



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110300591 A

(43)申请公布日 2019.10.01

(21)申请号 201780082175.3

D·米特格拉德尼格 T·塔布什

(22)申请日 2017.11.03

(74)专利代理机构 上海华诚知识产权代理有限公司 31300

(30)优先权数据

代理人 汤国华

62/417,750 2016.11.04 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

(51)Int.Cl.

2019.07.03

A61K 35/761(2015.01)

(86)PCT国际申请的申请数据

A61K 31/195(2006.01)

PCT/US2017/059971 2017.11.03

A61P 7/00(2006.01)

(87)PCT国际申请的公布数据

W02018/128689 EN 2018.07.12

(71)申请人 百深公司

地址 美国伊利诺伊州

申请人 百深有限责任公司

(72)发明人 C·菲德勒 E·弗里切尔

M·哈斯拉赫尔

权利要求书3页 说明书58页

(54)发明名称

腺相关病毒制剂

(57)摘要

本发明提供了腺相关的液体和冻干的药物组合物。在代表性的方面,药物组合物包含:约5mM至约25mM的L-组氨酸、约0mM至约150mM的氯化钠、约0.001%(w/v)至约0.01%(w/v)的聚山梨酯80(PS80)、约1%至约10%(w/v)的蔗糖、海藻糖或它们的组合,以及AAV。在代表性的方面,药物组合物进一步包括甘氨酸或甘露醇。本发明还提供了制备包含AAV的药物组合物的方法、治疗受试者的出血性病症的方法、以及储存AAV组合物的方法。

1. 一种药物组合物,其包含:腺相关病毒AAV和:
 - (i) 约5mM至约25mM的缓冲剂;
 - (ii) 约50mM至约150mM的药理学上可接受的盐;
 - (iii) 约0.001% (w/v) 至约0.01% (w/v) 的非离子表面活性剂;和
 - (iv) 约1%至约10% (w/v) 的糖、糖醇或它们的组合。
2. 一种药物组合物,其包含:腺相关病毒 (AAV) 和:
 - (i) 约5mM至约25mM的缓冲剂;
 - (ii) 小于约100mM的药理学上可接受的盐;
 - (iii) 约0.001% (w/v) 至约0.01% (w/v) 的非离子表面活性剂;和
 - (iv) 约1%至约10% (w/v) 的糖、糖醇或它们的组合。
3. 根据前述权利要求中任一项所述的药物组合物,其中,所述药物组合物的pH为约6.9至约7.7,任选地,为约7.0或约7.5。
4. 根据前述权利要求中任一项所述的药物组合物,其中,所述缓冲剂是L-组氨酸。
5. 根据权利要求4所述的药物组合物,其中,所述药物组合物包含约5mM至约25mM或约10mM至约20mM的L-组氨酸。
6. 根据前述权利要求中任一项所述的药物组合物,其中,所述药理学上可接受的盐是钠盐、铵盐或钾盐。
7. 根据权利要求6所述的药物组合物,其中,所述药物组合物包含约50mM至约120mM的氯化钠。
8. 根据权利要求6或7所述的药物组合物,其中,所述药物组合物包含约0mM至约100mM、约0mM至约60mM、30mM至约100mM、30mM至约80mM、或30mM至约60mM的氯化钠。
9. 根据权利要求6~8中任一项所述的药物组合物,其中,所述药物组合物包含约60mM至约100mM或约60mM至约80mM的氯化钠。
10. 根据前述权利要求中任一项所述的药物组合物,其中,所述非离子表面活性剂是PS80。
11. 根据权利要求10所述的药物组合物,其中,所述药物组合物包含约0.0025%至约0.0075% (w/v) 的PS80。
12. 根据前述权利要求中任一项所述的药物组合物,其中,所述糖是蔗糖、海藻糖或它们的组合。
13. 根据权利要求12所述的药物组合物,其中,所述药物组合物包含约1% (w/v) 至约5% (w/v) 的蔗糖、海藻糖或它们的组合。
14. 根据权利要求12或13所述的药物组合物,其中,所述海藻糖是海藻糖二水合物。
15. 根据前述权利要求中任一项所述的药物组合物,其中,所述药物组合物还包含甘氨酸。
16. 根据权利要求15所述的药物组合物,其中,所述药物组合物包含约35mM至约65mM的甘氨酸。
17. 根据前述权利要求中任一项所述的药物组合物,其中,所述药物组合物还包含甘露醇。
18. 根据权利要求17所述的药物组合物,其中,所述药物组合物包含约80mM至约120mM

的甘露醇。

19. 根据前述权利要求中任一项所述的药物组合物, 其中, 所述药物组合物不包含葡聚糖。

20. 根据前述权利要求中任一项所述的药物组合物, 其中, 所述药物组合物包含甘氨酸或甘露醇。

21. 根据权利要求10-20中任一项所述的药物组合物, 其中, PS80是Super Refined™PS80。

22. 一种药物组合物, 其包含: 腺相关病毒AAV和:

- (i) 约20mM的L-组氨酸,
- (ii) 约70mM的氯化钠,
- (iii) 约0.005% (w/v) 的聚山梨酯80 (PS80), 和
- (iv) 约5% (w/v) 的蔗糖。

23. 一种药物组合物, 其包含: 腺相关病毒AAV和:

- (i) 约10mM的L-组氨酸,
- (ii) 约100mM的氯化钠,
- (iii) 约0.005% (w/v) 的聚山梨酯80 (PS80),
- (iv) 约5% (w/v) 海藻糖, 和
- (v) 约50mM的甘氨酸。

24. 一种药物组合物, 其包含: 腺相关病毒 (AAV) 和:

- (i) 约10mM的L-组氨酸,
- (ii) 小于约100mM的氯化钠,
- (iii) 约0.005% (w/v) 的聚山梨酯80 (PS80),
- (iv) 约5% (w/v) 的海藻糖, 和
- (v) 约50mM的甘氨酸。

25. 根据权利要求1~21或24中任一项所述的药物组合物, 其中, 所述药物组合物包含约80mM的氯化钠。

26. 根据权利要求1~21或24中任一项所述的药物组合物, 其中, 所述药物组合物包含约70mM的氯化钠。

27. 根据权利要求1~21或24中任一项所述的药物组合物, 其中, 所述药物组合物包含约60mM的氯化钠。

28. 根据权利要求1~21或24中任一项所述的药物组合物, 其中, 所述药物组合物包含约50mM的氯化钠。

29. 根据权利要求1~21或24中任一项所述的药物组合物, 其中, 所述药物组合物包含约40mM的氯化钠。

30. 根据权利要求1~21或24中任一项所述的药物组合物, 其中, 所述药物组合物包含约30mM的氯化钠。

31. 根据权利要求2~21或24中任一项所述的药物组合物, 其中, 所述药物组合物包含约0mM的氯化钠。

32. 一种药物组合物, 其包含: 腺相关病毒AAV和:

- (i) 约20mM的L-组氨酸,
 - (ii) 约60mM的氯化钠,
 - (iii) 约0.005% (w/v) 的聚山梨酯80 (PS80),
 - (iv) 约35mM的海藻糖, 和
 - (v) 约110mM的甘露醇。
33. 根据前述权利要求中任一项所述的药物组合物, 其中, 所述药物组合物包含AAV。
34. 根据前述权利要求中任一项所述的药物组合物, 其中, 所述药物组合物包含AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9或AAV10。
35. 根据前述权利要求中任一项所述的药物组合物, 其中, 所述药物组合物包含AAV8。
36. 根据前述权利要求中任一项所述的药物组合物, 其中, 组合物是液体。
37. 根据前述权利要求中任一项所述的药物组合物, 其中, 组合物是冻干的。
38. 根据前述权利要求中任一项所述的药物组合物, 其中, 组合物存在于单位剂量容器中。
39. 根据权利要求38所述的药物组合物, 其中, 所述单位剂量容器是小瓶。
40. 根据权利要求39所述的药物组合物, 其中, 所述小瓶是密封的玻璃小瓶。
41. 一种制备含有腺相关病毒AAV的药物组合物的方法, 其中, 所述方法包括: 将权利要求1~40所述的药物组合物中的缓冲剂、药学上可接受的盐、非离子表面活性剂, 以及糖、糖醇或它们的组合进行混合, 获得含有AAV的药物组合物。
42. 一种制备含有腺相关病毒AAV的药物组合物的方法, 其中, 所述方法包括: 将约5mM至约25mM的L-组氨酸、约0mM至约150mM的氯化钠、约0.001% (w/v) 至约0.01% (w/v) 的聚山梨酯80 (PS80)、约1% (w/v) 至约10% (w/v) 的蔗糖、海藻糖或它们的组合与AAV进行混合, 获得含有AAV的药物组合物。
43. 一种治疗受试者的出血性病症的方法, 其中, 所述方法包括以有效治疗病症或疾病的剂量向受试者施用权利要求1~40中任一项所述的药物组合物。
44. 根据权利要求43所述的方法, 其中, 所述病症或疾病是出血性病症。
45. 一种储存含有AAV的组合物的方法, 其中, 所述方法包括: 将权利要求1~40所述的药物组合物中的缓冲剂、药学上可接受的盐、非离子表面活性剂, 以及糖、糖醇或它们的组合进行混合。
46. 一种储存含有AAV的组合物的方法, 其中, 所述方法包括: 将约5mM至约25mM的L-组氨酸、约0mM至约150mM的氯化钠、约0.001% (w/v) 至约0.01% (w/v) 的聚山梨酯80 (PS80)、约1%至约10% (w/v) 的蔗糖、海藻糖或它们的组合与AAV进行混合。
47. 根据权利要求42或46所述的方法, 其中, 包括约50mM至约150mM的氯化钠。
48. 根据权利要求42或46所述的方法, 其中, 包括约30mM至小于约100mM的氯化钠。
49. 根据权利要求42或46~48中任一项所述的方法, 其中, 包括约0mM至小于约100mM的氯化钠。
50. 根据权利要求42或46~49中任一项所述的方法, 其中, 包括约30mM的氯化钠。
51. 根据权利要求42或46~49中任一项所述的方法, 其中, 包括约60mM的氯化钠。
52. 根据权利要求42或46~49中任一项所述的方法, 其中, 包括约0mM的氯化钠。

腺相关病毒制剂

相关申请

[0001] 本专利申请要求2016年11月4日提交的美国临时专利申请62/417,750的优先权,该临时专利申请通过引用整体并入本文。

背景技术

[0002] 腺相关病毒 (Adeno-associated virus, AAV) 是一种小型无包膜病毒,病毒内包装有线性单链DNA基因组。AAV属于Parvoviridae科和Dependovirus属,因为AAV的增殖性感染 (productive infection) 仅在辅助病毒,例如腺病毒或疱疹病毒的存在下发生。即使在没有辅助病毒的情况下,AAV (血清2型) 也可以通过整合到宿主人类基因组的染色体19q13.4中来实现潜伏。AAV是已知能够位点特异性整合的唯一哺乳动物DNA病毒 (Daya和Berns, Clinical Microbiology Reviews, 583-593页 (2008))。

[0003] 为了在临床中安全使用AAV,已在AAV基因组内的若干位置进行遗传修饰。例如,已在许多病毒载体的AAV基因组中去除病毒复制所需的Rep基因和位点特异性整合所需的元件。该重组AAV (rAAV) 以染色体外状态存在,并且整合到基因组DNA的效率非常低。因此,即使未完全去除,rAAV在宿主细胞中诱导随机诱变的可能性也降低了。由于rAAV的这些特性和缺乏致病性,其作为基因治疗载体在临床前和临床应用的诸多方面显示出巨大的前景。临床上正在测试新的血清型和自身互补型载体。除了这些正在进行的载体开发之外,持续的努力还集中在能够有效地产生具有高纯度和高效价强度的高滴度量rAAV载体的可扩展制造工艺上。

[0004] AAV的研究还聚焦于旨在施用于人的AAV制剂。应理解,这种AAV制剂不仅应该安全、无菌且为良好生产规范 (GMP) 等级的,这些制剂还应表现出和促进AAV的长期稳定性,最大限度地减少制造、包装和储存过程中AAV效价的损失。该制剂还应进一步防止AAV吸附至包装和储存AAV的容器表面以及制造过程中使用的机械表面。虽然在该AAV制剂的设计上已投入了大量的研究,但仍然对改进的AAV制剂有需求。

发明内容

[0005] 本发明公开了一种适合施用于人的制剂,该制剂解决了上述未满足的需求。有利地,在一些实施方式中,制剂适于AAV的长期储存,最大限度地减少AAV效价的损失,并且有利地防止可见颗粒的形成,并且防止AAV吸附至包装和储存AAV的容器表面以及制造过程中使用的机械表面。在代表性的方面,本发明的药物组合物包含:腺相关病毒 (AAV) 和约5mM至约25mM的缓冲剂、约0mM至约150mM的药学上可接受的盐、约0.001% (w/v) 至约0.01% (w/v) 的非离子表面活性剂和约1% (w/v) 至约10% (w/v) 的糖或糖醇。在某些实施方式中,制剂包含约50mM至约150mM的药学上可接受的盐。在某些实施方式中,制剂包含约0mM至小于约100mM的药学上可接受的盐。在某些实施方式中,制剂包含约30mM至小于约100mM的生理上可接受的盐。在某些实施方式中,制剂包含约20mM至约40mM的药学上可接受的盐。

[0006] 在代表性的方面,本发明的药物组合物包含:AAV (例如AAV8)、约5mM至约25mM的L-

组氨酸、约0mM至约150mM的氯化钠、约0.001% (w/v) 至约0.01% (w/v) 的聚山梨酯80 (PS80)、约1%至约10% (w/v) 的蔗糖、海藻糖、甘露醇或它们的组合。在某些实施方式中,该制剂包含约50mM至约150mM的氯化钠。在某些实施方式中,该制剂包含约0mM至小于约100mM的氯化钠。在某些实施方式中,该制剂包含约30mM至小于约100mM的氯化钠。在某些实施方式中,该制剂包含约20mM至约40mM的氯化钠。

[0007] 在一些实施方式中,本发明提供的是液体制剂。在某些实施方式中,制剂是从液体制剂冻干的制剂。

[0008] 在某些方面,本发明的冻干的药物组合物是从液体制剂冻干得到,该液体制剂包含:AAV (例如AAV8)、约5mM至约25mM的L-组氨酸、约0mM至约150mM的氯化钠、约0.001% (w/v) 至约0.01% (w/v) 的聚山梨酯80 (PS80)、约30mM至约70mM的甘氨酸,以及约1%至约10% (w/v) 的蔗糖、海藻糖、甘露醇或它们的组合。在某些实施例方案中,该制剂包含约50mM至约150mM的氯化钠。在某些实施方式中,该制剂包含约0mM至小于约100mM的氯化钠。在某些实施方式中,该制剂包含约30mM至小于约100mM的氯化钠。在某些实施方式中,该制剂包含约20mM至约40mM的氯化钠。

[0009] 本发明进一步提供了制备含有AAV的药物组合物的方法。在代表性的方面,该方法包括:将约5mM至约25mM的L-组氨酸、约0mM至约150mM的氯化钠、约0.001% (w/v) 至约0.01% (w/v) 的聚山梨酯80 (PS80)、约1% (w/v) 至约10% (w/v) 的蔗糖、海藻糖、甘露醇或它们的组合与AAV进行混合,从而获得含有AAV的药物组合物。在某些实施方式中,该制剂包含约50mM至约150mM的氯化钠。在某些实施方式中,该制剂包含约0mM至小于约100mM的氯化钠。在某些实施方式中,该制剂包含约30mM至小于约100mM的氯化钠。在某些实施方式中,该制剂包含约20mM至约40mM的氯化钠。

[0010] 本公开提供了一种治疗受试者病症的方法,所述病症通过基因治疗可治疗。在代表性的方面,该方法包括以有效治疗病症的量向受试者施用如本文所述的药物组合物。

[0011] 本发明还提供了一种储存含有AAV的组合物的方法。在代表性的方面,该方法包括:将约5mM至约25mM的L-组氨酸、约0mM至约150mM的氯化钠、约0.001% (w/v) 至约0.01% (w/v) 的聚山梨酯80 (PS80)、约1% (w/v) 至约10% (w/v) 的蔗糖、海藻糖、甘露醇或它们的组合与AAV进行混合。在某些实施方式中,制剂包含约50mM至约150mM的氯化钠。在某些实施方式中,所述制剂包含约0mM至小于约100mM的氯化钠。在某些实施方式中,所述制剂包含约30mM至小于约100mM的氯化钠。在某些实施方式中,所述制剂包含约20mM至约40mM的氯化钠。

[0012] 在某些实施方式中,本发明的药物组合物包括:AAV和约20mM的L-组氨酸、约70mM的氯化钠、约0.005% (w/v) 的聚山梨酯80 (PS80) 和约5% (w/v) 的蔗糖。在一些实施方式中,本发明提供一种液体制剂。在某些实施方式中,制剂是从液体制剂冻干的制剂。

[0013] 在某些实施方式中,本发明的药物组合物包括:AAV和约20mM的L-组氨酸、约60mM的氯化钠、约0.005% (w/v) 的聚山梨酯80 (PS80)、约35mM的海藻糖和约110mM的甘露醇。在一些实施方式中,本发明提供一种液体制剂。在某些实施方式中,制剂是从液体制剂冻干的制剂。

[0014] 在某些实施方式中,本发明的药物组合物包括:AAV和约10mM的L-组氨酸、约100mM的氯化钠、约0.005% (w/v) 的聚山梨酯80 (PS80)、约5% (w/v) 的海藻糖和约50mM的甘氨酸。

在一些实施方式中,本发明提供一种液体制剂。在某些实施方式中,制剂是从液体制剂冻干的制剂。

[0015] 在某些实施方式中,本发明的药物组合物包括:AAV和约10mM的L-组氨酸、约80mM的氯化钠、约0.005% (w/v) 的聚山梨酯80 (PS80)、约5% (w/v) 的海藻糖和约50mM的甘氨酸。在一些实施方式中,本发明提供一种液体制剂。在某些实施方式中,制剂是从液体制剂冻干的制剂。

[0016] 在某些实施方式中,本发明的药物组合物包括:AAV和约10mM的L-组氨酸、约70mM的氯化钠、约0.005% (w/v) 的聚山梨酯80 (PS80)、约5% (w/v) 的海藻糖和约50mM的甘氨酸。在一些实施方式中,本发明提供一种液体制剂。在某些实施方式中,制剂是从液体制剂冻干的制剂。

[0017] 在某些实施方式中,本发明的药物组合物包括:AAV和约10mM的L-组氨酸、约60mM的氯化钠、约0.005% (w/v) 的聚山梨酯80 (PS80)、约5% (w/v) 的海藻糖和约50mM的甘氨酸。在一些实施方式中,本发明提供一种液体制剂。在某些实施方式中,制剂是从液体制剂冻干的制剂。

[0018] 在某些实施方式中,本发明的药物组合物包括:AAV和约10mM的L-组氨酸、约50mM的氯化钠、约0.005% (w/v) 的聚山梨酯80 (PS80)、约5% (w/v) 的海藻糖和约50mM的甘氨酸。在一些实施方式中,本发明提供一种液体制剂。在某些实施方式中,制剂是从液体制剂冻干的制剂。

[0019] 在某些实施方式中,本发明的药物组合物包括:AAV和约10mM的L-组氨酸、约40mM的氯化钠、约0.005% (w/v) 的聚山梨酯80 (PS80)、约5% (w/v) 的海藻糖和约50mM的甘氨酸。在一些实施方式中,本发明提供一种液体制剂。在某些实施方式中,制剂是从液体制剂冻干的制剂。

[0020] 在某些实施方式中,本发明的药物组合物包括:AAV和约10mM的L-组氨酸、约30mM的氯化钠、约0.005% (w/v) 的聚山梨酯80 (PS80)、约5% (w/v) 的海藻糖和约50mM的甘氨酸。在一些实施方式中,本发明提供一种液体制剂。在某些实施方式中,制剂是从液体制剂冻干的制剂。

[0021] 在某些实施方式中,本发明的药物组合物包括:AAV和约10mM的L-组氨酸、约20mM的氯化钠、约0.005% (w/v) 的聚山梨酯80 (PS80)、约5% (w/v) 的海藻糖和约50mM的甘氨酸。在一些实施方式中,本发明提供一种液体制剂。在某些实施方式中,制剂是从液体制剂冻干的制剂。

[0022] 在某些实施方式中,本发明的药物组合物包括:AAV和约10mM的L-组氨酸、约10mM的氯化钠、约0.005% (w/v) 的聚山梨酯80 (PS80)、约5% (w/v) 的海藻糖和约50mM的甘氨酸。在一些实施方式中,本发明提供一种液体制剂。在某些实施方式中,制剂是从液体制剂冻干的制剂。

[0023] 在某些实施方式中,本发明的药物组合物包括:AAV和约10mM的L-组氨酸、约0mM的氯化钠、约0.005% (w/v) 的聚山梨酯80 (PS80)、约5% (w/v) 的海藻糖和约50mM的甘氨酸。在一些实施方式中,本发明提供一种液体制剂。在某些实施方式中,制剂是从液体制剂冻干的制剂。

[0024] 一般而言,本发明提供的AAV制剂适于药物给药。在某些实施方式中,AAV是AAV1、

AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9或AAV10。在某些实施方式中，AAV是AAV2、AAV5、AAV8或AAV9。在某些实施方式中，AAV是AAV8。

具体实施方式

[0025] 本发明提供了制剂，例如药物组合物，其适用于人或兽医给药，也适用于AAV的长期储存和最大限度地降低AAV效价强度的损失。本文所提供的制剂是有益的，因为所述制剂防止了可见颗粒的形成并且也防止了AAV吸附到包装和储存AAV的容器表面，并且防止了AAV吸附到制造过程中使用的机械上。在某些实施方式中，本文提供的药物组合物在长时间储存时保持显著的AAV活性。在某些实施方式中，本文提供的药物组合物减少或延缓降解和/或凝集。

[0026] 在某些实施方式中，本发明提供了AAV的制剂，其包含：治疗有效量或剂量的AAV、亚生理学至生理学浓度的药学上可接受的盐、具有稳定浓度的一种以上糖和/或糖醇、非离子表面活性剂、为制剂提供中性pH的一种以上缓冲剂、以及可任选地有助于在纯化和/或加工过程中稳定和回收AAV的氨基酸。通常，本文提供的AAV制剂适用于药物给药。在某些实施方式中，AAV是AAV8。

[0027] 在某些实施方式中，含有AAV的组合物是脱水组合物。如本文所用，脱水组合物是含少量水的组合物，例如通过Karl Fischer (KF) 滴定法测得的含25%以下、或20%以下、或15%以下、或10%以下、或9%以下、或8%以下、或7%以下、或6%以下、或5%以下、或4%以下、或3%以下、或2%以下、或1%以下的水。在某些实施方式中，通过Karl Fischer滴定法测定脱水组合物含3%以下的水。在某些实施方式中，通过Karl Fischer滴定法测定，脱水组合物含2%以下的水。在某些实施方式中，通过Karl Fischer滴定法测定，脱水组合物含1%以下的水。在某些实施方式中，通过Karl Fischer滴定法测定，脱水组合物含0.9%以下的水。在某些实施方式中，通过Karl Fischer滴定法测定，脱水组合物含0.8%以下的水。在某些实施方式中，通过Karl Fischer滴定法测定，脱水组合物含0.7%以下的水。在某些实施方式中，通过Karl Fischer滴定法测定，脱水组合物含0.6%以下的水。在某些实施方式中，通过Karl Fischer滴定法测定，脱水组合物含0.5%以下的水。在某些实施方式中，通过Karl Fischer滴定法测定，脱水组合物含0.4%以下的水。在某些实施方式中，通过Karl Fischer滴定法测定，脱水组合物含0.3%以下的水。在某些实施方式中，通过Karl Fischer滴定法测定，脱水组合物含0.2%以下的水。可以使用任何方便的操作规程来生产脱水组合物，例如升高组合物的温度（例如加热）、降低压力、冻干（又称为冷冻干燥）等，以及它们的组合。其它测定组合物中水分含量的方法包括但不限于：干燥失重 (LOD)（当样品在特定条件干燥时，测量样品中水和挥发性物质的量），电解传感器（例如使用P205传感器）、压电吸附、氧化物传感器、氧化铝传感器、吸收光谱和近红外 (NIR)。

[0028] 进一步，发现减少冻干制剂中的盐浓度降低了冻干饼 (lyocake) 中的残留水分并且有助于形成改进的冻干饼。

[0029] 由于上述的冻干组合物的低含水量，冻干组合物可以是固体形式。在某些情况下，固体冻干组合物是粉末。在一些情况下，冻干组合物可以促进组合物的长时间储存（例如与相同组合物的液体制剂相比）。例如，冻干组合物可以是储存稳定的组合物（例如冻干的储存稳定的组合物），其中组合物在较长的时间段内是基本上稳定的。“稳定的”或“储存稳定

