 0.2 % w / v にさらに増加させても、回収率は 0.01 % w / v で観察されたものから有意に変化しなかった。

【図 5】図 5 は、凍結乾燥後のマンニトールの非存在下（B A 1）およびマンニトールの存在下（B A 2）での二つの製剤の各々のケーキ構造を示す。B A 2 製剤は、B A 1 製剤から生じる欠陥のない、エレガントなケーキの外観をもたらす。

【図 6 A】図 6 A および 6 B は、A A V 8 製剤の熱特性評価の結果を示す。図 6 A は、凍結乾燥顕微鏡による崩壊温度 T_c の特徴付けを示し、図 6 B は、製剤 F 7 中の D S C によるガラス転移温度 T_g を示す。

【図 6 B】同上。

【図 7 A】図 7 A、7 B、および 7 C は、25 °C での A A V 8 製剤の溶液内安定性の結果を示す。A A V 8 ベクターを F 7 中で製剤化し、25 °C で 2 日間保存した。図 7 A は、D L S による粒子サイズ分析を示し、図 7 B は、d d P C R によるウイルスゲノム力価分析を示し、図 7 C は、A E X - U P L C を使用した完全カプシドの割合によるカプシド純度の分析を示す。

【図 7 B】同上。

【図 7 C】同上。

【図 8 A】図 8 A、8 B、および 8 C は、F 7 製剤中の凍結乾燥 A A V 8 製品の 2 ~ 8 °C での保存安定性の結果を示す。凍結乾燥前の製剤の結果を薄い色のドットで示し、凍結乾燥後の再構成された製品の結果を濃い色のドットで示す。図 8 A は、D L S による粒子サイズ分析を示し、図 8 B は、d d P C R によるウイルスゲノム力価分析を示し、図 8 C は、A E X - U P L C を使用した完全カプシドの割合によるカプシド純度の分析を示す。

【図 8 B】同上。

【図 8 C】同上。

【図 9 A】図 9 A および 9 B は、製剤調製のための塩スクリーニングの結果を示す。図 9 A は、 1×10^{13} v g / m L の A A V 8、10 m M のトリス、30 m M の N a C l、80 m M の L - A r g H C l、5 % w / v のスクロース、3.3 % w / v のマンニトール、0.01 % w / v の P 1 8 8、p H 7.3 を含有する製剤（対照）、ならびにさまざまな種類および濃度の塩を含む製剤 F 8 ~ F 1 0 の製剤組成を示す。図 9 B は、凍結乾燥前の製剤と凍結乾燥後に再構成された製品におけるウイルスゲノム力価の比較によって評価された凍結乾燥後のゲノム力価の回収を示す。

【図 9 B】同上。

【図 10 A】図 10 A、10 B、および 10 C は、25 °C での A A V 8 製剤の溶液内安定性の結果を示す。A A V 8 ベクターを、 1×10^{13} v g / m L の A A V 8、10 m M のトリス、30 m M の N a C l、80 m M の L - A r g H C l、5 % w / v のスクロース、3.3 % w / v のマンニトール、0.01 % w / v の P 1 8 8、p H 7.3 を含有する製剤中で製剤化し、次いで 25 °C で 2 日間保存した。図 10 A は、D L S による粒子サイズ分析を示し、図 10 B は、d d P C R によるウイルスゲノム力価分析を示し、図 10 C は、A E X - U P L C を使用した完全カプシドの割合によるカプシド純度の分析を示す。

【図 10 B】同上。

【図 10C】 同上。

【図 11A】 図 11A、11B、および 11C は、25℃での製剤（ 1×10^{13} v g / mL の AAV8、10m のトリス、30mM の NaCl、80mM の L-Arg HCl、5% w / v のスクロース、3.3% w / v のマンニトール、0.01% w / v の P188、pH 7.3）中の凍結乾燥 AAV8 製品の安定性の結果を示す。凍結乾燥前の製剤の結果を薄い色のドットで示し、凍結乾燥後に再構成された製品の結果を濃い色のドットで示す。図 11A は、DLS による粒子サイズ分析を示し、図 11B は、ddPCR によるウイルスゲノム力価分析を示し、図 11C は、AEX-UPLC を使用した完全カプシドの割合によるカプシド純度の分析を示す。

【図 11B】 同上。

【図 11C】 同上。

【発明を実施するための形態】

【0038】

本発明を記載する前に、記載される特定の方法および実験条件が変化し得るため、本発明は、そのような方法および条件に限定されないことを理解されたい。本発明の範囲が添付の特許請求の範囲のみによって限定されるため、本明細書で使用される用語は、特定の実施形態のみを記載する目的のためであり、限定的であることを意図していないことも理解されたい。

【0039】

別途定義されない限り、本明細書で使用される全ての技術用語および科学用語は、本発明が属する技術分野の当業者によって一般に理解されるものと同一の意味を有する。本明細書で使用される場合、「約」という用語は、特定の言及される数値に関して使用されると、値が言及される値から 1% 以下だけ変化し得ることを意味する。例えば、本明細書で使用される場合、「約 100」という表現には、99 および 101、ならびにその間の全ての値（例えば、99.1、99.2、99.3、99.4 など）が含まれる。

【0040】

本明細書で使用される場合、「含む (include)」、「含む (includes)」、「および「含む (including)」という用語は、非限定的であることを意図しており、それぞれ「含む (comprise)」、「含む (comprises)」、「および「含む (comprising)」ことを意味すると理解される。本明細書で使用される場合、「および／または」という用語は、関連する列挙された項目のうちの一つまたは複数のすべての可能な組み合わせ、ならびに代替で解釈される場合（「または」）の組み合わせの欠如を指し、かつ包含する。本明細書で使用される場合、「または」という用語は、特定の一覧の任意の一構成員を指し、その一覧の構成員の任意の組み合わせも含む。本明細書で使用される場合、別段の示唆がない限り、または文脈から相反することが明白でないかぎり、本開示に記載する文脈（特に以下の請求の範囲の文脈）において、「a」、「および「an」、および「the」、および類似の指示対象の用語は、単数および複数の両方を包含するとみなされる。

【0041】

本明細書に記載したものと類似または同等な任意の方法および材料を本発明の実施または試験に使用することができるが、好ましい方法および材料をこれから記述する。本明細書で言及される全ての特許、出願、および非特許刊行物は、参照によりそれらの全体で本明細書に組み込まれる。

【0042】

定義

「アデノ随伴ウイルス」または「AAV」は、非エンベロープで約 4.7 kb のゲノムである、一本鎖 DNA を有する非病原性パルボウイルスであり、二十面体立体構造を有する。AAV は、アデノウイルス調製物の汚染物質として 1965 年に最初に発見された。AAV は、ディペンドウイルス属およびパルボウイルス科に属し、複製のためにヘルペスウイルスまたはアデノウイルスのいずれかからのヘルパー機能を必要とする。ヘルパーウ

10

20

30

40

50

イルスの非存在下では、AAVは、19q13.4位でヒト19番染色体に統合することによって、潜伏を設定することができる。AAVゲノムは、二つのAAV遺伝子RepおよびCapの各々に一つずつ、二つのオープンリーディングフレーム（ORF）からなる。AAV DNA末端は、145bpの逆位末端反復（ITR）を有し、125個の末端塩基は、パリンドロームであり、特徴的なT字型ヘアピン構造につながる。

【0043】

「組換えウイルス粒子」とは、少なくとも一つのウイルスヌクレオチド配列に隣接し得る一つまたは複数の異種配列（例えば、ウイルス起源ではない核酸配列）を含む、ウイルス粒子を指す。

【0044】

「組換えAAV粒子」とは、少なくとも一つ、例えば、二つのAAV逆位末端反復配列（ITR）に隣接し得る、一つまたは複数の異種配列（例えば、AAV起源ではない核酸配列）を含む、アデノ随伴ウイルス粒子を指す。そのようなrAAV粒子は、好適なヘルパーウイルスに感染しており（または好適なヘルパー機能を発現しており）、AAV RepおよびCap遺伝子製品（すなわち、AAV RepおよびCapタンパク質）を発現している宿主細胞に存在する場合に複製およびパッケージ化され得る。

【0045】

「ウイルス粒子」とは、少なくとも一つのウイルスカプシドタンパク質およびカプシド封入ウイルスゲノムから構成されるウイルス粒子を指す。

【0046】

「異種」とは、実体が比較されるか、または導入されるか、もしくは組み込まれる、残りの実体と遺伝子型的に明確に異なる実体に由来することを意味する。例えば、遺伝子操作技法によって異なる細胞型に導入される核酸は、異種核酸である（発現されると、異種ポリペプチドをコードすることができる）。同様に、ウイルス粒子に組み込まれる細胞配列（例えば、遺伝子またはその一部）は、ウイルス粒子に関する異種ヌクレオチド配列である。

【0047】

「空ウイルスカプシド」または「空カプシド」という用語は、図1Bに図示されるように、異種核酸分子（例えば、治療用遺伝子）を含まないカプシドを指す。

【0048】

「部分的完全ウイルスカプシド」または「部分的完全カプシド」という用語は、図1Bに図示されるように、異種核酸分子（例えば、治療用遺伝子）のいくつかのみを含むカプシドを指す。

【0049】

「完全ウイルスカプシド」または「完全カプシド」という用語は、図1Bに図示されるように、完全異種核酸分子（例えば、治療用遺伝子または目的の遺伝子）を含むカプシドを指す。

【0050】

本明細書に記載される組成物に関連して使用される場合、「薬学的に許容可能な」という用語は、生理学的に許容可能であり、対象に投与されたときに通常は好ましくない反応を引き起こさない、そのような組成物の分子実体および他の成分を指す。好ましくは、「薬学的に許容可能な」という用語は、連邦政府または州政府の規制当局によって承認されるか、または米国薬局方もしくは他の一般的に認識されている薬局方に、哺乳類で、より具体的にはヒトにおける使用に関して列記されていることを意味する。「薬学的に許容可能な塩」は、薬物製剤において対象（例えば、ヒト）への投与に安全である、例えば、金属塩（ナトリウム、カリウム、マグネシウム、カルシウムなど）およびアンモニアまたは有機アミンの塩を含む、医薬用途のための化合物またはコンジュゲートに製剤化され得る塩である。

【0051】

本明細書で使用される場合、塩の「生理学的濃度」とは、約100mM～約200mM

10

20

30

40

50

の薬学的に許容可能な塩の塩濃度を指す。

【0052】

本明細書で使用される場合、塩の「垂生理学的濃度」とは、約100mM未満の薬学的に許容可能な塩の塩濃度を指す。特定の実施形態では、塩の垂生理学的濃度は、約80mM未満の薬学的に許容可能な塩である。別の実施形態では、垂生理学的濃度の塩は、約70mM未満、約60mM未満、約50mM未満、約40mM未満、約30mM未満、約20mM未満、または約10mM未満の薬学的に許容可能な塩である。

【0053】

本明細書で使用される場合、ある状態、障害、または病態を「治療する (treat)」または「治療 (treatment)」という用語は、(1) 状態、障害、または病態に罹患しているか、または罹患しやすい可能性があるが、状態、障害、または病態の臨床的または潜在的症狀をまだ経験していない、または示していない対象において、状態、障害、または病態の少なくとも一つの臨床的または潜在的症狀の出現を防止、遅延、または発生および／または可能性を低減すること、または(2) 状態、障害、または病態を阻害すること、すなわち、疾患もしくはその再発、またはそれらの少なくとも一つの臨床的もしくは潜在的症狀の発症／進行を阻止、低減、または遅延させること、または(3) 疾患を緩和すること、すなわち、状態、障害、もしくは病態、またはその臨床的もしくは潜在的症狀のうちの少なくとも一つを退行させること、を含む。これらの用語を使用する場合、必ずしも100%または完全な治療を意味するわけではない。むしろ、当業者が潜在的な利益または治療効果を有すると認識する、さまざまな程度の治療がある。治療される対象に対する利益は、統計的に有意であるか、患者または医師にとって少なくとも知覚可能なものである。

【0054】

本明細書で使用される場合、「治療有効量もしくは用量」、または「十分量もしくは用量」は、それが投与された効果を生じさせる用量を指す。正確な用量は、治療の目的によって becoming になっており、公知の技術を用いて当業者によって確認できることになっている。

【0055】

「患者」および「対象」という用語は、互換的に使用され、本開示の組成物の投与によって予防または治療され得る状態を患う、または患う傾向のある生物を指し、ヒトおよび非ヒト動物の両方を含む。対象の例には、ヒト、チンパンジーおよび他の類人猿およびサル種；ウシ、ヒツジ、ブタ、ヤギおよびウマなどの家畜；イヌおよびネコなどの家畜哺乳類；マウス、ラットおよびモルモットなどの齧歯類を含む実験動物；ニワトリ、七面鳥、および他のキジ目鳥、アヒル、ガチョウなどの家禽、野鳥、狩猟鳥を含む鳥類が挙げられるが、これらに限定されない。この用語は、特定の年齢を意味しない。したがって、成年、若年、および新生児が企図される。

【0056】

本明細書で使用される場合、「保存」とは、製剤が調製されるとすぐに対象に投与されずに、使用前に特定の条件（例えば、特定の温度など）下で一定期間維持されることを意味する。例えば、液体または凍結乾燥製剤は、冷却（例えば、0℃～10℃）または室温（例えば、最大32℃の温度）などのさまざまな温度下に対象に投与する前に、数日、数週間、数か月、または数年間維持することができる。

【0057】

好ましい実施形態では、本開示の製剤および組成物は、滅菌されている。「滅菌」とは、例えば、実質的に微生物（例えば、真菌、細菌、非AAVウイルス、孢子形態など）がないなど、組成物中に実質的に免疫原性成分がないことを意味する。

【0058】

概要

本開示は、対象への投与（例えば、再構成時）に適合し、安定性を維持し、AAV効力の喪失を最小化しながらAAVの長期保存にも適する製剤、例えば、医薬製剤および凍結乾燥組成物を提供する。特定の実施形態では、本明細書に提供される医薬製剤および組成

物は、長期間保存されたとき、有意な A A V 活性を保持する。特定の実施形態では、本明細書で考察される医薬製剤および組成物は、分解および／または凝集を低減または遅延させる。

【0059】

A A V 製剤および製品開発の特別な課題は、A A V 製品の長期保存がしばしば効率的ではなく、組換えタンパク質ベースの生物製剤と比較して、保存期間が短い（通常 12～18 か月）ことである。例えば、既存の A A V 製品（Luxturna（登録商標）および Zolgensma（登録商標））の製剤は、 -60°C 以下で 12 か月の限られた保存期間しかサポートしておらず、Zolgensma（登録商標）の場合は $2\sim 8^{\circ}\text{C}$ で 14 日間の安定性しかサポートしていない。凍結 A A V 製品はまた、サプライチェーンおよび在庫管理、特に出荷、流通、保管に低温（例えば、 -65°C 未満）が必要な場合、実際的な課題をもたらす。

10

【0060】

本明細書で考察されるものなどの凍結乾燥組成物は、保管およびサプライチェーン管理の両方の課題に対処する。特に、本開示の製剤および組成物は、慎重に選択された賦形剤および濃度を利用して、保管寿命をサポートするための固体状態での長期保管安定性、および製造作業および臨床／治療用途の条件をサポートするための液体状態での室温安定性（例えば、通常最低 48 時間）を保証する。さらに、本開示の凍結乾燥組成物は、ケーキのエレガンスおよび許容可能な再構成特性を提供する。

【0061】

20

本明細書で考察される凍結乾燥サイクルは、凍結、アニーリング（マンニトールまたはグリシンなどの増量剤の存在下）、一次乾燥、および二次乾燥の四つの段階を含む。凍結乾燥を受ける医薬製剤は、凍結に続く乾燥プロセスが、低温変性、溶質（タンパク質）濃度（凍結濃縮によって引き起こされる増加）、氷結晶の形成、重要な賦形剤（例えば、緩衝液、塩）の結晶化、および pH 変化などのさまざまなストレスを与える可能性があるため、医薬製品の品質を決定する上で重要な役割を果たす。これらのストレスは、製剤の賦形剤の選択において慎重に考慮されない場合、タンパク質の立体構造変化を誘導し、最終的に凍結乾燥医薬製品の安定性に影響を与える可能性がある。

【0062】

30

製剤開発中に対処しなければならない凍結乾燥 A A V 製品にはいくつかの課題がある。第一に、A A V 製剤は、凝集を防止するために高いイオン強度の使用を必要とするが、塩は、非晶質系の崩壊温度（ T_c ）またはガラス転移温度（ T_g' ）を大幅に低減する可能性があるため、凍結工程でより低い凍結温度の使用を必要とし、結果として昇華プロセスが不十分になる可能性がある。第二に、A A V 医薬製品は通常、 $1\text{E}12\sim 1\text{E}13$ ベクターゲノムコピー（vg）／mL の範囲の低濃度で製剤化され、これは約 $0.01\sim 0.2\text{mg}/\text{mL}$ に相当し、 T_g' のさらなる低下をもたらし、異なる表面への吸着により A A V が失うリスクをもたらす。第三に、A A V 濃度が低いため、乾燥中にバイアルから A A V が失われるのを防ぎ、ケーキの崩壊から構造的完全性を維持するために、製剤中に増量剤を含める必要性があり得る。しかし、そうすることで、増量剤は、アニーリング工程中に十分な結晶化を達成できず、二次乾燥中およびその後の乾燥固体での保管中に結晶化し続けて、その結果、凍結乾燥医薬製品の再構成ならびに安定性に影響を及ぼす可能性がある。

40

【0063】

これらおよびその他の課題は、本開示の医薬製剤および組成物によって対処される。ある特定の実施形態では、本開示は、治療有効量または用量の A A V と、製剤に好適な pH を提供する一つまたは複数の緩衝剤と、一つまたは複数の薬学的に許容可能な塩と、一つまたは複数の糖および／または糖アルコールの安定化濃度と、非イオン性界面活性剤と、増量剤と、を含む、A A V の製剤を提供する。概して、本明細書に提供される A A V 製剤は、医薬投与に適している。

【0064】

50

アデノ随伴ウイルス粒子

AAV粒子は、組換えAAV (rAAV) 粒子であり得る。rAAV粒子は、異種導入遺伝子または異種核酸分子をコードするAAVベクターを含む。AAV粒子は、鳥類AAV、ウシAAV、イヌAAV、ウマAAV、ヒツジAAV、霊長類AAV、および非霊長類AAVであってもよい。

【0065】

いくつかの態様では、AAV粒子は、異種核酸分子（例えば、治療用遺伝子または目的の遺伝子）を含む。いくつかの態様では、異種核酸分子は、プロモーターに動作可能に連結される。例示的なプロモーターとしては、サイトメガロウイルス (CMV) 前初期プロモーター、RSV LTR、MoMLV LTR、ホスホグリセリン酸キナーゼ1 (PGK) プロモーター、シミアンウイルス40 (SV40) プロモーターおよびCK6プロモーター、トランスサイレチンプロモーター (TTR)、TKプロモーター、テトラサイクリン応答性プロモーター (TRE)、HBVプロモーター、hAATプロモーター、LSPプロモーター、キメラ肝臓特異的プロモーター (LSP)、E2Fプロモーター、テロメラーゼ (hTERT) プロモーター、サイトメガロウイルスエンハンサー／ニワトリベーターアクチン／ウサギベーターグロビンプロモーター、ならびに伸長因子1-アルファプロモーター (EF1-アルファ) プロモーターが挙げられるが、これらに限定されない。いくつかの態様では、プロモーターは、ヒトベーターグロクロニダーゼプロモーター、またはニワトリベーターアクチン (CBA) プロモーターに連結されたサイトメガロウイルスエンハンサーを含む。プロモーターは、構成的、誘導性、または抑制性プロモーターであり得る。いくつかの態様では、本開示は、CBAプロモーターに動作可能に連結された本開示の異種導入遺伝子をコードする核酸を含む、組換えベクターを提供する。いくつかの事例では、導入遺伝子のための天然プロモーターまたはその断片が使用される。天然プロモーターは、導入遺伝子の発現が天然発現を模倣するべきであることが所望されるときに使用され得る。天然プロモーターは、導入遺伝子の発現が、時間的もしくは発生的に、または組織特異的な様式で、または具体的な転写刺激に応答して調節されなければならないときに使用され得る。さらなる態様では、エンハンサー要素、ポリアデニル化部位、またはコザックコンセンサス配列などの他の天然発現制御要素もまた、天然発現を模倣するために使用され得る。

【0066】

例示的な実施形態では、本開示の医薬製剤および組成物は、AAVを含む。AAVは、任意のAAV血清型のものであってもよい。例示的な態様では、AAVは、AAV1血清型、AAV2血清型、AAV3血清型、AAV4血清型、AAV5血清型、AAV6血清型、AAV7血清型、AAV8血清型、AAV9血清型、またはAAV10血清型である。例示的な態様では、AAVは、AAV1血清型のものである。例示的な態様では、AAVは、AAV5血清型のものである。例示的な態様では、AAVは、AAV8血清型のものである。例示的な態様では、AAVは、AAV9血清型のものである。いくつかの事例では、AAVは、AAV11、AAV12、AAV-DJ、AAV-DJ／8、AAV-Rh10、AAV-retro、AAV-PHP.B、AAV8-PHP.eB、またはAAV-PHP.Sである。いくつかの実施形態では、AAV粒子は、血清型AAV1、AAV5、AAV8、またはAAV9のものである。

