



## (12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 109952372 A

(43)申请公布日 2019.06.28

(21)申请号 201780070621.9

(74)专利代理机构 永新专利商标代理有限公司  
72002

(22)申请日 2017.09.15

代理人 张晓威

(30)优先权数据

16189276.5 2016.09.16 EP

(51)Int.Cl.

C12N 7/00(2006.01)

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

A61K 9/00(2006.01)

2019.05.15

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/EP2017/073370 2017.09.15

(87)PCT国际申请的公布数据

W02018/050872 EN 2018.03.22

(71)申请人 白血球保健股份有限公司

地址 德国慕尼黑

(72)发明人 K·克姆特 M·肖尔茨

权利要求书1页 说明书41页 附图30页

### (54)发明名称

获得有效用于疫苗接种或基因治疗的基于病毒载体的组合物的新方法

### (57)摘要

本发明涉及用于制备基于病毒载体的组合物的方法,其中存在于组合物中的基于病毒载体的颗粒具有多分散性指数(PDI)小于0.5的粒度分布,所述方法包括以下步骤:(a)提供复制缺陷病毒载体;(b)提供溶液,所述溶液包含至少一种糖和选自亲水性赋形剂和两亲性赋形剂的至少三种不同的赋形剂,其中所述赋形剂的特征在于极性、脂肪族、芳香族、带负电和/或带正电的官能团,并且其中所述溶液的特征进一步在于赋形剂-糖的比率为至少1:2;和(c)将步骤(a)的所述复制缺陷病毒载体与步骤(b)的所述溶液混合。本发明还涉及可通过本发明的方法获得的基于病毒载体的组合物,以及本发明的基于病毒载体的组合物,其用作初免-加强疫苗。

1. 用于制备基于病毒载体的组合物的方法,其中存在于所述组合物中的基于病毒载体的颗粒具有多分散性指数(PDI)小于0.5的粒度分布,所述方法包括以下步骤:

(a) 提供复制缺陷病毒载体;

(b) 提供溶液,所述溶液包含至少一种糖和选自亲水性赋形剂和两亲性赋形剂的至少三种不同的赋形剂,其中所述赋形剂的特征在于极性、脂肪族、芳香族、带负电和/或带正电的官能团,并且其中所述溶液的特征进一步在于赋形剂-糖的比率为至少1:2(w/w);和

(c) 将步骤(a)的所述复制缺陷病毒载体与步骤(b)的所述溶液混合。

2. 权利要求1的方法,其中制备所述基于病毒载体的组合物用于作为液体储存。

3. 权利要求1的方法,其还包括干燥步骤(c)中获得的组合物的步骤(d)。

4. 权利要求3的方法,其还包括重构权利要求3中获得的组合物的步骤(e)。

5. 权利要求1、3和4中任一项的方法,其中所述组合物通过冷冻干燥、喷雾干燥、喷雾冷冻干燥或超临界干燥来干燥。

6. 根据权利要求1至5中任一项所述的方法,其中所述病毒载体选自MVA、腺病毒、腺相关病毒(AAV)、慢病毒、水疱性口炎病毒(VSV)或疱疹病毒。

7. 根据权利要求1至6中任一项所述的方法,其中所述复制缺陷病毒载体是病毒样颗粒。

8. 根据权利要求1至7中任一项所述的方法,其还包括添加抗原多肽。

9. 根据权利要求1至8中任一项所述的方法,其还包括添加至少一种佐剂。

10. 根据权利要求1至9中任一项所述的方法,其中(a)的所述复制缺陷病毒载体是从细胞培养物中收集并纯化后立即重构的复制缺陷病毒载体。

11. 根据权利要求1至10中任一项所述的方法获得或可获得的基于病毒载体的组合物。

12. 权利要求11的基于病毒载体的组合物,其用作初免-加强疫苗。

13. 根据权利要求10至12中任一项所述的基于病毒载体的组合物,其中所述基于病毒载体的组合物用于肌内、皮下、皮内、透皮、口服、经口、经鼻和/或吸入施用。

14. 权利要求1的方法,其中在加工和储存期间保持囊膜病毒载体的PDI值较小 $<0.5$ ,优选 $<0.3$ ,更优选 $<0.2$ ,最优选 $<0.1$ 。

15. 权利要求1的方法,其中在加工和储存期间保持无囊膜病毒载体的PDI值较小 $<0.3$ ,优选 $<0.2$ ,更优选 $<0.1$ ,最优选 $<0.05$ 。

## 获得有效用于疫苗接种或基因治疗的基于病毒载体的组合物的新方法

[0001] 本发明涉及用于制备基于病毒载体的组合物的方法,其中存在于组合物中的基于病毒载体的颗粒具有多分散性指数(PDI)小于0.5的粒度分布,所述方法包括以下步骤:(a)提供复制缺陷病毒载体;(b)提供溶液,所述溶液包含至少一种糖和选自亲水性赋形剂和两亲性赋形剂的至少三种不同的赋形剂,其中所述赋形剂的特征在于极性、脂肪族、芳香族、带负电和/或带正电的官能团,并且其中所述溶液的特征进一步在于赋形剂-糖的比率为至少1:2;和(c)将步骤(a)的所述复制缺陷病毒载体与步骤(b)的所述溶液混合。本发明还涉及可通过本发明的方法获得的基于病毒载体的组合物,以及本发明的基于病毒载体的组合物,其用作初免-加强疫苗。

[0002] 在本说明书中,引用了许多文件,包括专利申请和生产商手册。这些文件的公开内容以其整体援引加入本文,但不被认为与本发明的专利性有关。更具体地,所有参考文件援引加入,相同的程度如同明确地且单独地指出各单独文件援引加入。

[0003] 复制缺陷重组病毒载体代表疫苗开发和基因治疗的快速发展领域。当打算用于疫苗接种时,病毒载体和病毒样颗粒(VLP)相比传统疫苗提供一系列优势。除了诱导特异的抗体应答外,它们还引发细胞毒性T淋巴细胞(CTL),其对控制细胞内病原体和癌症至关重要,是基于蛋白质的疫苗未观察到的特征[Rollier CS等人,2011]。许多病毒种已被评价为疫苗的重组载体,包括反转录病毒、慢病毒、痘苗病毒(例如,修饰的安卡拉痘苗病毒;MVA)、腺病毒、腺相关病毒、巨细胞病毒、仙台病毒、麻疹病毒和水疱性口炎病毒(VSV)。然而,迄今为止评价最广泛的载体是5型腺病毒和痘病毒家族的成员[Rollier CS等人,2011,Ura T等人,2014]。

[0004] 与病毒载体相关的缺点,特别是在制备、储存和分配方面,是它们是高分子的复杂超分子集合体,其易于各种化学和物理降解途径[Vrdoljak A等人,2012]。因此,该领域的主要挑战是减少(避免)邻近病毒颗粒的交联和载体颗粒相互作用,这通常在生产、储存和应用的不同阶段通过各种机制在宽范围的浓度下引起。病毒载体在组合物中的不同形状和大小的颗粒团聚的这种固有趋向导致病毒颗粒的不均匀粒度分布和关联的多分散性增加。最终,这些作用导致治疗效果的显著丢失,甚至可能在注射部位产生不良反应,其最可能是由于所述颗粒团聚导致观察到的粘度增加。此外,病毒载体的聚集也被认为影响给药后的生物分布,并且与蛋白质药物类似,病毒载体的聚集可通过靶向载体至抗原呈递细胞而增加不期望的免疫原性,从而诱导或增强不期望的对表面蛋白或蛋白衣壳和转基因产品的免疫应答。由于高多分散性与高粘度相关,预期未显示出这样的不期望的多分散性的组合物也会导致更好的可灌注性和可注射性。因此,非常需要具有低多分散性并且在载体颗粒分布和功能效力之间具有更合适比率的改进的基于病毒载体的疫苗。

[0005] 当病毒载体打算用作基因转移疗法时,类似的考虑适用。病毒载体已成为临床基因治疗的安全有效的递送载体,如一系列临床研究所示,尤其是单基因隐性病症,但也适用于某些特发性疾病(参见例如Kotterman MA等人,Viral Vectors for Gene Therapy: Translational and Clinical Outlook. Annu Rev Biomed Eng. 2015 Dec 7;17:63-89)。这

些临床研究是基于将低遗传毒性和免疫原性与高效递送组合的载体进行的,包括基于腺相关病毒和慢病毒的载体,其越来越能使临床成功。基于病毒载体的临床治疗策略的重要实例包括例如,干细胞疗法、粘液粘稠病、血友病、遗传性视网膜病或囊性纤维化(Collins M, Thrasher A, Gene therapy: progress and predictions. Proc Biol Sci. 2015; 282)。通常,用于这样的基因转移治疗的病毒载体包括反转录病毒、腺病毒、腺相关病毒(AAV)和单纯疱疹病毒。

[0006] 同样就基因转移治疗而言,避免不期望的多分散性以获得基因转移载体的载体颗粒分布与功能效力之间的更合适比率对于有效的宿主细胞感染和随后的基因表达是必要的。特别是,体内给药基因治疗性病毒载体至某些部位,诸如中枢神经系统,期望需要少量高浓度的病毒载体,特征是最大可实现剂量可能受低载体溶解度的固有性质限制。因此,目前仍然存在必须克服的实质性递送挑战,以将迄今为止实现的成功扩展到各种各样的疾病;这些挑战包括开发技术以规避预存免疫、确保更有效地转导治疗相关细胞类型、靶向递送和确保基因组保持。

[0007] 用于疫苗或基因转移治疗的基于病毒的病毒载体组合物的制剂开发是相当困难的,主要是由于其复杂的分子结构。因此,基于病毒载体的药物组合物的制剂开发是相对较新的研究领域,并且仅报道了少数描述了系统努力以优化病毒载体制剂和稳定性的研究和专利申请。载体稳定性的一个重要方面是载体纯化、制备和储存期间的溶解度。

[0008] 美国专利申请US7704721描述了防止使用超速离心和/或色谱法纯化的重组腺相关病毒(AAV)病毒粒子聚集的组合物和方法,其通过添加一种或多种高浓度多价离子盐以生产病毒粒子制剂,但其与预期靶组织是等渗的。使用高价盐(诸如柠檬酸钠)实现高离子强度和适度渗透性的这种组合。通过这种方式每毫升高达 $6.5 \times 10^{13}$ 个病毒颗粒的用于基因治疗的高浓度AAV原液制剂可以被制备并储存而不会聚集。即使在10此冷冻/解冻循环后,通过动态光散射(DSL)也未观察到聚集。表面活性剂Pluronic F68可以0.001%加入,以防止处理期间病毒粒子丢失至表面。还可以用核酸酶处理病毒例子制剂以消除病毒粒子表面上加剧聚集的小核酸链。US7704721中描述的这些AAV组合物的高特异性制剂是有意衍生自AAV病毒粒子的特定固有结构条件,并且需要存在大量的多价离子和表面活性剂以及另外的核酸酶处理。因此,这些制剂不能简单地一般地转移到具有许多不同性质的其它基于病毒载体的组合物中。相反,需要根据各自单独的性质对各新的基于病毒载体的组合物进行单独调整。

[0009] WO 2009022174描述了非聚集病毒制剂,其包含病毒(优选腺病毒)、多元醇(优选甘油)和两性离子化合物(优选HEPES)。另外,描述了使用动态光散射(DLS)的病毒聚集的试验,其包括在组合物反复冷冻和解冻循环并在环境温度下储存后,分析样品中病毒颗粒的大小,其中颗粒在与多元醇的混合物中,并从大小确定样品是否基本上仅含有可接受的非聚集的颗粒。在该文献中得出结论,该组合物可以用于广范的病毒,优选腺病毒。尽管WO 2009022174描述了非聚集病毒制剂,但所述制剂必须包含甘油和缓冲剂,如所公开的两性离子缓冲物质HEPES。然而,使用诸如甘油的多元醇有与不期望的粘度的增加有关的缺点,其接着导致疫苗的不利的可灌注性和可注射性。使用缓冲物质HEPES有另外的缺点,即由于暴露于环境光和随后形成过氧化氢而可能出现的光毒性效应。

[0010] US 7888096描述了液体和冻干的腺病毒制剂,就感染性而言,在4℃下具有改善的

长期储存稳定性。制备液体和冻干制剂用于基因治疗,通常使用反转录病毒、腺病毒或慢病毒。US7888096的作者强调颗粒必须保持其生物完整性才具有感染性。他们进一步描述了干燥制剂中使用填充剂用于冻干(甘露醇)、冷冻保护剂(蔗糖)、冻干保护剂(人血清白蛋白)、几种缓冲剂和盐。US7888096中描述的液体制剂包含缓冲剂和多元醇,并且在纯化过程中需要另外的核酸酶处理以防止聚集。如上所述,多元醇可增加疫苗产品中不期望的粘度。然而,核酸酶有其可能在体内发挥不期望作用的缺点。

[0011] WO 2015040234描述了药物腺病毒制剂,其用于基因治疗以及疫苗中,特别是液体药物制剂,其包含腺病毒、组氨酸缓冲液、海藻糖、盐和非离子去污剂,其中pH为6-7。已显示所得制剂保留含有腺病毒的数量、效价(感染性)和质量,从而与本领域已知的其它制剂相比改善了整体腺病毒的稳定性。根据WO 2015040234的腺病毒制剂适于在2℃至8℃下长期储存超过6个月,其包含滴度为 $1 \times 10^7$ 至 $1 \times 10^{13}$ 个病毒颗粒/毫升的腺病毒。然而,所述腺病毒制剂的存储稳定性的分析仅基于qPCR分析和基于细胞培养的感染性试验的组合。使用动态光散射(DLS)分析的热熔融试验用于分析随温度升高的腺病毒衣壳的熔融温度。然而,没有检测多分散性指数的伴随变化。此外,也未测定经纯化和储存后多分散性指数的变化。然而,尽管总结了腺病毒载体的几种物理和化学不稳定性(例如,聚集、脱酰胺、氧化、降解等)并讨论了所产生的挑战,特别是在腺病毒载体的稳定化和制剂开发中,WO 2015040234中提及的不稳定性对蛋白质是很典型的。因此,所述稳定制剂没解决更复杂的VLP和/或病毒载体以及其聚集倾向,其结果是悬浮液中更高的多分散性。

[0012] US20100124557描述了液体组合物或液体-冷冻组合物,其包含修饰的安卡拉痘苗病毒(MVA)或其衍生物以及作为组合物的唯一稳定剂的甘露醇。甘露醇已显示在0℃至10℃温度的液体状态下和在-10至-30℃温度的液体-冷冻状态下发挥稳定作用。在基于细胞培养的感染性试验中仅分析甘露醇制剂中的MVA病毒的储存稳定性。然而,没有分析经制备和储存后导致感染性功能丢失的粒度分布曲线和相应的多分散性指数的变化。

[0013] WO 2013001034描述了使用病毒产生病毒或细菌抗原。描述了病毒表面分子的稳定化,从而能够延长可复制型病毒的储存和感染性。另外,描述了如果组合物包含氨基酸,则即使在照射后蛋白质的抗原性也得以保持。然而,没有解决悬浮液中非复制型VLP或病毒载体的多分散性增加的问题。

[0014] 所有这些方法的共同之处在于解决病毒或病毒蛋白质的稳定性。例如,维持可复制型病毒中病毒蛋白质(如细胞靶分子的配体)的分子完整性对细胞感染是重要的。此外,相关病毒蛋白质的抗原性在疫苗开发中受到关注。然而,除了这些生物学功能外,悬浮液中颗粒的物理特征代表了基于VLP和/或病毒载体的疫苗生产中的重要方面。迄今为止,尚未解决避免包含VLP和/或病毒载体的组合物的多分散性增加以及由此降低疫苗接种或基因转移功效的问题。

[0015] 因此,尽管目前正在投入大量努力来开发新的疫苗或基因转移治疗剂的事实,但仍需要提供以低的和中等的多分散性指数为特征的改进的组合物,从而组合物中的感染性颗粒与非感染性大颗粒或颗粒团聚物之间的比率更高。降低多分散性的结果是可以增加疫苗或基因转移方法的功效,从而导致成本减少以及注射部位和体内不良事件的减少。

[0016] 通过提供权利要求中表征的实施方案来解决这种需要。

[0017] 因此,本发明涉及用于制备基于病毒载体的组合物的方法,其中存在于组合物中

的基于病毒载体的颗粒具有多分散性指数(PDI)小于0.5的粒度分布,所述方法包括以下步骤:(a)提供复制缺陷病毒载体;(b)提供溶液,所述溶液包含至少一种糖和选自亲水性赋形剂和两亲性赋形剂的至少三种不同的赋形剂,其中所述赋形剂的特征在于极性、脂肪族、芳香族、带负电和/或带正电的官能团,并且其中所述溶液的特征进一步在于赋形剂-糖的比率为至少1:2(w/w);和(c)将步骤(a)的所述复制缺陷病毒载体与步骤(b)的所述溶液混合。

[0018] 病毒载体通常用于在体内或体外将遗传物质递送到细胞中。病毒可以有效地将其基因组运输到宿主细胞内。病毒样颗粒类似病毒,非感染性并且不含病毒遗传物质。病毒结构蛋白(诸如包膜或衣壳)的表达可导致病毒样颗粒(VLP)的自组装。源自乙型肝炎病毒的VLP可以由HBV表面抗原(HBsAg)组成(Hyakumura M.等人,J.Virol.89:11312-22,2015)或来自HBV核心(Sominskaya I.等人PLOS One 8:e75938)。VLP由各种病毒家族(包括细小病毒科(例如,腺相关病毒)、反转录病毒(例如,HIV)、黄病毒科(例如,丙型肝炎病毒)和噬菌体(例如Q $\beta$ ,AP205))的组分产生。VLP可以在不同的细胞培养体系中产生,包括细菌、哺乳动物、昆虫、酵母和植物细胞系。如本文所用的术语“基于病毒载体的组合物”涉及包含至少一种病毒载体的组合物。根据本发明,术语“病毒载体”涉及载体,即源自病毒的“载体”。根据本发明的“病毒载体”包括源自天然存在的或修饰的病毒以及病毒样颗粒(VLP)的载体。

[0019] 通常,用于开发病毒载体的起始材料是活病毒。因此,需要满足某些要求,诸如安全性和特异性,以确保它们适用于动物或人类患者。一个重要方面是避免病毒载体的不受控制的复制。这通常通过删除对病毒复制至关重要的病毒基因组的一部分来实现。这样的病毒可以感染靶细胞而不会随后产生新的病毒粒子。此外,病毒载体应该对靶细胞的生理学没有影响或只有极小的影响,并且不应发生病毒载体基因组的重排。源自天然存在或修饰的病毒的这样的病毒载体是本领域公知的,并且已在Lukashev AN和Zamyatnin AA的综述“Viral Vectors for Gene Therapy:Current State and Clinical Perspectives”,Front Mol Neurosci.2016;9:56以及Stoica L和Sena-Esteves M的综述“Adeno Associated Viral Vector Delivered RNAi for Gene Therapy of SOD1 Amyotrophic Lateral Sclerosis”,Front Mol Neurosci.2016Aug 2;9:56中描述。

[0020] 源自病毒样颗粒的载体也是本领域公知的,并且已经在例如Tegerstedt等人(Tegerstedt等人(2005),Murine polyomavirus virus-like particles (VLPs) as vectors for gene and immune therapy and vaccines against viral infections and cancer.Anticancer Res.25(4):2601-8.)中描述。VLP的一个主要优点是当活减毒病毒用作病毒载体时它们与任何可能的重组风险无关,因此,它们代表根据本发明的“复制缺陷病毒载体”。VLP生产具有另外的优点,即一旦感兴趣的特定病毒株的基因序列可获得,它可以比传统疫苗的生产更早开始。

[0021] VLP含有病毒表面蛋白的重复高密度展示,其呈递构象病毒表位,可引发强T细胞和B细胞免疫应答。VLP已被用于开发用于乙型肝炎和人乳头瘤病毒的FDA批准疫苗,此外,VLP已被用于开发针对奇昆古尼亚病毒的临床前疫苗。证据还表明针对流感病毒的VLP疫苗在预防流感病毒方面可能优于其它疫苗。在早期临床试验中,用于流感的VLP疫苗似乎提供针对甲型流感病毒亚型H5N1和1918流感的完全预防,如Quan FS等人的“Progress in developing virus-like particle influenza vaccines”.Expert Rev Vaccines.2016May 5:1-13所综述。

[0022] 高纯度和均匀的VLP可以配制成所谓的“脂质颗粒”，其含有高浓度的构象完整的感兴趣的膜蛋白。完整的膜蛋白参与多种生物学功能，并且被近50%的现有治疗药物靶向。然而，由于它们的疏水结构域，膜蛋白难以在活细胞外操作。脂质颗粒可包含多种结构完整的膜蛋白，包括G蛋白偶联受体(GPCR)、离子通道和病毒包膜。脂质颗粒可用作许多应用的平台，包括抗体筛选、免疫原的生产和配体结合试验。

[0023] 病毒样颗粒也可用作药物递送载体(Zdanowicz M和Chroboczek J,2016)。

[0024] 病毒结构蛋白(例如，包膜或衣壳中的结构蛋白)的存在可导致VLP的自组装。通常，VLP可以在多种细胞培养体系中产生，包括哺乳动物细胞系、昆虫细胞系、酵母和植物细胞，VLP由不同病毒家族(包括细小病毒科(例如，腺相关病毒)、反转录病毒(例如，HIV)和黄病毒科(例如，丙型肝炎病毒))产生。例如，源自乙型肝炎病毒并且由小的源自HBV的表面抗原(HBsAg)组成的VLP已描述于Sominskaya I等人Construction and immunological evaluation of multivalent hepatitis B virus(HBV) core virus-like particles carrying HBV and HCV epitopes.Clin Vaccine Immunol.2010Jun;17:1027-33。

[0025] 根据本发明，术语“病毒载体”包括但不限于(i)由一种特定类型的病毒载体代表的病毒载体，或(ii)不同分子类型的病毒载体的病毒载体混合物。

[0026] 任选地，组合物可包含能够改变病毒载体特征的其它分子。例如，这样的其它分子可用于稳定、调节和/或增强病毒载体的功能。通过本发明的方法制备的基于病毒载体的组合物可以是固体或液体形式，并且尤其可以是(a)粉末、(a)片剂或(a)溶液形式。

[0027] 根据本发明制备的基于病毒载体的组合物的特征进一步在于，包含于组合物中的颗粒具有多分散性指数(PDI)小于0.5的粒度分布。

[0028] 如本文所用，术语“颗粒”涉及代表根据本发明制备的组合物的主要活性成分的病毒载体。根据本发明，术语“粒度分布”指根据大小存在的颗粒的相对量。通常，相对量通过质量测定。

[0029] 根据本发明，粒度分布用多分散性指数(PDI)表示。多分散性和多分散性指数是除了通常测定的主要参数(即，颗粒的粒径和流体动力学直径)外，通过动态光散射(DLS)测量的表征分散体或溶液的参数。DLS测量由颗粒(如经历随机布朗运动(扩散)的病毒颗粒或蛋白质)产生的散射强度的随时间的波动。当光照射到移动的颗粒上时，单色光束(如激光束)在具有布朗运动的颗粒的溶液中引起多普勒频移，从而改变入射光的波长(通常在633nm处的红光或在830nm处的近红外线)，这种改变与颗粒的大小有关。液体中的颗粒随机移动，其运动用于确定颗粒的大小：小颗粒移动快，导致更快的强度波动，而大颗粒移动慢，导致更缓的强度波动。

[0030] 由测量的强度波动来构建随时间的自相关函数，并将该相关曲线拟合到指数函数，通过计算布朗分子运动的扩散系数来描述介质中的颗粒运动。随后可以通过使用Stokes-Einstein方程计算颗粒的流体动力学直径。对于多分散样品，该曲线是指数衰减的总和。多分散性指数(PDI)是来自DLS测量的强度自相关函数的累积量分析的参数，最初引自D.E.Koppel, The Journal of Chemical Physics 57(11);1972;pp:4814-20。在累积量分析中，通过实施DLS软件，假设遵循高斯分布的单个大小群体，将单指数拟合应用到所得到的自相关函数。多分散性指数以如下方式与假定粒径群体的假设高斯分布的标准偏差( $\sigma$ )相关：

[0031]  $PDI = \sigma^2 / Z_D^2$ ,

[0032] 其中 $Z_D$ 是Z-平均大小或累积量平均值,是颗粒的整体集合的强度加权平均流体动力学大小,代表多分散样品情况下的几个种类的平均值(Stephens, RFT等人(2009). "Dispersity in Polymer Science" Pure Appl. Chem. 81 (2): 351-353)。

[0033] 计算的多分散性指数是无量纲参数,代表溶液中粒度分布的宽度。PDI值在0.1至0.2之间对应于窄粒度分布,近似代表单分散粒度分布。PDI值约为0.3表示粒度分布的宽度增加,其含有增多数量的不同颗粒群体。值在0.5至0.7代表非常宽的粒度分布,其含有非常大的颗粒或聚集体。PDI值大于0.7表明样品具有非常宽的粒度分布并且可能含有大颗粒或聚集体。也就是说,PDI值越低,感染性病毒颗粒种类的存在越主要,即具有窄粒径且没有或仅有少量聚集体的病毒颗粒种类,因此,可以实现更高功效的病毒载体组合物。

[0034] 根据本发明,PDI小于0.5。如上所述,该PDI表明粒度分布范围从几乎单分散到中等多分散,感染性颗粒为主要种类,且仅有少部分大颗粒或团聚物,或甚至没有任何大颗粒或团聚物。优选地,PDI小于0.3,更优选地小于0.2,且最优选地小于0.1。

[0035] 根据本发明和应用实施例5,对于囊膜病毒,例如MVA,优选的PDI值小于0.5,对于无囊膜病毒,例如腺病毒,优选的PDI值小于0.3。此外,优选在病毒载体加工、制备和分配阶段期间保持上述PDI值。

[0036] 本发明的方法包括第一步骤(a)提供复制缺陷病毒载体。

[0037] 复制缺陷病毒载体是不能在宿主细胞中复制以产生新病毒颗粒的病毒载体。例如,病毒载体可通过经验和合理的衰减过程导致其基因组的重要部分丢失而丧失其复制能力,伴随有(i)保留其感染几种细胞类型的能力,和(ii)保留其免疫原性。根据本发明,VLP也属于术语“复制缺陷病毒载体”。

[0038] 由于缺乏复制能力,复制缺陷病毒载体代表了诱导效应细胞介导的免疫和体液免疫的安全和稳健机制。因此,用这些载体初免可以改善这样的应答的大小、质量和持久性,同时提供增加的安全性。

[0039] 用于疫苗制备的合适的复制缺陷病毒载体是本领域公知的。例如,Verheust C.等人(Vaccine 30,2012)提供了关于基于修饰的安卡拉痘苗病毒(MVA)的载体的综述,Rosewell A等人(J Genet Syndr Gene Ther,2011)提供了关于辅助病毒依赖型腺病毒载体的综述,和Mulder AM等人(PlosOne 7,2012)提供了关于基于重组VLP的疫苗的综述。在本领域中通常应用的选择合适的疫苗载体用于疫苗生产的考虑因素加以必要的改变后适用于根据本发明选择合适的病毒载体用于疫苗生产。因此,本领域已有的病毒载体以及新的病毒载体可用于要求保护的方法中。优选地,复制缺陷病毒载体选自MVA、腺病毒、腺相关病毒、慢病毒、水疱性口炎病毒、单纯疱疹病毒或麻疹病毒。最优选地,复制缺陷病毒载体是修饰的安卡拉痘苗病毒(MVA)或腺病毒。

[0040] 复制缺陷病毒载体可以是新制备的,例如从细胞培养物收集后重构,或可以是作为预先制备的组合物提供,例如,来自商业来源。

[0041] 在第二步骤(b)中,该方法包括提供溶液,所述溶液包含至少一种糖和选自亲水性赋形剂和两亲性赋形剂的至少三种不同的赋形剂,其中所述赋形剂的特征在于极性、脂肪族、芳香族、带负电和/或带正电的官能团。

[0042] 根据本发明,溶液可以是水溶液或非水溶液。在本发明的上下文种,术语“水溶液”



一方面指水,另一方面还延伸至可与水混溶的缓冲溶液和亲水溶剂,因此能够形成均匀相。水溶液的实例包括但不限于水、甲醇、乙醇或高级醇以及其混合物。非水溶剂的非限制性实例包括二甲基亚砷(DMSO)、乙苯和其它极性溶剂。

[0043] 如根据本发明所用,术语“包含”表示除了具体所述步骤和/或组分外还可包括其它步骤和/或组分。然而,该术语还包括所要求保护的主体恰好由所述步骤和/或组分组成。

[0044] 在根据本发明方法的步骤(b)的溶液中可包含的其它组分的非限制性实例包括例如,水,氨基酸,缓冲剂诸如磷酸盐、柠檬酸盐、琥珀酸盐、乙酸、组氨酸、甘氨酸、精氨酸和其它有机酸或其盐;抗氧化剂诸如抗坏血酸、甲硫氨酸、色氨酸、半胱氨酸、谷胱甘肽,螯合剂诸如乙二胺四乙酸(EDTA);配对离子诸如钠;和/或非离子表面活性剂诸如聚山梨酯、泊洛沙姆,或PEG或其它溶剂。优选地,溶液不含有除作为病毒载体一部分的(病毒)蛋白质以及以上包括的药物载体形式组分外的任何蛋白质。

[0045] 根据本发明方法的步骤(b)的溶液还包含至少一种糖。

[0046] 如本文所用,术语“糖”指任何类型的糖,即碳水化合物的单糖、二糖或寡糖形式以及糖醇。合适的糖的实例包括但不限于海藻糖、蔗糖(saccharose)、蔗糖(sucrose)、葡萄糖、乳糖、甘露醇和山梨醇,或糖衍生物,诸如氨基糖,例如葡糖胺或n-乙酰基葡糖胺。

[0047] 如本文所用,术语“至少”指具体列举的量或数量,但也指超过具体列举的量或数量。例如,术语“至少一种”还包括至少2、至少3、至少4、至少5、至少6、至少7、至少8、至少9、至少10,诸如至少20、至少30、至少40、至少50等。此外,该术语还包括恰好1、恰好2、恰好3、恰好4、恰好5、恰好6、恰好7、恰好8、恰好9、恰好10、恰好20、恰好30、恰好40、恰好50等。

[0048] 还会理解,术语“一种糖”指一种类型的糖,并不将该特定类型糖的分子数限定为一个。此外,在包含多于一种糖的那些情况下,如两种糖,涵盖两种不同类型的糖。优选地,溶液恰好包含一种类型的糖,优选海藻糖。

[0049] 根据本发明的溶液中包含的糖的优选量为0.1mg/ml至200mg/ml糖,更优选为10mg/ml至180mg/ml糖,甚至更优选为20mg/ml至160mg/ml糖,最优选的量为约80mg/ml糖。当使用不同类型的糖的混合物时,这些优选的量指溶液中所有糖的总和。

