

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202391018

(13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2023.07.07

(51) Int. Cl. C12Q 1/34 (2006.01)
C12N 15/86 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2021.10.15

(54) ИССЛЕДОВАНИЕ ДЛЯ ИЗМЕРЕНИЯ АКТИВНОСТИ ЛЕКАРСТВЕННОГО ПРОДУКТА ДЛЯ ГЕННОЙ ТЕРАПИИ

(31) 63/092,189

(32) 2020.10.15

(33) US

(86) PCT/US2021/055200

(87) WO 2022/081985 2022.04.21

(71) Заявитель:
ПРЕВЭЙЛ ТЕРАПЬЮТИКС, ИНК.
(US)

(72) Изобретатель:
Нг Мэри, Фенн Тимоти, Бизонски
Патрисия, Холлер Джордж, Дай Юн
(US)

(74) Представитель:
Нилова М.И. (RU)

(57) В изобретении предложен анализ на основе клеток для определения активности рекомбинантного вирусного вектора, экспрессирующего трансген.

	Патристы 14				Патристы 14				Патристы 14			
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	85	85	85	85	15.1	15.1	15.1	15.1	15.2	15.2	15.2	15.2
	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
B	85	85	85	85	15.1	15.1	15.1	15.1	15.2	15.2	15.2	15.2
	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
C	85	85	85	85	15.1	15.1	15.1	15.1	15.2	15.2	15.2	15.2
	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
D	85	85	85	85	15.1	15.1	15.1	15.1	15.2	15.2	15.2	15.2
	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
E	85	85	85	85	15.1	15.1	15.1	15.1	15.2	15.2	15.2	15.2
	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
F	85	85	85	85	15.1	15.1	15.1	15.1	15.2	15.2	15.2	15.2
	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
G	85	85	85	85	15.1	15.1	15.1	15.1	15.2	15.2	15.2	15.2
	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7
H	85	85	85	85	15.1	15.1	15.1	15.1	15.2	15.2	15.2	15.2
	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8
I	85	85	85	85	15.1	15.1	15.1	15.1	15.2	15.2	15.2	15.2
	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9
J	85	85	85	85	15.1	15.1	15.1	15.1	15.2	15.2	15.2	15.2
	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
K	85	85	85	85	15.1	15.1	15.1	15.1	15.2	15.2	15.2	15.2
	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11
L	85	85	85	85	15.1	15.1	15.1	15.1	15.2	15.2	15.2	15.2
	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
M	85	85	85	85	15.1	15.1	15.1	15.1	15.2	15.2	15.2	15.2
	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13

202391018
A1

202391018
A1

ИССЛЕДОВАНИЕ ДЛЯ ИЗМЕРЕНИЯ АКТИВНОСТИ ЛЕКАРСТВЕННОГО ПРОДУКТА ДЛЯ ГЕННОЙ ТЕРАПИИ

ПЕРЕКРЕСТНАЯ ССЫЛКА НА РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ

5 [0001] Данная заявка испрашивает приоритет предварительной заявки на патент США № 63/092 189, поданной 15 октября 2020 г., содержание которой полностью включено в данный документ посредством ссылки.

ОПИСАНИЕ ТЕКСТОВОГО ФАЙЛА, ПРЕДСТАВЛЕННОГО В ЭЛЕКТРОННОМ 10 ВИДЕ

[0002] Содержание текстового файла, представленного в электронном виде, полностью включено в данный документ посредством ссылки: Копия перечня последовательностей в машиночитаемом формате (название файла: PRVL_017_01WO_SeqList_ST25.txt, дата записи: 15 октября 2021 г., размер файла ~7474 байта).

15

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ

[0003] Данное изобретение в целом относится к области генной терапии. Более конкретно, в изобретении предложен анализ на основе клеток для анализа активности композиций, содержащих рекомбинантный вирусный вектор, экспрессирующий трансген.

20

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

[0004] Рекомбинантные вирусные векторы, кодирующие глюкоцереброзидазу (GCase; кодируется геном *GBA1*), применимы для лечения таких заболеваний, как болезнь Паркинсона и болезнь Гоше. Существует потребность в анализе для измерения
25 относительной активности рекомбинантных вирусных композиций, доставляющих GCase, которые предназначены для использования в генной терапии.

КРАТКОЕ ИЗЛОЖЕНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0005] В данном документе предложен способ измерения относительной активности
30 исследуемого образца, содержащего первый рекомбинантный вирус, содержащий трансген, кодирующий глюкоцереброзидазу (GCase), при этом способ включает: а) трансдукцию первого множества клеток исследуемым образцом; б) инкубацию трансдуцированного первого множества клеток в условиях, достаточных для экспрессии GCase; в) сбор первого клеточного лизата из трансдуцированного первого множества клеток; д) объединение
35 первого клеточного лизата с резорифин-бета-D-глюкопиранозидом; е) визуализацию

первого клеточного лизата для получения первого показания флуоресценции; f) трансдукцию второго множества клеток эталонным стандартом, содержащим второй рекомбинантный вирус, содержащий трансген, кодирующий GСазу; g) инкубацию трансдуцированного второго множества клеток в условиях, достаточных для экспрессии GСазы; h) сбор второго клеточного лизата из трансдуцированного второго множества клеток; i) объединение второго клеточного лизата с резорифин-бета-D-глюкопиранозидом; j) визуализацию второго клеточного лизата для получения второго показания флуоресценции; и k) сравнение первого показания флуоресценции со вторым показанием флуоресценции с использованием анализа параллельных линий для расчета относительной активности исследуемого образца.

[0006] В некоторых вариантах осуществления описанных в данном документе способов первый рекомбинантный вирус и второй рекомбинантный вирус содержат идентичные трансгены, кодирующие GСазу.

[0007] В некоторых вариантах осуществления описанных в данном документе способов первый рекомбинантный вирус и/или второй рекомбинантный вирус представляет собой рекомбинантный аденоассоциированный вирус (rAAV). В некоторых вариантах осуществления rAAV содержит капсидный белок AAV9. В некоторых вариантах осуществления rAAV содержит капсидный белок AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10 или AAV11 или вариант любого из этих капсидных белков.

[0008] В некоторых вариантах осуществления способов, описанных в данном документе, GСазу содержит SEQ ID NO:1. В некоторых вариантах осуществления трансген, кодирующий GСазу, содержит кодон-оптимизированную нуклеотидную последовательность. В некоторых вариантах осуществления кодон-оптимизированная нуклеотидная последовательность содержит SEQ ID NO: 2.

[0009] В некоторых вариантах осуществления описанных в данном документе способов первое множество клеток и/или второе множество клеток представляют собой клетки HEK-293T или HEK-293.

[0010] В некоторых вариантах осуществления описанных в данном документе способов, около 1,25 мМ резорифин-бета-D-глюкопиранозид объединяют с первым клеточным лизатом и/или вторым клеточным лизатом.

[0011] В некоторых вариантах осуществления описанных в данном документе способов первое множество клеток и/или второе множество клеток высевают в многолуночный планшет. В некоторых вариантах осуществления первое множество клеток и/или второе множество клеток высевают в количестве около 20 000 клеток на лунку.

[0012] В некоторых вариантах осуществления описанных в данном документе способов исследуемый образец и/или эталонный стандарт серийно разводят перед трансдукцией.

[0013] В некоторых вариантах осуществления описанных в данном документе способов первое множество клеток и второе множество клеток инкубируют от около 68 часов до 5 около 81 часа перед сбором клеточного лизата. В некоторых вариантах осуществления первое множество клеток и второе множество клеток инкубируют от около 66 часов до около 78 часов после трансдукции и перед сбором клеточного лизата.