【0067】

例示的な態様では、医薬製剤および組成物は、高力価AAV製品を含む。例示的な態様では、医薬製剤および組成物は、少なくとも約 1.0×10^{10} ウイルス粒子 (vp) または少なくとも約 1.0×10^{11} ウイルス粒子 (vp) または少なくとも約 1.0×10^{12} ウイルス粒子 (vp) または少なくとも約 1.0×10^{13} ウイルス粒子 (vp) を含む。例示的な態様では、医薬製剤および組成物は、少なくとも約 1.0×10^{14} ウイルス粒子 (vp) または少なくとも約 1.0×10^{15} ウイルス粒子 (vp)、例えば、少なくとも約 2×10^{15} ウイルス粒子 (vp) または少なくとも約 5×10^{15} ウイルス粒子 (vp) を含む。医薬製剤および組成物はまた、約 1.0×10^{10} ベクターゲノムもしくはウイルスゲノム (vg)、ま

10

20

30

40

50

たは少なくとも約 1.0×10^1 ベクターもしくはウイルスゲノム (vg)、または少なくとも約 1.0×10^2 ベクターゲノムもしくはウイルスゲノム (vg)、または少なくとも約 1.0×10^3 ベクターゲノムもしくはウイルスゲノム (vg) を含む。例示的な態様では、医薬製剤および組成物は、少なくとも約 1.0×10^4 ベクターゲノムもしくはウイルスゲノム (vg)、または少なくとも約 1.0×10^5 ベクターゲノムもしくはウイルスゲノム (vg)、例えば、少なくとも約 2×10^5 ベクターゲノムもしくはウイルスゲノム (vg)、または少なくとも約 5×10^5 ベクターゲノムもしくはウイルスゲノム (vg) を含む。

【0068】

賦形剤および pH

本開示の医薬製剤および組成物（別段の指示がない限り、液体医薬製剤、凍結乾燥医薬組成物、および再構成医薬製品を含む）は、製造中および使用中、ならびにサプライチェーンのロジスティクスを容易にする条件下での長期保存中に、AAV粒子の安定性を維持する濃度で、慎重に選択された賦形剤を含む。さまざまな実施形態では、本開示は、定義された pH 範囲内の一つまたは複数の緩衝液、一つまたは複数の塩、一つまたは複数の糖または糖アルコール、一つまたは複数の増量剤、および一つまたは複数の界面活性剤と組み合わせた AAV 粒子（例えば、上記または本明細書で論じたとおり）を含有する液体医薬製剤、凍結乾燥医薬組成物、および再構成医薬製品を含む。以下または本明細書でさまざまな賦形剤に関連して考察される濃度は、液体医薬製剤、続いて凍結乾燥に供される製剤、または凍結乾燥組成物の再構成によって調製される再構成組成物を指す。本開示の組成物に含まれるさまざまな賦形剤は、とりわけ、塩、糖、および増量剤を含む。塩は、凝集体の形成を緩和することによって AAV 粒子の安定化に寄与し得るが、崩壊温度を大幅に低下させ得る。糖は凍結乾燥中に凍結保護剤として作用することができるが、増量剤の結晶化も阻害することができる。増量剤を十分に結晶化できないと、ガラス転移温度に有害な影響を与え、保存安定性を損なう。したがって、安定な AAV 製剤および凍結乾燥組成物を生成するためには、賦形剤および濃度の慎重な選択が必要である。

【0069】

A. 緩衝液および pH

【0070】

本開示の液体医薬製剤、凍結乾燥医薬組成物、および再構成医薬製品は、薬学的に許容可能な緩衝剤を含む。いくつかの事例では、緩衝剤は、リン酸緩衝液、ヒスチジン緩衝液、クエン酸ナトリウム緩衝液、HEPES 緩衝液、トリス緩衝液、ピシン緩衝液、グリシン緩衝液、N-グリシルグリシン緩衝液、酢酸ナトリウム緩衝液、炭酸ナトリウム緩衝液、グリシルグリシン緩衝液、リジン緩衝液、アルギニン緩衝液、リン酸ナトリウム緩衝液、および／またはそれらの混合物を含むが、これらに限定されない。いくつかの実施形態では、緩衝剤は、リン酸緩衝液（例えば、リン酸ナトリウム緩衝液）である。いくつかの実施形態では、緩衝剤はトリス緩衝液である。

【0071】

例示的な実施形態では、本開示の医薬組成物は、約 1 ～ 約 30、約 1 mM ～ 約 20 mM、約 5 mM ～ 約 25 mM、約 5 ～ 約 15、約 7 mM ～ 約 13 mM、または約 8 mM ～ 約 12 mM の緩衝剤を含む。例示的な態様では、医薬組成物は、約 1 mM、約 2 mM、約 3 mM、約 4 mM、約 5 mM、約 6 mM、約 7 mM、約 8 mM、約 9 mM、約 10 mM、約 11 mM、約 12 mM、約 13 mM、約 14 mM、約 15 mM、約 16 mM、約 17 mM、約 18 mM、約 19 mM、約 20 mM、約 21 mM、約 22 mM、約 23 mM、約 24 mM、または約 25 mM の緩衝剤を含む。

【0072】

例示的な実施形態では、本開示の医薬組成物は、約 1 mM ～ 約 20 mM、約 5 mM ～ 約 15 mM、約 8 mM ～ 約 12 mM、または $10 \text{ mM} \pm 1 \text{ mM}$ のトリス緩衝液を含む。例示的な実施形態では、本開示の医薬組成物は、約 1 mM ～ 約 20 mM、約 5 mM ～ 約 15 mM、約 8 mM ～ 約 12 mM、または $10 \text{ mM} \pm 1 \text{ mM}$ のリン酸ナトリウム緩衝液を含む。

さまざまな実施形態では、医薬組成物は、約 5 mM、約 6 mM、約 7 mM、約 8 mM、約 9 mM、約 10 mM、約 11 mM、約 12 mM、約 13 mM、約 14 mM、または約 15 mM のトリス緩衝液を含む。さまざまな実施形態では、医薬組成物は、約 5 mM、約 6 mM、約 7 mM、約 8 mM、約 9 mM、約 10 mM、約 11 mM、約 12 mM、約 13 mM、約 14 mM、または約 15 mM のリン酸ナトリウム緩衝液を含む。特定の実施形態では、医薬組成物は、10 mM ± 2 mM のトリス緩衝液を含む。特定の実施形態では、医薬組成物は、10 mM ± 2 mM のリン酸ナトリウム緩衝液を含む。

【0073】

例示的な実施形態では、本開示の医薬組成物は、生理学的に適合した pH を有する。特定の実施形態では、製剤を中性 pH に、または中性 pH 付近に維持するのに好適な緩衝剤を含有する AAV 製剤が提供される。

10

【0074】

例示的な実施形態では、医薬組成物の pH は、約 6.5 ~ 約 9.0、約 6.5 ~ 約 8.0、約 6.9 ~ 約 7.7、または約 7.0 ~ 約 7.5 である。特定の実施形態では、製剤の pH は、約 6.5 または約 6.6、約 6.7、約 6.8、約 6.9、約 7.0、約 7.1、約 7.2、約 7.3、約 7.4、約 7.5、約 7.6、約 7.7、約 7.8、約 7.9、約 8.0、約 8.1、約 8.2、約 8.3、約 8.4、約 8.5、約 8.6、約 8.7、約 8.8、約 8.9、または約 9.0 である。例示的な実施形態では、医薬組成物の pH は、約 7.2、約 7.3、または約 7.4 である。特定の実施形態では、医薬組成物の pH は、7.3 ± 0.1 である。特定の実施形態では、医薬組成物の pH は、7.3 ± 0.05 である。

20

【0075】

B. 塩

【0076】

本開示の液体医薬製剤、凍結乾燥医薬組成物、および再構成医薬製品は、一つまたは複数の薬学的に許容可能な塩を含む。

【0077】

さまざまな実施形態では、薬学的に許容可能な塩としては、ナトリウム塩、カリウム塩、およびセシウム塩などの金属塩；カルシウム塩およびマグネシウム塩などのアルカリ土類金属塩；トリエチルアミン、グアニジン、および N-置換グアニジン塩、アセトアミジン、および N-置換アセトアミジン、ピリジン、ピコリン、エタノールアミン、トリエタノールアミン、ジシクロヘキシルアミン、および N, N'-ジベンジルエチレンジアミン塩などの有機アミン塩が挙げられるが、これらに限定されない。薬学的に許容可能な（塩基性窒素中心の）塩としては、塩酸塩、臭化水素酸塩、硫酸塩、リン酸塩などの無機酸塩；トリフルオロ酢酸塩およびマレイン酸塩などの有機酸塩；メタンスルホン酸塩、エタンスルホン酸塩、ベンゼンスルホン酸塩、p-トルエンスルホン酸塩、カンファースルホン酸塩およびナフタレンスルホン酸塩などのスルホン酸塩；アルギン酸塩、アラニン酸塩、アスパルギン酸塩およびグルタミン酸塩などのアミノ酸塩；ならびにグルコン酸塩およびガラクトuron酸塩などの炭水化物塩を含むが、これらに限定されない。薬学的に許容可能な塩の非限定的な例としては、限定されるものではないが、ナトリウム塩、アンモニウム塩、カリウム塩、カルシウム塩、マグネシウム塩（例えば、塩化ナトリウム、塩化アンモニウム、塩化カリウム、塩化カルシウム、塩化マグネシウム；酢酸ナトリウム、酢酸アンモニウム、酢酸カリウム、酢酸カルシウムおよび酢酸マグネシウム；クエン酸ナトリウム、クエン酸アンモニウム、クエン酸カリウム、クエン酸カルシウムおよびクエン酸マグネシウム；リン酸ナトリウム、リン酸アンモニウム、リン酸カリウム、リン酸カルシウムおよびリン酸マグネシウム；フッ化ナトリウム、フッ化アンモニウム、フッ化カリウム、フッ化カルシウムおよびフッ化マグネシウム；臭化ナトリウム、臭化アンモニウム、臭化カリウム、臭化カルシウムおよび臭化マグネシウム；およびヨウ化ナトリウム、ヨウ化アンモニウム、ヨウ化カリウム、ヨウ化カルシウムおよびヨウ化マグネシウム）が挙げられる。いくつかの事例では、薬学的に許容可能な塩は、塩化ナトリウムである。いくつかの

30

40

50

事例では、薬学的に許容可能な塩は、アルギニン塩酸塩（L-アルギニン塩酸塩）である。

【0078】

例示的な実施形態では、本開示の医薬組成物は、約0 mM～約150 mM、約5 mM～約150 mM、約5 mM～約100 mM、約5 mM～約90 mM、約5 mM～約80 mM、約5 mM～約70 mM、約5 mM～約60 mM、約5 mM～約50 mM、約5 mM～約40 mM、5 mM～約30 mM、約10 mM～約50 mM、約15 mM～約45 mM、約20 mM～約40 mM、約25 mM～約35 mM、約30 mM～約130 mM、約40 mM～約120 mM、約50 mM～約110 mM、約60 mM～約100 mM、約70 mM～約90 mM、または約75 mM～約85 mMの薬学的に許容可能な塩（上記に定義される通り、例えば、第一の塩、第二の塩、または第一の塩および第二の塩の両方）を含む。例示的な実施形態では、医薬組成物は、約0 mM、約5 mM、約10 mM、約15 mM、約20 mM、約25 mM、約30 mM、約35 mM、約40 mM、約45 mM、約50 mM、約55 mM、約60 mM、約65 mM、約70 mM、約75 mM、約80 mM、約85 mM、約90 mM、約95 mM、約100 mM、約105 mM、約110 mM、約115 mM、約120 mM、約125 mM、約130 mM、約135 mM、約140 mM、約145 mM、または約150 mMの薬学的に許容可能な塩（例えば、第一の塩、第二の塩、または第一の塩および第二の塩の両方）を含む。いくつかの実施形態では、医薬組成物は、約5 mM、約6 mM、約7 mM、約8 mM、約9 mM、約10 mM、約11 mM、約12 mM、約13 mM、約14 mM、約15 mM、約16 mM、約17 mM、約18 mM、約19 mM、約20 mM、約21 mM、約22 mM、約23 mM、約24 mM、約25 mM、約26 mM、約27 mM、約28 mM、約29 mM、約30 mM、約31 mM、約32 mM、約33 mM、約34 mM、約35 mM、約36 mM、約37 mM、約38 mM、約39 mM、約40 mM、約41 mM、約42 mM、約43 mM、約44 mM、約45 mM、約46 mM、約47 mM、約48 mM、約49 mM、約50 mM、約51 mM、約52 mM、約53 mM、約54 mM、約55 mM、約56 mM、約57 mM、約58 mM、約59 mM、約60 mM、約61 mM、約62 mM、約63 mM、約64 mM、約65 mM、約66 mM、約67 mM、約68 mM、約69 mM、約70 mM、約71 mM、約72 mM、約73 mM、約74 mM、約75 mM、約76 mM、約77 mM、約78 mM、約79 mM、約80 mM、約81 mM、約82 mM、約83 mM、約84 mM、約85 mM、約86 mM、約87 mM、約88 mM、約89 mM、約90 mM、約91 mM、約92 mM、約93 mM、約94 mM、約95 mM、約96 mM、約97 mM、約98 mM、約99 mM、約100 mM、約101 mM、約102 mM、約103 mM、約104 mM、または約105 mMの薬学的に許容可能な塩（例えば、第一の塩、第二の塩、または第一の塩および第二の塩の両方）を含む。

10

20

30

【0079】

特定の実施形態では、本開示の医薬組成物は、約10 mM、約11 mM、約12 mM、約13 mM、約14 mM、約15 mM、約16 mM、約17 mM、約18 mM、約19 mM、約20 mM、約21 mM、約22 mM、約23 mM、約24 mM、約25 mM、約26 mM、約27 mM、約28 mM、約29 mM、約30 mM、約31 mM、約32 mM、約33 mM、約34 mM、約35 mM、約36 mM、約37 mM、約38 mM、約39 mM、約40 mM、約41 mM、約42 mM、約43 mM、約44 mM、約45 mM、約46 mM、約47 mM、約48 mM、約49 mM、または約50 mMの塩化ナトリウムを含む。いくつかの実施形態では、組成物は、30 mM±5 mMの塩化ナトリウムを含む。いくつかの実施形態では、組成物は、30 mM±3 mMの塩化ナトリウムを含む。いくつかの実施形態では、組成物は、30 mM±1 mMの塩化ナトリウムを含む。特定の実施形態では、本開示の医薬組成物は、約60 mM、約61 mM、約62 mM、約63 mM、約64 mM、約65 mM、約66 mM、約67 mM、約68 mM、約69 mM、約70 mM、約71 mM、約72 mM、約73 mM、約74 mM、約75 mM、約76 mM、約77 mM、約78 mM、約79 mM、約80 mM、約81 mM、約82 mM、約83 mM、約8

40

50

4 mM、約 85 mM、約 86 mM、約 87 mM、約 88 mM、約 89 mM、約 90 mM、約 91 mM、約 92 mM、約 93 mM、約 94 mM、約 95 mM、約 96 mM、約 97 mM、約 98 mM、約 99 mM、または約 100 mM のアルギニン塩酸塩を含む。いくつかの実施形態では、組成物は、80 mM ± 10 mM のアルギニン塩酸塩を含む。いくつかの実施形態では、組成物は、80 mM ± 5 mM のアルギニン塩酸塩を含む。いくつかの実施形態では、組成物は、80 mM ± 3 mM のアルギニン塩酸塩を含む。

【0080】

C. 界面活性剤

【0081】

本開示の液体医薬製剤、凍結乾燥医薬組成物、および再構成医薬製品は、一つまたは複数の界面活性剤を含む。

10

【0082】

本明細書で考察されるように、非イオン性界面活性剤は、表面上の AAV の損失を実質的に低減し、本開示の医薬組成物の可視粒子の形成を防止する。したがって、特定の実施形態では、医薬組成物は、非イオン性界面活性剤の安定化濃度を含有する。本明細書で考察される組成物に使用され得る薬学的に許容可能な非イオン性界面活性剤としては、限定されないが、ポリソルベート 80 (Tween 80; PS 80)、ポリソルベート 20 (Tween 20; PS 20)、およびさまざまなポロキサマー (例えば、ポロキサマー 188)、またはそれらの混合物が挙げられる。いくつかの事例では、本開示の製剤および組成物に含まれ得る具体的な非イオン性界面活性剤としては、例えば、ポリソルベート 20、ポリソルベート 28、ポリソルベート 40、ポリソルベート 60、ポリソルベート 65、ポリソルベート 80、ポリソルベート 81、およびポリソルベート 85 などのポリソルベート; ポロキサマー 181、ポロキサマー 188、ポロキサマー 407 などのポロキサマー; またはポリエチレングリコール (PEG) が挙げられる。いくつかの実施形態では、組成物に使用される非イオン性界面活性剤は、ポリソルベート 80 である。いくつかの実施形態では、組成物に使用される非イオン性界面活性剤は、ポロキサマー 188 である。

20

【0083】

特定の実施形態では、本開示の医薬組成物は、約 0.001% (w/v) ~ 約 0.1% (w/v) の非イオン性界面活性剤を含む。さまざまな実施形態では、組成物は、約 0.001% (w/v)、約 0.0015% (w/v)、約 0.002% (w/v)、約 0.0025% (w/v)、約 0.003% (w/v)、約 0.0035% (w/v)、約 0.004% (w/v)、約 0.0045% (w/v)、約 0.005% (w/v)、約 0.0055% (w/v)、約 0.006% (w/v)、約 0.0065% (w/v)、約 0.007% (w/v)、約 0.0075% (w/v)、約 0.008% (w/v)、約 0.0085% (w/v)、約 0.009% (w/v)、約 0.0095% (w/v)、または約 0.01% (w/v) の非イオン性界面活性剤を含む。さまざまな実施形態では、組成物は、約 0.01% (w/v)、約 0.015% (w/v)、約 0.02% (w/v)、約 0.025% (w/v)、約 0.03% (w/v)、約 0.035% (w/v)、約 0.04% (w/v)、約 0.045% (w/v)、約 0.05% (w/v)、約 0.055% (w/v)、約 0.06% (w/v)、約 0.065% (w/v)、約 0.07% (w/v)、約 0.075% (w/v)、約 0.08% (w/v)、約 0.085% (w/v)、約 0.09% (w/v)、約 0.095% (w/v)、または約 0.1% (w/v) の非イオン性界面活性剤を含む。特定の実施形態では、本開示の医薬組成物は、約 0.005% w/v ± 約 0.001% w/v の非イオン性界面活性剤を含む。

30

40

【0084】

いくつかの例示的な実施形態では、本開示の医薬組成物は、約 0.001% (w/v) ~ 約 0.01% (w/v) のポリソルベート 80 を含む。いくつかの例示的な実施形態では、本開示の医薬組成物は、約 0.001% (w/v) ~ 約 0.01% (w/v) のポロキサマー 188 を含む。いくつかの実施形態では、医薬組成物は、約 0.001% (w/v)

50

v)、約0.0015%(w/v)、約0.002%(w/v)、約0.0025%(w/v)、約0.003%(w/v)、約0.0035%(w/v)、約0.004%(w/v)、約0.0045%(w/v)、約0.005%(w/v)、約0.0055%(w/v)、約0.006%(w/v)、約0.0065%(w/v)、約0.007%(w/v)、約0.0075%(w/v)、約0.008%(w/v)、約0.0085%(w/v)、約0.009%(w/v)、約0.0095%(w/v)、または約0.01%(w/v)のポリソルベート80を含む。いくつかの実施形態では、医薬組成物は、約0.001%(w/v)、約0.0015%(w/v)、約0.002%(w/v)、約0.0025%(w/v)、約0.003%(w/v)、約0.0035%(w/v)、約0.004%(w/v)、約0.0045%(w/v)、約0.005%(w/v)、約0.0055%(w/v)、約0.006%(w/v)、約0.0065%(w/v)、約0.007%(w/v)、約0.0075%(w/v)、約0.008%(w/v)、約0.0085%(w/v)、約0.009%(w/v)、約0.0095%(w/v)、または約0.01%(w/v)のポロキサマー188を含む。特定の実施形態では、本開示の医薬組成物は、約0.005%w/v±0.001%w/vのポリソルベート80を含む。特定の実施形態では、本開示の医薬組成物は、約0.005%w/v±0.001%w/vのポロキサマー188を含む。