[0050] 如本文所用,术语“约”包含明确列举的值以及由此的小偏差。换句话说,“约80mg/ml”的糖的量包括但不必恰好是所述的80mg/ml的量,但可相差几mg/ml,因此包括例如92mg/ml、84mg/ml、88mg/ml、76mg/ml、72mg/ml或68mg/ml。本领域技术人员知道,这样的值是不需要完全精确的相对值,只要该值大致对应于所列举的值即可。因此,术语“约”包含与所述值的偏差,例如15%,更优选10%和最优选5%。这些偏差为15%,更优选10%和最优选5%适用于其中使用术语“约”的本发明的所有实施方案。

[0051] 优选地,糖的量恰好为80mg/ml。

[0052] 根据本发明,根据本发明方法的步骤(b)的溶液还包含选自亲水性赋形剂和两亲性赋形剂的至少三种不同的赋形剂,其中赋形剂的特征在于极性、脂肪族、芳香族、带负电和/或带正电的官能团。

[0053] 赋形剂在本领域中是公知的。赋形剂定义为包括在组合物(如药物组合物)中的成分,连同活性剂一起。由于一些原因,它们通常被添加到制剂中,因此,作为制剂一部分,一些赋形剂可能具有一种以上的作用或目的。它们的主要功能之一是稳定剂。这样的稳定剂在药物制剂中的主要功能是保护生物活性剂免受在分离、纯化、干燥(例如,通过冷冻干燥、

喷雾干燥、喷雾冷冻干燥或泡沫干燥)、储存(在溶液中或干燥后)以及干燥后重构期间施加于所述生物活性剂(如蛋白质或病毒载体)的不同类型的压力。存在稳定生物活性剂的特定机制,其与制剂中的赋形剂具体相关。例如,通过增强稳定力、通过变性状态的去稳定作用或通过将赋形剂与生物活性剂直接结合来实现稳定化。经常使用的作为生物活性剂的稳定剂的赋形剂包括但不限于糖、多元醇、氨基酸、胺、盐、聚合物和表面活性剂,其每一种都可发挥不同的稳定作用。

[0054] 赋形剂的非限制性实例选自亲水性赋形剂和两亲性赋形剂,其中所述赋形剂的特征进一步在于具有极性、脂肪族、芳香族、带负电和/或带正电的官能团,根据国际药典分类作为用于基于病毒载体的组合物的安全赋形剂在下表1中所示。

[0055]

$\alpha$ -生育酚
DL- $\alpha$ -生育酚
1,2-二肉豆蔻酰基-SN-甘油-3-(磷酸-S-(1-甘油))
1,2-二肉豆蔻酰基-SN-甘油-3-磷酸胆碱
1,2-二硬脂酰基-SN-甘油-3-(磷酸-外消旋-(1-甘油))
1,2-二硬脂酰基-SN-甘油-3-磷酸胆碱
乙酸
冰醋酸
乙酸酐

[0056]

丙酮合亚硫酸氢钠
乙酰化甘油单酯
DL-乙酰色氨酸
活性炭
己二酸
丙氨酸
白蛋白聚集
白蛋白胶体
人白蛋白
乙醇
无水乙醇
变性乙醇
稀释乙醇
乙酸铵
氢氧化铵
硫酸铵
无水柠檬酸
无水葡萄糖
无水乳糖
无水柠檬酸三钠
精氨酸
抗坏血酸
天冬氨酸
苯扎氯铵
苯磺酸
苄索氯铵
苯甲酸
苯甲醇
苯甲酸苄酯
氯化苄
双巴西肽 (BIBAPCITIDE)
硼酸
溴克利那
丁基羟基苯甲醚
丁基羟基甲苯
对羟基苯甲酸丁酯
钙
氯化钙
葡庚糖酸钙
氢氧化钙
考布曲钙
卡地胺钠
钙塞酸三钠

[0057]

卡特利多钙
磺丁基环糊精 (CAPTISOL)
二氧化碳
羧甲基纤维素
羧甲基纤维素钠，非指定形式
蓖麻油
微晶纤维素
氯丁醇
半水合氯丁醇
无水氯丁醇
胆固醇
柠檬酸盐
柠檬酸
柠檬酸一水合物
含水柠檬酸
玉米油
棉籽油
肌酸
肌酸酐
甲酚
交联羧甲基纤维素钠
交联聚维酮
半胱氨酸
半胱氨酸盐酸盐
达伐吡啶
脱氧胆酸
右旋糖酐
右旋糖酐 40
葡萄糖
葡萄糖一水合物
葡萄糖溶液
泛影酸
二乙醇胺
医用二甲基硅油 360
二甲基亚砷
DL-双棕榈酰磷脂酰甘油
柠檬酸氢二钠
磺基水杨酸二钠
地索苯宁
DL-二硬脂酰基磷脂酰胆碱
多库酯钠
依地酸钙二钠
依地酸二钠

[0058]

无水依地酸二钠
依地酸钠
蛋磷脂
乙醇胺盐酸盐
乙酸乙酯
乙二胺
乙烯-醋酸乙烯酯共聚物
依沙美肟
氯化铁
果糖
氧化钐
$\gamma$ -环糊精
明胶
龙胆酸
龙胆酸乙醇酰胺
龙胆酸乙醇胺
葡庚糖酸钠
葡庚糖酸钠二水合物
葡萄糖酸内酯
葡萄糖醛酸
谷胱甘肽
甘油
甘氨酸
甘氨酸盐酸盐
盐酸胍
羟乙基淀粉
己基间苯二酚
组氨酸
人白蛋白微球
透明质酸钠
盐酸
稀释盐酸
羟乙基哌嗪乙烷磺酸
羟丙基 $\beta$ -环糊精
碘
碘沙酸
盐酸碘非他胺
异亮氨酸
异丙醇
等渗氯化钠溶液
DL-乳酸
L-乳酸
乳酸，非指定形式

[0059]

乳糖酸
乳糖一水合物
含水乳糖
乳糖，非指定形式
卵磷脂
蛋卵磷脂
氢化大豆卵磷脂
亮氨酸
利多苯宁
赖氨酸
醋酸赖氨酸
氯化镁
硬脂酸镁
马来酸
甘露醇
甲溴苯宁
亚甲基双磷酸氢钠
亚甲磷酸
葡甲胺
间甲酚
偏磷酸
甲磺酸
甲硫氨酸
甲基吡咯烷酮
甲基硼酸
甲基纤维素
亚甲蓝
对羟基苯甲酸甲酯
咪吡氯铵
一硫代甘油
N-(氨基甲酰基-甲氧基 PEG-40)-1,2-二硬脂酰-脑磷脂钠
N,N-二甲基乙酰胺
烟酰胺
1,2-环己二酮二肟
硝酸
氮
辛酸
奥昔膦酸二钠
羟喹啉
棕榈酸
花生油
PEG 植物油
PEG-20 山梨坦异硬脂酸酯

[0060]

PEG-40 蓖麻油
PEG-60 蓖麻油
PEG-60 氢化蓖麻油
喷替酸五钠
喷替酸钙钠
喷替酸
全氟丙烷
苯酚
液化苯酚
苯丙氨酸
苯乙醇
硝酸苯汞
磷脂酰甘油，蛋
磷脂
磷脂，蛋
磷酸
泊咯沙姆 188
聚乙二醇 200
聚乙二醇 300
聚乙二醇 3350
聚乙二醇 400
聚乙二醇 4000
聚乙二醇 600
聚乳酸羟基乙酸
聚乳酸
聚氧乙烯脂肪酸酯
聚氧乙烯 35 蓖麻油
聚丙二醇
聚硅氧烷
聚山梨酯 20
聚山梨酯 40
聚山梨酯 80
聚乙烯醇
亚硫酸氢钾
氯化钾
氢氧化钾
焦亚硫酸钾
磷酸氢二钾
磷酸二氢钾
聚维酮 K12
聚维酮 K17
聚维酮
脯氨酸

[0061]

没食子酸丙酯
丙二醇
对羟基苯甲酸丙酯
硫酸鱼精蛋白
糖精钠
无水糖精钠
盐
丝氨酸
芝麻油
硅酮
二甲基硅油
乙酸钠
无水乙酸钠
抗坏血酸钠
苯甲酸钠
碳酸氢钠
硫酸氢钠
亚硫酸氢钠
碳酸钠
十水碳酸钠
碳酸钠一水合物
氯酸钠
氯化钠
氯化钠注射液
氯化钠注射液，抑菌
胆固醇酰硫酸钠
柠檬酸钠
脱氧胆酸钠
连二亚硫酸钠
甲醛次硫酸氢钠
葡萄糖酸钠
氢氧化钠
次氯酸钠
碘化钠
乳酸钠
L-乳酸钠
焦亚硫酸钠
油酸钠
磷酸钠
磷酸钠二水合物
磷酸氢二钠
无水磷酸氢二钠
磷酸氢二钠二水合物



[0062]

磷酸氢二钠十二水合物
磷酸氢二钠七水合物
磷酸二氢钠
无水磷酸二氢钠
磷酸二氢钠二水合物
磷酸二氢钠一水合物
亚磷酸钠
焦磷酸钠
琥珀酸钠六水合物
硫酸钠
无水硫酸钠
亚硫酸钠
酒石酸钠
硫代乙醇酸钠
硫代苹果酸钠
硫代硫酸钠
无水硫代硫酸钠
三偏磷酸钠
山梨醇酐单棕榈酸酯
山梨醇
山梨醇溶液
大豆油
氯化亚锡
无水氯化亚锡
氟化亚锡
酒石酸亚锡
淀粉
硬脂酸
吸入用无菌水
注射用无菌水
二巯丁二酸
琥珀酸
蔗糖
磺丁基醚- $\beta$ -环糊精
二氧化硫
硫酸
亚硫酸
酒石酸
DL-酒石酸
叔丁醇
四(2-甲氧基异丁基异腈)络铜(I)四氟硼酸盐
替曲膦 (TETROFOSMIN)
茶碱

[0063]

硫柳汞
苏氨酸
锡
三氟乙酸
柠檬酸钠二水合物
曲金刚胺
氨丁三醇
色氨酸
酪氨酸
尿素
尿烷
缬氨酸
维塞胺
黄蜡
锌
乙酸锌
碳酸锌
氯化锌
氧化锌

[0064] 表1:根据国际药典分类的赋形剂作为用于基于病毒载体的组合物的安全赋形剂。

[0065] 根据本发明的溶液中包含的总赋形剂的优选量为0.001至100mg/ml,优选为1至80mg/ml,更优选为5至60mg/ml,甚至更优选为10至30mg/ml,最优选的量为约20mg/ml。

[0066] 优选地,溶液包含海藻糖或蔗糖作为糖,甘露醇作为糖醇和氨基酸作为至少三种赋形剂。甚至更优选地,溶液包含海藻糖作为糖和至少三种不同的氨基酸作为至少三种赋形剂。

[0067] 此外,溶液的特征在于赋形剂与糖的比率为至少1:2。更优选地,溶液的特征在于赋形剂与糖的比率为至少1:1.5 (w/w),如至少1:1 (w/w),最优选地为至少1:0.1 (w/w)。

[0068] 优选地,在与步骤(a)的复制缺陷病毒载体混合之前,会将根据步骤(b)所得的组合物的pH值调整为pH值4.0至9.0。pH值的选择取决于特定病毒载体的要求,由生物学特征决定,如大小、囊膜(脂膜)或无囊膜等。

[0069] 在第三步骤(c)中,本发明的方法包括将步骤(a)的复制缺陷病毒载体与步骤(b)的溶液混合的步骤。

[0070] 如本文所用,术语“混合”不受特别限制并且包括将病毒载体与根据(b)的溶液混合的所有方式。例如,步骤(a)和(b)的组分可以简单地转移到同一容器中,在其中它们可通过扩散混合;它们可以另外被搅动,例如,通过旋转容器或用合适的工具搅拌。搅拌可以持续有限量的次数,如一次或两次,或可以连续搅拌。

[0071] 优选地,步骤(a)和(b)的组分可以通过使用色谱操作以及透析、超滤和渗滤操作将所述步骤(a)的组合物在所述步骤(b)的组合物中再缓冲而混合在一起。

[0072] 步骤(a)和(b)的顺序没有特别限制,即可以首先进行步骤(a),然后进行步骤(b),反之亦然。此外,步骤(a)和(b)可以同时进行。然后在步骤(a)和(b)进行之后进行步骤(c)。

[0073] 在一个实施方案中,本发明的方法由所述步骤(a)至(c)组成。然而,会理解,在本发明的方法包括(而不是由其组成)所述步骤(a)至(c)的情况下,所述方法还可包括其它方法步骤。例如,可以包括另外的洗涤和/或干燥步骤。优选地,本发明的方法由所述步骤(a)至(c)任选地与下述的另外的方法步骤(d)和(e)组合组成,并且任选地与另外的洗涤步骤组合。甚至更优选地,本发明的方法由所述步骤(a)至(c)与下述的另外的方法步骤(d)干燥以及(e)重构所得干燥的组合物组合组成。

[0074] 根据本发明,提供制备改进的基于病毒载体的疫苗和基因转移治疗剂的方法。通过使用本发明的方法制备基于载体的组合物,可以避免不期望的多分散性,从而导致载体颗粒分布与功能效力之间更合适的比率。此外,如上文所讨论的,低分散性与较低粘度相关,不仅提供更好的感染性,而且还导致更好的可灌注性和可注射性。

[0075] 如所附实施例1中所示,令人惊讶地观察到,与原始供应商制剂以及常用的磷酸盐缓冲盐水(PBS)中的类似稀释相比,通过用根据本发明的包含至少一种糖和至少三种赋形剂的溶液(其中该溶液的特征进一步在于赋形剂与糖的比率为至少1:2(w/w))稀释高浓度的腺病毒原液来混合腺病毒载体,导致通过动态光散射(DLS)分析监测的所含腺病毒颗粒的流体动力学半径的完全保留。

[0076] 在冷冻干燥之前对腺病毒载体制剂的相应DLS实验中记录的所得的相关函数的评估表明,与未处理的原液相比,已经在根据本发明的溶液(特别是组合物1和组合物2)中混合腺病毒载体,导致保留相应分析的流体动力学半径为约70nm(实施例1;图1A至C)。相反,与未处理的腺病毒载体相比,在冷冻干燥之前的样品制备过程中,将腺病毒原液与PBS或与原始供应商制剂类似混合导致测量的流体动力学半径的显著增加(实施例1;图1A和图2)。

[0077] 在本发明方法的优选实施方案中,至少三种不同的赋形剂包括氨基酸。在本发明方法的甚至更优选的实施方案中,至少三种不同的赋形剂是至少三种不同的氨基酸。

[0078] 如本文所用,术语“氨基酸”是本领域公知的。氨基酸是蛋白质的基本结构单元。根据本发明,术语“氨基酸”指游离氨基酸,它们彼此不结合形成寡聚体或聚合物,诸如二肽、三肽、寡肽或蛋白质(本文也称为多肽)。术语“氨基酸”包括天然存在的氨基酸,也包括其它氨基酸如人工氨基酸。它们可分类为具有以下赋形剂的特征组:非极性,脂肪族;极性,不带电;带正电和/或负电和/或芳香族R基团(Nelson D.L.&Cox M.M.,“Lehninger Biochemie”(2005),pp.122-127)。本发明的溶液(b)中包含的氨基酸可选自天然存在的氨基酸以及人工氨基酸或这些天然存在或人工氨基酸的衍生物。

[0079] 天然存在的氨基酸包括构成蛋白质的20种氨基酸(即所谓的蛋白质氨基酸),即甘氨酸、脯氨酸、精氨酸、丙氨酸、天冬酰胺、天冬氨酸、谷氨酸、谷氨酰胺、半胱氨酸、苯丙氨酸、赖氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、组氨酸、甲硫氨酸、丝氨酸、缬氨酸、酪氨酸、苏氨酸和色氨酸。其它天然存在的氨基酸是例如,肉碱、肌酸、肌酐、胍乙酸、鸟氨酸、羟脯氨酸、高半胱氨酸、瓜氨酸、羟赖氨酸或β-丙氨酸。人工氨基酸是具有不同侧链长度和/或侧链结构和/或在不同于α-C-原子的位置具有胺基的氨基酸。氨基酸的衍生物包括但不限于,N-乙酰基-色氨酸、磷酸丝氨酸、磷酸苏氨酸、磷酸酪氨酸、黑色素、精氨酸琥珀酸以及其盐和DOPA。有关于本发明,所有这些术语还包括分别的氨基酸的盐。

[0080] 在本发明方法的实施方案中,至少三种不同的赋形剂包括“至少一种二肽和/或三肽”。当溶液中包含多于一种二肽或三肽时,本文明确涵盖二肽和三肽的混合物。二肽和三

肽的数量可以彼此独立地选择,例如,溶液可包含两种二肽和三种三肽。本领域技术人员会容易理解,当本文提及一定数量的二肽和三肽时,所述数量旨在限制不同类型的二肽和三肽的量,而不限制一种类型的二肽或三肽的分子数。因此,例如术语“四种二肽或三肽”指四种不同类型的二肽和/或三肽,其中每种单独的二肽和/或三肽的量不受特别限制。优选地,(不同)二肽或三肽的数量不超过九种二肽或三肽。

[0081] 如本文所用,术语“二肽或三肽”分别涉及由两个氨基酸或三个氨基酸组成的肽。示例性二肽是甘氨酸谷氨酰胺(Gly-Gln)、甘氨酸酪氨酸(Gly-Tyr)、丙氨酸谷氨酰胺(Ala-Gln)和甘氨酸甘氨酸(Gly-Gly)。天然存在的二肽的其它非限制性实例是肌肽( $\beta$ -丙氨酸-L-组氨酸)、N-乙酰基-肌肽(N-乙酰基-( $\beta$ -丙氨酸-L-组氨酸))、鹅肌肽( $\beta$ -丙氨酸-N-甲基组氨酸)、高鹅肌肽(homoanserine)(N-(4-氨基丁酰基)-L-组氨酸)、京都啡肽(L-酪氨酸-L-精氨酸)、鲸肌肽(或蛇肌肽)( $\beta$ -丙氨酸-N tau-甲基组氨酸)、glorin(N-丙酰基- $\gamma$ -L-谷氨酰基-L-鸟氨酸- $\delta$ -乳酸乙酯)和barettin(环-[(6-溴-8-烯-色氨酸)-精氨酸])。人工二肽的实例包括但不限于,阿斯巴甜(N-L-a-天冬氨酸-L-苯丙氨酸1-甲基酯)和伪脯氨酸。

[0082] 示例性的三肽是谷胱甘肽( $\gamma$ -谷氨酰-半胱氨酸-甘氨酸)及其类似物眼晶体酸(L- $\gamma$ -谷氨酰-L- $\alpha$ -氨基丁酰基-甘氨酸)以及去甲眼晶体酸( $\gamma$ -谷氨酰-丙氨酸基-甘氨酸)。三肽的其它非限制性实例包括异亮氨酸-脯氨酸-脯氨酸(IPP)、glypromate(Gly-Pro-Glu)、促甲状腺激素释放激素(TRH,促甲状腺素释放素或普罗瑞林:L-焦谷氨酰-L-组氨酸-L-脯氨酸)、促黑素抑制素(脯氨酸-亮氨酸-甘氨酸)、亮肽素(N-乙酰基-L-亮氨酸-L-亮氨酸-L-精氨酸)和eisenin(pGlu-Gln-Ala-OH)。

[0083] 本文还涵盖(b)的溶液包含至少三种赋形剂,其包括氨基酸以及至少一种二肽和/或三肽。

[0084] 优选地,所使用的所有氨基酸、二肽和/或三肽的总量(即溶液中所有这些组分的总和)为0.001至100mg/ml,优选1至80mg/ml,更优选5至60mg/ml,甚至更优选10至30mg/ml,最优选的量为约20mg/ml。

[0085] 当与医学应用相关使用时,优选氨基酸和/或二肽和/或三肽不发挥任何药理学性质。

[0086] 在本发明方法的另一优选实施方案中,制备基于病毒载体的组合物用于作为液体储存。在本发明方法的另一优选实施方案中,制备基于病毒载体的组合物用于作为干燥制剂储存。这样的基于病毒载体的组合物(液体或干燥制剂)可以随后用于制备疫苗或基因转移治疗剂。

[0087] 在本发明方法的进一步优选实施方案中,该实施方案包括干燥步骤(c)中获得的组合物的进一步步骤(d),所述组合物通过冷冻干燥、喷雾干燥、喷雾冷冻干燥或超临界干燥来干燥。

[0088] 如本文所用,术语“干燥”指减少或除去组合物中存在的液体含量。如果液体减少至小于20%,则认为液体含量已减少,如小于10%、如小于8%,更优选小于7%,如小于5%或小于1%。甚至更优选地,液体减少至0.5%或更少。

[0089] 合适的干燥方法包括但不限于冻干法(冷冻干燥)、喷雾干燥、冷冻-喷雾干燥、对流干燥、传导干燥、气流干燥、转鼓干燥、真空干燥、介电干燥(例如通过射频或微波)、表面干燥、空气干燥或泡沫干燥。

[0090] 冷冻干燥,也称为冻干法,也是本领域公知的,包括以下步骤:冷冻样品并随后降低周围压力同时添加足够的热量以使材料中的冷冻水直接从固相升华至气相,接着是二次干燥阶段。优选地,然后将冻干制剂密封以防止再吸收水分。

[0091] 喷雾干燥在本领域中也是公知的,是在一个单一处理步骤中将溶液、悬浮液或乳液转化成固体粉末的方法。通常,将液体产品的浓缩物泵送到雾化装置,在其中被破碎成小液滴。这些液滴暴露在热空气流中并且在仍悬浮在干燥空气中的同时非常快速地失去其水分。通过离心作用将干粉与旋风分离器中的潮湿空气分离,即稠密的粉末颗粒被迫朝向旋风壁,而较轻的潮湿空气被引导通过排气管。

[0092] 喷雾干燥通常是选择的方法,因为它与冻干法相比避免了冷冻步骤并且需要更低的能量成本。由于与高温的短接触时间及其特殊的过程控制,喷雾干燥也被证明是特别有利的适用于生物分子的干燥操作。因此,因为喷雾干燥仅在一歩中产生可分散的干粉,所以当涉及生物分子的干燥技术时,对冷冻干燥通常更偏好喷雾干燥。

[0093] 喷雾冷冻干燥在本领域中也是公知的,是结合冷冻干燥和喷雾干燥常用的加工步骤的方法。将提供的样品喷雾到低温介质(例如液氮)中,其产生骤冷(shock-frozen)液滴的分散体。然后将该分散体在冷冻干燥器中干燥。

[0094] 超临界干燥是本领域公知的另一种技术。该方法依赖于高于临界温度( $T_c$ )和临界压力( $P_c$ )的高温 and 高压将液体变成气体,其中没有相交的相界,而是液体到气体的转变通过超临界区域,其中气体和液体之间的区别不再适用。在干燥的临界点,液相和气相的密度变得相等。

[0095] 优选地,干燥(c)中获得的组合物的步骤(b)是通过冷冻干燥。

[0096] 如下面实施例1中进一步显示,令人惊讶地发现,通过本发明方法将腺病毒载体与所述至少三种赋形剂和糖以至少1:2的比率组合,为干燥的腺病毒载体制剂提供优异的稳定性。在实施例1中,已经在早期阶段缩小规模步骤和随后冷冻干燥期间腺病毒载体制剂与根据本发明的组合物(特别是组合物1和组合物2)的组合导致感染滴度(实施例1;图3)和病毒颗粒的流体动力学半径(实施例1;图4A和B)的完全保留。相反,在原始供应商制剂中冷冻干燥相应的腺病毒载体制剂导致感染性显著丢失(实施例1;图3)和粒径的增加(实施例1;图4C)。与常用的磷酸盐缓冲盐水(PBS)组合的类似样品制备操作在冷冻干燥后已经导致感染性的完全丢失(实施例1;图3)和粒径的大大增加(实施例1,图4D)并且形成显著量的更高级聚集体。最重要的是,这样的生物制药药物物质或药物产品的干燥制剂适用于各种进一步处理步骤,如等分、分配、装运、储存等。

[0097] 根据本发明方法的该优选实施方案,获得干燥组合物。特别优选的是组合物是粉末组合物。在冷冻干燥或喷雾冷冻干燥的情况下,所得干燥的组合物以粉末形式自动获得。在干燥组合物不是以粉末形式获得而是以例如干燥的饼状形式获得的情况下,技术人员知道如何进一步改进组合物以获得粉末。

[0098] 这样的另外的干燥步骤可以是有利的,因为组合物中的分子间相互作用可导致例如,改变病毒载体的静电相互作用,导致颗粒完整性和功能的丢失。根据该优选实施方案,组合物中减少的水含量降低了产品内的分子运动性,因此有助于维持颗粒的完整性和功能。

[0099] 在本发明方法的另一优选实施方案中,所述方法还包括随后在选自约-90℃至约

50℃的温度下储存基于病毒载体的组合物的步骤。更优选地,基于病毒载体的组合物随后在选自约-90℃至约-70℃、约-30℃至约-10℃、约1℃至约10℃、约15℃至约25℃和约30℃至约50℃的温度范围下储存。甚至更优选地,基于病毒载体的组合物随后在选自约-85℃至约-75℃、约-25℃至约-15℃、约2℃至约8℃和约20℃至约45℃的温度范围下储存。最优选地,基于病毒载体的组合物随后在选自约-80℃、约-20℃、室温、约4℃、约25℃和约40℃的温度下储存。

[0100] 如下面实施例1中另外显示,令人惊讶地观察到,在冷冻干燥后即刻已经观察到分别在根据本发明的组合物(组合物1和2)和原始供应商制剂以及PBS中冷冻干燥的腺病毒载体的体外感染性之间的差异,差异在冷冻干燥制剂在升高温度下储存后更加明显。观察到在原始供应商制剂中冷冻干燥的病毒载体的功能完全丢失,类似于PBS中获得的结果(实施例1;图5A和B)。相反,即使在25℃或甚至40℃下储存后,在早期生产过程期间在稳定化组合物1和2中配制的冷冻干燥的腺病毒载体组合物保留了与阳性对照(即,冷冻干燥之前的腺病毒载体)(在图5的图中以虚线描绘)几乎相同的病毒活性。

[0101] 体外感染性实验的这些结果与平行进行的DLS实验很好地对应。例如,图6中描绘了在40℃下储存14天后,分别在根据本发明的组合物1和2中或在原始供应商制剂和PBS中储存干燥的腺病毒载体组合物后记录的DLS相关函数的评估。在稳定化组合物1和2中储存干燥的腺病毒载体制剂导致测定的腺病毒颗粒的流体动力学半径的保留(实施例1;图6A和B),其与在原始供应商制剂和在PBS中储存的腺病毒颗粒(实施例1;图7A和7B)相反。

[0102] 在本发明方法的进一步优选实施方案中,所述方法还包括重构干燥后获得的组合物的步骤(e)。

[0103] 可通过本领域已知的任何方法进行组合物的重构。例如,将干燥的组合物溶解在合适的溶液中。合适的溶液的非限制性实例包括用于与病毒载体混合的步骤(b)的溶液以及已知适用于基于病毒载体的组合物的任何其它溶液,诸如注射用水,缓冲溶液,包含氨基酸、糖、缓冲剂、表面活性剂的溶液或其混合物。

[0104] 在本发明方法的进一步优选实施方案中,病毒载体选自MVA、腺病毒、腺相关病毒(AAV)、慢病毒、水疱性口炎病毒(VSV)或疱疹病毒。

[0105] 修饰的安卡拉痘苗病毒(MVA)是一种高度减毒的痘苗病毒株,是上世纪七十年代根除天花的运动接近结束时开发的。MVA在鸡胚成纤维细胞(CEF)中经570次传代衍生自安卡拉痘苗株。这导致六个主要缺失,对应于痘苗基因组的约10%的丢失。完整的基因组序列是已知的,具有178kp的长度,对应于177个基因。大量突变解释了MVA的减毒表型以及其在哺乳动物细胞中不能复制。由于其高安全性,MVA被广泛认为是用于临床研究选择的痘苗病毒株。MVA已经施用于许多动物物种,包括猴子、小鼠、猪、绵羊、牛、马和大象,没有局部或全身不良反应。超过120,000人通过皮内、皮下或肌肉注射安全地成功地疫苗接种了MVA抗天花。对小鼠和非人灵长类的研究进一步证明了MVA在免疫抑制条件下的安全性。与复制的痘苗病毒相比,即使在非允许细胞中,MVA也提供相似或更高水平的重组基因表达。在动物模型中,已经发现重组MVA疫苗具有免疫原性并且预防各种感染因子,包括流感病毒、副流感病毒、麻疹病毒、黄病毒和疟原虫。非常好的安全性特性和以高免疫原性方式递送抗原的能力的组合使得MVA适合作为疫苗载体。

[0106] 腺病毒是中等大小(90-100nm)、无囊膜(裸的)二十面体病毒,由核衣壳和双链线

性DNA基因组组成。在人类中有超过51种不同的血清型,其中儿童的上呼吸道感染占5-10%,许多也在成人中感染。当这些病毒感染宿主细胞时,它们将其DNA引入宿主。腺病毒的遗传物质未被包含在(瞬时)宿主细胞的遗传物质中。DNA分子在宿主细胞的细胞核中游离,这个额外的DNA分子中的指令就像任何其它基因一样被转录。唯一的区别是,当细胞即将进行细胞分裂时,这些额外的基因不会被复制,因此该细胞的后代不会具有额外的基因。因此,用腺病毒进行治疗需要在生长的细胞群中重新给药,但没有整合到宿主细胞的基因组中会防止在SCID试验中见到的癌症类型。该载体系统已显示出治疗癌症的真正前景,并且实际上第一个被许可的基因治疗产品(Gendicine)是治疗癌症的腺病毒。

[0107] 腺病毒科的病毒感染各种动物物种,包括人类。腺病毒代表最大的非囊膜病毒,因为它们能够通过内体转运的最大尺寸(即,不需要囊膜融合)。病毒粒子还具有与衣壳的各五邻体碱基相关的独特“纤突”或纤维,其有助于通过宿主细胞表面上的柯萨奇-腺病毒受体与宿主细胞连接。

[0108] 腺相关病毒(AAV)是一种感染人类和一些其它灵长类物种的小病毒。目前尚不知道AAV会引起疾病,因此病毒会引起非常轻微的免疫应答。AAV可以感染分裂和非分裂细胞,并且可以将其基因组包含在宿主细胞的基因组中。此外,游离型AAV引起长且稳定的表达,因此,AAV适合于产生用于基因治疗的病毒载体。由于其作为基因治疗载体的潜在用途,AAV先前已被修饰(自身互补的腺相关病毒;scAAV)。尽管AAV包装单链DNA并且需要第二链合成的过程,但scAAV包装两条链,其一起退火以形成双链DNA。该方法允许在靶细胞中快速表达。

