

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2012-143233

(P2012-143233A)

(43) 公開日 平成24年8月2日(2012.8.2)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 7/00 (2006.01)	C 1 2 N 7/00	4 B 0 6 5
A 6 1 K 9/08 (2006.01)	A 6 1 K 9/08	4 C 0 7 6
A 6 1 K 47/02 (2006.01)	A 6 1 K 47/02	4 C 0 8 7
A 6 1 K 35/76 (2006.01)	A 6 1 K 35/76	

審査請求 有 請求項の数 20 O L 外国語出願 (全 47 頁)

(21) 出願番号	特願2012-40561 (P2012-40561)	(71) 出願人	500034653
(22) 出願日	平成24年2月27日 (2012.2.27)		ジェンザイム・コーポレーション
(62) 分割の表示	特願2007-515525 (P2007-515525) の分割		アメリカ合衆国 マサチューセッツ O 2 1 4 2, ケンブリッジ, ケンダル ストリート 500
原出願日	平成17年6月1日 (2005.6.1)	(74) 代理人	100100158
(31) 優先権主張番号	60/575, 997		弁理士 鮫島 睦
(32) 優先日	平成16年6月1日 (2004.6.1)	(74) 代理人	100081422
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 田中 光雄
(31) 優先権主張番号	60/639, 222	(74) 代理人	100122301
(32) 優先日	平成16年12月22日 (2004.12.22)		弁理士 富田 憲史
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	100127638
			弁理士 志賀 美苗

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 A A Vベクターの凝集を防ぐための組成物およびその方法

(57) 【要約】 (修正有)

【課題】凝集なく、A A Vビリオンの高濃度ストック溶液を調製するための組成物および方法を提供する。

【解決手段】A A V調製物および保存のための製剤は、意図される標的組織と等張であるとはいえ、高いイオン強度の溶液（例えば、 $\mu \sim 500 \text{ mM}$ ）である。高いイオン強度および適度な浸透圧のこの組合せは、クエン酸ナトリウムのような高い価数の塩を用いて達成される。 $6.4 \times 10^{-3} \text{ g/mL}$ までのA A Vストック溶液は製剤を用いて実現でき、10回の凍結融解サイクル後でさえ凝集が全く観察されない。界面活性剤 P l u r o n i c [登録商標] F 6 8 を 0.001% で添加し、扱っている間のビリオンの表面への結合による損失を防ぐ。ビリオン調製物をヌクレアーゼで処理すると、凝集を悪化させるビリオン表面上の小核酸鎖が除去される。

【選択図】なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

ビリオン調製物におけるビリオンの凝集を防ぐ方法であって、少なくとも約 200 mM のイオン強度を達成するためにビリオン調製物に 1 種類以上の賦形剤を添加することを含む、方法。

【請求項 2】

ビリオンが AAVビリオンである、請求項 1 記載の方法。

【請求項 3】

該ビリオン調製物をヌクレアーゼで処理することをさらに含む、請求項 1 記載の方法。

【請求項 4】

ヌクレアーゼが Benzonase [登録商標] である、請求項 3 記載の方法。

【請求項 5】

1 種類以上の賦形剤が多価イオンを含むものである、請求項 1 記載の方法。

【請求項 6】

多価イオンがクエン酸塩である、請求項 5 記載の方法。

【請求項 7】

1 種類以上の賦形剤の添加後のビリオン調製物の浸透圧が、約 280 mOsm 未満である、請求項 1 記載の方法。

【請求項 8】

1 種類以上の賦形剤の添加後、ビリオン調製物におけるビリオンの平均粒子半径 (Rh) が約 20 nm 未満 (動的光散乱により測定される) である、請求項 1 記載の方法。

【請求項 9】

1 種類以上の賦形剤の添加後、ビリオンの回収率が、0.22 μm のフィルターを通してビリオン調製物をろ過した後、少なくとも約 90% である、請求項 1 記載の方法。

【請求項 10】

精製ウイルス粒子；

pH バッファー；および

1 種類以上の多価イオン

を含む賦形剤を含む精製ウイルス粒子の保存用組成物であって、イオン強度が約 200 mM より高い、組成物。

【請求項 11】

精製ウイルス粒子が AAVウイルス粒子である、請求項 10 記載の組成物。

【請求項 12】

1 種類以上の多価イオンの 1 つがクエン酸イオン (citrate) である、請求項 10 記載の組成物。

【請求項 13】

Pluronic [登録商標] F68 をさらに含む、請求項 10 記載の組成物。

【請求項 14】

Pluronic [登録商標] F68 が、0.001% にて存在する、請求項 13 記載の組成物。

【請求項 15】

pH バッファーが 10 mM Tris、pH 8.0 であり、賦形剤が 100 mM クエン酸ナトリウムを含むものである、請求項 10 記載の組成物。

【請求項 16】

精製ウイルス粒子の平均粒子半径 (Rh) が約 20 nm 未満 (動的光散乱により測定される) である、請求項 10 記載の組成物。

【請求項 17】

精製ウイルス粒子の回収率が、0.22 μm のフィルターを通してビリオン組成物をろ過した後、少なくとも約 90% である、請求項 10 記載の組成物。

【請求項 18】

10

20

30

40

50

ビリオン調製物におけるビリオンの凝集を防ぐ方法であって、該ビリオン調製物を Benzonas e [登録商標] で処理することを含む、方法。

【請求項 19】

Benzonas e [登録商標] 処理後、ビリオン調製物中のビリオンの平均粒子半径 (Rh) が、動的光散乱により測定された場合に約 20 nm 未満である、請求項 18 記載の方法。

【請求項 20】

Benzonas e [登録商標] 処理後、ビリオンの回収率が、0.22 μm のフィルターを通してビリオン調製物をろ過した後、少なくとも約 90 % である、請求項 18 記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

発明の分野

本発明は、凝集を防ぐ、AAV ビリオンの製造および保存用組成物および方法に関するものである。

【0002】

背景

組換えアデノ随伴ウイルス (rAAV) は、ヒト遺伝子導入のための有望なベクターである。Grimm, D., and Kleinschmidt, J. A. (1999) Hum Gene Ther. 10:2445-2450; Hig h, K. A. (2001) Ann. N. Y. Acad. Sci. 953:64-67; Pfeifer, A., and Verma, I. M. (2001) Ann. Rev. Genomics Hum. Genet. 2:177-211を参照されたい。AAV は、パルボウイルスのデピンドウイルス (Dependovirus) 属のメンバーである。AAV 血清型 2 (AAV2) は、末端逆方向反復 (ITR) 配列にフランクした複製 (rep) およびキャプシド形成 (cap) 遺伝子をコードする 4680 ヌクレオチドの 1 本鎖 DNA 分子から構成される。Berns, K. I. (1996) in Fields Virology (B. N. Fields et. al. Eds.), pp. 2173-2197. Lippincott-Raven Publishers, Philadelphiaを参照されたい。ゲノムは、cap 遺伝子産物のアミノ末端変異体である 3 個のキャプシドタンパク質 (VP1、VP2、および VP3) によりパッケージされる。得られた正二十面体のウイルス粒子は直径 ~ 26 nm を有する。AAV2 の高分解結晶構造が報告された。Xie, Q. et al. (2002) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 99:10405-10410を参照されたい。

【0003】

精製 AAV2 ウイルス粒子の溶解性には限界があり、そして AAV2 粒子の凝集が問題とされてきた。Croyle, M. A. et al. (2001) Gene Therapy 8:1281-1290; Huang, J. et al. (2000) Mol. Therapy 1: S286; Wright, J. F. et al. (2003) Curr. Opin. Drug Disc. Dev. 6:174-178; Xie, Q. et al. (2004) J. Virol. Methods 122:17-27を参照。通常用いられる緩衝食塩水溶液中では、有意な凝集は密度 10^{13} 粒子/mL で生じ、密度が高くなればなるほど、凝集は増大する。Huang と共同研究者らは、AAV ベクターが濃度依存性で凝集することを報告した。Huang, J. et al. (2000) Mol. Therapy 1:S286を参照。同様に、Xie と共同研究者ら (Xie, Q. et al. (2004) J. Virol. Methods 122: 17-27) は、0.1 mg/mL を超える濃度で、AAV2 ベクターが、凝集を防ぐための塩の濃度の上昇を必要とすることを報告した。AAV2 ベクターの凝集は、リン酸緩衝食塩水および Tris 緩衝食塩水のような通常用いられる中性緩衝溶液中 10^{13} 粒子/mL を超える粒子密度で生じる。これは、タンパク質濃度 ~ 0.06 mg/mL に該当し、これらの条件下で AAV2 の溶解性が低いことを強調するものである。過剰のエンブティー (empty) キャプシドは同時に精製され、粒子密度に因与するので、カラムクロマトグラフィー技術を用いて精製されたベクターについての有効なベクター濃度の限界は、なおさらに低いかもしれない。

【0004】

粒子の凝集は有意なものであり、その上アデノウイルスベクターについては完全に解決

10

20

30

40

50

された課題ではない。最近確立されたアデノウイルス関連材料 (A R N) の安定性が最近報告された。Adadevoh, K. et al. (2002) BioProcessing 1(2):62-69を参照されたい。20 mM Tris、25 mM NaCl、および2.5% グリセロール (pH 8.0) 中で形成された関連材料の凝集が、動的光散乱法、光子相関分光法、および外観により評価された。凍結融解サイクルまたは非凍結保存を行った後、ベクターの凝集のレベルが変動し得ることが観察された。このことから、A R Mの使用プロトコールは制限される。

【0005】

凝集は、精製中の損失、および精製されたベクター調製物の試験における矛盾を生じ得る。中枢神経系のようなある種の部位へのAAV2ベクターのインビボ投与は少量の高濃度ベクターを必要とし、最大達成可能用量は低いベクター溶解性により制限され得る。

10

【0006】

ベクターの凝集はまた、インビボ投与後の生体内分布に影響し、投与後にベクターに対して逆の免疫応答を引き起こすようである。タンパク質について報告 (Braun, A. et al. (1997) Pharm. Res. 14:1472-1478) されたように、ベクターの凝集は、ベクターを抗原提示細胞にターゲティングし、キャプシドタンパク質および導入遺伝子産物に対する免疫応答の増強を誘発することにより、免疫原性を増大し得る。前臨床 (Chenuaud, P. et al. (2004) Blood 103: 3303-3304; Flotte, T. R. (2004) Human Gene Ther. 15:716-717; Gao, G. et al. (2004) Blood 103:3300-3302) および臨床 (High, K. A. et al. (2004) Blood 104:121a) 研究におけるAAVベクターに対する免疫応答の報告は、ベクターの免疫原性に関与し得る全ての因子に対処する必要があることを説明するものである。

20

【0007】

精製ベクターを特徴付けるためのプロトコールの試験は、ベクターの凝集によっても影響されるようである。ベクターの感染価の決定はベクターの凝集に高感受性であることが報告された。Zhen, Z. et al. (2004) Human Gene Ther. 15: 709-715を参照されたい。重大な関心事は、ベクター凝集物は、それらの導入効率、生体内分布、および免疫原性が単量体粒子とは異なり得るので、インビボ投与後の有害な結果を有し得ることである。例えば、AAV2ベクターの肝細胞への血管内デリバリーには、ベクターが肝類洞壁の有窓内皮細胞を通ることが必要である。これらの有窓細胞は、単量体AAVベクター (直径 ~ 26 nm) の通過は可能だが、より大きなベクター凝集物の通過を防ぐと予想される、50 から 150 nmの範囲の半径を有する (Meijer, K. D. F., and Molema, G. (1995) Sem. Liver Dis. 15:206)。マウスにおける生体内分布の研究では、蛍光分子Cy3で標識された凝集AAV2ベクターは、血管デリバリーの後、肝マクロファージにおいて補足された。Huang, J. et al. (2000) Mol. Therapy 1:S286を参照。

30

【0008】

ウイルスベースの導入ベクターのための製剤の開発は比較的最近の研究分野であり、AAVベクターの製剤および安定性を最適化するための組織的努力を記載した2、3の研究が報告されているのみである。Croyle, M. A. et al. (2001) Gene Therapy 8:1281-1290; Wright, J. F. et al. (2003) Curr. Opin. Drug Disc. Dev. 6:174-178; Xie, Q. et al. (2004) J. Virol. Methods 122:17-27を参照されたい。ベクター調製物における変化を最小化する、前臨床および臨床上の適用に適合可能な製剤を決定することが、一貫して高いベクターの安定性および機能的特徴を達成するに重要な必要条件である。タンパク質療法について十分に確立されている (Chen, B. et al. (1994) J. Pharm. Sci. 83:1657-1661; Shire, S. J. et al. (2004) J. Pharm. Sci. 93:1390-1402; Wang, W. (1999) Int. J. Pharm. 185:129-188; Won, C. M. et al. (1998) Int. J. Pharm. 167:25-36) のように、ベクターの安定性の重要な見地は製造および保存中の溶解性であり、ベクターの凝集は完全に対処されることを必要とする問題である。ベクターの凝集はベクター精製中の損失を生じる一方、凝集物はろ過により除去され、収量における損失は、より高いコスト、および前臨床および臨床研究用のベクターを生成する場合のキャパシティーの限界となる。凝集物を除去するためのろ過後でさえ、新たな凝集物が、緩衝食塩水溶液中のAAV2ベクターの高濃度調製物において形成され得る。