的”或“基本上稳定的”是指组合物在较长的时间段内不显著降解和/或丧失活性。例如储存稳定的组合物在较长的时间段内不会因组合物的降解而具有明显的杂质,例如,在较长的时间段内具有10%以下的杂质、或9%以下、或8%以下、或7%以下、或6%以下、或5%以下、或4%以下、或3%以下、或2%以下、或1%以下的降解产物。在某些情况下,储存稳定的组合物在较长的时间段内具有5%以下的杂质。在一些情况下,储存稳定的组合物在较长的时间段内基本上保持其活性,例如组合物在较长的时间内保持活性的100%、或99%以上、或98%以上、或97%以上、或96%以上、或95%以上、或94%以上、或93%以上、或92%以上、或91%以上、或90%以上、或85%以上、或80%以上、或75%以上。例如,储存稳定的组合物可以在较长的时间段内保持90%以上的活性。在一些情况下,储存稳定的组合物在较长的时间段内保持95%以上的活性。较长的时间段是一段时间,例如1周以上、或2周以上、或3周以上、或1个月以上、或2个月以上、或3个月以上、或4个月以上、或6个月以上、或9个月以上、或1年以上、或1.5年(例如18个月)以上、或2年以上、或2.5年(例如30个月)以上、或3年或3年以上、或3.5年(例如42个月)以上、4年以上、或4.5年(例如54个月)以上、或5年以上。例如,较长的时间段可以是6个月以上。在某些情况下,较长的时间段是9个月以上时间。在某些情况下,较长的时间段是1年(例如12个月)以上。在某些情况下,较长的时间段是1.5年(例如18个月)以上。在某些情况下,较长的时间段是2年(例如,24个月)以上。在一些实施方式中,储存稳定的组合物在环境温度下在较长的时间段内基本稳定,环境温度为例如20~40℃、或25~35℃、或25~30℃的温度。在一些情况下,储存稳定的组合物在低于环境温度的温度下在较长的时间段内基本稳定,低于环境温度的温度为例如0~20℃、或0~15℃、或0~10℃、或2至8℃的温度。

[0030] 定义

[0031] 如本文所用,术语“AAV”是指天然存在的腺相关病毒和重组形式的腺相关病毒(rAAV),并且包括AAV的突变形式。术语AAV进一步包括但不限于AAV 1型、AAV 2型、AAV 3型、AAV 4型、AAV 5型、AAV 6型、AAV 7型、AAV 8型、AAV 9型、AAV 10型、禽AAV、牛AAV、犬AAV、马AAV、绵羊AAV、灵长类动物AAV和非灵长类动物AAV。在某些实施方式中,AAV是AAV8。

[0032] 与本文描述的组合物关联使用的短语“药学上可接受的”是指组合物的分子实体和其他成分在施用于受试者时是生理上耐受的并且通常不产生不良反应。优选地,术语“药学上可接受的”是指由联邦或州政府的管理机构批准的或在美国药典或其他公认的药典中列出的用于哺乳动物,特别是人类。“药学上可接受的盐”是指可以配制成用于药学用途的化合物或缀合物的盐,,包括例如:以药物制剂施用于受试者(例如人)时安全的金属盐(钠、钾、镁、钙等)和铵盐或有机胺的盐。(参考例如Berge等,“Pharmaceutical Salts,” J.Pharm.Sci.1977;66:1,其通过引用整体并入本文并用于所有用途)。合适的“药学上可接受的盐”包括但不限于:金属盐,如钠盐、钾盐和铯盐;碱土金属盐,如钙盐和镁盐;有机胺盐如三乙胺盐、胍盐和N-取代的胍盐、乙脒和N-取代的乙脒、吡啶、甲基吡啶、乙醇胺、三乙醇胺、二环己胺和N,N'-二苄基乙二胺盐。(碱性氮中心)的“药学上可接受的盐”包括但不限于:无机酸盐,如盐酸盐、氢溴酸盐、硫酸盐、磷酸盐;有机酸盐,如三氟乙酸盐和马来酸盐;磺酸盐,如甲磺酸盐、乙磺酸盐、苯磺酸盐、对甲苯磺酸盐、樟脑磺酸盐和萘磺酸盐;氨基酸盐,如精氨酸盐、丙氨酸盐、天冬氨酸盐和谷氨酸盐;以及碳水化合物盐,如葡萄糖酸盐和半乳糖醛酸盐。药学上可接受的盐的选择和使用是本领域熟知的,参考例如,Stahl和

Wermuth, Pharmaceutical Salts: Properties, Selection, and Use, 第二版修订版, Wiley, Hoboken, NJ, 其通过引用整体并入本文并用于所有用途。药学上可接受的盐的非限制性实例包括但不限于: 钠盐、铵盐、钾盐 (例如氯化钠、氯化铵和氯化钾; 乙酸钠、乙酸铵和乙酸钾; 柠檬酸钠、柠檬酸铵和柠檬酸钾; 磷酸钠、磷酸铵和磷酸钾; 氟化钠、氟化铵和氟化钾; 溴化钠、溴化铵和溴化钾; 以及碘化钠、碘化铵和碘化钾)。

[0033] 如本文所用, 盐的“生理浓度”是指药学上可接受的盐的盐浓度为约100mM至约200mM。

[0034] 如本文所用, 盐的“亚生理浓度”是指药学上可接受的盐的盐浓度小于约100mM。在某些实施方式中, 盐的亚生理浓度是药学上可接受的盐小于约80mM。在另一个实施方式中, 盐的亚生理浓度是药学上可接受的盐小于约70mM、小于约60mM、小于约50mM、小于约40mM、小于约30mM、小于约20mM、小于约10mM。

[0035] 如本文所用, 术语“治疗(treat)”或“治疗(treatment)”状态、病症或病况包括: (1) 预防、延迟或减少受试者中发展的状态、病症或病况的至少一种临床或亚临床症状的发生率和/或发生可能性, 所述受试者可能患有或易患该状态、病症或病况但尚未经历或显示该状态、病症或病况的临床或亚临床症状; 或 (2) 抑制状态、病症或病况, 即阻止、减少或减缓疾病的发展/加重或复发或至少一种其临床或亚临床症状; 或 (3) 缓解疾病, 即导致状态、病症或病况或至少一种其临床或亚临床症状消退。使用这些术语, 不一定意味着100%治疗或完全治疗。而是, 存在不同程度的治疗, 本领域普通技术人员认为其具有潜在的益处或治疗效果。受试者治疗的益处是统计学上显著的或至少患者或医生可察觉的。在这方面, 本发明的治疗病症 (例如出血性病症) 的方法可以提供任何量或任何水平的治疗。此外, 本发明的方法提供的治疗可以包括治疗被治疗者的一种以上病况或症状或体征。

[0036] 如本文所用, “治疗有效量或剂量”或“足够量或剂量”是指对受治者给药后产生效果的剂量。确切的剂量取决于治疗的目的, 并且是本领域技术人员使用已知技术可以确定的 (参考例如, Lieberman, Pharmaceutical Dosage Forms (卷1-3, 1992); Lloyd, The Art, Pharmaceutical and Pharmaceutical of Pharmaceutical Compounding (1999); Pickar, Dosage Calculations (1999); 和 Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 第20版, 2003, Gennaro, Ed., Lippincott, Williams & Wilkins)。

[0037] 术语“患者”和“受试者”可互换使用, 并且按照它们常规意义使用, 是指患有或易患病况的生物体, 包括人类和非人类动物, 所述病况可通过施用本发明的组合物进行预防或治疗。受试者的例子包括但不限于: 人、黑猩猩、其他猿以及猴类物种; 农场动物, 如牛、羊、猪、山羊和马; 家养哺乳动物, 如狗和猫; 实验动物, 包括啮齿类动物如小鼠、大鼠和豚鼠; 鸟类, 包括家禽、野禽和猎禽, 如鸡、火鸡和其他鹌鹑、鸭、鹅等。该术语不表示特定年龄。因此, 成人、青少年和新生个体都是对象。

[0038] 如本文所用, “储存”是指制剂制备后不立即施用于受试者, 而是使用前在特定条件 (例如特定温度等) 下放置一段时间。例如, 液体制剂或冻干制剂向受试者施用前可以在不同温度如冷藏 (0℃至10℃) 或室温 (例如温度高达32℃) 放置数天、数周、数月或数年。

[0039] 如本文所用, 术语“约”表示距离指定数值正或负10%的近似范围。例如, 表述“约20%”包括18-22%的范围。如本文所用, “约”也包括该准确量。因此, “约20%”表示“约20%”和“20%”。

[0040] 如本文所用,术语“和/或”涉及并涵盖一个或多个相关所列项目的任何和所有可能组合,以及当在替代方案(“或”)中解释时没有组合的情况。

[0041] 如本文所用,术语“或”是指具体举例中的任何一个成员,并且还包括该举例中成员的任何组合。

[0042] 在描述本公开的上下文中(特别是在以下权利要求的上下文中),除非本文另有说明或与上下文明显矛盾,否则使用的术语“一”、“一个”和“该”以及类似的指示词应被解释为涵盖单数和复数形式。除非另有说明,否则术语“包含”,“具有”,“包括”和“含有”应被解释为开放式术语(即,表示“包括但不限于”)。

[0043] 除非本文另有说明,否则本文中对数值范围的描述仅旨在用作单独提及落入该范围的每个单个值和每个端点的简写方法,并且每个单个值和端点被纳入说明书中,如同其在本文中被单独记载一样。

[0044] AAV组合物和制剂

[0045] 在代表性的方面,本发明的药物组合物包含:腺相关病毒(AAV)和约5mM至约25mM的缓冲剂、约0mM至约150mM的药学上可接受的盐、约0.001% (w/v) 至约0.01% (w/v) 的非离子表面活性剂,以及约1% (w/v) 至约10% (w/v) 的糖或糖醇。

[0046] 在代表性的方面,本发明的药物组合物包含:腺相关病毒(AAV)和约5mM至约25mM的缓冲剂、约50mM至约150mM的药学上可接受的盐、约0.001% (w/v) 至约0.01% (w/v) 的非离子表面活性剂,以及约1% (w/v) 至约10% (w/v) 的糖或糖醇。

[0047] 在代表性的方面,本发明的药物组合物包含:腺相关病毒(AAV)和约5mM至约25mM的缓冲剂、约0mM至小于100mM的药学上可接受的盐、约0.001% (w/v) 至约0.01% (w/v) 的非离子表面活性剂,以及约1% (w/v) 至约10% (w/v) 的糖或糖醇。

[0048] 在代表性的方面,本发明的药物组合物包含:腺相关病毒(AAV)和约5mM至约25mM的缓冲剂、约30mM至小于100mM的药学上可接受的盐、约0.001% (w/v) 至约0.01% (w/v) 的非离子表面活性剂,以及约1% (w/v) 至约10% (w/v) 的糖或糖醇。

[0049] 在某些情况下,组合物是无菌组合物。“无菌”是指组合物中基本上没有免疫原性成分,例如基本上没有微生物(例如真菌、细菌、病毒、孢子形式等)。

[0050] 在一些实施方式中,本发明提供了一种液体制剂。在某些实施方式中,制剂是从液体制剂冻干的。

[0051] 在代表性的方面,本发明的药物组合物包含约5mM至约25mM、约5mM至约15mM、约10mM至约20mM或约15mM至约25mM的缓冲剂。在代表性的方面,药物组合物包含约5mM、约6mM、约7mM、约8mM、约9mM、约10mM、约11mM、约12mM、约13mM、约14mM、约15mM、约16mM、约17mM、约18mM、约19mM、约20mM、约21mM、约22mM、约23mM、约24mM或约25mM的缓冲剂。

[0052] 药学上可接受的缓冲剂是本领域熟知的,包括但不限于:磷酸盐缓冲液、组氨酸、柠檬酸钠、HEPES、Tris、N-二(羟乙基)甘氨酸、甘氨酸、N-甘氨酸甘氨酸、乙酸钠、碳酸钠、甘氨酸甘氨酸、赖氨酸、精氨酸、磷酸钠及它们的混合物。在某些实施方式中,缓冲剂是组氨酸(例如L-组氨酸)。

[0053] 在代表性的方面,本发明的药物组合物包含约5mM至约25mM、约5mM至约15mM、约10mM至约20mM、或约15mM至约25mM的L-组氨酸。在代表性的方面,药物组合物包含约5mM、约6mM、约7mM、约8mM、约9mM、约10mM、约11mM、约12mM、约13mM、约14mM、约15mM、约16mM、约

17mM、约18mM、约19mM、约20mM、约21mM、约22mM、约23mM、约24mM或约25mM的L-组氨酸。在某些实施方式中,药物组合物包含约10mM的L-组氨酸。在某些实施方式中,药物组合物包含约20mM的L-组氨酸。

[0054] 在代表性的方面,本发明的药物组合物包含约0mM至约150mM、约5mM至约150mM、约5mM至约100mM、约5mM至约90mM、约5mM至约80mM、约5mM至约70mM、约5mM至约60mM、约5mM至约50mM、约5mM至约40mM、5mM至约30mM、约30mM至约100mM、约30mM至约90mM、约30mM至约80mM、约30mM至约70mM、约30mM至约60mM、约30mM至约50mM、约30mM至约40mM、约50mM至约150mM、50mM至约120mM、约55mM至约100mM、约60mM至约100mM、约60mM至约80mM、约70mM至约100mM、或约70mM至约80mM的药学上可接受的盐(如上文定义)。在某些实施方式中,本发明的药物组合物包含约80mM至约120mM、约70mM至约90mM、约50mM至约70mM、或约20mM至约40mM的药学上可接受的盐。在代表性的方面,本发明的药物组合物包含约0mM至约100mM、约0mM至约80mM、约0mM至约70mM、约0mM至约60mM、约0mM至约50mM、约0mM至约40mM、约0mM至约30mM、约0mM至约20mM、约0mM至约10mM、约0mM至约5mM的药学上可接受的盐。在代表性的方面,药物组合物包含约0mM、约5mM、约10mM、约15mM、约20mM、约25mM、约30mM、约35mM、约40mM、约45mM、约50mM、约55mM、约60mM、约65mM、约70mM、约75mM、约80mM、约85mM、约90mM、约95mM、约100mM、约105mM、约110mM、约115mM、约120mM、约125mM、约130mM、约135mM、约140mM、约145mM或约150mM的药学上可接受的盐。在其他实施方式中,药物组合物包含约0mM至小于约100mM、约5mM至小于约100mM、约10mM至小于约100mM、约20mM至小于约100mM、约30mM至小于约100mM、约40mM至小于约100mM、约50mM至小于约100mM、约60mM至小于约100mM、或约70mM至小于约100mM的药学上可接受的盐。在某些实施方式中,本发明的药物组合物包含约0mM的药学上可接受的盐。在某些实施方式中,本发明的药物组合物包含约30mM的药学上可接受的盐。在某些实施方式中,本发明的药物组合物包含约40mM的药学上可接受的盐。在某些实施例方案中,本发明的药物组合物包含约50mM的药学上可接受的盐。在某些实施方式中,本发明的药物组合物包含约60mM的药学上可接受的盐。在某些实施方式中,本发明的药物组合物包含约70mM的药学上可接受的盐。在某些实施方式中,本发明的药物组合物包含约80mM的药学上可接受的盐。在某些实施方式中,本发明的药物组合物包含约100mM的药学上可接受的盐。在某些实施方式中,药学上可接受的盐是钠盐(例如氯化钠)。

[0055] 有利地,发现含有亚生理浓度的药学上可接受的盐的药物组合物形成具有较低含水量的致密的冻干饼,并协助形成改进的冻干饼。在某些实施方式中,亚生理浓度的药学上可接受的盐得到白色、致密且均质的冻干饼。因此,在某些实施方式中,本发明提供了一种含有亚生理浓度的药学上可接受的盐的低盐药物组合物,如小于约100mM的药学上可接受的盐。在一个实施方式中,本文提供的低盐制剂含有小于约100mM的药用盐。在某些实施方式中,本文提供的低盐药物组合物含有少于约80mM的药用盐。在某些实施方式中,本发明提供的低盐药物组合物含有小于约70mM的药用盐。在另一个实施方式中,本发明提供的低盐药物组合物含有小于约60mM的药用盐。在另一个实施方式中,本发明提供的低盐药物组合物含有小于约50mM的药用盐。在另一个实施方式中,本发明提供的低盐药物组合物含有小于约40mM的药用盐。在另一个实施方式中,本发明提供的低盐药物组合物含有小于约30mM的药用盐。在另一个实施方式中,本发明提供的低盐药物组合物含有小于约20mM的药用盐。在另一个实施方式中,本发明提供的低盐药物组合物含有小于约10mM的药用盐。在另一个

实施方式中,低盐药物组合物含有约30mM至约60mM的药理学上可接受的盐。在其他实施方式中,低盐药物组合物含有约0mM、约5mM、约10mM、约15mM、约20mM、约25mM、约30mM、约35mM、约40mM、约45mM、约50mM、约55mM、约60mM、约65mM、约70mM、约75mM、约80mM、约85mM、约90mM、约95mM或约100mM的药理学上可接受的盐。在某些实施方式中,本发明的药物组合物包含约0mM的药理学上可接受的盐。在某些实施方式中,本发明的药物组合物包含约30mM的药理学上可接受的盐。在某些实施方式中,本发明的药物组合物包含约40mM的药理学上可接受的盐。在某些实施方式中,本发明的药物组合物包含约50mM的药理学上可接受的盐。在某些实施方式中,本发明的药物组合物包含约60mM的药理学上可接受的盐。在某些实施方式中,本发明的药物组合物包含约70mM的药理学上可接受的盐。在某些实施方式中,本发明的药物组合物包含约80mM的药理学上可接受的盐。在一个优选的实施方式中,低盐药物组合物是冻干制剂。在一个优选的实施方式中,盐是钠盐(例如氯化钠)。

[0056] 在代表性的方面,本发明的药物组合物包含约0mM至约150mM、约5mM至约150mM、约5mM至约100mM、约5mM至约90mM、约5mM至约80mM、约5mM至约70mM、约5mM至约60mM、约5mM至约50mM、约5mM至约40mM、约5mM至约30mM、约30mM至约100mM、约30mM至约90mM、约30mM至约80mM、约30mM至约70mM、约30mM至约60mM、约30mM至约50mM、约30mM至约40mM、约50mM至约150mM、50mM至约120mM、约55mM至约100mM、约60mM至约100mM、约60mM至约80mM、约70mM至约100mM、或约70mM至约80mM的氯化钠。在某些实施方式中,本发明的药物组合物包含约80mM至约120mM、约70mM至约90mM、约50mM至约70mM、或约20mM至约40mM的氯化钠。在代表性的方面,本发明的药物组合物包含约0mM至约100mM、约0mM至约80mM、约0mM至约70mM、约0mM至约60mM、约0mM至约50mM、约0mM至约40mM、约0mM至约30mM、约0mM至约20mM、约0mM至约10mM、约0mM至约5mM的氯化钠。在某些实施方式中,药物组合物包含小于约100mM、小于约80mM、小于约70mM、或小于约60mM的氯化钠。在其他实施方式中,药物组合物包含约0mM至小于约100mM、约5mM至小于约100mM、约10mM至小于约100mM、约20mM至小于约100mM、约30mM至小于约100mM、约40mM至小于约100mM、约50mM至小于约100mM、约60mM至小于约100mM、或约70mM至小于约100mM的氯化钠。在代表性的方面,药物组合物包含约0mM、约5mM、约10mM、约15mM、约20mM、约25mM、约30mM、约35mM、约40mM、约45mM、约50mM、约55mM、约60mM、约65mM、约70mM、约75mM、约80mM、约85mM、约90mM、约95mM、约100mM、约105mM、约110mM、约115mM、约120mM、约125mM、约130mM、约135mM、约140mM、约145mM或约150mM的氯化钠。在某些实施方式中,本发明的药物组合物包含约0mM的氯化钠。在某些实施方式中,本发明的药物组合物包含约10mM的氯化钠。在某些实施方式中,本发明的药物组合物包含约20mM的氯化钠。在某些实施方式中,本发明的药物组合物包含约30mM的氯化钠。在某些实施方式中,本发明的药物组合物包含约40mM的氯化钠。在某些实施方式中,本发明的药物组合物包含约50mM的氯化钠。在某些实施方式中,本发明的药物组合物包含约60mM的氯化钠。在某些实施方式中,本发明的药物组合物包含约70mM的氯化钠。在某些实施方式中,本发明的药物组合物包含约80mM的氯化钠。在某些实施方式中,本发明的药物组合物包含约100mM的氯化钠。

[0057] 有利地,发现加入非离子表面活性剂充分减少了表面AAV的损失并且防止了药物组合物形成可见颗粒。因此,在某些实施方式中,提供了含有稳定浓度的非离子型去污剂的药物组合物。本发明的制剂中能够使用的药理学上可接受的非离子表面活性剂是在药学领域中已知的,并且包括但不限于聚山梨酯80(吐温80;PS80),聚山梨酯20(吐温20;PS20)和各

种泊洛沙姆或普郎尼克类,包括普郎尼克F-68和BRIJ 35,或它们的混合物。在一个优选的实施方式中,本发明药物组合物中使用的非离子表面活性剂是聚山梨酯80。在代表性的方面,本发明的药物组合物包含可以从Croda Health Care (Snaith,英国)购买的Super Refined™ PS80。

[0058] 在某些实施方式中,本发明的药物组合物包含约0.001% (w/v) 至约0.01% (w/v),或约0.0025% (w/v) 至约0.0075% (w/v) 的非离子表面活性剂。在代表性的方面,药物组合物包含约0.001% (w/v),约0.0015% (w/v)、约0.002% (w/v)、约0.0025% (w/v)、约0.003% (w/v)、约0.0035% (w/v)、约0.004% (w/v)、约0.0045% (w/v)、约0.005% (w/v)、约0.0055% (w/v)、约0.006% (w/v)、约0.0065% (w/v)、约0.007% (w/v)、约0.0075% (w/v)、约0.008% (w/v)、约0.0085% (w/v)、约0.009% (w/v)、约0.0095% (w/v)、约0.01% (w/v) 的非离子表面活性剂。在某些实施方式中,本发明的药物组合物包含约0.005% (w/v) 的非离子表面活性剂。

[0059] 在代表性的方面,本发明的药物组合物包含约0.001% (w/v) 至约0.01% (w/v) 或约0.0025% (w/v) 至约0.0075% (w/v) 的聚山梨酯80(如Super Refined™ PS80)。在代表性的方面,药物组合物包含约0.001% (w/v)、约0.0015% (w/v)、约0.002% (w/v)、约0.0025% (w/v)、约0.003% (w/v)、约0.0035% (w/v)、约0.004% (w/v)、约0.0045% (w/v)、约0.005% (w/v)、约0.0055% (w/v)、约0.006% (w/v)、约0.0065% (w/v)、约0.007% (w/v)、约0.0075% (w/v)、约0.008% (w/v)、约0.0085% (w/v)、约0.009% (w/v)、约0.0095% (w/v) 约0.01% (w/v) 的PS80。在某些实施方式中,本发明的药物组合物包含约0.005% (w/v) 的PS80。

[0060] 发现加入适度水平(例如约1%至约10%之间)的一种以上糖和/或糖醇有助于液体制剂和/或冻干制剂的稳定性。例如,糖和/或糖醇使制剂在冷冻/解冻循环期间具有更好的性质。因此,在某些实施方式中,本发明提供含有约2%至约10%的一种以上糖和/或糖醇的药物组合物。可以使用任何糖,例如单糖、二糖或多糖、或水溶性葡聚糖,包括例如果糖、葡萄糖、甘露糖、山梨糖、木糖、麦芽糖、乳糖、蔗糖、葡聚糖、海藻糖、支链淀粉、糊精、环糊精、可溶性淀粉、羟乙基淀粉和羧甲基纤维素。在一个具体实施方式中,糖是蔗糖、海藻糖或它们的组合。在某些实施方式中,海藻糖是海藻糖二水合物。糖醇定义为具有约4至约8个碳原子和一个羟基基团的烃。可用于本发明提供的药物组合物的糖醇的非限制性实例包括:甘露醇、山梨糖醇、肌醇、半乳糖醇、卫矛醇、木糖醇和阿拉伯糖醇。在某些实施方式中,甘露醇用作糖醇添加剂。在某些实施方式中,药物组合物同时含有糖和糖醇添加剂。

