

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **035747**

(13) **B1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

(45) Дата публикации и выдачи патента
2020.08.05

(21) Номер заявки
201791184

(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**

(43) **2017.09.29**

(86) **PCT/EP2015/077882**

(87) **WO 2016/083560 2016.06.02**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
ЮНИКБЮРЕ АйПи Б.В. (NL)

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

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

(56) **WO-A2-2011112089**

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

B1

035747

**035747
B1**

Область техники, к которой относится изобретение

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 *cap*, *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 *cap* 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*, *Cap* 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 *grr* и *cap* ААВ 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 плаزمиды 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 трансген, где, предпочтительно, биологический компонент содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую трансген, где, более предпочтительно, биологический компонент содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую трансген, которая фланкирована по меньшей мере одним парвовирусным ITR, и где, наиболее предпочтительно, биологический компонент содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую трансген, 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 трансген, 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
- і) средним количеством прочтений на нуклеиновую кислоту референсной последовательности; и/или
- іі) 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
- і) референсной последовательностью; и/или
- іі) 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:

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

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. "трансен"), которые фланкированы по меньшей мере одной (и обычно двумя) парвовирусной последовательностью(ми) инвертированного концевой 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 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 млрд прочтений на один цикл, и прочтение имеет среднюю длину от 50 до 300 п.н. С другой стороны секвенирование 454 генерирует примерно 1 млн про-

чтений 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.

Неожиданный 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 выбирается 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 хелперной функцией для получения композиции. Такой ген, кодирующий белок или РНК с хелперной 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 хелперной 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 трансгена 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 трансгена. В наиболее предпочтительном варианте осуществления изобретения последовательность трансгена 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 коди-

рующие 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 T-образную шпильку. Эти шпилечные 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 ОРС 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 *g_{er}* и *g_{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 хелперных 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 мышинных клеток, Jennings et al., *Arthritis Res*, 3:1 (2001), и клеточный тропизм ААВ различается у разных серотипов. См., например, Goncalves, 2005, *Virology* 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 ААВ 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 ААВ, содержащего Rep белки ААВ2, ITRs ААВ2 и капсидные белки ААВ5. 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 ААВ2, а капсидные белки из ААВ5. 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 ААВ.

рААВ вектор в композиции настоящего изобретения может быть получен классическим способом получения рААВ. 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 транскомплементации и транзientной трансфекции, требует следующих генетических элементов: (i) последовательность генома рААВ. Последовательность генома рААВ может быть клонирована в плазмиду (так называемую вирусную векторную плазмиду). Эта вирусная векторная плаزمидка как правило содержит по меньшей мере один ITR и экспрессионную кассету для экспрессии трансгена; (ii) последовательность, кодирующую гены *g_{er}* и *g_{cap}*, и (iii) необходимые хелперные функции, кодируемые естественным вспомогательным вирусом, таким как аденовирус и/или вирус простого герпеса.

Например, рААВ может быть получен в клетках млекопитающего следующим способом, но без ограничений: векторный геном содержит трансенную 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 см^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 гер типа 2 и сар 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 ФСБ/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 бакуловируса/клетка насекомого.

Упаковывающие клетки могут содержать часть всех необходимых генетических элементов ААВ, такие как хелперные последовательности гер и сар ААВ. Последующая индукция синтеза рААВ линией упаковывающих клеток может быть осуществлена путем трансфекции плазмиды, содержащей последовательность рААВ (вирусная векторная плазида), 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, т.е. хелперные последовательности ААВ (гер-сар) 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 полиэдроза *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 трансген, где предпочтительно бакуловирусный вектор содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую трансген, где более предпочтительно бакуловирусный вектор содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую трансген, который фланкирован по меньшей мере одним парвовирусным ITR, и где наиболее предпочтительно бакуловирусный вектор содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую трансген, 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 WO 2007/046703, WO 2007/148971, WO 2009/014445, WO 2009/104964 и/или WO 2011/112089.

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 US 2003148506 сообщается, что последовательности Rep и ITR ААВ также являются эффективными кросс-комплементами других последовательностей Rep и ITR ААВ в клетках насекомых.

