

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11)公表番号
特表2024-500133
(P2024-500133A)

(43)公表日 令和6年1月4日(2024.1.4)

(51)国際特許分類		F I		テーマコード (参考)	
A 6 1 K	35/76 (2015.01)	A 6 1 K	35/76	4 C 0 7 6	
A 6 1 P	7/04 (2006.01)	A 6 1 P	7/04	4 C 0 8 4	
A 6 1 K	9/08 (2006.01)	A 6 1 K	9/08	4 C 0 8 7	
A 6 1 K	47/02 (2006.01)	A 6 1 K	47/02		
A 6 1 K	47/10 (2017.01)	A 6 1 K	47/10		
		審査請求	未請求	予備審査請求	未請求 (全57頁) 最終頁に続く
(21)出願番号	特願2023-537242(P2023-537242)		(71)出願人	508241200	
(86)(22)出願日	令和3年12月17日(2021.12.17)			サンガモ セラビューティクス, インコ	
(85)翻訳文提出日	令和5年8月18日(2023.8.18)			ーポレイテッド	
(86)国際出願番号	PCT/US2021/064222			アメリカ合衆国 カリフォルニア州 9 4	
(87)国際公開番号	WO2022/133324			0 0 5 ブリズベン マリーナ ブール	
(87)国際公開日	令和4年6月23日(2022.6.23)			バード 7 0 0 0	
(31)優先権主張番号	63/127,826		(71)出願人	593141953	
(32)優先日	令和2年12月18日(2020.12.18)			ファイザー・インク	
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)			アメリカ合衆国 1 0 0 0 1-2 1 9 2	
(81)指定国・地域	AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA			ニューヨーク州 ニューヨーク市 ハドソ	
	,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(		(74)代理人	100145403	
	AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,A			弁理士 山尾 憲人	
	T,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR		(74)代理人	100122301	
	,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,			弁理士 富田 憲史	
	最終頁に続く			最終頁に続く	

(54)【発明の名称】 アデノ随伴ウイルスベクターを含む改善された医薬組成物

(57)【要約】
本発明は、組換えA A Vおよび1つまたはそれ以上の医薬的に許容される賦形剤を含む組成物を提供する。
前記組成物は、他のA A V組成物と比較して改善された安定性および半減期を有する
【選択図】なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

組換えアデノ随伴ウイルス (rAAV) ベクター、
塩化ナトリウム (NaCl)、
塩化カリウム (KCl)、
リン酸二ナトリウム (Na_2HPO_4)、
リン酸一カリウム (KH_2PO_4)、
塩化マグネシウム (MgCl_2)、
ポリオール、および
ポロキサマー

10

を含む、医薬組成物であって、適宜、前記医薬組成物が、約 0.1 mM 未満の塩化カルシウムを含み、約 7.1 ~ 約 7.5 の pH である、医薬組成物。

【請求項 2】

前記ポリオールが、ショ糖である、請求項 1 に記載の医薬組成物。

【請求項 3】

前記ポロキサマーが、ポロキサマー 188 である、請求項 1 または 2 に記載の医薬組成物。

【請求項 4】

前記医薬組成物が、約 0.1 ~ 約 2.0 mM の塩化マグネシウムを含む、請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項に記載の医薬組成物。

20

【請求項 5】

前記医薬組成物が、約 0.5 mM またはそれ以上の塩化マグネシウムを含む、請求項 4 に記載の医薬組成物。

【請求項 6】

前記医薬組成物が、約 1.4 mM の塩化マグネシウムを含む、請求項 4 に記載の医薬組成物。

【請求項 7】

前記医薬組成物が、約 1.3 mM 以上の塩化マグネシウムを含む、請求項 4 に記載の医薬組成物。

【請求項 8】

前記医薬組成物が、約 150 ~ 約 200 mM、適宜、約 172 mM の塩化ナトリウムを含む、請求項 1 ~ 7 のいずれか 1 項に記載の医薬組成物。

30

【請求項 9】

前記医薬組成物が、約 2.5 ~ 約 3.0 mM、適宜、約 2.7 mM の塩化カリウムを含む、請求項 1 ~ 8 のいずれか 1 項に記載の医薬組成物。

【請求項 10】

前記医薬組成物が、約 5 ~ 約 10 mM、適宜、約 8 mM のリン酸二ナトリウムを含む、請求項 1 ~ 9 のいずれか 1 項に記載の医薬組成物。

【請求項 11】

前記医薬組成物が、約 1.0 ~ 約 2.0 mM、適宜、約 1.5 mM のリン酸一カリウムを含む、請求項 1 ~ 10 のいずれか 1 項に記載の医薬組成物。

40

【請求項 12】

前記医薬組成物が、約 0.5 % ~ 約 2 % (w/v)、適宜、約 1 % (w/v) のショ糖を含む、請求項 1 ~ 11 のいずれか 1 項に記載の医薬組成物。

【請求項 13】

前記医薬組成物が、約 0.01 % ~ 約 0.1 % (w/v)、適宜、約 0.05 % (w/v) のポロキサマー 188 を含む、請求項 1 ~ 12 のいずれか 1 項に記載の医薬組成物。

【請求項 14】

組換えアデノ随伴ウイルス (rAAV) ベクター、
約 171.81 mM の塩化ナトリウム、

50

約 2.68 mM の塩化カリウム、
約 8.10 mM のリン酸二ナトリウム、
約 1.47 mM のリン酸一カリウム、
約 1.40 mM の塩化マグネシウム、
約 1.00 % (w/v) のショ糖、および
約 0.05 % (w/v) のポロキサマー 188
を含む、医薬組成物であって、適宜、前記医薬組成物が、約 0.1 mM 未満の塩化カルシウムを含み、約 7.1～約 7.5 の pH である、医薬組成物。

【請求項 15】

組換えアデノ随伴ウイルス (rAAV) ベクター、
約 172 mM の塩化ナトリウム、
約 2.68 mM の塩化カリウム、
約 8.10 mM のリン酸二ナトリウム、
約 1.47 mM のリン酸一カリウム、
約 0.49 mM の塩化マグネシウム、
約 1.00 % (w/v) のショ糖、および
約 0.05 % (w/v) のポロキサマー 188
を含む、医薬組成物であって、適宜、前記医薬組成物が、約 0.1 mM 未満の塩化カルシウムを含み、約 7.1～約 7.5 の pH である、医薬組成物。

【請求項 16】

前記 rAAV が、治療タンパク質のための発現カセットを含むゲノムを含む、請求項 1～15 のいずれか 1 項に記載の医薬組成物。

【請求項 17】

前記治療タンパク質が、ヒト第 VII 因子ポリペプチドである、請求項 16 に記載の医薬組成物。

【請求項 18】

組換えアデノ随伴ウイルス (rAAV) ベクターであって、ヒト第 VII 因子ポリペプチドの発現のための発現カセットを含むゲノムを含む、前記 rAAV ベクター、
約 171.81 mM の塩化ナトリウム、
約 2.68 mM の塩化カリウム、
約 8.10 mM のリン酸二ナトリウム、
約 1.47 mM のリン酸一カリウム、
約 1.40 mM の塩化マグネシウム、
約 1.00 % (w/v) のショ糖、および
約 0.05 % (w/v) のポロキサマー 188
を含む、医薬組成物であって、適宜、前記医薬組成物が、約 0.1 mM 未満の塩化カルシウムを含み、約 7.1～約 7.5 の pH である、医薬組成物。

【請求項 19】

組換えアデノ随伴ウイルス (rAAV) ベクターであって、ヒト第 VII 因子ポリペプチド発現のための発現カセットを含むゲノムを含む、前記 rAAV、
約 172 mM の塩化ナトリウム、
約 2.68 mM の塩化カリウム、
約 8.10 mM のリン酸二ナトリウム、
約 1.47 mM のリン酸一カリウム、
約 0.49 mM の塩化マグネシウム、
約 1.00 % (w/v) のショ糖、および
約 0.05 % (w/v) のポロキサマー 188
を含む、医薬組成物であって、適宜、前記医薬組成物が、約 0.1 mM 未満の塩化カルシウムを含み、約 7.1～約 7.5 の pH である、医薬組成物。

【請求項 20】

前記ヒト第ⅤⅠⅠⅠ因子ポリペプチドが、配列番号 1 を含む、請求項 17～19 のいずれか 1 項に記載の医薬組成物。

【請求項 21】

前記 r A A V のゲノムが、配列番号 2 または配列番号 2 のヌクレオチド 131～5024 を含む、請求項 17～19 のいずれか 1 項に記載の医薬組成物。

【請求項 22】

前記医薬組成物が、前記 r A A V を、1 mL あたり約 1.0×10^{12} ～約 1.0×10^{14} バクテリオゲノム (vg)、適宜、1 mL あたり約 1.0×10^{13} ～約 5.0×10^{13} vg で含む、請求項 1～21 のいずれか 1 項に記載の医薬組成物。

【請求項 23】

前記医薬組成物が、1 mL あたり約 1.0×10^{13} vg を含む、請求項 22 に記載の医薬組成物。

【請求項 24】

前記 r A A V が、A A V 6 カプシドタンパク質を含み、適宜、A A V 2 の逆位末端配列 (ITR) を含む、請求項 1～23 のいずれか 1 項に記載の組成物。

【請求項 25】

5～10 mL、適宜、6.4 mL の請求項 1～24 のいずれか 1 項に記載の組成物を含む、バイアル。

【請求項 26】

シクロオレフィンコポリマーからなる、請求項 25 に記載のバイアル。

【請求項 27】

前記バイアルが、所定位置に熱可塑性エラストマー共栓が付いた、請求項 25 または 26 に記載のバイアル。

【請求項 28】

治療タンパク質を必要とする患者を治療する方法であって、請求項 1～24 のいずれか 1 項に記載の組成物を前記患者に投与することを特徴とする、方法。

【請求項 29】

増加を必要とするヒト対象における第ⅤⅠⅠⅠ因子の血清レベルを増加させる方法であって、請求項 17～24 のいずれか 1 項に記載の医薬組成物、または請求項 25～27 のいずれか 1 項に記載のバイアルの全含有量を、前記ヒト対象に静脈内に投与することを特徴とする、方法。

【請求項 30】

前記ヒト対象が、血友病 A に罹っている、請求項 29 に記載の方法。

【請求項 31】

治療を必要とするヒト対象における血友病 A を治療する方法であって、請求項 17～24 のいずれか 1 項に記載の医薬組成物、または請求項 25～27 のいずれか 1 項に記載のバイアルの全含有量を、前記ヒト対象に静脈内に投与することを特徴とする、方法。

【請求項 32】

請求項 28～31 のいずれか 1 項に記載の方法におけるヒト対象の治療薬の製造のための、請求項 1～24 のいずれか 1 項に記載の医薬組成物の使用。

【請求項 33】

請求項 28～31 のいずれか 1 項に記載の方法におけるヒト対象の治療に使用するための、請求項 1～24 のいずれか 1 項に記載の医薬組成物。

【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、参照によりその全体が本明細書に取り込まれる 2020 年 12 月 18 日に提出の米国出願番号 63 / 127, 826 からの優先権を請求する。

【0002】

10

20

30

40

50

配列表

本出願は、A S C I I形式で電子的に提出され、その全が参照により本明細書に取り込まれる配列表を含む。A S C I Iコピーは、2021年12月1日に作成され、025297_W0029_SL.txtとの名称で19,967バイトのサイズである。

【背景技術】

【0003】

遺伝子治療は、遺伝病を治療するための有望な方法である。これは、前記患者に対して欠陥遺伝子の健全なコピーを導入するか、または異常に機能している変異遺伝子を不活性にする。遺伝子治療研究の特に目的とされる遺伝子疾患は、血友病Aである。伝統的血友病とも呼ばれる血友病Aは、凝血プロセスが第V I I I因子をコードする欠陥または欠陥遺伝子により異常となるX連鎖遺伝病である。血友病A患者は、内部（例えば、関節および筋肉内）または外部（例えば、軽い切り傷、外傷、または歯科的処置による）で出血する。第V I I I因子の正常な血漿レベルは、50%～100%の範囲である。軽度の血友病Aは、血液中で第V I I I因子の6%～49%のレベルによって特徴付けられ；患者は、一般的に、重症の傷害、外傷、または外科的手術後にのみ出血する。中程度の血友病Aは、血液中で第V I I I因子の1%～5%のレベルによって特徴付けられ；患者は、損傷後の出血エピソードを示す。重症の血友病Aは、血液中で第V I I I因子の1%未満のレベルによって特徴付けられ；患者は、損傷後の出血を経験し、さらに、多くの場合、関節および筋肉における頻発する自然出血を示す。世界血友病連盟のウェブサイトも参照のこと。血友病Aは、一般に、補充第V I I I因子を用いて（出血に応じて）必要に応じてか、または予防的に治療される。ある患者は、前記補充因子に対する同種抗体（阻害剤としても知られている）を生じてしまい、これにより治療が無効となる。現在の療法は、頻度の高い静脈内注射を要するために負担が大きく、発展途上国では供給源に限りもある。よって、遺伝子治療は、血友病Aの治療に有望な方法を提供する。

【0004】

組換えアデノ随伴ウイルス（r A A V）は、遺伝子治療における遺伝子送達のパラダイムとして研究されてきた。アデノ随伴ウイルス（A A V）は、パルボウイルス科ディペンドパルボウイルス属に属する小さい非エンベロープウイルスである。前記ウイルスは、3つのカプシドタンパク質-ウイルスタンパク質（V P）1、V P 2、およびV P 3から構築されたカプシドにパッケージされた単鎖DNAゲノムから構成される。臨床使用のためのr A A V調製物の医薬組成物への製剤化は、課題であった。一般的に用いられるr A A V製剤は、長年または研究室で生じさせたストレス試験中に目視可能な沈殿物を形成することが観察されてきた。解決されずに残されてきたこれらの沈殿物は、患者の安全性に対するリスクを示す。いくつかのr A A V製剤で観察された物理的安定性の問題はまた、保存、輸送、および患者への投与に要する半減期に関する生成物の有効性に否定的な影響を及ぼしうる（例えば、Wright et al., Molecular Therapy (2005) 12(1):171-8; Croyle et al., Gene Therapy (2001) 8:1281-90を参照のこと）。よって、遺伝子治療の治療可能性が十分に発揮されるようなr A A Vベクターのための改善された製剤を開発する必要性が存在している。

【発明の概要】

【0005】

本開示は、臨床投与に適した安定なr A A Vベクター製剤を提供する。ある態様において、本開示は、r A A Vベクター、塩化ナトリウム（N a C l）、塩化カリウム（K C l）、リン酸二ナトリウム（N a₂ H P O₄）、リン酸一カリウム（K H₂ P O₄）、塩化マグネシウム（M g C l₂）、ポリオール（例えば、ショ糖）、およびポロキサマー（例えば、ポロキサマー188）を含む医薬組成物であって、適宜、約0.1mM以下の塩化カルシウムを含み、約7.1～約7.5のpHである、医薬組成物を提供する。

【0006】

ある実施態様において、前記組成物は、約0.1～約2.0mM（例えば、約0.5mMまたはそれ以上、約1.3mMまたはそれ以上、あるいは約1.4mM）の塩化マグネ

10

20

30

40

50

シウムを含む。

【0007】

ある実施態様において、前記組成物は、約150～約200mM、適宜、約172mMの塩化ナトリウムを含む。

【0008】

ある実施態様において、前記組成物は、約2.5～約3.0mM、適宜、約2.7mMの塩化カリウムを含む。

【0009】

ある実施態様において、前記組成物は、約5～約10mM、適宜、約8mMのリン酸二ナトリウムを含む。

【0010】

ある実施態様において、前記組成物は、約1.0～約2.0mM、適宜、約1.5mMのリン酸一カリウムを含む。

【0011】

ある実施態様において、前記組成物は、約0.5%～約2% (w/v)、適宜、約1% (w/v) のショ糖を含む。

【0012】

ある実施態様において、前記組成物は、約0.01%～約0.1% (w/v)、適宜、約0.05% (w/v) のポロキサマー188を含む。

【0013】

特定の実施態様において、本開示は、rAAVベクター、約171.81mMの塩化ナトリウム、約2.68mMの塩化カリウム、約8.10mMのリン酸二ナトリウム、約1.47mMのリン酸一カリウム、約1.40mMの塩化マグネシウム、約1.00 (w/v) %のショ糖、および約0.05 (w/v) %のポロキサマー188を含む医薬組成物であって、適宜、約0.1mM未満の塩化カルシウムを含み、約7.1～約7.5のpHである、医薬組成物を提供する。

【0014】

他のある実施態様において、本開示は、rAAVベクター、約172mMの塩化ナトリウム、約2.68mMの塩化カリウム、約8.10mMのリン酸二ナトリウム、約1.47mMのリン酸一カリウム、約0.49mMの塩化マグネシウム、約1.00 (w/v) %のショ糖、および約0.05 (w/v) %のポロキサマー188を含む医薬組成物であって、適宜、約0.1mM未満の塩化カルシウムを含み、約7.1～約7.5のpHである、医薬組成物を提供する。

【0015】

ある実施態様において、本発明の組成物におけるrAAVには、治療タンパク質、例えば、ヒト第VII因子ポリペプチド（例えば、配列番号1）のための発現カセットを含むゲノムが含まれる。特定の実施態様において、AAVゲノムには、配列番号2または配列番号2のヌクレオチド131～5,024が含まれる。

【0016】

ある実施態様において、前記組成物は、rAAVを1mLあたり約 1.0×10^{12} ～約 1.0×10^{14} ベクターゲノム (vg)、適宜、1mLあたり約 1.0×10^{13} ～約 5.0×10^{13} vg（例えば、1mLあたり約 1.0×10^{13} vg）で含む。

【0017】

ある実施態様において、前記rAAVは、（例えば、AAV6カプシドを有する）AAV6カプシドタンパク質を含む。ある実施態様において、前記AAVゲノムは、AAV2に由来する逆位末端配列 (ITR) を含む。

【0018】

別の態様において、本開示は、5～10mL、適宜、6.4mLの本発明の組成物を含むバイアルを提供する。前記バイアルは、例えば、シクロオレフィンコポリマーから構成されていてもよく、および／または所定位置に熱可塑性エラストマー共栓が付いていても

10

20

30

40

50

よい。

【0019】

別の態様において、本開示は、治療タンパク質を必要とする患者を治療する方法であって、本発明の組成物を前記患者に投与することを特徴とする方法を提供する。ある実施態様において、本開示は、第V E I I I因子の血清レベルの増加を必要とするヒト対象（例えば、血友病Aに罹っているヒト対象）における第V E I I I因子の血清レベルを増加させる方法であって、r A A Vがヒト第V E I I I因子ポリペプチドである治療組成物を、前記ヒト対象に静脈内投与することを特徴とする方法を提供する。このような治療方法で使用するための医薬組成物、およびこのような方法で使用するための医薬の製造のための前記組成物の使用もまた提供される。

10

【0020】

本発明の他の特徴、目的、および利点は、以下の詳細な説明で明らかである。しかしながら、詳細な説明は、本発明の実施態様および態様を示すが、例示として記載されるものであって、限定するものではないことが理解されるべきである。本発明の範囲内の様々な変更および改変は、詳細な説明から当業者にとって明らかである。

【図面の簡単な説明】

【0021】

【図1A】図1Aは、S B - 5 2 5を含む製剤の試料中で見出された粒子状物質の特徴付けを要約する。

【図1B】図1Bは、S B - 5 2 5を含む製剤の試料中で見出された粒子状物質の特徴付けを要約する。

20

【図1C】図1Cは、S B - 5 2 5を含む製剤の試料中で見出された粒子状物質の特徴付けを要約する。

【図1D】図1Dは、S B - 5 2 5を含む製剤の試料中で見出された粒子状物質の特徴付けを要約する。

【図1E】図1Eは、S B - 5 2 5を含む製剤の試料中で見出された粒子状物質の特徴付けを要約する。

【図1F】図1Fは、S B - 5 2 5を含む製剤の試料中で見出された粒子状物質の特徴付けを要約する。

【図2】図2は、タンジェンシャルフロー濾過（T F F）による緩衝液交換のスキームを示す。

30

【図3】図3は、A A V 6ベクター製剤の製剤化、充填、および最終工程を示す。

【図4A】図4Aは、複数回の凍結／解凍サイクル後のA A V 6ベクター製剤のベクターゲノム（v g）力価および感染力価を示す。示されるエラーバーは、M A D L Sによる粒子濃度の $N \geq 3$ 試料測定からの±パーセンテージR S D、あるいはv g力価の±許容される試験変動、平均組織培養感染用量（T C I D₅₀）、E L I S A、およびS E - L Cである。R S D：相対標準偏差。M A D L S：多角度動的光散乱法。S E - L C：サイズ排除液体クロマトグラフィー。

【図4B】図4Bは、複数回の凍結／解凍サイクル後のA A V 6ベクター製剤のカプシド力価および粒子濃度を示す。示されるエラーバーは、M A D L Sによる粒子濃度の $N \geq 3$ 試料測定からの±パーセンテージR S D、あるいはv g力価の±許容される試験変動、平均組織培養感染用量（T C I D₅₀）、E L I S A、およびS E - L Cである。

40

【図4C】図4Cは、凍結／解凍A A V 6ベクター製剤試料の一般的な純度品質特性の結果を示す表である。

【図4D】図4Dは、凍結／解凍A A V 6ベクター製剤試料の強度品質特性の結果を示す表である。

【図5A】図5Aは、周囲（25℃／60% R H）条件における6ヶ月間にわたるv gおよび感染力価を示す。R H：相対湿度。

【図5B】図5Bは、周囲（25℃／60% R H）条件下における6ヶ月間にわたるカプシド力価および粒子濃度を示す。

50

【図 5 C】図 5 C は、周囲（25℃／60％RH）条件下でインキュベートした試料の一般的な純度品質特性の結果を示す表である。ND：データなし。NAA：利用できる分析なし。