[0061] 糖和糖醇可以单独或混合使用。在一些实施方式中,糖、糖醇或它们的组合将以约1%至约10% (w/v)、约1% (w/v) 至约1.5% (w/v)、约2.5%至约7.5% (w/v)、或约1%至约5% (w/v) 的浓度存在于制剂中。在代表性的方面,本发明的药物组合物包含约1.0% (w/v)、约1.1% (w/v)、约1.2% (w/v)、约1.3% (w/v)、约1.4% (w/v)、约1.5% (w/v)、约1.6% (w/v)、约1.7% (w/v)、约1.8% (w/v)、约1.9% (w/v)、约2.0% (w/v)、约2.5% (w/v)、约3.0% (w/v)、约3.5% (w/v)、约4.0% (w/v)、约4.5% (w/v)、约5.0% (w/v)、约5.5% (w/v)、约6.0% (w/v)、约6.5% (w/v)、约7.0% (w/v)、约7.5% (w/v)、约8.0% (w/v)、约8.5% (w/v)、约9.0% (w/v)、约9.5% (w/v) 或约10% (w/v) 的糖、糖醇或它们的组合。在某些实施方式中,糖是蔗糖、海藻糖或它们的组合。在某些实施方式中,海藻糖是海藻糖二水合物。

[0062] 在某些实施方式中,本发明的药物组合物包含约1%至约10% (w/v)、约1% (w/v) 至约1.5% (w/v)、约2.5%至约7.5% (w/v)、或约1%至约5% (w/v) 的蔗糖、海藻糖或它们的组合。在代表性的方面,本发明的药物组合物包含约1.0% (w/v)、约1.1% (w/v)、约1.2% (w/v)、约1.3% (w/v)、约1.4% (w/v)、约1.5% (w/v)、约1.6% (w/v)、约1.7% (w/v)、约1.8% (w/v)、约1.9% (w/v)、约2.0% (w/v)、约2.5% (w/v)、约3.0% (w/v)、约3.5% (w/v)、约4.0% (w/v)、约4.5% (w/v)、约5.0% (w/v)、约5.5% (w/v)、约6.0% (w/v)、约6.5% (w/v)、约7.0% (w/v)、约7.5% (w/v)、约8.0% (w/v)、约8.5% (w/v)、约9.0% (w/v)、约9.5% (w/v) 或约10% (w/v) 的蔗糖、海藻糖或它们的组合。在某些实施方式中,本发明的药物组合物包含约1.3% (w/v) 的蔗糖、海藻糖或它们的组合。在某些实施方式中,本发明的药物组合物包含约5% (w/v) 的蔗糖、海藻糖它们的组合。在代表性的方面,本发明的药物组合物包含约10mM至约150mM、约30mM至约40mM、或约35mM至约132mM的蔗糖、海藻糖或它们的组合。在代表性的方面,本发明的药物组合物包含约10mM、约15mM、约20mM、约25mM、约30mM、约35mM、约40mM、约45mM、约50mM、约55mM、约60mM、约65mM、约70mM、约75mM、约80mM、约85mM、约90mM、约95mM、约100mM、约110mM、约120mM、约130mM、约140mM、或约150mM的蔗糖、海藻糖或它们的组合。在某些实施方式中,本发明的药物组合物包含约35mM的蔗糖、海藻糖或它们的组合。在某些实施方式中,本发明的药物组合物包含约132mM的蔗糖、海藻糖或它们的组合。在代表性的方面,海藻糖是海藻糖二水合物。

[0063] 在代表性的方面,本发明的药物组合物包含:腺相关病毒(AAV)和约5mM至约25mM的L-组氨酸、约0mM至约150mM的药学上可接受的盐、约0.001% (w/v) 至约0.01% (w/v) 的非离子表面活性剂,以及约1% (w/v) 至约10% (w/v) 的糖和/或糖醇。在某些实施方式中,药学上可接受的盐为约0nM至约100mM。在某些实施方式中,药学上可接受的盐为约30nM至约100mM。在某些实施方式中,药学上可接受的盐为约5nM至约150mM。在某些实施方式中,药学上可接受的盐为约50nM至约150mM。在某些实施方式中,药学上可接受的盐是氯化钠。

[0064] 在代表性的方面,本发明的药物组合物进一步包括甘氨酸。在代表性的方面,本发明的药物组合物包含约30mM至约70mM、约35mM至约65mM的甘氨酸、约40mM至约60mM或约45mM至约55mM的甘氨酸。在代表性的方面,本发明的药物组合物包含约30mM、约35mM、约40mM、约45mM、约50mM、约55mM、约60mM、约65mM或约70mM的甘氨酸。在某些实施方式中,本发明的药物组合物还包括约50mM的甘氨酸。

[0065] 在代表性的方面,本发明的药物组合物进一步包括甘露醇。在代表性的方面,本发明的药物组合物包含约50mM至约150mM、约60mM至约140mM、约70mM至约130mM、约80mM至约120mM、约90mM至约110mM的甘露醇。在某些实施方式中,本发明的药物组合物包含约110mM的甘露醇。在某些实施方式中,本发明的药物组合物包含甘氨酸或甘露醇,但不同时包括甘氨酸和甘露醇。

[0066] 在其他实施方式中,本发明的药物组合物包含:腺相关病毒(AAV)和约5mM至约25mM的L-组氨酸、约0mM至约150mM的药学上可接受的盐、约0.001% (w/v) 至约0.01% (w/v) 的非离子表面活性剂,以及约1% (w/v) 至约10% (w/v) 糖和/或糖醇。在某些实施方式中,药学上可接受的盐为约0nM至约100mM。在某些实施方式中,药学上可接受的盐为约30nM至约100mM。在某些实施方式中,药学上可接受的盐为约5nM至约150mM。在某些实施方式中,药学上可接受的盐为约50nM至约150mM。在某些实施方式中,糖和/或糖醇是蔗糖、海藻糖、甘露

醇及它们的组合。在某些实施方式中,药学上可接受的盐是氯化钠。

[0067] 在其他实施方式中,本发明的药物组合物包含:腺相关病毒(AAV)和约5mM至约25mM的L-组氨酸、约0mM至约150mM的药学上可接受的盐、约0.001% (w/v) 至约0.01% (w/v) 的非离子表面活性剂,以及约1% (w/v) 至约10% (w/v) 的糖和/或糖醇。在某些实施方式中,药学上可接受的盐为约0nM至约100mM。在某些实施方式中,药学上可接受的盐为约30nM至约100mM。在某些实施方式中,药学上可接受的盐为约5nM至约150mM。在某些实施方式中,药学上可接受的盐为约50nM至约150mM。在某些实施方式中,非离子表面活性剂是聚山梨酯20、聚山梨酯80、普郎尼克F-68、BRIJ35及它们的组合。在某些实施方式中,糖和/或糖醇是蔗糖、海藻糖、甘露醇及它们的组合。在某些实施方式中,非离子表面活性剂是PS80。在某些实施方式中,药学上可接受的盐是氯化钠。

[0068] 在代表性的方面,本发明的药物组合物包含:腺相关病毒(AAV)和约5mM至约25mM的L-组氨酸、小于约100mM的药学上可接受的盐、约0.001% (w/v) 至约0.01% (w/v) 的非离子表面活性剂,以及约1% (w/v) 至约10% (w/v) 的糖和/或糖醇。在某些实施方式中,药学上可接受的盐为约0nM至小于约100mM。在某些实施方式中,药学上可接受的盐为约0nM至约80mM、约0nM至约70mM、约0mM至约60mM、约0mM至约50mM、约0mM至约40mM、0mM至约30mM、约0mM至约20mM或0mM至约10mM。在某些实施方式中,药学上可接受的盐为约30nM至小于约100mM。在某些实施方式中,药学上可接受的盐为约30nM至约80mM、约30nM至约70mM、约30mM至约60mM、约30mM至约50mM、或约30mM至约40mM。在某些实施方式中,药学上可接受的盐是氯化钠。在某些实施方式中,本发明的药物组合物包含甘氨酸或甘露醇,但不同时包括甘氨酸和/或甘露醇。在某些实施方式中,本发明的药物组合物包含甘氨酸或甘露醇,但不同时包括甘氨酸和甘露醇。在某些实施方式中,制剂是液体制剂。在某些实施方式中,制剂是冻干制剂。在某些实施方式中,低盐药物组合物是冻干制剂。

[0069] 在其它实施方式中,本发明的药物组合物包含:腺相关病毒(AAV)和约5mM至约25mM的L-组氨酸、小于约100mM的药学上可接受的盐、约0.001% (w/v) 至约0.01% (w/v) 的非离子表面活性剂,以及约1% (w/v) 至约10% (w/v) 的糖和/或糖醇。在某些实施方式中,药学上可接受的盐为约0nM至小于约100mM。在某些实施方式中,药学上可接受的盐是约0nM至约80mM、约0nM至约70mM、约0mM至约60mM、约0mM至约50mM、约0mM至约40mM、0mM至约30mM、约0mM至约20mM或0mM至约10mM。在某些实施方式中,药学上可接受的盐是约30nM至小于约100mM。在某些实施方式中,药学上可接受的盐是约30nM至约80mM、约30nM至约70mM、约30mM至约60mM、约30mM至约50mM或约30mM至约40mM。在某些实施方式中,糖和/或糖醇是蔗糖、海藻糖、甘露醇及它们的组合。在某些实施方式中,药学上可接受的盐是氯化钠。在某些实施方式中,制剂是液体制剂。在某些实施方式中,制剂是冻干制剂。在某些实施方式中,低盐药物组合物是冻干制剂。

[0070] 在其它实施方式中,本发明的药物组合物包含:腺相关病毒(AAV)和约5mM至约25mM的L-组氨酸、小于约100mM的药学上可接受的盐、约0.001% (w/v) 至约0.01% (w/v) 的非离子表面活性剂,以及约1% (w/v) 至约10% (w/v) 的糖和/或糖醇。在某些实施方式中,药学上可接受的盐为约0nM至小于约100mM。在某些实施方式中,药学上可接受的盐为约0nM至约80mM、约0nM至约70mM、约0mM至约60mM、约0mM至约50mM、约0mM至约40mM、0mM至约30mM、约0mM至约20mM或0mM至约10mM。在某些实施方式中,药学上可接受的盐为约30nM至小于约

100mM。在某些实施方式中,药学上可接受的盐是约30mM至约80mM、约30mM至约70mM、约30mM至约60mM、约30mM至约50mM或约30mM至约40mM。在某些实施方式中,非离子表面活性剂是聚山梨酯20、聚山梨酯80、普郎尼克F-68、BRIJ 35及它们的组合。在某些实施方式中,糖和/或糖醇是蔗糖、海藻糖、甘露醇及它们的组合。在某些实施方式中,非离子表面活性剂是PS80。在某些实施方式中,药学上可接受的盐是氯化钠。在某些实施方式中,制剂是液体制剂。在某些实施方式中,制剂是冻干制剂。在某些实施方式中,低盐药物组合物是冻干制剂。

[0071] 在代表性的方面,本发明的药物组合物包含:腺相关病毒(AAV)和约5mM至约25mM的L-组氨酸、约50mM至约150mM的氯化钠、约0.001% (w/v) 至约0.01% (w/v) 的聚山梨酯80 (PS80),以及约1% (w/v) 至约10% (w/v) 的蔗糖或海藻糖。

[0072] 在代表性的方面,本发明的药物组合物包含:腺相关病毒(AAV)和约5mM至约25mM的L-组氨酸、约0mM至小于约100mM的氯化钠、约0.001% (w/v) 至约0.01% (w/v) 的聚山梨酯80 (PS80),以及约1% (w/v) 至约10% (w/v) 的蔗糖或海藻糖。在某些实施方式中,制剂是液体制剂。在某些实施方式中,制剂是冻干制剂。在某些实施方式中,低盐药物组合物是冻干制剂。

[0073] 在代表性的方面,本发明的药物组合物包含:腺相关病毒(AAV)和约5mM至约25mM的L-组氨酸、约30mM至约80mM的氯化钠、约0.001% (w/v) 至约0.01% (w/v) 的聚山梨酯80 (PS80),以及约1% (w/v) 至约10% (w/v) 的蔗糖或海藻糖。在某些实施方式中,制剂是液体制剂。在某些实施方式中,制剂是冻干制剂。在某些实施方式中,低盐药物组合物是冻干制剂。

[0074] 在某些实施方式中提供了一种低盐药物组合物,所述低盐药物组合物包含:腺相关病毒(AAV)和约5mM至约25mM的L-组氨酸、约50mM至约150mM的氯化钠、约0.001% (w/v) 至约0.01% (w/v) 的聚山梨酯80 (PS80)和约1% (w/v) 至约10% (w/v) 的蔗糖或海藻糖。在某些实施方式中,本发明的药物组合物还包括约30mM至约70mM的甘氨酸。在某些实施方式中,制剂是液体制剂。在某些实施方式中,制剂是冻干制剂。在某些实施方式中,低盐药物组合物是冻干制剂。

[0075] 在某些实施方式中提供了一种低盐药物组合物,所述低盐药物组合物包括:腺相关病毒(AAV)和约5mM至约25mM的L-组氨酸、约0mM至小于约100mM的氯化钠、约0.001% (w/v) 至约0.01% (w/v) 的聚山梨酯80 (PS80),以及约1% (w/v) 至约10% (w/v) 的蔗糖或海藻糖。在某些实施方式中,本发明的药物组合物进一步包括约30mM至约70mM的甘氨酸。在某些实施方式中,药物组合物包含小于约80mM的氯化钠。在某些实施方式中,药物组合物包含小于约70mM的氯化钠。在某些实施方式中,药物组合物包含小于约60mM的氯化钠。在某些实施方式中,药物组合物包含小于约50mM的氯化钠。在某些实施方式中,药物组合物包含小于约40mM的氯化钠。在某些实施方式中,药物组合物包含小于约30mM的氯化钠。在某些实施方式中,药物组合物包含约0mM至约80mM的氯化钠。在某些实施方式中,药物组合物包含约0mM至约70mM的氯化钠。在某些实施方式中,药物组合物包含约0mM至约60mM的氯化钠。在某些实施方式中,药物组合物包含约0mM至约50mM的氯化钠。在某些实施方式中,药物组合物包含约0mM至约40mM的氯化钠。在某些实施方式中,药物组合物包含约0mM至约30mM的氯化钠。在某些实施方式中,药物组合物包含约30mM至约80mM的氯化钠。在某些实施方式中,药物组合物包含约30mM至约70mM的氯化钠。在某些实施方式中,药物组合物包含约30mM至约60mM的

氯化钠。在某些实施方式中,药物组合物包含约30mM至约50mM的氯化钠。在某些实施方式中,药物组合物包含约30mM至约40mM的氯化钠。在某些实施方式中,制剂是液体制剂。在某些实施方式中,制剂是冻干制剂。在某些实施方式中,低盐药物组合物是冻干制剂。

[0076] 本发明还提供了一种药物组合物,所述药物组合物包含:腺相关病毒(AAV)和约20mM的L-组氨酸、约70mM的氯化钠、约0.005% (w/v)的聚山梨酯80(PS80)和约5% (w/v)的蔗糖。在某些实施方式中,药物组合物的pH为约 7.5 ± 0.2 和/或渗透压重量摩尔浓度为约 $300 \pm 10 \text{mOsmol/kg}$ 。

[0077] 本发明还提供了一种药物组合物,所述药物组合物包含:腺相关病毒(AAV)和约20mM的L-组氨酸、约60mM的氯化钠、约0.005% (w/v)的聚山梨酯80(PS80)、约35mM的海藻糖和约110mM的甘露醇。在某些实施方式中,药物组合物的pH为约 7.0 ± 0.2 和/或渗透压重量摩尔浓度为约 $390 \pm 10 \text{mOsmol/kg}$ 。在某些实施方式中,药物组合物的pH为约 7.0 ± 0.2 和/或渗透压重量摩尔浓度为约 $290 \pm 10 \text{mOsmol/kg}$ 。

[0078] 本发明进一步提供了一种药物组合物,所述药物组合物包含:腺相关病毒(AAV)和约10mM的L-组氨酸、约100mM的氯化钠、约0.005% (w/v)的聚山梨酯80(PS80)、约5% (w/v)的海藻糖和约50mM的甘氨酸。在某些实施方式中,药物组合物的pH为约 7.0 ± 0.2 和/或渗透压重量摩尔浓度为约 $400 \pm 10 \text{mOsmol/kg}$ 。

[0079] 本发明进一步提供了一种可以为液体或冻干(如从液体制剂冻干)的药物组合物,所述药物组合物包含:腺相关病毒(AAV)和约10mM的L-组氨酸、约80mM的氯化钠,约0.005% (w/v)的聚山梨酯80(PS80)、约5% (w/v)的海藻糖和约50mM的甘氨酸。在某些实施方式中,药物组合物的pH为约 7.0 ± 0.2 。

[0080] 本发明进一步提供了一种可以为液体或冻干(如从液体制剂冻干)的药物组合物,所述药物组合物包含:腺相关病毒(AAV)和约10mM的L-组氨酸、约70mM的氯化钠,约0.005% (w/v)的聚山梨酯80(PS80)、约5% (w/v)的海藻糖和约50mM的甘氨酸。在某些实施方式中,药物组合物的pH为约 7.0 ± 0.2 。

[0081] 本发明进一步提供了一种可以为液体或冻干(如从液体制剂冻干)的药物组合物,所述药物组合物包含:腺相关病毒(AAV)和约10mM的L-组氨酸、约60mM的氯化钠、约0.005% (w/v)的聚山梨酯80(PS80)、约5% (w/v)的海藻糖和约50mM的甘氨酸。在某些实施方式中,药物组合物的pH为约 7.0 ± 0.2 。

[0082] 本发明进一步提供了一种可以为液体或冻干(如从液体制剂冻干)的药物组合物,所述药物组合物包含:腺相关病毒(AAV)和约10mM的L-组氨酸、约50mM的氯化钠、约0.005% (w/v)的聚山梨酯80(PS80)、约5% (w/v)的海藻糖和约50mM的甘氨酸。在某些实施方式中,药物组合物的pH为约 7.0 ± 0.2 。

[0083] 本发明进一步提供了一种可以为液体或冻干(如从液体制剂冻干)的药物组合物,所述药物组合物包含:腺相关病毒(AAV)和约10mM的L-组氨酸,约40mM的氯化钠、约0.005% (w/v)的聚山梨酯80(PS80)、约5% (w/v)的海藻糖和约50mM的甘氨酸。在某些实施方式中,药物组合物的pH为约 7.0 ± 0.2 。

[0084] 本发明进一步提供了一种可以为液体或冻干(如从液体制剂冻干)的药物组合物,所述药物组合物包含:腺相关病毒(AAV)和约10mM的L-组氨酸、约30mM的氯化钠、约0.005% (w/v)的聚山梨酯80(PS80)、约5% (w/v)的海藻糖和约50mM的甘氨酸。在某些实施方式中,

药物组合物的pH为约 7.0 ± 0.2 。

[0085] 本发明进一步提供了一种可以为液体或冻干(如从液体制剂冻干)的药物组合物,所述药物组合物包含:腺相关病毒(AAV)和约10mM的L-组氨酸、约20mM的氯化钠、约0.005% (w/v)的聚山梨酯80 (PS80)、约5% (w/v)的海藻糖和约50mM的甘氨酸。在某些实施方式中,药物组合物的pH为约 7.0 ± 0.2 。

[0086] 本发明进一步提供了一种可以为液体或冻干(如从液体制剂冻干)的药物组合物,所述药物组合物包含:腺相关病毒(AAV)和约10mM的L-组氨酸,约10mM的氯化钠、约0.005% (w/v)的聚山梨酯80 (PS80)、约5% (w/v)的海藻糖和约50mM的甘氨酸。在某些实施方式中,药物组合物的pH为约 7.0 ± 0.2 。

[0087] 本发明进一步提供了一种可以为液体或冻干(如从液体制剂冻干)的药物组合物,所述药物组合物包含:腺相关病毒(AAV)和约10mM的L-组氨酸、约0mM的氯化钠、约0.005% (w/v)的聚山梨酯80 (PS80)、约5% (w/v)的海藻糖和约50mM的甘氨酸。在某些实施方式中,药物组合物的pH为约 7.0 ± 0.2 。

[0088] 其他成分

[0089] 在代表性的实施方式中,本发明的制剂或药物组合物包含其他的药学上可接受的成分。在代表性的方面,制剂或药物组合物包含以下任何一种或它们的组合:酸化剂、添加剂、吸附剂、气溶胶推进剂、空气置换剂(air displacement agent)、碱化剂、抗结块剂、抗凝血剂、抗菌防腐剂、抗氧化剂、防腐剂、碱、粘合剂、缓冲剂、螯合剂、涂层剂、着色剂、干燥剂、去污剂、稀释剂、消毒剂、崩解剂、分散剂、溶解增强剂、染料、润肤剂、乳化剂、乳化稳定剂、填充剂、成膜剂、增味剂、调味剂、流动促进剂、胶凝剂、造粒剂、保湿剂、润滑剂、粘膜粘合剂、软膏基质、软膏、油质载体、有机碱、锭剂基质、颜料、增塑剂、抛光剂、防腐剂、多价螯合剂、皮肤渗透剂、增溶剂、溶剂、稳定剂、栓剂基质、表面活性剂(surface active agent)、表面活性剂(surfactant)、悬浮剂、甜味剂、治疗剂、增稠剂、张力剂、毒性剂、增粘剂、吸水剂、水混溶性助溶剂、水软化剂或润湿剂。在一些实施方式中,本发明的制剂或药物组合物包含以下成分中的任何一种或它们的组合:阿拉伯胶、乙酰磺胺酸钾、柠檬酸乙酰基三丁酯、柠檬酸乙酰基三乙酯、琼脂、白蛋白、醇、脱水醇、变性醇、稀醇(dilute alcohol)、油桐酸、海藻酸、脂肪族聚酯、氧化铝、氢氧化铝、硬脂酸铝、支链淀粉、 α -直链淀粉、抗坏血酸、抗坏血酸棕榈酸酯、阿斯巴甜、注射用抑菌水、膨润土、膨润土岩浆、苯扎氯铵、苄索氯铵、苯甲酸、苯甲醇、苯甲酸苄酯、溴硝丙二醇、叔丁基羟基茴香醚、丁基羟基甲苯、对羟基苯甲酸丁酯、对羟基苯甲酸丁酯钠、海藻酸钙、抗坏血酸钙、碳酸钙、环己基氨基磺酸钙、无水磷酸氢钙、脱水磷酸氢钙(dibasic dehydrate calcium phosphate)、磷酸三钙、丙酸钙、硅酸钙、山梨酸钙、硬脂酸钙、硫酸钙、半水合硫酸钙、菜籽油、卡波姆、二氧化碳、羧甲基纤维素钙、羧甲基纤维素钠、 β -胡萝卜素、角叉菜胶、蓖麻油、氢化蓖麻油、阳离子乳化蜡、醋酸纤维素、醋酸邻苯二甲酸纤维素、乙基纤维素、微晶纤维素、粉状纤维素、硅化微晶纤维素、羧甲基纤维素钠、十六醇十八醇、溴棕三甲铵、十六醇、氯己定、氯丁醇、氯甲酚、胆固醇、醋酸氯己定、葡萄糖酸氯己定、盐酸氯己定、氯二氟乙烷(HCFC)、氯二氟甲烷、氯氟烃(CFC)、氯苯氧乙醇、氯二甲酚、玉米糖浆固体、无水柠檬酸、柠檬酸一水合物、可可脂、着色剂、玉米油、棉籽油、甲酚、间甲酚、邻甲酚、对甲酚、交联羧甲基纤维素钠、交聚维酮、环己基氨基磺酸、环糊精、葡聚糖(dextrate)、糊精、右旋糖、无水葡萄糖、重氮烷基脲、邻苯二甲酸二丁酯、癸二酸二