Известно, что белки VP ААВ определяют клеточный тропизм вириона ААВ. Последовательности, кодирующие белок VP, у различных серотипов ААВ значительно менее консервативны, чем белки и гены Rep. В предпочтительном варианте осуществления изобретения вектор рААВ содержит белки VP1. Способность последовательностей Rep и ITR к кросс-комплементации с соответствующими последовательностями других серотипов позволяет получать псевдотипированные частицы рААВ, содержащие

капсидные белки одного серотипа (например, AAB5) и последовательности Rep и/или ITR AAB другого серотипа (например, AAB). Такие псевдотипированные частицы рААВ являются частью способа настоящего изобретения. В данном случае псевдотипированная частица рААВ может быть обозначена типом "x/y", где "x" обозначает источник ITR, а "y" обозначает серотип капсида, например, частица рААВ 2/5 имеет ITR из AAB2 и капсид из AAB5.

Модифицированные последовательности AAB также могут использоваться в контексте настоящего изобретения, например, для получения векторов рААВ 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 рААВ или псевдотипированных векторов рААВ 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 рААВ в клетках (насекомых), как, например, описано в Международных патентных заявках WO 2007/046703, WO 2007/148971 и/или WO 2009/014445. 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; WO 2000/028004). 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 US 20080008690 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 непосредст-

венно 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 трансген. Наиболее предпочтительно, бакуловирусный вектор содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую трансген, 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 (rAAB), как описано выше. Кроме того, вирион rAAB 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 трансген, который фланкирован по меньшей мере одним ITR на каждом конце трансгена. В этом случае примесь нуклеиновой кислоты может содержать нуклеотидные последовательности, которые присутствуют на одном конце ITR, т.е. только непосредственно примыкают к левыми 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 относи-

тельного 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:

a) 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 трансгена (ее часть), промотор или ITRs. Кроме того, любая другая нуклеотидная последовательность парвовирусного вектора может быть одинаково пригодна для использования в способе 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 опре-

деляется 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 удлинен полимеразой или лигирован с присоединенной к соседнему основанию поли- или олигонуклеотидной молекулой. Используемый здесь термин "ампликон" относится к двухцепочечному сегменту нуклеиновой кислоты, имеющему определенный 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 № 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 учетом экспериментальных возможностей.

В предпочтительном варианте осуществления олигонуклеотидный праймер избирательно гибридизуется с примесью нуклеиновой кислоты, содержащей часть бакуловирусной последовательности или ее комплемент. Используемый здесь термин "комплемент" или "комплементарная последовательность" первой последовательности означает вторую последовательность, которая может образовывать двухцепочечную структуру или дуплекс с первой последовательностью путем 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 трансген, 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, предпочтитель-

но 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 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., Airene, 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., Toublanc, 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 BaEumler, 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 Zelenaia, 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

Фиг. 1 - устойчивость ААВ1-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 каж-

дого набора примеров проверяли две партии. А) и В) набор праймеров 59/60, С) и D) набор примеров 180/181, Е) и F) набор примеров 340/341;

фиг. 2 - карта последовательности бакуловирусной плазмиды Vac.VD. Показаны используемые наборы праймеров и ITRs;

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

фиг. 4 - рААВ, содержащий трансген, анализировали путем глубокого секвенирования. Полученные прочтения выравнивали с трансгеном (А), кассетой сар (В) или кассетой гер (С);

фиг. 5 - рААВ 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 фиг. 2;

фиг. 6 - пять различных партий векторов рААВ 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 ААВ1, проверяли, является ли остаточная ДНК устойчивой к действию ДНКазы. Образцы обрабатывали бензоной (9 Ед/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 ААВ1 определяли при помощи количественной ПЦР с набором праймеров 59/90, специфичным по отношению к промотору CMV вектора ААВ1-трансген. Количественное определение остаточной бакуловирусной ДНК проводили при помощи количественной ПЦР с бакуловирус-специфичными праймерами. Эксперименты проводились с использованием двух разных наборов праймеров; набор праймеров 180/181, специфичный по отношению к ОРС 1629 ДНК бакуловируса, рядом с ААВ-трансгенной кассетой, и набор праймеров 340/341, специфичный по отношению к последовательности hr3 бакуловируса, обнаруживая бакуловирусную ДНК, расположенную удаленно от ААВ-трансгенной кассеты. 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 VacVD с набором праймеров 340/341. Количество VacVD 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

$$[\text{ДНК}] = S \cdot D \cdot C,$$

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

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

где X - коэффициент пересчета для г в мкг (10^6);

A - число Авогадро ($6,022 \times 10^{23}$);

M_w - молекулярная масса ДНК.

