(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2023-0031281
(43) 공개일자 2023년03월07일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 7/00 (2006.01) *C12N 9/16* (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12N 7/00 (2013.01)
C12N 9/16 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2023-7000108
(22) 출원일자(국제) 2021년06월01일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2023년01월02일
(86) 국제출원번호 PCT/US2021/035113
(87) 국제공개번호 WO 2021/247476
국제공개일자 2021년12월09일
(30) 우선권주장
63/033,492 2020년06월02일 미국(US)
(뒷면에 계속)

(71) 출원인
얀센 바이오테크 인코포레이티드
미국 펜실베이니아주 19044 호샴 릿지뷰 드라이브 800/850
(72) 발명자
탐커비치, 브라이언, 이.
미국 펜실베니아 19477 스프링 하우스 맥킨 로드 1400
에르콜리노, 메튜, 피.
미국 펜실베니아 19477 스프링 하우스 맥킨 로드 1400
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
특허법인한성

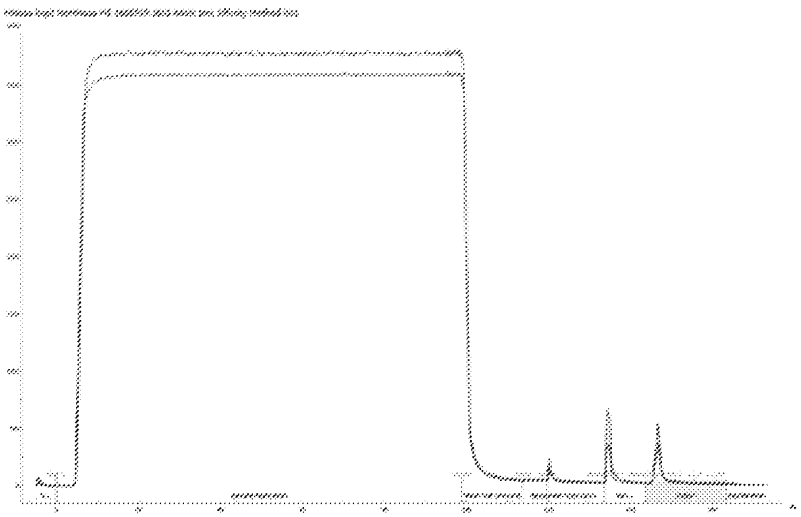
전체 청구항 수 : 총 74 항

(54) 발명의 명칭 **바이러스 정제를 위한 재료 및 방법**

(57) 요 약

염색질-DNA 뉴클레아제(예를 들어, MNase)를 사용한 AAV 입자 정제 방법, 및 AAV 입자 및 염색질-DNA 뉴클레아제(예를 들어, MNase)를 포함하는 조성물이 개시된다. AAV 입자의 정제를 위한 염색질-DNA 뉴클레아제(예를 들어, MNase)를 포함하는 조성물 및 키트가 또한 제공된다.

대 표 도 - 도1a



(52) CPC특허분류
C12Y 301/31001 (2013.01)
C12N 2750/14151 (2013.01)
(72) 발명자
스파놀, 스테펀, 티.
미국 펜실베니아 19477 스프링 하우스 맥킨 로드 1400
모하파트라, 사캬, 싱
미국 펜실베니아 19477 스프링 하우스 맥킨 로드 1400
페리, 윌리엄, 리로이드, 3세
미국 펜실베니아 19477 스프링 하우스 맥킨 로드 1400

(30) 우선권주장
63/033,449 2020년06월02일 미국(US)
63/033,531 2020년06월02일 미국(US)
63/033,549 2020년06월02일 미국(US)
63/033,631 2020년06월02일 미국(US)
63/033,643 2020년06월02일 미국(US)
63/033,731 2020년06월02일 미국(US)

명 세 서

청구범위

청구항 1

아데노-관련 바이러스(AAV) 입자를 정제하는 방법으로서,

(a) AAV 입자를 포함하는 상청액을 염색질-DNA 뉴클레아제를 포함하는 조성물과 접촉시키는 단계; 및

(b) AAV 입자를 정제하는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 2

제1항에 있어서, 정제 단계는 원심분리, 크로마토그래피, 여과 또는 이들의 조합을 포함하는, 방법.

청구항 3

제2항에 있어서, 원심분리는 밀도 구배 원심분리, 초원심분리 또는 이들의 조합을 포함하는, 방법.

청구항 4

제2항에 있어서, 크로마토그래피는 친화성 크로마토그래피, 이온 교환 크로마토그래피, 크기 배제 크로마토그래피, 소수성 상호작용 크로마토그래피 또는 이들의 조합을 포함하는, 방법.

청구항 5

제4항에 있어서, AAV 입자에 결합하기에 충분한 시간 동안 AAV 입자를 포함하는 상청액을 고체 지지체(solid support)와 함께 인큐베이션하는 단계를 추가로 포함하는, 방법.

청구항 6

제5항에 있어서, 고체 지지체를 세정하는 단계를 추가로 포함하는, 방법.

청구항 7

제6항에 있어서, 세정 단계는 고 pH 완충액을 포함하는, 방법.

청구항 8

제7항에 있어서, 고 pH 완충액은 pH 9.0 초과인, 방법.

청구항 9

제7항에 있어서, 고 pH 완충액은 pH 9.0 내지 pH 11인, 방법.

청구항 10

제7항에 있어서, 고 pH 완충액은 약 pH 9.5인, 방법.

청구항 11

제7항에 있어서, 고 pH 완충액은 약 pH 10.2인, 방법.

청구항 12

제7항에 있어서, 고 pH 완충액은 약 pH 10.3인, 방법.

청구항 13

제7항에 있어서, 고 pH 완충액은 약 pH 10.4인, 방법.

청구항 14

제4항 내지 제13항 중 어느 한 항에 있어서, 방법은 하나 이상의 친화성 크로마토그래피 정제를 포함하는, 방법.

청구항 15

제14항에 있어서, 친화성 크로마토그래피는 이온 교환 크로마토그래피를 포함하는, 방법.

청구항 16

제15항에 있어서, 이온 교환 크로마토그래피는 음이온 교환 크로마토그래피를 포함하는, 방법.

청구항 17

제1항 내지 제16항 중 어느 한 항에 있어서, 상청액은 정화된(clarified) 상청액인, 방법.

청구항 18

제1항 내지 제17항 중 어느 한 항에 있어서, 단계 (a)의 조성물은 Benzonase®를 추가로 포함하는, 방법.

청구항 19

제1항 내지 제18항 중 어느 한 항에 있어서, 인큐베이션은 약 10분 내지 약 1시간 동안 수행되는, 방법.

청구항 20

제19항에 있어서, 인큐베이션은 약 20분 내지 약 40분 동안 수행되는, 방법.

청구항 21

제19항 또는 제20항에 있어서, 인큐베이션은 약 30분 동안 수행되는, 방법.

청구항 22

제1항 내지 제21항 중 어느 한 항에 있어서, 염색질-DNA 뉴클레아제는 미세구균 뉴클레아제(MNase)인, 방법.

청구항 23

제22항에 있어서, 상청액 중의 MNase의 농도는 2.5 단위/mL 초과인, 방법.

청구항 24

제23항에 있어서, 상청액 중의 MNase의 농도는 10 단위/mL 초과인, 방법.

청구항 25

제23 또는 제24항에 있어서, 상청액 중의 MNase의 농도는 약 30 단위/mL 내지 약 100 단위/mL인, 방법.

청구항 26

제23항 내지 제25항 중 어느 한 항에 있어서, 상청액 중의 MNase의 농도는 약 60 단위/mL인, 방법.

청구항 27

제22항 내지 제26항 중 어느 한 항에 있어서, MNase는 결합된 AAV 입자를 함유하는 고체 지지체와 함께 인큐베이션되는, 방법.

청구항 28

제5항 내지 제27항 중 어느 한 항에 있어서, AAV 입자는 저 pH 완충액을 사용하여 고체 지지체로부터 용리되는, 방법.

청구항 29

제28항에 있어서, 저 pH 완충액 전에 고 pH 완충액을 추가로 포함하는, 방법.

청구항 30

제28항 또는 제29항에 있어서, 저 pH 완충액은 약 pH 3.0 미만인, 방법.

청구항 31

제30항에 있어서, 저 pH 완충액은 약 pH 1.5 내지 약 pH 2.5인, 방법.

청구항 32

제30항에 있어서, 저 pH 완충액은 약 pH 1.5인, 방법.

청구항 33

제30항에 있어서, 저 pH 완충액은 약 pH 2.5인, 방법.

청구항 34

제28항 내지 제33항 중 어느 한 항에 있어서, 저 pH 완충액은 시트레이트 완충액, 글리신 완충액 또는 인산 완충액인, 방법.

청구항 35

제34항에 있어서, 저 pH 완충액은 시트레이트 완충액인, 방법.

청구항 36

제34항에 있어서, 저 pH 완충액은 인산 완충액인, 방법.

청구항 37

제14항 내지 제36항 중 어느 한 항에 있어서, 친화성 크로마토그래피 정제는 두 번의 친화성 크로마토그래피 정제를 포함하는, 방법.

청구항 38

제37항에 있어서, 방법은 친화성 크로마토그래피 정제에 이어서 음이온-교환 크로마토그래피를 포함하는, 방법.

청구항 39

제28항 내지 제38항 중 어느 한 항에 있어서, 저 pH 완충액의 pH를 중화시키는 단계를 추가로 포함하는, 방법.

청구항 40

제39항에 있어서, 중화 단계는 비스-트리스-프로판(BTP) 또는 트리스 완충액을 첨가하는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 41

제28항 내지 제40항 중 어느 한 항에 있어서, 약 5% 내지 약 40%의 에탄올을 추가로 포함하는, 방법.

청구항 42

제41항에 있어서, 약 10% 내지 약 30%의 에탄올을 포함하는, 방법.

청구항 43

제41항 또는 제42항에 있어서, 약 15% 내지 약 25%의 에탄올을 포함하는, 방법.

청구항 44

제41항 내지 제43항 중 어느 한 항에 있어서, 약 20%의 에탄올을 포함하는, 방법.

청구항 45

제1항 내지 제44항 중 어느 한 항에 있어서, MNase와 접촉하지 않고 정제된 AAV 입자와 비교시, 정제된 AAV 입자에는 염색질-관련 DNA가 실질적으로 없는, 방법.

청구항 46

제1항 내지 제45항 중 어느 한 항에 있어서, MNase와 접촉하지 않고 정제된 AAV 입자와 비교시, 정제된 AAV 입자에는 숙주 세포 DNA가 실질적으로 없는, 방법.

청구항 47

제46항에 있어서, 숙주 세포 DNA 농도는 2 ng/mL 미만인, 방법.

청구항 48

제46항에 있어서, 숙주 세포 DNA 농도는 1.5 ng/mL 미만인, 방법.

청구항 49

제46항에 있어서, 숙주 세포 DNA 농도는 1 ng/mL 미만인, 방법.

청구항 50

제1항 내지 제49항 중 어느 한 항에 있어서, MNase와 접촉하지 않고 정제된 AAV 입자와 비교시, 정제된 AAV 입자에는 숙주 세포 단백질이 실질적으로 없는, 방법.

청구항 51

제50항에 있어서, MNase와 접촉하지 않고 정제된 AAV 입자와 비교시, 정제된 AAV 입자에는 DNA 결합 단백질이 실질적으로 없는, 방법.

청구항 52

제51항에 있어서, DNA 결합 단백질은 히스톤을 포함하는, 방법.

청구항 53

제1항 내지 제52항 중 어느 한 항에 있어서, 정제된 AAV 입자에는 육안으로 보이는 불순물 및 미세한 불순물이 실질적으로 없는, 방법.

청구항 54

제1항 내지 제53항 중 어느 한 항에 있어서, MNase와 접촉하지 않고 정제된 AAV 입자와 비교시, 정제된 AAV 입자는 증가된 바이러스 역가를 갖는, 방법.

청구항 55

제54항에 있어서, 바이러스 역가는 물리적 역가를 포함하는, 방법.

청구항 56

제54항에 있어서, 바이러스 역가는 기능적 역가를 포함하는, 방법.

청구항 57

제54항 내지 제56항 중 어느 한 항에 있어서, 바이러스 역가는 약 2배 내지 약 100배 증가되는, 방법.

청구항 58

제54항 내지 제56항 중 어느 한 항에 있어서, 바이러스 역가는 약 2배 이상 증가되는, 방법.

청구항 59

제54항 내지 제56항 중 어느 한 항에 있어서, 바이러스 역가는 약 3배 이상 증가되는, 방법.

청구항 60

제54항 내지 제56항 중 어느 한 항에 있어서, 바이러스 역가는 약 7배 이상 증가되는, 방법.

청구항 61

제54항 내지 제56항 중 어느 한 항에 있어서, 바이러스 역가는 약 80배 이상 증가되는, 방법.

청구항 62

제1항 내지 제61항 중 어느 한 항에 있어서, MNase와 접촉하지 않고 정제된 AAV 입자와 비교시, 정제된 AAV 입자는 후-생성물 AAV 입자 분획에 대한 생성물 AAV 입자 분획의 증가된 바이러스 역가 비를 포함하는, 방법.

청구항 63

제62항에 있어서, 바이러스 역가 비는 약 2배 이상 증가되는, 방법.

청구항 64

제62항에 있어서, 바이러스 역가 비는 약 5배 이상 증가되는, 방법.

청구항 65

제62항에 있어서, 바이러스 역가 비는 약 10배 이상 증가되는, 방법.

청구항 66

제62항에 있어서, 바이러스 역가 비는 약 25배 이상 증가되는, 방법.

청구항 67

제1항 내지 제66항 중 어느 한 항에 있어서, 정제된 AAV 입자는 동적 광 산란기(DLS)에 의해 측정시 응집 온도(Tagg)의 약 10℃ 미만 내의 용융 온도(Tm)를 갖는, 방법.

청구항 68

제67항에 있어서, 정제된 AAV 입자는 동적 광 산란기(DLS)에 의해 측정시 응집 온도(Tagg)의 약 5℃ 미만 내의 Tm을 갖는, 방법.

청구항 69

제67항에 있어서, 정제된 AAV 입자는 동적 광 산란기(DLS)에 의해 측정시 응집 온도(Tagg)의 2℃ 미만 내의 용융 온도(Tm)을 갖는, 방법.

청구항 70

제1항 내지 제69항 중 어느 한 항에 있어서, 정제된 AAV 입자는 약 50% 초과의 채워진-대-빈(full-to-empty) 캡시드 비를 포함하는, 방법.

청구항 71

제70항에 있어서, 정제된 AAV 입자는 약 60% 초과의 채워진-대-빈 캡시드 비를 포함하는, 방법.

청구항 72

제70항에 있어서, 정제된 AAV 입자는 약 70% 초과의 채워진-대-빈 캡시드 비를 포함하는, 방법.

청구항 73

제1항 내지 제72항 중 어느 한 항에 있어서, MNase와 접촉하지 않고 정제된 AAV 입자와 비교시, 정제된 AAV 입자는 260 nm에서 감소된 흡광도를 갖는 AAV 입자 후-생성물 분획을 포함하는, 방법.

청구항 74

제1항 내지 제73항 중 어느 한 항에 있어서, MNase와 접촉하지 않고 정제된 AAV 입자와 비교시, 정제된 AAV 입자는 280 nm에서 감소된 흡광도를 갖는 AAV 입자 후-생성물 분획을 포함하는, 방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 관련 출원의 상호 참조

[0002] 본 출원은 2020년 6월 2일자로 출원된 미국 특허 출원 시리즈 제63/033,449호, 2020년 6월 2일자로 출원된 미국 특허 출원 시리즈 제63/033,492호, 2020년 6월 2일자로 출원된 미국 특허 출원 시리즈 제63/033,531호, 2020년 6월 2일자로 출원된 미국 특허 출원 시리즈 제63/033,549호, 2020년 6월 2일자로 출원된 미국 특허 출원 시리즈 제63/033,631호, 2020년 6월 2일자로 출원된 미국 특허 출원 시리즈 제63/033,643호, 및 2020년 6월 2일자로 출원된 미국 특허 출원 시리즈 제63/033,731호의 우선권의 이익을 주장하며, 이들 각각은 전체적으로 본 명세서에 참고로 포함된다.

배 경 기 술

[0003] 아데노-관련 바이러스(AAV)는 핵산을 표적 세포로 전달하도록 유전자 조작될 수 있는 비외피성 바이러스이며, 유전자 치료 및 유전자 전달 응용에서 유용한 비히클로서 부각되어 왔다. 바이러스 DNA가 결여된 재조합 AAV(rAAV)는 본질적으로 세포막을 통과하도록 유전자 조작된 단백질 기반 나노입자로, 궁극적으로 이의 핵산 수송물(cargo)을 세포의 핵으로 이송 및 전달할 수 있다. 다른 바이러스 시스템과 비교해 광범위한 조직 친화성(tissue tropism)을 갖는 인간 집단에서 천연적으로 발생하는 지속적인 유전자 발현, 비-융합되고 비-병원성인 낮은 면역원성, 유사분열 후 세포의 감염성 및 상대적인 생성의 용이성과 같은 이러한 바이러스에 의해 부여되는 특성은 인간이 사용할 수 있는 급속한 확장으로 이어졌다. rAAV를 포함한 아데노-관련 바이러스(AAV)에 기초한 유전자 전달 벡터는 광범위한 적용에 대해 안전하고 효과적인 것으로 다시 부각되었다.

[0004] 임상 환경(clinical setting)에서 AAV(예컨대, rAAV)의 사용은 유전자 치료에 사용하기에 적합한 충분한 바이러스 역가를 또한 갖는 순수한 AAV 입자를 매우 대량으로 생성할 수 있는 생성 및 정제 시스템에 대한 시급한 필요성을 보여준다. 그러나, 현재 기술로는 벡터 생성물이 생성되는 생성 시스템의 성분으로부터 유래하는 잔여 수준의 단백질 및 핵산과 같은 모든 불순물을 제거할 수 없다. 따라서, 높은 바이러스 역가를 갖는 AAV 입자의 조성물뿐만 아니라 고도로 순수한 AAV 입자의 생성에 대한 충족되지 못한 요구가 존재한다.

발명의 내용

[0005] 일 양태에서, 아데노-관련 바이러스(AAV) 입자를 정제하는 방법이 본 명세서에 제공되며, 방법은 (a) AAV 입자를 포함하는 상청액을 염색질-DNA 뉴클레아제를 포함하는 조성물과 접촉시키는 단계; 및 (b) AAV 입자를 정제하는 단계를 포함한다.

[0006] 일 실시 형태에서, 정제는 원심분리, 크로마토그래피, 여과 또는 이들의 조합을 포함한다. 일 실시 형태에서, 원심분리는 밀도 구배 원심분리, 초원심분리 또는 이들의 조합을 포함한다. 일 실시 형태에서, 크로마토그래피는 친화성 크로마토그래피, 이온 교환 크로마토그래피, 크기 배제 크로마토그래피, 소수성 상호작용 크로마토그래피 또는 이들의 조합을 포함한다.

[0007] 일 실시 형태에서, 본 방법은 AAV 입자에 결합하기에 충분한 시간 동안 AAV 입자를 포함하는 상청액을 고체 지지체(solid support)와 함께 인큐베이션하는 단계를 추가로 포함한다.

[0008] 일 실시 형태에서, 본 방법은 고체 지지체를 세정하는 단계를 추가로 포함한다. 일 실시 형태에서, 세정 단계는 고 pH 완충액을 포함한다. 일 실시 형태에서, 고 pH 완충액은 pH 9.0 초과이다. 일 실시 형태에서, 고 pH

완충액은 pH 9.0 내지 pH 11이다. 일 실시 형태에서, 고 pH 완충액은 약 pH 9.5이다. 일 실시 형태에서, 고 pH 완충액은 약 pH 10.2이다. 일 실시 형태에서, 고 pH 완충액은 약 pH 10.3이다. 일 실시 형태에서, 고 pH 완충액은 약 pH 10.4이다.

[0009] 일 실시 형태에서, 본 방법은 하나 이상의 친화성 크로마토그래피 정제를 포함한다. 일 실시 형태에서, 친화성 크로마토그래피는 이온 교환 크로마토그래피를 포함한다. 일 실시 형태에서, 이온 교환 크로마토그래피는 음이온 교환 크로마토그래피를 포함한다.

[0010] 일 실시 형태에서, 상청액은 정화된(clarified) 상청액이다.

[0011] 일 실시 형태에서, 단계 (a)의 조성물은 Benzonase®를 추가로 포함한다.

[0012] 일 실시 형태에서, 인큐베이션은 약 10분 내지 약 1시간 동안 수행된다. 일 실시 형태에서, 인큐베이션은 약 20분 내지 약 40분 동안 수행된다. 일 실시 형태에서, 인큐베이션은 약 30분 동안 수행된다.

[0013] 일 실시 형태에서, 염색질-DNA 뉴클레아제는 미세구균 뉴클레아제(MNase)이다. 일 실시 형태에서, 상청액 중의 MNase의 농도는 2.5 단위/mL 초과이다. 일 실시 형태에서, 상청액 중의 MNase의 농도는 10 단위/mL 초과이다. 일 실시 형태에서, 상청액 중의 MNase의 농도는 약 30 단위/mL 내지 약 100 단위/mL이다. 일 실시 형태에서, 상청액 중의 MNase의 농도는 약 60 단위/mL이다. 일 실시 형태에서, MNase는 결합된 AAV 입자를 함유하는 고체 지지체와 함께 인큐베이션된다.

[0014] 일 실시 형태에서, AAV 입자는 저 pH 완충액을 사용하여 고체 지지체로부터 용리된다. 일 실시 형태에서, 용리는 저 pH 완충액 전에 고 pH 완충액을 추가로 포함한다. 일 실시 형태에서, 저 pH 완충액은 약 pH 3.0 미만이다. 일 실시 형태에서, 저 pH 완충액은 약 pH 1.5 내지 약 pH 2.5이다. 일 실시 형태에서, 저 pH 완충액은 약 pH 1.5이다. 일 실시 형태에서, 저 pH 완충액은 약 pH 2.5이다.

[0015] 일 실시 형태에서, 저 pH 완충액은 시트레이트 완충액, 글리신 완충액 또는 인산 완충액이다. 일 실시 형태에서, 저 pH 완충액은 시트레이트 완충액이다. 일 실시 형태에서, 저 pH 완충액은 인산 완충액이다.

[0016] 일 실시 형태에서, 친화성 크로마토그래피 정제는 두 번의 친화성 크로마토그래피 정제를 포함한다. 일 실시 형태에서, 본 방법은 친화성 크로마토그래피 정제에 이어서 음이온-교환 크로마토그래피를 포함한다.

[0017] 일 실시 형태에서, 용리는 저 pH 완충액의 pH를 중화시키는 것을 추가로 포함한다. 일 실시 형태에서, 중화는 비스-트리스-프로판(BTP) 또는 트리스 완충액을 첨가하는 것을 포함한다.

[0018] 일 실시 형태에서, 용리는 에탄올을 추가로 포함한다. 일 실시 형태에서, 에탄올은 약 5% 내지 약 40%이다. 일 실시 형태에서, 에탄올은 약 10% 내지 약 30%이다. 일 실시 형태에서, 에탄올은 약 15% 내지 약 25%이다. 일 실시 형태에서, 에탄올은 약 20%의 에탄올이다.

[0019] 일 실시 형태에서, MNase와 접촉하지 않고 정제된 AAV 입자와 비교시, 정제된 AAV 입자에는 염색질-관련 DNA가 실질적으로 없다.

[0020] 일 실시 형태에서, MNase와 접촉하지 않고 정제된 AAV 입자와 비교시, 정제된 AAV 입자에는 숙주 세포 DNA가 실질적으로 없다. 일 실시 형태에서, 숙주 세포 DNA 농도는 2 ng/mL 미만이다. 일 실시 형태에서, 숙주 세포 DNA 농도는 1.5 ng/mL 미만이다. 일 실시 형태에서, 숙주 세포 DNA 농도는 1 ng/mL 미만이다.

[0021] 일 실시 형태에서, MNase와 접촉하지 않고 정제된 AAV 입자와 비교시, 정제된 AAV 입자에는 숙주 세포 단백질이 실질적으로 없다. 일 실시 형태에서, MNase와 접촉하지 않고 정제된 AAV 입자와 비교시, 정제된 AAV 입자에는 DNA 결합 단백질이 실질적으로 없다. 일 실시 형태에서, DNA 결합 단백질은 히스톤을 포함한다.

[0022] 일 실시 형태에서, 정제된 AAV 입자에는 육안으로 보이는 불순물 및 미세한 불순물이 실질적으로 없다.

[0023] 일 실시 형태에서, MNase와 접촉하지 않고 정제된 AAV 입자와 비교시, 정제된 AAV 입자는 증가된 바이러스 역가를 갖는다. 일 실시 형태에서, 바이러스 역가는 물리적 역가를 포함한다. 일 실시 형태에서, 바이러스 역가는 기능적 역가를 포함한다. 일 실시 형태에서, 바이러스 역가는 약 2배 내지 약 100배 증가된다. 일 실시 형태에서, 바이러스 역가는 약 2배 이상 증가된다. 일 실시 형태에서, 바이러스 역가는 약 3배 이상 증가된다. 일 실시 형태에서, 바이러스 역가는 약 7배 이상 증가된다. 일 실시 형태에서, 바이러스 역가는 약 80배 이상 증가된다.

[0024] 일 실시 형태에서, 정제된 AAV 입자는 MNase와 접촉하지 않고 정제된 AAV 입자와 비교시, 후-생성물(post-

product) AAV 입자 분획에 대한 생성물 AAV 입자 분획의 증가된 바이러스 역가 비를 포함한다. 일 실시 형태에서, 바이러스 역가 비는 약 2배 이상 증가된다. 일 실시 형태에서, 바이러스 역가 비는 약 5배 이상 증가된다. 일 실시 형태에서, 바이러스 역가 비는 약 10배 이상 증가된다. 일 실시 형태에서, 바이러스 역가 비는 약 25배 이상 증가된다.

[0025] 일 실시 형태에서, 정제된 AAV 입자는 동적 광 산란기(DLS)에 의해 측정시 응집 온도(Tagg)의 약 10℃ 미만 내의 용융 온도(Tm)를 갖는다. 일 실시 형태에서, 정제된 AAV 입자는 동적 광 산란기(DLS)에 의해 측정시 응집 온도(Tagg)의 약 5℃ 미만 내의 Tm을 갖는다. 일 실시 형태에서, 정제된 AAV 입자는 동적 광 산란기(DLS)에 의해 측정시 응집 온도(Tagg)의 2℃ 미만 내의 용융 온도(Tm)를 갖는다.

[0026] 일 실시 형태에서, 정제된 AAV 입자는 약 50% 초과의 채워진-대-빈(full-to-empty) 캡시드 비를 포함한다. 일 실시 형태에서, 정제된 AAV 입자는 약 60% 초과의 채워진-대-빈 캡시드 비를 포함한다. 일 실시 형태에서, 정제된 AAV 입자는 약 70% 초과의 채워진-대-빈 캡시드 비를 포함한다.

[0027] 일 실시 형태에서, 정제된 AAV 입자는 MNase와 접촉하지 않고 정제된 AAV 입자와 비교시, 260 nm에서 감소된 흡광도를 갖는 AAV 입자 후-생성물 분획을 포함한다. 일 실시 형태에서, 정제된 AAV 입자는 MNase와 접촉하지 않고 정제된 AAV 입자와 비교시, 280 nm에서 감소된 흡광도를 갖는 AAV 입자 후-생성물 분획을 포함한다.

[0028] 일 양태에서, AAV 입자의 바이러스 역가를 증가시키는 방법이 본 명세서에 제공되며, 방법은 (a) AAV 입자를 포함하는 상청액을 염색질-DNA 뉴클레아제를 포함하는 조성물과 접촉시키는 단계; 및 (b) AAV 입자를 정제하는 단계를 포함한다.

[0029] 일 실시 형태에서, 바이러스 역가는 물리적 바이러스 역가, 기능적 바이러스 역가 또는 둘 모두를 포함한다. 일 실시 형태에서, 바이러스 역가는 물리적 바이러스 역가를 포함한다. 일 실시 형태에서, 바이러스 역가는 기능적 바이러스 역가를 포함한다.

[0030] 일 실시 형태에서, 정제는 원심분리, 크로마토그래피, 여과 또는 이들의 조합을 포함한다. 일 실시 형태에서, 원심분리는 밀도 구배 원심분리, 초원심분리 또는 이들의 조합을 포함한다. 일 실시 형태에서, 크로마토그래피는 친화성 크로마토그래피, 이온 교환 크로마토그래피, 크기 배제 크로마토그래피, 소수성 상호작용 크로마토그래피 또는 이들의 조합을 포함한다.

[0031] 일 실시 형태에서, 본 방법은 AAV 입자에 결합하기에 충분한 시간 동안 AAV 입자를 포함하는 상청액을 고체 지지체와 함께 인큐베이션하는 단계를 추가로 포함한다.

[0032] 일 실시 형태에서, 본 방법은 고체 지지체를 세정하는 단계를 추가로 포함한다. 일 실시 형태에서, 세정 단계는 고 pH 완충액을 포함한다. 일 실시 형태에서, 고 pH 완충액은 pH 9.0 초과이다. 일 실시 형태에서, 고 pH 완충액은 pH 9.0 내지 pH 11이다. 일 실시 형태에서, 고 pH 완충액은 약 pH 9.5이다. 일 실시 형태에서, 고 pH 완충액은 약 pH 10.2이다. 일 실시 형태에서, 고 pH 완충액은 약 pH 10.3이다. 일 실시 형태에서, 고 pH 완충액은 약 pH 10.4이다.

[0033] 일 실시 형태에서, 본 방법은 하나 이상의 친화성 크로마토그래피 정제를 포함한다. 일 실시 형태에서, 친화성 크로마토그래피는 이온 교환 크로마토그래피를 포함한다. 일 실시 형태에서, 이온 교환 크로마토그래피는 음이온 교환 크로마토그래피를 포함한다.

[0034] 일 실시 형태에서, 상청액은 정화된 상청액이다.

[0035] 일 실시 형태에서, 단계 (a)의 조성물은 Benzonase®를 추가로 포함한다.

[0036] 일 실시 형태에서, 인큐베이션은 약 10분 내지 약 1시간 동안 수행된다. 일 실시 형태에서, 인큐베이션은 약 20분 내지 약 40분 동안 수행된다. 일 실시 형태에서, 인큐베이션은 약 30분 동안 수행된다.

[0037] 일 실시 형태에서, 염색질-DNA 뉴클레아제는 미세구균 뉴클레아제(MNase)이다. 일 실시 형태에서, 상청액 중의 MNase의 농도는 2.5 단위/mL 초과이다. 일 실시 형태에서, 상청액 중의 MNase의 농도는 10 단위/mL 초과이다. 일 실시 형태에서, 상청액 중의 MNase의 농도는 약 30 단위/mL 내지 약 100 단위/mL이다. 일 실시 형태에서, 상청액 중의 MNase의 농도는 약 60 단위/mL이다. 일 실시 형태에서, MNase는 결합된 AAV 입자를 함유하는 고체 지지체와 함께 인큐베이션된다.

[0038] 일 실시 형태에서, AAV 입자는 저 pH 완충액을 사용하여 고체 지지체로부터 용리된다. 일 실시 형태에서, 용리는 저 pH 완충액 전에 고 pH 완충액을 추가로 포함한다. 일 실시 형태에서, 저 pH 완충액은 약 pH 3.0 미만이

다. 일 실시 형태에서, 저 pH 완충액은 약 pH 1.5 내지 약 pH 2.5이다. 일 실시 형태에서, 저 pH 완충액은 약 pH 1.5이다. 일 실시 형태에서, 저 pH 완충액은 약 pH 2.5이다.

[0039] 일 실시 형태에서, 저 pH 완충액은 시트레이트 완충액, 글리신 완충액 또는 인산 완충액이다. 일 실시 형태에서, 저 pH 완충액은 시트레이트 완충액이다. 일 실시 형태에서, 저 pH 완충액은 인산 완충액이다.

[0040] 일 실시 형태에서, 친화성 크로마토그래피 정제는 두 번의 친화성 크로마토그래피 정제를 포함한다. 일 실시 형태에서, 본 방법은 친화성 크로마토그래피 정제에 이어서 음이온-교환 크로마토그래피를 포함한다.

[0041] 일 실시 형태에서, 용리는 저 pH 완충액의 pH를 중화시키는 것을 추가로 포함한다. 일 실시 형태에서, 중화는 비스-트리스-프로판(BTP) 또는 트리스 완충액을 첨가하는 것을 포함한다.

[0042] 일 실시 형태에서, 용리는 에탄올을 추가로 포함한다. 일 실시 형태에서, 에탄올은 약 5% 내지 약 40%이다. 일 실시 형태에서, 에탄올은 약 10% 내지 약 30%이다. 일 실시 형태에서, 에탄올은 약 15% 내지 약 25%이다. 일 실시 형태에서, 에탄올은 약 20%의 에탄올이다.

[0043] 일 실시 형태에서, MNase와 접촉하지 않고 정제된 AAV 입자와 비교시, 정제된 AAV 입자에는 염색질-관련 DNA가 실질적으로 없다.

[0044] 일 실시 형태에서, MNase와 접촉하지 않고 정제된 AAV 입자와 비교시, 정제된 AAV 입자에는 숙주 세포 DNA가 실질적으로 없다. 일 실시 형태에서, 숙주 세포 DNA 농도는 2 ng/mL 미만이다. 일 실시 형태에서, 숙주 세포 DNA 농도는 1.5 ng/mL 미만이다. 일 실시 형태에서, 숙주 세포 DNA 농도는 1 ng/mL 미만이다.

[0045] 일 실시 형태에서, MNase와 접촉하지 않고 정제된 AAV 입자와 비교시, 정제된 AAV 입자에는 숙주 세포 단백질이 실질적으로 없다. 일 실시 형태에서, MNase와 접촉하지 않고 정제된 AAV 입자와 비교시, 정제된 AAV 입자에는 DNA 결합 단백질이 실질적으로 없다. 일 실시 형태에서, DNA 결합 단백질은 히스톤을 포함한다.

[0046] 일 실시 형태에서, 정제된 AAV 입자에는 육안으로 보이는 불순물 및 미세한 불순물이 실질적으로 없다.

[0047] 일 실시 형태에서, 바이러스 역가는 약 2배 내지 약 100배 증가된다. 일 실시 형태에서, 바이러스 역가는 약 2배 이상 증가된다. 일 실시 형태에서, 바이러스 역가는 약 3배 이상 증가된다. 일 실시 형태에서, 바이러스 역가는 약 7배 이상 증가된다. 일 실시 형태에서, 바이러스 역가는 약 80배 이상 증가된다.

[0048] 일 실시 형태에서, 정제된 AAV 입자는 MNase와 접촉하지 않고 정제된 AAV 입자와 비교시, 후-생성물 AAV 입자 분획에 대한 생성물 AAV 입자 분획의 증가된 바이러스 역가 비를 포함한다. 일 실시 형태에서, 바이러스 역가 비는 약 2배 이상 증가된다. 일 실시 형태에서, 바이러스 역가 비는 약 5배 이상 증가된다. 일 실시 형태에서, 바이러스 역가 비는 약 10배 이상 증가된다. 일 실시 형태에서, 바이러스 역가 비는 약 25배 이상 증가된다.

[0049] 일 실시 형태에서, 정제된 AAV 입자는 동적 광 산란기(DLS)에 의해 측정시 응집 온도(Tagg)의 약 10℃ 미만 내의 용융 온도(Tm)를 갖는다. 일 실시 형태에서, 정제된 AAV 입자는 동적 광 산란기(DLS)에 의해 측정시 응집 온도(Tagg)의 약 5℃ 미만 내의 Tm을 갖는다. 일 실시 형태에서, 정제된 AAV 입자는 동적 광 산란기(DLS)에 의해 측정시 응집 온도(Tagg)의 2℃ 미만 내의 용융 온도(Tm)를 갖는다.

[0050] 일 실시 형태에서, 정제된 AAV 입자는 약 50% 초과의 채워진-대-빈 캡시드 비를 포함한다. 일 실시 형태에서, 정제된 AAV 입자는 약 60% 초과의 채워진-대-빈 캡시드 비를 포함한다. 일 실시 형태에서, 정제된 AAV 입자는 약 70% 초과의 채워진-대-빈 캡시드 비를 포함한다.

[0051] 일 실시 형태에서, 정제된 AAV 입자는 MNase와 접촉하지 않고 정제된 AAV 입자와 비교시, 260 nm에서 감소된 흡광도를 갖는 AAV 입자 후-생성물 분획을 포함한다. 일 실시 형태에서, 정제된 AAV 입자는 MNase와 접촉하지 않고 정제된 AAV 입자와 비교시, 280 nm에서 감소된 흡광도를 갖는 AAV 입자 후-생성물 분획을 포함한다.