[0109] 慢病毒是反转录病毒的一个亚类,最近已被用作基因递送的病毒载体,因为其具有整合到非分裂细胞基因组的独特能力。当病毒进入细胞时RNA形式的病毒基因组反转录产生DNA,然后通过病毒整合酶插入基因组。该载体,此刻称为原病毒,保留在基因组中,并在分裂时传递给细胞的后代。

[0110] 水疱性口炎印第安纳病毒(VSIV)(通常仍被称为VSV)是弹状病毒科的病毒;公知的狂犬病病毒属于同一家族。VSIV可以感染昆虫、牛、马和猪。它对世界某些地区的农民特别重要,那里它们可以感染牛并导致类似于口蹄疫病毒的疾病。

[0111] 疱疹病毒属于疱疹病毒科,是大的DNA病毒家族,可引起动物和人类疾病。单纯疱疹病毒(HSV)HSV-1和HSV-2(口唇疱疹和生殖器疱疹)、水痘带状疱疹病毒(VZV;鸡痘和带状疱疹)、Epstein-Barr病毒(EBV;单核细胞增多症)和巨细胞病毒(CMV)在人类中普遍存在。超过90%的成年人感染过至少其中一种,并且潜伏形式的病毒保留在大部分人中。疱疹病毒目前被用作基因转移载体,因为它们具有高的病毒颗粒转基因能力,允许携带长序列的外源DNA,病毒基因组的遗传复杂性允许产生许多不同类型的具有溶瘤活性的减毒载体,以及HSV载体侵入并在感觉神经节神经元中建立终身无毒潜伏感染的能力,其中转基因可以强烈和长期表达。三种不同类的载体可以衍生自HSV:有复制能力的减毒载体,不能复制的重组载体和称为扩增子的缺陷辅助病毒依赖型载体。复制缺陷HSV载体是通过缺失一个或多个即早期基因来制备的,例如,ICP4,然后通过补充细胞系反式提供。溶瘤HSV载体是有希望的癌症治疗剂。已经在胶质瘤、黑素瘤和卵巢癌患者中测试了这样的基于HSV的载体。

[0112] 特别优选的病毒载体是MVA。

[0113] 已经分别评估了上面列出的优选病毒载体在动物和/或人中的安全性,并且可获

得临床前和临床数据。

[0114] 在本发明方法的另一优选实施方案中,复制缺陷病毒载体是病毒样颗粒。

[0115] 病毒样颗粒 (VLP) 提供的优点是它们没有传染性并且不含病毒遗传物质。因此,当活减毒病毒用作病毒载体时,其与任何可能的重组风险无关。

[0116] 在本发明方法的另一优选实施方案中,所述方法还包括添加抗原多肽。

[0117] 根据本发明的“抗原多肽”不受特别限制,只要其引发免疫应答即可。抗原多肽可选自例如病毒、细菌或肿瘤细胞。例如,抗原多肽可以是除本发明方法中使用的病毒载体的病毒的病毒表面蛋白或其部分;或主要的免疫原性病毒蛋白或其部分。这些另外的抗原多肽可以用于例如在初免-加强疫苗接种中初免疫系统。在这种情况下,由相应病毒或VLP引发的加强反应依赖于通过本发明的方法制备的基于病毒载体的组合物。本文所用的术语“多肽”与术语“蛋白质”可互换地描述氨基酸的线型分子链,包括单链蛋白质或其片段。

[0118] 添加抗原多肽的步骤可以在不同时间点进行。例如,抗原多肽可以添加到步骤(a)中提供的复制缺陷病毒载体中。或者,抗原多肽可以在步骤(c)中另外混合,或在步骤(c)的混合之后加入到所得组合物中。此外,作为另外的替代方案,抗原多肽可以在步骤(e)的重构后添加到基于病毒载体的组合物中。

[0119] 在本发明方法的进一步优选实施方案中,所述方法还包括添加至少一种佐剂。

[0120] 佐剂及其作用方式是本领域公知的。一些佐剂,诸如明矾和乳剂(例如MF59®),通过产生在注射部位捕获抗原物质的贮库而起到递送系统的作用,提供缓慢释放以提供免疫系统的持续刺激。这些佐剂增强注射部位的抗原持久性并增加抗原呈递细胞(APC)的募集和活化。颗粒佐剂(例如明矾)具有结合抗原物质以形成多分子聚集体的能力,这会促进APC的摄取。一些佐剂也能够通过主要组织相容性复合体(MHC)指引抗原呈递。其它佐剂,主要是模式识别受体(PRR)的配体,通过诱导先天免疫起作用,主要靶向APC并因此影响适应性免疫应答。几乎所有PRR家族的成员都是佐剂的潜在靶标。这些包括Toll样受体(TLR)、NOD样受体(NLR)、RIG-I样受体(RLR)和C型凝集素受体(CLR)。它们通过涉及不同衔接体分子的途径发出信号,导致不同转录因子的激活。这些转录因子(NF- $\kappa$ B, IRF3)诱导细胞因子和趋化因子以及IL-18的产生。

[0121] 优选地,至少一种佐剂选自明矾、MF59®、AS03、AF03、AS04、RC-529、Virosomen、ISCOMATRIX®、CpG 1018、CpG 7909、VaxImmune、ProMune®、IC-31®、CTA1-DD或环二-AMP。这些佐剂,其分类、适应症和提供者以及产品名称汇总在下表2中。



[0122]

佐剂	分类	主要适应症	提供者/产品
明矾	铝盐 氢氧化铝 磷酸铝 羟基磷酸铝	多种	多种 全球
MF59 <sup>®</sup>	水包油乳液 4,3 % 角鲨烯 0,5 % 聚山梨酯 80 0,5 % 山梨醇酐三油酸酯 (Span 85 <sup>®</sup> ) 10 mM 柠檬酸钠	季节性流感	Novartis / Fluad
AS03	水包油乳液 10,69 mg 角鲨烯 11,86 mg D,L- $\alpha$ -生育酚 (维生素 E) 4,86 mg 聚山梨酯 80	流行性感冒	GSK / Pandemrix
AF03	水包油乳液 12,4 mg 角鲨烯 1,9 mg 山梨醇酐油酸酯 2,4 mg 聚山梨酯 20 2,3 mg 甘露醇	流行性感冒	Sanofi Pasteur/ Humanza
AS04	组合单磷酸脂 A 和铝盐	乙型肝炎病毒 人乳头瘤病毒	GSK / Fendrix Cervarix

[0123]

RC-529	组合合成的单磷酸脂 A 和铝盐	乙型肝炎病毒	Dynavax
Virosomen	磷脂酰胆碱双层脂质体 150 nm	甲型肝炎病毒 季节性流感	Crucell / Inflexal V
ISCOMATRIX <sup>®</sup>	ISCOM 免疫刺激复合物 抗原 胆固醇 磷脂 来自皂树的皂苷	多种	CSL Limited Parkville, Victoria, Australien
CpG 1018	寡脱氧核苷酸	乙型肝炎病毒 癌症	Dynavax / HEPLISAV-B SD-101
CpG 7909 VaxImmune ProMune <sup>®</sup>	寡脱氧核苷酸	癌症疫苗接种 乙型肝炎病毒 癌症治疗	Coley/Chiron/Pfizer GSK
IC-31 <sup>®</sup>	肽和寡脱氧核苷酸	Tuberkulosis	Intercell
CTA1-DD	来自霍乱毒素(CT)的 CTA1-结构域的融合蛋白, 并且维持 ADP-核糖基化酶功能和蛋白 A (金黄色葡萄球菌)的 Ig 结合域的二聚体作为靶点		MIVAC Development AB, Sweden

[0124] 表2:特别优选的佐剂的详细信息。

[0125] 添加佐剂的步骤可以在不同时间点进行。例如,佐剂可以添加到步骤(a)中提供的复制缺陷病毒载体中。或者或另外的,辅剂可以在步骤(c)中混合,或在步骤(c)的混合之后加入到所得组合物中。作为进一步的替代或另外的选择,其可以在步骤(e)的重构后添加到基于病毒载体的组合物中。

[0126] 在本发明方法的另一优选实施方案中,佐剂的至少一种是皂苷。或者,佐剂是包含皂苷的物质的混合物。

[0127] 皂苷是形成次级代谢产物的一类化学化合物,其存在于天然来源中,源自天然来源或可化学合成。在各种植物物种中发现皂苷特别丰富。皂苷是两亲糖苷,其通过它们在水溶液中摇动时产生的皂样发泡在现象学上分组,以及通过它们的一种或多种亲水性糖苷部分与亲脂性甾体或三萜苷元组合的组成在结构上分组。其结构多样性反映在它们的物理化学和生物学性质上。皂苷的非限制性实例是甘草酸、甘草次酸、葡萄糖醛酸、七叶皂素、常春藤苷和毛地黄皂苷。

[0128] 优选地,皂苷选自公知的佐剂组合物,例如,如表2列出的从皂树中提取的皂苷,但不限于此。

[0129] 在另一实施方案中,皂苷是甘草酸或其衍生物。甘草酸(Glycyrrhizic acid)也称为甘草酸(glycyrrhizic acid)、甘草皂苷(glycyrrhizin)或甘草酸(glycyrrhizinic acid)。甘草酸是水溶性的并且作为阴离子存在,其可以是与活性成分的阳离子分子形成静电相关复合物的潜在配体。不希望受理论束缚,本发明人假设阴离子甘草酸通过静电相互作用、氢键或两者与本发明溶液中存在的氨基酸(即精氨酸或赖氨酸)形成复合物。

[0130] 甘草酸的衍生物是本领域公知的,包括通过在羧基和羟基上转化甘草酸产生的那

些,通过将氨基酸残基缀合到碳水化合物部分或将2-乙酰胺基- $\beta$ -d-吡喃葡萄糖胺引入到甘草酸的糖苷链。其它衍生物是甘草酸的酰胺,甘草酸与两个氨基酸残基和游离的30-COOH官能团的缀合物以及甘草酸分子的碳水化合物部分中的至少一个氨基酸烷基酯残基的缀合物。特定衍生物的实例可以在例如Kondratenko等人(Russian Journal of Bioorganic Chemistry, Vol 30 (2), (2004), pp.148-153)中找到。

[0131] 使用甘草酸(或其衍生物)的优选量为0.01至15mg/ml,优选0.1至10mg/ml,更优选0.5至5mg/ml,甚至更优选1至3mg/ml,最优选的量为2mg/ml。

[0132] 如本领域已知的,已经发现皂苷特别是甘草酸有利地存在佐剂的功能,因为它们增强了基于病毒载体的组合物的免疫原性作用。

[0133] 在本发明方法的另一优选实施方案中,(a)的复制缺陷病毒载体是从细胞培养物中收集并纯化后立即重构的复制缺陷病毒载体。

[0134] 用于重构复制缺陷病毒载体的途径和方法是本领域公知的。例如,在适当的细胞培养模型中扩增复制缺陷病毒载体(诸如MVA)后,可通过蔗糖垫超速离心从细胞碎片和重组蛋白中半纯化MVA的粗原液制剂。丢弃上清液(细胞碎片和蔗糖)后,可以将沉淀的病毒载体材料与根据(b)的溶液混合。或者,为了获得更高纯度的病毒,可以将半纯化的材料通过25-40%蔗糖梯度离心。浓缩管下半部出现的病毒载体带,同时通过用根据(b)的溶液填充超速离心管除去剩余的蔗糖,超速离心沉淀病毒载体材料并将沉淀物悬浮在根据(b)的溶液中。

[0135] 由于增加的多分散性,与非感染性颗粒相比组合物中存在的感染性颗粒的量的减少在从细胞培养物中收集病毒颗粒后立即开始。因此,根据本发明特别优选的是,在初始收集病毒载体后,尽早将复制缺陷病毒载体与(b)的溶液混合。

[0136] 如下面实施例2中所示,早期加入稳定化组合物,特别是组合物1和2,可以在整个制备操作中对腺病毒载体制剂的稳定性具有强烈影响。在通过CsCl密度超速离心的纯化步骤(加工步骤1)之后即刻,或者后期制备过程(加工步骤2)中,分别通过在组合物1和2中透析再缓冲后腺病毒制剂的体外感染性分析显示两种应用的稳定化组合物之间的差异。根据加工步骤1和2中的制备在组合物1中再缓冲,与以虚线描绘的阳性对照(实施例2;图11A和B)相比,导致透析后即刻以及实施5次和10次冷冻和解冻循环后感染性的完全保留(实施例2;图9)。在制备过程的早期步骤(加工步骤1)期间在组合物2中再缓冲也导致透析后即刻的感染性的完全保留,和在实施反复冷冻和解冻循环后感染滴度的较小损失(实施例2;图9和图11A)。相反,在加工步骤2的制备期间在组合物2中再缓冲导致在透析之后即刻感染滴度的显著降低(实施例2;图9)。进一步实施反复冷冻和解冻循环导致感染滴度的进一步显著降低(实施例2;图11B)。

[0137] 因此,发现早期应用根据本发明的稳定化组合物在整个生产过程中对特定生物分子具有显著的稳定作用。

[0138] 体外感染性实验的这些结果与平行进行的DLS实验很好地对应。在图10A和B中,在加工步骤1期间在组合物1和2中制备后测定腺病毒颗粒的流体动力学半径的结果表明,在使用超速离心纯化步骤之后即刻制备制剂后腺病毒粒径的完全保留,其与图9中的感染性结果一致。在组合物1的情况下,在根据加工步骤2再缓冲腺病毒载体制剂后,观察到流体动力学半径略微增加(图10C),其与图9中所示的感染性结果一致。相反,根据加工步骤2在组

合物2中再缓冲腺病毒载体制剂导致腺病毒颗粒的流体动力学半径显著增加(图10D),伴随着更高级聚集体的形成,其可以解释体外感染性测试中功能的丢失(图9)。

[0139] 在5次和10次反复冷冻和解冻循环后,通过DLS测量病毒颗粒(特别是组合物2中)的流体动力学半径的变化。当在加工步骤1和2中制备时,5次甚至10次冷冻和解冻循环后,组合物1中没有观察到显著的增加(实施例2;图12A和B,13A和B)。当在加工步骤1期间使用组合物2时,流体动力学半径5次冷冻和解冻循环后就已经显著增加,伴随更高级聚集体的形成(实施例2;13C和D),当在加工步骤2中使用时,10次冷冻和解冻循环后流体动力学半径是无法测量的,其由于半径的进一步增加和更高级的聚集体的形成,超出了DSL测量限制。

[0140] 本发明还涉及通过本发明方法获得或可获得的基于病毒载体的组合物。

[0141] 这些基于病毒载体的组合物可用于抗菌疫苗接种、抗病毒疫苗接种、抗癌疫苗接种、抗过敏疫苗接种和/或用于治疗具有遗传背景疾病的基因转移疗法。

[0142] 在优选实施方案中,组合物是药物组合物。

[0143] 根据本发明,术语“药物组合物”涉及向患者给药的组合物,优选人患者。

[0144] 药物组合物可以合适的剂量向个体给药。剂量方案由主治医生和临床因素确定。如在医学领域公知的,任何一个患者的剂量取决于许多因素,包括患者的大小、体表面积、年龄、要给药的特定化合物、性别、给药时间和给药途径、一般健康状况以及同时给药的其它药物。对于给定情况的治疗有效量会容易通过常规实验确定,并且在普通临床医生或医师的技能和判断范围内。药物组合物可以用于一次给药或在延长的时间段内定期给药。通常,对于单剂量,药物组合物的给药应当为例如1 $\mu$ g/kg体重至50mg/kg体重。然而,更优选的剂量可以为10 $\mu$ g/kg至20mg/kg体重,甚至更优选100 $\mu$ g/kg至10mg/kg体重,甚至更优选500 $\mu$ g/kg至5mg/kg体重。

[0145] 用于治疗性给药的药物组合物的组分必须是无菌的。例如,无菌通过无菌过滤膜(例如,0.2 $\mu$ m膜)过滤容易地实现。

[0146] 组合物的各种组分可以包装为药盒,并附有使用说明书。

[0147] 因此,本发明还涉及药盒,其包含通过本发明的方法获得或可获得的基于病毒载体的组合物和任选存在的如何使用该药盒的说明书。

[0148] 尽管最广泛的意义上术语“药盒”不需要存在除所述组分之外的任何其它化合物、小瓶、容器等,但在本发明的药盒的上下文中,术语“包含”表示药盒中可以存在进一步的组分。这样的进一步的组分的非限制性实例包括如上定义的抗原多肽或佐剂,以及用于储存的防腐剂、缓冲剂,酶等。

[0149] 当药盒中包含几种组分时,药盒的各种组分可以包装在一个或多个容器中,诸如一个或多个小瓶中。因此,药盒的各组分可以单独或组合存在。除组分外,容器或小瓶可包含用于储存的防腐剂或缓冲剂。此外,药盒可含有使用说明书。

[0150] 在本发明药盒的优选实施方案中,所述药盒包含通过本发明方法获得或可获得的基于病毒载体的组合物和抗原多肽(在同一容器或单独的容器中)。具有i)基于病毒载体的组合物和ii)抗原多肽的这些单独的容器可在单独的疫苗接种步骤中使用(同时或彼此随后),例如,用于初免-加强免疫接种方法。

[0151] 在本发明药盒的替代或另一优选实施方案中,药盒包含通过本发明的方法获得或可获得的基于病毒载体的组合物和一种或多种佐剂(在同一容器或单独的容器中)。

[0152] 还涵盖药盒,其包含(i)通过本发明方法获得或可获得的基于病毒载体的组合物;(ii)抗原多肽和(iii)一种或多种佐剂,在同一容器或不同容器中。

[0153] 本发明还涉及本发明的基于病毒载体的组合物,其用作初免-加强疫苗。

[0154] “初免-加强疫苗策略”是本领域公知的,包括“初免”免疫应答的第一步骤,然后是“加强”先前初免的免疫应答的第二步骤。这种方法能够实现高水平的抗原特异性T细胞记忆以及对病原体的保护性细胞免疫,甚至在人类中也是如此,因此是一种有前景的疫苗接种方法(Woodland DL,Trends in Immunology,2004;Nolz JC,Harty JT.Adv Exp Med Biol.2011;780:69-83.doi:10.1007/978-1-4419-5632-3\_7.Strategies and implications for prime-boost vaccination to generate memory CD8T cells)。

[0155] 基于病毒载体的组合物对于治疗性初免-加强疫苗方法具有高度吸引力。例如,很好地建立了用于预防HBV感染的预防性疫苗接种。相反,由于HBV感染及其后遗症的慢性肝炎的有效治疗目前尚无法获得,其可能通过具有特异性抗原初免和随后特异性的基于病毒载体的增强的初免-加强疫苗接种策略成功解决,其诱导抗原特异性抗体产生以及抗原特异性T细胞应答,都导致高效的疫苗接种结果。如上所讨论,所附实施例中提供的数据显示,与通过其它方法制备的基于病毒载体的组合物相比,通过本发明的方法制备的基于病毒载体的组合物的生物学、免疫原活性得到改善。换句话说,本发明的基于病毒载体的组合物刺激个体的免疫系统如引发免疫系统的细胞毒性T淋巴细胞(CTL)以保护个体免受开发疫苗用于的疾病的能力得到改善。

[0156] 在本发明的进一步优选实施方案中,基于病毒载体的组合物用于肌肉、皮下、皮内、透皮、口服、经口、经鼻和/或吸入施用。

[0157] 除非另有定义,否则本文使用的所有技术和科学术语具有与本发明所属领域的普通技术人员通常理解的相同的含义。如有冲突,以专利说明书(包括定义)为准。

[0158] 关于在本说明书中表征的实施方案,特别是在权利要求中,其旨在将从属权利要求中提到的各实施方案与所述从属权利要求从属于的各权利要求(独立的或从属的)的各实施方案组合。例如,在独立权利要求1列出3个可选方案A、B和C,从属权利要求2列出3个可选方案D、E和F,权利要求3从属于权利要求1和2并且列出3个可选方案G、H和I的情况下,会理解,本说明书明确地公开了相应的组合的实施方案:A、D、G;A、D、H;A、D、I;A、E、G;A、E、H;A、E、I;A、F、G;A、F、H;A、F、I;B、D、G;B、D、H;B、D、I;B、E、G;B、E、H;B、E、I;B、F、G;B、F、H;B、F、I;C、D、G;C、D、H;C、D、I;C、E、G;C、E、H;C、E、I;C、F、G;C、F、H;C、F、I,除非另有特别说明。

[0159] 类似地,同样在独立和/或从属权利要求没有列出可选方案的那些情况下,会理解,如果从属权利要求回引多个前述权利要求,则认为由此涵盖的主题的任何组合是被明确公开的。例如,在独立权利要求1的情况下,从属权利要求2回引权利要求1,从属权利要求3回引权利要求2和1两者,其结果是权利要求3和1的主题的组合是被清楚和明确地公开的,如同权利要求3、2和1的主题的组合一样。在存在另外的从属权利要求4的情况下,其引用权利要求1至3中任一项,其结果是权利要求4和1,权利要求4、2和1,权利要求4、3和1以及权利要求4、3、2和1的主题的组合是被清楚和明确公开的。

[0160] 上述考虑因素加以必要的改变后适用于所有所附权利要求。为了给出非限制性实例,鉴于权利要求结构,权利要求12、8、4、3和1的组合是清楚且明确地涵盖的。这同样适用于例如权利要求12、8和1的组合等。

[0161] 用以下附图说明本发明,其显示:

[0162] 图1:动态光散射 (DLS) 测定冷冻干燥前腺病毒载体组合物的流体动力学半径,作为悬浮液中聚集和多分散性的模型。(A) 评估作为对照的腺病毒原液的使用通过DynaPro DLS软件正则化拟合的DLS实验中记录的相关函数,(B) 评估通过稀释与组合物1混合后即刻腺病毒载体制剂的相关函数和(C) 评估通过稀释与组合物2混合后即刻腺病毒载体制剂的相关函数。计算的组合物1和2中的腺病毒载体制剂的流体动力学半径与未处理原液中的腺病毒颗粒的测量半径一致,并且与文献中已知的值一致。

[0163] 图2:动态光散射 (DLS) 测定冷冻干燥前腺病毒载体组合物的流体动力学半径,作为悬浮液中聚集和多分散性的模型。(A) 评估与原始供应商制剂混合后即刻腺病毒载体制剂的使用通过DynaProDLS软件正则化拟合的DLS实验中记录的相关函数和(B) 评估与PBS混合后即刻腺病毒载体制剂的相关函数。与前图相反,与未处理原液相比,与原始供应商制剂混合和与PBS混合后的腺病毒颗粒的流体动力学半径增加。

[0164] 图3:在不同制剂中冷冻干燥后腺病毒载体的体外感染性,作为在冷冻干燥压力条件下的功能性的模型。腺病毒载体制剂通过稀释配制,并随后在组合物1和2中冷冻-干燥。重构冷冻-干燥的载体后,在HEK 293细胞中进行体外感染性试验,使用腺病毒六邻体蛋白的基于抗体的比色检测以表明感染细胞中腺病毒的成功扩增。观察到在组合物1和2中配制的腺病毒载体制剂的感染滴度完全保留(与阳性对照相比每ml的感染单位;以虚线表示)。相反,在原始供应商制剂中稀释的冷冻干燥的腺病毒载体导致感染滴度的显著丢失,并且在PBS中稀释的冷冻干燥的腺病毒载体导致相应的感染滴度的完全丢失。

[0165] 图4:动态光散射 (DLS) 测定冷冻干燥后相应的腺病毒载体制剂中腺病毒颗粒的流体动力学半径,作为在冷冻干燥压力条件下的聚集和多分散性的模型。(A) 评估在组合物1中冷冻干燥后的腺病毒载体制剂的使用通过DynaPro DLS软件的正则化拟合的DLS实验中记录的相关函数,(B) 评估在组合物2中冷冻干燥后的腺病毒载体制剂。计算的组合物1和2中的腺病毒载体制剂的流体动力学半径与未处理原液中的腺病毒颗粒的测量半径(图1A)一致,并且与文献中已知的值一致。

[0166] 图5:动态光散射 (DLS) 测定冷冻干燥后相应的腺病毒载体制剂中腺病毒颗粒的流体动力学半径,作为在冷冻干燥压力条件下的聚集和多分散性的模型。(A) 评估在原始供应商制剂中冷冻干燥后即刻腺病毒载体制剂的使用通过DynaPro DLS软件的正则化拟合的DLS实验中记录的相关函数和(B) 评估在PBS中冷冻干燥后即刻腺病毒载体制剂的相关函数。与前图相反,与未处理原液(图1A)相比,在原始供应商制剂中和在PBS中冷冻干燥后的腺病毒颗粒的流体动力学半径增加,其与更高级聚集体形成有关。

[0167] 图6:在不同制剂中冷冻干燥并随后在升高温度下储存干燥制剂后的腺病毒载体的体外感染性,作为在热压力条件下的功能性的模型。 $t=0d$ (左侧的黑色柱)显示在储存之前冷冻干燥和重构后即刻的体外感染性。虚线显示未处理的阳性对照的相应感染滴度。(A) 通过在组合物1和2中稀释再缓冲并随后在25℃和60%残余湿度下储存冷冻-干燥的制剂21天(中间的一组柱)和42天(右侧的一组柱)后的腺病毒载体组合物的体外感染性,其相比于原始供应商缓冲液和PBS。(B) 通过在组合物1和2中稀释再缓冲并随后在40℃和75%残余湿度下储存冷冻-干燥的制剂7天(中间的一组柱)和28天(右侧的一组柱)后的腺病毒载体组合物的体外感染性,其相比于原始供应商缓冲液和PBS。在组合物1和2中制备的样品中观察

到腺病毒感染性的完全保留,而在原始供应商缓冲液或PBS中的储存导致腺病毒感染性的完全丢失。

[0168] 图7:动态光散射(DLS)测定冷冻干燥并随后在40℃下储存14天后的相应腺病毒载体制剂中的腺病毒颗粒的流体动力学半径,作为在热压力条件下的聚集和多分散性的模型。(A)评估干燥的制剂在组合物1中在40℃下储存14天后的腺病毒载体制剂的使用通过DynaPro DLS软件的正则化拟合的DLS实验中记录的相关函数和(B)评估干燥的制剂在组合物2中在40℃下储存14天后的腺病毒载体制剂。计算的组合物1和2中的腺病毒载体制剂的流体动力学半径与未处理原液中的腺病毒颗粒的测量半径(图1A)一致,并且与文献中已知的值一致。

[0169] 图8:动态光散射(DLS)测定冷冻干燥后的相应腺病毒载体制剂中的腺病毒颗粒的流体动力学半径,作为在热压力条件下的聚集和多分散性的模型。(A)评估冷冻干燥并随后在原始供应商制剂中在40℃下储存14天后的腺病毒载体制剂的使用通过DynaPro DLS软件的正则化拟合的DLS实验中记录的相关函数和(B)评估冷冻干燥并随后在PBS中在40℃下储存14天后的腺病毒载体制剂的相关函数。与前图相反,与未处理原液相比,冷冻干燥并随后在原始供应商制剂中和在PBS中在升高温度下储存后的腺病毒颗粒的流体动力学半径增加,其与更高级聚集体形成有关。

[0170] 图9:在加工步骤1或加工步骤2期间制备的稳定化组合物1和2中配制后的腺病毒载体制剂的体外感染性,作为在热压力条件下的功能性的模型。分别在通过CsCl密度超速离心(加工步骤1)之后即刻,或者制备过程后期(加工步骤2)中,通过在组合物1和2中透析再缓冲腺病毒制剂。在加工步骤1中,与阳性对照(以虚线描绘)相比,观察到在两种组合物中透析后感染滴度的完全保留。相反,在加工步骤2期间当在组合物2中进行透析时导致感染滴度显著丢失接近两个对数水平,而在组合物1中透析导致感染滴度的完全保留,类似于加工步骤1所得结果。

[0171] 图10:动态光散射(DLS)测定在加工步骤1或加工步骤2期间在稳定化组合物1和2中配制后的相应腺病毒载体制剂中的腺病毒颗粒的流体动力学半径,作为聚集和多分散性的模型。在加工步骤1或2中使用透析再缓冲组合物1中的腺病毒载体颗粒制剂导致颗粒的流体动力学半径的保留,(A)和(C)。在加工步骤1中的制备期间再缓冲组合物2中的腺病毒颗粒导致腺病毒载体的流体动力学半径的完全保留,(B)。相反,在加工步骤2中的制备期间再缓冲组合物2中的腺病毒颗粒导致颗粒的流体动力学半径的增加和有关的大聚集体的形成,(D)。

[0172] 图11:反复实施冷冻和解冻循环后腺病毒载体制剂的体外感染性,作为在压力条件下的功能性的模型。(A)在加工步骤1中的制备期间通过透析再缓冲腺病毒载体制剂。(B)在加工步骤2中的制备期间通过透析再缓冲腺病毒载体制剂。在两种制备操作(加工步骤1和2)中,与虚线描绘的阳性对照相比,组合物1中再缓冲导致透析后即刻(初始滴度)和在实施5个和10个冷冻和解冻循环后感染性的完全保留,(A)和(B)。在制备过程(加工步骤1)的早期步骤期间在组合物2中再缓冲也导致透析后即刻感染性的完全保留(初始滴度;A,左侧组的柱)和实施反复冷冻和解冻循环后感染滴度的轻微丢失,(A)。相反,在加工步骤2的制备期间在组合物2中再缓冲导致透析后即刻感染滴度的显著减少(B;左侧组的柱)。进一步实施反复冷冻和解冻循环导致感染滴度的进一步显著降低(B;中间和右侧组的柱)。

[0173] 图12:动态光散射(DLS)测定在实施5个或10个冷冻和解冻循环后的稳定化组合物1中的腺病毒颗粒的流体动力学半径,作为在压力条件下的聚集和多分散性的模型。在加工步骤2中使用透析再缓冲组合物1中的腺病毒载体颗粒制剂导致(A)实施5个冷冻和解冻循环后和(B)实施10个冷冻和解冻循环后的颗粒的流体动力学半径的保留。

[0174] 图13:动态光散射(DLS)测定在实施5个冷冻和解冻循环后在加工步骤1或加工步骤2期间的稳定化组合物1和2中的腺病毒颗粒的流体动力学半径,作为在压力条件下的聚集和多分散性的模型。在加工步骤1或2中使用透析再缓冲组合物1中的腺病毒载体颗粒制剂导致实施5个冷冻和解冻循环后颗粒的流体动力学半径的保留,(A)和(B)。相反,在加工步骤1或2中的制备期间再缓冲组合物2中的腺病毒颗粒导致在实施5个冷冻和解冻循环后,颗粒的流体动力学半径的增加以及有关的更高级聚集体的形成,(C)和(D)。

[0175] 图14:在组合物1中冷冻干燥和重构后的腺病毒载体制剂的透射电子显微镜(TEM)。(A)低放大率;(B)中等放大率;(C)高放大率;(D)具有超高放大率的特别观察。腺病毒颗粒出现为二十面体形状的明亮完整颗粒(黑色箭头)。观察到少量更密集染色的不太明显的二十面体形状颗粒(白色箭头),推定代表部分不稳定的病毒粒子。在网格的背景中存在小的浅染色结构(白色箭头),但没有观察到明显存在碎片或腺病毒亚单位。腺病毒颗粒优选地出现为单个二十面体形状的明亮完整实体,并且未观察到腺病毒颗粒或碎片的聚集。

