



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 116710149 A

(43) 申请公布日 2023. 09. 05

(21) 申请号 202180085158.1

(22) 申请日 2021.12.17

(30) 优先权数据

63/127,826 2020.12.18 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2023.06.16

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2021/064222 2021.12.17

(87) PCT国际申请的公布数据

W02022/133324 EN 2022.06.23

(71) 申请人 桑格摩生物治疗股份有限公司

地址 美国加利福尼亚州

申请人 美国辉瑞有限公司

(72) 发明人 J·E·康纳 L·A·克劳福德

R·达米茨 B·M·戴维斯

C·M·霍奇 M·L·基梅尔二世

T·库雷希威尔拉德 P·拉姆齐

D·J·索恩 A·L·扬

(74) 专利代理机构 北京市柳沈律师事务所

11105

专利代理师 李芳芳

(51) Int.Cl.

A61K 48/00 (2006.01)

权利要求书3页 说明书35页

序列表8页 附图27页

(54) 发明名称

含有腺相关病毒载体的改善的药物组合物

(57) 摘要

本发明提供了包含重组AAV和一种或多种药学上可接受的赋形剂的组合物。与其他AAV组合物相比,该组合物具有改善的稳定性和保存期限。

1. 药物组合物,其包含:  
重组腺相关病毒(rAAV)载体,  
氯化钠(NaCl)  
氯化钾(KCl),  
磷酸氢二钠( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ),  
磷酸二氢钾( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ),  
氯化镁( $\text{MgCl}_2$ ),  
多元醇,和  
泊洛沙姆,  
任选地,其中所述组合物包含不超过约0.1mM氯化钙并且具有约7.1至约7.5的pH。
2. 权利要求1的组合物,其中所述多元醇是蔗糖。
3. 权利要求1或2的组合物,其中所述泊洛沙姆是泊洛沙姆188。
4. 权利要求1-3中任一项的组合物,其中所述组合物含有约0.1至约2.0mM氯化镁。
5. 权利要求4的组合物,其中所述组合物含有约0.5mM或更高的氯化镁。
6. 权利要求4的组合物,其中所述组合物含有约1.4mM氯化镁。
7. 权利要求4的组合物,其中所述组合物含有超过约1.3mM的氯化镁。
8. 权利要求1-7中任一项的组合物,其中所述组合物含有约150mM至约200mM,任选地约172mM的氯化钠。
9. 权利要求1-8中任一项的组合物,其中所述组合物含有约2.5mM至约3.0mM,任选地约2.7mM的氯化钾。
10. 权利要求1-9中任一项的组合物,其中所述组合物含有约5mM至约10mM,任选地约8mM的磷酸氢二钠。
11. 权利要求1-10中任一项的组合物,其中所述组合物含有约1.0mM至约2.0mM,任选地约1.5mM的磷酸二氢钾。
12. 权利要求1-11中任一项的组合物,其中所述组合物含有约0.5%至约2% (w/v), 任选地约1% (w/v)的蔗糖。
13. 权利要求1-12中任一项的组合物,其中所述组合物含有约0.01%至约0.1% (w/v), 任选地约0.05% (w/v)的泊洛沙姆188。
14. 药物组合物,其包含:  
重组腺相关病毒(rAAV)载体,  
约171.81mM氯化钠,  
约2.68mM氯化钾,  
约8.10mM磷酸氢二钠,  
约1.47mM磷酸二氢钾,  
约1.40mM氯化镁,  
约1.00% (w/v) 蔗糖,和  
约0.05% (w/v) 泊洛沙姆188,  
任选地,其中所述组合物包含不超过约0.1mM氯化钙并且具有约7.1至约7.5的pH。
15. 药物组合物,其包含:

重组腺相关病毒(rAAV)载体,

约172mM氯化钠,

约2.68mM氯化钾,

约8.10mM磷酸氢二钠,

约1.47mM磷酸二氢钾,

约0.49mM氯化镁,

约1.00% (w/v) 蔗糖,和

约0.05% (w/v) 泊洛沙姆188,

任选地,其中所述组合物包含不超过约0.1mM氯化钙并且具有约7.1至约7.5的pH。

16. 权利要求1-15中任一项的组合物,其中所述rAAV包含基因组,所述基因组包含治疗性蛋白质的表达盒。

17. 权利要求16的组合物,其中所述治疗性蛋白质是人因子VIII多肽。

18. 药物组合物,其包含:

重组腺相关病毒(rAAV)载体,其中所述rAAV包含基因组,所述基因组包含用于表达人因子VIII多肽的表达盒,

约171.81mM氯化钠,

约2.68mM氯化钾,

约8.10mM磷酸氢二钠,

约1.47mM磷酸二氢钾,

约1.40mM氯化镁,

约1.00% (w/v) 蔗糖,和

约0.05% (w/v) 泊洛沙姆188,

任选地,其中所述组合物包含不超过约0.1mM氯化钙并且具有约7.1至约7.5的pH。

19. 药物组合物,其包含:

重组腺相关病毒(rAAV)载体,其中所述rAAV包含基因组,所述基因组包含用于表达人因子VIII多肽的表达盒,

约172mM氯化钠,

约2.68mM氯化钾,

约8.10mM磷酸氢二钠,

约1.47mM磷酸二氢钾,

约0.49mM氯化镁,

约1.00% (w/v) 蔗糖,和

约0.05% (w/v) 泊洛沙姆188,

任选地,其中所述组合物包含不超过约0.1mM氯化钙并且具有约7.1至约7.5的pH。

20. 权利要求17-19中任一项的组合物,其中所述人因子VIII多肽包含SEQ ID NO:1。

21. 权利要求17-19中任一项的组合物,其中所述rAAV的基因组包含SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:2的核苷酸131-5,024。

22. 权利要求1-21中任一项的组合物,所述组合物含有约 $1.0E+12$ 至约 $1.0E+14$ 个载体基因组(vg)每mL,任选地约 $1.0E+13$ 至约 $5.0E+13$ 个vg每mL的rAAV。

23. 权利要求22的组合物,其中所述组合物含有约 $1.0\text{E}+13$ 个vg/mL。
24. 前述权利要求中任一项的组合物,其中所述rAAV包含AAV6衣壳蛋白,任选地包含AAV2的反向末端重复(ITR)。
25. 小瓶,其包含5-10mL、任选地6.4mL的权利要求1-24中任一项的组合物。
26. 权利要求25的小瓶,其中所述小瓶由环烯烃共聚物制成。
27. 权利要求25或26的小瓶,其中所述小瓶具有原位热塑性弹性体塞子。
28. 治疗需要治疗性蛋白质的患者的方法,所述方法包括向所述患者施用权利要求1-24中任一项的组合物。
29. 在有此需要的人受试者中增加因子VIII的血清水平的方法,所述方法包括向所述人受试者经静脉内施用权利要求17-24中任一项的药物组合物,或权利要求25-27中任一项的小瓶的全部内容物。
30. 权利要求29的方法,其中所述人受试者患有A型血友病。
31. 治疗有此需要的人受试者的A型血友病的方法,所述方法包括向所述人受试者经静脉内施用权利要求17-24中任一项的药物组合物,或权利要求25-27中任一项的小瓶的全部内容物。
32. 权利要求1-24中任一项的药物组合物在制备用于在权利要求28-31中任一项的方法中治疗人受试者的药物中的用途。
33. 权利要求1-24中任一项的药物组合物,其用于在权利要求28-31中任一项的方法中治疗人受试者。

## 含有腺相关病毒载体的改善的药物组合物

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求2020年12月18日提交的美国申请号63/127,826的优先权,其内容通过引用整体并入本文。

[0003] 序列表

[0004] 本申请包含序列表,该序列表以ASCII格式以电子方式提交,并且在此通过引用整体并入。所述ASCII副本创建于2021年12月1日,命名为025297\_W0029\_SL.txt,并且大小为19,967字节。

[0005] 发明背景

[0006] 基因疗法是治疗遗传疾病的很有前景的方法。它向患者引入缺陷基因的健康拷贝,或使功能不适当的突变基因失活。基因疗法研究特别感兴趣的遗传疾病是A型血友病。A型血友病,也称为经典型血友病,是X连锁遗传疾病,其中血液凝固过程由于编码因子VIII的基因缺失或有缺陷而受损。患有A型血友病的患者会出现内部出血(例如,在关节和肌肉内)或外部出血(例如,由于轻微割伤、外伤或牙科手术)。因子VIII的正常血浆水平范围为50%至100%。轻度A型血友病的特征在于血液中因子VIII的水平为6%至49%;患者通常仅在严重受伤、外伤或手术后出血。中度A型血友病的特征在于血液中因子VIII的水平为1%至5%;患者在受伤后有出血事件。重度A型血友病的特征在于血液中因子VIII的水平低于1%;患者在受伤后经历出血并且还具具有频繁的自发性出血事件,通常发生在关节和肌肉中。另请参见国家血友病基金会的网站。A型血友病通常用替代性因子VIII进行按需(在出血时)或预防性治疗。一些患者会产生针对替代性因子的同种抗体(又名抑制剂),从而导致治疗无效。目前的疗法很繁琐,因为它们需要频繁的静脉注射,而且发展中国家的资源也有限。因此,基因疗法为治疗A型血友病提供了很有前景的方法。

[0007] 已经探索了重组腺相关病毒(rAAV)作为基因疗法中基因递送的平台。腺相关病毒(AAV)是小型无包膜病毒,属于细小病毒科和依赖性细小病毒属。该病毒包含包装在衣壳中的单链DNA基因组,该衣壳由三种衣壳蛋白—病毒蛋白(VP)1、VP2和VP3组装而成。将rAAV制剂配制临床使用的药物组合物一直是一个挑战。已经观察到常用的rAAV配制剂会随着时间的推移或在实验室模拟的压力测试中形成可见的沉淀物。如果不加以解决,这些沉淀物会对患者安全构成危险。从一些rAAV配制剂观察到的物理稳定性问题也可能对产品在储存、运输和向患者施用所需的保存期限内的功效产生负面影响(参见,例如,Wright et al.,Molecular Therapy (2005) 12(1):171-8;Croyle et al.,Gene Therapy (2001) 8:1281-90)。因此,需要开发改善的rAAV载体的配制剂,使得它们在基因疗法中的治疗潜力能够充分发挥。

[0008] 发明概述

[0009] 本公开提供了适用于临床施用的稳定的rAAV载体配制剂。在一方面,本公开提供了药物组合物,其包含rAAV载体、氯化钠(NaCl)、氯化钾(KCl)、磷酸氢二钠( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ )、磷酸二氢钾( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ )、氯化镁( $\text{MgCl}_2$ )、多元醇(例如蔗糖)和泊洛沙姆(例如泊洛沙姆188),任选地,其中组合物包含不超过约0.1mM的氯化钙并且具有约7.1至约7.5的pH。

[0010] 在一些实施方案中,组合物含有约0.1至约2.0mM(例如,约0.5mM或更高、约1.3mM或更高、或约1.4mM)的氯化镁。

[0011] 在一些实施方案中,组合物含有约150至约200mM,任选地约172mM的氯化钠。

[0012] 在一些实施方案中,组合物含有约2.5至约3.0mM,任选地约2.7mM的氯化钾。

[0013] 在一些实施方案中,组合物含有约5至约10mM,任选地约8mM的磷酸氢二钠。

[0014] 在一些实施方案中,组合物含有约1.0至约2.0mM,任选地约1.5mM的磷酸二氢钾。

[0015] 在一些实施方案中,组合物含有约0.5%至约2% (w/v),任选地约1% (w/v)的蔗糖。

[0016] 在一些实施方案中,组合物含有约0.01%至约0.1% (w/v),任选地约0.05% (w/v)的泊洛沙姆188。

[0017] 在特定的实施方案中,本公开提供了药物组合物,其包含rAAV载体、约171.81mM氯化钠、约2.68mM氯化钾、约8.10mM磷酸氢二钠、约1.47mM磷酸二氢钾、约1.40mM氯化镁、约1.00% (w/v) 蔗糖和约0.05% (w/v) 泊洛沙姆188,任选地,其中组合物包含不超过约0.1mM的氯化钙并且具有约7.1至约7.5的pH。

[0018] 在其他特定的实施方案中,本公开提供了药物组合物,其包含rAAV载体、约172mM氯化钠、约2.68mM氯化钾、约8.10mM磷酸氢二钠、约1.47mM磷酸二氢钾、约0.49mM氯化镁、约1.00% (w/v) 蔗糖和约0.05% (w/v) 泊洛沙姆188,任选地,其中组合物包含不超过约0.1mM的氯化钙并且具有约7.1至约7.5的pH。

[0019] 在一些实施方案中,本发明组合物中的rAAV包含基因组,该基因组包含治疗性蛋白质如人因子VIII多肽(例如,SEQ ID NO:1)的表达盒。在特定的实施方案中,AAV基因组包含SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:2的核苷酸131-5,024。

[0020] 在一些实施方案中,组合物含有约 $1.0 \times 10^{12}$ 至约 $1.0 \times 10^{14}$ 个载体基因组(vg)每mL,任选地约 $1.0 \times 10^{13}$ 至约 $5.0 \times 10^{13}$ 个vg每mL(例如,约 $1.0 \times 10^{13}$ 个vg每mL)的rAAV。

[0021] 在一些实施方案中,rAAV包含AAV6衣壳蛋白(例如,具有AAV6衣壳)。在一些实施方案中,AAV基因组包含来自AAV2的反向末端重复(ITR)。

[0022] 在另一方面,本公开提供了包含5-10mL、任选地6.4mL的本发明组合物的小瓶。小瓶可以由例如环烯烃共聚物制成,和/或可以具有原位热塑性弹性体塞子。

[0023] 在另一方面,本公开提供了治疗需要治疗性蛋白质的患者的方法,该方法包括向患者施用本发明的组合物。在一些实施方案中,本公开提供了提高有此需要的人受试者(例如,患有A型血友病的人受试者)的因子VIII的血清水平的方法,该方法包括向人受试者静脉内施用其中rAAV编码人因子VIII多肽的本发明组合物。还提供了用于此类治疗方法的药物组合物,以及组合物在制备用于此类方法的药物中的用途。

[0024] 本发明的其他特征、目的和优点在下面的详细描述中是显而易见的。然而,应当理解,详细描述虽然指示了本发明的实施方案和方面,但仅以说明而非限制的方式给出。通过详细描述,在本发明范围内的各种变化和修改对于本领域技术人员来说将是显而易见的。

[0025] 附图简述

[0026] 图1A-F总结了在含有SB-525的配制剂的样品中发现的微粒物质的表征。

[0027] 图2显示了通过切向流过滤(TFF)进行缓冲液交换的示意图。

[0028] 图3显示了AAV6载体配制剂的配制、装填和完成步骤。

[0029] 图4A显示了多次冻融循环后AAV6载体配制剂的载体基因组(vg)滴度和感染滴度。展示的误差条是来自通过MADLS测量颗粒浓度获得的 $N \geq 3$ 个样品测量值的 $\pm$ 百分比RSD,或者是vg滴度、中值组织培养感染剂量(TCID<sub>50</sub>)、ELISA和SE-LC的 $\pm$ 可接受的测试变异性。RSD:相对标准偏差。MADLS:多角度动态光散射。SE-LC:尺寸排阻液相色谱。

[0030] 图4B显示了多次冷冻/解冻循环后AAV6载体配制剂的衣壳滴度和颗粒浓度。展示的误差条是来自通过MADLS测量颗粒浓度获得的 $N \geq 3$ 个样品测量值的 $\pm$ 百分比RSD,或者是vg滴度、TCID<sub>50</sub>、ELISA和SE-LC的 $\pm$ 可接受的测试变异性。

[0031] 图4C是显示冷冻/解冻AAV6载体配制剂样品的总体和纯度质量属性结果的表格。

[0032] 图4D是显示冷冻/解冻AAV6载体配制剂样品的强度质量属性结果的表格。

[0033] 图5A显示了在环境(25℃/60%RH)条件下最长达6个月的vg和感染滴度。RH:相对湿度。

[0034] 图5B显示了在环境(25℃/60%RH)条件下最长达6个月的衣壳滴度和颗粒浓度。

[0035] 图5C是显示环境(25℃/60%RH)孵育样品的总体和纯度质量属性结果的表格。ND:无数据。NAA:无可用的分析。

[0036] 图5D是显示环境(25℃/60%RH)孵育样品的强度质量属性结果的表格。

[0037] 图6A显示了在受压(40℃/75%RH)条件下3个月的vg和感染滴度。

[0038] 图6B显示了在受压(40℃/75%RH)条件下最长达7个月的衣壳滴度和颗粒浓度。

[0039] 图6C是显示受压(40℃/75%RH)孵育样品的总体和纯度质量属性结果的表格。

[0040] 图6D是显示受压(40℃/75%RH)孵育样品的强度质量属性结果的表格。

[0041] 图7是显示稳定性样品质量属性的相关标准和失败标准的表格。

[0042] 图8是显示样品间配制剂评估总结的表格。

[0043] 图9是显示研究终点趋势线以及总体和纯度质量属性的配制剂评估的表格。

[0044] 图10是显示SB-525药品在预期储存温度(-70℃)下的长期(24个月)稳定性的表格。

[0045] 发明详述

[0046] 本公开提供了包含AAV载体和一种或多种药学上可接受的赋形剂的药物组合物。本发明的AAV载体组合物可以包含rAAV,其基因组携带感兴趣的蛋白质(例如,治疗性蛋白质)的表达盒。发明人出乎意料地发现,与现有组合物相比,基本上不含钙(例如,配制剂中未添加钙)的AAV载体配制剂具有改善的稳定性和保存期限。由于常规观点认为钙会改善AAV组合物的稳定性,因此现有配制剂中通常包含钙(参见,例如,Turnbull et al., Hum Gene Ther. (2000) 11(4):629-35; Cotmore et al., J Virol. (2010) 84(4):1945-56)。发明人已经发现,本发明的AAV载体组合物具有改善的外观(例如,澄清和无色)、更稳定的pH值和更少的聚集物(如在冷冻/解冻循环和加速稳定性条件下通过产品质量属性所确定的)。由于配制的 $\text{Ca}^{2+}$ 不含钙的AAV载体产品表现出更好的产品稳定性,因此产品性能或稳定性不需要钙离子。

[0047] I. 重组AAV的制备物

[0048] 本文描述的病毒制剂可以通过任何已知的生产系统获得,如哺乳动物细胞AAV生产系统(例如,基于293T或HEK293细胞的生产系统)和昆虫细胞AAV生产系统(例如,基于sf9昆虫细胞的生产系统和/或使用杆状病毒辅助载体的生产系统)。可以通过使用众所周知的

技术(如不连续氯化铯密度梯度)从细胞培养物中纯化病毒制剂(参见,例如,Grieger, Mol Ther Methods Clin Dev. (2016) 3:16002)。

[0049] 本发明的组合物可以包含以下多种AAV血清型的任何一种或组合:如AAV1、AAV2、AAV3、AAV3B、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV8.2、AAV9、AAVrh10、AAV10和AAV11,以及它们的变体、杂合体、嵌合体或伪型。“伪型的”或“交叉包装的”rAAV意指其衣壳被另一种AAV血清型的衣壳取代的重组AAV,例如,以改变病毒的转导效率或向性概况(参见,例如,Balaji et al., J Surg Res. (2013) 184(1):691-8)。“嵌合的”或“杂合的”rAAV意指其衣壳由衍生自不同血清型的衣壳蛋白组装而成和/或其衣壳蛋白是具有衍生自不同血清型(例如,血清型1和血清型2;参见,例如,Hauck et al., Mol Ther. (2003) 7(3):419-25)的序列的嵌合蛋白的重组AAV。例如,本发明的组合物可以包含其基因组(如ITR)衍生自一种血清型(如AAV2),而衣壳衍生自另一种血清型的重组AAV;例如,AAV2/8、AAV2/5、AAV2/6、AAV2/9或AAV2/6/9。参见,例如,美国专利7,198,951和9,585,971。

## [0050] II. 重组AAV的配制剂

[0051] 一经纯化,AAV制剂可以如本文所述配制,例如,通过切向流过滤的缓冲液交换、使用搅拌式过滤器(stir-cell)的正常流动过滤、凝胶过滤、透析、柱层析和/或脱盐柱,以达到包含期望的成分的组合物。作为示例,纯化的病毒制剂可以首先通过超滤(UF)浓缩,然后用10倍或更多倍等体积的期望的水性配制剂溶液渗滤(DI)。另请参见下面的示例。

[0052] 配制剂溶液可以包含张力剂、稳定剂、表面活性剂和缓冲剂。缓冲剂可以包括,例如,乙酸盐、琥珀酸盐(例如六水琥珀酸二钠)、琥珀酸、葡萄糖酸盐、柠檬酸盐、组氨酸、乙酸、磷酸盐、磷酸、抗坏血酸盐、抗坏血酸、酒石酸、苹果酸盐、马来酸、甘氨酸、乳酸盐、乳酸、碳酸氢盐、碳酸、苯甲酸钠、苯甲酸、依地酸盐、咪唑、tris及它们的混合物。在一些实施方案中,配制剂溶液含有例如分别约150-200mM(例如,约150mM、约155mM、约160mM、约165mM、约168mM、约170mM、约171mM、约171.1mM、约171.2mM、约171.3mM、约171.4mM、约171.5mM、约171.6mM、约171.7mM、约171.8mM、约171.9mM或约172mM)和约2.5-3.0mM(例如,约2.5mM、约2.6mM、约2.61mM、约2.61mM、约2.63mM、约2.64mM、约2.65mM、约2.66mM、约2.67mM、约2.68mM、约2.69mM或约2.7mM、约2.8mM、约2.9mM、约3.0mM)的氯化钠和/或氯化钾。

[0053] 配制剂溶液可以是磷酸盐缓冲的,例如通过磷酸氢二钠和/或磷酸二氢钾缓冲的。在一些实施方案中,配制剂溶液中的总磷酸根离子浓度为约8-12mM(例如,约9.6mM或约9.57mM)。在某些实施方案中,配制剂溶液含有约5-10mM(例如,约5mM、约6mM、约7mM、约7.9mM、约8mM或约8.1mM、约8.2mM、约8.5mM、约9mM或约10mM)磷酸氢二钠和约1-2mM(例如,约1mM、约1.2mM、约1.3mM、约1.45mM、约1.47mM、约1.48mM、约1.49mM、约1.5、约1.6mM、约1.7mM、约1.8mM、约1.9mM或约2mM)磷酸二氢钾。配制剂可以具有约6.5-8.0(例如,约7.1-7.5、约7.1、约7.2、约7.3、约7.4或约7.5)的pH。

[0054] 配制剂溶液可以含有镁但不添加钙。在一些实施方案中,配制剂溶液含有约0.1至2.0mM(例如,约0.5至约1.4mM、约0.1mM、约0.2mM、约0.3mM、约0.4mM、约0.42mM、约0.44mM、约0.45mM、约0.46mM、约0.47mM、约0.48mM、约0.49mM、约0.5、约0.55mM或约0.6mM)氯化镁。尽管配制剂溶液不含有添加的钙,但是由AAV制剂和配制剂溶液组成的药物组合物可以具有在AAV制备和纯化过程中携带的痕量的钙。例如,当通过比色测定测量时,药物组合物可以含有不超过约0.10mM(例如,不超过约0.09、0.07、0.05、0.03或0.01mM)的钙。在一些实施

方案中,药物组合物不含有如通过比色测定所测量的可检测的钙。在一些实施方案中,药物组合物不含有钙(即,0mM钙)。

[0055] 配制剂溶液可以含有多元醇,如甘露醇、海藻糖、山梨糖醇、赤藓糖醇、异麦芽酮糖醇、乳糖醇、麦芽糖醇、木糖醇、甘油、乳糖醇、乙二醇、丙二醇、聚乙二醇、肌醇、果糖、葡萄糖、甘露糖、蔗糖、山梨糖、木糖、乳糖、麦芽糖、右旋糖、普鲁兰多糖(pullulan)、糊精、环糊精、可溶性淀粉、羟乙基淀粉、水溶性葡聚糖或它们的混合物。在一些实施方案中,配制剂溶液含有约0.5%至2%(例如,约0.5%、约0.6%、约0.7%、约0.8%、约0.9%或约1%)(w/v)的蔗糖。

[0056] 配制剂溶液可以含有非离子或离子亲水性表面活性剂。表面活性剂的示例是聚山梨酯、泊洛沙姆、triton、十二烷基硫酸钠、月桂基硫酸钠、辛基糖苷钠、月桂基-磺基甜菜碱、肉豆蔻基-磺基甜菜碱、亚油基-磺基甜菜碱、硬脂基-磺基甜菜碱、月桂基-肌氨酸、肉豆蔻基-肌氨酸、亚油基-肌氨酸、硬脂酰-肌氨酸、亚油酰-甜菜碱、肉豆蔻基-甜菜碱、鲸蜡基-甜菜碱、月桂酰氨基丙基-甜菜碱、椰油酰胺丙基-甜菜碱、亚油酰胺丙基-甜菜碱、肉豆蔻酰胺丙基-甜菜碱、棕榈酰胺丙基-甜菜碱、异硬脂酰胺丙基-甜菜碱、肉豆蔻酰胺丙基-二甲胺、棕榈酰胺丙基-二甲胺、异硬脂酰胺丙基-二甲胺、甲基椰油酰基牛磺酸钠、甲基油酰基牛磺酸二钠、二羟丙基PEG-5亚油基氯化铵、聚乙二醇、聚丙二醇、失水山梨糖醇单酯(例如,Spans)、甘油的酸酯以及它们的混合物。在一些实施方案中,表面活性剂可以是聚山梨醇酯(PS)20、PS-21、PS-40、PS-60、PS-61、PS-65、PS-80、PS-81、PS-85、PEG-3350、泊洛沙姆188以及它们的混合物。在一些实施方案中,配制剂溶液含有约0.01%至0.1%(例如,约0.01%、约0.02%、约0.03%、约0.04%、约0.05%、约0.06%、约0.07%、约0.08%、约0.09%或约0.1%)(w/v)的泊洛沙姆188。

[0057] 在特定的实施方案中,药物组合物包含配制剂F2或F3中的AAV载体。F2和F3的成分如下表A所示。含有钙和镁的Dulbecco磷酸盐缓冲盐水(DPBS)是细胞培养应用中常用的配制剂。F0是另一种先前的含钙配制剂。如以下示例所示,F2和F3在配制AAV方面优于DPBS和F0。

[0058] 表A. 配制剂比较

[0059]

| 组分(单位)                                | 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 <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (mM) | 8.10   | 8.10   | 8.10   | 8.10   |
| KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (mM)  | 1.47   | 1.47   | 1.47   | 1.47   |
| CaCl <sub>2</sub> (mM)                | 0.90   | 0.90   | 0.0    | 0.0    |
| MgCl <sub>2</sub> (mM)                | 0.50   | 0.50   | 0.49   | 1.40   |
| 蔗糖(%w/v)                              | 0.0    | 1.00%  | 1.00%  | 1.00%  |
| 泊洛沙姆188(%w/v)                         | 0.0    | 0.05%  | 0.05%  | 0.05%  |

[0060] 如本文所用,配制剂中各种成分的浓度可以用零位、一位或两位小数表示。因此,例如,在F2中,NaCl、KCl、Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>、KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、MgCl<sub>2</sub>和蔗糖的浓度可以分别表示为171.80(或171.8或172)mM、2.68(或2.7)mM、8.10(或8.1或8)mM、1.47(或1.5)mM、0.49(或0.5)mM和1.00%(或1.0%或1%)(w/v)。在F3中,NaCl、KCl、Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>、KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、MgCl<sub>2</sub>和蔗糖的浓度可以

分别表示为171.80 (或171.8或172) mM、2.68 (或2.7) mM、8.10 (或8.1或8) mM、1.47 (或1.5) mM、1.40 (或1.4) mM和1.00% (或1.0%或1%) (w/v)。

[0061] 药物组合物还可以包含一种或多种防腐剂,如抗坏血酸(维生素C)、亚硫酸盐、山梨酸盐、苯甲酸盐、苯酚、间甲酚、苯甲醇、苯扎氯铵、苯氧乙醇和/或对羟基苯甲酸酯类(例如,对羟基苯甲酸甲酯)。在一些实施方案中,药物组合物不含有任何添加的防腐剂。

[0062] 药物组合物还可以包含增强药物组合物有效性的其他试剂。药物组合物可以含有递送媒介物,如脂质体、纳米胶囊、微粒、微球、脂质颗粒和囊泡。

[0063] III. 示例性重组AAV

[0064] 在示例性实施方案中,本公开提供了改善的药物组合物,其包含用于因子VIII基因疗法的rAAV载体。称为PF-07055480/SB-525 (或本文中的“SB-525”)的rAAV载体是2/6伪血清型,其包含AAV6衣壳和具有AAV2反向末端重复(ITR)的重组基因组。SB-525的基因组携带编码人因子VIII (FVIII)的B结构域缺失的(BDD)型式的表达盒。参见,例如,WO 2017/074526 (序列#37)。SB-525以静脉内(IV)剂施用并且具备肝脏特异性趋向性,以为患有A型血友病的患者提供因子VIII蛋白的长期肝脏产生。参见WO 2020/028830。分泌的FVIII蛋白与获批的重组抗血友病因子(**Refacto®**和**Xyntha®**)具有相同的氨基酸序列。

[0065] SB-525的基因组包含人因子VIII BDD型式的表达盒,其具有下文所示的氨基酸序列:

[0066] MQIELSTCFFLCCLRFCFSATRRYYLGAVELSWDYMQSDLGELPVDARFPFPRVPKSFPP  
NTSVVYKKTTFVEFTDHLFNIAPRPPWMGLLGPTIQAEVYDTVVITLKNMASHPVSLH  
AVGVSYWKA SEGAEYDDQTSQREKEDDKVFP GGSHTYVWQVLKENGPMASDPLCLTYSY  
LSHVDLVKDLNSGLIGALLVCREGLAKEKTQTLHKFILLFAVFDEGKSWHSETKNSLM  
QDRDAASARAWPKMHTVNGYVNRSLPGLIGCHRKSVYWHVIGMGTTPEVHSIFLEGHTF  
LVRNHRQASLEISPITFLTAQTLLMDLGQFLLFCHISSHQHDGMEAYVKVDSCPEEPQL  
RMKNNEEAEDYDDDLTDSEMDVVRFD DDDNSPSFIQIRSVAKKH PKTWVHYIAAEEEDWD  
YAPLV LAPDDRSYKSQYLNNGPQRIGRKYKKVRFMAYTDETFKTREAIQHESGILGPLL  
YGEVGD TLLIIFKNQASRPYNIYPHGITDVRPLYSRRLPKGVKHLKDFPILPGEIFKYK  
WTVTVEDGPTKSDPRCLTRYYSFVNMERDLASGLIGPLLICYSVDQQRGNQIMSDKR  
NVILFSVFDENRSWYLTENIQRF LNPAGVQLEDPEFQASNIMHSINGYVFDLSQLSVC  
LHEVAYWYILSIGAQTDFLSVFFSGYTFKHKMVYEDTLTLFPFSGETVFM SMENPGLWI  
LGCHNSDFRNRGMTALLKVSSCDKNTGDYEDSYEDISAYLLSKNNAIEPRSF SQNPV  
LKRHQREITRTTLQSDQEEIDYDDTISVEMKKEDFDIYDEDENQSPRSFQKKTRHYFIA  
AVERLWDYGMSSSPHVLNRNRAQSGSVPQFKKVVFQEFTDGSFTQPLYRGELNEHLGLLG  
PYIRAEVEDNIMVTFRNQASRPYSFYSSLISYEEDQRQGAEPKRFVKNPNETKTYFWKV  
QHMAPTKDEFDCKAWAYFSDVDLEKDVHSGLIGPLLVCHTNTLNPAHGRQVTVQEFAL  
FFTIFDETKSWYFTENMERNCRAPCNIQMEDPTFKENYRFHAINGYIMDTLPGLVMAQD  
QRIRWYLLSMGSNENIHSIHFSGHVFTVRKKEEYKMALYNLYPGVFETVEMLPSKAGIW  
RVECLIGEHLHAGMSTLFLVYSNKCQTPLGMASGHIRDFQITASGQYGQWAPKLARLHY  
SGSINAWSTKEPFSWIKVDLLAPMIIHG IKTQGARQKFSSLYISQFIIMYSLDGKKWQT  
YRGNSTGTLMVFFGNVDSSGIKHNI FNPPIIARYIRLHPHTHYSIRSTLRMELMGCDLNS  
CSMPLGMESKAISDAQITASSYFTNM FATWSPSKARLHLQGRSNAWRPQVNNPKEWLQV  
DFQKTMKVTVGTTQGVKSLLTSMYVKEFLISSQDGHQWTLFFQNGKVVFQGNQDSFT  
PVVNSLD PPLLTRYLRIHPQSWVHQIALRMEVLGCEAQDLY (SEQ ID NO:1)

[0068] SEQ ID NO:1的信号肽部分显示在上面的方框中并且在蛋白质分泌时被切除。

[0069] SB-525基因组包含以下核苷酸序列:

[0070]

```

1   CTGCGCGCTC GCTCGCTCAC TGAGGCCGCC CGGGCAAAGC CCGGGCGTCG GGCGACCTTT
61  GGTCGCCCCG CCTCAGTGAG CGAGCGAGCG CGCAGAGAGG GAGTGGCCAA CTCCATCACT
121 AGGGGTTTCCT GCGGCCTAAG CTTGGAACCA TTGCCACCTT CAGGGGGAGG CTGCTGGTGA
181 ATATTAACCA AGATCACCCC AGTTACCGGA GGAGCAAACA GGGACTAAGT TCACACGCGT
241 GGTACCGTCT GTCTGCACAT TTCGTAGAGC GAGTGTTCGG ATACTCTAAT CTCCCTAGGC
301 AAGGTTcata TTTGTGTAGG TTACTTATTC TCCTTTTGTG GACTAAGTCA ATAATCAGAA
361 TCAGCAGGTT TGGAGTCAGC TTGGCAGGGA TCAGCAGCCT GGGTTGGAAG GAGGGGGTAT
421 AAAAGCCCCC TCACCAGGAG AAGCCGTCAC ACAGATCCAC AAGCTCCTGA AGAGGTAAGG
481 GTTTAAGTTA TCGTTAGTTC GTGCACCATT AATGTTTAAT TACCTGGAGC ACCTGCCTGA
541 AATCATTTTT TTTTCAGGTT GGCTAGTATG CAGATCGAGC TCTCCACCTG CTTCTTTCTG
601 TGCCTGTTGA GATTCTGCTT CAGCGCCACC AGGAGATACT ACCTGGGGGC TGTGGAGCTG
661 AGCTGGGACT ACATGCAGTC TGACCTGGGG GAGCTGCCTG TGGATGCCAG GTTCCCCCCC
721 AGAGTGCCCA AGAGCTTCCC CTTCAACACC TCTGTGGTGT ACAAGAAGAC CCTGTTTGTG
781 GAGTTCACCT ACCACCTGTT CAACATTGCC AAGCCCAGGC CCCCCGGAT GGGCCTGCTG
841 GGCCCCACCA TCCAGGCTGA GGTGTATGAC ACTGTGGTGA TCACCTGAA GAACATGGCC
901 AGCCACCCTG TGAGCCTGCA TGCTGTGGGG GTGAGCTACT GGAAGGCCTC TGAGGGGGCT
961 GAGTATGATG ACCAGACGAG CCAGAGGGAG AAGGAGGATG ACAAGGTGTT CCTGGGGGCT
1021 AGCCACACCT ATGTGTGGCA GGTGCTGAAG GAGAATGGCC CCATGGCCTC TGACCCCTG
1081 TGCCTGACCT ACAGCTACCT GAGCCATGTG GACCTGGTGA AGGACCTGAA CTCTGGCCTG
1141 ATTGGGGCCC TGCTGGTGTG CAGGGAGGGC AGCCTGGCCA AGGAGAAGAC CCAGACCCTG
1201 CACAAGTTCA TCCTGCTGTT TGCTGTGTTT GATGAGGGCA AGAGCTGGCA CTCTGAAACC
1261 AAGAACAGCC TGATGCAGGA CAGGGATGCT GCCTCTGCCA GGGCCTGGCC CAAGATGCAC
1321 ACTGTGAATG GCTATGTGAA CAGGAGCCTG CCTGGCCTGA TTGGCTGCCA CAGGAAGTCT
1381 GTGTACTGGC ATGTGATTGG CATGGGCACC ACCCTGAGG TGCACAGCAT CTTCTGGAG
1441 GGCCACACCT TCCTGGTCAG GAACCACAGG CAGGCCAGCC TGGAGATCAG CCCCATCACC
1501 TTCCTGACTG CCCAGACCCT GCTGATGGAC CTGGGCCAGT TCCTGCTGTT CTGCCACATC
1561 AGCAGCCACC AGCATGATGG CATGGAGGCC TATGTGAAGG TGGACAGCTG CCCTGAGGAG
1621 CCCAGCTGA GGATGAAGAA CAATGAGGAG GCTGAGGACT ATGATGATGA CCTGACTGAC
1681 TCTGAGATGG ATGTGGTGAG GTTTGATGAT GACAACAGCC CCAGCTTCAT CCAGATCAGG
1741 TCTGTGGCCA AGAAGCACC CAAGACCTGG GTGCACTACA TTGCTGCTGA GGAGGAGGAC
1801 TGGGACTATG CCCCCCTGGT GCTGGCCCCG GATGACAGGA GCTACAAGAG CCAGTACCTG
1861 AACAAATGGC CCCAGAGGAT TGGCAGGAAG TACAAGAAGG TCAGGTTTCAT GGCCTACACT
1921 GATGAAACCT TCAAGACCAG GGAGGCCATC CAGCATGAGT CTGGCATCCT GGGCCCCCTG
1981 CTGTATGGGG AGGTGGGGGA CACCCTGCTG ATCATCTTCA AGAACCAGGC CAGCAGGCCC
2041 TACAACATCT ACCCCCATGG CATCACTGAT GTGAGGCCCC TGTACAGCAG GAGGCTGCCC
2101 AAGGGGGTGA AGCACCTGAA GGACTTCCCC 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 AGGTTTCCTG CCAACCCTGC TGGGGTGCAG CTGGAGGACC CTGAGTTCCA GGCCAGCAAC
2461 ATCATGCACA GCATCAATGG CTATGTGTTT GACAGCCTGC AGCTGTCTGT GTGCCTGCAT
2521 GAGGTGGCCT ACTGGTACAT CCTGAGCATT GGGGCCCAGA 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 GGTGTTCCAG GAGTTCAGT ATGGCAGCTT CACCCAGCCC
3181 CTGTACAGAG GGGAGCTGAA TGAGCACCTG GGCCTGCTGG GCCCTACAT CAGGGCTGAG
3241 GTGGAGGACA ACATCATGGT GACCTTCAGG AACCAGGCCA GCAGGCCCTA CAGCTTCTAC
3301 AGCAGCCTGA TCAGCTATGA GGAGGACCAG AGGCAGGGGG CTGAGCCCAG GAAGAACTTT
3361 GTGAAGCCCA ATGAAACCAA GACCTACTTC TGGAAGGTGC AGCACCACAT GGCCCCCACC
3421 AAGGATGAGT TTGACTGCAA GGCCTGGGCC TACTTCTCTG ATGTGGACCT GGAGAAGGAT
3481 GTGCACTCTG GCCTGATTGG CCCCCTGCTG GTGTGCCACA CCAACACCCCT GAACCTGCC
3541 CATGGCAGGC AGGTGACTGT GCAGGAGTTT GCCCTGTTCT TCACCATCTT TGATGAAACC
3601 AAGAGCTGGT ACTTCACTGA GAACATGGAG AGGAAGTGA GGGCCCCCTG CAACATCCAG
3661 ATGGAGGACC CCACCTTCAA GGAGAACTAC AGGTTCCATG CCATCAATGG CTACATCATG
3721 GACACCCTGC CTGGCCTGGT GATGGCCCAG GACCAGAGGA TCAGGTGGTA CCTGCTGAGC
3781 ATGGGCAGCA ATGAGAACAT CCACAGCATC CACTTCTCTG GCCATGTGTT CACTGTGAGG
3841 AAGAAGGAGG AGTACAAGAT GGCCCTGTAC AACCTGTACC CTGGGGTGTG TGAGACTGTG
3901 GAGATGCTGC CCAGCAAGGC TGGCATCTGG AGGGTGGAGT GCCTGATTGG GGAGCACCTG
3961 CATGCTGGCA TGAGCACCCT GTTCTGTTG TACAGCAACA AGTGCCAGAC CCCCCTGGGC
[0071] 4021 ATGGCCTCTG GCCACATCAG GGAATTCAG ATCACTGCCT CTGGCCAGTA TGGCCAGTGG
4081 GCCCCCAAGC TGGCCAGGCT GCACTACTCT GGCAGCATCA ATGCCTGGAG CACCAAGGAG
4141 CCCTTCAGCT GGATCAAGGT GGACCTGCTG GCCCCATGA TCATCCATGG CATCAAGACC
4201 CAGGGGGCCA GGCAGAAGTT CAGCAGCCTG TACATCAGCC AGTTCATCAT CATGTACAGC
4261 CTGGATGGCA AGAAGTGGCA GACCTACAGG GGCAACAGCA CTGGCACCCT GATGGTGTTC
4321 TTTGGCAATG TGGACAGCTC TGGCATCAAG CACAACATCT TCAACCCCCC CATCATTGCC
4381 AGATACATCA GGCTGCACCC CACCCACTAC AGCATCAGGA GCACCCTGAG GATGGAGCTG
4441 ATGGGCTGTG ACCTGAACAG CTGCAGCATG CCCCTGGGCA TGGAGAGCAA GGCCATCTCT
4501 GATGGCCAGA TCACTGCCAG CAGCTACTTC ACCAACATGT TTGCCACCTG GAGCCCCAGC
4561 AAGGCCAGGC TGCATCTGCA GGGCAGGAGC AATGCCTGGA GGCCCCAGGT CAACAACCCC
4621 AAGGAGTGGC TGCAGGTGGA CTTCCAGAAG ACCATGAAGG TGAAGTGGGT GACCACCCAG
4681 GGGGTGAAGA GCCTGCTGAC CAGCATGTAT GTGAAGGAGT TCCTGATCAG CAGCAGCCAG
4741 GATGGCCACC AGTGGACCCT GTTCTTCCAG AATGGCAAGG TGAAGTGTG CCAGGGCAAC
4801 CAGGACAGCT TCACCCCTGT GGTGAACAGC CTGGACCCCC CCCTGCTGAC CAGATACCTG
4861 AGGATTCACC CCCAGAGCTG GGTGCACCAG ATTGCCCTGA GGATGGAGGT GCTGGGCTGT
4921 GAGGCCAGG ACCTGTACTG AGGATCCAAT AAAATATCTT TATTTTCATT ACATCTGTGT
4981 GTTGGTTTTT TGTGTGTTTT CCTGTAACGA TCGGGCTCGA GCGCAGGAAC CCCTAGTGAT
5041 GGAGTTGGCC ACTCCCTCTC TGC GCGCTCG CTCGCTCACT GAGGCCGCCC GGGCTTTGCC
5101 CGGGCGGCCT CAGTGAGCGA GCGAGCGCGC AG (SEQ ID NO:2)

```

[0072] 在上述序列中,左侧(5') ITR(AAV2 ITR)跨越核苷酸1-130,右侧(3') ITR(AAV2 ITR)跨越核苷酸5025-5132。两个ITR均已加方框。

#### [0073] IV. 重组AAV配制剂的用途

[0074] 本发明的药物组合物可以在包含小瓶(例如,预处理的玻璃小瓶或COP小瓶)和使用说明书的制品(例如,试剂盒)中提供。在一些实施方案中,每个小瓶在0.5-50mL(例如,1-10mL)中含有约 $1\text{E}+11$ 至 $1\text{E}+15\text{vg}$ 每mL的AAV。在特定的实施方案中,每个小瓶含有 $5\text{E}+12$ 至 $1\text{E}+14/\text{mL}$ (例如, $1\text{E}+13\text{vg}/\text{mL}$ )。在某些实施方案中,每个小瓶在6mL中含有 $6\text{E}+13\text{vg}$ 。

[0075] 可以将组合物一次或多于一次施用于患者。例如,可以将组合物以不少于1个月、3个月、6个月、9个月或一年的间隔施用于患者。在一些实施方案中,可以将组合物以不少于两年、五年、七年、十年或十五年的间隔施用于患者。可以将药物组合物通过适合待治疗疾病的途径提供给有此需要的患者。例如,可以通过静脉内注射、动脉内注射、颅内注射、腹膜内注射、门静脉注射或肌肉注射来施用组合物。例如,可以将SB-525药物组合物以 $1\text{E}+11$ 至 $1\text{E}+15\text{vg}/\text{kg}$ ,如 $1\text{E}+11$ 至 $1\text{E}+14$ (例如, $1\text{E}+12$ 至 $1\text{E}+14$ )  $\text{vg}/\text{kg}$ 经静脉内提供给A型血友病患者。在一些实施方案中,可以将SB-525药物组合物以 $5\text{E}+11$ 、 $6\text{E}+11$ 、 $7\text{E}+11$ 、 $8\text{E}+11$ 、 $9\text{E}+11$ 、 $1\text{E}+12$ 、 $2\text{E}+12$ 、 $3\text{E}+12$ 、 $4\text{E}+12$ 、 $5\text{E}+12$ 、 $6\text{E}+12$ 、 $7\text{E}+12$ 、 $8\text{E}+12$ 、 $9\text{E}+12$ 、 $1\text{E}+13$ 、 $2\text{E}+13$ 、 $3\text{E}+13$ 、 $4\text{E}+13$ 、 $5\text{E}+$

13、6E+13、7E+13、8E+13、9E+13或1E+14vg/kg经静脉内提供给A型血友病患者。在一些实施方案中,将SB-525组合物以约6E+13vg/kg的剂量经静脉内提供给A型血友病患者。

[0076] 在一些实施方案中,患者患有重度或中度A型血友病。在进一步的一些实施方案中,患者没有抑制剂(因子VIII的同种抗体)。在某些实施方案中,患者不具有针对AAV6的中和抗体。患者可以是成人或青少年患者( $\geq 12$ 岁)或儿科患者( $< 12$ 岁)。

[0077] 除非本文另有定义,与本公开相关的科学术语和技术术语应具有本领域普通技术人员通常理解的含义。示例性方法和材料在下文描述,尽管与本文描述的方法和材料相似或等同的方法和材料也可以用于本公开的实践或测试。在冲突的情况下,以本说明书(包括定义)为准。通常,与本文所述的心脏病学、医学、药学和药物化学以及细胞生物学相关的命名法和技术是本领域熟知和常用的那些。酶促反应和纯化技术根据制造商的说明书进行,如本领域通常完成的或如本文所述。此外,除非上下文另有要求,单数术语应包括复数,并且复数术语应包括单数。贯穿本说明书和实施例,词语“具有”和“包含”或如“有”、“具有”、“包含”或“包括”的变体将被理解为意指包含所述的整数或整数组但不排除任何其他整数或整数组。本文提及的所有出版物和其他参考文献均通过引用整体并入。尽管本文引用了许多文件,但该引用并不构成承认这些文件中的任何文件构成本领域公知常识的一部分。如本文所用,应用于一个或多个感兴趣的值的术语“大约”或“约”是指类似于所述参考值的值。在某些实施方案中,该术语是指在所述参考值的任一方向上(大于或小于)落在10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%、1%或更小范围内的值的范围,除非另有说明或从上下文中明显看出。

[0078] 为了更好地理解本发明,列出了以下实施例。这些实施例仅出于示例目的,而不应被解释为以任何方式限制本发明的范围。

## 实施例

[0079] 以下实施例描述了发明人发现当前的SB-525配制剂在冷冻/解冻循环(评估生物产品保存期限和长期稳定性的常见测试)时形成沉淀物的研究。发明人发现沉淀物也在单独的缓冲液配制剂(即,不含活性病毒载体成分的缓冲液配制剂)中形成。因此,发明人开始寻找能够避免这个问题的新的配制剂。

[0080] 在该研究中,SB-525病毒制剂在以大约1.0E+13vg/mL在添加了CaCl<sub>2</sub>、MgCl<sub>2</sub>、35mM NaCl、1%蔗糖和0.05% **Kolliphor®P 188**(泊洛沙姆188)的磷酸盐缓冲盐水(PBS)中制备和配制,以5mL装入6mL Aseptic Technologies crystal封闭小瓶中,并在 $\leq -65^{\circ}\text{C}$ 下储存。对于稳定性测试,SB-525组合物在 $-0^{\circ}\text{C}$ 、 $5^{\circ}\text{C}$ 和 $25^{\circ}\text{C}$ 下处于稳定状态最长达24个月(表5)。还进行了五个不受控制的冷冻/解冻循环(F/T)(表1)和24小时搅拌(AG)(表2)。根据表5至表8分析了药物产品(DP)质量属性。

[0081] 实施例1:冷冻/解冻循环和搅拌测试

[0082] 材料和方法

[0083] SB-525在含有以下成分的配制剂缓冲液中以1.0E+13vg/mL标称浓度(nominal)提供:0.90mM CaCl<sub>2</sub>、0.49mM MgCl<sub>2</sub>、2.68mM KCl、1.47mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、172mM NaCl、8.10mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>、1% (w/v)蔗糖、0.05% (w/v)泊洛沙姆188,pH 7.36。23个小瓶储存在 $-70^{\circ}\text{C}$ ,11个储存在 $5^{\circ}\text{C}$ ,8个储存在 $25^{\circ}\text{C}$ 。

[0084] 对于冷冻/解冻 (F/T) 循环测试, 样品如表1所示不受控制地F/T循环了三个和五个循环。

[0085] 表1.DP不受控制的F/T循环

| F/T 循环 | 第 1 天 | 第 2 天 |       | 第 3 天 |       | 第 4 天 |       | 第 5 天 |       |
|--------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
|        | 4 pm  | 8 am  | 4 pm  | 8 am  | 4 pm  | 8 am  | 4 pm  | 8 am  | 4 pm  |
| 3      | -80°C | 25°C  | -80°C | 25°C  | -80°C | 25°C  |       |       |       |
| 5      | -80°C | 25°C  | -80°C | 25°C  | -80°C | 25°C  | -80°C | 25°C  | -80°C |

[0087] 对于搅拌测试, 样品如表2所示在室温下搅拌。

[0088] 表2.DP搅拌设置

| 搅拌稳定性   | T <sub>0</sub>       | T <sub>24hr</sub> |
|---------|----------------------|-------------------|
|         | 第 1 天(8 am)          | 第 2 天(8 am)       |
| 300 rpm | 使用稳定性 T <sub>0</sub> | 拉取 24Hr 材料        |

[0090] 对储存在-70°C、5°C、25°C的小瓶分别分析 (i) 外观 (液体)、pH、动态光散射 (DLS) 和高精度液体颗粒计数 (HIAC); (ii) vg同一性 (qPCR)、vg滴度 (qPCR)、衣壳滴度 (ELISA)、衣壳同一性 (ELISA) 和感染滴度 (TCID<sub>50</sub>); (iii) 体外FVIII活性 (生物测定); 或 (iv) UV 260/280、还原性CE-SDS、SEC滴度\_260/280。

[0091] 分析经过F/T循环的样品的 (i) 外观 (液体)、pH、渗透压、DLS、HIAC; (ii) vg滴度 (qPCR)、衣壳滴度和同一性 (ELISA)、还原性SDS-PAGE和感染滴度 (TCID<sub>50</sub>); 或 (iii) UV 260/280、SEC滴度\_260/280、RP-HPLC、体外FVIII活性 (生物测定) 和还原性CE-SDS。

[0092] 分析经过24小时搅拌 (AG) 的样品的 (i) 外观 (液体)、pH、渗透压、DLS和HIAC; (ii) vg滴度 (qPCR)、衣壳滴度和同一性 (ELISA)、还原性SDS-PAGE、感染滴度 (TCID<sub>50</sub>); 或 (iii) UV 260/280、SEC滴度\_260/280、RP-HPLC、体外FVIII活性 (生物测定) 和还原性CE-SDS。

[0093] 结果

[0094] SB-525DP稳定性、5个不受控制的F/T循环和24小时搅拌臂的结果如下文所述。

[0095] 如下文表3所示, 当样品储存在测试的条件下最长达一个月时, 颜色、净度、pH、通过DLS测量的流体动力学半径、vg滴度、衣壳滴度、通过SDS-PAGE测量的衣壳纯度、感染滴度、UV 260/280 (空衣壳: 完整衣壳比率的替代性测量) 和生物活性 (相对效力%) 没有显著变化。在5°C和25°C时, 可见颗粒发生了变化。所有样品都被冷冻并在T零 (T<sub>0</sub>) 时呈现白色和不透明。

[0096] 表3. 稳定性结果

| 测试     |    | 储存    | T <sub>0</sub> *   | T <sub>1M</sub> <sup>2</sup> |
|--------|----|-------|--------------------|------------------------------|
| 外观, 液体 | 颜色 | -70°C | 无色, 透明, 无沉淀物, 无污染物 | B6                           |
|        |    | 5°C   |                    | B6                           |
|        |    | 25°C  |                    | B6                           |
|        | 净度 | -70°C |                    | <= Ref. I                    |
|        |    | 5°C   |                    | <= Ref. I                    |
|        |    | 25°C  |                    | <= Ref. I                    |

[0098]

| 测试                                               |                                      | 储存    | T <sub>0</sub> *                                                                     | T <sub>1M</sub> <sup>2</sup>                                                         |
|--------------------------------------------------|--------------------------------------|-------|--------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------|
|                                                  | 可见颗粒                                 | -70°C |                                                                                      | EFVP                                                                                 |
|                                                  |                                      | 5°C   |                                                                                      | 1-5 个颗粒                                                                              |
|                                                  |                                      | 25°C  |                                                                                      | TMTC                                                                                 |
| pH                                               |                                      | -70°C | 7.3                                                                                  | 7.3                                                                                  |
|                                                  |                                      | 5°C   |                                                                                      | 7.3                                                                                  |
|                                                  |                                      | 25°C  |                                                                                      | 7.1                                                                                  |
| DLS                                              | Z-平均值-扩散系数<br>(cm <sup>2</sup> /s)   | -70°C | -                                                                                    | 1.70e <sup>-7</sup>                                                                  |
|                                                  |                                      | 5°C   |                                                                                      | 1.70e <sup>-7</sup>                                                                  |
|                                                  |                                      | 25°C  |                                                                                      | 1.70e <sup>-7</sup>                                                                  |
|                                                  | Z- 平 均 值 - 半 径<br>(nm)               | -70°C | 22.3 (直径)                                                                            | 14.7                                                                                 |
|                                                  |                                      | 5°C   |                                                                                      | 14.8                                                                                 |
|                                                  |                                      | 25°C  |                                                                                      | 14.4                                                                                 |
|                                                  | 峰 1- 扩 散 系 数<br>(cm <sup>2</sup> /s) | -70°C | -                                                                                    | 1.74e <sup>-7</sup>                                                                  |
|                                                  |                                      | 5°C   |                                                                                      | 1.69e <sup>-7</sup>                                                                  |
|                                                  |                                      | 25°C  |                                                                                      | 1.70e <sup>-7</sup>                                                                  |
|                                                  | 峰 1-半径(nm)                           | -70°C |                                                                                      | 14.2                                                                                 |
|                                                  |                                      | 5°C   |                                                                                      | 14.6                                                                                 |
|                                                  |                                      | 25°C  |                                                                                      | 14.5                                                                                 |
|                                                  | 峰 2- 扩 散 系 数<br>(cm <sup>2</sup> /s) | -70°C |                                                                                      | 9.42e <sup>-10</sup>                                                                 |
|                                                  |                                      | 5°C   |                                                                                      | 1.26e <sup>-9</sup>                                                                  |
|                                                  |                                      | 25°C  |                                                                                      | -                                                                                    |
|                                                  | 峰 2-半径(nm)                           | -70°C |                                                                                      | 2658.7                                                                               |
|                                                  |                                      | 5°C   |                                                                                      | 2261.8                                                                               |
|                                                  |                                      | 25°C  |                                                                                      | -                                                                                    |
| 通过 qPCR 测量的 vg 滴度<br>(vg/mL) <sup>1</sup>        |                                      | -70°C | 8.74E+12                                                                             | 9.77E+12                                                                             |
|                                                  |                                      | 5°C   |                                                                                      | 1.01E+13                                                                             |
|                                                  |                                      | 25°C  |                                                                                      | 9.98E+12                                                                             |
| 衣壳 ELISA (衣壳/mL)                                 |                                      | -70°C | 2.76E+13                                                                             | 2.52E+13                                                                             |
|                                                  |                                      | 5°C   |                                                                                      | 2.53E+13                                                                             |
|                                                  |                                      | 25°C  |                                                                                      | 2.66E+13                                                                             |
| SDS-PAGE                                         |                                      | -70°C | VP1、VP2 和<br>VP3 与参考值可<br>比。未观察到其<br>他条带≥灵敏度<br>对照(VP1、<br>VP2、VP3 组合<br>的纯度%)= 100% | VP1、VP2 和<br>VP3 与参考值可<br>比。未观察到其<br>他条带≥灵敏度<br>对照(VP1、<br>VP2、VP3 组合<br>的纯度%)= 100% |
|                                                  |                                      | 5°C   |                                                                                      |                                                                                      |
|                                                  |                                      | 25°C  |                                                                                      |                                                                                      |
| 感染滴度 TCID <sub>50</sub> (TCID <sub>50</sub> /mL) |                                      | -70°C | 1.12E+9                                                                              | 3.56E+9                                                                              |
|                                                  |                                      | 5°C   |                                                                                      | 2.00E+9                                                                              |
|                                                  |                                      | 25°C  |                                                                                      | 1.12E+9                                                                              |
| SEC UV 260/280 比率                                |                                      | -70°C | 1.37                                                                                 | 1.36                                                                                 |

| [0099] | 测试                             | 储存    | T <sub>0</sub> * | T <sub>1M</sub> <sup>2</sup> |
|--------|--------------------------------|-------|------------------|------------------------------|
|        |                                | 5°C   |                  | 1.36                         |
|        |                                | 25°C  |                  | 1.36                         |
|        |                                | -70°C |                  | 80                           |
|        | 体外 FVIII 活性/功能性生物测定<br>(相对效力%) | 5°C   | 85 <sup>3</sup>  | 80                           |
|        |                                | 25°C  |                  | 69                           |

[0100] \*T<sub>0</sub>:除功能性生物测定外,所有分析均在每次发布测试中进行

[0101] <sup>1</sup>通过qPCR对载体基因组同一性和滴度进行了T<sub>0</sub>重新测试

[0102] <sup>2</sup>由于DP中检测到颗粒,研究在T<sub>1M</sub>后终止;调查起始

[0103] <sup>3</sup>针对不同的参考材料对生物测定(相对效力%)进行T<sub>0</sub>重新测试

[0104] EFVP:基本上不含可见颗粒

[0105] TMTC:数量过多而无法计数

[0106] N.T.:未测试

[0107] 如表4所示,在所有储存条件下一个个月后衣壳纯度没有显著变化。

[0108] 表4.衣壳纯度稳定性结果

| [0109] | 时间点             | 储存    | 衣壳(%) | VP1 (%) | VP2 (%) | VP3 (%) | 其他(%) |
|--------|-----------------|-------|-------|---------|---------|---------|-------|
|        | T <sub>0</sub>  |       | 94.3  | 2.2     | 3.4     | 94.4    | 5.7   |
|        | T <sub>1M</sub> | -70°C | 95.1  | 1.1     | 3.1     | 95.8    | 4.9   |
|        |                 | 5°C   | 95.0  | 2.1     | 3.2     | 94.7    | 5.0   |
|        |                 | 25°C  | 94.8  | 1.9     | 3.0     | 95.1    | 5.2   |

[0110] 如表5所示,在所有储存条件下一个个月后,没有明显的聚集或高分子量物质(HMWS)的形成(NMT:不超过;LOQ:定量限)。

[0111] 表5.在预期、加速和受压储存条件下一个个月后的SEC滴度稳定性结果

| [0112] | 时间点             | 储存    | 病毒颗粒(vp)滴度<br>(vp/mL) | 单体(%) | HMWS (%) | LOQ      |
|--------|-----------------|-------|-----------------------|-------|----------|----------|
|        | T <sub>0</sub>  |       | 5.12E+13              | 100   | NMT 1.0  | 1.01E+12 |
|        | T <sub>1M</sub> | -70°C | 2.65E+13              | 100   | NMT 1.0  | 1.01E+12 |
|        |                 | 5°C   | 2.57E+13              | 100   | NMT 1.0  | 1.01E+12 |
|        |                 | 25°C  | 3.31E+13              | 100   | NMT 1.0  | 1.01E+12 |

[0113] 如表6所示,在所有储存条件下一个个月后亚可见(subvisible)颗粒(根据HIAC)没有显著增加。所有时间点均显示颗粒在对于≥10μm和≥25μm范围内低于USP<787>标准,其中接受标准是每个容器不超过6,000个>10μm的颗粒并且每个容器不超过600个>25μm的颗粒。

[0114] 表6.HIAC稳定性结果

| [0115] | 储存    | T <sub>0</sub> (颗粒/容器) |         | T <sub>1M</sub> (颗粒/mL) |        |        |         |         |
|--------|-------|------------------------|---------|-------------------------|--------|--------|---------|---------|
|        |       | > 10 μm                | > 25 μm | > 2 μm                  | > 5 μm | > 8 μm | > 10 μm | > 25 μm |
|        | -70°C | 10                     | 3       | 143                     | 11     | 1      | 0       | 0       |
|        | 5°C   |                        |         | 626                     | 96     | 24     | 15      | 0       |
|        | 25°C  |                        |         | 478                     | 94     | 15     | 4       | 1       |