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

Геном ААВ1 состоит из одноцепочечной ДНК длиной 3630 п.н. Чтобы вычислить количество ДНК ААВ1, M_w $3630 \text{ п.н.} \cdot 340 \text{ Да} = 1,23 \times 10^6$ 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 ААВ-трансгенной кассетой, в то время как последовательность для набора

праймеров 340/341 расположена удаленно от кассеты. Результаты, приведенные в табл. 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. фиг. 2). Для каждого набора праймеров в эксперимент была включена стандартная линия. Количество копий трансгена определяли с использованием набора праймеров 59/60. Впоследствии было определено относительное количество копий генома по сравнению с копиями трансгена. 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 (фиг. 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 трансгена и 2) бакуловирусные последовательности, расположенные в пределах 10 т.п.н. от трансгенной кассеты (в диапазоне предела упаковки ААВ), 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, Duren, 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 J.C., 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 J.F. (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 референтной последовательностью или собраны *de novo* для создания контригов. Здесь, после секвенирования всего содержимого, прочтения выравнивали с рядом референтных последовательностей. Эти референтные 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 референтной последовательности (фиг. 4). Общеизвестно, что когда нуклеотиды референтной 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 представляют собой справочную информацию, собранную на референтных последовательностях, представляющих потенциально представленные молекулы ДНК в векторных препаратах рААВ, т.е. 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 референтных 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. фиг. 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 (фиг. 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 (табл. 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
Рер кассета	460	676	596	691	562

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

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

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

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

$S_{\text{трансген}}$ - среднее количество прочтений, полученных для трансгенной кассеты;

$C_{\text{бак}}$ - коэффициент поправки на длину молекулы, где $C_{\text{бак}}$ - длина основной цепи бакуловируса (нд)/длина трансгенной кассеты (нт).

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

	$S_{\text{трансген}}/S_{\text{тра}}$ <i>нстген</i>	$S_{\text{бак}}/S_{\text{трансге}}$ <i>н</i>	$S_{\text{сар}}/S_{\text{трансге}}$ <i>н</i>	$S_{\text{рер}}/S_{\text{трансге}}$ <i>н</i>
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 lр1 (на основе формулы, описанной в тексте)

	трансген	рер	сар	Бакуловирусная основа
Длина молекулы (нд)	3645	2785	3088	133894
Коэффициент поправки на длину молекулы (С)	1	0.76406	0.847188	36.73361
%, трансгена, присутствующую	Н.Д.	0.061682%	0.00888%	7.630121%

щего партии 1				
% трансгена, присутствующего щего партии 2	Н.Д.	0.087726%	0.006835%	9.04252%
% трансгена, присутствующего щего партии 3	Н.Д.	0.075782%	0.006106%	7.555691%
% трансгена, присутствующего щего партии 4	Н.Д.	0.089591%	0.01463%	8.200541%
% трансгена, присутствующего щего 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 фиг. 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 (фиг. 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 фиг. 6, эти три метода хорошо коррелируют друг с другом и поэтому могут использоваться параллельно для обнаружения ДНК-примесей в векторах рААВ.

Как показано на фиг. 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 (ко-

торые иногда составляют 136000 п.н. в длину, например бакуловирусная 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 GTTCACTAA	CMV промотор	обратный	5214- 5284
9	pr180	CGAACCGATGGCT GGACTATC	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	смысловой	135323 - 135403
14	pr403	GCACAGTTCAAGC CTCACAGCCTA	Бакуловирусная ДНК 10	антисмысловой	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 CAGCAАСТАТАТ	Бакуловирусу ая ДНК справа ОРС603	АНТИСМЫСЛ ОВОЙ	4357- 4438
19	pr408	TACCGACTCTGCT GAAGAGGAGGAA	Бакуловирусу ая ДНК слева ОРС1629	СМЫСЛОВОЙ	8421- 8499
20	pr409	TGCGTCTGGTGCA AАСТССТТТА	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

			тип 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

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

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

а) секвенирование указанной композиции для получения случайных прочтений нуклеотидных последовательностей;

б) сравнение случайных последовательностей со стадии а) с нуклеотидной последовательностью биологического образца, используемого при получении композиции, где совпадение между случайным прочтением и нуклеотидной последовательностью биологического образца указывает на примесь нуклеиновой кислоты;

с) определение среднего количества прочтений на парвовирусном векторе; и

д) определение количества прочтений на нуклеотид избыточной примеси нуклеиновой кислоты, которая идентифицируется именно как избыточная, когда ее распределение прочтений не является случайным, и превышает в 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20 или 50 раз среднее количество прочтений в биологическом образце и 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 стадии (а) включает в себя высокопроизводительное секвенирование.

