

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 201791184 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2017.09.29

(22) Дата подачи заявки
2015.11.27

(51) Int. Cl. C12Q 1/68 (2006.01)
C12N 7/00 (2006.01)
C12N 15/864 (2006.01)
C12N 15/866 (2006.01)

(54) ДНК-ПРИМЕСИ В КОМПОЗИЦИИ, СОДЕРЖАЩЕЙ ПАРВОВИРУСНЫЙ ВИРИОН

(31) 14195464.4

(32) 2014.11.28

(33) EP

(86) PCT/EP2015/077882

(87) WO 2016/083560 2016.06.02

(71) Заявитель:
ЮНИКЬЮРЕ АйПи Б.В. (NL)

(72) Изобретатель:
Лубельский Яцек, Херменс
Вильгельмус Теодорус Йоханнес
Мария Кристиан (NL)

(74) Представитель:
Медведев В.Н. (RU)

(57) Настоящее изобретение относится к примесям нуклеиновой кислоты в композиции, содержащей парвовирусный вектор. В частности, настоящее изобретение показывает, что ДНК-примеси инкапсулируются в парвовирусном вирионе не случайным образом. Таким образом, настоящее изобретение относится к способу идентификации и количественного определения примеси нуклеиновой кислоты в композиции, содержащей парвовирусный вектор. Кроме того, настоящее изобретение относится к способу определения того, является ли композиция, содержащая парвовирусный вектор, клинически чистой.

A1

201791184

201791184

A1

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-542722EA/011

ДНК-ПРИМЕСИ В КОМПОЗИЦИИ, СОДЕРЖАЩЕЙ ПАРВОВИРУСНЫЙ ВИРИОН **ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ, К КОТОРОЙ ОТНОСИТСЯ ИЗОБРЕТЕНИЕ**

Настоящее изобретение относится к области вирусологии и генной терапии. В частности, изобретение относится к способу идентификации и/или количественного определения избыточной примеси нуклеиновой кислоты в композиции.

Уровень техники изобретения

Рекомбинантные векторы на основе аденоассоциированного вируса (ААВ) применялись в многочисленных клинических испытаниях и имеют большие перспективы для генной терапии человека. Основными характеристиками, обеспечивающими широкий успех ААВ, являются его способность устанавливать постоянную экспрессию трансгена в сочетании с хорошими характеристиками безопасности. Получение ААВ для клинического применения помимо прочего направлено на минимизацию ДНК-примесей, которые потенциально могут кодировать онкогены, маркеры антибиотиков или иммуногенные пептиды, снижающие безопасность вектора (Wright et al., 2008, Gene Ther. 15, 840-848).

Несмотря на то, что был достигнут значительный прогресс, как в предварительной, так и в последующей обработке ААВ с целью обеспечения чистоты конечного продукта, полное удаление нежелательной ДНК не кажется возможным. Упаковка клеточной ДНК или ДНК хелперного вектора, по-видимому, является побочным продуктом биологии ААВ, и таким образом неотъемлемо связана с капсидированием целевой трансгенной ДНК. После того как посторонняя ДНК инкапсулируется в преформированные капсиды, эти частицы становятся неотличимыми от капсидов, содержащих только желаемую экспрессионную кассету, и их фактически невозможно отделить.

Поэтому, для того чтобы поддержать клиническое развитие и понять риски, связанные с присутствием нежелательной ДНК в рААВ векторах, необходимо оценить потенциал экспрессии белка с этих генетических элементов в диапазоне клеточных линий, которые отражают профиль биораспределения используемого рААВ, чтобы

исключить теоретическую возможность того, что нежелательная экспрессия белков может привести к нежелательным эффектам, таким как, например, клеточные перестройки, туморогенность или нежелательные иммунные реакции, потенциально снижающие безопасность и/или эффективность этого вектора.

На сегодняшний день в научной литературе имеются сообщения о наличии и концентрации ДНК-примесей, контаминирующих препараты рААВ (Blouin et al., 2004, J. Gene Med. 6 Suppl 1, S223-S228; Nony et al., 2003, J. Virol. 77, 776-781; Chadeuf et al., 2005, Mol. Ther. 12, 744-753; Wright et al., 2008, выше). Удалось проследить, что источником этих примесей является или плаزمид-помощник или ДНК клетки-хозяина (Wright et al., 2008, выше). Только в ограниченном числе исследований рассматривался вопрос о предполагаемой экспрессии, происходящей с этой совместно упакованной остаточной ДНК. Wright с соавторами проанализировали экспрессию генов *car*, *amp(r)* и двух аденовирусных генов *E2A* и *E4* при помощи количественной ПЦР в реальном времени после инфекции человеческих гепатоцитов или мышей рААВ, и не выявили никакой обнаруживаемой транскрипции (Nauck et al., 2009, Mol Ther. 17(1) 144-152). С другой стороны, Miller et al. обнаружили опосредованную ДНК-примесями экспрессию гена *car* при помощи анализа комплементации (Halbert et al., 2011, Gene Ther. 18(4): 411-417).

В настоящее время предпочтительным методом для анализа примесей ДНК в биофармацевтических препаратах вириона является количественная ПЦР. При помощи этого метода определяют наличие и количество конкретных ДНК-примесей. Важно отметить, что специалист в данной области техники при этом заранее выбирает ДНК-примесь, подлежащую обнаружению, т.е. перед проведением количественной ПЦР, так как в данной области техники существует общее мнение, что ДНК-примеси упаковываются в вирион случайным образом. Такая (предварительно выбранная) ДНК-примесь может, например, включать в себя ДНК клетки-хозяина, нуклеотидные последовательности *Rep*, *Car* или плазмиды. Например, как указано в Thorne et al (2009, Hum. Gene Ther. 20: 707-714) ДНК-примеси клетки-хозяина определяют с использованием двух мишеней:

трансформирующие гены E6/E7 вируса папилломы человека (ВПЧ) в качестве релевантной последовательности для оценки безопасности продуцирующей системы на основе клеток HeLa, и сильно экспрессирующийся, высококопийный ген для рибосомальной РНК (рРНК) в качестве чувствительного общего маркера. Согласно Thorne et al. (см. выше), наиболее распространенные совместно пакующиеся последовательности происходят из упаковочной плазмиды, включая гены *rep* и *cap* AAV и селективные маркерные гены клеток бактерий и млекопитающих. Кроме того, в работе Ye et al. (2011, Gene Ther. 18, 135-144) показано, что последовательности ДНК из упаковочной плазмиды ВПЧ упаковываются случайным образом во время образования рААВ в линии клеток млекопитающих. Согласно Ye et al., вирион ААВ содержит случайные фрагменты, расположенные по всему геному ВПЧ. Кроме того, Chadeuf et al. (см. выше) показали, что в случае более мелкой ДНК-плазмиды в вирион инкапсулируются полноразмерная плазида и вирусные ITRs, включая ген селективного маркера. Таким образом, по-видимому, отсутствует необходимость в обнаружении конкретных нуклеотидных последовательностей, так как ДНК-примеси, по всей видимости, упаковываются в парвовирусный вирион случайным образом.

В отличие от общепринятой теории о том, что ДНК-примеси упаковываются в вирион случайным образом, в настоящем изобретении показано, что некоторые ДНК-примеси на самом деле являются избыточными. Как следствие, используемые в настоящее время способы обнаружения ДНК-примесей в биофармацевтической композиции могут приводить значительной недооценке ДНК-примесей, присутствующих в композиции. Такая недооценка ДНК-примесей в фармацевтической композиции может приводить к введению композиций, которые являются недостаточно клинически чистыми, что в свою очередь приводит потенциальному риску для здоровья пациентов.

Поэтому в данной области техники существует потребность в средствах и способах идентификации и количественного определения избыточных ДНК-примесей в биологических композициях, таких как, например, биофармацевтические препараты. Целью настоящего

изобретения является разработка таких средств и способов.

Сущность изобретения

В первом аспекте настоящее изобретение относится к способу идентификации и количественного определения избыточной примеси нуклеиновой кислоты в композиции, содержащей парвовирусный вектор, и где этот способ включает в себя этапы:

а) секвенирование композиции нуклеиновой кислоты для получения случайных прочтений нуклеотидных последовательностей;

б) сравнение случайных последовательностей из этапа а) с нуклеотидной последовательностью биологического компонента, используемого в способе получения композиции, при котором совпадение между случайным прочтением и нуклеотидной последовательностью биологического компонента идентифицирует примесь нуклеиновой кислоты;

с) определение среднего количества прочтений на парвовирусный вектор; и

д) определение количества прочтений на нуклеотид избыточной примеси нуклеиновой кислоты, где примесь нуклеиновой кислоты идентифицируется как избыточная примесь, когда распределение прочтений не является случайным, и избыточная примесь в 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20 или 50 раз превышает среднее количество прочтений биологического компонента, или когда количество прочтений на нуклеотид примеси нуклеиновой кислоты составляет, по меньшей мере, 0,001, 0,01, 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1,0, 2,0, 3,0, 5,0, 7,0 или 10% от среднего количества прочтений на парвовирусный вектор.

В предпочтительном варианте осуществления изобретения секвенирование нуклеиновой кислоты на этапе (а) включает в себя высокопроизводительное секвенирование.

В предпочтительном варианте осуществления изобретения парвовирусный вектор представляет собой вектор на основе рекомбинантного аденоассоциированного вируса (рААВ).

В предпочтительном варианте осуществления изобретения нуклеотидная последовательность биологического компонента выбрана из группы, состоящей из нуклеотидных последовательностей клетки-хозяина, плазмиды, вектора, отличного от рекомбинантного

парвовирусного вектора, и хелперного вируса, где предпочтительно вектор представляет собой бакуловирусный вектор.

В предпочтительном варианте осуществления изобретения хелперный вирус представляет собой рекомбинантный аденовирус и/или рекомбинантный вирус простого герпеса.

В предпочтительном варианте осуществления изобретения нуклеотидная последовательность биологического компонента содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую Rep, Cap и/или трансен, где, предпочтительно, биологический компонент содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую трансен, где, более предпочтительно, биологический компонент содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую трансен, которая фланкирована, по меньшей мере, одним парвовирусным ITR, и где, наиболее предпочтительно, биологический компонент содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую трансен, которая фланкирована, по меньшей мере, одним парвовирусным ITR с каждой стороны.

В предпочтительном варианте осуществления изобретения избыточную примесь нуклеиновой кислоты количественно определяют во второй или последующей композиции.

Во втором аспекте настоящее изобретение относится к способу количественного определения примеси нуклеиновой кислоты в композиции, содержащей парвовирусный вектор, где этот способ включает в себя этап определения относительного содержания примеси нуклеиновой кислоты, где эта примесь нуклеиновой кислоты содержит нуклеотидную последовательность, которая расположена между 1 и 8000 п.н., 1 и 5000 п.н., 1 и 3000 п.н., 1 и 1000 п.н., 1 и 500 п.н., 1 и 250 п.н. или 1 и 100 п.н., непосредственно примыкающими к последовательности парвовирусного ITR, где последовательность ITR присутствует в биологическом компоненте, используемом в способе получения композиции, и где биологический компонент содержит трансен, фланкированный, по меньшей мере, одной копией последовательности парвовирусного ITR.

В предпочтительном варианте осуществления изобретения биологический компонент выбран из группы, состоящей из клетки-

хозяина, плазмиды, вектора, отличного от рекомбинантного парвовирусного вектора, и хелперного вируса, где предпочтительно вектор представляет собой бакуловирусный вектор.

В предпочтительном варианте осуществления изобретения парвовирусный вектор представляет собой вектор на основе рекомбинантного аденоассоциированного вируса (рААВ).

В предпочтительном варианте осуществления изобретения нуклеотидная последовательность примеси нуклеиновой кислоты непосредственно примыкает к каждому концу последовательности парвовирусного ITR, где последовательность ITR присутствует в биологическом компоненте, используемом в способе получения композиции.

В предпочтительном варианте осуществления изобретения относительное содержание определяют по сравнению с нуклеотидной последовательностью парвовирусного вектора и/или референсной последовательностью композиции.

В предпочтительном варианте осуществления изобретения относительное содержание определяется:

а) средним количеством прочтений на нуклеиновую кислоту примеси нуклеиновой кислоты, как определено выше; и

i) средним количеством прочтений на нуклеиновую кислоту референсной последовательности; и/или

ii) средним количеством прочтений на парвовирусный вектор в композиции;

где количество прочтений определяется вышеописанным способом; и/или

б) амплификацией примеси нуклеиновой кислоты, как определено выше; и

i) референсной последовательностью; и/или

ii) нуклеотидной последовательностью парвовирусного вектора.

В предпочтительном варианте осуществления изобретения относительное содержание определяют при помощи количественной ПЦР и/или при помощи высокопроизводительного секвенирования.

В предпочтительном варианте осуществления изобретения способ дополнительно включает в себя этап селективной

гибридизации олигонуклеотидного праймера с примесью нуклеиновой кислоты, как определено выше, или ее комплементом.

В предпочтительном варианте осуществления изобретения олигонуклеотидный праймер селективно гибридизуется с примесью нуклеиновой кислоты, содержащей часть бакуловирусной последовательности, или ее комплементом.

В третьем аспекте настоящее изобретение относится к способу определения того, может ли композиция, содержащая парвовирусный вектор, считаться клинически чистой, где этот способ включает в себя этапы:

i) количественного определения примеси нуклеиновой кислоты в композиции парвовирусного вектора, как определено выше; и

ii) определение того, что композиция является клинически чистой, если примесь нуклеиновой кислоты, как определено выше, присутствует, по меньшей мере, в 10, 100, 250, 1000 раз меньшем количестве, по сравнению с референсной последовательностью и/или трансгеном, как определено по относительному содержанию примеси нуклеиновой кислоты.

В предпочтительном варианте осуществления изобретения композиция, содержащая парвовирусный вектор, представляет собой фармацевтическую композицию. В альтернативном варианте или в комбинации с другим предпочтительным вариантом осуществления изобретения, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения композиция, содержащая парвовирусный вектор, содержит парвовирусный капсид, в который упакован парвовирусный вектор. В альтернативном варианте или в комбинации с другим предпочтительным вариантом осуществления изобретения, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения композиция, содержащая парвовирусный вектор, не содержит образец, полученный или получаемый от млекопитающего, где это млекопитающее предпочтительно является не человекообразным приматом.

Описание изобретения

Настоящее изобретение относится к открытию, что ДНК-примеси упаковываются в парвовирусный вирион не случайным образом. В действительности, существуют примеси нуклеиновой кислоты,

которые являются избыточными в составе вириона. Таким образом, в первом аспекте настоящее изобретение относится к способу идентификации примеси нуклеиновой кислоты в композиции. Предпочтительно, эта композиция содержит парвовирусный вектор. Способ предпочтительно включает в себя этапы: а) секвенирования композиции нуклеиновой кислоты для получения случайных прочтений нуклеотидных последовательностей; б) сравнения случайных последовательностей из этапа а) с нуклеотидной последовательностью биологического компонента, используемого в способе получения композиции, при котором совпадение между случайным прочтением и нуклеотидной последовательностью биологического компонента идентифицирует примесь нуклеиновой кислоты. Для количественного определения идентифицированной примеси нуклеиновой кислоты способ предпочтительно дополнительно включает в себя этапы: с) определения среднего количества прочтений на парвовирусный вектор; и d) определения количества прочтений на нуклеотид идентифицированной примеси нуклеиновой кислоты, где примесь нуклеиновой кислоты идентифицируется как избыточная примесь, когда распределение прочтений не является случайным, и избыточная примесь в 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20 или 50 раз превышает среднее количество прочтений биологического компонента, или когда количество прочтений на нуклеотид примеси нуклеиновой кислоты составляет, по меньшей мере, 0,001, 0,01, 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1,0, 2,0, 3,0, 5,0, 7,0 или 10% от среднего количества прочтений на парвовирусный вектор.

Таким образом, способ настоящего изобретения относится к идентификации и количественному определению примеси нуклеиновой кислоты в композиции. Примесь нуклеиновой кислоты может представлять собой ДНК-примесь и/или РНК-примесь, предпочтительно, примесь нуклеиновой кислоты представляет собой ДНК-примесь.

Подразумевается, что термин «примесь нуклеиновой кислоты» включает в себя любую последовательность нуклеиновой кислоты, которая не предназначена для упаковки в парвовирусный вирион, такая как, например, нуклеотидные последовательности

биологического компонента, используемого в способе получения композиции. В частности последовательность, которая не фланкирована одним парвовирусным ITR с каждой стороны, может образовывать примесь нуклеиновой кислоты.

Используемый здесь термин «парвовирусный вектор» относится к рекомбинантной молекуле нуклеиновой кислоты, содержащей одну или несколько представляющих интерес полинуклеотидных последовательностей (например, экспрессионную конструкцию для гена, кодирующего целевой продукт, т.е. «трансген»), которые фланкированы, по меньшей мере, одной (и обычно двумя) парвовирусной последовательностью(ми) инвертированного конечного повтора (ITRs).

Используемый здесь термин «случайное распределение прочтений» определяется как распределение прочтений, которое равномерно выравнивается по длине нуклеотидной последовательности биологического компонента, используемого в способе получения композиции. В частности, случайное распределение прочтений определяется как распределение прочтений, которое равномерно выравнивается по длине нуклеотидной последовательности одного биологического компонента, используемого в способе получения композиции. Более предпочтительно, случайное распределение прочтений определяется здесь как распределение прочтений, которое равномерно выравнивается по длине нуклеотидной последовательности, выбранной из группы, состоящей из нуклеотидных последовательностей клетки-хозяина, плазмиды, вектора, отличного от рекомбинантного парвовирусного вектора, и хелперного вируса, где предпочтительно вектор представляет собой бакуловирусный вектор. Таким образом, наиболее предпочтительно, случайное распределение прочтений определяется в настоящем изобретении как распределение прочтений, которое равномерно выравнивается по длине нуклеотидной последовательности бакуловирусного вектора.

Равномерное выравнивание определяется здесь как равная вероятность того, что прочтение выравнивается с определенной областью нуклеотидной последовательности по сравнению с любой другой областью той же нуклеотидной последовательности.

Предпочтительно, при равномерном выравнивании число прочтений, которые выравниваются с нуклеотидом, не отклоняется более чем на 0,1, 0,2, 0,5, 1,0, 2,0, 5,0, 10, 15 или 20% от среднего числа прочтений, выравнивающихся с этой нуклеотидной последовательностью.

Используемый здесь термин «неслучайное распределение прочтений» определяется как распределение прочтений, которое неравномерно выравнивается по длине нуклеотидной последовательности биологического компонента, используемого в способе получения композиции. В частности, неслучайное распределение прочтений определяется как распределение прочтений, которое неравномерно выравнивается по длине нуклеотидной последовательности одного биологического компонента, используемого в способе получения композиции. Более предпочтительно, неслучайное распределение прочтений определяется здесь как распределение прочтений, которое неравномерно выравнивается по длине нуклеотидной последовательности, выбранной из группы, состоящей из нуклеотидных последовательностей клетки-хозяина, плазмиды, вектора, отличного от рекомбинантного парвовирусного вектора, и хелперного вируса, где предпочтительно вектор представляет собой бакуловирусный вектор. Таким образом, наиболее предпочтительно, неслучайное распределение прочтений определяется в настоящем изобретении как распределение прочтений, которое неравномерно выравнивается по длине нуклеотидной последовательности бакуловирусного вектора, т.е. это означает, что большее число прочтений выравнивается с конкретными областями бакуловирусного вектора по сравнению с другими областями бакуловирусного вектора.

Предпочтительно композиция представляет собой композицию, содержащую (рекомбинантный) парвовирусный вирион, содержащий или состоящий (по меньшей мере) парвовирусный капсид, в который упакован рекомбинантный парвовирусный вектор. Композиция и ее компоненты также являются предпочтительными, как определено здесь ниже.

В предпочтительном варианте осуществления настоящего

изобретения способ предназначен для идентификации и/или количественного определения примесей нуклеиновых кислот, которые упаковываются в парвовирусный вирион, т.е. инкапсулирован в вирион. В частности, примесь нуклеиновой кислоты в соответствии с настоящим изобретением не разрушается после обработки композиции, содержащей парвовирусный вирион, нуклеазой (например, обработки РНКазой или ДНКазой).

Композиции

В предпочтительном варианте осуществления изобретения парвовирусный вектор содержится в композиции. Предпочтительно композиция представляет собой фармацевтическую композицию. Фармацевтическая композиция дополнительно предпочтительно содержит фармацевтически приемлемый носитель. Любой подходящий фармацевтически приемлемый носитель или вспомогательное вещество может использоваться в настоящих композициях (см., например, Remington: The Science and Practice of Pharmacy, Alfonso R. Gennaro (Editor) Mack Publishing Company, April 1997).

Предпочтительные фармацевтические формы будут находиться в комбинации со стерильным физиологическим раствором, раствором декстрозы или буферным раствором или другими фармацевтически приемлемыми стерильными жидкостями. В альтернативном варианте, может использоваться твердый носитель, такой как, например, гранулы микроносителя.

В альтернативном варианте или в комбинации с другим предпочтительным вариантом осуществления изобретения, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения композиция, содержащая парвовирусный вектор, не содержит образец, такой как, например, образец печени или мышечной ткани, полученный или получаемый от млекопитающего. В еще более предпочтительном варианте осуществления изобретения, композиция не содержит образец, полученный или получаемый от не человекообразного примата. В более предпочтительном варианте осуществления изобретения композиция не содержит геномную ДНК из мышечной ткани или печени млекопитающего, такого как, например, не человекообразного примата.

Секвенирование нуклеиновой кислоты

В способе настоящего изобретения идентифицируют и количественно определяют избыточную примесь нуклеиновой кислоты в композиции. Способы идентификации и количественного определения избыточной примеси нуклеиновой кислоты включают в себя без ограничений секвенирование по Сэнгеру или высокопроизводительное секвенирование.