[0014] В некоторых вариантах осуществления описанных в данном документе способов первое множество клеток трансдуцируют исследуемым образцом по меньшей мере с двумя 10 различными множественностями заражения (MOI) первого рекомбинантного вируса. В некоторых вариантах осуществления второе множество клеток трансдуцируют эталонным стандартом по меньшей мере при двух различных множественностях заражения (MOI) второго рекомбинантного вируса.

[0015] В некоторых вариантах осуществления описанных в данном документе способов 15 первое показание флуоресценции и/или второе показание флуоресценции отражают измерение активности GCазы. В некоторых вариантах осуществления активность GCазы измеряют в относительных единицах флуоресценции (ОЕФ)/ч.

[0016] В некоторых вариантах осуществления описанных в данном документе способов стадия сравнения (k) включает выполнение log-трансформации количества 20 рекомбинантного вируса и ОЕФ/ч и построение стандартной логарифмической кривой количества рекомбинантного вируса в зависимости от логарифма ОЕФ/ч для каждого исследуемых образца и эталонного стандарта. В некоторых вариантах осуществления стадия сравнения (k) включает расчет линейной регрессии логарифма количества рекомбинантного вируса в зависимости от логарифма ОЕФ/ч для каждого исследуемого 25 образца и эталонного стандарта, тем самым получая наклон исследуемого образца и наклон эталонного стандарта. В некоторых вариантах осуществления стадия сравнения (k) включает расчет линейной регрессии с общим наклоном с использованием линейных регрессий, полученных для каждого исследуемого образца и эталонного стандарта. В некоторых вариантах осуществления относительную активность рассчитывают по 30 формуле: Относительная активность (%) = $10^{((b - b_{\text{эталон}})/A)}$ x 100. В некоторых вариантах осуществления соотношение наклона исследуемого образца к общему наклону составляет от около 0,60 до около 1,40. В некоторых вариантах осуществления соотношение наклона эталонного стандарта к общему наклону составляет от около 0,60 до около 1,40.

[0017] В некоторых вариантах осуществления способ, описанный в данном документе, дополнительно включает расчет значения R^2 для линейной регрессии исследуемого образца и эталонного стандарта. В некоторых вариантах осуществления значение R^2 для исследуемого образца и эталонного стандарта больше или равно 0,9.

5

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

[0018] ФИГ. 1 представляет схему планшета для ПЦР для анализа активности гAAV. «RS» означает «эталонный стандарт». «TS» означает «исследуемый образец».

[0019] ФИГ. 2 представляет линейный график и расчеты относительной активности
10 нескольких образцов гAAV, экспрессирующих GСазу.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0020] Данное изобретение относится к анализам трансдукции на основе клеток для измерения относительной активности рекомбинантных вирусных композиций,
15 доставляющих трансген, кодирующий глюкоцереброзидазу (*например*, глюкоцереброзидазу человека). Глюкоцереброзидаза (также называемая бета-глюкоцереброзидазой, лизосомальной кислотой β -глюкоцереброзидазой, GСазой и GBA) кодируется геном *GBA1*. Субъекты с мутациями только в одном аллеле *GBA1* подвергаются значительно повышенному риску болезни Паркинсона. Субъекты с мутациями в обеих
20 копиях *GBA1* страдают болезнью Гоше. Вирусные композиции, доставляющие трансген, кодирующий GСазу, применимы для генной терапии болезни Паркинсона (*например*, болезни Паркинсона с мутацией *GBA1*) и болезни Гоше.

[0021] В некоторых вариантах осуществления рекомбинантный вирусный вектор, кодирующий GСазу, представляет собой вектор рекомбинантного аденоассоциированного
25 вируса (гAAV).

[0022] В описанных в данном документе способах используют флуорогенный субстрат резорурфин- β -D-глюкопиранозид, который в присутствии GСазы катализируется с образованием флуоресцентного продукта резорурфина. Получение резорурфина контролируют непосредственно по мере протекания реакции для расчета скорости
30 образования продукта. В присутствии избытка субстрата резорурфин- β -D-глюкопиранозид и в условиях анализа скорость образования продукта линейно пропорциональна количеству белка GСазы.

[0023] Термин «рекомбинантный вирус» относится к вирусу, который был генетически изменен, например, путем добавления или вставки конструкции гетерологичной
35 нуклеиновой кислоты в вирусную частицу.

- 5 [0024] Термин «гетерологичный» используется в данном документе взаимозаменяемо с термином «экзогенный» и относится к веществу, происходящему из какого-либо источника, отличного от его естественного источника. Например, термин «экзогенный белок» или «экзогенный ген» относится к белку или гену из источника, отличного от AAV, который был искусственно введен в геном или частицу AAV.
- [0025] Термин «рекомбинантный аденоассоциированный вирус» или «гAAV» относится к частице AAV или вириону AAV, содержащему вектор гAAV, инкапсулированный одним или несколькими капсидными белками AAV.
- 10 [0026] Термин «вектор гAAV» относится к нуклеиновым кислотам, одноцепочечным или двухцепочечным, имеющим 5'-концевую последовательность инвертированного концевой повтора (ITR) AAV и 3'-концевой ITR AAV, фланкирующие кодирующую белок последовательность, функционально связанную с регуляторными элементами транскрипции, которые являются гетерологичными по отношению к геному вируса AAV, например, один или несколько промоторов и/или энхансеров и, необязательно, последовательность полиаденилирования и/или один или несколько интронов, вставленных между экзонами кодирующей белок последовательности.
- 15 [0027] Термин «ИЕ» относится к инфекционным единицам.
- [0028] Термин «TCID50» относится к инфекционной дозе для 50% клеточной культуры.
- [0029] Термин «USP» относится к Фармакопее США.
- 20 [0030] Термин «исследуемый образец» относится к образцу, содержащему вектор гAAV, содержащий последовательность, кодирующую интересующий экзогенный белок (*например*, GCase), активность которого неизвестна и будет определена с использованием способов, описанных в данном документе.
- [0031] Термин «эталонный стандарт» относится к композиции, содержащей вектор гAAV, кодирующий интересующий экзогенный белок (*например*, GCase), активность которого известна.
- 25 [0032] В некоторых аспектах в данном документе предложен способ измерения относительной активности исследуемого образца, содержащего первый рекомбинантный вирус, содержащий трансген, кодирующий глюкоцереброзидазу (GCase), при этом способ включает: а) трансдукцию первого множества клеток исследуемым образцом; б) инкубацию трансдуцированного первого множества клеток в условиях, достаточных для экспрессии GCase; в) сбор первого клеточного лизата из трансдуцированного первого множества клеток; г) объединение первого клеточного лизата с резорифин-бета-D-глюкопиранозидом; е) визуализацию первого клеточного лизата для получения первого показания флуоресценции; ф) трансдукцию второго множества клеток эталонным стандартом,
- 30
35

содержащим второй рекомбинантный вирус, содержащий трансген, кодирующий GCазу; g) инкубацию трансдуцированного второго множества клеток в условиях, достаточных для экспрессии GCазы; h) сбор второго клеточного лизата из трансдуцированного второго множества клеток; i) объединение второго клеточного лизата с резорифин-бета-D-глюкопиранозидом; j) визуализацию второго клеточного лизата для получения второго показания флуоресценции; и k) сравнение первого показания флуоресценции со вторым показанием флуоресценции с использованием анализа параллельных линий для расчета относительной активности исследуемого образца.

5
10
15
[0033] В некоторых вариантах осуществления первый рекомбинантный вирус и второй рекомбинантный вирус идентичны. В некоторых вариантах осуществления первый рекомбинантный вирус и второй рекомбинантный вирус не идентичны. В некоторых вариантах осуществления первый рекомбинантный вирус и второй рекомбинантный вирус содержат идентичные трансгены, кодирующие GCазу, но взяты из разных производственных партий или партий продукции. В некоторых вариантах осуществления GCаза содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1.