3. Способ по п.1 или 2, где парвовирусный вектор является рекомбинантным вектором аденоассоциированного вируса (рААВ).

4. Способ по любому из пп.1-3, где нуклеотидная последовательность биологического образца выбрана из группы, состоящей из нуклеотидных последовательностей клетки-хозяина, плазмиды, вектора, отличающегося от рекомбинантного парвовирусного вектора, хелперного вируса, и 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 пп.1-5, где нуклеотидная последовательность биологического образца со-

держит нуклеотидную последовательность, кодирующую Rep, Cap и/или трансген, где предпочтительно биологический компонент содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую трансген, которая фланкирована по меньшей мере одним парвовирусным ITR, и предпочтительно указанный биологический образец содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую трансген, которая фланкирована по меньшей мере одним парвовирусным ITR с каждой стороны.

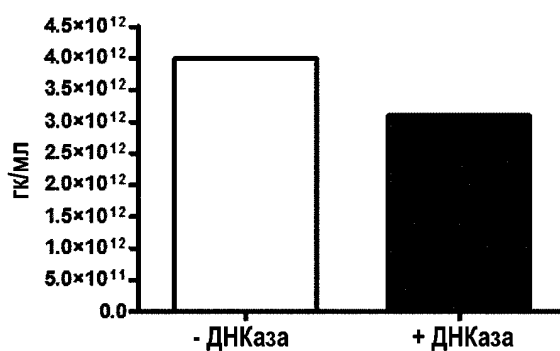
7. Способ по любому из пп.1-6, где избыточную примесь нуклеиновой кислоты количественно определяют во второй или последующей подобной композиции.

8. Способ определения пригодности композиции, содержащей парвовирусный вектор для применения в отношении людей при клиническом лечении, где этот способ включает следующие стадии:

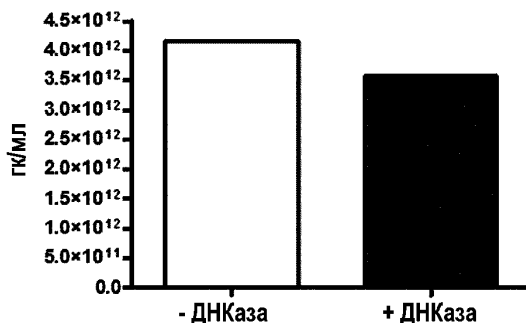
i) количественного определения избыточной примеси нуклеиновой кислоты в композиции парвовирусного вектора способом по любому из пп.1-7; и

ii) определение пригодности композиции, содержащей примесь нуклеиновой кислоты для лечения людей, если 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 референсной последовательностью и/или трансгеном.

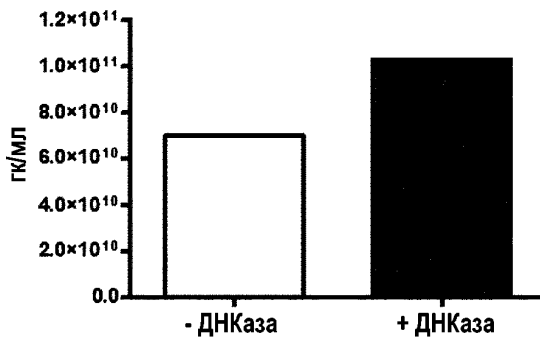
9. Способ по любому из пп.1-8, где композиция, содержащая парвовирусный вектор, представляет собой фармацевтическую композицию.



