

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11)公表番号

特表2023-536883

(P2023-536883A)

(43)公表日 令和5年8月30日(2023.8.30)

(51)国際特許分類

F I

テーマコード (参考)

A 6 1 K 47/46 (2006.01)

A 6 1 K 47/46

4 C 0 7 6

A 6 1 K 47/18 (2017.01)

A 6 1 K 47/18

A 6 1 K 47/26 (2006.01)

A 6 1 K 47/26

A 6 1 K 47/34 (2017.01)

A 6 1 K 47/34

A 6 1 K 9/08 (2006.01)

A 6 1 K 9/08

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全84頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2023-507428(P2023-507428)

(86)(22)出願日 令和3年8月6日(2021.8.6)

(85)翻訳文提出日 令和5年4月3日(2023.4.3)

(86)国際出願番号 PCT/US2021/044955

(87)国際公開番号 WO2022/032104

(87)国際公開日 令和4年2月10日(2022.2.10)

(31)優先権主張番号 63/063,128

(32)優先日 令和2年8月7日(2020.8.7)

(33)優先権主張国・地域又は機関

米国(US)

(31)優先権主張番号 63/063,108

(32)優先日 令和2年8月7日(2020.8.7)

(33)優先権主張国・地域又は機関

米国(US)

(81)指定国・地域 AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA

最終頁に続く

(71)出願人 509087759

ヤンセン バイオテック、インコーポレ
ーテッドアメリカ合衆国ペンシルベニア州190
44 ホーシャム・リτζジビユードライブ
800/850

(74)代理人 100092783

弁理士 小林 浩

(74)代理人 100095360

弁理士 片山 英二

(74)代理人 100093676

弁理士 小林 純子

(74)代理人 100120134

弁理士 大森 規雄

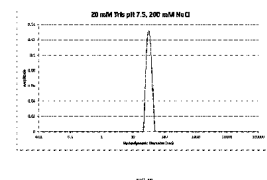
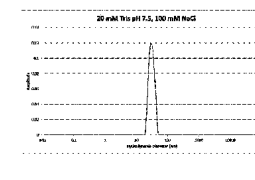
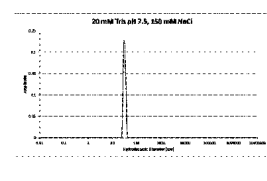
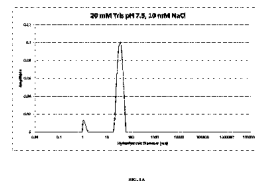
(74)代理人 100135943

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 高度に精製されたウイルス粒子のための製剤

(57)【要約】

高度に精製されたウイルス粒子（例えば、アデノ随伴ウイルス（AAV）粒子）のための製剤が、本明細書において提供される。本製剤は、不純物（例えば、産生物関連不純物及びプロセス関連不純物）を実質的に含まない精製されたAAV粒子と、緩衝剤、抗凍結剤、非イオン性界面活性剤、及び任意選択で薬学的に許容される塩のうちの1つ又は2つ以上と、を含む。ある特定の態様では、本製剤は、精製されたAAV粒子の安定性を維持若しくは増強し、かつ／又は精製されたAAV粒子の凝集を低減若しくは防止する。



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

精製されたアデノ随伴ウイルス（AAV）粒子、緩衝剤、抗凍結剤、及び非イオン性界面活性剤を含む医薬組成物であって、

- （a）前記精製された AAV 粒子が、不純物を実質的に含まず、
- （b）前記緩衝剤の濃度が、約 0 mM～約 50 mM であり、
- （c）前記抗凍結剤が、約 1 %～約 10 %（w/v）であり、
- （d）前記非イオン性界面活性剤が、約 0.0001 %（w/v）～約 0.1 %（w/v）である、医薬組成物。

【請求項 2】

薬学的に許容される塩を更に含み、前記薬学的に許容される塩の濃度が、

- （a）約 1 mM～約 200 mM、
- （b）約 10 mM～約 150 mM、
- （c）約 10 mM、
- （d）約 100 mM、又は
- （e）約 150 mM である、請求項 1 に記載の医薬組成物。

【請求項 3】

精製された AAV 粒子、薬学的に許容される塩、緩衝剤、抗凍結剤、及び非イオン性界面活性剤を含む医薬組成物であって、

- （a）前記精製された AAV 粒子が、不純物を実質的に含まず、
- （b）前記薬学的に許容される塩の濃度が、約 1 mM～約 49 mM であり、
- （c）前記緩衝剤の濃度が、約 0 mM～約 50 mM であり、
- （d）前記抗凍結剤が、約 1 %～約 10 %（w/v）であり、
- （e）前記非イオン性界面活性剤が、約 0.0001 %（w/v）～約 0.1 %（w/v）である、医薬組成物。

【請求項 4】

前記薬学的に許容される塩の濃度が

- （a）約 5 mM～約 45 mM、
- （b）約 7.5 mM～約 40 mM、
- （c）約 10 mM～約 30 mM、又は
- （d）約 10 mM である、請求項 3 に記載の医薬組成物。

【請求項 5】

前記薬学的に許容される塩が、ナトリウム塩、マグネシウム塩、カルシウム塩、カリウム塩、リン酸塩、及び硫酸塩からなる群から選択され、前記ナトリウム塩が、任意選択で、塩化ナトリウムを含む、請求項 2～4 のいずれか一項に記載の医薬組成物。

【請求項 6】

前記緩衝剤が、トリス HCl 又は L-ヒスチジン HCl を含む、請求項 1～5 のいずれか一項に記載の医薬組成物。

【請求項 7】

前記緩衝剤の濃度が、約 20 mM を含む、請求項 1～6 のいずれか一項に記載の医薬組成物。

【請求項 8】

前記抗凍結剤が、

- （a）約 3 %（w/v）～約 8 %（w/v）、
- （b）約 4 %（w/v）～約 6 %（w/v）、又は
- （c）約 5 %（w/v）である、請求項 1～7 のいずれか一項に記載の医薬組成物。

【請求項 9】

前記抗凍結剤が、糖を含む、請求項 1～8 のいずれか一項に記載の医薬組成物。

【請求項 10】

前記糖が、

10

20

30

40

50

- (a) スクロース、トレハロース、若しくはそれらの組み合わせ、又は
- (b) トレハロースを含む、請求項 9 に記載の医薬組成物。

【請求項 11】

前記非イオン性界面活性剤が、

- (a) 約 0.0005% (w/v) ~ 約 0.005% (w/v)、
- (b) 約 0.00075% (w/v) ~ 約 0.0025% (w/v)、又は
- (c) 約 0.001% (w/v) である、請求項 1 ~ 10 のいずれか一項に記載の医薬組成物。

【請求項 12】

前記非イオン性界面活性剤が、コポリマー、ポリオキシエチレンソルビタンエステル、リン脂質、Br i j 界面活性剤、及びソルビタンエステル、又はそれらの組み合わせからなる群から選択され、

10

前記ポリオキシエチレンソルビタンエステルが、(PS-20)、及びポリソルベート 80 (PS-80)、又はそれらの組み合わせからなる群から任意選択で選択され、

前記コポリマーが、ポロキサマーを任意選択で含み、

前記ポロキサマーが、任意選択で

(a) ポロキサマー 188 (P188)、ポロキサマー 237 (P237)、ポロキサマー 338 (P338)、及びポロキサマー 407 (P407)、若しくはそれらの組み合わせからなる群から選択されるか、又は

(b) ポロキサマー 188 (P188) を含む、請求項 1 ~ 11 のいずれか一項に記載の医薬組成物。

20

【請求項 13】

精製された AAV 粒子、緩衝剤、抗凍結剤、及び非イオン性界面活性剤を含む医薬組成物であって、

- (a) 前記精製された AAV 粒子が、不純物を実質的に含まず、
- (b) 前記緩衝剤の濃度が、約 20 mM であり、
- (c) 前記抗凍結剤が、約 5% (w/v) のトレハロースであり、
- (d) 前記非イオン性界面活性剤が、約 0.001% (w/v) のポロキサマー 188 である、医薬組成物。

【請求項 14】

30

精製された AAV 粒子、薬学的に許容される塩、緩衝剤、抗凍結剤、及び非イオン性界面活性剤を含む医薬組成物であって、

- (a) (i) 前記精製された AAV 粒子が、不純物を実質的に含まず、
- (i i) 前記薬学的に許容される塩の濃度が、約 10 mM の塩化ナトリウムであり、
- (i i i) 前記緩衝剤の濃度が、約 20 mM であり、
- (i v) 前記抗凍結剤が、約 5% (w/v) のトレハロースであり、
- (v) 前記非イオン性界面活性剤が、約 0.001% (w/v) のポロキサマー 188 であるか、

40

- (b) (i) 前記精製された AAV 粒子が、不純物を実質的に含まず、
- (i i) 前記薬学的に許容される塩の濃度が、約 25 mM の塩化ナトリウムであり、
- (i i i) 前記緩衝剤の濃度が、約 20 mM であり、
- (i v) 前記抗凍結剤が、約 5% (w/v) のトレハロースであり、
- (v) 前記非イオン性界面活性剤が、約 0.001% (w/v) のポロキサマー 188 であるか、

50

- (c) (i) 前記精製された AAV 粒子が、不純物を実質的に含まず、
- (i i) 前記薬学的に許容される塩の濃度が、約 50 mM の塩化ナトリウムであり、
- (i i i) 前記緩衝剤の濃度が、約 20 mM であり、
- (i v) 前記抗凍結剤が、約 5% (w/v) のトレハロースであり、
- (v) 前記非イオン性界面活性剤が、約 0.001% (w/v) のポロキサマー 188 であるか、

50

- (d) (i) 前記精製された A A V 粒子が、不純物を実質的に含まず、
 (ii) 前記薬学的に許容される塩の濃度が、約 100 mM の塩化ナトリウムであり

、

- (iii) 前記緩衝剤の濃度が、約 20 mM であり、
 (iv) 前記抗凍結剤が、約 5 % (w/v) のトレハロースであり、
 (v) 前記非イオン性界面活性剤が、約 0.001 % (w/v) のポロキサマー 18

8 であるか、

- (e) (i) 前記精製された A A V 粒子が、不純物を実質的に含まず、
 (ii) 前記薬学的に許容される塩の濃度が、約 125 mM の塩化ナトリウムであり

、

- (iii) 前記緩衝剤の濃度が、約 20 mM であり、
 (iv) 前記抗凍結剤が、約 5 % (w/v) のトレハロースであり、
 (v) 前記非イオン性界面活性剤が、約 0.001 % (w/v) のポロキサマー 18

8 であるか、

- (f) (i) 前記精製された A A V 粒子が、不純物を実質的に含まず、
 (ii) 前記薬学的に許容される塩の濃度が、約 150 mM の塩化ナトリウムであり

、

- (iii) 前記緩衝剤の濃度が、約 20 mM であり、
 (iv) 前記抗凍結剤が、約 5 % (w/v) のトレハロースであり、
 (v) 前記非イオン性界面活性剤が、約 0.001 % (w/v) のポロキサマー 18

8 であるか、又は

- (g) (i) 前記精製された A A V 粒子が、不純物を実質的に含まず、
 (ii) 前記薬学的に許容される塩の濃度が、約 200 mM の塩化ナトリウムであり

、

- (iii) 前記緩衝剤の濃度が、約 20 mM であり、
 (iv) 前記抗凍結剤が、約 5 % (w/v) のトレハロースであり、
 (v) 前記非イオン性界面活性剤が、約 0.001 % (w/v) のポロキサマー 18

8 である、医薬組成物。

【請求項 15】

前記緩衝剤が、トリス塩酸塩 (HCl) 又は L-ヒスチジン HCl を含む、請求項 13
 又は 14 に記載の医薬組成物。

【請求項 16】

前記医薬組成物の pH が、

- (a) 約 4.0 ~ 約 9.0、
 (b) 約 7.0 ~ 約 8.0、
 (c) 約 7.3 ~ 約 7.7、又は
 (d) 約 7.5 である、請求項 1 ~ 15 のいずれか一項に記載の医薬組成物。

【請求項 17】

- (a) 前記 A A V が、A A V 1、A A V 2、A A V 3、A A V 4、A A V 5、A A V 6
 、A A V 7、A A V 8、A A V 9、及び A A V 10 からなる群から選択され、かつ／又は
 (b) 前記 A A V が、組換え A A V (r A A V) を含む、請求項 1 ~ 16 のいずれか一
 項に記載の医薬組成物。

【請求項 18】

前記精製された A A V 粒子の力価が、

- (a) 1 ミリリットル当たり約 1×10^{10} ウイルスゲノム (vg/mL) 以上、
 (b) 1 ミリリットル当たり約 1×10^{11} ウイルスゲノム (vg/mL) 以上、
 (c) 1 ミリリットル当たり約 1×10^{12} ウイルスゲノム (vg/mL) 以上、
 (d) 1 ミリリットル当たり約 1×10^{13} ウイルスゲノム (vg/mL) 以上、
 (e) 1 ミリリットル当たり約 1×10^{14} ウイルスゲノム (vg/mL) 以上、又は
 (f) 1 ミリリットル当たり約 1×10^{15} ウイルスゲノム (vg/mL) 以上である

10

20

30

40

50

、請求項 1 ～ 1 7 のいずれか一項に記載の医薬組成物。

【請求項 1 9】

前記不純物が、

(a) プロセス関連不純物であって、

前記プロセス関連不純物が、残留宿主細胞成分、残留ウイルス産生成分、残留細胞培養成分、残留精製成分、若しくはそれらの組み合わせからなる群から任意選択で選択され、

前記残留宿主細胞成分が、宿主細胞タンパク質、宿主細胞 DNA、宿主細胞 RNA、若しくはそれらの組み合わせを任意選択で含み、

前記宿主細胞 DNA が、ウイルス外クロマチン結合 DNA を任意選択で含み、

10

前記残留ウイルス産生成分が、プラスミド DNA、ヘルパーウイルス、若しくはそれらの組み合わせを任意選択で含み、

前記残留細胞培養成分が、抗生物質、サプリメント、インデューサー、増殖因子、若しくはそれらの組み合わせを任意選択で含み、かつ／又は

前記残留精製成分が、緩衝剤、無機塩、酵素、洗剤、培地、若しくはそれらの組み合わせを任意選択で含む、プロセス関連不純物、

(b) 産生物関連不純物であって、前記産生物関連不純物が、空のカプシド、凝集 A A V 粒子、分解 A A V 粒子、若しくはそれらの組み合わせを含む、産生物関連不純物、又は

(c) (a) 及び (b) の組み合わせ、を含む、請求項 1 ～ 1 8 のいずれか一項に記載の医薬組成物。

20

【請求項 2 0】

前記精製された A A V 粒子が、

(a) 完全な若しくは部分的に完全なカプシドを含み、前記産生物関連不純物が、空のカプシドを含むか、又は

(b) 完全なカプシドを含み、前記産生物関連不純物が、空のカプシドを含む、請求項 1 9 に記載の医薬組成物。

【請求項 2 1】

前記精製された A A V 粒子が、完全なカプシドから本質的になり、前記産生物関連不純物が、空のカプシドを含む、請求項 1 9 に記載の医薬組成物。

【請求項 2 2】

30

前記産生物関連不純物が、

(a) 凝集 A A V 粒子、分解 A A V 粒子、若しくはそれらの組み合わせ、又は

(b) 凝集 A A V 粒子若しくはそれらの組み合わせを含む、請求項 1 9 に記載の医薬組成物。

【請求項 2 3】

前記精製された A A V 粒子が、空のカプシドを含むか、又は空のカプシドから本質的になる、請求項 2 2 に記載の医薬組成物。

【請求項 2 4】

前記医薬組成物が、

(a) 液体状態、又は

40

(b) 固体状態若しくは半固体状態にある、請求項 1 ～ 2 3 のいずれか一項に記載の医薬組成物。

【請求項 2 5】

前記医薬組成物が、

(a) 前記精製された A A V 粒子の安定性を維持若しくは増強する、かつ／又は

(b) 前記精製された A A V 粒子の凝集を低減若しくは防止する、請求項 1 ～ 2 4 のいずれか一項に記載の医薬組成物。

【請求項 2 6】

(a) 前記精製された A A V 粒子の前記安定性が、

(i) 1 回又は 2 回以上の凍結／解凍サイクル後に、若しくは

50

(i i) 3 回又は 4 回以上の凍結／解凍サイクル後に、維持若しくは増強され、かつ／又は

(b) 前記 A A V 粒子の前記凝集が、

(i) 1 回又は 2 回以上の凍結／解凍サイクル後に 5 % 未満、

(i i) 1 回又は 2 回以上の凍結／解凍サイクル後に 2 % 未満、

(i i i) 1 回又は 2 回以上の凍結／解凍サイクル後に 1 % 未満、

(i v) 3 回又は 4 回以上の凍結／解凍サイクル後に 5 % 未満、

(v) 3 回又は 4 回以上の凍結／解凍サイクル後に 2 % 未満、若しくは

(v i) 3 回又は 4 回以上の凍結／解凍サイクル後に 1 % 未満であり、

前記 A A V 粒子の前記安定性及び／又は凝集が、任意選択で、動的光散乱 (D L S) 、分析用超遠心分離 (A U C) 、光学顕微鏡法、サイズ排除クロマトグラフィー (S E C) 、透過型電子顕微鏡法、及び多角度静的光散乱を用いたフィールドフローフラクショネーション (F F F - M A L S) からなる群から選択されるアッセイによって測定される、請求項 2 5 に記載の医薬組成物。

10

【請求項 2 7】

前記精製された A A V 粒子が、

(a) A A V 粒子を含む上清を、ヌクレアーゼを含む組成物と接触させることと、

(b) 前記粒子を精製することと、を含む、方法によって得られ、

前記ヌクレアーゼが、Benzonase、又はBenzonase (登録商標) 及びクロマチン-DNAヌクレアーゼを任意選択で含み、

20

前記クロマチン-DNAヌクレアーゼが、MNaseを任意選択で含む、請求項 1 ～ 2 6 のいずれか一項に記載の医薬組成物。

【請求項 2 8】

精製された A A V 粒子を含む医薬組成物を作製するための方法であって、前記方法が、

(a) A A V 粒子を含む上清を、ヌクレアーゼを含む組成物と接触させることであって、

前記ヌクレアーゼが、Benzonase (登録商標)、又はBenzonase (登録商標) 及びクロマチン-DNAヌクレアーゼを任意選択で含み、

前記クロマチン-DNAヌクレアーゼが、MNaseを任意選択で含む、接触させることと、

30

(b) 前記 A A V 粒子が不純物を実質的に含まないように、前記 A A V 粒子を精製することと、

(c) 前記精製された A A V 粒子を、緩衝剤、抗凍結剤、及び非イオン性界面活性剤と組み合わせることであって、

(i) 前記緩衝剤の濃度が、約 0 m M ～ 約 5 0 m M であり、

(i i) 前記抗凍結剤が、約 1 % ～ 約 1 0 % (w / v) であり、

(i i i) 前記非イオン性界面活性剤が、約 0 . 0 0 0 1 % (w / v) ～ 約 0 . 1 % (w / v) である、組み合わせることと、を含む、方法。

【請求項 2 9】

ステップ (c) が、薬学的に許容される塩を更に含み、前記薬学的に許容される塩の濃度が、

40

(a) 約 1 m M ～ 約 2 0 0 m M 、

(b) 約 1 0 m M ～ 約 1 5 0 m M 、

(c) 約 1 m M ～ 約 4 9 m M 、

(d) 約 5 m M ～ 約 4 5 m M 、

(e) 約 7 . 5 m M ～ 約 4 0 m M 、

(f) 約 1 0 m M ～ 約 3 0 m M 、

(g) 約 1 0 m M 、

(h) 約 1 0 0 m M 、又は

(i) 約 1 5 0 m M である、請求項 2 8 に記載の方法。

50

【請求項 30】

前記薬学的に許容される塩が、ナトリウム塩、マグネシウム塩、カルシウム塩、カリウム塩、リン酸塩、及び硫酸塩からなる群から選択され、

前記ナトリウム塩が、塩化ナトリウムを任意選択で含む、請求項 29 に記載の方法。

【請求項 31】

前記緩衝剤が、トリス HCl 又は L-ヒスチジン HCl を含む、請求項 28～30 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 32】

前記緩衝剤の濃度が、約 20 mM を含む、請求項 28～31 のいずれか一項に記載の方法。

10

【請求項 33】

前記抗凍結剤が、

(a) 約 3 % (w/v) ～約 8 % (w/v) 、

(b) 約 4 % (w/v) ～約 6 % (w/v) 、又は

(c) 約 5 % (w/v) である、請求項 28～32 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 34】

前記抗凍結剤が、糖を含む、請求項 28～33 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 35】

前記糖が、

(a) スクロース、トレハロース、若しくはそれらの組み合わせ、又は

(b) トレハロースを含む、請求項 34 に記載の方法。

20

【請求項 36】

前記非イオン性界面活性剤が、

(a) 約 0.0005 % (w/v) ～約 0.005 % (w/v) 、

(b) 約 0.00075 % (w/v) ～約 0.0025 % (w/v) 、又は

(c) 約 0.001 % (w/v) である、請求項 28～35 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 37】

前記非イオン性界面活性剤が、コポリマー、ポリオキシエチレンソルビタンエステル、リン脂質、Br i j 界面活性剤、及びソルビタンエステル、又はそれらの組み合わせからなる群から選択され、

30

前記ポリオキシエチレンソルビタンエステルが、(PS-20)、及びポリソルベート 80 (PS-80)、又はそれらの組み合わせからなる群から任意選択で選択され、

前記コポリマーが、ポロキサマーを任意選択で含む、

前記ポロキサマーが、任意選択で、

(a) ポロキサマー 188 (P188)、ポロキサマー 237 (P237)、ポロキサマー 338 (P338)、及びポロキサマー 407 (P407)、若しくはそれらの組み合わせからなる群から選択されるか、又は

(b) ポロキサマー 188 (P188) を含む、請求項 28～36 のいずれか一項に記載の方法。

40

【請求項 38】

前記医薬組成物の pH が、

(a) 約 4.0 ～約 9.0 、

(b) 約 7.0 ～約 8.0 、

(c) 約 7.3 ～約 7.7、又は

(d) 約 7.5 である、請求項 28～37 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 39】

前記 AAV が、AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、及び AAV10 からなる群から選択され、かつ／又は、

前記 AAV が、rAAV を含む、請求項 28～38 のいずれか一項に記載の方法。

50

【請求項 40】

前記精製された AAV の力価が、

- (a) 1 ミリリットル当たり約 1×10^{10} ウイルスゲノム (vg/mL) 以上、
- (b) 1 ミリリットル当たり約 1×10^{11} ウイルスゲノム (vg/mL) 以上、
- (c) 1 ミリリットル当たり約 1×10^{12} ウイルスゲノム (vg/mL) 以上、
- (d) 1 ミリリットル当たり約 1×10^{13} ウイルスゲノム (vg/mL) 以上、
- (e) 1 ミリリットル当たり約 1×10^{14} ウイルスゲノム (vg/mL) 以上、又は
- (f) 1 ミリリットル当たり約 1×10^{15} ウイルスゲノム (vg/mL) 以上である

、請求項 28～39 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 41】

前記不純物が、

- (a) プロセス関連不純物であって、

前記プロセス関連不純物が、残留宿主細胞成分、残留ウイルス産生成分、残留細胞培養成分、残留精製成分、若しくはそれらの組み合わせからなる群から任意選択で選択され、

前記残留宿主細胞成分が、宿主細胞タンパク質、宿主細胞 DNA、宿主細胞 RNA、若しくはそれらの組み合わせを任意選択で含み、

前記宿主細胞 DNA が、ウイルス外クロマチン結合 DNA を任意選択で含み、

前記残留ウイルス産生成分が、プラスミド DNA、ヘルパーウイルス、若しくはそれらの組み合わせを任意選択で含み、

前記残留細胞培養成分が、抗生物質、サプリメント、インデューサー、増殖因子、若しくはそれらの組み合わせを任意選択で含み、かつ／又は

前記残留精製成分が、緩衝剤、無機塩、酵素、洗剤、培地、若しくはそれらの組み合わせを任意選択で含む、プロセス関連不純物、

(b) 産生物関連不純物であって、前記産生物関連不純物が、空のカプシド、凝集 AAV 粒子、分解 AAV 粒子、若しくはそれらの組み合わせを含む、産生物関連不純物、又は

(c) (a) 及び (b) の組み合わせ、を含む、請求項 28～40 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 42】

前記精製された AAV 粒子が、

(a) 完全な若しくは部分的に完全なカプシドを含み、前記産生物関連不純物が、空のカプシドを含むか、又は

(b) 完全なカプシドを含み、前記産生物関連不純物が、空のカプシドを含む、請求項 41 に記載の方法。

【請求項 43】

前記精製された AAV 粒子が、完全なカプシドから本質的になり、前記産生物関連不純物が、空のカプシドを含む、請求項 41 に記載の方法。

【請求項 44】

前記産生物関連不純物が、

- (a) 凝集 AAV 粒子、分解 AAV 粒子、若しくはそれらの組み合わせ、又は

- (b) 凝集 AAV 粒子、を含む、請求項 41 に記載の方法。

【請求項 45】

前記精製された AAV 粒子が、空のカプシドを含むか、又は空のカプシドから本質的になる、請求項 41 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

(関連出願の相互参照)

本出願は、2020 年 8 月 7 日に出願された米国特許出願第 63/063,108 号、及び 2020 年 8 月 7 日に出願された米国特許出願第 63/063,128 号に対して優

10

20

30

40

50

先権を主張するものであり、これらの各々の開示内容は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。

【0002】

（発明の分野）

特に、高度に精製されたウイルス粒子（例えば、アデノ随伴ウイルス（adeno-associated virus、AAV）粒子のための製剤が、本明細書で提供される。本製剤は、不純物（例えば、産生物関連不純物及びプロセス関連不純物）を実質的に含まない精製されたAAV粒子と、緩衝剤、抗凍結剤、非イオン性界面活性剤、及び任意選択で薬学的に許容される塩のうちの1つ又は2つ以上と、を含むことができる。ある特定の態様では、本明細書で提供される製剤は、精製されたAAV粒子の安定性を維持若しくは増強し、かつ／又は精製されたAAV粒子の凝集を低減若しくは防止する。

10

【背景技術】

【0003】

アデノ随伴ウイルス（AAV）は、標的細胞に核酸を送達するように操作することができる非エンベロープウイルスであり、遺伝子治療及び遺伝子送達用途において有用なビヒクルとして浮上している。ウイルスDNAを欠く組換えAAV（Recombinant AAV、rAAV）は、本質的に、細胞膜を横断するように操作されたタンパク質ベースのナノ粒子であり、最終的に、その核酸というカーゴを細胞の核内に輸送及び送達することができる。持続的な遺伝子発現、広範な組織向性を有してヒト集団において天然に存在すること、非組み込み性、非病原性、低い免疫原性、有糸分裂後細胞の感染性、及び他のウイルス系と比較した場合の相対的な産生の容易さといった、このウイルスによって付与される特性は、ヒトでの使用の迅速な拡大をもたらした。rAAVを含むAAVに基づく遺伝子送達ベクターが、多数の臨床的遺伝子治療適用のために安全かつ有効であるとして浮上している。

20

【0004】

AAV粒子の産生及び精製は、依然として、大きな課題となっている。更に、一旦精製されると、ウイルス感染性及び物理的安定性を維持し得る製剤の開発は、一貫した生物学的性能を有する高品質の産生物が患者に放出されることを確実にするのに最も重要になる。ウイルスベクターについての1つの特定の懸念は、それらの凝集する傾向である（Wright et al., Molecular Therapy, 2005を参照されたい）。したがって、改善された安定性及び最小限の凝集を有する高純度AAV粒子を含む製剤の満たされていない必要性に対処する新規AAV製剤が、本明細書で提供される。

30

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0005】

一態様では、精製されたAAV粒子、緩衝剤、抗凍結剤、及び非イオン性界面活性剤を含む医薬組成物であって、（a）精製されたAAV粒子が実質的に不純物を含まず、（b）緩衝剤の濃度が約0 mM～約50 mMであり、（c）抗凍結剤が約1%～約10%（w/v）であり、（d）非イオン性界面活性剤が約0.0001%（w/v）～約0.1%（w/v）である、医薬組成物が本明細書で提供される。一実施形態では、医薬組成物は、薬学的に許容される塩を含み、薬学的に許容される塩の濃度は、約1 mM～約200 mMである。一実施形態では、薬学的に許容される塩は、約10 mM～約150 mMである。一実施形態では、薬学的に許容される塩の濃度は、約10 mMである。一実施形態では、薬学的に許容される塩の濃度は、約100 mMである。一実施形態では、薬学的に許容される塩の濃度は、約150 mMである。

40

【0006】

一態様では、精製されたAAV粒子、薬学的に許容される塩、緩衝剤、抗凍結剤、及び非イオン性界面活性剤を含む医薬組成物であって、（a）精製されたAAV粒子が実質的に不純物を含まず、（b）薬学的に許容される塩の濃度が約1 mM～約49 mMであり、

50

(c) 緩衝剤の濃度が約 0 mM～約 50 mM であり、(d) 抗凍結剤が約 1 %～約 10 % (w/v) であり、(e) 非イオン性界面活性剤が約 0.0001 % (w/v)～約 0.1 % (w/v) である、医薬組成物が本明細書で提供される。一実施形態では、薬学的に許容される塩の濃度は、約 5 mM～約 45 mM である。一実施形態では、薬学的に許容される塩の濃度は、約 7.5 mM～約 40 mM である。一実施形態では、薬学的に許容される塩の濃度は、約 10 mM～約 30 mM である。一実施形態では、薬学的に許容される塩の濃度は、約 10 mM である。

【0007】

一実施形態では、薬学的に許容される塩は、ナトリウム塩、マグネシウム塩、カルシウム塩、カリウム塩、リン酸塩、及び硫酸塩からなる群から選択される。一実施形態では、ナトリウム塩は、塩化ナトリウムを含む。

10

【0008】

一実施形態では、緩衝剤は、トリス塩酸塩 (hydrochloride、HCl) を含む。一実施形態では、緩衝剤は、L-ヒスチジン HCl を含む。一実施形態では、緩衝剤の濃度は、約 20 mM を含む。

【0009】

一実施形態では、抗凍結剤は、約 3 % (w/v)～約 8 % (w/v) である。一実施形態では、抗凍結剤は、約 4 % (w/v)～約 6 % (w/v) である。一実施形態では、抗凍結剤は、約 5 % (w/v) である。一実施形態では、抗凍結剤は、糖を含む。一実施形態では、糖は、スクロース、トレハロース、又はそれらの組み合わせを含む。一実施形態では、糖は、トレハロースを含む。

20

【0010】

一実施形態では、非イオン性界面活性剤は、約 0.0005 % (w/v)～約 0.005 % (w/v) である。一実施形態では、非イオン性界面活性剤は、約 0.00075 % (w/v)～約 0.0025 % (w/v) である。一実施形態では、非イオン性界面活性剤は、約 0.001 % (w/v) である。一実施形態では、非イオン性界面活性剤は、コポリマー、ポリオキシエチレンソルビタンエステル、リン脂質、Brij 界面活性剤、及びソルビタンエステル、又はそれらの組み合わせからなる群から選択される。一実施形態では、ポリオキシエチレンソルビタンエステルは、(PS-20)、及びポリソルベート 80 (PS-80)、又はそれらの組み合わせからなる群から選択される。一実施形態では、コポリマーは、ポロキサマーを含む。一実施形態では、ポロキサマーは、ポロキサマー 188 (P188)、ポロキサマー 237 (P237)、ポロキサマー 338 (P338)、及びポロキサマー 407 (P407)、又はそれらの組み合わせからなる群から選択される。一実施形態では、ポロキサマーは、ポロキサマー 188 (P188) を含む。

30

【0011】

一態様では、精製された AAV 粒子、緩衝剤、抗凍結剤、及び非イオン性界面活性剤を含む医薬組成物であって、(a) 精製された AAV 粒子が実質的に不純物を含まず、(b) 緩衝剤の濃度が約 20 mM であり、(c) 抗凍結剤が約 5 % (w/v) のトレハロースであり、(d) 非イオン性界面活性剤が約 0.001 % (w/v) のポロキサマー 188 である、医薬組成物が本明細書で提供される。

40

【0012】

一態様では、精製された AAV 粒子、薬学的に許容される塩、緩衝剤、抗凍結剤、及び非イオン性界面活性剤を含む医薬組成物であって、(a) 精製された AAV 粒子が実質的に不純物を含まず、(b) 薬学的に許容される塩の濃度が約 10 mM 塩化ナトリウムであり、(c) 緩衝剤の濃度が約 20 mM であり、(d) 抗凍結剤が約 5 % (w/v) のトレハロースであり、(e) 非イオン性界面活性剤が約 0.001 % (w/v) のポロキサマー 188 である医薬組成物が本明細書で提供される。

【0013】

一態様では、精製された AAV 粒子、薬学的に許容される塩、緩衝剤、抗凍結剤、及び非イオン性界面活性剤を含む医薬組成物であって、(a) 精製された AAV 粒子が実質的

50

に不純物を含まず、(b)薬学的に許容される塩の濃度が約25mMの塩化ナトリウムであり、(c)緩衝剤の濃度が約20mMであり、(d)抗凍結剤が約5%(w/v)のトレハロースであり、(e)非イオン性界面活性剤が約0.001%(w/v)のポロキサマー188である、医薬組成物が本明細書で提供される。

【0014】

一態様では、精製されたAAV粒子、薬学的に許容される塩、緩衝剤、抗凍結剤、及び非イオン性界面活性剤を含む医薬組成物であって、(a)精製されたAAV粒子が実質的に不純物を含まず、(b)薬学的に許容される塩の濃度が約50mMの塩化ナトリウムであり、(c)緩衝剤の濃度が約20mMであり、(d)抗凍結剤が約5%(w/v)のトレハロースであり、(e)非イオン性界面活性剤が約0.001%(w/v)のポロキサマー188である、医薬組成物が本明細書で提供される。

10

【0015】

一態様では、精製されたAAV粒子、薬学的に許容される塩、緩衝剤、抗凍結剤、及び非イオン性界面活性剤を含む医薬組成物であって、(a)精製されたAAV粒子が実質的に不純物を含まず、(b)薬学的に許容される塩の濃度が約100mMの塩化ナトリウムであり、(c)緩衝剤の濃度が約20mMであり、(d)抗凍結剤が約5%(w/v)のトレハロースであり、(e)非イオン性界面活性剤が約0.001%(w/v)のポロキサマー188である、医薬組成物が本明細書で提供される。

【0016】

一態様では、精製されたAAV粒子、薬学的に許容される塩、緩衝剤、抗凍結剤、及び非イオン性界面活性剤を含む医薬組成物であって、(a)精製されたAAV粒子が、実質的に不純物を含まず、(b)薬学的に許容される塩の濃度が、約125mMの塩化ナトリウムであり、(c)緩衝剤の濃度が、約20mMであり、(d)抗凍結剤が、約5%(w/v)のトレハロースであり、(e)非イオン性界面活性剤が、約0.001%(w/v)のポロキサマー188である、医薬組成物が本明細書で提供される。

20

【0017】

一態様では、精製されたAAV粒子、薬学的に許容される塩、緩衝剤、抗凍結剤、及び非イオン性界面活性剤を含む医薬組成物であって、(a)精製されたAAV粒子が、実質的に不純物を含まず、(b)薬学的に許容される塩の濃度が、約150mMの塩化ナトリウムであり、(c)緩衝剤の濃度が、約20mMであり、(d)抗凍結剤が、約5%(w/v)のトレハロースであり、(e)非イオン性界面活性剤が、約0.001%(w/v)のポロキサマー188である、医薬組成物が本明細書で提供される。

30

【0018】

一態様では、精製されたAAV粒子、薬学的に許容される塩、緩衝剤、抗凍結剤、及び非イオン性界面活性剤を含む医薬組成物であって、(a)精製されたAAV粒子が、実質的に不純物を含まず、(b)薬学的に許容される塩の濃度が、約200mMの塩化ナトリウムであり、(c)緩衝剤の濃度が、約20mMであり、(d)抗凍結剤が、約5%(w/v)のトレハロースであり、(e)非イオン性界面活性剤が、約0.001%(w/v)のポロキサマー188である、医薬組成物が本明細書で提供される。

【0019】

一実施形態では、緩衝剤は、トリスHClを含む。一実施形態では、緩衝剤は、L-ヒスチジンHClを含む。

40

【0020】

一実施形態では、医薬組成物のpHは、約4.0～約9.0である。一実施形態では、医薬組成物のpHは、約7.0～約8.0である。一実施形態では、医薬組成物のpHは、約7.3～約7.7である。一実施形態では、医薬組成物のpHは、約7.5である。

【0021】

一実施形態では、AAVは、AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、及びAAV10からなる群から選択される。一実施形態では、AAVは、rAAVを含む。

50

【0022】

一実施形態では、精製されたAAV粒子の力価は、1ミリリットル当たり約 1×10^{10} ウイルスゲノム (vg/mL) 以上である。一実施形態では、精製されたAAV粒子の力価は、1ミリリットル当たり約 1×10^{11} ウイルスゲノム (vg/mL) 以上である。一実施形態では、精製されたAAV粒子の力価は、1ミリリットル当たり約 1×10^{12} ウイルスゲノム (vg/mL) 以上である。一実施形態では、精製されたAAV粒子の力価は、1ミリリットル当たり約 1×10^{13} ウイルスゲノム (vg/mL) 以上である。一実施形態では、精製されたAAV粒子の力価は、1ミリリットル当たり約 1×10^{14} ウイルスゲノム (vg/mL) 以上である。一実施形態では、精製されたAAV粒子の力価は、1ミリリットル当たり約 1×10^{15} ウイルスゲノム (vg/mL) 以上である。

10

【0023】

一実施形態では、不純物は、プロセス関連不純物、産生物関連不純物、又はそれらの組み合わせを含む。

【0024】

一実施形態では、プロセス関連不純物は、残留宿主細胞成分、残留ウイルス産生成分、残留細胞培養成分、残留精製成分、又はそれらの組み合わせからなる群から選択される。一実施形態では、残留宿主細胞成分は、宿主細胞タンパク質、宿主細胞DNA、宿主細胞RNA、又はそれらの組み合わせを含む。一実施形態では、宿主細胞DNAは、ウイルス外クロマチン結合DNAを含む。一実施形態では、残留ウイルス産生成分は、プラスミドDNA、ヘルパーウイルス、又はそれらの組み合わせを含む。一実施形態では、残留細胞培養成分は、抗生物質、サプリメント、インデューサー、成長因子、又はそれらの組み合わせを含む。一実施形態では、残留精製成分は、緩衝液、無機塩、酵素、洗剤、培地、又はそれらの組み合わせを含む。

20

【0025】

一実施形態では、産生物関連不純物は、空のカプシド、凝集AAV粒子、分解AAV粒子、又はそれらの組み合わせを含む。

【0026】

一実施形態では、精製されたAAV粒子は、完全な又は部分的に完全なカプシドを含み、産生物関連不純物は、空のカプシドを含む。一実施形態では、精製されたAAV粒子は、完全なカプシドを含み、産生物関連不純物は、空のカプシドを含む。一実施形態では、精製されたAAV粒子は、完全なカプシドから本質的になり、産生物関連不純物は、空のカプシドを含む。