丁酯、二乙醇胺、邻苯二甲酸二乙酯、二氟乙烷 (HFC)、二甲基-β-环糊精、环糊精类化合物如 **Captisol®**、二甲醚、邻苯二甲酸二甲酯、乙二胺四乙酸二钾 (dipotassium edentate)、乙二胺四乙酸二钠、磷酸氢二钠、多库酯钙、多库酯钾、多库酯钠、十二烷基没食子酸酯、十二烷基三甲基溴化铵、乙二胺四乙酸钙二钠、乙二胺四乙酸 (edtic acid)、葡乙胺 (eglumine)、乙醇、乙基纤维素、没食子酸乙酯、月桂酸乙酯、乙基麦芽酚、油酸乙酯、对羟基苯甲酸乙酯、对羟基苯甲酸乙酯钾、对羟基苯甲酸乙酯钠、乙基香草醛、果糖、果糖液、碾磨果糖、无热原果糖、果糖粉、富马酸、明胶、葡萄糖、液体葡萄糖、饱和植物脂肪酸的甘油酯混合物、甘油、山萘酸甘油酯、单油酸甘油酯、单硬脂酸甘油酯、自乳化单硬脂酸甘油酯、棕榈酸硬脂酸甘油酯、甘氨酸、乙二醇、三缩四乙二醇、瓜尔豆胶、七氟丙烷 (HFC)、十六烷基三甲基溴化铵、高果糖糖浆、人血清白蛋白、碳氢化合物 (HC)、稀盐酸、II型氢化植物油、羟乙基纤维素、2-羟乙基-β-环糊精、羟丙基纤维素、低取代羟丙基纤维素、2-羟丙基-β-环糊精、羟丙基甲基纤维素、羟丙基甲基纤维素邻苯二甲酸酯、咪脲、靛蓝胭脂红、离子交换剂、氧化铁、异丙醇、肉豆蔻酸异丙酯、棕榈酸异丙酯、等渗盐水、高岭土、乳酸、乳糖醇、乳糖、羊毛脂、羊毛脂醇、无水羊毛脂、卵磷脂、硅酸镁铝、碳酸镁、普通碳酸镁、无水碳酸镁、碱式碳酸镁、氢氧化镁、十二烷基硫酸镁、氧化镁、硅酸镁、硬脂酸镁、三硅酸镁、无水三硅酸镁、苹果酸、麦芽、麦芽糖醇、麦芽糖醇溶液、麦芽糖糊精、麦芽酚、麦芽糖、甘露醇、中链甘油三酯、葡甲胺、薄荷醇、甲基纤维素、甲基丙烯酸甲酯、油酸甲酯、对羟基苯甲酸甲酯、对羟基苯甲酸甲酯钾、对羟基苯甲酸甲酯钠、微晶纤维素和羧甲基纤维素钠、矿物油、轻质矿物油、矿物油和羊毛脂醇、油、橄榄油、单乙醇胺、蒙脱石、没食子酸辛酯、油酸、棕榈酸、石蜡、花生油、凡士林、凡士林及羊毛脂醇、药用油、苯酚、液化苯酚、苯氧乙醇、苯氧丙醇、苯乙醇、乙酸苯汞、硼酸苯汞、硝酸苯汞、宝拉利林、宝拉利林钾、泊洛沙姆、聚葡萄糖、聚乙二醇、聚环氧乙烷、聚丙烯酸酯、聚乙烯-聚氧丙烯-嵌段聚合物、聚甲基丙烯酸酯、聚氧乙烯烷基醚、聚氧乙烯蓖麻油衍生物、聚氧乙烯山梨糖醇脂肪酸酯、聚氧乙烯硬脂酸酯、聚乙烯醇、聚乙烯吡咯烷酮、海藻酸钾、苯甲酸钾、碳酸氢钾、亚硫酸氢钾、氯化钾、柠檬酸钾、无水柠檬酸钾、磷酸氢钾、焦亚硫酸氢钾、磷酸二氢钾、丙酸钾、山梨酸钾、聚维酮、丙醇、丙酸、碳酸丙烯酯、丙二醇、海藻酸丙二醇酯、没食子酸丙酯、对羟基苯甲酸丙酯、对羟基苯甲酸丙酯钾、对羟基苯甲酸丙酯钠、硫酸鱼精蛋白、菜籽油、林格氏液、糖精、糖精铵、糖精钙、糖精钠、红花油、皂石、血清蛋白、芝麻油、硅胶、二氧化硅胶体、海藻酸钠、抗坏血酸钠、苯甲酸钠、碳酸氢钠、亚硫酸氢钠、氯化钠、无水柠檬酸钠、脱水柠檬酸钠、氯化钠、甜蜜素、乙二胺四乙酸钠、十二烷基硫酸钠、十二醇硫酸钠、焦亚硫酸氢钠、磷酸钠、二碱基的 (dibasic)、磷酸钠、单碱基的 (monobasic)、磷酸钠、三碱基的 (tribasic)、无水丙酸钠、丙酸钠、山梨酸钠、羟基乙酸淀粉钠、硬脂酰富马酸钠、亚硫酸钠、山梨酸、山梨糖醇酯 (山梨糖醇脂肪酸酯)、山梨糖醇、70%的山梨糖醇溶液、大豆油、鲸蜡、淀粉、玉米淀粉、马铃薯淀粉、预胶化淀粉、可消毒玉米淀粉、硬脂酸、纯化硬脂酸、硬脂酰酒精、蔗糖、糖、可压缩糖、糖果糖、糖球、转化糖、Sugartab、日落黄FCF、合成石蜡、滑石粉、酒石酸、酒石黄、四氟乙烷 (HFC)、可可油、硫柳汞、二氧化钛、α-生育酚、醋酸生育酚、α-生育酚琥珀酸酯、β-生育酚、δ-生育酚、γ-生育酚、黄蓍胶、三醋精、柠檬酸三丁酯、三乙醇胺、柠檬酸三乙酯、三甲基-β-环糊精、三甲基十四烷基溴化铵、三羟甲基氨基甲烷缓冲液、乙二胺四乙酸三钠、香草醛、I型氢化植物油、水、软水、硬水、无二氧化碳水、无热原水、注射用水、吸入用无菌水、注射用无菌水、灌溉用无菌水、蜡、阴离子乳化蜡、巴西棕榈蜡、阳

离子乳化蜡、十六烷基酯蜡、微晶蜡、非离子乳化蜡、栓剂蜡、白蜡、黄蜡、白凡士林、羊毛脂、黄原胶、木糖醇、玉米蛋白、丙酸锌、锌盐、硬脂酸锌,或在A.H.Kibbe编写的“药用赋形剂手册 (Handbook of Pharmaceutical Excipients)” (第三版) (Pharmaceutical Press, London, UK, 2000) 中的任何赋形剂,该手册的全部内容通过引用并入本文。Remington's Pharmaceutical Sciences,第十六版,E.W.Martin (Mack Publishing Co., Easton, Pa., 1980),其通过引用整体并入本文并用于所有目的,该书公开了用于配制药学上可接受的组合物的各种组分和制备这些组分的已知技术。考虑任何常规试剂在药物组合物中的用途,除非其与药物组合物不相容。在代表性的实施方式中,本发明的制剂或药物组合物不包括上述成分中的一种或它们的组合。在代表性的实施方式中,本发明的制剂或药物组合物不包括上述成分。在代表性的方面,本发明的药物组合物不包括葡聚糖。在代表性的方面,本发明的药物组合物不包括氯化钙。

[0090] pH

[0091] 在代表性的实施方式中,本发明的药物组合物具有生理上相容的pH。因此,在某些实施方式中,提供的AAV制剂含有适于将制剂维持在中性pH的缓冲剂。

[0092] 在代表性的方面,药物组合物的pH为约6.5至约9.0、约6.5至约8.0、约6.9至约7.7或约7.0至约7.5。在某些实施方式中,制剂的pH为约6.5、约6.6、约6.7、约6.8、约6.9、约7.0、约7.1、约7.2、约7.3、约7.4、约7.5、约7.6、约7.7、约7.8、约7.9、约8.0、约8.1、约8.2、约8.3、约8.4、约8.5、约8.6、约8.7、约8.8、约8.9或约9.0。在代表性的方面,药物组合物的pH为约7.0或约7.5。在某些实施方式中,药物组合物的pH为约7.0。在某些实施方式中,药物组合物的pH为约7.5。

[0093] 渗透压重量摩尔浓度

[0094] 在代表性的实施方式中,本发明的药物组合物的渗透压重量摩尔浓度为约200至约400mOsmol/kg、约250至约400mOsmol/kg或约290至约390mOsmol/kg。在某些实施方式中,本发明提供的AAV制剂将具有以下以下的渗透压重量摩尔浓度,例如为约200mOsmol/L、约210mOsmol/L、约220mOsmol/L、约230mOsmol/L、约240mOsmol/L、约250mOsmol/L、约260mOsmol/L、约270mOsmol/L、约280mOsmol/L、约290mOsmol/L、约300mOsmol/L、约310mOsmol/L、约320mOsmol/L、约330mOsmol/L、约340mOsmol/L、约350mOsmol/L、约360mOsmol/L、约370mOsmol/L、约380mOsmol/L、约390mOsmol/L或约400mOsmol/L。在代表性的方面,本发明的药物组合物的渗透压重量摩尔浓度为约250mOsmol/kg至约400mOsmol/kg。在代表性的方面,本发明的药物组合物的渗透压重量摩尔浓度为约 300 ± 10 mOsmol/kg或约 380 ± 10 mOsmol/kg。在某些实施方式中,本发明的药物组合物的渗透压重量摩尔浓度为约 300 ± 10 mOsmol/kg。在某些实施方式中,本发明的药物组合物的渗透压重量摩尔浓度为约 380 ± 10 mOsmol/kg。

[0095] 可用于本发明的制剂的张度剂 (tonocity agent) 包括但不限于:氯化钠、右旋糖、蔗糖、木糖醇、果糖、甘油、山梨糖醇、甘露醇、海藻糖、氯化钾、甘露糖、氯化钙、氯化镁、其它无机盐、其它糖,其它糖醇及它们的组合。在某些实施方式中,AAV制剂可含有至少一种张度剂,或至少两种、三种、四种、五种或更多种张度剂。

[0096] AAV

[0097] 在代表性的实施方式中,本发明的药物组合物包含AAV。AAV可以是任何AAV血清

型。在代表性的方面, AAV是AAV1血清型、AAV2血清型、AAV3血清型、AAV4血清型、AAV5血清型、AAV6血清型、AAV7血清型、AAV8血清型、AAV9血清型或AAV10血清型。在代表性的方面, AAV是AAV8血清型。

[0098] 在本文提供的制剂的某些实施方式中, AAV是rAAV, 如美国专利申请公开号2017/0233455和临时申请号62/509,616中所描述的, 通过引用整体并入本文并用于所有目的。

[0099] 在代表性的方面, 药物组合物包含高滴度AAV产物。在代表性的方面, 药物组合物含有至少约 10^{10} 个病毒颗粒(vp)或至少约 10^{11} 个病毒颗粒(vp)或至少约 10^{12} 个病毒颗粒(vp)或至少约 10^{13} 个病毒颗粒(vp)。在代表性的方面, 药物组合物含有至少约 10^{14} 个病毒颗粒(vp)或至少约 10^{15} 个病毒颗粒(vp), 例如, 至少约 2×10^{15} 个病毒颗粒(vp), 至少约 5×10^{15} 个病毒颗粒。药物组合物还含有约 10^{10} 个载体基因组(vg)或至少约 10^{11} 个载体基因组(vg)或至少约 10^{12} 个载体基因组(vg)或至少约 10^{13} 个载体基因组(vg)。在代表性的方面, 药物组合物含有至少约 10^{14} 个载体基因组(vg)或至少约 10^{15} 个载体基因组(vg), 例如至少约 2×10^{15} 个载体基因组(vg), 至少约 5×10^{15} 个载体基因组(vg)。

[0100] 制造方法和用途

[0101] 本发明还提供了制备含有AAV的药物组合物的方法。在代表性的方面, 该方法包括: 将约5mM至约25mM的缓冲剂、约50mM至约150mM或小于约100mM的药学上可接受的盐、约0.001% (w/v) 至约0.01% (w/v) 的非离子表面活性剂、约1% (w/v) 至约10% (w/v) 的糖和/或糖醇与AAV组合, 从而获得含有AAV的药物组合物。在代表性的方面, 该方法包括: 制备一种组合物, 如一种水溶液, 其包含约5mM至约25mM的缓冲剂、约50mM至约150mM或小于约100mM的药学上可接受的盐、约0.001% (w/v) 至约0.01% (w/v) 的非离子表面活性剂、约1% (w/v) 至约10% (w/v) 的糖和/或糖醇, 以及将AAV加入到组合物中。在代表性的方面, 该方法包括: 制备一种组合物, 如一种水溶液, 其包含约20mM的缓冲剂、约70mM的药学上可接受的盐、约0.005% (w/v) 的非离子表面活性剂和约5% (w/v) 糖和/或糖醇, 以及将AAV加入到组合物中。在代表性的方面, 该方法包括: 制备一种组合物, 如一种水溶液, 其包含约10mM的缓冲剂、约100mM的药学上可接受的盐、约0.005% (w/v) 的非离子表面活性剂、约5% (w/v) 的糖和/或糖醇和约50mM的甘氨酸, 以及将AAV加入到组合物中。在代表性的方面, 该方法包括: 制备一种组合物, 如一种水溶液, 其包含约10mM的缓冲剂、约80mM的药学上可接受的盐、约0.005% (w/v) 的非离子表面活性剂、约5% (w/v) 的糖和/或糖醇和约50mM的甘氨酸, 以及将AAV加入到组合物中。在代表性的方面, 该方法包括: 制备一种组合物, 如一种水溶液, 其包含约10mM的缓冲剂、约70mM的药学上可接受的盐、约0.005% (w/v) 的非离子表面活性剂、约5% (w/v) 的糖和/或糖醇和约50mM的甘氨酸, 以及将AAV加入到组合物中。在代表性的方面, 该方法包括: 制备一种组合物, 如一种水溶液, 其包含约10mM的缓冲剂、约60mM的药学上可接受的盐、约0.005% (w/v) 的非离子表面活性剂, 约5% (w/v) 的糖和/或糖醇和约50mM甘氨酸, 以及将AAV加入到组合物中。在代表性的方面, 该方法包括: 制备一种组合物, 如一种水溶液, 其包含约10mM的缓冲剂、约50mM的药学上可接受的盐、约0.005% (w/v) 的非离子表面活性剂, 约5% (w/v) 的糖和/或糖醇和约50mM的甘氨酸, 以及将AAV加入到组合物中。在代表性的方面, 该方法包括: 制备一种组合物, 如一种水溶液, 其包含约10mM的缓冲剂、约40mM的药学上可接受的盐、约0.005% (w/v) 的非离子表面活性剂、约5% (w/v) 的糖和/或糖醇和约50mM的甘氨酸, 以及将AAV加入到组合物中。在代表性的方面, 该方法包括: 制备一种组合

物,如一种水溶液,其包含约10mM的缓冲剂、约30mM的药学上可接受的盐、约0.005% (w/v) 的非离子表面活性剂,约5% (w/v) 糖和/或糖醇和约50mM的甘氨酸,以及将AAV加入到组合物中。在代表性的方面,该方法包括:制备一种组合物,如一种水溶液,其包含约10mM的缓冲剂、约20mM的药学上可接受的盐、约0.005% (w/v) 的非离子表面活性剂,约5% (w/v) 的糖和/或糖醇和约50mM的甘氨酸,以及将AAV加入到组合物中。在代表性的方面,该方法包括:制备一种组合物,如一种水溶液,其包含约10mM的缓冲剂,约10mM的药学上可接受的盐,约0.005% (w/v) 的非离子表面活性剂,约5% (w/v) 的糖和/或糖醇和约50mM的甘氨酸,以及将AAV加入到组合物中。在代表性的方面,该方法包括:制备一种组合物,如一种水溶液,其包含约10mM的缓冲剂,约0mM的药学上可接受的盐、约0.005% (w/v) 的非离子表面活性剂,约5% (w/v) 的糖和/或糖醇和约50mM的甘氨酸,以及将AAV加入到组合物中。在代表性的方面,该方法包括:制备组合物,如一种水溶液,其包含约20mM的缓冲剂、约60mM药学上可接受的盐、约0.005% (w/v) 的非离子表面活性剂、约35mM糖和/或或糖醇和约110mM的甘露醇,以及将AAV加入到组合物中。在某些实施方式中,将水溶液冻干。

[0102] 本发明还提供了制备含有AAV的药物组合物的方法。在代表性的方面,所述方法包括:将约5mM至约25mM的L-组氨酸、约50mM至约150mM的氯化钠,约0.001% (w/v) 至约0.01% (w/v) 的聚山梨酯80 (PS80)、约1% (w/v) 至约10% (w/v) 的蔗糖或海藻糖与AAV混合,从而获得含有AAV的药物组合物。在代表性的方面,该方法包括:制备一种组合物,如一种水溶液,其包含约5mM至约25mM的L-组氨酸、约50mM至约150mM的氯化钠、约0.001% (w/v) 至约0.01% (w/v) 的聚山梨酯80 (PS80) 和约1% (w/v) 至约10% (w/v) 的蔗糖或海藻糖,以及将AAV加入到组合物中。在代表性的方面,该方法包括:制备一种组合物,如一种水溶液,其包含约20mM的L-组氨酸,约70mM的氯化钠,约0.005% (w/v) 的聚山梨酯80 (PS80) 和约5% (w/v) 的蔗糖,以及将AAV加入到组合物中。在代表性的方面,该方法包括:制备一种组合物,如一种水溶液,其包含约10mM的L-组氨酸、约100mM的氯化钠、约0.005% (w/v) 的聚山梨酯80 (PS80)、约5% (w/v) 的海藻糖和约50mM甘氨酸,以及将AAV加入到组合物中。在代表性的方面,该方法包括:制备一种组合物,如一种水溶液,其包含约10mM的L-组氨酸、约80mM的氯化钠、约0.005% (w/v) 的聚山梨酯80 (PS80)、约5% (w/v) 的海藻糖和约50mM甘氨酸,以及将AAV加入到组合物中。在代表性的方面,该方法包括:制备一种组合物,如一种水溶液,其包含约10mM的L-组氨酸、约70mM的氯化钠、约0.005% (w/v) 的聚山梨酯80 (PS80)、约5% (w/v) 的海藻糖和约50mM的甘氨酸,以及将AAV加入到组合物中。在代表性的方面,该方法包括:制备一种组合物,如一种水溶液,其包含约10mM的L-组氨酸、约60mM的氯化钠、约0.005% (w/v) 的聚山梨酯80 (PS80)、约5% (w/v) 的海藻糖和约50mM的甘氨酸,以及将AAV加入到组合物中。在代表性的方面,该方法包括:制备一种组合物,如一种水溶液,其包含约10mM的L-组氨酸、约50mM的氯化钠、约0.005% (w/v) 的聚山梨酯80 (PS80)、约5% (w/v) 的海藻糖和约50mM的甘氨酸,以及将AAV加入到组合物中。在代表性的方面,该方法包括:制备一种组合物,如一种水溶液,其包含约10mM的L-组氨酸、约40mM的氯化钠、约0.005% (w/v) 的聚山梨酯80 (PS80)、约5% (w/v) 的海藻糖和约50mM的甘氨酸,以及将AAV加入到组合物中。在代表性的方面,该方法包括:制备一种组合物,如一种水溶液,其包含约10mM的L-组氨酸、约30mM的氯化钠、约0.005% (w/v) 的聚山梨酯80 (PS80)、约5% (w/v) 的海藻糖和约50mM的甘氨酸,以及将AAV加入到组合物中。在代表性的方面,该方法包括:制备一种组合物,如一种水溶液,其

包含约10mM的L-组氨酸、约20mM的氯化钠、约0.005% (w/v) 的聚山梨酯80 (PS80)、约5% (w/v) 的海藻糖和约50mM的甘氨酸, 以及将AAV加入到组合物中。在代表性的方面, 该方法包括: 制备一种组合物, 如一种水溶液, 其包含约10mM的L-组氨酸、约10mM的氯化钠、约0.005% (w/v) 的聚山梨酯80 (PS80)、约5% (w/v) 的海藻糖和约50mM的甘氨酸, 以及将AAV加入到组合物中。在代表性的方面, 该方法包括: 制备一种组合物, 如一种水溶液中, 其包含约10mM的L-组氨酸、约0mM的氯化钠、约0.005% (w/v) 的聚山梨酯80 (PS80)、约5% (w/v) 的海藻糖和约50mM的甘氨酸, 以及将AAV加入到组合物中。在代表性的方面, 该方法包括: 制备一种组合物, 如一种水溶液, 其包含约20mM的L-组氨酸、约60mM的氯化钠、约0.005% (w/v) 的聚山梨酯80 (PS80)、约35mM的海藻糖和约110mM的甘露醇, 以及将AAV加入到组合物中。在某些实施方式中, 将水溶液冻干。

[0103] 在某些实施方式中, 使用冻干法制备脱水组合物, 因此所述组合物 (例如含有AAV的组合物) 是冻干组合物。在一些情况下, 冻干组合物是通过升华将水从组合物中除去的组合物, 组合物中的水经历从固体到气体的相变。例如, 冻干组合物可以通过冷冻组合物将水从组合物中除去 (例如使组合物中的水冷冻), 然后降低组合物周围的压力, 使组合物中的水经历升华。如上所述, 冻干组合物可以含有少量水, 例如通过Karl Fischer (KF) 滴定法测定的水含量为25%以下、或20%以下、或15%以下、或10%以下、或9%以下、或8%以下、或7%以下、或6%以下、或5%以下、或4%以下、或3%以下、或2%以下、或1%以下、或0.5%以下、或0.25%以下、或0.1%以下。在某些实施例方案中, 通过Karl Fischer滴定法测定的冻干的组合物含有3%以下的水。在某些实施方式中, 通过Karl Fischer滴定法测定的冻干组合物含有2%以下的水。在某些实施方式中, 通过Karl Fischer滴定法测定的冻干组合物含有1%以下的水。在某些实施方式中, 通过Karl Fischer滴定法测定的冻干组合物含有0.5%以下的水。

[0104] 在冻干过程中, 组合物的温度可能会降低, 例如降低至低于组合物中水的冰点的温度。例如, 组合物的温度可能会降低至0℃以下、或-5℃以下、或-10℃以下、或-15℃以下、或-20℃以下、或-25℃以下、或-30℃以下、或-35℃以下、或-40℃以下、或-45℃以下、或-50℃以下、或-55℃以下、或-60℃以下、或-65℃以下、或-75℃以下。在某些情况下, 组合物的温度降低至-20℃。在某些情况下, 组合物的温度降至≤-60℃ (设定点为-80℃)。

[0105] 在某些实施方式中, 组合物周围的压力降低至标准大气压以下。例如组合物周围的压力可能会降低到500Torr以下, 如250Torr以下、或100Torr以下、或50Torr以下、或10Torr以下、或1Torr以下、或500mTorr以下、或400mTorr以下、或300mTorr以下、或200mTorr以下、或100mTorr以下、或90mTorr以下、或80mTorr以下、或70mTorr以下、或60mTorr以下、或50mTorr以下、或40mTorr以下、或30mTorr以下、或20mTorr以下、或10mTorr以下、或5mTorr以下、或1mTorr以下。在某些情况下, 组合物周围的压力降至40至50mTorr以下, 例如1.5至2mTorr。

[0106] 在一些实施方式中, 冻干还可以包括在组合物周围的压力降低的同时升高组合物的温度。例如, 组合物的温度可以从如上所述的最低温度升高至高于最低温度的温度。在一些情况下, 升高温度以促进组合物中的水在降低的环境压力下的升华。

[0107] 制备冻干AAV组合物的方法的实施方式还可以包括: 制备含水浓缩组合物, 然后将其冻干。

[0108] 在代表性的方面,方法包括:将含有AAV的组合物置于玻璃容器或塑料容器(例如玻璃瓶或塑料管)。在代表性的方面,玻璃容器或塑料容器是本领域已知的市售和/或如本文所述(参见例如实施例3)的任何一种。在代表性的方面,方法包括将约0.1mL至约10mL的含有AAV的组合物置于玻璃容器或塑料容器中。在代表性的方面,方法包括将约0.2mL至约6mL(例如约0.2mL、约0.3mL、约0.5mL、约5.6mL)的含有AAV的组合物置于玻璃容器或塑料容器中。本文公开了制备药物组合物的方法(参见例如实施例1和2)。

[0109] 将组合物置于容器中可以帮助于将组合物保持为无菌组合物。例如,容器可以构造成将封装在容器中的组合物保持在无菌的环境。这样的容器可以是密封容器,例如容器可以包括密封件,如防水密封和/或气密密封件。密封件可以从容器上移除,从而允许使用者取出容器中的内容物。在一些情况下,密封件可以是易碎密封件,或者在其他情况下,密封件可以构造成允许将针、套管或注射器插入容器的内部而无需从容器移除密封件。在一些情况下,将密封件构造成允许进入容器内部而无需从容器移除密封件,可以帮助于在对受试者施用组合物之前将容器的内容物(例如,容器中的组合物)保持在无菌环境中。密封件的适用材料包括:例如橡胶密封件或聚合物密封件,如但不限于硅橡胶、天然橡胶、丁苯橡胶、乙烯-丙烯共聚物、聚氯乙烯、聚丙烯酸酯、聚丁二烯、聚氨酯、苯乙烯丁二烯等,以及它们的组合。例如,在某些实施方式中,密封件是可被针、注射器或套管刺穿的隔膜。密封件还可以给样品从容器中取出提供便利,以及提供覆盖容器开口的保护屏障。在一些情况下,密封件是可移除的密封件,例如螺纹帽或卡扣帽或可以应用于容器开口的其他合适的密封件。例如,将样品添加到容器之前或之后,可以将螺纹帽拧在开口上。

