

(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)(11) 공개번호 10-2023-0122076
(43) 공개일자 2023년08월22일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 48/00 (2006.01) A61K 38/37 (2006.01)
A61K 47/02 (2006.01) A61K 47/10 (2017.01)
A61K 47/26 (2017.01) A61K 9/00 (2006.01)
A61K 9/08 (2006.01) A61P 7/04 (2006.01)
C12N 15/86 (2006.01)

(52) CPC특허분류

A61K 48/0008 (2013.01)
A61K 38/37 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2023-7023859

(22) 출원일자(국제) 2021년12월17일

심사청구일자 없음

(85) 번역문제출일자 2023년07월13일

(86) 국제출원번호 PCT/US2021/064222

(87) 국제공개번호 WO 2022/133324

국제공개일자 2022년06월23일

(30) 우선권주장

63/127,826 2020년12월18일 미국(US)

(71) 출원인

상가모 테라퓨틱스, 인코포레이티드

미국 캘리포니아 94005 브리즈번 마리나 불러바드 7000

화이자 인코포레이티드

미국 뉴욕주 10001-2192 뉴욕 허드슨 불러바드 이스트 66

(72) 발명자

코너, 제시카 에일린

미국 63017 미주리 체스터필드 체스터필드 파크웨이 웨스트875 화이자 인코포레이티드 내

크로퍼드, 린제이 앤

미국 01801 매사추세츠 앤도버 버트 로드 1 화이자 인코포레이티드내

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

양영준, 김영

전체 청구항 수 : 총 33 항

(54) 발명의 명칭 아데노-연관 바이러스 벡터를 함유하는 개선된 제약조성물

(57) 요약

본 발명은 재조합 AAV 및 1종 이상의 제약상 허용되는 부형제를 포함하는 조성물을 제공한다. 상기 조성물은 다른 AAV 조성물과 비교하여 개선된 안정성 및 저장 기간을 가진다.

대표도

분석	샘플	결과	설명
디지털 영상화	FO		백색 미립자 물질이 관찰될 수 있음
디지털 영상화	FO 5x f/T		다량의 백색 입자 물질이 관찰될 수 있음
디지털 영상화	25°C 에서 1M 후 FO		다량의 백색 입자 물질이 관찰될 수 있음

(52) CPC특허분류

A61K 47/02 (2013.01)
A61K 47/10 (2013.01)
A61K 47/26 (2013.01)
A61K 48/005 (2013.01)
A61K 9/0019 (2013.01)
A61K 9/08 (2013.01)
A61P 7/04 (2018.01)
C12N 15/86 (2013.01)
C12N 2750/14143 (2013.01)

(72) 발명자

다미츠, 로버트

미국 94005 캘리포니아 브리즈번 마리나 불러바드
 7000 상가모테라퓨틱스, 인코포레이티드 내

데이비스, 브렌던 마이클

미국 01810 매사추세츠 앤도버 버트 로드 1 화이자
 인코포레이티드내

훗지, 코디 마이클

미국 63017 미주리 체스터필드 체스터필드 파크웨이
 이 웨스트875 화이자 인코포레이티드 내

김멜 2세, 마이클 윌런드

미국 63017 미주리 체스터필드 체스터필드 파크웨이
 이 웨스트875 화이자 인코포레이티드 내

쿠레시 월러드, 티하미

미국 63017 미주리 체스터필드 체스터필드 파크웨이
 이 웨스트875 화이자 인코포레이티드 내

램지, 필립

미국 94005 캘리포니아 브리즈번 마리나 불러바드
 7000 상가모테라퓨틱스, 인코포레이티드 내

쏜, 대니얼 조셉

미국 63017 미주리 체스터필드 체스터필드 파크웨이
 이 웨스트875 화이자 인코포레이티드 내

영, 앤써니 리

미국 63017 미주리 체스터필드 체스터필드 파크웨이
 이 웨스트875 화이자 인코포레이티드 내

명세서

청구범위

청구항 1

제조합 아데노-연관 바이러스 (rAAV) 벡터,
염화나트륨 (NaCl),
염화칼륨 (KCl),
인산이나트륨 (Na_2HPO_4),
인산일칼륨 (KH_2PO_4),
염화마그네슘 (MgCl_2),
폴리올, 및
폴록사머
를 포함하며,
임의로 약 0.1 mM 이하의 염화칼슘을 포함하고 약 7.1 내지 약 7.5의 pH를 갖는 제약 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 폴리올이 수크로스인 조성물.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, 폴록사머가 폴록사머 188인 조성물.

청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 약 0.1 내지 약 2.0 mM 염화마그네슘을 함유하는 조성물.

청구항 5

제4항에 있어서, 약 0.5 mM 이상의 염화마그네슘을 함유하는 조성물.

청구항 6

제4항에 있어서, 약 1.4 mM 염화마그네슘을 함유하는 조성물.

청구항 7

제4항에 있어서, 약 1.3 mM 초과인 염화마그네슘을 함유하는 조성물.

청구항 8

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서, 약 150 내지 약 200 mM, 임의로 약 172 mM, 염화나트륨을 함유하는 조성물.

청구항 9

제1항 내지 제8항 중 어느 한 항에 있어서, 약 2.5 내지 약 3.0 mM, 임의로 약 2.7 mM, 염화칼륨을 함유하는 조성물.

청구항 10

제1항 내지 제9항 중 어느 한 항에 있어서, 약 5 내지 약 10 mM, 임의로 약 8 mM, 인산이나트륨을 함유하는 조

성물.

청구항 11

제1항 내지 제10항 중 어느 한 항에 있어서, 약 1.0 내지 약 2.0 mM, 임의로 약 1.5 mM, 인산일칼륨을 함유하는 조성물.

청구항 12

제1항 내지 제11항 중 어느 한 항에 있어서, 약 0.5% 내지 약 2% (w/v), 임의로 약 1% (w/v), 수크로스를 함유하는 조성물.

청구항 13

제1항 내지 제12항 중 어느 한 항에 있어서, 약 0.01% 내지 약 0.1% (w/v), 임의로 약 0.05% (w/v), 폴록사머 188을 함유하는 조성물.

청구항 14

제조합 아데노-연관 바이러스 (rAAV) 벡터,

약 171.81 mM 염화나트륨,

약 2.68 mM 염화칼륨,

약 8.10 mM 인산이나트륨,

약 1.47 mM 인산일칼륨,

약 1.40 mM 염화마그네슘,

약 1.00% (w/v) 수크로스, 및

약 0.05% (w/v) 폴록사머 188

을 포함하며,

임의로 약 0.1 mM 이하의 염화칼슘을 포함하고 약 7.1 내지 약 7.5의 pH를 갖는 제약 조성물.

청구항 15

제조합 아데노-연관 바이러스 (rAAV) 벡터,

약 172 mM 염화나트륨,

약 2.68 mM 염화칼륨,

약 8.10 mM 인산이나트륨,

약 1.47 mM 인산일칼륨,

약 0.49 mM 염화마그네슘,

약 1.00% (w/v) 수크로스, 및

약 0.05% (w/v) 폴록사머 188

을 포함하며,

임의로 약 0.1 mM 이하의 염화칼슘을 포함하고 약 7.1 내지 약 7.5의 pH를 갖는 제약 조성물.

청구항 16

제1항 내지 제15항 중 어느 한 항에 있어서, rAAV가 치료 단백질에 대한 발현 카세트를 포함하는 게놈을 포함하는 것인 제약 조성물.

청구항 17

제16항에 있어서, 치료 단백질이 인간 인자 VIII 폴리펩티드인 조성물.

청구항 18

제조합 아데노-연관 바이러스 (rAAV) 벡터이며, 여기서 rAAV가 인간 인자 VIII 폴리펩티드를 발현하기 위한 발현 카세트를 포함하는 게놈을 포함하는 것인, rAAV 벡터,

약 171.81 mM 염화나트륨,

약 2.68 mM 염화칼륨,

약 8.10 mM 인산이나트륨,

약 1.47 mM 인산일칼륨,

약 1.40 mM 염화마그네슘,

약 1.00% (w/v) 수크로스, 및

약 0.05% (w/v) 폴록사머 188

을 포함하며,

임의로 약 0.1 mM 이하의 염화칼슘을 포함하고 약 7.1 내지 약 7.5의 pH를 갖는 제약 조성물.

청구항 19

제조합 아데노-연관 바이러스 (rAAV) 벡터이며, 여기서 rAAV가 인간 인자 VIII 폴리펩티드를 발현하기 위한 발현 카세트를 포함하는 게놈을 포함하는 것인, rAAV 벡터,

약 172 mM 염화나트륨,

약 2.68 mM 염화칼륨,

약 8.10 mM 인산이나트륨,

약 1.47 mM 인산일칼륨,

약 0.49 mM 염화마그네슘,

약 1.00% (w/v) 수크로스, 및

약 0.05% (w/v) 폴록사머 188

을 포함하며,

임의로 약 0.1 mM 이하의 염화칼슘을 포함하고 약 7.1 내지 약 7.5의 pH를 갖는 제약 조성물.

청구항 20

제17항 내지 제19항 중 어느 한 항에 있어서, 인간 인자 VIII 폴리펩티드가 서열식별번호: 1을 포함하는 것인 조성물.

청구항 21

제17항 내지 제19항 중 어느 한 항에 있어서, rAAV의 게놈이 서열식별번호: 2 또는 서열식별번호: 2의 뉴클레오타이드 131-5,024를 포함하는 것인 조성물.

청구항 22

제1항 내지 제21항 중 어느 한 항에 있어서, mL당 약 $1.0E+12$ 내지 약 $1.0E+14$ 벡터 게놈 (vg), 임의로 mL당 약 $1.0E+13$ 내지 약 $5.0E+13$ vg의 rAAV를 함유하는 조성물.

청구항 23

제22항에 있어서, mL당 약 $1.0E+13$ vg을 함유하는 조성물.

청구항 24

제1항 내지 제23항 중 어느 한 항에 있어서, rAAV가 AAV6 캡시드 단백질, 임의로 AAV2의 역위 말단 반복부(ITR)를 포함하는 것인 조성물.

청구항 25

제1항 내지 제24항 중 어느 한 항의 조성물 5-10 mL, 임의로 6.4 mL를 포함하는 바이알.

청구항 26

제25항에 있어서, 시클로-올레핀 공중합체로 제조되는 바이알.

청구항 27

제25항 또는 제26항에 있어서, 제 위치에 열가소성 엘라스토머 마개를 갖는 바이알.

청구항 28

치료 단백질을 필요로 하는 환자에게 제1항 내지 제24항 중 어느 한 항의 조성물을 투여하는 것을 포함하는, 치료 단백질을 필요로 하는 환자를 치료하는 방법.

청구항 29

인자 VIII의 혈청 수준의 증가를 필요로 하는 인간 대상체에게 제17항 내지 제24항 중 어느 한 항의 제약 조성물, 또는 제25항 내지 제27항 중 어느 한 항의 바이알의 전체 내용물을 정맥내 투여하는 것을 포함하는, 인자 VIII의 혈청 수준의 증가를 필요로 하는 인간 대상체에서 인자 VIII의 혈청 수준을 증가시키는 방법.

청구항 30

제29항에 있어서, 인간 대상체가 혈우병 A를 갖는 것인 방법.

청구항 31

혈우병 A의 치료를 필요로 하는 인간 대상체에게 제17항 내지 제24항 중 어느 한 항의 제약 조성물, 또는 제25항 내지 제27항 중 어느 한 항의 바이알의 전체 내용물을 정맥내 투여하는 것을 포함하는, 혈우병 A의 치료를 필요로 하는 인간 대상체에서 혈우병 A를 치료하는 방법.

청구항 32

제28항 내지 제31항 중 어느 한 항의 방법에서 인간 대상체를 치료하기 위한 의약의 제조를 위한 제1항 내지 제24항 중 어느 한 항의 제약 조성물의 용도.

청구항 33

제1항 내지 제24항 중 어느 한 항에 있어서, 제28항 내지 제31항 중 어느 한 항의 방법에서 인간 대상체를 치료하는데 사용하기 위한 제약 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 관련 출원에 대한 상호-참조

[0002] 본 출원은 2020년 12월 18일에 출원된 미국 출원 번호 63/127,826을 우선권 주장하며, 상기 출원의 내용은 그 전문이 본원에 참조로 포함된다.

[0003] 서열 목록

[0004] 본 출원은 ASCII 포맷으로 전자 제출되었고 그 전문이 본원에 참조로 포함된 서열 목록을 함유한다. 2021년 12

월 1일에 생성된 상기 ASCII 카피는 025297_W0029_SL.txt로 명명되며 19,967 바이트 크기이다.

배경 기술

[0005] 유전자 요법은 유전 질환을 치료하는 유망한 접근법이다. 이는 결함 유전자의 건강한 카피를 환자에게 도입하거나, 부적절하게 기능하는 돌연변이된 유전자를 불활성화한다. 유전자 요법 연구에 특히 관심인 유전 질환은 혈우병 A이다. 고전적 혈우병으로도 불리는 혈우병 A는 혈액 응고 과정이 누락 또는 결함 유전자 코딩 인자 VIII로 인해 손상되는 X-연관 유전 질환이다. 혈우병 A를 가진 환자는 내부로 (예를 들어, 관절 및 근육 내부로) 또는 외부로 (예를 들어, 작은 상처, 외상, 또는 치과 시술로 인해) 출혈할 수 있다. 인자 VIII의 정상 혈장 수준은 50% 내지 100%의 범위이다. 경증 혈우병 A는 혈액 내 인자 VIII의 6% 내지 49% 수준을 특징으로 하며; 환자는 전형적으로 심각한 부상, 외상, 또는 수술 후에만 출혈한다. 중등도 혈우병 A는 혈액 내 인자 VIII의 1% 내지 5% 수준을 특징으로 하며; 환자는 부상 후 출혈 에피소드를 가진다. 중증 혈우병 A는 혈액 내 인자 VIII의 1% 미만의 수준을 특징으로 하며; 환자는 부상 후 출혈을 경험하고 또한 종종 그의 관절 및 근육에서 빈번한 자발적인 출혈 에피소드를 가진다. 또한, 국립 혈우병 재단(National Hemophilia Foundation)의 웹 사이트를 참조한다. 혈우병 A는 통상적으로 요구시 (출혈시) 또는 대체 인자 VIII로 예방적으로 치료된다. 일부 환자는 대체 인자에 대한 동종항체(alloantibodies) (억제제라고도 함)를 발생시켜, 요법을 효과 없게 만든다. 현재의 요법은 빈번한 정맥내 주사를 필요로 하고 개발도상국에서는 자원에 제한이 있기 때문에 부담스럽다. 따라서, 유전자 요법은 혈우병 A 치료에 유망한 접근법을 제공한다.

[0006] 재조합 아데노-연관 바이러스 (rAAV)는 유전자 요법에서 유전자 전달을 위한 플랫폼으로서 탐구되었다. 아데노-연관 바이러스 (AAV)는 파르보비리다에(*Parvoviridae*) 과 및 데펜도파르보바이러스(*Dependoparvovirus*) 속에 속하는 소형 외피 비보유 바이러스이다. 상기 바이러스는 3종의 캡시드 단백질 - 바이러스 단백질 (VP) 1, VP2, 및 VP3 -로부터 어셈블리된 캡시드 내로 패키징된 단일-가닥 DNA 게놈으로 구성된다. rAAV 제제를 임상적 사용을 위한 제약 조성물로 제제화하는 것은 도전과제였다. 통상적으로 사용되는 rAAV 제제는 시간이 지남에 따라 또는 실험실-모의 스트레스 시험 동안 가시적 침전물을 형성하는 것으로 관찰되었다. 해결하지 않은 상태로 방치하면, 이들 침전물은 환자 안전성에 대한 위험을 나타낸다. 일부 rAAV 제제로 관찰된 물리적 안정성 문제는 또한 보관, 운송, 및 환자에게로의 투여에 필요한 저장 기간(shelf life)에 걸쳐 제품의 효능에 부정적으로 영향을 미칠 수 있다 (예를 들어, 문헌 [Wright et al., *Molecular Therapy* (2005) 12(1):171-8; Croyle et al., *Gene Therapy* (2001) 8:1281-90] 참조). 따라서, rAAV 벡터에 대한 개선된 제제를 개발하여 유전자 요법에서 이들의 치료 잠재력이 완전히 구현될 수 있도록 할 필요가 있다.

발명의 내용

[0007] 본 개시내용은 임상 투여에 적합한 안정한 rAAV 벡터 제제를 제공한다. 한 측면에서, 본 개시내용은 rAAV 벡터, 염화나트륨 (NaCl), 염화칼륨 (KCl), 인산이나트륨 (Na_2HPO_4), 인산일칼륨 (KH_2PO_4), 염화마그네슘 (MgCl_2), 폴리올 (예를 들어, 수크로스), 및 폴록사머 (예를 들어, 폴록사머 188)를 포함하며, 임의로 약 0.1 mM 이하의 염화칼슘을 포함하고 약 7.1 내지 약 7.5의 pH를 갖는 제약 조성물을 제공한다.

[0008] 일부 실시양태에서, 조성물은 약 0.1 내지 약 2.0 mM (예를 들어, 약 0.5 mM 이상, 약 1.3 mM 이상, 또는 약 1.4 mM) 염화마그네슘을 함유한다.

[0009] 일부 실시양태에서, 조성물은 약 150 내지 약 200 mM, 임의로 약 172 mM, 염화나트륨을 함유한다.

[0010] 일부 실시양태에서, 조성물은 약 2.5 내지 약 3.0 mM, 임의로 약 2.7 mM, 염화칼륨을 함유한다.

[0011] 일부 실시양태에서, 조성물은 약 5 내지 약 10 mM, 임의로 약 8 mM, 인산이나트륨을 함유한다.

[0012] 일부 실시양태에서, 조성물은 약 1.0 내지 약 2.0 mM, 임의로 약 1.5 mM, 인산일칼륨을 함유한다.

[0013] 일부 실시양태에서, 조성물은 약 0.5% 내지 약 2% (w/v), 임의로 약 1% (w/v), 수크로스를 함유한다.

[0014] 일부 실시양태에서, 조성물은 약 0.01% 내지 약 0.1% (w/v), 임의로 약 0.05% (w/v), 폴록사머 188을 함유한다.

[0015] 특정한 실시양태에서, 본 개시내용은 rAAV 벡터, 약 171.81 mM 염화나트륨, 약 2.68 mM 염화칼륨, 약 8.10 mM 인산이나트륨, 약 1.47 mM 인산일칼륨, 약 1.40 mM 염화마그네슘, 약 1.00% (w/v) 수크로스, 및 약 0.05% (w/v) 폴록사머 188을 포함하며, 임의로 약 0.1 mM 이하의 염화칼슘을 포함하고 약 7.1 내지 약 7.5의 pH를 갖

는 제약 조성물을 제공한다.

- [0016] 다른 특정한 실시양태에서, 본 개시내용은 rAAV 벡터, 약 172 mM 염화나트륨, 약 2.68 mM 염화칼륨, 약 8.10 mM 인산나트륨, 약 1.47 mM 인산일칼륨, 약 0.49 mM 염화마그네슘, 약 1.00% (w/v) 수크로스, 및 약 0.05% (w/v) 폴록사머 188을 포함하며, 임의로 약 0.1 mM 이하의 염화칼슘을 포함하고 약 7.1 내지 약 7.5의 pH를 갖는 제약 조성물을 제공한다.
- [0017] 일부 실시양태에서, 본 발명의 조성물 중의 rAAV는 인간 인자 VIII 폴리펩티드 (예를 들어, 서열식별번호: 1)와 같은 치료 단백질에 대한 발현 카세트를 포함하는 게놈을 포함한다. 특정한 실시양태에서, AAV 게놈은 서열식별번호: 2 또는 서열식별번호: 2의 뉴클레오티드 131-5,024를 포함한다.
- [0018] 일부 실시양태에서, 조성물은 mL당 약 1.0×10^{12} 내지 약 1.0×10^{14} 벡터 게놈 (vg), 임의로 mL당 약 1.0×10^{13} 내지 약 5.0×10^{13} vg (예를 들어, mL당 약 1.0×10^{13} vg)의 rAAV를 함유한다.
- [0019] 일부 실시양태에서, rAAV는 AAV6 캡시드 단백질 (예를 들어, AAV6 캡시드를 가짐)을 포함한다. 일부 실시양태에서, AAV 게놈은 AAV2로부터 역위 말단 반복부 (ITR)를 포함한다.
- [0020] 또 다른 측면에서, 본 개시내용은 5-10 mL, 임의로 6.4 mL의 본 발명의 조성물을 포함하는 바이알을 제공한다. 바이알은, 예를 들어, 시클로-올레핀 공중합체로 제조될 수 있고/있거나, 제 위치에(in-place) 열가소성 엘라스토머 마개(stopper)를 가질 수 있다.
- [0021] 또 다른 측면에서, 본 개시내용은 치료 단백질을 필요로 하는 환자에게 본 발명의 조성물을 투여하는 것을 포함하는, 치료 단백질을 필요로 하는 환자를 치료하는 방법을 제공한다. 일부 실시양태에서, 본 개시내용은 인자 VIII의 혈청수준의 증가를 필요로 하는 인간 대상체 (예를 들어, 혈우병 A를 갖는 인간 대상체)에게 rAAV가 인간 인자 VIII 폴리펩티드를 코딩하는 본 발명의 조성물을 정맥내 투여하는 것을 포함하는, 상기 인간 대상체에서 인자 VIII의 혈청 수준을 증가시키는 방법을 제공한다. 또한, 이러한 치료 방법에서 사용하기 위한 제약 조성물, 및 이러한 방법들에서 사용하기 위한 의학의 제조를 위한 조성물의 용도가 제공된다.
- [0022] 본 발명의 다른 특징, 목적 및 이점은 하기 상세한 설명에서 명백하다. 그러나, 상세한 설명은 본 발명의 실시양태 및 측면을 나타내지만, 제한이 아니라 단지 예시로서 주어지는 것으로 이해되어야 한다. 본 발명의 범위 내의 다양한 변화 및 변형은 상세한 설명으로부터 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 명백해질 것이다.

도면의 간단한 설명

- [0023] 도 1a-도 1f는 SB-525를 함유하는 제제의 샘플에서 발견되는 미립자 물질의 특성화를 요약한다.
- 도 2는 접선 흐름 여과 (TFF)에 의한 완충제 교환의 개략도를 나타낸다.
- 도 3은 AAV6 벡터 제제에 대한 제제화, 충전, 및 마무리 단계를 나타낸다.
- 도 4a는 다중 동결/해동 주기에 따른 AAV6 벡터 제제의 벡터 게놈 (vg) 역가 및 감염 역가를 나타낸다. 표시된 오차 막대는 MADLS에 의한 입자 농도에 대한 $N \geq 3$ 샘플 측정값으로부터의 $\pm$ 백분율 RSD, 또는 vg 역가, 중앙 조직 배양 감염 용량 (TCID₅₀), ELISA, 및 SE-LC에 대한 허용된 시험 가변성이다. RSD: 상대 표준 편차. MADLS: 다각도 동적 광 산란. SE-LC: 크기 배제 액체 크로마토그래피.
- 도 4b는 다중 동결/해동 주기에 따른 AAV6 벡터 제제의 캡시드 역가 및 입자 농도를 나타낸다. 표시된 오차 막대는 MADLS에 의한 입자 농도에 대한 $N \geq 3$ 샘플 측정값으로부터의 $\pm$ 백분율 RSD, 또는 vg 역가, TCID₅₀, ELISA, 및 SE-LC에 대한 $\pm$ 허용된 시험 가변성이다.
- 도 4c는 동결/해동 AAV6 벡터 제제 샘플의 일반 및 순도 품질 속성 결과를 나타내는 표이다.
- 도 4d는 동결/해동 AAV6 벡터 제제 샘플의 강도 품질 속성 결과를 나타내는 표이다.
- 도 5a는 주위 (25°C/60% RH) 조건에서 최대 6개월에 걸친 vg 및 감염 역가를 나타낸다. RH: 상대 습도.
- 도 5b는 주위 (25°C/60% RH) 조건에서 최대 6개월에 걸친 캡시드 역가 및 입자 농도를 나타낸다.
- 도 5c는 주위 (25°C/60% RH) 인큐베이션된 샘플의 일반 및 순도 품질 속성 결과를 나타내는 표이다. ND: 데이터 없음. NAA: 이용가능한 분석 없음.
- 도 5d는 주위 (25°C/60% RH) 인큐베이션된 샘플의 강도 품질 속성 결과를 나타내는 표이다.

도 6a는 스트레스가 가해진 (40℃/75% RH) 조건에서 3개월에 걸친 vg 및 감염 역가를 나타낸다.

도 6b는 스트레스가 가해진 (40℃/75% RH) 조건에서 최대 7개월에 걸친 캡시드 역가 및 입자 농도를 나타낸다.

도 6c는 스트레스가 가해진 (40℃/75%RH) 인큐베이션된 샘플의 일반 및 순도 품질 속성 결과를 나타내는 표이다.

도 6d는 스트레스가 가해진 (40℃/75% RH) 인큐베이션된 샘플의 강도 품질 속성 결과를 나타내는 표이다.

도 7은 안정성 샘플에 대한 연관 및 불합격 기준과 함께 품질 속성을 나타내는 표이다.

도 8은 샘플간 제제 평가 요약을 나타내는 표이다.

도 9는 일반 및 순도 품질 속성에 대한 연구 종점 추세선 및 제제 평가를 나타내는 표이다.

도 10은 의도된 보관 온도 (-70℃)에서 SB-525 약물 제품의 장기간 (24개월) 안정성을 나타내는 표이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0024]

본 개시내용은 AAV 벡터 및 1종 이상의 제약상 허용되는 부형제를 포함하는 제약 조성물을 제공한다. 본 발명의 AAV 벡터 조성물은 게놈이 관심 단백질 (예를 들어, 치료 단백질)에 대한 발현 카세트를 운반하는 rAAV를 포함할 수 있다. 본 발명자들은 본질적으로 칼슘 미함유인 (예를 들어, 제제에 어떤 첨가된 칼슘도 갖지 않은) AAV 벡터 제제가 이전 조성물과 비교하여 개선된 안정성 및 저장 기간을 가진다는 것을 예기치 않게 발견하였다. 칼슘은 전형적으로 칼슘이 AAV 조성물의 안정성을 개선시킬 것이라는 통상적인 믿음으로 인해 이전 제제에 포함된다 (예를 들어, 문헌 [Turnbull et al., *Hum Gene Ther.* (2000) 11(4):629-35; Cotmore et al., *J Virol.* (2010) 84(4):1945-56] 참조). 본 발명자들은 본 발명의 AAV 벡터 조성물이 개선된 외관 (예를 들어, 투명도 및 색상 없음), 보다 안정한 pH, 및 보다 적은 응집체 (동결/해동 주기 및 가속화된 안정성 조건 하에 제품 품질 속성에 의해 결정된 바와 같음)를 가진다는 것을 발견하였다. 칼슘 없이 제조된 AAV 벡터 제품은 보다 양호한 제품 안정성을 입증했기 때문에, 제품 성능 또는 안정성을 위해 칼슘 이온이 필요하지 않다.

[0025]

I. 제조합 AAV의 제조

[0026]

본원에 기재된 바이러스 제제는 임의의 공지된 생산 시스템, 예컨대 포유동물 세포 AAV 생산 시스템 (예를 들어, 293T 또는 HEK293 세포에 기반한 것들) 및 곤충 세포 AAV 생산 시스템 (예를 들어, sf9 곤충 세포에 기반한 것들 및/또는 바콜로바이러스 헬퍼 벡터를 사용하는 것들)에 의해 수득될 수 있다. 바이러스 제제는 불연속 염화세슘 밀도 구배와 같은 널리 공지된 기술을 사용함으로써 세포 배양물로부터 정제할 수 있다 (예를 들어, 문헌 [Grieger, *Mol Ther Methods Clin Dev.* (2016) 3:16002] 참조).