10

【0085】

D. 糖類

【0086】

20

本開示の液体医薬製剤、凍結乾燥医薬組成物、および再構成医薬製品は、一つまたは複数の糖を含む。

【0087】

一つまたは複数の糖（例えば、約1%～約20%）の含有は、本開示の液体および/または凍結乾燥製剤の安定性を改善する。例えば、糖は、凍結/融解サイクル中により良い特性を可能にする。したがって、特定の実施形態では、本開示の医薬組成物は、約1%～約10%の一つまたは複数の糖を含有する。例えば、フルクトース、グルコース、マンノース、ソルボース、キシロース、マルトース、ラクトース、スクロース、デキストラン、トレハロース、プルラン、デキストリン、シクロデキストリン、可溶性デンプン、ヒドロキシエチルデンプン、およびカルボキシメチルセルロースを含む、単糖類、二糖類、もしくは多糖類、または水溶性グルカンなどの任意の糖が、さまざまな実施形態で使用され得る。いくつかの実施形態では、糖は、スクロース、トレハロース、またはそれらの組み合わせである。特定の実施形態では、トレハロースは、トレハロース二水和物である。いくつかの実施形態では、糖は、スクロースである。いくつかの実施形態では、糖は、トレハロースである。

30

【0088】

糖は、個別にまたは組み合わせて使用されてもよい。いくつかの実施形態では、糖、またはその組み合わせは、約1%～約10%(w/v)、約2%(w/v)～約8%(w/v)、約2.5%～約7.5%(w/v)、約3%(w/v)～約7%(w/v)、または約4%～約6%(w/v)の濃度で製剤または組成物中に存在する。いくつかの実施形態では、本開示の医薬組成物は、約1.0%(w/v)、約1.1%(w/v)、約1.2%(w/v)、約1.3%(w/v)、約1.4%(w/v)、約1.5%(w/v)、約1.6%(w/v)、約1.7%(w/v)、約1.8%(w/v)、約1.9%(w/v)、約2.0%(w/v)、約2.1%(w/v)、約2.2%(w/v)、約2.3%(w/v)、約2.4%(w/v)、約2.5%(w/v)、約2.6%(w/v)、約2.7%(w/v)、約2.8%(w/v)、約2.9%(w/v)、約3.0%(w/v)、約3.1%(w/v)、約3.2%(w/v)、約3.3%(w/v)、約3.4%(w/v)、約3.5%(w/v)、約3.6%(w/v)、約3.7%(w/v)、約3.8%(w/v)、約3.9%(w/v)、約4.0%(w/v)、約4.1%(w/v)、約4.2%(w/v)、約4.3%(w/v)、約4.4%(w/v)、

40

50

約 4.5% (w/v)、約 4.6% (w/v)、約 4.7% (w/v)、約 4.8% (w/v)、約 4.9% (w/v)、約 5.0% (w/v)、約 5.1% (w/v)、約 5.2% (w/v)、約 5.3% (w/v)、約 5.4% (w/v)、約 5.5% (w/v)、約 5.6% (w/v)、約 5.7% (w/v)、約 5.8% (w/v)、約 5.9% (w/v)、約 6.0% (w/v)、約 6.1% (w/v)、約 6.2% (w/v)、約 6.3% (w/v)、約 6.4% (w/v)、約 6.5% (w/v)、約 6.6% (w/v)、約 6.7% (w/v)、約 6.8% (w/v)、約 6.9% (w/v)、約 7.0% (w/v)、約 7.1% (w/v)、約 7.2% (w/v)、約 7.3% (w/v)、約 7.4% (w/v)、約 7.5% (w/v)、約 7.6% (w/v)、約 7.7% (w/v)、約 7.8% (w/v)、約 7.9% (w/v)、約 8.0% (w/v)、約 8.1% (w/v)、約 8.2% (w/v)、約 8.3% (w/v)、約 8.4% (w/v)、約 8.5% (w/v)、約 8.6% (w/v)、約 8.7% (w/v)、約 8.8% (w/v)、約 8.9% (w/v)、約 9.0% (w/v)、約 9.1% (w/v)、約 9.2% (w/v)、約 9.3% (w/v)、約 9.4% (w/v)、約 9.5% (w/v)、約 9.6% (w/v)、約 9.7% (w/v)、約 9.8% (w/v)、約 9.9% (w/v)、または約 10% (w/v) の糖を含む。

10

【0089】

さまざまな実施形態では、本開示の組成物は、約 2.5% w/v ~ 約 7.5% w/v のスクロースを含む。いくつかの実施形態では、組成物は、4% w/v ~ 6% w/v のスクロースを含有する。いくつかの実施形態では、組成物は、5% w/v $\pm$ 0.5% w/v のスクロースを含有する。さまざまな実施形態では、本開示の組成物は、約 2.5% w/v ~ 約 7.5% w/v のトレハロースを含む。いくつかの実施形態では、組成物は、4% w/v ~ 6% w/v のトレハロースを含有する。いくつかの実施形態では、組成物は、5% w/v $\pm$ 0.5% w/v のトレハロースを含有する。

20

【0090】

E. 増量剤

【0091】

本開示の液体医薬製剤、凍結乾燥医薬組成物、および再構成医薬製品は、一つまたは複数の増量剤を含む。

【0092】

一つまたは複数の糖（例えば、約 1% ~ 約 10%）の含有は、本開示の液体および/または凍結乾燥製剤の安定性を改善する。例えば、本明細書で考察される増量剤は、安定性および再構成特性が改善された、より良好な凍結乾燥組成物の生成を可能にする。したがって、特定の実施形態では、本開示の医薬組成物は、約 1% ~ 約 10% の一つまたは複数の増量剤を含有する。さまざまな実施形態では、本開示の医薬組成物に含まれる増量剤は、マンニトール、グリシン、デキストラン、ポリビニルピロリドン、カルボキシメチルセルロース、ラクトース、ソルビトール、またはキシリトールなどのポリマーが挙げられ得るが、これらに限定されない。いくつかの実施形態では、増量剤はマンニトールである。いくつかの実施形態では、増量剤はグリシンである。

30

【0093】

増量剤は、個別にまたは組み合わせて使用されてもよい。いくつかの実施形態では、増量剤、またはその組み合わせは、約 1% ~ 約 10% (w/v)、約 1% (w/v) ~ 約 6% (w/v)、約 2% ~ 約 4% (w/v)、または約 3% (w/v) ~ 約 3.5% (w/v) の濃度で製剤または組成物中に存在する。いくつかの実施形態では、本開示の医薬組成物は、約 1.0% (w/v)、約 1.1% (w/v)、約 1.2% (w/v)、約 1.3% (w/v)、約 1.4% (w/v)、約 1.5% (w/v)、約 1.6% (w/v)、約 1.7% (w/v)、約 1.8% (w/v)、約 1.9% (w/v)、約 2.0% (w/v)、約 2.1% (w/v)、約 2.2% (w/v)、約 2.3% (w/v)、約 2.4% (w/v)、約 2.5% (w/v)、約 2.6% (w/v)、約 2.7% (w/v)、約 2.8% (w/v)、約 2.9% (w/v)、約 3.0% (w/v)、約 3.1%

40

50

(w/v)、約3.2%(w/v)、約3.3%(w/v)、約3.4%(w/v)、約3.5%(w/v)、約3.6%(w/v)、約3.7%(w/v)、約3.8%(w/v)、約3.9%(w/v)、約4.0%(w/v)、約4.1%(w/v)、約4.2%(w/v)、約4.3%(w/v)、約4.4%(w/v)、約4.5%(w/v)、約4.6%(w/v)、約4.7%(w/v)、約4.8%(w/v)、約4.9%(w/v)、約5.0%(w/v)、約5.1%(w/v)、約5.2%(w/v)、約5.3%(w/v)、約5.4%(w/v)、約5.5%(w/v)、約5.6%(w/v)、約5.7%(w/v)、約5.8%(w/v)、約5.9%(w/v)、約6.0%(w/v)、約6.1%(w/v)、約6.2%(w/v)、約6.3%(w/v)、約6.4%(w/v)、約6.5%(w/v)、約6.6%(w/v)、約6.7%(w/v)、約6.8%(w/v)、約6.9%(w/v)、約7.0%(w/v)、約7.1%(w/v)、約7.2%(w/v)、約7.3%(w/v)、約7.4%(w/v)、約7.5%(w/v)、約7.6%(w/v)、約7.7%(w/v)、約7.8%(w/v)、約7.9%(w/v)、約8.0%(w/v)、約8.1%(w/v)、約8.2%(w/v)、約8.3%(w/v)、約8.4%(w/v)、約8.5%(w/v)、約8.6%(w/v)、約8.7%(w/v)、約8.8%(w/v)、約8.9%(w/v)、約9.0%(w/v)、約9.1%(w/v)、約9.2%(w/v)、約9.3%(w/v)、約9.4%(w/v)、約9.5%(w/v)、約9.6%(w/v)、約9.7%(w/v)、約9.8%(w/v)、約9.9%(w/v)、または約100%(w/v)の増量剤を含む。

10

20

【0094】

さまざまな実施形態では、本開示の組成物は、約2%w/v～約4.5%w/vのマニトールを含む。いくつかの実施形態では、組成物は、3%w/v～3.5%w/vのマニトールを含有する。いくつかの実施形態では、組成物は、3.3%w/v±0.1%w/vのマニトールを含有する。さまざまな実施形態では、本開示の組成物は、約2%w/v～約4.5%w/vのグリシンを含む。いくつかの実施形態では、組成物は、3%w/v～3.5%w/vのグリシンを含有する。いくつかの実施形態では、組成物は、3.3%w/v±0.1%w/vのグリシンを含有する。

【0095】

F. 賦形剤の比率

30

【0096】

さまざまな実施形態では、本開示の液体医薬製剤、凍結乾燥医薬組成物、および再構成医薬製品は、組成物の安定性を強化するための特定の賦形剤の定義された比率を含む。いくつかの実施形態では、組成物は、特定の比率の増量剤と糖（増量剤：糖）を含む。いくつかの実施形態では、組成物は、特定の比率の二つの塩（第一の塩：第二の塩）を含む。

【0097】

いくつかの事例では、増量剤：糖の比は約1：1～1：10である。さまざまな実施形態では、増量剤：糖の比は、約1：1、約1：2、約1：3、約1：4、約1：5、約1：6、約1：7、約1：8、約1：9、約1：10、約2：3、約2：5、約2：7、約2：9、約3：4、約3：5、約3：7、約3：8、約3：10、約4：5、約4：7、約4：9、約5：6、約5：7、約5：8、約5：9、約6：7、約7：8、約7：9、約7：10、または約8：9である。いくつかの実施形態では、増量剤：糖の比は、約3.1：5、約3.2：5、約3.3：5、約3.4：5、または約3.5：5である。いくつかの事例では、増量剤：糖の比は3.3：5である。いくつかの事例では、増量剤はマンニトールであり、糖はスクロースであり、比は約1：1～1：10である。さまざまな実施形態では、マンニトール：スクロースの比は、約1：1、約1：2、約1：3、約1：4、約1：5、約1：6、約1：7、約1：8、約1：9、約1：10、約2：3、約2：5、約2：7、約2：9、約3：4、約3：5、約3：7、約3：8、約3：10、約4：5、約4：7、約4：9、約5：6、約5：7、約5：8、約5：9、約6：7、約7：8、約7：9、約7：10、または約8：9である。いくつかの実施形態では、

40

50

マンニトール：スクロースの比は、約 2.8 : 5、約 2.9 : 5、約 3.0 : 5、約 3.1 : 5、約 3.2 : 5、約 3.3 : 5、約 3.4 : 5、約 3.5 : 5、約 3.6 : 5、約 3.7 : 5、または約 3.8 : 5 である。いくつかの事例では、マンニトール：スクロースの比は 3.3 : 5 である。

【0098】

いくつかの事例では、第一の塩：第二の塩の比は、約 1 : 1 ~ 1 : 10 である。さまざまな実施形態では、第一の塩：第二の塩の比は、約 1 : 1、約 1 : 2、約 1 : 3、約 1 : 4、約 1 : 5、約 1 : 6、約 1 : 7、約 1 : 8、約 1 : 9、約 1 : 10、約 2 : 3、約 2 : 5、約 2 : 7、約 2 : 9、約 3 : 4、約 3 : 5、約 3 : 7、約 3 : 8、約 3 : 10、約 4 : 5、約 4 : 7、約 4 : 9、約 5 : 6、約 5 : 7、約 5 : 8、約 5 : 9、約 6 : 7、約 7 : 8、約 7 : 9、約 7 : 10、または約 8 : 9 である。いくつかの実施形態では、第一の塩：第二の塩の比は、約 2.5 : 8、約 2.6 : 8、約 2.7 : 8、約 2.8 : 8、約 2.9 : 8、約 3.0 : 8、約 3.1 : 8、約 3.2 : 8、約 3.3 : 8、約 3.4 : 8、または約 3.5 : 8 である。いくつかの事例では、第一の塩：第二の塩の比は、3 : 8 である。いくつかの事例では、第一の塩は塩化ナトリウムであり、第二の塩は L-アルギニン塩酸塩であり、比は約 1 : 1 ~ 1 : 10 である。さまざまな実施形態では、NaCl : L-アルギニン塩酸塩の比は、約 1 : 1、約 1 : 2、約 1 : 3、約 1 : 4、約 1 : 5、約 1 : 6、約 1 : 7、約 1 : 8、約 1 : 9、約 1 : 10、約 2 : 3、約 2 : 5、約 2 : 7、約 2 : 9、約 3 : 4、約 3 : 5、約 3 : 7、約 3 : 8、約 3 : 10、約 4 : 5、約 4 : 7、約 4 : 9、約 5 : 6、約 5 : 7、約 5 : 8、約 5 : 9、約 6 : 7、約 7 : 8、約 7 : 9、約 7 : 10、または約 8 : 9 である。いくつかの実施形態では、NaCl : L-アルギニン塩酸塩の比は、約 2.5 : 8、約 2.6 : 8、約 2.7 : 8、約 2.8 : 8、約 2.9 : 8、約 3.0 : 8、約 3.1 : 8、約 3.2 : 8、約 3.3 : 8、約 3.4 : 8、または約 3.5 : 8 である。いくつかの事例では、NaCl : L-アルギニン塩酸塩の比は、3 : 8 である。

10

20

【0099】

G. 追加の任意の成分

【0100】

本開示の液体医薬製剤、凍結乾燥医薬組成物、および再構成医薬製品はまた、任意選択で追加の成分を含み得る。例示的な実施形態では、製剤または医薬組成物は、以下のうちのいずれか一つまたは組み合わせを含む：酸性化剤、添加剤、吸着剤、空気置換剤、アルカリ化剤、固結防止剤、抗凝固剤、抗菌性防腐剤、酸化防止剤、防腐剤、基剤、結合剤、緩衝剤、キレート剤、コーティング剤、着色剤、乾燥剤、洗浄剤、希釈剤、消毒剤、崩壊剤、分散剤、溶解促進剤、染料、皮膚軟化剤、乳化剤、エマルション安定剤、充填剤、被膜形成剤、風味増強剤、香味剤、流動促進剤、ゲル化剤、造粒剤、保湿剤、潤滑剤、粘膜付着剤、軟膏基剤、軟膏、油性ビヒクル、有機基剤、錠剤基剤、顔料、可塑剤、研磨剤、保存剤、封鎖剤、可溶化剤、溶剤、安定化剤、表面活性剤、界面活性剤、懸濁化剤、甘味剤、治療剤、増粘剤、等張化剤、粘度増加剤、吸水剤、水混和性共溶剤、水軟化剤、または湿潤剤。

30

【0101】

凍結乾燥および組成物

凍結乾燥組成物は、上記または本明細書で考察される医薬製剤の凍結乾燥によって調製される。さまざまな態様では、本開示は、このような凍結乾燥組成物、および安定な凍結乾燥医薬組成物を生成する方法を含む。本明細書で考察される凍結乾燥 AAV 組成物を生成する方法の実施形態はまた、水性製剤を生成することを含んでもよく、これはその後凍結乾燥される。

【0102】

凍結乾燥プロセスは、一般に、(i) 凍結、(ii) アニール、(iii) 一次乾燥、および (iv) 二次乾燥を含む。いくつかの事例では、凍結は、 $-45^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$ の温度で 60 分 $\pm$ 10 分間実施される。いくつかの事例では、凍結は、アニールの前およ

40

50

び後の両方で実施される。いくつかの事例では、アニーリングは、 $-20^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$ の温度で6時間 $\pm$ 30分間実施される。いくつかの事例では、一次乾燥は、 $-26^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$ の温度で50時間 $\pm$ 10時間実施される。いくつかの事例では、二次乾燥は、 $35^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$ の温度で5 $\sim$ 20時間、または15時間 $\pm$ 5時間の間実施される。

【0103】

一実施形態では、rAAV試料をガラスバイアルに充填し、凍結乾燥チャンバー内に置く。試料は、最初に約 5°C で約60分間インキュベートされ、約 $0.5^{\circ}\text{C}/\text{分}$ のランプ速度で約 5°C $\sim$ 約 -45°C に冷却され、続いて約60分間等温保持され得る。アニーリングは、約 $0.5^{\circ}\text{C}/\text{分}$ のランプ速度で約 -20°C で約6時間実施され、約 $0.5^{\circ}\text{C}/\text{分}$ のランプ速度で約 -45°C に冷却され、続いて約60分間保持され得る。一次乾燥および二次乾燥の両方について約 $0.3^{\circ}\text{C}/\text{分}$ のランプ速度で、一次乾燥は、約50mTorrのチャンバー圧力下で約 -26°C で約50時間実施されてもよく、続いて、二次乾燥が、約100mTorr下で約 35°C で約10時間または15時間実施されてもよい。凍結乾燥サイクルの終了時に、試料は、大気圧の約80%の窒素ガスで再充填され、キャップされ、密封されてもよい。

10

【0104】

一実施形態では、rAAV試料をガラスバイアルに充填し、凍結乾燥チャンバー内に置く。試料は最初に、約 1°C $\sim$ 約 10°C の温度で約30分 $\sim$ 約90分間インキュベートされ、インキュベーション温度から約 -30°C $\sim$ 約 -60°C の凍結温度まで、約 $0.1^{\circ}\text{C}/\text{分}$ $\sim$ 約 $1^{\circ}\text{C}/\text{分}$ のランプ速度で冷却され、続いて約30分 $\sim$ 約90分間等温保持され得る。アニーリングは、約 -10°C $\sim$ 約 -30°C の温度で、約4時間 $\sim$ 約8時間の時間、約 $0.1^{\circ}\text{C}/\text{分}$ $\sim$ 約 $1^{\circ}\text{C}/\text{分}$ のランプ速度で実施されてもよく、次いで、試料を、約 $0.1^{\circ}\text{C}/\text{分}$ $\sim$ 約 $1^{\circ}\text{C}/\text{分}$ のランプ速度で約 -30°C $\sim$ 約 -60°C の温度に冷却し、続いて約30分 $\sim$ 約90分間保持してもよい。一次乾燥および二次乾燥の両方について約 $0.1^{\circ}\text{C}/\text{分}$ $\sim$ 約 $1^{\circ}\text{C}/\text{分}$ のランプ速度で、一次乾燥は、約 -20°C $\sim$ 約 -30°C の温度で、約40mTorr $\sim$ 約60mTorrのチャンバー圧力下で、約40時間 $\sim$ 約60時間実施されてもよく、続いて、二次乾燥が約 25°C $\sim$ 約 45°C の温度で、約75mTorr $\sim$ 約125mTorrの圧力下で、約5時間 $\sim$ 約20時間実施されてもよい。凍結乾燥サイクルの終了時に、試料は、大気圧の約70% $\sim$ 90%の窒素ガスで再充填され、キャップされ、密封されてもよい。

20

30

【0105】

いくつかの実施形態では、rAAV試料は、約 10°C 、約 9°C 、約 8°C 、約 7°C 、約 6°C 、約 5°C 、約 4°C 、約 3°C 、約 2°C 、約 1°C 、または約 0°C の温度で最初にインキュベートされる。このインキュベーションは、約10分 $\sim$ 約120分以上の期間保持されてもよい。いくつかの実施形態では、rAAV試料は、最初に、10分、20分、30分、40分、50分、60分、70分、80分、90分、100分、110分、または120分以上の期間インキュベートされる。

【0106】

凍結乾燥中、組成物（例えば、rAAV試料）の温度は、例えば、組成物中の水の凝固点を下回る温度に低下することがある。例えば、組成物の温度は、凍結乾燥プロセスの一部としての凍結中に、 0°C 以下、または -5°C 以下、または -10°C 以下、または -15°C 以下、または -20°C 以下、または -25°C 以下、または -30°C 以下、または -35°C 以下、または -40°C 以下、または -45°C 以下、または -50°C 以下、または -55°C 以下、または -60°C 以下、または -65°C 以下、または -70°C 以下に低減され得る。さまざまな実施形態では、rAAV試料は、約10分、15分、20分、25分、30分、35分、40分、45分、50分、55分、60分、65分、70分、75分、80分、85分、90分、またはそれ以上の時間、凍結温度（例えば、 -45°C ）で保持される。