[0052] 일 양태에서, 정제된 AAV 입자의 조성물이 본 명세서에 제공되며, AAV 입자는 염색질-DNA 뉴클레아제를 포함하는 정제 방법에 의해 정제된다. 일 실시 형태에서, 정제 방법은 원심분리, 크로마토그래피, 여과 또는 이들의 조합을 포함한다. 일 실시 형태에서, 원심분리는 밀도 구배 원심분리, 초원심분리 또는 이들의 조합을 포함한다. 일 실시 형태에서, 크로마토그래피는 친화성 크로마토그래피, 이온 교환 크로마토그래피, 크기 배제 크로마토그래피, 소수성 상호작용 크로마토그래피 또는 이들의 조합을 포함한다.

[0053] 일 실시 형태에서, 정제 방법은 AAV 입자에 결합하기에 충분한 시간 동안 AAV 입자를 포함하는 상청액을 고체

지지체와 함께 인큐베이션하는 단계를 추가로 포함한다.

[0054] 일 실시 형태에서, 정제 방법은 고체 지지체를 세정하는 단계를 추가로 포함한다. 일 실시 형태에서, 세정 단계는 고 pH 완충액을 포함한다. 일 실시 형태에서, 고 pH 완충액은 pH 9.0 초과이다. 일 실시 형태에서, 고 pH 완충액은 pH 9.0 내지 pH 11이다. 일 실시 형태에서, 고 pH 완충액은 약 pH 9.5이다. 일 실시 형태에서, 고 pH 완충액은 약 pH 10.2이다. 일 실시 형태에서, 고 pH 완충액은 약 pH 10.3이다. 일 실시 형태에서, 고 pH 완충액은 약 pH 10.4이다

[0055] 일 실시 형태에서, 정제 방법은 하나 이상의 친화성 크로마토그래피 정제를 포함한다. 일 실시 형태에서, 친화성 크로마토그래피는 이온 교환 크로마토그래피를 포함한다. 일 실시 형태에서, 이온 교환 크로마토그래피는 음이온 교환 크로마토그래피를 포함한다.

[0056] 일 실시 형태에서, 상청액은 정화된 상청액이다.

[0057] 일 실시 형태에서, 정제 방법은 Benzonase®를 추가로 포함한다.

[0058] 일 실시 형태에서, 정제 방법은 저 pH 완충액을 사용한 용리를 포함한다. 일 실시 형태에서, 정제 방법은 저 pH 완충액 전에 고 pH 완충액을 추가로 포함한다. 일 실시 형태에서, 저 pH 완충액은 약 pH 3.0 미만이다. 일 실시 형태에서, 저 pH 완충액은 약 pH 1.5 내지 약 pH 2.5이다. 일 실시 형태에서, 저 pH 완충액은 약 pH 1.5이다. 일 실시 형태에서, 저 pH 완충액은 약 pH 2.5이다.

[0059] 일 실시 형태에서, 저 pH 완충액은 시트레이트 완충액, 글리신 완충액 또는 인산 완충액이다. 일 실시 형태에서, 저 pH 완충액은 시트레이트 완충액이다. 일 실시 형태에서, 저 pH 완충액은 인산 완충액이다.

[0060] 일 실시 형태에서, 정제 방법은 두 번의 친화성 크로마토그래피 정제를 포함한다. 일 실시 형태에서, 정제 방법은 친화성 크로마토그래피 정제에 이어서 음이온-교환 크로마토그래피를 포함한다.

[0061] 일 실시 형태에서, 용리는 저 pH 완충액의 pH를 중화시키는 것을 추가로 포함한다. 일 실시 형태에서, 중화는 비스-트리스-프로판(BTP) 또는 트리스 완충액을 첨가하는 것을 포함한다.

[0062] 일 실시 형태에서, 용리는 에탄올을 추가로 포함한다. 일 실시 형태에서, 에탄올은 약 5% 내지 약 40%이다. 일 실시 형태에서, 에탄올은 약 10% 내지 약 30%이다. 일 실시 형태에서, 에탄올은 약 15% 내지 약 25%이다. 일 실시 형태에서, 에탄올은 약 20%의 에탄올이다.

[0063] 일 실시 형태에서, 조성물에는 염색질-DNA 뉴클레아제를 포함하지 않는 방법에 의해 정제된 조성물과 비교시, 불순물이 실질적으로 없다.

[0064] 일 실시 형태에서, 조성물에는 염색질-DNA 뉴클레아제를 포함하지 않는 방법에 의해 정제된 조성물과 비교시, 염색질-관련 DNA가 실질적으로 없다.

[0065] 일 실시 형태에서, 조성물에는 염색질-DNA 뉴클레아제를 포함하지 않는 방법에 의해 정제된 조성물과 비교시, 숙주 세포 DNA가 실질적으로 없다. 일 실시 형태에서, 숙주 세포 DNA 농도는 2 ng/mL 미만이다. 일 실시 형태에서, 숙주 세포 DNA 농도는 1.5 ng/mL 미만이다. 일 실시 형태에서, 숙주 세포 DNA 농도는 1 ng/mL 미만이다.

[0066] 일 실시 형태에서, 조성물에는 염색질-DNA 뉴클레아제와 접촉하지 않은 조성물과 비교시, 숙주 세포 단백질이 실질적으로 없다. 일 실시 형태에서, 조성물에는 염색질-DNA 뉴클레아제와 접촉하지 않은 조성물과 비교시, DNA 결합 단백질이 실질적으로 없다. 일 실시 형태에서, DNA 결합 단백질은 히스톤을 포함한다.

[0067] 일 실시 형태에서, 조성물에는 육안으로 보이는 불순물 및 미세한 불순물이 실질적으로 없다.

[0068] 일 실시 형태에서, 조성물은 염색질-DNA 뉴클레아제와 접촉하지 않은 조성물과 비교시, 음이온 교환 크로마토그램에 의해 측정된 바와 같은 감소된 후-생성물 AAV 입자 분획 피크를 포함한다.

[0069] 일 실시 형태에서, 염색질-DNA 뉴클레아제와 접촉하지 않은 조성물과 비교시, 조성물은 증가된 바이러스 역가를 포함한다. 일 실시 형태에서, 바이러스 역가는 물리적 역가를 포함한다. 일 실시 형태에서, 바이러스 역가는 기능적 역가를 포함한다. 일 실시 형태에서, 바이러스 역가는 약 2배 내지 약 100배 증가된다. 일 실시 형태에서, 바이러스 역가는 약 2배 이상 증가된다. 일 실시 형태에서, 바이러스 역가는 약 3배 이상 증가된다. 일 실시 형태에서, 바이러스 역가는 약 7배 이상 증가된다. 일 실시 형태에서, 바이러스 역가는 약 80배 이상 증가된다.

[0070] 일 실시 형태에서, 조성물은 염색질-DNA 뉴클레아제와 접촉하지 않은 조성물과 비교시, 후-생성물 AAV 입자 분

획에 대한 생성물 AAV 입자 분획의 증가된 바이러스 역가 비를 포함한다. 일 실시 형태에서, 바이러스 역가 비는 약 2배 이상 증가된다. 일 실시 형태에서, 바이러스 역가 비는 약 5배 이상 증가된다. 일 실시 형태에서, 바이러스 역가 비는 약 10배 이상 증가된다. 일 실시 형태에서, 바이러스 역가 비는 약 25배 이상 증가된다.

[0071] 일 실시 형태에서, 정제된 AAV 입자는 동적 광 산란기(DLS)에 의해 측정시 응집 온도(Tagg)의 약 10℃ 미만 내의 용융 온도(Tm)를 갖는다. 일 실시 형태에서, 정제된 AAV 입자는 동적 광 산란기(DLS)에 의해 측정시 응집 온도(Tagg)의 약 5℃ 미만 내의 Tm을 갖는다. 일 실시 형태에서, 정제된 AAV 입자는 동적 광 산란기(DLS)에 의해 측정시 응집 온도(Tagg)의 2℃ 미만 내의 용융 온도(Tm)를 갖는다.

[0072] 일 실시 형태에서, 조성물은 약 50% 초과의 채워진-대-빈 캡시드 비를 포함한다. 일 실시 형태에서, 조성물은 약 60% 초과의 채워진-대-빈 캡시드 비를 포함한다. 일 실시 형태에서, 조성물은 약 70% 초과의 채워진-대-빈 캡시드 비를 포함한다.

[0073] 일 실시 형태에서, 염색질-DNA 뉴클레아제와 접촉하지 않은 조성물과 비교시, 정제된 AAV 입자는 260 nm에서 감소된 흡광도를 갖는 AAV 입자 후-생성물 분획을 포함한다. 일 실시 형태에서, 염색질-DNA 뉴클레아제와 접촉하지 않은 조성물과 비교시, 정제된 AAV 입자는 280 nm에서 감소된 흡광도를 갖는 AAV 입자 후-생성물 분획을 포함한다.

[0074] 일 실시 형태에서, 염색질-DNA 뉴클레아제는 MNase이다.

[0075] 일 양태에서, 염색질-관련 DNA가 실질적으로 없는 AAV 입자를 생성하는데 사용하기 위한 조성물이 본 명세서에 제공되며, 조성물은 (a) AAV 입자를 포함하는 상청액; 및 (b) 염색질-DNA 뉴클레아제를 포함한다.

[0076] 일 실시 형태에서, 조성물은 Benzonase®를 추가로 포함한다.

[0077] 일 실시 형태에서, 염색질-DNA 뉴클레아제는 미세구균 뉴클레아제(MNase)이다. 일 실시 형태에서, 상청액 중의 MNase의 농도는 2.5 단위/mL 초과이다. 일 실시 형태에서, 상청액 중의 MNase의 농도는 10 단위/mL 초과이다. 일 실시 형태에서, 상청액 중의 MNase의 농도는 약 30 단위/mL 내지 약 100 단위/mL이다. 일 실시 형태에서, 상청액 중의 MNase의 농도는 약 60 단위/mL이다. 일 실시 형태에서, MNase는 AAV 입자와 관련된 염색질을 분해시키기에 충분한 양으로 존재한다.

[0078] 다른 양태에서, (a) AAV 입자를 포함하는 상청액; 및 (b) 염색질-DNA 뉴클레아제를 포함하는 조성물이 본 명세서에 제공된다.

[0079] 일 실시 형태에서, 조성물은 Benzonase®를 추가로 포함한다.

[0080] 일 실시 형태에서, 염색질-DNA 뉴클레아제는 미세구균 뉴클레아제(MNase)이다. 일 실시 형태에서, 상청액 중의 MNase의 농도는 2.5 단위/mL보다 크다. 일 실시 형태에서, 상청액 중의 MNase의 농도는 10 단위/mL 초과이다. 일 실시 형태에서, 상청액 중의 MNase의 농도는 약 30 단위/mL 내지 약 100 단위/mL이다. 일 실시 형태에서, 상청액 중의 MNase의 농도는 약 60 단위/mL이다. 일 실시 형태에서, MNase는 AAV 입자와 관련된 염색질을 분해시키기에 충분한 양으로 존재한다.

[0081] 일 실시 형태에서, MNase는 AAV 입자 불순물을 감소시키기에 충분한 양으로 존재한다. 일 실시 형태에서, AAV 입자 불순물은 숙주 세포 DNA, 숙주 세포 단백질, 염색질-관련 DNA 및 DNA 결합 단백질 중 하나 이상을 포함한다. 일 실시 형태에서, AAV 입자 불순물은 육안으로 보이는 불순물 및 미세한 불순물을 포함한다. 일 실시 형태에서, DNA 결합 단백질은 히스톤을 포함한다.

[0082] 일 실시 형태에서, MNase는 AAV 입자의 바이러스 역가를 증가시키기에 충분한 양으로 존재한다. 일 실시 형태에서, 바이러스 역가는 물리적 바이러스 역가, 기능적 바이러스 역가 또는 둘 모두를 포함한다. 일 실시 형태에서, 바이러스 역가는 물리적 역가를 포함한다. 일 실시 형태에서, 바이러스 역가는 기능적 역가를 포함한다. 일 실시 형태에서, 바이러스 역가는 약 2배 내지 약 100배 증가된다. 일 실시 형태에서, 바이러스 역가는 약 2배 이상 증가된다. 일 실시 형태에서, 바이러스 역가는 약 3배 이상 증가된다. 일 실시 형태에서, 바이러스 역가는 약 7배 이상 증가된다. 일 실시 형태에서, 바이러스 역가는 약 80배 이상 증가된다.

[0083] 일 실시 형태에서, MNase는 후-생성물 AAV 입자 분획에 대한 생성물 AAV 입자 분획의 바이러스 역가 비를 증가시키기에 충분한 양으로 존재한다.

[0084] 일 실시 형태에서, 바이러스 역가 비는 약 2배 이상 증가된다. 일 실시 형태에서, 바이러스 역가 비는 약 5배 이상 증가된다. 일 실시 형태에서, 바이러스 역가 비는 약 10배 이상 증가된다. 일 실시 형태에서, 바이러스

역가 비는 약 25배 이상 증가된다.

[0085] 일 실시 형태에서, MNase는 채워진-대-빈 캡시드 비를 증가시키기에 충분한 양으로 존재한다. 일 실시 형태에서, 채워진-대-빈 캡시드 비는 약 50% 초과이다. 일 실시 형태에서, 채워진-대-빈 캡시드 비는 약 60% 초과이다. 일 실시 형태에서, 채워진-대-빈 캡시드 비는 약 70% 초과이다.

[0086] 일 실시 형태에서, MNase는 260 nm에서 흡광도에 의해 측정된 바와 같이 AAV 입자 후-생성물 분획을 감소시키기에 충분한 양으로 존재한다. 일 실시 형태에서, MNase는 280 nm에서 흡광도에 의해 측정된 바와 같이 AAV 입자 후-생성물 분획을 감소시키기에 충분한 양으로 존재한다.

[0087] 일 실시 형태에서, MNase는 동적 광 산란기(DLS)에 의해 측정시 응집 온도(Tagg)의 약 10℃ 미만 내의 용융 온도(Tm)를 포함하는 정제된 AAV 입자를 생성하기에 충분한 양으로 존재한다.

[0088] 일 실시 형태에서, MNase는 동적 광 산란기(DLS)에 의해 측정시 응집 온도(Tagg)의 약 5℃ 미만 내의 용융 온도(Tm)를 포함하는 정제된 AAV 입자를 생성하기에 충분한 양으로 존재한다.

[0089] 일 실시 형태에서, MNase는 동적 광 산란기(DLS)에 의해 측정시 응집 온도(Tagg)의 약 2℃ 미만 내의 용융 온도(Tm)를 포함하는 정제된 AAV 입자를 생성하기에 충분한 양으로 존재한다.

[0090] 일 양태에서, (a) Benzonase®; 및 (b) 염색질-DNA 뉴클레아제를 포함하는 키트가 본 명세서에 제공된다.

[0091] 일 실시 형태에서, 염색질-DNA 뉴클레아제는 미세구균 뉴클레아제(MNase)이다. 일 실시 형태에서, 상청액 중의 MNase의 농도는 2.5 단위/mL 초과이다. 일 실시 형태에서, 상청액 중의 MNase의 농도는 10 단위/mL 초과이다. 일 실시 형태에서, 상청액 중의 MNase의 농도는 약 30 단위/mL 내지 약 100 단위/mL이다. 일 실시 형태에서, 상청액 중의 MNase의 농도는 약 60 단위/mL이다. 일 실시 형태에서, MNase는 AAV 입자와 관련된 염색질을 분해시키기에 충분한 양으로 존재한다.

[0092] 일 실시 형태에서, MNase는 AAV 입자 불순물을 감소시키기에 충분한 양으로 존재한다. 일 실시 형태에서, AAV 입자 불순물은 숙주 세포 DNA, 숙주 세포 단백질, 염색질-관련 DNA 및 DNA 결합 단백질 중 하나 이상을 포함한다. 일 실시 형태에서, AAV 입자 불순물은 육안으로 보이는 불순물 및 미세한 불순물을 포함한다. 일 실시 형태에서, DNA 결합 단백질은 히스톤을 포함한다.

[0093] 일 실시 형태에서, MNase는 AAV 입자의 바이러스 역가를 증가시키기에 충분한 양으로 존재한다. 일 실시 형태에서, 바이러스 역가는 물리적 바이러스 역가, 기능적 바이러스 역가 또는 둘 모두를 포함한다. 일 실시 형태에서, 바이러스 역가는 물리적 역가를 포함한다. 일 실시 형태에서, 바이러스 역가는 기능적 역가를 포함한다. 일 실시 형태에서, 바이러스 역가는 약 2배 내지 약 100배 증가된다. 일 실시 형태에서, 바이러스 역가는 약 2배 이상 증가된다. 일 실시 형태에서, 바이러스 역가는 약 3배 이상 증가된다. 일 실시 형태에서, 바이러스 역가는 약 7배 이상 증가된다. 일 실시 형태에서, 바이러스 역가는 약 80배 이상 증가된다.

[0094] 일 실시 형태에서, MNase는 후-생성물 AAV 입자 분획에 대한 생성물 AAV 입자 분획의 바이러스 역가 비를 증가시키기에 충분한 양으로 존재한다.

[0095] 일 실시 형태에서, 바이러스 역가 비는 약 2배 이상 증가된다. 일 실시 형태에서, 바이러스 역가 비는 약 5배 이상 증가된다. 일 실시 형태에서, 바이러스 역가 비는 약 10배 이상 증가된다. 일 실시 형태에서, 바이러스 역가 비는 약 25배 이상 증가된다.

[0096] 일 실시 형태에서, MNase는 채워진-대-빈 캡시드 비를 증가시키기에 충분한 양으로 존재한다. 일 실시 형태에서, 채워진-대-빈 캡시드 비는 약 50% 초과이다. 일 실시 형태에서, 채워진-대-빈 캡시드 비는 약 60% 초과이다. 일 실시 형태에서, 채워진-대-빈 캡시드 비는 약 70% 초과이다.

[0097] 일 실시 형태에서, MNase는 260 nm에서 흡광도에 의해 측정된 바와 같이 AAV 입자 후-생성물 분획을 감소시키기에 충분한 양으로 존재한다. 일 실시 형태에서, MNase는 280 nm에서 흡광도에 의해 측정된 바와 같이 AAV 입자 후-생성물 분획을 감소시키기에 충분한 양으로 존재한다.

[0098] 일 실시 형태에서, MNase는 동적 광 산란기(DLS)에 의해 측정시 응집 온도(Tagg)의 약 10℃ 미만 내의 용융 온도(Tm)를 포함하는 정제된 AAV 입자를 생성하기에 충분한 양으로 존재한다.

[0099] 일 실시 형태에서, MNase는 동적 광 산란기(DLS)에 의해 측정시 응집 온도(Tagg)의 약 5℃ 미만 내의 용융 온도(Tm)를 포함하는 정제된 AAV 입자를 생성하기에 충분한 양으로 존재한다.

[0100] 일 실시 형태에서, MNase는 동적 광 산란기(DLS)에 의해 측정시 응집 온도(Tagg)의 약 2℃ 미만 내의 용융 온도(Tm)를 포함하는 정제된 AAV 입자를 생성하기에 충분한 양으로 존재한다.

[0101] 일 양태에서, 정제된 AAV 입자에서 불순물을 감소시키기 위한 수단을 포함하는 조성물이 본 명세서에 제공된다.

[0102] 일 실시 형태에서, 불순물은 숙주 세포 DNA, 숙주 세포 단백질, 염색질-관련 DNA 및 DNA 결합 단백질로 이루어진 군으로부터 선택된다. 일 실시 형태에서, DNA 결합 단백질은 히스톤을 포함한다. 일 실시 형태에서, 불순물은 육안으로 보이는 불순물, 미세한 불순물 또는 둘 모두이다.

[0103] 다른 양태에서, AAV 입자의 바이러스 역가를 증가시키기 위한 수단을 포함하는 조성물이 본 명세서에 제공된다. 일 실시 형태에서, 바이러스 역가는 물리적 바이러스 역가, 기능적 바이러스 역가 또는 둘 모두를 포함한다. 일 실시 형태에서, 바이러스 역가는 물리적 바이러스 역가를 포함한다. 일 실시 형태에서, 바이러스 역가는 기능적 바이러스 역가를 포함한다. 일 실시 형태에서, 바이러스 역가는 약 2배 내지 약 100배 증가된다. 일 실시 형태에서, 바이러스 역가는 약 2배 이상 증가된다. 일 실시 형태에서, 바이러스 역가는 약 3배 이상 증가된다. 일 실시 형태에서, 바이러스 역가는 약 7배 이상 증가된다. 일 실시 형태에서, 바이러스 역가는 약 80배 이상 증가된다.

[0104] 또 다른 양태에서, 후-생성물 AAV 입자 분획에 대한 생성물 AAV 입자 분획의 바이러스 역가 비를 증가시키기 위한 수단을 포함하는 조성물이 본 명세서에 제공된다. 일 실시 형태에서, 바이러스 역가 비는 약 2배 이상 증가된다. 일 실시 형태에서, 바이러스 역가 비는 약 5배 이상 증가된다. 일 실시 형태에서, 바이러스 역가 비는 약 10배 이상 증가된다. 일 실시 형태에서, 바이러스 역가 비는 약 25배 이상 증가된다.

[0105] 다른 양태에서, AAV 입자의 채워진-대-빈 캡시드 비를 증가시키기 위한 수단을 포함하는 조성물이 본 명세서에 제공된다. 일 실시 형태에서, 채워진-대-빈 캡시드 비는 약 50% 초과이다. 일 실시 형태에서, 채워진-대-빈 캡시드 비는 약 60% 초과이다. 일 실시 형태에서, 채워진-대-빈 캡시드 비는 약 70% 초과이다.

[0106] 일 양태에서, 260 nm에서 흡광도에 의해 측정된 바와 같이 AAV 입자 후-생성물 분획을 감소시키는 수단을 포함하는 조성물이 본 명세서에 제공된다.

[0107] 일 양태에서, 280 nm에서 흡광도에 의해 측정된 바와 같이 AAV 입자 후-생성물 분획을 감소시키는 수단을 포함하는 조성물이 본 명세서에 제공된다.

[0108] 일 양태에서, AAV 입자에 바이러스 외(extra-virally) 복합체화된 DNA 결합 단백질을 제거하기 위한 제1 수단 및 잔여 숙주 생성 세포 핵산 및/또는 단백질을 제거하기 위한 제2 수단을 포함하는 조성물이 본 명세서에 제공된다.

[0109] 일 양태에서, (i) AAV 입자에 바이러스 외 복합체화된 DNA 결합 단백질을 제거하기 위한 단계를 포함하는 AAV 입자를 정제하는 방법이 본 명세서에 제공된다. 일 실시 형태에서, 본 방법은 (ii) 잔여 숙주 생성 세포 핵산 및/또는 단백질을 제거하기 위한 제2 단계를 추가로 포함한다. 일 실시 형태에서, 본 방법은 (iii) 바이러스 역가를 증가시키기 위한 제3 단계를 추가로 포함한다.

[0110] 일 양태에서, 불순물이 실질적으로 없는 정제된 AAV 입자를 제조 및 수득하기 위한 수단을 포함하는 시스템이 본 명세서에 제공된다. 일 실시 형태에서, 불순물은 숙주 세포 DNA, 숙주 세포 단백질, 염색질-관련 DNA 및 DNA 결합 단백질로 이루어진 군으로부터 선택된다. 일 실시 형태에서, DNA 결합 단백질은 히스톤을 포함한다. 일 실시 형태에서, 불순물은 육안으로 보이는 불순물, 미세한 불순물 또는 둘 모두이다.

[0111] 일 양태에서, 증가된 바이러스 역가를 갖는 AAV 입자를 제조 및 수득하기 위한 수단을 포함하는 시스템이 본 명세서에 제공된다.

[0112] 일 실시 형태에서, 바이러스 역가는 물리적 바이러스 역가, 기능적 바이러스 역가 또는 둘 모두를 포함한다. 일 실시 형태에서, 바이러스 역가는 물리적 역가를 포함한다. 일 실시 형태에서, 바이러스 역가는 기능적 역가를 포함한다. 일 실시 형태에서, 바이러스 역가는 약 2배 내지 약 100배 증가된다. 일 실시 형태에서, 바이러스 역가는 약 2배 이상 증가된다. 일 실시 형태에서, 바이러스 역가는 약 3배 이상 증가된다. 일 실시 형태에서, 바이러스 역가는 약 7배 이상 증가된다. 일 실시 형태에서, 바이러스 역가는 약 80배 이상 증가된다.

[0113] 일 양태에서, 후-생성물 AAV 입자 분획에 대한 생성물 AAV 입자 분획의 바이러스 역가 비를 증가시키기 위한 수단을 포함하는 시스템이 본 명세서에 제공된다. 일 실시 형태에서, 바이러스 역가 비는 약 2배 이상 증가된다. 일 실시 형태에서, 바이러스 역가 비는 약 5배 이상 증가된다. 일 실시 형태에서, 바이러스 역가 비는 약 10배

이상 증가된다. 일 실시 형태에서, 바이러스 역가 비는 약 25배 이상 증가된다.

[0114] 일 양태에서, AAV 입자의 채워진-대-빈 캡시드 비를 증가시키기 위한 수단을 포함하는 시스템이 본 명세서에 제공된다. 일 실시 형태에서, 채워진-대-빈 캡시드 비는 약 50% 초과이다. 일 실시 형태에서, 채워진-대-빈 캡시드 비는 약 60% 초과이다. 일 실시 형태에서, 채워진-대-빈 캡시드 비는 약 70% 초과이다.

[0115] 일 양태에서, 260 nm에서 흡광도에 의해 측정된 바와 같이 AAV 입자 후-생성물 분획을 감소시키는 수단을 포함하는 시스템이 본 명세서에 제공된다.

[0116] 일 양태에서, 280 nm에서 흡광도에 의해 측정된 바와 같이 AAV 입자 후-생성물 분획을 감소시키는 수단을 포함하는 시스템이 본 명세서에 제공된다.

[0117] 일 양태에서, AAV 입자에 바이러스 외 복합체화된 DNA 결합 단백질을 제거하기 위한 제1 수단 및 숙주 생성으로부터 잔여 핵산을 제거하기 위한 제2 수단을 포함하는 시스템이 본 명세서에 제공된다.

[0118] 본 발명의 다른 태양, 특징 및 이점은 본 발명 및 이의 바람직한 실시 형태의 상세한 설명을 포함한 하기의 개시내용 및 첨부된 청구범위로부터 명백할 것이다.

도면의 간단한 설명

[0119] 전술한 개요뿐만 아니라, 본 출원의 바람직한 실시 형태의 하기의 상세한 설명도 첨부 도면과 함께 읽을 때 더 잘 이해될 것이다. 그러나, 본 출원은 도면에 나타낸 정확한 실시 형태로 제한되지 않음이 이해되어야 한다.

도 1a 및 **도 1b**는 MNase 처리가 AAV 입자의 친화성 크로마토그래피에 영향을 미치지 않는다는 것을 도시한다. 바이러스 입자를 함유하는 상청액을 정상 pH(7.5)에서 컬럼에 결합시키고, Benzonase®를 MNase와 함께(도 1a) 또는 MNase 없이(도 1b) AAVX-함유 결합된 바이러스에 직접 첨가하였다. 이 단계에서 MNase의 첨가는 바이러스 입자의 크로마토그램의 형상 또는 수율에 영향을 미치지 않았다.

도 2a 및 **도 2b**는 Mnase의 첨가는 AAV 입자에 바이러스 외 복합체화된 DNA 결합 단백질을 방출했다는 것을 도시한다. 도 2a는 비처리(제1 레인), 2.5 U/mL의 MNase 또는 60 U/mL의 MNase 30분후 친화성 크로마토그래피를 사용하여 생성물 피크(좌측)에 해당하는 샘플 분획을 수집한 후의 겔 전기영동 및 은-염색(silver-staining)(우측)을 도시한다. 60 U/mL의 MNase는 약 10 kDa 근처에서 강한 밴드를 생성하였고, 이는 히스톤의 예측된 분자량 주위에 존재한다. 샘플을 후-생성물 피크 분획에서 취하고 전기영동을 수행하여 샘플에 존재할 수 있는 임의의 염색질을 시각화하였다(도 6b). 결과는 친화성 포획 크로마토그래피 동안 MNase에 의한 처리가 rAAV8로부터 염색질을 제거하기에 충분하다는 것을 나타낸다. 레인 1은 1kb 레더(ladder)이고, 레인 2는 ExpiFectamine™ 293 형질감염 키트를 사용한 Expi293F™ 세포 현탁액에서 생성된 rAAV8 입자이고, 레인 3은 레인 2의 1:10 희석한 샘플이고, 레인 4는 형질감염 키트 없이 Expi293F™ 세포 현탁액에서 생성된 rAAV8 입자이고, 레인 5는 레인 4의 1:10 희석한 샘플이고, 레인 6은 형질감염 키트 없이 Expi293F™ 세포 현탁액에서 생성되고 25℃에서 30분 동안 60U/mL MNase로 분해된 rAAV8 입자이고, 레인 7은 레인 6의 1:10 희석한 샘플이다.

도 3은 부착 세포 배양에서 AAV 입자 생성 동안 최소 세포 사멸은 친화성 포획 동안 미미한 후-생성물 피크를 생성하는 것을 도시한다.

도 4a및**도 4b**는 염색질 분해의 경우 60 U/mL의 MNase 처리(도 4b)가 MNase 처리되지 않은 AAV 입자 정제에 비해 AAV 입자 정제를 증강시켰다는 것을 도시한다(도 4a). MNase 처리 후, 큰 260 nm(RNA/DNA) 흡광도 기여는 후-생성물 피크에 대하여 크게 감소시켰고, 280 nm(단백질) 흡광도 피크와 같이 크게 감소된다.

도 5a 및 **도 5b**는 Mnase로 처리된 또는 Mnase가 없는 샘플을 함유한 rAAV8 입자 로부터의 크로마토그램의 중첩을 도시한다. MNase의 첨가는 DNA/RNA(260 nm)(도 5a) 및 단백질(280 nm)(도 5b)에 대한 후-생성물 피크 높이의 유의미한 감소를 야기하였으며, 이는 후-생성물 피크가 바이러스 외 염색질 관련된 AAV이고, MNase 처리가 AAV 입자 정제를 증강시켰음을 나타내었다.

도 6은 MNase 처리가 예를 들어 일반적인 AAV 입자 정제 작업 동안 염색질이 분해되고 제거될 수 있게 한다는 것을 도시한다. 음이온 교환 크로마토그래피 후 후-생성물 피크의 은 염색 분석은 약 20 kDa의 밴드를 포함하여 MNase로 분해되지 않은 샘플에서 단백질 불순물이 존재함을 나타내었다(도 6a). 레인 1은 ExpiFectamine™ 293 형질감염 키트 인핸서를 사용한 Expi293F™ 세포 현탁액에서 생성된 rAAV8 입자이고, 레인 2는 인핸서가 없는 Expi293F™ 세포 현탁액에서 생성된 rAAV8 입자이고, 레인 3은 Expi293F™ 세포 현탁액에서 생성되고 25℃에서 30분 동안 60U/mL MNase로 분해된 rAAV8 입자이다.

도 7a 내지 도 7c는 MNase 없음(도 7a) 또는 2.5 U/mL의 MNase(도 7b)에서 60 U/mL의 MNase(도 7c)로 MNase의 양을 증가시키는 것은 음이온 교환 크로마토그래피 폴리싱 단계에서 염색질-관련 AAV 입자를 감소시켰다는 것을 도시한다.

도 8은 후-생성물 피크의 검사가 ExpiFectamine™ 293 형질감염 키트 인핸서를 사용하거나 인핸서 없이 생성된 MNase 처리되지 않은 샘플에서 가시적 침전물을 나타냈다는 것을 도시한다. 그러나, MNase 분해는 바이러스 입자의 응집 및 침전을 방지하였다.

도 9a 내지 도 9f는 MNase 처리가 3가지의 상이한 유형의 용리를 사용하여 MNase 처리되지 않은 샘플과 비교해 생성물 피크 분획에서 DNA의 양을 증가시켰다는 것을 도시한다. MNase 없이 고/저 pH 용리(도 9a), MNase와 함께 고/저 pH 용리(도 9d), MNase 없이 시트레이트 용리(도 9b), MNase와 함께 시트레이트 용리(도 9e), MNase 없이 저 pH 용리(도 9c), 및 MNase와 함께 저 pH 용리(도 9f). 레인 1(효소 로딩, "L"), 레인 2(효소 세정, "W"), 레인 3(고 pH 세정 "H" 또는 빈 레인 "X"), 레인 4(음이온 교환 생성물 피크 "P"), 레인 5(음이온 교환 후-생성물 피크 "PP"), 및 레인 6(AAVX 스트립 피크 "S").

도 10a 내지 도 10c는 MNase 처리되지 않은 샘플 및 ExpiFectamine™ 293 형질감염 키트 인핸서를 사용하여 생성된 샘플과 비교해, MNase 처리가 바이러스 역가(도 10a), 게놈 카피/세포(도 10b) 및 총 게놈 카피(도 10c)를 증가시켰고, 생성된 후-생성물의 양을 감소시켰음을 도시한다.

도 11a 및 **도 11b**는 세포 당 게놈 카피(GC/세포)(도 11a) 및 총 게놈 카피(도 11b)에서의 증가는 3가지의 상이한 용리 완충액, 시트레이트, 저 pH 및 저/고 pH 각각에 대해 MNase 처리되지 않은 샘플(정사각형)에 비해 MNase 처리된 샘플(원)에서 일관되게 관찰되었음을 도시한다.

도 12는 MNase 처리되지 않은 생성물 분획(왼쪽 상단)에 비해 MNase 처리가 고/저 pH 용리 생성물 분획(오른쪽 상단)의 감염성을 증가시켰고, MNase 처리되지 않은 후-생성물 분획(왼쪽 하단)에 비해 MNase 처리된 후-생성물 분획(오른쪽 하단)의 감염성을 감소시켰음을 도시한다.

도 13은 MNase 처리되지 않은 생성물 분획(왼쪽 상단)에 비해 MNase 처리가 시트레이트 용리 생성물 분획(오른쪽 상단)의 감염성을 증가시켰고, MNase 처리되지 않은 후-생성물 분획(왼쪽 하단)에 비해 MNase 처리된 후-생성물 분획(오른쪽 하단)의 감염성을 감소시켰음을 도시한다.

도 14는 MNase 처리되지 않은 생성물 분획(왼쪽 상단)에 비해 MNase 처리가 저 pH 용리 생성물 분획(오른쪽 상단)의 감염성을 증가시켰고, MNase 처리되지 않은 후-생성물 분획(왼쪽 하단)에 비해 MNase 처리된 후-생성물 분획(오른쪽 하단)의 감염성을 감소시켰음을 도시한다.

도 15a 및 **도 15b**는 효소가 없는 샘플 또는 Benzonase® 단독 처리된 샘플은 은 염색에 의해 측정된 바와 같이 불순물을 함유한다는 것을 도시한다. 도 15a는 컬럼 상 효소 처리 없이 정제된 AAV 샘플을 도시하고, 도 15b는 Benzonase® 단독 처리한 샘플을 도시한다. PE = 용리 전 피크; E = 용리; R = 잔류물(retentate) (100 kDa 아미콘(amicon)); F = 여과액; S = 스트립. 마커 크기는 kDa 단위이다.

도 16a 및 **도 16b**는 Benzonase® 및 MNase 처리 전에 친화성 크로마토그래피 동안 적용된 고 pH 세정 완충액이 은 염색에 의해 측정된 바와 같이 AAV 입자 정제 후 불순물의 양을 감소시킨다는 것을 도시한다. 도 16a는 AAV 샘플을 고 pH(9.5) 세정 + 컬럼 상 Benzonase®/MNase 처리 및 시트레이트(pH 1.5) 용리에 적용하였음을 도시한다. 도 16b는 AAV 샘플을 고 pH(10.2) 세정 + 컬럼 상 Benzonase®/MNase 처리 및 인산(pH 1.5) 용리에 적용하였음을 도시한다. 3개의 진한 밴드는 VP1, VP2 및 VP3에 해당된다. W = 세정 피크; E = 용리 피크; R = 잔류물 (100 kDa 아미콘); F = 여과액; S = 스트립 피크. 마커 크기는 kDa 단위이다.

도 17a 및 **도17b**는 표 5에 기재된 상이한 정제 조건을 사용한 바이러스 정제의 요약을 도시한다. 도 17a는 정제된 AAV 입자의 은 염색을 도시한 것이다. 3개의 진한 밴드는 VP1, VP2 및 VP3.FIG에 해당된다. 도 17b는 DNA 아가로스 겔 전기영동 및 AAV 내에 함유된 ITR-전이유전자(transgene)의 존재를 도시한다. C = 시트레이트, pH 2.5; P = 인산, pH 1.5; "$+^{1}$" = pH 10.3; "$+^{2}$" = pH 9.5; "$+^{3}$" = pH 10.2; "$+^{4}$" = pH 10.4; * = (C_2H_5) NCL 음이온 교환 용리.