[0027]

본 발명의 조성물은 임의의 또는 다양한 AAV 혈청형의 조합의 AAV, 예컨대 AAV1, AAV2, AAV3, AAV3B, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV8.2, AAV9, AAVrh10, AAV10, 및 AAV11, 뿐만 아니라 그의 변이체, 하이브리드, 키메라 또는 슈도-유형(pseudo-type)을 포함할 수 있다. "슈도-유형" 또는 "교차-패키지형(cross-packaged)" rAAV는 그의 캡시드가 또 다른 AAV 혈청형의 캡시드로 대체되어, 예를 들어, 바이러스의 형질도입 효능(transduction efficacy) 또는 향성(tropism) 프로파일을 변경하는 제조합 AAV를 의미한다 (예를 들어, 문헌 [Balaji et al., *J Surg Res.* (2013) 184(1):691-8] 참조). "키메라" 또는 "하이브리드" rAAV란 그의 캡시드가 상이한 혈청형으로부터 유래된 캡시드 단백질로부터 어셈블리되고/되거나 그의 캡시드 단백질이 상이한 혈청형 (예를 들어, 혈청형 1 및 2; 예를 들어, 문헌 [Hauck et al., *Mol Ther.* (2003) 7(3):419-25] 참조)으로부터 유래된 서열을 가진 키메라 단백질인 제조합 AAV를 의미한다. 예를 들어, 본 발명의 조성물은 ITR과 같은 게놈이 AAV2와 같은 하나의 혈청형으로부터 유래되며 한편 캡시드가 또 다른 혈청형; 예를 들어, AAV2/8, AAV2/5, AAV2/6, AAV2/9, 또는 AAV2/6/9로부터 유래되는 제조합 AAV를 포함할 수 있다. 예를 들어, 미국 특허 7,198,951 및 9,585,971 참조.

[0028]

II. 제조합 AAV의 제제화

[0029]

일단 정제되면, AAV 제제는, 예를 들어, 접선 흐름 여과, 교반-셀을 사용한 정상 흐름 여과, 겔 여과, 투석, 컬럼 크로마토그래피, 및/또는 탈염 컬럼을 통한 완충제 교환에 의해 본원에 기재된 바와 같이 제제화되어, 원하는 성분을 포함하는 조성물에 도달될 수 있다. 예시로서, 정제된 바이러스 제제는 먼저 한외여과(UF)에 의해 농축된 다음에 원하는 수성 제제 용액의 10배 이상의 동등한 부피로 정용여과(DF)될 수 있다. 또한, 하기 실시예 참조.

- [0030] 제제 용액은 긴장제, 안정화제, 계면활성제, 및 완충제를 포함할 수 있다. 완충제는, 예를 들어, 아세테이트, 숙시네이트 (예를 들어, 디소듐 숙시네이트 6수화물), 숙신산, 글루코네이트, 시트레이트, 히스티딘, 아세트산, 포스페이트, 인산, 아스코르베이트, 아스코르브산, 타르타르산, 말레이트, 말레산, 글리신, 락테이트, 락산, 중탄산염, 탄산, 벤조산나트륨, 벤조산, 에데테이트, 이미다졸, 트리스, 및 그의 혼합물을 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 제제 용액은, 예를 들어, 각각 약 150-200 mM (예를 들어, 약 150 mM, 약 155 mM, 약 160 mM, 약 165 mM, 약 168 mM, 약 170 mM, 약 171 mM, 약 171.1 mM, 약 171.2 mM, 약 171.3 mM, 약 171.4 mM, 약 171.5 mM, 약 171.6 mM, 약 171.7 mM, 약 171.8 mM, 약 171.9 mM, 또는 약 172 mM) 및 약 2.5-3.0 mM (예를 들어, 약 2.5 mM, 약 2.6 mM, 약 2.61 mM, 약 2.61 mM, 약 2.63 mM, 약 2.64 mM, 약 2.65 mM, 약 2.66 mM, 약 2.67 mM, 약 2.68 mM, 약 2.69 mM, 또는 약 2.7 mM, 약 2.8 mM, 약 2.9 mM, 약 3.0 mM)의 염화나트륨 및/또는 염화칼륨을 함유한다.
- [0031] 제제 용액은 예를 들어 인산이나트륨 및/또는 인산일칼륨에 의해 포스페이트-완충될 수 있다. 일부 실시양태에서, 제제 용액 중 총 포스페이트 이온 농도는 약 8-12 mM (예를 들어, 약 9.6 mM 또는 약 9.57 mM)이다. 특정 실시양태에서, 제제 용액은 약 5-10 mM (예를 들어, 약 5 mM, 약 6 mM, 약 7 mM, 약 7.9 mM, 약 8 mM 또는 약 8.1 mM, 약 8.2 mM, 약 8.5 mM, 약 9 mM, 또는 약 10 mM) 인산이나트륨 및 약 1-2 mM (예를 들어, 약 1 mM, 약 1.2 mM, 약 1.3 mM, 약 1.45 mM, 약 1.47 mM, 약 1.48 mM, 약 1.49 mM, 약 1.5, 약 1.6 mM, 약 1.7 mM, 약 1.8 mM, 약 1.9 mM, 또는 약 2 mM) 인산일칼륨을 함유한다. 제제는 약 6.5-8.0 (예를 들어, 약 7.1-7.5, 약 7.1, 약 7.2, 약 7.3, 약 7.4, 또는 약 7.5)의 pH를 가질 수 있다.
- [0032] 제제 용액은 마그네슘을 함유할 수 있으나 어떤 첨가된 칼슘도 함유하지 않을 수 있다. 일부 실시양태에서, 제제 용액은 약 0.1 내지 2.0 mM (예를 들어, 약 0.5 내지 약 1.4 mM, 약 0.1 mM, 약 0.2 mM, 약 0.3 mM, 약 0.4 mM, 약 0.42 mM, 약 0.44 mM, 약 0.45 mM, 약 0.46 mM, 약 0.47 mM, 약 0.48 mM, 약 0.49 mM, 약 0.5, 약 0.55 mM, 또는 약 0.6 mM) 염화마그네슘을 함유한다. 제제 용액은 어떤 첨가된 칼슘도 함유하지 않긴 하지만, AAV 제제 및 제제 용액으로 구성된 제약 조성물은 AAV 제조 및 정제 공정을 위해 이월되는 미량의 칼슘을 가질 수 있다. 예를 들어, 제약 조성물은 비색 검정에 의해 측정되는 경우 약 0.10 mM 이하 (예를 들어, 약 0.09, 0.07, 0.05, 0.03, 또는 0.01 mM 이하)의 칼슘을 함유할 수 있다. 일부 실시양태에서, 제약 조성물은 비색 검정에 의해 측정된 바와 같이 어떤 검출가능한 칼슘도 함유하지 않는다. 일부 실시양태에서, 제약 조성물은 어떤 칼슘도 함유하지 않는다 (즉, 0 mM 칼슘).
- [0033] 제제 용액은 폴리올 예컨대 만니톨, 트레할로오스, 소르비톨, 에리스리톨, 이소말트, 락티톨, 말티톨, 크실리톨, 글리세롤, 락티톨, 에틸렌 글리콜, 프로필렌 글리콜, 폴리에틸렌 글리콜, 이노시톨, 프럭토스, 글루코스, 만노스, 수크로스, 소르보스, 크실로스, 락토스, 말토스, 텍스트란, 폴루란, 텍스트린, 시클로텍스트린, 가용성 전분, 히드록시에틸 전분, 수용성 글루칸, 또는 그의 혼합물을 함유할 수 있다. 일부 실시양태에서, 제제 용액은 약 0.5% 내지 2% (예를 들어, 약 0.5%, 약 0.6%, 약 0.7%, 약 0.8%, 약 0.9%, 또는 약 1%) (w/v) 수크로스를 함유한다.
- [0034] 제제 용액은 비이온성 또는 이온성 친수성 계면활성제를 함유할 수 있다. 계면활성제의 예는 폴리소르베이트, 폴록사머, 트리톤, 소듐 도데실 술페이트, 소듐 라우렐 술페이트, 소듐 옥틸 글리코시드, 라우릴-술포베타인, 미리스틸-술포베타인, 리놀레일-술포베타인, 스테아릴-술포베타인, 라우릴-사르코신, 미리스틸-사르코신, 리놀레일-사르코신, 스테아릴-사르코신, 리놀레일-베타인, 미리스틸-베타인, 세틸-베타인, 라우로아미도프로필-베타인, 코카미도프로필-베타인, 리놀레아미도프로필-베타인, 미리스타미도프로필-베타인, 팔미도프로필-베타인, 이소스테아르아미도프로필-베타인, 미리스타미도프로필-디메틸아민, 팔미도프로필-디메틸아민, 이소스테아르아미도프로필-디메틸아민, 소듐 메틸 코코일-타우레이트, 디소듐 메틸 올레일-타우레이트, 디히드록시프로필 PEG-5 리놀레아모늄 클로라이드, 폴리에틸렌 글리콜, 폴리프로필렌 글리콜, 소르비탄 모노에스테르 (예를 들어, 스팬 (Span)), 글리세롤의 산 에스테르, 및 그의 혼합물이다. 일부 실시양태에서, 계면활성제는 폴리소르베이트 (PS) 20, PS-21, PS-40, PS-60, PS-61, PS-65, PS-80, PS-81, PS-85, PEG-3350, 폴록사머 188, 및 그의 혼합물일 수 있다. 일부 실시양태에서, 제제 용액은 약 0.01% 내지 0.1% (예를 들어, 약 0.01%, 약 0.02%, 약 0.03%, 약 0.04%, 약 0.05%, 약 0.06%, 약 0.07%, 약 0.08%, 약 0.09%, 또는 약 0.1%) (w/v) 폴록사머 188을 함유한다.
- [0035] 특정한 실시양태에서, 제약 조성물은 제제 F2 또는 F3에서 AAV 벡터를 포함한다. F2 및 F3의 성분은 하기 표 A에 나타났다. 칼슘과 마그네슘을 가진 돌베코의 포스페이트 완충 식염수 (DPBS)는 세포 배양 적용에 통상적으로 사용되는 제제이다. F0는 또 다른 이전의, 칼슘-함유 제제이다. 하기 실시예에 나타난 바와 같이, F2 및

F3은 AAV 제제화에서 DPBS 및 F0보다 우수하다.

<표 A>

제제 비교

성분 (단위)	DPBS	F0	F2	F3
NaCl (mM)	136.89	171.80	171.80	171.80
KCl (mM)	2.68	2.68	2.68	2.68
Na ₂ HPO ₄ (mM)	8.10	8.10	8.10	8.10
KH ₂ PO ₄ (mM)	1.47	1.47	1.47	1.47
CaCl ₂ (mM)	0.90	0.90	0.0	0.0
MgCl ₂ (mM)	0.50	0.50	0.49	1.40
수크로스 (% w/v)	0.0	1.00%	1.00%	1.00%
폴록사머 188 (% w/v)	0.0	0.05%	0.05%	0.05%

본원에 사용되는 바와 같이, 제제 내의 다양한 성분의 농도는 소수점 이하 0, 1, 또는 2자리수로 표시될 수 있다. 따라서, 예를 들어, F2에서, NaCl, KCl, Na₂HPO₄, KH₂PO₄, MgCl₂, 및 수크로스의 농도는 각각 171.80 (또는 171.8 또는 172) mM, 2.68 (또는 2.7) mM, 8.10 (또는 8.1 또는 8) mM, 1.47 (또는 1.5) mM, 0.49 (또는 0.5) mM, 및 1.00% (또는 1.0% 또는 1%) (w/v)로 표시될 수 있다. F3에서, NaCl, KCl, Na₂HPO₄, KH₂PO₄, MgCl₂, 및 수크로스의 농도는 각각 171.80 (또는 171.8 또는 172) mM, 2.68 (또는 2.7) mM, 8.10 (또는 8.1 또는 8) mM, 1.47 (또는 1.5) mM, 1.40 (또는 1.4) mM, 및 1.00% (또는 1.0% 또는 1%) (w/v)로 표시될 수 있다.

제약 조성물은 1종 이상의 방부제 예컨대 아스코르브산 (비타민 C), 술피트, 소르베이트, 벤조에이트, 페놀, m-크레졸, 벤질 알코올, 벤즈알코늄 클로라이드, 페녹시에탄올, 및/또는 파라벤 (예를 들어, 메틸 파라벤)을 추가로 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 제약 조성물은 임의의 첨가된 방부제를 함유하지 않는다.

제약 조성물은 또한 제약 조성물의 유효성을 향상시키는 다른 시약을 포함할 수 있다. 제약 조성물은 전달 비히클 예컨대 리포솜, 나노캡슐, 미세입자, 미세구, 지질 입자, 및 소포를 함유할 수 있다.

III. 예시적인 재조합 AAV

예시적인 실시양태에서, 본 개시내용은 인자 VIII 유전자 요법을 위한 rAAV 벡터를 포함하는 개선된 제약 조성물을 제공한다. PF-07055480/SB-525 (또는 본원에서 "SB-525")로 명명된 rAAV 벡터는 AAV6 캡시드 및 AAV2 역위 말단 반복부 (ITR)를 갖는 재조합 게놈을 포함하는 2/6 슈도 혈청형이다. SB-525의 게놈은 인간 인자 VIII (FVIII)의 B-도메인 결실 (BDD) 버전을 코딩하는 발현 카세트를 운반한다. 예를 들어, WO 2017/074526 (서열 #37) 참조. SB-525는 정맥내 (IV) 용량으로서 투여되며 간-특이적 향성을 보유하여 혈우병 A를 가진 환자에서 인자 VIII 단백질의 장기간 간 생산을 제공한다. WO 2020/028830 참조. 분비된 FVIII 단백질은 승인된 재조합 항혈우병 인자 (레팩토(Refacto)® 및 크신타(Xyntha)®)와 동일한 아미노산 서열을 가진다.

SB-525의 게놈은 인간 인자 VIII BDD 버전에 대한 발현 카세트를 포함하며, 이는 하기에 나타낸 아미노산 서열을 가진다:

MQIELSTCFFLCCLLRFCFSATRRYYLGAVELSWDYMQSDLGELPVDARFPFPRVPKSFPE
NTSVVYKKTLEFVEFTDHLFENIAKPRPPWMGLLGPTIQAEVYDVTVVITLKNMASHFVSLH
AVGVSYWKASEGAEYDDQTSQREKEDDKVFPGGSHTYVWQVLKENGPMASDPLCLTYSY
LSHVDLVKDLNSGLIGALLVCREGLAKEKTQTLHKFILLFAVFDEGKSWHSETKNSLM
QDRDAASARAWPKMHTVNGYVNRSLPGLIGCHRKSVYWHVIGMGTTPEVHSIFLEGHTF
LVRNHRQASLEISPITFLTAQTLLMDLGQFLLFCHISSHQHDGMEAYVKVDSCEPEPQL
RMKNNEEAEDYDDDLTDSEMDVVRFDNNSPSFIQIRSVAKKHPKTWVHYIAAEEDWD
YAPLV LAPDDRSYKSYQLNNGPQRIGRKYKVRFMAYTDETFKTREAIQHESGILGPLL
YGEVGD TLLIIFKNQASRPYNIYPHGITDVRPLYSRRLPKGVKHLKDFPILPGEIFKYK
WTVTVEDGPTKSDPRCLTRYSSFVNMERDLASGLIGPLLYCYKESVDQGRNQIMSDKR
NVILFSVFDENRSWYLTENIQRFLPNPAGVQLEDPEFQASNMHSINGYVFDLSQLSVC
LHEVAYWYILSIGAQTDFLSVFFSGYTFKHKMYVEDTLTLFPFSGETVFMENPGLWI
LGCHNSDFRNRGMTALLKVSSCDKNTGDYEDSYEDISAYLLSKNNAIEPRFSFSQNPPV
LKRHQREITRTTLQSDQEEIDYDDTISVEMKKEDFDIYDEDENQSPRSFQKTRHYFIA
AVERLDYDYGTRSSQYVLRNRAQSGSVFPQFKVVFQEFDTGSGFTQPLYRGELNEHLGLLG
PYIRAEVEDNMIMVTRFNQASRPYSFYSSLSIYEEDQRQGAEPKRFVKPNETKTYFWKV
QHMAPTKDEFCKAWAYFSDVDLEKDVHSGLIGPLLVCHTNTLNPAGHRQVTVQEFAL
FFTIFDETCKSWYFTENMERNCRAPCNIQMEDPTFKENYRFHAINGYIMDTLPGLVMAQD
QRIRWYLLSMGSENENIHSIHFSGHVFTVRKKEEYKMALYNLYPGVFETVEMLPKAGIW
RVECLIGEHLHAGMSTLFLVYSNKCQTPLGMASGHIRDFQITASGQYQWAPKLARLHY
SGSINAWSTKEPFSWIKVDLLAPMIHGIKTQGARQKFSLSYISQFIIMYSLDGKKWQT
YRGNSTGTLMVFFGNVDSSGIKHNI FNPPIIARYIRLHPHYSIRSTLRMELMGCDLNS
CSMPLGMESKAISDAQITASSYFTNMFATWSPSKARLHLQGRSNARWPQVNNPKEWLQV
DFQTKMKVTGVTQGVKSLTSMYVKEFLISSQDGHQWTLFFQNGKVKVFQGNQDSFT
PVVNSLDPPLLTRYLRIHPQSWVHQIALRMEVLGCEAQDLY (SEQ ID NO:1)

[0045]

[0046]

서열식별번호: 1의 신호 펩티드 부분은 상기 박스에 표시되어 있으며 단백질이 분비될 때 절단 제거된다.

[0047]

SB-525 게놈은 하기 뉴클레오티드 서열을 포함한다:

1	CTGCGCGCTC	GCTCGCTCAC	TGAGGCCGCC	CGGGCAAAGC	CCGGCGCTCG	GGCGACCTTT
61	GGTGGCCCGG	CCTCAGTGAG	CGAGCGAGCG	CGCAGAGAGG	GAGTGGCCAA	CTCCATCACT
121	AGGGGTTCCT	GCGGCCTAAG	CTTGGAAACA	TTGCCACCTT	CAGGGGGAGG	CTGCTGGTGA
181	ATATTAACCA	AGATCACCCC	AGTTACCGGA	GGAGCAAACA	GGGACTAAGT	TCACACGCGT
241	GGTACCGTCT	GTCTGCACAT	TTCGTAGAGC	GAGTGTTCGG	ATACTCTAAT	CTCCCTAGGC
301	AAGGTTCATA	TTTGTGTAGG	TTACTTATTC	TCCTTTTGTT	GACTAAGTCA	ATAATCAGAA
361	TCAGCAGGTT	TGGAGTCAGC	TTGGCAGGGA	TCAGCAGCCT	GGGTGGGAAG	GAGGGGGTAT
421	AAAAGCCCTC	TCACCAGGAG	AAGCCGTCAC	ACAGATCCAC	AAGCTCCTGA	AGAGGTAAGG
481	GTTTAAAGTTA	TCGTGTAGTTC	GTGCACCAT	AATGTTTAAT	TACCTGGAGC	ACCTGCCTGA
541	AATCATTTTT	TTTTCAGGTT	GGCTAGTATG	CAGATCGAGC	TCTCCACCTG	CTTCTTTCTG
601	TGCCTGTGTA	GATTCTGCTT	CAGCGCCACC	AGGAGATACT	ACCTGGGGGC	TGTGGAGCTG
661	AGCTGGGACT	ACATGCAGTC	TGACCTGGGG	GAGCTGCCTG	TGGATGCCAG	GTTCCCCCCC
721	AGAGTGCCCC	AGAGCTTCCC	CTTCAACACC	TCTGTGGTGT	ACAAGAAGAC	CCTGTTTGTG
781	GAGTTCACATG	ACCACCTGTT	CAACATTGCC	AAGCCCAAGC	CCCCCTGGAT	GGGCCTGCTG
841	GGCCCCACCA	TCCAGGCTGA	GGTGTATGAC	ACTGTGGTGA	TCACCTGAA	GAACATGGCC
901	AGCCACCCTG	TGAGCCTGCA	TGCTGTGGGG	GTGAGCTACT	GGAAGGCCTC	TGAGGGGGCT
961	GAGTATGATG	ACCAGACCAG	CCAGAGGGAG	AAGGAGGATG	ACAAGGTGTT	CCCTGGGGGC
1021	AGCCACACCT	ATGTGTGGCA	GGTGTGAAG	GAGAATGGCC	CCATGGCCCT	TGACCCCCCTG
1081	TGCCTGACCT	ACAGCTACCT	GAGCCATGTG	GACCTGGTGA	AGGACCTGAA	CTCTGGCCTG
1141	ATTGGGGCCC	TGCTGGTGTG	CAGGGAGGGC	AGCCTGGCCA	AGGAGAAGAC	CCAGACCCTG
1201	CACAAAGTTCA	TCCTGCTGTT	TGCTGTGTTT	GATGAGGGCA	AGAGCTGGCA	CTCTGAAACC
1261	AAGAACAGCC	TGATGCAGGA	CAGGGATGCT	GCCTCTGCCA	GGGCCTGGCC	CAAGATGCAC
1321	ACTGTGAATG	GCTATGTGAA	CAGGAGCCTG	CCTGGCCTGA	TTGGCTGCCA	CAGGAAGTCT
1381	GTGTACTGGC	ATGTGATTTG	CATGGGCACC	ACCCCTGAGG	TGCACAGCAT	CTTCTGGAG
1441	GGCCACACCT	TCTTGGTCAG	GAACACACAG	CAGGCCAGCC	TGGAGATCAG	CCCCATCACC
1501	TTCTGACTG	CCCAGACCCT	GCTGATGGAC	CTGGGCCAGT	TCCTGCTGTT	CTGCCACATC
1561	AGCAGCCACC	AGCATGATGG	CATGGAGGCC	TATGTGAAGG	TGGACAGCTG	CCCTGAGGAG
1621	CCCCAGCTGA	GGATGAAGAA	CAATGAGGAG	GCTGAGGACT	ATGATGATGA	CCTGACTGAC
1681	TCTGAGATGG	ATGTGGTGAG	GTTTGTATGAT	GACAAACAGC	CCAGCTTCAT	CCAGATCAGG

[0048]

1741 TCTGTGGCCA AGAAGCACCC CAAGACCTGG GTGCACTACA TTGCTGCTGA GGAGGAGGAC
 1801 TGGGACTATG CCCCCCTGGT GCTGGCCCTT GATGACAGGA GCTACAAGAG CCAGTACCTG
 1861 AACCAATGGCC CCCAGAGGAT TGGCAGGAAG TACAAGAAGG TCAGGTTTCAT GGCCTACACT
 1921 GATGAACCTT TCAAGACCAG GGAGGCCATC CAGCATGAGT CTGGCATCCT GGGCCCCCTG
 1981 CTGTATGGGG AGGTGGGGGA CACCCTGCTG ATCATCTTCA AGAACCAGGC CAGCAGGCCC
 2041 TACAACATCT ACCCCCATGG CATCACTGAT GTGAGGCCCC TGTACAGCAG GAGGCTGCCC
 2101 AAGGGGGTGA AGCACTGAA GGAATTCCCC ATCCTGCTG GGGAGATCTT CAAGTACAAG
 2161 TGGACTGTGA CTGTGGAGGA TGGCCCCACC AAGTCTGACC CCAGGTGCCT GACCAGATAC
 2221 TACAGCAGCT TTGTGAACAT GGAGAGGGAC CTGGCCTCTG GCCTGATTGG CCCCCTGCTG
 2281 ATCTGCTACA AGGAGTCTGT GGACCAGAGG GGCAACCAGA TCATGTCTGA CAAGAGGAAT
 2341 GTGATCCTGT TCTCTGTGTT TGATGAGAAC AGGAGCTGGT ACCTGACTGA GAACATCCAG
 2401 AGGTTCTTGC CCAACCCTGC TGGGGTGCAG CTGGAGGACC CTGAGTTCCA GGCCAGCAAC
 2461 ATCATGCACA GCATCAATGG CTATGTGTTT GACAGCCTGC AGCTGTCTGT GTGCCTGCAT
 2521 GAGGTGGCCT ACTGTACAT CCTGAGCATT GGGGCCAGA CTGACTTCCT GTCTGTGTTT
 2581 TTCTCTGGCT ACACCTTCAA GCACAAGATG GTGTATGAGG ACACCCTGAC CCTGTTCCCC
 2641 TTCTCTGGGG AGACTGTGTT CATGAGCATG GAGAACCCCTG GCCTGTGGAT TCTGGGCTGC
 2701 CACAACCTCTG ACTTCAGGAA CAGGGGCATG ACTGCCCTGC TGAAGTCTC CAGCTGTGAC
 2761 AAGAACACTG GGGACTACTA TGAGGACAGC TATGAGGACA TCTCTGCCTA CCTGCTGAGC
 2821 AAGAACAATG CCATTGAGCC CAGGAGCTTC AGCCAGAATC CACCCGTCCT TAAGCGCCAT
 2881 CAGCGCGAGA TCACCAGGAC CACCCTGCAG TCTGACCAGG AGGAGATTGA CTATGATGAC
 2941 ACCATCTCTG TGGAGATGAA GAAGGAGGAC TTGACATCT ACACGAGGA CGAGAACCAG
 3001 AGCCCCAGGA GCTTCAGAA GAAGACCAGG CACTACTTCA TTGCTGCTGT GGAGAGGCTG
 3061 TGGGACTATG GCATGAGCAG CAGCCCCCAT GTGCTGAGGA ACAGGGCCCA GTCTGGCTCT
 3121 GTGCCCCAGT TCAAGAAGGT GGTGTTCCAG GAGTTCACTG ATGGCAGCTT CACCAGGCC
 3181 CTGTACAGAG GGGAGCTGAA TGAGCACCTG GGCCTGCTGG GCCCTACAT CAGGGCTGAG
 3241 GTGGAGGACA ACATCATGGT GACCTTCAGG AACCAGGCCA GCAGGCCCTA CAGCTTCTAC
 3301 AGCAGCCTGA TCAGCTATGA GGAGGACCAG AGGCAGGGGG CTGAGCCCAG GAAGAACTTT
 3361 GTGAAGCCCA GTGAAGCCAA GACCTACTTC TGGAGGTGC AGCACCACAT GGCCCCCACC
 3421 AAGGATGAGT TTGACTGCAA GGCCTGGGCC TACTTCTCTG ATGTGGACCT GGAGAAGGAT
 3481 GTGCACCTCT GCCTGATTGG CCCCCTGCTG GTGTGCCACA CCAACACCCT GAACCCTGCC
 3541 CATGGCAGGC AGGTGACTGT GCAGGAGTTT GCCCTGTTCT TCACCATCTT TGATGAAACC
 3601 AAGAGCTGGT ACTTCACTGA GAACATGGAG AGGAAGTGA GGGCCCCCTG CAACATCCAG
 3661 ATGGAGGACC CCACCTTCAA GGAGAACTAC AGGTTCATG CCATCAATGG CTACATCATG
 3721 GACACCCTGT CTGGCCTGGT GATGGCCAG GACCAGAGGA TCAGGTGGTA CCTGCTGAGC
 3781 ATGGGCAGCA ATGAGAACAT CCACAGCATC CACTTCTCTG GCCATGTGTT CACTGTGAGG
 3841 AAGAAGGAGG AGTACAAGAT GGCCCTGTAC AACCTGTACC CTGGGGTGTT TGAGACTGTG
 3901 GAGATGCTGC CCAGCAAGGC TGGCATCTGG AGGGTGGAGT GCCTGATTGG GGAGCACCTG
 3961 CATGCTGGCA TGAGCACCTT GTTCTTGGTG TACAGCAACA AGTGCCAGAG CCCCCTGGGC
 4021 ATGGCCTCTG GCCACATCAG GGAATTCCAG ATCACTGCCT CTGGCCAGTA TGGCCAGTGG
 4081 GCCCCCAAGC TGGCCAGGCT GCACTACTCT GGCAGCATCA ATGCCTGGAG CACCAAGGAG
 4141 CCCTTCACTG GGATCAAGGT GGACCTGCTG GCCCCCATGA TCATCCATGG CATCAAGACC
 4201 CAGGGGGCCA GGCAGAAGTT CAGCAGCCTG TACATCAGCC AGTTCATCAT CATGTACAGC
 4261 CTGGATGGCA AGAAGTGGCA GACCTACAGG GGCAACAGCA CTGGCACCTT GATGGTGTTC
 4321 TTTGGCAATG TGGACAGCTC TGGCATCAAG CACAACATCT TCAACCCCCC CATCATTTGCC
 4381 AGATACATCA GGCTGCACCC CACCCTACTAC AGCATCAGGA GCACCCTGAG GATGGAGCTG
 4441 ATGGGCTGTG ACCTGAACAG CTGCAGCATG CCCCTGGGCA TGGAGAGCAA GGCCATCTCT
 4501 GATGCCAGCA TCACCTGCCAG CAGTACTTTC ACCAACATGT TTGCCACCTG GAGCCCCAGC
 4561 AAGGCCAGGC TGCACTCTGCA GGGCAGGAGC AATGCCTGGA GGGCCAGGT CAACAACCCC
 4621 AAGGAGTGGC TGCAGGTGGA CTTCCAGAAG ACCATGAAGG TGACTGGGGT GACCACCCAG
 4681 GGGGTGAAGA GCCTGCTGAC CAGCATGTAT GTGAAGGAGT TCCTGATCAG CAGCAGCCAG
 4741 GATGGCCACC AGTGACCTT GTTCTTCCAG AATGGCAAGG TGAAGGTGTT CCAGGGCAAC
 4801 CAGGACAGCT TCACCCCTGT GGTGAACAGC CTGGACCCCC CCCTGCTGAC CAGATACCTG
 4861 AGGATTACCC CCCAGAGCTG GGTGCACAGC ATTGCCCTGA GGATGGAGGT GCTGGGCTGT
 4921 GAGGCCAGG ACCTGTACTG AGGATCCAAT AAAATATCTT TATTTTCATT ACATCTGTGT
 4981 GTTGGTTTTT TGTGTGTTTT CCTGTAACGA TCGGGCTCGA GCGCAGGAAC CCCTAGTGAT
 5041 GGAGTTGGCC ACTCCCTCTC TGCAGGCTCG CTCGCTCACT GAGGCCGCCC GGGCTTTGCC
 5101 CCGGCGGCCT CAGTGAGCGA GCGAGCGCGC AG (SEQ ID NO:2)

[0049]

[0050]

상기 서열에서, 왼쪽 (5') ITR (AAV2 ITR)은 뉴클레오타이드 1-130에 걸쳐 있고, 오른쪽 (3') ITR (AAV2 ITR)은 뉴클레오타이드 5025-5132에 걸쳐 있다. 두 ITR 모두 박스로 표시된다.