40

【0107】

いくつかの実施形態では、アニーリングは、約 -10°C $\sim$ 約 -30°C の温度で実施され

50

る。いくつかの事例では、アニーリングは、約 -10°C 、約 -11°C 、約 -12°C 、約 -13°C 、約 -14°C 、約 -15°C 、約 -16°C 、約 -17°C 、約 -18°C 、約 -19°C 、約 -20°C 、約 -21°C 、約 -22°C 、約 -23°C 、約 -24°C 、約 -25°C 、約 -26°C 、約 -27°C 、約 -28°C 、約 -29°C 、または約 -30°C の温度で実施される。さまざまな実施形態では、試料は、約3時間～約9時間以上の時間アニーリング温度に維持される。いくつかの事例では、試料は、約3時間、約3.5時間、約4時間、約4.5時間、約5時間、約5.5時間、約6時間、約6.5時間、約7時間、約7.5時間、約8時間、約8.5時間、または約9時間以上の時間アニーリング温度に維持される。

【0108】

いくつかの実施形態では、追加の凍結は、アニーリング後に実施される。さまざまな実施形態では、この追加の凍結は、上記または本明細書で論じるように、ある温度およびある持続時間で実施され得る。例えば、rAAV試料は、約60分間、約 -45°C に還元され得る。

【0109】

一次乾燥は、凍結乾燥プロセスの一部として、約 -10°C ～約 -50°C の温度で、約1mTorr～約10Torrの圧力で、かつ約10時間～約200時間以上の間行われてもよい。

【0110】

いくつかの実施形態では、一次乾燥は、約 -20°C ～約 -30°C の温度で実施される。さまざまな実施形態では、一次乾燥は、約 -10°C 、約 -11°C 、約 -12°C 、約 -13°C 、約 -14°C 、約 -15°C 、約 -16°C 、約 -17°C 、約 -18°C 、約 -19°C 、約 -20°C 、約 -21°C 、約 -22°C 、約 -23°C 、約 -24°C 、約 -25°C 、約 -26°C 、約 -27°C 、約 -28°C 、約 -29°C 、または約 -30°C の温度で実施される。いくつかの事例では、一次乾燥は、約 -25°C の温度で実施される。いくつかの事例では、一次乾燥は、約 -26°C の温度で実施される。いくつかの事例では、一次乾燥は、約 -27°C の温度で実施される。

【0111】

いくつかの実施形態では、一次乾燥中に組成物を取り囲む圧力は、標準大気圧以下に低減される。例えば、組成物を取り囲む圧力は、100Torr以下、または10Torr以下、または1Torr以下、または500mTorr以下、または400mTorr以下、または300mTorr以下、または200mTorr以下、または100mTorr以下、または90mTorr以下、または80mTorr以下、または70mTorr以下、または60mTorr以下、または50mTorr以下、または40mTorr以下、または30mTorr以下、または20mTorr以下、または10mTorr以下、または5mTorr以下、または1mTorr以下に低減され得る。いくつかの事例では、組成物を取り囲む圧力は、約40mTorr～約60mTorr以下に低減される。いくつかの事例では、組成物を取り囲む圧力は、約45mTorr～約55mTorr以下に低減される。いくつかの事例では、組成物を取り囲む圧力は約50mTorrまで低減される。

【0112】

さまざまな実施形態では、一次乾燥は、約10時間～約200時間以上の間実施される。いくつかの事例では、一次乾燥は、約10時間、約15時間、約20時間、約25時間、約30時間、約35時間、約40時間、約45時間、約50時間、約55時間、約60時間、約65時間、約70時間、約75時間、約80時間、約85時間、約90時間、約95時間、約100時間、約120時間、約140時間、約160時間、約180時間、または約200時間以上の間実施される。いくつかの事例では、一次乾燥は、約40時間～約60時間の間実施される。いくつかの事例では、一次乾燥は、約45時間～約55時間の間実施される。いくつかの事例では、一次乾燥は、約50時間実施される。

【0113】

二次乾燥は、凍結乾燥プロセスの一部として、約 5°C ～約 65°C の温度で、約1mTorr

rr～約10 Torrの圧力で、かつ約1時間～約30時間以上の間行われてもよい。

【0114】

いくつかの実施形態では、二次乾燥は、約20℃～約-50℃の温度で実施される。さまざまな実施形態では、二次乾燥は、約10℃、約11℃、約12℃、約13℃、約14℃、約15℃、約16℃、約17℃、約18℃、約19℃、約20℃、約21℃、約22℃、約23℃、約24℃、約25℃、約26℃、約27℃、約28℃、約29℃、約30℃、約31℃、約32℃、約33℃、約34℃、約35℃、約36℃、約37℃、約38℃、約39℃、約40℃、約41℃、約42℃、約43℃、約44℃、約45℃、約46℃、約47℃、約48℃、約49℃、または約50℃の温度で実施される。いくつかの事例では、二次乾燥は、約30℃～約40℃の温度で実施される。いくつかの事例では、二次乾燥は、約35℃の温度で実施される。

10

【0115】

いくつかの実施形態では、二次乾燥中に組成物を取り囲む圧力は、標準大気圧未満に低減される。例えば、組成物を取り囲む圧力は、100 Torr以下、または10 Torr以下、または1 Torr以下、または500 mTorr以下、または400 mTorr以下、または300 mTorr以下、または200 mTorr以下、または100 mTorr以下、または90 mTorr以下、または80 mTorr以下、または70 mTorr以下、または60 mTorr以下、または50 mTorr以下、または40 mTorr以下、または30 mTorr以下、または20 mTorr以下、または10 mTorr以下、または5 mTorr以下、または1 mTorr以下に低減され得る。いくつかの事例では、組成物を取り囲む圧力は、約150 mTorr～約50 mTorr以下に低減される。いくつかの事例では、組成物を取り囲む圧力は、約125 mTorr～約75 mTorr以下に低減される。いくつかの事例では、組成物を取り囲む圧力は約100 mTorrまで低減される。

20

【0116】

さまざまな実施形態において、二次乾燥は、約1時間～約30時間以上の間実施される。いくつかの事例では、一次乾燥は、約1時間、約2時間、約3時間、約4時間、約5時間、約6時間、約7時間、約8時間、約9時間、約10時間、約11時間、約12時間、約13時間、約14時間、約15時間、約16時間、約17時間、約18時間、約19時間、約20時間、約21時間、約22時間、約23時間、約24時間、約25時間、約26時間、約27時間、約28時間、約29時間、または約30時間以上の間実施される。いくつかの事例では、一次乾燥は、約5時間～約20時間の間実施される。いくつかの事例では、一次乾燥は、約10時間実施される。いくつかの事例では、一次乾燥は、約15時間実施される。

30

【0117】

凍結乾燥プロセス中、ある温度から別の温度に変化する時、ランプ速度は約0.5℃/分であってもよい。さまざまな実施形態では、ランプ速度は、約0.1℃/分、約0.2℃/分、約0.3℃/分、約0.4℃/分、約0.5℃/分、約0.6℃/分、約0.7℃/分、約0.8℃/分、約0.9℃/分、または約1℃/分であってもよい。いくつかの事例では、ランプ速度は、約2℃/分、約3℃/分、約4℃/分、または約5℃/分であってもよい。

40

【0118】

さまざまな実施形態では、凍結乾燥プロセスは、水分含量が低い（例えば、3%未満の水分）凍結乾燥組成物を生成する。さまざまな実施形態では、凍結乾燥組成物は、カールフィッシャー（KF）滴定もしくは別の方法（例えば、以下に記載）で測定した場合、3.0%以下、2.9%以下、2.8%以下、2.7%以下、2.6%以下、2.5%以下、2.4%以下、2.3%以下、2.2%以下、2.1%以下、2.0%以下、1.9%以下、1.8%以下、1.7%以下、1.6%以下、1.5%以下、1.4%以下、1.3%以下、1.2%以下、1.1%以下、1.0%以下、0.9%以下、0.8%以下、0.7%以下、0.6%以下、0.5%以下、0.4%以下、0.3%以下、0.2%以下、

50

下、または 0.1% 以下の水分含量を有する。いくつかの実施形態では、凍結乾燥組成物は、カールフィッシャー滴定または別の方法（例えば、以下に記載）によって測定した場合、約 0.5%～約 0.8% の水分含量を有する。いくつかの実施形態では、凍結乾燥組成物は、カールフィッシャー滴定または別の方法（例えば、以下に記載）によって測定した場合、0.5%、0.55%、0.6%、0.65%、0.7%、0.75%、または 0.8% の水分含量を有する。特定の実施形態では、凍結乾燥組成物は、カールフィッシャー滴定によって測定した場合、3% 以下の水を有する。特定の実施形態では、凍結乾燥組成物は、カールフィッシャー滴定によって測定した場合、2% 以下の水を有する。特定の実施形態では、凍結乾燥組成物は、カールフィッシャー滴定によって測定した場合、1.5% 以下の水を有する。特定の実施形態では、凍結乾燥組成物は、カールフィッシャー滴定によって測定した場合、1% 以下の水を有する。特定の実施形態では、凍結乾燥組成物は、カールフィッシャー滴定によって測定した場合、0.9% 以下の水を有する。特定の実施形態では、凍結乾燥組成物は、カールフィッシャー滴定によって測定した場合、0.8% 以下の水を有する。特定の実施形態では、凍結乾燥組成物は、カールフィッシャー滴定によって測定した場合、0.7% 以下の水を有する。特定の実施形態では、凍結乾燥組成物は、カールフィッシャー滴定によって測定した場合、0.6% 以下の水を有する。特定の実施形態では、凍結乾燥組成物は、カールフィッシャー滴定によって測定した場合、0.5% 以下の水を有する。特定の実施形態では、凍結乾燥組成物は、カールフィッシャー滴定によって測定した場合、0.4% 以下の水を有する。特定の実施形態では、凍結乾燥組成物は、カールフィッシャー滴定によって測定した場合、0.3% 以下の水を有する。特定の実施形態では、凍結乾燥組成物は、カールフィッシャー滴定によって測定した場合、0.2% 以下の水を有する。組成物の水分含量を決定するための他の方法には、乾燥減量（LOD）（試料が特定の条件下で乾燥された時に試料中の水の量および揮発性物質を測定する）、電解質センサー（例えば、P2O5 センサーを使用）、圧電吸着、酸化物センサー、酸化アルミニウムセンサー、吸収分光法、および近赤外（NIR）が含まれるが、これらに限定されない。

10

20

30

40

50

【0119】

上述の凍結乾燥組成物の水分含量が低いため、凍結乾燥組成物は固体の形態であってもよい。いくつかの事例では、固体凍結乾燥組成物は粉末である。いくつかの事例では、凍結乾燥組成物は、長期間（例えば、同じ組成物の液体製剤と比較して）の組成物の保存を容易にし得る。例えば、凍結乾燥組成物は、上記または本明細書で論じるように、組成物が長期間実質的に安定である保存安定性組成物であってもよい。

【0120】

凍結乾燥組成物の再構成によって調製された再構成組成物（例えば、再構成医薬製品）も、本開示の範囲内に包含される。こうした再構成組成物は、例えば、注射または静脈内投与で対象に投与されてもよい。いくつかの実施形態では、対象への再構成組成物の投与前に、例えば、上述の固体凍結乾燥組成物を液体と組み合わせ、例えば、注射または静脈内投与による投与に適した液体組成物を提供し得る。いくつかの事例では、対象への組成物の投与前に、固体凍結乾燥組成物は、水（例えば、注射用水、WFI）または緩衝液／緩衝剤（例えば、上述のように）と組み合わせ、例えば、注射または静脈内投与による投与に適した水性組成物を提供し得る。例えば、凍結乾燥組成物は、水（例えば、注射用水、WFI）または緩衝液／緩衝剤（例えば、上述のように）で再構成されて、例えば、注射または静脈内投与による対象への投与に適した再構成用量単位を生成してもよい。

【0121】

さまざまな実施形態では、再構成用量単位は、生理学的条件に適合する pH を有する。いくつかの事例では、再構成用量単位の pH は、6～8 の範囲である。いくつかの事例では、再構成用量単位の pH は、6.5～7.5 の範囲である。例えば、再構成用量単位の pH は、7～7.5 の範囲であり得る。いくつかの事例では、再構成用量単位の pH は 7.0 である。いくつかの事例では、再構成用量単位の pH は 7.1 である。いくつかの事例では、再構成用量単位の pH は 7.2 である。いくつかの事例では、再構成用量単位の

pHは7.3である。いくつかの事例では、再構成用量単位のpHは7.4である。いくつかの事例では、再構成用量単位のpHは7.5である。

【0122】

再構成用量単位は、対象において所望の治療効果を生じさせるのに十分な量で計算された、本開示の所定の量のrAAV粒子を含み得る。対象に投与される再構成用量単位中のrAAV粒子の量は、治療される対象、罹患の重症度、および投与方法に依存し得る。例えば、再構成用量単位は、治療有効量で本明細書に開示されるように投与されるrAAV粒子の量を含み得る。

【0123】

本明細書で考察される凍結乾燥組成物の再構成は、1分以内に達成され得る。いくつかの事例では、凍結乾燥組成物の再構成は、30秒以下で達成される。いくつかの事例では、凍結乾燥組成物の再構成は、20秒以下で達成される。いくつかの事例では、凍結乾燥組成物の再構成は、15秒以下で達成される。さまざまな実施形態では、凍結乾燥組成物の再構成は、60秒以下、55秒以下、50秒以下、45秒以下、40秒以下、35秒以下、30秒以下、25秒以下、20秒以下、15秒以下、10秒以下、または5秒以下で達成される。例示的な態様では、再構成組成物は、可視粒子を含まないか、または実質的に含まない。

10

【0124】

製剤および組成物の安定性

本発明の医薬製剤および組成物は、高レベルの安定性を呈する。医薬製剤に関連して本明細書で使用される場合の「安定的」という用語は、医薬製剤内のAAV粒子が、規定時間量にわたる保管後に、許容可能な程度の構造および／もしくは機能ならびに／または生物学的活性を保持することを意味する。製剤は、その中に含有されるAAV粒子が、規定時間量にわたる保管後に、その保管前の構造および／もしくは機能ならびに／または生物学的活性の100%を維持しなくても、安定的であり得る。ある特定の状況下では、規定時間量にわたる保管後のAAV粒子の構造および／もしくは機能ならびに／または生物学的活性の約90%、約95%、約96%、約97%、約98%、または約99%の維持は、「安定的」とみなされ得る。

20

【0125】

指定された期間「後」の医薬製剤または組成物の安定性への言及は、安定性パラメータ（例えば、完全カプシド%、ベクターゲノム力価、または平均粒子サイズ）の測定が、指定された期間の終了時またはほぼ終了時に行われることを意味することを意図しており、医薬製剤または組成物が、その後に測定されたパラメータについて同じ程度の安定性を必ずしも維持することを意味することを意図していない。例えば、6か月後の特定の安定性への言及は、安定性の測定が、試験の開始後6か月またはほぼ6か月で行われることを意味する。凍結乾燥組成物を含む製剤中のAAV粒子の安定性を評価するための追加の方法は、以下に提示される実施例で実証される。

30

【0126】

凍結乾燥組成物の保存安定性は、規定の時間保存した後に、凍結乾燥組成物から調製された再構成組成物で評価することができる。

40

【0127】

いくつかの事例では、（例えば、再構成医薬製品として）再構成時に安定な凍結乾燥組成物は、動的光散乱によって決定される、約20nm～約40nmの平均粒子サイズを含む。いくつかの事例では、平均粒子サイズは、動的光散乱によって決定される、約25nm～約35nmである。さまざまな実施形態では、平均粒子サイズは、動的光散乱によって決定される、約20nm、約21nm、約22nm、約23nm、約24nm、約25nm、約26nm、約27nm、約28nm、約29nm、約30nm、約31nm、約32nm、約33nm、約34nm、約35nm、約36nm、約37nm、約38nm、約39nm、または約40nmであるか、またはそれ以下である。

【0128】

50

いくつかの事例では、安定な凍結乾燥組成物は、再構成時に（例えば、再構成医薬製品として）、凍結乾燥前の組成物中の平均粒子サイズと比較して、規定時間にわたって保存した後に、動的光散乱によって決定される、約 10 %、約 9 %、約 8 %、約 7 %、約 6 %、約 5 %、約 4 %、約 3 %、約 2 %、または約 1 % を超えて変化していない平均粒子サイズを含む。

【0129】

いくつかの事例では、安定な凍結乾燥組成物は、再構成時に（例えば、再構成医薬製品として）、陰イオン交換クロマトグラフィー（例えば、AEX-UPLC）によって決定される、少なくとも 80 % の完全カブシドを含む rAAV 粒子の集合体を含む。いくつかの事例では、安定な凍結乾燥組成物は、再構成時に、AEX-UPLC によって決定される、少なくとも 95 % の完全カブシドを含む rAAV 粒子の集合体を含む。いくつかの事例では、rAAV 粒子の集合体は、完全カブシドを含むか、または AEX-UPLC によって決定される、少なくとも 80 %、81 %、82 %、83 %、84 %、85 %、86 %、87 %、88 %、89 %、90 %、91 %、92 %、93 %、94 %、95 %、96 %、97 %、98 %、または 99 % の完全カブシドを含む。

10

【0130】

いくつかの事例では、安定な凍結乾燥組成物は、再構成時に（例えば、再構成医薬製品として）、AEX-UPLC によって決定される完全カブシドの割合を含む rAAV 粒子の集合体を含み、再構成組成物中の完全カブシドの割合は、凍結乾燥前の医薬製剤中の完全カブシドの割合の 10 % 以内である。いくつかの事例では、再構成医薬製品中の完全カブシドの割合は、凍結乾燥前の医薬製剤中の完全カブシドの割合の 2 % 以内である。いくつかの事例では、再構成医薬製品中の完全カブシドの割合は、凍結乾燥前の医薬製剤中の完全カブシドの割合の 1 % 以内である。いくつかの事例では、再構成医薬製品中の完全カブシドの割合は、凍結乾燥前の医薬製剤中の完全カブシドの割合の 0.5 % 以内である。さまざまな実施形態では、再構成医薬製品中の完全カブシドの割合は、AEX-UPLC によって決定される、凍結乾燥前の医薬製剤中の完全カブシドの割合の 10 % 以内、9 % 以内、8 % 以内、7 % 以内、6 % 以内、5 % 以内、4.5 % 以内、4 % 以内、3.5 % 以内、3 % 以内、2.5 % 以内、2 % 以内、1.5 % 以内、1 % 以内、0.75 % 以内、0.5 % 以内、または 0.25 % 以内である。

20

【0131】

いくつかの事例では、安定な凍結乾燥組成物は、再構成時に（例えば、再構成医薬製品として）、液滴デジタルポリメラーゼ連鎖反応（ddPCR）によって決定されるベクターゲノム力価を含み、これは凍結乾燥前の医薬製剤中に存在するベクターゲノム力価の 10 % 以内である。いくつかの事例では、ベクターゲノム力価は、凍結乾燥前の製剤中に存在するベクターゲノム力価の 7 % 以内である。いくつかの事例では、ベクターゲノム力価は、凍結乾燥前の製剤中に存在するベクターゲノム力価の 5 % 以内である。さまざまな実施形態では、安定な凍結乾燥組成物は、再構成時に（例えば、再構成医薬製品として）、ddPCR によって決定されるベクターゲノム力価を含み、これは凍結乾燥前の医薬製剤中に存在するベクターゲノム力価の 10 % 以内、9 % 以内、8 % 以内、7 % 以内、6 % 以内、5 % 以内、4 % 以内、3 % 以内、2 % 以内、または 1 % 以内である。

30

40

【0132】

上記または本明細書で考察されるさまざまな実施形態のいずれかでは、凍結乾燥組成物から調製された再構成組成物で評価される凍結乾燥組成物の保存安定性は、特定の温度で定義された期間保存した後に測定され得る。いくつかの事例では、期間は 1 か月である。いくつかの事例では、期間は 3 か月である。いくつかの事例では、期間は 6 か月である。さまざまな実施形態では、期間は、2 日、3 日、4 日、5 日、6 日、1 週間、2 週間、3 週間、1 か月、2 か月、3 か月、4 か月、5 か月、6 か月、7 か月、8 か月、9 か月、10 か月、11 か月、12 か月、15 か月、18 か月、21 か月、24 か月、30 か月、36 か月、42 か月、48 か月、または 5 年またはそれ以上である。さまざまな実施形態では、安定性パラメータは、-30 °C、-20 °C、-10 °C、-5 °C、0 °C、2 ~ 8 °C、5

50

℃、10℃、15℃、20℃、または25℃の温度で保存された期間（上述のように）後に測定され得る。いくつかの事例では、保存期間および温度は、2～8℃の温度で1か月である。いくつかの事例では、保存期間および温度は、2～8℃の温度で3か月である。いくつかの事例では、保存期間および温度は、2～8℃の温度で6か月である。

【0133】

いくつかの事例では、安定な凍結乾燥組成物は、再構成時に（例えば、再構成医薬製品として）、上記または本明細書で論じたように、凍結乾燥前の製剤で測定されたパラメータと同じ、または実質的に同じままの保存パラメータを有する。