[0176] 图15:在组合物2中冷冻干燥和重构后的腺病毒载体制剂的透射电子显微镜(TEM)。(A)低放大率;(B)中等放大率;(C)高放大率;(D)具有超高放大率的特别观察。腺病毒颗粒出现为二十面体形状的明亮完整颗粒(黑色箭头)。背景呈现非常光滑,没有明显的碎片或腺病毒亚单位存在。腺病毒颗粒优选地出现为单个二十面体形状的明亮完整实体,并且未观察到腺病毒颗粒或碎片的聚集。

[0177] 图16:在PBS中冷冻干燥和重构后的腺病毒载体制剂的透射电子显微镜(TEM)。(A)低放大率;(B)中等放大率;(C)高放大率;(D)具有超高放大率的特别观察。未观察到完整的腺病毒颗粒。在网格上偶尔观察到可能代表六邻体结构的小环状结构(黑色箭头)。观察到六邻体结构均为自由实体并且与小的碎片簇(黑色箭头或球形浅染色结构(D))结合。观察到少量含有碎片的较大聚集体(B)。

[0178] 图17:在原始供应商制剂中冷冻干燥和重构后的腺病毒载体制剂的透射电子显微镜(TEM)。(A)低放大率;(B)中等放大率;(C)高放大率;(D)具有超高放大率的特别观察。未观察到完整的腺病毒颗粒。在网格上偶尔观察到可能代表六邻体结构的小环状结构(黑色箭头)。观察到六邻体结构均为自由实体并且与小的碎片簇(黑色箭头或球形浅染色结构(D))结合。

[0179] 图18:在标准缓冲液中以-80℃下储存的腺病毒载体制剂的透射电子显微镜(TEM)作为阳性对照。(A)低放大率;(B)中等放大率;(C)高放大率;(D)低放大率下特殊观察的概况图像。观察腺病毒颗粒,都是二十面体形状的明亮完整颗粒(A;黑色箭头)和密集染色的不太明显的二十面体形状颗粒(A、B和C;白色箭头),推定代表部分分散的颗粒。测量腺病毒颗粒的直径为约100nm(顶点到定点)。背景显示存在碎片(B;黑色虚线箭头)、纤维结构(C;白色虚线箭头)和小环状结构(C;黑色箭头),主要作为单个实体,很少成簇,可能代表六邻体结构(C;嵌入)。腺病毒颗粒既出现为单一实体也出现为较小簇。观察到一个含有腺病毒



和碎片的较大聚集体(D)。

[0180] 图19:在不同制剂中在5℃、25℃和37℃液体储存后的腺病毒载体的体外感染性,作为在液体压力条件下的功能性的模型。通过在不同制剂中稀释至 $1 \times 10^8$  IFU/ml来配制腺病毒载体制剂,随后将100 $\mu$ l液体储存在无菌PCR管中。在不同温度下储存后,在HEK 293细胞中进行体外感染性试验,使用腺病毒六邻体蛋白的基于抗体的比色检测以表明感染细胞中腺病毒的成功扩增。(A)在5℃下3个月后,观察到组合物3至9中配制的腺病毒载体制剂的感染滴度的完全保留(与阳性对照相比的每ml的感染单位;以虚线表示)。相反,原始供应商制剂1导致感染滴度几乎2个对数滴度的较高丢失。(B)在25℃下液体储存3个月后,在组合物3至9中配制的腺病毒载体制剂的感染滴度降低1个对数滴度,而原始供应商制剂1导致感染滴度的完全丢失(与阳性对照相比的每ml的感染单位;以虚线表示)。(C)在37℃下35天后,组合物8仍然可检测到 $1 \times 10^5$  IFU/ml的滴度,而原始供应商制剂1中的腺病毒载体在37℃下14天后就已经没有感染单位。(D)动态光散射(DLS)测定在37℃下液体储存后相应的腺病毒载体制剂中的腺病毒颗粒的PDI值,作为在液体储存压力条件下以PDI值表示的增加的粒度分布的模型。

[0181] 图20:在25℃下液体储存28天后组合物8中配制的腺病毒载体制剂的透射电子显微镜(TEM)。(A)低放大率;(B)中等放大率;(C)高放大率;(D)低放大率下特殊观察的概况图像。观察腺病毒颗粒,都是二十面体形状的明亮完整颗粒和密集染色的不太明显的二十面体形状颗粒,推定代表部分分散的颗粒。测量腺病毒颗粒的直径为约100nm(顶点到定点)。背景显示存在碎片、纤维结构和小环状结构,主要作为单个实体,很少成簇,可能代表六邻体结构。

[0182] 图21:在25℃下液体储存28天后组合物6中配制的腺病毒载体制剂的透射电子显微镜(TEM)。(A)低放大率;(B)中等放大率;(C)高放大率;(D)低放大率下特殊观察的概况图像。观察腺病毒颗粒,都是二十面体形状的明亮完整颗粒和密集染色的不太明显的二十面体形状颗粒,推定代表部分分散的颗粒。测量腺病毒颗粒的直径为约100nm(顶点到定点)。背景显示存在碎片、纤维结构和小环状结构,主要作为单个实体,很少成簇,可能代表六邻体结构。

[0183] 图22:在组合物10中在37℃下液体储存后的腺病毒载体的体外感染性,作为在液体压力条件下的功能性的模型。组合物10中的腺病毒载体制剂在37℃下液体储存14天后显示出比原始供应商制剂2中相应制剂更好的感染滴度的保留,并且在21天后更显著。

[0184] 图23:通过加工步骤1和2(PS1和PS2)制备的在组合物11和12或原始供应商制剂1和2中在37℃下液体储存后的腺病毒载体的体外感染性,作为不同加工步骤期间的功能性的模型。组合物11和12中的腺病毒载体制剂(A)在37℃下液体储存28天后比原始供应商制剂1和2中的相应制剂显示出更好的感染滴度的保留。与PBS相比(B;14天后感染性就已丢失),在使用制备步骤2的组合物11中配制的腺病毒载体制剂在37℃下储存28天后显示出显著的稳定性。

[0185] 图24:与原始供应商制剂1和2以及PBS相比,在根据PS1和PS2配制后在组合物11和12中实施不同的冻融循环后,腺病毒载体的体外感染性。组合物11和12中的腺病毒载体制剂(A)与原始供应商制剂1和2以及PBS相比,在实施5次冻融循环后显示出更好的感染滴度的保留,并且在15次冻融循环后更明显。与PBS相比,在使用制备步骤2(PS2)的组合物11中

的腺病毒载体制剂在实施10次冻融循环后显示出更好的感染性的保留。

[0186] 图25:动态光散射 (DLS) 测定在实施几次冻融循环后相应腺病毒载体制剂中腺病毒颗粒的PDI值,作为在不同加工条件下以PDI值表示的增加的粒度分布的模型。即使在20次冻融循环后,根据PS1在组合物11和12中配制的腺病毒载体组合物的PDI值也低于0.3 (A)。根据PS2在组合物11和12中配制的腺病毒载体样品导致PDI值保留低于0.3 (B)。

[0187] 图26:动态光散射 (DLS) 测定组合物13中MVA颗粒的PDI值。在实施20次冻融循环后,与原始供应商制剂1和2以及PBS相比,组合物13中MVA的PDI值小于0.5。

[0188] 以下实施例说明本发明:

[0189] 实施例1:冷冻干燥以及随后储存的腺病毒载体的功能和结构完整性的体外研究显示,包含氨基酸和糖的组合物在冷冻干燥期间稳定病毒载体。

[0190] 1.1材料与方法

[0191] 组合物1和2含有丙氨酸、精氨酸、甘氨酸、谷氨酸、赖氨酸、组氨酸和色氨酸7种氨基酸,其浓度相当于40g/l的总氨基酸。但在组合物1中,相比于组合物2,在减少其它氨基酸精氨酸、甘氨酸、赖氨酸浓度并保持丙氨酸浓度的情况下,5倍增加色氨酸浓度和1.667倍增加组氨酸和谷氨酸浓度,产生根据40g/l的总氨基酸的相同浓度。此外,与组合物2不同,在组合物1中加入浓度为0.05g/l的另外的表面活性剂聚山梨酯80。两种组合物都含有海藻糖作为相应的糖,氨基酸与海藻糖的比率为1:2。将所有组合物的pH值调节至7。

[0192] 使用在原始供应商制剂 (Firma Sirion;Martinsried/Munich;Germany) 中在-80℃下储存的浓度为 $7.5 \times 10^{10}$  IFU/ml的腺病毒原液。

[0193] 1.1.1样品制备和冷冻干燥

[0194] 通过用组合物1或组合物2将原液稀释至 $1 \times 10^8$  IFU/ml的浓度来再缓冲腺病毒载体原液。为了比较,用原始供应商制剂或PBS将原液稀释至相同浓度。

[0195] 为了制备用于冷冻干燥的样品,将不同的腺病毒制剂在500 $\mu$ l体积的2R冷冻干燥小瓶 (Schott AG;Mainz;Germany) 中等分,随后使用以下干燥参数冷冻-干燥:

[0196]

方案步骤	目标 T (°C)	斜率(h)	保持(h)	压强(mbar)
引入	20	0	0	1000
冷冻	-50	2:00	2:00	1000
升华	-50	0:01	0:30	0.045
	-35	3:00	30:00	0.045
二次干燥	20	3:00	7:00	0.009

[0197] 冷冻干燥后,目视检查样品,将样品的一部分在2-8℃下短时间储存直至在时间点 t=0时分析初始感染滴度。样品的另一部分根据国际协调会 (ICH) 指南在25℃、60%残余湿度的环境条件下储存21天或42天,或在40℃、75%残余湿度的环境条件下储存7天或28天。

[0198] 1.1.2细胞培养物中腺病毒载体感染滴度的测定

[0199] 为了分析腺病毒载体制剂的感染滴度,应用在HEK293细胞培养物中基于抗体的病毒滴定实验,在感染细胞中成功扩增腺病毒后使用腺病毒六邻体蛋白的检测。将 $2.5 \times$

10<sup>5</sup>HEK 293 (CCS) 细胞 (Firma Sirion; Martinsried/Munich; Germany) 以500μl的体积接种于24孔微量滴定板的每个孔中。腺病毒载体制剂在冷冻干燥后即刻重构或在25℃和40℃下储存后在指定时间点重构。使用原始供应商制剂 (Firma Sirion; Martinsried/Munich; Germany) 中在-80℃下储存的浓度为7.5×10<sup>10</sup>IFU/ml的腺病毒原液的等分试样作为阳性对照。随后,制备腺病毒样品的连续稀释液,并将每孔50μl所得稀释液用于感染细胞。将板在37℃下孵育42小时。感染后,将细胞用甲醇固定,与第一抗-六邻体蛋白抗体 (Santa Cruz Biotechnology, Inc.; Dallas; Texas; USA) 一起孵育,随后与对第一抗体特异的辣根过氧化物酶 (HRP) 偶联的第二抗-鼠抗体 (Cell Signaling Technology; Danvers; Massachusetts; USA) 一起孵育,并进行与二氨基联苯胺 (Carl Roth GmbH和Co. KG; Grafrath; Germany) 的HRP酶促反应,其中棕色表示感染的细胞。通过在显微镜下计数棕色细胞来定量感染的细胞的数量,其中各感染的细胞计为一个感染性病毒颗粒。

#### [0200] 1.1.3动态光散射 (DLS) 测量

[0201] 与对应于在-80℃下储存的腺病毒原液的等分试样的未处理阳性对照相比,对冷冻干燥前再缓冲后即刻取的样品以及腺病毒载体制剂重构后的样品进行DLS。在后一种情况下,DLS在冷冻干燥后立即 (t=0) 进行,或在25℃ (21天、42天) 和在40℃ (7天、28天) 下储存后的相关时间点进行。

[0202] 为此,将5μl样品移液到特殊的DLS吸收池中,并在DynaPro Nanostar DLS仪器 (Wyatt Technology Europe GmbH; Dernbach; Germany) 中分析。对于各实验制剂,在相同条件下进行空白测量。在10或20个循环中以20至40秒的采集时间进行DLS测量。使用DynaPro DLS软件分析所得的相关曲线。

#### [0203] 1.1.4透射电子显微镜

[0204] 通过稀释配制腺病毒载体制剂,随后在组合物1和2以及原始供应商制剂和PBS中冷冻干燥。EM图像由Vironova (Sweden) 获得。在重构冷冻干燥的载体后,将3μl样品施加到合适的亲水化EM网格 (例如,连续碳) 上,用水洗涤,并使用2%乙酸双氧铀进行负染色。使用在100kV加速电压下运行的FEI Tecnai G2 Spirit Biotwin电子显微镜对网格成像。在代表性区域中获得低放大率和高放大率图像。在阳性对照的情况下,将原始供应商制剂中3μl未稀释的冷冻储存样品 (-80℃) 施加到网格上。

#### [0205] 1.2结果

[0206] 有趣的是,与在原始原液中未处理的腺病毒颗粒 (图1A) 相比,在将腺病毒载体制剂与根据本发明的溶液 (组合物1或组合物2) 混合后即刻在DLS实验中记录的相关函数的评估表明腺病毒载体的流体动力学半径完全保留 (图1B和C)。与未处理的腺病毒载体 (图1A) 相比,在冷冻干燥前样品的制备过程期间腺病毒原液通过稀释与原始供应商制剂或PBS类似地混合已经导致测量的腺病毒载体的流体动力学半径的显著增加 (图2A和B)。

[0207] 冷冻干燥后的体外感染性试验显示在冷冻干燥生物制药产品的生产过程早期在稳定化组合物1和2中的腺病毒载体制剂导致感染滴度相当于图1中虚线所示的阳性对照。因此,在冷冻干燥后观察到感染滴度的完全保留。相反,当在原始供应商制剂中再缓冲的腺病毒载体被冷冻-干燥时,观察到感染滴度的显著丢失,并且在PBS中的冷冻干燥甚至导致相应的感染滴度的完全丢失 (图3)。

[0208] 腺病毒制剂的干燥产品重构后的体外感染性结果与动态光散射实验的流体动力

学半径的平行测定结果很一致。已经在早期阶段缩小规模的步骤和随后冷冻干燥期间腺病毒载体制剂与根据本发明的组合物1和2的组合导致病毒颗粒的流体动力学半径的完全保留(实施例1;图4A和B)。相反,在原始供应商制剂中冷冻干燥相应的腺病毒载体制剂导致粒径的增加(实施例1;图5A)。与常见的磷酸盐缓冲盐水(PBS)的组合物类似的样品制备操作已经在冷冻干燥后导致粒径的大幅增加(实施例1图5B)并且形成显著量的更高级聚集体。

[0209] 这些差异在冷冻-干燥制剂储存后甚至更加显著。观察到在原始供应商制剂中冷冻-干燥的病毒载体的功能完全丢失(图6),类似于在PBS中获得的结果。相反,即使在25℃或甚至在40℃下储存后,在生产过程早期在稳定化组合物1和2中配制的冷冻-干燥的腺病毒载体组合物保留了与阳性对照(即,在冷冻-干燥之前的腺病毒载体(图6的图表中以虚线所示))几乎相同的病毒活性。

[0210] 体外感染性实验的这些结果与平行进行的DLS实验很好地对应。例如,图7和图8中描绘了在40℃下储存14天后,分别在根据本发明的组合物1和2中或在原始供应商制剂和PBS中储存干燥的腺病毒载体组合物后记录的DLS相关函数的评估。在稳定化组合物1和2中储存的干燥的腺病毒载体制剂导致测定的腺病毒颗粒的流体动力学半径的保留(实施例1;图7A和7B),其与在原始供应商制剂和在PBS中储存的腺病毒颗粒(实施例1;图8A和8B)相反。

[0211] 重构冷冻干燥的腺病毒制剂,并使用电子显微镜分析进一步表征。该分析进一步证实,根据本发明,腺病毒载体与所述至少三种赋形剂和糖以至少1:2的比率组合,为干燥的腺病毒载体制剂提供优异的稳定性,同时也确证了上述详细的感染性和DLS结果。

[0212] 组合物1和2中相应的腺病毒制剂的电子显微镜图像(图14和15)显示相对均匀分布的腺病毒颗粒,大多数腺病毒颗粒出现为约100nm直径的二十面体形状的明亮完整颗粒(黑色箭头)。观察到少量较密集染色的不太明显的二十面体形状颗粒(白色箭头),推定代表部分不稳定的病毒粒子。在网格的背景中存在小的浅染色结构(白色箭头),但没有观察到明显存在碎片或腺病毒亚单位(图14B和14C)。对于组合物2,背景呈现非常光滑,没有明显的碎片或腺病毒亚单位存在(图15)。在组合物1和2中配制的腺病毒制剂中,腺病毒颗粒优选地出现为单个二十面体形状的明亮完整实体,并且未观察到腺病毒颗粒或碎片的聚集。相反,在原始供应商制剂(图17)和PBS(图16)中冷冻干燥后的腺病毒载体的分析显示,未观察到完整的腺病毒颗粒。在网格上偶尔观察到可能代表六邻体结构的小环状结构(黑色箭头)(黑色箭头,图16C和17D),都是自由实体并且与小的碎片簇(黑色箭头,图16A和17A和B)或球形浅染色结构(图16D和17D)结合。在PBS中的相应腺病毒制剂中,观察到少量含有碎片的较大聚集体(图16B)。

[0213] 为了比较,图18显示在-80℃下标准缓冲液中储存的显著更高浓度的阳性对照的电子显微镜分析。观察腺病毒颗粒,都是二十面体形状的明亮完整颗粒(图18A;黑色箭头)和密集染色的不太明显的二十面体形状颗粒(图18A、B和C;白色箭头),推定代表部分分散的颗粒。测量腺病毒颗粒的直径为约100nm(顶点到定点)。背景显示存在碎片(图14B;黑色虚线箭头)、纤维结构(图18C;白色虚线箭头)和小环状结构(图18C;黑色箭头),主要作为单个实体,很少成簇,可能代表六邻体结构(图18C;嵌入)。腺病毒颗粒既出现为单一实体也出现为较小簇。观察到一个含有腺病毒和碎片的较大聚集体(图18D)。应注意,阳性对照用保存在-80℃的标准缓冲液中的腺病毒组合物测量,其含有感染滴度为 $2 \times 10^{11}$  IU/ml。相反,根

据图14至17中的EM图像,冷冻干燥和重构的腺病毒制剂的感染滴度为约 $1 \times 10^8$  IU/ml。

[0214] 实施例2:冷冻和解冻压力后不同腺病毒载体制剂的功能和结构完整性的体外研究显示,包含氨基酸和糖的组合物在冷冻和解冻循环期间稳定病毒载体。

## [0215] 2.1材料与方法

### [0216] 2.1.1样品制备和进一步加工

[0217] 含有编码eGFP蛋白的DNA的腺病毒5型载体的高滴度腺病毒载体原液。用腺病毒颗粒转导 $5 \times 10^8$  HEK293细胞。转导后48小时,收集细胞并通过Na-脱氧胆酸和DNase I处理进行病毒颗粒的释放。通过CsCl梯度超速离心纯化病毒颗粒,然后通常在PD10柱上在原始供应商制剂中进行缓冲液交换,随后测定感染滴度。随后将得到的高滴度腺病毒原液等分并在 $-80^\circ\text{C}$ 下储存。

[0218] 样品制备-加工步骤1:在CsCl梯度超速离心后立即再缓冲制备的腺病毒载体来制备腺病毒载体制剂。收集获得的腺病毒载体,并在 $2-8^\circ\text{C}$ 下在组合物1或组合物2中透析(如1.1中所述)。将所得制剂等分并在 $-80^\circ\text{C}$ 下储存。

[0219] 样品制备-加工步骤2:将冷冻( $-80^\circ\text{C}$ )的腺病毒原液( $7.5 \times 10^{10}$  IFU/ml; Sirion, Martinsried/Munich, Germany)在原始供应商缓冲液中解冻(室温;RT),随后在 $2-8^\circ\text{C}$ 下在组合物1和组合物2中透析。

### [0220] 2.1.2来自加工步骤1和步骤2制备的腺病毒样品反复冷冻和解冻循环

[0221] 为了分析在随后的压力条件期间腺病毒载体制剂的稳定性,将在组合物1或组合物2中配制的50 $\mu\text{l}$ 的腺病毒载体进行反复冷冻( $-80^\circ\text{C}$ )和解冻(RT)循环。通过在HEK 293细胞培养物中的病毒滴定(在1.1.2中描述),在初始时间点 $t=0$ 和5次冷冻和解冻循环以及10次冷冻和解冻循环后测定体外感染性(在1.1.2中描述)。平行地,通过DLS测量腺病毒颗粒的流体动力学半径(在1.1.3中描述)。

## [0222] 2.2结果

[0223] 体外感染性试验显示,与阳性对照(图9中虚线)相比,组合物1完全保留了来自加工步骤1和步骤2中腺病毒载体制剂的感染滴度(图9)。在组合物2中超速离心步骤(加工步骤1)后立即再缓冲腺病毒载体制剂也完全保留了腺病毒载体制剂的感染性。有趣的是,在加工步骤2之后使用的组合物2导致初始滴度约2个对数水平的丢失(图9)。

[0224] 经另外的冷冻和解冻循环(5次和10次),无论生产加工步骤和再缓冲的时间点如何,组合物1都保留了完全的感染滴度(图11A和B)。相反,当在两种不同的加工步骤1和2中制备时,组合物2导致显著不同的效果。根据加工步骤2获得的组合物2样品的感染滴度在5次冷冻和解冻循环后显著进一步降低,在10次冷冻和解冻循环后甚至降低更大(图11B)。当在组合物2中在较早加工步骤1中配制腺病毒载体,在5次冷冻和解冻循环后观察到仅较小的滴度丢失。10次冷冻和解冻循环导致更大的降低,但与加工步骤2中的制剂相比程度较小(图11A)。

[0225] 与在反复冷冻和解冻循环之前和之后感染滴度的测定平行,使用动态光散射(DLS)分析相应腺病毒颗粒的流体动力学半径(图10、12和13)。使用超速离心(制备步骤1)纯化步骤后即刻再缓冲腺病毒载体制剂导致两种组合物中的病毒颗粒的流体动力学半径的完全保留(图10A和10B),确证相应的体外感染性的完全保留(图9)。在组合物1的情况下,根据加工步骤2再缓冲腺病毒载体制剂后,观察到流体动力学半径的轻微增加(图10C),其

与图9中显示的感染性结果一致。相反,在相应于加工步骤2的组合物2中再缓冲腺病毒载体制剂导致腺病毒颗粒的流体动力学半径的显著增加(图10D),伴随着更高级聚集体的形成,其可以解释体外感染性测试中功能的丢失(图9)。

[0226] 在5次和10次反复冷冻和解冻循环后,通过DLS测量病毒颗粒(特别是组合物2中)的流体动力学半径的变化。当在加工步骤1和2期间制备时,组合物1中没有观察到显著的增加。例如,图12中描绘了实施5次和10次冷冻和解冻循环后组合物1中腺病毒颗粒大小的DLS结果。当在加工步骤1期间使用组合物2时,已经5次冷冻和解冻循环后的流体动力学半径显著增加,伴随更高级聚集体的形成,10次冷冻和解冻循环后和在加工步骤2中使用时,其由于半径的进一步增加和更高级的聚集体的形成超出了DLS测量限制而无法测量(图13C和D)。图13A至D描绘了实施5次冷冻和解冻循环后在加工步骤1或2期间制备的组合物1和2中的腺病毒颗粒大小的表现。

[0227] 总之,组合物1在两种实施的早期生产步骤期间通常对腺病毒载体颗粒展现出优异的稳定功效。相反,尽管组合物2在超速离心后即刻使用时显示出稳定功效,但与组合物1相比在生产过程的后期使用时观察到降低的稳定功效。

[0228] DLS数据与实施例1中显示的体外感染性数据对应。这得出结论,在病毒载体组合物的生产过程的早期使用基于氨基酸的特别定制的稳定化组合物对于生物制药制备的进一步加工步骤期间的稳定性是重要的。此外,在降低溶液的多分散性方面基于病毒载体的组合物的稳定化导致溶液具有高体外感染性。

[0229] 实施例3:在25°C和37°C下液体储存期间腺病毒载体的功能和结构完整性的体外研究显示,基于氨基酸的组合物包含至少三种、四种和或五种赋形剂,优选氨基酸与糖(例如,蔗糖)以氨基酸与糖的比率为至少1:2组合,可显著保持细胞培养物中病毒载体的感染性,并且保持粒度分布,多分散性指数值低于0.3。

[0230] 3.1材料与方法

[0231] 组合物3、4、5和6含有以下3种氨基酸,分别为:

[0232] • 组氨酸、谷氨酸、甲硫氨酸(组合物3),

[0233] • 组氨酸、赖氨酸、甲硫氨酸(组合物4),

[0234] • 组氨酸、甘氨酸、甲硫氨酸(组合物5)和

[0235] • 组氨酸、丙氨酸、谷氨酸(组合物6)。

[0236] 组合物7和8含有以下4种氨基酸,分别为:

[0237] • 组氨酸、赖氨酸、甘氨酸、精氨酸(组合物7),和

[0238] • 组氨酸、赖氨酸、丙氨酸、甲硫氨酸(组合物8)。

[0239] 组合物9含有5种氨基酸,组氨酸、甘氨酸、丙氨酸、谷氨酸和甲硫氨酸。

[0240] 所有组合物另外含有固定浓度的40g/l蔗糖和2mM  $\text{MgCl}_2$ ,导致在组合物3、4、5和6的情况下,不同的氨基酸与糖的比率分别为1:3、1:1.3、1:1.6和1:1.5。在组合物7和8的情况下,在两种组合物中氨基酸与糖的比率都为1:1:1。在组合物9中将氨基酸与糖的比率调整至1:1.5。在所有组合物中将pH值调节至7.4。

[0241] 使用在原始供应商制剂(Firma Sirion;Martinsried/Munich;Germany)中在-80°C下储存的浓度为 $1 \times 10^{11}$  IFU/ml的腺病毒原液。原始供应商制剂含有10mM HEPES, pH 8, 4g/l蔗糖和2mM  $\text{MgCl}_2$ 。

### [0242] 3.1.1样品制备与液体储存

[0243] 用含有编码eGFP蛋白的DNA的高滴度腺病毒5型载体转导HEK293细胞。转导后48小时,收集细胞并通过Na-脱氧胆酸和DNase I处理进行病毒颗粒的释放。通过CsCl梯度超速离心纯化并浓缩病毒颗粒,然后在PD10柱上在原始供应商制剂中进行缓冲液交换,随后测定感染滴度。随后将得到的高滴度腺病毒原液等分并在-80℃下储存。原始供应商制剂中腺病毒原液的初始滴度测定为约 $2 \times 10^{11}$  IFU/ml。将腺病毒载体原液在包含根据上文3.1段的组合物的基础组分的原液中通过稀释再缓冲至 $5 \times 10^8$  IFU/ml的浓度,并随后使用根据上文3.1段的组合物的 $1.25 \times$ 浓缩物进一步稀释至终样品浓度为 $1 \times 10^8$  IFU/ml,得到腺病毒载体制剂用于随后液体储存。将50 $\mu$ l腺病毒载体制剂等分于无菌100 $\mu$ l PCR小瓶中,随后分别在5℃和25℃下储存多至3个月,并在37℃下储存多至35天。在液体储存期间的指定时间点以及初始时间点 $t=0$ ,根据上文1.1.2段中详述的在HEK 293细胞培养物中通过病毒滴定测定感染滴度。平行地,根据上文1.1.3段所述的使用略微不同的如下方案通过DLS测量腺病毒颗粒的流体动力学半径和相应的多分散性指数。分别地,用无菌过滤水(0.02nm)将10 $\mu$ l的腺病毒载体制剂稀释到合适浓度的腺病毒载体,在80和40个循环中以1至3秒的采集时间来进行DLS测量。使用DynaPro DLS软件分析所得的自相关函数,从而评估流体动力学半径(nm)以及关于多分散性指数(PDI)的粒度分布。根据本发明的组合物的特殊成分促成所得的分析的腺病毒颗粒的自相关函数。因此,所得自相关函数的差异和没有病毒载体的组合物导致DLS测量的计算结果。

[0244] 如上文1.1.4段所述进行电子显微镜分析。

### [0245] 3.2结果

#### [0246] 液体储存

[0247] 在根据本发明的包含三种、四种或五种氨基酸的组合物3至9(参见上文3.1段)中在5℃下液体储存3个月,与阳性对照相比显示感染滴度约 $1 \times 10^8$  IFU/ml的完全保留(图19A)。相反,在原始供应商制剂中储存的腺病毒颗粒在5℃下液体储存3个月后的感染滴度显著降低至约 $1 \times 10^6$  IFU/ml(图19A)。此外,在原始供应商制剂中的腺病毒载体颗粒在25℃下液体储存导致液体储存21天后感染滴度就已经降低至约 $1 \times 10^6$  IFU/ml,在液体储存1个月后感感染滴度进一步降低,液体储存1个月后再进一步降低至约 $1 \times 10^5$  IFU/ml。在原始供应商制剂中在25℃下进一步液体储存3个月导致腺病毒颗粒感染滴度的完全丢失(图19B)。另一方面,分别在包含三种、四种和五种氨基酸的组合物3至9中配制的腺病毒颗粒甚至在25℃下液体储存3个月导致腺病毒载体制剂的感染滴度的近乎完全保留(约 $1 \times 10^7$  IFU/ml;图19B)。在包含三种和或四种氨基酸的组合物4和8中配制的腺病毒载体颗粒甚至在37℃下液体储存21天导致感染滴度的显著保留,与在37℃下液体储存21天的原始供应商制剂中的感染滴度的完全丢失相比,其具有残余的滴度为约 $1 \times 10^6$  IFU/ml。而进一步在37℃下液体储存35天导致组合物4中的感染滴度丢失,包含四种氨基酸的组合物8中腺病毒载体的相应滴度保持在约 $1 \times 10^5$  IFU/ml(图19C)。

#### [0248] DLS测量

[0249] 使用DLS测量分析在37℃下液体储存14天至约35天期间腺病毒载体组合物的分子完整性。除了评估腺病毒颗粒的流体动力学半径之外,还测定了多分散性指数(PDI)以及D10、D50和D90的值作为腺病毒颗粒组合物中粒度分布的参数。图15中显示在35℃下液体储