[0116] 如表7所示,在F/T/AG压力后,颜色、净度、pH、通过DLS测量的流体动力学半径、vg

滴度、衣壳滴度、感染滴度、UV 260/280 (空衣壳:完整衣壳比率的替代物)、通过RP-HPLC测量的衣壳纯度和生物活性(相对效力%)没有显著变化。F/T的可见颗粒发生了变化。

[0117] 表7. 不受控制的F/T循环和24小时AG结果

[0118]

| 测试                                   |                                    | 处理  | 结果                                                              |
|--------------------------------------|------------------------------------|-----|-----------------------------------------------------------------|
| 外观                                   | 颜色                                 | F/T | B9 <sup>1</sup>                                                 |
|                                      |                                    | AG  | B9                                                              |
|                                      | 净度                                 | F/T | <= REF_1 <sup>2</sup>                                           |
|                                      |                                    | AG  | <= REF_1                                                        |
|                                      | 可见颗粒                               | F/T | TMTC                                                            |
|                                      |                                    | AG  | 基本上不含可见颗粒(EFVP)                                                 |
| pH                                   |                                    | F/T | 7.2                                                             |
|                                      |                                    | AG  | 7.3                                                             |
| 渗透压(mOsm/kg)                         |                                    | F/T | 387                                                             |
|                                      |                                    | AG  | 388                                                             |
| DLS                                  | Z-平均值-扩散系数<br>(cm <sup>2</sup> /s) | F/T | 1.70e <sup>-7</sup>                                             |
|                                      |                                    | AG  | 1.67e <sup>-7</sup>                                             |
|                                      | Z-平均值-半径(nm)                       | F/T | 14.5                                                            |
|                                      |                                    | AG  | 14.7                                                            |
|                                      | 峰 1-扩散系数(cm <sup>2</sup> /s)       | F/T | 1.69e <sup>-7</sup>                                             |
|                                      |                                    | AG  | 1.56e <sup>-7</sup>                                             |
|                                      | 峰 1-半径(nm)                         | F/T | 14.5                                                            |
|                                      |                                    | AG  | 15.7                                                            |
| 通过 qPCR 测量的 Vg 滴度(vg/mL)             |                                    | F/T | 8.44E+12                                                        |
|                                      |                                    | AG  | 8.63E+12                                                        |
| 衣壳 ELISA (衣壳/mL)                     |                                    | F/T | 2.08E+13                                                        |
|                                      |                                    | AG  | 2.00E+13                                                        |
| SDS-PAGE                             |                                    | F/T | VP1、VP2 和 VP3 与参考值可比。未观察到其他条带 ≥ 灵敏度对照(VP1、VP2、VP3 组合的纯度%)= 100% |
|                                      |                                    | AG  |                                                                 |
| 感染滴度 TCID50 (TCID <sub>50</sub> /mL) |                                    | F/T | 9.29E+8                                                         |
|                                      |                                    | AG  | 2.42E+9                                                         |

[0119]

| 测试                             |       | 处理  | 结果   |
|--------------------------------|-------|-----|------|
| UV 260/280 比率                  |       | F/T | 1.32 |
|                                |       | AG  | 1.32 |
| SEC UV 260/260 比率              |       | F/T | 1.35 |
|                                |       | AG  | 1.35 |
| RP-HPLC                        | 衣壳(%) | F/T | 98.9 |
|                                |       | AG  | 99.0 |
|                                | 其他(%) | F/T | 1.1  |
|                                |       | AG  | 1.0  |
| 体外 FVIII 活性/功能性生物测定<br>(相对效力%) |       | F/T | 85   |
|                                |       | AG  | 80   |

[0120] <sup>1</sup>颜色不比列出的参考标准更强烈或更呈乳白色。

[0121] <sup>2</sup>净度不比列出的参考标准更呈乳白色。

[0122] 如表8所示,在F/T/AG压力后,还原性CE-SDS没有显著变化。

[0123] 表8.5个不受控制的F/T循环和24小时AG CE-SDS-还原性结果

|        |     |       |        |        |        |       |
|--------|-----|-------|--------|--------|--------|-------|
| [0124] | 处理  | 衣壳(%) | VP1(%) | VP2(%) | VP3(%) | 其他(%) |
|        | F/T | 95.1  | 2.0    | 3.0    | 95.0   | 4.9   |
|        | AG  | 95.2  | 2.0    | 3.2    | 94.8   | 4.8   |

[0125] 如表9所示,在F/T/AG压力后,聚集/HMWS形成没有显著变化。

[0126] 表9.5个不受控制的F/T循环和24小时AG SEC滴度结果

|        |     |                   |       |          |          |
|--------|-----|-------------------|-------|----------|----------|
| [0127] | 处理  | 病毒颗粒滴度<br>(vp/mL) | 单体(%) | HMWS (%) | LOQ      |
|        | F/T | 4.95E+13          | 100   | 0        | 1.01E+12 |
|        | AG  | 5.05E+13          | 100   | 0        | 1.01E+12 |

[0128] 如表10所示,在F/T后亚可见颗粒(根据HIAC)显著增加。在F/T后的颗粒对于 $\geq 10\mu\text{m}$ 和 $\geq 25\mu\text{m}$ 范围高于USP<787>标准;而在AG后的颗粒对于 $\geq 10\mu\text{m}$ 和 $\geq 25\mu\text{m}$ 范围低于USP<787>标准。

[0129] 表10.5个不受控制的F/T循环和24小时AG HIAC结果

|        |     |                             |                             |                             |                              |                              |
|--------|-----|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|------------------------------|------------------------------|
| [0130] | 处理  | $\geq 2\mu\text{m}$ (颗粒/mL) | $\geq 5\mu\text{m}$ (颗粒/mL) | $\geq 8\mu\text{m}$ (颗粒/mL) | $\geq 10\mu\text{m}$ (颗粒/mL) | $\geq 25\mu\text{m}$ (颗粒/mL) |
|        | F/T | 24551                       | 14051                       | 8725                        | 6576                         | 710                          |
|        | AG  | 439                         | 41                          | 12                          | 4                            | 0                            |

[0131] 上述结果表明,当在 $-70^{\circ}\text{C}$ 、 $5^{\circ}\text{C}$ 、或 $25^{\circ}\text{C}$ 下储存最长达一个月时,SB-525样品在颜色、净度、pH、流体动力学半径(通过动态光散射测量)、vg滴度、衣壳滴度、感染滴度、空衣壳:完整衣壳比率(通过UV 260/280测量)、生物活性(相对效力%)、衣壳纯度(通过SDS-PAGE、还原性CE-SDS和RP-HPLC测量)或病毒颗粒滴度方面没有显著变化。此外,在F/T或AG压力后,在颜色、净度、pH、流体动力学半径(通过动态光散射测量)、vg滴度、衣壳滴度、感染滴度、空衣壳:完整衣壳比率(通过UV 260/280测量)、生物活性(相对效力%)、衣壳纯度(通过SDS-PAGE、还原性CE-SDS、RP-HPLC测量)或病毒颗粒滴度方面没有显著变化。然而,在F/T后亚可见颗粒(根据HIAC)显著增加,并且在 $5^{\circ}\text{C}$ 和 $25^{\circ}\text{C}$ 下储存一个月后可见颗粒增加。由于这些结果,该研究在一个月时终止。

[0132] 实施例2:F/T后DP小瓶中的微粒物质的表征。

[0133] 对来自上述SB-525配制剂稳定性测试中观察到微粒物质的样品进行进一步分析以进行分离和鉴定。

[0134] 分析了经过5个冻融循环的药物产品样品(“5个F/T后的DP”)和在 $25^{\circ}\text{C}$ 下储存一个月的样品(在 $25^{\circ}\text{C}$ 下1M后的DP)。微粒物质被分离到 $0.8\mu\text{m}$  gold滤光片上。然后使用Keyence VHX6000数码显微镜在部分环形照明下以150x放大倍数在滤光片上成像。然后将滤光片转移到傅里叶变换红外(FTIR)显微镜,在显微镜下获得材料的光谱。将FTIR光谱与已知光谱的KnowItAll数据库进行比较。在 $25^{\circ}\text{C}$ 下1M后部分DP样品也从滤光片上刮到载玻片上,并使用Nikon Eclipse ME600偏光显微镜在平面偏振光和正交偏光镜下成像。切割部分gold滤光片并在配备EDS模块的JEOL6000 SEM下分析。样品还通过拉曼显微镜分析进行了分析。

[0135] 对于所有样品,数字化成像都显示出看似半结晶的白色固体。在正交偏光镜条件

下,“5个F/T后的DP”样品没有展现出任何双折射,表明它是无定形物质或各向同性物质。SEM/EDS分析显示出大部分的氧、磷和钙。FTIR分析将该材料鉴定为盐,但需要进一步鉴定。拉曼显微镜能够检测到磷酸钙的特征峰,表明所有样品中的白色微粒物质都是磷酸钙。图1A-F总结了颗粒表征研究。

[0136] 实施例3:SB-525的重新配制

[0137] 本实施例描述了测试可以避免上文观察到的沉淀问题的新的SB-525配制剂的实验。这些实验评估了SB-525DP在分别重新配制以(1)去除钙,(2)去除钙和镁,或(3)将蔗糖增加至8.5%时的短期稳定性。预期这些变化分别通过(1)去除颗粒的来源,(2)由于 $\text{MgCl}_2$ 的溶解度问题而去除两种二价阳离子,或(3)增加配制剂对冻融压力的稳定性来防止颗粒的生成。两个试验批次进行了缓冲液交换,并且以2.5mL装填到6mL AT小瓶中来模拟表面积与体积(SA/V)装填的最坏情况。装填/完成后,将小瓶进行5次不受控制的冻融循环( $\leq -65^\circ\text{C}$ 至环境温度),然后在 $\leq -65^\circ\text{C}$ (预期储存)、 $2-8^\circ\text{C}$ (受压;液体储存)、 $25^\circ\text{C}$ (加速;液体储存)和 $40^\circ\text{C}$ (侵蚀性/强制降解条件;液体储存)下稳定放置。选择这些条件是为了突出配制剂之间的差异。

[0138] 从澄清的批量收获物中纯化SB-525病毒,并且在含有 $\text{CaCl}_2$ 、 $\text{MgCl}_2$ 、35mM NaCl、1%蔗糖和0.05% **Kolliphor® P 188**(泊洛沙姆188)的磷酸盐缓冲盐水(PBS)中以大约 $1.0\text{E}+13\text{vg/mL}$ 配制,装填到小瓶中,并且在 $\leq -65^\circ\text{C}$ 下储存。

[0139] 材料和方法

[0140] SB-525配制的原料药(bulk drug substance)含有:溶于0.90mM  $\text{CaCl}_2$ 、0.49mM  $\text{MgCl}_2$ 、2.68mM KCl、1.47mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 、172mM NaCl、8.10mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ 、1% (w/v) 蔗糖、0.05% (w/v) 泊洛沙姆188,pH 7.0-7.6的SB-525(标称 $1.0\text{E}+13\text{vg/mL}$ ),无菌过滤并且于 $\leq -65^\circ\text{C}$ 储存在125mL HDPE瓶中。 $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ (无水磷酸氢二钠)、 $\text{KH}_2\text{PO}_4$ (磷酸二氢钾)、 $\text{CaCl}_2$ (二水氯化钙)和 $\text{MgCl}_2$ (六水氯化镁)来源于JT Baker或Fischer。泊洛沙姆188来源于BASF。储存小瓶是6mL Aseptic Technologies(AT) Closed Crystal Vials(Aseptic Technologies;cat#VIA-060000),其是带有主容器密封件、环烯烃共聚物(COC)和原位热塑性弹性体塞子和黄色瓶盖的小瓶。在DP装填之前,将配制的原料药(FBDS)装填到125mL高密度聚乙烯(HDPE)瓶中并冷冻至 $\leq -65^\circ\text{C}$ 。然后将瓶子在环境温度下解冻、更换缓冲液、过滤并使用Aseptic Technologies M1装置将DP装填到6mL AT小瓶中。在大约40psi的压力下,使用50kDa过滤器装置经由TFF对一个试验批次材料进行缓冲液交换,总共进行10个交换体积。第二个试验批次使用Amicon搅拌式过滤器在50kDa NMW PES过滤器上以大约40psi进行缓冲液交换,总共进行10个交换体积。这两种交换方法先前已经用于AAV,没有明显的材料损失或吸附。

[0141] AT小瓶以大约 $1.0\text{E}+13\text{vg/mL}$ 的目标装填2.5mL,以不受控制的速率从 $\leq -65^\circ\text{C}$ 到环境温度条件冷冻解冻循环5次,并且在非GMP存储装置中稳定放置。小瓶进行表11中列出的稳定性拉取计划表,并且通过表12中列出的方法进行测试。表13列出了测试的配制剂。

[0142] 表11.衣壳纯度稳定性计划表

| [0143] | 储存温度(°C)   | T <sub>0</sub> | T <sub>3D</sub> | T <sub>1W</sub> | T <sub>2W</sub> | T <sub>3W</sub> | T <sub>4W</sub> | T <sub>5W</sub> |
|--------|------------|----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
|        | -70 (± 10) | XABCD          | -               | -               | -               | -               | XABC            | XA              |
|        | 5 (± 3)    |                | X               | X               | XA              | X               |                 | XA              |
|        | 25 (± 3)   |                | X               | X               | XAB             | X               |                 | -               |
|        | 40 (± 3)   |                | XABCF           | XA              | X               | XF              | -               | -               |

[0144] 表12. 分析测试

| [0145] | 测试编码 | 测试方法                        |
|--------|------|-----------------------------|
|        | X    | 外观(液体)                      |
|        | A    | pH                          |
|        | A    | SEC-聚集物, UV 260/280, 病毒颗粒滴度 |
|        | B    | 功能性FVIII生物测定                |
|        | C    | HIAC光遮蔽                     |
|        | D    | 渗透压(凝固点降低)                  |
|        | D    | P188                        |
|        | D    | 蔗糖                          |
|        | D    | 还原性毛细管凝胶电泳(rCGE)(比率和纯度)     |
|        | F    | 质谱(脱酰胺)                     |
|        | B    | 载体基因组滴度(qPCR)               |

[0146] 表13. 配制剂

| [0147] | 交换过程                       | 材料  | 制剂       | 与对照的区别                                   |
|--------|----------------------------|-----|----------|------------------------------------------|
|        | Millipore<br>Amicon 搅拌式过滤器 | M05 | 对照       | N/A                                      |
|        |                            | M06 | Ca 阴性    | 去除 CaCl <sub>2</sub>                     |
|        |                            | M07 | Ca/Mg 阴性 | 去除 CaCl <sub>2</sub> 和 MgCl <sub>2</sub> |
|        |                            | M08 | 8.5%蔗糖   | 增加蔗糖至 8.5% (w/v)                         |

[0148] \*对照配制剂(F0): 0.90mM CaCl<sub>2</sub>、0.49mM MgCl<sub>2</sub>、2.68mM KCl、1.47mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、172mM NaCl、8.10mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>、1% (w/v) 蔗糖、0.05% (w/v) 泊洛沙姆188 (P188), pH 7.0-7.6。

[0149] 结果

[0150] 配制剂表征

[0151] 为了确认获得了正确的配制剂, 对SB-525DP配制剂进行了测试以确定渗透压、P188浓度、蔗糖浓度以及通过还原性CGE测试了衣壳比率和纯度。M05-M08的这些测试结果如表14中所示。rCGE测量的衣壳纯度和比率没有显著差异。渗透压在预期范围内, 具体取决于蔗糖水平。M05-M08样品证明了P188的正确浓度。此外, 通过CEDEX确认了所有配制剂的钙和镁的浓度在预期范围内。

[0152] 表14. 配制剂表征

[0153]

| 材料             | 渗透压<br>(mOsm/kg) | 蔗糖<br>(%) | P188<br>(μg/mL) | 纯度(衣壳<br>%) | AAV 比率 |      |      |
|----------------|------------------|-----------|-----------------|-------------|--------|------|------|
|                |                  |           |                 |             | %VP1   | %VP2 | %VP3 |
| M05 - 对照       | 399              | 1.10      | 589             | 95.2        | 2.0    | 3.3  | 94.7 |
| M06 - Ca 阴性    | 391              | 1.00      | 565             | 95.3        | 2.1    | 3.0  | 94.9 |
| M07 - Ca/Mg 阴性 | 417              | 1.00      | 575             | 95.8        | 1.7    | 2.9  | 95.4 |
| M08 - 8.5%蔗糖   | 655              | 8.50      | 568             | 95.2        | 1.8    | 2.6  | 95.6 |

[0154] 载体基因组滴度 (vg/mL)

[0155] M05-M08的载体基因组滴度结果在下表15中呈现。在 $\leq -65^{\circ}\text{C}$ 和 $2-8^{\circ}\text{C}$ 条件下,储存4周后未观察到明显趋势。在 $40^{\circ}\text{C}$ 下3天后,Ca/Mg阴性配制剂的载体基因组滴度呈下降趋势。该结果被认为在测定变异性范围内,但与该配制剂的vp滴度和UV 260/280结果一致。

[0156] 表15. 基因组滴度 (vg/mL)

[0157]

| 配制剂            | 时间点            |                 |                 |                 |                 |                 |
|----------------|----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
|                | T <sub>0</sub> | T <sub>3D</sub> | T <sub>1W</sub> | T <sub>2W</sub> | T <sub>3W</sub> | T <sub>4W</sub> |
| -70℃           |                |                 |                 |                 |                 |                 |
| M05 - 对照       | 7.44E+12       | 未测试             |                 |                 |                 | 7.77E+12        |
| M06 - Ca 阴性    | 7.98E+12       |                 |                 |                 |                 | 7.47E+12        |
| M07 - Ca/Mg 阴性 | 6.33E+12       |                 |                 |                 |                 | 6.24E+12        |
| M08 - 8.5%蔗糖   | 6.23E+12       |                 |                 |                 |                 | 6.56E+12        |
| 5℃             |                |                 |                 |                 |                 |                 |
| M05 - 对照       | 7.44E+12       | 未测试             |                 |                 |                 | 7.39E+12        |
| M06 - Ca 阴性    | 7.98E+12       |                 |                 |                 |                 | 6.95E+12        |
| M07 - Ca/Mg 阴性 | 6.33E+12       |                 |                 |                 |                 | 6.56E+12        |
| M08 - 8.5%蔗糖   | 6.23E+12       |                 |                 |                 |                 | 6.24E+12        |
| 25℃            |                |                 |                 |                 |                 |                 |
| M05 - 对照       | 7.44E+12       | 未测试             |                 | 7.23E+12        | 未测试             | 7.84E+12        |
| M06 - Ca 阴性    | 7.98E+12       |                 |                 | 7.41E+12        |                 | 7.09E+12        |
| M07 - Ca/Mg 阴性 | 6.33E+12       |                 |                 | 6.04E+12        |                 | 5.85E+12        |

[0158]

| 配制剂            | 时间点            |                 |                 |                 |                 |                 |
|----------------|----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
|                | T <sub>0</sub> | T <sub>3D</sub> | T <sub>1W</sub> | T <sub>2W</sub> | T <sub>3W</sub> | T <sub>4W</sub> |
| M08 - 8.5%蔗糖   | 6.23E+12       |                 |                 | 6.11E+12        |                 | 7.01E+12        |
| 40°C           |                |                 |                 |                 |                 |                 |
| M05 - 对照       | 7.44E+12       | 7.16E+12        | 未测试             |                 |                 |                 |
| M06 - Ca 阴性    | 7.98E+12       | 6.94E+12        |                 |                 |                 |                 |
| M07 - Ca/Mg 阴性 | 6.33E+12       | 4.63E+12        |                 |                 |                 |                 |
| M08 - 8.5%蔗糖   | 6.23E+12       | 6.68E+12        |                 |                 |                 |                 |

[0159] 可见外观

[0160] 在所有时间点和条件下,在黑色和白色背景下进行目视检查期间使用的所有配制剂分别显示B9颜色并且小于或等于乳白光参考1(颜色和净度标准)(参见,例如,Ph.Eur.7.0,20201,20202(01/2008);Millipore Sigma颜色参考溶液B)。可见外观结果表明,只有“对照”配制剂(M05)在25°C下放置超过1周,或在40°C下放置3天或更长时间时,显示出数量过多而无法计数(TMTC)的白色片状颗粒。M06和M07配制剂偶尔会显示TMTC可见颗粒;然而,这些样品的颗粒描述都是纤维状颗粒。虽然本研究未鉴定出这些颗粒,但纤维状颗粒更具有外源性颗粒(例如过滤颗粒)的特征,而片状颗粒具有磷酸钙的特征。此外,对于基于实验室的开发研究(其中DP不是在严格控制的环境条件下制备的),纤维状/外源性颗粒的出现可以忽略不计。

[0161] 累积亚可见颗粒

[0162] 通过HIAC进行的亚可见累积颗粒分析表明,唯一的具有显著亚可见颗粒计数的配制剂是“对照”配制剂,随着更有侵蚀性的稳定性条件(更高的温度更长的时间),该配制剂显示出增加的趋势。其他配制剂(M06-M08)仅显示出不显著的颗粒计数,不依赖于时间或条件。

[0163] 功能性生物测定(效力)

[0164] 功能性FVIII生物测定结果在表16中呈现。结果显示,当样品保存在 $\leq -65^{\circ}\text{C}$ 或 $2-8^{\circ}\text{C}$ 条件下时,效力没有显著变化。在 $25^{\circ}\text{C}$ 下,4周后所有配制剂(M05-M08)的效力都有下降趋势。在 $40^{\circ}\text{C}$ 下,3天后Ca/Mg阴性配制剂的效力显著下降。

[0165] 表16. 功能性生物测定(相对效力)

[0166]

| 配制剂            | 材料  | 时间点            |                 |                 |                 |                 |                 |
|----------------|-----|----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
|                |     | T <sub>0</sub> | T <sub>3D</sub> | T <sub>1W</sub> | T <sub>2W</sub> | T <sub>3W</sub> | T <sub>4W</sub> |
| -70℃           |     |                |                 |                 |                 |                 |                 |
| M05 – 对照       | M05 | 75             | 未测试             |                 |                 |                 | 81              |
| M06 – Ca 阴性    | M06 | 90             |                 |                 |                 |                 | 81              |
| M07 - Ca/Mg 阴性 | M07 | 67             |                 |                 |                 |                 | 68              |
| M08 - 8.5%蔗糖   | M08 | 74             |                 |                 |                 |                 | 74              |
| 5℃             |     |                |                 |                 |                 |                 |                 |
| M05 - 对照       | M05 | 75             | 未测试             |                 |                 |                 | 73              |
| M06 - Ca 阴性    | M06 | 90             |                 |                 |                 |                 | 87              |
| M07 - Ca/Mg 阴性 | M07 | 67             |                 |                 |                 |                 | 71              |
| M08 - 8.5%蔗糖   | M08 | 74             |                 |                 |                 |                 | 76              |
| 25℃            |     |                |                 |                 |                 |                 |                 |
| M05 – 对照       | M05 | 75             | 未测试             |                 | 53              | 未测试             | 37              |
| M06 – Ca 阴性    | M06 | 90             |                 |                 | 66              |                 | 63              |
| M07 - Ca/Mg 阴性 | M07 | 67             |                 |                 | 39              |                 | 41              |
| M08 - 8.5%蔗糖   | M08 | 74             |                 |                 | 55              |                 | 45              |
| 40℃            |     |                |                 |                 |                 |                 |                 |
| M05 – 对照       | M05 | 75             | 51              | 未测试             |                 |                 |                 |
| M06 – Ca 阴性    | M06 | 90             | 60              |                 |                 |                 |                 |
| M07 - Ca/Mg 阴性 | M07 | 67             | 22              |                 |                 |                 |                 |
| M08 - 8.5%蔗糖   | M08 | 74             | 56              |                 |                 |                 |                 |

[0167] SEC

[0168] SEC结果如下文所示。聚集物百分比结果显示在下表17中。在 $\leq -65^{\circ}\text{C}$ 、 $2-8^{\circ}\text{C}$ 或 $25^{\circ}\text{C}$ 稳定性条件下未观察到显著的聚集趋势。在 $40^{\circ}\text{C}$ 时,Ca/Mg阴性配制剂的聚集物呈增加趋势,一周后最高达7%HMWS。“钙阴性”配制剂在 $40^{\circ}\text{C}$ 下一周结束时显示出大约3%的HMWS。其他配制剂保持在 $\leq -65^{\circ}\text{C}$ 或 $2-8^{\circ}\text{C}$ 下最长达5周、 $25^{\circ}\text{C}$ 下最长达4周以及 $40^{\circ}\text{C}$ 下最长达1周时没有显示出聚集的显著增长。

[0169] 表17.通过SEC检测的聚集物的浓度(HMWS%)

[0170]

| 配制剂         | 材料  | 时间点            |                 |                 |                 |                 |                 |                 |
|-------------|-----|----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
|             |     | T <sub>0</sub> | T <sub>3D</sub> | T <sub>1W</sub> | T <sub>2W</sub> | T <sub>3W</sub> | T <sub>4W</sub> | T <sub>5W</sub> |
| -70°C       |     |                |                 |                 |                 |                 |                 |                 |
| M05 – 对照    | M05 | NMT<br>1.0     | NT              |                 |                 |                 | NMT<br>1.0      | NMT<br>1.0      |
| M06 – Ca 阴性 | M06 | NMT<br>1.0     |                 |                 |                 |                 | NMT<br>1.0      | NMT<br>1.0      |

[0171]

| 配制剂               | 材料  | 时间点            |                 |                 |                 |                 |                 |                 |
|-------------------|-----|----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
|                   |     | T <sub>0</sub> | T <sub>3D</sub> | T <sub>1W</sub> | T <sub>2W</sub> | T <sub>3W</sub> | T <sub>4W</sub> | T <sub>5W</sub> |
| M07 –<br>Ca/Mg 阴性 | M07 | NMT<br>1.0     |                 |                 |                 |                 | NMT<br>1.0      | NMT<br>1.0      |
| M08 –<br>8.5%蔗糖   | M08 | NMT<br>1.0     |                 |                 |                 |                 | NMT<br>1.0      |                 |
| 5°C               |     |                |                 |                 |                 |                 |                 |                 |
| M05 –<br>对照       | M05 | NMT<br>1.0     | NT              |                 | NMT<br>1.0      | NT              | NMT<br>1.0      | NMT<br>1.0      |
| M06 –<br>Ca 阴性    | M06 | NMT<br>1.0     |                 |                 | NMT<br>1.0      |                 | NMT<br>1.0      |                 |
| M07 –<br>Ca/Mg 阴性 | M07 | NMT<br>1.0     |                 |                 | NMT<br>1.0      |                 | NMT<br>1.0      |                 |
| M08 –<br>8.5%蔗糖   | M08 | NMT<br>1.0     |                 |                 | NMT<br>1.0      |                 | NMT<br>1.0      |                 |
| 25°C              |     |                |                 |                 |                 |                 |                 |                 |
| M05 –<br>对照       | M05 | NMT<br>1.0     | NT              |                 | NMT<br>1.0      | NT              | NMT<br>1.0      | NT              |
| M06 – Ca 阴性       | M06 | NMT<br>1.0     |                 |                 | NMT<br>1.0      |                 | NMT<br>1.0      |                 |
| M07 - Ca/Mg 阴性    | M07 | NMT<br>1.0     |                 |                 | NMT<br>1.0      |                 | 2.6             |                 |
| M08 - 8.5%蔗糖      | M08 | NMT<br>1.0     |                 |                 | NMT<br>1.0      |                 | NMT<br>1.0      |                 |
| 40°C              |     |                |                 |                 |                 |                 |                 |                 |
| M05 –<br>对照       | M05 | NMT<br>1.0     | NMT<br>1.0      | NMT<br>1.0      | NT              |                 |                 |                 |
| M06 –<br>Ca 阴性    | M06 | NMT<br>1.0     | 3.1             | 2.6             |                 |                 |                 |                 |
| M07 –<br>Ca/Mg 阴性 | M07 | NMT<br>1.0     | 5.3             | 7.0             |                 |                 |                 |                 |
| M08 –<br>8.5%蔗糖   | M08 | NMT<br>1.0     | 1.9             | NMT<br>1.0      |                 |                 |                 |                 |

[0172] \*NMT:不超过。NT:未测试。

[0173] 病毒颗粒结果显示在下表18中。保持在 $\leq -65^{\circ}\text{C}$ 、 $2-8^{\circ}\text{C}$ 或 $25^{\circ}\text{C}$ 条件下的所有配制剂均显示病毒颗粒滴度没有显著变化。然而,在 $40^{\circ}\text{C}$ 下,3天和1周后Ca/Mg阴性配制剂的颗粒滴度显著下降。其他配制剂(M05-M06、M08)保持在 $\leq -65^{\circ}\text{C}$ 或 $2-8^{\circ}\text{C}$ 下最长达5周、 $25^{\circ}\text{C}$ 下最长达四周以及 $40^{\circ}\text{C}$ 下最长达1周时没有显示出病毒颗粒滴度的显著下降。

[0174] 表18.通过SEC检测的病毒颗粒滴度(vp/mL)

[0175]

| 配制剂            | 材料  | 时间点            |                 |                 |                 |                 |                 |                 |
|----------------|-----|----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
|                |     | T <sub>0</sub> | T <sub>3D</sub> | T <sub>1W</sub> | T <sub>2W</sub> | T <sub>3W</sub> | T <sub>4W</sub> | T <sub>5W</sub> |
| -70°C          |     |                |                 |                 |                 |                 |                 |                 |
| M05 – 对照       | M05 | 2.46E+13       | NT              |                 |                 |                 | 2.43E+13        | 2.54E+13        |
| M06 – Ca 阴性    | M06 | 2.44E+13       |                 |                 |                 |                 | 2.41E+13        | 2.61E+13        |
| M07 – Ca/Mg 阴性 | M07 | 2.02E+13       |                 |                 |                 |                 | 2.01E+13        | 2.11E+13        |
| M08 – 8.5%蔗糖   | M08 | 2.13E+13       |                 |                 |                 |                 | 2.16E+13        | 2.27E+13        |
| 5°C            |     |                |                 |                 |                 |                 |                 |                 |
| M05 – 对照       | M05 | 2.46E+13       | NT              |                 | 2.55E+13        | NT              | 2.45E+13        | 2.51E+13        |
| M06 – Ca 阴性    | M06 | 2.44E+13       |                 |                 | 2.54E+13        |                 | 2.41E+13        | 2.62E+13        |
| M07 – Ca/Mg 阴性 | M07 | 2.02E+13       |                 |                 | 2.11E+13        |                 | 1.99E+13        | 2.14E+13        |
| M08 – 8.5%蔗糖   | M08 | 2.13E+13       |                 |                 | 2.25E+13        |                 | 2.16E+13        | 2.34E+13        |
| 25°C           |     |                |                 |                 |                 |                 |                 |                 |
| M05 – 对照       | M05 | 2.46E+13       | NT              |                 | 2.49E+13        | NT              | 2.35E+13        | NT              |
| M06 – Ca 阴性    | M06 | 2.44E+13       |                 |                 | 2.53E+13        |                 | 2.39E+13        |                 |
| M07 – Ca/Mg 阴性 | M07 | 2.02E+13       |                 |                 | 2.01E+13        |                 | 1.90E+13        |                 |
| M08 – 8.5%蔗糖   | M08 | 2.13E+13       |                 |                 | 2.23E+13        |                 | 2.11E+13        |                 |
| 40°C           |     |                |                 |                 |                 |                 |                 |                 |
| M05 – 对照       | M05 | 2.46E+13       | 2.23E+13        | 2.14E+13        | NT              |                 |                 |                 |
| M06 – Ca 阴性    | M06 | 2.44E+13       | 2.16E+13        | 2.09E+13        |                 |                 |                 |                 |
| M07 – Ca/Mg 阴性 | M07 | 2.02E+13       | 1.62E+13        | 1.59E+13        |                 |                 |                 |                 |
| M08 – 8.5%蔗糖   | M08 | 2.13E+13       | 2.09E+13        | 2.06E+13        |                 |                 |                 |                 |