【0134】

例示的な製剤および組成物

本発明の一態様によれば、医薬製剤は、（i）組換えアデノ随伴ウイルス（rAAV）粒子、（ii）約1mM～約20mMの濃度の緩衝剤、（iii）約10mM～約50mMの濃度の第一の塩、（iv）約20mM～100mMの濃度の第二の塩、（v）約1%w/v～約10%w/vの濃度の糖、（vi）約1%w/v～約6%w/vの濃度の増量剤、および（vii）約0.001%w/v～約0.1%w/vの濃度の界面活性剤を含み、製剤は約6.8～約7.8のpHを有する。

【0135】

いくつかの事例では、医薬製剤は、（i）組換えアデノ随伴ウイルス（rAAV）粒子、（ii）5mM～15mMの濃度のトリス緩衝液、（iii）20mM～40mMの濃度の塩化ナトリウム、（iv）30mM～90mMの濃度のL-アルギニン塩酸塩、（v）3%w/v～7%w/vの濃度のスクロース、（vi）2%w/v～5%w/vの濃度のマンニトール、（vii）0.005%w/v～0.015%w/vの濃度のポリソルベート80またはポロキサマー188を含み、製剤は7.1～7.5のpHを有する。

【0136】

いくつかの事例では、医薬製剤は、（i）AAV1血清型、AAV2血清型、AAV3血清型、AAV4血清型、AAV5血清型、AAV6血清型、AAV7血清型、AAV8血清型、AAV9血清型、およびAAV10血清型からなる群から選択される、組換えアデノ随伴ウイルス（rAAV）粒子、（ii）5mM～15mMの濃度のトリス緩衝液、（iii）20mM～40mMの濃度の塩化ナトリウム、（iv）30mM～90mMの濃度のL-アルギニン塩酸塩、（v）3%w/v～7%w/vの濃度のスクロース、（vi）2%w/v～5%w/vの濃度のマンニトール、（vii）0.005%w/v～0.015%w/vの濃度のポリソルベート80またはポロキサマー188を含み、製剤は7.1～7.5のpHを有する。

【0137】

いくつかの事例では、医薬製剤は、（i）血清型AAV1の組換えアデノ随伴ウイルス（rAAV）粒子、（ii）5mM～15mMの濃度のトリス緩衝液、（iii）20mM～40mMの濃度の塩化ナトリウム、（iv）30mM～90mMの濃度のL-アルギニン塩酸塩、（v）3%w/v～7%w/vの濃度のスクロース、（vi）2%w/v～5%w/vの濃度のマンニトール、（vii）0.005%w/v～0.015%w/vの濃度のポリソルベート80またはポロキサマー188を含み、製剤は7.1～7.5のpHを有する。

【0138】

いくつかの事例では、医薬製剤は、（i）血清型AAV5の組換えアデノ随伴ウイルス（rAAV）粒子、（ii）5mM～15mMの濃度のトリス緩衝液、（iii）20mM～40mMの濃度の塩化ナトリウム、（iv）30mM～90mMの濃度のL-アルギニン塩酸塩、（v）3%w/v～7%w/vの濃度のスクロース、（vi）2%w/v～5%w/vの濃度のマンニトール、（vii）0.005%w/v～0.015%w/vの濃度のポリソルベート80またはポロキサマー188を含み、製剤は7.1～7.5のpHを有する。

【0139】

いくつかの事例では、医薬製剤は、(i) 血清型 AAV8 の組換えアデノ随伴ウイルス (rAAV) 粒子、(ii) 5 mM ~ 15 mM の濃度のトリス緩衝液、(iii) 20 mM ~ 40 mM の濃度の塩化ナトリウム、(iv) 30 mM ~ 90 mM の濃度の L-アルギニン塩酸塩、(v) 3 % w/v ~ 7 % w/v の濃度のスクロース、(vi) 2 % w/v ~ 5 % w/v の濃度のマンニトール、(vii) 0.005 % w/v ~ 0.015 % w/v の濃度のポリソルベート 80 またはポロキサマー 188 を含み、製剤は 7.1 ~ 7.5 の pH を有する。

【0140】

いくつかの事例では、医薬製剤は、(i) 血清型 AAV9 の組換えアデノ随伴ウイルス (rAAV) 粒子、(ii) 5 mM ~ 15 mM の濃度のトリス緩衝液、(iii) 20 mM ~ 40 mM の濃度の塩化ナトリウム、(iv) 30 mM ~ 90 mM の濃度の L-アルギニン塩酸塩、(v) 3 % w/v ~ 7 % w/v の濃度のスクロース、(vi) 2 % w/v ~ 5 % w/v の濃度のマンニトール、(vii) 0.005 % w/v ~ 0.015 % w/v の濃度のポリソルベート 80 またはポロキサマー 188 を含み、製剤は 7.1 ~ 7.5 の pH を有する。

【0141】

いくつかの事例では、医薬製剤は、(i) 組換えアデノ随伴ウイルス (rAAV) 粒子、(ii) 10 mM ± 1 mM の濃度のトリス緩衝液、(iii) 30 mM ± 3 mM の濃度の塩化ナトリウム、(iv) 40 mM ± 5 mM または 80 mM ± 5 mM の濃度の L-アルギニン塩酸塩、(v) 5 % w/v ± 1 % w/v の濃度のスクロース、(vi) 3.3 % w/v ± 0.5 % w/v の濃度のマンニトール、(vii) 0.01 % w/v ± 0.002 % w/v の濃度のポリソルベート 80 またはポロキサマー 188 を含み、製剤は 7.3 ± 0.1 の pH を有する。

【0142】

いくつかの事例では、医薬製剤は、(i) AAV1 血清型、AAV2 血清型、AAV3 血清型、AAV4 血清型、AAV5 血清型、AAV6 血清型、AAV7 血清型、AAV8 血清型、AAV9 血清型、および AAV10 血清型からなる群から選択される、組換えアデノ随伴ウイルス (rAAV) 粒子、(ii) 10 mM ± 1 mM の濃度のトリス緩衝液、(iii) 30 mM ± 3 mM の濃度の塩化ナトリウム、(iv) 40 mM ± 5 mM または 80 mM ± 5 mM の濃度の L-アルギニン塩酸塩、(v) 5 % w/v ± 1 % w/v の濃度のスクロース、(vi) 3.3 % w/v ± 0.5 % w/v の濃度のマンニトール、(vii) 0.01 % w/v ± 0.002 % w/v の濃度のポリソルベート 80 またはポロキサマー 188 を含み、製剤は 7.3 ± 0.1 の pH を有する。

【0143】

いくつかの事例では、医薬製剤は、(i) 血清型 AAV1 の組換えアデノ随伴ウイルス (rAAV) 粒子、(ii) 10 mM ± 1 mM の濃度のトリス緩衝液、(iii) 30 mM ± 3 mM の濃度の塩化ナトリウム、(iv) 40 mM ± 5 mM または 80 mM ± 5 mM の濃度の L-アルギニン塩酸塩、(v) 5 % w/v ± 1 % w/v の濃度のスクロース、(vi) 3.3 % w/v ± 0.5 % w/v の濃度のマンニトール、(vii) 0.01 % w/v ± 0.002 % w/v の濃度のポリソルベート 80 またはポロキサマー 188 を含み、製剤は 7.3 ± 0.1 の pH を有する。

【0144】

いくつかの事例では、医薬製剤は、(i) 血清型 AAV5 の組換えアデノ随伴ウイルス (rAAV) 粒子、(ii) 10 mM ± 1 mM の濃度のトリス緩衝液、(iii) 30 mM ± 3 mM の濃度の塩化ナトリウム、(iv) 40 mM ± 5 mM または 80 mM ± 5 mM の濃度の L-アルギニン塩酸塩、(v) 5 % w/v ± 1 % w/v の濃度のスクロース、(vi) 3.3 % w/v ± 0.5 % w/v の濃度のマンニトール、(vii) 0.01 % w/v ± 0.002 % w/v の濃度のポリソルベート 80 またはポロキサマー 188 を含み、製剤は 7.3 ± 0.1 の pH を有する。

【0145】

10

20

30

40

50

いくつかの事例では、医薬製剤は、(i) 血清型 AAV8 の組換えアデノ随伴ウイルス (rAAV) 粒子、(ii) 10 mM ± 1 mM の濃度のトリス緩衝液、(iii) 30 mM ± 3 mM の濃度の塩化ナトリウム、(iv) 40 mM ± 5 mM または 80 mM ± 5 mM の濃度の L-アルギニン塩酸塩、(v) 5 % w/v ± 1 % w/v の濃度のスクロース、(vi) 3.3 % w/v ± 0.5 % w/v の濃度のマンニトール、(vii) 0.01 % w/v ± 0.002 % w/v の濃度のポリソルベート 80 または ポロキサマー 188 を含み、製剤は 7.3 ± 0.1 の pH を有する。

【0146】

いくつかの事例では、医薬製剤は、(i) 血清型 AAV9 の組換えアデノ随伴ウイルス (rAAV) 粒子、(ii) 10 mM ± 1 mM の濃度のトリス緩衝液、(iii) 30 mM ± 3 mM の濃度の塩化ナトリウム、(iv) 40 mM ± 5 mM または 80 mM ± 5 mM の濃度の L-アルギニン塩酸塩、(v) 5 % w/v ± 1 % w/v の濃度のスクロース、(vi) 3.3 % w/v ± 0.5 % w/v の濃度のマンニトール、(vii) 0.01 % w/v ± 0.002 % w/v の濃度のポリソルベート 80 または ポロキサマー 188 を含み、製剤は 7.3 ± 0.1 の pH を有する。

【0147】

いくつかの事例では、医薬製剤は、(i) 組換えアデノ随伴ウイルス (rAAV) 粒子、(ii) 5 mM ~ 15 mM の濃度のリン酸緩衝液、(iii) 20 mM ~ 40 mM の濃度の塩化ナトリウム、(iv) 30 mM ~ 90 mM の濃度の L-アルギニン塩酸塩、(v) 3 % w/v ~ 7 % w/v の濃度のスクロース、(vi) 2 % w/v ~ 5 % w/v の濃度のマンニトール、(vii) 0.005 % w/v ~ 0.015 % w/v の濃度のポリソルベート 80 または ポロキサマー 188 を含み、製剤は 7.1 ~ 7.5 の pH を有する。

【0148】

いくつかの事例では、医薬製剤は、(i) AAV1 血清型、AAV2 血清型、AAV3 血清型、AAV4 血清型、AAV5 血清型、AAV6 血清型、AAV7 血清型、AAV8 血清型、AAV9 血清型、および AAV10 血清型からなる群から選択される、組換えアデノ随伴ウイルス (rAAV) 粒子、(ii) 5 mM ~ 15 mM の濃度のリン酸緩衝液、(iii) 20 mM ~ 40 mM の濃度の塩化ナトリウム、(iv) 30 mM ~ 90 mM の濃度の L-アルギニン塩酸塩、(v) 3 % w/v ~ 7 % w/v の濃度のスクロース、(vi) 2 % w/v ~ 5 % w/v の濃度のマンニトール、(vii) 0.005 % w/v ~ 0.015 % w/v の濃度のポリソルベート 80 または ポロキサマー 188 を含み、製剤は 7.1 ~ 7.5 の pH を有する。

【0149】

いくつかの事例では、医薬製剤は、(i) 血清型 AAV1 の組換えアデノ随伴ウイルス (rAAV) 粒子、(ii) 5 mM ~ 15 mM の濃度のリン酸緩衝液、(iii) 20 mM ~ 40 mM の濃度の塩化ナトリウム、(iv) 30 mM ~ 90 mM の濃度の L-アルギニン塩酸塩、(v) 3 % w/v ~ 7 % w/v の濃度のスクロース、(vi) 2 % w/v ~ 5 % w/v の濃度のマンニトール、(vii) 0.005 % w/v ~ 0.015 % w/v の濃度のポリソルベート 80 または ポロキサマー 188 を含み、製剤は 7.1 ~ 7.5 の pH を有する。

【0150】

いくつかの事例では、医薬製剤は、(i) 血清型 AAV5 の組換えアデノ随伴ウイルス (rAAV) 粒子、(ii) 5 mM ~ 15 mM の濃度のリン酸緩衝液、(iii) 20 mM ~ 40 mM の濃度の塩化ナトリウム、(iv) 30 mM ~ 90 mM の濃度の L-アルギニン塩酸塩、(v) 3 % w/v ~ 7 % w/v の濃度のスクロース、(vi) 2 % w/v ~ 5 % w/v の濃度のマンニトール、(vii) 0.005 % w/v ~ 0.015 % w/v の濃度のポリソルベート 80 または ポロキサマー 188 を含み、製剤は 7.1 ~ 7.5 の pH を有する。

【0151】

いくつかの事例では、医薬製剤は、(i) 血清型 AAV8 の組換えアデノ随伴ウイルス

10

20

30

40

50

(rAAV) 粒子、(ii) 5 mM～15 mMの濃度のリン酸緩衝液、(iii) 20 mM～40 mMの濃度の塩化ナトリウム、(iv) 30 mM～90 mMの濃度のL-アルギニン塩酸塩、(v) 3 %w/v～7 %w/vの濃度のスクロース、(vi) 2 %w/v～5 %w/vの濃度のマンニトール、(vii) 0.005 %w/v～0.015 %w/vの濃度のポリソルベート80またはポロキサマー188を含み、製剤は7.1～7.5のpHを有する。

【0152】

いくつかの事例では、医薬製剤は、(i) 血清型AAV9の組換えアデノ随伴ウイルス(rAAV) 粒子、(ii) 5 mM～15 mMの濃度のリン酸緩衝液、(iii) 20 mM～40 mMの濃度の塩化ナトリウム、(iv) 30 mM～90 mMの濃度のL-アルギニン塩酸塩、(v) 3 %w/v～7 %w/vの濃度のスクロース、(vi) 2 %w/v～5 %w/vの濃度のマンニトール、(vii) 0.005 %w/v～0.015 %w/vの濃度のポリソルベート80またはポロキサマー188を含み、製剤は7.1～7.5のpHを有する。

10

【0153】

いくつかの事例では、医薬製剤は、(i) 組換えアデノ随伴ウイルス(rAAV) 粒子、(ii) 10 mM±1 mMの濃度のリン酸緩衝液、(iii) 30 mM±3 mMの濃度の塩化ナトリウム、(iv) 40 mM±5 mMまたは80 mM±5 mMの濃度のL-アルギニン塩酸塩、(v) 5 %w/v±1 %w/vの濃度のスクロース、(vi) 3.3 %w/v±0.5 %w/vの濃度のマンニトール、(vii) 0.01 %w/v±0.002 %w/vの濃度のポリソルベート80またはポロキサマー188を含み、製剤は7.3±0.1のpHを有する。

20

【0154】

いくつかの事例では、医薬製剤は、(i) AAV1血清型、AAV2血清型、AAV3血清型、AAV4血清型、AAV5血清型、AAV6血清型、AAV7血清型、AAV8血清型、AAV9血清型、およびAAV10血清型からなる群から選択される、組換えアデノ随伴ウイルス(rAAV) 粒子、(ii) 10 mM±1 mMの濃度のリン酸緩衝液、(iii) 30 mM±3 mMの濃度の塩化ナトリウム、(iv) 40 mM±5 mMまたは80 mM±5 mMの濃度のL-アルギニン塩酸塩、(v) 5 %w/v±1 %w/vの濃度のスクロース、(vi) 3.3 %w/v±0.5 %w/vの濃度のマンニトール、(vii) 0.01 %w/v±0.002 %w/vの濃度のポリソルベート80またはポロキサマー188を含み、製剤は7.3±0.1のpHを有する。

30

【0155】

いくつかの事例では、医薬製剤は、(i) 血清型AAV1の組換えアデノ随伴ウイルス(rAAV) 粒子、(ii) 10 mM±1 mMの濃度のリン酸緩衝液、(iii) 30 mM±3 mMの濃度の塩化ナトリウム、(iv) 40 mM±5 mMまたは80 mM±5 mMの濃度のL-アルギニン塩酸塩、(v) 5 %w/v±1 %w/vの濃度のスクロース、(vi) 3.3 %w/v±0.5 %w/vの濃度のマンニトール、(vii) 0.01 %w/v±0.002 %w/vの濃度のポリソルベート80またはポロキサマー188を含み、製剤は7.3±0.1のpHを有する。

40

【0156】

いくつかの事例では、医薬製剤は、(i) 血清型AAV5の組換えアデノ随伴ウイルス(rAAV) 粒子、(ii) 10 mM±1 mMの濃度のリン酸緩衝液、(iii) 30 mM±3 mMの濃度の塩化ナトリウム、(iv) 40 mM±5 mMまたは80 mM±5 mMの濃度のL-アルギニン塩酸塩、(v) 5 %w/v±1 %w/vの濃度のスクロース、(vi) 3.3 %w/v±0.5 %w/vの濃度のマンニトール、(vii) 0.01 %w/v±0.002 %w/vの濃度のポリソルベート80またはポロキサマー188を含み、製剤は7.3±0.1のpHを有する。

【0157】

いくつかの事例では、医薬製剤は、(i) 血清型AAV8の組換えアデノ随伴ウイルス

50

(r A A V) 粒子、(i i) 10 mM ± 1 mM の濃度のリン酸緩衝液、(i i i) 30 mM ± 3 mM の濃度の塩化ナトリウム、(i v) 40 mM ± 5 mM または 80 mM ± 5 mM の濃度の L-アルギニン塩酸塩、(v) 5 % w / v ± 1 % w / v の濃度のスクロース、(v i) 3.3 % w / v ± 0.5 % w / v の濃度のマンニトール、(v i i) 0.01 % w / v ± 0.002 % w / v の濃度のポリソルベート 80 または ポロキサマー 188 を含み、製剤は 7.3 ± 0.1 の pH を有する。

【0158】

いくつかの事例では、医薬製剤は、(i) 血清型 A A V 9 の組換えアデノ随伴ウイルス (r A A V) 粒子、(i i) 10 mM ± 1 mM の濃度のリン酸緩衝液、(i i i) 30 mM ± 3 mM の濃度の塩化ナトリウム、(i v) 40 mM ± 5 mM または 80 mM ± 5 mM の濃度の L-アルギニン塩酸塩、(v) 5 % w / v ± 1 % w / v の濃度のスクロース、(v i) 3.3 % w / v ± 0.5 % w / v の濃度のマンニトール、(v i i) 0.01 % w / v ± 0.002 % w / v の濃度のポリソルベート 80 または ポロキサマー 188 を含み、製剤は 7.3 ± 0.1 の pH を有する。

【0159】

上述のさまざまな医薬製剤のいずれかにおいて、界面活性剤は、ポリソルベート 80 である。上述のさまざまな医薬製剤のいずれかにおいて、界面活性剤は、ポリキサマー 188 である。

【0160】

さまざまな実施形態では、本開示は、上述の医薬製剤のうちのいずれか一つの凍結乾燥によって調製された凍結乾燥組成物、またはかかる凍結乾燥組成物のうちのいずれかを再構成することによって調製された再構成組成物（または医薬製品）を提供する。

【0161】

容器、キットおよび単位剤形

本開示は、本明細書で考察される製剤または組成物を収容するか、またはそれを含む容器およびキットを含む。いくつかの事例では、容器は、凍結乾燥前の医薬組成物、凍結乾燥組成物、または再構成組成物もしくは医薬製品を収容する。いくつかの事例では、容器は、ガラスバイアルである。本開示はまた、容器、および（例えば、以下で考察される治療用途における）使用説明書を含むキットを含む。

【0162】

例示的な態様では、A A V 粒子を含む組成物は、本明細書に記載されるように、ガラスまたはプラスチック容器、例えば、ガラスバイアル、またはプラスチック管中に収容される。例示的な実施形態では、ガラスまたはプラスチック容器は、当技術分野で公知のものの中のいずれか一つであるか、または市販されているものである。いくつかの事例では、本開示は、A A V 粒子を含む組成物の約 0.1 mL ~ 約 25 mL（例えば、約 1 mL ~ 約 10 mL）をガラスまたはプラスチック容器内に配置することを含む。

【0163】

容器内に組成物を提供することは、滅菌組成物として組成物を維持することを容易にし得る。例えば、容器は、容器内に封入された組成物を滅菌環境に維持するように構成されてもよい。このように、容器は密封容器であってもよく、例えば容器は水密および／または気密シールなどのシールを含んでもよい。シールは、ユーザーが容器の内容物にアクセスできるように、容器から取り外し可能であってもよい。いくつかの実例では、シールは壊れやすいシールであってもよく、または他の実例では、シールは、容器からシールを取り外すことなく、針、カニューレ、またはシリンジを容器の内部に挿入することを可能にするように構成されてもよい。いくつかの事例では、容器からシールを取り外すことなく容器の内部へのアクセスを可能にするように構成されたシールは、容器の内容物（例えば、容器内の組成物）を、対象への組成物の投与前に滅菌環境に維持することを容易にし得る。シールに好適な材料としては、例えば、シリコーンゴム、天然ゴム、スチレンブタジエンゴム、エチレン-プロピレンコポリマー、ポリクロロプレン、ポリアクリレート、ポリブタジエン、ポリウレタン、スチレンブタジエン、およびこれに類するもの、ならびに