【図 5 D】図 5 D は、周囲（25℃／60％RH）条件下でインキュベートした試料の強度品質特性の結果を示す表である。

【図 6 A】図 6 A は、ストレス（40℃／75％RH）条件下における 3 ヶ月間にわたる v g および感染力価を示す。

【図 6 B】図 6 B は、ストレス（40℃／75％RH）条件下における 7 ヶ月間にわたるカプシド力価および粒子濃度を示す。

【図 6 C - 1】図 6 C は、ストレス（40℃／75％RH）条件下でインキュベートした試料の一般的な純度品質特性の結果を示す表である。

【図 6 C - 2】図 6 C は、ストレス（40℃／75％RH）条件下でインキュベートした試料の一般的な純度品質特性の結果を示す表である。

【図 6 D - 1】図 6 D は、ストレス（40℃／75％RH）条件下でインキュベートした試料の強度品質特性の結果を示す表である。

【図 6 D - 2】図 6 D は、ストレス（40℃／75％RH）条件下でインキュベートした試料の強度品質特性の結果を示す表である。

【図 7】図 7 は、安定化試料に関連する品質特性および失敗基準を示す表である。

【図 8】図 8 は、試料間製剤評価概要を示す表である。

【図 9】図 9 は、一般的な純度品質特性の試験エンドポイント傾向線および製剤評価を示す表である。

【図 10 - 1】図 10 は、目的の保存温度（-70℃）における SB-525 製剤の長期間（24 ヶ月）安定性を示す表である。

【図 10 - 2】図 10 は、目的の保存温度（-70℃）における SB-525 製剤の長期間（24 ヶ月）安定性を示す表である。

【発明を実施するための形態】

【0022】

（発明の詳細な説明）

本開示は、AAV ベクターおよび 1 つまたはそれ以上の医薬的に許容される賦形剤を含む医薬組成物を提供する。本発明の AAV ベクター組成物は、ゲノムが目的のタンパク質（例えば、治療タンパク質）の発現カセットを保有する rAAV を含んでいてもよい。本発明者らは、予想外なことに、カルシウムを実質的に含まない（例えば、製剤中に添加されたカルシウムを含まない）AAV ベクター製剤が、従来の組成物と比較して、改善された安定性および半減期を示すことを知見した。カルシウムは、典型的に、AAV 組成物の安定性を改善するという従来の考え方によりこれまでの製剤に含まれてきた（例えば、Turnbull et al., Hum Gene Ther. (2000) 11(4):629-35; Cotmore et al., J Virol. (2010) 84(4):1945-56 を参照のこと）。本発明者らは、本発明の AAV ベクター組成物が、改善された外観（例えば、透明度および無色）、より安定な pH、および少ない凝集（凍結／解凍サイクルおよび促進された安定性条件下での製品の品質特性によって決定される）を有することを知見した。カルシウムを含まずに製剤化された AAV ベクター製品が良好な製品安定性を示すことから、カルシウムイオンは、製品の機能または安定性に必要とされない。

【0023】

I. 組換え AAV の調製

本明細書に記載のウイルス調製物は、いずれかの公知の生成系、例えば、哺乳類細胞 AAV 生成系（例えば、293T または HEK293 細胞に基づく系）および昆虫細胞 AAV 生成系（例えば、sf9 昆虫細胞に基づく系および／またはバキュロウイルスのヘルパーベクターを用いた系）によって得られてもよい。前記ウイルス調製物は、細胞培養物を、不連続の塩化セシウム密度グラジエントなどの周知技術を用いて精製されてもよい（例えば、Grieger, Mol Ther Methods Clin Dev. (2016) 3:16002 を参照のこと）。

【0024】

本発明の組成物は、様々なAAVセロタイプ、例えば、AAV1、AAV2、AAV3、AAV3B、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV8.2、AAV9、AAVrh10、AAV10、およびAAV11、ならびにこれらの変異型、ハイブリッド、キメラまたは偽型のうちのいずれかまたは組み合わせのAAVを含んでいてもよい。「偽型」または「クロスパッケージ」rAAVは、例えば、ウイルスの形質導入効率または指向性プロファイルを変化させるために、カプシドが、別のAAVセロタイプのカプシドで置換されている組換えAAVを意味する（例えば、Balaji et al., J Surg Res. (2013) 184(1):691-8を参照のこと）。「キメラ」または「ハイブリッド」rAAVは、カプシドが、異なるセロタイプに由来するカプシドタンパク質から構成されるか、および／またはカプシドタンパク質が、異なるセロタイプに由来する配列を有するキメラタンパク質である組換えAAVを意味する（例えば、セロタイプ1および2；例えば、Hauck et al., Mol Ther. (2003) 7(3):419-25を参照のこと。例えば、本発明の組成物は、ITRなどのゲノムが、AAV2などのあるセロタイプに由来するが、カプシドが、別のセロタイプ（例えば、AAV2/8、AAV2/5、AAV2/6、AAV2/9、またはAAV2/6/9）に由来する組換えAAVを含んでいてもよい。例えば、米国特許第7,198,951および9,585,971号を参照のこと。

10

【0025】

II. 組換えAAVの製剤

精製されると、AAV調製物は、所望される成分を含む組成物を得るために、例えば、タンジェンシャルフロー濾過、通常のフロー濾過（攪拌式セルを使用）、ゲル濾過、透析、カラムクロマトグラフィー、および／または脱塩カラムを通した緩衝剤交換によって本明細書に記載されるように製剤化することができる。一例として、精製されたウイルス調製物は、まず限外濾過（UF）、続いて透析濾過（DF）によって所望される製剤化水溶液の10倍またはそれ以上の等価容量で濃縮されうる。下記の実施例も参照のこと。

20

【0026】

製剤の溶液は、等張化剤、安定化剤、界面活性剤、および緩衝剤を含んでいてもよい。緩衝剤には、例えば、酢酸塩、コハク酸塩（例えば、コハク酸二ナトリウム六水和物）、コハク酸、グルコン酸、クエン酸塩、ヒスチジン、酢酸、リン酸塩、リン酸、アスコルビン酸、アスコルビン酸塩、酒石酸、マレイン酸塩、マレイン酸、グリシン、乳酸塩、乳酸、炭酸水素塩、カルボン酸、安息香酸ナトリウム、安息香酸、エドト酸塩、イミダゾール、トリス、およびこれらの混合物が含まれうる。ある実施態様において、製剤化溶液には、塩化ナトリウムおよび／または塩化カリウムが、例えば、それぞれ、約150~200 mM（例えば、約150 mM、約155 mM、約160 mM、約165 mM、約168 mM、約170 mM、約171 mM、約171.1 mM、約171.2 mM、約171.3 mM、約171.4 mM、約171.5 mM、約171.6 mM、約171.7 mM、約171.8 mM、約171.9 mM、または約172 mM）および約2.5~3.0 mM（例えば、約2.5 mM、約2.6 mM、約2.61 mM、約2.61 mM、約2.63 mM、約2.64 mM、約2.65 mM、約2.66 mM、約2.67 mM、約2.68 mM、約2.69 mM、または約2.7 mM、約2.8 mM、約2.9 mM、約3.0 mM）で含まれる。

30

40

【0027】

製剤化溶液は、例えば、リン酸二ナトリウムおよび／またはリン酸一カリウムによってリン酸緩衝化されていてもよい。ある実施態様において、製剤化溶液中の総リン酸イオン濃度は、約8~12 mM（例えば、約9.6 mMまたは約9.57 mM）である。ある実施態様において、製剤化溶液は、約5~10 mM（例えば、約5 mM、約6 mM、約7 mM、約7.9 mM、約8 mMもしくは約8.1 mM、約8.2 mM、約8.5 mM、約9 mM、または約10 mM）のリン酸二ナトリウムおよび約1~2 mM（例えば、約1 mM、約1.2 mM、約1.3 mM、約1.45 mM、約1.47 mM、約1.48 mM、約1.49 mM、約1.5、約1.6 mM、約1.7 mM、約1.8 mM、約1.9 mM、

50

または約 2 mM) のリン酸一カリウムを含む。製剤は、約 6.5～8.0 (例えば、約 7.1～7.5、約 7.1、約 7.2、約 7.3、約 7.4、または約 7.5) の pH であってもよい。

【0028】

製剤化溶液は、マグネシウムを含んでいてもよいが、添加されたカルシウムを含まない。ある実施態様において、製剤化溶液は、約 0.1～2.0 mM (例えば、約 0.5～約 1.4 mM、約 0.1 mM、約 0.2 mM、約 0.3 mM、約 0.4 mM、約 0.42 mM、約 0.44 mM、約 0.45 mM、約 0.46 mM、約 0.47 mM、約 0.48 mM、約 0.49 mM、約 0.5、約 0.55 mM、または約 0.6 mM) の塩化マグネシウムを含む。製剤化溶液は、添加されたカルシウムを含まず、医薬組成物は AAV 調製物から調製されるが、製剤化溶液は、AAV 製造および精製プロセスで持ち越されている追跡量のカルシウムを有する。例えば、医薬組成物は、比色分析アッセイによって測定されると、約 0.10 mM 未満 (例えば、約 0.09、0.07、0.05、0.03、または 0.01 mM 未満) のカルシウムを含みうる。ある実施態様において、医薬組成物は、比色分析アッセイによって測定されると、検出できないカルシウムを含む。ある実施態様において、医薬組成物は、カルシウムを含まない (すなわち、0 mM のカルシウム)。

10

【0029】

製剤化溶液は、ポリオール、例えば、マンニトール、トレハロース、ソルビトール、エリトリトール、イソマルト、ラクチトール、マルチトール、キシリトール、グリセロール、ラクチトール、エチレングリコール、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール、イノシトール、フルクトース、グリコール、マンノース、ショ糖、ソルボース、キシロース、乳糖、マルトース、デキストラン、プルラン、デキストリン、シクロデキストリン、可溶性デンプン、ヒドロキシエチルスターチ、水溶性グルカン、またはこれらの混合物を含んでいてもよい。ある実施態様において、製剤化溶液は、約 0.5%～2% (例えば、約 0.5%、約 0.6%、約 0.7%、約 0.8%、約 0.9%、または約 1%) (w/v) ショ糖を含む。

20

【0030】

製剤化溶液は、非イオンまたはイオン性親水性界面活性剤を含んでいてもよい。界面活性剤の例は、ポリソルベート、ポロキサマー、トリトン、ドデシル硫酸ナトリウム、ラウリル硫酸ナトリウム、オクチルグリコシドナトリウム、ラウリルスルホベタイン、ミリスチルスルホベタイン、リノレイルスルホベタイン、ステアリルスルホベタイン、ラウリルサルコシン、ミリスチルサルコシン、リノレイルサルコシン、ステアリルサルコシン、リノレイルベタイン、ミリスチルベタイン、セチルベタイン、ラウラミドプロピルベタイン、ココミドプロピルベタイン、リノールアミドプロピルベタイン、ミリスタミドプロピルベタイン、パルミドプロピルベタイン、イソステアラミドプロピルベタイン、ミリスタミドプロピルジメチルアミン、パルミドプロピルジメチルアミン、イソステアラミドプロピルジメチルアミン、ココイルメチルタウリンナトリウム、オレオイルメチルタウリンナトリウム、ジヒドロキシプロピル PEG-5 リノールアンモニウムクロリド、ポリエチレングリコール、ポリプロピレングリコール、ソルビタンモノステアレート (例えば、Span 80)、グリセロールの酸エステル、およびこれらの混合物である。ある実施態様において、界面活性剤は、ポリソルベート (PS) 20、PS-21、PS-40、PS-60、PS-61、PS-65、PS-80、PS-81、PS-85、PEG-3350、ポロキサマー 188、およびこれらの混合物であってもよい。ある実施態様において、製剤化溶液は、ポロキサマー 188 を約 0.01%～0.1% (例えば、約 0.01%、約 0.02%、約 0.03%、約 0.04%、約 0.05%、約 0.06%、約 0.07%、約 0.08%、約 0.09%、または約 0.1%) (w/v) で含む。

30

40

【0031】

ある実施態様において、医薬組成物は、製剤 F2 または F3 中に AAV ベクターを含む。F2 および F3 の成分を下記表 A に示す。ダルベッコリン酸緩衝生理食塩水 (DPBS) (カルシウムおよびマグネシウムを含む) は、細胞培養のために一般的に用いられる製

50

剤である。F0は、別の従来のカルシウムを含有する製剤である。下記実施例に示されるように、F2およびF3は、AAVを製剤化するとDPBSおよびF0より優れている。

表A．製剤の比較

【表1】

構成成分(単位)	DPBS	F0	F2	F3
NaCl (mM)	136.89	171.80	171.80	171.80
KCl (mM)	2.68	2.68	2.68	2.68
Na ₂ HPO ₄ (mM)	8.10	8.10	8.10	8.10
KH ₂ PO ₄ (mM)	1.47	1.47	1.47	1.47
CaCl ₂ (mM)	0.90	0.90	0.0	0.0
MgCl ₂ (mM)	0.50	0.50	0.49	1.40
ショ糖 (% w/v)	0.0	1.00%	1.00%	1.00%
ホ°ロキサマー188 (% w/v)	0.0	0.05%	0.05%	0.05%

【0032】

本明細書で用いられるように、製剤中の様々な成分の濃度は、小数点0、1、または2で表されうる。よって、例えば、F2において、NaCl、KCl、Na₂HPO₄、KH₂PO₄、MgCl₂、およびショ糖の濃度は、それぞれ、171.80（または171.8もしくは172）mM、2.68（もしくは2.7）mM、8.10（または8.1もしくは8）mM、1.47（もしくは1.5）mM、0.49（もしくは0.5）mM、および1.00%（または1.0%もしくは1%）（w/v）として表されてもよい。F3において、NaCl、KCl、Na₂HPO₄、KH₂PO₄、MgCl₂、およびショ糖の濃度は、それぞれ、171.80（または171.8もしくは172）mM、2.68（もしくは2.7）mM、8.10（または8.1もしくは8）mM、1.47（もしくは1.5）mM、1.40（または1.4）mM、および1.00%（または1.0%もしくは1%）（w/v）として表されてもよい。

【0033】

医薬組成物は、1つまたはそれ以上の保存剤、例えば、アスコルビン酸（ビタミンC）、亜硫酸塩、ソルビン酸塩、安息香酸塩、フェノール、m-クレゾール、ベンジルアルコール、塩化ベンザルコニウム、フェノキシエタノール、および／またはパラベン（例えば、メチルパラベン）をさらに含んでもよい。ある実施態様において、医薬組成物は、添加される保存剤は含まれない。

【0034】

医薬組成物は、医薬組成物の有効性を高める他の試薬を含んでもよい。医薬組成物は、送達ベヒクル、例えば、リポソーム、ナノカプセル剤、微小粒子、ミクロスフェア、脂質粒子、および小胞を含むうる。

【0035】

III. 典型的な組換えAAV

典型的な実施態様において、本開示は、第VII因子遺伝子療法のためのrAAVベクターを含む改善された医薬組成物を提供する。PF-07055480/SB-525（または本明細書では、「SB-525」）と称されるrAAVベクターは、2/6シュードセロタイプのものであって、AAV6カプシドおよびAAV2逆位末端配列（ITR）を有する組換えゲノムを含む。SB-525のゲノムは、ヒト第VII因子（FVII）のBドメイン欠失（BDD）型をコードする発現カセットを保有する。例えば、WO2017/074526（配列番号37）を参照のこと。SB-525は、静脈内（IV）用量として投与され、血友病A患者における第VII因子タンパク質の長期間の肝臓産生を提供するための肝臓特異性を有する。WO2020/028830を参照のこと。分泌型FVIIタンパク質は、承認された組換え抗血友病因子（Refacto（登

録商標) および X y n t h a (登録商標)) と同一のアミノ酸配列を有する。

【0036】

S B - 5 2 5 のゲノムは、ヒト第 V I I I 因子 B D D 型のための発現カセットを含み、下記に示されるアミノ酸配列を有する：

【表 2】

MQIELSTCFFLCCLLRFCFSATTRYYLGAVELSWDYMQSDLGELPVDARFPPRVPKSFPF
NTSVVYKKTLEFVEFTDHLFNIAPRPPWMGLLGPTIQAEVYDTVVITLKNMASHPVSLH
AVGVSYWKASEGAEYDDQTSQREKEDDKVFPGGSHTYVWQVLKENGPMASDPLCLTYSY
LSHVDLVKDLNSGLIGALLVCREGLAKEKTQTLHKFILLFAVFDEGKSWHSETKNSLM
QDRDAASARAWPKMHTVNGYVNRSLPGLIGCHRKSVYWHVIGMGTTPEVHSIFLEGHTF
LVRNHRQASLEISPITFLTAQTLLMDLGQFLLFCHISSHQHDGMEAYVKVDSCPEEPQL
RMKNNEEAEDYDDDLTDSEMDVVRFDNNSPSFIQIRSVAKKHPKTWVHYIAAEEEDWD
YAPLV LAPDDRSYKSQYLNNGPQRIGRKYKKVRFMAYTDETFKTREAIQHESGILGPLL
YGEVGD TLLIIFKNQASRPYNIYPHGITDVRPLYSRRLPKG VKHLKDFPILPGEIFKYK
WTVTVEDGPTKSDPRCLTRYYS SFVNMERDLASGLIGPLLCYKESVDQQRGNQIMSDKR
NVILFSVF DENRSWYL TENIQRFLPNPAGVQLEDPEFQASNIMHSINGYVFDSLQLSVC
LHEVAYWYILSIGAQTDFLSVFFSGYTFKHKMVYEDTLTLFPFSGETVFMSMENPGLWI
LGCHNSDFRNRGMTALLKVSSCDKNTGDYYEDSYEDISAYLLSKNNAIEPRSFQKTRHYFIA
AVERLWDYGMSSSPHVLNRNAQSGSVPPQFKKVVFQEF TDGSFTQPLYRGELNEHLGLLG
PYIRAEVEDNIMVTFRNQASRPYSFYSSLI SYEEDQRQGAEPKRFVKNETKTYFWKV
QHHMAPTKDEFDC KAWAYFS DVDLEKDVHSGLIGPLLVCHTNTLNPAHGRQVTVQEFAL
FFTIFDET KSWYFTENMERNCRAPCNIQMEDPTFKENYRFHAINGYIMDTLPGLVMAQD
QRIRWYLLSMGSNENIHSIHFS GHVFTVRKKEEYKMALYNLYPGVFETVEMLP SKAGIW
RVECLIGEHLHAGMSTLFLVYSNKCQTP LGMASGHIRDFQITASGQYGQWAPKLARLHY
SGSINAWSTKEPFSWIKVDLLAPMI IHGIKTQGARQKFSSLYISQFIIMYSLDGKKWQT
YRGNSTGTLMVFFGNVDSSGIKHNIFNPPIIARYIRLHPHTHSIRSTLRMELMGCDLNS
CSMPLGMESKAISDAQITASSYFTNM FATWSPSKARLHLQGRSNAWRPQVNNPKEWLQV
DFQKTMKVTVGTTQGVKSLLTSMYVKEFLISSSQDGHQWTLFFQNGKV KVFQGNQDSFT
PVVNSLDPPLLTRYLRHPQSWVHQIALRMEVLGCEAQDLY (配列番号 1)

10

20

30

【0037】

配列番号 1 のシグナルペプチド部分は、上記ボックスで示され、タンパク質が分泌されるときに切り離される。

【0038】

S B - 5 2 5 ゲノムは、以下のヌクレオチド配列を含む：

40

50

【表 3】

1	CTGCGCGCTC	GCTCGCTCAC	TGAGGCCGCC	CGGGCAAAGC	CCGGGCGTCG	GGCGACCTTT
61	GGTCGCCCGG	CCTCAGTGAG	CGAGCGAGCG	CGCAGAGAGG	GAGTGGCCAA	CTCCATCACT
121	AGGGGTTTCT	GCGGCCTAAG	CTTGGAACCA	TTGCCACCTT	CAGGGGGAGG	CTGCTGGTGA
181	ATATTAACCA	AGATCACCCC	AGTTACCGGA	GGAGCAAACA	GGGACTAAGT	TCACACGCGT
241	GGTACCGTCT	GTCTGCACAT	TTCGTAGAGC	GAGTGTTCGG	ATACTCTAAT	CTCCCTAGGC
301	AAGGTTTCATA	TTTGTGTAGG	TTACTTATTC	TCCTTTTGTG	GACTAAGTCA	ATAATCAGAA
361	TCAGCAGGTT	TGGAGTCAGC	TTGGCAGGGA	TCAGCAGCCT	GGGTTGGAAG	GAGGGGGTAT
421	AAAAGCCCCCT	TCACCAGGAG	AAGCCGTCAC	ACAGATCCAC	AAGCTCCTGA	AGAGGTAAGG
481	GTTTAAGTTA	TCGTTAGTTC	GTGCACCATT	AATGTTTAAT	TACCTGGAGC	ACCTGCCTGA
541	AATCATTTTT	TTTTTCAGGT	GGCTAGTATG	CAGATCGAGC	TCTCCACCTG	CTTCTTTCTG
601	TGCCTGTTGA	GATTCTGCTT	CAGCGCCACC	AGGAGATACT	ACCTGGGGGC	TGTGGAGCTG
661	AGCTGGGACT	ACATGCAGTC	TGACCTGGGG	GAGCTGCCTG	TGGATGCCAG	GTTCCTCCCC
721	AGAGTGCCCA	AGAGCTTCCC	CTTCAACACC	TCTGTGGTGT	ACAAGAAGAC	CCTGTTTGTG
781	GAGTTCACCTG	ACCACCTGTT	CAACATTGCC	AAGCCCAGGC	CCCCCTGGAT	GGGCTGCTG
841	GGCCCCACCA	TCCAGGCTGA	GGTGTATGAC	ACTGTGGTGA	TCACCTGAA	GAACATGGCC
901	AGCCACCCTG	TGAGCCTGCA	TGCTGTGGGG	GTGAGCTACT	GGAAGGCCTC	TGAGGGGGCT
961	GAGTATGATG	ACCAGACCAG	CCAGAGGGAG	AAGGAGGATG	ACAAGGTGTT	CCCTGGGGGC
1021	AGCCACACCT	ATGTGTGGCA	GGTGTGAAG	GAGAATGGCC	CCATGGCCTC	TGACCCCTG
1081	TGCCTGACCT	ACAGCTACCT	GAGCCATGTG	GACCTGGTGA	AGGACCTGAA	CTCTGGCCTG
1141	ATTGGGGCCC	TGCTGGTGTG	CAGGGAGGGC	AGCCTGGCCA	AGGAGAGAC	CCAGACCCTG
1201	CACAAGTTCA	TCCTGCTGTT	TGCTGTGTTT	GATGAGGGCA	AGAGCTGGCA	CTCTGAAACC
1261	AAGAACAGCC	TGATGCAGGA	CAGGGATGCT	GCCTCTGCCA	GGGCTGGCC	CAAGATGCAC
1321	ACTGTGAATG	GCTATGTGAA	CAGGAGCCTG	CCTGGCCTGA	TTGGCTGCCA	CAGGAAGTCT
1381	GTGTACTGCG	ATGTGATTGG	CATGGGCACC	ACCCCTGAGG	TGCACAGCAT	CTTCTTGGAG
1441	GGCCACACCT	TCCTGGTCAG	GAACCACAGG	CAGGCCAGCC	TGGAGATCAG	CCCCATCACC
1501	TTCTGACTG	CCCAGACCCT	GCTGATGGAC	CTGGGCCAGT	TCCTGCTGTT	CTGCCACATC
1561	AGCAGCCACC	AGCATGATGG	CATGGAGGCC	TATGTGAAGG	TGGACAGCTG	CCCTGAGGAG
1621	CCCCAGCTGA	GGATGAAGAA	CAATGAGGAG	GCTGAGGACT	ATGATGATGA	CCTGACTGAC
1681	TCTGAGATGG	ATGTGGTGAG	GTTTGATGAT	GACAACAGCC	CCAGCTTCAT	CCAGATCAGG
1741	TCTGTGGCCA	AGAAGCACCC	CAAGACCTGG	GTGCCTTACA	TTGCTGCTGA	GGAGGAGGAC
1801	TGGGACTATG	CCCCCTGGT	GCTGGCCCT	GATGACAGGA	GCTACAAGAG	CCAGTACCTG
1861	AACAATGGCC	CCCAGAGGAT	TGGCAGGAAG	TACAAGAAGG	TCAGGTTTCA	GGCCTACACT
1921	GATGAAACCT	TCAAGACCAG	GGAGGCCATC	CAGCATGAGT	CTGGCATCCT	GGGCCCCCTG
1981	CTGTATGGGG	AGGTGGGGGA	CACCCTGCTG	ATCATCTTCA	AGAACCAGGC	CAGCAGGCCC
2041	TACAACATCT	ACCCCATGG	CATCACTGAT	GTGAGGCCCC	TGTACAGCAG	GAGGCTGCCC
2101	AAGGGGGTGA	AGCAGCTGAA	GGAGTTCCCC	ATCCTGCCTG	GGGAGATCTT	CAAGTACAAG
2161	TGGACTGTGA	CTGTGGAGGA	TGGCCCCACC	AAGTCTGACC	CCAGGTGCCT	GACCAGATAC
2221	TACAGCAGCT	TTGTGAACAT	GGAGAGGGAC	CTGGCCTCTG	GCCTGATTGG	CCCCCTGCTG
2281	ATCTGCTACA	AGGAGTCTGT	GGACCAGAGG	GGCAACCAGA	TCATGTCTGA	CAAGAGGAAT
2341	GTGATCCTGT	TCTCTGTGTT	TGATGAGAAC	AGGAGCTGGT	ACCTGACTGA	GAACATCCAG
2401	AGGTTTCTGC	CCAACCTGCT	TGGGGTGAC	CTGGAGGACC	CTGAGTTCCA	GGCCAGCAAC
2461	ATCATGCACA	GCATCAATGG	CTATGTGTTT	GACAGCCTGC	AGCTGTCTGT	GTGCCTGCAT
2521	GAGGTGGCCT	ACTGGTACAT	CCTGAGCATT	GGGGCCGAGA	CTGACTTCCT	GTCTGTGTTT
2581	TTCTCTGGCT	ACACCTTCAA	GCACAAGATG	GTGTATGAGG	ACACCCTGAC	CCTGTTCCCC
2641	TTCTCTGGGG	AGACTGTGTT	CATGAGCATG	GAGAACCCTG	GCCTGTGGAT	TCTGGGCTGC
2701	CACAACCTG	ACTTCAGGAA	CAGGGGCATG	ACTGCCCTGC	TGAAAGTCTC	CAGCTGTGAC
2761	AAGAACACTG	GGGACTACTA	TGAGGACAGC	TATGAGGACA	TCTCTGCCTA	CCTGCTGAGC
2821	AAGAACAATG	CCATTGAGCC	CAGGAGCTTC	AGCCAGAATC	CACCCGTCCT	TAAGCGCCAT
2881	CAGCGCGAGA	TCACCAGGAC	CACCCTGCAG	TCTGACCAGG	AGGAGATTGA	CTATGATGAC
2941	ACCATCTCTG	TGGAGATGAA	GAAGGAGGAC	TTTGACATCT	ACGACGAGGA	CGAGAACCAG
3001	AGCCCCAGGA	GCTTCCAGAA	GAAGACCAGG	CACTACTTCA	TTGCTGCTGT	GGAGAGGCTG
3061	TGGGACTATG	GCATGAGCAG	CAGCCCCCAT	GTGCTGAGGA	ACAGGGCCCA	GTCTGGCTCT
3121	GTGCCCCAGT	TCAAGAAGGT	GGTGTTCAG	GAGTTCACTG	ATGGCAGCTT	CACCCAGCCC
3181	CTGTACAGAG	GGGAGCTGAA	TGAGCACCTG	GGCCTGCTGG	GCCCCACAT	CAGGGCTGAG
3241	GTGGAGGACA	ACATCATGGT	GACCTTCAGG	AACCAGGCCA	GCAGGCCCTA	CAGCTTCTAC