[0110] 在一些情况下,容器是单位剂量容器。单位剂量容器是指含有用于向受试者施用的一种或多种单剂量的容器。在一些实施方式中,单位剂量容器包括预定量的受试者组合物,该受试者组合物含有经计算足以在受试者中产生期望效果的量。在某些实施方式中,将适合向个体施用的精确剂量的组成物提供在单位剂量容器中。向受试者施用的活性组成物的量取决于所治疗的受试者、痛苦的严重程度和施用方式。例如,单位剂量容器可以含有一定量的本发明公开的组合物,其量可在所治疗的受试者中达到所需的治疗效果。在某些情况下,单位剂量容器包括含有治疗有效量的AAV的组合物。在某些实施方式中,单位剂量容器是小瓶。在一些情况下,小瓶是密封的小瓶(例如,如上所述的密封容器)。

[0111] 容器可以由与AAV和组合物的其他组分相容的任何方便的材料组成。例如,容器可以配置成用于容纳固体(例如冻干组合物)的与固体相容的容器。在某些情况下,容器配置成容纳液体的与液体相容的容器。容器也可以是固体和液体相容的,其中容器配置成容纳固体和液体。在一些情况下,容器中的液体可以是含水液体,并且在这些情况下,容器可以与含水组合物相容。“相容的”是指容器对与容器接触的液体和/或组合物或其它组分基本上是惰性的(例如不会显著反应)。合适的容器材料的例子包括但不限于玻璃和塑料。例如,容器可以由玻璃构成,例如但不限于硅酸盐玻璃、硼硅酸盐玻璃、硼硅酸钠玻璃(例如PYREX™)、熔融石英玻璃、熔融二氧化硅玻璃等。用于容器的合适容器材料的其它实例包括塑料,例如但不限于聚丙烯、聚甲基戊烯、聚四氟乙烯(PTFE)、全氟醚(PFE)、氟化乙烯丙烯(FEP)、全氟烷氧基烷烃(PFA)、聚对苯二甲酸乙二醇酯(PET)、聚乙烯(PE)、聚醚醚酮(PEEK)、聚苯乙烯等。在某些情况下,如上所述,容器是小瓶,并因此可以是玻璃小瓶。如上所述,容器可以是密封容器,并因此可以是密封的玻璃小瓶。

[0112] 在代表性的方面,含有AAV的组合物置于玻璃或塑料容器中的体积为约0.1ml至约10ml、约0.1ml至约5ml、约0.2ml至约6ml、约0.2ml至约5ml、约0.25ml至约5ml、约2ml至约5ml、约2.5ml至约5ml、约3ml至约5ml、约4ml至约5ml、约5ml至约10ml、约6ml至约9ml或约7ml至约8ml。在代表性的方面,体积分约0.1ml、约0.2ml、约0.25ml、约0.3ml、约0.4ml、约0.5ml、约0.6ml、约0.7ml、约0.75ml、约0.8ml、约0.9ml、约1ml、约2ml、约2.5ml、约3ml、约4ml、约5ml、约5.5ml、约5.6ml、约6ml、约7ml、约7.5ml、约8ml、约9ml或约10ml。

[0113] 在代表性的方面,含有AAV的组合物在约-80℃至约-10℃的温度储存至少1个月(例如至少2个月、至少3个月、至少4个月、在至少5个月、至少6个月)。在代表性方面,含有AAV的组合物在约-60℃至约-20℃的温度储存至少1个月(例如至少2个月、至少3个月、至少4个月、至少5个月、至少6个月)。在代表性方面,含有AAV的组合物储存3、4、5或6个月以上时间。本文描述了储存组合物的方法(参见例如实施例1至3)。在代表性方面,在储存期(例如约3个月、约4个月、约5个月、或约6个月或更长的储存期)后,大于80%的初始量的AAV(例如储存前组合物中AAV的量)是有效的。在代表性方面,在储存期(例如约3个月、约4个月、约5个月、或约6个月或更长的储存期)后,大于90%的初始量的AAV是有效的。在代表性方面,在储存期(例如约3个月、约4个月、约5个月、或约6个月或更长的储存期)后,大于95%的初始量的AAV是有效的。在代表性方面,在储存期结束时AAV的生物效价与在储存期开始时AAV的生物效价基本相同。在代表性方面,在储存期结束时AAV的生物效价相对于储存期开始时AAV的生物效价增加。在代表性方面,组合物在储存期结束时的外观与储存期开始时的组合物基本相同。在代表性方面,组合物在储存期结束时的外观的特征是没有可见的颗粒。在代表性方面,组合物在储存期结束时的颗粒浓度基本上与储存期开始时组合物的颗粒浓度相同。在代表性方面,通过微流成像(MFI)确定储存期结束时组合物的颗粒浓度。

[0114] 本发明提供了一种治疗受试者病症的方法,所述病症通过基因治疗可治疗。在代表性的方面,该方法包括以有效治疗病症的量向受试者施用如本发明所述的药物组合物。在代表性的方面,该病症是出血性病症(例如血友病A或B),并且该方法包括以有效治疗出血性病症的量向受试者施用本发明的药物组合物。

[0115] 在代表性的方面,方法包括通过肠胃外给药施用药物组合物。术语“肠胃外”指不通过消化道而是通过其他途径。例如,本发明的制剂可以被配制成通过已知方法给药,例如静脉内给药(例如推注或连续输注一段时间)、通过肌内、腹膜内、脑脊髓内、皮下、关节内、滑膜内、鞘内、口服、局部或吸入途径。在某些实施方式中,本发明提供的AAV制剂可以全身给药或局部给药。全身给药包括但不限于:口服、皮下、腹膜内、皮下、经鼻、舌下或直肠给药。局部给药包括但不限于:局部、皮下、肌内和腹膜内给药。

[0116] 施用AAV用于受试者的基因治疗的方法是本领域已知的。参考例如Monahan, Gene therapy in an era of emerging treatment options for hemophilia B, J Thromb Haemost. 2015年6月;13(01):S151-S160.。

[0117] 可以例如通过注射或静脉内给药,将本公开的重构的组合物施用于受试者。在这些实施方式中,在将重构的组合物施用于受试者之前,可以将例如如上所述的固体组合物与液体组合,以提供适于例如通过注射或静脉内给药的液体组合物。在一些情况下,在将组合物施用于受试者之前,可以将固体组合物与水(例如注射用水,WFI)或缓冲/缓冲剂(例如如上所述)组合,以提供适于例如通过注射或静脉内给药的液体组合物。例如,冻干的组合

物可以用水(例如注射用水、WFI)或缓冲/缓冲剂(例如如上所述)重构,以产生适于例如通过注射或静脉注射施用于受试者的重构的剂量单位。

[0118] 在某些实施方式中,重构的剂量单位具有与生理条件相容的pH。在一些情况下,重构的剂量单位的pH范围为6至8。在一些情况下,重构的剂量单位的pH范围为7至8。例如重构的剂量单位的pH可以为7至7.5。在一些情况下,重构的剂量单位的pH为7.0。在一些情况下,重构的剂量单位的pH为7.1。在一些情况下,重构的剂量单位的pH为7.2。在某些情况下,重构的剂量单位的pH值为7.3。在某些情况下,重构的剂量单位的pH值为7.4。

[0119] 重构的剂量单位可以包括预定量的本发明的组合物,预定量经计算足以在受试者中产生期望的治疗效果。施用于受试者的重构的剂量单位的组合物的量可以取决于接受治疗的受试者、痛苦的严重程度和给药方式。例如,重构的剂量单位可以包括一定量的如本发明所述的以治疗有效量施用的组合物。

[0120] 当施用于受试者时,液体或重构的剂量单位可以包括治疗有效量的AAV,使重构的剂量单位释放 $1\text{E}+10\text{vp/ml}$ 至 $5\text{E}+15\text{vp/ml}$ 或 $1\text{E}+10\text{cp/ml}$ 至 $5\text{E}+15\text{cp/ml}$ 。

[0121] 在某些实施方式中,该方法包括根据治疗方案将液体或重构的剂量单位施用于受试者。例如在某些情况下,接受治疗的受试者可能已经由医疗保健提供者开具了治疗方案。在一些情况下,治疗方案包括但不限于:每天给药五次、每天给药四次、每天给药三次、每天给药两次、每天给药一次、每周给药三次、每周给药两次、每周给药一次、每两周给药一次、每三周给药一次、每月给药一次、每五周给药一次、每六周给药一次、每七周给药一次、每隔一个月给药一次,以及它们任何的组合。

[0122] 在一些实施方式中,治疗方案包括在延长的时间段内施用一个以上剂量。在某些情况下,向受试者施用单剂量(例如单剂量单位),并且初始剂量之后可以在随后的时间向受试者施用一剂或多剂。在一些情况下,向受试者施用超过一个剂量(例如,多于一个剂量单位),初始剂量之后可以在随后的时间向受试者施用一个以上剂量。例如可以向受试者施用单剂量(例如单剂量单位),并且单剂量之后可以在随后的时间向受试者施用单剂量。可以在随后的时间点施用另外的单剂量。在其它情况下,可以向受试者施用单剂量(例如单剂量单位),并且单剂量之后可以在随后的时间向受试者施用两个剂量。可以在随后的时间点施用另外的单剂量或多剂量。

[0123] 在某些实施方式中,例如,在联合治疗中,本发明的重构的剂量单位可以在用于治疗相关或不相关的病况的其他活性剂之前、同时或之后施用。这类其他疗法的实例包括放射疗法、手术疗法和化疗疗法。如果本发明的重构的剂量单位与其他活性剂同时提供,则本发明的重构的剂量单位可以以相同或不同的制剂提供。例如,根据特定的治疗方案,可以通过施用重构的剂量单位和具有至少一种其他活性剂(例如化学治疗剂,其组合提供治疗有效剂量)的药物组合物来实现同时治疗。单独的药物组合物的施用可以同时进行或在不同时间进行(例如顺序地、以任一顺序、在同一天或在不同的日子),只要在接受治疗的受试者中引起这些物质的组合的治疗有效效果。

[0124] 因此,本发明的方面还包括组合疗法。在某些实施方式中,主题方法包括施用治疗有效量的一种以上另外的活性剂。联合治疗是指AAV组合物(例如,如本文所述)可以与另一种治疗剂组合使用,来治疗单一疾病或病况。在某些实施方式中,本发明的化合物与另一种治疗剂的同时施用,所述另一种治疗剂可以作为包括本发明的化合物的组合物的组分或作

为不同组合物的组分施用。在某些实施方式中,在施用另一种治疗剂之前或之后,施用包含本发明化合物的组合物。

[0125] 以下实施例仅用于说明本发明,而不以任何方式限制其范围。

实施例

实施例1

[0126] 本实施例公开了初步研究,筛选到三种制剂用于进一步的开发。

[0127] 制造六种不同的制剂。简单来说,用PBS/NaCl/山梨糖醇缓冲液稀释包含大部分空衣壳材料的单个批次,得到180.8g。向溶液中加入0.005%禾大超精制吐温80,以防止溶液通过吸附造成过多的材料损失。将该溶液分成6份,每份含有30g原料。然后,使用Slide-A-Lyzer透析盒将缓冲溶液替换为六种缓冲液中的一种,用100倍的体积将该步骤进行三次。在三次透析步骤后,将每种透析液装入2-ml SiO₂的小瓶(填充体积=0.25ml)中,然后在-20±2℃和≤-60℃(设定点:-80℃)储存长达6个月,在5±3℃储存长达4个月。表1-6分别记载了制剂1-6(也称为缓冲液1-6和样品1-6)。

表1:制剂1:含有聚山梨酯80 (PS80) 的PBS/NaCl/山梨糖醇缓冲液

赋形剂	浓度 [mM]	浓度 g/kg 缓冲液
氯化钠	350	20.45
氯化钾	2.68	0.20
二水合磷酸氢二钠	8.09	1.44
磷酸二氢钾	1.47	0.20
D-山梨糖醇	5%	50.00
禾大超精制吐温 80 (PS80)	0.005%	0.05

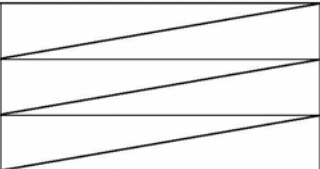
25 % 盐酸		调节 pH
1 M 氢氧化钠		
纯净水		加至 1 kg
pH 值	7.4±0.3	

表2:制剂2

赋形剂	浓度 [mM]	浓度 g/kg 缓冲液
L-组氨酸	20	3.103
氯化钠	70	4.091
蔗糖	5%	50.00
禾大超精制吐温 80 (PS80)	0.005%	0.050
纯净水		加至 1 kg
pH 值		
	7.5	

表3:制剂3

赋形剂	浓度 [mM]	浓度 g/kg 缓冲液
L-组氨酸	20	3.103
氯化钠	60	3.506
甘露醇	110	20.039
海藻糖二水合物	35	13.24
禾大超精制吐温 80 (PS80)	0.005%	0.05
纯净水		加至 1 kg
pH 值		7.0±0.1

表4:制剂4

赋形剂	浓度 [mM]	浓度 g/kg 缓冲液
L-组氨酸	10	1.552
氯化钠	100	5.844
甘氨酸	50	3.754
海藻糖二水合物	5%	50.00
禾大超精制吐温 80 (PS80)	0.005%	0.05
纯净水		加至 1 kg
pH 值		7.0±0.1

表5:制剂5

赋形剂	浓度 [mM]	浓度 g/kg 缓冲液
柠檬酸钠二水合物	15	4.41
甘氨酸	15	1.13
甘露醇	2%	20.00
海藻糖二水合物	1%	10.00
禾大超精制吐温 80 (PS80)	0.005%	0.05
纯净水		加至 1 kg
pH 值		7.3±0.1

表6:制剂6

赋形剂	浓度 [mM]	浓度 g/kg 缓冲液
三羟甲基氨基甲烷 (TRIS)	80	9.691
右旋糖酐 T40	1.77%	17.70
右旋糖酐 T10	0.53%	5.30
蔗糖	6.9%	69.00
禾大超精制吐温 80 (PS80)	0.005%	0.05
纯净水		加至 1 kg
pH 值	7.1	

[0128] 通过总rAAV颗粒ELISA,测定总颗粒滴度(空+完整)。通过SDS-PAGE(荧光染色,4-12%BisTris凝胶和Flamingo染色)测定AAV的纯度和化学降解。通过SEC和MFI测定了物理降解(受损的衣壳或碎片)。还测试了外观和pH值。

[0129] 在表7所示的测试时间点对储存在 $-20 \pm 2^\circ\text{C}$ 和 $\leq -60^\circ\text{C}$ (设定点: -80°C)的制剂测试MFI、外观、pH、总rAAV8颗粒ELISA、SDS-PAGE和SEC。“-”表示没有取样。

表7:在 $-20 \pm 2^\circ\text{C}$ 和 $\leq -60^\circ\text{C}$ (*设定点 -80°C)储存的样品的研究概要

测试	样品体积	测试时间点 (月)					总样品数量
		0	1	2 (8 周)	3	6	
MFI	3 ml	x	-	-	-	x	50
外观	1 ml	x	x	x	x	x	10
pH 值		x	x	x	x	x	
总 rAAV8 颗粒 ELISA	2x 0.3 ml	x	x	x	x	x	100
SDS-PAGE (荧光染色, 4-12%BisTris 凝胶和 Flamingo 染色)	0.3 ml	x	x	x	x	x	50
SEC	0.3 ml	x	x	x	x	x	50

[0130] 在表8所示的测试时间点对储存在 $5 \pm 3^\circ\text{C}$ 的制剂测试MFI、外观、pH、总rAAV8颗粒ELISA、SDS-PAGE和SEC。“-”表示没有取样。

表8:在 $5 \pm 3^\circ\text{C}$ 储存的样品的研究概要

测试	样品体积	测试时间点 (月)				总样品数量
		0	1	2 (8 周)	4	
MFI	3 ml	x	-	-	-	x
外观	1 ml	x	x	x	x	20
pH 值		x	x	x	x	
总 rAAV8 颗粒 ELISA	2x 0.3 ml	x	x	x	x	40
SDS-PAGE (荧光染色, 4-12%BisTris 凝胶和 Flamingo 染色)	0.3 ml	x	x	x	x	20
SEC	0.3 ml	x	x	x	x	20

[0131] 外观测试的结果如表9所示,其中使用肉眼观察的颗粒分类如下:A级=无可见颗粒;B级=小的单个粒子,几乎看不见;C级=小的单个颗粒,容易看见;D级=许多小颗粒,容易看见;E级=大于或等于1mm的可见粒子。

表9:在 $+5\pm 3^{\circ}\text{C}$ 、 $-20\pm 2^{\circ}\text{C}$ 和 $\leq -60^{\circ}\text{C}$ 储存的样品外观

测试时间点/在 $+5\pm 3^{\circ}\text{C}$ 的缓冲液	0 个月	1 个月	8 周	4 个月	
在 $+5\pm 3^{\circ}\text{C}$ 的缓冲液 1	A	A-B	A-B	C	
在 $+5\pm 3^{\circ}\text{C}$ 的缓冲液 2	A	A	A	A	
在 $+5\pm 3^{\circ}\text{C}$ 的缓冲液 3	A	A	A	A	
在 $+5\pm 3^{\circ}\text{C}$ 的缓冲液 4	A	A	A	A	
在 $+5\pm 3^{\circ}\text{C}$ 的缓冲液 5	A	A	A	A	
在 $+5\pm 3^{\circ}\text{C}$ 的缓冲液 6	A (黄色)	A (黄色)	A (黄色)	A (黄色)	
测试时间点/在 $-20\pm 2^{\circ}\text{C}$ 的缓冲液	0 个月	1 个月	8 周	3 个月	6 个月
在 $-20\pm 2^{\circ}\text{C}$ 的缓冲液 1	A	A-B	A-B	A-B	A-B
在 $-20\pm 2^{\circ}\text{C}$ 的缓冲液 2	A	A	A	A	A
在 $-20\pm 2^{\circ}\text{C}$ 的缓冲液 3	A	A	A	A	A
在 $-20\pm 2^{\circ}\text{C}$ 的缓冲液 4	A	A	A	A	A
在 $-20\pm 2^{\circ}\text{C}$ 的缓冲液 5	A	A	A	A	A
在 $-20\pm 2^{\circ}\text{C}$ 的缓冲液 6	A (黄色)	A (黄色)	A (黄色)	A (黄色)	A (黄色)
测试时间点/在 $\leq -60^{\circ}\text{C}$ 的缓冲液	0 个月	1 个月	8 周	3 个月	6 个月
在 $\leq -60^{\circ}\text{C}$ 的缓冲液 1	A	A-B	A-B	A	A
在 $\leq -60^{\circ}\text{C}$ 的缓冲液 2	A	A	A	A	A
在 $\leq -60^{\circ}\text{C}$ 的缓冲液 3	A	A	A	A	A
在 $\leq -60^{\circ}\text{C}$ 的缓冲液 4	A	A	A	A	A
在 $\leq -60^{\circ}\text{C}$ 的缓冲液 5	A	A	A	A	A
在 $\leq -60^{\circ}\text{C}$ 的缓冲液 6	A (黄色)	A (黄色)	A (黄色)	A (黄色)	A (黄色)

[0132] pH测定的结果如表10所示,样品在 $5\pm 3^{\circ}\text{C}$ 储存长达4个月和在 $-20\pm 2^{\circ}\text{C}$ 以及 $\leq -60^{\circ}\text{C}$ 储存长达6个月后解冻,pH没有显著变化。

表10:在 $+5\pm 3^{\circ}\text{C}$ 、 $-20\pm 2^{\circ}\text{C}$ 和 $\leq -60^{\circ}\text{C}$ 储存的总pH值

测试时间点/在 $+5\pm 3^{\circ}\text{C}$ 的缓冲液	目标 pH 值	0 个月	1 个月	8 周	4 个月	
在 $+5\pm 3^{\circ}\text{C}$ 的缓冲液 1	7.4	7.24	7.29	7.31	7.31	
在 $+5\pm 3^{\circ}\text{C}$ 的缓冲液 2	7.5	7.37	7.38	7.40	7.47	
在 $+5\pm 3^{\circ}\text{C}$ 的缓冲液 3	7.0	6.86	6.95	7.00	7.01	

在 $+5\pm 3^{\circ}\text{C}$ 的缓冲液 4	7.0	6.93	6.89	7.01	7.01	
在 $+5\pm 3^{\circ}\text{C}$ 的缓冲液 5	7.3	7.22	7.08	7.13	7.23	
在 $+5\pm 3^{\circ}\text{C}$ 的缓冲液 6	7.1	7.12	7.11	7.10	7.09	
测试时间点/在$-20\pm 2^{\circ}\text{C}$的缓冲液	目标 pH 值	0 个月	1 个月	8 周	3 个月	6 个月
在 $-20\pm 2^{\circ}\text{C}$ 的缓冲液 1	7.4	7.24	7.32	7.33	7.34	7.33
在 $-20\pm 2^{\circ}\text{C}$ 的缓冲液 2	7.5	7.37	7.37	7.42	7.40	7.38
在 $-20\pm 2^{\circ}\text{C}$ 的缓冲液 3	7.0	6.86	7.00	7.02	7.00	7.00
在 $-20\pm 2^{\circ}\text{C}$ 的缓冲液 4	7.0	6.93	6.97	6.99	6.97	6.99
在 $-20\pm 2^{\circ}\text{C}$ 的缓冲液 5	7.3	7.22	6.90	6.93	6.92	6.93
在 $-20\pm 2^{\circ}\text{C}$ 的缓冲液 6	7.1	7.12	6.88	6.98	6.98	6.98
测试时间点/在$\leq -60^{\circ}\text{C}$的缓冲液	目标 pH 值	0 个月	1 个月	8 周	3 个月	6 个月
在 $\leq -60^{\circ}\text{C}$ 的缓冲液 1	7.4	7.24	7.31	7.34	7.34	7.31
在 $\leq -60^{\circ}\text{C}$ 的缓冲液 2	7.5	7.37	7.40	7.42	7.41	7.39
在 $\leq -60^{\circ}\text{C}$ 的缓冲液 3	7.0	6.86	6.98	7.04	7.01	7.00
在 $\leq -60^{\circ}\text{C}$ 的缓冲液 4	7.0	6.93	6.89	7.00	7.00	7.00
在 $\leq -60^{\circ}\text{C}$ 的缓冲液 5	7.3	7.22	6.88	6.93	6.94	6.92
在 $\leq -60^{\circ}\text{C}$ 的缓冲液 6	7.1	7.12	6.86	6.98	6.98	6.97

[0133] AAV8滴定ELISA (AAV8titration ELISA) 的结果如表11所示。在 $5\pm 3^{\circ}\text{C}$ 、 $-20\pm 2^{\circ}\text{C}$ 和 $\leq -60^{\circ}\text{C}$ 储存时的所有结果在所研究的六种制剂之间没有显示出任何显著差异。显示了协调结果(用0.44计算)。

表11: 在 $+5\pm 3^{\circ}\text{C}$ 、 $-20\pm 2^{\circ}\text{C}$ 和 $\leq -60^{\circ}\text{C}$ 储存的计算出的AAV8滴定ELISA

测试时间点/在$+5\pm 3^{\circ}\text{C}$的缓冲液	0 个月	1 个月	8 周	4 个月	
在 $+5\pm 3^{\circ}\text{C}$ 的缓冲液 1	1.45E+13	1.74E+13	2.43E+13	1.77E+13	
在 $+5\pm 3^{\circ}\text{C}$ 的缓冲液 2	1.45E+13	1.57E+13	1.93E+13	1.80E+13	
在 $+5\pm 3^{\circ}\text{C}$ 的缓冲液 3	1.31E+13	1.49E+13	1.94E+13	1.64E+13	
在 $+5\pm 3^{\circ}\text{C}$ 的缓冲液 4	1.46E+13	1.57E+13	2.00E+13	1.92E+13	
在 $+5\pm 3^{\circ}\text{C}$ 的缓冲液 5	1.41E+13	1.52E+13	2.02E+13	1.72E+13	
在 $+5\pm 3^{\circ}\text{C}$ 的缓冲液 6	1.74E+13	1.88E+13	2.42E+13	2.09E+13	
测试时间点/在$-20\pm 2^{\circ}\text{C}$的缓冲液	0 个月	1 个月	8 周	3 个月	6 个月
在 $-20\pm 2^{\circ}\text{C}$ 的缓冲液 1	1.45E+13	1.58E+13	1.93E+13	1.89E+13	1.92E+13
在 $-20\pm 2^{\circ}\text{C}$ 的缓冲液 2	1.45E+13	1.59E+13	1.83E+13	1.87E+13	1.89E+13