30

【0027】

一実施形態では、産生物関連不純物は、凝集AAV粒子、分解AAV粒子、又はそれらの組み合わせを含む。一実施形態では、精製されたAAV粒子は、空のカプシドを含む。一実施形態では、精製されたAAV粒子は、空のカプシドから本質的になる。一実施形態では、産生物関連不純物は、凝集AAV粒子又はその組み合わせを含む。

【0028】

一実施形態では、医薬組成物は、液体状態にある。一実施形態では、医薬組成物は、固体又は半固体形態にある。

40

【0029】

一実施形態では、医薬組成物は、精製されたAAV粒子の安定性を維持又は増強する。

【0030】

一実施形態では、医薬組成物は、精製されたAAV粒子の凝集を低減又は防止する。

【0031】

一実施形態では、医薬組成物は、(a) 精製されたAAV粒子の安定性を維持又は増強し、(b) 精製されたAAV粒子の凝集を低減又は防止する。

【0032】

一実施形態では、精製されたAAV粒子の安定性は、1回又は2回以上の凍結／解凍サ

50

イクル後に維持又は増強される。一実施形態では、精製された A A V 粒子の安定性は、3 回又は 4 回以上の凍結／解凍サイクル後に維持又は増強される。

【0033】

一実施形態では、A A V 粒子の凝集は、1 回又は 2 回以上の凍結／解凍サイクル後に 5 %未満である。一実施形態では、A A V 粒子の凝集は、1 回又は 2 回以上の凍結／解凍サイクル後に 2 %未満である。一実施形態では、A A V 粒子の凝集は、1 回又は 2 回以上の凍結／解凍サイクル後に 1 %未満である。一実施形態では、A A V 粒子の凝集は、3 回又は 4 回以上の凍結／解凍サイクル後に 5 %未満である。一実施形態では、A A V 粒子の凝集は、3 回又は 4 回以上の凍結／解凍サイクル後に 2 %未満である。一実施形態では、A A V 粒子の凝集は、3 回又は 4 回以上の凍結／解凍サイクル後に 1 %未満である。

10

【0034】

一実施形態では、A A V 粒子の安定性／又は凝集は、動的光散乱 (dynamic light scattering、D L S)、分析用超遠心分離 (analytical ultracentrifugation、A U C)、光学顕微鏡法、サイズ排除クロマトグラフィー (size exclusion chromatography、S E C)、透過型電子顕微鏡法、及び多角度静的光散乱を用いたフィールドフローフラクシオネーション (field flow fractionation with multi-angle static light scattering、F F F - M A L S) からなる群から選択されるアッセイによって測定される。

【0035】

一実施形態では、精製された A A V 粒子は、(a) A A V 粒子を含む上清を、ヌクレアーゼを含む組成物と接触させることと、(b) 粒子を精製することと、を含む、方法によって取得される。一実施形態では、ヌクレアーゼは、Benzonase、又は Benzonase (登録商標) 及びクロマチン-DNAヌクレアーゼを含む。一実施形態では、クロマチン-DNAヌクレアーゼは、MNaseを含む。

20

【0036】

一態様では、精製された A A V 粒子を含む医薬組成物を作製するための方法であって、方法が、(a) A A V 粒子を含む上清を、ヌクレアーゼを含む組成物と接触させることと、(b) A A V 粒子が不純物を実質的に含まないように、A A V 粒子を精製することと、(c) 精製された A A V 粒子を、緩衝剤、抗凍結剤、及び非イオン性界面活性剤と組み合わせることであって、(i) 緩衝剤の濃度が、約 0 mM～約 50 mMであり、(ii) 抗凍結剤が、約 1 %～約 10 % (w/v) であり、かつ (iii) 非イオン性界面活性剤が、約 0.0001 % (w/v)～約 0.1 % (w/v) である、組み合わせることと、を含む、方法が本明細書で提供される。一実施形態では、ステップ (c) は、薬学的に許容される塩を更に含み、薬学的に許容される塩の濃度は、約 1 mM～約 200 mMである。

30

【0037】

一実施形態では、薬学的に許容される塩は、約 10 mM～約 150 mMである。一実施形態では、薬学的に許容される塩は、約 1 mM～約 49 mMである。一実施形態では、薬学的に許容される塩は、約 5 mM～約 45 mMである。一実施形態では、薬学的に許容される塩は、約 7.5 mM～約 40 mMである。一実施形態では、薬学的に許容される塩は、約 10 mM～約 30 mMである。一実施形態では、薬学的に許容される塩の濃度は、約 10 mMである。一実施形態では、薬学的に許容される塩の濃度は、約 100 mMである。一実施形態では、薬学的に許容される塩の濃度は、約 150 mMである。

40

【0038】

一実施形態では、薬学的に許容される塩は、ナトリウム塩、マグネシウム塩、カルシウム塩、カリウム塩、リン酸塩、及び硫酸塩からなる群から選択される。一実施形態では、ナトリウム塩は、塩化ナトリウムを含む。

【0039】

一実施形態では、緩衝剤は、トリス HCl を含む。一実施形態では、緩衝剤は、L-ヒスチジン HCl を含む。一実施形態では、緩衝剤の濃度は、約 20 mMを含む。

【0040】

50

一実施形態では、抗凍結剤は、約 3 % (w / v) ~ 約 8 % (w / v) である。一実施形態では、抗凍結剤は、約 4 % (w / v) ~ 約 6 % (w / v) である。一実施形態では、抗凍結剤は、約 5 % (w / v) である。一実施形態では、抗凍結剤は、糖を含む。一実施形態では、糖は、スクロース、トレハロース、又はそれらの組み合わせを含む。一実施形態では、糖は、トレハロースを含む。

【0041】

一実施形態では、非イオン性界面活性剤は、約 0.0005 % (w / v) ~ 約 0.005 % (w / v) である。一実施形態では、非イオン性界面活性剤は、約 0.00075 % (w / v) ~ 約 0.0025 % (w / v) である。一実施形態では、非イオン性界面活性剤は、約 0.001 % (w / v) である。一実施形態では、非イオン性界面活性剤は、コポリマー、ポリオキシエチレンソルビタンエステル、リン脂質、Br i j 界面活性剤、及びソルビタンエステル、又はそれらの組み合わせからなる群から選択される。一実施形態では、ポリオキシエチレンソルビタンエステルは、(P S - 20)、及びポリソルベート 80 (P S - 80)、又はそれらの組み合わせからなる群から選択される。一実施形態では、コポリマーは、ポロキサマーを含む。一実施形態では、ポロキサマーは、ポロキサマー 188 (P 188)、ポロキサマー 237 (P 237)、ポロキサマー 338 (P 338)、及びポロキサマー 407 (P 407)、又はそれらの組み合わせからなる群から選択される。一実施形態では、ポロキサマーは、ポロキサマー 188 (P 188) を含む。

10

【0042】

一実施形態では、医薬組成物の pH は、約 4.0 ~ 約 9.0 である。一実施形態では、医薬組成物の pH は、約 7.0 ~ 約 8.0 である。一実施形態では、医薬組成物の pH は、約 7.3 ~ 約 7.7 である。一実施形態では、医薬組成物の pH は、約 7.5 である。

20

【0043】

一実施形態では、AAV は、AAV 1、AAV 2、AAV 3、AAV 4、AAV 5、AAV 6、AAV 7、AAV 8、AAV 9、及び AAV 10 からなる群から選択される。一実施形態では、AAV は、r AAV を含む。

【0044】

一実施形態では、ヌクレアーゼは、Benzonase、又は Benzonase (登録商標) 及びクロマチン-DNA ヌクレアーゼを含む。一実施形態では、クロマチン-DNA ヌクレアーゼは、MNase を含む。

30

【0045】

一実施形態では、精製された AAV 粒子の力価は、1 ミリリットル当たり約 1×10^{10} ウイルスゲノム (vg / mL) 以上である。一実施形態では、精製された AAV 粒子の力価は、1 ミリリットル当たり約 1×10^{11} ウイルスゲノム (vg / mL) 以上である。一実施形態では、精製された AAV 粒子の力価は、1 ミリリットル当たり約 1×10^{12} ウイルスゲノム (vg / mL) 以上である。一実施形態では、精製された AAV 粒子の力価は、1 ミリリットル当たり約 1×10^{13} ウイルスゲノム (vg / mL) 以上である。一実施形態では、精製された AAV 粒子の力価は、1 ミリリットル当たり約 1×10^{14} ウイルスゲノム (vg / mL) 以上である。一実施形態では、精製された AAV 粒子の力価は、1 ミリリットル当たり約 1×10^{15} ウイルスゲノム (vg / mL) 以上である。

40

【0046】

一実施形態では、不純物は、プロセス関連不純物、産生物関連不純物、又はそれらの組み合わせを含む。

【0047】

一実施形態では、プロセス関連不純物は、残留宿主細胞成分、残留ウイルス産生成分、残留細胞培養成分、残留精製成分、又はそれらの組み合わせからなる群から選択される。一実施形態では、残留宿主細胞成分は、宿主細胞タンパク質、宿主細胞 DNA、宿主細胞 RNA、又はそれらの組み合わせを含む。一実施形態では、宿主細胞 DNA は、ウイルス外クロマチン結合 DNA を含む。一実施形態では、残留ウイルス産生成分は、プラスミド

50

DNA、ヘルパーウイルス、又はそれらの組み合わせを含む。一実施形態では、残留細胞培養成分は、抗生物質、サプリメント、インデューサー、成長因子、又はそれらの組み合わせを含む。一実施形態では、残留精製成分は、緩衝液、無機塩、酵素、洗剤、培地、又はそれらの組み合わせを含む。

【0048】

一実施形態では、産生物関連不純物は、空のカプシド、凝集AAV粒子、分解AAV粒子、又はそれらの組み合わせを含む。一実施形態では、精製されたAAV粒子は、完全な又は部分的に完全なカプシドを含み、産生物関連不純物は、空のカプシドを含む。一実施形態では、精製されたAAV粒子は、完全なカプシドを含み、産生物関連不純物は、空のカプシドを含む。一実施形態では、精製されたAAV粒子は、完全なカプシドから本質的になり、産生物関連不純物は、空のカプシドを含む。

10

【0049】

一実施形態では、産生物関連不純物は、凝集AAV粒子、分解AAV粒子、又はそれらの組み合わせを含む。一実施形態では、精製されたAAV粒子は、空のカプシドを含む。一実施形態では、精製されたAAV粒子は、空のカプシドから本質的になる。一実施形態では、産生物関連不純物は、凝集したAAV粒子を含む。

【0050】

一態様では、精製されたAAV粒子の安定性を維持又は増強するための手段を含む医薬組成物が、本明細書で提供される。一実施形態では、精製されたAAV粒子の安定性は、1回又は2回以上の凍結／解凍サイクル後に維持又は増強される。一実施形態では、精製されたAAV粒子の安定性は、3回又は4回以上の凍結／解凍サイクル後に維持又は増強される。一実施形態では、AAV粒子の安定性は、動的光散乱(DLS)、分析用超遠心分離(UC)、光学顕微鏡法、サイズ排除クロマトグラフィー(SEC)、透過型電子顕微鏡法、及び多角度静的光散乱を用いたフィールドフローフラクシオネーション(FFF-MALS)からなる群から選択されるアッセイによって測定される。

20

【0051】

一態様では、精製されたAAV粒子の凝集を減少又は防止させるための手段を含む医薬組成物が、本明細書で提供される。一実施形態では、AAV粒子の凝集は、1回又は2回以上の凍結／解凍サイクル後に5%未満である。一実施形態では、AAV粒子の凝集は、1回又は2回以上の凍結／解凍サイクル後に2%未満である。一実施形態では、AAV粒子の凝集は、1回又は2回以上の凍結／解凍サイクル後に1%未満である。一実施形態では、AAV粒子の凝集は、3回又は4回以上の凍結／解凍サイクル後に5%未満である。一実施形態では、AAV粒子の凝集は、3回又は4回以上の凍結／解凍サイクル後に2%未満である。一実施形態では、AAV粒子の凝集は、3回又は4回以上の凍結／解凍サイクル後に1%未満である。一実施形態では、AAV粒子は、動的光散乱(DLS)、分析用超遠心分離(UC)、光学顕微鏡法、サイズ排除クロマトグラフィー(SEC)、透過型電子顕微鏡法、及び多角度静的光散乱を用いたフィールドフローフラクシオネーション(FFF-MALS)からなる群から選択されるアッセイによって測定される。

30

【0052】

一態様では、(a)精製されたAAV粒子の安定性を維持又は増強する、及び(b)精製されたAAV粒子の凝集を減少又は防止するための手段を含む、医薬組成物が、本明細書で提供される。一実施形態では、精製されたAAV粒子の安定性は、1回又は2回以上の凍結／解凍サイクル後に維持又は増強される。一実施形態では、精製されたAAV粒子の安定性は、3回又は4回以上の凍結／解凍サイクル後に維持又は増強される。一実施形態では、AAV粒子の凝集は、1回又は2回以上の凍結／解凍サイクル後に5%未満である。一実施形態では、AAV粒子の凝集は、1回又は2回以上の凍結／解凍サイクル後に2%未満である。一実施形態では、AAV粒子の凝集は、1回又は2回以上の凍結／解凍サイクル後に1%未満である。一実施形態では、AAV粒子の凝集は、3回又は4回以上の凍結／解凍サイクル後に5%未満である。一実施形態では、AAV粒子の凝集は、3回又は4回以上の凍結／解凍サイクル後に2%未満である。一実施形態では、AAV粒子の

40

50

凝集は、3回又は4回以上の凍結／解凍サイクル後に1%未満である。一実施形態では、AAV粒子の安定性及び凝集は、動的光散乱（DLS）、分析用超遠心分離（AUC）、光学顕微鏡法、サイズ排除クロマトグラフィー（SEC）、透過型電子顕微鏡法、及び多角度静的光散乱を用いたフィールドフローフラクショネーション（FFF-MALS）からなる群から選択されるアッセイによって測定される。

【0053】

一態様では、精製されたAAV粒子、緩衝剤、抗凍結剤、及び非イオン性界面活性剤を含む医薬組成物を作製及び取得するための手段を含むシステムであって、（a）精製されたAAV粒子が、実質的に不純物を含まず、（b）緩衝剤の濃度が、約0mM～約50mMであり、（c）抗凍結剤が、約1%～約10%（w/v）であり、（d）非イオン性界面活性剤が、約0.0001%（w/v）～約0.1%（w/v）である、システムが、本明細書で提供される。一実施形態では、医薬組成物は、薬学的に許容される塩を更に含み、薬学的に許容される塩の濃度は、約1mM～約200mMである。一実施形態では、薬学的に許容される塩は、約10mM～約150mMである。一実施形態では、薬学的に許容される塩の濃度は、約10mMである。一実施形態では、薬学的に許容される塩の濃度は、約100mMである。一実施形態では、薬学的に許容される塩の濃度は、約150mMである。

【0054】

一態様では、精製されたAAV粒子、薬学的に許容される塩、緩衝剤、抗凍結剤、及び非イオン性界面活性剤を含む医薬組成物を作製及び取得するための手段を含むシステムであって、（a）精製されたAAV粒子が、実質的に不純物を含まず、（b）緩衝剤の濃度が、約0mM～約50mMであり、（c）抗凍結剤が、約1%～約10%（w/v）であり、（d）非イオン性界面活性剤が、約0.0001%（w/v）～約0.1%（w/v）である、システムが、本明細書で提供される。一実施形態では、医薬組成物は、薬学的に許容される塩を更に含み、薬学的に許容される塩の濃度は、約1mM～約200mMである。一実施形態では、薬学的に許容される塩は、約10mM～約150mMである。一実施形態では、薬学的に許容される塩の濃度は、約10mMである。一実施形態では、薬学的に許容される塩の濃度は、約100mMである。一実施形態では、薬学的に許容される塩の濃度は、約150mMである。

【0055】

一態様では、精製されたAAV粒子、薬学的に許容される塩、緩衝剤、抗凍結剤、及び非イオン性界面活性剤を含む医薬組成物を作製及び入手するための手段を含むシステムであって、（a）精製されたAAV粒子が、実質的に不純物を含まず、（b）薬学的に許容される塩の濃度が、約1mM～約49mMであり、（c）緩衝剤の濃度が、約0mM～約50mMであり、（d）抗凍結剤が、約1%～約10%（w/v）であり、（e）非イオン性界面活性剤が、約0.0001%（w/v）～約0.1%（w/v）である、システムが、本明細書で提供される。一実施形態では、薬学的に許容される塩の濃度は、約5mM～約45mMである。一実施形態では、薬学的に許容される塩の濃度は、約7.5mM～約40mMである。一実施形態では、薬学的に許容される塩の濃度は、約10mM～約30mMである。一実施形態では、薬学的に許容される塩の濃度は、約10mMである。

【0056】

一実施形態では、薬学的に許容される塩は、ナトリウム塩、マグネシウム塩、カルシウム塩、カリウム塩、リン酸塩、及び硫酸塩からなる群から選択される。一実施形態では、ナトリウム塩は、塩化ナトリウムを含む。

【0057】

一実施形態では、緩衝剤は、トリスHClを含む。一実施形態では、緩衝剤は、L-ヒスチジンHClを含む。一実施形態では、緩衝剤の濃度は、約20mMを含む。

【0058】

一実施形態では、抗凍結剤は、約3%（w/v）～約8%（w/v）である。一実施形態では、抗凍結剤は、約4%（w/v）～約6%（w/v）である。一実施形態では、抗

凍結剤は、約 5 % (w / v) である。一実施形態では、抗凍結剤は、糖を含む。一実施形態では、糖は、スクロース、トレハロース、又はそれらの組み合わせを含む。一実施形態では、糖は、トレハロースを含む。

【0059】

一実施形態では、非イオン性界面活性剤は、約 0.0005 % (w / v) ~ 約 0.005 % (w / v) である。一実施形態では、非イオン性界面活性剤は、約 0.00075 % (w / v) ~ 約 0.0025 % (w / v) である。一実施形態では、非イオン性界面活性剤は、約 0.001 % (w / v) である。一実施形態では、非イオン性界面活性剤は、コポリマー、ポリオキシエチレンソルビタンエステル、リン脂質、Br i j 界面活性剤、及びソルビタンエステル、又はそれらの組み合わせからなる群から選択される。一実施形態では、ポリオキシエチレンソルビタンエステルは、(PS-20)、及びポリソルベート 80 (PS-80)、又はそれらの組み合わせからなる群から選択される。一実施形態では、コポリマーは、ポロキサマーを含む。一実施形態では、ポロキサマーは、ポロキサマー 188 (P188)、ポロキサマー 237 (P237)、ポロキサマー 338 (P338)、及びポロキサマー 407 (P407)、又はそれらの組み合わせからなる群から選択される。一実施形態では、ポロキサマーは、ポロキサマー 188 (P188) を含む。

10

【0060】

一態様では、精製された AAV 粒子、緩衝剤、抗凍結剤、及び非イオン性界面活性剤を含む医薬組成物を作製及び入手するための手段を含むシステムであって、(a) 精製された AAV 粒子が、実質的に不純物を含まず、(b) 緩衝剤の濃度が、約 20 mM であり、(c) 抗凍結剤が、約 5 % (w / v) のトレハロースであり、(d) 非イオン性界面活性剤が、約 0.001 % (w / v) のポロキサマー 188 である、システムが、本明細書で提供される。

20

【0061】

一態様では、精製された AAV 粒子、薬学的に許容される塩、緩衝剤、抗凍結剤、及び非イオン性界面活性剤を含む医薬組成物を作製及び入手するための手段を含むシステムであって、(a) 精製された AAV 粒子が、実質的に不純物を含まず、(b) 薬学的に許容される塩の濃度が、約 10 mM の塩化ナトリウムであり、(c) 緩衝剤の濃度が、約 20 mM であり、(d) 抗凍結剤が、約 5 % (w / v) のトレハロースであり、(e) 非イオン性界面活性剤が、約 0.001 % (w / v) のポロキサマー 188 である、システムが、本明細書で提供される。

30

【0062】

一態様では、精製された AAV 粒子、薬学的に許容される塩、緩衝剤、抗凍結剤、及び非イオン性界面活性剤を含む医薬組成物を作製及び入手するための手段を含むシステムであって、(a) 精製された AAV 粒子が、実質的に不純物を含まず、(b) 薬学的に許容される塩の濃度が、約 25 mM の塩化ナトリウムであり、(c) 緩衝剤の濃度が、約 20 mM であり、(d) 抗凍結剤が、約 5 % (w / v) のトレハロースであり、(e) 非イオン性界面活性剤が、約 0.001 % (w / v) のポロキサマー 188 である、システムが、本明細書で提供される。

40

【0063】

一態様では、精製された AAV 粒子、薬学的に許容される塩、緩衝剤、抗凍結剤、及び非イオン性界面活性剤を含む医薬組成物を作製及び入手するための手段を含むシステムであって、(a) 精製された AAV 粒子が、実質的に不純物を含まず、(b) 薬学的に許容される塩の濃度が、約 50 mM の塩化ナトリウムであり、(c) 緩衝剤の濃度が、約 20 mM であり、(d) 抗凍結剤が、約 5 % (w / v) のトレハロースであり、(e) 非イオン性界面活性剤が、約 0.001 % (w / v) のポロキサマー 188 である、システムが、本明細書で提供される。

【0064】

一態様では、精製された AAV 粒子、薬学的に許容される塩、緩衝剤、抗凍結剤、及び非イオン性界面活性剤を含む医薬組成物を作製及び取得するための手段を含むシステムで

50

あって、(a) 精製された AAV 粒子が、実質的に不純物を含まず、(b) 薬学的に許容される塩の濃度が、約 100 mM の塩化ナトリウムであり、(c) 緩衝剤の濃度が、約 20 mM であり、(d) 抗凍結剤が、約 5 % (w/v) のトレハロースであり、(e) 非イオン性界面活性剤が、約 0.001 % (w/v) のポロキサマー 188 である、システムが、本明細書で提供される。

【0065】

一態様では、精製された AAV 粒子、薬学的に許容される塩、緩衝剤、抗凍結剤、及び非イオン性界面活性剤を含む医薬組成物を作製及び入手するための手段を含むシステムであって、(a) 精製された AAV 粒子が、実質的に不純物を含まず、(b) 薬学的に許容される塩の濃度が、約 125 mM の塩化ナトリウムであり、(c) 緩衝剤の濃度が、約 20 mM であり、(d) 抗凍結剤が、約 5 % (w/v) のトレハロースであり、(e) 非イオン性界面活性剤が、約 0.001 % (w/v) のポロキサマー 188 である、システムが、本明細書で提供される。

10

【0066】

一態様では、精製された AAV 粒子、薬学的に許容される塩、緩衝剤、抗凍結剤、及び非イオン性界面活性剤を含む医薬組成物を作製及び入手するための手段を含むシステムであって、(a) 精製された AAV 粒子が、実質的に不純物を含まず、(b) 薬学的に許容される塩の濃度が、約 150 mM の塩化ナトリウムであり、(c) 緩衝剤の濃度が、約 20 mM であり、(d) 抗凍結剤が、約 5 % (w/v) のトレハロースであり、(e) 非イオン性界面活性剤が、約 0.001 % (w/v) のポロキサマー 188 である、システムが、本明細書で提供される。

20

【0067】

一態様では、精製された AAV 粒子、薬学的に許容される塩、緩衝剤、抗凍結剤、及び非イオン性界面活性剤を含む医薬組成物を作製及び入手するための手段を含むシステムであって、(a) 精製された AAV 粒子が、実質的に不純物を含まず、(b) 薬学的に許容される塩の濃度が、約 200 mM の塩化ナトリウムであり、(c) 緩衝剤の濃度が、約 20 mM であり、(d) 抗凍結剤が、約 5 % (w/v) のトレハロースであり、(e) 非イオン性界面活性剤が、約 0.001 % (w/v) のポロキサマー 188 である、システムが、本明細書で提供される。

【0068】

一実施形態では、緩衝剤は、トリス HCl を含む。一実施形態では、緩衝剤は、L-ヒスチジン HCl を含む。

30

【0069】

一実施形態では、医薬組成物の pH は、約 4.0 ~ 約 9.0 である。一実施形態では、医薬組成物の pH は、約 7.0 ~ 約 8.0 である。一実施形態では、医薬組成物の pH は、約 7.3 ~ 約 7.7 である。一実施形態では、医薬組成物の pH は、約 7.5 である。

【0070】

一実施形態では、AAV は、AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、及び AAV10 からなる群から選択される。一実施形態では、AAV は、rAAV を含む。

40

【0071】

一実施形態では、精製された AAV 粒子の力価は、1 ミリリットル当たり約 1×10^{10} ウイルスゲノム (vg/mL) 以上である。一実施形態では、精製された AAV 粒子の力価は、1 ミリリットル当たり約 1×10^{11} ウイルスゲノム (vg/mL) 以上である。一実施形態では、精製された AAV 粒子の力価は、1 ミリリットル当たり約 1×10^{12} ウイルスゲノム (vg/mL) 以上である。一実施形態では、精製された AAV 粒子の力価は、1 ミリリットル当たり約 1×10^{13} ウイルスゲノム (vg/mL) 以上である。一実施形態では、精製された AAV 粒子の力価は、1 ミリリットル当たり約 1×10^{14} ウイルスゲノム (vg/mL) 以上である。一実施形態では、精製された AAV 粒子の力価は、1 ミリリットル当たり約 1×10^{15} ウイルスゲノム (vg/mL) 以上である。

50

。

【0072】

一実施形態では、不純物は、プロセス関連不純物、産生物関連不純物、又はそれらの組み合わせを含む。

【0073】

一実施形態では、プロセス関連不純物は、残留宿主細胞成分、残留ウイルス産生成分、残留細胞培養成分、残留精製成分、又はそれらの組み合わせからなる群から選択される。一実施形態では、残留宿主細胞成分は、宿主細胞タンパク質、宿主細胞DNA、宿主細胞RNA、又はそれらの組み合わせを含む。一実施形態では、宿主細胞DNAは、ウイルス外クロマチン結合DNAを含む。一実施形態では、残留ウイルス産生成分は、プラスミドDNA、ヘルパーウイルス、又はそれらの組み合わせを含む。一実施形態では、残留細胞培養成分は、抗生物質、サプリメント、インデューサー、成長因子、又はそれらの組み合わせを含む。一実施形態では、残留精製成分は、緩衝液、無機塩、酵素、洗剤、培地、又はそれらの組み合わせを含む。

10

【0074】

一実施形態では、産生物関連不純物は、空のカプシド、凝集AAV粒子、分解AAV粒子、又はそれらの組み合わせを含む。

【0075】

一実施形態では、精製されたAAV粒子は、完全な又は部分的に完全なカプシドを含み、産生物関連不純物は、空のカプシドを含む。一実施形態では、精製されたAAV粒子は、完全なカプシドを含み、産生物関連不純物は、空のカプシドを含む。一実施形態では、精製されたAAV粒子は、完全なカプシドから本質的になり、産生物関連不純物は、空のカプシドを含む。

20

【0076】

一実施形態では、産生物関連不純物は、凝集AAV粒子、分解AAV粒子、又はそれらの組み合わせを含む。一実施形態では、精製されたAAV粒子は、空のカプシドを含む。一実施形態では、精製されたAAV粒子は、空のカプシドから本質的になる。一実施形態では、産生物関連不純物は、凝集AAV粒子又はその組み合わせを含む。

【0077】

一実施形態では、医薬組成物は、液体状態にある。一実施形態では、医薬組成物は、固体又は半固体状態にある。

30

【0078】

一実施形態では、医薬組成物は、精製されたAAV粒子の安定性を維持又は増強する。

【0079】

一実施形態では、医薬組成物は、精製されたAAV粒子の凝集を低減又は防止する。

【0080】

一実施形態では、医薬組成物は、(a) 精製されたAAV粒子の安定性を維持又は増強し、(b) 精製されたAAV粒子の凝集を低減又は防止する。

【0081】

一実施形態では、精製されたAAV粒子の安定性は、1回又は2回以上の凍結／解凍サイクル後に維持又は増強される。一実施形態では、精製されたAAV粒子の安定性は、3回又は4回以上の凍結／解凍サイクル後に維持又は増強される。

40

【0082】

一実施形態では、AAV粒子の凝集は、1回又は2回以上の凍結／解凍サイクル後に5%未満である。一実施形態では、AAV粒子の凝集は、1回又は2回以上の凍結／解凍サイクル後に2%未満である。一実施形態では、AAV粒子の凝集は、1回又は2回以上の凍結／解凍サイクル後に1%未満である。一実施形態では、AAV粒子の凝集は、3回又は4回以上の凍結／解凍サイクル後に5%未満である。一実施形態では、AAV粒子の凝集は、3回又は4回以上の凍結／解凍サイクル後に2%未満である。一実施形態では、AAV粒子の凝集は、3回又は4回以上の凍結／解凍サイクル後に1%未満である。

50

【0083】

一実施形態では、AAV粒子の安定性／又は凝集は、動的光散乱（DLS）、分析用超遠心分離（AUC）、光学顕微鏡法、サイズ排除クロマトグラフィー（SEC）、透過型電子顕微鏡法、及び多角度静的光散乱を用いたフィールドフローフラクシオネーション（FFF-MALS）からなる群から選択されるアッセイによって測定される。

【0084】

一実施形態では、精製されたAAV粒子は、（a）AAV粒子を含む上清を、ヌクレアーゼを含む組成物と接触させることと、（b）粒子を精製することと、を含む、方法によって取得される。一実施形態では、ヌクレアーゼは、Benzonase、又はBenzonase（登録商標）及びクロマチン-DNAヌクレアーゼを含む。一実施形態では、クロマチン-DNAヌクレアーゼは、MNaseを含む。

【図面の簡単な説明】

【0085】

上記の概要、及び本出願の好ましい実施形態の以下の詳細な説明は、添付の図面と併せて読むことでより良く理解されるであろう。しかしながら、本出願は、図面に示される実施形態そのものに限定されないことを理解するべきである。

【図1A】4つの代表的な製剤について動的光散乱（DLS）によって測定されたAAV粒径データ（凍結前）を示す。図1Aは、例示的な製剤#1（20mMのトリス-HCl pH7.5、10mMのNaCl、5%のトレハロース、及び0.001%のポロキサマー188）中の精製されたAAV粒子を示す。

【図1B】4つの代表的な製剤について動的光散乱（DLS）によって測定されたAAV粒径データ（凍結前）を示す。図1Bは、例示的な製剤#2（20mMのトリス-HCl pH7.5、100mMのNaCl、5%のトレハロース、及び0.001%のポロキサマー188）中の精製されたAAV粒子を示す。

【図1C】4つの代表的な製剤について動的光散乱（DLS）によって測定されたAAV粒径データ（凍結前）を示す。図1Cは、例示的な製剤#3（20mMのトリス-HCl pH7.5、150mMのNaCl、5%のトレハロース、及び0.001%のポロキサマー188）中の精製されたAAV粒子を示す。

【図1D】4つの代表的な製剤について動的光散乱（DLS）によって測定されたAAV粒径データ（凍結前）を示す。図1Dは、例示的な製剤#4（20mMのトリス-HCl pH7.5、200mMのNaCl、5%のトレハロース、及び0.001%のポロキサマー188）中の精製されたAAV粒子を示す。

【図2A】4つの代表的な製剤について動的光散乱（DLS）によって測定された、単一凍結／解凍サイクル後のAAV粒径データを示す。図2Aは、例示的な製剤#1（20mMのトリス-HCl pH7.5、10mMのNaCl、5%のトレハロース、及び0.001%のポロキサマー188）中の精製されたAAV粒子を示す。

【図2B】4つの代表的な製剤について動的光散乱（DLS）によって測定された、単一凍結／解凍サイクル後のAAV粒径データを示す。図2Bは、例示的な製剤#2（20mMのトリス-HCl pH7.5、100mMのNaCl、5%のトレハロース、及び0.001%のポロキサマー188）中の精製されたAAV粒子を示す。

【図2C】4つの代表的な製剤について動的光散乱（DLS）によって測定された、単一凍結／解凍サイクル後のAAV粒径データを示す。図2Cは、例示的な製剤#3（20mMのトリス-HCl pH7.5、150mMのNaCl、5%のトレハロース、及び0.001%のポロキサマー188）中の精製されたAAV粒子を示す。

【図2D】4つの代表的な製剤について動的光散乱（DLS）によって測定された、単一凍結／解凍サイクル後のAAV粒径データを示す。図2Dは、例示的な製剤#4（20mMのトリス-HCl pH7.5、200mMのNaCl、5%のトレハロース、及び0.001%のポロキサマー188）中の精製されたAAV粒子を示す。

【図3A】4つの代表的な製剤について動的光散乱（DLS）によって測定された、3回の凍結／解凍サイクル後のAAV粒径データを示す。図3Aは、例示的な製剤#1（20

10

20

30

40

50

mMのトリス-HCl pH7.5、10mMのNaCl、5%のトレハロース、及び0.001%のポロキサマー188)中の精製されたAAV粒子を示す。

【図3B】4つの代表的な製剤について動的光散乱(DLS)によって測定された、3回の凍結／解凍サイクル後のAAV粒径データを示す。図3Bは、例示的な製剤#2(20mMのトリス-HCl pH7.5、100mMのNaCl、5%のトレハロース、及び0.001%のポロキサマー188)中の精製されたAAV粒子を示す。

【図3C】4つの代表的な製剤について動的光散乱(DLS)によって測定された、3回の凍結／解凍サイクル後のAAV粒径データを示す。図3Cは、例示的な製剤#3(20mMのトリス-HCl pH7.5、150mMのNaCl、5%のトレハロース、及び0.001%のポロキサマー188)中の精製されたAAV粒子を示す。

【図3D】4つの代表的な製剤について動的光散乱(DLS)によって測定された、3回の凍結／解凍サイクル後のAAV粒径データを示す。図3Dは、例示的な製剤#4(20mMのトリス-HCl pH7.5、200mMのNaCl、5%のトレハロース、及び0.001%のポロキサマー188)中の精製されたAAV粒子を示す。

【図4A】MNase処理なしのAAV粒子精製(図4A)を伴う、例示的なAAV精製方法を示す。産生物後ピークに対する、260nm(RNA/DNA)吸光度の大きな寄与は、MNase処理後に、280nm(タンパク質)吸光度ピークと同様に大きく減少する。

【図4B】60U/mLのMNase処理ありのAAV粒子精製(図4B)を伴う、例示的なAAV精製方法を示す。産生物後ピークに対する、260nm(RNA/DNA)吸光度の大きな寄与は、MNase処理後に、280nm(タンパク質)吸光度ピークと同様に大きく減少する。

【図5A】MNaseを用いて又は用いずに処理された試料を含む、rAAV8粒子からのクロマトグラムのオーバーレイを示す。MNaseの添加は、DNA/RNA(260nm)(図5A)に対する産生物後ピーク高さの有意な減少を引き起こし、これは、産生物後ピークが、ウイルス外で結合したクロマチンを含有するAAV粒子であること、及びMNase処理がAAV粒子精製を強化したことを示した。

【図5B】MNaseを用いて又は用いずに処理された試料を含む、rAAV8粒子からのクロマトグラムのオーバーレイを示す。MNaseの添加は、タンパク質(280nm)(図5B)に対する産生物後ピーク高さの有意な減少を引き起こし、これは、産生物後ピークが、ウイルス外で結合したクロマチンを含有するAAV粒子であること、及びMNase処理がAAV粒子精製を強化したことを示した。

【図6】産生物後ピークの検査により、Expifectamine(商標)293トランスフェクションキットエンハンサーを使用して、又はエンハンサーを用いずに、のいずれかで産生されたMNase処理なしの試料において、視認できる沈殿物が示されたことを示す。しかし、MNaseによる消化は、ウイルス粒子の凝集及び沈殿を妨げた。

【図7A】MNase処理が、MNase処理なしの試料及びExpifectamine(商標)293トランスフェクションキットエンハンサーを使用して生成された試料と比較した場合に、ウイルス力価(図7A)を増加させ、かつ産生された産生物後の量を低減させたことを示す。

【図7B】MNase処理が、MNase処理なしの試料及びExpifectamine(商標)293トランスフェクションキットエンハンサーを使用して生成された試料と比較した場合に、ゲノムコピー／細胞(図7B)を増加させ、かつ産生された産生物後の量を低減させたことを示す。

【図7C】MNase処理が、MNase処理なしの試料及びExpifectamine(商標)293トランスフェクションキットエンハンサーを使用して生成された試料と比較した場合に、総ゲノムコピー(図7C)を増加させ、かつ産生された産生物後の量を低減させたことを示す。

【図8A】細胞当たりのゲノムコピー(GC／細胞)(図8A)の増加が、3つの異なる溶出緩衝液(クエン酸塩、低pH、及び低／高pH)の各々について、MNase処理な

10

20

30

40

50

しの試料（四角）と比較した場合に、MNase処理された試料（丸）において一貫して観察されたことを示す。

【図8B】総ゲノムコピー（図8B）の増加が、3つの異なる溶出緩衝液（クエン酸塩、低pH、及び低／高pH）の各々について、MNase処理なしの試料（四角）と比較した場合に、MNase処理された試料（丸）において一貫して観察されたことを示す。

【図9A】表3に記載される異なる精製条件を使用したウイルス精製の概要を示す。図9Aは、精製されたAAV粒子の銀染色を示す。3つの強いバンドは、VP1、VP2、及びVP3に対応する。C＝クエン酸塩、pH2.5、P＝リン酸、pH1.5、「+1」＝pH10.3、「+2」＝pH9.5、「+3」＝pH10.2、「+4」＝pH10.4、*＝(C₂H₅)NCL陰イオン交換溶出。

10

【図9B】表3に記載される異なる精製条件を使用したウイルス精製の概要を示す。図9Bは、DNAアガロースゲル電気泳動及びAAV内に含まれるITR導入遺伝子の存在を示す。C＝クエン酸塩、pH2.5、P＝リン酸、pH1.5、「+1」＝pH10.3、「+2」＝pH9.5、「+3」＝pH10.2、「+4」＝pH10.4、*＝(C₂H₅)NCL陰イオン交換溶出。

【図10A】静的光散乱（SLS）からの結果、並びに酵素処理なし（図10A）、benzonase処理のみ（図10B）、benzonase処理及びMNase処理（図10C）、benzonase処理、MNase処理なし、高pH洗浄、及びリン酸溶出（図10D）、並びにbenzonase処理、MNase処理、高pH洗浄、及びリン酸溶出（図10E）後のタンパク質凝集（Tagg）曲線及び融解（Tm）曲線を示す。

20

【図10B】静的光散乱（SLS）からの結果、並びに酵素処理なし（図10A）、benzonase処理のみ（図10B）、benzonase処理及びMNase処理（図10C）、benzonase処理、MNase処理なし、高pH洗浄、及びリン酸溶出（図10D）、並びにbenzonase処理、MNase処理、高pH洗浄、及びリン酸溶出（図10E）後のタンパク質凝集（Tagg）曲線及び融解（Tm）曲線を示す。

【図10C】静的光散乱（SLS）からの結果、並びに酵素処理なし（図10A）、benzonase処理のみ（図10B）、benzonase処理及びMNase処理（図10C）、benzonase処理、MNase処理なし、高pH洗浄、及びリン酸溶出（図10D）、並びにbenzonase処理、MNase処理、高pH洗浄、及びリン酸溶出（図10E）後のタンパク質凝集（Tagg）曲線及び融解（Tm）曲線を示す。