40

50

【0009】

ウイルス粒子の凝集を防ぐ、r A A V 2のようなA A Vベクターの精製および保存のための改良された製剤および方法に対する必要がある。

【0010】

発明の概要

当該技術分野におけるこれらの要求および他の要求が本発明によって満たされ、そしてそれは、凍結融解サイクル後でさえ高い感染価および導入効率が維持されるA A Vベクターの製造および保存において使用するための高いイオン強度溶液を提供する。

【0011】

1つの態様において、本発明は、賦形剤を添加して、凝集を防ぐのに十分な高イオン強度を達成することにより、ビリオン調製物におけるビリオンの凝集を防ぐ方法に関するものである。別の態様において、本発明は、凝集を防ぐのに十分な高イオン強度を有するビリオン組成物に関するものである。

【0012】

本発明のある種の実施態様において、イオン強度は、少なくとも約150 mM、200 mM、250 mM、300 mM、350 mM、400 mM、450 mM、500 mM、600 mM、700 mMまたはそれ以上である。ある実施態様において、このイオン強度は、1種類以上の多価イオン、例えば、クエン酸塩、硫酸塩、マグネシウム、または硫酸塩を含む賦形剤を用いて達成される。

【0013】

さらなる実施態様において、イオン強度がビリオンの凝集を防ぐのに十分に高いものであったとしても、ビリオン調製物の浸透圧は、似通った等浸透圧レベル、例えば、200 mOsm、250 mOsm、280 mOsm、300 mOsm、350 mOsm、または400 mOsmで維持される。

【0014】

ある実施態様において、ビリオンは、アデノ随伴ウイルス(A A V)ビリオン、例えば、A A V - 2である。

【0015】

本発明の方法の他の実施態様において、ビリオン調製物は、ヌクレアーゼ、例えば、Benzonase [登録商標]で処理される。さらなる実施態様において、ヌクレアーゼ処理は、凝集を防ぐのに十分に高いイオン強度を達成する賦形剤の添加と組合わされる。

【0016】

本発明のある実施態様において、界面活性剤Pluronic [登録商標] F68が、例えば、0.001%までビリオン調製物に添加される。1つの実施態様において、組成物は、精製ウイルス粒子、10 mM Tris pH 8.0、100 mM クエン酸ナトリウム、および0.001% Pluronic [登録商標] F68を含む。

【0017】

1つの実施態様において、A A Vベクターは、 1×10^{13} vg/mLを超える濃度、例えば、 2×10^{13} 、 3×10^{13} 、 4×10^{13} 、 5×10^{13} 、および 6.4×10^{13} vg/mLまでの濃度で有意な凝集を示すことなく本発明の組成物として保存され得る。ある実施態様において、本発明の方法および組成物を用いて保存されたA A Vベクターは、4にて5日間保存されたとき、有意な凝集を示さない。他の実施態様において、かかる組成物として保存されたA A Vベクターは、-20 または -80 で凍結融解サイクルを1回、5回、10回、またはそれ以上行った後、有意な凝集を示さない。

【0018】

ある実施態様において、本発明の方法および組成物により保存されたビリオン調製物は、動的光散乱により測定された場合に平均的粒子半径(Rh)を示す。これは、ビリオンの有意な凝集が全く起こらなかったことを示す。ある実施態様において、本発明の方法および組成物により保存されたビリオン調製物は、約15 nm、20 nm、または30 nmより大きい平均的粒子半径(Rh)を示す。

10

20

30

40

50

【 0 0 1 9 】

ある実施態様において、本発明の方法および組成物により保存されたビリオン調製物からのビリオンの回収率は、 $0.22\text{ }\mu\text{m}$ のフィルターを通してろ過した後、約85%、90%、または95%より高い。

【 0 0 2 0 】

なお別の実施態様において、本発明は、本発明の高いイオン強度製剤を含むキットに関するものである。1つの実施態様において、キットは、予め混合された賦形剤溶液を含む。別の実施態様において、キットは、本発明の高いイオン強度組成物の2種類以上の成分を別々に含み、これは使用者により混合され得る。ある実施態様において、キットは、クエン酸ナトリウム、T r i s [登録商標]、およびP l u r o n i c [登録商標] F 6 8を含む。他の実施態様において、キットは、本発明の組成物の製造、あるいは本発明の方法の実施のための指示書をさらに含む。

10

【 0 0 2 1 】

発明の詳細な説明

A A V 2 ベクターの凝集は、ベクターの高濃度調製物において頻繁に観察され、そして精製、回収、およびインビボでの能力および安全性に影響を及ぼし得る。ゆえに、A A V 2 ベクターの開発にとって重要な目的は、高濃度ストックが調製されるときにベクターの凝集を防ぐ方法および製剤を同定することである。

【 0 0 2 2 】

特に示さない限り、本明細書において用いられる用語「ベクター」は、組換えA A V ビリオン、またはウイルス粒子に言及し、「ベクター」が頻繁に用いられるにも関わらず、他の文脈においてはプラスミドのような非ウイルスDNA分子にも言及する。

20

【 0 0 2 3 】

本発明は、凝集過程におけるウイルス粒子間のイオン相互作用の関与を示唆する、溶液のイオン強度がA A V ベクター凝集の重要なパラメーターであるという知見に一部基づくものである。イオン強度の上昇が、荷電賦形剤の同一性に関わらず、A A V 2 ベクターの溶解性を増大させるという知見は、特定のイオン種に関与する相互作用よりむしろ溶液自体のイオン強度が、関連する物理化学的パラメーターであるという仮説を支持するものである。少なくとも200 mMの閾値イオン強度が、本明細書で調べられるベクター粒子密度での凝集を防ぐのに必要とされる。

30

【 0 0 2 4 】

実際的な関心事のうち、通常用いられる緩衝食塩水溶液は、 10^{13} 粒子/mLを超える密度でのA A V 2 ベクターの凝集を防ぐのに十分なイオン強度を有する。高い塩濃度は、A A V 2 ベクターの溶解性を増大させることが知られている（例えば、勾配から回収された高濃度A A V 2 ベクターは、一般に、高濃度C s C lに溶解性のままである）。しかしながら、前臨床および臨床研究に最適な製剤は、特に、高張液の希釈が遅い可能性のある部位へのベクターのインビボ投与のため、等張（280 ~ 400 m O s m）近くであるべきである。本発明の実施態様において、イオン強度の荷電価数との指数関数的関係を用いて、高いイオン強度を有する等張製剤が開発される。ヒト非経腸製剤における賦形剤として通常用いられる複数の電荷価数を有する塩種（例えば、硫酸塩、クエン酸塩、およびリン酸塩）は、等張濃度で用いられるとき、A A V 2 ベクターの凝集を防ぐために必要とされるイオン強度レベルをもたらし得る。等張（150 mM）塩化ナトリウムは、イオン強度150 mM（高いベクター濃度でのA A V 2の溶解性を維持するのに十分な値である）を有する一方、イオン強度~500 mMを有する等張クエン酸ナトリウムは、少なくとも 6.4×10^{13} v g / mLのA A V 2 ベクター濃度を凝集することなく支持することができる。

40

【 0 0 2 5 】

理論により制限されることを意図するのではないが、A A V 2 粒子の低い溶解性は、凝集物における隣接粒子間の相補的に荷電した領域の安定効果と併せてそれらの高度に対称的な性質により引き起こされ得る。A A V 2の結晶構造に基づく表面電荷密度（Xie, Q.

50

et al. (2002) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 99:10405-10410) は、ウイルス表面上の正および負の電荷パターンを示す。従前の報告により、A A V 2 ベクターの凝集が pH 依存性であることが示され、荷電した側鎖基を有するアミノ酸が粒子間結合に関与するとの仮説が立てられた。Qu, G. et al. (2003) Mol. Therapy 7:S238を参照。これらの報告により、荷電したアミノ酸側鎖がベクターの凝集に関与するなら、高濃度の遊離アミノ酸がベクター粒子の相互作用をブロックし得るとの仮説が立てられた。しかしながら、本発明者らは、荷電した側鎖を有するアミノ酸は、それらのイオン強度への関与を超えて A A V 2 ベクターの凝集を防ぐ際に有効でないことを見出した。

【0026】

低いイオン強度でのベクターの凝集は、精製ベクター粒子の有効なヌクレアーゼ処理により低減されるが、阻止されないことも見出した。精製過程の初期工程における消化（清澄化 H E K 細胞溶解物）は、ベクター精製後の凝集を低減しなかった。核酸基質に対する酵素の割合がより高いので、既に精製されたビリオンの消化はより有効なようである。これらの結果を説明する 1 つのメカニズムは、ベクター表面に結合した残りの核酸不純物（例えば、宿主細胞およびプラスミド DNA）が、隣接するウイルス粒子上の結合部位をもたらし、これにより凝集を生じ得るということである。精製 A A V 2 ベクター（エンベロープなし）は、約 1 % の非ベクター DNA を含有することが報告された。Smith, P. et al. (2003) Mol. Therapy 7:S348を参照。この非ベクター DNA の > 50 % が、ヌクレアーゼ耐性であり、キャプシド粒子内にパッケージされることが報告された。一方、不純物 DNA のうち、ヌクレアーゼ耐性であり、精製ベクター粒子の表面と結合するように思われるものもあった。有効なヌクレアーゼ処理がベクターの凝集を低減し得るという知見により、1 個のベクター粒子当たり 25 ヌクレオチド以下の平均的レベルでベクター表面と結合する核酸が A A V ベクターの凝集に関与し得ることが示唆される。

【0027】

要約すると、A A V 2 ベクターの精製中の高いイオン強度溶液の使用および最終製剤、ならびに残りのベクター表面 DNA の有効な除去は、前臨床および臨床研究において使用するための A A V 2 ベクターの高濃度溶液を達成するための 2 つの有効な戦略である。高いイオン強度溶液およびヌクレアーゼ処理は、組み合わせで、または別々に用いられ得る。データは A A V 2 ベクターを用いて得られたものだが、本発明の組成物および方法は、他の A A V 血清型 / 変異体、またはアデノウイルス、レンチウイルス、およびレトロウイルスのような他のウイルスベクターにも有用であり得る。

【0028】

賦形剤の濃度の関数としての A A V の凝集

A A V ベクターの凝集の機序を明らかにし、凝集を低減 / 阻止し得る賦形剤の種類を同定するために、最初のスクリーニング実験を行う。低い濃度の緩衝液（20 mM リン酸ナトリウム, pH 7.2）を含む中性緩衝食塩水においてベクターを希釈（5 倍）して、ベクターの凝集を引き起こすことができる。希釈液に含まれるとき、ベクターの凝集を防ぐことができる賦形剤を同定するための「希釈圧力（dilution-stress）」法を用いて、賦形剤をスクリーニングする。スクリーニングのため、動的光散乱（DLS）により凝集を測定する。調べた賦形剤の種類は、選択した無機塩類、アミノ酸、非荷電炭水化物、および界面活性剤を含むものであった。結果を表 1 に表す。

【0029】

表 1

希釈圧力法を用いた、A A V 2 ベクターの凝集を防ぐ賦形剤についてのスクリーニング

【表 1】

賦形剤	凝集を防ぐのに必要な O s m (試験した最大値)
硫酸マグネシウム	1 8 0 m O s m
クエン酸ナトリウム	2 2 0 m O s m
塩化ナトリウム	3 2 0 m O s m
リン酸ナトリウム	2 2 0 m O s m
硫酸ナトリウム	2 2 0 m O s m
アルギニン	N I A (2 0 0 m O s m)
アスパラギン酸	3 2 0 m O s m
グルタミン酸	3 2 0 m O s m
グリシン	N I A (2 0 0 m O s m)
ヒスチジン	N I A (2 0 0 m O s m)
リジン	3 0 0 m O s m
グリセロール	N I A (5 % w / v 、 5 4 3 m O s m)
イオディキサノール	N I A (5 % w / v 、 3 2 m O s m)
マンニトール	N I A (5 % w / v 、 2 7 5 m O s m)
ソルビトール	N I A (5 % w / v 、 2 7 5 m O s m)
スクロース	N I A (5 % w / v 、 1 4 6 m O s m)
トレハロース	N I A (5 % w / v 、 1 4 6 m O s m)
P l u r o n i c [登録商標] F 6 8	N I A (1 0 % w / v 、 1 2 m O s m)
ポリソルベート 8 0	N I A (1 % w / v)

10

20

30

40

50

N I A : 凝集の阻害なし

【 0 0 3 0 】

表 1 に示す通り、荷電した賦形剤（無機塩およびアミノ酸）は、十分な濃度で存在するとき、凝集を防ぐ。しかしながら、ベクターの凝集を防ぐのに必要な塩濃度は変動し、それは、硫酸マグネシウムについて 1 8 0 m O s m から塩化ナトリウムについて 3 2 0 m O s m の範囲に及ぶ。アミノ酸のアルギニン、アスパラギン酸、グルタミン酸、グリシン、ヒスチジン、およびリジンは、2 0 0 m O s m で凝集を阻止しないが、リジン、アスパラギン酸、およびグルタミン酸は、3 0 0 ~ 3 2 0 m O s m で凝集を防ぐ。アルギニン、グリシン、およびヒスチジンは、2 0 0 m O s m 以外の濃度で試験しなかった。選択した炭水化物は、5 % w / v までの濃度で存在するとき、ベクター粒子の凝集に対する効果を全く有さない。例えば、5 % w / v グリセロール (5 4 3 m O s m) は凝集を阻止しない。界面活性剤のポリソルベート 8 0 (1 % w / v) および P l u r o n i c [登録商標] F 6 8 (1 0 % w / v) は、同様に、「希釈圧力」法を用いた凝集に対する効果を全く有さない。