[0051]

IV. 제조합 AAV 제제의 용도

[0052]

본 발명의 제약 조성물은 바이알 (예를 들어, 전처리된 유리 바이알 또는 COP 바이알) 및 사용 설명서를 포함하는 제조품 (예를 들어, 키트)으로 공급될 수 있다. 일부 실시양태에서, 각각의 바이알은 0.5-50 mL (예를 들어, 1-10 mL) 중 AAV의 mL당 약 1E+11 내지 1E+15 vg를 함유한다. 특정한 실시양태에서, 각각의 바이알은 5E+12 내지 1E+14/mL (예를 들어, 1E+13 vg/mL)을 함유한다. 특정 실시양태에서, 각각의 바이알은 6 mL 중 6E+13 vg를 함유한다.

[0053]

조성물은 환자에게 1회 또는 1회 초과 투여될 수 있다. 예를 들어, 조성물은 환자에게 1개월, 3개월, 6개월, 9개월, 또는 1년 이상의 간격으로 투여될 수 있다. 일부 실시양태에서, 조성물은 환자에게 2년, 5년, 7년, 10년, 또는 15년 이상의 간격으로 투여될 수 있다. 제약 조성물은 이를 필요로 하는 환자에게 치료하고자 하는 질환에 적합한 경로를 통해 제공될 수 있다. 예를 들어, 조성물은 정맥내 주사, 동맥내 주사, 두개내 주사, 복강내 주사, 문맥 주사, 또는 근육내 주사를 통해 투여될 수 있다. 예를 들어, SB-525 제약 조성물은 혈우병 A 환자에게 1E+11 내지 1E+15 vg/kg, 예컨대 1E+11 내지 1E+14 (예를 들어, 1E+12 내지 1E+14) vg/kg으로 정맥내

로 제공될 수 있다. 일부 실시양태에서, SB-525 제약 조성물은 혈우병 A 환자에게 5E+11, 6E+11, 7E+11, 8E+11, 9E+11, 1E+12, 2E+12, 3E+12, 4E+12, 5E+12, 6E+12, 7E+12, 8E+12, 9E+12, 1E+13, 2E+13, 3E+13, 4E+13, 5E+13, 6E+13, 7E+13, 8E+13, 9E+13, 또는 1E+14 vg/kg으로 정맥내로 제공될 수 있다. 일부 실시양태에서, SB-525 조성물은 혈우병 A 환자에게 약 6E+13 vg/kg의 용량으로 정맥내로 제공될 수 있다.

[0054] 일부 실시양태에서, 환자는 중증 또는 중등도 혈우병 A를 가진다. 추가의 일부 실시양태에서, 환자는 어떤 억제제 (인자 VIII에 대한 동종항체)도 갖고 있지 않다. 특정 실시양태에서, 환자는 AAV6에 대한 중화 항체를 갖고 있지 않는다. 환자는 성인 또는 청소년 환자 (≥ 12 세 이상) 또는 소아 환자 (< 12 세 미만)일 수 있다.

[0055] 본원에서 달리 정의되지 않는 한, 본 개시내용과 관련하여 사용된 과학 기술 용어는 관련 기술분야의 통상의 기술자에 의해 일반적으로 이해되는 의미를 가질 것이다. 예시적인 방법 및 물질이 하기에 기재되긴 하지만, 본원에 기재된 것들과 유사하거나 동등한 방법 및 물질이 또한 본 개시내용의 실시 또는 시험에 사용될 수 있다. 상충되는 경우에, 정의를 포함한 본 명세서가 지배할 것이다. 일반적으로, 본원에 기재된 심장학, 의학, 의약 및 제약 화학, 및 세포 생물학과 관련하여 사용되는 명명법 및 기술은 관련 기술분야에 널리 공지되어 있고 통상적으로 사용되는 것들이다. 효소적 반응 및 정제 기술은 제조업체의 설명서에 따라, 관련 기술분야에서 통상적으로 완수되는 바와 같이 또는 본원에 기재된 바와 같이 수행된다. 추가로, 문맥상 달리 요구되지 않는 한, 단수 용어는 복수를 포함할 것이고, 복수 용어는 단수를 포함할 것이다. 본 명세서 및 실시양태 전반에 걸쳐, 단어 "가진다" 및 "포함한다", 또는 변형어 예컨대 "가진다", "갖는다", "포함한다" 또는 "포함하는"은 언급된 정수 또는 정수의 군을 포함하나, 임의의 다른 정수 또는 정수의 군을 배제하지 않음을 암시하는 것으로 이해될 것이다. 본원에 언급된 모든 간행물 및 다른 참고문헌은 그 전문이 참조로 포함된다. 다수의 문헌이 본원에 인용되긴 하지만, 이러한 인용이 이들 문헌 중 임의의 것이 관련 기술분야의 통상의 일반 지식의 일부를 형성한다는 것의 인정을 구성하는 것은 아니다. 본원에 사용되는 바와 같이, 하나 이상의 관심 값에 적용되는 바와 같은 용어 "대략" 또는 "약"은 명시된 참조 값과 유사한 값을 지칭한다. 특정 실시양태에서, 용어는 달리 명시되지 않거나 문맥으로부터 달리 명백하지 않는 한 명시된 참조 값의 어느 방향으로든 (초과 또는 미만) 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1%, 또는 그 미만 내에 속하는 값의 범위를 지칭한다.

[0056] 본 발명을 보다 잘 이해할 수 있도록 하기 위해, 하기 실시예를 제시한다. 이들 실시예는 단지 예시를 위한 것이며, 어떤 방식으로든 본 발명의 범주를 제한하는 것으로 해석되어서는 안된다.

[0057] 실시예

[0058] 하기 실시예는 생물학적 제품의 저장 기간 및 장기간 안정성을 평가하기 위한 통상적인 시험인, 본 발명자들이 현재의 SB-525 제제가 동결/해동 순환시 침전물을 형성함을 발견한 연구를 기재한다. 본 발명자들은 완충제 제제 단독 (즉, 어떤 활성 바이러스 벡터 성분도 함유하지 않는 완충제 제제)에서도 침전물이 형성됨을 발견하였다. 따라서 본 발명자들은 이 문제를 피할 수 있는 신규 제제를 찾는 데 착수하였다.

[0059] 이 연구에서, SB-525 바이러스 제제를 제조하고 CaCl_2 , MgCl_2 , 35 mM NaCl, 1% 수크로스, 및 0.05% 콜리포르 (Kolliphor)® P 188 (폴록사머 188)가 첨가된 포스페이트-완충 식염수 (PBS)에서 대략 $1.0\text{E}+13$ vg/mL로 제제화하고, 6 mL 어셉틱 테크놀로지스(Aseptic Technologies) 크리스탈 밀폐형 바이알에 5 mL를 충전하고 $\leq -65^\circ\text{C}$ 에서 보관하였다. 안정성 시험을 위해, SB-525 조성물을 -0°C , 5°C , 및 25°C 에서 최대 24개월 동안 안정 상태로 두었다 (표 5). 또한, 5회 주기의 제어되지 않은 동결/해동 (F/T) (표 1) 및 24시간 교반 (AG) (표 2)을 수행하였다. 약물 제품(Drug product) (DP) 품질 속성을 표 5 내지 표 8에 따라 분석하였다.

[0060] 실시예 1: 동결/해동 순환 및 교반 시험

[0061] 물질 및 방법

[0062] SB-525는 하기 성분을 함유하는 제제 완충제에서 공칭 $1.0\text{E}+13$ vg/mL로 제공되었다: 0.90 mM CaCl_2 , 0.49 mM MgCl_2 , 2.68 mM KCl, 1.47 mM KH_2PO_4 , 172 mM NaCl, 8.10 mM Na_2HPO_4 , 1% (w/v) 수크로스, 0.05% (w/v) 폴록사머 188, pH 7.36. 23개 바이알을 -70°C 에서, 11개는 5°C 에서, 그리고 8개는 25°C 에서 보관하였다.

[0063] 동결/해동 (F/T) 순환 시험의 경우, 샘플을 표 1에 나타낸 바와 같이 3회 주기 및 5회 주기 동안 제어되지 않은 F/T 순환시켰다.

[0064] <표 1>

[0065] DP 제어되지 않은 F/T 순환

F/T 순환	1일차	2일차		3일차		4일차		5일차	
	4 pm	8 am	4 pm	8 am	4 pm	8 am	4 pm	8 am	4 pm
3	-80°C	25°C	-80°C	25°C	-80°C	25°C			
5	-80°C	25°C	-80°C	25°C	-80°C	25°C	-80°C	25°C	-80°C

[0066]

[0067] 교반 시험의 경우, 샘플을 표 2에 나타난 바와 같이 실온에서 교반하였다.

[0068] <표 2>

[0069] DP 교반 설정

교반 안정성	T ₀	T _{24hr}
	1일차 (8 am)	2일차 (8 am)
300 rpm	사용 안정성 T ₀	풀(Pull) 24Hr 물질

[0070]

[0071] 각각 -70°C, 5°C에서, 25°C에서 보관된 바이알을 (i) 외관 (액체), pH, 동적 광 산란 (DLS), 및 고 정확도 액체 입자 계수기 (HIAC); (ii) vg 동일성 (qPCR), vg 역가 (qPCR), 캡시드 역가 (ELISA), 캡시드 동일성 (ELISA), 및 감염 역가 (TCID₅₀); (iii) 시험관내 FVIII 활성 (생물검정); 또는 (iv) UV 260/280, 환원 CE-SDS, SEC 역가_{260/280}에 대해 분석하였다.

[0072] F/T 순환을 거친 샘플을 (i) 외관 (액체), pH, 오스몰농도, DLS, HIAC; (ii) vg 역가 (qPCR), 캡시드 역가 및 동일성 (ELISA), 환원 SDS-페이지, 및 감염 역가 (TCID₅₀); 또는 (iii) UV 260/280, SEC 역가_{260/280}, RP-HPLC, 시험관내 FVIII 활성 (생물검정), 및 환원 CE-SDS에 대해 분석하였다.

[0073] 24시간 교반 (AG)을 거친 샘플을 (i) 외관 (액체), pH, 오스몰농도, DLS, 및 HIAC; (ii) vg 역가 (qPCR), 캡시드 역가 및 동일성 (ELISA), 환원 SDS-페이지, 감염 역가 (TCID₅₀); 또는 (iii) UV 260/280, SEC 역가_{260/280}, RP-HPLC, 시험관내 FVIII 활성 (생물검정), 및 환원 CE-SDS에 대해 분석하였다.

[0074] **결과**

[0075] SB-525 DP 안정성, 5회 주기의 제어되지 않은 F/T, 및 24시간 교반 아암으로부터의 결과를 하기에 기재하였다.

[0076] 하기 표 3에 나타난 바와 같이, 샘플이 최대 1개월 동안 시험된 조건에서 보관되었을 경우 색상, 투명도, pH, DLS에 의해 측정된 바와 같은 유체역학적 반경, vg 역가, 캡시드 역가, SDS-페이지에 의해 측정된 바와 같은 캡시드 순도, 감염 역가, UV 260/280 (비어 있는(empty): 완전(full) 캡시드 비에 대한 대체 측정치), 및 생물학적 활성 (% 상대 효능)에 어떤 유의한 변화도 없었다. 5°C 및 25°C에서 가시적 입자의 변화가 있었다. 모든 샘플은 동결되었고 T 제로 (T₀)에서 백색 및 불투명으로 나타났다.

[0077] <표 3>

[0078] 안정성 결과

시험		보관	T ₀ *	T _{1M} ²
외관, 액체	색상	-70°C	무색, 투명, 어떤 침전물도 없음, 어떤 오염물도 없음	B6
		5°C		B6
		25°C		B6
	투명도	-70°C		<= 참조 I
		5°C		<= 참조 I
		25°C		<= 참조 I
	가시적 입자	-70°C		EFVP
		5°C		1-5개의 입자
		25°C		TMTC
pH		-70°C	7.3	7.3
		5°C		7.3
		25°C		7.1
DLS	Z-평균 - 확산 계수 (cm ² /s)	-70°C	-	1.70e ⁻⁷
		5°C		1.70e ⁻⁷
		25°C		1.70e ⁻⁷
	Z-평균 - 반경 (nm)	-70°C	22.3 (직경)	14.7
		5°C		14.8
		25°C		14.4
	피크 1 - 확산 계수 (cm ² /s)	-70°C	-	1.74e ⁻⁷
		5°C		1.69e ⁻⁷
		25°C		1.70e ⁻⁷
	피크 1 - 반경 (nm)	-70°C		14.2
		5°C		14.6
		25°C		14.5
	피크 2 - 확산 계수 (cm ² /s)	-70°C		9.42e ⁻¹⁰
		5°C		1.26e ⁻⁹
		25°C		-
	피크 2 - 반경 (nm)	-70°C		2658.7
		5°C		2261.8
		25°C		-
qPCR에 의한 Vg 역가 (vg/mL) ¹		-70°C	8.74E+12	9.77E+12
		5°C		1.01E+13
		25°C		9.98E+12
캡시드 ELISA (캡시드/mL)		-70°C	2.76E+13	2.52E+13
		5°C		2.53E+13
		25°C		2.66E+13
SDS-페이지		-70°C		
		5°C		

[0079]

시험	보관	T ₀ *	T _{1M} ²
	25°C	참조에 필적하는 VP1, VP2, 및 VP3. 다른 밴드 ≥ 감도 대조군 관찰되지 않음 (함한 % 순도 VP1, VP2, VP3) = 100%	참조에 필적하는 VP1, VP2, 및 VP3. 다른 밴드 ≥ 감도 대조군 관찰되지 않음 (함한 % 순도 VP1, VP2, VP3) = 100%
감염 역가 TCID ₅₀ (TCID ₅₀ /mL)	-70°C	1.12E+9	3.56E+9
	5°C		2.00E+9
	25°C		1.12E+9
SEC UV 260/280 비	-70°C	1.37	1.36
	5°C		1.36
	25°C		1.36
시험관내 FVIII 활성/ 기능적 생물검정 (% 상대 효능)	-70°C	85 ³	80
	5°C		80
	25°C		69

[0080]

[0081] *T₀: 방출 시험에 의해 수행된, 기능적 생물검정을 제외한 모든 분석

[0082] ¹ qPCR에 의한 박터 게놈 동일성 및 역가의 T₀ 재-시험을 수행하였음

[0083] ² 연구는 DP에서 입자 검출로 인해 T1M 후에 종료되었으며; 조사가 개시되었음

[0084] ³ 상이한 참조 물질에 대한 생물검정 (% 상대 효능)에 대한 T₀ 재-시험

[0085] EFVP: 가시적 입자가 본질적으로 없음

[0086] TMT: 셀 수 없을 정도로 많음

[0087] N.T.: 시험되지 않음

[0088] 표 4에 나타난 바와 같이, 모든 보관 조건에서 1개월 후 캡시드 순도에 어떤 유의한 변화도 없었다.

[0089] <표 4>

[0090] 캡시드 순도 안정성 결과

시점	보관	캡시드 (%)	VP1 (%)	VP2 (%)	VP3 (%)	기타 (%)
T ₀		94.3	2.2	3.4	94.4	5.7
T _{1M}	-70°C	95.1	1.1	3.1	95.8	4.9
	5°C	95.0	2.1	3.2	94.7	5.0
	25°C	94.8	1.9	3.0	95.1	5.2

[0091]

[0092] 표 5에 나타난 바와 같이, 모든 보관 조건 (NMT: 이하; LOQ: 정량화 한계)에서 1개월 후에 고분자량 중 (HMWS) 의 어떤 유의한 응집 또는 형성도 없었다.

[0093] <표 5>

[0094] 의도된, 가속화된, 및 스트레스가 가해진 보관 조건 하에

[0095] 1개월 후 SEC 역가 안정성 결과

시점	보관	바이러스 입자 (vp) 역가 (vp/mL)	단량체 (%)	HMWS (%)	LOQ
T ₀		5.12E+13	100	NMT 1.0	1.01E+12
T _{1M}	-70°C	2.65E+13	100	NMT 1.0	1.01E+12
	5°C	2.57E+13	100	NMT 1.0	1.01E+12
	25°C	3.31E+13	100	NMT 1.0	1.01E+12

[0096]

[0097] 표 6에 나타난 바와 같이, 모든 보관 조건에서 1개월 후 비가시적 입자(subvisible particle) (HIAC당)의 어떤 유의한 증가도 없었다. 모든 시점은 $\geq 10 \mu\text{m}$ 및 $\geq 25 \mu\text{m}$ 범위와 관련하여 USP <787> 표준 미만의 입자를 나타냈으며, 여기서 허용 기준은 용기당 $> 10 \mu\text{m}$ 의 입자 6,000개 이하 및 용기당 $> 25 \mu\text{m}$ 의 입자 600개 이하 이다.

[0098] <표 6>

[0099] HIAC 안정성 결과

보관	T ₀ (입자/용기)		T _{1M} (입자/mL)				
	$\geq 10 \mu\text{m}$	$\geq 25 \mu\text{m}$	$\geq 2 \mu\text{m}$	$\geq 5 \mu\text{m}$	$\geq 8 \mu\text{m}$	$\geq 10 \mu\text{m}$	$\geq 25 \mu\text{m}$
-70°C	10	3	143	11	1	0	0
5°C			626	96	24	15	0
25°C			478	94	15	4	1

[0100]

[0101] 표 7에 나타난 바와 같이, F/T/AG 스트레스시 색상, 투명도, pH, DLS에 의해 측정된 바와 같은 유체역학적 반경, vg 역가, 캡시드 역가, 감염 역가, UV 260/280 (비어 있는: 완전 캡시드 비에 대한 대체물), RP-HPLC에 의해 측정된 바와 같은 캡시드 순도, 및 생물학적 활성 (% 상대 효능)에 어떤 유의한 변화도 없었다. F/T에 대한 가시적 입자에 변화가 있었다.

[0102] <표 7>

[0103] 주기 제어되지 않은 F/T 및 24시간 AG 결과

시험		처리	결과
외관	색상	F/T	B9 ¹
		AG	B9
	투명도	F/T	≤ REF 1 ²
		AG	≤ REF 1
	가시적 입자	F/T	TMTC
		AG	가시적 입자가 본질적으로 없음 (EFVP)
pH		F/T	7.2
		AG	7.3
오스몰랄농도 (mOsm/kg)		F/T	387
		AG	388
DLS	Z-평균 - 확산 계수 (cm ² /s)	F/T	1.70e ⁻⁷
		AG	1.67e ⁻⁷
	Z-평균 -반경 (nm)	F/T	14.5
		AG	14.7
	피크 1 - 확산 계수 (cm ² /s)	F/T	1.69e ⁻⁷
		AG	1.56e ⁻⁷
	피크 1 - 반경 (nm)	F/T	14.5
		AG	15.7
QPCR에 의한 Vg 역가 (vg/mL)		F/T	8.44E+12
		AG	8.63E+12
캡시드 ELISA (캡시드/mL)		F/T	2.08E+13
		AG	2.00E+13
SDS-페이지		F/T	참조에 필적하는 VP1, VP2, 및 VP3. 다른 밴드 ≥ 감도 대조군 관찰되지 않음 (합한 % 순도 VP1, VP2, VP3) = 100%
		AG	
감염 역가 TCID ₅₀ (TCID ₅₀ /mL)		F/T	9.29E+8
		AG	2.42E+9
UV 260/280 비		F/T	1.32
		AG	1.32
SEC UV 260/260 비		F/T	1.35
		AG	1.35
RP-HPLC	캡시드 (%)	F/T	98.9
		AG	99.0
	기타 (%)	F/T	1.1
		AG	1.0
시험관내 FVIII 활성/ 기능적 생물검정 (% 상대 효능)		F/T	85
		AG	80

[0104]

[0105] ¹ 색상은 열거된 참조 표준보다 더 강렬하거나 더 유백광을 내지 않는다.

[0106] ² 투명도는 열거된 참조 표준보다 더 유백광을 내지 않는다.

[0107] 표 8에 나타난 바와 같이, F/T/AG 스트레스시 환원 CE-SDS의 어떤 유의한 변화도 없었다.

[0108] <표 8>

[0109] 5회 주기 제어되지 않은 F/T 및 24시간 AG CE-SDS-환원 결과

처리	캡시드 (%)	VP1 (%)	VP2 (%)	VP3 (%)	기타 (%)
F/T	95.1	2.0	3.0	95.0	4.9
AG	95.2	2.0	3.2	94.8	4.8

[0110]

[0111] 표 9에 나타난 바와 같이, F/T/AG 스트레스시 어떤 유의한 응집/HMWS 형성도 없었다.

[0112] <표 9>

[0113] 5회 주기 제어되지 않은 F/T 및 24시간 AG SEC 역가 결과

처리	바이러스 입자 역가 (vp/mL)	단량체 (%)	HMWS (%)	LOQ
F/T	4.95E+13	100	0	1.01E+12
AG	5.05E+13	100	0	1.01E+12

[0114]

[0115] 표 10에 나타난 바와 같이, F/T 시 비가시적 입자 (HIAC당)에 유의한 증가가 있었다. F/T 시의 입자는 $\geq 10 \mu\text{m}$ 및 $\geq 25 \mu\text{m}$ 범위와 관련하여 USP <787> 표준 초과였으며; 한편 AG시 입자는 $\geq 10 \mu\text{m}$ 및 $\geq 25 \mu\text{m}$ 범위와 관련하여 USP <787> 표준 미만이였다.

[0116] <표 10>

[0117] 5회 주기 제어되지 않은 F/T 및 24시간 AG HIAC 결과

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

[0118]

[0119] 상기 결과는 SB-525 샘플이 -70°C , 5°C , 또는 25°C 에서 최대 1개월 보관되는 경우 색상, 투명도, pH, 유체역학적 반경 (동적 광 산란에 의해 측정된 바와 같음), vg 역가, 캡시드 역가, 감염 역가, 비어 있는: 완전 캡시드 비 (UV 260/280에 의해 측정된 바와 같음), 생물학적 활성 (% 상대 효능), 캡시드 순도 (SDS-페이지, 환원 CE-SDS 및 RP-HPLC에 의해 측정된 바와 같음), 또는 바이러스 입자 역가에 어떤 유의한 변화도 나타내지 않았음을 입증하였다.

[0120] 또한, F/T 또는 AG 스트레시 색상, 투명도, pH, 유체역학적 반경 (동적 광 산란에 의해 측정된 바와 같음), vg 역가, 캡시드 역가, 감염 역가, 비어 있는: 완전 캡시드 비 (UV 260/280에 의해 측정된 바와 같음), 생물학적 활성 (% 상대 효능), 캡시드 순도 (SDS-페이지, 환원 CE-SDS, RP-HPLC에 의해 측정된 바와 같음), 또는 바이러스 입자 역가에 어떤 유의한 변화도 역시 없었다. 그러나, F/T시 비가시적 입자 (HIAC당)의 유의한 증가가 있었으며 5°C 및 25°C 에서 1개월 보관 후 가시적 입자의 증가가 있었다. 이들 결과로 인해 연구는 1개월에 종료되었다.

[0121] 실시예 2: F/T 후 DP 바이알에서 미립자 물질의 특성화

[0122] 미립자 물질이 관찰된 SB-525 제제의 상기 안정성 시험으로부터의 샘플을 단리 및 확인을 위해 추가로 분석하였다.

[0123] 5회 동결-해동 주기를 거친 약물 제품 샘플 ("5 F/T 후 DP") 및 1개월 동안 25°C 에서 보관된 샘플 (25°C 에서 1M 후 DP)을 분석하였다. 미립자 물질은 $0.8 \mu\text{m}$ 금 필터 상에 단리되었다. 이어서 이를 키엔스(Keyence) VHX6000 디지털 현미경을 사용하여 150x 배율로 부분 링 조명 하에 필터 상에서 영상화하였다. 이어서 필터를 푸리에 변환 적외선 (FTIR) 현미경으로 옮겨 상기 물질에 대한 스펙트럼을 획득하였다. FTIR 스펙트럼을 알려진 스펙트럼에 대한 KnowItAll 데이터베이스와 비교하였다. 25°C 에서 1M 후 DP 샘플의 일부를 또한 유리 슬라이드 상에 필터에서 긁어내고 니콘 이클립스(Nikon Eclipse) ME600 편광 현미경을 사용하여 평면 편광 및 교차 극선(crossed polar) 하에 영상화하였다. 금 필터의 일부를 커팅하고 EDS 모듈이 장착된 JEOL6000 SEM 하에 분석하였다. 샘플은 또한 라만(Raman) 현미경검사 분석에 의해 분석하였다.

[0124] 모든 샘플에 대해, 디지털 영상화는 반결정질로 보이는 백색 고체를 나타냈다. 교차 극선 하에, "5 F/T 후 DP" 샘플은 어떤 복굴절도 나타내지 않았으며, 이는 상기 샘플이 비정질 물질이거나 등방성이었음을 시사한다. SEM/EDS 분석은 많은 분량의 산소, 인, 및 칼슘을 나타냈다. FTIR 분석은 물질을 염으로서 확인하였으나, 추가 확인이 필요하였다. 라만 현미경검사는 인산칼슘의 특징적인 피크를 검출할 수 있었으며, 이는 모든 샘플 중의 백색 미립자 물질이 인산칼슘이었음을 시사한다. 도 1a-도 1f는 입자 특성화 연구를 요약한다.