도 18은 예를 들어, AAV 입자 정제의 순도를 개선하기 위해 불순물 및 DNA가 제거될 수 있는 방식을 도시한다.

도 19a 내지 **도 19c**는 에탄올을 포함한 용리 조건의 변경이 음이온-교환 컬럼에서 바이러스의 회수를 향상시킬 수 있음을 도시한다. 도 19a는 Benzonase® 및 고 pH 세정 후 인산(pH 1.5)을 사용하여 용리된 샘플을 도시한

다. 도 19b는 Benzonase®와 MNase, 그리고 고 pH 세정 후 인산(pH 1.5)을 사용하여 용리된 샘플을 도시한다. 도 19c는 Benzonase®와 MNase, 그리고 고 pH 세정 후 인산(pH 1.5) 및 20% 에탄올을 사용하여 용리된 샘플을 도시한다. 화살표는 컬럼 스트립핑 후 검출된 잔여 바이러스를 나타낸다.

도 20a 내지 도 20e는, 효소 처리 없음(도 20a) Benzonase® 단독(도 20b); Benzonase® 및 MNase(도 20c); Benzonase®, MNase 없음, 고 pH 세정 및 인산 용리(도 20d); 및 Benzonase®, MNase, 고 pH 세정 및 인산 용리(도 20e) 이후에 동적 광 산란기(DLS) 및 단백질 응집(Tagg) 및 용융(Tm) 곡선으로부터의 결과를 예시한다.

도 21a 및 **도 21b**는, Benzonase® 또는 MNase를 사용하지 않은 정제("효소 없음"); (2) Benzonase® 및 시트레이트 용리를 사용한 정제("B, 시트레이트(친화성)"); (3) Benzonase® 및 시트레이트 용리를 사용한 정제("B, 시트레이트"); (4) Benzonase®, MNase 및 인산 용리를 사용한 정제("B, M, Phos"); (5) Benzonase®, 고 pH(pH 10.3) 세정 및 인산 용리를 사용한 정제("B, pH 10.3, phos"); 및 (6) Benzonase®, MNase 및 인산 용리를 사용한 정제("B, M, pH 10.3, phos") 이후에, 숙주 세포 DNA를 검출하기 위해 AlphaLISA를 사용한 미가공 계수(도 21a) 및 농도 결과(도 21b)를 예시한다.

도 22는 프로토콜 #1에 따른 생성물 피크에 대응하는 AAV 입자 샘플 분획(레인 1), 프로토콜 #2에 따른 생성물 피크에 대응하는 AAV 입자 샘플 분획(레인 2) 및 프로토콜 #2에 따른 후-생성물 피크에 대응하는 AAV 입자 샘플 분획(레인 3)의 수집 후 겔 전기영동 및 은-염색을 도시한다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0120] 다양한 간행물, 논문, 및 특허가 배경기술에 그리고 본 명세서 전체에 걸쳐 인용되어 있거나 기재되어 있으며; 이들 참고문헌 각각은 전체적으로 본 명세서에 참고로 포함된다. 본 명세서에 포함된 문헌, 행동, 재료, 장치, 물품 등에 대한 논의는 본 발명에 대한 상황을 제공하는 것을 목적으로 한다. 그러한 논의는 이들 대상 중 임의의 것 또는 모든 것이 개시되거나 청구된 임의의 발명에 대하여 종래 기술의 일부를 형성하는 것을 인정하는 것은 아니다.

[0121] 달리 정의되지 않는 한, 본 명세서에 사용된 모든 기술 및 과학 용어는 본 발명이 속하는 기술 분야의 당업자에 의해 통상적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 갖는다. 그렇지 않으면, 본 명세서에 사용되는 소정의 용어는 본 명세서에 제시된 바와 같은 의미를 갖는다. 본원에 인용된 모든 특허, 공개된 특허 출원 및 간행물은 마치 본원에 완전히 기재되어 있는 것처럼 참고로 포함된다.

[0122] 본 명세서 및 첨부된 청구범위에서 사용되는 바와 같이, 단수 형태(부정 관사 및 정관사)는, 문맥이 명확하게 달리 지시하지 않으면, 복수의 지시 대상을 포함한다는 것에 유의해야 한다.

[0123] 달리 지시되지 않는 한, 일련의 요소 앞의 용어 "적어도"는 일련 내의 각각의 모든 요소를 지칭하는 것으로 이해되어야 한다. 당업자는 단지 일반적인 실험을 사용하여, 본 명세서에서 설명된 본 발명의 구체적인 실시 형태에 대한 많은 등가물을 인식하거나 확인할 수 있을 것이다. 그러한 등가물은 본 발명에 의해 포함되도록 의도된다.

[0124] 본 명세서 및 후술되는 청구범위 전체에 걸쳐, 문맥상 달리 필요로 하지 않는 한, 단어 "포함하다" 및 변형 형태, 예컨대 "포함한다" 및 "포함하는"은 언급된 정수 또는 단계 또는 정수들 또는 단계들의 군을 포함하지만, 어떠한 다른 정수 또는 단계 또는 정수 또는 단계의 군을 배제하지는 않음을 내포하는 것으로 이해될 것이다. 본 명세서에서 사용될 때, 용어 "포함하는"은 용어 "함유하는" 또는 "구비하는"으로 치환될 수 있거나, 경우에 따라서는 본 명세서에 사용될 때 용어 "갖는"으로 치환될 수 있다.

[0125] 본 명세서에서 사용될 때, "~로 이루어진"은 청구범위 요소에 명시되지 않은 임의의 요소, 단계, 또는 구성성분을 배제한다. 본 명세서에서 사용될 때, "~로 본질적으로 이루어진"은 청구항의 기본적이고 신규한 특징에 실질적으로 영향을 주지 않는 재료 또는 단계를 배제하지 않는다. 본 출원의 태양 또는 실시 형태와 관련하여 본 명세서에 사용되는 모든 경우에, 임의의 전술한 용어 "포함하는", "함유하는", "구비하는" 및 "갖는"은 본 개시 내용의 범주를 변동시키기 위해 용어 "~로 이루어진" 또는 "~로 본질적으로 이루어진"으로 대체될 수 있다.

[0126] 본 명세서에 사용되는 바와 같이, 다수의 언급된 요소들 사이의 접속 용어 "및/또는"은 개별 선택지 및 조합된 선택지 둘 모두를 포함하는 것으로 이해된다. 예를 들어, 2개의 요소들이 "및/또는"에 의해 결합되는 경우, 제1 선택지는 제2 요소 없이 제1 요소의 적용가능성을 지칭한다. 제2 선택지는 제1 요소 없이 제2 요소의 적용가능성을 지칭한다. 제3 선택지는 제1 요소와 제2 요소가 함께 적용가능함을 지칭한다. 이들 선택지 중 어느 것이든 하나는 이 의미 내에 속하는 것으로 이해되며, 이에 따라 본 명세서에 사용되는 바와 같이 용어 "및/또

는"의 요건을 충족시킨다. 이들 선택지 중 하나 초과의 동시 적용가능성 또한 이 의미 내에 속하는 것으로 이해되며, 이에 따라 용어 "및/또는"의 요건을 충족시킨다.

[0127] 본 명세서에 사용된 바와 같이, 용어 "정제"는 불순물(예를 들어, 숙주 세포 단백질, 염색질 및/또는 핵산)을 제거하고 AAV 입자를 풍부하게 할 수 있는 임의의 기술을 의미하하는 것으로 의도된다 AAV 입자를 정제하는 예시적인 기술은, 예를 들어, 원심분리(예를 들어, 밀도 구배 원심분리, 초원심분리 또는 이들의 조합), 크로마토그래피(예를 들어, 친화성 크로마토그래피, 이온 교환 크로마토그래피, 크기 배제 크로마토그래피 또는 소수성 상호작용 크로마토그래피), 여과 또는 이러한 기술의 조합을 포함하지만, 이로 제한되지 않는다. 정제는 1단계 정제 기술, 또는 둘 이상의 유형의 정제 기술을 조합한 다단계 정제 기술을 포함할 수 있는 것으로 이해된다.

[0128] 본 명세서에 사용된 바와 같이, 용어 "아데노-관련 바이러스(AAV)"는 모든 상이한 AAV 혈청형(serotype)을 포함하는 AAV의 천연 발생 형태뿐만 아니라 비-천연 발생 형태(예를 들어, 재조합 rAAV 및 위형(pseudotype)), 및 이들의 변이체 모두를 의미하는 것으로 의도된다. AAV 바이러스는 *Rep* 유전자(Rep78, Rep68, Rep52, Rep40으로 번역됨 - AAV 생활 주기에 필요), 및 *Cap* 유전자(VP1, VP2, VP3로서 번역됨 - 캡시드 단백질)로 구성된다.

[0129] 본 명세서에 사용된 바와 같이, 용어 "바이러스 입자" 또는 "AAV 입자"는 핵산을 함유하고 캡시드로 불리는 단백질의 보호막(protective coat)에 의해 둘러싸인, 숙주 세포 외부에 있는 AAV 바이러스의 완전한 감염성 형태를 의미하는 것으로 의도된다.

[0130] 본 명세서에 사용된 바와 같이, 용어 "역가"는 주어진 부피에서 바이러스의 양을 의미하도록 의도된다. 바이러스 역가는 "물리적 역가"또는 "기능적 역가"를 포함할 수 있다. 물리적 역가는 얼마나 많은 바이러스가 존재하는지에 대한 측정치이며, 일반적으로 mL 당 바이러스 입자의 수(VP/mL) 또는 mL 당 게놈 카피의 수(genome copy)(GC/mL)로서 표현된다. 기능적 역가 또는 감염성 역가는 얼마나 많은 바이러스가 실제로 표적 세포를 감염시키는지의 측정치이며, 일반적으로 mL 당 형질도입 단위(TU/mL)의 형태로 표현되거나, 아데노바이러스의 경우 mL 당 플라크 형성 단위(pfu/mL) 또는 mL 당 감염성 단위(ifu/mL)로서 표현된다. 기능적 역가는 일반적으로 물리적 역가보다 낮고, 보통 약 10배 내지 약 100배 정도 낮을 것으로 이해된다.

[0131] 본 명세서에 사용된 바와 같이, 용어 "충분한 양"은, 예를 들어, 친화성 지지체와 같은 고체 지지체에 AAV 입자가 결합하는 것, 또는 AAV 입자를 함유하는 샘플로부터 불순물(예를 들어, 숙주 세포 단백질, 염색질 및/또는 핵산)을 제거하는 것과 같이, 원하는 효과를 생성하거나 원하는 결과를 달성할 수 있는 양을 의미하는 것으로 의도된다.

[0132] 본 명세서에 사용된 바와 같이, AAV 입자의 샘플과 관련하여 사용될 때, 용어 "실질적으로 없는"은 AAV 입자의 샘플이 매칭된 음성 대조군 샘플과 비교하여 약 50% 미만, 약 20% 미만, 약 10% 미만, 약 5% 미만의 불순물을 포함함을 의미하는 것으로 의도된다. 예시적인 불순물에는 숙주 세포 단백질 및 바이러스 외 염색질-관련 DNA가 포함되나, 이에 한정되지 않는다. 샘플은 하나 이상의 불순물이 "실질적으로 없을" 수 있지만, 계속해서 소량(예를 들어, 검출 불가능한 수준)의 일부 불순물을 가지며, "실질적으로 없는"은 모든 불순물의 완전한 제거를 필요로 하지는 않는다는 것이 추가로 이해된다.

[0133] 달리 언급되지 않는 한, 본 명세서에 기재된 농도 또는 농도 범위와 같은 임의의 수치 값은 모든 경우에 용어 "약"에 의해 수식되는 것으로 이해되어야 한다. 따라서, 수치 값은 전형적으로 인용된 값의 ±10%를 포함한다. 예를 들어, 1 mg/mL의 농도는 0.9 mg/mL 내지 1.1 mg/mL를 포함한다. 마찬가지로, 1 mg/mL 내지 10 mg/mL의 농도 범위는 0.9 mg/mL 내지 11 mg/mL를 포함한다. 본 명세서에 사용되는 바와 같이, 문맥이 명백히 달리 지시하지 않는 한, 수치 범위의 사용은 모든 가능한 하위범위, 그 범위 내의 모든 개별 수치 값, 예를 들어 그러한 범위 내의 정수 및 값의 분율을 명시적으로 포함한다.

[0134] 본 출원의 독자를 돕기 위한 시도로, 다양한 단락 또는 섹션에서 설명이 분리되어 있거나 본 출원의 다양한 실시 형태로 설명되고 있다. 이들 분리는 단락 또는 섹션 또는 실시 형태의 요지를 다른 단락 또는 섹션 또는 실시 형태의 요지로부터 분리하는 것으로 간주되어서는 안 된다. 반대로, 당업자는 발명의 상세한 설명이 넓은 응용을 가지며, 고려될 수 있는 다양한 섹션, 단락, 및 문장의 모든 조합을 포함한다는 것을 이해할 것이다. 임의의 실시예의 논의는 단지 예시적인 것으로 의도되며, 청구범위를 포함하는 본 개시 내용의 범주가 이들 실시예로 제한됨을 시사하고자 의도되지 않는다. 예를 들어, 본 명세서에 제공된 정제 기술의 유형은 본 명세서에 제공된 AAV 입자의 생성을 위한 다양한 예시적인 방법 중 임의의 것과 조합될 수 있다. 본 출원은 특정 조합이 명시적으로 설명되었는지 여부에 관계없이 임의의 조합으로 적용 가능한 구성요소들 중 임의의 것의 사용을 고려한다.

[0135] 염색질-DNA 뉴클레아제를 사용하여 아데노-관련 바이러스(AAV) 입자를 정제하기 위한 방법, 조성물, 키트 및 시스템이 본 명세서에 제공된다. 소규모 생성(예를 들어, 밀도 구배 원심분리) 또는 대규모 생성(예를 들어, 이온 교환 크로마토그래피; 크기 배제 크로마토그래피; 및 소수성 상호작용 크로마토그래피; 또는 이러한 기술의 조합을 포함한 친화성 크로마토그래피)을 위해 AAV 입자를 정제하기 위한 다양한 정제 기술이 당업계에 공지되어 있다(예를 들어, 문헌[Burova and Ioffe, Gene Therapy (2005) 12, S5-S17] 참조). 그러나, 일반적으로 고순도 생성물을 생성하는 기술에서 조차도, AAV 입자 제조에서 발생된 공정-관련 불순물이 문제가 될 수 있다. 예를 들어, 본 명세서에 제공된 바와 같이, 본 개시내용은 바이러스 외 염색질-관련 AAV 입자가 정제된 AAV 입자 생성물에서 검출될 수 있는 중요한 불순물을 나타내며, 이는 정제된 생성물의 가시적인 침전을 야기할 수 있고, 예를 들어, 바이러스 감염성 제한과 같은, AAV 입자의 다운스트림 적용에 문제가 될 수 있음을 제공한다. 따라서, 본 개시내용은 최종 정제된 생성물의 순도 및/또는 역가를 향상시키기 위해 AAV 입자를 정제하기 위한 당업계에 공지된 임의의 다양한 방법 중 임의의 방법에 포함될 수 있다.

[0136] 염색질은 DNA, 단백질 및 관련 단백질의 복합체이다. 염색질의 주요 단백질은 히스톤이다. 히스톤은 음으로 하전된 DNA에 강하게 부착하고 뉴클레오솜으로 불리는 복합체를 형성하는 H1, H2A, H2B, H3 및 H4로 지칭되는 양으로 하전된 작은 단백질 계열이다. AAV 입자와 관련된 염색질은 일반적으로 DNA가 히스톤에 의해 보호되어 뉴클레아제가 접근할 수 없기 때문에 뉴클레아제에 대해 저항성이다.

[0137] 염색질 관련 단백질은, 예를 들어, 특히 히스톤 메틸트랜스퍼라제(예를 들어, 폴리콤 그룹(PcG) 단백질 EZH2; DOTL1; PRMT5), 히스톤 데메틸라아제(예를 들어, LSD1, JmjC-도메인 함유 히스톤 데메틸라아제), 브로모도메인-함유의 BET 계열(예를 들어, 특히 BRD2, BRD3 및 BRD4 및 BRDT)을 포함한다. 추가의 염색질 변형 및 DNA 결합 단백질은, 예를 들어, 아연 핑거(ZnF) 단백질 또는 다른 DNA 결합 단백질을 포함한다.

[0138] 따라서, 본 개시내용은 특정 유형의 뉴클레아제, 염색질-DNA 뉴클레아제(예를 들어, 미세구균 뉴클레아제 MNase))를 임의의 유형의 AAV 입자 정제 방법에 첨가하는 것이 회수된 AAV 입자의 수율뿐만 아니라 다운-스트림 정제 동안 회수된 AAV 입자의 품질을 유의미하게 개선할 수 있음을 제공한다.

[0139] 따라서, 일부 실시 형태에서, (a) AAV 입자를 포함하는 상청액을 염색질-DNA 뉴클레아제를 포함하는 조성물과 접촉시키는 단계; 및 (b) AAV 입자를 정제하는 단계를 포함하는 AAV 입자를 정제하는 방법이 본 명세서에 제공된다.

[0140] 상기에 기재된 바와 같이, AAV 입자는 당업계에 공지된 다양한 방법을 사용하여 정제될 수 있고, 염색질-DNA 뉴클레아제는 임의의 유형의 AAV 입자 정제 방법과 조합될 수 있다. 일반적으로, 정제는 원심분리, 크로마토그래피 또는 여과, 또는 가능하게는 이들의 조합을 포함한다. 일부 실시 형태에서, 정제는, 예를 들어, 두 번의 크로마토그래피 단계 또는 초원심분리/여과와 크로마토그래피의 조합을 포함하는 2단계 정제 프로토콜을 포함할 수 있다. 예로서, 2단계 정제 프로토콜은 친화성 크로마토그래피(예를 들어, 헤파린 친화성 수지를 사용함)에 의한 이어서 이온 교환 컬럼상에서 폴리싱에 의한 정제를 포함할 수 있다. 다른 예시적인 2단계 정제 프로토콜은 초원심분리(예를 들어, 이오딕사놀 밀도 초원심분리)와 후속 크로마토그래피(예를 들어, 헤파린 친화성 정제와 같은 친화성 크로마토그래피)를 포함할 수 있다.

[0141] 정제 공정에 사용되는 출발 물질의 여과 및/또는 원심분리는, 예를 들어, 세포 잔해물 및/또는 세포 단편과 같은 벌크 불순물 중 일부를 제거하는 데 도움이 될 수 있다. 따라서, 일부 실시 형태에서, 상청액은 정화된 상청액이다. 소정 실시 형태에서, 여과 및/또는 원심분리는 예를 들어, 크로마토그래피 정제와 같은 하나 이상의 추가 정제 단계 전에 수행된다. 상청액을 정화하기 위한 다양한 방법이 당업계에 알려져 있다. 예를 들어, 0.2 μm 필터를 사용하여 상청액을 정화할 수 있다. 구체적인 실시 형태에서, 정화된 상청액은 하나 이상의 추가 정제 단계 전에 Benzonase®로 처리될 수 있다.

[0142] AAV 입자의 정제를 위한 원심분리 기술은, 예를 들어, 밀도 구배 원심분리, 초원심분리 또는 이들의 조합을 포함할 수 있다. 밀도 구배 원심분리의 예시적인 유형은 CsCl을 포함할 수 있으며, 이는 강한 원심력장(centrifugal field)에 적용될 때 밀도 구배를 형성한다. 예를 들어, 바이러스가 CsCl 염에서 평형 상태로 원심분리되면, 이들은 오염물로부터 분리되고 부유 밀도에 기초하여 밴드로 수집된다. 일부 실시 형태에서, AAV 입자의 정제는 다수 회의 CsCl 구배 원심분리 단계를 포함한다. AAV 입자의 정제를 위한 다른 예시적인 밀도 매질은 이오딕사놀을 포함할 수 있다. 일부 실시 형태에서, AAV 입자의 정제는 예비 정제 단계로서 밀도 구배 원심분리(예를 들어, 불연속 요오딕사놀 구배 원심분리), 이어서 헤파린처리된(heparinized) 지지체 매트릭스 크로마토그래피 또는 이온 교환 크로마토그래피에 의한 것과 같은 친화성 크로마토그래피 바이러스 정제 단계를

포함할 수 있다.

[0143] 일부 실시 형태에서, AAV 입자의 정제는 크로마토그래피를 포함한다. 예를 들어, 대규모 양의 AAV 입자의 정제는 일반적으로 용액(이동상) 중의 분자가 고정 물질(고체상 또는 고체 지지체)과의 화학적 또는 물리적 상호작용의 차이에 기초하여 분리되는 일부 형태의 크로마토그래피를 포함한다. 예시적인 유형의 크로마토그래피는, 예를 들어, 크기(즉, 물리적 배제)에 기초하여 분자를 분리하기 위해 다공성 수지 재료를 사용하는 겔 여과(크기 배제 크로마토그래피 또는 SEC라고도 칭함)를 포함한다. 다른 예시적인 유형의 크로마토그래피는 친화성 크로마토그래피(친화성 정제라고도 칭함)이다.

[0144] 소정 실시 형태에서, 크로마토그래피는 크로마토그래피 컬럼을 포함한다. 본 명세서에 개시된 바와 같이, 다양한 유형의 크로마토그래피 컬럼을 사용하여 AAV 입자를 정제할 수 있다. 소정 실시 형태에서, 크로마토그래피 컬럼은 모노리스(monolith)이다. 모노리스는 다수의 상호연결된 채널을 갖는 균질한 고정상의 단일 블록을 갖는 크로마토그래피 컬럼이다. 모노리스의 고정상은 다양한 화학 물질일 수 있어서, 상이한 특성을 갖는 상이한 종류의 생체분자의 정제를 가능하게 한다. 그러나, 컬럼이 모노리스일 필요는 없으며, 비드, 다공성 입자-기반 컬럼 및 막 흡착기(membrane adsorber)가 또한 사용될 수 있는 것으로 이해된다.

[0145] 친화성 크로마토그래피는 표적 분자에 결합하는 리간드와 같은 분자들 사이의 특이적 결합 상호작용 또는 표적 분자와의 특이적 이온 상호작용을 이용한다. 예시적인 유형의 친화성 크로마토그래피는 바이러스 캡시드와, 특정 생물학적 리간드 또는 크로마토그래피 매트릭스에 결합된 수용체 사이의 가역적 상호작용에 기초하여 단백질 및 핵산 오염물로부터 바이러스 입자를 분리하는 것을 포함한다. 일부 실시 형태에서, 친화성 크로마토그래피에 의한 정제는 음으로 하전된 셀룰로오스 친화성 매질 셀룰로핀 설페이트를 포함할 수 있다. 대안적인 친화성 정제 접근법은 조립되지 않은 캡시드 단백질의 분리를 가능하게 하는 단일클론 항체(예를 들어, A20)에 의한 AAV 입자(예를 들어, AAV2 입자)의 인식에 기초한다. 친화성 크로마토그래피에 대한 추가의 예시적인 예는 헤파린 친화성을 포함한다.

[0146] 일부 실시 형태에서, 친화성 크로마토그래피는 정제되는 AAV 입자의 위형 또는 AAV 캡시드 혈청형에 특이적일 수 있다. 예를 들어, 일부 AAV 혈청형, 예컨대 AAV1, AAV4 및 AAV5는 헤파린 컬럼에 덜 효율적으로 결합한다. 따라서, 일부 실시 형태에서, 예를 들어, AAV5 입자의 포획을 위한 친화성 매트릭스는 CNBr-활성화 Sepharose에 공유 결합되는 뮤신으로 불리는 시알산-풍부 단백질을 포함할 수 있다. 대안적으로, PDGFR-알파 및 PDGFR-베타는 예를 들어 AAV5 입자의 포획을 위한 특이적 분자로서 사용될 수 있다.

[0147] 일부 실시 형태에서, 크로마토그래피는 이온 교환 크로마토그래피이다. 이온 교환 크로마토그래피는 고체상 물질과의 전체적인 이온 상호작용의 강도에 따른 분자의 분리를 포함한다. 이온 교환 크로마토그래피에 의한 정제는 바이러스 캡시드의 외부 상의 단백질의 순전하(net charge)에 기초한다. 표면 단백질의 순전하는 노출된 아미노산 기의 pH에 따라 달라진다.

[0148] 하나의 예시적인 유형의 이온 교환 크로마토그래피는 이들의 순 표면 전하에 기초하여 분자를 분리하는 데 사용되는 음이온 교환 크로마토그래피이다. 음이온 교환 크로마토그래피는 순 음성 표면 전하를 갖는 분자에 대해 친화성을 갖는 양으로 하전된 이온 교환 수지를 사용한다. 상기 제공된 예는 예시적인 것으로 의도되며, 본 개시내용과 함께 사용될 수 있는 크로마토그래피의 유형을 망라하는 것으로 의도되지 않는다는 것이 이해된다.

[0149] 본 명세서에 제공된 바와 같이, AAV 입자를 정제하는 방법에 사용될 수 있는 하나의 예시적인 유형의 정제는 친화성 크로마토그래피이다. 일부 실시 형태에서, 친화성 크로마토그래피는 착물 혼합물(complex mixture)이 컬럼을 통과할 때, 리간드에 대하여 특이적 결합 친화성을 갖는 그의 분자가 결합하게 되도록 고체 지지체(예를 들어, 친화성 지지체)에 화학적으로 고정되거나 "결합"되는 특정 리간드를 포함할 수 있다. 다른 실시 형태에서, 친화성 크로마토그래피는, 분자의 순 표면 전하에 기초하여 고체 지지체에 특이적 결합 친화성을 갖는 분자가 결합하게 되도록 특이적 순 표면 전하에 기초한 이온 상호작용을 포함할 수 있다.

[0150] 일부 실시 형태에서, 친화성 크로마토그래피는 이온 교환 크로마토그래피이다. 전술한 바와 같이, 이온 교환 크로마토그래피는 친화성 지지체와 같은 고체상 물질과의 전체적인 이온 상호작용의 강도에 따라 분자를 분리한다. 일부 실시 형태에서, 이온 교환 크로마토그래피는 음이온 교환 크로마토그래피이다. 음이온 교환 크로마토그래피는 분자의 순 표면 전하에 기초하여 분자를 분리하는데 사용될 수 있다. 예를 들어, 음이온 교환 크로마토그래피는 순 음성 표면 전하를 갖는 분자에 대해 친화성을 갖는 양으로 하전된 이온 교환 수지를 사용한다.

[0151] 상기에 기재된 바와 같이, 크로마토그래피는 일반적으로 고정 물질(고체상 또는 고체 지지체)과의 화학적 또는 물리적 상호작용의 차이에 기초하여 분리되는 분자를 용액(이동상) 중에 포함한다. 다양한 형태의 크로마토그

래피는 선택적으로 고체 지지체로부터 원치 않는 성분을 제거하기 위해 세정을 또한 포함할 수 있다. 따라서, 일부 실시 형태에서, 본 명세서에 제공된 방법은 고체 지지체를 세정하는 단계를 포함한다. 다른 샘플 성분을 세정하여 없앤 후, 결합된 분자는 지지체로부터 스트립핑되어(즉, 용리되어), 원래 샘플로부터 분자가 정제된다.

[0152] AAV 입자의 용리는 선형 구배 용리에 의해 또는 단계 등용매 용리(step isocratic elution)를 사용하여 용리될 수 있다. 보통, 구배 용리를 사용하여 용리 조건을 최적화할 수 있다. 일단 관심 단백질의 용리 프로파일이 확립되어 있고 어떤 이온 강도 또는 pH에서 단백질이 용리되는지 알려져 있으면, 단계 용리는 정제 공정을 가속화하는 데 사용될 수 있다. AAV 입자를 정제하는 데 사용되는 크로마토그래피의 유형에 따라, 용리 조건은 경쟁적 리간드를 포함하거나, 또는 pH, 이온 강도 또는 극성을 변화시키는 것을 포함한다. 표적 단백질은 정제되고 농축된 형태로 용리될 수 있다. 예를 들어, 이온 교환 크로마토그래피의 경우, 최종 생성물은 그들의 순 표면 전하에 따라 순서대로 용리될 수 있다. 7.5에 더 가까운 pI 값을 갖는 샘플은 더 낮은 이온 강도에서 용리될 것이고, 매우 낮은 pI 값을 갖는 샘플은 높은 염 농도에서 용리될 것이다.

[0153] 일부 실시 형태에서, AAV 입자는 저 pH 완충액을 사용하여 용리될 수 있다. 소정 실시 형태에서, 고 pH 완충액은 저 pH 완충액을 사용하기 직전에 사용되며, "고/저 pH 완충액"이라고 불린다. 구체적인 실시 형태에서, 저 pH는 약 pH 2.5이다. 일부 실시 형태에서, 저 pH 완충액은 시트레이트 완충액, 글리신 완충액 또는 인산 완충액이다. 소정 실시 형태에서, 저 pH 완충액은 약산을 포함한다.

[0154] 본 명세서에 제공된 바와 같이, 용리 단계에 에탄올의 첨가는 이온 교환 컬럼으로부터 바이러스의 회수를 향상시킬 수 있다. 따라서, 일부 실시 형태에서, 용리 완충액은 에탄올을 포함할 수 있다. 일부 실시 형태에서, 에탄올은 약 5% 내지 약 40% 에탄올일 수 있다. 일부 실시 형태에서, 에탄올은 약 10% 내지 약 30%의 에탄올일 수 있다. 일부 실시 형태에서, 에탄올은 약 15% 내지 약 25%의 에탄올일 수 있다. 구체적인 실시 형태에서, 에탄올은 약 20%의 에탄올일 수 있다.

[0155] 저 pH 완충액을 사용하여 수행된 용리는 종종 용리 완충액이 즉시 중화되는 것을 요구한다. 따라서, 일부 실시 형태에서, 용리는 완충액의 pH를 중화시키는 것을 추가로 포함한다. 구체적인 실시 형태에서, 중화는 비스-트리스-프로판(BTP) 또는 트리스 완충액을 첨가하는 것을 포함한다. 소정 실시 형태에서, 중화는 트리스를 첨가하는 것을 포함한다. Ad 또는 AAV 정제 절차에 사용되는 많은 크로마토그래피 용리 완충액은 생체내 조작에 적합하지 않기 때문에, 투석 또는 농축(concentration)과 같은 추가적인 정제 단계가 필요할 수 있다. 따라서, 일부 실시 형태에서, 정제는 또한 AAV 바이러스 입자의 투석 및/또는 농축을 포함한다.

[0156] 따라서, 일부 실시 형태에서, (a) AAV 입자에 결합하기에 충분한 시간 동안 AAV 입자를 포함하는 상청액을 고체 지지체와 함께 인큐베이션하는 단계; (b) AAV 입자를 포함하는 상청액을 염색질-DNA 뉴클레아제를 포함하는 조성물과 접촉시키는 단계; 및 (c) 정제된 AAV 입자를 용리시키는 단계를 포함하는, AAV 입자를 정제하는 방법이 본 명세서에 제공된다. 염색질-DNA 뉴클레아제와의 접촉은 또한 AAV 입자의 결합 전에 수행될 수 있는 것으로 이해된다. 따라서, 일부 실시 형태에서, (a) AAV 입자를 포함하는 상청액을 염색질-DNA 뉴클레아제를 포함하는 조성물과 접촉시키는 단계; (b) AAV 입자에 결합하기에 충분한 시간 동안 AAV 입자를 포함하는 상청액을 고체 지지체와 함께 인큐베이션하는 단계; 및 (c) 정제된 AAV 입자를 용리시키는 단계를 포함하는, 아데노-관련 바이러스(AAV) 입자를 정제하는 방법이 본 명세서에 제공된다. 유사하게, 염색질-DNA 뉴클레아제와의 접촉이 고체 지지체 설정에서 조합될 필요가 없고 당업계에 공지된 임의의 AAV 입자 정제 기술과 조합될 수 있음이 또한 이해된다. 소정 실시 형태에서, 정제된 AAV 입자를 AAV 입자를 폴리싱하기 위해 하나 이상의 추가의 정제에 적용한다. 예를 들어, 입자는 친화성 크로마토그래피에 의해 정제된 후, 음이온 교환 크로마토그래피와 같은 상이한 유형의 크로마토그래피에 의해 폴리싱될 수 있다.

[0157] 일부 실시 형태에서, 본 방법은 샘플을 용리하기 전에 고체 지지체를 세정하는 단계를 추가로 포함한다. 본 명세서에 기재된 바와 같이, 지지체로부터 비결합된 샘플 성분을 세정하여 없애는 것은 표적과 리간드 사이의 결합 상호작용을 유지하는 적절한 완충액을 사용하여 수행될 수 있다. 세정은 일부 비결합된 오염물을 제거할 수 있다. 일부 실시 형태에서, 비특이적 결합 상호작용은 낮은 수준의 세제를 첨가하거나, 결합 및/또는 세정 완충액의 염 농도를 중간 정도로 조정하여 최소화될 수 있다.

[0158] 본 명세서에 제공된 바와 같이, 일부 실시 형태에서, AAV 입자의 순도는 고 pH로 세정함으로써 증가될 수 있다. 예를 들어, 대량의 수확물을 친화성 크로마토그래피로 정제한 후, 고 pH 완충액으로 세정하여 불순물을 제거할 수 있다. 일부 실시 형태에서, 고 pH 세정에 이어서 Benzonase 및/또는 염색질-DNA 뉴클레아제를 사용한 컬럼상 효소 처리가 이어진다. 소정 실시 형태에서, 고 pH 세정 완충액은 pH 9 초과이다. 일부 실시 형태에서, 고

pH 세정 완충액은 pH 9.5 내지 pH 10.9이다. 다른 실시 형태에서, 고 pH 세정 완충액은 pH 9.5이다. 일부 실시 형태에서, 고 pH 세정 완충액은 pH 10.2이다. 일부 실시 형태에서, 고 pH 세정 완충액은 pH 10.3이다. 일부 실시 형태에서, 고 pH 세정 완충액은 pH 10.4이다.

[0159] 일부 실시 형태에서, 염색질-DNA 뉴클레아제는 미세구균 뉴클레아제(MNase)(EC 3.1.31.1)이다. *스타필로코커스 아우레우스*로부터 단리된 MNase는 핵산(DNA 및/또는 RNA)을 분해할 수 있는 비특이적 엔도-엑소뉴클레아제 활성을 갖는 포스포다이에스테라제이다. MNase는 장애물(뉴클레오솜 또는 다른 핵산 결합 단백질)에 도달할 때까지 2개의 뉴클레오솜을 연결하는 링커 영역 내의 노출된 핵산을 분해한다. MNase는 세포 용해물로부터 핵산을 제거하여 염색질-결합 단백질을 방출하는 데 적합할 수 있는 반면, DNase는 뉴클레오솜-결여된 또는 "유리" DNA를 우선적으로 절단한다. MNase는 이중 가닥, 단일 가닥, 원형 및 선형 핵산을 분해한다. 일부 실시 형태에서, 상청액 중의 MNase의 농도는 2.5 단위/mL(U/mL) 초과이다. 소정 실시 형태에서, 상청액 중의 MNase의 농도는 10 단위/mL 초과이다. 구체적인 실시 형태에서, 상청액 중의 MNase의 농도는 약 30 단위/mL 내지 약 100 단위/mL이다. 보다 구체적인 실시 형태에서, 상청액 중의 MNase의 농도는 약 60 단위/mL이다. 일부 실시 형태에서, MNase는 MNase의 활성을 갖는 폴리펩티드이다. 일 실시 형태에서, MNase는 AAV 입자와 관련된 염색질을 분해시키기에 충분한 양으로 존재한다.

[0160] 일 실시 형태에서, MNase는 AAV 입자 불순물을 감소시키기에 충분한 양으로 존재한다. 일 실시 형태에서, AAV 입자 불순물은 숙주 세포 DNA, 숙주 세포 단백질, 염색질-관련 DNA 및 DNA 결합 단백질 중 하나 이상을 포함한다. 일 실시 형태에서, AAV 입자 불순물은 육안으로 보이는 불순물 및 미세한 불순물을 포함한다. 일 실시 형태에서, DNA 결합 단백질은 히스톤을 포함한다.

[0161] 일 실시 형태에서, MNase는 AAV 입자의 바이러스 역가를 증가시키기에 충분한 양으로 존재한다. 일 실시 형태에서, 바이러스 역가는 물리적 바이러스 역가, 기능적 바이러스 역가 또는 둘 모두를 포함한다. 일 실시 형태에서, 바이러스 역가는 물리적 역가를 포함한다. 일 실시 형태에서, 바이러스 역가는 기능적 역가를 포함한다. 일 실시 형태에서, 바이러스 역가는 약 2배 내지 약 100배 증가된다. 일 실시 형태에서, 바이러스 역가는 약 2배 이상 증가된다. 일 실시 형태에서, 바이러스 역가는 약 3배 이상 증가된다. 일 실시 형태에서, 바이러스 역가는 약 7배 이상 증가된다. 일 실시 형태에서, 바이러스 역가는 약 80배 이상 증가된다.