【 0 0 3 1 】

浸透圧およびイオン強度の関数としての A A V の凝集

図 1 A および 1 B は、ベクターの凝集のより詳細な分析の結果を種々の塩の濃度の関数として示す。図 1 A は、ベクターの凝集を選択した賦形剤の浸透圧の関数として示す。荷電した種について、A A V 2 ベクターの凝集の濃度依存性阻害を観察する。多価イオンを有する塩は、1 価の塩化ナトリウムより低い濃度で同程度の凝集阻害を達成する。例えば

、硫酸マグネシウムは200 mOsmで凝集を防ぐが、塩化ナトリウムは同様の効果達成するのに350 mOsmを必要とする。クエン酸ナトリウム、硫酸ナトリウム、およびリン酸ナトリウムは、ベクター凝集を防ぐそれらの有効性の中間である。

【0032】

図1Aおよび表1の結果は、グリセロールおよび5%までの濃度でのある種の糖の、低いイオン強度により誘発されるAAV2ベクターの凝集に対する効果を全く示していないが、データにより、5%より高いグリセロール濃度でのAAV2の溶解性の改善を除外することはできない。例えば、Xieと共同研究者らは、25% (w/v) グリセロールが、低いイオン強度溶液においてAAV2を非常に高濃度(4.4から 1.8×10^{14} 粒子/ml)まで濃縮できることを報告した。Xie, Q. et al. (2004) J. Virol. Methods 122:17-27を参照されたい。

10

【0033】

図1Bは、図1Aのデータを、それぞれの賦形剤について浸透圧ではなく計算したイオン強度の関数としてプロットしたものを示す。図1Bは、用いる塩に関わらず、イオン強度が200 mM以上のとき、ベクターの凝集は阻止されることを示している。これらのデータは、溶質濃度および電荷価数の両方に依存するパラメーターである溶液のイオン強度(μ)が、凝集に影響する1次因子であることを示唆するものであった。

【0034】

本発明の実施態様において凝集を防ぐのに有用なイオン強度は、例えば、250 mM、300 mM、350 mM、400 mM、450 mM、500 mM、600 mM、700 mM、またはそれより高いイオン強度を含む。本発明の方法および製剤においてこれらのイオン強度を達成するには多価イオンが好ましく、例えば、2価、3価、4価、5価のイオン、およびそれより高い価数のイオンである。本発明の溶液および製剤におけるpHバッファは、リン酸塩、Tris、またはHEPES(または他の良好なバッファ)であってもよく、任意の他の適当なpHバッファが用いられてもよい。好ましい実施態様において、製造されるベクターの標的組織と相性のよい多価イオンおよびバッファが選択される。

20

【0035】

本発明の方法および組成物における多価イオンの使用により、比較的低い浸透圧だが、高いイオン強度の組成物を生成することが可能になる。本発明の高いイオン強度の組成物は、ほぼ等張であってもよく、例えば、約200 mOsm、250 mOsm、280 mOsm、300 mOsm、350 mOsm、または400 mOsmであってもよいが、他の浸透圧は、組成物のある種の使用に許容され得る。

30

【0036】

AAVの精製方法の関数としてのAAVの凝集

異なる方法(例えば、密度勾配精製対イオン交換クロマトグラフィー)により精製された組換えAAV2は、異なる不純物プロファイルを有すると予測される。図2は、精製方法の異なるいくつかのAAV調製物について、イオン強度の関数としてベクターの凝集を示す。精製方法は実施例1に記載されている。塩化ナトリウムを用いて、イオン強度を変動させる。2回塩化セシウム勾配超遠心(方法1)、陽イオン交換カラムクロマトグラフィー(方法2)、または合わせたカラムおよび塩化セシウム勾配超遠心(方法3)により精製されたAAV2-FIXベクターはそれぞれ、イオン強度が低減するにつれ、類似の凝集応答を示す。対照的に、カラム方法による精製、次に、ヌクレアーゼ消化工程(方法2+ヌクレアーゼ)の対象とされたAAV2-FIXは、低いイオン濃度での凝集の低減を示す。

40

【0037】

製造的スケールでのAAVの凝集

表1、および図1A、1B、および2のデータは、分析的スケール(凝集を測定するためのDLSを利用する)でのベクターの凝集に関連する。対照的に、表2は、製造的スケールのベクター精製に相当する、ベクターの凝集を誘発し、定量するための方法を用いて

50

、ラージスケールでの A A V 2 ベクターの凝集に対する上昇したイオン強度およびヌクレアーゼ処理の効果を示す。実験の詳細を実施例 2 に記載する。精製 A A V ベクターを、種々のイオン強度の溶液中にダイアフィルトレーションし、容量を低減して、高いベクター濃度を達成し、次に、 $0.22\ \mu\text{m}$ のフィルターを通してろ過した後のベクターの回収率を測定することにより、凝集を評価する。方法 1 ないし第 2 の C s C l 勾配遠心工程 ($91\ \text{mL}$ 中 $1.8 \times 10^{15}\ \text{vg}$ 、 $\sim 3\ \text{M}$ C s C l 中 $1.8 \times 10^{13}\ \text{vg/mL}$) により精製した A A V 2 - A A D C ベクターの単一プールからのアリコート、ダイアフィルトレーション実験の出発材料として用いる。中空系を用いたタンジェンシャルフローフィルトレーションをダイアフィルトレーションのために用いる。なぜなら、それはスケールの拡大縮小が可能であり、様々な容量 (最小 $1.4\ \text{mL}$) の調製も可能であるため、中性緩衝食塩水中で凝集が生じると予測される濃度に A A V を濃縮できるからである。

【0038】

実験 1 において、3 個の中空系単位を用いて、製剤 C F、T F 1、または T F 2 において A A V 2 - A A D C ベクターをダイアフィルトレーションし、容量を目標の $2.5 \times 10^{13}\ \text{vg/mL}$ まで低減する。実施例 2 を参照されたい。次に、試料を $0.22\ \mu\text{m}$ のフィルターを通してろ過する。結果を表 2 に示す。上昇したイオン強度製剤 T F 1 ($95 \pm 7.4\%$) および T F 2 ($93 \pm 7.4\%$) 両方についてのベクター回収率 (「収率 %」) は、対照製剤 C F を用いた回収率 ($77 \pm 6.6\%$) より有意に高い。

【0039】

表 2

処理スケールでの A A V ベクターの回収率

【表 2】

実験	製剤	$\mu\text{(mM)}$	目標 (vg/mL)	実測 (vg/mL)	収率% (RSD)
1	CF	160	2.5E13	1.93E13	77(6.6)
1	TF1	310	2.5E13	2.38E13	95(7.4)
1	TF2	510	2.5E13	2.33E13	93(7.4)
2	CF	160	6.7E13	3.98E13	59(6.0)
2	TF2	510	6.7E13	6.42E13	96(4.4)
3	CF(-Bz)	160	3.6E13	2.46E13	68(11)
3	CF(+Bz)	160	3.6E13	3.29E13	91(12)

【0040】

実験 2 において、A A V 2 - A A D C を C F または T F 2 においてより高い目標値 ($6.7 \times 10^{13}\ \text{vg/mL}$) まで濃縮する。T F 2 を用いたベクターの回収率 ($96 \pm 4.4\%$) は、再度、C F を用いた回収率 ($59 \pm 6.0\%$) より有意に高い。用いたアッセイの変化内、T F 2 を用い目標濃度の両方でベクターを完全に回収した。これは、凝集が阻止されたことを示す。対照において、C F を用いた目標濃度の両方で有意な凝集を観察し、凝集の程度 (すなわち、 $0.22\ \mu\text{m}$ ろ過後の損失) は、目標ベクター濃度が高くなるほど、高くなった。さらなる実験 (示していない) において、実験 2 の濃縮後、 $0.22\ \mu\text{m}$ ろ過工程前に A A V 2 ベクター試料 $50\ \mu\text{L}$ を採取し、次に、光学顕微鏡により調べる。C F において濃縮したベクターは、明らかな量の見える物質を含有し (示していない)、一方、かかる物質は、T F 2 において濃縮したベクターにおいて全く観察されない。

【0041】

実験 3 は、精製ベクターのヌクレアーゼ消化前の凝集に対する効果を調べるものである。ヌクレアーゼ消化がない場合、C F における A A V 2 - A A D C の回収率は、 $68 \pm 11\%$ であり、これは実験 1 および 2 における回収率に類似する。対照において、ヌクレアーゼ処理し、次に、C F において濃縮した精製ベクターはより高い回収率 ($91 \pm 12\%$) となる。これらの製造用スケールの結果は、「希釈圧力」(分析的スケール)法を用い

た図 2 に示すヌクレアーゼ消化の効果と同じ効果を反映する。

【 0 0 4 2 】

表 2 に表す結果は、本発明の方法および組成物が、A A V ベクターの回収率を増大させることを示す。例えば、本発明の種々の実施態様において、回収率は、約 8 0 % 未満から少なくとも約 8 5 %、9 0 %、9 5 %、またはそれ以上まで改善される。

【 0 0 4 3 】

保存または凍結融解サイクル後の A A V の安定性および活性

Croyle と共同研究者らは、リン酸ナトリウム緩衝液において凍結融解サイクルを複数回行った後の A A V およびアデノウイルスのタイターの有意な損失を報告し、リン酸カリウムによりもたらされるより良好な pH の緩衝化により、凍結融解サイクル中のタイターの損失が阻止されることを示した。Croyle, M. A. et al. (2001) Gene Therapy 8: 1281-1290 を参照されたい。本発明者らのリン酸ナトリウムを用いた凍結融解の安定性の研究の結果は、これらの知見を支持するものである。本発明者らは、1 5 0 m M リン酸ナトリウムが、高濃度の A A V 2 - A A D C ベクターの調製および非凍結保存中の凝集を防ぐのに十分なイオン強度をもたすが、- 2 0 または - 8 0 での 1 回の凍結融解サイクルでさえ凝集を生じることを見出した。

10

【 0 0 4 4 】

保存または凍結融解 (F / T) サイクル後の A A V の安定性を、本発明の緩衝液において次の通り評価する。C F、T F 1、および T F 2 において調製した高濃度のベクター (表 2、実験 1) を短期間の安定性の研究の対象とし、凝集が冷蔵保存中または複数回の凍結融解 (F / T) サイクル後に生じ得るかどうかを評価する。未希釈の試料を用いた D L S により凝集を評価し、R h 値 > 2 0 n m があるレベルの凝集の発生を示すとみなす。

20

【 0 0 4 5 】

表 3

A A V 2 ベクターの概要

【 表 3 】

製剤	粒子半径 - R h (n m)							
	Pre	4℃	-20℃			-80℃		
		5日間	1F/T	5F/T	10F/T	1F/T	5F/T	10F/T
CF	14.5	27.0	22.4	56.1	94.5	20.6	57.5	141
TF1	13.8	16.3	TH	TH	TH	TH	TH	TH
TF2	13.8	14.4	14.2	14.0	14.1	13.8	21.3	50.9

30

P r e : 0 . 2 μ m 直後に測定した D L S 半径

ベクター濃度 (v g / m L) : C F : 1 . 9 3 E 1 3、T F 1 : 2 . 3 8 E 1 3、T F 2 : 2 . 3 3 E 1 3

T H : 過剰の凝集のため、シグナル強度があまりに高く測定できない

【 0 0 4 6 】

表 3 に示すとおり、C F において調製した A A V 2 - A A D C ベクターは、4 での 5 日間の保存後、ならびに - 2 0 または - 8 0 での 1 回以上の F / T サイクル後にいくらかの凝集を示す。T F 1 において調製したベクターについては、4 での 5 日間保存後に凝集は全く生じなかったが、- 2 0 または - 8 0 での 1 回の F / T サイクル後に凝集が生じる (測定するにはシグナル強度があまりに高く、D L S により示す)。これらの試料の外観検査は若干の懸濁を示し、そしてそれは凝集と一致する。T F 2 において調製したベクターについては、4 での保存後または - 2 0 での F / T サイクル 1 0 回まで、凝集は全く観察されない。- 8 0 での 5 および 1 0 回の F / T サイクル後、凝集がいくらか観察される。

40

【 0 0 4 7 】

T F 2 における保存または F / T サイクル後の A A V 活性を、次の通り評価する。上述

50

の通り、高いイオン強度、等張な製剤 T F 2 は、濃縮および保存中のベクターの凝集を効果的に防ぎ、それゆえ、さらなる研究の前途有望な候補を表している。重要な疑問は、高いイオン強度の T F 2 におけるベクターの調製および保存が、その機能活性に反対に影響するかどうかということである。これを評価するために、T F 2 において長時間調製し、保存したベクターの感染価および導入効率を測定するためのアッセイを行う。

【 0 0 4 8 】

感染性については、1 回の感染現象を検出可能な高感度の感染性アッセイを用いる。Zhen, Z. et al. (2004) Human Gene Ther. 15:709-715を参照されたい。A A V 2 - A A D C を濃度 6.4×10^{13} v g / m L にて T F 2 中に調製する。4 にて 4 5 日間保存後、調製物は、感染単位に対するベクターゲノムの比 (v g / I U) 1 3 を有し、これに対して参照ベクターの値は 1 6 v g / I U である。この差は、報告されたこのアッセイの変動性 (R S D ~ 5 0 %) を与えるほど有意ではない。

10

【 0 0 4 9 】

D 7 / 4 細胞を形質導入後、E L I S A により A A D C タンパク質の発現を測定することにより、形質導入効率を評価する。図 3 は、 10 から 10^5 v g / 細胞までの範囲のベクター投入量について、T F 2 において調製したベクターと参照対照との間で有意差がないことを示す。さらに、これらのデータは、高いイオン強度の T F 2 における A A V 2 ベクターの調製および保存が、ベクターの感染性または導入効率に対して有害な効果を有さないことを示す。