В первом варианте осуществления изобретения ДНК парвовирусного вектора может быть клонирована в плазмиду с последующим обычным секвенированием по Сэнгеру. Секвенирование по Сэнгеру в настоящем изобретении означает способ секвенирования ДНК, который основан на избирательном встраивании прерывающих синтез цепи дидезоксинуклеотидов ДНК-полимеразой в процессе репликации ДНК *in vitro*. В соответствии с настоящим изобретением секвенирование по Сэнгеру включает в себя, так называемое, секвенирование по Сэнгеру с обрывом цепи и/или секвенирование по Сэнгеру с мечеными терминирующими нуклеотидами. Предпочтительно, секвенирование по Сэнгеру представляет собой секвенирование по Сэнгеру с мечеными терминирующими нуклеотидами. В секвенировании по Сэнгеру с мечеными терминирующими нуклеотидами используются меченые прерывающие синтез цепи ddNTPs. В частности, при секвенировании с мечеными терминирующими нуклеотидами каждый из четырех прерывающих синтез цепи дидезоксинуклеотидов метят флуоресцентными красителями, каждый из которых излучает свет при разных длинах волн, что позволяет осуществлять процесс секвенирования в ходе одной реакции. Другие способы секвенирования ДНК также могут быть использованы, например, нанопоровое секвенирование ДНК, секвенирование ДНК с туннельным потоком, секвенирование при помощи гибридизации, секвенирование при помощи масс-спектрометрии, микрофлюидное секвенирование по Сэнгеру, методы на основе микроскопии и секвенирование с РНК-полимеразой.

В предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения секвенирование нуклеиновой кислоты включает в себя высокопроизводительное секвенирование. Высокопроизводительное секвенирование (также именуемое секвенированием следующего

поколения или глубоким секвенированием) относится к отличным от секвенирования по Сэнгеру технологиям секвенирования ДНК с высокой пропускной способностью. Тысячи, миллионы или даже миллиарды цепей ДНК могут быть секвенированы параллельно, что дает значительно большую пропускную способность и сводит к минимуму необходимость в методах клонирования фрагментов, которые часто используются в секвенировании геномов по Сэнгеру.

В предпочтительном способе настоящего изобретения высокопроизводительное секвенирование включает в себя одномолекулярное секвенирование Heliscope, одномолекулярное секвенирование в реальном времени, секвенирование Ion Torrent (ионное полупроводниковое секвенирование), секвенирование 454 (пиросеквенирование, Roche 454 Life Sciences™, Branford, CT), Solexa (секвенирование синтезом, Illumina, Inc, San Diego, CA) и/или секвенирование SOLiD (секвенирование лигированием, ABI, Applied Biosystems, Indianapolis, IN). В еще одном предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения секвенирование нуклеиновой кислоты включает в себя секвенирование SOLiD, Solexa и/или 454. В наиболее предпочтительном варианте осуществления изобретения секвенирование нуклеиновой кислоты включает в себя секвенирование Solexa/Illumina или 454.

Способ настоящего изобретения не ограничивается известными в настоящее время способами высокопроизводительного секвенирования. В частности, следует понимать, что с течением времени будут разработаны новые способы высокопроизводительного секвенирования, которые в равной степени пригодны для использования в способе настоящего изобретения. В частности, любой способ секвенирования, который классифицируется как способ высокопроизводительного секвенирования, т.е. любой способ, который генерирует тысячи, миллионы или миллиарды прочтений за один цикл, может использоваться в способе настоящего изобретения.

В предпочтительном способе настоящего изобретения случайные прочтения получают путем секвенирования нуклеиновых кислот

композиции, содержащей парвовирусный вектор. «Прочтение» или «подсчет» при секвенировании определяется здесь как отдельная цепь оснований, получаемая способом секвенирования нуклеиновой кислоты. Различные способы высокопроизводительного секвенирования могут генерировать различное количество прочтений за один цикл (реакцию), и это могут быть прочтения разной длины. Например, Illumina генерирует до 3 миллиардов прочтений на один цикл, и прочтение имеет среднюю длину от 50 до 300 п.н. С другой стороны секвенирование 454 генерирует примерно 1 миллион прочтений на цикл со средней длиной прочтения примерно 700 п.н. Число прочтений (количество прочтений на цикл) и длина прочтения (количество оснований на прочтение) могут меняться в каждом цикле секвенирования, и ожидается, что длина прочтения, а также число прочтений, на цикл будут в дальнейшем увеличиваться после разработки других способов высокопроизводительного секвенирования.

Идентификация избыточной примеси нуклеиновой кислоты

В одном варианте осуществления настоящего изобретения случайные прочтения, полученные, как описано выше, сравнивают с нуклеотидной последовательностью биологического компонента, используемого в способе получения композиции, где сравнение случайных прочтений с нуклеотидной последовательностью из биологического компонента приводит к идентификации избыточной примеси нуклеиновой кислоты. Эта нуклеотидная последовательность биологического компонента может быть предполагаемым или неожиданным источником нуклеотидных последовательностей.

Предполагаемый источник нуклеотидных последовательностей может быть выбран из группы, состоящей из нуклеотидных последовательностей клетки-хозяина, плазмиды, вектора и хелперного вируса. Где предпочтительно хелперный вирус представляет собой аденовирус и/или вирус простого герпеса, и/или где вектор представляет собой бакуловирусный вектор. В предпочтительном варианте осуществления изобретения предполагаемый источник нуклеотидных последовательностей представляет собой бакуловирусный вектор. В способе настоящего изобретения случайные прочтения таким образом выравниваются или

сравниваются с предполагаемым источником нуклеотидных последовательностей, что это приводит к идентификации избыточной примеси нуклеиновой кислоты.

В альтернативном варианте или в комбинации с вышеописанными вариантами осуществления изобретения источник нуклеотидных последовательностей представляет собой неожиданный источник нуклеотидных последовательностей, т.е. источник нуклеотидных последовательностей не является заранее определенным. Неожданный источник нуклеотидных последовательностей может быть восстановлен путем сборки *de novo* случайных прочтений, полученных способом настоящего изобретения, и сравнения этих собранных нуклеотидных последовательностей с базой данных нуклеотидных последовательностей. Такая база данных нуклеотидных последовательностей может быть частной или общедоступной базой данных нуклеотидных последовательностей. Примеры общедоступной базой данных нуклеотидных последовательностей включают в себя без ограничений UCSC Genome Bioinformatics, GenBank, DDBJ, ENA и т.д. Сравнение собранной последовательности с последовательностью в частной или общедоступной базе данных может приводить к идентификации примеси нуклеиновой кислоты.

В предпочтительном способе настоящего изобретения нуклеотидная последовательность биологического компонента, используемого в способе получения композиции, является подозреваемым источником нуклеотидных последовательностей. В частности, в предпочтительном варианте осуществления изобретения нуклеотидная последовательность биологического компонента выбрана из группы, состоящей из нуклеотидных последовательностей клетки-хозяина, плазмиды, вектора, отличного от рекомбинантного парвовирусного вектора, и хелперного вируса. В частности, нуклеотидная последовательность биологического компонента не содержит нуклеотидную последовательность парвовирусного вектора.

Клетка-хозяин в соответствии с настоящим изобретением может представлять собой любую клетку, используемую в способе получения композиции. Клетка-хозяин может быть выбрана из группы, состоящей из растительной клетки, бактериальной клетки,

дрожжевой клетки и животной клетки. Предпочтительно, клетка-хозяин представляет собой животную клетку, и более предпочтительно, клетка-хозяин представляет собой клетку-хозяин млекопитающего или клетку-хозяин насекомого. В наиболее предпочтительном варианте осуществления изобретения клетка-хозяин представляет собой клетку-хозяин насекомого. Нуклеотидная последовательность клетки-хозяина, используемая в способе получения композиции, содержит геномную ДНК и/или митохондриальную ДНК. Предпочтительно, нуклеотидная последовательность клетки-хозяина содержит геномную ДНК. Геномная ДНК может содержать ген, выбранный из группы генов, состоящей из трансгена, гена, кодирующего Rep, гена, кодирующего Cap, и гена, кодирующего белок или РНК с желперной функцией для получения композиции. Такой ген, кодирующий белок или РНК с желперной функцией для получения композиции, может быть получен из вируса животного, такого как аденовирус и/или вирус простого герпеса, или вируса насекомого, такого как бакуловирус. В альтернативном варианте или в комбинации, геномная ДНК может содержать последовательность ITR. В предпочтительном варианте осуществления изобретения геномная ДНК клетки-хозяина содержит трансген, фланкированный, по меньшей мере, одним ITR, и предпочтительно трансген, фланкированный ITR с каждой стороны.

Плазмида в соответствии с настоящим изобретением может представлять собой любую плазмиду, используемую в способе получения композиции. Плазмида предпочтительно содержит ген, выбранный из группы генов, состоящей из гена устойчивости, трансгена, гена, кодирующего Rep, гена, кодирующего Cap, и гена, кодирующего белок или РНК с желперной функцией для получения композиции. В альтернативном варианте или в комбинации, плазмида может содержать последовательность ITR. В предпочтительном варианте осуществления изобретения плазмида содержит трансген, фланкированный, по меньшей мере, одним ITR, и предпочтительно трансген, фланкированный ITR с каждой стороны.

Вектор в соответствии с настоящим изобретением может представлять собой любой вектор, используемый в способе получения композиции. Вектор может быть выбран из группы,

состоящей из плазмиды, вирусного вектора, космиды и искусственной хромосомы. В предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения вектор представляет собой вирусный вектор. В наиболее предпочтительном варианте осуществления вектор представляет собой бакуловирусный вектор. Бакуловирусный вектор, используемый в способе получения композиции, может содержать ген, выбранный из группы генов, состоящей из: трансгена, гена, кодирующего Rep, гена, кодирующего Cap, и гена, кодирующего белок с хелперной функцией для получения композиции. В альтернативном варианте или в комбинации, бакуловирусный вектор может содержать последовательность ITR. В предпочтительном варианте осуществления изобретения бакуловирусный вектор содержит трансген, фланкированный, по меньшей мере, одним ITR, и предпочтительно трансген, фланкированный ITR с каждой стороны.

Хелперный вирус в соответствии с настоящим изобретением может представлять собой любой вирус, используемый в способе получения композиции. В предпочтительном варианте осуществления изобретения хелперный вирус используется в способе получения парвовирусного вириона. В еще одном предпочтительном варианте осуществления изобретения хелперный вирус используется в способе получения рекомбинантного аденоассоциированного вириона (rAAB). В более предпочтительном варианте осуществления изобретения хелперный вирус представляет собой аденовирус и/или вирус простого герпеса. В наиболее предпочтительном варианте осуществления изобретения хелперный вирус представляет собой рекомбинантный аденовирус и/или рекомбинантный вирус простого герпеса. В еще одном варианте осуществления изобретения хелперный вирус содержит ген, выбранный из группы генов, состоящей из трансгена, гена, кодирующего Rep, гена, кодирующего Cap, и гена, кодирующего белок с хелперной функцией для получения композиции. В альтернативном варианте или в комбинации, хелперный вирус может содержать последовательность ITR. В предпочтительном варианте осуществления изобретения хелперный вирус содержит трансген, фланкированный, по меньшей мере, одним ITR, и предпочтительно трансген, фланкированный ITR

с каждой стороны.

В предпочтительном варианте осуществления изобретения нуклеотидная последовательность биологического компонента, используемого в способе получения композиции, получена из бакуловирусного вектора. В наиболее предпочтительном варианте осуществления изобретения нуклеотидная последовательность из биологического компонента получена из бакуловирусного вектора, содержащего трансген, фланкированный, по меньшей мере, одним ITR, и предпочтительно трансген, фланкированный двумя ITRs.

В комбинации или в качестве альтернативы вышеуказанному, нуклеотидная последовательность биологического компонента содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую Rep, Cap и/или трансген, где предпочтительно биологический компонент содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую трансген, причем более предпочтительно биологический компонент содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую трансген, который фланкирован по меньшей мере одним парвовирусным ITR, и где наиболее предпочтительно биологический компонент содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую трансген, который фланкирован, по меньшей мере, одним парвовирусным ITR с каждой стороны.

Количественное определение избыточной примеси нуклеиновой кислоты при помощи секвенирования нуклеиновой кислоты

Настоящее изобретение относится к способу идентификации и количественного определения избыточной примеси нуклеиновой кислоты в композиции, где этот способ включает в себя этап осуществления секвенирования нуклеиновой кислоты композиции для получения случайных прочтений нуклеотидных последовательностей. Примесь нуклеиновой кислоты может быть идентифицирована как, указано выше. Затем идентифицированную примесь нуклеиновой кислоты можно подвергнуть количественному определению путем определения количества прочтений на нуклеиновую кислоту избыточной примеси нуклеиновой кислоты в композиции.

Число прочтений на нуклеиновую кислоту определяется здесь как число прочтений, которые выравниваются с конкретной нуклеиновой кислотой нуклеотидной последовательности. Таким

образом, число прочтений на нуклеиновую кислоту примеси нуклеиновой кислоты в композиции следует понимать как число прочтений, которые специфично выравниваются с нуклеиновой кислотой примеси нуклеиновой кислоты.

Число прочтений, выравнивающихся с конкретной нуклеиновой кислотой нуклеотидной последовательности, переводится в частоту, где эта конкретная нуклеиновая кислота присутствует в композиции. Таким образом, большое число прочтений, выравнивающихся с конкретной нуклеиновой кислотой, следует понимать как нуклеиновую кислоту, которая часто встречается в композиции. В альтернативном варианте, если только несколько прочтений выравниваются с конкретной нуклеиновой кислотой, следует понимать, что эта нуклеиновая кислота встречается в композиции редко.

В соответствии со способом настоящего изобретения примесь нуклеиновой кислоты является избыточной, когда распределение прочтений не является случайным, и избыточная примесь в 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20 или 50 раз превышает среднее количество прочтений биологического компонента, или когда количество прочтений на нуклеотид примеси нуклеиновой кислоты составляет, по меньшей мере, 0,0005, 0,001, 0,002, 0,003, 0,004, 0,005, 0,006, 0,007, 0,008, 0,009, 0,01, 0,02, 0,03, 0,04, 0,05, 0,05, 0,06, 0,07, 0,08, 0,09, 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1,0, 1,5, 2,0, 3,0, 4,0, 5,0, 6,0, 7,0 или 10% от среднего количества прочтений на нуклеиновую кислоту парвовирусного вектора.

Среднее число прочтений на парвовирусный вектор определяется здесь как общее число прочтений, которые выравниваются с парвовирусным вектором, деленное на общее число нуклеотидов парвовирусного вектора. Предпочтительно, прочтения и нуклеотиды, расположенные за 25, 50, 75, 100, 200, 300, 400 или 500 нуклеотидов перед парвовирусным вектором и/или прочтения и нуклеотиды, расположенные за 25, 50, 75, 100, 200, 300, 400 или 500 нуклеотидов после парвовирусного вектора, не рассматриваются при определении среднего числа прочтений на парвовирусный вектор. Эти прочтения могут не быть репрезентативными для

среднего числа прочтений на парвовирусный вектор, так как существует искусственное уменьшение числа прочтений, которые выравниваются с нуклеотидами, находящимися максимально перед и/или максимально после парвовирусного вектора, то есть на концах вектора.

Среднее число прочтений биологического компонента определяется здесь как общее число прочтений, которые выравниваются с биологическим компонентом, деленное на общее число нуклеотидов биологического компонента. Биологический компонент может содержать один биологический компонент, используемый в способе получения композиции. Более предпочтительно, биологический компонент выбран из группы, состоящей из нуклеотидных последовательностей клетки-хозяина, плазмиды, вектора, отличного от рекомбинантного парвовирусного вектора, и хелперного вируса, где предпочтительно вектор представляет собой бакуловирусный вектор. Наиболее предпочтительно, биологический компонент представляет собой бакуловирусный вектор.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения число нуклеотидов парвовирусного вектора может содержать полную нуклеотидную последовательность парвовирусного вектора, например, включая последовательности ITR, промоторные последовательности, последовательность трангена и любые другие последовательности между левым ITR и правым ITR. В более предпочтительном варианте осуществления изобретения часть нуклеотидной последовательности парвовирусного вектора выбрана для определения среднего числа прочтений парвовирусного вектора. Такая часть парвовирусного вектора может содержать нуклеотидную последовательность ITR, промоторную последовательность и/или последовательность трангена. В наиболее предпочтительном варианте осуществления изобретения последовательность трангена выбрана для определения среднего числа прочтений на нуклеотидную кислоту парвовирусного вектора, т.е. числа прочтений, выравнивающихся с трансгеном, деленного на число нуклеотидов нуклеотидной последовательности трансгена.

В другом варианте осуществления настоящего изобретения

избыточную примесь нуклеиновой кислоты количественно определяют во второй или последующей композиции. После идентификации и количественного определения избыточной примеси нуклеиновой кислоты в первой композиции, избыточная примесь нуклеиновой кислоты может быть затем количественно определена в последующей композиции. Количественное определение избыточной примеси нуклеиновой кислоты во второй и последующей композиции может быть проведено так, как описано выше. В альтернативном варианте количественное определение избыточной примеси нуклеиновой кислоты во второй и последующей композиции может быть проведено любым другим способом, подходящим для определения количества примеси нуклеиновой кислоты. Способы количественного определения конкретных фрагментов ДНК хорошо известны из уровня техники и равно применимы для количественного определения избыточной примеси нуклеиновой кислоты во второй и последующей композиции. Эти способы включают в себя без ограничений высокопроизводительное секвенирование, количественную ПЦР, ПЦР с ограниченным числом циклов, гибридизационный анализ, анализ с использованием микрочипа и электрофорез в агарозном геле.

Парвовирусные вирионы

В предпочтительном варианте осуществления изобретения композиция содержит парвовирусный вектор. В частности, в предпочтительном способе настоящего изобретения парвовирусный вектор представляет собой вектор на основе рекомбинантного аденоассоциированного вируса (рААВ). Вирусы семейства Parvoviridae представляют собой небольшие ДНК-вирусы животных. Семейство Parvoviridae может быть разделено на два подсемейства: Parvovirinae, которые заражают позвоночных, и Densovirinae, которые заражают насекомых. Члены подсемейства Parvovirinae именуются здесь парвовирусами и включают в себя род Dependovirus. Как можно заключить из названия этого рода, члены Dependovirus уникальны тем, что они для продуктивной инфекции в культуре клеток обычно требуют совместной инфекции с хелперным вирусом, таким как аденовирус или вирус герпеса. Род Dependovirus включает в себя ААВ, который обычно заражает людей (например, серотипы 1, 2, 3А, 3В, 4, 5 и 6) или приматов

(например, серотипы 1 и 4), и родственные вирусы, которые заражают других теплокровных животных (например, бычий, собачий, конский и овечий аденоассоциированные вирусы). Дополнительная информация о парвовирусах и других членах семейства Parvoviridae описана в Kenneth I. Berns, «Parvoviridae: The Viruses and Their Replication» Chapter 69 in Fields Virology (3d Ed. 1996).

Геномная организация всех известных серотипов ААВ является в значительной степени сходной. Геном ААВ представляет собой линейную одноцепочечную молекулу ДНК, которая состоит из, менее чем, 5000 нуклеотидов (нд). Инвертированные концевые повторы (ITR) фланкируют уникальные кодирующие нуклеотидные последовательности неструктурных белков репликации (Rep) и структурных белков (VP). Белки VP (VP1, -2 и -3) образуют капсид. Концевые 145 нуклеотидов является самокомплементарными и организован таким образом, что могут формировать энергетически стабильный внутримолекулярный дуплекс, образующий Т-образную шпильку. Эти шпильчатые структуры функционируют как источник репликации вирусной ДНК, они служат в качестве праймеров для клеточного комплекса ДНК-полимеразы. После инфицирования ААВ дикого типа (wt) клеток млекопитающих, гены Rep (т.е. Rep78 и Rep52) экспрессируются с промотора P5 и промотора P19, соответственно, и обоим белкам Rep принадлежит своя функция в репликации вирусного генома. Событие сплайсинга в ORC Rep приводит к экспрессии фактически четырех белков Rep (т.е. Rep78, Rep68, Rep52 и Rep40). Однако было показано, что несплайсированная мРНК, кодирующая белки Rep78 и Rep52, в клетках млекопитающих достаточна для синтеза вектора ААВ. Также в клетках насекомых белки Rep78 и Rep52 достаточны для синтеза вектора ААВ.

Используемый здесь термин «парвовирусный или ААВ вектор» или «рААВ вектор» относится к молекуле нуклеиновой кислоты, содержащей одну или несколько представляющих интерес полинуклеотидных последовательностей (например, экспрессионную конструкцию для гена, кодирующего целевой продукт, т.е. «трансен»), которые фланкированы, по меньшей мере, одной парвовирусной или ААВ последовательностью инвертированного

концевого повтора (ITRs). Такие рААВ вектора могут реплицироваться и упаковываться в инфекционные вирионы, когда они находятся в клетке-хозяине, которая экспрессирует продукты генов *rep* и *cap* ААВ (т.е. белки Rep и Cap ААВ). Парвовирусный или ААВ вектор предпочтительно представляет собой рекомбинантную молекулу нуклеиновой кислоты, т.е. молекулу нуклеиновой кислоты, которая не встречается в природе и получена путем комбинации элементов последовательности, которые не встречаются в природе в этой комбинации и/или порядке.

Когда рААВ вектор встроен в более крупную конструкцию нуклеиновой кислоты (например, в хромосому или в другой вектор, такой как плаزمид или бакуловирус, используемый для клонирования или трансфекции), то этот рААВ вектор обычно называется «провектор», который может быть «спасен» путем репликации и инкапсидирования при наличии функций упаковки ААВ и необходимых желперных функций.

Предпочтительно, целевой генный продукт с каждой стороны фланкирован ITRs ААВ. Любой ITR ААВ может быть использован в способе настоящего изобретения, включая ITRs из ААВ1, ААВ2, ААВ4, ААВ5, ААВ6, ААВ8, ААВ9 и/или ААВrh10. ITRs ААВ2 являются наиболее предпочтительными. Примеры предпочтительных последовательностей ITR для использования в предпочтительных конструкциях нуклеиновых кислот приведены в SEQ ID NO: 1 (левый или 5'-ITR) и SEQ ID NO: 2 (правый или 3'-ITR).

ААВ способен инфицировать ряд клеток млекопитающих. См., например, Tratschin et al. (1985, Mol. Cell Biol. 5: 3251-3260) и Grimm et al. (1999, Hum. Gene Ther. 10: 2445-2450). Однако, трансдукция ААВ синовиальных фибробластов человека значительно эффективнее, чем аналогичных мышечных клеток, Jennings et al., Arthritis Res, 3:1 (2001), и клеточный тропизм ААВ различается у разных серотипов. См., например, Goncalves, 2005, Virol J. 2(1): 43, где обсуждаются подходы к модификации тропизма ААВ.