[0176] UV 260/280比率结果如下表19中所示。对于UV 260/280比率,当保持在40°C时,Ca/Mg阴性配制剂记录了下降趋势。UV 260/280被认为是空颗粒/完整颗粒比率的替代物。如所示,其他配制剂(M05、M06和M08)在任何条件或时间点的UV 260/280比率均未显示出任何显著变化。

[0177] 表19.通过SEC检测的UV 260/280比率

[0178]

| 配制剂            | 材料  | 时间点            |                 |                 |                 |                 |                 |                 |
|----------------|-----|----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
|                |     | T <sub>0</sub> | T <sub>3D</sub> | T <sub>1W</sub> | T <sub>2W</sub> | T <sub>3W</sub> | T <sub>4W</sub> | T <sub>5W</sub> |
| -70℃           |     |                |                 |                 |                 |                 |                 |                 |
| M05 - 对照       | M05 | 1.33           | NT              |                 |                 |                 | 1.33            | 1.33            |
| M06 - Ca 阴性    | M06 | 1.32           |                 |                 |                 |                 | 1.32            | 1.33            |
| M07 - Ca/Mg 阴性 | M07 | 1.32           |                 |                 |                 |                 | 1.32            | 1.33            |
| M08 - 8.5%蔗糖   | M08 | 1.32           |                 |                 |                 |                 | 1.32            | 1.33            |
| 5℃             |     |                |                 |                 |                 |                 |                 |                 |
| M05 - 对照       | M05 | 1.33           | NT              |                 | 1.33            | NT              | 1.32            | 1.38            |
| M06 - Ca 阴性    | M06 | 1.32           |                 |                 | 1.33            |                 | 1.33            | 1.33            |
| M07 - Ca/Mg 阴性 | M07 | 1.32           |                 |                 | 1.33            |                 | 1.32            | 1.33            |
| M08 - 8.5%蔗糖   | M08 | 1.32           |                 |                 | 1.33            |                 | 1.32            | 1.33            |
| 25℃            |     |                |                 |                 |                 |                 |                 |                 |
| M05 - 对照       | M05 | 1.33           | NT              |                 | 1.34            | NT              | 1.33            | NT              |
| M06 - Ca 阴性    | M06 | 1.32           |                 |                 | 1.32            |                 | 1.33            |                 |
| M07 - Ca/Mg 阴性 | M07 | 1.32           |                 |                 | 1.33            |                 | 1.33            |                 |
| M08 - 8.5%蔗糖   | M08 | 1.32           |                 |                 | 1.32            |                 | 1.32            |                 |
| 40℃            |     |                |                 |                 |                 |                 |                 |                 |
| M05 - 对照       | M05 | 1.33           | 1.33            | 1.33            | NT              |                 |                 |                 |
| M06 - Ca 阴性    | M06 | 1.32           | 1.32            | 1.32            |                 |                 |                 |                 |
| M07 - Ca/Mg 阴性 | M07 | 1.32           | 1.28            | 1.25            |                 |                 |                 |                 |
| M08 - 8.5%蔗糖   | M08 | 1.32           | 1.33            | 1.33            |                 |                 |                 |                 |

[0179] pH

[0180] 所有配制剂在任何条件和时间点的pH均没有显著变化,如下表20所示。

[0181] 表20.pH

[0182]

| 配制剂            | 材料  | 时间点            |                 |                 |                 |                 |                 |                 |
|----------------|-----|----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
|                |     | T <sub>0</sub> | T <sub>3D</sub> | T <sub>1W</sub> | T <sub>2W</sub> | T <sub>3W</sub> | T <sub>4W</sub> | T <sub>5W</sub> |
| -70℃           |     |                |                 |                 |                 |                 |                 |                 |
| M05 - 对照       | M05 | 7.3            | NT              |                 |                 |                 | 7.2             | 7.3             |
| M06 - Ca 阴性    | M06 | 7.3            |                 |                 |                 |                 | 7.3             | 7.3             |
| M07 - Ca/Mg 阴性 | M07 | 7.3            |                 |                 |                 |                 | 7.3             | 7.4             |
| M08 - 8.5%蔗糖   | M08 | 7.2            |                 |                 |                 |                 | 7.3             | 7.3             |
| 5℃             |     |                |                 |                 |                 |                 |                 |                 |
| M05 - 对照       | M05 | 7.3            | NT              |                 | 7.3             | NT              | 7.2             | 7.3             |

[0183]

| 配制剂            | 材料  | 时间点            |                 |                 |                 |                 |                 |                 |
|----------------|-----|----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
|                |     | T <sub>0</sub> | T <sub>3D</sub> | T <sub>1W</sub> | T <sub>2W</sub> | T <sub>3W</sub> | T <sub>4W</sub> | T <sub>5W</sub> |
| M06 - Ca 阴性    | M06 | 7.3            |                 |                 | 7.3             |                 | 7.3             | 7.3             |
| M07 - Ca/Mg 阴性 | M07 | 7.3            |                 |                 | 7.2             |                 | 7.3             |                 |
| M08 - 8.5%蔗糖   | M08 | 7.2            |                 |                 | 7.2             |                 | 7.2             |                 |
| 25℃            |     |                |                 |                 |                 |                 |                 |                 |
| M05 - 对照       | M05 | 7.3            | NT              |                 | 7.3             | NT              | 7.2             | NT              |
| M06 - Ca 阴性    | M06 | 7.3            |                 |                 | 7.3             |                 | 7.3             |                 |
| M07 - Ca/Mg 阴性 | M07 | 7.3            |                 |                 | 7.3             |                 | 7.2             |                 |
| M08 - 8.5%蔗糖   | M08 | 7.2            |                 |                 | 7.2             |                 | 7.2             |                 |
| 40℃            |     |                |                 |                 |                 |                 |                 |                 |
| M05 - 对照       | M05 | 7.3            | 7.1             | 7.1             | NT              |                 |                 |                 |
| M06 - Ca 阴性    | M06 | 7.3            | 7.3             | 7.3             |                 |                 |                 |                 |
| M07 - Ca/Mg 阴性 | M07 | 7.3            | 7.3             | 7.3             |                 |                 |                 |                 |
| M08 - 8.5%蔗糖   | M08 | 7.2            | 7.1             | 7.2             |                 |                 |                 |                 |

[0184] 质谱表征(脱酰胺)

[0185] 通过质谱测定的脱酰胺结果如下表21中所示。仅在40°C下储存的样品用于此测试,因为在5周的研究期间,在较低温度下储存的样品预期不会显示出配制剂之间的显著差异。

[0186] 使用对照配制剂的T<sub>0</sub>作为所有配制剂的T<sub>0</sub>呈现结果。在所有脱酰胺位点中,AAV VP1中的N57G和N94H热点是在40°C下3周期间显示出最显著的脱酰胺增加的两个位点。其他位点也显示出脱酰胺增加,但程度要小得多(未显示)。这两个热点特别重要,因为它们预期会影响转导效率。Ca/Mg阴性配制剂显示出最显著的脱酰胺增加。在40°C下3天和3周后,其他配制剂(M05、M06和M08)均具有相似水平的脱酰胺增加。

[0187] 表21.通过质谱检测的脱酰胺(40°C下%)

| 配制剂            | 材料  | 时间点              |                 |                 |                  |                 |                 |
|----------------|-----|------------------|-----------------|-----------------|------------------|-----------------|-----------------|
|                |     | N57G (VP1)       |                 |                 | N94H (VP1)       |                 |                 |
|                |     | T <sub>0</sub> * | T <sub>3D</sub> | T <sub>3W</sub> | T <sub>0</sub> * | T <sub>3D</sub> | T <sub>3W</sub> |
| M05 - 对照       | M05 | 7.8              | 14.4            | 41.1            | 5.1              | 6.7             | 30.4            |
| M06 - Ca 阴性    | M06 | 7.8              | 18.6            | 43.5            | 5.1              | 6.4             | 33.9            |
| M07 - Ca/Mg 阴性 | M07 | 7.8              | 23.1            | 57.4            | 5.1              | 8.6             | 54.6            |
| M08 - 8.5%蔗糖   | M08 | 7.8              | 16.0            | 38.7            | 5.1              | 6.0             | 23.7            |

[0189] \*T<sub>0</sub>对M05材料进行测试并且用作所有配制剂的T<sub>0</sub>。

[0190] 结论

[0191] 对当前SB-525配制剂的三种可能的变体进行了评估:一种不含钙,一种既不含钙也不含镁,并且另一种含有更高浓度的蔗糖。实施例1和2显示在缓冲液和药物产品中出现大量白色片状颗粒的随机生成,尤其是在冷冻/解冻循环随后在25°C下稳定保持超过1周或在40°C下稳定保持3天或更长时间之后。这些颗粒被鉴定为磷酸钙。

[0192] 此处的结果证明,氯化钙对于在预期储存条件和受压储存条件下的产品稳定性而言是非必需的赋形剂。此外,在40°C下最长达2周、25°C下最长达4周以及5°C和-70°C下最长达5周时,没有观察到“钙阴性”和“高蔗糖”配制剂的显著差异。然而,观察到从配制剂中去

除钙和镁导致药物产品质量属性变化,包括显示出 $v_g$ 和 $v_p$ 滴度较大的下降幅度以及较高的脱酰胺和聚集,尤其是在40℃下保存时。此外,发现贯穿5周期间,只有先前的(对照)配制剂继续显示出白色片状颗粒。

[0193] 实施例4:SB-525的进一步重新配制

[0194] 为了防止颗粒生成,在本实施例中测试了三种类型的配制剂变化:(1)将蔗糖浓度从1%增加到5-10%以增加对FT压力的稳定性,(2)去除二价阳离子以去除颗粒来源并防止潜在的溶解度问题,以及(3)增加NaCl以改变配制剂的离子强度。

[0195] 更具体地,本实施例中的实验评估了与先前的(对照)配制剂(即172mM NaCl、8.10mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ 、2.68mM KCl、1.47mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 、0.90mM  $\text{CaCl}_2$ 、0.49mM  $\text{MgCl}_2$ 、1% (w/v) 蔗糖和0.05% (w/v) 泊洛沙姆188, pH 7.0-7.6) 相比重新配制为几种变体之一时SB-525缓冲液的稳定性。将5mL配制剂装填到6mL AT小瓶中,进行5次不受控制的FT循环( $\leq -65^\circ\text{C}$ 至环境温度),然后置于2℃-8℃(加速;液体储存)和25℃(受压;液体储存)的热稳定性条件以针对颗粒形成评估各种缓冲液。

[0196] 研究计划

[0197] 如表22所示,所测试的配制剂是通过向水中添加氯化钠和氯化钾以及磷酸盐,然后添加蔗糖来配制的。如果存在的话,氯化镁然后是氯化钙在单独的50mL溶液中制备,转移到较大的溶液中。然后将泊洛沙姆188添加到溶液中。然后对配制剂进行QS' d(足量)测试、pH测试,并且在0.22 $\mu\text{m}$  PES过滤器上过滤。

[0198] 表22. 配制剂

[0199]

| 材料       | 配制剂                                 | 与对照的区别                               |
|----------|-------------------------------------|--------------------------------------|
| 0139-M03 | 200mM NaCl                          | 增加NaCl至200mM                         |
| 0139-M04 | 5% 蔗糖                               | 增加蔗糖至5%                              |
| 0139-M05 | 8.5% 蔗糖                             | 增加蔗糖至8.5%                            |
| 0139-M06 | 10% 蔗糖                              | 增加蔗糖至10%                             |
| 0139-M07 | 无 $\text{CaCl}_2$                   | 去除 $\text{CaCl}_2$                   |
| 0139-M08 | 无 $\text{MgCl}_2$ 或 $\text{CaCl}_2$ | 去除 $\text{CaCl}_2$ 和 $\text{MgCl}_2$ |
| 0139-M09 | 对照                                  | N/A                                  |

[0200] 用这些配制剂,将AT小瓶以5mL装填,进行5次不受控制的冷冻/解冻循环,然后置于5℃或25℃的稳定性条件下。表23概述了稳定性拉取计划表。在表中,X指外观(液体);A指渗透压(凝固点降低)、电导率、粘度和密度;B指HIAC光遮蔽;C指P188浓度;并且D指pH。

[0201] 表23. 稳定性计划表0139-M03至-M08

[0202]

| 温度<br>(°C) | T <sub>0</sub> | FT1 | FT2 | FT3 | FT4 | FT5* | T <sub>5D</sub> | T <sub>8D</sub> | T <sub>2W</sub> | T <sub>3W</sub> | T <sub>4W</sub> | T <sub>6W</sub> | T <sub>8W</sub> |
|------------|----------------|-----|-----|-----|-----|------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| 5 (± 3)    | XABD           | X   | X   | XBD | X   | XBD  | X               | X               | XC              | XB              | XB              | XB              | XB              |
| 25 (± 3)   |                |     |     |     |     |      | XBC             |                 | X               |                 |                 |                 |                 |

[0203] \*5FT样品为热稳定性样品的T<sub>0</sub>

[0204] 配制剂表征

[0205] 测试SB-525缓冲液配制剂以确定电导率、渗透压、密度和粘度。还在5℃储存2.5周和25℃储存5天时测量P188浓度。这些测试的结果如下表24所示。M03-M09的电导率、渗透

压、密度和粘度结果均符合预期趋势——较高量的蔗糖导致较高的渗透压、密度和粘度；较高的NaCl导致较高的渗透压和电导率。P188浓度的结果在每组结果的方法变异性范围内，证实了在配制过程中实现了正确的P188浓度。

[0206] 表24. 配制剂表征

| 配制剂                  | 电导率<br>(ms/cm) | 渗透压<br>(mOsm/kg) | 密度 <sup>1</sup><br>(g/mL) | 粘度 <sup>2</sup><br>(Cp) | P188 (µg/mL)          |                      |
|----------------------|----------------|------------------|---------------------------|-------------------------|-----------------------|----------------------|
|                      |                |                  |                           |                         | T <sub>2.5W</sub> 5°C | T <sub>5D</sub> 25°C |
| M03 –<br>200 mM NaCl | 20.20          | 433              | 1.011915                  | 1.165                   | 590                   | 484                  |
| M04 –<br>5%蔗糖        | 16.12          | 515              | 1.026105                  | 1.285                   | 630                   | 467                  |

| 配制剂               | 电导率<br>(ms/cm) | 渗透压<br>(mOsm/kg) | 密度 <sup>1</sup><br>(g/mL) | 粘度 <sup>2</sup><br>(Cp) | P188 (µg/mL)          |                      |
|-------------------|----------------|------------------|---------------------------|-------------------------|-----------------------|----------------------|
|                   |                |                  |                           |                         | T <sub>2.5W</sub> 5°C | T <sub>5D</sub> 25°C |
| M05 –<br>8.5%蔗糖   | 15.37          | 647              | 1.039606                  | 1.382                   | 635                   | 486                  |
| M06 –<br>10%蔗糖    | 15.12          | 704              | 1.045258                  | 1.429                   | 633                   | 457                  |
| M07 –<br>Ca 阴性    | 17.91          | 380              | 1.010685                  | 1.112                   | 663                   | 488                  |
| M08 –<br>Ca/Mg 阴性 | 17.88          | 379              | 1.010806                  | 1.123                   | 672                   | 471                  |
| M09 –<br>对照       | 17.86          | 384              | 1.010854                  | 1.105                   | 668                   | 475                  |

[0209] <sup>1</sup>密度测量期间的温度记录为20.0°C。

[0210] <sup>2</sup>粘度测量期间的温度记录为20.0°C，剪切速率记录为2000s<sup>-1</sup>。

[0211] pH

[0212] 在FT循环期间没有观察到任何配制剂的pH的显著变化，如下表25所示。

[0213] 表25. pH结果

| 配制剂               | FT 循环          |     |     |
|-------------------|----------------|-----|-----|
|                   | T <sub>0</sub> | FT3 | FT5 |
| M03 – 200 mM NaCl | 7.2            | 7.3 | 7.2 |
| M04 – 5%蔗糖        | 7.2            | 7.2 | 7.2 |
| M05 – 8.5%蔗糖      | 7.2            | 7.2 | 7.2 |
| M06 – 10%蔗糖       | 7.1            | 7.2 | 7.2 |
| M07 – Ca 阴性       | 7.3            | 7.3 | 7.3 |
| M08 – Ca 和 Mg 阴性  | 7.3            | 7.3 | 7.3 |
| M09 – 对照          | 7.2            | 7.3 | 7.2 |

[0215] 可见外观

[0216] 对于测试的每个条件和时间点，所有样品均显示B9颜色并且小于或等于乳白光参考1。可见外观结果表明，只有对照配制剂(M09)在5°C和25°C下从5天到最长达8周始终展现出数量过多而无法计数(TMTC)的白色片状颗粒。5%蔗糖配制剂表现出TMTC可见颗粒的随机生成。许多样品还显示出1-5个纤维状颗粒。虽然本研究未鉴定这些颗粒，但纤维状颗粒

更具有外源性颗粒(例如过滤颗粒)的特征,而片状颗粒具有磷酸钙的特征。此外,对于基于实验室的开发研究(其中DP不是在严格控制的环境条件下制备的),纤维状/外源性颗粒的出现可以忽略不计。

[0217] 亚可见颗粒计数

[0218] 通过HIAC进行的亚可见颗粒分析表明,唯一具有显著且一致的亚可见颗粒计数的配制剂是对照配制剂(M09),在较高的稳定性条件(25℃)下持续储存会加剧这种情况。其他配制剂(M03-M08)显示出不显著的颗粒计数,不依赖于时间或条件,并且没有表现出总体趋势。

[0219] 结论

[0220] 本实施例评估了冻融压力和热稳定性对先前的(对照)SB-525配制剂的几种配制剂变体的影响。将七种不同的配制剂装填到AT crystal封闭小瓶中,冻融循环,并且在5℃和25℃下储存8周。在所有研究条件下,只有对照配制剂继续一致地显示出白色片状颗粒。

[0221] 在FT循环后,没有配制剂表现出显著的可见颗粒形成或pH变化,因此所有配制剂都在8周的时间段中放置在5℃和25℃的短期稳定性条件下。置于稳定状态后,唯一显示持续生成显著的可见颗粒的配制剂是对照配制剂(M09)。尽管颗粒结果具有可比性(即,没有显著的可见颗粒生成),但未选择“200mM NaCl”(M03)、“5%蔗糖”(M04)和“10%蔗糖”(M06)配制剂用于继续重新配制研究。具体地,“5%蔗糖”配制剂(M04)显示出一些白色片状颗粒的形成,表明该浓度的蔗糖可能不足以防止由于FT压力导致的颗粒生成,而“10%蔗糖”(M06)由于其较高的粘度会带来制备挑战。因此,基于这些结果,“8.5%蔗糖”(M05)、“钙阴性”(M07)和“钙和镁阴性”(M08)配制剂似乎是有前景的。

[0222] 实施例5.SB-525的最终配制剂

[0223] SB-525 (PF-07055480) 原料药(DS)的组分和描述如表26所示。该配制剂的最终pH为 $7.3 \pm 0.3$ 。赋形剂浓度完全或部分通过添加碱性缓冲液(磷酸盐缓冲盐水)获得。DS浓度目标为 $1.0E+13$ vg/mL( $0.5E+13$ - $2.5E+13$ vg/mL),其中DS范围为DS目标的50%-250%。

[0224] 表26.SB-525原料药配制剂描述

| [0225] | 原材料    | 化学式                  | FW      | 浓度(mM)          | 浓度(g/L)         |
|--------|--------|----------------------|---------|-----------------|-----------------|
|        | SB-525 | N/A                  | N/A     | $1.0E+13$ vg/mL | $1.0E+13$ vg/mL |
|        | 六水氯化镁  | $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ | 203.30  | 0.49            | 0.10            |
|        | 氯化钾    | KCl                  | 74.5513 | 2.68            | 0.20            |
|        | 磷酸二氢钾  | $KH_2PO_4$           | 136.086 | 1.47            | 0.20            |

| [0226] | 原材料             | 化学式                           | FW       | 浓度(mM)      | 浓度(g/L)    |
|--------|-----------------|-------------------------------|----------|-------------|------------|
|        | 蔗糖              | $C_{12}H_{22}O_{11}$          | 342.2965 | 1% (w/v)    | 10.00      |
|        | 氯化钠             | NaCl                          | 58.44    | 172         | 10.05      |
|        | 泊洛沙姆 188 (P188) | $(C_3H_6O \bullet C_2H_4O)_x$ | 8350     | 0.05% (w/v) | 0.50       |
|        | 无水磷酸氢二钠         | $Na_2HPO_4$                   | 141.96   | 8.10        | 1.15       |
|        | WFI             | $H_2O$                        | 18.015   | q.s.至 1 mL  | q.s.至 1 mL |

[0227] SB-525 (PF-07055480) 药物产品的组成和描述如表27所示。DP的最终pH为 $7.3 \pm 0.3$ 。赋形剂浓度完全或部分通过添加碱性缓冲液(磷酸盐缓冲盐水)获得。DP浓度目标为 $1.0E+13$ vg/mL( $0.3E+13$ - $3.0E+13$ vg/mL),其中DP范围为DP目标的30%-300%。

[0228] 表27.SB-525药物产品配制剂描述

[0229]

| 成分名称                      | 功能    | 浓度(mM)        | 单位配方<br>(mg/mL)  | 单位配方<br>(mg/小瓶)    |
|---------------------------|-------|---------------|------------------|--------------------|
| SB-525                    | 活性成分  | 1.0E+13 vg/mL | 1.0E+13<br>vg/mL | 6.0E+13 vg/ 小<br>瓶 |
| 无水磷酸氢二钠                   | 缓冲组分  | 8.10          | 1.15             | 6.75               |
| 磷酸二氢钾                     |       | 1.47          | 0.20             | 1.20               |
| 氯化钠                       | 稳定剂   | 172           | 10.05            | 60.30              |
| 氯化钾                       |       | 2.68          | 0.20             | 1.20               |
| 六水氯化镁                     |       | 0.49          | 0.10             | 0.60               |
| 蔗糖                        | 冷冻保护剂 | 1% (w/v)      | 10.00            | 60.00              |
| Kolliphor (泊洛沙姆)<br>P 188 | 表面活性剂 | 0.05% (w/v)   | 0.50             | 3.00               |
| WFI                       | 溶剂    | q.s.至 1 mL    | q.s.至 1 mL       | q.s.至标称装填<br>体积    |

[0230] 容器和装填体积

[0231] 过滤后的原料药包装在无菌高密度聚乙烯 (HDPE) 瓶中。将DP装入具有原位热塑性弹性体塞子的AT 10mL环烯烃共聚物(COC)小瓶中(Aseptic Technologies VIA-101800)。DS和DP均储存在-60℃至-90℃。每个小瓶含有6.4mL的DP(预期可提取体积6mL),以及6.4E+13(标称6.0E+13)vg SB-525AAV。

[0232] DP的表征

[0233] 测量了SB-525DP的粘度、渗透压、密度和电导率。密度为1.0106g/mL(20℃)。粘度为1.112cP(20℃)。渗透压为374mOsm/kg。电导率为17.80mS/cm(20℃)。

[0234] 实施例6:AAV6病毒载体药物产品配制剂

[0235] 下面的实施例6-8描述了为评估含有不同浓度的二价阳离子盐的AAV2/6病毒载体药物产品配制剂而进行的额外的重新配制和加速稳定性研究。与前面的实施例一样,病毒载体具有AAV6衣壳和含有AAV2 ITR的重组基因组。此处的病毒载体携带编码 $\alpha$ -L-艾杜糖苷酶(IDUA)的转基因。该转基因将帮助缺乏IDUA的患者,如患有I型粘多糖贮积症(MPS I)(也称为Hurler综合征(溶酶体贮积病症))的患者。AAV基因组如US2020/0246486的表5中的序列号28所示。因为病毒基因组位于AAV衣壳内且未暴露于产品配制剂,所以实施例6-8中进行的观察与之前的实施例中的观察一样,预期适用于携带其他转基因的AAV6载体。

[0236] 还进行了研究以确定在冷冻/解冻循环后不形成沉淀物的新产品配制剂。评估了含有不同浓度二价阳离子盐的四种AAV6病毒载体药物产品配制剂的稳定性。

[0237] 所测试的配制剂含有不同浓度的二价阳离子盐( $\text{Ca}^{2+}$ 和 $\text{Mg}^{2+}$ )。如上文所述,观察到之前的AAV6配制剂以及不含AAV6的配制剂缓冲液均在多次冷冻/解冻循环后形成少量的可见沉淀物。沉淀的颗粒经确定由磷酸钙盐组成。由于药物产品在通常使用过程中会经历冷冻/解冻循环,盐沉淀的可能性会对患者安全和产品质量构成风险。以下实施例6-8中所示的研究旨在找到没有此类沉淀问题的改善的配制剂。

[0238] 在研究中,AAV6病毒载体产品的样品通过切向流过滤和用更高浓度的“加标缓冲液(spiker buffer)”加标样品制备成不同的产品配制剂。然后将重新配制的样品在各种加速稳定性条件下孵育,并在孵育后评估样品的质量属性。在适当的情况下,考虑已知方法的变异性来评估质量属性。鉴定四种配制剂中的每一种在研究期间的异常值和趋势结果。基

于每个研究终点的结果,为每个质量属性和配制剂分配通过、中立或失败的评分。最后,将每四种配制剂的总体质量属性稳定性评分相互比较。下文详细描述了该研究。

#### [0239] 样品制备

[0240] 本文制备的AAV6产品配制剂含有悬浮在配制剂缓冲液F0中的大约 $1.0E+13$ vg/mL的AAV6供体载体,如下表1中所述。缓冲液F0基于Dulbecco磷酸盐缓冲盐水的配方,包括二价阳离子钙(如 $\text{CaCl}_2$ )和镁(如 $\text{MgCl}_2$ ),大约35mM额外的氯化钠,并配制为1%w/v蔗糖和0.05%w/v泊洛沙姆188。

[0241] 为了将AAV6材料转移到替代缓冲液配制剂中,通过切向流过滤进行缓冲液交换,如图2所示。简言之,将在缓冲液F0中配制的若干小瓶的AAV6药物产品解冻并转移到单个超滤/渗滤(UF/DF)储液器中。首先进行超滤以将材料浓缩大约2x。然后用至少10x等体积的配制剂缓冲液F1渗滤浓缩的材料。因此回收的中间材料(在图2中标记为“A”)应当含有悬浮在配制剂缓冲液F1中的大约 $2.0E+13$ vg拷贝/mL。

[0242] 然后将中间UF/DF产品“A”分成三个体积,并配制成三种不同的缓冲液。三种额外的配制剂缓冲液(F1、F2和F3;表28)衍生自Dulbecco磷酸盐缓冲盐水并具有额外的氯化钠、蔗糖和泊洛沙姆188(例如,Pluronic®F-68)。这三种缓冲液不含钙,而是含有不同量的镁。缓冲液F1不含钙或镁组分,缓冲液F2含有与F0等摩尔浓度的镁,并且缓冲液F3含有占从缓冲液F0中去除的钙的摩尔数的额外的镁。

#### [0243] 表28. 配制剂缓冲液的组成

| 浓度(单位)                         | F0             | F1           | F2<br>(6x 浓度) | F2<br>(1x 浓度) | F3<br>(6x 浓度) | F3<br>(1x 浓度) |
|--------------------------------|----------------|--------------|---------------|---------------|---------------|---------------|
| NaCl (mM)                      | 171.8          | <b>171.8</b> | 171.8         | <b>171.8</b>  | 171.8         | <b>171.8</b>  |
| KCl (mM)                       | 2.7            | <b>2.7</b>   | 2.7           | <b>2.7</b>    | 2.7           | <b>2.7</b>    |
| $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ (mM) | 8.1            | <b>8.1</b>   | 8.1           | <b>8.1</b>    | 8.1           | <b>8.1</b>    |
| $\text{KH}_2\text{PO}_4$ (mM)  | 1.5            | <b>1.5</b>   | 1.5           | <b>1.5</b>    | 1.5           | <b>1.5</b>    |
| $\text{CaCl}_2$ (mM)           | 0.9            | <b>0.0</b>   | 0.0           | <b>0.0</b>    | 0.0           | <b>0.0</b>    |
| $\text{MgCl}_2$ (mM)           | 0.5            | <b>0.0</b>   | 3.0           | <b>0.5</b>    | 8.4           | <b>1.4</b>    |
| 蔗糖 (% w/v)                     | 1.00%          | <b>1.00%</b> | 1.00%         | <b>1.00%</b>  | 1.00%         | <b>1.00%</b>  |
| 泊洛沙姆 188 (% w/v)               | 0.05%          | <b>0.05%</b> | 0.05%         | <b>0.05%</b>  | 0.05%         | <b>0.05%</b>  |
| 目标 pH                          | <b>7.1-7.5</b> |              |               |               |               |               |

[0245] 为了简化样品制备并容许制备不同的缓冲液,制备了缓冲液F2和F3的浓度高6倍的“加标缓冲液”。如图3所示,当以1:5的比例与F1混合时,这些F2和F3“6x浓度”缓冲液分别产生了缓冲液F2和F3的预期组成。

[0246] 为了制备这些配制剂缓冲液,使用微量天平称量各个干燥组分。将各组分用注射用去离子水混合并溶解。如果需要的话,然后用0.1M NaOH或0.1M HCl将这些缓冲液滴定到预期的pH范围。最后,将这些缓冲液与蔗糖和泊洛沙姆188配制成期望的浓度。

[0247] 制备的药物产品配制剂的组成用若干半定量测定作为检查进行测量,其结果报告于表29中。现成的比色测定用于测量 $\text{Ca}^{2+}$  (Bio Vision Cat#K380-250)和 $\text{Mg}^{2+}$  (Bio Vision Cat#K385-1 00)的浓度。对于两种比色测定,样品浓度都在测定的动态线性范围内,并且报告的信号和计算的浓度与理论样品组成趋势良好。重要的是,配制剂F1、F2和F3的钙信号都与测定阴性对照相匹配。因此,这些样品不含有钙,并且TFF样品制备步骤有效去除F0起始