10

20

30

40

50

【表 4】

3301	AGCAGCCTGA	TCAGCTATGA	GGAGGACCAG	AGGCAGGGGG	CTGAGCCCAG	GAAGAACCTT
3361	GTGAAGCCCA	ATGAAACCAA	GACCTACTTC	TGGAAGGTGC	AGCACCACAT	GGCCCCCACC
3421	AAGGATGAGT	TTGACTGCAA	GGCCTGGGCC	TACTTCTCTG	ATGTGGACCT	GGAGAAGGAT
3481	GTGCACTCTG	GCCTGATTGG	CCCCCTGCTG	GTGTGCCACA	CCAACACCCT	GAACCCTGCC
3541	CATGGCAGGC	AGGTGACTGT	GCAGGAGTTT	GCCCTGTTCT	TCACCATCTT	TGATGAAACC
3601	AAGAGCTGGT	ACTTCACTGA	GAACATGGAG	AGGAACTGCA	GGGCCCCCTG	CAACATCCAG
3661	ATGGAGGACC	CCACCTTCAA	GGAGAACTAC	AGGTTCCATG	CCATCAATGG	CTACATCATG
3721	GACACCCTGC	CTGGCCTGGT	GATGGCCCAG	GACCAGAGGA	TCAGGTGGTA	CCTGCTGAGC
3781	ATGGGCAGCA	ATGAGAACAT	CCACAGCATC	CACTTCTCTG	GCCATGTGTT	CACTGTGAGC
3841	AAGAAGGAGG	AGTACAAGAT	GGCCCTGTAC	AACCTGTACC	CTGGGGTGTT	TGAGACTGTG
3901	GAGATGCTGC	CCAGCAAGGC	TGGCATCTGG	AGGGTGGAGT	GCCTGATTGG	GGAGCACCTG
3961	CATGCTGGCA	TGAGCACCCCT	GTTCCCTGGT	TACAGCAACA	AGTGCCAGAC	CCCCCTGGGC
4021	ATGGCCTCTG	GCCACATCAG	GGACTTCCAG	ATCACTGCCT	CTGGCCAGTA	TGGCCAGTGG
4081	GGCCCCAAGC	TGGCCAGGCT	GCACTACTCT	GGCAGCATCA	ATGCCTGGAG	CACCAAGGAG
4141	CCCTTCAGCT	GGATCAAGGT	GGACCTGCTG	GGCCCCATGA	TCATCCATGG	CATCAAGACC
4201	CAGGGGGCCA	GGCAGAAAGT	CAGCAGCCTG	TACATCAGCC	AGTTCATCAT	CATGTACAGC
4261	CTGGATGGCA	AGAAGTGGCA	GACCTACAGG	GGCAACAGCA	CTGGCACCCCT	GATGGTGTTT
4321	TTTGGCAATG	TGGACAGCTC	TGGCATCAAG	CACAACATCT	TCAACCCCCC	CATCATTTGCC
4381	AGATACATCA	GGCTGCACCC	CACCCACTAC	AGCATCAGGA	GCACCCTGAG	GATGGAGCTG
4441	ATGGGCTGTG	ACCTGAACAG	CTGCAGCATG	CCCCTGGGCA	TGGAGAGCAA	GGCCATCTCT
4501	GATGCCCAGA	TCACTGCCAG	CAGCTACTTC	ACCAACATGT	TTGCCACCTG	GAGCCCCAGC
4561	AAGGCCAGGC	TGCATCTGCA	GGGCAGGAGC	AATGCCTGGA	GGCCCCAGGT	CAACAACCCC
4621	AAGGAGTGGC	TGCAGGTGGA	CTTCCAGAAG	ACCATGAAGG	TGACTGGGGT	GACCACCCAG
4681	GGGGTGAAGA	GCCTGCTGAC	CAGCATGTAT	GTGAAGGAGT	TCCTGATCAG	CAGCAGCCAG
4741	GATGGCCACC	AGTGGACCCT	GTTCTTCCAG	AATGGCAAGG	TGAAGGTGTT	CCAGGGCAAC
4801	CAGGACAGCT	TCACCCCTGT	GGTGAACAGC	CTGGACCCCC	CCCTGCTGAC	CAGATACCTG
4861	AGGATTACAC	CCCAGAGCTG	GGTGCACCAG	ATTGCCCTGA	GGATGGAGGT	GCTGGGCTGT
4921	GAGGCCCAGG	ACCTGTACTG	AGGATCCAAT	AAAATATCTT	TATTTTCATT	ACATCTGTGT
4981	GTTGGTTTTT	TGTGTGTTTT	CCTGTAACGA	TCGGGCTCGA	GCGCAGGAAC	CCCTAGTGA
5041	GGAGTTGGCC	ACTCCCTCTC	TGCGCGCTCG	CTCGCTCACT	GAGGCCGCCC	GGGCTTTGCC
5101	CGGGCGGCCT	CAGTGAGCGA	GCGAGCGCGC	AG	(配列表 2)	

10

20

【0039】

上記配列において、左側（5'）ITR（AAV2 ITR）は、ヌクレオチド1～130に及び、右側（3'）ITR（AAV2 ITR）は、ヌクレオチド5025～5132に及び。両ITRをボックスで示す。

30

【0040】

IV. 組換えAAV製剤の使用

本発明の医薬組成物は、使用のためのバイアル（例えば、予め処理されたガラスバイアルまたはCOPバイアル）および説明書を含む製品（例えば、キット）によって供給される。ある実施態様において、各バイアルは、0.5～50mL（例えば、1～10mL）中にAAVの1mLあたり約 1×10^{11} ～ 1×10^{15} vgを含む。ある実施態様において、各バイアルは、 5×10^{12} ～ 1×10^{14} vg/mL（例えば、 1×10^{13} vg/mL）を含む。ある実施態様において、各バイアルは、6mL中に 6×10^{13} vgを含む。

【0041】

前記組成物は、患者に1回またはそれ以上投与されてもよい。例えば、前記組成物は、1ヶ月、3ヶ月、6ヶ月、9ヶ月、または1年未満の間隔で患者に投与されてもよい。ある実施態様において、前記組成物は、2年、5年、7年、10年、または15年未満の間隔で患者に投与されてもよい。前記医薬組成物は、治療される疾患に適切な経路によりそれを必要とする患者に提供されてもよい。例えば、前記組成物は、静脈内注射、動脈内注射、脳内注射、腹腔内注射、門脈注射、または筋肉内注射により投与されてもよい。例えば、SB-525医薬組成物は、 1×10^{11} ～ 1×10^{15} vg/kg、例えば、 1×10^{11} ～ 1×10^{14} （例えば、 1×10^{12} ～ 1×10^{14} ）vg/kgで血友病A患者に静脈内に提供されてもよい。ある実施態様において、SB-525医薬組成物は、 5×10^{11} 、 6×10^{11} 、 7×10^{11} 、 8×10^{11} 、 9×10^{11} 、 1×10^{12} 、 2×10^{12} 、 3×10^{12}

40

50

2、4 E + 1 2、5 E + 1 2、6 E + 1 2、7 E + 1 2、8 E + 1 2、9 E + 1 2、1 E + 1 3、2 E + 1 3、3 E + 1 3、4 E + 1 3、5 E + 1 3、6 E + 1 3、7 E + 1 3、8 E + 1 3、9 E + 1 3、または1 E + 1 4 v g / k gで血友病A患者に静脈内に提供されてもよい。ある実施態様において、SB-525組成物は、約6 E + 1 3 v g / k gの用量で血友病A患者に静脈内に提供される。

【0042】

ある実施態様において、患者は、重度または中等度の血友病Aに罹っている。さらなるある実施態様において、患者は、阻害因子（第V I I I因子に対する同種抗体）を有していない。ある実施態様において、患者は、AAV6に対する中和抗体を有していない。患者は、成人もしくは青年患者（ ≥ 12 歳）または小児患者（ < 12 歳）であってもよい。

10

【0043】

本明細書で他で定義されない限り、本開示に関して用いられる科学および技術用語は、当業者によって一般的に理解される意味を有するべきである。例示の方法および材料が下記で記載されるが、本明細書に記載の方法および材料と同様または同等のものもまた本開示の実施または試験で用いることができる。矛盾する場合、定義を含む本明細書が優先される。一般に、本明細書に記載される心臓病学、医学、医薬品化学および製薬化学、ならびに細胞生物学に関して用いられる命名法および技術は、当該技術分野で周知であり、一般に用いられるものである。酵素反応および精製技術は、製造業者の説明書に従って、当該技術分野で一般的に実施されるように、または本明細書に記載されるように行われる。さらに、他に文脈上必要とされない限り、単数形用語は、複数形を含むべきであり、複数形用語は単数形を含むべきである。本明細書および実施態様を通して、単語「有する（have）」および「含む（comprise）」、あるいは「（has）」、「（having）」、「（comprises）」または「（comprising）」などの変化形は、記載される整数または整数群を含むことを意味するが、他の整数または整数群を排除するものではないことが認められる。本明細書で記載の全ての刊行物および他の参考資料は、参照によりそれらの全体が取り込まれる。Although 多くの文献が本明細書で引用されるが、この引用は、これらの文献のいずれもが当該技術分野における技術常識の一部を形成することを認めるわけではない。本明細書で用いられるように、1つまたはそれ以上の目的の値に適用される用語「およそ」または「約」は、記載される参照値に類似する値を意味する。ある実施態様において、前記用語は、特に示されていないか、または文脈から明らかでない限り、記載される参照値のいずれかの方向（異常または以下）における10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%、1%、またはそれ以下に入る値の範囲を意味する。

20

30

【0044】

本発明がより理解され得るために、下記の実施例が説明されている。これらの実施例は、単に例示を目的とするものであって、いずれの方法においても本発明の範囲を限定するものと解釈されるべきではない。

【実施例】

【0045】

下記の実施例は、本発明者らが、現在のSB-525製剤が、生物学的製品の半減期および長期安定性を評価するための一般的な試験である凍結／解凍サイクリングにより沈殿物を形成することを知見した研究を記載する。本発明者らはまた、沈殿物が緩衝液製剤のみ（すなわち、活性のウイルスベクター成分を含まない緩衝液製剤）で形成されたことを知見した。よって、本発明者らは、この課題を解決する新規製剤を見出した。

40

【0046】

本研究において、SB-525ウイルス調製物は、リン酸緩衝生理食塩水（PBS）中に約1.0 E + 1 3 v g / m Lにて、CaCl₂、MgCl₂、35 mM NaCl、1% ショ糖、および0.05% Kolliphor（登録商標）P188（ポロキサマー188）を加え、5 mLで6 mLのAseptic Technologies クリスタル クローズドバイアルに密封して調製し、製剤化し、 $\leq -65^{\circ}\text{C}$ で保存した。安定性試験では、SB-525組成物を -0°C 、 5°C 、および 25°C で24ヶ月間安定性にかけた（表

50

5)。非制御の凍結／解凍（F／T）の5サイクル（表1）および24時間攪拌（AG）（表2）も行った。製剤（DP）品質特性を表5～表8に従って分析した。

【0047】

実施例1：凍結／解凍サイクリングおよび攪拌試験

材料と方法

SB-525は、下記成分：0.90mM CaCl₂、0.49mM MgCl₂、2.68mM KCl、1.47mM KH₂PO₄、172mM NaCl、8.10mM Na₂HPO₄、1%（w／v）ショ糖、0.05%（w／v）ポロキサマー188（pH7.36）を含む製剤化緩衝液中で1.0E+13vg／mL（公称上）にて供した。23個のバイアルを-70℃、11個を5℃、および8個を25℃で保存した。

【0048】

凍結／解凍（F／T）サイクリング試験では、試料を、表1で示されるように、3サイクルまたは5サイクルの非制御のF／Tで周期させた。

表1．DP非制御F／T周期

【表5】

F/T サイクリング*	1日目	2日目		3日目		4日目		5日目	
	4 pm	8 am	4 pm	8 am	4 pm	8 am	4 pm	8 am	4 pm
3	-80℃	25℃	-80℃	25℃	-80℃	25℃			
5	-80℃	25℃	-80℃	25℃	-80℃	25℃	-80℃	25℃	-80℃

【0049】

攪拌試験では、試料を表2で示されるように室温で攪拌した。

表2．DP攪拌設定

【表6】

攪拌安定性	T ₀	T _{24Hr}
	1日目（8 am）	2日目（8 am）
300 rpm	安定性T ₀ を使用	24Hr後の物質の影響

【0050】

-70℃、5℃、25℃それぞれで保存したバイアルを、（i）外観（液体）、pH、動的光散乱法（DLS）、および高精度液中パーティクルカウンター（HIA）；（ii）vg同一性（qPCR）、vg力価（qPCR）、カプシド力価（ELISA）、カプシド同一性（ELISA）、および感染力価（TCID₅₀）；（iii）インビトロFVII活性（生物アッセイ）；または（iv）UV260／280、還元CE-SDS、SEC力価_{260／280}について分析した。

【0051】

F／T周期にかけた試料を、（i）外観（液体）、pH、モル浸透圧濃度、DLS、HIA；（ii）vg力価（qPCR）、カプシド力価および同一性（ELISA）、還元SDS-PAGE、および感染力価（TCID₅₀）；または（iii）UV260／280、SEC力価_{260／280}、RP-HPLC、インビトロFVII活性（生物アッセイ）、および還元CE-SDSについて分析した。

【0052】

24時間攪拌（AG）にかけた試料を、（i）外観（液体）、pH、モル浸透圧濃度、DLS、およびHIA；（ii）vg力価（qPCR）、カプシド力価および同一性（ELISA）、還元SDS-PAGE、感染力価（TCID₅₀）；または（iii）UV260／280、SEC力価_{260／280}、RP-HPLC、インビトロFVII活性（生物アッセイ）、および還元CE-SDSについて分析した。

【0053】

結果

SB-525のDP安定性、非制御F／Tの5サイクル、および24時間攪拌群からの

結果を以下に記載する。
【 0 0 5 4 】

下記表 3 で示されるように、試料を 1 ヶ月間まで試験条件で保存した場合、色、透明度、pH、流体力学半径（DLS によって測定）、vg 力価、カプシド力価、カプシド純度（SDS-PAGE によって測定）、感染力価、UV260/280（空：全カプシド比率の代替測定）、および生物学的活性（相対%効力）においてあまり変化がなかった。5℃および25℃で目視可能な粒子に変化があった。全ての試料を凍結し、Tゼロ（T0）で白く不透明に見えた。

表 3 . 安定性結果
【表 7】

試験		保存	T ₀ *	T _{1M} ²	
外観、液体	色	-70℃	無色、清澄、沈殿なし、混入物質なし	B6	
		5℃		B6	
		25℃		B6	
	透明度	-70℃		<= 参照 I	
		5℃		<= 参照 I	
		25℃		<= 参照 I	
	目視可能な粒子	-70℃		EFVP	
		5℃		1-5個の粒子	
		25℃		TMTC	
pH		-70℃	7.3	7.3	
		5℃		7.3	
		25℃		7.1	
DLS	Z-平均 - 拡散係数 (cm ² /s)	-70℃	-	1.70e ⁻⁷	
		5℃		1.70e ⁻⁷	
		25℃		1.70e ⁻⁷	
	Z-平均 - 半径 (nm)	-70℃	22.3 (直径)	14.7	
		5℃		14.8	
		25℃		14.4	
	ピーク 1 - 拡散係数 (cm ² /s)	-70℃	-	1.74e ⁻⁷	
		5℃		1.69e ⁻⁷	
		25℃		1.70e ⁻⁷	
	ピーク 1 - 半径 (nm)	-70℃		14.2	
		5℃		14.6	
		25℃		14.5	
	ピーク 2 - 拡散係数 (cm ² /s)	-70℃		9.42e ⁻¹⁰	
		5℃		1.26e ⁻⁹	
		25℃		-	
	ピーク 2 - 半径 (nm)	-70℃		2658.7	
		5℃		2261.8	
		25℃		-	
	Vg力価 (qPCRによる) (vg/mL) ¹		-70℃	8.74E+12	9.77E+12
			5℃		1.01E+13
			25℃		9.98E+12
カプシド ELISA (カプシド ² s/mL)		-70℃	2.76E+13	2.52E+13	
		5℃		2.53E+13	
		25℃		2.66E+13	
SDS-PAGE		-70℃	参照と比較したVP1、VP2、およびVP3。コントロールで測定された感度≥の他のバンドはなし (VP1、VP2、VP3を合わせた純度%) = 100%	参照と比較したVP1、VP2、およびVP3。コントロールで測定された感度≥の他のバンドはなし (VP1、VP2、VP3を合わせた純度%) = 100%	
		5℃			
		25℃			

10

20

30

40

50

【表 8】

感染力価 TCID ₅₀ (TCID ₅₀ /mL)	-70℃	1.12E+9	3.56E+9
	5℃		2.00E+9
	25℃		1.12E+9
SEC UV260/280比	-70℃	1.37	1.36
	5℃		1.36
	25℃		1.36
インビトロFVIII活性/機能生物アッセイ (相対%効力)	-70℃	85 ³	80
	5℃		80
	25℃		69

10

* T₀ : 機能生物アッセイを除くすべての分析を、リリース試験ごとに行った
¹ ベクターゲノム同定および滴定のT₀再試験 (qPCRによる) を行った
² 試験開始のDPにおける粒子検出によるT_{1M}後に試験を終了した ;
³ 異なる参照物質に対する生物学的アッセイ (相対%効力) についてのT₀再試験
EFVP : 目視可能な粒子を基本的に含まない
TMT C : 数え切れないほど多い
N. T. : 試験せず

【0055】

表4で示されるように、全ての保存条件で1ヶ月後にカプシド純度にあまり変化がなかった。

20

表4．カプシド純度の安定性結果

【表 9】

時点	保存	カプシド [*] (%)	VP1 (%)	VP2 (%)	VP3 (%)	その他 (%)
T ₀		94.3	2.2	3.4	94.4	5.7
T _{1M}	-70℃	95.1	1.1	3.1	95.8	4.9
	5℃	95.0	2.1	3.2	94.7	5.0
	25℃	94.8	1.9	3.0	95.1	5.2

【0056】

表5で示されるように、全ての保存条件で1ヶ月後の高分子種 (HMWS) の凝集または形成はあまりなかった (NMT : 未満 ; LOQ : 定量の限界) 。

30

表5．1ヶ月後のSEC力価安定性結果

目的、加速、およびストレス保存条件

【表 10】

時点	保存	ウイルス粒子 (vp) 力価 (vp/mL)	モノマー (%)	HMWS (%)	LOQ
T ₀		5.12E+13	100	NMT 1.0	1.01E+12
T _{1M}	-70℃	2.65E+13	100	NMT 1.0	1.01E+12
	5℃	2.57E+13	100	NMT 1.0	1.01E+12
	25℃	3.31E+13	100	NMT 1.0	1.01E+12

40

【0057】

表6で示されるように、全ての保存条件で1か月後に (HIACによる) 肉眼で見えない粒子はあまり増加していなかった。全ての時点において、 $\geq 10 \mu\text{m}$ および $\geq 25 \mu\text{m}$ の範囲に関して (許容基準は、1容器あたり $> 10 \mu\text{m}$ で6,000粒子未満および1容器あたり $> 25 \mu\text{m}$ で600粒子である)、USP<787>標準以下の粒子を示した。