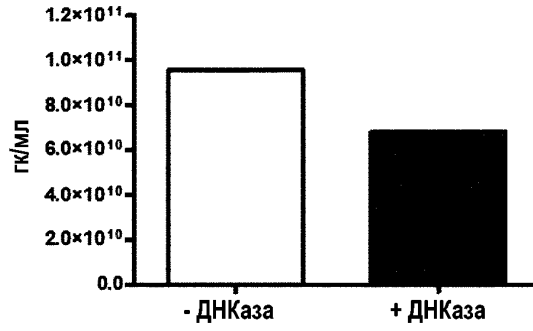
Фиг. 1А



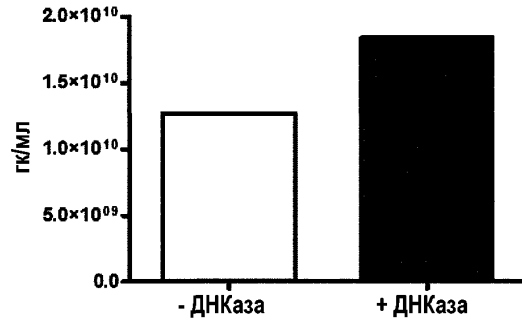
Фиг. 1В



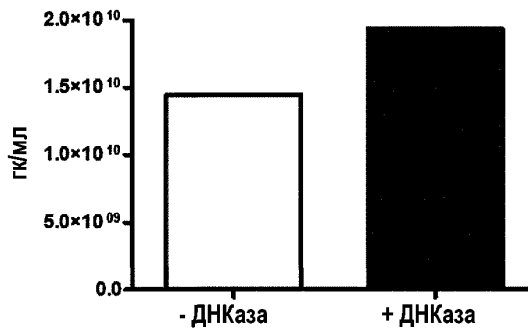
Фиг. 1С



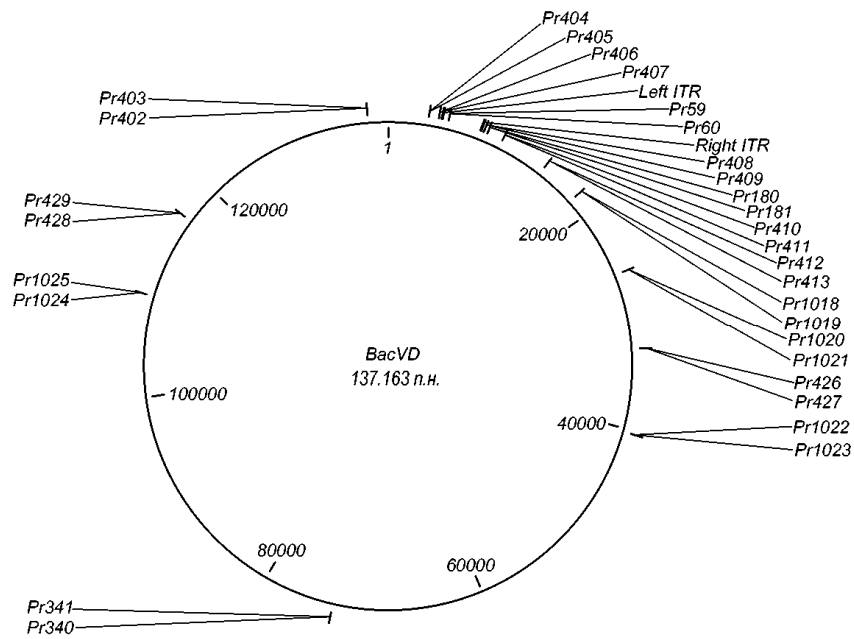
Фиг. 1D



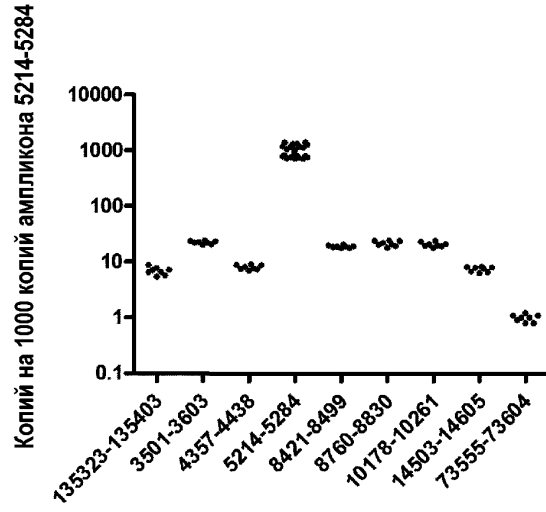
Фиг. 1E



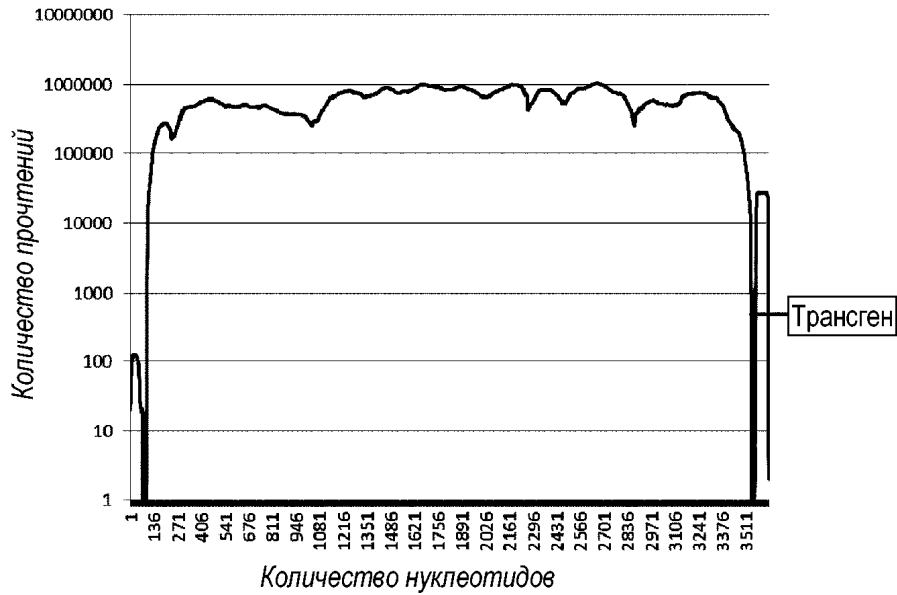
Фиг. 1F