20

【 0 0 5 0 】

結論

ウイルス粒子の相互作用に対するイオン強度 (μ) の効果を決定し、ベクターの凝集の機序を解明する。中性緩衝等張食塩水 ($\mu = 150$ m M) のイオン強度は、 $\sim 10^{13}$ 粒子 / m L を超える密度での勾配超遠心または陽イオン交換クロマトグラフィーにより精製した A A V 2 ベクターの凝集を防ぐのに十分である。5 % (w / v) までの濃度の糖 (ソルビトール、スクロース、マンニトール、トレハロース、グリセロール) または界面活性剤 T w e e n 8 0 [登録商標] (1 %) または P l u r o n i c [登録商標] F 6 8 (1 0 %) の含有は、ベクター粒子の凝集を阻止しない。

【 0 0 5 1 】

対照的に、精製中および最終ベクター製剤のために、上昇したイオン強度の溶液 ($\mu > 200$ m M) を用いるとき、ベクター粒子は依然溶解性である。インビボ投与のための等張賦形剤濃縮物を用いた上昇したイオン強度の溶液を、クエン酸ナトリウム、リン酸ナトリウム、および硫酸マグネシウムを含む多価イオンの塩を用いて調製する。10 m M T r i s 、 100 m M クエン酸ナトリウム、0.001 % P l u r o n i c [登録商標] F 6 8 、 p H 8.0 ($\mu \sim 500$ m M) を含有する等張製剤により、A A V 2 - A A D C ベクターを 6.4×10^{13} v g / m L まで濃縮可能であり、調製中および - 20 で凍結融解サイクルを 10 回行った後に観察される凝集が全くない。以下の表 3 および付随の考察を参照されたい。上昇したイオン強度の製剤にて長時間調製し、保存した A A V 2 - A A D C ベクターは、高い感染価 (13 I U / v g) および導入効率を保持する。

30

【 0 0 5 2 】

精製 A A V 2 ベクターのヌクレアーゼ処理は、ベクターの凝集の程度を低減し、このことは粒子間相互作用におけるベクター表面の核酸不純物の関与を示唆する。ゆえに、上昇したイオン強度の等張製剤の使用と組み合わせた、ベクター表面の残りの核酸を有効に除去するための精製方法が、A A V 2 ベクターの凝集を防ぐのに有用な方法である。

40

【 0 0 5 3 】

実施例 1

A A V 精製方法

ヒト凝固因子 I X (F I X) またはヒトアミノ酸デカルボキシラーゼ (A A D C) を発現する A A V 2 ベクターを、既に記載 (Matsushita, T. et al. (1998) Gene Therapy 5: 938-945) の通り (変更含む) 、H E K 2 9 3 細胞のトリプルトランスフェクションによ

50

り生成する。ラージスケールの調製のため、細胞を 850 mm^2 のローラーボトル (Corning) にて培養し、トランスフェクションする。ベクターを3種類の方法のうちの1つで精製する。

【0054】

精製方法1 (Matsushitaから変更されている) において、ローラーボトル中のトランスフェクションしたHEK293細胞を遠心 (1000 g 、15分) により回収し、 10 mM リン酸ナトリウム、 500 mM 塩化ナトリウム、 $\text{pH } 7.2$ に再懸濁し、次に、3回の凍結融解サイクル (エタノール/ドライアイスバスおよび 37°C のウォーターバスを交互) により溶解する。細胞溶解物を遠心 (8000 g 、15分) により清澄化する。次に、 10 mM リン酸ナトリウム、 $\text{pH } 7.2$ を添加して、上清を 200 mM NaCl まで希釈し、Benzonase [登録商標] (Merck, Purity Grade 1; 200 U/mL 、1時間、 37°C) を用いて消化する。溶解物を 25 mM CaCl_2 まで 1 M ストック溶液を用いて調節し、 4°C で1時間インキュベーションする。

10

【0055】

混合物を遠心 (8000 g 、15分) し、ベクターを含有する上清を回収する。清澄化した細胞溶解物からウイルスを沈殿させるために、ポリエチレングリコール (PEG8000) を最終濃度8%まで添加し、混合物を 4°C にて3時間インキュベーションし、次に遠心 (8000 g 、15分) する。ベクターを含有するペレットを、混合しながら 0.15 M NaCl 、 50 mM HEPES、 25 mM EDTA、 $\text{pH } 8.0$ 中に再懸濁し、 4°C で16時間インキュベーションする。再懸濁した材料をプールし、固体塩化セシウムを最終密度 1.40 g/mL まで添加する。次に、BeckmanモデルLE-80遠心機を用いた超遠心 ($\text{SW } 28$ 、 27000 rpm 、24時間、 20°C) により、ベクターをバンド化する。遠心チューブを画分化し、ベクターを含有する密度 1.38 から 1.42 g/mL 部分をプールする。この材料を超遠心 (NVT65ローター、 6500 rpm 、16時間、 20°C) によって2回目のバンド化し、精製AAV2ベクターを含有する分画をプールする。ベクターを濃縮し、バッファー交換を行うために、高濃度塩化セシウム溶液中のベクターを、以下 (実施例2) に記載のタンジェンシャルフローフィルトレーションによる限外ろ過/ダイアフィルトレーション (UF/DF) の対象とする。

20

【0056】

精製方法2において、AAVを含有する細胞回収物をマイクロ流動化し、続いて、 0.65 および $0.22\text{ }\mu\text{m}$ のフィルター (Sartorius) を通してろ過する。既に記載のPoros HS50樹脂を用いた陽イオン交換クロマトグラフィーにより、ウイルスを清澄化細胞溶解物から精製する。米国特許第6,593,123号を参照。図2に記載のヌクレアーゼ消化のために、カラム精製ベクターを、 100 U/mL Benzonase および 10 U/mL DNase I (RNAseフリー、Roche Diagnostics, Indianapolis, Indiana) と共にインキュベーション (4°C 、室温) する。

30

【0057】

精製方法3のため、陽イオン交換クロマトグラフィーにより精製したAAV2ベクターを、さらに塩化セシウム勾配超遠心工程 ($\text{SW } 28$ 、 27000 rpm 、20時間) の対象とし、UF/DF前にエンブティーキャプシドを除去する。

40

【0058】

リアルタイム定量的PCR (Q-PCR) を用いて、上述のAAV調製物を定量する。Sommer, J. M. et al. (2003) Mol. Therapy 7:122-128を参照。3種類の方法それぞれにより精製したベクターを、SDS-PAGE/銀染色分析により分析し、全てのケースで、VP1、VP2、およびVP3が予測した割合で存在し、さらに、キャプシドタンパク質は走査濃度測定により決定した総タンパク質の $>95\%$ を表す。しかしながら、方法2 (カラムクロマトグラフィー) により精製したベクターは、方法1および3により精製した勾配精製AAV2ベクター同様、エンブティーキャプシドを含有し、これは1ベクターゲノム当たり3~10個のエンブティーキャプシド範囲に渡る。

【0059】

50

実施例 2

A A V 2 の凝集を検出するための限外ろ過およびダイアフィルトレーション

使い捨ての中空系タンジェンシャルフローフィルトレーション装置 (Amersham BioSciences 8" Midgee、100 kDa の通常の孔サイズ) を用いて、上述の方法および表 2 に記載の U F / D F 実験について記載の方法により精製した A A V 2 ベクターを濃縮し、ダイアフィルトレーションする。全 U F / D F 方法のため、10 × 生成物容量に該当するダイアフィルトレーションバッファー容量を用い、それを ~ 1 mL ずつの増加にて添加し、ほぼ連続してダイアフィルトレーションする。この方法を用いて、ダイアフィルトレーション後に計測した残りの C s C l は、< 0.5 mM である。

【0060】

U F / D F については、次の 3 種類の製剤：対照製剤 (C F : 140 mM 塩化ナトリウム、10 mM リン酸ナトリウム、5 % ソルビトール、pH 7.3)；試験製剤 1 (T F 1 : 150 mM リン酸ナトリウム、pH 7.5)；および試験製剤 2 (T F 2 : 100 mM クエン酸ナトリウム、10 mM T r i s、pH 8.0) を用いた。表 2 に示す実験について、ベクター濃度 1×10^{13} v g / m L に該当する容量でダイアフィルトレーションを行い、ダイアフィルトレーション後、 2.5×10^{13} v g / m L (ベクターの損失は全くと仮定) に該当する値まで容量を低減する。

【0061】

実験 2 について、 2×10^{13} v g / m L に該当する容量でダイアフィルトレーションを行い、次に、容量を 6.7×10^{13} v g / m L に該当する値に低減する。

【0062】

実験 3 (C F ± B z) について、A A V 2 - A A D C (約 1.2×10^{14} v g) をまず、T F 1 (ヌクレアーゼ活性と適合し得る製剤) にダイアフィルトレーションし、次に、0.22 μm のフィルターに通す。この材料のタイターを決定し、容量を濃度 1×10^{13} v g / m L になるよう調節する。この材料 10 mL に、M g C l₂ を濃度 2 mM まで添加し、次に 2 つの等しいアリコートに分配する。第 1 のアリコートを B e n z o n a s e (200 U / m L、4 時間、R T) と共にインキュベーションし、第 2 のアリコートを偽インキュベーションする。次に、それぞれのアリコートを、ベクター濃度 2×10^{13} v g / m L に該当する容量でダイアフィルトレーションし、次に、目標 3.6×10^{13} v g / m L まで濃縮する。全 U F / D F プロトコルの後、1 % ストックの P l u r o n i c [登録商標] F - 68 (BASF Corp., Mount Olive, NJ) を最終濃度 0.001 % までベクター生成物に添加し、溶液を 0.22 μm のシリンジフィルター (Sartorius) に通す。全 U F / D F 方法を、ラミナーフローキャビネット内で行う。

【0063】

実施例 3

動的光散乱によるベクターの凝集の測定

Protein Solutions DynaPro 99 ($\lambda = 825.4$ nm) を用いた動的光散乱 (D L S) により、精製ベクターを凝集について分析する。1 次データ (粒子半径 - R h、30 サイクル、10 サイクル / 分に渡り測定した平均値) を、報告した分析全てについて用いる。「希釈圧力」法を用いて、ベクター凝集に対する種々の賦形剤の効果を評価する。この方法において、試験希釈液 80 μL をベクター溶液 20 μL に、D L S 測定のために用いる実測用キュベット中で混合しながら添加し、データの収集を混合 10 秒以内に開始する。試験希釈物の添加前に、A A V 2 ベクター調製物の R h 値を測定し、< 15 nm であることを確かめ、出発材料が単量体であることを確認する。100 % 単量体でない試料は、0.22 μm のシリンジディスクフィルター (Sartorius、低タンパク質結合) に通して凝集物を除去する。

【0064】

図 1 および 2 において示す浸透圧およびイオン強度値を、混合物 (すなわち、重量：試験希釈液 (80 %) および出発ベクター製剤 (20 %)) に存在する全ての賦形剤を用いて計算する。浸透圧を、方程式：

10

20

30

40

50

【数 1】

浸透圧 = c_i

(c_i は各溶液種のモル濃度である) により計算する。イオン強度 (μ) を、方程式:

【数 2】

$$\mu = 1/2 \sum c_i z_i^2$$

(z_i は、各種上の荷電である) により計算する。ベクターの凝集を生じる条件 (例えば、低 μ) では、Rh の漸進的増加を一連のデータ回収に渡り観察する。希釈後 3 分間隔で測定した平均 Rh が凝集の信頼可能な測定であることを確認するために、同じ時間間隔での Rh の平均増加速度 ($\Delta Rh / \Delta t$) も決定する (示していない)。 $\Delta Rh / \Delta t$ の分析は、図 1 および 2 に報告した平均 Rh 値を用いて得たものと一致する結果を生じる。

10

【0065】

実施例 4

AAV ビリオンの感染性

AAV2 - AADC ベクターの感染性を既に記載の高感度アッセイを用いて決定する。Zhen, Z. et al. (2004) Human Gene Ther. 15:709-715 を参照されたい。簡単に言うと、試料を連続希釈 (10 倍希釈、10 複製物 / 希釈) し、10% FBS を含有する DME M 培地中 96 ウェル組織培養プレート (Falcon, カタログ番号 353227) にて成長させた D7 / 4 細胞 (AAV rep および cap を発現する改変 HeLa 細胞) に添加する。アデノウイルス (Ad - 5、100 vp / 細胞) を各ウェルに添加し、ヘルパー機能を提供する。48 時間後、各ウェルにおける AAV ベクターの複製を、導入遺伝子特異的プライマーおよびプローブを用いた Q-PCR により定量し、限界希釈における感染頻度を、Karber 法により分析し、感染価を計算する。CF において予め調製し、-80 で保存した参照 AAV2 - AADC と同時に、試験試料を実施する。

20

【0066】

AAV2 ベクターの導入効率を、全細胞 ELISA により定量する。10 から 10^5 vg / 細胞投入量 (5 複製物 / 希釈) に該当する試験試料および参照ベクターの 10 倍連続希釈物を用いて、96 ウェルプレートで成長させた D7 / 4 細胞を感染させる。48 時間後、培地を除去し、細胞を PBS (10 mM リン酸ナトリウム、140 mM 塩化ナトリウム, pH 7.2) 200 μ L で 2 回洗浄する。次に、細胞を透過処理し、0.5% Triton X - 100 および 4% パラホルムアルデヒドを含有する PBS 100 μ L を各ウェルに添加 (15 分) して、固定する。固定液を除去し、0.5% Triton X - 100 を含有する PBS で 2 回、細胞を洗浄する。3% ウシ血清アルブミン (BSA) および 0.5% Triton X - 100 を含有する PBS を添加して、非特異的部位をブロックする (60 分間)。