在-20±2℃的缓冲液 3	1.31E+13	1.48E+13	1.70E+13	1.74E+13	1.71E+13
在-20±2℃的缓冲液 4	1.46E+13	1.57E+13	1.82E+13	1.86E+13	1.95E+13
在-20±2℃的缓冲液 5	1.41E+13	1.47E+13	1.78E+13	1.78E+13	1.81E+13
在-20±2℃的缓冲液 6	1.74E+13	1.89E+13	2.22E+13	2.29E+13	2.19E+13
测试时间点/在≤-60℃的缓冲液	0 个月	1 个月	8 周	3 个月	6 个月
在≤-60℃的缓冲液 1	1.45E+13	1.58E+13	2.03E+13	1.80E+13	1.72E+13
在≤-60℃的缓冲液 2	1.45E+13	1.57E+13	2.19E+13	1.86E+13	1.72E+13
在≤-60℃的缓冲液 3	1.31E+13	1.50E+13	1.76E+13	1.76E+13	1.73E+13
在≤-60℃的缓冲液 4	1.46E+13	1.65E+13	1.94E+13	1.78E+13	1.43E+13
在≤-60℃的缓冲液 5	1.41E+13	1.51E+13	1.82E+13	1.80E+13	1.64E+13
在≤-60℃的缓冲液 6	1.74E+13	1.98E+13	2.44E+13	2.13E+13	1.54E+13

[0134] 凝集百分比的测定结果如表12所示。制剂3在0个月时和在5±3℃和≤-60℃储存后出现更高的凝集值。所有其他缓冲液显示出波动的值。

表12: 在+5±3℃、-20±2℃和≤-60℃储存的凝集率[%]

测试时间点/在+5±3℃的缓冲液	0 个月	1 个月	8 周	4 个月	
在+5±3℃的缓冲液 1	1.55	1.50	1.90	1.84	
在+5±3℃的缓冲液 2	1.59	1.50	1.57	1.85	
在+5±3℃的缓冲液 3	2.34	1.75	2.00	1.98	
在+5±3℃的缓冲液 4	1.56	1.57	1.50	1.69	
在+5±3℃的缓冲液 5	1.72	1.81	1.49	1.81	
在+5±3℃的缓冲液 6	1.64	1.76	1.88	1.85	
测试时间点/在-20±2℃的缓冲液	0 个月	1 个月	8 周	3 个月	6 个月
在-20±2℃的缓冲液 1	1.55	1.47	2.21	1.31	1.41
在-20±2℃的缓冲液 2	1.59	1.52	2.24	1.43	1.42
在-20±2℃的缓冲液 3	2.34	1.49	1.74	1.37	1.44
在-20±2℃的缓冲液 4	1.56	1.58	1.58	1.38	1.50
在-20±2℃的缓冲液 5	1.72	1.70	1.43	1.90	1.54
在-20±2℃的缓冲液 6	1.64	1.69	2.78	2.41	1.87
测试时间点/在≤-60℃的缓冲液	0 个月	1 个月	8 周	3 个月	6 个月
在≤-60℃的缓冲液 1	1.55	1.54	2.30	1.38	1.47
在≤-60℃的缓冲液 2	1.59	1.53	1.70	1.46	1.51

在 $\leq -60^{\circ}\text{C}$ 的缓冲液 3	2.34	2.25	1.95	1.61	2.27
在 $\leq -60^{\circ}\text{C}$ 的缓冲液 4	1.56	1.52	1.63	1.49	1.46
在 $\leq -60^{\circ}\text{C}$ 的缓冲液 5	1.72	2.81	2.07	2.26	1.95
在 $\leq -60^{\circ}\text{C}$ 的缓冲液 6	1.64	1.58	1.93	1.47	1.59

[0135] SDS-PAGE测定结果如表13-18所示,显示在0、1、2、3、4和6个月时的测量。除了缓冲液1在 $5\pm 3^{\circ}\text{C}$ 储存4个月和在163kDa出现额外条带,所有样品在储存期间的所有温度均显示稳定性。

表13:储存时间=0个月的纯度和总结

条带	样品 1	样品 2	样品 3	样品 4	样品 5	样品 6
	条带%	条带%	条带%	条带%	条带%	条带%
VP1	15.85	15.33	16.11	16.58	16.62	16.43
VP2	22.55	22.92	22.08	23.58	23.4	24.51
VP3	61.6	61.75	61.82	59.84	59.98	59.06
VP1+VP2+VP3 总和	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00

表14A:在 $+5\pm 3^{\circ}\text{C}$ 下、储存时间=1个月的纯度和总结

条带	样品 1	样品 2	样品 3	样品 4	样品 5	样品 6
	泳道 3	泳道 4	泳道 5	泳道 6	泳道 7	泳道 8
	条带%	条带%	条带%	条带%	条带%	条带%
VP1	15.8	16.7	16.5	16.6	16.6	17.3
VP2	27.1	27.1	26.3	26.7	26.2	26.7
VP3	57.2	56.2	57.3	56.6	57.2	56.0
VP1+VP2+VP3 总和	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00

表14B:在 $-20\pm 2^{\circ}\text{C}$ 下、储存时间=1个月的纯度和总结

条带	样品 1	样品 2	样品 3	样品 4	样品 5	样品 6
	泳道 9	泳道 10	泳道 11	泳道 12	泳道 13	泳道 14
	条带%	条带%	条带%	条带%	条带%	条带%
VP1	16.8	16.7	16.3	17.1	16.6	17.0
VP2	26.1	26.2	26.2	26.2	25.4	26.3
VP3	57.2	57.1	57.5	56.8	58.1	56.7
VP1+VP2+VP3 总和	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00

表14C:在 $\leq -60^{\circ}\text{C}$ 下、储存时间=1个月的纯度和总结

条带	样品 1	样品 2	样品 3	样品 4	样品 5	样品 6
	泳道 15	泳道 16	泳道 17	泳道 18	泳道 19	泳道 20
	条带 %	条带 %	条带 %	条带 %	条带 %	条带 %
VP1	16.5	16.5	16.3	16.4	16.4	17.7
VP2	26.3	26.8	26.1	26.9	26.5	27.2
VP3	57.2	56.7	57.6	56.7	57.1	55.1
VP1+VP2+VP3 总和	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00

表15A:在 $+5\pm 3^{\circ}\text{C}$ 下、储存时间=2个月的纯度和总结

条带	样品 1	样品 2	样品 3	样品 4	样品 5	样品 6
	泳道 3	泳道 4	泳道 5	泳道 6	泳道 7	泳道 8
	条带 %	条带 %	条带 %	条带 %	条带 %	条带 %
VP1	15.3	16.2	16.3	16.3	16.6	16.9
VP2	26.6	26.5	26.4	26.4	26.5	26.4
VP3	58.1	57.3	57.3	57.4	56.9	56.7
VP1+VP2+VP3 总和	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00

表15B:在 $-20\pm 2^{\circ}\text{C}$ 下、储存时间=2个月的纯度和总结

条带	样品 1	样品 2	样品 3	样品 4	样品 5	样品 6
	泳道 9	泳道 10	泳道 11	泳道 12	泳道 13	泳道 14
	条带 %	条带 %	条带 %	条带 %	条带 %	条带 %
VP1	16.1	16.5	16.1	16.2	16.2	16.8
VP2	26.6	27.2	26.5	26.7	26.1	26.6
VP3	57.4	56.3	57.4	57.1	57.7	56.6
VP1+VP2+VP3 总和	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00

表15C:在 $\leq -60^{\circ}\text{C}$ 下、储存时间=2个月的纯度和总结

条带	样品 1	样品 2	样品 3	样品 4	样品 5	样品 6
	泳道 15	泳道 16	泳道 17	泳道 18	泳道 19	泳道 20
	条带 %	条带 %	条带 %	条带 %	条带 %	条带 %
VP1	16.4	16.5	16.4	16.7	16.9	17.7
VP2	26.5	26.8	26.4	26.5	26.7	27.3
VP3	57.1	56.6	57.2	56.7	56.5	55.0
VP1+VP2+VP3 总和	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00

表16A:在 $-20\pm 2^{\circ}\text{C}$ 下、储存时间=3个月的纯度和总结

条带	样品 1	样品 2	样品 3	样品 4	样品 5	样品 6
	泳道 5	泳道 6	泳道 7	泳道 8	泳道 9	泳道 10
	条带 %	条带 %	条带 %	条带 %	条带 %	条带 %
VP1	19.58	18.95	18.78	18.6	18.69	18.45
VP2	27.6	27.33	27.65	27.32	27.31	27.21
VP3	52.82	53.72	53.57	54.08	53.99	54.35
VP1+VP2+VP3 总和	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00

表16B:在 $\leq -60^{\circ}\text{C}$ 下、储存时间=3个月的纯度和总结

条带	样品 1	样品 2	样品 3	样品 4	样品 5	样品 6
	泳道 12	泳道 13	泳道 14	泳道 15	泳道 16	泳道 17
	条带 %	条带 %	条带 %	条带 %	条带 %	条带 %
VP1	18.6	18.49	18.91	19.14	19.08	19.07
VP2	27.06	26.6	27.69	27.04	27.81	27.57
VP3	54.34	54.92	53.4	53.82	53.12	53.36
VP1+VP2+VP3 总和	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00

表17:在 $+5\pm 3^{\circ}\text{C}$ 下、储存时间=4个月的纯度和总结

条带	样品 1	样品 2	样品 3	样品 4	样品 5	样品 6
	泳道 5	泳道 6	泳道 7	泳道 8	泳道 9	泳道 10
	条带 %	条带 %	条带 %	条带 %	条带 %	条带 %
	5.39					
VP1	15.75	17.96	18.03	18.42	17.99	17.66
VP2	27.73	27.83	28.56	28.27	29.06	28.2
VP3	51.12	54.21	53.42	53.31	52.94	54.14
VP1+VP2+VP3 总和	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00

表18A:在 $-20\pm 2^{\circ}\text{C}$ 下、储存时间=6个月的纯度和总结

条带	样品 1	样品 2	样品 3	样品 4	样品 5	样品 6
	泳道 5	泳道 6	泳道 7	泳道 8	泳道 9	泳道 10
	条带 %	条带 %	条带 %	条带 %	条带 %	条带 %
VP1	19.26	19.27	19.01	18.81	18.59	18.72
VP2	27.79	27.64	26.85	27.25	26.93	26.83
VP3	52.95	53.09	54.14	53.94	54.48	54.45
VP1+VP2+VP3 总和	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00

表18B:在 $\leq -60^{\circ}\text{C}$ 下、储存时间=6个月的纯度和总结

条带	样品 1	样品 2	样品 3	样品 4	样品 5	样品 6
	泳道 12	泳道 13	泳道 14	泳道 15	泳道 16	泳道 17
	条带 %	条带 %	条带 %	条带 %	条带 %	条带 %
VP1	18.63	18.33	18.46	18.73	18.8	18.94
VP2	26.83	26.61	27.29	26.5	26.53	27.16
VP3	54.54	55.07	54.25	54.77	54.67	53.9
VP1+VP2+VP3 总和	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00

[0136] 使用MFI测定材料中亚可见(subvisible)颗粒浓度的结果如表19-23所示。进行该测试观察AAV材料在 $5\pm 3^{\circ}\text{C}$ 下储存4个月和在 $-20\pm 2^{\circ}\text{C}$ 以及 $\leq -60^{\circ}\text{C}$ 下储存6个月时亚可见颗粒的产生情况。

表19:10 μm 以上颗粒的比较(个/ml)

样品	0个月	在 $+5\pm 3^{\circ}\text{C}$ 4个月	在 $-20\pm 2^{\circ}\text{C}$ 6个月	在 $\leq -60^{\circ}\text{C}$ 6个月
样品 1	515.89		478.03	606.05
样品 2	548.45	826.43	748.80	688.69
样品 3	550.95	1179.54	1570.22	1450.01
样品 4	578.50	593.53		668.66
样品 5	813.91	5086.30	4299.94	4675.59
样品 6	1014.25	437.65		

表20:25 μm 以上颗粒的比较(个/ml)

样品	0个月	在 $+5\pm 3^{\circ}\text{C}$ 4个月	在 $-20\pm 2^{\circ}\text{C}$ 6个月	在 $\leq -60^{\circ}\text{C}$ 6个月
样品 1	100.17		117.63	157.77
样品 2	95.16	127.72	175.30	152.76
样品 3	107.69	363.13	250.43	185.32
样品 4	120.21	107.69		152.76
样品 5	127.72	833.94	558.47	548.45
样品 6	272.97	83.00		

表21:在0个月时的颗粒浓度

测试	$\geq 1\mu\text{m}$	$\geq 2\mu\text{m}$	$\geq 5\mu\text{m}$	$\geq 10\mu\text{m}$	$\geq 25\mu\text{m}$	$\geq 50\mu\text{m}$	$\geq 70\mu\text{m}$
样品1	29107.85	9408.77	1803.12	515.89	100.17	20.03	7.51
样品2	34912.89	10653.43	1878.25	548.45	95.16	12.52	2.50
样品3	35030.59	10250.43	1783.08	550.95	107.69	25.04	10.02

样品4	30908.46	9303.59	1798.11	578.50	120.21	17.53	5.01
样品5	48681.70	12366.39	2376.61	813.91	127.72	20.03	2.50
样品6	39713.69	11710.25	2784.82	1014.25	272.97	67.62	35.06

表22:在 $+5\pm 3^{\circ}\text{C}$ 4个月后的颗粒浓度

测试内容	$\geq 1\mu\text{m}$	$\geq 2\mu\text{m}$	$\geq 5\mu\text{m}$	$\geq 10\mu\text{m}$	$\geq 25\mu\text{m}$	$\geq 50\mu\text{m}$	$\geq 70\mu\text{m}$
在 $+5\pm 3^{\circ}\text{C}$ 的样品2	22999.78	11469.84	3551.14	826.43	127.72	22.54	2.50
在 $+5\pm 3^{\circ}\text{C}$ 的样品3	11504.90	5088.80	2033.52	1179.54	363.13	72.63	40.07
在 $+5\pm 3^{\circ}\text{C}$ 的样品4	28096.10	9498.93	1808.13	593.53	107.69	27.55	10.02
在 $+5\pm 3^{\circ}\text{C}$ 的样品5	19516.26	11943.16	7798.49	5086.30	833.94	75.13	22.54
在 $+5\pm 3^{\circ}\text{C}$ 的样品6	20710.38	6235.25	1466.38	437.65	83.00	22.64	7.55

表23:在 $-20\pm 2^{\circ}\text{C}$ 和 $\leq -60^{\circ}\text{C}$ 6个月后的颗粒浓度

测试	$\geq 1\mu\text{m}$	$\geq 2\mu\text{m}$	$\geq 5\mu\text{m}$	$\geq 10\mu\text{m}$	$\geq 25\mu\text{m}$	$\geq 50\mu\text{m}$	$\geq 70\mu\text{m}$
在 -20°C 的样品 1	24131.83	6790.05	1501.67	478.03	117.63	45.05	12.51
在 $\leq -60^{\circ}\text{C}$ 的样品 1	24144.26	6836.83	1510.11	606.05	157.77	35.06	22.54
在 -20°C 的样品 2	44356.72	16899.23	3591.21	748.80	175.30	42.57	12.52
在 $\leq -60^{\circ}\text{C}$ 的样品 2	32438.61	9433.82	2036.02	688.69	152.76	40.07	22.54
在 -20°C 的样品 3	51606.76	9498.93	3032.75	1570.22	250.43	75.13	55.10
在 $\leq -60^{\circ}\text{C}$ 的样品 3	43041.95	9493.92	2874.97	1450.01	185.32	35.06	17.53
在 $\leq -60^{\circ}\text{C}$ 的样品 4	31191.45	8807.73	1930.84	668.66	152.76	32.56	10.02
在 -20°C 的样品 5	82750.63	17525.31	7695.81	4299.94	558.47	50.09	25.04
在 $\leq -60^{\circ}\text{C}$ 的样品 5	77216.06	19578.87	8812.74	4675.59	548.45	50.09	22.54

[0137] 渗透压重量摩尔浓度的测定结果如表24所示。

表24:渗透压重量摩尔浓度的测定

名称和制剂	mOsmol/kg
缓冲液 1 ⁷ : Chatham 缓冲液+0.005%PS80	990
缓冲液 2 ⁷ : 20mM 组氨酸、70mM 氯化钠、5 %蔗糖、0.005%PS80	309
缓冲液 3 ⁷ : 20mM 组氨酸、60mM 氯化钠、110mM 甘露醇、35mM 海藻糖二水合物、0.005%PS80	296
缓冲液 4 ⁷ : 10mM 组氨酸、100mM 氯化钠、50mM 甘氨酸、5%海藻糖二水合物、0.005%PS80	386
缓冲液 5 ⁷ : 15mM 柠檬酸钠缓冲液、15mM 甘氨酸、20g 甘露醇、10g 海藻糖二水合物、0.005%PS80	212
缓冲液 6 ⁷ : 80mM 三羟甲基氨基甲烷、葡聚糖 T10 和 T40、6.9%蔗糖、0.005%PS80	417

[0138] 综上所述,在 $5\pm 3^{\circ}\text{C}$ 4个月后和在 $-20\pm 2^{\circ}\text{C}$ 以及 $\leq -60^{\circ}\text{C}$ 6个月,六种制剂之间的AAV8滴定ELISA没有显著差异。制剂2-5的外观符合,而制剂1中形成少量颗粒,制剂6中观察

到浅黄色。通过SDS-PAGE (密度法) 测试,除制剂6和对照外,所有制剂在所有温度的储存期间均显示出稳定性。基于外观、亚可见颗粒测定 (MFI) 数据和渗透压重量摩尔浓度值,选择制剂2、3和4用于进一步开发。

实施例2

[0139] 本实施例公开了对三种制剂的额外测试和进一步的开发。

[0140] 制剂2、3和4 (缓冲液2、3和4; 样品2、3和4) 的制备基本同实施例1。简单来说,用PBS/NaCl/山梨糖醇缓冲液稀释单个批次,得到约90ml的溶液。将0.005% 禾大超精制PS80 掺入该溶液并等分成3份。通过Slide-A-Lyzer透析盒将缓冲液替换为三种不同缓冲液中的一种或对照缓冲液,用样品体积的100倍重复该步骤共3次。将3种不同的溶液填充到2mL具有SiO₂层的Schott I型玻璃小瓶中,并在下述温度储存。

[0141] 本实施例中,“缓冲液1”是指实施例1的制剂/缓冲液/样品2,“缓冲液2”是指实施例1的制剂/缓冲液/样品4,“缓冲液3”是指实施例1的制剂/缓冲液/样品3,“缓冲液4”是指PBS/NaCl/山梨糖醇缓冲液对照。为清楚起见,表25-28描述了本实施例的缓冲液1-3和PBS/NaCl/山梨糖醇缓冲液对照。

表25:缓冲液1 (制剂2)

赋形剂	浓度 [mM]	浓度 g/kg 缓冲液
L-组氨酸	20	3.103
氯化钠	70	4.09
蔗糖	5%	50.00
禾大超精制吐温 80 (PS80)	0.005%	0.05
纯净水		
pH 值		
	7.5	

表26:缓冲液2 (制剂4)

赋形剂	浓度 [mM]	浓度 g/kg 缓冲液
L-组氨酸	10	1.552
氯化钠	100	5.844
甘氨酸	50	3.754
海藻糖二水合物	5%	50
禾大超精制吐温 80 (PS80)	0.005%	0.05
纯净水		
pH 值		
	7.0±0.1	

表27:缓冲液3 (制剂3)

赋形剂	浓度 [mM]	浓度 g/kg 缓冲液
L-组氨酸	20	3.103
氯化钠	60	3.506
甘露醇	110	20.039
海藻糖二水合物	35	13.24
禾大超精制吐温 80 (PS80)	0.005%	0.05
纯净水		加至 1 kg
pH 值		7.0±0.1

表28:PBS/NaCl/山梨糖醇缓冲液对照

制剂	浓度 [mM]	浓度 g/kg 缓冲液
氯化钠	350	20.45
氯化钾	2.68	0.2
二水合磷酸氢二钠	8.09	1.44
磷酸二氢钾	1.47	0.2
D-山梨糖醇	5%	50.00
禾大超精制吐温 80 (PS80)	0.005%	0.05
25 % 盐酸		调节 pH
1 M 氢氧化钠		
纯净水		
pH 值		加至 1 kg
		7.4±0.3

[0142] 中期至长期稳定性的研究在 $\leq -60^{\circ}\text{C}$ (设定点: -80°C) 和 $-20 \pm 2^{\circ}\text{C}$ 下进行长达5个月(0、1、2、3和5个月)以及在 $5 \pm 3^{\circ}\text{C}$ 下进行长达4个月(0、1、2和4个月)。将制剂储存在2ml具有 SiO_2 层的Schott I型玻璃小瓶中。每个小瓶装有0.3mL制剂。进行表29列出的分析测试,并且在指定的储存温度每个测试下的测试时间点如表30和31所示。表30或31中的“-”表示没有取样。

表29:分析测试

质量属性	通过分析方法/原理检测
总体	聚山梨酯 80
	外观
	pH 值
活性	体外生物效价
	体内生物效价
	FIX-qPCR
总颗粒滴度 (空+完整)	总 rAAV8 颗粒 ELISA
AAV 纯度	SDS-PAGE (荧光染色, 4-12% BisTris 凝胶和 Flamingo 染色)
化学降解	
物理降解 (损坏的衣壳和碎片)	WAX [弱阴离子交换 HPLC]
	SEC [体积排阻 HPLC]

表30: 在 $-20 \pm 2^{\circ}\text{C}$ 和 $\leq -60^{\circ}\text{C}$ (设定点: -80°C) 储存的样品的研究概要

测试	样品体积	测试时间点 (月)					总样品数量
		0	1	2	3	5	
SDS-PAGE (荧光染色, 4-12% BisTris 凝胶和 Flamingo 染色)	0.3 ml	x	x	x	x	x	36
WAX [弱阴离子交换 HPLC]	0.3 ml	x	x	x	x	x	36
SEC [体积排阻 HPLC]	0.3 ml	x	x	x	x	x	36
体外生物效价	0.3 ml	x	x	x	x	x	36
体内生物效价	0.3 ml	x	x	-	-	x	20
FIX-qPCR	0.3 ml	x	x	x	x	x	36
总 rAAV8 颗粒 ELISA	2 x 0.3 ml	x	x	x	x	x	72
外观	1 ml	x	x	-	-	-	136
pH 值		x	x	-	-	-	12
聚山梨酯 80	0.3 ml	-	-	-	-	x	3

表31: 在 $+5 \pm 3^{\circ}\text{C}$ 下储存的样品的研究概要

		测试时间点 (月)				总样品数量
测试	样品体积	0	1	2	4	
SDS-PAGE (荧光染色, 4-12% BisTris 凝胶和 Flamingo 染色)	0.3 ml	x	x	x	x	16
WAX [弱阴离子交换 HPLC]	0.3 ml	x	x	x	x	16
SEC [体积排阻 HPLC]	0.3 ml	x	x	x	x	16
体外生物效价	0.3 ml	x	x	x	x	16
体内生物效价	0.3 ml	x	x	-	x	12
FIX-qPCR	0.3 ml	x	x	x	x	16
总 rAAV8 颗粒 ELISA	2 x 0.3 ml	x	x	x	x	32
外观	1 ml	x	x	x	x	56
pH 值		x	x	-	-	8

[0143] ELISA的结果如表32所示。AAV8滴定ELISA显示缓冲液4(对照)在 $5\pm 3^{\circ}\text{C}$ 储存期间出现材料的大量损失。将0个月时的 $5.61\times 10^{12}[\text{cp/ml}]$ 与4个月后的 2.71×10^{12} 相比较。对于在 $-20\pm 2^{\circ}\text{C}$ 和 $\leq -60^{\circ}\text{C}$ 下储存的相同材料,未观察到额外损失。缓冲液和1和2没有表现出任何材料损失。缓冲液3显示在储存期间没有降低的较低起始材料量。