30

【図10D】静的光散乱（SLS）からの結果、並びに酵素処理なし（図10A）、benzonase処理のみ（図10B）、benzonase処理及びMNase処理（図10C）、benzonase処理、MNase処理なし、高pH洗浄、及びリン酸溶出（図10D）、並びにbenzonase処理、MNase処理、高pH洗浄、及びリン酸溶出（図10E）後のタンパク質凝集（Tagg）曲線及び融解（Tm）曲線を示す。

【図10E】静的光散乱（SLS）からの結果、並びに酵素処理なし（図10A）、benzonase処理のみ（図10B）、benzonase処理及びMNase処理（図10C）、benzonase処理、MNase処理なし、高pH洗浄、及びリン酸溶出（図10D）、並びにbenzonase処理、MNase処理、高pH洗浄、及びリン酸溶出（図10E）後のタンパク質凝集（Tagg）曲線及び融解（Tm）曲線を示す。

40

【図11A】benzonaseを用いない、又はMNaseを用いない精製（「酵素なし」）、（2）benzonase及びクエン酸塩溶出を用いた精製（「B、クエン酸塩（アフィニティー）」）、（3）benzonase及びクエン酸塩溶出を用いた精製（「B、クエン酸塩」）、（4）benzonase、MNase、及びリン酸溶出を用いた精製（「B、M、Phos」）、（5）benzonase、高pH（pH10.3）洗浄、及びリン酸溶出を用いた精製（「B、pH10.3、Phos」）、並びに（6）benzonase、MNase、及びリン酸溶出を用いた精製（「B、M、pH10.3、Phos」）後の宿主細胞DNAを検出する、AlphaLISAを使用した生カウント（図11A）を示す。

【図11B】benzonaseを用いない、又はMNaseを用いない精製（「酵素なし」）

50

し」)、(2) *benzonase* 及びクエン酸塩溶出を用いた精製(「B、クエン酸塩(アフィニティー)」)、(3) *benzonase* 及びクエン酸塩溶出を用いた精製(「B、クエン酸塩」)、(4) *benzonase*、*MNase*、及びリン酸溶出を用いた精製(「B、M、Phos」)、(5) *benzonase*、高pH(pH10.3)洗浄、及びリン酸溶出を用いた精製(「B、pH10.3、Phos」)、並びに(6) *benzonase*、*MNase*、及びリン酸溶出を用いた精製(「B、M、pH10.3、Phos」)後の宿主細胞DNAを検出する、*AlphaLISA*を使用した濃度結果(図11B)を示す。

【図12】プロトコル#1後の産生物ピークに対応するAAV粒子試料画分(レーン1)、プロトコル#2後の産生物ピークに対応するAAV粒子試料画分(レーン2)、及びプロトコル#2後の産生物後ピークに対応するAAV粒子試料画分(レーン3)を収集した後の、ゲル電気泳動及び銀染色を示す。

【図13A】DLSによって測定した場合に、AAV粒子が、1回又は2回以上の凍結／解凍サイクル後に例示的な製剤番号2(20mMのトリス、100mMのNaCl、5%のトレハロース、0.001%のポロキサマー-188、pH7.5)中で安定であることを示す。図13Aは、Z平均サイズにおける最小変動を示す。

【図13B】DLSによって測定した場合に、AAV粒子が、1回又は2回以上の凍結／解凍サイクル後に例示的な製剤番号2(20mMのトリス、100mMのNaCl、5%のトレハロース、0.001%のポロキサマー-188、pH7.5)中で安定であることを示す。図13Bは、多分散指数(PDI)における最小変動を示す。

【図14A】DLSによって測定した場合に、AAV粒子が、-80℃で1~3ヶ月後に例示的な製剤番号2(20mMのトリス、100mMのNaCl、5%のトレハロース、0.001%のポロキサマー-188、pH7.5)中で安定であることを示す。図14Aは、Z平均サイズにおける最小変動を示す。

【図14B】DLSによって測定した場合に、AAV粒子が、-80℃で1~3ヶ月後に例示的な製剤番号2(20mMのトリス、100mMのNaCl、5%のトレハロース、0.001%のポロキサマー-188、pH7.5)中で安定であることを示す。図14Bは、多分散指数(PDI)における最小変動を示す。

【図15A】例示的な製剤#2(20mMのトリス、100mMのNaCl、5%のトレハロース、0.001%のポロキサマー-188、pH7.5)が、1~5回の凍結／解凍サイクル後にSEC-FLDによって測定した場合に、最小のAAV凝集を有することを示す。図15Aは、非常に少数の高分子量種(HMWS)を示す。

【図15B】例示的な製剤#2(20mMのトリス、100mMのNaCl、5%のトレハロース、0.001%のポロキサマー-188、pH7.5)が、1~5回の凍結／解凍サイクル後にSEC-FLDによって測定した場合に、最小のAAV凝集を有することを示す。図15Bは、測定された試料がほぼ全てモノマーであったことを示す。

【図16A】例示的な製剤#2(20mMのトリス、100mMのNaCl、5%のトレハロース、0.001%のポロキサマー-188、pH7.5)が、-80℃で1~3ヶ月後にSEC-FLDによって測定した場合に、最小のAAV凝集を有することを示す。図16Aは、非常に少数の高分子量種(HMWS)を示す。

【図16B】例示的な製剤#2(20mMのトリス、100mMのNaCl、5%のトレハロース、0.001%のポロキサマー-188、pH7.5)が、-80℃で1~3ヶ月後にSEC-FLDによって測定した場合に、最小のAAV凝集を有することを示す。図16Bは、測定された試料がほぼ全てモノマーであったことを示す。

【発明を実施するための形態】

【0086】

本開示は、不純物(例えば、産生物関連不純物及びプロセス関連不純物)を実質的に含まない精製されたウイルス粒子(例えば、AAV粒子)を、緩衝剤、抗凍結剤、非イオン性界面活性剤、及び任意選択で薬学的に許容される塩のうちの1つ又は2つ以上と組み合わせ、精製されたAAV粒子の安定性を増強し、凝集を低減又は防止する医薬組成物を

生成することができるという発見に部分的に基づく。ある特定の態様では、本開示はまた、本明細書に記載される医薬組成物が、高力価（例えば、 1×10^{13} v g / mL を超える濃度）の精製されたウイルス粒子の安定性を増強し、凝集を制限又は防止するのにも好適であるという発見に部分的に基づく。

【0087】

「背景技術」において、また、本明細書全体を通じて様々な刊行物、論文及び特許を引用又は記載し、これら参考文献の各々は、その全体が参照により本明細書に組み込まれる。本明細書に含まれる文書、操作、材料、デバイス、物品などの考察は、本発明のコンテキストを与えるためのものである。かかる考察は、これらの事物のいずれか又は全てが、開示又は特許請求されるいずれかの発明に対する先行技術の一部を構成することを容認するものではない。

10

【0088】

特に規定のない限り、本明細書で使用される全ての技術用語及び科学用語は、本発明が属する技術分野の当業者に一般的に理解されるのと同じ意味を有する。そうでない場合、本明細書で使用されるある特定の用語は、本明細書に記載される意味を有するものである。本明細書に引用する全ての特許、公開された特許出願及び刊行物は、参照によってあたかもその全体が本明細書に記載されているように組み込まれる。

【0089】

本明細書及び添付の特許請求の範囲で使用する時、単数形「a」、「an」及び「the」は、特に文脈上明らかでない限り、複数の指示対象物を含むことに留意する必要がある。

20

【0090】

本明細書及び以下の特許請求の範囲を通して、文脈上他の意味に解すべき場合を除き、「含む (comprise)」という単語並びに「含む (comprises)」及び「含む (comprising)」などの変形は、指定の整数若しくはステップ又は整数若しくはステップの群を含むが、任意の他の整数若しくはステップ又は整数若しくはステップの群を除外するものではないことを意味すると理解されるであろう。本明細書で使用する時、用語「含む」は、用語「含有する」又は「含む (including)」に置き換えることができ、又はときに本明細書で使用する時、用語「有する」に置き換えることもできる。

【0091】

本明細書で使用する時、「からなる (consisting of)」は、特許請求の範囲の要素において指定されていない任意の要素、ステップ、又は成分を除外する。本明細書で使用する時、「から本質的になる (consisting essentially of)」は、特許請求の範囲の基本的かつ新規の特徴に実質的に影響を及ぼさない材料又はステップは除外しない。本出願の態様又は実施形態に関連して本明細書で使用する時、本開示の範囲を変化させるために、「含む (comprising)」、「含有する (containing)」、「含む (including)」、及び「有する」という上記用語のいずれかを、「からなる」又は「から本質的になる」という用語に置き換えることができる。

30

【0092】

本明細書で使用する時、複数の列挙された要素間の「及び／又は」という接続的な用語は、個々の及び組み合わされた選択肢の両方を包含するものとして理解される。例えば、2つの要素が「及び／又は」によって接続される場合、第1の選択肢は、第2の要素なしに第1の要素が適用可能であることを指す。第2の選択肢は、第1の要素なしに第2の要素が適用可能であることを指す。第3の選択肢は、第1及び第2の要素と一緒に適用可能であることを指す。これらの選択肢のうちのいずれか1つは、意味に含まれ、したがって、本明細書で使用する時、「及び／又は」という用語の要件を満たすことが理解される。選択肢のうちの2つ以上の同時適用性もまた、意味に含まれ、したがって、「及び／又は」という用語の要件を満たすことが理解される。

40

【0093】

本明細書で使用される場合、「アデノ随伴ウイルス (AAV)」という用語は、全ての

50

異なる A A V 血清型を含む天然に存在する形態、並びに A A V の天然に存在しない形態（例えば、組換え r A A V、及び偽型）の両方、及びそれらの改変体を意味することが意図される。A A V ウイルスは、R e p 遺伝子（A A V のライフサイクルに必要な R e p 7 8、R e p 6 8、R e p 5 2、R e p 4 0 として翻訳される）及び C a p 遺伝子（V P 1、V P 2、V P 3 - カプシドタンパク質として翻訳される）からなる。

【0094】

本明細書で使用される場合、「ウイルス粒子」又は「A A V 粒子」という用語は、別段の指定がない限り、ゲノム含有（「完全なカプシド」又は「部分的に完全なカプシド」としても既知）、並びに空のカプシド、又は完全なカプシド、部分的に完全なカプシド、及び空のカプシドの任意の組み合わせを意味することが意図される。

10

【0095】

本明細書で使用される場合、「不純物」又は「複数の不純物」という用語は、所望の産生物ではない精製された A A V 粒子中に又はそれとともに存在する任意の成分、又は医薬組成物の意図される成分を意味することが意図される。A A V 粒子不純物は、プロセス関連不純物及び／又は産生物関連不純物の両方を含む。例示的なプロセス関連不純物としては、残留宿主細胞成分（例えば、タンパク質、ウイルス外を含む D N A、クロマチン関連 D N A 及び／又は R N A）、残留ウイルス産生成分（例えば、プラスミド D N A、及び／又はヘルパーウイルス）、残留細胞培養成分（例えば、抗生物質、サプリメント、インデューサー、及び／又は増殖因子）、及び残留精製成分（例えば、緩衝液、無機塩、酵素、培地、及び／又は洗剤）、並びに他の汚染物質が挙げられるが、これらに限定されない。例示的な産生物関連不純物としては、空のカプシド（望ましくない場合）、凝集 A A V 粒子、及び分解 A A V 粒子が挙げられ得るが、これらに限定されない。試料は、1 つ又は 2 つ以上の不純物を「実質的に含まない」ものであり得るが、少量（例えば、検出不能なレベル、又は許容される範囲未満）の 1 つ又は 2 つ以上の不純物を有し続け得、「実質的に含まない」ことは、全ての不純物の完全な除去を必要としないということが、理解される。

20

【0096】

本明細書で使用される場合、「力価」という用語は、所定の容量中のウイルスの量を意味することが意図される。ウイルス力価は、「物理的力価」又は「機能的力価」を含み得る。物理的力価は、どれだけのウイルスが存在するかの尺度であり、一般に、1 m L 当たりのウイルス粒子数（V P / m L）、又は 1 m L 当たりのゲノムコピー数（G C / m L）として表される。機能的力価又は感染力価は、どれだけのウイルスが実際に標的細胞に感染するかの尺度であり、一般に、1 m L 当たりの形質導入単位（T U / m L）の形態で、又はアデノウイルスについては 1 m L 当たりのプラーク形成単位（p f u / m L）若しくは 1 m L 当たりの感染単位（i f u / m L）として表される。機能的力価は、一般に、物理的力価よりも、通常、約 1 0 ～ 約 1 0 0 倍低いことが理解される。

30

【0097】

本明細書中で使用される場合、「薬学的に許容される塩」という用語は、無機酸及び塩基並びに有機酸及び塩基を含む、薬学的に許容される非毒性の酸又は塩基から調製される塩を指す。本明細書に開示される薬学的に許容される組成物の好適な薬学的に許容される塩基付加塩としては、アルミニウム、カルシウム、リチウム、マグネシウム、カリウム、ナトリウム及び亜鉛、から作製される金属塩、又はリジン、N，N'-ジベンジルエチレンジアミン、クロロプロカイン、コリン、ジエタノールアミン、エチレンジアミン、メグルミン（N-メチル-グルカミン）及びプロカインから作製される有機塩が挙げられるが、これらに限定されない。好適な非毒性酸としては、酢酸、アルギン酸、アントラニル酸、ベンゼンスルホン酸、安息香酸、カンファースルホン酸、クエン酸、エテンスルホン酸、ギ酸、フマル酸、フロ酸、ガラクトロン酸、グルコン酸、グルクロン酸、グルタミン酸、グリコール酸、臭化水素酸、塩酸、イセチオン酸、乳酸、マレイン酸、リンゴ酸、マンデル酸、メタンスルホン酸、ムチン酸、硝酸、パモ酸、パントテン酸、フェニル酢酸、リン酸、プロピオン酸、サリチル酸、ステアリン酸、コハク酸、スルファニル酸、硫酸、酒

40

50

石酸、及び p-トールエンスルホン酸などの無機及び有機酸が挙げられるが、これらに限定されない。具体的な非毒性酸としては、塩酸、臭化水素酸、マレイン酸、リン酸、硫酸、及びメタンスルホン酸が挙げられる。したがって、具体的な塩の例としては、塩酸塩及びメシル酸塩が挙げられる。

【0098】

本明細書で使用される場合、「十分な量」という用語は、例えば、アフィニティー支持体などの固体支持体への AAV 粒子の結合、又は AAV 粒子を含有する試料からの不純物（例えば、宿主細胞タンパク質、クロマチン、及び／又は核酸）の除去など、所望の効果をもたらすことができるか、又は所望の結果を達成することができる量を意味することが意図される。

10

【0099】

本明細書で使用される場合、「実質的に含まない」という用語は、AAV 粒子の試料に関して使用される場合には、AAV 粒子の試料が、精製されていない AAV 粒子（例えば、粗回収物）と比較した場合、約 50% 未満、約 20% 未満、約 10% 未満、約 5% 未満の不純物を含むことを意味することが意図される。

【0100】

特に断らない限り、本明細書に記載される濃度又は濃度範囲などのあらゆる数値は、全ての場合において、「約」という語によって修飾されているものとして理解されるべきである。したがって、数値は、典型的には、記載される値の $\pm 10\%$ を含む。例えば、 1 mg/mL の濃度は $0.9 \text{ mg/mL} \sim 1.1 \text{ mg/mL}$ を含む。同様に、 $1 \text{ mg/mL} \sim 10 \text{ mg/mL}$ の濃度範囲は、 $0.9 \text{ mg/mL} \sim 11 \text{ mg/mL}$ を含む。本明細書で使用する時、数値範囲の使用は、文脈上そうでない旨が明確に示されない限り、その範囲内の整数及び値の分数を含む、全ての可能な部分範囲、その範囲内の全ての個々の数値を明示的に含む。

20

【0101】

本出願の読者を助けるため、明細書の記載は、様々な段落若しくはセクションに分けられているか、又は本出願の様々な実施形態に向けられている。これらの分離は、段落又はセクション又は実施形態の実体を別の段落又はセクション又は実施形態の実体から切り離すものとみなされるべきではない。反対に、当業者であれば、本明細書の記載が広範な用途を有し、想到され得る様々な段落、パラグラフ、及び文章の全ての組み合わせを包含することを理解するであろう。いかなる実施形態の考察も、単なる例示であることを意味するものであり、特許請求の範囲を含む本開示の範囲がこれらの実施例に限定されることを示唆することを意図するものではない。本出願は、特定の組み合わせが明示的に記載されているか否かにかかわらず、適用可能な構成要素の任意のものを、任意の組み合わせで使用することを企図する。

30

【0102】

医薬組成物

精製された AAV 粒子、並びに緩衝剤、抗凍結剤、非イオン性界面活性剤、及び任意選択で薬学的に許容される塩のうちの 1 つ又は 2 つ以上を含む医薬組成物であって、AAV 粒子が実質的に不純物を含まない、医薬組成物が、本明細書で提供される。また、本明細書では、本明細書に記載される医薬組成物を作製するための方法も提供される。

40

【0103】

AAV 粒子

本開示は、産生物純度が製剤開発に影響を及ぼし得るという発見に部分的に基づく。具体的には、カプシド形成されていない核酸（例えば、宿主細胞 DNA/RNA、プラスミド DNA など）及びタンパク質不純物〔例えば、宿主細胞タンパク質、空のカプシド（望ましくない場合）など〕は、それらの明らかな安全性リスクに加えて、産生物の安定性及び凝集に重大な影響を及ぼし得る。更に、異なる産生物純度は、製剤の結果を混乱させ得る。これは、不十分なプロセスロバスト性の結果として、並びに最終製剤の導入（タンジェンシャルフロー濾過、透析、スピン濾過などによるかどうかにかかわらず）中に現れ得

50

、変わり易い不純物プロファイルをもたらす。

【0104】

不純物は、プロセス関連不純物（例えば、宿主細胞DNA又は宿主細胞タンパク質などのAAV粒子精製後に残存する不純物）、並びに産生物関連不純物（例えば、完全な非凝集カプシドではないAAV粒子）を含み得る。したがって、本明細書で提供される医薬組成物は、不純物を実質的に含まない精製されたAAV粒子に関する。

【0105】

いくつかの実施形態では、AAV粒子は、不純物を実質的に含まず、不純物は、プロセス関連不純物、産生物関連不純物、又はそれらの組み合わせを含む。プロセス関連不純物は、残留宿主細胞成分、残留ウイルス産生成分、残留細胞培養成分、残留精製成分、又はそれらの組み合わせを含み得る。例えば、AAV粒子の精製後、AAV粒子を生成するために使用される宿主細胞由来の核酸及び／又はタンパク質の残留量は、これらの不純物を除去するために適切なステップがとられない場合に、精製されたAAV粒子とともに残存し得る。したがって、いくつかの実施形態では、AAV粒子は、宿主細胞タンパク質、宿主細胞DNA、宿主細胞RNA、又はそれらの組み合わせを実質的に含まない。

【0106】

本開示のある特定の態様はまた、ウイルス外のクロマチン結合DNAがまた、AAV粒子の純度に大きく影響し得る精製されたAAV粒子中に存在する不純物である、及び本明細書（例えば、第5.4節、第5.5節及び／又は実施例）に記載される例示としての精製方法がクロマチン-DNAヌクレアーゼを使用することによって、AAV粒子の純度を有意に改善するという発見にも基づく。したがって、いくつかの実施形態では、AAV粒子は、不純物を実質的に含まず、不純物は、ウイルス外のクロマチン結合DNAを含む。

【0107】

不純物はまた、AAV粒子産生を支持するように使用される残留ウイルス産生成分に起源をもち得る。例えば、宿主細胞系においてAAV粒子を生成するように使用されるプラスミドDNA、又はヘルパーウイルスDNAなどの核酸はまた、これらの不純物を除去するために適切なステップがとられない場合に、精製されたAAV粒子とともに残存し得る。残留ウイルス産生を除去するための精製方法としては、本明細書（例えば、第5.4節、第5.5節、及び／又は実施例）に記載されるものが挙げられる。したがって、いくつかの実施形態では、AAV粒子は、残留ウイルス産生成分を実質的に含まない。ある特定の

【0108】

実施形態では、AAV粒子は、プラスミドDNA、ヘルパーウイルス、又はそれらの組み合わせを実質的に含まない。不純物を実質的に含まない本開示のAAV粒子はまた、残留細胞培養成分を実質的に含まないAAV粒子も含み得る。例えば、宿主細胞は、抗生物質、増殖因子、ウシ血清、誘導物質又は他のサプリメントを含む培地中で培養され得る。これらの細胞培養成分の除去は、精製されたAAV粒子を生成するために重要である。したがって、いくつかの実施形態では、精製されたAAV粒子は、抗生物質、サプリメント、誘導物質、成長因子、又はそれらの組み合わせを実質的に含まない。

【0109】

精製されたAAV粒子に影響を及ぼし得る別の不純物源としては、AAV粒子を精製するために使用される精製試薬が挙げられる。例えば、AAV粒子を精製するための例示的な方法は、クロマトグラフィーを含み、多くの場合、無機塩で洗浄することを伴う。AAV粒子を精製するための別の例示的な方法は、遠心分離を伴い、この例示的な方法は、多くの場合、AAV粒子の分離及び単離のために密度勾配培地を利用する。したがって、本明細書に記載される医薬組成物に含まれる精製されたAAV粒子由来のそのような残留精製成分を除去することは好ましい。したがって、いくつかの実施形態では、精製されたAAV粒子は、残留精製成分を実質的に含まない。いくつかの実施形態では、残留精製成分は、緩衝液、無機塩、酵素、洗剤、培地、又はそれらの組み合わせを含む。

【0110】

産生物関連不純物は、本明細書に記載される医薬組成物に影響を及ぼし得る別の不純物源を表す。このような産生物関連不純物としては、例えば、凝集 A A V 粒子、分解 A A V 粒子、及び／又は空のカプシド（望ましくない場合）が挙げられる。したがって、いくつかの実施形態では、精製された A A V 粒子は、産生物関連不純物を実質的に含まない。いくつかの実施形態では、産生物関連不純物は、空のカプシド（望ましくない場合）、凝集 A A V 粒子、分解 A A V 粒子、又はそれらの組み合わせを含む。いくつかの実施形態では、産生物関連不純物は、凝集 A A V 粒子、分解 A A V 粒子、又はそれらの組み合わせを含む。具体的な実施形態では、産生物関連不純物は、凝集した A A V 粒子を含む。

【0111】

本開示はまた、本明細書に記載される医薬組成物が、1ミリリットル当たり 1×10^{13} ウイルスゲノム (vg/mL) を超える濃度を有する A A V 粒子であっても凝集を低減又は防止することができるという発見に部分的に基づく。今日まで、既存の A A V 粒子のための製剤は、高力価（すなわち、 1×10^{13} vg/mL を超える）のウイルスには高イオン強度 (> 200 mM) 製剤が必要であるという理解を前提としている。例として、典型的な高イオン強度製剤は、約 500 mM である。対照的に、本明細書に記載されるように、本開示の医薬組成物は、高力価の A A V 粒子に好適であり、かつ高イオン強度製剤を伴わない。本開示は、高力価の A A V 粒子に好適であるが、本明細書に記載される医薬組成物は高濃度である必要はなく、かつ医薬組成物は 1×10^{13} vg/mL 未満の力価を有する A A V 粒子にも好適であることが理解される。

【0112】

いくつかの実施形態では、精製された A A V 粒子の力価は、1ミリリットル当たり約 1×10^{10} ウイルスゲノム (vg/mL) 以上である。いくつかの実施形態では、精製された A A V 粒子の力価は、1ミリリットル当たり約 1×10^{11} ウイルスゲノム (vg/mL) 以上である。いくつかの実施形態では、精製された A A V 粒子の力価は、1ミリリットル当たり約 1×10^{12} ウイルスゲノム (vg/mL) 以上である。いくつかの実施形態では、精製された A A V 粒子の力価は、1ミリリットル当たり約 1×10^{13} ウイルスゲノム (vg/mL) 以上である。いくつかの実施形態では、精製された A A V 粒子の力価は、1ミリリットル当たり約 1×10^{14} ウイルスゲノム (vg/mL) 以上である。いくつかの実施形態では、精製された A A V 粒子の力価は、1ミリリットル当たり約 1×10^{15} ウイルスゲノム (vg/mL) 以上である。

【0113】

本明細書に記載される A A V 粒子は、特定の血清型に限定されず、任意の A A V 血清型、並びに A A V 変異体は、本明細書に記載される医薬組成物に好適である。例えば、いくつかの実施形態では、A A V は、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、又は A A V 10 である。いくつかの実施形態では、A A V は、A A V 1 を含むか、又は本質的に A A V 1 からなる。いくつかの実施形態では、A A V は、A A V 2 を含むか、又は本質的に A A V 2 からなる。いくつかの実施形態では、A A V は、A A V 3 を含むか、又は本質的に A A V 3 からなる。いくつかの実施形態では、A A V は、A A V 4 を含むか、又は本質的に A A V 4 からなる。いくつかの実施形態では、A A V は、A A V 5 を含むか、又は本質的に A A V 5 からなる。いくつかの実施形態では、A A V は、A A V 6 を含むか、又は本質的に A A V 6 からなる。いくつかの実施形態では、A A V は、A A V 7 を含むか、又は本質的に A A V 7 からなる。いくつかの実施形態では、A A V は、A A V 8 を含むか、又は本質的に A A V 8 からなる。いくつかの実施形態では、A A V は、A A V 9 を含むか、又は本質的に A A V 9 からなる。いくつかの実施形態では、A A V は、A A V 10 を含むか、又は本質的に A A V 10 からなる。いくつかの実施形態では、A A V は、A A V 変異体を含むか、又は本質的に A A V 変異体からなる。本開示のある特定の態様では、A A V は、r A A V を含む。

【0114】

本明細書に記載される A A V 粒子は、A A V 粒子と適合した任意の下流での適用で使用するために意図される。例えば、いくつかの実施形態では、A A V 粒子は、遺伝子治療に

おける使用に好適であり、精製された A A V 粒子は、治療遺伝子を有する A A V ベクターを有する。しかしながら、A A V 粒子がワクチンとしても有用であり得ることも理解される。更に、ダウンストリームアPLICANTは、治療的使用を超えて拡張する。例えば、本明細書に記載される A A V 粒子はまた、イメージングアプリケーション又は他の非治療的使用のための、アゴニストとしても有用であり得る。いくつかの実施形態では、空のカプシド、完全なカプシド及び空のカプシドの混合物を含む A A V 粒子、完全なカプシド、部分的に完全なカプシド、及び空のカプシドの混合物を含む A A V 粒子、又は部分的に完全なカプシド及び空のカプシドの混合物を含む A A V 粒子、を含む A A V 粒子を有することは、望ましい場合がある。いくつかの実施形態では、A A V 粒子は、空のカプシドを含む。いくつかの実施形態では、A A V 粒子は、完全なカプシドを含む。いくつかの実施形態では、A A V 粒子は、部分的に完全なカプシドを含む。いくつかの実施形態では、A A V 粒子は、完全なカプシド及び空のカプシドの混合物を含む。いくつかの実施形態では、A A V 粒子は、完全なカプシド、部分的に完全なカプシド、及び空のカプシドの混合物を含む。いくつかの実施形態では、A A V 粒子は、部分的に完全なカプシド及び空のカプシドの混合物を含む。したがって、ダウンストリームアプリケーションは、本明細書に記載される医薬組成物によって限定されない。

10

【0115】

緩衝剤

いくつかの実施形態では、本明細書に開示される医薬組成物は、緩衝剤を含む。いくつかの実施形態では、緩衝剤は、当該技術分野で周知の薬学的に許容される緩衝剤である。いくつかの実施形態では、緩衝剤は、H E P E S、トリス、ピシン、酢酸塩、グルタミン酸塩、乳酸塩、マレイン酸塩、酒石酸塩、リン酸塩、クエン酸塩、炭酸塩、グリシン酸塩、ヒスチジン、グリシン、リジン、アルギニン、コハク酸塩、H E P E S (4-(2-ヒドロキシエチル)-1-ピペラジンエタンスルホン酸)、M O P S (3-(N-モルホリノ)プロパンスルホン酸)、M E S (2-(N-モルホリノ)エタンスルホン酸)及びトリエタノールアミン緩衝液、並びにそれらの混合物である。いくつかの実施形態では、緩衝剤は、H E P E S である。いくつかの実施形態では、緩衝剤は、トリスである。いくつかの実施形態では、緩衝剤は、ピシンである。いくつかの実施形態では、緩衝剤は、酢酸塩である。いくつかの実施形態では、緩衝剤は、グルタミン酸塩である。いくつかの実施形態では、緩衝剤は、乳酸塩である。いくつかの実施形態では、緩衝剤は、マレイン酸塩である。いくつかの実施形態では、緩衝剤は、酒石酸塩である。いくつかの実施形態では、緩衝剤は、リン酸塩である。いくつかの実施形態では、緩衝剤は、クエン酸塩である。いくつかの実施形態では、緩衝剤は、炭酸塩である。いくつかの実施形態では、緩衝剤は、グリシン酸塩である。いくつかの実施形態では、緩衝剤は、ヒスチジンである。いくつかの実施形態では、緩衝剤は、グリシンである。いくつかの実施形態では、緩衝剤は、リジンである。いくつかの実施形態では、緩衝剤は、アルギニンである。いくつかの実施形態では、緩衝剤は、コハク酸塩である。いくつかの実施形態では、緩衝剤は、H E P E S (4-(2-ヒドロキシエチル)-1-ピペラジンエタンスルホン酸)である。いくつかの実施形態では、緩衝剤は、M O P S (3-(N-モルホリノ)プロパンスルホン酸)である。いくつかの実施形態では、緩衝剤は、M E S (2-(N-モルホリノ)エタンスルホン酸)である。いくつかの実施形態では、緩衝剤は、ワクチンである。

20

30

40

【0116】

いくつかの実施形態では、緩衝剤は、トリス又はヒスチジン、及びそれらの混合物である。いくつかの実施形態では、緩衝剤は、トリスである。いくつかの実施形態では、緩衝剤は、ヒスチジンである。いくつかの実施形態では、緩衝剤は、トリス及びヒスチジンの混合物である。

【0117】

いくつかの実施形態では、緩衝剤は、トリス H C l 若しくは L-ヒスチジン H C l、又はそれらの混合物を含む。いくつかの実施形態では、緩衝剤は、L-ヒスチジン H C l を含む。いくつかの実施形態では、緩衝剤は、トリス H C l を含む。いくつかの実施形態で

50

は、緩衝剤は、トリスHClである。いくつかの実施形態では、緩衝剤は、L-ヒスチジンHClである。

【0118】

いくつかの実施形態では、緩衝剤は、約4.0～約9.0、約6.0～約8.0、又は約7.3～約7.7の範囲のpHを有する。いくつかの実施形態では、緩衝剤は、約4.0～約9.0のpHを有する。いくつかの実施形態では、緩衝剤は、約6.0～約8.0のpHを有する。いくつかの実施形態では、緩衝剤は、約7.3～約7.7のpHを有する。一実施形態では、緩衝剤は、約7.5のpHを有する。

【0119】

いくつかの実施形態では、本明細書に開示される医薬組成物は、約0mM～約50mM、約0mM～約45mM、約0mM～約40mM、約0mM～約35mM、約0mM～約30mM、約0mM～約25mM、約0mM～約20mM、約5～約30mM、約10～約25mM、又は約15mM～約20mMの緩衝剤を含む。いくつかの実施形態では、本明細書に開示される医薬組成物は、約0.5mM、約1mM、約2mM、約3mM、約4mM、約5mM、約6mM、約7mM、約8mM、約9mM、約10mM、約11mM、約12mM、約13mM、約14mM、約15mM、約16mM、約17mM、約18mM、約19mM、又は約20mMの緩衝剤を含む。いくつかの実施形態では、本明細書に開示される医薬組成物は、約0mM～約50mMの緩衝剤を含む。いくつかの実施形態では、医薬組成物は、約0mM～約45mMの緩衝剤を含む。いくつかの実施形態では、医薬組成物は、約0mM～約40mMの緩衝剤を含む。いくつかの実施形態では、医薬組成物は、約0mM～約35mMの緩衝剤を含む。いくつかの実施形態では、医薬組成物は、約0mM～約30mMの緩衝剤を含む。いくつかの実施形態では、医薬組成物は、約0mM～約25mMの緩衝剤を含む。いくつかの実施形態では、医薬組成物は、約0mM～約20mMの緩衝剤を含む。いくつかの実施形態では、医薬組成物は、約5～約30mMの緩衝剤を含む。いくつかの実施形態では、医薬組成物は、約10～約25mMの緩衝剤を含む。いくつかの実施形態では、医薬組成物は、約15mM～約20mMの緩衝剤を含む。いくつかの実施形態では、本明細書に開示される医薬組成物は、約0.5mMの緩衝剤を含む。いくつかの実施形態では、医薬組成物は、約1mMの緩衝剤を含む。いくつかの実施形態では、医薬組成物は、約2mMの緩衝剤を含む。いくつかの実施形態では、医薬組成物は、約3mMの緩衝剤を含む。いくつかの実施形態では、医薬組成物は、約4mMの緩衝剤を含む。いくつかの実施形態では、医薬組成物は、約5mMの緩衝剤を含む。いくつかの実施形態では、医薬組成物は、約6mMの緩衝剤を含む。いくつかの実施形態では、医薬組成物は、約7mMの緩衝剤を含む。いくつかの実施形態では、医薬組成物は、約8mMの緩衝剤を含む。いくつかの実施形態では、医薬組成物は、約9mMの緩衝剤を含む。いくつかの実施形態では、医薬組成物は、約10mMの緩衝剤を含む。いくつかの実施形態では、医薬組成物は、約11mMの緩衝剤を含む。いくつかの実施形態では、医薬組成物は、約12mMの緩衝剤を含む。いくつかの実施形態では、医薬組成物は、約13mMの緩衝剤を含む。いくつかの実施形態では、医薬組成物は、約14mMの緩衝剤を含む。いくつかの実施形態では、医薬組成物は、約15mMの緩衝剤を含む。いくつかの実施形態では、医薬組成物は、約16mMの緩衝剤を含む。いくつかの実施形態では、医薬組成物は、約17mMの緩衝剤を含む。いくつかの実施形態では、医薬組成物は、約18mMの緩衝剤を含む。いくつかの実施形態では、医薬組成物は、約19mMの緩衝剤を含む。一実施形態では、本明細書に開示される医薬組成物は、約20mMの緩衝剤を含む。

10

20

30

40

【0120】

抗凍結剤

いくつかの実施形態では、本明細書に開示される医薬組成物は、抗凍結剤を更に含む。いくつかの実施形態では、抗凍結剤は、有機溶媒、ポリオール、ポリマー、糖、又はそれらの組み合わせである。いくつかの実施形態では、抗凍結剤は、DMSO（ジメチルスルホキシド）、エチレングリコール、グリセロール、プロピレングリコール、（MPD）2

50

ーメチル-2, 4-ペンタンジオール、グリセロール-3-リン酸、ジエチルグリコール、トリエチレングリコール、ポリビニルアルコール、PEG、ヒドロキシエチルデンプン、ソルビトール、マンニトール、ラクトース、スクロース、トレハロース、又はそれらの組み合わせである。いくつかの実施形態では、抗凍結剤は、有機溶媒である。いくつかの実施形態では、抗凍結剤は、ポリオールである。いくつかの実施形態では、抗凍結剤は、ポリマーである。いくつかの実施形態では、抗凍結剤は、糖である。いくつかの実施形態では、抗凍結剤は、DMSO（ジメチルスルホキシド）である。いくつかの実施形態では、抗凍結剤は、エチレングリコールである。いくつかの実施形態では、抗凍結剤は、グリセロールである。いくつかの実施形態では、抗凍結剤は、プロピレングリコールである。いくつかの実施形態では、抗凍結剤は、(MPD) 2-メチル-2, 4-ペンタンジオールである。いくつかの実施形態では、抗凍結剤は、グリセロール-3-リン酸である。いくつかの実施形態では、抗凍結剤は、ジエチルグリコールである。いくつかの実施形態では、抗凍結剤は、トリエチレングリコールである。いくつかの実施形態では、抗凍結剤は、ポリビニルアルコールである。いくつかの実施形態では、抗凍結剤は、PEGである。いくつかの実施形態では、抗凍結剤は、ヒドロキシエチルデンプンである。いくつかの実施形態では、抗凍結剤は、ソルビトールである。いくつかの実施形態では、抗凍結剤は、マンニトールである。いくつかの実施形態では、抗凍結剤は、ラクトースである。いくつかの実施形態では、抗凍結剤は、スクロースである。いくつかの実施形態では、抗凍結剤は、トレハロースである。一実施形態では、抗凍結剤は、糖を含む。いくつかの実施形態では、糖は、単糖である。いくつかの実施形態では、糖は、二糖である。いくつかの実施形態では、糖は、多糖である。そのような一実施形態では、糖は、スクロース、トレハロース、又はそれらの組み合わせである。一実施形態では、抗凍結剤は、トレハロースである。

10

20

30

40

【0121】

いくつかの実施形態では、本明細書に開示される医薬組成物は、約1% (w/v) ~ 約10% (w/v)、約3% (w/v) ~ 約8% (w/v)、又は約4% (w/v) ~ 約6% (w/v) の抗凍結剤を含む。いくつかの実施形態では、本明細書に開示される医薬組成物は、約1% (w/v) ~ 約10% (w/v) の抗凍結剤を含む。いくつかの実施形態では、本明細書に開示される医薬組成物は、約3% (w/v) ~ 約8% (w/v) の抗凍結剤を含む。いくつかの実施形態では、本明細書に開示される医薬組成物は、約4% (w/v) ~ 約6% (w/v) の抗凍結剤を含む。いくつかの実施形態では、本明細書に開示される医薬組成物は、約1% (w/v)、約2% (w/v)、約3% (w/v)、約4% (w/v)、約5% (w/v)、約6% (w/v)、約7% (w/v)、約8% (w/v)、約9% (w/v)、又は約10% (w/v) の濃度の抗凍結剤を含む。一実施形態では、本明細書に開示される医薬組成物は、約1% (w/v) の抗凍結剤を含む。一実施形態では、本明細書に開示される医薬組成物は、約2% (w/v) の抗凍結剤を含む。一実施形態では、本明細書に開示される医薬組成物は、約3% (w/v) の抗凍結剤を含む。一実施形態では、本明細書に開示される医薬組成物は、約4% (w/v) の抗凍結剤を含む。一実施形態では、本明細書に開示される医薬組成物は、約5% (w/v) の抗凍結剤を含む。一実施形態では、本明細書に開示される医薬組成物は、約6% (w/v) の抗凍結剤を含む。一実施形態では、本明細書に開示される医薬組成物は、約7% (w/v) の抗凍結剤を含む。一実施形態では、本明細書に開示される医薬組成物は、約8% (w/v) の抗凍結剤を含む。一実施形態では、本明細書に開示される医薬組成物は、約9% (w/v) の抗凍結剤を含む。一実施形態では、本明細書に開示される医薬組成物は、約10% (w/v) の抗凍結剤を含む。

【0122】

非イオン性界面活性剤

いくつかの実施形態では、本明細書に開示される医薬組成物は、非イオン性界面活性剤を更に含む。いくつかの実施形態では、非イオン性界面活性剤は、コポリマーである。いくつかの実施形態では、非イオン性界面活性剤は、ポロキサマーである。ポロキサマーは