[0034] В некоторых вариантах осуществления первое множество клеток и/или второе множество клеток представляют собой клетки НЕК-293Т или НЕК-293.

20
25
[0035] Описанные в данном документе способы можно осуществлять в многолуночных планшетах. В некоторых вариантах осуществления способ, описанный в данном документе, осуществляют в 96-луночном планшете. В некоторых вариантах осуществления первое множество клеток и второе множество клеток высевают в многолуночный планшет. В некоторых вариантах осуществления первое множество клеток и/или второе множество клеток высевают в количестве около 20 000 клеток на лунку перед трансдукцией исследуемым образцом и эталонным стандартом, соответственно. В некоторых вариантах осуществления клетки оставляют прикрепляться в течение ночи при 37°C и 5% CO₂.

[0036] В некоторых вариантах осуществления трансдукция происходит через около 24 часа после посева клеток.

30
[0037] В некоторых вариантах осуществления исследуемый образец и/или эталонный стандарт серийно разводят перед трансдукцией. В некоторых вариантах осуществления исследуемый образец разводят на 50%, 100% и 200% относительно эталонного стандарта. В некоторых вариантах осуществления серийные разведения дают следующие общие количества векторного генома (вг) на лунку: 5,00E+10 вг/лунку, 3,33E+10 вг/лунку, 2,22E+10 вг/лунку, 1,48E+10 вг/лунку, 9,88E+9 вг/лунку и 6,58E+9 вг/лунку.

[0038] В некоторых вариантах осуществления параллельно с исследуемым образцом проводят стандартную кривую очищенной рекомбинантной GСазы (rGBA, от 0 до 333 нг/мл, кат. номер R&D № 7410-GHB-020, чистота >95%).

5 **[0039]** В некоторых вариантах осуществления первое множество клеток трансдуцируют исследуемым образцом по меньшей мере с двумя различными множественностями заражения (MOI) первого рекомбинантного вируса. В некоторых вариантах осуществления второе множество клеток трансдуцируют эталонным стандартом по меньшей мере при двух различных MOI второго рекомбинантного вируса.

10 **[0040]** В некоторых вариантах осуществления первое множество клеток и второе множество клеток инкубируют от около 68 часов до около 81 часов после трансдукции и перед сбором клеточного лизата. В некоторых вариантах осуществления первое множество клеток и второе множество клеток инкубируют от около 2 до около 2,5 часов перед добавлением к клеткам восстановительной среды (*например*, 10% ФСБ/ДМЕМ/1 мкМ Hoechst 33342). В некоторых вариантах осуществления первое множество клеток и второе
15 множество клеток инкубируют 72 часа \pm 6 часов (*например*, от около 66 часов до около 78 часов) после трансдукции и перед сбором клеточного лизата. В некоторых вариантах осуществления инкубация происходит при 37°C и 5% CO₂.

[0041] В некоторых вариантах осуществления около 1,25 mM резорурфин-бета-D-глюкопиранозид объединяют с первым клеточным лизатом на стадии объединения (d)
20 и/или со вторым клеточным лизатом на этапе объединения (i).

[0042] В некоторых вариантах осуществления стадию визуализации (e) и/или (j) осуществляют с помощью планшетного ридера.

[0043] В некоторых вариантах осуществления первое показание флуоресценции и/или второе показание флуоресценции отражают измерение активности GСазы. В некоторых
25 вариантах осуществления активность GСазы измеряют в относительных единицах флуоресценции (ОЕФ)/ч.

[0044] В некоторых вариантах осуществления стадия сравнения (k) включает выполнение log-трансформации количества рекомбинантного вируса и ОЕФ/ч и построение стандартной логарифмической кривой количества рекомбинантного вируса в зависимости
30 от логарифма ОЕФ/ч для каждого исследуемых образца и эталонного стандарта. В некоторых вариантах осуществления стадия сравнения (k) включает расчет линейной регрессии логарифма количества рекомбинантного вируса в зависимости от логарифма ОЕФ/ч для каждого исследуемого образца и эталонного стандарта, тем самым получая наклон исследуемого образца и наклон эталонного стандарта. В некоторых вариантах
35 осуществления стадия сравнения (k) включает расчет линейной регрессии с общим

наклоном с использованием линейных регрессий, полученных для каждого исследуемого образца и эталонного стандарта. В некоторых вариантах осуществления относительную активность исследуемого образца рассчитывают по формуле: Относительная активность (%) = $10 \cdot ((b - b_{\text{эталон}})/A) \times 100$. В некоторых вариантах осуществления соотношение наклона исследуемого образца к общему наклону составляет от около 0,60 до около 1,40. В некоторых вариантах осуществления соотношение наклона эталонного стандарта к общему наклону составляет от около 0,60 до около 1,40.

5 **[0045]** В некоторых вариантах осуществления способ измерения относительной активности исследуемого образца дополнительно включает расчет значения R^2 для линейной регрессии исследуемого образца и эталонного стандарта. В некоторых вариантах осуществления значение R^2 для исследуемого образца и эталонного стандарта больше или равно 0,9. В некоторых вариантах осуществления значение R^2 для исследуемого образца и эталонного стандарта больше или равно 0,96.

10 **[0046]** В некоторых вариантах осуществления относительная активность вирусного вектора составляет по меньшей мере 40%, по меньшей мере 50%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99%, по меньшей мере 99,5 %, по меньшей мере 99,9 %, по меньшей мере 100 %, по меньшей мере 110 %, по меньшей мере 120 %, по меньшей мере 130 % или по меньшей мере 140 % относительно эталонного стандарта. В некоторых вариантах осуществления относительная активность вирусного вектора составляет по меньшей мере 90% относительно эталонного стандарта.

15 **[0047]** Инфекционный титр (также называемый функциональным титром) векторов гAAV представляет собой концентрацию вирусных частиц, которые могут инфицировать клетки. В некоторых вариантах осуществления анализа клеточной трансдукции используют для определения инфекционного титра. В некоторых вариантах осуществления инфекционный титр вирусного вектора определяют с использованием способа, представленного в Примере 1. В некоторых вариантах осуществления инфекционный титр композиции, описанной в
25 данном документе, составляет от около $8,0E+9$ ИЕ/мл до около $1,2E+10$ ИЕ/мл. В некоторых вариантах осуществления инфекционный титр композиции, описанной в данном документе, составляет около $8,0E+9$ ИЕ/мл, около $8,15E+9$ ИЕ/мл, около $8,5E+9$ ИЕ/мл, около $9,0E+9$ ИЕ/мл, около $9,5E+9$ ИЕ/мл, около $9,99E+9$ ИЕ/мл, около $1E+10$ ИЕ/мл, около $1,12E+10$ ИЕ/мл или около $1,2E+10$ ИЕ/мл. В некоторых вариантах осуществления титр
30 $TCID_{50}$ композиции, описанной в данном документе, составляет от около 4500 вг/ИЕ до

около 10000 вг/ИЕ. В некоторых вариантах осуществления ТСID50 композиции, описанной в данном документе, составляет около 4500 вг/ИЕ, около 5000 вг/ИЕ, около 5500 вг/ИЕ, около 6000 вг/ИЕ, около 6290 вг/ИЕ, около 6500 вг/ИЕ, около 7000 вг/ИЕ, около 7500 вг/ИЕ, около 8000 вг/ИЕ, около 8500 вг/ИЕ, около 9000 вг/ИЕ, около 9500 вг/ИЕ, около 9980 вг/ИЕ или около 10000 вг/ИЕ.