それらの組み合わせなどのゴムまたはポリマーシールが挙げられるが、これらに限定されない。例えば、特定の実施形態では、シールは、針、シリンジ、またはカニューレによって穿刺可能な隔壁である。シールはまた、容器内の試料への便利なアクセス、ならびに容器の開口部を覆う保護バリアを提供し得る。いくつかの実例では、シールは、容器の開口部に適用され得る、ねじ式もしくはスナップオン式のキャップ、またはその他の適切なシール要素などの取り外し可能なシールである。例えば、ねじ式キャップは、試料が容器に加えられる前または後に開口部の上にねじ止めすることができる。

【0164】

いくつかの事例では、容器は単位用量容器である。単位用量容器は、対象への投与のための一つまたは複数の単位用量を含有する容器を指す。いくつかの実施形態では、単位用量容器は、対象に所望の効果をもたらすのに十分な量で計算された所定の量の対象組成物を含む。組成物の特定の実施形態は、正確な用量の個々の投与に適した単位用量容器で提供されてもよい。対象に投与される活性組成物の量は、治療される対象、罹患の重症度、および投与方法に依存し得る。例えば、単位用量容器は、本明細書に開示されるように投与される組成物の量が、治療される対象において所望の効果を達成するために有効な量で含まれていてもよい。特定の事例では、単位用量容器は、治療有効量のAAVを有する組成物を含む。特定の事例では、単位用量容器はバイアルである。いくつかの事例では、バイアルは、密封バイアルである（例えば、密封容器に関して上述したように）。

【0165】

容器は、AAVおよび組成物の他の成分と適合性がある任意の便利な材料から構成されてもよい。例えば、容器は、固体（例えば、凍結乾燥組成物）を含有するように構成された固体適合性容器とすることができる。いくつかの実例では、容器は、液体を含むように構成された液体適合性容器である。容器はまた、固体および液体適合性であってもよく、容器は固体および液体を含むように構成される。いくつかの事例では、容器内の液体は水性液体であってもよく、これらの事例では、容器は水性組成物と適合性であってもよい。

「適合性」とは、容器が、容器と接触する液体および／または組成物、または他の成分と実質的に不活性である（例えば、著しく反応しない）ことを意味する。適切な容器材料の例としては、ガラスおよびプラスチックが挙げられるが、これらに限定されない。例えば、容器は、ケイ酸ガラス、ホウケイ酸ガラス、ホウケイ酸ナトリウムガラス、熔融石英ガラス、熔融シリカガラスなどのガラスから構成されてもよいが、これらに限定されない。容器に適した容器材料のその他の例には、ポリプロピレン、ポリメチルペンテン、ポリテトラフルオロエチレン（PTFE）、ペルフルオロエーテル（PFE）、フッ素化エチレンプロピレン（FEP）、ペルフルオロアルコキシアリカン（PFA）、ポリエチレンテレフタレート（PET）、ポリエチレン（PE）、ポリエーテルエーテルケトン（PEEK）、ポリスチレンなどのプラスチックが含まれるが、これらに限定されない。特定の事例では、上述のように、容器はバイアルであり、そのためガラスバイアルであってもよい。上述のように、容器は密封容器であってもよく、そのため密封ガラスバイアルであってもよい。

【0166】

例示的な態様では、ガラスまたはプラスチック容器内に配置されたAAVを含む組成物の容量は、約0.1～約25ml、約0.1ml～約10ml、約0.1ml～約5ml、約0.2ml～約6ml、約0.2ml～約5ml、約0.25ml～約5ml、約2ml～約5ml、約2.5ml～約5ml、約3ml～約5ml、約4ml～約5ml、約5ml～約10ml、約6ml、約9ml、または約7ml～約8mlである。いくつかの事例では、容量は、約0.1ml、約0.2ml、約0.25ml、約0.3ml、約0.4、約0.5ml、約0.6ml、約0.7ml、約0.75ml、約0.8ml、約0.9ml、約1ml、約2ml、約2.5ml、約3ml、約3.5ml、約4ml、約4.5ml、約5ml、約5.5ml、約6ml、約6.5ml、約7ml、約7.5ml、約8ml、約8.5ml、約9ml、約9.5ml、または約10mlである。

【0167】

治療上の使用

本発明の医薬製剤および組成物は、とりわけ、遺伝子療法によって治療可能な任意の疾患または障害の治療、予防、および／または改善に有用である。例示的な実施形態では、本明細書で考察される医薬組成物は、障害を治療するのに有効な量で対象に投与することができる。

【0168】

本明細書に開示される組成物は、静脈内投与（例えば、ボラスとして、または一定期間にわたる連続注入によって）または注射による投与などの公知の方法を介して、投与のために製剤化され得る。ある特定の実施形態では、本明細書に提供されるAAV製剤は、全身的にまたは局所的に投与することができる。全身投与には、静脈内投与が含まれるが、これらに限定されない。局所投与には、皮下および筋肉内注射の投与が含まれるが、これらに限定されない。

【0169】

対象に投与する場合、液体または再構成用量単位は、再構成用量単位が 1×10^8 ウイルスゲノム（またはベクターゲノム）／ミリリットル（vg/ml）から 5×10^{15} vg/mlを送達するように、治療有効量のAAVを含み得る。

【0170】

特定の実施形態では、対象への液体または再構成用量単位の投与は、治療レジメンに従って実施される。例えば、いくつかの事例では、治療される対象は、医療従事者から治療レジメンを処方されている場合がある。いくつかの事例では、治療レジメンは、用量単位の単回投与を含む。概して、AAV医薬製品を投与された対象は、対象に投与されたAAVの血清型に対する抗薬物抗体を生成し、それによって、治療効果をもたらすための医薬製品の追加投与を妨げる。これは、rAAV医薬製品内に含まれる同じ目的遺伝子の追加投与を、異なるAAV血清型を使用して投与され得る可能性を排除するものではない。

【0171】

特定の実施形態では、本開示の再構成用量単位は、関連または無関連状態を治療するための他の活性剤の前、同時、または後に、例えば、併用療法で投与することができる。こうした追加療法の例としては、放射線療法、外科療法、および化学療法が挙げられる。他の活性剤と同時に提供される場合、本開示の再構成用量単位は、同じ製剤または異なる製剤で提供され得る。例えば、同時療法は、再構成用量単位および化学療法剤などの少なくとも一つの他の活性剤を有する医薬組成物を投与することによって達成され、これらを組み合わせて、特定の治療レジメンに従って治療有効用量を提供することができる。別個の医薬組成物の投与は、治療を受けている対象においてこれらの物質の組み合わせの治療有効効果が引き起こされる限り、同時に、または異なる時間に（例えば、順次、いずれかの順序で、同じ日に、または異なる日に）実施することができる。

【0172】

したがって、本開示の態様は、併用療法をさらに含む。併用療法とは、AAV組成物（例えば、本明細書に記載される）を別の治療剤と組み合わせて使用して、単一の疾患または状態を治療することができることを意味する。特定の実施形態では、本開示のAAV製剤または組成物は、別の治療剤の投与と同時に投与され得る。特定の実施形態では、本開示のAAV製剤または組成物は、別の治療剤の投与の前または後に投与することができる。特定の実施形態では、併用療法は、異なる血清型および／または異なる目的の遺伝子を含む二つ以上のAAV組成物を含む。

【実施例】

【0173】

以下の実施例は、本発明の方法および組成物をどのように作製し使用するかという完全な開示および説明を当業者に提供するように記載され、発明者がその発明とみなすものの範囲を限定することを意図していない。使用される数字（例えば、量、温度など）に関して正確性を確保するための努力がなされているが、いくつかの実験誤差および偏差を考慮

10

20

30

40

50

に入れるべきである。別段の指示がない限り、部は重量部、分子量は平均分子量、温度は摂氏、圧力は大気圧または大気圧付近である。

【0174】

実施例1：凍結乾燥前製剤スクリーニング試験

この試験は、凍結乾燥に適しており、25℃で最大2日間まで液体安定性を有する可能性のある製剤をスクリーニングするように設計された。

【0175】

表1に示される各々の製剤の約3mLを調製した。層流フード内で、各製剤を、0.2μmフィルターを使用してフィルター滅菌し、0.7mLの目標充填容量になるよう2RRTUガラスバイアルに分注した。すべてのバイアルをゴムストッパーで密封した。各製剤を少なくとも二バイアル用意した。

【0176】

【表1】

表1：製剤

製剤	AAV8、 vg/mL	リン酸、 mM	スクロース %、w/v	P188 %、w/v	マンニトール、 mM(3.3%w/v)	NaCl、 mM	L-アルギニン HCl、mM	pH
F1	1.00E+13	10	1.2	0.005	180	80	0	7.3
F2	1.00E+13	10	1.2	0.005	180	50	0	7.3
F3	1.00E+13	10	1.2	0.005	180	30	0	7.3
F4	1.00E+13	10	1.2	0.005	180	30	80	7.3
F5	1.00E+13	10	1.2	0.005	180	30	50	7.3
F6	1.00E+13	10	1.2	0.005	180	30	30	7.3
F7	1.00E+13	10	5.0	0.005	180	30	80	7.3
F8-1	1.00E+13	10	5.0	0.005	180	0	110	7.3

【0177】

動的光散乱(DLS)による粒子サイズ分布を、ZEN2112低容量石英キュベットを用いた90度側方散乱を使用して、Zetasizer Ultraシステム(Malvern、マサチューセッツ州ウェストボロー)で行った。試料当たり五回の反復測定を収集し、各反復測定に対して、それぞれ10秒間、10回の取得が行われた。

【0178】

データは、スクロースおよびマンニトールがAAV8と適合性があり、AAV8凝集体の形成を誘導しなかったことを実証した。製剤F1、F4、およびF7は、25℃および60%の相対湿度でt=0および2日間の両方で、同等の動的光散乱(DLS)結果(約25nm)を示した(他の試料は、可逆的凝集の可能性を示した)。DLSアッセイは、25℃/60%RHに2日間曝露した後、すべての製剤が安定であることを示した。さらに、製剤F7について、25℃/60%RHで2日間インキュベーションしても、明らかな回収損失(ddPCRによる)または純度変化(AEX-UPLCによるカプシドの空対完全比)は観察されなかった。

【0179】

実施例2：凍結乾燥実現可能性試験

この試験は、AAV8凍結乾燥プロセス開発のために提案された七つの製剤の凍結乾燥プロセスの実行可能性を評価するように設計された。

【0180】

スクロースを凍結保護剤として使用し、マンニトール(3.3%w/v)を増量剤として使用した。L-アルギニンHClおよびNaClの濃度(0mM、30mM、50mMおよび80mM)を変えた製剤と、二つの濃度のスクロース(1.2%w/vおよび5%w/v)、および0.005%w/vのP188を有する製剤を使用して、凍結乾燥設計

を評価した。本試験で評価した七つの製剤を表 2 に示す。

【 0 1 8 1 】

【表 2】

表 2：凍結乾燥製剤

製剤	AAV8、 vg/mL	リン酸、 mM	スクロース %、w/v	P188 %、w/v	マンニトール、 mM	NaCl、 mM	L-アルギニン HCl、mM	pH
F1	1.00E+13	10	1.2	0.005	180	80	0	7.3
F2	1.00E+13	10	1.2	0.005	180	50	0	7.3
F3	1.00E+13	10	1.2	0.005	180	30	0	7.3
F4	1.00E+13	10	1.2	0.005	180	30	80	7.3
F5	1.00E+13	10	1.2	0.005	180	30	50	7.3
F6	1.00E+13	10	1.2	0.005	180	30	30	7.3
F7	1.00E+13	10	5.0	0.005	180	30	80	7.3

10

【 0 1 8 2 】

層流フード内で、各製剤を、0.2 μ m フィルターを使用してフィルター滅菌し、0.4 mL の目標充填容量になるよう 2 mL ガラスバイアルに分注した。すべてのバイアルをゴムストッパーで密封した。各製剤を少なくとも 10 バイアル用意した。各製剤の T c 崩壊温度または T e u 共晶温度は、凍結乾燥顕微鏡によって測定される。

20

【 0 1 8 3 】

各凍結乾燥サイクルのロードは、70 本の 2 mL ガラスバイアルを含み、各製剤 F 1 ~ F 7 につき 10 本のバイアルであった。各製剤と一緒にグループ化した。バイアルを水分含量、ケーキの外観、および T g (ガラス転移) 分析について評価した。動的光散乱を使用して、AAV 製品の主要な分解経路である凝集を検出した。

【 0 1 8 4 】

凍結乾燥サイクルを、以下の表 3 に示す。

【 0 1 8 5 】

30

40

50

【表 3】

表 3：凍結乾燥サイクル

初期保持：	5℃で60分間
凍結ランプ速度：	0.5℃/分
保持：	-45℃で60分間
加熱ランプ速度（アニーリング）：	0.5℃/分
アニーリング：	-20℃で6時間
凍結ランプ速度：	0.5℃/分
保持：	-45℃で120分間
真空設定点：	100mTorr
加熱ランプ速度（一次乾燥）：	0.3℃/分
一次乾燥の温度：	-26℃
一次乾燥の長さ：	50時間
二次乾燥の温度：	35℃ 100mTorr
二次乾燥のランプ速度：	0.3℃/分
二次乾燥の長さ：	10時間
真空下での停止：	608,000mTorr (大気圧80%)
再充填ガスが必要か？	要 ガス： 窒素

10

20

【0186】

FTS LyoStar（商標）3凍結乾燥機（SP Scientific、ニューヨーク州ストーンリッジ）を使用して凍結乾燥実験を実施した。上述のように、すぐに使用できる（RTU）I型ガラスバイアル（SCHOTT、ドイツ、ミュールハイム）を凍結乾燥棚に入れた。二本のワイヤ熱電対（Omega、コネチカット州ノーウォーク）を使用して、凍結乾燥プロセス全体を通してプラセボ製品の温度プロファイルを監視した。試料は、最初に5℃で60分間インキュベートされ、0.5℃/分のランプ速度で5℃〜-45℃に冷却され、続いて60分間等温保持した。アニーリングは、0.5℃/分のランプ速度で-20℃で6時間実施され、0.5℃/分のランプ速度で-45℃に冷却され、続いて60分間保持した。一次乾燥および二次乾燥の両方について0.3℃/分の加熱ランプ速度で、一次乾燥は、100mTorrのチャンバー圧力で-26℃で50時間、続いて、二次乾燥が、100mTorr下で35℃で10時間であった。凍結乾燥サイクルの終了時に、試料を、80%大気圧の窒素ガスで再充填し、13mmのFluorotec（登録商標）クロロブチルストッパーでキャップし、13mmのアルミニウムフリップオフシール（West、ペンシルバニア州ジャージーショア）で密封した。

30

【0187】

凍結乾燥製品の色およびケーキの外観を目視検査によって評価した。

【0188】

液体製剤の最大凍結濃縮溶液のガラス転移温度 T_g' および固体凍結乾燥製剤のガラス転移温度 T_g を、DSC2500（TA Instruments、デラウェア州ニューキャッスル）で決定した。 T_g' を決定するために、40 μ Lの試料溶液をTzeroパンにピペティングし、Tzero密封蓋で十分に密封した。 T_g を決定するために、凍結乾燥試料を粉碎し、湿度制御された室内で調製して、試料調製中の試料への水分の混入を最小限にした。次いで、試料粉末をTzeroパンに移し、Tzero密封蓋で十分に密封した。試料を-80℃で平衡化し、5分間等温を保持した後、60秒毎に0.5℃ずつ調整して、2℃/分で25℃まで上昇させた。データ分析はTRIOSで実施した。

40

【0189】

製剤の崩壊温度（ T_c ）を、偏光フィルターおよびオリンパスカメラを備えたLyoS

50

t a t 3凍結乾燥顕微鏡 (L i n k a m S c i e n t i f i c、英国ウォーターフィールド) で決定した。約5 u Lの試料溶液を、顕微鏡下の冷却段階に置かれたガラスカバースリップ上に載せた。試料をまず-45℃まで凍結させ、続いて真空下(100 m T o r r) で1℃/分で0℃まで加熱した。L i n s y s 3 2ソフトウェアを使用して画像を取得し、エクスポートし、T cを決定するために使用した。

【0190】

凍結乾燥試料の残留水分含量を、V a p o r P r o R X水分分析器および乾燥空気発生器 (A r i z o n a I n s t r u m e n t、アリゾナ州チャンドラー) を使用して決定した。分析前に、凍結乾燥ケーキを密封ガラスバイアル内で小片に分解した。気流量を75 mL / 分に設定し、乾燥温度を75℃に設定した。残留水分含量の割合を計算するために、残留水分の測定重量を凍結乾燥ケーキの重量で割った。

10

【0191】

動的光散乱 (D L S) による粒子サイズ分布を、Z E N 2 1 1 2低容量石英キュベットを用いた90度側方散乱を使用して、Z e t a s i z e r U l t r aシステム (M a l v e r n、マサチューセッツ州ウェストボロー) で行った。試料当たり五回の反復測定を収集し、各反復測定に対して、それぞれ10秒間、10回の取得が行われた。七つの製剤の各々についてのD L Sアッセイの結果を図2に示す。評価した七つの製剤のうち、F 7は、凍結乾燥前試料と比較して、サイズ分布プロファイルで最小限の変化を示した唯一の製剤であった。

20

【0192】

実施例3：緩衝液スクリーニング試験

【0193】

T r i s緩衝液対リン酸ナトリウム緩衝液を使用したr A A V 8の製剤の安定性の評価を行った。凝集体を特定するための平均粒子サイズを凍結乾燥前および凍結乾燥後の両方で決定し、完全カプシドの%を凍結乾燥前および凍結乾燥後に決定し、ウイルスゲノムの力価を凍結乾燥前および凍結乾燥後に決定した。凍結乾燥を、実施例2で上述したように行った。

【0194】

r A A V 8カプシドは、治療用途のための目的の遺伝子 (G O I) を含有した。r A A V 8ベクターは、R e g e n e r o n P h a r m a c e u t i c a l s (ニューヨーク州タリータウン) でH E K 2 9 3細胞の三重トランスフェクションにより作製された。

30

【0195】

リン酸ナトリウム製剤は、1.00E13 v g / m Lのr A A V 8-G O I、p H 7.3で10 mMのリン酸ナトリウム、0.005 % w / vのP 1 8 8、5 % w / vのスクロース、3.3 % w / vのマニトール、30 mMのN a C l、および80 mMのL-アルギニン塩酸塩を含有した。トリス製剤は、1.00E13 v g / m Lのr A A V 8-G O I、p H 7.3で10 mMのトリス緩衝液、0.005 % w / vのP 1 8 8、5 % w / vのスクロース、3.3 % w / vのマニトール、30 mMのN a C l、および80 mMのL-アルギニン塩酸塩を含有した。

【0196】

動的光散乱 (D L S) による粒子サイズ分布を、Z E N 2 1 1 2低容量石英キュベットを用いた90度側方散乱を使用して、Z e t a s i z e r U l t r aシステム (M a l v e r n、マサチューセッツ州ウェストボロー) で行った。試料当たり五回の反復測定を収集し、各反復測定に対して、それぞれ10秒間、10回の取得が行われた。

40

【0197】

空対完全カプシドの比を、P D AおよびF R R検出器を備えたW a t e r s A c q u i t y U P L C H-C l a s sシステム (W a t e r s、マサチューセッツ州ミルフォード) およびC I M a c A A V空/完全0.1 mL、1.3 μm分析カラム (B I A S e p a r a t i o n、スロベニア) を用いた陰イオン交換超高速液体クロマトグラフィー (A E X-U P L C) によって決定した。空および完全カプシドを、p H 8.5のビス

50

ートリスプロパンおよびテトラメチルアンモニウムクロリドを含有する直線勾配を使用して、0.8 mL/分で溶出した。Waters Empower クロマトグラフィーデータシステムを使用して、ピークの特定および統合を実施した。

【0198】

ベクターゲノム力価は、QX200 Droplet Digital PCR (ddPCR) システム (BioRad、カリフォルニア州ハーキュリーズ) を使用して定量した。AAV 試料を三重に調製し、DNase I (Ambion Part No. AM2224) で消化して、非封入 DNA を除去し、続いて、プロテイナーゼ K (Invitrogen Part No. 25530049) で消化してカプシドを破壊した。次いで、プライマーおよびプローブセットを含有する ddPCR マスターミックスを加え、反応混合物と混合した。その後、22 μ L のアリコートを除くし、液滴分配のために液滴発生器に導入した。液滴生成後、液滴中に含まれるベクターゲノム DNA を PCR で増幅し、液滴リーダー上の QuantaSoft ソフトウェアで分析した。

10

【0199】

凍結乾燥前後の安定性評価の結果を以下の表 5 に示す。

【0200】

【表 4】

表 5：リン酸ナトリウム緩衝液対トリス緩衝液の安定性評価

製剤	DLS Z-Avg、 (nm)	AEX % 完全カプシド	ddPCR 力価 (vg/mL)	力価回収率%
NaPB-F7 (凍結乾燥前)	25	97.4	6.04E+12	100.0
NaPB-F7 (凍結乾燥後)	35	95.7	5.48E+12	90.6
トリス-F1 (凍結乾燥前)	27	97.8	8.20E+12	100.0
トリス-F1 (凍結乾燥後)	31	97.7	7.69E+12	93.7