存14天和35天后,与原始供应商制剂中相应PDI值相比,组合物6、8和9中配制的腺病毒载体的PDI值。与组合物6、8和9中相应PDI值相比,在原始供应商制剂中配制的腺病毒载体组合物在时间点 $t=0$ 处的初始PDI值已显著增加(PDI约0.25),伴随着强标准偏差。这些发现表明,与组合物6、8和9中的腺病毒颗粒在时间点 $t=0$ 处具有窄粒度分布(PDI约0.1)相比,原始供应商制剂中出现尺寸波动的大颗粒。在35℃下储存14天后,组合物6、8和9中的粒度分布略微增加至不同程度,但值保持在0.1至0.2。在37℃下液体储存14天后,原始供应商制剂中的粒度分布略微下降。在37℃下液体储存35天后,在所有制剂中PDI值进一步增加,特别是在原始供应商制剂中,其PDI值增加至约0.26,伴随着强标准偏差,表明具有变化尺寸的大颗粒的出现。在组合物6和8中,对应PDI值的粒度分布也增加但与原始供应商制剂相比增加较小程度,即在组合物6的情况下,PDI为0.234,在组合物8的情况下,PDI为0.171。原始供应商制剂中的大标准偏差和PDI的显著增加可解释在37℃下液体储存35天后由于出现变化尺寸的大颗粒而在该制剂中感染性丢失。相反,在包含四种氨基酸的组合物8中液体储存腺病毒载体导致PDI值保持为0.171,具有小的标准偏差,表明出现大多数测量的颗粒代表与窄粒度分布有关的感染性颗粒(图19D)。

#### [0250] 透射电子显微镜

[0251] 此外,如上文1.1.4段所述,使用透射电子显微镜进一步分析在25℃下液体储存2个月后组合物5和8中配制的腺病毒载体制剂的分子完整性。在获得的电子显微镜图像中,观察到大多数腺病毒颗粒为完整的二十面体形状的明亮颗粒(图20和21;黑色箭头)。顶点到顶点测量腺病毒的直径为约100nm。腺病毒颗粒优选出现为单一实体。然而,背景显示存在腺病毒载体碎片,诸如大的多形结构和较小的颗粒结构,可能代表腺病毒亚组分,诸如六邻体和纤维。偶尔可以观察到腺病毒颗粒和碎片的聚集(图20和21)。

[0252] **实施例4:**在37℃的液体储存期间在指定时间点对腺病毒载体组合物的感染滴度分析显示,与原始供应商制剂相比,根据本发明的包含4种氨基酸的组合物更好的稳定功效。

#### [0253] 4.1材料与方法

[0254] 在该实施例中使用的组合物11含有组氨酸、赖氨酸、丙氨酸、甲硫氨酸四种氨基酸,与40g/l蔗糖组合,导致氨基酸与糖的比率为1.1:1。将制剂的pH值调节至7.4。为了比较,应用标准原始供应商制剂2,其包含1.522g/l组氨酸、50g/l蔗糖、1mM  $MgCl_2$ 、1.211g/l Tris、4.383g/l NaCl、0.029g/l EDTA、0.005% (v/v) 乙醇和0.2% 聚山梨酯80,pH为7.4。

[0255] 使用在原始供应商制剂(Firma Sirion;Martinsried/Munich;Germany)中在-80℃下储存的浓度为 $2 \times 10^{11}$  IFU/ml的腺病毒血清型5 (Ad5)。原始供应商制剂含有10mM HEPES,pH 8,4g/l蔗糖和2mM  $MgCl_2$ 。

#### [0256] 4.1.1样品制备与液体储存

[0257] 用含有编码eGFP蛋白的DNA的高滴度腺病毒5型载体转导HEK293细胞。转导后48小时,收集细胞并通过Na-脱氧胆酸和DNase I处理释放病毒颗粒。通过CsCl梯度超速离心纯化并浓缩病毒颗粒,然后在PD10柱上在原始供应商制剂中进行缓冲液交换,随后测定感染滴度。随后将得到的高滴度腺病毒原液等分并在-80℃下储存。原始供应商制剂中腺病毒原液的初始滴度测定为约 $2 \times 10^{11}$  IFU/ml。在第一步骤中,用原始供应商制剂以1:2稀释初始感染性为 $2 \times 10^{11}$  IFU/ml的腺病毒原液得到起始浓度为 $1 \times 10^{11}$  IFU/ml。将腺病毒载体原液在



包含根据上文4.1部分的组合物的基础组分的原液中以1/200稀释再缓冲至浓度 $5 \times 10^8$  IFU/ml。随后使用根据上文4.1部分的组合物的 $1.25 \times$ 浓缩物进一步1:5稀释样品至达到终样品浓度为 $1 \times 10^8$  IFU/ml,用于随后液体储存。将50 $\mu$ l腺病毒载体制剂等分到无菌100  $\mu$ l PCR小瓶中,随后在37 $^{\circ}$ C下储存长达21天。在初始时间点 $t=0$ 以及液体储存期间的指定时间点,根据上文1.1.2部分在HEK 293细胞培养物中通过病毒滴定测定感染滴度。

[0258] 4.2结果

[0259] 液体储存

[0260] 在包含四种氨基酸的组合物11中配制的腺病毒载体的液体储存,与标准原始供应商制剂2相比,导致在37 $^{\circ}$ C下液体储存14天后更好的感染滴度的保留,且在37 $^{\circ}$ C下液体储存21天后更加明显(图22)。该数据进一步确证了上述实施例3的结果,其中最有效的稳定化组合物也是包含组氨酸、赖氨酸、丙氨酸、甲硫氨酸四种氨基酸,与40g/l蔗糖组合,氨基酸与糖的比率为1.1:1(组合物8)。因此,组氨酸、赖氨酸、丙氨酸、甲硫氨酸四种氨基酸与40g/l蔗糖组合且氨基酸与糖的比率为1.1:1的组合在热压力和液体储存期间,表现出优于标准制剂的腺病毒载体颗粒的稳定性,如4.1部分所述。

[0261] 实施例5:在不同加工步骤和随后实施几次冻融循环后以及在37 $^{\circ}$ C下液体储存期间对腺病毒载体的功能和结构完整性的体外研究显示,基于氨基酸的组合物包含至少三种、四种和五种赋形剂,优选氨基酸与糖(例如蔗糖)以氨基酸与糖的比率为至少1:2组合,显著保持细胞培养物中的病毒载体的感染性,并且保持粒度分布,多分散性指数值低于0.3。

[0262] 5.1材料与amp;方法

[0263] 组合物11含有丙氨酸、组氨酸、谷氨酸三种氨基酸,与40g/l蔗糖以氨基酸与糖的比率为1:1.5组合。该实施例中使用的组合物12含有组氨酸、赖氨酸、丙氨酸、甲硫氨酸四种氨基酸,与40g/l蔗糖组合,导致氨基酸与糖的比率为1.1:1。将制剂的pH值调节至7.4。为了比较,应用标准原始供应商制剂2,其包含1.522g/l组氨酸、50g/l蔗糖、1mM  $MgCl_2$ 、1.211g/l Tris、4.383g/l NaCl、0.029g/l EDTA、0.005% (v/v) 乙醇和0.2% 聚山梨酯80,pH为7.4,以及应用另一标准原始供应商制剂1,其包含10mM HEPES,pH 8,4g/l蔗糖和2mM  $MgCl_2$ ,以及标准缓冲液PBS。

[0264] 使用在原始供应商制剂(Sirion;Martinsried/Munich;Germany)中在-80 $^{\circ}$ C下储存的浓度为 $2 \times 10^{11}$  IFU/ml的腺病毒血清型5(Ad5)原液。原始供应商制剂含有10mM HEPES,pH 8,4g/l蔗糖和2mM  $MgCl_2$ 。

[0265] 使用在Tris-HCL (pH 9)中的修饰的安卡拉痘苗病毒(MVA)载体用于冷冻和解冻实验和随后的DLS分析。

[0266] 5.1.1样品制备与液体储存

[0267] 用含有编码eGFP蛋白的DNA的高滴度腺病毒5型载体转导HEK293细胞。转导后48小时,收集细胞并通过Na-脱氧胆酸和DNase I处理进行病毒颗粒的释放。通过CsCl梯度超速离心纯化并浓缩病毒颗粒。腺病毒载体颗粒的进一步配制在以下两个不同的加工步骤中进行。

[0268] 加工步骤1:在CsCl梯度超速离心后立即再缓冲制备的腺病毒载体来制备腺病毒载体制剂。在第一步骤中,将获得的浓缩并收集的腺病毒载体带在标准原始供应商制剂1中

以1:1稀释,并在根据本发明的组合物11和12(如5.1所述)中以及在标准原始供应商制剂1和2和在标准缓冲液PBS中在2-8℃下使用透析再缓冲。

[0269] 加工步骤2:超速离心后,将获得的浓缩并收集的腺病毒载体带在标准原始供应商制剂1中以1:1稀释并在标准原始供应商制剂1中在2-8℃下使用透析再缓冲。随后将所得高滴度的腺病毒原液等分并储存在-80℃。解冻后,将标准原始供应商制剂1中的腺病毒载体在根据本发明的组合物11(如5.1所述)中和标准缓冲液PBS中在2-8℃下第二次使用透析再缓冲。

[0270] 在两个加工步骤之后,标准原始供应商制剂3和1以及根据本发明的组合物中的腺病毒原液的初始滴度测定为约 $1 \times 10^{11}$  IFU/ml。对于随后实施几次冷冻和解冻循环,将50μl高滴度腺病毒载体制剂等分于无菌100μl PCR小瓶中并进行反复冷冻(在-80℃下1小时)和解冻(在室温下1小时)循环。在时间点 $t=0$ 和实施5次、10次、15次和20次冷冻和解冻循环后,根据1.1.2段在HEK 293细胞培养物中通过病毒滴定测定感染滴度。平行地,根据1.1.3段使用根据3.1.1段略微不同的方案通过DLS测量腺病毒颗粒的流体动力学半径和相应的多分散性指数。

[0271] 对于随后在37℃下液体储存,将不同制剂中的高滴度腺病毒原液进一步稀释至约 $1 \times 10^8$  IFU/ml的感染滴度。将50μl稀释的腺病毒载体制剂等分到无菌的100μl PCR小瓶中,随后在37℃下储存长达28天。在初始时间点 $t=0$ 以及在37℃下液体储存14天和28天后,根据1.1.2段在HEK 293细胞培养物中通过病毒滴定测定感染滴度。平行地,根据1.1.3段使用根据3.1.1段略微不同的方案通过DLS测量腺病毒颗粒的流体动力学半径和相应的多分散性指数。

[0272] 对于MVA制剂,使用包含组氨酸、甲硫氨酸、丙氨酸三种氨基酸的组合物13。随后,实施冻融循环并通过DLS分析样品。

[0273] 5.2结果

[0274] 液体储存

[0275] 在图23中,描绘了在37℃下液体储存长达28天期间的两种不同加工步骤(PS)之后腺病毒制剂的体外感染性。与标准缓冲液PBS相比,组合物12和11中的腺病毒载体制剂显示在37℃下液体储存期间通过加工步骤1(PS1)制备的感染滴度显著更高的保留,并且保持与两种标准原始供应商制剂2和1相当。根据加工步骤2(PS2)制备的腺病毒载体制剂显示,在37℃下液体储存28天期间,与标准缓冲液PBS中的制剂相比,甚至与在原始供应商制剂中通过加工步骤(PS1)制备的腺病毒载体制剂相比,在组合物11中配制的腺病毒载体的感染滴度的更高的稳定性。

[0276] 实施几次冷冻和解冻循环后的体外感染性

[0277] 根据加工步骤1(PS1)在组合物11和12中制备的腺病毒载体的制剂与原始供应商制剂2和1相比显示出体外感染性的显著保持,特别是在实施15次冷冻和解冻循环后(图24A)。相反,在标准缓冲液PBS中制备的腺病毒载体制剂在加工步骤1(PS1)后就已完全丢失感染滴度(图24A)。此外,根据加工步骤2在组合物11中制备的腺病毒载体制剂在实施多达10次冷冻和解冻循环后显示出几乎完全保留的体外感染性(图20B)。相反,根据加工步骤2在标准缓冲液PBS中制备的腺病毒载体制剂在实施5次冷冻和解冻循环后就已导致感染性的完全丢失(图24B)。

**[0278] DLS测量**

**[0279]** 在平行进行的DLS测量中进行了类似的观察。根据加工步骤1 (PS1) 的样品制备导致,在组合物11和12以及原始供应商制剂1中样品制备后即刻(0) 在腺病毒载体制剂中的粒度分布几乎完全保留,表达为计算的多分散性指数低于0.3。相反,根据加工步骤1 (PS1) 在标准缓冲液PBS中制备的腺病毒载体制剂在制备后已显示更高的粒度分布,多分散性指数 $>0.3$ ,在实施仅5次冷冻和解冻循环后更明显。进一步实施10次和20次冷冻和解冻循环导致PBS中配制的病毒颗粒的完全降解。对根据本发明的组合物11和12中配制的腺病毒载体制剂进一步实施5、10和20次冷冻和解冻循环导致初始粒度分布 $<0.3$ 的近乎完全保留。相反,在原始供应商制剂1中配制的腺病毒载体制剂在实施10次以及20次冷冻和解冻循环后导致显著增加的PDI $>0.3$ ,伴随着增加的标准偏差,表明除主要腺病毒载体颗粒外,出现变化尺寸的更大颗粒(图25)。

**[0280]** 根据加工步骤2 (PS2) 的样品制备显示,在根据本发明的组合物11和12中配制的腺病毒载体制剂的情况下,实施5次、10次、15次和20次冷冻和解冻循环后粒度分布的保留(PDI $<0.3$ )。相反,根据加工步骤2 (PS2) 在标准缓冲液PBS中的腺病毒载体的制剂导致在实施10次、15次和20次冷冻和解冻循环后完整的腺病毒颗粒完全丢失。

**[0281]** 与原始供应商制剂2和1以及PBS相比,在组合物13中用MVA进行类似的实验(图26)。当MVA在组合物13中配制时,PDI小于0.5。相反,在原始供应商制剂1和2中在样品制备后和实施20次冷冻和解冻循环后已显示PDI值高于0.5。

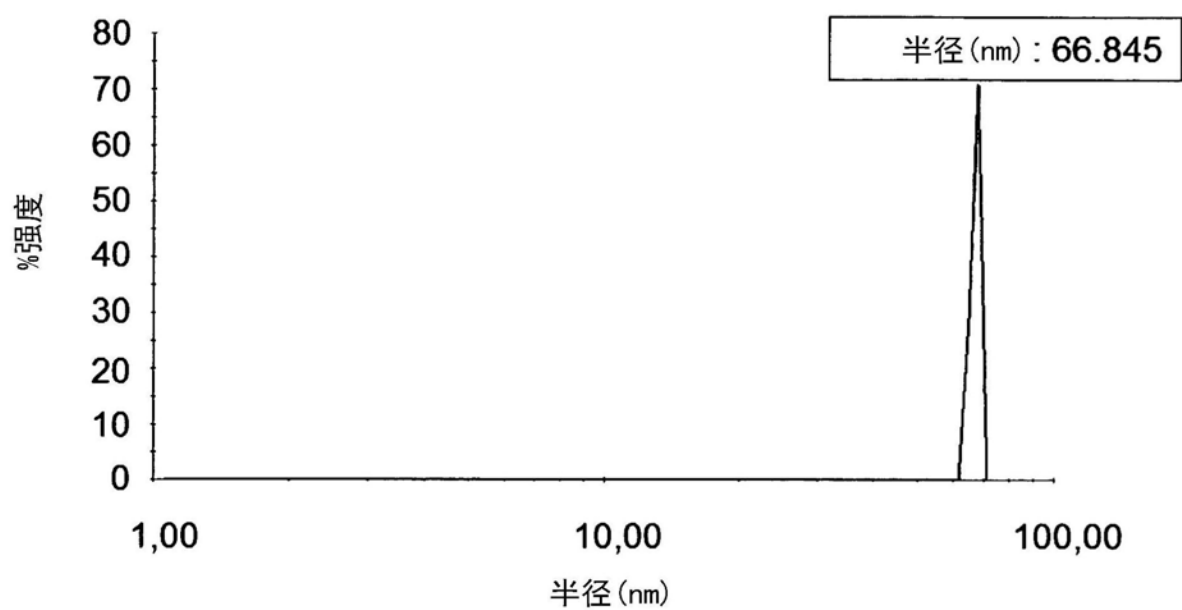
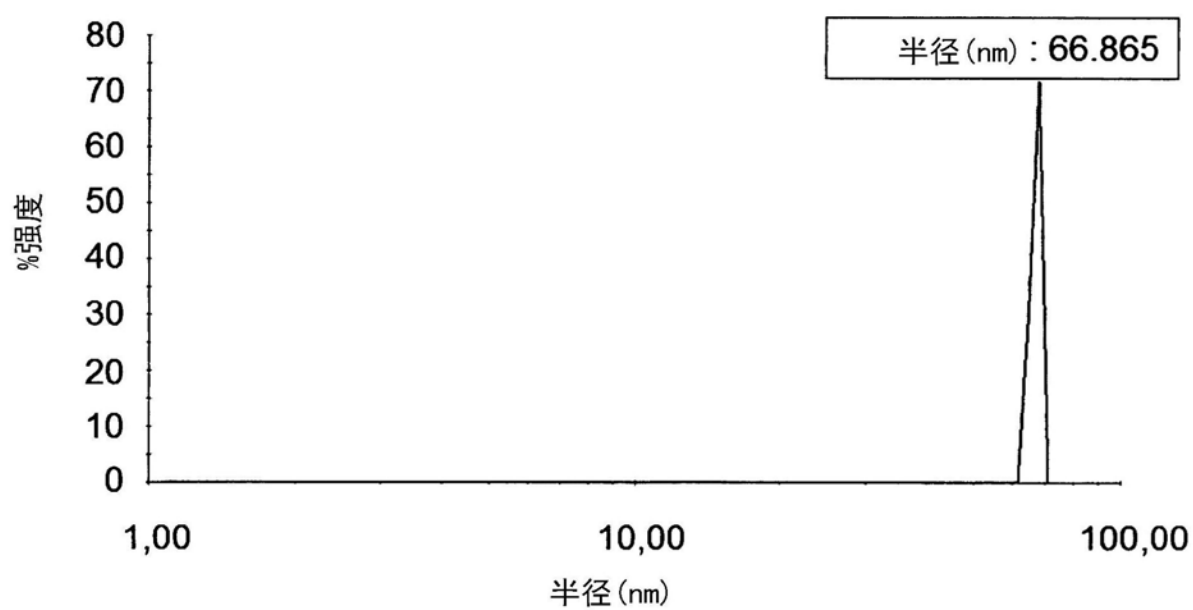
**A****B**

图1

C

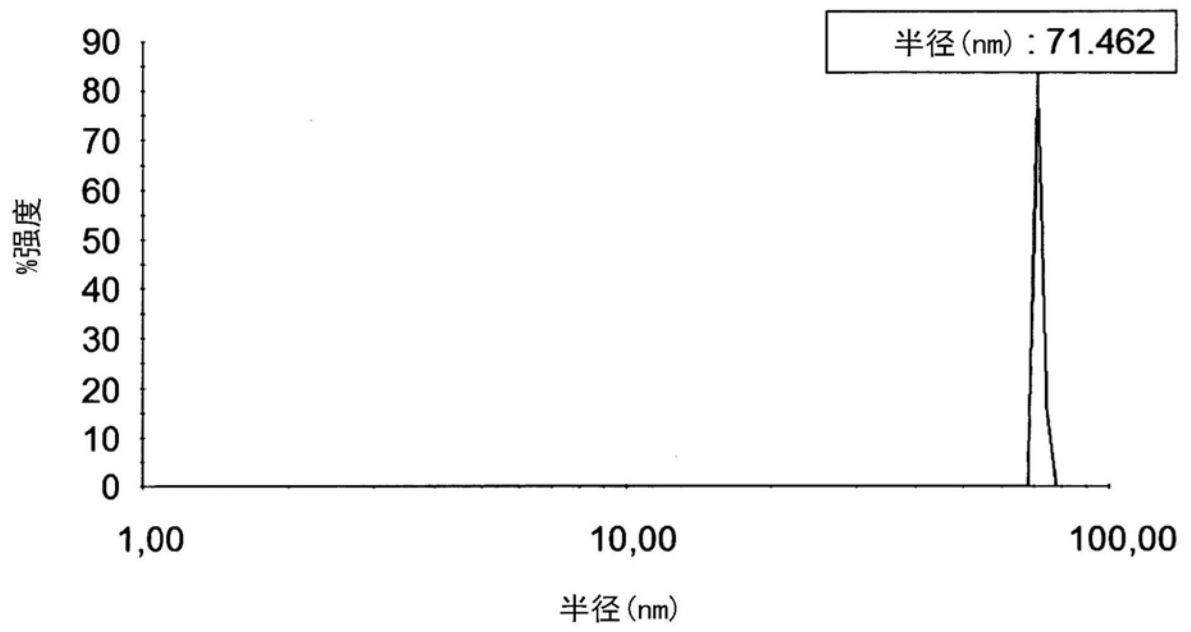
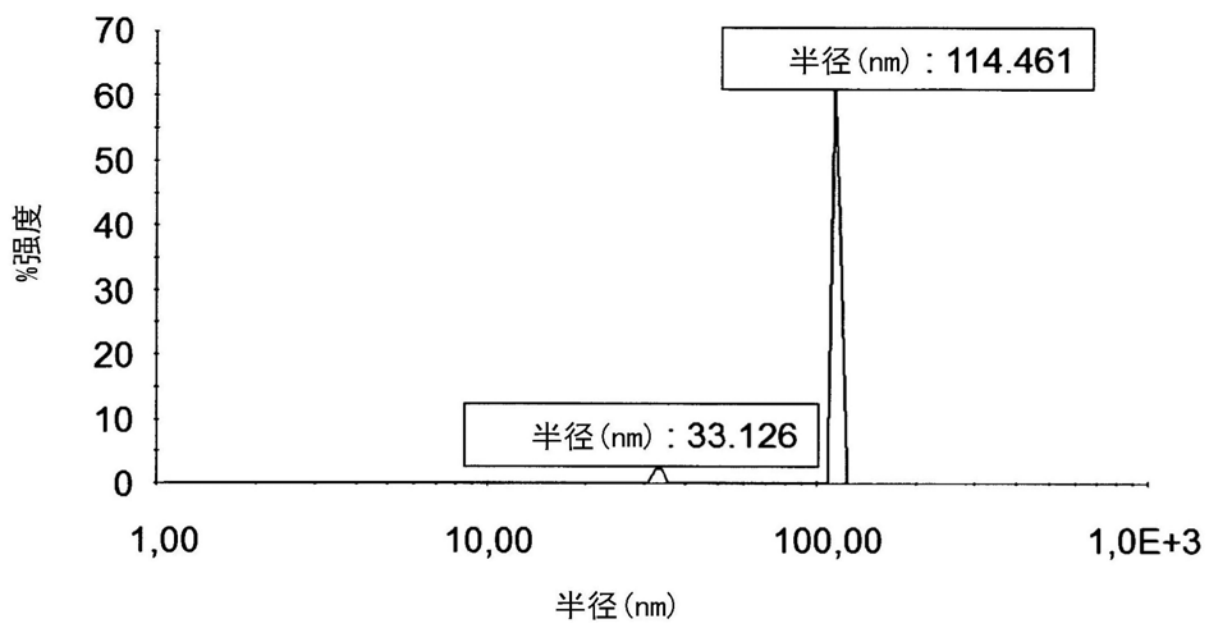


图1续

A



B

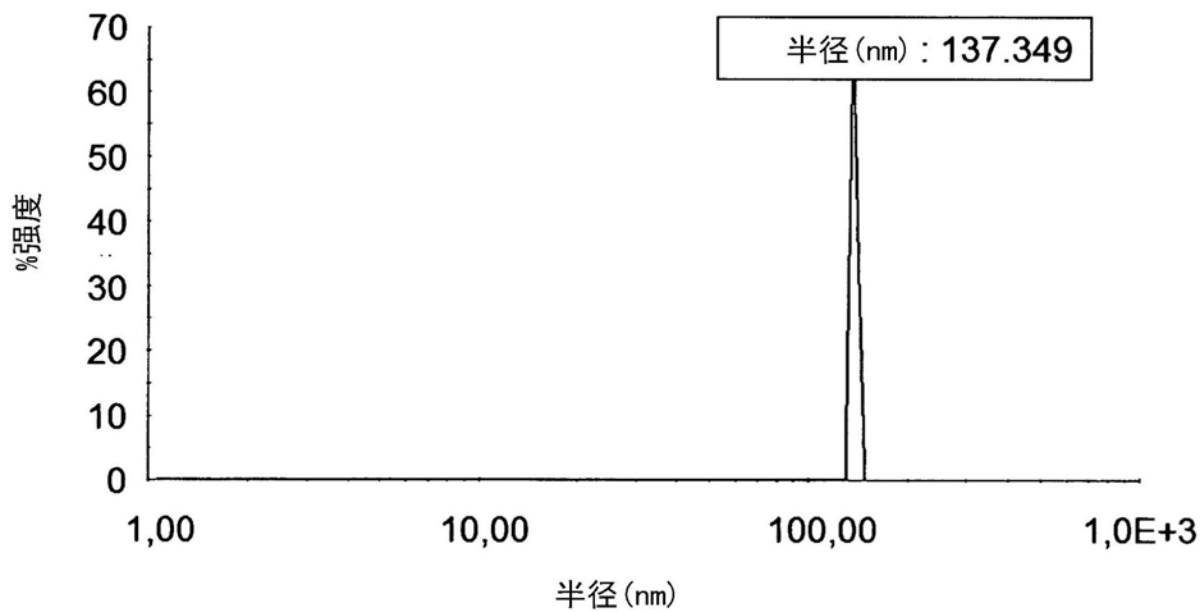


图2

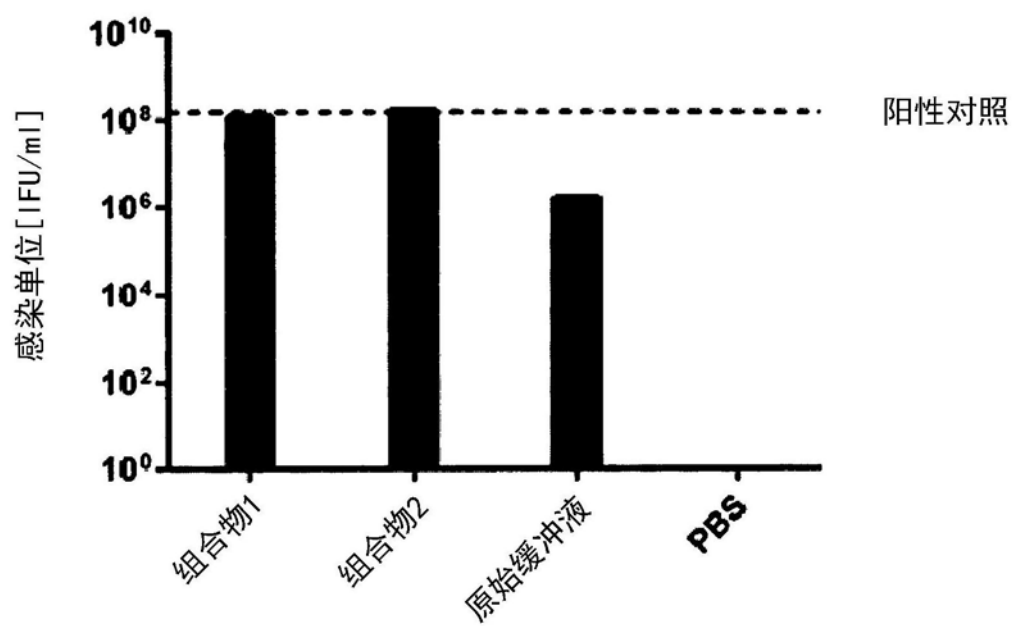
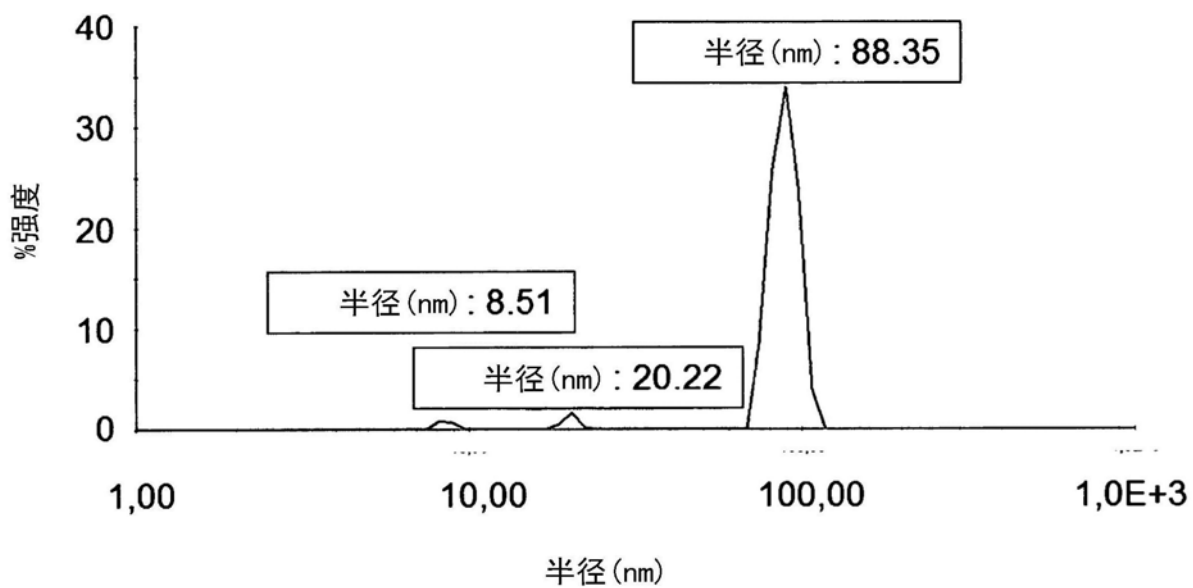