[0125] 실시예 3: SB-525의 재제제화

[0126] 이 실시예는 상기에서 관찰된 침전 문제를 피할 수 있는 신규 SB-525 제제를 시험하는 실험을 기재한다. 이들 실험은 (1) 칼슘을 제거하거나, (2) 칼슘과 마그네슘을 제거하거나, (3) 수크로스를 8.5%로 증가시키도록 재제제화되는 경우 SB-525 DP의 단기간 안정성을 평가하였다. 이들 변화는 각각 (1) 입자 공급원 제거, (2) MgCl_2

의 용해도 문제로 인한 2가 양이온 둘 다를 제거, 또는 (3) 동결-해동 스트레스에 대한 제제의 안정성 증가에 의해 입자 생성을 방지할 것으로 예상되었다. 2개의 파일럿 배치를 완충제 교환하고 6 mL AT 바이알에 2.5 mL를 충전하여 부피에 대한 표면적 (SA/V) 충전에 대한 최악-사례 조건을 모방하였다. 충전/마무리 후, 바이알을 5회의 제어되지 않은 동결-해동 주기 ($\leq -65^{\circ}\text{C}$ 내지 주위)에 적용한 다음에, $\leq -65^{\circ}\text{C}$ (의도된 보관), $2-8^{\circ}\text{C}$ (스트레스가 가해짐; 액체 보관), 25°C (가속화됨; 액체 보관), 및 40°C (공격적/강제적 분해 조건; 액체 보관)에서 안정 상태로 두었다. 이들 조건은 제제 간의 차이를 강조할 것이라는 기대로 선택되었다.

[0127] SB-525 바이러스는 정화된 벌크 수확물로부터 정제되었고 CaCl_2 , MgCl_2 , 35 mM NaCl, 1% 수크로스, 및 0.05% 콜리포라® P 188 (폴록사머 188)을 함유하는 포스페이트 완충 식염수 (PBS)에서 대략 $1.0\text{E}+13$ vg/mL로 제제화되고, 바이알에 충전하고, $\leq -65^{\circ}\text{C}$ 에서 보관하였다.

[0128] **물질 및 방법**

[0129] SB-525 제제화된 벌크 약물 물질은 다음을 함유하였다: 멸균 여과되고 $\leq -65^{\circ}\text{C}$ 에서 125 mL HDPE 병에 보관된, 0.90 mM CaCl_2 , 0.49 mM MgCl_2 , 2.68 mM KCl, 1.47 mM KH_2PO_4 , 172 mM NaCl, 8.10 mM Na_2HPO_4 , 1% (w/v) 수크로스, 0.05% (w/v) 폴록사머 188, pH 7.0-7.6 중 SB-525 ($1.0\text{E}+13$ vg/ mL 공칭). Na_2HPO_4 (인산나트륨, 이염기성, 무수물), KH_2PO_4 (일염기성 인산칼륨), CaCl_2 (염화칼슘 2수화물), 및 MgCl_2 (염화마그네슘 6수화물)는 JT 베이커(Baker) 또는 피셔(Fischer)로부터 공급되었다. 폴록사머 188은 바스프(BASF)로부터 공급되었다. 보관 바이알은 6 mL 어셉틱 테크놀로지스 (AT) 밀폐형 크리스탈 바이알 (어셉틱 테크놀로지스; cat# VIA-060000)이었으며, 이는 주된 용기 폐쇄부(primary container closure), 제 위치에 열가소성 엘라스토머 마개 및 황색 캡을 가진 시클로-올레핀 공중합체 (COC)를 가진 바이알이다. DP 충전 전에, 제제화된 벌크 약물 물질 (FBDS)을 125 mL 고밀도 폴리에틸렌 (HDPE) 병에 충전하고 $\leq -65^{\circ}\text{C}$ 로 동결시켰다. 이어서 병을 주위 온도에서 해동하고, 완충제를 교환하고, 여과하고, 어셉틱 테크놀로지스 M1 유닛을 사용하여 DP를 6 mL AT 바이알에 채웠다. 하나의 파일럿 배치 물질은 총 10개의 교환 부피에 대해 대략 40 psi의 압력에서 50 kDa 필터 유닛을 사용하여 TFF를 통해 완충제 교환되었다. 두 번째 파일럿 배치는 총 10개의 교환 부피에 대해 대략 40 psi에서 50 kDa NMW PES 필터에 걸쳐 아미콘(Amicon) 교반 셀을 사용하여 완충제 교환되었다. 두 가지 교환 방법은 물질의 유의한 손실이나 흡착 없이 AAV 용으로 이전에 사용되었다.

[0130] AT 바이알을 대략 $1.0\text{E}+13$ vg/mL의 목표로 2.5 mL 충전하고, $\leq -65^{\circ}\text{C}$ 에서 주위 조건까지 제어되지 않은 속도로 5회 주기로 동결 해동하고, 비-GMP 보관 유닛에 안정 상태로 두었다. 바이알은 표 11에 개요를 설명한 안정성 풀(pull) 일정에 적용되었고, 표 12에 열거된 방법에 의해 시험되었다. 시험된 제제는 표 13에 개요를 설명하였다.

[0131] <표 11>

[0132] 캡시드 순도 안정성 일정

보관 온도 ($^{\circ}\text{C}$)	T_0	T_{3D}	T_{1W}	T_{2W}	T_{3W}	T_{4W}	T_{5W}
-70 (± 10)	XABCD	-	-	-	-	XABC	XA
5 (± 3)		X	X	XA	X		XA
25 (± 3)		X	X	XAB	X		-
40 (± 3)		XABCF	XA	X	XF	-	-

[0133]

[0134] <표 12>

[0135] 분석적 시험

시험 코드	시험 방법
X	외관 (액체)
A	pH
A	SEC - 응집체, UV 260/280, 바이러스 입자 역가
B	기능적 FVIII 생물검정
C	HIAC를 사용한 광 차폐
D	오스몰랄농도 (동결점 강하)
D	P188
D	수크로스
D	감소된 모세관 켈 전기영동 (rCGE) (비 및 순도)
F	질량 분석법 (탈아미드화)
B	백터 계승 역가 (qPCR)

[0136]

[0137] <표 13>

[0138] 제제

교환 공정	물질	제제	대조군과의 차이
밀리포어 아미콘 교환 셀	M05	대조군	N/A
	M06	Ca 음성	제거된 CaCl ₂
	M07	Ca/Mg 음성	제거된 CaCl ₂ 및 MgCl ₂
	M08	8.5% 수크로스	수크로스가 8.5% (w/v)로 증가

[0139]

[0140] *대조군 제제 (F0): 0.90 mM CaCl₂, 0.49 mM MgCl₂, 2.68 mM KCl, 1.47 mM KH₂PO₄, 172 mM NaCl, 8.10 mM Na₂HPO₄, 1% (w/v) 수크로스, 0.05% (w/v) 폴록사머 188 (P188), pH 7.0-7.6.

[0141] 결과

[0142] 제제 특성화

[0143] 올바른 제제가 달성되었는지 확인하기 위해, SB-525 DP 제제를 시험하여 오스몰랄농도, P188 농도, 수크로스 농도, 및 환원 CGE에 의한 캡시드 비 및 순도를 결정하였다. M05-M08에 대한 이들 시험 결과는 하기 표 14에 나타났다. 캡시드 순도 및 비는 rCGE에 의해 측정된 바와 같이 어떤 유의한 차이도 나타내지 않았다. 오스몰랄 농도는 수크로스 수준에 따라 예상 범위 내에 있다. M05-M08 샘플은 P188에 대한 올바른 농도를 나타냈다. 또한, 칼슘과 마그네슘의 농도는 모든 제제에 대해 예상 범위 내에 있는 것으로 CEDEX에 의해 확인되었다.

[0144] <표 14>

[0145] 제제 특성화

물질	오스몰랄농도 (mOsm/kg)	수크로스 (%)	P188 (μg/mL)	순도 (%캡시드)	AAV 비		
					%VP1	%VP2	%VP3
M05 - 대조군	399	1.10	589	95.2	2.0	3.3	94.7
M06 -Ca 음성	391	1.00	565	95.3	2.1	3.0	94.9
M07 - Ca/Mg 음성	417	1.00	575	95.8	1.7	2.9	95.4
M08 - 8.5% 수크로스	655	8.50	568	95.2	1.8	2.6	95.6

[0146]

[0147] 백터 계승 역가 (vg/mL)

[0148] M05-M08에 대한 백터 계승 역가 결과는 하기 표 15에 제시되어 있다. ≤ -65℃ 및 2-8℃ 조건에서, 4주 동안 보관 후에 관찰된 어떤 유의한 추세도 없었다. 3일 동안 40℃ 후, Ca/Mg 음성 제제는 백터 계승 역가에서 하향 추세를 나타냈다. 이 결과는 검정 가변성 내에서 고려되나, 이 제제에 대한 vp 역가 및 UV 260/280 결과와 일치한다.

[0149] <표 15>

[0150] 계농 역가 (vg/mL)

제제	시점					
	T ₀	T _{3D}	T _{1W}	T _{2W}	T _{3W}	T _{4W}
-70℃						
M05 - 대조군	7.44E+12	시험되지 않음				7.77E+12
M06 - Ca 음성	7.98E+12					7.47E+12
M07 - Ca / Mg 음성	6.33E+12					6.24E+12
M08 - 8.5% 수크로스	6.23E+12					6.56E+12
5℃						
M05 - 대조군	7.44E+12	시험되지 않음				7.39E+12
M06 - Ca 음성	7.98E+12					6.95E+12
M07 - Ca / Mg 음성	6.33E+12					6.56E+12
M08 - 8.5% 수크로스	6.23E+12					6.24E+12
25℃						
M05 - 대조군	7.44E+12	시험되지 않음		7.23E+12	시험되지 않음	7.84E+12
M06 - Ca 음성	7.98E+12			7.41E+12		7.09E+12
M07 - Ca / Mg 음성	6.33E+12			6.04E+12		5.85E+12
M08 - 8.5% 수크로스	6.23E+12			6.11E+12		7.01E+12
40℃						
M05 - 대조군	7.44E+12	7.16E+12	시험되지 않음			
M06 - Ca 음성	7.98E+12	6.94E+12				
M07 - Ca / Mg 음성	6.33E+12	4.63E+12				
M08 - 8.5% 수크로스	6.23E+12	6.68E+12				

[0151]

[0152] 가시적 외관

[0153] 모든 제제는 모든 시점 및 조건에 대해, 흑색 및 백색 백그라운드에 대한 육안 검사 동안 사용된, B9 색상 및 유백광 참조 1 이하, 색상 및 투명도 표준을 각각 나타냈다 (예를 들어, [Ph. Eur. 7.0, 20201, 20202 (01/2008); Millipore Sigma Colour Reference Solutions B] 참조). 가시적 외관 결과는 "대조군" 제제 (M05)만이 25°C에서 1주 초과 동안, 또는 40°C에서 3일 이상 동안 유지되는 경우 너무 많아 셀 수 없는 (TMT) 백색 플레이크형 입자를 나타냈음을 나타낸다. M06 및 M07 제제는 때때로 TMT 가시적 입자를 나타냈으나; 이들 샘플에 대한 입자 설명은 모두 섬유형 입자였다. 이들 입자는 이 연구에서 확인되지 않았지만, 섬유형 입자는 인산칼슘의 특징인 플레이크형 입자에 비해 외인성 입자 (예를 들어, 필터 입자)의 특징이 더 컸다. 또한, 엄격하게 제어된 환경 조건 하에 DP가 제조되지 않는 실험실-기반 개발 연구에서는 섬유형/외인성 입자의 출현은 무시할 만하다.

[0154] 누적 비가시적 입자

[0155] HIAC에 의한 비가시적 누적 입자 분석은 유의한 비가시적 입자 수를 가진 유일한 제제가 "대조군" 제제임을 나타냈으며, 이는 더 공격적인 안정성 조건 (더 긴 시간 동안 더 높은 온도)에서 증가 추세를 나타냈다. 다른 제제 (M06-M08)는 시간 또는 조건과 무관하게, 유의하지 않은 입자 수만을 나타냈다.

[0156] 기능적 생물검정 (효능)

[0157] 기능적 FVIII 생물검정 결과는 하기 표 16에 제시되어 있다. 결과는 샘플이 ≤ -65°C 또는 2-8°C 조건에서 유지되는 경우 효능에 어떤 유의한 변화도 나타내지 않았다. 25°C에서, 4주 후 모든 제제 (M05-M08)의 효능의 하향 추세가 있었다. 40°C에서, 3일 후 Ca/Mg 음성 제제의 경우 효능의 유의한 하락이 있었다.

[0158] <표 16>

[0159] 기능적 생물검정 (상대 효능)

제제	물질	시점					
		T ₀	T _{3D}	T _{1W}	T _{2W}	T _{3W}	T _{4W}
-70°C							
M05 - 대조군	M05	75	시험되지 않음				81
M06 - Ca 음성	M06	90					81
M07 - Ca / Mg 음성	M07	67					68
M08 - 8.5% 수크로스	M08	74					74
5°C							
M05 - 대조군	M05	75	시험되지 않음				73
M06 - Ca 음성	M06	90					87
M07 - Ca / Mg 음성	M07	67					71
M08 - 8.5% 수크로스	M08	74					76
25°C							
M05 - 대조군	M05	75	시험되지 않음	53	시험되지 않음	37	
M06 - Ca 음성	M06	90		66		63	
M07 - Ca / Mg 음성	M07	67		39		41	
M08 - 8.5% 수크로스	M08	74		55		45	
40°C							
M05 - 대조군	M05	75	51	시험되지 않음			
M06 - Ca 음성	M06	90	60				
M07 - Ca / Mg 음성	M07	67	22				
M08 - 8.5% 수크로스	M08	74	56				

[0160]

[0161] SEC

[0162] SEC 결과는 하기에 제시되어 있다. 퍼센트 응집체 결과는 하기 표 17에 나타났다. ≤ -65°C, 2-8°C, 또는 25°C 안정성 조건에서 응집의 어떤 유의한 추세도 보이지 않았다. 40°C에서, Ca/Mg 음성 제제의 경우 응집체에서 1주 후 최대 7% HMWS까지 증가 추세가 있었다. "칼슘 음성" 제제는 40°C에서 1주의 종료시 대략 3% HMWS를 나타냈다. 다른 제제는 최대 5주 동안 ≤ -65°C 또는 2-8°C, 최대 4주 동안 25°C, 그리고 최대 1주 동안 40°C에서 유지되는 경우 응집에서 유의한 성장을 나타내지 않았다.

[0163] <표 17>

[0164] SEC에 의한 응집체의 농도 (%HMWS)

제제	물질	시점						
		T ₀	T _{3D}	T _{1W}	T _{2W}	T _{3W}	T _{4W}	T _{5W}
-70°C								
M05 - 대조군	M05	NMT 1.0	NT				NMT 1.0	NMT 1.0
M06 - Ca 음성	M06	NMT 1.0					NMT 1.0	NMT 1.0
M07 - Ca / Mg 음성	M07	NMT 1.0					NMT 1.0	NMT 1.0
M08 - 8.5% 수크로스	M08	NMT 1.0					NMT 1.0	NMT 1.0
5°C								
M05 - 대조군	M05	NMT 1.0	NT	NMT 1.0	NT	NMT 1.0	NMT 1.0	
M06 - Ca 음성	M06	NMT 1.0		NMT 1.0		NMT 1.0		
M07 - Ca / Mg 음성	M07	NMT 1.0		NMT 1.0		NMT 1.0		
M08 - 8.5% 수크로스	M08	NMT 1.0		NMT 1.0		NMT 1.0		
25°C								
M05 - 대조군	M05	NMT 1.0	NT	NMT 1.0	NT	NMT 1.0	NT	
M06 - Ca 음성	M06	NMT 1.0		NMT 1.0		NMT 1.0		
M07 - Ca / Mg 음성	M07	NMT 1.0		NMT 1.0		2.6		
M08 - 8.5% 수크로스	M08	NMT 1.0		NMT 1.0		NMT 1.0		
40°C								
M05 - 대조군	M05	NMT 1.0	NMT 1.0	NMT 1.0	NT			
M06 - Ca 음성	M06	NMT 1.0	3.1	2.6				
M07 - Ca / Mg 음성	M07	NMT 1.0	5.3	7.0				
M08 - 8.5% 수크로스	M08	NMT 1.0	1.9	NMT 1.0				

[0165]

[0166] *NMT: 이하. NT: 시험되지 않음.

[0167] 바이러스 입자 결과는 하기 표 18에 제시되어 있다. ≤ -65°C, 2-8°C, 또는 25°C 조건에서 유지된 모든 제제는 바이러스 입자 역가에서 어떤 유의한 변화도 나타내지 않았다. 그러나, 40°C에서, 3일 및 1주 후에 Ca/Mg 음성 제제에 대한 입자 역가의 유의한 하락이 있었다. 다른 제제 (M05-M06, M08)는 최대 5주 동안 ≤ -65°C 또는 2-8°C, 최대 4주 동안 25°C, 그리고 최대 1주 동안 40°C에서 유지되는 경우 바이러스 입자 역가에서 유의한 하락을 나타내지 않았다.

[0168] <표 18>

[0169] SEC에 의한 바이러스 입자 역가 (vp/mL)

제제	물질	시점						
		T ₀	T _{3D}	T _{1W}	T _{2W}	T _{3W}	T _{4W}	T _{5W}
-70°C								
M05 - 대조군	M05	2.46E+13	NT				2.43E+13	2.54E+13
M06 - Ca 음성	M06	2.44E+13					2.41E+13	2.61E+13
M07 - Ca / Mg 음성	M07	2.02E+13					2.01E+13	2.11E+13
M08 - 8.5% 수크로스	M08	2.13E+13					2.16E+13	2.27E+13
5°C								
M05 - 대조군	M05	2.46E+13	NT		2.55E+13	NT	2.45E+13	2.51E+13
M06 - Ca 음성	M06	2.44E+13			2.54E+13		2.41E+13	2.62E+13
M07 - Ca / Mg 음성	M07	2.02E+13			2.11E+13		1.99E+13	2.14E+13
M08 - 8.5% 수크로스	M08	2.13E+13			2.25E+13		2.16E+13	2.34E+13
25°C								
M05 - 대조군	M05	2.46E+13	NT		2.49E+13	NT	2.35E+13	NT
M06 - Ca 음성	M06	2.44E+13			2.53E+13		2.39E+13	
M07 - Ca / Mg 음성	M07	2.02E+13			2.01E+13		1.90E+13	
M08 - 8.5% 수크로스	M08	2.13E+13			2.23E+13		2.11E+13	
40°C								
M05 - 대조군	M05	2.46E+13	2.23E+13	2.14E+13	NT			
M06 - Ca 음성	M06	2.44E+13	2.16E+13	2.09E+13				
M07 - Ca / Mg 음성	M07	2.02E+13	1.62E+13	1.59E+13				
M08 - 8.5% 수크로스	M08	2.13E+13	2.09E+13	2.06E+13				

UV 260/280 비 결과는 하기 표 19에 제시되어 있다. UV 260/280 비의 경우, 40°C에서 유지되는 경우 Ca/Mg 음성 제제에 대해 기록된 하향 추세가 있었다. UV 260/280은 비어 있는/완전 입자 비의 대체물로 간주된다. 다른 제제 (M05, M06 및 M08)는 나타난 바와 같이, 임의의 조건 또는 시점에서 UV 260/280 비의 어떤 유의한 변화도 나타내지 않았다.

<표 19>

[0173] SEC에 의한 UV 260/280 비

제제	물질	시점						
		T ₀	T _{3D}	T _{1W}	T _{2W}	T _{3W}	T _{4W}	T _{5W}
-70°C								
M05 - 대조군	M05	1.33	NT				1.33	1.33
M06 - Ca 음성	M06	1.32					1.32	1.33
M07 - Ca / Mg 음성	M07	1.32					1.32	1.33
M08 - 8.5% 수크로스	M08	1.32					1.32	1.33
5°C								
M05 - 대조군	M05	1.33	NT		1.33	NT	1.32	1.38
M06 - Ca 음성	M06	1.32			1.33		1.33	
M07 - Ca / Mg 음성	M07	1.32			1.33		1.32	1.33
M08 - 8.5% 수크로스	M08	1.32			1.33		1.32	1.33
25°C								
M05 - 대조군	M05	1.33	NT		1.34	NT	1.33	NT
M06 - Ca 음성	M06	1.32			1.32		1.33	
M07 - Ca / Mg 음성	M07	1.32			1.33		1.33	
M08 - 8.5% 수크로스	M08	1.32			1.32		1.32	
40°C								
M05 - 대조군	M05	1.33	1.33	1.33	NT			
M06 - Ca 음성	M06	1.32	1.32	1.32				
M07 - Ca / Mg 음성	M07	1.32	1.28	1.25				
M08 - 8.5% 수크로스	M08	1.32	1.33	1.33				

[0174]

[0175] pH

[0176] 하기 표 20에 나타난 바와 같이, 모든 제제에 대해 임의의 조건 및 시점에서 pH의 어떤 유의한 변화도 없었다.

[0177] <표 20>

[0178] pH

제제	물질	시점						
		T ₀	T _{3D}	T _{1W}	T _{2W}	T _{3W}	T _{4W}	T _{5W}
-70°C								
M05 - 대조군	M05	7.3	NT				7.2	7.3
M06 - Ca 음성	M06	7.3					7.3	7.3
M07 - Ca / Mg 음성	M07	7.3					7.3	7.4
M08 - 8.5% 수크로스	M08	7.2					7.3	7.3
5°C								
M05 - 대조군	M05	7.3	NT		7.3	NT	7.2	7.3
M06 - Ca 음성	M06	7.3			7.3		7.3	7.3
M07 - Ca / Mg 음성	M07	7.3			7.2		7.3	7.3
M08 - 8.5% 수크로스	M08	7.2			7.2		7.2	7.2
25°C								
M05 - 대조군	M05	7.3	NT		7.3	NT	7.2	NT
M06 - Ca 음성	M06	7.3			7.3		7.3	
M07 - Ca / Mg 음성	M07	7.3			7.3		7.2	
M08 - 8.5% 수크로스	M08	7.2			7.2		7.2	
40°C								
M05 - 대조군	M05	7.3	7.1	7.1	NT			
M06 - Ca 음성	M06	7.3	7.3	7.3				
M07 - Ca / Mg 음성	M07	7.3	7.3	7.3				
M08 - 8.5% 수크로스	M08	7.2	7.1	7.2				

[0179]

[0180] 질량 분석법 특성화 (탈아미드화)

[0181] 질량 분석법에 의해 결정된 바와 같은 탈아미드화 결과는 하기 표 21에 제시되어 있다. 보다 낮은 온도에서 보관된 샘플은 5주 연구 기간에 걸쳐 제제 간에 유의한 차이를 나타낼 것으로 예상되지 않기 때문에 40°C에서 보관된 샘플만 이 시험에 사용하였다.

[0182] 결과는 모든 제제의 T₀로서 대조군 제제의 T₀을 사용하여 제시된다. 모든 탈아미드화 사이트 중에서, AAV VP1의 N57G 및 N94H 핫스팟은 40°C에서 3주에 걸쳐 탈아미드화에서 가장 유의한 증가를 나타낸 두 곳이다. 다른 사이트가 또한 탈아미드화의 증가를 나타냈으나, 그 정도는 훨씬 적었다 (표시되지 않음). 이들 두 핫스팟은 형질

도입 효율(transduction efficiency)에 영향을 미칠 것으로 예상되기 때문에 특히 중요하다. Ca/Mg 음성 제제는 탈아미드화에서 가장 유의한 증가를 나타냈다. 다른 제제 (M05, M06, 및 M08)는 모두 40℃에서 3일 및 3주 후에 유사한 수준의 탈아미드화 증가를 가졌다.

<표 21>

질량 분석법에 의한 탈아미드화 (40℃에서 %)

제제	물질	시점					
		N57G (VP1)			N94H (VP1)		
		T ₀ *	T _{3D}	T _{3W}	T ₀ *	T _{3D}	T _{3W}
M05 - 대조군	M05	7.8	14.4	41.1	5.1	6.7	30.4
M06 - Ca 음성	M06	7.8	18.6	43.5	5.1	6.4	33.9
M07 - Ca / Mg 음성	M07	7.8	23.1	57.4	5.1	8.6	54.6
M08 - 8.5% 수크로스	M08	7.8	16.0	38.7	5.1	6.0	23.7

*T₀은 M05 물질에 대해 시험되었으며 모든 제제에 대해 T₀으로서 사용되었다.

결론

현재의 SB-525 제제에 대한 세 가지 가능한 변화를 평가하였다: 칼슘이 없는 것, 칼슘도 마그네슘도 없는 것, 그리고 더 높은 농도의 수크로스를 가진 것. 실시예 1 및 2는, 특히 동결/해동 순환 후 1주 초과 동안 25℃, 또는 3일 이상 동안 40℃에서 안정 상태로 유지한 후에, 완충제 및 약물 제품 둘 다에서 나타나는 매우 많은 백색-플레이크 입자의 무작위 생성을 나타낸다. 입자는 인산칼슘으로서 확인되었다.

여기서의 결과는 염화칼슘이 의도되고 스트레스가 가해진 보관 조건에서 제품 안정성을 위한 비필수 부형제임을 입증한다. 또한, 40℃에서 최대 2주, 25℃에서 4주, 그리고 5℃ 및 -70℃에서 5주 동안 "칼슘 음성" 및 "고 수크로스" 제제에 대해 어떤 유의한 차이도 관찰되지 않았다. 그러나, 제제로부터 칼슘과 마그네슘 둘 다를 제거하면, 특히 40℃에서 유지되는 경우, vg 및 vp 역가의 더 큰 하락뿐만 아니라 더 높은 탈아미드화 및 응집을 나타내는 것을 포함하여, 약물 제품 품질 속성의 변화를 발생시키는 것으로 관찰되었다. 또한, 5주 동안 내내, 이전 (대조군) 제제만이 백색 플레이크형 입자를 계속 나타내는 것으로 밝혀졌다.

실시예 4: SB-525의 추가 재제제화

입자 생성을 방지하기 위해, 제제에 대한 세 가지 유형의 변화가 본 실시예에서 시험되었다: (1) 수크로스 농도를 1%에서 5-10%로 증가시켜 FT 스트레스에 대한 안정성을 증가, (2) 2가 양이온을 제거하여 입자 공급원을 제거하고 잠재적인 용해도 문제를 방지, 그리고 (3) NaCl을 증가시켜 제제의 이온 강도를 이동시킴.

보다 구체적으로, 본 실시예의 실험은 이전 (대조군) 제제와 비교하여 여러 변형 중 하나로 재제제화되는 경우 SB-525 완충제의 안정성을 평가하였다; 즉, 172 mM NaCl, 8.10 mM Na₂HPO₄, 2.68 mM KCl, 1.47 mM KH₂PO₄, 0.90 mM CaCl₂, 0.49 mM MgCl₂, 1% (w/v) 수크로스, 및 0.05% (w/v) 폴록사머 188, pH 7.0-7.6. 제제를 6 mL AT 바이알에 5 mL로 충전하고, 5회의 제어되지 않은 FT 주기 (≤ -65℃에서 주위)에 적용한 다음에, 2-8℃ (가속화됨; 액체 보관) 및 25℃에서 (스트레스가 가해짐; 액체 보관)에서 열 안정 상태로 두어 입자 형성에 대한 다양한 완충제를 평가하였다.