20

30

【0201】

安定性評価の結果は、凍結乾燥後のトリス緩衝液で優れた結果を示した。平均粒子サイズの違いは、以下の実施例 7 でより詳細に論じるように、AAV 粒子の凝集ではなく、再構成組成物中のナノバブルの結果であると考えられる。

【0202】

実施例 4：糖および塩の濃度の評価

スクロース濃度、ならびに NaCl およびアルギニン HCl の濃度の評価を行い、rAAV8-GOI 安定性への影響を判断した。以下の表 6 に示す八つの製剤を評価した。これらの八つの製剤の凍結乾燥を、実施例 2 で上述したように行った。

【0203】

40

50

【表 5】

表 6：製剤

製剤	AAV8、 vg/mL	リン酸、 mM	スクロース %、w/v	P188%、 w/v	マンニトール、 w/v	NaCl、 mM	L-アルギニン HCl、mM	pH
F1	1.00E+13	10	1.2	0.005	3.3	80	0	7.3
F2	1.00E+13	10	1.2	0.005	3.3	50	0	7.3
F3	1.00E+13	10	1.2	0.005	3.3	30	0	7.3
F4	1.00E+13	10	1.2	0.005	3.3	30	80	7.3
F5	1.00E+13	10	1.2	0.005	3.3	30	50	7.3
F6	1.00E+13	10	1.2	0.005	3.3	30	30	7.3
F7	1.00E+13	10	5.0	0.005	3.3	30	80	7.3
F8-1	1.00E+13	10	5.0	0.005	3.3	0	110	7.3

10

【0204】

動的光散乱（DLS）による凍結乾燥前後両方の粒子サイズ分布を、ZEN2112低容量石英キュベットを用いた90度側方散乱を使用して、Zetasizer Ultraシステム（Malvern、マサチューセッツ州ウェストボロー）で行った。試料当たり五回の反復測定を収集し、各反復測定に対して、それぞれ10秒間、10回の取得が行われた。

20

【0205】

結果を、以下の表7に示す。

【0206】

【表 6】

表 7：凍結乾燥前後の製剤の粒子サイズ分布

製剤	バリエーション賦形剤	DLSによるZ平均(nm) 凍結乾燥前AAV	DLSによるZ平均(nm) 凍結乾燥後AAV
F1	80mM NaCl、1.2%スクロース	29.8	59.3
F2	50mM NaCl、1.2%スクロース	43.3	70.8
F3	30mM NaCl、1.2%スクロース	32.0	67.6
F4	30mM NaCl、80mM L-Arg、 1.2%スクロース	25.1	164.4
F5	30mM NaCl、50mM L-Arg、1.2% スクロース	27.1	54.2
F6	30mM NaCl、30mM L-Arg、1.2% スクロース	30.2	54.6
F7	30mM NaCl、80mM L-Arg、5% スクロース	24.7	34.9
F8-1	110mM L-Arg HCl、5%スクロース	43.0	116.4

30

40

【0207】

30mMのNaCl、80mMのL-Arg HCl、および5%のスクロースを含む製剤F7は、試験した製剤の中で粒子サイズの増加が最も少なかった。この製剤はまた、凝集の兆候なしに、25℃で2日間、良好な溶液中安定性を示した。観察された粒子サイズ分布の違いは、以下の実施例7でより詳細に論じるように、AAV粒子の凝集ではなく、再構成組成物中のナノバブルの結果であると考えられる。

【0208】

50

凍結乾燥後の製剤 F 7 中の残留水分含量を分析したところ、水分含量は 0.7% であった。残留水分含量を、Vapor Pro RX 水分分析器および乾燥空気発生器 (Arizona Instrument、アリゾナ州チャンドラー) を使用して決定した。分析前に、凍結乾燥ケーキを密封ガラスバイアル内で小片に分解した。気流量を 75 mL/分に設定し、乾燥温度を 75℃ に設定した。残留水分含量の割合を計算するために、残留水分の測定重量を凍結乾燥ケーキの重量で割った。

【0209】

製剤 (F 7) の T_c および T_g ' を、それぞれ -34℃ および -43℃ として決定された凍結乾燥顕微鏡および DSC を使用して測定した。結果を図 6A ~ 図 6B に示す。

【0210】

図 9A および図 9B に示されるように、製剤中の総イオン強度を 80 mM に減少させることは、凍結乾燥後の v_g 力価回収の大幅な減少 (約 18%) をもたらした。2 mM の塩化マグネシウムの添加は、v_g 力価回復を約 6% 改善するのに役立ったが、対照製剤で達成されたものと比較して、凍結乾燥後の v_g 力価回収において同等の安定化効果を示さなかった。この観察は、塩が凍結乾燥中に結晶化し、乾燥形態のタンパク質を安定化させる前提条件である非晶質基質に留まらないため、塩が凍結乾燥医薬製品中のタンパク質にとって効果的な安定剤にはならないのではないかという仮定に基づく予想外のものではあった。これらの結果は、約 110 mM の総イオン強度を有する塩が、凍結乾燥 AAV 8 製剤に安定化効果を提供することが確認された。

【0211】

実施例 5：凍結乾燥製品に対する増量剤および濃度の影響

r AAV 8 - GOI 凍結乾燥製品に対するマンニトールの影響、ならびにマンニトール、スクロース、および塩の濃度の評価を行った。

【0212】

マンニトールを含む、および含まない製剤を凍結乾燥し、実施例 2 で上述したように、外観、再構成時間、および残留水分含量について評価した。二つの評価された製剤を、評価の結果とともに以下の表 8 に示す。

【0213】

【表 7】

表 8：凍結乾燥製剤に対する増量剤の影響

製剤	説明	ケーキの外観	再構成時間 (秒)	再構成後の外観	水分%
BA1	1E13 vg/ml AAV8、pH 7.3 での 10 mM リン酸ナトリウム、80 mM NaCl、0.01% w/v P188、10% w/v スクロース	オフホワイトの均一なケーキ、著しい収縮	58	透明、目に見える粒子なし	2.0
BA2	1E13 vg/ml AAV8、pH 7.3 での 10 mM リン酸ナトリウム、80 mM NaCl、0.01% w/v P188、5% w/v スクロース、3.3% w/v マンニトール	オフホワイトの均一なケーキ、ケーキ底部でわずかな収縮があるが、容積の明らかな減少なし	15	透明、目に見える粒子なし	0.7

【0214】

マンニトールの存在は、図 5 に示すように、ケーキの外観を改善し、残留水分含量を低減した。

【0215】

さまざまな濃度のマンニトール、スクロース、NaCl、アルギニン-HCl、およびMgCl₂がrAAV8-GOI製剤に及ぼす影響も評価した。六つの評価された製剤を以下の表9に示す。すべての製剤は、1E13 AAV8-GOI、0.02% w/v P188、およびpH7.3での10mM トリスを含有した。

【0216】

【表8】

表9：スクロース／マンニトールおよび塩スクリーニング試験製剤

製剤	マンニトール (% w/v)	スクロース (% w/v)	NaCl (mM)	Arg-HCl (mM)	MgCl ₂ (mM)
SM1	7.0	5.0	80	0	0
SM2	7.0	5.0	80	0	2
SM3	7.0	5.0	40	40	0
SM4	7.0	7.0	80	0	0
SM5	0	10.0	80	0	0
SM6	3.3	5.0	80	0	0

10

【0217】

結果は、これらの成分の濃度を変化させることが、同等の安定性結果をもたらすことを示すと予想される。

【0218】

実施例6：界面活性剤スクリーニング試験

ポロキサマー188 (P188) またはポリソルベート80 (PS80) をさまざまな濃度で使用して、rAAV8の製剤の安定性の評価を実施した。凝集体を特定するための平均粒子サイズを凍結乾燥前および凍結乾燥後の両方で決定し、実施例3で上述したように、完全カプシドの%を凍結乾燥前および凍結乾燥後に決定し、ウイルスゲノムの回収%を凍結乾燥前および凍結乾燥後に決定した。凍結乾燥を、実施例2で上述したように行った。

30

【0219】

第一の試験では、1E13 vg/mLのrAAV8-GOI、pH7.3での10mMのリン酸ナトリウム、5% w/vのスクロース、3.3% w/vのマンニトール、30mMのNaCl、および80mMのL-Arg-HClを含有する製剤中で、三つの濃度のP188を評価した。結果を、以下の表10に示す。

【0220】

【表9】

表10：凍結乾燥製剤安定性に対するP188のさまざまな濃度

製剤 (P188濃度)	Z-平均 (nm) 凍結乾燥前	Z-平均 (nm) 凍結乾燥後	完全カプシド% 凍結乾燥前	完全カプシド% 凍結乾燥後
S1 0.005% w/v	27.3	30.6	97.8	97.7
S2 0.01% w/v	27.0	29.8	97.6	97.3
S3 0.02% w/v	27.2	30.0	97.6	97.4

40

【0221】

第二の試験では、P188の代わりにPS80を使用して効果を評価した。1E13 v

50

g / mL の r A A V 8 - G O I、p H 7 . 3 での 1 0 m M のリン酸ナトリウム、5 % w / v のスクロース、3 . 3 % w / v のマンニトール、3 0 m M の N a C l、および 8 0 m M の L - A r g - H C l、ならびに 0 . 0 0 5 % w / v の P 1 8 8 または 0 . 0 0 5 % w / v の P S 8 0 のいずれかを含有する製剤の各々。結果を、以下の表 1 1 に示す。

【 0 2 2 2 】

【表 1 0】

表 1 1：界面活性剤の変化

製剤	Z-平均 (nm) 凍結乾燥前	Z-平均 (nm) 凍結乾燥後	完全カプシド% 凍結乾燥前	完全カプシド% 凍結乾燥後
P188	27.3	32.2	97.9	97.6
PS80	26.4	27.9	97.9	97.6

10

【 0 2 2 3 】

第三の試験では、異なる濃度の界面活性剤での回収率を評価した。製剤の各々は、1 E 1 3 v g / mL の r A A V 8 - G O I、p H 7 . 3 での 1 0 m M のリン酸ナトリウム、5 % w / v のスクロース、3 . 3 % w / v のマンニトール、3 0 m M の N a C l、および 8 0 m M の L - A r g - H C l、ならびにさまざまな界面活性剤 / 濃度を含有した。二つの異なるタイプの非イオン性界面活性剤（0 . 0 0 5 % w / v での P S 8 0 および P 1 8 8）、ならびに異なる濃度の P 1 8 8（0 . 0 0 5、0 . 0 1、および 0 . 0 2 % w / v）を試験した。図 4 に示すように、0 . 0 0 5 % P S 8 0 および P 1 8 8 の両方を有する製剤は、凍結乾燥後の t = 0 試料において同様のレベルの回収損失（それぞれ 9 1 % および 9 0 %）を示し、観察された回収損失が特定のタイプの非イオン性界面活性剤と関連していないことを示唆した。しかしながら、界面活性剤の濃度を 0 . 0 0 5 % から 0 . 0 1 %、0 . 0 2 % w / v に上昇させることは、凍結乾燥後の回収の増加（それぞれ 9 0、9 5、および 9 6 %）をもたらし、観察された回収損失は、凍結乾燥プロセス中の I 型ガラスバイアルへの A A V 吸着に起因する可能性が高いことを示唆している。凍結乾燥後の回収が最も増加したのは、P 1 8 8 濃度を 0 . 0 0 5 % から 0 . 0 1 % に増加させたときであり、界面活性剤濃度をさらに増加させても、影響は最小限であるようであった。したがって、約 0 . 0 1 % w / v の界面活性剤濃度は、試験した力価範囲内のガラスバイアルへの A A V 吸着を軽減するのに十分であろう。

20

30

【 0 2 2 4 】

実施例 7：2 ~ 8 °C での r A A V 凍結乾燥製剤の安定性

凍結乾燥医薬製品の経時的な安定性を評価するために、六つの製剤（三つのプラセボおよび三つの r A A V 8）を調製した。二次乾燥の長さを 1 0 時間まで延長したことを除いて、実施例 2 で上述したように凍結乾燥を行った。製剤を以下の表 1 2 に特定する。六つの製剤すべてが、p H 7 . 3 での 1 0 m M のリン酸ナトリウム緩衝液を含有した

【 0 2 2 5 】

40

50

【表 1 1】

表 1 2：長期安定性評価のための製剤

製剤	スクロース% (w/v)	P188% (w/v)	マンニトール (mM)	NaCl (mM)	L-アルギニン HCl (mM)
プラセボ-4	1.2	0.005	180	30	80
プラセボ-7	5	0.005	180	30	80
プラセボ-8	1.2	0.005	180	0	110
rAAV-4	1.2	0.005	180	30	80
rAAV-7	5	0.005	180	30	80
rAAV-8	1.2	0.005	180	0	110

10

【0 2 2 6】

凍結乾燥製品の色およびケーキの外観を目視検査によって評価し、実施例 2 で上述したように再構成時間を決定した。結果を、以下の表 1 3 に示す。

20

【0 2 2 7】

【表 1 2】

表 1 3：外観および再構成時間

製剤	ケーキの外観	再構成時間 (秒)	再構成後の外観
プラセボ-4	オフホワイトの均一なケーキ：容積の明らかな減少またはケーキ表面欠陥なし	12	透明、目に見える粒子なし
プラセボ-7	オフホワイトの均一なケーキ、ケーキ底部でわずかな収縮があるが、容積の明らかな減少なし	15	透明、目に見える粒子なし
プラセボ-8	オフホワイトの均一なケーキ：容積の明らかな減少またはケーキ表面欠陥なし	20	透明、目に見える粒子なし
rAAV-4	オフホワイトの均一なケーキ：容積の明らかな減少なし	13	透明、目に見える粒子なし
rAAV-7	オフホワイトの均一なケーキ、ケーキ底部でわずかな収縮があるが、容積の明らかな減少なし	15	透明、目に見える粒子なし
rAAV-8	オフホワイトの均一なケーキ：容積の明らかな減少またはケーキ表面欠陥なし	15	透明、目に見える粒子なし

30

40

【0 2 2 8】

凝集体を特定するための平均粒子サイズを、実施例 3 で上述したように、凍結乾燥前および凍結乾燥後の両方で決定した。結果を、以下の表 1 4 に示す。

【0 2 2 9】

50

【表 1 3】

表 1 4 : 試験した製剤の平均粒子サイズ

製剤	Z平均-DLS (凍結乾燥前)	Z平均-DLS (凍結乾燥後)
rAAV-4 (試料1)	25.1	164.1
rAAV-7 (試料1)	24.7	36.5
rAAV-8 (試料1)	45.5	117.0
rAAV-4 (試料2)	25.1	164.6
rAAV-7 (試料2)	24.7	33.2
rAAV-8 (試料2)	40.5	115.7

10

20

【0 2 3 0】

凝集に基づいて最良の安定性を示した製剤 r A A V - 7 (表 1 4) をさらに 6 か月間にわたって評価し、実施例 3 で上述したように、外観、粒子サイズ、完全カプシドの%、およびウイルスゲノムの力価を監視した。結果を、以下の表 1 5 に示す。

【0 2 3 1】

【表 1 4】

表 1 5 : 凍結乾燥 r A A V - 7 の 5 °C での安定性

時点	外観	DLS平均 サイズ、nm	AEX % 完全 カプシド	ddPCR vg/mL
凍結乾燥前t=0	目に見える欠陥のないエレガントなケーキ	25	97	6.04E+12
凍結乾燥後t=0	目に見える欠陥のないエレガントなケーキ	35	96	5.48E+12
凍結乾燥後1m	目に見える欠陥のないエレガントなケーキ	32	96	5.49E+12
凍結乾燥後3m	目に見える欠陥のないエレガントなケーキ	37	96	5.73E+12
凍結乾燥後6m	目に見える欠陥のないエレガントなケーキ	34	96	5.9E+12

30

40

【0 2 3 2】

r A A V - 7 (A A V 8 血清型) は、5 °C で最大六か月間、良好な安定性を示した。

【0 2 3 3】

実施例 3 および実施例 4 で上述したように、平均粒子サイズの観察された増加の大部分は、再構成組成物中のナノバブルの存在によって説明され得る。例えば、試料 r A A V - 7 は、凍結乾燥前の製剤と比較して、A A V 製品の凍結乾燥後の保存安定性が良好であることを示したが、凍結乾燥完了時に、再構成 r A A V - 7 製剤で約 1 0 n m の粒子サイズの増加が D L S で検出され (凍結乾燥後 t = 0、表 1 5)、凍結乾燥プロセス中により大

50

きなサイズの粒子種が生じたことを示唆している。根本原因を調査するために、プラセボ試料（A A V粒子を含まない製剤）を凍結乾燥し、推定サイズおよそ100～200 nmの大きな粒子種を特定した（図3）。これは、再構成された凍結乾燥タンパク質製品で以前に観察されたナノバブルと同じサイズ範囲であり（データは示さず）、凍結乾燥ケーキ内の微小空隙ら生じている可能性が高い。r A A V-7製剤では、凍結乾燥後最大6か月まで明らかな粒子サイズの増加は検出されなかったため、凍結乾燥中に生じたより大きなサイズの粒子種は、A A V凝集ではなくナノバブルによるものである可能性が高い。さらに、凍結乾燥r A A V-7製剤からの安定性結果は、凍結乾燥ケーキ中のナノバブルの存在が、A A V製品保存安定性に明らかな悪影響を及ぼしたことを示唆する証拠を示さなかった。

10

【0234】

実施例8：室温でのr A A V凍結乾燥製剤の短期安定性

凍結乾燥製剤の液体状態での少なくとも48時間の室温安定性は、凍結乾燥に先立ち製品をガラスバイアルに充填および分注する前の保持工程などの製造操作をサポートするために望ましい。溶液中安定性試験を評価するために、製剤F7中のA A V8製品0.7 mLを2 mLのI型ガラスバイアルに充填し、25℃で2日間インキュベートした。図7A、図7B、および図7Cに示すように、製剤F7は、凝集を評価するためのDLSによる粒子サイズ、回収を評価するためのddPCRによるウイルスゲノム（vg）力価、またはカプシド純度を評価するためのAEXによる空対完全カプシド比を含む、A A Vの選択された重要品質特性（CQA）の検出可能な変化がなく、良好な溶液中安定性を示した。

20

【0235】

1×10^{13} vg/mLでのA A V8、10 mMのトリス、30 mMの塩化ナトリウム、80 mMのL-アルギニン塩酸塩、5% w/vのスクロース、3.3% w/vのマンニトール、およびpH 7.3での0.01% w/vのP188を含有する別の製剤を調製し、25℃で2日間、および一か月間、溶液中での安定性について評価した。結果を図10A、図10B、および図10C、ならびに図11A、図11Bおよび図11Cにそれぞれ示す。粒子サイズ、vg力価、および空対完全カプシド比を含むCQAに、有意な変化は観察されなかった。細胞ベースの効力アッセイを使用した試料では、有意な変化は観察されなかった（データは示さず）。

【0236】

実施例9：2～8℃でのr A A V凍結乾燥製剤の長期安定性

製剤F7中の凍結乾燥A A V8医薬製品の2～8℃での長期保存安定性を、0、1、3、6、および12か月時点で、ケーキの外観および再構成時間（データは示さず）、ならびに再構成A A V8製剤中の粒子サイズ、vg力価、ならびに空対完全カプシド比について評価した。結果を図8A、図8Bおよび図8Cに示す。凍結乾燥後再構成製剤における上記の評価すべてについて有意な変化は観察されず、製剤F7中の凍結乾燥A A V8医薬製品が、2～8℃で最大十二か月間の長期保存中に安定であることを示している。

30

【0237】

凍結乾燥前0時間の試料と比較して、凍結乾燥後0時間の試料（図8A）ではDLSによる粒子サイズの約10 nmの増加は、実施例7で考察されるように、ナノバブルに起因し得る。ナノバブルの存在が、再構成された凍結乾燥タンパク質製剤で検出できるサブミクロン粒子の数に寄与することを除いて、凍結乾燥タンパク質製品の品質または安定性に著しい影響を与えることを示唆する証拠はない。

40

【0238】

本発明は、本明細書に記載される具体的な実施形態によって範囲を限定されるものではない。実際には、本明細書に記載されるものに加えて本発明のさまざまな修正が、前述の記載から当業者に明らかとなるであろう。そのような修正は、添付される特許請求の範囲内にあることを意図している。