50

、ポリオキシエチレン（ポリ（エチレンオキシド））の2本の親水性鎖に隣接するポリオキシプロピレン（ポリ（プロピレンオキシド））の中央の疎水性鎖で構成される非イオン性トリブロックコポリマーである。ポロキサマーはまた、商品名 *Pluronic*（登録商標）でも既知である。ポリマーブロックの長さはカスタマイズされ得るために、わずかに異なる特性を有する多くの異なるポロキサマーが存在する。総称「ポロキサマー」の場合、これらのコポリマーは、一般に、文字「P」（ポロキサマーを表す）とそれに続く3つの数字で命名され、最初の2つの数字×100は、ポリオキシプロピレンコアのおよその分子量を示し、最後の数字×10は、ポリオキシエチレン含有量のパーセンテージ（例えば、P407＝4,000g/molのポリオキシプロピレン分子量及び70%のポリオキシエチレン含有量を有するポロキサマー）を示す。いくつかの実施形態では、ポロキサマーは、P188、P237、P338、又はP407である。一実施形態では、ポロキサマーは、P188である。一実施形態では、ポロキサマーは、P237である。一実施形態では、ポロキサマーは、P338である。一実施形態では、ポロキサマーは、P407である。いくつかの実施形態では、非イオン性界面活性剤は、PS-20及びPS-80などの、ポリオキシエチレンソルビタンエステル界面活性剤（一般に、*Tween*と称される）；エチレンオキシド（EO）、ホスファチジルコリン（レシチン）などの、リン脂質のコポリマー；トリエチレングリコールモノラウリルエーテル（*Brj30*）又はポリオキシエチレン（23）ラウリルエーテル（*Brj35*）などの、ラウリルアルコール、セチルアルコール、ステアリルアルコール及びオレイルアルコールから誘導されるポリオキシエチレン脂肪エーテル（*Brj*界面活性剤として既知）；並びにソルビタントリオレート（*Span85*）及びソルビタンモノラウレートなどのソルビタンエステル（一般に、*SPAN*として既知）である。一実施形態では、非イオン性界面活性剤は、ポリソルベート20（PS-20）、ポリソルベート80（PS-80）、若しくは*Brj*界面活性剤、又はそれらの組み合わせである。一実施形態では、非イオン性界面活性剤は、ポリソルベートである。一実施形態では、ポリソルベートは、PS-20である。一実施形態では、ポリソルベートは、PS-40である。一実施形態では、ポリソルベートは、PS-60である。一実施形態では、ポリソルベートは、PS-80である。一実施形態では、非イオン性界面活性剤は、*Brj*界面活性剤である。一実施形態では、非イオン性界面活性剤は、EOのコポリマーである。一実施形態では、非イオン性界面活性剤は、リン脂質である。一実施形態では、非イオン性界面活性剤は、ホスファチジルコリン（レシチン）である。一実施形態では、非イオン性界面活性剤は、ラウリルアルコールから誘導されるポリオキシエチレン脂肪エーテルである。一実施形態では、非イオン性界面活性剤は、セチルアルコールから誘導されるポリオキシエチレン脂肪エーテルである。一実施形態では、非イオン性界面活性剤は、ステアリルアルコールから誘導されるポリオキシエチレン脂肪エーテルである。一実施形態では、非イオン性界面活性剤は、オレイルアルコールから誘導されるポリオキシエチレン脂肪エーテルである。一実施形態では、非イオン性界面活性剤は、トリエチレングリコールモノラウリルエーテル（*Brj30*）である。一実施形態では、非イオン性界面活性剤は、ポリオキシエチレン（23）ラウリルエーテル（*Brj35*）である。一実施形態では、非イオン性界面活性剤は、ソルビタンエステルである。一実施形態では、非イオン性界面活性剤は、ソルビタントリオレート（*Span85*）である。一実施形態では、非イオン性界面活性剤は、ソルビタンモノラウレートである。

【0123】

いくつかの実施形態では、本明細書に開示される医薬組成物は、約0.0001%（w/v）～約0.1%（w/v）、約0.0005%（w/v）～約0.005%（w/v）、約0.00075%（w/v）～約0.0025%（w/v）の非イオン性界面活性剤を含む。いくつかの実施形態では、本明細書に開示される医薬組成物は、約0.0001%（w/v）～約0.1%（w/v）の非イオン性界面活性剤を含む。いくつかの実施形態では、本明細書に開示される医薬組成物は、約0.0005%（w/v）～約0.005%（w/v）の非イオン性界面活性剤を含む。いくつかの実施形態では、本明細書に

10

20

30

40

50

開示される医薬組成物は、約 0.00075% (w/v) ~ 約 0.0025% (w/v) の非イオン性界面活性剤を含む。

【0124】

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) の非イオン性界面活性剤を含む。いくつかの実施形態では、医薬組成物は、約 0.001% (w/v) の非イオン性界面活性剤を含む。いくつかの実施形態では、医薬組成物は、約 0.0015% (w/v) の非イオン性界面活性剤を含む。いくつかの実施形態では、医薬組成物は、約 0.002% (w/v) の非イオン性界面活性剤を含む。いくつかの実施形態では、医薬組成物は、約 0.0025% (w/v) の非イオン性界面活性剤を含む。いくつかの実施形態では、医薬組成物は、約 0.003% (w/v) の非イオン性界面活性剤を含む。いくつかの実施形態では、医薬組成物は、約 0.0035% (w/v) の非イオン性界面活性剤を含む。いくつかの実施形態では、医薬組成物は、約 0.004% (w/v) の非イオン性界面活性剤を含む。いくつかの実施形態では、医薬組成物は、約 0.0045% (w/v) の非イオン性界面活性剤を含む。いくつかの実施形態では、医薬組成物は、約 0.005% (w/v) の非イオン性界面活性剤を含む。いくつかの実施形態では、医薬組成物は、約 0.0055% (w/v) の非イオン性界面活性剤を含む。いくつかの実施形態では、医薬組成物は、約 0.006% (w/v) の非イオン性界面活性剤を含む。いくつかの実施形態では、医薬組成物は、約 0.0065% (w/v) の非イオン性界面活性剤を含む。いくつかの実施形態では、医薬組成物は、約 0.007% (w/v) の非イオン性界面活性剤を含む。いくつかの実施形態では、医薬組成物は、約 0.0075% (w/v) の非イオン性界面活性剤を含む。いくつかの実施形態では、医薬組成物は、約 0.008% (w/v) の非イオン性界面活性剤を含む。いくつかの実施形態では、医薬組成物は、約 0.0085% (w/v) の非イオン性界面活性剤を含む。いくつかの実施形態では、医薬組成物は、約 0.009% (w/v) の非イオン性界面活性剤を含む。いくつかの実施形態では、医薬組成物は、約 0.0095% (w/v) の非イオン性界面活性剤を含む。

10

20

30

【0125】

薬学的に許容される塩

本明細書で提供される場合、本開示の医薬組成物はまた、薬学的に許容される塩も含み得る。したがって、本開示のいくつかの態様では、医薬組成物は、精製された AAV 粒子、薬学的に許容される塩、緩衝剤、抗凍結剤、及び非イオン性界面活性剤を含む。

【0126】

いくつかの実施形態では、薬学的に許容される塩は、薬物製剤中の対象（例えば、ヒト）への投与のために安全な金属塩及びアンモニア又は有機アミンの塩である。好適な薬学的に許容される塩としては、ナトリウム、カリウム、マグネシウム、カルシウム、セシウム、アンモニウム、トリエチルアミン、グアニジン及び N-置換グアニジン塩、アセトアミジン及び 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、並びに N, N'-ジベンジルエチレンジアミン塩が挙げられるが、これらに限定されない。（塩基性窒素中心の）薬学的に許容される塩としては、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、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、及びナフタレンスルホン酸塩などのスルホネート類；アルギン酸塩、アラニン塩、アスパラギン塩及びグルタミン酸塩などのアミノ酸塩；並びにグルコン酸塩及びガラクトuron酸塩などの炭水化物塩が挙げられるが、これらに限定されない。本明細書で使用され得る他の塩は、当該技術

40

50

分野で周知であり、例えば、Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th eds., Mack Publishing, Easton PA (1990) 又は Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 19th eds., Mack Publishing, Easton PA (1995) を参照されたく、これらは、全ての意図及び目的のために、その全体が参照することにより本明細書に組み込まれる。一実施形態では、薬学的に許容される塩は、ナトリウム塩、マグネシウム塩、カルシウム塩、カリウム塩、リン酸塩、又は硫酸塩である。一実施形態では、薬学的に許容される塩は、金属塩である。一実施形態では、塩は、ナトリウム塩である。いくつかの実施形態では、薬学的に許容される塩は、マグネシウム塩である。いくつかの実施形態では、薬学的に許容される塩は、カルシウム塩である。いくつかの実施形態では、薬学的に許容される塩は、カリウム塩である。いくつかの実施形態では、薬学的に許容される塩は、リン酸塩である。いくつかの実施形態では、薬学的に許容される塩は、硫酸塩である。一実施形態では、薬学的に許容される塩は、塩化ナトリウムである。

10

【0127】

いくつかの実施形態では、薬学的に許容される塩の濃度は、約1 mM～約200 mMである。いくつかの実施形態では、薬学的に許容される塩の濃度は、約10 mM～約150 mMである。いくつかの実施形態では、薬学的に許容される塩の濃度は、約1 mM～約49 mMである。いくつかの実施形態では、薬学的に許容される塩の濃度は、約5 mM～約45 mMである。いくつかの実施形態では、薬学的に許容される塩の濃度は、約7.5 mM～約40 mMである。いくつかの実施形態では、薬学的に許容される塩の濃度は、約10 mM～約30 mMである。いくつかの実施形態では、薬学的に許容される塩の濃度は、約200 mM未満、約150 mM未満、約100 mM未満、約90 mM未満、約80 mM未満、約70 mM未満、約60 mM未満、約50 mM未満、約40 mM未満、約30 mM未満、約20 mM未満、又は約10 mM未満である。いくつかの実施形態では、薬学的に許容される塩の濃度は、約200 mM未満である。いくつかの実施形態では、薬学的に許容される塩の濃度は、約150 mM未満である。いくつかの実施形態では、薬学的に許容される塩の濃度は、約100 mM未満である。いくつかの実施形態では、薬学的に許容される塩の濃度は、約90 mM未満である。いくつかの実施形態では、薬学的に許容される塩の濃度は、約80 mM未満である。いくつかの実施形態では、薬学的に許容される塩の濃度は、約70 mM未満である。いくつかの実施形態では、薬学的に許容される塩の濃度は、約60 mM未満である。いくつかの実施形態では、薬学的に許容される塩の濃度は、約50 mM未満である。いくつかの実施形態では、薬学的に許容される塩の濃度は、約40 mM未満である。いくつかの実施形態では、薬学的に許容される塩の濃度は、約30 mM未満である。いくつかの実施形態では、薬学的に許容される塩の濃度は、約20 mM未満である。いくつかの実施形態では、薬学的に許容される塩の濃度は、約10 mM未満である。いくつかの実施形態では、薬学的に許容される塩の濃度は、約200 mM、約150 mM、約100 mM、又は約50 mMである。いくつかの実施形態では、薬学的に許容される塩の濃度は、約150 mMである。いくつかの実施形態では、薬学的に許容される塩の濃度は、約100 mMである。いくつかの実施形態では、薬学的に許容される塩の濃度は、約10 mMである。

20

30

40

【0128】

pH条件

本明細書で提供される場合、本開示の医薬組成物は、約4.0～約9.0であるpHを有し得る。いくつかの実施形態では、医薬組成物のpHは、約7.0～約8.0である。いくつかの実施形態では、医薬組成物のpHは、約7.3～約7.7である。ある特定の実施形態では、医薬組成物のpHは、約4.0、約4.1、約4.2、約4.3、約4.4、約4.5、約4.6、約4.7、約4.8、約4.9、約5.0、約5.1、約5.2、約5.3、約5.4、約5.5、約5.6、約5.7、約5.8、約5.9、約6.0、約6.1、約6.2、約6.3、約6.4、約6.5、約6.6、約6.7、約6.

50

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、約9.0である。いくつかの実施形態では、医薬組成物のpHは、約7.3～約7.7である。ある特定の実施形態では、医薬組成物のpHは、約4.0である。ある特定の実施形態では、医薬組成物のpHは、約4.1である。ある特定の実施形態では、医薬組成物のpHは、約4.2である。ある特定の実施形態では、医薬組成物のpHは、約4.3である。ある特定の実施形態では、医薬組成物のpHは、約4.4である。ある特定の実施形態では、医薬組成物のpHは、約4.5である。ある特定の実施形態では、医薬組成物のpHは、約4.6である。ある特定の実施形態では、医薬組成物のpHは、約4.7である。ある特定の実施形態では、医薬組成物のpHは、約4.8である。ある特定の実施形態では、医薬組成物のpHは、約4.9である。ある特定の実施形態では、医薬組成物のpHは、約5.0である。ある特定の実施形態では、医薬組成物のpHは、約5.1である。ある特定の実施形態では、医薬組成物のpHは、約5.2である。ある特定の実施形態では、医薬組成物のpHは、約5.3である。ある特定の実施形態では、医薬組成物のpHは、約5.4である。ある特定の実施形態では、医薬組成物のpHは、約5.5である。ある特定の実施形態では、医薬組成物のpHは、約5.6である。ある特定の実施形態では、医薬組成物のpHは、約5.7である。ある特定の実施形態では、医薬組成物のpHは、約5.8である。ある特定の実施形態では、医薬組成物のpHは、約5.9である。ある特定の実施形態では、医薬組成物のpHは、約6.0である。ある特定の実施形態では、医薬組成物のpHは、約6.1である。ある特定の実施形態では、医薬組成物のpHは、約6.2である。ある特定の実施形態では、医薬組成物のpHは、約6.3である。ある特定の実施形態では、医薬組成物のpHは、約6.4である。ある特定の実施形態では、医薬組成物のpHは、約6.5である。ある特定の実施形態では、医薬組成物のpHは、約6.6である。ある特定の実施形態では、医薬組成物のpHは、約6.7である。ある特定の実施形態では、医薬組成物のpHは、約6.8である。ある特定の実施形態では、医薬組成物のpHは、約6.9である。ある特定の実施形態では、医薬組成物のpHは、約7.0である。ある特定の実施形態では、医薬組成物のpHは、約7.1である。ある特定の実施形態では、医薬組成物のpHは、約7.2である。ある特定の実施形態では、医薬組成物のpHは、約7.3である。ある特定の実施形態では、医薬組成物のpHは、約7.4である。ある特定の実施形態では、医薬組成物のpHは、約7.5である。ある特定の実施形態では、医薬組成物のpHは、約7.6である。ある特定の実施形態では、医薬組成物のpHは、約7.7である。ある特定の実施形態では、医薬組成物のpHは、約7.8である。ある特定の実施形態では、医薬組成物のpHは、約7.9である。ある特定の実施形態では、医薬組成物のpHは、約8.0である。ある特定の実施形態では、医薬組成物のpHは、約8.1である。ある特定の実施形態では、医薬組成物のpHは、約8.2である。ある特定の実施形態では、医薬組成物のpHは、約8.3である。ある特定の実施形態では、医薬組成物のpHは、約8.4である。ある特定の実施形態では、医薬組成物のpHは、約8.5である。ある特定の実施形態では、医薬組成物のpHは、約8.6である。ある特定の実施形態では、医薬組成物のpHは、約8.7である。ある特定の実施形態では、医薬組成物のpHは、約8.8である。ある特定の実施形態では、医薬組成物のpHは、約8.9である。ある特定の実施形態では、医薬組成物のpHは、約9.0である。上で参照したpH値の間の範囲がまた、企図される。

10

20

30

40

【0129】

医薬組成物の状態

本明細書で提供される医薬組成物は、液体組成物又は凍結組成物のいずれかであり得る。いくつかの実施形態では、医薬組成物は、液体状態にある。他の実施形態では、医薬組成物は、固体状態又は半固体状態にある。

【0130】

医薬組成物及び投与の経路

50

ある特定の実施形態では、本明細書に開示される組成物は、非経口的に、経粘膜的に、経皮的に、筋肉内注射で、静脈内注射で、皮内に、鼻腔内に、皮下に、腹腔内になどの当業者に既知の1つ又は2つ以上の方法によって対象に投与され、それに応じて製剤化される。一実施形態では、本明細書に記載される組成物は、液体調製物の表皮注射、筋肉内注射、静脈内注射、動脈内注射、皮下注射、又は呼吸器内粘膜注射を介して投与される。注射用の液体製剤としては、溶液などが挙げられる。

【0131】

保存条件

ある特定の実施形態では、本明細書に開示される組成物は、約25℃などの周囲温度で保存される。いくつかの実施形態では、本明細書に開示される組成物は、25℃未満で保存される。いくつかの実施形態では、本明細書に開示される組成物は、約0℃～約25℃で保存される。いくつかの実施形態では、組成物は、0℃～10℃で保存される。いくつかの実施形態では、組成物は、約2℃～約8℃で保存される。いくつかの実施形態では、組成物は、約4℃で保存される。いくつかの実施形態では、組成物は、0℃未満で保存される。いくつかの実施形態では、組成物は、約-20℃～約-80℃で保存される。いくつかの実施形態では、組成物は、約-20℃で保存される。いくつかの実施形態では、組成物は、約-70℃で保存される。いくつかの実施形態では、組成物は、約-80℃で保存される。

【0132】

本明細書に提供される場合、本明細書に開示される組成物は、精製されたAAV粒子の安定性を維持若しくは増強し、かつ／又は1回以上の遊離／解凍サイクル後の凝集を減少若しくは防止することができる。いくつかの実施形態では、本明細書に開示される組成物は、精製されたAAV粒子の安定性を維持する。いくつかの実施形態では、本明細書に開示される組成物は、1回の遊離／解凍サイクル後の凝集を減少させる。いくつかの実施形態では、本明細書に開示される組成物は、2回以上の遊離／解凍サイクル後の凝集を減少させる。いくつかの実施形態では、本明細書に開示される組成物は、1回の遊離／解凍サイクル後の凝集を防止する。いくつかの実施形態では、本明細書に開示される組成物は、2回以上の遊離／解凍サイクル後の凝集を防止する。

【0133】

ある特定の実施形態では、組成物は、0℃未満で保存され、安定性は、1回又は2回以上の凍結／解凍サイクル後に維持又は増強される。ある特定の実施形態では、組成物は、約-20℃で保存され、安定性は、1回又は2回以上の凍結／解凍サイクル後に維持又は増強される。ある特定の実施形態では、組成物は、約-20℃で保存され、安定性は、1回又は2回以上の凍結／解凍サイクル後に維持又は増強される。ある特定の実施形態では、組成物は、約-70℃で保存され、安定性は、1回又は2回以上の凍結／解凍サイクル後に維持又は増強される。ある特定の実施形態では、組成物は、約-80℃で保存され、安定性は、1回又は2回以上の凍結／解凍サイクル後に維持又は増強される。いくつかの実施形態では、安定性は、維持される。いくつかの実施形態では、安定性は、1回の凍結／解凍サイクル後に維持される。いくつかの実施形態では、安定性は、2回以上の凍結／解凍サイクル後に維持される。いくつかの実施形態では、安定性は、増強される。いくつかの実施形態では、安定性は、1回の凍結／解凍サイクル後に増強される。いくつかの実施形態では、安定性は、2回以上の凍結／解凍サイクル後に増強される。

【0134】

ある特定の実施形態では、組成物は、0℃未満で保存され、安定性は、3回又は4回以上の凍結／解凍サイクル後に維持又は増強される。ある特定の実施形態では、組成物は、約-20℃で保存され、安定性は、3回又は4回以上の凍結／解凍サイクル後に維持又は増強される。ある特定の実施形態では、組成物は、約-20℃で保存され、安定性は、3回又は4回以上の凍結／解凍サイクル後に維持又は増強される。ある特定の実施形態では、組成物は、約-70℃で保存され、安定性は、3回又は4回以上の凍結／解凍サイクル後に維持又は増強される。ある特定の実施形態では、組成物は、約-80℃で保存され、

安定性は、3回又は4回以上の凍結／解凍サイクル後に維持又は増強される。いくつかの実施形態では、安定性は、維持される。いくつかの実施形態では、安定性は、3回の凍結／解凍サイクル後に維持される。いくつかの実施形態では、安定性は、4回以上の凍結／解凍サイクル後に維持される。いくつかの実施形態では、安定性は、増強される。いくつかの実施形態では、安定性は、3回の凍結／解凍サイクル後に増強される。いくつかの実施形態では、安定性は、4回以上の凍結／解凍サイクル後に増強される。

【0135】

いくつかの実施形態では、組成物は、0℃未満で保存され、凝集は、1回又は2回以上の凍結／解凍サイクル後に減少又は防止される。いくつかの実施形態では、組成物は、約-20℃で保存され、凝集は、1回又は2回以上の凍結／解凍サイクル後に減少又は防止される。いくつかの実施形態では、組成物は、約-70℃で保存され、凝集は、1回又は2回以上の凍結／解凍サイクル後に減少又は防止される。いくつかの実施形態では、組成物は、約-80℃で保存され、凝集は、1回又は2回以上の凍結／解凍サイクル後に減少又は防止される。いくつかの実施形態では、AAV粒子の凝集は、1回又は2回以上の凍結／解凍サイクル後に5%未満である。いくつかの実施形態では、AAV粒子の凝集は、1回又は2回以上の凍結／解凍サイクル後に2%未満である。いくつかの実施形態では、AAV粒子の凝集は、1回又は2回以上の凍結／解凍サイクル後に1%未満である。いくつかの実施形態では、凝集は、減少する。いくつかの実施形態では、凝集は、1回の凍結／解凍サイクル後に減少する。いくつかの実施形態では、凝集は、2回以上の凍結／解凍サイクル後に減少する。いくつかの実施形態では、凝集は、防止される。いくつかの実施形態では、凝集は、1回の凍結／解凍サイクル後に防止される。いくつかの実施形態では、凝集は、2回以上の凍結／解凍サイクル後に防止される。

10

20

【0136】

いくつかの実施形態では、組成物は、0℃未満で保存され、凝集は、3回又は4回以上の凍結／解凍サイクル後に減少又は防止される。いくつかの実施形態では、組成物は、約-20℃で保存され、凝集は、3回又は4回以上の凍結／解凍サイクル後に減少又は防止される。いくつかの実施形態では、組成物は、約-70℃で保存され、凝集は、3回又は4回以上の凍結／解凍サイクル後に減少又は防止される。いくつかの実施形態では、組成物は、約-80℃で保存され、凝集は、3回又は4回以上の凍結／解凍サイクル後に減少又は防止される。いくつかの実施形態では、AAV粒子の凝集は、3回又は4回以上の凍結／解凍サイクル後に5%未満である。いくつかの実施形態では、AAV粒子の凝集は、3回又は4回以上の凍結／解凍サイクル後に2%未満である。いくつかの実施形態では、AAV粒子の凝集は、3回又は4回以上の凍結／解凍サイクル後に1%未満である。いくつかの実施形態では、凝集は、減少する。いくつかの実施形態では、凝集は、3回の凍結／解凍サイクル後に減少する。いくつかの実施形態では、凝集は、4回以上の凍結／解凍サイクル後に減少する。いくつかの実施形態では、凝集は、防止される。いくつかの実施形態では、凝集は、3回の凍結／解凍サイクル後に防止される。いくつかの実施形態では、凝集は、4回以上の凍結／解凍サイクル後に防止される。

30

【0137】

例示的製剤

本明細書に開示される例示的な製剤としては、以下に又は実施例に記載される製剤のいずれか1つが挙げられるが、これに限定されない。しかしながら、本出願は、以下に記載され、実施例として提供される的確な実施形態に限定されないことを理解すべきである。

40

【0138】

一実施形態では、医薬組成物は、精製されたAAV粒子、緩衝剤、抗凍結剤、及び非イオン性界面活性剤を含む医薬組成物を含み、(a)精製されたAAV粒子は、不純物を実質的に含まず、(b)緩衝剤の濃度は、約20mMであり、(c)抗凍結剤は、約5%(w/v)のトレハロースであり、(d)非イオン性界面活性剤は、約0.001%(w/v)のポリキサマー188である。いくつかの実施形態では、緩衝剤は、トリスHClを含む。いくつかの実施形態では、緩衝剤は、L-ヒスチジンHClを含む。

50

【0139】

一実施形態では、医薬組成物は、精製されたAAV粒子、薬学的に許容される塩、緩衝剤、抗凍結剤、及び非イオン性界面活性剤を含む医薬組成物を含み、(a)精製されたAAV粒子は、不純物を実質的に含まず、(b)薬学的に許容される塩の濃度は、約10mMの塩化ナトリウムであり、(c)緩衝剤の濃度は、約20mMであり、(d)抗凍結剤は、約5%(w/v)のトレハロースであり、(e)非イオン性界面活性剤は、約0.001%(w/v)のポリキサマー188である。いくつかの実施形態では、緩衝剤は、トリスHClを含む。いくつかの実施形態では、緩衝剤は、L-ヒスチジンHClを含む。

【0140】

一実施形態では、医薬組成物は、精製されたAAV粒子、薬学的に許容される塩、緩衝剤、抗凍結剤、及び非イオン性界面活性剤を含む医薬組成物を含み、(a)精製されたAAV粒子は、不純物を実質的に含まず、(b)薬学的に許容される塩の濃度は、約25mMの塩化ナトリウムであり、(c)緩衝剤の濃度は、約20mMであり、(d)抗凍結剤は、約5%(w/v)のトレハロースであり、(e)非イオン性界面活性剤は、約0.001%(w/v)のポリキサマー188である。いくつかの実施形態では、緩衝剤は、トリスHClを含む。いくつかの実施形態では、緩衝剤は、L-ヒスチジンHClを含む。

10

【0141】

一実施形態では、医薬組成物は、精製されたAAV粒子、薬学的に許容される塩、緩衝剤、抗凍結剤、及び非イオン性界面活性剤を含む医薬組成物を含み、(a)精製されたAAV粒子は、不純物を実質的に含まず、(b)薬学的に許容される塩の濃度は、約50mMの塩化ナトリウムであり、(c)緩衝剤の濃度は、約20mMであり、(d)抗凍結剤は、約5%(w/v)のトレハロースであり、(e)非イオン性界面活性剤は、約0.001%(w/v)のポリキサマー188である。いくつかの実施形態では、緩衝剤は、トリスHClを含む。いくつかの実施形態では、緩衝剤は、L-ヒスチジンHClを含む。

20

【0142】

別の態様では、医薬組成物は、精製されたAAV粒子、薬学的に受容可能な塩、緩衝剤、凍結保護剤、及び非イオン性界面活性剤を含む医薬組成物を含み、(a)精製されたAAV粒子は、不純物を実質的に含まず、(b)薬学的に許容される塩の濃度は、約100mMの塩化ナトリウムであり、(c)緩衝剤の濃度は、約20mMであり、(d)抗凍結剤は、約5%(w/v)のトレハロースであり、(e)非イオン性界面活性剤は、約0.001%(w/v)のポリキサマー188である。いくつかの実施形態では、緩衝剤は、トリスHClを含む。いくつかの実施形態では、緩衝剤は、L-ヒスチジンHClを含む。

30

【0143】

別の態様では、医薬組成物は、精製されたAAV粒子、薬学的に受容可能な塩、緩衝剤、凍結保護剤、及び非イオン性界面活性剤を含む医薬組成物を含み、(a)精製されたAAV粒子は、不純物を実質的に含まず、(b)薬学的に許容される塩の濃度は、約125mMの塩化ナトリウムであり、(c)緩衝剤の濃度は、約20mMであり、(d)抗凍結剤は、約5%(w/v)のトレハロースであり、(e)非イオン性界面活性剤は、約0.001%(w/v)のポリキサマー188である。いくつかの実施形態では、緩衝剤は、トリスHClを含む。いくつかの実施形態では、緩衝剤は、L-ヒスチジンHClを含む。

40

【0144】

別の態様では、医薬組成物は、精製されたAAV粒子、薬学的に受容可能な塩、緩衝剤、凍結保護剤、及び非イオン性界面活性剤を含む医薬組成物を含み、(a)精製されたAAV粒子は、不純物を実質的に含まず、(b)薬学的に許容される塩の濃度は、約150mMの塩化ナトリウムであり、(c)緩衝剤の濃度は、約20mMであり、(d)抗凍結剤は、約5%(w/v)のトレハロースであり、(e)非イオン性界面活性剤は、約0.001%(w/v)のポリキサマー188である。いくつかの実施形態では、緩衝剤は、トリスHClを含む。いくつかの実施形態では、緩衝剤は、L-ヒスチジンHClを含む。

50

。

【0145】

別の態様では、医薬組成物は、精製されたAAV粒子、薬学的に受容可能な塩、緩衝剤、凍結保護剤、及び非イオン性界面活性剤を含む医薬組成物を含み、(a)精製されたAAV粒子は、不純物を実質的に含まず、(b)薬学的に許容される塩の濃度は、約200mMの塩化ナトリウムであり、(c)緩衝剤の濃度は、約20mMであり、(d)抗凍結剤は、約5%(w/v)のトレハロースであり、(e)非イオン性界面活性剤は、約0.001%(w/v)のボロキサマー188である。いくつかの実施形態では、緩衝剤は、トリスHClを含む。いくつかの実施形態では、緩衝剤は、L-ヒスチジンHClを含む。

。

【0146】

AAV粒子の精製

AAV粒子は、当該技術分野で既知の様々な方法を使用して精製され得る。一般に、精製は、遠心分離、クロマトグラフィー、若しくは濾過、又は場合によってはそれらの組み合わせを伴う。いくつかの実施形態では、精製は、2つのステップの精製プロトコルを含むことができ、例えば、2つのクロマトグラフィーのステップ、又はクロマトグラフィーと超遠心分離／濾過との組み合わせを含み得る。例として、2つのステップの精製プロトコルは、アフィニティークロマトグラフィー（例えば、ヘパリンアフィニティー樹脂を使用するもの）と、それに続くイオン交換カラム上での仕上げとによる精製を含むことができる。別の例示的な2つのステップの精製プロトコルは、超遠心分離（例えば、イオジキサノール密度超遠心分離）と、それに続くクロマトグラフィー（例えば、ヘパリンアフィニティー精製などのアフィニティークロマトグラフィー）と、を伴い得る。

【0147】

精製プロセスで使用される出発材料の濾過及び／又は遠心分離は、例えば細胞デブリ及び／又は細胞断片などのバルク不純物の一部を除去するのに役立ち得る。したがって、いくつかの実施形態では、上清は清澄化された上清である。ある特定の実施形態では、濾過及び／又は遠心分離が、例えば、クロマトグラフィー精製などの1つ又は2つ以上の追加の精製ステップの前に実施される。上清を清澄化するための様々な方法が、当該技術分野で既知である。例えば、0.2µmフィルターを使用して上清を清澄化することができる。具体的な実施形態では、清澄化された上清は、精製の1つ又は2つ以上の更なるステップの前に、Benzonase（登録商標）で処理され得る。

【0148】

AAV粒子の精製のための遠心分離技術としては、例えば、密度勾配遠心分離、超遠心分離、又はそれらの組み合わせが挙げられ得る。例示的なタイプの密度勾配遠心分離は、強い遠心力場に供された場合に密度勾配を形成する、CsClを伴い得る。例えば、ウイルスがCsCl塩中で平衡に達するまで遠心分離される場合、それらは汚染物質から分離され、それらの浮遊密度に基づいて集団で回収される。いくつかの実施形態では、AAV粒子の精製は、複数のCsCl勾配遠心分離ステップを含む。AAV粒子の精製のための別の例示的な密度培地は、イオジキサノールを含むことができる。いくつかの実施形態では、AAV粒子の精製は、予備精製ステップとしての密度勾配遠心分離（例えば、不連続イオジキサノール勾配遠心分離）と、それに続くアフィニティークロマトグラフィーウイルス精製ステップ、例えばヘパリン化支持マトリックスクロマトグラフィー又はイオン交換クロマトグラフィーなどによるものを含み得る。

【0149】

いくつかの実施形態では、AAV粒子の精製は、クロマトグラフィーを伴う。例えば、大規模量のAAV粒子の精製は、一般的に、溶液（移動相）中の分子が、固定材料（固相又は固体支持体）との化学的又は物理的相互作用の差異に基づいて分離される、ある形態のクロマトグラフィーを伴う。例示的なタイプのクロマトグラフィーとしては、例えば、ゲル濾過（サイズ排除クロマトグラフィー又はSECとも呼ばれる）が挙げられ、これは、多孔質の樹脂材料を使用して、分子を分子のサイズに基づいて分離するものである（す

10

20

30

40

50

なわち、物理的排除)。別の例示的なタイプのクロマトグラフィーは、アフィニティークロマトグラフィー(アフィニティー精製とも呼ばれる)である。

【0150】

ある特定の実施形態では、クロマトグラフィーは、クロマトグラフィーカラムを伴う。本明細書に開示されるように、様々なタイプのクロマトグラフィーカラムを使用して、AAV粒子を精製することができる。ある特定の実施形態では、クロマトグラフィーカラムは、モノリスである。モノリスは、多くの相互接続されたチャンネルを有する均質な固定相の単一ブロックを有するクロマトグラフィーカラムである。モノリスの固定相は、異なる特性を有する異なる種類の生体分子の精製を可能にする、様々な化学的性質のものであり得る。しかしながら、カラムはモノリスである必要はなく、ビーズ、多孔質粒子ベースのカラム、及び膜吸着体も使用できるということが理解される。

10

【0151】

アフィニティークロマトグラフィーは、標的分子へのリガンド結合又は標的分子との特異的イオン相互作用などの分子間の特異的結合相互作用を利用する。例示的なタイプのアフィニティークロマトグラフィーは、ウイルスカプシドと、クロマトグラフィーマトリックスに結合された特定の生物学的リガンド又はレセプターとの間の可逆的相互作用に基づいて、タンパク質及び核酸汚染物からウイルス粒子を分離することを伴う。いくつかの実施形態では、アフィニティークロマトグラフィーによる精製は、負に荷電したセルロースアフィニティー媒体硫酸セルロファインを含むことができる。代替的なアフィニティー精製アプローチは、モノクローナル抗体(例えば、A20)によるAAV粒子(例えば、AAV2粒子)の認識に基づくものであり、アセンブルされていないカプシドタンパク質の分離を可能にする。アフィニティークロマトグラフィーの更なる例示的な例としては、ヘパリンアフィニティーが挙げられる。

20

【0152】

いくつかの実施形態では、アフィニティークロマトグラフィーは、精製されるAAV粒子のAAVカプシド血清型又は偽型に特異的であり得る。例えば、いくつかのAAV血清型(例えば、AAV1、4、及び5など)は、ヘパリンカラムにあまり効率的に結合しない。したがって、いくつかの実施形態では、例えばAAV5粒子の捕捉のためのアフィニティーマトリックスは、CNBr活性化セファロースに共有結合した、ムチンと呼ばれるシアル酸を豊富に有するタンパク質を含むことができる。あるいは、PDGFR- α 及びPDGFR- β は、例えばAAV5粒子の捕捉のための特異的分子として使用することができる。

30

【0153】

いくつかの実施形態では、クロマトグラフィーはイオン交換クロマトグラフィーである。イオン交換クロマトグラフィーは、固相材料との全体的なイオン相互作用の強度に従って、分子を分離することを伴う。イオン交換クロマトグラフィーによる精製は、ウイルスカプシドの外側のタンパク質の正味の電荷に基づく。表面タンパク質の正味の電荷は、露出したアミノ酸基のpHに依存する。

【0154】

イオン交換クロマトグラフィーの1つの例示的なタイプは、陰イオン交換クロマトグラフィーであり、これは、分子をそれらの正味の表面電荷に基づいて分離するために使用される。陰イオン交換クロマトグラフィーは、正味の負の表面電荷を有する分子に対する親和性を有する、正に荷電したイオン交換樹脂を使用する。上記で提供された例は、例示的であることが意図され、本開示とともに使用され得るクロマトグラフィーのタイプを網羅することは意図されないことが理解される。

40

【0155】

本明細書において提供されるように、AAV粒子を精製するプロセスにおいて使用され得る精製の1つの例示的なタイプは、アフィニティークロマトグラフィーである。いくつかの実施形態では、アフィニティークロマトグラフィーは、固体支持体(例えば、アフィニティー支持体)に化学的に固定化又は「結合」された特定のリガンドを伴うことができ

50

、その結果、複合混合物がカラムを通過すると、リガンドに対する特異的結合親和性を有する分子が結合する。他の実施形態では、アフィニティークロマトグラフィーは、特異的正味表面電荷に基づくイオン相互作用を伴い得るが、そのため、それらの正味表面電荷に基づいて固体支持体に対する特異的結合親和性を有する分子が結合される。

【0156】

いくつかの実施形態では、アフィニティークロマトグラフィーはイオン交換クロマトグラフィーである。前述したように、イオン交換クロマトグラフィーは、親和性支持体などの固相材料との全体的なイオン相互作用の強度に従って、分子を分離する。いくつかの実施形態では、イオン交換クロマトグラフィーは、陰イオン交換クロマトグラフィーである。陰イオン交換クロマトグラフィーを使用して、正味の表面電荷に基づいて分子を分離することができる。例えば、陰イオン交換クロマトグラフィーは、正味の負の表面電荷を有する分子に対する親和性を有する、正に荷電したイオン交換樹脂を使用する。

10

【0157】

上述したように、クロマトグラフィーは、一般に、固定材料（固相又は固体支持体）との化学的又は物理的相互作用の差に基づいて分離される、溶液（移動相）中の分子を伴う。クロマトグラフィーの様々な形態はまた、必要に応じて、固体支持体から不要な成分を除去するための洗浄を伴い得る。したがって、いくつかの実施形態では、本明細書で提供される方法は、固体支持体を洗浄することを伴う。他の試料成分が洗い流された後、結合した分子は支持体から剥がされ（すなわち、溶出され）、元々の試料から精製される。

【0158】

AAV粒子の溶出は、直線勾配溶出又は段階的均一濃度の溶出のいずれかによって溶出することができる。多くの場合、勾配溶出を用いて、溶出条件を最適化することができる。目的のタンパク質の溶出プロファイルが確立され、どのイオン強度又はpHでタンパク質が溶出するかが分かると、精製プロセスを加速するために段階的溶出を使用することができる。AAV粒子を精製するために使用されるクロマトグラフィーのタイプに依存して、溶出条件は、競合リガンドを伴うか、又はpH、イオン強度、若しくは極性を変化させることを伴う。標的タンパク質は、精製及び濃縮された形態で溶出され得る。例えば、イオン交換クロマトグラフィーについて、最終生成物は、それらの正味の表面電荷に依存する順序で溶出され得る。7.5に近いpI値を有する試料は、より低いイオン強度で溶出し、非常に低いpI値を有する試料は、高い塩の濃度で溶出する。

20

30

【0159】

いくつかの実施形態では、AAV粒子は、低pH緩衝液を使用して溶出され得る。ある特定の実施形態では、高pH緩衝液は、低pH緩衝液の使用の直前に使用され、「高／低pH緩衝液」と称される。具体的な実施形態では、低いpHは約2.5である。いくつかの実施形態では、低pH緩衝液は、クエン酸緩衝液、グリシン緩衝液、又はリン酸緩衝液である。ある特定の実施形態では、低pH緩衝液は弱酸を含む。