[0048] Примеры подходящих векторов гAAV, которые можно использовать в способах, описанных в данном документе, описаны в WO 2019/070891, WO 2019/070893, WO 2019/070894 и WO 2019/084068, содержание каждого из которых включено в данный документ посредством ссылки в полном объеме.

[0049] В некоторых вариантах осуществления способов, описанных в данном документе, вектор гAAV дополнительно содержит одно или несколько из следующего: промотор куриного бета-актина (CBA); энхансер цитомегаловируса (ЦМВ); посттранскрипционный регуляторный элемент вируса гепатита сурков (WPRE); сигнальный хвост полиА бычьего гормона роста; искусственный интрон; искусственный экзон; и один или несколько из следующих сайтов активации регуляции транскрипции в промоторной области: TATA, RBS и YY1 (Francois et al., (2005) *J. Virol.* 79(17):11082–11094). Сайты активации регуляции транскрипции TATA, RBS и YY1 могут быть расположены на 5'-конце промоторной области.

[0050] В некоторых вариантах осуществления способов, описанных в данном документе, вектор гAAV содержит первый инвертированный концевой повтор (ITR) AAV и второй ITR, фланкирующие полинуклеотид, кодирующий представляющий интерес генный продукт, и связанные регуляторные последовательности. В некоторых вариантах осуществления каждый ITR представляет собой ITR AAV2 дикого типа (SEQ ID NO: 3). В некоторых вариантах осуществления каждый ITR получен из ITR AAV2 дикого типа.

[0051] В некоторых вариантах осуществления способов, описанных в данном документе, вектор гAAV содержит в последовательном порядке первый инвертированный концевой повтор (ITR) AAV, энхансер цитомегаловируса (ЦМВ), промотор куриного бета-актина (CBA), полинуклеотид, кодирующий белок GCазы человека, посттранскрипционный регуляторный элемент вируса гепатита сурков (WPRE), сигнальный хвост полиА бычьего гормона роста и второй ITR AAV. В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид, кодирующий белок GCазы человека, является кодон-оптимизированным (*например*, кодон-оптимизированным для экспрессии в клетках человека). В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид, кодирующий белок GCазы человека, содержит SEQ ID NO: 2. В некоторых вариантах осуществления частица гAAV, содержащая вектор гAAV, содержащий полинуклеотид, содержащий SEQ ID NO: 2, обозначена как «PR001».

[0052] В некоторых вариантах осуществления способов, описанных в данном документе, вектор гAAV представляет собой самокомплементарный вектор рекомбинантного аденоассоциированного вируса (scAAV). Векторы scAAV описаны, например, в McCarty et al., *Gene Ther.* 2001; 8(16):1248-54.

5 [0053] В некоторых вариантах осуществления способов, описанных в данном документе, рекомбинантный вирус представляет собой AAV. В некоторых вариантах осуществления способов, описанных в данном документе, гAAV содержит капсидный белок AAV9. В некоторых вариантах осуществления способов, описанных в данном документе, гAAV содержит капсидный белок AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8,
10 AAV9, AAV10 или AAV11 или вариант любого из этих капсидных белков.

[0054] Все публикации, патенты и патентные заявки включены в данный документ посредством ссылки в полном объеме в той же степени, как если бы каждая отдельная публикация, патент или патентная заявка были специально и индивидуально указаны для включения посредством ссылки в полном объеме.

15 [0055] Следующие примеры приведены для того, чтобы предоставить специалистам в данной области техники полное раскрытие и описание создания и оценки соединений, композиций, изделий, устройств и/или способов, описанных и заявляемых в данном документе, и предназначены исключительно для иллюстрации и не предназначены для ограничения объема того, что изобретатели считают своим изобретением.

20

ПРИМЕР

Пример 1: Анализ ферментативной активности *in vitro* для гAAV, кодирующего глюкоцеребозидазу.

25 [0056] Целью данного анализа является измерение *in vitro* относительной активности инкапсулированного вектора AAV (*например*, AAV9), кодирующего глюкоцеребозидазу (GCase, кодируется геном *GBA1*) с использованием анализа на основе клеток.

Метод лабораторных испытаний

30 [0057] Целью этого метода является измерение реакции на дозу инкапсулированного AAV вектора, кодирующего глюкоцеребозидазу (GCase, кодируется геном *GBA1*), *in vitro* с использованием функционального анализа на основе клеток. Этот метод тестирования можно использовать в исследовательских целях, например, для сравнения ответов различных партий продуктов генной терапии AAV.

Таблица 1: Определения

AAV9	Аденоассоциированный вирус серотипа-9
CV	Коэффициент вариации

Эксиципиент	Буфер для состава
ФБС	Фетальная бычья сыворотка
FB	Буфер для состава; то же, что эксципиент
GSаза	Глюкоцереброзидаза, также известная как β -глюкоцереброзидаза
Glc	Глюкоза или глюкопиранозид
HEK-293T	Клетки почки эмбриона человека (содержит T-антиген SV40)
ФСБ	Фосфатно-солевой буфер
КТ	Комнатная температура
SDS	Сертификат безопасности
TS	Исследуемый образец, а именно DS, DP или образец вируса
ВГ, вг	Вирусные Геномы, вирусные геномы
RP	Относительная активность
RS	Эталонный стандарт

Таблица 2: Материалы и оборудование

Описание материала	Производитель	Номер продукта
Клетки HEK293T	Источник: Prevail	Н/Д
DMEM	Gibco	11-995-065
ФБС (термически инактивированная)	Gibco	1008247
Пенициллин (10 000 ЕД/мл) и Стрептомицин (10 000 мкг/мл)	Gibco	15140122
Фермент TrypLE Select (1X)	Gibco	12563-011
Аналитический буфер: 50 мМ лимонной кислоты, 176 мМ K_2HPO_4 , 10 мМ натрия таурохолата натрия и 0,01% Твин-20 при pH 5,9	Источник: Prevail	Н/Д
Поли-D-лизин, 96-луночный черный/прозрачный микропланшет с плоским дном, обработанный ТС	Corning	356640
Краситель трипановый синий	Invitrogen	T10282
Краситель Hoechst 33342 (16,234 мМ)	Molecular probes	H3570
AAV для исследования	Источник: Prevail	Н/Д
Эксиципиент	Для соответствия AAV	Н/Д
Планшет для разведения: 96- луночный ПЦР-микропланшет	Axygen	PCR-96-FS-C

Ингибиторы протеазы, без ЭДТА	Pierce	A32955 или A32965
96-луночный черный планшет с прозрачным плоским дном	Corning	3904
Считыватель Varioskan Lux	Thermo Fisher Scientific	FA-0049
Стерильные микроцентрифужные пробирки Biorix Safe Lock на 1,5 мл	Fisher Scientific	21-402-903
Гемацитометр; INCYTO; одноразовый; С-чип	Incyte	22600100
стерильные одноразовые резервуары на 25 мл	Fisher Scientific	21-381-27C
Резорурфин-b-D-глюкопиранозид	Marker Gene Technologies	M0569
Диметилсульфоксид (ДМСО)	Sigma-Aldrich	D2438-50ML

5 **[0058] Предпосылки/теория метода:** PR001 представляет собой типичный гAAV, экспрессирующий GBA1. Анализ трансдукции вводит PR001 в клетки HEK293T и приводит к экспрессии фермента GСазы. Ферментативную активность, полученную в результате трансдукции, анализировали в лизате клеток с использованием флуорогенного субстрата 4-метилумбеллиферил-β-D-глюкопиранозид, который генерирует флуоресцентный продукт резорурфин под действием катализа GСазы. Относительную активность между двумя или более гAAV рассчитывали по ферментативной активности, полученной в результате трансдукции различных количеств PR001, с использованием параллельного линейного анализа.