[0162] 일 실시 형태에서, MNase는 후-생성물 AAV 입자 분획에 대한 생성물 AAV 입자 분획의 바이러스 역가 비를 증가시키기에 충분한 양으로 존재한다.

[0163] 일 실시 형태에서, 바이러스 역가 비는 약 2배 이상 증가된다. 일 실시 형태에서, 바이러스 역가 비는 약 5배 이상 증가된다. 일 실시 형태에서, 바이러스 역가 비는 약 10배 이상 증가된다. 일 실시 형태에서, 바이러스 역가 비는 약 25배 이상 증가된다.

[0164] 일 실시 형태에서, MNase는 채워진-대-빈 캡시드 비를 증가시키기에 충분한 양으로 존재한다. 일 실시 형태에서, 채워진-대-빈 캡시드 비는 약 50% 초과이다. 일 실시 형태에서, 채워진-대-빈 캡시드 비는 약 60% 초과이다. 일 실시 형태에서, 채워진-대-빈 캡시드 비는 약 70% 초과이다.

[0165] 일 실시 형태에서, MNase는 260 nm에서 흡광도에 의해 측정된 바와 같이 AAV 입자 후-생성물 분획을 감소시키기에 충분한 양으로 존재한다. 일 실시 형태에서, MNase는 280 nm에서 흡광도에 의해 측정된 바와 같이 AAV 입자 후-생성물 분획을 감소시키기에 충분한 양으로 존재한다.

[0166] 일 실시 형태에서, MNase는 동적 광 산란기(DLS)에 의해 측정시 응집 온도(Tagg)의 약 10℃ 미만 내의 용융 온도(Tm)를 포함하는 정제된 AAV 입자를 생성하기에 충분한 양으로 존재한다.

[0167] 일 실시 형태에서, MNase는 동적 광 산란기(DLS)에 의해 측정시 응집 온도(Tagg)의 약 5℃ 미만 내의 용융 온도(Tm)를 포함하는 정제된 AAV 입자를 생성하기에 충분한 양으로 존재한다.

[0168] 일 실시 형태에서, MNase는 동적 광 산란기(DLS)에 의해 측정시 응집 온도(Tagg)의 약 2℃ 미만 내의 용융 온도(Tm)를 포함하는 정제된 AAV 입자를 생성하기에 충분한 양으로 존재한다.

[0169] 염색질-DNA 뉴클레아제가 AAV 입자에 바이러스 외 복합체화된 DNA 결합 단백질 및 유리 핵산을 방출하기 위해 필요한 시간을 결정하는 것은 당업자의 기술 내에 있다. 소정 실시 형태에서, 인큐베이션은 약 10분 내지 약 1시간 동안 수행된다. 일부 실시 형태에서, 인큐베이션은 약 20분 내지 약 40분 동안 수행된다. 구체적인 실시 형태에서, 인큐베이션은 약 30분 동안 수행된다.

[0170] 본 명세서에 제공된 방법의 일부 실시 형태에서, 염색질-DNA 뉴클레아제를 포함하는 조성물은 또한 Benzonase®

뉴클레아제(*세라티아 마르세센스* 유래 엔도뉴클레아제; 효소 위원회(EC) 번호 3.1.30.2)를 포함할 수 있다. Benzonase®는 접근 가능한 DNA 및 RNA(예를 들어, 비-염색질 DNA)를 분해할 수 있는 무차별적 엔도뉴클레아제이다. 이것은 모든 형태의 DNA 및 RNA(예를 들어, 단일 가닥, 이중 가닥, 선형 및 원형)를 공격하고 분해하며, 광범위한 작동 조건에 걸쳐 효과적이다. 예를 들어, 이는 천연 또는 열 변성 DNA 및 RNA를 분해할 수 있다.

[0171] Benzonase®의 첨가는 숙주 생성 세포 유래의 잔여 핵산과 같은 조(crude) 샘플에 존재하는 뉴클레아제-민감성 핵산을 제거하는 것을 도울 수 있다. 예컨대, 단백질 샘플에서 점도를 감소시키기 위해서와 같이 유리 핵산을 분해하기 위해 Benzonase®가 첨가될 수 있지만, 그 자체로는 AAV 입자에 바이러스 외 복합체화된 DNA 결합 단백질을 방출하기에 충분하지 않다. 일부 실시 형태에서, Benzonase® 및 염색질-DNA 뉴클레아제가 함께 인큐베이션된다. 구체적인 실시 형태에서, Benzonase® 및 염색질-DNA 뉴클레아제는 친화성 교환 크로마토그래피 후 함께 인큐베이션된다. 그러나, Benzonase® 처리는 염색질-DNA 뉴클레아제와 동시에 수행될 필요가 없다는 것이 이해된다. 예를 들어, 일부 실시 형태에서, Benzonase®는 정제 전에 대량의 수확물에 첨가된다. 추가로, 임의의 Benzonase® 생성물이 본 개시내용에 적합하다는 것이 이해된다.

[0172] 본 개시내용은 소정 실시 형태에서 예시적인 엔도뉴클레아제로서 Benzonase®의 사용을 기재하지만, 잔여 숙주 세포 DNA를 감소시킬 수 있는 임의의 뉴클레아제 또는 잔여 숙주 세포 DNA를 감소시킬 수 있는 뉴클레아제의 활성을 갖는 폴리펩티드가 사용될 수 있는 것으로 이해된다. 이러한 대안적인 뉴클레아제는, 예를 들어, Cryonase(저온균(psychrophile)인 *시와넬라 종* 유래의 재조합 엔도뉴클레아제), 염 활성 뉴클레아제(SAN) 또는 DNase I™를 포함할 수 있다.

[0173] 본 명세서에 제공된 바와 같이, AAV 입자를 함유하는 샘플을 MNase와 접촉시키는 것은 염색질-관련 DNA, 숙주 세포 단백질을 제거하고, MNase 처리되지 않은 샘플에 비해 AAV 입자의 전체 수율을 향상시킬 수 있다. 따라서, 일부 실시 형태에서, MNase와 접촉하지 않고 정제된 AAV 입자와 비교시, 본 명세서에 제공된 방법을 사용하여 제조된 정제된 AAV 입자에는 염색질-관련 DNA가 실질적으로 없다. 소정 실시 형태에서, MNase와 접촉하지 않고 정제된 AAV 입자와 비교시, 정제된 AAV 입자에는 숙주 세포 단백질이 실질적으로 없다. 일부 실시 형태에서, MNase와 접촉하지 않고 정제된 AAV 입자와 비교시, AAV 입자는 증가된 수율을 갖는다.

[0174] 본 명세서에 제공된 바와 같이, AAV 입자의 정제에서 염색질-DNA 뉴클레아제의 사용은 바이러스 역가를 증가시키는데 사용될 수 있음을 본 개시내용은 제공한다. 따라서, 일부 실시 형태에서, (a) AAV 입자를 포함하는 상청액을 염색질-DNA 뉴클레아제를 포함하는 조성물과 접촉시키는 단계; 및 (b) AAV 입자를 정제하는 단계를 포함하는, AAV 입자의 역가를 증가시키는 방법이 본 명세서에 제공된다.

[0175] 일부 실시 형태에서, 증가된 바이러스 역가는 세포 당 게놈 카피(즉, 물리적 역가)뿐만 아니라 총 게놈 카피의 증가를 포함할 수 있다. 다른 실시 형태에서, 증가된 바이러스 역가는 기능적 역가의 증가를 포함할 수 있다. 추가의 실시 형태에서, 증가된 바이러스 역가는 물리적 역가 및 기능적 역가에서의 증가 둘 모두를 포함할 수 있다.

[0176] 물리적 역가는, 예를 들어, ELISA, 바이러스 게놈 RNA의 측정(예를 들어, qRT-PCR 또는 노던 블로팅(Northern blotting)에 의해)과 같은 비기능적 방법을 사용하여 결정될 수 있다. 기능적 역가는 얼마나 많은 바이러스가 표적 세포로 들어가는지를 측정하고, 벡터가 항생제 내성 유전자를 함유하는 경우 또는 벡터가 표적 세포의 형광 단백질, 유세포 분석 또는 면역형광 분석을 포함하는 경우, 항생제 선택 후 콜로니 형성 단위의 수의 평가를 포함할 수 있다. 대안적으로, 벡터가 형광 단백질을 발현하지 않는 경우, qPCR에 의해 세포당 융합된 프로바이러스의 DNA(proviral DNA) 카피 수를 결정하는 것은 기능적 역가를 평가하는 빠르고 용이한 방법을 제공한다.

[0177] 역가의 증가는 염색질-DNA 뉴클레아제를 포함하는 조성물과 접촉하지 않은 AAV 입자를 포함하는 상청액에 비해 1.0 초과의 임의의 정수의 배수 변화를 포함할 수 있다. 일부 실시 형태에서, 배수 변화는 1.5배 초과, 2.0배 초과, 5.0배 초과, 10배 초과, 50배 초과, 또는 100배 초과이다. 기능적 역가는 일반적으로 물리적 역가보다 보통 약 10배 내지 약 100배 정도 낮을 것으로 이해된다. 따라서, 일부 실시 형태에서, 물리적 역가의 증가는 1.5배 초과, 2.0배 초과, 5.0배 초과, 10배 초과, 50배 초과, 또는 100배 초과이다. 구체적인 실시 형태에서, 물리적 역가의 증가는 1.5배 초과이다. 일부 실시 형태에서, 물리적 역가의 증가는 2.0배 초과이다. 일부 실시 형태에서, 물리적 역가의 증가는 5.0배 초과이다. 일부 실시 형태에서, 물리적 역가의 증가는 10배 초과이다. 일부 실시 형태에서, 물리적 역가의 증가는 50배 초과이다. 일부 실시 형태에서, 물리적 역가의 증가는 100배 초과이다. 다른 실시 형태에서, 기능적 역가의 증가는 1.5배 초과, 2.0배 초과, 5.0배 초과, 10배 초과, 50배 초과, 또는 100배 초과이다. 일부 실시 형태에서, 기능적 역가의 증가는 1.5배 초과이다. 일부 실시 형태에서, 기능적 역가의 증가는 1.5배 초과이다. 일부 실시 형태에서, 기능적 역가의 증가는 2.0배 초과이다.

일부 실시 형태에서, 기능적 역가의 증가는 5.0배 초과이다. 일부 실시 형태에서, 기능적 역가의 증가는 10배 초과이다. 일부 실시 형태에서, 기능적 역가의 증가는 50배 초과이다. 일부 실시 형태에서, 기능적 역가의 증가는 100배 초과이다.

[0178] 본 명세서에 제공된 바와 같이, 본 개시내용은 AAV 정제 공정에 염색질-DNA 뉴클레아제(예를 들어, MNase)의 첨가가 생성물 분획의 바이러스 역가를 증가시키고 후-생성물 분획의 바이러스 역가를 감소시킬 수 있음을 입증한다. 따라서, 바이러스 역가의 증가는 또한 AAV 후-생성물 분획에 대한 AAV 생성물 분획의 비로서 기재될 수 있다. 따라서, 일부 양태에서, 증가된 바이러스 역가는, 염색질-DNA 뉴클레아제(예를 들어, MNase)와 접촉하지 않은 AAV 입자에 비해 후-생성물 AAV 입자 분획에 대한 생성물 AAV 입자 분획의 증가된 바이러스 역가 비이다. 일부 실시 형태에서, 바이러스 역가 비의 증가는 1.5배 초과, 2.0배 초과, 5.0배 초과, 10배 초과, 50배 초과, 또는 100배 초과이다. 구체적인 실시 형태에서, 바이러스 역가 비의 증가는 약 2배 이상이다. 다른 실시 형태에서, 바이러스 역가 비의 증가는 약 5배 이상이다. 또 다른 실시 형태에서, 바이러스 역가 비의 증가는 약 10배 이상이다. 다른 실시 형태에서, 바이러스 역가 비의 증가는 약 25배 이상이다.

[0179] 본 명세서에 기재된 바와 같이, 본 개시내용의 방법은 불순물이 실질적으로 없는 고도로 순수한 AAV 입자의 생성에 관한 것이다. AAV 물리적 특성(예를 들어, AAV 입자 크기)을 측정하기 위한 다양한 기술이 당업계에 공지되어 있다. 예를 들어, 입자 크기 및 응집을 측정하기 위한 예시적인 기술은 동적 광 산란(DLS), 정적 광 산란(SLS), DLS 및 SLS, 및 투과 전자 현미경(TEM)을 포함한다(예를 들어, 문헌[Stetefeld J, *et al.*, *Biophys Rev.* 2016;8(4):409-427] 참조).

[0180] DLS는 AAV 개발 분야에서 잘 확립된 분석 기술이다. 이는 응집체 형성을 시험하기 위해 주로 사용된다. 큰 종에 대한 높은 감도로 인해, 심지어 응집에 의해 야기되는 작은 불순물도 검출될 수 있다. DLS를 SLS와 조합하는 것도 가능하다. DLS에서, 용액 중 입자의 유체역학적 크기 및 크기 분포가 얻어질 수 있다. 시간 및 온도의 함수로서 이러한 측정을 조사하는 것에 관심이 있을 수 있다. 예를 들어, 저온에서 단백질은 안정하고 반복 가능한 크기(및 산란 강도) 측정치를 나타낼 수 있지만, 전형적으로 일부 승도(Tagg)에서는 단백질 분자가 올리고머화되거나 응집되는 경향을 보일 수 있다. 이것이 발생하는 온도는 단백질 자체와 완충액 조성물에 따라 달라질 것이다. 따라서 DLS 또는 DLS와 SLS의 조합은 기기 사용자가 용융(Tm), 응집(Tagg) 및 개시 온도(Tonse)를 스크리닝할 수 있게 한다. Tm과 거의 유사한 Tagg를 갖는 샘플은 불순물이 실질적으로 없는 고도로 순수한 AAV 입자를 나타낸다.

[0181] 따라서, 본 명세서에 기재된 방법의 일부 실시 형태에서, 정제된 AAV 입자는 DLS에 의해 측정시 Tagg의 약 10℃ 미만 내의 Tm을 갖는다. 소정 실시 형태에서, 정제된 AAV 입자는 DLS에 의해 측정시 Tagg의 약 5℃ 미만 내의 Tm을 갖는다. 추가 실시 형태에서, 정제된 AAV 입자는 DLS에 의해 측정시 Tagg의 2℃ 미만 내의 Tm을 갖는다.

[0182] 본 개시내용은 또한 AAV 입자의 정제 공정에 MNase의 첨가가 회수된 채워진 캡시드의 양을 증가시킬 수 있음을 입증한다. 본 개시내용의 일부 양태에서, 정제된 AAV 입자는 약 50% 초과의 채워진-대-빈 캡시드 비를 포함한다. 다른 실시 형태에서, 정제된 AAV 입자는 약 60% 초과의 채워진-대-빈 캡시드 비를 포함한다. 또 다른 실시 형태에서, 정제된 AAV 입자는 약 70% 초과의 채워진-대-빈 캡시드 비를 포함한다.

[0183] 본 개시내용은 또한 본 명세서에 제공된 임의의 방법에 의해 생성된 AAV 입자의 조성물을 제공한다. 일부 실시 형태에서, 염색질-DNA 뉴클레아제와 접촉하지 않은 조성물과 비교시, 조성물에는 가시적인 또는 현미경으로 관찰 가능한 침전물(즉, 육안으로 보이는 또는 미세한)이 실질적으로 없다. 소정 실시 형태에서, 염색질-DNA 뉴클레아제와 접촉하지 않은 조성물과 비교시, 조성물에는 염색질-관련 DNA가 실질적으로 없다. 일부 실시 형태에서, 염색질-DNA 뉴클레아제와 접촉하지 않은 조성물과 비교시, 조성물에는 숙주 세포 단백질이 실질적으로 없다. 일부 실시 형태에서, 염색질-DNA 뉴클레아제와 접촉하지 않은 조성물과 비교시, 조성물에는 DNA 결합 단백질 및/또는 염색질 관련 단백질이 실질적으로 없다. 구체적인 실시 형태에서, DNA 결합 단백질은 히스톤(예를 들어, H1, H2A, H2B, H3 및 H4)을 포함하고, 염색질-DNA 뉴클레아제와 접촉하지 않은 조성물과 비교시, 조성물에는 히스톤이 실질적으로 없다. 일부 실시 형태에서, 조성물은 증가된 바이러스 역가를 갖는다. 구체적인 실시 형태에서, 바이러스 역가는 물리적 역가를 포함한다. 다른 실시 형태에서, 바이러스 역가는 기능적 역가를 포함한다. 구체적인 실시 형태에서, 염색질-DNA 뉴클레아제와 접촉하지 않은 조성물과 비교시, 조성물은 음이온 교환 크로마토그램에 의해 측정된 바와 같이 감소된 후-생성물 피크를 갖는다. 보다 구체적인 실시 형태에서, 염색질-DNA 뉴클레아제는 MNase이다.

[0184] 또한, (a) AAV 입자를 포함하는 상청액; 및 (b) 염색질-DNA 뉴클레아제를 포함하는 조성물이 본 명세서에 제공된다. 일부 실시 형태에서, 조성물은 Benzonase®를 추가로 포함한다. 구체적인 실시 형태에서, 염색질-DNA

뉴클레아제는 MNase이다.

[0185] 본 개시내용은 또한 염색질-관련 DNA가 실질적으로 없는 AAV 입자를 생성하는데 사용하기 위한 조성물을 제공하며, 조성물은 (a) AAV 입자를 포함하는 상청액; 및 (b) 염색질-DNA 뉴클레아제를 포함한다. 일부 실시 형태에서, 조성물은 Benzonase®를 추가로 포함한다. 구체적인 실시 형태에서, 염색질-DNA 뉴클레아제는 MNase이다.

[0186] 조성물에 적합한 MNase의 농도를 결정하는 것은 당업자의 기술 내에 있다. 일부 실시 형태에서, MNase의 농도는 2.5 단위/mL 초과이다. 소정 실시 형태에서, MNase의 농도는 10 단위/mL 초과이다. 구체적인 실시 형태에서, MNase의 농도는 약 30 단위/mL 내지 약 100 단위/mL이다. 구체적인 실시 형태에서, 상청액 중의 MNase의 농도는 약 60 단위/mL이다.

[0187] 또한, (a) Benzonase®; 및 (b) 염색질-DNA 뉴클레아제를 포함하는 키트가 본 명세서에 제공된다. 일부 실시 형태에서, 염색질-DNA 뉴클레아제는 MNase이다. 소정 실시 형태에서, MNase는 AAV 입자 정제를 향상시키기에 충분한 양으로 존재한다. 일부 실시 형태에서, MNase는 염색질 결합 단백질을 방출하기에 충분한 양으로 존재한다.

[0188] 다양한 시스템 및 입자 생성 플랫폼이 현재 AAV 입자의 제조를 위해 사용되고 있으며 당업계에 공지되어 있고, 이들 각각은 본 명세서에 기재된 정제 방법, 조성물 및 시스템에 사용하기에 적합하다. 대규모의 AAV 입자의 생성을 위한 예시적인 방법 및 시스템은, 예를 들어, 포유류 세포에서의 플라스미드 DNA 형질감염, 안정한 포유류 세포주의 Ad 감염, 재조합 단순 포진 바이러스(rHSV)에 의한 포유류 세포의 감염, 및 재조합 바큘로바이러스에 의한 곤충 세포의 감염을 포함할 수 있다(예를 들어, 문헌[Penaud-Budloo M. et al., Mol Ther Methods Clin Dev. 2018 Jan 8;8:166-180] 참조).

[0189] AAV 입자의 생성을 위한 예시적인 방법 또는 시스템은, 예를 들어, 인간 배아 HEK293 세포의 플라스미드 형질감염이다. 예를 들어, HEK293 세포는 무기 화합물(예를 들어, 인산 칼슘) 또는 유기 화합물(예를 들어, 폴리에틸렌이민(PEI)) 또는 비화학적 방법(예를 들어, 전기천공)을 사용하는 1개 또는 2개의 헬퍼 플라스미드(helper plasmid) 및 관심 유전자를 함유하는 플라스미드로 동시에 형질감염될 수 있다. 헬퍼 플라스미드(들)는 4개의 Rep 단백질(Rep78, Rep68, Rep52, Rep40), 3개의 AAV 구조 단백질(VP1, VP2, 및 VP3), AAP 및 아데노바이러스 보조 기능 E2A, E4, 및 VA RNA의 발현을 허용한다. AAV 복제에 필요한 추가의 아데노바이러스 E1A/E1B 보조인자는 HEK293 생성자 세포에서 발현될 수 있다. 플라스미드는 박테리아 기원 및 항생제 내성 유전자를 사용한 대장균에서의 통상적인 기술에 의해 또는 소형 고리형(minicircle, MC) 기술에 의해 생성될 수 있다. HEK293 생성자 세포와 같은 생성자 세포는 부착 또는 현탁 배양일 수 있다.

[0190] 제조를 위한 다른 예시적인 방법 또는 시스템은 rHSV 벡터로 포유류 세포를 감염시키는 것을 포함한다. 햄스터 BHK21 세포주 또는 HEK293 및 유도체와 같은 세포는 2개의 rHSV로 감염될 수 있는데, 하나는 AAV ITR에 의해 결합(rHSV-AAV)된 관심 유전자를 운반하고, 두 번째는 AAV 입자의 생성을 위해 원하는 혈청형의 AAV rep 및 cap ORF(rHSV-repcap)를 가지고 있다.

[0191] AAV 입자 생성을 위한 안정한 생성자 세포주는 AAV 입자의 생성을 위한 추가의 예시적인 시스템을 제공한다. 예를 들어, 안정한 생성자 세포주는 세포주(예를 들어, HEK293 세포, HeLa 세포 또는 유도체)로부터 유래되고, AAV rep 및 cap 유전자(패키징 세포주(packaging cell line)) 및/또는 AAV 게놈(예를 들어, rAAV 게놈)을 도입하여 유전자 조작되어 생성(생성자 세포)될 수 있다. AAV 입자의 생성을 위한 또 다른 예시적인 안정한 세포주는 통상적으로 독성인 AAV 복제(rep) 유전자 및 AAV 캡시드(cap) 유전자 및 전이유전자를 포함하는 안정한 세포주를 포함한다(예를 들어, 본 명세서에 전체적으로 개시된 미국 특허 출원 제62/877,508호 참조).

[0192] 생성자 세포주는 포유류 세포주일 필요가 없고, 비-포유류 세포, 예컨대 곤충 세포 및 효모가 생성에 사용될 수 있음이 추가로 이해된다. AAV 입자의 생성에 적합한 비-포유류 플랫폼의 예시적인 예는 바큘로바이러스-Sf9 곤충-세포 플랫폼을 포함한다. AAV 입자의 생성에 적합한 비-포유류 세포주는 형질감염 방법 또는 안정한 세포주를 사용하여 생성될 수 있다(예를 들어, 문헌 [Mietzsch M. et al. Hum. Gene Ther. 2014; 25: 212-222]; 문헌[Mietzsch M. et al. Hum. Gene Ther. Methods. 2017; 28: 15-22] 참조). 상기 기재된 AAV 입자 생성 플랫폼의 예는 예시적인 것으로 이해되고, 제한적인 것으로 의도되지 않으며, 다양한 생성 플랫폼들 중 임의의 것이 본 명세서에 기재된 정제 방법 및 조성물과 조합될 수 있다.

[0193] 본 명세서에 사용된 바와 같이, "벡터"는 유전 물질을 세포 내로 운반하는 데 사용되는 핵산 분자이며, 이것은 복제 및/또는 발현될 수 있다. 본 개시내용의 관점에서 당업자에게 알려진 임의의 벡터가 사용될 수 있다. 벡터의 예는 플라스미드, 바이러스 벡터(박테리오파지, 동물 바이러스 및 식물 바이러스), 코스미드 및 인공 염색

체(예를 들어, YAC)를 포함하지만, 이로 제한되지는 않는다. 바람직하게는, 벡터는 DNA 플라스미드이다. 당업자는 본 개시내용을 고려하여 표준 재조합 기법을 통해 본 출원의 벡터를 구성할 수 있다.

[0194] 본 출원의 벡터는 발현 벡터일 수 있다. 본 명세서에 사용된 바와 같이, 용어 "발현 벡터"는 전사될 수 있는 RNA를 코딩하는 핵산을 포함하는 임의의 유형의 유전자 작제물을 지칭한다. 발현 벡터는 재조합 단백질 발현을 위한 벡터, 예컨대 DNA 플라스미드 또는 바이러스 벡터 및 대상체의 조직 내에서의 발현을 위하여 대상체 내로의 핵산의 전달을 위한 벡터, 예컨대 DNA 플라스미드 또는 바이러스 벡터를 포함하지만 이로 제한되지 않는다. 당업자는, 발현 벡터의 설계가 형질전환되는 숙주 세포의 선택, 원하는 단백질의 발현 수준 등과 같은 인자에 달려 있음을 이해할 것이다.

[0195] 본 출원의 일부 실시 형태에서, 벡터는 비-바이러스 벡터이다. 비-바이러스 벡터의 예에는 DNA 플라스미드, 박테리아 인공 염색체, 효모 인공 염색체, 박테리오파지 등이 포함되지만 이로 제한되지 않는다. 바람직하게는, 비-바이러스 벡터는 DNA 플라스미드이다. "DNA 플라스미드 벡터", "플라스미드 DNA" 또는 "플라스미드 DNA 벡터"와 상호교환적으로 사용되는 "DNA 플라스미드"는 적합한 숙주 세포에서 자율 복제할 수 있는 이중 가닥 및 일반적으로 원형 DNA 서열을 지칭한다. 암호화된 폴리뉴클레오티드의 발현에 사용되는 DNA 플라스미드는 전형적으로 복제 기점, 다중 클로닝 부위, 및 예를 들어, 항생제 내성 유전자일 수 있는 선택 가능한 마커를 포함한다. 사용될 수 있는 적합한 DNA 플라스미드의 예에는 공지된 발현 시스템(원핵 및 진핵 시스템 둘 모두를 포함함)에 사용하기 위해 상업적으로 입수 가능한 발현 벡터, 예컨대, 대장균에서 단백질의 생성 및/또는 발현에 사용될 수 있는 pSE420(Invitrogen, 미국 캘리포니아주 샌디에이고 소재); 효모 균주 *사카로마이세스 세레비지애*에서 단백질의 생성 및/또는 발현에 사용될 수 있는 pYES2(Invitrogen, Thermo Fisher Scientific); 곤충 세포에서의 생성 및/또는 발현에 사용될 수 있는 MAXBAC® 완전 바큘로바이러스 발현 시스템(Thermo Fisher Scientific); 포유류 세포에서 높은 수준의 구성 단백질 발현을 위해 사용될 수 있는 pcDNA ™ 또는 pcDNA3™(Life Technologies, Thermo Fisher Scientific); 및 대부분의 포유류 세포에서 관심 단백질의 고수준 일시적 발현에 사용될 수 있는 pVAX 또는 pVAX-1(Life Technologies, Thermo Fisher Scientific)이 포함되지만, 이로 제한되지 않는다. 임의의 상업적으로 입수 가능한 DNA 플라스미드의 골격은 숙주 세포에서 단백질 발현을 최적화하도록 변형될 수 있으며, 예컨대, 통상적인 기술 및 용이하게 입수 가능한 출발 물질을 사용하여, 특정 요소(예를 들어, 복제 기점 및/또는 항생제 내성 카세트)의 배향을 역전시키고/시키거나, 플라스미드에 내인성인 프로모터(예를 들어, 항생제 내성 카세트의 프로모터)를 대체하고/하거나 전사된 단백질(예를 들어, 항생제 내성 유전자의 코딩 서열)을 암호화하는 폴리뉴클레오티드 서열을 대체한다. (예를 들어, 문헌[Sambrook *et al.,* Molecular Cloning a Laboratory Manual, Second Ed. Cold Spring Harbor Press (1989)] 참조).

[0196] 바람직하게는, DNA 플라스미드는 포유류 숙주 세포에서 단백질 발현에 적합한 발현 벡터이다. 포유류 숙주 세포에서 단백질 발현에 적합한 발현 벡터는 pUC, pcDNATM, pcDNA3TM, pVAX, pVAX-1, ADVAX, NTC8454 등이 포함되지만 이로 제한되지 않는다. 예를 들어, 벡터는 pUC 복제 기점과 암피실린 내성 유전자를 함유하는 pUC57을 기반으로 할 수 있다. 이는 헤르페스 바이러스 티미딘 키나제 유전자 프로모터, 퓨로마이신 N-아세틸 트랜스퍼라제 코딩 영역, 및 소 성장 호르몬 유전자로부터의 폴리아데닐화 신호로부터 작제된 포유류 퓨로마이신 내성 유전자 카세트를 추가로 포함할 수 있다. 벡터는 또한 엡스타인 바 바이러스(EBV)의 '2회 대칭(Dyad Symmetry)' 영역 및 EBV의 '반복체 군(Family of Repeats)' 영역의 복합체를 나타내는 EBV OriP 복제 기원 단편을 포함할 수 있다.

[0197] 본 출원의 벡터는 또한 바이러스 벡터일 수 있다. 일반적으로, 바이러스 벡터는 비-감염성이 된 변형된 바이러스 DNA 또는 RNA를 갖지만 여전히 바이러스 프로모터 및 전이유전자를 보유하는 유전자 조작된 바이러스이며, 따라서 바이러스 프로모터를 통한 전이유전자의 번역을 허용한다. 바이러스 벡터는 감염성 서열이 빈번하게 결여되기 때문에, 대규모 형질감염을 위한 헬퍼 바이러스 또는 패키징 세포주를 필요로 한다. 사용될 수 있는 바이러스 벡터의 예는 아데노바이러스 벡터, 아데노-관련 바이러스 벡터, pox 바이러스 벡터, 장용 바이러스 벡터, 베네수엘라 말 뇌염 바이러스 벡터, 셈리키 삼림 바이러스 벡터, 담배 모자이크 바이러스 벡터, 렌티바이러스 벡터 등을 포함하지만, 이로 제한되지 않는다. 벡터는 비-바이러스 벡터일 수 있다.

[0198] 예시적인 바이러스 벡터는 아데노바이러스 벡터, 예를 들어, 재조합 아데노바이러스 벡터이다. 본 명세서에 사용된 바와 같이, 용어 "재조합 아데노바이러스 벡터" 및 "재조합 아데노바이러스 벡터" 및 "재조합 아데노바이러스 입자"는 상호교환적으로 사용되고, 관심 폴리뉴클레오티드를 진핵 세포 내로 삽입하도록 설계된 유전자 조작된 아데노바이러스를 지칭하며, 폴리뉴클레오티드가 후속적으로 발현된다. 본 발명의 바이러스 벡터로서 사

용될 수 있는 아데노바이러스의 예는 혈청형 Ad2, Ad5, Ad11, Ad12, Ad24, Ad26, Ad34, Ad35, Ad40, Ad48, Ad49, Ad50, Ad52(예를 들어, RhAd52) 및 Pan9(AdC68로도 공지됨)를 갖거나 이로부터 유래된 것들을 포함하며; 이들 벡터는 예를 들어, 인간, 침팬지(예를 들어, ChAd1, ChAd3, ChAd7, ChAd8, ChAd21, ChAd22, ChAd23, ChAd24, ChAd25, ChAd26, ChAd27.1, ChAd28.1, ChAd29, ChAd30, ChAd31.1, ChAd32, ChAd33, ChAd34, ChAd35.1, ChAd36, ChAd37.2, ChAd39, ChAd40.1, ChAd41.1, ChAd42.1, ChAd43, ChAd44, ChAd45, ChAd46, ChAd48, ChAd49, ChAd49, ChAd50, ChAd67 또는 SA7P), 또는 레서스 아데노바이러스(예를 들어, rhAd51, rhAd52 또는 rhAd53)로부터 유래될 수 있다. 재조합 아데노바이러스 벡터는, 예를 들어, 인간 아데노바이러스(HAdV 또는 AdHu), 또는 침팬지 또는 고릴라 아데노바이러스와 같은 유인원 아데노바이러스(ChAd, AdCh 또는 SAdV), 또는 레서스 아데노바이러스(rhAd)로부터 유래될 수 있다.

[0199] 바람직하게는, 아데노바이러스 벡터는 재조합 인간 아데노바이러스 벡터, 예를 들어 재조합 인간 아데노바이러스 혈청형 5, 또는 재조합 인간 아데노바이러스 혈청형 26, 4, 35, 7, 48 등 중 임의의 하나이다. 본 출원에 유용한 재조합 바이러스 벡터는 본 개시내용을 고려하여 당업계에 공지된 방법을 사용하여 제조될 수 있다. 예를 들어, 유전자 코드의 축퇴성을 고려하여, 동일한 폴리펩타이드를 암호화하는 몇몇 핵산 서열이 설계될 수 있다. 관심 단백질을 인코딩하는 폴리뉴클레오티드는 숙주 세포(예를 들어, 박테리아 또는 포유류 세포)에서 적절한 발현을 보장하기 위해 선택적으로 코돈 최적화될 수 있다. 코돈 최적화는 당업계에 널리 적용된 기술이며, 코돈 최적화된 폴리뉴클레오티드를 얻는 방법은 본 개시내용을 고려하여 당업자에게 잘 알려져 있을 것이다.

[0200] 비-천연 발생 핵산 분자 또는 벡터는 하나 이상의 발현 카세트를 포함할 수 있다. "발현 카세트"는 RNA 및 단백질을 제조하도록 세포 조직에 지시하는 핵산 분자 또는 벡터의 일부이다. 발현 카세트는 프로모터 서열, 오픈 리딩 프레임, 및 선택적으로 폴리아데닐화 신호를 포함하는 3'-비번역 영역(UTR)을 포함할 수 있다. 오픈 리딩 프레임(ORF)은 시작 코돈에서 정지 코돈까지 관심 단백질(예를 들어, Rep, Cap, 재조합 효소 또는 관심 재조합 단백질)의 코딩 서열을 함유하는 리딩 프레임이다. 발현 카세트의 조절 요소는 관심 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오티드 서열에 작동 가능하게 연결될 수 있다.

[0201] 본 출원의 비-천연 발생 핵산 분자 또는 벡터는 다양한 조절 서열을 함유할 수 있다. 본 명세서에 사용된 바와 같이, 용어 "조절 서열"은 숙주 세포 또는 유기체 내로 핵산 또는 이의 유도체(즉, mRNA)의 복제, 중복(duplication), 전사, 스플라이싱, 번역, 안정성 및/또는 수송을 포함하는 핵산 분자의 기능적 조절을 허용하거나, 이에 기여하거나 또는 이를 조절하는 임의의 서열을 지칭한다. 조절 요소에는, 비제한적으로, 프로모터, 인핸서, 폴리아데닐화 신호, 번역 정지 코돈, 리보솜 결합 요소, 전사 종결자, 선별 마커, 복제 기점 등이 포함된다.

[0202] 비-천연 발생 핵산 분자 또는 벡터는 관심 단백질의 발현을 제어하기 위해 바람직하게는 발현 카세트 내에 프로모터 서열을 포함할 수 있다. 용어 "프로모터"는 그의 통상적인 의미로 사용되며 작동가능하게 연결된 뉴클레오티드 서열의 전사를 개시하는 뉴클레오티드 서열을 지칭한다. 프로모터는 그것이 전사하는 뉴클레오티드 서열 부근의 동일한 가닥 상에 위치한다. 프로모터는 구성적, 유도성, 또는 억제성일 수 있다. 프로모터는 천연 발생 또는 합성일 수 있다. 프로모터는 바이러스, 박테리아, 진균, 식물, 곤충, 및 동물을 포함하는 공급원으로부터 유래될 수 있다. 프로모터는 상동성 프로모터(즉, 벡터와 동일한 유전자 공급원으로부터 유래됨) 또는 이종성 프로모터(즉, 상이한 벡터 또는 유전자 공급원으로부터 유래됨)일 수 있다. 예를 들어, 사용되는 벡터가 DNA 플라스미드인 경우, 프로모터는 플라스미드에 내인성(상동성)이거나 다른 공급원(이종성)으로부터 유래될 수 있다. 바람직하게는, 프로모터는 발현 카세트 내부에서 관심 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오티드의 상류에 위치한다.