表32:AAV8滴定ELISA

在+5±3℃的 AAV8 滴定 ELISA[cp/ml]	0 个月	在+5±3℃1 个月	在+5±3℃2 个月	在+5±3℃4 个月	
缓冲液 1	9.39E+12	7.46E+12	9.33E+12	8.56E+12	
缓冲液 2	1.01E+13	7.46E+12	9.17E+12	9.90E+12	
缓冲液 3	8.05E+12	6.69E+12	7.55E+12	8.03E+12	
缓冲液 4	5.61E+12	4.80E+12	3.82E+12	2.71E+12	
在-20±2℃的 AAV8 滴定 ELISA[cp/ml]	0 个月	在-20±2℃ 1 个月	在-20±2℃ 2 个月	在-20±2℃ 3 个月	在-20±2℃ 5 个月
缓冲液 1	9.93E+12	7.59E+12	8.73E+12	8.67E+12	9.83E+12
缓冲液 2	1.01E+13	7.81E+12	8.78E+12	9.17E+12	1.00E+13
缓冲液 3	8.05E+12	6.60E+12	7.55E+12	7.52E+12	8.17E+12
缓冲液 4	5.61E+12	5.35E+12	5.68E+12	5.17E+12	6.79E+12
在≤-60℃的 AAV8 滴定 ELISA[cp/ml]	0 个月	在≤-60℃ 1 个月	在≤-60℃ 2 个月	在≤-60℃ 3 个月	在≤-60℃ 5 个月
缓冲液 1	9.39E+12	7.35E+12	9.13E+12	8.58E+12	9.62E+12
缓冲液 2	1.01E+13	7.35E+12	9.46E+12	8.82E+12	9.98E+12
缓冲液 3	8.05E+12	6.14E+12	7.77E+12	7.22E+12	8.59E+12
缓冲液 4	5.61E+12	4.91E+12	6.45E+12	5.26E+12	6.00E+12

[0144] qPCR结果如表33所示。该测定获得的所有数据证实了ELISA和体外生物效价试验。缓冲液4显示出大量的测试变化。

表33:FIX-qPCR[v_g/ml]

在+5±3℃的 FIX-qPCR [v _g /ml]	0 个月	在+5±3℃1 个月	在+5±3℃2 个月	在+5±3℃4个 月	
缓冲液 1	6.11E+12	4.34E+12	1.74E+12	4.65E+12	
缓冲液 2	4.34E+12	4.60E+12	5.16E+12	4.14E+12	
缓冲液 3	3.66E+12	3.53E+12	3.86E+12	3.49E+12	
缓冲液 4	1.62E+12	1.63E+12	1.92E+12	4.98E+12	

在-20±2 °C 的 FIX-qPCR [vg/ml]	0 个月	在-20±2°C 1 个月	在-20±2°C 2 个月	在-20±2°C 3 个月	在-20±2°C 5 个月
缓冲液 1	6.11E+12	3.42E+12	4.42E+12	4.10E+12	4.07E+12
缓冲液 2	4.34E+12	3.57E+12	4.12E+12	4.01E+12	4.20E+12
缓冲液 3	3.66E+12	2.23E+12	3.44E+12	3.51E+12	3.79E+12
缓冲液 4	1.62E+12	4.33E+12	2.70E+12	3.29E+12	2.06E+12
在≤ -60 °C 的 FIX-qPCR [vg/ml]	0 个月	在≤-60°C 1 个月	在≤-60°C 2 个月	在≤-60°C 3 个月	在≤-60°C 5 个月
缓冲液 1	6.11E+12	4.59E+12	4.67E+12	4.06E+12	4.35E+12
缓冲液 2	4.34E+12	3.78E+12	4.77E+12	2.78E+12	4.37E+12
缓冲液 3	3.66E+12	2.57E+12	3.68E+12	3.48E+12	3.37E+12
缓冲液 4	1.62E+12	1.47E+12	1.97E+12	1.60E+12	1.86E+12

[0145] 凝集率%的测量结果如表34所示。观察到在5±3°C储存4个月后凝集值降低。缓冲液4在3个月后从1.55%增加至3.39%，并且在4个月后没有凝集物。缓冲液3在≤-60°C 2个月达到高水平的6.64%，3个月后降至3.25%，并且5个月后降至3.94%。

表34:凝集率[%]

在+5±3 °C 的凝集率[%]	0 个月	在+5±3°C 1 个月	在+5±3°C 2 个月	在+5±3°C 4 个月	
缓冲液 1	2.39	2.34	2.26	1.40	
缓冲液 2	2.46	2.13	2.55	1.36	
缓冲液 3	2.65	2.49	2.79	1.39	
缓冲液 4	1.55	3.39	3.39	0.00	
在-20±2 °C 的凝集率[%]	0 个月	在-20±2°C 1 个月	在-20±2°C 2 个月	在-20±2°C 3 个月	在-20±2°C 5 个月
缓冲液 1	2.39	2.35	2.49	2.46	2.81
缓冲液 2	2.46	2.30	2.48	2.42	2.47
缓冲液 3	2.65	2.62	2.91	2.79	2.85
缓冲液 4	1.55	3.06	3.24	3.73	3.66
在≤ -60 °C 的凝集率[%]	0 个月	在≤-60°C 1 个月	在≤-60°C 2 个月	在≤-60°C 3 个月	在≤-60°C 5 个月
缓冲液 1	2.39	2.24	2.26	2.12	2.56
缓冲液 2	2.46	2.20	2.50	2.57	2.39
缓冲液 3	2.65	3.39	6.64	3.25	3.94
缓冲液 4	1.55	2.28	2.01		2.90

[0146] 弱阴离子交换 (WAX) 对完整衣壳的测定结果在所有的测试时间点和储存温度没有显示有意义的差异(表35)。

表35:完整衣壳[%]

在 $+5\pm 3^{\circ}\text{C}$ 的完整衣壳[%]	0 个月	在 $+5\pm 3^{\circ}\text{C}$ 1 个月	在 $+5\pm 3^{\circ}\text{C}$ 2 个月	在 $+5\pm 3^{\circ}\text{C}$ 4 个月	
缓冲液 1	61	62	67	62	
缓冲液 2	62	64	65	61	
缓冲液 3	63	62	64	63	
缓冲液 4	62	62	66	58	
在 $-20\pm 2^{\circ}\text{C}$ 的完整衣壳[%]	0 个月	在 $-20\pm 2^{\circ}\text{C}$ 1 个月	在 $-20\pm 2^{\circ}\text{C}$ 2 个月	在 $-20\pm 2^{\circ}\text{C}$ 3 个月	在 $-20\pm 2^{\circ}\text{C}$ 5 个月
缓冲液 1	61	64	68	63	62
缓冲液 2	62	63	66	61	61
缓冲液 3	63	62	66	63	61
缓冲液 4	62	62	64	63	60
在 $\leq -60^{\circ}\text{C}$ 的完整衣壳[%]	0 个月	在 $\leq -60^{\circ}\text{C}$ 1 个月	在 $\leq -60^{\circ}\text{C}$ 2 个月	在 $\leq -60^{\circ}\text{C}$ 3 个月	在 $\leq -60^{\circ}\text{C}$ 5 个月
缓冲液 1	61	64	64	61	60
缓冲液 2	62	62	65	63	63
缓冲液 3	63	63	65	62	61
缓冲液 4	62	63	66	62	61

[0147] 体外生物效价的测定结果如表36所示。在测试变化范围内,缓冲液1、缓冲液2和缓冲液3显示出相似的波动值。缓冲液4在 $5\pm 3^{\circ}\text{C}$ 下储存4个月后显示出较高程度的降低。在所有其他缓冲液、测试时间点和温度,检测到可比较的结果。

表36:体外生物效价[BPU]

在 $+5\pm 3^{\circ}\text{C}$ 的体外生物效价[BPU]	0 个月	在 $+5\pm 3^{\circ}\text{C}$ 1 个月	在 $+5\pm 3^{\circ}\text{C}$ 2 个月	在 $+5\pm 3^{\circ}\text{C}$ 4 个月	
缓冲液 1	1.05	0.87	1.05	1.22	
缓冲液 2	0.85	1.02	1.02	1.07	
缓冲液 3	0.78	0.90	1.14	1.20	
缓冲液 4	0.67	0.65	0.57	0.13	
在 $-20\pm 2^{\circ}\text{C}$ 的体外生物效价[BPU]	0 个月	在 $-20\pm 2^{\circ}\text{C}$ 1 个月	在 $-20\pm 2^{\circ}\text{C}$ 2 个月	在 $-20\pm 2^{\circ}\text{C}$ 3 个月	在 $-20\pm 2^{\circ}\text{C}$ 5 个月
缓冲液 1	1.05	0.83	1.23	1.09	1.24
缓冲液 2	0.85	0.84	1.11	0.97	1.35
缓冲液 3	0.78	0.68	0.94	1.13	1.25
缓冲液 4	0.67	1.93	1.76	0.79	1.18
在 $\leq -60^{\circ}\text{C}$ 的体外生物效价[BPU]	0 个月	在 $\leq -60^{\circ}\text{C}$ 1 个月	在 $\leq -60^{\circ}\text{C}$ 2 个月	在 $\leq -60^{\circ}\text{C}$ 3 个月	在 $\leq -60^{\circ}\text{C}$ 5 个月
缓冲液 1	1.05	1.15	1.10	1.01	1.34
缓冲液 2	0.85	1.09	0.80	0.96	1.21
缓冲液 3	0.78	0.83	0.96	0.94	1.12
缓冲液 4	0.67	0.80	0.98	0.68	1.08

[0148] 体内生物效价的测定结果如表37所示。缓冲液1-3的结果在测试变化范围内出现了波动。缓冲液4从0个月时的3.70[IU/ml]降低至在 $5\pm 3^{\circ}\text{C}$ 下4个月后的1.33[IU/ml],并且从0个月时的3.79[IU/ml]增加至在 $\leq -60^{\circ}\text{C}$ 下4个月后的6.73[IU/ml]。第7天的结果与第14

天的结果相似。将在 $\leq -60^{\circ}\text{C}$ 下储存1个月后的结果作为参考值,代表在所有储存温度下的第0个月。

表37:第14天的体内生物效价[IU/ml]结果

在 $+5\pm 3^{\circ}\text{C}$ 的体内生物效价[IU/ml]	第0个月 第14天	在 $+5\pm 3^{\circ}\text{C}$ 1个月,第 14天	在 $+5\pm 3^{\circ}\text{C}$ 2个月,第 14天	在 $+5\pm 3^{\circ}\text{C}$ 3个月,第 14天	在 $+5\pm 3^{\circ}\text{C}$ 4个月,第 14天	
缓冲液 1	3.48 $\pm$ 1.28	5.91 $\pm$ 1.33	4.82 $\pm$ 0.63		4.76 $\pm$ 0.55	
缓冲液 2	4.99 $\pm$ 0.74	5.49 $\pm$ 0.64	5.27 $\pm$ 0.84		5.36 $\pm$ 1.80	
缓冲液 3	4.43 $\pm$ 1.15	6.42 $\pm$ 0.89	4.64 $\pm$ 1.42		5.58 $\pm$ 0.68	
缓冲液 4	3.79 $\pm$ 0.70	3.43 $\pm$ 0.61	2.77 $\pm$ 0.44		1.33 $\pm$ 0.26	
在 $-20\pm 2^{\circ}\text{C}$ 的体内生物效价[IU/ml]	第0个月 第14天	在 $-20\pm 2^{\circ}\text{C}$ 1个月,第 14天	在 $-20\pm 2^{\circ}\text{C}$ 2个月,第 14天	在 $-20\pm 2^{\circ}\text{C}$ 3个月,第 14天	在 $-20\pm 2^{\circ}\text{C}$ 4个月,第 14天	在 $-20\pm 2^{\circ}\text{C}$ 5个月,第 14天
缓冲液 1	3.48 $\pm$ 1.28			5.09 $\pm$ 2.25	4.97 $\pm$ 1.30	5.28 $\pm$ 0.55
缓冲液 2	4.99 $\pm$ 0.74			5.85 $\pm$ 0.74	4.88 $\pm$ 1.44	5.04 $\pm$ 0.70
缓冲液 3	4.43 $\pm$ 1.15			4.34 $\pm$ 1.62	5.16 $\pm$ 0.79	5.03 $\pm$ 1.00
缓冲液 4	3.79 $\pm$ 0.70			3.42 $\pm$ 1.46	4.20 $\pm$ 1.74	4.39 $\pm$ 0.76
在 $\leq -60^{\circ}\text{C}$ 的体内生物效价[IU/ml]	第0个月 第14天	在 $\leq -60^{\circ}\text{C}$ 1个月,第 14天	在 $\leq -60^{\circ}\text{C}$ 2个月,第 14天	在 $\leq -60^{\circ}\text{C}$ 3个月,第 14天	在 $\leq -60^{\circ}\text{C}$ 4个月,第 14天	在 $\leq -60^{\circ}\text{C}$ 5个月,第 14天
缓冲液 1	3.48 $\pm$ 1.28	3.48 $\pm$ 1.28				5.99 $\pm$ 1.58
缓冲液 2	4.99 $\pm$ 0.74	4.99 $\pm$ 0.74				5.68 $\pm$ 1.02
缓冲液 3	4.43 $\pm$ 1.15	4.43 $\pm$ 1.15				4.63 $\pm$ 1.33
缓冲液 4	3.79 $\pm$ 0.70	3.79 $\pm$ 0.70				6.73 $\pm$ 0.90

表38:第7天的体内生物效价[IU/ml]结果

在 $+5\pm 3^{\circ}\text{C}$ 的体内生物效价[IU/ml]	0个月第7天	在 $+5\pm 3^{\circ}\text{C}$ 1个月,第 7天	在 $+5\pm 3^{\circ}\text{C}$ 2个月,第 7天	在 $+5\pm 3^{\circ}\text{C}$ 3个月,第 7天	在 $+5\pm 3^{\circ}\text{C}$ 4个月,第 7天	
缓冲液 1	2.35 $\pm$ 0.79	3.86 $\pm$ 0.93	3.15 $\pm$ 0.29		2.70 $\pm$ 0.32	
缓冲液 2	3.41 $\pm$ 0.55	3.31 $\pm$ 0.68	3.81 $\pm$ 0.74		3.46 $\pm$ 0.23	
缓冲液 3	3.29 $\pm$ 0.25	3.58 $\pm$ 0.59	3.09 $\pm$ 0.76		3.12 $\pm$ 0.36	
缓冲液 4	2.30 $\pm$ 0.48	2.00 $\pm$ 0.40	1.68 $\pm$ 0.30		0.80 $\pm$ 0.04	
在 $-20\pm 2^{\circ}\text{C}$ 的体内生物效价[IU/ml]	0个月第7天	在 $-20\pm 2^{\circ}\text{C}$ 1个月,第 7天	在 $-20\pm 2^{\circ}\text{C}$ 2个月,第 7天	在 $-20\pm 2^{\circ}\text{C}$ 3个月,第 7天	在 $-20\pm 2^{\circ}\text{C}$ 4个月,第 7天	在 $-20\pm 2^{\circ}\text{C}$ 5个月,第 7天
缓冲液 1	2.35 $\pm$ 0.79			3.20 $\pm$ 1.40	2.91 $\pm$ 0.81	3.29 $\pm$ 0.56

缓冲液 2	3.41±0.55			3.60±0.55	3.01±0.80	3.01±0.64
缓冲液 3	3.29±0.25			3.04±1.11	3.12±0.56	3.18±0.69
缓冲液 4	2.30±0.48			1.84±0.80	0.80±0.04	2.46±0.45
在≤ -60℃ 的体内生物效价[IU/ml]	0 个月第 7 天	在≤ -60℃ 1 个月, 第 7 天	在≤ -60℃ 2 个月, 第 7 天	在≤ -60℃ 3 个月, 第 7 天	在≤ -60℃ 4 个月, 第 7 天	在≤ -60℃ 5 个月, 第 7 天
缓冲液 1	2.35±0.79	2.35±0.79				4.02±1.11
缓冲液 2	3.41±0.55	3.41±0.55				3.58±1.07
缓冲液 3	3.29±0.25	3.29±0.97				2.67±0.74
缓冲液 4	2.30±0.48	2.30±0.48				3.53±0.46

[0149] SDS PAGE密度测定的结果如表39-44所示。在 $5\pm 3^{\circ}\text{C}$ 储存长达4个月和在 $-20\pm 2^{\circ}\text{C}$ 以及 $\leq -60^{\circ}\text{C}$ 储存长达5个月的期间,未观察到其它条带。

表39: 储存0个月的纯度和总结

载体蛋白	HT6AR00G (参考) 10μg/ml	样品 1	样品 2	样品 3	样品 4
	泳道 3	平均值 L5-L7	平均值 L9-L11	平均值 L13-L15	平均值 L17-L19
	条带%	条带%	条带%	条带%	条带%
VP1	11.4	17.5	17.5	17.2	15.6
VP2	10.9	19.9	20.9	20.4	18.8
VP3	77.7	62.6	61.6	62.4	65.6
VP1+VP2+VP3 总和 (纯度)	100	100	100	100	100

表40: 储存1个月的纯度和总结

载体蛋白	参考	在 $+5\pm 3^{\circ}\text{C}$ 1 个月				在 $-20\pm 2^{\circ}\text{C}$ 1 个月				在 $-60\pm 2^{\circ}\text{C}$ 1 个月			
	HT6AR00G 10μg/ml	缓冲液 1	缓冲液 2	缓冲液 3	缓冲液 4	缓冲液 1	缓冲液 2	缓冲液 3	缓冲液 4	缓冲液 1	缓冲液 2	缓冲液 3	缓冲液 4
	泳道 3	泳道 5	泳道 6	泳道 7	泳道 8	泳道 10	泳道 11	泳道 12	泳道 13	泳道 15	泳道 16	泳道 17	泳道 18
	条带%	条带%	条带%	条带%	条带%	条带%	条带%	条带%	条带%	条带%	条带%	条带%	条带%
VP1	7.49	15.63	15.95	15.82	14.06	14.91	15.34	15.72	14.22	15.31	15.27	14.99	14.35
VP2	10.96	18.16	18.18	18.56	16.12	17.05	18.33	18.14	17.65	19.18	19.48	18.33	17.36
VP3	81.54	66.21	65.88	65.62	69.82	68.04	66.32	66.14	68.13	65.51	65.25	66.69	68.29
VP1+VP2+VP3 总和 (纯度)	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100

表41: 储存2个月的纯度和总结

载体蛋白	参考	在+5±3℃2个月				在-20±2℃2个月				在-60±2℃2个月			
	HT6AR00G 10μg/ml	缓冲液 1	缓冲液 2	缓冲液 3	缓冲液 4	缓冲液 1	缓冲液 2	缓冲液 3	缓冲液 4	缓冲液 1	缓冲液 2	缓冲液 3	缓冲液 4
	泳道 3	泳道 5	泳道 6	泳道 7	泳道 8	泳道 10	泳道 11	泳道 12	泳道 13	泳道 15	泳道 16	泳道 17	泳道 18
	条带%	条带%	条带%	条带%	条带%	条带%	条带%	条带%	条带%	条带%	条带%	条带%	条带%
VP1	6.33	12.14	12.92	12.1	8.7	12.28	14.09	11.8	10.82	12.28	12.61	12.25	10.96
VP2	7.46	19.79	19.24	17.78	14.62	18.84	18.26	16.97	15.28	18.77	19.45	17.87	16.08
VP3	86.21	68.07	67.84	70.12	76.68	68.87	67.65	71.24	73.9	68.95	67.95	69.88	72.96
VP1+VP2+VP3 总和 (纯度)	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100

表42: 储存3个月的纯度和总结

载体蛋白	参考	在-20±2℃3个月				在-60±2℃3个月			
	HT6AR00G 10μg/ml	缓冲液 1	缓冲液 2	缓冲液 3	缓冲液 4	缓冲液 1	缓冲液 2	缓冲液 3	缓冲液 4
	泳道 3	泳道 5	泳道 6	泳道 7	泳道 8	泳道 10	泳道 11	泳道 12	泳道 13
	条带%	条带%	条带%	条带%	条带%	条带%	条带%	条带%	条带%
VP1	7.1	16.73	16.75	16.63	14.98	15.93	16	16.05	13.3
VP2	6.56	20.94	21.9	21.02	17.77	21.07	21.89	19.95	16.14
VP3	86.34	62.32	61.35	62.36	67.25	63	62.11	64.01	70.55
VP1+VP2+VP3 总和 (纯度)	100	100	100	100	100	100	100	100	100

表43: 储存4个月的纯度和总结

载体蛋白	参考	在+5±3℃4个月			
	HT6AR00G 10μg/ml	缓冲液 1	缓冲液 2	缓冲液 3	缓冲液 4
	泳道 3	泳道 5	泳道 6	泳道 7	泳道 8
	条带%	条带%	条带%	条带%	条带%
VP1	12.13	16.16	17.45	16.44	11.35
VP2	14.66	24.2	22.36	21.25	10.1
VP3	73.2	59.65	60.19	62.3	78.55
VP1+VP2+VP3 总和 (纯度)	100	100	100	100	100

表44: 储存5个月的纯度和总结

	参考	在-20±2℃ 5个月				在-60±2℃ 5个月			
	HT6AR00G 10μg/ml	缓冲液 1	缓冲液 2	缓冲液 3	缓冲液 4	缓冲液 1	缓冲液 2	缓冲液 3	缓冲液 4
	泳道 3	泳道 5	泳道 6	泳道 7	泳道 8	泳道 10	泳道 11	泳道 12	泳道 13
	条带%	条带%	条带%	条带%	条带%	条带%	条带%	条带%	条带%
VP1	11.51	17.45	17.52	17.2	14.68	16.65	16.91	16.83	15.24
VP2	16.44	22.43	23.27	22.5	19.7	22.46	22.69	22.38	20.38
VP3	72.05	60.12	59.2	60.3	65.62	60.89	60.4	60.79	64.37
VP1+VP2+VP3 总和(纯度)	100	100	100	100	100	100	100	100	100

[0150] 外观测试的结果如表45-48所示,其中使用肉眼观察的颗粒分类如下:A级=无可见颗粒;B级=小的单个粒子,几乎看不见;C级=小的单个颗粒,容易看见;D级许多小颗粒,容易看见;E级=大于或等于1mm的可见粒子。在 $5\pm 3^{\circ}\text{C}$ 、 $-20\pm 2^{\circ}\text{C}$ 和 $\leq -60^{\circ}\text{C}$ (设定点: -80°C)1个月后,所有样品的外观均为澄清、无色的溶液,无可见颗粒(在下文和整个说明书均表示为“符合”)。

表45:在 $+25\pm 2^{\circ}\text{C}$ 下48小时期间的外观

在 $+25\pm 2^{\circ}\text{C}$ 的外观	起始材料	1.5 小时	3 小时	4.5 小时	6 小时	24 小时	48 小时
AAV8 颗粒的浓度: $8.8\text{E}+12$ [cp/ml]							
缓冲液 1	A	A	A	A	A	A	A
缓冲液 2	A	A	A	A	A	A	A
缓冲液 3	A	A	A	A	A	A	A
缓冲液 4	A	A	A	A-B	A-B	A	A-B
AAV8 颗粒的浓度: $17.6\text{E}+12$ [cp/ml]							
缓冲液 1	A	A	A	A	A	A	A
缓冲液 2	A	A	A	A	A	A	A
缓冲液 3	A	A	A	A	A	A	A
缓冲液 4	A	A	B	A-B	A-B	A-B	A-B

表46:在 $+5\pm 3^{\circ}\text{C}$ 下4个月期间的外观

在 $+5\pm 3^{\circ}\text{C}$ 的外观	无菌过滤后短 时间的起始材 料	在 $+5\pm 3^{\circ}\text{C}$ 下 6 天后的起始 材料	1 个 月	2 个月	4 个月	4 个月
AAV8 颗粒的浓度: $8.8\text{E}+12$ [cp/ml]						
缓冲液 1	A	符合标准	A	A	A	符合
缓冲液 2	A		A	A	A	符合
缓冲液 3	A		A	A	A	符合

缓冲液 4	A	澄清、无色、有可见颗粒	A-B	A-B (2 个纤维)	A-B (2 个纤维)	符合
AAV8 颗粒的浓度: 17.6E+12 [cp/ml]						
缓冲液 1	A	符合标准	A	A	A	符合
缓冲液 2	A		A	A	A	符合
缓冲液 3	A		A	A	A	符合
缓冲液 4	A	澄清、无色、有可见颗粒	A-B	A-B (4 个纤维)	A-B (4 个纤维, > 5 个颗粒)	不符合, 白色颗粒> 10