【0160】

本明細書で提供されるように、溶出ステップへのエタノールの添加は、イオン交換カラムからのウイルスの回収を改善することができる。したがって、いくつかの実施形態では、溶出緩衝液はエタノールを含むことができる。いくつかの実施形態では、エタノールは、約5%～約40%のエタノールであり得る。いくつかの実施形態では、エタノールは、約10%～約30%のエタノールであり得る。いくつかの実施形態では、エタノールは、約15%～約25%のエタノールであり得る。具体的な実施形態では、エタノールは、約20%のエタノールであり得る。

40

【0161】

低pH緩衝液を使用して行われる溶出は、しばしば、溶出緩衝液が直ちに中和されることを必要とする。したがって、いくつかの実施形態では、溶出は、緩衝液のpHを中和することを更に含む。具体的な実施形態では、中和は、ビスートリズブopan（BTP）を添加することを含む。ある特定の実施形態では、中和することは、トリスを添加することを含む。Ad又はAAVの精製の手順のために使用される多くのクロマトグラフィー溶

50

出緩衝液は、インビボでの操作に適していないので、分解又は濃縮のような追加の精製ステップが必要であり得る。したがって、いくつかの実施形態では、精製はまた、A A V ウイルス粒子の分解及び／又は濃縮を含む。

【0162】

したがって、いくつかの実施形態では、(a) A A V 粒子を含む上清を固体支持体とともに、A A V 粒子を結合させるのに十分な時間インキュベートすることと、(b) A A V 粒子を含む上清を、クロマチン-DNAヌクレアーゼを含む組成物と接触させることと、(c) 精製されたA A V 粒子を溶出させることと、を含む、A A V 粒子を精製するための方法が、本明細書で提供される。クロマチン-DNAヌクレアーゼと接触させることはまた、A A V 粒子の結合の前に行われ得るということが理解される。したがって、いくつかの実施形態では、アデノ随伴ウイルス(A A V)粒子を精製するための方法であって、(a) A A V 粒子を含む上清を、クロマチン-DNAヌクレアーゼを含む組成物と接触させることと、(b) A A V 粒子を含む上清を、固体支持体とともに、A A V 粒子を結合させるのに十分な時間インキュベートすることと、(c) 精製されたA A V 粒子を溶出させることと、を含む方法が本明細書で提供される。同様に、クロマチン-DNAヌクレアーゼと接触させることは、固体支持体の設定において組み合わせられる必要はなく、当該技術分野で既知の任意のA A V 粒子精製技術と組み合わせられ得るということもまた理解される。ある特定の実施形態では、精製されたA A V 粒子は、A A V 粒子を仕上げるための1つ又は2つ以上の追加の精製に供される。例えば、粒子は、アフィニティークロマトグラフィーによって精製され得、次いで、陰イオン交換クロマトグラフィーなどの異なるタイプのクロマトグラフィーによって仕上げられ得る。

【0163】

いくつかの実施形態では、本方法は、試料を溶出させる前に、固体支持体を洗浄することを更に含む。本明細書中に記載されるように、支持体から、非結合試料成分を洗浄除去することは、標的トリガンドとの間の結合相互作用を維持する適切な緩衝液を使用して行われ得る。洗浄により、いくつかの結合していない汚染物質を除去することができる。いくつかの実施形態では、非特異的結合相互作用は、低い濃度の洗剤を添加することによって、又は結合緩衝液及び／若しくは洗浄緩衝液中の塩の濃度を適度に調整することによって、最小限に抑えることができる。

【0164】

本明細書で提供されるように、いくつかの実施形態では、A A V 粒子の純度は、高いpHで洗浄することによって増加させることができる。例えば、バルク回収物をアフィニティークロマトグラフィーによって精製し、次いで高pH緩衝液で洗浄して不純物を除去することができる。いくつかの実施形態では、高pH洗浄後に、Benzonase(登録商標)及び／又はクロマチン-DNAヌクレアーゼを用いたオンカラム酵素処理が続く。ある特定の実施形態では、高pH洗浄緩衝液は、pH9より大きい。いくつかの実施形態では、高pH洗浄緩衝液は、pH9.5~pH10.9である。他の実施形態では、高pH洗浄緩衝液は、pH9.5である。いくつかの実施形態では、高pH洗浄緩衝液は、pH10.2である。いくつかの実施形態では、高pH洗浄緩衝液は、pH10.3である。いくつかの実施形態では、高pH洗浄緩衝液は、pH10.4である。

【0165】

いくつかの実施形態では、クロマチン-DNAヌクレアーゼは、小球菌ヌクレアーゼ(MNase)(EC3.1.31.1)である。Staphylococcus aureusから単離されたMNaseは、核酸(DNA及び／又はRNA)を消化することができる非特異的エンドーエキソヌクレアーゼ活性を有するホスホジエステラーゼである。MNaseは、障害物(ヌクレオソーム又は他の核酸結合タンパク質)に達するまで、2つのヌクレオソームを接続するリンカー領域内の露出した核酸を消化する。MNaseは、細胞溶解物から核酸を除去し、クロマチン結合タンパク質を放出するのに好適であり得るが、DNaseは、ヌクレオソーム枯渇DNA又は「ヌクレオソームを含まない」DNAを優先的に切断する。MNaseは、二本鎖、一本鎖、環状及び直鎖状核酸を消化する

。いくつかの実施形態では、上清中のMNaseの濃度は、2.5単位/mL(U/mL)より大きい。ある特定の実施形態では、上清中のMNaseの濃度は、10単位/mLより大きい。具体的な実施形態では、上清中のMNaseの濃度は、約30単位/mL～約100単位/mLである。より具体的な実施形態では、上清中のMNaseの濃度は、約60単位/mLである。いくつかの実施形態では、MNaseは、MNaseの活性を有するポリペプチドである。一実施形態では、MNaseは、AAV粒子と結合したクロマチンを消化するのに十分な量で存在する。

【0166】

一実施形態では、MNaseは、AAV粒子不純物を減少させるのに十分な量で存在する。一実施形態では、AAV粒子不純物は、宿主細胞DNA、宿主細胞タンパク質、クロマチン結合DNA、及びDNA結合タンパク質のうちの1つ又は2つ以上を含む。一実施形態では、AAV粒子不純物は、巨視的不純物及び微視的不純物を含む。一実施形態では、DNA結合タンパク質は、ヒストンを含む。

【0167】

一実施形態では、MNaseは、260nmでの吸光度によって測定される場合、AAV粒子産生物後画分を減少させるのに十分な量で存在する。一実施形態では、MNaseは、280nmでの吸光度によって測定される場合、AAV粒子産生物後画分を減少させるのに十分な量で存在する。

【0168】

一実施形態では、MNaseは、動的光散乱(DLS)によって測定される場合、凝集温度(Tagg)の約10℃未満以内の融解温度(Tm)を含む、精製されたAAV粒子を生成するのに十分な量で存在する。一実施形態では、MNaseは、動的光散乱(DLS)によって測定される場合、凝集温度(Tagg)の約5℃未満以内の融解温度(Tm)を含む、精製されたAAV粒子を生成するのに十分な量で存在する。一実施形態では、MNaseは、動的光散乱(DLS)によって測定される場合、凝集温度(Tagg)の約2℃未満以内の融解温度(Tm)を含む、精製されたAAV粒子を生成するのに十分な量で存在する。

【0169】

クロマチン-DNAヌクレアーゼが、AAV粒子及び遊離核酸とウイルス外で複合体化したDNA結合タンパク質を放出するのに必要な時間の長さの決定は、当業者の技能の範囲内である。ある特定の実施形態では、インキュベーションは、約10分間～約1時間である。いくつかの実施形態では、インキュベーションは、約20分間～約40分間である。具体的な実施形態では、インキュベーションは約30分間である。

【0170】

本明細書で提供される方法のいくつかの実施形態では、クロマチン-DNAヌクレアーゼを含む組成物はまた、Benzonase(登録商標)ヌクレアーゼ(*Serratia marcescens*由来のエンドヌクレアーゼ; 酵素委員会(Enzyme Commission、EC)番号: 3.1.30.2)を含み得る。Benzonase(登録商標)は、アクセス可能なDNA及びRNA(例えば、非クロマチンDNA)を分解することができる、無差別的なエンドヌクレアーゼである。それは、DNA及びRNAの全ての形態(例えば、一本鎖、二本鎖、直鎖状及び環状)を攻撃及び分解し、広範囲の操作条件にわたって有効である。例えば、天然又は熱変性したDNA及びRNAを消化することができる。

【0171】

Benzonase(登録商標)の添加は、粗試料中に存在するヌクレアーゼ感受性核酸を除去、例えば、宿主産生細胞から、残留核酸を除去するのに役立ち得る。Benzonase(登録商標)の添加は、遊離核酸を消化するために、例えばタンパク質試料中の粘度を低下させるために含めることができるが、それ自体では、AAV粒子にウイルス外で複合体化したDNA結合タンパク質を放出させるには不十分である。いくつかの実施形態では、Benzonase(登録商標)及びクロマチン-DNAヌクレアーゼは、一緒

10

20

30

40

50

にインキュベートされる。具体的な実施形態では、Benzonase（登録商標）及びクロマチン-DNAヌクレアーゼは、アフィニティー交換クロマトグラフィー後に、一緒にインキュベートされる。しかしながら、Benzonase（登録商標）処理は、クロマチン-DNAヌクレアーゼと同時に進行される必要はないことが理解される。例えば、いくつかの実施形態では、Benzonase（登録商標）は、精製前にバルク回収物に添加される。任意のBenzonase（登録商標）生成物が、本開示に適していることが更に理解される。

【0172】

本開示は、ある特定の実施形態では、例示的なエンドヌクレアーゼとしてBenzonase（登録商標）の使用を記載するが、残留宿主細胞DNAを低減することができる任意のヌクレアーゼ、又は残留宿主細胞DNAを低減することができるヌクレアーゼの活性を有するポリペプチドを使用することができるということが理解される。このような代替的なヌクレアーゼとしては、例えば、クリオナーゼ（好冷生物 *Shewanella* sp. に由来する組換えエンドヌクレアーゼ）、塩活性ヌクレアーゼ（salt active nuclease、SAN）、又はDNase I（商標）を挙げることができる。

10

【0173】

本明細書で提供されるように、AAV粒子を含有する試料をMNaseと接触させることにより、クロマチン結合DNA、宿主細胞タンパク質を除去し、MNase処理なしの試料と比較して、AAV粒子の全体的な収率を改善することができる。したがって、いくつかの実施形態では、本明細書において提供される方法を用いて調製された精製AAV粒子は、MNase非接触で精製されたAAV粒子と比較した場合、クロマチン結合DNAを実質的に含まない。ある特定の実施形態では、精製AAV粒子は、MNase非接触で精製されたAAV粒子と比較した場合に、宿主細胞タンパク質を実質的に含まない。いくつかの実施形態では、AAV粒子は、MNase非接触で精製されたAAV粒子と比較した場合に、増加した収率を有する。

20

【0174】

AAVの産生

様々な産生プラットフォームが、現在、AAV粒子の産生のために使用されており、かつ当該技術分野で既知であり、これらの各々は、本明細書に記載される精製方法及び組成物での使用に好適である。AAV粒子の大規模な生成のための例示的な方法は、例えば、哺乳動物細胞におけるプラスミドDNAトランスフェクション、安定な哺乳動物細胞株のAd感染、組換え単純ヘルペスウイルス単純ヘルペスウイルス（recombinant herpes simplex viruses、rHSV）による哺乳動物細胞の感染、及び組換えバキュロウイルスによる昆虫細胞の感染を伴い得る（例えば、Penaud-Budloo M. et al., Mol Ther Methods Clin Dev. 2018 Jan 8; 8: 166-180を参照されたい）。

30

【0175】

AAV粒子の産生のための例示的な方法は、例えば、ヒト胎児HEK293細胞のプラスミドトランスフェクションである。例えば、HEK293細胞は、無機化合物（例えば、リン酸カルシウム）、有機化合物（例えば、ポリエチレンイミン（PEI））、又は非化学薬品（例えば、電気穿孔）のいずれかを用いて、目的の遺伝子を含むプラスミド及び1つ又は2つのヘルパープラスミドで同時にトランスフェクトされ得る。ヘルパープラスミドは、4つのRepタンパク質（Rep78、Rep68、Rep52、Rep40）、3つのAAV構造タンパク質（VP1、VP2、及びVP3）、AAP、並びにアデノウイルス補助機能E2A、E4、及びVA RNAの発現を可能にする。AAV複製に必要な、更なるアデノウイルスE1A/E1Bの補因子は、HEK293プロデューサー細胞において発現され得る。プラスミドは、細菌起源及び抗生物質耐性遺伝子を使用したE. coliにおける従来の技術によって、又はミニサークル（minicircle、MC）技術によって産生され得る。プロデューサー細胞（例えば、HEK293プロデューサー細胞）は、接着培養物又は懸濁培養物であり得る。

40

50

【0176】

産生の別の例示的な方法は、rHSVベクターでの哺乳動物細胞の感染を伴う。ハムスターBHK21細胞株又はHEK293及び誘導体などの細胞を、2つのrHSVに感染させることができるが、そのうち一方は、AAV ITR (rHSV-AAV) によって囲まれた目的の遺伝子を有し、他方は、AAV粒子の産生のための所望の血清型 (rHSV-V-rep cap) のAAV rep及びcap ORFを有する。

【0177】

AAV粒子産生のための安定なプロデューサー細胞株は、AAV粒子の産生のための更なる例示的な方法を提供する。例えば、安定なプロデューサー細胞株は、細胞株（例えば、HEK293細胞、HeLa細胞、又は誘導体）から誘導し得るが、産生されるAAV rep及びcap遺伝子（パッケージング細胞株）及び／又はAAVゲノム（例えば、rAAVゲノム）を導入することにより遺伝子操作され得る（プロデューサー細胞）。AAV粒子の産生のための別の例示的な安定細胞株としては、通常毒性のあるAAV複製 (rep) 遺伝子並びにAAVカプシド (cap) 遺伝子、及び導入遺伝子を組み込む安定細胞株が挙げられる（例えば、その全体が本明細書に開示される米国特許出願第62/877,508号を参照されたい）。

【0178】

プロデューサー細胞株は哺乳動物細胞株である必要はなく、昆虫細胞のような非哺乳動物細胞及び酵母が産生のために使用され得るということが更に理解される。AAV粒子の産生に適した非哺乳動物プラットフォームの例示的な例としては、バキュロウイルス-Sf9昆虫細胞プラットフォームが挙げられる。AAV粒子の産生に好適な非哺乳動物細胞株は、トランスフェクション法を使用して、又は安定な細胞株として生成され得る（例えば、Mietzsch M. et al. Hum. Gene Ther. 2014; 25: 212-222、Mietzsch M. et al. Hum. Gene Ther. Methods. 2017; 28: 15-22を参照されたい）。上記のAAV粒子産生プラットフォームの例は、例示的であり、限定することを意図しないと理解され、様々な産生プラットフォームのいずれも、本明細書に記載される精製方法及び組成物と組み合わせることができる。

【0179】

本明細書で使用される場合、「ベクター」は、遺伝物質を細胞に運ぶために使用される核酸分子であり、複製及び／又は発現され得る。本開示を考慮して当業者に既知の任意のベクターを使用することができる。ベクターの例としては、プラスミド、ウイルスベクター（バクテリオファージ、動物ウイルス、及び植物ウイルス）、コスミド、及び人工染色体（例えば、YAC）が挙げられるが、これらに限定されない。好ましくは、ベクターはDNAプラスミドである。当業者は、本開示を考慮して、標準的な組換え技術によって本出願のベクターを構築することができる。

【0180】

本出願のベクターは、発現ベクターであり得る。本明細書で使用される場合、「発現ベクター」という用語は、転写され得るRNAをコードする核酸を含む任意の型の遺伝子構築物をいう。発現ベクターとしては、これらに限定されるものではないが、DNAプラスミド及びウイルスベクターなどの、組換えタンパク質を発現させるためのベクター、及びDNAプラスミド及びウイルスベクターなどの、対象の体内に核酸を送達させて対象の組織で発現させるためのベクターなどが挙げられる。発現ベクターの設計は、形質転換される宿主細胞の選択、望ましいタンパク質の発現レベルなどの因子に依存し得るということを、当業者は理解するであろう。

【0181】

本願のいくつかの実施形態では、ベクターは、非ウイルスベクターである。非ウイルスベクターの例としては、これらに限定されるものではないが、DNAプラスミド、細菌人工染色体、酵母人工染色体、バクテリオファージなどが挙げられる。好ましくは、非ウイルスベクターは、DNAプラスミドである。「DNAプラスミドベクター」、「プラスミ

10

20

30

40

50

ドDNA」又は「プラスミドDNAベクター」と互換的に使用される「DNAプラスミド」は、好適な宿主細胞において自律複製することができる二本鎖の、一般的には環状のDNA配列を指す。コードされたポリヌクレオチドの発現のために使用されるDNAプラスミドは、典型的には、複製起点、マルチクロニング部位、及び選択マーカー（例えば、抗生物質耐性遺伝子であり得る）を含む。使用され得る好適なDNAプラスミドの例としては、周知の発現系（原核生物系及び真核生物系の両方を含む）において使用するための市販の発現ベクターが挙げられるが、これらに限定されず、例えば、pSE420（Invitrogen, San Diego, Calif.）は、*Escherichia coli*におけるタンパク質の産生及び／又は発現のために使用され得るものであり、pYES2（Invitrogen, Thermo Fisher Scientific）は、酵母の*Saccharomyces cerevisiae*株における産生及び／又は発現のために使用され得るものであり、MAXBAC（登録商標）は、完全バキュロウイルス発現系（Thermo Fisher Scientific）であり、昆虫の細胞内での産生及び／又は発現のための使用され得るものであり、pcDNA（商標）又はpcDNA3（商標）（Life Technologies, Thermo Fisher Scientific）は、哺乳動物細胞における高いレベルの構成タンパク質の発現に使用され得るものであり、pVAX又はpVAX-1（Life Technologies, Thermo Fisher Scientific）は、ほとんどの哺乳動物細胞における目的のタンパク質の高レベルな一過性発現のために使用され得るものである。任意の市販のDNAプラスミドの骨格は、宿主細胞におけるタンパク質発現を最適化するように、例えば、ある特定のエレメント（例えば、複製起点及び／又は抗生物質耐性カセット）の配向を逆転させるように、プラスミドに対して内因性のプロモーター（例えば、抗生物質耐性カセットにおけるプロモーター）を置き換えるように、かつ／又は転写されたタンパク質をコードするポリヌクレオチド配列（例えば、抗生物質耐性遺伝子のコード配列）を置き換えるように、日常的な技術及び容易に入手可能な出発物質を使用することによって、改変され得る。（例えば、Sambrook et al., *Molecular Cloning a Laboratory Manual*, Second Ed. Cold Spring Harbor Press (1989) を参照されたい）。

10

20

30

40

50

【0182】

好ましくは、DNAプラスミドは、哺乳動物宿主細胞におけるタンパク質発現に好適な発現ベクターである。哺乳動物宿主細胞におけるタンパク質発現に好適な発現ベクターとしては、pUC、pcDNA TM、pcDNA3 TM、pVAX、pVAX-1、ADVAX、NTC8454などが挙げられるが、これらに限定されない。例えば、ベクターは、pUC複製起点及びアンピシリン耐性遺伝子を含むpUC57に基づき得る。それは更に、ヘルペスウイルスチミジンキナーゼ遺伝子プロモーター、ピューロマイシンN-アセチルトランスフェラーゼコード領域、及びウシ成長ホルモン遺伝子由来のポリアデニル化シグナルから構築された哺乳動物ピューロマイシン耐性遺伝子カセットを含み得る。ベクターはまた、エプスタイン・バーウイルス（Epstein Barr Virus、EBV）OriP複製起点フラグメントを含み得るが、これは、EBVの「ダイアド対称性」領域及び「反復ファミリー」領域の複合体を表す。

【0183】

本願のベクターはまた、ウイルスベクターであり得る。一般に、ウイルスベクターは、非感染性にされた改変ウイルスDNA又はRNAを保有する遺伝子操作されたウイルスであるが、依然としてウイルスプロモーター及び導入遺伝子を含むし、したがってウイルスプロモーターを介した導入遺伝子の翻訳を可能にする。ウイルスベクターはしばしば感染配列を欠いているので、それらは、大規模トランスフェクションのためにはヘルパーウイルス又はパッケージング株を必要とする。使用され得るウイルスベクターの例としては、アデノウイルスベクター、アデノ随伴ウイルスベクター、痘瘡ウイルスベクター、腸内ウイルスベクター、ベネズエラウマ脳炎ウイルスベクター、セムリキ森林ウイルスベクター、タバコモザイクウイルスベクター、レンチウイルスベクターなどが挙げられるが、これ

らに限定されない。ベクターはまた、非ウイルスベクターであってもよい。

【0184】

例示的なウイルスベクターは、アデノウイルスベクター、例えば、組換えアデノウイルスベクターである。本明細書で使用される場合、「組換えアデノウイルスベクター」及び「組換えアデノウイルスベクター」及び「組換えアデノウイルス粒子」という用語は、交換可能に使用され、そしてポリヌクレオチドが引き続いて発現されるように、目的のポリヌクレオチドを真核生物細胞に挿入するように設計され、遺伝子操作されたアデノウイルスを指す。本発明のウイルスベクターとして使用することができるアデノウイルスの例としては、血清型 Ad 2、Ad 5、Ad 11、Ad 12、Ad 24、Ad 26、Ad 34、Ad 35、Ad 40、Ad 48、Ad 49、Ad 50、Ad 52（例えば、RhAd 52）及び Pan 9（AdC 68としても既知）を有するか、又はそれらに由来するものが挙げられる。これらのベクターは、例えば、ヒト、チンパンジーから由来し得る（例えば、ChAd 1、ChAd 3、ChAd 7、ChAd 8、ChAd 21、ChAd 22、ChAd 23、ChAd 24、ChAd 25、ChAd 26、ChAd 27. 1、ChAd 28. 1、ChAd 29、ChAd 30、ChAd 31. 1、ChAd 32、ChAd 33、ChAd 34、ChAd 35. 1、ChAd 36、ChAd 37. 2、ChAd 39、ChAd 40. 1、ChAd 41. 1、ChAd 42. 1、ChAd 43、ChAd 44、ChAd 45、ChAd 46、ChAd 48、ChAd 49、ChAd 49、ChAd 50、ChAd 67、又は SA 7 P）か、又はアカゲザルアデノウイルス（例えば、rhAd 51、rhAd 52、又は rhAd 53）に由来し得る。組換えアデノウイルスベクターは、例えば、ヒトアデノウイルス（HAdV 又は AdHu）、又はチンパンジー若しくはゴリラアデノウイルス（ChAd、AdCh、又は SA dV）などのサルアデノウイルス、又はアカゲザルアデノウイルス（rhAd）に由来し得る。

10

20

【0185】

好ましくは、アデノウイルスベクターは、組換えヒトアデノウイルスベクター、例えば組換えヒトアデノウイルス血清型 5、又は組換えヒトアデノウイルス血清型 26、4、35、7、48 などのいずれか 1 つである。本願に有用な組換えウイルスベクターは、本開示を考慮して、当該技術分野で既知の方法を使用して調製することができる。例えば、遺伝暗号の縮重を考慮して、同じポリペプチドをコードするいくつかの核酸配列を設計することができる。目的のタンパク質をコードするポリヌクレオチドは、宿主細胞（例えば、細菌細胞又は哺乳動物細胞）における適切な発現を確実にするように、任意選択でコドン最適化され得る。コドン最適化は、当該技術分野において広く適用されている技術であり、コドン最適化ポリヌクレオチドを得るための方法は、本開示を考慮すれば当業者に周知であろう。

30

【0186】

天然に存在しない核酸分子又はベクターは、1 つ又は 2 つ以上の発現カセットを含み得る。「発現カセット」は、RNA 及びタンパク質を作製するための細胞機構を指向する、核酸分子又はベクターの一部である。発現カセットは、プロモーター配列と、オープンリーディングフレームと、任意選択的にポリアデニル化シグナルを含む 3' 非翻訳領域（untranslated region、UTR）と、を含み得る。オープンリーディングフレーム（open reading frame、ORF）は、開始コドンから終止コドンへの目的のタンパク質（例えば、Rep、Cap、組換え酵素、又は目的の組換えタンパク質）のコード配列を含むリーディングフレームである。発現カセットの調節エレメントは、目的のタンパク質をコードするポリヌクレオチド配列に操作可能に連結され得る。

40

【0187】

本願の天然に存在しない核酸分子又はベクターは、様々な制御配列を含有することができる。本明細書で使用される場合、「調節配列」という用語は、複製、複写、転写、スプライシング、翻訳、安定性及び／又は宿主細胞又は生物への核酸又はその誘導体の 1 つ（すなわち、mRNA）の輸送を含む核酸分子の機能調節を可能にするか、それに寄与するか、又は調節する任意の配列を指す。調節エレメントとしては、プロモーター、エンハン

50

サー、ポリアデニル化シグナル、翻訳終止コドン、リボソーム結合エレメント、転写ターミネーター、選択マーカー、複製起点などが挙げられるが、これらに限定されない。

【0188】

天然に存在しない核酸分子又はベクターは、目的のタンパク質の発現を制御するために、好ましくは発現カセット内にプロモーター配列を含み得る。「プロモーター」という用語は、その従来の意味で使用され、操作可能に連結されたヌクレオチド配列の転写を開始するヌクレオチド配列を指す。プロモーターは、転写されたヌクレオチド配列の近くの同じ鎖上に位置する。プロモーターは、常時発現型、誘導型、又は抑制型であり得る。プロモーターは、天然又は合成であり得る。プロモーターは、ウイルス、細菌、真菌、植物、昆虫、及び動物を含む供給源に由来し得る。プロモーターは、相同プロモーター（すなわち、ベクターと同じ遺伝子源に由来する）又は異種プロモーター（すなわち、異なるベクター又は遺伝子源に由来する）であり得る。例えば、使用されるベクターがDNAプラスミドである場合、プロモーターは、プラスミドに対して内因性であり得る（同種）か、又は他の供給源に由来し得る（異種）。好ましくは、プロモーターは、発現カセット内、目的のタンパク質をコードするポリヌクレオチドの上流に位置する。

10

【0189】

使用され得るプロモーターの例としては、シミアンウイルス40（simian virus 40、SV40）由来のプロモーター、マウス乳がんウイルス（mouse mammary tumor virus、MMTV）プロモーター、ヒト免疫不全ウイルス（human immunodeficiency virus、HIV）プロモーター（例えば、ウシ免疫不全ウイルス（bovine immunodeficiency virus、BIV）末端反復配列（long terminal repeat、LTR）プロモーター）、モロニーウイルスプロモーター、トリ白血病ウイルス（avian leukosis virus、ALV）プロモーター、サイトメガロウイルス（cytomegalovirus、CMV）プロモーター（例えば、CMV最初期プロモーター（CMV-IE））、エプスタイン・バーウイルス（Epstein Barr virus、EBV）プロモーター、又はラウス肉腫ウイルス（Rous sarcoma virus、RSV）プロモーターが挙げられるが、これらに限定されない。プロモーターはまた、ヒトアクチン、ヒトミオシン、ヒトヘモグロビン、ヒト筋肉クレアチン、又はヒトメタロチオネインのようなヒト遺伝子由来のプロモーターであり得る。プロモーターは、天然又は合成の、筋肉又は皮膚特異的プロモーターなどの組織特異的プロモーターであってもよい。好ましくは、プロモーターは、強力な真核生物プロモーター（例えば、サイトメガロウイルス（CMV）プロモーター（nt-672~+15）、EF1- α プロモーター、ヘルペスウイルスチミジンキナーゼ遺伝子プロモーターなど）である。

20

30

【0190】

非自然発生核酸分子又はベクターは、発現転写物を安定化させ、RNA転写物の核輸送を向上させ、かつ／又は転写翻訳カップリングを改善する、追加のポリヌクレオチド配列を更に含むことができる。そのような配列の例としては、ポリアデニル化シグナル及びエンハンサー配列が挙げられる。ポリアデニル化シグナルは、通常、ベクターの発現カセット内の目的のタンパク質（例えば、Rep、Cap、組換え酵素）のコード配列の下流に位置する。エンハンサー配列は、転写因子によって結合したときに関連する遺伝子の転写を向上させる調節DNA配列である。エンハンサー配列は、好ましくはプロモーター配列の下流にあり、ベクターの発現カセット内のコード配列の下流又は上流にあり得る。

40

【0191】

本開示を考慮して当業者に既知の任意のポリアデニル化信号を使用することができる。例えば、ポリアデニル化シグナルは、SV40ポリアデニル化シグナル、AAV2ポリアデニル化シグナル（bp4411~4466、NC_001401）、単純ヘルペスウイルスチミジンキナーゼ遺伝子由来のポリアデニル化シグナル、LTRポリアデニル化シグナル、ウシ成長ホルモン（bovine growth hormone、bGH）ポリアデニル化シグナル、ヒト成長ホルモン（human growth hormone、hGH）ポリアデニル化シグナル、又はヒト β -グロビンポリアデニル化シグナルであり得る。好ましくは、ポリアデニル

50

化シグナルは、ウシ成長ホルモン（bGH）ポリアデニル化シグナル、GenBank 受託番号 NC_001401 のヌクレオチド配列のヌクレオチド番号 4411～4466 を有する AAV2 のポリアデニル化シグナル、又は SV40 ポリアデニル化シグナルである。

【0192】

本開示を考慮して当業者に既知の任意のエンハンサー配列を使用することができる。例えば、エンハンサー配列は、ヒトアクチン、ヒトミオシン、ヒトヘモグロビン、ヒト筋肉クレアチン、又はウイルスエンハンサー（例えば、CMV、HA、RSV、若しくはEBV由来のエンハンサー）であり得る。特定のエンハンサーの例としては、ウッドチャックHBV転写後制御要素（Woodchuck HBV Post-transcriptional regulatory element、WPRE）、ヒトアポリポタンパク質A1前駆体（ApoA1）由来のイントロン／エキソン配列、ヒトT細胞白血病ウイルス1型（human T-cell leukemia virus type 1、HTLV-1）末端反復配列（long terminal repeat、LTR）の非翻訳R-U5ドメイン、スプライシングエンハンサー、合成ウサギβ-グロビンイントロン、又はそれらの任意の組み合わせが挙げられるが、これらに限定されない。

10

【0193】

好ましくは、エンハンサー配列は、AAVのP5プロモーターを含む。P5プロモーターは、rep遺伝子のコード配列内のシス作用性Rep依存性エレメント（cis-acting Rep-dependent element、CARE）の一部である。CAREは、シスで存在する場合、複製及びカプシド形成を増強することが示された。CAREはまた、いくつかのAAV粒子プロデューサー細胞株におけるように、染色体に組み込まれたrep遺伝子（AAV ITRが存在しない場合）の増幅のために重要である。理論に束縛されるものではないが、capコード配列の下流に配置されたP5プロモーターは、Cap発現、したがってAAV粒子収量を増加させるためのエンハンサーとして潜在的に作用し、染色体に組み込まれた遺伝子を増幅するためのエンハンサー活性も提供すると考えられる。

20

【0194】

天然に存在しない核酸分子又はベクター、例えば、DNAプラスミドはまた、細菌細胞（例えば、E. coli）におけるプラスミドの選択及び維持のための細菌複製起点及び抗生物質耐性発現カセットを含み得る。複製起点（origin of replication、ORI）は、複製が開始される配列であり、プラスミドが細胞内でコピー及び生存することを可能にする。本出願における使用に適したORIの例としては、ColE1、pMB1、pUC、pSC101、R6K、及び15A、好ましくはpUCが挙げられるが、これらに限定されない。

30

【0195】

細菌細胞における選択及び維持のためのベクターは、典型的には、抗生物質耐性遺伝子に操作可能に連結されたプロモーター配列を含む。好ましくは、抗生物質耐性遺伝子に操作可能に連結されたプロモーター配列は、目的のタンパク質をコードするポリヌクレオチド配列に操作可能に連結されたプロモーター配列とは異なる。抗生物質耐性遺伝子はコドン最適化することができ、抗生物質耐性遺伝子の配列組成は通常、細菌（例えば、E. coli）のコドン使用頻度に合わせて調整される。本開示を考慮して当業者に既知の任意の抗生物質耐性遺伝子が使用され得るが、カナマイシン耐性遺伝子（Kan^r）、アンピシリン耐性遺伝子（Amp^r）、及びテトラサイクリン耐性遺伝子（Tet^r）、並びにクロラムフェニコール、プレオマイシン、スペクチノマイシン、カルベニシリンなどに対する耐性を付与する遺伝子が挙げられるが、これらに限定されない。

40

【0196】

医薬組成物の特性を試験するためのアッセイ

本明細書で提供される場合、本開示の医薬組成物は、AAV粒子の凝集を防止し、かつ／又は安定性を増強することができる。AAV粒子の物理的特性（例えば、AAV粒径）、ウイルス力価、及び／又は純度を測定するための様々な技術は、当該技術分野で既知である。例示的なアッセイを以下に提供し、いくつかの例では、アッセイは、複数の特性を

50

測定することができる。しかしながら、本出願は、以下に記載されるアッセイに限定されないことを理解するべきである。

【0197】

同一性を測定するための例示的アッセイ

AAV粒子調製物の同一性を評価するための様々なアッセイは、当該技術分野で既知である。例えば、ウイルスタンパク質発現を解析するアッセイは、AAV粒子の同一性を評価するのに有用であり得る。そのようなアッセイとしては、SDS-PAGE、質量分析法、イムノブロットイング、及びELISAが挙げられるが、これらに限定されない。ウイルスタンパク質の適切な数、分子量、及び化学量論を使用して、ベクター、並びに不純物の存在を明確に同定することができる。更に、ベクターゲノムを、正の同一性を確実にするPCR又はハイスループットNGS（次世代ゲノム配列決定）を使用して評価することができる。

10

【0198】

ウイルス力価を測定するための例示的アッセイ

本開示のAAV粒子はまた、それらのウイルス力価によって特徴付けられ得る。ウイルス力価は、物理的力価、並びに機能的力価を含み得る。物理的力価は、存在する生存ウイルス粒子及び死滅ウイルス粒子の総数を計算し、1 mL当たりのウイルス粒子数（VP/mL）として、又はAAVについては1 mL当たりのゲノムコピー（GC/mL）として表される。様々な方法を、ウイルスゲノム又はウイルスタンパク質の濃度を定量化することに基づいてウイルスの物理的力価を決定するために使用することができる。好適な技術としては、DNAハイブリダイゼーション、定量的PCR（qPCR）及びデジタルドロップPCR（dPCR）を含むがこれらに限定されないリアルタイムPCR、光学密度（A₂₆₀/A₂₈₀）、NanoSight、並びに高速液体クロマトグラフィー（HPLC）が挙げられるが、これらに限定されない。

20

【0199】

例えば、光学密度（A₂₆₀/A₂₈₀）アッセイにより、ウイルスDNA及びウイルスタンパク質の濃度が測定される。これは、ウイルス粒子（viral particle、VP）の濃度を測定する物理的アッセイである。HPLCはまた、インタクトなウイルス粒子の他の細胞夾雑物又はウイルス粒子フラグメントからの分離によって、全ウイルス粒子を定量する迅速な方法である。

30

【0200】

機能的力価は、どれだけのウイルスが標的細胞に入るかを測定し、ベクターが抗生物質耐性遺伝子を含む場合、又はベクターが蛍光タンパク質を含む場合、抗生物質選択後のコロニー形成単位の数の評価、標的細胞のフローサイトメトリー又は免疫蛍光分析を含み得る。あるいは、ベクターが蛍光タンパク質を発現しない場合には、qPCRによる細胞当たりの組み込まれたプロウイルスDNAコピーの数の決定は、機能的力価を評価するための迅速かつ容易な方法を提供する。

【0201】

純度を測定する例示的なアッセイ

AAV粒子の純度を測定するアッセイは、当該技術分野で既知である。残留DNAレベルを決定する従来の方法としては、PicoGreen及びDNA閾値アッセイが挙げられる。より最近では、宿主細胞核酸を定量化することは、リアルタイム又は定量的PCR（qPCR）を使用して行われている。本明細書で提供される場合、残留宿主細胞DNAを測定する更なる例示的なアッセイは、AlphaLISAアッセイである。

40

【0202】

宿主細胞関連タンパク質の検出は、抗体が宿主タンパク質と反応するELISAによって実行され得る。タンパク質不純物はまた、透過型電子顕微鏡（transmission electron microscopy、TEM）を使用して首尾よく検出され得る。

【0203】

純度を測定するための更なる例示的な方法としては、質量分析法（Mass Spectrometry）

50

try、MS) 及びクロマトグラフィー法が挙げられる。タンパク質夾雑物を検出及び同定することができることに加えて、MS 及びクロマトグラフはまた、AAV 粒子調製物中の洗剤及び有機溶媒を同定するために使用され得る。AAV 粒子調製物の品質はまた、TEM 又は分析用超遠心分離 (AUC) を用いた直接可視化によって分析され得る。

【0204】

分析用超遠心分離 (AUC) は、質量 (沈降速度) 又は密度 (沈降平衡) のいずれかによって異なる AAV 種を識別及び定量化する強力なツールである。AUC は、粒子の分子量、均一性、並びに他の粒子及びそれ自体との相互作用に関する重要な情報を提供する、遠心力場下で粒子の沈降を経時的に監視する技術である。空のカプシドは、遠心力場下での流体力学に基づくベースライン分離を可能にする、完全な粒子及び部分的に充填された粒子とは異なる密度及び／又は質量を有する。いくつかの機器では、多波長吸光度が、単一の実験でゲノム DNA 及びウイルスカプシド含有量の両方を定量化するために使用され得る。

10

【0205】

安定性を測定するための例示的アッセイ

AAV 粒子の安定性を測定するための例示的な技術としては、動的光散乱 (DLS)、分析用超遠心分離 (AUC)、光学顕微鏡法、多角度静的光散乱 (MALS) を伴う SEC を含むサイズ排除クロマトグラフィー (SEC)、透過型電子顕微鏡法 (TEM)、及び多角度静的光散乱を伴うフラクショネーション法 (FFF-MALS) が挙げられるが、これらに限定されない。

20

【0206】

DLS は、AAV 開発の分野において十分に確立された分析技術である。その主な用途は、凝集体形成について試験することである。大きな種に対するその高い感度のために、凝集によって引き起こされる小さな不純物でさえ検出することができる。DLS を SLS と組み合わせることも可能である。DLS では、溶液中の粒子の流体力学的サイズ及びサイズ分布を得ることができる。時間及び温度の関数としてこの測定値を調べることは興味深いことであり得る。例えば、低温ではタンパク質は安定であり得、反復可能なサイズ (及び散乱強度) 測定値を示し得るが、典型的にはある高温 (Tagg) では、タンパク質分子はオリゴマー化又は凝集する傾向を示す。これが起こる温度は、タンパク質それ自体に加えて緩衝液組成に依存する。したがって、DLS、又は DLS 及び SLS の組み合わせは、機器ユーザが、融解温度 (Tm)、凝集温度 (Tagg) 及び開始温度 (Tonset) をスクリーニングすることを可能にし、これらの分子は温度は、ともに凝集する傾向を有する。この情報は、コロイド安定性及び立体構造安定性の温度依存性の両方を理解するのに役立ち得る。