10

Таблица 3: Реагенты/Разбавитель/Среда

Продукт
10% ФБС/DMEM/Пен/Стреп [Среда для культивирования клеток]
2% ФБС/DMEM
10 % ФБС/DMEM/ 1 мкМ Hoechst 33342 [Среда для восстановления]
50 мМ цитрата - 176 мМ фосфатного буфера для анализа, pH 5,9
2 мкМ Hoechst 33342 в 2% ФБС/DMEM [среда для трансдукции]
Буфер для анализа лизиса с мини-таблеткой коктейля ингибитора протеазы

Резорурфин-β-D-глюкопиранозид [исходный]

[0059] Процедура: Клетки НЕК293Т высевали по 20 000 клеток/лунку в 96-луночный планшет и оставляли прикрепляться в течение ночи при 37°C и 5% CO₂. Серийные разведения AAV готовили в его эксципиенте, как показано в Таблице 4.

5 **Таблица 4**

Разведение	вг/мкл	Объем вируса (мкл)	Источник (разведение)	Объем эксципиент (мкл)	Остаточный объем (мкл)
1	5,00E+09	60	Н/Д	Н/Д	20
2	3,33E+09	40	1	20	20
3	2,22E+09	40	2	20	20
4	1,48E+09	40	3	20	20
5	9,88E+08	40	4	20	20
6	6,58E+08	40	5	20	20

[0060] 10 мкл разведений AAV или носителя переносили в лунки в соответствии с схемой планшета на Фиг. 1. Результирующие общие вг были достигнуты (Таблица 5).

Таблица 5

вг/мкл	добавлено мкл	общее кол-во вг/лунка
5,00E+09	10	5,00E+10
3,33E+09	10	3,33E+10
2,22E+09	10	2,22E+10
1,48E+09	10	1,48E+10
9,88E+08	10	9,88E+09
6,58E+08	10	6,58E+09

10

[0061] Клетки инкубировали от 2 до 2,5 часов в инкубаторе при 37°C, 5% CO₂. После инкубации к клеткам/среде для трансдукции в лунки добавляли 100 мкл среды для восстановления до общего объема 150 мкл. Клетки инкубировали в течение 72 + 6 часов при 37°C и 5% CO₂, чтобы обеспечить экспрессию GСазы вирусного происхождения.

15 [0062] Собирали клеточные лизаты. Активность GСазы измеряли путем добавления 10 мкл 1,25 mM рабочего раствора резорурфин-β-D глюкопиранозид в черный планшет с

прозрачным плоским дном, а затем 40 мкл клеточного лизата. Планшет немедленно считывали на планшетном ридере Varioskan при 37°C.

[0063] Анализ: Параллельный анализ данных для расчета относительной активности проводили следующим образом:

- 5 1. Рассчитайте % CV для каждой точки вг/лунка, он должен быть $\leq 30\%$. Для достижения этого при необходимости можно отказаться от одной повторности на точку вг/лунка.
2. Выполните логарифмическое преобразование количества вируса и активности GСазы (относительные единицы флуоресценции (ОЕФ)/ч).
- 10 3. Постройте график ответа в виде Log (ОЕФ/ч) от Log (вирус).
4. Выполните линейную регрессию для каждого образца.
5. Выполните новую линейную регрессию с общим наклоном «А» ($Y = A X + b$).
6. Используя параметры, полученные на стадии 5, рассчитайте относительную активность по следующей формуле:
- 15 Относительная активность (%) = $10^{((b - b \text{ эталон})/A) \times 100}$
7. Запишите результаты относительно эталонного стандарта в процентах, без десятичных знаков (например, если результат равен 100,50, это будет 101%).

Таблица 6: Пригодность системы анализа и критерии отбора проб

Параметр	Критерий приемлемости
Соотношение наклона к среднему наклону	Соотношение наклона стадии 3 анализа к общему наклону (стадии 4 анализа) должно быть в пределах 0,60-1,40.
R ²	Целевое значение R ² линейной регрессии на стадии 3 анализа для RS должно быть > 0,9.
Эталонный стандарт и повторности исследуемого образца	% CV ≤ 30 . Одна повторность может быть замаскирована для достижения % CV ≤ 30 .

20 **Протокол квалификации метода испытаний**

[0064] Цель: Целью этого плана квалификации является определение метода испытания для измерения относительной активности PR001 *in vitro* с использованием анализа на основе клеток. Этот протокол продемонстрирует, что метод дает надежные данные и подходит для анализа образцов AAV для целей исследования и разработки процессов (не GXP).

25 **Таблица 7: Материалы для квалификации**

Описание материала	Физический титр
--------------------	-----------------

Эталонный стандарт PR001	2,62E+13 вг/мл
Контроль специфичности (продукт PR006)	1,64E +13 вг/мл

[0065] План квалификации: Валидация будет проводиться в соответствии с валидацией методов аналитических испытаний, процедурой, описанной на Международной конференции по гармонизации (ICH) Q2 (R1), USP<1032> и USP<1033>. Валидационные испытания будут состоять из испытания AAV9-GBA DP при относительном уровне активности, а также специфичности, 50%, 100% и 200%. Для оценки линейности, точности и сходимости метода (повторяемость и промежуточная сходимость) каждый уровень будет исследован двумя аналитиками. Относительная активность из каждого анализа независима и рассматривается как определение одного анализа. Каждый планшет будет содержать один эталонный стандарт и до двух исследуемых образцов. Если пригодность системы не подходит для планшета, то планшет будет повторен. Если пригодность системы не подходит для образца, то будет повторен только неудачный образец. Все образцы должны соответствовать критериям приемлемости анализа, определенным в методе, и критериям валидации, определенным в этом протоколе. Определение специфичности также будут выполнять с использованием неродственного продукта AAV, который не несет GBA1. Пределы обнаружения и количественного определения не включены, поскольку они не относятся к методу, который сообщает об относительной активности, как описано в USP<1032>. В Таблице 8 приведены процедуры валидации и критерии приемлемости, которые будут использоваться для оценки эффективности метода.

Таблица 8: Краткое изложение процедуры валидации и критериев приемлемости квалификации

Параметр	Определение	Процедура и анализ данных	Критерий приемлемости
Линейность	Способность метода (в заданном диапазоне) получать результаты испытаний, прямо пропорциональные концентрации (количеству)	Исследуемые образцы AAV9-GBA будут разведены до 50 %, 100 % и 200 % эталонного стандарта и будут исследованы до 4 раз для каждой концентрации. Средняя (измеренная) относительная активность	Коэффициент детерминации (R^2) для линейной регрессии будет $\geq 0,9$.

	анализируемого вещества в образцах.	будет нанесена на график относительно ожидаемой относительной активности и проанализирована с использованием линейной регрессии.	
Точность	Близость совпадения между значением, принятым в качестве истинного значения образца, и значением, полученным в результате измерения.	Данные о линейности будут оценивать для оценки точности. Средний процент извлечения будет рассчитываться для каждого уровня.	Средний процент извлечения на каждом уровне будет составлять от 50% до 150% от теоретического значения.
Повторяемость	Сходимость (т. е. близость совпадения между сериями измерений, полученных при многократном взятии образцов одного и того же однородного образца в заданных условиях), измеренных в одних и тех же рабочих условиях за короткий промежуток времени.	Данные о линейности будут оценивать для оценки повторяемости. Процентное относительное стандартное отклонение (% RSD) будут рассчитывать на каждом уровне для каждого анализа (т. е. тот же аналитик и та же неделя).	% RSD будет ≤ 30% на каждом уровне для каждого аналитика за каждую неделю.