[0203] 사용될 수 있는 예시적인 프로모터는 유인원 바이러스 40(SV40) 유래 프로모터, 마우스 유방 종양 바이러스(MMTV) 프로모터, 인간 면역결핍 바이러스(HIV) 프로모터, 예컨대 소 면역결핍 바이러스(BIV) 긴 말단 반복부(LTR) 프로모터, 몰로니 바이러스 프로모터, 조류 백혈증 바이러스(ALV) 프로모터, 거대세포바이러스(CMV) 프로모터, 예컨대 CMV 전초기(immediate early) 프로모터(CMV-IE), 엡스타인 바 바이러스(EBV) 프로모터 또는 라우스 육종 바이러스(RSV) 프로모터를 포함하지만, 이로 제한되지는 않는다. 프로모터는 또한 인간 액틴, 인간 미오신, 인간 헤모글로빈, 인간 근육 크레아틴 또는 인간 메탈로티오네인과 같은 인간 유전자 유래의 프로모터일 수 있다. 프로모터는 또한 천연 또는 합성의 근육 또는 피부 특이적 프로모터와 같은 조직 특이적 프로모터일 수 있다. 바람직하게는, 프로모터는 강력한 진핵생물 프로모터, 예컨대 거대세포바이러스(CMV) 프로모터(nt -672 내지 +15), EF1-알파 프로모터, 헤르페스 바이러스 티미딘 키나제 유전자 프로모터 등이다.

[0204] 비-천연 발생 핵산 분자 또는 벡터는 발현된 전사체를 안정화시키고/시키거나, RNA 전사체의 핵 방출을 증강시키고/시키거나, 전사-번역 커플링을 개선시키는 추가의 폴리뉴클레오티드 서열을 포함할 수 있다. 이러한 서열의 예에는 폴리아데닐화 신호 및 인핸서 서열이 포함된다. 폴리아데닐화 신호는 전형적으로 벡터의 발현 카세트 내 관심 단백질(예를 들어, Rep, Cap, 재조합 효소)에 대한 코딩 서열의 하류에 위치한다. 인핸서 서열은 전사 인자에 의해 결합되는 경우에 연관된 유전자의 전사를 증강시키는 조절 DNA 서열이다. 인핸서 서열은 바람직하게는 프로모터 서열의 하류에 있고, 벡터의 발현 카세트 내의 코딩 서열의 하류 또는 상류에 있을 수 있다.

[0205] 본 개시내용의 관점에서 당업자에게 알려진 임의의 폴리아데닐화 신호가 사용될 수 있다. 예를 들어, 폴리아데닐화 신호는 SV40 폴리아데닐화 신호(AAV2 폴리아데닐화 신호(bp 4411-4466, NC_001401), 단순 포진 바이러스 티미딘 키나아제 유전자 유래의 폴리아데닐화 신호, LTR 폴리아데닐화 신호, 소 성장 호르몬(bGH) 폴리아데닐화 신호, 인간 성장 호르몬(hGH) 폴리아데닐화 신호 또는 인간 β-글로빈 폴리아데닐화 신호일 수 있다. 바람직하게는, 폴리아데닐화 신호는 소 성장 호르몬(bGH) 폴리아데닐화 신호, GenBank 수탁 번호 NC_001401의 뉴클레오티드 서열의 뉴클레오티드 번호 4411 내지 4466을 갖는 AAV2의 폴리아데닐화 신호 또는 SV40 폴리아데닐화 신호이다.

[0206] 본 개시내용의 관점에서 당업자에게 알려진 임의의 인핸서 서열이 사용될 수 있다. 예를 들어, 인핸서 서열은 인간 액틴, 인간 미오신, 인간 헤모글로빈, 인간 근육 크레아틴, 또는 CMV, HA, RSV 또는 EBV 중 하나와 같은 바이러스 인핸서일 수 있다. 특정 인핸서의 예는 우드척 HBV 전사 후 조절 요소(Woodchuck HBV Post-transcriptional regulatory element, WPRE), 인간 아포지질단백질 A1 전구체(ApoAI)로부터 유래된 인트론/엑손 서열, 인간 T-세포 백혈병 바이러스 유형 1(HTLV-1) 긴 말단 반복부(LTR)의 비번역 R-U5 도메인, 스플라이싱 인핸서, 합성 토끼 β-글로빈 인트론 또는 이들의 임의의 조합을 포함하지만, 이로 제한되지는 않는다.

[0207] 바람직하게는, 인핸서 서열은 AAV의 P5 프로모터를 포함한다. P5 프로모터는 *rep* 유전자의 코딩 서열 내의 시스-작용성 Rep-의존 요소(cis-acting Rep-dependent element, CARE)의 일부이다. CARE는 시스 내에 존재할 때 복제 및 캡슐화를 증가시키는 것으로 나타났다. CARE는 또한 일부 AAV 입자 생성자 세포주에서와 같이 염색체 융합된 *rep* 유전자(AAV ITR이 존재하지 않는 경우)의 증폭에 중요하다. 이론에 구속되고자 하지 않지만, *cap* 코딩 서열의 하류에 배치된 P5 프로모터는 잠재적으로 Cap 발현, 이에 따른 AAV 입자 수율을 증가시키는 인핸서로서 작용하는 것으로 여겨지며, 이는 또한 염색체 내로 통합되는 유전자를 증폭시키는 인핸서 활성을 제공한다.

[0208] 비-천연 발생 핵산 분자 또는 벡터, 예컨대 DNA 플라스미드는 또한 박테리아 복제 기점 및 박테리아 세포, 예를 들어, 대장균에서 플라스미드의 선택 및 유지를 위한 항생제 내성 발현 카세트를 포함할 수 있다. 복제 기점(ORI)은 복제가 개시되어, 플라스미드가 세포 내에서 재생되고 생존할 수 있게 하는 서열이다. 본 출원에 사용하기에 적합한 ORI의 예에는 비제한적으로, ColE1, pMB1, pUC, pSC101, R6K 및 15A, 바람직하게는 pUC가 포함되지만 이로 제한되지 않는다.

[0209] 박테리아 세포에서 선택 및 유지를 위한 벡터는 전형적으로 항생제 내성 유전자에 작동 가능하게 연결된 프로모터 서열을 포함한다. 바람직하게는, 항생제 내성 유전자에 작동 가능하게 연결된 프로모터 서열은 관심 단백질을 인코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열에 작동 가능하게 연결된 프로모터 서열과 상이하다. 항생제 내성 유전자는 코돈 최적화될 수 있고, 항생제 내성 유전자의 서열 조성은 보통 박테리아, 예를 들어, 대장균의 코돈 사용으로 조정된다. 본 개시내용의 당업자에게 알려진 임의의 항생제 내성 유전자가 사용될 수 있으며, 카나마이신 내성 유전자(Kan^r), 암피실린 내성 유전자(Amp^r) 및 테트라사이클린 내성 유전자(Tet^r) 뿐만 아니라 클로람페니콜, 블레오마이신, 스펙티노마이신, 카르베니실린 등에 대한 내성을 부여하는 유전자를 포함하지만 이로 제한되지 않는다.

[0210] 본 발명의 특정 실시 형태가 본 명세서에 기재되어 있다. 전술한 설명을 읽을 때, 개시된 실시 형태들의 변형이 당업자에게 명백해질 수 있으며, 숙련자는 적절한 경우에 그러한 변형을 사용할 수 있을 것으로 예상된다. 따라서, 본 발명은 본 명세서에 구체적으로 기재된 것과 다른 방식으로 실시될 수 있으며, 본 발명은 적용가능한 법에 의해 허용되는 한 본 명세서에 첨부된 청구범위에 언급된 발명 요지의 모든 변형 및 등가물을 포함하는 것으로 의도된다. 더욱이, 본 명세서에서 달리 지시되거나 문맥에 의해 달리 명확하게 모순되지 않는 한, 이의 모든 가능한 변형 내의 전술된 요소들의 임의의 조합이 본 발명에 의해 포함된다. 본 발명의 다수의 실시 형태가 기재되어 있다. 그럼에도 불구하고, 본 발명의 사상 및 범주로부터 벗어남이 없이 다양한 변형들이 이루어질 수 있다는 것은 이해될 것이다. 따라서, 실시예 섹션에서의 설명은 청구범위에 기재된 본 발명의 범주를 예

시하지만 이를 제한하고자 하지 않는다.

[0211] **실시 형태**

[0212] 본 발명은 하기의 비제한적인 실시 형태를 제공한다.

[0213] 일 세트의 실시 형태에서, 다음이 제공된다:

[0214] A1. 아데노-관련 바이러스(AAV) 입자를 정제하는 방법으로서,

[0215] (a) AAV 입자를 포함하는 상청액을 염색질-DNA 뉴클레아제를 포함하는 조성물과 접촉시키는 단계; 및

[0216] (b) AAV 입자를 정제하는 단계를 포함하는, 방법.

[0217] A2. 실시 형태 A1에 있어서, 정제 단계는 원심분리, 크로마토그래피, 여과 또는 이들의 조합을 포함하는, 방법.

[0218] A3. 실시 형태 A2에 있어서, 원심분리는 밀도 구배 원심분리, 초원심분리, 또는 이들의 조합을 포함하는, 방법.

[0219] A4. 실시 형태 A2에 있어서, 크로마토그래피는 친화성 크로마토그래피, 이온 교환 크로마토그래피, 크기 배제 크로마토그래피, 소수성 상호작용 크로마토그래피, 또는 이들의 조합을 포함하는, 방법.

[0220] A5. 실시 형태 A4에 있어서, AAV 입자에 결합하기에 충분한 시간 동안 AAV 입자를 포함하는 상청액을 고체 지지체와 함께 인큐베이션하는 단계를 추가로 포함하는, 방법.

[0221] A6. 실시 형태 A5에 있어서, 고체 지지체를 세정하는 단계를 추가로 포함하는, 방법.

[0222] A7. 실시 형태 A6에 있어서, 세정 단계는 고 pH 완충액을 포함하는, 방법.

[0223] A8. 실시 형태 A7에 있어서, 고 pH 완충액은 pH 9.0 초과인, 방법.

[0224] A9. 실시 형태 A7에 있어서, 고 pH 완충액은 pH 9.0 내지 pH 11인, 방법.

[0225] A10. 실시 형태 A7에 있어서, 고 pH 완충액은 약 pH 9.5인, 방법.

[0226] A11. 실시 형태 A7에 있어서, 고 pH 완충액은 약 pH 10.2인, 방법.

[0227] A12. 실시 형태 A7에 있어서, 고 pH 완충액은 약 pH 10.3인, 방법.

[0228] A13. 실시 형태 A7에 있어서, 고 pH 완충액은 약 pH 10.4인, 방법.

[0229] A14. 실시 형태 A4 내지 실시 형태 A13 중 어느 한 실시 형태에 있어서, 방법은 하나 이상의 친화성 크로마토그래피 정제를 포함하는, 방법.

[0230] A15. 실시 형태 A14에 있어서, 친화성 크로마토그래피는 이온 교환 크로마토그래피를 포함하는, 방법.

[0231] A16. 실시 형태 A15에 있어서, 이온 교환 크로마토그래피는 음이온 교환 크로마토그래피를 포함하는, 방법.

[0232] A17. 실시 형태 A1 내지 실시 형태 A16 중 어느 한 실시 형태에 있어서, 상청액은 정화된 상청액인, 방법.

[0233] A18. 실시 형태 A1 내지 실시 형태 A17 중 어느 한 실시 형태에 있어서, 단계 (a)의 조성물은 Benzonase®를 추가로 포함하는, 방법.

[0234] A19. 실시 형태 A1 내지 실시 형태 A18 중 어느 한 실시 형태에 있어서, 인큐베이션은 약 10분 내지 약 1시간 동안 수행되는, 방법.

[0235] A20. 실시 형태 A19에 있어서, 인큐베이션은 약 20분 내지 약 40분 동안 수행되는, 방법.

[0236] A21. 실시 형태 A19 또는 실시 형태 A20에 있어서, 인큐베이션은 약 30분 동안 수행되는, 방법.

[0237] A22. 실시 형태 A1 내지 실시 형태 A21 중 어느 한 실시 형태에 있어서, 염색질-DNA 뉴클레아제는 미세구균 뉴클레아제(MNase)인, 방법.

[0238] A23. 실시 형태 A22에 있어서, 상청액 중의 MNase의 농도는 2.5 단위/mL 초과인, 방법.

[0239] A24. 실시 형태 A23에 있어서, 상청액 중의 MNase의 농도는 10 단위/mL 초과인, 방법.

[0240] A25. 실시 형태 A23 또는 실시 형태 A24에 있어서, 상청액 중의 MNase의 농도는 약 30 단위/mL 내지 약 100 단위/mL인, 방법.

[0241] A26. 실시 형태 A23 내지 실시 형태 A25중 어느 한 실시 형태에 있어서, 상청액 중의 MNase의 농도는 약 60 단위/mL인, 방법.

[0242] A27. 실시 형태 A22 내지 실시 형태 A26 중 어느 한 실시 형태에 있어서, Mnase는 결합된 AAV 입자를 함유하는 고체 지지체와 함께 인큐베이션되는, 방법.

[0243] A28. 실시 형태 A5 내지 실시 형태 A27 중 어느 한 실시 형태에 있어서, AAV 입자는 저 pH 완충액을 사용하여 고체 지지체로부터 용리되는, 방법.

[0244] A29. 실시 형태 A28에 있어서, 저 pH 완충액 전에 고 pH 완충액을 추가로 포함하는, 방법.

[0245] A30. 실시 형태 A28 또는 실시 형태 A29에 있어서, 저 pH 완충액은 약 pH 3.0 미만인, 방법.

[0246] A31. 실시 형태 A30에 있어서, 저 pH 완충액은 약 pH 1.5 내지 약 pH 2.5인, 방법.

[0247] A32. 실시 형태 A30에 있어서, 저 pH 완충액은 약 pH 1.5인, 방법.

[0248] A33. 실시 형태 A30에 있어서, 저 pH 완충액은 약 pH 2.5인, 방법.

[0249] A34. 실시 형태 A28 내지 실시 형태 A33 중 어느 한 실시 형태에 있어서, 저 pH 완충액은 시트레이트 완충액, 글리신 완충액 또는 인산 완충액인, 방법.

[0250] A35. 실시 형태 A34에 있어서, 저 pH 완충액은 시트레이트 완충액인, 방법.

[0251] A36. 실시 형태 A34에 있어서, 저 pH 완충액은 인산 완충액인, 방법.

[0252] A37. 실시 형태 A14 내지 실시 형태 A36 중 어느 한 실시 형태에 있어서, 친화성 크로마토그래피 정제는 두 번의 친화성 크로마토그래피 정제를 포함하는, 방법.

[0253] A38. 실시 형태 A37에 있어서, 방법은 친화성 크로마토그래피 정제에 이어서 음이온-교환 크로마토그래피를 포함하는, 방법.

[0254] A39. 실시 형태 A28 내지 실시 형태 A38 중 어느 한 실시 형태에 있어서, 저 pH 완충액의 pH를 중화시키는 단계를 추가로 포함하는, 방법.

[0255] A40. 실시 형태 A39에 있어서, 중화 단계는 비스-트리스-프로판(BTP) 또는 트리스 완충액을 첨가하는 단계를 포함하는, 방법.

[0256] A41. 실시 형태 A28 내지 실시 형태 A40 중 어느 한 실시 형태에 있어서, 약 5% 내지 약 40%의 에탄올을 추가로 포함하는, 방법.

[0257] A42. 실시 형태 A41에 있어서, 약 10% 내지 약 30%의 에탄올을 포함하는, 방법.

[0258] A43. 실시 형태 A41 또는 실시 형태 A42에 있어서, 약 15% 내지 약 25%의 에탄올을 포함하는, 방법.

[0259] A44. 실시 형태 A41 내지 실시 형태 A43 중 어느 한 실시 형태에 있어서, 약 20%의 에탄올을 포함하는, 방법.

[0260] A45. 실시 형태 A1 내지 실시 형태 A44 중 어느 한 실시 형태에 있어서, MNase와 접촉하지 않고 정제된 AAV 입자와 비교시, 정제된 AAV 입자에는 염색질-관련 DNA가 실질적으로 없는, 방법.

[0261] A46. 실시 형태 A1 내지 실시 형태 A45 중 어느 한 실시 형태에 있어서, MNase와 접촉하지 않고 정제된 AAV 입자와 비교시, 정제된 AAV 입자에는 숙주 세포 DNA가 실질적으로 없는, 방법.

[0262] A47. 실시 형태 A46에 있어서, 숙주 세포 DNA 농도는 2 ng/mL 미만인, 방법.

[0263] A48. 실시 형태 A46에 있어서, 숙주 세포 DNA 농도는 1.5 ng/mL 미만인, 방법.

[0264] A49. 실시 형태 A46에 있어서, 숙주 세포 DNA 농도는 1 ng/mL 미만인, 방법.

[0265] A50. 실시 형태 A1 내지 실시 형태 A49 중 어느 한 실시 형태에 있어서, MNase와 접촉하지 않고 정제된 AAV 입자와 비교시, 정제된 AAV 입자에는 숙주 세포 단백질이 실질적으로 없는, 방법.

[0266] A51. 실시 형태 A50에 있어서, MNase와 접촉하지 않고 정제된 AAV 입자와 비교시, 정제된 AAV 입자에는 DNA 결

합 단백질이 실질적으로 없는, 방법.

[0267] A52. 실시 형태 A51에 있어서, DNA 결합 단백질은 히스톤을 포함하는, 방법.

[0268] A53. 실시 형태 A1 내지 실시 형태 A52 중 어느 한 실시 형태에 있어서, 정제된 AAV 입자에는 육안으로 보이는 불순물 및 미세한 불순물이 실질적으로 없는, 방법.

[0269] A54. 실시 형태 A1 내지 실시 형태 A53 중 어느 한 실시 형태에 있어서, MNase와 접촉하지 않고 정제된 AAV 입자와 비교시, 정제된 AAV 입자는 증가된 바이러스 역가를 갖는, 방법.

[0270] A55. 실시 형태 A54에 있어서, 바이러스 역가는 물리적 역가를 포함하는, 방법.

[0271] A56. 실시 형태 A54에 있어서, 바이러스 역가는 기능적 역가를 포함하는, 방법.

[0272] A57. 실시 형태 A54 내지 실시 형태 A56 중 어느 한 실시 형태에 있어서, 바이러스 역가는 약 2배 내지 약 100배 증가되는, 방법.

[0273] A58. 실시 형태 A54 내지 실시 형태 A56 중 어느 한 실시 형태에 있어서, 바이러스 역가는 약 2배 이상 증가되는, 방법.

[0274] A59. 실시 형태 A54 내지 실시 형태 A56 중 어느 한 실시 형태에 있어서, 바이러스 역가는 약 3배 이상 증가되는, 방법.

[0275] A60. 실시 형태 A54 내지 실시 형태 A56 중 어느 한 실시 형태에 있어서, 바이러스 역가는 약 7배 이상 증가되는, 방법.

[0276] A61. 실시 형태 A54 내지 실시 형태 A56 중 어느 한 실시 형태에 있어서, 바이러스 역가는 약 80배 이상 증가되는, 방법.

[0277] A62. 실시 형태 A1 내지 실시 형태 A61 중 어느 한 실시 형태에 있어서, MNase와 접촉하지 않고 정제된 AAV 입자와 비교시, 정제된 AAV 입자는 후-생성물 AAV 입자 분획에 대한 생성물 AAV 입자 분획의 증가된 바이러스 역가 비를 포함하는, 방법.

[0278] A63. 실시 형태 A62에 있어서, 바이러스 역가 비는 약 2배 이상 증가되는, 방법.

[0279] A64. 실시 형태 A62에 있어서, 바이러스 역가 비는 약 5배 이상 증가되는, 방법.

[0280] A65. 실시 형태 A62에 있어서, 바이러스 역가 비는 약 10배 이상 증가되는, 방법.

[0281] A66. 실시 형태 A62에 있어서, 바이러스 역가 비는 약 25배 이상 증가되는, 방법.

[0282] A67. 실시 형태 A1 내지 실시 형태 A66 중 어느 한 실시 형태에 있어서, 정제된 AAV 입자는 동적 광 산란기(DLS)에 의해 측정시 응집 온도(Tagg)의 약 10℃ 미만 내의 용융 온도(Tm)를 갖는, 방법.

[0283] A68. 실시 형태 A67에 있어서, 정제된 AAV 입자는 동적 광 산란기(DLS)에 의해 측정시 응집 온도(Tagg)의 약 5℃ 미만 내의 Tm을 갖는, 방법.

[0284] A69. 실시 형태 A67에 있어서, 정제된 AAV 입자는 동적 광 산란기(DLS)에 의해 측정시 응집 온도(Tagg)의 2℃ 미만 내의 용융 온도(Tm)를 갖는, 방법.

[0285] A70. 실시 형태 A1 내지 실시 형태 A69 중 어느 한 실시 형태에 있어서, 정제된 AAV 입자는 약 50% 초과의 채워진-대-빈 캡시드 비를 포함하는, 방법.

[0286] A71. 실시 형태 A70에 있어서, 정제된 AAV 입자는 약 60% 초과의 채워진-대-빈 캡시드 비를 포함하는, 방법.

[0287] A72. 실시 형태 A70에 있어서, 정제된 AAV 입자는 약 70% 초과의 채워진-대-빈 캡시드 비를 포함하는, 방법.

[0288] A73. 실시 형태 A1 내지 실시 형태 A72 중 어느 한 실시 형태에 있어서, MNase와 접촉하지 않고 정제된 AAV 입자와 비교시, 정제된 AAV 입자는 260 nm에서 감소된 흡광도를 갖는 AAV 입자 후-생성물 분획을 포함하는, 방법.

[0289] A74. 실시 형태 A1 내지 실시 형태 A73 중 어느 한 실시 형태에 있어서, MNase와 접촉하지 않고 정제된 AAV 입자와 비교시, 정제된 AAV 입자는 280 nm에서 감소된 흡광도를 갖는 AAV 입자 후-생성물 분획을 포함하는, 방법.

[0290] 다른 세트의 실시 형태에서, 다음이 제공된다:

[0291] B1. AAV 입자의 바이러스 역가를 증가시키는 방법으로서,

[0292] (a) AAV 입자를 포함하는 상청액을 염색질-DNA 뉴클레아제를 포함하는 조성물과 접촉시키는 단계; 및

[0293] (b) AAV 입자를 정제하는 단계를 포함하는, 방법.

[0294] B2. 실시 형태 B1에 있어서, 바이러스 역가는 물리적 바이러스 역가, 기능적 바이러스 역가 또는 둘 모두를 포함하는, 방법.

[0295] B3. 실시 형태 B1에 있어서, 바이러스 역가는 물리적 바이러스 역가를 포함하는, 방법.

[0296] B4. 실시 형태 B1에 있어서, 바이러스 역가는 기능적 바이러스 역가를 포함하는, 방법.

[0297] B5. 실시 형태 B1에 있어서, 정제 단계는 원심분리, 크로마토그래피, 여과 또는 이들의 조합을 포함하는, 방법.

[0298] B6. 실시 형태 B5에 있어서, 원심분리는 밀도 구배 원심분리, 초원심분리, 또는 이들의 조합을 포함하는, 방법.

[0299] B7. 실시 형태 B5에 있어서, 크로마토그래피는 친화성 크로마토그래피, 이온 교환 크로마토그래피, 크기 배제 크로마토그래피, 소수성 상호작용 크로마토그래피, 또는 이들의 조합을 포함하는, 방법.

[0300] B8. 실시 형태 B7에 있어서, AAV 입자에 결합하기에 충분한 시간 동안 AAV 입자를 포함하는 상청액을 고체 지지체와 함께 인큐베이션하는 단계를 추가로 포함하는, 방법.

[0301] B9. 실시 형태 B8에 있어서, 고체 지지체를 세정하는 단계를 추가로 포함하는, 방법.

[0302] B10. 실시 형태 B9에 있어서, 세정 단계는 고 pH 완충액을 포함하는, 방법.

[0303] B11. 실시 형태 B10에 있어서, 고 pH 완충액은 pH 9.0 초과인, 방법.

[0304] B12. 실시 형태 B10에 있어서, 고 pH 완충액은 pH 9.0 내지 pH 11인, 방법.

[0305] B13. 실시 형태 B10에 있어서, 고 pH 완충액은 약 pH 9.5인, 방법.

[0306] B14. 실시 형태 B10에 있어서, 고 pH 완충액은 약 pH 10.2인, 방법.

[0307] B15. 실시 형태 B10에 있어서, 고 pH 완충액은 약 pH 10.3인, 방법.

[0308] B16. 실시 형태 B10에 있어서, 고 pH 완충액은 약 pH 10.4인, 방법.

[0309] B17. 실시 형태 B7 내지 실시 형태 B16 중 어느 한 실시 형태에 있어서, 방법은 하나 이상의 친화성 크로마토그래피 정제를 포함하는, 방법.

[0310] B18. 실시 형태 B17에 있어서, 친화성 크로마토그래피는 이온 교환 크로마토그래피를 포함하는, 방법.

[0311] B19. 실시 형태 B18에 있어서, 이온 교환 크로마토그래피는 음이온 교환 크로마토그래피를 포함하는, 방법.

[0312] B20. 실시 형태 B1 내지 실시 형태 B19 중 어느 한 실시 형태에 있어서, 상청액은 정화된 상청액인, 방법.

[0313] B21. 실시 형태 B1 내지 실시 형태 B20 중 어느 한 실시 형태에 있어서, 단계 (a)의 조성물은 Benzonase®를 추가로 포함하는, 방법.

[0314] B22. 실시 형태 B1 내지 실시 형태 B21 중 어느 한 실시 형태에 있어서, 인큐베이션은 약 10분 내지 약 1시간 동안 수행되는, 방법.

[0315] B23. 실시 형태 B22에 있어서, 인큐베이션은 약 20분 내지 약 40분 동안 수행되는, 방법.

[0316] B24. 실시 형태 B22 또는 실시 형태 B23에 있어서, 인큐베이션은 약 30분 동안 수행되는, 방법.

[0317] B25. 실시 형태 B1 내지 실시 형태 B24 중 어느 한 실시 형태에 있어서, 염색질-DNA 뉴클레아제는 미세구균 뉴클레아제(MNase)인, 방법.

[0318] B26. 실시 형태 B25에 있어서, 상청액 중의 MNase의 농도는 2.5 단위/mL 초과인, 방법.

[0319] B27. 실시 형태 B26에 있어서, 상청액 중 MNase의 농도는 10 단위/mL 초과인, 방법.

[0320] B28. 실시 형태 B26 또는 실시 형태 B27에 있어서, 상청액 중의 MNase의 농도는 약 30 단위/mL 내지 약 100 단위/mL인, 방법.

[0321] B29. 실시 형태 B26 내지 실시 형태 B28 중 어느 한 실시 형태에 있어서, 상청액 중의 MNase의 농도는 약 60 단위/mL인, 방법.

[0322] B30. 실시 형태 B26 내지 실시 형태 B29 중 어느 한 실시 형태에 있어서, Mnase는 결합된 AAV 입자를 함유하는 고체 지지체와 함께 인큐베이션되는, 방법.

[0323] B31. 실시 형태 B1 내지 실시 형태 B30 중 어느 한 실시 형태에 있어서, AAV 입자는 저 pH 완충액을 사용하여 용리되는, 방법.

[0324] B32. 실시 형태 B31에 있어서, 저 pH 완충액 전에 고 pH 완충액을 추가로 포함하는, 방법.

[0325] B33. 실시 형태 B31 또는 실시 형태 B32에 있어서, 저 pH 완충액은 약 pH 3.0 미만인, 방법.

[0326] B34. 실시 형태 B33에 있어서, 저 pH 완충액은 약 pH 1.5 내지 약 pH 2.5인, 방법.

[0327] B35. 실시 형태 B33에 있어서, 저 pH 완충액은 약 pH 1.5인, 방법.

[0328] B36. 실시 형태 B33에 있어서, 저 pH 완충액은 약 pH 2.5인, 방법.

[0329] B37. 실시 형태 B31 내지 실시 형태 B36 중 어느 한 실시 형태에 있어서, 저 pH 완충액은 시트레이트 완충액, 글리신 완충액 또는 인산 완충액인, 방법.

[0330] B38. 실시 형태 B37에 있어서, 저 pH 완충액은 시트레이트 완충액인, 방법.

[0331] B39. 실시 형태 B37에 있어서, 저 pH 완충액은 인산 완충액인, 방법.

[0332] B40. 실시 형태 B14 내지 실시 형태 B39 중 어느 한 실시 형태에 있어서, 친화성 크로마토그래피 정제는 두 번의 친화성 크로마토그래피 정제를 포함하는, 방법.

[0333] B41. 실시 형태 B40에 있어서, 방법은 친화성 크로마토그래피 정제에 이어서 음이온-교환 크로마토그래피를 포함하는, 방법.

[0334] B42. 실시 형태 B31 내지 실시 형태 B41 중 어느 한 실시 형태에 있어서, 저 pH 완충액의 pH를 중화시키는 단계를 추가로 포함하는, 방법.

[0335] B43. 실시 형태 B42에 있어서, 중화 단계는 비스-트리스-프로판(BTP) 또는 트리스 완충액을 첨가하는 단계를 포함하는, 방법.

[0336] B44. 실시 형태 B31 내지 실시 형태 B43 중 어느 한 실시 형태에 있어서, 약 5% 내지 약 40%의 에탄올을 추가로 포함하는, 방법.

[0337] B45. 실시 형태 B44에 있어서, 약 10% 내지 약 30%의 에탄올을 포함하는, 방법.

[0338] B46. 실시 형태 B44 또는 실시 형태 B45에 있어서, 약 15% 내지 약 25%의 에탄올을 포함하는, 방법.

[0339] B47. 실시 형태 B44 내지 실시 형태 B46 중 어느 한 실시 형태에 있어서, 약 20%의 에탄올을 포함하는, 방법.

[0340] B48. 실시 형태 B1 내지 실시 형태 B47 중 어느 한 실시 형태에 있어서, MNase와 접촉하지 않고 정제된 AAV 입자와 비교시, 정제된 AAV 입자에는 염색질-관련 DNA가 실질적으로 없는, 방법.

[0341] B49. 실시 형태 B1 내지 실시 형태 B48 중 어느 한 실시 형태에 있어서, MNase와 접촉하지 않고 정제된 AAV 입자와 비교시, 정제된 AAV 입자에는 숙주 세포 DNA가 실질적으로 없는, 방법.

[0342] B50. 실시 형태 B49에 있어서, 숙주 세포 DNA 농도는 2 ng/mL 미만인, 방법.

[0343] B51. 실시 형태 B49에 있어서, 숙주 세포 DNA 농도는 1.5 ng/mL 미만인, 방법.

[0344] B52. 실시 형태 B49에 있어서, 숙주 세포 DNA 농도는 1 ng/mL 미만인, 방법.

[0345] B53. 실시 형태 B1 내지 실시 형태 B52 중 어느 한 실시 형태에 있어서, MNase와 접촉하지 않고 정제된 AAV 입자와 비교시, 정제된 AAV 입자에는 숙주 세포 단백질이 실질적으로 없는, 방법.

[0346] B54. 실시 형태 B53에 있어서, MNase와 접촉하지 않고 정제된 AAV 입자와 비교시, 정제된 AAV 입자에는 DNA 결

합 단백질이 실질적으로 없는, 방법.

[0347] B55. 실시 형태 B54에 있어서, DNA 결합 단백질은 히스톤을 포함하는, 방법.

[0348] B56. 실시 형태 B1 내지 실시 형태 B55 중 어느 한 실시 형태에 있어서, 정제된 AAV 입자에는 육안으로 보이는 불순물 및 미세한 불순물이 실질적으로 없는, 방법.

[0349] B57. 실시 형태 B1 내지 실시 형태 B56 중 어느 한 실시 형태에 있어서, 바이러스 역가는 약 2배 내지 약 100배 증가되는, 방법.

[0350] B58. 실시 형태 B1 내지 실시 형태 B56 중 어느 한 실시 형태에 있어서, 바이러스 역가는 약 2배 이상 증가되는, 방법.

[0351] B59. 실시 형태 B1 내지 실시 형태 B56 중 어느 한 실시 형태에 있어서, 바이러스 역가는 약 3배 이상 증가되는, 방법.

[0352] B60. 실시 형태 B1 내지 실시 형태 B56 중 어느 한 실시 형태에 있어서, 바이러스 역가는 약 7배 이상 증가되는, 방법.

[0353] B61. 실시 형태 B1 내지 실시 형태 B56 중 어느 한 실시 형태에 있어서, 바이러스 역가는 약 80배 이상 증가되는, 방법.

[0354] B62. 실시 형태 B1 내지 실시 형태 B61 중 어느 한 실시 형태에 있어서, MNase와 접촉하지 않고 정제된 AAV 입자와 비교시, 후-생성물 AAV 입자 분획에 대한 생성물 AAV 입자 분획의 바이러스 역가 비는 증가되는, 방법.

[0355] B63. 실시 형태 B62에 있어서, 바이러스 역가 비는 약 2배 이상 증가되는, 방법.

[0356] B64. 실시 형태 B62에 있어서, 바이러스 역가 비는 약 5배 이상 증가되는, 방법.

[0357] B65. 실시 형태 B62에 있어서, 바이러스 역가 비는 약 10배 이상 증가되는, 방법.

[0358] B66. 실시 형태 B62에 있어서, 바이러스 역가 비는 약 25배 이상 증가되는, 방법.

[0359] B67. 실시 형태 B1 내지 실시 형태 B66 중 어느 한 실시 형태에 있어서, 정제된 AAV 입자는 동적 광 산란기(DLS)에 의해 측정시 응집 온도(Tagg)의 약 10℃ 미만 내의 용융 온도(Tm)를 갖는, 방법.

[0360] B68. 실시 형태 B67에 있어서, 정제된 AAV 입자는 동적 광 산란기(DLS)에 의해 측정시 응집 온도(Tagg)의 약 5℃ 미만 내의 Tm을 갖는, 방법.

[0361] B69. 실시 형태 B67에 있어서, 정제된 AAV 입자는 동적 광 산란기(DLS)에 의해 측정시 응집 온도(Tagg)의 2℃ 미만 내의 용융 온도(Tm)를 갖는, 방법.

[0362] B70. 실시 형태 B1 내지 실시 형태 B69 중 어느 한 실시 형태에 있어서, 정제된 AAV 입자는 약 50% 초과의 채워진-대-빈 캡시드 비를 포함하는, 방법.

[0363] B71. 실시 형태 B70에 있어서, 정제된 AAV 입자는 약 60% 초과의 채워진-대-빈 캡시드 비를 포함하는, 방법.

[0364] B72. 실시 형태 B70에 있어서, 정제된 AAV 입자는 약 70% 초과의 채워진-대-빈 캡시드 비를 포함하는, 방법.

[0365] B73. 실시 형태 B1 내지 실시 형태 B72 중 어느 한 실시 형태에 있어서, MNase와 접촉하지 않고 정제된 AAV 입자와 비교시, 정제된 AAV 입자는 260 nm에서 감소된 흡광도를 갖는 AAV 입자 후-생성물 분획을 포함하는, 방법.

[0366] B74. 실시 형태 B1 내지 실시 형태 B73 중 어느 한 실시 형태에 있어서, MNase와 접촉하지 않고 정제된 AAV 입자와 비교시, 정제된 AAV 입자는 280 nm에서 감소된 흡광도를 갖는 AAV 입자 후-생성물 분획을 포함하는, 방법.

[0367] 다른 세트의 실시 형태에서, 다음이 제공된다:

[0368] C1. 정제된 AAV 입자의 조성물로서, AAV 입자는 염색질-DNA 뉴클레아제를 포함하는 정제 방법에 의해 정제되는, 조성물.

[0369] C2. 실시 형태 C1에 있어서, 정제 방법은 원심분리, 크로마토그래피, 여과 또는 이들의 조합을 포함하는, 조성물.

[0370] C3. 실시 형태 C2에 있어서, 원심분리는 밀도 구배 원심분리, 초원심분리 또는 이들의 조합을 포함하는, 조성

물.

[0371] C4. 실시 형태 C2에 있어서, 크로마토그래피는 친화성 크로마토그래피, 이온 교환 크로마토그래피, 크기 배제 크로마토그래피, 소수성 상호작용 크로마토그래피, 또는 이들의 조합을 포함하는, 조성물.

[0372] C5. 실시 형태 C4에 있어서, 정제 방법은 AAV 입자에 결합하기에 충분한 시간 동안 AAV 입자를 포함하는 상청액을 고체 지지체와 함께 인큐베이션하는 단계를 추가로 포함하는, 조성물.

[0373] C6. 실시 형태 C5에 있어서, 정제 방법은 고체 지지체를 세정하는 단계를 추가로 포함하는, 조성물.

[0374] C7. 실시 형태 C6에 있어서, 세정 단계는 고 pH 완충액을 포함하는, 조성물.

[0375] C8. 실시 형태 C7에 있어서, 고 pH 완충액은 pH 9.0 초과인, 조성물.

[0376] C9. 실시 형태 C7에 있어서, 고 pH 완충액은 pH 9.0 내지 pH 11인, 조성물.

[0377] C10. 실시 형태 C7에 있어서, 고 pH 완충액은 약 pH 9.5인, 조성물.

[0378] C11. 실시 형태 C7에 있어서, 고 pH 완충액은 약 pH 10.2인, 조성물.

[0379] C12. 실시 형태 C7에 있어서, 고 pH 완충액은 약 pH 10.3인, 조성물.