30

【0207】

本明細書で提供されるように、いくつかの実施形態では、医薬組成物は、精製された AAV 粒子の安定性を維持又は増強する。いくつかの実施形態では、医薬組成物は、精製された AAV 粒子の凝集を低減又は防止する。いくつかの実施形態では、医薬組成物は、(a) 精製された AAV 粒子の安定性を維持又は増強し、かつ (b) 精製された AAV 粒子の凝集を低減又は防止する。

40

【0208】

ある特定の実施形態では、1 回以上の遊離／解凍サイクル後に、安定性が維持若しくは増強され、かつ／又は凝集が減少若しくは防止される。いくつかの実施形態では、安定性は、1 回又は 2 回以上の凍結／解凍サイクル後に維持又は増強される。いくつかの実施形態では、安定性は、3 回又は 4 回以上の凍結／解凍サイクル後に維持又は増強される。

【0209】

いくつかの実施形態では、AAV 粒子の凝集は、1 回又は 2 回以上の凍結／解凍サイクル後に 5 % 未満である。いくつかの実施形態では、AAV 粒子の凝集は、1 回又は 2 回以上の凍結／解凍サイクル後に 2 % 未満である。いくつかの実施形態では、AAV 粒子の凝集は、1 回又は 2 回以上の凍結／解凍サイクル後に 1 % 未満である。

50

【0210】

いくつかの実施形態では、AAV粒子の凝集は、3回又は4回以上の凍結／解凍サイクル後に5%未満である。いくつかの実施形態では、AAV粒子の凝集は、3回又は4回以上の凍結／解凍サイクル後に2%未満である。いくつかの実施形態では、AAV粒子の凝集は、3回又は4回以上の凍結／解凍サイクル後に1%未満である。

【0211】

上記のアッセイのいずれかを使用して、凝集及び／又は安定性を測定することができる。例えば、いくつかの実施形態では、凝集及び／又は安定性は、DLSによって決定される。いくつかの実施形態では、凝集及び／又は安定性は、AUCによって決定される。

【0212】

実施形態

本発明は、以下の非限定的な実施形態を提供する。

【0213】

1組の実施形態では、以下が提供される。

A1．精製されたアデノ随伴ウイルス（AAV）粒子、緩衝剤、抗凍結剤、及び非イオン性界面活性剤を含む医薬組成物であって、

（a）精製されたAAV粒子が、不純物を実質的に含まず、

（b）緩衝剤の濃度が、約0 mM～約50 mMであり、

（c）抗凍結剤が、約1%～約10%（w/v）であり、

（d）非イオン性界面活性剤が、約0.0001%（w/v）～約0.1%（w/v）である、医薬組成物。

A2．薬学的に許容される塩を更に含み、薬学的に許容される塩の濃度が、約1 mM～約200 mMである、実施形態A1に記載の医薬組成物。

A3．薬学的に許容される塩が、約10 mM～約150 mMである、実施形態A2に記載の医薬組成物。

A4．薬学的に許容される塩の濃度が、約10 mMである、実施形態A2又はA3に記載の医薬組成物。

A5．薬学的に許容される塩の濃度が、約100 mMである、実施形態A2又はA3に記載の医薬組成物。

A6．薬学的に許容される塩の濃度が、約150 mMである、実施形態A2又はA3に記載の医薬組成物。

A7．精製されたアデノ随伴ウイルス（AAV）粒子、薬学的に許容される塩、緩衝剤、凍結保護剤、及び非イオン性界面活性剤を含む医薬組成物であって、

（a）精製されたAAV粒子が、不純物を実質的に含まず、

（b）薬学的に許容される塩の濃度が、約1 mM～約49 mMであり、

（c）緩衝剤の濃度が、約0 mM～約50 mMであり、

（d）抗凍結剤が、約1%～約10%（w/v）であり、

（e）非イオン性界面活性剤が、約0.0001%（w/v）～約0.1%（w/v）である、医薬組成物。

A8．薬学的に許容される塩の濃度が、約5 mM～約45 mMである、実施形態A7に記載の医薬組成物。

A9．薬学的に許容される塩の濃度が、約7.5 mM～約40 mMである、実施形態A7又はA8に記載の医薬組成物。

A10．薬学的に許容される塩の濃度が、約10 mM～約30 mMである、実施形態A7～A9のいずれか1つに記載の医薬組成物。

A11．薬学的に許容される塩の濃度が、約10 mMである、実施形態A7～A10のいずれか1つに記載の医薬組成物。

A12．薬学的に許容される塩類が、ナトリウム塩、マグネシウム塩、カルシウム塩、カリウム塩、リン酸塩、及び硫酸塩からなる群から選択される、実施形態A2～A11のいずれか1つに記載の医薬組成物。

10

20

30

40

50

A 1 3 . ナトリウム塩が、塩化ナトリウムを含む、実施形態 A 1 2 に記載の医薬組成物。

A 1 4 . 緩衝剤が、トリス H C l を含む、実施形態 A 1 ~ A 1 3 のいずれか 1 つに記載の医薬組成物。

A 1 5 . 緩衝剤が、L - ヒスチジン H C l を含む、実施形態 A 1 ~ A 1 3 のいずれか 1 つに記載の医薬組成物。

A 1 6 . 緩衝剤の濃度が、約 2 0 m M を含む、実施形態 A 1 ~ A 1 5 のいずれか 1 つに記載の医薬組成物。

A 1 7 . 抗凍結剤が、約 3 % (w / v) ~ 約 8 % (w / v) である、実施形態 A 1 ~ A 1 6 のいずれか 1 つに記載の医薬組成物。

A 1 8 . 抗凍結剤が、約 4 % (w / v) ~ 約 6 % (w / v) である、実施形態 A 1 ~ A 1 7 のいずれか 1 つに記載の医薬組成物。

A 1 9 . 抗凍結剤が、約 5 % (w / v) である、実施形態 A 1 ~ A 1 8 のいずれか 1 つに記載の医薬組成物。

A 2 0 . 抗凍結剤が、糖を含む、実施形態 A 1 から A 1 9 のいずれか 1 つに記載の医薬組成物。

A 2 1 . 糖が、スクロース、トレハロース、又はそれらの組み合わせを含む、実施形態 A 2 0 に記載の医薬組成物。

A 2 2 . 糖が、トレハロースを含む、実施形態 A 2 0 に記載の医薬組成物。

A 2 3 . 非イオン性界面活性剤が、約 0 . 0 0 0 5 % (w / v) ~ 約 0 . 0 0 5 % (w / v) である、実施形態 A 1 ~ A 2 2 のいずれか 1 つに記載の医薬組成物。

A 2 4 . 非イオン性界面活性剤が、約 0 . 0 0 0 7 5 % (w / v) ~ 約 0 . 0 0 2 5 % (w / v) である、実施形態 A 1 ~ A 2 3 のいずれか 1 つに記載の医薬組成物。

A 2 5 . 非イオン性界面活性剤が、約 0 . 0 0 1 % (w / v) である、実施形態 A 1 ~ A 2 4 のいずれか 1 つに記載の医薬組成物。

A 2 6 . 非イオン性界面活性剤が、コポリマー、ポリオキシエチレンソルビタンエステル、リン脂質、B r i j 界面活性剤、及びソルビタンエステル、又はそれらの組み合わせからなる群から選択される、実施形態 A 1 ~ A 2 5 のいずれか 1 つに記載の医薬組成物。

A 2 7 . ポリオキシエチレンソルビタンエステルが、(P S - 2 0)、及びポリソルベート 8 0 (P S - 8 0)、又はそれらの組み合わせからなる群から選択される、実施形態 A 2 6 に記載の医薬組成物。

A 2 8 . コポリマーが、ポロキサマーを含む、実施形態 A 2 6 に記載の医薬組成物。

A 2 9 . ポロキサマーが、ポロキサマー 1 8 8 (P 1 8 8)、ポロキサマー 2 3 7 (P 2 3 7)、ポロキサマー 3 3 8 (P 3 3 8)、及びポロキサマー 4 0 7 (P 4 0 7)、又はそれらの組み合わせからなる群から選択される、実施形態 A 2 8 に記載の医薬組成物。

A 3 0 . ポロキサマーが、ポロキサマー 1 8 8 (P 1 8 8) を含む、実施形態 A 2 8 に記載の医薬組成物。

A 3 1 . 精製されたアデノ随伴ウイルス (A A V) 粒子、緩衝剤、抗凍結剤、及び非イオン性界面活性剤を含む医薬組成物であって、

(a) 精製された A A V 粒子が、不純物を実質的に含まず、

(b) 緩衝剤の濃度が、約 2 0 m M であり、

(c) 抗凍結剤が、約 5 % (w / v) のトレハロースであり、

(d) 非イオン性界面活性剤が、約 0 . 0 0 1 % (w / v) のポロキサマー 1 8 8 である、医薬組成物。

A 3 2 . 精製されたアデノ随伴ウイルス (A A V) 粒子、薬学的に許容される塩、緩衝剤、抗凍結剤、及び非イオン性界面活性剤を含む医薬組成物であって、

(a) 精製された A A V 粒子が、不純物を実質的に含まず、

(b) 薬学的に許容される塩の濃度が、約 1 0 m M の塩化ナトリウムであり、

(c) 緩衝剤の濃度が、約 2 0 m M であり、

(d) 抗凍結剤が、約 5 % (w / v) のトレハロースであり、

10

20

30

40

50

(e) 非イオン性界面活性剤が、約 0.001% (w/v) のポリキサマー 188 である、医薬組成物。

A 3 3 . 精製されたアデノ随伴ウイルス (AAV) 粒子、薬学的に許容される塩、緩衝剤、抗凍結剤、及び非イオン性界面活性剤を含む医薬組成物であって、

(a) 精製された AAV 粒子が、不純物を実質的に含まず、

(b) 薬学的に許容される塩の濃度が、約 25 mM の塩化ナトリウムであり、

(c) 緩衝剤の濃度が、約 20 mM であり、

(d) 抗凍結剤が、約 5% (w/v) のトレハロースであり、

(e) 非イオン性界面活性剤が、約 0.001% (w/v) のポリキサマー 188 である、医薬組成物。

10

A 3 4 . 精製されたアデノ随伴ウイルス (AAV) 粒子、薬学的に許容される塩、緩衝剤、抗凍結剤、及び非イオン性界面活性剤を含む医薬組成物であって、

(a) 精製された AAV 粒子が、不純物を実質的に含まず、

(b) 薬学的に許容される塩の濃度が、約 50 mM の塩化ナトリウムであり、

(c) 緩衝剤の濃度が、約 20 mM であり、

(d) 抗凍結剤が、約 5% (w/v) のトレハロースであり、

(e) 非イオン性界面活性剤が、約 0.001% (w/v) のポリキサマー 188 である、医薬組成物。

A 3 5 . 精製されたアデノ随伴ウイルス (AAV) 粒子、薬学的に許容される塩、緩衝剤、抗凍結剤、及び非イオン性界面活性剤を含む医薬組成物であって、

20

(a) 精製された AAV 粒子が、不純物を実質的に含まず、

(b) 薬学的に許容される塩の濃度が、約 100 mM の塩化ナトリウムであり、

(c) 緩衝剤の濃度が、約 20 mM であり、

(d) 抗凍結剤が、約 5% (w/v) のトレハロースであり、

(e) 非イオン性界面活性剤が、約 0.001% (w/v) のポリキサマー 188 である、医薬組成物。

A 3 6 . 精製されたアデノ随伴ウイルス (AAV) 粒子、薬学的に許容される塩、緩衝剤、抗凍結剤、及び非イオン性界面活性剤を含む医薬組成物であって、

(a) 精製された AAV 粒子が、不純物を実質的に含まず、

(b) 薬学的に許容される塩の濃度が、約 125 mM の塩化ナトリウムであり、

(c) 緩衝剤の濃度が、約 20 mM であり、

(d) 抗凍結剤が、約 5% (w/v) のトレハロースであり、

(e) 非イオン性界面活性剤が、約 0.001% (w/v) のポリキサマー 188 である、医薬組成物。

30

A 3 7 . 精製されたアデノ随伴ウイルス (AAV) 粒子、薬学的に許容される塩、緩衝剤、抗凍結剤、及び非イオン性界面活性剤を含む医薬組成物であって、

(a) 精製された AAV 粒子が、不純物を実質的に含まず、

(b) 薬学的に許容される塩の濃度が、約 150 mM の塩化ナトリウムであり、

(c) 緩衝剤の濃度が、約 20 mM であり、

(d) 抗凍結剤が、約 5% (w/v) のトレハロースであり、

(e) 非イオン性界面活性剤が、約 0.001% (w/v) のポリキサマー 188 である、医薬組成物。

40

A 3 8 . 精製されたアデノ随伴ウイルス (AAV) 粒子、薬学的に許容される塩、緩衝剤、抗凍結剤、及び非イオン性界面活性剤を含む医薬組成物であって、

(a) 精製された AAV 粒子が、不純物を実質的に含まず、

(b) 薬学的に許容される塩の濃度が、約 200 mM の塩化ナトリウムであり、

(c) 緩衝剤の濃度が、約 20 mM であり、

(d) 抗凍結剤が、約 5% (w/v) のトレハロースであり、

(e) 非イオン性界面活性剤が、約 0.001% (w/v) のポリキサマー 188 である、医薬組成物。

50

A 3 9 . 緩衝剤が、トリス H C l を含む、実施形態 A 3 1 ~ A 3 8 のいずれか 1 つに記載の医薬組成物。

A 4 0 . 緩衝剤が、L - ヒスチジン H C l を含む、実施形態 A 3 1 ~ A 3 8 のいずれか 1 つに記載の医薬組成物。

A 4 1 . 医薬組成物の p H が、約 4 . 0 ~ 約 9 . 0 である、実施形態 A 1 ~ A 4 0 のいずれか 1 つに記載の医薬組成物。

A 4 2 . 医薬組成物の p H が、約 7 . 0 ~ 約 8 . 0 である、実施形態 A 1 ~ A 4 1 のいずれか 1 つに記載の医薬組成物。

A 4 3 . 医薬組成物の p H が、約 7 . 3 ~ 約 7 . 7 である、実施形態 A 1 ~ A 4 2 のいずれか 1 つに記載の医薬組成物。

A 4 4 . 医薬組成物の p H が、約 7 . 5 である、実施形態 A 1 ~ A 4 3 のいずれか 1 つに記載の医薬組成物。

A 4 5 . A A V が、A A V 1、A A V 2、A A V 3、A A V 4、A A V 5、A A V 6、A A V 7、A A V 8、A A V 9、及び A A V 1 0 からなる群から選択される、実施形態 A 1 ~ A 4 4 のいずれか 1 つに記載の医薬組成物。

A 4 6 . A A V が、組換え A A V (r A A V) を含む、実施形態 A 1 ~ A 4 5 のいずれか 1 つに記載の医薬組成物。

A 4 7 . 精製された A A V ウイルス粒子の力価が、1 ミリリットル当たり約 1×10^{10} ウイルスゲノム (v g / m L) 以上である、実施形態 A 1 ~ A 4 6 のいずれか 1 つに記載の医薬組成物。

A 4 8 . 精製された A A V ウイルス粒子の力価が、1 ミリリットル当たり約 1×10^{11} ウイルスゲノム (v g / m L) 以上である、実施形態 A 1 ~ A 4 6 のいずれか 1 つに記載の医薬組成物。

A 4 9 . 精製された A A V ウイルス粒子の力価が、1 ミリリットル当たり約 1×10^{12} ウイルスゲノム (v g / m L) 以上である、実施形態 A 1 ~ A 4 6 のいずれか 1 つに記載の医薬組成物。

A 5 0 . 精製された A A V ウイルス粒子の力価が、1 ミリリットル当たり約 1×10^{13} ウイルスゲノム (v g / m L) 以上である、実施形態 A 1 ~ A 4 6 のいずれか 1 つに記載の医薬組成物。

A 5 1 . 精製された A A V ウイルス粒子の力価が、1 ミリリットル当たり約 1×10^{14} ウイルスゲノム (v g / m L) 以上である、実施形態 A 1 ~ A 4 6 のいずれか 1 つに記載の医薬組成物。

A 5 2 . 精製された A A V ウイルス粒子の力価が、1 ミリリットル当たり約 1×10^{15} ウイルスゲノム (v g / m L) 以上である、実施形態 A 1 ~ A 4 6 のいずれか 1 つに記載の医薬組成物。

A 5 3 . 不純物が、プロセス関連不純物、産生物関連不純物、又はそれらの組み合わせを含む、実施形態 A 1 ~ A 5 2 のいずれか 1 つに記載の医薬組成物。

A 5 4 . プロセス関連不純物が、残留宿主細胞成分、残留ウイルス産生成分、残留細胞培養成分、残留精製成分、又はそれらの組み合わせからなる群から選択される、実施形態 A 5 3 に記載の医薬組成物。

A 5 5 . 残留宿主細胞成分が、宿主細胞タンパク質、宿主細胞 D N A、宿主細胞 R N A、又はそれらの組み合わせを含む、実施形態 A 5 4 に記載の医薬組成物。

A 5 6 . 宿主細胞 D N A が、ウイルス外クロマチン結合 D N A を含む、実施形態 A 5 5 に記載の医薬組成物。

A 5 7 . 残留ウイルス産生成分が、プラスミド D N A、ヘルパーウイルス、又はそれらの組み合わせを含む、実施形態 A 5 6 に記載の医薬組成物。

A 5 8 . 残留細胞培養成分が、抗生物質、サプリメント、インデューサー、成長因子、又はそれらの組み合わせを含む、実施形態 A 5 4 に記載の医薬組成物。

A 5 9 . 残留精製成分が、緩衝液、無機塩、酵素、洗剤、培地、又はそれらの組み合わせを含む、実施形態 A 5 4 に記載の医薬組成物。

10

20

30

40

50

A 6 0 . 産生物関連不純物が、空のカプシド、凝集 A A V 微粒子、分解 A A V 微粒子、又はそれらの組み合わせを含む、実施形態 A 5 3 に記載の医薬組成物。

A 6 1 . 精製された A A V 粒子が、完全な又は部分的に完全なカプシドを含み、産生物関連不純物は、空のカプシドを含む、実施形態 A 6 0 に記載の医薬組成物。

A 6 2 . 精製された A A V 粒子が、完全なカプシドを含み、産生物関連不純物が、空のカプシドを含む、実施形態 A 6 0 に記載の医薬組成物。

A 6 3 . 精製された A A V 粒子が、完全なカプシドから本質的になり、産生物関連不純物が、空のカプシドを含む、実施形態 A 6 0 に記載の医薬組成物。

A 6 4 . 産生物関連不純物が、凝集 A A V 微粒子、分解 A A V 微粒子、又はそれらの組み合わせを含む、実施形態 A 5 3 に記載の医薬組成物。

A 6 5 . 精製された A A V ウイルス粒子が、空のカプシドを含む、実施形態 A 6 4 に記載の医薬組成物。

A 6 6 . 精製された A A V ウイルス粒子が、空のカプシドから本質的になる、実施形態 A 6 4 に記載の医薬組成物。

A 6 7 . 産生物関連不純物が、凝集 A A V 微粒子又はその組み合わせを含む、実施形態 A 5 3 に記載の医薬組成物。

A 6 8 . 医薬組成物が、液体状態にある、実施形態 A 1 ~ A 6 7 のいずれか 1 つに記載の医薬組成物。

A 6 9 . 医薬組成物が、固体状態又は半固体形態にある、実施形態 A 1 ~ A 6 7 のいずれか 1 つに記載の医薬組成物。

A 7 0 . 医薬組成物が、精製された A A V ウイルス粒子の安定性を維持増強する、実施形態 A 1 ~ A 6 9 のいずれか 1 つに記載の医薬組成物。

A 7 1 . 医薬組成物が、精製された A A V ウイルス粒子の凝集を低減又は防止する、実施形態 A 1 ~ A 6 9 のいずれか 1 つに記載の医薬組成物。

A 7 2 . 医薬組成物が、

(a) 精製された A A V 粒子の安定性を維持又は増強し、

(b) 精製された A A V 粒子の凝集を低減又は防止する、実施形態 A 1 ~ A 6 9 のいずれか 1 つに記載の医薬組成物。

A 7 3 . 精製された A A V ウイルス粒子の安定度が、1 回又は 2 回以上の凍結／解凍サイクル後に維持又は増強される、実施形態 A 7 0 又は A 7 2 に記載の医薬組成物。

A 7 4 . 精製された A A V ウイルス粒子の安定度が、3 回又は 4 回以上の凍結／解凍サイクル後に維持又は増強される、実施形態 A 7 0 又は A 7 2 に記載の医薬組成物。

A 7 5 . A A V 粒子の凝集が、1 回又は 2 回以上の凍結／解凍サイクル後に 5 % 未満である、実施形態 A 7 1 又は A 7 2 に記載の医薬組成物。

A 7 6 . A A V 粒子の凝集が、1 回又は 2 回以上の凍結／解凍サイクル後に 2 % 未満である、実施形態 A 7 1 又は A 7 2 に記載の医薬組成物。

A 7 7 . A A V 粒子の凝集が、1 回又は 2 回以上の凍結／解凍サイクル後に 1 % 未満である、実施形態 A 7 1 又は A 7 2 に記載の医薬組成物。

A 7 8 . A A V 粒子の凝集が、3 回又は 4 回以上の凍結／解凍サイクル後に 5 % 未満である、実施形態 A 7 1 又は A 7 2 に記載の医薬組成物。

A 7 9 . A A V 粒子の凝集が、3 回又は 4 回以上の凍結／解凍サイクル後に 2 % 未満である、実施形態 A 7 1 又は A 7 2 に記載の医薬組成物。

A 8 0 . A A V 粒子の凝集が、3 回又は 4 回以上の凍結／解凍サイクル後に 1 % 未満である、実施形態 A 7 1 又は A 7 2 に記載の医薬組成物。

A 8 1 . A A V 微粒子の安定及び／又は凝集が、動的光散乱 (D L S) 、分析用超遠心分離 (A U C) 、光学顕微鏡法、サイズ排除クロマトグラフィー (S E C) 、透過型電子顕微鏡法、及び多角度静的光散乱を用いたフィールドフローフラクシオネーション (F F F - M A L S) からなる群から選択されるアッセイによって測定される、実施形態 A 7 3 ~ A 8 0 のいずれか 1 つに記載の医薬組成物。

A 8 2 . 精製された A A V 粒子が、

10

20

30

40

50

(a) A A V 粒子を含む上清を、ヌクレアーゼを含む組成物と接触させることと、

(b) 粒子を精製することと、を含む、方法によって取得される、実施形態 A 1 ~ A 8 1 のいずれか 1 つに記載の医薬組成物。

A 8 3 . ヌクレアーゼが、Benzonase、又は Benzonase (登録商標) 及びクロマチン-DNA ヌクレアーゼを含む、実施形態 A 8 2 に記載の医薬組成物。

A 8 4 . クロマチン-DNA ヌクレアーゼが、MNase を含む、実施形態 A 8 3 に記載の医薬組成物。

A 8 5 . 精製された A A V 粒子を含む医薬組成物を作製するための方法であって、方法が、

(a) A A V 粒子を含む上清を、ヌクレアーゼを含む組成物と接触させることと、

(b) A A V 粒子が不純物を実質的に含まないように、A A V 粒子を精製することと、

(c) 精製された A A V 粒子を、緩衝剤、抗凍結剤、及び非イオン性界面活性剤と組み合わせることであって、

i . 緩衝剤の濃度が、約 0 mM ~ 約 5 0 mM であり、

i i . 抗凍結剤が、約 1 % ~ 約 1 0 % (w / v) であり、

i i i . 非イオン性界面活性剤が、約 0 . 0 0 0 1 % (w / v) ~ 約 0 . 1 % (w / v) である、組み合わせることと、を含む、方法。

A 8 6 . ステップ (c) が、薬学的に許容される塩を更に含み、薬学的に許容される塩の濃度が、約 1 mM ~ 約 2 0 0 mM である、実施形態 A 8 5 に記載の方法。

A 8 7 . 薬学的に許容される塩が、約 1 0 mM ~ 約 1 5 0 mM である、実施形態 A 8 6 に記載の方法。

A 8 8 . 薬学的に許容される塩が、約 1 mM ~ 約 4 9 mM である、実施形態 A 8 6 に記載の方法。

A 8 9 . 薬学的に許容される塩が、約 5 mM ~ 約 4 5 mM である、実施形態 A 8 6 に記載の方法。

A 9 0 . 薬学的に許容される塩が、約 7 . 5 mM ~ 約 4 0 mM である、実施形態 A 8 6 に記載の方法。

A 9 1 . 薬学的に許容される塩が、約 1 0 mM ~ 約 3 0 mM である、実施形態 A 8 6 に記載の方法。

A 9 2 . 薬学的に許容される塩の濃度が、約 1 0 mM である、実施形態 A 8 6 に記載の方法。

A 9 3 . 薬学的に許容される塩の濃度が、約 1 0 0 mM である、実施形態 A 8 6 に記載の方法。

A 9 4 . 薬学的に許容される塩の濃度が、約 1 5 0 mM である、実施形態 A 8 6 に記載の方法。

A 9 5 . 薬学的に許容される塩が、ナトリウム塩、マグネシウム塩、カルシウム塩、カリウム塩、リン酸塩、及び硫酸塩からなる群から選択される、実施形態 A 8 6 ~ A 9 4 のいずれか 1 つに記載の方法。

A 9 6 . ナトリウム塩が、塩化ナトリウムを含む、実施形態 A 9 5 に記載の方法。

A 9 7 . 緩衝剤が、トリス HCl を含む、実施形態 A 8 5 ~ A 9 6 のいずれか 1 つに記載の方法。

A 9 8 . 緩衝剤が、L-ヒスチジン HCl を含む、実施形態 A 8 5 ~ A 9 6 のいずれか 1 つに記載の方法。

A 9 9 . 緩衝剤の濃度が、約 2 0 mM を含む、実施形態 A 8 5 ~ A 9 8 のいずれか 1 つに記載の方法。

A 1 0 0 . 抗凍結剤が、約 3 % (w / v) ~ 約 8 % (w / v) である、実施形態 A 8 5 ~ A 9 9 のいずれか 1 つに記載の方法。

A 1 0 1 . 抗凍結剤が、約 4 % (w / v) ~ 約 6 % (w / v) である、実施形態 A 8 5 ~ A 1 0 0 のいずれか 1 つに記載の方法。

A 1 0 2 . 抗凍結剤が、約 5 % (w / v) である、実施形態 A 8 5 ~ A 1 0 1 のいずれ

10

20

30

40

50

か 1 つに記載の方法。

A 1 0 3 . 抗凍結剤が、糖を含む、実施形態 8 5 ~ 1 0 2 のいずれか 1 つに記載の方法。

A 1 0 4 . 糖が、スクロース、トレハロース、又はそれらの組み合わせを含む、実施形態 A 1 0 3 に記載の方法。

A 1 0 5 . 糖が、トレハロースを含む、実施形態 A 1 0 3 に記載の方法。

A 1 0 6 . 非イオン性界面活性剤が、約 0 . 0 0 0 5 % (w / v) ~ 約 0 . 0 0 5 % (w / v) である、実施形態 A 8 5 ~ A 1 0 5 のいずれか 1 つに記載の方法。

A 1 0 7 . 非イオン性界面活性剤が、約 0 . 0 0 0 7 5 % (w / v) ~ 約 0 . 0 0 2 5 % (w / v) である、実施形態 A 8 5 ~ A 1 0 6 のいずれか 1 つに記載の方法。

A 1 0 8 . 非イオン性界面活性剤が、約 0 . 0 0 1 % (w / v) である、実施形態 A 8 5 ~ A 1 0 7 のいずれか 1 つに記載の方法。

A 1 0 9 . 非イオン性界面活性剤が、コポリマー、ポリオキシエチレンソルビタンエステル、リン脂質、B r i j 界面活性剤、及びソルビタンエステル、又はそれらの組み合わせからなる群から選択される、実施形態 A 8 5 ~ A 1 0 8 のいずれか 1 つに記載の方法。

A 1 1 0 . ポリオキシエチレンソルビタンエステルが、(P S - 2 0)、及びポリソルベート 8 0 (P S - 8 0)、又はそれらの組み合わせからなる群から選択される、実施形態 A 1 0 9 に記載の方法。

A 1 1 1 . コポリマーが、ポロキサマーを含む、実施形態 A 1 0 9 に記載の方法。

A 1 1 2 . ポロキサマーが、ポロキサマー 1 8 8 (P 1 8 8)、ポロキサマー 2 3 7 (P 2 3 7)、ポロキサマー 3 3 8 (P 3 3 8)、及びポロキサマー 4 0 7 (P 4 0 7)、又はそれらの組み合わせからなる群から選択される、実施形態 A 1 1 1 に記載の方法。

A 1 1 3 . ポロキサマーが、ポロキサマー 1 8 8 (P 1 8 8) を含む、実施形態 A 1 1 1 に記載の方法。

A 1 1 4 . 医薬組成物の p H が、約 4 . 0 ~ 約 9 . 0 である、実施形態 A 8 5 ~ A 1 1 3 のいずれか 1 つに記載の方法。

A 1 1 5 . 医薬組成物の p H が、約 7 . 0 ~ 約 8 . 0 である、実施形態 A 8 5 ~ A 1 1 4 のいずれか 1 つに記載の方法。

A 1 1 6 . 医薬組成物の p H が、約 7 . 3 ~ 約 7 . 7 である、実施形態 A 8 5 ~ A 1 1 5 のいずれか 1 つに記載の方法。

A 1 1 7 . 医薬組成物の p H が、約 7 . 5 である、実施形態 A 8 5 ~ A 1 1 6 のいずれか 1 つに記載の方法。

A 1 1 8 . A A V が、A A V 1、A A V 2、A A V 3、A A V 4、A A V 5、A A V 6、A A V 7、A A V 8、A A V 9、及び A A V 1 0 からなる群から選択される、実施形態 A 8 5 ~ A 1 1 7 のいずれか 1 つに記載の方法。

A 1 1 9 . A A V が、組換え A A V (r A A V) を含む、実施形態 A 8 5 ~ A 1 1 8 のいずれか 1 つに記載の方法。

A 1 2 0 . ヌクレアーゼが、B e n z o n a s e、又は B e n z o n a s e (登録商標) 及びクロマチン-DNA ヌクレアーゼを含む、実施形態 A 8 5 ~ A 1 1 9 のいずれか 1 つに記載の方法。

A 1 2 1 . クロマチン-DNA ヌクレアーゼが、M N a s e を含む、実施形態 A 1 2 0 に記載の方法。

A 1 2 2 . 精製された A A V ウイルス粒子の力価が、1 ミリリットル当たり約 1×10^{10} ウイルスゲノム (v g / m L) 以上である、実施形態 A 8 5 ~ A 1 2 1 のいずれか 1 つに記載の方法。

A 1 2 3 . 精製された A A V ウイルス粒子の力価が、1 ミリリットル当たり約 1×10^{11} ウイルスゲノム (v g / m L) 以上である、実施形態 A 8 5 ~ A 1 2 1 のいずれか 1 つに記載の方法。

A 1 2 4 . 精製された A A V ウイルス粒子の力価が、1 ミリリットル当たり約 1×10^{12} ウイルスゲノム (v g / m L) 以上である、実施形態 A 8 5 ~ A 1 2 1 のいずれか 1

10

20

30

40

50

つに記載の方法。

A 1 2 5 . 精製された A A V ウイルス粒子の力価が、1 ミリリットル当たり約 1×10^{13} ウイルスゲノム (v g / m L) 以上である、実施形態 A 8 5 ~ A 1 2 1 のいずれか 1 つに記載の方法。

A 1 2 6 . 精製された A A V ウイルス粒子の力価が、1 ミリリットル当たり約 1×10^{14} ウイルスゲノム (v g / m L) 以上である、実施形態 A 8 5 ~ A 1 2 1 のいずれか 1 つに記載の方法。

A 1 2 7 . 精製された A A V ウイルス粒子の力価が、1 ミリリットル当たり約 1×10^{15} ウイルスゲノム (v g / m L) 以上である、実施形態 A 8 5 ~ A 1 2 1 のいずれか 1 つに記載の方法。

A 1 2 8 . 不純物が、プロセス関連不純物、産生物関連不純物、又はそれらの組み合わせを含む、実施形態 A 8 5 ~ A 1 2 7 のいずれか 1 つに記載の方法。

A 1 2 9 . プロセス関連不純物が、残留宿主細胞成分、残留ウイルス産生成分、残留細胞培養成分、残留精製成分、又はそれらの組み合わせからなる群から選択される、実施形態 A 1 2 8 に記載の方法。

A 1 3 0 . 残留宿主細胞成分が、宿主細胞タンパク質、宿主細胞 D N A、宿主細胞 R N A、又はそれらの組み合わせを含む、実施形態 A 1 2 9 に記載の方法。

A 1 3 1 . 宿主細胞 D N A が、ウイルス外クロマチン結合 D N A を含む、実施形態 A 1 3 0 に記載の方法。

A 1 3 2 . 残留ウイルス産生成分が、プラスミド D N A、ヘルパーウイルス、又はそれらの組み合わせを含む、実施形態 A 1 2 9 に記載の方法。

A 1 3 3 . 残留細胞培養成分が、抗生物質、サプリメント、インデューサー、増殖因子、又はそれらの組み合わせを含む、実施形態 A 1 2 9 に記載の方法。

A 1 3 4 . 残留精製成分が、緩衝液、無機塩、酵素、洗剤、培地、又はそれらの組み合わせを含む、実施形態 A 1 2 9 に記載の方法。

A 1 3 5 . 産生物関連不純物が、空のカプシド、凝集 A A V 微粒子、分解 A A V 微粒子、又はそれらの組み合わせを含む、実施形態 A 1 2 8 に記載の方法。

A 1 3 6 . 精製された A A V ウイルス粒子が、完全な又は部分的に完全なカプシドを含み、産生物関連不純物が、空のカプシドを含む、実施形態 A 1 3 5 に記載の方法。

A 1 3 7 . 精製された A A V ウイルス粒子が、完全なカプシドを含み、産生物関連不純物が、空のカプシドを含む、実施形態 A 1 3 5 に記載の方法。

A 1 3 8 . 精製された A A V ウイルス粒子が、完全なカプシドから本質的になり、産生物関連不純物が、空のカプシドを含む、実施形態 A 1 3 5 に記載の方法。

A 1 3 9 . 産生物関連不純物が、凝集 A A V 微粒子、分解 A A V 微粒子、又はそれらの組み合わせを含む、実施形態 A 1 2 8 に記載の方法。

A 1 4 0 . 精製された A A V ウイルス粒子が、空のカプシドを含む、実施形態 A 1 3 9 に記載の方法。

A 1 4 1 . 精製された A A V ウイルス粒子が、空のカプシドから本質的になる、実施形態 A 1 3 9 に記載の方法。

A 1 4 2 . 産生物関連不純物が、凝集 A A V 微粒子を含む、実施形態 A 1 2 8 に記載の方法。

【 0 2 1 4 】

第 2 のセットの実施形態では、以下が提供される。

B 1 . 精製された A A V 粒子の安定性を維持又は増強するための手段を含む、医薬組成物。

B 2 . 精製された A A V ウイルス粒子の安定性が、1 回又は 2 回以上の凍結／解凍サイクル後に維持又は増強される、実施形態 B 1 に記載の医薬組成物。

B 3 . 精製された A A V 粒子の安定性が、3 回又は 4 回以上の凍結／解凍サイクル後に維持又は増強される、実施形態 B 1 に記載の医薬組成物。

B 4 . A A V 粒子の安定性が、動的光散乱 (D L S)、分析用超遠心分離 (A U C)、

10

20

30

40

50

光学顕微鏡法、サイズ排除クロマトグラフィー（SEC）、透過型電子顕微鏡法、及び多角度静的光散乱を用いたフィールドフローフラクショネーション（FFF-MALS）からなる群から選択されるアッセイによって測定される、実施形態 B 1～B 3 のいずれか 1 つに記載の医薬組成物。

B 5 . 精製された A A V 粒子の凝集を減少又は防止するための手段を含む、医薬組成物。

B 6 . A A V 粒子の凝集が、1 回又は 2 回以上の凍結／解凍サイクル後に 5 % 未満である、実施形態 B 5 に記載の医薬組成物。

B 7 . A A V 粒子の凝集が、1 回又は 2 回以上の凍結／解凍サイクル後に 2 % 未満である、実施形態 B 5 に記載の医薬組成物。

B 8 . A A V 粒子の凝集が、1 回又は 2 回以上の凍結／解凍サイクル後に 1 % 未満である、実施形態 B 5 に記載の医薬組成物。

B 9 . A A V 粒子の凝集が、3 回又は 4 回以上の凍結／解凍サイクル後に 5 % 未満である、実施形態 B 5 に記載の医薬組成物。

B 10 . A A V 粒子の凝集が、3 回又は 4 回以上の凍結／解凍サイクル後に 2 % 未満である、実施形態 B 5 に記載の医薬組成物。

B 11 . A A V 粒子の凝集が、3 回又は 4 回以上の凍結／解凍サイクル後に 1 % 未満である、実施形態 B 5 に記載の医薬組成物。

B 12 . A A V 粒子が、動的光散乱（DLS）、分析用超遠心分離（AUC）、光学顕微鏡法、サイズ排除クロマトグラフィー（SEC）、透過型電子顕微鏡法、及び多角度静的光散乱を用いたフィールドフローフラクショネーション（FFF-MALS）からなる群から選択されるアッセイによって測定される、実施形態 B 5～B 11 のいずれか 1 つに記載の医薬組成物。

B 13 . (a) 精製された A A V 粒子の安定性を維持又は増強するため、かつ (b) 精製された A A V 粒子の凝集を減少又は防止するための手段を含む、医薬組成物。

B 14 . 精製された A A V ウイルス粒子の安定性が、1 回又は 2 回以上の凍結／解凍サイクル後に維持又は増強される、実施形態 B 13 に記載の医薬組成物。

B 15 . 精製された A A V ウイルス粒子の安定性が、3 回又は 4 回以上の凍結／解凍サイクル後に維持又は増強される、実施形態 B 13 に記載の医薬組成物。

B 16 . A A V 粒子の凝集が、1 回又は 2 回以上の凍結／解凍サイクル後に 5 % 未満である、実施形態 B 13 に記載の医薬組成物。

B 17 . A A V 粒子の凝集が、1 回又は 2 回以上の凍結／解凍サイクル後に 2 % 未満である、実施形態 B 13 に記載の医薬組成物。

B 18 . A A V 粒子の凝集が、1 回又は 2 回以上の凍結／解凍サイクル後に 1 % 未満である、実施形態 B 13 に記載の医薬組成物。

B 19 . A A V 粒子の凝集が、3 回又は 4 回以上の凍結／解凍サイクル後に 5 % 未満である、実施形態 B 13 に記載の医薬組成物。

B 20 . A A V 粒子の凝集が、3 回又は 4 回以上の凍結／解凍サイクル後に 2 % 未満である、実施形態 B 13 に記載の医薬組成物。

B 21 . A A V 粒子の凝集が、3 回又は 4 回以上の凍結／解凍サイクル後に 1 % 未満である、実施形態 B 13 に記載の医薬組成物。

B 22 . A A V 微粒子の安定性及び／又は凝集が、動的光散乱（DLS）、分析用超遠心分離（AUC）、光学顕微鏡法、サイズ排除クロマトグラフィー（SEC）、透過型電子顕微鏡法、及び多角度静的光散乱を用いたフィールドフローフラクショネーション（FFF-MALS）からなる群から選択されるアッセイによって測定される、実施形態 B 13～B 21 のいずれか 1 つに記載の医薬組成物。