30

【0067】

洗浄後、細胞をウサギ抗 AADC IgG 抗体 (Chemicon, AB136) と共に 1 時間インキュベーションし、洗浄する。次に、細胞をアルカリホスファターゼ結合ヤギ抗ウサギ IgG と共に 1 時間インキュベーションし、洗浄する。抗体を 1% BSA、0.5% Triton X - 100 を含有する PBS に 1:1000 希釈する。次に、基質 (PNPP, Pierce、カタログ番号 34047) を添加 (1 $\times$ ジエタノールアミン基質バッファー中 1 mg / mL、Pierce、カタログ番号 34064) し、30 分間インキュベーション後、開裂した基質濃度を分光光度法 ($\lambda = 405$ nm) により測定する。ベクター投入量の関数としてのヒト AADC 発現を、スプライン曲線 (SigmaPlot) を用いて近似させる。AAV2 - AADC 参照ベクターを試験試料と同時に測定する。

40

【0068】

本発明の好ましい実例となる実施態様が記載されているが、種々の変更および修飾が、本発明から逸脱することなくその中で成され得ることは当業者に明らかであり、かつ添付の請求の範囲において、本発明の真の精神および範囲内にあるかかる変更および修飾全て

50

をカバーすることが意図される。

【図面の簡単な説明】

【0069】

【図1】図1 Aおよび1 Bは、AAV2-FIX粒子の凝集を示すデータを種々のバッファ組成物についての浸透圧（図1 A）またはイオン強度（図1 B）の関数として表す。AAV2-FIXベクターを実施例1の方法2により調製する。pH 7.5にて10 mMリン酸ナトリウムで緩衝化した各濃度の賦形剤中にベクターを希釈後、平均粒子半径を動的光散乱（DLS）により測定する。賦形剤は、塩化ナトリウム（ ）、クエン酸ナトリウム（ ）、リン酸ナトリウム（ ）、硫酸ナトリウム（ ）、硫酸マグネシウム（ ）、およびグリセロール（ ）を含む。

10

【図2】図2は、AAV2-FIXの凝集についてのデータを精製方法の関数として表す。DLSにより測定され、次に、pH 7.5にて10 mMリン酸ナトリウムで緩衝化した各濃度の塩化ナトリウム中にベクターを希釈後、平均粒子半径を測定する。方法1（2回のCsCl勾配）（ ）；方法2（陽イオン交換クロマトグラフィー）（ ）；方法2 + ヌクレアーゼ消化（ ）；または方法3（クロマトグラフィー + 1回のCsCl勾配）（ ）により、ベクターを精製する。精製方法1～3は、実施例1に記載されている。

【図3】図3は、高いイオン強度製剤（ ）または対照製剤（ ）として調製し、保存したrAAV2-ADCペリオンで形質導入したD7/4細胞からの導入遺伝子の発現についてのデータを表す。形質導入の72時間後にELISA（それぞれのデータポイントについてトリPLICATE）により、ADCの濃度を測定した。エラーバーは標準偏差を表す。

20

【図1】

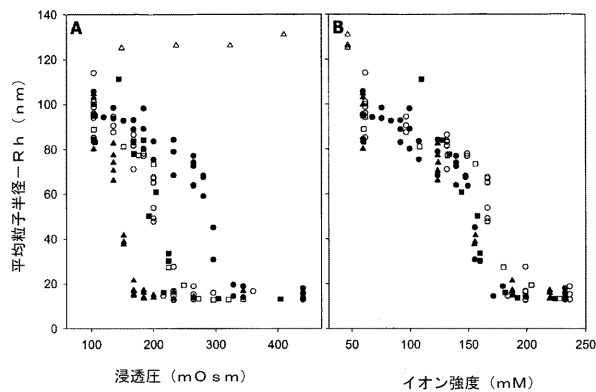


FIGURE 1

【図2】

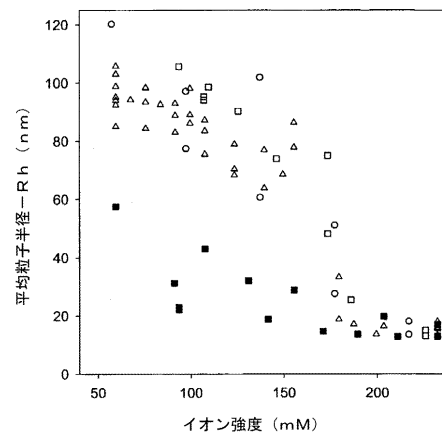


FIGURE 2

【図 3】

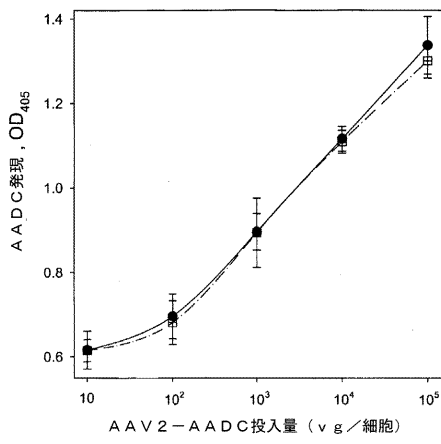


FIGURE 3

フロントページの続き

(72)発明者 ジョン・フレイザー・ライト

アメリカ合衆国 0 8 5 4 0 ニューヨーク州プリンストン、リバー・パーチ・サークル 6 8 番

(72)発明者 ク・グアン

アメリカ合衆国 9 4 5 0 1 カリフォルニア州アラメダ、アパートメント・ディ、リージェント・ストリート 1 1 0 3 番

F ターム(参考) 4B065 AA95X AC20 BD22 BD25 CA44 CA60

4C076 AA12 DD23Q DD26Q DD26Z FF63

4C087 AA10 BC83 CA12 MA05 MA17 NA03

【 外国語明細書 】

WO 2005/118792

PCT/US2005/019235

COMPOSITIONS AND METHODS TO PREVENT AAV VECTOR AGGREGATION

FIELD OF THE INVENTION

The present invention relates to compositions and methods of preparing and storing AAV virions that prevent aggregation.

BACKGROUND

Recombinant adeno-associated virus (rAAV) is a promising vector for human gene transfer. Grimm, D., and Kleinschmidt, J. A. (1999) *Hum Gene Ther.* 10: 2445-2450; High, K. A. (2001) *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 953: 64-67; Pfeifer, A., and Verma, I. M. (2001) *Ann. Rev. Genomics Hum. Genet.* 2: 177-211. AAV is a member of the Dependovirus genus of the parvoviruses. AAV serotype 2 (AAV2) is composed of a single-strand DNA molecule of 4680 nucleotides encoding replication (*rep*) and encapsidation (*cap*) genes flanked by inverted terminal repeat (ITR) sequences. Berns, K. I. (1996) in *Fields Virology* (B. N. Fields *et al.* Eds.), pp. 2173-2197. Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia. The genome is packaged by three capsid proteins (VP1, VP2 and VP3), which are amino-terminal variants of the *cap* gene product. The resulting icosahedral virus particle has a diameter of ~26 nm. A high resolution crystal structure of AAV2 has been reported. Xie, Q. *et al.* (2002) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 99: 10405-10410.

The solubility of purified AAV2 virus particles is limited, and aggregation of AAV2 particles has been described as a problem. Croyle, M. A. *et al.* (2001) *Gene Therapy* 8: 1281-1290; Huang, J. *et al.* (2000) *Mol. Therapy* 1: S286; Wright, J. F. *et al.* (2003) *Curr. Opin. Drug Disc. Dev.* 6: 174-178; Xie, Q. *et al.* (2004) *J. Virol. Methods* 122: 17-27. In commonly used buffered-saline solutions, significant aggregation occurs at concentrations of

WO 2005/118792

PCT/US2005/019235

10^{13} particles/mL, and aggregation increases at higher concentrations. Huang and co-workers reported that AAV vectors undergo concentration-dependent aggregation. Huang, J. *et al.* (2000) *Mol. Therapy* 1: S286. Xie and coworkers (Xie, Q. *et al.* (2004) *J. Virol. Methods* 122: 17-27) similarly reported that at concentrations exceeding 0.1mg/mL, AAV2 vectors require elevated concentrations of salt to prevent aggregation. Aggregation of AAV2 vectors occurs at particle concentrations exceeding 10^{13} particles/mL in commonly used neutral-buffered solutions such as phosphate- and Tris-buffered saline. This corresponds to a protein concentration of ~0.06 mg/mL, and emphasizes the low solubility of AAV2 under these conditions. The effective vector concentration limit may be even lower for vectors purified using column chromatography techniques because excess empty capsids are co-purified and contribute to particle concentration.

Particle aggregation is a significant and not fully resolved issue for adenovirus vectors as well. Stability of a recently established adenovirus reference material (ARM) was recently reported. Adadevoh, K. *et al.* (2002) *BioProcessing* 1(2): 62-69. Aggregation of the reference material, formulated in 20mM Tris, 25 mM NaCl, and 2.5% glycerol at pH 8.0, was assessed by dynamic light scattering, photon correlation spectroscopy and visual appearance. A variable level of vector aggregation following either freeze-thaw cycling or non-frozen storage was observed, resulting in restrictive protocols for the use of the ARM.

Aggregation can lead to losses during purification and inconsistencies in testing of purified vector preparations. The *in vivo* administration of AAV2 vectors to certain sites, such as the central nervous system, may require small volumes of highly concentrated vector, and the maximum achievable dose may be limited by low vector solubility.

Vector aggregation is also likely to influence biodistribution following *in vivo* administration, and cause adverse immune responses to vectors following their administration. As has been reported for proteins (Braun, A. *et al.* (1997) *Pharm. Res.* 14:

WO 2005/118792

PCT/US2005/019235

1472-1478), aggregation of vector may increase immunogenicity by targeting the vector to antigen presenting cells, and inducing enhanced immune responses to the capsid proteins and transgene product. The reports of immune responses to AAV vectors in pre-clinical (Chenuaud, P. *et al.* (2004) *Blood* 103: 3303-3304; Flotte, T. R. (2004) *Human Gene Ther.* 15: 716-717; Gao, G. *et al.* (2004) *Blood* 103: 3300-3302) and clinical (High, K. A. *et al.* (2004) *Blood* 104: 121a) studies illustrate the need to address all factors that may contribute to vector immunogenicity.

Testing protocols to characterize purified vectors are also likely to be affected by vector aggregation. Determination of the infectivity titer of vector was reported to be highly sensitive to vector aggregation. Zhen, Z. *et al.* (2004) *Human Gene Ther.* 15: 709-715. An important concern is that vector aggregates may have deleterious consequences following their *in vivo* administration because their transduction efficiency, biodistribution and immunogenicity may differ from monomeric particles. For example, intravascular delivery of AAV vectors to hepatocytes requires that the vectors pass through the fenestrated endothelial cell lining of hepatic sinusoids. These fenestrations have a radius ranging from 50 to 150 nm (Meijer, K. D. F., and Molema, G. (1995) *Sem. Liver Dis.* 15: 206) that is predicted to allow the passage of monomeric AAV vectors (diameter ~26 nm), but prevent the passage of larger vector aggregates. In biodistribution studies in mice, aggregated AAV2 vectors labeled with the fluorescent molecule Cy3 were sequestered in liver macrophages following vascular delivery. Huang, J. *et al.* (2000) *Mol. Therapy* 1: S286.

Formulation development for virus-based gene transfer vectors is a relatively recent area of investigation, and only a few studies have been reported describing systematic efforts to optimize AAV vector formulation and stability. Croyle, M. A. *et al.* (2001) *Gene Therapy* 8: 1281-1290; Wright, J. F. *et al.* (2003) *Curr. Opin. Drug Disc. Dev.* 6: 174-178; Xie, Q. *et al.* (2004) *J. Virol. Methods* 122: 17-27. Defining formulations compatible with pre-clinical

WO 2005/118792

PCT/US2005/019235

and clinical applications that minimize changes in vector preparations is an important requirement to achieve consistently high vector safety and functional characteristics. As is well established for protein therapeutics (Chen, B. *et al.* (1994) *J. Pharm. Sci.* 83: 1657-1661; Shire, S. J. *et al.* (2004) *J. Pharm. Sci.* 93: 1390-1402; Wang, W. (1999) *Int. J. Pharm.* 185: 129-188; Won, C. M. *et al.* (1998) *Int. J. Pharm.* 167: 25-36), an important aspect of vector stability is solubility during preparation and storage, and vector aggregation is a problem that needs to be fully addressed. Vector aggregation leads to losses during vector purification, and while aggregates can be removed by filtration, the loss in yield results in higher costs and capacity limitations when producing vector for pre-clinical and clinical studies. Even after filtration to remove aggregates, new aggregates can form in concentrated preparations of AAV2 vector in buffered-saline solutions.

The need exists for improved formulations and methods for purification and storage of AAV vectors, such as rAAV2, that prevent aggregation of virus particles.

SUMMARY OF THE INVENTION

These and other needs in the art are met by the present invention, which provides high ionic strength solutions for use in preparing and storing AAV vectors that maintain high infectivity titer and transduction efficiency, even after freeze-thaw cycles.

In one aspect the invention relates to methods of preventing aggregation of virions in a preparation of virions by adding excipients to achieve an ionic strength high enough to prevent aggregation. In another aspect the invention relates to compositions of virions having an ionic strength high enough to prevent aggregation.