Вектор рААВ для использования в способе настоящего изобретения может быть получен или в клетках млекопитающих, или в клетках насекомых. Оба способа описаны в данной области

техники. Например, в работе Grimm et al. (2003 Molecular Therapy 7(6): 839-850) раскрыта стратегия получения AAV векторов визуально контролируемым способом без хелперного вируса, которая основана на трансфекции только двух плазмид в клетки 293Т. В этой работе описан способ получения гибридного вектора AAV, содержащего Rep белки AAV2, ITRs AAV2 и капсидные белки AAV5. Эта ссылка включена в настоящее изобретение полностью. Дополнительная информация также может быть получена из Blits et al. (2010) (Journal of Neuroscience methods 185(2): 257-263).

Термины «гибридный» и «псевдотипированный» используются здесь взаимозаменяемо и используются для обозначения векторов, в которых белки Rep, ITRs и/или капсидные белки получены из разных серотипов. Например, ITRs и белки Rep из AAV2, а капсидные белки из AAV5. Термин «химерный» используется здесь для описания того, что один ген, такой как, например, капсид, состоит из, по меньшей мере, двух последовательностей, полученных из разных серотипов.

Способы получения AAV

рAAV вектор в композиции настоящего изобретения может быть получен классическим способом получения рAAV. Такой классический способ получения основан на протоколах транзientной трансфекции клеток-мишеней/продуцирующих клеток (Merten et al, Gene Ther, 2006,, 12: S51-S61). Это подход, основанный на транс-комплементации и транзientной трансфекции, требует следующих генетических элементов: (i) последовательность генома рAAV. Последовательность генома рAAV может быть клонирована в плазмиду (так называемую вирусную векторную плазмиду). Эта вирусная векторная плазида как правило содержит, по меньшей мере, один ITR и экспрессионную кассету для экспрессии трансгена; (ii) последовательность, кодирующую гены гер и сар, и (iii) необходимые хелперные функции, кодируемые естественным вспомогательным вирусом, таким как аденовирус и/или вирус простого герпеса.

Например, рAAV может быть получен в клетках млекопитающего следующим способом, но без ограничений: векторный геном содержит трансгенную экспрессионную кассету, фланкированную двумя

инвертированными концевыми повторами (ITRs), полученными из ААВ серотипа 2. Общая длина генома вирусного вектора не может превышать размер генома дикого типа 4,7 т.п.н. для поддержания высокой эффективности упаковки. Один капсид состоит из 60 вирусных белков VP1 (62 кДа), VP2 (73 кДа) или VP3 (87 кДа) в соотношении 1:1:10. Способ получения векторов ААВ основан на $\text{Ca}(\text{PO}_4)_2$ трансфекции двух плазмид в клетки-продуценты почки эмбриона человека (HEK293) в роллерных флаконах (площадь поверхности 850 cm^2) с последующей очисткой капсидированных векторных геномов методами фильтрации и хроматографии. Первая плазида представляет собой вирусную векторную плазмиду и содержит экспрессионную конструкцию, которая фланкирована ITRs ААВ2. Вторая плазида представляет собой упаковочную плазмиду и кодирует гены ААВ *rep* типа 2 и *cap* типа 5 желаемого серотипа и ранние хелперные гены аденовируса E2A, VA, E4 (pDP5, нуклеотидная последовательность, раскрытая в SEQ ID NO: 3). Геном линии клеток-продуцентов содержит аденовирус E1 для обеспечения хелперных функций. После котрансфекции двумя плазидами в среде Дульбекко, модифицированной по способу Исков, (IMDM), содержащей 10% фетальной телячьей сыворотки (ФТС), клетки инкубировали в течение трех суток в бессывороточной модифицированной по способу Дульбекко среде Игла (DMEM), чтобы обеспечить образование вектора. Образование вектора в роллерных флаконах приводит к среднему выходу 3×10^3 векторных геномов на клетку или 4×10^{11} векторных геномов на роллерный флакон (определяется при помощи количественной ПЦР). Затем культуру клеток лизируют буфером, содержащим Тритон-Х-100, и клеточный дебрис удаляют при помощи низкоскоростного центрифугирования. Осветленную массу очищают с помощью аффинной хроматографии на AVB Sepharose и растворяют в ФСВ/5% сахарозу путем концентрирования и диафильтрации с использованием модуля полых волокон 400 кДа (например, от Spectrum Laboratories).

В альтернативном варианте, рААВ в композиции настоящего изобретения могут быть получены преимущественно независимым от трансфекции способом. Такие способы могут быть основаны или на

использовании упаковывающих/продуцирующих клеточных линий, которые продуцируют рААВ после индукции, или на использовании систем бакуловирус/клетка насекомого.

Упаковывающие клетки могут содержать часть всех необходимых генетических элементов ААВ, такие как хелперные последовательности *rep* и *cap* ААВ. Последующая индукция синтеза рААВ линией упаковывающих клеток может быть осуществлена путем трансфекции плазмиды, содержащей последовательность рААВ (вирусная векторная плаزمид), с последующим введением последовательности, кодирующей необходимые хелперные функции, такие как, например, инфицирование (репликативно дефицитным) аденовирусом и/или вирусом простого герпеса. Линии клеток-продуцентов могут быть полными транс-комплементарными системами, которые содержат все необходимые полученные из ААВ компоненты, интегрированные в их геном, то есть хелперные последовательности ААВ (*rep-cap*) вместе с вирусной векторной последовательностью. Индукция синтеза рААВ может происходить после введения последовательности, кодирующей необходимые хелперные функции.

С другой стороны, последовательность генома рААВ, содержащая, по меньшей мере, один ITR и экспрессионную кассету для экспрессии трансгена, может быть встроена в геном хелперного вируса, такого как аденовирус или вирус простого герпеса, соответственно образуя гибридную систему рААВ/Ад (Thorne et al., 2009; Hum. Gene Ther. 20; 707-714) или гибридную систему рААВ/ВПГ (Clement et al., 2009; Hum. Gene ther. 20; 796-806.; Ye et al., 2014; Hum. Gene Ther. 15; 1-6).

В альтернативном варианте, вектор ААВ для использования в способе настоящего изобретения может быть получен в клетках насекомых, как описано ранее Urabe et al. (Journal of Virology 2006 80 (4): 1874-1885). В этой системе последовательность генома рААВ может быть клонирована в рекомбинантный бакуловирус.

ДНК-примеси в композиции, содержащей парвовирусный вектор, могут иметь своим источником любой биологический компонент, используемый в способе получения композиции. Композиция может быть получена любым из описанных выше способов.

Предпочтительно, в способе настоящего изобретения

нуклеотидная последовательность биологического компонента выбрана из группы, состоящей нуклеотидных последовательностей клетки-хозяина, плазмиды, вектора и хелперного вируса. В предпочтительном варианте осуществления изобретения биологический компонент содержит, по меньшей мере, один из следующих генетических элементов: (i) последовательность генома рААВ, предпочтительно содержащая, по меньшей мере, один ITR и экспрессионную кассету для экспрессии трансгена; (ii) последовательность, кодирующую гены гер и/или сар, и/или (iii) последовательность, кодирующую необходимые хелперные функции, которые в природе кодируются вспомогательным вирусом, таким как аденовирус и/или вирус простого герпеса. Более предпочтительно, биологический компонент содержит, по меньшей мере, один ITR и экспрессионную кассету для экспрессии трансгена.

В предпочтительном способе настоящего изобретения вектор представляет собой бакуловирусный вектор. Baculoviridae представляет собой семейство крупных оболочечных ДНК-вирусов. Бакуловирусы инфицируют преимущественно членистоногих с огромным количеством восприимчивых видов, относящихся к порядку Lepidoptera. Несколько перевиваемых клеточных линий, таких как Sf9, Sf21 или High Five, позволяющих осуществлять размножение бакуловируса *in vitro*, являются коммерчески доступными и могут быть использованы для получения композиции настоящего изобретения.

Рекомбинантные бакуловирусы, полученные из вируса многоядерного полиэдроса *Autographa californica* (AcMNPV), наиболее часто используются в биотехнологии, в частности для получения рекомбинантных белков или вирусоподобных частиц (ВПЧ, т.е. оболочек, лишенных вирусных нуклеиновых кислот).

Основные преимущества получения, основанного на бакуловирусной экспрессионной векторной системе (BEVS), могут быть суммированы следующим образом: (i) наличие очень сильных промоторов (полиэдрин или p10) позволяет получать большое количество гетерологичных белков без ограничения размера гена; (ii) клетки насекомых обладают способностью выполнять основные посттрансляционные модификации, что позволяет получать

биологически активные белки; и (iii) бакуловирусная технология может быть легко реализована, масштабирование легко достижимо, клетки выращиваются в суспензии, и различные бессывороточные среды являются коммерчески доступными.

Сборка вирусных частиц является более сложным процессом, чем экспрессия одного белка. Тем не менее, было показано, что ВПЧ на основе вируса гепатита В человека, парвовируса В19, ротавируса, вируса папилломы человека могут быть успешно получены с помощью BEVS. Кроме того, бакуловирусная экспрессионная векторная система может быть использована для получения рААВ (Merten et al, выше, Urabe et al., 2002).

Таким образом, в способе настоящего изобретения парвовирусный вирион может быть получен с использованием бакуловирусной экспрессионной векторной системы в клетках млекопитающих или в клетках насекомых. Предпочтительно парвовирусный вирион получают с использованием бакуловирусной экспрессионной векторной системы в клетках насекомых.

В предпочтительном варианте осуществления изобретения бакуловирусный вектор содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую Rep, Cap и/или трансен, где предпочтительно бакуловирусный вектор содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую трансен, где более предпочтительно бакуловирусный вектор содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую трансен, который фланкирован по меньшей мере одним парвовирусным ITR, и где наиболее предпочтительно бакуловирусный вектор содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую трансен, который фланкирован, по меньшей мере, одним парвовирусным ITR с каждой стороны.

Также в настоящем изобретении могут быть использованы модификации последовательностей Rep и VP1, VP2 и VP3, например, раскрытые в публикациях международных патентных заявок WO2007/046703, WO2007/148971, WO2009/014445, WO2009/104964 и/или WO2011/112089.

Последовательности ITR и Rep ААВ, которые могут быть использованы в способе настоящего изобретения для получения векторов рААВ, могут быть получены из генома ААВ любого

серотипа. Как правило, серотипы ААВ имеют геномные последовательности, обладающие значительной гомологией на аминокислотном и нуклеотидном уровне. Это обеспечивает идентичный набор генетических функций для получения вирионов, которые в значительной степени являются физически и функционально эквивалентными. Геномные последовательности различных серотипов ААВ и обзор геномных сходств см., например, в регистрационный номер в GenBank U89790; регистрационный номер в GenBank J01901; регистрационный номер в a GenBank AF043303; регистрационный номер в GenBank AF085716; Chiorini et al. (1997, J. Vir. 71: 6823-33); Srivastava et al. (1983, J. Vir. 45:555-64); Chiorini et al. (1999, J. Vir. 73:1309-1319); Rutledge et al. (1998, J. Vir. 72:309-319); и Wu et al. (2000, J. Vir. 74: 8635-47). рААВ серотипов 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 и 12 могут быть использованы в качестве источника нуклеотидных последовательностей для применения в контексте настоящего изобретения. рААВ серотипов 1, 2, 3, 4 и 5 являются предпочтительным источником нуклеотидных последовательностей ААВ. Предпочтительно последовательности ITR ААВ в контексте настоящего изобретения получены из ААВ1, ААВ2 и/или ААВ 5. Более предпочтительно, последовательности ITR в способе настоящего изобретения представляют собой ITR ААВ2. Аналогично, кодирующие последовательности Rep (Rep78/68 и Rep52/40) предпочтительно получены из ААВ1, ААВ2 и/или ААВ5, более предпочтительно из ААВ2.

Последовательности Rep и ITR ААВ являются особенно консервативными среди большинства серотипов. Белки Rep78 различных серотипов ААВ являются, например, более чем на 89% идентичными, а общая идентичность нуклеотидной последовательности на уровне генома между ААВ2, ААВ3А, ААВ3В и ААВ6 составляет около 82% (Bantel-Schaal et al., 1999, J. Virol., 73 (2): 939-947). Кроме того, известно, что последовательности Rep и ITR многих серотипов ААВ являются эффективными кросс-комплементами, т.е. они функционально заменяют соответствующие последовательности из других серотипов при получении частиц ААВ в клетках млекопитающих. В заявке на

Патент США US2003148506 сообщается, что последовательности Rep и ITR AAB также являются эффективными кросс-комплементариями других последовательностей Rep и ITR AAB в клетках насекомых.

Известно, что белки VP AAB определяют клеточный тропизм вириона AAB. Последовательности, кодирующие белок VP, у различных серотипов AAB значительно менее консервативны, чем белки и гены Rep. В предпочтительном варианте осуществления изобретения вектор рAAB содержит белки VP1. Способность последовательностей Rep и ITR к кросс-комплементации с соответствующими последовательностями других серотипов позволяет получать псевдотипированные частицы рAAB, содержащие капсидные белки одного серотипа (например, AAB5) и последовательности Rep и/или ITR AAB другого серотипа (например, AAB). Такие псевдотипированные частицы рAAB являются частью способа настоящего изобретения. В данном случае псевдотипированная частица рAAB может быть обозначена типом «х/у», где «х» обозначает источник ITR, а «у» обозначает серотип капсида, например, частица рAAB 2/5 имеет ITR из AAB2 и капсид из AAB5.

Модифицированные последовательности AAB также могут использоваться в контексте настоящего изобретения, например, для получения векторов рAAB в клетках насекомых. Такие модифицированные последовательности, например, включающие в себя последовательности, обладающие, по меньшей мере, примерно 70%, по меньшей мере, примерно 75%, по меньшей мере, примерно 80%, по меньшей мере, примерно 85%, по меньшей мере, примерно 90%, по меньшей мере, примерно 95% или более идентичности по нуклеотидной и/или аминокислотной последовательности (например, последовательность, обладающая от примерно 75% до примерно 99% идентичности по нуклеотидной последовательности) с ITR, Rep или VP AAB1, AAB2, AAB3, AAB4, AAB5, AAB6, AAB7, AAB8 или AAB9, могут быть использованы вместо последовательностей ITR, Rep или VP AAB дикого типа.

Последовательности ITR, Rep и Cap могут быть модифицированы желаемым образом для обеспечения эффективного образования рAAB или псевдотипированных векторов рAAB в клетках, таких как клетки насекомых. Например, старт-кодон последовательностей Rep может

быть модифицирован, сайты сплайсинга VP могут быть модифицированы или удалены, и/или старт кодон VP1 может быть модифицирован для улучшения образования векторов рAAB в клетках (насекомых), как, например, описано в Международных патентных заявках WO2007/046703, WO2007/148971 и/или WO2009/014445. Также настоящее изобретение относится к химерным капсидам AAB, где, например, VP1 AAB5 частично или полностью заменен VP1, полученным из AAB2, а VP2 и 3 получены из AAB5 (Urabe et al., 2006; WO2000/028004). Предпочтительные аденовирусные векторы модифицируют, чтобы уменьшить ответ хозяина, как описано в Russell (2000, J. Gen. Virol. 81: 2573-2604), или как описано в заявке на Патент США US20080008690 и в Zaldumbide and Hoeben (Gene Therapy 2008: 239-246).

Предпочтительно, белок Rep AAB, содержащийся в векторе для генной терапии настоящего изобретения, представляет собой белок Rep AAB серотипа 2. Еще более предпочтительно, в настоящем изобретении используется белок Rep78, имеющий нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 4 и/или аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5, и в настоящем изобретении используется белок Rep52, имеющий нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 6.

Количественное определение избыточной примеси нуклеиновой кислоты

В альтернативном варианте или в комбинации с любым из описанных здесь вариантов осуществления изобретения, настоящее изобретение также относится к количественному определению избыточной примеси нуклеиновой кислоты. В частности, настоящее изобретение относится к открытию того, что конкретные ДНК-примеси представлены в избыточном количестве в композиции, содержащей парвовирусный вектор. Эти ДНК-примеси содержат нуклеотидные последовательности, которые непосредственно фланкируют ITRs парвовирусной нуклеотидной последовательности в процессе получения парвовирусного вириона. Так, например, последовательности, расположенные перед левым парвовирусным ITR и/или последовательности, расположенные после правого парвовирусного ITR, являются избыточными в парвовирусном

вирионе.

Таким образом, в другом аспекте настоящее изобретение относится к способу количественного определения примеси нуклеиновой кислоты в композиции, содержащей парвовирусный вектор, где этот способ включает в себя этап определения относительного содержания примеси нуклеиновой кислоты, где эта примесь нуклеиновой кислоты содержит нуклеотидную последовательность, которая расположена между 1 и 8000 п.н., 1 и 5000 п.н., 1 и 3000 п.н., 1 и 1000 п.н., 1 и 500 п.н., 1 и 250 п.н. или 1 и 100 п.н., непосредственно примыкающими к последовательности парвовирусного ITR, где последовательность ITR присутствует в биологическом компоненте, используемом в способе получения композиции, и где биологический компонент содержит трансген, фланкированный, по меньшей мере, одной копией последовательности парвовирусного ITR. В другом варианте осуществления настоящее изобретение относится к способу количественного определения примеси нуклеиновой кислоты в композиции, содержащей парвовирусный вектор, где этот способ состоит из этапа определения относительного содержания примеси нуклеиновой кислоты, где эта примесь нуклеиновой кислоты содержит нуклеотидную последовательность, которая расположена между 1 и 8000 п.н., 1 и 5000 п.н., 1 и 3000 п.н., 1 и 1000 п.н., 1 и 500 п.н., 1 и 250 п.н. или 1 и 100 п.н., непосредственно примыкающими к последовательности парвовирусного ITR, где последовательность ITR присутствует в биологическом компоненте, используемом в способе получения композиции, и где биологический компонент содержит трансген, фланкированный, по меньшей мере, одной копией последовательности парвовирусного ITR.

Как указано выше, во время процесса получения парвовирусных вирионов парвовирусная последовательность может присутствовать в клетке-хозяине, плазмиде, векторе и/или хелперном вирусе, где предпочтительный вектор представляет собой бакуловирусный вектор. Парвовирусная последовательность может содержать, по меньшей мере, одну копию ITR и экспрессионную кассету для экспрессии трансгена. Избыточные ДНК-примеси могут содержать

любую последовательность, которая непосредственно фланкирует парвовирусный ITR или ITRs, такие как геномные последовательности, плазмидные последовательности, векторные последовательности или последовательности хелперного вируса. Таким образом, тип ДНК-примеси зависит от последовательностей от последовательностей, фланкирующих ITR при получении парвовирусных вирионов. Например, если парвовирусная последовательность, содержащая, по меньшей мере, одну копию ITR и предпочтительно трансген, присутствует в бакуловирном векторе, то бакуловирусные последовательности, непосредственно фланкирующие ITR или ITRs, будут представлены в избыточном количестве в композиции, содержащей парвовирусный вектор.

В одном варианте осуществления изобретения примесь нуклеиновой кислоты количественно определяют в композиции, содержащей парвовирусный вектор. Способ количественного определения примеси нуклеиновой кислоты может включать в себя любой способ, известный из уровня техники для количественного определения нуклеиновой кислоты. Такие способы включают в себя без ограничений высокопроизводительное секвенирование, количественную ПЦР, ПЦР с ограниченным числом циклов, гибридизационный анализ, анализ с использованием микрочипа и электрофорез в агарозном геле.

В еще одном варианте осуществления настоящего изобретения биологический компонент определяется, как указано выше. В частности, биологический компонент выбран из группы, состоящей из клетки-хозяина, плазмиды, вектора, отличного от рекомбинантного парвовирусного вектора, и хелперного вируса. Предпочтительно, биологический компонент содержит парвовирусную последовательность, где предпочтительно парвовирусная последовательность содержит, по меньшей мере, один ITR и нуклеотидную последовательность, кодирующую трансген. Наиболее предпочтительно, биологический компонент содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую трансген, который фланкирован, по меньшей мере, одним парвовирусным ITR с каждой стороны.

В наиболее предпочтительном варианте осуществления изобретения биологический компонент представляет собой вектор,

где этот вектор представляет собой бакуловирусный вектор. Бакуловирусный вектор предпочтительно содержит парвовирусную последовательность. Эта парвовирусная последовательность предпочтительно содержит, по меньшей мере, один ITR и нуклеотидную последовательность, кодирующую трансен. Наиболее предпочтительно, бакуловирусный вектор содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую трансен, которая фланкирована, по меньшей мере, одним парвовирусным ITR с каждой стороны.

В способе настоящего изобретения примесь нуклеиновой кислоты содержит нуклеотидную последовательность, которая расположена между 1 и 10000 п.н., 1 и 9000 п.н., 1 и 8000 п.н., 1 и 7000 п.н., 1 и 6000 п.н., 1 и 5000 п.н., 1 и 4000 п.н., 1 и 3000 п.н., 1 и 2000 п.н., 1 и 1000 п.н., 1 и 800, 1 и 600 п.н. 1 и 500 п.н., 1 и 400 п.н., 1 и 250 п.н. или 1 и 100 п.н., непосредственно примыкающими к последовательности парвовирусного ITR, которая присутствует в биологическом компоненте, используемом в способе получения композиции. Длина ДНК-примеси может зависеть от присутствия других случайно упакованных ДНК-примесей и/или от размера трансгена, так как существует максимальная упаковочная емкость парвовирусного вириона. Однако известно, что парвовирусный вирион может включать более длинные последовательности ДНК, чем длина его собственного генома (Grieger et al, J Virol. 2005 79(15): 9933-44).

В предпочтительном варианте осуществления изобретения парвовирусный вектор представляет собой вектор на основе рекомбинантного аденоассоциированного вируса (рААВ), как описано выше. Кроме того, вирион рААВ может быть получен с использованием любого из способов получения, как описано ранее.