50

【図面】
【図 1 A】

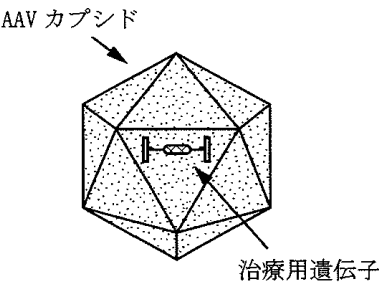


図 1 A

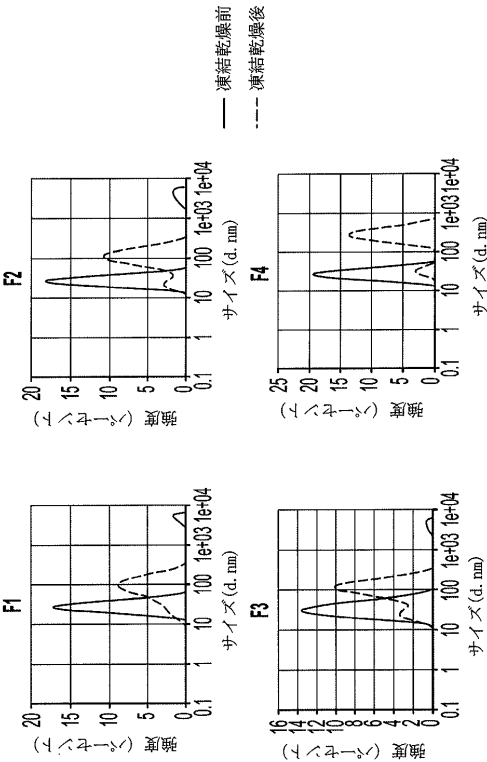
【図 1 B】



図 1 B

10

【図 2 - 1】



【図 2 - 2】

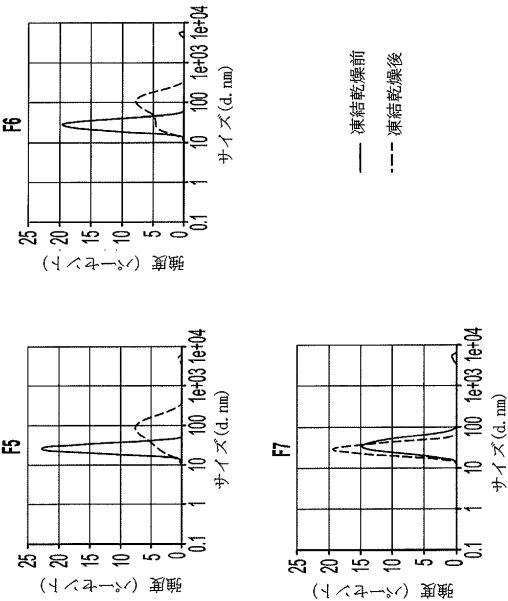


図 2 続き

20

30

40

50

【 図 3 】

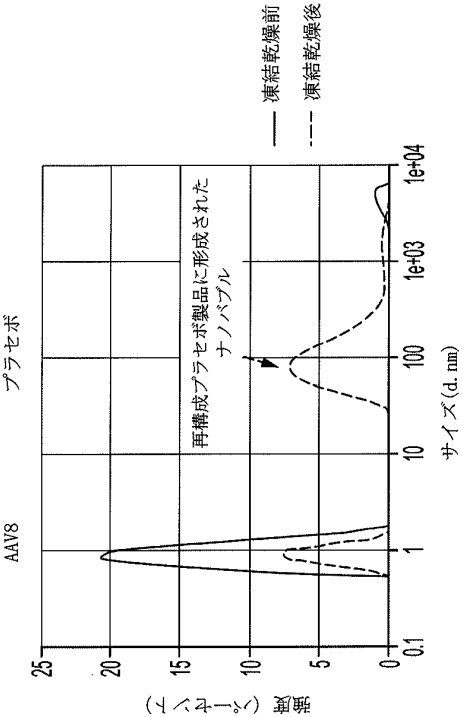


図 3

【 図 4 】

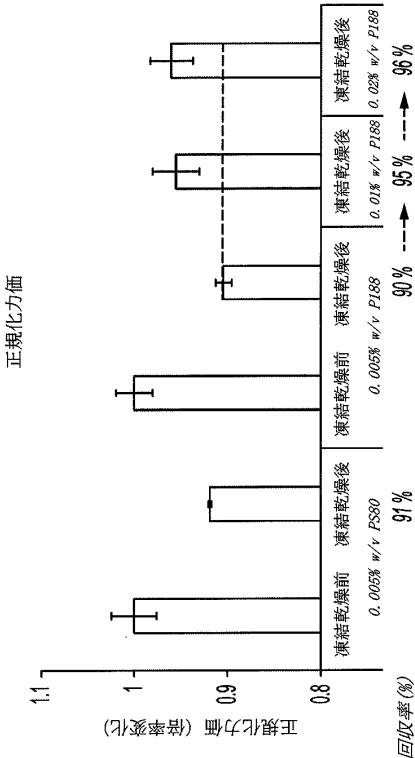


図 4

【 図 5 】

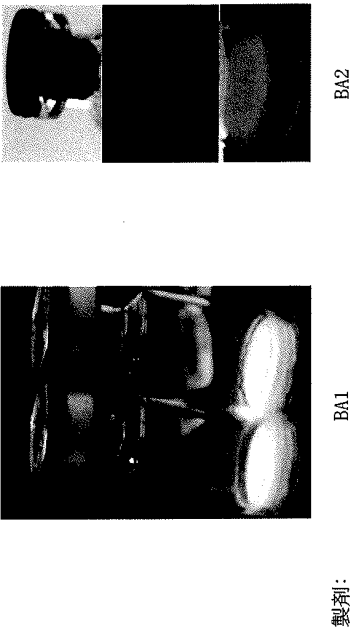


図 5

【 図 6 A 】

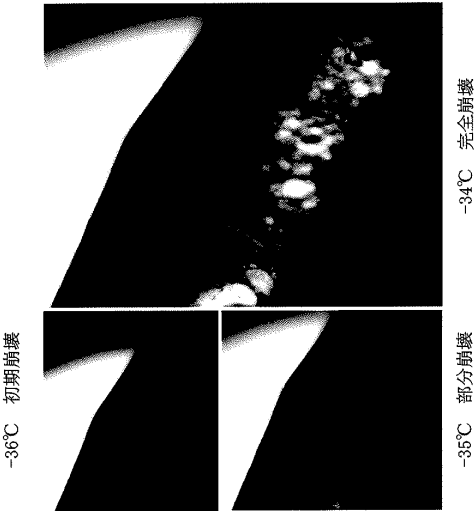


図 6 A

【図 6 B】

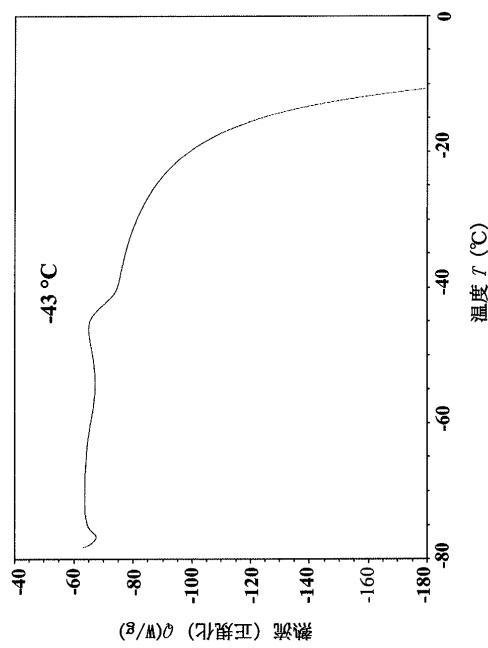


図 6 B

【図 7 A】

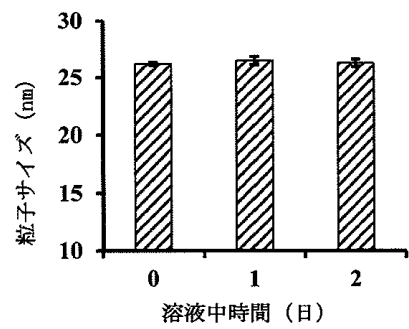


図 7 A

【図 7 B】

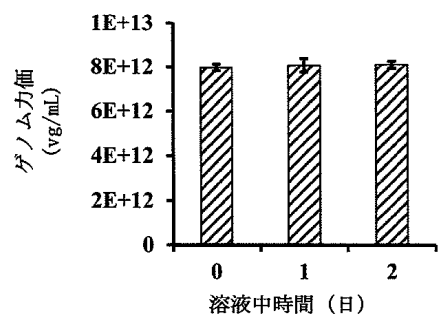


図 7 B

【図 7 C】

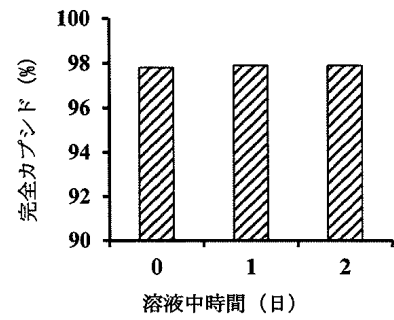


図 7 C

10

20

30

40

50

【図 8 A】

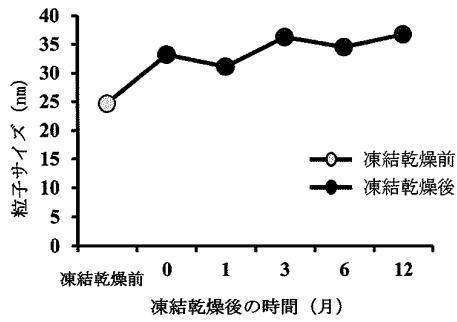


図 8 A

【図 8 B】

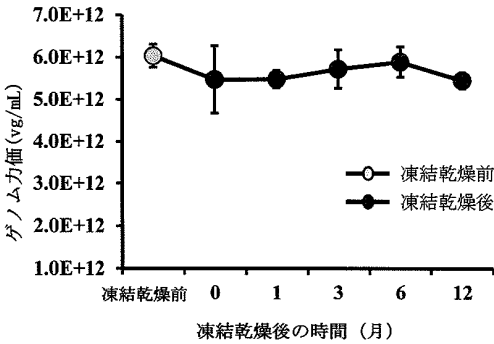


図 8 B

【図 8 C】

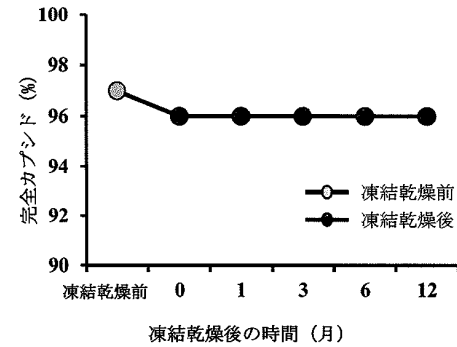


図 8 C

【図 9 A】

製剤	基礎製剤	NaCl	L-Arg HCl	MgCl ₂
最適化された製剤 (対照)	10mM トリス、5%スクロース、 3.3%マンニトール、 0.01%P188、pH7.3	30mM	80mM	0
F8		80mM	0	0
F9		40mM	40mM	0
F10		80mM	0	2mM

図 9 A

10

20

30

40

50

【図 9 B】

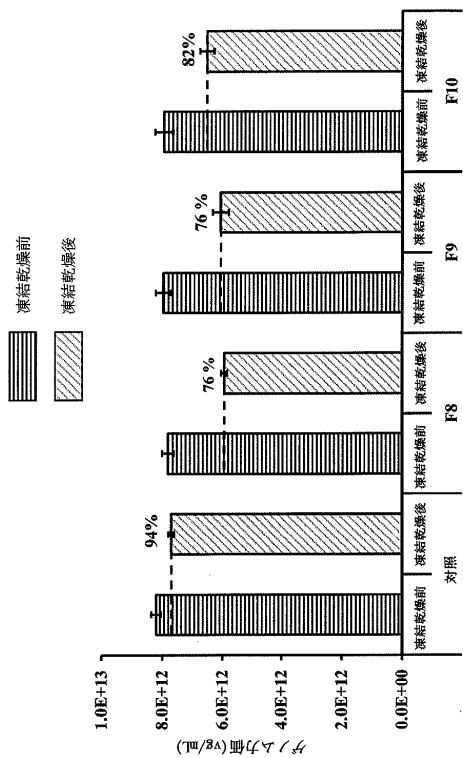


図 9 B

【図 10 A】

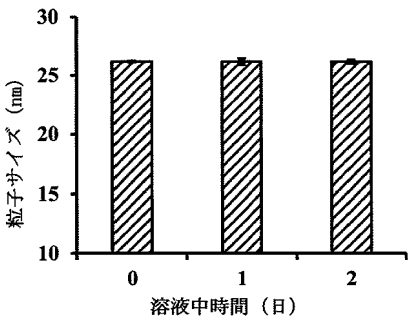


図 10 A

【図 10 B】

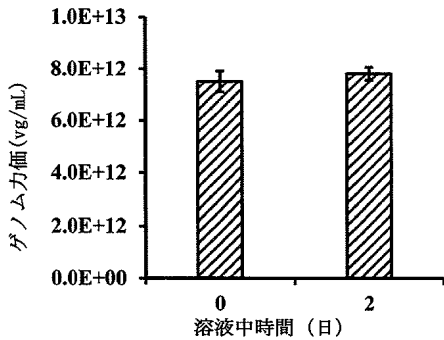


図 10 B

【図 10 C】

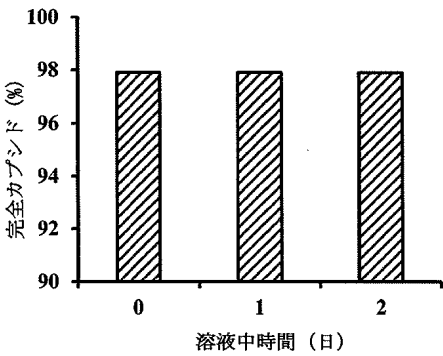


図 10 C

【図 1 1 A】

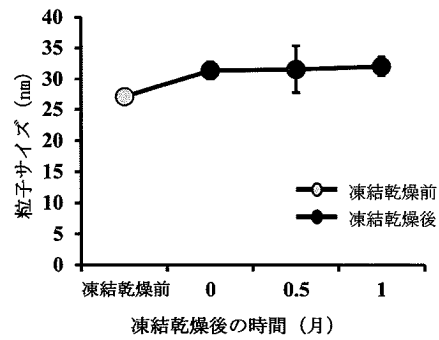


図 1 1 A

【図 1 1 B】

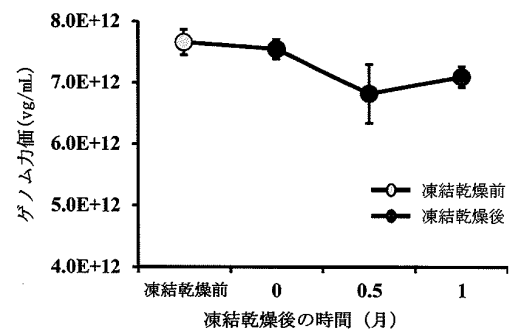


図 1 1 B

10

【図 1 1 C】

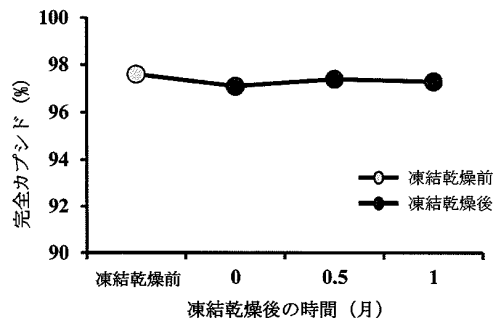


図 1 1 C

20

30

40

50

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2023/015112

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
INV.	A61K9/19	A61K47/18
	A61K47/26	A61K47/34
ADD.		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)		
A61K		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)		
EPO-Internal, WPI Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2020/214929 A1 (REGENXBIO INC [US])	1-78
	22 October 2020 (2020-10-22)	
Y	the whole document	1-78
	claims 1-134	

X	WO 2020/150556 A1 (VOYAGER THERAPEUTICS	1-78
	INC [US]) 23 July 2020 (2020-07-23)	
Y	the whole document	1-78
	claims 1-22	

X	WO 2021/071835 A1 (REGENXBIO INC [US])	1-78
	15 April 2021 (2021-04-15)	
Y	the whole document	1-78
	claims 1-184	

	-/--	
☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.		
☒ See patent family annex.		
* Special categories of cited documents :		
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance		
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date		
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)		
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means		
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention		
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone		
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art		
"&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report
24 May 2023		05/06/2023
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Felder, Christian

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2023/015112

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2020/102369 A1 (REGENXBIO INC [US]) 22 May 2020 (2020-05-22)	1
Y	the whole document claims 1-67	1-78
X	WO 2021/202943 A1 (BIOMARIN PHARM INC [US]) 7 October 2021 (2021-10-07)	1
Y	the whole document claims 1-107	1-78

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/US2023/015112

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2020214929 A1	22-10-2020	AR 118734 A1	27-10-2021
		CA 3136939 A1	22-10-2020
		CN 113993552 A	28-01-2022
		EP 3955891 A1	23-02-2022
		IL 287214 A	01-12-2021
		JP 2022529002 A	16-06-2022
		TW 202103718 A	01-02-2021
		US 2022143115 A1	12-05-2022
		WO 2020214929 A1	22-10-2020
WO 2020150556 A1	23-07-2020	AU 2020208467 A1	05-08-2021
		CA 3125770 A1	23-07-2020
		CN 113631225 A	09-11-2021
		EP 3911410 A1	24-11-2021
		IL 284532 A	31-08-2021
		JP 2022522995 A	21-04-2022
		SG 11202107645R A	30-08-2021
		TW 202039858 A	01-11-2020
		US 2022064671 A1	03-03-2022
		WO 2020150556 A1	23-07-2020
WO 2021071835 A1	15-04-2021	AR 120171 A1	02-02-2022
		AU 2020362119 A1	26-05-2022
		BR 112022006718 A2	12-07-2022
		CA 3156984 A1	15-04-2021
		CN 114728049 A	08-07-2022
		EP 4041292 A1	17-08-2022
		IL 291930 A	01-06-2022
		JP 2022552262 A	15-12-2022
		KR 20220081365 A	15-06-2022
		TW 202126319 A	16-07-2021
		WO 2021071835 A1	15-04-2021
WO 2020102369 A1	22-05-2020	AU 2019379141 A1	03-06-2021
		BR 112021009370 A2	17-08-2021
		CA 3117982 A1	22-05-2020
		EP 3880235 A1	22-09-2021
		IL 282808 A	30-06-2021
		JP 2022513034 A	07-02-2022
		KR 20210092755 A	26-07-2021
		SG 112021042950 A	29-06-2021
		US 2021393802 A1	23-12-2021
		WO 2020102369 A1	22-05-2020
WO 2021202943 A1	07-10-2021	AR 122409 A1	07-09-2022
		TW 202144575 A	01-12-2021
		WO 2021202943 A1	07-10-2021

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (April 2005)

10

20

30

40

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 9/08 (2006.01)	A 6 1 K 9/08	
A 6 1 K 47/34 (2017.01)	A 6 1 K 47/34	
A 6 1 K 9/19 (2006.01)	A 6 1 K 9/19	
A 6 1 P 43/00 (2006.01)	A 6 1 P 43/00	1 0 5

,MC,ME,MK,MT,NL,NO,PL,PT,RO,RS,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,KM,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BN,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,CV,CZ,DE,DJ,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IQ,IR,IS,IT,JM,JO,JP,KE,KG,KH,KN,KP,KR,KW,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LU,LY,MA,MD,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RU,RW,SA,SC,SD,SE,SG,SK,SL,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,WS,ZA,ZM,ZW

(特許庁注：以下のものは登録商標)

1. T W E E N

- ル・リバー・ロード 7 7 7 . リジェネロン・ファーマシューティカルズ・インコーポレイテッド
- (72)発明者 リー・ジー
アメリカ合衆国ニューヨーク州 1 0 5 9 1 . タリータウン・オールド・ソー・ミル・リバー・ロード 7 7 7 . リジェネロン・ファーマシューティカルズ・インコーポレイテッド
- (72)発明者 ヤオ・チェン
アメリカ合衆国ニューヨーク州 1 0 5 9 1 . タリータウン・オールド・ソー・ミル・リバー・ロード 7 7 7 . リジェネロン・ファーマシューティカルズ・インコーポレイテッド
- (72)発明者 クウアン・ユー・ライ
アメリカ合衆国ニューヨーク州 1 0 5 9 1 . タリータウン・オールド・ソー・ミル・リバー・ロード 7 7 7 . リジェネロン・ファーマシューティカルズ・インコーポレイテッド
- (72)発明者 ヨナタン・ヴェルト
アメリカ合衆国ニューヨーク州 1 0 5 9 1 . タリータウン・オールド・ソー・ミル・リバー・ロード 7 7 7 . リジェネロン・ファーマシューティカルズ・インコーポレイテッド
- (72)発明者 シャオイエン・ワン
アメリカ合衆国ニューヨーク州 1 0 5 9 1 . タリータウン・オールド・ソー・ミル・リバー・ロード 7 7 7 . リジェネロン・ファーマシューティカルズ・インコーポレイテッド

F ターム (参考) 4C076 AA11 AA30 BB11 BB13 CC26 DD09F DD23 DD26Z DD38 DD50Z
DD51 DD67 EE23F FF13 FF16 FF61 FF63 GG06 GG47
4C084 AA13 MA05 MA17 MA44 MA66 NA03 ZB21
4C087 AA01 AA10 BC83 CA12 MA05 MA17 MA44 MA66 NA03 ZB21