[0380] C13. 실시 형태 C7에 있어서, 고 pH 완충액은 약 pH 10.4인, 조성물.

[0381] C14. 실시 형태 C4 내지 실시 형태 C13 중 어느 한 실시 형태에 있어서, 방법은 하나 이상의 친화성 크로마토그래피 정제를 포함하는, 조성물.

[0382] C15. 실시 형태 C14에 있어서, 친화성 크로마토그래피는 이온 교환 크로마토그래피를 포함하는, 조성물.

[0383] C16. 실시 형태 C15에 있어서, 이온 교환 크로마토그래피는 음이온 교환 크로마토그래피를 포함하는, 조성물.

[0384] C17. 실시 형태 C5 내지 실시 형태 C16 중 어느 한 실시 형태에 있어서, 상청액은 정화된 상청액인, 조성물.

[0385] C18. 실시 형태 C1 내지 실시 형태 C17 중 어느 한 실시 형태에 있어서, 정제 방법은 Benzonase®를 추가로 포함하는, 조성물.

[0386] C19. 실시 형태 C5 내지 실시 형태 C18 중 어느 한 실시 형태에 있어서, 정제 방법은 저 pH 완충액을 사용한 용리를 포함하는, 조성물.

[0387] C20. 실시 형태 C19에 있어서, 정제 방법은 저 pH 완충액 전에 고 pH 완충액을 추가로 포함하는, 조성물.

[0388] C21. 실시 형태 C19 또는 실시 형태 C20에 있어서, 저 pH 완충액은 약 pH 3.0 미만인, 조성물.

[0389] C22. 실시 형태 C21에 있어서, 저 pH 완충액은 약 pH 1.5 내지 약 pH 2.5인, 조성물.

[0390] C23. 실시 형태 C21에 있어서, 저 pH 완충액은 약 pH 1.5인, 조성물.

[0391] C24. 실시 형태 C21에 있어서, 저 pH 완충액은 약 pH 2.5인, 조성물

[0392] C25. 실시 형태 C19 내지 실시 형태 C24 중 어느 한 실시 형태에 있어서, 저 pH 완충액은 시트레이트 완충액, 글리신 완충액 또는 인산 완충액인, 조성물.

[0393] C26. 실시 형태 C25에 있어서, 저 pH 완충액은 시트레이트 완충액인, 조성물.

[0394] C27. 실시 형태 C25에 있어서, 저 pH 완충액은 인산 완충액인, 조성물.

[0395] C28. 실시 형태 C14 내지 실시 형태 C27 중 어느 한 실시 형태에 있어서, 정제 방법은 두 번의 친화성 크로마토그래피 정제를 포함하는 포함하는, 조성물.

[0396] C29. 실시 형태 C28에 있어서, 정제 방법은 친화성 크로마토그래피 에 이어서 음이온-교환 크로마토그래피를 포함하는, 조성물.

[0397] C30. 실시 형태 C19 내지 실시 형태 C29 중 어느 한 실시 형태에 있어서, 저 pH 완충액의 pH를 중화시키는 것을 추가로 포함하는, 조성물.

[0398] C31. 실시 형태 C30에 있어서, 중화는 비스-트리스-프로판(BTP) 또는 트리스 완충액을 첨가하는 것을 포함하는, 조성물.

[0399] C32. 실시 형태 C19 내지 실시 형태 C31 중 어느 한 실시 형태에 있어서, 약 5% 내지 약 40%의 에탄올을 추가로 포함하는, 조성물.

[0400] C33. 실시 형태 C32에 있어서, 정제 방법은 약 10% 내지 약 30%의 에탄올을 포함하는, 조성물.

[0401] C34. 실시 형태 C32 또는 실시 형태 C33에 있어서, 정제 방법은 약 15% 내지 약 25%의 에탄올을 포함하는, 조성물

[0402] C35. 실시 형태 C32 내지 실시 형태 C34 중 어느 한 실시 형태에 있어서, 정제 방법은 약 20%의 에탄올을 포함하는, 조성물.

[0403] C36. 실시 형태 C1 내지 실시 형태 C35 중 어느 한 실시 형태에 있어서, 염색질-DNA 뉴클레아제를 포함하지 않는 방법에 의해 정제된 조성물과 비교시, 조성물에는 불순물이 실질적으로 없는, 조성물.

[0404] C37. 실시 형태 C1 내지 실시 형태 C36 중 어느 한 실시 형태에 있어서, 염색질-DNA 뉴클레아제를 포함하지 않는 방법에 의해 정제된 조성물과 비교시, 조성물에는 염색질-관련 DNA가 실질적으로 없는, 조성물.

[0405] C38. 실시 형태 C1 내지 실시 형태 C37 중 어느 한 실시 형태에 있어서, 염색질-DNA 뉴클레아제를 포함하지 않는 방법에 의해 정제된 조성물과 비교시, 조성물에는 숙주 세포 DNA가 실질적으로 없는, 조성물.

[0406] C39. 실시 형태 C38에 있어서, 숙주 세포 DNA 농도는 2 ng/mL 미만인, 조성물.

[0407] C40. 실시 형태 C38에 있어서, 숙주 세포 DNA 농도는 1.5 ng/mL 미만인, 조성물.

[0408] C41. 실시 형태 C38에 있어서, 숙주 세포 DNA 농도는 1 ng/mL 미만인, 조성물.

[0409] C42. 실시 형태 C1 내지 실시 형태 C41 중 어느 한 실시 형태에 있어서, 염색질-DNA 뉴클레아제와 접촉하지 않은 조성물과 비교시, 조성물에는 숙주 세포 단백질이 실질적으로 없는, 조성물.

[0410] C43. 실시 형태 C1 내지 실시 형태 C42 중 어느 한 실시 형태에 있어서, 염색질-DNA 뉴클레아제와 접촉하지 않은 조성물과 비교시, 조성물에는 DNA 결합 단백질이 실질적으로 없는, 조성물.

[0411] C44. 실시 형태 C43에 있어서, DNA 결합 단백질은 히스톤을 포함하는, 조성물.

[0412] C45. 실시 형태 C1 내지 실시 형태 C44 중 어느 한 실시 형태에 있어서, 조성물에는 육안으로 보이는 불순물 및 미세한 불순물이 실질적으로 없는, 조성물.

[0413] C46. 실시 형태 C1 내지 실시 형태 C45 중 어느 한 실시 형태에 있어서, 염색질-DNA 뉴클레아제와 접촉하지 않은 조성물과 비교시, 조성물은 음이온 교환 크로마토그램에 의해 측정된 바와 같은 감소된 후-생성물 AAV 입자 분획 피크를 포함하는, 조성물.

[0414] C47. 실시 형태 C1 내지 실시 형태 C45 중 어느 한 실시 형태에 있어서, 염색질-DNA 뉴클레아제와 접촉하지 않은 조성물과 비교시, 조성물은 증가된 바이러스 역가를 포함하는, 조성물.

[0415] C48. 실시 형태 C47에 있어서, 바이러스 역가는 물리적 바이러스 역가, 기능적 바이러스 역가 또는 둘 모두를 포함하는, 조성물.

[0416] C49. 실시 형태 C47에 있어서, 바이러스 역가는 물리적 역가를 포함하는, 조성물.

[0417] C50. 실시 형태 C47에 있어서, 바이러스 역가는 기능적 역가를 포함하는, 조성물.

[0418] C51. 실시 형태 C47 내지 실시 형태 C50 중 어느 한 실시 형태에 있어서, 바이러스 역가는 약 2배 내지 약 100배 증가되는, 조성물.

[0419] C52. 실시 형태 C47 내지 실시 형태 C50 중 어느 한 실시 형태에 있어서, 바이러스 역가는 약 2배 이상 증가되는, 조성물.

[0420] C53. 실시 형태 C47 내지 실시 형태 C50 중 어느 한 실시 형태에 있어서, 바이러스 역가는 약 3배 이상 증가되는, 조성물.

[0421] C54. 실시 형태 C47 내지 실시 형태 C50 중 어느 한 실시 형태에 있어서, 바이러스 역가는 약 7배 이상 증가되는, 조성물.

[0422] C55. 실시 형태 C47 내지 실시 형태 C50 중 어느 한 실시 형태에 있어서, 바이러스 역가는 약 80배 이상 증가

되는, 조성물.

[0423] C56. 실시 형태 C1 내지 실시 형태 C55 중 어느 한 실시 형태에 있어서, 염색질-DNA 뉴클레아제와 접촉하지 않은 조성물과 비교시, 조성물은 후-생성물 AAV 입자 분획에 대한 생성물 AAV 입자 분획의 증가된 바이러스 역가 비를 포함하는, 조성물.

[0424] C57. 실시 형태 C56에 있어서, 바이러스 역가 비는 약 2배 이상 증가되는, 조성물.

[0425] C58. 실시 형태 C56에 있어서, 바이러스 역가 비는 약 5배 이상 증가되는, 조성물.

[0426] C59. 실시 형태 C56에 있어서, 바이러스 역가 비는 약 10배 이상 증가되는, 조성물.

[0427] C60. 실시 형태 C56에 있어서, 바이러스 역가 비는 약 25배 이상 증가되는, 조성물.

[0428] C61. 실시 형태 C1 내지 실시 형태 C60 중 어느 한 실시 형태에 있어서, 정제된 AAV 입자는 동적 광 산란기(DLS)에 의해 측정시 응집 온도(Tagg)의 약 10℃ 미만 내의 용융 온도(Tm)를 갖는, 조성물.

[0429] C62. 실시 형태 C61에 있어서, 정제된 AAV 입자는 동적 광 산란기(DLS)에 의해 측정시 응집 온도(Tagg)의 약 5℃ 미만 내의 Tm을 갖는, 조성물.

[0430] C63. 실시 형태 C61에 있어서, 정제된 AAV 입자는 동적 광 산란기(DLS)에 의해 측정시 응집 온도(Tagg)의 2℃ 미만 내의 용융 온도(Tm)를 갖는, 조성물.

[0431] C64. 실시 형태 C1 내지 실시 형태 C63 중 어느 한 실시 형태에 있어서, 조성물은 약 50% 초과의 채워진-대-빈 캡시드 비를 포함하는, 조성물.

[0432] C65. 실시 형태 C64에 있어서, 정제된 AAV 입자는 약 60% 초과의 채워진-대-빈 캡시드 비를 포함하는, 조성물.

[0433] C66. 실시 형태 C64에 있어서, 조성물은 약 70% 초과의 채워진-대-빈 캡시드 비를 포함하는, 조성물.

[0434] C67. 실시 형태 C1 내지 실시 형태 C66 중 어느 한 실시 형태에 있어서, 염색질-DNA 뉴클레아제와 접촉하지 않은 조성물과 비교시, 정제된 AAV 입자는 260 nm에서 감소된 흡광도를 갖는 AAV 입자 후-생성물 분획을 포함하는, 조성물.

[0435] C68. 실시 형태 C1 내지 실시 형태 C67 중 어느 한 실시 형태에 있어서, 염색질-DNA 뉴클레아제와 접촉하지 않은 조성물과 비교시, 정제된 AAV 입자는 280 nm에서 감소된 흡광도를 갖는 AAV 입자 후-생성물 분획을 포함하는, 조성물.

[0436] C69. 실시 형태 C1 내지 실시 형태 C68 중 어느 한 실시 형태에 있어서, 염색질-DNA 뉴클레아제는 MNase인, 조성물.

[0437] 다른 세트의 실시 형태에서, 다음이 제공된다:

[0438] D1. 염색질-관련 DNA가 실질적으로 없는 AAV 입자를 생성하는데 사용하기 위한 조성물로서,

[0439] (a) AAV 입자를 포함하는 상청액; 및

[0440] (b) 염색질-DNA 뉴클레아제를 포함하는, 조성물.

[0441] D2. 실시 형태 D1에 있어서, Benzonase®를 추가로 포함하는, 조성물.

[0442] D3. 실시 형태 D1 또는 실시 형태 D2에 있어서, 염색질-DNA 뉴클레아제는 미세구균 뉴클레아제(MNase)인, 조성물.

[0443] D4. 실시 형태 D3에 있어서, 상청액 중의 MNase의 농도는 2.5 단위/mL 초과인, 조성물.

[0444] D5. 실시 형태 D4에 있어서, 상청액 중의 MNase의 농도는 10 단위/mL 초과인, 조성물.

[0445] D6. 실시 형태 D4 또는 실시 형태 D5에 있어서, 상청액 중의 MNase의 농도는 약 30 단위/mL 내지 약 100 단위/mL인, 조성물.

[0446] D7. 실시 형태 D4 내지 실시 형태 D6 중 어느 한 실시 형태에 있어서, 상청액 중의 MNase의 농도는 약 60 단위/mL인, 조성물.

[0447] D8. 실시 형태 D3에 있어서, MNase는 AAV 입자와 관련된 염색질을 분해시키기에 충분한 양으로 존재하는, 조성

물.

[0448] D9. 조성물로서,

[0449] (a) AAV 입자를 포함하는 상청액; 및

[0450] (b) 염색질-DNA 뉴클레아제를 포함하는, 조성물.

[0451] D10. 실시 형태 D9에 있어서, Benzonase®를 추가로 포함하는, 조성물.

[0452] D11. 실시 형태 D9 또는 실시 형태D10에 있어서, 염색질-DNA 뉴클레아제는 미세구균 뉴클레아제(MNase)인, 조성물.

[0453] D12. 실시 형태 D11에 있어서, MNase의 농도는 2.5 단위/mL 초과인, 조성물.

[0454] D13. 실시 형태 D11에 있어서, MNase의 농도는 10 단위/mL 초과인, 조성물.

[0455] D14. 실시 형태 D11에 있어서, MNase의 농도는 약 30 단위/mL 내지 약 100 단위/mL인, 방법.

[0456] D15. 실시 형태 D11 내지 실시 형태 D13 중 어느 한 실시 형태에 있어서, 상청액 중의 MNase의 농도는 약 60 단위/mL인, 조성물.

[0457] D16. 실시 형태 D11에 있어서, MNase는 AAV 입자 불순물을 감소시키기에 충분한 양으로 존재하는, 조성물.

[0458] D17. 실시 형태 D16에 있어서, AAV 입자 불순물은 숙주 세포 DNA, 숙주 세포 단백질, 염색질-관련 DNA 및 DNA 결합 단백질 중 하나 이상을 포함하는, 조성물.

[0459] D18. 실시 형태 D16 또는 실시 형태 D17에 있어서, AAV 입자 불순물은 육안으로 보이는 불순물 및 미세한 불순물을 포함하는, 조성물.

[0460] D19. 실시 형태 D17에 있어서, DNA 결합 단백질은 히스톤을 포함하는, 조성물.

[0461] D20. 실시 형태 D11에 있어서, MNase는 AAV 입자의 바이러스 역가를 증가시키기에 충분한 양으로 존재하는, 조성물.

[0462] D21. 실시 형태 D20에 있어서, 바이러스 역가는 물리적 바이러스 역가, 기능적 바이러스 역가 또는 둘 모두를 포함하는, 조성물.

[0463] D22. 실시 형태 D20에 있어서, 바이러스 역가는 물리적 역가를 포함하는, 조성물.

[0464] D23. 실시 형태 D20에 있어서, 바이러스 역가는 기능적 역가를 포함하는, 조성물.

[0465] D24. 실시 형태 D20 내지 실시 형태 D23 중 어느 한 실시 형태에 있어서, 바이러스 역가는 약 2배 내지 약 100배 증가되는, 조성물.

[0466] D25. 실시 형태 D20 내지 실시 형태 D23 중 어느 한 실시 형태에 있어서, 바이러스 역가는 약 2배 이상 증가되는, 조성물.

[0467] D26. 실시 형태 D20 내지 실시 형태 D23 중 어느 한 실시 형태에 있어서, 바이러스 역가는 약 3배 이상 증가되는, 조성물.

[0468] D27. 실시 형태 D20 내지 실시 형태 D23 중 어느 한 실시 형태에 있어서, 바이러스 역가는 약 7배 이상 증가되는, 조성물.

[0469] D28. 실시 형태 D20 내지 실시 형태 D23 중 어느 한 실시 형태에 있어서, 바이러스 역가는 약 80배 이상 증가되는, 조성물.

[0470] D29. 실시 형태 D20 내지 실시 형태 D28 중 어느 한 실시 형태에 있어서, MNase는 후-생성물 AAV 입자 분획에 대한 생성물 AAV 입자 분획의 바이러스 역가 비를 증가시키기에 충분한 양으로 존재하는, 조성물.

[0471] D30. 실시 형태 D29에 있어서, 바이러스 역가 비는 약 2배 이상 증가되는, 조성물.

[0472] D31. 실시 형태 D29에 있어서, 바이러스 역가 비는 약 5배 이상 증가되는, 조성물.

[0473] D32. 실시 형태 D29에 있어서, 바이러스 역가 비는 약 10배 이상 증가되는, 조성물.

[0474] D33. 실시 형태 D29에 있어서, 바이러스 역가 비는 약 25배 이상 증가되는, 조성물.

[0475] D34. 실시 형태 D11에 있어서, MNase는 채워진-대-빈 캡시드 비를 증가시키기에 충분한 양으로 존재하는, 조성물.

[0476] D35. 실시 형태 D34에 있어서, 채워진-대-빈 캡시드 비는 약 50% 초과인, 조성물.

[0477] D36. 실시 형태 D34에 있어서, 채워진-대-빈 캡시드 비는 약 60% 초과인, 조성물.

[0478] D37. 실시 형태 D34에 있어서, 채워진-대-빈 캡시드 비는 약 70% 초과인, 조성물.

[0479] D38. 실시 형태 D11에 있어서, MNase는 260 nm에서 흡광도에 의해 측정된 바와 같이 AAV 입자 후-생성물 분획을 감소시키기에 충분한 양으로 존재하는, 조성물.

[0480] D39. 실시 형태 D11에 있어서, MNase는 280 nm에서 흡광도에 의해 측정된 바와 같이 AAV 입자 후-생성물 분획을 감소시키기에 충분한 양으로 존재하는, 조성물.

[0481] D40. 실시 형태 D11에 있어서, MNase는 동적 광 산란기(DLS)에 의해 측정시 응집 온도(Tagg)의 약 10℃ 미만 내의 용융 온도(Tm)를 포함하는 정제된 AAV 입자를 생성하기에 충분한 양으로 존재하는, 조성물.

[0482] D41. 실시 형태 D11에 있어서, MNase는 동적 광 산란기(DLS)에 의해 측정시 응집 온도(Tagg)의 약 5℃ 미만 내의 용융 온도(Tm)를 포함하는 정제된 AAV 입자를 생성하기에 충분한 양으로 존재하는, 조성물.

[0483] D42. 실시 형태 D11에 있어서, MNase는 동적 광 산란기(DLS)에 의해 측정시 응집 온도(Tagg)의 약 2℃ 미만 내의 용융 온도(Tm)를 포함하는 정제된 AAV 입자를 생성하기에 충분한 양으로 존재하는, 조성물.

[0484] 다른 세트의 실시 형태에서, 다음이 제공된다:

[0485] E1. 키트로서,

[0486] (a) Benzonase®; 및

[0487] (b) 염색질-DNA 뉴클레아제를 포함하는, 키트.

[0488] E2. 실시 형태 E1에 있어서, 염색질-DNA 뉴클레아제는 미세구균 뉴클레아제(MNase)인, 키트.

[0489] E3. 실시 형태 E2에 있어서, MNase의 농도는 2.5 단위/mL 초과인, 키트.

[0490] E4. 실시 형태 E2에 있어서, MNase의 농도는 10 단위/mL 초과인, 키트.

[0491] E5. 실시 형태 E2에 있어서, MNase의 농도는 약 30 단위/mL 내지 약 100 단위/mL인, 키트.

[0492] E6. 실시 형태 E2에 있어서, MNase의 농도는 약 60 units/mL인, 키트.

[0493] E7. 실시 형태 E2에 있어서, MNase는 AAV 입자와 관련된 염색질을 분해시키기에 충분한 양으로 존재하는, 키트.

[0494] E8. 실시 형태 E2 또는 실시 형태 E7에 있어서, MNase는 AAV 입자 불순물을 감소시키기에 충분한 양으로 존재하는, 키트.

[0495] E9. 실시 형태 E8에 있어서, AAV 입자 불순물은 숙주 세포 DNA, 숙주 세포 단백질, 염색질-관련 DNA, 및 DNA 결합 단백질 중 하나 이상을 포함하는, 키트.

[0496] E10. 실시 형태 E8 또는 실시 형태 E9에 있어서, AAV 입자 불순물은 육안으로 보이는 불순물 및 미세한 불순물을 포함하는, 키트.

[0497] E11. 실시 형태 E9에 있어서, DNA 결합 단백질은 히스톤을 포함하는, 키트.

[0498] E12. 실시 형태 E2에 있어서, MNase는 AAV 입자의 바이러스 역가를 증가시키기에 충분한 양으로 존재하는, 키트.

[0499] E13. 실시 형태 E12에 있어서, 바이러스 역가는 물리적 바이러스 역가, 기능적 바이러스 역가 또는 둘 모두를 포함하는, 키트.

[0500] E14. 실시 형태 E12에 있어서, 바이러스 역가는 물리적 역가를 포함하는, 키트.

[0501] E15. 실시 형태 E12에 있어서, 바이러스 역가는 기능적 역가를 포함하는, 키트.

[0502] E16. 실시 형태 E12 내지 실시 형태 E15 중 어느 한 실시 형태에 있어서, 바이러스 역가는 약 2배 내지 약 100배 증가되는, 키트.

[0503] E17. 실시 형태 E12 내지 실시 형태 E15 중 어느 한 실시 형태에 있어서, 바이러스 역가는 약 2배 이상 증가되는, 키트.

[0504] E18. 실시 형태 E12 내지 실시 형태 E15 중 어느 한 실시 형태에 있어서, 바이러스 역가는 약 3배 이상 증가되는, 키트.

[0505] E19. 실시 형태 E12 내지 실시 형태 E15 중 어느 한 실시 형태에 있어서, 바이러스 역가는 약 7배 이상 증가되는, 키트.

[0506] E20. 실시 형태 E12 내지 실시 형태 E15 중 어느 한 실시 형태에 있어서, 바이러스 역가는 약 80배 이상 증가되는, 키트.

[0507] E21. 실시 형태 E12 내지 실시 형태 E20 중 어느 한 실시 형태에 있어서, MNase는 후-생성물 AAV 입자 분획에 대한 생성물 AAV 입자 분획의 바이러스 역가 비를 증가시키기에 충분한 양으로 존재하는, 키트.

[0508] E22. 실시 형태 E21에 있어서, 바이러스 역가 비는 약 2배 이상 증가되는, 키트.

[0509] E23. 실시 형태 E21에 있어서, 바이러스 역가 비는 약 5배 이상 증가되는, 키트.

[0510] E24. 실시 형태 E21에 있어서, 바이러스 역가 비는 약 10배 이상 증가되는, 키트.

[0511] E25. 실시 형태 E21에 있어서, 바이러스 역가 비는 약 25배 이상 증가되는, 키트.

[0512] E26. 실시 형태 E2에 있어서, MNase는 채워진-대-빈 캡시드 비를 증가시키기에 충분한 양으로 존재하는, 키트.

[0513] E27. 실시 형태 E26에 있어서, 채워진-대-빈 캡시드 비는 약 50% 초과인, 키트.

[0514] E28. 실시 형태 E26에 있어서, 채워진-대-빈 캡시드 비는 약 60% 초과인, 키트.

[0515] E29. 실시 형태 E26에 있어서, 채워진-대-빈 캡시드 비는 약 70% 초과인, 키트.

[0516] E30. 실시 형태 E2에 있어서, MNase는 260 nm에서 흡광도에 의해 측정된 바와 같이 AAV 입자 후-생성물 분획을 감소시키기에 충분한 양으로 존재하는, 키트.

[0517] E31. 실시 형태 E2에 있어서, MNase는 280 nm에서 흡광도에 의해 측정된 바와 같이 AAV 입자 후-생성물 분획을 감소시키기에 충분한 양으로 존재하는, 키트.

[0518] E32. 실시 형태 E2에 있어서, MNase는 동적 광 산란기(DLS)에 의해 측정시 응집 온도(Tagg)의 약 10℃ 미만 내의 용융 온도(Tm)를 포함하는 정제된 AAV 입자를 생성하기에 충분한 양으로 존재하는, 키트.

[0519] E33. 실시 형태 E2에 있어서, MNase는 동적 광 산란기(DLS)에 의해 측정시 응집 온도(Tagg)의 약 5℃ 미만 내의 용융 온도(Tm)를 포함하는 정제된 AAV 입자를 생성하기에 충분한 양으로 존재하는, 키트.

[0520] E34. 실시 형태 E2에 있어서, MNase는 동적 광 산란기(DLS)에 의해 측정시 응집 온도(Tagg)의 약 2℃ 미만 내의 용융 온도(Tm)를 포함하는 정제된 AAV 입자를 생성하기에 충분한 양으로 존재하는, 키트.

[0521] 다른 세트의 실시 형태에서, 다음이 제공된다:

[0522] F1. 정제된 AAV 입자에서 불순물을 감소시키기 위한 수단을 포함하는 조성물.

[0523] F2. 실시 형태 F1에 있어서, 불순물은 숙주 세포 DNA, 숙주 세포 단백질, 염색질-관련 DNA 및 DNA 결합 단백질로 이루어진 군으로부터 선택되는, 조성물.

[0524] F3. 실시 형태 F2에 있어서, DNA 결합 단백질은 히스톤을 포함하는, 조성물.

[0525] F4. 실시 형태 F1에 있어서, 불순물은 육안으로 보이는 불순물, 미세한 불순물 또는 둘 모두인, 조성물.

[0526] F5. AAV 입자의 바이러스 역가를 증가시키기 위한 수단을 포함하는 조성물.

[0527] F6. 실시 형태 F5에 있어서, 바이러스 역가는 물리적 바이러스 역가, 기능적 바이러스 역가 또는 둘 모두를 포

함하는, 조성물.

[0528] F7. 실시 형태 F5에 있어서, 바이러스 역가는 물리적 바이러스 역가를 포함하는, 조성물.

[0529] F8. 실시 형태 F5에 있어서, 바이러스 역가는 기능적 바이러스 역가를 포함하는, 조성물.

[0530] F9. 실시 형태 F5 내지 실시 형태 F8 중 어느 한 실시 형태에 있어서, 바이러스 역가는 약 2배 내지 약 100배 증가되는, 조성물.

[0531] F10. 실시 형태 F5 내지 실시 형태 F8 중 어느 한 실시 형태에 있어서, 바이러스 역가는 약 2배 이상 증가되는, 조성물.

[0532] F11. 실시 형태 F5 내지 실시 형태 F8 중 어느 한 실시 형태에 있어서, 바이러스 역가는 약 3배 이상 증가되는, 조성물.

[0533] F12. 실시 형태 F5 내지 실시 형태 F8 중 어느 한 실시 형태에 있어서, 바이러스 역가는 약 7배 이상 증가되는, 조성물.

[0534] F13. 실시 형태 F5 내지 실시 형태 F8 중 어느 한 실시 형태에 있어서, 바이러스 역가는 약 80배 이상 증가되는, 조성물.

[0535] F14. 후-생성물 AAV 입자 분획에 대한 생성물 AAV 입자 분획의 바이러스 역가 비를 증가시키기 위한 수단을 포함하는 조성물.

[0536] F15. 실시 형태 F14에 있어서, 바이러스 역가 비는 약 2배 이상 증가되는, 조성물.

[0537] F16. 실시 형태 F14에 있어서, 바이러스 역가 비는 약 5배 이상 증가되는, 조성물.

[0538] F17. 실시 형태 F14에 있어서, 바이러스 역가 비는 약 10배 이상 증가되는, 조성물.

[0539] F18. 실시 형태 F14에 있어서, 바이러스 역가 비는 약 25배 이상 증가되는, 조성물.

[0540] F19. AAV 입자의 채워진-대-빈 캡시드 비를 증가시키기 위한 수단을 포함하는 조성물.

[0541] F20. 실시 형태 F19에 있어서, 채워진-대-빈 캡시드 비는 약 50% 초과인, 조성물.

[0542] F21. 실시 형태 F19에 있어서, 채워진-대-빈 캡시드 비는 약 60% 초과인, 조성물.

[0543] F22. 실시 형태 F19에 있어서, 채워진-대-빈 캡시드 비는 약 70% 초과인, 조성물.

[0544] F23. 260 nm에서 흡광도에 의해 측정된 바와 같이 AAV 입자 후-생성물 분획을 감소시키는 수단을 포함하는 조성물.

[0545] F24. 280 nm에서 흡광도에 의해 측정된 바와 같이 AAV 입자 후-생성물 분획을 감소시키는 수단을 포함하는 조성물.

[0546] F25. AAV 입자에 바이러스 외에 복합체화된 DNA 결합 단백질을 제거하는 제1 수단 및 잔여 숙주 생성 세포 핵산 및/또는 단백질을 제거하기 위한 제2 수단을 포함하는 조성물.

[0547] F26. (i) AAV 입자에 바이러스 외에 복합체화된 DNA 결합 단백질을 제거하는 단계를 포함하는 AAV 입자를 정제하는 방법.

[0548] F27. 실시 형태 F26에 있어서, (ii) 잔여 숙주 생성 세포 핵산 및/또는 단백질을 제거하기 위한 제2 단계를 추가로 포함하는, 방법.

[0549] F28. 실시 형태 F26 또는 실시 형태 F27에 있어서, (iii) 바이러스 역가를 증가시키기 위한 제3 단계를 추가로 포함하는, 방법.

[0550] 다른 세트의 실시 형태에서, 다음이 제공된다:

[0551] G1. 불순물이 실질적으로 없는 정제된 AAV 입자를 제조 및 수득하기 위한 수단을 포함하는 시스템.

[0552] G2. 실시 형태 G1에 있어서, 불순물은 숙주 세포 DNA, 숙주 세포 단백질, 염색질-관련 DNA 및 DNA 결합 단백질로 이루어진 군으로부터 선택되는, 시스템.

[0553] G3. 실시 형태 G2에 있어서, DNA 결합 단백질은 히스톤을 포함하는, 시스템.

[0554] G4. 실시예 G1에 있어서, 불순물은 육안으로 보이는 불순물, 미세한 불순물 또는 둘 모두인, 시스템.

[0555] G5. 증가된 바이러스 역가를 갖는 AAV 입자를 제조 및 수득하기 위한 수단을 포함하는 시스템.

[0556] G6. 실시 형태 G5에 있어서, 바이러스 역가는 물리적 바이러스 역가, 기능적 바이러스 역가 또는 둘 모두를 포함하는, 시스템.

[0557] G7. 실시 형태 G5에 있어서, 바이러스 역가는 물리적 바이러스 역가를 포함하는, 시스템.

[0558] G8. 실시 형태 G5에 있어서, 바이러스 역가는 기능적 바이러스 역가를 포함하는, 시스템.

[0559] G9. 실시 형태 G5 내지 실시 형태 G8 중 어느 한 실시 형태에 있어서, 바이러스 역가는 약 2배 내지 약 100배 증가되는, 시스템.

[0560] G10. 실시 형태 G5 내지 실시 형태 G8 중 어느 한 실시 형태에 있어서, 바이러스 역가는 약 2배 이상 증가되는, 시스템.

[0561] G11. 실시 형태 G5 내지 실시 형태 G8 중 어느 한 실시 형태에 있어서, 바이러스 역가는 약 3배 이상 증가되는, 시스템.

[0562] G12. 실시 형태 G5 내지 실시 형태 G8 중 어느 한 실시 형태에 있어서, 바이러스 역가는 약 7배 이상 증가되는, 시스템.

[0563] G13. 실시 형태 G5 내지 실시 형태 G8 중 어느 한 실시 형태에 있어서, 바이러스 역가는 약 80배 이상 증가되는, 시스템.

[0564] G14. 후-생성물 AAV 입자 분획에 대한 생성물 AAV 입자 분획의 바이러스 역가 비를 증가시키기 위한 수단을 포함하는 시스템.

[0565] G15. 실시 형태 G14에 있어서, 바이러스 역가 비는 약 2배 이상 증가되는, 시스템.

[0566] G16. 실시 형태 G14에 있어서, 바이러스 역가 비는 약 5배 이상 증가되는, 시스템.

[0567] G17. 실시 형태 G14에 있어서, 바이러스 역가 비는 약 10배 이상 증가되는, 시스템.

[0568] G18. 실시 형태 G14에 있어서, 바이러스 역가 비는 약 25배 이상 증가되는, 시스템.

[0569] G19. AAV 입자의 채워진-대-빈 캡시드 비를 증가시키기 위한 수단을 포함하는 시스템.

[0570] G20. 실시 형태 G19에 있어서, 채워진-대-빈 캡시드 비는 약 50% 초과인, 시스템.

[0571] G21. 실시 형태 G19에 있어서, 채워진-대-빈 캡시드 비는 약 60% 초과인, 시스템.

[0572] G22. 실시 형태 G19에 있어서, 채워진-대-빈 캡시드 비는 약 70% 초과인, 시스템.

[0573] G23. 260 nm에서 흡광도에 의해 측정된 바와 같이 AAV 입자 후-생성물 분획을 감소시키는 수단을 포함하는 시스템.

[0574] G24. 280 nm에서 흡광도에 의해 측정된 바와 같이 AAV 입자 후-생성물 분획을 감소시키는 수단을 포함하는 시스템.

[0575] G25. AAV 입자에 바이러스 외에 복합체화된 DNA 결합 단백질을 제거하기 위한 제1 수단 및 숙주 생성 세포로부터 잔여 핵산을 제거하기 위한 제2 수단을 포함하는 시스템.

[0576] **실시예**

[0577] 본 출원의 하기 실시예는 본 출원의 성질을 추가로 예시하기 위한 것이다. 당업자는 광범위한 본 발명의 개념으로부터 벗어나지 않고서 전술된 실시 형태에 변경이 이루어질 수 있음을 인식할 것이다. 따라서, 본 발명은 개시된 특정 실시 형태로 제한되는 것이 아니라, 본 명세서에 의해 한정되는 바와 같은 본 발명의 사상 및 범주 내의 변형들을 포함하는 것으로 의도됨이 이해된다.

[0578] **실시예 I**

[0579] **AAV 입자와 관련된 바이러스 외 DNA 결합 단백질은 정제 후 불순물로서 확인되었다.**

[0580] 본 실시예는 AAV 입자의 다운-스트림 정제 후, AAV 입자와 관련된 잔여 DNA 결합 단백질/염색질 착물을 염색질-

DNA 뉴클레아제인, 미세구균 뉴클레아제(MNase)의 첨가에 의해 검출하고 방출할 수 있음을 입증한다.

[0581] 간략하게, AAV8 입자를 함유하는 현탁 배양의 정화된(0.2 μm 여과된) 상청액은 CIMmultus QA-모놀리스 컬럼(BIA Separations)을 사용하는 음이온 교환 폴리싱 단계와 연결된 상업적으로 입수 가능한 POROS CaptureSelect AAVX 친화성 수지(Thermo)를 사용하여 친화성 교환 크로마토그래피를 적용하였다. AAV 입자 생성 배양물로부터의 정화된 상청액을 5.5 mL/분의 일정한 유량으로 POROS 컬럼 위에 로딩하였다. 상청액을 함유하는 바이러스를 정상 pH(7.5)에서 컬럼에 결합시켰다. 시간 경과에 따라 증대되는 증가된 사전-칼럼 압력과 점도를 감소시키기 위해, 5 U/mL의 Benzonase®를 정제 동안 첨가하였다. 이어서, 바이러스를 저 pH(2.5) 시트레이트 완충액을 사용하여 용리시키고 BTP pH 10.2로 즉시 중화시켰다.

[0582] 바이러스 정제의 제2 상은 바이러스에 대한 예측된 pKa보다 더 고 pH인 pH 10의 높은 이온 강도 완충액을 사용하는 음이온-교환 폴리싱를 포함하였다. 이 pH에서, AAV 입자는 모노리스에 단단히 결합하여, 바이러스 응집을 감소시키고 잔여 숙주 세포 단백질 또는 DNA를 추가로 제거할 것이다. 증가하는 염 구배를 사용하여 그리고 "채워진 캡시드" 대 "빈 캡시드"를 함유하는 DNA 사이의 전하 차이에 기초하여 바이러스를 용리하고, 원하는 바이러스 집단을 생성물 피크로서 분리하였다. 그러나, 음이온 교환 폴리싱 동안 다수의 종의 후-생성물 피크가 통상적으로 관찰되었다.

[0583] 이들 후-생성물 피크의 용리 프로파일이 불균질하고 생성물 피크에 비해 더 높은 이온 강도를 필요로 하였다는 것을 고려하면, 이들 바이러스의 이들 분획이 여전히 고전하 단백질과 연관될 수 있다고 의심되었다. 이러한 관찰에 기초하여, Benzonase® 분해에 내성인 AAV 입자와 DNA 함유 복합체 사이의 상호작용을 조사하였다. Benzonase®는 뉴클레오솜 DNA의 분해에 비교적 효과적이지 않으므로, 이러한 바이러스 입자를 용리시키는데 필요한 더 높은 이온 강도가 AAV 입자와 관련된 잔여 DNA 결합 단백질/염색질 착물의 직접적인 결과였는지의 여부에 대한 조사를 수행하였다.