表6．HIAC安定性の結果

50

【表 1 1】

保存	T ₀ (粒子/容器)		T _{1M} (粒子/mL)				
	≥ 10 μm	≥ 25 μm	≥ 2 μm	≥ 5 μm	≥ 8 μm	≥ 10 μm	≥ 25 μm
-70℃	10	3	143	11	1	0	0
5℃			626	96	24	15	0
25℃			478	94	15	4	1

【 0 0 5 8 】

表 7 で示されるように、F / T / A G ストレスにより色、透明度、p H、流体力学半径（D L S により測定）、v g 力価、カプシド力価、感染力価、U V 2 6 0 / 2 8 0（空：全カプシド比率の代替測定）、カプシド純度（R P - H P L C により測定）、および生物学的活性（相対%効力）においてあまり変化がなかった。F / T において目視可能な粒子に変化があった。

表 7 . サイクル非制御 F / T および 2 4 時間 A G の結果

10

20

30

40

50

【表 1 2】

試験		処理	結果
外観	色	F/T	B9 ¹
		AG	B9
	透明度	F/T	<= 参照_1 ²
		AG	<= 参照_1
	目視可能な粒子	F/T	TMTC
		AG	目視可能な粒子を基本的に含まない (EFVP)
pH		F/T	7.2
		AG	7.3
オスモル濃度 (mOsm/kg)		F/T	387
		AG	388
DLS	Z-平均 - 拡散係数 (cm ² /s)	F/T	1.70e ⁻⁷
		AG	1.67e ⁻⁷
	Z-平均 -半径 (nm)	F/T	14.5
		AG	14.7
	t [*] -カット 1 - 拡散係数 (cm ² /s)	F/T	1.69e ⁻⁷
		AG	1.56e ⁻⁷
	t [*] -カット 1 - 半径 (nm)	F/T	14.5
		AG	15.7
V _g 力価 (qPCRによる) (vg/mL)		F/T	8.44E+12
		AG	8.63E+12
カブシト [®] ELISA (カブシト [®] /mL)		F/T	2.08E+13
		AG	2.00E+13
SDS-PAGE		F/T	参照と比較したVP1、VP2、およびVP3。コントロールで測定された感度≥の他のバンドはなし (VP1、VP2、VP3を合わせた純度%) = 100%
		AG	
感染力価 TCID ₅₀ (TCID ₅₀ /mL)		F/T	9.29E+8
		AG	2.42E+9
UV260/280比		F/T	1.32
		AG	1.32
SEC UV 260/260比		F/T	1.35
		AG	1.35
RP-HPLC	カブシト [®] (%)	F/T	98.9
		AG	99.0
	その他 (%)	F/T	1.1
		AG	1.0
インビトロFVIII活性/機能生物アッセイ (相対%効力)		F/T	85
		AG	80

¹ 色は、記載の参照標準より強くなく、乳白色でもない。

² 透明度は、記載の参照標準より乳白ではない。

【0059】

表 8 で示されるように、F / T / AG ストレスによる還元 CE - SDS においてあまり変化がなかった。

表 8 . 5 サイクル非制御 F / T および 24 時間 AG の CE - SDS 還元の結果

【表 1 3】

処理	カブシト [®] (%)	VP1 (%)	VP2 (%)	VP3 (%)	その他 (%)
F / T	95.1	2.0	3.0	95.0	4.9
AG	95.2	2.0	3.2	94.8	4.8

【0060】

表9で示されるように、F／T／AGストレスにより攪拌／HMWS製剤にあまり変化がなかった。

表9．5サイクル非制御F／Tおよび24時間AGのSEC力価の結果

【表14】

処理	ウイルス粒子力価 (vp/mL)	モノマー (%)	HMWS (%)	LOQ
F/T	4.95E+13	100	0	1.01E+12
AG	5.05E+13	100	0	1.01E+12

10

【0061】

表10で示されるように、F／Tにより（HIACによる）目視不可能な粒子が顕著に増加した。F／Tによる粒子は、 $\geq 10\mu\text{m}$ および $\geq 25\mu\text{m}$ の範囲に関して、 $\text{USP}<787>$ 標準以上であったが；AGによる粒子は、 $\geq 10\mu\text{m}$ および $\geq 25\mu\text{m}$ の範囲に関して、 $\text{USP}<787>$ 標準以下であった。

表10．5サイクル非制御F／Tおよび24時間AGのHIAC結果

【表15】

処理	$\geq 2\mu\text{m}$ (粒子/mL)	$\geq 5\mu\text{m}$ (粒子/mL)	$\geq 8\mu\text{m}$ (粒子/mL)	$\geq 10\mu\text{m}$ (粒子/mL)	$\geq 25\mu\text{m}$ (粒子/mL)
F/T	24551	14051	8725	6576	710
AG	439	41	12	4	0

20

【0062】

上記結果により、SB-525試料は、 -70°C 、 5°C 、または 25°C で1ヶ月まで保存した場合、色、透明度、pH、流体力学半径（動的光散乱法により測定）、vg力価、カプシド力価、感染力価、空：全カプシド比（UV260／280により測定）、生物学的活性（相対%効力）、カプシド純度（SDS-PAGE、還元CE-SDSおよびRP-HPLCにより測定）、またはウイルス粒子力価においてあまり変化を示さなかったことが示される。また、F／TもしくはAGストレスのいずれにより色、透明度、pH、流体力学半径（動的光散乱法により測定）、vg力価、カプシド力価、感染力価、空：全カプシド比（UV260／280により測定）、生物学的活性（相対%効力）、カプシド純度（SDS-PAGE、還元CE-SDS、RP-HPLCにより測定）、またはウイルス粒子力価においてあまり変化がなかった。しかしながら、F／Tにより（HIACによる）目視不可能な粒子において顕著に増加し、 5°C および 25°C の保存1ヶ月後に目視可能な粒子が増加した。前記試験は、これらの結果により1ヶ月で終了した。

30

【0063】

実施例2：F／T後のDPバイアルにおける粒子状物質の特徴付け

SB-525製剤の上記安定性試験からの試料（粒子状物質が観察された）を単離および同定のためにさらに分析した。

【0064】

5凍結／解凍サイクルを経た製剤試料（「5F／T後のDP」）および 25°C で1ヶ月間保存させた試料（ 25°C で1M後のDP）を分析した。粒子状物質を $0.8\mu\text{m}$ の金フィルター上で単離した。次いで、これを、前記フィルター上でKeyence VHX6000デジタル顕微鏡を150xの倍率で用いて部分リング照明下で画像化した。続いて、該フィルターをフーリエ変換赤外（FTIR）顕微鏡に移し、スペクトルを前記物質について得た。FTIRスペクトルを、公知のスペクトルに関するKnowItAllデータベースと比較した。 25°C で1M後のDP試料の一部もまた、該フィルターからガラススライドに削ぎ落とし、Nikon Eclipse ME600偏光顕微鏡を用いて直線偏光および直交ポラー下で画像化した。前記金フィルターの一部を切り取り、EDSモジュールを搭載したJEOL6000SEMで分析した。前記試料もまた、ラマン顕微鏡解析

40

50

により分析した。

【0065】

全ての試料について、デジタルイメージングにより、半結晶物に見える白色の固形物が示された。直交ポラードにおいて、「5F/T後のDP」試料では、複屈折が示されず、このことは、アモルファス物質または等方晶のいずれかであることが示す。SEM/EDS分析により、大部分が酸素、リンおよびカルシウムであることが示された。FTIR分析により、前記物質が塩として同定されたが、さらなる同定が必要であった。ラマン顕微鏡により、リン酸カルシウムのピーク特性を検出できたが、このことは、全ての試料における白色粒子状物質がリン酸カルシウムであることを示す。図1A-Fは、粒子特徴付け試験の概要である。

10

【0066】

実施例3：SB-525の再製剤化

この実施例は、上記で見られた沈殿物の問題を回避できる新規SB-525製剤を試験する実験を記載する。これらの実験により、(1)カルシウムを除去し、(2)カルシウムおよびマグネシウムを除去し、または(3)ショ糖を8.5%まで増加させて再製剤化した場合のSB-525DPの短期安定性を評価した。これらの変更により、粒子の発生を、(1)粒子の供給源を除去することにより、(2)MgCl₂の溶解性の懸念により二価陽イオンの両方を除去することにより、または(3)凍結/解凍ストレスに対する製剤の安定性を増加させることにより、それぞれ防ぐことが記載される。2つのパイロットバッチは、表面積対体積(SA/V)充填について最悪の場合の条件を追跡するために、6mLのATバイアルに2.5mLで緩衝液交換し、充填させた。充填/最終化後、バイアルを5非制御凍結/解凍サイクル(周囲に対して $\leq -65^{\circ}\text{C}$)にかけ、続いて、 $\leq -65^{\circ}\text{C}$ (意図した保存)、 $2-8^{\circ}\text{C}$ (ストレス;液体保存)、 25°C (加速;液体保存)、および 40°C (攻撃的/強制的分解条件;液体保存)で安定性にかけた。これらの条件は、製剤間の差異が明確となることを予測して選択した。

20

【0067】

SB-525ウイルスを、清澄化したバルクハーベストから精製し、リン酸緩衝生理食塩水(PBS)(CaCl₂、MgCl₂、35mM NaCl、1%ショ糖、および0.05% Kolliphor(登録商標)P188(ポロキサマー188)を含む)中に約 1.0×10^{13} vg/mLで製剤化し、バイアルに充填し、 $\leq -65^{\circ}\text{C}$ で保存した。

30

【0068】

材料および方法

SB-525製剤化バルク原薬には、0.90mM CaCl₂、0.49mM MgCl₂、2.68mM KCl、1.47mM KH₂PO₄、172mM NaCl、8.10mM Na₂HPO₄、1%(w/v)ショ糖、0.05%(w/v)ポロキサマー188中でSB-525(1.0×10^{13} vg/mL(公称上))が含まれ(pH7.0~7.6)、滅菌濾過し、125mLのHDPEボトル中において $\leq -65^{\circ}\text{C}$ で保存した。Na₂HPO₄(リン酸ナトリウム、二塩基、無水)、KH₂PO₄(リン酸二水素カリウム)、CaCl₂(塩化カルシウム二水和物)、およびMgCl₂(塩化マグネシウム六水和物)の供給元は、JT BakerまたはFischerであった。ポロキサマー188の供給元は、BASFであった。保存バイアルは、一次包装施栓、シクロオレフィンコポリマー(COC)の所定位置熱可塑性エラストマー栓および黄色の蓋を備えたバイアルである6mLのAseptic Technologies(AT)クローズドクリスタルバイアル(Aseptic Technologies; cat#VIA-060000)であった。DP充填前に、製剤化されたバルク原薬(FBDS)を125mLの高密度ポリエチレン(HDPE)ボトルに充填し、 $\leq -65^{\circ}\text{C}$ で凍結した。次いで、ボトル周囲温度で融解し、緩衝液交換し、濾過し、6mLのATバイアルにAseptic Technologies M1ユニットを用いてDP充填した。1つのパイロットバッチ物質を、合計10交換体積において、50kDaのフィルターユニットを用いて約40psiの圧力でTFFにより緩衝液交換した。次のパイロットバッチを、合計10交換体

40

50

積において、50 kDaのNMW PESフィルター上でアミコン攪拌式セルを用いて約40 psiで緩衝液交換した。これらの2つの交換方法は、これまで、AAVについてあまり物質を喪失し、または吸収することなく用いられてきた。

【0069】

前記ATバイアルを、約1.0E+13 vg/mLの目標で2.5 mL充填し、 $\leq -65^{\circ}\text{C}$ から周囲条件に非制御の速度で凍結／解凍を5回繰り返し、次いで非GMP保存ユニット中で安定性にかけた。バイアルを表11に概略される安定性実施（pull）スケジュールにかけ、表12に記載の方法によって試験した。試験した製剤を表13に概略する。

表11．カプシド純度安定性スケジュール

【表16】

保存温度（℃）	T ₀	T _{3D}	T _{1W}	T _{2W}	T _{3W}	T _{4W}	T _{5W}
-70（± 10）	XABCD	—	—	—	—	XABC	XA
5（± 3）		X	X	XA	X		XA
25（± 3）		X	X	XAB	X		—
40（± 3）		XABCF	XA	X	XF	—	—

表12．分析試験

【表17】

試験コード	試験方法
X	外観（液体）
A	pH
A	SEC－凝集、UV260/280、ウイルス粒子力価
B	機能FVIII生物学的アッセイ
C	光遮断法（HIACによる）
D	オスモル濃度（凝固点降下）
D	P188
D	シヨ糖
D	還元キャピラリーゲル電気泳動（rCGE）（比と純度）
F	質量分析（脱アミド化）
B	ベクターゲノム力価（qPCR）

表13．製剤

【表18】

交換方法	物質	製剤	コントロールとの相違点
ミリポア アミコン攪拌 式セル	M05	コントロール	N/A
	M06	Caを含まない	CaCl ₂ を除去
	M07	Ca/Mgを含まない	CaCl ₂ とMgCl ₂ を除去
	M08	8.5% シヨ糖	シヨ糖を8.5%（w/v）に増加

*コントロール製剤（F0）：0.90 mM CaCl₂、0.49 mM MgCl₂、2.68 mM KCl、1.47 mM KH₂PO₄、172 mM NaCl、8.10 mM Na₂HPO₄、1%（w/v）シヨ糖、0.05%（w/v）ポロキサマー188（P188）（pH 7.0～7.6）

【0070】

結果

製剤の特徴付け

正しい製剤が達成されたことを確認するために、SB-525DP製剤を、オスモル濃

度、P188濃度、ショ糖濃度、およびカプシド比および純度（還元CGEによる）について調べるために試験した。M05－M08についてのこれらの試験結果を下記表14に示す。カプシド純度および比は、rCGEによって測定されるように、あまり相違は示されなかった。オスモル濃度は、ショ糖レベルに応じて予測される範囲内である。M05－M08試料は、P188の正しい濃度を示した。さらに、カルシウムおよびマグネシウムの濃度は、CEDEXにより全ての製剤について予測される範囲内であることが確認された。

表14．製剤の特徴付け

【表19】

物質	オスモル濃度 (mOsm/kg)	ショ糖 (%)	P188 (μg/mL)	純度(カプシド%)	AAV比		
					%VP1	%VP2	%VP3
M05－コントロール	399	1.10	589	95.2	2.0	3.3	94.7
M06－Caを含まない	391	1.00	565	95.3	2.1	3.0	94.9
M07－Ca/Mgを含まない	417	1.00	575	95.8	1.7	2.9	95.4
M08－8.5%ショ糖	655	8.50	568	95.2	1.8	2.6	95.6

【0071】

ベクターゲノム力価（vg/mL）

M05－M08のベクターゲノム力価の結果を下記の表15で示す。≤－65℃および2～8℃条件では、4週間の保存後にあまり変化は見られなかった。40℃で3日間の後、Ca/Mgを含まない製剤は、ベクターゲノム力価が減少傾向であることが示された。この結果は、実験上のばらつきの範囲内と考えられるが、この製剤のvp力価およびUV260／280の結果と一致する。

表15．ゲノム力価（vg/mL）

30

40

50

【表 2 0】

製剤	時点					
	T ₀	T _{3D}	T _{1W}	T _{2W}	T _{3W}	T _{4W}
-70℃						
M05 - コントロール	7.44E+1 2	試験せず ^a				7.77E+12
M06 - Caを含まない	7.98E+1 2					7.47E+12
M07 - Ca/Mgを含まない	6.33E+1 2					6.24E+12
M08 - 8.5% ショ糖	6.23E+1 2					6.56E+12
5℃						
M05 - コントロール	7.44E+1 2	試験せず ^a				7.39E+12
M06 - Caを含まない	7.98E+1 2					6.95E+12
M07 - Ca/Mgを含まない	6.33E+1 2					6.56E+12
M08 - 8.5% ショ糖	6.23E+1 2					6.24E+12
25℃						
M05 - コントロール	7.44E+1 2	試験せず ^a		7.23E+12	試験せず ^a	7.84E+12
M06 - Caを含まない	7.98E+1 2			7.41E+12		7.09E+12
M07 - Ca/Mgを含まない	6.33E+1 2			6.04E+12		5.85E+12
M08 - 8.5% ショ糖	6.23E+1 2			6.11E+12		7.01E+12
40℃						
M05 - コントロール	7.44E+1 2	7.16E+1 2	試験せず ^a			
M06 - Caを含まない	7.98E+1 2	6.94E+1 2				
M07 - Ca/Mgを含まない	6.33E+1 2	4.63E+1 2				
M08 - 8.5% ショ糖	6.23E+1 2	6.68E+1 2				

【 0 0 7 2 】

目視外観

全ての製剤は、それぞれ色度および透明度標準であるB 9色およびオパールエッセンス参照1と同等もしくはそれ以下を示し、全ての時点および条件について白黒背景に対する外観検査に使用した（例えば、Ph. Eur. 7.0, 20201, 20202 (01/2008) ; M i l l i p o r e S i g m a色度参照溶液Bを参照のこと）。目視外観の結果により、「コントロール」製剤（M05）のみが、25℃で1週間以上の間、または40℃で3日間またはそれ以上置いた場合に数えきれないほど多い（TMT C）白色薄片状粒子を示したことが示される。M06およびM07製剤は、TMT C目視可能な粒子をわずかに示したが；これらの試料の粒子状態全てが繊維状粒子であった。これらの粒子は本試験では同定しなかったが、繊維状粒子は、リン酸カルシウムの特徴である薄片状粒子に対して、外因性

粒子（例えば、フィルター粒子）の特徴が強い。また、繊維状／外因性粒子の外観は、D Pが厳密に管理された環境条件下で生成されない研究室での開発試験では無視できる。

【0073】

累積目視不可能な粒子

H I A Cによる目視不可能な累積粒子分析により、目視不可能な粒子数が顕著な製剤は「コントロール」製剤のみでことが示され、これにより、攻撃的な安定性条件（より高い温度でより長期間）で増加する傾向にあることが示された。他の製剤（M 0 6－M 0 8）では、時間または条件に関わらずわずかな粒子数のみが示された。

【0074】

機能的生物アッセイ（効力）

機能的F V I I I生物アッセイ結果を下記表16に示す。結果は、試料が $\leq -65^{\circ}\text{C}$ または $2-8^{\circ}\text{C}$ のいずれかの条件で維持した場合に効力にあまり変化がないことが示された。25 $^{\circ}\text{C}$ では、4週間後の全ての製剤（M 0 5－M 0 8）で効力が減少する傾向にあった。40 $^{\circ}\text{C}$ では、3日後のC a／M gを含まない製剤で効力が顕著に減少した。

表16．機能的生物アッセイ（相対効力）

【表21】

製剤	物質	時点					
		T ₀	T _{3D}	T _{1W}	T _{2W}	T _{3W}	T _{4W}
-70℃							
M05 - コントロール	M05	75	試験せず				81
M06 - Caを含まない	M06	90					81
M07 - Ca/Mgを含まない	M07	67					68
M08 - 8.5% ショ糖	M08	74					74
5℃							
M05 - コントロール	M05	75	試験せず				73
M06 - Caを含まない	M06	90					87
M07 - Ca/Mgを含まない	M07	67					71
M08 - 8.5% ショ糖	M08	74					76
25℃							
M05 - コントロール	M05	75	試験せず		53	試験せず	37
M06 - Caを含まない	M06	90			66		63
M07 - Ca/Mgを含まない	M07	67			39		41
M08 - 8.5% ショ糖	M08	74			55		45
40℃							
M05 - コントロール	M05	75	51	試験せず			
M06 - Caを含まない	M06	90	60				
M07 - Ca/Mgを含まない	M07	67	22				
M08 - 8.5% ショ糖	M08	74	56				

【0075】

S E C

S E C結果を下記に示す。凝集割合の結果を下記表17に示す。 $\leq -65^{\circ}\text{C}$ 、 $2-8^{\circ}\text{C}$ 、または25 $^{\circ}\text{C}$ の安定性条件で凝集にあまり傾向は見られなかった。40 $^{\circ}\text{C}$ では、C a／M gを含まない製剤について、1ヶ月後に7%未満のH M W Sと凝集が増加傾向にあった。「カルシウムを含まない」製剤では、40 $^{\circ}\text{C}$ で1ヶ月後に約3%のH M W Sが示された。他の製剤では、 $\leq -65^{\circ}\text{C}$ または $2-8^{\circ}\text{C}$ で5週間、25 $^{\circ}\text{C}$ で4週間、および40 $^{\circ}\text{C}$ で

1週間まで置いた場合に凝集にあまり増加は示されなかった。

表 17. SEC による凝集の濃度 (% HMWS)

【表 22】

製剤	物質	時点						
		T ₀	T _{3D}	T _{1W}	T _{2W}	T _{3W}	T _{4W}	T _{5W}
-70℃								
M05 - コントロール	M05	NMT 1.0	NT				NMT 1.0	NMT 1.0
M06 - Caを含まない	M06	NMT 1.0					NMT 1.0	NMT 1.0
M07 - Ca/Mgを含まない	M07	NMT 1.0					NMT 1.0	NMT 1.0
M08 - 8.5% ショ糖	M08	NMT 1.0					NMT 1.0	NMT 1.0
5℃								
M05 - コントロール	M05	NMT 1.0	NT		NMT 1.0	NT	NMT 1.0	NMT 1.0
M06 - Caを含まない	M06	NMT 1.0			NMT 1.0		NMT 1.0	
M07 - Ca/Mgを含まない	M07	NMT 1.0			NMT 1.0		NMT 1.0	
M08 - 8.5% ショ糖	M08	NMT 1.0			NMT 1.0		NMT 1.0	
25℃								
M05 - コントロール	M05	NMT 1.0	NT		NMT 1.0	NT	NMT 1.0	NT
M06 - Caを含まない	M06	NMT 1.0			NMT 1.0		NMT 1.0	
M07 - Ca/Mgを含まない	M07	NMT 1.0			NMT 1.0		2.6	
M08 - 8.5% ショ糖	M08	NMT 1.0			NMT 1.0		NMT 1.0	
40℃								
M05 - コントロール	M05	NMT 1.0	NMT 1.0	NMT 1.0	NT			
M06 - Caを含まない	M06	NMT 1.0	3.1	2.6				
M07 - Ca/Mgを含まない	M07	NMT 1.0	5.3	7.0				
M08 - 8.5% ショ糖	M08	NMT 1.0	1.9	NMT 1.0				

*NMT: 未満。

NT: 試験せず。

【0076】

ウイルス粒子の結果を下記表 18 に示す。≤ -65℃、2~8℃、または 25℃ の条件で維持した全ての製剤でウイルス粒子力価にあまり変化が示されなかった。しかしながら、40℃ では、3日および1週間後に Ca/Mg を含まない製剤の粒子力価に顕著な減少があった。他の製剤 (M05-M06、M08) では、≤ -65℃ または 2-8℃ で5週間、25℃ で4週間、および40℃ で1週間まで維持した場合にウイルス粒子力価にあまり減少は示されなかった。