<p>Промежуточная сходимость</p>	<p>Сходимость (т. е. близость совпадения между сериями измерений, полученных при многократном взятии образцов одного и того же однородного образца в заданных условиях), выражающая изменение в зависимости от разных недель и разных аналитиков.</p>	<p>Данные о линейности будут оценивать для оценки промежуточной сходимости. Общий % RSD будут рассчитывать на каждом уровне.</p>	<p>Общий % RSD будет $\leq 30\%$ на каждом уровне.</p>
<p>Диапазон</p>	<p>Интервал между верхней и нижней концентрацией, демонстрирующий подходящий уровень линейности, точности и сходимости.</p>	<p>Результаты линейности, точности и сходимости будут использовать для определения диапазона метода.</p>	<p>Диапазон будет определен в исследовании. Концентрации образца в пределах диапазона должны соответствовать критериям приемлемости для линейности, точности и сходимости.</p>

Специфичность	Возможность однозначно оценить аналит в присутствии компонентов, присутствие которых можно ожидать.	Альтернативная молекула будет исследована в одном анализе одним аналитиком.	Альтернативная молекула не будет соответствовать критериям приемлемости образца.
----------------------	---	---	--

[0066] Линейность: Исследуемые образцы AAV9-GBA будут разведены до 50 %, 100 % и 200 % эталонного стандарта и будут исследованы в семи анализах двумя аналитиками. Средняя (измеренная) относительная активность будет нанесена на график относительно ожидаемой относительной активности и проанализирована с использованием линейной регрессии. Полученное уравнение линейности и коэффициент детерминации (R^2) будут сообщены. Аналитические планшеты, которые не подходят для пригодности системы, не могут использоваться для анализа.

[0067] Точность: Данные о линейности будут оценивать для оценки точности. Средний процент извлечения будет рассчитываться на каждом уровне по следующей формуле:

$$\% \text{ восстановления} = \left(\frac{\text{Среднее измеренное значение}}{\text{Теоретическое значение}} \right) \times 100\%$$

Будут представлены значения % восстановления на каждом уровне.

[0068] Повторяемость: Данные о линейности будут оценивать для оценки повторяемости. Процентное относительное стандартное отклонение (% RSD) будут рассчитывать на каждом уровне для каждого анализа (**т. е.** тот же аналитик и та же неделя) и сообщать.

[0069] Промежуточная сходимост: Данные о линейности будут оценивать для оценки повторяемости. Общий % RSD будут рассчитывать на каждом уровне и сообщать.

[0070] Диапазон: Самая низкая и самая высокая проверенная активность, которая соответствует критериям линейности, точности и сходимости экспериментов, будет использоваться для определения диапазона метода и будет сообщена.

[0071] Специфичность: Альтернативная молекула (образец специфичности) будет исследована в одном анализе одним аналитиком. Образец специфичности будет разведен в анализе, как если бы это были исследуемые образцы AAV9-GBA. Образец специфичности представляет собой альтернативную молекулу (AM): PR006.

[0072] Обработка данных и отчетность: Необработанные данные будут получены с помощью программного обеспечения SkanIt RE 5.0, а анализ параллельных линий будет

выполнен, как указано в методе испытания, приведенном выше. Эти данные будут экспортированы в электронную таблицу для расчета дополнительных параметров анализа (например, точность и сходимость). Все полученные данные, включая детали экспериментов, такие как материалы, реагенты, используемое оборудование и условия испытаний, будут записаны и рассмотрены вторым аналитиком.

[0073] На основании результатов всех действительных циклов анализа и всех допустимых концентраций эталонного стандартного вируса и исследуемого вируса общая средняя относительная активность по всем циклам из квалификации будет использована для установления номинального значения ОА для этих образцов для использования в дальнейшем анализе.

[0074] Пример данных анализа активности нескольких образцов PR001 показан на Фиг. 2.

Таблица 9: Таблица последовательностей

<p>Аминокислотная последовательность GСазы</p>	<p>MEFSSPSREECPKPLSRV SIMAGSLTGLLLLQAVSWASG ARPCIPKSFGYSSVVCVCNATYCDSFDPPTFPALGTF SR YESTRSGRRMELSMGPIQANHTGTGLLLTLQPEQKFQK VKGFGGAMTDAALNILALSPPAQNLLLKSYFSEEGIG YNIIRVPMASCDFSIRTYTYADTPDDFQLHNFSLPEEDT CLKIPLIHRALQLAQRPVSLASPWTSPTWLKTNGAVN GKGS LKGQPGDIYHQTWARYFVKFLDAYAEHKLQFW AVTAENEPSAGLLSGYPFQCLGFTPEHQ RDFIARDLGPT LANSTHHNVRLMLDDQRLLLPHWAKVVLTDPEAAKY VHGIAVHWYLDLAPAKATLGETHRLFPNTMLFA SEAC VGSKFWEQSVRLG SWDRGMQYSHSITNLLYHVVGWT DWNLALNPEGGP NWVRNFVDSPIIVDITKDTFYKQPMF YHLGHFSKFIPEGSQRVGLVASQKNDLDAVALMHPDGS AVVVVLNRSSKDVPLTIKDP AVGFLETISPGYSIHTYLW RRQ (SEQ ID NO: 1)</p>
<p>Кодон-оптимизированная нуклеотидная последовательность, кодирующая GСазу</p>	<p>atggaattcagcagccccagcagaggaatgccccagcctctgagccgggtgtca atcatggccggatctctgacaggactgctgctgctcaggccgtgtcttgggcttctggc gctagaccttgcatccccaagagcttcggctacagcagcgtcgtgtgcgtgtgcaatgc cacctactgcgacagcttcgacctctaccttctctgctctgggcaccttcagcagatac gagagcaccagatccggcagacggatggaactgagcatgggacctaccaggccaa</p>

	<p>tcacacaggcactggcctgctgctgacactgcagcctgagcagaattccagaaagtg aaaggcttcggcggagccatgacagatgccgccgctctgaatatcctggctctgtctcc accagctcagaacctgctgctcaagagctacttcagcgaggaaggcatcggctacaac atcatcagagtgccatggccagctgcgacttcagcatcaggacctacacctacgccga cacacccgacgattccagctgcacaacttcagcctgcctgaagaggacaccaagctg aagatccctctgatccacagagccctgcagctggcacaagaccgctgctactgctgg cctctccatggacatctccacctggctgaaaacaaatggcgccctgaatggcaaggg cagcctgaaaggccaacctggcgacatctaccaccagacctgggccaagatactctg aagttcctggacgctatgccgagcacaagctgcagtttgggcccgtgacagccgaga acgaaccttctgctggactgctgagcggctaccctttcagtgctgggctttacacccg agcaccagcgggactttatcgcccgtgatctgggaccacactggccaatagcaccca ccataatgtcgggctgctgatgctggacgaccagagactgcttctgccccactgggcta aagtggctgacagatcctgaggccgccaatactgcacggaatcgccgtgactg gtatctggactttctggcccctgccaaaggccacactgggagagacacacagactgtcc ccaacaccatgctgttcgccagcgaagcctgtgtgggagcaagtttgggaacagag cgtgcggctcggcagctgggatagaggcatgcagtacagccacagcatcatcacaa cctgctgtaccacgtcgtcggctggaccgactggaatctggccctgaatcctgaaggcg gccctaactgggtccgaaacttcgtggacagccccatcatcgtggacatcaccaagga caccttctacaagcagccatgttctaccacctgggacacttcagcaagttcatccccga gggctctcagcgcgttggactggtggcttccagaagaacgatctggacgcctggct ctgatgcaccctgatggatctgctgtgtgtgtgtcctgaaccgcagcagcaaatgt ggcctgacctcaaggatcccgcctgggattcctggaacaatcagccctggctact ccatccacacctactgtggcgtagacag</p> <p>(SEQ ID NO: 2)</p>
<p>ITR AAV2 дикого типа</p>	<p>aggaaccctagtgatggagttggcactccctctctgcgcgctcgtcgtcactgag gccggcgaccaaaggctgcccgacgcccgggctttgccggcggcctcagtgag cgagcgcgagcgcgagagagggagtgccaa</p> <p>(SEQ ID NO: 3)</p>