In some embodiments of the invention, the ionic strength is at least about 150mM, 200mM, 250mM, 300mM, 350mM, 400mM, 450mM, 500mM, 600mM, 700mM or more. In

WO 2005/118792

PCT/US2005/019235

some embodiments this ionic strength is accomplished using excipients comprising one or more multivalent ions, for example citrate, sulfate, magnesium or phosphate.

In additional embodiments, the osmolarity of the preparation of virions is maintained at near isotonic levels, for example 200mOsm, 250mOsm, 280mOsm, 300mOsm, 350mOsm or 400mOsm, even though the ionic strength is high enough to prevent virion aggregation.

In some embodiments the virions are adeno-associated virus (AAV) virions, for example AAV-2.

In other embodiments of the methods of the present invention preparations of virions are treated with a nuclease, for example Benzonase®. In further embodiments, nuclease treatment is combined with addition of excipients that achieve an ionic strength high enough to prevent aggregation.

In some embodiments of the present invention, the surfactant Pluronic® F68 is added to a preparation of virions, for example to 0.001%. In one embodiment, the composition comprises purified virus particles, 10 mM Tris pH 8.0, 100mM sodium citrate and 0.001% Pluronic® F68.

In one embodiment, AAV vectors can be stored as compositions of the present invention at concentrations exceeding 1×10^{13} vg/mL, for example 2×10^{13} , 3×10^{13} , 4×10^{13} , 5×10^{13} and up to 6.4×10^{13} vg/mL, without significant aggregation. In some embodiments, AAV vectors stored using the methods and compositions of the invention do not exhibit significant aggregation when stored at 4°C for five days. In other embodiments, AAV vectors that are stored as such compositions do not exhibit significant aggregation after one, five, ten or more freeze-thaw cycles at -20°C or at -80°C.

In some embodiments, preparations of virions stored according to the methods and compositions of the invention exhibit an average particle radius (R_h), as measured by dynamic light scattering, indicating that no significant aggregation of virions has taken place.

WO 2005/118792

PCT/US2005/019235

In some embodiments, preparations of virions stored according to the methods and compositions of the invention exhibit an average particle radius (R_h) greater than about 15nm, 20nm, or 30nm.

In some embodiments, recovery of virions from preparations of virions stored according to the methods and compositions of the invention is greater than about 85%, 90% or 95% following filtration through a 0.22 μ m filter.

In yet another aspect, the invention relates to kits comprising the high ionic strength formulations of the invention. In one embodiment the kit comprises a pre-mixed solution of excipients. In another embodiment the kit comprises two or more separate components of a high ionic strength composition of the present invention to be mixed by a user. In some embodiments the kit comprises sodium citrate, Tris[®] and Pluronic[®] F68. In other embodiments, the kit further comprises instructions for making a composition or performing a method of the present invention.

DESCRIPTION OF THE DRAWINGS

FIGS. 1A and 1B present data showing aggregation of AAV2-FIX particles as a function of osmolarity (FIG. 1A) or ionic strength (FIG. 1B) for various buffer compositions. AAV2-FIX vectors are prepared by Method 2 of Example 1. Average particle radius is measured by dynamic light scattering (DLS) following vector dilution in varying concentrations of excipients buffered with 10 mM sodium phosphate at pH 7.5. Excipients include sodium chloride (), sodium citrate (), sodium phosphate (), sodium sulfate (), magnesium sulfate (), and glycerol ().

FIG. 2 presents data on AAV2-FIX aggregation as a function of the method of purification. The average particle radius is measured by DLS following vector dilution in varying concentrations of sodium chloride buffered with 10mM sodium phosphate at pH 7.5.

WO 2005/118792

PCT/US2005/019235

Vectors are purified by Method 1 (double CsCl gradient) (); Method 2 (cation exchange chromatography) (); Method 2 plus nuclease digestion (); or Method 3 (chromatography plus one CsCl gradient) (). Purification Methods 1-3 are described in Example 1.

FIG. 3 presents data on transgene expression from D7/4 cells transduced with rAAV2-AAADC virions prepared and stored in high ionic strength formulation () or in a control formulation (). The concentration of AAADC was measured by ELISA (in triplicate for each data point) 72 hours post-transduction. Error bars represent standard deviations.

DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION

AAV2 vector aggregation is frequently observed in concentrated preparations of vectors and can affect purification recovery, and *in vivo* potency and safety. Hence, an important objective for the development AAV2 vectors is to identify methods and formulations that prevent aggregation of vectors when concentrated stocks are prepared.

Unless otherwise indicated, the term “vector” as used herein refers to a recombinant AAV virion, or virus particle, regardless of the frequent use of “vector” to also refer to non-viral DNA molecules, such as plasmids, in other contexts.

The present invention is based in part on the observation that solution ionic strength is an important parameter in AAV vector aggregation, implicating the involvement of ionic interactions between virus particles in the aggregation process. The observation that elevated ionic strength increases AAV2 vector solubility regardless of the identity of the charged excipient supports the hypothesis that ionic strength of solution *per se*, rather than interactions involving a specific ionic species, is the relevant physico-chemical parameter. A threshold ionic strength of at least 200mM is required to prevent aggregation at vector particle concentrations examined herein.

WO 2005/118792

PCT/US2005/019235

Of practical concern, commonly used buffered saline solutions have insufficient ionic strength to prevent AAV2 vector aggregation at concentrations exceeding 10^{13} particles/mL. It is known that high salt concentrations increase AAV2 vector solubility (e.g. highly concentrated AAV2 vectors recovered from gradients generally remain soluble in concentrated CsCl). However, optimal formulations for pre-clinical and clinical studies should be close to isotonic (280-400 mOsm), especially for *in vivo* administration of vector to sites where dilution of hypertonic solutions may be slow. In embodiments of the present invention the exponential relationship of ionic strength with charge valency is used to develop isotonic formulations with high ionic strengths. Salt species with multiple charge valencies (e.g. salts of sulfate, citrate, and phosphate) that are commonly used as excipients in human parenteral formulations can provide the level of ionic strength needed to prevent AAV2 vector aggregation when used at isotonic concentrations. While isotonic (150mM) sodium chloride has an ionic strength of 150mM, a value insufficient to maintain AAV2 solubility at high vector concentrations, isotonic sodium citrate, with an ionic strength of ~500mM, can support AAV2 vector concentrations of at least 6.4×10^{13} vg/mL without aggregation.

Without intending to be limited by theory, the low solubility of AAV2 particles may be caused by their highly symmetrical nature in conjunction with the stabilizing effect of complementary charged regions between neighbouring particles in aggregates. The surface charge density based on the crystal structure of AAV2 (Xie, Q. *et al.* (2002) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 99: 10405-10410) reveals a pattern of positive and negative charges on the virus surface. Previous reports have shown that AAV2 vector aggregation is pH dependent, and hypothesized that amino acids with charged side groups are involved in inter-particle binding. Qu, G. *et al.* (2003) *Mol. Therapy* 7: S238. These reports hypothesized that if charged amino acid side chains are involved in vector aggregation, high concentrations of free amino acids

WO 2005/118792

PCT/US2005/019235

could block vector particle interactions. However, we have found that amino acids with charged side chains are not effective in preventing AAV2 vector aggregation beyond their contribution to ionic strength.

Vector aggregation at low ionic strength was also found to be reduced but not prevented by efficient nuclease treatment of purified vector particles. Digestion at an earlier stage of the purification process (clarified HEK cell lysate) did not reduce aggregation following vector purification. It is likely that digestion of already purified virions is more efficient because of a higher enzyme to nucleic acid substrate ratio. One mechanism to explain these results is that residual nucleic acid impurities (e.g. host cell and plasmid DNA) bound to the vector surface can bridge to binding sites on neighbouring virus particles and thus cause aggregation. Purified AAV2 vectors (empty capsid free) have been reported to contain approximately 1% non-vector DNA. Smith, P. *et al.* (2003) *Mol. Therapy* 7: S348. While >50% of this non-vector DNA was reported to be nuclease resistant and was packaged within capsid particles, some impurity DNA was nuclease resistant and appeared to be associated with the surface of purified vector particles. The observation that efficient nuclease treatment can reduce vector aggregation suggests that nucleic acids associated with the vector surface at an average level not greater than ~25 nucleotides per vector particle can contribute to AAV vector aggregation.

In summary, the use of high ionic strength solutions during AAV2 vector purification and final formulation, and efficient removal of residual vector surface DNA are two effective strategies to achieve highly concentrated solutions of AAV2 vectors for use in pre-clinical and clinical studies. High ionic strength solutions and nuclease treatment can be used in combination or separately. Although data were obtained using AAV2 vectors, the composition and methods of the present invention may also be useful with other AAV serotypes / variants, or other viral vectors such as adenoviruses, lentiviruses and retroviruses.

WO 2005/118792

PCT/US2005/019235

AAV Aggregation as a Function of Excipient Concentration

Initial screening experiments are performed to elucidate the mechanism of AAV vector aggregation and to identify classes of excipients that can reduce / prevent aggregation. Vector aggregation can be caused by dilution (5-fold) of vector in neutral-buffered saline with low concentration buffer (20mM sodium phosphate, pH 7.2). Excipients are screened using this “dilution-stress” method to identify excipients that are able to prevent vector aggregation when included in the diluent. For screening, aggregation is measured by dynamic light scattering (DLS). Classes of excipients examined included selected inorganic salts, amino acids, uncharged carbohydrates, and surfactants. Results are presented in Table 1.

WO 2005/118792

PCT/US2005/019235

TABLE 1

SCREENING FOR EXCIPIENTS THAT PREVENT AAV2 VECTOR AGGREGATION
USING DILUTION-STRESS METHOD

Excipient	Osm required to prevent aggregation (max tested)
Magnesium sulfate	180 mOsm
Sodium citrate	220 mOsm
Sodium chloride	320 mOsm
Sodium phosphate	220 mOsm
Sodium sulfate	220 mOsm
Arginine	NIA (200 mOsm)
Aspartic acid	320 mOsm
Glutamic acid	320 mOsm
Glycine	NIA (200 mOsm)
Histidine	NIA (200 mOsm)
Lysine	300 mOsm
Glycerol	NIA (5% w/v, 543 mOsm)
Iodixanol	NIA (5% w/v, 32 mOsm)
Mannitol	NIA (5% w/v, 275 mOsm)
Sorbitol	NIA (5% w/v, 275 mOsm)
Sucrose	NIA (5% w/v, 146 mOsm)
Trehalose	NIA (5% w/v, 146 mOsm)
Pluronic® F68	NIA (10% w/v, 12 mOsm)
Polysorbate 80	NIA (1% w/v)

NIA: No inhibition of aggregation

WO 2005/118792

PCT/US2005/019235

As illustrated in Table 1, charged excipients (inorganic salts and amino acids) prevent aggregation when present at sufficient concentrations. However, salt concentrations required to prevent vector aggregation vary, ranging from 180 mOsm for magnesium sulfate, to 320 mOsm for sodium chloride. The amino acids arginine, aspartic acid, glutamic acid, glycine, histidine, and lysine do not prevent aggregation at 200 mOsm, but lysine, aspartic acid, and glutamic acid prevent aggregation at 300-320 mOsm. Arginine, glycine and histidine were not tested at concentrations other than 200 mOsm. Selected carbohydrates have no effect on vector particle aggregation when present at concentrations up to 5% w/v. For example, 5% w/v glycerol (543 mOsm) does not prevent aggregation. The surfactants Polysorbate80 (1% w/v) and Pluronic® F68 (10% w/v) similarly have no effect on aggregation using the “dilution-stress” method.

AAV Aggregation as a Function of Osmolarity and Ionic Strength

FIGS. 1A and 1B show the results of a more detailed analysis of vector aggregation as a function of the concentration of various salts. FIG. 1A shows vector aggregation as a function of the osmolarity of selected excipients. For charged species a concentration-dependent inhibition of AAV2 vector aggregation is observed. Salts with multivalent ions achieve a similar degree of inhibition of aggregation at lower concentrations than monovalent sodium chloride. For example, magnesium sulfate prevents aggregation at 200 mOsm whereas sodium chloride requires 350 mOsm to achieve a similar effect. Sodium citrate, sodium sulfate, and sodium phosphate are intermediate in their potency to prevent vector aggregation.

Although the results in FIG. 1A and Table 1 show no effect of glycerol and certain sugars at concentrations up to 5% on AAV2 vector aggregation induced by low ionic

WO 2005/118792

PCT/US2005/019235

strength, the data cannot rule out improvement of AAV2 solubility at glycerol concentrations above 5%. For example, Xie and co-workers reported that 25% (w/v) glycerol enabled concentration of AAV2 to very high concentrations (4.4 to 18×10^{14} particles/ml) in low ionic strength solutions. Xie, Q. *et al.* (2004) *J. Virol. Methods* 122: 17-27.

FIG. 1B shows the data of FIG. 1A plotted as a function of the calculated ionic strength, rather than osmolarity, for each excipient. FIG. 1B demonstrates that vector aggregation is prevented when ionic strength is ~ 200 mM or greater regardless of which salt is used. These data suggested that the ionic strength (μ) of a solution, a parameter that depends on both solute concentration and charge valency, is the primary factor affecting aggregation.