10

20

30

40

50

表 18 . S E C によるウイルス粒子力価 (v p / m L)
【表 2 3】

製剤	物質	時点						
		T ₀	T _{3D}	T _{1W}	T _{2W}	T _{3W}	T _{4W}	T _{5W}
-70℃								
M05 – コントロール	M05	2.46E+13	NT				2.43E+13	2.54E+13
M06 – Caを含まない	M06	2.44E+13					2.41E+13	2.61E+13
M07 – Ca/Mgを含まない	M07	2.02E+13					2.01E+13	2.11E+13
M08 – 8.5% ショ糖	M08	2.13E+13					2.16E+13	2.27E+13
5℃								
M05 – コントロール	M05	2.46E+13	NT		2.55E+13	NT	2.45E+13	2.51E+13
M06 – Caを含まない	M06	2.44E+13			2.54E+13		2.41E+13	2.62E+13
M07 – Ca/Mgを含まない	M07	2.02E+13			2.11E+13		1.99E+13	2.14E+13
M08 – 8.5% ショ糖	M08	2.13E+13			2.25E+13		2.16E+13	2.34E+13
25℃								
M05 – コントロール	M05	2.46E+13	NT		2.49E+13	NT	2.35E+13	NT
M06 – Caを含まない	M06	2.44E+13			2.53E+13		2.39E+13	
M07 – Ca/Mgを含まない	M07	2.02E+13			2.01E+13		1.90E+13	
M08 – 8.5% ショ糖	M08	2.13E+13			2.23E+13		2.11E+13	
40℃								
M05 – コントロール	M05	2.46E+13	2.23E+13	2.14E+13	NT			
M06 – Caを含まない	M06	2.44E+13	2.16E+13	2.09E+13				
M07 – Ca/Mgを含まない	M07	2.02E+13	1.62E+13	1.59E+13				
M08 – 8.5% ショ糖	M08	2.13E+13	2.09E+13	2.06E+13				

【0077】

UV260 / 280 比の結果を下記表 19 に示す。UV260 / 280 比について、40℃で維持した場合にCa / Mg を含まない製剤について減少傾向にあった。UV260 / 280 は、空 / 全粒子比の代替測定と考えられている。他の製剤 (M05、M06、およびM08) では、示されるように、いずれの条件または時点でもUV260 / 280 比に全く変化が示されなかった。

表 19 . S E C によるUV260 / 280 比

10

20

30

40

【表 2 4】

製剤	物質	時点						
		T ₀	T _{3D}	T _{1W}	T _{2W}	T _{3W}	T _{4W}	T _{5W}
-70℃								
M05 - コントロール	M05	1.33	NT				1.33	1.33
M06 - Caを含まない	M06	1.32					1.32	1.33
M07 - Ca/Mgを含まない	M07	1.32					1.32	1.33
M08 - 8.5% ショ糖	M08	1.32					1.32	1.33
5℃								
M05 - コントロール	M05	1.33	NT	1.33	NT	1.32	1.38	
M06 - Caを含まない	M06	1.32		1.33		1.33		
M07 - Ca/Mgを含まない	M07	1.32		1.33		1.32		
M08 - 8.5% ショ糖	M08	1.32		1.33		1.32		
25℃								
M05 - コントロール	M05	1.33	NT	1.34	NT	1.33	NT	
M06 - Caを含まない	M06	1.32		1.32		1.33		
M07 - Ca/Mgを含まない	M07	1.32		1.33		1.33		
M08 - 8.5% ショ糖	M08	1.32		1.32		1.32		
40℃								
M05 - コントロール	M05	1.33	1.33	1.33	NT			
M06 - Caを含まない	M06	1.32	1.32	1.32				
M07 - Ca/Mgを含まない	M07	1.32	1.28	1.25				
M08 - 8.5% ショ糖	M08	1.32	1.33	1.33				

【0078】

pH

下記表 2 0 に示されるように、全ての製剤についていずれかの条件および時点において pH に変化はあまりなかった。

表 2 0 . pH

【表 2 5】

製剤	物質	時点						
		T ₀	T _{3D}	T _{1W}	T _{2W}	T _{3W}	T _{4W}	T _{5W}
-70℃								
M05 - コントロール	M05	7.3	NT				7.2	7.3
M06 - Caを含まない	M06	7.3					7.3	7.3
M07 - Ca/Mgを含まない	M07	7.3					7.3	7.4
M08 - 8.5% ショ糖	M08	7.2					7.3	7.3
5℃								
M05 - コントロール	M05	7.3	NT	7.3	NT	7.2	7.3	
M06 - Caを含まない	M06	7.3		7.3		7.3	7.3	
M07 - Ca/Mgを含まない	M07	7.3		7.2		7.3	7.3	
M08 - 8.5% ショ糖	M08	7.2		7.2		7.2	7.2	
25℃								
M05 - コントロール	M05	7.3	NT	7.3	NT	7.2	NT	
M06 - Caを含まない	M06	7.3		7.3		7.3		
M07 - Ca/Mgを含まない	M07	7.3		7.3		7.2		
M08 - 8.5% ショ糖	M08	7.2		7.2		7.2		
40℃								
M05 - コントロール	M05	7.3	7.1	7.1	NT			
M06 - Caを含まない	M06	7.3	7.3	7.3				
M07 - Ca/Mgを含まない	M07	7.3	7.3	7.3				
M08 - 8.5% ショ糖	M08	7.2	7.1	7.2				

【0079】

質量分析による特徴付け（脱アミド化）

質量分析により決定される脱アミド化の結果を表 2 1 に示す。低温で保存した試料は 5 週間の試験期間で製剤間にあまり差異を示すことが予測されないことから、40℃で保存した試料のみをとして本試験で用いた。

【0080】

結果は、全ての製剤の T₀としてコントロール製剤の T₀を用いて示した。全ての脱アミド化部位について、AAVVP1におけるN57GおよびN94Hのホットスポットは、40℃で3週間にて脱アミド化の最も顕著に増加を示した2つである。他の部位でも脱アミド化の増加が示されたが、非常に少ない程度であった（示さず）。これらの2つのホットスポットは、導入効率に影響を与えることが予測されるため、特に重要である。Ca/Mgを含まない製剤により、脱アミド化に最も顕著な増加が示された。他の製剤（M05、M06、およびM08）全てにおいても、40℃で3日および3週間後に同様のレベルの脱アミド化の増加が示された。

表 2 1 . 質量分析法による脱アミド化（40℃における%）

10

20

30

40

50

【表 2 6】

製剤	物質	時点					
		N57G (VP1)			N94H (VP1)		
		T ₀ *	T _{3D}	T _{3W}	T ₀ *	T _{3D}	T _{3W}
M05 - コントロール	M05	7.8	14.4	41.1	5.1	6.7	30.4
M06 - Caを含まない	M06	7.8	18.6	43.5	5.1	6.4	33.9
M07 - Ca/Mgを含まない	M07	7.8	23.1	57.4	5.1	8.6	54.6
M08 - 8.5% ショ糖	M08	7.8	16.0	38.7	5.1	6.0	23.7

* T₀をM05物質で試験し、全ての製剤のT₀として用いた。

10

【0081】

結論

現在のSB-525製剤における3つの可能な変更を施した製剤を評価した：カルシウムを含まない製剤、カルシウムもマグネシウムも含まない製剤、およびショ糖を高濃度で含む製剤。実施例1および2は、特に、凍結／解凍サイクリング、続いて25℃で1週間以上または40℃で3日間またはそれ以上のいずれかで安定性にかけて後に、緩衝液と製剤の両方で見られる非常に多くの白色薄片状粒子のランダムな発生を示す。前記粒子をリン酸カルシウムと同定した。

【0082】

本明細書の結果により、塩化カルシウムは、意図した保存条件またはストレス保存条件で製剤安定性のために必須ではない賦形剤であることが示される。また、「カルシウムを含まない」および「高ショ糖」製剤について40℃で2週間まで、25℃で4週間、ならびに5℃および-70℃で5週間までの間であまり相違が見られなかった。しかしながら、製剤からのカルシウムおよびマグネシウムの両方の除去は、特に40℃で維持した場合、vgおよびvp力価のより大きな減少ならびにより高い脱アミド化および凝集を示すことを含む、製剤品質特性に変化を生じさせることが観察された。さらに、5週間を通して、従来の（コントロール）製剤のみが白色薄片状粒子を示し続けたことがわかった。

20

【0083】

実施例4：SB-525のさらなる再製剤化

粒子の発生を防止するために、この実施例では、製剤に対して3タイプの変化を試験した：（1）FTストレスに対する安定性を増加させるために、ショ糖濃度を1%から5〜10%に増加させること、（2）粒子の供給源を除去し、可能性のある溶解性問題を防止するために、二価陽イオンを除去すること、および（3）製剤のイオン強度を変化させるために、NaClを増加させること。

30

【0084】

より具体的には、この実施例の実験では、従来の（コントロール）製剤と比較して数種類の変化のうちの1つに対して再製剤化した場合のSB-525緩衝液の安定性を評価した；すなわち、172mM NaCl、8.10mM Na₂HPO₄、2.68mM KCl、1.47mM KH₂PO₄、0.90mM CaCl₂、0.49mM MgCl₂、1%（w/v）ショ糖、および0.05%（w/v）ポロキサマー188、pH7.0〜7.6。製剤を6mLのATバイアル内に5mLで充填し、5非制御F/Tサイクル（周囲に対して±65℃）にかけ、続いて2-8℃（加速；液体保存）および25℃（ストレス；液体保存）で熱安定性にかけて、粒子形成に対する様々な緩衝液を評価した。

40

【0085】

試験設計

試験した製剤を、表22に示されるように、塩化およびリン酸化ナトリウムおよびカリウムを水に加え、続いてショ糖を加えることにより製剤化した。必要に応じて、塩化マグネシウム、続いて塩化カルシウムを別の50mL溶液中で調製し、より多い溶液に移す。次いで、ポロキサマー188を該溶液に加えた。次に、該製剤を適量にし、pHを試験し

50

、 0 . 2 2 μ m の P E S フィルターに通して濾過した。

表 2 2 . 製剤

【表 2 7】

物質	製剤	コントロールとの相違点
0139-M03	200 mM NaCl	NaClを200 mMまで増加
0139-M04	5% ショ糖	ショ糖を5%まで増加
0139-M05	8.5% ショ糖	ショ糖を8.5%まで増加
0139-M06	10% ショ糖	ショ糖を10%まで増加
0139-M07	CaCl ₂ なし	CaCl ₂ を除去
0139-M08	MgCl ₂ もCaCl ₂ もなし	CaCl ₂ とMgCl ₂ を除去
0139-M09	コントロール	N/A

10

【 0 0 8 6 】

これらの製剤によりA T バイアルを 5 m L で充填し、5 非制御凍結／解凍サイクルにかけ、5℃または25℃のいずれかで安定性にかけた。安定性実施スケジュールを表 2 3 で概略する。前記表において、X は、外観（液体）を示し；A は、オスモル濃度（凝固点降下）、導電率、粘度、および密度を示し；B は、H I A C による光遮蔽法を示し；C は、P 1 8 8 濃度を示し；ならびに D は、p H を示す。

表 2 3 . 安定性スケジュール 0 1 3 9 – M 0 3 ～ – M 0 8

【表 2 8】

Temp (°C)	T ₀	FT1	FT2	FT3	FT4	FT5*	T _{5D}	T _{8D}	T _{2W}	T _{3W}	T _{4W}	T _{6W}	T _{8W}
5 (± 3)	XABD	X	X	XBD	X	XBD	X	X	XC	XB	XB	XB	XB
25 (± 3)							XBC		X				

* F T 5 試料は、熱安定性試料の T₀ であった。

20

【 0 0 8 7 】

製剤特性

S B – 5 2 5 緩衝液製剤を、導電率、オスモル濃度、密度、および粘度を決定するために試験した。P 1 8 8 濃度もまた、5℃保存の2.5週間、および25℃の5日間で測定した。これらの試験の結果を下記表 2 4 に示す。M 0 3 – M 0 9 についての導電率、オスモル濃度、密度、および粘度の結果は全て予想どおりでありーショ糖のより多い量は、より高いオスモル濃度、密度、および粘度を生じ；より多いN a C l は、より高いオスモル濃度および導電率を生じた。P 1 8 8 濃度の結果は、結果の各セットについての方法のばらつきの範囲内であり、正しいP 1 8 8 濃度が製剤化中に達成されたことを確認した。

表 2 4 . 製剤の特徴付け

30

40

50

【表 2 9】

製剤	導電率 (ms/cm)	オスモル濃度 (mOsm/kg)	密度 ¹ (g/mL)	粘度 ² (Cp)	P188 (μg/mL)	
					T _{2.5W} 5℃	T _{5D} 25℃
M03 – 200 mM NaCl	20.20	433	1.011915	1.165	590	484
M04 – 5% ショ糖	16.12	515	1.026105	1.285	630	467
M05 – 8.5% ショ糖	15.37	647	1.039606	1.382	635	486
M06 – 10% ショ糖	15.12	704	1.045258	1.429	633	457
M07 – Caを含まない	17.91	380	1.010685	1.112	663	488
M08 – Ca/Mgを含まない	17.88	379	1.010806	1.123	672	471
M09 – コントロール	17.86	384	1.010854	1.105	668	475

¹ 密度測定中の温度を 20.0℃として記録した。
² 粘度測定中の温度を 20.0℃として記録し、せん断速度を 2000 s⁻¹として記録した。

【0088】

pH
下記表 2 5 で示されるように、FT サイクリング中にいずれの製剤についても pH にあまり変化は見られなかった。

表 2 5 . pH 結果

【表 3 0】

製剤	FT サイクル		
	T ₀	FT3	FT5
M03 – 200 mM NaCl	7.2	7.3	7.2
M04 – 5% ショ糖	7.2	7.2	7.2
M05 – 8.5% ショ糖	7.2	7.2	7.2
M06 – 10% ショ糖	7.1	7.2	7.2
M07 – Caを含まない	7.3	7.3	7.3
M08 – CaとMgを含まない	7.3	7.3	7.3
M09 – コントロール	7.2	7.3	7.2

【0089】

目視外観
全ての試料は、試験した各条件および時点において B 9 色およびオパールエッセンス参照 1 と同等もしくはそれ以下を示した。目視外観の結果により、コントロール製剤 (M 0 9) のみで 5℃および 25℃の 5 日間から 8 週間までで数えきれないほど多い (T M T C) 白色薄片状粒子が常に示された。5%のショ糖製剤は、T M T C 目視可能な粒子のランダムな発生を示した。多くの試料もまた、1～5 個の繊維状粒子を示した。これらの粒子は本試験では同定しなかったが、繊維状粒子は、リン酸カルシウムの特徴である薄片状粒子に対して、外因性粒子 (例えば、フィルター粒子) の特徴が強い。また、繊維状／外因性粒子の外観は、D P が厳密に管理された環境条件下で生成されない研究室での開発試験では無視できる。

【0090】

目視不可能な粒子数

H I A Cによる目視不可能な粒子分析により、顕著で一定の目視不可能な粒子数を示す製剤は、コントロール製剤（M 0 9）のみであることが示され、このことは、より高い安定性条件（2 5℃）で保存を続けることにより悪化した。他の製剤（M 0 3－M 0 8）では、時間または条件に関わらず粒子数はあまり示されず、全体的な傾向が示されなかった。

【0 0 9 1】

結論

この実施例は、従来の（コントロール）S B－5 2 5製剤とのいくつかの製剤の差異における凍結／解凍ストレスおよび熱安定性の効果を評価した。7つの異なる製剤をA Tクリスタルクローズドバイアルに充填し、凍結／解凍サイクルにかけ、5℃および2 5℃で8週間保存した。全ての試験条件を通して、コントロール製剤のみが常に白色薄片状粒子を示し続けた。

【0 0 9 2】

F Tサイクル後、いずれの製剤も目視可能な粒子形成もp H変化もあまり示さず、それゆえ、全ての製剤を8週間にわたる5℃および2 5℃における短期間安定性にかけた。安定性にかけたことにより、一定して目視可能な粒子を顕著に発生することが示されたのは、コントロール製剤（M 0 9）のみであった。前記粒子の結果が同等であったため（すなわち、目視可能な粒子があまり発生しないため）、「2 0 0 m M N a C l」（M 0 3）、「5 % ショ糖」（M 0 4）、および「1 0 % ショ糖」（M 0 6）製剤を続く再製剤化試験において選択しなかった。特に、「5 % ショ糖」製剤（M 0 4）では、白色薄片状粒子のいくつかの形成が示され、このことは、このショ糖濃度がF Tストレスによる粒子の発生を防止するために十分ではない可能性を示し、および「1 0 % ショ糖」（M 0 6）がその高い粘度による製造課題を導入してしまうことを示す。よって、これらの結果に基づくと、「8 . 5 % ショ糖」（M 0 5）、「カルシウムを含まない」（M 0 7）、および「カルシウムおよびマグネシウムを含まない」（M 0 8）製剤は、有望でありうる。

【0 0 9 3】

実施例5：S B－5 2 5の最終製剤

S B－5 2 5（P F－0 7 0 5 5 4 8 0）原薬（D S）の組成および説明を表2 6に示す。前記製剤は、7 . 3 ± 0 . 3の最終p Hであった。賦形剤濃度は、塩基緩衝液（リン酸緩衝生理食塩水）を加えることにより全体として、または部分的に得た。D S濃度の目標は、D S目標の5 0－2 5 0 %のD S範囲で1 . 0 E + 1 3 v g / m L（0 . 5 E + 1 3 ~ 2 . 5 E + 1 3 v g / m L）であった。

表2 6 . S B－5 2 5原薬製剤の説明

【表3 1】

原材料	化学式	FW	濃度（mM）	濃度（g/L）
SB-525	N/A	N/A	1.0E+13 vg/mL	1.0E+13 vg/mL
塩化マグネシウム六水和物	MgCl ₂ ● 6H ₂ O	203.30	0.49	0.10
塩化カリウム	KCl	74.5513	2.68	0.20
リン酸二水素カリウム	KH ₂ PO ₄	136.086	1.47	0.20
ショ糖	C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁	342.2965	1%（w/v）	10.00
塩化ナトリウム	NaCl	58.44	172	10.05
ホモキサマー-188（P188）	(C ₃ H ₆ O ● C ₂ H ₄ O) _x	8350	0.05%（w/v）	0.50
リン酸二ナトリウム無水物	Na ₂ HPO ₄	141.96	8.10	1.15
WFI	H ₂ O	18.015	q. s. ~ 1 mL	q. s. ~ 1 mL

【0 0 9 4】

S B－5 2 5（P F－0 7 0 5 5 4 8 0）製剤の組成および説明を表2 7に示す。前記D Pは、7 . 3 ± 0 . 3の最終p Hであった。賦形剤濃度は、塩基緩衝液（リン酸緩衝生

理食塩水)を加えることにより全体として、または部分的に得た。D P濃度の目標は、D P目標の30-300%のD P範囲で1.0E+13vg/mL(0.3E+13~3.0E+13vg/mL)であった。

表 27. SB-525 原薬製剤の説明
【表 32】

成分名	機能	濃度 (mM)	単位式 (mg/mL)	単位式 (mg/バイアル)
SB-525	活性成分	1.0E+13 vg/mL	1.0E+13 vg/mL	6.0E+13 vg/vial
リン酸二ナトリウム無水物	緩衝液成分	8.10	1.15	6.75
リン酸二水素カリウム		1.47	0.20	1.20
塩化ナトリウム	安定剤	172	10.05	60.30
塩化カリウム		2.68	0.20	1.20
塩化マグネシウム 六水和物		0.49	0.10	0.60
ショ糖	凍結保護物質	1% (w/v)	10.00	60.00
Kolliphor (ホ®キシマー) P 188	界面活性剤	0.05% (w/v)	0.50	3.00
WFI	溶媒	q. s. ~1 mL	q. s. ~1 mL	q. s. ~ (公称上の)充填体積

【0095】

容器および充填体積

濾過した原薬を無菌高密度ポリエチレン (HDPE) ボトル中に包装した。該DPを、所定位置に熱可塑性エラストマー共栓が付いたAT10mLのシクロオレフィンコポリマー (COC) バイアル (Aseptic Technologies VIA-101800) に充填した。DSおよびDPを-60℃~-90℃で保存した。各バイアルには、6.4E+13 (公称上、6.0E+13) vgのSB-525AAVとともに、6.4mLのDP (目的の抽出可能な体積6mL) が含まれた。

【0096】

DPの特徴付け

SB-525DPの粘度、オスモル濃度、密度、および導電率を測定した。密度は1.0106g/mL(20℃)であった。粘度は1.112cP(20℃)であった。オスモル濃度は374mOsm/kgであった。導電率は17.80mS/cm(20℃)であった。

【0097】

実施例 6: AAV6 ウイルスベクター原薬製剤

下記実施例6~8は、様々な濃度の二価陽イオン塩を含むAAV2/6 ウイルスベクター製剤を評価するために行ったさらなる再製剤化および加速安定性試験を記載する。前記実施例と同様に、ウイルスベクターは、AAV6 カプシドおよび組換えゲノム (AAV2 ITRを含む) を有する。ここでのウイルスベクターは、アルファールイズロニダーゼ (IDUA) をコードする導入遺伝子を保有する。この導入遺伝子は、IDUAが欠失している患者、例えば、ハーラー症候群 (リソソーム蓄積症) としても公知のムコ多糖症I型 (MPS-I) の患者の助けとなる。AAVゲノムは、US2020/0246486の表5における配列番号28として示される。ウイルスゲノムは、AAVカプシド内に位置し、前記製剤に曝露されないため、実施例6~8での観察は、これまでの実施例のように、他の導入遺伝子を保有するAAV6ベクターに適用できると予測される。

【0098】

この試験はまた、凍結/解凍サイクル後に沈殿を形成しない新たな製剤を特定するため

に行った。様々な濃度の二価陽イオン塩を含む4つのAAV6ウイルスベクター原薬製剤の安定性を評価した。

【0099】

試験した製剤には、様々な濃度の二価陽イオン塩（ Ca^{2+} および Mg^{2+} ）を含有させた。上記に記載されるように、従来のAAV6製剤ならびに製剤緩衝液（AAV6を含まない）は全て、複数回の凍結／解凍サイクル後に少量の目視可能な沈殿物の形成が見られた。沈殿した粒子は、リン酸カルシウム塩から構成されることを決定した。製剤が一般的な使用中に凍結／解凍サイクルを経るため、塩沈殿の可能性は、患者の安全性に対するリスクおよび製剤品質に対するリスクとなりうる。下記実施例6－8に示される試験は、このような沈殿の問題を有さない改善された製剤を見つけ出すことが目的であった。

10

【0100】

この試験において、AAV6ウイルスベクター製剤の試料は、タンジェンシャルフロー濾過により異なる原薬製剤として調製し、試料を高濃度「スパイク緩衝液」でスパイクした。次いで、再製剤化した試料を様々な加速させた安定性条件下でインキュベートし、試料の品質特性をインキュベート後に測定した。品質特性の結果を適切に公知の方法変動性を考慮しつつ評価した。当該試験期間の異常値と傾向の結果を4つの製剤各々について特定した。合格（Pass）、中間（Neutral）、または失敗（Fail）のスコアを、各試験エンドポイントでの結果に基づいて各品質特性および製剤について割り当てた。最終的に、各4つの製剤の全体の品質特性安定性スコアを相互に比較した。試験を下記で詳細に記載する。