[0584] 염색질 구조가 AAV 입자와 바이러스 외에 관련이 있는지에 대한 가설을 시험하기 위해, 단독으로 또는 Benzonase®와 조합하여, MNase를 사용하여 증가된 핵산 효소 분해에 캡시드를 적용하였다. Benzonase®를 MNase와 함께 또는 없이 AAVX-함유 결합된 바이러스에 직접 첨가하였다. 이 단계를 30분 동안 유지하여 DNA 및 염색질-관련 DNA를 분해하였다. MNase의 증가량을 친화성 크로마토그래피 단계 동안 "컬럼 상" Benzonase® 단계에 조합하여 또는 단독으로 첨가하였다. 결과적으로 크로마토그램의 형상은 MNase 없이 처리된 샘플(도 1a) 또는 MNase로 처리된 샘플(도 1b)이 동일하였고 MNase가 바이러스의 수율에 영향을 미치지 않았음을 나타냈다.

[0585] 컬럼-후 효소적 세정물을 수집하고 나트륨 도데실 설페이트-폴리아크릴아미드 겔 전기영동법(SDS-PAGE)을 적용한 후, DNA 결합 단백질의 존재에 대해 은 염색을 적용시켰다. 은 오염 분석은 약 10 kDa에서 단일 단백질 밴드의 존재를 보여주었고, 최적의(60 U/mL) MNase-처리된 샘플(도 2a, 제3 레인)에서만 식별가능하였다. Benzonase® 없이 단독으로 또는 이를 갖는 MNase의 차선의 농도(2.5 U/mL)는 추가의 바이러스 외 관련 DNA 결합 단백질(도 2a, 제2 레인)을 방출하는 데 비효율적이었다. 이는 60 U/mL의 MNase가 염색질-결합 DNA 결합 단백질을 방출할 수 있었음을 나타내었다.

[0586] 또한, 후-생성물 피크 분획을 전기영동법에 의해 분석하여 샘플에 존재할 수 있는 임의의 염색질을 시각화하였다. 결과는 친화성 포획 크로마토그래피 동안 MNase로 처리한 후-생성물 피크 분획으로부터 염색질을 제거하기에 충분한 것으로 나타났다(도 2b). 구체적으로, 하기 샘플을 분석하였다: ExpiFectamine™ 293 형질감염 Kit를 사용한 Expi293F™ 세포 현탁액에서 생성된 rAAV8 입자로부터 희석되지 않은 샘플(레인 2) 및 1:10으로 희석된 샘플(레인 3); 형질감염 키트를 사용하지 않은 현탁액 Expi293F™ 세포에서 생성된 rAAV8 입자로부터 희석되지 않은 샘플(레인 4) 및 1:10으로 희석된 샘플(레인 5); 및 형질감염 키트를 사용하지 않은 현탁 Expi293F™ 세포에서 생성되고 25℃에서 30분 동안 60U/mL MNase로 분해한 rAAV8 입자로부터의 희석되지 않은 샘플(레인 6) 및 1:10으로 희석된 샘플(레인 7). 결과는 MNase 처리되지 않은 샘플(예를 들어, 레인 2 및 4)의 경우 후-생성물 피크에서 가시적인 고분자량 DNA가 존재하였고, 이는 염색질이 겔을 침투하기에는 너무 크기 때문에 염색질을 나타냄을 입증하였다. 대조적으로, 고분자량 DNA가 MNase 처리된 샘플에 존재하지 않았다(예를 들어, 레인 6).

[0587] 이들 결과는 AAV 입자가 AAV 입자와 관련있는 잔여 DNA 결합 단백질/염색질 착물을 함유하고, 복합체가 MNase를 정제 공정에 포함시킴으로써 파괴될 수 있음을 나타내었다.

[0588] **실시예 II**

[0589] **MNase 첨가는 음이온-교환 용리 프로파일을 개선시킨다**

[0590] 본 실시예는 염색질-DNA 뉴클레아제인, 미세구균 뉴클레아제(MNase)의 첨가가 다운-스트림 정제 동안 회수된 AAV 입자의 품질을 유의미 개선시킨다는 것을 입증한다.

[0591] 바이러스 외, 염색질-관련 AAV 입자는 바람직하지 않은 생성물이고, 이는 정제된 생성물의 가시적인 침전을 야기할 수 있으며, 이는 임의의 제형 연구에 문제가 될 수 있다. 더욱이, 증가된 염색질/DNA 결합 단백질은 바람직하지 않은 오염물이며, 이들 둘 모두는 숙주 세포 단백질/DNA 오염을 증가시킬 수 있다. 염색질-관련 AAV 입자의 문제를 극복하기 위해, 본 연구는 염색질-DNA 뉴클레아제, MNase가 정제 동안 첨가될 수 있고, AAV 입자의 개선된 정제를 초래한다는 것을 입증하였다.

[0592] 부착 세포를 사용한 AAV 입자의 생성은 최소 세포 사멸을 초래하는 것으로 관찰되었고, 음이온 교환 크로마토그램에 의해 미미한 후-생성물 피크의 생성을 초래하였다(도 3). 대조적으로, 현탁 세포 배양에서의 생존력은 부착 세포 배양과 비교하여 감소(50 내지 70%에 근접함)하였고, 우세한 후-생성물 피크를 초래하였다(도 4a). 그러나, 친화성 크로마토그래피 단계 동안 MNase의 첨가는 음이온-교환 크로마토그래피 동안 후-생성물 피크 높이를 감소시켰으며, 이는 생성물의 순도의 개선을 나타냈다(도 4b). 구체적으로, 60 U/mL의 MNase 처리는 큰 260 nm(DNA/RNA) 흡광도 피크 및 후-생성물 피크의 280 nm(단백질) 흡광도 피크 둘 모두를 감소시켰다(도 4b). MNase 처리와 함께 또는 이의 처리 없이 현탁 배양으로부터 생성된 rAAV8 입자의 친화도 교환 크로마토그램의 중첩에 의한 DNA/RNA(260 nm) 및 단백질(280 nm)의 후-생성물 피크 높이의 직접적인 비교는, 염색질 분해를 위한 MNase 처리가 AAV 입자의 정제를 향상시키고 잔여 숙주 세포 단백질 오염물을 검출 불가능한 수준으로 유의미하게 감소시켰음(도 5a 및 도 5b)에 대한 추가의 증거를 제공하였다. 특히, 핵산 스펙트럼(260 nm)으로 관찰된 후-생성물 피크 높이의 감소는 상당히 유의미하며, 피크 높이 및 면적에서 90% 초과로 감소한 것으로 추정되었다(도 5a). 또한, 단백질 스펙트럼(280 nm)에서 후-생성물 피크 높이의 감소가 또한 관찰되었다(도 5b).

[0593] 더욱이, 음이온 교환 크로마토그래피 후 후-생성물 피크의 은 염색 분석은 MNase로 분해된 샘플에는 존재하지 않는 DNA 결합 단백질의 존재를 나타내는 약 10 kDa의 밴드를 포함하여, MNase로 분해되지 않은 샘플에 단백질 불순물이 존재함을 나타내었다(도 6a). 겔 전기영동에 의해 분리되고 은 염색을 사용하여 염색된 샘플의 비교는 히스톤의 예상된 크기에 근접한 약 10 kDA의 분자량에 상응하는 희미한 밴드를 나타내었다. 구체적으로, ExpiFectamine™ 293 형질감염 키트 인핸서(Thermo Fisher Scientific)를 사용한 Expi293F™ 세포(Thermo Fisher Scientific) 현탁액에서 생성된 rAAV8 입자(레인 1), 인핸서 없이 Expi293F™ 세포 현탁액에서 생성된 rAAV8 입자(레인 2), 및 인핸서 없이 Expi293F™ 세포 현탁액에서 생성되고 60U/mL Mnase로 25℃에서 30분 동안 분해된 rAAV8 입자(레인 3)를 분석하였다. 화살표는 10kDA 밴드가 MNase 분해되지 않은 샘플에는 존재하였지만, MNase 분해된 샘플에는 존재하지 않았다(도 6a). 다량의 염색질-관련 DNA가 통상적으로 정제 동안 AAV 입자와 바이러스 외에 관련된 것이라는 추가의 증거가 후-생성물 피크 분획에서 AAV 입자를 용리하기 위해 증가된 염이 필요하였다는 관찰과 히스톤과 같은 DNA 결합 단백질이 고도로 양으로 하전(음이온 교환제처럼 거동함)되었다는 사실에 의해 제시되었다.

[0594] 용리 완충액이 음이온-교환 용리 프로파일을 야기하는지 여부를 결정하기 위해, 3가지의 상이한 용리 완충액인 포스페이트 완충액, 시트레이트 완충액 및 고 pH 완충액을 사용하였다. 260 nm 및 280 nm 둘 모두에 대해, 생성물 피크("피크 A")에 대한 면적을 후-생성물 피크(피크 A 이후에 검출된 임의의 추가 피크)와 비교한 측정은 MNase 처리가 모든 완충액에 대한 생성물 피크에서 DNA/RNA의 양을 개선하였음을 보여주었다(표 1).

[0595] [표 1]

DNA/RNA(260 nm) 및 단백질(280 nm)에 대한 음이온 교환 용리 프로파일

		260 nm		280 nm	
		MNase 없음	MNase	MNase 없음	MNase
포스페이트	피크 A	43.55	49.33	42.13	54.23
	피크 B	47.75	37.91	50.07	38.78
	피크 C	8.71	7.94	7.80	6.99
	피크 D		4.83		
시트레이트	피크 A	57.87	75.93	51.11	59.41
	피크 B	30.05	13.08	37.11	27.48
	피크 C	8.50	8.39	6.16	13.11
	피크 D	3.58	2.61	5.62	
고 pH	피크 A	42.28	54.98	86.73	60.62
	피크 B	42.46	32.88	7.86	5.4133.51
	피크 C	4.48	7.31		5.87
	피크 D	7.06	4.83		
	피크 E	1.83			
	피크 F	1.79			

[0596]

[0597] 종합하면, 이들 결과는 다량의 염색질-관련 DNA가 통상적으로 정제 동안 AAV 입자와 바이러스 외에 일반적으로 관련이 있고 MNase 처리가 AAV 입자의 정제를 향상시킬 수 있음을 나타내었다.

[0598] **실시예 III**

[0599] **MNase 증가는 음이온 교환 크로마토그래피에서 후-생성물 피크를 감소시켰다**

[0600] 본 실시예는 친화성 정제 동안 MNase 첨가를 증가시키는 것이 음이온 교환 크로마토그래피 폴리싱 단계에서 염색질-관련 AAV 입자를 감소시켰음을 증명한다.

[0601] MNase의 최적 범위를 결정하기 위해, 샘플은 Mnase 처리되지 않았거나(도 7a), 상이한 양, 예를 들어, 2.5 U/mL(도 7b) 또는 60 U/mL(도 7c)의 MNase로 처리되었다. 친화성 크로마토그래피 결과는 MNase가 없거나(도 7a) 또는 적은 양의 MNase(도 7b)에 비해서 더 많은 양의 MNase가 후-생성물 피크(도 7c)를 감소시켰음을 나타내었다.

[0602] 이들 결과는 친화성 정제 동안 MNase 첨가를 증가시키는 것이 음이온 교환 크로마토그래피 폴리싱 단계에서 염색질-관련 AAV 입자를 감소시켰으며, 60 U/mL의 MNase가 염색질-관련 AAV 입자를 감소시키기 위한 효과적인 농도였음을 입증하였다.

[0603] **실시예 IV**

[0604] **MNase 분해는 AAV 입자의 응집을 방지하고 침전을 감소시켰다**

[0605] 본 실시예는 MNase 분해가 AAV 입자의 응집 및 침전을 방지하였음을 입증한다.

[0606] 후-생성물 피크 분획의 육안 검사는, ExpiFectamine™ 293 형질감염 키트 인핸서(Thermo Fisher Scientific)를 사용한 Expi293F™ 세포(Thermo Fisher Scientific) 현탁액에서 생성된 MNase 처리되지 않은 rAAV8 입자, 또는 인핸서 없이 Expi293F™ 세포 현탁액에서 생성된 MNase 처리되지 않은 rAAV8 입자가 육안 검사에서 가시적 침전물을 가졌음을 보여주었다(도 8). 대조적으로, 인핸서가 없는 Expi293F™ 세포 현탁액에서 생성되고 25℃에서 30분 동안 60 U/mL MNase로 분해된 rAAV8 입자는 가시적인 침전물이 없었다(도 8).

[0607] 본 데이터는 MNase 분해가 AAV 입자의 응집 및 침전을 방지하였음을 입증하였다.

[0608] **실시예 VI**

[0609] **MNase 처리는 AAV 입자의 역가를 증가시킨다**

[0610] 본 실시예는 MNase 처리가 상이한 정제 프로토콜에 첨가되었을 때 AAV 입자의 역가를 증가시켰다는 것을 입증한다.

[0611] MNase 처리가 상이한 용리 방법과 양립할 수 있는지 여부를 결정하기 위해, 3가지의 상이한 유형의 용리를 고/저 pH 용리, 시트레이트 용리 및 저 pH 용리를 사용하여 수행하였다. MNase 처리 유무와 DNA 수율 사이의 정성적 비교를 겔 전기영동 후 SYBR 금 염색을 사용하여 수행하였다(도 9a 내지 도 9f). 결과는 MNase로 처리된 샘플은, 고/저 pH 용리, 시트레이트 용리 및 저 pH 용리의 3가지의 상이한 유형의 용리를 사용하여 MNase 처리되지 않은 샘플과 비교해 생성물 피크에서 DNA의 양이 증가했음을 나타내었다(도 9a 내지 도 9f).

[0612] 또한, mL 당 게놈 카피(GC/mL) 역가(도 10), 세포 당 게놈 카피(GC/세포)(도 10b), 및 총 게놈 카피 (도 10c)의 정량화는 MNase 처리가 ExpiFectamine™ 293 형질감염 키트 인핸서(Thermo Fisher Scientific)가 있거나 없는 MNase 처리되지 않은 샘플에 비해 원하는 생성물의 바이러스 역가를 증가시키고 원치 않는 후-생성물의 양을 감소시키는 것을 나타내었다.

[0613] 도 11a 및 도 11b에 도시된 바와 같이, 세포 당 게놈 카피(GC/세포)(도 11a, 표 2) 및 총 게놈 카피(도 11b, 표 3)에서의 증가는 3가지의 상이한 용리 완충액(즉, 시트레이트, 저 pH 및 저/고 pH) 각각에 대해 MNase 처리된 샘플에서 일관되게 관찰되었다.

[0614] [표 2]

세포 당 게놈 카피(GC/세포)

[0615]

	MNase 없음	MNase
시트레이트	7,250	21,800
저 pH	8,140	41,500
저/고 pH	2,300	190,000

[0616] [표 3]

총 게놈 카피

[0617]

	MNase 없음	MNase
시트레이트	$1.09e^{12}$	$3.27e^{12}$
저 pH	$8.48e^{11}$	$6.22e^{12}$
저/고 pH	$3.45e^{11}$	$2.84e^{13}$

[0618] 종합하면, 이들 데이터는 MNase 처리가 AAV 입자의 역가를 증가시켰고, AAV 입자의 역가의 증가는 용리 완충액과 독립적이었음을 입증한다.

[0619] **실시예 V**

[0620] **MNase 처리는 생성물 분획의 기능적 역가를 증가시킨다**

[0621] 본 실시예는 MNase 처리가 생성물 분획의 더 큰 감염성에 의한 증거로서 생성물 분획의 기능적 역가를 증가시켰음을 입증한다.

[0622] MNase를 사용하여 생성된 바이러스의 기능적 역가를 평가하기 위해, 표적 세포를 MNase로 처리된 또는 처리되지 않은, 생성물 분획 또는 후-생성물 분획으로부터 수집된 적색 형광 단백질을 발현하는 바이러스 입자로 형질도입하였다. 표적 세포가 감염성에 대한 대용물로서 적색 형광 단백질 발현에서 임의의 차이를 나타내었는지 여부를 결정함으로써 기능적 역가를 측정하였다.

[0623] 간략하게, 샘플을 MNase로 처리하거나 처리하지 않았고, 고/저 pH(도 12), 시트레이트(도 13) 또는 저 pH(도 14)로 용리시켰고, 생성물 및 후-생성물 바이러스 분획을 수집하였다. 이어서, 분획을 세포와 접촉시키고, 감염 다중도(MOI)를 측정하여 기능적 역가 수준을 결정하였다.

[0624] 생성물 분획의 감염성 프로파일은 MNase 처리가 각각의 상이한 용리 완충액에 대해 더 큰 MOI를 초래하였음을 나타냈다(표 4). 대조적으로, 후-생성물 분획의 감염성 프로파일은 MNase 처리가 각각의 상이한 용리 완충액에 대해 감소된 MOI를 초래하였음을 나타내었다.

[0625] [표 4]

생성물 분획의 감염성 프로파일

	생성물 분획		후-생성물 분획	
	MNase 없음	MNase	MNase 없음	MNase 없음
시트레이트	$3.8e^6$	$9.9e^6$	$7.1e^5$	$6.9e^4$
저 pH	$2.8e^6$	$2.0e^7$	$5.4e^5$	$2.1e^5$
저/고 pH	$1.4e^6$	$2.0e^7$	$2.0e^5$	$8.9e^4$

[0626]

[0627] 이들 결과는 MNase 처리가 각각의 상이한 용리 완충액에 대한 생성물 분획의 기능적 역가를 증가시켰지만, 후-생성물 분획은 증가시키지 않았다는 것을 나타내었다.

[0628] **실시예 VI**

[0629] **고 pH 세정은 AAV의 순도를 개선시켰다**

[0630] 본 실시예는 AAV의 친화성 교환 크로마토그래피 동안 고 pH 세정이 AAV의 순도를 개선할 수 있었음을 입증한다.

[0631] AAV를 정제하기 위한 최적의 조건을 결정하기 위해, AKTA 시스템을 사용하고, 샘플을 정제 동안 다양한 세정 및/또는 효소 처리 조건에 적용하였다. 상이한 정제 조건이 표 5에 요약되어 있다.

[0632] [표 5]

정제 조건

	친화도				음이온 교환제
조건	세정 pH	Benzonase®	MNase	용리	용리
1	n/a	아니오	아니오	시트레이트, pH 2.5	20 mM BTP, pH 10.2; 10 mM – 200 mM NaCl 선형 구배
2	n/a	예	아니오	시트레이트, pH 2.5	
3	n/a	예	예	H_3PO_4, pH 1.5	
4	pH 9.5	예	예	시트레이트, pH 2.5	
5	pH 10.2	예	예	H_3PO_4, pH 1.5	
6	pH 10.3	예	예	H_3PO_4, pH 1.5	
7	pH 10.3	예	아니오	H_3PO_4, pH 1.5	
8	pH 10.9	예	예	H_3PO_4, pH 1.5	
9	pH 10.4	예	예	H_3PO_4, pH 1.5	
10	pH 10.4	예	예	H_3PO_4, pH 1.5	20 mM 트리스 pH 9.0; 0-300 mM (C_2H_5)NCl 선형 구배

[0633] BTP: 비스-트리스-프로판; NaCl: 염화나트륨; H_3PO_4: 인산

[0634] 간략하게는, 대량 수확 및 Benzonase® 처리 후, 조 샘플을 친화성 크로마토그래피에 적용하였다. 표 5에 나타낸 바와 같이, 특정 조건(즉, 조건 4-10)하에, 친화성 컬럼을 pH 9.5 내지 pH 10.9 범위의 고 pH 완충액으로 세정하였다. 또한, 표 5에 나타낸 바와 같이, 샘플을 Benzonase® 또는 MNase(조건 1)로 처리하지 않거나, Benzonase® 단독(조건 2 및 7)으로 컬럼 처리하거나, Benzonase® 및 MNase(조건 3-5, 및 8-10)로 컬럼상 처리하였다. 친화성 컬럼으로부터의 용리를 시트레이트, pH 2.5(조건 1, 2, 및 4), 또는 인산(H_3PO_4), pH 1.5(조건 3 및 5-10)를 사용하여 수행하였다.

[0635] 친화성 크로마토그래피 정제 후, 이어서 샘플을 CIM QA(4차 아민) 모노리스 컬럼을 사용하여 음이온-교환 크로마토그래피로 폴리싱하였다. 그 후, 샘플을 10 mM 내지 200 mM NaCl 선형 구배를 사용하여 용리시키고 20 mM BTP, pH 10.2(조건 1-9)에서 중화시키거나, 0 내지 300 mM (C_2H_5)NCl 선형 구배를 사용하여 용리시키고 20 mM 트리스 pH 9.0(조건 10)에서 중화시켰다.

[0636] 정제된 샘플을 수집하고 나트륨 도데실 설페이트-폴리아크릴아미드 겔 전기영동(SDS-PAGE)에 이어서 은 염색을 수행하였다. 어떠한 효소적 처리(조건 1)도 포함하지 않거나 오직 Benzonase® 처리(조건 2) 만을 포함하는 조건에서, 용리된 AAV는 다량의 불순물을 갖는 것으로 밝혀졌다(각각 도 15a 및 도 15b). 예를 들어, VP1, VP2 및 VP3에 대응하는 3개의 진한 밴드에 더하여, 은 염색에 의해 검출된 다른 단백질 불순물이 많았다. 대조적으

로, AAV 샘플이 친화성 크로마토그래피 정제 단계 동안 pH 9.5 세정을 사용하여 정제되었을 때(조건 4), 용리 분획에서 불순물이 상당히 적었다(도 16a). 친화성 크로마토그래피 정제 단계 동안 pH 10.4 세정을 사용하여 추가의 개선이 관찰되었다(도 16b). 그러나, pH 10.9에서 친화성 컬럼을 세정하는 것은 대량의 바이러스 손실을 초래하였다. 상이한 정제 조건의 비교는, Benzonase® 및 MNase 처리와 조합될 때, pH 10.9 미만의 고 pH 세정 조건은 고도로 순수한 AAV 샘플을 생성하였음(도 17a)을 나타내었다. 또한, 정제된 AAV 샘플의 DNA 아가로스 겔 전기영동은 AAV 내에 함유된 ITR-전이유전자의 존재를 나타내었다.

[0637] 이들 결과는 친화성 크로마토그래피 정제 동안 고 pH 세정(약 pH 9.5-pH 10.4)이 정제된 AAV의 순도를 향상시킬 수 있음을 나타내었다(도 18).

[0638] **실시예 VII**

[0639] **용리 조건의 변경은 바이러스의 회수를 개선시킨다**

[0640] 본 실시예는 저 pH 완충액 및 에탄올을 사용한 용리가 정제된 AAV의 순도를 개선할 수 있었음을 입증한다(도 19).

[0641] 음이온-교환 크로마토그래피 컬럼 상에 잔여 바이러스가 남아있는지 여부를 결정하기 위해, 2개의 상이한 용리 조건을 포함하는 3개의 별개의 조건 하에서 샘플을 처리하였다. 간략하게, 샘플을 MNase가 있거나 없는 Benzonase®로 처리하고, 친화성 크로마토그래피 정제를 거치고, 이전에 기재된 바와 같이 음이온-교환 크로마토그래피로 폴리싱하였다. 이어서, 샘플을 20% 에탄올과 함께 또는 없이 저 pH 완충액(인산, pH 1.5)을 사용하여 용리시켰다.

[0642] 결과는 Benzonase®로만 처리되고(즉, MNase 없음) 고 pH 완충액으로 세정되고 인산(pH 1.5)으로 용리된 샘플에서, 표시된 크로마토그래피 피크에 의해 강조된 바와 같이(화살표 참조), 스트립핑 후 잔여 바이러스가 컬럼 상에 남아 있는 것(도 19a)으로 나타났다. 친화성 크로마토그래피 정제 단계 동안 MNase의 첨가는 컬럼 스트립 동안 잔여 바이러스를 감소시킬 수 있었다(화살표 참조)(도 19b). 컬럼으로부터의 바이러스의 용리는, 크로마토그래피 피크의 거의 부재에 의해 표시된 바와 같이, 용리 동안 20% 에탄올의 첨가에 의해 더욱 개선되었다(화살표 참조)(도 19c).

[0643] 종합하면, 이들 결과는 음이온-교환 크로마토그래피 컬럼으로부터의 바이러스의 회수가 용리 동안 에탄올의 첨가에 의해 추가로 개선될 수 있음을 나타낸다.

[0644] **실시예 VIII**

[0645] **MNase 처리는 동적 광 산란(DLS) 및 Tm/Tagg에 의해 측정된 바와 같이 불순물의 제거를 개선시켰다**

[0646] 본 실시예는 동적 광 산란(DLS)에 의한 측정 및 단백질 응집 Tagg가 바이러스의 용융과 일치하는 온도의 결정으로 MNase 처리가 불순물의 제거를 개선하였음을 입증한다.

[0647] AAV 혈청형 식별의 결정 요인으로서 열 안정성은 당업계에 공지되어 있으며, 이는 또한 AAV 입자 샘플에서 불순물을 검출하는 데 사용될 수 있다. 예를 들어, 제거된 불순물로서, 단백질 응집(Tagg)의 개시는 바이러스의 용융 온도(Tm)과 일치한다.

[0648] 상기 기재된 이전의 결과와 일치하게, 동적 광 산란(DLS) 및 Tm/Tagg 검정은 MNase가 AAV 입자로부터 불순물의 제거를 개선시켰음을 확인할 수 있었다. 구체적으로, Benzonase® 또는 MNase로 처리되지 않은 샘플에서, Tagg 및 Tm은 10℃ 초과만큼 차이가 난다는 것을 발견하였다(도 20a). Benzonase®의 첨가는 불순물의 제거를 개선하였지만, Benzonase® 및 MNase 조합은 Tagg 및 Tm 정렬의 개선을 나타냈다(도 20b 및 도 20c).

[0649] 불순물을 감소시키는 개선은 또한 MNase로 처리되고 고 pH 조건 하에서 용리된 샘플에서 관찰되었다. 구체적으로, Benzonase® 및 MNase로 처리되고 인산(pH 10.3)으로 용리된 샘플(도 20e)의 경우 Tagg 및 Tm 정렬은 Benzonase®로만 처리되고 인산(pH 10.3)으로 용리된 샘플(도 20d)에 비해 향상되었다.

[0650] 종합하면, 이들 결과는 MNase 처리가 AAV 입자 샘플에서 불순물의 양을 감소시킬 수 있고, 고 pH 조건과 조합된 MNase 처리가 불순물의 양을 훨씬 더 감소시킬 수 있음을 확인시켜 주었다.

[0651] **실시예 IX**

[0652] **정제 동안 MNase 처리는 잔여 숙주 세포 DNA를 감소시킨다**

[0653] 본 실시예는 숙주 세포 DNA가 MNase 처리에 의해 유의미하게 감소될 수 있음을 입증한다.

[0654] 음이온-교환(AEX) 정제 후 AAV 입자 샘플에 임의의 잔여 숙주-세포 DNA가 존재하는지 여부를 결정하기 위해, AlphaLISA 검정을 수행하여 숙주 세포 DNA를 분석물로서 검출하였다. AlphaLISA 비드 기반 기술은 PerkinElmer의 증폭된 발광 근접 균질 검정에 의존하고, 숙주 세포 DNA를 검출하기 위해 발광 산소-채널링 화학을 사용한다(문헌[Beaudet *et al.*, *Nat Methods* **5**, an8-An9 (2008)] 참조).

[0655] AEX 정제 후 잔여 숙주-세포 DNA의 분석을 6개의 상이한 조건 하에서 제조된 샘플에서 AlphaLISA에 의해 측정하였다: (1) Benzonase® 또는 Mnase를 사용하지 않은 정제("효소 없음"); (2) Benzonase® 및 시트레이트 용리를 사용한 정제("B, 시트레이트(친화성)"); (3) Benzonase® 및 시트레이트 용리를 사용한 정제("B, 시트레이트"); (4) Benzonase®, MNase 및 인산 용리를 사용한 정제("B, M, Phos"); (5) Benzonase®, 고 pH(pH 10.3) 세정 및 인산 용리를 사용한 정제("B, pH 10.3, Phos"); 및 (6) Benzonase®, MNase 및 인산 용리를 사용한 정제("B, M, pH 10.3, phos") 이후에, 숙주 세포 DNA를 검출하기 위해 AlphaLISA를 사용한 미가공 계수(도 21a) 및 농도 결과(도 21b)를 예시한다. 존재하는 숙주 세포 DNA의 농도 수준을 외삽하기 위해 표준 곡선을 생성하였다.

[0656] 결과는 MNase로 처리된 샘플에서 숙주 세포 DNA의 수준이 유의미하게 감소되었음을 나타냈다(도 21a 및 도 20b). 특히, Benzonase®, MNase 및 인산 용리를 사용한 정제("B, M, pH 10.3, Phos")는 거의 검출 불가능한 수준의 숙주-세포 DNA를 초래하였다(도 21a 및 도 20b).

[0657] 이들 결과는 MNase 처리가 AAV 입자 샘플로부터 숙주-세포 DNA를 유의미하게 감소시켰음을 나타내었다.

[0658] **실시예 X**

[0659] **MNase 처리는 정제 공정을 향상시킨다**

[0660] 본 실시예는 본 명세서에 제공된 정제 방법이 최신 기술에 비해 개선을 나타냄을 예시한다.

[0661] 음이온-교환 및 Benzonase®를 사용한 AAV 입자의 현재 정제 방법이 기재되어 있다(문헌[Wang C, *et al*. Mol Ther Methods Clin Dev. 2019;15:257-263] 참조). 그러나, MNase는 이러한 방법에서 사용되지 않는다.

[0662] MNase 처리를 포함하는 본 명세서에 기재된 정제 방법이 현재의 정제 방법보다 더 양호하게 수행할 수 있는지 여부를 결정하기 위해, MNase 처리 프로토콜(프로토콜#1)을 Wang 등의 방법(프로토콜#2)을 사용하여 얻은 분획과 비교하였다.

[0663] 간략하게는, Wang 등에 따른 정제는 친화성 수지에 의해 수행되었다. 컬럼으로 로딩하기 전에, 대량 AAV 풀을 37℃에서 1시간 동안 50 U/mL Benzonase®로 처리하고 15분 동안 10,000 × g에서 원심분리에 의해 정화한 후, 1.2 mm 필터 및 0.45 mm 필터를 통한 순차적 여과로 정제하였다. AAV를 저 pH 완충액을 갖는 컬럼으로부터 용리시켰다. 동시에, MNase 처리를 포함하는, 본 명세서에 기재된 방법에 따라 상이한 샘플 세트를 정제하였다.

[0664] 프로토콜 #1과 프로토콜 #2 사이의 비교는, MNase 처리가 은 염색에 의해 측정시 AAV 입자 샘플에 존재하는 불순물의 양을 크게 감소시킬 수 있었음을 보여주었다(도 22).

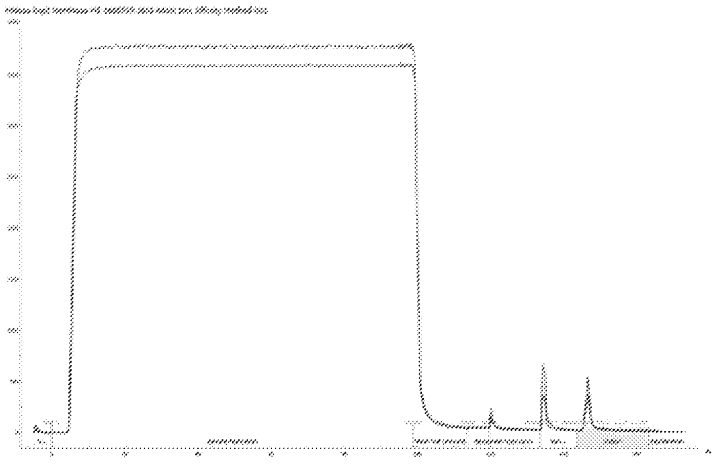
[0665] 따라서, 본 실시예는 MNase를 사용하는 본 명세서에 제공된 정제 방법이 AAV 정제에 사용된 방법에 비해 개선을 나타냄을 입증한다.

[0666] * * * * *

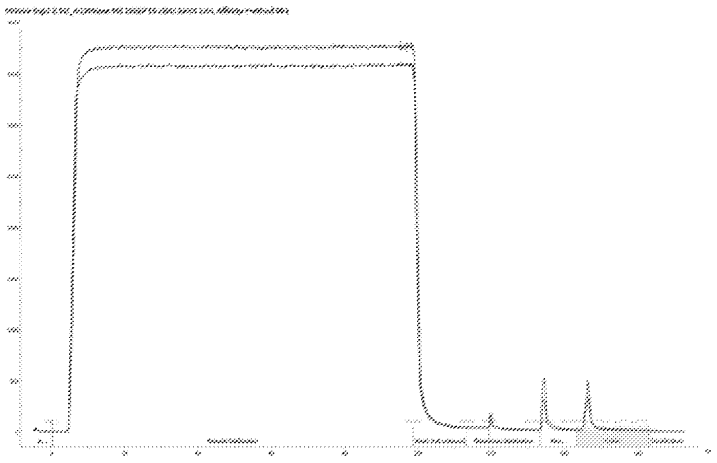
[0667] 당업자는 광범위한 본 발명의 개념으로부터 벗어나지 않고서 전술된 실시 형태에 변경이 이루어질 수 있음을 인식할 것이다. 따라서, 본 발명은 개시된 특정 실시 형태로 제한되는 것이 아니라, 본 명세서에 의해 한정되는 바와 같은 본 발명의 사상 및 범주 내의 변형들을 포함하도록 의도됨이 이해된다.