表47:在-20±2℃6个月期间的外观

在-20±2℃的外观	无菌过滤后短时间的起始材料	在-20±2℃冷冻后的起始材料	在-20±2℃冷冻后的起始材料	1个月	2个月	3个月	4个月	6个月	6个月
AAV8 颗粒的浓度: 8.8E+12 [cp/ml]									
缓冲液 1	A	A	符合	A	A	A	符合	A	符合
缓冲液 2	A	A-B	符合	A	A	A	符合	A	符合
缓冲液 3	A	A	符合	A	A	A-B	符合	A-B	符合
缓冲液 4	A	B (1 个颗粒)	澄清、无色、有可见颗粒	A-B	A-B (3 个纤维)	B (>5 个颗粒)	不符合, 白色颗粒> 5	C (>6 个纤维)	澄清无色溶液, 可见颗粒>10
AAV8 颗粒的浓度: 17.6E+12 [cp/ml]									
缓冲液 1	A	A-B	符合	A	A	A-B	符合	A-B	符合
缓冲液 2	A	A-B	符合	A	A	A	符合	A	符合
缓冲液 3	A	A-B	符合	A	A	A-B	符合	A-B	符合
缓冲液 4	A	B	澄清、无色、有可见颗粒	A-B	A-B (2 个纤维)	C (3 个纤维, >5 个颗粒)	不符合, 白色颗粒> 5	C (3 个纤维, >10 个颗粒)	澄清无色溶液, 可见颗粒> 10

表48:在≤-60℃6个月期间的外观

在≤-60℃的外观	无菌过滤后短时间的起始材料	在≤-60℃冷冻后的起始材料	1个月	2个月	3个月	6个月	6个月
-----------	---------------	----------------	-----	-----	-----	-----	-----

AAV8 颗粒的浓度: 8.8E+12 [cp/ml]							
缓冲液 1	A	A	A	A	A	A	符合
缓冲液 2	A	A	A	A	A	A	符合
缓冲液 3	A	A	A	A	A	A	符合
缓冲液 4	A	A-B	A-B	A-B (3 个纤维)	A-B (4 个纤维)	A-B	符合
AAV8 颗粒的浓度: 17.6E+12[cp/ml]							
缓冲液 1	A	A	A	A	A	A	符合
缓冲液 2	A	A	A	A	A	A	符合
缓冲液 3	A	A	A	A	A	A	符合
缓冲液 4	A	A-B	A-B	A-B (3 个纤维)	A-B (4 个纤维)	B-C (>5 个纤维)	澄清无色 溶液, 可见 颗粒>10

[0151] 0个月时和在指定温度储存1个月后缓冲液/制剂的pH值如表49所示。

表49:1个月的pH值

在+5±3℃的pH值	目标pH值	0个月	在+5±3℃1个月
缓冲液1	7.5	7.45	7.46
缓冲液2	7.0	6.95	6.94
缓冲液3	7.0	7.00	6.98
缓冲液4	7.4	7.34	7.31
在-20±2℃的pH值	目标pH值	0个月	在-20±2℃1个月
缓冲液1	7.5	7.45	7.44
缓冲液2	7.0	6.95	6.96
缓冲液3	7.0	7.00	6.99
缓冲液4	7.4	7.34	7.33
在≤-60℃的pH值	目标pH值	0个月	在≤-60℃1个月
缓冲液1	7.5	7.45	7.43
缓冲液2	7.0	6.95	6.95
缓冲液3	7.0	7.00	6.98
缓冲液4	7.4	7.34	7.33

[0152] 在≤-60℃下储存5个月后进行聚山梨酯80 (PS80) 测量。结果 (如表50所示) 证实在≤-60℃下储存5个月后PS80的量没有减少。

表50: 聚山梨酯80 (HPLC法)

样品	μg/ml	回收率[%]
目标浓度	50	100%
样品1 (缓冲液1-制剂2)	62.6	125%
样品2 (缓冲液2-制剂4)	65.7	131%
样品3 (缓冲液3-制剂3)	47.8	96%

[0153] 基于本研究的数据, 当在所测试的三种缓冲液/制剂中的任何一种中配制时, AAV8 的稳定性特征没有显著差异。因此, 可以认为这三种都适合用于AAV8基因治疗产品的储存。

实施例3

[0154] 本实施例展示了两种制剂吸附到不同小瓶和管的内表面上的额外研究。

[0155] 测试了实施例2描述的缓冲液1 (制剂2) 和缓冲液2 (制剂4) 对不同小瓶和管的内表面的吸附。将缓冲液1 (1717.37×10^{11} cp/ml) 和缓冲液2 (1431.94×10^{11} cp/ml) 稀释至 1.1×10^{13} cp/ml 的目标浓度, 并用PALL EKV过滤器无菌过滤。将样品装入2ml玻璃小瓶中并冷冻, 以备将来参考。然后将材料按表51中所述填充至小瓶和管中。

表51

样品容器	填充容量
2 ml SiO ₂ 玻璃小瓶货号 3000375	0.3 ml
10 ml SiO ₂ 玻璃小瓶货号 3000727	5.6 ml
1.8 ml Nunc® 冻存管 (PP)	0.5 ml
0.5 ml 艾本德安全锁定管® (Eppendorf safe lock tubes®) (PP)	0.2 ml
1.5 ml 艾本德安全锁定管® (PP)	0.5 ml
0.5 ml 艾本德蛋白 LoBind 管® (Eppendorf Protein LoBind tubes®) (PP)	0.2 ml
1.5 ml 艾本德蛋白 LoBind 管® (PP)	0.5 ml

[0156] 样品在 $25 \pm 2^\circ\text{C}$ 储存8小时, 然后通过PDTS/AAV8滴定ELISA进行测试。测定结果如表52所示。

表52

储存容器	缓冲液 1 [cp/ml]	回收率[%]	缓冲液 2 [cp/ml]	回收率[%]
2 ml SiO ₂ 小瓶, 起始材料	1.61E+13	100	1.04E+13	100
在 $+25 \pm 2^\circ\text{C}$ 8h 后				
2 ml SiO ₂ 小瓶	1.53E+13	95	1.05E+13	101
10 ml SiO ₂ 小瓶	1.61E+13	100	1.03E+13	99
1.8 ml Nunc	1.56E+13	97	1.03E+13	99
0.5 ml 安全锁定管	1.60E+13	99	1.01E+13	97
1.5 ml 安全锁定管	1.69E+13	105	1.06E+13	102
0.5 ml LowBind 管	1.57E+13	97	9.85E+12	95
1.5 ml LowBind 管	1.62E+13	100	1.05E+13	101

[0157] 这些结果表明, 从2ml SiO₂小瓶中回收了大于90%的起始基因治疗材料。没有观察到吸附, 并且在两个测试缓冲液之间没有观察到显著差异。

实施例4

[0158] 本实施例证实了制剂4中各种AAV亚型的稳定性。

[0159] 生产了AAV的亚型AAV 2、AAV 5、AAV 8和AAV 9 (马萨诸塞大学伍斯特医学院载体核心设施) 并储存在制剂4中 (如实施例1-3所述), 然后测试外观以确认没有产生可见的颗粒, 并通过ITR-qPCR定量用于体外生物效价测定中给药的载体基因组的剂量。这些AAV亚型各自包括编码绿色荧光蛋白 (CB6-P1-eGFP) 的eGFP包装插入。在时间点为0时进行测试, 并且在 $+5 \pm 3^\circ\text{C}$ 下储存6周后再次进行测试。

[0160] 将基于PBS的缓冲液 (1xPBS+0.001%Pluoronic F+68) 中的2毫升样品 (具有浓度 $> 5\text{E}+12$ vg/ml 的AAV颗粒), 在环境温度下解冻并用制剂4稀释至4ml (大约 $> 2.5\text{E}+12$ vg/ml)。制

剂4中约0.0025%的聚山梨酯80通过吸附(例如在设备的内表面)防止了材料的过多损失。使用Slide-A-Lyzer®10K透析盒,将每个样品的总缓冲液替换为制剂4,并用100倍的体积重复进行该步骤三次,每个步骤的透析进行至少4小时。将缓冲液替换为制剂4后,取样用于最初的0周测试时间点,然后在+5±3℃下储存6周。

[0161] 在制剂4中储存的不同AAV亚型没有观察到可见颗粒,即使储存6周后也没有可见颗粒(表53)。因此,有可能在时间点0观察到的赋形剂经过6周已经被溶解。

表53:在+5±3℃下制剂4中储存的外观

亚型	测试时间点	
	0 周	6 周
AAV2	没有颗粒的无色溶液, 浑浊	
AAV5	没有颗粒的无色溶液, 非常轻微的浑浊	没有颗粒的澄清无色溶液
AAV8	没有颗粒的无色溶液, 轻微浑浊	没有颗粒的澄清无色溶液
AAV9	没有颗粒的澄清无色溶液	没有颗粒的澄清无色溶液

[0162] 虽然AAV2的回收率低,这可能是由于ITR-qPCR测定的变化性(ITR-qPCR测定具有±0.5log的测试变化),但其他AAV亚型在测试的6周是稳定的。制剂4的使用使AAV8具有意想不到的稳定性。

表54:在+5±3℃下在制剂4中储存期间的ITR-qPCR[vg/ml]

亚型	ITR-qPCR [vg/ml], 0 周	ITR-qPCR [vg/ml], 6 周	6 周后回收率[%]
AAV2	6.45E+10	2.65E+10	41
AAV5	1.64E+12	1.44E+12	88
AAV8	1.85E+10	2.11E+10	114
AAV9	6.38E+11	5.24E+11	82

实施例5

[0163] 本实施例证明了冻干AAV制剂的可行性,特别是在制剂4中AAV的冻干。

[0164] 将AAV制剂4冻干并在+5±3℃下储存长达10个月。简单来说,生产含有AAV8的基因治疗材料并将其冻干,然后将含有冻干材料的小瓶储存在+5±3℃(用与SIZ连接的Eurotherm系统控制)。在每个测试时间点(1、2、3、6和10),用5.5ml纯净水重构一个小瓶,将液体根据表55等分。仅用缓冲液“制剂4”,进行两次冻干,在这些实验后,用制剂4中的活性基因治疗材料进行冻干。将具有活性基因治疗材料的小瓶置于架子的前部、中部或后部。用填充有不含AAV的制剂4的相同SiO₂玻璃小瓶封闭间隙。

表55:在+5±3℃下储存的研究概要

测试	样品体积	测试时间点 [月]					样品总数量	合格标准
		1	2	3	6	10		
SDS-PAGE（荧光染色，4-12％BisTris 凝胶和 Flamingo 染色）	0.2 ml	x	x	x	x	x	5	报告结果
WAX [弱阴离子交换 HPLC]	0.2 ml	x	x	x	x	x	5	
SEC [体积排阻 HPLC]	0.2 ml	x	x	x	x	x	5	
体外生物效价	0.5 ml	x	x	x	x	x	5	
外观	2 ml	x	x	x	x	x	5	
pH 值		x	x	x	x	x		
体内生物效价	0.5 ml	x	x	-	x	x	5	
FIX-qPCR	0.2 ml	x	x	x	x	x	5	
总 rAAV8 颗粒 ELISA	2 x 0.2 ml	x	x	x	x	x	10	

[0165] 在冻干前和冻干后测量不同参数。对于每次测量,将三次测量(前部、中部和后部的样品)的平均值记录在表56。除了残留水分之外,没有发现所测试的参数的显著差异。前部样品的残留水分为0.7%,后部样品的残留水分为3.6%,前部样品的干燥速度快于后部样品。中部的小瓶具有3.7%的残留水分。

表56A:冻干后的基因治疗材料的不同参数

冻干基因治疗产品的稳定性	AAV8 滴定 ELISA [cp/ml]	FIX-qPCR [vg/ml]	体外生物效价 [BPU]	体内生物效价, 14 天 [IU/ml]	外观	pH	残留水分	凝集率 [%]	WAX, 完整衣壳 [%]
冻干前的起始材料	1.30E+13	4.99E+12	1.27	2.64	没有颗粒的澄清无色溶液			3.1	55
前部	1.21E+13	2.73E+12	1.24	2.91	没有颗粒的澄清无色溶液	7.02	0.7	4.2	50
中部	1.29E+13	4.02E+12	1.31	2.24	有 1 个可见颗粒(2-3mm 的纤维)的澄清无色溶液并	7.02	3.7	3.8	57
后部	1.16E+13	3.99E+12	1.45	2.34	没有颗粒的澄清无色溶液	7.02	3.6	4.2	56

表56B:冻干后的基因治疗材料的不同参数、回收率[%]

回收率[%]	AAV8 滴定 ELISA	FIX-qPCR	体外生物效价	体内生物效价, 14 天
冻干前的起始材料	100	100	100	100
前部	93	55	98	110
中部	99	81	103	85
后部	89	80	114	89

表57:基因治疗材料作为冻干饼在+5±3℃下储存长达10个月后的不同参数

制剂 4		外观	pH 值	AAV8 滴定 ELISA [cp/ml]	回收率 [%]	FIX-qPCR [vg/ml]	回收率 [%]	体外生物效价 [BPU]	回收率 [%]	凝集率 [%]	WAX, 完整衣壳 [%]	体内 BP, 14 天	体内 BP, 14 天, 回收率 [%]
冻干期间置于架子上	冻干前的起始材料	符合		1.30E+13	100	4.99E+12	100	1.27	100	3.1	55	2.64	100
	冻干后	前部: 没有颗粒的澄清无色溶液, 中部: 有 1 个可见颗粒(2-3 mm 的纤维)的澄清无色溶液, 后部: 没有颗粒的澄清无色溶液	7.02	1.22E+13	94	3.58E+12	72	1.33	105	4.1	54	2.50	95
左前部	1 个月	没有颗粒的澄清无色溶液	7.03	1.16E+13	89	1.64E+12	33	0.89	70	3.9	55	1.76	67
右前部	2 个月	有许多可见颗粒的澄清无色溶液	7.05	1.14E+13	88	3.71E+12	74	0.95	75	4.1	50	2.14	81
中部	3 个月	没有颗粒的澄清无色溶液	7.03	1.15E+13	89	3.07E+12	62	0.89	70	4.0	59	2.02	77
右前部	6 个月	没有颗粒的澄清无色溶液	7.09	1.20E+13	92	3.97E+12	80	0.81	64	4.6	55	1.72	65
右后部	10 个月	没有颗粒的澄清无色溶液	7.07	1.07E+13	83	4.22E+12	85	0.89	70	3.9	52	--	

[0166] 总之,在10个月的时间点获得85%的回收率。体外生物效价(10个月后回收率为70%)以及体内生物效价(6个月后回收率为65%)没有显示出冻干后的即刻损失,但在储存1个月后略有下降。然而,在10个月的时间点时没有观察到活性的进一步减少。完整衣壳的百分比以及凝集率的结果稳定。

实施例6

[0167] 本实施例展示了额外的测试以及冻干制剂的进一步开发。

[0168] 用两种不同的冻干速度来研究具有不同NaCl浓度的四种不同制剂(表58-61)。简单来说,在初级干燥过程中,冻干程序的温度斜率在-55℃到+2℃之间不同。在一个循环中,温度在1.5小时的时间段内升高(程序1),而在另一个循环中,温度在12小时内升高(程序2)。

表58:制剂4

赋形剂	浓度 [mM]	浓度 g/kg 缓冲液
L-组氨酸	10	1.552
氯化钠	100	5.844
甘氨酸	50	3.754
海藻糖二水合物	5%	50.00
禾大超精制吐温 80 (PS80)	0.005%	0.05
纯净水	7.0±0.1	
pH 值		

表59:制剂7

赋形剂	浓度 [mM]	浓度 g/kg 缓冲液
L-组氨酸	10	1.552
氯化钠	80	4.675
甘氨酸	50	3.754
海藻糖二水合物	5%	50.00
禾大超精制吐温 80 (PS80)	0.005%	0.05
纯净水		加至 1 kg
pH 值		7.0±0.1

表60:制剂8

赋形剂	浓度 [mM]	浓度 g/kg 缓冲液
L-组氨酸	10	1.552
氯化钠	70	4.091
甘氨酸	50	3.754
海藻糖二水合物	5%	50.00
禾大超精制吐温 80 (PS80)	0.005%	0.05
纯净水		加至 1 kg
pH 值		7.0±0.1

表61:制剂9

赋形剂	浓度 [mM]	浓度 g/kg 缓冲液
L-组氨酸	10	1.552
氯化钠	60	3.506
甘氨酸	50	3.754
海藻糖二水合物	5%	50.00
禾大超精制吐温 80 (PS80)	0.005%	0.05
纯净水		加至 1 kg
pH 值		7.0±0.1

[0169] 将基因治疗材料解冻并合并,并将29.2ml的合并材料装入Slide-A-Lyzer®10K透析盒中。将缓冲替换为如上所述的制剂4、7、8或9。所有样品在100倍体积中透析三次,透析至少三小时。透析后,将5.5ml的每种材料放入10ml的SiO₂小瓶中。在冻干前,将冻干塞子放在玻璃瓶上而不塞紧塞子。将冻干产品在+5±3℃下储存长达12个月。

[0170] NaCl的浓度越低,残留水分也越低(表62)。

表62:冻干后即刻残留水分[%]的比较

残留水分 NaCl 浓度/ 程序	前部		中部			后部	
	前部 30/2 缓冲液	前部 30/2 活 性材料	中部 30/2 缓冲液	中部 30/2 活 性材料	中部 30/2a 缓冲液	后部 30/2 缓冲液	后部 30/2 活 性材料
100 mM	2.4	3.2	2.1	2.8	3.7	2.7	2.5
80 mM	2.1	1.7	1.6	1.7	2.7	1.8	2.1
70 mM	1.6	1.8	1.5	1.8	2.2	1.8	1.9
60 mM	1.2	1.2	1.3	0.9	1.4	1.2	1.3

[0171] 将冻干的产物在 $+5\pm 3^{\circ}\text{C}$ 下储存长达12个月并测试活性、总颗粒滴度(空+完整)、纯度、降解和pH(表63和64)。在每个测试时间点(0、1、3、6和12个月),用5.5ml纯净水重构一个小瓶,将液体根据表63等分。样品在 $\leq -60^{\circ}\text{C}$ (设定点: -80°C)下冷冻。冻干后,未检测到有意义的值的差异,并且发现所有数据都在测试变化范围内。

表63:在 $+5\pm 3^{\circ}\text{C}$ 下储存的样品的研究概要

测试	样品体积	测试时间点 (月)					样品总数量	合格标准
		0	1	3	6	12		
SDS-PAGE（荧光染色，4-12%BisTris 凝胶和 Flamingo 染色）	0.2 ml	x	x	x	x	x	40	报告结果
WAX [弱阴离子交换 HPLC]	0.2 ml	x	x	x	x	x	40	
SEC [体积排阻 HPLC]	0.2 ml	x	x	x	x	x	40	
外观	2 ml	x	x	x	x	x	40	
pH 值		x	x	x	x	x		
体外生物效价	0.5 ml	x	x	x	x	x	40	
体内生物效价	0.5 ml	x	x	-	x	x	最少 8 (36)	
FIX-qPCR	0.2 ml	x	x	x	x	x	40	
总 rAAV8 颗粒 ELISA	2 x 0.2 ml	x	x	x	x	x	80	
残留水分	1 个小瓶	x	x	x	x	x	12	
重构时间	1 个小瓶	x	x	x	x	x	40	

表64:程序1结果

NaCl 浓度/ 参数	AAV8 滴 定 ELISA [vp/ml]	FIX-qPCR [vg/ml]	体外生物 效价, 剂 量 FIX-qPCR [BPU]	体外生物 效价, 剂 量 AAV8-ELISA 滴度 [BPU]	完整衣 壳百分 数[%]	凝集率 [%]	pH	外观
起始材料 (100 mM)	1.39E+13				61	2.3	7.00	没有颗粒的 澄清无色液 体
100 mM	1.17E+13	4.80E+12	0.75	0.68	63	3.5	7.00	没有颗粒的 澄清无色液 体
80 mM	1.08E+13	5.06E+12	0.70	0.75	57	4.1	7.02	没有颗粒的 澄清无色液 体
70 mM	1.20E+13	4.17E+12	0.77	0.74	54	4.1	7.00	没有颗粒的 澄清无色液 体

NaCl 浓度/ 参数	AAV8 滴 定 ELISA [vp/ml]	FIX-qPCR [vg/ml]	体外生物 效价, 剂 量 FIX-qPCR [BPU]	体外生物 效价, 剂 量 AAV8-ELISA 滴度 [BPU]	完整衣 壳百分 数[%]	凝集率 [%]	pH	外观
60 mM	1.32E+13	4.73E+12	0.67	0.68	55	3.9	7.04	没有颗粒的 澄清无色液 体

[0172] 综上所述,程序1是更激进的程序,但它能够得到更致密和均质的冻干饼。NaCl的浓度越低,残留水分的值越低。起始材料和每个NaCl浓度在透析后、冻干和重构后的外观符合“没有颗粒的澄清无色液体”。pH测量、AAV8颗粒ELISA、FIX-qPCR和体外生物效价测定的结果显示,每个NaCl浓度具有相似的数值。WAX测定(完整衣壳的百分率)显示测试变化在54%至63%之内(表69)。凝集率显示从未处理的起始材料的2.3%增加到透析和冻干的基因治疗材料的3.5%和4.1%。每种NaCl浓度的冻干饼是白色、致密且均质的。

实施例7

[0173] 本实施例展示了其他制剂。

[0174] 制剂10和11的制备基本同实施例1。

表65:制剂10

赋形剂	浓度 [mM]	浓度 g/kg 缓冲液
L-组氨酸	10	1.552
氯化钠	30	1.753
甘氨酸	50	3.754
海藻糖二水合物	5%	50
禾大超精制吐温 80	0.005%	0.05
纯净水		加至 1 kg
pH 值		
		7.0±0.1

表66:制剂11

赋形剂	浓度 [mM]	浓度 g/kg 缓冲液
L-组氨酸	10	1.552
氯化钠	0	0
甘氨酸	50	3.754
海藻糖二水合物	5%	50
禾大超精制吐温 80	0.005%	0.05
纯净水		加至 1 kg
pH 值		
		7.0±0.1

实施例8

[0175] 本实施例展示了其他制剂。

[0176] 制剂12-15的制备基本同实施例1。

表67:制剂12

赋形剂	浓度 [mM]	浓度 g/kg 缓冲液
L-组氨酸	10	1.552
氯化钠	50	2.922
甘氨酸	50	3.754
海藻糖二水合物	5%	50
禾大超精制吐温 80	0.005%	0.05
纯净水		加至 1 kg
pH 值		
		7.0±0.1

表68:制剂13

赋形剂	浓度 [mM]	浓度 g/kg 缓冲液
L-组氨酸	10	1.552
氯化钠	40	2.338
甘氨酸	50	3.754
海藻糖二水合物	5%	50
禾大超精制吐温 80	0.005%	0.05
纯净水		加至 1 kg
pH 值		
	7.0±0.1	

表69:制剂14

赋形剂	浓度 [mM]	浓度 g/kg 缓冲液
L-组氨酸	10	1.552
氯化钠	20	1.169
甘氨酸	50	3.754
海藻糖二水合物	5%	50
禾大超精制吐温 80	0.005%	0.05
纯净水		加至 1 kg
pH 值		
	7.0±0.1	

表70:制剂15

赋形剂	浓度 [mM]	浓度 g/kg 缓冲液
L-组氨酸	10	1.552
氯化钠	10	0.584
甘氨酸	50	3.754
海藻糖二水合物	5%	50
禾大超精制吐温 80	0.005%	0.05
纯净水		加至 1 kg
pH 值		
	7.0±0.1	

[0177] 本发明引用的所有参考文献,包括出版物、专利申请和专利均通过引用并入到本发明中,其程度如同每个参考文献被单独且具体地指出通过引用并入且在本文中完整地阐述。

[0178] 除非本发明另有说明或与上下文明显矛盾,否则本发明描述的所有方法可以以任何合适的顺序进行。除非另有说明,否则本文提供的任何和所有实施例或示例性语言(如“例如”)仅旨在更好地说明本发明,并且不对本发明的范围构成限制。说明书中的任何语言

都不应被解释成表明任何未要求的要素对于本公开的实践是必不可少的。

[0179] 本发明描述了优选的实施方式,包括发明人已知的实施本发明的最优方式。在阅读本发明的内容后,那些优选实施方式的变化对于本领域技术人员来说可以变得显而易见。发明人预期本领域技术人员适当地采用这些变化,并且发明人意图以不同于本文具体描述的方式实施本发明。因此,本发明包括法律所授权的权利要求中所述主题的所有变型和等同物。此外,除非本文另有说明或与上下文明显矛盾,否则本发明涵盖上述要素的所有可能变型的任何组合。