Фиг. 2



ампликон
Фиг. 3



Количество прочтений

Количество нуклеотидов
Фиг. 4А

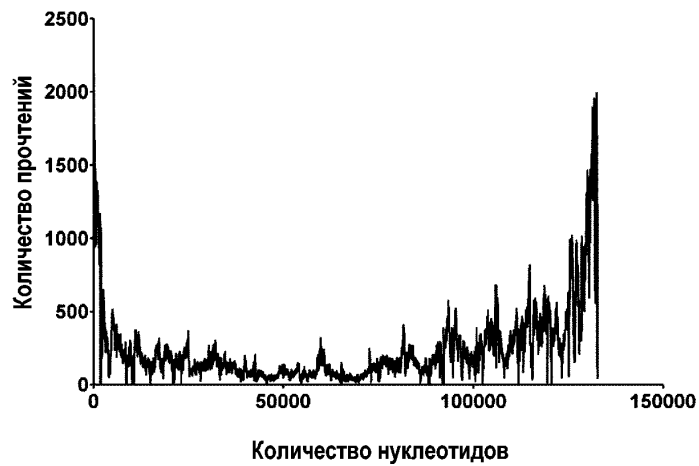


Количество прочтений

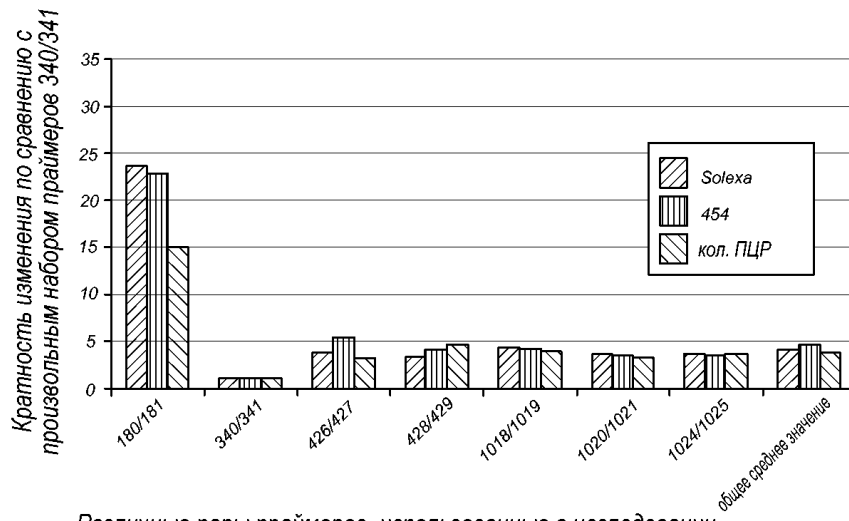
Количество нуклеотидов
Фиг. 4В



Фиг. 4С



Фиг. 5



Различные пары праймеров, использованные в исследовании

Фиг. 6