材料中存在的任何钙。镁测定还证实了 $Mg^{2+}$ 也通过TFF而去除并且在F2和F3中加标成适当的浓度。

[0248] 表29. 配制的药物产品的实验测量参数

|        | 组分(单位)                         | F0       | F1       | F2<br>(1x 浓度) | F3<br>(1x 浓度) |
|--------|--------------------------------|----------|----------|---------------|---------------|
| [0249] | CaCl <sub>2</sub> (mM, 通过比色测定) | 1.02     | 0.07     | 0.09          | 0.1           |
|        | MgCl <sub>2</sub> (mM, 通过比色测定) | 0.29     | -0.04    | 0.38          | 0.9           |
|        | VG 滴度 (vg/ml, 通过 qPCR)         | 1.54E+13 | 1.77E+13 | 1.91E+13      | 1.87 E+13     |
|        | 颗粒浓度 (p/mL, 通过 MADLS)          | 7.79E+12 | 6.38E+12 | 7.30E+12      | 8.23E+12      |

[0250] \*MADLS: 多角度动态光散射

[0251] 还进行了qPCR以测量vg滴度, 并且进行了多角度动态光散射 (MADLS) 以测量颗粒浓度。同样, 这些结果在样品制备的预期范围内, 表明缓冲液更换和配制步骤按预期进行。

[0252] 批量配制的产品经过无菌过滤, 并且以0.5mL/小瓶装入2mL环烯烃聚合物 (COP) 瓶 (West Pharma/Daikyo CZ Cat#19550057) 中。

[0253] 样品孵育

[0254] 装瓶的药物产品在下述各种条件下孵育。用表30中列出的拉取日期进行冷冻/解冻循环。

[0255] 表30. 冷冻/解冻循环样品拉取日期

|        |                   |      |      |      |       |
|--------|-------------------|------|------|------|-------|
| [0256] | 条件                | 开始日期 | 3X循环 | 5X循环 | 10X循环 |
|        | 冷冻/解冻循环-80°C/环境温度 | D0   | D2   | D4   | D11   |

[0257] 样品经历“加速, 受压”条件 (40°C/75%相对湿度 (RH)) 或“加速, 环境”条件 (25°C/60%RH), 拉取日期为D3、D7、2周、1个月、2个月、3个月或6个月。样品储存在2°C-8°C, 并且在它们的拉取时间的24小时内进行分析。

[0258] 将所有拉取的样品等分到聚碳酸酯翻盖离心管中用于预期的样品测试。在活性测试期间, 等分试样在2°C-8°C下储存不超过2个月。如果测试未在从拉取日期起的合理时间内进行, 则将等分试样冷冻在≤-65°C下, 直到可以进行测试。测试后的所有保留样品和剩余材料都在≤-65°C下冷冻以便长期储存。

[0259] 实施例7: AAV6药物产品配制剂的测试

[0260] 进行的样品测试包括表31中列出的质量属性。缩写如下所示: DLS, 动态光散射; MADLS, 多角度动态光散射; HMWS, 高分子量物质; SE-LC, 尺寸排阻液相色谱; 和AEX-LC, 阴离子交换液相色谱。评估溶液的外观以确认它们是透明的、无色的且无微粒。模糊、浑浊或含有可见颗粒的溶液不符合标准。

[0261] 表31. 评估的产品质量属性

[0262]

| 类别 | 质量属性                     | 测试方法               |
|----|--------------------------|--------------------|
| 总体 | 外观, 液体                   | 目视检查               |
|    | pH                       | 电势测定               |
| 纯度 | 单体峰平均尺寸                  | DLS                |
|    | 多分散性指数                   | DLS                |
|    | 单体级分                     | DLS                |
|    | HMWS 级分                  | DLS                |
|    | HMWS 级分                  | SE-LC              |
|    | 完整衣壳%                    | AEX-LC             |
| 强度 | 载体基因组滴度                  | qPCR               |
|    | 感染滴度                     | TCID <sub>50</sub> |
|    | VG/TCID <sub>50</sub> 比率 | 计算                 |
|    | 衣壳浓度                     | ELISA              |
|    | 单体浓度                     | SE-LC              |
|    | 单体浓度                     | MADLS              |

[0263] 初始样品

[0264] 所有初始配制的药物产品样品的质量属性结果显示在表32和表33中。结果按总体、纯度和强度的质量属性类别分组。

[0265] 表32. 初始( $t_0$ )样品的总体和纯度质量属性结果

[0266]

| 配制剂       | F0 | F1 | F2 | F3 |
|-----------|----|----|----|----|
| 外观(通过/失败) | 通过 | 通过 | 通过 | 通过 |

[0267]

|              |        |        |        |        |
|--------------|--------|--------|--------|--------|
| pH           | 7.3    | 7.3    | 7.2    | 7.2    |
| 单体峰平均尺寸(nm)  | 29.7   | 33.0   | 33.6   | 33.4   |
| 多分散性指数       | 0.07   | 0.12   | 0.14   | 0.12   |
| 单体%, 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%   |
| 完整衣壳%        | 89.2%  | 89.1%  | 89.3%  | 89.1%  |

[0268] 表33. 初始( $t_0$ )样品的强度质量属性结果

[0269]

| 配制剂                          | F0      | F1      | F2      | F3      |
|------------------------------|---------|---------|---------|---------|
| VG滴度(vg/mL)                  | 7.9E+12 | 8.3E+12 | 9.4E+12 | 7.7E+12 |
| 感染滴度(TCID <sub>50</sub> /mL) | 9.3E+09 | 9.3E+09 | 1.1E+10 | 1.1E+09 |
| VG/TCID <sub>50</sub>        | 1200    | 1100    | 1100    | 8400    |
| 衣壳滴度(衣壳/mL)                  | 5.0E+12 | 5.5E+12 | 5.2E+12 | 6.7E+12 |
| 单体浓度, SE-LC(颗粒/mL)           | 9.9E+12 | 9.5E+12 | 9.9E+12 | 9.7E+12 |
| 单体浓度, MADLS(颗粒/mL)           | 7.8E+12 | 6.4E+12 | 7.3E+12 | 8.2E+12 |

[0270] 与其他初始样品相比, F3的初始感染滴度结果通常较低。这也导致比其他样品高得多的vg/TCID比率。这主要归因于TCID<sub>50</sub>测定的变异性。其他结果似乎都没有受到实质性影响。

[0271] 冷冻/解冻循环样品

[0272] 来自四种不同配制剂的冷冻/解冻循环的测试结果如图4A-D中所示。数据显示冷冻/解冻循环不影响溶液pH、单体衣壳尺寸、样品尺寸分布或完整衣壳含量；在所有四种配制剂中它也没有生成大量的HMWS或可溶性聚集物。然而，冷冻/解冻循环确实会导致初始F0对照配制剂可见的外观失败。在5次F/T循环后，可以观察到沉淀物的白色小斑点，这些是之前观察到的磷酸钙沉淀物的特征。在配制剂F1、F2或F3中未检测到这些沉淀物。数据还表明，当同时考虑测试方法的变异性时，冷冻/解冻循环似乎也没有显著影响任何产品强度属性。

[0273] 25℃/60%RH(环境)加速样品

[0274] 四种不同配制剂的环境条件(25℃/60%RH)孵育的测试结果如图5A-D所示。数据显示外观和pH不受25℃条件的影响。样品尺寸分布似乎变宽，增加了多分散性指数(PDI)，并且随着孵育时间的增加，单体峰平均尺寸略有增加。高分子量物质(HMWS)也开始随着孵育时间推移而形成。一般而言，通过SE-LC比DLS更容易检测到这些HMWS。在25℃下孵育1-2个月后，完整衣壳和空衣壳的电荷分离似乎已经消失，因此无法通过AEX-LC测量完整衣壳百分比。衣壳滴度和单体浓度不受25℃条件的影响，vg滴度似乎也没有受到影响。TCID<sub>50</sub>在F0、F1和F2的3个月和6个月时间点下降，但F3没有观察到相同的结果。

[0275] 40℃/75%RH受压样品

[0276] 四种不同配制剂的受压条件(40℃/75%RH)孵育的测试结果如图6A-D所示。数据显示，40℃/75%RH条件对若干结果产品质量属性的影响要大得多。颗粒尺寸分布大幅度变宽并且形成了HMWS。SE-LC似乎比DLS对检测更少量的HMWS更敏感，但当存在大量的HMWS(并且可能还有更大分子量物质)时，SE-LC可能检测不到这些颗粒。在这些情况下，大分子量物质可能被过滤或未通过LC色谱柱到达检测器。

[0277] 在40℃下3个月后，所有溶液开始出现模糊，这可能是由于形成了大的不溶性聚集物或HMWS。溶液pH似乎没有受到影响。在40℃/75%RH下1个月后，所有样品中的TCID<sub>50</sub>确实大幅度降低，其中在F3中观察到从初始最少的降低。

[0278] 实施例8：研究终点评估

[0279] 对每种配制剂进行样品内分析。在每种配制剂中，每个质量属性的每个研究终点结果都根据图7中所述的接受和失败标准进行评分。预期的稳定性研究终点如下：10x冷冻/解冻循环，每个循环在≤-65℃下不少于12小时并且在环境温度下不少于6小时，在25℃/60%RH下3个月，并且在40℃/75%RH下1个月。在每个研究终点，如图7中列出的质量属性是基于已知和已建立的方法变异性以及对本研究中生成的所有数据的整体评估确定的。

[0280] 为了对每种配制剂进行样品间分析或相对评估，每个质量属性的每个终点得分按配制剂进行比较。当考虑单个质量属性时，通过整体比较四种考虑的配制剂的相对终点评分，为每种配制剂分配总体通过、中立或失败评分。例如，如果所有终点结果都通过了给定配制剂的接受标准，则为该配制剂的质量属性分配总体通过评分。在为该配制剂分配总体质量属性评分时，考虑了中立和失败终点条件的数量。对于某些质量属性(如外观)，一个失败的终点评分就足以对该配制剂进行整体失败评分。对于其他质量属性(如单体浓度)，所有配制剂(F3除外)均在40℃条件下遭遇一个失败终点；因此，这个失败终点没有被评分为严重。TCID<sub>50</sub>结果仅包括在内用于参考，未分配评分。

[0281] 这些样品内分析评分显示于图8和图9中。表34中显示了每种配制剂的所有总体质

量属性评分的汇总表,其中配制剂F0用作对照。

[0282] 表34.样品间配制剂评估汇总

| [0283] | 测试(方法)           | F0 | F1 | F2 | F3 |
|--------|------------------|----|----|----|----|
|        | 外观, 液体<br>(目视检查) | 失败 | 通过 | 通过 | 通过 |
|        | pH (电势测定)        | 通过 | 通过 | 通过 | 通过 |
|        | 尺寸分布(DLS)        | 中立 | 失败 | 中立 | 中立 |
|        | HMWS 级分(DLS)     | 通过 | 失败 | 通过 | 通过 |
|        | HMWS 级分(SE-LC)   | 中立 | 失败 | 中立 | 通过 |
|        | 完整衣壳% (AEX-LC)   | 通过 | 通过 | 通过 | 通过 |
|        | VG 滴度(qPCR)      | 通过 | 失败 | 通过 | 中立 |
|        | 衣壳浓度(ELISA)      | 通过 | 中立 | 通过 | 通过 |
|        | 单体浓度(SE-LC)      | 中立 | 中立 | 中立 | 通过 |
|        | 单体浓度(MADLS)      | 中立 | 中立 | 中立 | 通过 |

[0284] 在加速稳定性研究期间的总体质量属性评分证明,配制剂F3和F2优于F0和F1。配制剂F3似乎表现最好,具有八个总体通过质量属性评分和仅两个中立评分。配制剂F2也表现良好。F0具有外观的总体失败评分,证实了改善该产品配制剂的最初目标。F1似乎具有大量的聚集,检测到最大量的HMWS。

[0285] 实施例9:扩展温度测试

[0286] 在扩展温度下测试了配制剂缓冲液中以 $1.00\text{E}+13\text{vg/mL}$ 提供的SB-525 (PF-07055480) 药物产品的稳定性。配制剂缓冲液含有以下成分: $0.49\text{mM MgCl}_2$ 、 $2.68\text{mM KCl}$ 、 $1.47\text{mM KH}_2\text{PO}_4$ 、 $172\text{mM NaCl}$ 、 $8.10\text{mM Na}_2\text{HPO}_4$ 、1% (w/v) 蔗糖、0.05% (w/v) 泊洛沙姆188,pH 7.4。

[0287] 含有药物产品的小瓶在(i)  $-70^\circ\text{C}$ 下储存0天( $T_0$ ), (ii)在 $-150^\circ\text{C}$ 下储存3天( $T_{3\text{-天}}$ ), 和(iii)在 $-150^\circ\text{C}$ 下储存14天( $T_{14\text{-天}}$ )。然后分析药物产品样品的(i)外观(液体), (ii)还原性CE-SDS, (iii) SEC滴度<sub>260/280</sub>, 和(iv)体外FVIII活性(生物测定)。还分析了配制剂缓冲液样品的(i)容器封闭完整性。

[0288] 如下表35所示,当样品在包括储存在 $-150^\circ\text{C}$ 下最长达十四天的测试条件下储存时,颜色、净度、还原性CE-SDS、SEC滴度<sub>260/280</sub>(空衣壳:完整衣壳比率的替代测量值)或生物活性(相对效力%)没有显著变化。在 $-150^\circ\text{C}$ 下储存十四天后,未观察到对容器封闭完整性的影响。

[0289] 表35.稳定性结果

[0290]

| 测试                             |      | T <sub>0</sub> | T <sub>3-天</sub> | T <sub>14-天</sub> |
|--------------------------------|------|----------------|------------------|-------------------|
| 外观, 液体                         | 颜色   | ≤B9            | ≤B9              | ≤B9               |
|                                | 净度   | ≤ Ref. I       | ≤ Ref. I         | ≤ Ref. I          |
|                                | 可见颗粒 | EFVP           | EFVP             | EFVP              |
| 容器封闭完整性                        |      | N.T.           | N.T.             | 通过                |
| 衣壳蛋白纯度(CE): 衣壳%                |      | 95.0           | 94.5             | 94.9              |
| 衣壳蛋白纯度(CE): 其他%                |      | 5.0            | 5.5              | 5.1               |
| 尺寸分布<br>(SEC): 单体%             |      | 98.8           | 99.0             | 99.5              |
| 尺寸分布<br>(SEC): 聚集物%            |      | 1.2            | NMT 1.0          | NMT 1.0           |
| 颗粒含量<br>(SEC): 260/280 比率      |      | 1.34           | 1.34             | 1.33              |
| 体外 FVIII 活性/功能性生物测定<br>(相对效力%) |      | 67%            | 69%              | 70%               |

[0291] EFVP:基本上不含可见颗粒

[0292] TMTC:数量过多而无法计数

[0293] N.T.:未测试

[0294] 实施例10:运输模拟和扩展温度测试

[0295] 测试了SB-525药物产品在模拟的运输条件下(如冲击、压力、掉落和震动)的稳定性。SB-525药物产品在含有以下成分的配制剂缓冲液中以1.00E+13vg/mL提供:0.49mM MgCl<sub>2</sub>、2.68mM KCl、1.47mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、172mM NaCl、8.10mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>、1% (w/v) 蔗糖、0.05% (w/v) 泊洛沙姆188,pH 7.4。

[0296] 利用最坏情况的整体运输概况,含有药物产品的测试样品小瓶经受了同时施加的运输危险(例如冲击、压力、掉落和震动)。对照样品小瓶不经受那些同时应用的运输危险。作为模拟的一部分,测试小瓶在-35℃下保持40小时,随后在-70℃下再保持40小时。模拟后,将对照和测试药物产品小瓶储存在-70℃并在第0天(T<sub>0</sub>)、第6个月(T<sub>6个月</sub>)和第10个月(T<sub>10个月</sub>)进行测试。配制剂缓冲液小瓶储存在-70℃并在T<sub>0</sub>测试。分析药物产品样品的(i)外观(液体),(ii)还原性CE-SDS,(iii)SEC滴度\_260/280,和(iv)体外FVIII活性(生物测定)。分析配制剂缓冲液样品的(i)容器封闭完整性。

[0297] 如下表36所示,当样品在测试条件下储存最长达十个月时,颜色、净度、还原性CE-SDS、SEC滴度\_260/280(空衣壳:完整衣壳比率的替代测量值)或生物活性(相对效力%)没有显著变化。在T<sub>0</sub>时对容器封闭完整性没有影响。

[0298] 表36.稳定性结果

[0299]

| 测试                             |      | 样品 | T <sub>0</sub> | T <sub>6个月</sub> | T <sub>10个月</sub> |
|--------------------------------|------|----|----------------|------------------|-------------------|
| 外观，液体                          | 颜色   | 对照 | ≤B9            | ≤B9              | ≤B9               |
|                                |      | 测试 | ≤B9            | ≤B9              | ≤B9               |
|                                | 净度   | 对照 | ≤ Ref. I       | ≤ Ref. I         | ≤ Ref. I          |
|                                |      | 测试 | ≤ Ref. I       | ≤ Ref. I         | ≤ Ref. I          |
|                                | 可见颗粒 | 对照 | EFVP           | EFVP             | EFVP              |
|                                |      | 测试 | EFVP           | EFVP             | EFVP              |
| 容器封闭完整性                        |      | 对照 | 通过             | N.T.             | N.T.              |
|                                |      | 测试 | 通过             | N.T.             | N.T.              |
| 基因组滴度(qPCR)                    |      | 对照 | 1.11E+13       | 1.02E+13         | 7.96E+12          |
|                                |      | 测试 | 9.07E+12       | 9.29E+12         | 7.81E+12          |
| 衣壳滴度(ELISA)                    |      | 对照 | 1.71E+13       | 1.28E+13         | 1.30E+13          |
|                                |      | 测试 | 1.69E+13       | 1.19E+13         | 1.34E+13          |
| 衣壳蛋白纯度(CE): 衣壳%                |      | 对照 | 94.0           | 94.3             | 95.0              |
|                                |      | 测试 | 94.5           | 94.6             | 94.7              |
| 衣壳蛋白纯度(CE): 其他%                |      | 对照 | 6.0            | 5.7              | 5.0               |
|                                |      | 测试 | 5.5            | 5.4              | 5.3               |
| 尺寸分布<br>(SEC): 单体%             |      | 对照 | 99.2           | 99.1             | 99.3              |
|                                |      | 测试 | 99.3           | 98.8             | 99.4              |
| 尺寸分布<br>(SEC): 聚集物%            |      | 对照 | NMT 1.0        | NMT 1.0          | NMT 1.0           |
|                                |      | 测试 | NMT 1.0        | 1.2              | NMT 1.0           |
| 颗粒含量<br>(SEC): 260/280 比率      |      | 对照 | 1.33           | 1.32             | 1.34              |
|                                |      | 测试 | 1.33           | 1.32             | 1.33              |
| 体外 FVIII 活性/功能性生<br>物测定(相对效力%) |      | 对照 | 72             | 58               | 62                |
|                                |      | 测试 | 63             | 58               | 62                |

[0300] 实施例11: 药物产品稳定性数据—24个月

[0301] 本研究的目的是建立SB-525药物产品在预期储存温度(-70℃)下的长期(24个月)稳定性。对于该研究, SB-525药物产品(DP)从Sf9昆虫细胞中纯化, 并且在8.10mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>、1.47mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、0.49mM MgCl<sub>2</sub>、2.68mM KCl、172mM NaCl、1% (w/v) 蔗糖和0.05% (w/v) 泊洛沙姆P188, pH 7.3±0.3中以1.00E+13载体vg/mL为目标进行配制。然后将DP以6.4mL装填到10mL Aseptic Technologies(AT) crystal封闭小瓶中, 并在-60℃至-90℃下储存。

[0302] 来自包括5个循环的不受控制的F/T和24小时搅拌的DP稳定性研究结果如图10所示。数据显示, -70℃下最长达24个月、5℃下最长达12个月和25℃/60%RH下最长达3个月的颜色、净度、pH、亚可见累积微粒物质、通过R-CGE检测的衣壳纯度和VP比率、通过SEC-HPLC检测的HMMS%和UV 260/280以及衣壳滴度没有观察到明显趋势。12个月、5℃样品报告溶液中有“1个长纤维颗粒”, 基于形态学和在不受控制的环境条件(即开放实验室空间)中进行的测试, 这似乎事实上是外来的; 所有其他样品均报告“基本上不含可见颗粒”。在五个循环的不受控制的F/T或24小时搅拌后, 没有观察到这些质量属性的变化。

[0303] 对于测试的所有时间点和条件, 基因组滴度和感染性病毒滴度以及感染比率的结果的变异性都在预期的测定变异性范围内, 并且没有表现出明显的趋势。体外相对效力(灵敏且精确的稳定性指示方法)的结果显示在预期的储存条件(-70℃)下24个月后效力略有下降趋势, 但结果在临床稳定性接受标准内。还观察到在25℃/60%RH下3个月和5℃下12个

月时效力的稳定性指示呈下降趋势。

[0304] 此外,在预期储存条件(-70℃)下在18个月时由经过验证的顶空分析仪对容器封闭完整性(CCIT)进行了测试并且记录了通过结果。六个应急小瓶用于该分析。P188浓度在-70℃下最长达18个月、在5℃下最长达12个月以及在25℃/60%RH下最长达3个月也是稳定的。在-70℃下在24个月时观察到P188浓度略有下降。

## 序列表

&lt;110&gt; 桑格摩生物治疗股份有限公司

美国辉瑞有限公司

&lt;120&gt; 含有腺相关病毒载体的改善的药物组合物

&lt;130&gt; 025297.W0029

&lt;140&gt;

&lt;141&gt;

&lt;150&gt; 63/127,826

&lt;151&gt; 2020-12-18

&lt;160&gt; 2

&lt;170&gt; PatentIn version 3.5

&lt;210&gt; 1

&lt;211&gt; 1457

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; 来源

&lt;223&gt; /注释="人工序列描述：合成的多肽"

&lt;400&gt; 1

```

Met Gln Ile Glu Leu Ser Thr Cys Phe Phe Leu Cys Leu Leu Arg Phe
1           5           10           15
Cys Phe Ser Ala Thr Arg Arg Tyr Tyr Leu Gly Ala Val Glu Leu Ser
          20           25           30
Trp Asp Tyr Met Gln Ser Asp Leu Gly Glu Leu Pro Val Asp Ala Arg
          35           40           45
Phe Pro Pro Arg Val Pro Lys Ser Phe Pro Phe Asn Thr Ser Val Val
          50           55           60
Tyr Lys Lys Thr Leu Phe Val Glu Phe Thr Asp His Leu Phe Asn Ile
65           70           75           80
Ala Lys Pro Arg Pro Pro Trp Met Gly Leu Leu Gly Pro Thr Ile Gln
          85           90           95
Ala Glu Val Tyr Asp Thr Val Val Ile Thr Leu Lys Asn Met Ala Ser
          100          105          110
His Pro Val Ser Leu His Ala Val Gly Val Ser Tyr Trp Lys Ala Ser
          115          120          125
Glu Gly Ala Glu Tyr Asp Asp Gln Thr Ser Gln Arg Glu Lys Glu Asp
          130          135          140
Asp Lys Val Phe Pro Gly Gly Ser His Thr Tyr Val Trp Gln Val Leu

```

|                                                                 |     |     |     |
|-----------------------------------------------------------------|-----|-----|-----|
| 145                                                             | 150 | 155 | 160 |
| Lys Glu Asn Gly Pro Met Ala Ser Asp Pro Leu Cys Leu Thr Tyr Ser |     |     |     |
|                                                                 | 165 | 170 | 175 |
| Tyr Leu Ser His Val Asp Leu Val Lys Asp Leu Asn Ser Gly Leu Ile |     |     |     |
|                                                                 | 180 | 185 | 190 |
| Gly Ala Leu Leu Val Cys Arg Glu Gly Ser Leu Ala Lys Glu Lys Thr |     |     |     |
|                                                                 | 195 | 200 | 205 |
| Gln Thr Leu His Lys Phe Ile Leu Leu Phe Ala Val Phe Asp Glu Gly |     |     |     |
|                                                                 | 210 | 215 | 220 |
| Lys Ser Trp His Ser Glu Thr Lys Asn Ser Leu Met Gln Asp Arg Asp |     |     |     |
| 225                                                             | 230 | 235 | 240 |
| Ala Ala Ser Ala Arg Ala Trp Pro Lys Met His Thr Val Asn Gly Tyr |     |     |     |
|                                                                 | 245 | 250 | 255 |
| Val Asn Arg Ser Leu Pro Gly Leu Ile Gly Cys His Arg Lys Ser Val |     |     |     |
|                                                                 | 260 | 265 | 270 |
| Tyr Trp His Val Ile Gly Met Gly Thr Thr Pro Glu Val His Ser Ile |     |     |     |
|                                                                 | 275 | 280 | 285 |
| Phe Leu Glu Gly His Thr Phe Leu Val Arg Asn His Arg Gln Ala Ser |     |     |     |
|                                                                 | 290 | 295 | 300 |
| Leu Glu Ile Ser Pro Ile Thr Phe Leu Thr Ala Gln Thr Leu Leu Met |     |     |     |
| 305                                                             | 310 | 315 | 320 |
| Asp Leu Gly Gln Phe Leu Leu Phe Cys His Ile Ser Ser His Gln His |     |     |     |
|                                                                 | 325 | 330 | 335 |
| Asp Gly Met Glu Ala Tyr Val Lys Val Asp Ser Cys Pro Glu Glu Pro |     |     |     |
|                                                                 | 340 | 345 | 350 |
| Gln Leu Arg Met Lys Asn Asn Glu Glu Ala Glu Asp Tyr Asp Asp Asp |     |     |     |
|                                                                 | 355 | 360 | 365 |
| Leu Thr Asp Ser Glu Met Asp Val Val Arg Phe Asp Asp Asp Asn Ser |     |     |     |
|                                                                 | 370 | 375 | 380 |
| Pro Ser Phe Ile Gln Ile Arg Ser Val Ala Lys Lys His Pro Lys Thr |     |     |     |
| 385                                                             | 390 | 395 | 400 |
| Trp Val His Tyr Ile Ala Ala Glu Glu Glu Asp Trp Asp Tyr Ala Pro |     |     |     |
|                                                                 | 405 | 410 | 415 |
| Leu Val Leu Ala Pro Asp Asp Arg Ser Tyr Lys Ser Gln Tyr Leu Asn |     |     |     |
|                                                                 | 420 | 425 | 430 |
| Asn Gly Pro Gln Arg Ile Gly Arg Lys Tyr Lys Lys Val Arg Phe Met |     |     |     |
|                                                                 | 435 | 440 | 445 |
| Ala Tyr Thr Asp Glu Thr Phe Lys Thr Arg Glu Ala Ile Gln His Glu |     |     |     |
| 450                                                             | 455 | 460 |     |

|                                                                 |     |     |     |
|-----------------------------------------------------------------|-----|-----|-----|
| Ser Gly Ile Leu Gly Pro Leu Leu Tyr Gly Glu Val Gly Asp Thr Leu |     |     |     |
| 465                                                             | 470 | 475 | 480 |
| Leu Ile Ile Phe Lys Asn Gln Ala Ser Arg Pro Tyr Asn Ile Tyr Pro |     |     |     |
|                                                                 | 485 | 490 | 495 |
| His Gly Ile Thr Asp Val Arg Pro Leu Tyr Ser Arg Arg Leu Pro Lys |     |     |     |
|                                                                 | 500 | 505 | 510 |
| Gly Val Lys His Leu Lys Asp Phe Pro Ile Leu Pro Gly Glu Ile Phe |     |     |     |
|                                                                 | 515 | 520 | 525 |
| Lys Tyr Lys Trp Thr Val Thr Val Glu Asp Gly Pro Thr Lys Ser Asp |     |     |     |
|                                                                 | 530 | 535 | 540 |
| Pro Arg Cys Leu Thr Arg Tyr Tyr Ser Ser Phe Val Asn Met Glu Arg |     |     |     |
|                                                                 | 545 | 550 | 555 |
| Asp Leu Ala Ser Gly Leu Ile Gly Pro Leu Leu Ile Cys Tyr Lys Glu |     |     |     |
|                                                                 | 565 | 570 | 575 |
| Ser Val Asp Gln Arg Gly Asn Gln Ile Met Ser Asp Lys Arg Asn Val |     |     |     |
|                                                                 | 580 | 585 | 590 |
| Ile Leu Phe Ser Val Phe Asp Glu Asn Arg Ser Trp Tyr Leu Thr Glu |     |     |     |
|                                                                 | 595 | 600 | 605 |
| Asn Ile Gln Arg Phe Leu Pro Asn Pro Ala Gly Val Gln Leu Glu Asp |     |     |     |
|                                                                 | 610 | 615 | 620 |
| Pro Glu Phe Gln Ala Ser Asn Ile Met His Ser Ile Asn Gly Tyr Val |     |     |     |
|                                                                 | 625 | 630 | 635 |
| Phe Asp Ser Leu Gln Leu Ser Val Cys Leu His Glu Val Ala Tyr Trp |     |     |     |
|                                                                 | 645 | 650 | 655 |
| Tyr Ile Leu Ser Ile Gly Ala Gln Thr Asp Phe Leu Ser Val Phe Phe |     |     |     |
|                                                                 | 660 | 665 | 670 |
| Ser Gly Tyr Thr Phe Lys His Lys Met Val Tyr Glu Asp Thr Leu Thr |     |     |     |
|                                                                 | 675 | 680 | 685 |
| Leu Phe Pro Phe Ser Gly Glu Thr Val Phe Met Ser Met Glu Asn Pro |     |     |     |
|                                                                 | 690 | 695 | 700 |
| Gly Leu Trp Ile Leu Gly Cys His Asn Ser Asp Phe Arg Asn Arg Gly |     |     |     |
|                                                                 | 705 | 710 | 715 |
| Met Thr Ala Leu Leu Lys Val Ser Ser Cys Asp Lys Asn Thr Gly Asp |     |     |     |
|                                                                 | 725 | 730 | 735 |
| Tyr Tyr Glu Asp Ser Tyr Glu Asp Ile Ser Ala Tyr Leu Leu Ser Lys |     |     |     |
|                                                                 | 740 | 745 | 750 |
| Asn Asn Ala Ile Glu Pro Arg Ser Phe Ser Gln Asn Pro Pro Val Leu |     |     |     |
|                                                                 | 755 | 760 | 765 |
| Lys Arg His Gln Arg Glu Ile Thr Arg Thr Thr Leu Gln Ser Asp Gln |     |     |     |