20

【0101】

試料調製

本明細書で調製したAAV6製剤には、下記表1に記載されるように、製剤化緩衝液F0中に懸濁させた約 $1.0 \times 10^{13} \text{ v g / mL}$ のAAV6ドナーベクターを含ませた。緩衝液F0は、二価陽イオンのカルシウム（ CaCl_2 として）およびマグネシウム（ MgCl_2 として）、さらなる量の約35mMの塩化ナトリウムを含むダルベッコリン酸緩衝生理食塩水の方法に基づき、1%w/v ショ糖および0.05%w/v ポロキサマー188に製剤化させた。

【0102】

前記AAV6物質を別の緩衝液製剤に移すために、図2に示されるように、タンジェンシャルフロー濾過による緩衝液交換を行った。簡単に説明すると、緩衝液F0中に製剤化したAAV6製剤の数個のバイアルを融解し、単一の限外濾過／透析濾過（UF／DF）リザーバーに移した。まず限外濾過を行って該物質を約2xに濃縮した。次いで、濃縮した物質を、少なくとも10x同等体積の製剤緩衝液F1で透析濾過した。図2で「A」とラベルされた回収した中間体物質を、製剤緩衝液F1中で懸濁して約 $2.0 \times 10^{13} \text{ v g コピー / mL}$ が含まれるはずである。

30

【0103】

次に、前記中間体UF／DF生成物「A」を3つに分割し、3つの異なる緩衝液に製剤化した。3つのさらなる製剤緩衝液（F1、F2、およびF3；表28）は、塩化ナトリウム、ショ糖、およびポリキサマー188（例えば、Pluronic（登録商標）F68）をさらに加えたダルベッコリン酸緩衝生理食塩水から調製した。これらの3つの緩衝液には、カルシウムが含まれず、代わりに異なる量のマグネシウムを含ませた。緩衝液F1には、カルシウム成分もマグネシウム成分も含ませず、緩衝液F2には、F0と等価モル濃度のマグネシウムを含ませ、および緩衝液F3には、緩衝液F0から除いたカルシウムのモルの割合を占めるさらなる量のマグネシウムを含ませた。

40

表28．製剤緩衝液の組成

50

【表 3 3】

成分(単位)	F0	F1	F2 (6x濃度)	F2 (1x濃度)	F3 (6x濃度)	F3 (1x濃度)
NaCl (mM)	171.8	171.8	171.8	171.8	171.8	171.8
KCl (mM)	2.7	2.7	2.7	2.7	2.7	2.7
Na ₂ HPO ₄ (mM)	8.1	8.1	8.1	8.1	8.1	8.1
KH ₂ PO ₄ (mM)	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5
CaCl ₂ (mM)	0.9	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
MgCl ₂ (mM)	0.5	0.0	3.0	0.5	8.4	1.4
ショ糖 (% w/v)	1.00%	1.00%	1.00%	1.00%	1.00%	1.00%
ポロキサマー188 (% w/v)	0.05%	0.05%	0.05%	0.05%	0.05%	0.05%
目的pH	7.1-7.5					

10

【0104】

試料調製を簡便にし、異なる緩衝液の調製を可能にするために、緩衝液 F 2 および F 3 の 6 倍高い濃度の「スパイク緩衝液」を調製した。図 3 で示されるように、これらの F 2 および F 3 「6 x 濃度」緩衝液は、F 1 と 1 : 5 の比率で混合して緩衝液 F 2 および F 3 のそれぞれの目的の組成物を生成した。

【0105】

これらの製剤緩衝液を調製するために、各乾燥成分の重量を、マイクロバランスを用いて量りとした。前記成分を混合し、注射用脱イオン水に溶解させた。続いて、これらの緩衝液を、必要であれば、0.1 M NaOH または 0.1 M HCl で目的の pH 範囲に滴定した。最終的に、これらの緩衝液をショ糖およびポロキサマー 188 と所望される濃度で製剤化した。

20

【0106】

調製した原薬製剤の組成を、確認のためにいくつかの半定量的測定で測定し、それらの結果を表 29 に記載する。市販の比色分析アッセイを用いて Ca^{2+} (Bio Vision Cat # K380-250) および Mg^{2+} (Bio Vision Cat # K385-100) の濃度を測定した。両方の比色分析アッセイにおいて、前記試料濃度は、測定のダイナミック線形範囲内であり、調べたシグナルと算出された濃度は、理論上の試料組成と傾向が一致していた。決定的なことに、製剤 F 1、F 2、および F 3 全てのカルシウムシグナルがアッセイネガティブコントロールと一致した。よって、これらの試料には、カルシウムが含まれておらず、TFF 試料の調製工程は F 0 出発物質中に存在するカルシウムを除去するのに効果的であった。マグネシウム測定により、also confirmed Mg^{2+} も TFF により除去され、F 2 および F 3 中で適切な濃度で添加されたことも確認された。

30

表 29. 製剤化した原薬の実験上測定したパラメータ

【表 3 4】

成分 (単位)	F0	F1	F2 (1x濃度)	F3 (1x濃度)
CaCl ₂ (mM, 比色アッセイ)	1.02	0.07	0.09	0.1
MgCl ₂ (mM, 比色アッセイ)	0.29	-0.04	0.38	0.9
Vg 力価 (vg/ml, qPCR)	1.54E+13	1.77E+13	1.91E+13	1.87E+13
粒子濃度 (p/mL, MADLS)	7.79E+12	6.38E+12	7.30E+12	8.23E+12

40

*MADLS: 多角度動的散乱法

【0107】

qPCR もまた、vg 力価を測定するために行い、多角度動的散乱法 (MADLS) を、粒子濃度を測定するために行った。再度、これらの結果は、試料の調製から予測され

50

る範囲であり、緩衝液交換と製剤化工程が意図されたとおりに行われたことを示す。

【0108】

バルク製剤化した生成物を濾過し、0.5 mL / バイアルで2 mLの環化オレフィンポリマー（COP）バイアル（West Pharma / Daikyo CZ Cat # 19550057）に充填した。

【0109】

試料インキュベーション

バイアルに入れた製剤を下記に記載の様々な条件でインキュベートした。凍結／解凍サイクリングは、表30に記載の実施日に行った。

表30．凍結／解凍サイクリング試料の実施日

【表35】

条件	開始日	3xサイクル	5xサイクル	10xサイクル
凍結/解凍サイクリング ^o -80℃/周囲	D0	D2	D4	D11

【0110】

試料を「加速下、ストレス」条件（40℃／75％相対湿度（RH））または「加速下、周囲」条件（25℃／60％RH）にそれらの実施日のD3、D7、2週間、1ヶ月、2ヶ月、3ヶ月、または6ヶ月にかけた。試料を2～8℃で保存し、それらの実施時の24時間以内に分析した。

【0111】

全ての実施済み試料を、目的の試料を試験するために、ポリカルボネートフリップトップ遠心分離チューブに一定分量で分注した。一定分量を。2ヶ月未満で積極的に試験する間は2～8℃で保存した。実施日から合理的な時間内に試験しない場合、該一定分量を試験が行われ得るまで≤-65℃で保存した。全ての保存試料および試験後の残りの材料を長期間保存のために≤-65℃で保存した。

【0112】

実施例7：AAV6原薬製剤の試験

試料は、表31に記載の品質特性を含む試験を行った。略語を下記に示す：DLS、動的光散乱法；MADLS、多角度動的光散乱法；HMWS、高分子量種；SE-LC、サイズ排除液体クロマトグラフィー；およびAEX-LC、陰イオン交換液体クロマトグラフィー。溶液の外観を、それらが清澄であり、無色であり、および粒子状物を含まないことを確認するために評価した。濁り、曇り、または目視可能な粒子を含む溶液は、評価基準に適合しなかった。

表31．評価した製剤の品質特性

10

20

30

40

50

【表 3 6】

カテゴリー	品質特性	試験方法
総体	外観，液体	目視検査
	pH	電位差測定
純度	モノマーピーク平均サイズ [*]	DLS
	多分散度	DLS
	モノマーフラクション	DLS
	HMWSフラクション	DLS
	HMWSフラクション	SE-LC
	全カブシト [*] %	AEX-LC
強度	ベクターゲノム力価	qPCR
	感染力価	TCID ₅₀
	VG/TCID ₅₀ 比	計算
	カブシト [*] 濃度	ELISA
	モノマー濃度	SE-LC
	モノマー濃度	MADLS

10

【0113】

初回試料

全ての開始製剤化製剤試料からの品質特性の結果を表32および表33に示す。結果を、全体、純度、および強度の品質特性カテゴリーによってグループ化した。

表32．開始（t₀）試料における全体および純度の品質特性結果

【表 3 7】

製剤	F0	F1	F2	F3
外観(合格/失敗)	合格	合格	合格	合格
pH	7.3	7.3	7.2	7.2
モノマーピーク平均サイズ [*] (nm)	29.7	33.0	33.6	33.4
多分散度	0.07	0.12	0.14	0.12
% モノマー, DLS	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%
% HMWS, DLS	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%
% HMWS, SE-LC	0.2%	0.5%	0.5%	0.4%
全カブシト [*] %	89.2%	89.1%	89.3%	89.1%

30

表33．開始（t₀）試料における濃度の品質特性結果

【表 3 8】

製剤	F0	F1	F2	F3
Vg力価 (vg/mL)	7.9E+12	8.3E+12	9.4E+12	7.7E+12
感染力価 (TCID ₅₀ /mL)	9.3E+09	9.3E+09	1.1E+10	1.1E+09
VG/TCID ₅₀	1200	1100	1100	8400
カブシト [*] 力価 (カブシト [*] s/mL)	5.0E+12	5.5E+12	5.2E+12	6.7E+12
モノマー濃度、SE-LC (粒子/mL)	9.9E+12	9.5E+12	9.9E+12	9.7E+12
モノマー濃度、MADLS (粒子/mL)	7.8E+12	6.4E+12	7.3E+12	8.2E+12

40

【0114】

開始の感染力価の結果は、F3では、他の開始試料と比較して大抵低かった。これはまた、他の試料より顕著に高いvg／TCID比を示した。このことは、主に、TCID₅₀アッセイのばらつきによるものであった。他の結果のいずれもあまり影響されていないようであった。

50

【0115】

凍結／解凍サイクル試料

4つの異なる製剤の凍結／解凍サイクリングによる試験結果を図4A～Dに示す。データにより、凍結／解凍サイクリングは、4つの製剤全てにおいて、溶液pH、モノマーカブシドサイズ、試料サイズ分布、または全カブシド含量に影響を与えず、HMWSまたは可溶性凝集物の量もあまり生じなかったことが示される。しかしながら、凍結／解凍サイクリングにより、開始F0コントロール製剤において目視外観が失敗した。5x F／Tサイクル後、小さい白色薄片の沈殿物が見られ、これらは以前に観察されたリン酸カルシウム沈殿物の特徴を有していた。これらの沈殿物は、製剤F1、F2、またはF3で検出されなかった。前記データはまた、凍結／解凍サイクリングが、試験方法の変動性も考慮すると、いずれの製剤強度特性にあまり影響を与えないことも示す。

10

【0116】

25℃／60% RH（周囲）加速下の試料

4つの異なる製剤の周囲条件（25℃／60% RH）インキュベーションによる試験結果を図5A～Dに示す。前記データは、外観およびpHが25℃条件によって影響を受けなかったことを示す。試料サイズ分布は、広がっているように見え、多分散度（PDI）が増加し、モノマーピーク平均サイズは、インキュベーション時間が長くなるにつれ少し増加した。高分子量種（HMWS）もまた、インキュベーション時間とともに形成され始めた。一般に、これらのHMWSは、DLSよりSECによってより簡易に検出された。全および空カブシドの電荷分離は、25℃でインキュベーションの1～2ヶ月後に喪失されているようであり、それゆえ、全カブシド%は、AEX-ECによって測定できなかった。カブシド力価およびモノマー濃度は、25℃条件によって影響を受けず、vg力価も影響されているように見えなかった。TCID₅₀は、F0、F1、およびF2について3ヶ月および6ヶ月の時点で減少したが、同一の結果はF3で観察されなかった。

20

【0117】

40℃／75% RHストレス下の試料

4つの異なる製剤のストレス条件（40℃／75% RH）インキュベーションによる試験結果を図6A～Dに示す。前記データは、40℃／75% RH条件が、いくつかの製剤品質特性に著しく大きな影響を与えたことを示す。粒子サイズ分布は、大幅に広がり、HMWSが形成されていた。SECは、DLSよりより少量のHMWSの検出について感度が高いようであるが、大量のHMWS（可能性のある高分子量種）が存在する場合、これらの粒子は、SECによって検出されなかった可能性がある。高分子量種は、濾過されたか、または前記検出器に到達するためにLCカラムを通過しなかった可能性がある。

30

【0118】

40℃で3ヶ月後、全ての溶液は、恐らく大きい不溶性凝集物またはHMWSの形成により、濁って見え始めた。溶液pHは、影響を受けていないようであった。TCID₅₀は、40℃／75% RHにおける1ヶ月後の全ての試料で大幅に減少し、F3で見られた開始から最も少ない減少だった。

【0119】

実施例8：試験エンドポイント測定

試料内分析を各製剤について行った。各製剤内において、各品質特性についての各試験エンドポイント結果を、図7に記載されるように、許容および失敗基準に対してスコア化した。目的の安定性試験エンドポイントは以下のとおりである：1サイクルあたり≤-65℃で12時間未満および周囲温度で6時間未満の10x凍結／解凍サイクル、25℃／60% RHで3ヶ月、および40℃／75% RHで1ヶ月。各試験エンドポイントにおいて、図7に記載される品質特性は、公知の樹立された方法の変動性、ならびにこの試験で得られた全てのデータの全体的な評価に基づいて決定した。

40

【0120】

各製剤の試料間分析または相対評価を行うために、各品質特性についての各エンドポイ

50

ントスコアを製剤ごとに比較した。1つの品質特性を考慮する場合、全体の合格（Pass）、中間（Neutral）、または失敗（Fail）スコアを、4つの考慮する製剤全体の相対エンドポイントスコアを全体として比較することにより各製剤について割り当てた。例えば、全てのエンドポイント結果が、所定の製剤について合格した許容基準を示した場合、全体の合格スコアを、その製剤についてのその品質特性について割り当てた。中間および失敗エンドポイント条件の数は、その製剤についての全体の品質特性スコアを割り当てる際に考慮した。外観などの一定の品質特性について、1つの失敗エンドポイントスコアで、その製剤についての全体の失敗をスコア化するのに十分である。モノマー濃度などの他の品質特性については、40℃条件での1つの失敗エンドポイントが全ての製剤（F3を除く）に適用された；よって、この失敗エンドポイントは十分にスコア化されなかった。TCID₅₀の結果には、情報のみが含まれ、スコアは割り当てられなかった。

【0121】

これらの試料間分析スコアを図8および図9に示す。各製剤についての全ての全品質特性スコアの概要図を表34に示し、製剤F0をコントロールとして用いる。

表34．試料間の製剤評価概要

【表39】

試験（方法）	F0	F1	F2	F3
外観，液体（目視検査）	失敗	合格	合格	合格
pH（電位差測定）	合格	合格	合格	合格
サイズ分布（DLS）	中間	失敗	中間	中間
HMWSフラクション（DLS）	合格	失敗	合格	合格
HMWSフラクション（SE-LC）	中間	失敗	中間	合格
全カブシット％（AEX-LC）	合格	合格	合格	合格
Vg力価（qPCR）	合格	失敗	合格	中間
カブシット濃度（ELISA）	合格	中間	合格	合格
モノマー濃度（SE-LC）	中間	中間	中間	合格
モノマー濃度（MADLS）	中間	中間	中間	合格

【0122】

加速した安定性試験の期間中の全体の品質特性スコアは、製剤F3およびF2が、F0およびF1より優れていることを示す。製剤F3は、最も優れているようであり、8つの全体の合格品質特性スコアと2つの中間スコアであった。製剤F2もまた、十分に優れていた。F0は、外観についての全体の失敗スコアを示し、この製剤を改善するという最初の目的が確認された。F1は、最も多い凝集物を示し、検出されたHMWSが最も多いようであった。

【0123】

実施例9：長期温度試験

製剤緩衝液中に1.00E+13vg/mLで供されたSB-525（PF-07055480）製剤の安定性を長期の温度で試験した。製剤化緩衝液には、以下の成分が含有された：0.49mM MgCl₂、2.68mM KCl、1.47mM KH₂PO₄、172mM NaCl、8.10mM Na₂HPO₄、1%（w/v）ショ糖、0.05%（w/v）ポロキサマー188（pH7.4）。

【0124】

前記製剤を含むバイアルを、（i）-70℃で0日間（T₀）、（ii）-150℃で3日間（T₃日間）、および（iii）-150℃で14日間（T₁₄日間）保存した。続いて、製剤試料を（i）外観（液体）、（ii）還元CE-SDS、（iii）SEC力価__260/280、および（iv）インビトロFVII活性（生物アッセイ）について分析した。製剤緩衝液試料もまた、（i）容器完全性について分析した。

【0125】

下記表 3 5 で示されるように、試料を − 1 5 0 ° C で 1 4 日間までの保存を含む試験条件で保存した場合、色、透明度、還元 C E − S D S、S E C 力価 2 6 0 / 2 8 0（空：全カプシド比の代替測定）、または生物学的活性（相対 % 効力）にあまり変化はなかった。容器完全性について − 1 5 0 ° C で 1 4 日間の保存後に影響は見られなかった。

表 3 5 . 安定性結果
【表 4 0】

試験		T ₀	T _{3 日目}	T _{14 日目}
外観、液体	色	<=B9	<=B9	<=B9
	透明度	<=参照 I	<=参照 I	<=参照 I
	目視可能な粒子	EFVP	EFVP	EFVP
容器完全性		N. T.	N. T.	合格
カプシドタンパク質の純度 (CE) : カプシド %		95. 0	94. 5	94. 9
カプシドタンパク質の純度 (CE) : 他 %		5. 0	5. 5	5. 1
サイズ分布 (SEC) : モノマー %		98. 8	99. 0	99. 5
サイズ分布 (SEC) : 凝集物 %		1. 2	NMT 1. 0	NMT 1. 0
粒子含量 (SEC) : 260/280 比		1. 34	1. 34	1. 33
インビトロ FVIII 活性 / 機能生物アッセイ (相対 % 効力)		67%	69%	70%

EFVP : 目視可能な粒子を基本的に含まない
TMTc : 数えきれないほど多い
N. T. : 試験せず

【0126】

実施例 1 0 : 輸送想定および長期温度試験

衝撃、気圧、落下、および振動などの想定される輸送条件下での S B − 5 2 5 製剤の安定性を試験した。S B − 5 2 5 製剤を、下記成分を含む製剤化緩衝液中で 1 . 0 0 E + 1 3 v g / m L で供した : 0 . 4 9 m M M g C l 2、2 . 6 8 m M K C l、1 . 4 7 m M K H 2 P O 4、1 7 2 m M N a C l、8 . 1 0 m M N a 2 H P O 4、1 % (w / v) ショ糖、0 . 0 5 % (w / v) ポロキサマー 1 8 8 (p H 7 . 4) 。

【0127】

前記製剤を含む試験試料バイアルを、最悪の場合のグローバル輸送プロファイルを用いて、同時に適用される輸送危険（例えば、衝撃、気圧、落下、および振動）にかけた。コントロール試料バイアルは、同時に適用される輸送危険にかけなかった。刺激の一部として、試験バイアルを − 3 5 ° C で 4 0 時間、その後、− 7 0 ° C でさらに 4 0 時間保った。刺激後、コントロールおよび試験製剤バイアルを − 7 0 ° C で保存し、0 日目 (T 0)、6 ヶ月目 (T 6 ヶ月)、および 1 0 ヶ月目 (T 1 0 ヶ月) で試験した。製剤緩衝液バイアルを − 7 0 ° C で保存し、T 0 で試験した。製剤試料を、(i) 外観 (液体)、(i i) 還元 C E − S D S、(i i i) S E C 力価 2 6 0 / 2 8 0、および (i v) インビトロ F V I I 活性 (生物アッセイ) について分析した。製剤緩衝液試料を (i) 容器完全性について分析した。

【0128】

下記表 3 6 で示されるように、試料を前記試験条件で 1 0 ヶ月まで保存した場合、色、透明度、還元 C E − S D S、S E C 力価 2 6 0 / 2 8 0（空：全カプシド比の代替測定）、または生物学的活性（相対 % 効力）にあまり変化はなかった。T 0 で容器完全性に影響はなかった。

表 3 6 . 安定性の結果
【表 4 1】

試験		試料	T ₀	T 6ヶ月	T 10ヶ月
外 観 , 液 体	色	コントロール	≦B9	≦B9	≦B9
		試験	≦B9	≦B9	≦B9
	透明度	コントロール	≦参照 I	≦参照 I	≦参照 I
		試験	≦参照 I	≦参照 I	≦参照 I
	目視可能な 粒子	コントロール	EFVP	EFVP	EFVP
		試験	EFVP	EFVP	EFVP
容器完全性		コントロール	合格	N. T.	N. T.
		試験	合格	N. T.	N. T.
ゲノム力価 (qPCR)		コントロール	1.11E+13	1.02E+13	7.96E+12
		試験	9.07E+12	9.29E+12	7.81E+12
カプシド力価 (ELISA)		コントロール	1.71E+13	1.28E+13	1.30E+13
		試験	1.69E+13	1.19E+13	1.34E+13
カプシドタンパク質の純度 (CE): カプシド%		コントロール	94.0	94.3	95.0
		試験	94.5	94.6	94.7
カプシドタンパク質の純度 (CE): 他%		コントロール	6.0	5.7	5.0
		試験	5.5	5.4	5.3
サイズ分布 (SEC): モノマー%		コントロール	99.2	99.1	99.3
		試験	99.3	98.8	99.4
サイズ分布 (SEC): 凝集物%		コントロール	NMT 1.0	NMT 1.0	NMT 1.0
		試験	NMT 1.0	1.2	NMT 1.0
粒子含量 (SEC): 260/280比		コントロール	1.33	1.32	1.34
		試験	1.33	1.32	1.33
インヒトリFVIII活性/機能生 物アッセイ(相対%効力)		コントロール	72	58	62
		試験	63	58	62

【0129】

実施例 1 1 : 製剤安定性データー 2 4 ヶ月

この試験の目的は、目的の保存温度 (−7 0℃) における S B − 5 2 5 製剤の長期間 (2 4 ヶ月) 安定性を設定することであった。この試験において、S B − 5 2 5 製剤 (D P) は、S f 9 昆虫細胞から精製し、8 . 1 0 m M N a ₂ H P O ₄、1 . 4 7 m M K H ₂ P O ₄、0 . 4 9 m M M g C l ₂、2 . 6 8 m M K C l、1 7 2 m M N a C l、1 % (w / v) ショ糖、および 0 . 0 5 % (w / v) ポロキサマー P 1 8 8 (p H 7 . 3 ± 0 . 3) 中で目的の 1 . 0 0 E + 1 3 ベクター v g / m L で製剤化した。続いて、前記 D P を 6 . 4 m L で 1 0 m L の A s e p t i c T e c h n o l o g i e s (A T) クリスタルクローズバイアルに充填し、−6 0℃〜−9 0℃で保存した。