ПРОНУМЕРОВАННЫЕ ВАРИАНТЫ ОСУЩЕСТВЛЕНИЯ

[0075] Несмотря на прилагаемую формулу изобретения, в данном изобретении представлены следующие пронумерованные варианты осуществления:

- 5 [0076] 1. Способ измерения относительной активности исследуемого образца, содержащего первый рекомбинантный вирус, содержащий трансген, кодирующий глюкоцереброзидазу (GCase), включающий:

- а) трансдукцию первого множества клеток исследуемым образцом;
- б) инкубацию трансдуцированного первого множества клеток в условиях, достаточных для экспрессии GСазы;
- 5 с) сбор первого клеточного лизата из трансдуцированного первого множества клеток;
- д) объединение первого клеточного лизата с резорурфин-бета-D-глюкопиранозидом;
- е) визуализацию первого клеточного лизата для получения первого показания флуоресценции;
- ф) трансдукцию второго множества клеток эталонным стандартом, содержащим
10 второй рекомбинантный вирус, содержащий трансген, кодирующий GСазу;
- г) инкубацию трансдуцированного второго множества клеток в условиях, достаточных для экспрессии GСазы;
- h) сбор второго клеточного лизата из трансдуцированного второго множества клеток;
- 15 i) объединение второго клеточного лизата с резорурфин-бета-D-глюкопиранозидом;
- j) визуализацию второго клеточного лизата для получения второго показания флуоресценции; и
- к) сравнение первого показания флуоресценции со вторым показанием флуоресценции с использованием анализа параллельных линий для расчета
20 относительной активности исследуемого образца.

[0077] 2. Способ по варианту осуществления 1, отличающийся тем, что первый рекомбинантный вирус и второй рекомбинантный вирус содержат идентичные трансгены, кодирующие GСазу.

25 **[0078]** 3. Способ по варианту осуществления 1 или 2, отличающийся тем, что первый рекомбинантный вирус и/или второй рекомбинантный вирус представляет собой рекомбинантный аденоассоциированный вирус (rAAV).

[0079] 4. Способ по варианту осуществления 3, отличающийся тем, что rAAV содержит капсидный белок AAV9.

30 **[0080]** 5. Способ по варианту осуществления 3, отличающийся тем, что rAAV содержит капсидный белок AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10 или AAV11 или вариант любого из этих капсидных белков.

[0081] 6. Способ по любому из вариантов осуществления 1-5, отличающийся тем, что GСаза содержит SEQ ID NO:1.

- [0082]** 7. Способ по любому из вариантов осуществления 1-6, отличающийся тем, что трансген, кодирующий GСазу, содержит кодон-оптимизированную нуклеотидную последовательность.
- [0083]** 8. Способ по варианту осуществления 7, отличающийся тем, что кодон-оптимизированная нуклеотидная последовательность содержит SEQ ID NO: 2.
- [0084]** 9. Способ по любому из вариантов осуществления 1-8, отличающийся тем, что первое множество клеток и/или второе множество клеток представляют собой клетки НЕК-293Т или НЕК-293.
- [0085]** 10. Способ по любому из вариантов осуществления 1-9, отличающийся тем, что около 1,25 мМ резорруфин-бета-D-глюкопиранозида объединяют с первым клеточным лизатом и/или вторым клеточным лизатом.
- [0086]** 11. Способ по любому из вариантов осуществления 1-10, отличающийся тем, что первое множество клеток и второе множество клеток высевают в многолуночный планшет.
- [0087]** 12. Способ по варианту осуществления 11, отличающийся тем, что первое множество клеток и/или второе множество клеток высевают в количестве около 20 000 клеток на лунку.
- [0088]** 13. Способ по любому из вариантов осуществления 1-12, отличающийся тем, что исследуемый образец и/или эталонный стандарт серийно разводят перед трансдукцией.
- [0089]** 14. Способ по любому из вариантов осуществления 1-13, отличающийся тем, что первое множество клеток и второе множество клеток инкубируют от около 68 часов до около 81 часа перед сбором клеточного лизата.
- [0090]** 15. Способ по любому из вариантов осуществления 1-13, отличающийся тем, что первое множество клеток и второе множество клеток инкубируют от около 66 часов до около 78 часов после трансдукции и перед сбором клеточного лизата.
- [0091]** 16. Способ по любому из вариантов осуществления 1-15, отличающийся тем, что первое множество клеток трансдуцируют исследуемым образцом по меньшей мере с двумя различными множественностями заражения (МОI) первого рекомбинантного вируса.
- [0092]** 17. Способ по любому из вариантов осуществления 1-16, отличающийся тем, что второе множество клеток трансдуцируют эталонным стандартом по меньшей мере при двух различных множественностях заражения (МОI) второго рекомбинантного вируса.
- [0093]** 18. Способ по любому из вариантов осуществления 1-17, отличающийся тем, что первое показание флуоресценции и/или второе показание флуоресценции отражают измерение активности GСазы.
- [0094]** 19. Способ по варианту осуществления 18, отличающийся тем, что активность GСазы измеряют в относительных единицах флуоресценции (ОЕФ)/ч.

- 5 [0095] 20. Способ по варианту осуществления 19, отличающийся тем, что стадия сравнения (k) включает выполнение log-трансформации количества рекомбинантного вируса и ОЕФ/ч и построение стандартной логарифмической кривой количества рекомбинантного вируса в зависимости от логарифма ОЕФ/ч для каждого исследуемых образца и эталонного стандарта.
- 10 [0096] 21. Способ по варианту осуществления 20, отличающийся тем, что стадия сравнения (k) включает расчет линейной регрессии логарифма количества рекомбинантного вируса в зависимости от логарифма ОЕФ/ч для каждого исследуемого образца и эталонного стандарта, тем самым получая наклон исследуемого образца и наклон эталонного стандарта.
- 15 [0097] 22. Способ по варианту осуществления 21, отличающийся тем, что стадия сравнения (k) включает расчет линейной регрессии с общим наклоном с использованием линейных регрессий, полученных для каждого исследуемого образца и эталонного стандарта.
- 20 [0098] 23. Способ по варианту осуществления 22, отличающийся тем, что относительную активность рассчитывают по формуле: Относительная активность (%) = $10^{((b - b_{\text{эталон}})/A) \times 100}$.
- [0099] 24. Способ по варианту осуществления 22 или 23, отличающийся тем, что соотношение наклона исследуемого образца к общему наклону составляет от около 0,60 до около 1,40.
- [0100] 25. Способ по любому из вариантов осуществления 22-24, отличающийся тем, что соотношение наклона эталонного стандарта к общему наклону составляет от около 0,60 до около 1,40.
- 25 [0101] 26. Способ по любому из вариантов осуществления 20-25, отличающийся тем, что способ дополнительно включает расчет значения R^2 для линейной регрессии исследуемого образца и эталонного стандарта.
- [0102] 27. Способ по варианту осуществления 26, отличающийся тем, что значение R^2 для исследуемого образца и эталонного стандарта больше или равно 0,9.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ измерения относительной активности исследуемого образца, содержащего первый рекомбинантный вирус, содержащий трансген, кодирующий глюкоцереброзидазу (GСазу), включающий:
- 5 а) трансдукцию первого множества клеток исследуемым образцом;
- б) инкубацию трансдуцированного первого множества клеток в условиях, достаточных для экспрессии GСазы;
- в) сбор первого клеточного лизата из трансдуцированного первого множества клеток;
- 10 д) объединение первого клеточного лизата с резорурфин-бета-D-глюкопиранозидом;
- е) визуализацию первого клеточного лизата для получения первого показания флуоресценции;
- ф) трансдукцию второго множества клеток эталонным стандартом, содержащим второй рекомбинантный вирус, содержащий трансген, кодирующий GСазу;
- 15 г) инкубацию трансдуцированного второго множества клеток в условиях, достаточных для экспрессии GСазы;
- h) сбор второго клеточного лизата из трансдуцированного второго множества клеток;
- и) объединение второго клеточного лизата с резорурфин-бета-D-глюкопиранозидом;
- 20 j) визуализацию второго клеточного лизата для получения второго показания флуоресценции; и
- к) сравнение первого показания флуоресценции со вторым показанием флуоресценции с использованием анализа параллельных линий для расчета относительной активности исследуемого образца.
- 25
2. Способ по п. 1, отличающийся тем, что первый рекомбинантный вирус и второй рекомбинантный вирус содержат идентичные трансгены, кодирующие GСазу.
3. Способ по п. 1 или п. 2, отличающийся тем, что первый рекомбинантный вирус и/или
- 30 второй рекомбинантный вирус представляет собой рекомбинантный аденоассоциированный вирус (rAAV).
4. Способ по п. 3, отличающийся тем, что rAAV содержит капсидный белок AAV9.