В другом варианте осуществления изобретения нуклеотидная последовательность примеси нуклеиновой кислоты непосредственно примыкает к каждому концу последовательности парвовирусного ITR, где последовательность ITR присутствует в биологическом компоненте, используемом в способе получения композиции. Парвовирусная последовательность, присутствующая в биологическом компоненте, может содержать трансен, который фланкирован, по меньшей мере, одним ITR на каждой конце трансгена. В этом случае

примесь нуклеиновой кислоты может содержать нуклеотидные последовательности, которые присутствуют на одном конце ITR, т.е. только непосредственно примыкают к левым ITRs или только непосредственно примыкают к правым ITRs. В альтернативном варианте, нуклеотидная последовательность примеси нуклеиновой кислоты может содержать нуклеотидные последовательности, которые присутствуют на обоих концах ITRs.

В одном варианте осуществления изобретения примеси нуклеиновой кислоты содержит нуклеотидную последовательность, которая непосредственно примыкает к последовательности парвовирусного ITR, где последовательность ITR присутствует в биологическом компоненте, используемом в способе получения композиции. «Непосредственно примыкает» определяется здесь следующим образом: В случае ITR перед трансгеном «непосредственно примыкает» означает любую нуклеотидную последовательность, которая заканчивается, по меньшей мере, за 0, 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 40 или 50 п.н. перед ITR. В случае ITR, расположенного после трансгена, «непосредственно примыкает» означает любую нуклеотидную последовательность, которая начинается, по меньшей мере, через 0, 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 40 или 50 п.н. после ITR.

Относительное содержание

В одном варианте осуществления изобретения способ включает в себя этап определения относительного содержания примеси нуклеиновой кислоты. Используемый здесь термин «относительное содержание» относится к присутствию (части) первой молекулы нуклеиновой кислоты по сравнению с присутствием (части) второй молекулы нуклеиновой кислоты в той же самой или другой композиции. В случае если относительное содержание определяется между двумя или более композициями, вторая молекула нуклеиновой кислоты может содержать такую же или другую нуклеотидную последовательность, что и первая молекула нуклеиновой кислоты. В случае если относительное содержание определяется в одной композиции, первая и вторая молекулы нуклеиновой кислоты содержат, по меньшей мере, частично другую нуклеотидную последовательность.

В способе настоящего изобретения относительное содержание между примесью нуклеиновой кислоты и второй молекулой нуклеиновой кислоты предпочтительно определяют в той же композиции, хотя в другом варианте осуществления изобретения, относительное содержание примеси нуклеиновой кислоты определяют между разными композициями. В предпочтительном способе настоящего изобретения относительное содержание определяют по сравнению с нуклеотидной последовательностью парвовирусного вектора и/или референсной последовательностью в композиции. Предпочтительно, чтобы трансгенная и/или референсная последовательность присутствовали в той же композиции, что и примесь нуклеиновой кислоты.

Нуклеотидная последовательность парвовирусного вектора может содержать любую последовательность парвовирусного вектора, такую как полный парвовирусный вектор, или (часть) нуклеотидной последовательности трансгена, промотора или ITRs. Однако любая другая нуклеотидная последовательность парвовирусного вектора может быть одинаково пригодна для использования в способе настоящего изобретения.

Референсная последовательность может представлять собой любую подходящую нуклеотидную последовательность (или ее часть). Предпочтительно референсная последовательность представляет собой последовательность (или ее часть) гена домашнего хозяйства. Нуклеотидная последовательность биологического компонента и/или референсная последовательность представляет собой последовательность нуклеиновой кислоты, которая используется в качестве добавленного контроля композиции.

В случае если референсная последовательность представляет собой последовательность биологического компонента, то эта последовательность не является непосредственно фланкирующей парвовирусный ITR, и эта референсная последовательность предпочтительно получена из клетки-хозяина, плазмиды или вектора, используемого в способе получения композиции. Предпочтительно референсная последовательность получена из того же биологического компонента, содержащего трансген и, по меньшей мере, один ITR. Более предпочтительно, референсная

последовательность содержит последовательность из бакуловирусного вектора, где этот бакуловирусный вектор используется в способе получения композиции, и содержит трансген и, по меньшей мере, один ITR, и эта референсная бакуловирусная последовательность не является непосредственно фланкирующей парвовирусный ITR.

В случае если референсная последовательность представляет собой нуклеиновую кислоту, которая используется в качестве добавленного контроля композиции, то предполагается, что эта нуклеиновая кислота отсутствует после получения композиции и добавляется в более поздний момент времени, но до определения относительного содержания примеси нуклеиновой кислоты. Молекула нуклеиновой кислоты, используемая в качестве добавленного контроля композиции, может представлять собой любую подходящую молекулу нуклеиновой кислоты, такую как небольшая линейная или кольцевая молекула РНК или ДНК размером, по меньшей мере, 10, 30, 50, 100, 150, 200, 500, 1000 или более пар оснований. Такая молекула нуклеиновой кислоты может содержать кодирующую и/или некодирующую область.

В еще одном варианте осуществления изобретения относительное содержание определяется:

а) средним количеством прочтений на нуклеиновую кислоту примеси нуклеиновой кислоты, как определено выше; и

i) средним количеством прочтений на нуклеиновую кислоту референсной последовательности; и/или

ii) средним количеством прочтений на парвовирусный вектор в композиции;

где количество прочтений определяется любым вышеописанным способом; и/или

b) амплификацией примеси нуклеиновой кислоты, как определено выше; и

i) референсной последовательностью; и/или

ii) нуклеотидной последовательностью парвовирусного вектора.

В предпочтительном варианте осуществления изобретения среднее количество прочтений определяется, как указано выше.

Кроме того, парвовирусный вектор может относиться к любой последовательности парвовирусного вектора, такой как полный парвовирусный вектор, или только нуклеотидная последовательность трангена (ее часть), промотор или ITRs. Кроме того, любая другая нуклеотидная последовательность парвовирусного вектора может быть одинаково пригодна для использования в способе настоящего изобретения.

В еще одном варианте осуществления изобретения относительное содержание примеси нуклеиновой кислоты может быть определено любым способом, подходящим для определения количества молекулы нуклеиновой кислоты, как указано выше. Более предпочтительно, относительное содержание определяется при помощи количественной ПЦР и/или при помощи высокопроизводительного секвенирования. Любой способ количественной ПЦР или способ высокопроизводительного секвенирования, который приводит к количественному определению нуклеиновой кислоты, является пригодным для использования в способе настоящего изобретения. Способы количественной ПЦР (полимеразной цепной реакции в режиме реального времени) хорошо известны из уровня техники, и в этих способах могут использоваться или неспецифичные флуорохромы, или гибридизационные зонды. В предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения количественную ПЦР проводят с использованием специфичных гибридизационных зондов.

Предпочтительно способ дополнительно включает в себя этап селективной гибридизации олигонуклеотидного праймера с примесью нуклеиновой кислоты, как определено выше.

Под селективной гибридизацией олигонуклеотидного праймера с примесью нуклеиновой кислоты понимается, что олигонуклеотид образует продуктивный или позитивный дуплекс с примесью нуклеиновой кислоты. Образование такого продуктивного или позитивного дуплекса следует понимать как образование дуплекса между олигонуклеотидом и примесью нуклеиновой кислоты, которое может быть обнаружено путем образования ампликона в анализе при помощи количественной ПЦР. На практике это будет означать, что конец олигонуклеотидного праймера будет образовывать дуплекс с

примесью нуклеиновой кислоты, так что олигонуклеотид может быть удлинён полимеразой или лигирован с присоединённой к соседнему основанию поли- или олигонуклеотидной молекулой. Используемый здесь термин «ампликон» относится к двухцепочечному сегменту нуклеиновой кислоты, имеющему определённый размер и последовательность, который образуется в результате процедуры амплификации, такой как процедура ПЦР. Размер ампликона определяется сайтами на двух цепях дуплекса нуклеиновой кислоты, с которыми связываются олигонуклеотидные праймеры. Как объясняется в Патенте США No.4683195, этот сегмент нуклеиновой кислоты продукта становится преобладающим продуктом процедуры амплификации после небольшого числа циклов амплификации. Кроме того, последовательность является «специфичной» или «селективной» для примеси нуклеиновой кислоты, если она эффективно гибридизуется с целевой последовательностью, но не гибридизуется с любой последовательностью, которая не является примесью нуклеиновой кислоты, как определено выше, в условиях, используемых с учётом экспериментальных возможностей.

В предпочтительном варианте осуществления олигонуклеотидный праймер избирательно гибридизуется с примесью нуклеиновой кислоты, содержащей часть бакуловирусной последовательности или её комплемент. Используемый здесь термин «комплемент» или «комплементарная последовательность» первой последовательности означает вторую последовательность, которая может образовывать двухцепочечную структуру или дуплекс с первой последовательностью путём связывания пар оснований, например, комплементарной последовательностью для G-T-A-C является C-A-T-G.

Таким образом, предпочтительно, чтобы нуклеиновая кислота была получена из бакуловирусного вектора, используемого в способе получения композиции. В частности, предпочтительно, чтобы такой бакуловирусный вектор содержал транстен, фланкированный, по меньшей мере, одним парвовирусным ITR. В предпочтительном варианте осуществления изобретения олигонуклеотидный праймер селективно гибридизуется с примесью нуклеиновой кислоты, где примесь нуклеиновой кислоты содержит

нуклеотидную последовательность, полученную из бакуловируса, которая расположена между 1 и 10000 п.н., 1 и 9000 п.н., 1 и 8000 п.н., 1 и 7000 п.н., 1 и 6000 п.н., 1 и 5000 п.н., 1 и 4000 п.н., 1 и 3000 п.н., 1 и 2000 п.н., 1 и 1000 п.н., 1 и 800, 1 и 600 п.н. 1 и 500 п.н., 1 и 400 п.н., 1 и 250 п.н. или 1 и 100 п.н., непосредственно примыкающими к последовательности парвовирусного ITR, когда эта последовательность парвовирусного ITR присутствует в бакуловирусном векторе.

Клиническое применение

Композиция, содержащая парвовирусный вектор, не должна содержать высокую степень примесей нуклеиновых кислот, особенно если композиция должна использоваться при лечении. В частности, такие примеси нуклеиновой кислоты могут вызывать побочные реакции у обычно уже чувствительных пациентов, что может привести к тяжелым осложнениям. Настоящее изобретение относится к открытию, что ДНК-примеси что ДНК-примеси упаковываются в парвовирусный вирион не случайным образом. В действительности, последовательности, которые фланкируют ITR во время образования парвовирусных вирионов, являются избыточными. Таким образом, в другом аспекте настоящее изобретение относится к способу определения того, является ли композиция, содержащая парвовирусный вектор, клинически чистой, где этот способ включает в себя этапы:

i) количественного определения примеси нуклеиновой кислоты в композиции, содержащей парвовирусный вектор, как определено выше; и

ii) определение того, что композиция является клинически чистой, если примесь нуклеиновой кислоты, как определено выше, присутствует, по меньшей мере, в 10, 100, 250, 1000 раз меньшем количестве, по сравнению с референсной последовательностью и/или трансгеном, как определено по относительному содержанию примеси нуклеиновой кислоты.

Клинически чистый здесь определяется как фармацевтический продукт высокого качества, который представляет собой композицию, которая считается безопасной для введения животным, предпочтительно фармацевтический продукт высокого качества

представляет собой продукт, который считается безопасным для введения млекопитающим, наиболее предпочтительно композиция считается безопасной для введения людям.

В предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения примесь нуклеиновой кислоты, как определено выше, присутствует, по меньшей мере, в 10, 100, 150, 200, 250, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 10000 или 100000 раз меньшем количестве, по сравнению с трансгеном или референсной последовательностью. Присутствие примеси нуклеиновой кислоты и трансгенной или эталонной последовательности может быть количественно определено любым стандартным способом количественного определения конкретной последовательности ДНК.

Под термином «клинически чистый» здесь подразумевается, что композиция, содержащая парвовирусный вектор, считается достаточно чистой для клинического применения. В частности, клинически чистая композиция в соответствии с настоящим изобретением содержит низкую степень ДНК-примесей в соответствии с требованиями Руководства по качеству и безопасности Международной конференции по гармонизации технических требований к регистрации лекарственных препаратов для медицинского применения (ICH). Предпочтительным является уровень ДНК-примеси ниже уровня, вызывающего любые неблагоприятные эффекты у пациентов.

В настоящем описании и формуле изобретения глагол «содержать» и его спряжения используется в его неограничивающем смысле, что означает, что предметы, следующие за этим словом, включены, но элементы, не указанные конкретно, не исключаются. Кроме того, упоминание элемента в единственном числе не исключает возможности наличия более одного элемента, если только контекст явно не требует наличия одного и только одного из элементов. Таким образом, упоминание элемента в единственном числе, как правило, означает «по меньшей мере, один».

Все патентные и литературные ссылки, приведенные в настоящем описании, включены в него полностью путем ссылки.

Следующие примеры предлагаются только для иллюстративных целей и никак не предназначены для ограничения объема настоящего

изобретения.

ССЫЛКИ

1. Fujita, R., Matsuyama, T., Yamagishi, J., Sahara, K., Asano, S., and Bando, H. (2006) Expression of Autographa californica multiple nucleopolyhedrovirus genes in mammalian cells and upregulation of the host beta-actin gene, *J. Virol.* 80, 2390-2395.
2. Liu, C. Y., Wang, C. H., Wang, J. C., and Chao, Y. C. (2007) Stimulation of baculovirus transcriptome expression in mammalian cells by baculoviral transcriptional activators, *J. Gen. Virol.* 88, 2176-2184.
3. Laakkonen, J. P., Kaikkonen, M. U., Ronkainen, P. H., Ihalainen, T. O., Niskanen, E. A., Hakkinen, M., Salminen, M., Kulomaa, M. S., Yla-Herttuala, S., Airenne, K. J., and Vihinen-Ranta, M. (2008) Baculovirus-mediated immediate-early gene expression and nuclear reorganization in human cells, *Cell Microbiol.* 10, 667-681.
4. Blouin, V., Brument, N., Toubanc, E., Raimbaud, I., Moullier, P., and Salvetti, A. (2004) Improving rAAV production and purification: towards the definition of a scaleable process, *J. Gene Med.* 6 Suppl 1, S223-S228
5. Nony, P., Chadeuf, G., Tessier, J., Moullier, P., and Salvetti, A. (2003) Evidence for packaging of rep-cap sequences into adeno-associated virus (AAV) type 2 capsids in the absence of inverted terminal repeats: a model for generation of rep-positive AAV particles, *J. Virol.* 77, 776-781.
6. Chadeuf, G., Ciron, C., Moullier, P., and Salvetti, A. (2005) Evidence for encapsidation of prokaryotic sequences during recombinant adeno-associated virus production and their in vivo persistence after vector delivery, *Mol. Ther.* 12, 744-753.
7. Wright, J. F. (2008) Manufacturing and characterizing AAV-based vectors for use in clinical studies, *Gene Ther.* 15, 840-848.
8. Arsalan Haseeb Zaidi, Patrick J. Bakkes, Jacek Lubelski, Herfita Agustindari, Oscar P. Kuipers, and Arnold J. M.

Driessen (2008) The ABC-Type Multidrug Resistance Transporter LmrCD Is Responsible for an Extrusion-Based Mechanism of Bile Acid Resistance in *Lactococcus lactis* *Journal of Bacteriology*, 7357-7366

9. Jean - Marie Rouillard, Michael Zuker and Erdogan Gulari (2003) OligoArray 2.0: Design of oligonucleotide probes for DNA microarrays using a thermodynamic approach, *Nucleic Acids Research*, Vol. 31, No. 12 3057-3062

10. Van Hijum SA., de la Nava GJ, Trelles O., Kok J., Kuipers OP., (2003) MicroPreP: a cDNA microarray data pre-processing framework. *Appl Bioinformatics*, 2(4):241-4

11. P. Baldi and A.D. Long, (2001) A Bayesian Framework for the Analysis of Microarray Expression Data: Regularized t-Test and Statistical Inferences of Gene Changes, *Bioinformatics*, 17, 6, 509-519.

12. Krappa, R., Roncarati, R., Knebel-Morsdorf, D., (1995) Expression of PE38 and IE2, Viral members of the C3HC4 finger family, during baculovirus infection: PE38 and IE2 localize to distinct nuclear regions, *J Virol*, 5287-5293.

13. Gerhard Schwarz, Stefan BaÈumler, Annette Block, Friedrich G. Felsenstein and Gerhard Wenzel (2004) Determination of detection and quantification limits for SNP allele frequency estimation in DNA pools using real time PCR *Nucleic Acids Research*, Vol. 32, No. 3 e24

14. Yaffe David, Saxel Ora, (1977) Serial passaging and differentiation of myogenic cells isolated from dystrophic mouse muscle, *Nature* 270, 725-727

15. Manno, CS, Pierce, GF, Arruda, VR, Glader, B, Ragni, M, Rasko, J et al. (2006).

Successful transduction of liver in hemophilia by AAV-factor IX and limitations

imposed by the host immune response. *Nat Med* 12: 342-347.

16. Mingozzi, F, Maus, MV, Hui, DJ, Sabatino, DE, Murphy, SL, Rasko, JE et al. (2007).

CD8+ T-cell responses to adeno-associated virus capsid in humans. *Nat Med* 13:

419-422.

17. Christine L. Halbert*, Michael J. Metzger*, Siu-Ling Lam, and A. Dusty Miller (2011) Capsid-expressing DNA in AAV vectors and its elimination by use of an oversize capsid gene for vector production. *Gene Ther.* 18(4): 411-417

18. Bernd Hauck, Samuel L Murphy, Peter H Smith, Guang Qu, Xingge Liu, Olga Zelenai, Federico Mingozzi, Jürg M Sommer, Katherine A High and J Fraser Wright (2009) Undetectable Transcription of cap in a Clinical AAV Vector: Implications for Preformed Capsid in Immune Responses. *Mol Ther.* 17(1) 144-152

Описание чертежей

Фигура 1. Устойчивость AAB1-трансгена (верхние изображения) и бакуловирусной ДНК (средние и нижние изображения) к действию ДНКазы I. Количество ДНК определяли при помощи количественной ПЦР с использованием трех различных наборов праймеров, с обработкой ДНКазой или без нее. Для каждого набора праймеров проверяли две партии. А) и В) набор праймеров 59/60, С) и D) набор праймеров 180/181, Е) и F) набор праймеров 340/341.

Фигура 2. Карта последовательности бакуловирусной плазмиды Vas.VD. Показаны используемые наборы праймеров и ITRs.

Фигура 3. Относительное количество копий генома, обнаруженное различными наборами праймеров. На оси указывается местоположение ампликонов. Ампликон 5214-5284 представляет собой CMV-промотор AAB-трансгенной кассеты. Ампликон 73555-73604 получен с набором праймеров 340/341 и расположен дальше всего от AAB-трансгенной кассеты. Каждая точка представляет собой одно измерение.

Фигура 4. pAAB, содержащий трансген, анализировали путем глубокого секвенирования. Полученные прочтения выравнивали с трансгеном (А), кассетой cap (В) или кассетой rep (С).

Фигура 5. pAAB анализировали путем глубокого секвенирования. Полученные прочтения выравнивали с бакуловирусным геномом. Показано распределение прочтений на нуклеотид бакуловирусной основы. Нуклеотид 1 представляет собой правый ITR, как показано на Фигуре 2.

Фигура 6. Пять различных партий векторов pAAB были

протестированы на ДНК-примеси с использованием количественной ПЦР или глубокого секвенирования при помощи технологии Illumina или Roche 454.

Примеры

Пример 1: ДНК-примеси при получении векторов рААВ

1.1 Материалы и методы

Чтобы исследовать, была ли остаточная ДНК упакована в частицы AAV1, проверяли, является ли остаточная ДНК устойчивой к действию ДНКазы. Образцы обрабатывали бензоназой (9Ед/мл) и количество ДНК анализировали при помощи количественной ПЦР.

ДНК выделяли из образцов с последующим проведением количественной ПЦР, используя три разных набора праймеров (59/60, 180/181, 340/341). Чтобы исследовать устойчивость бакуловирусной ДНК к ДНКазе, для некоторых образцов этап обработки ДНКазой был пропущен (обозначено как без ДНКазы). Данные анализировали методом близкого лигирования, и для каждого образца определяли соотношения количества ДНК, амплифицированного различными наборами праймеров.

Количество ДНК AAV1 определяли при помощи количественной ПЦР с набором праймеров 59/90, специфичным по отношению к промотору CMV вектора AAV1-трансген. Количественное определение остаточной бакуловирусной ДНК проводили при помощи количественной ПЦР с бакуловир-специфичными праймерами. Эксперименты проводились с использованием двух разных наборов праймеров; набор праймеров 180/181, специфичный по отношению к ОРС 1629 ДНК бакуловируса, рядом с AAV-трансгенной кассетой, и набор праймеров 340/341, специфичный по отношению к последовательности hr3 бакуловируса, обнаруживая бакуловирусную ДНК, расположенную удаленно от AAV-трансгенной кассетой. Для этих экспериментов были включены два стандарта: стандартная линия плазмиды (pVD) и очищенная бакуловирусная ДНК клона VD.

Для определения количества бакуловирусной ДНК с использованием набора праймеров 180/181 в качестве стандарта использовали pVD с набором праймеров 180/181. Концентрацию pVD определяли с помощью измерений ОП. Для определения количества бакуловирусной ДНК с использованием наборов праймеров 340/341 в

качестве стандарта использовали BacVD с набором праймеров 340/341. Количество BacVD для стандартной линии определяли при помощи количественной ПЦР с использованием набора праймеров 180/181 с pVD в качестве стандарта.

Количество ДНК (гк/мл) рассчитывали по формуле:

$$[ДНК] = S \cdot D \cdot C$$

где:

S=Среднее измеренное количество (геномные копии, гк)

D=Коэффициент разбавления вирусной ДНК (или в 500 раз или в 1000 раз)

C=Поправочный коэффициент для расчета от 10 мкл образца к 1 мл образца (100)

Для вычисления количества ДНК в мкг/мл, формула была расширена до:

$$[ДНК] = \frac{S \cdot D \cdot C \cdot X}{A} \cdot Mw \Rightarrow \dots \dots \text{мкг} / \text{мл}$$

где:

X=Коэффициент пересчета для г в мкг (10^6)

A=Число Авогадро ($6,022 \times 10^{23}$)

Mw=Молекулярная масса ДНК. Бакуловирусный геном состоит из 135 т.п.н. двухцепочечной ДНК. Средняя молекулярная масса на п.н. составляет 649 Да. В качестве Mw для бакуловирусной ДНК (после определения с использованием наборов праймеров 180/181 или 340/341), использовали Mw $135000 \cdot 649 = 8,76 \times 10^7$ Да.