【0130】

5 サイクルの非制御 F / T および 2 4 時間攪拌を含む D P 安定性試験による結果を図 1 0 に示す。前記データにより、−7 0℃で 2 4 ヶ月、5℃で 1 2 ヶ月、および 2 5℃ / 6 0 % R H で 3 ヶ月までに、色、透明度、p H、目視不可能な累積粒子状物質、カプシド純度および V P 比 (R − C G E による)、% H M M S および U V 2 6 0 / 2 8 0 (S E C − H P L C による)、ならびにカプシド力価においてみられる明確な傾向がなかったことが示される。5℃で 1 2 ヶ月の試料では、形態上、自然および非制御の実験条件 (すなわち、オープンラボ空間) での試験において外来物であるように見える溶液中の「1 つの長い繊維状粒子」が記録された ; 他の全ての試料では、「目視可能な粒子が基本的に含まれない」ことが記録された。5 サイクルの非制御 F / T または 2 4 時間攪拌後にこれらの品質特性に変化がないことが観察された。

【 0 1 3 1 】

試験した全ての時点および条件について、ゲノム力価および感染したウイルス力価ならびに感染比についての結果の変動性は、予測した測定変動性の範囲内であり、明らかな傾向は示されなかった。感度と正確な安定性を示す方法であるインビトロ相対効力の結果は、24ヶ月後に目的の保存条件（−70℃）で効力がわずかに減少傾向を示したが、これらの結果は、臨床的な安定性許容基準の範囲内である。25℃／60％RHで3ヶ月および5℃で12ヶ月の効力において安定性を示す減少傾向もまた見られた。

【 0 1 3 2 】

また、容器完全性（CCIT）を、有効化したヘッドスペースアナライザーにより目的の保存条件（−70℃）で18ヶ月目に試験し、結果を記録した。6つの条件付きバイアルをこの解析に用いた。P188濃度もまた、−70℃で18ヶ月、5℃で12ヶ月、および25℃／60％RHで3ヶ月までで安定であった。−70℃で24ヶ月においてP188濃度のわずかな減少が見られた。

【図面】

【図1A】

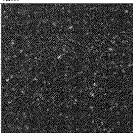
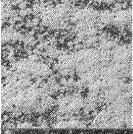
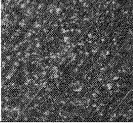
分析	試料	結果	説明
デジタル 画像	F0		白色粒子状物質が観察できる
デジタル 画像	F0 5x F/T		大量の白色粒子状物質が観察できる
デジタル 画像	25℃で1ヶ月後のF0		大量の白色粒子状物質が観察できる

図 1A

【図1B】

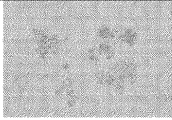
顕光顕微鏡	25℃で1ヶ月後のF0		
			交叉偏光下で後屈折が見られなかったことから、物質は、等方性またはアモルファスであることが示される。
			

図 1 B

10

20

30

40

50

【図 1 C】

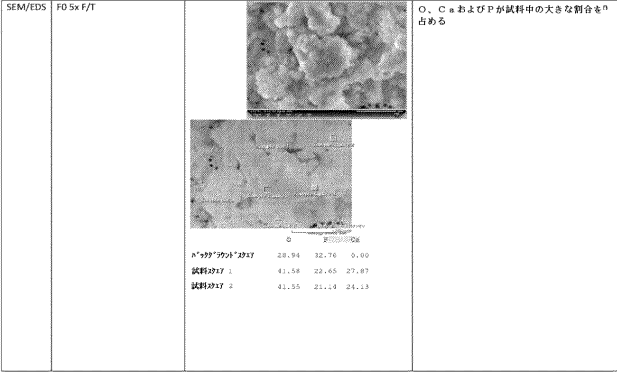


図 1 C

【図 1 D】

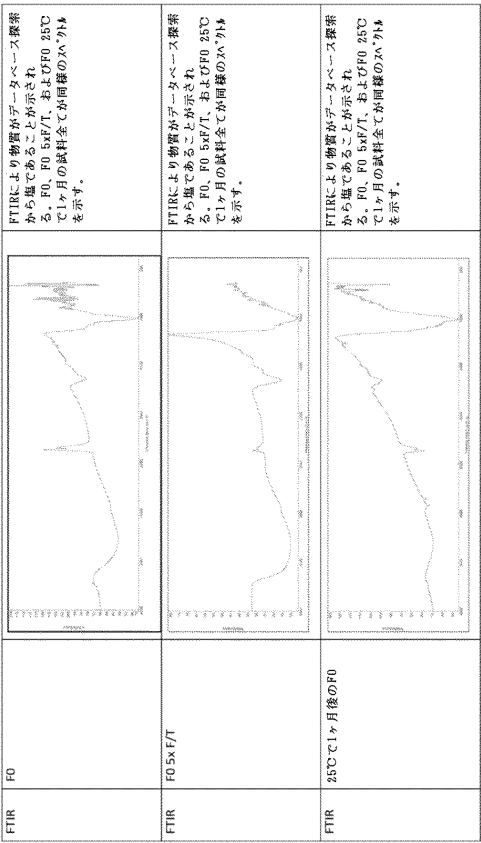


図 1 D

【図 1 E】

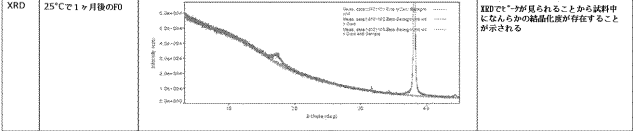


図 1 E

【図 1 F】

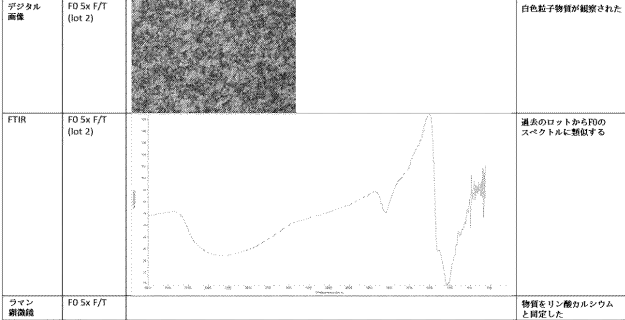


図 1 F

【図 2】

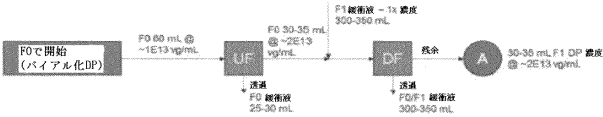


図 2

【図 3】

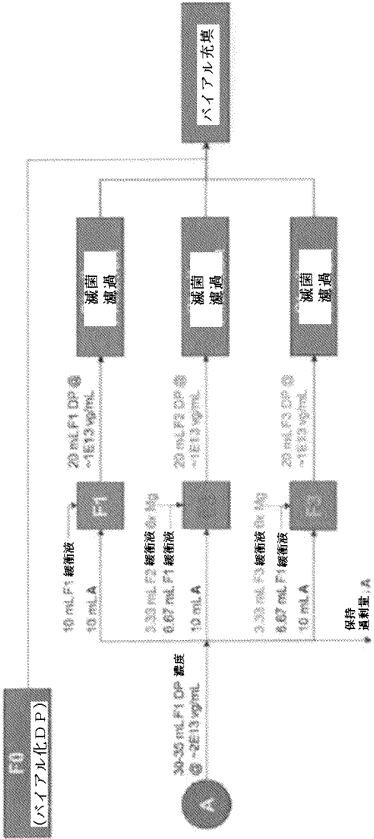


図 3

【図 4 A】

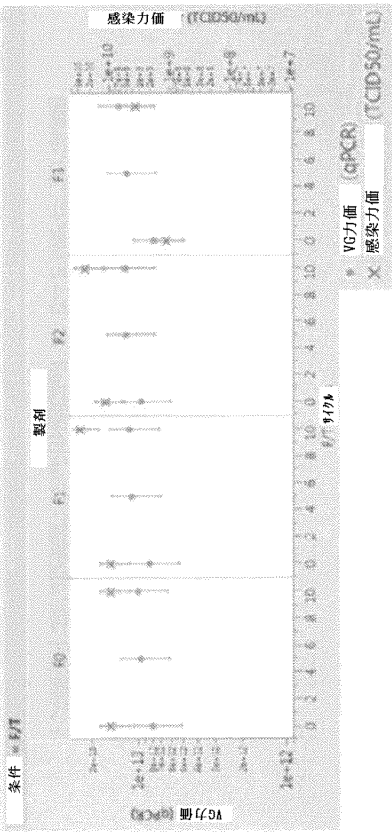


図 4 A

【図 4 B】

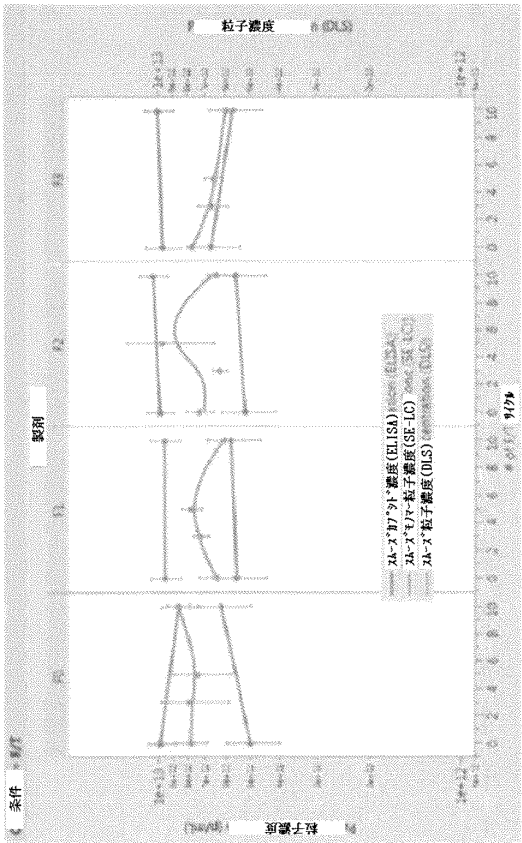


図 4 B

【図 4 C】

製剤	条件	外観	pH	モノマー平均サイズ (nm)	多分散係数	% モノマー DLS	% HMWS, DLS	% HMWS, SE-LC	全カプソド%
F0	開始	合格	7.3	29.7	0.07	100.0%	0%	0.2%	89.2%
	3x F/T	合格	7.3	30.7	0.12	99.6%	0.4%	ND	ND
	5x F/T	失敗	7.3	30.4	0.08	100.0%	0%	ND	ND
F1	10x F/T	失敗	7.3	30.2	0.07	100.0%	0%	0.0%	89.3%
	開始	合格	7.3	33.0	0.12	100.0%	0%	0.5%	89.1%
	3x F/T	合格	7.2	32.8	0.13	100.0%	0%	ND	ND
F2	5x F/T	合格	7.2	34.3	0.13	100.0%	0%	0%	ND
	10x F/T	合格	7.3	33.4	0.12	100.0%	0%	0.6%	89.2%
	開始	合格	7.2	33.6	0.14	100.0%	0%	0.5%	89.3%
F3	3x F/T	合格	7.2	34.0	0.14	100.0%	0%	ND	ND
	5x F/T	合格	7.3	33.9	0.13	100.0%	0%	ND	ND
	10x F/T	合格	7.2	33.6	0.13	100.0%	0%	0.5%	89.3%
F3	開始	合格	7.2	33.4	0.12	100.0%	0%	0.4%	89.1%
	3x F/T	合格	7.2	33.3	0.12	100.0%	0%	ND	ND
	5x F/T	合格	7.2	33.3	0.13	100.0%	0%	ND	ND
F3	10x F/T	合格	7.3	33.7	0.13	100.0%	0%	0.3%	89.0%

ND: データなし

図 4 C

【図 4 D】

製剤	条件	VG 力値 (vg/mL)	感染力値 (TCID ₅₀ /mL)	VG/TCID ₅₀	37°C 力価 (37°C ₅₀ /mL)	モノマー濃度, SE-LC (p/mL)	モノマー濃度, MADLS (p/mL)
F0	開始	7.9E+12	9.3E+09	1200	5.0E+12	1.0E+13	7.8E+12
	3x F/T	ND	ND	ND	ND	ND	8.3E+12
	5x F/T	9.5E+12	ND	ND	ND	ND	8.3E+12
F1	10x F/T	9.9E+12	9.3E+09	700	6.2E+12	8.6E+12	7.8E+12
	開始	8.3E+12	9.3E+09	1100	5.5E+12	9.5E+12	6.4E+12
	3x F/T	ND	ND	ND	ND	ND	6.7E+12
F2	5x F/T	1.1E+13	ND	ND	NO	ND	7.0E+12
	10x F/T	1.1E+13	2.9E+10	300	5.7E+12	9.5E+12	5.9E+12
	開始	9.4E+12	1.1E+10	1100	5.2E+12	9.9E+12	7.3E+12
F3	3x F/T	1.2E+13	ND	ND	ND	ND	6.8E+12
	5x F/T	1.2E+13	ND	ND	ND	ND	1.0E+13
	10x F/T	1.2E+13	2.4E+10	400	5.6E+12	1.0E+13	6.4E+12
F3	開始	7.7E+12	1.1E+09	8400	6.7E+12	9.7E+12	8.2E+12
	3x F/T	ND	ND	ND	ND	ND	6.1E+12
	5x F/T	1.8E+13	ND	ND	ND	ND	6.0E+12
F3	10x F/T	1.3E+13	3.6E+09	2600	5.7E+12	1.0E+13	5.7E+12

図 4 D

【図 5 A】

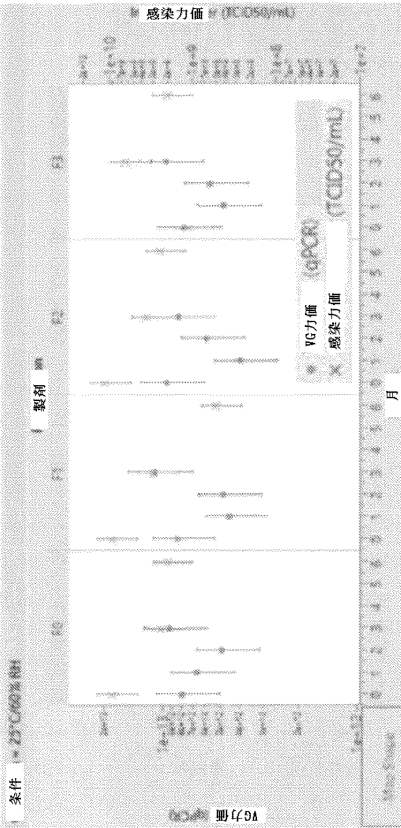


図 5 A

【図 5 B】

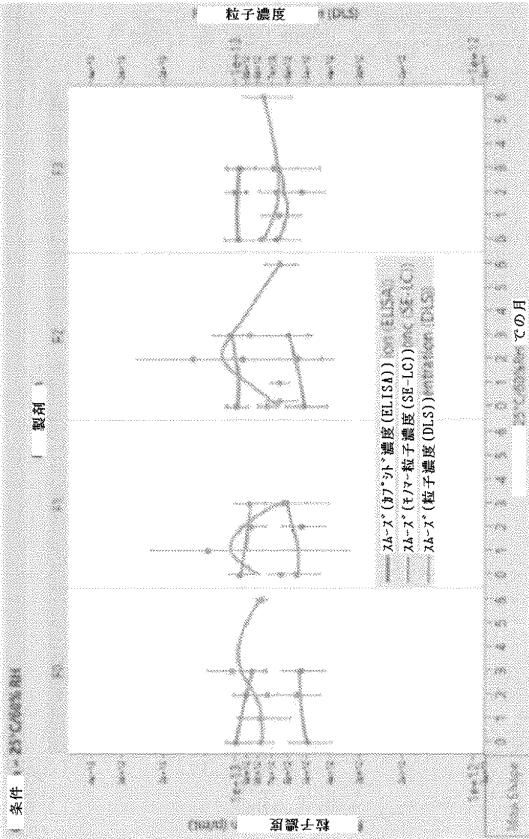


図 5 B

10

20

30

40

50

【図 5 C】

製剤	条件	外観	pH	モノマー平均径 $\bar{x}$ (nm)	多分散 指標	% ζ-ポット	% HMWS, DLS	% HMWS, SEC-LC	全 β 7 γ ポット γ %
F0	開始	合格	7.3	29.7	0.07	100.0%	0.0%	0.2%	89.2%
	1週間	合格	7.3	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	1ヶ月	合格	7.3	30.2	0.08	100.0%	0.0%	ND	ND
	2ヶ月	合格	7.2	30.1	0.07	100.0%	0.0%	0.7%	NAA
	3ヶ月	合格	7.4	32.9	0.13	100.0%	0.0%	0.0%	NAA
	6ヶ月	合格	7.2	30.6	0.08	100.0%	0.0%	ND	ND
F1	開始	合格	7.3	33.0	0.12	100.0%	0.0%	0.5%	89.1%
	1週間	合格	7.1	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	1ヶ月	合格	7.2	34.3	0.14	100.0%	0.0%	ND	ND
	2ヶ月	合格	7.2	34.4	0.14	100.0%	0.0%	1.9%	NAA
	3ヶ月	合格	7.2	36.4	0.17	99.6%	0.4%	5.5%	NAA
	6ヶ月	合格	7.2	ND	ND	ND	ND	ND	ND
F2	開始	合格	7.2	33.6	0.14	100.0%	0.0%	0.5%	89.3%
	1週間	合格	7.2	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	1ヶ月	合格	7.2	34.2	0.13	100.0%	0.0%	ND	ND
	2ヶ月	合格	7.2	34.6	0.14	100.0%	0.0%	0.8%	NAA
	3ヶ月	合格	7.2	35.4	0.17	99.5%	0.5%	1.3%	NAA
	6ヶ月	合格	7.3	34.0	0.13	100.0%	0.0%	ND	ND
F3	開始	合格	7.2	33.4	0.12	100.0%	0.0%	0.4%	89.1%
	1週間	合格	7.2	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	1ヶ月	合格	7.3	33.6	0.13	100.0%	0.0%	ND	ND
	2ヶ月	合格	7.2	33.5	0.12	100.0%	0.0%	0.6%	NAA
	3ヶ月	合格	7.4	34.7	0.17	99.2%	0.8%	1.7%	NAA
	6ヶ月	合格	7.2	33.9	0.13	100.0%	0.0%	ND	ND

図 5 C

【図 5 D】

製剤	条件	VG力価 (vg/mL)	感染力価 (TCID ₅₀ /mL)	VG/TCID ₅₀	β 7 γ ポット力価 (capsid/mL)	モノマー濃度 SE-LC (pM)	モノマー濃度 MADIS (pM)
F0	開始	7.9E+12	9.3E+09	1200	5.0E+12	1.0E+13	7.8E+12
	1ヶ月	6.6E+12	ND	ND	ND	ND	8.6E+12
	2ヶ月	4.9E+12	ND	ND	5.5E+12	9.0E+12	8.4E+12
	3ヶ月	9.2E+12	2.4E+09	1100	5.3E+12	8.4E+12	8.6E+12
	6ヶ月	ND	2.0E+09	ND	ND	ND	7.7E+12
	開始	8.3E+12	9.3E+09	1100	5.5E+12	9.5E+12	6.4E+12
F1	1ヶ月	4.5E+12	ND	ND	ND	ND	1.2E+13
	2ヶ月	4.8E+12	ND	ND	5.3E+12	8.6E+12	1.5E+13
	3ヶ月	1.1E+13	2.9E+09	600	6.3E+12	8.7E+12	4.8E+12
	6ヶ月	ND	5.2E+08	ND	ND	ND	ND
	開始	9.4E+12	1.1E+10	1100	5.2E+12	9.9E+12	7.3E+12
	1ヶ月	3.9E+12	ND	ND	ND	ND	6.7E+12
F2	2ヶ月	5.9E+12	ND	ND	5.5E+12	9.3E+12	7.6E+12
	3ヶ月	8.2E+12	3.6E+09	1300	6.0E+12	1.1E+13	8.6E+12
	6ヶ月	ND	2.4E+09	ND	ND	ND	6.5E+12
	開始	7.7E+12	1.1 E+09	8400	6.7E+12	9.7E+12	8.2E+12
	1ヶ月	4.8E+12	ND	ND	ND	ND	6.5E+12
	2ヶ月	5.6E+12	ND	ND	5.3E+12	1.0E+13	7.1E+12
F3	3ヶ月	9.5E+12	6.3E+09	500	6.8E+12	9.5E+12	7.5E+12
	6ヶ月	ND	2.0E+09	ND	ND	ND	7.5E+12