B 23 . 精製されたアデノ随伴ウイルス（AAV）粒子、緩衝剤、抗凍結剤、及び非イオン性界面活性剤を含む医薬組成物を作製及び取得するための手段を含むシステムであって、

(a) 精製された A A V 粒子が、不純物を実質的に含まず、

10

20

30

40

50

- (b) 緩衝剤の濃度が、約 0 mM～約 50 mMであり、
- (c) 抗凍結剤が、約 1 %～約 10 % (w/v) であり、
- (d) 非イオン性界面活性剤が、約 0.0001 % (w/v)～約 0.1 % (w/v)

である、システム。

B 2 4. 医薬組成物が、薬学的に許容される塩を更に含み、薬学的に許容される塩の濃度が、約 1 mM～約 200 mMである、実施形態 B 2 3に記載のシステム。

B 2 5. 薬学的に許容される塩が、約 10 mM～約 150 mMである、実施形態 B 2 4に記載のシステム。

B 2 6. 薬学的に許容される塩の濃度が、約 10 mMである、実施形態 B 2 4又は25に記載のシステム。

10

B 2 7. 薬学的に許容される塩の濃度が、約 100 mMである、実施形態 B 2 4又は25に記載のシステム。

B 2 8. 薬学的に許容される塩の濃度が、約 150 mMである、実施形態 B 2 4又は25に記載のシステム。

B 2 9. 精製されたアデノ随伴ウイルス (AAV) 粒子、薬学的に許容される塩、緩衝剤、抗凍結剤、及び非イオン性界面活性剤を含む医薬組成物を作製及び取得するための手段を含むシステムであって、

a. 精製された AAV 粒子が、不純物を実質的に含まず、

b. 薬学的に許容される塩の濃度が、約 1 mM～約 49 mMであり、

c. 緩衝剤の濃度が、約 0 mM～約 50 mMであり、

20

d. 抗凍結剤が、約 1 %～約 10 % (w/v) であり、

e. 非イオン性界面活性剤が、約 0.0001 % (w/v)～約 0.1 % (w/v) である、システム。

B 3 0. 薬学的に許容される塩の濃度が、約 5 mM～約 45 mMである、実施形態 B 2 9に記載のシステム。

B 3 1. 薬学的に許容される塩の濃度が、約 7.5 mM～約 40 mMである、実施形態 B 2 9又はB 3 0に記載のシステム。

B 3 2. 薬学的に許容される塩の濃度が、約 10 mM～約 30 mMである、実施形態 B 2 9～B 3 1のいずれか1つに記載のシステム。

B 3 3. 薬学的に許容される塩の濃度が、約 10 mMである、実施形態 B 2 9～B 3 2のいずれか1つに記載のシステム。

30

B 3 4. 薬学的に許容される塩が、ナトリウム塩、マグネシウム塩、カルシウム塩、カリウム塩、リン酸塩、及び硫酸塩からなる群から選択される、実施形態 B 2 4～B 3 3のいずれか1つに記載のシステム。

B 3 5. ナトリウムが、塩化ナトリウムを含む、実施形態 B 3 4に記載のシステム。

B 3 6. 緩衝剤が、トリス HCl を含む、実施形態 B 2 3～B 3 5のいずれか1つに記載のシステム。

B 3 7. 緩衝剤が、L-ヒスチジン HCl を含む、実施形態 B 2 3～B 3 5のいずれか1つに記載のシステム。

B 3 8. 緩衝剤の濃度が、約 20 mMを含む、実施形態 B 2 3～B 3 7のいずれか1つに記載のシステム。

40

B 3 9. 抗凍結剤が、約 3 % (w/v)～約 8 % (w/v) である、実施形態 B 2 3～B 3 8のいずれか1つに記載のシステム。

B 4 0. 抗凍結剤が、約 4 % (w/v)～約 6 % (w/v) である、実施形態 B 2 3～B 3 9のいずれか1つに記載のシステム。

B 4 1. 抗凍結剤が、約 5 % (w/v) である、実施形態 B 2 3～B 4 0のいずれか1つに記載のシステム。

B 4 2. 抗凍結剤が、糖を含む、実施形態 B 2 3～B 4 1のいずれか1つに記載のシステム。

B 4 3. 糖が、スクロース、トレハロース、又はそれらの組み合わせを含む、実施形態

50

B 4 2 に記載のシステム。

B 4 4 . 糖が、トレハロースを含む、実施形態 B 4 2 に記載のシステム。

B 4 5 . 非イオン性界面活性剤が、約 0 . 0 0 0 5 % (w / v) ~ 約 0 . 0 0 5 % (w / v) である、実施形態 B 2 3 ~ B 4 4 のいずれか 1 つに記載のシステム。

B 4 6 . 非イオン性界面活性剤が、約 0 . 0 0 0 7 5 % (w / v) ~ 約 0 . 0 0 2 5 % (w / v) である、実施形態 B 2 3 ~ B 4 5 のいずれか 1 つに記載のシステム。

B 4 7 . 非イオン性界面活性剤が、約 0 . 0 0 1 % (w / v) である、実施形態 B 2 3 ~ B 4 6 のいずれか 1 つに記載のシステム。

B 4 8 . 非イオン性界面活性剤が、コポリマー、ポリオキシエチレンソルビタンエステル、リン脂質、B r i j 界面活性剤、及びソルビタンエステル、又はそれらの組み合わせからなる群から選択される、実施形態 B 2 3 ~ B 4 7 のいずれか 1 つに記載のシステム。 10

B 4 9 . ポリオキシエチレンソルビタンエステルが、(P S - 2 0)、及びポリソルベート 8 0 (P S - 8 0)、又はそれらの組み合わせからなる群から選択される、実施形態 B 4 8 に記載のシステム。

B 5 0 . コポリマーが、ポロキサマーを含む、実施形態 B 4 8 に記載のシステム。

B 5 1 . ポロキサマーが、ポロキサマー 1 8 8 (P 1 8 8)、ポロキサマー 2 3 7 (P 2 3 7)、ポロキサマー 3 3 8 (P 3 3 8)、及びポロキサマー 4 0 7 (P 4 0 7)、又はそれらの組み合わせからなる群から選択される、実施形態 B 5 0 に記載のシステム。

B 5 2 . ポロキサマーが、ポロキサマー 1 8 8 (P 1 8 8)を含む、実施形態 B 5 0 に記載のシステム。 20

B 5 3 . 精製されたアデノ随伴ウイルス (A A V) 粒子、緩衝剤、抗凍結剤、及び非イオン性界面活性剤を含む医薬組成物を作製及び取得するための手段を含むシステムであって、

(a) 精製された A A V 粒子が、不純物を実質的に含まず、

(b) 緩衝剤の濃度が、約 2 0 m M であり、

(c) 抗凍結剤が、約 5 % (w / v) のトレハロースであり、

(d) 非イオン性界面活性剤が、約 0 . 0 0 1 % (w / v) のポロキサマー 1 8 8 である、システム。

B 5 4 . 精製されたアデノ随伴ウイルス (A A V) 粒子、薬学的に許容される塩、緩衝剤、抗凍結剤、及び非イオン性界面活性剤を含む医薬組成物を作製及び取得するための手段を含むシステムであって、 30

(a) 精製された A A V 粒子が、不純物を実質的に含まず、

(b) 薬学的に許容される塩の濃度が、約 1 0 m M の塩化ナトリウムであり、

(c) 緩衝剤の濃度が、約 2 0 m M であり、

(d) 抗凍結剤が、約 5 % (w / v) のトレハロースであり、

(e) 非イオン性界面活性剤が、約 0 . 0 0 1 % (w / v) のポロキサマー 1 8 8 である、医薬組成物。

B 5 5 . 精製されたアデノ随伴ウイルス (A A V) 粒子、薬学的に許容される塩、緩衝剤、抗凍結剤、及び非イオン性界面活性剤を含む医薬組成物を作製及び取得するための手段を含むシステムであって、 40

(a) 精製された A A V 粒子が、不純物を実質的に含まず、

(b) 薬学的に許容される塩の濃度が、約 2 5 m M の塩化ナトリウムであり、

(c) 緩衝剤の濃度が、約 2 0 m M であり、

(d) 抗凍結剤が、約 5 % (w / v) のトレハロースであり、

(e) 非イオン性界面活性剤が、約 0 . 0 0 1 % (w / v) のポロキサマー 1 8 8 である、システム。

B 5 6 . 精製されたアデノ随伴ウイルス (A A V) 粒子、薬学的に許容される塩、緩衝剤、抗凍結剤、及び非イオン性界面活性剤を含む医薬組成物を作製及び取得するための手段を含むシステムであって、

(a) 精製された A A V 粒子が、不純物を実質的に含まず、 50

(b) 薬学的に許容される塩の濃度が、約 50 mM の塩化ナトリウムであり、
(c) 緩衝剤の濃度が、約 20 mM であり、
(d) 抗凍結剤が、約 5 % (w/v) のトレハロースであり、
(e) 非イオン性界面活性剤が、約 0.001 % (w/v) のポリキサマー 188 である、システム。

B 57. 精製されたアデノ随伴ウイルス (AAV) 粒子、薬学的に許容される塩、緩衝剤、抗凍結剤、及び非イオン性界面活性剤を含む医薬組成物を作製及び取得するための手段を含むシステムであって、

(a) 精製された AAV 粒子が、不純物を実質的に含まず、
(b) 薬学的に許容される塩の濃度が、約 100 mM の塩化ナトリウムであり、
(c) 緩衝剤の濃度が、約 20 mM であり、
(d) 抗凍結剤が、約 5 % (w/v) のトレハロースであり、
(e) 非イオン性界面活性剤が、約 0.001 % (w/v) のポリキサマー 188 である、システム。

10

B 58. 精製されたアデノ随伴ウイルス (AAV) 粒子、薬学的に許容される塩、緩衝剤、抗凍結剤、及び非イオン性界面活性剤を含む医薬組成物を作製及び取得するための手段を含むシステムであって、

(a) 精製された AAV 粒子が、不純物を実質的に含まず、
(b) 薬学的に許容される塩の濃度が、約 125 mM の塩化ナトリウムであり、
(c) 緩衝剤の濃度が、約 20 mM であり、
(d) 抗凍結剤が、約 5 % (w/v) のトレハロースであり、
(e) 非イオン性界面活性剤が、約 0.001 % (w/v) のポリキサマー 188 である、システム。

20

B 59. 精製されたアデノ随伴ウイルス (AAV) 粒子、薬学的に許容される塩、緩衝剤、抗凍結剤、及び非イオン性界面活性剤を含む医薬組成物を作製及び取得するための手段を含むシステムであって、

(a) 精製された AAV 粒子が、不純物を実質的に含まず、
(b) 薬学的に許容される塩の濃度が、約 150 mM の塩化ナトリウムであり、
(c) 緩衝剤の濃度が、約 20 mM であり、
(d) 抗凍結剤が、約 5 % (w/v) のトレハロースであり、
(e) 非イオン性界面活性剤が、約 0.001 % (w/v) のポリキサマー 188 である、システム。

30

B 60. 精製されたアデノ随伴ウイルス (AAV) 粒子、薬学的に許容される塩、緩衝剤、抗凍結剤、及び非イオン性界面活性剤を含む医薬組成物を作製及び取得するための手段を含むシステムであって、

(a) 精製された AAV 粒子が、不純物を実質的に含まず、
(b) 薬学的に許容される塩の濃度が、約 200 mM の塩化ナトリウムであり、
(c) 緩衝剤の濃度が、約 20 mM であり、
(d) 抗凍結剤が、約 5 % (w/v) のトレハロースであり、
(e) 非イオン性界面活性剤が、約 0.001 % (w/v) のポリキサマー 188 である、システム。

40

B 61. 緩衝剤が、トリス HCl を含む、実施形態 B 53 ~ B 60 のいずれか 1 つに記載のシステム。

B 62. 緩衝剤が、L-ヒスチジン HCl を含む、実施形態 B 53 ~ B 60 のいずれか 1 つに記載のシステム。

B 63. 医薬組成物の pH が、約 4.0 ~ 約 9.0 である、実施形態 B 23 ~ B 62 のいずれか 1 つに記載のシステム。

B 64. 医薬組成物の pH が、約 7.0 ~ 約 8.0 である、実施形態 B 23 ~ B 63 のいずれか 1 つに記載のシステム。

B 65. 医薬組成物の pH が、約 7.3 ~ 約 7.7 である、実施形態 B 23 ~ B 64 の

50

いずれか 1 つに記載のシステム。

B 6 6 . 医薬組成物の pH が、約 7 . 5 である、実施形態 B 2 3 ~ B 6 5 のいずれか 1 つに記載のシステム。

B 6 7 . A A V が、A A V 1、A A V 2、A A V 3、A A V 4、A A V 5、A A V 6、A A V 7、A A V 8、A A V 9、及び A A V 1 0 からなる群から選択される、実施形態 B 2 3 ~ B 6 6 のいずれか 1 つに記載の方法。

B 6 8 . A A V が、組換え A A V (r A A V) を含む、実施形態 B 2 3 ~ B 6 7 のいずれか 1 つに記載のシステム。

B 6 9 . 精製された A A V ウイルス粒子の力価が、1 ミリリットル当たり約 1×10^{10} ウイルスゲノム (v g / m L) 以上である、実施形態 B 2 3 ~ B 6 8 のいずれか 1 つに記載のシステム。

B 7 0 . 精製された A A V ウイルス粒子の力価が、1 ミリリットル当たり約 1×10^{11} ウイルスゲノム (v g / m L) 以上である、実施形態 B 2 3 ~ B 6 8 のいずれか 1 つに記載のシステム。

B 7 1 . 精製された A A V ウイルス粒子の力価が、1 ミリリットル当たり約 1×10^{12} ウイルスゲノム (v g / m L) 以上である、実施形態 B 2 3 ~ B 6 8 のいずれか 1 つに記載のシステム。

B 7 2 . 精製された A A V ウイルス粒子の力価が、1 ミリリットル当たり約 1×10^{13} ウイルスゲノム (v g / m L) 以上である、実施形態 B 2 3 ~ B 6 8 のいずれか 1 つに記載のシステム。

B 7 3 . 精製された A A V ウイルス粒子の力価が、1 ミリリットル当たり約 1×10^{14} ウイルスゲノム (v g / m L) 以上である、実施形態 B 2 3 ~ B 6 8 のいずれか 1 つに記載のシステム。

B 7 4 . 精製された A A V ウイルス粒子の力価が、1 ミリリットル当たり約 1×10^{15} ウイルスゲノム (v g / m L) 以上である、実施形態 B 2 3 ~ B 6 8 のいずれか 1 つに記載のシステム。

B 7 5 . 不純物が、プロセス関連不純物、産生物関連不純物、又はそれらの組み合わせを含む、実施形態 B 2 3 ~ B 7 4 のいずれか 1 つに記載のシステム。

B 7 6 . プロセス関連不純物が、残留宿主細胞成分、残留ウイルス産生成分、残留細胞培養成分、残留精製成分、又はそれらの組み合わせからなる群から選択される、実施形態 B 7 5 に記載のシステム。

B 7 7 . 残留宿主細胞成分が、宿主細胞タンパク、宿主細胞 D N A、宿主細胞 R N A、又はそれらの組み合わせを含む、実施形態 B 7 6 に記載のシステム。

B 7 8 . 宿主細胞 D N A が、ウイルス外クロマチン結合細胞 D N A を含む、実施形態 B 7 7 のシステム。

B 7 9 . 残留ウイルス産生成分が、プラスミド D N A、ヘルパーウイルス、又はそれらの組み合わせを含む、実施形態 B 7 8 に記載のシステム。

B 8 0 . 残留細胞培養成分が、抗生物質、サプリメント、インデューサー、増殖因子、又はそれらの組み合わせを含む、実施形態 B 7 6 に記載のシステム。

B 8 1 . 残留精製成分が、緩衝液、無機塩、洗剤、培地、又はそれらの組み合わせを含む、実施形態 B 7 6 に記載のシステム。

B 8 2 . 産生物関連不純物が、空のカプシド、凝集 A A V 微粒子、分解 A A V 微粒子、又はそれらの組み合わせを含む、実施形態 B 7 5 に記載のシステム。

B 8 3 . 精製された A A V ウイルス粒子が、完全な又は部分的に完全なカプシドを含み、産生物関連不純物が、空のカプシドを含む、実施形態 B 8 2 に記載のシステム。

B 8 4 . 精製された A A V ウイルス粒子が、完全なカプシドを含み、産生物関連不純物が、空のカプシドを含む、実施形態 B 8 2 に記載のシステム。

B 8 5 . 精製された A A V ウイルス粒子が、完全なカプシドから本質的になり、産生物関連不純物が、空のカプシドを含む、実施形態 B 8 2 に記載のシステム。

B 8 6 . 産生物関連不純物が、凝集 A A V 微粒子、分解 A A V 微粒子、又はそれらの組

10

20

30

40

50

み合わせを含む、実施形態 B 7 5 に記載のシステム。

B 8 7 . 精製された A A V ウイルス粒子が、空のカプシドを含む、実施形態 B 8 6 に記載のシステム。

B 8 8 . 精製された A A V ウイルス粒子が、空のカプシドから本質的になる、実施形態 B 8 6 に記載のシステム。

B 8 9 . 産生物関連不純物が、凝集 A A V 微粒子又はその組み合わせを含む、実施形態 B 7 5 に記載のシステム。

B 9 0 . 医薬組成物が、液体状態にある、実施形態 B 2 3 ~ B 8 9 のいずれか 1 つに記載のシステム。

B 9 1 . 医薬組成物が、固体状態又は半固体形態にある、実施形態 B 2 3 ~ B 8 9 のいずれか 1 つに記載のシステム。

B 9 2 . 医薬組成物が、精製された A A V ウイルス粒子の安定性を維持増強する、実施形態 B 2 3 ~ B 9 1 のいずれか 1 つに記載のシステム。

B 9 3 . 医薬組成物が、精製された A A V ウイルス粒子の凝集を低減又は防止する、実施形態 B 2 3 ~ B 9 1 のいずれか 1 つに記載のシステム。

B 9 4 . 医薬組成物が、

(a) 精製された A A V 粒子の安定性を維持又は増強し、

(b) 精製された A A V 粒子の凝集を低減又は防止する、実施形態 B 2 3 ~ E 9 1 のいずれか 1 つに記載の方法。

B 9 5 . 精製された A A V ウイルス粒子の安定性が、1 回又は 2 回以上の凍結／解凍サイクル後に維持又は増強される、実施形態 B 9 2 又は B 9 4 に記載のシステム。

B 9 6 . 精製された A A V ウイルス粒子の安定性が、3 回又は 4 回以上の凍結／解凍サイクル後に維持又は増強される、実施形態 B 9 2 又は B 9 4 に記載のシステム。

B 9 7 . A A V 粒子の凝集が、1 回又は 2 回以上の凍結／解凍サイクル後に 5 % 未満である、実施形態 B 9 3 又は B 9 4 に記載のシステム。

B 9 8 . A A V 粒子の凝集が、1 回又は 2 回以上の凍結／解凍サイクル後に 2 % 未満である、実施形態 B 9 3 又は B 9 4 に記載のシステム。

B 9 9 . A A V 粒子の凝集が、1 回又は 2 回以上の凍結／解凍サイクル後に 1 % 未満である、実施形態 B 9 3 又は B 9 4 に記載のシステム。

B 1 0 0 . A A V 粒子の凝集が、3 回又は 4 回以上の凍結／解凍サイクル後に 5 % 未満である、実施形態 B 9 3 又は B 9 4 に記載のシステム。

B 1 0 1 . A A V 粒子の凝集が、3 回又は 4 回以上の凍結／解凍サイクル後に 2 % 未満である、実施形態 B 9 3 又は B 9 4 に記載のシステム。

B 1 0 2 . A A V 粒子の凝集が、3 回又は 4 回以上の凍結／解凍サイクル後に 1 % 未満である、実施形態 B 9 3 又は B 9 4 に記載のシステム。

B 1 0 3 . A A V 微粒子の安定及び／又は凝集が、動的光散乱 (D L S) 、分析用超遠心分離 (A U C) 、光学顕微鏡法、サイズ排除クロマトグラフィー (S E C) 、透過型電子顕微鏡法、及び多角度静的光散乱を用いたフィールドフローフラクショネーション (F F F - M A L S) からなる群から選択されるアッセイによって測定される、実施形態 B 9 3 ~ B 1 0 2 のいずれか 1 つに記載のシステム。

B 1 0 4 . 精製された A A V 粒子が、

(a) A A V 粒子を含む上清を、ヌクレアーゼを含む組成物と接触させることと、

(b) 粒子を精製することと、を含む、方法によって取得される、実施形態 B 2 3 ~ B 1 0 3 のいずれか 1 つに記載のシステム。

B 1 0 5 . ヌクレアーゼが、Benzonase、又はBenzonase (登録商標) 及びクロマチン-DNA ヌクレアーゼを含む、実施形態 B 1 0 4 に記載のシステム。

B 1 0 6 . クロマチン-DNA ヌクレアーゼが、MNaseを含む、実施形態 B 1 0 5 に記載のシステム。

【 0 2 1 5 】

本発明の特定の実施形態が本明細書に記載される。前述の説明を読むと、開示された実

10

20

30

40

50

施形態の変形形態は、当業者に明らかになり得、必要に応じてそのような変形形態を採用し得ることが予想される。したがって、本発明が、本明細書に具体的に記載されるもの以外の方法で実施されること、並びに本発明が、適用法によって許可されるように、本明細書に添付の特許請求の範囲に列挙される主題の全ての修正物及び同等物を含むことが意図される。また、全ての可能性のあるこれらの変形形態における上記要素の任意の組み合わせは、本明細書において別途記載のない限り、又は文脈が明らかに矛盾しない限り、本明細書に包含される。本発明の多くの実施形態が説明されてきた。しかしながら、様々な修正が、本発明の趣旨及び範囲から逸脱することなく実行され得ることが、理解されるであろう。したがって、実施例のセクションにおける説明は、特許請求の範囲に記載される本発明の範囲を限定するのではなく、例示することを意図するものである。

10

【実施例】

【0216】

本出願の以下の実施例は、本出願の本質を更に説明するためのものである。当業者は、広い発明概念から逸脱することなく、上で説明される実施形態に変更を行うことができることを理解するであろう。したがって、本発明は、開示された特定の実施形態に制限されず、本説明によって定義されるように本発明の趣旨及び範囲内の修正を包含することを意図するものと理解される。AAV2／8粒子を代表的なAAV種として以下の実施例で使

【0217】

実施例I：低イオン強度製剤中の精製されたAAV粒子は、凍結／解凍後に物理的安定性を示した。

20

この実施例は、200mM以下の塩の濃度を有する製剤中の精製されたAAV粒子が、遊離／解凍後に物理的安定性を示したことを確立する。

【0218】

低塩の濃度を有する製剤が1回又は2回以上の凍結／解凍後に精製されたAAV粒子の物理的安定性を維持することができるかどうかを判定するために、精製されたAAV2／8粒子を代表的なAAV粒子種として使用し、表1に記載される製剤のうちの1つで製剤化した。

【0219】

【表1】

30

表1：製剤組成物

	製剤番号1	製剤番号2	製剤番号3	製剤番号4
濃度 (vg/mL)	>1E13	>1E13	>1E13	>1E13
緩衝液 (mM)、pH	20mMトリス-HCl pH7.5	20mMトリス-HCl pH7.5	20mMトリス-HCl pH7.5	20mMトリス-HCl pH7.5
塩(mM)	10mM NaCl	100mM NaCl	150mM NaCl	200mM NaCl
抗凍結剤 (w/v%)	5%トレハロース	5%トレハロース	5%トレハロース	5%トレハロース
界面活性剤 (w/v%)	0.001% P188	0.001% P188	0.001% P188	0.001% P188

40

【0220】

簡潔に述べると、産生及び精製後、AAV粒子を、製剤番号1、製剤番号2、製剤番号3、又は製剤番号4に製剤化した。次いで、AAV粒子の物理的特性を、動的光散乱(DLS)を使用して製剤化後に特徴付けた。4つの製剤についての代表的なDLSデータを、図1A～図1Dに示す。4つの製剤の各々についてのAAV粒子の流体力学的直径の測定は、4つ全ての製剤が、初期の製剤後に、凝集がほとんどないか全くない均一な粒径をもたらすことを明らかにした。

【0221】

次に、製剤は、凍結し、物理的安定性の評価のために単一の凍結／解凍サイクルに供さ

50

れた（図 2 A～図 2 D）。粒径データを、単一の凍結／解凍サイクル後に 4 つの代表的な製剤について D L S によって測定し、強固な物理的安定性が、凍結前 D L S と比較して、全ての製剤にわたって観察された。具体的には、製剤番号 1、製剤番号 2、製剤番号 3、又は製剤番号 4 に製剤化された A A V 粒子は、単分散ピークを有し、凝集がほとんどないか全くないことを示した。1 n m のピークは、一般的な賦形剤ピークであるが、A A V の凝集に関連しない。

【 0 2 2 2 】

同様の結果が、3 回の凍結／解凍サイクル後に観察された（図 3 A～図 3 D）。具体的には、3 回の凍結／解凍サイクル後の D L S 結果は、製剤番号 2 及び製剤番号 3 において非常に小さいテーリングを有する単分散ピークを示した。

10

【 0 2 2 3 】

まとめると、本実施例は、低イオン強度（例えば、塩 ≤ 200 m M）を有する製剤中の A A V 粒子が、複数回の凍結／解凍サイクル後であっても、頑強な物理的安定性を示すことを実証する。

【 0 2 2 4 】

実施例 I I：A A V 粒子中の不純物及び空のカプシドの検出

この実施例は、産生物及び産生物後画分における 280 n m（タンパク質）及び 260 n m（D N A／R N A）でのクロマトグラフィー及び U V 吸光度スペクトルが、精製された A A V 粒子中の不純物を検出するように、並びに完全なカプシドと空のカプシドとを区別するように使用され得ることを確立する。加えて、本実施例は、M N a s e 処理を伴う例示的な方法を使用して、不純物及び空のカプシド（望ましくない場合）の量を精製された A A V 粒子から実質的に低減させることができることを例示する。

20

【 0 2 2 5 】

ウイルス外クロマチン結合 A A V 粒子などの A A V 粒子中の不純物は、望ましくない産生物である。これらの不純物は、精製された産生物の視認できる沈殿を引き起こす可能性があり、これは、任意の製剤研究にとって問題となり得る。更に、増加したクロマチン／D N A 結合タンパク質は、望ましくない混入物であり、その両方が宿主細胞タンパク質／D N A 混入を増加させ得る。更に、ある特定の設定では、空のカプシドも、望ましくない場合がある。本研究は、クロマチン－D N A ヌクレアーゼ、M N a s e が、精製中に添加することができ、A A V 粒子の精製の改善をもたらすことを実証した。

30

【 0 2 2 6 】

組換え A A V 2／8 粒子が、例示的な A A V 粒子種として産生された。A A V 粒子は、懸濁培養、及び M N a s e 処理あり又はなしでの B i a S e p a r a t i o n s C I M D i s k（0.34 m L のカラム体積、1.3 μ m の孔径）上での陰イオン交換クロマトグラフィーを使用する精製を伴う、例示的な方法を使用して産生された。D N A（260 n m での吸光度）及びタンパク質（280 n m での吸光度）が、産生物及び産生物後画分において測定された。結果により、M N a s e 処理なしで精製された試料において、大量の D N A 及びタンパク質が産生物後画分中に存在し（図 4 A）、これは M N a s e 処理によって実質的に低減された（図 4 B）ことが示された。具体的には、60 U／m L の M N a s e 処理は、産生物後ピークの大きな 260 n m（D N A／R N A）吸光度ピーク及び 280 n m（タンパク質）吸光度ピークの両方を低下させた（図 4 B）。

40

【 0 2 2 7 】

M N a s e 処理あり（破線）又はなし（実線）での懸濁培養から産生された r A A V 8 粒子のアフィニティー交換クロマトグラムを重ねて、D N A／R N A（260 n m）（図 5 A）及びタンパク質（280 n m）（図 5 B）についての産生物後ピーク高さを直接比較することにより、クロマチン消化のための M N a s e 処理を伴う A A V 粒子精製のための例示的な方法が、A A V 粒子の精製を強化して、残留宿主細胞タンパク質汚染を検出不能なレベルまで有意に低減させるという更なる証拠（それぞれ、図 5 A 及び図 5 B）が提供された。特に、核酸スペクトル（260 n m）で観察された、産生物後ピーク高さの低下は非常に有意であり、ピーク高さ及び面積において 90 % 超の減少であると推定された

50

(図 5 A)。加えて、タンパク質スペクトル (280 nm) でも、産生物後ピークの低下が観察された (図 5 B)。

【0228】

したがって、上記の結果により、精製された AAV 粒子中の不純物が、クロマトグラフィーを使用し、産生物及び産生物後画分中の 280 nm (タンパク質) 及び 260 nm (DNA/RNA) における UV 吸光度スペクトルを測定することによって検出され得ることが証明された。更に、精製された AAV 粒子中の不純物の量は、AAV 粒子を MNase で処理するなどの精製技術を使用して、実質的に低減され得る。

【0229】

実施例 III：AAV 粒子中の産生物関連不純物の低減

この実施例は、産生物関連不純物 (例えば、凝集 AAV 粒子) が顕微鏡によって AAV 粒子中で測定され得ること、及び MNase 処理を伴う例示的な方法が産生物関連不純物を低減させ得ることを、確立する。

【0230】

精製された AAV 粒子が、凝集 AAV 粒子及び沈殿 AAV 粒子などの産生物関連不純物を実質的に含み得ないことを実証するために、巨視的画像及び微視的画像を、異なる精製技術を使用して、試料から取得した。例示的な技術は、MNase 処理ありなしでの AAV 粒子の精製を伴った。結果により、AAV 粒子が、視認できる関与物 (participates) を実質的に含まないように生成され得ることが証明された。

【0231】

例えば、産生物後ピーク画分の肉眼検査により、Expifectamine (商標) 293 トランスフェクションキットエンハンサー (Thermo Fisher Scientific) を使用して懸濁 Exp i 293 F (商標) 細胞 (Thermo Fisher Scientific) 中で産生された MNase 処理なしの rAAV8 粒子、又はエンハンサーを用いずに懸濁 Exp i 293 F (商標) 細胞中で産生された MNase 処理なしの rAAV8 粒子が、肉眼検査で視認できる沈殿物を有することが示された (図 6)。対照的に、エンハンサーを用いずに懸濁 Exp i 293 F (商標) 細胞において産生され、かつ 60 U/mL の MNase を用いて 25 °C で 30 分間消化させた rAAV8 粒子は、視認できる沈殿物を有しなかった (図 6)。

【0232】

このデータは、AAV 粒子が、産生物関連不純物、凝集 AAV 粒子及び沈殿 AAV 粒子を実質的に含まないように精製されたことを実証した。更に、結果により、AAV 粒子不純物が顕微鏡によって視認され得ることが例証された。

【0233】

実施例 IV：高力価の精製された AAV 粒子の生成

この実施例は、高力価の精製された AAV 粒子が生成され、測定され得ることを確立する。

【0234】

AAV 粒子が、3つの例示的な精製技術を使用して精製され、ウイルス力価が測定された。簡単に説明すると、AAV2/8 粒子が、例示的な AAV 粒子として調製され、(1) MNase を含まないか、(2) MNase を含むか、又は (3) エンハンサーを含むかのいずれかの例示的な精製技術を使用して精製された。1 mL 当たりのゲノムコピー (GC/mL) 力価 (図 7 A)、細胞当たりのゲノムコピー (GC/細胞) (図 7 B)、及び総ゲノムコピー (図 7 C) の定量化により、高力価の精製された AAV 粒子が生成され得ることが明らかになった。

【0235】

更に、高力価の精製された AAV ベクターはまた、MNase を用いて又は用いずに処理された試料から産生され、(1) 高/低 pH 溶出、(2) クエン酸塩溶出、又は (3) 低 pH 溶出を使用して溶出された。図 8 B に示されるように、 $1 \times 10^{11} \sim 1 \times 10^{14}$ の範囲の総ゲノムコピー (図 8 B、表 2) が、3つの異なる溶出緩衝液 (すなわち、ク

10

20

30

40

50

エン酸、低 pH、及び低／高 pH) の各々について、MNase 処理試料において一貫して観察された。

【0236】

【表2】

表2：全ゲノムコピー

	MNaseなし	MNase
クエン酸塩	$1.09e^{12}$	$3.27e^{12}$
低pH	$8.48e^{11}$	$6.22e^{12}$
低／高pH	$3.45e^{11}$	$2.84e^{13}$

10

【0237】

総合すると、これらのデータにより、AAV粒子を精製して高いウイルス力価を生成することができ、ウイルス力価を測定することができることが実証される。

【0238】

実施例V：高pHでの洗浄が、AAV粒子の純度を改善した。

この実施例は、AAV粒子のアフィニティー交換クロマトグラフィー中の高pH洗浄が、不純物の存在を低減させることができることを確立する。

【0239】

不純物を除去し得るAAV粒子を精製するための例示的な条件を決定するために、AKTシステムを使用し、試料は精製中に様々な洗浄及び／又は酵素処理条件に供された。異なる精製条件を表3に要約する。

20

【0240】

【表3】

表3：精製条件

条件	アフィニティー				陰イオン交換
	洗浄pH	Benzonase	MNase	溶出	溶出
1	該当なし	なし	なし	クエン酸塩、pH2.5	20mM BTP、pH 10.2、 10mM～200mM NaCl 直線勾配
2	該当なし	あり	なし	クエン酸塩、pH2.5	
3	該当なし	あり	あり	H ₃ PO ₄ 、pH1.5	
4	pH9.5	あり	あり	クエン酸塩、pH2.5	
5	pH10.2	あり	あり	H ₃ PO ₄ 、pH1.5	
6	pH10.3	あり	あり	H ₃ PO ₄ 、pH1.5	
7	pH10.3	あり	なし	H ₃ PO ₄ 、pH1.5	
8	pH10.9	あり	あり	H ₃ PO ₄ 、pH1.5	
9	pH10.4	あり	あり	H ₃ PO ₄ 、pH1.5	
10	pH10.4	あり	あり	H ₃ PO ₄ 、pH1.5	20mMトリス pH9.0、 0～300mM(C ₂ H ₅)NCl 直線勾配

30

BTP：ビスートリスプロパン；NaCl：塩化ナトリウム；H₃PO₄：リン酸

【0241】

簡潔に述べると、バルク回収及びbenzonase処理後に、粗試料をアフィニティークロマトグラフィーに供した。表3に示すように、特定の条件（すなわち、条件4～10）下で、アフィニティークラムを、pH9.5～pH10.9の範囲の高pH緩衝液で洗浄した。更に、表3に示されるように、試料は、benzonase又はMNaseで処理されなかった（条件1）か、benzonaseのみでオンカラムで処理された（条件2及び7）か、又はbenzonase又はMNaseでオンカラムで処理された（条件3～5及び8～10）かのいずれかとした。アフィニティークラムからの溶出は、クエン酸塩、pH2.5（条件1、2、及び4）、又はリン酸（H₃PO₄）、pH1.5（条件3、及び5～10）を用いて行った。

40

【0242】

アフィニティークロマトグラフィーによる精製後、次いで、CIM QA（第四級アミ

50

ン) モノリスカラムを使用して、陰イオン交換クロマトグラフィーによって試料を仕上げた。その後、試料を、10 mM～200 mMのNaCl直線勾配を用いて溶出し、20 mMのBTP、pH10.2(条件1～9)中で中和するか、又は0～300 mM(C₂H₅)NCI直線勾配を用いて溶出し、20 mMのトリスpH9.0(条件10)中で中和した。

【0243】

精製された試料を収集し、ドデシル硫酸ナトリウム-ポリアクリルアミドゲル電気泳動(SDS-PAGE)に供し、続いて銀染色して、不純物が精製されたAAV粒子中に存在するかどうかを検出した。異なる例示的な精製条件の比較により、benzonase及びMNase処理と組み合わせた場合に、pH10.9未満の高pH洗浄条件を伴う例示的な精製プロセスが、高度に純粋なAAV試料をもたらしたことが示された(図9A)。更に、精製されたAAV試料のDNAアガロースゲル電気泳動は、AAV内に含有されるITR導入遺伝子の存在を示した(図9B)。

10

【0244】

これらの結果により、アフィニティークロマトグラフィー精製中に高pH洗浄(約pH9.5～pH10.4)を伴う例示的な精製プロセスが、精製されたAAVの純度を改善し得ることが示された。更に、結果により、不純物が、ゲル電気泳動及び銀染色を伴う例示的なアッセイによって測定され得ることが実証される。

【0245】

実施例VI：不純物をほとんど又は全く含まないAAV粒子の測定

20

この実施例は、AAV粒子不純物が、動的光散乱(Differential Scanning Fluorimetry、DLS)を使用して測定され得ること、及び示差走査蛍光定量法(DSF)が、タンパク質凝集Taggがウイルスの融解と整列する温度の決定のために使用され得ることを確立する。

【0246】

AAV血清型同一性の決定因子としての熱安定性は、当該技術分野で既知であり、AAV粒子試料中の不純物を検出するために使用することもできる。例えば、不純物が除去されると、タンパク質凝集の開始(Tagg)はウイルスの融解温度(Tm)と一致する。

【0247】

精製後に不純物がAAV粒子中に存在するかどうかを決定するために、様々な精製方法を実行し、試料をある範囲の温度にわたってDLSによって測定して、Tm及びTaggを決定した。以前の上記の結果と一致して、MNaseを伴う例示的な方法は、AAV粒子からの不純物の除去を改善することができた。具体的には、benzonase又はMNaseで処理されなかった試料において、Tagg及びTmが10℃を超えて異なることが見出された(図10A)。benzonaseの添加は不純物の除去を改善したが、benzonase及びMNaseはともに、Tagg及びTmアライメントにおいて改善を示した(図10B及び図10C)。

30

【0248】

同様に、MNase及び高pH溶出条件を伴う更なる例示的な精製技術は、Tagg及びTmアライメントを有する精製されたAAV粒子が生成され得ることを示した。具体的には、Tagg及びTmは、benzonaseのみで処理し、かつリン酸(pH10.3)で溶出した試料(図10D)と比較して、benzonase(登録商標)及びMNaseで処理し、リン酸(pH10.3)で溶出した試料(図10E)においてアライメントされた。

40

【0249】

まとめると、これらの結果により、精製されたAAV粒子中の夾雑物が実質的に除去され得ること、及びDLS and DSFがAAV粒子夾雑物を測定するための例示的なアッセイであることが実証された。

【0250】

実施例VII：精製されたAAV粒子中のプロセス関連不純物の検出

50

この実施例は、AAV粒子が、宿主細胞DNA及び宿主細胞タンパク質などのプロセス関連不純物を実質的に含まないように精製され得ることを確立する。

【0251】

任意の残留宿主細胞DNAが陰イオン交換（AEX）精製後の精製されたAAV粒子試料中に存在するかどうかを判定するために、AlphaLISAアッセイを実行して、宿主細胞DNAを分析物として検出した。AlphaLISAビーズベースの技術は、PerkinElmerの増幅発光近接ホモジニアスアッセイに依存し、発光酸素チャネリング化学を使用して宿主細胞DNAを検出する（Beaudet et al., Nat Methods 5, 889–894, (2008)を参照されたい）。