Геном AAB1 состоит из одноцепочечной ДНК длиной 3630 п.н. Чтобы вычислить количество ДНК AAB1, Mw 3630 п.н. $\cdot 340$ Да = $1,23 \times 10^6$ Да.

1.2 Результаты

Количество бакуловирусной ДНК определяли при помощи количественной ПЦР с использованием двух разных наборов праймеров. Набор праймеров 180/181 обнаруживает последовательность в ОРС 1629, расположенную рядом с AAB-трансенной кассетой, в то время как последовательность для набора праймеров 340/341 расположена удаленно от кассеты. Результаты, приведенные в Таблице 1, показывают, что два набора

праймеров дают очень разные значения для количества гк/мл бакуловирусной ДНК (набор праймеров 180/181 дает в среднем в 20 раз более высокое значение, чем значение, полученное с помощью набора праймеров 340/341).

Таблица 1. Концентрация предполагаемого генома рААВ и контаминирующей ДНК ×

Партия	ДНК ААВ (праймеры 59...90)	Бакуловирусная ДНК (праймер 180..181)	Бакуловирусная ДНК (праймер 340..341)
1	$5,9 \times 10^{12}$	$3,2 \times 10^{11}$	$1,4 \times 10^{10}$
2	$5,6 \times 10^{12}$	$2,9 \times 10^{11}$	$1,5 \times 10^{10}$
3	$6,5 \times 10^{12}$	$3,0 \times 10^{11}$	$1,3 \times 10^{10}$
4	$7,1 \times 10^{11}$	$3,7 \times 10^{10}$	$1,5 \times 10^9$
5	$7,0 \times 10^{12}$	$3,0 \times 10^{11}$	$1,2 \times 10^{10}$
6	$8,5 \times 10^{11}$	$3,5 \times 10^{10}$	$2,7 \times 10^9$
7	$9,1 \times 10^{12}$	$3,0 \times 10^{11}$	$2,0 \times 10^{10}$
8	$8,9 \times 10^{11}$	$3,9 \times 10^{10}$	$2,0 \times 10^9$
9	$8,4 \times 10^{11}$	$3,9 \times 10^{10}$	$1,9 \times 10^9$
10	$1,1 \times 10^{12}$	$3,6 \times 10^{10}$	$1,7 \times 10^9$
11	$3,0 \times 10^{12}$	$1,3 \times 10^{11}$	$5,8 \times 10^9$
12	$3,3 \times 10^{12}$	$1,3 \times 10^{11}$	$5,9 \times 10^9$
13	$2,9 \times 10^{12}$	$1,2 \times 10^{11}$	$6,1 \times 10^9$

Концентрация стандарта Вас.VD была скорректирована при помощи количественной ПЦР, поэтому можно исключить, что эта разница связана со стандартом. Таким образом, эти данные показывают, что бакуловирусная ДНК, близкая к ITR (обнаруженная при помощи набора праймеров 180/181), присутствует в гораздо большем количестве, чем ДНК, удаленная от ITR (обнаруженная при помощи набора праймеров 340/341).

Пример 2. Определение примеси нуклеиновой кислоты с использованием количественной ПЦР

2.1 Материалы и методы

Чтобы дополнительно исследовать, какие части бакуловирусного генома присутствуют в образцах, и возможные различия в количестве различных последовательностей, проводили количественную ПЦР с различными наборами праймеров (см. Фигуру 2). Для каждого набора праймеров в эксперимент была включена стандартная линия. Количество копий трангена определяли с использованием набора праймеров 59/60. Впоследствии было определено относительное количество копий генома по сравнению с копиями трангена. Поскольку известно, что частица ААВ может включать в себя более длинные последовательности ДНК, чем длина собственного генома (Grieger et al., 2005, Allosca et al., 2008), праймеры были выбраны в начале и конце ОРС, фланкирующих трансгенную кассету и на 10 т.п.н. перед и после ITR.

2.2 Результаты

Количество бакуловирусной ДНК определяли с использованием набора праймеров 340/341, амплифицирующего ампликон 73555–73604, который расположен рядом с последовательностью hr3 бакуловируса. Предполагалось, что количество копий генома, определенных этими праймерами, является репрезентативным для всего бакуловирусного генома. Однако аналогичные эксперименты с использованием разных наборов праймеров, специфичных по отношению к последовательностям, близким к ААВ-трансгенным кассетам, показали, что большее количество копий генома было обнаружено, когда ампликон находился ближе к ААВ-трансгенной кассете, содержащей ITRs (Фигура 3). Так как известно, что ААВ может упаковывать большие последовательности ДНК (до 8,9 т.п.н., возможно даже больше (Allosca et al., 2008)), ожидалось, что эти последовательности будут упакованы внутри частицы. Это предполагает, что существуют два типа остаточных последовательностей бакуловирусной ДНК; 1) случайные последовательности, определяемые с набором праймеров 340/341, которые находятся только в 0,1% от количества геномных копий трангена и 2) бакуловирусные последовательности, расположенные

в пределах 10 т.п.н. от трансгенной кассеты (в диапазоне предела упаковки AAV), которые составляют от 1 до 2,5% количества копий трансгенного генома. Обе последовательности, по-видимому, упакованы внутри частицы AAV1 или связаны с капсидом.

Пример 3: Определение примесей нуклеиновой кислоты с использованием секвенирования следующего поколения

3.1 Материал и методы

Чтобы исследовать степень и происхождение примесей ДНК в полученных векторах рААВ, четыре различные партии векторов рААВ анализировали путем глубокого секвенирования. ДНК из этих векторов рААВ выделяли с использованием набора Nucleospin extract II (Macherey Nagel, Düren, Germany).

Эту ДНК использовали для получения библиотек для глубокого секвенирования.

Для создания отдельных функций секвенирования проводили гибридизацию *in situ*. Кластеры выполняли путем ограничения разведений исходного материала. Фрагменты ДНК расплавляли, и одиночные цепи задерживали внутри проточной ячейки, которая покрыта плотным слоем праймеров. Последующая локальная амплификация (мост-ПЦР) приводит к образованию кластера примерно 1000 идентичных молекул на квадратный микрометр. Встраивание оснований начинается с добавления праймеров, полимеразы и четырех меченых флуорофором дезоксинуклодитрифосфатов. dNTP действуют как обратимые терминаторы, т.е. только одно основание добавляется на молекулу в каждом цикле. Флуоресценцию кластера измеряли для определения того, какое основание было встроено. Зеленый лазер идентифицирует включение оснований G и T, а красный лазер идентифицирует основания A и C. Для различения G/T и A/C используются два разных фильтра. После обнаружения сигнала удаляются флуорофор и конечная модификация нуклеотида (Dohm, JC, Lottaz, C., Borodina, T., and Himmelbauer, H. (2008), *Nucleic Acids Res.* 36, e105; Shendure, J and Ji, H. (2008), *Nat. Biotechnol.*, 26, 1135-1145, Rothberg, JM and Leamon, JH (2008), *Nat. Biotechnol.*, 26, 1117-1124, Kahvejian, A., Quackenbush, J., and Thompson, JF (2008), *Nat. Biotechnol.*, 26, 1125-1133). Этот метод может быть особенно пригоден для определения того, какой

тип последовательности присутствует в качестве примеси, и каковы отношения между популяциями конкретной последовательности. Анализ проводился ServiceXS (Leiden).

Стандартный эксперимент секвенирования следующего поколения приводит к образованию > 20 миллионов коротких прочтений, которые должны быть выровнены с референсной последовательностью или собраны *de novo* для создания контригов. Здесь, после секвенирования всего содержимого, прочтения выравнивали с рядом референсных последовательностей. Эти референсные последовательности представляют собой молекулы ДНК, о которых известно, что они присутствуют в препаратах вектора рААВ. Это включает в себя предполагаемый геном и образование сопутствующих ДНК-примесей. Выравнивание выполняли при помощи программы CLC_bio aligner. Частота считывания каждого основания в эксперименте дает информацию об его относительном появлении по сравнению с другими измеренными последовательностями. Количество прочтений на нуклеотид были получены для каждой референсной последовательности (Фигура 4). Общеизвестно, что когда нуклеотиды референсной последовательности считываются более 8-12 раз, информация о последовательности имеет высокий уровень достоверности (Schuster, S. C. (2008), Nat. Methods 5, 16-18).

3.2 Результаты

Для анализа состава ДНК различных партий ААВ использовали полное секвенирование ДНК. Анализ проводился Baseclear (Leiden, The Netherlands) на основе процедуры секвенирования одного прочтения Illumina GAI-II. Полученные качественные необработанные отдельные данные были проанализированы с помощью пакета биоинформатических программ CLC_bio. Прочтения представляли собой справочную информацию, собранную на референсных последовательностях, представляющих потенциально представленные молекулы ДНК в векторных препаратах рААВ, то есть бакуловирусную основу, сар-специфичные, гер-специфичные и трансген-специфичные ДНК. Как и ожидалось, большая часть > 99,7% из генерируемых ~ 20 млн. прочтений были собраны в целевую ДНК трансгенной кассеты и известные связанные с получением ДНК-примеси. Все остальные последовательности (менее 0,3%), которые не были собраны ни в

одну из упомянутых референсных последовательностей, могут представлять собой ошибки секвенирования, мультимеризацию линкера, низкое качество прочтений и другие последовательности ДНК.

Число прочтений на нуклеотид получали для трансгенной кассеты, сар кассеты, гер кассеты и бакуловирусного генома и наносили на график против числа нуклеотидов (см. Фигуры 4 и 5). Распределение частот прочтений на нуклеотид в высокой степени совпадало у препаратов из различных партий. Кроме того, стало очевидно, что распределение бакуловирусного генома не является случайным. Сегменты генома, фланкирующие ITR.s были явно представлены в избыточном количестве (Фигура 5).

Авторы настоящего изобретения использовали среднее распределение прочтений, полученных из экспериментов по секвенированию, в качестве входных данных для расчета относительного появления различных последовательностей ДНК, обнаруженных в препаратах рААВ (Таблица 2).

Таблица 2. Среднее распределение прочтений (S) в 5 различных партиях рААВ (лот#)

	Лот#1	Лот#2	Лот#3	Лот#4	Лот#5
Трансгенная кассета	569837	588620	600677	589597	544717
Бакуловирус	1184	1449	1236	1316	1087
Сар кассета	60	47	43	102	46
Гер кассета	460	676	596	691	562

В Таблице 2 приведены средние частоты (S), полученные в каждой последовательности. Эти частоты представлены по отношению к основной ДНК в образце, то есть к трансгенной кассете в Таблице 3. Процент данной примеси рассчитывается по отношению к трансгенной кассете в соответствии с приведенной ниже формулой и учитывает коэффициент поправки на размер.

$$X_{\text{бак}} = S_{\text{бак}} / S_{\text{трансген}} * C_{\text{бак}} * 100\%$$

Где:

$X_{\text{бак}}$ – процент ДНК-примесей бакуловируса по отношению к трансгенной кассете

$S_{\text{бак}}$ – среднее количество прочтений, полученных для бакуловирусной основы

$S_{\text{трансен}}$ – среднее количество прочтений, полученных для трансенной кассеты

$C_{\text{бак}}$ – Коэффициент поправки на длину молекулы, где $C_{\text{бак}}$ =длина основной цепи бакуловируса (нд)/длина трансенной кассеты (нт)

Таблица 3. Относительное содержание различных ДНК-примесей по сравнению с трансенной кассетой. Среднее распределение прочтений (S) различных молекул представлено по отношению к распределению для трансена ($S_{\text{трансен}}$)

	$S_{\text{трансен}}/S_{\text{тра}}$ нсен	$S_{\text{бак}}/S_{\text{трансе}}$ н	$S_{\text{сар}}/S_{\text{трансе}}$ н	$S_{\text{rep}}/S_{\text{трансе}}$ н
Лот#1	1	2.077E-03	1.048E-04	8.073E-04
Лот#2	1	2.462E-03	8.068E-05	1.148E-03
Лот#3	1	2.057E-03	7.207E-05	9.918E-04
Лот#4	1	2.232E-03	1.727E-04	1.173E-03
Лот#5	1	1.996E-03	8.467E-05	1.031E-03

Таблица 4. Процентное содержание различных примесей, присутствующих в различных партиях ААВ, относительно кассеты lpl (на основе формулы, описанной в тексте).

	трансен	rep	сар	Бакуловиру сная основа
Длина молекулы (нд)	3645	2785	3088	133894
Коэффициент поправки на длину молекулы (С)	1	0.76406	0.847188	36.73361
% трансена, присутствую	Н.Д.	0.061682%	0.00888%	7.630121%

щего в партии 1				
% транспена, присутствую щего в партии 2	Н.Д.	0.087726%	0.006835%	9.04252%
% транспена, присутствую щего в партии 3	Н.Д.	0.075782%	0.006106%	7.555691%
% транспена, присутствую щего в партии 4	Н.Д.	0.089591%	0.01463%	8.200541%
% транспена, присутствую щего в партии 5	Н.Д.	0.078764%	0.007173%	7.333003%

Пример 4: Неслучайное распределение ДНК-примесей

4.1 Материалы и методы

Следующим этапом было определение точное происхождение ДНК-примесей, полученных из бакуловируса. С этой целью различные партии векторов рААВ подвергали глубокому секвенированию на платформе Illumina, как описано выше. Выравнивание считываний в бакуловирусном геноме дало возможность изучить частоту каждого из нуклеотидов, полученных из бакуловируса, в библиотеке глубокого секвенирования. Кроме того, среднюю частоту рассчитывали путем деления общего числа считываний, принадлежащих бакуловирусному геному, на количество нуклеотидов.

4.2 Результаты

На Фигуре 5 показано выравнивание прочтений с бакуловирусным геномом после глубокого секвенирования. Если бы ДНК-примеси были бы случайным образом получены из генома бакуловируса, то должно было наблюдаться относительно равномерное распределение с примерно 1200 прочтениями на нуклеотид. Равномерное распределение действительно наблюдается в середине бакуловирусного генома. Однако в начале и в конце бакуловирусного генома наблюдается сильное увеличение числа прочтений. Это указывает на то, что эти области являются избыточными как ДНК-примеси в рААВ.

Пример 5: Оценка контроля качества с использованием количественной ПЦР или глубокого секвенирования

5.1 Материалы и методы

Чтобы исследовать количественные возможности различных методологий секвенирования следующего поколения, а именно Solexa и 454 Roche, полученное распределение прочтения секвенирования следующего поколения сравнивали с измерениями различных мишеней, расположенных в бакуловирусном гене при помощи количественной ПЦР (Фигура 6). Мишени для количественной ПЦР представляли собой следующие области: представленные в сильно увеличенном количестве (180/181), соответствующие среднему распределению (426/427, 428/429; 1018/1019; 1020/1021; 1024/1025) и недопредставленные (340/341). Последнюю область использовали в качестве калибратора для всех других измерений.

5.2 Результаты

Были исследованы три разных метода для проверки уровня ДНК-примеси в векторах рААВ. Как показано на Фигуре 6, эти три метода хорошо коррелируют друг с другом и поэтому могут использоваться параллельно для обнаружения ДНК-примесей в векторах рААВ.

Как показано на Фигуре 6, анализ при помощи секвенирования следующего поколения наглядно демонстрирует, что случайный выбор ДНК-ампликона для количественной ПЦР может приводить к неточному измерению конкретной ДНК-примеси в препарате вектора. Присутствие данной ДНК-примеси рассчитывали на основе измерения ампликона, предполагая, что все части исследуемой молекулы ДНК

(которые иногда составляют 136000 п.н. в длину, например бакуловирусовая основа) распределены с одинаковой частотой. Приведенный анализ ясно показывает, что различные сегменты длинных молекул ДНК, например, бакуловирусного генома, могут контаминировать препарат вектора с различными частотами из-за неравномерной упаковки различных последовательностей ДНК.

Таблица 5. Праймеры для количественной ПЦР, используемые в экспериментах

ID NO	Название	Последовательность	Мишень	Направление	Ампликон
7	pr59	AATGGGCGGTAGG CGTGTA	CMV промотор	прямой	5214- 5284
8	pr60	AGGCGATCTGACG GTTCATAA	CMV промотор	обратный	5214- 5284
9	pr180	CGAACCGATGGCT GGAATATC	OPC 1629 (protein sciences baculo system)	прямой	8760- 8830
10	pr181	TGCTGCTACAAGA TTTGGCAAGT	OPC 1629 (protein sciences baculo system)	обратный	8760- 8830
11	pr340	ATACAACCGTTGG TTGCACG	hr3 правая область бакуловируса	прямой	73555- 73604
12	pr341	CGGGACACGCCAT GTATT	hr3 правая область бакуловируса	обратный	73555- 73604
13	pr402	GGGAGTGGCGGCG TTGATTT	Бакуловирусная ДНК 10 тпн слева	смысловый	135323- 135403
14	pr403	GCACAGTTCAAGC CTCACAGCCTA	Бакуловирусная ДНК 10	антисмысловый	135323

			тпн слева		- 135403
15	pr404	CAAACGTGGTTTC GTGTGCCAA	Бакуловирусу ая ДНК слева ОРС603	смысловой	3501- 3603
16	pr405	GATGCATGACTTC ACCCACACACTT	Бакуловирусу ая ДНК слева ОРС603	антисмысл овой	3501- 3603
17	pr406	ACAGCCATTGTAA TGAGACGCACAA	Бакуловирусу ая ДНК справа ОРС603	смысловой	4357- 4438
18	pr407	CCTAGCGCCCGAT CAGCAACTATAT	Бакуловирусу ая ДНК справа ОРС603	антисмысл овой	4357- 4438
19	pr408	TACCGACTCTGCT GAAGAGGAGGAA	Бакуловирусу ая ДНК слева ОРС1629	смысловой	8421- 8499
20	pr409	TGCGTCTGGTGCA AACTCCTTTA	Бакуловирусу ая ДНК слева ОРС1629	антисмысл овой	8421- 8499
21	pr410	GATTCGTCATGGC CACCACAAA	Бакуловирусу ая ДНК справа ОРС 1629	смысловой	10178- 10261
22	pr411	CCAAAGCGCCCGT TGATTATTTT	Бакуловирусу ая ДНК справа ОРС 1629	антисмысл овой	10178- 10261
23	pr412	GCGTACTTGCGGC TGTCGTTGTA	Бакуловирусу ая ДНК 10 тпн справа	смысловой	14503- 14605
24	pr413	CGAGGTCAAGTTC AAAGGGCAACAT	Бакуловирусу ая ДНК 10	антисмысл овой	14503- 14605

			тпн справа		
25	Pr426	GCATTTTCGCAGCT CTCCTTCAATT	Вас геном	смысловой	32837- 32935
26	Pr427	CTTCAAGCGAGAA CGCAGCAATT	Вас геном	антисмысл овой	32837- 32935
27	Pr428	GTGGCGTTTGCCG TGGAAAA	Вас геном	смысловой	116615 - 116699
28	Pr429	TGCAGCTGTGCGT TTTGAATGAA	Вас геном	антисмысл овой	116615 - 116699
29	Pr101 8	TTGTTATGTCAAT TTGTAGCGC	Вас геном	смысловой	18230- 18296
30	Pr101 9	TGCATAAAGACAC AGTACAACG	Вас геном	антисмысл овой	18230- 18296
31	Pr102 0	GACATAGTTCGTT TGAAAATTATCCC	Вас геном	смысловой	25963- 26024
32	Pr102 1	AACGATCAAGCTG TTAATAAACG	Вас геном	антисмысл овой	25963- 26024
33	Pr102 4	CGCTTCGGCGTAG TTTACC	Вас геном	смысловой	109100 - 109151
34	Pr102 5	CGCTATAAGCGCG GGTTAC	Вас геном	антисмысл овой	109100 - 109151

СПИСОК ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

<110> uniQure IP B.V.