Ionic strengths useful to prevent aggregation in embodiments of the present invention include, for example, 250 mM, 300 mM, 350 mM, 400 mM, 450 mM, 500 mM, 600 mM, 700 mM or higher ionic strengths. Multivalent ions are preferred to achieve these ionic strengths in methods and formulations of the present invention, such as divalent, trivalent, tetravalent, pentavalent ions and ions of even higher valency. The pH buffer in solutions and formulations of the present invention may be phosphate, Tris, or HEPES (or other Good's buffers), but any other suitable pH buffer may be used. In preferred embodiments, the multivalent ions and buffer are selected to be compatible with the target tissue for the vector being prepared.

Use of multivalent ions in the methods and compositions of the invention makes it possible to create compositions of high ionic strength but relatively low osmolarity. High ionic strength compositions of the present invention may be nearly isotonic, and may be, for example, about 200mOsm, 250mOsm, 280mOsm, 300mOsm, 350mOsm or 400mOsm, although other osmolarities may be acceptable for some uses of the compositions.

WO 2005/118792

PCT/US2005/019235

AAV Aggregation as a Function of the Method of AAV Purification

Recombinant AAV2 purified using different methods (e.g. density gradient purification versus ion-exchange chromatography) would be expected to have different impurity profiles. FIG. 2 shows vector aggregation as a function of ionic strength for several preparations of AAV differing in the purification method. Purification methods are described in Example 1. Sodium chloride is used to vary the ionic strength. AAV2-FIX vectors purified by double cesium chloride gradient ultracentrifugation (Method 1), by cation exchange column chromatography (Method 2), or by combined column and cesium chloride gradient ultracentrifugation (Method 3) each demonstrate similar aggregation responses as ionic strength is decreased. In contrast, AAV2-FIX purified by the column method and then subjected to a nuclease digestion step (Method 2 + nuclease) shows reduced aggregation at low ionic strength.

AAV Aggregation at Preparative Scale

The data in Table 1 and FIGS. 1A, 1B and 2 involve vector aggregation *at an analytical scale*, employing DLS to measure aggregation. Table 2, in contrast, shows the effects of elevated ionic strength and nuclease treatment on AAV2 vector aggregation at a larger scale, using methods to induce and quantify vector aggregation that are relevant to *preparative scale* vector purification. Experimental details are provided in Example 2. Purified AAV vectors are diafiltered into solutions of various ionic strengths, the volume is reduced to achieve high vector concentrations, and aggregation is then assessed by measuring vector recovery after filtration through a 0.22µm filter. Aliquots from a single pool of AAV2-AADC vector purified by Method 1 through the second CsCl gradient centrifugation step (1.8×10^{15} vg in 91mL, 1.8×10^{13} vg/mL, in ~3M CsCl) are used as starting material in the diafiltration experiments. Tangential flow filtration using hollow fibers is used for

WO 2005/118792

PCT/US2005/019235

diafiltration because it is scalable and yet it still enables preparation of volumes (min.

1.4mL), and thus AAV concentrations, at which aggregation would be expected in neutral buffered saline.

In Experiment 1, three hollow fiber units are used to diafilter AAV2-AADC vector in formulations CF, TF1, or TF2, and the volume is reduced to a target of 2.5×10^{13} vg/mL. See Example 2. The samples are then filtered through a $0.22 \mu\text{m}$ filter. Results are shown in Table 2. Vector recovery ("Yield %") for both elevated ionic strength formulations TF1 ($95 \pm 7.4\%$) and TF2 ($93 \pm 7.4\%$) are significantly higher than the recovery using the control formulation CF ($77 \pm 6.6\%$).

TABLE 2
AAV VECTOR RECOVERY AT PROCESS SCALE

Experiment	Formulation	μ (mM)	Target (vg/mL)	Actual (vg/mL)	Yield % (RSD)
1	CF	160	2.5E13	1.93E13	77 (6.6)
1	TF1	310	2.5E13	2.38E13	95 (7.4)
1	TF2	510	2.5E13	2.33E13	93 (7.4)
2	CF	160	6.7E13	3.98E13	59 (6.0)
2	TF2	510	6.7E13	6.42E13	96 (4.4)
3	CF (-Bz)	160	3.6E13	2.46E13	68 (11)
3	CF (+Bz)	160	3.6E13	3.29E13	91 (12)

In Experiment 2, AAV2-AADC is concentrated to a higher target value (6.7×10^{13} vg/mL) in CF or TF2. Vector recovery using TF2 ($96 \pm 4.4\%$) is again significantly higher than recovery using CF ($59 \pm 6.0\%$). Within the variability of the assays used, vector was recovered fully at both target concentrations using TF2, indicating that aggregation was prevented. In contrast, significant aggregation was observed at both target concentrations using CF, and the extent of aggregation (i.e. loss following $0.22 \mu\text{m}$ filtration) was higher at the higher target vector concentration. In an additional experiment (not shown), $50 \mu\text{L}$

WO 2005/118792

PCT/US2005/019235

samples of AAV2 vector are taken following concentration but prior to the 0.22 μ m filtration step of Experiment 2, and examined by light microscopy. Vector concentrated in CF contains obvious amounts of visible material (not shown), while no such material is seen in vector concentrated in TF2.

Experiment 3 examines the effect of prior nuclease digestion of purified vector on aggregation. In the absence of nuclease digestion recovery of AAV2-AADC in CF is $68 \pm 11\%$, similar to the recoveries in Experiments 1 and 2. In contrast, purified vector treated with nuclease and then concentrated in CF gives higher recovery ($91 \pm 12\%$). These prep scale results reflect the same effect of nuclease digestion shown in FIG. 2 using the "dilution-stress" (analytical scale) method.

The results presented in Table 2 demonstrate that the methods and compositions of the present invention increase the recovery of AAV vector recovery. For example, in various embodiments of the present invention, recovery is improved from less than about 80% to at least about 85%, 90%, 95% or more.

AAV Stability and Activity Following Storage or Freeze-Thaw Cycling

Croyle and coworkers reported a significant loss of titer of AAV and adenovirus following multiple freeze-thaw cycling in sodium phosphate buffer, and demonstrated that the better pH buffering provided by potassium phosphate during freeze-thaw cycling prevented titer loss. Croyle, M. A. *et al.* (2001) *Gene Therapy* 8: 1281-1290. Results of our freeze-thaw stability study using sodium phosphate support these findings. We find that while 150mM sodium phosphate provides sufficient ionic strength to prevent aggregation during preparation and non-frozen storage of concentrated AAV2-AADC vector, even a single freeze-thaw cycle at -20 or -80 °C results in aggregation.

WO 2005/118792

PCT/US2005/019235

AAV stability after storage or freeze-thaw (F/T) cycling is assessed in buffers of the present invention as follows. The concentrated vectors prepared in CF, TF1, and TF2 (Table 2, Experiment 1) are subjected to a short stability study to investigate whether aggregation will occur during refrigerated storage, or following multiple freeze-thaw (F/T) cycles. Aggregation is assessed by DLS using undiluted samples, and *R_h* values >20nm are deemed to indicate the occurrence of some level of aggregation.

TABLE 3
STABILITY OF AAV2 VECTORS

Formulation	Particle radius – <i>R_h</i> (nm)							
	Pre	4 °C	- 20 °C			- 80 °C		
		5d	1 F/T	5 F/T	10 F/T	1 F/T	5 F/T	10 F/T
CF	14.5	27.0	22.4	56.1	94.5	20.6	57.5	141
TF1	13.8	16.3	TH	TH	TH	TH	TH	TH
TF2	13.8	14.4	14.2	14.0	14.1	13.8	21.3	50.9

Pre: DLS radius measured immediately following 0.2µm filtration.

Vector concentrations (vg/mL): CF: 1.93E13, TF1: 2.38E13, TF2: 2.33E13.

TH: signal intensity is too high to measure because of extensive aggregation.

As shown in Table 3, AAV2-AADC vector prepared in CF shows some aggregation after 5 days of storage at 4 °C, as well as following one or more F/T cycles at -20 or -80°C. For vector prepared in TF1, no aggregation occurs after 5 days at 4°C, but aggregation occurs following a single F/T cycle at -20 or -80 °C as indicated by a DLS signal intensity that is too high to measure. Visual inspection of these samples reveals slight cloudiness, which is consistent with aggregation. For vector prepared in TF2, no aggregation is observed at 4 °C, or following up to 10 F/T cycles at -20 °C. Some aggregation is observed following 5 and 10 F/T cycles at -80 °C.

WO 2005/118792

PCT/US2005/019235

AAV activity after storage or F/T cycling in TF2 is assessed as follows. As described above, the high ionic strength, isotonic formulation TF2 effectively prevents vector aggregation during concentration and storage, and therefore represents a promising candidate for further study. An important question is whether preparation and storage of the vector in high ionic strength TF2 would adversely affect its functional activity. To assess this, assays are performed to measure the infectious titer and the transduction efficiency of vectors prepared and stored for an extended period of time in TF2.

For infectivity, a highly sensitive infectivity assay capable of detecting single infectious events is used. Zhen, Z. *et al.* (2004) *Human Gene Ther.* 15: 709-715. AAV2-AADC is prepared in TF2 at a concentration of 6.4×10^{13} vg/mL. After being stored for 45 days at 4 °C the preparation has a vector genome to infectious unit ratio (vg/IU) of 13, compared to a value of 16 vg/IU for the reference vector. This difference is not significant given the reported variability of this assay (RSD ~50%).

Transduction efficiency is assessed by measuring the expression of AADC protein by ELISA following transduction of D7/4 cells. FIG. 3 shows no significant difference between vector prepared in TF2 and the reference control for vector input ranging from 10 to 10^5 vg/cell. Together, these data indicate that preparation and storage of AAV2 vectors in high ionic strength TF2 does not have a deleterious effect on vector infectivity or transduction efficiency.

Conclusion

The effect of ionic strength (μ) on virus particle interactions is determined to elucidate the mechanism of vector aggregation. The ionic strength of neutral-buffered isotonic saline ($\mu = 150\text{mM}$) is insufficient to prevent aggregation of AAV2 vectors purified by gradient ultracentrifugation or by cation exchange chromatography at concentrations exceeding $\sim 10^{13}$

WO 2005/118792

PCT/US2005/019235

particles/mL. Inclusion of sugars (sorbitol, sucrose, mannitol, trehalose, glycerol) at concentrations up to 5% (w/v) or of surfactants Tween80® (1%) or Pluronic® F68 (10%) does not prevent aggregation of vector particles.

In contrast, vector particles remain soluble when elevated ionic strength solutions ($\mu > 200\text{mM}$) are used during purification and for final vector formulation. Elevated ionic strength solutions using isotonic excipient concentrations for *in vivo* administration are prepared with salts of multivalent ions, including sodium citrate, sodium phosphate, and magnesium sulfate. An isotonic formulation containing 10mM Tris, 100mM sodium citrate, 0.001% Pluronic® F68, pH 8.0 ($\mu \sim 500\text{mM}$) enables concentration of AAV2-AADC vectors to 6.4×10^{13} vg/mL with no aggregation observed during preparation and following ten freeze-thaw cycles at -20°C . See Table 3, below, and accompanying discussion. AAV2-AADC vectors prepared and stored for an extended period in elevated ionic strength formulation retain high infectivity titer (13 IU/vg) and transduction efficiency.

Nuclease treatment of purified AAV2 vectors reduces the degree of vector aggregation, implicating vector surface nucleic acid impurities in inter-particle interactions. Hence, purification methods to efficiently remove vector surface residual nucleic acids, coupled with the use of elevated ionic strength isotonic formulations, are useful methods to prevent AAV2 vector aggregation.

EXAMPLE 1

AAV PURIFICATION METHODS

AAV2 vectors expressing human coagulation factor IX (FIX) or human amino acid decarboxylase (AADC) are produced by triple transfection of HEK293 cells as previously described (Matsushita, T. *et al.* (1998) *Gene Therapy* 5: 938-945), with modifications. For

WO 2005/118792

PCT/US2005/019235

the large scale preparations, cells are cultured and transfected in 850 mm² roller bottles (Corning). Vectors are purified by one of three methods.

In purification Method 1, modified from Matsushita, transfected HEK293 cells in roller bottles are collected by centrifugation (1000g, 15min), resuspended in 10mM sodium phosphate, 500mM sodium chloride, pH 7.2, and lysed by three freeze / thaw cycles (alternating an ethanol / dry ice bath and a 37°C water bath). The cell lysate is clarified by centrifugation (8,000g, 15 min). The supernatant is then diluted to 200mM NaCl by addition of 10mM sodium phosphate, pH 7.2, and digested with Benzonase® (Merck, Purity Grade 1; 200 U/mL, 1h, 37 °C). The lysate is adjusted to 25mM CaCl₂ using a 1M stock solution, and incubated at 4°C for one hour.

The mixture is centrifuged (8,000g, 15 min), and the supernatant containing vector is collected. To precipitate virus from the clarified cell lysate, polyethylene glycol (PEG8000) is added to a final concentration of 8%, the mixture incubated at 4°C for three hours, and then centrifuged (8,000g, 15 min). The pellets containing vector are re-suspended with mixing in 0.15M NaCl, 50mM Hepes, 25mM EDTA, pH 8.0 and incubated at 4°C for 16 hours. The resuspended material is pooled, and solid cesium chloride is added to a final density of 1.40 gm/ml. Vector is then banded by ultracentrifugation (SW28, 27,000rpm, 24h, 20°C) using a Beckman model LE-80 centrifuge. The centrifugation tubes are fractionated, and densities from 1.38 to 1.42 gm/mL containing vector are pooled. This material is banded a second time by ultracentrifugation (NVT65 rotor, 65,000 rpm, 16h, 20°C), and fractions containing purified AAV2 vectors are pooled. To concentrate vector and to perform buffer exchange, vectors in concentrated cesium chloride solution are subjected to ultrafiltration / diafiltration (UF/DF) by tangential flow filtration as described below (Example 2).