연구 설계

표 22에 나타낸 바와 같은, 시험된 제제는 염화나트륨 및 염화칼륨과 인산나트륨 및 인산칼륨을 물에 첨가한 후, 수크로스를 첨가함으로써 제제화하였다. 존재하는 경우, 염화마그네슘에 이어서 염화칼슘을 별도의 50 mL 용액으로 준비하고, 더 큰 용액으로 옮겼다. 이어서, 폴록사머 188을 용액에 첨가하였다. 이어서 제제를 충분히 첨가하고 (적당량), pH를 시험하고, 0.22 μm PES 필터 상에서 여과하였다.

<표 22>

[0196] 제제

물질	제제	대조군과의 차이
0139-M03	200 mM NaCl	NaCl을 200 mM으로 증가
0139-M04	5% 수크로스	수크로스를 5%로 증가
0139-M05	8.5% 수크로스	수크로스를 8.5%로 증가
0139-M06	10% 수크로스	수크로스를 10%로 증가
0139-M07	CaCl ₂ 미함유	제거된 CaCl ₂
0139-M08	MgCl ₂ 또는 CaCl ₂ 미함유	제거된 CaCl ₂ 및 MgCl ₂
0139-M09	대조군	N/A

[0197]

[0198] 이들 제제로, AT 바이알을 5 mL로 충전하고, 5회 제어되지 않은 동결/해동 주기를 거친 다음에, 5℃ 또는 25℃ 안정 상태로 두었다. 안정성 풀 일정은 **표 23**에 개요를 설명하였다. 표에서, X는 외관 (액체)을 지칭하며; A는 오스몰랄농도 (어는 점 하락), 전도도, 점도, 및 밀도를 지칭하며; B는 HIAC를 사용한 빛 차폐(light obscuration)를 지칭하며; C는 P188 농도를 지칭하고; D는 pH를 지칭한다.

[0199] <표 23>

[0200] 안정성 일정 0139-M03 내지 -M08

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

[0201]

[0202] * 5 FT 샘플은 열 안정성 샘플에 대한 T₀이었다.

[0203] 제제 특성화

[0204] 전도도, 오스몰랄농도, 밀도, 및 점도를 결정하기 위해 SB-525 완충제 제제를 시험하였다. P188 농도는 또한 5℃ 보관의 2.5주, 및 25℃ 보관의 5일에서 측정되었다. 이들 시험에 대한 결과는 하기 **표 24**에 나타났다. M03-M09에 대한 전도도, 오스몰랄농도, 밀도, 및 점도의 결과는 모두 예상되는 추세를 따른다 - 수크로스의 양이 많을수록 오스몰랄농도, 밀도, 및 점도가 더 높아졌으며; NaCl이 높을수록 오스몰랄농도 및 전도도가 높아졌다. P188 농도에 대한 결과는 각각의 결과 세트에 대한 방법 가변성 내에 있었으며, 이는 제제화 동안 올바른 P188 농도가 달성되었음을 확인시켜 준다.

[0205] <표 24>

[0206] 제제 특성화

제제	전도도 (ms/cm)	오스몰랄농도 (mOsm/kg)	밀도 ¹ (g/mL)	점도 ² (Cp)	P188 (µg/mL)	
					T _{2SW} 5°C	T _{SD} 25°C
M03 - 200 mM NaCl	20.20	433	1.011915	1.165	590	484
M04 - 5% 수크로스	16.12	515	1.026105	1.285	630	467
M05 - 8.5% 수크로스	15.37	647	1.039606	1.382	635	486
M06 - 10% 수크로스	15.12	704	1.045258	1.429	633	457
M07 - Ca 음성	17.91	380	1.010685	1.112	663	488
M08 - Ca / Mg 음성	17.88	379	1.010806	1.123	672	471
M09 - 대조군	17.86	384	1.010854	1.105	668	475

[0207]

[0208] ¹ 밀도 측정 동안 온도는 20.0℃로서 기록되었다.

[0209] ² 점도 측정 동안 온도는 20.0℃로서 기록되었고 전단 속도는 2000 s⁻¹로서 기록되었다.

[0210] pH

[0211] 하기 표 25에 나타난 바와 같이, FT 순환 동안 임의의 제제에 대해 pH의 어떤 유의한 변화도 관찰되지 않았다.

[0212] <표 25>

[0213] pH 결과

제제	FT 주기		
	T ₀	FT3	FT5
M03 - 200 mM NaCl	7.2	7.3	7.2
M04 - 5% 수크로스	7.2	7.2	7.2
M05 - 8.5% 수크로스	7.2	7.2	7.2
M06 - 10% 수크로스	7.1	7.2	7.2
M07 - Ca 음성	7.3	7.3	7.3
M08 - Ca 및 Mg 음성	7.3	7.3	7.3
M09 - 대조군	7.2	7.3	7.2

[0214]

[0215] 가시적 외관

[0216] 모든 샘플은 시험된 각각의 조건 및 시점에 대해, B9 색상 및 유백광 참조 1 이하를 나타냈다. 가시적 외관 결과는 대조군 제제 (M09)만이 5℃ 및 25℃에서 5일에서 최대 8주까지 일관되게 너무 많아 셀 수 없는 (TMTC), 백색 플레이크형 입자를 나타냈음을 나타냈다. 5% 수크로스 제제는 TMTC 가시적 입자의 무작위 생성을 나타냈다. 많은 샘플은 또한 1-5개의 섬유질 입자를 나타냈다. 이들 입자는 이 연구에서 확인되지 않았지만, 섬유형 입자는 인산칼슘의 특징인 플레이크형 입자에 비해 외인성 입자 (예를 들어, 필터 입자)의 특징이 더 컸다. 또한, 엄격하게 제어된 환경 조건 하에 DP가 제조되지 않는 실험실-기반 개발 연구에서는 섬유형/외인성 입자의 출현은 무시할 만하였다.

[0217] 비가시적 입자 수

[0218] HIAC에 의한 비가시적 입자 분석은 유의하고 일관된 비가시적 입자 수를 가진 유일한 제제가 대조군 제제 (M09)이며, 더 높은 안정성 조건 (25℃)에서 계속 진행중인 보관에 의해 악화됨을 나타냈다. 다른 제제 (M03-M08)는 시간 또는 조건과 무관하게 유의하지 않은 입자 수를 나타냈고, 어떤 전반적인 추세도 나타내지 않았다.

[0219] 결론

[0220] 본 실시예는 이전 (대조군) SB-525 제제로부터의 여러 제제 변형체에 대한 동결-해동 스트레스 및 열 안정성의 효과를 평가하였다. 일곱 가지 상이한 제제를 AT 크리스탈 밀폐형 바이알에 충전하고, 동결-해동 순환시키고, 5℃ 및 25℃에서 8주 동안 보관하였다. 모든 연구 조건에 걸쳐, 대조군 제제만이 일관되게 백색 플레이크형 입자를 계속 나타냈다.

[0221] FT 순환 후에, 어떤 제제도 유의한 가시적 입자 형성 또는 pH 변화를 나타내지 않았으며, 따라서 모든 제제는 8주 기간에 걸쳐 5℃ 및 25℃에서 단기간 안정 상태로 두었다. 안정 상태로 두었을 때, 유의한 가시적 입자를 일관되게 생성하는 것으로 나타난 유일한 제제는 대조군 제제 (M09)였다. 입자 결과는 필적하였긴 하지만 (즉, 어떤 유의한 가시적 입자 생성도 없음), "200 mM NaCl" (M03), "5% 수크로스" (M04) 및 "10% 수크로스" (M06) 제제가 계속되는 제제제화 연구를 위해 선택되지는 않았다. 특히, "5% 수크로스" 제제 (M04)는 백색 플레이크형 입자의 일부 형성을 나타냈으며, 이는 수크로스의 이 농도가 FT 스트레스로 인한 입자 생성을 방지하기에 충분하지 않을 수 있으며, "10% 수크로스" (M06)는 그의 더 높은 점도로 인해 제조상의 도전과제를 도입할 수 있음을 나타내는 것이다. 따라서, 이들 결과를 기반으로 하여, "8.5% 수크로스" (M05), "칼슘 음성" (M07), 및 "칼슘 및 마그네슘 음성" (M08) 제제가 유망한 것으로 보인다.

[0222] 실시예 5: SB-525에 대한 최종 제제

[0223] SB-525 (PF-07055480) 약물 물질 (DS)의 조성 및 설명은 표 26에 제시되어 있다. 제제는 7.3 ± 0.3의 최종 pH를 가졌다. 부형제 농도는 염기 완충제 (포스페이트 완충 식염수)를 첨가하여 전체적으로 또는 부분적으로 수득하였다. DS 농도 목표는 1.0E+13 vg/mL (0.5E+13 - 2.5E+13 vg/mL)였으며, DS 범위는 DS 목표의 50-250%였다.

[0224] <표 26>

[0225] SB-525 약물 물질 제제 설명

원료	화학식	FW	농도 (mM)	농도 (g/L)
SB-525	N/A	N/A	1.0E+13 vg/mL	1.0E+13 vg/mL
염화마그네슘 6수화물	MgCl ₂ • 6H ₂ O	203.30	0.49	0.10
염화칼륨	KCl	74.5513	2.68	0.20
일염기성 인산칼륨	KH ₂ PO ₄	136.086	1.47	0.20
수크로스	C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁	342.2965	1% (w/v)	10.00
염화나트륨	NaCl	58.44	172	10.05
폴록사머 188 (P188)	(C ₃ H ₆ O • C ₂ H ₄ O) _x	8350	0.05% (w/v)	0.50
이염기성 인산나트륨 무수	Na ₂ HPO ₄	141.96	8.10	1.15
WFI	H ₂ O	18.015	1 mL까지 충분히	1 mL까지 충분히

SB-525 (PF-07055480) 약물 제품의 조성 및 설명은 표 27에 나타났다. DP는 7.3 ± 0.3의 최종 pH를 가졌다. 부형제 농도는 염기 완충제 (포스페이트 완충 식염수)를 첨가하여 전체적으로 또는 부분적으로 수득하였다. DP 농도 목표는 1.0E+13 vg/mL (0.3E+13 - 3.0E+13 vg/mL)였으며, DP 범위는 DP 목표의 30-300%였다.

<표 27>

SB-525 약물 제품 제제 설명

성분의 명칭	기능	농도 (mM)	단위 화학식 (mg/mL)	단위 화학식 (mg/바이알)
SB-525	활성 성분	1.0E+13 vg/mL	1.0E+13 vg/mL	6.0E+13 vg/바이알
이염기성 인산나트륨 무수	완충 성분	8.10	1.15	6.75
일염기성 인산칼륨		1.47	0.20	1.20
염화나트륨	안정 화제	172	10.05	60.30
염화칼륨		2.68	0.20	1.20
염화마그네슘 6수화물		0.49	0.10	0.60
수크로스	동결보호제	1% (w/v)	10.00	60.00
폴리포르 (폴록사머) P 188	계면활성제	0.05% (w/v)	0.50	3.00
WFI	용매	1 mL까지 충분히	1 mL까지 충분히	공칭 충전 부피까지 충분히

용기 및 충전 부피

여과된 약물 물질을 멸균 고밀도 폴리에틸렌 (HDPE) 병에 패키징하였다. 제 위치에 열가소성 엘라스토머 마개 (어셉틱 테크놀로지스 VIA-101800)를 가진 AT 10 mL 시클로-올레핀 공중합체 (COC) 바이알에 DP를 충전하였다. DS와 DP 둘 다 -60℃ 내지 -90℃에서 보관하였다. 각각의 바이알은 6.4E+13 (공칭 6.0E+13) vg SB-525 AAV와 함께, 6.4 mL의 DP (의도된 추출가능 부피 6 mL)를 함유하였다.

DP의 특성화

SB-525 DP의 점도, 오스몰랄농도, 밀도, 및 전도도를 측정하였다. 밀도는 1.0106 g/mL (20℃)였다. 점도는 1.112cP (20℃)였다. 오스몰랄농도는 374 mOsm/kg이었다. 전도도는 17.80 mS/cm (20℃)였다.

실시예 6: AAV6 바이러스 벡터 약물 제품 제제

하기 실시예 6 내지 8은 다양한 농도의 2가 양이온 염을 함유하는 AAV2/6 바이러스 벡터 약물 제품 제제를 평가하기 위해 수행된 추가적인 재제제화 및 가속화된 안정성 연구를 기재한다. 이전 예에서와 같이, 바이러스 벡터는 AAV6 캡시드 및 AAV2 ITR을 함유하는 재조합 계놈을 가진다. 여기서의 바이러스 벡터는 알파-L-이두로니다제 (IDUA)를 코딩하는 트랜스진을 운반한다. 이 트랜스진은 헐러 증후군(Hurler Syndrome) (리소좀 축적 장애)으로도 알려진 점액다당류 I형 (MPS I)을 가진 환자와 같이, IDUA-결핍인 환자에게 도움이 될 것이다. AAV 계놈은 US2020/0246486의 표 5에서 서열 번호 28로서 나타났다. 바이러스 계놈은 AAV 캡시드 내에 위치하고 제품 제제에 노출되지 않기 때문에, 이전 실시예에서의 것들과 같이, 실시예 6 내지 실시예 8에서 이루어진 관찰은 다른 트랜스진을 운반하는 AAV6 벡터에 적용가능할 것으로 예상된다.

동결/해동 주기 후에 침전물을 형성하지 않는 신규 제품 제제를 확인하기 위해 연구가 또한 수행되었다. 다양

한 농도의 2가 양이온 염을 함유하는 4개의 AAV6 바이러스 벡터 약물 제품 제제의 안정성을 평가하였다.

[0238] 시험된 제제는 다양한 농도의 2가 양이온 염 (Ca^{2+} 및 Mg^{2+})을 함유하였다. 상기에 기재된 바와 같이, 이전의 AAV6 제제뿐만 아니라 AAV6이 없는 제제 완충제는 모두 다수의 동결/해동 주기 후에 소량의 가시적 침전물을 형성하는 것으로 관찰되었다. 침전된 입자는 인산칼슘 염으로 구성된 것으로 결정되었다. 약물 제품은 전형적인 사용 동안 동결/해동 주기를 경험하기 때문에, 염 침전 가능성은 환자 안전성에 대한 위험뿐만 아니라 제품 품질에 대한 위험을 초래할 것이다. 하기 실시예 6-8에 나타난 연구는 이러한 침전 문제를 갖지 않는 개선된 제제를 찾는 것을 목표로 하였다.

[0239] 연구에서, AAV6 바이러스 벡터 제품의 샘플은 접선 흐름 여과 및 더 높은 농도를 가진 스파이킹 샘플 "스파이킹 완충제"에 의해 상이한 제품 제제로 제조되었다. 이어서 재제화된 샘플을 다양한 가속화된 안정성 조건에서 인큐베이션하고, 샘플의 품질 속성을 인큐베이션 후 평가하였다. 품질 속성 결과는 적절한 경우 알려진 방법 가변성을 고려하여 평가되었다. 네 가지 제제 각각에 대해 연구 지속기간에 걸쳐 이상치 및 추세 결과를 확인하였다. 합격(Pass), 애매함(neutral), 또는 불합격(Fail)의 특징은 각각의 연구 종점의 결과를 기반으로 하여 각각의 품질 속성 및 제제에 배정되었다. 마지막으로, 각각의 네 가지 제제의 전반적인 품질 속성 안정성 점수를 서로 비교하였다. 연구는 하기에 상세히 설명되어 있다.

[0240] 샘플 제조

[0241] 본원에서 제조된 AAV6 생성물 제제는 하기 표 1에 기재된 바와 같이 제제 완충제 F0에 현탁된 대략 $1.0\text{E}+13$ vg/mL의 AAV6 공여체 벡터를 함유하였다. 완충제 F0은 둘베코의 포스페이트 완충 식염수의 레시피를 기반으로 하며, 이는 2가 양이온 칼슘 (CaCl_2 로서) 및 마그네슘 (MgCl_2 로서), 대략 35 mM의 추가 염화나트륨을 포함하고, 1% w/v 수크로스 및 0.05% w/v 폴록사머 188로 제제화된다.

[0242] AAV6 물질을 대안적 완충제 제제로 옮기기 위해, 접선 흐름 여과에 의한 완충제 교환을 도 2에 나타난 바와 같이 수행하였다. 간단히 말해서, 완충제 F0에서 제제화된 AAV6 약물 제품의 여러 바이알을 해동하고 단일 한외 여과/정용여과 (UF/DF) 저장소로 옮겼다. 한외여과를 먼저 수행하여 물질을 대략 2x 농축하였다. 이어서 농축된 물질을 적어도 10x 증가 부피의 제제 완충제 F1로 정용여과하였다. 따라서, 도 2에서 "A"로 표시된 회수된 중간 물질은 제제 완충제 F1에 현탁된 대략 $2.0\text{E}+13$ vg 카피/mL를 함유해야 한다.

[0243] 이어서 중간 UF/DF 생성물 "A"는 세 가지 부피로 분리되었고 세 가지 상이한 완충제로 제제화되었다. 세 가지 추가 제제 완충제 (F1, F2, 및 F3; 표 28)는 추가 염화나트륨, 수크로스, 및 폴록사머 188 (예를 들어, 플루로닉(Pluronic)® F-68)과 함께 둘베코의 포스페이트 완충 식염수로부터 유래되었다. 이들 세 가지 완충제는 어떤 칼슘도 함유하지 않았으며 대신에 상이한 양의 마그네슘을 가졌다. 완충제 F1은 어떤 칼슘 또는 마그네슘 성분도 함유하지 않았고, 완충제 F2는 F0과 동등한 물 농도의 마그네슘을 함유하였으며, 완충제 F3은 완충제 F0으로부터 제거된 칼슘의 몰수를 차지하는 추가 마그네슘을 함유하였다.

[0244] <표 28>

[0245] 제제 완충제의 조성

성분 (단위)	F0	F1	F2 (6x 농축)	F2 (1x 농축)	F3 (6x 농축)	F3 (1x 농축)
NaCl (mM)	171.8	171.8	171.8	171.8	171.8	171.8
KCl (mM)	2.7	2.7	2.7	2.7	2.7	2.7
Na_2HPO_4 (mM)	8.1	8.1	8.1	8.1	8.1	8.1
KH_2PO_4 (mM)	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5
CaCl_2 (mM)	0.9	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
MgCl_2 (mM)	0.5	0.0	3.0	0.5	8.4	1.4
수크로스 (% w/v)	1.00%	1.00%	1.00%	1.00%	1.00%	1.00%
폴록사머 188 (% w/v)	0.05%	0.05%	0.05%	0.05%	0.05%	0.05%
목표 pH	7.1-7.5					

[0246]

[0247] 샘플 제조를 단순화하고 상이한 완충제의 제조를 허용하기 위해, 완충제 F2 및 F3의 6배 더 높게 농축된 "스파이킹 완충제"를 제조하였다. 도 3에 나타난 바와 같이, 이들 F2 및 F3 "6x 농축" 완충제는 F1과 1:5 비로 혼합되는 경우 각각 의도된 조성의 완충제 F2 및 F3을 산출하였다.

[0248] 이들 제제 완충제를 제조하기 위해, 개별 건조 성분을 마이크로저울을 사용하여 칭량하였다. 성분을 혼합하고

주사용 탈이온수로 용해시켰다. 이어서 필요에 따라 이들 완충제를 0.1 M NaOH 또는 0.1 M HCl로 의도된 pH 범위로 조정하였다. 마지막으로, 이들 완충제는 수크로스 및 폴록사머 188을 사용하여 원하는 농도로 제제화되었다.

[0249] 제조된 약물 제품 제제의 조성을 체크로서 몇몇 반정량 검정으로 측정하였고, 그의 결과는 표 29에 보고하였다. 기성 비색 검정을 사용하여 Ca^{2+} (바이오 비전(Bio Vision) Cat# K380-250) 및 Mg^{2+} (바이오 비전 Cat#K385-100)의 농도를 측정하였다. 두 비색 검정 모두의 경우, 샘플 농도는 검정의 동적 선형 범위 내에 있었고, 보고된 신호 및 계산된 농도는 이론적 샘플 조성의 경향을 잘 나타내었다. 결정적으로, 제제 F1, F2 및 F3에 대한 칼슘 신호는 모두 검정 음성 대조군과 일치하였다. 따라서, 이들 샘플은 어떤 칼슘도 함유하지 않았으며, TFF 샘플 제조 단계는 F0 출발 물질에 존재하는 임의의 칼슘을 제거하는 데 효과적이었다. 마그네슘 검정은 또한 Mg^{2+} 가 TFF에 의해 제거되고 F2 및 F3에서 적절한 농도로 스파이킹되었음을 확인해 주었다.

[0250] <표 29>

[0251] 제제화된 약물 제품의 실험적으로 측정된 파라미터

성분 (단위)	F0	F1	F2 (1x 농축)	F3 (1x 농축)
CaCl_2 (mM, 비색 검정에 의해)	1.02	0.07	0.09	0.1
MgCl_2 (mM, 비색 검정에 의해)	0.29	-0.04	0.38	0.9
VG 역가 (vg/mL, qPCR에 의해)	1.54E+13	1.77E+13	1.91E+13	1.87 E+13
입자 농도 (p/mL, MADLS에 의해)	7.79E+12	6.38E+12	7.30E+12	8.23E+12

[0252]

[0253] *MADLS: 다각도 동적 광 산란.

[0254] 또한 vg 역가를 측정하기 위해 qPCR을 수행하였고, 입자 농도를 측정하기 위해 다각도 동적 광 산란 (MADLS)을 수행하였다. 다시 말하면, 이들 결과는 샘플 제조로부터 예상된 범위에 있었으며, 이는 완충제 교환 및 제제화 단계가 의도한 바와 같이 수행되었음을 나타낸다.

[0255] 벌크 제제화 제품을 멸균 여과하고 0.5 mL/바이알로 2 mL 시클릭 올레핀 중합체 (COP) 바이알 (웨스트 파르마 (West Pharma)/다이코(Daikyo) CZ Cat # 19550057)에 충전하였다.

[0256] 샘플 인큐베이션

[0257] 바이알에 든 약물 제품을 하기에 기재된 다양한 조건에서 인큐베이션하였다. 동결/해동 순환은 표 30에 열거된 폴 데이터로 수행되었다.

[0258] <표 30>

[0259] 동결/해동 순환 샘플 폴 데이터

조건	시작일	3X 주기	5X 주기	10X 주기
동결/해동 순환 -80°C/주위	D0	D2	D4	D11

[0260]

[0261] 샘플을 "가속화된, 스트레스가 가해진" 조건 (40°C/75% 상대 습도 (RH)) 또는 "가속화된, 주위" 조건 (25°C/60% RH)에 적용하였고, 폴 데이터는 D3, D7, 2주, 1개월, 2개월, 3개월 또는 6개월이었다. 샘플을 2-8°C에서 보관하였고 그의 폴 타임 24시간 내에 분석하였다.

[0262] 모든 폴링된 샘플을 의도된 샘플 시험을 위해 폴리카보네이트 플립-탑 원심분리기 튜브에 분취하였다. 분취액을 2개월 이하 동안 활성 시험 동안 2-8°C에서 보관하였다. 폴 데이터로부터 합리적인 시간 내에 시험을 수행하지 않은 경우, 분취액을 시험이 발생할 수 있을 때까지 ≤ -65°C에서 동결시켰다. 시험 후 모든 유지 샘플 및 나머지 물질을 장기간 보관을 위해 ≤ -65°C에서 동결시켰다.

[0263] 실시예 7: AAV6 약물 제품 제제의 시험

[0264] 수행된 샘플 시험은 표 31에 열거된 품질 속성을 포함하였다. 약어는 다음과 같이 표시된다: DLS, 동적 광 산란; MADLS, 다각도 동적 광 산란; HMWS, 고분자량 중; SE-LC, 크기 배제 액체 크로마토그래피; 및 AEX-LC, 음이온 교환 액체 크로마토그래피. 용액의 외관을 평가하여 용액이 투명하고 무색이며 미립자가 없는지 확인해 주었다. 흐리거나, 탁하거나, 가시적 입자를 함유한 용액은 기준을 충족하지 못하였다.

<표 31>

평가된 제품 품질 속성

범주	품질 속성	시험 방법
일반	외관, 액체	육안 검사
	pH	전위차
순도	단량체 피크 평균 크기	DLS
	다분산 지수	DLS
	단량체 분획	DLS
	HMWS 분획	DLS
	HMWS 분획	SE-LC
	% 완전 캡시드	AEX-LC
강도	백터 게놈 역가	qPCR
	감염 역가	TCID ₅₀
	VG/TCID ₅₀ 비	계산
	캡시드 농축	ELISA
	단량체 농축	SE-LC
	단량체 농축	MADLS

초기 샘플

모든 초기 제제화 약물 제품 샘플로부터의 품질 속성 결과는 표 32 및 표 33에 나타났다. 결과는 일반, 순도, 및 강도의 품질 속성 범주에 의해 그룹화된다.

<표 32>

초기 (t₀) 샘플의 일반 및 순도 품질 속성 결과

제제	F0	F1	F2	F3
외관 (합격/불합격)	합격	합격	합격	합격
pH	7.3	7.3	7.2	7.2
단량체 피크 평균 크기 (nm)	29.7	33.0	33.6	33.4
다분산 지수	0.07	0.12	0.14	0.12
% 단량체, DLS	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%
% HMWS, DLS	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%
% HMWS, SE-LC	0.2%	0.5%	0.5%	0.4%
% 완전 캡시드	89.2%	89.1%	89.3%	89.1%

<표 33>

초기 (t₀) 샘플의 강도 품질 속성 결과

제제	F0	F1	F2	F3
VG 역가 (vg/mL)	7.9E+12	8.3E+12	9.4E+12	7.7E+12
감염 역가 (TCID ₅₀ /mL)	9.3E+09	9.3E+09	1.1E+10	1.1E+09
VG/TCID ₅₀	1200	1100	1100	8400
캡시드 역가 (캡시드/mL)	5.0E+12	5.5E+12	5.2E+12	6.7E+12
단량체 농도, SE-LC (입자/mL)	9.9E+12	9.5E+12	9.9E+12	9.7E+12
단량체 농도, MADLS (입자/mL)	7.8E+12	6.4E+12	7.3E+12	8.2E+12

초기 감염 역가 결과는 다른 초기 샘플과 비교했을 때 F3의 경우 대개 낮았다. 이것은 또한 다른 샘플보다 훨씬 더 높은 vg/TCID 비를 발생시켰다. 이것은 주로 TCID₅₀ 검정의 가변성에 기인하였다. 다른 결과 중 어느 것도 실질적으로 영향을 받지 않는 것으로 보였다.

동결/해동 순환된 샘플

네 가지 상이한 제제의 동결/해동 순환으로부터의 시험 결과를 도 4a-도 4d에 나타났다. 데이터는 동결/해동 순환이 용액 pH, 단량체 캡시드 크기, 샘플 크기 분포, 또는 완전 캡시드 함량에 영향을 미치지 않았으며; 또한 모든 네 가지 제제에서 유의한 양의 HMWS 또는 가용성 응집체를 생성하지도 않았음을 나타낸다. 그러나, 동결/해동 순환은 초기 F0 대조군 제제에서 가시적 외관 불합격을 야기하였다. 5x F/T 주기 후, 침전물의 작은 백색 반점(fleck)이 관찰될 수 있었고, 이들은 이전에 관찰된 인간칼슘 침전물의 특징이었다. 이들 침전물은 제제

F1, F2 또는 F3에서 검출되지 않았다. 데이터는 또한 시험 방법의 가변성을 또한 고려할 경우 동결/해동 순환이 임의의 제품 강도 속성에 유의하게 영향을 미치는 것으로 보이지 않았음을 나타낸다.