<120> ДНК-примеси в композиции, содержащей парвовирусный вирион

<130> p6042305pct

<160> 34

<170> Патентная версия 3.3

<210> 1

<211> 145

<212> ДНК

<213> аденоассоциированный вирус 2

<220>

<221> Прочий признак

<223> левый ITR

<400> 1

ttggccactc cctctctgcg cgctcgctcg ctactgagg ccgggcgacc aaaggtcgcc 60

cgacgcccgg gctttgcccg ggcggcctca gtgagcgagc gagcgcgag agagggagtg 120

gccaactcca tcactagggg ttcct 145

<210> 2

<211> 183

<212> ДНК

<213> аденоассоциированный вирус 2

<220>

<221> Прочий признак

<223> правый ITR

<400> 2

gcgcggtacc ccatggagga acccctagt atggagttgg cactccctc tctgcgcgt 60

cgctcgctca ctgaggccgc ccgggcaaag cccgggcgtc gggcgacctt tggtcgccc 120

gcctcagtga gcgagcgagc gcgcagagag ggagtggcca agatatcca tgggggtaccg 180

cgc 183

<210> 3

<211> 2203

<212> ДНК

<213> аденоассоциированный вирус 5

<220>

<221> Прочий признак

<223> pDP5

<400> 3

atgtcttttg ttgatcacc cccagattgg ttggaagaag ttggtgaagg tcttcgcgag 60

tttttggggc ttgaagcggg cccaccgaaa ccaaaaccca atcagcagca tcaagatcaa 120

gcccgtggtc	ttgtgctgcc	tggttataac	tatctcggac	cgggaaacgg	tctcgatcga	180
ggagagcctg	tcaacagggc	agacgaggtc	gcgcgagagc	acgacatctc	gtacaacgag	240
cagcttgagg	cgggagacaa	cccctacctc	aagtacaacc	acgcggacgc	cgagtttcag	300
gagaagctcg	ccgacgacac	atccttcggg	ggaaacctcg	gaaaggcagt	ctttcaggcc	360
aagaaaaggg	ttctcgaacc	ttttggcctg	gttgaagagg	gtgctaagac	ggccccctacc	420
ggaaagcggg	tagacgacca	ctttccaaaa	agaaagaagg	ctcggaccga	agaggactcc	480
aagccttcca	cctcgtcaga	cgccgaagct	ggaccacgag	gatcccagca	gctgcaaatc	540
ccagcccaac	cagcctcaag	tttgggagct	gatacaatgt	ctgcgggagg	tggcggccca	600
ttgggcgaca	ataaccaagg	tgccgatgga	gtgggcaatg	cctcgggaga	ttggcattgc	660
gattccacgt	ggatggggga	cagagtcgtc	accaagtcca	cccgaacctg	ggtgctgccc	720
agctacaaca	accaccagta	ccgagagatc	aaaagcggct	ccgtcgcgag	aagcaacgcc	780
aacgcctact	ttggatacag	cacccctctg	gggtactttg	actttaaccg	cttccacagc	840
cactggagcc	cccgcgactg	gcaaagactc	atcaacaact	actgggggctt	cagaccccgg	900
tccttcagag	tcaaaatctt	caacattcaa	gtcaaagagg	tcacggtgca	ggactccacc	960
accaccatcg	ccaacaacct	cacctccacc	gtccaagtgt	ttacggacga	cgactaccag	1020
ctgccctacg	tcgtcggcaa	cgggaccgag	ggatgcctgc	cggccttccc	tccgcaggtc	1080
tttacgctgc	cgcagtacgg	ttacgcgacg	ctgaaccgcg	acaacacaga	aaatcccacc	1140
gagaggagca	gcttcttctg	cctagagtac	tttcccagca	agatgctgag	aacgggcaac	1200
aactttgagt	ttacctaaa	ctttgaggag	gtgcccttcc	actccagctt	cgctcccagt	1260
cagaacctgt	tcaagctggc	caaccgcgtg	gtggaccagt	acttgtaccg	cttcgtgagc	1320
acaaataaca	ctggcggagt	ccagttcaac	aagaacctgg	ccgggagata	cgccaacacc	1380
tacaaaaact	ggttcccggg	gcccattggc	cgaaccacgg	gctggaacct	gggctccggg	1440
gtcaaccgcg	ccagtgtcag	cgccttcgcc	acgaccaata	ggatggagct	cgagggcgcg	1500
agttaccagg	tgcccccgca	gccgaacggc	atgaccaaca	acctccaggg	cagcaacacc	1560
tatgccctgg	agaacactat	gatcttcaac	agccagccgg	cgaaccgggg	caccaccgcc	1620
acgtacctcg	agggaacat	gctcatcacc	agcgagagcg	agacgcagcc	ggtgaaccgc	1680
gtggcgta	acgtcggcgg	gcagatggcc	accaacaacc	agagctccac	cactgcccc	1740
gcgaccggca	cgtacaacct	ccaggaaatc	gtgcccggca	gcgtgtggat	ggagagggac	1800
gtgtacctcc	aaggacccat	ctgggccaa	atcccagaga	cgggggcgca	ctttcacccc	1860
tctccggcca	tgggcggatt	cggactcaaa	caccaccgc	ccatgatgct	catcaagaac	1920
acgcctgtgc	ccggaaatat	caccagcttc	tcggacgtgc	ccgtcagcag	cttcatcacc	1980
cagtacagca	ccgggcaggt	caccgtggag	atggagtggg	agctcaagaa	ggaaaactcc	2040

aagaggtgga acccagagat ccagtacaca aacaactaca acgacccccca gtttgtggac 2100
 tttgccccgg acagcaccgg ggaatacaga accaccagac ctatcggaac ccgatacctt 2160
 acccgacccc tttaacccat tcatgtcgca taccctcaat aaa 2203

<210> 4
 <211> 1876
 <212> ДНК
 <213> аденоассоциированный вирус 2

<220>
 <221> Кодированная последовательность
 <222> (11)..(1876)

<400> 4
 cgcagccgcc atg ccg ggg ttt tac gag att gtg att aag gtc ccc agc 49
 Met Pro Gly Phe Tyr Glu Ile Val Ile Lys Val Pro Ser
 1 5 10

gac ctt gac gag cat ctg ccc ggc att tct gac agc ttt gtg aac tgg 97
 Asp Leu Asp Glu His Leu Pro Gly Ile Ser Asp Ser Phe Val Asn Trp
 15 20 25

gtg gcc gag aag gaa tgg gag ttg ccg cca gat tct gac atg gat ctg 145
 Val Ala Glu Lys Glu Trp Glu Leu Pro Pro Asp Ser Asp Met Asp Leu
 30 35 40 45

aat ctg att gag cag gca ccc ctg acc gtg gcc gag aag ctg cag cgc 193
 Asn Leu Ile Glu Gln Ala Pro Leu Thr Val Ala Glu Lys Leu Gln Arg
 50 55 60

gac ttt ctg acg gaa tgg cgc cgt gtg agt aag gcc ccg gag gcc ctt 241
 Asp Phe Leu Thr Glu Trp Arg Arg Val Ser Lys Ala Pro Glu Ala Leu
 65 70 75

ttc ttt gtg caa ttt gag aag gga gag agc tac ttc cac atg cac gtg 289
 Phe Phe Val Gln Phe Glu Lys Gly Glu Ser Tyr Phe His Met His Val
 80 85 90

ctc gtg gaa acc acc ggg gtg aaa tcc atg gtt ttg gga cgt ttc ctg 337
 Leu Val Glu Thr Thr Gly Val Lys Ser Met Val Leu Gly Arg Phe Leu
 95 100 105

agt cag att cgc gaa aaa ctg att cag aga att tac cgc ggg atc gag 385
 Ser Gln Ile Arg Glu Lys Leu Ile Gln Arg Ile Tyr Arg Gly Ile Glu
 110 115 120 125

ccg act ttg cca aac tgg ttc gcg gtc aca aag acc aga aat ggc gcc 433
 Pro Thr Leu Pro Asn Trp Phe Ala Val Thr Lys Thr Arg Asn Gly Ala
 130 135 140

gga ggc ggg aac aag gtg gtg gat gag tgc tac atc ccc aat tac ttg 481
 Gly Gly Gly Asn Lys Val Val Asp Glu Cys Tyr Ile Pro Asn Tyr Leu
 145 150 155

ctc ccc aaa acc cag cct gag ctc cag tgg gcg tgg act aat atg gaa 529
 Leu Pro Lys Thr Gln Pro Glu Leu Gln Trp Ala Trp Thr Asn Met Glu
 160 165 170

cag tat tta agc gcc tgt ttg aat ctc acg gag cgt aaa cgg ttg gtg 577

Gln	Tyr	Leu	Ser	Ala	Cys	Leu	Asn	Leu	Thr	Glu	Arg	Lys	Arg	Leu	Val		
175						180					185						
gcg	cag	cat	ctg	acg	cac	gtg	tcg	cag	acg	cag	gag	cag	aac	aaa	gag	625	
Ala	Gln	His	Leu	Thr	His	Val	Ser	Gln	Thr	Gln	Glu	Gln	Asn	Lys	Glu		
190					195					200					205		
aat	cag	aat	ccc	aat	tct	gat	gcg	ccg	gtg	atc	aga	tca	aaa	act	tca	673	
Asn	Gln	Asn	Pro	Asn	Ser	Asp	Ala	Pro	Val	Ile	Arg	Ser	Lys	Thr	Ser		
				210					215					220			
gcc	agg	tac	atg	gag	ctg	gtc	ggg	tgg	ctc	gtg	gac	aag	ggg	att	acc	721	
Ala	Arg	Tyr	Met	Glu	Leu	Val	Gly	Trp	Leu	Val	Asp	Lys	Gly	Ile	Thr		
			225					230					235				
tcg	gag	aag	cag	tgg	atc	cag	gag	gac	cag	gcc	tca	tac	atc	tcc	ttc	769	
Ser	Glu	Lys	Gln	Trp	Ile	Gln	Glu	Asp	Gln	Ala	Ser	Tyr	Ile	Ser	Phe		
		240					245					250					
aat	gcg	gcc	tcc	aac	tcg	cgg	tcc	caa	atc	aag	gct	gcc	ttg	gac	aat	817	
Asn	Ala	Ala	Ser	Asn	Ser	Arg	Ser	Gln	Ile	Lys	Ala	Ala	Leu	Asp	Asn		
	255					260					265						
gcg	gga	aag	att	atg	agc	ctg	act	aaa	acc	gcc	ccc	gac	tac	ctg	gtg	865	
Ala	Gly	Lys	Ile	Met	Ser	Leu	Thr	Lys	Thr	Ala	Pro	Asp	Tyr	Leu	Val		
270					275					280					285		
ggc	cag	cag	ccc	gtg	gag	gac	att	tcc	agc	aat	cgg	att	tat	aaa	att	913	
Gly	Gln	Gln	Pro	Val	Glu	Asp	Ile	Ser	Ser	Asn	Arg	Ile	Tyr	Lys	Ile		
				290					295					300			
ttg	gaa	cta	aac	ggg	tac	gat	ccc	caa	tat	gcg	gct	tcc	gtc	ttt	ctg	961	
Leu	Glu	Leu	Asn	Gly	Tyr	Asp	Pro	Gln	Tyr	Ala	Ala	Ser	Val	Phe	Leu		
			305					310					315				
gga	tgg	gcc	acg	aaa	aag	ttc	ggc	aag	agg	aac	acc	atc	tgg	ctg	ttt	1009	
Gly	Trp	Ala	Thr	Lys	Lys	Phe	Gly	Lys	Arg	Asn	Thr	Ile	Trp	Leu	Phe		
		320					325					330					
ggg	cct	gca	act	acc	ggg	aag	acc	aac	atc	gcg	gag	gcc	ata	gcc	cac	1057	
Gly	Pro	Ala	Thr	Thr	Gly	Lys	Thr	Asn	Ile	Ala	Glu	Ala	Ile	Ala	His		
	335					340					345						
act	gtg	ccc	ttc	tac	ggg	tgc	gta	aac	tgg	acc	aat	gag	aac	ttt	ccc	1105	
Thr	Val	Pro	Phe	Tyr	Gly	Cys	Val	Asn	Trp	Thr	Asn	Glu	Asn	Phe	Pro		
350					355					360					365		
ttc	aac	gac	tgt	gtc	gac	aag	atg	gtg	atc	tgg	tgg	gag	gag	ggg	aag	1153	
Phe	Asn	Asp	Cys	Val	Asp	Lys	Met	Val	Ile	Trp	Trp	Glu	Glu	Gly	Lys		
				370					375					380			
atg	acc	gcc	aag	gtc	gtg	gag	tcg	gcc	aaa	gcc	att	ctc	gga	gga	agc	1201	
Met	Thr	Ala	Lys	Val	Val	Glu	Ser	Ala	Lys	Ala	Ile	Leu	Gly	Gly	Ser		
			385					390					395				
aag	gtg	cgc	gtg	gac	cag	aaa	tgc	aag	tcc	tcg	gcc	cag	ata	gac	ccg	1249	
Lys	Val	Arg	Val	Asp	Gln	Lys	Cys	Lys	Ser	Ser	Ala	Gln	Ile	Asp	Pro		
		400				405						410					
act	ccc	gtg	atc	gtc	acc	tcc	aac	acc	aac	atg	tgc	gcc	gtg	att	gac	1297	
Thr	Pro	Val	Ile	Val	Thr	Ser	Asn	Thr	Asn	Met	Cys	Ala	Val	Ile	Asp		
	415					420					425						
ggg	aac	tca	acg	acc	ttc	gaa	cac	cag	cag	ccg	ttg	caa	gac	cgg	atg	1345	

Gly 430	Asn	Ser	Thr	Thr	Phe 435	Glu	His	Gln	Gln	Pro 440	Leu	Gln	Asp	Arg	Met 445	
ttc	aaa	ttt	gaa	ctc	acc	cgc	cgt	ctg	gat	cat	gac	ttt	ggg	aag	gtc	1393
Phe	Lys	Phe	Glu	Leu 450	Thr	Arg	Arg	Leu	Asp 455	His	Asp	Phe	Gly	Lys	Val 460	
acc	aag	cag	gaa	gtc	aaa	gac	ttt	ttc	cgg	tgg	gca	aag	gat	cac	gtg	1441
Thr	Lys	Gln	Glu	Val 465	Lys	Asp	Phe	Phe	Arg	Trp	Ala	Lys	Asp	His	Val 475	
gtt	gag	gtg	gag	cat	gaa	ttc	tac	gtc	aaa	aag	ggt	gga	gcc	aag	aaa	1489
Val	Glu	Val	Glu	His	Glu	Phe	Tyr 485	Val	Lys	Lys	Gly	Gly	Ala	Lys	Lys 490	
aga	ccc	gcc	ccc	agt	gac	gca	gat	ata	agt	gag	ccc	aaa	cgg	gtg	cgc	1537
Arg	Pro	Ala	Pro	Ser	Asp	Ala	Asp	Ile	Ser	Glu	Pro	Lys	Arg	Val	Arg 505	
gag	tca	gtt	gcg	cag	cca	tcg	acg	tca	gac	gcg	gaa	gct	tcg	atc	aac	1585
Glu	Ser	Val	Ala	Gln	Pro	Ser	Thr	Ser	Asp	Ala	Glu	Ala	Ser	Ile	Asn 525	
tac	gca	gac	agg	tac	caa	aac	aaa	tgt	tct	cgt	cac	gtg	ggc	atg	aat	1633
Tyr	Ala	Asp	Arg	Tyr 530	Gln	Asn	Lys	Cys	Ser	Arg	His	Val	Gly	Met	Asn 540	
ctg	atg	ctg	ttt	ccc	tgc	aga	caa	tgc	gag	aga	atg	aat	cag	aat	tca	1681
Leu	Met	Leu	Phe	Pro	Cys	Arg	Gln	Cys	Glu	Arg	Met	Asn	Gln	Asn	Ser 555	
aat	atc	tgc	ttc	act	cac	gga	cag	aaa	gac	tgt	tta	gag	tgc	ttt	ccc	1729
Asn	Ile	Cys	Phe	Thr	His	Gly	Gln	Lys	Asp	Cys	Leu	Glu	Cys	Phe	Pro 570	
gtg	tca	gaa	tct	caa	ccc	gtt	tct	gtc	gtc	aaa	aag	gcg	tat	cag	aaa	1777
Val	Ser	Glu	Ser	Gln	Pro	Val	Ser	Val	Val	Lys	Lys	Ala	Tyr	Gln	Lys 585	
ctg	tgc	tac	att	cat	cat	atc	atg	gga	aag	gtg	cca	gac	gct	tgc	act	1825
Leu	Cys	Tyr	Ile	His	His	Ile	Met	Gly	Lys	Val	Pro	Asp	Ala	Cys	Thr 605	
gcc	tgc	gat	ctg	gtc	aat	gtg	gat	ttg	gat	gac	tgc	atc	ttt	gaa	caa	1873
Ala	Cys	Asp	Leu	Val	Asn	Val	Asp	Leu	Asp	Asp	Cys	Ile	Phe	Glu	Gln 620	
taa																1876

<210> 5
 <211> 621
 <212> Белок
 <213> аденоассоциированный вирус 2

 <400> 5

Met 1	Pro	Gly	Phe	Tyr 5	Glu	Ile	Val	Ile	Lys	Val	Pro	Ser	Asp	Leu	Asp	15
Glu	His	Leu	Pro	Gly	Ile	Ser	Asp	Ser	Phe	Val	Asn	Trp	Val	Ala	Glu	
			20					25						30		

Lys	Glu	Trp	Glu	Leu	Pro	Pro	Asp	Ser	Asp	Met	Asp	Leu	Asn	Leu	Ile	35	40	45	
Glu	Gln	Ala	Pro	Leu	Thr	Val	Ala	Glu	Lys	Leu	Gln	Arg	Asp	Phe	Leu	50	55	60	
Thr	Glu	Trp	Arg	Arg	Val	Ser	Lys	Ala	Pro	Glu	Ala	Leu	Phe	Phe	Val	65	70	75	80
Gln	Phe	Glu	Lys	Gly	Glu	Ser	Tyr	Phe	His	Met	His	Val	Leu	Val	Glu	85	90	95	
Thr	Thr	Gly	Val	Lys	Ser	Met	Val	Leu	Gly	Arg	Phe	Leu	Ser	Gln	Ile	100	105	110	
Arg	Glu	Lys	Leu	Ile	Gln	Arg	Ile	Tyr	Arg	Gly	Ile	Glu	Pro	Thr	Leu	115	120	125	
Pro	Asn	Trp	Phe	Ala	Val	Thr	Lys	Thr	Arg	Asn	Gly	Ala	Gly	Gly	Gly	130	135	140	
Asn	Lys	Val	Val	Asp	Glu	Cys	Tyr	Ile	Pro	Asn	Tyr	Leu	Leu	Pro	Lys	145	150	155	160
Thr	Gln	Pro	Glu	Leu	Gln	Trp	Ala	Trp	Thr	Asn	Met	Glu	Gln	Tyr	Leu	165	170	175	
Ser	Ala	Cys	Leu	Asn	Leu	Thr	Glu	Arg	Lys	Arg	Leu	Val	Ala	Gln	His	180	185	190	
Leu	Thr	His	Val	Ser	Gln	Thr	Gln	Glu	Gln	Asn	Lys	Glu	Asn	Gln	Asn	195	200	205	
Pro	Asn	Ser	Asp	Ala	Pro	Val	Ile	Arg	Ser	Lys	Thr	Ser	Ala	Arg	Tyr	210	215	220	
Met	Glu	Leu	Val	Gly	Trp	Leu	Val	Asp	Lys	Gly	Ile	Thr	Ser	Glu	Lys	225	230	235	240
Gln	Trp	Ile	Gln	Glu	Asp	Gln	Ala	Ser	Tyr	Ile	Ser	Phe	Asn	Ala	Ala	245	250	255	
Ser	Asn	Ser	Arg	Ser	Gln	Ile	Lys	Ala	Ala	Leu	Asp	Asn	Ala	Gly	Lys	260	265	270	
Ile	Met	Ser	Leu	Thr	Lys	Thr	Ala	Pro	Asp	Tyr	Leu	Val	Gly	Gln	Gln	275	280	285	

Pro Val Glu Asp Ile Ser Ser Asn Arg Ile Tyr Lys Ile Leu Glu Leu
290 295 300

Asn Gly Tyr Asp Pro Gln Tyr Ala Ala Ser Val Phe Leu Gly Trp Ala
305 310 315 320

Thr Lys Lys Phe Gly Lys Arg Asn Thr Ile Trp Leu Phe Gly Pro Ala
325 330 335

Thr Thr Gly Lys Thr Asn Ile Ala Glu Ala Ile Ala His Thr Val Pro
340 345 350

Phe Tyr Gly Cys Val Asn Trp Thr Asn Glu Asn Phe Pro Phe Asn Asp
355 360 365

Cys Val Asp Lys Met Val Ile Trp Trp Glu Glu Gly Lys Met Thr Ala
370 375 380

Lys Val Val Glu Ser Ala Lys Ala Ile Leu Gly Gly Ser Lys Val Arg
385 390 395 400

Val Asp Gln Lys Cys Lys Ser Ser Ala Gln Ile Asp Pro Thr Pro Val
405 410 415

Ile Val Thr Ser Asn Thr Asn Met Cys Ala Val Ile Asp Gly Asn Ser
420 425 430

Thr Thr Phe Glu His Gln Gln Pro Leu Gln Asp Arg Met Phe Lys Phe
435 440 445

Glu Leu Thr Arg Arg Leu Asp His Asp Phe Gly Lys Val Thr Lys Gln
450 455 460

Glu Val Lys Asp Phe Phe Arg Trp Ala Lys Asp His Val Val Glu Val
465 470 475 480

Glu His Glu Phe Tyr Val Lys Lys Gly Gly Ala Lys Lys Arg Pro Ala
485 490 495

Pro Ser Asp Ala Asp Ile Ser Glu Pro Lys Arg Val Arg Glu Ser Val
500 505 510

Ala Gln Pro Ser Thr Ser Asp Ala Glu Ala Ser Ile Asn Tyr Ala Asp
515 520 525

Arg Tyr Gln Asn Lys Cys Ser Arg His Val Gly Met Asn Leu Met Leu
530 535 540

Phe Pro Cys Arg Gln Cys Glu Arg Met Asn Gln Asn Ser Asn Ile Cys
545 550 555 560

Phe Thr His Gly Gln Lys Asp Cys Leu Glu Cys Phe Pro Val Ser Glu
565 570 575

Ser Gln Pro Val Ser Val Val Lys Lys Ala Tyr Gln Lys Leu Cys Tyr
580 585 590

Ile His His Ile Met Gly Lys Val Pro Asp Ala Cys Thr Ala Cys Asp
595 600 605

Leu Val Asn Val Asp Leu Asp Asp Cys Ile Phe Glu Gln
610 615 620

<210> 6

<211> 1194

<212> ДНК

<213> Искусственная

<220>

<223> AAB2 Rep52 AcMNPV оптимизированный

<220>

<221> Прочий признак

<223> AcMNPV оптимизированная Rep52 кодирующая последовательность

<400> 6

atggaattgg tcggttgggtt ggtggacaag ggtattacct cggagaagca atggatacaa	60
gaagatcaag cctcatacat ctctgtttaat gcggcatcca actcgcgtag ccaaatcaaa	120
gctgccttgg acaatgcggg caagattatg agcctgacta aaaccgcccc cgactacctg	180
gtggggccagc aaccctgtga agacatttcc agcaatcgca tctataagat tttggagtta	240
aacggctacg atcctcaata tgcggcttcc gtattttttgg gctgggcgac gaaaaagt	300
ggcaaaagaa acaccatttg gttgttttga cctgcaacta cgggaaaaac aaacatagcg	360
gaggccatag cccacactgt acctttttat ggctgcgtta actggaccaa tgagaacttt	420
ccattcaacg actgtgtcga caagatgggt atttggtggg aggaaggcaa aatgaccgct	480
aaagtcgtgg agtcggccaa agcaatttta ggaggcagca aagtgcgcgt agaccagaaa	540
tgcaaaagct ctgcgcagat agacccgaca ccggtgatcg ttacaagcaa cacgaacatg	600
tgcgccgtga ttgacggtaa cagtacgaca ttcgaacacc aacaaccgtt gcaagaccga	660
atgttcaa at ttgaattgac gcgccgactg gatcatgatt ttggcaaggt aacaaaacaa	720
gaagtcaaag acttctttcg ttgggcaaag gatcacgttg ttgaagtgga acatgaat	780
tacgtcaaaa aaggtggtgc taagaaaaga cccgccccga gtgatgcaga tataagt	840
cccaaacgag tgagagaatc ggttgccgag ccaagcacgt cagatgcgga agcttcgata	900

aactacgcag accgctacca aaacaaatgt tctcgtcacg taggcatgaa cttaatgttg	960
tttccttgca gacaatgtga gagaatgaat cagaatagta atatctgttt cactcacggc	1020
cagaaagact gtttagaatg ctttccggtg tcagaatctc aacccgtttc tgtcgtaaaa	1080
aaggcgtatc aaaaattatg ctatattcat catatcatgg gaaaagtgcc agacgcttgt	1140
actgcctgcg atctgggttaa tgtggatttg gatgactgta tctttgaaca ataa	1194