In purification Method 2, cell harvests containing AAV are microfluidized and filtered sequentially through 0.65 and 0.22 µm filters (Sartorius). Virus is purified from the

WO 2005/118792

PCT/US2005/019235

clarified cell lysates by cation exchange chromatography using Poros HS50 resin as previously described. U.S. Pat. No. 6,593,123. For the nuclease digestion described in FIG. 2, column-purified vectors are incubated (4h, RT) with 100 U/mL Benzonase and 10 U/mL DNase I (RNase free, Roche Diagnostics, Indianapolis, Indiana).

For purification Method 3, AAV2 vectors purified by cation exchange chromatography are subjected to an additional cesium chloride gradient ultracentrifugation step (SW28, 27,000rpm, 20h) to remove empty capsids prior to UF/DF.

Real time quantitative PCR (Q-PCR) is used to quantify AAV preparations as previously described. Sommer, J. M. *et al.* (2003) *Mol. Therapy* 7: 122-128. Vectors purified by each of the three methods are analyzed by SDS-PAGE / silver staining analysis, and in all cases VP1, VP2 and VP3 are present in the expected ratios, with the capsid proteins representing >95% of total proteins as determined by scanning densitometry. However, unlike gradient-purified AAV2 vectors purified using Methods 1 and 3, vectors purified by Method 2 (column chromatography) contain empty capsids, ranging from 3-10 empty capsids per vector genome.

EXAMPLE 2

ULTRAFILTRATION AND DIAFILTRATION TO DETECT AAV AGGREGATION

Disposable hollow fiber tangential flow filtration devices (Amersham BioSciences 8" Midgee, 100 kDa nominal pore size) are used to concentrate and diafilter AAV2 vectors purified by the methods described above, and for the UF/DF experiments described in Table 2. For all UF/DF procedures a volume of diafiltration buffer corresponding to 10x the product volume is used, and it is added in ~1mL increments to approximate continuous diafiltration. Using this method, the calculated residual CsCl after diafiltration is <0.5mM.

WO 2005/118792

PCT/US2005/019235

The following three formulations were used for UF/DF: Control Formulation (CF: 140mM sodium chloride, 10mM sodium phosphate, 5% sorbitol, pH 7.3); Test Formulation 1 (TF1: 150mM sodium phosphate, pH7.5); and Test Formulation 2 (TF2: 100 mM sodium citrate, 10mM Tris, pH8.0). For Experiment 1 shown in Table 2, diafiltration is performed at a volume corresponding to a vector concentration of 1×10^{13} vg/mL, and following diafiltration the volume is reduced to a value corresponding to 2.5×10^{13} vg/mL (assuming no vector loss).

For Experiment 2, diafiltration is performed at a volume corresponding to a 2×10^{13} vg/mL, and the volume is then reduced to a value corresponding to 6.7×10^{13} vg/mL.

For Experiment 3 (CF $\pm$ Bz), AAV2-AADC (approximately 1.2×10^{14} vg) is first diafiltered into TF1 (a formulation compatible with nuclease activity) and then passed through a 0.22 μ m filter. The titer of this material is determined, and the volume is adjusted to correspond to a concentration of 1×10^{13} vg/mL. To 10 mL of this material, $MgCl_2$ is added to a concentration of 2 mM, and then divided into two equal aliquots. One aliquot is incubated with Benzonase (200 U/mL, 4h, RT), and the second is mock-incubated. Each aliquot is then diafiltered at a volume corresponding to a vector concentration 2×10^{13} vg/mL, and then concentrated to a 3.6×10^{13} vg/mL target. Following all UF/DF protocols, Pluronic[®] F-68 (BASF Corp., Mount Olive, NJ) from a 1% stock is added to the vector product to a final concentration of 0.001%, and the solution is passed through a 0.22 μ m syringe filter (Sartorius). All UF/DF procedures are performed in a laminar flow cabinet.

WO 2005/118792

PCT/US2005/019235

EXAMPLE 3

MEASUREMENT OF VECTOR AGGREGATION BY
DYNAMIC LIGHT SCATTERING

Purified vectors are analyzed for aggregation by dynamic light scattering (DLS) using a Protein Solutions *DynaPro 99* ($\lambda=825.4$ nm). Primary data (particle radius – Rh , average value measured over 30 cycles, 10 cycles/min) are used for all analyses reported. A “dilution-stress” method is used to assess the effect of varying excipients on vector aggregation. In this method, 80 μ L of test diluent is added to 20 μ L of vector solution with mixing in the actual cuvette used for DLS measurement, and data collection is initiated within 10 seconds of mixing. Prior to addition of test diluents, the Rh value for AAV2 vector preparations is measured and confirmed to be <15 nm to ensure that the starting material is monomeric. Samples that are not 100% monomeric are passed through a 0.22 μ m syringe disc filter (Sartorius, low protein binding) to remove aggregates.

The osmolarity and ionic strength values given in FIGS. 1 and 2 are calculated using all excipients present in the mixture (i.e. weighted: test diluent (80%) and starting vector formulation (20%)). Osmolarity is calculated according to the equation: $\text{Osmolarity} = \sum c_i$, where c_i is the molar concentration of each solute species. The ionic strength (μ) is calculated according to the equation: $\mu = \frac{1}{2} \sum c_i z_i^2$, where z_i is the charge on each species. In conditions that resulted in vector aggregation (e.g. low μ) a progressive increase in Rh is observed over the course of data collection. To validate the use of the average Rh measured over the 3 minute interval following dilution as a reliable measure of aggregation, the average rate of increase of Rh ($\Delta Rh / \Delta t$) over the same time interval is also determined (not shown). Analysis of $\Delta Rh / \Delta t$ gives results concordant with those obtained using the average Rh value reported in FIGS. 1 and 2.

WO 2005/118792

PCT/US2005/019235

EXAMPLE 4

AAV VIRION INFECTIVITY

Infectivity of AAV2-AADC vectors is determined using a highly sensitive assay as previously described. Zhen, Z. *et al.* (2004) *Human Gene Ther.* 15: 709-715. Briefly, samples are serially diluted (10-fold dilutions, 10 replicates / dilution) and added to D7/4 cells (modified HeLa cells expressing AAV *rep* and *cap*) grown in 96 well tissue culture plates (Falcon, cat. #353227) in DMEM medium containing 10% FBS. Adenovirus (Ad-5, 100 vp/cell) is added to each well to provide helper functions. After 48h, replication of AAV vector in each well is quantified by Q-PCR using transgene-specific primers and probes, and the frequency of infection at limiting dilution is analyzed by the Karber method to calculate the infectivity titer. The test sample is run concurrently with an AAV2-AADC reference previously prepared in CF and stored at -80 °C.

The transduction efficiency of AAV2 vectors is quantified by a whole cell ELISA. D7/4 cells grown in 96 well plates are infected with 10-fold serial dilutions of the test sample and reference vector, corresponding to 10 to 10⁵ vg / cell input (5 replicates / dilution). After 48h, the culture medium is removed, and cells are washed twice with 200 µL PBS (10 mM sodium phosphate, 140mM sodium chloride, pH 7.2). Cells are then permeabilized and fixed by addition of 100µL of PBS containing 0.5% Triton X-100 and 4% paraformaldehyde to each well (15 min). The fixing solution is removed, and the cells are washed twice with PBS containing 0.5% Triton X-100. Non-specific sites are blocked by adding PBS containing 3% bovine serum albumin (BSA) and 0.5% Triton X-100 (60min).

After washing, cells are incubated for one hour with rabbit anti-AADC IgG antibody (Chemicon, AB136), and washed. Cells are then incubated for one hour with alkaline phosphatase-conjugated goat anti-rabbit IgG, and washed. Antibodies are diluted 1:1000 in PBS containing 1% BSA, 0.5% Triton X-100. Substrate (PNPP, Pierce, cat. #34047) is then

WO 2005/118792

PCT/US2005/019235

added (1 mg/mL in 1X diethanolamine substrate buffer, Pierce, cat. #34064), and after incubation for 30min the concentration of cleaved substrate is measured spectrophotometrically ($\lambda=405\text{nm}$). Human AADC expression as a function of vector input is fitted using a spline curve (SigmaPlot). The AAV2-AADC reference vector is measured concurrently with the test sample.

While preferred illustrative embodiments of the present invention are described, it will be apparent to one skilled in the art that various changes and modifications may be made therein without departing from the invention, and it is intended in the appended claims to cover all such changes and modifications that fall within the true spirit and scope of the invention.

WO 2005/118792

PCT/US2005/019235

We claim:

1. A method of preventing aggregation of virions in a preparation of virions, comprising adding one or more excipients to the preparation of virions to achieve an ionic strength of at least about 200 mM.
2. The method of claim 1, wherein the virions are AAV virions.
3. The method of claim 1, further comprising treating said preparation of virions with a nuclease.
4. The method of claim 3, wherein the nuclease is Benzonase[®].
5. The method of claim 1, wherein one or more of the excipients comprises a multivalent ion.
6. The method of claim 5, wherein the multivalent ion is citrate.
7. The method of claim 1, wherein the osmolarity of the preparations of virions after addition of the one or more excipients is no greater than about 280mOsm.
8. The method of claim 1, wherein, after addition of the one or more excipients, the average particle radius (*R_h*) of the virions in the preparation of virions is less than about 20nm as measured by dynamic light scattering.
9. The method of claim 1, wherein, after addition of the one or more excipients, recovery of the virions is at least about 90% following filtration of the preparations of virions through a 0.22μm filter.
10. A composition for the storage of purified virus particles, comprising:
 - purified virus particles;
 - a pH buffer; and
 - excipients comprising one or more multivalent ions; wherein the ionic strength of the composition is greater than about 200 mM.

WO 2005/118792

PCT/US2005/019235

11. The composition of claim 10, wherein the purified virus particles are AAV virus particles.
12. The composition of claim 10, wherein one of the one or more multivalent ions is citrate.
13. The composition of claim 10, further comprising Pluronic® F68.
14. The composition of claim 13, wherein the Pluronic® F68 is present at 0.001%.
15. The composition of claim 10, wherein the pH buffer is 10 mM Tris, pH 8.0 and the excipients comprise 100 mM sodium citrate.
16. The composition of claim 10, wherein the average particle radius (R_h) of the purified virus particles is less than about 20nm as measured by dynamic light scattering.
17. The composition of claim 10, wherein recovery of the purified virus particles is at least about 90% following filtration of the composition of virions through a 0.22 μ m filter.
18. A method of preventing aggregation of virions in a preparation of virions, comprising treating said preparation of virions with Benzonase®.
19. The method of claim 18, wherein, after Benzonase® treatment, the average particle radius (R_h) of the virions in the preparation of virions is less than about 20nm as measured by dynamic light scattering.
20. The method of claim 18, wherein, after Benzonase® treatment, recovery of the virions is at least about 90% following filtration of the preparation of virions through a 0.22 μ m filter.

(57) Abstract: Compositions and methods are provided for preparation of concentrated stock solutions of AAV virions without aggregation. Formulations for AAV preparation and storage are high ionic strength solutions (e.g. $\mu \sim 500\text{mM}$) that are nonetheless isotonic with the intended target tissue. This combination of high ionic strength and modest osmolarity is achieved using salts of high valency, such as sodium citrate. AAV stock solutions up to 6.4×10^{13} vg/mL are possible using the formulations of the invention, with no aggregation being observed even after ten freeze-thaw cycles. The surfactant Pluronic® F68 may be added at 0.001% to prevent losses of virions to surfaces during handling. Virion preparations can also be treated with nucleases to eliminate small nucleic acid strands on virions surfaces that exacerbate aggregation.

WO 2005/118792

PCT/US2005/019235

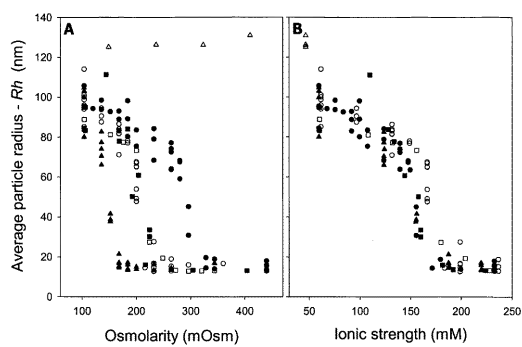


FIGURE 1

1/3

WO 2005/118792

PCT/US2005/019235

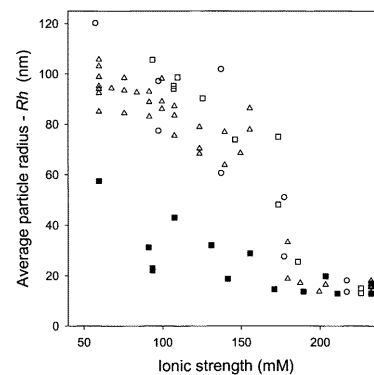


FIGURE 2

2/3

WO 2005/118792

PCT/US2005/019235

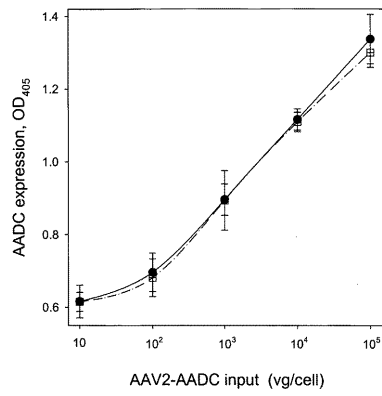


FIGURE 3