图3

A



B

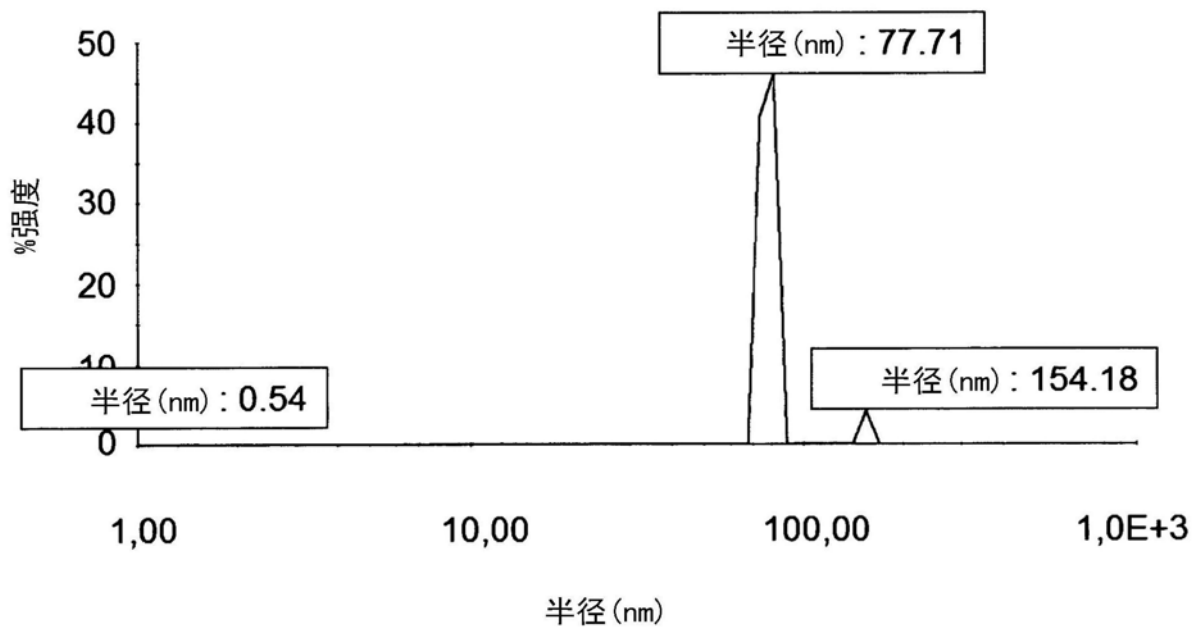
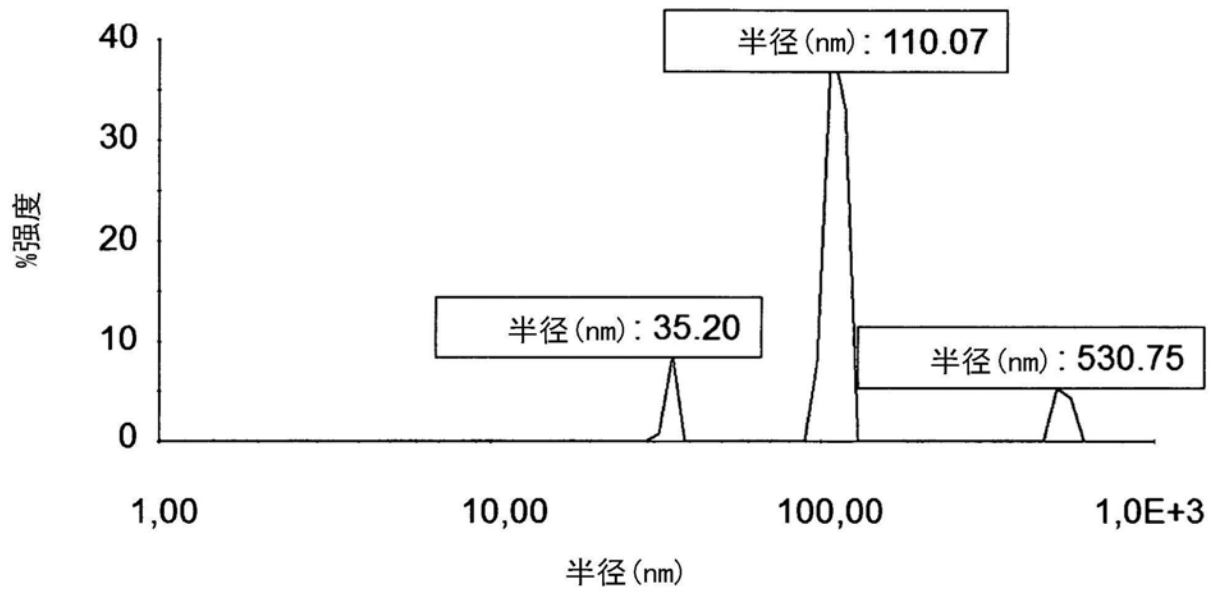


图4



A



B

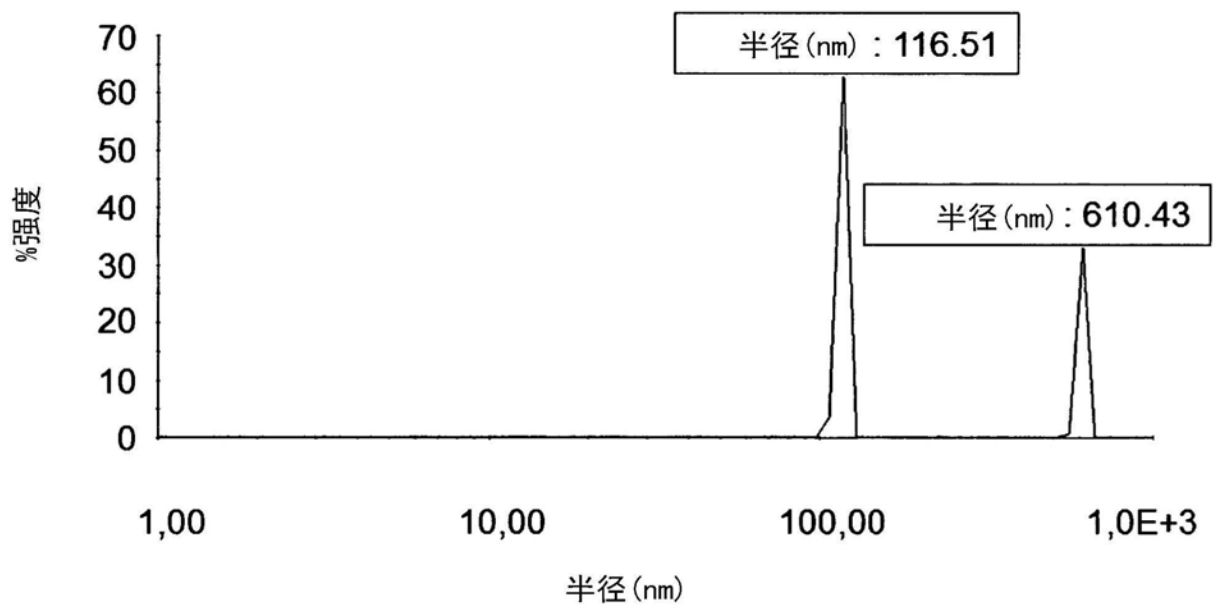


图5

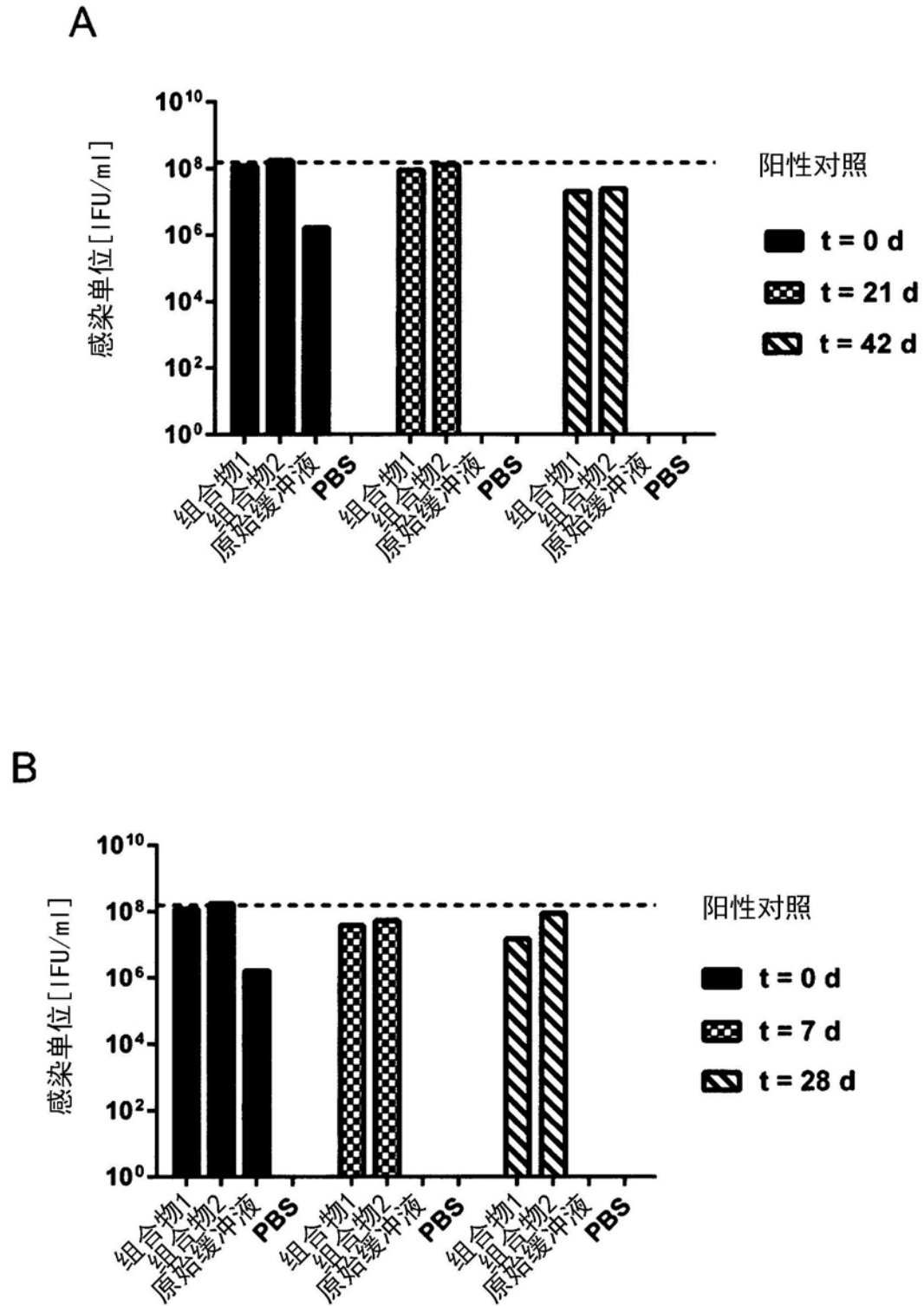
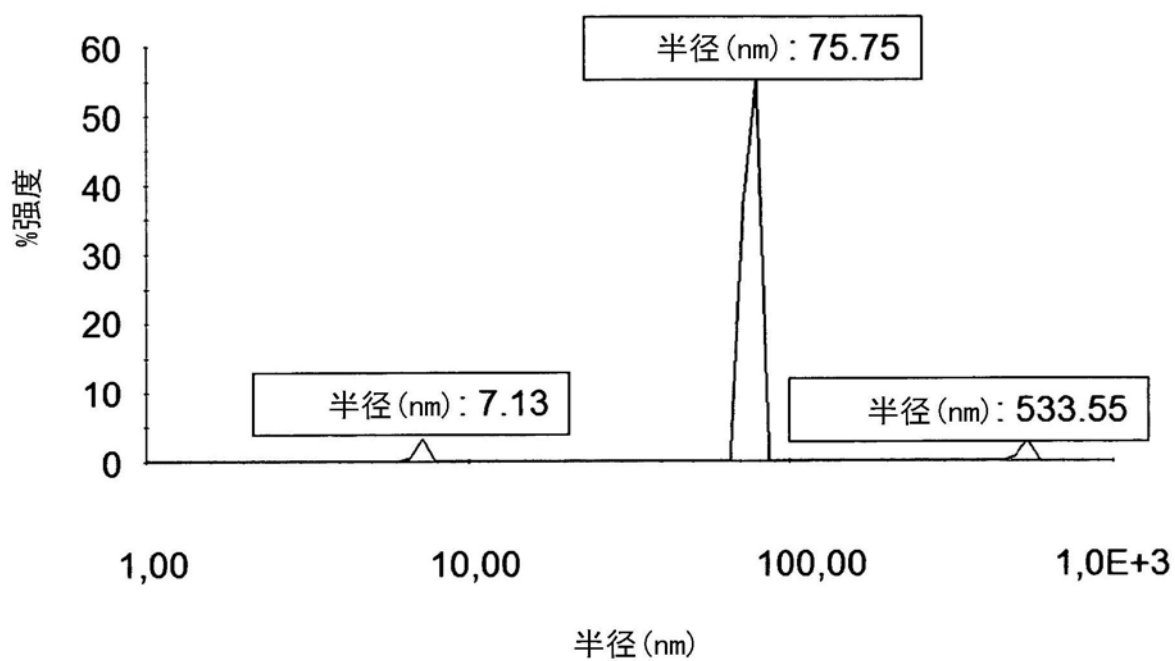


图6

A



B

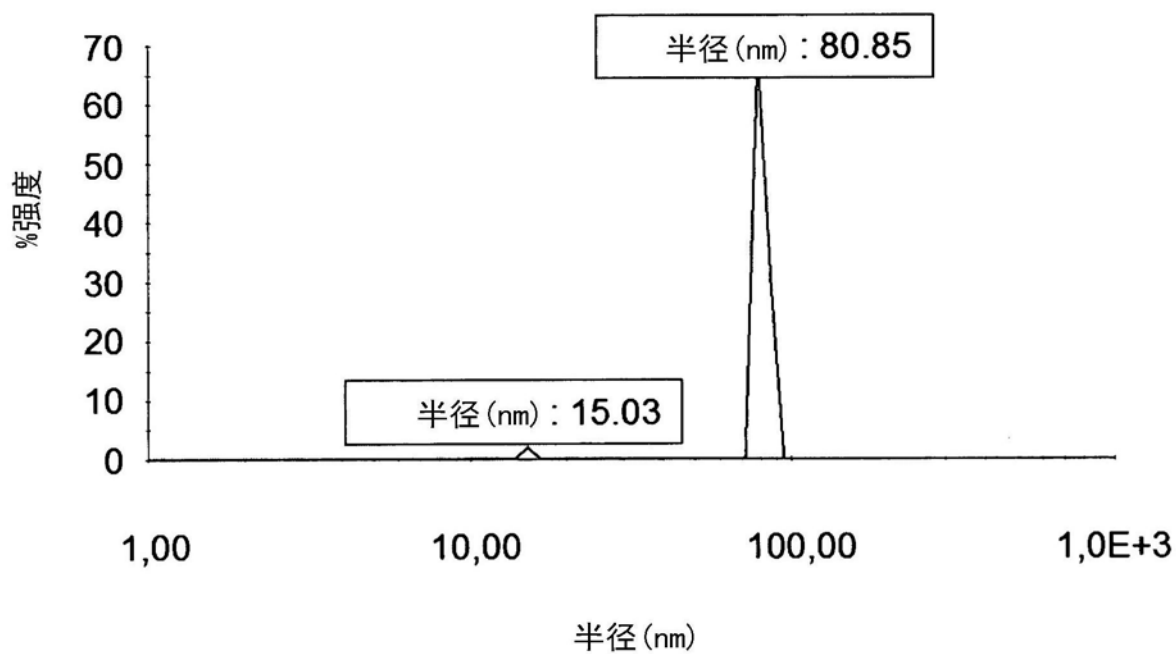
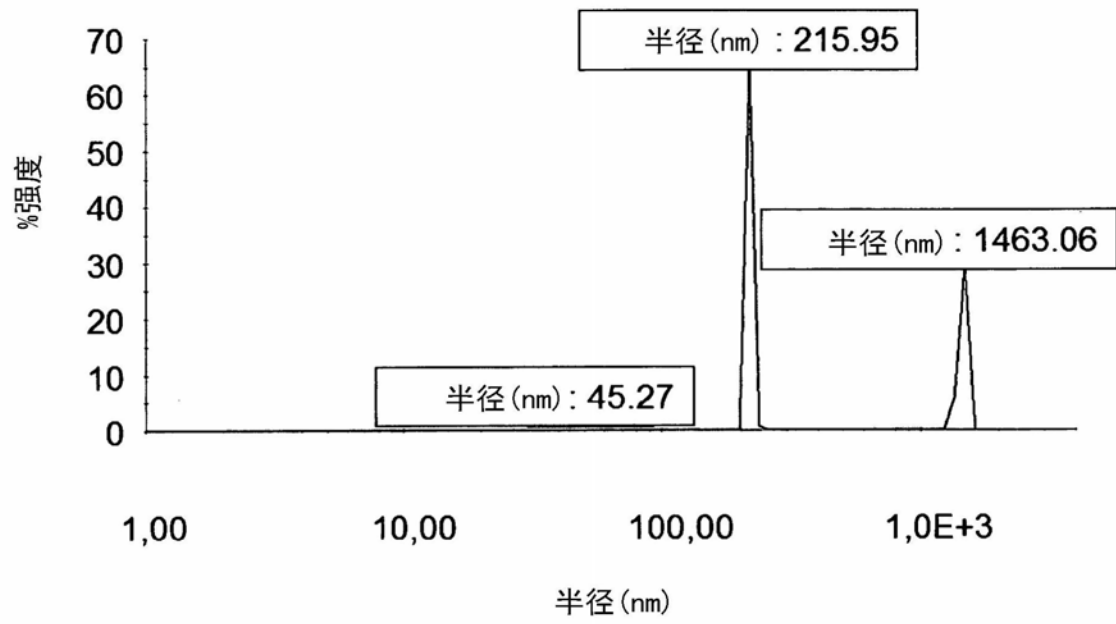


图7

A



B

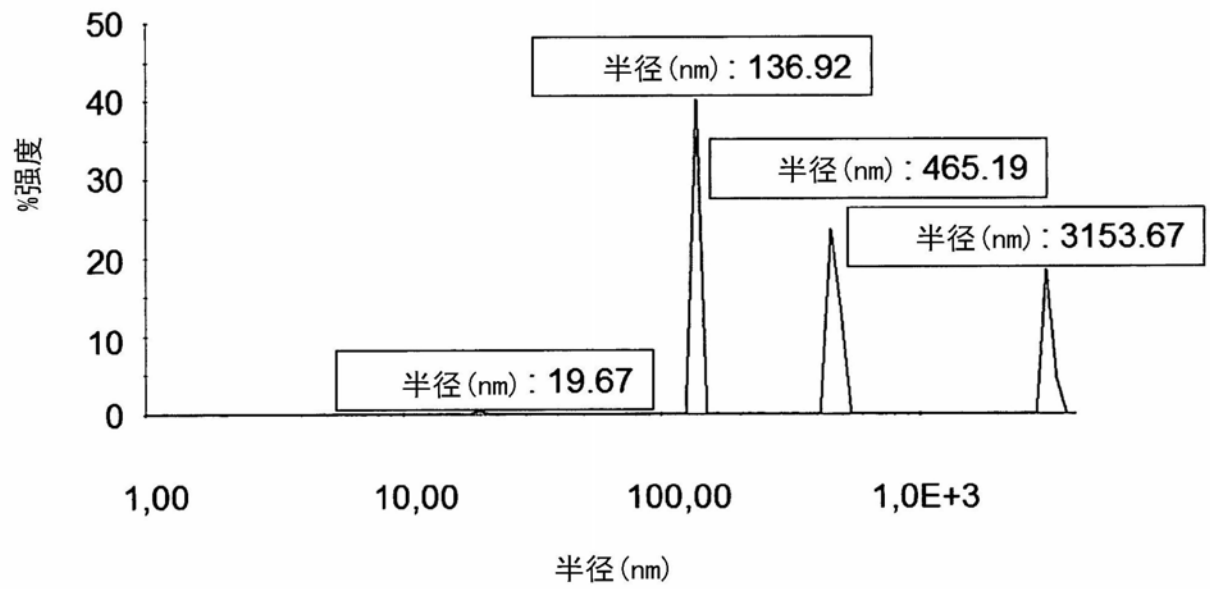


图8

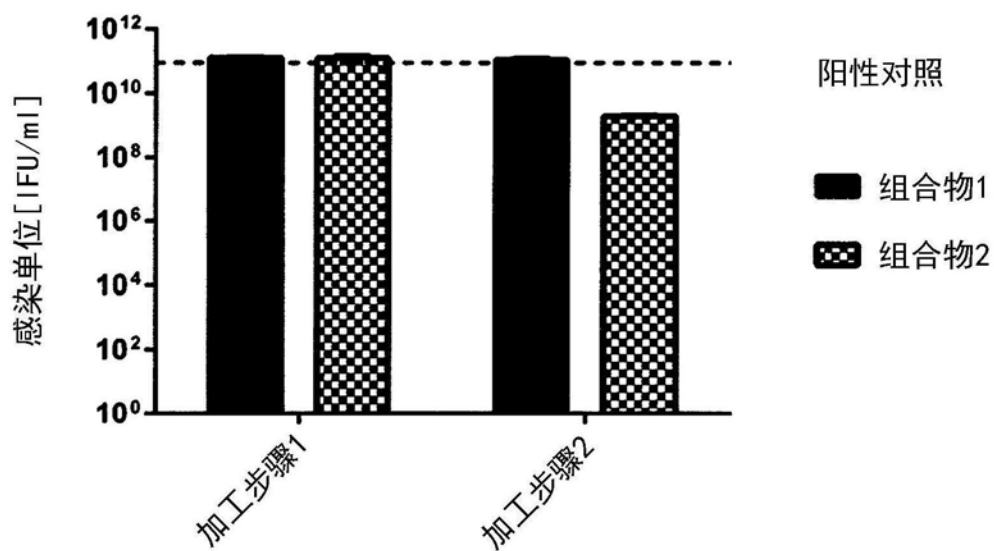


图9

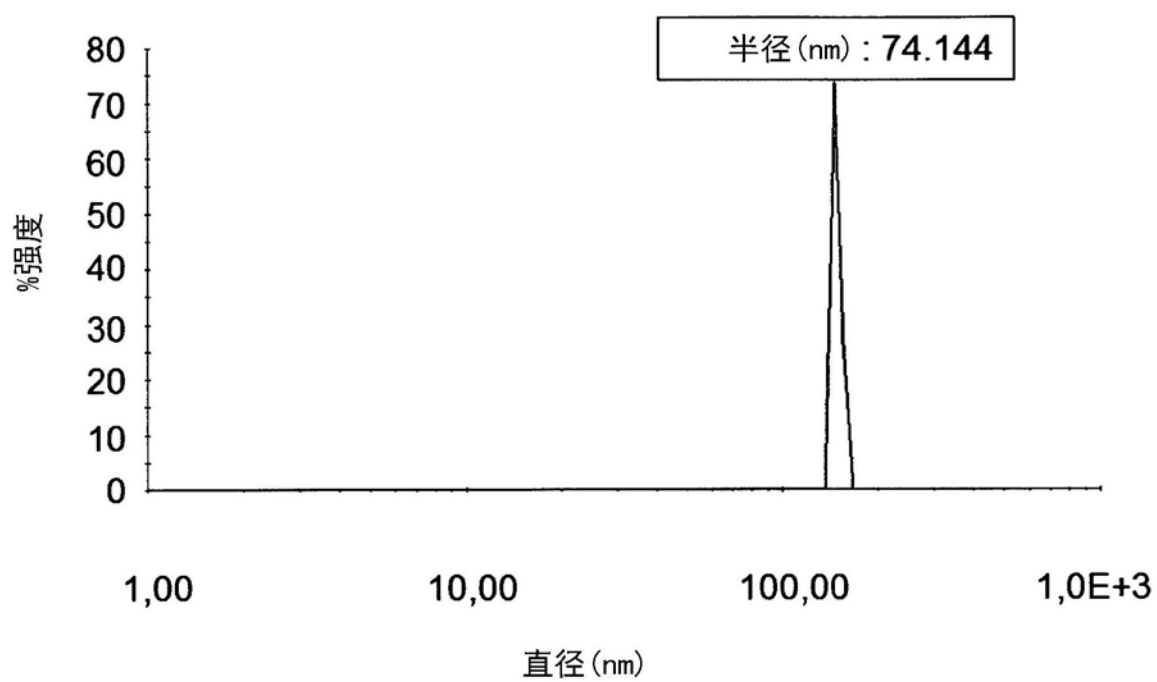
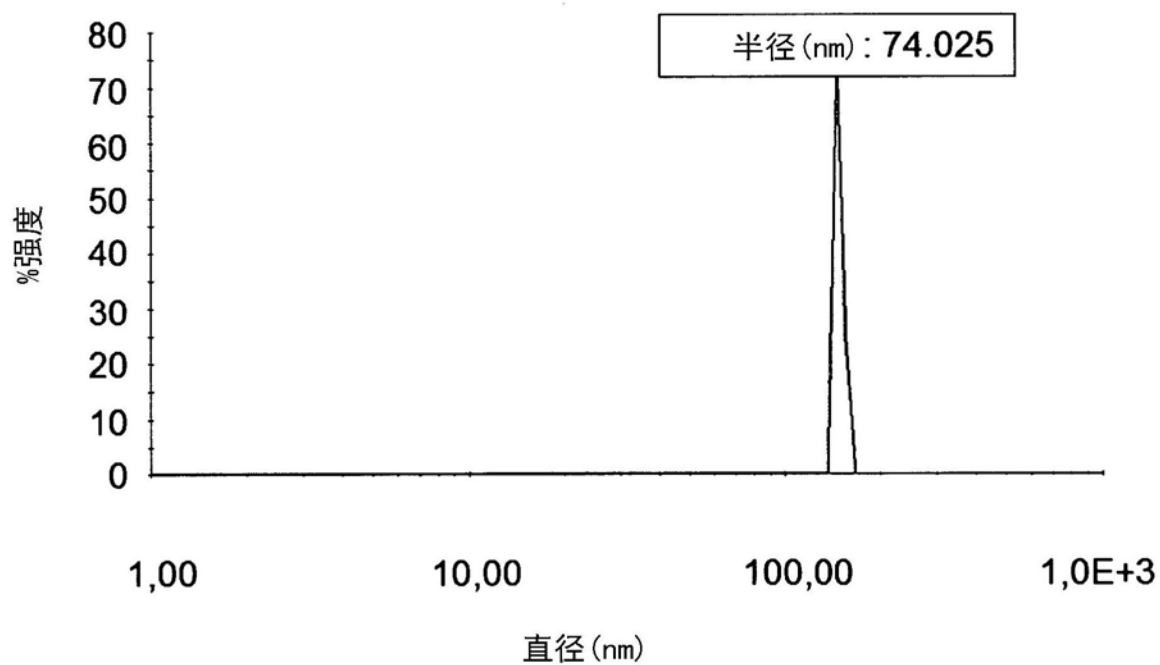
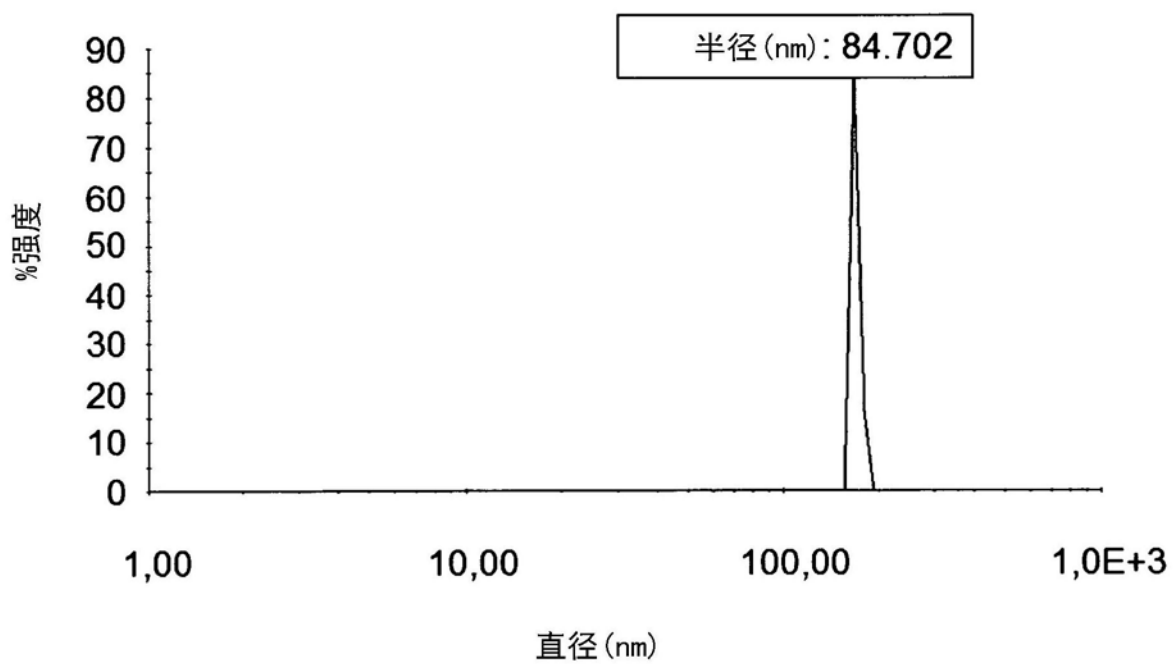
**A****B**

图10

C



D

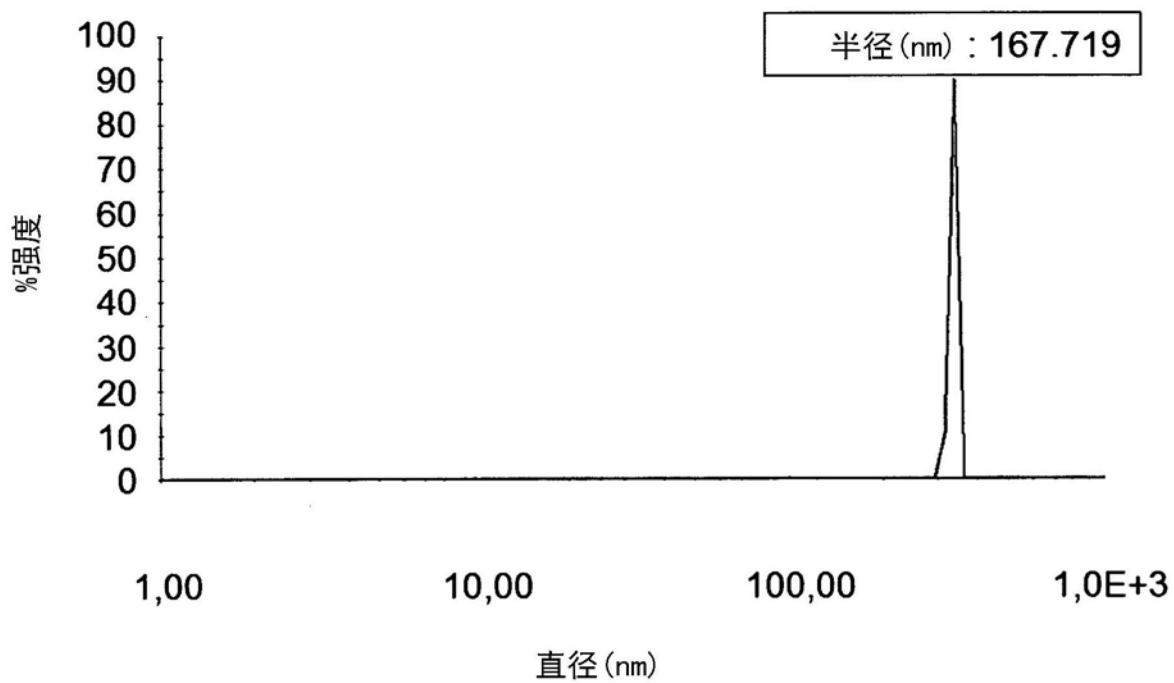
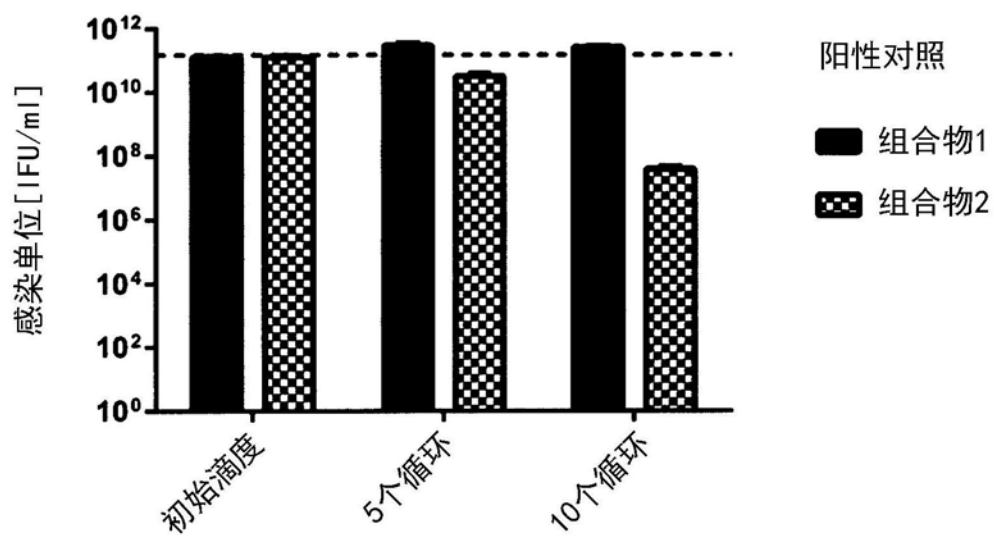