|                                                                 |      |      |
|-----------------------------------------------------------------|------|------|
| 770                                                             | 775  | 780  |
| Glu Glu Ile Asp Tyr Asp Asp Thr Ile Ser Val Glu Met Lys Lys Glu |      |      |
| 785                                                             | 790  | 795  |
| Asp Phe Asp Ile Tyr Asp Glu Asp Glu Asn Gln Ser Pro Arg Ser Phe |      | 800  |
| 805                                                             | 810  | 815  |
| Gln Lys Lys Thr Arg His Tyr Phe Ile Ala Ala Val Glu Arg Leu Trp |      |      |
| 820                                                             | 825  | 830  |
| Asp Tyr Gly Met Ser Ser Ser Pro His Val Leu Arg Asn Arg Ala Gln |      |      |
| 835                                                             | 840  | 845  |
| Ser Gly Ser Val Pro Gln Phe Lys Lys Val Val Phe Gln Glu Phe Thr |      |      |
| 850                                                             | 855  | 860  |
| Asp Gly Ser Phe Thr Gln Pro Leu Tyr Arg Gly Glu Leu Asn Glu His |      |      |
| 865                                                             | 870  | 875  |
| Leu Gly Leu Leu Gly Pro Tyr Ile Arg Ala Glu Val Glu Asp Asn Ile |      |      |
| 885                                                             | 890  | 895  |
| Met Val Thr Phe Arg Asn Gln Ala Ser Arg Pro Tyr Ser Phe Tyr Ser |      |      |
| 900                                                             | 905  | 910  |
| Ser Leu Ile Ser Tyr Glu Glu Asp Gln Arg Gln Gly Ala Glu Pro Arg |      |      |
| 915                                                             | 920  | 925  |
| Lys Asn Phe Val Lys Pro Asn Glu Thr Lys Thr Tyr Phe Trp Lys Val |      |      |
| 930                                                             | 935  | 940  |
| Gln His His Met Ala Pro Thr Lys Asp Glu Phe Asp Cys Lys Ala Trp |      |      |
| 945                                                             | 950  | 955  |
| Ala Tyr Phe Ser Asp Val Asp Leu Glu Lys Asp Val His Ser Gly Leu |      |      |
| 965                                                             | 970  | 975  |
| Ile Gly Pro Leu Leu Val Cys His Thr Asn Thr Leu Asn Pro Ala His |      |      |
| 980                                                             | 985  | 990  |
| Gly Arg Gln Val Thr Val Gln Glu Phe Ala Leu Phe Phe Thr Ile Phe |      |      |
| 995                                                             | 1000 | 1005 |
| Asp Glu Thr Lys Ser Trp Tyr Phe Thr Glu Asn Met Glu Arg Asn     |      |      |
| 1010                                                            | 1015 | 1020 |
| Cys Arg Ala Pro Cys Asn Ile Gln Met Glu Asp Pro Thr Phe Lys     |      |      |
| 1025                                                            | 1030 | 1035 |
| Glu Asn Tyr Arg Phe His Ala Ile Asn Gly Tyr Ile Met Asp Thr     |      |      |
| 1040                                                            | 1045 | 1050 |
| Leu Pro Gly Leu Val Met Ala Gln Asp Gln Arg Ile Arg Trp Tyr     |      |      |
| 1055                                                            | 1060 | 1065 |
| Leu Leu Ser Met Gly Ser Asn Glu Asn Ile His Ser Ile His Phe     |      |      |
| 1070                                                            | 1075 | 1080 |

|                                                             |      |      |
|-------------------------------------------------------------|------|------|
| Ser Gly His Val Phe Thr Val Arg Lys Lys Glu Glu Tyr Lys Met |      |      |
| 1085                                                        | 1090 | 1095 |
| Ala Leu Tyr Asn Leu Tyr Pro Gly Val Phe Glu Thr Val Glu Met |      |      |
| 1100                                                        | 1105 | 1110 |
| Leu Pro Ser Lys Ala Gly Ile Trp Arg Val Glu Cys Leu Ile Gly |      |      |
| 1115                                                        | 1120 | 1125 |
| Glu His Leu His Ala Gly Met Ser Thr Leu Phe Leu Val Tyr Ser |      |      |
| 1130                                                        | 1135 | 1140 |
| Asn Lys Cys Gln Thr Pro Leu Gly Met Ala Ser Gly His Ile Arg |      |      |
| 1145                                                        | 1150 | 1155 |
| Asp Phe Gln Ile Thr Ala Ser Gly Gln Tyr Gly Gln Trp Ala Pro |      |      |
| 1160                                                        | 1165 | 1170 |
| Lys Leu Ala Arg Leu His Tyr Ser Gly Ser Ile Asn Ala Trp Ser |      |      |
| 1175                                                        | 1180 | 1185 |
| Thr Lys Glu Pro Phe Ser Trp Ile Lys Val Asp Leu Leu Ala Pro |      |      |
| 1190                                                        | 1195 | 1200 |
| Met Ile Ile His Gly Ile Lys Thr Gln Gly Ala Arg Gln Lys Phe |      |      |
| 1205                                                        | 1210 | 1215 |
| Ser Ser Leu Tyr Ile Ser Gln Phe Ile Ile Met Tyr Ser Leu Asp |      |      |
| 1220                                                        | 1225 | 1230 |
| Gly Lys Lys Trp Gln Thr Tyr Arg Gly Asn Ser Thr Gly Thr Leu |      |      |
| 1235                                                        | 1240 | 1245 |
| Met Val Phe Phe Gly Asn Val Asp Ser Ser Gly Ile Lys His Asn |      |      |
| 1250                                                        | 1255 | 1260 |
| Ile Phe Asn Pro Pro Ile Ile Ala Arg Tyr Ile Arg Leu His Pro |      |      |
| 1265                                                        | 1270 | 1275 |
| Thr His Tyr Ser Ile Arg Ser Thr Leu Arg Met Glu Leu Met Gly |      |      |
| 1280                                                        | 1285 | 1290 |
| Cys Asp Leu Asn Ser Cys Ser Met Pro Leu Gly Met Glu Ser Lys |      |      |
| 1295                                                        | 1300 | 1305 |
| Ala Ile Ser Asp Ala Gln Ile Thr Ala Ser Ser Tyr Phe Thr Asn |      |      |
| 1310                                                        | 1315 | 1320 |
| Met Phe Ala Thr Trp Ser Pro Ser Lys Ala Arg Leu His Leu Gln |      |      |
| 1325                                                        | 1330 | 1335 |
| Gly Arg Ser Asn Ala Trp Arg Pro Gln Val Asn Asn Pro Lys Glu |      |      |
| 1340                                                        | 1345 | 1350 |
| Trp Leu Gln Val Asp Phe Gln Lys Thr Met Lys Val Thr Gly Val |      |      |
| 1355                                                        | 1360 | 1365 |
| Thr Thr Gln Gly Val Lys Ser Leu Leu Thr Ser Met Tyr Val Lys |      |      |

|                                             |                 |      |
|---------------------------------------------|-----------------|------|
| 1370                                        | 1375            | 1380 |
| Glu Phe Leu Ile Ser Ser Ser Gln Asp Gly His | Gln Trp Thr Leu |      |
| 1385                                        | 1390            | 1395 |
| Phe Phe Gln Asn Gly Lys Val Lys Val Phe Gln | Gly Asn Gln Asp |      |
| 1400                                        | 1405            | 1410 |
| Ser Phe Thr Pro Val Val Asn Ser Leu Asp Pro | Pro Leu Leu Thr |      |
| 1415                                        | 1420            | 1425 |
| Arg Tyr Leu Arg Ile His Pro Gln Ser Trp Val | His Gln Ile Ala |      |
| 1430                                        | 1435            | 1440 |
| Leu Arg Met Glu Val Leu Gly Cys Glu Ala Gln | Asp Leu Tyr     |      |
| 1445                                        | 1450            | 1455 |

&lt;210&gt; 2

&lt;211&gt; 5132

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; 来源

&lt;223&gt; /注释="人工序列描述：合成的多核苷酸"

&lt;400&gt; 2

```

ctgcgcgctc gctcgctcac tgaggccgcc cgggcaaagc ccgggcgctc ggcgaccttt 60
ggtcgccccg cctcagtgag cgagcgagcg cgcagagagg gagtggccaa ctccatcact 120
aggggttcct gcggcctaag cttggaacca ttgccacctt cagggggagg ctgctggtga 180
atattaacca agatcacccc agttaccgga ggagcaaaca gggactaagt tcacacgcgt 240
ggtaccgtct gtctgcacat ttcgtagagc gagtgttccg atactctaata ctccctaggc 300
aaggttcata tttgtgtagg ttacttattc tccttttgtt gactaagtca ataatacaga 360
tcagcagggt tggagtcagc ttggcaggga tcagcagcct ggggttgaag gagggggtat 420
aaaagcccc taccaggag aagccgtcac acagatccac aagctcctga agaggtaagg 480
gtttaagtta tcgttagttc gtgcaccatt aatgtttaat tacctggagc acctgcctga 540
aatcatTTTT ttttcaggtt ggctagtatg cagatcgagc tctccacctg cttctttctg 600
tgctgttga gattctgctt cagcgccacc aggagatact acctgggggc tgtggagctg 660
agctgggact acatgcagtc tgacctgggg gagctgacct tggatgccag gttccccccc 720
agagtgccca agagcttccc cttcaacacc tctgtggtgt acaagaagac cctgtttgtg 780
gagttcactg accacctgtt caacattgcc aagcccaggc cccctggat gggcctgctg 840
ggccccacca tccaggctga ggtgtatgac actgtggtga tcacctgaa gaacatggcc 900
agccaccctg tgagcctgca tgctgtgggg gtgagctact ggaaggcctc tgagggggct 960
gagtatgatg accagaccag ccagaggagg aaggaggatg acaaggtgtt ccctgggggc 1020
agccacacct atgtgtggca ggtgtgaag gagaatggcc ccatggcctc tgacccctg 1080
tgctgacct acagctacct gagccatgtg gacctgtga aggacctgaa ctctggcctg 1140
attggggccc tgctggtgtg cagggagggc agcctggcca aggagaagac ccagaccctg 1200

```

cacaagttca tcctgctgtt tgctgtgttt gatgagggca agagctggca ctctgaaacc 1260  
aagaacagcc tgatgcagga cagggatgct gcctctgccca gggcctggcc caagatgcac 1320  
actgtgaatg gctatgtgaa caggagcctg cctggcctga ttggctgccca caggaagtct 1380  
gtgtactggc atgtgattgg catggggcacc acccctgagg tgcacagcat cttcctggag 1440  
ggccacacct tcctggtcag gaaccacagg caggccagcc tggagatcag ccccatcacc 1500  
ttcctgactg cccagaccct gctgatggac ctggggccagt tcctgctgtt ctgccacatc 1560  
agcagccacc agcatgatgg catggaggcc tatgtgaagg tggacagctg ccctgaggag 1620  
ccccagctga ggatgaagaa caatgaggag gctgaggact atgatgatga cctgactgac 1680  
tctgagatgg atgtggtgag gtttgatgat gacaacagcc ccagcttcat ccagatcagg 1740  
tctgtggcca agaagcacc caagacctgg gtgcactaca ttgctgctga ggaggaggac 1800  
tgggactatg cccccctggt gctggccct gatgacagga gctacaagag ccagtacctg 1860  
aacaatggcc cccagaggat tggcaggaag tacaagaagg tcaggttcat ggcctacact 1920  
gatgaaacct tcaagaccag ggaggccatc cagcatgagt ctggcatcct gggccccctg 1980  
ctgtatgggg aggtggggga caccctgctg atcatcttca agaaccaggc cagcaggccc 2040  
tacaacatct acccccatgg catcactgat gtgaggcccc tgtacagcag gaggtgccc 2100  
aaggggggtga agcacctgaa ggacttcccc atcctgcctg gggagatctt caagtacaag 2160  
tggactgtga ctgtggagga tggccccacc aagtctgacc ccaggtgcct gaccagatac 2220  
tacagcagct ttgtgaacat ggagagggac ctggcctctg gcctgattgg cccctgctg 2280  
atctgctaca aggagtctgt ggaccagagg ggcaaccaga tcatgtctga caagaggaat 2340  
gtgatcctgt tctctgtgtt tgatgagaac aggagctggt acctgactga gaacatccag 2400  
aggttctctgc ccaaccctgc tgggggtgcag ctggaggacc ctgagttcca ggccagcaac 2460  
atcatgcaca gcatcaatgg ctatgtgttt gacagcctgc agctgtctgt gtgcctgcat 2520  
gaggtggcct actggtacat cctgagcatt gggggcccaga ctgacttcct gtctgtgttc 2580  
ttctctggct acaccttcaa gcacaagatg gtgtatgagg acacctgac cctgttcccc 2640  
ttctctgggg agactgtgtt catgagcatg gagaaccctg gcctgtggat tctgggctgc 2700  
cacaactctg acttcaggaa caggggcatg actgccctgc tgaaagtctc cagctgtgac 2760  
aagaacactg gggactacta tgaggacagc tatgaggaca tctctgccta cctgctgagc 2820  
aagaacaatg ccattgagcc caggagcttc agccagaatc caccgtcct taagcgccat 2880  
cagcgcgaga tcaccaggac caccctgcag tctgaccagg aggagattga ctatgatgac 2940  
accatctctg tggagatgaa gaaggaggac tttgacatct acgacgagga cgagaaccag 3000  
agccccagga gcttccagaa gaagaccagg cactacttca ttgctgctgt ggagaggctg 3060  
tgggactatg gcatgagcag cagcccccat gtgctgagga acagggccca gtctggctct 3120  
gtgccccagt tcaagaaggt ggtgttccag gagtactg atggcagctt caccagccc 3180  
ctgtacagag gggagctgaa tgagcacctg ggctgctgg gccctacat cagggtgag 3240  
gtggaggaca acatcatggt gaccttcagg aaccaggcca gcaggcccta cagcttctac 3300  
agcagcctga tcagctatga ggaggaccag aggcaggggg ctgagcccag gaagaacttt 3360  
gtgaagccca atgaaaccaa gacctacttc tggaaggtgc agcaccacat ggccccacc 3420  
aaggatgagt ttgactgcaa ggcctgggcc tacttctctg atgtggacct ggagaaggat 3480  
gtgcactctg gcctgattgg cccctgctg gtgtgccaca ccaacacct gaacctgcc 3540

catggcaggc aggtgactgt gcaggagttt gccctgttct tcaccatctt tgatgaaacc 3600  
aagagctggg acttcactga gaacatggag aggaactgca gggccccctg caacatccag 3660  
atggaggacc ccaccttcaa ggagaactac aggttccatg ccatcaatgg ctacatcatg 3720  
gacaccctgc ctggcctggg gatggcccag gaccagagga tcaggtggta cctgctgagc 3780  
atgggcagca atgagaacat ccacagcatc cacttctctg gccatgtgtt cactgtgagg 3840  
aagaaggagg agtacaagat ggccctgtac aacctgtacc ctgggggtgtt tgagactgtg 3900  
gagatgctgc ccagcaaggc tggcatctgg aggggtggagt gcctgattgg ggagcacctg 3960  
catgctggca tgagcaccct gttcctgggtg tacagcaaca agtgccagac ccccctgggc 4020  
atggcctctg gccacatcag ggacttccag atcactgcct ctggccagta tggccagtgg 4080  
gcccccaagc tggccaggct gcactactct ggcagcatca atgcctggag caccaaggag 4140  
cccttcagct ggatcaaggt ggacctgtg gcccctatga tcatccatgg catcaagacc 4200  
cagggggcca ggcagaagtt cagcagcctg tacatcagcc agttcatcat catgtacagc 4260  
ctggatggca agaagtggca gacctacagg ggcaacagca ctggcacctt gatggtgttc 4320  
tttggcaatg tggacagctc tggcatcaag cacaacatct tcaaccccc catcattgcc 4380  
agatacatca ggctgcaccc caccactac agcatcagga gcacctgag gatggagctg 4440  
atgggctgtg acctgaacag ctgcagcatg cccctgggca tggagagcaa ggccatctct 4500  
gatgccaga tcactgccag cagctacttc accaakatgt ttgccacctg gagccccagc 4560  
aaggccaggc tgcactctga gggcaggagc aatgcctgga gggcccaggc caacaacccc 4620  
aaggagtggc tgcaggtgga cttccagaag accatgaagg tgactggggg gaccacccag 4680  
gggggtgaaga gcctgctgac cagcatgtat gtgaaggagt tcctgatcag cagcagccag 4740  
gatggccacc agtggaccct gttcttccag aatggcaagg tgaaggtgtt ccagggaac 4800  
caggacagct tcaccctgt ggtgaacagc ctggaccccc ccctgctgac cagatacctg 4860  
aggattcacc ccagagctg ggtgcaccag attgcctga ggatggagg gctgggctgt 4920  
gaggcccagg acctgtactg aggatccaat aaaatatctt tattttcatt acatctgtgt 4980  
gttgggtttt tgtgtgtttt cctgtaacga tcgggctcga gcgcaggaac ccctagtgt 5040  
ggagtggcc actccctctc tgcgcgctcg ctcgctcact gaggccgccc gggctttgcc 5100  
cgggcggcct cagtgaagca gcgagcgcgc ag 5132

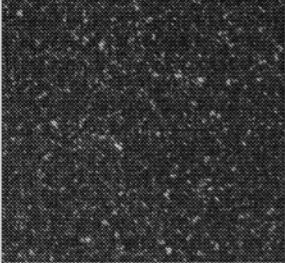
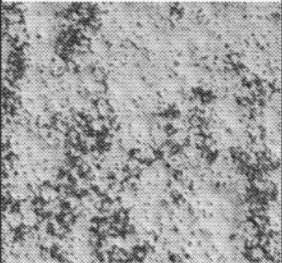
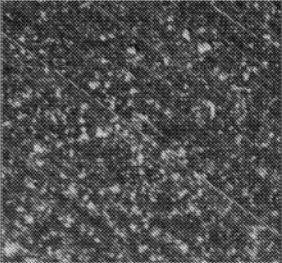
| 分析        | 样品           | 结果                                                                                  | 描述             |
|-----------|--------------|-------------------------------------------------------------------------------------|----------------|
| 数字化<br>成像 | F0           |   | 可以观察到白色颗粒物质    |
| 数字化<br>成像 | F0 5x F/T    |   | 可以观察到大量的白色颗粒物质 |
| 数字化<br>成像 | 25°C下1个月后的F0 |  | 可以观察到大量的白色颗粒物质 |

图1A

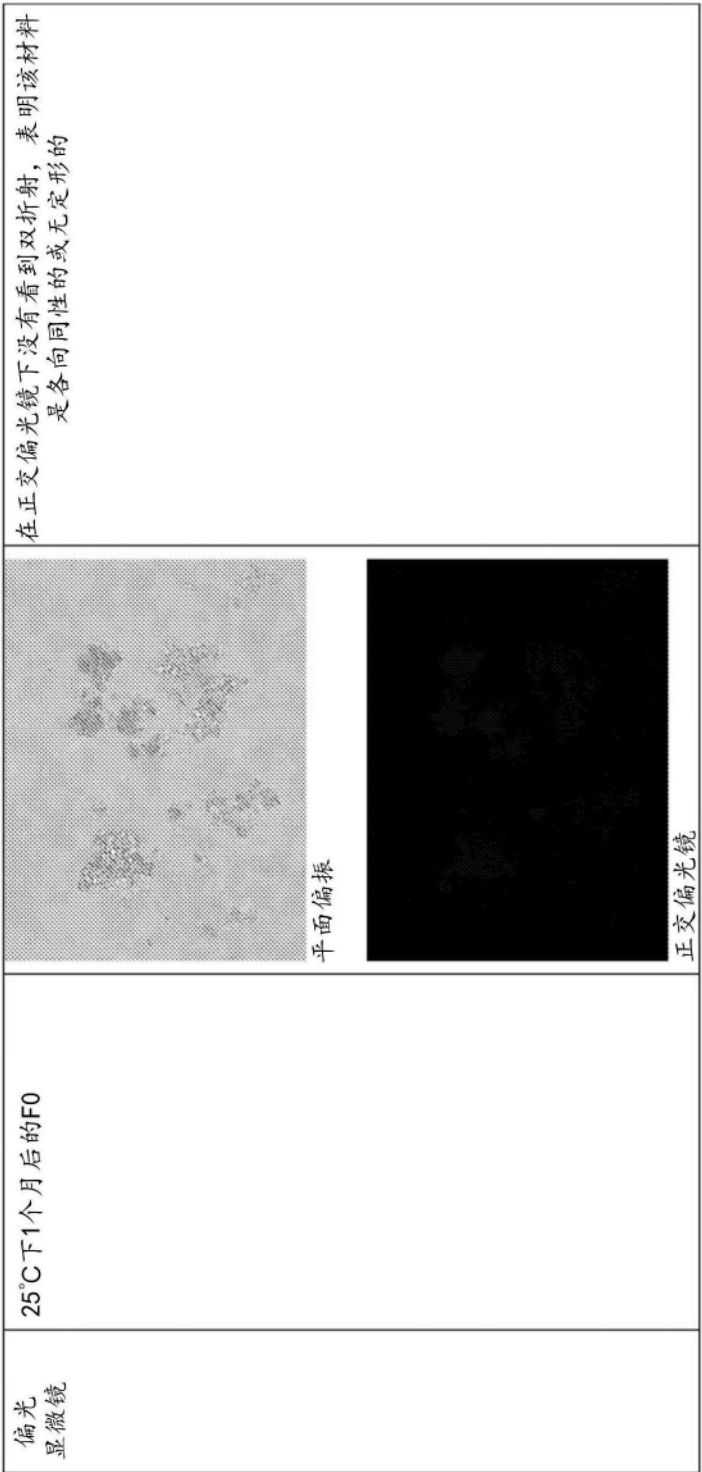


图1B

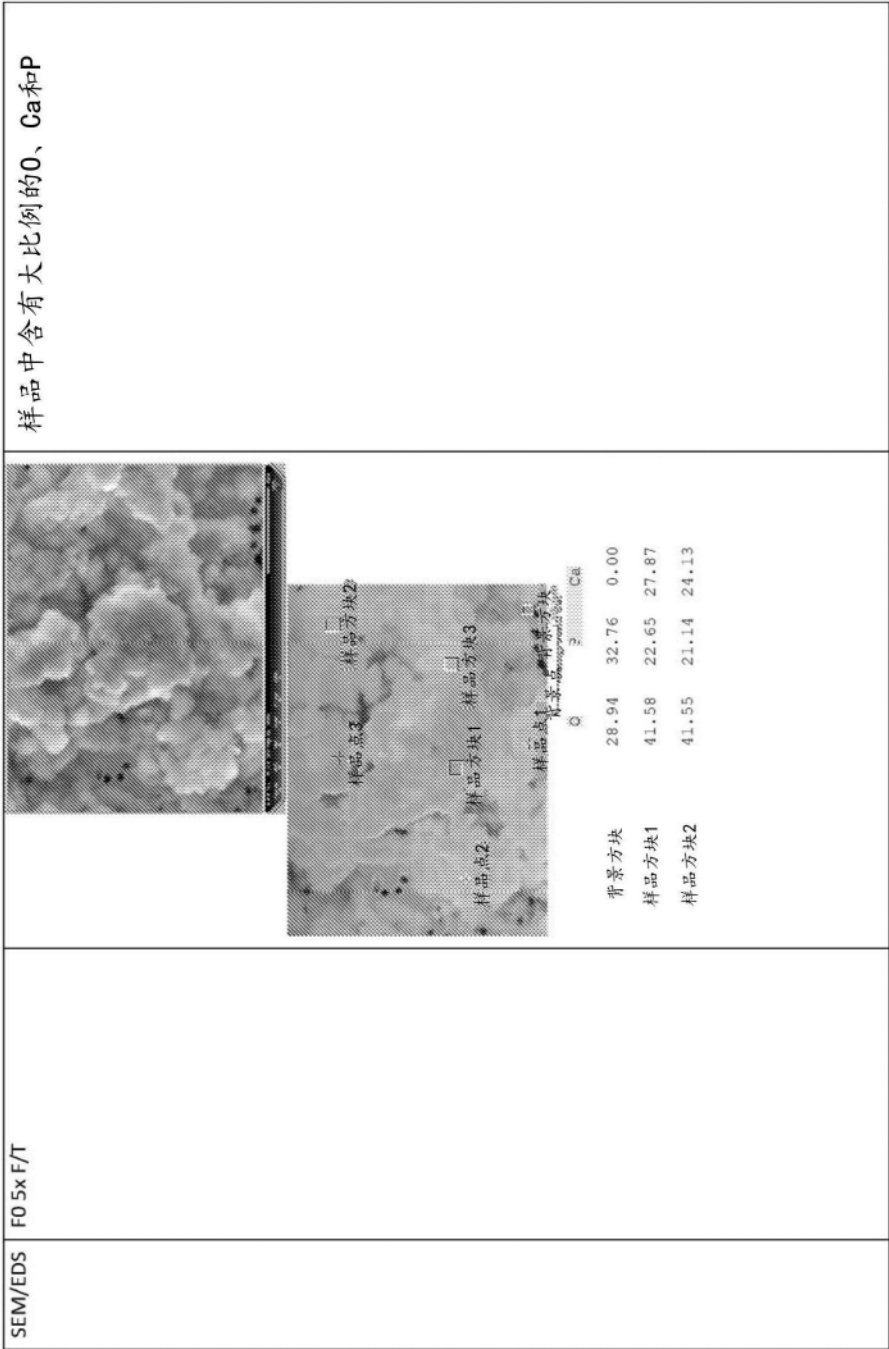


图1C

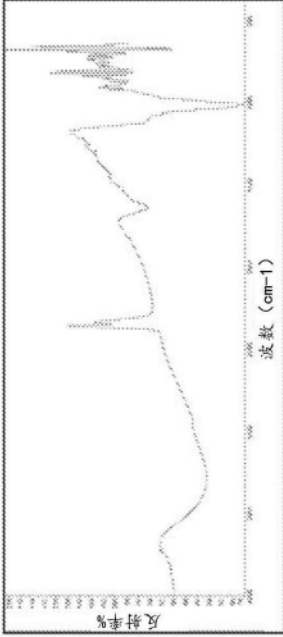
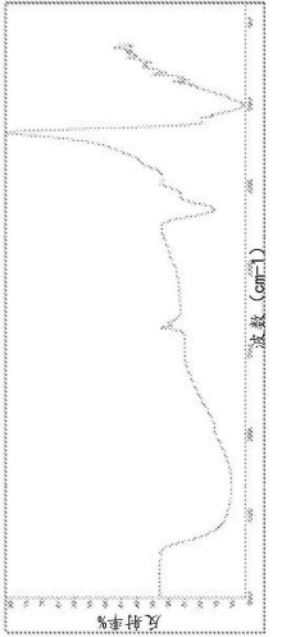
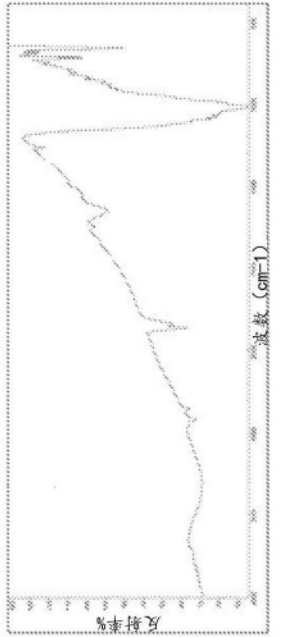
|      |              |                                                                                     |                                                        |
|------|--------------|-------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------|
| FTIR | F0           |   | FTIR表明材料是来自数据库搜索的盐。F0、F0 5x F/T和25°C下1个月的F0样品均显示相似的光谱。 |
| FTIR | F0 5x F/T    |   | FTIR表明材料是来自数据库搜索的盐。F0、F0 5x F/T和25°C下1个月的F0样品均显示相似的光谱。 |
| FTIR | 25°C下1个月后的F0 |  | FTIR表明材料是来自数据库搜索的盐。F0、F0 5x F/T和25°C下1个月的F0样品均显示相似的光谱。 |