5. Способ по п. 3, отличающийся тем, что rAAV содержит капсидный белок AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10 или AAV11 или вариант любого из этих капсидных белков.
- 5 6. Способ по любому из пп. 1-5, отличающийся тем, что GСаза содержит SEQ ID NO:1.
7. Способ по любому из пп. 1-6, отличающийся тем, что трансген, кодирующий GСазу, содержит кодон-оптимизированную нуклеотидную последовательность.
- 10 8. Способ по п. 7, отличающийся тем, что кодон-оптимизированная нуклеотидная последовательность содержит SEQ ID NO: 2.
9. Способ по любому из пп. 1-8, отличающийся тем, что первое множество клеток и/или второе множество клеток представляют собой клетки НЕК-293Т или НЕК-293.
- 15 10. Способ по любому из пп. 1-9, отличающийся тем, что около 1,25 мМ резорифин-бета-D-глюкопиранозиды объединяют с первым клеточным лизатом и/или вторым клеточным лизатом.
- 20 11. Способ по любому из пп. 1-10, отличающийся тем, что первое множество клеток и второе множество клеток высевают в многолуночный планшет.
12. Способ по п. 11, отличающийся тем, что первое множество клеток и/или второе множество клеток высевают в количестве около 20 000 клеток на лунку.
- 25 13. Способ по любому из пп. 1-12, отличающийся тем, что исследуемый образец и/или эталонный стандарт серийно разводят перед трансдукцией.
14. Способ по любому из пп. 1-13, отличающийся тем, что первое множество клеток и второе множество клеток инкубируют от около 68 часов до около 81 часа перед сбором клеточного лизата.
- 30 15. Способ по любому из пп. 1-13, отличающийся тем, что первое множество клеток и второе множество клеток инкубируют от около 66 часов до около 78 часов после трансдукции и перед сбором клеточного лизата.
- 35

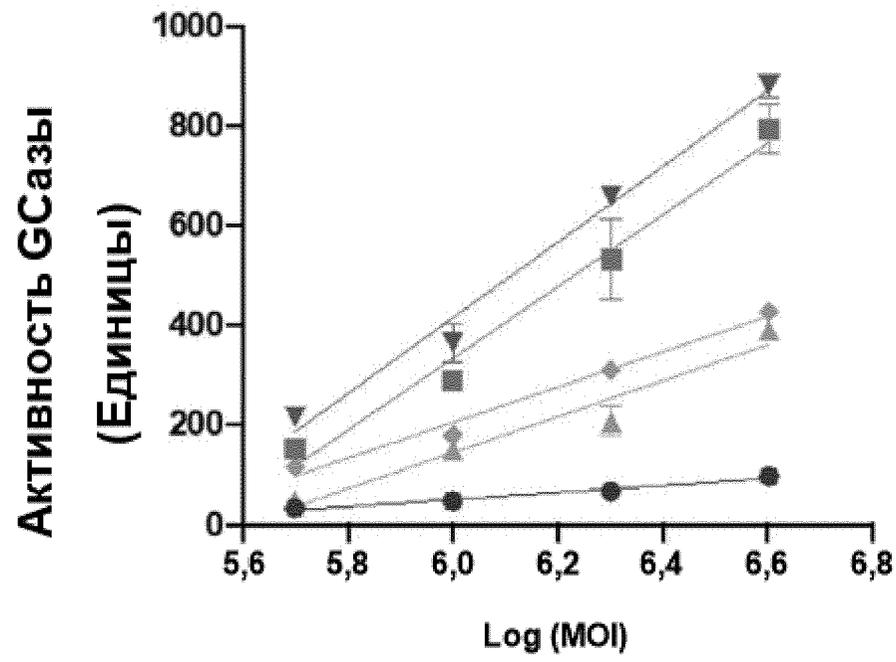
16. Способ по любому из пп. 1-15, отличающийся тем, что первое множество клеток трансдуцируют исследуемым образцом по меньшей мере с двумя различными множественностями заражения (МОИ) первого рекомбинантного вируса.
- 5
17. Способ по любому из пп. 1-16, отличающийся тем, что второе множество клеток трансдуцируют эталонным стандартом по меньшей мере при двух различных множественностях заражения (МОИ) второго рекомбинантного вируса.
- 10
18. Способ по любому из пп. 1-17, отличающийся тем, что первое показание флуоресценции и/или второе показание флуоресценции отражают измерение активности GCазы.
- 15
19. Способ по п. 18, отличающийся тем, что активность GCазы измеряют в относительных единицах флуоресценции (ОЕФ)/ч.
- 20
20. Способ по п. 19, отличающийся тем, что стадия сравнения (к) включает выполнение log-трансформации количества рекомбинантного вируса и ОЕФ/ч и построение стандартной логарифмической кривой количества рекомбинантного вируса в зависимости от логарифма ОЕФ/ч для каждого исследуемых образца и эталонного стандарта.
- 25
21. Способ по п. 20, отличающийся тем, что стадия сравнения (к) включает расчет линейной регрессии логарифма количества рекомбинантного вируса в зависимости от логарифма ОЕФ/ч для каждого исследуемого образца и эталонного стандарта, тем самым получая наклон исследуемого образца и наклон эталонного стандарта.
- 30
22. Способ по п. 21, отличающийся тем, что стадия сравнения (к) включает расчет линейной регрессии с общим наклоном с использованием линейных регрессий, полученных для каждого исследуемого образца и эталонного стандарта.
- 35
23. Способ по п. 22, отличающийся тем, что относительную активность рассчитывают по формуле: Относительная активность (%) = $10^{((b - b_{\text{эталон}})/A)} \times 100$.
24. Способ по п. 22 или п. 23, отличающийся тем, что соотношение наклона исследуемого образца к общему наклону составляет от около 0,60 до около 1,40.

25. Способ по любому из пп. 22-24, отличающийся тем, что соотношение наклона эталонного стандарта к общему наклону составляет от около 0,60 до около 1,40.

5 26. Способ по любому из пп. 20-25, отличающийся тем, что способ дополнительно включает расчет значения R^2 для линейной регрессии исследуемого образца и эталонного стандарта.

27. Способ по п. 26, отличающийся тем, что значение R^2 для исследуемого образца и эталонного стандарта больше или равно 0,9.

10



ID	Относительная активность
Образец 1	<0,37
Образец 2	2,53
Образец 3	0,74
Образец 4	3,96
Образец 5	1,00

ФИГ. 2