图10续

A



B

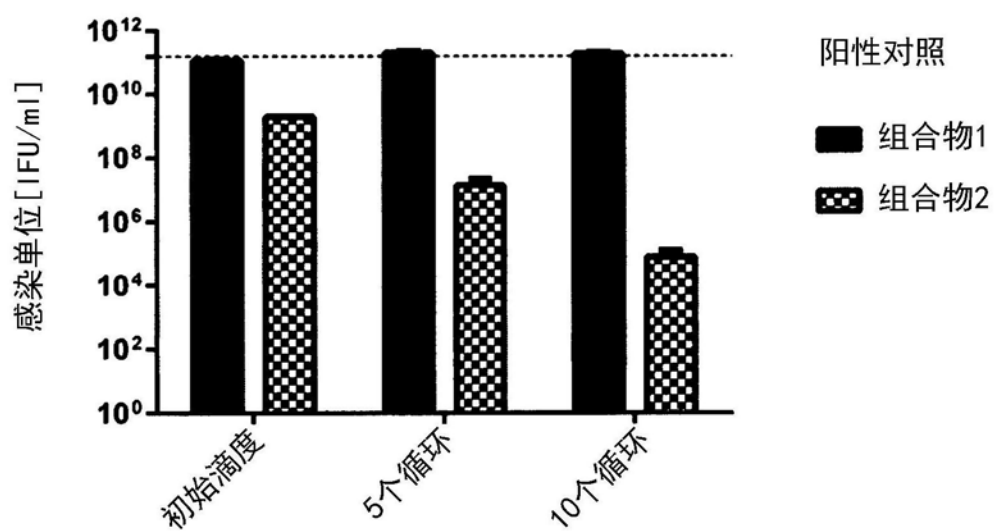


图11



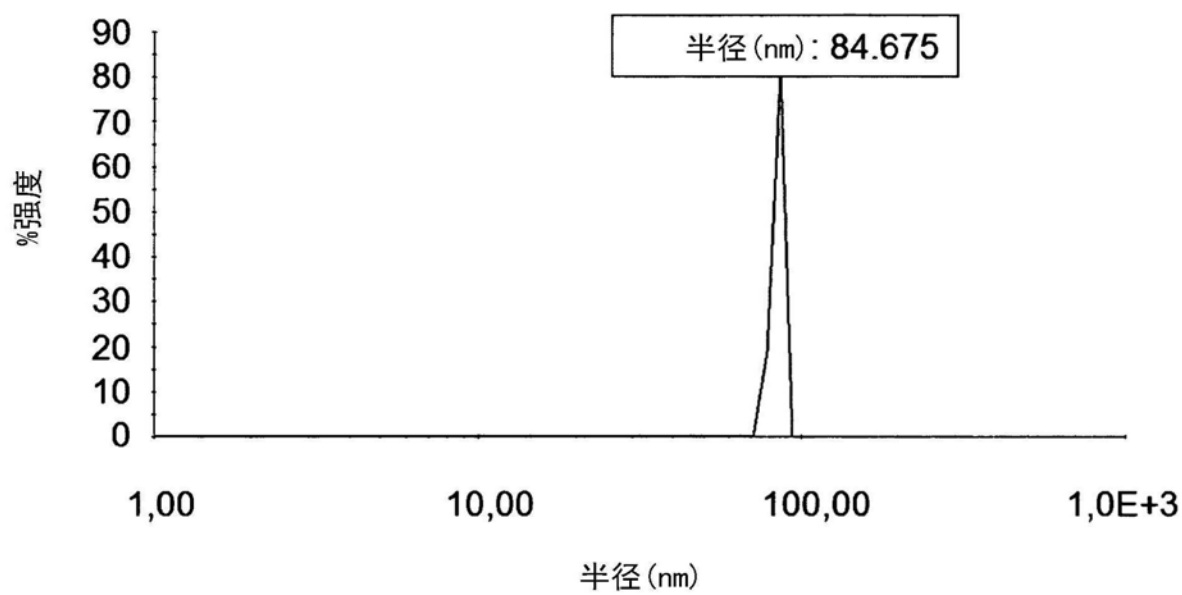
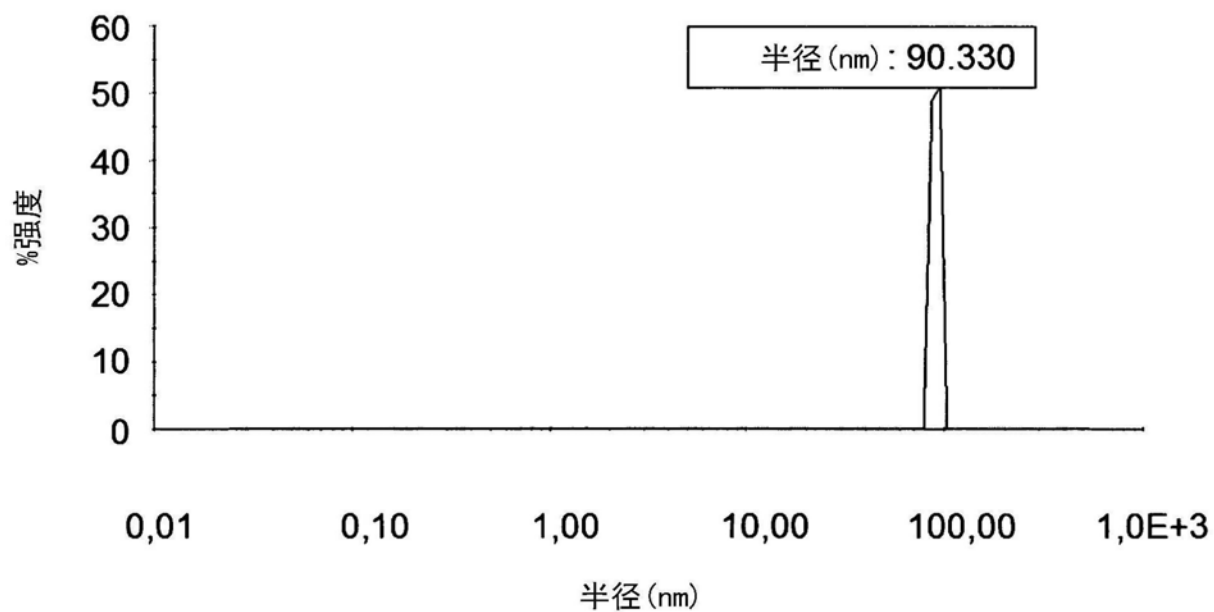
**A****B**

图12

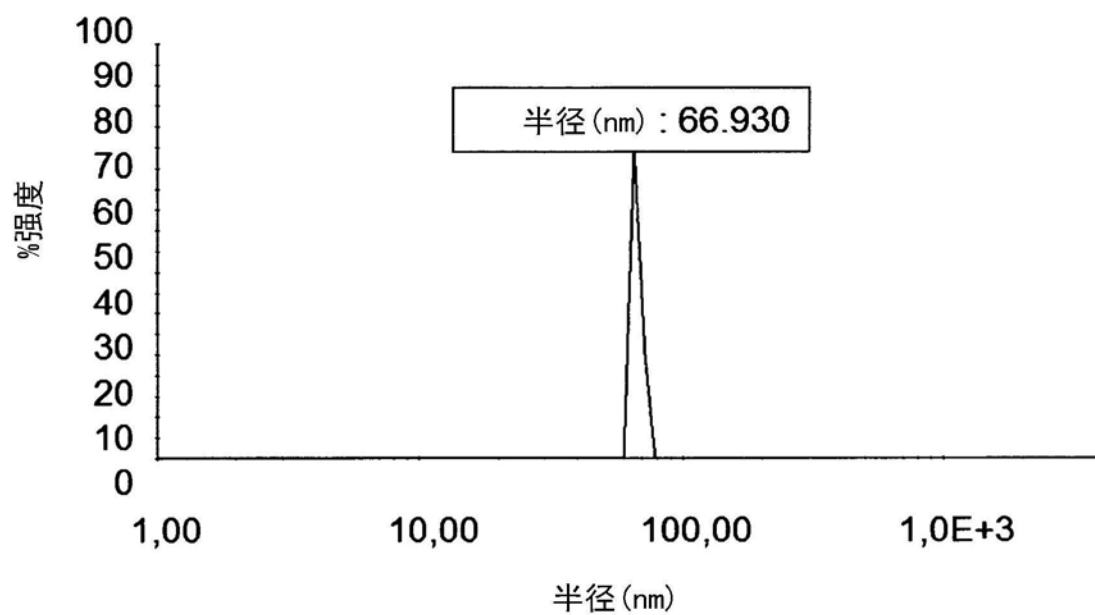
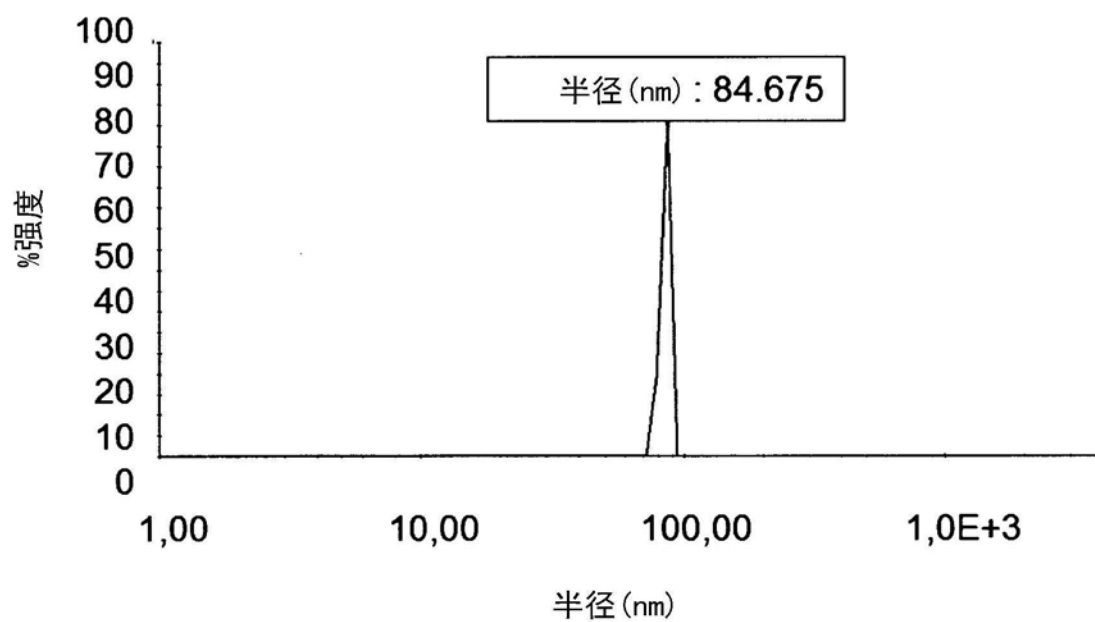
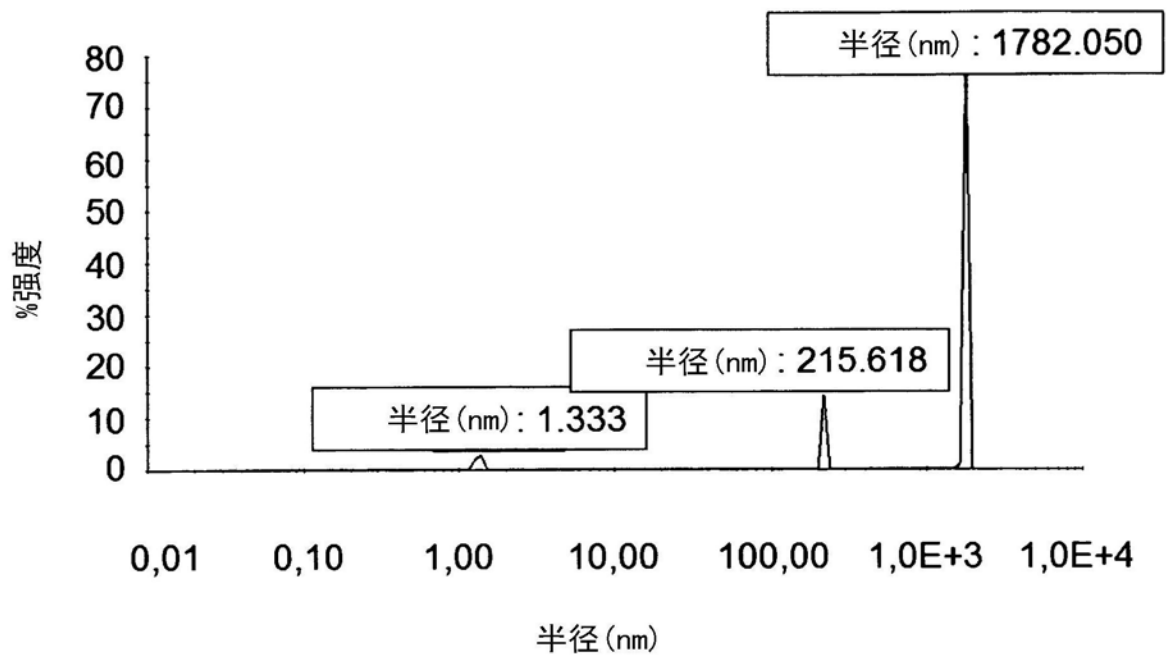
**A****B**