图1D

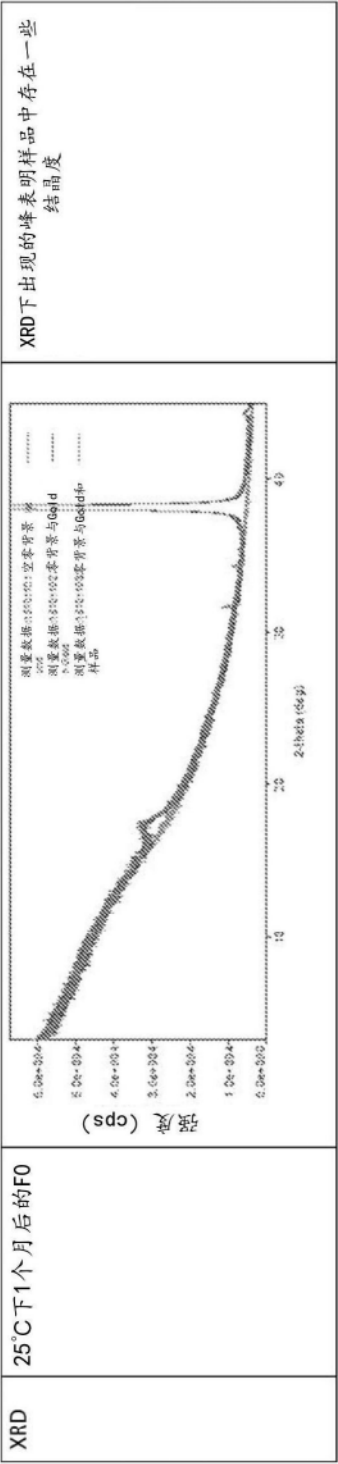


图1E

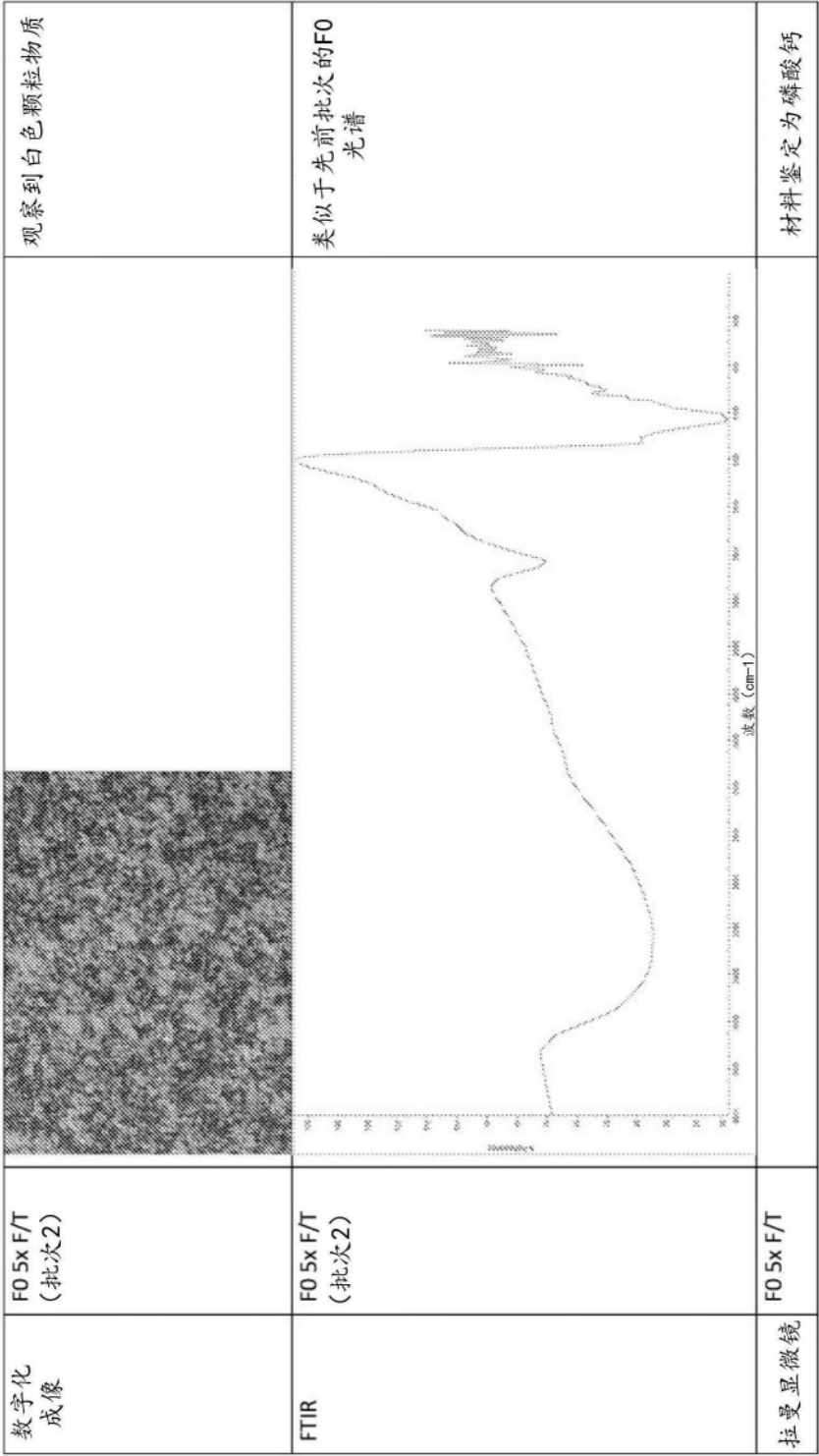


图1F

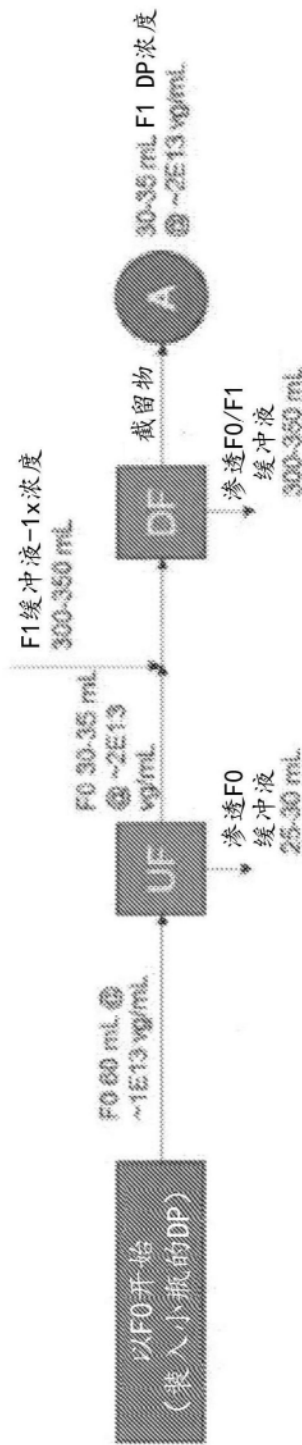


图2

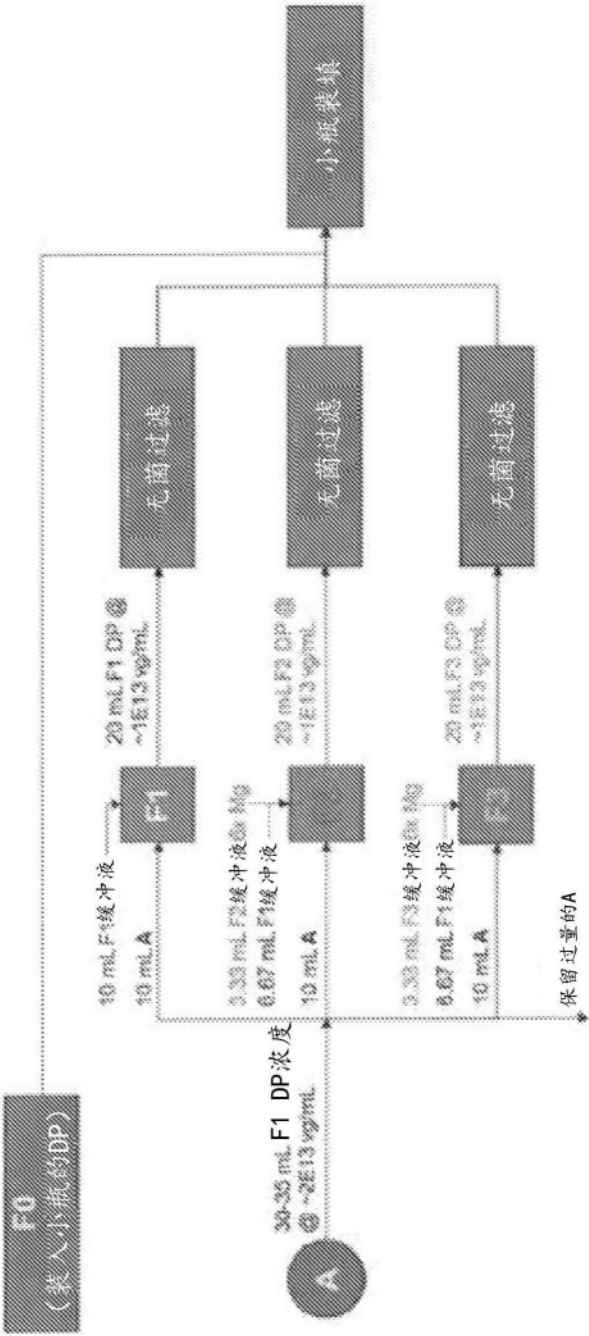


图3

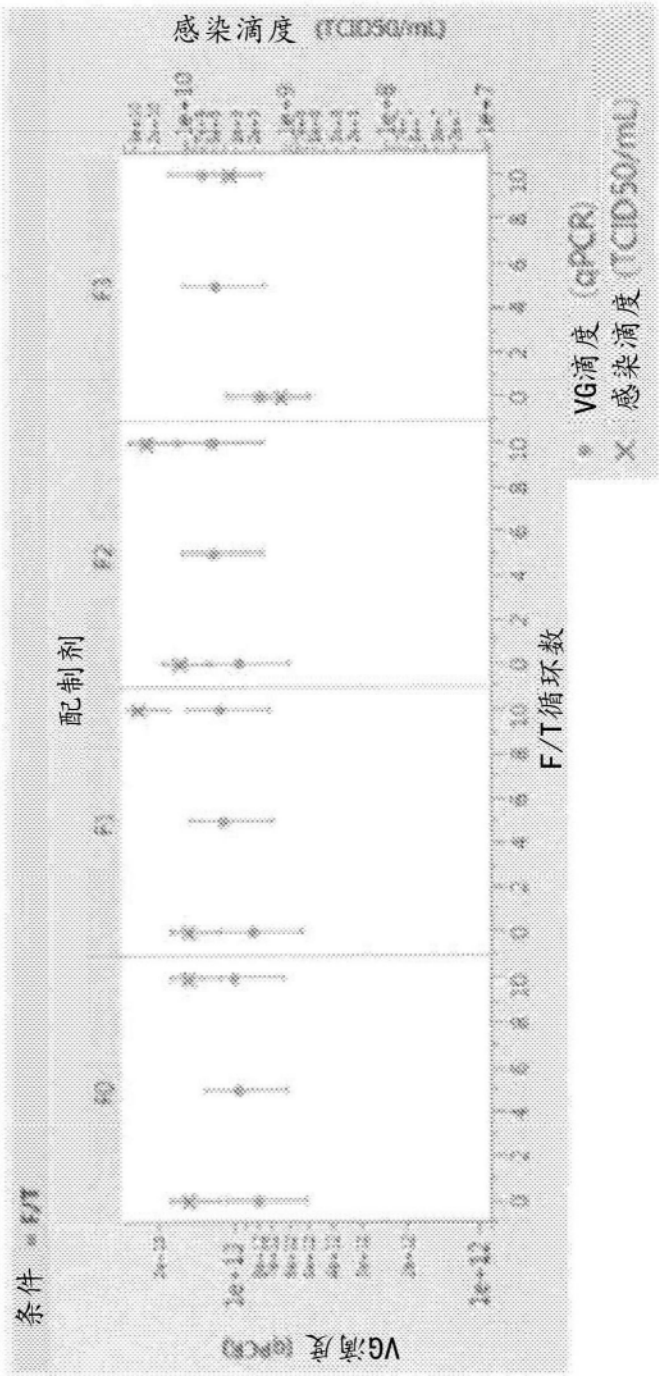


图4A

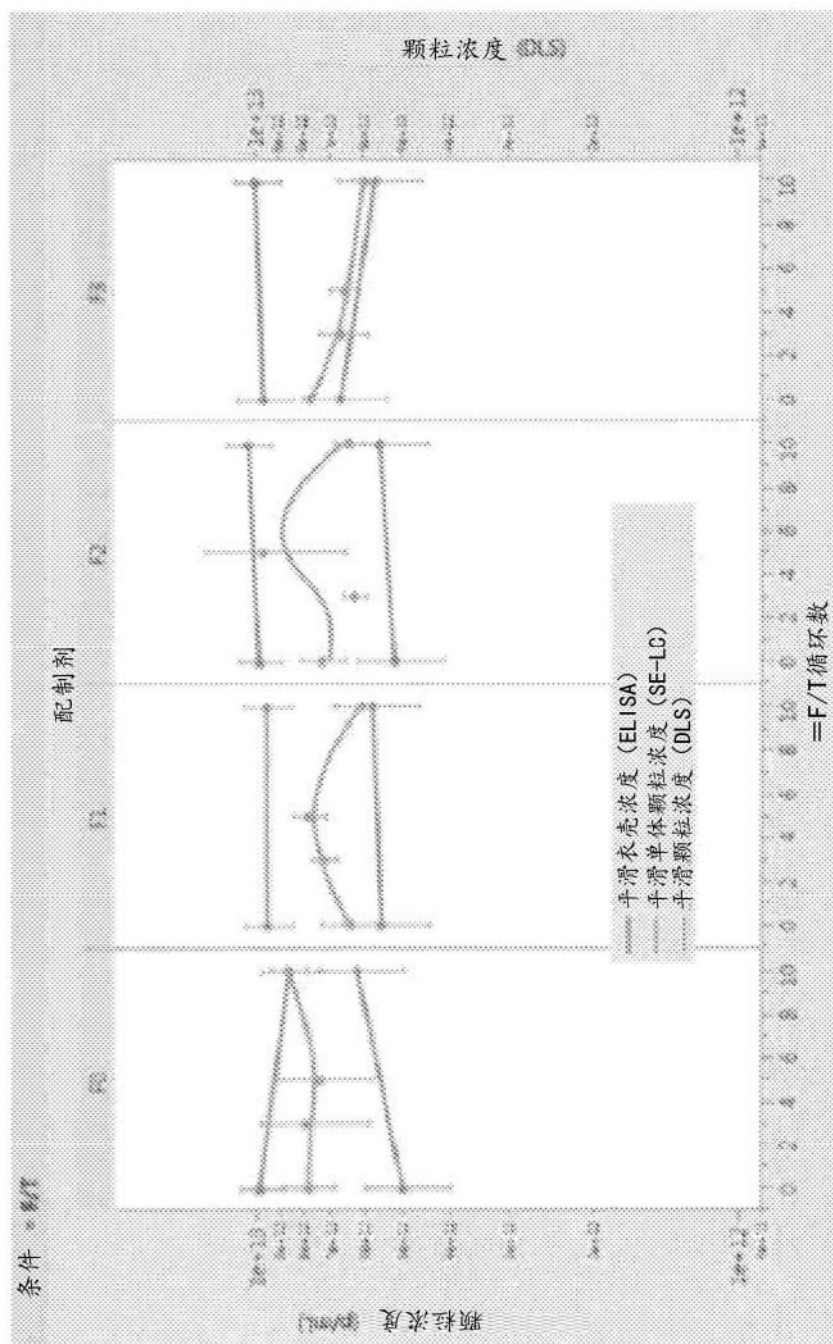


图4B

| 配制剂 | 条件      | 外观 | pH  | 单体峰<br>平均<br>尺寸 (nm) | 多分散性<br>指数 | 单体%,<br>DLS | HMWS%,<br>DLS | HMWS%,<br>SE-LC | 完整<br>衣壳% |
|-----|---------|----|-----|----------------------|------------|-------------|---------------|-----------------|-----------|
| F0  | 初始      | 通过 | 7.3 | 29.7                 | 0.07       | 100.0%      | 0%            | 0.2%            | 89.2%     |
|     | 3x F/T  | 通过 | 7.3 | 30.7                 | 0.12       | 99.6%       | 0.4%          | ND              | ND        |
|     | 5x F/T  | 失败 | 7.3 | 30.4                 | 0.08       | 100.0%      | 0%            | ND              | ND        |
|     | 10x F/T | 失败 | 7.3 | 30.2                 | 0.07       | 100.0%      | 0%            | 0.0%            | 89.3%     |
| F1  | 初始      | 通过 | 7.3 | 33.0                 | 0.12       | 100.0%      | 0%            | 0.5%            | 89.1%     |
|     | 3x F/T  | 通过 | 7.2 | 32.8                 | 0.13       | 100.0%      | 0%            | ND              | ND        |
|     | 5x F/T  | 通过 | 7.2 | 34.3                 | 0.13       | 100.0%      | 0%            | ND              | ND        |
|     | 10x F/T | 通过 | 7.3 | 33.4                 | 0.12       | 100.0%      | 0%            | 0.6 %           | 89.2%     |
| F2  | 初始      | 通过 | 7.2 | 33.6                 | 0.14       | 100.0%      | 0%            | 0.5%            | 89.3%     |
|     | 3x F/T  | 通过 | 7.2 | 34.0                 | 0.14       | 100.0%      | 0%            | ND              | ND        |
|     | 5x F/T  | 通过 | 7.3 | 33.9                 | 0.13       | 100.0%      | 0%            | ND              | ND        |
|     | 10x F/T | 通过 | 7.2 | 33.6                 | 0.13       | 100.0%      | 0%            | 0.5%            | 89.3%     |
| F3  | 初始      | 通过 | 7.2 | 33.4                 | 0.12       | 100.0%      | 0%            | 0.4%            | 89.1%     |
|     | 3x F/T  | 通过 | 7.2 | 33.3                 | 0.12       | 100.0%      | 0%            | ND              | ND        |
|     | 5x F/T  | 通过 | 7.2 | 33.6                 | 0.13       | 100.0%      | 0%            | ND              | ND        |
|     | 10x F/T | 通过 | 7.3 | 33.7                 | 0.13       | 100.0%      | 0%            | 0.3%            | 89.0%     |

ND: 无数据。

图4C

| 配制剂 | 条件      | VG滴度<br>(vg/mL) | 感染滴度<br>(TCID <sub>50</sub> /mL) | VG/TCID <sub>50</sub> | 衣壳滴度<br>(衣壳/mL) | 单体<br>浓度, SE-LC<br>(p/mL) | 单体<br>浓度,<br>MADLS<br>(p/mL) |
|-----|---------|-----------------|----------------------------------|-----------------------|-----------------|---------------------------|------------------------------|
| F0  | 初始      | 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                      |
|     | 10x F/T | 9.9E+12         | 9.3E+09                          | 700                   | 6.2E+12         | 8.6E+12                   | 7.8E+12                      |
| F1  | 初始      | 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                      |
|     | 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                      |
| F2  | 初始      | 9.4E+12         | 1.1E+10                          | 1100                  | 5.2E+12         | 9.9E+12                   | 7.3E+12                      |
|     | 3x F/T  | ND              | 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  | 初始      | 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                      |
|     | 10x F/T | 1.3E+13         | 3.6E+09                          | 2600                  | 5.7E+12         | 1.0E+13                   | 5.7E+12                      |

图4D

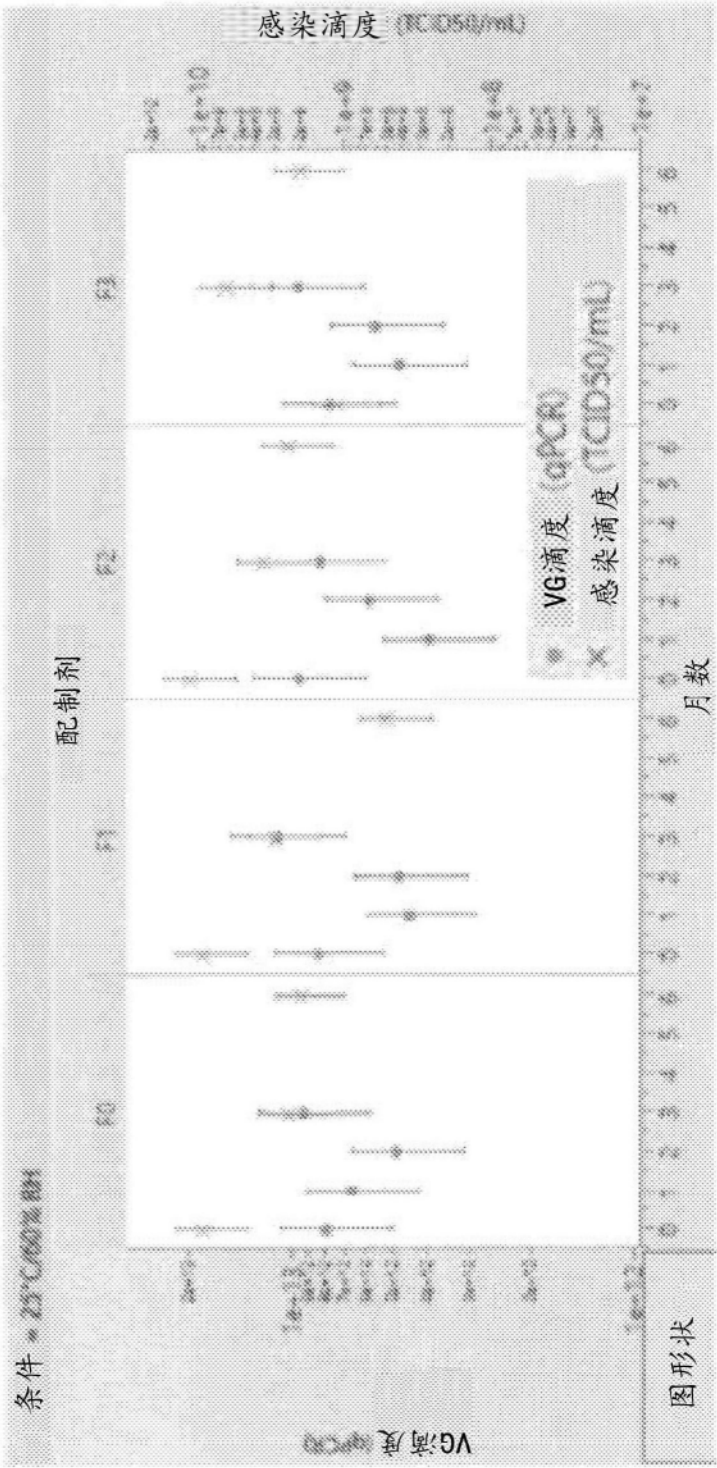


图5A

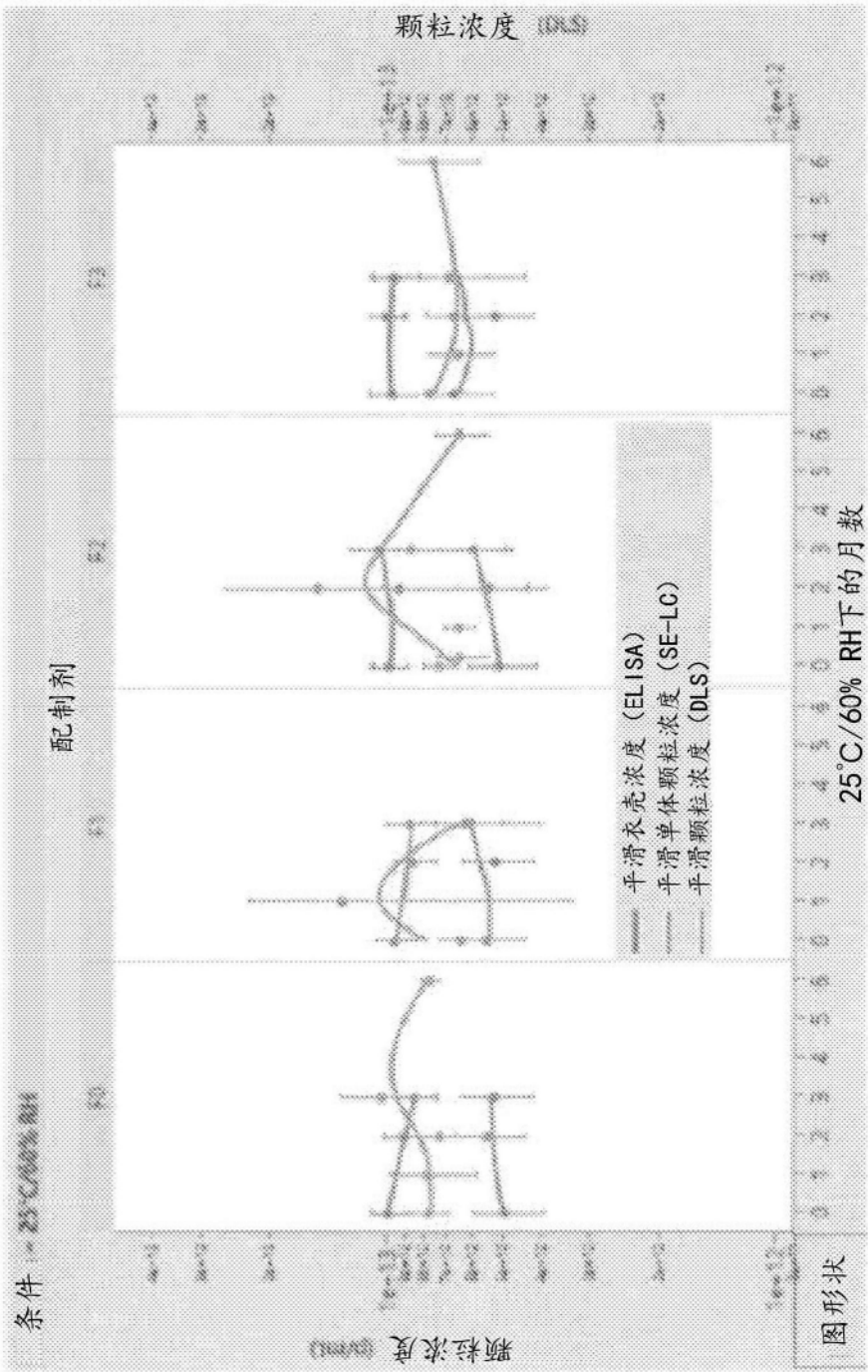


图5B

| 配制剂 | 条件  | 外观 | pH  | 单体峰平均<br>尺寸 (nm) | 多分散性<br>指数 | 单体%,<br>DLS | HMWS%,<br>DLS | HMWS%,<br>SE-LC | 完整<br>衣壳% |
|-----|-----|----|-----|------------------|------------|-------------|---------------|-----------------|-----------|
| F0  | 初始  | 通过 | 7.3 | 29.7             | 0.07       | 100.0%      | 0.0%          | 0.2%            | 89.2%     |
|     | 1周  | 通过 | 7.3 | ND               | ND         | ND          | ND            | ND              | ND        |
|     | 1个月 | 通过 | 7.3 | 30.2             | 0.08       | 100.0%      | 0.0%          | ND              | ND        |
|     | 2个月 | 通过 | 7.2 | 30.1             | 0.07       | 100.0%      | 0.0%          | 0.7%            | NAA       |
|     | 3个月 | 通过 | 7.4 | 32.9             | 0.13       | 100.0%      | 0.0%          | 0.0%            | NAA       |
|     | 6个月 | 通过 | 7.2 | 30.6             | 0.08       | 100.0%      | 0.0%          | ND              | ND        |
| F1  | 初始  | 通过 | 7.3 | 33.0             | 0.12       | 100.0%      | 0.0%          | 0.5%            | 89.1%     |
|     | 1周  | 通过 | 7.1 | ND               | ND         | ND          | ND            | ND              | ND        |
|     | 1个月 | 通过 | 7.2 | 34.3             | 0.14       | 100.0%      | 0.0%          | ND              | ND        |
|     | 2个月 | 通过 | 7.2 | 34.4             | 0.14       | 100.0%      | 0.0%          | 1.9%            | NAA       |
|     | 3个月 | 通过 | 7.2 | 36.4             | 0.17       | 99.6%       | 0.4%          | 5.5%            | NAA       |
|     | 6个月 | 通过 | 7.2 | ND               | ND         | ND          | ND            | ND              | ND        |
| F2  | 初始  | 通过 | 7.2 | 33.6             | 0.14       | 100.0%      | 0.0%          | 0.5%            | 89.3%     |
|     | 1周  | 通过 | 7.2 | ND               | ND         | ND          | ND            | ND              | ND        |
|     | 1个月 | 通过 | 7.2 | 34.2             | 0.13       | 100.0%      | 0.0%          | ND              | ND        |
|     | 2个月 | 通过 | 7.2 | 34.6             | 0.14       | 100.0%      | 0.0%          | 0.8%            | NAA       |
|     | 3个月 | 通过 | 7.2 | 35.4             | 0.17       | 99.5%       | 0.5%          | 1.3%            | NAA       |
|     | 6个月 | 通过 | 7.3 | 34.0             | 0.13       | 100.0%      | 0.0%          | ND              | ND        |
| F3  | 初始  | 通过 | 7.2 | 33.4             | 0.12       | 100.0%      | 0.0%          | 0.4%            | 89.1%     |
|     | 1周  | 通过 | 7.2 | ND               | ND         | ND          | ND            | ND              | ND        |
|     | 1个月 | 通过 | 7.3 | 33.6             | 0.13       | 100.0%      | 0.0%          | ND              | ND        |
|     | 2个月 | 通过 | 7.2 | 33.5             | 0.12       | 100.0%      | 0.0%          | 0.6%            | NAA       |
|     | 3个月 | 通过 | 7.4 | 34.7             | 0.17       | 99.2%       | 0.8%          | 1.7%            | NAA       |
|     | 6个月 | 通过 | 7.2 | 33.9             | 0.13       | 100.0%      | 0.0%          | ND              | ND        |

图5C

| 配制剂 | 条件  | VG滴度<br>(vg/mL) | 感染滴度<br>(TCID <sub>50</sub> /mL) | VG/TCID <sub>50</sub> | 衣壳滴度<br>(衣壳/mL) | 单体<br>浓度, SE-LC<br>(p/mL) | 单体<br>浓度, MADLS<br>(p/mL) |
|-----|-----|-----------------|----------------------------------|-----------------------|-----------------|---------------------------|---------------------------|
| F0  | 初始  | 7.9E+12         | 9.3E+09                          | 1200                  | 5.0E+12         | 1.0E+13                   | 7.8E+12                   |
|     | 1个月 | 6.6E+12         | ND                               | ND                    | ND              | ND                        | 8.6E+12                   |
|     | 2个月 | 4.9E+12         | ND                               | ND                    | 5.5E+12         | 9.0E+12                   | 8.4E+12                   |
|     | 3个月 | 9.2E+12         | 2.4E+09                          | 1100                  | 5.3E+12         | 8.4E+12                   | 8.6E+12                   |
|     | 6个月 | ND              | 2.0E+09                          | ND                    | ND              | ND                        | 7.7E+12                   |
| F1  | 初始  | 8.3E+12         | 9.3E+09                          | 1100                  | 5.5E+12         | 9.5E+12                   | 6.4E+12                   |
|     | 1个月 | 4.5E+12         | ND                               | ND                    | ND              | ND                        | 1.2E+13                   |
|     | 2个月 | 4.8E+12         | ND                               | ND                    | 5.3E+12         | 8.6E+12                   | 1.5E+13                   |
|     | 3个月 | 1.1E+13         | 2.9E+09                          | 600                   | 6.3E+12         | 8.7E+12                   | 4.8E+12                   |
|     | 6个月 | ND              | 5.2E+08                          | ND                    | ND              | ND                        | ND                        |
| F2  | 初始  | 9.4E+12         | 1.1E+10                          | 1100                  | 5.2E+12         | 9.9E+12                   | 7.3E+12                   |
|     | 1个月 | 3.9E+12         | ND                               | ND                    | ND              | ND                        | 6.7E+12                   |
|     | 2个月 | 5.9E+12         | ND                               | ND                    | 5.5E+12         | 9.3E+12                   | 7.6E+12                   |
|     | 3个月 | 8.2E+12         | 3.6E+09                          | 1300                  | 6.0E+12         | 1.1E+13                   | 8.6E+12                   |
|     | 6个月 | ND              | 2.4E+09                          | ND                    | ND              | ND                        | 6.5E+12                   |
| F3  | 初始  | 7.7E+12         | 1.1 E+09                         | 8400                  | 6.7E+12         | 9.7E+12                   | 8.2E+12                   |
|     | 1个月 | 4.8E+12         | ND                               | ND                    | ND              | ND                        | 6.5E+12                   |
|     | 2个月 | 5.6E+12         | ND                               | ND                    | 5.3E+12         | 1.0E+13                   | 7.1E+12                   |
|     | 3个月 | 9.5E+12         | 6.3E+09                          | 500                   | 6.8E+12         | 9.5E+12                   | 7.3E+12                   |
|     | 6个月 | ND              | 2.0E+09                          | ND                    | ND              | ND                        | 7.5E+12                   |