<210> 7
 <211> 19
 <212> ДНК
 <213> Искусственная

<220>
 <223> праймер

<220>
 <221> Прочий признак
 <223> pr59

<400> 7	
aatgggcggt aggcgtgta	19

<210> 8
 <211> 22
 <212> ДНК
 <213> Искусственная

<220>
 <223> праймер

<220>
 <221> Прочий признак
 <223> pr60

<400> 8	
aggcgatctg acggttcast aa	22

<210> 9
 <211> 21
 <212> ДНК
 <213> Искусственная

<220>
 <223> праймер

<220>
 <221> Прочий признак
 <223> pr180

<400> 9	
cgaaccgatg gctggactat c	21

<210> 10

<211> 23
<212> ДНК
<213> Искусственная

<220>
<223> праймер

<220>
<221> Прочий признак
<223> pr181

<400> 10
tgctgctaca agatttggca agt

23

<210> 11
<211> 20
<212> ДНК
<213> Искусственная

<220>
<223> праймер

<220>
<221> Прочий признак
<223> pr340

<400> 11
atacaaccgt tggttgcacg

20

<210> 12
<211> 18
<212> ДНК
<213> Искусственная

<220>
<223> праймер

<220>
<221> Прочий признак
<223> pr341

<400> 12
cgggacacgc catgtatt

18

<210> 13
<211> 20
<212> ДНК
<213> Искусственная

<220>
<223> праймер

<220>
<221> Прочий признак
<223> pr402

<400> 13

gggagtggcg gcgttgattt

20

<210> 14

<211> 24

<212> ДНК

<213> Искусственная

<220>

<223> праймер

<220>

<221> Прочий признак

<223> pr403

<400> 14

gcacagttca agcctcacag ccta

24

<210> 15

<211> 22

<212> ДНК

<213> Искусственная

<220>

<223> праймер

<220>

<221> Прочий признак

<223> pr404

<400> 15

caaacgtggg ttctgtgtgcc aa

22

<210> 16

<211> 25

<212> ДНК

<213> Искусственная

<220>

<223> праймер

<220>

<221> Прочий признак

<223> pr405

<400> 16

gatgcatgac ttcacccaca cactt

25

<210> 17

<211> 25

<212> ДНК

<213> Искусственная

<220>

<223> праймер

<220>

<221> Прочий признак	
<223> pr406	
<400> 17	
acagccattg taatgagacg cacaa	25
<210> 18	
<211> 25	
<212> ДНК	
<213> Искусственная	
<220>	
<223> праймер	
<220>	
<221> Прочий признак	
<223> pr407	
<400> 18	
cctagcgccc gatcagcaac tatat	25
<210> 19	
<211> 25	
<212> ДНК	
<213> Искусственная	
<220>	
<223> праймер	
<220>	
<221> Прочий признак	
<223> pr408	
<400> 19	
taccgactct gctgaagagg agga	25
<210> 20	
<211> 23	
<212> ДНК	
<213> Искусственная	
<220>	
<223> праймер	
<220>	
<221> Прочий признак	
<223> pr409	
<400> 20	
tgcgtctggt gcaaactcct tta	23
<210> 21	
<211> 22	
<212> ДНК	
<213> Искусственная	
<220>	

<223> праймер

<220>

<221> Прочий признак

<223> pr410

<400> 21

gattcgtcat ggссассаса аа

22

<210> 22

<211> 23

<212> ДНК

<213> Искусственная

<220>

<223> праймер

<220>

<221> Прочий признак

<223> pr411

<400> 22

ссаааgсgсс cgttgattat ttt

23

<210> 23

<211> 23

<212> ДНК

<213> Искусственная

<220>

<223> праймер

<220>

<221> Прочий признак

<223> pr412

<400> 23

gcgtacttgс ggctgtcgтт gta

23

<210> 24

<211> 25

<212> ДНК

<213> Искусственная

<220>

<223> праймер

<220>

<221> Прочий признак

<223> pr413

<400> 24

cgaggтсааg ttcaaaggгс аасат

25

<210> 25

<211> 24

<212>	ДНК	
<213>	Искусственная	
<220>		
<223>	праймер	
<220>		
<221>	Прочий признак	
<223>	pr426	
<400>	25	
	gcatttcgca gctctccttc aatt	24
<210>	26	
<211>	23	
<212>	ДНК	
<213>	Искусственная	
<220>		
<223>	праймер	
<220>		
<221>	Прочий признак	
<223>	pr427	
<400>	26	
	cttcaagcga gaacgcagca att	23
<210>	27	
<211>	20	
<212>	ДНК	
<213>	Искусственная	
<220>		
<223>	праймер	
<220>		
<221>	Прочий признак	
<223>	pr428	
<400>	27	
	gtggcgtttg ccgtggaaaa	20
<210>	28	
<211>	23	
<212>	ДНК	
<213>	Искусственная	
<220>		
<223>	праймер	
<220>		
<221>	Прочий признак	
<223>	pr429	
<400>	28	
	tgcagctgtg cgttttgaat gaa	23

<210> 29
<211> 22
<212> ДНК
<213> Искусственная

<220>
<223> праймер

<220>
<221> Прочий признак
<223> pr1018

<400> 29
ttgttatgtc aattttagtc gc

22

<210> 30
<211> 22
<212> ДНК
<213> Искусственная

<220>
<223> праймер

<220>
<221> Прочий признак
<223> pr1019

<400> 30
tgcataaaga cacagtacaа cg

22

<210> 31
<211> 26
<212> ДНК
<213> Искусственная

<220>
<223> праймер

<220>
<221> Прочий признак
<223> pr1020

<400> 31
gacatagttc gtttgaaaat tatccc

26

<210> 32
<211> 23
<212> ДНК
<213> Искусственная

<220>
<223> праймер

<220>
<221> Прочий признак

<223> pr1021

<400> 32

aacgatcaag ctgttaataa acg

23

<210> 33

<211> 19

<212> ДНК

<213> Искусственная

<220>

<223> праймер

<220>

<221> Прочий признак

<223> pr1024

<400> 33

cgcttcggcg tagtttacc

19

<210> 34

<211> 19

<212> ДНК

<213> Искусственная

<220>

<223> праймер

<220>

<221> Прочий признак

<223> pr1025

<400> 34

cgctataagc gcgggttac

19

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ идентификации и количественного определения избыточной примеси нуклеиновой кислоты в композиции, содержащей парвовирусный вектор, и где этот способ включает в себя этапы:

а) секвенирование композиции нуклеиновой кислоты для получения случайных прочтений нуклеотидных последовательностей;

б) сравнение случайных последовательностей из этапа а) с нуклеотидной последовательностью биологического компонента, используемого в способе получения композиции, при котором совпадение между случайным прочтением и нуклеотидной последовательностью биологического компонента идентифицирует примесь нуклеиновой кислоты;

с) определение среднего количества прочтений на парвовирусный вектор; и

д) определение количества прочтений на нуклеотид избыточной примеси нуклеиновой кислоты, где примесь нуклеиновой кислоты идентифицируется как избыточная примесь, когда распределение прочтений не является случайным, и избыточная примесь в 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20 или 50 раз превышает среднее количество прочтений биологического компонента, или когда количество прочтений на нуклеотид примеси нуклеиновой кислоты составляет, по меньшей мере, 0,001, 0,01, 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1,0, 2,0, 3,0, 5,0, 7,0 или 10% от среднего количества прочтений на парвовирусный вектор.

2. Способ по п.1, где секвенирование нуклеиновой кислоты на этапе (а) включает в себя высокопроизводительное секвенирование.

3. Способ по п.1 или п.2, где парвовирусный вектор представляет собой вектор на основе рекомбинантного аденоассоциированного вируса (рAAB).

4. Способ по любому из п.п. 1-3, где нуклеотидная последовательность биологического компонента выбрана из группы, состоящей из нуклеотидных последовательностей клетки-хозяина, плазмиды, вектора, отличного от рекомбинантного парвовирусного вектора, и хелперного вируса, где предпочтительно вектор представляет собой бакуловирусный вектор.

5. Способ по п.4, где хелперный вирус представляет собой

рекомбинантный аденовирус и/или рекомбинантный вирус простого герпеса.

6. Способ по любому из п.п. 1-5, где нуклеотидная последовательность биологического компонента содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую Rep, Cap и/или трансен, где, предпочтительно, биологический компонент содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую трансен, где, более предпочтительно, биологический компонент содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую трансен, которая фланкирована, по меньшей мере, одним парвовирусным ITR, и где, наиболее предпочтительно, биологический компонент содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую трансен, которая фланкирована, по меньшей мере, одним парвовирусным ITR с каждой стороны.

7. Способ по любому из п.п. 1-6, где избыточную примесь нуклеиновой кислоты количественно определяют во второй или последующей композиции.

8. Способ количественного определения примеси нуклеиновой кислоты в композиции, содержащей парвовирусный вектор, где этот способ включает в себя этап определения относительного содержания примеси нуклеиновой кислоты, где эта примесь нуклеиновой кислоты содержит нуклеотидную последовательность, которая расположена между 1 и 8000 п.н., 1 и 5000 п.н., 1 и 3000 п.н., 1 и 1000 п.н., 1 и 500 п.н., 1 и 250 п.н. или 1 и 100 п.н., непосредственно примыкающими к последовательности парвовирусного ITR, где последовательность ITR присутствует в биологическом компоненте, используемом в способе получения композиции, и где биологический компонент содержит трансен, фланкированный, по меньшей мере, одной копией последовательности парвовирусного ITR, где предпочтительно биологический компонент выбран из группы, состоящей из клетки-хозяина, плазмиды, вектора, отличного от рекомбинантного парвовирусного вектора, и хелперного вируса, где предпочтительно вектор представляет собой бакуловирусный вектор.

9. Способ по п.8, где парвовирусный вектор представляет собой вектор на основе рекомбинантного аденоассоциированного вируса (pAAB).

10. Способ по п.8 или п.9, где нуклеотидная последовательность примеси нуклеиновой кислоты непосредственно примыкает к каждому концу последовательности парвовирусного ITR, где последовательность ITR присутствует в биологическом компоненте, используемом в способе получения композиции.

11. Способ по любому из п.п. 8-10, где относительное содержание определяют по сравнению с нуклеотидной последовательностью парвовирусного вектора и/или референсной последовательностью композиции.

12. Способ по п.11, где относительное содержание определяется:

а) средним количеством прочтений на нуклеиновую кислоту примеси нуклеиновой кислоты, как определено в п.8; и

i) средним количеством прочтений на нуклеиновую кислоту референсной последовательности;

и/или

ii) средним количеством прочтений на парвовирусный вектор в композиции;

где количество прочтений определяется способом по любому из п.п. 1-6; и/или

б) амплификацией примеси нуклеиновой кислоты, как определено в п.8; и

i) референсной последовательностью; и/или

ii) нуклеотидной последовательностью парвовирусного вектора.

13. Способ по любому из п.п. 8-12, где относительное содержание определяют при помощи количественной ПЦР и/или при помощи высокопроизводительного секвенирования.

14. Способ по любому из п.п. 8-13, где способ дополнительно включает в себя этап селективной гибридизации олигонуклеотидного праймера с примесью нуклеиновой кислоты, как определено в п.8, или ее комплементом, где предпочтительно этот олигонуклеотидный праймер селективно гибридизуется с примесью нуклеиновой кислоты, содержащей часть бакуловирусной последовательности, или ее комплементом.

15. Способ определения того, может ли композиция,

содержащая парвовирусный вектор, считается клинически чистой, где этот способ включает в себя этапы:

i) количественного определения примеси нуклеиновой кислоты в композиции парвовирусного вектора по любому из п.п. 8-14; и

ii) определение того, что композиция является клинически чистой, если примесь нуклеиновой кислоты, как определено выше, присутствует, по меньшей мере, в 10, 100, 250, 1000 раз меньшем количестве, по сравнению с референсной последовательностью и/или трансгеном, как определено по относительному содержанию примеси нуклеиновой кислоты.

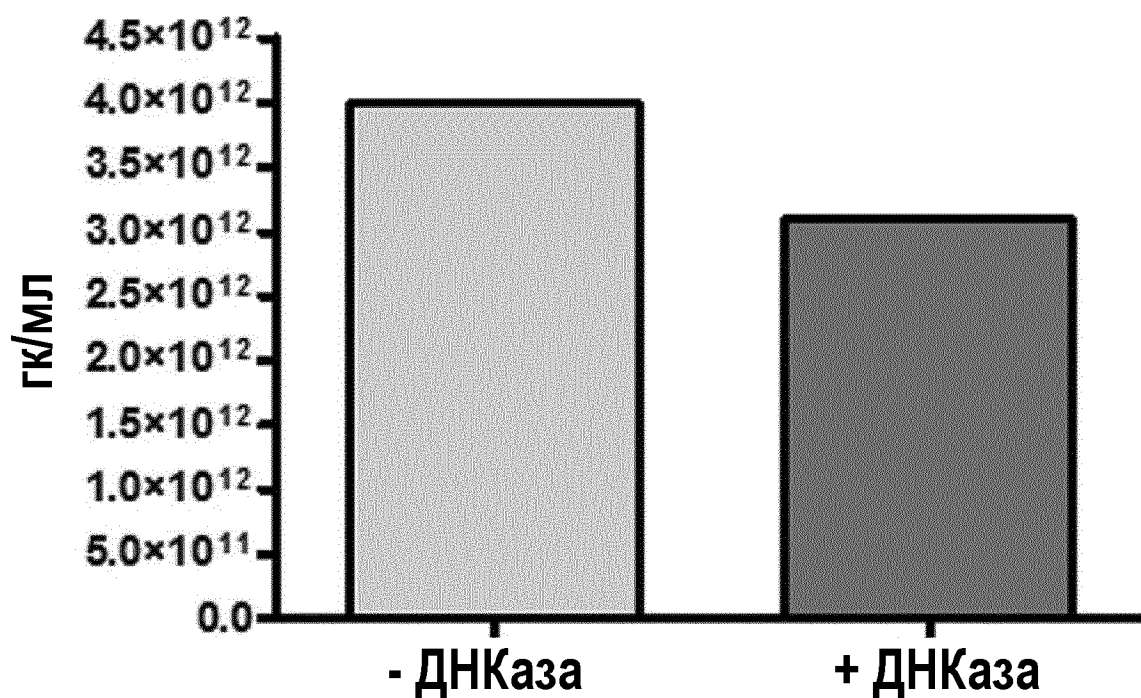
16. Способ по любому из п.п. 1-15, где композиция, содержащая парвовирусный вектор, представляет собой фармацевтическую композицию.

17. Способ по любому из п.п. 1-16, где композиция, содержащая парвовирусный вектор, содержит парвовирусный капсид, в который упакован парвовирусный вектор.

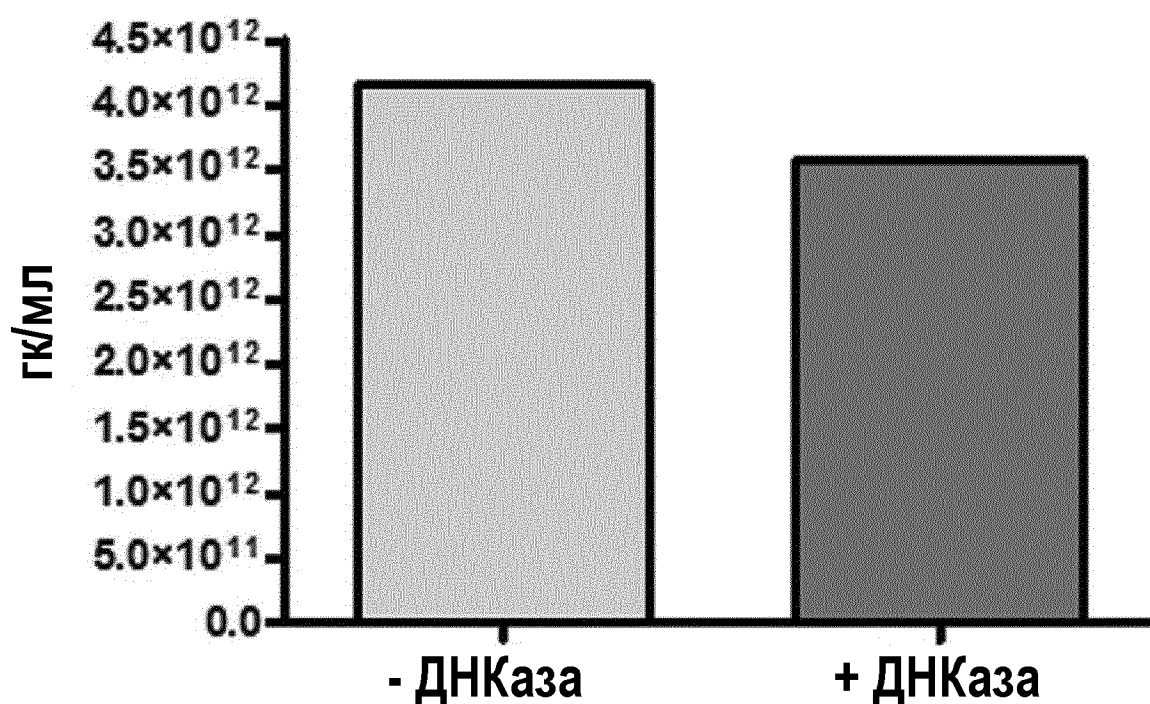
18. Способ по любому из п.п. 1-17, где композиция, содержащая парвовирусный вектор, не содержит образец, полученный или получаемый от млекопитающего, где это млекопитающее предпочтительно является не человекообразным приматом.