[0279] 25℃/60% RH (주위) 가속화된 샘플

[0280] 네 가지 상이한 제제의 주위 조건 (25℃/60% RH) 인큐베이션으로부터의 시험 결과를 도 5a-도 5d에 나타냈다. 데이터는 외관과 pH가 25℃ 조건에 영향을 받지 않음을 나타낸다. 샘플 크기 분포는 넓어져, 다분산 지수 (PDI)가 증가하는 것으로 보였고, 단량체 피크 평균 크기는 배양 시간이 증가함에 따라 약간 성장하였다. 고분자량 중 (HMWS)이 또한 인큐베이션 시간 동안 형성되기 시작하였다. 일반적으로, 이들 HMWS는 DLS에 의해서 보다 SE-LC에 의해 더 쉽게 검출되었다. 완전 캡시드와 비어 있는 캡시드의 전하 분리는 25℃에서 1-2개월 인큐베이션 후 손실된 것으로 보였으므로, % 완전 캡시드는 AEX-LC에 의해 측정할 수 없었다. 캡시드 역가 및 단량체 농도는 25℃ 조건에 의해 영향을 받지 않았고, vg 역가도 영향을 받지 않는 것으로 보였다. TCID₅₀은 F0, F1, F2의 경우 3개월 및 6개월 시점에서 감소하였으나 F3으로는 동일한 결과가 관찰되지 않았다.

[0281] 40℃/75% RH 스트레스가 가해진 샘플

[0282] 네 가지 상이한 제제의 스트레스 조건 (40℃/75% RH) 인큐베이션으로부터의 시험 결과를 도 6a-도 6d에 나타냈다. 데이터는 40℃/75% RH 조건이 여러 제품 품질 속성에 훨씬 더 큰 영향을 미쳤음을 나타낸다. 입자 크기 분포가 실질적으로 넓어지고 HMWS가 형성되었다. SE-LC는 DLS보다 적은 양의 HMWS를 검출하는 데 더 민감한 것으로 보였으나, 다량의 HMWS (및 아마도 더 큰 분자량 중)가 존재할 경우, 이들 입자는 SE-LC에 의해 검출되지 않았을 수 있다. 이들 경우에 검출기에 도달하기 위해 큰 분자량 중은 여과되었거나 LC 컬럼을 통과하지 않을 가능성이 있다.

[0283] 40℃에서 3개월 후, 모든 용액이 흐릿하게 보이기 시작했는데, 이는 아마도 큰 불용성 응집체 또는 HMWS의 형성으로 인한 것일 수 있다. 용액 pH는 영향을 받지 않는 것으로 보였다. TCID₅₀은 40℃/75% RH에서 1개월 후 모든 샘플에서 실질적으로 감소하였으며 F3에서 초기부터 가장 작은 감소가 보였다.

[0284] 실시예 8: 연구 종점 평가

[0285] 각각의 제제에 대해 샘플내 분석을 수행하였다. 각각의 제제 내에서, 각각의 품질 속성에 대한 각각의 연구 종점 결과는 도 7에 기재된 바와 같이 허용 및 불합격 기준에 대해 채점되었다. 의도된 안정성 연구 종점은 다음과 같았다: 주기당 ≤ -65℃에서 12시간 이상 그리고 주위 온도에서 6시간 이상의 10x 동결/해동 주기, 25℃/60% RH에서 3개월, 및 40℃/75% RH에서 1개월. 각각의 연구 종점에서, 도 7에 열거된 바와 같은 품질 속성은 공지되고 확립된 방법 가변성뿐만 아니라 이 연구에서 생성된 모든 데이터의 전체적 평가를 기반으로 하여 결정되었다.

[0286] 샘플간 분석 또는 각각의 제제의 상대적인 평가를 수행하기 위해, 각각의 품질 속성에 대한 각각의 종점 점수를 제제별로 비교하였다. 단일 품질 속성을 고려할 때, 네 가지 고려된 제제에 걸쳐 상대 종점 득점을 전체적으로 비교함으로써 각각의 제제에 대해 전반적인 합격, 애매함, 또는 불합격 득점을 배정하였다. 예를 들어, 모든 종점 결과가 주어진 제제에 대해 허용 기준을 통과한 경우, 그 제제에 대한 품질 속성에 대해 전반적인 합격 점수가 배정되었다. 그 제제에 대한 전반적인 품질 속성 득점을 배정할 때 애매함 및 불합격 종점 조건의 수를 고려하였다. 외관과 같은 특정 품질 속성의 경우, 하나의 불합격 종점 점수가 그 제제에 대한 전반적인 불합격 점수를 매기기에 충분하였다. 단량체 농도와 같은 다른 품질 속성의 경우, 모든 제제 (F3 제외)에 대해 40℃ 조건에서 하나의 불합격 종점이 직면되었으며; 따라서, 이 불합격 종점은 심각하게 점수가 매겨지지 않았다. TCID₅₀ 결과는 정보용으로만 포함되었으며 득점은 배정되지 않았다.

[0287] 이들 샘플내 샘플 분석 점수는 도 8 및 도 9에 나타냈다. 각각의 제제에 대한 모든 전반적인 품질 속성 점수의 요약 표를 표 34에 나타냈으며, 여기서 제제 F0은 대조군으로서 사용된다.

[0288] <표 34>

[0289] 샘플간 제제 평가 요약

시험 (방법)	F0	F1	F2	F3
외관, 액체 (육안 검사)	불합격	합격	합격	합격
pH (전위차)	합격	합격	합격	합격
크기 분포 (DLS)	에매함	불합격	에매함	에매함
HMWS 분획 (DLS)	합격	불합격	합격	합격
HMWS 분획 (SE-LC)	에매함	불합격	에매함	합격
% 완전 캡시드 (AEX-LC)	합격	합격	합격	합격
VG 역가 (qPCR)	합격	불합격	합격	에매함
캡시드 농도, (ELISA)	합격	에매함	합격	합격
단량체 농도 (SE-LC)	에매함	에매함	에매함	합격
단량체 농도, (MADLS)	에매함	에매함	에매함	합격

[0290]

[0291] 가속화된 안정성 연구의 지속기간 동안 전체 품질 속성 특징은 제제 F3 및 F2가 F0 및 F1보다 우수함을 입증한다. 제제 F3은 여덟 가지의 전반적인 합격 품질 속성 점수 및 단 두 가지의 에매함 점수로, 가장 잘 수행한 것으로 보인다. 제제 F2가 또한 잘 수행하였다. F0은 외관에 대한 전반적인 불합격 점수를 가졌고, 이는 이 제제 제제를 개선하기 위한 초기 목표를 확인해 준다. F1은 가장 많은 양의 HMWS가 검출되어 가장 많은 양의 응집을 갖는 것으로 보였다.

[0292] 실시예 9: 확장된 온도 시험

[0293] 제제 완충제에서 1.00E+13 vg/mL로 제공된 SB-525 (PF-07055480) 약물 제품의 안정성을 확장된 온도에서 시험하였다. 제제 완충제는 하기 성분을 함유하였다: 0.49 mM MgCl₂, 2.68 mM KCl, 1.47 mM KH₂PO₄, 172 mM NaCl, 8.10 mM Na₂HPO₄, 1% (w/v) 수크로스, 0.05% (w/v) 폴록사머 188, pH 7.4.

[0294] 약물 제품을 함유하는 바이알을 (i) -70°C에서 0일 동안 (T₀), (ii) -150°C에서 3일 동안 (T_{3-일}), 및 (iii) -150°C에서 14일 동안 (T_{14-일}) 보관하였다. 이어서, 약물 제품 샘플을 (i) 외관 (액체), (ii) 환원 CE-SDS, (iii) SEC 역가_{260/280}, 및 (iv) 시험관내 FVIII 활성 (생물검정)에 대해 분석하였다. 제제 완충제 샘플은 또한 (i) 용기 폐쇄부 무결성에 대해 분석되었다.

[0295] 하기 표 35에 나타난 바와 같이, 샘플을 최대 14일 동안 -150°C에서의 보관을 포함하여 시험된 조건에서 보관하였을 경우 색상, 투명도, 환원 CE-SDS, SEC 역가_{260/280} (비어 있는:완전 캡시드 비에 대한 대체 측정치), 또는 생물학적 활성 (% 상대 효능)에서 어떤 유의한 변화도 없었다. -150°C에서 14일 보관 후에도 용기 폐쇄부 무결성에 대해 어떤 영향도 관찰되지 않았다.

[0296] <표 35>

[0297] 안정성 결과

시험		T ₀	T _{3-일}	T _{14-일}
외관, 액체	색상	<=B9	<=B9	<=B9
	투명도	<= 참조 I	<= 참조 I	<= 참조 I
	가시적 입자	EFVP	EFVP	EFVP
용기 폐쇄부 무결성		N.T.	N.T.	합격
캡시드 단백질 순도 (CE): % 캡시드		95.0	94.5	94.9
캡시드 단백질 순도 (CE): % 기타		5.0	5.5	5.1
크기 분포 (SEC): % 단량체		98.8	99.0	99.5
크기 분포 (SEC): % 응집체		1.2	NMT 1.0	NMT 1.0
입자 함량 (SEC): 260/280 비		1.34	1.34	1.33
시험관내 FVIII 활성/ 기능적 생물검정 (% 상대 효능)		67%	69%	70%

[0298]

[0299] EFVP: 본질적으로 가시적 입자가 없음

[0300] TMTc: 셀 수 없을 정도로 많음

[0301] N.T.: 시험되지 않음

[0302] **실시예 10: 운송 시뮬레이션 및 확장된 온도 시험**

[0303] 충격, 압력, 낙하, 및 진동과 같은 시뮬레이션된 운송 조건 하에 SB-525 약물 제품의 안정성을 시험하였다. SB-525 약물 제품은 하기 성분을 함유하는 제제 완충제에서 1.00E+13 vg/mL로 제공되었다: 0.49 mM MgCl₂, 2.68 mM KCl, 1.47 mM KH₂PO₄, 172 mM NaCl, 8.10 mM Na₂HPO₄, 1% (w/v) 수크로스, 0.05% (w/v) 폴록사머 188, pH 7.4.

[0304] 약물 제품을 함유하는 시험 샘플 바이알은 최악의 경우의 전체 수송 프로파일을 활용하여, 공동으로 적용되는 수송 위험 (예를 들어, 충격, 압력, 낙하, 및 진동)을 겪었다. 대조군 샘플 바이알은 그러한 공동으로 적용되는 수송 위험에 적용되지 않았다. 시뮬레이션의 일부로서, 시험 바이알을 -35℃에서 40시간 동안 및 후속적으로 -70℃에서 또 다른 40시간 동안 유지하였다. 시뮬레이션 후, 대조군 및 시험 약물 제품 바이알을 -70℃에 보관하고 0일 (T₀), 6개월 (T_{6-개월}), 및 10개월 (T_{10-개월})에 시험하였다. 제제 완충제 바이알을 -70℃에서 보관하고 T₀에 시험하였다. 약물 제품 샘플을 (i) 외관 (액체), (ii) 환원 CE-SDS, (iii) SEC 역가_{260/280}, 및 (iv) 시험관내 FVIII 활성 (생물검정)에 대해 분석하였다. 제제 완충제 샘플을 (i) 용기 폐쇄부 무결성에 대해 분석하였다.

[0305] 하기 표 36에 나타낸 바와 같이, 샘플을 최대 10개월 동안 시험된 조건에서 보관한 경우, 색상, 투명도, 환원 CE-SDS, SEC 역가_{260/280} (비어 있는:완전 캡시드 비에 대한 대체 측정치), 또는 생물학적 활성 (% 상대 효능)에 어떤 유의한 변화도 없었다. T₀에 용기 폐쇄부 무결성에 어떤 영향도 없었다.

[0306] <표 36>

[0307] 안정성 결과

시험		샘플	T ₀	T _{6-개월}	T _{10-개월}
외관, 액체	색상	대조군	<=B9	<=B9	<=B9
		시험군	<=B9	<=B9	<=B9
	투명도	대조군	<= 참조 I	<= 참조 I	<= 참조 I
		시험군	<= 참조 I	<= 참조 I	<= 참조 I
	가시적 입자	대조군	EFVP	EFVP	EFVP
		시험군	EFVP	EFVP	EFVP
용기 폐쇄부 무결성		대조군	합격	N.T.	N.T.
		시험군	합격	N.T.	N.T.
게놈 역가 (qPCR)		대조군	1.11E+13	1.02E+13	7.96E+12
		시험군	9.07E+12	9.29E+12	7.81E+12
캡시드 역가 (ELISA)		대조군	1.71E+13	1.28E+13	1.30E+13
		시험군	1.69E+13	1.19E+13	1.34E+13
캡시드 단백질 순도 (CE): % 캡시드		대조군	94.0	94.3	95.0
		시험군	94.5	94.6	94.7
캡시드 단백질 순도 (CE): % 기타		대조군	6.0	5.7	5.0
		시험군	5.5	5.4	5.3
크기 분포 (SEC): % 단량체		대조군	99.2	99.1	99.3
		시험군	99.3	98.8	99.4
크기 분포 (SEC): % 응집체		대조군	NMT 1.0	NMT 1.0	NMT 1.0
		시험군	NMT 1.0	1.2	NMT 1.0
입자 함량 (SEC): 260/280 비		대조군	1.33	1.32	1.34
		시험군	1.33	1.32	1.33
시험관내 FVIII 활성/ 기능적 생물검정 (% 상대 효능)		대조군	72	58	62
		시험군	63	58	62

[0308]

[0309] **실시예 11: 약물 제품 안정성 데이터 - 24개월**

[0310] 이 연구의 목적은 의도된 보관 온도 (-70℃)에서 SB-525 약물 제품의 장기간 (24개월) 안정성을 확립하는 것이었다. 이 연구를 위해, SB-525 약물 제품 (DP)을 Sf9 곤충 세포로부터 정제하고 8.10 mM Na₂HPO₄, 1.47 mM

KH_2PO_4 , 0.49 mM MgCl_2 , 2.68 mM KCl, 172 mM NaCl, 1% (w/v) 수크로스, 및 0.05% (w/v) 폴록사머 P188, pH 7.3 $\pm$ 0.3 중 $1.00\text{E}+13$ 벡터 vg/mL의 목표로 제제화하였다. 이어서 DP를 6.4 mL로 10 mL 어셉틱 테크놀로지스 (AT) 크리스탈 밀폐형 바이알에 충전하고, -60°C 내지 -90°C 에서 보관하였다.

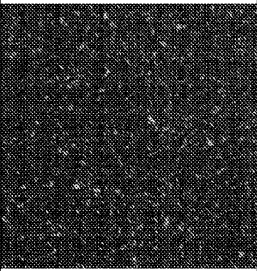
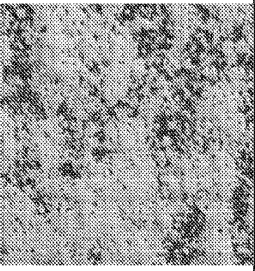
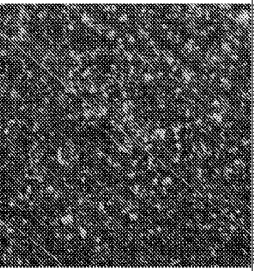
[0311] 5회 주기의 제어되지 않은 F/T 및 24시간 교반을 포함한, DP 안정성 연구로부터의 결과를 도 10에 나타냈다. 데이터는 색상, 투명도, pH, 비가시적 누적 미립자 물질, R-CGE에 의한 캡시드 순도 및 VP 비, SEC-HPLC에 의한 %HMMS 및 UV 260/280, 및 캡시드 역가에서 -70°C 에서 최대 24개월, 5°C 에서 12개월, 그리고 25°C / 60% RH에서 3개월까지 관찰된 어떤 명백한 추세도 없었음을 나타낸다. 12개월, 5°C 샘플은 제어되지 않은 환경 조건 (즉, 개방된 실험실 공간)에서 형태론 및 시험을 기반으로 하여 본질적으로 외인성인 것으로 보인 용액에서 "1개의 긴 섬유 입자"를 보고하였으며; 모든 다른 샘플은 "본질적으로 가시적 입자가 없음"을 보고하였다. 5회 주기의 제어되지 않은 F/T 또는 24시간 교반 후에 이들 품질 속성의 어떤 변화도 관찰되지 않았다.

[0312] 시험된 모든 시점 및 조건에 대해, 계농 역가 및 감염 바이러스 역가뿐만 아니라 감염성 비에 대한 결과의 가변성은 예상된 검정 가변성 내에 있었고 명백한 추세를 나타내지 않았다. 민감하고 정밀한 안정성-표시법인 시험 관내 상대 효능에 대한 결과는 의도된 보관 조건(-70°C)에서 24개월 후 효능의 약간 하향 추세를 나타내나, 결과는 임상적 안정성 허용 기준 내에 있다. 25°C / 60% RH에서 3개월 및 5°C 에서 12개월에서 효능의 안정성-표시 하향 추세가 또한 관찰되었다.

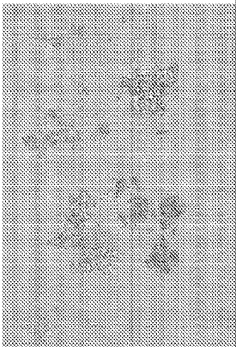
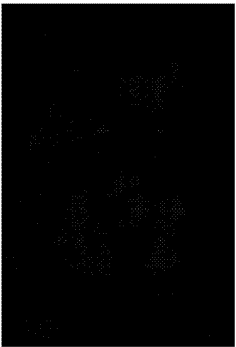
[0313] 또한, 용기 폐쇄부 무결성 (CCIT)은 검증된 헤드스페이스 분석기에 의해 의도된 보관 조건 (-70°C)에서 18개월에 시험하고 합격 결과를 기록하였다. 이 분석에는 6개의 비상용 바이알이 사용되었다. P188 농도가 또한 -70°C 에서 최대 18개월, 5°C 에서 12개월, 그리고 25°C /60% RH에서 3개월 동안 안정적이었다. -70°C 에서 24개월에 P188 농도의 약간의 감소가 관찰되었다.

도면

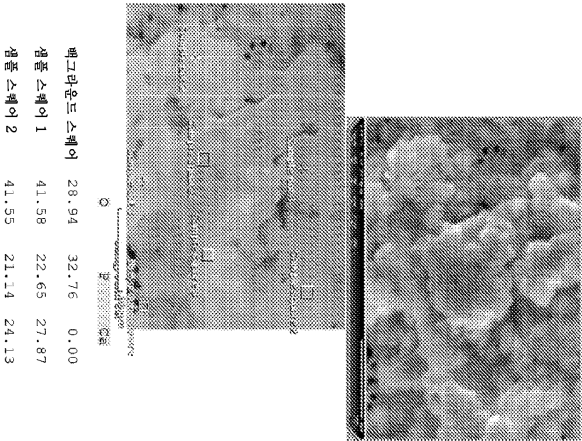
도면1a

분석	샘플	결과	설명
디지털 영상화	F0		백색 미립자 물질이 관찰될 수 있음
디지털 영상화	F0 5x F/T		다량의 백색 입자 물질이 관찰될 수 있음
디지털 영상화	25°C 에서 1M 후 F0		다량의 백색 입자 물질이 관찰될 수 있음

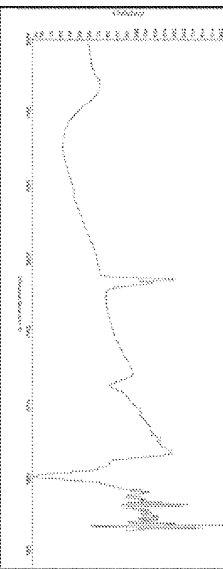
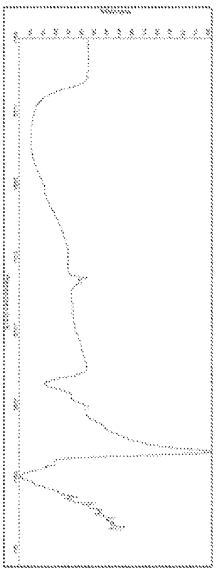
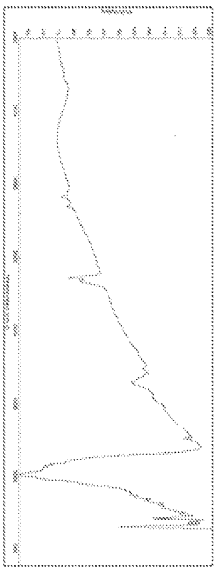
도면1b

편광 현미경검사	25°C 에서 1M 후 FO	평면 편광  교차 극선 	교차 극선 하에 어떤 복굴절도 보이지 않았으며, 이는 등방성이거나 비정질임을 시사함
-------------	-----------------	---	---

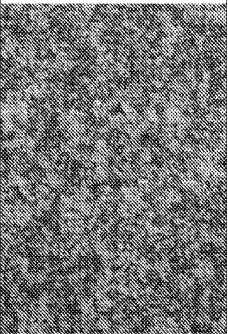
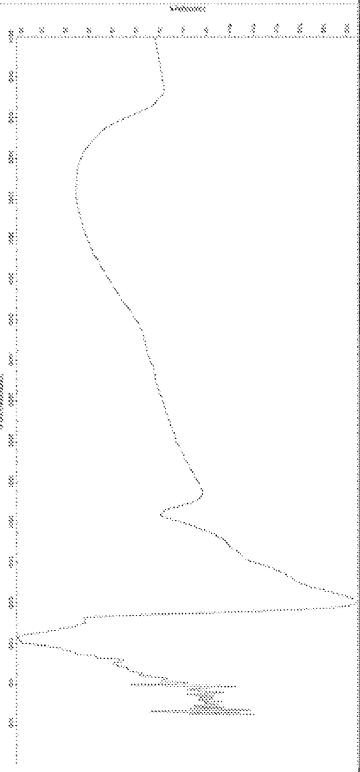
도면1c

SEM/EDS	FO 5x F/T		샘플 중 큰 비율의 O, Ca 및 P가 있음												
		 웨그라운드 스펙터 <table><thead><tr><th></th><th>O</th><th>Ca</th><th>P</th></tr></thead><tbody><tr><td>샘플 스펙터 1</td><td>28.94</td><td>32.76</td><td>0.00</td></tr><tr><td>샘플 스펙터 2</td><td>41.58</td><td>22.65</td><td>27.87</td></tr></tbody></table>		O	Ca	P	샘플 스펙터 1	28.94	32.76	0.00	샘플 스펙터 2	41.58	22.65	27.87	
	O	Ca	P												
샘플 스펙터 1	28.94	32.76	0.00												
샘플 스펙터 2	41.58	22.65	27.87												

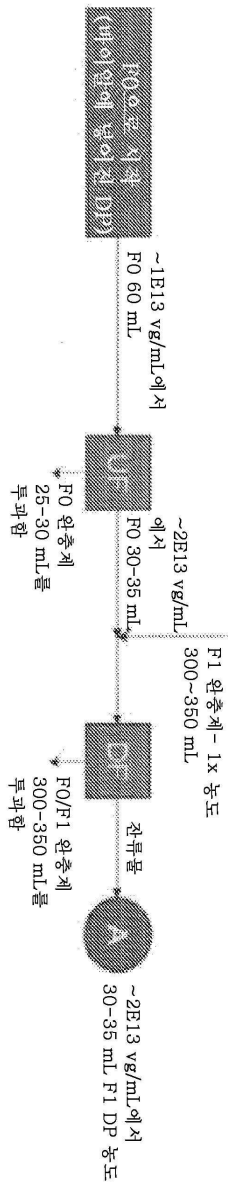
도면1d

FTIR	F0		FTIR은 물질이 데이터베이스 검색으로부터의 염인을 시사한다. F0, F0 5x F/T, 및 25°C에서 1 M F0 샘플은 모두 유사한 스펙트럼을 나타낸다.
FTIR	F0 5x F/T		FTIR은 물질이 데이터베이스 검색으로부터의 염인을 시사한다. F0, F0 5x F/T, 및 25°C에서 1 M F0 샘플은 모두 유사한 스펙트럼을 나타낸다.
FTIR	25°C 에서 1M 후 F0		FTIR은 물질이 데이터베이스 검색으로부터의 염인을 시사한다. F0, F0 5x F/T, 및 25°C에서 1 M F0 샘플은 모두 유사한 스펙트럼을 나타낸다.