图5D

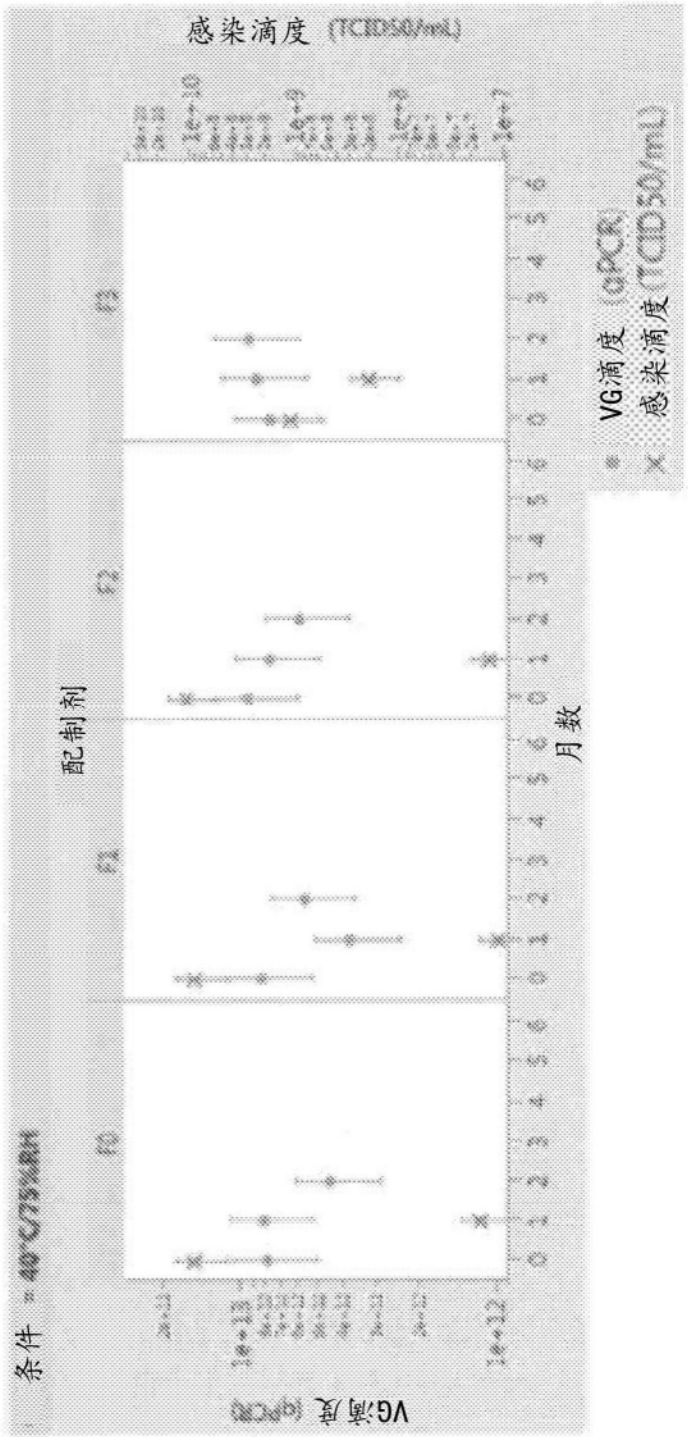


图6A

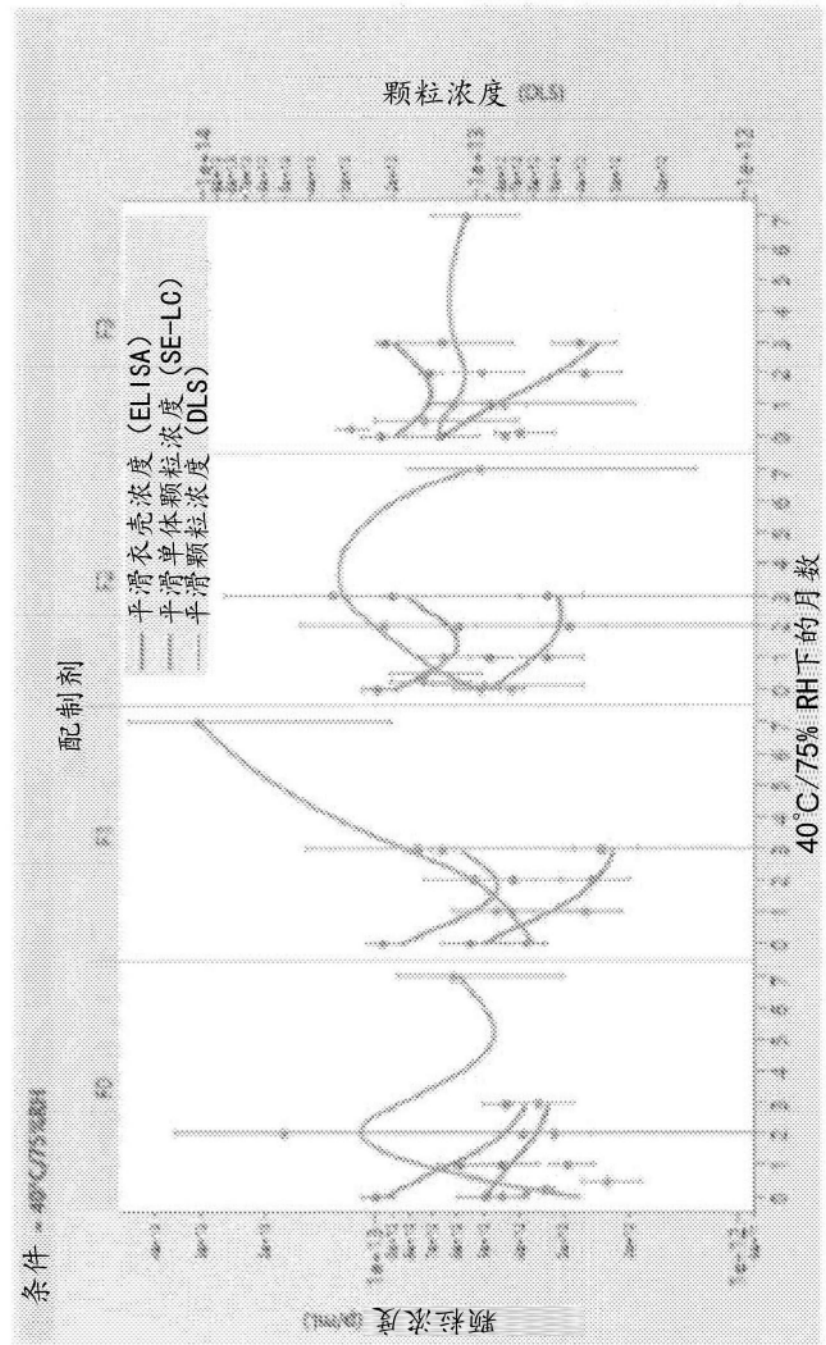


图6B

| 配制剂 | 条件  | 外观 | pH  | 单体峰<br>平均尺寸<br>(nm) | 多分散性<br>指数 | 单体%,<br>DLS | HMWS%,<br>DLS | HMWS%,<br>SE-LC | 完整<br>衣壳% |
|-----|-----|----|-----|---------------------|------------|-------------|---------------|-----------------|-----------|
| F0  | 初始  | 通过 | 7.3 | 29.7                | 0.07       | 100.0%      | 0.0%          | 0.2%            | 89.2%     |
|     | 3天  | 通过 | 7.3 | 34.1                | 0.15       | 99.6 %      | 0.4%          | ND              | ND        |
|     | 1周  | 通过 | 7.4 | 35.0                | 0.14       | 100.0%      | 0.0%          | ND              | ND        |
|     | 2周  | 通过 | 7.3 | 35.9                | 0.20       | 98.1%       | 1.9%          | ND              | ND        |
|     | 1个月 | 通过 | 7.3 | 33.4                | 0.14       | 100.0%      | 0.0%          | 5.4%            | NAA       |
|     | 2个月 | 通过 | 7.1 | 28.8                | 0.36       | 94.6%       | 5.4%          | 0.0%            | NAA       |
|     | 3个月 | 失败 | 7.1 | 32.6                | 0.32       | 87.6%       | 12.4%         | 0.0%            | NAA       |
| F1  | 7个月 | ND | ND  | 32.8                | 0.50       | 72.7%       | 27.3%         | ND              | ND        |
|     | 初始  | 通过 | 7.3 | 33.0                | 0.12       | 100.0 %     | 0.0%          | 0.5%            | 89.1%     |
|     | 3天  | 通过 | 7.2 | ND                  | ND         | ND          | ND            | ND              | ND        |
|     | 1周  | 通过 | 7.2 | ND                  | ND         | ND          | ND            | ND              | ND        |
|     | 2周  | 通过 | 7.2 | ND                  | ND         | ND          | ND            | ND              | ND        |
|     | 1个月 | 通过 | 7.2 | 43.9                | 0.25       | 96.5%       | 3.6%          | 15.2%           | NAA       |
|     | 2个月 | 通过 | 7.2 | 40.6                | 0.22       | 98.5%       | 1.5%          | 4.5%            | NAA       |
| F2  | 3个月 | 失败 | 7.2 | 41.7                | 0.24       | 96.9%       | 3.1%          | 20.3%           | NAA       |
|     | 7个月 | ND | ND  | 46.7                | 0.24       | 99.0%       | 1.0%          | ND              | ND        |
|     | 初始  | 通过 | 7.2 | 33.6                | 0.14       | 100.0%      | 0.0%          | 0.5%            | 89.3%     |
|     | 3天  | 通过 | 7.2 | 39.5                | 0.22       | 96.6%       | 3.4%          | ND              | ND        |
|     | 1周  | 通过 | 7.2 | 45.1                | 0.25       | 94.5%       | 5.5%          | ND              | ND        |
|     | 2周  | 通过 | 7.2 | 42.2                | 0.26       | 92.6%       | 7.4%          | ND              | ND        |
|     | 1个月 | 通过 | 7.2 | 41.3                | 0.23       | 97.6%       | 2.4%          | 6.5%            | NAA       |
| F3  | 2个月 | 通过 | 7.2 | 42.0                | 0.23       | 98.5%       | 1.5%          | 11.6%           | NAA       |
|     | 3个月 | 失败 | 7.3 | 40.3                | 0.24       | 95.0%       | 5.0%          | 17.1%           | NAA       |
|     | 7个月 | ND | ND  | 55.4                | 0.28       | 97.5%       | 2.5%          | ND              | ND        |
|     | 初始  | 通过 | 7.2 | 33.4                | 0.12       | 100.0%      | 0.0%          | 0.4%            | 89.1%     |
|     | 3天  | 通过 | 7.2 | 36.3                | 0.23       | 96.6%       | 3.4%          | ND              | ND        |
|     | 1周  | 通过 | 7.2 | 40.2                | 0.20       | 98.4%       | 1.6%          | ND              | ND        |
|     | 2周  | 通过 | 7.2 | 42.9                | 0.22       | 98.2%       | 1.8%          | ND              | ND        |
|     | 1个月 | 通过 | 7.2 | 37.7                | 0.18       | 100.0%      | 0.0%          | 3.5%            | NAA       |
|     | 2个月 | 通过 | 7.2 | 37.9                | 0.20       | 98.9%       | 1.1%          | 5.6%            | NAA       |

图6C

| 配制剂 | 条件  | 外观 | pH  | 单体峰<br>平均尺寸 (nm) | 多分散<br>性指数 | 单体%,<br>DLS | HMWS%,<br>DLS | HMWS%,<br>SE-LC | 完整<br>衣壳% |
|-----|-----|----|-----|------------------|------------|-------------|---------------|-----------------|-----------|
|     | 3个月 | 失败 | 7.3 | 39.2             | 0.25       | 92.8%       | 7.2%          | 9.5%            | NAA       |
|     | 7个月 | ND | ND  | 46.9             | 0.36       | 82.4%       | 17.6%         | ND              | ND        |

图6C(续)

| 配制剂 | 条件  | VG滴度<br>(vg/mL) | 感染滴度<br>(TCID <sub>50</sub> /mL) | VG/TCID <sub>50</sub> | 衣壳滴度<br>(衣壳/mL) | 单体浓度<br>SE-LC, (p/mL) | 单体浓度<br>(MADLS<br>(p/mL) |
|-----|-----|-----------------|----------------------------------|-----------------------|-----------------|-----------------------|--------------------------|
| F0  | 初始  | 7.9E+12         | 9.3E+09                          | 1200                  | 5.0E+12         | 1.0E+13               | 7.8E+12                  |
|     | 3天  | ND              | ND                               | ND                    | ND              | ND                    | 6.3E+12                  |
|     | 1周  | ND              | ND                               | ND                    | ND              | ND                    | 5.4E+12                  |
|     | 2周  | ND              | ND                               | ND                    | ND              | ND                    | 3.2E+12                  |
|     | 1个月 | 8.1E+12         | 1.7E+07                          | 440000                | 4.5E+12         | 5.9E+12               | 4.0E+12                  |
|     | 2个月 | 4.5E+12         | ND                               | ND                    | 3.2E+12         | 3.9E+12               | 5.1E+13                  |
|     | 3个月 | ND              | ND                               | ND                    | 3.6E+12         | 4.4E+12               | 5.2E+12                  |
| F1  | 7个月 | ND              | ND                               | ND                    | ND              | ND                    | 1.2E+13                  |
|     | 初始  | 8.3E+12         | 9.3E+09                          | 1100                  | 2.6E+12         | 9.5E+12               | 6.4E+12                  |
|     | 3天  | ND              | ND                               | ND                    | ND              | ND                    | ND                       |
|     | 1周  | ND              | ND                               | ND                    | ND              | ND                    | ND                       |
|     | 2周  | ND              | ND                               | ND                    | ND              | ND                    | ND                       |
|     | 1个月 | 3.8E+12         | 1.1E+07                          | 280000                | 2.6E+12         | 4.2E+12               | 1.0E+13                  |
|     | 2个月 | 5.7E+12         | ND                               | ND                    | 2.5E+12         | 4.2E+12               | 8.6E+12                  |
| F2  | 3个月 | ND              | ND                               | ND                    | 2.4E+12         | 6.6E+12               | 1.8E+13                  |
|     | 7个月 | ND              | ND                               | ND                    | ND              | ND                    | 1.0E+14                  |
|     | 初始  | 9.4E+12         | 1.1E+10                          | 1100                  | 5.2E+12         | 9.9E+12               | 7.3E+12                  |
|     | 3天  | ND              | ND                               | ND                    | ND              | ND                    | 9.2E+12                  |
|     | 1周  | ND              | ND                               | ND                    | ND              | ND                    | 1.5E+13                  |
|     | 2周  | ND              | ND                               | ND                    | ND              | ND                    | 1.5E+13                  |
|     | 1个月 | 7.8E+12         | 1.4E+07                          | 410000                | 3.4E+12         | 4.9E+12               | 1.4E+13                  |
| F3  | 2个月 | 6.0E+12         | ND                               | ND                    | 2.9E+12         | 5.9E+12               | 2.2E+13                  |
|     | 3个月 | ND              | ND                               | ND                    | 3.4E+12         | 9.0E+12               | 3.2E+13                  |
|     | 7个月 | ND              | ND                               | ND                    | ND              | ND                    | 1.0E+13                  |
|     | 初始  | 7.7E+12         | 1.1E+09                          | 8400                  | 6.7E+12         | 9.7E+12               | 8.2E+12                  |
|     | 3天  | ND              | ND                               | ND                    | ND              | ND                    | 6.8E+12                  |
|     | 1周  | ND              | ND                               | ND                    | ND              | ND                    | 2.8E+13                  |
|     | 2周  | ND              | ND                               | ND                    | ND              | ND                    | 1.5E+13                  |
|     | 1个月 | 8.7E+12         | 2.0E+08                          | 42000                 | 4.9E+12         | 6.2E+12               | 5.5E+12                  |
|     | 2个月 | 9.3E+12         | ND                               | ND                    | 2.7E+12         | 7.2E+12               | 8.0E+12                  |

图6D

| 配制剂 | 条件  | VG滴度<br>(vg/mL) | 感染滴度<br>(TCID <sub>50</sub> /mL) | VG/TCID <sub>50</sub> | 衣壳滴度<br>(衣壳/mL) | 单体浓度<br>SE-LC, (p/mL) | 单体浓度<br>(MADLS<br>(p/mL) |
|-----|-----|-----------------|----------------------------------|-----------------------|-----------------|-----------------------|--------------------------|
|     | 3个月 | ND              | ND                               | ND                    | 2.8E+12         | 9.4E+12               | 1.3E+13                  |
|     | 7个月 | ND              | ND                               | ND                    | ND              | ND                    | 1.1E+13                  |

图6D(续)

| 质量属性                                  | 测试方法               | 方法<br>变异性 | 稳定性接受标准                           | 失败标准                         |
|---------------------------------------|--------------------|-----------|-----------------------------------|------------------------------|
| 外观液体                                  | 目视检查               | N/A       | 透明无色，无微粒                          | 模糊、浑浊或目视检测到颗粒                |
| pH                                    | 电势测定               | ±0.1      | 7.1 - 7.5                         | <7.1或>7.5                    |
| 单体峰平均尺寸                               | DLS                | <10%      | 从初始(t <sub>0</sub> )变化< 10%       | 从初始变化> +25%                  |
| 多分散性指数                                | DLS                | <10%      | PDI < 0.20                        | PDI > 0.25                   |
| 单级分                                   | DLS                | <2.5%     | > 97.5% 单体                        | < 95% 单体                     |
| HMWS级分                                | DLS                | <2.5%     | < 2.5% HMWS                       | > 5% HMWS                    |
| HMWS级分                                | SE-LC              | <10%      | < 5% HMWS                         | > 10% HMWS                   |
| 完整衣壳%                                 | AEX-LC             | <10%      | > 85% 完整衣壳                        | < 80% 完整衣壳                   |
| 载体基因组滴度                               | qPCR               | 36.0%     | 从初始变化-36%至+36%                    | 从初始变化< -50%                  |
| 感染滴度                                  | TCID <sub>50</sub> | 50.0%     | 从初始变化-50%至+50%                    | 从初始变化< -60%                  |
| V <sub>G</sub> /TCID <sub>50</sub> 比率 | 计算                 | 86.0%     | -log <sub>10</sub> 从初始变化-0.5至+0.5 | -log <sub>10</sub> 从初始变化< -1 |
| 衣壳浓度                                  | ELISA              | 20.0%     | 从初始变化-20%至+20%                    | 从初始变化< -40%                  |
| 单体浓度                                  | SE-LC              | 30.0%     | 从初始变化-30%至+30%                    | 从初始变化< -40%                  |
| 单体浓度                                  | MADLS              | <30%      | 从初始变化-25%至+25%                    | 从初始变化< -40%                  |

图7

| 配制剂 | 测试            | 外观，液体 | pH  | 单体峰<br>平均尺寸     | 多分散<br>性指数 | 单体<br>级分，DLS | HMWS<br>级分<br>DLS | HMWS<br>级分，SE-<br>LC | 完整<br>衣壳%<br>AEX-LC |
|-----|---------------|-------|-----|-----------------|------------|--------------|-------------------|----------------------|---------------------|
|     |               |       |     |                 |            |              |                   |                      |                     |
| F0  | 条件            | 通过/失败 | pH  | 从 $\tau_0$ 的变化% | PDI        | 单体%          | HMWS%             | HMWS%                | 完整%                 |
|     | 初始            | 通过    | 7.3 | 29.65           | 0.07       | 100.0%       | 0.0%              | 0.2%                 | 89.2%               |
|     | 10x F/T       | 失败    | 7.3 | 1.8%            | 0.07       | 99.6%        | 0.4%              | 0.0%                 | 89.3%               |
|     | 3个月25°C/60%RH | 通过    | 7.4 | 11.1%           | 0.13       | 99.6%        | 0.4%              | 0.0%                 | NAA                 |
|     | 1个月40°C/75%RH | 通过    | 7.3 | 12.6%           | 0.14       | 100.0%       | 0.0%              | 5.4%                 | NAA                 |
| F1  | 评估            | 失败    | 通过  | 中立              | 通过         | 通过           | 通过                | 中立                   | 通过                  |
|     | 初始            | 通过    | 7.3 | 33.0            | 0.12       | 100.0%       | 0.0%              | 0.5%                 | 89.1%               |
|     | 10x F/T       | 通过    | 7.3 | 1.0%            | 0.12       | 100.0%       | 0.0%              | 0.6%                 | 89.2%               |
|     | 3个月25°C/60%RH | 通过    | 7.2 | 10.3%           | 0.17       | 100.0%       | 0.0%              | 5.5%                 | NAA                 |
|     | 1个月40°C/75%RH | 通过    | 7.2 | 32.9%           | 0.25       | 85.5%        | 14.5%             | 15.2%                | NAA                 |
| F2  | 评估            | 通过    | 通过  | 失败              | 失败         | 失败           | 失败                | 失败                   | 通过                  |
|     | 初始            | 通过    | 7.2 | 33.6            | 0.14       | 100.0%       | 0.0%              | 0.5%                 | 89.3%               |
|     | 10x F/T       | 通过    | 7.2 | 0.0%            | 0.13       | 100.0%       | 0.0%              | 0.5%                 | 89.3%               |
|     | 3个月25°C/60%RH | 通过    | 7.2 | 5.4%            | 0.17       | 98.4%        | 1.6%              | 1.3%                 | NAA                 |
|     | 1个月40°C/75%RH | 通过    | 7.2 | 23.0%           | 0.23       | 99.7%        | 0.4%              | 6.5%                 | NAA                 |
| F3  | 评估            | 通过    | 通过  | 中立              | 通过         | 通过           | 通过                | 中立                   | 通过                  |
|     | 初始            | 通过    | 7.2 | 33.4            | 0.12       | 100.0%       | 0.0%              | 0.4%                 | 89.1%               |
|     | 10x F/T       | 通过    | 7.3 | 1.0%            | 0.13       | 99.5%        | 0.5%              | 0.3%                 | 89.0%               |
|     | 3个月25°C/60%RH | 通过    | 7.4 | 3.8%            | 0.17       | 100.0%       | 0.0%              | 1.7%                 | NAA                 |
|     | 1个月40°C/75%RH | 通过    | 7.2 | 12.9%           | 0.18       | 100.0%       | 0.0%              | 3.5%                 | NAA                 |
|     | 评估            | 通过    | 通过  | 中立              | 通过         | 通过           | 通过                | 通过                   | 通过                  |

图8

| 测试  |                  | VG滴度，<br>qPCR | 感染滴度，<br>TCID50 | VG/TCID50比率 | 衣壳浓度，<br>ELISA | 单体浓度，<br>SE-LC | 单体浓度，<br>MADLS |
|-----|------------------|---------------|-----------------|-------------|----------------|----------------|----------------|
| 配制剂 | 条件               | 从t0的变化%       | 从t0的变化%         | 从t0的负log变化  | 从t0的变化%        | 从t0的变化%        | 从t0的变化%        |
| F0  | 初始               | 7.9E+12       | 9.3E+09         | 1200        | 5.0E+12        | 1.0E+13        | 7.8E+12        |
|     | 10x F/T          | 25.1%         | 0.0%            | 0.23        | 24.5%          | -13.3%         | 10.8%          |
|     | 3个月 25°C / 60%RH | 16.9%         | -73.9%          | 0.02        | 6.6%           | -14.8%         | 32.0%          |
|     | 1个月 40°C / 75%RH | 3.2%          | -99.8%          | -2.57       | -9.6%          | -40.7%         | -43.3%*        |
|     | 评估               | 通过            |                 | 无评分         | 通过             | 中立             | 中立             |
| F1  | 初始               | 8.3E+12       | 9.3E+09         | 1100        | 5.5E+12        | 9.5E+12        | 6.4E+12        |
|     | 10x F/T          | 36.5%         | 216.2%          | 0.54        | 4.2%           | 0.2%           | -5.5%          |
|     | 3个月 25°C / 60%RH | 31.4%         | -68.3%          | 0.26        | 13.6%          | -8.5%          | -4.6%          |
|     | 1个月 40°C / 75%RH | -54.5%        | -99.9%          | -2.39       | -52.1%         | -55.5%         | 28.9%*         |
|     | 评估               | 失败            |                 | 无评分         | 中立             | 中立             | 中立             |
| F2  | 初始               | 9.4E+12       | 1.1E+10         | 1100        | 5.2E+12        | 9.9E+12        | 7.3E+12        |
|     | 10x F/T          | 27.3%         | 115.4%          | 0.46        | 7.7%           | 5.1%           | -17.5%         |
|     | 3个月 25°C / 60%RH | -13.2%        | -68.4%          | -0.05       | 15.8%          | 6.8%           | 11.4%          |
|     | 1个月 40°C / 75%RH | -17.6%        | -99.9%          | -2.56       | -34.4%         | -50.7%         | 65.9%*         |
|     | 评估               | 通过            |                 | 无评分         | 通过             | 中立             | 中立             |
| F3  | 初始               | 7.7E+12       | 1.1E+09         | 8400        | 6.7E+12        | 9.7E+12        | 7.7E+12        |
|     | 10x F/T          | 68.9%         | 216.2%          | 0.5         | -15.2%         | 3.7%           | -23.6%         |
|     | 3个月 25°C / 60%RH | 22.8%         | 462.3%          | 1.27        | 2.6%           | -1.5%          | -15.0%         |
|     | 1个月 40°C / 75%RH | 12.6%         | -82.2%          | -0.7        | -27.0%         | -36.1%         | 0.1%*          |
|     | 评估               | 中立            |                 | 无评分         | 通过             | 通过             | 通过             |

\*结果不可重复并且不考虑用于最终评分

图9

稳定性结果

| 测试                         |          | 温度 (°C) | T0        | 1个月      | 3个月      | 6个月      | 9个月      | 12个月       | 18个月     | 24个月     |
|----------------------------|----------|---------|-----------|----------|----------|----------|----------|------------|----------|----------|
| 外观，<br>液体                  | 颜色       | -70     | 透明        | ≤B9      | ≤B9      | ≤B9      | ≤B9      | ≤B9        | ≤B9      | ≤B9      |
|                            |          | 5       |           | ≤B9      | ≤B9      | ≤B9      |          | ≤B9        |          |          |
|                            |          | 25      |           | ≤B9      | ≤B9      |          |          |            |          |          |
|                            | 净度       | -70     | 无色        | ≤Ref I   | ≤Ref I   | ≤Ref I   | ≤Ref I   | ≤Ref I     | ≤Ref I   | ≤Ref I   |
|                            |          | 5       |           | ≤Ref I   | ≤Ref I   | ≤Ref I   |          | ≤Ref I     |          |          |
|                            |          | 25      |           | ≤Ref I   | ≤Ref I   |          |          |            |          |          |
|                            | 可见<br>颗粒 | -70     | 无可见<br>微粒 | EFVP     | EFVP     | EFVP     | EFVP     | EFVP       | EFVP     | EFVP     |
|                            |          | 5       |           | EFVP     | EFVP     | EFVP     |          | 1-5 prtcl* |          |          |
|                            |          | 25      |           | EFVP     | EFVP     |          |          |            |          |          |
| 容器封闭完整性                    |          | -70     |           |          |          |          |          |            | 通过       |          |
| pH                         |          | -70     | 7.4       | 7.5      | 7.4      | 7.4      | 7.4      | 7.4        | 7.3      | 7.3      |
|                            |          | 5       |           | 7.4      | 7.3      | 7.3      |          | 7.4        |          |          |
|                            |          | 25      |           | 7.4      | 7.3      |          |          |            |          |          |
| 基因组滴度(qPCR)                |          | -70     | 1.06E+13  | 8.12E+12 | 9.17E+12 | 7.45E+12 | 1.14E+13 | 8.77E+12   | 9.05E+12 | 7.41E+12 |
|                            |          | 5       |           | 7.69E+12 | 8.93E+12 | 6.79E+12 |          | 9.00E+12   |          |          |
|                            |          | 25      |           | 7.93E+12 | 9.26E+12 |          |          |            |          |          |
| 衣壳滴度 (ELISA)               |          | -70     | 1.50E+13  | 1.05E+13 | 1.28E+13 | 1.07E+13 | 1.21E+13 | 1.40E+13   | 1.59E+13 | 1.07E+13 |
|                            |          | 5       |           | 1.14E+13 | 1.26E+13 | 1.14E+13 |          | 1.26E+13   |          |          |
|                            |          | 25      |           | 1.06E+13 | 1.23E+13 |          |          |            |          |          |
| 感染滴度 (TCID <sub>50</sub> ) |          | -70     | 4.31E+09  | 2.93E+09 | 2.20E+09 | 9.29E+08 | 3.56E+09 | 1.82E+09   | 2.00E+09 | 7.67E+09 |
|                            |          | 5       |           | 2.00E+09 | 9.27E+08 | 1.36E+09 |          | 5.22E+09   |          |          |
|                            |          | 25      |           | 5.22E+09 | 1.12E+09 |          |          |            |          |          |
| 基因组滴度/<br>感染滴度比率           |          | -70     | 2459      | 3618     | 4818     | 11410    | 2978     | 5824       | 5300     | 1382     |
|                            |          | -70     |           | 94.4     | 94.5     | 94.5     | 94.7     | 94.6       | 94.5     | 94.9     |
|                            |          | 5       |           | 94.2     | 94.8     | 94.5     |          | 94.8       |          |          |
| 衣壳蛋白纯度 (OE) :<br>衣壳%       |          | -70     | NR        | 94.3     | 93.5     |          |          |            |          |          |
|                            |          | -70     |           | 5.6      | 5.5      | 5.5      | 5.3      | 5.4        | 5.5      | 5.1      |
|                            |          | 5       |           | 5.8      | 5.2      | 5.5      |          | 5.2        |          |          |
| 衣壳蛋白纯度 (OE) :<br>其他%       |          | 25      |           | 5.7      | 6.5      |          |          |            |          |          |
|                            |          |         |           |          |          |          |          |            |          |          |

图10

| 测试                           | 温度 (°C) | T0      | 1个月     | 3个月   | 6个月     | 9个月   | 12个月    | 18个月    | 24个月    |
|------------------------------|---------|---------|---------|-------|---------|-------|---------|---------|---------|
| 尺寸分布 (SEC) :<br>单体%          | -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    |         |         |
|                              | 25      |         | 98.5    | 98.5  |         |       |         |         |         |
| 尺寸分布 (SEC) :<br>聚集体%         | -70     | NMT 1.0 | 1.1     | 1.1   | NMT 1.0 | 1.0   | N/A     | NMT 1.0 | NMT 1.0 |
|                              | 5       |         | NMT 1.0 | 1.2   | NMT 1.0 |       | NMT 1.0 |         |         |
|                              | 25      |         | 1.5     | 1.5   |         |       |         |         |         |
| 颗粒含量 (SEC) :<br>260/280比率    | -70     | 1.32    | 1.32    | 1.32  | 1.32    | 1.32  | 1.32    | 1.33    | 1.32    |
|                              | 5       |         | 1.32    | 1.32  | 1.32    |       | 1.32    |         |         |
|                              | 25      |         | 1.32    | 1.33  |         |       |         |         |         |
| 体外FVII活性/功能性生<br>物测定 (相对效力%) | -70     | 73      | 76      | 82    | 64      | 60    | 69      | 60      | 55      |
|                              | 5       |         | 73      | 60    | 60      |       | 48      |         |         |
|                              | 25      |         | 61      | 42    |         |       |         |         |         |
| P188浓度                       | -70     | NT      | 443.8   | 454.4 | 456.8   | 432.3 | 464.2   | 504.8   | 399.0   |
|                              | 5       |         | NT      | 467.2 | 455.7   |       | 466.6   |         |         |
|                              | 25      |         | 454.7   | 461.9 |         |       |         |         |         |

\*1-5颗粒 (prtcl) ; 颗粒描述—“1个长纤维颗粒”  
NR: 未报道, NTM: 不超过, NT: 未测试

图10(续)