По доверенности

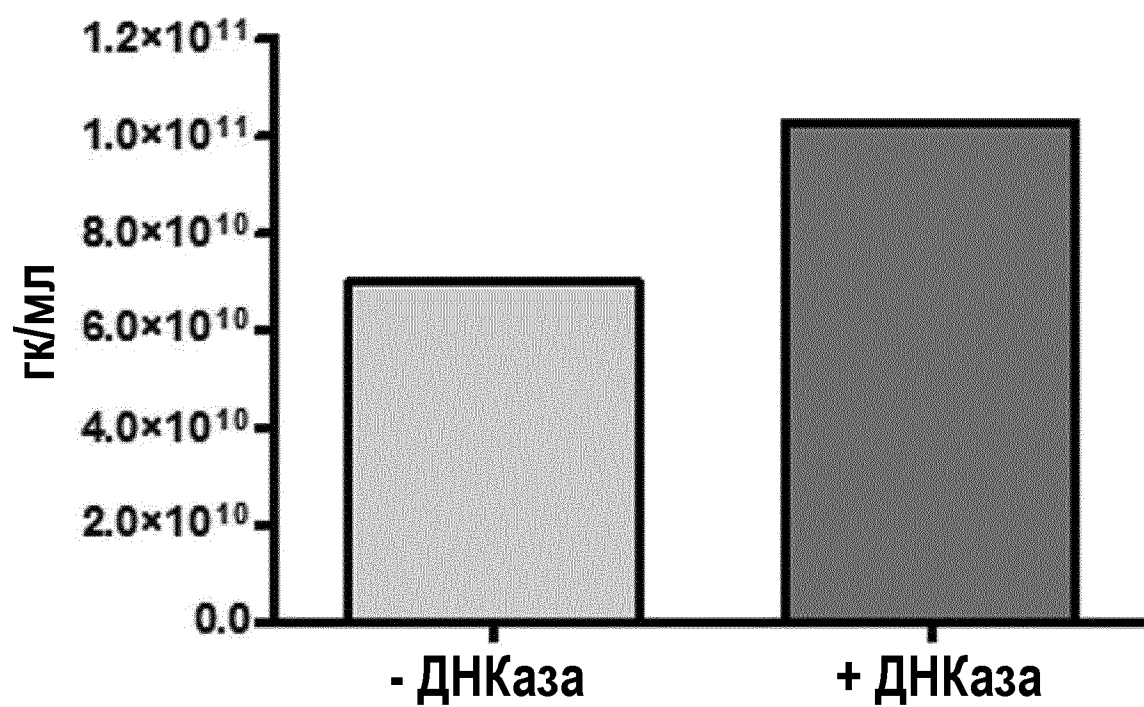
ФИГ. 1А



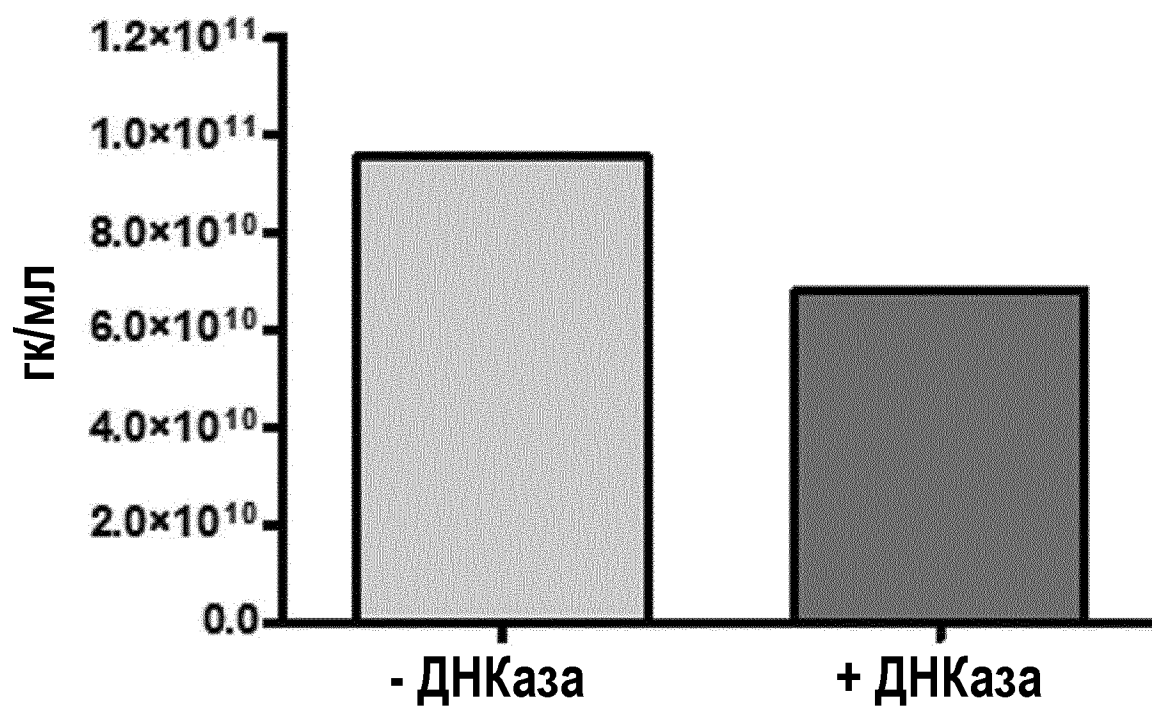
ФИГ. 1В



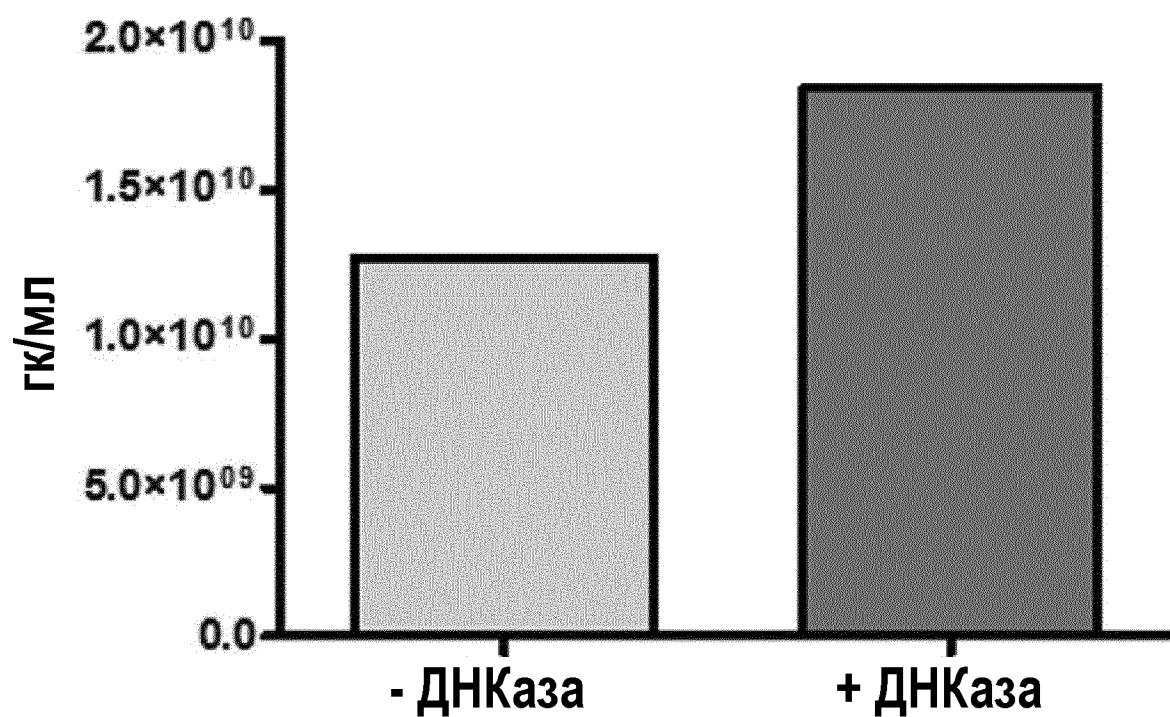
ФИГ. 1С



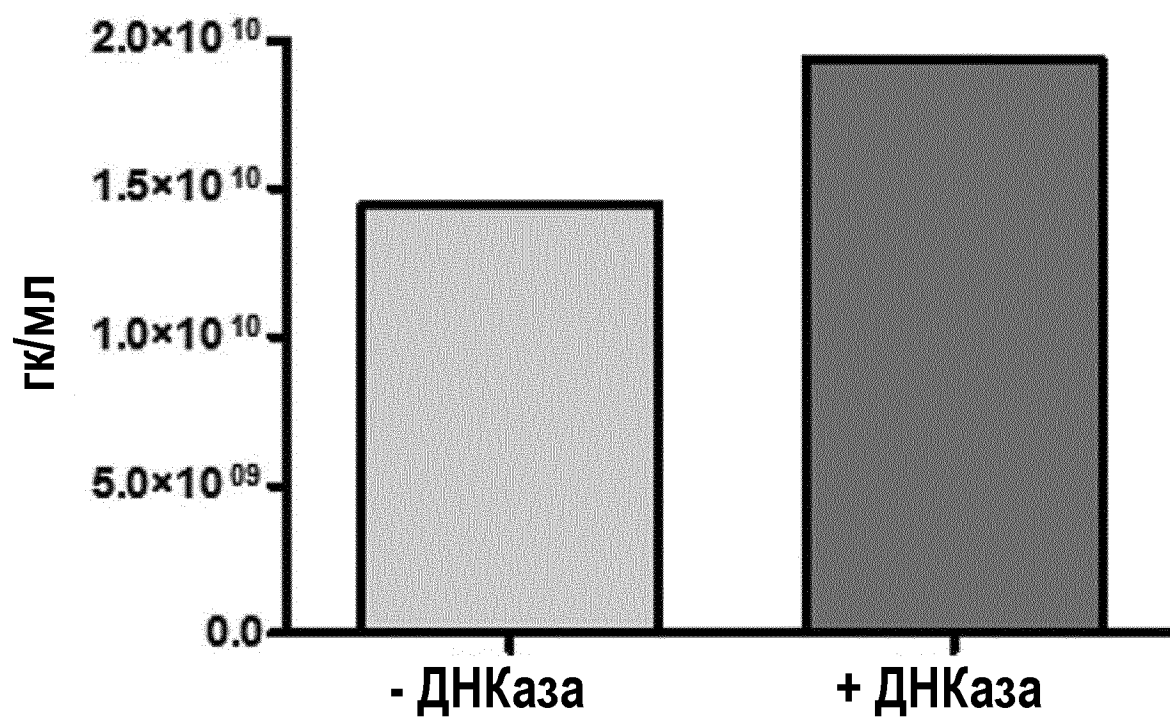
ФИГ. 1D



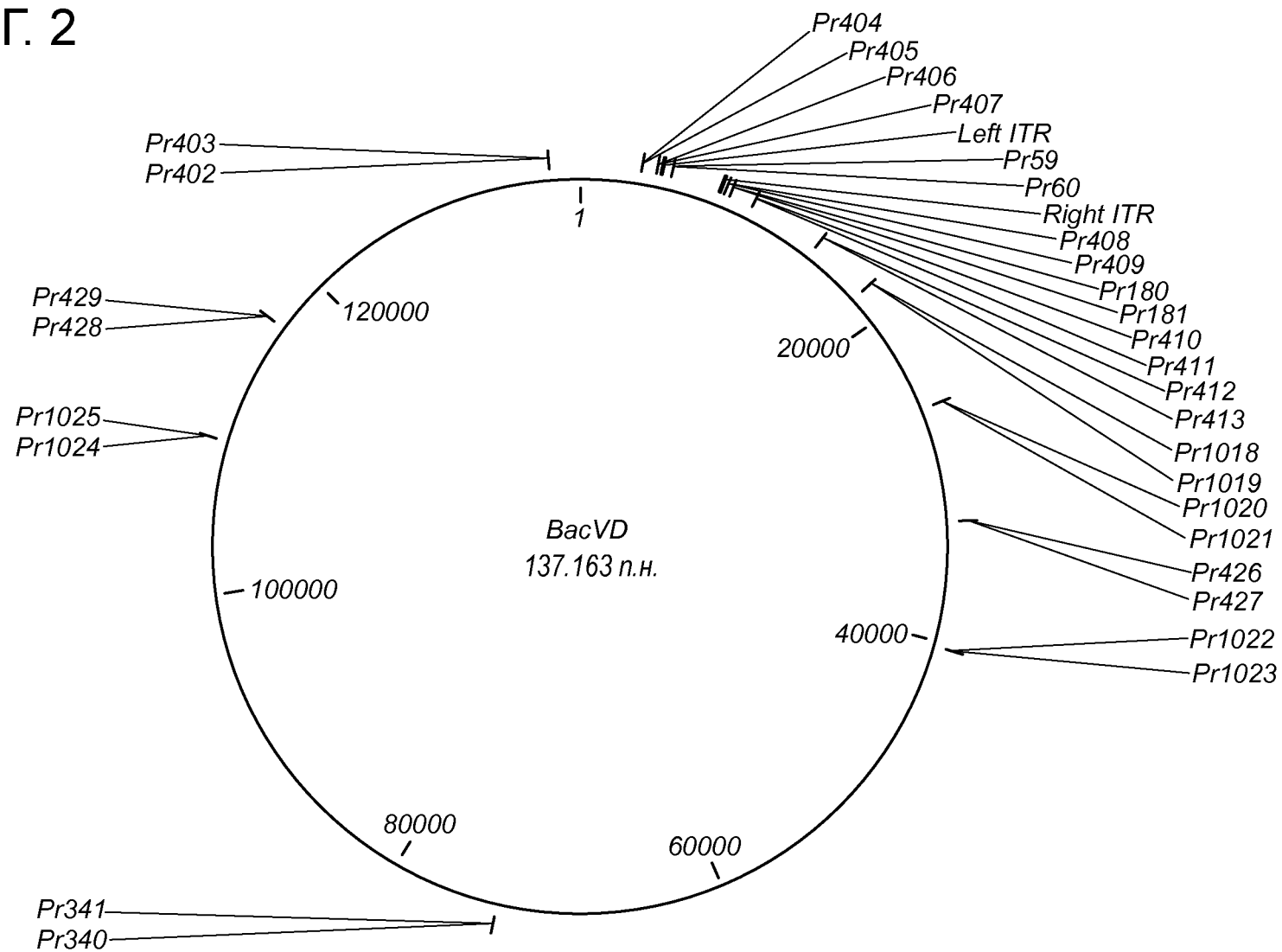
ФИГ. 1Е



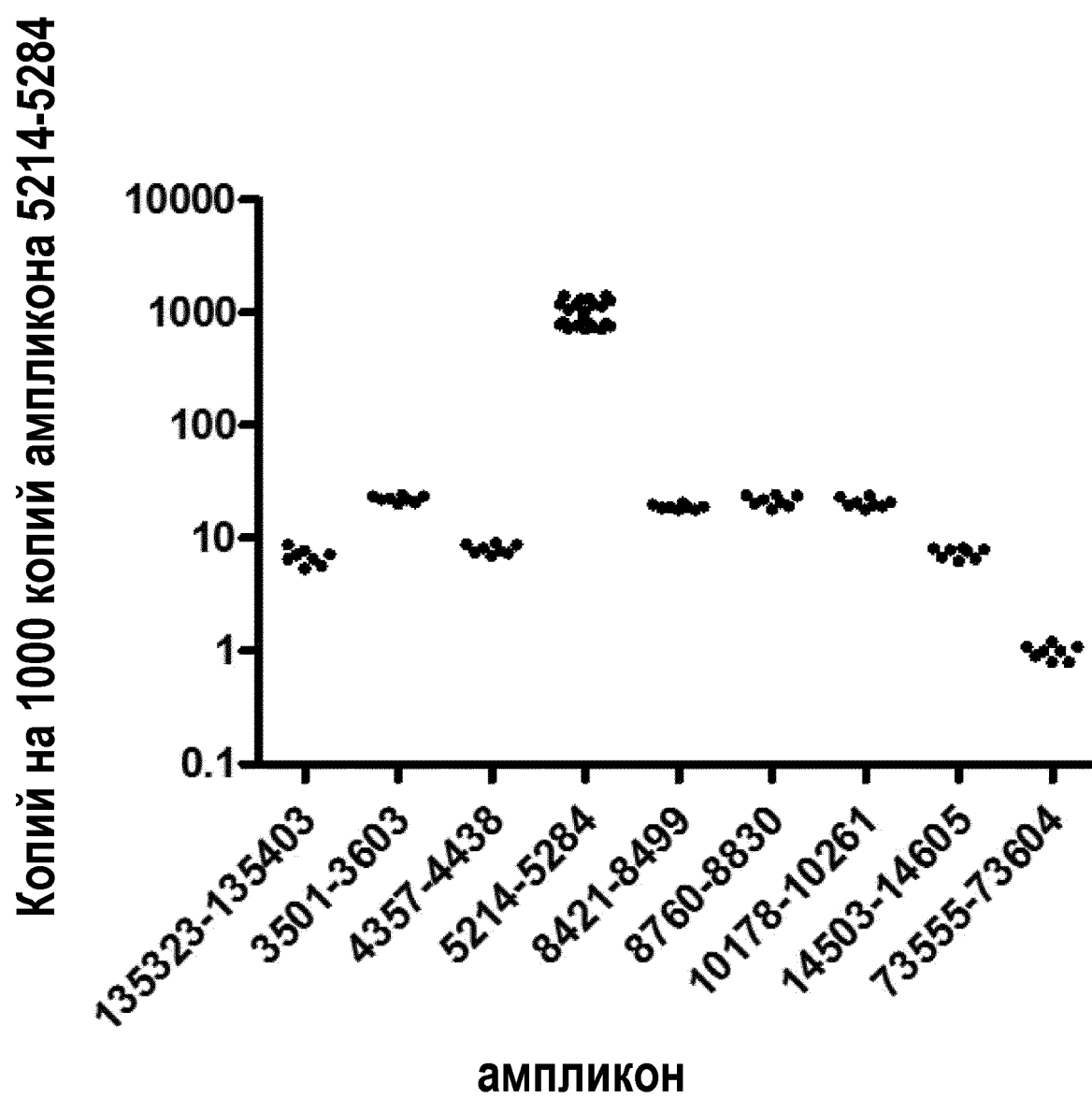
ФИГ. 1F



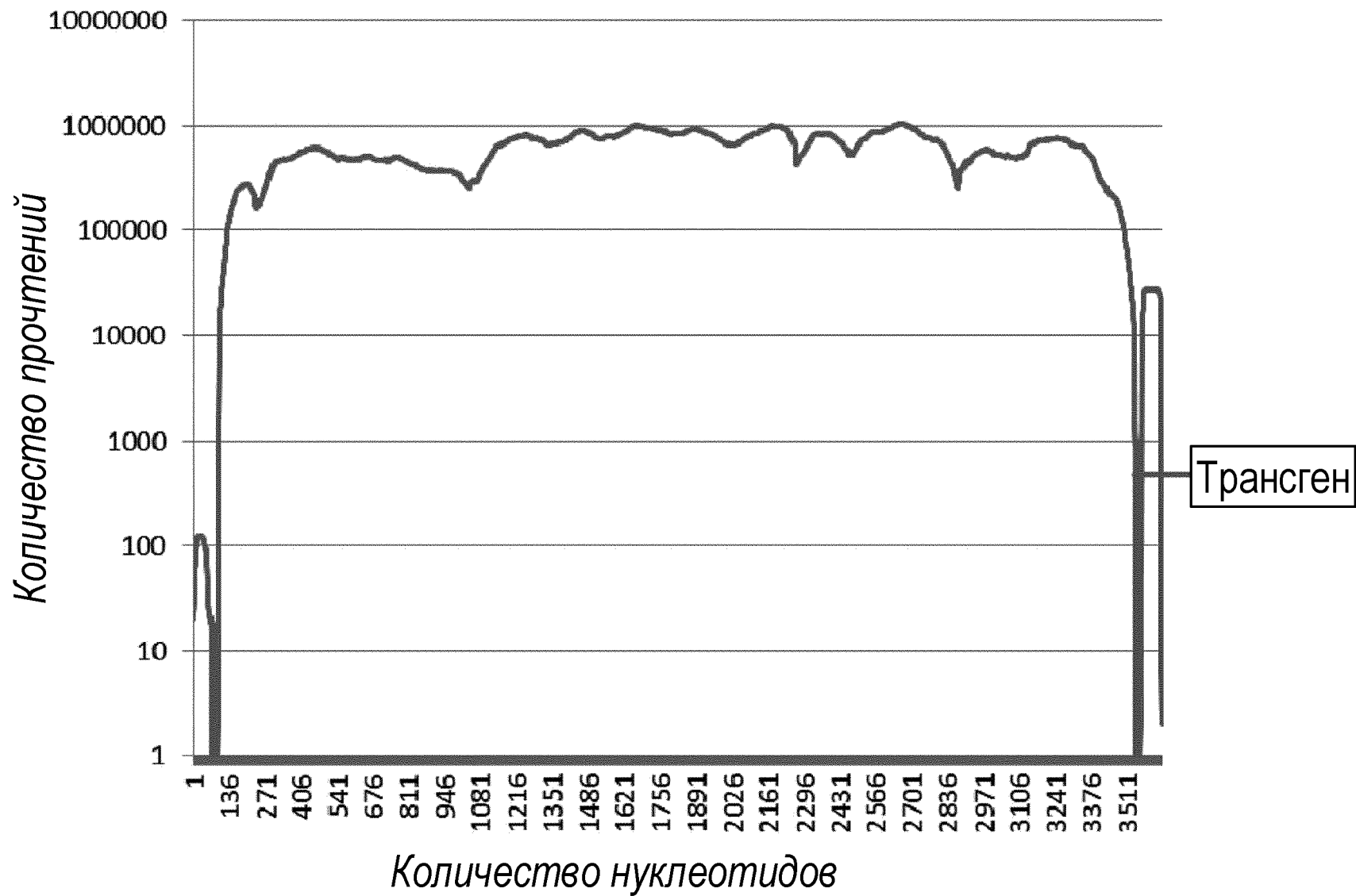
ФИГ. 2



ФИГ. 3



ФИГ. 4А



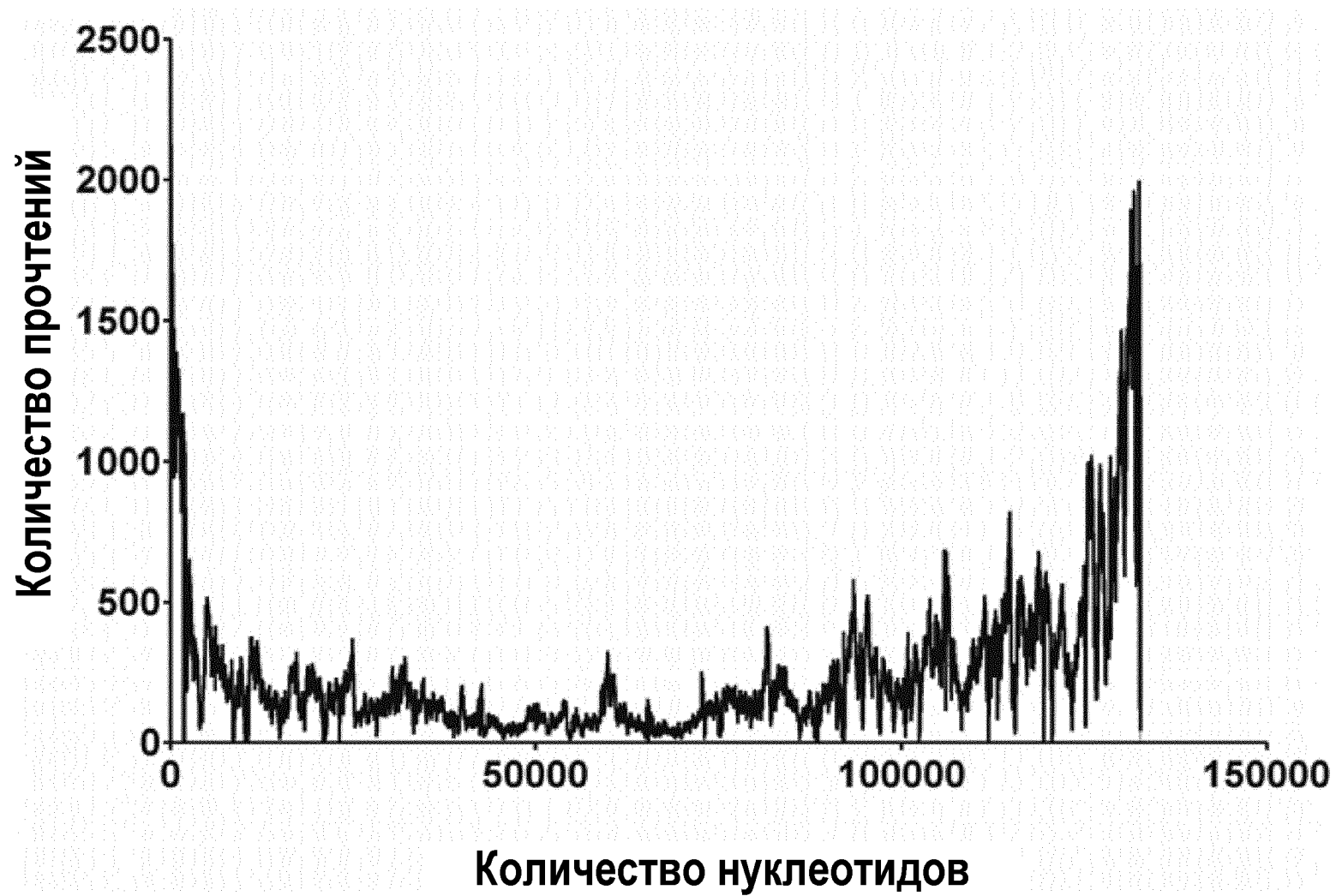
ФИГ. 4В



ФИГ. 4С



ФИГ. 5



ФИГ. 6