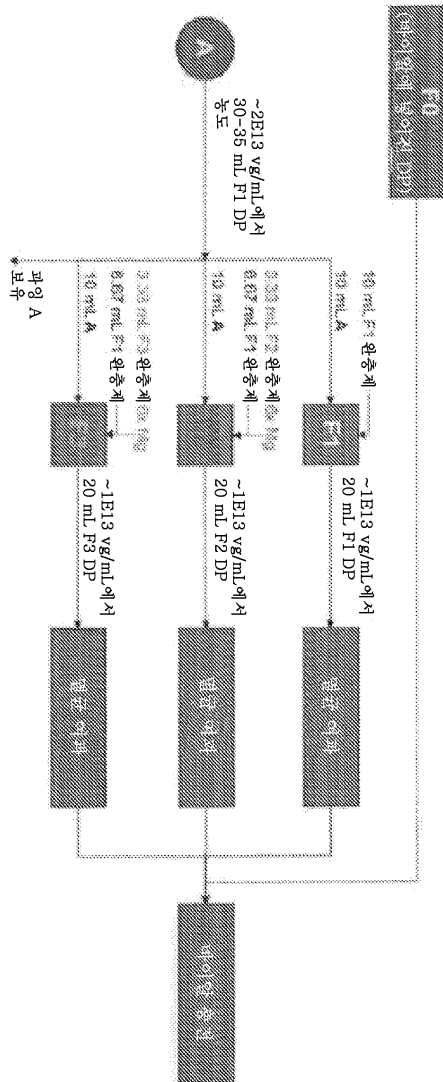
도면1f

디지털 영상화	F0 5x F/T (로트 2)		백색 입자 물질이 관찰됨
FTIR	F0 5x F/T (로트 2)		이전 로트로부터의 F0에 대한 스펙트럼과 유사
라만 편미경검사	F0 5x F/T		인산칼륨으로서 확인된 물질

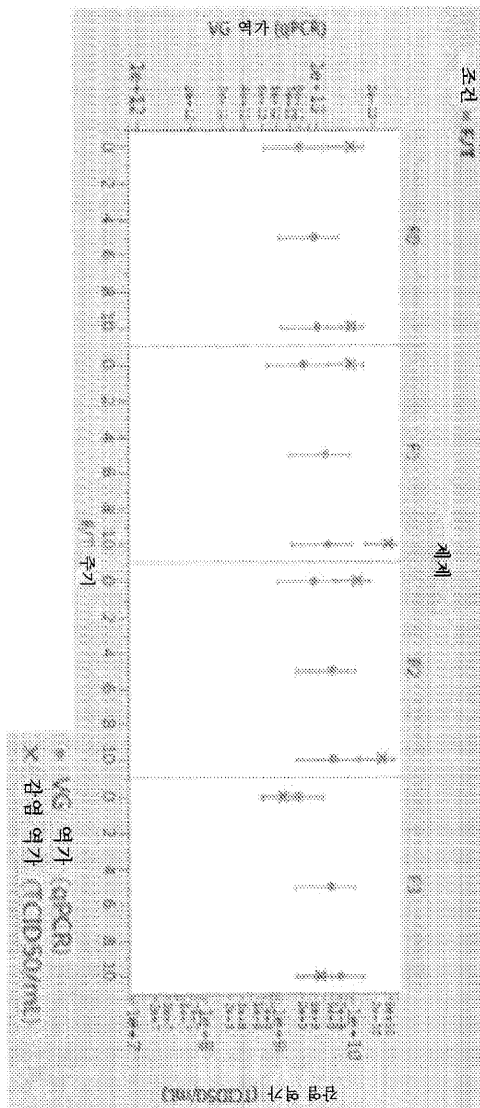
도면2



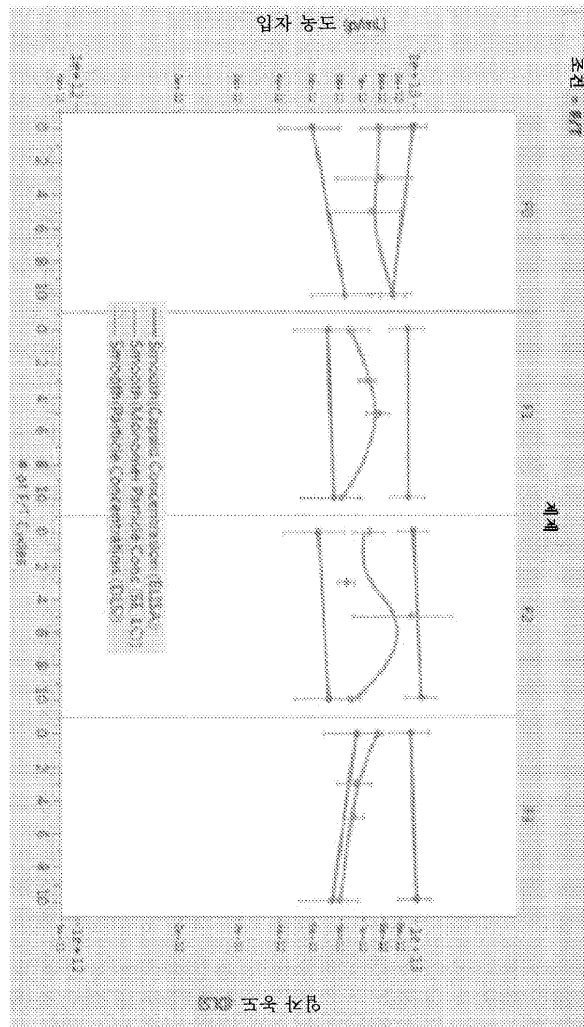
도면3



도면4a



도면4b



도면4c

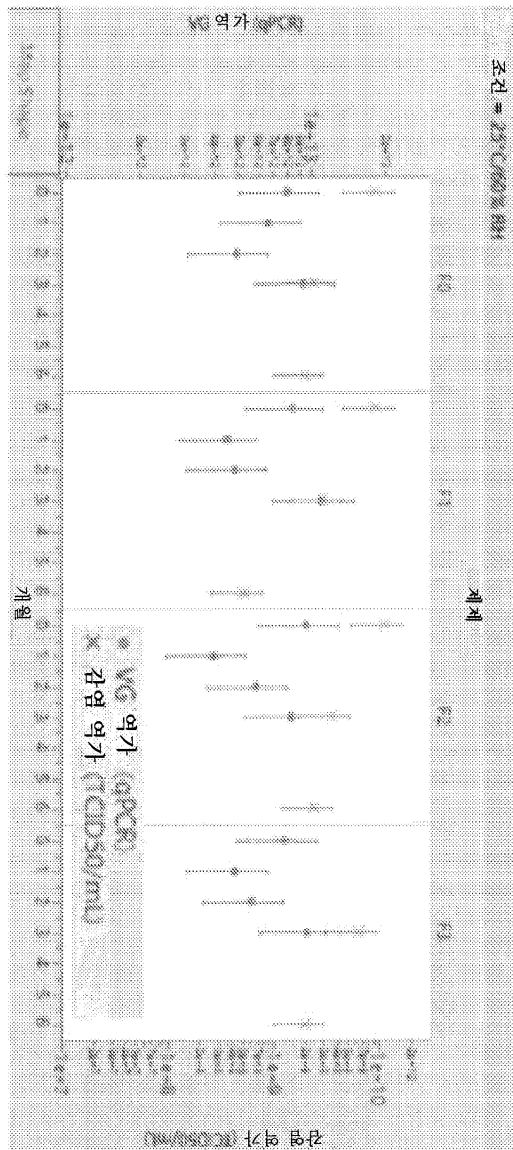
계제	조건	외관	pH	단량체		% 단량체 DLS	% HMWS, DLS	% HMWS, SE-IC	% 완전 캡시드
				평균 크기 (nm)	다분산 지수				
F0	초기	합격	7.3	29.7	0.07	100.0%	0%	0.2%	89.2%
	3x F/T	합격	7.3	30.7	0.12	99.6%	0.4%	ND	ND
	5x F/T	불합격	7.3	30.4	0.08	100.0%	0%	ND	ND
	10x F/T	불합격	7.3	30.2	0.07	100.0%	0%	0.0%	89.3%
F1	초기	합격	7.3	33.0	0.12	100.0%	0%	0.5%	89.1%
	3x F/T	합격	7.2	32.8	0.13	100.0%	0%	ND	ND
	5x F/T	합격	7.2	34.3	0.13	100.0%	0%	ND	ND
	10x F/T	합격	7.3	33.4	0.12	100.0%	0%	0.6 %	89.2%
F2	초기	합격	7.2	33.6	0.14	100.0%	0%	0.5%	89.3%
	3x F/T	합격	7.2	34.0	0.14	100.0%	0%	ND	ND
	5x F/T	합격	7.3	33.9	0.13	100.0%	0%	ND	ND
	10x F/T	합격	7.2	33.6	0.13	100.0%	0%	0.5%	89.3%
F3	초기	합격	7.2	33.4	0.12	100.0%	0%	0.4%	89.1%
	3x F/T	합격	7.2	33.3	0.12	100.0%	0%	ND	ND
	5x F/T	합격	7.2	33.6	0.13	100.0%	0%	ND	ND
	10x F/T	합격	7.3	33.7	0.13	100.0%	0%	0.3%	89.0%

ND: 데이터 없음.

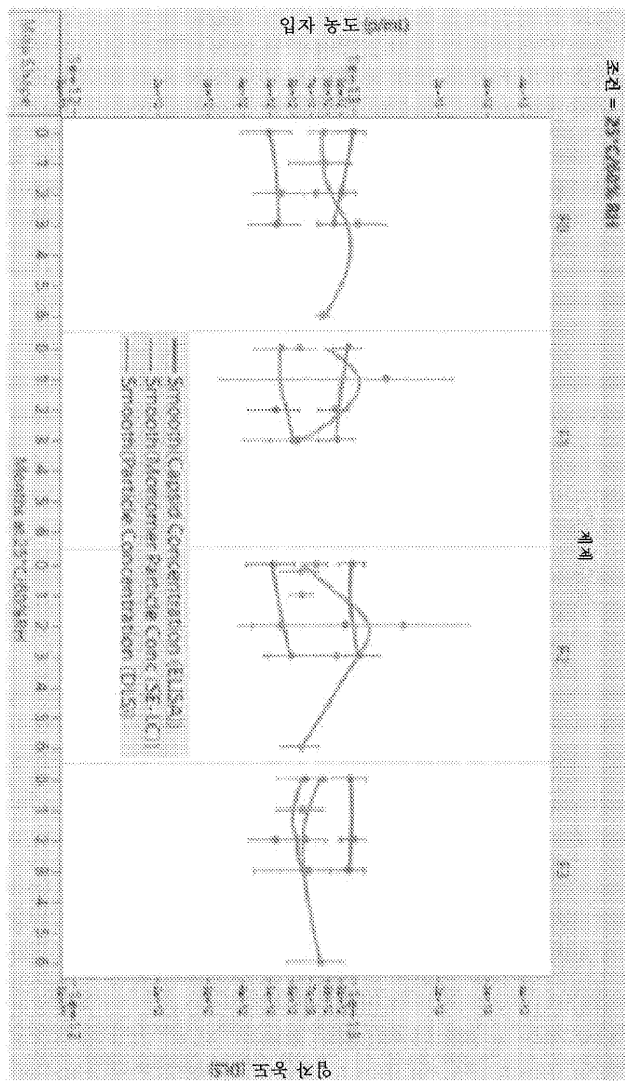
도면4d

계제	조건	VG 역가 (vg/mL)	감염 역가 (TCID ₅₀ /mL)	VG/TCID ₅₀	캡사이드 역가 (캡사이드/mL)	단량체 농도, SE-LC (p/mL)	단량체 농도, MADLS (p/mL)
F0	초기	7.9E+12	9.3E+09	1200	5.0E+12	1.0E+13	7.8E+12
	3x F/T	ND	ND	ND	ND	ND	8.3E+12
	5x F/T	9.5E+12	ND	ND	ND	ND	8.3E+12
	10x F/T	9.9E+12	9.3E+09	700	6.2E+12	8.6E+12	7.8E+12
	초기	8.3E+12	9.3E+09	1100	5.5E+12	9.5E+12	6.4E+12
F1	3x F/T	ND	ND	ND	ND	ND	6.7E+12
	5x F/T	1.1E+13	ND	ND	NO	ND	7.0E+12
	10x F/T	1.1E+13	2.9E+10	300	5.7E+12	9.5E+12	5.9E+12
	초기	9.4E+12	1.1E+10	1100	5.2E+12	9.9E+12	7.3E+12
	3x F/T	ND	ND	ND	ND	ND	6.8E+12
F2	5x F/T	1.2E+13	ND	ND	ND	ND	1.0E+13
	10x F/T	1.2E+13	2.4E+10	400	5.6E+12	1.0E+13	6.4E+12
	초기	7.7E+12	1.1E+09	8400	6.7E+12	9.7E+12	8.2E+12
	3x F/T	ND	ND	ND	ND	ND	6.1E+12
	5x F/T	1.8E+13	ND	ND	ND	ND	6.0E+12
F3	10x F/T	1.3E+13	3.6E+09	2600	5.7E+12	1.0E+13	5.7E+12

도면5a



도면5b



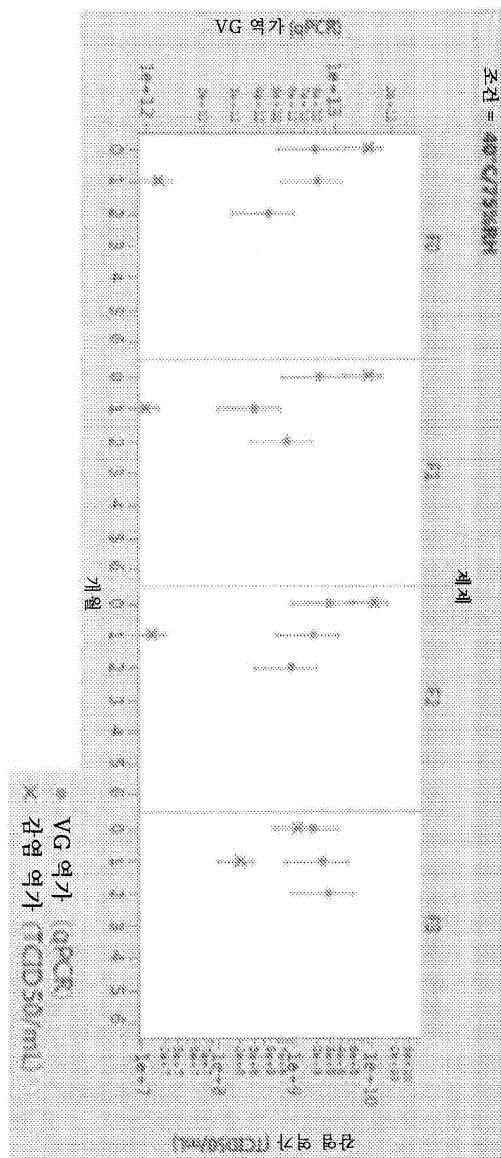
도면5c

제제	조건	외관	pH	단량체 피크 평균 크기 (nm)	다분산 계수	% 단량체, DLS	% HMWS, DLS	% HMWS, SE-LC	% 완전 캡처드
F0	초기	합적	7.3	29.7	0.07	100.0%	0.0%	0.2%	89.2%
	1주	합적	7.3	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	1개월	합적	7.3	30.2	0.08	100.0%	0.0%	ND	ND
	2개월	합적	7.2	30.1	0.07	100.0%	0.0%	0.7%	NAA
	3개월	합적	7.4	32.9	0.13	100.0%	0.0%	0.0%	NAA
F1	6개월	합적	7.2	30.6	0.08	100.0%	0.0%	ND	ND
	초기	합적	7.3	33.0	0.12	100.0%	0.0%	0.5%	89.1%
	1주	합적	7.1	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	1개월	합적	7.2	34.3	0.14	100.0%	0.0%	ND	ND
	2개월	합적	7.2	34.4	0.14	100.0%	0.0%	1.9%	NAA
F2	3개월	합적	7.2	36.4	0.17	99.6%	0.4%	5.5%	NAA
	6개월	합적	7.2	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	초기	합적	7.2	33.6	0.14	100.0%	0.0%	0.5%	89.3%
	1주	합적	7.2	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	1개월	합적	7.2	34.2	0.13	100.0%	0.0%	ND	ND
F3	2개월	합적	7.2	34.6	0.14	100.0%	0.0%	0.8%	NAA
	3개월	합적	7.2	35.4	0.17	99.5%	0.5%	1.3%	NAA
	6개월	합적	7.3	34.0	0.13	100.0%	0.0%	ND	ND
	초기	합적	7.2	33.4	0.12	100.0%	0.0%	0.4%	89.1%
	1주	합적	7.2	ND	ND	ND	ND	ND	ND
F3	1개월	합적	7.3	33.6	0.13	100.0%	0.0%	ND	ND
	2개월	합적	7.2	33.5	0.12	100.0%	0.0%	0.6%	NAA
	3개월	합적	7.4	34.7	0.17	99.2%	0.8%	1.7%	NAA
	6개월	합적	7.2	33.9	0.13	100.0%	0.0%	ND	ND

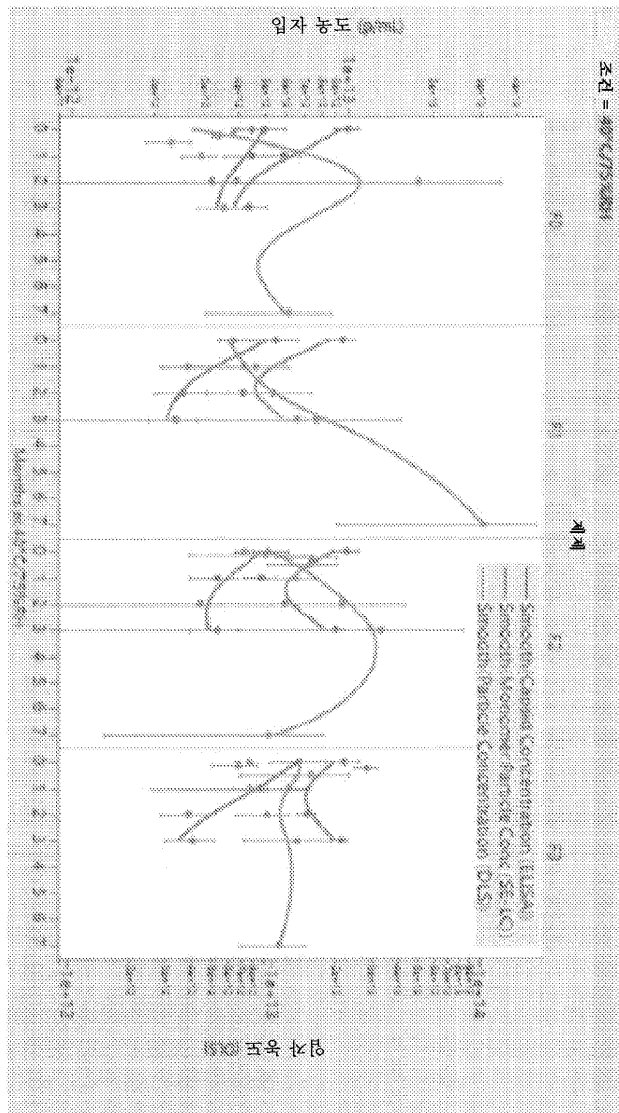
도면5d

계세	조건	VG 역가 (vg/mL)	감염 역가 (TCID ₅₀ /mL)	VG/TCID ₅₀	웹시드 역가 (웹시드/mL)	단량체 농도, SE-1C (p/mL)	단량체 농도, MADLS (p/mL)
F0	초기	7.9E+12	9.3E+09	1200	5.0E+12	1.0E+13	7.8E+12
	1개월	6.6E+12	ND	ND	ND	ND	8.6E+12
	2개월	4.9E+12	ND	ND	5.5E+12	9.0E+12	8.4E+12
	3개월	9.2E+12	2.4E+09	1100	5.3E+12	8.4E+12	8.6E+12
F1	6개월	ND	2.0E+09	ND	ND	ND	7.7E+12
	초기	8.3E+12	9.3E+09	1100	5.5E+12	9.5E+12	6.4E+12
	1개월	4.5E+12	ND	ND	ND	ND	1.2E+13
	2개월	4.8E+12	ND	ND	5.3E+12	8.6E+12	1.5E+13
F2	3개월	1.1E+13	2.9E+09	600	6.3E+12	8.7E+12	4.8E+12
	6개월	ND	5.2E+08	ND	ND	ND	ND
	초기	9.4E+12	1.1E+10	1100	5.2E+12	9.9E+12	7.3E+12
	1개월	3.9E+12	ND	ND	ND	ND	6.7E+12
F3	2개월	5.9E+12	ND	ND	5.5E+12	9.3E+12	7.6E+12
	3개월	8.2E+12	3.6E+09	1300	6.0E+12	1.1E+13	8.6E+12
	6개월	ND	2.4E+09	ND	ND	ND	6.5E+12
	초기	7.7E+12	1.1E+09	8400	6.7E+12	9.7E+12	8.2E+12
F3	1개월	4.8E+12	ND	ND	ND	ND	6.5E+12
	2개월	5.6E+12	ND	ND	5.3E+12	1.0E+13	7.1E+12
	3개월	9.5E+12	6.3E+09	500	6.8E+12	9.5E+12	7.3E+12
	6개월	ND	2.0E+09	ND	ND	ND	7.5E+12

도면6a



도면 6b



도면6ci

제제	조건	외관	pH	단량체 피크 평균 크기 (nm)	다분산 계수	% 단량체, DLS	% HMWS, DLS	% HMWS, SEC-LC	% 완전 캡시드
F0	초기	합적	7.3	29.7	0.07	100.0%	0.0%	0.2%	89.2%
	3일	합적	7.3	34.1	0.15	99.6%	0.4%	ND	ND
	1주	합적	7.4	35.0	0.14	100.0%	0.0%	ND	ND
	2주	합적	7.3	35.9	0.20	98.1%	1.9%	ND	ND
	1개월	합적	7.3	33.4	0.14	100.0%	0.0%	5.4%	NAA
	2개월	합적	7.1	28.8	0.36	94.6%	5.4%	0.0%	NAA
	3개월	불합적	7.1	32.6	0.32	87.6%	12.4%	0.0%	NAA
F1	7개월	ND	ND	32.8	0.50	72.7%	27.3%	ND	ND
	초기	합적	7.3	33.0	0.12	100.0%	0.0%	0.5%	89.1%
	3일	합적	7.2	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	1주	합적	7.2	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	2주	합적	7.2	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	1개월	합적	7.2	43.9	0.25	96.5%	3.6%	15.2%	NAA
	2개월	합적	7.2	40.6	0.22	98.5%	1.5%	4.5%	NAA
F2	3개월	불합적	7.2	41.7	0.24	96.9%	3.1%	20.3%	NAA
	7개월	ND	ND	46.7	0.24	99.0%	1.0%	ND	ND
	초기	합적	7.2	33.6	0.14	100.0%	0.0%	0.5%	89.3%
	3일	합적	7.2	39.5	0.22	96.6%	3.4%	ND	ND
	1주	합적	7.2	45.1	0.25	94.5%	5.5%	ND	ND
	2주	합적	7.2	42.2	0.26	92.6%	7.4%	ND	ND
	1개월	합적	7.2	41.3	0.23	97.6%	2.4%	6.5%	NAA
F3	2개월	합적	7.2	42.0	0.23	98.5%	1.5%	11.6%	NAA
	3개월	불합적	7.3	40.3	0.24	95.0%	5.0%	17.1%	NAA
	7개월	ND	ND	55.4	0.28	97.5%	2.5%	ND	ND
	초기	합적	7.2	33.4	0.12	100.0%	0.0%	0.4%	89.1%
	3일	합적	7.2	36.3	0.23	96.6%	3.4%	ND	ND
	1주	합적	7.2	40.2	0.20	98.4%	1.6%	ND	ND
	2주	합적	7.2	42.9	0.22	98.2%	1.8%	ND	ND
F3	1개월	합적	7.2	37.7	0.18	100.0%	0.0%	3.5%	NAA
	2개월	합적	7.2	37.9	0.20	98.9%	1.1%	5.6%	NAA

도면6cii

제제	조건	외관	pH	단량체 피크 평균 크기 (nm)	다분산 지수	% 단량체, DLS	% HMWS, DLS	% HMWS, SEC	% 완전 캡시드
	3개월	분말상	7.3	39.2	0.25	92.8%	7.2%	9.5%	NAA
	7개월	ND	ND	46.9	0.36	82.4%	17.6%	ND	ND

도면6di

제제	조건	VG 역가 (vg/mL)	감염 역가 (TCID ₅₀ /mL)	VG/TCID ₅₀	웹시드 역가 (웹시드/mL)	단량체 농도 SE-LC, (p/mL)	단량체 농도 (MADLS (p/mL)
F0	초기	7.9E+12	9.3E+09	1200	5.0E+12	1.0E+13	7.8 E+12
	3일	ND	ND	ND	ND	ND	6.3E+12
	1주	ND	ND	ND	ND	ND	5.4E+12
	2주	ND	ND	ND	ND	ND	3.2E+12
	1개월	8.1E+12	1.7E+07	440000	4.5E+12	5.9E+12	4.0 E+12
	2개월	4.5E+12	ND	ND	3.2E+12	3.9E+12	5.1E+13
	3개월	ND	ND	ND	3.6E+12	4.4E+12	5.2E+12
F1	7개월	ND	ND	ND	ND	ND	1.2E+13
	초기	8.3E+12	9.3E+09	1100	2.6E+12	9.5E+12	6.4E+12
	3일	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	1주	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	2주	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	1개월	3.8E+12	1.1E+07	280000	2.6E+12	4.2E+12	1.0E+13
	2개월	5.7E+12	ND	ND	2.5E+12	4.2E+12	8.6E+12
F2	3개월	ND	ND	ND	2.4E+12	6.6E+12	1.8E+13
	7개월	ND	ND	ND	ND	ND	1.0E+14
	초기	9.4E+12	1.1E+10	1100	5.2E+12	9.9E+12	7.3E+12
	3일	ND	ND	ND	ND	ND	9.2E+12
	1주	ND	ND	ND	ND	ND	1.5E+13
	2주	ND	ND	ND	ND	ND	1.5E+13
	1개월	7.8E+12	1.4E+07	410000	3.4E+12	4.9E+12	1.4E+13
F3	2개월	6.0E+12	ND	ND	2.9E+12	5.9E+12	2.2E+13
	3개월	ND	ND	ND	3.4E+12	9.0E+12	3.2E+13
	7개월	ND	ND	ND	ND	ND	1.0E+13
	초기	7.7E+12	1.1E+09	8400	6.7E+12	9.7E+12	8.2E+12
	3일	ND	ND	ND	ND	ND	6.8E+12
	1주	ND	ND	ND	ND	ND	2.8E+13
	2주	ND	ND	ND	ND	ND	1.5E+13
F3	1개월	8.7E+12	2.0E+08	42000	4.9E+12	6.2E+12	5.5E+12
	2개월	9.3E+12	ND	ND	2.7E+12	7.2E+12	8.0E+12

도면6dii

제제	조건	VG 역가 (vg/mL)	감염 역가 (TCID ₅₀ /mL)	VG/TCID ₅₀	웹시드 역가 (웹시드/mL)	단량체 농도 SE-LC, (p/mL)	단량체 농도 (MADLS (p/mL)
	3개월	ND	ND	ND	2.8E+12	9.4E+12	1.3E+13
	7개월	ND	ND	ND	ND	ND	1.1E+13

도면7

품질 속성	시험 방법	방법 가변성	안정성 허용 기준	불합격 기준
외관 액체	육안 검사	N/A	투명, 무색, 미립자 없음	호리거나, 탁하거나, 입자의 육안 검출
pH	전위차	± 0.1	7.1 - 7.5	< 7.1 또는 > 7.5
단량체 피크 평균 크기	DLS	< 10%	중기 (t_0)로부터 < 10% 변화	중기로부터 > + 25% 변화
다분산 지수	DLS	< 10%	PDI < 0.20	PDI > 0.25
단량체 분율	DLS	< 2.5%	> 97.5% 단량체	< 95% 단량체
HMWS 분율	DLS	< 2.5%	< 2.5% HMWS	> 5% HMWS
HMWS 분율	SE-LC	< 10%	< 5% HMWS	> 10% HMWS
% 완전 캡시드	AEX-LC	< 10%	> 85% 완전 캡시드	< 80% 완전 캡시드
배터 계층 역가	qPCR	36.0%	중기로부터 -36% 내지 + 36% 변화	중기로부터 < -50% 변화
감염 역가	TCID ₅₀	50.0%	중기로부터 -50% 내지 + 50% 변화	중기로부터 < -60% 변화
VG/TCID ₅₀ 비	계산	86.0%	중기로부터 -0.5 내지 + 0.5 -log ₁₀ 변화	중기로부터 - 1 -log ₁₀ 변화
캡시드 농도	ELISA	20.0%	중기로부터 -20% 내지 + 20% 변화	중기로부터 < -40% 변화
단량체 농도	SE-LC	30.0%	중기로부터 -30% 내지 + 30% 변화	중기로부터 < -40% 변화
단량체 농도	MADLS	< 30%	중기로부터 -25% 내지 + 25% 변화	중기로부터 < -40% 변화

도면8

시험		외관, 액체	pH	단량체 피크 평균 크기	다분산 지수	단량체 분율, DLS	HMWS 분율, DLS	HMWS 분율, SE- LC	% 완전 AEX-LC
F0	조건	합격/불합격	pH	t0으로부터의 % 변화	PDI	% 단량체	% HMWS	% HMWS	
	초기	합격	7.3	29.65	0.07	100.0%	0.0%	0.2%	89.2%
	10x F/T	불합격	7.3	1.8%	0.07	99.6%	0.4%	0.0%	89.3%
	3 mo 25°C / 60%RH	합격	7.4	11.1%	0.13	99.6%	0.4%	0.0%	NAA
	1 mo 40°C / 75%RH	합격	7.3	12.6%	0.14	100.0%	0.0%	5.4%	NAA
F1	평가	불합격	합격	예매함		합격		예매함	합격
	초기	합격	7.3	33.0	0.12	100.0%	0.0%	0.5%	89.1%
	10x F/T	합격	7.3	1.0%	0.12	100.0%	0.0%	0.6%	89.2%
	3 mo 25°C / 60%RH	합격	7.2	10.3%	0.17	100.0%	0.0%	5.5%	NAA
	1 mo 40°C / 75%RH	합격	7.2	32.9%	0.25	85.5%	14.5%	15.2%	NAA
F2	평가	합격	합격	불합격		불합격		불합격	합격
	초기	합격	7.2	33.6	0.14	100.0%	0.0%	0.5%	89.3%
	10x F/T	합격	7.2	0.0%	0.13	100.0%	0.0%	0.5%	89.3%
	3 mo 25°C / 60%RH	합격	7.2	5.4%	0.17	98.4%	1.6%	1.3%	NAA
	1 mo 40°C / 75%RH	합격	7.2	23.0%	0.23	99.7%	0.4%	6.5%	NAA
F3	평가	합격	합격	예매함		합격		예매함	합격
	초기	합격	7.2	33.4	0.12	100.0%	0.0%	0.4%	89.1%
	10x F/T	합격	7.3	1.0%	0.13	99.5%	0.5%	0.3%	89.0%
	3 mo 25°C / 60%RH	합격	7.4	3.8%	0.17	100.0%	0.0%	1.7%	NAA
	1 mo 40°C / 75%RH	합격	7.2	12.9%	0.18	100.0%	0.0%	3.5%	NAA