図 5 D

【図 6 A】

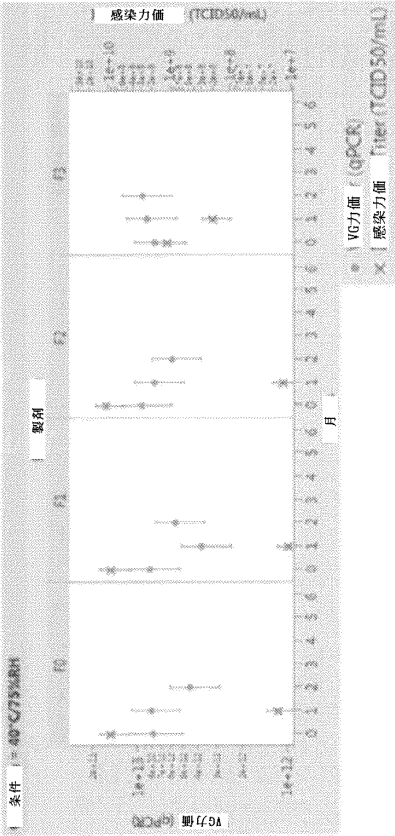


図 6 A

【図 6 B】

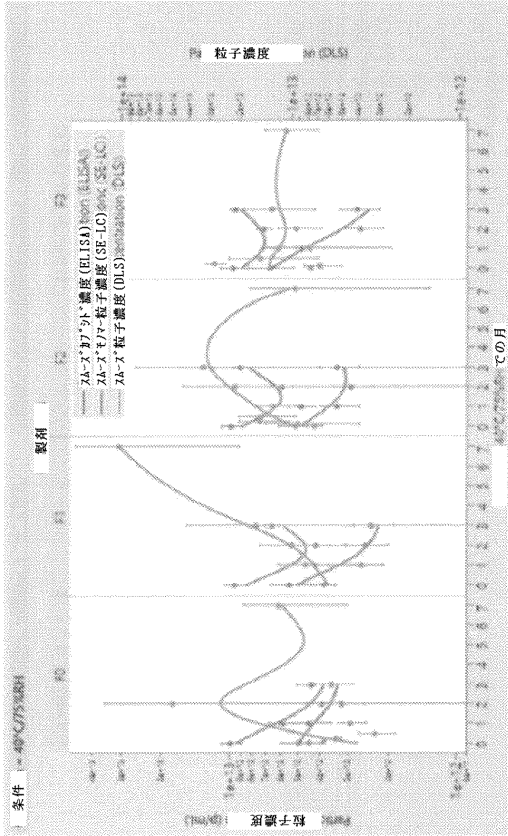


図 6 B

10

20

30

40

50

【図 6 C - 1】

製剤	条件	外観	pH	モノマー平均分子量	多分散指標	% モノマー DLS	% HMWS, DLS	% HMWS, SE-LC	全分子量 %
F0	開始	合格	7.3	29.7	0.07	100.0%	0.0%	0.2%	89.2%
	3日	合格	7.3	34.1	0.15	99.6%	0.4%	ND	ND
	1週間	合格	7.4	35.0	0.14	100.0%	0.0%	ND	ND
	2週間	合格	7.3	35.9	0.20	98.1%	1.9%	ND	ND
	1ヶ月	合格	7.3	33.4	0.14	100.0%	0.0%	5.4%	NAA
	2ヶ月	合格	7.1	28.8	0.36	94.6%	5.4%	0.0%	NAA
	3ヶ月	失敗	7.1	32.6	0.32	87.6%	12.4%	0.0%	NAA
	7ヶ月	ND	ND	32.8	0.50	72.7%	27.3%	ND	ND
	開始	合格	7.3	33.0	0.12	100.0%	0.0%	0.5%	89.1%
	3日	合格	7.2	ND	ND	ND	ND	ND	ND
F1	1週間	合格	7.2	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	2週間	合格	7.2	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	1ヶ月	合格	7.2	43.9	0.25	96.5%	3.6%	15.2%	NAA
	2ヶ月	合格	7.2	40.6	0.22	98.5%	1.5%	4.5%	NAA
	3ヶ月	失敗	7.2	41.7	0.24	96.9%	3.1%	20.3%	NAA
	7ヶ月	ND	ND	46.7	0.24	99.0%	1.0%	ND	ND
	開始	合格	7.2	33.6	0.14	100.0%	0.0%	0.5%	89.3%
	3日	合格	7.2	39.5	0.22	96.6%	3.4%	ND	ND
	1週間	合格	7.2	45.1	0.25	94.5%	5.5%	ND	ND
	2週間	合格	7.2	42.2	0.26	92.6%	7.4%	ND	ND
F2	1ヶ月	合格	7.2	41.3	0.23	97.6%	2.4%	6.5%	NAA
	2ヶ月	合格	7.2	42.0	0.23	98.5%	1.5%	11.6%	NAA
	3ヶ月	失敗	7.3	40.3	0.24	95.0%	5.0%	17.1%	NAA
	7ヶ月	ND	ND	55.4	0.28	97.5%	2.5%	ND	ND
	開始	合格	7.2	33.4	0.12	100.0%	0.0%	0.4%	89.1%
	3日	合格	7.2	36.3	0.23	96.6%	3.4%	ND	ND
	1週間	合格	7.2	40.2	0.20	98.4%	1.6%	ND	ND
	2週間	合格	7.2	42.9	0.22	98.2%	1.8%	ND	ND
	1ヶ月	合格	7.2	37.7	0.18	100.0%	0.0%	3.5%	NAA
	2ヶ月	合格	7.2	37.9	0.20	98.9%	1.1%	5.6%	NAA

図 6 C

【図 6 C - 2】

製剤	条件	外観	pH	モノマー平均分子量	多分散指標	% モノマー DLS	% HMWS, DLS	% HMWS, SE-LC	全分子量 %
	3ヶ月	失敗	7.3	39.2	0.25	92.8%	7.2%	9.5%	NAA
	7ヶ月	ND	ND	46.9	0.36	82.4%	17.6%	ND	ND

図 6 C (続き)

10

20

【図 6 D - 1】

製剤	条件	VG力価 (vg/mL)	感染力価 (TCID ₅₀ /mL)	VG/TCID ₅₀	分子量力価 (kDa)	モノマー濃度 SE-LC, (p/mL)	モノマー濃度 (MADIS (p/mL)
F0	開始	7.9E+12	9.3E+09	1200	5.0E+12	1.0E+13	7.8 E+12
	3日	ND	ND	ND	ND	ND	6.3E+12
	1週間	ND	ND	ND	ND	ND	5.4E+12
	2週間	ND	ND	ND	ND	ND	3.2E+12
	1ヶ月	8.1E+12	1.7E+07	440000	4.5E+12	5.9E+12	4.0 E+12
	2ヶ月	4.3E+12	ND	ND	3.2E+12	3.9E+12	5.1E+13
	3ヶ月	ND	ND	ND	3.6E+12	4.4E+12	5.2E+12
	7ヶ月	ND	ND	ND	2.6E+12	9.5E+12	1.2E+13
	開始	8.3E+12	9.3E+09	1100	2.6E+12	9.5E+12	6.4E+12
	3日	ND	ND	ND	ND	ND	ND
F1	1週間	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	2週間	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	1ヶ月	3.8E+12	1.1E+07	280000	2.6E+12	4.2E+12	1.0E+13
	2ヶ月	5.7E+12	ND	ND	2.3E+12	4.2E+12	8.6E+12
	3ヶ月	ND	ND	ND	2.4E+12	6.6E+12	1.8E+13
	7ヶ月	ND	ND	ND	ND	ND	1.0E+14
	開始	9.4E+12	1.1E+10	1100	5.2E+12	9.9E+12	7.3E+12
	3日	ND	ND	ND	ND	ND	9.2E+12
	1週間	ND	ND	ND	ND	ND	1.3E+13
	2週間	ND	ND	ND	ND	ND	1.5E+13
F2	1ヶ月	7.8E+12	1.4E+07	410000	3.4E+12	4.9E+12	1.4E+13
	2ヶ月	6.0E+12	ND	ND	2.9E+12	5.9E+12	2.2E+13
	3ヶ月	ND	ND	ND	3.4E+12	9.0E+12	3.2E+13
	7ヶ月	ND	ND	ND	ND	ND	1.0E+13
	開始	7.7E+12	1.1E+09	8400	6.7E+12	9.7E+12	8.2E+12
	3日	ND	ND	ND	ND	ND	6.8E+12
	1週間	ND	ND	ND	ND	ND	2.8E+13
	2週間	ND	ND	ND	ND	ND	1.5E+13
	1ヶ月	8.7E+12	2.0E+08	42000	4.9E+12	6.2E+12	5.5E+12
	2ヶ月	9.3E+12	ND	ND	2.7E+12	7.2E+12	8.0E+12

図 6 D

【図 6 D - 2】

製剤	条件	VG力価 (vg/mL)	感染力価 (TCID ₅₀ /mL)	VG/TCID ₅₀	分子量力価 (kDa)	モノマー濃度 SE-LC, (p/mL)	モノマー濃度 (MADIS (p/mL)
	3ヶ月	ND	ND	ND	2.8E+12	9.4E+12	1.3E+13
	7ヶ月	ND	ND	ND	ND	ND	1.1E+13

図 6 D (続き)

30

40

50

【図 7】

製剤	試験条件	試験方法	方法の変動性	安定性許容基準	失敗基準
F0	外観の液体	目視検査	N/A	粒子状態を含まない清澄な無色	濁り、曇りまたは粒子の目視検出
	pH	電位差測定	± 0.1	7.1 - 7.5	< 7.1 or > 7.5
	モナ-ビ-タ平均サイズ*	DLS	< 10%	< 10% (開始)からの変化	> +25% 開始からの変化
	多分散指標	DLS	< 10%	PDI < 0.20	PDI > 0.25
	モナ-ブ-ブ-ブ	DLS	< 2.5%	> 97.5% モナ-	< 95% モナ-
F1	モナ-ブ-ブ-ブ	DLS	< 2.5%	< 2.5% HMWS	> 5% HMWS
	HMWS 77777777	SE-LC	< 10%	< 5% HMWS	> 10% HMWS
	全オ-ブ-ブ-ブ	AEX-LC	< 10%	> 85% 全オ-ブ-ブ	< 80% 全オ-ブ-ブ
	オ-ブ-ブ-ブ力価	qPCR	36.0%	-30% ~ +30% 開始からの変化	< -50% 開始からの変化
	感染力価	TCID ₅₀	50.0%	-50% ~ +50% 開始からの変化	< -60% 開始からの変化
F2	VG/TCID ₅₀ 比	計算	86.0%	-0.5 ~ +0.5 -log ₁₀ 開始からの変化	< -1 -log ₁₀ 開始からの変化
	オ-ブ-ブ-ブ濃度	ELISA	20.0%	-20% ~ +20% 開始からの変化	< -40% 開始からの変化
	モナ-濃度	SE-LC	30.0%	-30% ~ +30% 開始からの変化	< -40% 開始からの変化
	モナ-濃度	MADLS	< 30%	-25% ~ +25% 開始からの変化	< -40% 開始からの変化
	モナ-濃度				

図 7

【図 9】

製剤	試験条件	VG/PCR、qPCR	感染力価、TCID ₅₀	VG/TCID ₅₀ 比	オ-ブ-ブ-ブ濃度、ELISA	モナ-濃度、SE-LC	モナ-濃度、MADLS
F0	条件	100% の変化	100% の変化	100% の変化	100% の変化	100% の変化	100% の変化
	開始	7.9E+12	9.3E+09	5.0E+12	5.0E+12	1.0E+13	7.8E+12
	10x E/T	25.1%	0.0%	0.23	24.5%	-13.3%	10.8%
	3 mo 25°C / 60% RH	16.9%	-73.9%	0.02	6.6%	-14.8%	32.0%
	1 mo 40°C / 75% RH	3.2%	-99.8%	-2.57	-9.6%	-40.7%	-43.3%*
F1	条件	8.3E+12	9.3E+09	1100	5.5E+12	9.5E+12	6.4E+12
	開始	36.5%	216.2%	0.54	4.2%	0.2%	-5.5%
	10x E/T	31.4%	-68.3%	0.26	13.6%	-8.5%	-4.6%
	3 mo 25°C / 60% RH	54.5%	-99.9%	-2.39	-52.1%	-55.5%	28.99%
	1 mo 40°C / 75% RH	11.2%	-99.9%	-2.39	-52.1%	-55.5%	28.99%
F2	条件	9.4E+12	1.1E+10	1100	5.2E+12	9.5E+12	7.3E+12
	開始	27.3%	115.4%	0.46	17.7%	2.1%	-17.5%
	10x E/T	11.2%	-68.4%	0.05	0.8%	-5.0%	0.5%
	3 mo 25°C / 60% RH	11.2%	-68.4%	0.05	0.8%	-5.0%	0.5%
	1 mo 40°C / 75% RH	11.2%	-68.4%	0.05	0.8%	-5.0%	0.5%
F3	条件	7.7E+12	1.1E+09	8400	6.7E+12	9.5E+12	7.3E+12
	開始	68.9%	216.2%	0.5	-15.2%	3.7%	-23.6%
	10x E/T	22.8%	462.3%	1.27	2.6%	-1.5%	-1.5%
	3 mo 25°C / 60% RH	12.6%	-82.2%	-0.7	-27.0%	-36.1%	0.1%*
	1 mo 40°C / 75% RH	12.6%	-82.2%	-0.7	-27.0%	-36.1%	0.1%*

* 結果は再現性がなく、最終的なスコアとは考えられなかった

図 9

【図 8】

製剤	試験条件	外観、液体、合格/失敗	pH	モナ-ビ-タ平均サイズ*	多分散指標	モナ-ブ-ブ-ブDLS	HMWS 77777777DLS	HMWS 77777777SE-LC	全オ-ブ-ブ-ブAEX-LC
F0	条件	合格/失敗	pH	100% の変化	PDI	モナ-ブ-ブ-ブDLS	HMWS 77777777DLS	HMWS 77777777SE-LC	全オ-ブ-ブ-ブAEX-LC
	開始	合格	7.3	29.63	0.07	100.0%	0.0%	0.0%	89.7%
	10x E/T	合格	7.3	1.8%	0.07	99.6%	0.4%	0.0%	89.7%
	3 mo 25°C / 60% RH	合格	7.4	11.1%	0.13	99.6%	0.4%	0.0%	NAA
	1 mo 40°C / 75% RH	合格	7.3	12.6%	0.14	100.0%	0.0%	0.0%	NAA
F1	条件	合格	7.3	33.0	0.12	100.0%	0.0%	0.0%	89.1%
	開始	合格	7.3	1.0%	0.12	100.0%	0.0%	0.0%	89.7%
	10x E/T	合格	7.2	10.3%	0.17	100.0%	0.0%	0.0%	NAA
	3 mo 25°C / 60% RH	合格	7.2	32.9%	0.25	85.5%	14.5%	15.5%	NAA
	1 mo 40°C / 75% RH	合格	7.2	33.6	0.14	100.0%	0.0%	0.0%	89.7%
F2	条件	合格	7.2	0.0%	0.13	100.0%	0.0%	0.0%	89.7%
	開始	合格	7.2	0.0%	0.13	100.0%	0.0%	0.0%	89.7%
	10x E/T	合格	7.2	5.4%	0.17	98.4%	1.6%	1.3%	NAA
	3 mo 25°C / 60% RH	合格	7.2	23.0%	0.23	99.7%	0.4%	0.0%	NAA
	1 mo 40°C / 75% RH	合格	7.2	23.0%	0.23	99.7%	0.4%	0.0%	NAA
F3	条件	合格	7.2	33.4	0.12	100.0%	0.0%	0.0%	89.1%
	開始	合格	7.2	1.0%	0.13	99.5%	0.5%	0.0%	89.0%
	10x E/T	合格	7.3	1.0%	0.17	100.0%	0.0%	0.0%	NAA
	3 mo 25°C / 60% RH	合格	7.4	3.8%	0.18	100.0%	0.0%	0.0%	NAA
	1 mo 40°C / 75% RH	合格	7.2	12.9%	0.17	100.0%	0.0%	0.0%	NAA

図 8

【図 10 - 1】

試験条件	温度 (°C)	T0	1ヶ月	3ヶ月	6ヶ月	9ヶ月	12ヶ月	18ヶ月	24ヶ月
外観、液体	色	清澄	<B9	<B9	<B9	<B9	<B9	<B9	<B9
	濁度	7.4	7.4	7.4	7.4	7.4	7.4	7.4	7.4
	pH	7.4	7.4	7.4	7.4	7.4	7.4	7.4	7.4
	モナ-ブ-ブ-ブ濃度 (qPCR)	1.00E+13	8.12E+12	9.17E+12	7.43E+12	1.14E+13	8.77E+12	9.03E+12	7.41E+12
	感染力価 (TCID ₅₀)	5	5	5	5	5	5	5	5
安定性試験	目視可能な粒子	目視可能な粒子なし	目視可能な粒子なし	目視可能な粒子なし	目視可能な粒子なし	目視可能な粒子なし	目視可能な粒子なし	目視可能な粒子なし	目視可能な粒子なし
	感染力価 (ELISA)	5	5	5	5	5	5	5	5
	モナ-ブ-ブ-ブ濃度 (CE)	5	5	5	5	5	5	5	5
	感染力価 (TCID ₅₀)	5	5	5	5	5	5	5	5
	モナ-ブ-ブ-ブ濃度 (CE)	5	5	5	5	5	5	5	5

図 10

【図 10 - 2】

試験	温度 (°C)	T0	1ヶ月	3ヶ月	6ヶ月	9ヶ月	12ヶ月	18ヶ月	24ヶ月
粒径分布 (SEC): $\mu\text{m}\%$	-70	99.4	98.9	98.9	99.2	99.0	99.3	99.2	99.0
	-5		99.1	98.8	99.3		99.1		
	5		99.3	98.5					
	-20		98.1	95.3					
粒径分布 (SEC): 複数物%	-70	NMT 1.0	NMT 1.0	1.2	NMT 1.0	1.0	N/A	NMT 1.0	NMT 1.0
	-5		NMT 1.5	1.5					
	5		1.32	1.32	1.32	1.32	1.32	1.33	1.32
	-20		1.32	1.32	1.32	1.32	1.32		
粒子含量 (SEC): 360/280 比	-70	1.32	1.32	1.32	1.32	1.32	1.32	1.33	1.32
	-5		1.32	1.33					
	5		76	82	64	60	69	60	55
	-20		73	60	60		48		
粒径分布 (SEC): 複数物%	-70	73	73	42	45.8	43.3	46.2	50.8	39.0
	-5		61	42	45.7				
	5		443.8	454.4	455.7				
	-20		NT	467.2					
P188 濃度	-70	NT	454.7	461.9					
	-5								
	5								
	-20								

図 10 (続き)

【配列表】

2024500133000001.app

10

20

30

40

50

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2021/064222

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
INV.	A61K9/08	A61K48/00
	A61K47/26	A61P7/04
	A61K47/10	A61K47/02
ADD.		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)		
A61K A61P		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)		
EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE, WPI Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2020/102369 A1 (REGENXBIO INC [US])	1-19,
A	22 May 2020 (2020-05-22)	22-33
	paragraphs [0223] - [0228], [0281] -	20, 21
	[0282]	

A	WRIGHT J FRASER ET AL: "Recombinant	1-33
	adeno-associated virus: formulation	
	challenges and strategies for a gene	
	therapy vector",	
	CURRENT OPINION IN DRUG DISCOVERY AND	
	DEVELOPMENT, CURRENT DRUGS, LONDON, GB,	
	vol. 6, no. 2, 1 March 2003 (2003-03-01),	
	pages 174-178, XP009092903,	
	ISSN: 1367-6733	
	abstract	

	-/--	
☒ 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		"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
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date		"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
"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)		"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
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means		"&" document member of the same patent family
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report
23 March 2022		05/04/2022
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5618 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Konter, Jörg

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2021/064222

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	GNATENKO D V ET AL: "EXPRESSION OF THERAPEUTIC LEVELS OF FACTOR VIII IN HEMOPHILIA A MICE USING A NOVEL ADENO/ADENO-ASSOCIATED HYBRID VIRUS", THROMBOSIS AND HAEMOSTASIS, SCHATTAUER GMBH, DE, vol. 92, no. 2, 1 August 2004 (2004-08-01) , pages 317-327, XP009036414, ISSN: 0340-6245 abstract -----	1-33
X,P	WO 2021/071835 A1 (REGENXBIO INC [US]) 15 April 2021 (2021-04-15)	1-19, 22-33
A,P	paragraphs [0413] - [0414]; claim 1 -----	20,21

1

10

20

30

40

50

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US2021/064222
Box No. I	Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)	
1.	With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing: a. ☒ forming part of the international application as filed: ☒ in the form of an Annex C/ST.25 text file. ☐ on paper or in the form of an image file. b. ☐ furnished together with the international application under PCT Rule 13ter.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file. c. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only: ☐ in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13ter.1(a)). ☐ on paper or in the form of an image file (Rule 13ter.1(b) and Administrative Instructions, Section 713). 2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished. 3. Additional comments:	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/US2021/064222

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2020102369 A1	22-05-2020	AU 2019379141 A1 BR 112021009370 A2 CA 3117982 A1 EP 3880235 A1 JP 2022513034 A KR 20210092755 A SG 11202104295U A US 2021393802 A1 WO 2020102369 A1	03-06-2021 17-08-2021 22-05-2020 22-09-2021 07-02-2022 26-07-2021 29-06-2021 23-12-2021 22-05-2020
WO 2021071835 A1	15-04-2021	TW 202126319 A WO 2021071835 A1	16-07-2021 15-04-2021

10

20

30

40

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類

F I

テーマコード (参考)

A 6 1 K 47/36 (2006.01)

A 6 1 K 47/36

A 6 1 K 48/00 (2006.01)

A 6 1 K 48/00

A 6 1 K 38/37 (2006.01)

A 6 1 K 38/37

C 1 2 N 15/864 (2006.01)

C 1 2 N 15/864 1 0 0 Z

C 1 2 N 15/12 (2006.01)

C 1 2 N 15/12 Z N A

C 1 2 N 15/35 (2006.01)

C 1 2 N 15/35

MK,MT,NL,NO,PL,PT,RO,RS,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,KM,ML,MR,N
E,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BN,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,
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,K
E,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,N
G,NI,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RU,RW,SA,SC,SD,SE,SG,SK,SL,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,
TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,WS,ZA,ZM,ZW

(74)代理人 100157956

弁理士 稲井 史生

(74)代理人 100170520

弁理士 笹倉 真奈美

(72)発明者 コナー, ジェシカ アイリーン

アメリカ合衆国 6 3 0 1 7 ミズーリ州チェスターフィールド、チェスターフィールド・パークウェ
イ・ウエスト 8 7 5、ファイザー・インコーポレイテッド内

(72)発明者 クロフォード, リンジー アン

アメリカ合衆国 0 1 8 1 0 マサチューセッツ州アンドーバー、バート・ロード 1、ファイザー・
インコーポレイテッド内

(72)発明者 ダミッツ, ロバート

アメリカ合衆国 9 4 0 0 5 カリフォルニア州ブリズベン、マリーナ・ブルバード 7 0 0 0、サ
ンガモ・セラピューティクス・インコーポレイテッド内

(72)発明者 デビス, ブレندان マイケル

アメリカ合衆国 0 1 8 1 0 マサチューセッツ州アンドーバー、バート・ロード 1、ファイザー・
インコーポレイテッド内

(72)発明者 ホッジ, コディ マイケル

アメリカ合衆国 6 3 0 1 7 ミズーリ州チェスターフィールド、チェスターフィールド・パークウェ
イ・ウエスト 8 7 5、ファイザー・インコーポレイテッド内

(72)発明者 キメル ザ セカンド, マイケル リーランド

アメリカ合衆国 6 3 0 1 7 ミズーリ州チェスターフィールド、チェスターフィールド・パークウェ
イ・ウエスト 8 7 5、ファイザー・インコーポレイテッド内

(72)発明者 クレシ ウィラード, ティハミ

アメリカ合衆国 6 3 0 1 7 ミズーリ州チェスターフィールド、チェスターフィールド・パークウェ
イ・ウエスト 8 7 5、ファイザー・インコーポレイテッド内

(72)発明者 ラムジー, フィリップ

アメリカ合衆国 9 4 0 0 5 カリフォルニア州ブリズベン、マリーナ・ブルバード 7 0 0 0、サ
ンガモ・セラピューティクス・インコーポレイテッド内

(72)発明者 ソーン, ダニエル ジョセフ

アメリカ合衆国 6 3 0 1 7 ミズーリ州チェスターフィールド、チェスターフィールド・パークウェ
イ・ウエスト 8 7 5、ファイザー・インコーポレイテッド内

(72)発明者 ヤング, アンソニー リー

アメリカ合衆国 6 3 0 1 7 ミズーリ州チェスターフィールド、チェスターフィールド・パークウェ
イ・ウエスト 8 7 5、ファイザー・インコーポレイテッド内

F ターム (参考) 4C076 AA12 BB13 CC14 DD23 DD26 DD38 EE23 EE30 FF11 FF18

FF36 FF61 FF63 GG45 GG50

4C084 AA13 DC15 MA02 MA05 MA17 MA66 NA03 NA05 NA10 ZA531

ZA532**ZA53**