图13

C



D

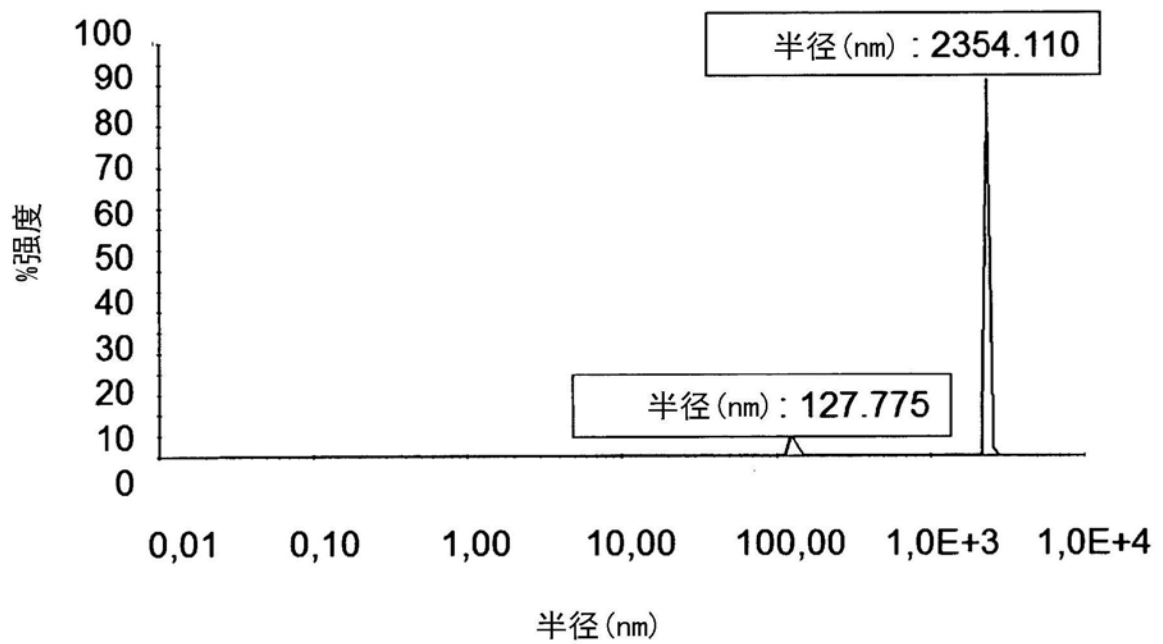


图13续

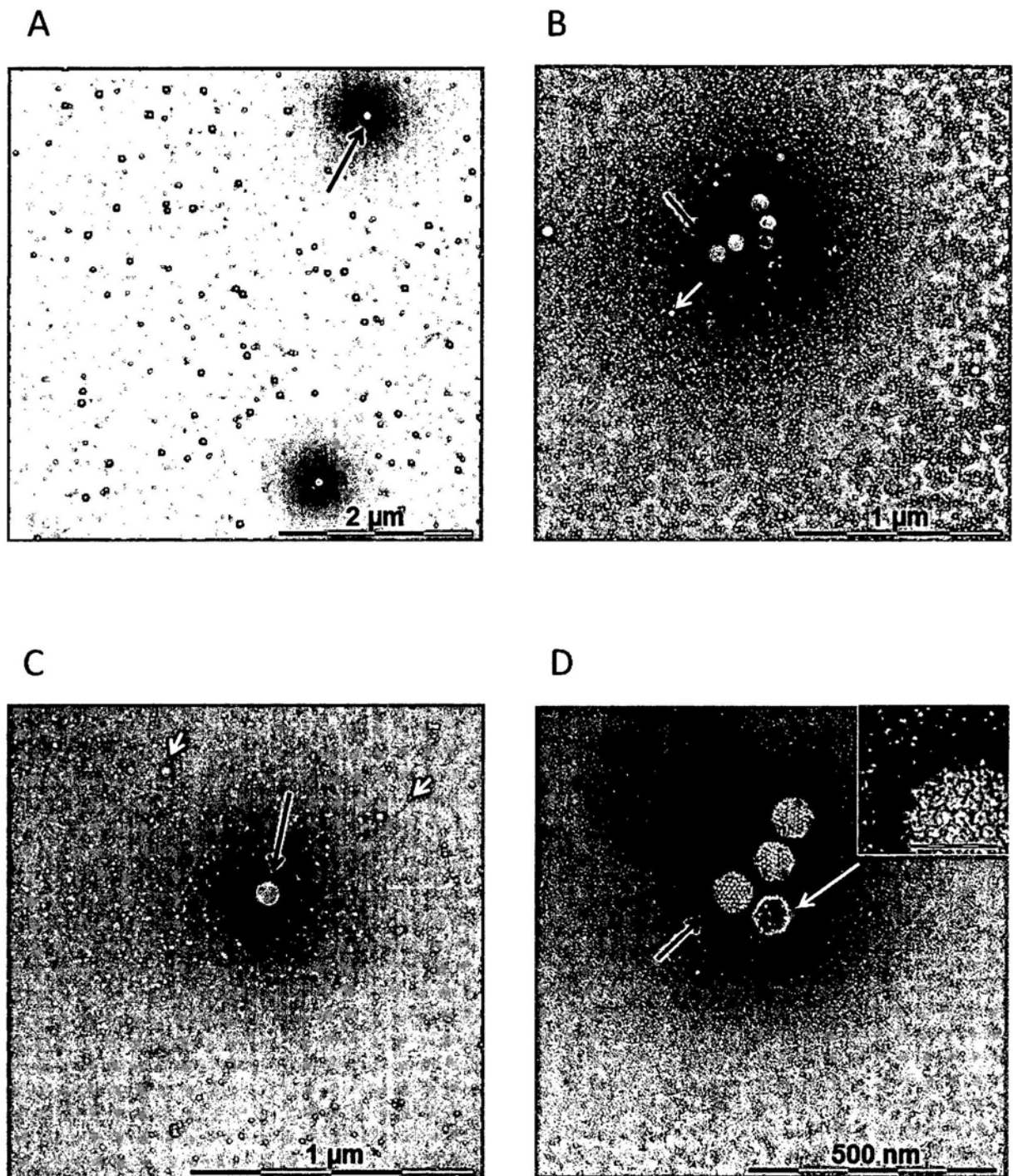


图14

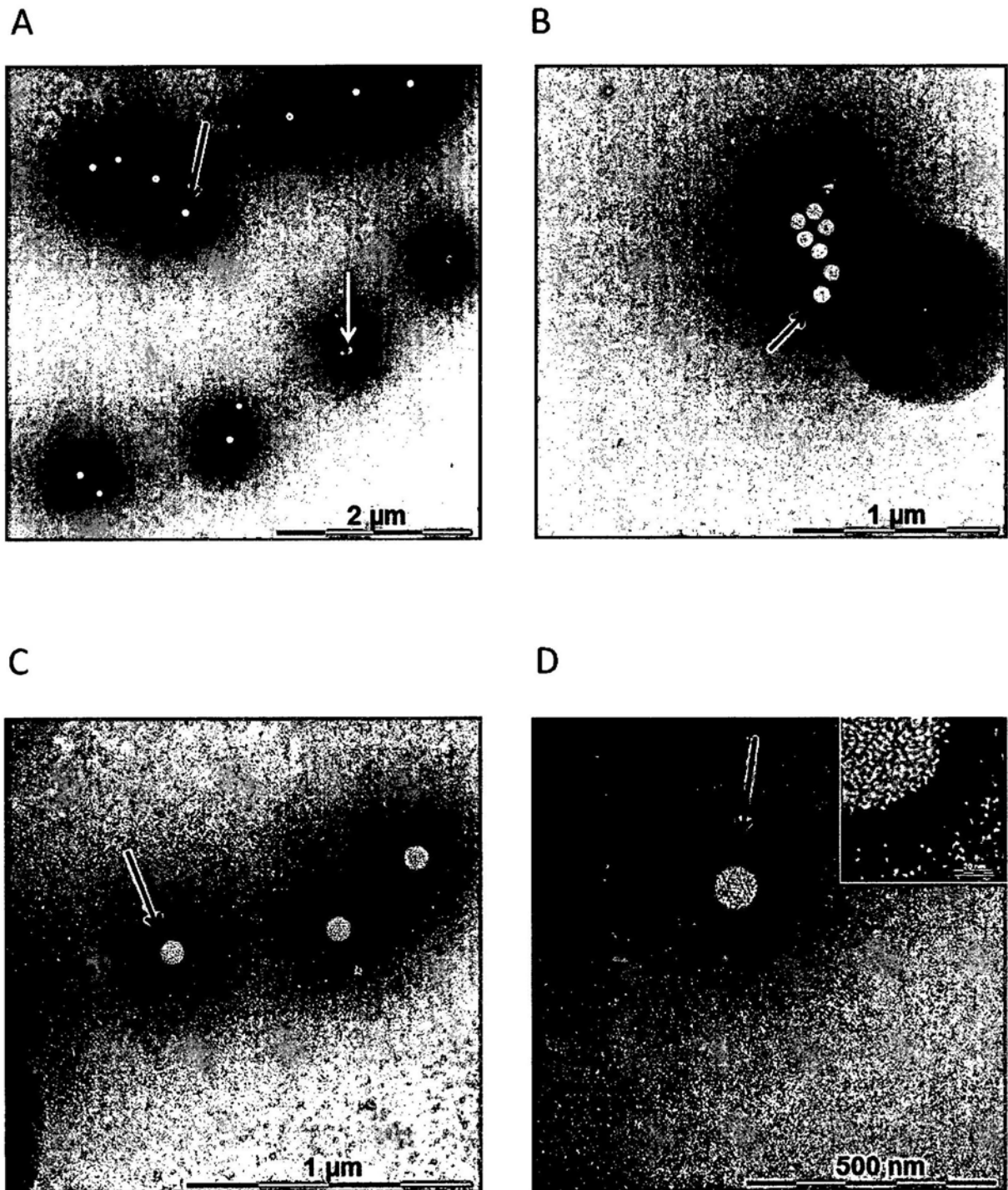


图15

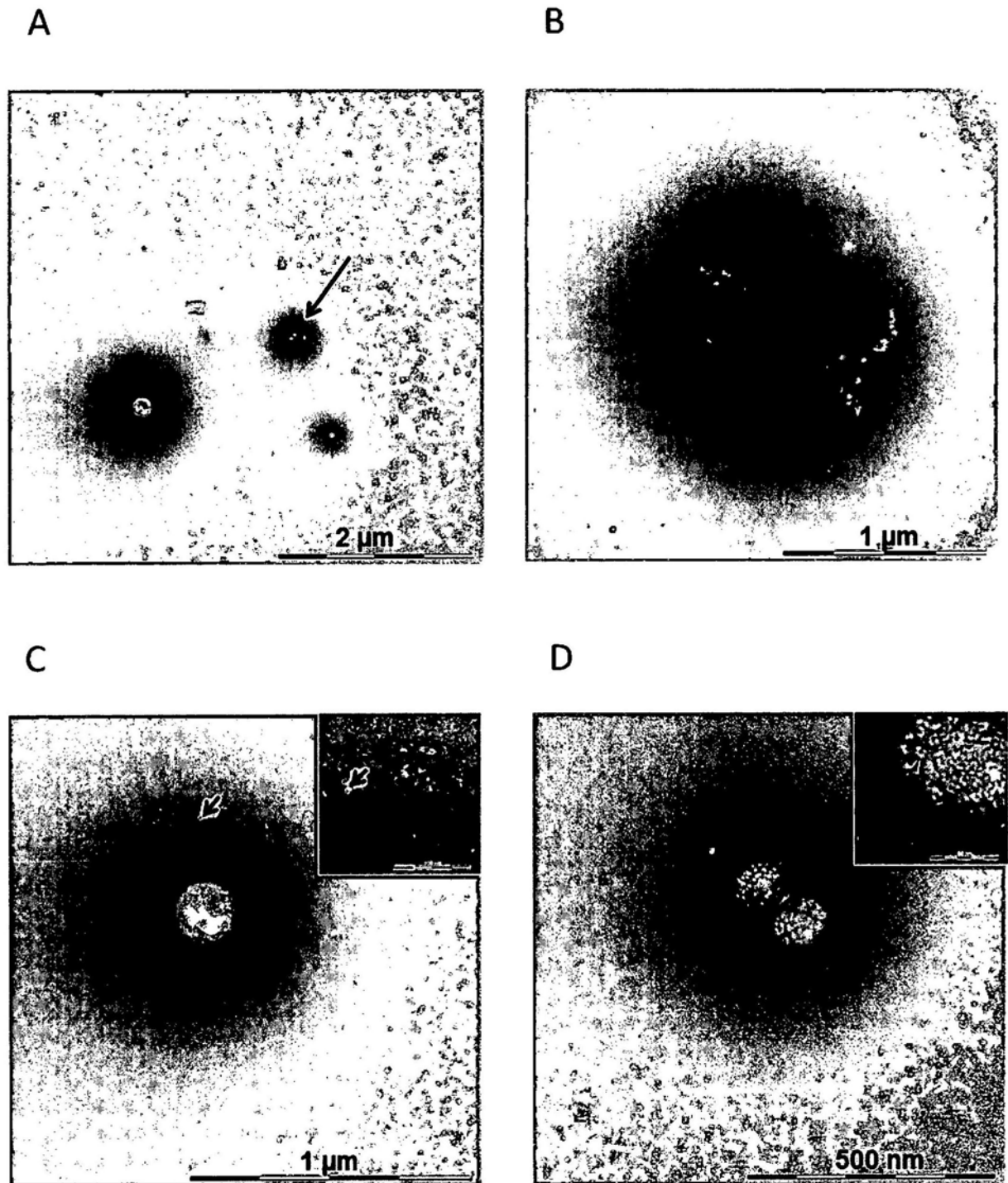


图16

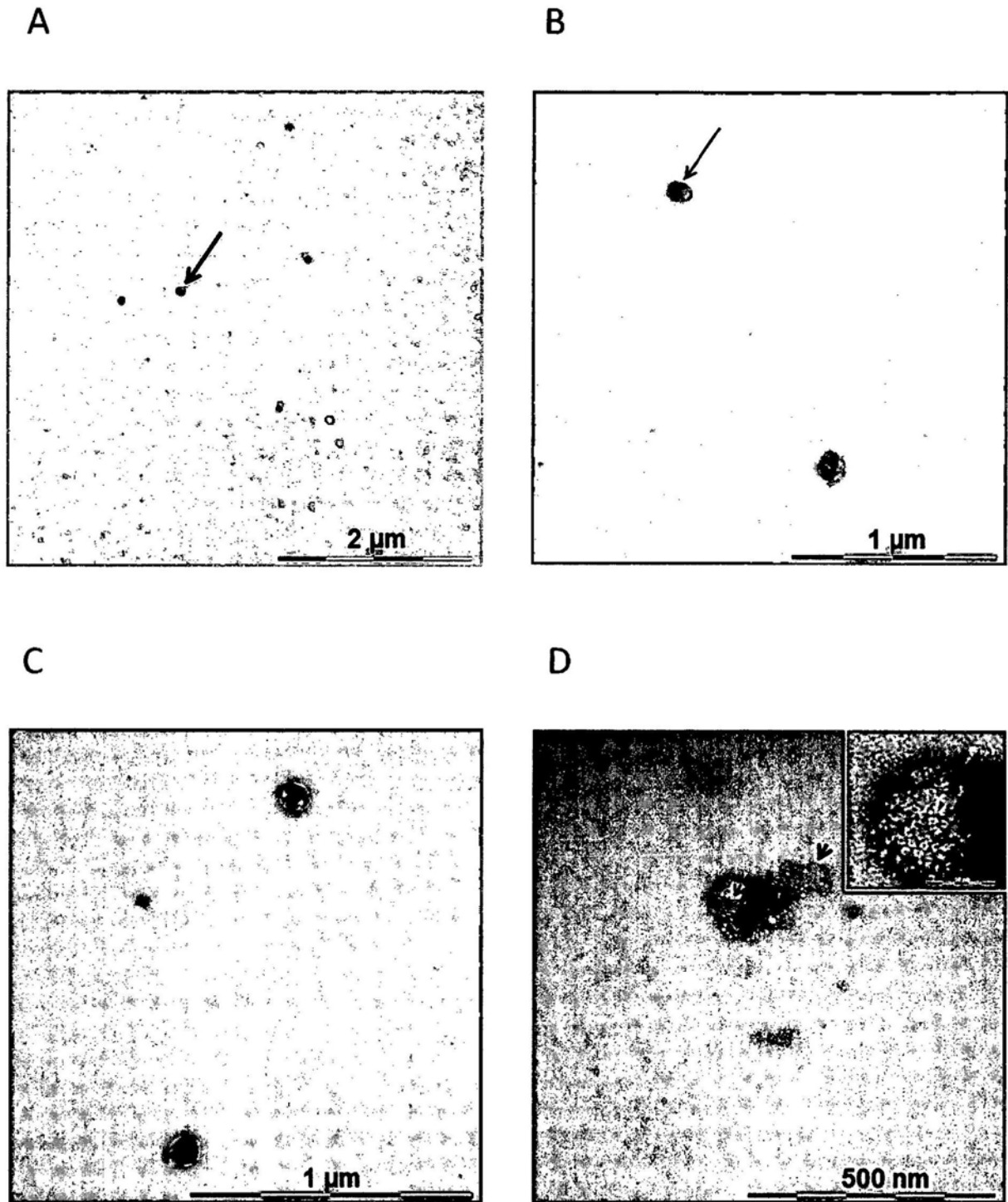


图17

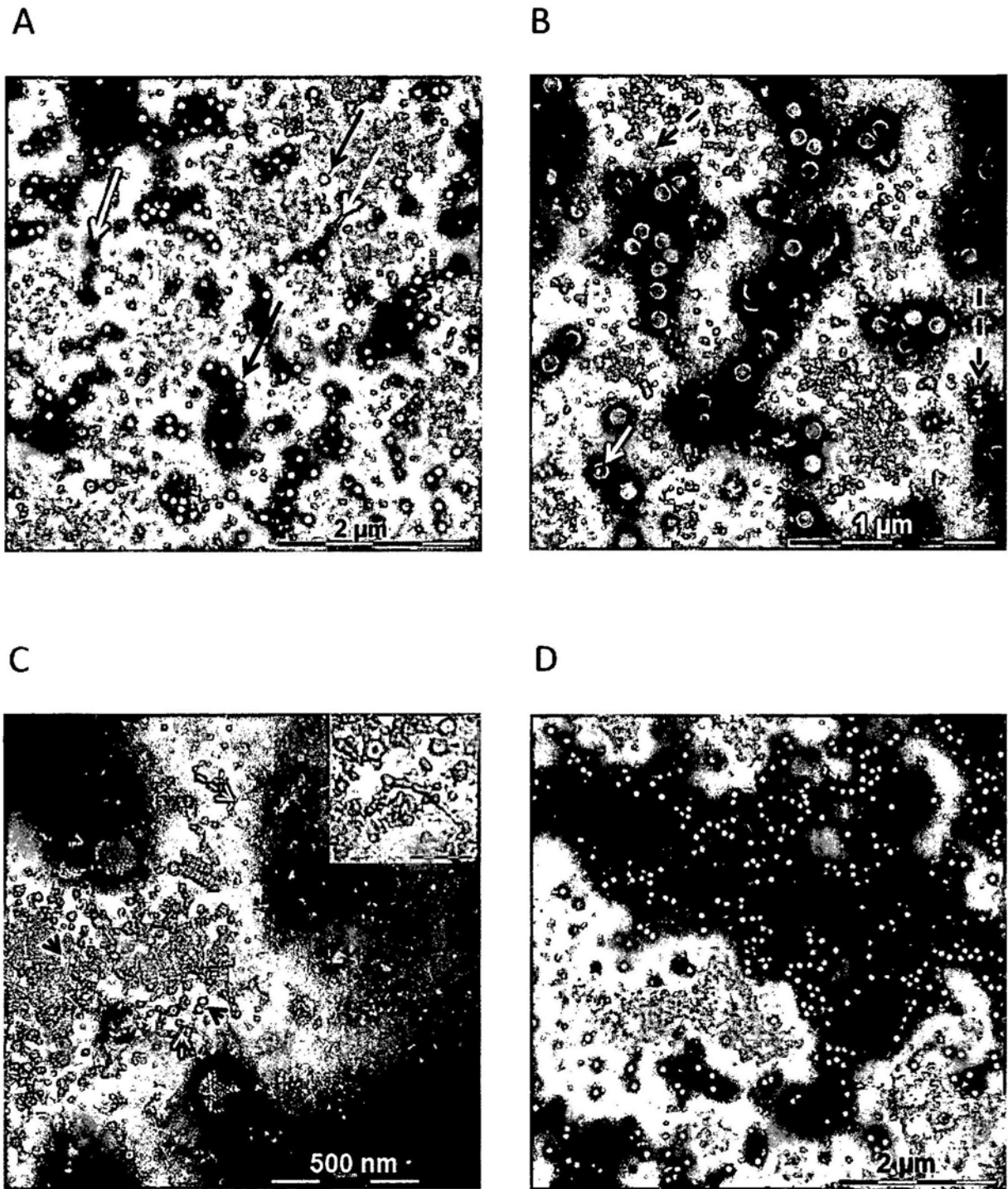


图18



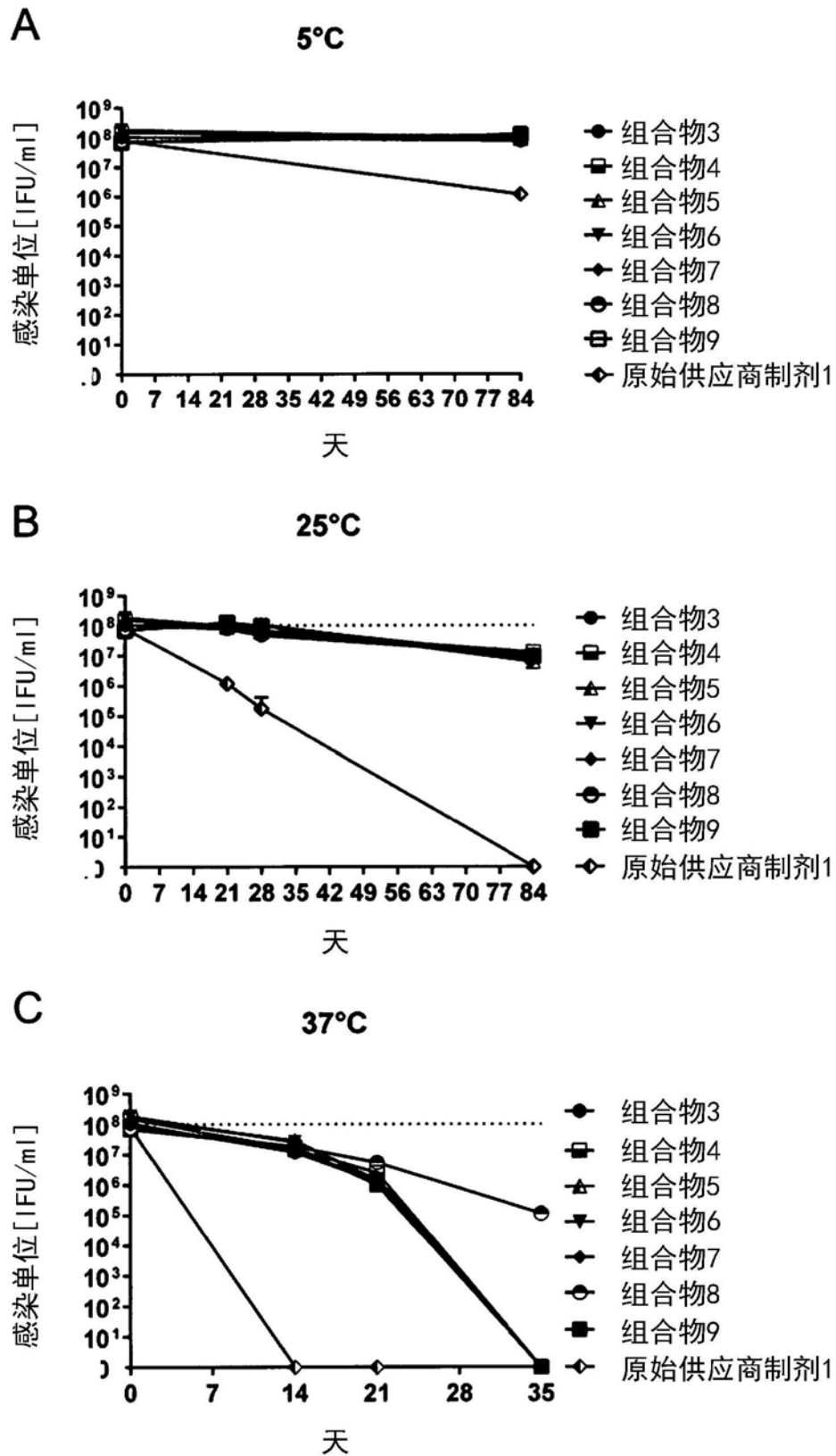


图19

C

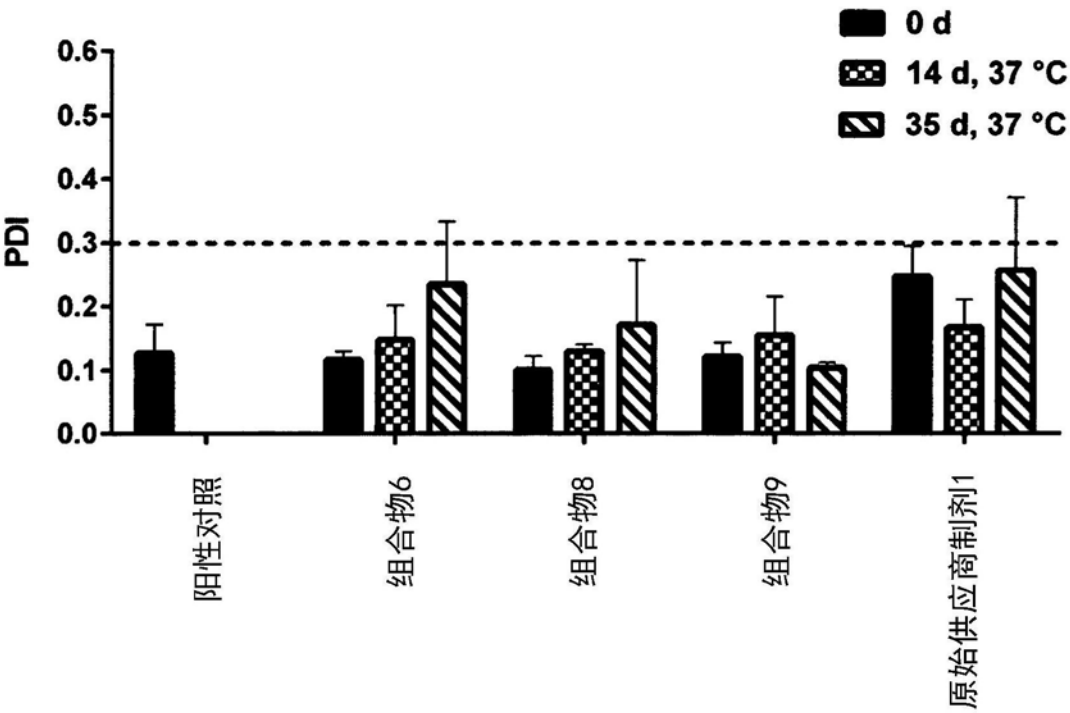


图19续

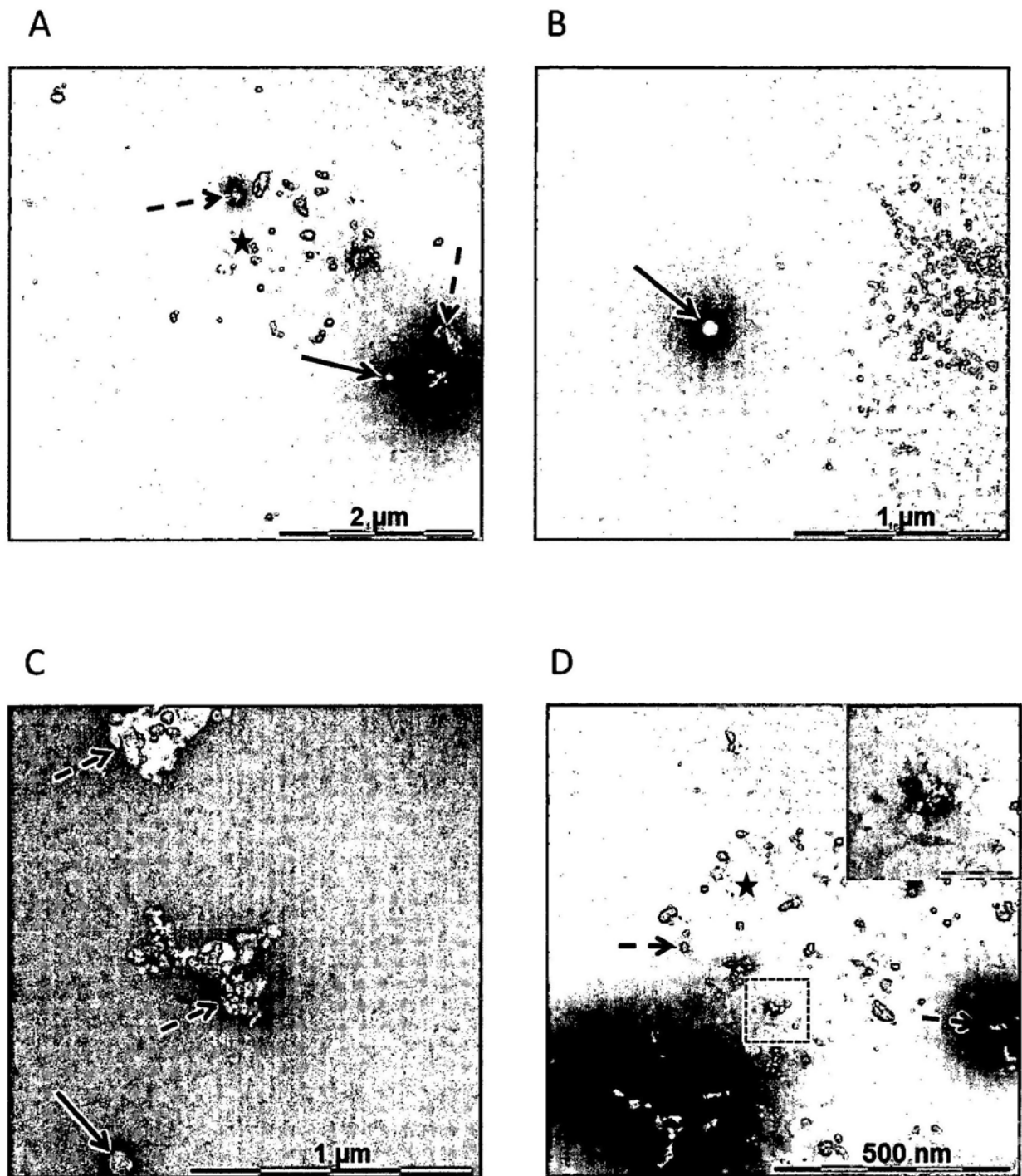


图20

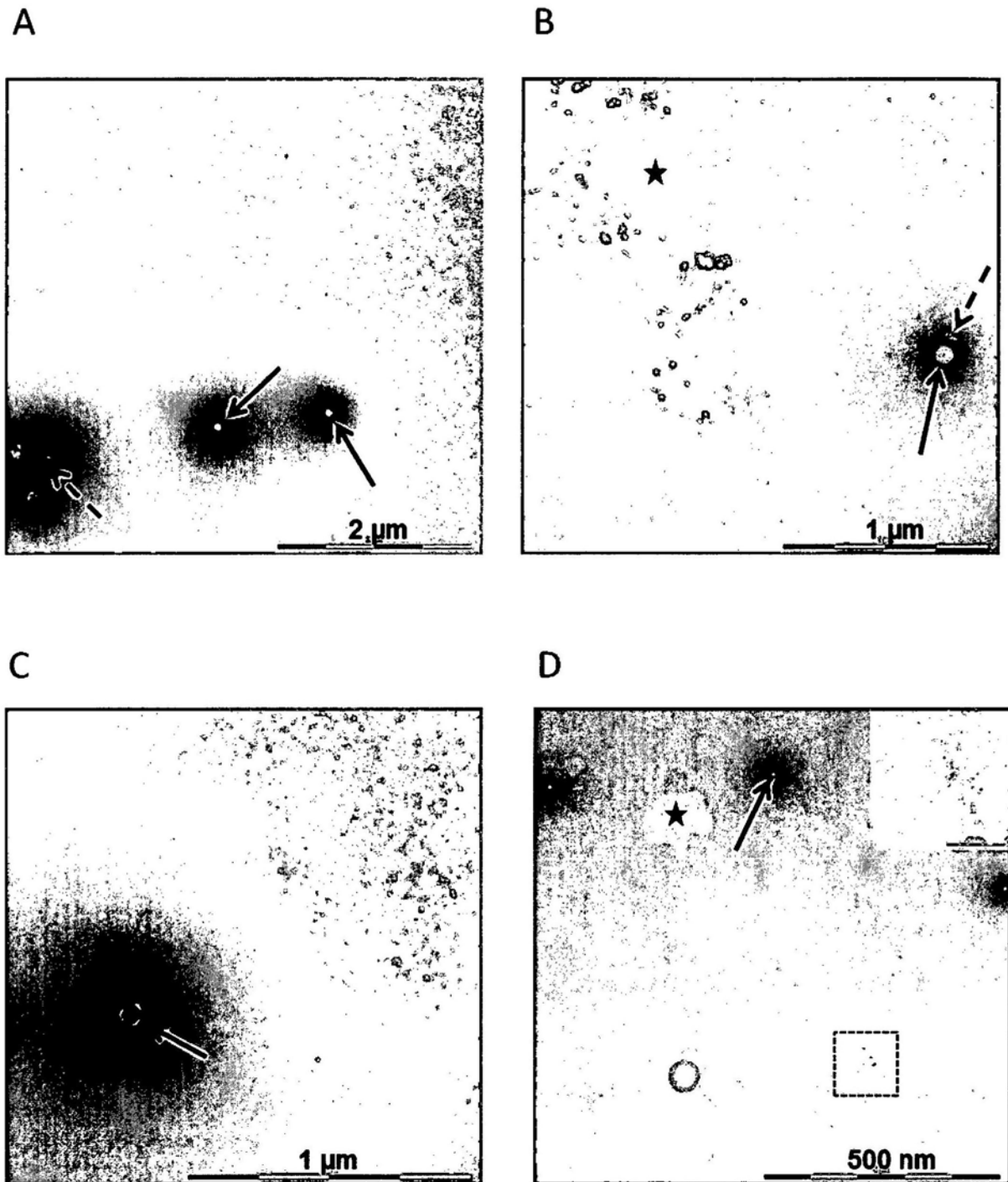


图21

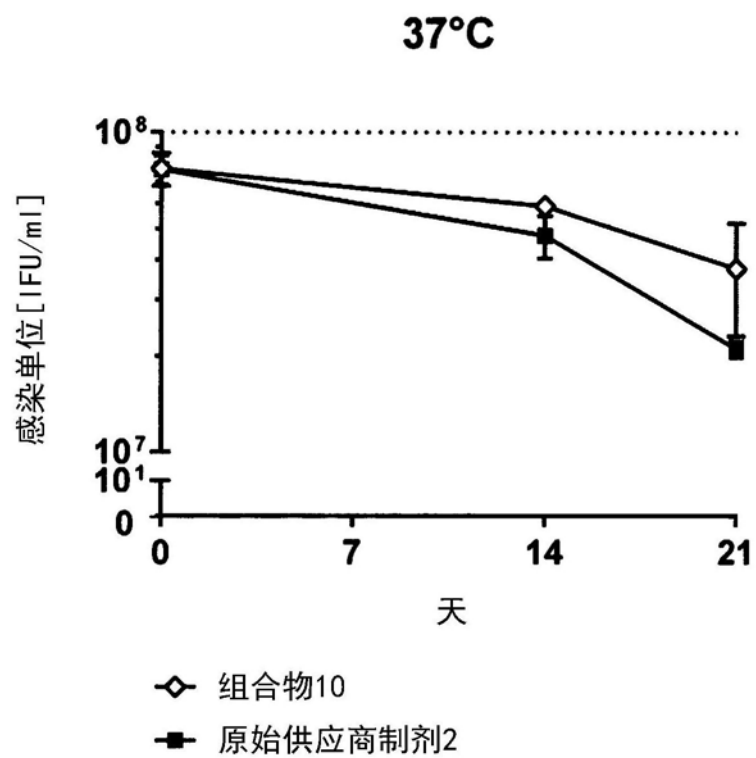


图22

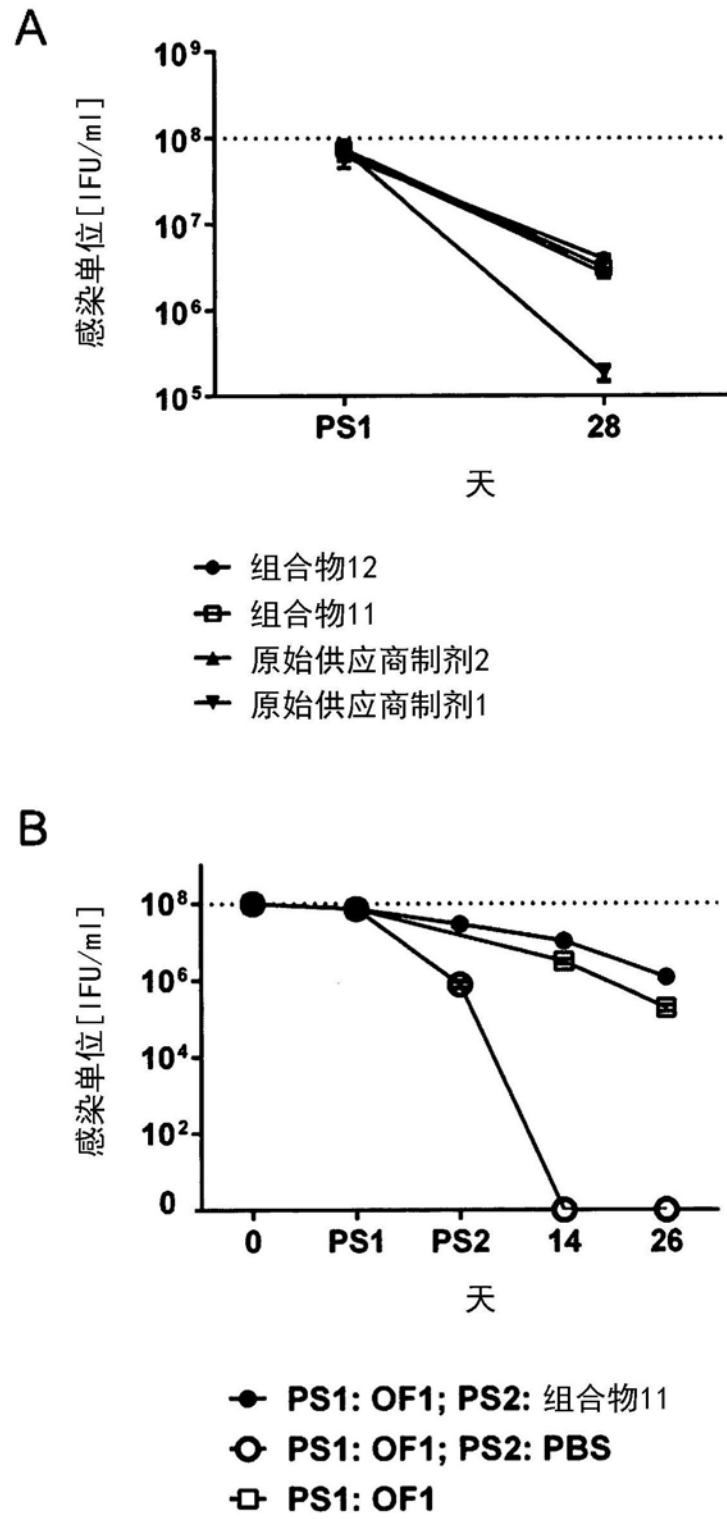


图23

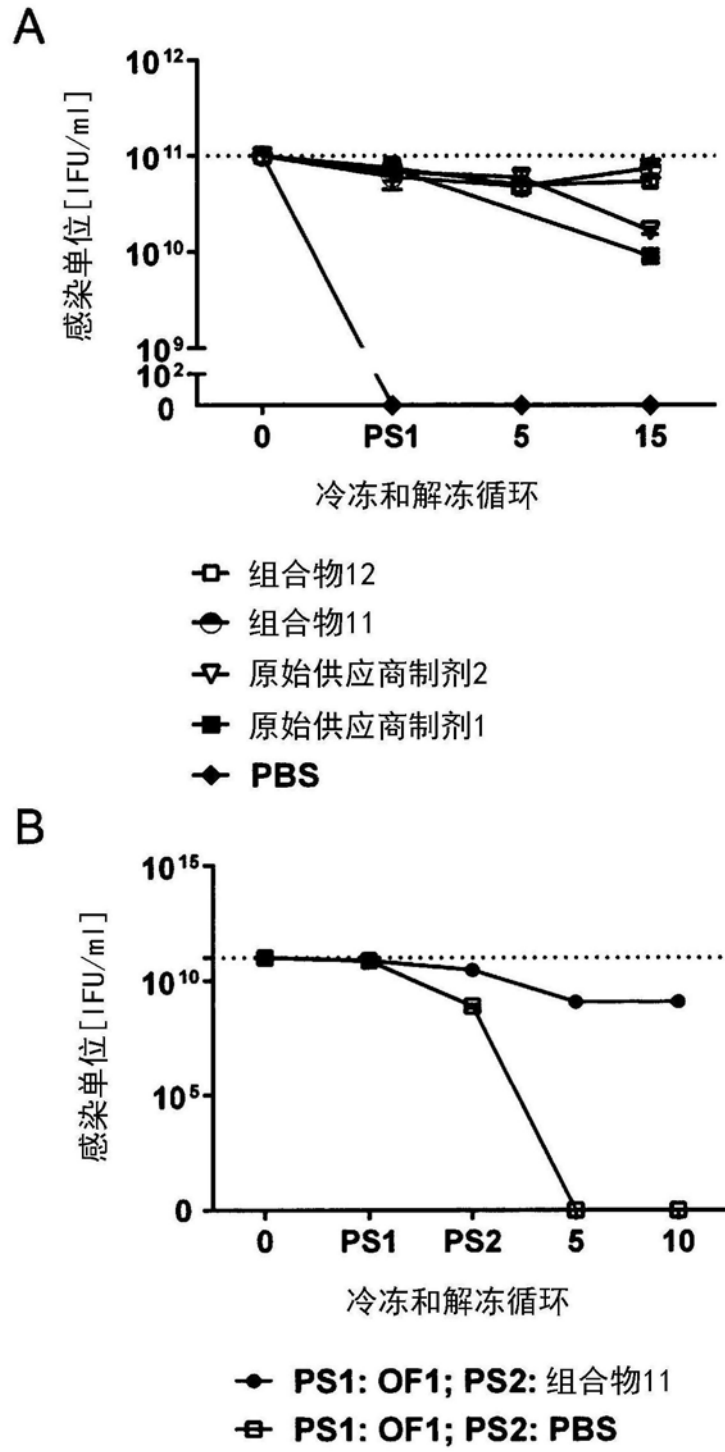
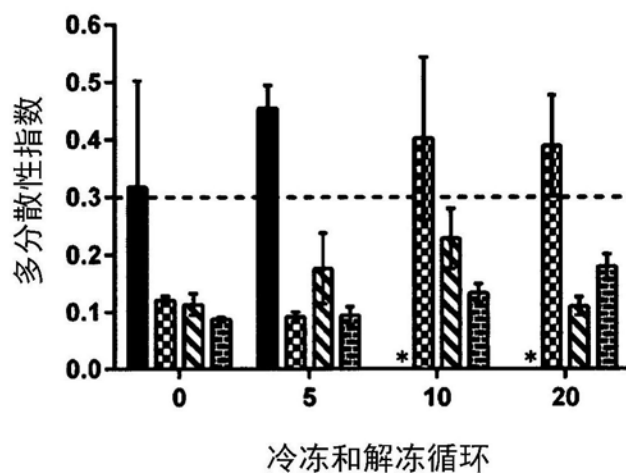


图24

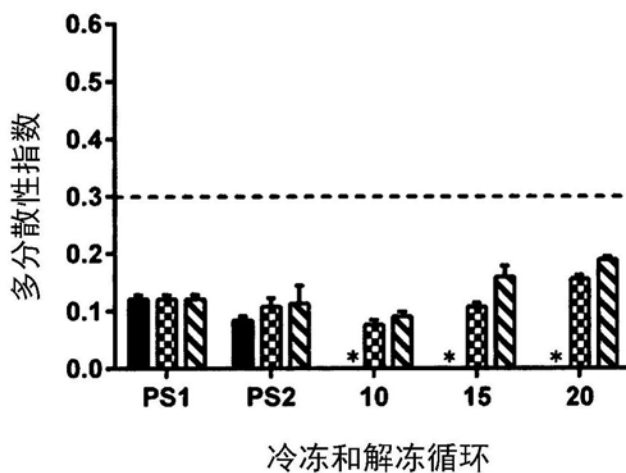
A



\* 由于病毒颗粒降解不可测量PDI

■ PBS  
 ▨ 原始供应商制剂1  
 ▩ 组合物11  
 ▤ 组合物12

B



\* 由于病毒颗粒降解不可测量PDI

■ PS1: OF1; PS2: PBS  
 ▨ PS1: OF1; PS2: 组合物11  
 ▩ PS1: OF1; PS2: 组合物12

图25



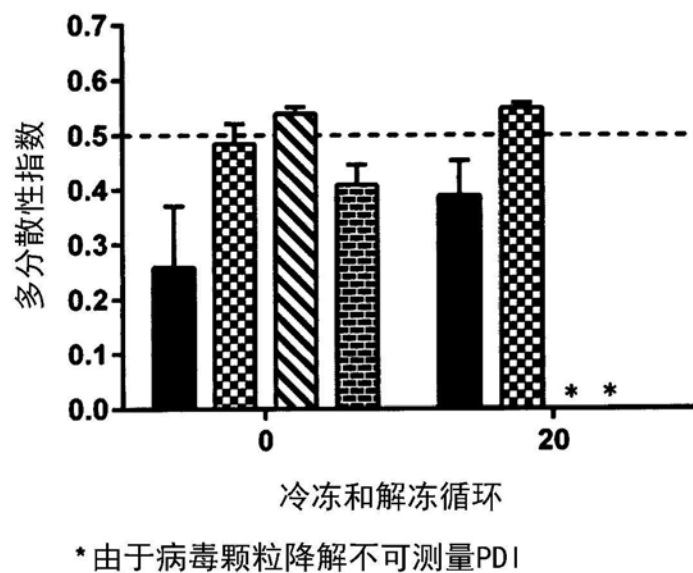


图26