도면9

시험		VG 역가, qPCR	감염 역가, TCID ₅₀	VG / TCID ₅₀ 비	캡시드 농도, ELISA	단량체 농도, SE-1C	단량체 농도, MADIS
형태	조건	<i>10</i> 으로부터의 평균	<i>10</i> 으로부터의 평균	<i>10</i> 으로부터의 log 평균	<i>10</i> 으로부터의 평균	<i>10</i> 으로부터의 평균	<i>10</i> 으로부터의 평균
	조기	7.9E+12	9.3E+09	1200	5.0E+12	1.0E+13	7.8E+12
	10x F/T	25.1%	0.0%	0.23	24.5%	-13.3%	10.8%
	3 mo 25°C / 60%RH	16.9%	-73.9%	0.02	6.6%	-14.8%	32.0%
F0	1 mo 40°C / 75%RH	3.2%	-99.8%	-2.57	-9.6%	-40.7%	-43.3%*
	평가	합격	검수 없음		합격	예배합	예배합
	조기	8.3E+12	9.3E+09	1100	5.5E+12	9.5E+12	6.4E+12
	10x F/T	36.5%	216.2%	0.54	4.2%	0.2%	-5.5%
F1	3 mo 25°C / 60%RH	31.4%	-68.3%	0.26	13.6%	-8.5%	-4.6%
	1 mo 40°C / 75%RH	-54.5%	-99.9%	-2.39	-52.1%	-55.5%	28.9%*
	평가	불합격	검수 없음		예배합	예배합	예배합
	조기	9.4E+12	1.1E+10	1100	5.2E+12	9.9E+12	7.3E+12
F2	10x F/T	27.3%	115.4%	0.46	7.7%	5.1%	-17.5%
	3 mo 25°C / 60%RH	-13.2%	-68.4%	-0.05	15.8%	6.8%	11.4%
	1 mo 40°C / 75%RH	-17.6%	-99.9%	-2.56	-34.4%	-50.7%	65.9%*
	평가	합격	검수 없음		합격	예배합	예배합
F3	조기	7.7E+12	1.1E+09	8400	6.7E+12	9.7E+12	7.7E+12
	10x F/T	68.9%	216.2%	0.5	-15.2%	3.7%	-23.6%
	3 mo 25°C / 60%RH	22.8%	462.3%	1.27	2.6%	-1.5%	-15.0%
	1 mo 40°C / 75%RH	12.6%	-82.2%	-0.7	-27.0%	-36.1%	0.1%*
평가		예배합	검수 없음		합격	합격	합격

*결과를 재현할 수 없었으며 최종 독점에 고려되지 않았음

도면10i

안정성 결과

시험		온도(°C)	T0	1개월	3개월	6개월	9개월	12개월	18개월	24개월
의약품, 액제	색상	-70	투명	≤B9	≤B9	≤B9	≤B9	≤B9	≤B9	≤B9
		5		≤B9	≤B9	≤B9		≤B9		
		25		≤B9	≤B9					
	투명도	-70	무색	≤참조 I	≤참조 I	≤참조 I	≤참조 I	≤참조 I	≤참조 I	≤참조 I
		5		≤참조 I	≤참조 I	≤참조 I		≤참조 I		
		25		≤참조 I	≤참조 I					
	가시적 입자	-70	어떤 가시적 미립자도 없음	EFVP	EFVP	EFVP	EFVP	EFVP	EFVP	EFVP
		5		EFVP	EFVP	EFVP		1-5 ptcl*		
		25		EFVP	EFVP					
	용기 폐쇄부 무결성	-70							합격	
pH		-70	7.4	7.5	7.4	7.4	7.4	7.4	7.3	7.3
		5		7.4	7.3	7.3		7.4		
		25		7.4	7.3					
계분 역가 (qPCR)		-70	1.06E+13	8.12E+12	9.17E+12	7.45E+12	1.14E+13	8.77E+12	9.05E+12	7.41E+12
		5		7.69E+12	8.93E+12	6.79E+12		9.00E+12		
		25		7.93E+12	9.26E+12					
캡시드 역가 (ELISA)		-70	1.50E+13	1.05E+13	1.28E+13	1.07E+13	1.21E+13	1.40E+13	1.59E+13	1.07E+13
		5		1.14E+13	1.26E+13	1.14E+13		1.26E+13		
		25		1.06E+13	1.23E+13					
간염 역가 (TCID ₅₀)		-70	4.31E+09	2.93E+09	2.20E+09	9.29E+08	3.56E+09	1.82E+09	2.00E+09	7.67E+09
		5		2.00E+09	9.27E+08	1.36E+09		5.22E+09		
		25		5.22E+09	1.12E+09					
계분 역가 / 간염 역가 비		-70	2459	3618	4818	11410	2978	5824	5300	1382
		-70		94.4	94.5	94.5	94.7	94.6	94.5	94.9
		5		94.2	94.8	94.5		94.8		
% 캡시드		25	94.8	94.3	93.5					
		-70		5.6	5.5	5.5	5.3	5.4	5.5	5.1
		5		5.8	5.2	5.5		5.2		
캡시드 단백질 순도 (CE): % 기타		25	NR	5.7	6.5					

도면10ii

시험	온도 (°C)	T0	1개월	3개월	6개월	9개월	12개월	18개월	24개월
크기 분포 (SEC): % 단량체	-70	99.4	98.9	98.9	99.2	99.0	99.3	99.2	99.0
	5		99.1	98.8	99.3		99.1		
	25		98.5	98.5					
크기 분포 (SEC): % 응집체	-70	NMT 1.0	1.1	1.1	NMT 1.0	1.0	N/A	NMT 1.0	NMT 1.0
	5		NMT 1.0	1.2	NMT 1.0		NMT 1.0		
	25		1.5	1.5					
입자 함량 (SEC): 260/280 비	-70	1.32	1.32	1.32	1.32	1.32	1.32	1.33	1.32
	5		1.32	1.32	1.32		1.32		
	25		1.32	1.33					
시험관내 FVIII 활성/ 기능적 생물검정 (% 상대 활성)	-70	73	76	82	64	60	69	60	55
	5		73	60	60		48		
	25		61	42					
P188 농도	-70	NT	443.8	454.4	456.8	432.3	464.2	504.8	399.0
	5		NT	467.2	455.7		466.6		
	25		454.7	461.9					

*1-5 입자 (partic): 입자 설명 - "1개의 긴 섬유 입자"
NR: 보고되지 않음, NTM: 이하, NT: 시험되지 않음

서열 목록

SEQUENCE LISTING

- <110> SANGAMO THERAPEUTICS, INC.
PFIZER INC.
- <120> IMPROVED PHARMACEUTICAL COMPOSITIONS CONTAINING ADENO-ASSOCIATED
VIRAL VECTOR
- <130> 025297.W0029
- <140><141><150> 63/127,826
- <151> 2020-12-18

<160> 2

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 1457

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide"

<400> 1

Met Gln Ile Glu Leu Ser Thr Cys Phe Phe Leu Cys Leu Leu Arg Phe

1	5	10	15
Cys Phe Ser Ala Thr Arg Arg Tyr Tyr Leu Gly Ala Val Glu Leu Ser			
	20	25	30
Trp Asp Tyr Met Gln Ser Asp Leu Gly Glu Leu Pro Val Asp Ala Arg			
	35	40	45
Phe Pro Pro Arg Val Pro Lys Ser Phe Pro Phe Asn Thr Ser Val Val			
	50	55	60
Tyr Lys Lys Thr Leu Phe Val Glu Phe Thr Asp His Leu Phe Asn Ile			

65	70	75	80
Ala Lys Pro Arg Pro Pro Trp Met Gly Leu Leu Gly Pro Thr Ile Gln			
	85	90	95
Ala Glu Val Tyr Asp Thr Val Val Ile Thr Leu Lys Asn Met Ala Ser			
	100	105	110
His Pro Val Ser Leu His Ala Val Gly Val Ser Tyr Trp Lys Ala Ser			
	115	120	125
Glu Gly Ala Glu Tyr Asp Asp Gln Thr Ser Gln Arg Glu Lys Glu Asp			

130	135	140
Asp Lys Val Phe Pro Gly Gly Ser His Thr Tyr Val Trp Gln Val Leu		
145	150	155
Lys Glu Asn Gly Pro Met Ala Ser Asp Pro Leu Cys Leu Thr Tyr Ser		
	165	170
		175

Tyr Leu Ser His Val Asp Leu Val Lys Asp Leu Asn Ser Gly Leu Ile
 180 185 190
 Gly Ala Leu Leu Val Cys Arg Glu Gly Ser Leu Ala Lys Glu Lys Thr
 195 200 205
 Gln Thr Leu His Lys Phe Ile Leu Leu Phe Ala Val Phe Asp Glu Gly
 210 215 220
 Lys Ser Trp His Ser Glu Thr Lys Asn Ser Leu Met Gln Asp Arg Asp
 225 230 235 240
 Ala Ala Ser Ala Arg Ala Trp Pro Lys Met His Thr Val Asn Gly Tyr
 245 250 255
 Val Asn Arg Ser Leu Pro Gly Leu Ile Gly Cys His Arg Lys Ser Val
 260 265 270
 Tyr Trp His Val Ile Gly Met Gly Thr Thr Pro Glu Val His Ser Ile
 275 280 285
 Phe Leu Glu Gly His Thr Phe Leu Val Arg Asn His Arg Gln Ala Ser
 290 295 300
 Leu Glu Ile Ser Pro Ile Thr Phe Leu Thr Ala Gln Thr Leu Leu Met
 305 310 315 320
 Asp Leu Gly Gln Phe Leu Leu Phe Cys His Ile Ser Ser His Gln His
 325 330 335
 Asp Gly Met Glu Ala Tyr Val Lys Val Asp Ser Cys Pro Glu Glu Pro
 340 345 350
 Gln Leu Arg Met Lys Asn Asn Glu Glu Ala Glu Asp Tyr Asp Asp Asp
 355 360 365
 Leu Thr Asp Ser Glu Met Asp Val Val Arg Phe Asp Asp Asp Asn Ser
 370 375 380
 Pro Ser Phe Ile Gln Ile Arg Ser Val Ala Lys Lys His Pro Lys Thr
 385 390 395 400
 Trp Val His Tyr Ile Ala Ala Glu Glu Glu Asp Trp Asp Tyr Ala Pro
 405 410 415
 Leu Val Leu Ala Pro Asp Asp Arg Ser Tyr Lys Ser Gln Tyr Leu Asn

420 425 430
Asn Gly Pro Gln Arg Ile Gly Arg Lys Tyr Lys Lys Val Arg Phe Met

435 440 445
Ala Tyr Thr Asp Glu Thr Phe Lys Thr Arg Glu Ala Ile Gln His Glu

450 455 460
Ser Gly Ile Leu Gly Pro Leu Leu Tyr Gly Glu Val Gly Asp Thr Leu

465 470 475 480
Leu Ile Ile Phe Lys Asn Gln Ala Ser Arg Pro Tyr Asn Ile Tyr Pro

485 490 495
His Gly Ile Thr Asp Val Arg Pro Leu Tyr Ser Arg Arg Leu Pro Lys

500 505 510
Gly Val Lys His Leu Lys Asp Phe Pro Ile Leu Pro Gly Glu Ile Phe

515 520 525
Lys Tyr Lys Trp Thr Val Thr Val Glu Asp Gly Pro Thr Lys Ser Asp

530 535 540
Pro Arg Cys Leu Thr Arg Tyr Tyr Ser Ser Phe Val Asn Met Glu Arg

545 550 555 560
Asp Leu Ala Ser Gly Leu Ile Gly Pro Leu Leu Ile Cys Tyr Lys Glu

565 570 575
Ser Val Asp Gln Arg Gly Asn Gln Ile Met Ser Asp Lys Arg Asn Val

580 585 590
Ile Leu Phe Ser Val Phe Asp Glu Asn Arg Ser Trp Tyr Leu Thr Glu

595 600 605
Asn Ile Gln Arg Phe Leu Pro Asn Pro Ala Gly Val Gln Leu Glu Asp

610 615 620
Pro Glu Phe Gln Ala Ser Asn Ile Met His Ser Ile Asn Gly Tyr Val

625 630 635 640
Phe Asp Ser Leu Gln Leu Ser Val Cys Leu His Glu Val Ala Tyr Trp

645 650 655
Tyr Ile Leu Ser Ile Gly Ala Gln Thr Asp Phe Leu Ser Val Phe Phe

660 665 670

Ser Gly Tyr Thr Phe Lys His Lys Met Val Tyr Glu Asp Thr Leu Thr
675 680 685

Leu Phe Pro Phe Ser Gly Glu Thr Val Phe Met Ser Met Glu Asn Pro
690 695 700

Gly Leu Trp Ile Leu Gly Cys His Asn Ser Asp Phe Arg Asn Arg Gly
705 710 715 720

Met Thr Ala Leu Leu Lys Val Ser Ser Cys Asp Lys Asn Thr Gly Asp
725 730 735

Tyr Tyr Glu Asp Ser Tyr Glu Asp Ile Ser Ala Tyr Leu Leu Ser Lys
740 745 750

Asn Asn Ala Ile Glu Pro Arg Ser Phe Ser Gln Asn Pro Pro Val Leu
755 760 765

Lys Arg His Gln Arg Glu Ile Thr Arg Thr Thr Leu Gln Ser Asp Gln
770 775 780

Glu Glu Ile Asp Tyr Asp Asp Thr Ile Ser Val Glu Met Lys Lys Glu
785 790 795 800

Asp Phe Asp Ile Tyr Asp Glu Asp Glu Asn Gln Ser Pro Arg Ser Phe
805 810 815

Gln Lys Lys Thr Arg His Tyr Phe Ile Ala Ala Val Glu Arg Leu Trp
820 825 830

Asp Tyr Gly Met Ser Ser Ser Pro His Val Leu Arg Asn Arg Ala Gln
835 840 845

Ser Gly Ser Val Pro Gln Phe Lys Lys Val Val Phe Gln Glu Phe Thr
850 855 860

Asp Gly Ser Phe Thr Gln Pro Leu Tyr Arg Gly Glu Leu Asn Glu His
865 870 875 880

Leu Gly Leu Leu Gly Pro Tyr Ile Arg Ala Glu Val Glu Asp Asn Ile
885 890 895

Met Val Thr Phe Arg Asn Gln Ala Ser Arg Pro Tyr Ser Phe Tyr Ser
900 905 910

Ser Leu Ile Ser Tyr Glu Glu Asp Gln Arg Gln Gly Ala Glu Pro Arg

915	920	925
Lys Asn Phe Val Lys Pro Asn Glu Thr Lys Thr Tyr Phe Trp Lys Val		
930	935	940
Gln His His Met Ala Pro Thr Lys Asp Glu Phe Asp Cys Lys Ala Trp		
945	950	955
Ala Tyr Phe Ser Asp Val Asp Leu Glu Lys Asp Val His Ser Gly Leu		
965	970	975
Ile Gly Pro Leu Leu Val Cys His Thr Asn Thr Leu Asn Pro Ala His		
980	985	990
Gly Arg Gln Val Thr Val Gln Glu Phe Ala Leu Phe Phe Thr Ile Phe		
995	1000	1005
Asp Glu Thr Lys Ser Trp Tyr Phe Thr Glu Asn Met Glu Arg Asn		
1010	1015	1020
Cys Arg Ala Pro Cys Asn Ile Gln Met Glu Asp Pro Thr Phe Lys		
1025	1030	1035
Glu Asn Tyr Arg Phe His Ala Ile Asn Gly Tyr Ile Met Asp Thr		
1040	1045	1050
Leu Pro Gly Leu Val Met Ala Gln Asp Gln Arg Ile Arg Trp Tyr		
1055	1060	1065
Leu Leu Ser Met Gly Ser Asn Glu Asn Ile His Ser Ile His Phe		
1070	1075	1080
Ser Gly His Val Phe Thr Val Arg Lys Lys Glu Glu Tyr Lys Met		
1085	1090	1095
Ala Leu Tyr Asn Leu Tyr Pro Gly Val Phe Glu Thr Val Glu Met		
1100	1105	1110
Leu Pro Ser Lys Ala Gly Ile Trp Arg Val Glu Cys Leu Ile Gly		
1115	1120	1125
Glu His Leu His Ala Gly Met Ser Thr Leu Phe Leu Val Tyr Ser		
1130	1135	1140
Asn Lys Cys Gln Thr Pro Leu Gly Met Ala Ser Gly His Ile Arg		
1145	1150	1155

Asp Phe	Gln Ile Thr	Ala Ser	Gly Gln Tyr	Gly Gln	Trp Ala Pro
1160		1165		1170	
Lys Leu	Ala Arg Leu	His Tyr	Ser Gly Ser	Ile Asn	Ala Trp Ser
1175		1180		1185	
Thr Lys	Glu Pro Phe	Ser Trp	Ile Lys Val	Asp Leu	Leu Ala Pro
1190		1195		1200	
Met Ile	Ile His Gly	Ile Lys	Thr Gln Gly	Ala Arg	Gln Lys Phe
1205		1210		1215	
Ser Ser	Leu Tyr Ile	Ser Gln	Phe Ile Ile	Met Tyr	Ser Leu Asp
1220		1225		1230	
Gly Lys	Lys Trp Gln	Thr Tyr	Arg Gly Asn	Ser Thr	Gly Thr Leu
1235		1240		1245	
Met Val	Phe Phe Gly	Asn Val	Asp Ser Ser	Gly Ile	Lys His Asn
1250		1255		1260	
Ile Phe	Asn Pro Pro	Ile Ile	Ala Arg Tyr	Ile Arg	Leu His Pro
1265		1270		1275	
Thr His	Tyr Ser Ile	Arg Ser	Thr Leu Arg	Met Glu	Leu Met Gly
1280		1285		1290	
Cys Asp	Leu Asn Ser	Cys Ser	Met Pro Leu	Gly Met	Glu Ser Lys
1295		1300		1305	
Ala Ile	Ser Asp Ala	Gln Ile	Thr Ala Ser	Ser Tyr	Phe Thr Asn
1310		1315		1320	
Met Phe	Ala Thr Trp	Ser Pro	Ser Lys Ala	Arg Leu	His Leu Gln
1325		1330		1335	
Gly Arg	Ser Asn Ala	Trp Arg	Pro Gln Val	Asn Asn	Pro Lys Glu
1340		1345		1350	
Trp Leu	Gln Val Asp	Phe Gln	Lys Thr Met	Lys Val	Thr Gly Val
1355		1360		1365	
Thr Thr	Gln Gly Val	Lys Ser	Leu Leu Thr	Ser Met	Tyr Val Lys
1370		1375		1380	
Glu Phe	Leu Ile Ser	Ser Ser	Gln Asp Gly	His Gln	Trp Thr Leu

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

1445	1450	1455
<210> 2		
<211> 5132		
<212> DNA		
<213> Artificial Sequence		
<220><221> source		
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polynucleotide"		

<400> 2	
ctgcgcgctc gctcgtcac tgaggccgcc cgggcaaagc ccgggcgtcg ggcgaccttt	60
ggtcgcccgg cctcagttag cgagcgagcg cgagagagg gaggggcga ctccatcact	120
aggggttctt gggcctaag cttggaacca ttgccacctt cagggggagg ctgctggtga	180
atattaacca agatcacccc agttaccgga ggagcaaaca gggactaagt tcacacgcgt	240
ggtaccgtct gctcgcacat ttcttagagc gagggttccg atactctaata ctccctaggc	300
aaggttcata ttgtgtagg ttacttattc tcttttgggt gactaagtca ataatacaga	360
tcagcagggt tggagtcagc ttggcaggga tcagcagcct ggggttgaag gagggggtat	420
aaaagccctt tcaccaggag aagccgtcac acagatccac aagctcctga agaggtaagg	480
gtttaagtta tcgttagttc gtgcaccatt aatgtttaat tacctggagc acctgcctga	540
aatcattttt ttttcagggt ggctagtatg cagatcgagc tctccacctg cttctttctg	600
tgctgttga gattctgctt cagcggcacc aggagatact acctgggggc tgtggagctg	660
agctgggact acatgcagtc tgacctgggg gagctgcctg tggatgccag gttccccccc	720
agagtgcaca agagcttccc cttcaacacc tctgtggtgt acaagaagac cctgtttgtg	780
gagttcactg accacctgtt caacattgcc aagcccaggc cccctggat gggcctgctg	840
ggccccacca tccaggctga ggtgtatgac actgtggtga tcaccctgaa gaacatggcc	900

agccaccctg tgagcctgca tgctgtgggg gtgagctact ggaaggcctc tgagggggct	960
gagtatgatg accagaccag ccagaggag aaggaggatg acaaggtgtt ccctgggggc	1020
agccacacct atgtgtggca ggtgctgaag gagaatggcc ccatggcctc tgacccctg	1080
tgcctgacct acagctacct gagccatgtg gacctggtga aggacctgaa ctctggcctg	1140
attggggccc tgctggtgtg caggaggggc agcctggcca aggagaagac ccagaccctg	1200
cacaagtcca tectgtgtt tgctgtgtt gatgaggga agagctggca ctctgaaacc	1260
aagaacagcc tgatgcagga cagggatgct gcctctgcca gggcctggcc caagatgcac	1320
actgtgaatg gctatgtgaa caggagcctg cctggcctga ttggctgcca caggaagtct	1380
gtgtactggc atgtgattgg catgggcacc acccctgagg tgcacagcat ctccctggag	1440
ggccacacct tctggctcag gaaccacagg caggccagcc tggagatcag ccccatcacc	1500
ttctgactg ccagaccct gctgatggac ctgggccagt tctgtgtt ctgccacatc	1560
agcagccacc agcatgatgg catggaggcc tatgtgaagg tggacagctg ccctgaggag	1620
ccccagctga ggatgaagaa caatgaggag gctgaggact atgatgatga cctgactgac	1680
tctgagatgg atgtggtgag gtttgatgat gacaacagcc ccagcttcat ccagatcagg	1740
tctgtggcca agaagcacc caagacctgg gtgcactaca ttgctgtga ggaggaggac	1800
tgggactatg ccccccgtgt gctggccct gatgacagga gctacaagag ccagtacctg	1860
aacaatggcc ccagaggat tggcaggaag tacaagaagg tcaggttcat ggcctacact	1920
gatgaaacct tcaagaccag ggaggccatc cagcatgagt ctggcatcct gggccccctg	1980
ctgtatgggg aggtggggga caccctgtg atcatcttca agaaccaggc cagcaggccc	2040
tacaacatct acccccatgg catcactgat gtgaggcccc tgtacagcag gaggctgccc	2100
aagggggtga agcacctgaa ggacttccc atcctgcctg gggagatctt caagtacaag	2160
tggactgtga ctgtggagga tggccccacc aagtctgacc ccaggtgcct gaccagatac	2220
tacagcagct ttgtgaacat ggagaggga ctggcctctg gcctgattgg cccctgtctg	2280
atctgtaca aggagtctgt ggaccagagg ggcaaccaga tcatgtctga caagaggaat	2340
gtgatcctgt tctctgtgtt tgatgagaac aggagctggt acctgactga gaacatccag	2400
aggttcctgc ccaacctgc tggggtgcag ctggaggacc ctgagttcca ggcagcaac	2460
atcatgcaca gcatcaatgg ctatgtgtt gacagcctgc agctgtctgt gtgcctgcat	2520
gaggtggcct aciggtacat cctgagcatt ggggccaga ctgacttct gtctgtgttc	2580
ttctctggct acaccttcaa gcacaagatg gtgtatgagg acacctgac cctgttcccc	2640
ttctctgggg agactgtgtt catgagcatg gagaacctg gcctgtggat tctgggctgc	2700

cacaactctg acttcaggaa caggggcatg actgccctgc tgaaagtctc cagctgtgac 2760

aagaacactg gggactacta tgaggacagc tatgaggaca tctctgccta cctgctgagc 2820

aagaacaatg ccattgagcc caggagcttc agccagaatc caccgctcct taagcgccat 2880

cagcgcgaga tcaccaggac caccctgcag tctgaccagg aggagattga ctatgatgac 2940

accatctctg tggagatgaa gaaggaggac ttgacatct acgacgagga cgagaaccag 3000

agccccagga gcttcagaa gaagaccagg cactacttca ttgctgctgt ggagaggctg 3060

tgggactatg gcatgagcag cagccccat gtgctgagga acagggccca gtctggctct 3120

gtgccccagt tcaagaaggt ggtgttccag gatttactg atggcagctt caccagccc 3180

ctgtacagag gggagctgaa tgagcaccig ggcctgctgg gccctacat cagggtgag 3240

gtggaggaca acatcatggt gaccttcagg aaccaggcca gcaggcccta cagcttctac 3300

agcagcctga tcagctatga ggaggaccag aggcaggggg ctgagcccag gaagaacttt 3360

gtgaagccca atgaaacaa gacctacttc tggaaggtgc agcaccacat ggccccacc 3420

aaggatgagt ttactgcaa ggcctgggcc tacttctctg atgtggacct ggagaaggat 3480

gtgactctg gctgattgg cccctgctg gtgtgccaca ccaacacct gaacctgcc 3540

catggcaggc aggtgactgt gcaggagttt gcctgttct tcaccatctt tgatgaaacc 3600

aagagctggt acttcactga gaacatggag aggaactgca gggccccctg caacatccag 3660

atggaggacc ccacctcaa ggagaactac aggttccatg ccatcaatgg ctacatcatg 3720

gacacctgc ctggcctggt gatggcccag gaccagagga tcaggtggtta cctgctgagc 3780

atgggcagca atgagaacat ccacagcatc cacttctctg gccatgtgtt cactgtgagg 3840

aagaaggagg agtacaagat ggccctgtac aacctgtacc ctggggtgtt tgagactgtg 3900

gagatgctgc ccagcaaggc tggcatctgg aggggtgagt gcctgattgg ggagcacctg 3960

catgctggca tgagcacctt gttcttggtg tacagcaaca agtgccagac cccctgggc 4020

atggcctctg gccacatcag ggacttccag atcactgcct ctggccagta tggccagtgg 4080

gccccaaagc tggccaggct gcaactactt ggcagcatca atgcctggag caccaaggag 4140

cccttcagct ggatcaaggt ggacctgctg gccccatga tcatccatgg catcaagacc 4200

cagggggcca ggcagaagtt cagcagcctg tacatcagcc agttcatcat catgtacagc 4260

ctggatggca agaagtggca gacctacagg ggcaacagca ctggcaccct gatgggtgtt 4320

tttggcaatg tggacagctc tggcatcaag cacaacatct tcaaccccc catcattgcc 4380

agatacatca ggcctgaccc caccactac agcatcagga gcacctgag gatggagctg 4440

atgggctgtg acctgaacag ctgcagcatg cccctgggca tggagagcaa ggccatctct	4500
gatgcccaga tcactgccag cagctacttc accaacaatgt ttgccacctg gagccccagc	4560
aaggccaggc tgcacttgca gggcaggagc aatgcctgga ggccccaggt caacaacccc	4620
aaggagtggc tgcaggtgga cttccagaag accatgaagg tgactggggt gaccacccag	4680
ggggtgaaga gcctgctgac cagcatgtat gtgaaggagt tcctgacag cagcagccag	4740
gatggccacc agtggaccct gttcttccag aatggcaagg tgaagggttt ccagggaac	4800
caggacagct tcaccctgt ggtgaacagc ctggaccccc cctgctgac cagatacctg	4860
aggattcacc ccagagctg ggtgcaccag attgccctga ggatggaggt gctgggctgt	4920
gaggcccagg acctgtactg aggatccaat aaaatatctt tattttcatt acatctgtgt	4980
gttggttttt tgtgtgtttt cctgtaacga tcgggctcga gcgcaggaac ccctagtgat	5040
ggagttggcc actccctctc tgcgcgctcg ctgcctcact gaggccgccc gggttttgcc	5100
cgggcggcct cagtgagcga gcgagcgcg ag	5132