도면

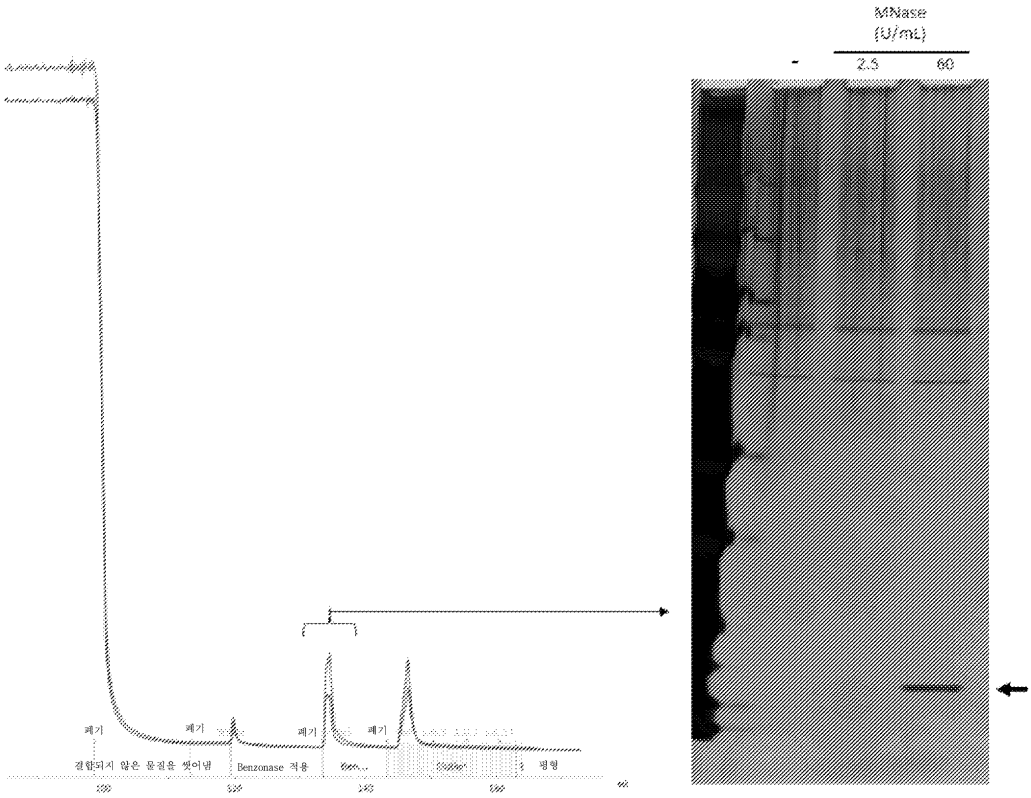
도면1a



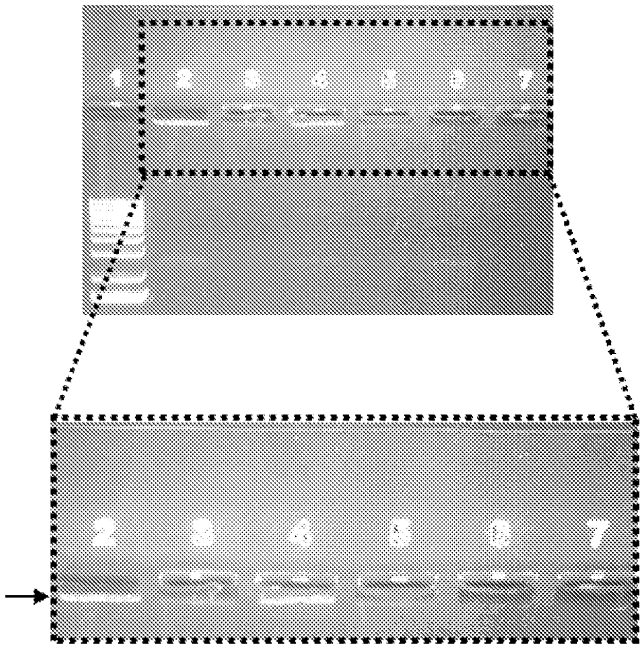
도면1b



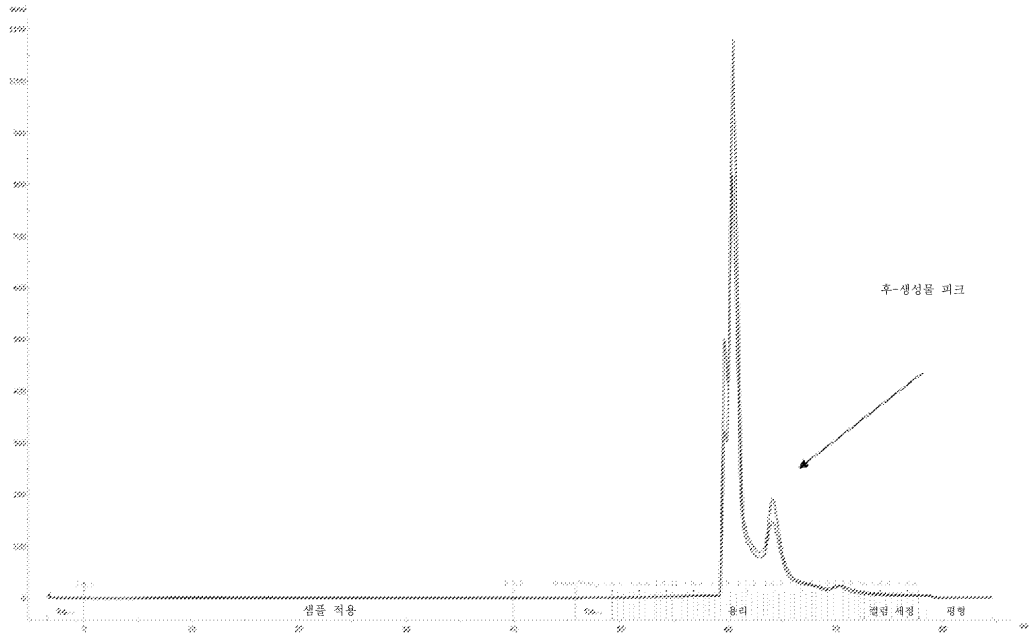
도면2a


MNase
(U/mL)
-
2.5
60
폐기
폐기
폐기
폐기
결합되지 않은 물질을 씻어냄
Benzonase 적용
용출
평형

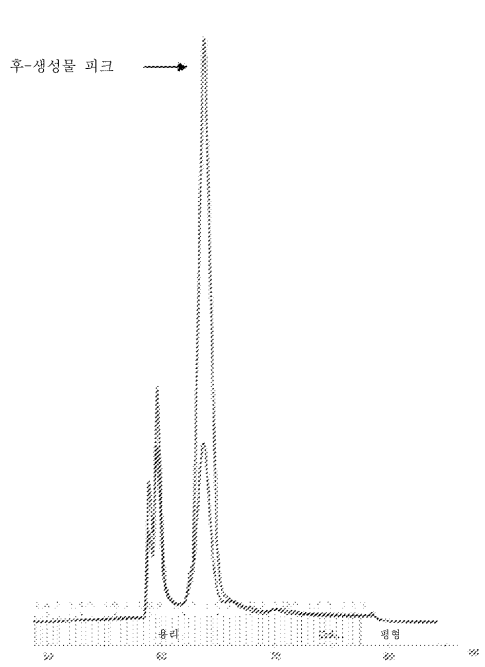
도면2b


1
2
3
4
5
6
7

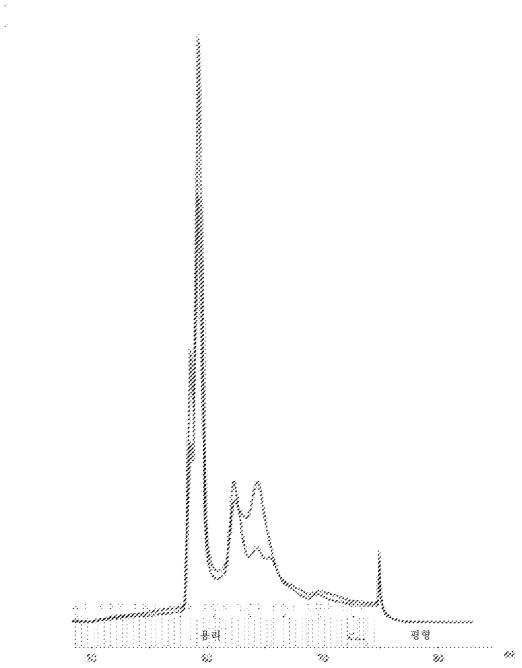
도면3



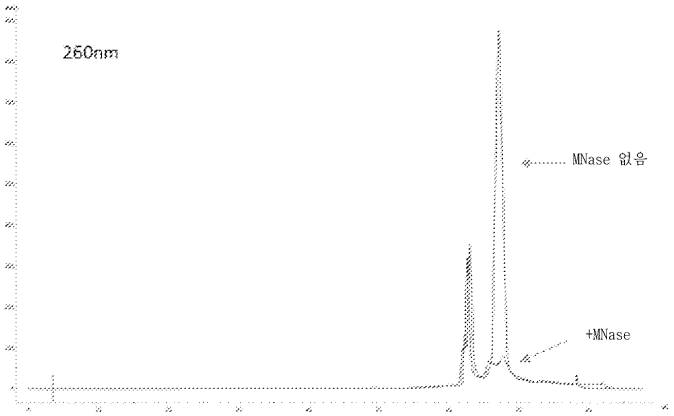
도면4a



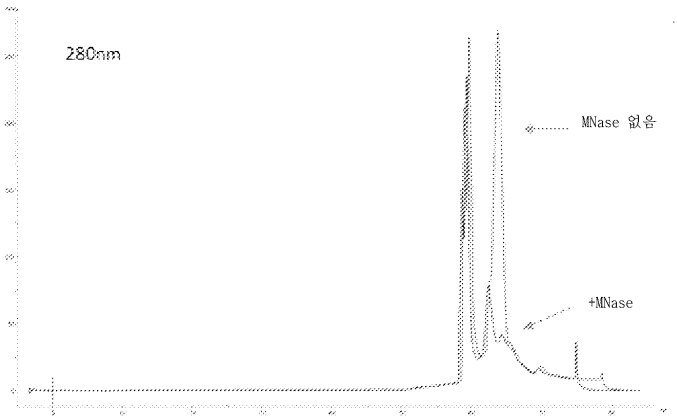
도면4b



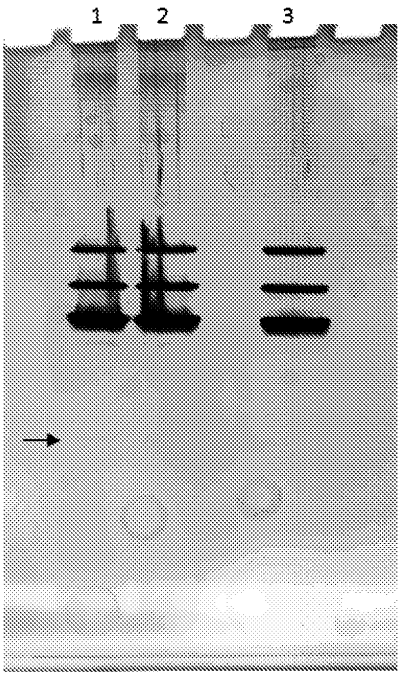
도면5a



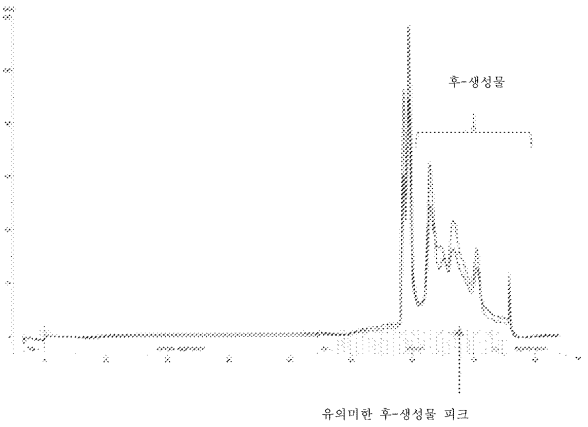
도면5b



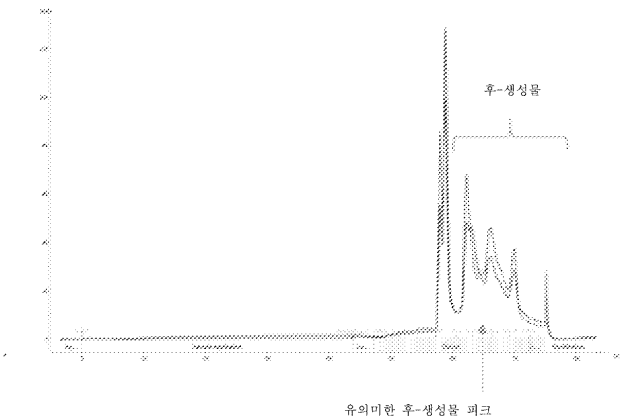
도면6



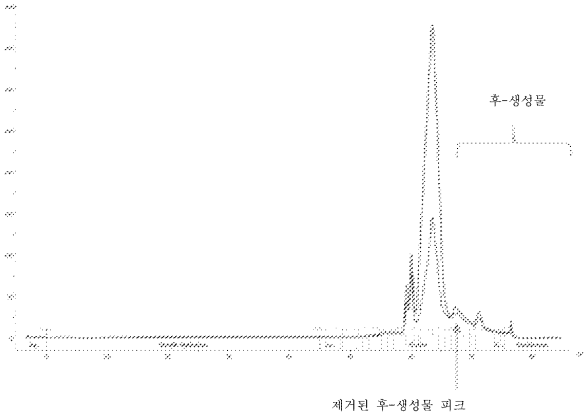
도면7a



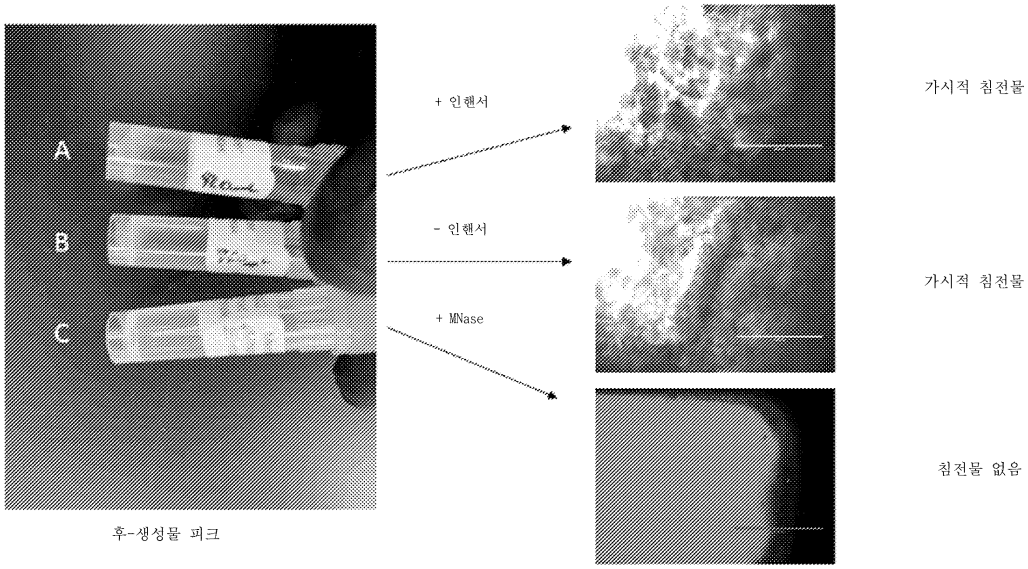
도면7b



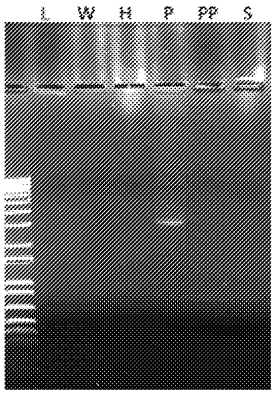
도면7c



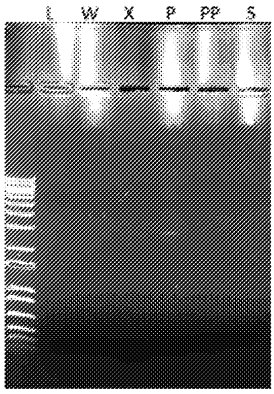
도면8



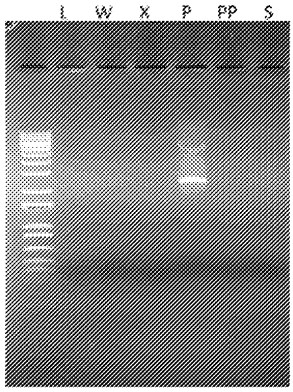
도면9a



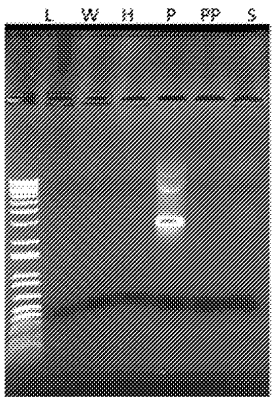
도면9b



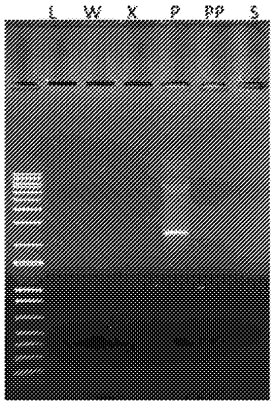
도면9c



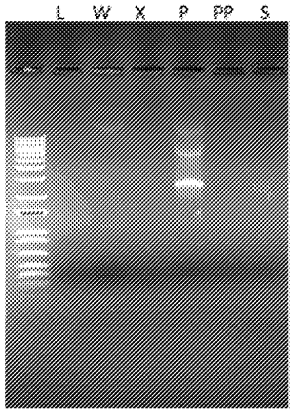
도면9d



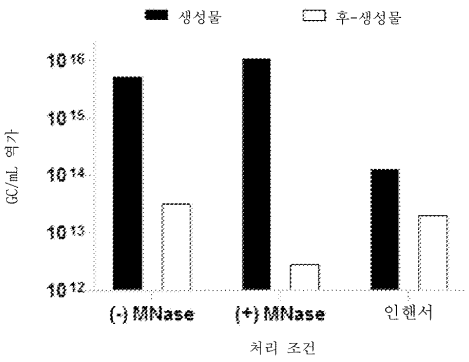
도면9e



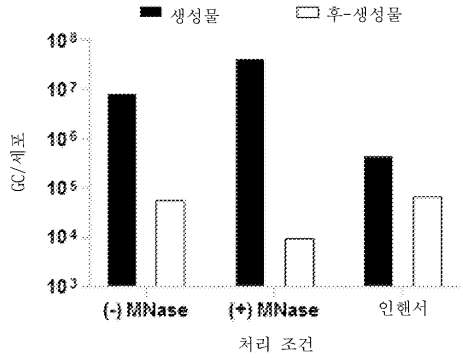
도면9f



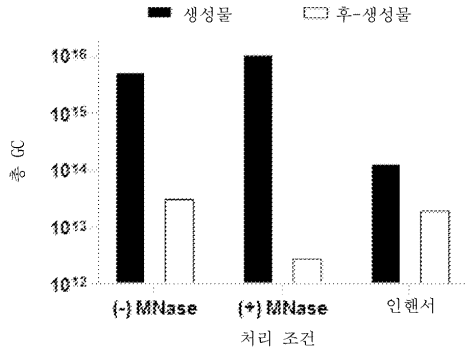
도면10a



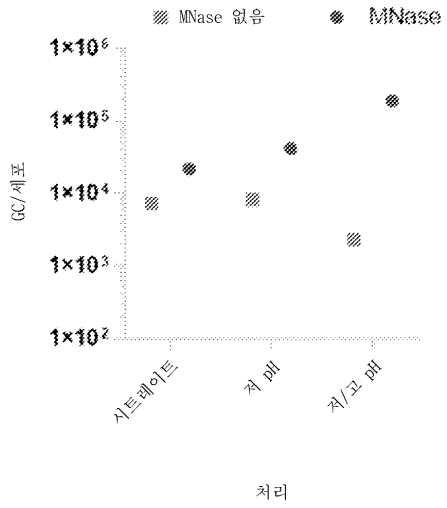
도면10b



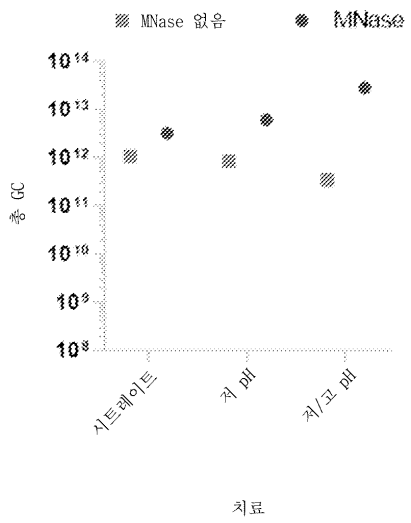
도면10c



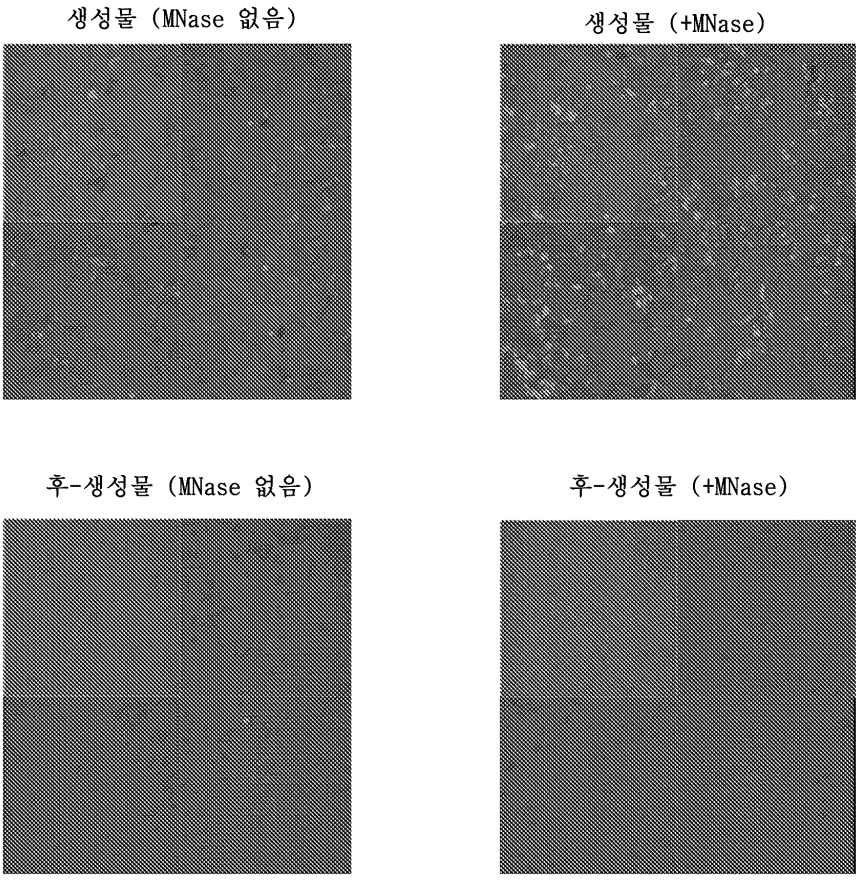
도면11a



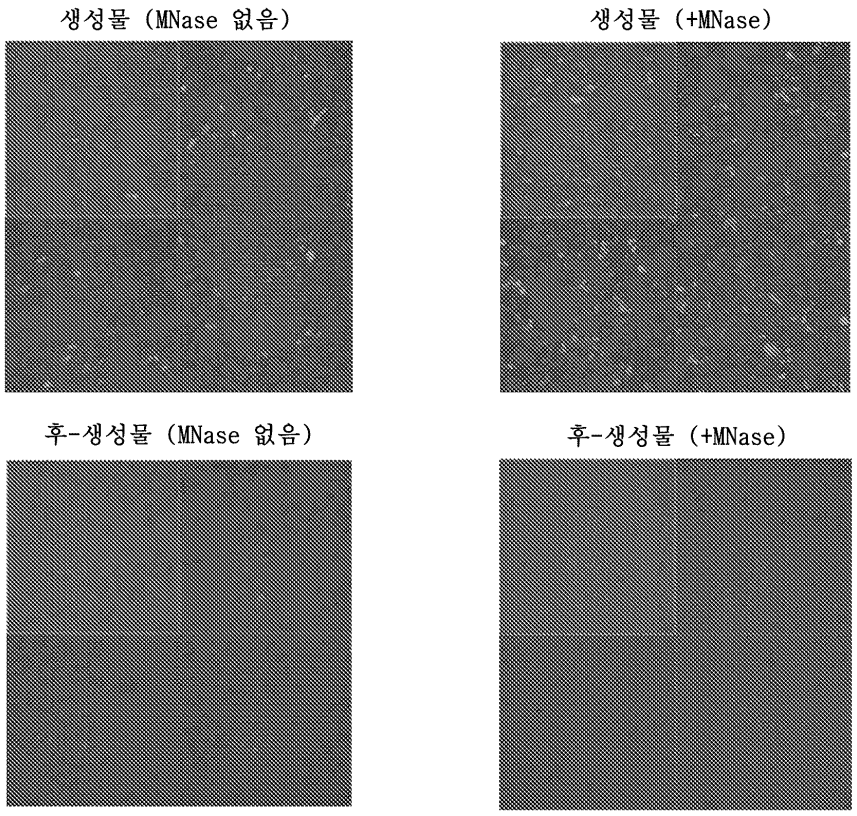
도면11b


MNase 없음
MNase
10^{14}
10^{13}
10^{12}
10^{11}
10^{10}
10^{9}
10^{8}
총 GC
시트레이트
저 pH
저/고 pH
치료

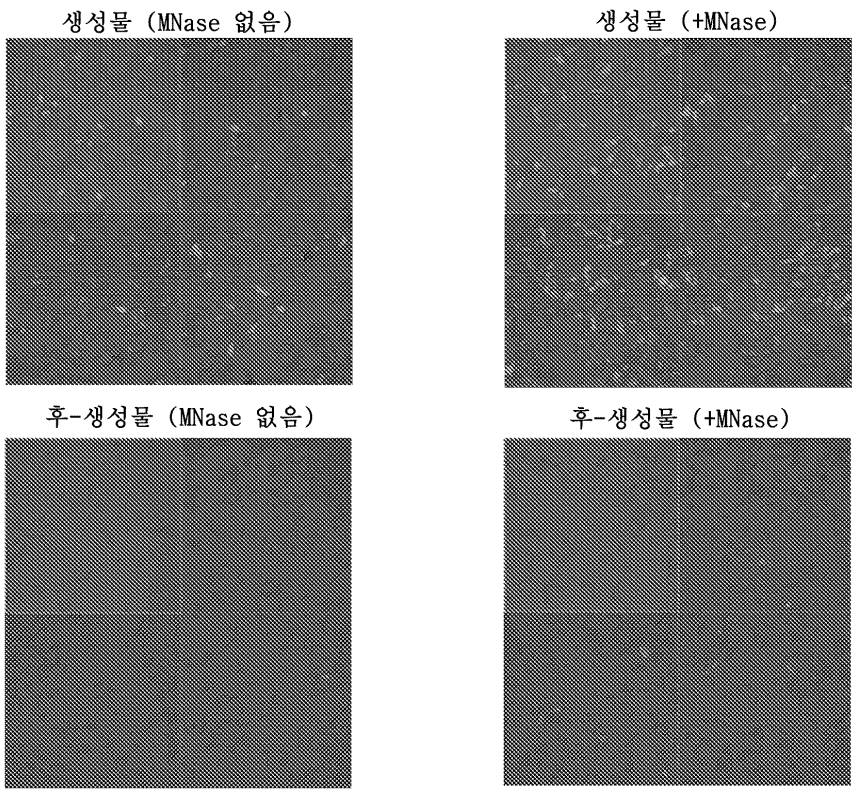
도면12


생성물 (MNase 없음)
생성물 (+MNase)
후-생성물 (MNase 없음)
후-생성물 (+MNase)

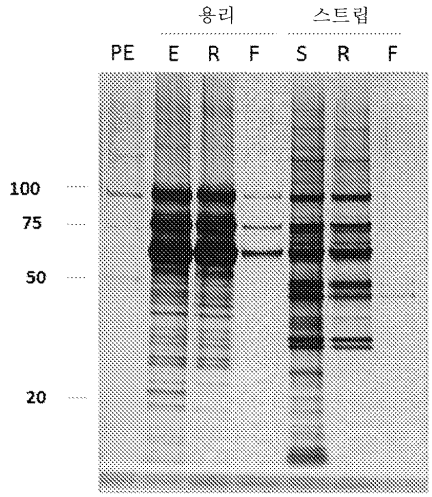
도면13


생성물 (MNase 없음)
생성물 (+MNase)
후-생성물 (MNase 없음)
후-생성물 (+MNase)

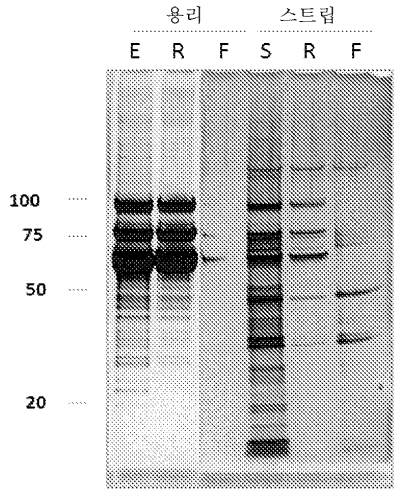
도면14


생성물 (MNase 없음)
생성물 (+MNase)
후-생성물 (MNase 없음)
후-생성물 (+MNase)

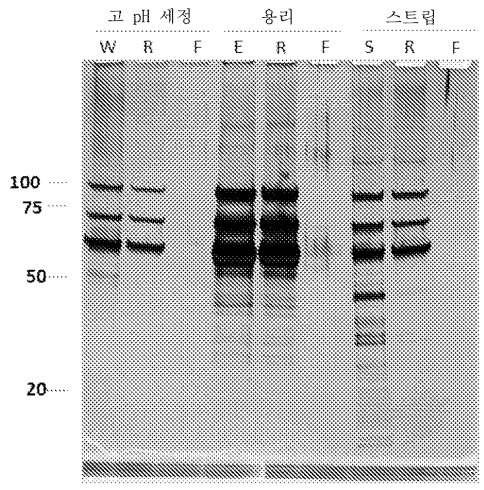
도면15a



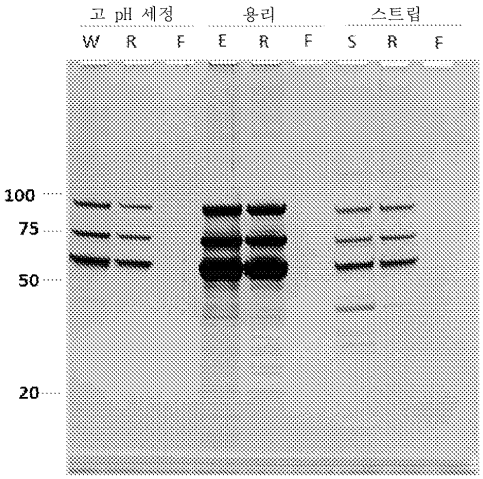
도면15b



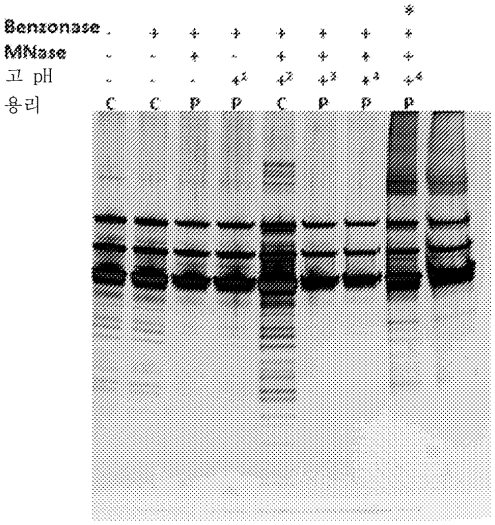
도면16a



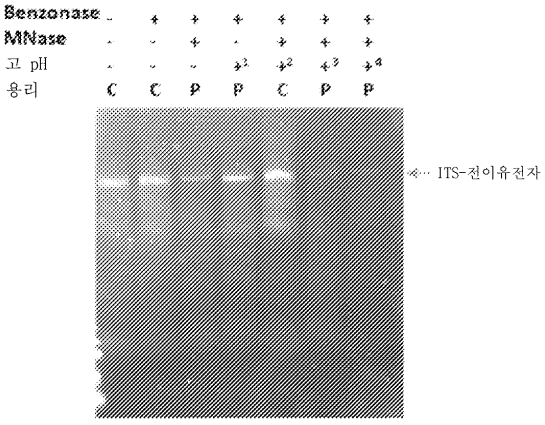
도면16b



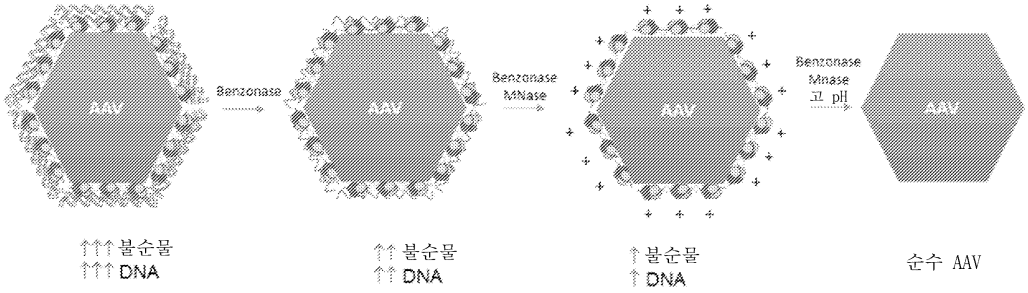
도면17a



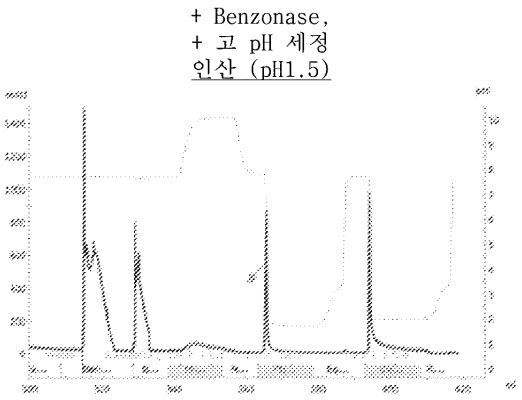
도면17b



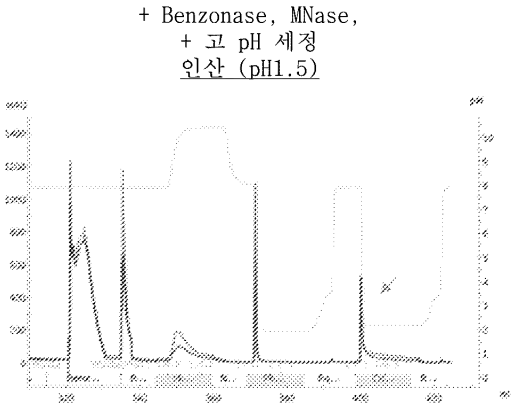
도면18



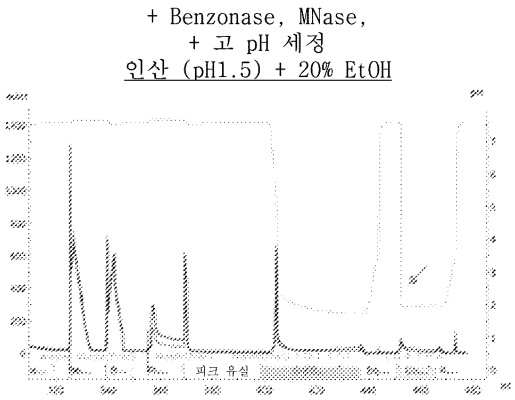
도면19a



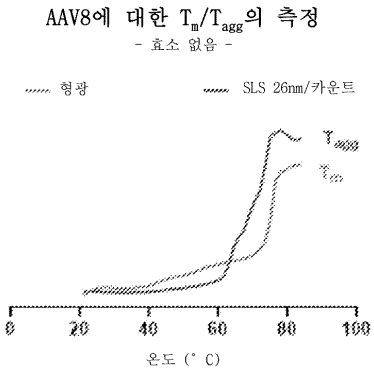
도면19b



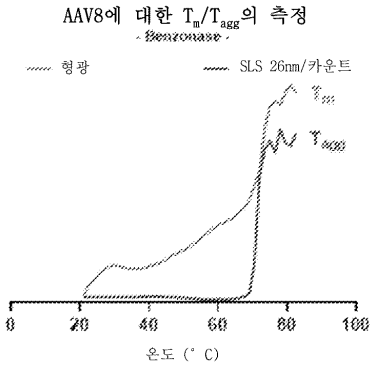
도면19c



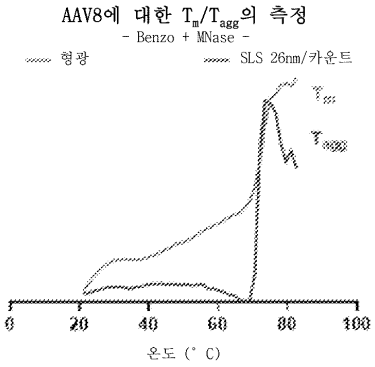
도면20a



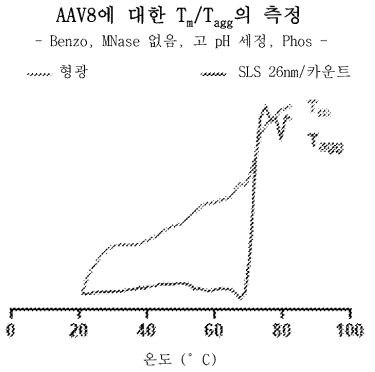
도면20b



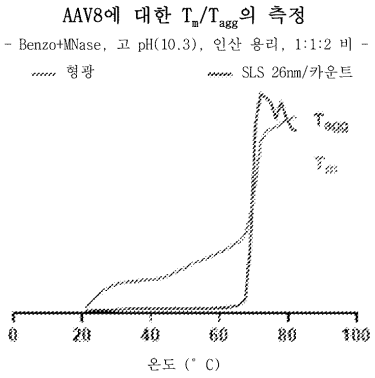
도면20c



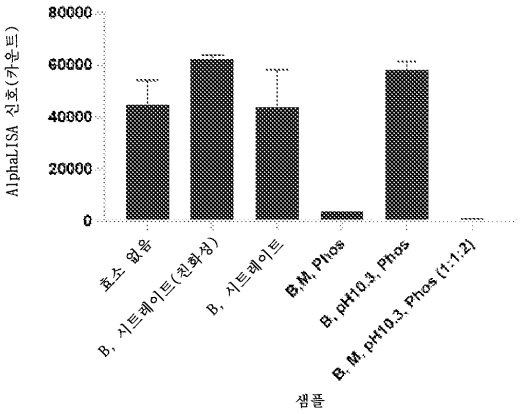
도면20d



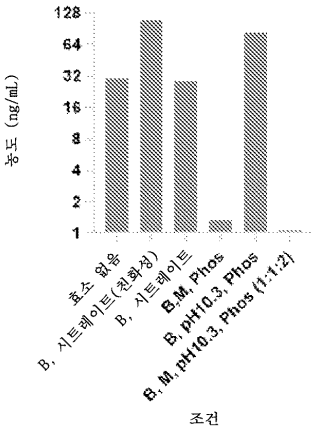
도면20e



도면21a



도면21b



도면22