【0252】

AEX精製後の残留宿主細胞DNAの分析を、以下の6つの異なる条件下で調製された試料中のAlphaLISAによって測定した：（1）benzonaseを用いない、又はMNaseを用いない精製（「酵素なし」）、（2）benzonase及びクエン酸塩溶出を用いた精製（「B、クエン酸塩（アフィニティー）」）、（3）benzonase及びクエン酸塩溶出を用いた精製（「B、クエン酸塩」）、（4）benzonase、MNase、及びリン酸溶出を用いた精製（「B、M、Phos」）、（5）benzonase、高pH（pH10.3）洗浄、及びリン酸溶出を用いた精製（「B、pH10.3、Phos」）、並びに（6）benzonase、MNase、及びリン酸溶出を用いた精製（「B、M、pH10.3、Phos」）。標準曲線を作成して、存在する宿主細胞DNAの濃度レベルを外挿した。

【0253】

結果により、MNaseを含む例示的な精製技術において、AAV粒子が宿主細胞DNAを実質的に含まないように精製され得ることが示された（図11A及び図11B）。例えば、benzonase、MNase、及びリン酸溶出を用いた精製（「B、M、pH10.3、Phos」）は、ほぼ検出不可能なレベルの宿主細胞DNAをもたらした（図11A及び図11B）。

【0254】

これらの結果により、宿主細胞DNAなどのプロセス関連不純物が、精製されたAAV粒子から実質的に除去され得ることが実証された。

【0255】

実施例VIIII：MNase処理は精製プロセスを改善する

この実施例は、MNaseを伴う本明細書に記載される例示的なAAV精製方法が、最新技術を超える改善を表し、実質的により少ない不純物を有する精製されたAAV粒子を生成し得ることを示す。

【0256】

陰イオン交換及びbenzonaseを使用する現在のAAV粒子の精製方法が説明されている（Wang C, et al. Mol Ther Methods Clin Dev. 2019; 15: 257–263を参照されたい）。しかしながら、MNaseは、そのような方法では使用されていない。

【0257】

MNase処理を含む本明細書に記載される精製方法が、上記の現在の精製方法よりも良好に機能し得るか否かを判定するために、MNase処理プロトコル（プロトコル#1）を、Wangらの方法（プロトコル#2）を使用して得られた画分と比較した。

【0258】

簡単に説明すると、Wangらによる精製法を、アフィニティー樹脂によって行った。カラムにロードする前に、バルクAAVプールを、50 U/mLのbenzonaseで、37°Cで1時間処理し、10,000×gで15分間の遠心分離によって清澄化し、続いて1.2 mmフィルター及び0.45 mmフィルターを通して連続的に濾過した。低pH緩衝液を用いてカラムからAAVを溶出させた。並行して、異なるセットの試料を、MNase処理を含む本明細書に記載される方法に従って精製した。

【0259】

プロトコル番号1とプロトコル番号2との比較により、MNase処理が、銀染色によって測定した場合に、AAV粒子試料中に存在する不純物の量を大きく低減させることができたことが明らかになった（図12）。

【0260】

したがって、この実施例は、MNaseを使用する本明細書中で提供される精製方法が、AAV精製のために使用される方法を超える改善を示すことを立証している。

【0261】

実施例IX：代替的な製剤条件下で精製されたAAVの改善された安定性

この実施例は、本明細書で提供される製剤が、凍結／解凍ストレス及び−80℃での長期保存を通して改善された安定性を有することを確立する。

10

【0262】

簡単に説明すると、AAV8（GFP）を、例示的なAAV粒子として使用し、MNase処理、アフィニティークロマトグラフィー、及び陰イオン交換クロマトグラフィーを含む本明細書に記載される方法に従って精製した。生成及び精製後、 4.6×10^{13} VG/mLのAAV粒子を、製剤番号2の例示的な緩衝液（20mMのトリス、100mMのNaCl、5%のトレハロース、0.001%のポロキサマー188、pH7.5）中で製剤化した。続いて、AAV8（GFP）粒子製剤を、 2.0×10^{13} VG/mLのAAV粒子の最終濃度まで、製剤番号2緩衝液中に希釈した。試料を、（a）1.2mLをラベル付きクライオバイアルに、（b）0.1mLをDLSバイアルに、（c）0.15mLをSEC-FLDバイアルに配分し、−80℃の冷凍庫に入れた。

20

【0263】

次いで、製剤中のAAV粒子の物理的特性が、遊離／解凍の前後に、及び動的光散乱（DLS）及び蛍光検出に連結されたサイズ排除クロマトグラフィー（SEC-FLD）を使用した−80℃での長期保存の前後に、特徴付けられた。試料を−80℃の冷凍庫から取り出し、室温で30分を超えて放置して解凍することにより、解凍を行った。採取したSEC試料を、解凍後に再凍結した。

【0264】

DLS及びSEC-FLDを測定した時点の概要を、それぞれ表4及び表5に示す。

【0265】

30

【表4】

表4：DLS試料の概要

試料	温度(℃)	時点(ヶ月間)
AAV8(GFP)	初期	0
AAV8(GFP)	−80	1
AAV8(GFP)	−80	3
AAV8(GFP)	−80	6
AAV8(GFP)	−80	F/T 1
AAV8(GFP)	−80	F/T 2
AAV8(GFP)	−80	F/T 3
AAV8(GFP)	−80	F/T 4
AAV8(GFP)	−80	F/T 5

40

【0266】

50

【表 5】

表 5 : S E C - F L D 試料の概要

試料	温度(°C)	時点(ヶ月間)
AAV8(GFP)	初期	0
AAV8(GFP)	-80	1
AAV8(GFP)	-80	3
AAV8(GFP)	-80	6
AAV8(GFP)	-80	F/T 1
AAV8(GFP)	-80	F/T 3
AAV8(GFP)	-80	F/T 5

10

【0267】

結果により、5回の凍結／解凍サイクルを通して、及び-80℃での少なくとも3ヶ月間の保存を通して、例示的な製剤番号2の強い安定性が実証された。例えば、図13A～図13B及び図14A～図14B、並びに表6及び7に示すように、凍結／解凍及び-80℃での保存を通して、凍結前DLS(t0)と比較したDLS粒径によって測定されるように、強い物理的安定性が観察された。具体的には、全体を通して粒径又は多分散性においてはほとんど変化がなかった。

【0268】

更に、図15A～図15B、及び図16A～図16B、並びに表8及び9に示されるように、非常に強い%モノマーがSEC-FLDによって実証され、高分子量種はごくわずかであった。(HMWS)を凍結／解凍及び-80℃保存によって同定したが、これはごくわずかな凝集を示した。

20

【0269】

【表 6】

表 6 : 凍結／解凍についてのDLS結果

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

30

PDI = 多分散指数、STDEV = 標準偏差。

【0270】

【表 7】

表 7. -80℃安定性についてのDLS結果

時間(ヶ月間)	Z-平均(nm)	Z STDEV	PDI	PDI STDEV
0	30	0.30	0.203	0.008
1	29	0.23	0.174	0.009
3	30	0.28	0.184	0.006

40

PDI = 多分散指数、STDEV = 標準偏差。

【0271】

50

【表 8】

表 8．凍結／解凍についてのSEC－FLD結果

周期	HMWS	モノマー
0	0. 29%	99. 71%
1	0. 63%	99. 37%
3	0. 45%	99. 55%
5	2. 47%	97. 53%

HMWS＝高分子量種。

【0 2 7 2】

10

【表 9】

表 9．－8 0℃安定性についてのSEC－FLD結果

時間(ヶ月間)	HMWS	モノマー
0	0. 29%	99. 71%
2	0. 47%	99. 53%
3	0. 76%	99. 24%

HMWS＝高分子量種。

【0 2 7 3】

20

総合すると、これらの結果により、例示的な製剤番号 2 が精製された A A V 製剤に対して強い安定性を有することが実証される。

* * * * *

【0 2 7 4】

当業者は、広い発明概念から逸脱することなく、上で説明される実施形態に変更を行うことができることを理解するであろう。したがって、本発明は、開示された特定の実施形態に制限されず、本説明によって定義されるように本発明の趣旨及び範囲内の修正を包含することを意図するものと理解される。

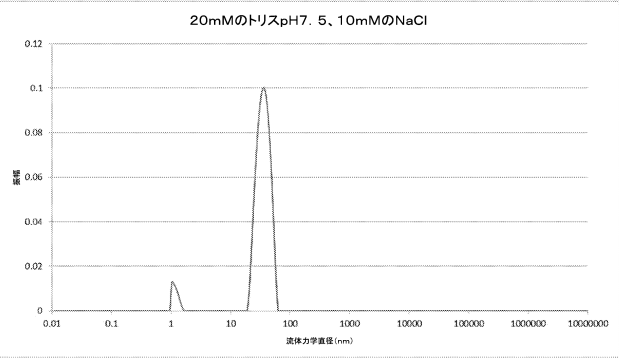
【0 2 7 5】

「背景技術」において、また、本明細書全体を通じて様々な刊行物、論文及び特許を引用又は記載し、これらの参考文献の各々は、その全体が参照により本明細書に組み込まれる。本明細書に含まれる文書、操作、材料、デバイス、物品などの考察は、本発明のコンテキストを与えるためのものである。かかる考察は、これらの事物のいずれか又は全てが、開示又は特許請求されるいずれかの発明に対する先行技術の一部を構成することを容認するものではない。

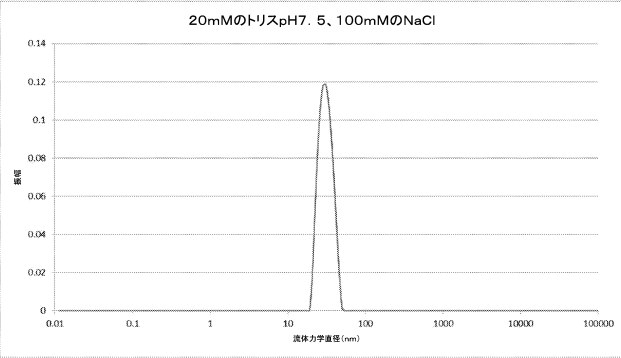
30

【図面】

【図 1 A】



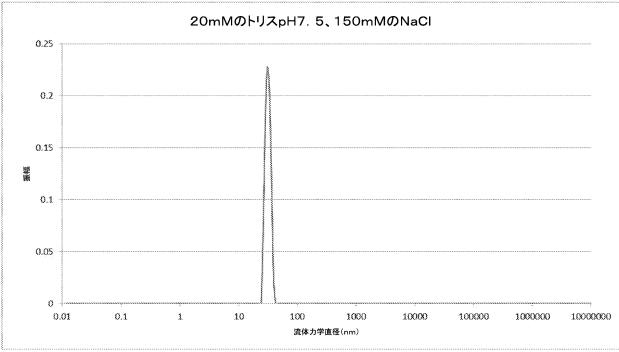
【図 1 B】



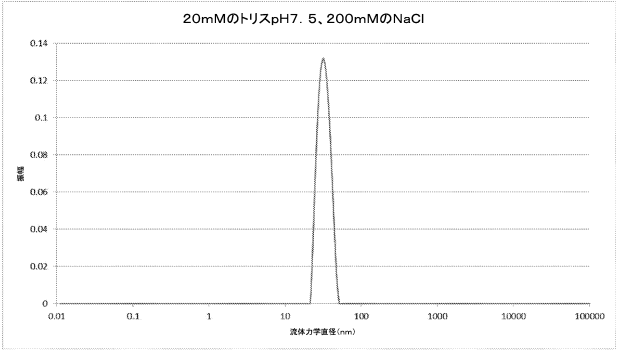
40

50

【図 1 C】

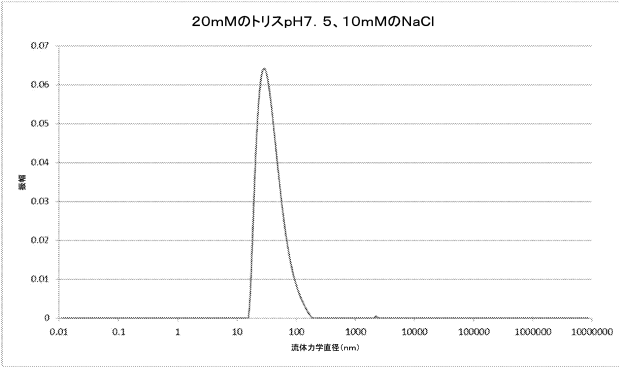


【図 1 D】

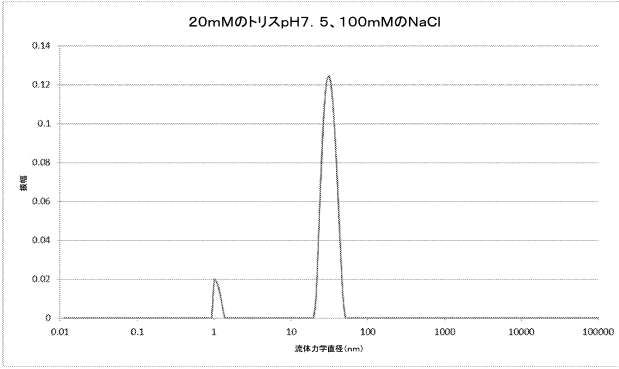


10

【図 2 A】

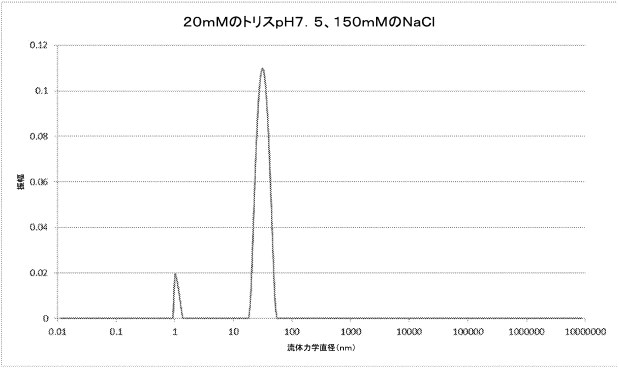


【図 2 B】

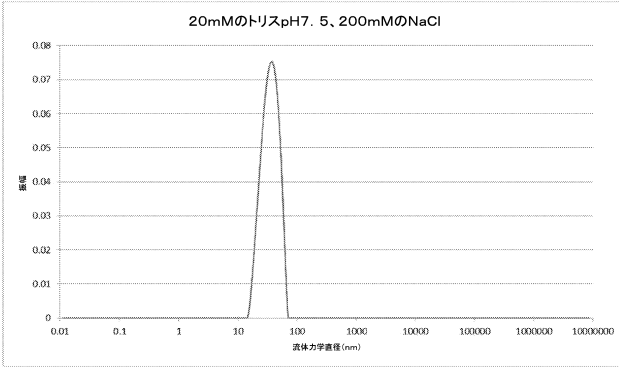


20

【図 2 C】



【図 2 D】

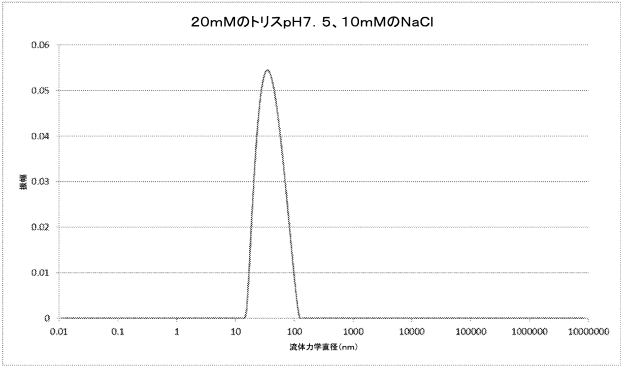


30

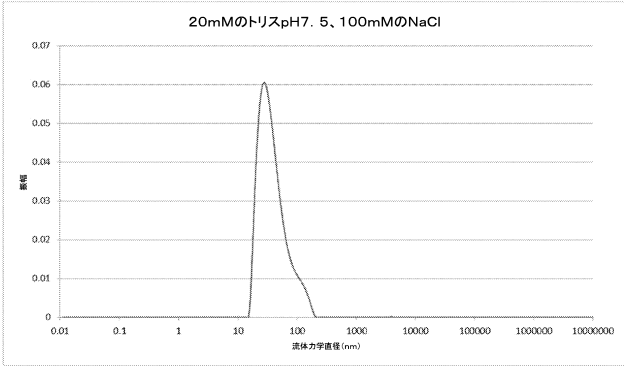
40

50

【図 3 A】

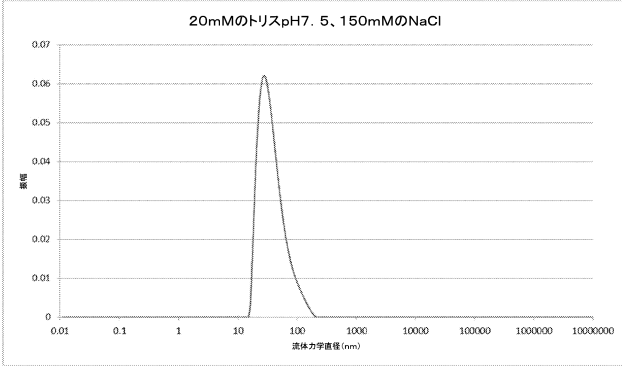


【図 3 B】

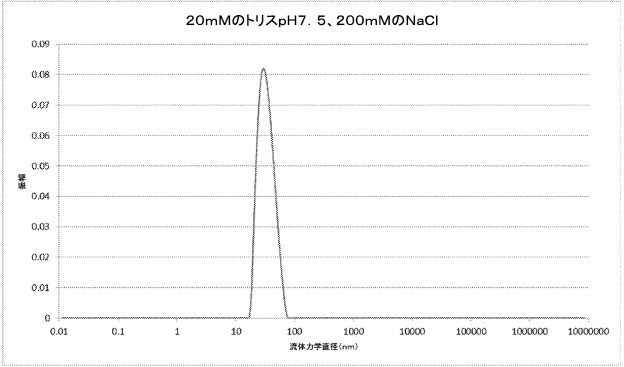


10

【図 3 C】



【図 3 D】



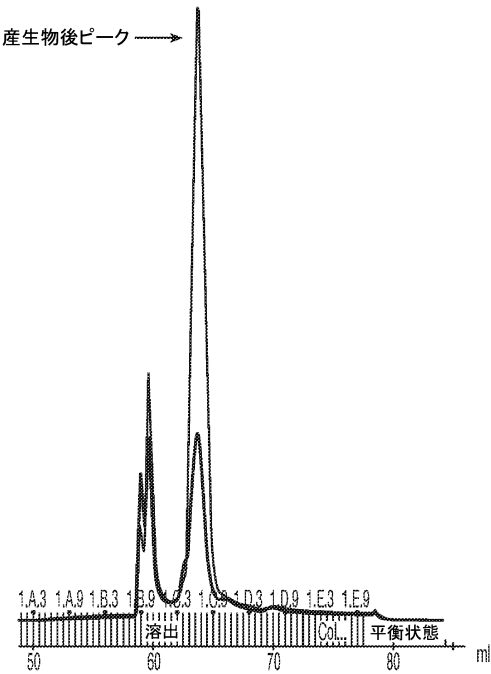
20

30

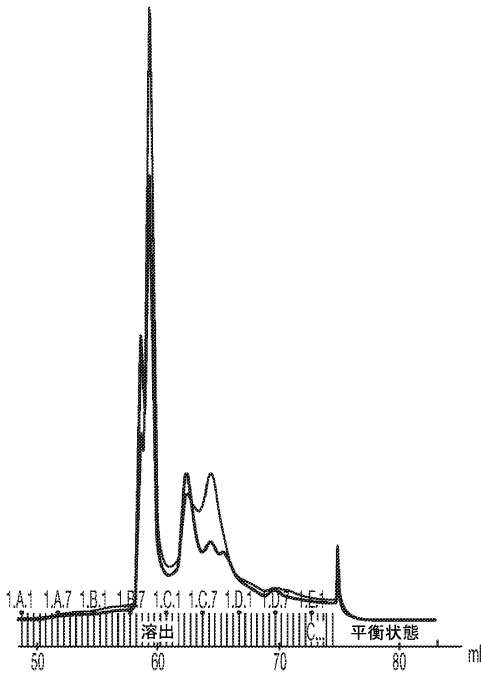
40

50

【図 4 A】

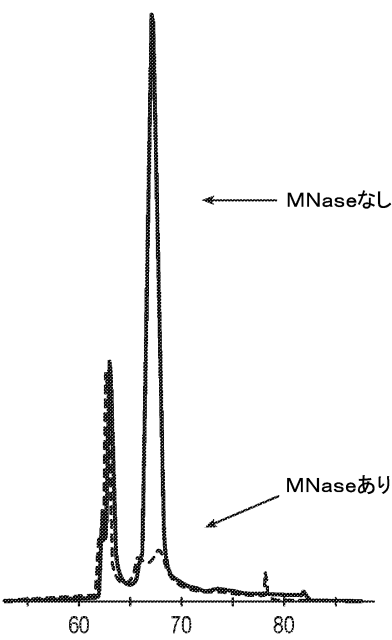


【図 4 B】



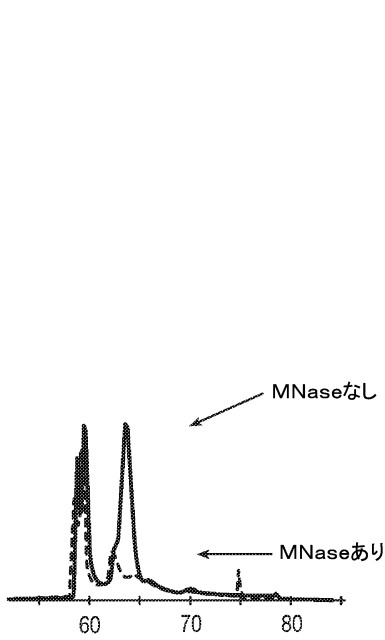
【図 5 A】

260nm



【図 5 B】

280nm



10

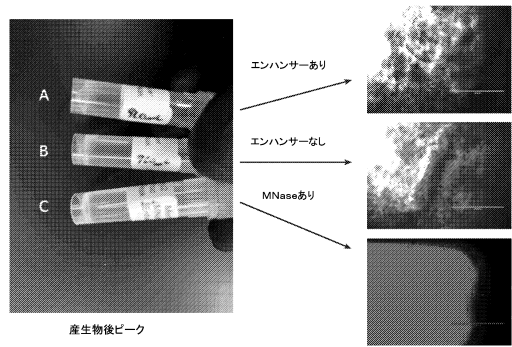
20

30

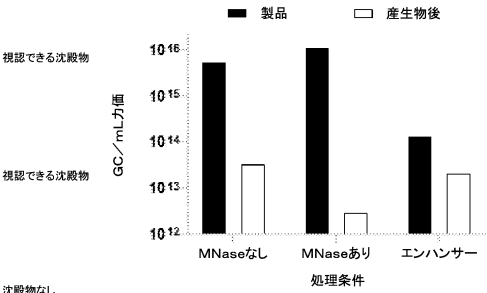
40

50

【図 6】

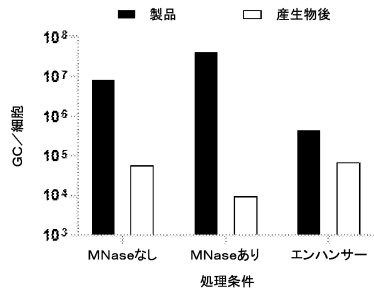


【図 7 A】

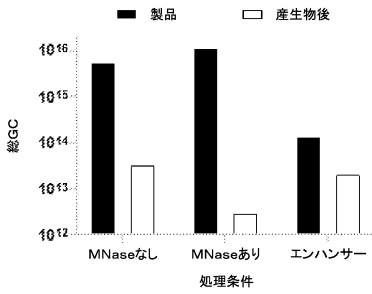


10

【図 7 B】

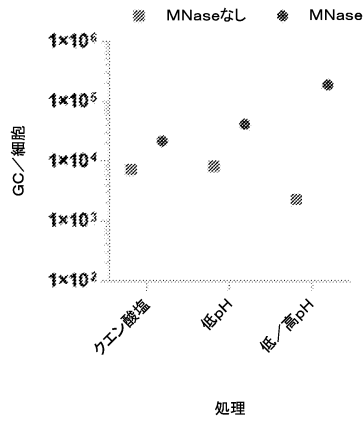


【図 7 C】

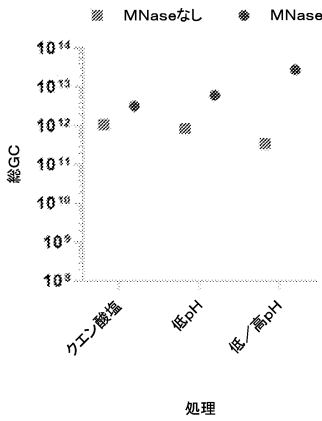


20

【図 8 A】



【図 8 B】

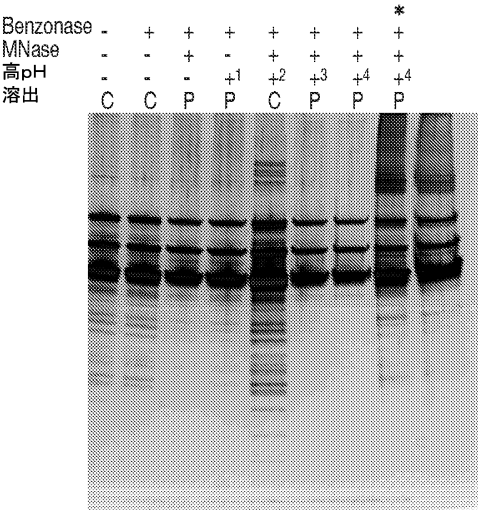


30

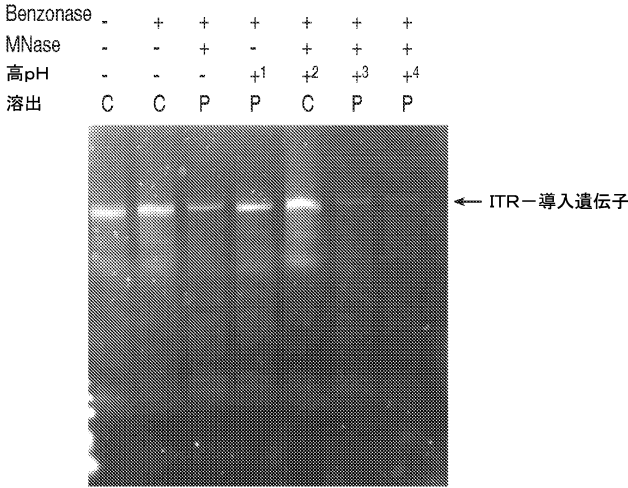
40

50

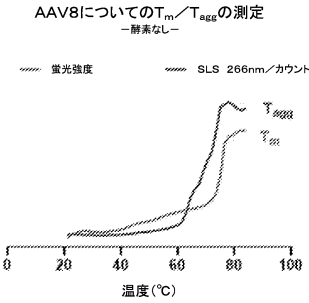
【図 9 A】



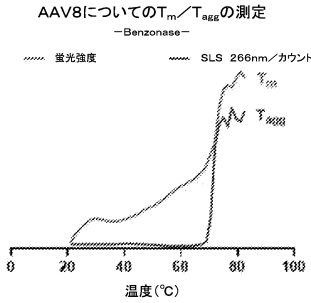
【図 9 B】



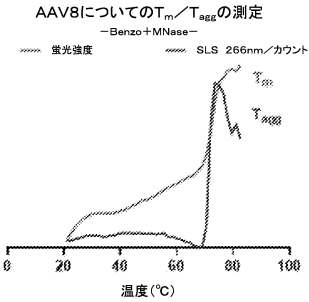
【図 10 A】



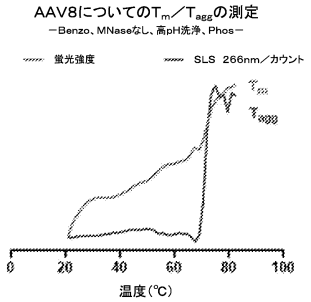
【図 10 B】



【図 10 C】



【図 10 D】



10

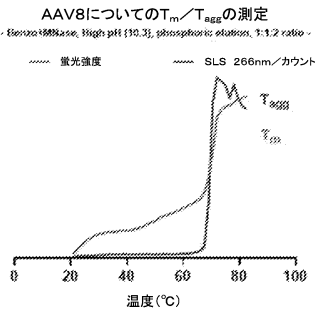
20

30

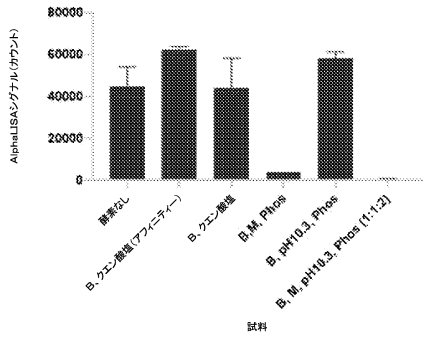
40

50

【図 10 E】

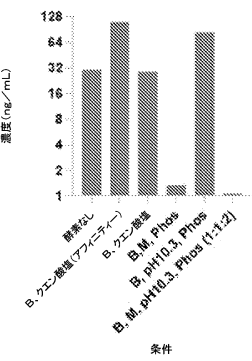


【図 11 A】

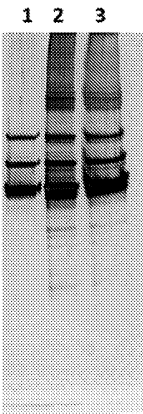


10

【図 11 B】

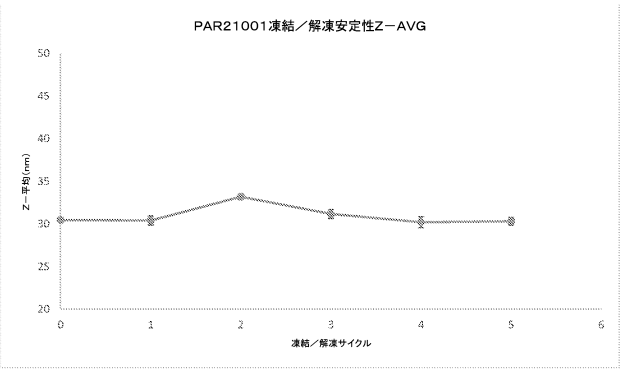


【図 12】

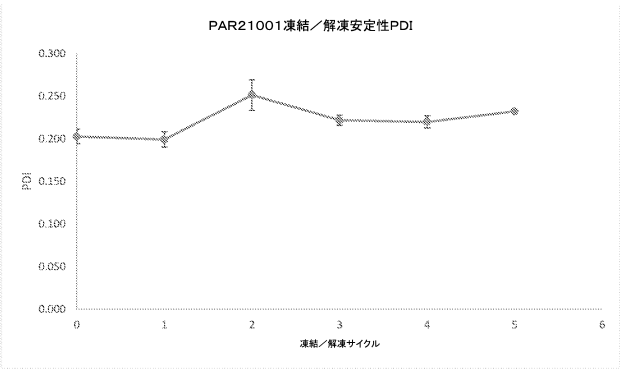


20

【図 13 A】



【図 13 B】

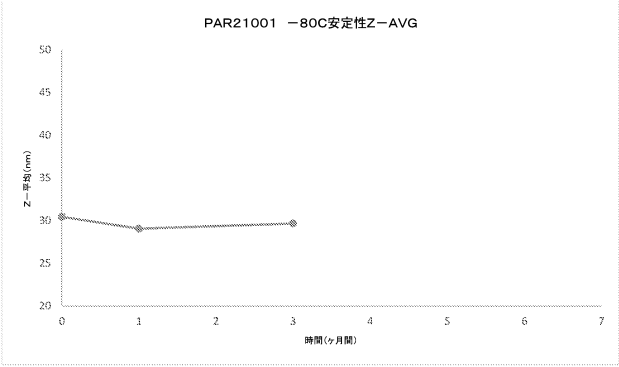


30

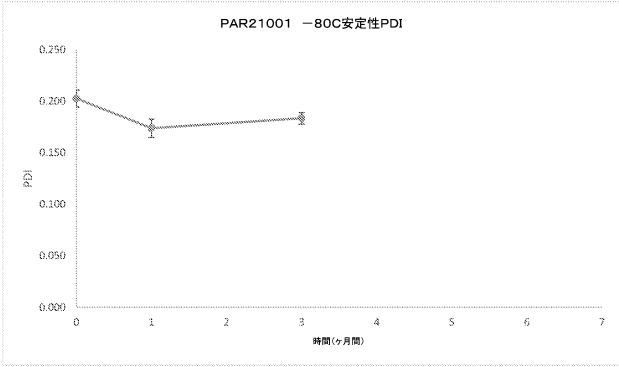
40

50

【図 1 4 A】

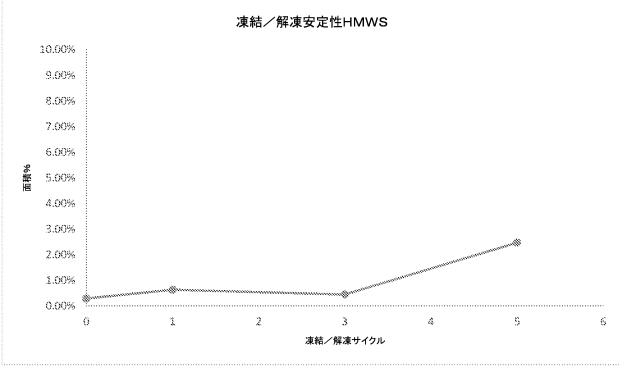


【図 1 4 B】

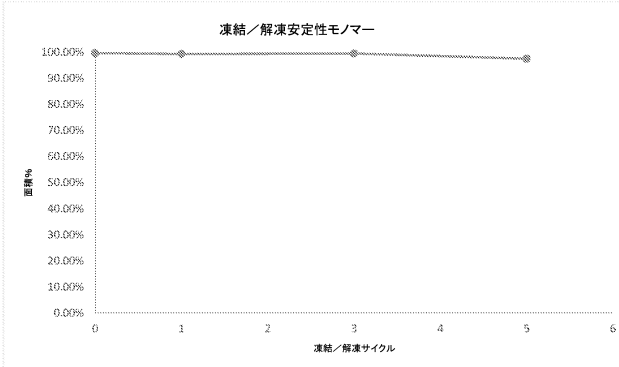


10

【図 1 5 A】

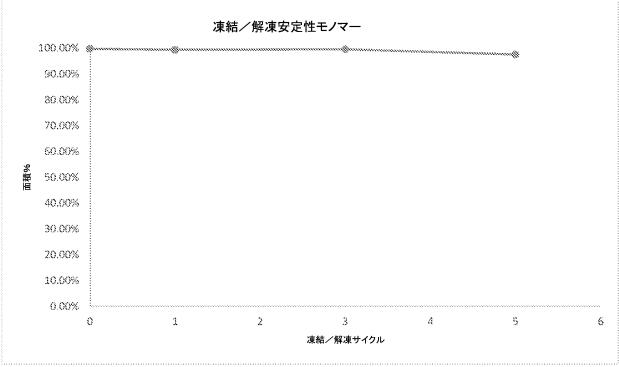


【図 1 5 B】

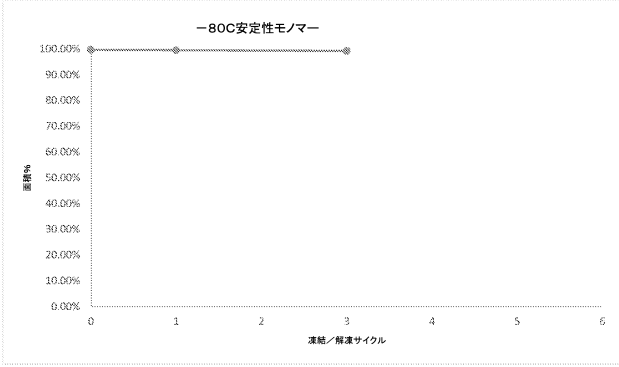


20

【図 1 6 A】



【図 1 6 B】



30

40

50

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US21/44955

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC - A61K 9/19; C12N 7/02 (2021.01)

CPC - A61K 9/19; A61K 48/0091; C12N 7/02

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)

See Search History document

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

See Search History document

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

See Search History document

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2001/066137 A1 (MERCK & CO INC) 13 September 2001; page 3, lines 4-10; page 7, lines 29-30; page 8, lines 10-11; page 9, lines 6-15; page 11, lines 13-25	1-5
X	WO 2020/023612 A1 (VOYAGER THERAPEUTICS INC) 30 January 2020; paragraphs [0022]-[0023], [0037], [0041], [0058], [0288], [0355], [0366], [0372]; claims 41, 45-46, 61, 69, 79, 81, 75, 77; figure 3	13-15, 28-31

☐ 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

"D" document cited by the applicant in the international application

"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

12 October 2021 (12.10.2021)

Date of mailing of the international search report

Nov 23 2021

Name and mailing address of the ISA/US

Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents
P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450
Facsimile No. 571-273-8300

Authorized officer

Shane Thomas

Telephone No. PCT Helpdesk: 571-272-4300

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 2019)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US21/44955

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☒ Claims Nos.: 6-12, 16-27, 32-45
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

フロントページの続き

(51)国際特許分類

A 6 1 K **9/51 (2006.01)**
C 1 2 N **15/864 (2006.01)**

F I

A 6 1 K **9/51**
C 1 2 N **15/864** **1 0 0 Z**

テーマコード (参考)

,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,D
 K,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,MK,MT,NL,NO,PL,PT,RO,RS,SE,SI,SK,SM,TR),O
 A(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,B
 B,BG,BH,BN,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DJ,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD
 ,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IR,IS,IT,JO,JP,KE,KG,KH,KN,KP,KR,KW,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LU,
 LY,MA,MD,ME,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,Z
 W

(特許庁注：以下のものは登録商標)

1. B R I J

弁理士 三橋 規樹

(72)発明者 トムコウィクズ, ブライアン, イー.

アメリカ合衆国 ペンシルベニア州 1 9 4 7 7, スプリング ハウス, マッキーン ロード 1 4 0 0

(72)発明者 エルコリノ, マシュー, ピー.

アメリカ合衆国 ペンシルベニア州 1 9 4 7 7, スプリング ハウス, マッキーン ロード 1 4 0 0

(72)発明者 スパグノル, ステファン, ティー.

アメリカ合衆国 ペンシルベニア州 1 9 4 7 7, スプリング ハウス, マッキーン ロード 1 4 0 0

(72)発明者 マハパトラ, サクヤ, シング

アメリカ合衆国 ペンシルベニア州 1 9 4 7 7, スプリング ハウス, マッキーン ロード 1 4 0 0

(72)発明者 スミス, ジェフリー

アメリカ合衆国 ペンシルベニア州 1 9 4 7 7, スプリング ハウス, マッキーン ロード 1 4 0 0

F ターム (参考) 4C076 AA12 AA65 AA95 BB13 BB15 BB16 CC50 DD08E DD08F DD09E

DD09F DD50Z DD51Z DD60Z DD67 EE23E EE23F FF16 FF36 FF61